Function and Structure of Carboxypeptidase gp180

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2018-01-29
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: Kuroki, Kazuyuki
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00049900

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

KAKEN

1994
46

カルボキシペプチダーゼgp180の機能と構造

課題番号　（05808056）

平成6年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者　黒木　和之
（金沢大学　がん研究所）

KAKEN
1994
95

はしがき

研究組織

研究代表者：　黒木　和之
（金沢大学　がん研究所）

研究経費：

平成５年度	９００千円
平成６年度	７００千円
計	１６００千円

8000-37174-X
金沢大学附属図書館

4/14

研究発表

1. Kuroki, K., Cheung, R., Marion, P. l., and Ganem, D. (1994).
   A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles.
   J. Virol., 68, 2091-2096.

2. Ishikawa, T., Kuroki, K., Lenhoff, R., Summers, J. and Ganem, D. (1994).
   Analysis of the binding of a host cell surface glycoprotein to the preS protein of duck hepatitis B virus.
   Virology, 202, 1061-1064.

3. Kuroki, K., Eng, F., Ishikawa, T., Turck, C., Harada, F. and Ganem, D.
   gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded a member of the carboxypeptidase gene family. (submitted for publication)

研究目的

カルボキシペプチダーゼは、メタロプロテアーゼに分類され、標的タンパク質のCOOH末端の塩基性アミノ酸(Arg, Lys)を切断することにより、そのタンパク質のmaturationやactivationに機能する。したがって、ホルモンなど目的タンパク質の生理活性、調節機構を知る上で、たいへん重要な機能酵素である。

我々は、ダックＢ型肝炎ウィルスの感染機構を研究する過程で、ダック肝細胞より分子量１８万の宿主糖タンパク質(gp180)を発見した)。最近、我々は、gp180 N末端領域を欠くが、C末端領域約7 kbのcDNAを得ることができたので、その塩基配列決定、アミノ酸一次構造の推定、ホモロジー検索等を行ってきた。その結果、このgp180がこれまでに報告されているカルボキシペプチダーゼと高いホモロジーがあることからこの酵素群に分類されると考えている。しかし、既知カルボキシペプチダーゼの全ドメインが3個タンデムにgp180上に並んでいるなど、ユニークなアミノ酸一次構造、遺伝子構造をとっていることがわかった。

これらgp180の構造上の特徴は、（1）合目的に、3種のカルボキシペプチダーゼを一つのペプチドに持つことで協調的に発現される必然性がある、（2）gp180は前駆体であり、3番目のカルボキシペプチダーゼはCOOH末端近くの２１アミノ酸からなる疎水性領域を介して膜に結合し機能するが、proteolytic cleavageによって1、２番目のカルボキシペプチダーゼはプラズマあるいはオルガネラなど機能するための特異的な局在性を持って分布するようになる、など生化学、分子生物学上たいへん意味のある仮説を我々に提示している。

本研究の目的は、新発見のカルボキシペプチダーゼgp180の機能とその構造の特異性を理解すること、ウィルスと宿主プロテアーゼとの関係について、また生物種間の普遍性について論ずることである。

研究成果

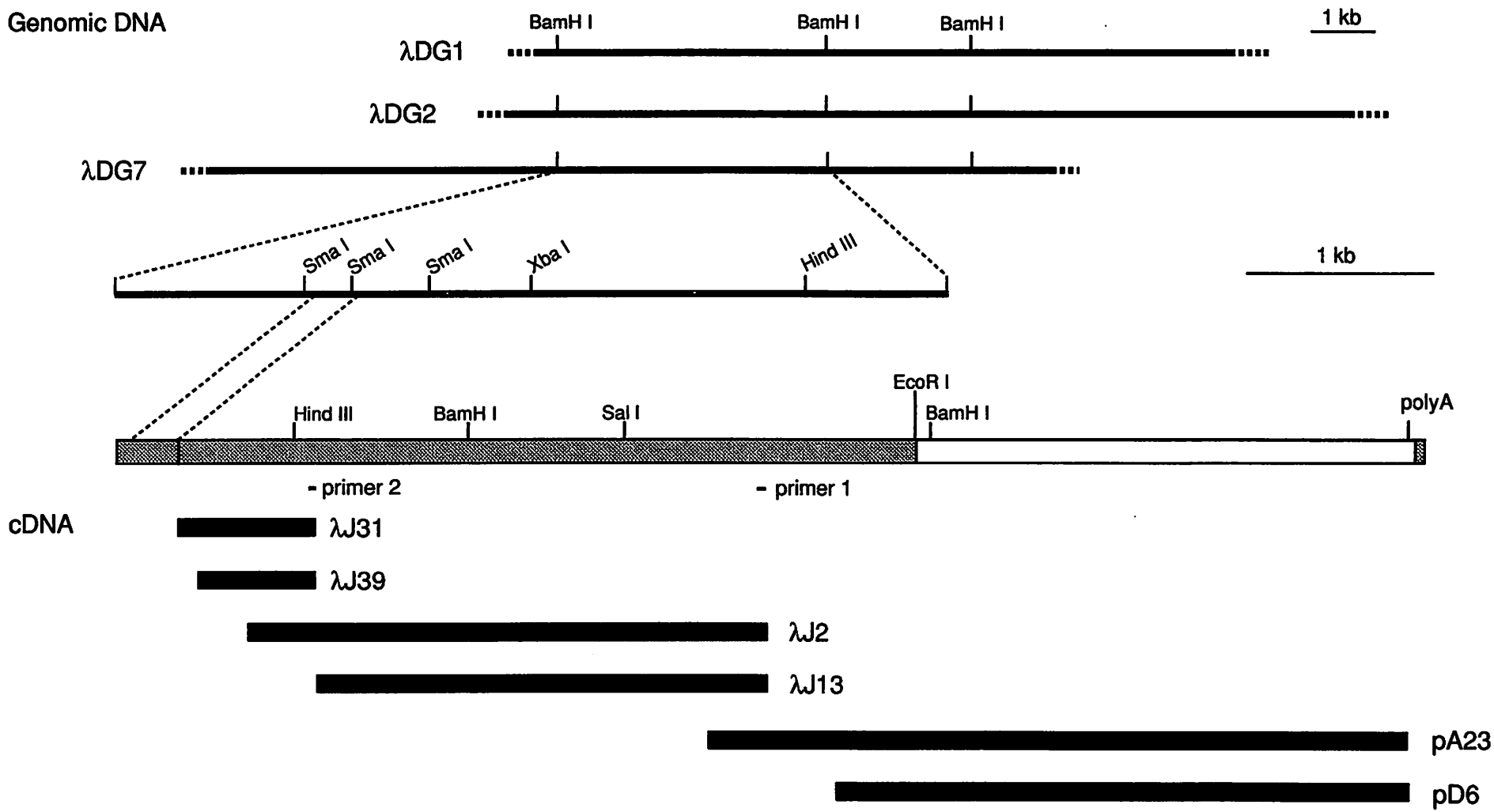
gp180 の全アミノ酸一次構造の決定。

新規カルボキシペプチダーゼ gp180 の未決定のN末端領域のアミノ酸一次構造を知るため、まず 5' RACE 法により gp180 の 5' cDNA を単離することを試みた。しかし、gp180 の5' cDNA を得ることができなかったので、つぎに、我々は、gp180 cDNA をプローブにダック肝臓 genomic DNA の EMBL3 ライブラリィから gp180 5' 部分の単離を試みた（図１）。単離したゲノム DNA の解析から、gp180 の全アミノ酸一次構造を推定することができた。gp180 のN末端は、ヒトカルボキシペプチダーゼHとのホモロジーから推定した（図４）。

gp180 は、分子量 153,498 で、1389 個のアミノ酸からなり、アミノ末端に putative signal peptide, カルボキシ末端より 60 残基上流に21 個のアミノ酸からなる疎水性領域を持つ膜糖蛋白質であり、13 個の potential N-linked glycosylation sites がある（図２、図３）。gp180 は、ユニークなことに全アミノ酸一次構造を３分割するようにカルボキシペプチダーゼドメイン（A、B 及び C）を配列していることがわかった（図４）。ヒトカルボキシペプチダーゼHとのホモロジーは、ドメイン A、B 及び C との間にそれぞれ３９％、４３％及び２９％あった。

完全長 gp180 DNA の構築。

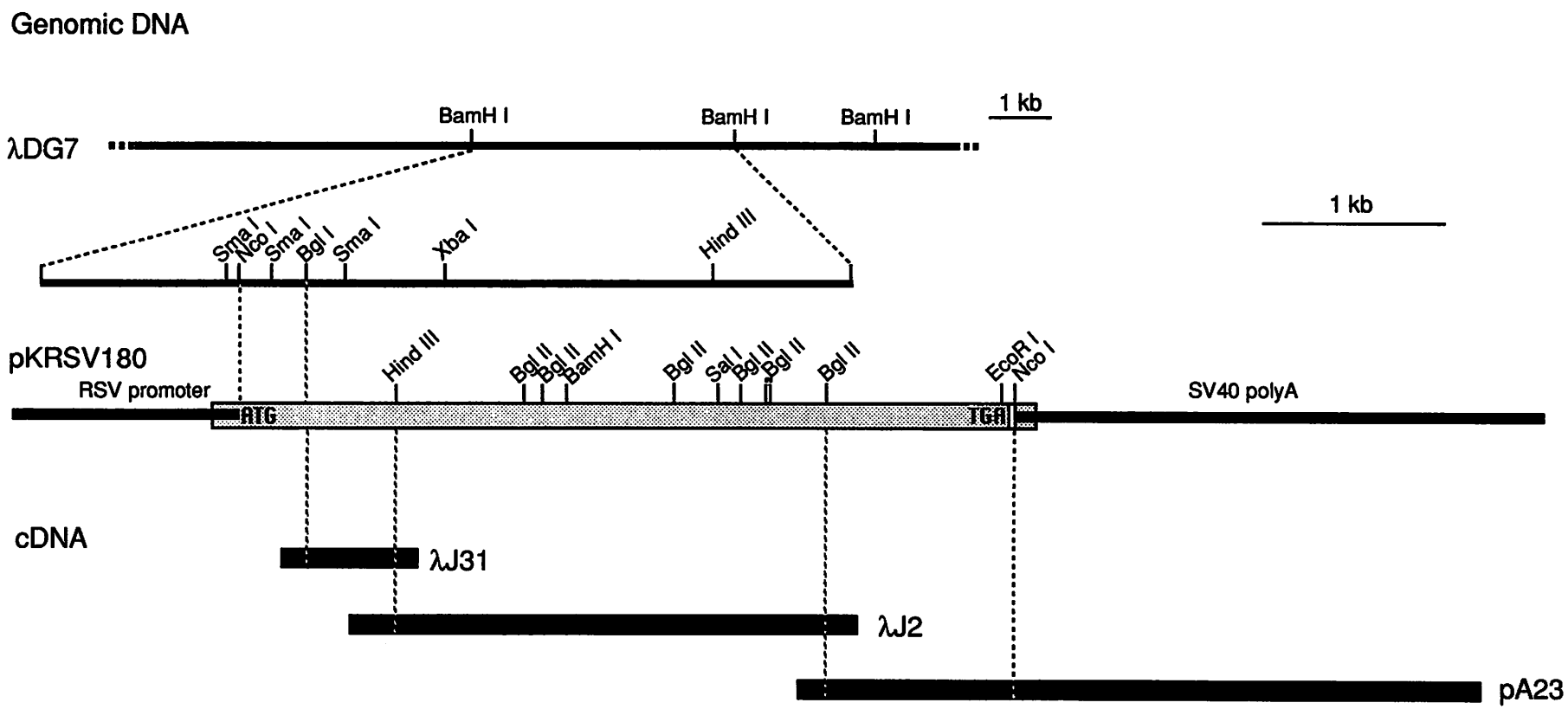
gp180 の機能解析を行うため、得られた gp180 cDNA 及びゲノム DNA 断片から完全長のgp180 DNA を構築し、これをSV40 early promoter の下流に挿入した発現プラスミッド（pSV-gp180）及び RSV promoter の下流に挿入した発現プラスミッド（pKRSV180）を作成した（図３）。完全な gp180 DNA であることは、pSV-gp180 を COS7 細胞に導入しその発現をみることで確認した。



（図　1）　gp180 cDNA 及び genomic DNA のクローニング

```
1      CCCGGGGCTGGGGTCGGGGCCGGGCCGGGCCGGGCGGTGGCGGCGGCGGGGCC      53

54     ATGGCGGGGGCAGCGCGGGGGCTGCTGTGGGCGGCTTTATCCCTGTGCCTGCTGCCGGAGCCTCTCCGTGCTGCTCATATTAAGAAAGCGGAGGCGGCGGCGGCCGGAGGAGGAGGGGGT   173
1      M  A  G  A  A  R  G  L  L  W  A  A  L  S  L  C  L  L  P  E  P  L  R  A  A  H  I  K  K  A  E  A  A  A  A  G  G  G  G  G   40

174    GTGGGGGGGGAGCTGCGGTACCTGCACGCCGCCGAGCTGGGCCAGGCGCTGCGGGACCTGGTGGCCGAAGCCCCCCCGGGGCTGGCCCGGCTCTTCAGCATTGGCCGCTCGGTGGAGGGG   293
41     V  G  G  E  L  R  Y  L  H  A  A  E  L  G  Q  A  L  R  D  L  V  A  E  A  P  P  G  L  A  R  L  F  S  I  G  R  S  V  E  G   80

294    AGGCCGCTGTGGGTGCTGCGCCTGACGGCCGGGCTGCCAGAGCTGCCCGAGGCCCGGCAGGACGGGGAGAAGAAGAAAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAGGAGGGGGAGGAA   413
81     R  P  L  W  V  L  R  L  T  A  G  L  P  E  L  P  E  A  R  Q  D  G  E  K  K  K  K  E  E  E  E  E  E  E  E  E  E  G  E  E   120

414    GGAGGGGGGGGGGCGCTGCCCGGCCGGCCGCAGGTGAAGCTGGTGGGGAACATGCACGGGGACGAGCCCCTGGCCCGGCCGCTGCTGCTGCGCCTGGCCCAGGAGTTGGTGCGGGGCTGG   533
121    G  G  G  G  A  L  P  G  R  P  Q  V  K  L  V  G  N  M  H  G  D  E  P  L  A  R  P  L  L  L  R  L  A  Q  E  L  V  R  G  W   160

534    GCCGGGGGGGACGAGAGGCTGGGCCGCCTGCTCAACACCACCGACCTGTACCTGCTGCCCAGCCTCAACCCCGACGGCTTCGAGCGTGCCCGAGAGGGAGACTGCGGGGGAGGAGGAGGA   653
161    A  G  G  D  E  R  L  G  R  L  L  N  T  T  D  L  Y  L  L  P  S  L  N  P  D  G  F  E  R  A  R  E  G  D  C  G  G  G  G  G   200

654    GGAGGAGGTGAAGGAGGAGGAGAGCCCGGGGGCCGGGAGAACAGCCGAGGCCGGGACCTCAACCGCAGCTTCCCCGATCAGTTTGGGAGCGCTCAGCCCGACCTGGAGCCGGTGCCCGAG   773
201    G  G  G  E  G  G  G  E  P  G  G  R  E  N  S  R  G  R  D  L  N  R  S  F  P  D  Q  F  G  S  A  Q  P  D  L  E  P  V  P  E   240

774    GTGCGAGCCCTCATCGCCTGGATGCGGCGCAACAAGTTCCTGCTCTCCGGCAATCTTCACGGCGGCTCGGTGGTTGCAAGCTATCCCTACGATGACTCTCCCACGCACAGGCCCACGGGA   893
241    V  R  A  L  I  A  W  M  R  R  N  K  F  L  L  S  G  N  L  H  G  G  S  V  V  A  S  Y  P  Y  D  D  S  P  T  H  R  P  T  G   280

894    GTCTACAGTAAATCAGCTGATGACGAAGTGTTCAAATATTTGGCCAAAGCTTACGCCTCACATCACCCCATCATGAGGACTGGCAAACCAAACTGCCCCGGCGAGGAGGGAGAGACCTTC   1013
281    V  Y  S  K  S  A  D  D  E  V  F  K  Y  L  A  K  A  Y  A  S  H  H  P  I  M  R  T  G  K  P  N  C  P  G  E  E  G  E  T  F   320

1014   CAAGACGGCATCACGAACGGTGCCCAGTGGTACGATGTGGAAGGTGGGATGCAGGACTACAACTACGTGTGGGCCAACTGCTTTGAGATCACCTTGGAGCTGTCCTGCTGCAAATACCCA   1133
321    Q  D  G  I  T  N  G  A  Q  W  Y  D  V  E  G  G  M  Q  D  Y  N  Y  V  W  A  N  C  F  E  I  T  L  E  L  S  C  C  K  Y  P   360

1134   CCGACCTCCGAGCTTCAGCAGGAGTGGGAAAACAACCGGGAGTCTCTCCTTACTTTCATTGAGAAGGTCCACATCGGTGTGAAAGGCTTTGTCAGGGATGCGATCACTGGGGCTGGCTTG   1253
361    P  T  S  E  L  Q  Q  E  W  E  N  N  R  E  S  L  L  T  F  I  E  K  V  H  I  G  V  K  G  F  V  R  D  A  I  T  G  A  G  L   400

1254   GAGAACGCGACCATTGTCGTTGCCGGCATCGCTCATAACATCACGGCGGGCAAATTTGGTGACTACCACCGGCTGCTCGTGCCTGGGACCTACAACGTGACCGCAGTTGTGATGGGTTAC   1373
401    E  N  A  T  I  V  V  A  G  I  A  H  N  I  T  A  G  K  F  G  D  Y  H  R  L  L  V  P  G  T  Y  N  V  T  A  V  V  M  G  Y   440

1374   GCACCAGTGACCAAGGAGAACATTGAGGTGAAGGAGGCAGATGCAACCGTAGTGGATTTCTCCTTGCAGCCAACCGTGGTGGCACCAGACCCTAACCTCACGCAGTTCACCGCGACGCCT   1493
441    A  P  V  T  K  E  N  I  E  V  K  E  A  D  A  T  V  V  D  F  S  L  Q  P  T  V  V  A  P  D  P  N  L  T  Q  F  T  A  T  P   480

1494   GCTCCTCCATCCACCCTCACACCCTCTGTTGCGCAGGTAGAGCCCCCGGCCACAACCTCTCTCCACCAAGCAGTCCAACCCGTGGACTTTCGCCACCATCACTTCTCGGACATGGAGATC   1613
481    A  P  P  S  T  L  T  P  S  V  A  Q  V  E  P  P  A  T  T  S  L  H  Q  A  V  Q  P  V  D  F  R  H  H  H  F  S  D  M  E  I   520

1614   TTCCTGCGGCGGTATGCCAACGAGTACCCCAGCATCACCCGCCTCTACTCTGTGGGCAAGTCAGTAGAGCTGCGGGAGCTCTACGTAATGGAGATCTCGGACAACCCCGGCATCCATGAA   1733
521    F  L  R  R  Y  A  N  E  Y  P  S  I  T  R  L  Y  S  V  G  K  S  V  E  L  R  E  L  Y  V  M  E  I  S  D  N  P  G  I  H  E   560

1734   GCAGGTGAGCCAGAGTTCAAGTATATTGGTAACATGCATGGGAATGAAGTTGTGGGGCGAGAGCTGCTCCTGAACCTCATCGAGTACCTCTGCAAGAACTTCGGCACAGATCCCGAAGTG   1853
561    A  G  E  P  E  F  K  Y  I  G  N  M  H  G  N  E  V  V  G  R  E  L  L  L  N  L  I  E  Y  L  C  K  N  F  G  T  D  P  E  V   600

1854   ACTGACTTGGTCCAGAGCACGCGGATCCACATCATGCCGTCCATGAACCCAGATGGCTACGAGAAGTCCCAGGAAGGAGACAGAGGAGGCACCGTTGGCAGAAATAACAGCAACAACTAC   1973
601    T  D  L  V  Q  S  T  R  I  H  I  M  P  S  M  N  P  D  G  Y  E  K  S  Q  E  G  D  R  G  G  T  V  G  R  N  N  S  N  N  Y   640

1974   GACCTGAACCGGAACTTCCCAGATCAGTTCTTCCAGGTGACAGACCCTCCGCAGCCAGAAACTCTTGCTGTCATGAGCTGGTTGAAAACTTACCCGTTCGTGCTTTCAGCAAACCTGCAT   2093
641    D  L  N  R  N  F  P  D  Q  F  F  Q  V  T  D  P  P  Q  P  E  T  L  A  V  M  S  W  L  K  T  Y  P  F  V  L  S  A  N  L  H   680

2094   GGAGGTTCTCTGGTGGTTAATTACCCCTTTGATGACGATGAACAAGGAATAGCCATATACAGTAAATCCCCAGACGATGCTGTGTTTCAGCAGCTGGCACTTTCCTACTCCAAGGAAAAC   2213
681    G  G  S  L  V  V  N  Y  P  F  D  D  D  E  Q  G  I  A  I  Y  S  K  S  P  D  D  A  V  F  Q  Q  L  A  L  S  Y  S  K  E  N   720

2214   AAAAAGATGTATCAGGGAAGCCCTTGTAAGGATTTGTACCCCACAGAGTACTTTCCACATGGCATCACGAACGGGGCCCAGTGGTACAACGTTCCAGGTGGGATGCAGGACTGGAATTAC   2333
721    K  K  M  Y  Q  G  S  P  C  K  D  L  Y  P  T  E  Y  F  P  H  G  I  T  N  G  A  Q  W  Y  N  V  P  G  G  M  Q  D  W  N  Y   760

2334   TTAAATACAAACTGCTTTGAAGTGACCATTGAGCTGGGCTGTGTGAAATACCCAAAAGCAGAGGAGCTGCCGAAGTACTGGGAGCAGAACCGTAGATCTCTCCTCCAGTTCATTAAACAG   2453
761    L  N  T  N  C  F  E  V  T  I  E  L  G  C  V  K  Y  P  K  A  E  E  L  P  K  Y  W  E  Q  N  R  R  S  L  L  Q  F  I  K  Q   800

2454   GTTCACCGCGGCATCTGGGGATTTGTGCTGGATGCCACGGATGGAAGGGGCATTCTCAACGCCACCATCAGCGTCGCCGACATCAACCACCCCGTGACCACCTACAAAGATGGGGACTAC   2573
801    V  H  R  G  I  W  G  F  V  L  D  A  T  D  G  R  G  I  L  N  A  T  I  S  V  A  D  I  N  H  P  V  T  T  Y  K  D  G  D  Y   840

2574   TGGCGCCTCTTGGTCCAGGGGACGTACAAAGTCACAGCATCTGCCCGAGGGTATGATCCAGTCACTAAAACAGTGGAAGTCGACAGCAAAGGTGGGGTGCAGGTCAACTTCACTCTTTCA   2693
841    W  R  L  L  V  Q  G  T  Y  K  V  T  A  S  A  R  G  Y  D  P  V  T  K  T  V  E  V  D  S  K  G  G  V  Q  V  N  F  T  L  S   880

2694   CGGACAGACGCCAAAGTGGAGGAGGGGAAGGTGCCGGTCCTGAACACCCCAGACACCAGCGACCCCAACGAGAAGGAGTTTGAGACTCTGATCAAAGATCTATCTGCTGAAAACGGCCTG   2813
881    R  T  D  A  K  V  E  E  G  K  V  P  V  L  N  T  P  D  T  S  D  P  N  E  K  E  F  E  T  L  I  K  D  L  S  A  E  N  G  L   920

2814   GAGCGCCTTCTGCTTGCCTCCTCGGGGAAAGTCTCTCCTTACCGATACCGCCCCTACAAGGACCTCTCTGAGTTCCTCCGAGGCCTCTATCTGAACTACCCACACATCACAAATCTCACC   2933
921    E  R  L  L  L  A  S  S  G  K  V  S  P  Y  R  Y  R  P  Y  K  D  L  S  E  F  L  R  G  L  Y  L  N  Y  P  H  I  T  N  L  T   960

2934   AGCCTGGGTCAGAGTGTTGAGTTCCGTCAGATCTGGTCCCTTGAGATCTCCAACAAGCCCAACCACTCCGAGCCTGAGGAGCCCAAGATCCGCTTCGTTGCTGGTATTCATGGAAACGCC   3053
961    S  L  G  Q  S  V  E  F  R  Q  I  W  S  L  E  I  S  N  K  P  N  H  S  E  P  E  E  P  K  I  R  F  V  A  G  I  H  G  N  A   1000

3054   CCCGTCGGTACGGAGCTGCTCCTGGCACTGGCAGAATTTCTTTGCATGAACTACAAGAAGAACTCTGCTGTTACGAAGCTGATTGACCGGACGCGGATTGTGATCGTGCCTTCCCTGAAT   3173
1001   P  V  G  T  E  L  L  L  A  L  A  E  F  L  C  M  N  Y  K  K  N  S  A  V  T  K  L  I  D  R  T  R  I  V  I  V  P  S  L  N   1040

3174   CCAGATGGACGTGAGATAGCGCAGGAGAGAGGCTGCACCTCGAAGTTAGGCCACGCTAATGCTCATGGCAGAGATCTGGACACAGACTTCACAAGCAATTACTCCTGGTACTCAGGGACA   3293
1041   P  D  G  R  E  I  A  Q  E  R  G  C  T  S  K  L  G  H  A  N  A  H  G  R  D  L  D  T  D  F  T  S  N  Y  S  W  Y  S  G  T   1080

3294   CGAGAGCCTGAGACCAAAGCCATCATAGAGAACTTGATACTGAAGCAGGATTTCAGCCTCTCTGTTGCACTAGATGGTGGATCTCTACTTGTCACTTACCCATTTGATAAGCCAGCACAG   3413
1081   R  E  P  E  T  K  A  I  I  E  N  L  I  L  K  Q  D  F  S  L  S  V  A  L  D  G  G  S  L  L  V  T  Y  P  F  D  K  P  A  Q   1120

3414   ACAGTGGAGAACAAAGAAACGCTGAAGCATTTGGCATCTGTGTATGCAAACAACCATCCATTGATGCATTTGGGCCAGCCAGGCTGTCCAAATAAGTCAGATGAGAATATTCCTGGGGGT   3533
1121   T  V  E  N  K  E  T  L  K  H  L  A  S  V  Y  A  N  N  H  P  L  M  H  L  G  Q  P  G  C  P  N  K  S  D  E  N  I  P  G  G   1160

3534   GTGATCCGTGGCTCTGAATGGCACAGTCACCTGGGAAGTATGAAGGATTTCAGTGTTACGTTTGGTCATTGTCCTGAGATTACAGTTTATACCAGCTGCTGCTACTTCCCCAGCGCAGGG   3653
1161   V  I  R  G  S  E  W  H  S  H  L  G  S  M  K  D  F  S  V  T  F  G  H  C  P  E  I  T  V  Y  T  S  C  C  Y  F  P  S  A  G   1200

3654   CAGCTCCCTGGCTTGTGGGCAGACCACAGGAAGTCTCTGCTTAGCATGCTCGTGGAGGTTCATAAGGGAGTCCACGGATTTGTCCAGGACAAGAGTGGCAAGGCAATTTCTAAAGCTACC   3773
1201   Q  L  P  G  L  W  A  D  H  R  K  S  L  L  S  M  L  V  E  V  H  K  G  V  H  G  F  V  Q  D  K  S  G  K  A  I  S  K  A  T   1240

3774   ATTGTCCTTAATGAAGGCTTGAGGGTCTACACTAAAGAAGGTGGCTATTTCCATGTGCTGTTGGCTCCTGGTTTGCATAACATCAATGCAATAGCGGATGGGTACCAACAGAAGCATATG   3893
1241   I  V  L  N  E  G  L  R  V  Y  T  K  E  G  G  Y  F  H  V  L  L  A  P  G  L  H  N  I  N  A  I  A  D  G  Y  Q  Q  K  H  M   1280

3894   AAGGTCTTGGTACGCCACGATGCACCCAGCTCTGTGTTCATTGTATTTGACATGGAAAACAGGATATTTGGTCTGCCTCGAGAGCTGGTTGTAACTGTTGCAGGTGCAAGTATGTCTGCT   4013
1281   K  V  L  V  R  H  D  A  P  S  S  V  F  I  V  F  D  M  E  N  R  I  F  G  L  P  R  E  L  V  V  T  V  A  G  A  S  M  S  A   1320

4014   TTGGTCCTCACCGCCTGTATCATCTGGTGTGTCTGCTCAATCAAGTCCAACAGACACAAAGACGGCTTCCCAACCCTCCGGCAGCACCACGACGATTACGAGGACGAAATCCGCATGATG   4133
1321   L  V  L  T  A  C  I  I  W  C  V  C  S  I  K  S  N  R  H  K  D  G  F  P  T  L  R  Q  H  H  D  D  Y  E  D  E  I  R  M  M   1360

4134   TCCACTGGCTCAAAGAAATCCCTTTTGAGCCACGAATTCCAGGATGAAACAGACACTGAAGAAGAAACATTATACTCCAGCAAACACTGACACCTCCCAGACAGGAAAGGAGGTTCCCAT   4253
1361   S  T  G  S  K  K  S  L  L  S  H  E  F  Q  D  E  T  D  T  E  E  E  T  L  Y  S  S  K  H  *                                  1389

4254   GGACCAGCCCCAGTGGAGGGGGGGGGATCC                                                                                           4284
```

（図　2）　gp180のDNAシークエンスと推定されるアミノ酸一次構造。
box は、potential N-linked glycosylation site。アンダーラインは、gp180アミノ酸シークエンシングと一致したペプチド。破線は、putative signal peptide。ダブルアンダーラインは、putative transmembrane domain。



（図　3）　完全長 gp180 DNA の構築。

（図　4）　gp180 ドメインA、B 及び C とヒトカルボキシペプチダーゼHとのホモロジーアライメント。

box は、同一アミノ酸配列。星印は、Zn binding site。白丸は、sunstrate binding site。黒丸は、catalytic site.
ヒトカルボキシペプチダーゼHのアミノ酸配列は、Manser, E. et al. Biochem. J., 267, 517-525 (1990)より引用。

gp180 は細胞表面に存在する。

gp180 が細胞表面に局在することを確認するため、pSV-gp180 DNAをtransfection 後、2 日間培養した COS7 細胞表面の蛋白質は、NHS-LC-Biotin でラベルした。これら細胞を可溶化した後、gp180 を DHBVpreS-GST と結合させたのち Glutathione-sepharose で回収した。Biotin ラベルされた gp180 は、SDS-PAGE 後 nitrocellulose membrane に transfer し、Avidin-HRP、Enhanced Chemiluminessence 法で検出した。COS7 細胞で発現したgp180 は、全体のおよそ10 % が細胞表面に存在することが わかった（図５）。

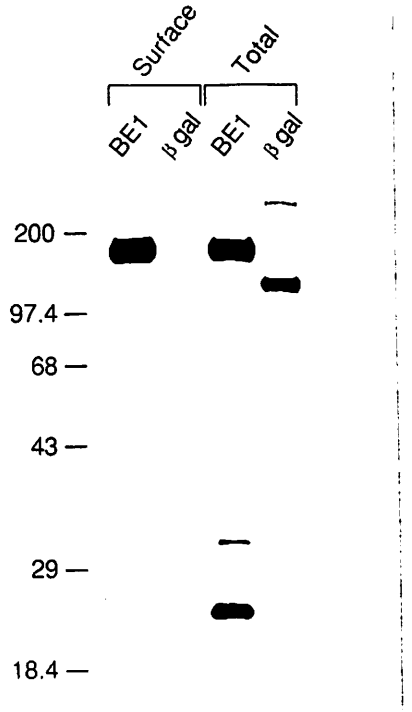
DHBVpreS は gp180 の３番目のカルボキシペプチダーゼドメインと結合する。

DHBVpreS の gp180 上の結合領域を決定するため、gp180 の各種欠失変異体と DHBVpreS との binding assay を行った。

gp180 の各種欠失変異体は、各種制限酵素を用いて特定部分を欠失させ、エピトープタッグの HBV エンベロープ蛋白質にこれらを結合させて作成した。DHBVpreS は gp180 の３番目のカルボキシペプチダーゼドメインと結合することがわかった(図６）。

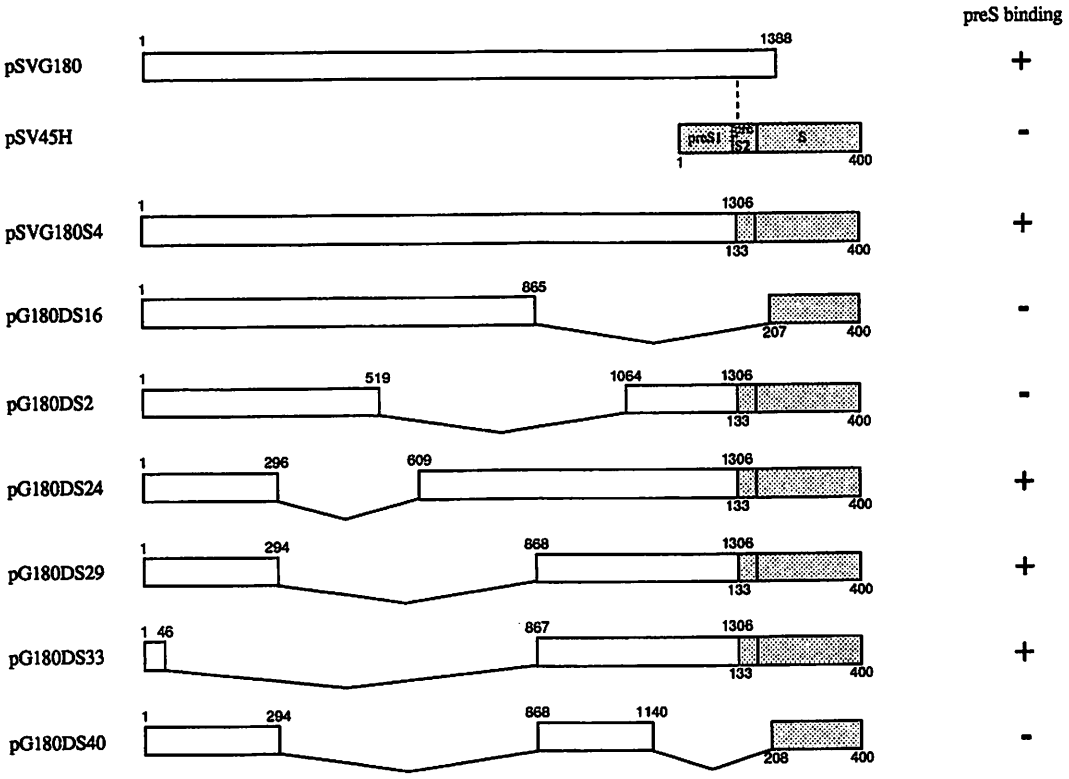
gp180 発現細胞株の樹立。

ニワトリ肝癌由来の細胞株 LMH は、DHBV DNA をトランスフェクションすると効率よく DHBV ウィルスを増殖する細胞である。しかし、DHBV は感染しない。そこで我々は、DHBV 感染における gp180 の機能を探るため、まず LMH 細胞に pKRSV180 プラスミッド DNA をtransfection した後、 G418 selection により pKRSV180 導入細胞株を樹立した。樹立した細胞株は全て、single plasmid が host genomic DNA にintegration していた（図７）。これら細胞株のうち、gp180 の発現は、LMHG13、15、16及び35に認められたが、LMHG11及び12では検出されなかった。



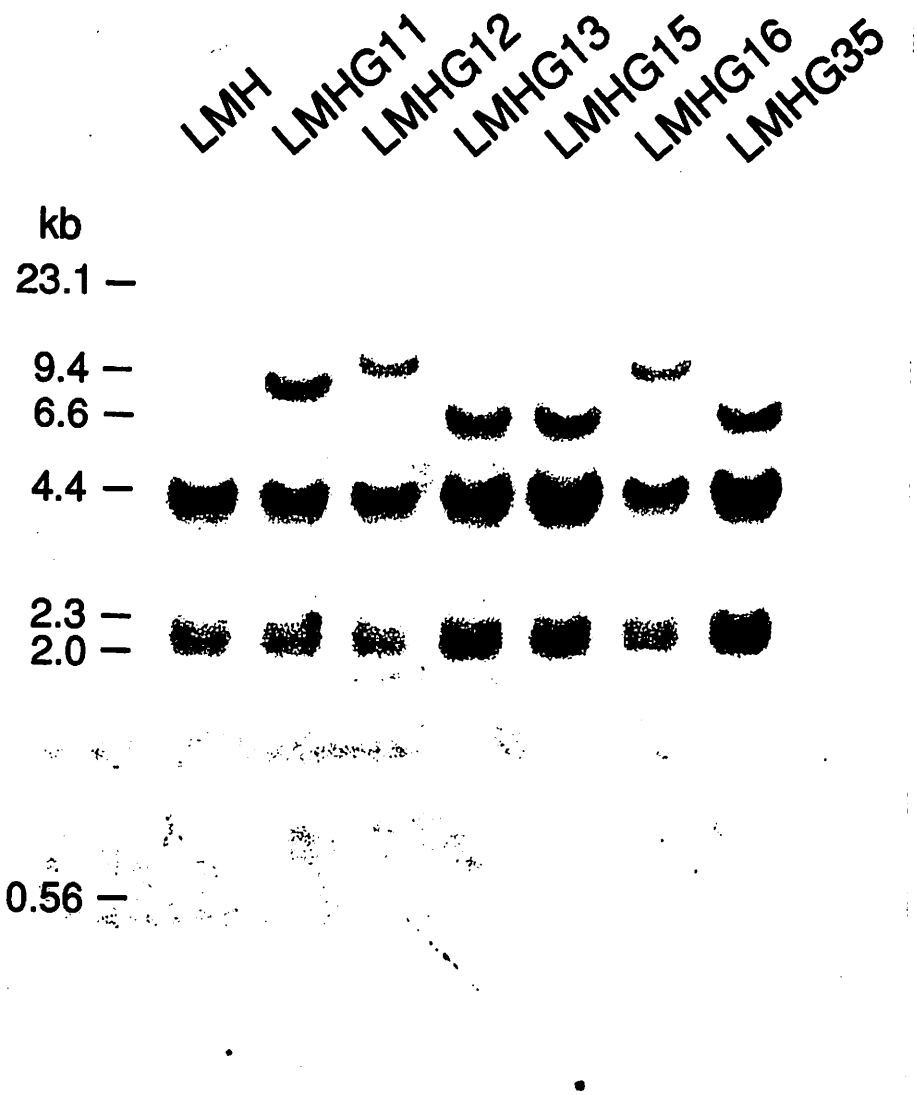
（図　5）　gp180 は細胞表面に局在する。

pSV-gp180 と β galactosidase 遺伝子を COS7 細胞に導入、発現の後、細胞表面の蛋白質を NHS-LC-Biotin で標識した。gp180 と β galactosidase はそれぞれ BE1 (GST-DHBVpreS fusion protein)、抗 β gal 抗体で単離した。ビオチン化蛋白質は、Avidin-HRP / ECL (Amersham) で検出した。これらの蛋白質が 導入後COS7細胞で発現していることは、細胞を可溶化後、全蛋白質をビオチン化することにより確認した（右 2 レーン）。



（図　6）　DHBV エンベロープ蛋白質 preS は、gp180 のドメイン C と結合する。

（a）作成した各種 gp180 欠失変異体。pSVG180 は SV40 early promoter の下流に wild type の gp180をもつ。gp180 欠失変異体には tag としてC末側にpSV45H の HBV エンベロープ蛋白質を融合した。
（b）各種 gp180 欠失変異体と DHBV preS の binding assay。COS7 細胞に導入し 35S メチオニンでラベルした gp180 欠失変異体と GST-DHBV preS 融合蛋白質の結合能を調べた。これら変異体が COS7 細胞内で発現していることは、抗 HBs 抗体によって確認した。



（図　7）　gp180 発現細胞株の樹立。

G418 耐性細胞株の genomic DNA を Hind III digestion 後サザンブロット。Probe は ^{32}P-dCTP でラベルした gp180 cDNA の 2.5kb BamHI fragment。得られた細胞株には、シングルコピーの pKRSV180 が組み込まれていた。4.4 kb 以下の複数のバンドは host 由来。

DHBV は gp180 発現細胞株に吸着する。

宿主細胞への DHBV の感染過程で gp180 がどのように関わっているのかを知るために、まず gp180 発現細胞を用いて DHBV 粒子の吸着実験を行った。

DHBV 粒子は、gp180 発現細胞にのみよく吸着することがわかった（図８）。このことから、gp180 は DHBV 感染の初期、細胞表面へのウィルス粒子の吸着に関わっているものと思われる。

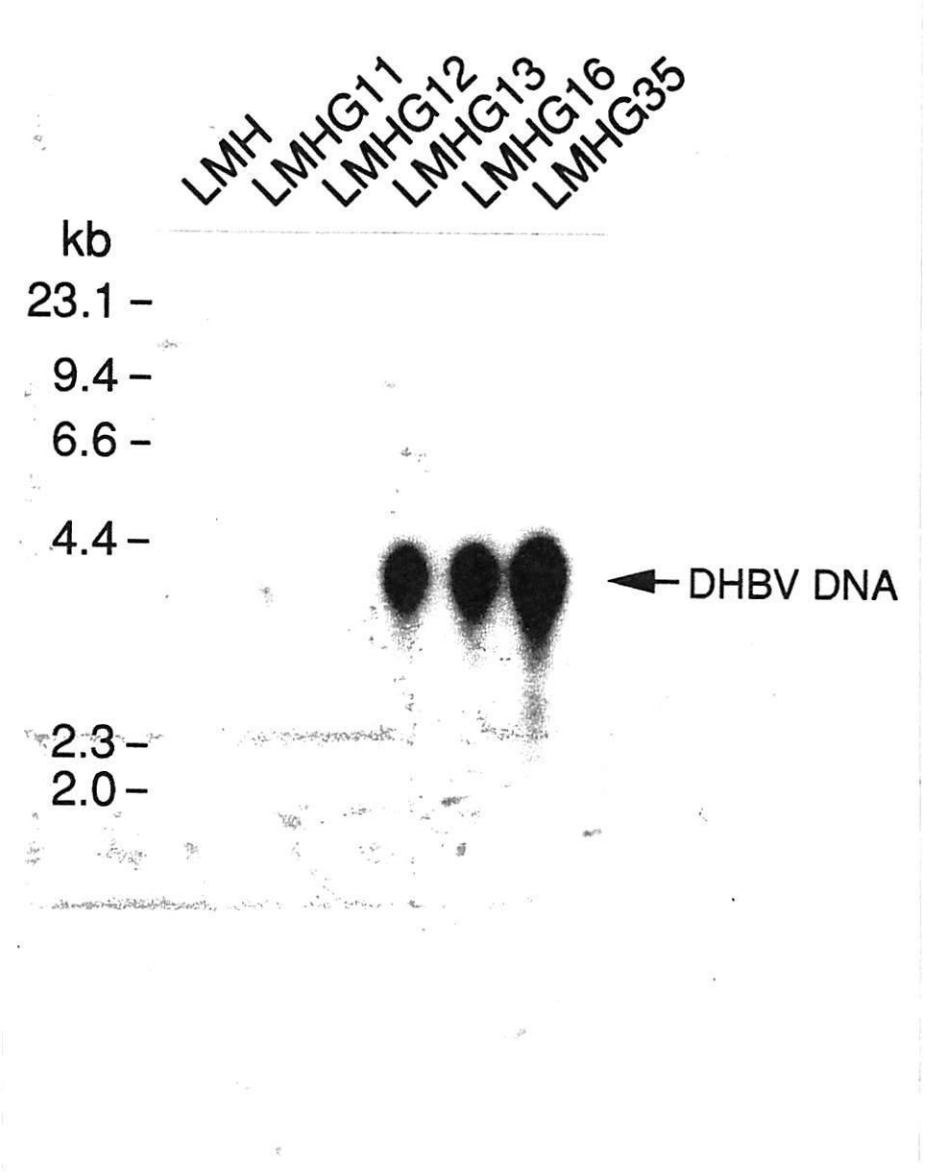
DHBV は上記の gp180 発現細胞株で増殖しない。

さらに我々は、これらgp180 発現細胞での DHBV 増殖の可能性について検討した。LMHG35 細胞を対象に、種々の培養条件下で DHBV 感染実験を行った。しかし、DHBV の増殖は、培養１４日後も認められなかった（図９）。LMH 細胞には、DHBV 感染成立に必要な gp180 以外の因子が欠けているものと思われる。

抗 gp180 抗体はニワトリ gp180 を認識する。

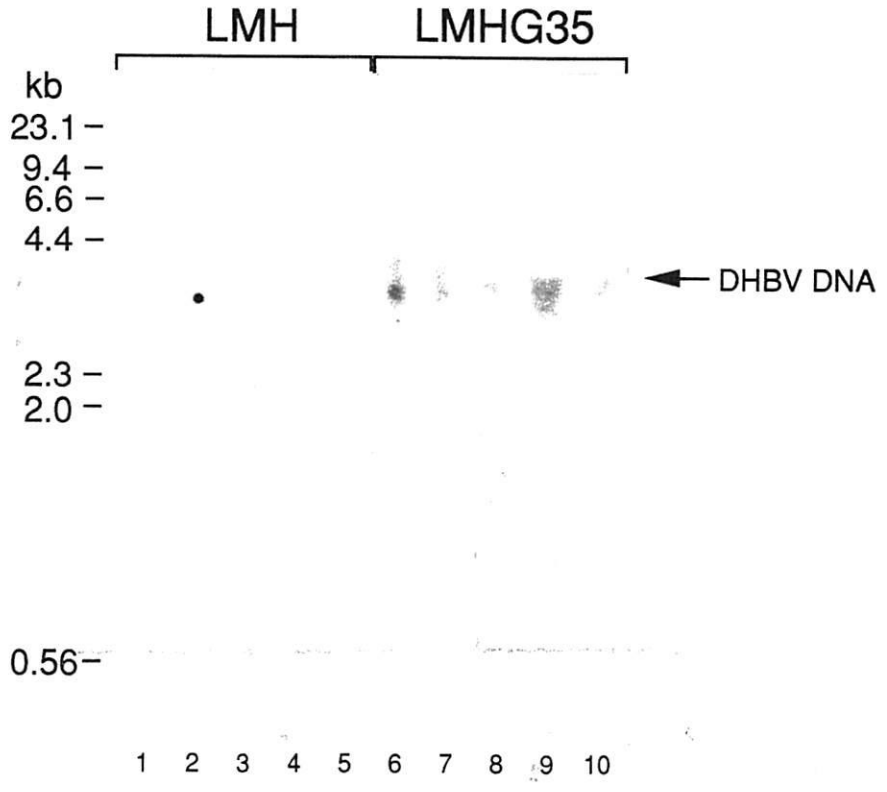
DHBV 感染過程における gp180 の機能を、また、gp180 の細胞局在、生物種分布明かにする上で、抗 gp180 抗体による解析は重要である。

DHBVpreS は gp180 の３番目のカルボキシペプチダーゼドメインに結合する（図６）ので、この領域を GST との融合蛋白質として大量に得、それを抗原としてラビット及びマウスを用い抗 gp180 抗体を作成した。まだ DHBVpreS と gp180 の結合を阻害するような中和抗体は得られていないが、今回得られた抗 gp180 モノクローナル抗体を用いることによって、LMH 細胞にも gp180 が存在することを示唆する結果が得られた（図１０ａ）。このニワトリ gp180 は、DHBVpreS と結合しない（図１０ｂ）ことから、DHBV の宿主特異性は、gp180 が担っているものと思われる。gp180 のカルボキシペプチダーゼドメインが triplicate したユニークな構造は、ダックに特異的なものではなく生物種を越えて広く存在しているように思われる。また、抗 gp180 抗体が、分子量 18 万の gp180 分子のみを認識することから、gp180 は processing を受けずに mature form として機能しているものと思われる。



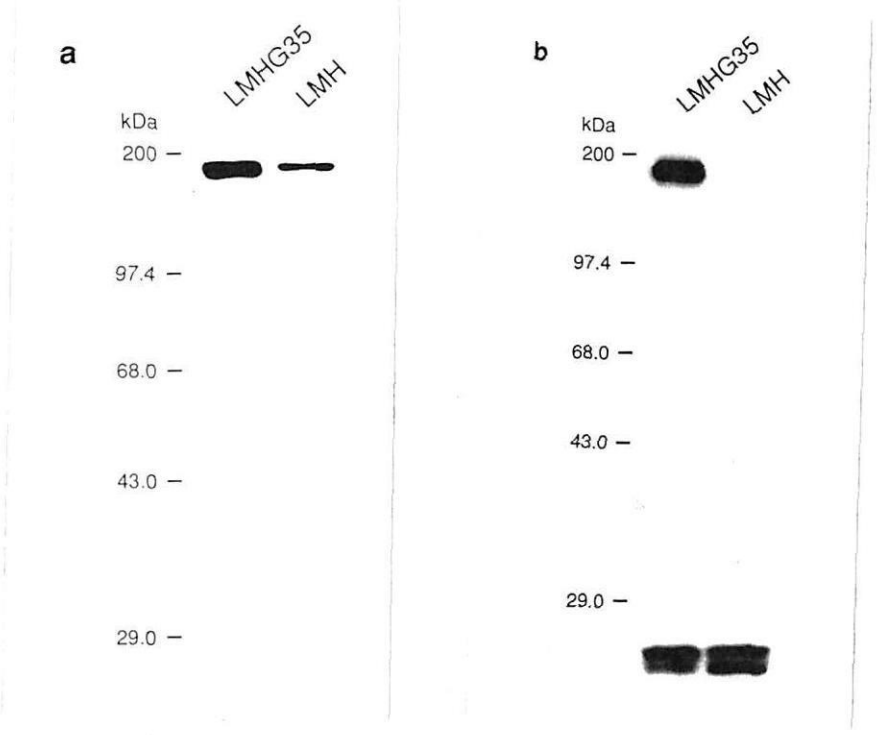
（図　8）　DHBV 粒子は gp180 発現細胞によく吸着する。

10^6 の細胞を 5 X 10^6 DHBV 存在下、37度で16時間培養後、細胞をトリプシン処理により回収。その total DNA をサザンブロット。Probe は ^{32}P-dCTP でラベルした 3.2 kb DHBV DNAを用いた。



（図　9）　LMHG35細胞ではDHBVの感染が成立しない。

10^6 の細胞を 5 X 10^6 DHBV 存在下、37度で16時間培養した後、DHBV フリーの培養液に交換。以降２日おきに培養液を交換した。DHBV フリーの培養液に交換してから、０日（レーン１、６）、３日（２、７）、６日（３、８）、１０日（４、９）、１４日（５、１０）後、細胞をトリプシン処理により回収。その total DNA をサザンブロット。Probe は ^{32}P-dCTP でラベルした 3.2 kb DHBV DNA。DHBV の増殖は、LMHG35 細胞でも認められなかった。



（図　１０）抗 gp180 モノクローナル抗体（1D11）はニワトリの gp180 を認識する。

（a）LMH 及び LMHG35 細胞の全蛋白質を SDS-PAGE で分離した後、PVDF メンブランにトランスファー。gp180 の検出は、HRP-conjugated anti-mouse IgG antibodies / enhanced chemiluminescence method で行った。

（b）gp180 と DHBV preS の binding assay。^{35}Sメチオニンでメタボリカルにラベルした gp180 と GST-DHBV preS 融合蛋白質 (BE1) の結合能を調べた。LMH 細胞に検出されたニワトリ gp180（a）は、DHBV preS と結合しない。