

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02971

研究課題名(和文)フラビウイルス科の各ウイルスを厳密に区別できるモノクローナル抗体の開発

研究課題名(英文) Research and development of monoclonal antibodies that can strictly distinguish
Flavi viruses

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)：我々が決定した、ウエストナイルウイルス(WNV)のエンベロープタンパク質(Eタンパク質)とモノクローナル抗体WN_83との複合体のX線結晶構造に基づき、フラビウイルス科に属する日本脳炎ウイルス(JEV)、黄熱病ウイルス、ジカ熱ウイルスの各Eタンパク質とWN_83との複合体の結晶構造解析に取り組み、大量発現および精製法の確立、複合体の確認、結晶化等を行った。また、WN_83とWNVのEタンパク質ドメイン3の複合体構造をモデルに、WN_83とWNVおよびJEVのEタンパク質全長の複合体のモデルシミュレーションを行い、その相互作用の分子機構について考察を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

WN_83と各種フラビウイルスのEタンパク質との複合体の結晶構造解析は完了しなかったが、それぞれのタンパク質の大量発現および精製系を構築することができたことは、今後の当分野の発展に寄与すると思われる。WN_83とWNVおよびJEVのEタンパク質全体構造についてモデルシミュレーションを行い、その相互作用の違いを見出した。さらに、抗体分子結合によるウイルス粒子全体構造のシミュレーションについての先進的な研究を開始した。これらの知見は、今後の当分野の発展に寄与すると共に、ウイルスという巨大分子を対象とするシミュレーションという新分野の今後の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Based on the X-ray crystal structure of the complex between the West Nile virus (WNV) envelope protein (E protein) and the monoclonal antibody WN_83 that we determined, we carried out the crystal structure analysis of the complex between the E proteins of Japanese encephalitis virus (JEV), Yellow fever virus, and Zika virus, which belong to the Flaviviridae family, and WN_83. We established overexpression and purification procedure of them, confirmed to obtain the complexes, and crystallization. We also performed a model simulation of the interactions between WN_83 and full-length E proteins (WNV and JEV) based on the complex structure of WN_83 and WNV E protein (domain 3), and discussed the molecular mechanism of the interaction.

研究分野：構造生物学

キーワード：フラビウイルス 中和抗体 X線結晶構造解析 MDシミュレーション

1. 研究開始当初の背景

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ヒト感染性ウイルスである。蚊媒介性フラビウイルスとして、WNV の他に日本脳炎ウイルス (JEV)、黄熱病ウイルス (YFV)、デング熱ウイルス (DENV)、ジカ熱ウイルス (ZIKV) があり、その感染区域は一部重複している。JEV, YFV については既にワクチンが存在しているが、WNV, DENV, ZIKV には実用的なものは未だなく、いずれも確立された治療法はない。昨今の COVID-19 の outbreak のように、現代の国際間の交通事情によりひとたび免疫のないウイルスが侵入した場合の危険性は改めて言うまでもない。また本邦における今後の高齢者の増加や、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、ワクチンや治療薬の開発を始めとするその感染症対策は非常に重要である。また、これらの多重感染区域でどのウイルスに感染しているかを判定できる方法も、感染症対策の一環として重要である。

未だ有効な治療法のない WNV 感染症を含むフラビウイルス感染症に対して、包括的かつ効果的な治療薬の開発は、人類にとって極めて有効と思われる。また、フラビウイルス科の中で特定のウイルスだけを迅速かつ簡便に検出できる技術の開発は、疫学的にも重要であり多重感染区域だけでなく適切な感染症対策を講じる上で役立つ。

2. 研究の目的

フラビウイルス感染症は、世界の広い地域に分布し我が国への感染拡大の危険性が指摘されているが、実用的な治療薬やワクチンは未だ無い。研究分担者らによって見出された WNV に働く中和抗体 WN_83 は、同じフラビウイルス科の JEV とも交差反応を示すという興味深い性質を持つ。我々はその抗体と WNV のエンベロープタンパク質 (E タンパク質) との複合体の立体構造の決定に成功し、異なるウイルスを同時に認識する抗体の分子機構を明らかにした。その構造基盤を発展させ、(1) フラビウイルス科の各種ウイルスを同時に認識する抗体を開発し、異なるフラビウイルス感染症のどれにも効果のある抗体医薬開発につながる知見を得ること、(2) フラビウイルス科の中の特定のウイルスだけを認識する抗体を開発し、多重感染地域などでどのウイルスに感染しているかを判定できる診断薬の開発につながる知見を得ること、を研究の目的とした。

3. 研究の方法

各ウイルス由来 E タンパク質と中和抗体 Fab の大量生産・精製系を構築し、その複合体 X 線結晶構造を決定して、分子認識の詳細と違いを明らかにする。

抗体が実際にどのように働くかを調べるためのウイルスの中和活性測定法として、WNV ゲノムの構造タンパク質遺伝子を蛍光蛋白質 DsRed2 遺伝子に置換することにより増殖能を欠失させて BSL2 施設で取り扱うことが出来る RVPs (Fernández, I. et al., J. Virol. Methods (2014) 208, 96-101) 法の構築と、それを他のウイルスにも適用した系の構築を行い、その評価を行う。

WNV と中和抗体 Fab の複合体の立体構造に基づいて、他のフラビウイルスとのドッキング構

造をモデリングし、MD シミュレーションを行い、情報科学的にその生体環境中の安定構造とその揺らぎの解析から重要な相互作用点を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 結晶構造解析について

JEV, YFV, ZIKV の E タンパク質の発現コンストラクトの作成を行った。それらのうち、JEV と YFV については、発現および精製法の確立に成功し大量精製を行い、WN_83 の Fab 化抗体についてもその大量精製を行った。これらを用いて複合体形成について調べたところ JEV の E タンパク質と Fab 化抗体は強い親和性を示し(図1)、安定な複合体を得ることができた(図2)。そしてこのサンプルを用いて結晶化を行い、結晶を得ることができた(図3)。

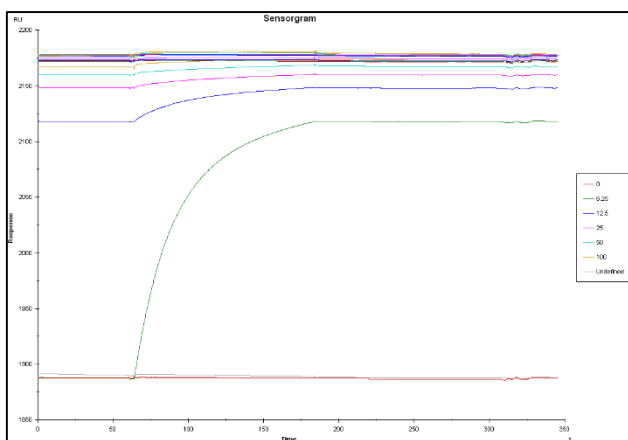


図1.
表面プラズモン共鳴を用いた WN83 Fab と JEV E タンパク質の相互作用解析

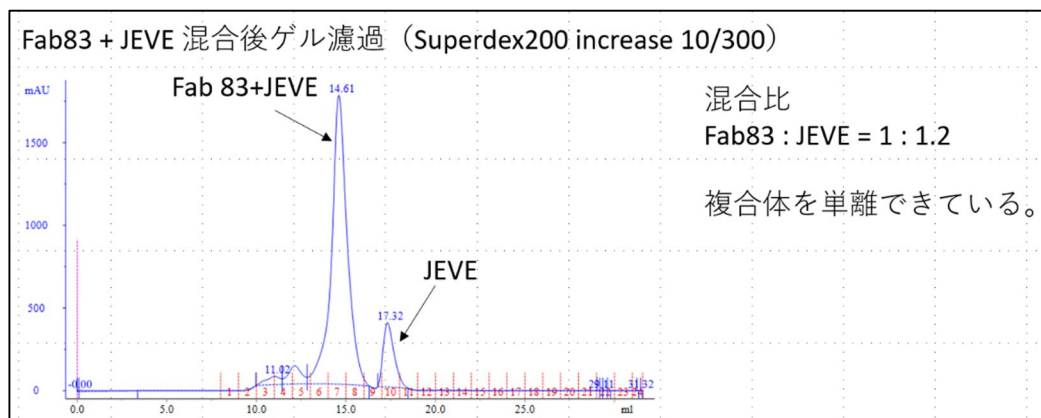


図2. WN_83 Fab と JEV E タンパク質の複合体の分離精製

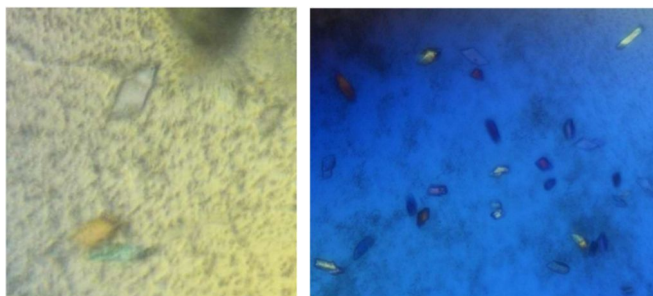


図3.
WN_83 Fab と JEV E タンパク質の複合体の結晶

しかし残念ながら、現在までに構造解析を行うのに必要な回折能を示す結晶を得るに至って
おらず、結晶化条件の最適化を継続して進めている。

YFV の E タンパク質と WN_83 の Fab 化抗体については、弱い親和性を示すことがわかった
(図4)。ゲル濾過で複合体の分離精製を試みたが、弱い相互作用とゲル濾過中にサンプル濃度
が低下することからか、複合体の分離には至らなかった(図5)。そこで、2者を混合したサン
プルを用いて結晶化を行ったところ、結晶を得ることができた(図6)。しかし残念ながら、現
在までに構造解析を行うのに回折能を示す結晶を得るに至っておらず、結晶化条件の最適化を
継続して進めている。

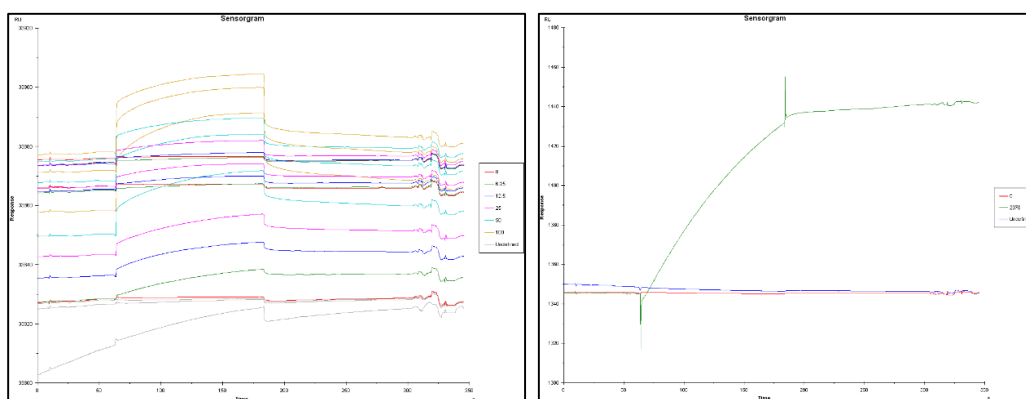


図4. 表面プラズモン共鳴を用いた WN_83 Fab と YFV E タンパク質の相互作用解析
左: 0.625 - 10 μ M YFV E ほとんど相互作用していない
右: 129 μ M YFV E 高濃度で結合が観察された

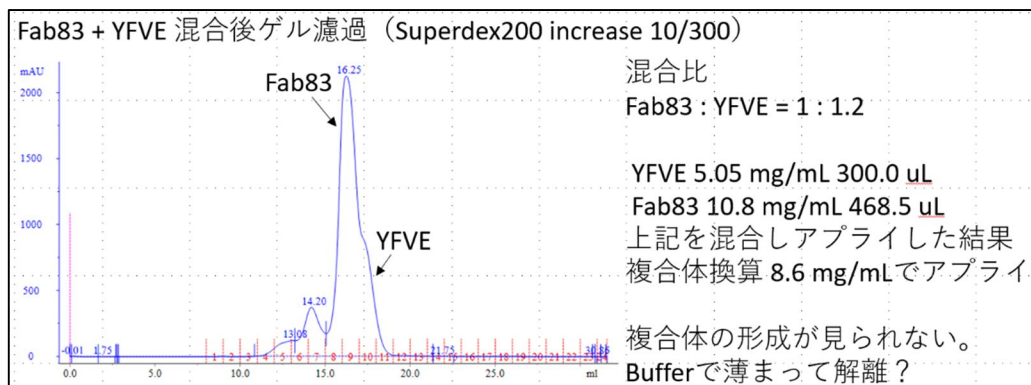


図5. WN_83 Fab と YFV E タンパク質のゲル濾過結果

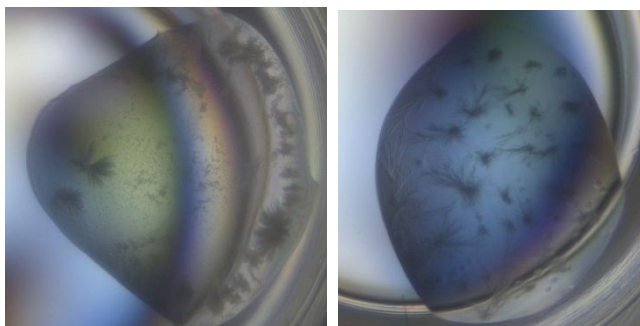


図6.
WN_83 Fab と YFV E タンパク質
の結晶

(2) 中和活性測定系の構築について

各ウイルスと中和抗体の中和活性測定系の構築のため、それぞれのウイルスに対するプラーク減少法を用いた実験系の構築の準備を行った。具体的には、JEV Beijing-1 株・ZIKV PRVABC59 株、および Vero 細胞 9013 株を入手して培養を行い、中和活性測定に用いるためのストックを製作した。四種特定病原体である JEV Beijing-1 株の取り扱いに際して法令で要求されるものの、実験室を容易に消毒することが出来るようにするための実験室壁面の耐水化工事、および WNV RVP を用いた実験を行うための大臣確認申請を行い、中和活性測定実験を行うための拡散防止措置の大臣確認を得た。そして、実験に必要な RprBHK2G2 細胞株と、pCAGGS-WNV C および pCAGGA-WNV prM/E の 2 種類のプラスミドを入手し、予備実験を行った。

(3) 構造シミュレーションについて

我々が構造を決定した WNV の E タンパク質の domain 3 (D3) と Fab 化抗体の分子認識の相互作用が、他のウイルスで保存されているかどうか検討するため、WNV と Fab 化抗体の複合体、JEV と Fab 化抗体のそれぞれの複合体モデルの作成と、それらの分子動力学 (MD) シミュレーションを実施した。WNV と JEV で共通な相互作用、異なる相互作用のほか、結晶構造とは違う相互作用も見出され (図 7)、それらが Fab 化抗体の WNV と JEV の E タンパク質に対する結合力の違いの原因である可能性とともに、結晶構造とは異なる溶液中での相互作用の可能性についても示唆することができた。

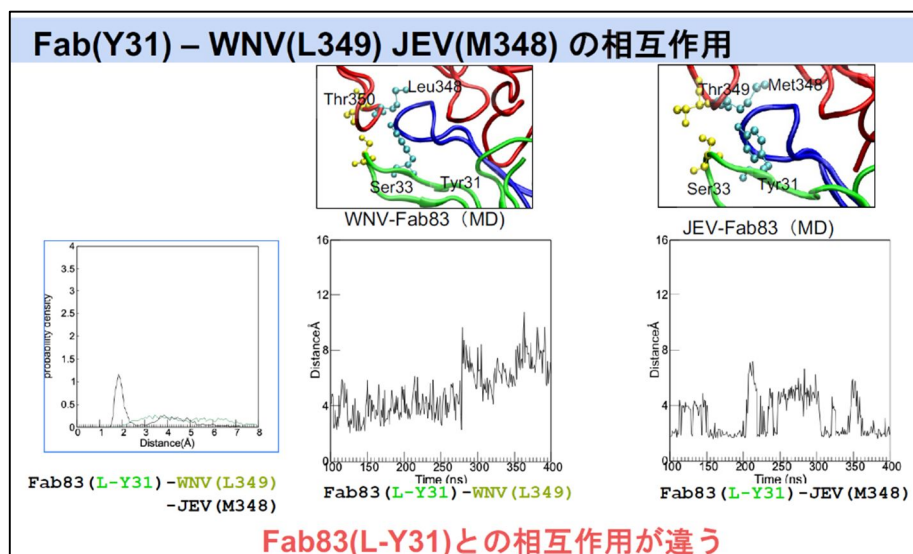


図7. MD シミュレーションによる相互作用様式の違い

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Ozawa Tatsuhiko, Kobayashi Eiji, Hamana Hiroshi, Nakamura Tomoko, Lyu Fulian, Hayashi Atsushi, Muraguchi Atsushi, Kishi Hiroyuki | 4. 巻 51 |
| 2. 論文標題 Rapid and efficient generation of T cell receptor like antibodies using chip based single cell analysis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 European Journal of Immunology | 6. 最初と最後の頁 1850 ~ 1853 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.202049083 | 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 | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 Automation of Crystallization Screening at KEK | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nihon Kessho Gakkaishi | 6. 最初と最後の頁 212 ~ 215 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5940/jcrsj.63.212 | 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 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤龍一 |
| 2. 発表標題 構造生物学研究センターにおける結晶化の自動化 |
| 3. 学会等名 量子ビームサイエンスフェスタ |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤龍一 |
| 2. 発表標題 高エネ機構における結晶化の自動化の最新状況 |
| 3. 学会等名 iBIX-JAXA-KEK物構研-QST合同タンパク質研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 小澤龍彦 |
| 2. 発表標題 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 熊本大学 第27回遺伝子実験施設セミナー |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 坂口久峻、辻 彩花、東 慶直、正木秀幸、加藤暢宏 |
| 2. 発表標題 経口粘膜ワクチン開発に向けたジカウイルスエンベロープ蛋白質発現酵母菌株の樹立 |
| 3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小澤龍彦 |
| 2. 発表標題 富山大学における抗体作製支援の取り組みーマラリア抗体やスーパー中和抗体など |
| 3. 学会等名 令和3年度BINDS公開シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kobayashi J, Ozawa T, Masaki H, Kato R |
| 2. 発表標題 Recognition mechanism of a monoclonal antibody which neutralizes different species of flavivirus |
| 3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉川誠仁, 加藤龍一, 小澤龍彦, 正木秀幸, 宮下尚之 |
| 2. 発表標題 MDシミュレーションを用いたWNVエンベロープ蛋白質部分モデルと中和ヒトモノクロナール抗体との相互作用に関する研究 |
| 3. 学会等名 第29回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 川崎淳矢, 西埜菜津紀, 阪上仁頌, 正木秀幸, 芦田 久 |
| 2. 発表標題 乳酸菌を用いたジカウイルスに対する経口粘膜ワクチン開発の検討 |
| 3. 学会等名 2024年度日本農芸化学会大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masahito Yoshikawa, Hideyuki Masaki, Ryuichi Kato, Tatsuhiko Ozawa, Naoyuki Miyashita |
| 2. 発表標題 Molecular Dynamics simulation of the complex of the multiple distinctive structural regions in the WNV envelope and human monoclonal antibody. |
| 3. 学会等名 21st IUPAB Congress 2024 (IUPAB2024) (国際学会) |
| 4. 発表年 2024年 |

〔図書〕 計0件

〔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 |
|-----------|--|--------------------------------------|----|
| 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 | 宮下 尚之 (Miyashita Naoyuki) (20452162) | 近畿大学・生物理工学部・准教授 (34419) | |
| 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 |
|---------|---------|
| | |