

学位（博士）論文の和文要旨

論文提出者	工学府博士後期課程 生命工学 専攻 平成 24 年度入学 学籍番号 12831105 (15891002) 氏名 Kulkarni Manjiri Ravindra 印
主指導教員氏名	黒田 裕
論文題目	Structural and biophysical study of Dengue envelope protein domain 3. (Dengue 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局所構造の変形及び抗体認識の特異性を議論した。本博士論文は 4 章から成っている。</p> <p>第 1 章では研究の背景を述べている。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、交差反応によって致命率が 5%とも言われるデングショック症候群を発症することがある (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ウイルス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されている。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。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、デング 3 型と 4 型のエピトープ領域を入れ替えた E3D 変異体を 6 種類作製し、交差反応を、それぞれの変異体の免疫応答実験と ED3 の立体構造を基に議論した。DEN3 と DEN4、エピトープ 1 及び 2 を互いに置換した計 8 種類 (野生型 2 種類を含む) の変異体に対して免疫応答実験を行った。その結果、DEN3 型 E3D 及び DEN4 型 E3D に対して血清型特異的な免疫応答を観測した。さらに、DEN3 型ではエピトープ 2 が、DEN4 型ではエピトープ 1 が免疫応答の特異性に大きく寄与すると推定された。最後に、著者は、DEN4 型の E3D のエピトープ 2 を DEN3 型の配列に置換した DEN4_E2^{DEN3} 変異体を大腸菌で大量発現させ、立体構造を 2.7Å の分解能で決定した。さらにエピトープ領域を置換した残りの 5 種類の変異体の構造を分子モデリングし、血清との相互作用を議論した。</p> <p>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、両血清型の構造安定機構を議論した。先行研究で、デング 3 型の配列の 310 番の</p>

残基をデング 4 型のメチオニンに置換したところ、その安定性が大きく低下していることを解明した。さらに、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から、Leu387 と Met310 間衝突し、熱安定性を低下させていると推定されている。一方、デング 4 型では、L387 を Ile に置換して側鎖原子間に衝突は発生しなく、野生型とほぼ同じ安定性を維持すると側鎖の分子モデリングによって予測された。さらに申請者は、野生型デング 4 型 ED3 に Leu387Ile を導入した DEN4_ED3_L387I 変異体を作製し、円偏光二色性分光を用いて安定性が低下していないことを検証した。また、DEN4_ED3_L387I 変異体の X 線結晶構造を決定したところ、分子モデリングで予測した側鎖構造（ロターマー）が X 線結晶構造と 0.3Å の精度で一致していた。一方、主鎖構造が置換残基の周辺で変形していることは原子間衝突のみを指標に用いたモデリングでは予測できなかった。

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、エピトープ領域を置換することで ED3 の構造および免疫応答への影響を実験的な変異体解析を初めて報告された。さらに、本研究では、DEN4_ED3_L387I の高分解能構造を決定することで、主鎖構造（フォールド）の居所的な構造変形が観測され、側鎖の全原子を観測することで、タンパク質の安定性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 biophysical studies of dengue envelope protein domain 3
NAME	Manjiri R. Kulkarni
<p>ABSTRACT</p> <p>Dengue is the most common mosquito-borne viral disease of humans, with over 50 million cases in tropical and subtropical regions annually. The causal agent of this disease, dengue virus, is a single stranded, positive-sense, RNA virus with a genome of approximately 11 kb. Dengue virus, a member of the genus <i>Flavivirus</i> (family <i>Flaviviridae</i>) is classified into four distinct serotypes (denoted DEN1-4), with 70% sequence similarity. Humans are the major host of dengue virus which is transmitted by <i>Aedes aegypti</i> mosquitoes. DEN infection causes diseases such as mild dengue fever (DF) and life threatening dengue hemorrhagic fever (DHF), dengue shock syndrome (DSS), when sequential infection by multiple serotypes occurs. There is neither approved vaccine nor specific therapy to fight these infections. Few residues that differ from one serotype to the other are responsible for the Sero-specificity. Thus, further elucidation of these residues is very important.</p> <p>This study mainly focuses on the structural and immunological insights into sero-specificity of the envelope domain (ED) 3; namely, DEN3 ED3 and DEN4 ED3. 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. Envelope protein (E-protein) is important for initiation of dengue infection.</p>	

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 represents 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 and consist of 9 β -strands and epitope residues are mostly distributed onto β -1, β -9 and their adjacent loops. Envelope protein being a major determinant of dengue virulence, it was subjected to immunological analysis.

Chapter 2 reports the structural and immunological analysis of surface-exposed epitope residues of ED3 from two distant (in evolutionary sense and structural observations) serotypes, DEN3 and DEN4. We designed six epitope grafted ED3 variants in which the surface-exposed epitope residues from DEN3 ED3 were switched to those of DEN4 ED3 and *vice versa*. We examine the sero-specificity and cross reactivity of the immune response against DEN3 and DEN4 ED3. We prepared anti-DEN3 and anti-DEN4 ED3 serum by immunizing Swiss Albino mice and measured their reactivities against all six grafted mutants. Further elucidation of this study was done using x-ray crystal structure of one of the grafted mutant of DEN4 ED3. This study enables us to determine the importance of E1 and E2 residues in DEN3 and DEN4 serotype.

In Chapter 3, we examine effect of single mutation in core of DEN4 ED3 on its structure and stability. We focused on how a putative Leu387Ile (L387I) mutation could fit with a Met at position 310 in DEN4 ED3 but could not fit in DEN3 ED3 without destabilizing its structure. Primarily, we examined steric clashes occurred at Ile³⁸⁷, through extensive side-chain modeling using 273 side-chain rotamers of the residues surrounding Ile³⁸⁷ using wtDEN4 ED3 as a template. Next, we determined crystal structure of DEN4_L387I at 2 Å. To this end, in modeling of DEN4_L387I using the

Richardson Penultimate Rotamer library, we found that 3 out of 7 Ile conformations fit at residue 387 in DEN4 ED3 without experiencing the atomic clashes that were observed when DEN3 ED3 is used as template. In fact, in crystal structure of DEN4_L387I, Ile³⁸⁷ adopted one of the three predicted rotamers which confirmed our modeling and gave insights into side-chain repacking occurring around Ile³⁸⁷, which overcome steric clashes thereon conserved thermal stability of DEN4 ED3. CD analysis indicated that the thermal stability of DEN4_L387I was essentially similar to that of the wtDEN4 ED3 indicating that L387I did not introduce local strain in DEN4 ED3. This study demonstrates that the effects of single mutations are to a large extent successfully predicted by systematically modeling the side-chain structures of the mutated as well as those of its surrounding residues using fixed main-chain structures and assessing inter-atomic steric clashes. More accurate and reliable predictions require considering sub-angstrom main-chain deformation, which remains a challenging task.