

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「異分野融合による新型コロナウイルスを
はじめとした感染症との共生に資する技術基盤の
創生」
研究課題「Antibody-Based Molecular Design に基
づくウイルスの機能制御技術およびセンシング技術
の開発」

研究終了報告書

研究期間 2021年02月～2024年03月

研究代表者: 津本 浩平
(東京大学 大学院工学系研究科 教
授)

§1 研究実施の概要

(1)実施概要

- 中和抗体の単ドメイン化による低分子化を行い、抗原蛋白質に対する結合親和性を確認した。また、単ドメイン化を可能にする界面活性剤を見出した。さらに、従来から報告されている VHH 抗体由来の変異では、溶解性は向上するものの、構造的には不安定になることを明らかにした。
- 中和抗体の CDR 切り出しによる低分子化を行い、環状化することで抗原蛋白質に対する弱い結合親和性を確認した。主鎖間のアミド結合よりも側鎖間のジスルフィド結合の方が、結合親和性が強いことを見出した。
- 本研究に必要な SARS-CoV-2 の主要蛋白質である、S 蛋白質、3CL-Mpro 蛋白質等の発現・精製系を確立した。こうした系を活用して、様々な研究機関と共同研究を実施した。
- Cryo 電子顕微鏡構造解析と X 線結晶構造解析により、さまざまな VOC の S 蛋白質の構造決定、および、さまざまな VOC に対応できることが知られている中和抗体の立体構造決定を行った。その結果、BA.5、BA.2.75、BQ.1.1、XBB.1、XBB.1.5 による中和抗体逃避と ACE2 受容体認識のバランス変化を明らかにした。
- SARS-CoV-2 N 蛋白質の動態を精査するために、gRNA に由来するいくつかの RNA 断片やポリアデニル酸などの RNA 試料と、N 蛋白質との間の相互作用を解析した。
- 計算機シミュレーションを用いた解析により、プロテアーゼおよび S 蛋白質 RBD に対する変異の影響を定量的に評価した。また、SARS-CoV RBD のダイナミクスと比較することで、CoV および CoV-2 に対して交差反応性を示す中和抗体設計のための指針を得た。抗体の単変異により特異性・親和性の変換・改変が可能であることを示し、その分子機構を記述した。
- SARS-CoV-2 プロテアーゼ蛋白質をウサギに対して免疫し、免疫ファージライブラリにより、ヒットクローンを得た。得られた 9 クローンをリコンビナントの Fab 抗体として発現精製し、8 クローンで Mpro との結合が確認された。興味深いことに、各クローンにより各種溶液条件における相互作用の性質が異なった。
- SARS-CoV-2 プロテアーゼ蛋白質に結合する単ドメイン抗体を人工合成ライブラリから取得した。この抗体は、結合により SARS-CoV-2 プロテアーゼ蛋白質の二量体化を阻害し、プロテアーゼ活性を阻害した。
- SARS-CoV-2 プロテアーゼに対する低分子化合物のスクリーニングを実施し、ヒット化合物を得た。

(2)顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 中和抗体の単ドメイン化の物性/機能関連の解明

概要: SARS-CoV-2 RBD を標的とするヒト由来の中和抗体の単ドメイン化を実施した。界面活性剤の添加による物性改良を通じて、VH ドメイン単独での精製、RBD への結合能検出が可能になった。VH ドメイン単独での分子動力学計算を実施することで、ヒト由来の抗体でも、自然界の単ドメイン抗体と類似した立体構造を取る可能性が強く示唆された。

2. 中和抗体のペプチド化の環状化方法/機能関連の解明

概要: SARS-CoV-2 RBD を標的とするヒト由来の中和抗体の CDR 切り出しによるペプチド化を実施した。環状化することで、CDR-H3 単独での RBD への結合能も検出できた。環状化方法により結合活性の回復の仕方にばらつきがあることを見出した。分子動力学計算を実施することで、2 次構造を形成しやすいペプチドが、より結合活性が向上しやすいことを見出した。ペプチド化における特異性・親和性創出・向上について、構

造アンサンブルの詳述が重要であることを指摘した。

3. SARS-CoV-2 変異株による受容体認識・中和抗体逃避、及び、SARS-CoV-2 変異株に対する広域中和抗体の構造基盤解明

概要: SARS-CoV-2 は、「懸念される変異株 (VOC)」に代表されるように変異を繰り返して、複数の流行の波を形成している。そのため、パンデミックの初期に作製された中和抗体の多くが、現在の変異株に対して中和能を失う問題が発生している。ウイルスの進化を原子レベルで理解するため、2022 年夏に本邦で世界最多の感染者数が報告された変異株であるオミクロン BA.5 及びそれ以降の複数の変異株 (BA.2.75, BQ.1.1, XBB.1, XBB.1.5) による中和抗体逃避と ACE2 受容体認識のバランス変化について、SARS-CoV-2 の進化の構造基盤を解明した。また、複数の変異株を中和できる抗体の詳細な作用機序を構造解析により明らかにし、抗体デザイン技術により、その広域性を拡大させることにも成功した。

4. 一分子蛍光分光法による S タンパク質の構造変化の検出方法の確立

概要: トランスグルタミナーゼを用いた反応による SARS-CoV2 の S タンパク質の部位選択的色素ラベル化を可能とした。構造を検出することを可能とする蛍光色素のラベル化を実施した。その結果、S タンパク質の RBD のアップ型、ダウン型を検出することが可能になり、ACE2 受容体が結合した場合、あるいは、抗体を結合した場合にアップ型になることなどを確かめた。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 中和抗体の低分子量化

概要: 抗体の低分子量化の意義は、抗体に基づく治療薬や診断薬の性能と実用性を向上させることにある。低分子量化することで、医薬品の製造・開発面における効率化だけでなく、標的組織や腫瘍内への高い浸透性が期待できる。従って、抗体の低分子量化技術は感染症に留まらず、広く応用可能な技術である。これらの意義を持つ一方で、低分子量化された抗体は、結合特異性や安定性などの面での課題を持つことが報告されている。そのため、各応用において、適切な抗体の形態や設計を選択することが重要となっている。本研究では SARS-CoV-2 を題材とし、さまざまな中和抗体の低分子量化を試みることで、単ドメイン化のために必要な実験条件や抗体の物性-配列-構造相関に関する新たな知見を得ることができた。また CDR 切り出しによるペプチド化においても、環状化方法を変更することで、低分子量化「抗体」の機能が異なることを見出した。いずれの低分子量化の過程でも計算科学の技術を駆使することで、低分子量化時の「抗体」の構造変化を可視化できること、ペプチドの構造アンサンブル記述の重要性を示した。

2. SARS-CoV-2 変異株のワクチン抗原の構造情報の公開

概要: オミクロン BA.5、及び、それ以降の複数の変異株 (BA.2.75, BQ.1.1, XBB.1, XBB.1.5) のワクチン抗原として利用される S 蛋白質単独、及び、ACE2 受容体との複合体構造について世界最速レベルで構造決定を行い、論文として報告するとともに、世界中で誰でもワクチン開発のために構造情報を無償で利用できるように、Protein Data Bank に登録し、公開した。

3. N タンパク質による gRNA のフォールディング仮説の提案

概要: gRNA は N タンパク質と結合すると 800 塩基程度の単位がコンパクトに収縮し顆粒状の構造を作ると考えられている。長鎖 RNA を試験管内合成し蛍光色素をラベル化することで、蛍光相関分光法や一分子蛍光分光法を用いて、N タンパク質との結合により構造転移する過程の観察を可能にした。その結果、gRNA は塩基配列に応じてコンパクトな構造を形成すると考える gRNA のフォールディング仮説を提案した。

<代表的な論文>

1. Matsunaga R, Tsumoto K. Addition of arginine hydrochloride and proline to the culture medium enhances recombinant protein expression in *Brevibacillus choshinensis*: The case of RBD of SARS-CoV-2 spike protein and its antibody, *Protein Expr Purif*, 2022 doi: 10.1016/j.pep.2022.106075

概要: SARS-CoV-2 RBD および中和抗体のブレヴィバチルスを用いた新規発現系について報告した。

2. Kimura I, Yamasoba D, Tamura T, Nao N, Suzuki T, Oda Y, Mitoma S, Ito J, Nasser H, Zahradnik J, Uriu K, Fujita S, Kosugi Y, Wang L, Tsuda M, Kishimoto M, Ito H, Suzuki R, Shimizu R, M.S.T. Begum M, Yoshimatsu K, Kimura KT, Sasaki J, Tabata KS, Yamamoto Y, Nagamoto Y, Kanamune J, Kobiyama K, Asakura H, Nagashima M, Sadamasu K, Yoshimura K, Shirakawa K, Kondo AT, Kuramochi J, Schreiber G, Ishii KJ, ***Hashiguchi T**, *Ikeda T, *Saito A, *Fukuhara T, *Tanaka S, *Matsuno K, *Sato K. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 subvariants including BA.4 and BA.5. *Cell*. 2022. doi: 10.1016/j.cell.2022.09.018

概要: 2022 年夏に本邦で世界最多の感染者数が報告された変異株であるオミクロン BA.5 について、親株である BA.2 との比較した中和抗体逃避と ACE2 受容体認識のバランス変化の構造基盤を解明した (SARS-CoV-2 変異株の進化を原子レベルで可視化した)。

3. Saito A, Tamura T, Zahradnik J, Deguchi S, Tabata K, Anraku Y, Kimura I, Ito J, Yamasoba D, Nasser H, Toyoda M, Nagata K, Uriu K, Kosugi Y, Fujita S, Shofa M, Monira Begum M, Shimizu R, Oda Y, Suzuki R, Ito H, Nao N, Wang L, Tsuda M, Yoshimatsu K, Kuramochi J, Kita S, Sasaki-Tabata K, **Fukuhara H**, Maenaka K, Yamamoto Y, Nagamoto T, Asakura H, Nagashima M, Sadamasu K, Yoshimura K, Ueno T, Schreiber G, Takaori-Kondo A; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium, Shirakawa K, Sawa H, Irie T, **Hashiguchi T**, Takayama K, Matsuno K, *Tanaka S, *Ikeda T, *Fukuhara T, *Sato K. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75 variant. *Cell Host Microbe*. 2022 Nov 9;30(11):1540-1555.e15. doi: 10.1016/j.chom.2022.10.003.

概要: オミクロン BA.2.75 以前の変異株では、ACE2 受容体上の N90 結合型糖鎖が受容体結合の阻害要因 (宿主側からみると物理的な感染防御) であったが、オミクロン BA.2.75 でウイルスが獲得した S 蛋白質 N460K の変異は、ACE2 受容体上の N90 結合型糖鎖との結合性を上げる作用がある (宿主の物理的感染防御因子を乗り越えるためにウイルスが進化した) ことを構造と変異体実験から解明した。また同時に N460K 変異は中和抗体逃避能を高める効果があることも明らかにした。BA.2.75 以降の変異株ではこの変異が必ず引き継がれており、ACE2 受容体結合能を高めつつ、中和抗体逃避能も付与する N460K の重要性を世界で初めて明らかにした。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

津本グループ

① 研究代表者: 津本 浩平 (東京大学 大学院工学系研究科 教授)

② 研究項目

- 動物免疫による抗体取得、変異導入等による改変・改良抗体取得
- 抗体の物性機能解析 (溶液論的解析、分子動力学的解析を含む)
- 抗体の低分子量化とそのための基盤構築

高橋グループ

- ① 主たる共同研究者：高橋 聡 （東北大学多元物質科学研究所 教授）
- ② 研究項目
- 一分子蛍光分光法を使った N タンパク質および S タンパク質の特性と抗体結合の影響解析
 - 一分子蛍光分光法を使った N タンパク質の特性解析
 - 一分子蛍光イメージングを使った N タンパク質の特性解析

福原グループ

- ① 主たる共同研究者：福原 秀雄 （北海道大学 大学院薬学研究科 准教授）
- ② 研究項目
- 環状ペプチドの合成
 - 中和抗体の立体構造解析

橋口グループ

- ① 主たる共同研究者：橋口 隆生 （京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 教授）
- ② 研究項目
- 抗原蛋白質の調製
 - 抗原蛋白質および中和抗体の立体構造解析

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

・領域内連携

相手方チーム・グループ	連携内容
永井チーム中島グループ	橋口 G が、結晶化用の精製 SARS-CoV-2 RBD 蛋白質およびクライオ電子顕微鏡構造解析用の SARS-CoV-2 S trimer の提供を行っており、相手方チームが作製した S 蛋白質認識ペプチドの結合部位決定のための構造解析の研究協力を行った。
永井チーム藤原グループ	橋口 G が、相手方チームが作製した SARS-CoV-2 RBD 結合ペプチドによる SARS-CoV-2 変異体 S 蛋白質への結合性を評価するため、最新の変異体 S 蛋白質の提供を行い、結合性評価の研究協力を行った。
川上チーム佐藤グループ	橋口 G と福原 G が共同で、世界的感染拡大が懸念される SARS-CoV-2 変異株の S 蛋白質の構造解析を行うことで、中和抗体逃避や ACE2 受容体結合能増減の構造基盤を明らかにする共同研究を複数実施した。

・領域外連携

連携先（研究者・企業名）	連携内容
国立感染症研究所	橋口 G と福原 G が共同で、中和抗体のエピトープ決定に必要な構造解析や免疫評価に必要な精製抗原蛋白質を提供して共同研究を進めた。
富山大学	橋口 G と福原 G が共同で、中和抗体のエピトープ決定に必要な構造解析の共同研究を進めた。