

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16057

研究課題名(和文)麻疹ウイルス膜融合開始複合体の構造解析による宿主細胞感染機構の解明

研究課題名(英文)Structural basis for the measles virus membrane fusion initiation complex

研究代表者

鈴木 干城 (Suzuki, Tateki)

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：80833334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：麻疹(はしか)を起こす麻疹ウイルスは、高い感染力を示し、一過性の免疫抑制を起こすため、高い病原性を示す。その医学的重要性にもかかわらず、未だ感染メカニズムは十分理解されていない。ウイルスのエンベロープ上には2つのタンパク質、ヘマグルチニン(H)と融合タンパク質(F)が存在する。Hは宿主細胞上の受容体を認識して、Fを活性化することで膜同士の融合を引き起こし、細胞にウイルスゲノムを送り込む。本研究では、Fの活性化を担うHのstalkドメインの結晶構造解析を行い、ウイルス感染における膜融合制御モデルを提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麻疹(はしか)には予防のためのワクチンはあるものの、一旦発症すると治療法が存在せず、未だに世界全体で約13万人の死者を出している。また、低頻度ながら、感染から数年を経て致死性脳炎を発症する等の問題があり、有効な抗ウイルス薬の開発が望まれている。本研究では、ウイルスの感染に必須となるヘマグルチニンタンパク質の結晶構造解析を行い、その立体構造を解析した。さらに解析した立体構造に基づいて、ウイルスによる細胞感染モデルを提案した。我々が明らかにした結晶構造は有効な抗ウイルス薬開発の構造基盤としても活用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The measles virus, which is a causative agent of measles, is highly pathogenic because it is highly infectious and causes transient immunosuppression. Despite its medical importance, the mechanism of infection is still poorly understood. Two proteins, haemagglutinin (H) and fusion protein (F), are present on the viral envelope; H recognizes receptors on host cells and activates F, causing membrane fusion and delivering the viral genome into the cell. In this study, we analyzed the crystal structure of the H stalk domain, which is responsible for the activation of F, and proposed a model for the membrane fusion in viral infection.

研究分野：ウイルス学、構造生物学

キーワード：麻疹ウイルス ヘマグルチニン 膜融合 X線結晶構造解析 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

麻疹(はしか)には予防のためのワクチンはあるものの、一旦発症すると治療法が存在せず、未だに世界全体で毎年約13万人の死者を出している。また、低頻度ながら、感染から数年を経て致死性脳炎を発症する等の問題があり、有効な抗ウイルス薬の開発が望まれている。

麻疹ウイルス(MeV)は、ウイルス粒子膜上に存在する2種類の1回膜貫通型タンパク質(HとF)を用いて細胞へ感染を開始する。Hタンパク質(H)は受容体結合能を担っており、細胞表面の特異的な受容体に結合してウイルスの細胞/組織特異性を決定する。麻疹ウイルスはまず、免疫細胞特異的な受容体であるSLAMを認識して免疫細胞に感染することで全身へと広がる。その後、上皮細胞特異的な受容体であるNectin-4を認識して気道の管腔側へと放出され、他個体へと伝染する。感染成立にはHによる受容体の認識に加え、ウイルス粒子膜と細胞膜が融合し、ウイルスゲノムが細胞内へ放出される必要がある。Fタンパク質(F)は膜融合活性を持ち、細胞膜にアンカーされることでウイルス粒子膜と細胞膜を近づけ、膜融合を引き起こす。つまり、麻疹ウイルスの感染過程における細胞/組織特異性の決定と細胞侵入はHとFが担っている。HとFはウイルス粒子膜上で複合体を形成しており、Hの受容体結合がFの膜融合を誘導する。すなわち、受容体結合によりHは構造変化を起こし、その構造変化がFに伝達される。伝達後、FはPrefusion型から中間体構造を経て安定なPostfusion型へと不可逆的に構造変化して膜融合が起こる。従って、Fは感染過程の適切な状況で構造変化し、膜融合を起こすようにHによって厳密に制御されている。これまでに、Hと受容体の共結晶構造解析により、Hによる受容体認識メカニズムは明らかになってきた。しかしながら、受容体結合によるHの構造変化がどのようにしてFに伝達され、構造変化を誘導し、膜融合を起こすのかは未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

Hタンパク質は受容体との結合を担うheadドメインと、受容体結合シグナルをFに伝達してその構造変化を誘導するstalkドメインから構成されている。本研究ではstalkドメインに着目し、受容体非依存的に膜融合を誘導するように改変したstalkドメインの結晶構造解析を行い、HからFへのシグナル伝達メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Hタンパク質のheadドメインをGCN4と呼ばれる4量体化ドメインで置き換えた融合タンパク質(headless stalk_{GCN4})をFタンパク質と共発現させると、受容体非依存的に膜融合を起こすことが報告されている。そこで、麻疹ウイルスと同じモルビリウイルス属に属するイヌジステンパーウイルス(CDV)とネコモルビリウイルス(FeMV)のstalkドメインにGCN4を融合させたheadless stalk_{GCN4}タンパク質を調製し、結晶構造解析を行った。さらに膜融合アッセイにより、調製したheadless stalk_{GCN4}が膜融合活性型の構造であることを確認した。

4. 研究成果

(1) CDV由来 headless stalk_{GCN4}の結晶構造解析

Headless stalk_{GCN4}は受容体非依存的にFを活性化して膜融合を起こすことから、受容体結合後のHstalkの構造を取っていると考えられる。そこで、昆虫細胞発現系を利用して組換えheadless stalk_{GCN4}を調製し、結晶化を行った。構造解析の結果、headless stalk_{GCN4}はstalkヘリックスとGCN4ヘリックスがループでつながったヘアピン構造をしており、ヘリックスを介してコイルドコイル構造を持つ二量体を形成していたが、予想外なことに、その会合の仕方は逆平行の向きであった(図1A)。二量体の界面にはロイシンやイソロイシンといった疎水性残基が並び、疎水性相互作用を形成していた(図1B、C)。

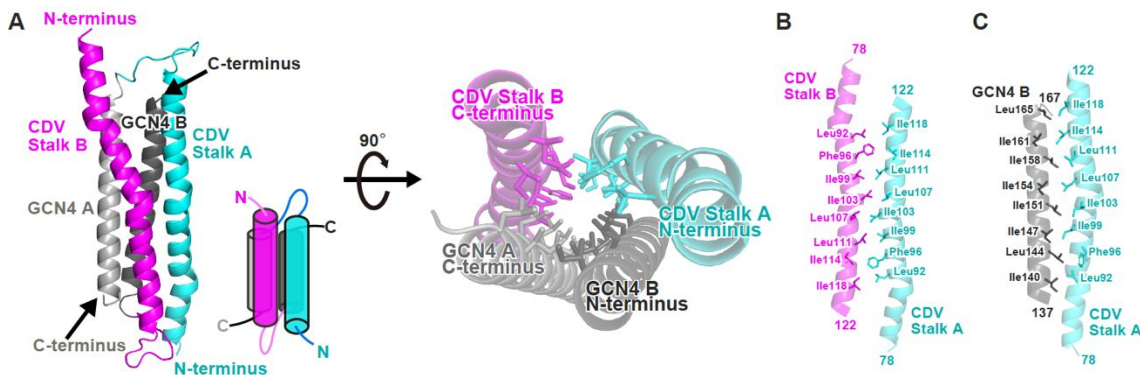


図1. CDV由来 headless stalk_{GCN4}の結晶構造. (A) Headless stalk_{GCN4}の二量体構造. (B)逆平行な2本のstalkヘリックス間の相互作用. (C)平行なstalk-GCN4ヘリックス間の相互作用.

(2) Headless stalkGCN4 を用いた膜融合アッセイ

結晶構造解析に用いた headless stalk_{GCN4} が膜融合能を持つかどうかを確認するため、膜融合アッセイを行った。headless stalk_{GCN4} と F をコードする発現プラスミドを 293FT 細胞にトランスフェクションして共発現させたところ、headless stalk_{GCN4} は受容体非依存的に膜融合が起こることが示された (図 2A、B)。このことから、逆平行型の H stalk が F の活性化を引き起こすことが示唆された。

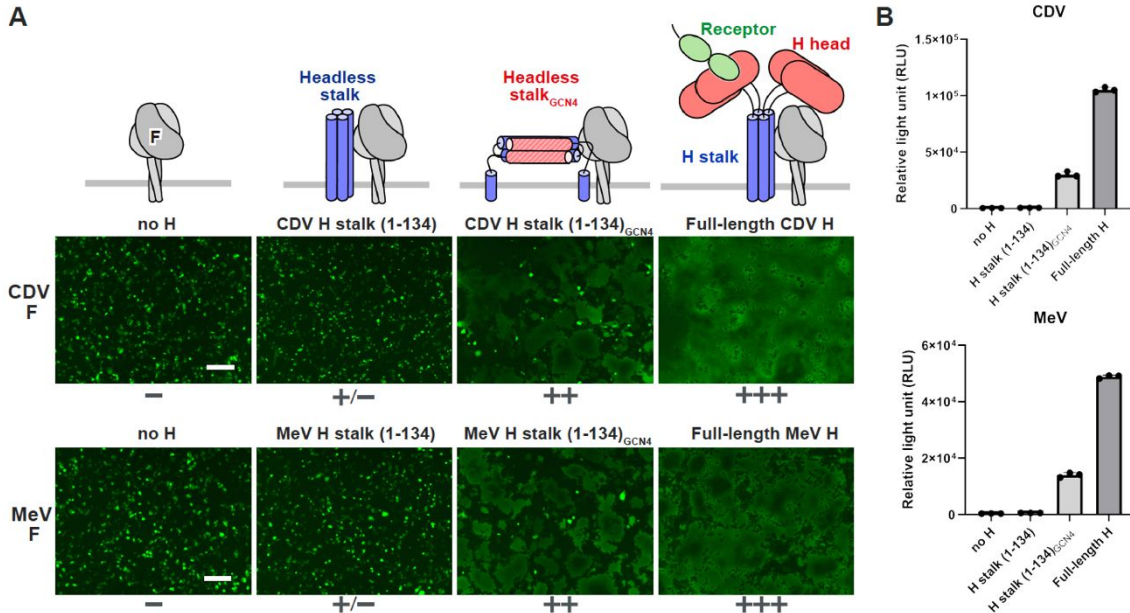


図 2. Headless stalk_{GCN4} を用いた膜融合アッセイ.

(A) トランスフェクション後 16 時間の細胞の様子。(B) A の実験を定量化したグラフ。

(3) FeMV 由来 headless stalk_{GCN4} の結晶構造解析

FeMV headless stalk_{GCN4} についても結晶化条件を探索した所、二量体が更に二量体を形成した四量体構造が得られた (図 3)。全長の H は四量体構造を取ることが報告されていることから、この構造は全長の H 四量体が受容体に結合したときの stalk の構造を反映していると考えられる。

以上の結果から、次のような H による F の膜融合制御モデルを提案した (図 4) (論文投稿中)。

H と F はウイルス粒子膜上で複合体を形成しており、H の stalk ドメインは 4 本の平行な ヘリックス構造を取る (図 4A)。H の head ドメインが宿主細胞の受容体分子を認識すると (図 4B)、stalk ドメインは構造変化して、平行な ヘリックスから逆平行な ヘリックス構造に変化する。この構造変化は F の構造変化を誘導する (図 4C)。その結果 F は中間体構造を経て (図 4D)、Postfusion 型となり膜融合が起こる (図 4E)。これらの成果から、H stalk ドメインをターゲットにした抗ウイルス薬の開発が期待される。

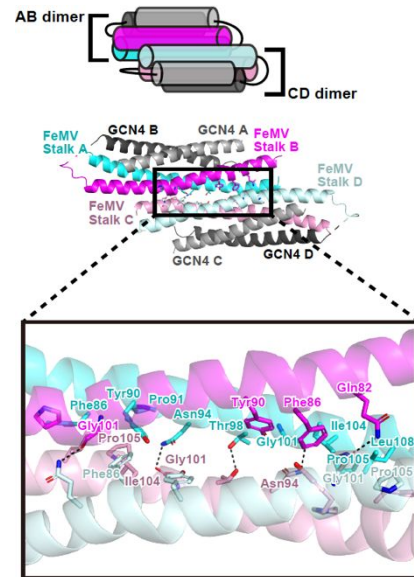


図 3. FeMV 由来 headless stalk_{GCN4} の四量体構造.

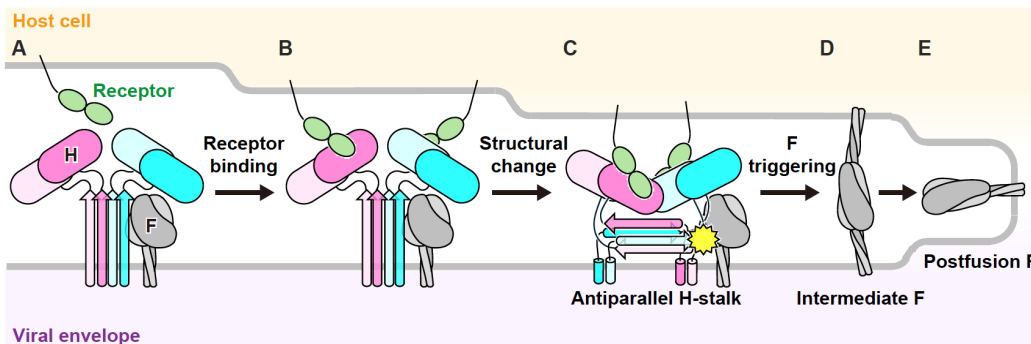


図 4. モルビリウイルス H タンパク質による F タンパク質活性化モデル.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takemoto Ryuichi, Hirai Yuichi, Watanabe Shumpei, Harada Hidetaka, Suzuki Tateki, Hashiguchi Takao, Yanagi Yusuke, Shirogane Yuta	4. 巻 97
2. 論文標題 Interaction of the Hemagglutinin Stalk Region with Cell Adhesion Molecule (CADM) 1 and CADM2 Mediates the Spread between Neurons and Neuropathogenicity of Measles Virus with a Hyperfusogenic Fusion Protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0034023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.00340-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shirogane Yuta, Harada Hidetaka, Hirai Yuichi, Takemoto Ryuichi, Suzuki Tateki, Hashiguchi Takao, Yanagi Yusuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Collective fusion activity determines neurotropism of an en bloc transmitted enveloped virus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adf3731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takemoto Ryuichi, Suzuki Tateki, Hashiguchi Takao, Yanagi Yusuke, Shirogane Yuta	4. 巻 96
2. 論文標題 Short-Stalk Isoforms of CADM1 and CADM2 Trigger Neuropathogenic Measles Virus-Mediated Membrane Fusion by Interacting with the Viral Hemagglutinin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01949-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shirogane Yuta, Takemoto Ryuichi, Suzuki Tateki, Kameda Tomonori, Nakashima Kinichi, Hashiguchi Takao, Yanagi Yusuke	4. 巻 95
2. 論文標題 CADM1 and CADM2 Trigger Neuropathogenic Measles Virus-Mediated Membrane Fusion by Acting in <i>cis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00528-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kubota Marie, Matsuoka Rei, Suzuki Tateki, Yonekura Koji, Yanagi Yusuke, Hashiguchi Takao	4. 巻 93
2. 論文標題 Molecular Mechanism of the Flexible Glycan Receptor Recognition by Mumps Virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00344-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tateki Suzuki, Yusuke Yanagi, Takao Hashiguchi
2. 発表標題 Crystal structure of the H protein stalk domain proposes a mechanism of F protein activation in morbilliviruses
3. 学会等名 The 70th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tateki Suzuki, Yukihiro Sugita, Takeshi Noda, Takao Hashiguchi
2. 発表標題 A platform to prepare highly stable coronavirus S proteins for developing vaccines and antivirals
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------