OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Hepatitis B virus replication alters host N-Glycosylation machinery and its depletion affects the virus' life cycle
Author(s)	Priyambada, Surya Agung
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73443
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　Surya Agung Priyambada　）	
論文題名	Hepatitis B virus replication alters host *N*-Glycosylation machinery and its depletion affects the virus' life cycle （B型肝炎ウイルスの複製は宿主の*N*-結合型糖鎖合成機能を変化させその機能不全はウイルス生活環に影響を及ぼす）

論文内容の要旨

In chapter 1, general introduction and research objectives are shown. Blumberg et al. (1984) were the first to discovered hepatitis B virus (HBV) and nearly 60 years since its discovery HBV is still a major health problem. HBV is a partially double-stranded DNA virus, covered by hepatitis B core protein (HBc), and enveloped by hepatitis B surface proteins (HBs). In eukaryotes, numerous proteins are *N*-glycosylated and either secreted from or displayed on the cell surface. HBV, which can only replicate in human liver cell, is secreted from liver cell as a mature virion and have *N*-glycosylated HBs. *N*-glycan moiety of HBs together with host *N*-glycosylation machinery played part in virus trafficking and secretion. However, *N*-glycan structure was never considered to be important for the regulation of HBV life cycle. Thus, this dissertation attempt to understand how HBV replication affect host *N*-glycosylation and the effect of depleting the upregulated *N*-glycan for HBV life cycle.

In chapter 2, cell surface *N*-glycan alteration in HepAD38 cell lines expressing hepatitis B virus was described. Alteration of *N*-glycan expression can disclose anomaly in a cell. This was addressed by taking advantage of the HepAD38 cell line to express HBV. In the presence of tetracycline [Tet(+)], this cell line is free from the virus due to the repression of pregenomic (pg) RNA synthesis. In culture medium without tetracycline, cells express viral pgRNA and start to secrete virions into the supernatant. The expression of glycosyltransferases and the cell surface *N*-glycan composition of Tet(+) and Tet(-)HepAD38 were studied. Among the glycosyltransferases upregulated by the expression of HBV were GnT-II, GnT-IVa, and ST6Gal1, whereas GnT-I, GnT-III, β4GalT1, and FUT8 were downregulated. About one-third of the total cell surface *N*-glycans found on Tet(-)HepAD38 were sialylated. As for Tet(+)HepAD38, sialylated cell surface *N*-glycan was 6% lower compared to the Tet(-) cells. Neither treatment changed the cell surface *N*-glycans expression of the total complex type or the total fucosylated type, which were about 50% or 60%, respectively. The results indicated that the expression of HBV triggers higher sialylation in HepAD38 cells. Altogether, the results show that HBV expression triggered the alteration of the cell surface *N*-glycosylation pattern and the expression levels of glycosyltransferases of HepAD38 cells.

In chapter 3, alteration of HBV life cycle in HepAD38 cell by ST6Gal1 knockdown was described. Complex glycans at the cell surface play important roles, and their alteration is known to modulate cellular activity. In the previous chapter, HBV replication in HepAD38 altered cell surface sialylated *N*-glycan through the upregulation of ST6Gal1, GnT-II, and GnT-IVa expression. The effects of knocking them down on HBV replication in HepAD38 were examined. The results showed that ST6Gal1 knockdown (KD) reduced intracellular HBV rcDNA level by 90%, that GnT-II KD did not change the intracellular HBV rcDNA level, and that GnT-IVa KD increased the intracellular HBV rcDNA level by 19 times compared to Tet(-). The changes in intracellular rcDNA level were followed by the alteration of Pol and HBc expression. This study suggests that ST6Gal1 KD contributes more to the HBV life cycle than GnT-II or GnT-IVa KD through the modification of intracellular L, Pol, and HBc expression.

In chapter 4, conclusion and perspective are described. Aberrant *N*-glycan expression can indicate abnormalities in a cell. This study demonstrated that HBV replication in HepAD38 cell enhanced the sialylated cell surface *N*-glycan property of the host cell through the upregulation of ST6Gal1, GnT-II, and GnT-IVa expression. It is understood that the presence of *N*-glycan in the HBV envelope protein and the disruption of host *N*-glycan machinery impaired HBV life cycle. However, the *N*-glycan structure itself apparently was never considered to influence the HBV life cycle. Nevertheless, of the two type of Sia linkage present in the terminus Galβ1-4GlcNAc residue, the current results suggested that Siaα2-6Galβ1-4GlcNAc moiety contributed more to the HBV life cycle. Depletion of α2,6-Sia caused attenuation of intracellular viral proteins expression. Overall, this study indicated that the type of glycosidic linkage through which sugar residues are attached to the underlying glycoconjugate can profoundly influence the expression of HBV.

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（ Priyambada Surya Agung ）		
		（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査	教授	藤山　和仁
	副 査	教授	福崎　英一郎
	副 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	大政　健史
	副 査	教授	渡邉　肇
	副 査	教授	村中　俊哉
	副 査	教授	内山　進
	副 査	教授	永井　健治

論文審査の結果の要旨

B 型肝炎ウイルス（HBV）は世界中で毎年多数の感染者が出る病原性ウイルスであるが、感染、侵入、複製というウイルス生活環の各ステップに関わる分子メカニズムが不明であるため、治療薬となる標的分子の同定が進んでいない。一方で、近年の研究から糖タンパク質糖鎖の生物学的機能と重要性が示されると共に、ウイルス表面タンパク質あるいは宿主由来の糖鎖がウイルス感染にも深く関わっていることが分かってきた。HBV 表面タンパク質（HBs）も糖鎖を保持することが分かっているが、その機能についての情報はほとんどない。本論文では、HBV 生活環に影響を与える HBs および宿主細胞由来の糖質関連酵素と糖鎖構造について調査し、その成果から新しい知見を得ている。

第一章では、研究背景として本研究を着想するに至った経緯および目的について記述している。HBV 感染者の分布や HBV の構造を紹介し、タンパク質翻訳後修飾である *N*-結合型糖鎖の生物学的重要性とその合成経路を示している。ウイルス感染と *N*-結合型糖鎖の関係についての先行研究に触れ、HBV の生活環に関わる糖鎖の機能が不明である点について言及している。

第二章では、HBV ゲノム DNA を保持する肝癌培養細胞（HepAD38）を利用して、肝細胞が HBV を生産するにあたり、宿主細胞自身の *N*-結合型糖鎖構造がどのように変化するかについて解析している。テトラサイクリン非存在下（Tet(-)）で HBV を分泌生産できる HepAD38 の糖鎖修飾関連酵素遺伝子の発現量を調査したところ、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素（GnT）-II、GnT-IV、α2,6-シアル酸転移酵素（ST6Gal1）遺伝子の発現が増加したのに対し、GnT-I、GnT-III、β1,4-ガラクトース転移酵素、α1,6-フコース転移酵素遺伝子では減少している。さらに、HepAD38 表面の糖鎖構造を解析すると、Tet(-)ではウイルスを生産していない細胞に比べシアル酸結合型糖鎖が 6%増加している。フコース結合型糖鎖などの含量へは影響がないことから、HBV の生産が糖鎖のシアリル化の引き金になると述べている。

第三章では、前章の結果を受けて ST 発現抑制下で HBV 生活環が受ける影響について調査している。*N*-結合型糖鎖のシアル酸結合様式には ST6Gal1 で付加されるα2,6 結合と ST3Gal4 で付加されるα2,3 結合が存在するため、それぞれの酵素をコードする遺伝子発現を抑制したところ、HBV の生産量は ST6Gal1 の発現抑制下において rcDNA レベルで顕著に阻害されており、しかも HBV を構成する L、Pol、HBc タンパク質の生産が減少することを発見している。

第四章では、第二章および第三章で得られた結果について総括しており、研究成果が示す生命科学における新しい知見について十分な考察がなされている。

本論文では、HBV の生活環に糖鎖修飾が関わることを見出しており、特筆すべきはα2,6-シアル酸結合という特定の糖鎖構造が HBV の感染宿主細胞からの分泌生産に必要であるという新しい知見を提唱している。これは、今後の HBV 治療に向けた創薬などの応用へと繋がる成果でもあると考える。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。