

トリインフルエンザ H5N1 を高病原性化する Non-structural protein 1 における 変異のタンパク質分子機構

加藤 有介^{1*}、福井 清¹、鈴木 和男²

¹徳島大学先端酵素学研究所、²帝京大学アジア国際感染症制御研究所

*E-mail: ysk.kt@tokushima-u.ac.jp

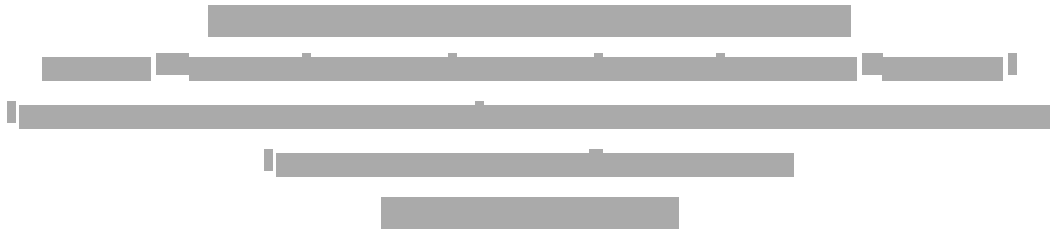
鳥インフルエンザウイルス H5N1 はヒトなどの哺乳類に対し高い致死率を示す。Non-structural protein 1 (NS1)は、H5N1 の病原性因子である。NS1 の RNA 結合ドメイン (RBD)における 42 番目の残基におけるアミノ酸置換変異は、H5N1 のマウスに対する病原性の程度を劇的に変化させる。我々は、この置換が RBD に与える影響を検討したところ、この残基が Ser の場合には RBD は二本鎖 RNA に結合し、Pro の場合にはそうではないことを見出した。Ser42 型と Pro42 型の RBD の構造モデルを構築したところ、その構造に大きな違いが見られた。一方で、ゲル濾過クロマトグラフィーと円二色性スペクトル (CD)の測定では、両者に際立った違いは見られなかった。我々の結果は、点変異による単一アミノ酸置換が、マイナーではあるが、グローバルな構造変化を導くことで、NS1 の機能に重大な影響を及ぼし、ひいては H5N1 の病原性の程度を著しく変化させるということを示唆した。

結果と議論：大腸菌による発現系を用い、Pro42 型の RBD (RBD(P))と Ser42 型の RBD (RBD(S))を発現、調製した。分析用のゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 75 10/300 column (GE Healthcare))により、これらのサンプルの溶液内での分子量を測定したところ、それぞれ 19.4 ± 0.2 および 19.4 ± 0.1 kDa という値が計測された。アミノ酸配列から計算される RBD のモノマーの分子量は、およそ 8.5 kDa であることから、RBD(P)、RBD(S)ともに、水溶液中でダイマーを形成していることが示唆された。ついで我々は CD 測定を行ったところ、両者のスペクトルはほとんど同じであった。これらのスペクトルは 208, 222 nm に谷が見られたことから、RBD がヘリックスリッチであることが示唆された。このように、ダイマーを形成し、ヘリックスリッチであるという点で、共通の構造を示す RBD(P)と RBD(S)が、機能上等価であるのかどうかを検討するために、Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)を行った。

その結果、二本鎖 RNA に対して RBD(P)が結合しなかったことに対し、RBD(S)では、結合が示された。こうした変異が、タンパク質構造におよぼす影響を、より詳細に解析するために、RBD の分子モデルをホモロジーモデリングと分子ドッキング手法により構築した。その結果、RBD(S)と RBD(P)では、 α ヘリックス間の相対的な配置が大きく異なることが示唆された。こうした違いにより、RNA 結合のためのインターフェースの構造に大きな違いが生じ、RNA 結合能に違いが見られたのではないかと考えられる。これまで、RBD の RNA 結合に重要な役割を果たす残基は、Arg35 と Arg38 であると考えられてきた。しかし、これらの残基を変異させた場合でも、H5N1 のマウスに対する病原性の程度は、さほど変化がないことが報告されている。Arg 残基は、正電荷を持つ残基であり、複数の水素結合を形成することが可能である。それに対して、Ser 残基には電荷はなく、形成出来る水素結合は 1 本だけである。したがって、なぜ、Ser の置換が、Arg の置換よりも、RBD の機能に、より大きな影響を示すのか、ということは、アミノ酸残基の性質だけを考えていても理解することは難しい。そこで我々は、今回、RBD(P)と RBD(S)の分子モデルを作成し、それらの構造を比較したところ、RNA 結合インターフェースにおいてグローバルな構造変化が生じており、その結果、Arg35, Arg38 をふくむ、さまざまな RNA 結合残基の相対的な配置に、大きな変化が見られることが示唆された。こうした構造変化は、RNA 結合能に対する変化だけでなく、NS1 と他のタンパク質の間の相互作用にも、影響を及ぼす可能性があるかも知れない。こうしたことなどにより、H5N1 の病原性に大きな違いが生じることとなった可能性が示された。我々の解析結果により、RBD のヘリックスの相対配置を変化させることで、その働きに重大な変化をもたらす可能性が示された。RBD の構造に影響に影響を与える薬剤を開発することが出来れば、その

病原性の程度を大幅に低減することが、可能になるかも知れない。

Kato YS, Fukui K, Suzuki K. Mechanism of a Mutation in Non-Structural Protein 1 Inducing High Pathogenicity of Avian Influenza Virus H5N1. *Protein Pept Lett.* 2016;23(4):372-378.



[Redacted text block]

[Redacted text block]