

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20596

研究課題名（和文）情報科学的アプローチを活用した精密な機能性分子設計システムの構築

研究課題名（英文）Establishing a precision functional molecular design system utilizing a structural informatics approach

研究代表者

橋口 隆生（Hashiguchi, Takao）

京都大学・医生物学研究所・教授

研究者番号：50632098

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ペプチドや蛋白質分子レベルでの標的情報に合わせた精密な分子設計システム構築を行い、標的蛋白質の構造解析とも組み合わせることで分子デザイン技術を開拓することを目的とした。その結果、ウイルス膜融合タンパク質のprefusion型構造およびpostfusion型構造、細胞侵入に関連するウイルス糖蛋白質に対する特異的阻害分子・ペプチド・抗体の構造情報に基づくデザインを行い、高機能性分子の単離や作製、作用機序の解明に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルスによるパンデミックを筆頭に、ウイルス感染症による社会的・人的損失は非常に大きい。しかし、治療薬やワクチンを理論的にデザインする手法は未だに確立したものが無く試行錯誤が続いている。本研究では、構造情報を利用した精密な分子設計システム構築に挑戦し、感染症創薬に貢献できる構造情報の取得とデザイン技術の構築を行った。これらの技術・情報は理論的な治療薬やワクチン開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to establish a precision molecular design system tailored to target information at the peptide and protein level, and to explore molecular design technology by combining it with structural analysis of target proteins as well. Consequently, we have succeeded in isolating and producing highly functional molecules and elucidating their mechanisms of action by designing them based on the structural information of prefusion and postfusion structures of viral membrane fusion proteins, and specific inhibitory molecules, peptides, and antibodies against viral glycoproteins related to cell entry.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス学 構造生物学 感染阻害 分子デザイン

1. 研究開始当初の背景

- (1) 我々は半世紀以上に抗ウイルス活性があるとされていた、化学修飾された tri-ペプチド (Chemically-modified peptide: CM Pep) によるウイルス感染阻害の採用機序を構造解析により解明した (Hashiguchi T et al. *PNAS* 2018)。その結果、疎水性の高い化学修飾部分が麻疹ウイルス膜融合蛋白質の疎水性ポケットに結合し、その周囲のアミノ酸残基の配置に応じてペプチド部分が相互作用することで、わずか数アミノ酸配列でも特異性を発揮していることが明らかとなった (図1)。

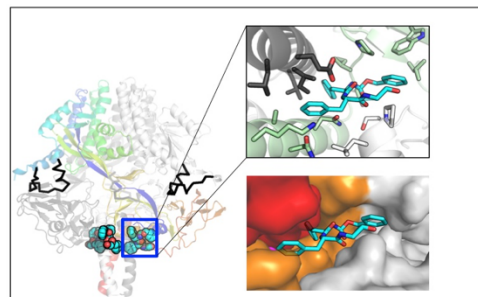


図1. 麻疹ウイルス膜融合蛋白質の疎水性ポケットに結合したCM Pepの構造 (右下の図では疎水性ポケットが分かりやすいよう、蛋白質のみを充填モデルで示した。)

- (2) 上記の抗ウイルス活性を示す CM pep の作用機序を解明するために、麻疹ウイルス (ヒトに急性に感染して発症する熱性発疹性疾患である麻疹(はしか・ましん)を引き起こす病原体) の fusion 蛋白質を機能性のある prefusion 型構造として蛋白質発現と精製を行う必要があった。しかし、細胞外ドメインを単純に分泌型として発現させる従来の方法では機能性の失われた postfusion 型構造になってしまうため、蛋白質分子デザインを行い準安定化状態の prefusion 型構造を固定する変異を導入、もしくは、scaffold による安定化を図る必要があった。この分子デザインを行うには予測される構造情報を下に変異導入して、実験的な手法で蛋白質発現や構造を評価する必要があり、多くのコンストラクトを検討して prefusion 型構造を固定することに成功した (図1)。

以上の(1)と(2)の研究背景から、構造情報に基づきペプチドや蛋白質レベルでの分子デザインを精密に行う技術基盤の確立と阻害剤/分子の作用機序の解明は、創薬研究の効率的な推進を可能にすることから、当該技術の開拓が求められていた。

2. 研究の目的

阻害剤・機能性分子の開発研究では、主にライブラリー等から実験的に取得する必要があり、目的とする結合・相互作用部位や機能を満たす分子取得には膨大な労力と時間がかかる。従って、標的情報に合わせた精密な分子設計/取得システムは次世代技術として待望されている。そこで、本研究では、ペプチドや蛋白質分子レベルでの標的情報に合わせた精密な分子設計システム構築を行い、標的蛋白質の構造解析とも組み合わせることで分子デザイン技術を開拓することを目的とした。

3. 研究の方法

エンベロープ(細胞由来の脂質二重膜)に覆われた全てのウイルスは膜融合蛋白質を保持しており、膜融合蛋白質はその性質および構造上、必ず prefusion 型構造と postfusion 型構造が存在する。そこで、背景(1)に対応して、ウイルス膜融合タンパク質の prefusion 型構造および細胞侵入に関連するウイルス糖蛋白質に対する特異的阻害分子・ペプチド・抗体の構造情報に基づくデザインを行い、ウイルス学的な手法による細胞侵入阻害効果や膜融合能阻害効果の評価・解析を行った。また、背景(2)に対応して、ウイルス膜融合タンパク質の prefusion 型構造を固定する変異や scaffold の検討、および、阻害分子による作用機序解明のため、標的タンパク質との構造解析 (X線結晶構造解析・クライオ電子顕微鏡単粒子構造解析)を行った。これらの研究を総合することで、構造情報に基づきペプチドや蛋白質レベルでの分子デザインを精密に行う技術基盤の確立を目指した。

4. 研究成果

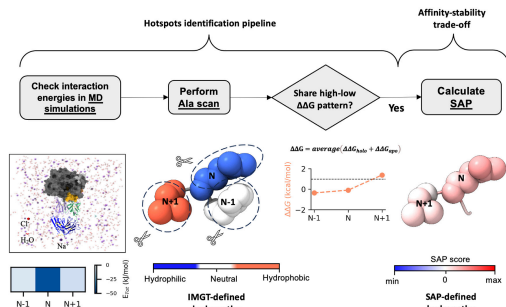
(1) ウイルス糖蛋白質発現・精製系の構築

ヒト培養細胞を用いたウイルス糖蛋白質発現・精製系の構築は、精製ウイルス糖蛋白質をプローブとした機能性分子 (化合物やペプチド・抗体) の効率的な単離・取得に役立つだけでなく、感染阻害機能を持つ化合物やペプチド・抗体との複合体の構造解析を通じた作用機序の解明にも大きく貢献する。そこで、精製ウイルス糖蛋白質を得るためのラージスケールでの発現精製系のプロトコルをまとめて報告した (Kubota M, Hashiguchi T. Large-Scale Expression and Purification of Mumps Virus Hemagglutinin-Neuraminidase for Structural Analyses and

(2) 麻疹ウイルスに対する感染阻害剤の分子デザイン

麻疹 (はしか) の原因である麻疹ウイルスは、パラミクソウイルス科に属する RNA ウイルスで、免疫系細胞に感染し一過性の免疫抑制を起こす。また、麻疹ウイルスは低頻度ながら極めて予後不良の重急性硬化性全脳炎(SSPE)や麻疹封入体脳炎 (MIBE) などの中枢神経系感染を起こす場合がある。麻疹ウイルスは、エンベロープ上に受容体結合能を担う Hemagglutinin (H) 蛋白質と膜融合能を担う Fusion (F) 蛋白質の2つの糖蛋白質を持ち、受容体結合に伴い、H 蛋白質と F 蛋白質が相互作用をして連鎖的に構造変化することで膜融合を引き起こし細胞侵入する。

我々は、麻疹ウイルス H 蛋白質に対する中和抗体の作用機序解明と抗体デザインによる抗体の感染阻害能の向上を目的に、ホモロジーモデリング、ドッキングシミュレーション、MD シミュレーション、および *in silico* アラニンスキャニングに基づき、安定性と結合親和性の双方に関する可能性のある残基を計算により予測し、抗麻疹ウイルス H 抗体の物理化学的特性を実験的に解析した (図2)。その結果、複数の抗体が受容体結合部位をエピトープとしており、麻疹ウイルス H 蛋白質に対して 1nM 以下の高い結合親和性を示したが、安定性には差があった (図2)。ペアワイズ点突然変異解析により、これらの違いが明らかになり、抗麻疹ウイルス H 抗体の親和性と安定性の間に関係がある可能性が示唆された (図2) (Paul R, et.al. Unveiling the affinity-stability relationship in anti-measles virus antibodies: a computational approach for hotspots prediction. Front Mol Biosci. 2024 Mar 1;10:1302737.)。また、麻疹ウイルス F 蛋白質に対する阻害 CM pep である FIP (図1) を構造情報を下に改良デザインを施し、50%阻害濃度 (IC50) を 10 倍から 100 倍程度に向上させることにも成功している。



Physicochemical analysis (wild type)	< 1 nM affinity group				> 50 nM affinity group			
	7C6	8F6	2F4	10B5	7C6	8F6	2F4	10B5
Binding affinity								
k_{on} ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$)	11.4 ± 4.8	3.4 ± 2.9	1.2 ± 0.5	0.1 ± 0.1	11.4 ± 4.8	3.4 ± 2.9	1.2 ± 0.5	0.1 ± 0.1
k_{off} ($\times 10^{-4} s^{-1}$)	4.1 ± 1.7	2.8 ± 1.7	65.8 ± 29.1	8.6 ± 0.4	4.1 ± 1.7	2.8 ± 1.7	65.8 ± 29.1	8.6 ± 0.4
K_D at 25°C (nM)	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.2	54.1 ± 0.1	60.3 ± 19.4	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.2	54.1 ± 0.1	60.3 ± 19.4
Thermal stability								
T_m (°C)	73.9 ± 0.3	68.0 ± 0.1	72.7 ± 0.1	73.9 ± 0.1	73.9 ± 0.3	68.0 ± 0.1	72.7 ± 0.1	73.9 ± 0.1
Physicochemical analysis (mutant type)								
	k_{on} ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} ($\times 10^{-4} s^{-1}$)	K_D at 25°C (nM)	T_m (°C)	ΔT_m (°C)			
7C6 WT	11.4 ± 4.8	4.1 ± 1.7	0.4 ± 0.2	73.9 ± 0.9				
L-Y81A	1.8 ± 0.5	168.8 ± 35.0	97.5 ± 8.2	71.3 ± 0.7	-2.6			
L-D92A	7 ± 0.4	4.6 ± 0.4	0.7 ± 0	73.7 ± 1.7	-0.3			
H-D96A	14.2 ± 0.3	90.8 ± 0.2	6.4 ± 0.1	75 ± 1.7	1.0			
H-W97A	43.6 ± 5.1	37.6 ± 1.6	0.9 ± 0.1	72.9 ± 0.3	-1.0			
L-Y81F	27.0 ± 1.0	13.2 ± 0.3	0.5 ± 0	71.7 ± 1.1	-2.2			
L-D92F	14.4 ± 0.2	4.4 ± 0.2	0.3 ± 0	72.7*	-1.2			
H-D96F	14.4 ± 1.3	363.1 ± 27.3	25.2 ± 0.4	72.8 ± 0.8	-1.1			
8F6 WT	3.4 ± 2.9	2.8 ± 1.7	0.9 ± 0.2	68.4 ± 0.9				
H-S8A	2.2 ± 0.8	153.3 ± 48.8	70.5 ± 2.4	69.1 ± 1.0	0.7			
H-Y99A	0.1 ± 0	8.9 ± 0.2	99.5 ± 2.8	68.6 ± 0.4	0.2			
H-Y100A	N.D.	69.7 ± 0.7	1.3			
H-R100A	0.1 ± 0	40.5 ± 0.3	284.0 ± 0.9	70.2 ± 0.4	1.8			

図2. 抗麻疹ウイルスH抗体の構造シミュレーションと機能性解析

(3) インフルエンザウイルス HA 蛋白質に対する広域 *in vivo* 防御抗体の作用機序の解明と抗原デザイン

インフルエンザの原因である A 型インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス科に属する RNA ウイルスで、発熱、頭痛、全身倦怠感、筋肉痛・関節痛、上気道炎症状を起こす。インフルエンザウイルスは、エンベロープ上に受容体結合能を担う HA1 サブユニットと膜融合能を担う HA2 サブユニットが一体となった糖蛋白質 HA を持ち、受容体結合に伴い、HA1 と HA2 が連鎖的に構造変化することで膜融合を引き起こし細胞侵入する。

我々は、中和能を示さないものの複数の亜型に対して *in vivo* で感染防御能を示すヒトモノクローナル抗体の詳細な解析を行った (図3)。抗体 LAH31 は、postfusion 型構造特異的なステムヘリックスのキンクドープエピトープを標的とすることで、IgG Fc 依存的な広範な防御能を示した。構造解析と分子モデリングにより、体細胞変異を起こした軽鎖に依存するエピトープ特異性と主要な認識部位が明らかになった (図3)。

抗体 LAH31 は細胞表面に発現している prefusion 型構造は認識できなかったが、感染細胞上に存在する HA 構造には結合し、Fc を介したクリアランスに機能的に貢献した。これらの結果は、postfusion 型構造で出現する新しい非ネイティブエピトープが防御抗原デザインに有用であることを示した (図3)。

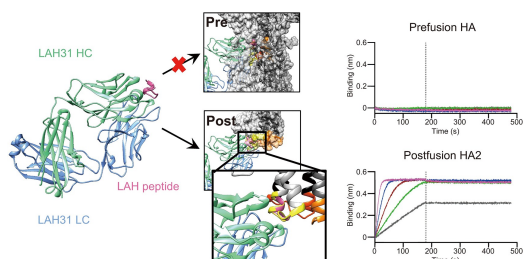


図3. 抗インフルエンザウイルスHA抗体のpostfusion構造を認識する抗体LAH31と抗原の複合体構造と抗原結合能

(Tonouchi K, et al., Structural basis for cross-group recognition of an influenza virus hemagglutinin antibody that targets postfusion stabilized epitope. PLoS Pathog. 2023 Aug 9;19(8):e1011554.)

(4) SARS-CoV-2 S 蛋白質に対する広域中和抗体の効率的な抗体単離と作用機序の解明

COVID-19 の原因である severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)は、コロナウイルス科に属する RNA ウイルスで、発熱・上気道炎症状を起こし、ときに嗅覚異常・味覚異常を引き起こすことがある。また、肺炎を合併する事例もある。特に基礎疾患を持つ患者や高齢者で予後が悪い。SARS-CoV-2 は、エンベロープ上に受容体結合能を担う S1 サブユニットと膜融合能を担う S2 サブユニットが一体となった糖蛋白質 Spike (S)を持ち、受容体結合に伴い、S1 と S2 が連鎖的に構造変化することで膜融合を引き起こし細胞侵入する。

我々は、複数の SARS-CoV-2 変異株に対して広域な中和能を示す抗体を抗原蛋白質をプローブとして利用することで効率的に回復期患者から単離する手法と広域中和抗体 9-105 を報告した(図4)。9-105 は、S 蛋白質の受容体結合ドメイン (RBD) を非常に高い親和性で認識し、オミクロン以前の複数の変異株を中和した。同手法を用いて、さらに広域性の高い中和抗体 4-66 の単離と構造解析による作用機序の解明にも成功しており(図4)、抗体デザインや抗原デザインの基盤となる構造情報の決定を行うことが出来た。(Kaku Y, et al., Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by antibodies induced in convalescent patients with COVID-19. Cell Rep. 2021 Jul 13;36(2):109385.)

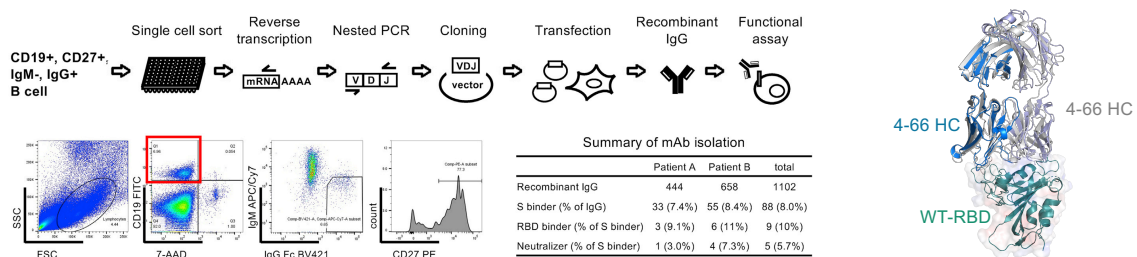


図4. 抗SARS-CoV-2 S抗体の効率的な単離手法と広域中和抗体の作用機序の解明

本研究では、構造情報に基づきペプチドや蛋白質レベルでの分子デザインを精密に行う技術基盤の確立と阻害剤/分子の作用機序の解明に挑戦し、以上の研究成果を得ることが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kaku Y, Kuwata T, Zahid HM, Hashiguchi T, Noda T, Kuramoto N, Biswas S, Matsumoto K, Shimizu M, Kawanami Y, Shimura K, Onishi C, Muramoto Y, Suzuki T, Sasaki J, Nagasaki Y, Minami R, Motozono C, Toyoda M, Takahashi H, Kishi H, Fujii K, Tatsuke T, Ikeda T, Maeda Y, Ueno T, Koyanagi Y, Iwagoe H, Matsushita S	4. 巻 36
2. 論文標題 Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by antibodies induced in convalescent patients with COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109385 ~ 109385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109385	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 -

1. 著者名 Forgione Rosa Ester, Di Carluccio Cristina, Milanese Francesco, Kubota Marie, Fabregat Nieto Ferran, Molinaro Antonio, Hashiguchi Takao, Francesconi Oscar, Marchetti Roberta, Silipo Alba	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization of Natural and Synthetic Sialoglycans Targeting the Hemagglutinin-Neuraminidase of Mumps Virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Chemistry	6. 最初と最後の頁 711346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fchem.2021.711346	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 橋口隆生	4. 巻 72
2. 論文標題 構造生物学的手法による麻疹・ムンプスウイルスの細胞侵入及び侵入阻害機構の研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 335-338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubota Marie, Hashiguchi Takao	4. 巻 -
2. 論文標題 Large-Scale Expression and Purification of Mumps Virus Hemagglutinin-Neuraminidase for Structural Analyses and Glycan-Binding Assays	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 641 ~ 652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0430-4_55	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MAENAKA Katsumi、FUKUHARA Hideo、HASHIGUCHI Takao、CAAVEIRO Jose M. M.、NAGATOISHI Satoshi、KURODA Daisuke、TSUMOTO Kouhei	4. 巻 61
2. 論文標題 Viral Biophysics: Contributions to Drug Modalities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 082 ~ 089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.61.082	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Paul Rimpa、Kasahara Keisuke、Sasaki Jiei、Perez Jorge Fernandez、Matsunaga Ryo、Hashiguchi Takao、Kuroda Daisuke、Tsumoto Kouhei	4. 巻 10
2. 論文標題 Unveiling the affinity-stability relationship in anti-measles virus antibodies: a computational approach for hotspots prediction	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1302737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2023.1302737	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 -

1. 著者名 Tonouchi Keisuke、Adachi Yu、Suzuki Tateki、Kuroda Daisuke、Nishiyama Ayae、Yumoto Kohei、Takeyama Haruko、Suzuki Tadaki、Hashiguchi Takao、Takahashi Yoshimasa	4. 巻 19
2. 論文標題 Structural basis for cross-group recognition of an influenza virus hemagglutinin antibody that targets postfusion stabilized epitope	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1011554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1011554	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hashiguchi T
2. 発表標題 Viral pathogenesis and pharmaceutical studies for viral infectious diseases utilizing protein science
3. 学会等名 Advanced Seminar Series on Microbiology and Immunology (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hashiguchi T
2. 発表標題 Glycan receptor and entry mechanism of mumps virus
3. 学会等名 Sialoglyco2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hashiguchi T
2. 発表標題 Structural biology of human pathogenic RNA viruses
3. 学会等名 UCLA-KU seminar series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hashiguchi T
2. 発表標題 Molecular mechanism of glycan receptor recognition by mumps virus
3. 学会等名 The 27th East Asia Joint Symposium (EAJS) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋口隆生
2. 発表標題 麻疹ウイルスによる神経感染症の分子メカニズム
3. 学会等名 第 25 回日本神経感染症学会総会・学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hashiguchi T
2. 発表標題 Glycan receptors for mumps virus and other paramyxoviruses
3. 学会等名 2020 Society for Glycobiology Virtual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Ikegame, Kasopefoluwa Oguntuyo, Takao Hashiguchi, Makoto Takeda, Benhur Lee
2. 発表標題 Identify and interrogating the functional constraints that contribute to the lack of antigenic drift in paramyxoviruses.
3. 学会等名 American Society for Virology (ASV) 39th Annual Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋口隆生
2. 発表標題 原子の世界でウイルスを視る、制御する
3. 学会等名 京都大学医生物学研究所 第17回公開講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 菅又昌実編 (橋口隆生)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 264
3. 書名 日本の感染症 (麻疹 急性および持続感染機構からワクチンの作用機序まで)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------