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

# 学位論文

**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**

**2023** 年

大阪大学大学院 薬学研究科

創成薬学専攻 生体構造機能分析分野

山口 桂史

# 略語一覧

| | | |
|---|---|---|
| ACE2: | : | Angiotensin Converting Enzyme-II、アンジオテンシン変換酵素 II |
| BLI | : | bio-layer interferometry |
| BSA | : | Buried surface area |
| CD | : | connector domain |
| CDR | : | complementarity-determining region |
| CH | : | central helix |
| $C_H$ | : | constant region of heavy chain |
| $C_L$ | : | constant region of light chain |
| COVID-19 | : | Coronavirus disease 2019、新型コロナウイルス感染症 |
| cryo-EM | : | cryo-electron microscopy |
| CT | : | cytoplasmic tail |
| EDTA | : | ethylenediaminetetraacetic acid |
| EMDB | : | The electron microscopy data bank |
| FDA | : | U.S. Food and Drug Administration、アメリカ食品医薬品局 |
| FEP 法 | : | 自由エネルギー摂動法 |
| FP | : | fusion peptide |
| hcAb | : | heavy-chain antibody |
| HR1 | : | heptad repeat 1 |
| HR2 | : | heptad repeat 2 |
| IgG | : | Immunoglobulin G、免疫グロブリン G |
| IPTG | : | Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside |
| $K_D$ | : | Equilibrium dissociation constant、平衡解離定数 |
| $k_{off}$ | : | Dissociation rate constant、解離速度定数 |
| $k_{on}$ | : | Association rate constant、会合速度定数 |
| MD 法 | : | 分子動力学法 |
| $M_{Pro}$ | : | Main protease、メインプロテアーゼ |
| NSP | : | Nonstructural protein、非構造タンパク質 |
| NTD | : | N-terminal domain |
| SARS-CoV-2 | : | Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 |
| SD1 | : | subdomain 1 |
| SD2 | : | subdomain 2 |
| S1/S2 | : | S1/S2 cleavage site |

| | | |
|---|---|---|
| S2’ | : | S2’ cleavage site |
| ORF | : | Open Reading Frame |
| PBS | : | phosphate-buffered saline |
| PDB | : | Protein data bank |
| PEG | : | Polyethylene glycol |
| RBD | : | Receptor binding domain |
| RBM | : | Receptor binding motif |
| RdRp | : | RNA-dependent RNA polymerase |
| RMSD | : | Root mean square deviation |
| RNA | : | Ribonucleic acid |
| SS | : | Signal sequence、シグナル配列 |
| TM | : | Transmembrane domain |
| VdW | : | Van der Waals |
| VHH | : | Variable domain of heavy chain of heavy chain antibody |
| VOC | : | Variants of concern、懸念される変異株 |
| VOI | : | Variants of Interest、注目すべき変異株 |
| VUM | : | Variants under monitoring |
| WHO | : | World Health Organization、世界保健機関 |

# 目次

序論……1
本論……10
第一章
　第一節……10
　第二節……11
　第三節……14
　第四節……23
　第五節……27
　第六節……28
　小括……28
第二章
　第一節……29
　第二節……34
　第三節……38
　小括……40
総括……41
謝辞……42
実験の部……43
引用文献……49

# 序論

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 万人以上にのぼると報告されている (https://covid19.who.int/, 2022 年 10 月時点)。この世界的なパンデミックは未だに継続しており、人々の健康や経済を脅かしている。

SARS-CoV-2 はベータコロナウイルス属の一本鎖プラス鎖 RNA ウイルスであり、約 30,000 bp に及ぶ巨大なウイルスゲノムの中には、6 つの Open Reading Frame (ORF)が存在する (*1*)。5'末端から始まる ORF1a/b では全ゲノムの 3 分の 2 に及ぶ領域にかけて、polyprotein 1a, b がコードされる **(Fig. 1)** (*2*)。これらのタンパク質は宿主細胞内において、16 種類の非構造タンパク質 (NSP)に切断され、パパイン様プロテアーゼである NSP3、3C 様プロテアーゼである NSP5 (メインプロテアーゼ、$M_{Pro}$)、ならびに NSP7、NSP8、NSP12 で構成されゲノム転写や複製にかかわる RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)複合体等のタンパク質を形成する (*2, 3*)。一方、残りの 3'末端側の領域では、ヌクレオカプシド (N)タンパク質、メンブレン (M)タンパク質、エンベロープ (E)タンパク質ならびにスパイク (S)タンパク質といったウイルスビリオン形成に重要なタンパク質がコードされる。N タンパク質は、ウイルスゲノムとともにヌクレオカプシドを形成し、S、M、E タンパク質はそれらの外側を包む

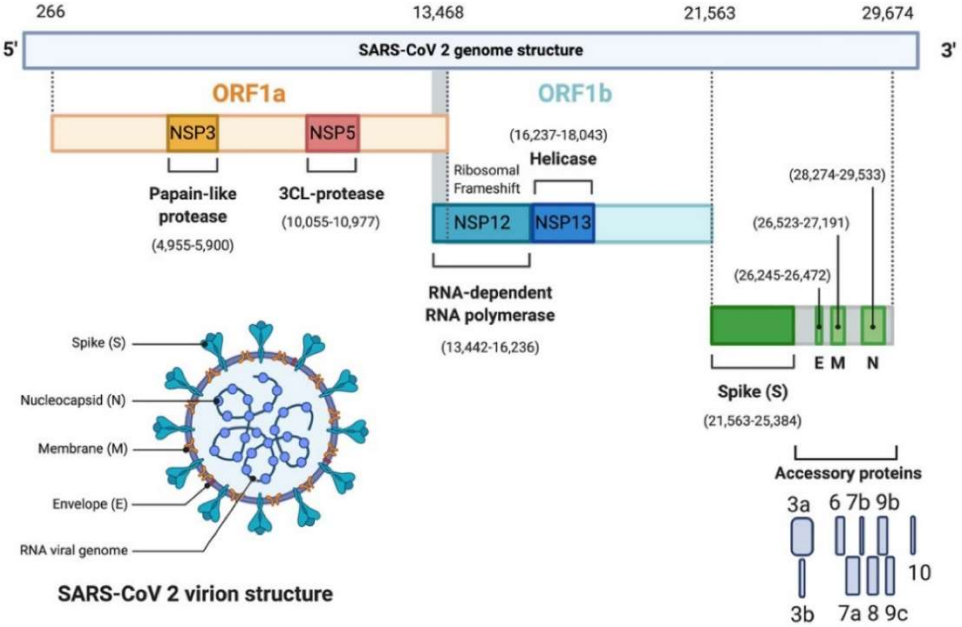


**Fig. 1 SARS-CoV-2 のウイルスゲノムによってコードされるタンパク質 (引用 2 より)**

エンベロープに局在する。

これらのタンパク質等によって構成される SARS-CoV-2 は、下記のライフサイクルで複製される **(Fig. 2)** (*2*)。即ち、①S タンパク質による宿主細胞表面の受容体であるヒトアンジオテンシン変換酵素 II (ACE2)への結合及び細胞内への侵入、②脱殻によるウイルスゲノムの放出、③ゲノムからの polyprotein 1a, b の翻訳及びプロテアーゼ切断による RNA ポリメラーゼの産生、④RNA ポリメラーゼによるマイナス鎖 RNA の合成、ならびに合成された RNA を鋳型としたサブゲノム RNA (sgRNA)の合成、⑤sgRNA を鋳型とした種々のウイルスタンパク質 mRNA の転写、⑥⑤で転写された mRNA からの翻訳、ならびに翻訳された E、S、M タンパク質の小胞体への集合、及び N タンパク質による細胞質でのヌクレオカプシド形成、⑦E、S、M タンパク質と N タンパク質の会合、⑧成熟したビリオンの形成、そして、⑨エクソサイトーシスにより感染細胞外への放出、である。

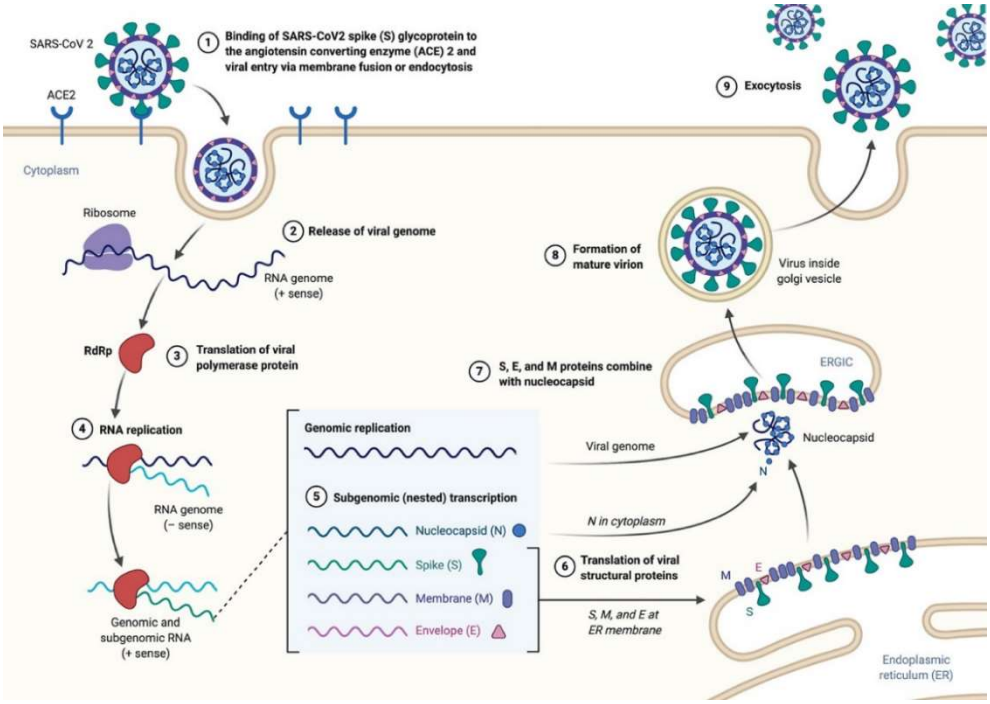


**Fig. 2 SARS-CoV-2 の複製サイクル (引用 2 より)**

これまでに、種々の COVID-19 治療薬がアメリカ食品医薬品局 (FDA)において使用が許可されている。抗ウイルス剤では、Pfizer 社によって開発された PAXLOVID (一般名 : nirmatrelvir/ritonavir)は、nirmatrelvir がウイルス由来の $M_{Pro}$ を阻害する (*4*)。また、本薬剤は ritonavir との組み合わせによってシトクロム P450 を阻害することで代謝安定性を向上させている。Merck 社と Ridgeback

Biotherapeutics 社によって開発された LAGEVRIO (一般名：molnupiravir)は、ウイルス RNA の複製障害や複製時の RNA 変異の発生頻度を増加させることで、抗ウイルス活性を示す (*5, 6*)。さらに、Gilead Sciences 社で開発された VEKLURY (一般名：remdesivir)は、エボラ出血熱治療薬として開発されていたが、SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス効果が確認された薬剤であり、LAGEVRIO と同様にウイルス RNA の複製障害を引き起こすことが示されている (*7-9*)。

ACE2 に結合する S タンパク質についても、SARS-CoV-2 による宿主細胞への侵入といった重要な役割を示すことから、モノクローナル抗体や S タンパク質を抗原とするワクチンの標的とされている (*10-14*)。S タンパク質は、ウイルス表面から突き出た膜貫通型タンパク質であり、ホモ三量体を形成する (*15*)。各々のプロトマーは、大きく S1、S2 サブユニットに大別される。S1 サブユニットは、主に N-terminal domain (NTD)と receptor binding domain (RBD)で構成され、RBD を介して宿主細胞表

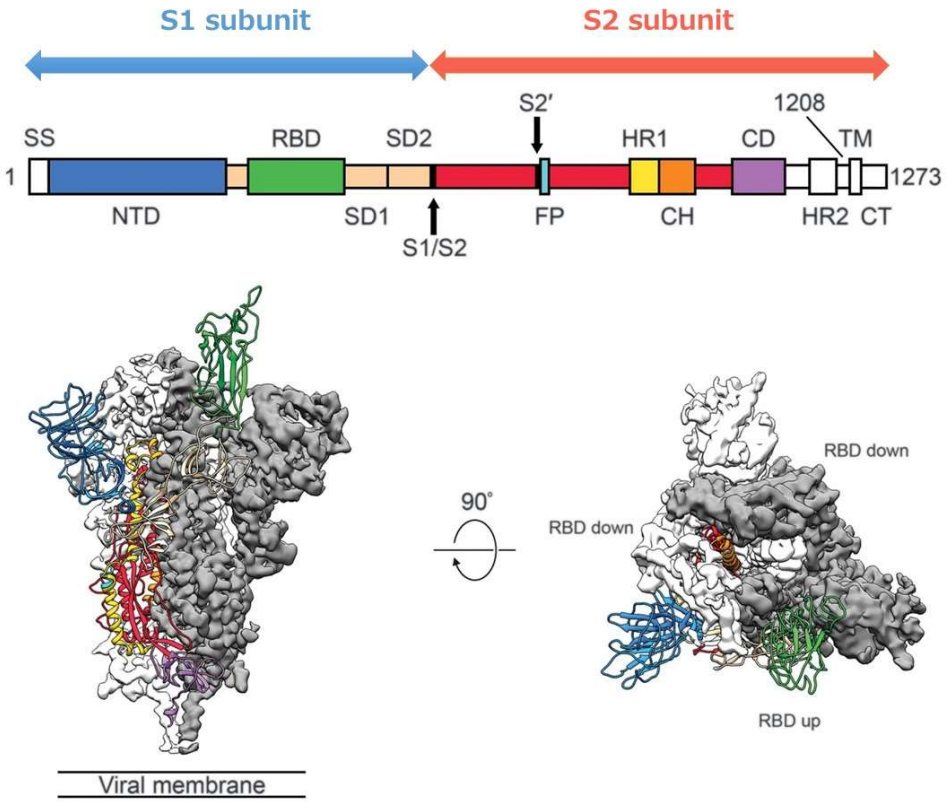


**Fig. 3 S タンパク質を構成する各ドメインと三量体構造 (引用 15 より改編)**
(上段)S タンパク質における各ドメインの概要、SS：シグナル配列、NTD：N-terminal domain、RBD：receptor binding domain、SD1：subdomain 1、SD2：subdomain 2、S1/S2：S1/S2 cleavage site、S2'：S2 cleavage site、FP：fusion peptide、HR1：heptad repeat 1、CH：central helix、CD：connector domain、HR2：heptad repeat 2、TM：transmembrane domain、CT：cytoplasmic tail

面の ACE2 に結合する。S2 サブユニットは、fusion peptide (FP)、heptad repeat 1 (HR1)、central helix (CH)、connector domain (CD)、heptad repeat 2 (HR2)、transmembrane domain (TM)、ならびに cytoplasmic tail (CT)で構成され、宿主細胞への侵入を担う **(Fig. 3)**。RBD は、受容体結合部位を露出した状態の up 型とそれらを隠した状態の down 型コンフォメーションをとることができる。RBD が down 型の場合には、受容体に近接できないため、ACE2 に結合する際には、そのコンフォメーションを up 型に変化させる **(Fig. 4)** (*16*)。RBD を介して ACE2 に結合した後、furin プロテアーゼによって、S タンパク質は S1/S2 サイトで切断される。この時、切断された S1 サブユニットは遊離し、露出された S2 サブユニットによって宿主細胞内に侵入する。このような特徴から、RBD と ACE2 との結合を阻害することが、COVID-19 の治療ならびに感染抑制につながると期待され、これまでに 5 種類の抗体製剤が FDA により使用が許可されている **(Table 1)**。これらの抗体製剤はいずれも RBD を標的としており、治療薬として使用が許可されているが (*10-14*)、Astrazeneca 社の tixagevimab/cilgavimab のみ、長時間作用する特性から唯一 COVID-19 感染予防としての使用も許可されている (*12*)。

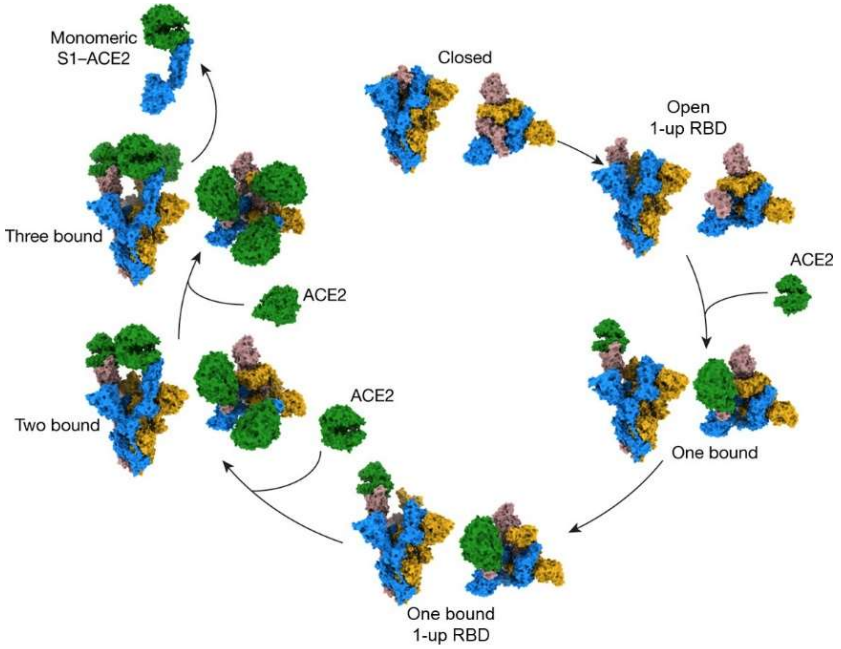


**Fig. 4 ACE2 との結合による RBD の構造変化と S1 サブユニットの遊離 (引用 16 より一部改編)**
S タンパク質の各モノマーを青、黄、ピンク、ACE2 を緑で示す。

| 一般名 | 開発元 | 備考 | 使用状況 |
|---|---|---|---|
| bebtelovimab | Eli Lilly and Company | Omicron 株亜種に有効性あり | FDA 緊急使用許可 |
| tixagevimab<br>cilgavimab | AstraZeneca Pharmaceuticals LP | Omicron 株亜種に有効性あり<br>COVID-19 の予防と治療に適応 | FDA 緊急使用許可 |
| casirivimab<br>imdevimab | Regeneron Pharmaceuticals, Inc | Omicron 株に対する有効性示さず | FDA 使用制限勧告<br>2022 年 1 月 |
| sotrovimab | GlaxoSmithKline LLC | BA.2 株に対する有効性示さず | FDA 使用制限勧告<br>2022 年 4 月 |
| bamlanivimab<br>etesevimab | Eli Lilly and Company | Omicron 株に対する有効性示さず | FDA 使用制限勧告<br>2022 年 1 月 |

**Table 1 これまでに使用が許可された S タンパク質に対する抗体製剤**
FDA ウェブサイト：https://www.fda.gov/drugs/emergency-preparedness-drugs/coronavirus-covid-19-drugs より引用

SARS-CoV-2 はこれまでに種々の変異株が確認されており、感染性、重症化リスク、ならびに治療薬やワクチンに対する効果に影響するものが存在する。それらの変異の中には S タンパク質の一部のアミノ酸の変異も含まれる。初期に中国武漢で発見された株の流行以降、Asp614 が Gly に変異した S タンパク質を持つ変異株の出現をはじめ数多くの変異株の出現が報告されている。世界保健機関 (WHO)や国立感染症研究所では、これらの変異株についてリスクごとに、懸念される変異株 (variants of concern, VOC)、注目すべき変異株 (variants of interest, VOI)ならびに監視下の変異株 (variants under monitoring)に分類している **(Table 2)**。

| VOC | | VOI | | VUM | |
|---|---|---|---|---|---|
| WHO Label | PANGO Lineage | WHO Label | PANGO Lineage | PANGO Lineage | |
| Alpha | B.1.1.7 | Epsilon | B.1.427, B.1.429 | AV.1 | B.1.1.318 |
| Beta | B.1.351 | Zeta | P.2 | AT.1 | C.1.2 |
| Gamma | P.1 | Eta | B.1.525 | R.1 | B.1.640 |
| Delta | B.1.617.2 | Theta | P.3 | B.1.466.2 | XD |
| Omicron | B.1.1.529 | Iota | B.1.526 | B.1.1.519 | |
| Omicron subvariants | BA.1 | Kappa | B.1.617.1 | C.36.3 | |
| | BA.2 | Lambda | C.37 | B.1.214.2 | |
| | BA.4 | Mu | B.1.621 | B.1.1.523 | |
| | BA.5 | | | B.1.619 | |
| | BA.2.75 | | | B.1.620 | |
| | BJ.1 | | | B.1.630 | |
| | BA.4.6 | | | | |
| | XBB | | | | |
| | BA.2.3.20 | | | | |

**Table 2 これまでにモニタリングされていた SARS-CoV-2 変異株**
現在は、VOC に Omicron 及び Omicron subvariant のみが監視対象であり、その他の VOC、VOI、VUM に記載した変異株は監視対象から除外されている。(WHO ウェブサイト：https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants より引用)

これまでに VOC に分類されていた株は、Alpha 株、Beta 株、Gamma 株ならびに Delta 株であり、現在では Omicron 株が VOC に分類されている。Omicron 株においては、さらなる変異を有した亜系統 (subvariant)も報告されている。これらの変異株においては、S タンパク質に様々な変異が確認されており、感染能の増強や中和抗体の活性低下の原因の一つとなっている **(Fig. 5)**。

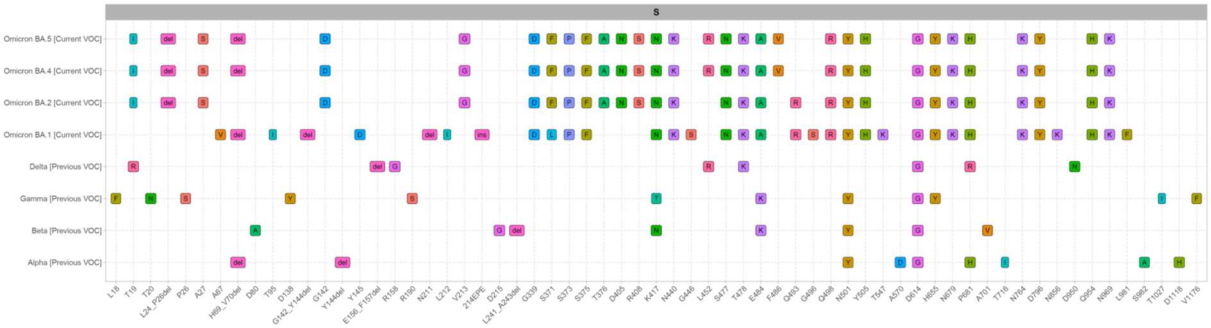


**Fig. 5 VOC における S タンパク質の変異部位**
横軸：オリジナル株におけるアミノ酸、縦軸：VOC 及びオリジナル株から変異したアミノ酸、を示す。Del：deletion mutant (WHO ウェブサイト：https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/s.pdf?sfvrsn=990a05c2_14 より引用)

これまでに種々のワクチンや抗体製剤が迅速に開発・使用されているにも関わらず感染が収束しないのは、ウイルスの適応進化に伴って発生するこれらの変異株が断続的に出現しているためである (*17, 18*)。中でも Omicron 株は初期に確認されたウイルスと比較して S タンパク質に 30 箇所以上の変異を有しているため、感染能が向上しているとともにワクチン接種によって産生される中和抗体を回避することができる (*19-21*)。その影響により、これまでに使用が許可されていた casirivimab/imdevimab、sotrovimab、bamlanivimab/etesevimab は、現在のオミクロン株亜系統に対する有効性を示さないことから、2022 年に FDA による緊急使用許可の取り消し勧告がなされた **(Table 1)**。

抗体治療はワクチン接種ならびに抗ウイルス剤の服用とともに COVID-19 の効果的な治療オプションの一つである。しかしながら、前述のとおりモノクローナル抗体による治療は、断続的に出現する変異株が有する新たな変異によってその効果が低減される恐れがある (*22*)。そのため、既存の抗体を回避する変異株が出現するたびに新しいモノクローナル抗体を作製する必要があるが、その作

製には高いコストと時間を要するため、より迅速に変異株に対処する手法が求められる。

ラクダ科の動物は重鎖のみで構成される免疫グロブリン (heavy-chain antibody, hcAb)を有している。hcAb は、定常領域 (constant region of heavy chain, $C_H$) 1 が欠損した軽鎖を持たない抗体であり、その中に有する可変ドメインは VHH (または nanobody)と呼ばれている **(Fig. 6)** (*23*)。免疫グロブ

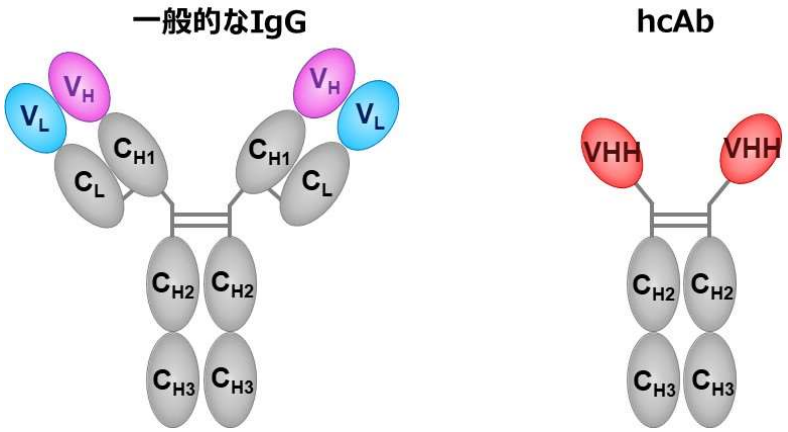


**Fig. 6 一般的な IgG とラクダ科特徴的な hcAb の模式図**
(左)一般的な IgG、(右)hcAb を示した。$V_H$: variable domain of heavy chain、$V_L$: variable domain of light chain、VHH: variable domain of heavy chain of hcAb、$C_{H1}$, $C_{H2}$, or $C_{H3}$: constant region of heavy chain 1, 2, or 3、$C_L$: constant region of light chain

リン G (IgG)が抗原認識に重要な相補性決定領域 (CDR)を H 鎖と L 鎖にそれぞれ 3 つずつ合計 6 か所有しているのに対して、VHH は 3 つの CDR によって結合の多様性を生み出している **(Fig. 7)**。VHH は分子量が約 15kDa であり、IgG と同様に抗原に対して高い親和性を示すとともに、その小さい分子量の特性から IgG では立体的な障害により接近できない狭い空間に入り込むことができる (*24*)。また、VHH は構造の安定性が高く (*25-27*)、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とともに安価に大量生産できると期待される (*28-30*)。さらに、リンカーの導入による VHH 同士の融合や、IgG の Fc ドメインのような多量体タンパク質との融合によって結合部位を複数有する多価抗体を作製することも可能である (*31, 32*)。VHH の薬剤応用に向けた開発も進んでおり、2019 年には後天性血栓性血小板減少性紫斑病を適応として caplacizumab が FDA に承認され (*33*)、その他の VHH 薬剤の臨床試験についても複数実施されている **(Table 3)** (*34, 35*)。

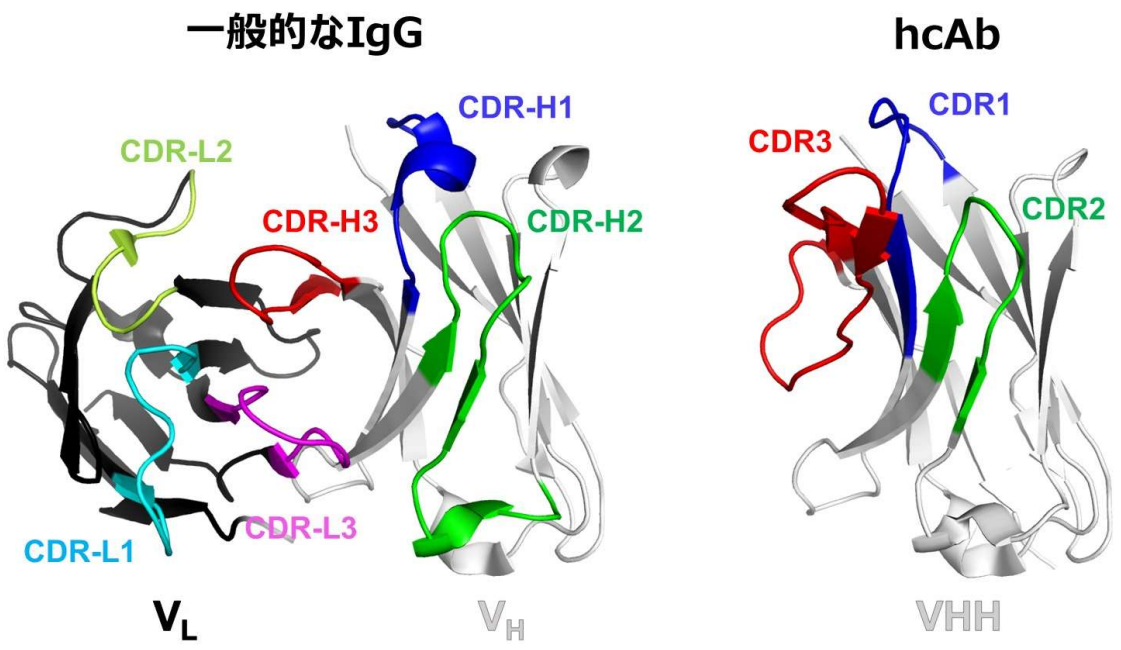


**Fig. 7 一般的な IgG とラクダ科特徴的な hcAb における CDR の比較**
(左)一般的な IgG、(右)hcAb の各々の variable domain を示した。IgG における CDR-H1、H2、H3 は $V_H$ における CDR、CDR-L1、L2、L3 は $V_L$ における CDR をそれぞれ示している。モデル図作製には、PDB ID：5I1A (IgG)及び PDB ID: 7KN5 (hcAb)を使用した。

抗体を改変する技術として、これまでにランダムな変異導入や静電相互作用等の抗原との相互作用獲得を狙った点変異導入等が報告されている (*36-39*)。さらには、抗原-抗体の相互作用境界面のアミノ酸残基を Ala に置換することで誘起されるエンタルピーまたはエントロピー変化が親和性向上に寄与することも知られている (*40*)。いずれの手法においても、抗原と抗体の結合界面の詳細な構造情報は、抗体改変に向けた変異導入部位の探索において大いに役立つと考えられる。

これまでに、我々はアルパカに S タンパク質を免疫することによって SARS-CoV-2 に対する中和活性を有する VHH である P17 クローンを見出した。P17 クローンを二量体化した P17 (P17d)は、中国武漢で発見されたオリジナル株の SARS-CcV-2 に対して強力な中和活性を示し、VOC に対しては Alpha 株及び Delta 株に対する有効性を有する (*24*)。さらに、P17 による S タンパク質の認識部位を明らかにするために、クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM)を用いて、単量体化した P17 (P17m)と S タンパク質三量体との複合体構造解析を試みたが、P17m が S タンパク質の RBD に結合していることを確認できたものの、P17m に相当するマップのピークが弱いことから、VHH を改良するための詳

細な結合様式を明らかにすることはできなかった。

そこで、本研究では P17 と S タンパク質 RBD の相互作用の詳細を明らかにするために、P17m と RBD の複合体結晶構造解析に取り組んだ。得られた結晶構造情報と種々の VOC の RBD との結合キネティクス実験を組み合わせることで、P17 の結合活性の減弱につながる S タンパク質の変異部位を同定することができた。さらに、詳細な結合様式に基づいた、オミクロン株の RBD との相互作用獲得に向けた抗体デザインを考案したため、それらについても議論する。

| nanobody drug | Disease | Target |
|---|---|---|
| caplacizumab<br>ALX-0681<br>ALX-0081 | Thrombotic thrombocytopenic purpura | Ultra large von Willebrand factor |
| ozoralizumab<br>ATN-103 | Rheumatoid arthritis | TNF |
| vobarilizumab<br>ALX-0061 | Rheumatoid arthritis | IL6 |
| vobarilizumab<br>ALX-0061 | Systemic lupus erythematosus | IL6 |
| ALX-0171 | Lower respiratory tract infection | RSV |
| ALX-0761<br>M1095<br>MSB0010841 | Psoriasis | IL17A, IL17F and IL17A/F |
| bispecific nanobody-derived CAR-T cells | Refractory/ relapsed B-cell lymphoma | CD19/CD20 |
| α-ADAMTS-5 nanobody<br>M6495 | Osteoarthritis | ADAMTS-5 |
| VHH batch 203027 | Diarrhoea | Rotavirus |
| [131I]-SGMIB anti-HER2 VHH1 | Breast cancer | HER2 |
| 68-GaNOTA-anti-HER2 VHH1 | Brain metastasis of breast carcinoma | HER2 |
| ALX-0651 | Healthy volunteers | CXCR4 |

**Table 3 臨床開発段階にある VHH 製剤** (引用文献 34 より一部改訂)

# 本論

## 第一章　SARS-CoV-2 RBD と単量体化 P17 の複合体構造解析

### 第一節　SARS-CoV-2 Alpha 株 RBD と単量体化 P17 の複合体形成確認

S タンパク質 RBD と P17 の複合体構造解析を行うために、結晶化に適した複合体の作製に着手した。P17d は、2 つの VHH が Gly-Gly-Gly-Gly-Ser の配列を 4 回連続したフレキシブルなリンカー ($(GGGGS)_4$) によって二量体化されているため、二量体タンパク質をそのまま結晶化に用いるとリンカーの柔軟性によって結晶化を妨げる恐れがある。P17d を使用した場合、2 つの VHH に 2 つの RBD が結合するが、各々の結合様式は同一であると想定されるため、本研究では結晶の析出確率を向上させるために、P17d のリンカーを除去した単量体化 P17 (P17m)を使用した。また、S タンパク質には、SARS-CoV-2 Alpha 株の S タンパク質の RBD を使用した **(Fig. 8)**。この時、RBD の配列長は、Asn331 に修飾される糖鎖を除去するために Thr333 から Ser530 までとした。

P17m が RBD 単体に対しても複合体を形成するか確認するために、サイズ排除クロマトグラフィーを行った。RBD と P17m を混合したサンプルは、RBD 単独、P17m 単独と比べて早い保持時間で溶出されたことから、P17m は RBD 単体に対しても溶液中で安定な複合体を形成することが確認された **(Fig. 9)**。

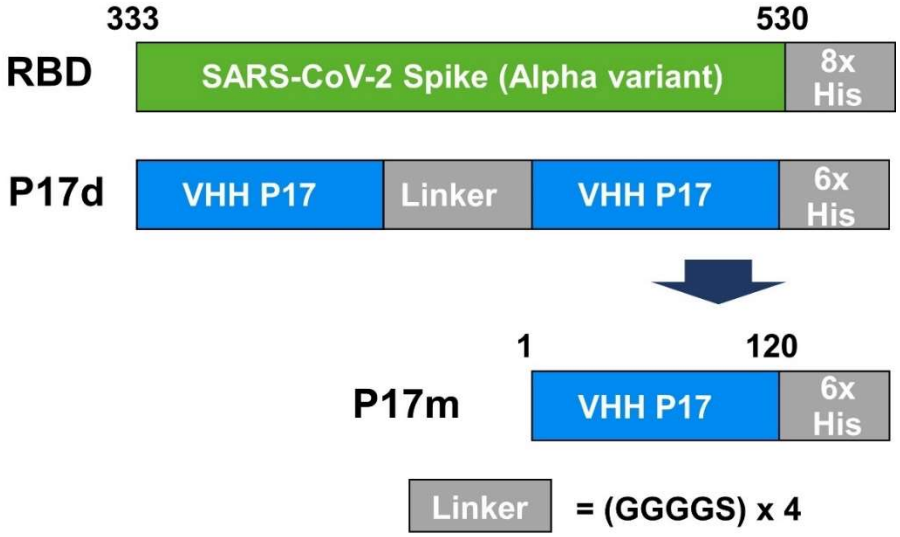


**Fig. 8** 複合体作製に使用した **RBD** 及び **P17** の発現コンストラクト

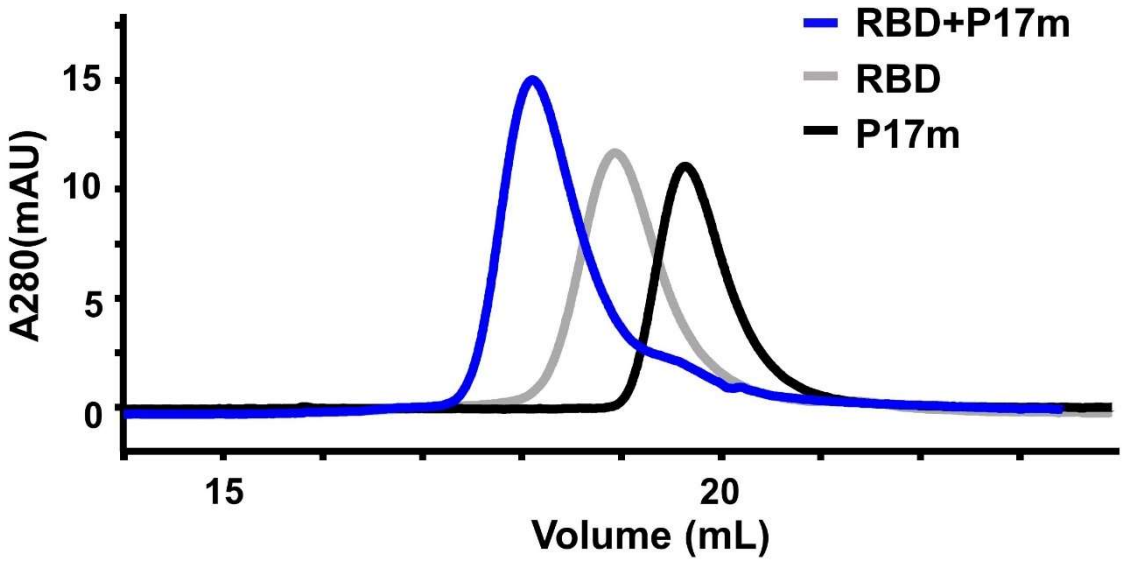


**Fig. 9 RBD/P17m 複合体形成確認におけるサイズ排除カラムクロマトグラフィーチャート**

## 第二節　RBD/ P17m 複合体及びフリー体 P17m 結晶作製と X 線結晶構造解析

第一節で見出した複合体形成条件をスケールアップし、結晶化実験用の RBD/P17m 複合体サンプルを取得した。10.5 mg/mL に濃縮した RBD/P17m サンプルを用いて、結晶化条件を探索した結果、0.1 M Bis-Tris propane (pH 7.0)、1.0 M Succinic acid (pH 7.0)、温度 20 ℃の結晶化条件でロッド状の RBD/P17m 複合体結晶が得られた **(Fig. 10)**。また、16.0 mg/mL に濃縮した P17m を用いて、結晶化条件の探索ならびに条件最適化を行った結果、0.1 M Bis-Tris propane (pH 8.5), 24.5 % w/v PEG 6,000 の条件周辺で板状のフリー体 P17m の結晶が得られた **(Fig. 10)**。得られた結晶を用いて X 線回折実験を行い、回折データを取得した。

収集した回折データを用いて、RBD/P17m 複合体構造については分解能 1.70 Å、P17m フリー体については分解能 1.35 Å でデータ処理を行い、分子置換法により位相を決定した。この時、RBD/P17m 複合体構造のサーチモデルとして Protein Data Bank (PDB)に登録されている SARS-CoV-2 RBD (PDB ID: 7NX6)及び nanobody（PDB ID: 7KN6）を用いた。得られた電子密度マップ

に基づいてモデルの修正ならびに構造精密化を行った結果、$R_{works}/R_{free}$ 値がそれぞれ 0.172/0.190 で RBD/P17m 複合体構造を決定した。また、フリー体 P17m については、前述の RBD/P17m 複合体構造の P17m をサーチモデルとした。同様に、モデルの修正ならびに構造精密化を行った結果、$R_{works}/R_{free}$ 値がそれぞれ 0.150/0.179 でフリー体 P17m 構造を決定した。

RBD/P17m 複合体及びフリー体 P17m の構造解析における各々の回折データ処理及び精密化の統計値を Table 4 に示す。

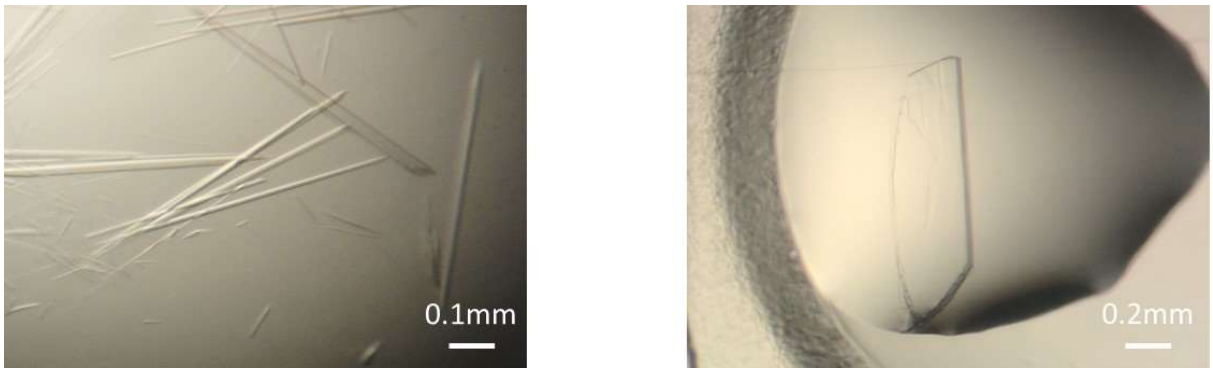


**Fig. 10 RBD/P17m 複合体結晶 (左)とフリー体 P17m 結晶 (右)の写真**

**Table 4 X 線回折データ収集と精密化の統計値**

| **Data Collection** | **RBD/P17m complex** | **free-P17m** |
|---|---|---|
| X-ray source | SPring-8 BL44XU | SPring-8 BL44XU |
| Wavelength (Å) | 0.9000 | 0.9000 |
| Space group | $P3_22_1$ | $P2_1$ |
| Unit cell *a*, *b*, *c* (Å) | 82.68, 82.68, 162.48 | 39.76, 32.11, 84.57 |
| Unit cell *α*, *β*, *γ* (°) | 90.00, 90.00, 120.00 | 90.00, 93.96, 90.00 |
| Resolution range (Å) | 43.19-1.70 (1.73-1.70)[1] | 42.18-1.35 (1.37-1.35)[1] |
| Total No. of reflections | 732,289 (40,098) | 153,619 (8,290) |
| No. of unique reflections | 71,557 (3,760) | 46,794 (2,408) |
| Completeness (%) | 100.0 (99.8) | 99.0 (100.0) |
| Redundancy | 10.2 (10.7) | 3.3 (3.4) |
| $\langle I/\sigma(I)\rangle$ | 12.2 (0.8) | 9.5 (1.4) |
| $R_{meas}$ (all I+ & I-) | 0.127 (4.347) | 0.042 (0.885) |
| $R_{meas}$ (within I+/I-) | 0.127 (4.319) | 0.041 (0.930) |
| $CC_{1/2}$ | 0.999 (0.545) | 0.999 (0.686) |
| **Refinement** | | |
| Resolution range (Å) | 43.19-1.70 (1.73-1.70)[1] | 42.18-1.35 (1.37-1.35)[1] |
| Completeness (%) | 99.95 (99.89) | 98.90 (99.66) |
| No. of reflections, working set | 71,487 (7,088) | 46,774 (4,695) |
| No. of reflections, test set | 3,522 (370) | 2,274 (224) |
| $R_{work}$/ $R_{free}$ | 0.172/0.190 (0.351/0.332) | 0.150/0.179 (0.262/0.320) |
| No. of non-H atoms | 2,995 | 2,111 |
| Protein | 2,527 | 1,842 |
| Ion/Ligand | 86 | 8 |
| Water | 382 | 261 |
| R.m.s. deviation bonds (Å), angles (°) | 0.012, 1.12 | 0.010, 1.21 |
| Average *B* factors (Å$^2$) | 39.71 | 27.39 |
| Protein | 36.94 | 25.08 |
| Ion/Ligand | 64.49 | 29.09 |
| Water | 52.49 | 43.65 |
| Ramachandran statistics | | |
| Favored (%) | 96.82 | 96.64 |
| allowed (%) | 3.18 | 3.36 |
| disallowed (%) | 0.00 | 0.00 |
| PDB code ID | 8GZ5 | 8GZ6 |

[1]Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

## 第三節　P17m による S タンパク質 RBD の認識機構

RBD/p17m 複合体は、非対称単位中に RBD 及び P17m がそれぞれ 1 分子ずつ含まれていた。また、フリー体 P17m は非対称単位中に 2 分子含まれており、各分子の Cα における root mean square deviation (RMSD)は 0.095 Å であることから、ほぼ同様の構造であると考えられた。フリー体 P17m において、3 つの相補鎖決定領域 (CDR1、CDR2、CDR3)はいずれも明瞭なマップが観察された。また、P17m のタンパク質表面電荷を計算すると、CDR3 は電気的に中性な領域を形成するだけでなく、CDR1 の一部とともに正電荷領域を形成することが明らかとなった **(Fig. 11)**。

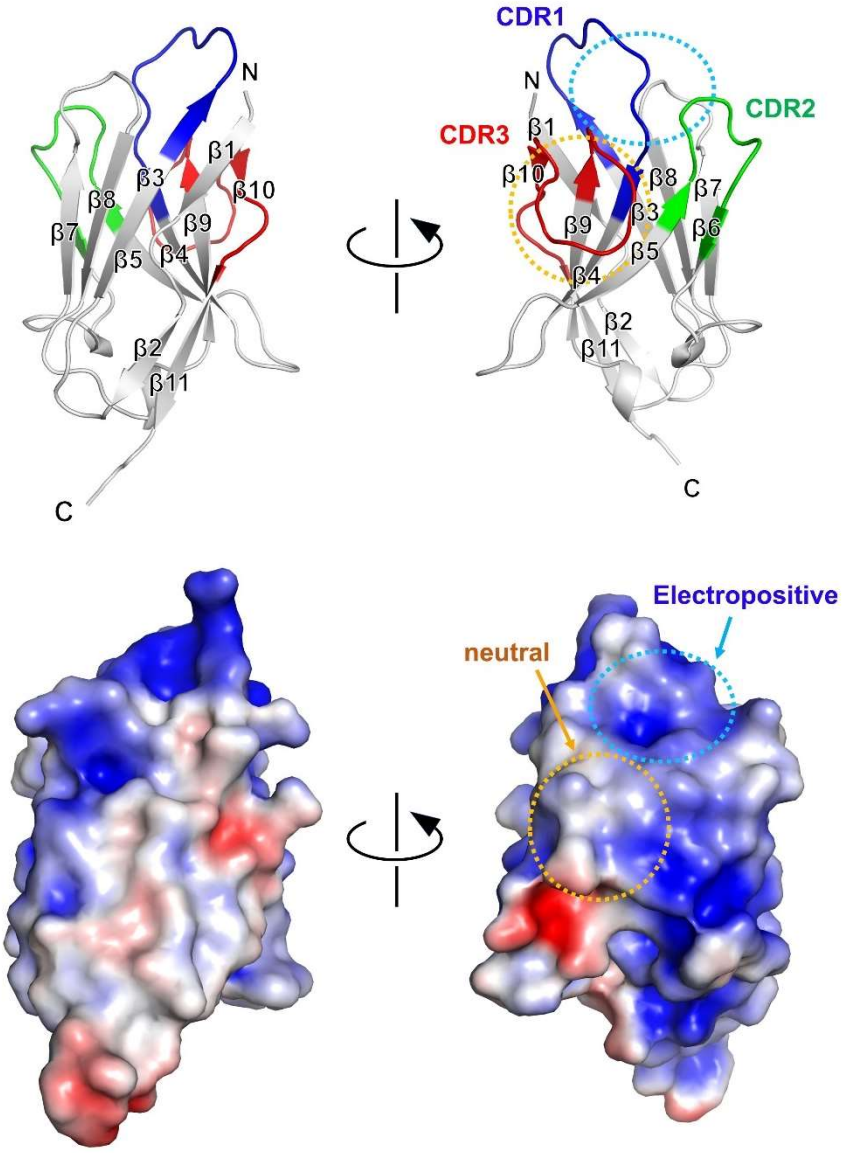


**Fig. 11** (上段)フリー体 **P17m** の結晶構造及び(下段)同一方向から表示した表面電荷

P17m は、RBD とヒト ACE2 との結合に必須となる領域 receptor binding motif (RBM, 438–506)に結合していた **(Fig. 12)**。これまでに、RBM に結合する VHH と RBD との複合体結晶構造が複数報

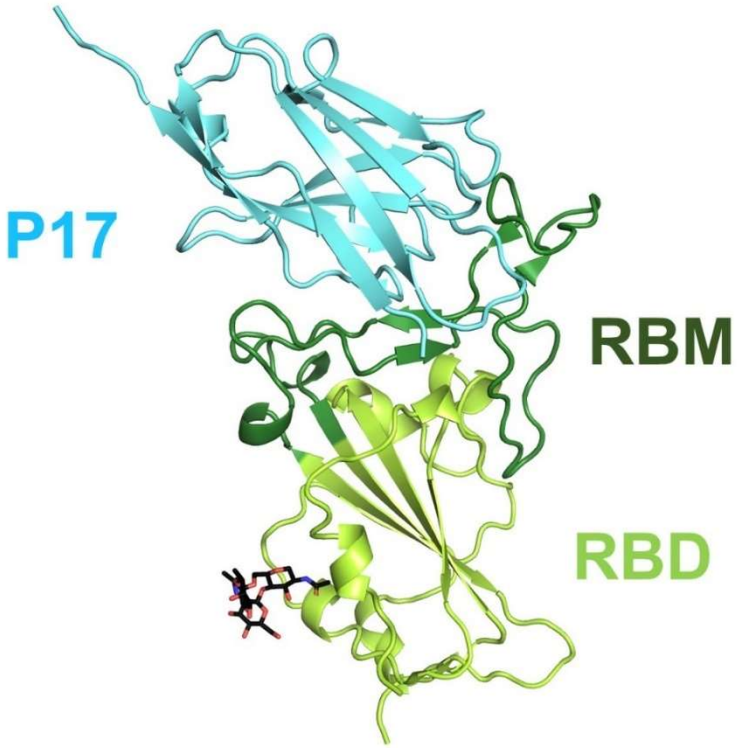


**Fig. 12 RBD/P17m の複合体結晶構造**

告されていることから、それらの複合体構造と RBD/P17m 複合体構造 (PDB ID: 6YZ5、6ZBP、7JVB、7KM5、7KN5、7OAO、7OAP、7OAY、7OLZ、及び 7RBY)を RBD で重ね合わせたところ、P17m はいずれの VHH とも結合様式が異なっていた(*31, 41-45*)。重ね合わせに使用した RBD/VHH 複合体の中から一部を抜粋して **Fig. 13** に示した。また、RBM のループ構造は複合体ごとにコンフォメーションが異なっており、RBD/P17m 複合体構造においても報告されている複合体構造とはループ構造が異なっていた **(Fig. 14)**。RBM のループ構造は、VHH と相互作用していることから、各々の VHH との異なる相互作用形成に合わせて柔軟なループ構造がコンフォメーション変化したと考えられた。

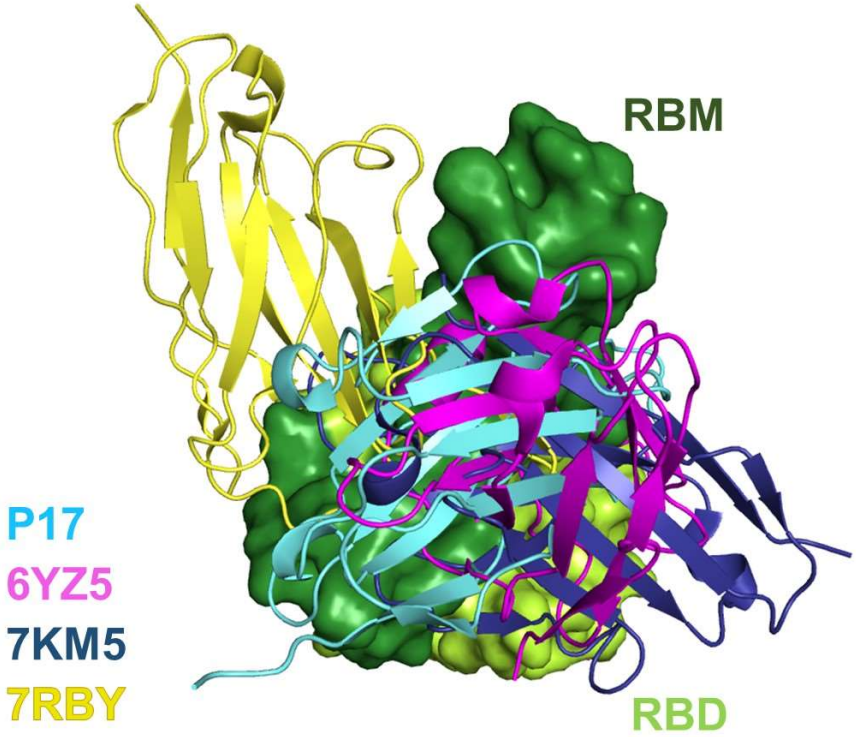


**Fig. 13 過去に報告された VHH と P17m の結合様式の比較**
**Fig. 12** と同様に RBD を黄緑、RBM を濃緑、P17 を水色で示した。重ね合わせに使用した RBD/VHH 複合体の中から、PDB ID; 6YZ5 (マゼンタ)、7KM5 (濃紺)、7RBY (黄)を代表として表示した。

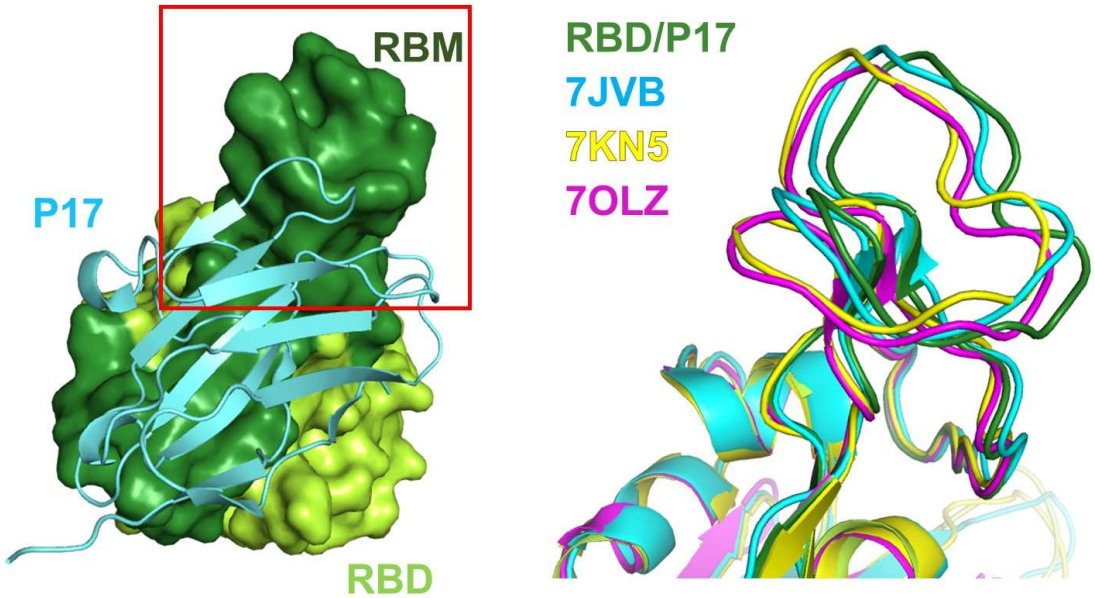


**Fig. 14 RBD/P17m と過去に報告された RBD/VHH 複合体間の RBD の構造比較**
**Fig. 12** と同様に RBD を黄緑、RBM を濃緑、P17 を水色で示した。左図の赤枠の拡大図を右図に表示した。重ね合わせに使用した RBD/VHH 複合体の中から、PDB ID; 7JVB (水色)、7KN5 (黄色)、7OLZ (マゼンタ) を代表として表示した。

フリー体 P17m と RBD 複合体における P17m (RBD 結合型)を主鎖で重ね合わせると、2 つの構造の RMSD は 0.290 Å であった。一方、P17m の CDR1 と β4-β5 間のループ構造は、フリー体と RBD 結合型ではそれぞれ 2.1 Å、1.2 Å シフトしており、P17m が RBD への結合の際に部分的に構造を変化させることが明らかとなった **(Fig. 15)**。

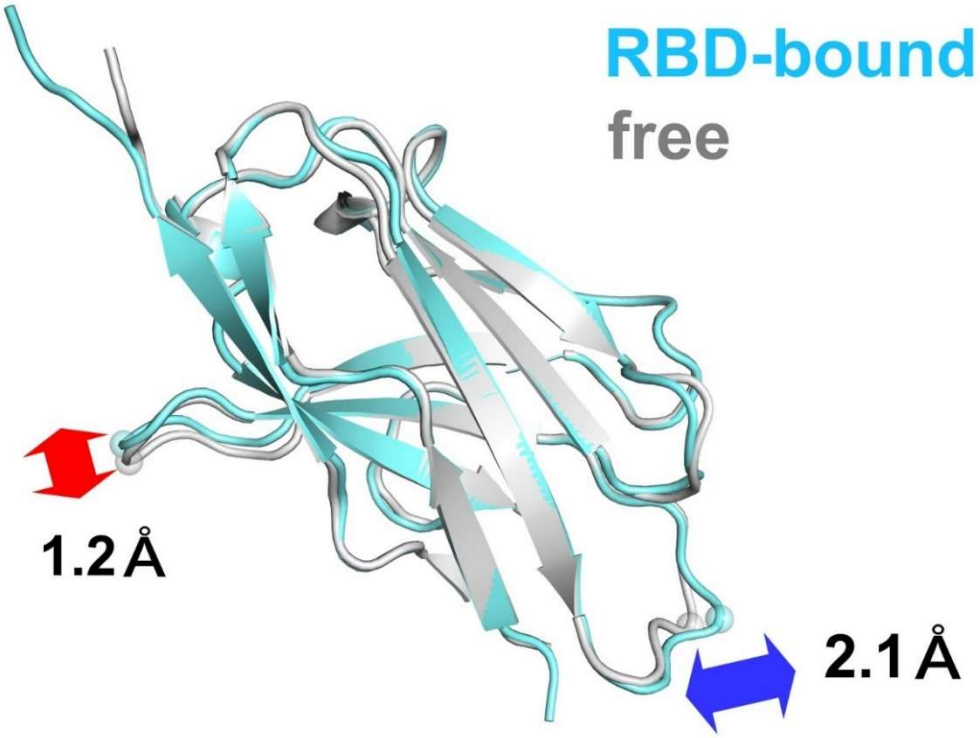


**Fig. 15 主鎖の重ね合わせによる RBD 結合型及びフリー型 P17m の結晶構造の比較**

CDR1 については、フリー体における $Tyr32^{P17}$ (以下、各アミノ酸番号の右肩に由来となるタンパク質 (RBD または P17m)を表記)のコンフォメーションは $Phe490^{RBD}$ と衝突すると懸念される。しかし、RBD 結合型においては衝突を避けるように $Tyr32^{P17}$ をシフトさせており、このシフトに伴って CDR1 全体の構造変化につながったと考えられた **(Fig. 16)**。 また、β4-β5 間のループ構造については、フリー体における $Arg45^{P17}$ のコンフォメーションは $Tyr449^{RBD}$ と衝突すると懸念される。しかし、RBD 結合型においては、衝突を避けるように $Arg45^{P17}$ をシフトさせており、このシフトに伴ってループ構造の変化が生じたと考えられた **(Fig. 17)**。一方、CDR3 は RBD への結合前後で構造がほぼ変化していないことから、揺らぎの少ない領域であると示唆された。

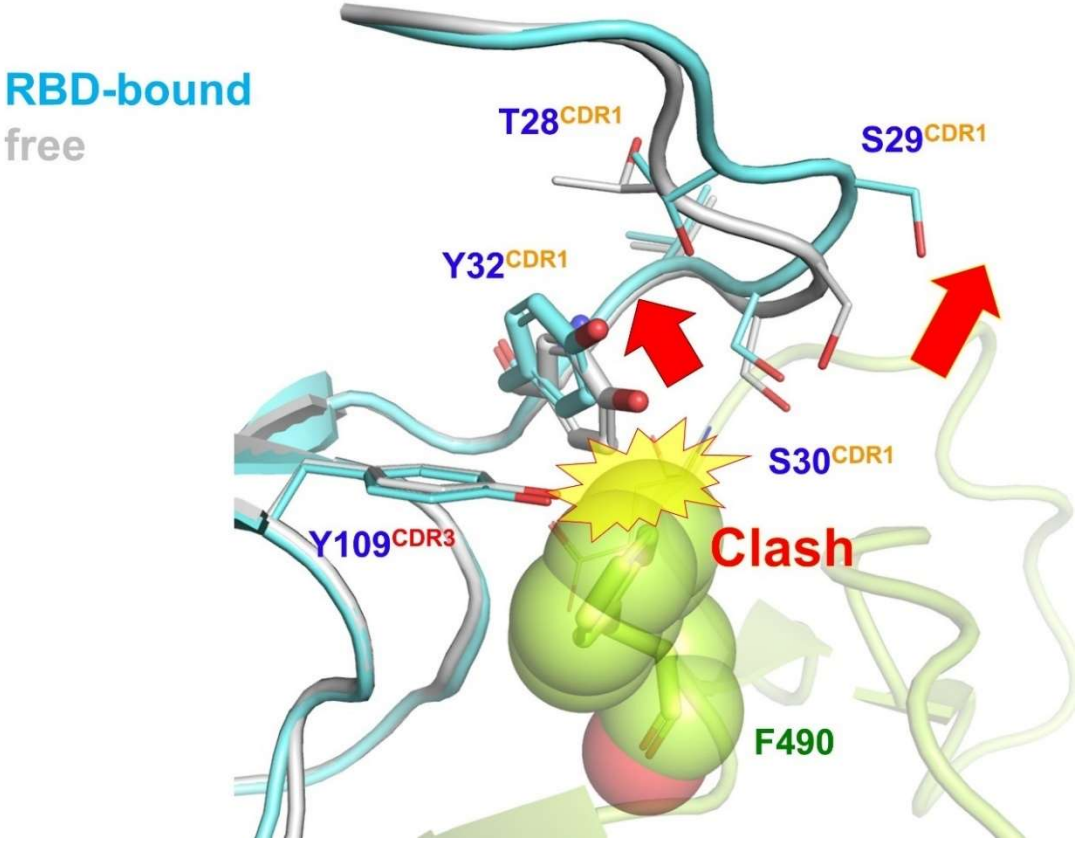


**Fig. 16 RBD との結合による CDR1 の構造変化**

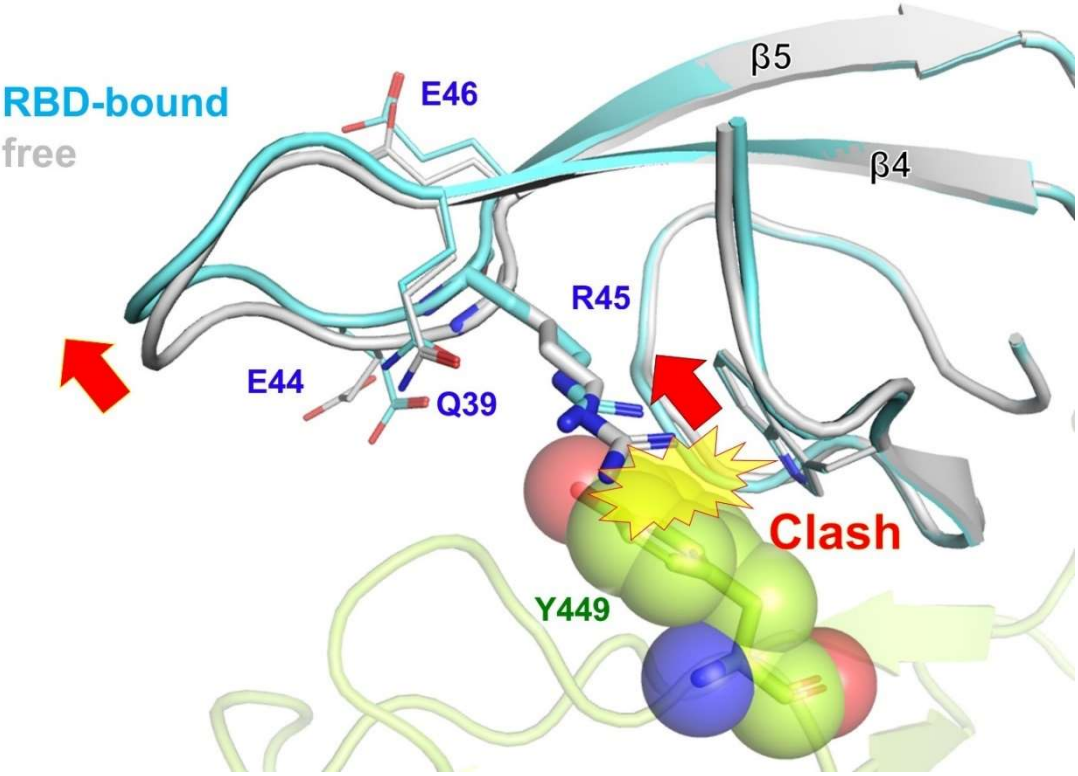


**Fig. 17 RBD との結合による β4-β5 間ループの構造変化**

これまでに、RBD に結合する中和抗体の結合部位は、Barnes らによって 4 つのクラスに分類されている (*46*)。P17m は、本分類における class 1 または 2 に分類される結合部位に重なっており、ACE2 の結合部位とも重なる位置であった（**Fig. 18**）。これまでに報告されている RBD/ACE2 複合体の結

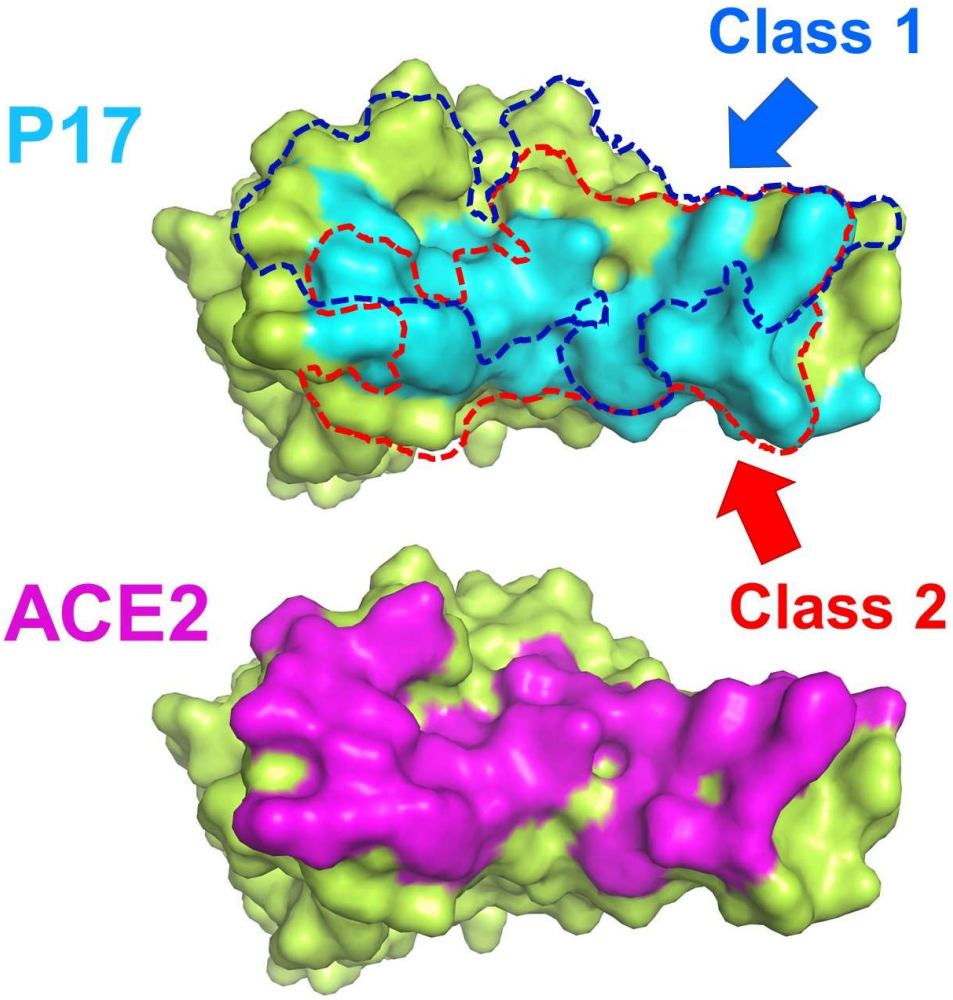


**Fig. 18 P17m 結合部位とヒト ACE2、Class 1 及び Class 2 中和抗体の結合部位の比較**
RBD のタンパク質表面 (黄緑)に P17、ACE2、既知の中和抗体 (Class 1、2)の結合部位を示した。(上段) P17 の結合部位を水色、Class 1 中和抗体の結合部位を青色破線、Class 2 中和抗体の結合部位を赤色破線で表示した。 (下段) ACE2 結合部位をマゼンタで表示した。

晶構造 (PDB ID: 7EKF)と我々が取得した RBD/P17m 複合体を各々の RBD で重ね合わせると、P17m の一部の構造は ACE2 の構造と重なっており、P17m と ACE2 が同時に結合すると 2 つのタンパク質が衝突すると示唆された（**Fig. 19**）。我々はこれまでに、P17 は SARS-CoV-2 に対する高い中和活性を示すこと確認しているが (*24*)、その機能は P17 の結合による立体反発によって RBD

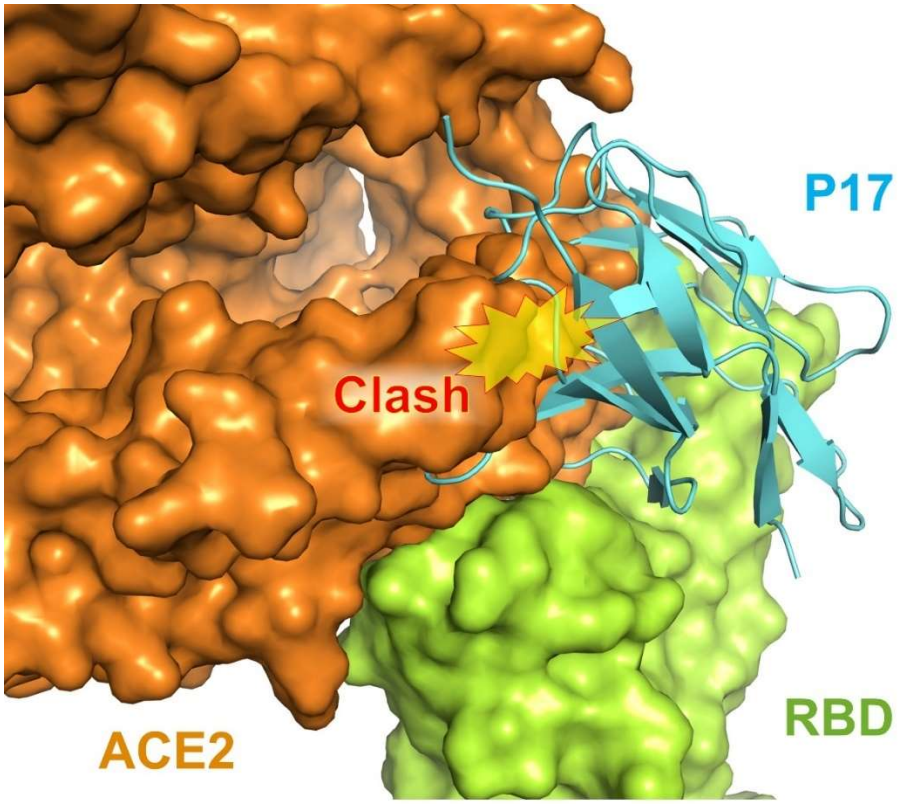


**Fig. 19 P17m の結合によって生じるヒト ACE2 に対する立体障害**

と ACE2 の結合を遮断することに起因すると考えられた。さらに、RBD/P17m 複合体における RBD 及び P17m のタンパク質表面電荷をプログラム APBS を用いて計算すると、RBD 上の結合界面は負電荷領域と中性電荷領域、P17m 上の結合界面は正電荷領域と中性電荷領域で構成されていた（**Fig. 20**）。これらの結果から、RBD と P17m の結合界面は RBD の負電荷領域と P17m の正電荷領域との重なり、及び各々の中性電荷領域同士の重なりによって形成されることが明らかとなった。

RBD と P17m の結合界面は、RBD の 24 アミノ酸、P17m の 20 アミノ酸で形成されていた **(Fig. 21、22)**。P17m の CDR1、CDR2、CDR3 はいずれも結合界面に関わっており、中でも CDR3 は P17m のコア領域と RBD の間に挟まれる位置に結合していた。複合体界面の情報探索に用いるツール PISA (https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/)による計算から、RBD/P17m 境界面の全 Buried Surface Area (BSA)値の約 55 %が CDR3 によって形成されていた **(Fig. 22)**。CDR3 による相互作用は Van der Waals (VdW)相互作用に加えて、$Gly100^{P17m}$－$Glu484^{RBD}$、$Arg105^{P17m}$－$Tyr501^{RBD}$、$Asn106^{P17m}$－

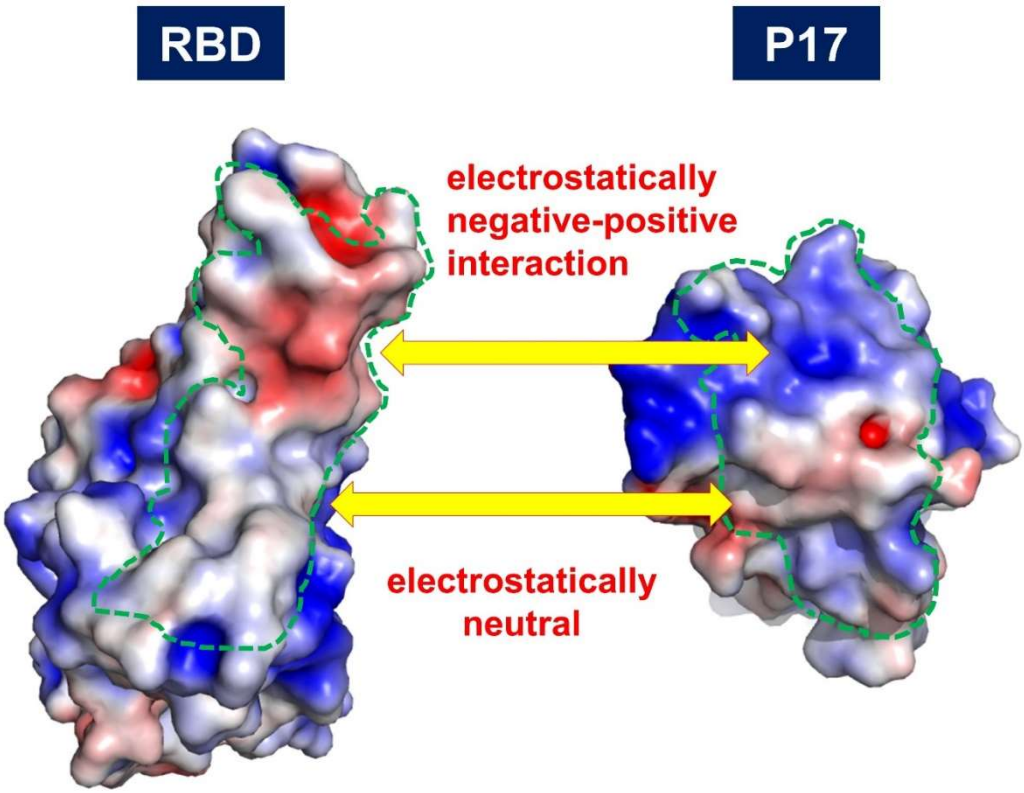


**Fig. 20 RBD と P17m の結合における静電相互作用**

Ser494$^{RBD}$ における直接的な水素結合と、Gly99$^{P17m}$ や Arg105$^{P17m}$ による水を介した水素結合によって形成されていた。さらに、Trp110$^{P17m}$ は Tyr449$^{RBD}$ と π-π スタッキング相互作用を形成していた。また、CDR1 においては Val31$^{P17m}$－Gly482$^{RBD}$、Val31$^{P17m}$－Glu484$^{RBD}$、Asn33$^{P17m}$－Glu484$^{RBD}$ の 3 つの直接的な水素結合によって RBD tip (481-487)と称される RBD のループ構造を安定化させるとともに、Ser30$^{P17m}$ が Thr470$^{RBD}$ 及び Ile472$^{RBD}$ と水分子を介した水素結合を形成していた。CDR2 は、VdW 相互作用によって結合界面の形成に寄与しており、明確な水素結合形成は確認されなかった。CDR とは反対に位置する領域においては、β4 と β5 の間に位置するループ中の Glu44$^{P17m}$ と Gln498$^{RBD}$ との直接的な水素結合が確認された。

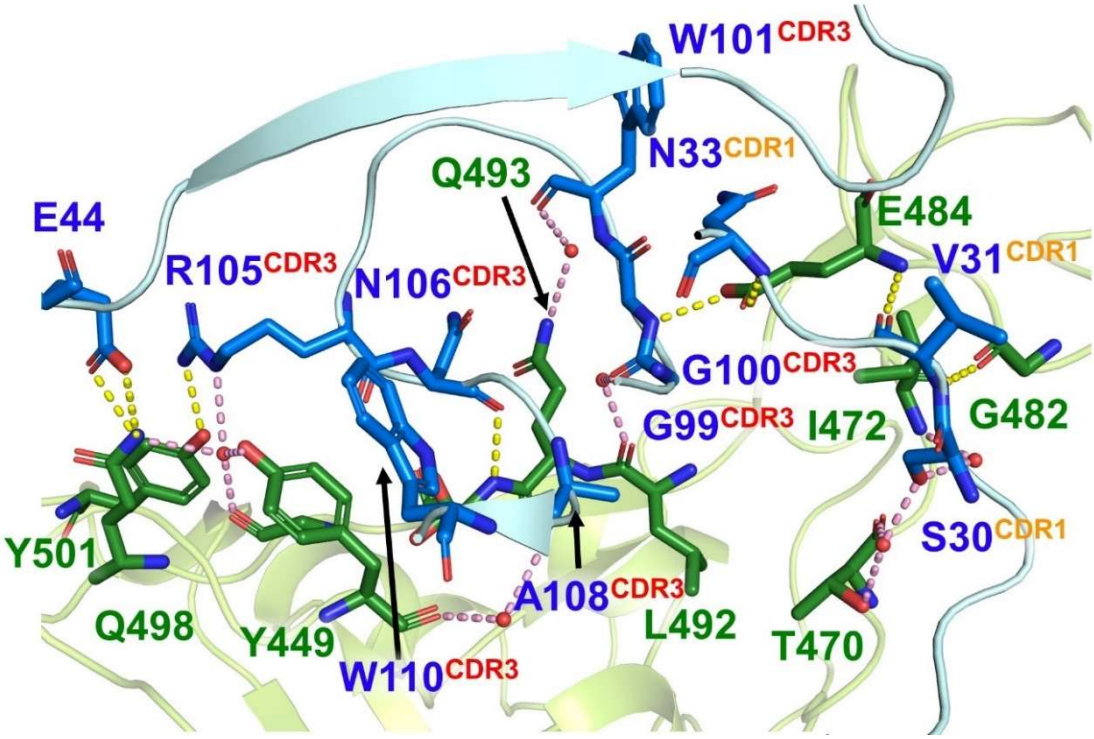


**Fig. 21 RBD/P17m 結合界面の各アミノ酸の相互作用**
リボン表示した RBD (黄緑)及び P17m (水色)上に相互作用にかかわる RBD の残基を濃緑、P17m の残基を濃青で表示した。CDR に含まれる P17m の残基は右肩に CDR 番号を記載。RBD と P17m 間の直接水素結合を黄色点線、水分子を介した水素結合をピンク色点線で表示した。

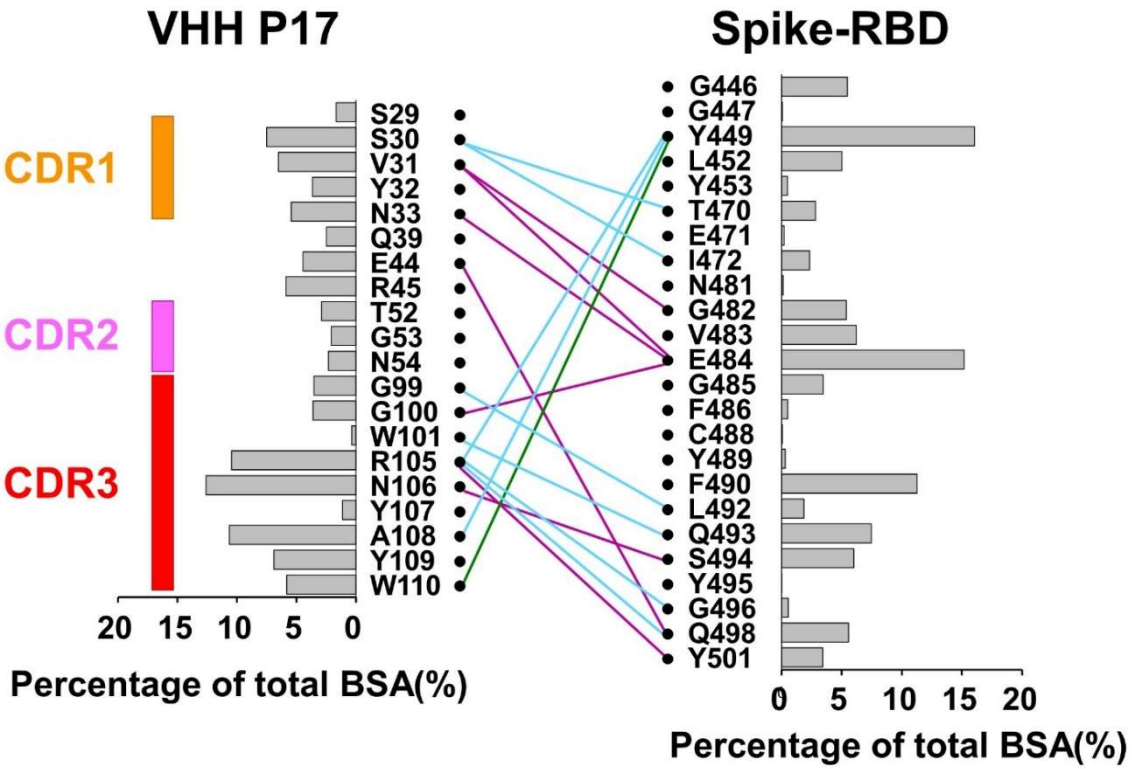


**Fig. 22 RBD/P17m 結合界面を形成するアミノ酸とそれらの BSA に対する寄与率及び相互作用**
紫線で直接水素結合、水色線で水を介した水素結合、緑線で π-π スタッキング相互作用を示す。

## 第四節　S タンパク質三量体に対する P17m の結合モデル

我々は過去に cryo-EM を用いた S タンパク質三量体と P17m の複合体構造解析を検討し、詳細な結合様式の決定には至らなかったものの、S タンパク質上における P17m に相当するマップを確認していた (*24*)。そこで、過去に取得した S タンパク質三量体/P17m 複合体の cryo-EM マップに対して、既知の S タンパク質三量体構造をフィッティングさせ、その RBD に対して本研究で得られた RBD/P17m 複合体構造を重ね合わせることで、本複合体構造が生体内の結合様式を反映しているかを確認した。これまでに取得したデータから、S タンパク質/P17m 複合体における S タンパク質は、3 つの RBD のうち、1 つが up 型、残り 2 つが down 型の 1-up、2-down 型構造と 2-up、1-down 型構造の 2 種のコンフォメーションが混在することがわかっている。そのため、フィッティングには、1-up、2-down 型については、EM databank (EMDB) ID: EMD-32080 のマップ、S タンパク質三量体には PDB ID: 6VSB を使用し、2-up、1-down 型については、EMDB ID: EMD-32081 のマップ、S タンパク質三量体には PDB ID: 6X2B を使用した。作成したモデルから、RBD/P17m 複合体結晶構造における P17m の結合部位は、1-up、2-down 型または 2-up、1-down 型のいずれのコンフォメーションにおいても cryo-EM で得られた P17m のマップと重なる部位であることが明らかとなり、我々が解析した RBD/P17m 複合体構造が生体内の結合様式を反映していることが示された **(Fig. 23)**。 また、本モデルから P17m は up 型または down 型いずれの RBD に対しても、周辺構造との大きな衝突を生じることなく結合可能であることが明らかとなった **(Fig. 24)**。唯一、P17m が up 型 RBD に隣接する down 型 RBD に結合する場合のみ、隣接する RBD とわずかに衝突する位置であったが、生体内において RBD のコンフォメーションは揺らいでおり、それらの揺らぎによって衝突が緩和されていると考えられた。

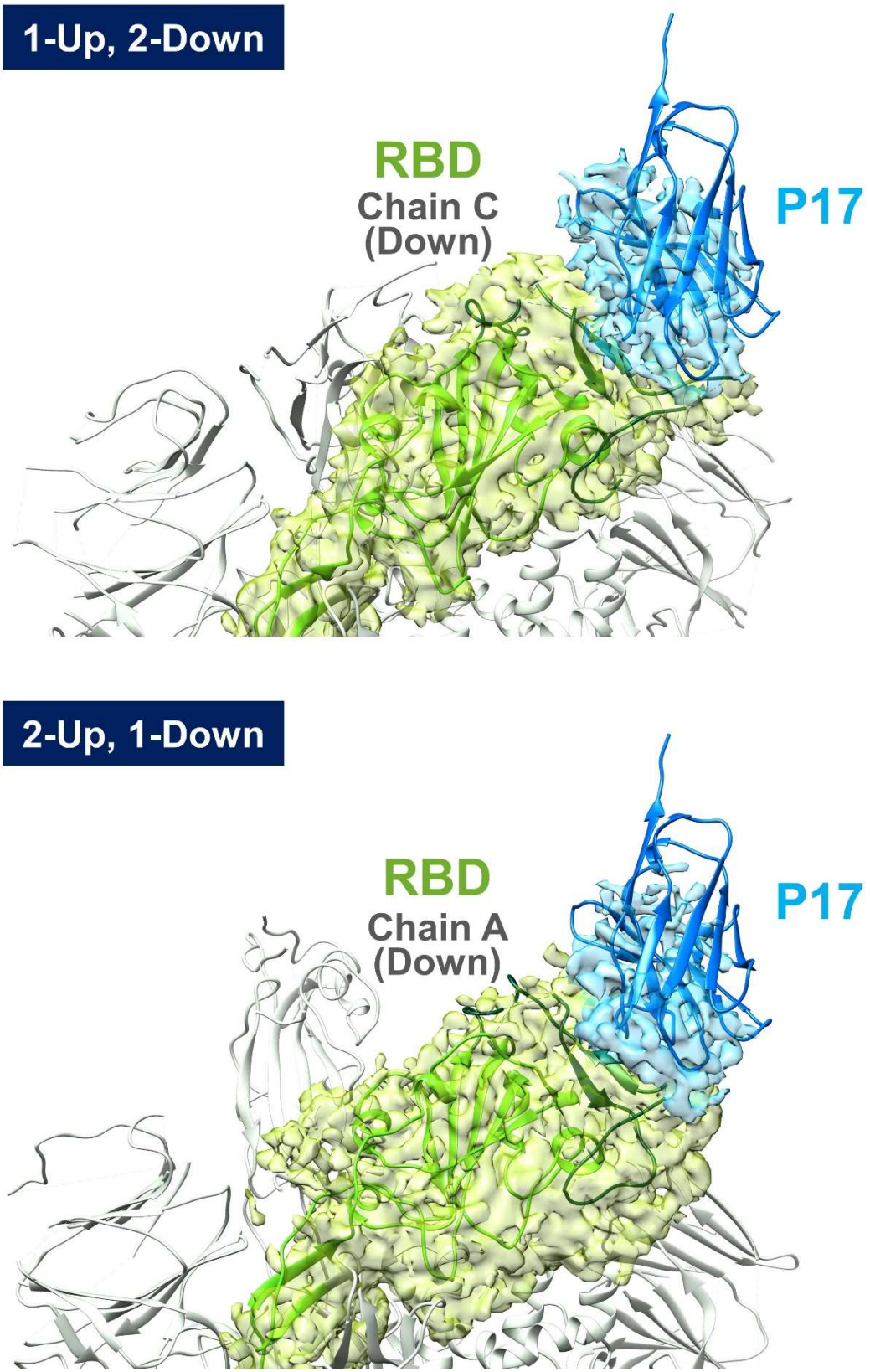


**Fig. 23 cryo-EM マップに対する S タンパク質体及び RBD/P17m 複合体構造のフィッティング**
S タンパク質三量体の内、一つの chain のみ RBD (黄緑)、P17m (青)を示し、その他の領域は灰色で示した。マップは、RBD 及び P17 のみ表示した。 (上段)1-up、2-down 型、PDB ID: 6VSB の Chain C の RBD (down 型)を示した。 (下段) 2-up、1-down 型、PDB ID: 6X2B の Chain A の RBD (down 型)を示した。

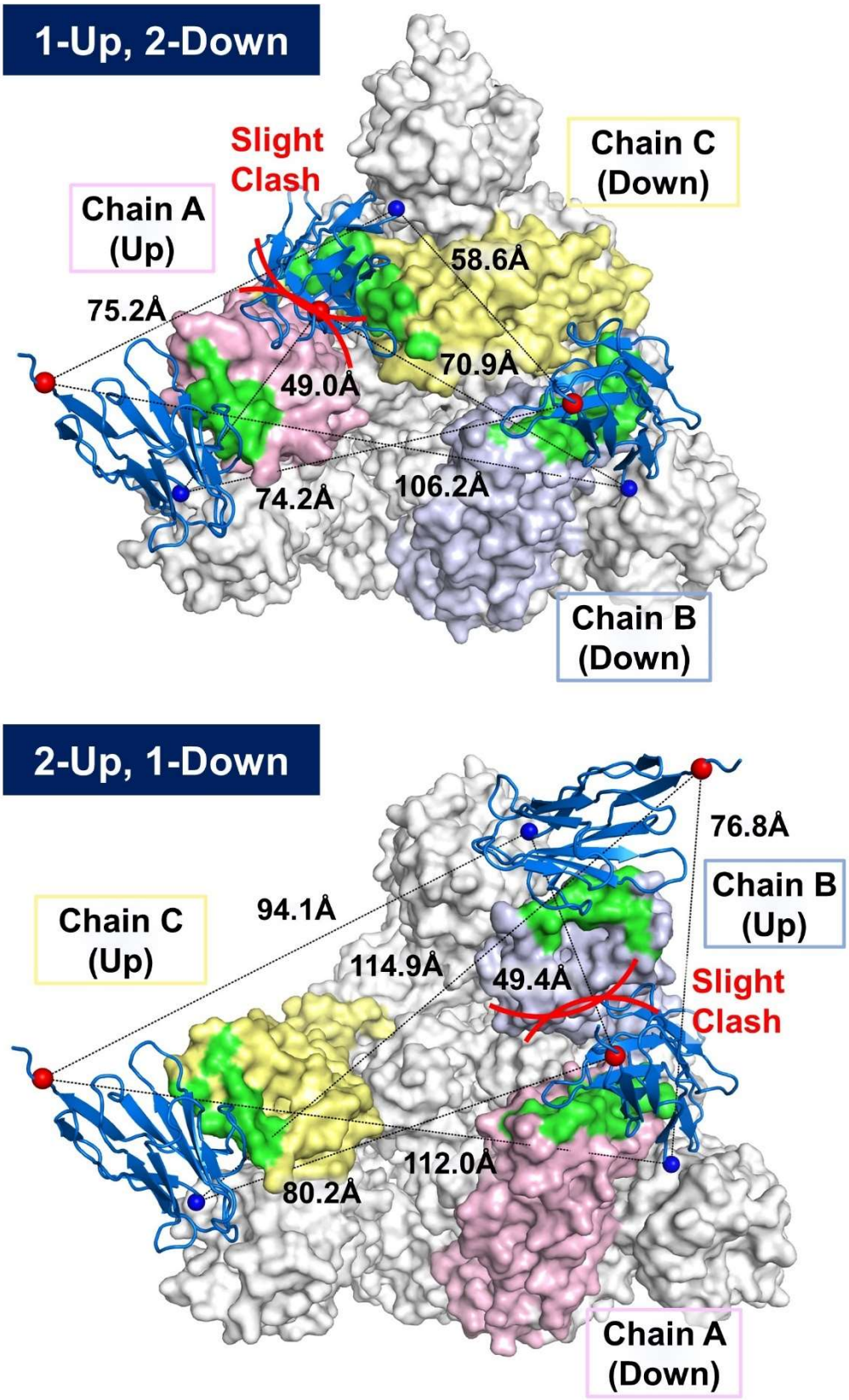


**Fig. 24 S タンパク質の各コンフォメーションに対する P17m の結合モデル**

S タンパク質三量体の各 chain の RBD をそれぞれ chainA:ピンク、chainB:薄青、chainD:黄色で示し、それ以外の領域を灰色で示した。モデルした P17m を濃青、RBD/P17m 結合界面を緑で示した。数字は N 末端－C 末端の距離を示している。

さらに、二量体 VHH である P17d の最適なリンカー長の情報を得るために、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 末端間の距離をそれぞれ計測した **(Fig. 24)**。1-up、2-down 型 S タンパク質においては、chain A (up 型 RBD)に結合する P17m の N 末端と、隣接する chain B (down 型 RBD)に結合する P17m の C 末端の距離は、74.2 Å であった。逆に、chain A に結合する P17m の C 末端と chain B に結合する P17m の N 末端の距離は、106.2 Å であった。同様に、Chain B (down 型 RBD)と chain C (down 型 RBD)に結合する各 P17m の N 末端と C 末端、C 末端と N 末端の距離は、それぞれ 70.9 Å、58.6 Å であり、Chain C と chain A に結合する各 P17m の N 末端と C 末端、C 末端と N 末端の距離は、それぞれ 75.2 Å、49.0 Å であった。2-up、1-down 型においても同様に、各 chain に結合する各々の P17m 間の N 末端と C 末端の距離を測定したところ、chain A (down 型 RBD)と chain B (up 型 RBD)では N 末端－C 末端間：76.8 Å、C 末端－N 末端間：49.4 Å、chain B (up 型 RBD)と chain C (up 型 RBD)では N 末端－C 末端間：94.1 Å、C 末端－N 末端間：114.9 Å、chain C (up 型 RBD) vs chain A (down 型 RBD)は N 末端－C 末端間：80.2 Å、C 末端－N 末端間：112.0 Å であった。

P17d は、$(GGGGS)_4$リンカーでつながれて二量体化されている。先行研究では、$(GGGGS)_3$リンカーの長さが約 57Å であると報告されていることから、$(GGGGS)_4$リンカーの長さは約 76 Å であると推定される (*47*)。前述の計測結果から、2 つの down 型 RBD に結合する P17m の N 末端と C 末端の距離はいずれも 76 Å 以下であり、P17 が 2 つの RBD を同時に認識可能であることが示された。また、up 型と down 型 RBD に結合する P17m の N 末端と C 末端の距離は、1-up、2-down 型及び 2-up、1-down 型のいずれにおいても 76Å 以下になる組合せが存在することから、P17 は up 型と down 型 RBD を同時認識することが可能である。一方で、2 つの Up 型 RBD に結合する P17m の N 末端と C 末端の距離は、どの組合せにおいても 76Å 以上であったことから、P17 は 2 つの up 型 RBD を同時認識できないと考えられる。そのため、$(GGGGS)_4$ よりもさらにリンカー長を長くすることで、2 つの up 型の同時認識だけでなく、ウイルス粒子上の他の S タンパク質の認識によって中和活性を向上させることができると期待される。

## 第五節　Alpha 株 S タンパク質 RBD に対する P17 の結合キネティクス

結晶構造解析に使用した Alpha 株 RBD に対する P17d の結合親和性をバイオレイヤー干渉法(BLI 法)により評価した。本評価は、共同研究者である株式会社 COGNANO の前田良太博士に実験して頂き、データを取得した。

ビオチン化した P17d をストレプトアビジンを担持したセンサーチップにキャプチャーし、濃度 6 点で希釈した Alpha 株 RBD の精製サンプルを用いて、結合キネティクスを測定した。その結果、濃度依存的な結合シグナルの増加が認められた。バックグラウンドを差し引いたセンサーグラムを用いて、1:1 のフィッティングモデルを計算し、平衡解離定数 ($K_D$)を算出した。得られた $K_D$ 値は、0.37 nM **(Fig. 25)**であり、会合速度定数 ($k_{on}$)及び解離速度定数 ($k_{off}$)はそれぞれ $k_{on}$:2.1 × $10^7$ $M^{-1}$・$s^{-1}$ 、$k_{off}$: 3.4 × 10-3 $s^{-1}$ であった。

先行研究では P17d は S タンパク質三量体に対して、$K_D$ 値:0.001 nM 以下の結合親和性を示すことが報告されている (*24*)。本研究で使用した RBD のみに対する $K_D$ 値と比較して S タンパク質三量体に対しては、370 倍以上高い親和性を示していることから、P17d は二量体化によるアビディティ効果を獲得したと考えられる。これは、前述のとおり、P17d が S タンパク質三量体において 2 つの RBD を適切に認識できる適切なリンカー長を有していることに起因すると考えられた。

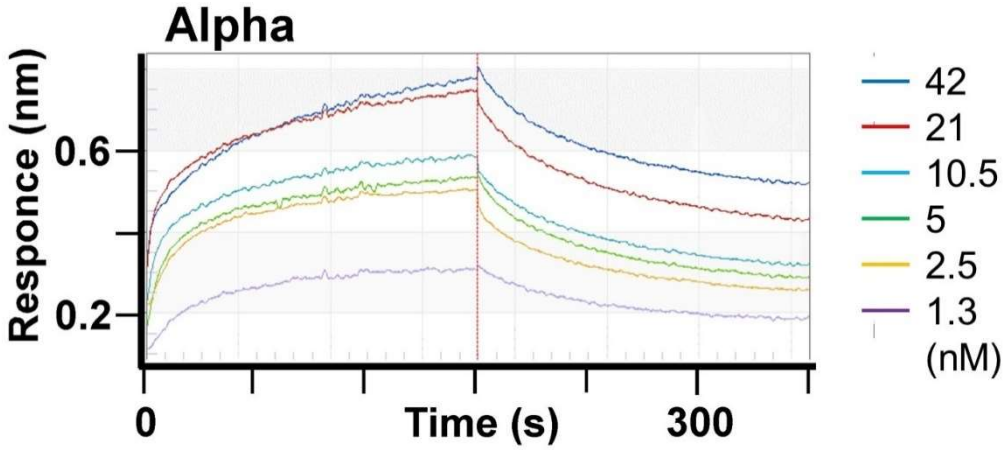


**Fig. 25 SARS-CoV-2 Alpha 株 RBD に対する P17 の結合親和性評価**

## 第六節　P17 の親和性及び中和活性向上に向けた抗体デザイン

適切なリンカー長を設計することによって複数の RBD を同時に認識することでアビディティ効果が期待できることから、三量体化 VHH の作製も更なる中和活性向上に寄与する可能性がある。先行研究では、リンカーを用いて 3 つの VHH を融合した三量体化 VHH や、コラーゲン XVIII の NC1 ドメインのような三量体タンパク質と融合して作製した三量体化 VHH が報告されている (*31, 44, 48*)。P17 においても、本研究で解明された複合体構造が適切なリンカー長の多価抗体作製に貢献できると期待される。

また、第三節で示した、P17 による RBD への結合における CDR1 または β4-β5 間のループのシフトは親和性獲得においてペナルティとなっている可能性がある。先行研究において、抗体とエピトープの結合界面の内部におけるかさ高い置換基を Ala に置換することで、立体反発の低減、周辺残基による静電相互作用の最適化またはエントロピー的に有利なエネルギー獲得につながることが報告されている (*40*)。そのため、P17 における、CDR1 または β4-β5 間のループを構成する $Tyr32^{P17}$ や $Arg45^{P17}$ を Ala 置換することで、隣接する $Phe490^{RBD}$ または $Tyr449^{RBD}$ との衝突を回避でき、親和性向上を達成できると期待される。

## 小括

単量体化 VHH である P17m と Alpha 株 RBD の複合体サンプルを作製し、複合体結晶構造解析に成功した。得られた複合体構造から、P17 による詳細な RBD 認識機構、及び P17 が立体反発により ACE2 の結合を阻害することを明らかにした。また、フリー体 P17m 結晶構造との比較から P17 が RBD との結合によってループ構造を変化させることを明らかにした。さらに、S タンパク質三量体への P17 の結合モデルから、P17d が 2 つの RBD 認識に適切なリンカー長を有することを明らかにした。これらの情報から、RBD への結合時の立体衝突による構造変化を緩和するエントロピー的に有利な変異、P17 のリンカーの改良及び更なる多価抗体の作成アイデアを考案した。

## 第二章　懸念される変異体に対して有効な VHH の設計

### 第一節　P17 の結合界面における懸念される変異株に含まれる変異部位

現在、世界保健機関 (WHO)において VOC に分類されている変異株は Omicron 株である。また、これまでに Alpha 株、Beta 株、Gamma 株及び Delta 株も VOC として分類されていた。これらの VOC では、S タンパク質の RBD においても変異が確認されている **(Table 5)**。先行研究では、これらの変異が中和抗体の活性に影響することが報告されていることから、P17 においてもこれらの変異が結合界面に影響しうるものであるかを前章で得られた複合体構造をもとに解析した。本解析において、Omicron 株については BA.1 株ならびに BA.2 株を対象とした。

| SARS CoV-2 Variant | RBD mutation sites |
|---|---|
| Alpha | N501Y |
| Beta | N501Y/K417N/E484K |
| Gamma | N501Y/K417T/E484K |
| Delta | L452R/T478K |
| Omicron BA.1 | N501Y/K417N/E484A/T478K/G339D/S371L/S373P/S375F/N440K/G446S/S477N/Q493R/G496S/Q498R/Y505H |
| BA.2 | N501Y/K417N/E484A/T478K/G339D/S371F/S373P/S375F/T376A/D405N/R408S/N440K/S477N/Q493R/Q498R/Y505H |

**Table 5 SARS-CoV-2 の VOC において確認されている RBD の変異部位**
各アミノ酸の文字の色は、想定される P17 の親和性へ影響度を示す。緑:親和性への影響が低い、赤:親和性低減が懸念される、灰色:RBD/P17 結合界面から離れている

RBD/P17m 複合体に、これまでに報告されている VOC の変異部位をマッピングしたところ、RBD の Gly446、Leu452、Glu484、Gln493、Gly496、Gln498、Asn501 が P17m との結合界面に含まれていた **(Table 5、Fig. 26)**。Beta 株、Gamma 株、Delta 株、Omicron BA.1 株、Omicron BA.2 株で幅広く変異が報告されている Lys417、Thr478 は、P17m との結合界面から離れた部位に位置していた。

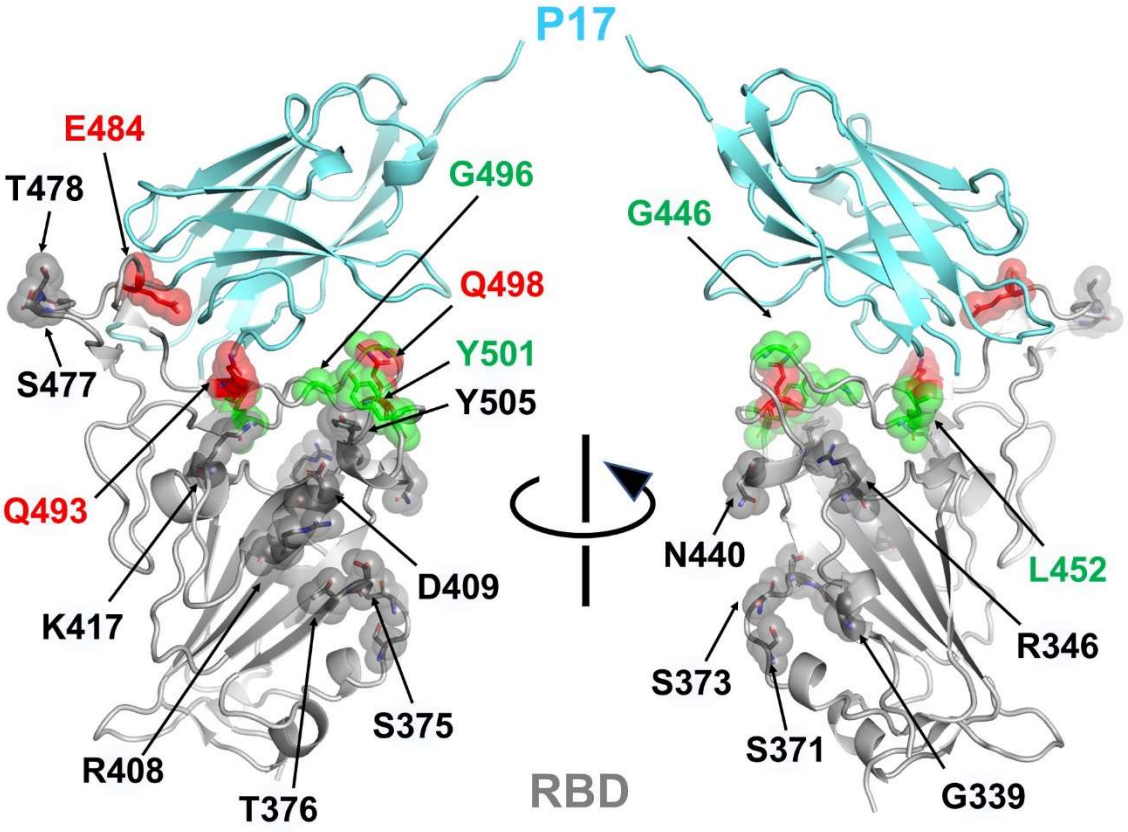


**Fig. 26 VOC で報告されている RBD 変異部位の RBD/P17m 複合体へのマッピング**
Table.1 と同様に、各アミノ酸の文字の色は、想定される P17 の親和性へ影響度を示す。緑:親和性への影響が低い、赤:親和性低減が懸念される、灰色:RBD/P17 結合界面から離れている

Asn501 は、Delta 株を除く VOC で Tyr への変異が報告されている **(Table 5)**。今回構造解析に使用した RBD が Alpha 株であったことから、変異によって導入された Tyr501 が $Arg105^{P17}$ と水素結合を形成することが明らかとなった **(Fig. 27)**。そのため、Asn501Tyr の変異は P17 にとって、相互作用に獲得に有利な変異であると考えられる。P17 は、Asn501 を有する中国武漢で確認されたオリジナル株に対しても中和活性を示すことが報告されており、Asn501 であったとしても相互作用可能であると推察される (*24*)。$Asn501^{RBD}$ である場合、$Arg105^{P17}$ との距離は約 5.3Å であると推定されることから、水分子を介した水素結合によって相互作用していると考えられる。

Leu452 は、P17m との VdW 相互作用を形成するとともに、周辺残基の Phe351$^{RBD}$、Asn450$^{RBD}$ に囲まれた領域に位置していたが、側鎖の一部は溶媒領域に露出していた **(Fig. 27)**。VOC の中で、Delta 株のみ Leu452 に対して、かさ高い側鎖を有する Arg への変異が報告されているが、P17 は Delta 株に対して中和活性を維持することが示されている **(Table 5)** (*24*)。これは、かさ高い側鎖が溶媒領域に伸長できる経路が存在することで Arg との立体反発を回避でき、その結果中和活性を維持していると考えられる。

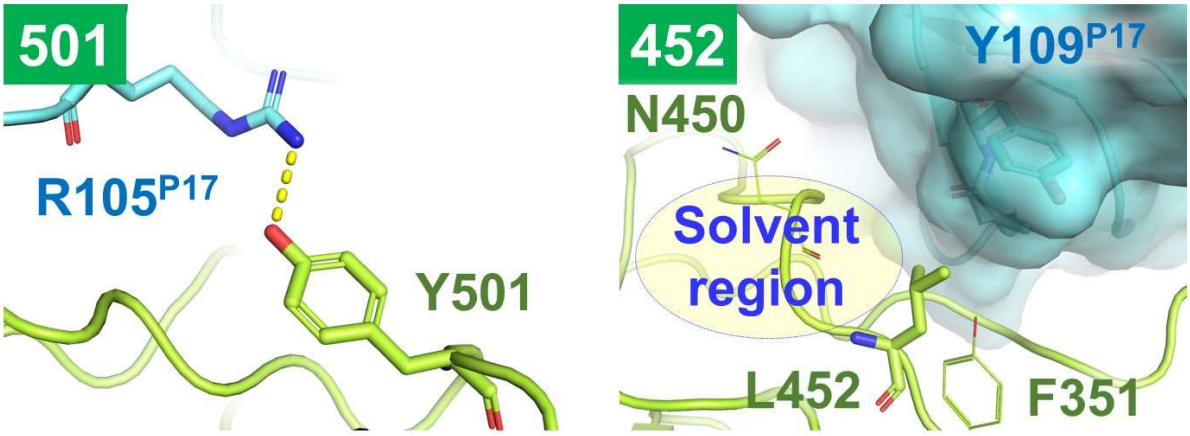


**Fig. 27 P17 と Tyr501(左)と Leu452(右)との相互作用様式**

Glu484 は、Asn33$^{P17}$ 及び Gly99$^{P17}$ の主鎖 N 原子と 2 つの水素結合を形成していた **(Fig. 28)**。さらに、Glu484 の側鎖は RBD の周辺残基や P17m のアミノ酸残基に囲まれていた。Glu484 は全 BSA の約 15%を占めていることから、VdW 相互作用による親和性獲得にも寄与していると考えられる **(Fig. 22)**。Beta 株や Gamma 株で報告されている Glu484Lys 変異は、これらの水素結合を消失させるとともに、Lys 側鎖の正電荷と Asn33$^{P17}$ 及び Gly99$^{P17}$ の主鎖 N 原子との静電的な反発を生じさせると考えられる。実際に、Alpha 株と Beta 株 RBD のタンパク質表面電荷を確認すると Alpha 株 RBD で負電荷を帯びていた Glu484 周辺は、Beta 株 RBD では Lys484 により正電荷を帯びていた **(Fig. 29)**。また、BA.1 株や BA.2 株で報告されている Glu484Ala 変異は同様に水素結合を消失させるとともに、分子量が小さい側鎖への置換によって Glu の側鎖が獲得していた VdW 相互作用を低減させると考えられる。そのため、Glu484 への変異導入は、P17 の親和性を大きく低減させると考えられた。

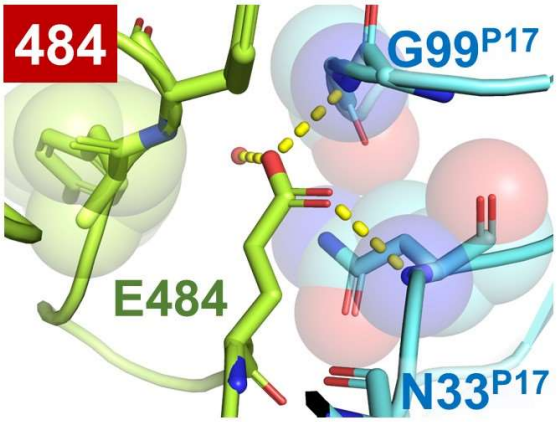


**Fig. 28 P17 と Glu484 との相互作用様式**

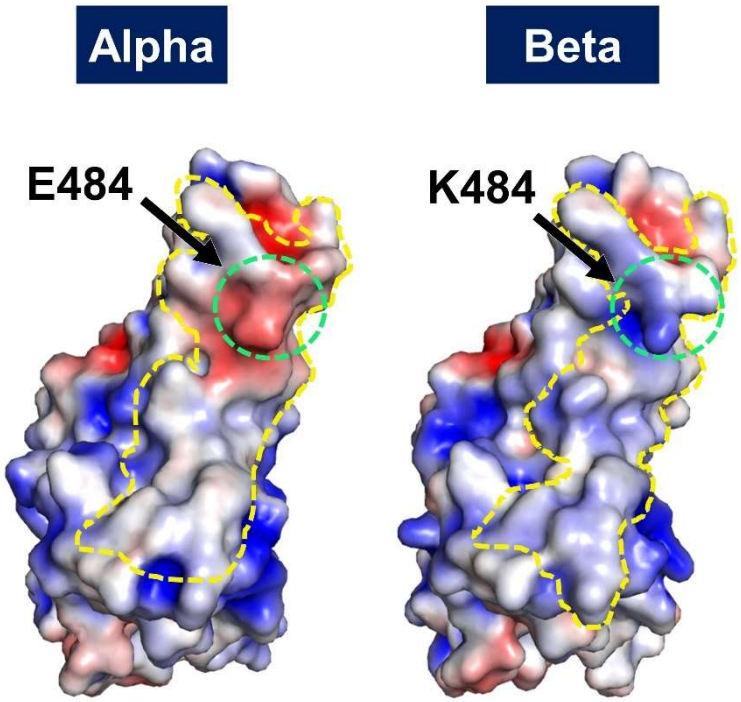


**Fig. 29 Glu484Lys 変異による RBD 表面電荷の変化**
Alpha 株には本研究で解析した結晶構造、Beta 株には PDB ID：7EKG を使用した。黄色破線で P17m の結合界面を示した。

Gln493 は Asn106$^{P17}$ と VdW 相互作用を形成し、Gln498 は Glu44$^{P17}$ と水素結合を形成していた **(Fig. 30)**。Omicron BA.1 株や Omicron BA.2 株では、Gln493 及び Gln498 において Arg への変異が報告されている **(Table 5)**。Arg498 は、かさ高い側鎖が Glu44$^{P17}$ と立体反発を生じると考えられ、形成していた水素結合を失うことで、親和性低減につながると考えられる。一方、Arg493 は、隣接する Asn106$^{P17}$ と平行方向に伸長すると予想されるため、親和性に影響はないと思われた。し

かし、Alpha 株と Omicron BA.1 株 RBD のタンパク質表面の静電ポテンシャルを比較すると、Alpha 株 RBD において中性電荷であった領域が、Omicron BA.1 株 RBD では正電荷領域に変化していることが判明した **(Fig. 31)** (*49*)。これらの電荷の変化は、Gln493 と Gln498 が Arg に変異した影響によるものであり、それに伴って P17 の正電荷領域と反発し、Alpha 株 RBD との間に獲

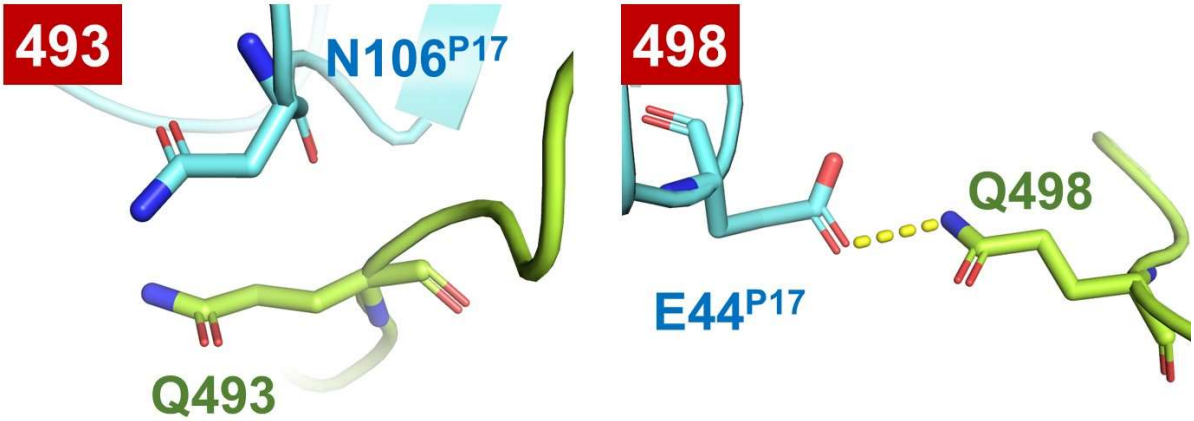


**Fig. 30 P17 と Gln493 及び Gln498 との相互作用様式**

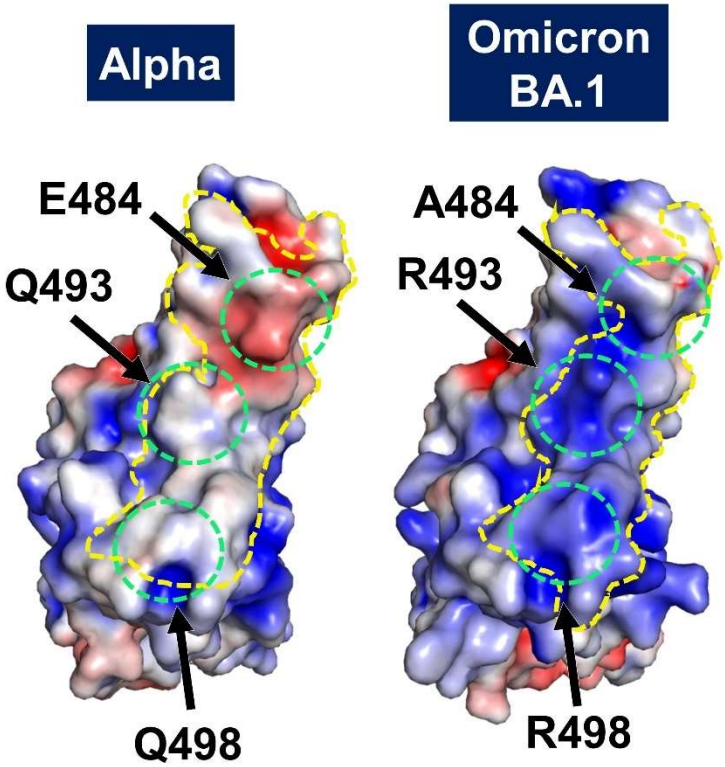


**Fig. 31 Gln493Arg 及び Gln498Arg 変異によるタンパク質表面電荷の変化**
Alpha 株には本研究で解析した結晶構造、Omicron BA.1 株には PDB ID：7TN0 を使用した。
黄色破線で P17m の結合界面を示した。

得していた静電相互作用が消失すると考えられた。

Gly446 と Gly496 は、P17 と VdW 相互作用を形成していた **(Fig. 32)**。Omicron BA.1 株では、Gly446 及び Gly496 において Ser への変異が報告されている **(Table 5)**。Gly446 及び Gly496 と P17 の間には、わずかな隙間が存在している。そのため、Ser への置換はそれらの隙間を占有することで、新たな VdW 相互作用の獲得につながるかもしれない。一方、Gly496－P17 間の隙間は Gly448－P17 間の隙間よりも広いため、VdW 相互作用の寄与は小さい可能性がある。

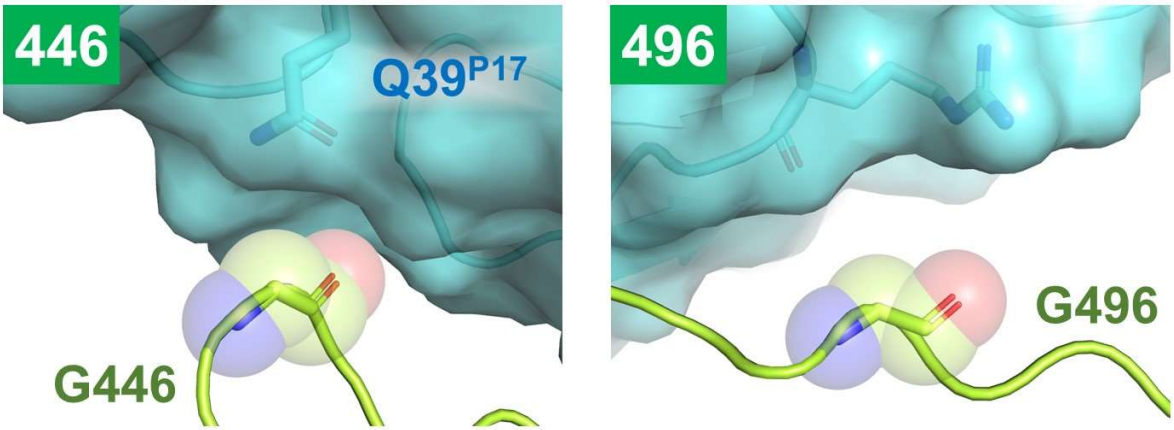


**Fig. 32 P17 と Gly446(左)及び Gly496(右)との相互作用様式**

## 第二節　各種 VOC の S タンパク質 RBD に対する P17 の結合キネティクス

前節で解析に用いた種々の VOC の S タンパク質 RBD に対する P17d の結合親和性を、バイオレイヤー干渉法 (BLI 法)により評価した。本評価は、第一章第五節と同様に共同研究者である株式会社 COGNANO の前田良太博士に実験して頂き、データを取得した。

ビオチン化した P17d をストレプトアビジンを担持したセンサーチップにキャプチャーし、濃度 6 点で希釈した Beta 株、Gamma 株、Delta 株、Omicron BA.1 株ならびに Omicron BA.2 株の RBD の精製サンプルを用いて、結合キネティクスを測定した。その結果、Delta 株の RBD のみ、濃度依存的な結合シグナルの増加が認められた。バックグラウンドを差し引いたセンサーグラムを用いて、1:1

のフィッティングモデルを計算し、Delta 株 RBD の平衡解離定数 ($K_D$)を算出した **(Fig. 35)**。得られた $K_D$ 値は、0.87 nM であり、会合速度定数 ($k_{on}$)及び解離速度定数 ($k_{off}$)はそれぞれ $k_{on}$: $1.1 \times 10^7$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$、$k_{off}$; $5.1 \times 10^{-3}$ $s^{-1}$ であった。

Beta 株及び Omicron BA.1 株 RBD については、弱い結合が観察されたものの、結合が非常に弱いため $K_D$ 値を算出することができなかった **(Fig. 33、36)**。また、Gamma 株及び Omicron BA.2 株 RBD については、結合が確認できず、バックグラウンドノイズのみ観察された **(Fig. 34、37)**。

本節における結果ならびに第一章第五節の結果から、Alpha 株及び Delta 株で報告されている変異は P17 の結合能に影響しないが、Beta 株、Gamma 株、Omicron BA.1 株、Omicron BA.2 株で報告されている変異は、P17 の結合能を著しく低下させることが示された。先行研究では、P17d は SARS-CoV-2 Alpha 株及び Delta 株に対して強力な中和活性を示すものの、Beta 株に対しては中和活性を示さないことが報告されており、本キネティクス評価は先行研究の結果と一致していると言える (*24*)。

Omicron BA.1 株 RBD と Omicron BA.2 株 RBD は、いずれも $K_D$ 値を算出できない程度まで親和性が低下していたものの、Omicron BA.1 株ではわずかに結合が確認され、Omicron BA.2 株では全く結合が確認されなかった。P17 との結合界面における Omicron BA.1 株と Omicron BA.2 株の違いは、Gly446Ser 及び Gly496Ser 変異の有無である **(Table 5)**。わずかに P17d の結合が見られた Omicron BA.1 株 RBD だけが Gly446Ser 及び Gly496Ser 変異を有していることから、これらの変異によって獲得できると想定される VdW 相互作用は、親和性維持に寄与する可能性がある。

一方、Beta 株 RBD と Gamma 株 RBD においても、Beta 株はわずかな結合が見られたものの、Gamma 株は全く結合が確認されないという差が見られた。これらの変異株が有する変異は、Lys417Asn (Beta 株)と Lys417Thr (Gamma 株)が異なるのみである **(Table 5)**。前述のとおり、Lys417 は P17 との結合界面から離れた領域に位置しているため、これらの変異が親和性に直接影響する可能性は低い **(Fig. 38)**。そのため、これらの変異株 RBD で見られた挙動の違いは、Asn (Beta 株)または Thr (Gamma 株)の違いによる間接的なタンパク質のダイナミクスの変化が影響している可能

性がある。このようなダイナミクスの違いは分子動力学法 (MD 法)によるシミュレーションで考察できると考えられ、シミュレーション時間内における相互作用形成確率の違いを利用した VHH の改変案の提案にも応用できるかもしれない。また、自由エネルギー摂動法 (FEP 法)を適用できれば、フリー体 VHH と RBD の自由エネルギーと RBD/VHH 複合体の自由エネルギーの差から、親和性を予測できると考えられる (*50*)。本手法により、改変型 VHH 変異体におけるダイナミクスを考慮した親和性の見積もりも可能となるかもしれない。

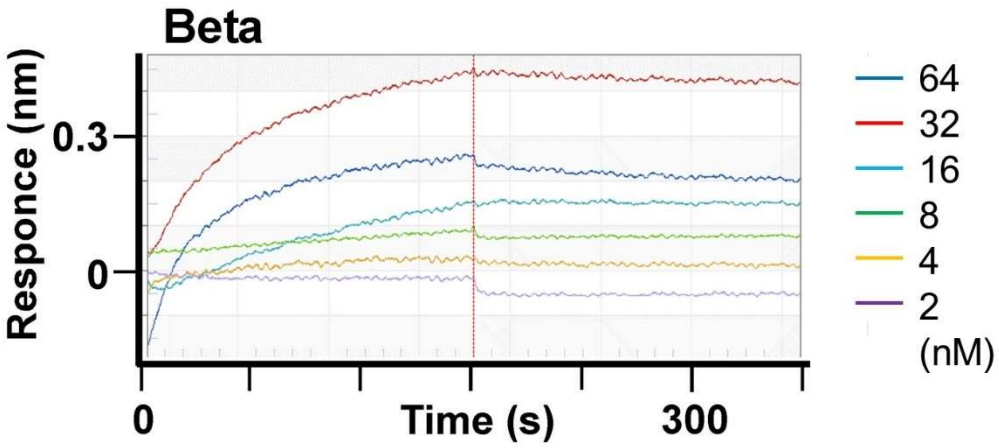


**Fig. 33 SARS-CoV-2 Beta 株 RBD に対する P17 の結合親和性評価**

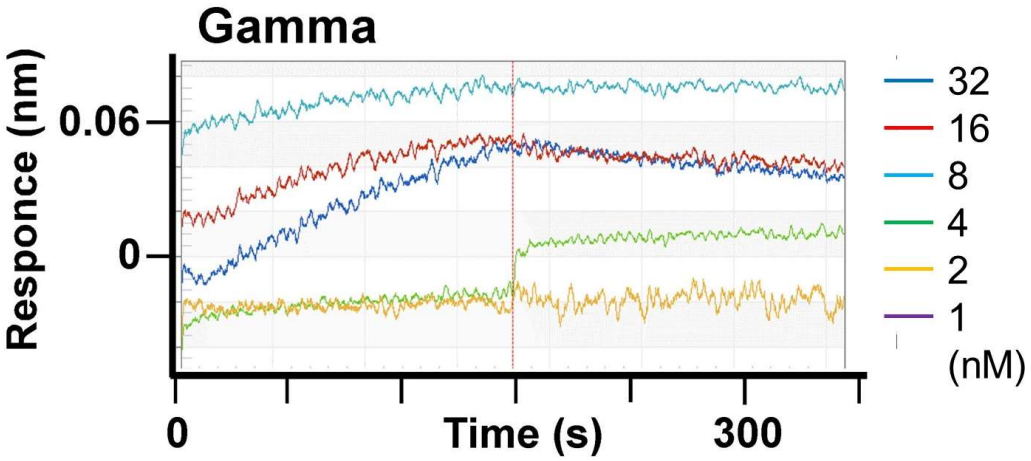


**Fig. 34 SARS-CoV-2 Gamma 株 RBD に対する P17 の結合親和性評価**

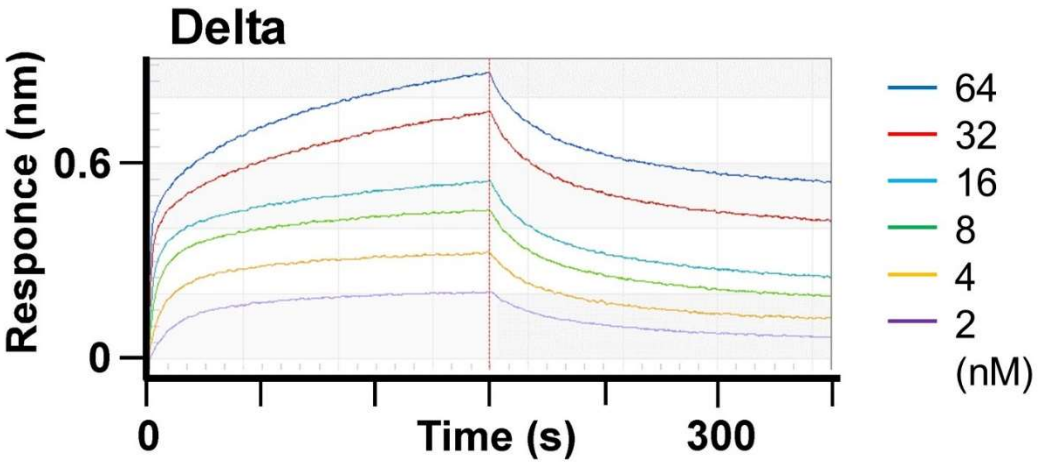


**Fig. 35 SARS-CoV-2 Delta 株 RBD に対する P17 の結合親和性評価**

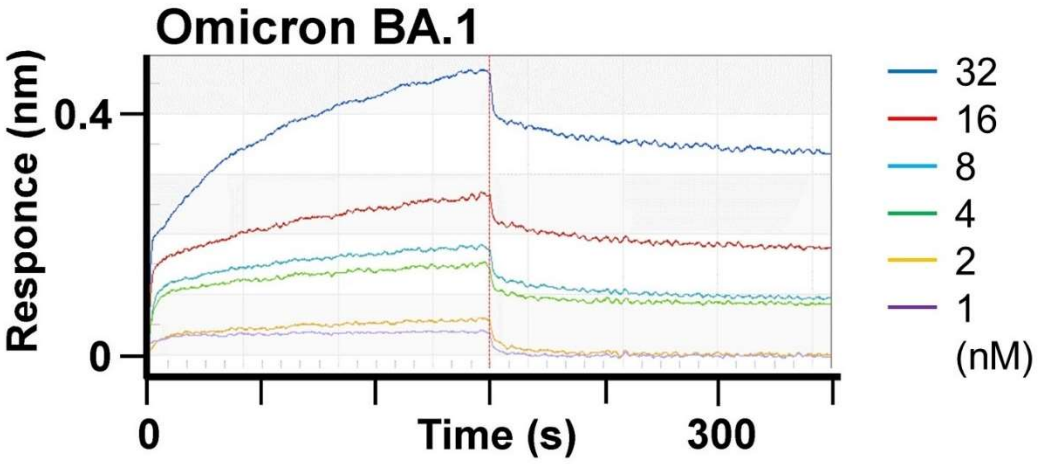


**Fig. 36 SARS-CoV-2 Omicron BA.1 株 RBD に対する P17 の結合親和性評価**

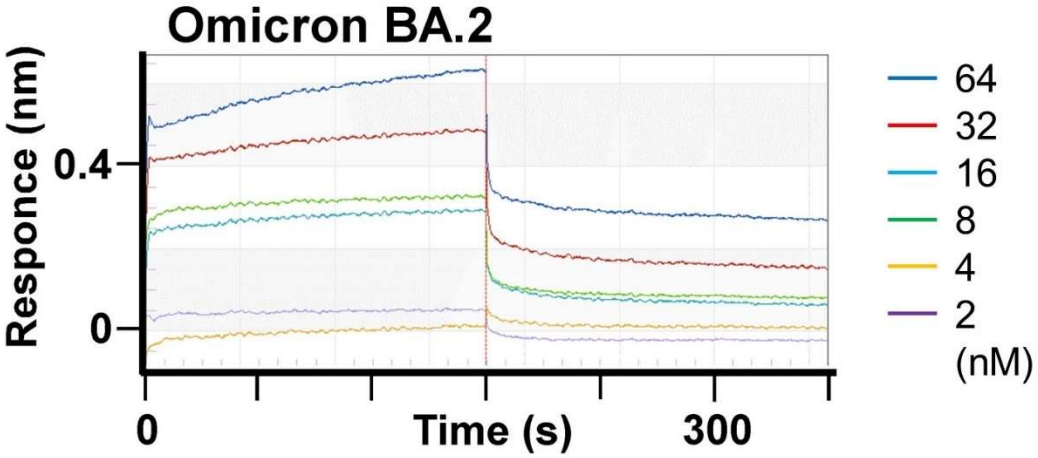


**Fig. 37 SARS-CoV-2 Omicron BA.2 株 RBD に対する P17 の結合親和性評価**

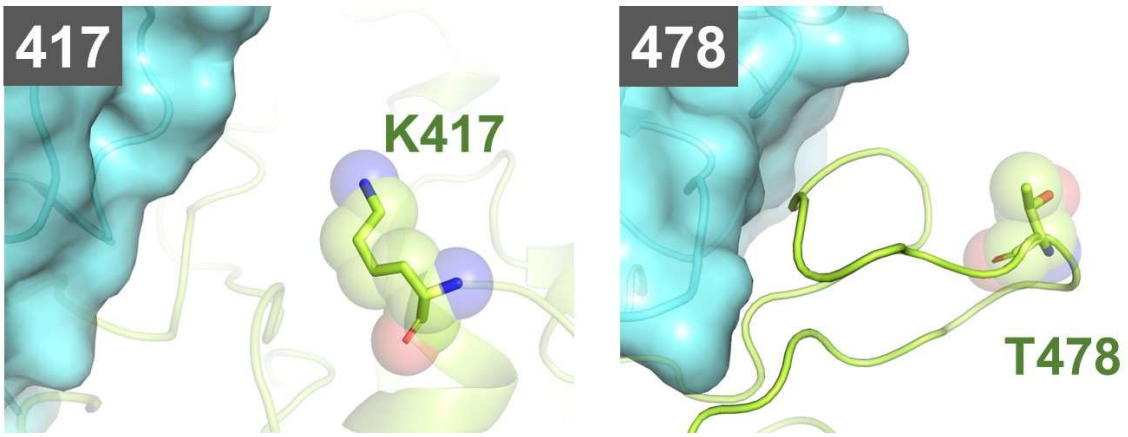


**Fig. 38 P17 の結合界面から離れた部位に位置する Lys417 及び Thr478**

## 第三節　**Omicron** 株への有効性を示すための抗体デザイン

現在、世界的に最も流行し、VOC に分類されている Omicron 株に対する有効性を獲得するために必要な、抗体デザインを行った。これまでの検討結果から、Glu484Ala による水素結合、VdW 相互作用の低減及び Gln493Arg、Gln498Arg によって形成される正電荷領域に対処することが、P17 が親和性を維持するために重要であると考えられる。

Ala484 は Glu よりも側鎖の分子量が小さいことから、P17 との結合界面に余剰の空間を残すことになるため、それらの空間を占有することで親和性獲得が期待できる。隣接する $Asn33^{P17}$ から Ala484 方向に側鎖が伸長可能と考えられる。例えば、Val、Leu、Ile といった疎水性アミノ酸を導入することで Ala484 との VdW 相互作用を獲得できるかもしれない **(Fig. 39)**。また、Phe、Tyr、Trp といった芳香族を持つアミノ酸を導入することで、Ala484 との CH-π 相互作用の獲得も期待できる **(Fig. 40)**。一方、これらのアミノ酸の導入は Ala484 と近接しすぎる可能性が懸念されることから、P17 変異体を作製後、結合実験にて評価する必要がある。

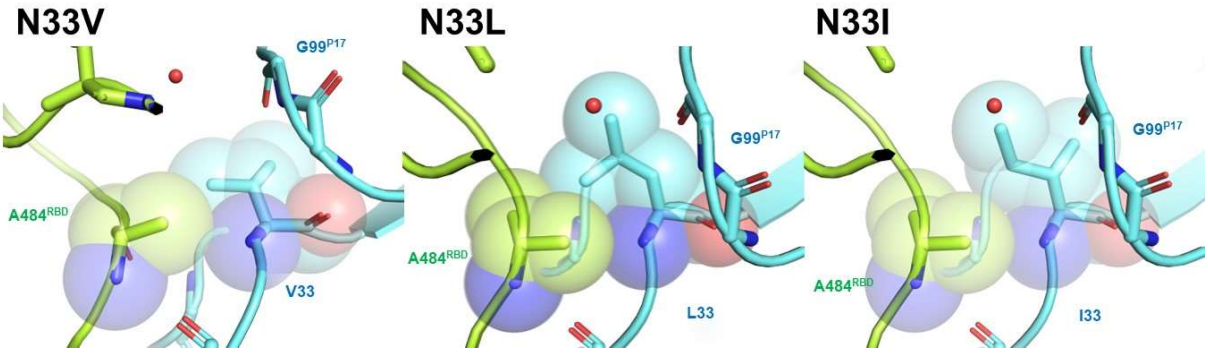


**Fig. 39 Ala484 との相互作用形成のための疎水性アミノ酸の導入モデル**
本研究で解析した RBD/P17m 複合体を基に、PyMOL を用いたアミノ酸置換により、RBD の Ala484 変異及び P17m のアミノ酸番号 33 番の変異体モデルを作成した。

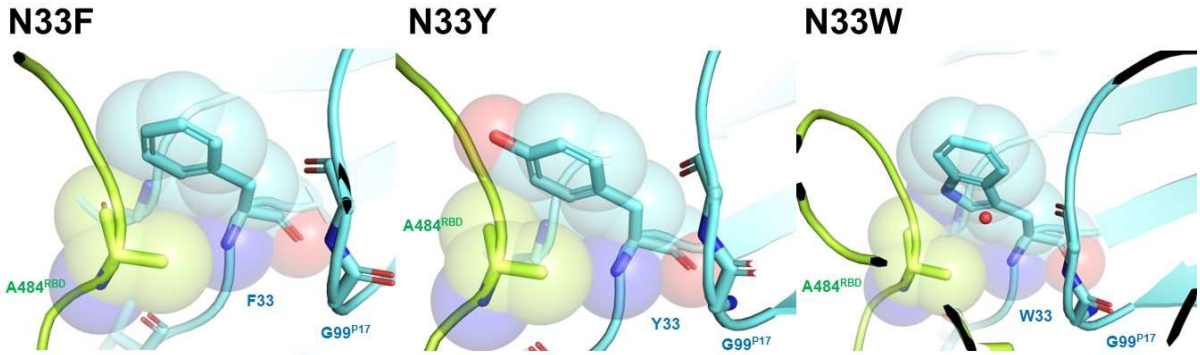


**Fig. 40 Ala484 との相互作用形成のための芳香環を有するアミノ酸の導入モデル**
Fig. 39 と同様に本研究で解析した RBD/P17m 複合体を基に、PyMOL を用いたアミノ酸置換により、RBD の Ala484 変異及び P17m のアミノ酸番号 33 番の変異体モデルを作成した。

Gln493$^{RBD}$、Gln498$^{RBD}$ に隣接する P17 のアミノ酸を改変することで、Arg によって形成される正電荷領域の中和を図ることができると期待される。例えば、Asn106$^{P17}$ を酸性アミノ酸である Asp や Glu に置換することで Gln493Arg の正電荷を中和できると期待される。さらに、Glu44$^{P17}$ を Asp に置換することで、Gln498Arg のかさ高い置換基による立体反発を回避しつつ、適切な配置で Arg と塩橋を形成できると考えられる。

今回得られた知見に関しては、Omicron 株だけでなく、今後出現する恐れがある新たな変異株に対しても応用できると期待される。立体反発の回避、相互作用獲得 (疎水性相互作用・水素結合など)、静電相互作用の獲得といった相互作用に関する知見については、新たな変異株における S タ

ンパク質の配列情報を取得できれば、応用可能であろう。また、新たな変異株においても S タンパク質三量体の up 型と down 型の相対位置は同様であると考えられるため、リンカー長に関する知見や、三量体タンパク質と融合した三価 VHH を作成するための S タンパク質三量体における各 RBD の相対配置に関する知見は同様に応用可能と考えられる。また、アルパカに免疫することで、新規の VHH を取得可能ではあるが、アルパカへの免疫からクローン選抜までは約 2 か月の期間を要する。その一方で、変異導入による改変を行う場合には、約 1 か月で改良型 VHH を取得可能である。そのため、本研究の手法を改良することで、今後出現する恐れがある新たな変異株に対してもより迅速に対処できると期待される。

## 小括

SARS-CoV-2 の VOC 変異株において報告されている S タンパク質の変異のうち、RBD/P17m 結合界面に存在する変異を明らかにした。

RBD/P17m 複合体の詳細な解析及び BLI を用いた結合キネティクス評価を組み合わせた解析により、Glu484、Gln493、Gln498 への変異が P17 の結合活性低下に大きく寄与することを明らかにした。

上記の知見を基に、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占有による相互作用獲得、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に P17 の適切な部位への酸性アミノ酸導入、を指向した抗体改変アイデアを考案した。

# 総括

SARS-CoV-2 Alpha 株 RBD と単量体化 P17 の複合体構造を解明し、抗体改変に寄与する下記の知見を明らかにした。

・RBD と P17 の詳細な相互作用様式及び RBD との結合に伴う P17 の構造変化

・P17 は S タンパク質中の 2 つの RBD を同時認識可能なリンカー長を有する

・VOC の S タンパク質における、Glu484、Gln493、Gln498 への変異が P17 の親和性に大きく影響する

これらの知見に基づき、下記の P17 改変案を考案した。

・RBD との立体反発低減のためのかさ高いアミノ酸への Ala 導入

・2-Up RBD 同時認識のための現行よりも長いリンカーの導入

・S タンパク質の 3 つの RBD 同時認識のための三量体タンパク質と P17 の融合発現

・Omicron 株への有効性獲得に向けた疎水性アミノ酸導入による Ala484 との相互作用獲得及び酸性アミノ酸導入委夜 Arg493、Arg498 との静電相互作用獲得

# 謝辞

本研究を行うにあたり、終止にわたり熱心にご指導、ご鞭撻頂きました大阪大学大学院薬学研究科 井上 豪 教授に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、ご指導、ご鞭撻頂きました大阪大学大学院薬学研究科 淺原 時泰 准教授、福田 庸太 助教ならびに森口 舞子 助教に心より感謝致します。

本論文を審査して頂き、御助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 小比賀 聡 教授ならびに青山 浩 准教授に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、細胞実験において大変親切にご指導、ご鞭撻頂きました大阪大学微生物病研究所 渡辺 登喜子 教授ならびに安齋 樹 助教に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、結合実験においてご指導、ご鞭撻頂きました株式会社 COGNANO 伊村 明浩 博士ならびに前田 良太 博士に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、有益なるご指導、ご鞭撻頂きました京都大学大学院医学研究科 高折晃史 教授に心より感謝致します。

本研究の高輝度光科学研究センターBL44XU 及び BL41XU での回折データ測定の際にお世話になりました大阪大学蛋白質研究所 中川 敦史 教授、山下 栄樹 准教授、吉村 政人 准教授、櫻井 啓介 先生ならびに BL41XU のスタッフの皆様に心より感謝申し上げます。

最後に、会社員生活と学生生活を両立している間、休日をほとんど不在にしていたにもかかわらず温かくサポートしてくれた家族に心より感謝致します。

# 実験の部

## SARS-CoV-2 RBD の発現・精製

SARS-CoV-2 Alpha 株、Beta 株、Gamma 株ならびに Delta 株の S タンパク質の RBD (アミノ酸番号 333 番から 530 番)の遺伝子を pcDNA3.1 (+)ベクターにクローニングした。この際、RBD の N 末端には、インターロイキン-2 (IL-2)の分泌シグナル配列 (ILco2: MYRMQLLSCIALSLALVTNS)、C 末端には 8×His のポリヒスチジンタグを付加した。オミクロン BA.1 株及び BA.2 株の RBD については、Alpha 株 RBD の発現プラスミドに点変異を導入して作成した。また、BA.1 株及び BA.2 株の RBD の発現プラスミドについては、ILco2 シグナル配列に代わり、S タンパク質のシグナル配列 (MFVFLVLLPLVSTNLCPFGE)を導入した。構築したプラスミドを大腸菌 DH5α 株に形質転換し、100 μg/mL のアンピシリンを含む LB 培地寒天プレートに播種した。得られたシングルコロニーを 100 μg/mL のアンピシリンを含む 100 mL LB 培地を用いて、170 rpm、37 ℃で終夜培養し、得られた菌体を回収した。回収した菌体から、PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Thermo 製)を用いてトランスフェクション用プラスミドを抽出した。

HE400AZ 培地 (Gmep, Inc.製)を用いて $3.0\times10^{6}$ cell/mL に培養した Expi293-F 細胞 (Thermo 製)に対して、抽出したプラスミド及び Gxpress 293 Transfection Kit (Gmep 製)のトランフェクション試薬を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後、終夜 37 ℃、150 rpm で細胞を振盪した後、Gxpress 293 Transfection Kit のエンハンサー試薬を添加した。その後、31 ℃、150 rpm で 5 日間振盪培養した培養液を遠心分離し、培養上清を回収した。

得られた培養上清に 20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl を含むバッファーで平衡化した Ni-NTA superflow resin (QIAGEN 製)を添加した。培養上清をスターラーを用いて緩やかに 1 時間撹拌した後、カラムに添加してレジンを回収した。その後、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、20 mM imdazole を含むバッファーをレジンの 10 倍量添加し、レジンを洗浄した。この操作を 2 回行った。その後、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、350 mM imdazole を含むバッファーをレジンの 5 倍量添加し、目的タンパク質を回収した。さらに、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl を含

むバッファーで平衡化した 10/300 superdex200 increase カラム (Cytiva 製)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを行い、目的タンパク質を含む画分を回収した。

**P17m の発現・精製**

単量体化した VHH P17 (P17m)の遺伝子を pMES4 ベクターにクローニングした。この際、P17m の N 末端には、PelB シグナル配列 (MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA)、C 末端には 6×His のポリヒスチジンタグを付加した。構築したプラスミドを大腸菌 DH5α 株に形質転換し、100 μg/mL のアンピシリンを含む LB 培地寒天プレートに播種した。得られたシングルコロニーを 100 μg/mL のアンピシリンを含む 100 mL LB 培地を用いて、170 rpm、37℃で終夜培養し、得られた菌体を回収した。回収した菌体から、タンパク質発現用プラスミドを抽出した。得られたプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3)株に形質転換し、100 μg/mL のアンピシリンを含む LB 培地寒天プレートに播種して得られたコロニーを用いて、170 rpm、37 ℃で終夜前培養を行った。全培養液を 100 μg/mL のアンピシリンを含む LB 培地に播種し、170 rpm、37 ℃で振盪培養を行い、$OD_{600}$ 値が 0.6 に達したことを確認後、終濃度 1 mM の isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG)を添加した。その後、4 時間振盪培養を継続した後、6000×g で 30 分間遠心分離した細胞ペレットを回収した。

得られた回収を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)、0.68 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、0.5 M sucrose 及び benzonase を含むバッファーで懸濁した。ペリプラズム画分を抽出するために、2 倍量の 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)を添加し、スターラーを用いて 1 時間緩やかに攪拌した。攪拌後、20000×g で 10 分間遠心分離した上清を回収し、0.45 μm のフィルターに通して夾雑物を除去した。

得られたサンプルに 20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl を含むバッファーで平衡化した Ni-NTA superflow resin (QIAGEN 製)を添加した。スターラーを用いて緩やかに 1 時間撹拌した後、カラムに添加してレジンを回収した。その後、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、20 mM imdazole を含むバッファーをレジンの 10 倍量添加し、レジンを洗浄した。この操作を 2 回行った。そ

の後、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、350 mM imdazole を含むバッファーをレジンの 5 倍量添加し、目的タンパク質を回収した。さらに、20 mM Tris-HCl (pH8.0)、150 mM NaCl を含むバッファーで平衡化した Hiload 16/60 superdex75 カラム (Cytiva 製)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを行い、目的タンパク質を含む画分を回収した。

**P17d の発現・精製**

本実験は、共同研究者である株式会社 COGNANO の前田良太博士に実施して頂いた。P17m と同様に、二量体化した VHH P17 (P17d)の遺伝子を pMES4 ベクターにクローニングした。この際、P17m の N 末端には、PelB シグナル配列 (MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA)、C 末端には 6×His のポリヒスチジンタグを付加した。構築したプラスミドを大腸菌 DH5α 株に形質転換し、P17m と同様に、タンパク質発現用プラスミドを抽出した。また、得られたプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3)株に形質転換し、P17m と同様に培養した後、細胞ペレットを回収した。

得られた回収を 200 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)、0.5 mM EDTA 及び 0.5 M sucrose を含むバッファーで懸濁した。ペリプラズム画分を抽出するために、2 倍量の 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)、0.125 mM EDTA、0.125 M sucrose 及び Benzonase を含む buffer を添加し、スターラーを用いて 45 分間緩やかに攪拌した。攪拌後、20000×g で 30 分間遠心分離した上清を回収し、0.45 μm のフィルターに通して夾雑物を除去した。

得られたサンプルを HisTrap HP カラム (Cytiva 製)にアプライし、300 mM imdazole を含むバッファーで溶出させ、目的タンパク質を回収した。その後、phosphate-buffer saline (PBS)で平衡化した Superdex75 increase 10/300GL カラム (Cytiva 製)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを行い、目的タンパク質を含む画分を回収した。

**P17m と RBD の複合体形成評価**

精製した P17m と Alpha 株 RBD をモル比 1:1 になるように混合し、10 分間氷上でインキュベート

した。その後、20 mM Tris-HCl (pH8.0)、150 mM NaCl を含むバッファーで平衡化した 10/300 superdex200 increase カラム (Cytiva 製)に、P17m、RBD 及び P17/RBD 混合物をそれぞれ添加しサイズ排除クロマトグラフィーを行った。タンパク質の溶出ピークは、波長 280 nm の吸収を基に検出した。

**RBD/P17m の結晶化**

精製した P17m と Alpha 株 RBD をモル比 1:1.05 になるように混合し、30 分間氷上でインキュベートした。その後、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl を含むバッファーで平衡化した 10/300 superdex200 increase カラム (Cytiva 製)に添加し、サイズ排除クロマトグラフィーを行った。RBD/P17m 複合体に相当するピークを回収した後、Amicon Ultra-4 MWCO10kDa (Millipore 製)を用いた限外濾過により 10.5mg/mL まで濃縮し、結晶化用サンプルとした。

結晶化実験は、シッティングドロップ蒸気拡散法により実施した。スクリーニングキットとして Crystal Screen I・II、PEGIon Screen、PEGRx、SaltRx (Hampton Research 社)を使用し、それぞれ温度 20 または 4 ℃の合計 768 条件を検討した。0.1 M Bis-Tris propane (pH7.0)、1.0 M Succinic acid (pH 7.0)、温度 20 ℃の結晶化条件で結晶が析出したため、リザーバー溶液に 30 % (v/v) エチレングリコールを添加したクライオプロテクタント溶液に浸漬した後、液体窒素下で瞬間凍結した。

**P17m の結晶化**

精製した P17m を VIVASPIN turbo 15 MWCO5000 (Sartorius 製)を用いた限外濾過により 16.0 mg/mL に濃縮し、結晶化用サンプルとした。結晶化実験は、シッティングドロップ蒸気拡散法により実施した。スクリーニングキット PEGIon Screen、PEGRx、SaltRx (Hampton Research 社)について、それぞれ温度 20 または 4℃、Crystal Screen I・II 及び Memgold I について温度 20℃の合計 768 条件を検討した。0.1 M Bis-Tris propane (pH 9.0), 30 % (w/v) polyethylene glycol 6,000、温度 4 ℃の結晶化条件で結晶が析出した。ハンギングドロップ法による条件最適化を行い、0.1 M Bis-Tris

propane (pH 8.5), 24.5 % (w/v) polyethylene glycol 6,000 周辺の条件で良好な結晶が析出したため、リザーバー溶液に 20 % (v/v) エチレングリコールを添加したクライオプロテクタント溶液に浸漬した後、液体窒素下で瞬間凍結した。

## X 線回折実験及び結晶構造解析

RBD/P17m 複合体結晶及びフリー体 P17m 結晶を用いて、高輝度放射光施設 SPring-8 の BL44XU ビームラインにおいて X 線回折実験を行った。実験は 100 K で行い、回折データは EIGER X 16M 検出器 (Dectris 製)で収集した。RBD/P17m 複合体について、回折データをプログラム XDS で処理し (*51*)、プログラム Aimless でスケーリングした (*52*)。その後、プログラム PHASER を用いた分子置換法により位相を決定した (*53*)。この時、サーチモデルとして Protein Data Bank に登録されている RBD の結晶構造 (PDB ID: 7NX6)及び VHH の結晶構造 (PDB ID: 7KN6)を使用した。得られた初期構造をプログラム Coot を用いて、手動で修正し (*54*)、ccp4 パッケージ (*55*) に含まれるプログラム refmac5 (*56*) 及びプログラム phenix.refine (*57*) を用いて構造精密化を行った。P17m についても同様に、プログラム XDS で処理を行い、プログラム PHASER を用いた分子置換法によって位相を決定した。この時、サーチモデルとして構造精密化した RBD/ P17m 複合体構造の P17m 結晶構造を使用した。その後、同様にプログラム Coot を用いた手動での構造修正、ccp4 パッケージ (*55*)に含まれるプログラム refmac5 (*56*) 及びプログラム phenix.refine (*57*)を用いて構造精密化を行った。構造精密化後のモデルの立体化学的な整合性はプログラム Molprobity を用いて確認した (*58*)。データ収集及び精密化における統計値は Table 4 に示した。解析した座標データ及び構造因子ファイルは、Protein Data Bank に PDB ID: 8GZ5 (RBD/ P17m)、 8GZ6 (free P17m) として登録した。タンパク質構造を用いた解析及び図の作成はプログラム PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System、Version 2.0 Schrödinger 社)及びプログラム UCSF Chimera (*59*)を使用した。また、タンパク質の静電ポテンシャルマップはプログラム APBS を用いて計算した (*60*)。

## バイオレイヤー干渉法

本実験は、共同研究者である株式会社COGNANOの前田良太博士に実施して頂いた。精製した二量体化 P17 (P17d)を EZ-Link sulfo-NHS-LC-biotin (Thermo Scientific 製)を用いてビオチン化した。反応後、PBS (pH 7.4)で満たした PD SpinTrap G-25 カラム (Cytiva)を用いて残存する未反応のビオチン化試薬を除去した。結合キネティクスを Octet Red96 (fortèBIO, Pall Life Science 製)を用いて測定した。各測定に使用したサンプルは、PBS で希釈し、測定中はサンプルを 1000rpm で攪拌しながら温度 30 ℃下で行った。ビオチン化された P17d を streptavidin-coated sensor chip (fortèBIO 製)でキャプチャーした。この時、P17d の結合量は波長シフトが 0.8 nm に到達した量とし、VHH をキャプチャーしていないセンサーチップの波形をベースラインとした。アナライトには、濃度を 6 段階に希釈した各変異株の S タンパク質 RBD を使用した。P17 をキャプチャー後、PBS を用いて 180 秒間平衡化を行い、RBD の結合ならびに乖離の評価をそれぞれ 180 秒間ずつ行った。データは、ソフトウェア Octet Data Acquisition v9.0 を用いて収集した。得られたセンサーグラムからバックグラウンド及び非特異的結合の成分を除外し、解析ソフトウェア Octet Data Analysis v11.1 を用いて 1:1 のフィッティングモデルを計算した。Alpha 株及び Delta 株については、得られたフィッティングモデルから平衡解離定数 $K_D$、$k_{on}$,値、ならびに $k_{off}$ 値を算出した。

# 引用文献


1. A. E. Gorbalenya *et al.*, The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology* **5**, 536-544 (2020).
2. L. a. Alanagreh, F. Alzoughool, M. Atoum, The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens* **9**, 331 (2020).
3. H. S. Hillen *et al.*, Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. *Nature* **584**, 154-156 (2020).
4. J. Hammond *et al.*, Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. *New England Journal of Medicine* **386**, 1397-1408 (2022).
5. F. Kabinger *et al.*, Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis. *Nature Structural & Molecular Biology* **28**, 740-746 (2021).
6. A. Jayk Bernal *et al.*, Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *New England Journal of Medicine* **386**, 509-520 (2021).
7. G. Kokic *et al.*, Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. *Nature Communications* **12**, 279 (2021).
8. J. H. Beigel *et al.*, Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. *New England Journal of Medicine* **383**, 1813-1826 (2020).
9. J. Grein *et al.*, Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *New England Journal of Medicine* **382**, 2327-2336 (2020).
10. M. Dougan *et al.*, Bamlanivimab plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid-19. *New England Journal of Medicine* **385**, 1382-1392 (2021).
11. A. Gupta *et al.*, Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. *New England Journal of Medicine* **385**, 1941-1950 (2021).
12. M. J. Levin *et al.*, Intramuscular AZD7442 (Tixagevimab–Cilgavimab) for Prevention of Covid-19. *New England Journal of Medicine* **386**, 2188-2200 (2022).
13. K. Westendorf *et al.*, LY-CoV1404 (bebtelovimab) potently neutralizes SARS-CoV-2 variants. *Cell Reports* **39**, 110812 (2022).
14. D. M. Weinreich *et al.*, REGEN-COV Antibody Combination and Outcomes in Outpatients with Covid-19. *New England Journal of Medicine* **385**, e81 (2021).
15. D. Wrapp *et al.*, Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* **367**, 1260-1263 (2020).
16. D. J. Benton *et al.*, Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature* **588**, 327-330 (2020).
17. D. Singh, S. V. Yi, On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Experimental & Molecular Medicine* **53**, 537-547 (2021).

18. S. Harari *et al.*, Drivers of adaptive evolution during chronic SARS-CoV-2 infections. *Nature Medicine* **28**, 1501-1508 (2022).
19. J. Hu *et al.*, Increased immune escape of the new SARS-CoV-2 variant of concern Omicron. *Cellular & Molecular Immunology* **19**, 293-295 (2022).
20. A. M. Syed *et al.*, Omicron mutations enhance infectivity and reduce antibody neutralization of SARS-CoV-2 virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**, e2200592119 (2022).
21. S. Cele *et al.*, Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization. *Nature* **602**, 654-656 (2022).
22. Y. Cao *et al.*, Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature* **602**, 657-663 (2022).
23. K. Satoshi, I. Yuji, Therapeutic applications of antigen binding domain VHH derived from heavy chain antibodies of Camelidae. *MEDCHEM NEWS* **27**, 35-41 (2017).
24. R. Maeda *et al.*, A panel of nanobodies recognizing conserved hidden clefts of all SARS-CoV-2 spike variants including Omicron. *Communications Biology* **5**, 669 (2022).
25. R. H. J. van der Linden *et al.*, Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1431**, 37-46 (1999).
26. S. Muyldermans, C. Cambillau, L. Wyns, Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 230-235 (2001).
27. M. Dumoulin *et al.*, Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Science* **11**, 500-515 (2002).
28. V. Salema, L. Á. Fernández, Escherichia coli surface display for the selection of nanobodies. *Microbial Biotechnology* **10**, 1468-1484 (2017).
29. F. Fleetwood *et al.*, Surface display of a single-domain antibody library on Gram-positive bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**, 1081-1093 (2013).
30. C. McMahon *et al.*, Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nature Structural & Molecular Biology* **25**, 289-296 (2018).
31. P.-A. Koenig *et al.*, Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape. *Science* **371**, eabe6230 (2021).
32. A. I. Schriek *et al.*, Anti-HIV-1 Nanobody-IgG1 Constructs With Improved Neutralization Potency and the Ability to Mediate Fc Effector Functions. *Frontiers in Immunology* **13**, (2022).
33. M. Scully *et al.*, Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *New England Journal of Medicine* **380**, 335-346 (2019).

34. I. Jovčevska, S. Muyldermans, The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs* **34**, 11-26 (2020).
35. L. Senolt, Emerging therapies in rheumatoid arthritis: focus on monoclonal antibodies [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* **8**, (2019).
36. J.-L. Liu *et al.*, Attainment of 15-Fold Higher Affinity of a Fusarium-specific Single-Chain Antibody by Directed Molecular Evolution Coupled to Phage Display. *Molecular Biotechnology* **52**, 111-122 (2012).
37. S. M. Lippow, K. D. Wittrup, B. Tidor, Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation. *Nature Biotechnology* **25**, 1171-1176 (2007).
38. C. Shinozaki *et al.*, Improvement of the affinity of an anti-rat P2X4 receptor antibody by introducing electrostatic interactions. *Scientific Reports* **12**, 131 (2022).
39. P. S. Chowdhury, in *Antibody Phage Display: Methods and Protocols,* P. M. O'Brien, R. Aitken, Eds. (Humana Press, Totowa, NJ, 2002), pp. 269-285.
40. T. Yamashita *et al.*, Affinity Improvement of a Cancer-Targeted Antibody through Alanine-Induced Adjustment of Antigen-Antibody Interface. *Structure* **27**, 519-527.e515 (2019).
41. Y. Xiang *et al.*, Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2. *Science* **370**, 1479-1484 (2020).
42. G. Ye *et al.*, The development of Nanosota-1 as anti-SARS-CoV-2 nanobody drug candidates. *eLife* **10**, e64815 (2021).
43. J. Huo *et al.*, A potent SARS-CoV-2 neutralising nanobody shows therapeutic efficacy in the Syrian golden hamster model of COVID-19. *Nature Communications* **12**, 5469 (2021).
44. T. Güttler *et al.*, Neutralization of SARS-CoV-2 by highly potent, hyperthermostable, and mutation-tolerant nanobodies. *The EMBO Journal* **40**, e107985 (2021).
45. T. J. Esparza *et al.*, Nebulized delivery of a broadly neutralizing SARS-CoV-2 RBD-specific nanobody prevents clinical, virological, and pathological disease in a Syrian hamster model of COVID-19. *mAbs* **14**, 2047144 (2022).
46. C. O. Barnes *et al.*, SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature* **588**, 682-687 (2020).
47. X. Chen, J. L. Zaro, W. Shen, Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews* **65 10**, 1357-1369 (2013).
48. M. Schoof *et al.*, An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science* **370**, 1473-1479 (2020).
49. P. Han *et al.*, Receptor binding and complex structures of human ACE2 to spike RBD from omicron and delta SARS-CoV-2. *Cell* **185**, 630-640.e610 (2022).
50. A. J. Clark *et al.*, Free Energy Perturbation Calculation of Relative Binding Free Energy between Broadly Neutralizing Antibodies and the gp120 Glycoprotein of HIV-1. *Journal of*

*Molecular Biology* **429**, 930-947 (2017).

51. W. Kabsch, XDS. *Acta Crystallographica Section D* **66**, 125-132 (2010).
52. P. R. Evans, G. N. Murshudov, How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallographica Section D* **69**, 1204-1214 (2013).
53. A. J. McCoy *et al.*, Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography* **40**, 658-674 (2007).
54. P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D* **66**, 486-501 (2010).
55. M. D. Winn *et al.*, Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D* **67**, 235-242 (2011).
56. G. N. Murshudov *et al.*, REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D* **67**, 355-367 (2011).
57. P. D. Adams *et al.*, PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D* **66**, 213-221 (2010).
58. V. B. Chen *et al.*, MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D* **66**, 12-21 (2010).
59. E. F. Pettersen *et al.*, UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1605-1612 (2004).
60. N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, J. A. McCammon, Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 10037-10041 (2001).