

論文提出者	工学府博士後期課程 生命工学 専攻 平成 21 年度入学 学籍番号 09831108 氏名 Md. Montasir Elahi 印
主指導教員氏名	黒田 裕
論文題目	Structural and thermodynamic analysis of dengue envelope protein domain III: Insights into dengue's serospecificity and molecular evolution. (デング熱ウイルス・エンベロープ糖タンパク質・第 3 ドメインに於ける抗体認識の血清型特異性及び分子進化機構の構造的・生物物理学的解析)
論文要旨 (2000 字程度)	
<p>本博士論文では、デング熱ウイルスのエンベロープ糖タンパク質・第 3 ドメイン (E3D) の結晶構造解析及び種々生物物理学的な解析を用いて、ウイルス型における分子進化機構及び抗体認識の特異性を議論した。本博士論文は、4 章からなり、第 1 章では研究の背景を述べる。</p>	
<p>蚊によって媒介されるデング熱に対して現在のところワクチンもなく、東南アジアなど広い地域で公衆衛生問題となっている。デングウイルスは、デング 1~4 の 4 つの血清型に大別される。デング熱初感染の後、他の血清型ウイルスに感染すると、交差反応によってデングショック症候群を発症することがある。その致命率は 5%程度と高い (倉根一郎、ウイルス、2001 年など)。抗体認識に直接関わるデング菌のエンベロープ糖タンパク質 (以下、E タンパク質) は 3 つのドメインから成っており、その第 3 ドメインに (以下、ED3) に抗体結合部位及び受容体結合部位が座位すると考えられている。E タンパク質の配列類似性は、70~90%と高く、全型で同じフォールドを形成すると推定される。E3D は $\beta 1$ から $\beta 9$ と命名された 9 本の β ストランドから成る Immunoglobulin-like 構造を形成する。さらに、デングウイルスの E3D には、エピトープ 1 (304-312) とエピトープ 2 (379-390) という 2 つの抗体結合部位が同定されており、それぞれ、$\beta 1$ (304-312) と $\beta 9$ (379-390) と重なる (Hung, J. J., 2004, J Virol.)。</p>	
<p>第 2 章では、X 線結晶構造解析を用いて、デング 3 型と 4 型の E3D の立体構造を決定し、血清型間に観測した構造変化から抗体認識の特異性を議論した。先行研究で決定された E3D の NMR 構造や全長 E タンパク質の結晶構造による E3D の構造では分解能が比較的低いため、E3D のフォールドははっきりと決定されているものの側鎖の詳細な議論は出来なかった。著者は、良質なデング 3 型と 4 型の E3D を得るための切断部位を同定し、それらのドメインを大腸菌で大量発現させ、立体構造をそれぞれ、1.7Å と 2.2Å の高分解能で決定した。その結果、エピトープ領域 (抗体結合部位) を含む局所的な構造変化を複数観測した。まずは、ED3 の $\beta 1$ ストランド (304-312) の中心残基の主鎖構造が 1 Å も変形しているため、$\beta 1$ が 3 残基 (307-309) にわたって破壊されていることが明らかになった。この変形は、全長 E タンパク質の構造では観測されていないため、E3D をドメイン化したことによる変形であると考えられる。$\beta 1$ とエピトープ 1 が一致するため、この局所的な変形は、</p>	

ED3 の断片化が抗体認識に影響する可能性があると考えられる。また、2 型 E3D の Pro382 が 3 型 E3D で Asp382 (382 残基目のアスパラギン酸) に置換されていることによって、C α 原子が 4.0Å も移動していることも明らかになり、Asp382 はエピトープ 2 に含まれるため、血清型間の抗体認識の特異性に寄与する可能性が高い局所的な変形である。さらに、デング 3 型の 307 番のリジン残基が 1 型では、グルタミン酸に置換されているため、エピトープ 1 周辺の分子表面における静電ポテンシャルが正から不に変化していることも、抗体認識の特異性に大きく寄与すると推定した。

第 3 章では、デング 3 型と 4 型で見られる変異の中で、Val310Met と Ile387Leu 置換に注目して、両血清型の分子進化を議論した。著者は、デング 3 型の配列の 310 番の残基をデング 4 型のメチオニンに置換したところ、その安定性が低下していた。デング 3 型 ED3 の高分解能構造に Val310Met を導入した変異体モデルを構築し、候補原子間衝突を調べたところ、Leu387 と Met310 の間に衝突が推定された。さらに、デング 3 型に Val310Met と Ile387Leu を同時置換した変異体では側鎖原子間の衝突が解消され、安定性は野生型とほぼ同じと予測された。その予測を検証するため、野生型デング 3 型 ED3 と 3 種類の変異体 (Val310Met、Val310MetIle387Leu、Val387Ile) を作製し、円偏光二色性分光を用いてそれぞれの安定性を調べた。その結果、Val310Met と Ile387Leu の安定性はそれぞれ 10°C と 5°C と大きく低下しているのに対して、Val310MetIle387Leu と野生型デング 3 型 ED3 の安定性は殆ど同じであったことから Leu387Ile が Val310Met に対して補償的変異であることが示された。さらに、デング 4 型 ED3 に、310 と 387 番目の残基を 3 型のアミノ酸に置換した変異体を作製し、それらの安定性を調べたところ、どの変異体の安定性も変化していなかった。その結果、デング 3 型が 4 型から進化するには、310 と 387 番目の残基が同時に置換する必要が強く示唆された。一方、デング 4 型から 3 型に進化した場合は、310 と 387 番目の残基は独立に置換しても、ED3 は不安定化しない。その結果、デング 4 型からデング 3 型の進化の可能性が高いと示唆される。

第 4 章では、第 2 章と第 3 章の結果を纏め、それに基づく研究の展望を述べた。本研究によって、進化の方向性を実験的な変異体解析に基づいて推定する初めて報告された。さらに、本研究では、E3D の高分解能構造を決定することで、主鎖構造 (フォールド) のみではなく、側鎖の全原子を観測することで、タンパク質の安定性及び分子間相互作用を議論することが可能になることを示したことも独創的な点であり、今後、本手法がデング以外のタンパク質へ応用されると期待される。

TITLE	Structural and thermodynamic analysis of dengue envelope protein domain III: Insights into dengue's serospecificity and molecular evolution.
NAME	Md. Montasir Elahi

ABSTRACT

Deadly dengue fever is caused by the enveloped virus dengue (DEN), which is a major health problem in South and South-East Asia causing 50-100 million human infections every year. The DEN virus is a member of the flavivirus family with four distinct serotypes (DEN1-DEN4). Symptoms of the DEN virus infection range from mild classical dengue fever to the potentially lethal dengue hemorrhagic fever, when sequential infection by multiple serotypes occurs. The dissertation consists of 4 chapters. The first chapter, introduction, is a general discussion about the dengue virus structure, structural proteins and their relationship to the virus infection and evolution. Envelope protein (E-protein) is important for initiation of dengue infection. Structurally it consists of 3 domains which are termed as ED1, ED2 and ED3. The immunoglobulin like domain, ED3, forms the distal projection from the viral surface and takes part to the interaction with host cell and represent the epitopes. Monoclonal antibodies raised against ED3 have been proved as an important blocker of the virus to the host cell surface. Structurally ED3 is an immunoglobulin like domain consist of 9 β -strands and epitope residues are mostly distributed into β -1, β -9 and their adjacent loops. As envelope protein is the major determinant of dengue virulence therefore it was subjected to phylogenetic analysis. And different studies revealed that evolutionary important residues are accumulated mostly in ED3.

Chapter 2 reports the crystal structure of DEN3 and DEN4 ED3. Four serotypes of dengue virus share 70 - 90% sequence similarity in their ED3 which is translated in their native fold. Recent crystal structure of ED3 for different serotypes has been determined in the context of whole envelope protein at low resolution. These structures and other NMR structures of isolated ED3 can explain the overall fold of the

ED3. However a high resolution x-ray crystal structure that enables the visualization of all side chain atoms, including critical residues in the epitope regions and in flexible regions on the protein surface, could in turn provide an inclusive view of the molecular determinants of the interaction between ED3 and antibodies and thereby would be important for providing molecular explanation of serospecificity. Here, we report the crystal structure of DEN3 and DEN4 ED3 at 1.70 Å and 2.27 Å respectively. We observed that a local backbone deformation in the first β -strand that contains the putative epitope 1 occurred upon domain isolation. Furthermore, a comparison with DEN2 ED3 indicated a large structural change by as much as 4.0 Å at Asp³⁸², located in epitope 2. Additionally, substitution of charged residue at 307 leads to the variation in surface electrostatic potentials in epitope 1 among the serotypes.

Chapter 3 focuses a “size switch type repacking” that occurred during the evolution of dengue envelope protein domain III (ED3). Side-chain modeling based on our crystal structures of DEN3 (PDB: 3VTT) and DEN4 ED3 (PDB: 3WE1) suggested that amino acid substitutions at 310 and 387 might be critical for the maintenance of thermal stability. Thermodynamic analysis supported the hypothesis proposed from structural modeling. In experiment we observed, a Val310Met mutation destabilizes the DEN3 ED3 by as much as 10°C and Ile387Leu by 5°C. However, simultaneous occurrence restored the stability to the level of wildtype DEN3. Further, ancestral sequence reconstruction using the serotype’s nucleotide information pointed out that the mutations at these two sites occurred in order to maintain the thermodynamic stability during the evolution of DEN. We introduced a new terminology “size switch type repacking” rather than “size switch” because, in the case of DEN ED3, the first Val310Met mutation is a small to large substitution, and the second Ile387Leu mutation where the size of the side-chain is not switched but the bulkiness and shape complementarily ensures the stability of the proteins.

In chapter 4, is a general conclusion of the present studies.