

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08069

研究課題名(和文) 計算科学的手法を用いたインフルエンザウイルス中和抗体の抗原認識能の改変

研究課題名(英文) A computational structural study on recognition of the influenza virus hemagglutinin by heterosubtypic monoclonal antibody

研究代表者

五十嵐 学 (Igarashi, Manabu)

北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・准教授

研究者番号：10374240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インフルエンザウイルスの表面糖蛋白質ヘマグルチニン(HA)と中和モノクローナル抗体S139/1との複合体構造を基点に、エスケープ変異株や複数のHA亜型のウイルスを中和する抗体の設計を目指し、分子シミュレーションの結果を指標にS139/1の結合能の改変を試みた。本解析に用いたH3N2ウイルスでは、S139/1上のアミノ酸置換のみで、エスケープ変異株への結合能を回復させることは難しく、相補性決定領域の置換も必要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最終目的は、抗体の親和性・特異性を制御するための論理的分子設計手法の確立である。このような立体構造を基盤に既存抗体の親和性・特異性を改変する技術は、様々な人獣共通感染症の診断・治療研究へ幅広く応用されることが想定される。本課題の成果はその設計手法の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We are aiming to design a neutralizing antibody against escape mutant strains and/or multiple HA subtypes of influenza A viruses. In this study, we tried to modify the binding ability of S139/1, a cross-reactive neutralizing monoclonal antibody against HAs, using the binding free energy obtained from molecular dynamics simulations as an indicator. For the HA from A/Victoria/3/75 (H3N2) used in this study, only amino acid substitutions on S139/1 was unable to restore the recognition ability of S139/1 against escape mutants, suggesting that the replacement of an entire CDR loop are required.

研究分野：計算構造生物学

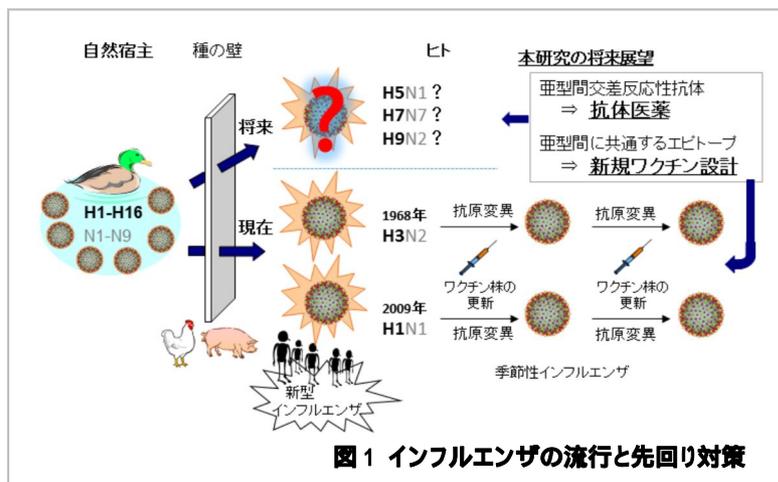
キーワード：インフルエンザウイルス 抗体 分子動力学 分子モデリング 分子間相互作用 結合自由エネルギー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ A ウイルスは、ヒトを含む哺乳動物および鳥に広く感染する人獣共通感染症病原体である。ウイルス粒子の表面糖蛋白質 HA は、ウイルス中和抗体の主要な標的であり、抗原性の違いから 16 種類の血清亜型 (H1-H16) に分類される。全ての亜型のインフルエンザウイルスは、自然宿主である野生水禽から分離されている。したがって、どの HA 亜型のウイルスも、種の壁を越え、新型インフルエンザとして流行を始めても不思議ではない (図 1)。このような理由から申請者らは、抗原性の異なる多くのウイルスに対応可能な予防・治療法の開発を目指している。

通常の中和試験において抗血清は異なる亜型間で交差反応性を示さないことから、亜型間に共通する中和エピトープはほとんど存在しないと考えられてきた。しかし、近年、複数の HA 亜型のウイルスを中和するモノクローナル抗体が次々と報告されている (Science 2009; Science 2011; Cell 2016)。このような亜型間交差反応性を示す中和抗体は、抗体医薬として新型インフルエンザ発生時の治療に、またその共通エピトープは万能ワクチンの抗原や薬剤の標的として応用できる可能性を秘めている (図 1)。

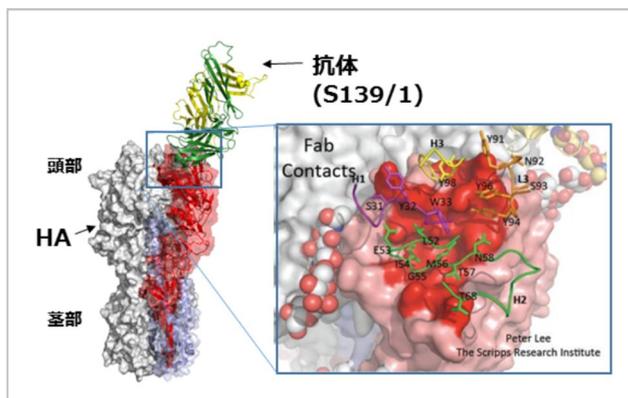


2. 研究の目的

申請者らは、進化系統の異なる複数の HA 亜型のウイルスに対して中和活性を有するモノクローナル抗体 S139/1 の作出に成功し (PLoS Pathog 2009)、X 線結晶解析により H3 亜型 HA との複合体構造を決定した (PNAS 2012) (図 2)。さらに、この結合構造を基に、複数の亜型の HA と抗体との結合構造を計算機上で構築し、分子シミュレーションを行い、複数の HA と抗体との間の相互作用を解析した (薬学雑誌 2015)。その結果、(1) 亜型間に共通する中和エピトープおよびそのパラトープ (抗体上の抗原結合部位) は、ともに 10 個程度のアミノ酸残基から構成されていること、(2) 抗体の中和能の有無を計算機で評価するには結合自由エネルギーが良い指標になること、が明らかとなった。

また、エピトープ上のアミノ酸に変異が起こると、HA と抗体との相互作用が弱くなり、新たな抗原構造を持ったエスケープ変異株が出現する。申請者らは、分子シミュレーションから得られた H3 HA と抗体との結合自由エネルギーをアミノ酸残基単位に分解し解析を行い、エスケープ変異は抗体と強く結合している HA 上のアミノ酸残基位置で起こり、かつ抗体との親和性を最も減少させるアミノ酸が選択されている可能性を明らかにした。Leong らも、HA-抗体複合体の分子シミュレーションを行い、計算結果がウイルス学的実験による観察結果とよく一致することを報告している (Biophys J. 2015)。

以上のような背景から、HA-抗体結合構造の分子シミュレーションから得られる結合自由エネルギーを指標に、HA に対する抗体の認識能を操作し、エスケープ変異株やより多くの HA 亜型のウイルスを中和する抗体を設計するという着想に至った。本研究では、立体構造モデリングや分子シミュレーション等の計算科学的手法やバイオインフォマティクス手法を用いて、抗体の親和性・特異性を制御する手法の開発について検証・検討することを目的とする。



**図 2 抗体 S139/1 と H3 HA との複合体結晶構造**

この立体構造を鋳型にシミュレーションを行い、親和性増強のために置換が必要と推測されるアミノ酸残基 (抗体側) 位置を予測した。その位置に計算機上でアミノ酸変異を導入し、結合自由エネルギーより HA に対する親和性を計算した。

### 3. 研究の方法

HA 亜型間交差反応性抗体 S139/1 は H1, H2, H3, H13 および H16 亜型のウイルスに対して中和活性を示す。また S139/1 と H3 亜型 (A/Victoria/3/75 株:Vic 株) の HA との共結晶構造はすでに決定され、プロテイン・データ・バンク (PDB) に登録されている (4GMS.pdb)。

#### (1) エスケープ変異後の HA に再結合する抗体の設計 (図 2)

S139/1 からエスケープした Vic 株変異 HA と、再結合できるように S139/1 の改変を試みた。

- 1) Vic 株を S139/1 存在下で培養し、S139/1 から逃げるエスケープ変異株のアミノ酸置換をウイルス学的実験により同定した。
- 2) Vic 株 HA と S139/1 の共結晶構造 4GMS.pdb に、エスケープ変異で観測された変異を計算機上で導入し、結合構造を構築した。
- 3) 2) の結合構造を初期構造として、100 ナノ秒の分子動力学シミュレーションを行った。HA と S139/1 との結合自由エネルギーは MM/GBSA 法により計算した。得られた結合自由エネルギーをアミノ酸残基単位に分解し、結合にネガティブに働いている残基位置を同定した。
- 4) 市販ソフトウェア MOE 上で、同定した抗体側の残基位置各々に全 20 種類のアミノ酸を導入し、計算機上で抗体ライブラリを構築した。
- 5) 構築したライブラリの中から、エスケープ変異後の HA に対して高い親和性エネルギーを示す抗体を 5 つ選択した。エネルギー計算には MM/GBVI 法を用いた。
- 6) 選択した 5 つの構造を初期構造として分子動力学シミュレーションを行い、結合自由エネルギー計算を指標に抗体の中和能の有無を予測した。
- 7) 中和能を有すると予測されたアミノ酸配列を持つ変異 S139/1 を組換え抗体として作出し、*in vitro* の実験で中和能を評価した。

#### (2) 多くの亜型の HA に結合可能な交差反応性抗体の設計

- 1) H1, H2, H3, H6, H9, H13HA と S139/1 との結合構造を、ホモロジーモデリング法により構築した。
- 2) 1) で構築した HA-S139/1 の結合構造を初期構造として、100 ナノ秒の分子動力学シミュレーションを行った。HA と S139/1 との結合自由エネルギーは MM/GBSA 法により、計算した。計算プログラムには、AMBER16 を用いた。
- 3) 得られた結合自由エネルギーをアミノ酸残基単位に分解し、主成分分析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) エスケープ変異後の HA に再結合する抗体の設計

はじめに本研究では、S139/1 の存在下で A/Victoria/3/75 (H3N2) (Vic 株) を培養すると、HA の 158 番目のアミノ酸が Gly (G) から Glu (E) に変異したエスケープ変異体 (HA\_vic158) が分離されることを *in vitro* の実験で明らかにした。そこで S139/1 が HA\_vic158 に再結合できるように、S139/1 の改変を試みた。

Vic 株 HA (HA\_vic) と S139/1 の複合体結晶構造 (4GMS.pdb) と、この構造の HA158 番目に G158E 変異を導入した HA\_vic158 と S139/1 との複合体構造について、各々分子動力学シミュレーションを行った。つづいて結合自由エネルギー計算を行い、HA および S139/1 上の各残基における結合自由エネルギーへの寄与が、HA G158E によりどのように変化したかを解析した。その結果、S139/1 の相補性決定領域 (CDR) 上の Y91 (L 鎖)、Y96 (L 鎖)、E53 (H 鎖)、D97 (H 鎖) の 4 つ残基が、G158E によりエネルギー的に不利に働くことが判明した。そこで、これら 4 箇所のアミノ酸位置に全 20 種類のアミノ酸を計算機上で導入し、抗体ライブラリを構築した。この中から、HA\_vic158 に対して親和性エネルギーを示す変異 S139/1 を 5 つ選択した後、分子動力学シミュレーションを行い、結合自由エネルギーを計算した。結果、5 つ中 4 つの変異 S139/1 が、野生型 S139/1 と比べて、HA\_vic158 に対して強く結合することが予測された。そこで、これら 4 つの変異 S139/1 を組換え抗体として作出し、*in vitro* の実験で中和能を評価した。しかしながら、いずれの抗体も HA\_vic158 に対して中和活性を示さなかった (図 3)。

この結果を検証するため、HA\_vic158 と S139/1 との結合構造を再度解析した。その結果、エスケープ変異体 HA\_vic158 の 158 番目の残基 Glu は、S139/1 の L 鎖 CDR3 と物理的に衝突することが分かった。そこで、この衝突を回避できる L 鎖 CDR3 を、公共データベース (PDB) を活用し、探索した。はじめに PDB に登録されている抗体構造の L 鎖 CDR3 をすべて抽出した。次にこれらを S139/1 の L 鎖 CDR3 に移植し、改変 S139/1 の構造モデルを計算機上で網羅的に構築した。これらの改変 S139/1 と HA\_vic158 との親和性エネルギーを計算した

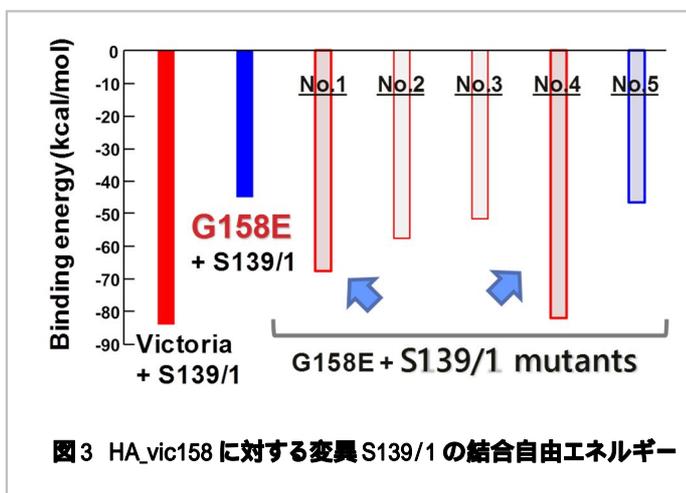


図3 HA\_vic158 に対する変異 S139/1 の結合自由エネルギー

結果、S139/1 と野生型 HA の親和性と同等の値を示す改変 S139/1 が複数存在した。これらのほとんどは S139/1 の L 鎖 CDR3 よりも短いアミノ酸配列であった。さらに、高い親和性エネルギーを有した改変 S139/1-HA\_vic158 複合体構造に対して、分子動力学シミュレーションを行い、結合自由エネルギーを解析した。しかしながら、現在まで強い相互作用を示す改変 S139/1 は得られていない。現在、HA\_vic158 との衝突が小さい改変 S139/1 モデルを選別し、これらの改変 S139/1 の CDR にアミノ酸置換を導入することで、強い相互作用を示す改変 S139/1 の取得を試みている。

#### (2) 多くの HA 亜型に結合可能な交差反応性抗体の設計

S139/1 は、複数の HA 亜型 (H1, H2, H3, H13 および H16) に対して中和活性を示す。本研究では H6, H7 や H9 亜型のウイルスに対しても中和活性を示すように S139/1 の改変を試みる。本研究期間では、HA\_vic-S139/1 の複合体結晶構造 (PDB ID: 4GMS) を鋳型に、H6, H9 亜型を含む計 10 種の HA と S139/1 との複合体構造をホモロジーモデリングにより構築した。それらの構造を初期構造として分子動力学シミュレーションを行い、各 HA と S139/1 との結合自由エネルギーを計算した。さらに、結合構造における残基ごとのエネルギー寄与を解析した。各 HA の残基ごとの寄与エネルギーに対して主成分分析を行った結果、HA 上の 156 番目の残基が S139/1 による中和、非中和に大きく寄与していることが示唆された。現在、動的残基間相互作用ネットワーク (dRIN) 解析を行い、156 番目の残基との相互作用に深く関わる抗体側のアミノ酸残基を探索している。これらの結果は、多くの HA 亜型に結合可能な交差反応性抗体を設計するための基礎的知見となることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Masahiro, Maruyama Junki, Kondoh Tatsunari, Nao Naganori, Miyamoto Hiroko, Takadate Yoshihiro, Furuyama Wakako, Kajihara Masahiro, Ogawa Hirohito, Manzoor Rashid, Yoshida Reiko, Igarashi Manabu, Takada Ayato	4. 巻 9
2. 論文標題 Generation of bat-derived influenza viruses and their reassortants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37830-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Milligan Jacob C, Parekh Diptiben V, Fuller Katherine M, Igarashi Manabu, Takada Ayato, Sapphire Erica Ollmann	4. 巻 219
2. 論文標題 Structural Characterization of Pan-Ebolavirus Antibody 6D6 Targeting the Fusion Peptide of the Surface Glycoprotein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 415 ~ 419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiy532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Manzoor Rashid, Igarashi Manabu, Takada Ayato	4. 巻 18
2. 論文標題 Influenza A Virus M2 Protein: Roles from Ingress to Egress	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2649 ~ 2649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18122649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Reiko Yoshida, Ema Qurnianingsih, Rashid Manzoor, Mari Ishijima, Asako Shigeno, Hiroko Miyamoto, Manabu Igarashi, Chairul A Nidom, Ayato Takada
2. 発表標題 Mechanisms of antibody-mediated protection against H5N1 influenza virus infection
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐 学
2. 発表標題 ウイルス蛋白質と宿主分子の 相互作用解析：立体構造情報の活用
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐 学
2. 発表標題 ウイルス蛋白質と宿主分子の相互作用解析： 計算科学の活用
3. 学会等名 CBI学会2017年大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 五十嵐学、関嶋政和、安尾信明、阿部貴志、Rashid Manzoor、渡部輝明、広川貴次、高田礼人
2. 発表標題 Computational characterization of influenza A virus hemagglutinin recognition sites by a cross-neutralizing monoclonal antibody
3. 学会等名 CBI学会2017年大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 五十嵐 学
2. 発表標題 計算科学的手法によるウイルスタンパク質の解析
3. 学会等名 日本生化学会北海道支部、日本生物物理学会北海道支部合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 五十嵐学、他約80名	4. 発行年 2018年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 540
3. 書名 in silico創薬におけるスクリーニングの高速化・高精度化技術	

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所国際疫学部門 <a href="http://www.czc.hokudai.ac.jp/epidemiol/">http://www.czc.hokudai.ac.jp/epidemiol/</a>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------