3P086

ノロウィルスキャプシドタンパク質とルイス抗原との糖鎖認識機構

産業技術総合研究所 ナノシステム研究部門　○石田豊和　産業技術総合研究所　糖鎖創薬技術研究センター　久保田智巳　　国立感染研究所　ウィルス第二部　白土東子

Computational Modeling of Carbohydrate Recognition in Norovirus Capsid Protein and Lewis Antigen

Nanosystem Research Institute (NRI) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) ○ Toyokazu Ishida
Glycomedicine Technology Research Center (GTRC) AIST Tomomi Kubota
Department of Virology II National Institute of Infectious Diseases (NIID) Haruko Shirato

はじめに

生物機能の多様性において、細胞表面での糖鎖認識は非常に重要な役割を果たし、糖鎖がタンパク質や核酸に次ぐ第３の生命鎖であるとの認識も深まっている。糖鎖を特異的に認識して結合するタンパク質はレクチンと総称され、細胞表面の様々な糖鎖認識プロセスにおいては、多様性に富む糖鎖と種々のレクチン間の相互作用が多様性の起源であることが、近年の実験事実により明らかとなっている。現在知られるレクチンは、少なくとも 40 種類以上のフォールディングに分類されるが、糖鎖認識機構の詳細を見た時、各種レクチンの糖鎖特異性や結合力の差異等に関して、分子論的な起源は殆ど分かっていないのが現状である。弱い分子間力で会合体を形成する糖鎖 – タンパク質複合体一般に関しては、会合対形成のドライビングフォースは明確ではなく、レクチンによる糖鎖認識を介した生体機能の発現メカニズムの解読は分子科学分野において今後いっそうの研究が期待される分野である。この状況を踏まえ我々は、糖鎖認識の一例としてセレクチンの糖鎖認識パターンを解析する為の段階的なモデリング手法を提案したが、先の研究に続き今回、ウィルス感染系の典型例としてノロウィルスキャプシドタンパク質と血液型抗原（糖鎖）との相互作用に注目し、感染初期のウィルスによる糖鎖認識の分子メカニズムの研究を開始した。

ノロウイルス (NoV) は冬季に流行する感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、一般には軽症で経過するが、しばし二次的な感染から大規模化して、社会的な関心を集める事は周知の事実である。ヒトから分離される NoV はヒトのみに感染性を有し、培養細胞や実験動物での感染実験や増殖系が成立しないことから、ウイルスの感染機構および複製機構などの基本的知見は明らかとなっていない。過去の研究により、遺伝子型 GI/1 に分類されるプロトタイプ NV/68 株に関しては、キャプシド P ドメインと A および H 抗原との複合体結晶構造が報告され、α1,2 Fuc の認識機構の詳細は明らかになっている。しかしながらルイス抗原を構成する α1,3/4 Fuc 認識機構については未だ明らかにされておらず、糖鎖認識機構の包括的な理解には至ってない。そこで今回、1.6 Å 分解能の結晶構造と QM/MM 計算を基礎とする複合モデリング技術をベースとして、複数の血液型抗原（血液型糖鎖）とノロウィルスキャプシドタンパク質との結合様式に関して一連の分

子シミュレーションおよび詳細な解析を実行して、弱い相互作用に起因する糖鎖認識機構の分子メカニズムを議論した。特に今回は、１アミノ酸レベルの相互作用エネルギー解析を通して、異なった糖鎖抗原に対する認識の分子論的な起源、および１アミノ酸変位が糖鎖結合に及ぼす相対的なエネルギー変化に注目した解析を行った。

研究目的と計算手法

糖鎖複合体の出発構造に関しては、久保田らによるノロウィルスキャプシドタンパク質のＸ線結晶構造を用いて、これまで開発した独自のモデリング／計算手法を適用する事で、各種血液型抗原との構造モデルを作成した。レクチン – 糖鎖複合体に代表される、弱い会合体を形成するタンパク質複合体をモデル化する場合には、初期構造として結晶構造を利用し単純な構造精密化を実行した場合に、生理条件下での会合状態が正しくモデル化でき、かつ意味ある計算結果が得られるかは、必ずしも明確ではない。そこで本研究では、以下の異なった２つのアプローチでモデリングを行う事で、得られる計算結果の比較検討を通し、原子レベルでの糖鎖認識機構を議論した：（１）複合体結晶構造を初期情報として、QM/MM レベルで全系の構造精密化、モデル構造を構築する事で、結合サイト周辺の複合体構造解析、水素結合ネットワークの判定、および相互作用エネルギー成分の解析を行う。（２）分子動力学計算と QM/MM 計算を組み合わせ、糖鎖結合状態を定義する自由エネルギー面を評価して、安定領域の構造アンサンブルとして結合状態をモデル化する事で、最小自由エネルギー状態における糖鎖結合配座の同定と各種の構造パラメータを抽出する。

計算および解析結果

各種糖鎖抗原との認識パターンを網羅的に解析するため、分子モデリング構造の出発点としては天然型キャプシドタンパク質とルイスｂ糖鎖複合体の結合構造を基準にとり、これを基に系統的な分子モデリング、相互作用エネルギー成分解析、結合自由エネルギーの解析を段階を踏んで実施した。天然型タンパク質の糖鎖結合部位に１アミノ酸置換を導入した場合、ルイスｂ糖鎖との親和性が向上することが実験事実から知られているが、この分子論的起源は明確ではなく、高分解能の結晶構造解析からも明確な回答が得られていない。そこで先ず初めに、Ｘ線結晶データを直接用いて結合サイト近辺の構造パターンを QM/MM 計算から詳細に解析したが、ルイスｂ糖鎖とウィルスキャプシドとの相互作用に関しては、明確な構造論的差異を見つける事は困難であった。そこで次に、糖鎖結合を定義する自由エネルギー面を QM/MM 計算より求める事で、自由エネルギー的に安定な糖鎖の集団構造を解析し、天然型および変位型での構造差を比較した。この場合でもタンパク質との相互作用に関しては有為な違いが認められず、むしろ１アミノ酸置換に誘発された局所的な構造変化、それに伴った水和構造の変化が大きく影響する事が徐々に明らかと成り、更に詳細な解析を継続している。

References

1. Kubota, et al. *Journal of Virology* **2012**, *86*, 11138-11150.

2. Ishida *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 3950-3964 (Cover Art Article).