

X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原との結合解析

Structural basis for the recognition of histo-blood group antigens by genogroup I norovirus

久保田智巳¹、白土東子²

¹産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センター、〒305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 つくば中央第 2¹

²国立感染症研究所 ウイルス 2 部 〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1²

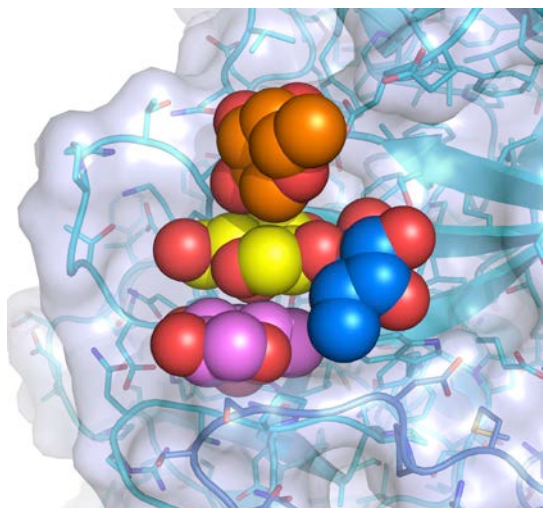
1. はじめに

ウイルス性食中毒の主たる原因ウイルス、ノロウイルス (NoV) はヒト小腸に発現する糖鎖抗原の一種、血液型抗原に吸着することで感染を開始することが明らかになっている。しかし、NoV が認識する糖鎖エピトープの詳細、および糖鎖が NoV 感染において果たす役割は明らかになっていない。プロトタイプ Norwalk/68 (NV/68) (GI. 1) 株では α 1, 2 フコース (Fuc) 転移酵素遺伝子活性型の分泌型個体で感染が成立し、不活性型の非分泌型個体では感染が成立しないことから、NoV と血液型抗原との結合には α 1, 2 Fuc が不可欠と言われてきた。しかしその一方で、非分泌型個体にも感染する NoV 株が存在することが知られており、 α 1, 2 Fuc を持たない Le^a にも NoV が結合し、感染が成立する可能性が示唆されている。私たちはこれまでに産総研糖鎖医工学研究センターで保有している糖鎖ライブラリーとウイルス様中空粒子 (VLP) を用いて、NoV 糖鎖結合特異性を ELISA、SPR で解析し、Le^a に結合するいくつかの遺伝子型を同定している [1]。私たちは今回、NoV の Le^a 認識機構を原子レベルで明らかにし、さらには多様な糖鎖を認識する構造基盤を解明するため、Le^a 結合能を有する FUV258 (GI. 2 遺伝子型) 株のキャプシド P ドメインと Le^a を含むいくつかの糖鎖との複合体の X 線結晶構造解析を行った。

2. 実験および結果

FUV258 株 VP1 のキャプシド P ドメインは GST 融合タンパクとして大腸菌で発現させた。プロテアーゼ消化により GST アフィニティーカラムから P ドメインを回収し、ゲルろ過で精製した。精製 P ドメインを hanging-drop 蒸気拡散法により結晶化し、さらに

浸漬法により Le^a の導入を行った。また、Le^a との比較のため、Le^b, Le^x, Le^y, A type 1, A type 2, B type 1, H type 1, H type 2, H type 3 の導入も行い、B type 1 を除いて、糖鎖との複合体の構造モデルを得ることに成功した [2]。解析の結果、B type 1 を除く全ての糖鎖は同じ糖鎖結合部位に結合していた。糖鎖の非還元末端のガラクトース骨格はどの糖鎖においてもタンパク質と同じ相互作用をしていた。一方で、Fuc の結合部位は 3 つあり、糖鎖の立体構造に合わせて結合部位を使い分けていることが分かった (図)。Fuc 結合部位を構成するアミノ酸残基は遺伝子型間で保存されておらず、NoV の糖鎖認識の多様性に関係していると考えられた。また、FUV258 株に特徴的な Le^a との結合に重要なループ構造とまたそのループを維持するために重要な塩基 (Gln389) を明らかにした [2]。次に、この残基の重要性を確認するため、Q389N 変異体を作成しその糖鎖結合特異性を ELISA で解析したところ、予想通り Le^a への親和性が低下したのに対し、予想に反して Le^b への親和性が向上していた。この現象を理解するために変異体と Le^a, Le^b 複合体との X 線結晶構造解析を行った。変異体のタンパク質部分の構造には野生型と比べほとんど変化はなく、Q389 の機能を N389 と水分子により相補出来る構造となっていた [2]。糖鎖との相互作用においては、水分子の介在により Le^b の位置が野生型と比べ約 1.2 Å ほどシフトすることが可能になっており、結果として野生型で見られた α 1, 2 Fuc 結合部位の構造的歪みを解消したより良好な相互作用を獲得していた。この結果は 1 残基の置換によって糖鎖との結合パターンが大きく変わりうることを示している。また、NoV と糖鎖との相互作用には水分子が大きな役割を果たしていることが明らかとなった [2]。



図：FUV258株Pドメイン上の糖鎖結合部位
糖鎖結合部位はPドメインダイマー（水色濃淡のリボンモデル）の境界に存在する。糖鎖構造（ボールモデル）は3asp（A型の α 2Fuc；オレンジ色）および3ass（H型の α 2Fuc；青色、Le^aの α 4Fuc；紫色、非還元末端のGal；黄色）から糖鎖構造を挿入し合成した。ウイルス表面にはGal結合部位の周りに3つのFuc結合部位があり、いろいろな糖鎖に対応できる構造を形成している。

3. 考察

NoVは宿主体内における感染標的細胞が明らかにされていない。本研究における糖鎖エピトープの詳細な解析は、糖鎖発現を指標としたNoV感染標的組織・細胞の同定、感染機序の解明に繋がるばかりでなく、糖鎖-ウイルス結合をターゲットとした創薬の開発に繋がる。

4. 謝辞

本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機能（NEDO）の委託を受けた「糖鎖機能活用技術開発プロジェクト」の一環として行われました。また、本研究はPFのスタッフの方々にサポートして頂きました。ここに感謝致します。

5. 参考文献

- [1] H. Shirato, S. Ogawa, H. Ito, T. Sato, A. Kameyama, H. Narimatsu, Z. Xiaofan, T. Miyamura, T. Wakita, K. Ishii, N. Takeda: Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *Journal of Virology*, 82, 10756-10767, 2008
- [2] T. Kubota, A. Kumagai, H. Ito, S. Furukawa, Y. Someya, N. Takeda, K. Ishii, T. Wakita, H. Narimatsu, H. Shirato: Structural basis for the recognition of Lewis antigens by genogroup I norovirus. *Journal of Virology*, 86, 11138-11150, 2012