



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	HIV-2およびSARS-CoV-2表面糖蛋白質の立体構造解析 [全文の要約]
Author(s)	安楽, 佑樹
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/92321
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Anaku_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏名 安楽 佑樹

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

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）は国際的に流行が拡大し、公衆衛生および社会に大きな影響を与えた。ウイルス表面に存在する糖蛋白質はヒト免疫が産生する中和抗体の標的となるため、創薬標的として研究が進められている。しかしながら、HIV を抗原としたワクチンは未だ上市されていない。抗原となるウイルス表面蛋白質（Env）はウイルス増殖を繰り返す中でアミノ酸配列が多様となるために、多様なウイルス株を中和する抗体を誘導可能なワクチンの設計されていない点が課題として挙げられる。一方、SARS-CoV-2 ウイルス表面蛋白質（spike）を標的とするワクチンと中和抗体医薬品は上市されているものの、spike のアミノ酸配列が多様化した Omicron 系統株に対しては十分な中和活性を発揮しないことが明らかとなっている。以上より Env および spike はよい創薬標的となるものの、多様なウイルス系統を広く中和可能な中和抗体またはそのような抗体を誘導可能なワクチン抗原の設計が求められている。本研究では HIV および SARS-CoV-2 を広範に中和可能な中和抗体の開発を目的として立体構造解析の観点から中和抗体および表面糖蛋白質の特徴の理解を進めた。

本研究では HIV-1 と HIV-2 のうち HIV-2 Env の広域中和抗体の活性の長期持続性に着目し、HIV-2 Env 三量体の抗原性の解析を試みた。HIV-2 Env 三量体の調製を試みたが可溶性として発現すると三量体構造を維持できず解離して単量体が得られてしまう結果となった。そこで HIV-2 Env 三量体の立体構造解析に向けた HIV-2 Env 三量体の安定化を指向した組換え蛋白質を設計した。最終的に三量体界面のアミノ酸配列を安定して三量体を形成することが知られている HIV-1 Env の配列に置き換えて、14 つの三量体安定化アミノ酸変異を導入することによって、HIV-2 Env 三量体を純度良く精製することに成功した。見出した HIV-2 Env 三量体安定化コンストラクトには新規の三量体安定化変異が含まれており、今後のワクチン抗原設計への応用が期待される。調製した HIV-2 Env 三量体試料を高速原子間力顕微鏡（HS-AFM）を用いた観察から、HIV-2 Env 三量体は CD4 等の結合なしに open 型を取りうるという構造的特徴を示し、open 型 HIV-2 Env は比較的アミノ酸が保存されている蛋白質の内側が露出していることで HIV-1 よりも広域中和抗体の活性が長期に渡って機能しているという仮説を立てた。今後は仮説を検証していくことによって HIV-2 Env 三量体構造に特有の特徴を明らかにし、広域中和抗体の活性の持続性と抗原の立体構造の関係性の理解が進むことが期待される。

SARS-CoV-2 spike 蛋白質に対して広範な中和活性を発揮する中和抗体の特徴を理解するために、感染症の高橋らが取得した NT-108 抗体についてクライオ電子顕微鏡（Cryo-EM）による spike との複合体構造を決定した。その結果、NT-108 は受容体結合ドメイン（RBD）に結合し、NT-108 は 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 のエピトープ領域に含まれる E484K は主要な抗体逃避変異であるが、アミノ酸変異によって相互作用の解消や立体衝突を引き起こすことが複合体構造より明らかになった。spike E484 は RBD の ACE2 認識部位近傍に存在するものの ACE2 とは直接相互作用しないため、アミノ酸変異によって親和性を下げることなく抗体逃避を成立させる。このことから ACE2 結合に重要な残基を標的とする抗体は広範な系統株に対応できる可能性が考えられた。

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 NIV 抗体群の複合体構造解析を行った。NIV 抗体は ACE2 相互作用残基のうち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。選別された抗体のうち、NIV-8, 10, 11, 13 の 4 つの抗体について spike との複合体構造を決定した。このうち NIV-10, 11, 13 は F486

および Y489 を含む類似した領域を認識していることが分かった。これら抗体が認識しているエピトープ面積は大きく異なり、NIV-10 が最も広い領域を認識していた。NIV-11, 13 が F486 残基に変異をもつ BA.4/5 系統株に対して中和活性を減弱することと対照的に、NIV-10 は F486 残基に変異をもつ BA.4/5 系統株にも中和活性を維持していた。NIV-10 の F486 変異に対する交差活性を理解するために 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、アミノ酸変異の影響を強く受けないことが分かった。以上のことから NIV-10 は RBD の広い領域を認識することで広範な中和活性を発揮する抗体であることが分かった。

2021 年以降の流行の主流である Omicron 系統は spike に 30 以上のアミノ酸変異を蓄積しており、高い抗体逃避能を有している。これらアミノ酸変異についての特徴を明らかにするために、本研究では Omicron 系統のうち BA.2.75 および XBB.1 系統の 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。BA.2.75 と XBB.1 系統にみられる N460K 変異は ACE2 との複合体構造解析の結果、N460K 変異によって ACE2 N90 糖鎖を介して ACE2 親和性を向上させていることが示唆された。また XBB.1 系統にみられる F486S 変異は XBB.1 spike-ACE2 複合体では ACE2 との疎水性相互作用が失われている様子が観察され、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 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明らかになった。

NT-108 の複合体構造解析により RBD の ACE2 認識に重要な残基を認識するような抗体が広範な中和活性を発揮すると予想され、実際に NIV-10 は広い系統株に中和活性を示し、その広いエピトープ領域が特徴的であることを示した。Omicron 系統では N460K 変異のような ACE2 親和性を向上させる変異によって、F486S 変異による ACE2 親和性の低下を緩衝して従来では変異頻度が低かったアミノ酸残基の変異が許容されていることが示唆された。今後、広範な系統株を中和可能な抗体を開発するためには Omicron 系統に特徴的な変異を考慮した設計が求められる。