

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06238

研究課題名(和文) X線結晶学による甲殻類急性ウイルス血症の感染機構の解明

研究課題名(英文) Crystal structure of the C-terminal domain of envelope protein VP37 from white spot syndrome virus

研究代表者

鈴木 守 (Suzuki, Mamoru)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：40280507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：甲殻類急性ウイルス血症の感染機構を解明するために感染関連分子の立体構造を決定しようとする研究は始まったばかりである。本研究ではVP37のX線結晶構造の解明および感染関連VP28との複合体モデルを提案した。今後、本研究の成果を利用し、WSSVの感染機序、甲殻類急性ウイルス血症予防・防御のための重要な情報基盤を明らかにする研究が発展することを期待したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義
分解能2.51ÅでVP37のX線結晶構造解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：Research to determine the 3D structures of infection-associated molecules to elucidate the infection mechanism of crustacean acute viremia has just begun. In this study, we elucidated the X-ray crystal structure of VP37 and proposed a model of its complex with infection-associated VP28. We hope that the results of this study will be used in future studies to elucidate the mechanisms of WSSV infection and the important information base for the prevention and protection of crustacean acute viremia.

研究分野：X線結晶構造学

キーワード：X線結晶学 る甲殻類急性ウイルス血症

1. 研究開始当初の背景

甲殻類急性ウイルス血症は、エビの養殖において最も甚大な被害が報告されている疾病であり、White Spot Syndrome Virus (WSSV) の感染により発生する。エビが感染すると 3~10 日のうちに 100%死に至る。ウイルスがいったん養殖場に入り込んでしまうと、ウイルスを排除するためには、現状そこで飼育しているエビを全て廃棄するしかなく、有効な予防・防御方法が求められている。本申請では、感染に関係すると目されている WSSV の VP37 および感染関連分子群の立体構造を X 線結晶構造解析により決定し、感染メカニズムを分子構造レベルで理解することを目的とする。そのために VP37 および感染関連分子群の大量発現系の構築と精製方法および結晶化条件の探索を行う。結晶が得られれば放射光施設で回折実験を行い、その立体構造を解明する。そして、立体構造情報を元に生化学実験を行い、感染機構を明らかにするとともに、VP37/VP28 複合体の結晶構造解析にも果敢に挑戦する。

WSSV を構成するタンパク質は、エンベロープタンパク質、テグメントタンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質に分類できる。細胞へのエントリーの詳細は明らかになっていないが、エンベロープタンパク質の VP37 と VP28 が細胞へのアタッチメントに直接寄与することは知られている。

VP37 は、抗 VP37 抗体が WSSV 感染を有意に抑えること、精製した VP37 が WSSV の宿主細胞への結合を競合的に阻害すること等から、感染時に必須なタンパク質であることが強く示唆されている。同様に VP28 は、RNA 干渉により感染阻害が観察されることから感染に関わることが強く示唆されている。また、VP37 と VP28 の間には相互作用があり、感染に相乗的に働くことが知られている(Liu et. al.,2009)。

VP37 は F1 ATP synthase β サブユニットとの相互作用が明らかになっている (Zhan et. al.,2013)。さらに、インテグリンとの相互作用に知られている RGD モチーフが含まれているため、インテグリンが感染のレセプターである可能性も指摘されている。VP28 は Hsc70 (Xu et. al.,2009)及び PmRab7(Verma et. al.,2013)との相互作用が報告されている。

WSSV のタンパク質としては、これまで VP28 の構造がそれぞれ明らかにされている(Tang et. al.,2007)が、VP37 やその他の感染関連タンパク質については未だ構造が明らかになっておらず、その構造を明らかにすることで、WSSV の感染機序を分子レベルで解明し、その感染を防ぐ養殖池循環水装置の吸着材等の開発に寄与することが期待できる。

2. 研究の目的

本申請では、VP37 及び、感染関連分子群の立体構造を X 線結晶学により決定し、生化学的・細胞生物学的実験の知見と合わせて、以下の疑問について明らかにする。

ア) VP37 の構造と感染機構

イ) 感染関連分子群の構造と感染機構

ウ) VP37/VP28 複合体の構造と分子間相互作用

ア) イ) については立体構造から直接回答が得られる。ウ) については VP37/VP28 複合体構造を元に、複数の変異体を作成し相互作用解析を行う。

甲殻類の急性ウイルス血症の感染機構を解明するために感染関連分子の立体構造を決定しようとする研究は、世界的に見て緒に就いたばかりである。本申請で構造解析が成功すれば、関連分野のブレークスルーとなることが期待できる。

急性ウイルス血症感染に重要な機能を持つと考えられる VP37、VP28 および感染関連分子について、これまで報告されている知見は、全て ELISA や Western blot 等の免疫的手法によるものであり、上皮細胞へ「結合する」以上のことは何もわかっていないと言っても過言ではない。今回、VP37、感染関連分子および VP37/VP28 複合体の立体構造を明らかにし、表面プラズモン共鳴法による相互作用解析の情報を加えることで、はじめて分子レベルでの WSSV の感染機序に言及することができ、基礎化学的に重要であるとともに、甲殻類の急性ウイルス血症予防および撲滅のための重要な情報基盤を提供することにより社会的貢献な貢献も期待できる。

3. 研究の方法

VP37 の大量発現系の構築、培養・精製を行う。本申請開始時には大量発現系の構築済みであり、結晶解析に十分量のタンパク質を得る方法を確立しており、得られているサンプルは電気泳動において不純物由来のマイナーバンドが見られるものの、すでに結晶を得ることに成功していた。良質の結晶を得るにはさらに精製純度を上げる必要があるため、精製方法の最適化を最優先で行う。精製した試料を用い結晶化スクリーニングを行い、良質な結晶が得られれば X 線回折実験、結晶構造解析を行う。他の感染関連分子についても同様に精製、結晶化を行う。VP28 については構造既知のタンパク質であることから発現・精製法は確立されている。VP37/VP28 複合体の結晶を得ることは簡単なことではないと予想されるが果敢に挑戦する。

回折実験では、結晶はあらかじめ液体窒素で凍結させたものを放射光施設にドライシッパー

に入れて持ち込む。結晶ができてからの経時変化が問題になる結晶の場合は、測定の数日前に放射光施設内の生化学実験室にて結晶化することも考える。位相決定はヨウ素化した結晶を用いての I-SAD、あるいはタンパク質に含まれるチオニン、システインの硫黄原子の異常分散を利用した S-SAD、さらにセレノメチオニンを利用した Se-MAD を利用する予定である。VP37 分子中には 4 個のシステイン残基、5 個のメチオニン残基が存在している。S-SAD では $\Delta F/F$ が 0.5% 以上であれば位相決定が可能である。波長 1.54 Å を用いた場合、期待される $\Delta F/F$ は 0.75% であり、VP37 の位相決定に有望である。構造解析に成功した暁には、立体構造を元に感染メカニズムを推定し、それを証明するための遺伝子変異体作成し、表面プラズモン共鳴、等温滴定型カロリメトリーを用いて相互作用評価を行う予定である。必要な装置は所属研究所内で利用可能である。

4. 研究成果

本研究はエビ養殖が重要な輸出産業であるタイ王国のモンクット王立工科大学の Pongsak Khunrae 博士との共同研究として進めた。最も重要な成果は VP37 の結晶化および X 線結晶構造解析に成功したことである。KEK-Photon Factory のビームライン BL-17A において、低温窒素ガス気流下、検出器として Pilatus 6M を用いて回折データを取得した。弱い硫黄信号による異常信号の改善と、試料吸収の長波長化によるデータ品質の低下との良い妥協点を達成するために、ネイティブデータでは波長 0.98 Å、S-SAD 位相決定用には波長 2.00 Å の X 線を用いた。1° の振動と 1 秒の露光時間で、ネイティブデータ用の 360 枚の回折像と位相決定用の 5400 枚の回折像を測定した。すべての回折データは、XDS を使用してインデックス付けと積分を行った。位相決定は、タンパク質中に含まれる硫黄原子を用いた SAD 法によって行った。0.98 Å の波長で収集されたネイティブデータの高解像度データセットを用いて最終構造 (2.51 Å) を得た。構造は、8 本鎖の バレルフォールドであった。得られた構造と、すでに明らかになっている VP28 の構造との複合体モデルと提案した。

本研究の成果を利用し、今後 WSSV の感染機序、甲殻類急性ウイルス血症予防・防御のための重要な情報基盤を明らかにする研究が発展することを期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Murakawa Takeshi, Suzuki Mamoru, Fukui Kenji, Masuda Tetsuya, Sugahara Michihiro, Tono Kensuke, Tanaka Tomoyuki, Iwata So, Nango Eriko, Yano Takato, Tanizawa Katsuyuki, Okajima Toshihide	4. 巻 78
2. 論文標題 Serial femtosecond X-ray crystallography of an anaerobically formed catalytic intermediate of copper amine oxidase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 1428 ~ 1438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798322010385	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masuda Tetsuya, Okubo Kyohei, Baba Seiki, Suzuki Mamoru, Tani Fumito, Yamasaki Masayuki, Mikami Bunzo	4. 巻 389
2. 論文標題 Structure of thaumatin under acidic conditions: Structural insight into the conformations in lysine residues responsible for maintaining the sweetness after heat-treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 132996 ~ 132996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2022.132996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakawa Takeshi, Suzuki Mamoru, Arima Toshi, Sugahara Michihiro, Tanaka Tomoyuki, Tanaka Rie, Iwata So, Nango Eriko, Tono Kensuke, Hayashi Hideyuki, Fukui Kenji, Yano Takato, Tanizawa Katsuyuki, Okajima Toshihide	4. 巻 77
2. 論文標題 Microcrystal preparation for serial femtosecond X-ray crystallography of bacterial copper amine oxidase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 356 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X21008967	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Somsoros Wasusit, Sangawa Takeshi, Takebe Katsuki, Attarataya Jakrada, Wongprasert Kanokpan, Senapin Saengchan, Rattanarojpong Triwit, Suzuki Mamoru, Khunrae Pongsak	4. 巻 102
2. 論文標題 Crystal structure of the C-terminal domain of envelope protein VP37 from white spot syndrome virus reveals sulphate binding sites responsible for heparin binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001611	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 Li Hongjie et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Capturing structural changes of the S1 to S2 transition of photosystem II using time-resolved serial femtosecond crystallography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 431 ~ 443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2052252521002177	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 -

1. 著者名 Iijima Hiroshi, Takebe Katsuki, Suzuki Mamoru, Kobayashi Hiroko, Takamiya Tomoko, Saito Hiroaki, Niwa Norio, Kuwada-Kusunose Takao	4. 巻 68
2. 論文標題 Crystal Structure of Catechol O-Methyltransferase Complexed with Nitecapone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 447 ~ 451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c20-00011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugahara Michihiro, Motomura Koji, Suzuki Mamoru, Masuda Tetsuya, Joti Yasumasa, Numata Keiji, Tono Kensuke, Yabashi Makina, Ishikawa Tetsuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Viscosity-adjustable grease matrices for serial nanocrystallography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1371 ~ 1371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57675-7	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 -

1. 著者名 Murakawa Takeshi, Kurihara Kazuo, Shoji Mitsuo, Shibasaki Chie, Sunami Tomoko, Tamada Taro, Yano Naomine, Yamada Taro, Kusaka Katsuhiko, Suzuki Mamoru, Shigeta Yasuteru, Kuroki Ryota, Hayashi Hideyuki, Yano Takato, Tanizawa Katsuyuki, Adachi Motoyasu, Okajima Toshihide	4. 巻 117
2. 論文標題 Neutron crystallography of copper amine oxidase reveals keto/enolate interconversion of the quinone cofactor and unusual proton sharing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 10818 ~ 10824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1922538117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 飯島 洋、武部 克希、鈴木 守、桑田-楠瀬 隆生、高宮 知子、鶴澤 成一
2. 発表標題 カテコールO-メチル転移酵素の配座構造の変化
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林 弘子、武部 克希、元吉 尚美、板垣 正、鶴澤 成一、鈴木 守
2. 発表標題 ヤマブシタケ由来RNase He1の至適 pHに関するアミノ酸残基の検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Katsuki Takebe, Tomoko Shirai, Yuma Handa, Kaori Fukuzawa, Mamoru Suzuki, Takao K
2. 発表標題 Investigation of hydrogen bond network in the active center of catechol O-methyltransferase by X-ray crystallography and FMO method
3. 学会等名 情報計算化学生物学会(CBI学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Murakawa, Mamoru Suzuki, Kenji Fukui, Tetuya Masuda, Ikuko Miyahara, Takehiko Tosha, Takato Yano, So Iwata, Eriko Nango, Katsuyuki Tanizawa, Toshihide Okajima
2. 発表標題 Molecular movie of the catalytic reaction of bacterial copper amine oxidase conducted by mix and inject serial femtosecond X ray crystallography
3. 学会等名 Molecular Movies International Symposium 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東 孝太郎, 山口 雅也, 中田 匡宣, 武部 克希, 住友 倫子, 鈴木 守, 川端 重忠
2. 発表標題 化膿レンサ球菌の不活性型ヒアルロン酸分解酵素の結晶構造解析と活性型変異体の構造予測
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南後恵理子、Fangjia Luo、木村哲就、菅原道泰、中根崇智、鈴木守、榎田哲哉、溝端栄一、登野健介、岩田想
2. 発表標題 二液混合シリアルフェムト秒結晶構造解析による酵素反応及び構造変化追跡
3. 学会等名 日本結晶学会令和3年度年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林弘子、寒川 剛 武部克希 元吉尚美、板垣正、鈴木守
2. 発表標題 ヤマブシタケ由来RNase He1の3'-GMP複合体のX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武部 克希、桑田（楠瀬） 隆生、鈴木 守、高宮 知子、鶴澤 成一、飯島 洋
2. 発表標題 COMT（カテコールO-メチル基転移酵素）-新規阻害剤の複合体の構造解析: Opicaponeは基質（SAM）、生成物（SAH）とも安定な複合体を形成する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯島 洋、武部 克希、桑田（楠瀬） 隆生、鈴木 守、高宮 知子、鶴澤 成一
2. 発表標題 賦活化化合物によるCOMTの生成物阻害の解除機構：結晶構造解析による検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武部克希、福澤薫、鈴木守、楠瀬隆生、鶴澤成一、飯島洋
2. 発表標題 COMT/阻害剤複合体の結晶構造解析及び、量子化学計算による相互作用解析
3. 学会等名 第48回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東 孝太郎、武部 克希、山口 雅也、住友 倫子、中田 匡宣、鈴木 守、川端 重忠
2. 発表標題 化膿レンサ球菌におけるヒアルロン酸分解酵素の分子系統解析および結晶構造解析
3. 学会等名 第43回分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東 孝太郎、山口 雅也、中田 匡宣、武部 克希、住友 倫子、鈴木 守、川端 重忠
2. 発表標題 結晶構造解析に基づく化膿レンサ球菌におけるヒアルロン酸分解酵素の分子機構解明
3. 学会等名 第43回分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤啓子, 納屋昌実, 近藤好夫, 武部克希, 内藤真理子, 鈴木守, 今田勝巳, 石川岳志, 佐藤主税
2. 発表標題 歯周病細菌叢の病原性を抑える試み
3. 学会等名 第43回分子生物学会
4. 発表年 2021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			
タイ	King Mongkut's University of Technology			
タイ	King Mongkut's University of Technology	Synchrotron Light Research Institute	Mahidol University	他1機関
タイ	King Mongkut's University of Technology	Synchrotron Light Research Institute	Mahidol University	他1機関