HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	NEDD4結合タンパク質1（N4BP1）はHBV RNAを分解することでHBVゲノムの複製を抑制する
Author(s)	小林, 展大
Description	配架番号：2952
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16642号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16642
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98252
Type	doctoral thesis
File Information	KOBAYASHI_Nobuhiro.pdf, 全文

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

NEDD4 結合タンパク質 1（N4BP1）は HBV RNA を分解することで HBV ゲノムの複製を抑制する

（NEDD4-binding protein 1 suppresses HBV replication by degrading HBV RNAs）

2025 年 9 月

北海道大学
小林展大

学位論文

NEDD4 結合タンパク質 1（N4BP1）は HBV RNA を分解することで HBV ゲノムの複製を抑制する

（NEDD4-binding protein 1 suppresses HBV replication by degrading HBV RNAs）

2025 年 9 月

北海道大学
小林展大

目次

発表論文目録および学会発表目録 ・・・1 頁
要旨 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2 頁
略語表 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・5 頁
緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7 頁
方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10 頁
結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 52 頁
考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 87 頁
結論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 90 頁
謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 92 頁
利益相反 ・・・・・・・・・・・・・・・・ 92 頁
引用文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・ 93 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1.　Nobuhiro Kobayashi, Saori Suzuki, Yuki Sakamoto, Rigel Suzuki, Kento Mori, Yume Kosugi, Tomoya Saito, Yuan Ma, Lihan Liang, Takuma Izumi, Kisho Noda, Daisuke Okuzaki, Yumi Kanegae, Sanae Hayashi, Yasuhito Tanaka, Atsuya Yamashita, Kohji Moriishi, Yoshiharu Matsuura, Osamu Takeuchi, Tomokazu Tamura, Akinobu Taketomi and Takasuke Fukuhara.

NEDD4-binding protein 1 suppresses hepatitis B virus replication by regulating viral RNAs

J Gen Virol. 2025 Mar;106(3). doi: 10.1099/jgv.0.002082.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1.　小林展大、福原崇介、武冨紹信

HBV 感染に関与する RNA 結合タンパク質の機能解析

JDDW 2022 第 26 回日本肝臓学会大会 2022 年 10 月 27-30 日・福岡

2.　小林展大、齋藤智哉、鈴木理滋、田村友和、武冨紹信、福原崇介

HBV 感染に関与する RNA 結合タンパク質の同定とその機能解析

第 69 回日本ウイルス学会学術集会 2022 年 11 月 13-15 日・長崎

要旨

【背景と目的】

B 型肝炎ウイルス（hepatitis B virus：HBV）は世界で約 2.5 億人が慢性感染していると推定され、肝硬変や肝細胞癌の発症リスクを増大させる重大な疾患である。現在、HBV の治療には主に核酸アナログ製剤（nucleos（t）ide analogs：NA）が使用されており、ウイルスの逆転写を抑制することで血中 HBV 量を効果的に低下させることができる。しかし、NA 製剤は肝細胞内に存在する完全二本鎖 DNA（covalently closed circular DNA：cccDNA）を直接排除することができないため、治療を中断するとウイルスの再活性化が生じ、B 型肝炎の再発リスクが残るという課題がある。そのため、NA 製剤は長期にわたる継続が必要とされ、患者に対する負担や管理上の課題が残されている。こうした背景から、新規 HBV 治療薬の開発に向けた宿主因子の同定が求められている。本研究では、HBV の増殖の抑制に関与する宿主因子を探索するため、RNA 結合タンパク質（RNA-binding proteins：RBP）に着目し、それらの中から HBV ゲノムの複製を抑制する新たな宿主因子を同定することを目的とした。RBP 発現プラスミドライブラリーを用いたスクリーニングを実施し、HBV ゲノムの複製を抑制する因子の探索ならびにその機能解析を行った。

【対象と方法】

HBV の増殖の抑制に関与する RBP の同定を目的とし、132 種類の RBP 発現プラスミドライブラリーを用いたスクリーニングを実施した。肝細胞癌細胞株（Huh7 細胞）および HBV 受容体を発現した肝癌細胞株（HepG2-hNTCP C4 細胞）に対し、HBV とともに各 RBP を外因性に発現させ、HBV ゲノムの複製に及ぼす影響を評価した。HBV ゲノムの複製の指標として、コア内不完全二本鎖 DNA（relaxed circular DNA：rcDNA）を測定した。スクリーニングによりライブラリーの中から NEDD4-binding protein 1（N4BP1）が最も HBV の増殖抑制効果を示したため、その発現が HBV ゲノムの複製に与える影響や作用機序を解析した。具体的には、RBP の過剰発現、RBP のノックダウンおよびノックアウトによる影響を評価するとともに、HBV プレゲノム RNA（pregenomic RNA：pgRNA）および cccDNA の産生量を測定した。また、N4BP1 のドメイン機能を解析するため、K homology（KH）-like ドメインおよび RNase ドメインを欠損させた変異体を用いて HBV の増殖抑制効果を検討した。さらに、ノーザンブロッティングによる HBV RNA の発現解析や N4BP1 と pgRNA との結合解析、RNA シークエンス解析により、N4BP1 の作用機構の解明を行った。

【結果】

132 種類の RBP のスクリーニングの結果、N4BP1 を含む 23 種類の RBP においてコア内 rcDNA レベルが 50%以下に低下した。中でも N4BP1 は HBV ゲノムの複製に対する顕著な抑制効果を示し、その効果は遺伝子型 A、B、C のいずれ

においても再現された。HepG2-hNTCP C4 細胞および初代培養ヒト肝細胞（primary human hepatocytes：PHH）を用いた感染実験においても、N4BP1 の過剰発現によりコア内 rcDNA および pgRNA 量が有意に減少した。一方、N4BP1 のノックダウンおよびノックアウトにより pgRNA およびコア内 rcDNA レベルの増加が観察され、N4BP1 が HBV ゲノムの複製を内因的に抑制していることが示唆された。さらに N4BP1 ノックアウト細胞に再度 N4BP1 を導入することでコア内 rcDNA レベルの低下が確認されたことから、N4BP1 の HBV に対する増殖抑制効果はその発現に依存することが裏付けられた。N4BP1 は KH-like ドメインおよび RNase ドメインが保存されているが、ドメイン欠損変異体を用いた解析からこれら二つのドメインは HBV の増殖抑制効果に必須であることが判明した。特に RNase ドメインの D623N 変異体は構造を保ちながら RNase 活性を欠損しており、この変異体ではコア内 rcDNA の抑制効果は失われた。

次に、N4BP1 が HBV のどの複製過程に干渉して増殖抑制効果を示すのか解析した。N4BP1 を過剰発現した HepG2-hNTCP C4 細胞を用いた検討で、cccDNA の発現は変化せず、pgRNA および rcDNA レベルが減少したことから、cccDNA を形成後から pgRNA の産生過程に作用していることが予想された。cccDNA の転写活性化を評価するために、HBV プロモーター活性を N4BP1 を過剰発現した細胞で評価したところ、HBV プロモーター活性には影響を与えなかった。さらに RNA シークエンス解析により、N4BP1 の過剰発現により変動した遺伝子群の中には HBV ゲノムの複製に関与する転写因子や経路は含まれていなかったことからも、転写活性には影響を与えないことが裏付けられた。ノーザンブロッティングおよび RNA 免疫沈降の結果では、N4BP1 は pgRNA に直接結合し、3.5 kb および 2.4/2.1 kb の HBV RNA を制御することが確認された。さらにテトラサイクリンにより HBV の産生が誘導可能な肝癌細胞株（HepAD38.7 細胞）を用いて pgRNA の安定性を評価したところ、野生型 N4BP1 を過剰発現した細胞では pgRNA の著明な分解促進が認められたが、KH-like ドメインおよび RNase ドメイン欠損変異体では pgRNA の安定性が保たれたままであった。これらの結果は、N4BP1 が主に HBV RNA の分解を通じて HBV ゲノムの複製を抑制していることを示している。

【考察】

本研究により、N4BP1 が HBV ゲノムの複製、特に HBV RNA の制御において重要な役割を担う宿主因子であることが明らかとなった。N4BP1 による HBV の増殖抑制効果には RNA 結合能と RNase 活性が必須であり、これらの機能を欠損した変異体では HBV の抑制効果が消失することから、N4BP1 は pgRNA または HBV RNA を直接的に分解して HBV ゲノムの複製を阻害していると考えられる。既存の NA 製剤やインターフェロン製剤が cccDNA や pgRNA に対して限定的な効果しか持たない中で、N4BP1 のような HBV RNA 全体に影響を与える分子は、既存治療とは異なる新たな治療戦略につながる可能性がある。

【結論】

N4BP1 は、HBV RNA の分解を介して HBV ゲノムの複製を抑制する新規の宿主因子であることが明らかとなった。本研究は、HBV に対する治療戦略において、RNA 結合タンパク質を標的とした新たなアプローチの可能性を示唆するものであり、今後の治療法開発において N4BP1 の応用が期待される。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AdV：adenoviral vectors
BSA：bovine serum albumin
cccDNA：covalently closed circular DNA
cDNA：complementary DNA
CHB：chronic hepatitis B
CLIA：clinical laboratory improvement amendments
CRISPR/Cas9：Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR Associated proteins 9
DAPI：4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM：Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO：dimethyl sulfoxide
EDTA：ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA：enzyme-linked immuno sorbent assay
ETV：entecavir
FBS：fetal bovine serum
FPKM：Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped reads
GAPDH：glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GEq：genome equivalents
GFP：Green Fluorescent Protein
HBV：Hepatitis B virus
HCC：hepatocellular carcinoma
HNRNPC：Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C
IFN：interferon
ISG：interferon-stimulated genes
JCRB：Japanese Collection of Research Bioresources
KH：K homology
KHNYN：KH And NYN Domain Containing
KO：knockout
mRNA：messenger RNA
MOI：multiplicity of infection
MOPS：3-Morpholinopropanesulfonic Acid
NA：nucleos（t）ide analogs
NB：northern blotting
NS：not significant

NTCP：sodium-taurocholate co-transporting polypeptide
N4BP1：NEDD4-binding protein 1
OE：over expression
PBS：phosphate-buffered saline
PCR：polymerase chain reaction
PEG：polyethylene glycol
pgRNA：pregenomic RNA
PHH：primary human hepatocytes
PJA1：Praja Ring Finger Ubiquitin Ligase 1
qPCR：quantitative polymerase chain reaction
RBP：RNA binding proteins
RIP：RNA Immunoprecipitation
RT-qPCR：reverse transcription quantitative PCR
rcDNA：relaxed circular DNA
scRNA-seq：single cell RNA sequencing
SD：standard deviation
SDS：sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE：sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA：small interfering RNA
SOC：Super Optimal broth with Catabolite repression
SSC：Saline Sodium Citrate Buffer
WB：western blotting
WT：wild type
ZCCHC10：Zinc Finger CCHC-Type Containing 10
ZC3H12B：Zinc Finger CCCH-Type Containing 12B

緒言

B 型肝炎ウイルス（hepatitis B virus：HBV）感染は、急性または慢性の肝炎を引き起こす。現在、世界中で約 2 億 5,400 万人が B 型肝炎に罹患しており、毎年約 120 万人が新たに B 型肝炎に罹患するとされている。B 型肝炎感染者は肝疾患発症のリスクが高く、HBV 感染に起因する肝硬変や肝細胞癌（hepatocellular carcinoma：HCC）により、年間約 110 万人が死亡している（World Health Organization Hepatitis B Fact Sheet, 2024）。HBV 感染はワクチン接種により予防可能であるが、アフリカ、アジア、東ヨーロッパなどの HBV 高蔓延地域には依然として多くの HBV 感染者が存在し、これらの地域ではワクチン接種率が低いため、HBV の新規感染は依然として多くの地域で報告されている（World Health Organization Immunization Coverage, 2024）。

HBV はヘパドナウイルス科に分類される DNA ウイルスであり、ウイルスゲノムは約3,200塩基の不完全環状二本鎖DNAで構成される。肝細胞への侵入は、肝細胞膜上に存在する胆汁酸輸送体であるナトリウム-タウロコール酸共輸送ポリペプチド（sodium-taurocholate co-transporting polypeptide : NTCP）を介したエンドサイトーシスにより行われる。細胞内に取り込まれた後、ウイルスエンベロープが失われ、不完全二本鎖 DNA（relaxed circular DNA：rcDNA）を内包したカプシドが細胞質に放出される（Yan et al, 2012）。その後、カプシドは rcDNA を核内に輸送し、宿主の DNA 修復機構を利用して完全二本鎖 DNA（covalently closed circular DNA：cccDNA）へと変換され、cccDNA はウイルス messenger RNA（mRNA）の転写鋳型として機能する（Koniger et al, 2014；Qi et al, 2016；Sheraz et al, 2019；Kitamura et al, 2018）。cccDNA からは 4 種類のウイルス mRNA が転写され、その中で最も長いプレゲノム RNA（pregenomic RNA：pgRNA）はウイルス複製において重要な役割を果たす。pgRNA はウイルスポリメラーゼと結合し、カプシドに内包された後、逆転写を経て rcDNA が形成される。形成されたヌクレオカプシドはエンベロープに覆われて成熟ウイルス粒子となり、細胞外へ分泌される（Hayes et al, 2016；Selzer and Zlotnick, 2015）。（図 1）

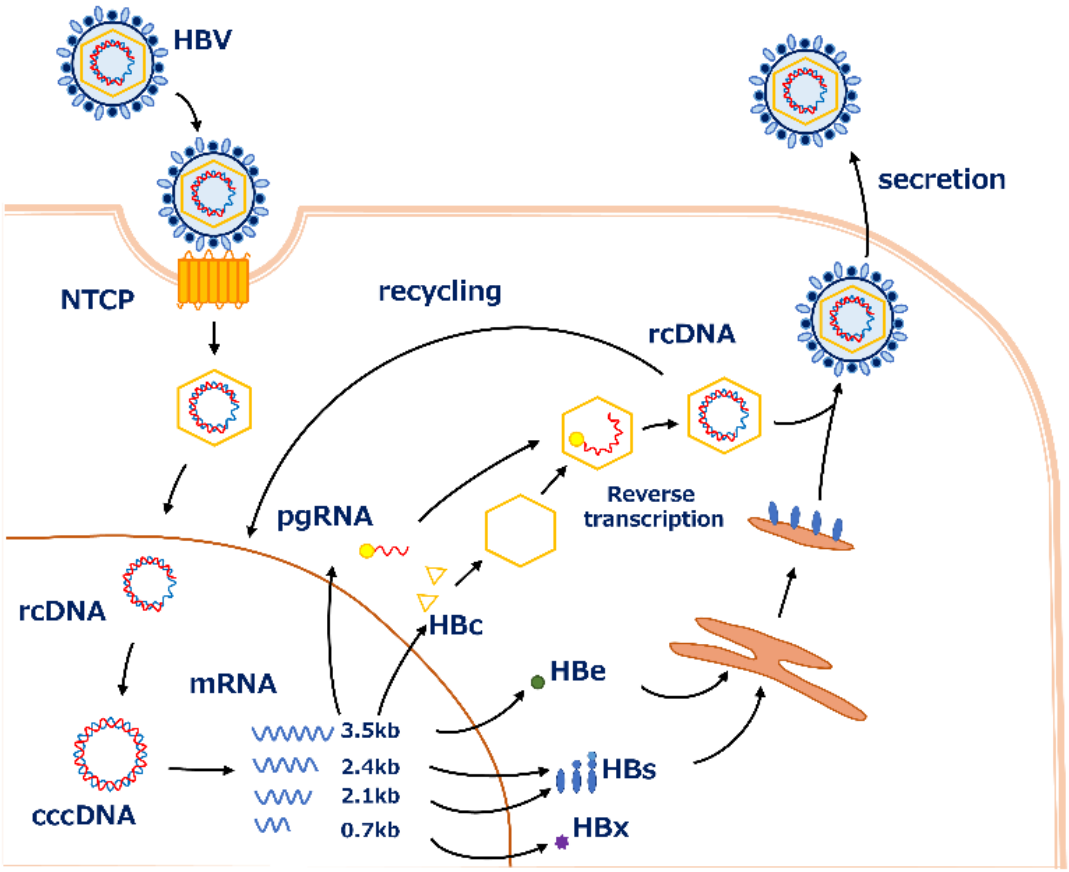

図 1.　B 型肝炎ウイルスの生活環

HBV は NTCP を介して肝細胞へ侵入する。細胞内に取り込まれたウイルスはエンベロープを失い、rcDNA を内包したカプシドが細胞質へ放出される。カプシドは核膜孔へ移行し、rcDNA を核内へ輸送する。核内で rcDNA は宿主の DNA 修復機構を介して cccDNA へと変換され、cccDNA を鋳型として HBV mRNA の転写が行われる。転写された mRNA のうち、pgRNA はウイルスポリメラーゼと結合し、HBc からなるカプシドに内包される。カプシド内で pgRNA は逆転写されて rcDNA となり、HBs により構成されるエンベロープに包まれて細胞外へ分泌される。一部のカプシドは核へ再輸送され、cccDNA の維持に関与する。また cccDNA からは HBx、HBs、HBe などの HBV タンパク質も産生され、ウイルスの増殖や免疫回避に関与する。

現在、HBV 感染症の治療にはインターフェロン製剤（interferon : IFN）および核酸アナログ製剤（nucleos（t）ide analogs : NA）が使用されており、いずれも血中 HBV 量の制御に一定の効果を示している（Rijckborst and Janssen, 2010 ; Doong et al, 1991）。IFN 製剤は、宿主細胞において IFN 誘導遺伝子（interferon-stimulated genes : ISG）の発現を促進し、HBV ゲノムの複製や転写を阻害する（Li et al, 2022）。しかし、IFN 製剤は肝障害を含む副作用が顕著であり、重度の肝機能障害を有する患者には適さない（Tang et al, 2018）。

一方、NA 製剤は HBV の逆転写を阻害し、新規ウイルス粒子の産生を抑制することで肝細胞内への感染拡大を防ぐ（Dienstag et al, 1995 ; Nowak et al, 1996）。しかし、NA 製剤は HBV の逆転写を阻害するが、HBV s 抗原（HBsAg）および e 抗原（HBeAg）の産生には影響を与えないため、これらの抗原の排除には寄与しない。また、NA 製剤は cccDNA を除去できないため、ウイルスは肝細胞内に持続感染し、治療中断後に HBV が再活性化するリスクが高い（Suzuki et al, 2006）。そのため、NA 製剤による治療は長期継続が推奨されている。

このような既存治療薬の課題を克服するため、抗ウイルス作用を持つ宿主因子の同定が進められている。特に、HBV の増殖を抑制する宿主因子の作用機序を理解することで、新規抗ウイルス治療法の開発に寄与する可能性がある。これまでに、RNA 結合タンパク質（RNA binding proteins : RBP）の中には HBV の増殖を抑制する因子がいくつか報告されている。例えば、CCCH ジンクフィンガー抗ウイルスタンパク質 ZAP（ZC3HAV1）は、N 末端の 4 つのジンクフィンガーモチーフを用いて HBV RNA に結合し、pgRNA の分解を促進する（Mao et al, 2013）。同様に、MCPIP1（ZC3H12A、regnase-1）も、HBV pgRNA に結合し、RNase 活性を介して pgRNA を直接的に分解することで HBV ゲノムの複製を阻害することが報告されている（Li et al, 2020）。さらに、PUF60 は転写因子 TCF7L2 とともに HBV エンハンサーII 領域に結合することで、HBV 3.5 kb プレコアおよび pgRNA の発現を促進する一方で、N 末端 RNA 認識モチーフを介して HBV 3.5 kb RNA の分解を促進することも知られている（Sun et al, 2017）。しかしながら、これらの報告にも関わらず、HBV は初代培養ヒト肝細胞（primary human hepatocytes : PHH）および生体内において高レベルの HBV RNA を産生するため、これら宿主因子の抗ウイルス作用は限定的であると考えられる。

本研究では、HBV の増殖の抑制に関与する新規 RBP の探索と機能解析を目的とした。RBP 発現プラスミドライブラリーを用いた包括的スクリーニングを実施した結果、HBV ゲノムの複製を抑制する宿主因子として NEDD4 結合タンパク質 1（NEDD4-binding protein 1 : N4BP1）を同定した。さらに、N4BP1 が HBV RNA を制御し、RNA の分解を促進することにより HBV ゲノムの複製を抑制するメカニズムを解明した。

方法

1. 細胞培養

1-1. 使用した細胞と培地

本研究では、Huh7 細胞、HEK293T 細胞、HepG2-hNTCP C4 細胞、HepAD 38.7 細胞および PHH を使用し、全ての細胞は 5%（v/v）CO2 環境下、37℃で培養した。Huh7 細胞はヒト HCC に由来する細胞株であり、細胞は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクから入手し、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン（nacalai tesque）、および 10%ウシ胎児血清（fetal bovine serum：FBS、Sigma-Aldrich）を含む Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）High-glucose（nacalai tesque）を用いて培養した。HEK293T 細胞はヒト胎児腎由来の上皮様細胞株であり、細胞は JCRB 細胞バンクから入手し、Huh7 細胞と同様の培地を用いて培養した。HepG2-hNTCP C4 細胞はヒト HCC 由来の HepG2 細胞に NTCP を安定発現させた細胞株であり、HBV 感染に対して高い感受性を示す。細胞は国立感染症研究所（NIID）の脇田隆字先生から恵与され、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、10% FBS を含む DMEM High-glucose に 0.8% G418（nacalai tesque）を添加した培地を用いて培養した。HepAD38.7 細胞はテトラサイクリン依存性プロモーターの制御下で HBV（遺伝子型 D）を安定発現する細胞株であり、テトラサイクリン存在下では HBV ゲノムの転写・複製が抑制され、テトラサイクリン除去により HBV ゲノムの複製が誘導される特性を持つ。細胞は NIID の脇田隆字先生から恵与され、10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、0.8% G418、5 µg/mL インスリン（nacalai tesque）、および 400 ng/mL テトラサイクリン（nacalai tesque）を添加した DMEM/Ham's F-12 培地（nacalai tesque）を用いて培養した。PHH はヒト肝組織から単離された肝細胞であり、*in vitro* において生理学的に最もヒト肝臓に近い HBV 感染モデルを再現できる。PHH は株式会社フェニックスバイオ（Phoenix Bio）から購入し、製造元から提供された dHCGM 培地（Phoenix Bio）を用いて培養した。細胞の入手先および培地の組成の詳細は表 1 および 2 に示した。

表 1.　細胞の入手先

細胞名	入手先
Huh7	JCRB 0403
HEK293T	JCRB 9068
HepG2-hNTCP C4	Wakita（NIID）
HepAD38.7	Wakita（NIID）
PHH	Phoenix Bio

表 2.　培地の組成

細胞名	培地	添加物
Huh7	DMEM High-glucose（nacalai tesque）	10% FBS（Biosera） 1% Penicillin-Streptomycin（nacalai tesque）
HEK293T	DMEM High-glucose（nacalai tesque）	10% FBS（Biosera） 1% Penicillin-Streptomycin（nacalai tesque）
HepG2-hNTCP C4（維持）	DMEM High-glucose（nacalai tesque）	10% FBS（Biosera） 1% Penicillin-Streptomycin（nacalai tesque） 0.8% G418（nacalai tesque）
HepG2-hNTCP C4（感染）	DMEM High-glucose（nacalai tesque）	10% FBS（Biosera） 1% Penicillin-Streptomycin（nacalai tesque） 3% dimethyl sulfoxide（DMSO、nacalai tesque）
HepAD38.7	DMEM/Ham's F-12（nacalai tesque）	10% FBS（Biosera） 1% Penicillin-Streptomycin（nacalai tesque） 0.4% G418（nacalai tesque） 5 µg/mL insulin（nacalai tesque） 400 ng/mL tetracycline（nacalai tesque）
PHH	DMEM Low-glucose（Sigma-Aldrich）	10% FBS（Biological industries） 1% Penicillin-Streptomycin（Gibco） 2% DMSO（Sigma-Aldrich） 20 mM HEPES（Gibco） 5 ng/mL EGF（Sigma-Aldrich） 44 mM NaHCO3（富士フイルム） 0.25 µg/mL insulin（Sigma-Aldrich） 50 pM Dexamethasone（Sigma-Aldrich） 0.1 mM Asc-2P（富士フイルム） 15 µg/mL L-proline（富士フイルム）

1-2.　RBP を過剰発現した細胞の作製

・Huh7 細胞における RBP の過剰発現

RBP を過剰発現した Huh7 細胞は、TransIT LT-1 transfection reagent（Mirus）を用いた RBP 発現プラスミドのトランスフェクションにより作製した。Huh7 細胞を 24-well プレート（Greiner）に播種し、翌日にトランスフェクションを実施した。1 μL の TransIT LT-1 transfection reagent、0.3 μg の RBP 発現プラスミドを、50 μL の Opti-MEM（Thermo Fisher Scientific）に混合した。HBV との同時トランスフェクションに際しては、RBP 発現プラスミドに加え、1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）を 0.1 μg を混合した。室温で 15 分インキュベートした後、混合液を培養中の Huh7 細胞の培地上清に添加した。RBP を過剰発現した Huh7 細胞の作製手順は表 3 に示した。ポジティブコントロール群には、トランスフェクション翌日に 5 μM のエンテカビル（富士フイルム）を添加した。なお、N4BP1 をノックアウトした Huh7 細胞への N4BP1 タンパク質の再発現ならびに各変異タンパク質の発現プラスミド導入も、本手順に準じて実施した。

表 3.　RBP を過剰発現した Huh7 細胞の作製手順

RBP を過剰発現した Huh7 細胞の作製手順
1.　24-well プレート（Greiner）に Huh7 細胞を 0.7×10^5 cells/mL となるよう播種する。
2.　以下の組成で試薬を調製し、室温で 15 分静置する。
・Opti-MEM：50 μL
・TransIT LT-1 transfection reagent：1 μL
・RBP 発現プラスミド：0.3 μg
・1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）：0.1 μg
3.　細胞の上清に添加する。
4.　3 日後に細胞を回収し、解析に使用する。

・HepG2-hNTCP C4 細胞における RBP の過剰発現

RBP を過剰発現した HepG2-hNTCP C4 細胞はレンチウイルスベクターを用いて作製した。レンチウイルスは、HEK293T 細胞に HIV gag/pol、VSV-G、REV、pcs-II EF RBP 発現プラスミドを TransIT LT-1 transfection reagent を用いてトランスフェクションすることにより作製した。トランスフェクション 2 日後に HEK293T 細胞の培地上清を回収し、室温で 4,200 rpm、2 分遠心後、得られた上清を HepG2-hNTCP C4 細胞に添加した。レンチウイルスベクターの詳細な作製手順は表 4 に示した。

表 4.　レンチウイルスベクターの作製手順

レンチウイルスベクターの作製手順
1. 6-well コラーゲンプレート（IWAKI）に HEK293T 細胞を播種し、 2.0×10^6 cells/mL となるよう調整する。
2. TransIT LT-1 transfection reagent を用いて、以下の試薬を混合する。 Opti-MEM：200 µL、TransIT LT-1 transfection reagent：8 µL HIV gag/pol：1 µg、VSV-G：1 µg、Rev：1 µg、pCSII-EF RBP plasmid：1 µg
3. 室温で 15 分インキュベートし、HEK293T 細胞の培地上清に添加する。
4. 48 時間後に HEK293T 細胞の培地上清を回収する。
5. 回収した HEK293T 細胞の培地上清を遠心（室温、4,200 rpm、2 分）。
6. 遠心後の上清を回収する。

・PHH における N4BP1 の過剰発現

PHH における N4BP1 の発現にはアデノウイルスベクター（adenoviral vectors : AdV）を使用した。N4BP1 発現アデノウイルスベクター（N4BP1-AdV）は、アデノウイルスゲノムのコスミドカセット pAxEFwit2 を用いて構築した。このコスミドカセットは、アデノウイルスゲノムの E1 欠失領域に EF1α プロモーターとウサギ β-グロビン polyA シグナルを挟む *SwaI* クローニングサイトを有する。N4BP1 complementary DNA（cDNA）は pCS2-EF-N4BP1-HA プラスミドから調製し、*SwaI* クローニングサイトへ挿入した。アデノウイルスベクターの調製は、東京慈恵会医科大学 鐘ヶ江裕美先生に依頼し、先行研究に基づいて実施した（Nakai et al, 2007；Suzuki et al, 2015）。AdV の力価測定は Pei らの方法（Pei et al, 2012）を参考に行い、定量 PCR（quantitative PCR：qPCR）により標的細胞への導入が成功したウイルスゲノムのコピー数を測定した。N4BP1 を過剰発現した PHH を作製するため、HBV 感染の 2 日前に multiplicity of infection（MOI）5 または 30 で N4BP1 AdV を感染させた。

1-3. RBP ノックダウン細胞の作製

・培養細胞における RBP のノックダウン

RBP ノックダウン細胞は、Silencer Select siRNA（Thermo Fisher Scientific）および Lipofectamine RNAiMAX（Thermo Fisher Scientific）を用いて作製した。1.5 μL の Lipofectamine RNAiMAX と 5 pg の small interfering RNA（siRNA）を 50 μL の Opti-MEM に混合し、室温で 5 分インキュベートした後、混合液を培地上清に静かに添加した。本研究では、表 5 に示す siRNA 試薬を使用し、付属の滅菌蒸留水 200 μL に希釈して 5 pg/μL に調製した。RBP ノックダウン細胞の作製手順は表 6 に示した。作製したノックダウン細胞に対して HBV 発現プラスミドを導入する際には、siRNA 導入から 24 時間後に、前述の方法に従い TransIT LT-1 transfection reagent を用いて 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）のトランスフェクションを実施した。

表 5. 本実験に使用した siRNA

名称	メーカー	製品番号
Control siRNA	Thermo Fisher Scientific	Silencer Select Negative Control No.1 siRNA, 4390843
siZCCHC10#1	Thermo Fisher Scientific	s29507
siZCCHC10#2	Thermo Fisher Scientific	s29508
siZCCHC10#3	Thermo Fisher Scientific	s29509
siHNRNPC#1	Thermo Fisher Scientific	s6719
siHNRNPC#2	Thermo Fisher Scientific	s6720
siHNRNPC#3	Thermo Fisher Scientific	s6721
siN4BP1#1	Thermo Fisher Scientific	s18638
siN4BP1#2	Thermo Fisher Scientific	s18639

表 6. RBP ノックダウン細胞の作製手順

RBP ノックダウン細胞の作製手順
1. 24-well プレート（Greiner）に Huh7 細胞を播種し、0.7×10^5 cells/mL となるよう調整する。
2. 細胞播種から半日後、以下の溶液をそれぞれ調製する。
・Opti-MEM 25 μL + RNAiMAX 1.5 μL
・Opti-MEM 25 μL + siRNA 5 pg
3. 室温で 5 分インキュベートする。
4. 調製した両溶液を混合し、細胞の培地に添加して siRNA を導入する。

・PHH における RBP のノックダウン

PHH における RBP のノックダウンは、HBV（遺伝子型 D）感染の 2 日前に実施した。0.5 μL の Lipofectamine RNAiMAX と 5 nM の siRNA を 50 μL の Opti-MEM に混合し、細胞に導入した。HBV の感染方法はメーカーのプロトコール（後述）に準拠し、dHCGM 培地に 4% polyethylene glycol（PEG）8000 を添加して 100 genome equivalents （GEq）/cell の条件で実施した。培養培地は 4 日ごとに交換し、細胞は感染 7 日目および 10 日目に回収し、逆転写定量 PCR（reverse transcription quantitative PCR：RT-qPCR）を行った。

1-4. N4BP1 ノックアウト（knockout：KO）細胞の作製

N4BP1 KO Huh7 細胞は、pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 （pX330、Addgene）および HR110PA-1（System Biosciences）を用いた Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR Associated proteins 9（CRISPR/Cas9）システムにより作製した。まず、HR110PA-1 ベクターに由来するピューロマイシン耐性遺伝子配列を pX330 ベクターに組み込み、pX330-puro ベクターを構築した。次に、pX330-puro ベクターを *BbsI*（Biolabs）を用いて処理し、標的配列をサブクローニングした。N4BP1 KO Huh7 細胞作製の詳細な手順については、図 2 および表 7~12 に記載した。

図 2. N4BP1 の塩基配列

N4BP1 の配列の中で、上記 2 箇所に対するガイド RNA を設計した。

表 7.　Prime STAR GXL DNA Polymerase（Takara Bio）を用いた PCR 反応の手順

Prime STAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR 反応の手順
1.　以下の試薬を混合し、最終反応液量を 50 μL に調整する。
・GXL Buffer：10 μL
・dNTP：4 μL
・GXL：1 μL
・10 μM Primer (forward)：1 μL
・10 μM Primer (reverse)：1 μL
・cDNA：1 μL
・滅菌蒸留水：32 μL
2.　以下の条件で PCR 反応を実施する。
a. 98℃、2 分
b. 98℃、10 秒
c. 55℃、15 秒
d. 68℃、n 分（1 分/1 kb）
e. b-d を 30 サイクル繰り返す。
f. 68℃、2 × n 分

表 8.　pX330-puro ベクターの作製手順

pX330-puro ベクターの作製手順
1.　pX330 および HR110PA-1 を使用する。
2.　プライマー#1、#2 を用いて、pX330 から Green Fluorescent Protein（GFP）を除去したベクターをクローニングする（表 7）。
3.　プライマー#3、#4 を用いて、HR110PA-1 からピューロマイシン耐性遺伝子領域を PCR により増幅する。
4.　PCR 産物（ステップ 2 および 3）に *DpnI* を 1 μL 添加し、37℃で 1 時間インキュベートする。
5.　PCR 産物を電気泳動し、ゲル抽出を行う。
6.　In-Fusion 反応（50℃、15 分）を行う。
7.　コンピテントセル（DH5α）にトランスフォーメーション（42℃、30 秒）し、LB 寒天培地に播種する。
8.　37℃、16 時間インキュベートする。
9.　コロニーを複数選択して増幅させ、シークエンスを確認する。
10.　配列が正しく挿入されていたコロニーのミディプレップを行う。

表 9.　pX330-puro ベクターの *BbsI* 処理の手順

pX330-puro ベクターの *BbsI* 処理の手順
1.　以下の試薬を混合し、最終反応液量を 50 μL に調整する。
・pX330-puro ベクター：1 μg
・Buffer NE：5 μL
・*BbsI*：1 μL
・滅菌蒸留水：up to 50 μL
2.　反応液を 37℃で 1 時間インキュベートする。
3.　電気泳動を行い、ゲル切除後、DNA を精製する。

表 10.　インサートの作製手順

インサートの作製手順
1.　以下のプライマーを 10 μL ずつ混合する。
・10 μM Primer（#5 と#6、または#7 と#8）
2.　以下の条件で PCR 反応を 1 サイクル実施する。
a. 95℃、2 分
b. 95℃から 85℃まで 2℃/秒で冷却
c. 85℃から 20℃まで 0.1℃/秒で冷却
d. 4℃
3.　PCR 産物を滅菌蒸留水で 20 倍希釈する。

表 11.　pX330-puro-N4BP1 プラスミドの作製

pX330-puro-N4BP1 プラスミドの作製
1. インサート PCR 産物 5 μL を滅菌蒸留水 95 μL で希釈し、20 倍希釈溶液を作製する。
2. 以下の試薬を混合する。
・pX330-puro（*BbsI* 処理後）：1 μL
・インサート（20 倍希釈後）：4 μL
・Takara Solution I：5 μL
3. ライゲーション反応（16℃、30 分）を実施する。
4. コンピテントセル（DH5α）と混合し、トランスフォーメーション（42℃、30 秒）を行う。
5. アンピシリン含有 LB 寒天培地に播種し、37℃で 16 時間インキュベートする。
6. コロニーを数個選択し、ミニプレップを行う。
7. シークエンスを確認する。
8. 配列が正しく挿入されていたコロニーのミディプレップを行う。

表 12.　使用したプライマーの配列

	プライマー	配列
#1	pX330 F	CTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCC
#2	pX330 R	TGGGCCAGGATTCTCCTCGACGTCACCGCAT
#3	puro F	GAGAATCCTGGCCCAATGACCGAGTACAAGCCCACGGTGC
#4	puro R	ATCAGCGAGCTCTAGTCAGGCACCGGGCTTGCGGGTCA
#5	N4BP1① F	CACCGTTCACTGCGCCAGCTGAGA
#6	N4BP1① R	AAACTCTCAGCTGGCGCAGTGAA
#7	N4BP1② F	CACCGGCGTGAGCCTAGCCGTGCT
#8	N4BP1② R	AAACAGCACGGCTAGGCTCACGC

構築した pX330-puro-N4BP1 プラスミドを TransIT LT-1 transfection reagent を用いて Huh7 細胞に導入した後、ピューロマイシン二塩酸塩（InvivoGen）を添加して KO に成功した細胞を選択し、コロニー形成を待った。単一クローンのコロニーを単離して増殖させ、KO の確認を行った。標的遺伝子の KO は、DNA シークエンスによる遺伝子レベルの解析と、ウエスタンブロッティングによるタンパク質レベルの解析により確認した。ピューロマイシン濃度の検討手順は表 13 に示した。条件検討では、ピューロマイシン濃度を 0、0.01、0.1、0.5、1、2、3、5、10 μg/mL の 9 段階の濃度に設定して評価した。

表 13.　ピューロマイシン濃度の検討

ピューロマイシン濃度の検討
1. Huh7 細胞を 2 × 10^5 cells/mL の濃度に調整し、96-well プレートに 100 μL ずつ播種する。
2. ピューロマイシン濃度を以下の範囲で検討する。
・0　0.01　0.1　0.5　1　2　3　5　10（μg/mL）
3. 細胞播種の翌日に、上記濃度のピューロマイシン含有培地に交換する。
4. 2 日おきにピューロマイシン含有培地に交換する。
5. 7 日目に phosphate-buffered saline（PBS）で洗浄し、トリプシン処理を行う。
6. トリパンブルー10 μL を細胞懸濁液に加え、最終 20 μL に調整する。
7. セルカウンターを用いて細胞数を測定する。

N4BP1 KO 細胞のシークエンス確認は、表 14 および 15 に示した手順で実施した。得られた塩基配列の概要は図 3 および 4 に示した。

表 14.　KO 細胞のシークエンス確認手順

KO 細胞のシークエンス確認手順
1.　KO 細胞を PBS で洗浄し、トリプシン処理を行う。
2.　PBS で回収し、室温で 1,000 rpm、3 分遠心して上清を除去する。
3.　DNA 抽出キット（Qiagen）を用いて DNA を抽出する。
4.　以下の試薬を混合し、最終反応液量を 50 µL に調整する。 GXL Buffer：10 µL、dNTP：4 µL、GXL：1 µL、DNA 産物：1 µL、 10 µM Primer #9：1 µL、10 µM Primer #10：1 µL、滅菌蒸留水：32 µL
5.　以下の条件で PCR 反応を実施する。
a. 98℃、2 分
b. 98℃、10 秒
c. 55℃、15 秒
d. 68℃、1 分
e. b-d を 30 サイクル繰り返す。
f. 68℃、2 分
6.　電気泳動を行い、ゲル抽出する。
7.　Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit（Invitrogen）を用いて、以下の試薬を混合し、室温で 5 分インキュベートする。
・PCR 産物：4 µL
・Salt Solution：1 µL
・pCR-Blunt II-TOPO：1 µL
8.　コンピテントセルと混合し、トランスフォーメーション（42℃、30 秒）を行い、氷上で 30 分静置する。
9.　Super Optimal broth with Catabolite repression（SOC）培地を加え、37℃で 60 分振とう培養する。
10.　カナマイシン含有 LB 培地に播種し、37℃で 16 時間インキュベートする。
11.　生成したコロニーをカナマイシン含有 LB 培地に移し、振とう培養する。
12.　ミニプレップを行う。
13.　プライマー（#9~#15）を用いてシークエンスを確認する。

表 15.　使用したプライマーの配列

	プライマー	配列
#9	N4BP1 CRISPR PCR F	CATATATCTACATCCACCAGATCCCGCGAAAGCGG
#10	N4BP1 CRISPR PCR R	GTACTTTCGTCAGCGCCACTTTACAAATGGGGAAA
#11	N4BP1 CRISPR seq	AATGGATTTGTTGATTTTGCCCACT
#12	N4BP1 CRISPR seq	AACCATTATTGCTCTTAGAGGAAAT
#13	N4BP1 CRISPR seq	AGGACCTTCTGATCATATTGATTCC
#14	N4BP1 CRISPR seq	GCCAAATGTGGGCATGTTTGACCCC
#15	N4BP1 CRISPR seq	CAAGGATATCTTGTCTTCGTTGGGA

CRISPR①は赤の挿入型、②は 1 塩基欠損型の変異を認めた

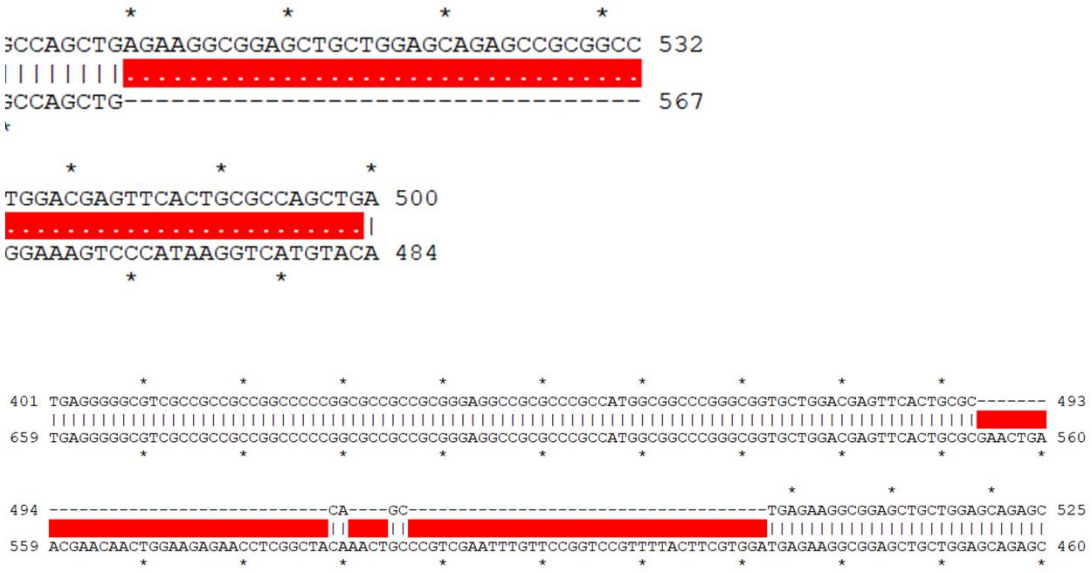

図 3.　ターゲット 1 についての塩基配列
上記 2 種類のアリルを認めた。

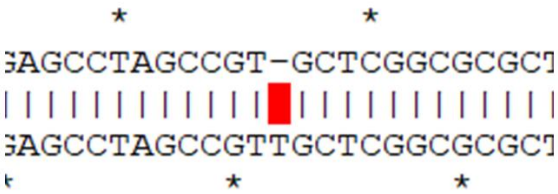

図 4.　ターゲット 2 についての塩基配列
上記の 1 塩基欠損を認めた。

2.　ウエスタンブロッティング（western blotting：WB）

細胞を 10% 2-メルカプトエタノール（Sigma-Aldrich）を含む 2 × Laemmli sample buffer（Bio Rad Laboratories）で回収した後、100℃で 10 分加熱し、急冷した。得られたライセートを 10~20% 勾配 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis（SDS-PAGE）ゲル（ATTO）に流し、分離後、polyvinylidene fluoride transfer membrane（Millipore）へ転写した。メンブレンは、1%ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin：BSA、Sigma-Aldrich）を含む Block Ace（KAC）に浸漬し、室温で 1 時間インキュベートした。その後、ブロッキング液を除去し、Can Get Signal Solution 1（TOYOBO）に適切な一次抗体を添加し、室温で 1 時間反応させた。メンブレンは、0.1% polyoxyethylene（20）sorbitan monolaurate（富士フイルム）を含む 1 × PBS（富士フイルム）で洗浄後、Can Get Signal Solution 2（TOYOBO）にウサギまたはマウス免疫グロブリンに対するホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）結合二次抗体を加えて室温で 1 時間インキュベートした。その後、Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagents（Cytiva）を添加し、LuminoGraph I（ATTO）を用いて検出を行った。WB に使用した製剤および詳細な手順は以下に示した（表 16~19）。

表 16.　使用した製品

使用物品	メーカー
2 × Laemmli Buffer	Bio Rad Laboratories
2-メルカプトエタノール	Sigma-Aldrich
電気泳動用特性試薬	nacalai tesque
ゲル e-PAGEL E-T1020L	ATTO
メンブレン（Immobilon-P）	Millipore
ろ紙（Absorbent paper）	ATTO
Block Ace	KAC
Can Get Signal	TOYOBO
ECL Prime	Amersham、Cytiva
Blotting System	ATTO
LuminoGraph I	ATTO

表 17.　使用した製剤の組成

試薬	組成
ブロッティングバッファー	Tris hydroxymethyl aminomethane（nacalai tesque）　6.06g Glycine（Aminoacetic Acid）（nacalai tesque）　7.61g メタノール（nacalai tesque）　25mL 滅菌蒸留水　475mL
ブロッキングバッファー	Block Ace（KAC） 1% BSA（Sigma-Aldrich） 滅菌蒸留水　100mL
PBS-T	PBS（富士フイルム） 0.1% Tween（富士フイルム）

表 18.　使用した抗体と希釈倍率

抗体	正式名称	メーカー	型番	希釈倍率
Rabbit	Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG（H+L）	Jackson Immuno Research	111-035-003	1:10,000
Mouse	Goat anti-Mouse IgG（H+L）Secondary Antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific	31430	1:10,000
HA	Purified anti-HA.11 Epitope Tag Antibody	BioLegend	901501	1:1,000
GAPDH	Anti GAPDH, Monoclonal Antibody, Peroxidase Conjugated	富士フイルム	015-25473	1:10,000
N4BP1	Anti N4BP1	Bethyl	A304-628A-T	1:1,000
ZCCHC10	Anti-ZCCHC10 antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich	HPA038944	1:500
HNRNPC	Anti-hnRNP C1/ C2 抗体 [EP3034Y]	abcam	ab75822	1:1,000
KHNYN	KHNYN Antibody	富士フイルム	NBP2-17041	1:1,000
ZC3H12B	ZC3H12B antibody	Gene Tex	GTX85196	1:1,000

表 19.　WB の手順

WB の手順
1. 細胞上清を除去し、PBS で洗浄する。
2. 2 × Laemmli Buffer + 10% 2-メルカプトエタノールを用いて細胞を回収する。
3. 100℃で 10 分加熱後、急冷する。
4. ゲルに各サンプルを 10 μL ずつアプライする。
5. 300 V、20 mA/枚、75 分の条件で電気泳動を行う。
6. メンブレンをメタノールに 30 秒浸した後、ブロッキングバッファーに浸す。
7. ゲルおよび吸収ろ紙をブロッキングバッファーに浸す。
8. Blotting System を用い、メンブレンとゲルをろ紙で挟んで転写を行う。
9. 50 V、100 mA/枚、60 分の条件で転写を行う。
10. メンブレンを室温で 1 時間ブロッキングする。
11. 一次抗体を Can Get Signal Solution 1 で希釈する。
12. 一次抗体を室温で 1 時間反応させる。
13. PBS-T（0.1% Tween-20）で 10 分 × 3 回洗浄する。
14. 二次抗体を Can Get Signal Solution 2 で希釈し、1 時間反応させる。
15. PBS-T（0.1% Tween-20）で 10 分 × 3 回洗浄する。
16. ECL Prime の Solution A と Solution B を等量混合する。
17. メンブレンに上記試薬を 3~5 分反応させる。
18. LuminoGraph I を用いて撮影する。

3. プラスミド

3-1. HBV 発現プラスミド

本研究では、それぞれ以下に示す遺伝子型の 1.3 倍長 HBV 発現プラスミドを使用した。pUC19-Ae_us（遺伝子型 A、Accession No. AB246337）、pGEM-Bj-JPN56（遺伝子型 B、Accession No. AB246342）、および pUC19-C_JPNAT（遺伝子型 C、Accession No. AB246345）。

3-2. RBP および N4BP1 ドメイン欠損変異体発現プラスミドの構築

RBP 発現プラスミドライブラリーは、京都大学の竹内理先生から恵与された。RBP の一覧は、表 20 に示す。各 RBP 発現プラスミドには C 末端に HA タグを付加し、pcs-II EF ベクターの *XhoI* および *XbaI* 部位の間に挿入するように構築した。

表 20.　使用した RBP ライブラリー

番号	遺伝子名	番号	遺伝子名	番号	遺伝子名	番号	遺伝子名
1	KIAA0391	34	5-MAR	67	GPATCH8	100	ELAV2
2	ZCCHC4	35	LOC10013	68	GPATCH4	101	ZC3H12B
3	ZCCHC9	36	RNF141	69	GPATCH3	102	ZC3H12D
4	ZCCHC7	37	RNF11	70	SRRD TFIP1	103	ZC3H15
5	ZCCHC11	38	RNF32	71	RBM10	104	ZC3H14
6	ZCCHC8	39	HLA-DMB	72	RBM6	105	ZC3H11A
7	ZCCHC18	40	RNF6	73	ARFRP1	106	ZFP36
8	ZCCHC17	41	PSME2	74	IQSEC3	107	ZFP36L1
9	CCHCR1	42	RNF213	75	TRIM32	108	TIA-1
10	ZCCHC10	43	SH3RF2	76	PJA1	109	TIAL1
11	ZC3H3	44	ICMT	77	FASTKD	110	ZC3H18
12	ZC3H8	45	RNF170	78	SESTED1	111	RNPD
13	SF1	46	RNF168	79	STT3A	112	CCHC6
14	QKI	47	RNF38	80	TARDBP	113	ZC3H10
15	PNPT1	48	2-MAR	81	YTHDC1	114	ZC3H6
16	ANKHD1	49	RNF41	82	RIGI	115	CCDC47
17	TDRKH	50	RNF185	83	MEX3C	116	N4BP1
18	KHDRBS3	51	RFWD2	84	KHNYN	117	CCDC47
19	FXR1	52	RNF24	85	FUBP1	118	UBR2
20	HNRNPK	53	RNF44	86	YTHDF1	119	PSME2
21	RPS3A	54	RNF144A	87	YTHDF2	120	APBA3
22	PCBP3	55	RNF123	88	YTHDF3	121	LETMD1
23	PCBP4	56	MID1	89	RPQUIN	122	YTDHF2
24	PCBP1	57	SH3RF1	90	ZC3H7A	123	IGF2BP3
25	KHDRBS1	58	RNF186	91	ZC3H7A	124	IFG2BP2
26	KHDRBS3	59	GPATCH4	92	ZC3H7B	125	PCBP2
27	HD1BP	60	GPATCH2	93	IREBP1	126	MKRN1
28	TDRKH	61	FTSJD2	94	IREBP2	127	RNF138
29	DPPA5A	62	PINX1	95	ZC3H12C	128	CALCOCO2
30	RPS3A	63	NDUFB11	96	MOV10	129	IGF2GB3
31	PNPT1	64	RBM5	97	HNRNPC	130	PCGF3
32	PNO1	65	ZGPAT	98	CPSF4	131	MEX3B
33	RNF7	66	NKRF	99	CPSF4L	132	NYNRIN

N4BP1 発現プラスミドを基に、以下の N4BP1 変異体を作製した。
・K homology（KH）-like ドメイン欠損変異体（ΔKH）: N4BP1 のアミノ酸 59–143 を欠失
・RNase ドメイン欠損変異体（ΔRNase）: N4BP1 のアミノ酸 617–769 を欠失
・D623N 変異体 : N4BP1 の 623 番目のアスパラギン酸（D）をアスパラギン（N）に置換

これらの変異 N4BP1 遺伝子を pcs-II EF ベクターの *XhoI* および *XbaI* 部位の間に挿入するために、以下のプライマーを使用し、In-Fusion Snap Assembly Master Mix（Takara Bio）を用いて実施した。詳細な手順は表 21 および 22 に示した。

表 21.　N4BP1 変異体発現プラスミドの作製手順

N4BP1 変異体発現プラスミドの作製手順
1. N4BP1 発現プラスミド（10 ng/μL）とテンプレートを用い、F1-R1 および F2-R2 のプライマーペアで PCR 反応を行う。
2. PCR 産物を電気泳動し、ゲル抽出を行う。
3. pCSII-EF ベクター（*XhoI*、*XbaI* 処理後）に In-Fusion 反応を行う。
4. アンピシリン含有 LB 寒天培地に播種し、37℃で 16 時間インキュベートする。
5. コロニーを数個ピックアップし、ミニプレップを行う。
6. シークエンスを確認し、成功したものをミディプレップする。

表 22.　使用したプライマーの配列

	プライマー	配列
#16	⊿KH F1	CGCTACCGGTCTCGAGATGGCGGCCCGGGCGGTGCT
#17	⊿KH R2	GGGTAGGTTCTCTTTCGCCCCGCAGAGCTGCAGCC
#18	⊿KH F2	CAGCTCTGCGGGGCGAAAGAGAACCTACCCAGTAG
#19	⊿KH R2	GGTACATGGTCTCGAGATCCAACACCATGGCAGAAA
#20	⊿RNase F1	CGCTACCGGTCTCGAGATGGCGGCCCGGGCGGTGCT
#21	⊿RNase R1	TTCCTTCTGAAGAAAATCCGTTCTCCCTGGTTCAT
#22	⊿RNase F2	CCAGGGAGAACGGATTTTCTTCAGAAGGAAGTCTG
#23	⊿RNase R2	GGGTAGGTTCTCTTTCGCCCCGCAGAGCTGCAGCC
#24	D623N F1	CGCTACCGGTCTCGAGATGGCGGCCCGGGCGGTGCT
#25	D623N R1	AACATTGCTCCCATTTATAACAATGTGTTTCAAAT
#26	D623N F2	AATGGGAGCAATGTTGCAATTACCCATGGTCTGAA
#27	D623N R2	GGTACATGGTCTCGAGATCCAACACCATGGCAGAAA

4. ウイルス

4-1. HBV の作製

HBV（遺伝子型 D）の作製は、先行研究（Watashi et al, 2013）を参考に実施した。まず、HepAD38.7 細胞をテトラサイクリン（400 ng/mL）含有培地で培養し、その後、HBV 粒子の産生を誘導するためにテトラサイクリンを除去した。培養上清を 6 日目および 9 日目に回収した。回収した上清を 30% PEG 8000（Sigma-Aldrich）と混合し、4℃で一晩インキュベートした。その後、4℃で 3,000 rpm、20 分遠心して濃縮した。HBV の作製に用いた試薬および具体的な手順は表 23 および 24 に示した。

表 23. PEG solution の組成

PEG solution の組成（500 mL）
PEG 8000（Sigma-Aldrich）：150 g
5 M NaCl：150 mL
0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid（EDTA、pH 8.0）：60 mL
滅菌蒸留水：up to 500 mL
調整後、オートクレーブをかけて 4℃で保存

表 24. HBV の作成手順

HBV の作成手順
1. Day 1：HepAD38.7 細胞を 1.0 × 10^5 cells/mL に調整し、10cm コラーゲンプレート（IWAKI）× 30 枚にテトラサイクリン含有培地（Tet +）で播種する。
2. Day 4：細胞がコンフルエントに達したら、テトラサイクリン非含有培地（Tet - ）に交換する。
3. Day 7：培地を Tet - 培地に交換する。
4. Day 10：滅菌ボトルに培地上清を回収し、暗所 4℃で保管する。 細胞には新たに Tet - 培地 10 mL を追加し、37℃でインキュベートする。
5. Day 13：上清を回収し、前回のボトルに追加する。50 mL ずつ分注し、4℃で 1,500 rpm、3 分遠心する。
6. 50 mL チューブに上清 25 mL と PEG solution 25 mL を加え、転倒混和する。4℃で一晩静置する。
7. Day 14：4℃で 3,000 rpm、20 分遠心する。上清を除去し、ペレットのみを回収する。DMEM 2.5 mL で懸濁し、別のチューブに回収する（20 倍濃縮）。1.5 mL チューブに 1 mL ずつ分注し、-80℃で保管する。

4-2.　HBV の感染方法

・HepG2-hNTCP C4 細胞における HBV の感染

HepG2-hNTCP C4 細胞への HBV の感染には前述した HBV（遺伝子型 D）を使用した。細胞の継代および感染には、それぞれ以下の異なる組成の培地を使用した。

継代培地：DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin + 0.8% G418

感染培地：DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin + 3% DMSO

HepG2-hNTCP C4 細胞を 24-well コラーゲンプレート（IWAKI）に播種し、3% DMSO（nacalai tesque）および 4% PEG 8000 を含む DMEM 培地で細胞を 5,000 GEq/cell の HBV に感染させ、2~3 日ごとに培地の交換を行いながら 14 日目まで培養した。感染手順の概要は表 25 に示した。なお、RBP を過剰発現させた HepG2-hNTCP C4 細胞への HBV の感染に際しては、HBV を感染させる 2 日前にレンチウイルスを導入して RBP を発現させた状態で感染を実施した。

表 25.　HBV の感染実験の手順（HepG2-hNTCP C4 細胞）

HBV の感染実験の手順（HepG2-hNTCP C4 細胞）
1.　HepG2-hNTCP C4 細胞を 24-well コラーゲンプレート（IWAKI）に 2.5×10^5 cells/mL となるよう調整して播種する（継代培地）。
2.　培地を以下の用量で調製し、500 μL/well ずつ添加する。
・HBV（5,000 GEq/cell）：1 mL
・感染培地：10.5 mL
・32% PEG：1.5 mL
3.　HBV の感染から 16 時間後、培地を交換する（感染培地）。
4.　2~3 日おきに培地を交換する（感染培地）。
5.　HBV の感染から 14 日後に細胞を回収する。

・PHH における HBV の感染

PHH には、株式会社フェニックスバイオ（Phoenix Bio）から購入した dHCGM 培地および HBV（遺伝子型 C)、または上記方法で調整した HBV（遺伝子型 D）を用いた。PHH への HBV の感染方法は、メーカーのプロトコールに従い 40% PEG 8000 を含む dHCGM 培地で、5 GEq/cell（遺伝子型 C）または 100 GEq/cell（遺伝子型 D）の条件で実施した。培地の交換は 4 日ごとに行い、7 日目、10 日目、および 14 日目に細胞を回収し、WB および RT-qPCR に使用した。PHH への HBV の感染手順は表 26 に示した。なお、RBP を過剰発現した PHH への HBV の感染は、HBV を感染させる 2 日前にアデノウイルスベクターを MOI 5 または 30 で導入した上で実施した。

表 26.　HBV の感染実験の手順（PHH）

HBV の感染実験の手順（PHH）
1.　PHH（8×10^5 cells/mL）を播種する。
2.　培地を以下の用量で調製し、500 µL/well ずつ添加する。
・HBV（遺伝子型 C 5 GEq/cell、または遺伝子型 D 100 GEq/cell）
・dHCGM 培地：10.5 mL
・32% PEG：1.5 mL（最終濃度 4%）
3.　HBV の感染から 20 時間後、培地を除去し、PBS で洗浄する。
4.　dHCGM 培地を 500 µL/well ずつ添加し、37℃でインキュベートする。
5.　4 日おきに培地を交換（感染培地）。
6.　HBV の感染から 7、10、14 日目に細胞を回収する。

5. 細胞内 HBV DNA の測定

5-1. コア内 rcDNA の測定

コア内 rcDNA の抽出は、以下の手順で実施した。まず細胞を PBS で 2 回洗浄した後、4℃で 15 分、溶解バッファー（100 mM Tris-HCl [pH 8.0]、0.2% NP-40）を用いて溶解した。次に、室温で 13,000 rpm、1 分遠心し、上清を回収した。回収した上清に 1 M $MgCl_2$、20 mg/mL の DNase I（Sigma-Aldrich）、10 mg/mL の RNase A（nacalai tesque）を加え、37℃で 3 時間以上インキュベートした。その後、500 mM EDTA および 5 M NaCl を添加し、20 mg/mL の Proteinase K（関東化学）および 10% sodium dodecyl sulfate（SDS）を加えて 55℃で 5 時間インキュベートした。HBV DNA の精製は、フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール（Sigma-Aldrich）による抽出を行い、イソプロパノール、0.5 mg/mL のグリコーゲン（nacalai tesque）、および 3 M の酢酸ナトリウムを用いて沈殿させた。沈殿後、70%エタノールで洗浄し、最終的に 50 μL の滅菌蒸留水で再溶解した。コア内 rcDNA の定量は、Power SYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystems）を用いた qPCR で行った。rcDNA のスタンダードとして、1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）を用いた。qPCR の手順は、メーカーのプロトコールに従い、まず 50℃で 2 分、次に 95℃で 10 分インキュベートして初期変性を行った。その後、95℃で 15 秒、60℃で 1 分のサイクルを 40 回繰り返してポリメラーゼ反応を実施した。本手順では、コア粒子に取り込まれた pgRNA が逆転写されて形成された rcDNA 量を主に測定している。試薬の組成（表 27）、詳細な手順（表 28）、および使用したプライマーについては、下記に示した。

表 27. 試薬の組成

試薬	組成
Lysis Buffer	1 M Tris-HCl（pH 8.0）：5 mL 10%ノニデット P40（nacalai tesque）：1mL 滅菌蒸留水：44 mL
20 mg/mL DNase I	DNase I（Roche）：100 mg 1 M Tris-HCl（pH7.5）：100 μL 1 M $MgCl_2$：5 μL 100%グリセロール：2,500 μL 滅菌蒸留水：2,395 μL

表 28.　コア内 rcDNA の測定手順

コア内 rcDNA の測定手順
1.　細胞を PBS で 2 回洗浄後、Lysis Buffer（250 µL/well）を添加して回収する。
2.　氷上で 15 分静置した後、室温で 13,000 rpm、1 分遠心する。
3.　上清 250 µL を回収し、以下の試薬を加えて調製する。
1 M $MgCl_2$：1.8 µL、20 mg/mL DNase I：3 µL
10 mg/mL RNase A：3 µL、滅菌蒸留水：42.2 µL
4.　37℃で 3 時間以上インキュベート後、室温で 13,000 rpm、1 分遠心する。
5.　上清 300 µL を回収し、以下の試薬を加えて調製する。
500 mM EDTA：7 µL、5 M NaCl：7 µL
20 mg/mL Proteinase K：3.5 µL、10% SDS：35 µL
6.　55℃ で 5 時間以上インキュベートする。
7.　フェノールクロロホルム 350 µL を加え、ボルテックス混合する。
8.　室温で 13,000 rpm、5 分遠心する。
9.　上清 250 µL を回収し、以下の試薬を加えて調製する。
・0.5 mg/mL グリコーゲン：15 µL
・3 M 酢酸ナトリウム：30 µL
・イソプロパノール：280 µL
10.　ボルテックス後、4℃で 13,000 rpm、15 分遠心し、上清を破棄する。
11.　氷冷した 70%エタノール 500 µL を加える。
12.　4℃で 13,000 rpm、5 分遠心後、風乾する。
13.　50 µL の RNase-free water で溶解する。
14.　以下の試薬を混合し、PCR 反応液（20 µL）を調製する。
SYBR Green：10 µL、10 µM Primer（forward）：1 µL、
10 µM Primer（reverse）：1 µL、Template：4 µL、滅菌蒸留水：4 µL
15.　以下の条件で qPCR を実施する。
a.　50℃：2 分
b.　95℃：10 分
c.　95℃：15 秒
d.　60℃：1 分
e.　c-d を 40 サイクル繰り返す。

コア内 rcDNA の測定に使用したプライマーは以下の通りである。
forward：5’- GGAGGGATACATAGAGGTTCCTTGA -3’
reverse：5’- GTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTC -3’

5-2.　細胞内 cccDNA の測定

細胞内 HBV cccDNA の抽出は以下の手順で実施した。まず、細胞を溶解バッファー（10 mM Tris-HCl [pH 7.4]、10 mM EDTA、0.5% SDS）で溶解し、5 M NaCl を添加した。4℃で一晩インキュベート後、4℃で 15,000 rpm、30 分遠心し、上清を回収してタンパク質を含まない DNA を単離した。単離した DNA をフェノール（nacalai tesque）、フェノール-クロロホルム-イソアミル（富士フイルム）、クロロホルム（富士フイルム）を用いて 3 回精製した。イソプロパノールおよびエタノールで DNA を沈殿させた後、Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase（Lucigen）を加え、不要な二本鎖および環状 DNA を除去することで cccDNA を濃縮した。精製した DNA は、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics）を用いて、30 μL の 10 mM Tris-Cl（pH 8.5）で抽出した。cccDNA の測定には、TaqMan Fast Advanced Master Mix（Applied Biosystems）を用いた qPCR を実施した。cccDNA のスタンダードとして、1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）を使用した。qPCR の手順はメーカーのプロトコールに従い、まず 50℃で 2 分、95℃で 10 分インキュベートして初期変性を行った。その後、95℃で 15 秒、60℃で 1 分の反応を 50 サイクル実施しポリメラーゼ反応を行った。プライマーおよびプローブは、先行研究（Watashi et al, 2013）に基づいて以下を使用した。試薬の組成（表 29）、詳細な手順（表 30）、使用したプライマーおよびプローブについては、下記に示した。

表 29.　cccDNA の Lysis buffer の組成

cccDNA の Lysis buffer の組成
1 M Tris-HCl（pH 7.4）：5 mL
0.5 M EDTA：10 mL
10% SDS：25 mL
滅菌蒸留水：460 mL

表 30.　cccDNA の測定手順

cccDNA の測定手順
1. HBV 感染細胞を PBS で 2 回洗浄し、Lysis Buffer（375 μL/well）を添加して室温で 20 分インキュベートする。
2. 細胞を回収し、5 M NaCl 100 μL を加え、4℃で一晩静置する。
3. 4℃で 15,000 rpm、30 分遠心した後、上清を回収する。
4. 等量のフェノール、フェノールクロロホルム、クロロホルムを順に加え、それぞれ室温で 15,000 rpm、5 分遠心し、上清を回収する。
5. イソプロパノール 170 μL、3 M 酢酸ナトリウム 20 μL、0.5 mg/mL グリコーゲン 1 μL を混合し、上清と等量混合。4℃で一晩静置する。
6. 4℃で 15,000 rpm、20 分遠心し、上清を破棄する。
7. 70%エタノール 500 μL で洗浄（4℃で 15,000 rpm、10 分遠心後、上清破棄）。
8. 風乾し、滅菌蒸留水 20 μL で溶解する。
9. 以下の組成で 50 μL に調製する。 DNA：20 μL、滅菌蒸留水：22 μL、25 mM ATP：2 μL、 10 × Reaction Buffer：5 μL、Plasmid-Safe DNase（10 U）：1 μL
10. 37℃で 30 分インキュベート後、70℃で 30 分インキュベートする。
11. FastGene Gel/PCR Extraction Kit を使用し、30 μL の 10 mM Tris-Cl（pH 8.5）を用いて DNA を抽出する。
12. 以下の組成で qPCR 反応液（20 μL）を調製する。
・2 × Fast Advanced Master Mix：10 μL
・10 μM Primer（forward）：1 μL
・10 μM Primer（reverse）：1 μL
・5 μM プローブ：1 μL
・サンプル：4 μL
・滅菌蒸留水：3 μL
13. 以下の条件で qPCR を実施する。
a. 50℃、2 分
b. 95℃、10 分
c. 95℃、15 秒
d. 60℃、1 分
e. c-d を 50 サイクル繰り返す。

cccDNA の測定に使用したプライマーおよびプローブは以下の通りである。
forward：5’- CGTCTGTGCCTTCTCATCTGC -3’
reverse：5’- GCACAGCTTGGAGGCTTGAA -3’
Probe：5’- CTGTAGGCATAAATTGGT -3’

5-3.　細胞内 pgRNA の測定

細胞内の HBV pgRNA を含む総 RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit（Qiagen）を使用し、製造元のプロトコールに従って抽出した。抽出した RNA は 50 μL の滅菌蒸留水に溶解し、Power SYBR Green RNA-to-Ct 1-step Kit（Applied Biosystems）を用いた RT-qPCR により測定した。pgRNA の発現量は、ハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）の発現量を基準とし、ΔΔCT 法を用いて算出した。RT-qPCR の手順はメーカーのプロトコールに従って行い、まず 50℃で 2 分、次に 95℃で 10 分インキュベートして初期変性を行った。その後、95℃で 15 秒、60℃で 1 分、ポリメラーゼ反応を 40 サイクル実施した。最終的に、95℃で 15 秒、60℃で 1 分、95℃で 15 秒のインキュベートを行い、融解曲線を測定した。詳細な手順は表 31 に示し、使用したプライマーを下記に示した。

表 31.　pgRNA の測定手順

pgRNA の測定手順
1.　HBV 感染細胞から RNA を抽出する（RNeasy Mini Kit を使用）。
2.　以下の組成で 20 μL に調製する。
・Power SYBR One-Step：10 μL
・RT Enzyme Mix：0.16 μL
・10 μM Primer（forward）：0.2 μL
・10 μM Primer（reverse）：0.2 μL
・Template：4 μL
・滅菌蒸留水：5.44 μL
3.　ΔΔCT 法を用いて以下の条件で RT-qPCR を実施する。
a.　50℃、2 分
b.　95℃、10 分
c.　95℃、15 秒
d.　60℃、1 分
e.　c-d を 40 サイクル繰り返す。
f.　95℃、15 秒
g.　60℃、1 分
h.　95℃、15 秒

pgRNA の測定に使用したプライマーは以下の通りである。

・pgRNA

forward：5’- TCCCTCGCCTCGCAGACG -3’

reverse：5’- GTTTCCCACCTTATGAGTC -3’

・GAPDH

forward：5’- AGAAGGCTGGGGCTCATTTG -3’

reverse：5’- AGGGGCCATCCACAGTCTTC -3’

6. 細胞蛍光免疫染色

Huh7 細胞および HepG2-hNTCP C4 細胞を 8-well チャンバースライド（Corning）もしくはコラーゲンコート 8-well チャンバースライド（IWAKI）に播種し、翌日に PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒド（nacalai tesque）固定および 0.2% TritonX-100（富士フイルム）による透過処理を行った。ブロッキング後、抗 N4BP1 抗体を用いて一次抗体反応を行い、4℃で一晩インキュベートした。翌日、Alexa-488 標識二次抗体（Thermo Fisher Scientific）を反応させた。4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）を含む Antifade mounting medium（Vector Laboratories）で封入し、Nikon A1R HD25 共焦点顕微鏡（Nikon）を用いて観察した。詳細な手順は表 32 に示し、使用した抗体は表 33 に示した。

表 32. 細胞蛍光免疫染色の手順

細胞蛍光免疫染色の手順
1. 細胞を 8-well チャンバースライドに播種する。
2. 翌日、PBS で 2 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドを用いて室温で 15 分固定する。
3. 0.2% TritonX-100 を含む PBS で 20 分透過処理する。
4. 2% BSA 含有 PBS を用いて室温で 1 時間ブロッキングする。
5. 抗 N4BP1 抗体を 2% BSA 含有 PBS で希釈し、4℃で一晩反応させる。
6. PBS で 3 回洗浄後、Alexa-488 標識二次抗体を室温で 1 時間反応させる。
7. PBS で 3 回洗浄後、DAPI 含有 Antifade Mounting Medium（Vector Laboratories）で封入する。
8. Nikon A1R HD25 共焦点顕微鏡を用いて観察する。

細胞蛍光免疫染色に使用した抗体は以下の通りである。

表 33. 本研究に使用した抗体

抗体名	希釈倍率	メーカー
rabbit anti-N4BP1	1:500	Bethyl
anti-Mouse IgG（H+L）Alexa Fluor Plus 488	1:1000	Thermo Fisher Scientific

7.　pgRNA の安定性評価

HepAD38.7 細胞を 12-well コラーゲンプレート（IWAKI）に播種し、Tet + 培地で一晩培養した。翌日、PBS で 2 回洗浄後、Tet - 培地に変更し、48 時間培養した。その後、N4BP1 野生型（wild type：WT）発現プラスミド、ΔKH 発現プラスミド、ΔRNase 発現プラスミド、またはコントロールベクターをそれぞれ細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後に Tet + 培地へ変更して HBV の産生を停止させた。コア内 rcDNA を測定するための細胞はテトラサイクリンを添加する 5 日前からテトラサイクリンを添加する日まで連日回収し、pgRNA を測定するための細胞はテトラサイクリンを添加後から 2、3、4 日目に回収した。コア内 rcDNA および pgRNA を含む総 RNA の抽出は、前述の方法（方法 5.　細胞内 HBV DNA の測定）に従い実施し、RT-qPCR により解析した（表 34）。

表 34.　pgRNA 分解アッセイの手順

pgRNA 分解アッセイの手順
1. HepAD38.7 細胞を 1.0 × 10^5 cells/mL に調整し、1 mL ずつ 12-well コラーゲンプレート（IWAKI）に播種する（Tet + 培地）。 また rcDNA 測定のための細胞を、手順 4 まで連日回収する。
2. 翌日、PBS で洗浄後、Tet - 培地に変更する。
3. Tet - 培地に変更から 2 日後、以下の試薬を調製し、プラスミドをトランスフェクションする。 Opti-MEM：100 µL、TransIT LT-1 transfection reagent：6 µL 各種プラスミド：3 µg
4. トランスフェクション 2 日後 PBS で 2 回洗浄後、Tet + 培地に変更する。
5. Tet + 培地に変更後、2・3・4 日目に細胞を回収し、RNA 抽出（Qiagen）および cDNA 合成（SuperScript IV）を行う。
6. qPCR で pgRNA を測定する。

8. ノーザンブロッティング（northern blotting：NB）

TransIT LT-1 transfection reagent を用い、Huh7 細胞に 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）および N4BP1 発現プラスミドを同時にトランスフェクションした。トランスフェクション後 3 日目に細胞を回収し、Isogen（NIPPON GENE）を用いて総 RNA を抽出した。得られた RNA は、1%アガロースホルムアルデヒドゲルおよび 3-モルホリンプロパンスルホン酸（3-Morpholinopropanesulfonic Acid：MOPS）緩衝液（nacalai tesque）を用いて電気泳動した。リボソーム RNA はエチジウムブロマイド染色により可視化した。分離した RNA を正電荷ナイロン膜（Roche）へ転写した。HBV RNA プローブおよび GAPDH RNA プローブはジゴキシゲニン RNA 標識キット（Roche）を用いて作製した。ハイブリダイゼーションは DIG Northern Starter kit（Roche）を用いて行い、LuminoGraph I（ATTO）を用いて撮像した。詳細な手順は表 35~39 に示した。

表 35. NB 用の細胞を回収するまでの手順

NB 用の細胞を回収するまでの手順
1. Huh7 細胞を 10 cm プレート（Greiner）に 2.0×10^5 cells/ml で播種し、37℃、5% CO_2で一晩インキュベートする。
2. 翌日、以下の試薬を混合し、室温で 15 分静置後、細胞に添加する。
・Opti-MEM：1 mL
・TransIT LT-1 transfection reagent：20 µL
・N4BP1 または GFP 発現プラスミド：6 µg
・1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）：2 µg
3. 37℃、5% CO_2で 60~72 時間インキュベートする。
4. 培地を除去し、PBS で洗浄後、Isogen 1 mL を添加し、セルスクレイパーで細胞を剥離・回収する。ピペッティングで溶解し、室温で 5 分静置する。
5. クロロホルム 200 µL を添加し、3 分ボルテックス後、3 分静置する。
6. 4℃で 15,000 rpm、15 分遠心する。
7. 上清 RNA（600 µL）を回収し、等量のイソプロパノールを添加し、室温で 5~10 分静置する。
8. 4℃で 15,000 rpm、10 分遠心し、上清を除去する。
9. 70%エタノール 1 mL を加えてボルテックス後、4℃で 15,000 rpm、15 分遠心する。
10. 上清を除去し、ペレットを 5 分風乾する。
11. RNase Free Water または Tris-EDTA Buffer を用いて 100 µL に溶解する。
12. 10 µg/µL になるよう希釈し、-80℃で保存する。

表 36.　NB 用のプローブの作製手順

NB 用のプローブの作製手順
1.　以下のように調整し、37℃で一晩インキュベートする。
・*EcoRI-HF*（20,000 units/mL）：60 μL
・*HindIII-HF*（20,000 units/mL）：60 μL
・1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）（1 μg/μL）：150 μL
・Smart cut：30 μL
2.　0.8~1%アガロースゲルで電気泳動し、4,017 bp のバンドを切り出す。
3.　Mini Elute Gel Extraction kit（Qiagen）を用いてゲル抽出し、滅菌蒸留水で溶出する。Nanodrop を用いて濃度を確認する（62.5 ng/μL 以上）。
4.　DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II（Roche）および DIG-High Prime（Roche）を用いて DNA ラベル化を行う。
5.　1 μg のテンプレート DNA を滅菌蒸留水で希釈し、16 μL に調製する。
6.　100℃ で 10 分インキュベートして DNA を熱変性後、氷水で 10 分急冷する。
7.　よく混ぜた DIG-High Prime 4 μL を変性 DNA に加え、混和する。
8.　37℃で 20 時間インキュベートする。最終的に 20 μL（約 115 ng/μL）となる。
9.　RNase Free Water を 80 μL 加えて 100 μL に調整する。
10.　High Pure PCR Product Purification Kit の結合バッファーを 500 μL 添加して混合する。
11.　回収用チューブに High Pure フィルターチューブを差し、サンプルを添加して室温で 15,000 rpm、1 分遠心する。
12.　500 μL の洗浄バッファーを添加し、室温で 15,000rpm、1 分遠心する。
13.　200 μL の洗浄バッファーを添加し、室温で 15,000rpm、1 分遠心する。
14.　50 μL の溶出バッファーを添加し、15 分静置後に室温で 15,000rpm、1 分遠心する。
15.　上記ステップを再度行い、計 100 μL で溶出する（最終濃度 30~40 ng/μL）。

表 37.　プローブの定量および検出の手順

プローブの定量および検出の手順
1. DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II を使用し、ラベル化されたプローブおよび DIG ラベルコントロール DNA を 10 pg/μL に希釈する。
2. 以下のバッファーを準備する：DIG Wash and Block Buffer Set（Roche）
・10 × マレイン酸バッファー：5 mL + 45 mL 超純水で希釈
・10 × Wash Buffer：30 mL
・10 × Detection Buffer：超純水で 10 倍希釈（1 × Buffer を調製）
・10 × Blocking Buffer：使用前に転倒混和し、1 × マレイン酸バッファーで 10 倍希釈（30 mL）
3. ラベル化プローブおよびコントロール DNA から 1 μL ずつをナイロンメンブレンにスポットし、キムタオルの上に配置する。
4. UV クロスリンク（120 mJ/cm²）を行い、核酸をメンブレンに固定化する。
5. メンブレンを 10~15 mL の 1 × マレイン酸バッファーに浸し、振とうしながら室温で 2 分インキュベートする。
6. 1 × Blocking Buffer（10~15 mL）に浸し、30 分室温で振とうする。
7. 抗体（Anti-DIG-AP Fab fragments）1 μL を 1 × Blocking Buffer 10 mL に添加し、使用前に 4℃で 10,000 rpm、5 分遠心する。
8. 抗体溶液 10 mL を添加し、30 分室温で振とうする。
9. 1 × Wash Buffer（10~15 mL）で 15 分、室温で 2 回振とうする。
10. Detection Buffer（10~15 mL）で 5 分振とうし、平衡化する。
11. CDP-Star（Sigma-Aldrich）を 0.2 mL 滴下し、均一に広げる。
12. 気泡が入らないようメンブレンを密着させ、室温で 5 分インキュベートする。
13. 余剰な溶液を除去し、LuminoGraph I を用いて検出する。

表 38.　電気泳動および転写の手順

電気泳動および転写の手順
1. ゲルおよびバッファーの作製
①NB 用ゲルの作製（1 枚あたり）
・アガロース：1.0 g
・10 × MOPS：10 mL
・diethyl pyrocarbonate（DEPC）処理水：84.5 mL
・Ethidium Bromide（10 mg/mL）：1 μL
・ホルムアルデヒド：5.5 mL
②Denaturing Loading Buffer（12.5 mL）
・ホルムアミド：6.25 mL
・10 × MOPS：1.25 mL
・ホルムアルデヒド：2.19 mL
・10 × Loading Buffer：1.25 mL
・超純水：1.56 mL
③Running Buffer（1 × MOPS）
・10 × MOPS：50 mL
・超純水：450 mL
2.　サンプル調整
2-1.　回収した RNA（20 μg）を RNase Free チューブに分注する。
2-2.　SpeedVac を用いて完全乾燥する。
2-3.　Denaturing Loading Buffer（30 μL）を添加してボルテックスし、65℃で 10 分加熱する。
2-4.　ボルテックスし、65℃で 5 分加熱後に、氷上で 1 分冷却する。
2-5.　ボルテックスし、氷上に静置する。
3.　電気泳動、転写
3-1.　調製したサンプルをゲルにアプライする。
3-2.　4℃、50 V で約 2 時間電気泳動する。
3-3.　泳動終了後、ゲルを撮影する（ribosomal RNA 確認）。
3-4.　ゲルを超純水で 30 分振とうする。
3-5.　メンブレンを 10 × Saline Sodium Citrate Buffer（SSC）に浸す。
3-6.　ブロッティング装置に 10 × SSC を入れ、メンブレンをろ紙とキムタオルで挟んで室温で一晩静置する。

表 39.　ハイブリダイゼーションおよび検出の手順

ハイブリダイゼーションおよび検出の手順
1.　DIG Easy Hyb Buffer（50℃）を用いて 1 時間インキュベートする。
2.　メンブレンを 2 × SSC で 1 分洗浄後、UV クロスリンク（120 mJ/cm²）を実施する。
3.　メンブレンを DIG Easy Hyb Buffer で 50℃、1 時間振とうする。
4.　以下の組成でプローブを調製する。
・HBV プローブ：200 ng + 滅菌蒸留水 50 µL
・GAPDH プローブ：10 ng + 滅菌蒸留水 50 µL
・100℃で 5 分インキュベートし、氷水で 1 分以上急冷する。
5.　プローブを全量添加し、50℃で一晩インキュベートする。
6.　以下のバッファーを準備する。
①Buffer 1（2 × SSC、0.1% SDS）
②Buffer 2（0.1 × SSC、0.1% SDS、68℃加温）
③DIG Wash and Block Buffer Set
・10 × マレイン酸バッファー：20 mL（超純水で希釈）
・10 × Wash Buffer：40 mL（超純水で希釈）
・10 × Detection Buffer：10 mL（超純水で希釈）
・10 × Blocking Buffer：20 ml（1 × マレイン酸バッファーで 10 倍希釈）
④抗体溶液
Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments を 4℃で 10,000 rpm、5 分遠心後、1 µL を 1 × Blocking Buffer（10 mL）に添加する。
7.　メンブレンを Buffer 1 を用いて 5 分、室温で 2 回振とうする。
8.　Buffer 2 を用いて 15 分、68℃で 2 回振とうする。
9.　1 × Wash Buffer を用いて 5 分、室温で 1 回振とうする。
10.　1 × Blocking Buffer を用いて 30 分、室温で 1 回振とうする。
11.　抗体溶液（20 mL）を用いて 30 分、室温で 1 回振とうする。
12.　1 × Wash Buffer を用いて 15 分、室温で 2 回振とうする。
13.　Detection Buffer を用いて 5 分、室温で 1 回振とうする。
14.　メンブレンに CDP-Star を滴下し、LuminoGraph I を用いて検出する。

9. 薬剤処理アッセイ

Huh7 細胞、HepG2-hNTCP C4 細胞および PHH に対し、IFN-α（1,000 U/mL、PBL Assay Science）または IFN-λ（100 ng/mL、Pepro Tech）によるサイトカイン刺激を行った。薬剤刺激後 6 時間、24 時間、48 時間に細胞を回収し、RNeasy Mini Kit を用いて総 RNA を抽出した。得られた RNA から、SuperScript IV VILO Master Mix（Invitrogen）を用いて cDNA を合成した。また WB 解析用のサンプルとして、細胞を 10% 2-メルカプトエタノールを含む 2 × Laemmli サンプルバッファーで溶解し、前述の手順に従い処理した。qPCR は Power SYBR Green PCR Master Mix を用いて実施した。N4BP1 および ISG15 の mRNA の発現レベルは、GAPDH の発現量を基準として正規化し、ΔΔCT 法により算出した。本実験の手順（表 40）および使用したプライマーの配列は以下に示した。

表 40. 薬剤処理アッセイの手順

薬剤処理アッセイの手順
1. 細胞を播種する。
2. 翌日、いずれかの薬剤を以下の用量で培地に添加する。
・IFN-α：1,000 U/mL
・IFN-λ：100 ng/mL
3. 薬剤添加から 6、24、48 時間後に細胞を回収する。
4. qPCR 用の細胞は RNA 抽出（Qiagen）を行い、Super Script IV を用いて cDNA 合成する。
5. WB、qPCR により遺伝子発現を確認する。 （手順は「ウエスタンブロッティング」、「pgRNA の測定手順」を参照）

pgRNA の測定に使用したプライマーの配列は以下の通りである。

・N4BP1

forward：5’- CCCGATGATCCTCTGGGAAG -3’

reverse：5’- TTTGGCAGGGCACTGAGTAG -3’

・ISG15

forward：5’- ACTCATCTTTGCCAGTACAGGAG -3’

reverse：5’- CAGCATCTTCACCGTCAGGTC -3’

・GAPDH

forward：5’- AGAAGGCTGGGGCTCATTTG -3’

reverse：5’- AGGGGCCATCCACAGTCTTC -3’

10.　RNA 免疫沈降（RNA Immunoprecipitation、RIP）アッセイ

Huh7 細胞に対し、1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）および N4BP1 WT、ドメイン欠損変異体、または HA コントロールベクターを TransIT LT-1 transfection reagent を用いて同時にトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収した。回収した細胞を HA タグモノクローナル抗体磁気ビーズ（Medical & Biological Laboratories Co.）を用いて免疫沈降した。免疫沈降および RNA 抽出は、RiboCluster Profiler RIP-Assay Kit（Medical & Biological Laboratories Co.）を用い、以下の手順の通りに実施した（表 41）。沈降したサンプルについて、WB および pgRNA の qPCR を前述の方法に従い測定した（方法 2.　ウエスタンブロッティング、方法 5-3.　細胞内 pgRNA の測定）。

表 41.　RNA 免疫沈降（RIP アッセイ）の手順

RNA 免疫沈降（RIP アッセイ）の手順
1. RiboCluster Profiler RIP-Assay Kit を使用する。
2. Huh7 細胞を 6-well プレートに播種し、1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）と各発現プラスミドを同時にトランスフェクションする。
3. トランスフェクションから 3 日後に細胞を回収する。
4. 以下の試薬を調整する。 Lysis Buffer：Dithiothreitol 1.5 mM、Aprotinin 10 μg/mL、Leupeptin 5 μg/mL、Phenylmethylsulfonyl fluoride 0.5mM、RNase inhibitor（192 U/mL、Takara Bio） Wash Buffer：Dithiothreitol　1.5 mM、RNase inhibitor（142 U/mL）
5. PBS で細胞を洗浄後、セルスクレイパーで回収して遠心（4℃、300 g、5 分）。PBS で計 5 回洗浄し、ペレットのみにして Lysis Buffer 500 μL を添加してボルテックスする。
6. 総 RNA 用に 20 μL を分注し、-80℃で保管する。 残りの Lysis Buffer を 4℃で 10 分静置し、遠心する（4℃、12,000 g、5 分）。
7. HA 磁気ビーズを Lysis Buffer で洗浄（遠心：4℃、2,000 g、1 分）し、細胞サンプルに添加する。4℃で 3 時間ローテーション後、遠心する（4℃、2,000 g、1 分）。Wash Buffer で 4 回洗浄する（4℃、2,000 g、1 分）。
8. 1 μL の Wash Buffer を加えて混合し、遠心（4℃、2,000 g、1 分）して上清を破棄する。
9. 手順 6 の総 RNA サンプルを準備し、Solution I 10 μL + Solution II 390 μL を加えてボルテックスし、Solution III 250 μL を加えてボルテックス後、遠心（室温、2,000 g、2 分）。上清を 2 μL の Solution IV と混合する。
10. イソプロパノール 600 μL を加えボルテックスし、-20℃で 20 分以上インキュベートする。
11. 遠心（4℃、12,000 g、10 分）して、上清を破棄し、70%エタノール 500 μL を用いて洗浄する（遠心：4℃、12,000 g、3 分）。 ペレットを風乾させ、20 μL の nuclease-free water で溶解する。
12. 上記手順に従い pgRNA を qPCR により測定する。 また GAPDH、HA タンパク質を WB により測定する。

11. HBeAg CLIA および HBsAg ELISA

HBeAg を化学発光酵素免疫測定法（clinical laboratory improvement amendments：CLIA）により測定し、HBsAg を酵素結合免疫吸着測定法（enzyme-linked immuno sorbent assay：ELISA）により測定した。測定は使用したキットのメーカー提供プロトコールに準拠して実施し、以下の手順で実施した（表 42、表 43）。

表 42. HBeAg の測定手順：HBeAg CLIA（Ig Biotechnology）

HBeAg CLIA の手順
1. 試薬を準備する。
・すべての試薬を室温に 30 分放置し、使用前に穏やかに混合する。
・Substrate A および Substrate B を等量混合し、20 分以内に使用する。
2. 各 well にサンプルまたはスタンダードを 50 μL 添加する。
3. 各 well に酵素標識抗体を 50 μL 添加し、60 秒混合する。
4. 37℃で 60 分インキュベートする。
5. 洗浄 Buffer 350 μL/well を添加し、計 6 回洗浄を行う。
6. 基質溶液 50 μL/well を添加する。
7. ルミノメーター（Infinite M Plex、Tecan）を用いて吸光度を測定する。

表 43.　HBsAg の測定手順：HBs S Antigen Quantitative ELISA Kit, Rapid-II（Takara Bio）

HBs S Antigen Quantitative ELISA Kit, Rapid-II の手順
1.　試薬の調整
・滅菌蒸留水 190 mL + Buffer A 10 mL を混合する。
・滅菌蒸留水 20 mL + 反応 Buffer 10 mL を混合する。
・標準抗原を Buffer A 1 mL で溶解する（100 nUnit/mL）
2.　スタンダードの調整
・Buffer A 900 µL に 100 nUnit/mL 抗原原液 100 µL を添加し、10 nUnit/mL の抗原溶液を作製する。
・同様の手順で Buffer A により希釈系列を作製する。
3.　サンプルの調整
・Buffer A 80 µL + サンプル 40 µL を混合する。
4.　プレートにスタンダードを 100 µL/well 分注し、25℃で 1 時間インキュベートする。
5.　検出抗体を反応バッファーで 1,000 倍希釈する。
6.　プレートの反応液を除去し、Buffer A 300 µL/well を用いて 3 回洗浄する。
7.　検出抗体溶液を各 well へ 100 µL ずつ分注し、25℃で 1 時間インキュベートする。
8.　反応液を除去し、Buffer A 300 µL を用いて 5 回洗浄する。
9.　発光試薬 100 µL/well 分注し、遮光して室温で 30 分インキュベートする。
10.　発色反応停止液を 50 µL/well 添加する。
11.　プレートリーダー（吸収波長 450 nm）で発光度を測定する。

12. HBV プロモーターアッセイ

HBV 遺伝子型 A の各プロモーター配列（CURS BCP、EnhI-X、PreS1、PreS2）をホタルルシフェラーゼ（Firefly luciferase）遺伝子上流に配置したレポータープラスミドを構築し、Huh7 細胞へ導入した安定発現細胞株を使用した（Huh7 GL4.18 CURS_BCP_AeUS、Huh7 GL4.18 EnhIX-Pro_AeUS、Huh7 GL4.18 preS1-Pro_AeUS、Huh7 GL4.18 preS2-Pro_AeUS）。これらの細胞株は、山梨大学 森石恆司先生より恵与された（Yamashita et al, 2017）。トランスフェクション効率の補正用として、ウミシイタケルシフェラーゼ（Renilla luciferase）遺伝子をヒト β-アクチンプロモーター制御下で発現する、pGL4.77 β-アクチンプラスミドを作製した。各細胞に pcs-II EF N4BP1 発現プラスミドまたは pcs-II EF GFP 発現プラスミド（コントロール）、そして Renilla luciferase がコードされている pGL4.77 β-アクチンプラスミドをトランスフェクションした。pGL4.77 β-アクチンプラスミドは、pDRIVE5SEAP-hβAct/RU5’（InvivoGen）から β-アクチンプロモーター断片（*XbaI*/*HindIII*）を切り出し、pGL4.77 [hRlucP/Hygro]（Promega）の *NheI*/*HindIII* サイトへクローニングすることで構築した。これらのプラスミドは山梨大学 森石恆司先生より恵与された。トランスフェクション後の細胞において、Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega）を用いて Firefly luciferase 活性および Renilla luciferase 活性を測定した。手順は表 44 に示した。

表 44. HBV プロモーターアッセイの手順

HBV プロモーターアッセイの手順
1. 培地の組成：
・DMEM High glucose
・10% FBS
・1% Penicillin/Streptomycin
・1% Sodium pyruvate solution（Sigma-Aldrich）
・1% MEM Non-essential Amino Acid Solution（100 ×）（Sigma-Aldrich）
・1% G418
2. 細胞を 4×10^4 cells/well となるようプレートに播種する。
3. 翌日、TransIT LT-1 transfection reagent を用いて N4BP1 発現プラスミドをトランスフェクションする。
4. トランスフェクションから 2 日後にルシフェラーゼ活性を測定する。

13. RNA シークエンス

PHH における RNA シークエンス解析を実施した。N4BP1 を過剰発現した PHH に対し、HBV（遺伝子型 C：5 GEq/cell）を感染させ、3 日後に RNeasy Mini Kit（Qiagen）を用いて総 RNA を抽出した。RNA シークエンスは大阪大学 微生物病研究所 ゲノム情報解析センターに依頼し実施した。解析には N4BP1 を過剰発現した群（2well）とコントロール群（2well）のサンプルを用いた。トランスクリプトーム解析は、Illumina NovaSeq 6000 プラットフォームを用いた 101 bp シングルエンドモードで実施した。得られたリードは、TopHat version 2.2.1（マッピング）、Bowtie 2 version 2.2.3（配列アライメント）、SAMtools version 1.0（データ処理）を用いてヒト参照ゲノム（hg19）へマッピングした。発現カウントが 50 未満の遺伝子を除外した後、DESeq2 package（version 1.42.0）を用いて差次的遺伝子発現解析を実施した（Love et al, 2014）。統計的有意性の基準として、adjusted P-value < 0.1、および absolute fold change > 2 の条件を満たす遺伝子を有意に発現変動した遺伝子と定義した。その後、差次的発現遺伝子（DEGs）のパスウェイ解析を、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes（KEGG）データベース（Ogata et al, 1999）を用いて clusterProfiler package（version 4.10.0）（Wu et al, 2021）により実施した。さらに、データの可視化には ggplot2 package（version 3.5.1）（Wickham, 2016）を使用した。

本研究の RNA シークエンスデータは Gene Expression Omnibus（GEO）に登録されており、以下のリンクからアクセス可能である（The accession No.：GSE225322）。

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE225322.

14. 臨床検体における N4BP1 の発現解析

臨床検体における N4BP1 の発現を評価するため、HBV 関連肝細胞癌（HBV-HCC）の切除検体を使用した。対象とした検体は、HBs 抗原（HBsAg）陽性、HBe 抗原（HBeAg）陰性、HBe 抗体（HBeAb）陽性であった。検体を HBV DNA 陽性群（n＝9）および陰性群（n＝8）に分類し、すべての症例において非癌部位の組織を使用した。切除組織から RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出し、N4BP1 および ISG15 の発現レベルを、前述の方法に従い qPCR により測定した。本研究は、北海道大学大学院医学研究院・医の倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号：No.14-015、022-0195）。また、すべての患者から検体使用に関する同意書を取得し、オプトアウトの機会を提供した。

15.　single cell RNA sequencing（scRNA-seq）解析

慢性 B 型肝炎（chronic hepatitis B：CHB）患者における N4BP1 の発現を評価するため、公的に利用可能な肝生検由来の scRNA-seq データ（Narmada et al, 2024）を解析した。本解析では、欧州肝臓学会（European Association for the Study of the Liver）（EASL, 2017）による分類に基づき、HBV 感染の第 3 相（Phase 3）に分類される不活性キャリア（inactive carrier）、第 4 相（Phase 4）に分類される HBeAg 陰性慢性肝炎（HBeAg-negative chronic hepatitis）、および機能的治癒（functionally cured）とされた患者群を比較した。Phase 3 および Phase 4 の患者群は、HBeAg 陰性であり、HBsAg の発現レベルが低〜中程度、HBV DNA 量が低いという共通の特徴を有している。全ての公的データは sratoolkit v3.0.0 を用いて取得し、cellranger v8.0.1 pipeline（Zheng et al, 2017）を用いてリードを GRCh38 ゲノムおよび 10 × Chromium によるアノテーションデータにマッピングした。得られた raw feature-barcode matrix は scanpy v1.7.1（Wolf et al, 2018）にインポートし、元の scRNA-seq データ取得研究で用いられた手法に準じてスケーリングおよび正規化を行った。細胞のアノテーションは Azimuth（Hao et al, 2021）を用いて行い、その結果を基に N4BP1 および ISG15 が発現する肝細胞を抽出し、それぞれの平均発現レベルを解析した。

本研究で参照した scRNA-seq データは、Sequence Read Archive に BioProject PRJNA1096305 として登録されている。BioProject 内で使用したアクセッション番号は以下の通りである。SRR28562212、SRR28562213、SRR28562215、SRR28562246、SRR28562250、SRR28562251、SRR28562253、SRR28562255、SRR28562256、SRR28562259

16.　統計解析

データは 3 回以上の独立した実験の平均値を使用した。図中のデータは、すべて平均値 ± 標準偏差（standard deviation：SD）として示した。統計解析は Mann-Whitney U 検定を用いて行い、P 値 ＜0.05 を統計的に有意と判定した。統計解析には JMP Pro version 16 を使用した。

結果

1. RBP を過剰発現した細胞を用いたスクリーニングにより、5 種類の RBP を選定した

1-1. HBV プラスミドおよび RBP を過剰発現した細胞を用いたスクリーニング

HBV の増殖に関与する新規の RBP を同定するため、132 種類の RBP 発現プラスミドのライブラリー（表 20）を用いたスクリーニングを実施した。Huh7 細胞に RBP 発現プラスミドおよび 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）を同時にトランスフェクションし、3 日目に細胞を回収した。回収した細胞からコア内 rcDNA レベルを測定し、HBV の増殖に影響を与える RBP の同定を試みた。ポジティブコントロールとして、トランスフェクションの翌日に 5 μM のエンテカビル（富士フイルム）を添加した細胞を使用した。GFP 発現プラスミドをトランスフェクションした細胞をコントロール群とし、コア内 rcDNA 量がコントロール群の 0.5 倍以下となる因子を候補として選定した。それぞれのコア内 rcDNA を測定した結果、132 種類の RBP のうち 23 種類において、コントロールと比較して 50%以上のコア内 rcDNA レベルの低下が認められた（図 5、表 45）。

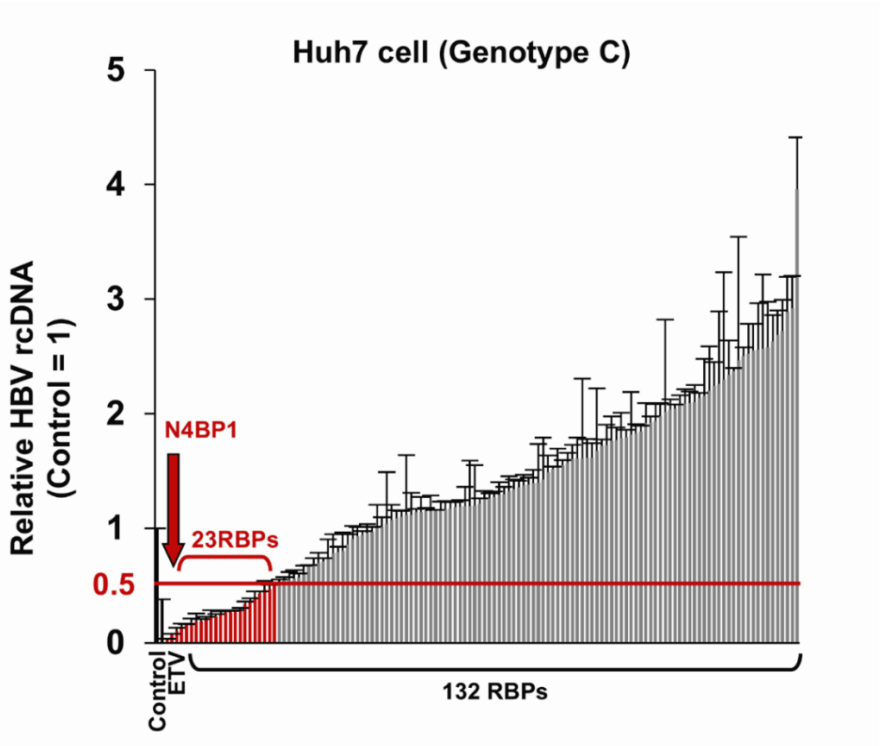

図 5. HBV 発現プラスミドを用いたスクリーニングの結果

Huh7 細胞に 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）と 132 種類の RBP 発現プラスミドを同時にトランスフェクションし、3 日目にコア内 rcDNA レベルを測定した。コントロールの 50%未満をカットオフ値とした。

表 45.　50%以上のコア内 rcDNA レベルの低下が認められた因子

N4BP1	ELAV21
PJA1	RNPD
KHNYN	ZCCHC10
MZC3H7B	ELAV2
KHDRBS1	PSME2
IFG2BP2	TIA1
ZC3H7B	PCBP2
ZC3H12B	ZC3H12D
MOV10	HNRNPC
HUR	KHDRBS3
PCBP4	ZGPAT
AUF1	

1-2.　HBV 感染および RBP を過剰発現した細胞を用いたスクリーニング

次にこれら 23 種類の RBP が HBV の侵入および複製に与える影響を検討した。HepG2-hNTCP C4 細胞に各 RBP をレンチウイルスを感染させることで過剰発現させた後、HBV（遺伝子型 D）を感染させた。HBV 感染 14 日目に細胞を回収し、コア内 rcDNA レベルを測定した。その結果、23 種類の RBP のうち 7 種類（N4BP1、TIA-1、Zinc Finger CCCH-Type Containing 12B：ZC3H12B、Praja Ring Finger Ubiquitin Ligase 1：PJA1、Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C：HNRNPC、Zinc Finger CCHC-Type Containing 10 : ZCCHC10、KH And NYN Domain Containing：KHNYN）において、コントロールと比較して rcDNA レベルの低下を認めた（図 6）。これらの因子のうち、TIA-1 および PJA1 については、既に先行研究により HBs 抗原発現および HBV の転写・複製を抑制することが報告されていたため（Tang et al, 2008；Xu et al, 2018）、本検討から除外した。

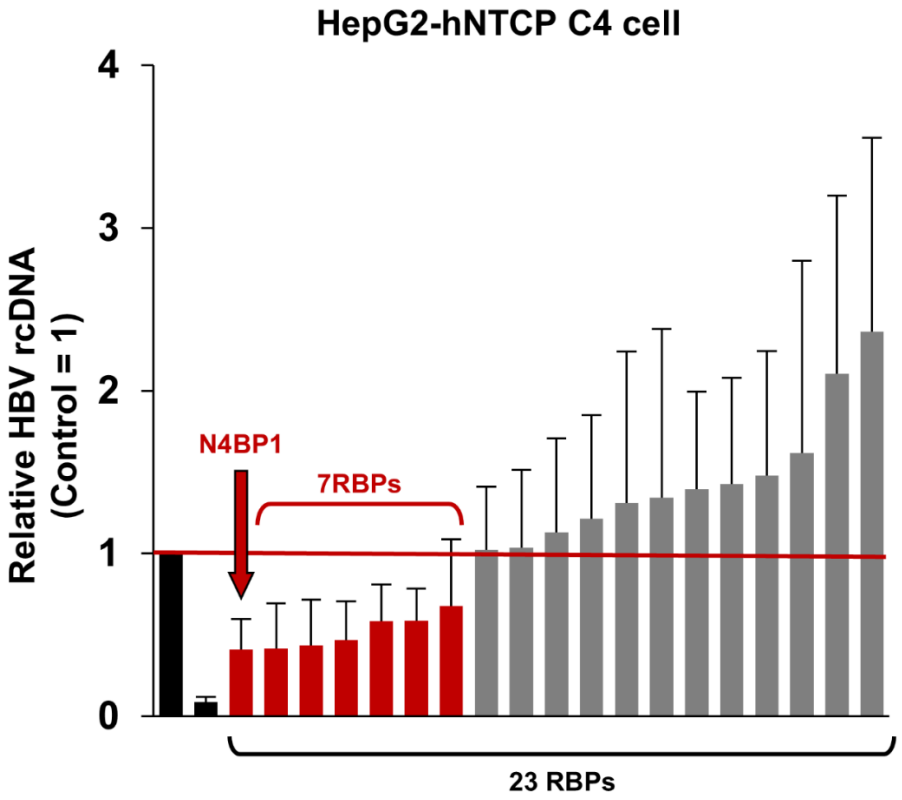

図 6.　HBV 感染系によるスクリーニングの結果

23 種類の RBP をそれぞれ過剰発現した HepG2-hNTCP C4 細胞に、HBV（遺伝子型 D）を感染させ、感染後 14 日目に細胞を回収してコア内 rcDNA レベルを測定した。コントロール未満をカットオフ値とした。

2.　4 種類の RBP（N4BP1、HNRNPC、ZCCHC10、KHNYN）が、肝癌細胞株において内在的に発現していた

RBP を過剰発現した細胞を用いたスクリーニングにより選定された 5 種類の RBP（N4BP1、ZC3H12B、HNRNPC、ZCCHC10、KHNYN）について、Huh7 細胞および HepG2-hNTCP C4 細胞における内在性発現を WB により検討した。その結果、ZC3H12B を除く 4 種類の RBP（N4BP1、HNRNPC、ZCCHC10、KHNYN）が、両肝癌細胞株において内在的に発現していることが確認された（図 7）。一方、ZC3H12B については WB において発現を認めず、「The Human Protein Atlas」（The Human Protein Atlas, 2024）でも肝細胞における発現が低いことが報告されていることから、本研究における以後の解析対象から除外した。

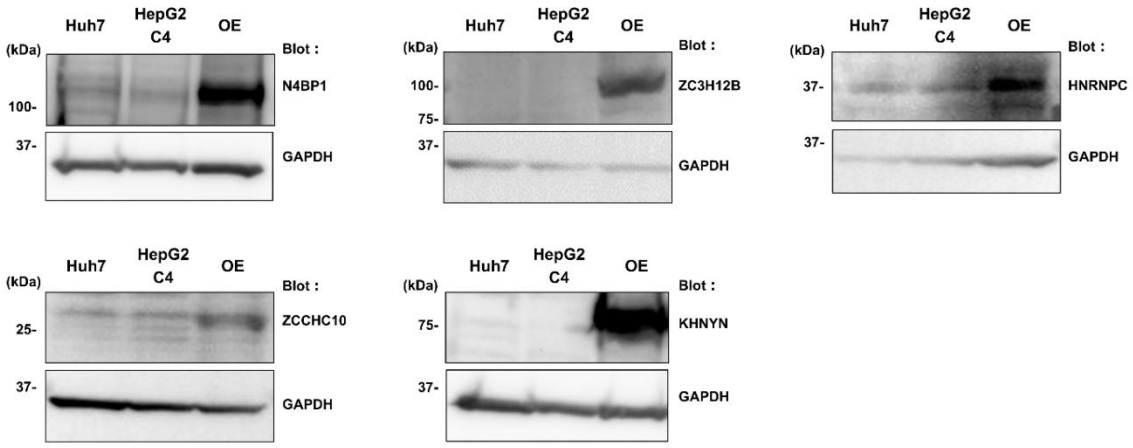

図 7.　RBP の内在性発現確認の WB

スクリーニングにより同定された 5 種類の RBP（N4BP1、ZC3H12B、HNRNPC、ZCCHC10、KHNYN）について、Huh7 細胞および HepG2-hNTCP C4 細胞における内在性発現を、WB により検討した。ポジティブコントロールとして、RBP 発現プラスミドをトランスフェクションした Huh7 細胞を使用した。HepG2 C4：HepG2-hNTCP C4 細胞、OE：RBP を過剰発現した Huh7 細胞

3. RBP のノックダウンを行い、N4BP1 を選定した

Huh7 細胞を使用し、N4BP1、HNRNPC、KHNYN、ZCCHC10 が HBV ゲノムの複製に及ぼす影響を評価した。siRNA を用いて各 RBP の発現をノックダウンした状態で、1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）をトランスフェクションし、コア内 rcDNA レベルを測定した。ノックダウンの効率は WB により確認し、ポジティブコントロール群としてエンテカビルを投与した細胞を使用した。その結果、ZCCHC10、HNRNPC、KHNYN では、タンパク質の発現が抑制されても rcDNA レベルの一貫した増加は認められなかった。一方、N4BP1 のノックダウンにおいては、いずれの siRNA を使用した場合でもコア内 rcDNA レベルの安定した増加が認められた（図 8）。この結果から、N4BP1 が HBV ゲノムの複製を制御する宿主因子であることが示唆されたため、本研究では N4BP1 に着目して解析を進めた。

さらに、N4BP1 のノックダウンが PHH における pgRNA レベルに及ぼす影響を検討した。N4BP1 siRNA #2 を HBV 感染の 2 日前にトランスフェクションし、7 日目および 10 日目に pgRNA レベルを測定した結果、Control siRNA と比較して有意な増加が認められた（図 9）。また、N4BP1 の細胞内局在を未処理の Huh7 細胞および HepG2-hNTCP C4 細胞において解析したところ、N4BP1 は細胞質および核の両方に局在することが確認された（図 10）。

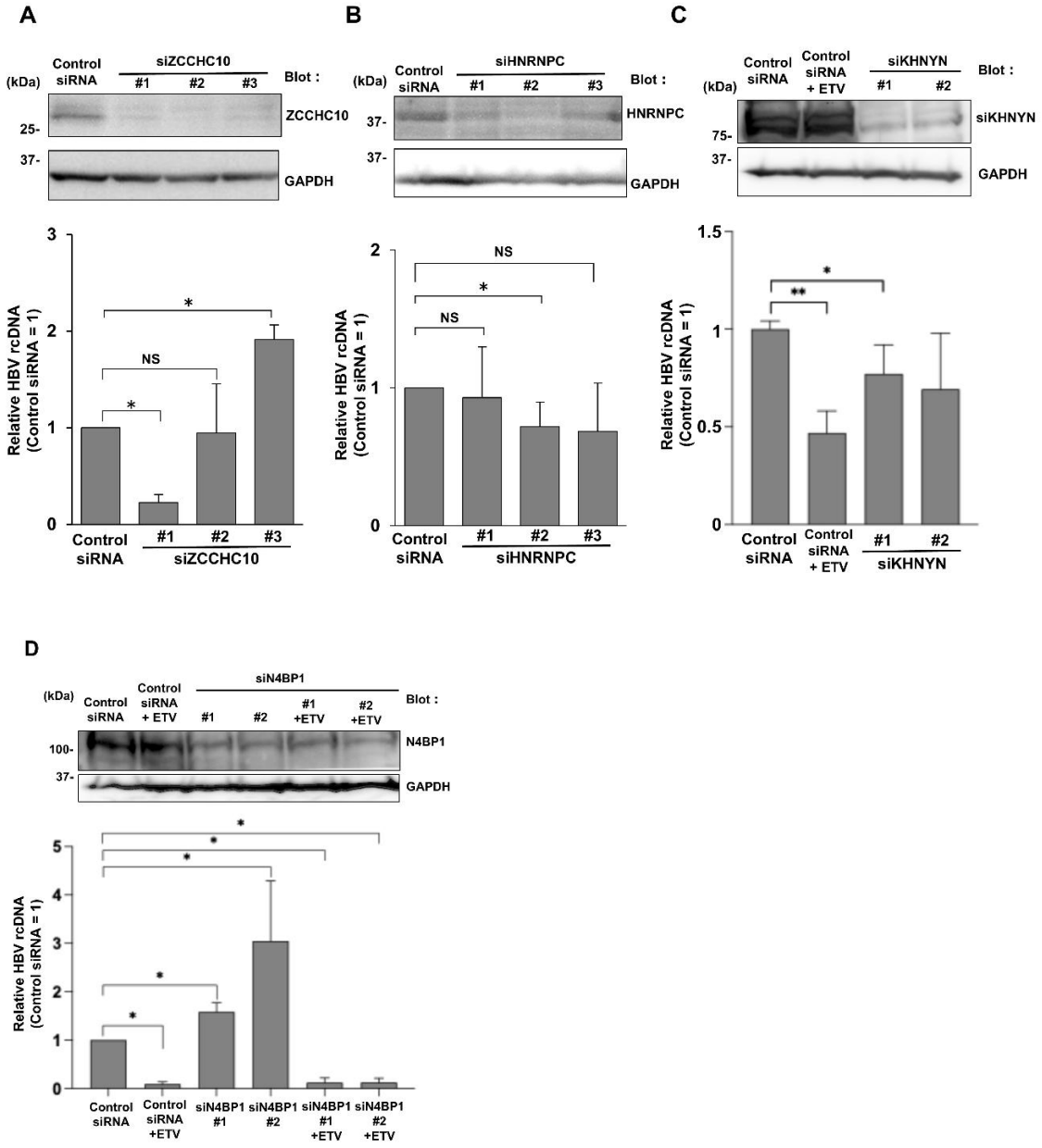

図 8.　RBP ノックダウン後の発現確認およびコア内 rcDNA の解析

Huh7 細胞に各 RBP に対する siRNA を導入後、1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）をトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収した。各 RBP のノックダウン効率は WB により確認し、コア内 rcDNA レベルは qPCR により定量した。（A）ZCCHC10、（B）HNRNPC、（C）KHNYN、（D）N4BP1 における解析結果を示す。Control siRNA を導入した細胞をコントロールとし、エンテカビルを投与した Huh7 細胞をポジティブコントロールとした。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P＜0.05、**P＜0.01。ETV：エンテカビル、NS：有意差なし。

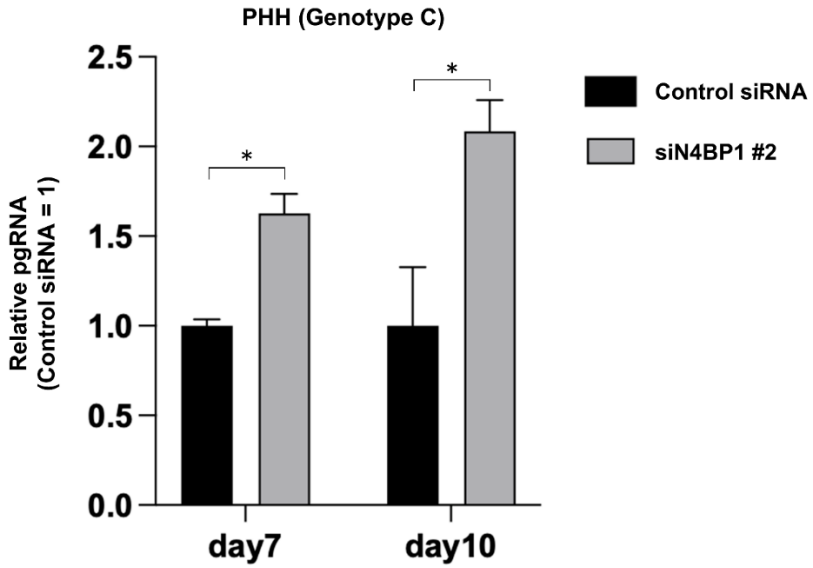

図 9.　PHH における N4BP のノックダウン後の pgRNA 発現解析

HBV 感染の 2 日前に PHH に N4BP1 siRNA #2 をトランスフェクションし、N4BP1 の発現をノックダウンした。HBV 感染後 7 日目および 10 日目に細胞を回収し、qPCR により pgRNA レベルを測定した。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P < 0.05。

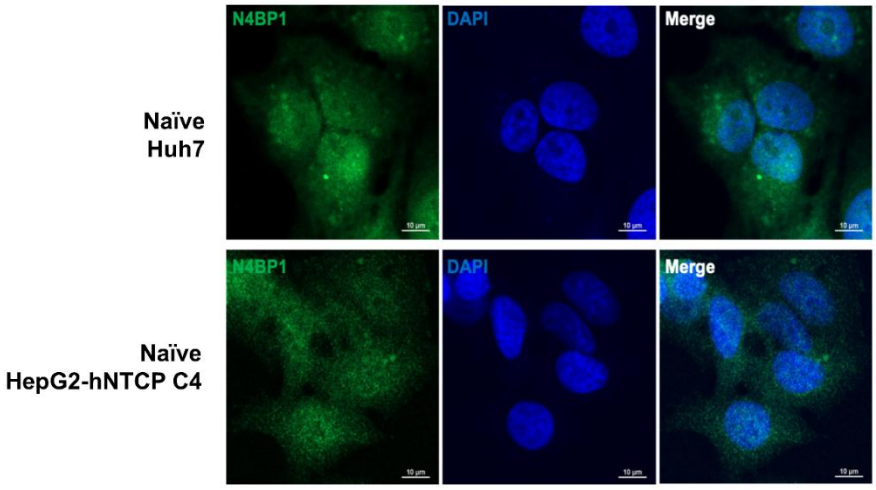

図 10.　N4BP1 の細胞内局在の免疫染色

Naïve Huh7 細胞（上段）および naïve HepG2-hNTCP C4 細胞（下段）をチャンバースライドに播種し、翌日に抗 N4BP1 抗体を用いて一次染色を行った。続いて、Alexa Flour 488 標識二次抗体（緑）を用いて N4BP1 を可視化し、DAPI（青）で核を染色した。スケールバー：10 μm。

4.　異なる遺伝子型においても、N4BP1 の過剰発現によりコア内 rcDNA レベルが低下した

N4BP1 が HBV の他の遺伝子型に対しても同様に rcDNA を抑制する効果を示すかを検討するため、HBV 遺伝子型 A、B、C の発現プラスミドを用いて実験を行った。Huh7 細胞に N4BP1 発現プラスミドおよび各 HBV 発現プラスミドを同時にトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収してコア内 rcDNA レベルを測定した。その結果、いずれの遺伝子型においても N4BP1 の過剰発現によりコア内 rcDNA レベルの低下が認められた（図 11）。

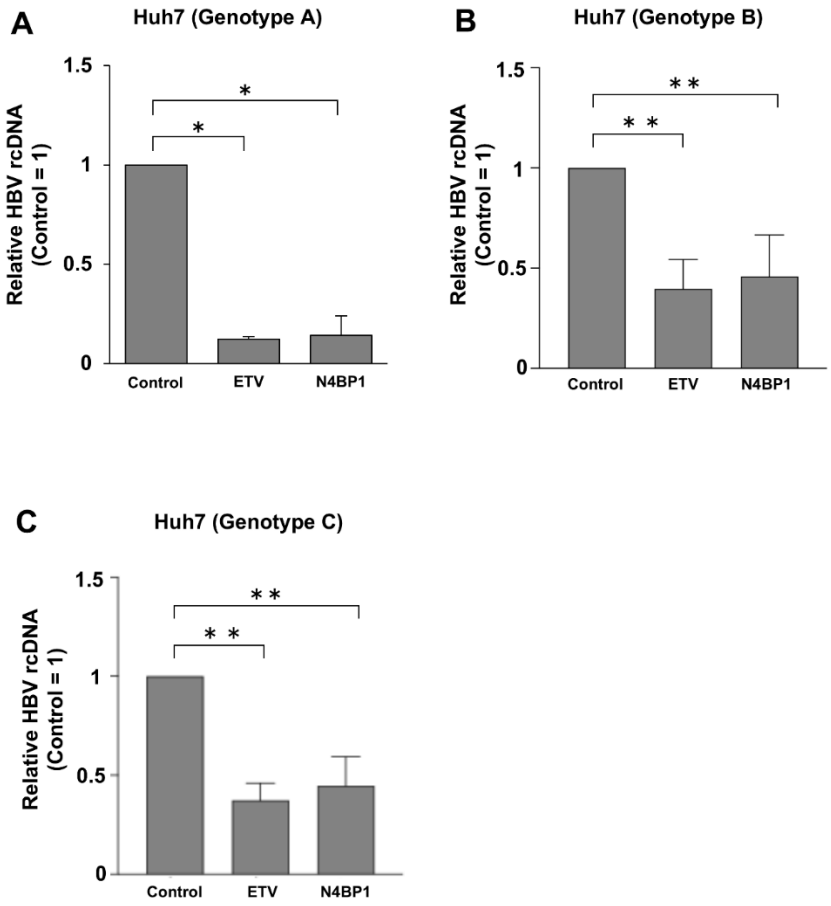

図 11.　HBV 各遺伝子型における N4BP1 過剰発現の影響解析

Huh7 細胞に N4BP1 発現プラスミドおよび各遺伝子型の HBV の発現プラスミドを同時にトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収してコア内 rcDNA レベルを測定した。A：遺伝子型 A、B：遺伝子型 B、C：遺伝子型 C。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P < 0.05、**P < 0.01。ETV：エンテカビル。

5. N4BP1 KO および再発現実験により HBV ゲノムの複製抑制効果を確認した

5-1. ピューロマイシン濃度の最適条件を確立し、N4BP1 KO Huh7 細胞を樹立した

N4BP1 KO Huh7 細胞の作製にあたり、ピューロマイシンを用いたコロニー選択を実施した。ピューロマイシン濃度の最適条件を検討するため、Huh7 細胞に各濃度のピューロマイシンを添加し、トリパンブルー染色法により生細胞数を測定した。その結果、1 μg/mL 以上の濃度において有意な細胞数の減少が認められた（図 12）。これらの結果および既報（Liang et al, 2005）を踏まえ、コロニー選択に使用するピューロマイシン濃度を 2 μg/mL に設定した。

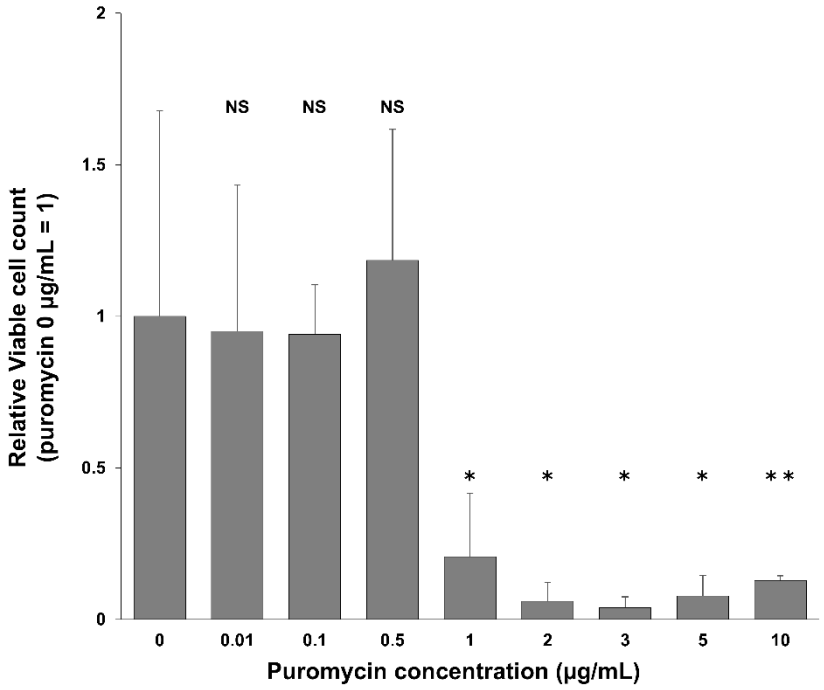

図 12. ピューロマイシン濃度の最適条件の検討

Huh7 細胞に、ピューロマイシンを各濃度（0、0.01、0.1、0.5、1、2、3、5、10 μg/mL）で添加し、トリパンブルー染色法により生細胞数を測定した。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P < 0.05、**P < 0.01。NS：有意差なし。

5-2.　N4BP1 KO Huh7 細胞株における HBV ゲノムの複製抑制効果の検討

HBV ゲノムの複製における N4BP1 の役割をさらに明らかにするため、CRISPR/Cas9 システムを用いて N4BP1 KO Huh7 細胞を作製した。N4BP1 KO Huh7 細胞のクローンを 2 系統樹立し、WB により N4BP1 タンパク質の発現消失を確認した。さらに、1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）をトランスフェクションし、トランスフェクション 3 日後に細胞を回収してコア内 rcDNA レベルを測定した。その結果、両 KO 細胞株において、コントロール細胞と比較してコア内 rcDNA レベルが約 3 倍に増加した（図 13）。

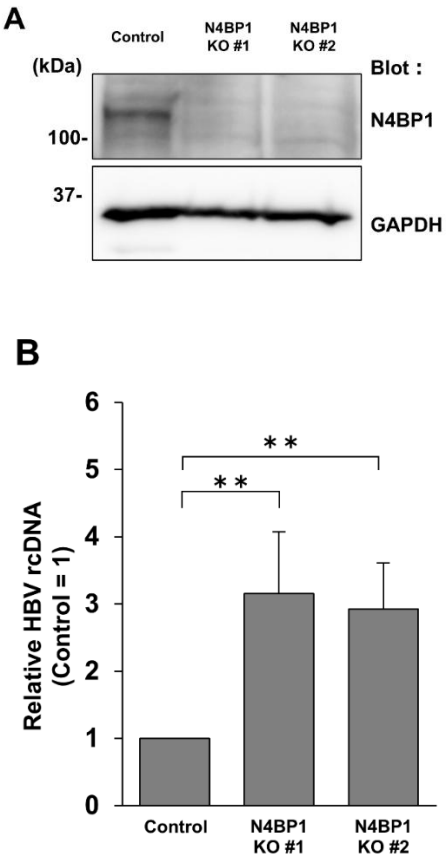

図 13.　N4BP1 ノックアウト後の発現確認およびコア内 rcDNA の解析

2 系統の N4BP1 KO Huh7 細胞に 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）をトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収して解析を行った。N4BP1 のノックアウトは抗 N4BP1 抗体による WB（A、上段）で確認し、GAPDH をローディングコントロールとした（A、下段）。qPCR によりコア内 rcDNA レベルを測定した（B）。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。**P<0.01。

5-3.　N4BP1 KO Huh7 細胞において N4BP1 の再発現後の HBV ゲノムの複製抑制効果の検討

N4BP1 KO Huh7 細胞に N4BP1 発現プラスミドをトランスフェクションすることで、N4BP1 の発現を回復させた。トランスフェクションから 3 日後に細胞を回収し、コア内 rcDNA レベルに及ぼす影響を評価した。WB により、N4BP1 が再発現していることを確認した。N4BP1 を再発現させた後、コア内 rcDNA レベルはコントロール群（N4BP1 KO Huh7 細胞）と比較して有意に減少した(図 14)。以上の結果から、N4BP1 は HBV ゲノムの複製を抑制する宿主因子であることが示唆された。

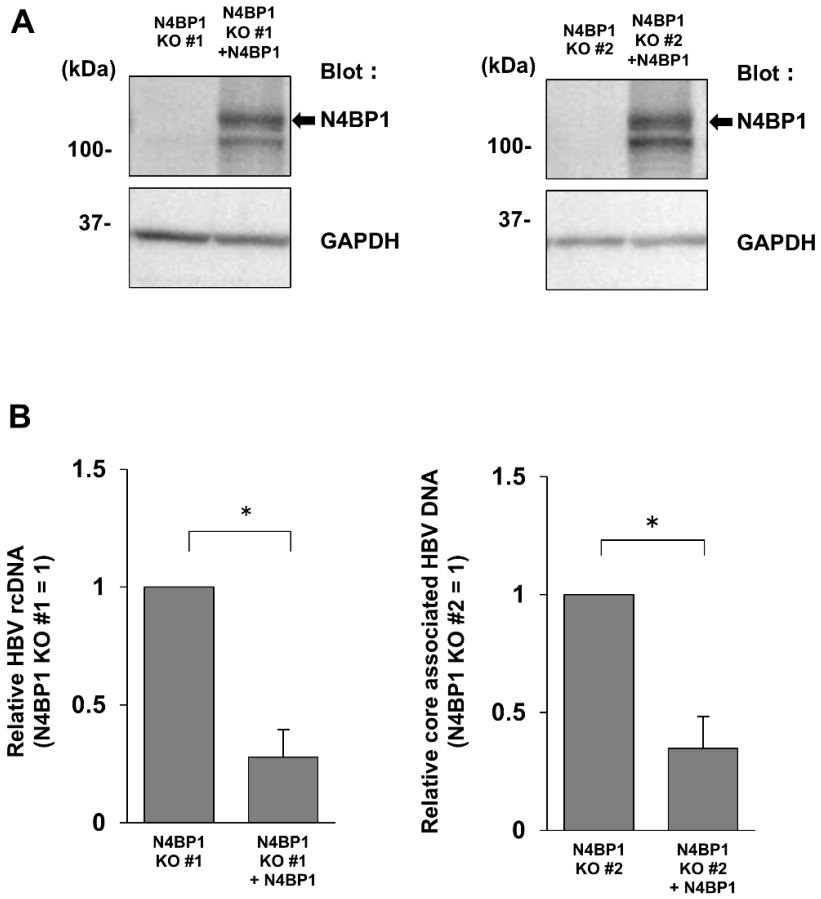

図 14.　N4BP1 KO 細胞における N4BP1 再発現後の WB およびコア内 rcDNA の解析

N4BP1 KO Huh7 細胞株#1 および#2 に N4BP1 発現プラスミドを導入し、抗 N4BP1 抗体を用いた WB により N4BP1 の再発現を確認した（A、上段）。GAPDH をローディングコントロールとして使用した（A、下段）。qPCR によりコア内 rcDNA レベルを測定した（B）。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P<0.05。

6. N4BP1 の発現は HBV の感染による影響を受けなかった

N4BP1 の発現が HBV の感染により変化するかどうかを検討するため、3 つの異なる実験系を用いてその発現レベルを評価した。各実験において、HBV の存在は pgRNA の定量により確認した。

まず、1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）を Huh7 細胞にトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収して、WB および qPCR により N4BP1 の発現量を評価した。その結果、HBV ゲノムの導入は N4BP1 の転写レベルおよびタンパク質レベルのいずれにも有意な影響を与えなかった（図 15A、15B）。

次に、HepG2-hNTCP C4 細胞において、HBV 感染後 3 日目および 10 日目に N4BP1 の発現レベルを測定したが、いずれの時点においても著明な変化は認められなかった（図 15A、15C）。

さらに、HBV 粒子を持続的に分泌する HepAD38.7 細胞を用い、テトラサイクリン除去による HBV 粒子の産生が N4BP1 の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、HBV 粒子の産生が誘導されても、N4BP1 の発現レベルに変化は認められなかった（図 15A、15D）。

以上の結果から、N4BP1 の発現は HBV の感染やウイルスの増殖によって誘導されないことが示唆された。

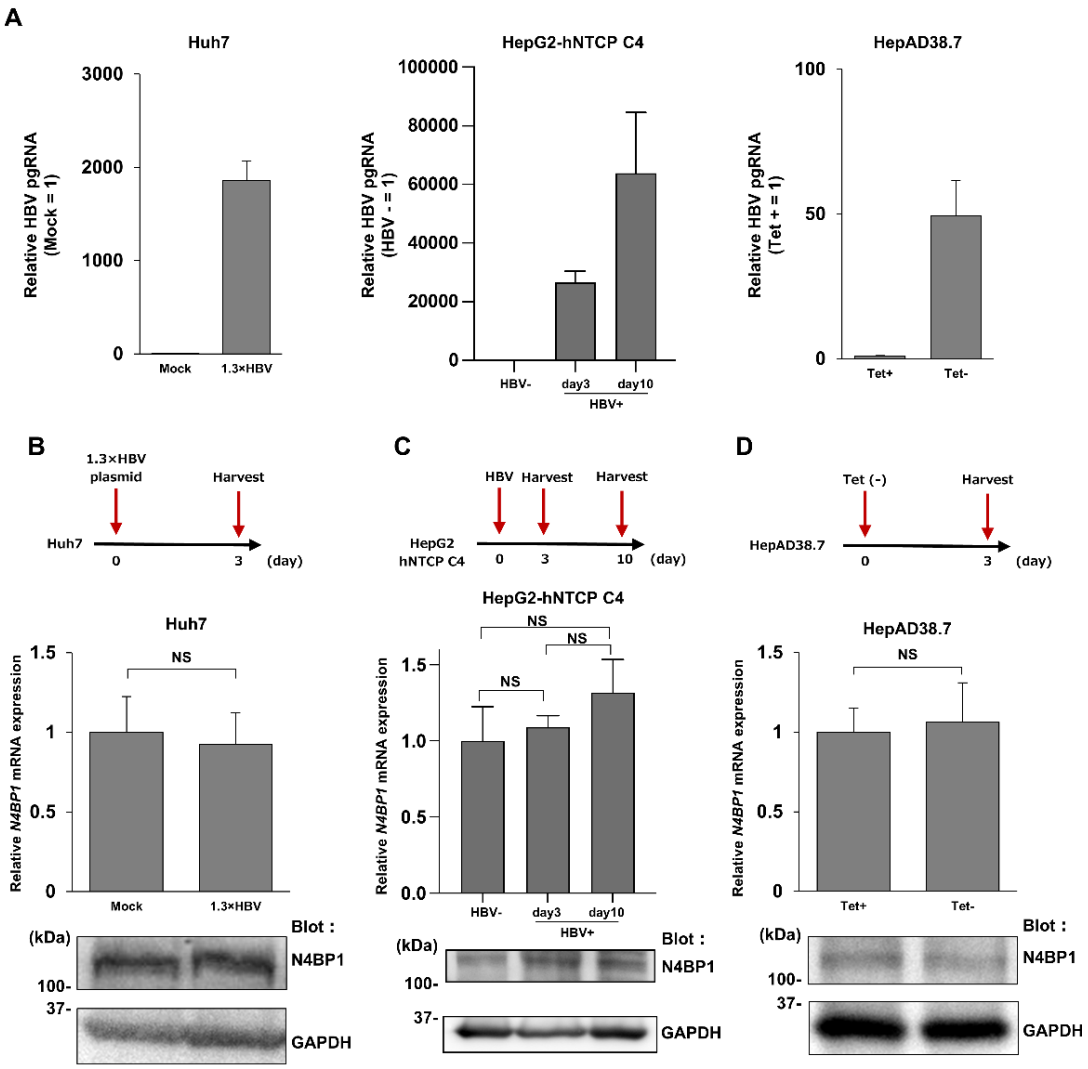

図 15.　HBV 存在下における N4BP1 発現の評価

（A）各実験系において、pgRNA の定量により HBV の存在を確認した。

（B）Huh7 細胞に 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）をトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収した（上段）。N4BP1 の mRNA およびタンパク質の発現レベルを、それぞれ qPCR（中段）および WB（下段）により解析した。

（C）HepG2-hNTCP C4 細胞に HBV（遺伝子型 D）を感染させ、3 日目および 10 日目に細胞を回収した（上段）。N4BP1 の mRNA およびタンパク質の発現レベルを、qPCR（中段）および WB（下段）により解析した。

（D）HepAD38.7 細胞において、テトラサイクリン除去により HBV 粒子の産生を誘導し、3 日後に細胞を回収した（上段）。N4BP1 の mRNA およびタンパク質の発現レベルを qPCR（中段）および WB（下段）により解析した。

エラーバーは標準偏差（SD）を示す。NS：有意差なし。

7. N4BP1 の HBV ゲノムの複製抑制効果には、KH-like ドメインおよび RNase ドメインの両方が必須であった

N4BP1 は全長 896 アミノ酸から構成され、N 末端側に KH-like ドメイン、C 末端側に RNase ドメインを有する（図 16、Cai et al, 2014）。N4BP1 のどのドメインが HBV ゲノムの複製の抑制に関与するかを明らかにするため、KH-like ドメイン欠損変異体（ΔKH：アミノ酸 59-143 欠損）および RNase ドメイン欠損変異体（ΔRNase：アミノ酸 617-769 欠損）を作製した。N4BP1 WT または各変異型の発現プラスミドと 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）を Huh7 細胞に同時にトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収してコア内 rcDNA レベルを測定した。変異体の発現は、HA タグ抗体を用いた WB により確認した（図 17A）。その結果、N4BP1 WT を過剰発現した細胞では、コア内 rcDNA レベルが有意に低下したのに対し、ΔKH および ΔRNase 変異体を発現させた細胞ではコントロール群と同程度のレベルであり、HBV ゲノムの複製抑制効果は認められなかった。（図 17B）。

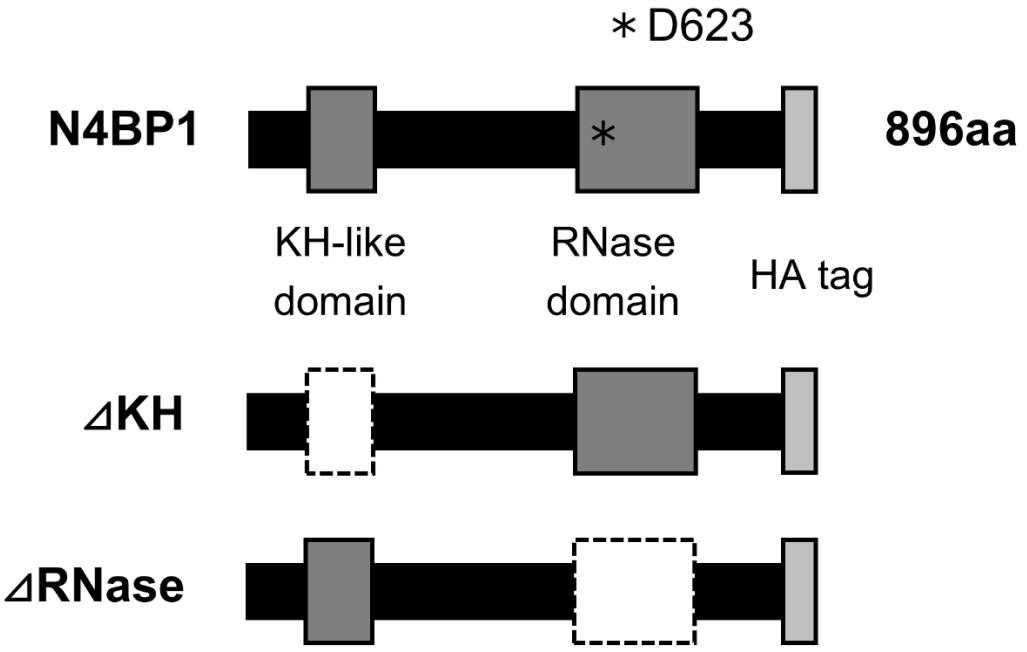

図 16.　N4BP1 の構造

N4BP1 は全長 896 アミノ酸から構成され、KH-like ドメイン（アミノ酸 59-143）および RNase ドメイン（アミノ酸 617-769）を有する。各ドメインを欠損させた変異体として、KH-like ドメイン欠損変異体（ΔKH）および RNase ドメイン欠損変異体（ΔRNase）を作製した。各発現プラスミドの C 末端には HA タグを付加した。

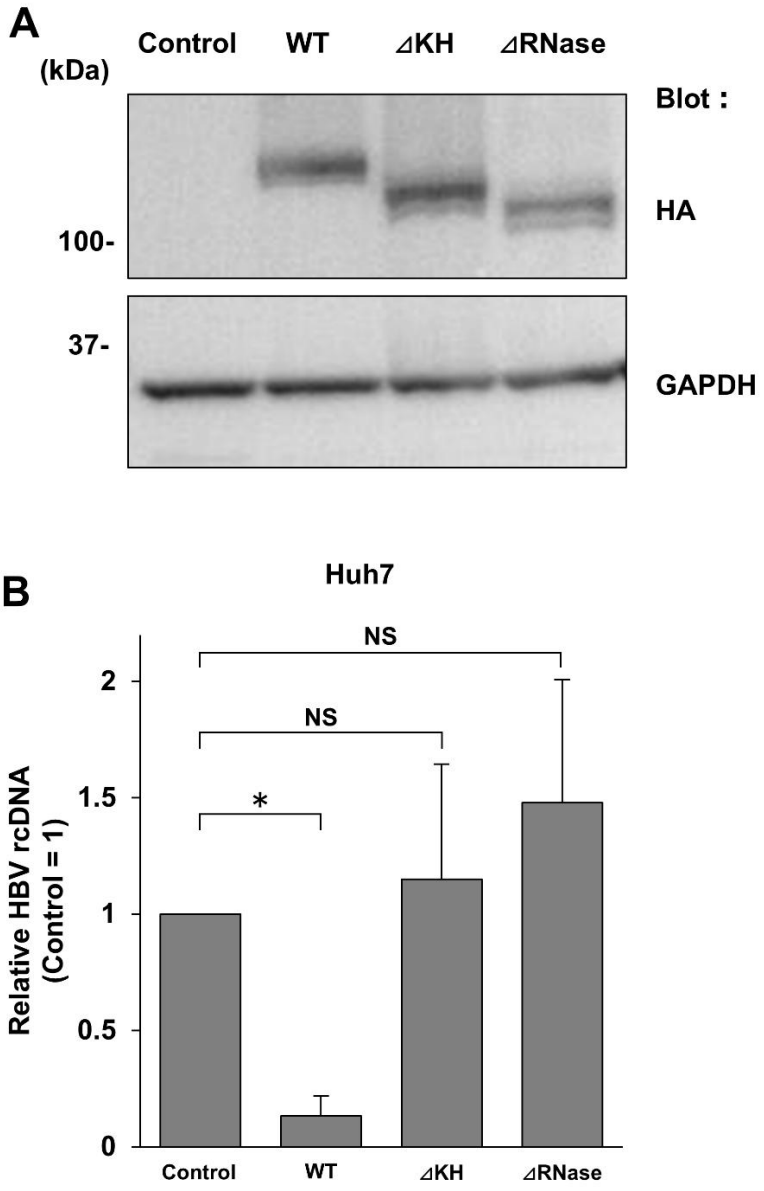

図 17.　N4BP1 ドメイン欠損変異体による HBV ゲノム複製への影響

Huh7 細胞に 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）とともに、N4BP1 WT または各欠損変異体（ΔKH、ΔRNase)、コントロールベクターをトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収した。

（A）HA タグ抗体を用いた WB により各 N4BP1 変異体の発現を確認した（上段)。GAPDH をローディングコントロールとして使用した（下段)。

（B）上記細胞からコア内 rcDNA を抽出し、qPCR により測定した。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P < 0.05。NS：有意差なし。

また、N4BP1 の RNase ドメインに存在する 623 番目のアミノ酸（アスパラギン酸：D）は、N4BP1 の RNase 活性に重要であることが報告されている（Yamasoba et al, 2019）。D623 残基をアスパラギン（N）に置換した D623N 変異体は、N4BP1 の構造を維持したまま RNase 活性を喪失させる。そこで、この D623N 変異体発現プラスミドと 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）を Huh7 細胞に同時にトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収してコア内 rcDNA レベルを測定した。

その結果、N4BP1 WT を過剰発現した細胞ではコア内 rcDNA レベルが有意に低下した一方で、D623N 変異体を過剰発現した細胞ではコア内 rcDNA レベルの低下は認められなかった（図 18）。以上の結果から、N4BP1 による HBV ゲノムの複製抑制効果には、KH-like ドメインおよび RNase ドメインの両方が必須であり、特に RNase ドメインの D623 残基が重要な役割を果たしていることが示唆された。

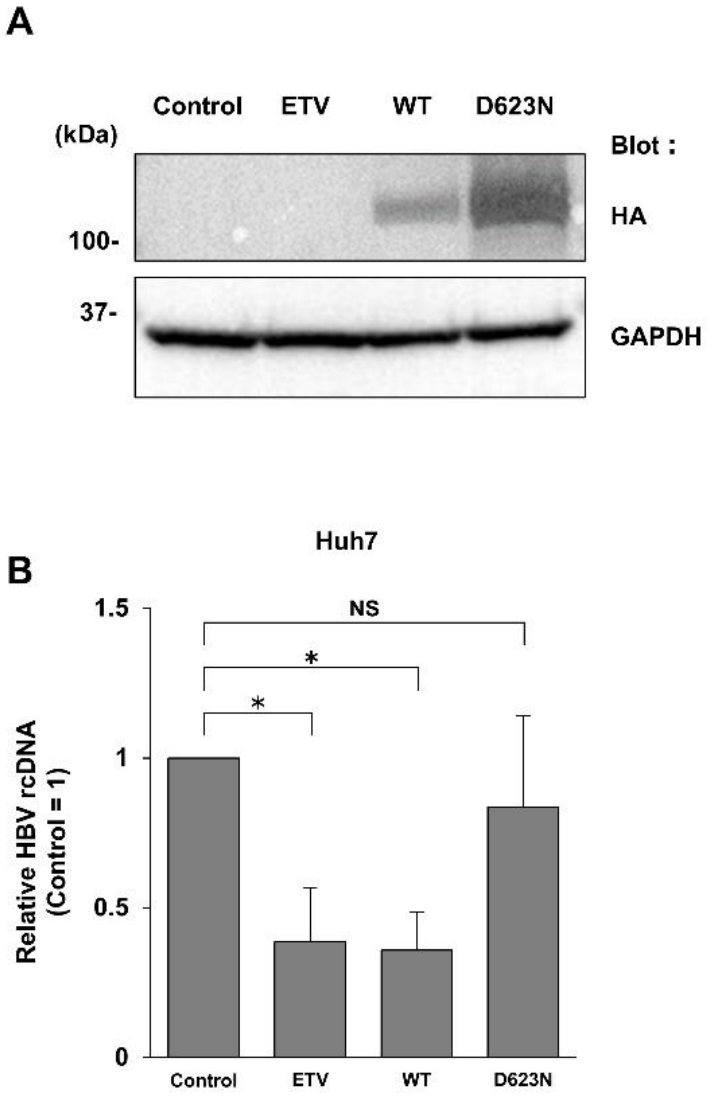

図 18.　D623N 変異体による HBV ゲノム複製への影響

Huh7 細胞に 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）とともに、N4BP1 WT、D623N 変異体、またはコントロールベクターをトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収した。

（A）HA タグ抗体を用いた WB により N4BP1 WT および D623N 変異体の発現を確認した（上段)。GAPDH をローディングコントロールとして使用した（下段)。

（B）上記細胞からコア内 rcDNA を抽出し、qPCR により測定した。エンテカビルを投与した細胞をポジティブコントロールとした。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P＜0.05。ETV：エンテカビル、NS：有意差なし。

8. N4BP1 は転写後の段階で HBV ゲノムの複製を抑制した

N4BP1 を過剰発現した HepG2-hNTCP C4 細胞に HBV（遺伝子型 D）を感染させ、14 日目に細胞を回収した。回収した細胞からコア内 rcDNA、cccDNA、pgRNA の各レベルをそれぞれ定量解析した、その結果、cccDNA レベルには変化は認められなかったが、pgRNA およびコア内 rcDNA レベルはいずれも有意に低下していた（図 19）。以上の結果から、N4BP1 は HBV ゲノムの複製過程において転写後の段階で抑制的に作用していることが示唆された。

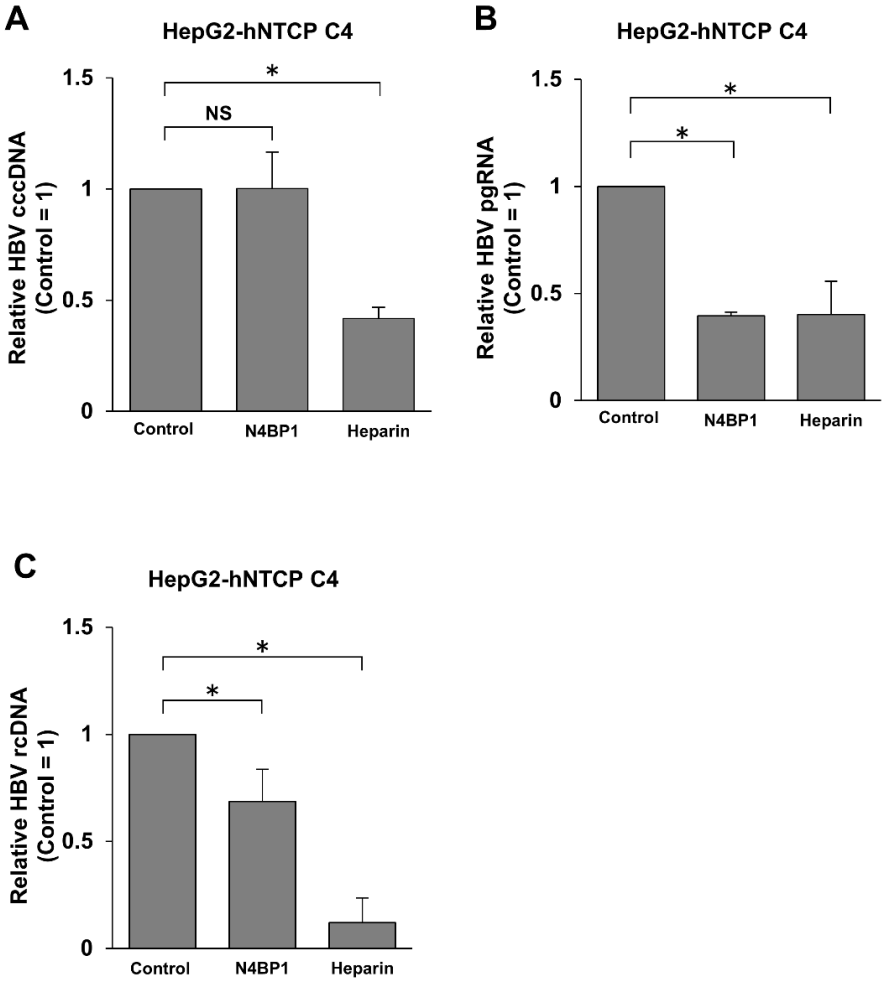

図 19. HBV ライフサイクルにおける N4BP1 の抑制ステップの解析

HepG2-hNTCP C4 細胞において N4BP1 を過剰発現した状態で HBV（遺伝子型 D）を感染させ、感染後 14 日目に細胞を回収した。（A）cccDNA、（B）pgRNA、（C）コア内 rcDNA の各レベルを定量した。ポジティブコントロールとしてヘパリン処理を行った細胞を使用した。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P < 0.05。NS：有意差なし。

9. N4BP1 は HBV cccDNA の転写活性を直接制御しなかった

これまでの結果により、N4BP1 は pgRNA および rcDNA レベルを低下させる一方で、cccDNA レベルには影響を及ぼさないことが示された。これらの知見から、N4BP1 は HBV ゲノムの複製を転写後の段階で制御している可能性が示唆された。N4BP1 による HBV の増殖抑制効果の機序としては、(1) cccDNA の転写活性を抑制することによる HBV RNA 産生の低下、(2) HBV RNA の分解あるいは翻訳抑制などによる転写後制御、(3) pgRNA に特異的に作用する複製阻害機構、などが考えられた。

これらの仮説を検証するため、まず N4BP1 が HBV cccDNA 由来のプロモーター活性に与える影響を評価した。HBV の各プロモーター（CURS BCP、EnhI-X、PreS1、PreS2）の制御下で Firefly ルシフェラーゼを発現する Huh7 細胞（HBV 遺伝子型 A）に、N4BP1 またはコントロールプラスミド、および Renilla ルシフェラーゼを発現する β-アクチンプラスミドを同時にトランスフェクションした。β-アクチンは N4BP1 とコントロールの導入効率の差を補正するために使用した。トランスフェクション 2 日後に Firefly および Renilla ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、N4BP1 の発現は HBV プロモーター活性にいずれも有意な影響を及ぼさなかった（図 20）。

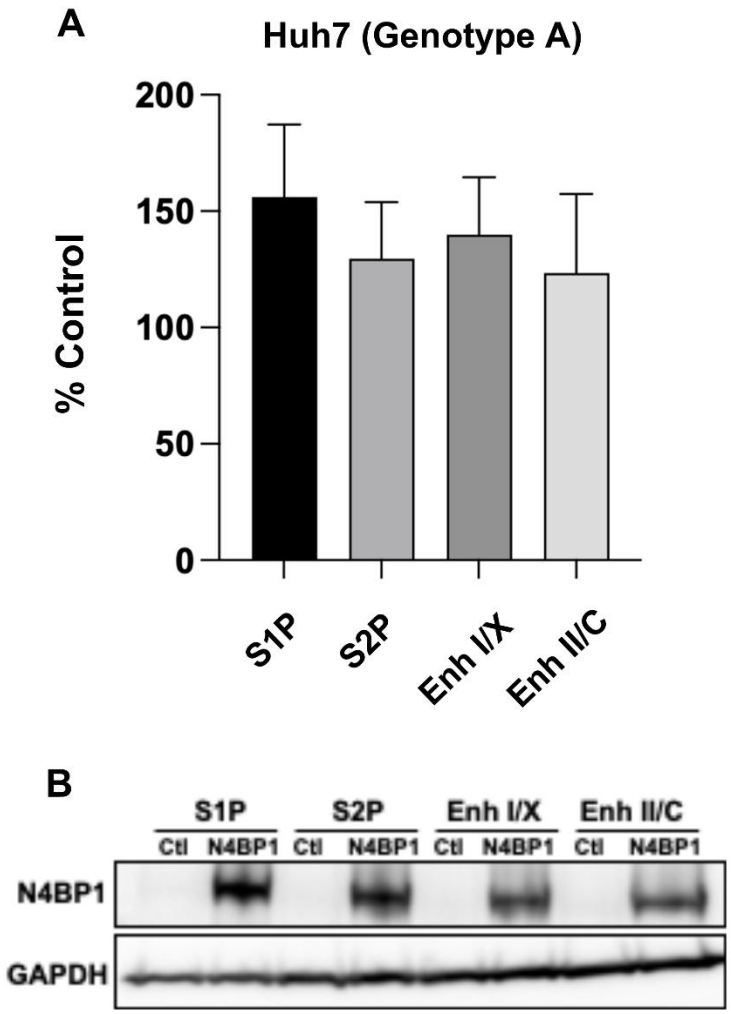

図 20.　N4BP1 による HBV プロモーター活性の評価

（A）HBV の各プロモーター（CURS BCP、EnhI-X、PreS1、PreS2 : 遺伝子型 A）を安定発現する Huh7 細胞に、N4BP1 発現プラスミドおよび β-アクチンルシフェラーゼ発現プラスミドをトランスフェクションした。β-アクチンにコードされた Renilla ルシフェラーゼを用いてトランスフェクション効率を補正し、トランスフェクション 48 時間後に Firefly および Renilla ルシフェラーゼ活性を測定した。

（B）WB により N4BP1 の発現を確認した（上段）、GAPDH をローディングコントロールとして使用した（下段）。

10. トランスクリプトーム解析により、N4BP1 が転写調節に直接関与しない可能性が示唆された

次に、N4BP1 が HBV ゲノムの複製に及ぼす影響をより詳細に検討するため、N4BP1 を過剰発現した PHH およびコントロール PHH を用いてトランスクリプトーム解析（RNA シークエンス解析）を実施した。まず、N4BP1 の HBV の増殖抑制効果を確認するため、N4BP1 を発現するアデノウイルスベクターを HBV（遺伝子型 C）感染の 2 日前に PHH へ導入し、HBV 感染 14 日後に細胞を回収して pgRNA およびコア内 rcDNA レベルを測定した。その結果、N4BP1 の過剰発現により両者とも有意に減少した（図 21）。RNA シークエンス解析の結果、N4BP1 を過剰発現した PHH ではコントロール PHH と比較して 178 遺伝子の発現が上昇し、230 遺伝子の発現が低下していた（図 22B）。しかし、これらの変動遺伝子の中に HBV ゲノムの複製に関与する既知の転写因子は含まれておらず、またパスウェイ解析においても翻訳関連経路における遺伝子発現の顕著な変動は認められなかった（図 22C）。

なお HepG2-hNTCP C4 細胞から分泌される HBV 子孫粒子は非感染性であり、単回感染しか成立しないことが報告されている（Iwamoto et al, 2014；Köing et al, 2019）。したがって、先に示した結果（図 19）、プロモーターアッセイの結果（図 20）、およびトランスクリプトーム解析の結果（図 22）を総合的に解釈すると、N4BP1 は cccDNA の転写活性の阻害や転写制御因子を介して HBV の増殖を抑制するのではなく、pgRNA に対する分解促進や翻訳抑制などの転写後の機構を介して HBV の増殖を抑制していることが示唆された。

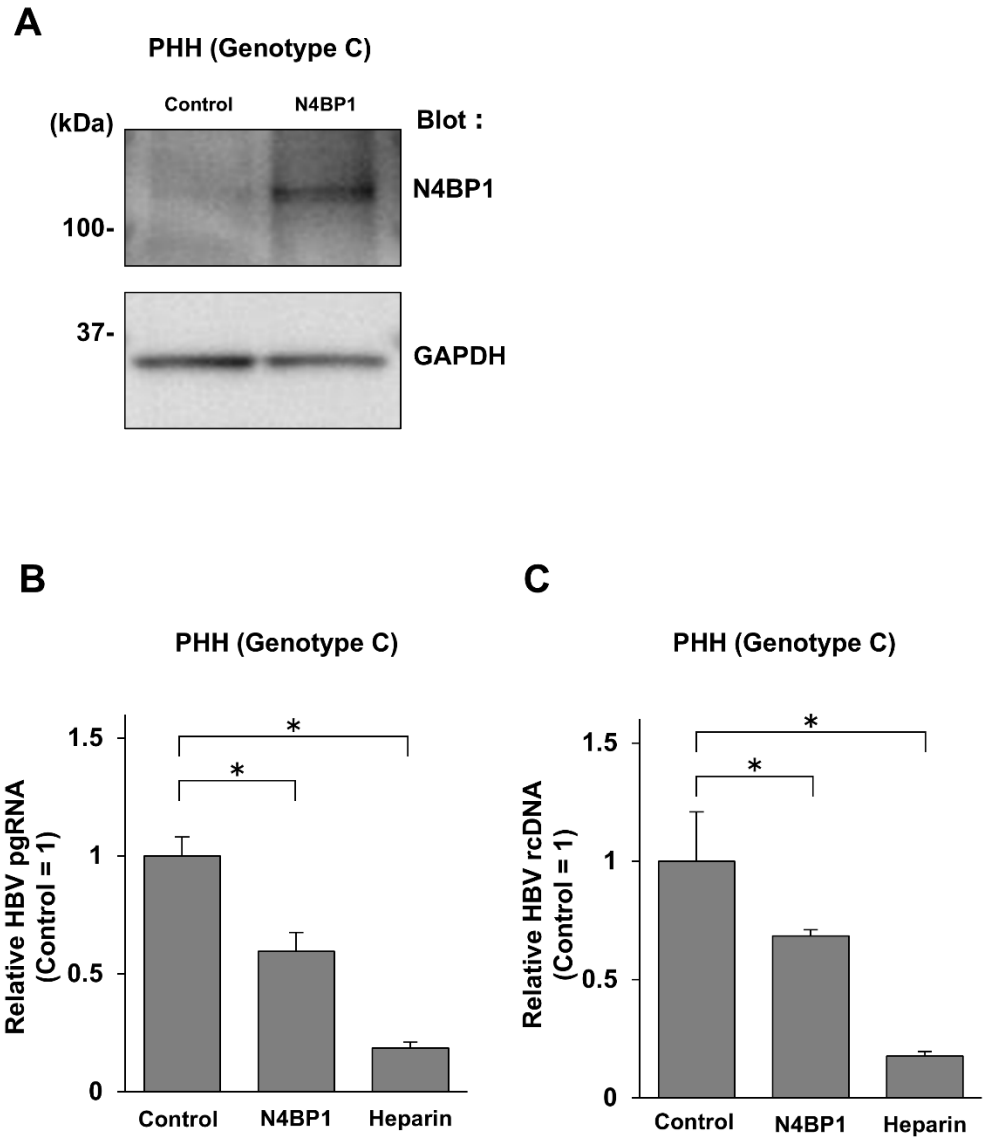

図 21.　PHH における N4BP 過剰発現後の pgRNA およびコア内 rcDNA レベルの評価

PHH にアデノウイルスベクターを用いて N4BP1 を過剰発現させ、2 日後に HBV（遺伝子型 C）を感染させた。HBV 感染 14 日後に細胞を回収し、N4BP1 および GAPDH の発現を WB により確認した（A）。pgRNA レベル（B）およびコア内 rcDNA レベル（C）を qPCR により測定した。ポジティブコントロールとしてヘパリン処理を行った細胞を使用した。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P < 0.05。

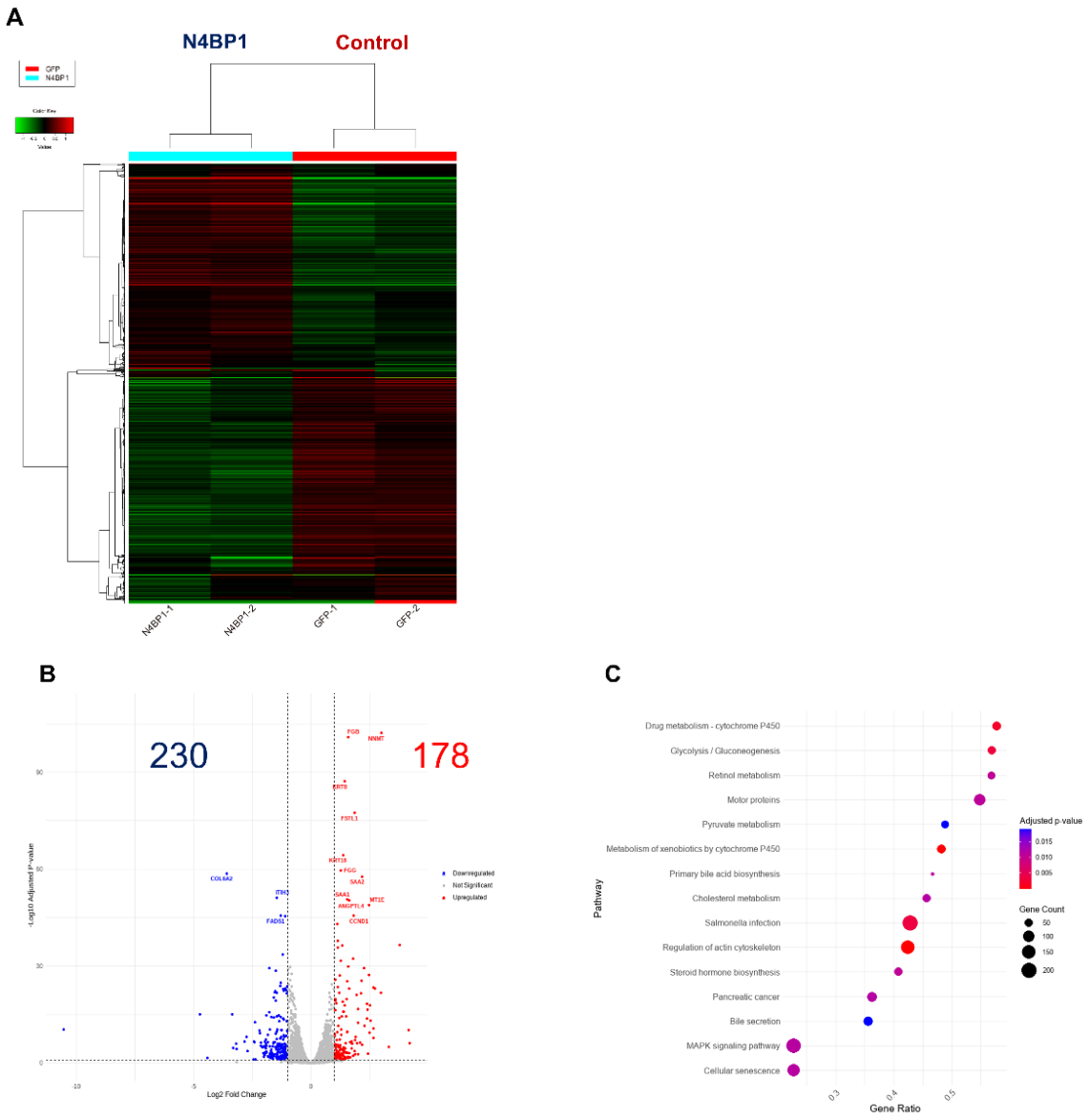

図 22.　N4BP1 過剰発現によるトランスクリプトーム解析

（A）N4BP1 を過剰発現した PHH およびコントロール PHH におけるトランスクリプトーム解析のヒートマップ。

（B）Volcano plot。発現変動遺伝子の抽出基準は、adjusted P-value < 0.1 および absolute fold change > 2 とした。N4BP1 の過剰発現により 178 遺伝子の発現が上昇し、230 遺伝子の発現が低下した。

（C）N4BP1 を過剰発現した PHH におけるパスウェイ解析。各点は関連するパスウェイを示し、点の大きさは該当パスウェイに含まれる遺伝子数、色は adjusted P-value、横軸は該当パスウェイに属する遺伝子の割合（gene ratio）を示す。

11. N4BP1 を過剰発現した細胞ではすべての HBV RNA の発現が低下した

次に、N4BP1 が pgRNA 以外の HBV RNA にも抑制効果を及ぼすかを検討した。Huh7 細胞に N4BP1 発現プラスミドと 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）を同時にトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収してノーザンブロッティングを実施した。その結果、コントロール細胞では 3.5kb（pgRNA）、2.4/2.1kb HBV RNA の強い発現が確認されたが、N4BP1 を過剰発現した細胞では 0.7kb を除くすべての HBV RNA の発現が低下していた（図 23）。

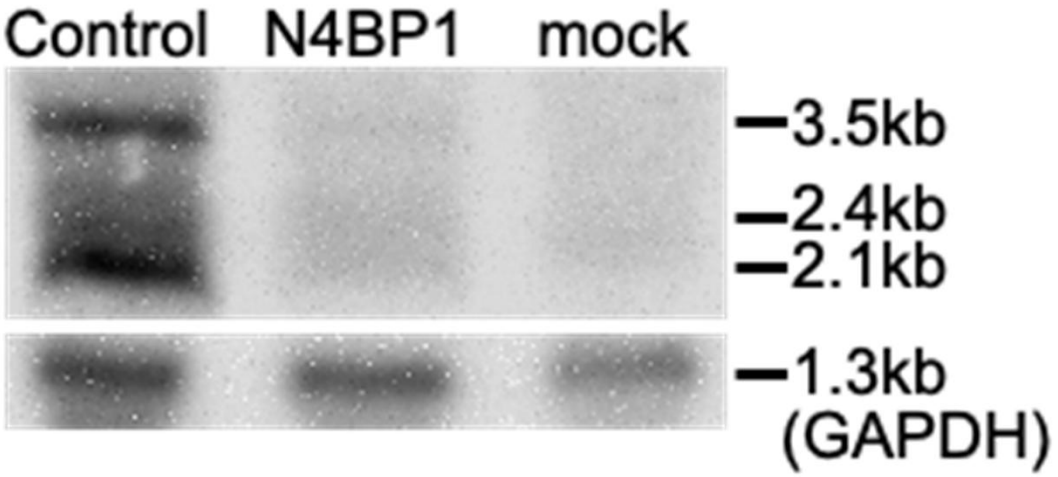

図 23. ノーザンブロッティングによる HBV RNA 発現レベルの解析

Huh7 細胞に 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）をトランスフェクションし、N4BP1 を過剰発現した細胞およびコントロール細胞におけるノーザンブロッティング解析を実施した。未処理細胞（mock）をネガティブコントロールとした。

12. N4BP1 は HBeAg および HBsAg の発現も抑制した

N4BP1 の発現が HBV RNA の抑制だけでなく、HBV タンパク質の発現にも影響を与えるかを評価するため、HBV 感染 14 日後の PHH 培養上清中の HBeAg および HBsAg の量を測定した（図 24）。その結果、N4BP1 を過剰発現した PHH では、コントロール群と比較して HBeAg および HBsAg の発現量が有意に低下していた。これらの結果は、N4BP1 が PreS2/S RNA および pgRNA の発現を抑制することと一致しており、ノーザンブロッティングの結果（図 23）とも整合性があった。

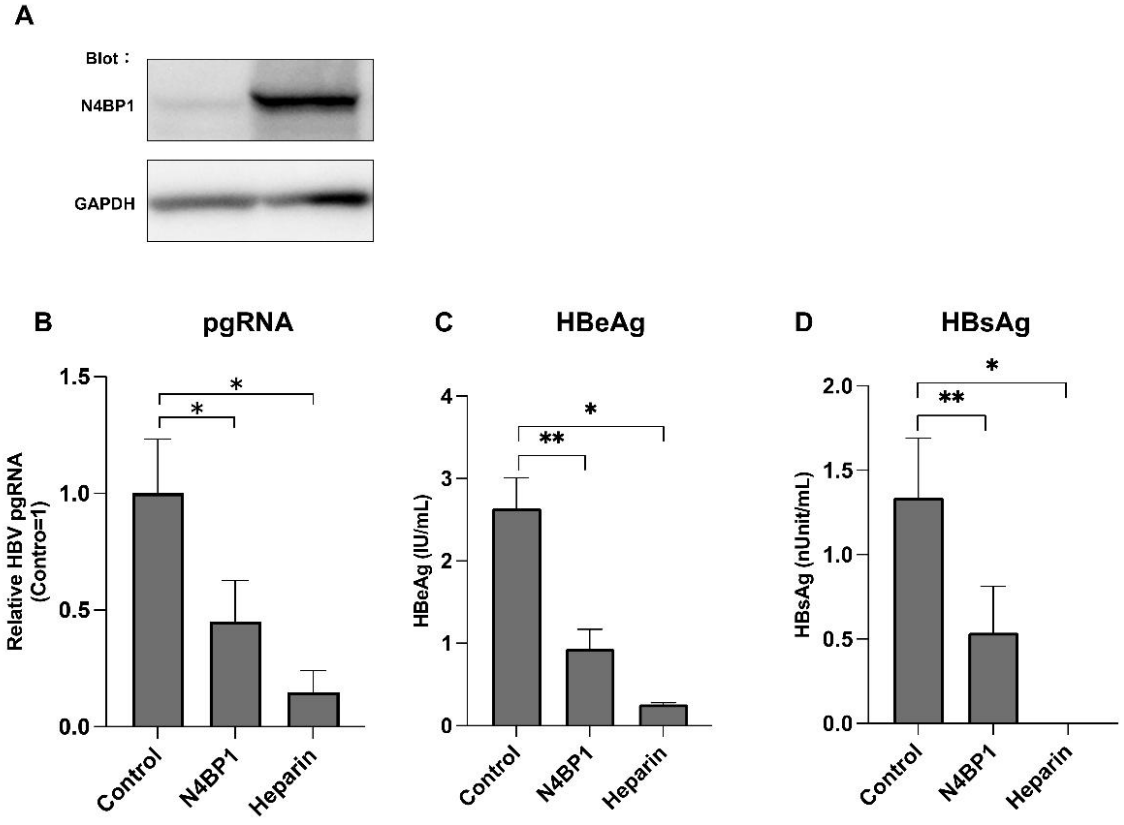

図 24.　N4BP1 発現による HBeAg および HBsAg 発現の評価

PHH に HBV（遺伝子型 C）を感染させ、N4BP1 の過剰発現による影響を検討した。感染後 14 日目に細胞および上清を回収した。

（A）N4BP1 の発現を WB により確認した。

（B）細胞内 pgRNA レベルを RT-qPCR により測定した。

（C）培養上清中の HBeAg 量を CLIA により測定した。

（D）培養上清中の HBsAg 量を ELISA により測定した。

ポジティブコントロールとしてヘパリン処理細胞を使用した。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P < 0.05、**P < 0.01。

13. N4BP1 は pgRNA に直接結合した

N4BP1 が HBV RNA に直接結合するかを検証するため、RIP アッセイを行った。Huh7 細胞に HA タグ付き N4BP1 WT、各ドメイン欠損変異体、またはコントロールベクターを 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）と同時にトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収した。その後、HA タグモノクローナル抗体磁気ビーズを用いて免疫沈降を行い、N4BP1 に結合した RNA を回収した。WB により N4BP1 WT およびドメイン欠損変異体が HA タグ抗体により適切に沈降されたことを確認した（図 25A）。

次に、RIP-qPCR により RNA-タンパク質間相互作用の強さを定量した。その結果、ΔRNase 変異体を過剰発現した細胞では pgRNA の回収量が最も高かったことから、安定した RNA-タンパク質間相互作用が維持されていたことが示された（図 25B）。一方、N4BP1 WT および ΔKH 変異体を過剰発現した細胞では、pgRNA の回収量が著しく低下していた。これらの結果から、N4BP1 WT を過剰発現した細胞では RNase 活性により pgRNA が分解された可能性があること、ならびに ΔKH 変異体を過剰発現した細胞では RNA との結合能が低下していた可能性があることが示唆された。

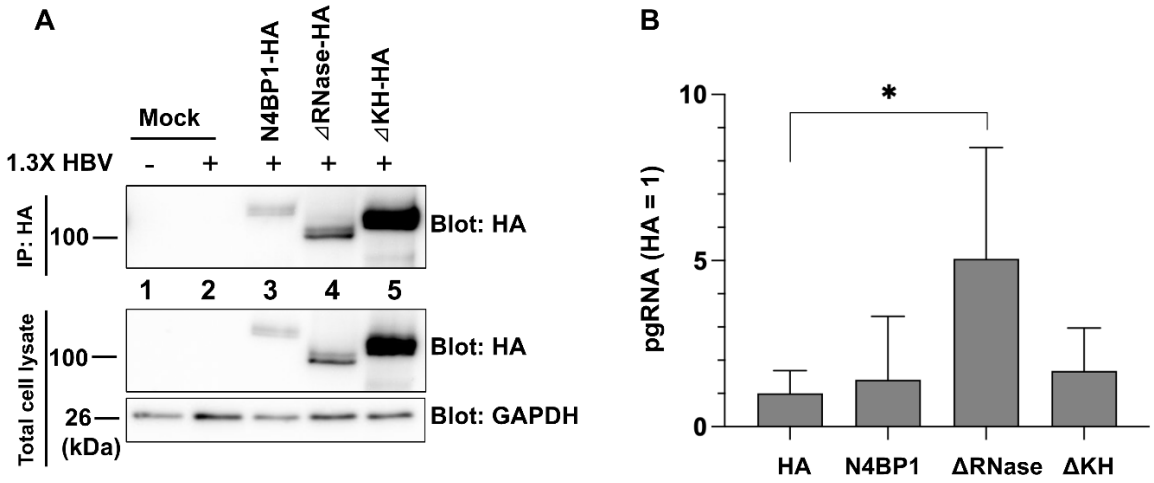

図 25.　RNA 免疫沈降による N4BP1 の pgRNA 結合能の解析

Huh7 細胞に 1.3 倍長 HBV 発現プラスミド（遺伝子型 C）とともに HA タグ付き N4BP1 WT または各ドメイン欠損変異体をトランスフェクションし、RIP アッセイを実施した。

（A）HA タグ抗体を用いた WB により、各 N4BP1 タンパク質の発現を確認した（上段）。GAPDH をローディングコントロールとした（下段）。

（B）トランスフェクション 3 日後に細胞を回収し、全細胞溶解液および免疫沈降画分から RNA を抽出し、RT-qPCR により pgRNA を定量した。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*$P < 0.05$。

14. N4BP1 は pgRNA の分解を促進し、その作用には KH-like ドメインおよび RNase ドメインが必要であった

これまでの解析により、N4BP1 が pgRNA と直接結合し、HBV RNA を抑制していることが示唆された。次に、pgRNA と結合した後に、どのように HBV RNA を抑制するのか、HepAD38.7 細胞を用いた実験を行った。HepAD38.7 細胞は、テトラサイクリン含有培地下では HBV ゲノムの複製を停止し、テトラサイクリン非含有培地下では pgRNA を産生して HBV ゲノムの複製が誘導される特性を有する。

まず、細胞をテトラサイクリン非含有培地で 2 日間培養し、HBV ゲノムの複製を誘導した。次に、N4BP1 またはドメイン欠損変異体発現プラスミドをトランスフェクションし、さらに 2 日後にテトラサイクリンを再添加して HBV ゲノムの複製を停止させた（図 26A）。テトラサイクリン添加前にコア内 rcDNA を測定し、HBV ゲノムの複製が十分に誘導されていることを確認した（図 26B）。テトラサイクリン含有培地へ変更後、2 日目から順次細胞を回収し、pgRNA レベルを測定した。なお、コントロール群には GFP を過剰発現した細胞を使用した。

その結果、N4BP1 WT を過剰発現させることにより pgRNA の分解が促進された（図 26C）。一方、ΔKH および ΔRNase 変異体を過剰発現させても、pgRNA の分解速度はコントロール群とほぼ同等であった。これらの結果から、N4BP1 は pgRNA の分解を促進するが、その作用には KH-like ドメインおよび RNase ドメインの両方が必要であることが示された。

以上より、N4BP1 は pgRNA に直接結合して分解を促進することで HBV の増殖を抑制し、その作用には KH-like ドメインおよび RNase ドメインが必須であることが示された。また、N4BP1 による HBV の増殖抑制効果は HBV RNA 全体に及び、ウイルス抗原タンパク質の発現抑制にも寄与していることが明らかとなった。

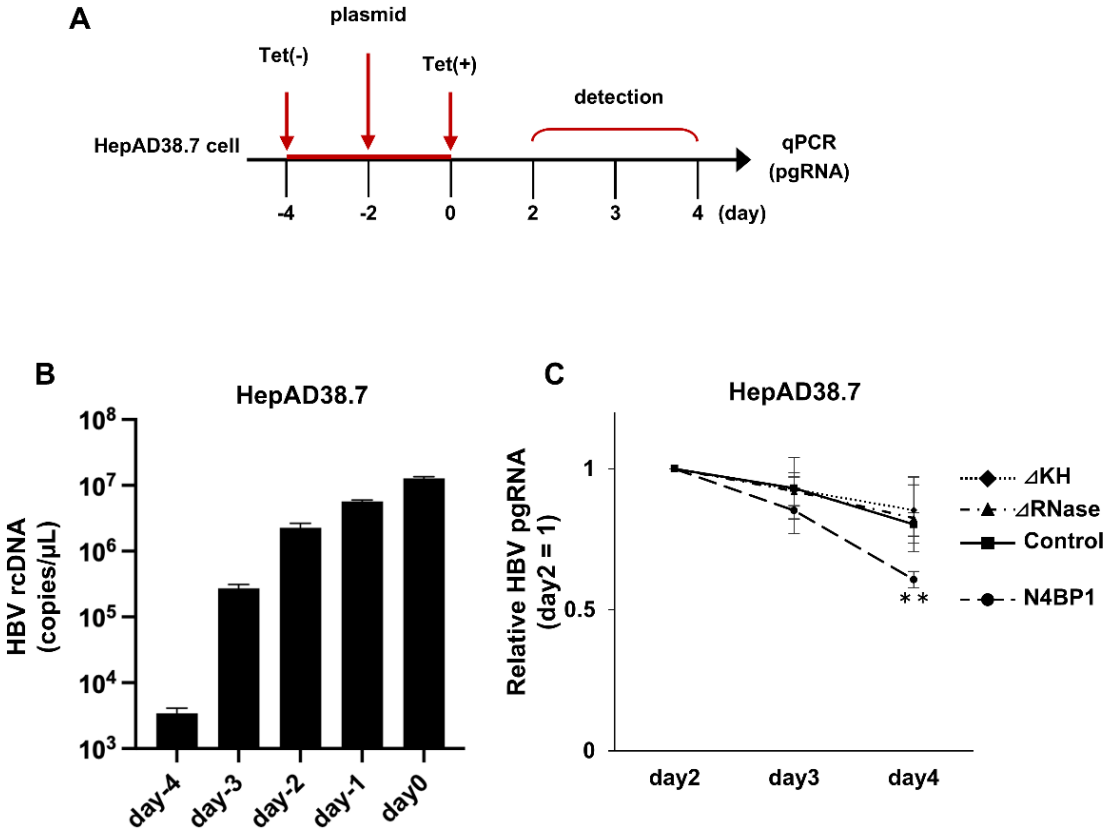

図 26.　N4BP1 の pgRNA 分解機能およびドメイン依存性の解析

（A）HepAD38.7 細胞を用いた pgRNA 分解アッセイのタイムコース。HBV ゲノムの複製を誘導した HepAD38.7 細胞に、N4BP1 WT または各ドメイン欠損変異体を過剰発現させた後、テトラサイクリン再添加により HBV ゲノムの産生を停止し、pgRNA の分解を経時的に解析した。

（B）テトラサイクリン再添加直前の HepAD38.7 細胞におけるコア内 rcDNA レベルの測定。

（C）N4BP1 WT、ΔKH、ΔRNase またはコントロールベクターを過剰発現させた HepAD38.7 細胞における pgRNA レベルの測定。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。**P < 0.01。

15.　Huh7 細胞および HepG2-hNTCP C4 細胞では IFN-α のみにより N4BP1 の発現が誘導され、PHH では IFN-α/λ の両方により N4BP1 の発現が誘導された

先行研究により、Jurkat 細胞および THP-1 細胞において、IFN-α 処理により N4BP1 の発現が 3~5 倍に増加することが報告されている（Yamasoba et al, 2019）。本研究では、この現象が肝癌細胞株および PHH においても認められるかを検討した。

Huh7、HepG2-hNTCP C4、PHH を用い、HBV 感染を伴わない条件下で、IFN-α（1000 U/mL）または IFN-λ（100 ng/mL）を投与し、投与後 6、24、48 時間に細胞を回収した（図 27）。各時点で N4BP1 mRNA およびタンパク質の発現レベルを、それぞれ qPCR および WB により測定した。ISG15 mRNA をポジティブコントロールとして解析した。

その結果、Huh7 細胞では 6 時間後、HepG2-hNTCP C4 細胞では 24 時間後に、IFN-α 刺激により N4BP1 mRNA の発現レベルが約 2 倍に増加した。ただし、この増加は統計的に有意ではあるものの、変動幅は小さいものであった（図 28）。一方 PHH では、IFN-λ 刺激により 24 時間および 48 時間後に N4BP1 mRNA の発現レベルの有意な増加が認められた。さらに、Huh7 細胞および PHH においては、N4BP1 タンパク質の発現の誘導も確認された（図 29）。PHH では IFN-α および IFN-λ のいずれによっても、N4BP1 の mRNA およびタンパク質の発現レベルが約 2 倍に増加した。

これらの結果から、Huh7 細胞および HepG2-hNTCP C4 細胞では IFN-α により N4BP1 の発現が誘導されるのに対し、PHH では IFN-α および IFN-λ のいずれの刺激によっても N4BP1 の発現が誘導されることが示された。

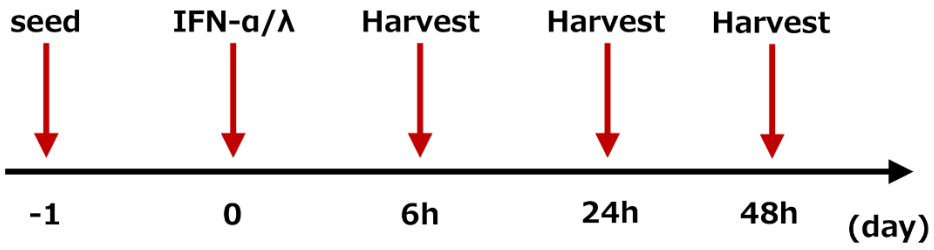

図 27.　本実験のタイムコース

各細胞を播種し、翌日に IFN-α または IFN-λ を投与した。薬剤投与後、6、24、48 時間後に細胞を回収した。

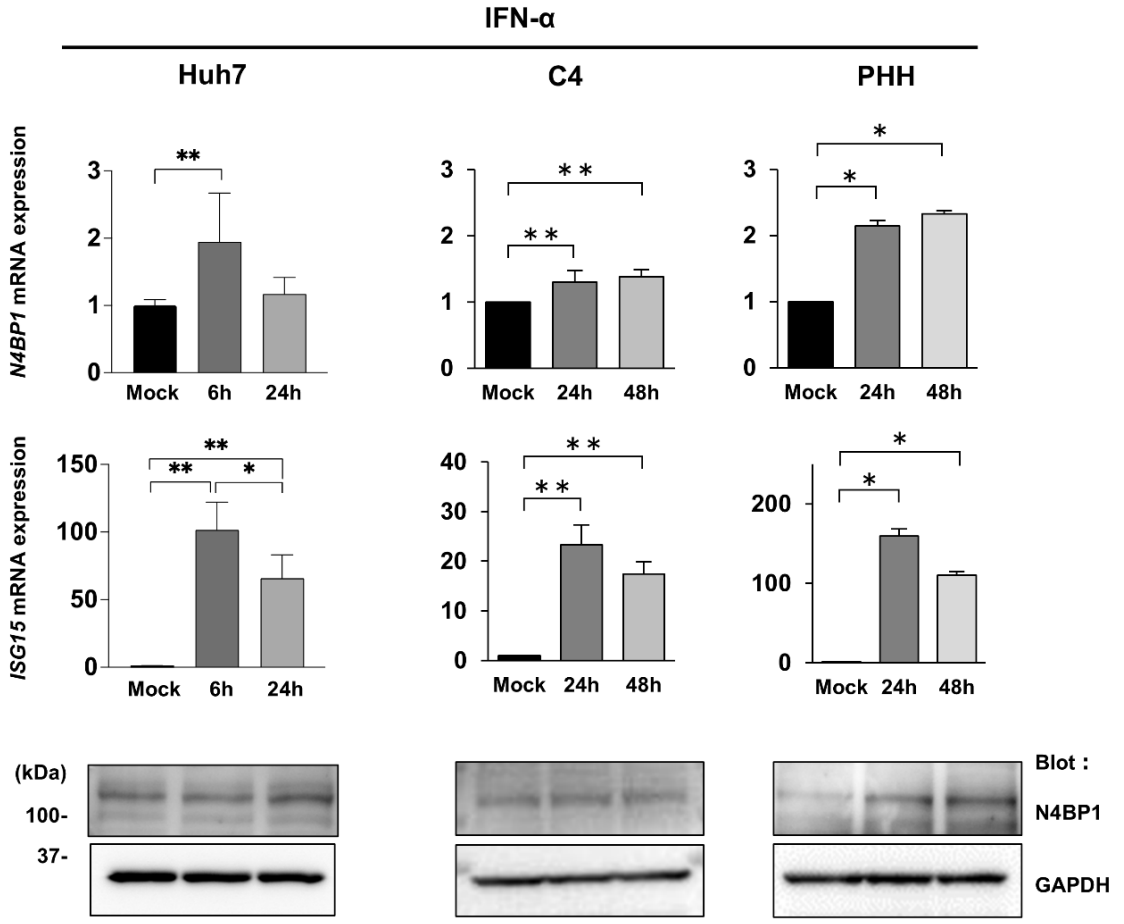

図 28.　各細胞における IFN-α 刺激による N4BP1 発現の解析

IFN-α 処理後、各細胞における N4BP1 および ISG15 の mRNA 発現を qPCR により測定した（上段および中段）。N4BP1 タンパク質の発現は WB により評価し、GAPDH をローディングコントロールとした（下段）。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P＜0.05、**P＜0.01。

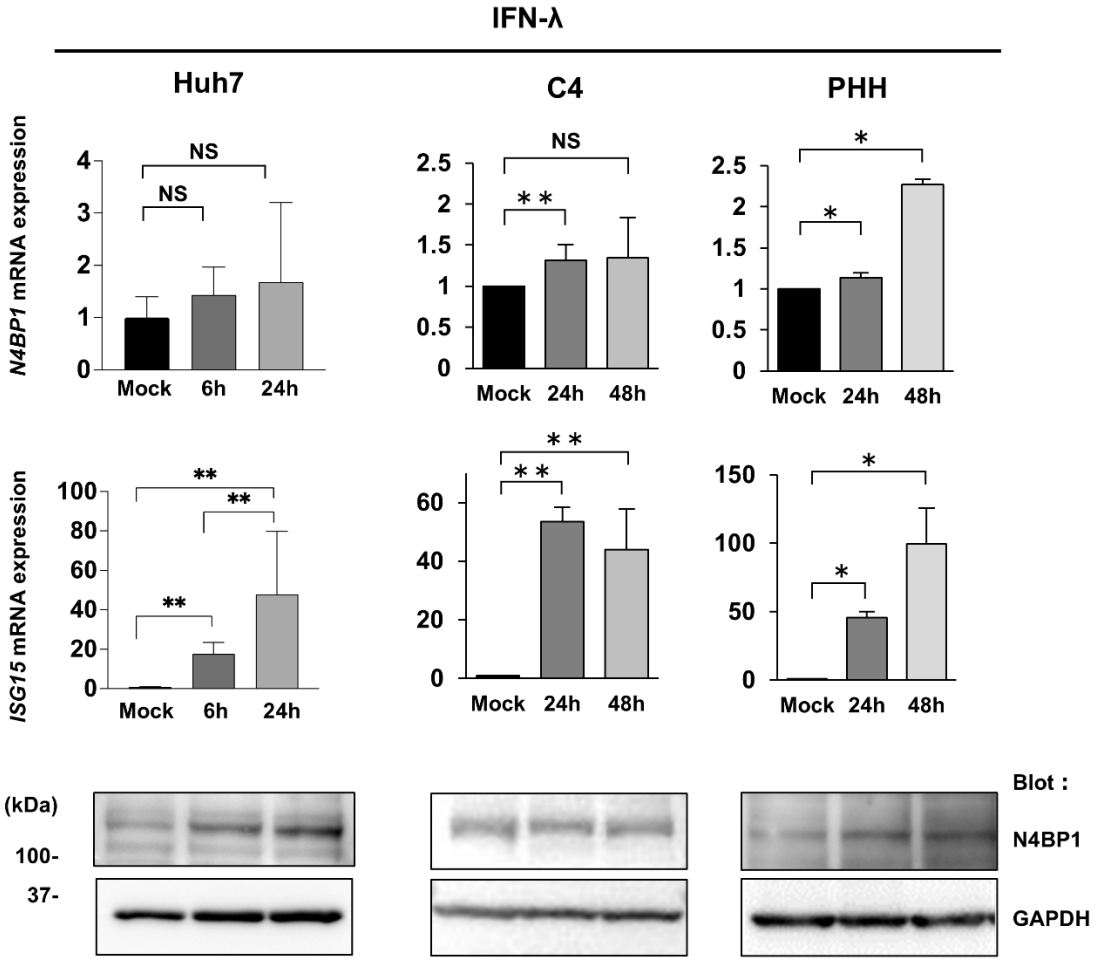

図 29.　各細胞における IFN-λ 刺激による N4BP1 発現の解析

IFN-λ 処理後、各細胞における N4BP1 および ISG15 の mRNA 発現を qPCR により測定した（上段および中段）。N4BP1 タンパク質の発現は WB により評価し、GAPDH をローディングコントロールとした（下段）。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P＜0.05、**P＜0.01。NS：有意差なし。

16. N4BP1 の発現は HBV DNA 陰性の HCC 患者および機能的治癒状態にある患者の肝組織において高発現していた

前述の検討により、PHH では IFN-α および IFN-λ の両方により N4BP1 の発現が誘導されることが示された。PHH は Huh7 細胞や HepG2-hNTCP C4 細胞のような肝癌細胞株とは異なり、IFN 応答を保持しているため、より生理学的に適切なモデルである。

本研究の *in vitro* 解析を補強するため、HBV-HCC 患者由来の肝切除検体および公的に利用可能な scRNA-seq データを解析し、肝組織における N4BP1 mRNA の発現と HBV の再活性化状態との関連を検討した。HCC の肝切除検体においては、全例が HBsAg（+）、HBeAg（-）、HBeAb（+）であり、血清 HBV DNA 量に基づいて HBV DNA 陽性群または陰性群に分類した。各患者の非癌部肝組織から RNA を抽出し、N4BP1 および ISG15 の mRNA 発現レベルを qPCR により測定した（図 30A、30B）。その結果、ISG15 mRNA の発現レベルには群間で有意差は認められなかったが、N4BP1 mRNA の発現レベルは HBV DNA 陰性群において有意に高かった。この結果と一致して、scRNA-seq データベース解析においても、機能的治癒（functional cure）とされた患者では、CHB 患者と比較して、N4BP1 mRNA の平均発現レベルが有意に高いことが確認された（図 30C、30D）。

以上の結果から、N4BP1 の発現は PHH において IFN-α および IFN-λ により誘導されることに加え、HBV DNA 陰性の HCC 患者や機能的治癒状態にある患者の肝組織においても高発現していることが示唆された。

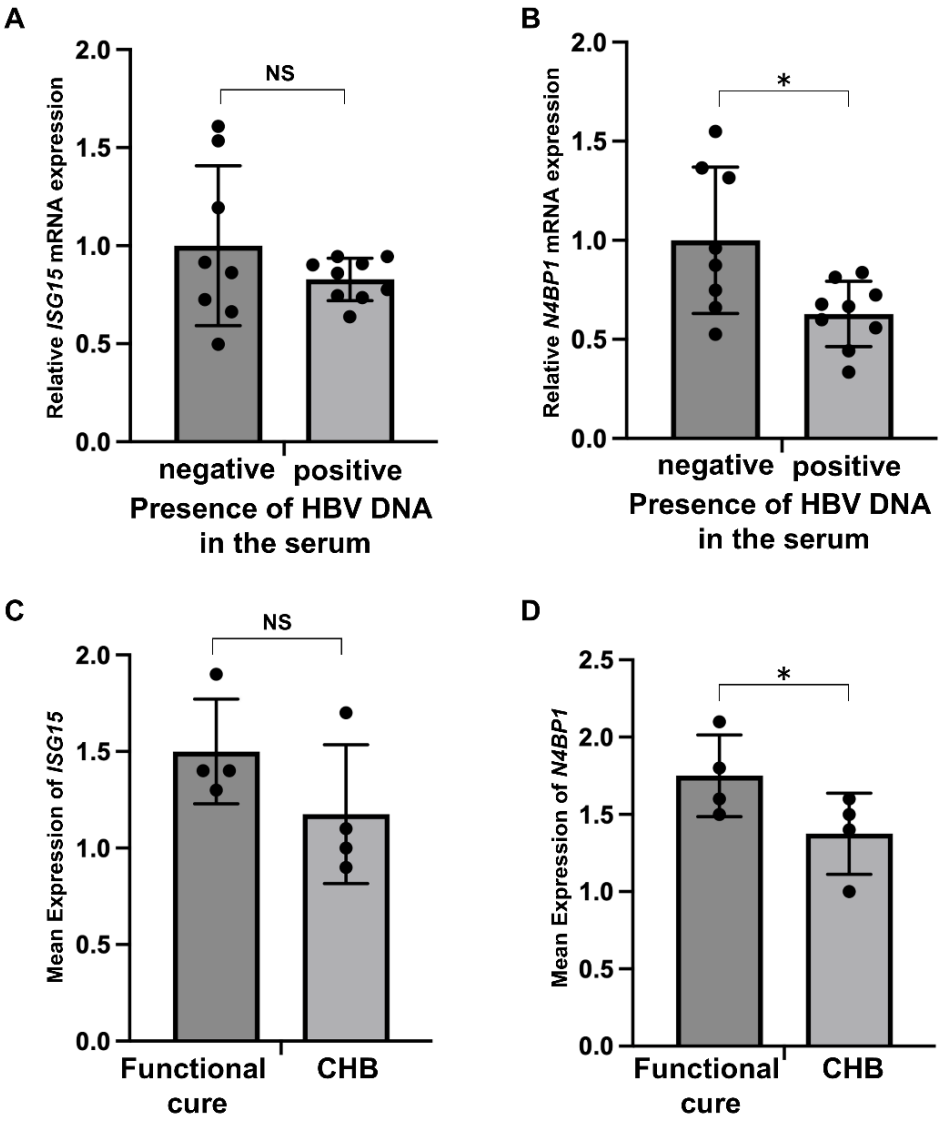

図 30.　臨床検体および scRNA-seq データに基づく N4BP1 発現の解析

HBV-HCC 患者由来の肝切除検体および scRNA-seq データを用いて、肝組織における N4BP1 mRNA の発現と HBV の再活性化状態との関連を解析した。（A、B）HBsAg（+）、HBeAg（-）、HBeAb（+）の HBV-HCC 患者由来の非癌部肝組織において、血中 HBV DNA の有無により陽性群（n＝9）と陰性群（n＝8）に分類し、ISG15（A）および N4BP1（B）の mRNA 発現レベルを測定した。（C、D）scRNA-seq データベースを用い、機能的治癒患者（n＝4）および慢性 B 型肝炎患者（n＝4）の肝細胞における ISG15（C）および N4BP1（D）の mRNA 発現レベルを測定した。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。*P < 0.05。NS：有意差なし。

考察

NA 製剤は一般的に忍容性が高く、HBV ゲノムの複製を強力に抑制するため、現在 HBV 治療において最も広く使用されている。しかし、NA 製剤は逆転写を阻害することで HBV ゲノムの複製を抑制するものの、肝細胞核内の cccDNA を直接排除することはできない。そのため、HBV の完全な治癒は困難であり、実際に NA 治療を中止した患者ではウイルス学的再燃を起こすリスクが高いため、長期にわたる NA 治療の継続が必要となる。また、NA 製剤の長期使用は抗ウイルス薬耐性の発現リスクを伴い（Honkoop et al, 1997 ; Tipples et al, 1996 ; Bartholomew et al, 1997）、広く使用されているエンテカビルやテノホビルであっても、耐性ウイルスの出現を完全に防ぐことはできない。そのため、NA 製剤の長期内服を回避し、HBV 感染を根本的に治癒できる新規治療法の開発が求められている。この背景のもと、本研究では、NA 製剤が標的とするウイルス因子とは異なるメカニズムで HBV の増殖を制御する宿主因子の同定を目的とした。RNA 認識モチーフドメインやジンクフィンガードメインを有する既知の RBP 132 種類を網羅的にスクリーニングした結果、N4BP1 が HBV ゲノムの複製を抑制することを発見した。さらに、肝癌細胞株において N4BP1 の発現レベルがコア内 rcDNA レベルと負の相関を示すことを確認し、N4BP1 が宿主因子として HBV ゲノムの複製を抑制する新たなターゲットである可能性を示唆した。

本研究では、N4BP1 の KH-like ドメインおよび RNase ドメインの両方が、HBV ゲノムの複製抑制効果に必須であることを確認した（図 17）。KH-like ドメインは RNA や一本鎖 DNA と結合し、スプライシングや転写・翻訳調節に関与することが知られている（Cai et al, 2014 ; Valverde et al, 2008 ; Hollingworth et al, 2012）。一方、N4BP1 の RNase ドメインはゲノム安定性の維持に関与し、標的 mRNA の切断を介して遺伝子発現を抑制することが報告されている（Anantharaman and Aravind, 2006）。本研究の RIP アッセイの結果から、N4BP1 は KH-like ドメインを介して HBV RNA に結合し、RNase ドメインの RNase 活性によって HBV RNA を分解している可能性が示唆された。しかし、N4BP1 がどのようにして HBV RNA を認識し結合するのか、その詳細なメカニズムは未解明であり、今後さらなる解析が必要である。

また本研究では、N4BP1 が HBV のライフサイクルにおいて pgRNA の段階で HBV ゲノムの複製を抑制することを明らかにした（図 19）。さらに、ノーザンブロッティングの結果、N4BP1 は HBV の 3.5 kb RNA に加えて、2.4/2.1 kb RNA の発現も抑制しており、これらの RNA に対して N4BP1 が分解を促進する、あるいは産生を抑制している可能性が示唆された。一方、cccDNA プロモーター活性アッセイ（図 20）では、N4BP1 による HBV RNA 転写の抑制を認めておらず、さらにトランスクリプトーム解析（図 22）においても、転写調節因子の大きな変動は観察されなかった。これらの結果から、N4BP1 による HBV の増殖抑制効

果は、HBV RNA の産生抑制や転写制御によるものではなく、主に RNA 分解の促進による機序である可能性が高いと考えられる。なお、この作用機序をより確実に裏付けるためには、Actinomycin D chase アッセイなどによる追加検討が必要である。さらに、N4BP1 が HBV ウイルスタンパク質の一つである HBx の発現に与える影響についても未解明であり、今後の解析が求められる。

N4BP1 は自然免疫および炎症性サイトカイン産生の抑制因子としても知られている。NF-κB はサイトカイン応答を引き起こす重要な転写因子であり、多くの免疫応答においてその活性化が必要不可欠である。N4BP1 は、NF-κB シグナル伝達に必須の調節因子である NEMO（IκB kinase γ とも呼ばれる）と相互作用し、Toll 様受容体（TLR）依存的な NF-κB の活性化を抑制することが報告されている（Shi et al, 2021）。また、N4BP1 欠損マウスでは軽度の炎症が生じ、TLR 依存的な炎症応答が増強されることが確認されている（Gitlin et al, 2020）。近年、N4BP1 が HBV のゲノム統合における新規ホットスポット遺伝子として同定されており（Cui et al, 2023）、HBV の増殖抑制効果を有する N4BP1 がウイルス統合の標的となることは興味深い知見である。さらに、N4BP1 は HIV-1 や豚繁殖・呼吸器症候群ウイルス（Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus）の複製にも関与していることが報告されている（Yamasoba et al, 2019 ; Gu et al, 2022）。いずれの報告でも、N4BP1 の RNase 活性がウイルス RNA を直接分解することでウイルスの複製を抑制することが確認されており、本研究の結果とも整合性がある。さらに、N4BP1 の RNase ドメインは、MCPIP1（Regnase-1）と類似した構造を有することが報告されている（Mino et al, 2021）。MCPIP1 は、HBV pgRNA を直接認識し分解することが知られている（Li et al, 2020）。しかし、MCPIP1 は細胞質に局在する RNase であるのに対し、N4BP1 は主に核に局在する。また、MCPIP1 は 2.4 kb および 2.1 kb HBV RNA の抑制には関与しないとされているが、本研究では N4BP1 がこれらの RNA を抑制することを明らかにした。これらの結果から、MCPIP1 と N4BP1 は異なる機構を介して HBV RNA の分解を制御している可能性が示唆される。本研究では、N4BP1 の KH-like ドメインが HBV の増殖抑制効果に重要であることも確認された。これは、KH-like ドメインが HBV RNA への結合に関与しているためと考えられるが、その詳細なメカニズムについてはさらなる検討が必要である。

N4BP1 の発現は I 型 IFN（IFN-α）によって誘導されることが報告されている（Yamasoba et al, 2019）。しかし、本研究において IFN-α（I 型 IFN）および IFN-λ（III 型 IFN）による N4BP1 の発現誘導は、PHH と肝癌細胞株（Huh7 および HepG2）で異なる結果を示した。この差異は、Huh7 および HepG2 細胞における IFN シグナル伝達の異常が報告されていること（Melén et al, 2000；Marozin et al, 2008）に起因する可能性がある。これらの細胞株では IFN 応答が低下しており、その結果、N4BP1 の誘導が制限されていると考えられる。また、ISG15 は IFN-α および IFN-λ の誘導因子である（Speer et al, 2016；Dickensheets et al, 2013）。本

研究では、N4BP1 の発現特性を調べた結果、肝癌細胞株では HBV 感染または HBV ゲノムのトランスフェクションによって N4BP1 の発現は誘導されなかった（図 15）。さらに、臨床肝組織検体において、N4BP1 の発現量は HBV DNA 陽性検体で有意に低く、HBV DNA 陰性検体で高い発現を示した（図 30A、30B）。加えて、scRNA-seq データ解析により、機能的治癒患者における N4BP1 の発現レベルが、CHB 患者と比較して有意に高いことが確認された（図 30C、30D）。これらの結果から、N4BP1 の発現は個体ごとに異なり、その発現レベルの違いにより HBV ゲノムの複製や再活性化に与える影響が異なる可能性が示唆された。あるいは、N4BP1 の上流因子が発現レベルの変動を引き起こし、HBV の再活性化に影響を与えている可能性も考えられた。さらに、N4BP1 はカスパーゼ-8（Gitlin et al, 2020）や粘膜関連リンパ組織リンフォーマ転座因子 1（MALT1）（Yamasoba et al, 2019）によって免疫細胞内で不活性化されることが報告されている。特に MALT1 による N4BP1 の不活性化は、HIV-1 の再活性化を引き起こすことが知られている。しかし、本研究では PHH に対して N4BP1 を過剰発現した際の RNA-seq 解析において、MALT1 の発現誘導は確認されなかったため、本研究の条件下では MALT1 が HBV ゲノムの複製に関与している可能性は低いと考えられる。しかし、MALT1 以外のシグナル伝達因子が N4BP1 の発現を制御し、結果的に肝細胞における HBV ゲノムの複製を促進する可能性も否定できない。この点については、さらなる研究が必要である。

本研究の限界の一つは、N4BP1 と HBV の再活性化との関連を評価する際に用いた患者検体の数が限られていることである。この関連性をより詳細に検討するためには、より多くの患者検体を用いた解析が必要となる。さらに、N4BP1 が結合する HBV RNA の特異的配列や構造の同定も今後の課題として残されている。HBV RNA は相互にオーバーラップする配列を有するため、明確な結合領域を特定することは困難であった。先行研究では、N4BP1 は HIV-1 転写産物を分解できることが示されており、GC ジヌクレオチド以外の配列モチーフを認識する可能性が示唆されている（Yamasoba et al, 2019）。HIV-1 RNA は GC ジヌクレオチドの頻度が著しく低いため、N4BP1 が GC 依存的に RNA を認識するとは限らない。本研究のデータに基づくと、HBV の 3.5 kb RNA および 2.4/2.1 kb RNA のオーバーラップ領域が N4BP1 の結合部位である可能性が考えられた。この点については、さらなる詳細な解析が必要である。

本研究では、現在承認されている HBV 治療法とは異なるアプローチによる HBV 感染の治療法を模索するため、RBP に着目した。その結果、N4BP1 が新規の HBV の増殖抑制作用を有する RBP であり、HBV RNA の分解を介して HBV ゲノムの複製を抑制することを明らかにした。N4BP1 による HBV ゲノムの複製抑制作用の詳細な分子メカニズムは未解明の部分が残るものの、N4BP1 と HBV の関連性を解明することで、新たな HBV 治療法の開発につながる可能性がある。

結論

① 本研究全体から得られた新知見

・N4BP1 が HBV ゲノムの複製を抑制する新規の宿主因子であることを明らかにした。

・N4BP1 が pgRNA の分解を介して HBV ゲノムの複製を抑制することを解明した。

・臨床検体の解析により、N4BP1 の発現量と HBV のゲノム量が負の相関を示すことを確認した。

・N4BP1 の KH-like ドメインおよび RNase ドメインが HBV の増殖を抑制する作用に不可欠であることを明らかにした。

② 新知見の意義

本研究の成果は、HBV 治療の新たな可能性を示すものである。現在、HBV 治療の主流は NA 製剤であり、ウイルスの逆転写を阻害することで HBV ゲノムの複製を抑制する。しかし、NA 製剤は肝細胞内の cccDNA を排除できず、ウイルスの持続感染を完全に根絶することは難しいため、長期投与が必要となる。一方で、N4BP1 は HBV pgRNA を直接分解することにより HBV ゲノムの複製を抑制することが示された。この作用機序は、従来の治療法とは異なるアプローチであり、cccDNA の機能的抑制を通じて HBV の持続感染を制御する新たな治療戦略につながる可能性を秘めている。さらに、臨床検体の解析により N4BP1 の発現と HBV のゲノム量が負の相関を示したことは、N4BP1 が自然免疫応答や病態進行に関与する可能性を示唆しており、今後の診断・治療マーカーとしての応用も期待される。また、本研究では N4BP1 の KH-like ドメインおよび RNase ドメインが HBV ゲノムの複製を抑制する作用に不可欠であることを明らかにしており、今後の創薬ターゲットとしての展開も視野に入る。

③今後の課題

N4BP1 の HBV の増殖抑制作用に関与する分子機構のさらなる解明

・N4BP1 の KH-like ドメインにおける RNA 結合機能および RNase 活性の標的部位を、RIP アッセイや CLIP-seq 解析等の構造生物学的解析を用いて明らかにする。

・N4BP1 が cccDNA の転写活性に与える影響を Actinomycin D chase アッセイなどにより検証する。

・N4BP1 が HBV RNA のどの配列や構造を認識して分解を促進しているのかを詳細に解析する。

・N4BP1 と他の RNA 分解因子との相互作用や協調機構を明らかにする。

④本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

本研究の成果を基に、今後以下のような研究が展開されることが期待される。

1. N4BP1 を標的とした新規 HBV 治療法の開発

・N4BP1 の発現または活性を促進する化合物のスクリーニングを行い、新規治療薬としての可能性を検討する。

・上記スクリーニングにより得られた候補化合物を用いて、ヒト化マウスや HBV トランスジェニックマウスなどの *in vivo* モデルを用いて N4BP1 の HBV の増殖抑制作用と安全性を検証し、臨床応用の可能性を探る。

2. N4BP1 の免疫調節機能と HBV 病態との関連の解明

・N4BP1 が I 型 IFN 応答や炎症シグナル伝達に与える影響を解析し、HBV の免疫回避機構との関連を明らかにする。

・HBV 感染患者における N4BP1 の発現動態を詳細に解析し、病態マーカーとしての有用性を検討する。また N4BP1 の遺伝子多型（SNP）と予後の関連性について追跡調査を行い、予後予測マーカーとしての可能性を検討する。

・臨床検体を用いた大規模コホート研究を実施し、N4BP1 発現と HBV 治療成績や病態進行との関連を明らかにする。

・N4BP1 の発現レベルを指標とした個別化治療の可能性を検討するため、SNP と予後との関連、患者背景や治療反応性との関連を解析する。

3. N4BP1 を標的とした治療法の実用化に向けた研究

・N4BP1 の過剰発現または活性化が肝細胞に及ぼす毒性や免疫応答への影響を検討し、安全性を評価する。

・N4BP1 の発現制御メカニズムを解明し、治療標的としての適格性を検証する。

⑤総括

本研究により、N4BP1 が HBV ゲノムの複製を抑制する新規宿主因子として機能することが明らかとなった。N4BP1 は pgRNA の分解を介して HBV ゲノムの複製を抑制することが示され、また臨床検体の解析によって N4BP1 の発現と HBV ゲノムの複製との間に負の相関が示された。これらの知見により、N4BP1 が HBV 治療の新たな標的となる可能性が示唆された。今後、分子機構のさらなる解明や N4BP1 を標的とした治療法の開発が進展することで、HBV 持続感染の克服につながる新たな治療戦略の確立が期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご指導を賜りました九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野 福原崇介教授、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 I 武冨紹信教授に心より感謝申し上げます。日々の実験指導のみならず、研究の進め方に至るまで懇切丁寧にご助言いただきましたことに、深く感謝いたします。また、九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野 鈴木紗織先生には、技術的な手法から考察の進め方、論文作成に至るまで、多岐にわたるご指導とご助力を賜りました。ここに感謝の意を表します。さらに、貴重な資料をご恵与いただきました京都大学 竹内理先生、国立感染症研究所 脇田隆字先生、山梨大学 森石恆司先生、アデノウイルスベクター作成をご担当いただいた東京慈恵会医科大学 鐘ヶ江裕美先生、RNA シークエンス解析をご担当いただいた大阪大学 奥崎大介先生、ならびにノーザンブロッティング解析に関してご指導・ご助言くださった熊本大学 田中靖人先生をはじめとする関係各位に、厚く御礼申し上げます。本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED、研究費番号：22fk0310501h0001、22fk0310506h0001、22fk0310513h0001、22fk0310524h0001、22fk0310523h0001）、革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST、研究費番号：JP22gm1610008）、および科学研究費助成事業（研究費番号：JP23K20041）による支援を受けて実施されました。ここに記して感謝申し上げます。最後に、本研究の遂行にあたりさまざまな助言や励ましを頂きました所属研究室の皆様にも、この場をお借りして深く感謝申し上げます。

利益相反

本研究に関して著者全員に開示すべき利益相反はありません。

引用文献

Anantharaman V and Aravind L（2006）The NYN domains: novel predicted RNAses with a PIN domain-like fold. RNA Biol. 3, 18-27.

Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, Reddy KR, Johnson LC, Bunzendahl H, Condreay L, Tzakis A, Schiff E and Brown N（1997）Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. Lancet 349, 20-22.

Cai J, Yang L, Wang B, Huang Y, Tang J, Lu Y, Wu Z and Jian J（2014）Identification of a novel N4BP1-like gene from grass carp （Ctenopharyngodon idella） in response to GCRV infection. Fish Shellfish Immunol. 36, 223-228.

Cui X, Li Y, Xu H, Sun Y, Jiang S and Li W（2023）Characteristics of Hepatitis B virus integration and mechanism of inducing chromosome translocation. NPJ Genom Med. 8, 11.

Dickensheets H, Sheikh F, Park O, Gao B and Donnelly RP（2013）Interferon-lambda （IFN-λ） induces signal transduction and gene expression in human hepatocytes, but not in lymphocytes or monocytes. J Leukoc Biol. 93, 377-385.

Dienstag JL, Perrillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicary C and Rubin M（1995）A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. N Engl J Med. 333, 1657-1661.

Doong SL, Tsai CH, Schinazi RF, Liotta DC and Cheng YC（1991）Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues. Proc Natl Acad Sci U S A. 88, 8495-8499.

European Association for the Study of the Liver（2017）EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. J Hepatol. 67, 370-398.

Gitlin AD, Heger K, Schubert AF, Reja R, Yan D, Pham VC, Suto E, Zhang J, Kwon YC, Freund EC, et al（2020）Integration of innate immune signalling by caspase-8 cleavage of N4BP1. Nature 587, 275-280.

Gu H, Zheng S, Han G, Yang H, Deng Z, Liu Z and He F（2022）Porcine Reproductive

and Respiratory Syndrome Virus Adapts Antiviral Innate Immunity via Manipulating MALT1. mBio 13, e0066422.

Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM 3rd, Zheng S, Butler A, Lee MJ, Wilk AJ, Darby C, Zager M, et al（2021）Integrated analysis of multimodal single-cell data. Cell 184, 3573-3587.

Hayes CN, Zhang Y, Makokha GN, Hasan MdZ, Omokoko MD and Chayama K（2016）Early events in hepatitis B virus infection: From the cell surface to the nucleus. J Gastroenterol Hepatol. 2, 302-309.

Hollingworth D, Candel AM, Nicastro G, Martin SR, Briata P, Gherzi R and Ramos A（2012）KH domains with impaired nucleic acid binding as a tool for functional analysis. Nucleic Acids Res. 40, 6873-6886.

Honkoop P, Niesters HG, de Man RA, Osterhaus AD and Schalm SW（1997）Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. Incidence and patterns. J Hepatol. 26, 1393-1395.

Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly H. H, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, et al（2014）Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. BioChem Biophys Res Commun. 443, 808-813.

Kitamura K, Que L, Shimadu M, Koura M, Ishihara Y, Wakfae K, Nakamura T, Watashi K, Wakita T and Muramatsu M（2018）Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus. PLoS Pathog. 14, e1007124.

Köing A, Yang J, Jo E, Park HPK, Kim H, Than TT, Song X, Qi X, Dai X, Park S, et al（2019）Efficient long-term amplification of hepatitis B virus isolates after infection of slow proliferating HepG2-NTCP cells. J Hepatol. 71, 289-300.

Koniger C, Wingert I, Marsmann M, Rosler C, Beck J and Nassal M（2014）Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. Proc Natl Acad Sci USA. 111, E4244-4253.

Li M, Yang J, Zhao Y, Song Y, Yin S, Guo J, Zhang H, Wang K, Wei L, Li S, et al（2020）MCPIP1 inhibits Hepatitis B virus replication by destabilizing viral RNA and negatively

regulates the virus-induced innate inflammatory responses. Antiviral Res. 174, 104705.

Li Q, Sun B, Zhuo Y, Jiang Z, Li R, Lin C, Jin Y, Gao Y and Wang D（2022）Interferon and interferon-stimulated genes in HBV treatment. Front Immunol. 13, 1034968.

Liang C, Rieder E, Hahm B, Jang SK, Paul A and Wimmer E（2005）Replication of a novel subgenomic HCV genotype 1a replicon expressing a puromycin resistance gene in Huh-7 cells. Virology 333, 41-53.

Love MI, Huber W and Anders S（2014）Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 15, 550.

Mao R, Nie H, Cai D, Zhang J, Liu H, Yan R, Cuconati A, Block T, Guo J and Guo H（2013）Inhibition of hepatitis B virus replication by the host zinc finger antiviral protein. PLoS Pathog. 9, e1003494.

Marozin S, Altomonte J, Stadler F, Thasler WE, Schmid RM and Ebert O（2008）Inhibition of the IFN-β Response in Hepatocellular Carcinoma by Alternative Spliced Isoform of IFN Regulatory Factor-3. Molecular Therapy 16, 1789-1797.

Melén K, Keskinen P, Lehtonen A and Julkunen I（2000）Interferon-induced gene expression and signaling in human hepatoma cell lines. J Hepatol. 33, 764-772.

Mino T and Takeuchi O（2021）Regnase-1-related endoribonucleases in health and immunological diseases. Immunol Rev. 304, 97-110.

Nakai M, Komiya K, Murata M, Kimura T, Kanaoka M, Kanegae Y and Saito I（2007）Expression of pIX gene induced by transgene promoter: possible cause of host immune response in first-generation adenoviral vectors. Hum Gene Ther. 18, 925-936.

Narmada BC, Khakpoor A, Shirgaonkar N, Narayanan S, Aw PPK, Singh M, Ong KH, Owino CO, Ng JWT, Yew HC, et al（2024）Single-cell landscape of functionally cured chronic hepatitis B patients reveals activation of innate and altered CD4-CTL-driven adaptive immunity. J Hepatol. 81, 42-61.

Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC and McDade H（1996）Viral dynamics in hepatitis B virus infection. Proc Natl Acad Sci USA. 93, 4398-4402.

Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H and Kanehisa M（1999）KEGG: Kyoto Encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res. 27, 29-34.

Pei Z, Kondo S, Kanegae Y and Saito I（2012）Copy number of adenoviral vector genome transduced into target cells can be measured using quantitative PCR: application to vector titration. Biochem Biophys Res Commun. 417, 945-950.

Qi Y, Gao Z, Xu G, Peng B, Liu C, Yan H, Yao Q, Sun G, Liu Y, Tang D, et al（2016）DNA Polymerase kappa Is a Key Cellular Factor for the Formation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Virus. PLoS Pathog. 12, e1005893.

Rijckborst V and Janssen HL（2010）The Role of Interferon in Hepatitis B Therapy. Curr Hepat Rep. 9, 231-288.

Selzer L and Zlotnick A（2015）Assembly and Release of Hepatitis B Virus. Cold Spring Harb Perspect Med. 5, a021394.

Sheraz M, Cheng J, Tang L, Chang J and Guo JT（2019）Cellular DNA Topoisomerases Are Required for the Synthesis of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA. J Virol. 93, e02230-18.

Shi H, Sun L, Wang Y, Liu A, Zhan X, Li X, Tang M, Anderton P, Hildebrand S, Quan J, et al（2021）N4BP1 negatively regulates NF-kappaB by binding and inhibiting NEMO oligomerization. Nat Commun. 12, 1379.

Speer SD, Li Z, Buta S, Payelle-Brogard B, Qian L, Vigant F, Rubino E, Gardner T, Wedeking T, Hermann M, et al（2016）ISG15 deficiency and increased viral resistance in humans but not mice. Nat Commun. 7, 11496.

Sun S, Nakashima K, Ito M, Li Y, Chida T, Takahashi H, Watashi K, Sawasaki T, Wakita T and Suzuki T（2017）Involvement of PUF60 in Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Expression. Sci Rep. 7, 12874.

Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, Sezaki H, Arase Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, et al（2006）Clinical and virological features of non-breakthrough and severe exacerbation due to lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants. J Med Virol. 78, 341-352.

Suzuki M, Kondo S, Pei Z, Maekawa A, Saito I and Kanegae Y（2015）Preferable sites and orientations of transgene inserted in the adenovirus vector genome: The E3 site may be unfavorable for transgene position. Gene Ther. 22, 421-429.

Tang H, Huang Y, Chen J, Yu C and Huang AL（2008）Cellular protein TIA-1 regulates the expression of HBV surface antigen by binding the HBV posttranscriptional regulatory element. Intervirology. 51, 203-209.

Tang LSY, Covert E, Wilson E and Kottilil S（2018）Chronic Hepatitis B Infection: A Review. 2018. JAMA 319, 1802-1813.

The Human Protein Atlas （2024）. In The Human Protein Atlas, https://www.proteinatlas.org/（Accessed 1 April 2025）

Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM and Tyrrell DL（1996）Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. Hepatology 24, 714-717.

Valverde R, Edwards L and Regan L（2008）Structure and function of KH domains. FEBS J. 275, 2712-2726.

Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, et al（2013）Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase （AID）. J Biol Chem. 288, 31715-37127.

Wickham H（2016）ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.（Springer-Verlag New York：New York, NY）

Wolf FA, Angerer P and Theis FJ（2018）SCANPY: large-scale single-cell gene expression data analysis. Genome Biol. 19, 15.

World Health Organization（2024）Hepatitis B Fact Sheet [updated 9 April 2024]. In https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b（Accessed 1 April 2025）

World Health Organization（2024）Immunization Coverage [updated 15 July 2024]. In https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage（Accessed 1 April 2025）

Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, Feng T, Zhou L, Tang W, Zhan L, et al（2021）clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. Innovation（Camb）2, 100141.

Xu W, Ma C, Zhang Q, Zhao R, Hu D, Zhang X, Chen J, Liu F, Wu K, Liu Y, et al（2018）PJA1 Coordinates with the SMC5/6 Complex To Restrict DNA Viruses and Episomal Genes in an Interferon-Independent Manner. J Virol. 92, e00825-18.

Yamashita A, Tamaki M, Kasai H, Tanaka T, Otoguro T, Ryo A, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd, N. Tanaka J, et al（2017）Inhibitory effects of metachromin A on hepatitis B virus production via impairment of the viral promoter activity. Antiviral Res. 145, 136-145.

Yamasoba D, Sato K, Ichinose T, Imamura T, Koepke L, Joas S, Reith E, Hotter D, Misawa N, Akaki K, et al（2019）N4BP1 restricts HIV-1 and its inactivation by MALT1 promotes viral reactivation. Nat Microbiol. 4, 1532-1544.

Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, et al（2012）Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. Elife 13, e00049.

Zheng GX, Terry JM, Belgrader P, Ryvkin P, Bent ZW, Wilson R, Ziraldo SB, Wheeler TD, McDermott GP, Zhu J, et al（2017）Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. Nat Commun. 8, 14049.