

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16330

研究課題名（和文）VP1-145変異によるEV-A71構造機能の制御ネットワークの解明

研究課題名（英文）Regulation of structure-function network of EV-A71 capsid protein by VP1-145 substitution

研究代表者

小谷 治（Kotani, Osamu）

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長

研究者番号：00769581

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：EV-A71カプシドタンパク質VP1の145番目のアミノ酸残基の変異により、ウイルスの様々な性質が変化することが知られている。しかし、変異の構造への効果を記述する構造情報が少ない。本研究では、MD解析と実験により変異がカプシド構造とEV生物活性に与える影響を調べた。MD解析から、変異により、カプシド機能部位の構造動態や宿主因子との相互作用が変化した。中和試験から、変異により、構造特性が変化したエピトープをもつ抗体群は中和感受性が変化した。したがって、VP1-145はウイルスと宿主因子との相互作用ネットワークを調節する制御部位であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EV-A71カプシドタンパク質VP1-145の変異がウイルスの多種にわたる性質変化をどのようにして制御しているかは不明な点が多かった。本研究で構築したEV-A71カプシド構造解析基盤は、未だ謎の多いEV-A71の構造活性制御機構の解明に貢献する。さらには、EV-A71感染の重症化機構の解明、変異を勘案したEV-A71感染制御法開発など、基礎・開発研究の双方の新展開に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：The capsid protein of EV-A71 constitutes the virion surface, playing pivotal roles in viral life cycle and virus-host interactions. Previous studies have shown that a single amino acid substitution at position 145 in VP1 (VP1-145) coincidentally alters a variety of viral biological phenotypes. However, the structural mechanism underlying the VP1-145 mediated co-regulation of viral phenotypes remain unclear. To address this issue, we examined the effects of VP1-145 on the physical properties of the capsid model. The MD results showed that the VP1-145 is the allosteric regulator to coincidentally modulate physical properties of multiple interaction surfaces of the capsid. On the other hand, Neutralization studies showed that mutations altered the neutralization sensitivity of a group of specific antibodies. This would be a structural basis for the VP1-145 mediated co-regulation of interaction network between virus and host factor.

研究分野：感染症の構造生物学

キーワード：エンテロウイルス カプシドタンパク質 構造ゆらぎ 相互作用ネットワーク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エンベロープを持たない RNA ウイルスの粒子は、ウイルス RNA がカプシドタンパク質で覆われた構造をとる。カプシドタンパク質は、粒子最外殻に位置し、刻々と変化する体内環境や自然環境に適応するため、可変部位を持つ。獲得する変異の種類により、ウイルスの細胞指向性、増殖能、中和抗体感受性などが変化し、重症化や流行につながる。EV-A71 は、手足口病の主な病原であり、稀に重篤な中枢神経合併症を引き起こす。EV-A71 カプシドタンパク質 VP1 の 145 番目のアミノ酸残基 (VP1-145) は可変部位であり、自然界でグリシン、グルタミン酸、グルタミンを許容する。VP1-145G 株は VP1-145E 株より動物モデルにおける神経病原性が強いことが知られている。また、VP1-145G 株と 145E 株は、変異箇所とは別の VP1 GH ループを認識する単抗体への中和感受性が異なることが報告された。このように、VP1-145 は、ウイルスの多彩な生物活性を一度に制御する重要な部位と考えられる。しかし、VP1-145 変異が、EV-A71 の多種にわたる性質変化をどのようにして制御しているかは、現在まで全く不明なままに残されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、EV-A71 の VP1-145 変異がウイルスの多種にわたる性質変化を同時に誘導する分子メカニズムを明らかにすることである。本研究を遂行することにより、VP1-145 変異によるカプシドタンパク質とウイルスの性質変化を構造レベルで理解することができる。

3. 研究の方法

本研究では、EV-A71 の VP1-145 変異がウイルスの多種にわたる性質変化を同時に誘導する分子メカニズムの解明に、計算科学と実験を併用したアプローチで取り組む。

我々は、これまでの予備的解析結果から「VP1-145 アミノ酸変異により、離れた機能部位の構造変化が連動して起こり、その結果様々な活性変化が生じる」という作業仮説を立てた。本研究では、*in silico* 解析と実験を併用してこの作業仮説を検証する。

(1) カプシド構造変化と EV 性質変化の予測：ホモロジーモデリング法により、VP1-145 変異体のカプシドタンパク質構造モデルを構築。Amber を用いて、各モデル全体のエネルギー極小化計算後、1atm, 310K 環境下での MD シミュレーションを実施。トラジェクトリーデータを用いて、RMSD 値、RMSF 値、二次構造の頻度、残基間の動態の相関を算出し、野生型と変異体でプロファイルを比較。

(2) カプシド/宿主因子複合体の MD 解析：EV-A71 カプシドタンパク質と相互作用する宿主因子 (受容体や抗体) の分子モデルを構築。既知の結合様式情報、または MOE のドッキングシミュレーションを用いて、カプシドタンパク質と各宿主因子との複合体モデルを構築。カプシドタンパク質と各宿主因子間の相互作用の種類や結合エネルギーを算出し、野生型と変異体で比較。

(3) 変異株の感染増殖能の評価：PCR 法により変異導入感染性 cDNA クローンを作製。*In vitro* 転写系を用いてウイルス全長 RNA を合成。RNA を細胞に導入し、数日後に培養上清を回収。ウイルスの感染価 (pfu, TCID₅₀) を測定。

(4) 変異株の中和感受性の評価：各種抗体の希釈系列パネルを用意し、抗体とウイルスを混合したのち感染させ、ND₅₀ (50% 中和抗体濃度) を算出、比較。

4. 研究成果

(1) EV-A71 カプシド構造変化と EV 性質変化の予測

EV-A71 のカプシドタンパク質をモデル分子とし、*in silico* 技術を用いて変異がカプシド構造特性に与える影響を調べた。EV-A71 カプシド五量体モデルの構築と *in silico* 変異導入解析法の構築を行った。既知の EV-A71 カプシドタンパク質構造を鋳型にして、ホモロジーモデリング法により、VP1-145 のアミノ酸置換 (E, G, Q) を伴うカプシドタンパク質変異体モデルを構築した。それらの MD シミュレーションを実施し、溶液中で準安定な構造を獲得した。次にトラジェクトリーデータを用いて、構造ゆらぎを評価した。その結果、変異により VP1-145 領域から離れたカプシド表面に存在する機能部位のゆらぎが変化することがわかった。さらにカプシド五量体分子内のアミノ酸残基の動態について調べた。その結果、VP1-145 と連動して同じ方向あるいは反対の方向に動くアミノ酸残基が複数存在することがわかった。これより、カプシドタンパク質内にはアミノ酸ネットワークが存在することが示唆された。

(2) カプシド/宿主因子複合体の相互作用解析

VP1-145 変異がカプシドタンパク質と宿主分子間の相互作用に与える影響を調べた。EV-A71 カプシドタンパク質と宿主分子 (受容体や中和抗体) の複合体モデルをそれぞれ構築した。EV-A71 カプシドタンパク質モデルは上記に構築した五量体モデルを用いた。それらの複合体モデルから、VP1-145 変異体モデルを構築し、MD シミュレーションを実施した。MD 計算で得られたトラジェクトリーデータから RMSD の推移を算出した。その結果、変異により、宿主分子がカプシドタンパク質から離れるなどの大きな構造変化は認められなかった。次に VP1-145 変異が

宿主分子の結合能に与える影響を調べるために、カプシドタンパク質と各宿主分子間の結合自由エネルギーを算出した。その結果、変異による受容体 SCARB2 親和性に変化は見られなかった。一方、中和抗体との親和性は VP1-145E より 145G の方が高い傾向が見られた。その要因を調べるために、カプシドと抗体間で形成される水素結合ネットワークを解析した結果、VP1-145 変異によりアロステリックに相互作用ネットワークが変化することを見出した。

(3) VP1-145 変異が中和感受性に与える影響

抗 E V-A71 カプシド単抗体を用いた中和試験により、構造特性変化と EV 中和感受性変化の関連を検証した。2 種類の EV-A71 cDNA クローン (VP1-145G と 145E) から感染性ウイルスを作製した。抗体はエピトープが判明している抗 EV-A71 カプシド単抗体を用いた。これらの材料を用いて、中和試験を実施した結果、単抗体 8 種類は VP1-145 変異により中和能が変化する結果が得られた。これらの抗体の推定エピトープ領域は、*in silico* 解析で VP1-145 置換により構造特性が変化すると予測された領域を含んだ。一方、3 種類の単抗体は、中和能の変化は認められず、*in silico* 解析からエピトープ領域の構造特性変化は認められなかった。したがって、中和抗体のエピトープ領域の構造特性の変化は、EV-A71 の抗体感受性変化に関与すると考えられた。

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 Matsuda Mami, Hirai-Yuki Asuka, Kotani Osamu, Kataoka Michiyo, Zheng Xin, Yamane Daisuke, Yokoyama Masaru, Ishii Koji, Muramatsu Masamichi, Suzuki Ryosuke	4. 巻 20
2. 論文標題 Loxapine inhibits replication of hepatitis A virus in vitro and in vivo by targeting viral protein 2C	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1012091
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1012091	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 鄭 シン、平井-結城 明香、寺原 和孝、渡邊 則幸、塩田 智之、小谷 治、山根 大典、深野 顕人、大崎 恵理子、小野寺 大志、安達 悠、佐藤由子、大園誠也、若江 亨祥、滝本 一広、永田 典代、加藤 孝宣、相崎 英樹、上田 啓次、鈴木 亮介、高橋 宜聖、村松 正道
2. 発表標題 動物モデルにおけるヒトモノクロー抗HAV抗体の感染阻止効果の検討
3. 学会等名 第31回日本抗ウイルス療法学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鄭シン、平井-結城 明香、寺原 和孝、渡邊 則幸、塩田 智之、小谷 治、山根 大典、深野 顕人、大崎 恵理子、小野寺 大志、安達 悠、若江 亨祥、滝本 一広、永田 典代、加藤 孝宣、相崎 英樹、上田 啓次、鈴木 亮介、高橋 宜聖、村松 正道
2. 発表標題 抗HAVヒト抗体の単離および動物モデルを使った抗HAV効果の検討
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------