

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650134

研究課題名(和文)蛋白質に断続的に働いた正の自然選択を検出する方法の開発と応用

研究課題名(英文)A method for detecting natural selection at single amino acid substitutions and its applications

研究代表者

鈴木 善幸 (SUZUKI, YOSHIYUKI)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・教授

研究者番号：70353430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題においては、蛋白質の進化の過程で断続的に働いた自然選択を検出できる方法のアルゴリズム開発、ならびに実際の配列解析への応用としてH3N2亜型ヒトインフルエンザウイルスのヘマグルチニン蛋白質におけるN-結合型糖鎖付加部位数の変化に働いた自然選択の検出を行った。その結果、H3N2亜型ヒトインフルエンザウイルスはヘマグルチニン蛋白質にN-結合型糖鎖を付加することにより免疫から逃避し続けていることが示唆された。本研究課題で開発された方法は生物の進化機構の解明に広く応用することができ、またインフルエンザウイルスについて得られた結果は治療法や予防法を考える上で重要な知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, a method for detecting natural selection at single amino acid substitutions is developed and applied to infer the evolutionary mechanism operating on the change in the number of N-linked glycosylation sites in the hemagglutinin protein of H3N2 human influenza A virus. Positive selection is detected for the amino acid substitutions generating N-linked glycosylation sites, suggesting that N-linked glycans shield antigenic sites from immune responses. The method developed in the present study is applicable to a wide variety of evolutionary problems and the results obtained from the analysis of influenza A virus are useful for prophylaxis and treatment against influenza A virus.

研究分野：分子進化学

キーワード：分子進化 自然選択 同義置換 非同義置換 インフルエンザウイルス ヘマグルチニン 免疫逃避
糖鎖

1. 研究開始当初の背景

(1) 蛋白質の進化の過程で働いてきた自然選択を検出することは、その蛋白質の機能や進化機構を解明する上で重要である。分子進化学において蛋白質に働く自然選択は、しばしばそれをコードする塩基配列に進化の過程で蓄積されてきた同義置換(アミノ酸を変えない塩基置換)の数と非同義置換(アミノ酸を変える塩基置換)の数を統計学的に比較することで検出される。すなわち、(同義置換数 > 非同義置換数)ならば負の自然選択、(同義置換数 < 非同義置換数)ならば正の自然選択、(同義置換数 = 非同義置換数)ならば自然選択なしと判定される。特に正の自然選択は生物個体の生存あるいは生殖を有利にする突然変異に働くため、それを検出することは生物学的に興味深く、研究代表者はこれまでに様々な方法を開発してきたが、現行の方法論では非同義置換数が同義置換数よりも統計学的に多い場合にしか検出されないため、ある遺伝子で有利な突然変異が繰り返し生じてきていない限り正の自然選択は検出されない。しかしながら生物学的にある遺伝子の進化の過程で有利な突然変異が繰り返し生じることは稀と考えられ、進化の過程で一度だけ生じた有利な突然変異に働いた正の自然選択を検出する方法の開発が必要である。

2. 研究の目的

(1) 蛋白質の進化の過程で一度だけ生じた正の自然選択を検出できる方法のアルゴリズム開発
(2) 実際の配列解析への応用として、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン蛋白質における N-結合型糖鎖付加部位数の変化に働いた自然選択の検出

3. 研究の方法

(1) 新しい方法では、任意の蛋白質の系統樹におけるある枝で起こったアミノ酸置換に着目し、そのアミノ酸置換に正の自然選択が働いたかどうかを統計学的に検定する。そのアミノ酸置換が個体の生存や生殖を有利にしたために正の自然選択が働いて集団中に固定したとすると、生物集団のその後の進化において外的な要因が変化しない限り、逆向きのアミノ酸置換突然変異は個体の生存あるいは生殖を不利にするため負の自然選択が働くと考えられ、それを検出することにより間接的にもとのアミノ酸置換に正の自然選択が働いたことを示すのである。

逆向きのアミノ酸置換突然変異に働いた負の自然選択を検出するアルゴリズムとしては、系統樹中でもとのアミノ酸置換が起こった枝より後の枝を解析対象として、それらの枝において逆向きのアミノ酸置換を生じさせる非同義置換速度と同義置換速度を比較し、前者が後者よりも遅いことを示せばよいと考えられる。

(2) H3N2 亜型ヒトインフルエンザウイルスは 1968 年に自然宿主である水禽からヒトに種間伝播しヒト集団内で季節性に流行するようになってから、ヘマグルチニン蛋白質で特異的に N-結合型糖鎖の付加部位数が増加してきたことが知られている。実験的に N-結合型糖鎖は抗体の抗原領域への結合を阻害できるだけでなく、ヘマグルチニン蛋白質のシアル酸受容体への結合も阻害してしまうため、ヘマグルチニン蛋白質における N-結合型糖鎖付加部位数の増加は、インフルエンザウイルスの適応度を上げるために正の自然選択が働いたことによって増加したのか、ウイルスの生存や複製に有利にも不利にも働かなかったが突然変異パターンの偏りによって中立的に増加したのか不明である。これを検証するために本研究課題で開発される方法を適用する。

国際塩基配列データベースから H3N2 亜型ヒトインフルエンザウイルスのヘマグルチニン蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列を全て抽出し系統樹を作成して、N-結合型糖鎖付加部位が増加した枝ならびに増加に寄与したアミノ酸置換を特定し、その後の進化において逆方向のアミノ酸置換を生じさせる非同義置換速度が同義置換速度よりも遅くなっているかどうかを統計的に検定することによって、N-結合型糖鎖付加部位の増加の進化機構を推測する。

4. 研究成果

(1) 平成 26 年度においては、任意の蛋白質をコードする複数の塩基配列をもちいて作成された系統樹において、特定の枝で起こったと推測されるアミノ酸置換に着目し、そのアミノ酸置換に正の自然選択が働いたかどうかを統計的に検定する方法を考案した。その方法は、系統樹において目的のアミノ酸置換よりも後の枝において、逆向きのアミノ酸置換を生じさせる非同義置換速度と同義置換速度を統計的に比較し、非同義置換速度が同義置換速度よりも遅いことを検出することで逆向きのアミノ酸置換に負の自然選択が働いていることを示すことにより、間接的に目的のアミノ酸置換に働いた正の自然選択を検出するという方法である。研究代表者らによってこれまでに開発されてきた自然選択検出法を発展させることによってこの比較が可能であることが明らかになった。すなわち、系統樹において各内部結節の祖先配列を最尤法などをもちいて推定し、対象としたアミノ酸座位で適応度を高めたと考えられるアミノ酸を祖先に持つ枝に着目する。それらの枝において、逆向きのアミノ酸変異を起こし得る非同義的な突然変異率 (sNR) と同義的な突然変異率 (sS) を 2 parameter model などの塩基置換モデルを仮定することにより計算する。ここでは転移型突然変異率と転換型突然変異率の比を考慮に入れ、突然変異率の偏りによる影響を排除する。すると、

それらの枝で実際に観察される逆向きの非同義置換の数 (cNR) と同義置換の数 (cS) は、逆向きの非同義置換に正の自然選択が働いていれば ($cNR/sNR > cS/sS$)、負の自然選択が働いていれば ($cNR/sNR < cS/sS$)、自然選択が働いていなければ ($cNR/sNR = cS/sS$) という関係になると期待されるので、($cNR/sNR = cS/sS$) を帰無仮説とし、統計的に有意に ($cNR/sNR < cS/sS$) の関係が支持されるとき、もとのアミノ酸置換には正の自然選択が働いたと推測する。C 言語をもちいてこの方法を実装したコンピューター・プログラムを作成した。従来の正の自然選択検出法においては、非同義置換数が同義置換数よりも統計的に多く観察されたときにのみ正の自然選択が検出されるため正の自然選択を検出するためには多くの非同義置換が生じていることが必要であったが、新しい方法では非同義置換数が同義置換数よりも少ない場合に正の自然選択が検出されるため非同義置換数が少なければ少ないほど正の自然選択を検出しやすくなり、従来の方法よりも適用範囲が格段に広がると考えられる。また、生物学的に極めて興味深い革新的な機能や構造の創出の多くは進化の過程で一度あるいは少数回しか生じていないと考えられるため、新しい方法によりこれらに働いた正の自然選択も検出することができるようになる。と期待される。

(2) 平成 27 年度においては、平成 26 年度に開発された蛋白質に断続的に働いた正の自然選択を検出する方法の実際の配列解析への応用として、H3N2 亜型ヒトインフルエンザウイルスのヘマグルチニンにおいて N-結合型糖鎖付加部位数の変化に働いた自然選択の検出を試みた。H3N2 亜型ヒトインフルエンザウイルスのヘマグルチニンにおいては進化の過程で N-結合型糖鎖付加部位数が増加してきたことが知られている。N-結合型糖鎖は実験的に抗体のヘマグルチニンへの結合を阻害することが示されているが、一方でインフルエンザウイルスのシアル酸受容体への結合も阻害してしまうことが示されており、N-結合型糖鎖付加部位数の増加がどのような進化機構で生じてきたのかは不明である。そこで国際塩基配列データベースに登録されている H3N2 亜型ヒトインフルエンザウイルスのヘマグルチニンをコードする遺伝子の塩基配列を 2,043 本抽出して系統樹を作成し、系統樹の各内部結節における祖先配列を最尤法をもちいて推定することにより N-結合型糖鎖付加部位数が増加した枝を特定し、63、124、126、133、144、173、248 番目のアミノ酸座位において N-結合型糖鎖付加部位数を増加させるアミノ酸置換が生じたことが明らかにされた。そこで、系統樹のその後の枝において N-結合型糖鎖付加部位数を増加させたアミノ酸置換と逆向きのアミノ酸置換を起こす非同義置換速度と同義置換速度を、転移型塩基置換突然変異率と転

換型塩基置換突然変異率の比の観察値として得られた 4.057 をもちいることにより突然変異率の偏りを排除しながら統計的に比較したところ、それぞれのアミノ酸置換については逆向きのアミノ酸置換突然変異に自然選択は検出されなかったが、これらのアミノ酸座位全体については、逆向きのアミノ酸置換突然変異に、危険率 0.0477 で負の自然選択が検出された。このことより、H3N2 亜型ヒトインフルエンザウイルスはヘマグルチニンに N-結合型糖鎖を付加することにより免疫から逃避し続けていることが示唆される。これらの結果は、H3N2 亜型ヒトインフルエンザウイルスの治療や予防を考える上で重要な知見である。本研究課題で得られた成果は、分子進化学的にもウイルス学的にも意義深いと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Mieko Suzuki-Matsubara, Senarath B. P. Athauda, Yoshiyuki Suzuki, Kazumi Matsubara, and Akihiko Moriyama: Comparison of the primary structures, cytotoxicities, and affinities to phospholipids of five kinds of cytotoxins from the venom of Indian cobra, *Naja naja*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 2016 年, 179 巻, 158-164 ページ. 査読有

Yoshiyuki Suzuki: A candidate packaging signal of human rotavirus differentiating Wa-like and DS-1-like genomic constellations. *Microbiology and Immunology* 2015 年, 59 巻, 567-571 ページ. 査読有

Chantal A. Agbemabiese, Toyoko Nakagomi, Yoshiyuki Suzuki, George Armah, and Osamu Nakagomi: Evolution of a G6P[6] rotavirus strain isolated from a child with acute gastroenteritis in Ghana, 2012. *Journal of General Virology* 2015 年, 96 巻, 2219-2231 ページ. 査読有

Yoshiyuki Suzuki: Selecting vaccine strains for H3N2 human influenza A virus. *Meta Gene* 2015 年, 4 巻, 64-72 ページ. 査読有

Yoshiyuki Suzuki, Yuki Kobayashi, Masayuki Horie, and Keizo Tomonaga: Origin of endogenous bornavirus-like nucleoprotein elements in thirteen-lined ground squirrels. *Genes & Genetic Systems* 2014 年, 89 巻, 143-148 ページ. 査読有

Yoshiyuki Suzuki: A possible packaging signal in the rotavirus genome. *Genes & Genetic Systems* 2014 年, 89 巻, 81-86 ページ. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

鈴木 善幸 : ウイルスの分子進化解析からわかること. 日本大学、神奈川県藤沢市、2016年1月12日

鈴木 善幸 : ロタウイルスのパッケージングシグナル. 日本遺伝学会第87回大会ワークショップ「分節型ウイルスにおける遺伝子再集合による進化」、東北大学、宮城県仙台市、2015年9月24日

Yoshiyuki Suzuki : Selecting vaccine strains for H3N2 human influenza A virus. Biodiversity and environmental medicine in South East and East Asia based on molecular biology 2015. Main Auditorium, Nagoya City University, 愛知県名古屋市、2015年7月16日

鈴木 善幸 : Selecting vaccine strains for H3N2 human influenza A virus. 国立遺伝学研究所研究会「ビッグデータ時代の分子進化」、静岡県三島市、2015年6月27日

鈴木 善幸 : ウイルスの分子進化解析からわかること. 東海医学会例会、東海大学、神奈川県伊勢原市、2015年6月18日

鈴木 善幸 : ウイルスの分子進化解析からわかること. 藤田保健衛生大学第204回医学セミナー(特別講演89回) 藤田保健衛生大学、愛知県豊明市、2015年6月5日

Yoshiyuki Suzuki : Packaging mechanisms in viruses with segmented genomes. Nagasaki University, 長崎県長崎市、2014年10月22日

鈴木 善幸 : Packaging mechanisms in viruses with segmented genomes. 第16回日本進化学会年会ワークショップ「ウイルスと宿主の共進化のダイナミクス」、高槻現代劇場、大阪府高槻市、2014年8月22日

鈴木 善幸 : Packaging mechanisms in viruses with segmented genomes. 国立遺伝学研究所研究会「ゲノム編集時代の分子進化」、静岡県三島市、2014年6月28日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 善幸 (SUZUKI, Yoshiyuki)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学

研究科・教授

研究者番号: 70353430

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: