

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16268

研究課題名（和文）ノロウイルスの感染・防御のための構造基盤の研究

研究課題名（英文）Structural Study of Norovirus for Infection and protection

研究代表者

ソン チホン（Song, Chihong）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・特任助教

研究者番号：20755516

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）：ノロウイルス capsid における可逆的な2種類の構造（突起下降：Aタイプ、突起上昇：Bタイプ）の生理的機能の解明を目指した。主な成果として、マウスノロウイルスを用いて細胞受容体分子の結合位置をクライオ電子顕微鏡で調べた結果、Aタイプの構造の場合がBタイプの構造より細胞受容体分子が結合しやすいことを見出し、Aタイプが感染のための構造であることを明らかにした。また、治療薬やワクチンの開発のためにヒトノロウイルスの構造基盤の研究を行ってきた。主な成果として、GII-3株のウイルス様中空粒子（VLP）試料中に存在する二つのタイプの構造において高分解能解析を行い、分子構造を決めたことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者の研究室では2012年度にBタイプの構造を示すHuNVのGII-10株に中和抗体が突起とシェルとの隙間に入り込んで結合する例を報告した（Hansman et al. 2012）。この抗体は構造変化を阻害して感染を防ぐと予測される。このように構造変化を防ぐ抗体は直接的に治療薬の開発につながると考えられる。本研究は、このウイルスに限らず、サボウイルス、豚水疱疹ウイルスなどのカリシウイルス科ウイルス全体を理解する上で重要な知見となり、様々なウイルスに対する治療薬やワクチンの開発へとつなげて行けると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the physiological functions of two reversible structures (protrusion descent: A type, protrusion elevation: B type) in norovirus capsid. As a result of investigating the binding area of the cellular receptor molecule with mouse norovirus using cryo-electron microscopy, it was found that the cellular receptor molecule is more easily bound to the A type structure than the B type structure. This is a result demonstrating that A type is a structure for infecting cells. We have also studied the structural basis of HuNV for the development of therapeutic agents and vaccines. As a major result, the molecular structures of the two types present in the VLP sample of the HuNVGII-3 strain were determined by high resolution cryo-electron microscopy.

研究分野：構造生物学

キーワード：ノロウイルス クライオ電子顕微鏡 受容体 構造変化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトノロウイルス (HNoV) は世界中で流行しているウイルス性急性胃腸炎の主要な原因物質である。しかし、HNoV を研究するための細胞培養系が非常に限られており、構造学的な知見も少ないため、効率的な治療法はなく、ワクチンも未だ存在しない。一方、マウスノロウイルス (MNoV) は、その生化学的性状や遺伝子構成が HNoV と似ており、しかも MNoV は培養細胞株で増殖可能であるため、MNoV は HNoV の感染症モデルとして研究されている。

ノロウイルスの抗原多様性の仕組みやワクチン作製のためには、そのキャプシドの構造的情報がとても重要であり、研究代表者はクライオ電顕を用いて MNoV の感染性粒子と HNoV のウイルス様中空粒子 (VLP) の構造解析を行ってきた。今までの研究の一番大きな成果として、MNoV が構造変化を起こして可逆的な2種類の構造を示すことを発見した。それは、内側のシェル(S)ドメインと外側の突起(P)ドメインとが密着するAタイプ。そして、Pドメインが浮き上がってSドメインとの間に大きな隙間ができるBタイプである。さらにBタイプではPドメイン自身が約70度回転する。これまでもノロウイルスが属するカリシウイルス科ウイルスは、そのキャプシド構造によってAタイプとBタイプに分類されていた。しかし、それは当初、ウイルスの種類や遺伝子型の違いによるものと考えられていた。研究代表者は、マウスノロウイルスを用いて同種のウイルスに二つのタイプの構造が同時に存在することを初めて見出した。さらに、溶液条件(pH と金属イオン)を変えることにより二つのタイプの構造を人為的かつ可逆的に変換させることに成功した。また、最近、HNoV GII-3 株のVLPの試料中にも、AタイプとBタイプ、二つの構造が同時に存在することを確認した。以上のことから、ノロウイルスキャプシドには2つの構造があり、可逆的に変化することができ、おそらく何らかの生理的機能を果たしていると考えられた。この謎を解明することにより、ノロウイルスの感染防御機構の解明、さらには治療薬の開発にもつながると考え、本計画の立案に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、ノロウイルスの構造研究の中で発見したキャプシドの2つの構造の生理的な意味とその分子メカニズムを解明することを目的とする。ノロウイルスによる急性胃腸炎はワクチンや治療法が全く確立されていない。その中で一つブレークスルーになったのが、2016年のMNoVの細胞受容体の発見である。これを契機として、ウイルスキャプシドにおける細胞受容体の結合部位が報告され、今後はヒトを含むすべてのノロウイルスで、この感染部位を遺伝子操作で導入することにより、培養細胞で感染実験が行える状況になりつつある。この様な折、研究代表者が発見したノロウイルスキャプシドの2つの構造は、今まで報告されたことのない、全く新しいものであり、ノロウイルスの感染メカニズムを解明する上でさらに新しい概念を導入すると考えられる。また、この構造変化の仕組みを利用する治療薬の開発も可能となるだろうと期待される。

### 3. 研究の方法

#### 1) MNoV の構造変化のメカニズムの解明 - 高分解能構造解析と原子モデル構築

MNoV の2つの構造の中で、Aタイプはクライオ電顕による高分解能構造解析が行われ、 $3.5\text{\AA}$  の原子モデルが構築されて、蛋白質構造データベース(PDB; Protein Data Bank)に登録済である。一方、Bタイプの構造はまだ高分解能原子モデル構築が行われていない。そこで、Bタイプに関するクライオ電顕データを300kVクライオ電子顕微鏡を用いて行って解析した。再構築されたBタイプの原子モデルをAタイプの原子モデルと比較して、構造変化が起こる仕組みを分子レベルで調べた。

#### 2) 感染機構の解明 - MNoV における細胞受容体分子の結合位置の解析

MNoV キャプシドにおける細胞受容体分子 CD300lf の結合位置を、実際の T=3 正二十面体のウイルス粒子上でどのように結合しているかを調べた。Aタイプと CD300lf を混ぜて氷包埋し、生理研の200kVクライオ電顕で構造解析を行い、CD300lf の結合位

置を調べた。その CD300lf の結合位置に基づいて CD300lf を B タイプにもフィットし、二つのタイプで比較した。

### 3) ヒトノロウイルスへの応用 - HNoV VLP の 2 つの構造の解析

これまでの研究で、HNoV GII-3 株の VLP の試料の中にも MNoV で見られたような P ドメインの 2 つの構造が存在することがわかった。これは HNoV でも MNoV と同様の構造変化が起こりうることを強く示唆する結果である。そこで、この試料から 300kV クライオ電顕を使って十分な量の画像データを取得し、2 つの構造をそれぞれ分離して単粒子構造解析した。また、MNoV と HNoV との 2 種類の構造的な差異を調べた。

## 4. 研究成果

1) MNoV の構造解析: MNoV の二つの構造において各々  $3.5\text{\AA}$  (A タイプ) と  $7.3\text{\AA}$  (B タイプ) の分解能で構造解析がされていた。300kV のクライオ電子顕微鏡により新しくデータを収集して、それぞれ  $2.7\text{\AA}$  (A タイプ) と  $4.7\text{\AA}$  (B タイプ) への分解能の向上ができた。この電子マップから作られた分子モデルを比較すると、A タイプは突起とシェル間で金属イオンを介したアミノ酸同士の相互作用が多数見られたが、B タイプはそのような相互作用は見られなくて、構造的な安定性が低いことが示された。A タイプから B タイプに変わる時は金属イオンの解離が必要であることがわかった。

2) 細胞受容体分子の結合位置の解析: クライオ電子顕微鏡により CD300lf とウイルス粒子を結合させて解析を行った。その結果、CD300lf の結合構造について約  $14\text{\AA}$  の分解能での解析ができた (図 1 A)。分子モデルを構築するには分解能が低かったため、結合場所についてマップに基づいた予測シミュレーションを行った (図 1 B、C)。その結果、CD300lf は P ドメインの上ではなく、P ドメインの長い方のサイド面に結合することがわかった。この結合場所は、A タイプの場合では結合しやすいが (図 1 D)、B タイプでは隣の p ドメインにより隠されて結合が難しいことがわかった (図 1 E)。このことは A タイプが感染型であることを強く示す結果であった。

3) HNoV VLP の高分解能解析: 300 kV のクライオ電子顕微鏡を用いて高分解能解析を行った。その結果、A タイプは  $2.8\text{\AA}$ 、B タイプは  $7.2\text{\AA}$  のマップが得られた (図 2)。この二つの粒子の大きさは  $40\text{nm}$  ぐらいであるが、試料の中では  $50\text{nm}$  ぐらいの粒子と、 $30\text{nm}$  ぐらいの粒子も存在し、これらは  $3.24\text{\AA}$  と  $4.2\text{\AA}$  の分解能で解析ができた (図 2)。この二つの構造は普通のウイルスでは見えない、VLP だけで形成されるものである。しかし、VP1 タンパク質から形成されることは、 $40\text{nm}$  の粒子と同じであり、B タイプの VP1 のタンパク質の分子モデルを作るために参考とされた。このように構築された HNoV の構造は MNoV より複雑であり、MNoV よりもっと複雑な仕組みで構造変化が行っていることが示唆された。

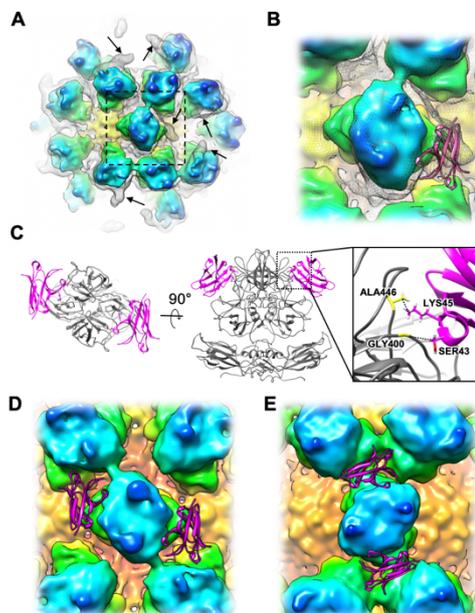


図 1. 細胞受容体分子 CD300lf の MNoV への結合場所。A: 矢印のところが CD300lf の電子密度である。B、C: シミュレーションにより予測された CD300lf の結合位置。D: A タイプの場合の CD300lf。E: B タイプの場合の CD300lf

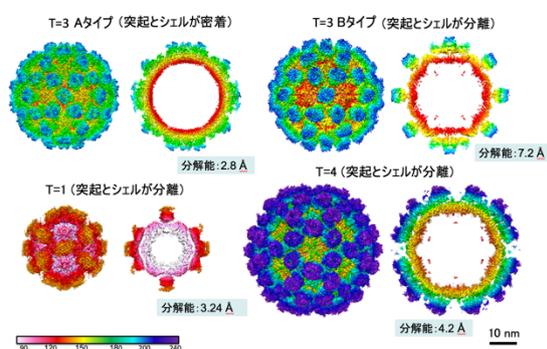


図 2. HNoV VLP の 4 種類の粒子の構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Song Chihong, Takai-Todaka Reiko, Miki Motohiro, Haga Kei, Fujimoto Akira, Ishiyama Ryoka, Oikawa Kazuki, Yokoyama Masaru, Miyazaki Naoyuki, Iwasaki Kenji, Murakami Kosuke, Katayama Kazuhiko, Murata Kazuyoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Dynamic rotation of the protruding domain enhances the infectivity of norovirus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1008619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1008619	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 Chihong Song, Kei Haga, Reiko Todaka, Ryoka Ishiyama, Kazuhiko Katayama and Kazuyoshi Murata
2. 発表標題 High-resolution Analysis on Structural Changes of Norovirus by Cryo-EM
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第77回学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chihong Song, Ryoka Ishiyama, Reiko Todaka, Kei Haga, Kazuhiko Katayama and Kazuyoshi Murata
2. 発表標題 Analysis of Dynamic Structure of Norovirus by Cryo-EM
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第78回学術講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ノロウイルスは感染前に粒子の形を変化させることを発見  
[https://www.nips.ac.jp/nips\\_research/press/2020/07/post\\_414.html](https://www.nips.ac.jp/nips_research/press/2020/07/post_414.html)

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
研究協力者	片山 和彦  (Katayama Kazuhiko)	北里大学・大村智記念研究所 ウイルス感染制御学・教授  (32607)	

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
---------	---------