

## 4P083

### ノロウイルスキャプシドタンパク質の糖鎖認識における糖鎖構造依存性

産業技術総合研究所 ナノ材料研究部門 ○石田豊和 産業技術総合研究所 バイオメディカル  
研究部門 久保田智巳 国立感染研究所 ウィルス第二部 白土東子

Structural origin of carbohydrate recognition mechanism in norovirus capsid protein

Nanomaterials Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and  
Technology (AIST), ○Toyokazu Ishida, Biomedical Research Institute, AIST, Tomomi Kubota  
Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases (NIID), Haruko Shirato

#### はじめに

ノロウイルス (NoV) は冬季に流行する感染性胃腸炎の主要原因ウイルスとして知られ、多くの場合は軽症で経過するが、しばしば二次的な感染から大規模化し、社会的な関心を集める事は良く知られている。ウイルス感染の初期過程では、タンパク質と糖鎖間での相互作用の重要性が指摘されているが、分子スケールで見た場合の糖鎖認識機構の詳細は必ずしも明確でなく、感染機構の分子メカニズムに関しては良く分かっていないのが現状である。ノロウイルスキャプシドタンパク質の構造学的な知見に関して、遺伝子型 GI/1 に分類されるプロトタイプ NV/68 株では、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、 $\alpha$ 1,2 Fuc 認識機構の詳細が明らかとなったが、ルイス抗原を構成する  $\alpha$ 1,3/4 Fuc 認識機構については、糖鎖結合様式の詳細は未だ不明な点が多く、糖鎖認識機構の包括的な理解は得られていない。

しかし近年我々は、キャプシド P ドメインと各種血液型抗原との立体構造を高分解能で決定し、その結果ノロウイルスキャプシドタンパク質に対して詳細な分子モデリングが可能となり、各種血液型抗原に対する特異性の差異、結合親和力の分子論的起源の解明に向けて、更なる研究を推進している。高分解能複合体結晶構造を基点として、QM/MM 計算を基礎とする複合モデリング技術を適用する事で、キャプシドタンパク質と血液型抗原（血液型糖鎖）との結合構造をモデリングし、一連の分子シミュレーション解析を行う事で、弱い分子間相互作用を起源とする糖鎖認識機構の分子メカニズムを研究してきた。過去の報告では、糖鎖結合状態を定義する自由エネルギー面を導入し、エネルギー的に安定な構造アンサンブルの構造を解析する事で、糖鎖結合を支配する要因を議論してきたが、今回更に、糖鎖結合の自由エネルギー変化そのものを計算し、分子構造の違いが結合自由エネルギーに及ぼす影響を検討した。

#### 研究目的と計算手法

分子モデリングの出発構造としては、久保田らにより構造解析がなされた、天然型キャプシドタンパク質とルイス b 糖鎖との複合体の高分解能結晶構造を用いた (Ref.1)。今回対象とする血液型糖鎖（ルイス a、ルイス b、H 抗原）に関しては、結晶構造を基にして天然構造に相当する糖鎖

構造を作成／結合させる事で、初期分子モデルを作成した。一般に、弱い相互作用で結合したタンパク質－糖鎖複合体をモデリングする場合、結晶構造を利用した単純な構造精密化では、生理条件下での会合状態が正しくモデル化できるか、また相互作用エネルギーの見積もりが適切であるかは、必ずしも自明ではない。そこで我々の研究では、以前に提案した段階的な計算手順で分子モデリング／計算を行って、実験構造との相違や計算結果の妥当性を十分に検証し、糖鎖認識における微細な構造変化、それに伴ったエネルギー変化を詳細に調べる事にした (Ref.2)。

### 計算および解析結果

糖鎖結合サイトの局所的な構造変化が結合親和力に与える影響を定量的に見積もるため、計算解析の第一段階としては、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、結合サイトに一アミノ酸変位を加えた変異型キャプシドとの間で、結合親和力の差異を比較する事を試みた。本系の場合、比較的高分解能の複合体結晶構造が得られているが、結晶構造間の比較だけでは、糖鎖結合親和力の起源が必ずしも明確でない。そこで水和キャプシドタンパク質を QM/MM 計算にて構造最適化し、局所的な水素結合ネットワークを同定した上でエネルギー成分解析を行ったが、これら構造的知見のみからでは「変異型タンパク質の方がより強く糖鎖を結合する」事を示唆する実験事実を説明する事が困難であった。

そこで次に、弱い相互作用で複合体を形成する揺らいだ系の結合状態をモデル化する為に、糖鎖結合を表す自由エネルギー面を導入し、自由エネルギー面上の安定領域の集団構造をサンプルする事によって、天然型および変位型キャプシドに結合した糖鎖構造のエピトープ変化、および糖鎖自身の結合構造の変化を詳細に比較した。しかしこの場合でも、糖鎖構造のみに注目した場合には両者の間で明確な差異は認められず、ごく僅かに、アミノ酸置換を導入した部分の水素結合距離に違いが現れた程度であった。そこで最後に、熱力学サイクルを仮定して糖鎖リガンドの結合自由エネルギーを評価する事を試みたが、この結果から、結合自由エネルギーそのものは変異型タンパク質の方が僅かに大きく、ルイス b 糖鎖を強く結合しうる事が確かめられた。そこで自由エネルギー変化を成分分割する事で、両者の違いを比較したところ、タンパク質との相互作用以上に溶媒和の影響が大きくなっている事が示され、結合サイトにおけるアミノ酸置換が局所的な構造変化を誘発し、これに伴った水和構造の変化が糖鎖認識に強く影響を与えた事が確かめられた。この結果は、結晶構造に代表される静的な構造解析から糖鎖結合の親和性を予測する事が困難である事を示唆しており、微細な糖鎖構造の変化が分子認識に及ぼす影響を考察する上で非常に興味深い事実を与えている。これら一連のシミュレーション結果の詳細は、当日に発表する予定である。

### 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).
3. Ishida, Kubota, Shirato, in preparation