HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	HIV-2およびSARS-CoV-2表面糖蛋白質の立体構造解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	安楽, 佑樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15780号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92309
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Anraku_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　氏　名　　安楽　佑樹

審査担当者	主査	教　授	前　仲　勝　実
	副査	教　授	中　川　真　一
	副査	講師	米　田　宏
	副査	准教授	黒　木　喜　美　子

学 位 論 文 題 名

HIV-2 および SARS-CoV-2 表面糖蛋白質の立体構造解析

博士学位論文審査等の結果について（報告）

新興感染症は 1980 年以降新しく認知され、局地的あるいは国際的に公衆衛生上の問題となる感染症のことである。新興感染症の中でもヒト免疫不全ウイルス（HIV）および新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は国際的に流行拡大を示し、公衆衛生に加えて社会的にも大きな影響を与えた。筆者は、HIV および SARS-CoV-2 について、ウイルスのアミノ酸変異に耐えうる中和抗体の開発を目指して、立体構造解析の観点から表面糖蛋白質の特徴について研究を進めた。

第１部では、HIV-2 の表面糖タンパク質（Env）について、膜外領域の発現系構築や抗体との結合実験、立体構造解析を行った。HIV-2 Env はウイルスが細胞に侵入する際に重要な役割を果たす膜タンパク質であるが、糖鎖が多く柔軟な構造をしていることもあり、立体構造は未解明である。HIV の Env は三量体を形成するとされているが、膜外領域のみを発現させた場合は、三量体の安定性は乏しいとされている。そのため筆者は、HIV-1 Env との融合タンパク質や、安定化変異の導入など、多くのコンストラクトを作製し、発現条件や精製方法について検討を重ねた。調製した試料については ELISA 法による抗体との結合実験、Blue Native-PAGE による多量体形成の解析、クライオ電子顕微鏡（Cryo-EM）による粒子形状の観察などを行い、コンストラクトの評価とした。その結果、Chimera U6 MD4 と名前をつけたコンストラクトは、発現量が良く、効率よく三量体を形成し、抗体結合能も保持していることが判明した。筆者はさらに、Chimera U6 MD4 の精製タンパク質について、グルタルアルデヒドを用いて化学的に架橋を行い、高速原子間力顕微鏡（HS-AFM）を用いた動的構造解析を行った。HS-AFM では、HIV-2 Env の三量体に相当する三角形状の粒子が観察され、各プロトマーの頂点が揺らぐ様子が観察された。グルタルアルデヒドによる架橋を施した Env についても同様に、三量体相当の粒子が観察されたが、プロトマーの頂点が揺らぐような動きは観察されたなかった。HIV-2 Env の HS-AFM で観察されたプロトマー間の動きは、HIV-1 Env で報告されているような、open 型と closed 型に相当することが推察された。HIV-2 Env の Chimera U6 コンストラクトは、Cryo-EM による観察で open 型であることも示唆された。以上の結果から筆者は、HIV-2 Env は closed 型と open 型の平衡状態にあるが、HIV-1 Env と比較するとより open 型に平衡は傾いている可能性を指摘した。さらに、糖鎖に覆われていないエピトープが露出していることが、HIV-2 では広域中和抗体を誘導されやすい原因になっていることについても考察した。

第２部で、筆者は SARS-CoV-2 の spike タンパク質の構造解析、および spike タンパク質と中和抗体複合体の構造解析を行った。まず、ヒト抗体産生化マウスから単離された中和抗体 NT-108 について、Cryo-EM を用いて Spike と NT-108 複合体の構造を決定し、NT-108 は受容体結合ドメイン

（RBD）に結合することが分かった。得られた複合体構造から NT-108 が ACE2 結合を直接阻害することで中和活性を発揮することが明らかになった。NT-108 はエピトープ領域に含まれる E484K および S494P アミノ酸変異によって ACE2 阻害活性が消失することが分かっている。E484 は NT-108 重鎖 CDR2 に含まれるアルギニン残基と塩橋を形成しているが E484K 変異により塩橋を解消、S494 は NT-108 重鎖 CDR3 主鎖と相互作用を形成しているが S494P 変異により立体的に衝突が起こることで十分な親和性を維持できなくなったと考えられた。筆者は得られた構造からし中和抗体 NT-108 のエピトープを決定し、抗体の作用機序やウイルスが変異によって NT-108 逃避する機構について考察した。

続いて筆者は、広範な系統株を中和可能な中和抗体の取得を目指して選別された NIV 抗体群について Cryo-EM による Spike と中和抗体の複合体構造解析を行った。NIV 抗体は COVID-19 回復者血清から単離された中和抗体について、変異頻度の少ない残基を認識するようにスクリーニングされた抗体である。選別された抗体の中から NIV-8、NIV-10、 NIV-11、NIV-13 の 4 つの抗体について Spike との複合体構造を決定した。NIV-8 を除き NIV-10、NIV-11、NIV-13 は F486 および YF489 を含む領域を認識していたが、興味深いことに抗体が認識している領域は 3 つの抗体で大きく異なり、NIV-10 が最も広い領域を認識していた。2021 年 11 月に検出された Omicron 系統は従来系統と変異頻度の傾向が異なり、これまで変異頻度が低かった F486 残基に変異を有するが、NIV-10 は F486 残基に変異をもつ系統株にも中和活性を維持していた。NIV-10 と NIV-11 の F486 残基の認識について比較すると、NIV-10 は F486 残基を緩やかに認識しており、変異に対する耐性が高いことが分かった。以上のことから NIV-10 は RBD の広い領域を認識し、Omicron 系統に特徴的な変異に対応して広範な中和活性を発揮できる抗体であることが分かった。

最後に筆者は、SARS-CoV-2 の Omicron 系統のうち 2022 年に流行した XBB.1 株の Spike 蛋白質について単体および ACE2 複合体の Cryo-EM を用いた構造解析を行った。XBB.1 は Omicron 系統に特徴的な N460K 変異と F486S 変異をもつ。N460K 変異は ACE2 アミノ酸残基とは離れた位置に存在し、直接相互作用を形成しないが ACE2 親和性を向上させる。XBB.1 Spike-ACE2 複合体では N460K 変異は ACE2 N90 残基に付加された N 型糖鎖と接触していた。これまでに ACE2 N90 糖鎖は RBD 結合に不利であり、RBD-ACE2 複合体構造では糖鎖の接触が観察されていないことが示されており、N460K 変異によって N90 糖鎖との接触が結合に有利に働くように変化させていることが示唆された。一方、F486 残基は ACE2 との直接相互作用に関与しておりを形成し、F486S 変異によって ACE2 親和性を低下させるが、抗体逃避にも大きく貢献している。XBB.1 Spike-ACE2 複合体では F486S 変異により ACE2 との疎水性相互作用が失われたことが、ACE2 親和性低下の要因であることが分かった。以上の結果から Omicron 系統が獲得した N460K 変異は ACE2 糖鎖を介して親和性を向上させる一方で、F486S 変異は疎水性相互作用の消失によって親和性を低下させることが立体構造の観点からも明らかにされた。

このように、筆者は、HIV や SARS-CoV-2 の糖タンパク質について、物理化学解析や立体構造解析を行い、表面糖タンパク質の性状を考察し、そこからウイルス感染による中和抗体誘導やウイルスによる免疫逃避などについて重要な知見を見出した。筆者は、SARS-CoV-2 のパンデミックにおいて基礎科学の面から重要な貢献を行ったとともに、将来のパンデミックに活用される非常に貴重な知見を残した。

よって筆者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。