

News Release



金沢大学
KANAZAWA
UNIVERSITY



World Premier International
Research Center Initiative



Institute for Frontier Science Initiative



GRAfiniti

新学術創成研究科

令和5年1月18日

各報道機関文教担当記者 殿

SARS-CoV-2 スパイクタンパク質に対する中和抗体の作用機序を高速原子間力顕微鏡で可視化することに成功

金沢大学ナノ生命科学研究所のキイシヤン・リン特任助教と大学院新学術創成研究科ナノ生命科学専攻博士後期課程の西出梧朗さん、エルマ・サキナトゥス・サジダさん、医薬保健研究域医学系／ナノ生命科学研究所の山野友義准教授、ナノ生命科学研究所の安藤敏夫特別功績教授、華山力成教授、ナノ生命科学研究所／新学術創成研究機構のリチャード・ウオング教授らの共同研究において、**高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）（※1）を用い、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質とその中和抗体（※2）の相互作用をリアルタイムかつ 3D で捉えることに世界で初めて成功しました。**

SARS-CoV-2（新型コロナウイルス）は、ウイルス表面のスパイクタンパク質をヒト細胞表面のアンジオテンシン変換酵素 2（ACE2）に結合させることにより、細胞内への侵入を開始します。現在国内でも接種が実施されている新型コロナワクチンは、この機構を利用してウイルスの体内侵入を抑制するものです。ワクチンを接種することで、私たちの体にはスパイクタンパク質に対する中和抗体が作られ、この中和抗体がスパイクタンパク質に結合してウイルスが ACE2 に結合することを防ぎ、ウイルス感染を抑制します。また、この中和抗体自体を COVID-19 患者へ注入する中和抗体療法も、重症化を防ぐ手段として用いられています。ゆえに、中和抗体がどのようにスパイクタンパク質に結合するのか、またどのような環境でその結合が増強、あるいは弱くなるのかを明らかにすることは大変重要です。しかし、中和抗体は 15 ナノメートル前後と非常に小さいため、その動態を直接リアルタイムで捉えることは困難でした。

本研究では高速 AFM を用いることにより、中和抗体がスパイクタンパク質に結合する様子をナノレベル、リアルタイムかつ 3D で捉えることに成功しました。これまでにリン特任助教らは、スパイクタンパク質が細胞内の環境変化に合わせ、効率よく細胞内に侵入するために構造変化を起こすことを見出していましたが、本研究ではさらに抗体が結合することによりこれらの構造変化が起らなくなることを明らかにしました。**高速 AFM が SARS-CoV-2 のみならず、さまざまなウイルスに対する中和抗体の作用機序を評価できる強力なツールである**ことが示されたと言えます。こうした成果は、高い時空間分解能（ナノ秒、ミリ秒レベル）で、定性的、定量的なデータを提供することができる高速 AFM での計測によって、初めて得られたものであり、**将来、さまざまなナノ生体材料の評価ツールとして活用されることが期待されます。**

本研究成果は、2023 年 1 月 15 日（米国東部時間）に国際学術誌『Nano Letters』にオンライン掲載されました。

【研究の背景】

SARS-CoV-2 は、ウイルスの表面にあるスパイクタンパク質をヒトの細胞膜上の ACE2 タンパク質と結合させ、細胞への侵入を開始します。SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質に結合し、ACE2 との結合を阻害する作用を持つ抗体は「中和抗体」と呼ばれ、一般的な抗体とは異なります。

中和抗体の物理的な特性評価は非常に重要です。従来の原子間力顕微鏡 (AFM) でも、中和抗体のナノ構造変化を可視化することはできましたが、その画像は静的なスナップショットであるため、測定の間分解能は低く、ミリ秒単位での動的な変化をリアルタイムで観察・測定することは不可能でした。一方、本研究で用いた高速 AFM は、高い時空間分解能を持つ強力なナノイメージングツールで、カンチレバーによってサンプルを穏やかにタッピングすることにより、試料にダメージを与えることなく、ミリ秒単位で画像を取得することができます。高速 AFM を用いることで、ウォング教授と華山教授らはこれまでに、ウイルスタンパク質、ヒストンへの DNA ラッピング、真核生物のオルガネラ（核膜孔と細胞外小胞）のナノ構造変化を直接可視化することに成功しています。

【研究成果の概要】

COVID-19 の患者数は、全世界で 6 億人以上確認されています。SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質はウイルスが体内へ侵入する際の先鋒であり、このスパイクタンパク質に対する抗体は、中和抗体として宿主免疫反応の引き金となっています。現在、COVID-19 の予防と治療のために、スパイクタンパク質に対する中和抗体が開発されています。しかしながら、これまでにスパイクタンパク質と中和抗体の動的な相互作用をナノレベルで解析することは困難でした。本研究では、高速 AFM を用い、スパイクタンパク質に対する抗体 MM43 とスパイクタンパク質との相互作用を観察することにより、抗体の結合特性と、中和抗体としての機能の 2 つを同時に判定するナノスコープ評価プラットフォームを開発しました(図 1)。まず研究チームは、SARS-CoV-2 のモデルとしてスパイクタンパク質を表面に発現する細胞外小胞を作製し、MM43 との相互作用を高速 AFM によりリアルタイムで可視化しました。MM43 は低密度では Y 構造を持つ単量体として現れ、高密度では 6 量体のオリゴマーを形成しました。スパイクタンパク質の中でも特にその変異や動きに関係するドメインであるスパイクタンパク質受容体結合ドメイン (RBD) は、通常、ウイルスが細胞内に効率よく侵入できるように、構造が大きく変化しますが、抗体が結合すると、構造変化が起りませんでした。さらに、この相互作用は pH が変わっても変化しませんでした。抗体の中には期待通りに機能せず、逆にウイルスの働きを増強する（抗体依存性感染増強 (Antibody-dependent enhancement) : ADE) ももの存在しますが、これらの結果から MM43 には、ADE リスクはほとんどないことが分かりました(図 2)。

【今後の展開】

これらの結果は、高速 AFM が、COVID-19 の治療において、ADE リスクの低い適切な中和抗体をスクリーニングする優れたツールであることを示しています。この方法は MM43 に限らず、臨床グレードにある中和抗体や、ADE 関連の抗スパイクタンパク質抗体にも適用可能であると考えられます(図 3)。さらに近い将来、高速 AFM は、活動中および回復期の COVID-19 患者の血清から得られた抗スパイクタンパク質モノクローナル抗体の研究にも用いられ、新しい中和抗体や新たな ADE メカニズムの発見に役立つものと考えられます。

本研究は、武田科学振興財団ビジョナリーリサーチ助成（研究テーマ：「新型コロナウイルスのタンパク質のナノ立体構造変換反応と構造創薬への開発」）、文部科学省世界トップレベル研究拠点プログラム(WPI)、日本学術振興会科学研究費助成事業(19K23841, 20K16262, 21H05744, 21K19043 22H02209, 22H05537)、科学技術振興機構 CREST (No. JPMJCR18H4)、小林国際奨学財団、島津科学技術振興財団、金沢大学新学術創成研究機ユニット研究推進経費、金沢大学超然プロジェクト、金沢大学「新型コロナウイルス感染症対策支援ファンド」研究費の支援を受けて実施されました。

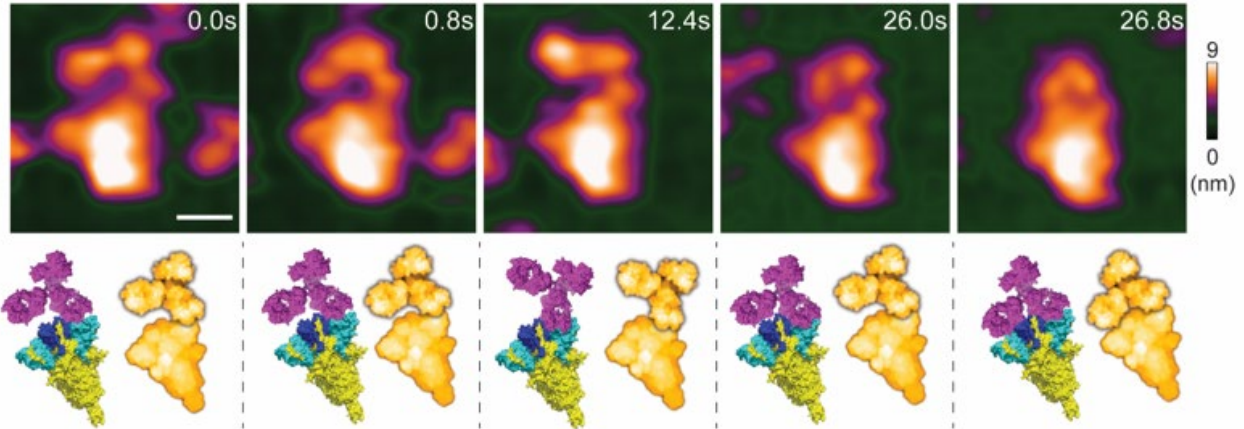


図 1：高速 AFM による動的な中和抗体—スパイクタンパク質の相互作用の可視化

(上段) MM43 がスパイクタンパク質の受容体結合ドメイン (RBD) にリアルタイムで結合している様子。(下段) 中和抗体とスパイクタンパク質の分子構造のシミュレーション画像により、相互作用の方向を示している (scale bar, 25 nm)。

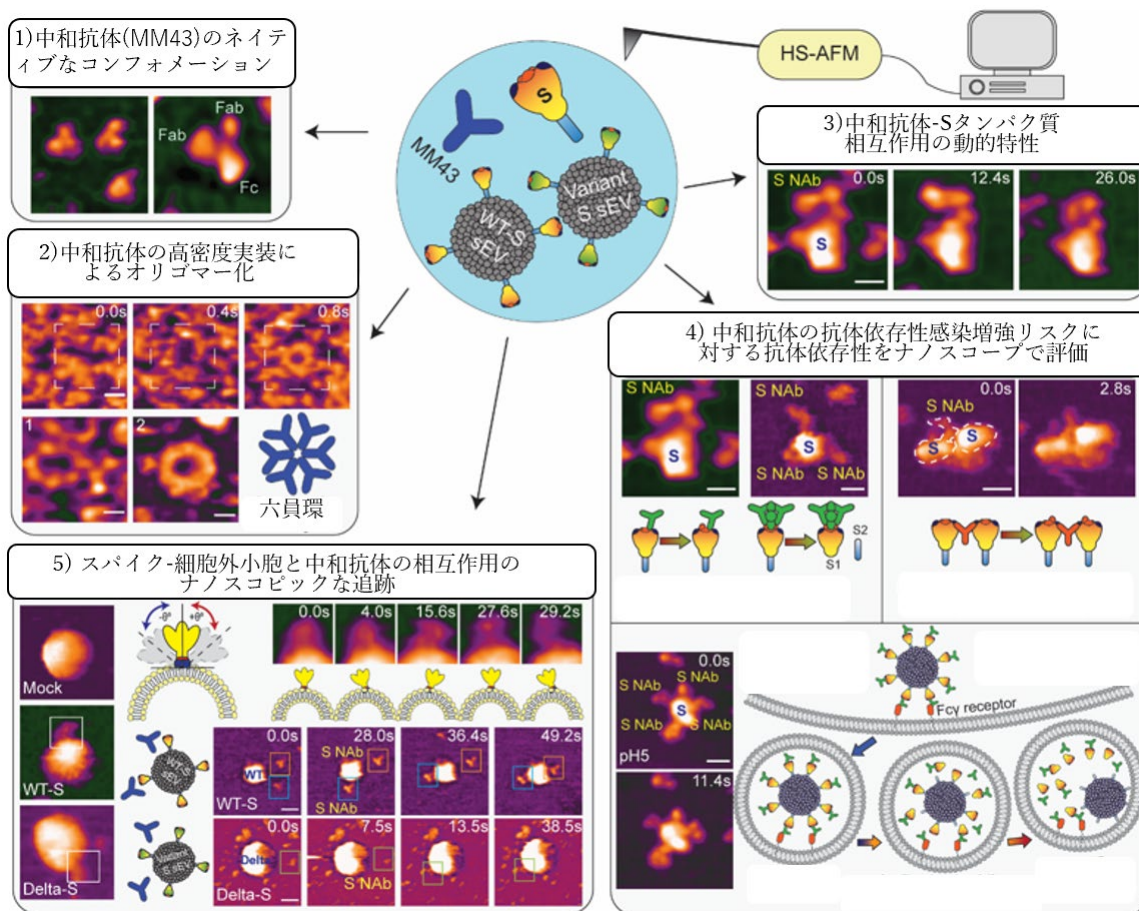


図 2：中和抗体－スパイクタンパク質相互作用のナノスケープ観察により，中和抗体の治療適用評価が高精度に可能となる。

- (i) (ii) 高速 AFM を用いた MM43 のナノスケール観察により，MM43 の本来の構造 (i) とオリゴマー化といった固有の性質 (ii) が明らかとなった。
- (iii) 高い時空間分解能により，高速 AFM は MM43 とスパイクタンパク質の動的な相互作用とその結合パターンを捉えることができる。
- (iv) 中性または酸性 pH における MM43 とスパイクタンパク質複合体のコンフォメーションを直接可視化することで，RBD の「閉」－「開」遷移，S1 サブユニットの脱落，抗体の脱落など ADE に関連する重要な情報が得られる。
- (v) スパイクタンパク質発現細胞外小胞は，MM43 や SARS-CoV-2 相互作用のナノレベルにおける追跡を行う上で安全な代替物質である。スパイクタンパク質発現細胞外小胞のトポロジーと細胞外小胞表面のスパイクタンパク質の動的な動きは，SARS-CoV-2 ウイルスに類似している。

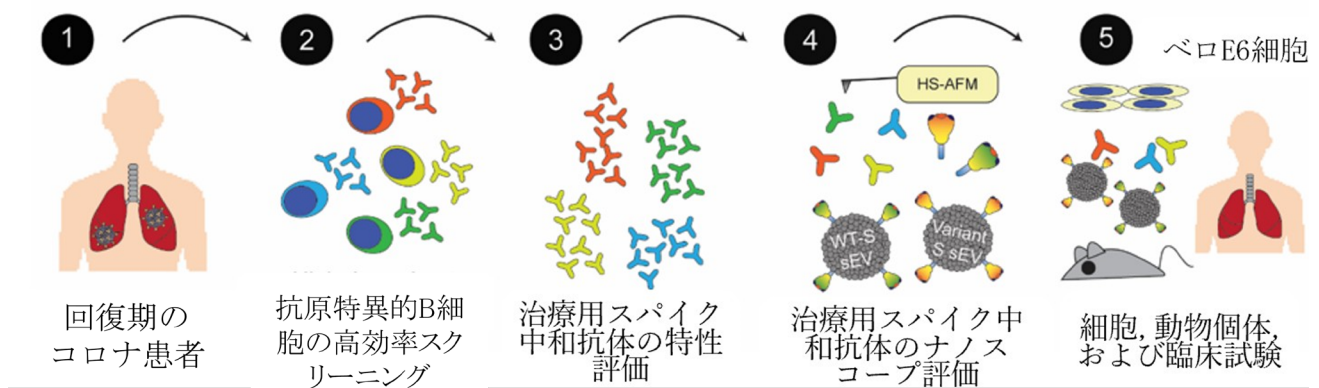


図3：高速 AFM が治療に適用可能な中和抗体のナノレベルでの評価に役立つ。

- (1) COVID-19 から回復した患者は， SARS-CoV-2 に対する免疫を獲得している。
- (2) 抗原特異的 B 細胞のハイスループットスクリーニングを行う。
- (3) 中和抗体を分離し， その治療効果をさらに評価する。
- (4) 高速 AFM を用いたこれらの候補のナノスケール評価は， より良い中和抗体を選択するために不可欠な情報を提供できる。
- (5) 選択された中和抗体は， その治療効果を検証するために， 下流の *in vitro* および *in vivo* 実験ならびに臨床試験に使用される。

【掲載論文】

雑誌名：Nano Letters

論文名：Nanoscopic assessment of anti-SARS-CoV-2 spike neutralizing antibody using high-speed AFM (高速 AFM による抗 SARS-CoV-2 スパイク中和抗体のナノスケール評価)

著者名：Keesiang Lim¹, Goro Nishide², Elma Sakinatus Sajidah², Tomoyoshi Yamano^{1,3}, Yujia Qiu², Takeshi Yoshida^{1,3}, Akiko Kobayashi^{3,4}, Masaharu Hazawa^{1,4}, Toshio Ando¹, Rikinari Hanayama^{1,3}, Richard W. Wong^{1,4}

1. 金沢大学ナノ生命科学研究所
2. 金沢大学大学院新学術創成研究科ナノ生命科学専攻
3. 金沢大学医薬保健研究域医学系
4. 金沢大学新学術創成研究機構

掲載日時：2023 年 1 月 15 日 (米国東部時間) にオンライン版に掲載

DOI: 10.1021/acs.nanolett.2c04270

<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.2c04270>

【用語解説】

※1 高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）

探針と試料の間に働く原子間力を基に分子の形状をナノメートル（ 10^{-9} m）程度の高い空間分解能で可視化する顕微鏡。高速 AFM は溶液中で動いているタンパク質などの生体分子をナノメートルの空間分解能とサブ秒という時間分解能で観察することが可能。

※2 中和抗体

SARS-CoV-2 は、ウイルスの表面にあるスパイクタンパク質がヒトの細胞膜上の ACE2 タンパク質と結合する事をきっかけに細胞への侵入を開始する。SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質に結合し、ACE2 との結合を阻害する作用を持つ抗体は「中和抗体」と呼ばれる。デルタ株やオミクロン株などでは、スパイクタンパク質に変異を入れることで、中和抗体から逃れようとする。

【本件に関するお問い合わせ先】

■研究内容に関すること

金沢大学ナノ生命科学研究所／医薬保健研究域医学系 免疫学 教授

華山 力成（はなやま りきなり）

TEL：076-265-2727（日本語対応）

E-mail：hanayama@med.kanazawa-u.ac.jp

金沢大学ナノ生命科学研究所／新学術創成研究機構 教授

リチャード・ウォング（Richard Wong）

TEL：076-264-6250

E-mail：rwong@staff.kanazawa-u.ac.jp

■広報担当

金沢大学ナノ生命科学研究所事務室

米田 洋恵（よねだ ひろえ）

今永 藤子（いまなが ふじこ）

TEL：076-234-4555

E-mail：nanolsi-office@adm.kanazawa-u.ac.jp