

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713018

研究課題名(和文) 構造生物学的手法によるウイルスの細胞侵入メカニズムの解明

研究課題名(英文) Structural basis for the mechanisms of virus entry into host cells

研究代表者

橋口 隆生 (Hashiguchi, Takao)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50632098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウイルスの細胞侵入機構を解明することを目的に流行性耳下腺炎(おたふくかぜ)を起こすムンプスウイルス感染症と出血熱を起こすエボラ・マールブルグウイルス感染症について構造生物学とウイルス学の2領域を融合させた研究を行った。その結果、これらのウイルスがどのようにして細胞へと侵入するかを原子レベルで可視化することに成功し、細胞侵入機構の詳細の一端が理解できるようになった。これらの成果は、今後の抗ウイルス薬の開発にも構造情報として活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To better understand the mechanisms of virus entry, we utilize combined strategies of Structural biology and Virology for mumps virus that causes epidemic parotitis and ebola/marburg virus that cause highly lethal hemorrhagic fever. As the results, we successfully visualized how the viruses enter into host cells at atomic level, which enabled us to better understand a part of the mechanisms of virus entry. These results will illuminate directions toward therapeutics against the viruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：感染症 ウイルス 蛋白質 構造解析

1. 研究開始当初の背景

モノネガウイルス（一本鎖非分節マイナス鎖の RNA ウイルス）には麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、RS ウイルスなど世界中で流行し、多くの人々がワクチン接種や自然感染で身近に体験したことがあるウイルスから、エボラウイルス、マールブルグウイルスやニパウイルス、ヘンドラウイルスなど、予防法や治療法が存在せず、Biosafety Level 4 (BSL4)での使用が義務づけられるウイルスまで、幅広い病原性ウイルスが含まれる。

こうしたウイルスが感染の最初の工程として、どのような分子機構により細胞に侵入するかは、ウイルス学における大きなトピックの一つである。しかし、現在、その詳細なメカニズムは未解明である。細胞侵入機構を理解することは、ウイルスの宿主域や組織特性を解明することにもつながり、将来的な予防・治療法への進展が期待される。

2. 研究の目的

ウイルスがどのようにして宿主細胞へと侵入するのかに注目して、構造生物学的手法とウイルス学的手法を組み合わせる分子機構の全容解明を目指して研究を進めることを目的とした。本研究では特にウイルス糖蛋白質に焦点を当てた。ウイルス糖蛋白質は細胞表面の受容体を結合し、ウイルスが細胞侵入する際に必須の役割を果たす重要なタンパク質である。また、細胞侵入を担うウイルス糖蛋白質は抗体による中和の主要な標的となるため、ワクチン開発の際に最も重要な抗原となる。そこで、糖蛋白質の立体構造から最も効果的なワクチン抗原の構造基盤を見出すことも目指して研究を進めた。ウイルスの細胞侵入機構を解明することは病原性の理解に役立ち、ウイルスが抗体に中和される機構を解明することは、予防・治療法開発に役立つと期待される。

3. 研究の方法

ウイルス学的手法 (*in vitro* と *in vivo* における感染実験) と構造生物学的手法 (X線結晶構造解析・X線小角散乱解析・電子顕微鏡解析) を組み合わせ、ウイルスの細胞侵入機構の研究を行った。また、アレイを使った結合実験、熱力学的解析、コンピュータ計算なども行うことで多角的な研究手法を用いてウイルスの細胞侵入機構の研究を行った。

4. 研究成果

(1) 出血熱を起こすエボラ・マールブルグウイルスに交差反応性のある抗体を複数同定し (1)、世界で初めてマールブルグウイルス糖蛋白質 GP と交差反応性を示す中和抗体 MR78 との複合体構造を X線結晶構造解析により決定した (2)。また、複合体の構造情報を元に GP と NPC-1 受容体の相互作用部位を高精度に予測した。予測が正しかったことが GP-NPC1 受容体の複合体構造が 2016 年に解

明されたことで確認できた (3)。また X線小角散乱解析により、エボラウイルスとマールブルグウイルスでは GP 上のムチン様ドメインの配置が異なり、それに伴って、抗体による主要な中和メカニズムがそれぞれ膜融合阻害と受容体結合阻害で異なっていることを明らかにした (2)。

(2) 構造解析用に蛋白質工学的に安定化したウイルス抗原は、*in vivo* で高い感染防御能を示す抗体を効率的に誘導することを報告した (4)。マールブルグウイルス GP 蛋白質変異体を抗原としてマウスへの免疫によって得られた抗体を用いて Biosafety Level 4 (BSL4)施設にて感染防御実験を行ったところ、中にはマウス実験で 100%の防御能を示す抗体(30G5)もあった。また、マールブルグウイルス GP を免疫抗原として抗体を取得すると、数は少ないがエボラウイルスにも結合できる能力がある抗体が産生されることが分かった。一方で、エボラウイルス GP を免疫抗原として取得された抗体では両ウイルスに結合できる抗体の報告はない。この理由としては、GP 上の受容体結合部位周辺のアミノ酸配列は 5つの種全てのエボラウイルスとマールブルグウイルスとで非常に保存されていることが立体構造上で示されており (2)、マールブルグウイルスでは構造上、受容体結合部位が一部露出されていることが示唆されている。

(3) 流行性耳下腺炎 (ムンプス・おたふくかぜ) の原因ウイルスであるムンプスウイルスの受容体が、単純なシアル酸単体ではなく、 $\alpha 2,3$ 結合型のシアル酸-ガラクトース-グルコース (N-アセチルグルコサミン) で構成される 3糖全体で受容体として機能することを感染実験、結合実験、構造解析、コンピュータ計算によって明らかにした (5)。また、ムンプスウイルスの受容体結合蛋白質 (MuV-HN) の X線結晶構造を単独および受容体との複合体として世界で初めて解明することに成功した (5)。さらに、ムンプスウイルス感染やムンプスワクチン接種で出来る抗体が、12種類ある遺伝子型間で特にアミノ酸の保存性が低い領域に結合することも明らかにした。すなわち、遺伝子型による差が大きい領域に抗体が出来やすい構造をしていることが既感染者やワクチン接種者の一部がムンプスウイルスに再感染する理由の一つであると考えられた (5)。

<引用文献>

1. Flyak AI, Ilinykh PA, Murin CD, Garron T, Shen X, Fusco ML, **Hashiguchi T**, Bornholdt ZA, Slaughter JC, Sapparapu G, Klages C, Ksiazek TG, Ward AB, Sapphire EO, Bukreyev A, and Crowe JE Jr. "Mechanism of human antibody-mediated neutralization of

Marburg virus” *Cell*. Feb 26;160(5):893-903, 2015

2. **Hashiguchi T**, Fusco ML, Bornholdt ZA, Lee JE, Flyak AI, Matsuoka R, Kohda D, Yanagi Y, Hammel M, Crowe, JE Jr., and Saphire EO. “Structural basis for Marburg virus neutralization by a cross-reactive human antibody.” *Cell*. Feb 26;160(5):904-12, 2015
3. Wang H, Shi Y, Song J, Qi J, Lu G, Yan J, Gao GF. Ebola Viral Glycoprotein Bound to Its Endosomal Receptor Niemann-Pick. *Cell*. 2016 Jan 14;164(1-2):258-68
4. Fusco ML, **Hashiguchi T**, Cassan R, Biggins JE, Murin CD, Warfield KL, Li S, Holtsberg FW, Shulenin S, Vu H, Olinger GG, Kim DH, Whaley KJ, Zeitlin L, Ward AB, Nykiforuk C, Aman MJ, Berry JD, Saphire EO. “Protective mAbs and Cross-Reactive mAbs Raised by Immunization with Engineered Marburg Virus GPs.” *PLoS Pathog.* Jun 26;11(6):e1005016, 2015
5. Kubota M, Takeuchi K*, Watanabe S, Ohno S, Matsuoka R, Kohda D, Nakakita S, Hiramatsu H, Suzuki Y, Nakayama T, Terada T, Shimizu K, Shimizu N, Yanagi Y, **Hashiguchi T***. “Trisaccharide containing α 2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus” *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 11;113(41):11579-11584. 2016

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 8 件)

1. Kubota M, Takeuchi K*, Watanabe S, Ohno S, Matsuoka R, Kohda D, Nakakita S, Hiramatsu H, Suzuki Y, Nakayama T, Terada T, Shimizu K, Shimizu N, Yanagi Y, **Hashiguchi T***. “Trisaccharide containing α 2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 、査読あり、Oct 11;113(41):11579-11584. 2016 * **Corresponding author**
2. **Hashiguchi, T**. “Crystal Structure of Marburg Virus GP Bound to a Cross-Reactive Antibody from a Human Survivor.” *PF Activity Report 2014*. 、査読なし、PartA;32:40-41, 2015
3. Fusco ML, **Hashiguchi T**, Cassan R,

Biggins JE, Murin CD, Warfield KL, Li S, Holtsberg FW, Shulenin S, Vu H, Olinger GG, Kim DH, Whaley KJ, Zeitlin L, Ward AB, Nykiforuk C, Aman MJ, Berry JD, Saphire EO. “Protective mAbs and Cross-Reactive mAbs Raised by Immunization with Engineered Marburg Virus GPs.” *PLoS Pathog.* 、査読あり、Jun 26;11(6):e1005016, 2015

4. **Hashiguchi T**, Fusco ML, Bornholdt ZA, Lee JE, Flyak AI, Matsuoka R, Kohda D, Yanagi Y, Hammel M, Crowe, JE Jr., and Saphire EO. “Structural basis for Marburg virus neutralization by a cross-reactive human antibody.” *Cell*. 、査読あり、Feb 26;160(5):904-12, 2015
5. Flyak AI, Ilinykh PA, Murin CD, Garron T, Shen X, Fusco ML, **Hashiguchi T**, Bornholdt ZA, Slaughter JC, Sapparapu G, Klages C, Ksiazek TG, Ward AB, Saphire EO, Bukreyev A, and Crowe JE Jr. “Mechanism of human antibody-mediated neutralization of Marburg virus” *Cell*. 、査読あり、Feb 26;160(5):893-903, 2015
6. 久保田万理恵、橋口隆生、柳雄介、ムンプスウイルスの糖鎖受容体、査読なし、医学の歩み 2017 年、Vol. 260. No.6, p522-527
7. **橋口隆生**、抗体医薬研究の最前線と展望、査読なし、実験医学、2015 年、p2837-2843
8. **橋口隆生**、交差反応性を示すヒトの抗体によるマールブルグウイルスの中和の分子機構、ライフサイエンス新着論文レビュー、査読なし、2015年、<http://first.lifesciencedb.jp/archives/9883>

[学会発表] (計 15 件)

1. **橋口隆生**、糖鎖受容体を介したムンプスウイルス細胞侵入メカニズムの構造生物学的・ウイルス学的解析、第 6 回 Negative Strand Virus-Japan Symposium、2017 年 1 月 16 日、沖縄
2. **Takao Hashiguchi**. Molecular basis for negative-strand RNA virus entry and neutralization by antibodies.、The 64th

- Annual meeting of the Japanese Society for Virology、2016年10月24日、札幌
3. Yoshinari Fukuda, Takao Hashiguchi, Shinji Ohno, Yusuke Yanagi. Characterization of Neutralizing Antibodies against Measles Virus.、The 64th Annual meeting of the Japanese Society for Virology、2016年10月24日、札幌
 4. Mizuki Saito, Hideo Fukuhara, Masaaki Higashibata, Yuichiro Nakatsu, Makoto Takeda, Takao Hashiguchi, Yusuke Yanagi, Matsumi Maenaka. Screening for entry inhibitors targeting the H protein expressing on surface of measles virus.、The 64th Annual meeting of the Japanese Society for Virology、2016年10月23日、札幌
 5. Marie Kubota, Kaoru Takeuchi, Shumpei Watanabe, Shinji Ohno, Rei Matsuoka, Daisuke Kohda, Shin-ichi Nakakita, Hiroaki Hiramatsu, Yasuo Suzuki, Tetsuo Nakayama, Tohru Terada, Kentaro Shimizu, Nobutaka Shimizu, Yusuke Yanagi, Takao Hashiguchi. Linear saccharide moiety containing α 2,3-linked sialic acid, rather than the sialic acid alone, constitutes a receptor for mumps virus.、The 64th Annual meeting of the Japanese Society for Virology、2016年10月23日、札幌
 6. Iori Okabe, Marie Kubota, Shin-ichi Nakakita, Takao Hashiguchi, Yusuke Yanagi. Tetrameric interaction of the mumps virus hemagglutinin-neuraminidase head domain is critical for triggering membrane fusion.、The 64th Annual meeting of the Japanese Society for Virology、2016年10月23日、札幌
 7. Takao Hashiguchi, Yusuke Yanagi, Rei Matsuoka, Daisuke Kohda, Erica Ollmann Saphire, Structural basis for Ebola and Marburg virus neutralization by antibodies、第16回日本蛋白質科学会、2016年6月07日、福岡
 8. 橋口 隆生、中和抗体によるエボラ・マールブルグウイルスの侵入阻害機構、第136回日本薬学会年会 2016年3月27日、横浜、(招待講演)
 9. Hashiguchi T., Structural basis for filovirus neutralization by antibodies. The 63rd Annual meeting of the Japanese Society for Virology 2015年11月24日、福岡、(招待講演)
 10. Marie Kubota, Takao Hashiguchi, Shumpei Watanabe, Shinji Ohno, Rei Matsuoka, Tetsuo Nakayama, Hiroaki Hiramatsu, Yasuo Suzuki, Yusuke Yanagi, Kaoru Takeuchi, Structural basis of the interaction between mumps virus HN protein and its receptor, The 63rd Annual meeting of the Japanese Society for Virology、2015年11月23日、福岡
 11. 橋口 隆生、抗体によるエボラ・マールブルグウイルスの中和の構造基盤、第2回感染コンピテンシー若手研究会、2015年07月17日、神奈川
 12. 橋口 隆生、抗体によるフィロウイルスの中和の構造基盤、感染症国際研究センター/全国共同利用・共同研究拠点 若手ジョイントシンポジウム 2015年02月18日、東京、(招待講演)
 13. 東端 将哲、福原 秀雄、逢坂 文那、橋口 隆生、柳 雄介、竹田 誠、児玉 耕太、齊藤 貴士、前仲 勝実、麻疹ウイルス H タンパク質を標的とした侵入阻害剤の開発、第62回 日本ウイルス学会、2014年11月11日、横浜
 14. 橋口 隆生、柳 雄介、Erica Ollmann Saphire、マールブルグウイルス糖蛋白質 GP とヒト由来抗体の X 線結晶構造、第62回 日本ウイルス学会、2014年11月10日、横浜
 15. 橋口 隆生、モノネガウイルスワクチンの有効性と新規開発の構造基盤、『感染・炎症・免疫・発癌』(北海道大学遺伝子病制御研究所)2014年07月04日、札幌、(招待講演)
- 〔図書〕(計1件)
1. 前仲 勝実、橋口 隆生、白石 充典、“細胞表面受容体の不安定なリガンド複合体の発現・結晶化”、松島 正明、伊中 浩治 編：“進化を続ける構造生物学”、化学同人、2014年、p67-78
- 〔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
九州大学 医学研究院 ウイルス学
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/virus/index.html>

研究者情報

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K004960/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋口 隆生 (HASHIGUCHI, Takao)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：50632098

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者