

氏名（本籍）	Mohini Yadav（インド）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 251 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Theoretical study on the molecular mechanism of drug resistance in influenza A viruses
論文審査委員	(主査) 教授 河合 剛太 (副査) 教授 坂本 泰一 教授 松澤 秀則 教授 寺本 直純 准教授 山本 典史

学位論文の要旨

Theoretical study on the molecular mechanism of drug resistance in influenza A viruses

インフルエンザは、インフルエンザウイルスを病原体とするウイルス性呼吸器感染症である。インフルエンザウイルスの表面にはノイラミニダーゼ (neuraminidase; NA) という糖タンパク質が存在し、ウイルスの増殖・伝播で重要な役割を果たす。このため、NA の酵素反応を阻害する抗インフルエンザウイルス治療薬の開発が行われてきた。現在、日本国内では 4 種類の NA 阻害剤 (オセルタミビル (oseltamivir; OTV), ザナミビル, ペラミビル, ラニナミビル) がインフルエンザの治療に用いられている。一方で、近年、NA 阻害剤に耐性を持つインフルエンザウイルス変異株の出現が頻繁に報告されている。2008/09 年のインフルエンザ流行シーズンには、OTV に顕著な耐性を持つソ連型 A/H1N1 インフルエンザウイルスが世界的に流行し、社会問題となっている。インフルエンザウイルスの薬剤耐性化については、これまで、さまざまな先行研究が報告されているが、その詳細な分子機構は未だ明らかになっていない。

本研究では、OTV に対する感受性が天然型に比べて低いことが知られている A 型インフルエンザウイルスの 2 つの変異株を対象として、薬剤耐性機構の解明に取り組んだ。具体的には、インフルエンザウイルス NA の 274 番目に位置するアミノ酸残基がヒスチジン (His) からチロシン (Tyr) に置換した H274Y 変異株、および、NA の 117 番目に位置するアミノ酸残基がイソロシニン (Ile) からバリン (Val) に置換した I117V 変異株に注目し、これらの変異株の NA が天然型に

比べて OTV に対して結合親和性が低下するに分子機構について、分子シミュレーションに基づく理論的解析をおこなった。H274Y 変異株の研究では、タンパク質内のアミノ酸残基同士で形成する動的な相互作用ネットワークの特徴を定量的に明らかにするための新しい手法として、動的残基間相互作用ネットワーク (dynamic residue interaction network; dRIN) 法を開発し、分子動力学 (molecular dynamics; MD) シミュレーションと組み合わせた解析に取り組んだ。dRIN 解析の結果、NA の OTV 結合部位と H274Y 変異部位は、両者を媒介する 3 つのインターフェース残基を介して間接的に相互作用しており、変異にともなうアミノ酸残基間相互作用の連鎖的な変化が、NA の OTV に対する結合親和性を低下させ、結果としてインフルエンザウイルスの薬剤耐性化をもたらすことが明らかになった。I117V 変異株の研究では、MD シミュレーションに基づいて、変異に伴う NA の特徴的な構造変化の解析に取り組んだ。解析の結果、NA の変異部位近傍では二次構造が変化しており、この構造変化に伴う影響がアミノ酸残基間相互作用の連鎖的な変化を経て OTV と相互作用するアミノ酸残基に及ぶことで、NA の OTV に対する結合親和性が低下することが明らかになった。

本学位論文は全 5 章で構成され、各章の概要は次の通りである。

第 1 章では、インフルエンザウイルスの薬剤耐性について、学術的背景、先行研究における課題、および、本研究の位置付けについて述べた。

第 2 章では、本研究で新たに開発した dRIN 解析法について説明した。従来、タンパク質内でアミノ酸残基の側鎖が形成する様々な相互作用 (水素結合, 静電相互作用, van der Waals 相互作用など) を解析するため、いくつかの手法が開発されてきた。しかし従来の手法は、専ら、X線結晶構造解析や NMR などを実験的に決定された 1 つの立体構造に対して適用するものであり、タンパク質内の相互作用に関する「静的」な側面しか捉えることができないものであった。本研究では、MD シミュレーションで得られる多数の構造状態に適用し、タンパク質内のアミノ酸残基同士で形成するさまざまな相互作用のネットワーク構造の「動的」な側面を定量的に明らかにすることができる新しい手法として、dRIN を開発した。

第 3 章では、H274Y 変異株を対象とする解析について説明した。本研究で新たに開発した dRIN 解析法を用いて、アミノ酸の変異に伴うタンパク質内相互作用ネットワークの特徴的な変化を捉えた。その結果、従来とは全く異なる視点から、インフルエンザウイルスが薬剤耐性を獲得する分子メカニズムを明らかにすることに成功した。具体的には、H274Y 変異株の場合、NA のオセルタミビル結合部位と H274Y 変異部位は、両者を媒介する 3 つのインターフェース残基を介して間接的に相互作用することが dRIN 解析から明らかになった。H274Y 変異は、NA の 274 番目のアミノ酸残基と 3 つのインターフェース残基との間の相互作用を大きく安定化させることで、オセルタミビルとその周囲のアミノ酸残基との間の相互作用を不安定化させていた。したがって、変異にともなうアミノ酸残基間相互作用の連鎖的な変化が、NA のオセルタミビルに対する結合親和性を低下させ、結果としてインフルエンザウイルスの薬剤耐性化をもたらすことが明らかになった。

第 4 章では、I117V 変異株を対象とする解析について説明した。MD シミュレーションを用いて、I117V 変異株 NA-OTV 複合体の構造状態を解析した結果、NA の変異部位近傍では Ile/Val 変異に

伴って、隣接する 118 番目のアミノ酸残基 (Arg118) が β シート構造を形成する傾向が顕著に低下することが明らかになった。天然構造の NA-OTV 複合体の場合、 β シート領域に位置する Arg118 の正電荷を帯びた側鎖が、OTV 結合部位のアミノ酸残基である Glu119 の負電荷を帯びた側鎖と頻繁に相互作用していた。この Arg118-Glu119 間の相互作用により、同じく OTV 結合部位位置する負電荷を持つ残基である Asp151 と Glu119 に対する静電的反発を抑えることで、Glu119 と Asp151 の両方が同時に OTV と水素結合を形成する頻度が高くなり、NA の OTV に対する結合親和性に大きく寄与していることが明らかになった。一方、I117V 変異後は、Arg118 部位の二次構造変化に伴って、Arg118 が Glu119 と相互作用する頻度が低下していた。その結果、Glu119-Asp151 間の静電的な反発が天然構造に比べて大きくなり、Glu119 と Asp151 の両方が同時に OTV と水素結合を形成することが困難になったため、OTV に対する NA の結合親和性が低下することが明らかになった。

第 5 章では、本研究を総括し、将来的な展望などについて述べた。

審査結果の要旨

インフルエンザは、インフルエンザウイルスを病原体とするウイルス性呼吸器感染症である。インフルエンザウイルスの表面にはノイラミニダーゼ (neuraminidase; NA) という糖タンパク質が存在し、ウイルスの増殖・伝播で重要な役割を果たす。このため、NA の酵素反応を阻害する抗インフルエンザウイルス治療薬の開発が行われてきた。現在、日本国内では 4 種類の NA 阻害剤 (オセルタミビル (oseltamivir; OTV) , ザナミビル, ペラミビル, ラニナミビル) がインフルエンザの治療に用いられている。一方で、近年、NA 阻害剤に耐性を持つインフルエンザウイルス変異株の出現が頻繁に報告されている。インフルエンザウイルスの薬剤耐性化については、これまで、さまざまな先行研究が報告されているが、その詳細な分子機構は未だ明らかになっていない。

本研究では、OTV に対する感受性が天然型に比べて低いことが知られている A 型インフルエンザウイルスの 2 つの変異株を対象として、薬剤耐性機構の解明に取り組んでいる。具体的には、インフルエンザウイルス NA の 274 番目に位置するアミノ酸残基がヒスチジン (His) からチロシン (Tyr) に置換した H274Y 変異株、および、NA の 117 番目に位置するアミノ酸残基がイソロシニン (Ile) からバリン (Val) に置換した I117V 変異株に注目し、これらの変異株の NA が天然型に比べて OTV に対して結合親和性が低下するに分子機構について、分子シミュレーションに基づく理論的解析をおこなっている。H274Y 変異株の研究では、タンパク質内のアミノ酸残基同士で形成する動的な相互作用ネットワークの特徴を定量的に明らかにするための新しい手法として、動的残基間相互作用ネットワーク (dynamic residue interaction network; dRIN) 法を開発し、分子動力学 (molecular dynamics; MD) シミュレーションと組み合わせた解析に取り組んでいる。dRIN 解析の結果、NA の OTV 結合部位と H274Y 変異部位は、両者を媒介する 3

つのインターフェース残基を介して間接的に相互作用しており、変異にともなうアミノ酸残基間相互作用の連鎖的な変化が、NA の OTV に対する結合親和性を低下させ、結果としてインフルエンザウイルスの薬剤耐性化をもたらすことを明らかにしている。I117V 変異株の研究では、MD シミュレーションに基づいて、変異に伴う NA の特徴的な構造変化の解析に取り組んでいる。解析の結果、NA の変異部位近傍では二次構造が変化しており、この構造変化に伴う影響がアミノ酸残基間相互作用の連鎖的な変化を経て OTV と相互作用するアミノ酸残基に及ぶことで、NA の OTV に対する結合親和性が低下することが明らかにしている。

本学位論文は全5章で構成され、各章の概要は次の通りである。

第1章では、インフルエンザウイルスの薬剤耐性について、学術的背景、先行研究における課題、および、本研究の位置付けについて述べている。

第2章では、本研究で新たに開発した dRIN 解析法を説明している。タンパク質内でアミノ酸残基の側鎖が形成する相互作用を解析するため、いくつかの手法が開発されてきた。しかし従来の手法は、専ら、X線結晶構造解析や NMR で実験的に決定された1つの立体構造に対して適用するものであり、タンパク質内の相互作用に関する「静的」側面しか捉えることができないものであった。本研究では、MD シミュレーションで得られる多数の構造状態に適用し、タンパク質内のアミノ酸残基同士で形成する相互作用のネットワーク構造の「動的」側面を定量的に明らかにすることができる新しい手法として、dRIN を開発している。

第3章では、H274Y 変異株を対象とする解析について説明している。本研究で開発した dRIN 解析法を用いて、アミノ酸の変異に伴うタンパク質内相互作用ネットワークの特徴的な変化を捉えている。その結果、従来とは全く異なる視点から、インフルエンザウイルスが薬剤耐性を獲得する分子メカニズムを明らかにすることに成功している。具体的には、H274Y 変異株の場合、NA のオセルタミビル結合部位と H274Y 変異部位は、両者を媒介する3つのインターフェース残基を介して間接的に相互作用することが dRIN 解析から明らかになった。H274Y 変異は、NA の 274 番目のアミノ酸残基と3つのインターフェース残基との間の相互作用を大きく安定化させることで、オセルタミビルとその周囲のアミノ酸残基との間の相互作用を不安定化させることが明らかになっている。

第4章では、I117V 変異株を対象とする解析について説明している。MD シミュレーションを用いて、I117V 変異株 NA-OTV 複合体の構造状態を解析した結果、NA の変異部位近傍では Ile/Val 変異に伴って、隣接する 118 番目のアミノ酸残基 (Arg118) が β シート構造を形成する傾向が顕著に低下することが明らかになっている。天然構造の NA-OTV 複合体の場合、Arg118 の正電荷を帯びた側鎖が、OTV 結合部位の Glu119 の負電荷を帯びた側鎖と頻りに相互作用していた。この Arg118-Glu119 間の相互作用により、負電荷を持つ残基である Asp151 と Glu119 に対する静電的反発を抑えることで、Glu119 と Asp151 の両方が同時に OTV と水素結合を形成する頻度が高くなり、NA の OTV に対する結合親和性に大きく寄与していることが明らかになった。一方、I117V 変異後は、Arg118 部位の二次構造変化に伴って、Arg118 が Glu119 と相互作用する頻度が低下していた。その結果、Glu119-Asp151 間の静電的な反発が天然構造に比べて大きくなり、

Glu119 と Asp151 の両方が同時に OTV と水素結合を形成することが困難になったため、OTV に対する NA の結合親和性が低下することが明らかになっている。

第5章では、本研究を総括し、将来的な展望などについて述べている。

本論文は、OTV に対する感受性が天然型に比べて低いことが知られている A 型インフルエンザウイルスの 2 つの変異株を対象として、分子シミュレーション、そして、本研究で新しく開発した dRIN 解析を用いて、ウイルスが薬剤耐性を獲得する分子機構を明らかにしている。本研究で得られた知見は、薬剤耐性を獲得したインフルエンザウイルスに対する効果的な治療薬の開発などに対して、大きく貢献することが期待できる。以上のことから、学位申請者である Mohini Yadav は、博士（工学）の学位を得る資格があると認める。