

トピックス

2. B型およびD型肝炎ウイルス侵入受容体のタンパク質構造

木村 香菜子¹⁾, 渡士 幸一²⁾

1) 京都大学 医生物学研究所,

2) 国立感染症研究所 治療薬・ワクチン開発研究センター

肝細胞特異的に発現するナトリウムタウロコール酸共輸送体 (NTCP/SLC10A1) は、血中から肝細胞に胆汁酸をナトリウムと共輸送する膜タンパク質であり、B型およびD型肝炎ウイルス (HBV, HDV) の侵入受容体として機能する。最近、NTCP タンパク質の立体構造が解明され、当該研究領域の大きなトピックとなっている。

はじめに

HBV, HDV はウイルス学的研究が長らく進まないウイルスであったが、その主な理由はほとんどすべての細胞株で感染を再現できないことにあった。2012年の暮れに北京の李博士のグループによって、NTCP/SLC10A1 がHBV およびHDVの侵入受容体として機能することが明らかに¹⁾、これをヒト肝細胞株に発現させることでウイルス感染感受性がある程度付与できることがわかると、研究が一気に加速した。2020年には、NTCPを標的とする myrcludex-B (Bulevirtide) が世界初のD型肝炎治療薬として、ヨーロッパで条件付き承認された²⁾。このようにNTCPは、この10年の当該研究領域に大きなインパクトを与え、常に研究領域の主役の一端を担い続けてきた。しかしながらこれまで、そのNTCPタンパク質の構造は不明であり、HBV/HDV感染や宿主選択のメカニズム解析、これを標的とする創薬を効率的に進める上での課題であった。

NTCP-preS1 結合の意義

HBV およびHDVの粒子表面には、large, middle, small 表面抗原 (LHBs, MHBs, SHBs) という3種類のウイルス性エンベロープタンパク質が発現しており、このうち

LHBsのアミノ末端側108アミノ酸 (遺伝子型Dでのアミノ酸番号、以下同じ) のpreS1と言われる領域が受容体結合に関わることが知られていた。preS1の中でも特にそのアミノ末端の、ミリストイル基 (Myr) 修飾化248アミノ酸領域が受容体結合に必須である¹⁾。このpreS1とNTCPの結合は、ウイルスの細胞侵入に必須であるだけでなく、HBV およびHDVがヒトおよびその他ごく限られた動物種の肝細胞のみに感染するというウイルスの宿主指向性決定にも関わっており、また抗ウイルス薬開発の魅力的な標的でもある。これまでpreS1側およびNTCP側それぞれの、ウイルス結合/感染に関わるアミノ酸が生化学的に解析されてきたが^{1, 3-4)}、両者の構造は長らく不明であった。

NTCPの立体構造

2022年5月にNatureに初のヒトNTCPの立体構造を報告する論文が発表された⁵⁻⁷⁾。この報告は、日本から2グループ、フランスから1グループの計3グループから同時に行われた。3つのグループから発表されたこれらの構造は、全て立体構造認識抗体が結合していた。膜タンパク質の単粒子解析は、一般的に界面活性剤やNanodisc⁸⁾などに覆われた状態で行うため得られるdensityが弱くなることや膜貫通領域 (TM) の構造が不均一である等の理由により画像解析が困難になることが多い。そこで立体構造認識抗体を結合させた状態で単粒子解析を行うことによってこの問題を解決する手法が近年よく用いられている。NTCPはいずれも細胞の外向きに開いたoutward-open構造をしていた (図1)。加えて、いずれの構造も立体構造認識抗体が細胞外側のN末端loopやヘリックスの一部と相互作用していた。抗体とNTCPの相互作用の違いによっ

連絡先

〒606-8507

京都府京都市左京区聖護院川原町53

京都大学医生物学研究所ウイルス制御分野

TEL: 075-751-4049

E-mail: kimura.kanako.7c@kyoto-u.ac.jp

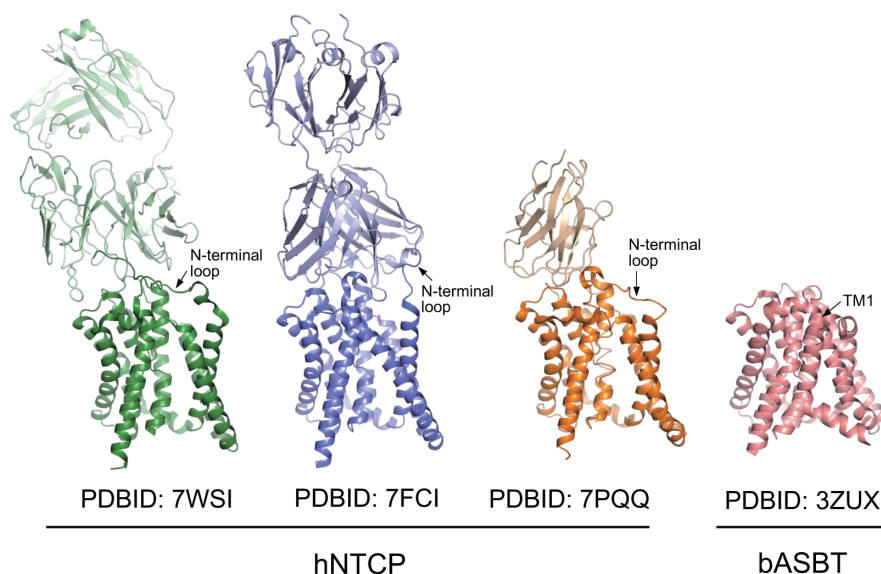


図1 ヒト胆汁酸トランスポーター NTCP とバクテリア由来 ASBT の立体構造

ヒト NTCP (hNTCP) は立体構造認識抗体との複合体構造で単粒子解析された。PDBID 7WSI: hNTCP は緑, 抗体は薄緑で表示 (文献 5), PDBID 7FCI: hNTCP は青, 抗体は薄青で表示 (文献 6), PDBID 7PQQ: hNTCP は橙, 抗体は薄橙で表示 (文献 7), PDBID 3ZUX: バクテリア由来 ASBT (bASBT) はピンクで表示 (文献 9)。bASBT にみられる TM1 に相当する領域は hNTCP には無く, 横方向にポアが開いている。

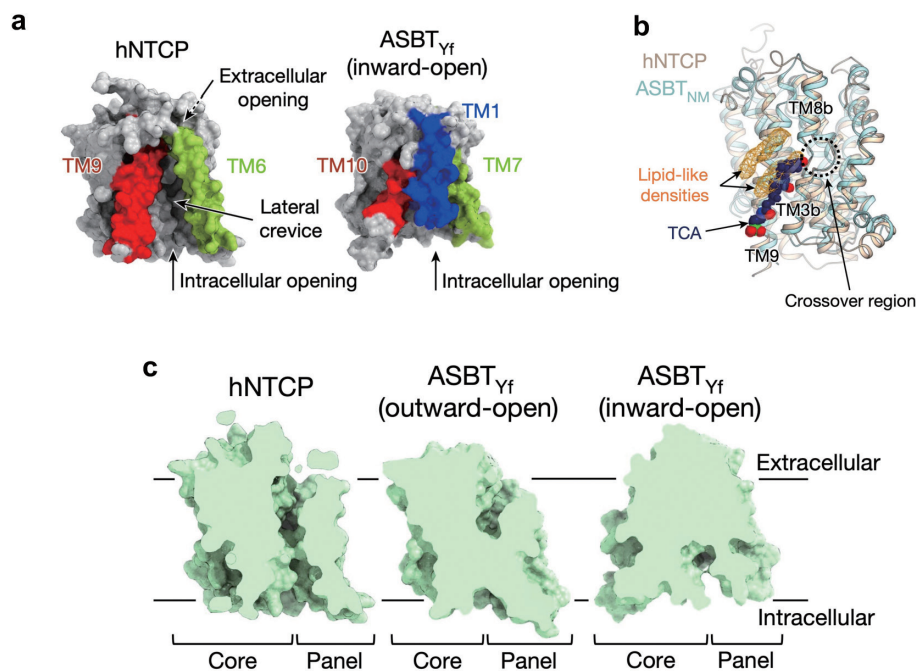


図2 hNTCP と bASBT の構造の比較

a hNTCP と bASBT_{Yf} (*Y. frederiksenii* 由来) (PDB ID: 4N7W) 構造の sphere モデル。NTCP では, TM6 (薄緑) と TM9 (赤) によって横方向の隙間が形成されている。ASBT では, NTCP には対応するヘリックスの無い TM1 (青) が, 隙間を覆っている。**b** hNTCP と ASBT_{Nm} の重ね合わせ。脂質と予想される形状のマップ (オレンジ)。ASBT_{Nm} に結合しているタウロコール酸 (sphere)。**c** hNTCP と ASBT_{Yf} (PDB ID: 4N7X, outward-open, PDB ID: 4N7W, inward-open) との構造の比較。文献 5 (Asami *et al.* *Nature* 2022) より抜粋

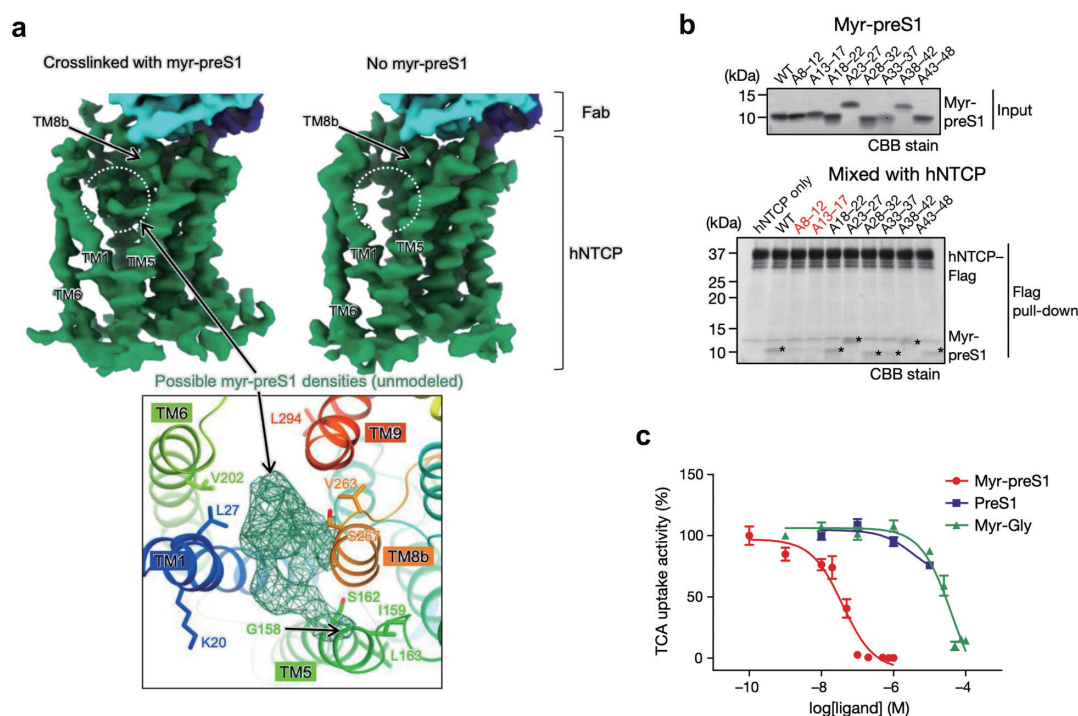


図3 NTCP と Myr-preS1 の相互作用

a preS1 結合と考えられるトンネルの細胞外開口部のクライオ電子顕微鏡マップ。Myr-preS1 存在下（左上）と非存在下（右上）のヒト NTCP-Fab 複合体のクライオ電子顕微鏡マップ。緑:NTCP;シアン:Fab 重鎖;青:Fab 軽鎖。Myr-preS1 存在下（左上）で観察されたトンネルの細胞外開口部（点線円）のマップ拡大図（下）。**b** ヒト NTCP と Myr-preS1 変異体を用いたプルダウンアッセイ。赤色は、NTCP との結合を弱める Myr-preS1 のアラニン変異体。**c** Myr-preS1（赤）、非修飾 preS1（青）または Myr 化グリシン（Myr-Gly）（緑）の存在におけるヒト NTCP のタウロコール酸輸送活性の阻害。文献 5（Asami *et al.* *Nature* 2022）より抜粋

て NTCP の構造の一部に差がみられたが、3 グループの NTCP の構造は非常に似ていた。NTCP はこれまでに明らかにされたバクテリア由来の胆汁酸トランスポーター（bASBT/SLC10A2）の構造^{9,10}と同様にパネルドメインとコアドメインをもち、これらが動くことで内向きと外向きを制御していると考えられる（図 2）。NTCP と bASBT の主な違いは、NTCP では N 末端のヘリックスが 1 つ少ないため、外向きと内向きの状態の間に横方向の隙間ができていることである（図 1, 2a）。これは、側面の出口が TM1 によって覆われている bASBT とは異なる。

NTCP と myr-PreS1 の予想される結合様式

大戸・野村グループは、Myr 化修飾 preS1（Myr-preS1）との複合体での単粒子解析を行った。残念ながら分解能が不十分であったため、モデル構築には至っておらず Myr-preS1 のどの領域が見えているのかは不明であるが、ペプチド領域を含むと予想される比較的大きなマップが得られている（図 3a）。結合様式については、プルダウンアッセイによって NTCP の結合に重要な領域を同定している（図 3b）。Myr-preS1 側は 8-17 アミノ酸領域が結合に最も重要

な部分であり、これまでの報告とも一致していた⁴。またタウロコール酸の取り込み活性阻害実験で、ミリスチル基の無い preS1 及び Myr-glycine では Myr-preS1 と比較して阻害能が大きく低下していた（図 3c）ことから、NTCP 内の胆汁酸結合領域と Myr-preS1 結合領域は重複していると考えられた。NTCP の 84-87 アミノ酸 (Patch 1) と 157-165 アミノ酸 (Patch 2) は、preS1 結合とウイルス感染に関わることを示唆する。この論文ではこれまでの知見^{1,3}をふまえ、二つの結合様式を提案している（図 5）。一つは、preS1 が Patch 2 を含む疎水性ポアに U 字状に入り込み、ミリスチル基は膜貫通領域の外側と結合する様式、もう一つは N 末端のミリスチル基が胆汁酸結合部位の一部を共有し、Patch 2 および疎水性ポアに垂直に preS1 のアミノ酸領域が入る様式である（図 5b）。

朴グループは、変異導入実験などから NTCP 内の Myr-preS1 結合領域を予想している（図 4）。TM1 の Leu27, Leu31, Leu35 の変異は胆汁酸取り込み活性および Myr-preS1 結合の双方を欠失していることから、これらのアミノ酸が面するポアに Myr-preS1 が結合すると予想している（図 4cd）。この結合領域は、大戸・野村らのグループ

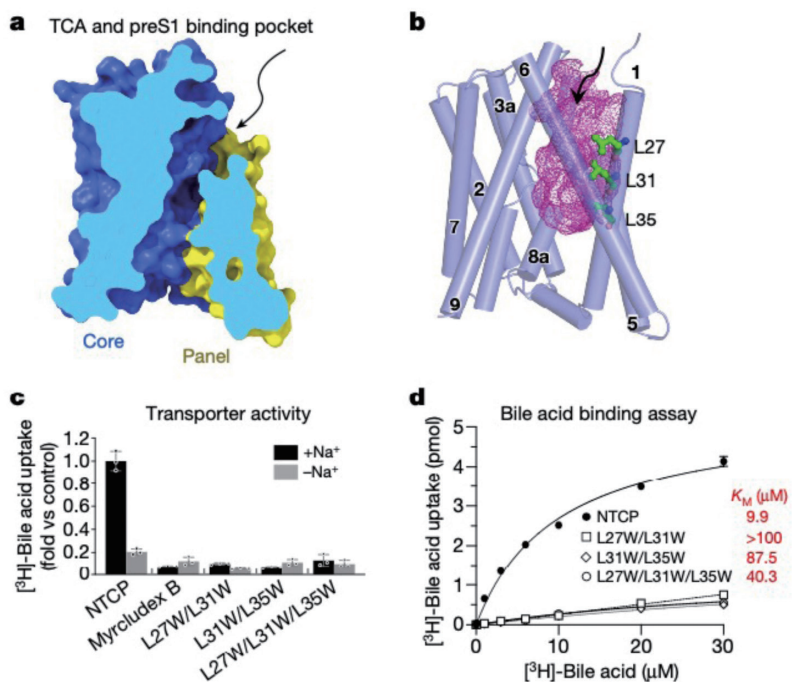


図4 タウロコール酸（TCA）結合部位と変異体解析

a TCA と preS1 結合ポケットを示した NTCP の断面図。パネルドメイン（黄）とコアドメイン（青）。矢印はポケットの外側の開口部。 **b** TCA と preS1 結合ポケット（ピンク）。NTCP は円柱で表示。空洞を覆う残基 Leu27, Leu31, Leu35 はボールアンドスティックモデルとして表示。 **c** 野生型 NTCP または NTCP 変異体を発現させた Huh7 細胞において、胆汁酸の取り込みを測定した。Myrcludex B で阻害した野生型 NTCP をコントロールとした。 **d** 輸送活性測定によるミカエリス定数 (K_M) 値の算出。文献6 (Park *et al.* Nature 2022) より抜粋

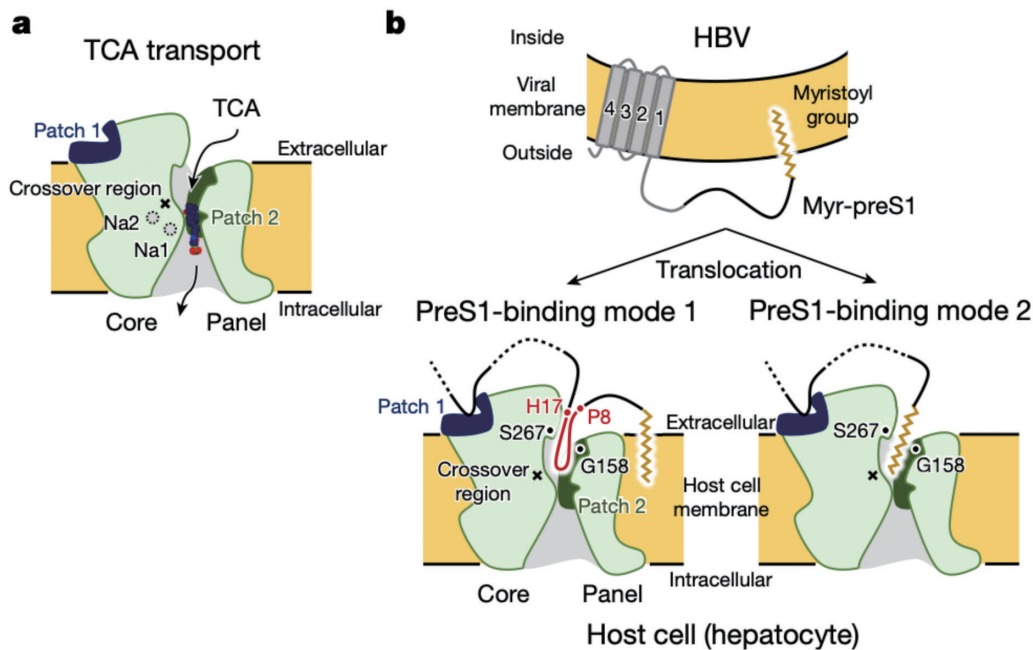


図5 preS1 結合様式のモデル。

a 基質輸送様式, **b** preS1 結合様式の予想図。文献5 (Asami *et al.* Nature 2022) より抜粋

が単粒子解析によって取得した Myr-preS1 と予想されるマップが得られた領域と一致している。S267F の変異は、漢民族の約 10% など、東アジアに多く見られる NTCP の一塩基多型 (SNP) によって発現する¹¹⁾。S267F は、胆汁酸の輸送能および HBV 感染感受性が低下するが、かさ高い Phe によってこのポアが埋まることで胆汁酸輸送および Myr-preS1 結合が阻害されるものと推測される。

おわりに

今回の発見は、NTCP のナトリウム依存性胆汁酸輸送および HBV/HDV preS1 結合の構造的分子基盤を提供するものであり、HBV/HDV と宿主の相互作用を理解するうえで大きな成果である。一方で、NTCP と preS1 の複合体構造はいまだ明らかでなく、今後の解析が待たれる。

・本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

引用文献

- 1) Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* **2012**, 1, e00049.
- 2) Urban S, Neumann-Haefelin C, Lampertico P. Hepatitis D virus in 2021: virology, immunology and new treatment approaches for a difficult-to-treat disease. *Gut* **2021**, 70(9), 1782-1794.
- 3) Yan H, Peng B, He W, Zhong G, Qi Y, Ren B, Gao Z, Jing Z, Song M, Xu G, Sui J, Li W. Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J. Virol.* **2013**, 87(14), 7977-7991.
- 4) Schulze A, Schieck A, Ni Y, Mier W, Urban S. Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction. *J. Virol.* **2010**, 84(4), 1989-2000.
- 5) Asami J, Kimura KT, Fujita-Fujiharu Y, Ishida H, Zhang Z, Nomura Y, Liu K, Uemura T, Sato Y, Ono M, Yamamoto M, Noda T, Shigematsu H, Drew D, Iwata S, Shimizu T, Nomura N, Ohto U. Structure of the Bile Acid Transporter and HBV Receptor NTCP. *Nature* **2022**, 606 (7916), 1021-1026.
- 6) Park JH, Iwamoto M, Yun JH, Uchikubo-Kamo T, Son D, Jin Z, Yoshida H, Ohki M, Ishimoto N, Mizutani K, Oshima M, Muramatsu M, Wakita T, Shirouzu M, Liu K, Uemura T, Nomura N, Iwata S, Watashi K, Tame JRH, Nishizawa T, Lee W, Park SY. Structural Insights into the HBV Receptor and Bile Acid Transporter NTCP. *Nature* **2022**, 606 (7916), 1027-1031.
- 7) Goutam K, Ielasi FS, Pardon E, Steyaert J, Reyes N. Structural Basis of Sodium-Dependent Bile Salt Uptake into the Liver. *Nature* **2022**, 606 (7916), 1015-1020.
- 8) Denisov IG, Grinkova YV, Lazarides AA, Sligar SG. Directed Self-Assembly of Monodisperse Phospholipid Bilayer Nanodiscs with Controlled Size. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (11), 3477-3487.
- 9) Hu NJ, Iwata S, Cameron AD, Drew D. Crystal Structure of a Bacterial Homologue of the Bile Acid Sodium Symporter ASBT. *Nature* **2011**, 478 (7369), 408-411.
- 10) Zhou X, Levin EJ, Pan Y, McCoy JG, Sharma R, Kloss B, Bruni R, Quick M, Zhou M. Structural Basis of the Alternating-Access Mechanism in a Bile Acid Transporter. *Nature* **2014**, 505 (7484), 569-573.
- 11) Ho RH, Leake BF, Roberts RL, Lee W, Kim RB. Ethnicity-Dependent Polymorphism in Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (SLC10A1) Reveals a Domain Critical for Bile Acid Substrate Recognition. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (8), 7213-7222.

