

令和元年6月17日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08824

研究課題名(和文) ランダム行列理論によるHIV-1 Env三量体の構造セクターと進化セクターの推定

研究課題名(英文) Estimation of structural and statistical sectors of HIV-1 Env trimer by random matrix theory

研究代表者

横山 勝 (Yokoyama, Masaru)

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官

研究者番号：70296028

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)：ランダム行列理論によりHIV-1 Envの構造セクターおよび進化セクターの推定を行った。構造セクターの1つに、V3 tipと隣接するプロトマーのV1/V2が含まれていた。この結果は、抗V3抗体の中和エピトープが、隣接するプロトマーのV1/V2との相関運動によりのマスキングされていることを示唆する。HIV-1 EnvのC-C loopに位置する進化セクターを推定した。この進化セクターは構造安定性を維持するために、変異を許容し難いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、HIV-1 Env三量体のプロトマー間での相関運動による中和抗体逃避機構が明らかになった。この研究成果は、タンパク質構造に基づく抗原デザインや抗ウイルス薬による中和感受性の制御を可能にする。また、HIV-1 Envに変異を許容し難い進化セクターがあることを見出した。HIV-1は易変異性ウイルスであり、これまでEnvで変異を許容し難い部位の報告は無い。この進化セクターは新たな治療標的になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of the neutralizing antibody escape and the origin of functional constraints in the evolution of HIV-1 Env, we estimated the structural and statistical sectors by random matrix theory. One of the structural sectors contained the V3 tip and the adjacent protomer V1/V2. The result suggests that masking of the neutralizing epitope of the anti-V3 antibody is controlled by the correlation motion with the adjacent protomer V1/V2. We estimated the statistical sector located in the C-C loop in HIV-1 Env. This statistical sector would be intolerant of mutations in order to maintain structural stability.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 エンベロープ 揺らぎ 統計的カップリング行列 ランダム行列理論 セクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) はエイズの原因ウイルスである。HIV-1 エンベロープ (Env) は感染受容体との結合部位を持つ gp120 と、ウイルスと標的細胞との膜融合に重要な gp41 からなる糖タンパク質であり、gp120 と gp41 のヘテロダイマーが三量体を形成している。HIV-1 Env は感染受容体との結合より大きな構造変化を起こし、ウイルスと標的細胞との膜融合を可能にする。HIV-1 は易変異性であるにもかかわらず、この機能を維持している。さらに、HIV-1 Env には抗原変異だけでは説明できない中和抗体逃避のメカニズムがある。これまで、立体配置による遮蔽、糖鎖による遮蔽、立体構造変化による遮蔽などが提案されているが、中和抗体逃避のメカニズムはいまだ明らかでない。

我々は、gp120 の中和抗体逃避の制御因子として、V3 ループの電荷量に注目した。V3 配列の多様性解析を行い、V3 の荷電量の低下によって V3 配列の多様性が低下することを示した。次に、V3 の荷電量が gp120 構造に与える影響を知るために、gp120 外側ドメインの分子動力学計算を行った。その結果、V3 の荷電量が V3 ループの立体配置を制御すること、V3 の荷電量が感染受容体との結合部位である CD4 結合ループの配置を制御することを明らかにした。V3 および CD4 結合ループは中和抗体のエピトープである。ゆえに、以上の結果は V3 が荷電量に基づきウイルスの中和感受性を司る機能領域であることを示唆する。

タンパク質の機能領域はアミノ酸残基がグループを形成して機能する。このグループのことをセクターと呼ぶ。セクターには共進化のグループ (進化セクター) や相関運動のグループ (構造セクター) などがある。このセクターを構成するアミノ酸残基を知ることが、タンパク質の機能の理解および機能を制御するために重要である。申請者らはセクターを推定する方法としてランダム行列理論に注目した。ランダム行列理論により、ノイズを含むデータの中から本質的な相関関係を抽出できる。申請者らは HIV-1 Env gp120 単量体の分子動力学計算を行い、ランダム行列理論により解析した。V1/V2 による V3 の配置を制御する構造セクターが推定された。この構造セクターはアロステリックパスであると考えられる (第 37 回日本分子生物学会年會において発表)

2. 研究の目的

本研究は、HIV-1 Env の中和抗体逃避および機能発現のメカニズムを明らかにすることを目的とする。そのため、HIV-1 Env の機能構造である三量体の分子動力学計算を行い、ランダム行列理論により構造セクターの推定を行う。また、進化における機能的制約の起源を知るために進化セクターの推定も行う。中和抗体逃避および機能発現のメカニズムが明らかになれば、それらの制御部位を標的とする抗原デザインが可能となり、ワクチン開発につながる重要な情報となる。

3. 研究の方法

(1) HIV-1 Env 三量体の平衡構造を分子動力学計算により得た。分子動力学計算に用いた初期構造は、ホモロジーモデリング法により構築した中和抵抗性株である。糖鎖は $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ を付加した。分子動力学計算は Amber16 の pmemd.cuda モジュール、力場はタンパク質に ff14SB、糖鎖に GLYCAM_06j-01 を用いた。圧力は 1atm、温度は 310K、塩濃度は 150 mM NaCl、計算時間は 1250 ns とした。分子動力学計算により得られたデータを用いて、AmberTools16 の cpptraj により RMSF (根平均二乗揺らぎ) および動的相互相関行列を計算した。構造セクターの推定は、動的相互相関行列からランダム行列理論に基づきノイズに起因する成分を取り除き、スペクトラルクラスタリングにより行った。

(2) 進化セクターの推定に用いる HIV-1 Env 領域全長のアミノ酸配列は、HIV sequence database (<https://www.hiv.lanl.gov/content/index>) から取得し、'X' を含むアミノ酸配列や短いアミノ酸配列は除いた。取得したアミノ酸配列を用いて統計的カップリング行列を求めた。その時、アミノ酸頻度にサンプリングバイアスの補正を行った。得られた統計的カップリング行列から、ランダム行列理論によりノイズに起因する成分を取り除いた。ノイズを取り除くことで統計的カップリング行列の主成分を求め、進化セクターの推定を行った。最大固有値の進化セクターを HIV-1 Env 三量体立体構造に表示した。最大固有値の進化セクターの変異口バネトネスを評価するために、統合計算化学システム MOE の Protein Design application を用いて、セクターのアミノ酸残基に in silico 変異導入解析を実行した。

4. 研究成果

(1) ランダム行列とは行列要素が確率変数である行列のことである。このランダム行列は固有値および固有ベクトルが普遍的な性質を持つため、ランダム行列理論から外れた固有値および固有ベクトルにより、統計的に有意な相関関係を抽出することができる。これまで、タンパク質におけるセクターの推定法として、Halabi らの方法や Dahiriel らの方法がある。しかし、セクターの推定法は確立された方法は無く、新たにセクターの推定法を検討する必要がある。これまで、ランダム行列理論によるセクター推定は、相関行列の固有ベクトル成分の比較により行っていたが、高々 4 つのセクターまでしか推定できない問題があった。本研究では、相関行列からランダム行列理論によりノイズ除去を行い、得られたデータのスペクトラルクラスタリ

ングにより、セクターを推定するプログラムの開発を行った。新しく開発したプログラムを評価するために、HIV-1 gp120 単量体の分子動力学計算を行い、これまでの手法と新しい手法で構造セクターの推定を行った。これまでの手法では3つのセクターが推定されたが、新しい手法では6つのセクターが推定された。

(2) HIV-1 Env 三量体が中和抵抗性となる分子メカニズムの理解は、タンパク質構造に基づく抗原デザインや抗ウイルス薬による中和感受性の制御を可能にする。HIV-1 エンベロープ三量体の構造セクターの推定を行い、中和抗体逃避における役割を検討した。はじめに、HIV-1 Env 三量体の構造揺らぎをRMSFより調べると、単量体では大きく揺らいでいたループが、三量体では揺らぎが抑えられていることが分かった。次に、動的相互相関行列からランダム行列理論によりノイズに起因する成分を取り除き、スペクトラルクラスタリングによって構造セクターの推定を行った。構造セクターの1つには、HIV-1の主要エピトープであるV3 tipと隣接するプロトマーのV1/V2も含まれていた。抗V3抗体の中和エピトープのマスキングは、隣接するプロトマーのV1/V2との相関運動により制御されていると考えられる。

(3) HIV-1 エンベロープの進化における機能的制約の起源を知るために、進化セクターの推定を行った。進化セクターの推定に用いた HIV-1 Env 領域全長のアミノ酸配列の数は、Clade B が 27908、Clade C が 14739 であった。統計的カップリング行列から、ランダム行列理論によりノイズに起因する成分を取り除いた。統計的カップリング行列は、Clade B では 16、Clade C では 21 の主成分からなることが明らかになった。Clade B において 27、Clade C において 33 の進化セクターが推定された。最大固有値の進化セクターを HIV-1 Env 三量体立体構造に表示すると、最大固有値の進化セクターは主に gp41 の C-C loop に位置していた。最大固有値の進化セクターのアミノ酸残基に *in silico* 変異導入解析を実行すると、最大固有値の進化セクターを構成するアミノ酸残基の多くは、最も構造を安定にするアミノ酸であることが明らかになった。情報エントロピーにより、最大固有値の進化セクターの多様性解析を行うと、多くのアミノ酸残基は極めて保存されていた。このことは、最大固有値の進化セクターが構造安定性を維持するために、変異を許容し難いことを示唆する。

< 引用文献 >

- Naganawa S, Yokoyama M, Shiino T, Suzuki T, Ishigatsubo Y, Ueda A, Shirai A, Takeno M, Hayakawa S, Sato S, Tochikubo O, Kiyoura S, Sawada K, Ikegami T, Kanda T, Kitamura K, Sato H. Net Positive Charge of HIV-1 CRF01_AE V3 Sequence Regulates Viral Sensitivity to Humoral Immunity. *PLoS ONE*, 3: e3206, 2008.
- Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural Dynamics of HIV-1 Envelope 1 Gp120 Outer Domain with V3 Loop. *PLoS ONE*, 7(5): e37530, 2012.
- Halabi N, Rivoire O, Stanislas Leibler S, Ranganathan R. Protein Sectors: Evolutionary Units of Three-Dimensional Structure. *Cell*, 138(4): 774-786, 2009.
- Dahirel V, Shekhar K, Pereyra F, Miura T, Artyomov M, Talsania S, Allen TM, Altfeld M, Carrington M, Irvine DJ, Walker BD, Chakraborty AK. Coordinate linkage of HIV evolution reveals regions of immunological vulnerability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (28):11530-11535, 2011.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- Doi N, Yokoyama M, Koma T, Kotani O, Sato H, Adachi A, Nomaguchi M. Concomitant enhancement of HIV-1 replication potential and neutralization-resistance in concert with three Adaptive Mutations in Env V1/C2/C4 Domains. *Frontiers in Microbiology*, 査読有、10:2, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.00002
- Yokoyama M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Ito K, Sato H. Molecular dynamics simulation of the influenza A(H3N2) hemagglutinin trimer reveals the structural basis for adaptive evolution of the recent epidemic clade 3C.2a. *Frontiers in Microbiology*, 査読有、8:584, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00584
- Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Tanaka T, Motomura K. Evolutionary constraints on the norovirus pandemic variant GII.4_2006b over the five-year persistence in Japan. *Frontiers in Microbiology*, 査読有、8:410, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00410
- Alam M, Kuwata T, Shimura K, Yokoyama M, Ramirez Valdez KP, Tanaka K, Maruta Y, Oishi S, Fujii N, Sato H, Matsuoka M, Matsushita S. Enhanced antibody-mediated neutralization of HIV-1 variants that are resistant to fusion inhibitors. *Retrovirology*, 査読有、13:70, 2016. doi: 10.1186/s12977-016-0304-7
- Hikichi Y, Yokoyama M, Takemura T, Fujino M, Kumakura S, Maeda Y, Yamamoto N, Sato H, Matano T, Murakami T. Increased HIV-1 Sensitivity to Neutralizing Antibodies by

〔学会発表〕(計16件)

- Kotani O, Yokoyama M, Ono A, Sato H, A proposal of molecular dynamics based structural models of the Pr55Gag precursor of HIV-1, 第32回日本エイズ学会学術集会・総会, 2018.
- 横山 勝, 佐藤裕徳, HIV-1 エンベロープ三量体における中和感受性に関連する構造とゆらぎ, 第32回日本エイズ学会学術集会・総会, 2018.
- 原田恵嘉, 野村 渉, 鳴海哲夫, 横山 勝, 前田賢次, 竹内怜音, 紺野奇重, 引地優太, 佐藤裕徳, 玉村啓和, 俣野哲朗, 吉村和久, 網羅的 Env 標的阻害剤ライブラリーの構築-3, 第32回日本エイズ学会学術集会・総会, 2018.
- Kotani O, Yokoyama M, Ono A, Sato H. A proposal of molecular dynamics based structural models of the full-length, ligand-free Pr55Gag precursor of HIV-1. The 43rd annual meeting on Retroviruses, 2018.
- Murakami T, Masayuki Fujino M, Yokoyama M, Kobayakawa T, Takeuchi H, Masuda T, Kotani O, Tamamura H, Sato H. Biological and molecular characterization of a novel anti-HIV-1 compound created by in silico design and de novo organic synthesis. The 43rd annual meeting on Retroviruses, 2018.
- 横山 勝, 佐藤裕徳, 分子動力学計算による HIV-1 エンベロープ三量体の構造セクターの解析, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)(第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 2017.
- 横山 勝, 佐藤裕徳, HIV-1 エンベロープ三量体における中和抗体逃避機構の解析, 第31回日本エイズ学会学術集会・総会, ワークショップ「分子・細胞・集団」, 2017.
- 原田恵嘉, 野村 渉, 鳴海哲夫, 横山 勝, 前田賢次, 林 宏典, 紺野奇重, 引地優太, 佐藤裕徳, 玉村啓和, 俣野哲朗, 吉村和久, 網羅的 Env 標的阻害剤ライブラリーの構築-2, 第31回日本エイズ学会学術集会・総会, 2017.
- Harada S, Yokoyama M, Ogihara K, Hikichi Y, Sato H, Narumi T, Matano T, Yoshimura K, Discovery of novel bifunctional entry inhibitors of HIV-1 using structure-based in silico screening, 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017.
- 横山 勝, 佐藤裕徳, Structural sectors that are contributed to neutralization escape in HIV-1 envelope glycoprotein trimer, 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017.
- 荻原香澄, 引地優太, 原田恵嘉, 横山 勝, 加藤由奈, 佐藤浩平, 間瀬暢之, 吉村和久, 鳴海哲夫, HIVの細胞侵入を阻害するオレアノール酸誘導体の構造活性相関研究, 第27回抗ウイルス療法学会学術集会・総会, 2017.
- 横山 勝, 奥田 萌, 中村浩美, 小谷 治, 由良 敬, 佐藤裕徳, HIV-1 Env 三量体における制限された構造ゆらぎ, 第39回日本分子生物学会年会, 2016.
- 原田恵嘉, 野村 渉, 鳴海哲夫, 横山 勝, 前田賢次, 林宏典, 荻原香澄, 石田有佑, 引地優太, 佐藤裕徳, 玉村啓和, 俣野哲朗, 吉村和久, 網羅的 Env 標的阻害剤ライブラリーの構築-1, 第30回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016.
- 横山 勝, HIV envelope の構造と動的性質, 第30回日本エイズ学会学術集会・総会, シンポジウム「HIV envelope を標的とした感染防御」, 2016.
- 横山 勝, 奥田 萌, 中村浩美, 小谷 治, 由良 敬, 佐藤裕徳, ノロウイルスカプシドにおける構造ゆらぎと相関運動, 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016.
- Yokoyama M, Okuda M, Nakamura H, Kotani O, Yura K, Sato H, Structural Fluctuations and Correlated Motions in Norovirus Capsid Oligomer, The 6th International Calicivirus Conference, 2016.

〔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:
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。