

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02855

研究課題名(和文) 抗フラビウイルス薬の創製を目指した中和モノクローナル抗体認識の立体構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis of neutralized monoclonal antibody which recognizes multiple species of flavivirus

研究代表者

加藤 龍一 (Kato, Ryuichi)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授

研究者番号：50240833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウエストナイルウイルス(WNV)は、時に致死性の脳炎・髄膜炎を惹き起こすフラビウイルス科の蚊媒介性ヒト感染性ウイルスである。研究分担者らによって見出された WNV に働く中和抗体は、同じフラビウイルス科の日本脳炎ウイルス(JEV)とも交差反応を示すという興味深い性質を持つ。我々は、そのFab化抗体とWNVのエンベロープタンパク質の複合体のX線結晶構造を2.6 Å分解能で決定した。明らかにした立体構造および変異体を用いた結合測定実験結果から、この中和抗体はJEVとWNVに保存されているArg388を認識し、また抗体L鎖CDRの特異性に許容範囲がある、という認識機構を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2種類の抗原に活性を示すモノクローナル抗体の単離自体ユニークであり、それとWNVのエンベロープタンパク質複合体の立体構造解析は当然唯一無二である。明らかにした立体構造から分子認識機構を明らかにすることができ、それはフラビウイルスに共通の抗体医薬および合成低分子抗ウイルス薬の創薬を検討する上で重要な知見を与え得ると言える。

研究成果の概要(英文)：West Nile virus (WNV) is a mosquito-borne human infectious virus of the Flavivirus family and sometimes causes lethal encephalitis and meningitis. We isolated interesting antibodies which neutralize both WNV and Japanese encephalitis virus (JEV) that also belongs to Flavivirus family. We determined the X-ray crystal structure of the complex of one of the antibodies and the enveloped protein of WNV at 2.6 Å resolution. The three-dimensional structure and mutational analysis revealed that Arg388 which are conserved in JEV and WNV and CDR of L-chain are essential for the binding activity.

研究分野：構造生物学

キーワード：ウエストナイルウイルス フラビウイルス 中和抗体 X線結晶構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウエストナイルウイルス (WNV) は、高齢者層を中心に時に致死性の脳炎・髄膜炎を惹き起こすフラビウイルス科の蚊媒介性ヒト感染性ウイルスで、アフリカ、ヨーロッパ、中東、中央アジア、西アジアなど広い地域に分布している。かつて北米大陸にこのウイルスは存在していなかったが、1999 年にニューヨーク市で outbreak が発生してから瞬く間に北米大陸全般において患者発生が報告されるようになり、その後毎年北米全域において患者が発生していることから、今やこのウイルスは北米大陸に定着したものと見なされるようになった。

自然界においては鳥と蚊により感染環が維持されているが、このウイルスは他のフラビウイルスに比べはるかに広い宿主域を持っている。それらの鳥と蚊は本邦にも普遍的に存在していることから、我が国にも一旦ウイルスが侵入すれば急速に拡散・定着し、その駆逐は事実上不可能であることが危惧される。国際間の交通事情により、ウイルス侵入の危険は常在しており、また今後の老年者の増加や、WNV 感染症に対する実用的な治療薬やワクチンが未だ無いことを鑑みれば、ワクチン開発や治療薬開発を始めとするその感染症対策は急務である。

他のフラビウイルスと同様、WNV の構造タンパク質である E (envelope) タンパク質は、中和抗体エピトープが存在する防御免疫誘導の主体となるタンパク質である。WNV に近縁の日本脳炎ウイルス (JEV) ワクチン接種者の一部に、中和活性を持つ抗 WNV 抗体の誘導が認められるという報告があった (青山幾子ら、平成 22 年 第 58 回日本ウイルス学会学術集会)。この知見に基づき、研究分担者らは、JEV ワクチン被接種ヒト末梢血単核球から 3 種類のヒト抗 WNV E タンパク質モノクローナル抗体 (WN_11、WN_39、WN_83) を樹立した。これらは、いずれも WNV E タンパク質に対して $K_d = 1.6 \times 10^{-9} \text{ M}$ 以下の強い親和性を示し、WNV に対する中和力価 (70% プラーク減少率) も、27.3 $\mu\text{g/ml}$ 未満の濃度であった。さらに、ELISA を用いた競合結合阻害試験により、これらの抗体はいずれも異なったエピトープを認識していることが示唆された。さらに、マウスに致死量の WNV を感染させた実験において、WN_83 を投与した群では、コントロール抗体を投与した群と比較して、生存率が改善することを示した。

また、これらの抗体は、JEV および デングウイルス (DENV、これもフラビウイルス属のウイルスである) に対しても中和作用を示し、フラビウイルス属に共通する感染機構を阻害している可能性が考えられる。フラビウイルス属に対する抗ウイルス薬開発の試みとしては、その作用機序に基づいて、ウイルス侵入阻害薬、カプシド合成阻害薬、ウイルス非構造タンパク質遺伝子にコードされるプロテアーゼ・ヘリカーゼ・メチルトランスフェラーゼ・RNA ポリメラーゼなどウイルス増殖に係わる酵素類の阻害薬、宿主のウイルス増殖に係わる因子の阻害薬などが考えられている (Lim *et al.* (2013) *Antiviral Research* 100, 500-519)。これらのうち、ウイルス侵入阻害薬以外は、宿主細胞内に取り込まれて作用することから、何らかの毒性が生ずる可能性がより大きいと考えられる。一方、我々の見出した抗体は、宿主細胞の受容体に結合および感染時におけるエンドソーム膜との膜融合に係る E タンパク質に結合する。そのため、抗ウイルス薬の作用機序から言えば、宿主細胞内に取り込まれて作用しないため、より安全と考えられるウイルス侵入阻害薬に類するものである。よって、これらの抗体の E タンパク質に対する結合機構を詳細に解析することにより、フラビウイルスに対する安全な抗ウイルス薬の創薬に繋がる知見が得られると考えられる。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究を発展させて、抗 WNV 薬の創薬を目指す基盤研究を行う。そのために以下の 4 つの到達目標を設定した。

(1) 今回得られた中和活性を有する 3 種類のモノクローナル抗体のエピトープ解析を X 線結晶構造解析にて行う。

(2) 得られた WNV E タンパク質 - 抗体複合体の立体構造から、抗体の認識の分子機構を明らかにする。

(3) 今回の抗体がフラビウイルス科の WNV、JEV、DENV と交差反応を示すことから、ウイルス間で共通すると考えられる分子認識機構を明らかにする。

(4) 中和抗体結合部の立体構造を明らかにすることにより、フラビウイルスに共通の抗体医薬開発のみならず、抗原結合部位の立体構造を mimic すること等による合成低分子抗ウイルス薬の創薬に繋げる新規研究計画を立案する。

3. 研究の方法

(1) WNV E タンパク質の発現と精製

研究分担者の正木 (近畿大学) は、WNV の組換えワクチン開発を目指して、ユニークな *Drosophila* 昆虫細胞発現系により組換え WNV E タンパク質発現系を確立している。この系を

用いて、全長の WNV E タンパク質の発現を正木(近畿大学)および加藤(高エネ機構)で行い、最終精製は加藤(高エネ機構)で行った。最終精製品は精製度は結晶化に耐えるものであったが、量としては結晶化スクリーニングを数セット行える程度が得られた。

また、高エネ機構では、大腸菌の発現系を用いての全長およびドメインごとの発現コンストラクトを作成し、その発現および精製法の検討を行った。大腸菌で発現させた全長タンパク質は不溶性であったので、各種巻き戻し条件を検討したが有効なものは見出すことはできず、一方、WNV E タンパク質の断片化したドメイン III のコンストラクトについては可溶性画分として回収でき、その精製法の確立を行った。その精製度および量とも、結晶化スクリーニングを行うのに十分なサンプルを得ることができた。

(2) モノクローナル抗体の発現と精製

研究分担者の小澤(富山大学)は、抗 WNV E タンパク質モノクローナル抗体 3 種類の大量生産を行った。それまでにスモールスケールで成功していた全てのクローンでスケールアップしての発現、精製、Fab 化を行った。Fab 化した後の精製過程のゲル濾過で、該当する分子量の分画として回収され、結晶化を行うのに十分な品質を持ち、一度の培養で数ミリグラムの精製タンパク質を得る事もでき、結晶化スクリーニングを行うのに十分であった。

(3) WNV E タンパク質と抗体の複合体の結晶構造解析

加藤(高エネ機構)は、精製された WNV E タンパク質とその Fab 化した抗体との複合体の大量調製およびその最終精製を行い、その結晶化を行った。結晶化スクリーニングには加藤らが開発運用している高エネ機構の「全自動結晶化観察ロボット」を用いることで、スクリーニングの効率化を図り、得られた結晶化条件の最適化を行って迅速に回折実験に供する結晶の作成を行った。その際、クライオ条件の検討や、複数結晶による回折データのマージなども行った。結晶の評価および回折データの収集には、加藤の所属する高エネ機構の放射光研究施設(PF)を主に使用すると共に、適宜、SPring-8 などの他の放射光施設も活用し、迅速で高精度のデータ収集を行った。

(4) 立体構造解析からの展開

得られた複合体の結晶構造から、WNV E タンパク質を抗体がどのように認識しているかの分子機構を明らかにした。そして、その相互作用に関わるアミノ酸に変異を導入した変異 WNV E タンパク質をデザインし、その発現精製を行った。これを用いて、ELISA により抗体と E タンパク質の相互作用解析を行ってどのアミノ酸に関わる相互作用が重要かの検証を行った。また、今回の研究対象の抗体は、同じフラビウイルス科の WNV, JEV, DENV とも交差反応を示すことから、それらに共通の構造基盤があると想像され、得られた立体構造と各ウイルスの E タンパク質のアミノ酸配列の比較を行い、その分子機構の推定を行った。

4. 研究成果

WNV 中和抗体を Fab 化した発現コンストラクト、および WNV E タンパク質の発現コンストラクトを作成し、それらの発現精製を行い、結晶構造解析に十分な純度と量のサンプルを得た。それらを用いて結晶化を行い、X線結晶構造解析により Fab 化した WN_83 と WNV E タンパク質のドメイン III の複合体の立体構造を 2.6 Å 分解能で決定することに成功した(図)。2 種類の抗原に活性を示すモノクローナル抗体の単離自体ユニークであり、それと WNV E タンパク質複合体の立体構造解析結果は今回初めて得られたものである。

明らかにした立体構造から、分子認識に寄与するアミノ酸残基を推定し、それらに変異を導入した変異 WNV E タンパク質を作成し、その発現精製を行った。それらと WN_83 抗体との ELISA 実験の結果から、この中和抗体は JEV と WNV に保存されている Arg388 を認識することが最も重要で、また抗体 L 鎖 CDR の特異性に許容範囲がある、という認識機構を明らかにすることができた。この知見は、フラビウイルスに共通の抗体医薬および合成低分子抗ウイルス薬の創薬を検討する上で重要な知見を与えると考えられる。



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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ozawa T, Masaki H, Takasaki T, Aoyama I, Yumisashi T, Yamanaka A, Konishi E, Ohnuki Y, Muraguchi A, Kishi H	4. 巻 154
2. 論文標題 Human monoclonal antibodies against West Nile virus from Japanese encephalitis-vaccinated volunteers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antiviral Res	6. 最初と最後の頁 58-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.antiviral.2018.04.011	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 Kato Ryuichi, Hiraki Masahiko, Yamada Yusuke, Tanabe Mikio, Senda Toshiya	4. 巻 77
2. 論文標題 A fully automated crystallization apparatus for small protein quantities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 29 ~ 36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S2053230X20015514	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 Miyoshi Shogo, Tokunaga Soh, Ozawa Tatsuhiko, Takeda Hiroyuki, Aono Mitsuo, Miyoshi Takanori, Kishi Hiroyuki, Muraguchi Atsushi, Shimizu Shin-ichi, Nozawa Akira, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 15
2. 論文標題 Production of a rabbit monoclonal antibody for highly sensitive detection of citrus mosaic virus and related viruses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0229196	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15件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ryuichi Kato, Mikio Tanabe, Yusuke Yamada, Masahiko Hiraki, Toshiya Senda
2. 発表標題 Improvements of an automated crystallization and observation system and in situ X-ray diffraction experiment for LCP crystallization
3. 学会等名 13th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato, Ryuichi; Hiraki, Masahiko; Yamada, Yusuke; Tanabe Mikio; Senda, Toshiya
2. 発表標題 Improvements of a fully automated protein crystallization and monitoring system
3. 学会等名 International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤龍一・平木雅彦・山田悠介・田辺幹雄・千田俊哉
2. 発表標題 全自動結晶化観察システムの機能向上と外部利用
3. 学会等名 日本結晶学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤龍一
2. 発表標題 全自動大規模結晶化スクリーニングシステムを用いたX線結晶構造解析支援と高度化
3. 学会等名 BINDS報告会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤龍彦
2. 発表標題 ヒト、ウサギ、サメモノクローナル抗体の迅速作製と創薬への応用
3. 学会等名 フォーラム富山「創薬」第49回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Masaki H, Ozawa T, Takasaki T, Aoyama I, Yumisashi T, Yamanaka A, Konishi E, Muraguchi A, Kishi H.
2. 発表標題	Human anti-WNV monoclonal antibodies established from JEV-vaccinated volunteers.
3. 学会等名	ファーマラボEXPOアカデミックフォーラム
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	山田悠介・田辺幹雄・尾関雅弘・菅原隆広・千田俊哉・加藤龍一
2. 発表標題	Photon Factoryにおける膜タンパク質結晶構造解析パイプライン
3. 学会等名	日本結晶学会 2018年度年会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	加藤龍一
2. 発表標題	放射光施設における結晶化スクリーニングの自動化
3. 学会等名	第41回 日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	小祝 孝太郎、月本 準、東 哲也、加藤 龍一、Leonard M.G. Chavas、千田 俊哉、伊藤 孝司、湯本 史明
2. 発表標題	哺乳動物細胞を用いた細胞内結晶化法
3. 学会等名	第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 加藤龍一
2. 発表標題 全自動大規模結晶化スクリーニングシステムを用いたX線結晶構造解析支援と高度化
3. 学会等名 BINDS報告会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅原隆広, 山田悠介, 田辺幹雄, 加藤龍一, 千田俊哉
2. 発表標題 In situデータ測定によって得られたタンパク質X線回折データの解析
3. 学会等名 第34回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林淳, 山田悠介, 篠田晃, 松垣直宏, 引田理英, 千田俊哉, 加藤龍一
2. 発表標題 全自動多点測定システムとMR Native-SAD法を用いた構造決定
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅原隆広, 山田悠介, 田辺幹雄, 加藤龍一, 千田俊哉
2. 発表標題 In situデータ測定によって得られたタンパク質X線回折データの解析
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林淳, 小澤龍彦, 正木秀幸, 加藤龍一
2. 発表標題 複数のエピトープと結合するモノクローナル抗体の認識機構—クラスター状結晶からの構造解析—
3. 学会等名 日本結晶学会2020年度年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤龍彦, 小林栄治, 浜名洋, 村口篤, 岸裕幸
2. 発表標題 ISAAC法を用いたTCR様抗体の迅速作製とその応用
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター https://www2.kek.jp/imss/sbrc/ 富山大学大学院医学薬学研究部 免疫学講座 http://www.med.u-toyama.ac.jp/immuno/top.html 近畿大学 生物理工学部・大学院 生物理工学研究科 https://www.kindai.ac.jp/bost/research-and-education/teachers/introduce/hideyuki-masaki-70b.html
--

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
研究分担者	小澤 龍彦 (Ozawa Tatsuhiko) (10432105)	富山大学・学術研究部医学系・准教授 (13201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	正木 秀幸 (Masaki Hideyuki) (90247982)	近畿大学・生物理工学部・准教授 (34419)	

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