



Title	Crystal structure of the catalytic domain of Japanese encephalitis virus NS3 helicase/nucleoside triphosphatase at a resolution of 1.8 Å
Author(s)	山下, 哲生
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48868">https://hdl.handle.net/11094/48868</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	山下哲生
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第21832号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Crystal structure of the catalytic domain of Japanese encephalitis virus NS3 helicase/nucleoside triphosphatase at a resolution of 1.8 Å (日本脳炎ウイルスのRNAヘリカーゼドメインのX線結晶構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 松浦 善治 (副査) 教授 生田 和良 教授 塩田 達雄

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

フラビウイルスのNS3蛋白質はヘリカーゼ活性を有し、そのC末端領域に典型的なRNAヘリカーゼモチーフが存在する。NS3蛋白質のヘリカーゼ活性はゲノム複製に関与することが示唆されているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。本研究では、日本脳炎ウイルス(JEV)のNS3蛋白質のヘリカーゼ領域の結晶構造を決定し、構造生物学的な側面からJEVヘリカーゼの活性発現を解析した。

## 〔方法ならびに成績〕

JEVNS3蛋白質のヘリカーゼ領域(190-618アミノ酸残基)を大腸菌で発現し、ゲルfiltrationおよび陰イオン交換カラムを用いて精製した。精製蛋白質をハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶化し、大型放射光施設Spring-8で得られたデータから、JEVヘリカーゼの結晶構造を決定した。また、構造解析から推測された活性中心に変異を導入し、変異体のATPaseとヘリカーゼ活性を測定して、構造活性相関を検討した。

## 〔総括〕

分解能1.8ÅでJEVNS3蛋白質のヘリカーゼ領域の結晶構造を決定した。デングウイルス(DEN)、黄熱ウイルス(YFV)、およびC型肝炎ウイルス(HCV)のヘリカーゼの構造と比較したところ、同じフラビウイルス属のDENとYFVのヘリカーゼ領域の構造は非常に類似していたが、HCVとはATPaseの活性中心を構成するMotif I(Walker A Motif)とMotif II(Walker B Motif)に相違が認められた。いずれのヘリカーゼとも、ATPaseの活性中心は、Motif I、II、およびVIによってポケットを形成しており、多くの極性アミノ酸の側鎖が内側に向かって伸びていた。これらの極性アミノ酸の活性発現における役割を明らかにするため、JEVヘリカーゼの極性アミノ酸をアラニンに置換した変異体を作製した。その結果、すべての変異体でATPase活性とRNAヘリカーゼ活性の著しい減弱が認められ、これらの極性アミノ酸がヘリカーゼ活性の発現に重要であることが明らかとなった。特にMotif Iの200位のリジンは、他の極性アミノ酸へ置換しても活性が完全に消失することから、適度な電荷と極性が活性発現に重要であることが示された。さらに、Motif VIに関してもアラニンスキャニングを行ない、ATPase活性とhelicase活性への詳細な役割を調べた。その結果、活性中心に向いているアミノ酸Q457、R461、R464と活性中心とは反対側に向いて

いるアミノ酸 R458 に変異を入れることでの著しい活性の減弱がみられた。この結果より、活性中心に向いている R457、R461、R464 の極性残基は基質である ATP と相互作用し、ATPase と helicase 活性の直接的な寄与がわかつた。そして、活性中心とは反対に向いている R458 はモチーフの構造が保つことに機能し、変異を入れることでこのモチーフが崩れること基質結合のが低下し酵素活性も低下すると考えることが出来た。

#### 論文審査の結果の要旨

日本脳炎ウイルス (JEV) はヒトに感染すると、頭痛、発熱、そして意識障害などを発症し、回復してもその半数に精神障害や神経障害などの後遺症を残す。この様に JEV は重篤なヒト病原性ウイルスであるにも関わらず、その詳細な複製機構は明らかにされていない。本研究では JEV のゲノム複製に必須な NS3 蛋白質のヘリケース領域の結晶構造を決定し、構造生物学的な側面から JEV ヘリケースの活性発現様式を解析した。大腸菌で発現し、精製した JEV のヘリケース領域の結晶構造を、分解能 1.8Å で決定した。デングウイルス (DEN) 、黄熱ウイルス (YFV) 、および C 型肝炎ウイルス (HCV) のヘリケースの構造と比較したところ、同じフラビウイルス属の DEN と YFV のヘリケース構造は非常によく保存されていたが、HCV とは ATPase の活性中心を構成する Motif I と Motif II に相違が認められた。いずれのヘリケースとも、ATPase の活性中心は、Motif I、II、および VI によってポケットを形成しており、多くの極性アミノ酸の側鎖が内側に向かって伸びていた。これらの極性アミノ酸の活性発現における役割を明らかにするため、JEV ヘリケースの極性アミノ酸をアラニンに置換した変異体を作製した。その結果、すべての変異体で ATPase 活性と RNA ヘリケース活性の著しい減弱が認められ、これらの極性アミノ酸がヘリケース活性の発現に重要であることが明らかとなった。特に Motif I の 200 位のリジンは、他の極性アミノ酸へ置換しても活性が完全に消失することから、適度な電荷と極性が活性発現に重要であることが示された。本研究により、構造生物学的な観点から、世界で猛威をふるっているフラビウイルス感染症に対する抗ウイルス剤の開発に有用な情報を提示することができた。以上のことから、申請者の研究は医学領域において価値ある研究であり、本医学系研究科からの学位の授与に相当すると考えられる。