The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	改良型VHHの合理的デザインを指向したSARS-CoV-2 Sタンパク質とVHHの複合体結晶構造解析
Author(s)	山口, 桂史
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92101
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　山口　桂史　　）	
論文題名	改良型VHHの合理的デザインを指向したSARS-CoV-2 Sタンパク質とVHHの複合体結晶構造解析

論文内容の要旨

Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)によって引き起こされる新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は、現在までに世界中で感染者数6億人以上、死者数650万人以上にのぼる (2022年10月時点)。SARS-CoV-2の表面に発現するスパイク (S)タンパク質は、宿主細胞表面のアンジオテンシン変換酵素II (ACE2)に結合し、細胞内への侵入に重要な役割を示すことから、ワクチンや抗体製剤の標的とされている。これまでに種々のワクチンや抗体製剤が開発・使用されているにも関らず感染が収束しないのは、種々のSARS-CoV-2変異株が断続的に出現し、変異株におけるSタンパク質への変異が、既存のワクチンや抗体製剤の有効性を低減させるためである。そのため、変異株の出現ごとに新たな抗体を作製する必要があるが、その作製には時間とコストを要する。ラクダ科の動物が有する重鎖のみで構成される免疫グロブリンの可変ドメインは、VHHと呼ばれている。VHHは大腸菌を含めた種々のタンパク質発現系で生産可能であるため、アミノ酸変異による抗体改変を容易に行える。我々はこれまでにSARS-CoV-2に対して中和活性を示すVHH P17クローンを選抜し、その二量体化したVHH (P17d)が強力な中和活性を示すことを見出した。単量体化したP17 (P17m)を用いたクライオ電子顕微鏡構造解析により結合部位を同定したが、詳細な結合様式の決定には至らなかった。そこで、本研究ではP17mとAlpha株SタンパクのReceptor Binding Domain (RBD)の複合体及びフリー体P17mの結晶構造解析を行い、結晶構造から得られた知見ならびに懸念される変異株 (VOC)のRBDとP17dのキネティクス実験から、VHHの親和性向上ならびに変異株に対する親和性獲得に向けた抗体改変案を提案する。

まず、P17mとAlpha株RBDが溶液中で複合体形成することをサイズ排除クロマトグラフィーにより確認した。得られたRBD/P17m複合体及びフリー体P17mを用いて結晶構造解析を検討し、それぞれ分解能1.7Å及び1.35Åで構造を決定した。複合体におけるP17mとフリー体P17mの構造比較から、P17mはRBDの結合に伴ってCDR1とβ4-β5間のループをそれぞれ2.1、1.2Åシフトさせ、それらの構造変化が、CDR1では$Tyr32^{P17}$、β4-β5間のループでは$Arg45^{P17}$によるRBDの残基との衝突を避けるためであることを明らかにした。本知見から、RBDとの立体反発を低減するために、TyrやArgをAlaに置換することで親和性を向上できると考えられた。また、RDBのP17mとの結合部位はACE2との結合部位と重なっていたことから、P17はACE2との結合の競争阻害によって中和活性を示すと考えられた。結合界面は、RBDの24残基、P17mの20残基で構成され、水素結合やπ-πスタッキング相互作用とともに、P17mの正電荷領域とRBDの負電荷領域の静電相互作用ならびに、各々の電気的に中性な領域同士の疎水性相互作用を形成していた。さらに、RBD/P17m複合体を既知のSタンパク質三量体構造のRBDに重ね合せたモデルから、各RBDに結合するP17mと隣接するP17mのN末端－C末端間及びC末端－N末端間の距離を計測した。P17m 同士を繋ぐP17dのリンカー長は約76Åと推定され、2つのdown型RBDに結合するP17mのN－C末端間及びup型とdown型RBDに結合するN－C末端間の距離においてそれぞれ76Å以下の組合せが存在することから、P17dがSタンパク質三量体中の2つのRBDを同時に認識可能な適切なリンカーを有した二量化抗体であることを明らかとした。

次に、世界保健機関によってVOCに認定されていたAlpha、Beta、Gamma、Delta、Omicron BA.1、BA.2株におけるSタンパク質の変異がP17mの親和性に影響しうるか考察した。報告されている変異の内、結合界面に含まれるのはGly446、Leu452、Glu484、Gln493、Gly496、Gln498、Asn501であった。これらの変異の内、Tyr501及びLeu452への変異はP17mの親和性に影響しないと考えられた。一方、Glu484は周辺の$Asn33^{P17}$や$Gly99^{P17}$の主鎖N原子との水素結合、及びP17mとのVan der Waals (VdW)相互作用を形成しており、Beta株、Gamma株におけるLys変異は、Lys側鎖の正電荷とこれらの主鎖N原子との静電的反発、Omicron BA.1株、BA.2株におけるAla変異は、水素結合及びVdW相互作用の消失によって親和性を低下させると考えられた。また、Gln493及びGln498は、Omicron株におけるArg変異によって表面電荷を正電荷に変化させ、P17の正電荷領域と反発することで親和性を低下させると考えられた。Gly446及びGly496への変異は、Omicron BA.1株でのみSer変異が確認されているが、親和性に大きく影響しないと

考えられた。これらの考察をVOCのRBDを用いたバイオレイヤー干渉法（BLI法)によって検証した結果、Tyr501に変異を有するAlpha株に加え、Leu452に変異を有するDelta株RBDに対してもP17dが親和性を示すことを確認した。一方、Glu484、Gln493、Gln498に変異を有するBeta、Gamma、Omicron BA.1及びBA.2株RBDに対しては平衡解離定数を算出できなかった。本知見を基に、現在最も拡散しているOmicron変異株に対処するために、Glu484Ala変異によって形成される空間を占有するための疎水性アミノ酸残基の導入、Gln493及びGln498のArgへの変異によって生じる正電荷領域との静電相互作用獲得のための酸性アミノ酸導入、といった抗体改変アイデアを考案した。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　　山口　桂史　　）		
	（職）	氏　　名
論文審査担当者	主 査　　教授	井上　豪
	副 査　　教授	小比賀　聡
	副 査　　准教授	青山　浩

論文審査の結果の要旨

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の原因ウイルスであるSevere acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)は、スパイク (S)タンパク質によって宿主細胞のアンジオテンシン変換酵素II (ACE2)に結合し、細胞内へ侵入する。これまでにSタンパク質を標的とした多くのワクチンや抗体製剤が開発されているが、SARS-CoV-2変異株におけるSタンパク質の変異が、既存のワクチンや抗体製剤の有効性を低減させる。そのため、変異株の出現の度に新たな抗体を作製する必要があるが、それには時間とコストを要する。ラクダ科の動物が有する重鎖のみで構成される免疫グロブリンの可変ドメインVHHは大腸菌を含む種々のタンパク質発現系で生産可能であるため、アミノ酸変異による抗体改変を容易に行えると期待される。VHH P17クローンは、その二量体化したVHH (P17d)がSARS-CoV-2に対する強力な中和活性を示すが、抗体改変に必要なSタンパク質に対する詳細な結合様式は未解明であった。申請者は、P17の親和性向上及び変異株に対する親和性獲得に向けた抗体改変案の提案を目的として、単量体化P17 (P17m)とAlpha株SタンパクのReceptor Binding Domain (RBD)の複合体及びフリー体P17mの結晶構造解析、ならびに懸念される変異株 (VOC)のRBDとP17dとのキネティクス実験を行い、以下の成果を得た。

まず、RBD/P17m複合体及びフリー体P17mについて、それぞれ分解能1.7Å及び1.35Åで結晶構造を決定した。RBD結合型P17mとフリー体P17mの構造比較から、P17mはRBDの結合に伴い、CDR1のTyr32^{P17}、β4-β5間のループのArg45^{P17}によるRBDとの衝突を避けるためにループ構造を変化することを示した。本知見は、TyrやArgのAlaへの置換によってRBDとの立体反発を低減する親和性向上案の提示につながった。また、RDBにおけるP17mとACE2の結合部位の重なりから、P17の中和活性はACE2との競争阻害によることを示し、その結合界面における水素結合、π-πスタッキング相互作用ならびに静電相互作用の形成を明らかにした。さらに、RBD/P17m複合体を既知のSタンパク質三量体構造に重ねたモデルから、隣り合う2つのRBDに結合するP17mのN－C末端間の距離がP17dの推定リンカー長76Å以下となる組合せが存在することを示し、P17dが2つのRBDを同時に認識可能なリンカーを持つことを示した。これらの知見は、リンカー長の伸長による更なるRBDの組合せの認識や三量体タンパク質とP17との融合による3つのRBDの同時認識といった親和性の更なる向上に向けたVHHの改変の提案に貢献した。

次に、VOCのAlpha、Beta、Gamma、Delta、Omicron BA.1、BA.2株におけるRBDの変異の内、RBDとP17の結合界面に含まれる変異がGly446、Leu452、Glu484、Gln493、Gly496、Gln498、Asn501であることを示した。これらの変異の内、Gly446、Leu452、Gly496及びTyr501への変異はP17mの親和性に影響せず、Glu484、Gln493及びGln498が親和性を低下させると考察した。本考察をバイオレイヤー干渉法 (BLI法)によって検証した結果、Tyr501に変異を有するAlpha株、Leu452に変異を有するDelta株RBDに対してP17dが親和性を示し、Glu484、Gln493、Gln498に変異を有するBeta、Gamma、Omicron BA.1及びBA.2株RBDに対しては平衡解離定数を算出できず、親和性が著しく低下することを明らかにした。本知見を基に、現在最も拡散しているOmicron変異株に対処するために、Glu484Ala変異によって形成される空間を占有するための疎水性アミノ酸残基の導入、Gln493及びGln498のArgへの変異によって生じる正電荷領域との静電相互作用獲得のための酸性アミノ酸導入、といった抗体改変アイデアを考案した。

以上、RBD/P17m複合体及びフリー体P17mの結晶構造解析ならびに結合キネティクス解析により、既存抗体の親和性向上及び新たな変異株への親和性獲得に向けた結合部位への変異導入による抗体改良といった新たなアプローチ法の提案を達成できたことから博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。