

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06091

研究課題名(和文) マウスノロウイルス感染時分子認識機構についての構造生物学的研究

研究課題名(英文) Structural study of infection molecular mechanism of the mouse norovirus.

研究代表者

水谷 健二 (Mizutani, Kenji)

横浜市立大学・生命医科学研究科・助教

研究者番号：10525570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：冬型の急性胃腸炎、食中毒の原因ウイルスとして知られるヒトノロウイルス(HuNoV)は株化培養細胞で増殖させることができず、感染モデルとなる小動物も存在しないことが研究の障壁になっている。近年、近縁のマウスノロウイルス(MNV)の感染受容体となるタンパク質が同定され、ようやくMNVの感染に関する分子レベルの研究が可能となった。本研究では、MNVの感染受容体として同定されたCD300lf及びCD300ldと、MNVのキャプシドタンパク質であるVP1の相互作用解析を行うとともに、その相互作用を妨げる分子の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、第一にはMNVの感染・増殖機構に関する分子的な理解が深まることにより、さらにMNVについての研究に用いられる実験系が増え、MNVに関する研究をより推進することにある。第二に、HuNoVの感染・増殖機構の理解やHuNoVのワクチンの開発のための基盤構築としての意味合いが挙げられる。MNVに関する研究はHuNoVの研究進展に直結する重要課題である。現時点で可能なMNVの実験系を利用し、HuNoVの理解を深めることでその期待に応えることにつながる。MNV及びHuNoVの感染・増殖メカニズム解明を目指した本研究成果は、学術的な側面だけでなく社会的な価値を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Human norovirus (HuNoV), which is known to cause acute gastroenteritis and food poisoning in winter, cannot be propagated in cell lines, and there are no small animals that can be used as a model of infection. Recently, proteins that act as infection receptors for closely related murine norovirus (MNV) have been identified, and it is only now possible to carry out molecular level studies on MNV infection. In this study, we analyzed the interaction between CD 300 lf and CD 300 ld, which were identified as infection receptors of MNV, and VP1, a capsid protein of MNV, and searched for molecules that interfere with the interaction.

研究分野：構造生物学

キーワード：マウスノロウイルス

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスは、急性胃腸炎の主要因となるウイルスであり、全世界のノロウイルス性胃腸炎に罹患する人数は年間7億人にのぼる。ノロウイルスに感染すると、吐き気・嘔吐・下痢・腹痛・悪寒・発熱などの重篤な症状が出る。通常1~2日で治癒するが、免疫力の低下した老人や乳幼児の場合は死亡する例も報告されている。経済的な側面に注目すると、ノロウイルス感染による医療コストが40億ドルに及ぶだけでなく、ウイルス感染に伴う生産性の低下により600億ドルの経済損失があるといわれている(SM Bartsch et al., 2016)。しかしながら、ノロウイルスに対する有効なワクチンは未だに開発されていない。そればかりか、ノロウイルスの感染機構についてもほとんど明らかになっていないのが現状である。また、ノロウイルスはエンベロープを持たないため、嘔吐物の消毒などには塩素系消毒薬による処理が必要となり、アルコール系の消毒液に対して耐性を示すことも対処を困難にしている。

ノロウイルス研究の進展が遅い要因として、ヒトノロウイルス(HuNoV)の増殖に必要な強力な細胞培養方法が開発されていないことが挙げられる。そのため近年発見された培養可能なマウスノロウイルス(MNV)はHuNoVのモデルとして重要な研究対象となった。以前はこのMNVの感染受容体は細胞表面に発現した糖鎖分子であると考えられていたが、2016年に相次いで報告がなされ(RC Orchard et al., K Haga et al.)、CD300Id及びCD300Ifという1回膜貫通型のタンパク質がMNVの感染受容体であることが明らかとなった。これ以後、MNV感染受容体分子そのものに関する研究がようやく可能になったため、我々はこの感染受容体タンパク質分子に着目し、MNVのキャプシドタンパク質であるVP1との相互作用についての研究に着手するに至った。

2. 研究の目的

本研究ではMNVとその感染受容体に関して、将来的に抗ウイルス剤や消毒剤などの開発に利用することを想定し、その目的のために感染時に関わる分子について高分解能の立体構造を明らかにすることを目的とする。具体的な研究対象はMNVウイルス側のタンパク質であるキャプシドタンパク質VP1(図-1)とヒト側細胞の膜表面に存在するCD300Id, CD300Ifであり、両者が複合体を形成した状態の詳細な立体構造を明らかにすることで、感染時に起こる相互作用について原子レベルの知見を得ることが重要である。また、変異体タンパク質を用いた分子間相互作用解析を行うことでも、MNV感染に関わる分子基盤の詳細を明らかにすることを目指す。

本研究の意義は、第一にはMNVの感染・増殖機構に関する分子的な理解が深まることにより、さらにMNVについての研究に用いられる実験系が増え、MNVに関する研究をより推進することにある。第二に、より社会的インパクトのある意義として、HuNoVの感染・増殖機構の理解やNuNoVのワクチンの開発のための基盤構築としての意味合いが挙げられる。ウイルスの培養が制限され可能な実験が限られている現在、MNVに関する研究はHuNoVの研究進展に直結する重要課題である。社会的なニーズとしてHuNoVに対する感染予防や治療のためのワクチンが期待されているが、現時点で可能なMNVの実験系を利用し、HuNoVの理解を深めることでその期待に応えることにつながる。未だほとんど明らかになっていないMNV及びHuNoVの感染・増殖メカニズム解明を目指した本研究は、学術的な側面だけでなく社会的にも大きなインパクトを与えるものである。

3. 研究の方法

受容体とキャプシドタンパク質の微量発現系では既に機能的なタンパク質の発現・精製に成功しているが、受容体の大量発現系はリフォールディングの工程を含むためか再現性が低い問題がある。これを解決し安定的に大量調製するために条件検討を行った。

得られたサンプルを用いて、分析超遠心や蛍光ゲルろ過クロマトグラフィーなどの手法で詳細な相互作用解析を行う。

受容体として同定された CD3001d 及び CD3001f は 1 回膜貫通タンパク質であるため、N 末端ドメインのみを可溶性画分に発現させることを目指した。また VP1 に関しては P ドメインと呼ばれるウイルス表面に突き出た部分のみのコンストラクトを用いた発現を検討した。しかしながら両者の複合体の結晶化及び X 線結晶構造解析の成功のために、より複合体の結晶化に適した様々なコンストラクトの組み合わせの検討を行い、結晶が得られた場合は申請者所属の研究室で所有している X 線回折装置でただちに結晶の評価を行う。そのような設計と評価の繰り返しを通して構造解析に適した発現コンストラクトを決定する。

まず、マウスノロウイルスのキャプシドタンパク質 VP1 の P ドメインとマウス側の受容体である CD3001f の大腸菌大量発現系の構築を行った。CD3001f はインクルージョンボディーからリフォールディングによって可溶性タンパク質として精製を行っていたが、収量が安定しない問題があった。リフォールディング条件を検討することによりよい高い収量の確保を目指した。

研究実施期間中に我々が解明を目指す CD3001f と P ドメインの立体構造が昨年度中に他グループによって報告されたため、研究計画を修正する必要があった。修正後の研究計画では、CD3001d と VP1 の P ドメインとの相互作用解析に焦点を絞り研究を進めることに加えて、VP1 と結合する可能性のある分子との相互作用解析を行うことにした。また、マウスノロウイルスのキャプシドを構成する VP2 蛋白質についても共同研究者からサンプルの提供を受け、分析超遠心による溶液性状の解析と結晶化スクリーニングを行なった。

4. 研究成果

CD3001f の発現条件および精製条件をベースに条件検討をした結果、比較的高純度で精製することができた。収量については十分ではなかったため、リフォールディング条件の検討と培養スケールを上げることで各実験に必要なサンプル量を確保することが可能となった。

同様の手法で CD3001d のサンプル調製にも成功した。プルダウンアッセイとゲル濾過クロマトグラフィーにより VP1 と CD3001d との相互作用が確認できたため共結晶化のスクリーニングを行なった。市販のスクリーニングキットで約 700 種のバッファー条件を試したが結晶は得られなかった。

コンストラクティングの際の N 末端および C 末端の処理に原因があると考え、コンストラクトの検討を行なっているが、結晶構造の解明には至っていない。

別のアプローチとして、VP1 と相互作用する分子の探索を進めている。ウイルス表面タンパク質と相互作用することによりウイルスの不活化を示すことが報告されているリゾチーム 分子との相互作用解析を行った。リゾチーム のフラグメントペプチドと VP1 との結合を確認するため、ゲル濾過クロマトグラフィー、分析超遠心を行なったが相互作用を示すはっきりとした結果は得られていない。相互作用解析については条件検討が必要な部分もあると考えており、リゾチーム 分子の前処理としてプロテアーゼによる限定分解などの検討を行う予定である。

また、リゾチームフラグメントと VP1 の共結晶化スクリーニングでも結晶化スクリーニング

を行なった。いくつかの条件で結晶が出たため条件の精密化を行っている。VP1との相互作用する分子として胆汁酸との共結晶化を試みた。またVP2タンパク質についても様々なコンストラクトで調製したサンプルについて結晶化スクリーニングや分析超遠心による相互作用解析を行なった。VP2の結晶化スクリーニングでは未だ結晶がえら得ていないため、今後はVP2の溶液性状を踏まえたコンストラクトを検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Jeongmin Han, Iktae Kim, Jae-Hyun Park, Ji-Hye Yun, Keehyoung Joo, Taehee Kim, Gye-Young Park, Kyoung-Seok Ryu, Yoon-Joo Ko, Kenji Mizutani, Sam-Young Park, Rho-Hyun Seong, Jooyoung Lee, Jeong-Yong Suh, Weontae Lee | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 A Coil-to-Helix Transition Serves as a Binding Motif for hSNF5 and BAF155 Interaction | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 1-19 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072452 | 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 該当する |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Kamata Kenichi, Mizutani Kenji, Takahashi Katsuya, Marchetti Roberta, Silipo Alba, Addy Christine, Park Sam-Yong, Fujii Yuki, Fujita Hideaki, Konuma Tsuyoshi, Ikegami Takahisa, Ozeki Yasuhiro, Tame Jeremy R. H. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 The structure of SeviL, a GM1b/asialo-GM1 binding R-type lectin from the mussel Mytilisepta virgata | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1-13 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78926-7 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|