

# 新型コロナウイルスのスパイク蛋白質と感染増強に関わる抗体の複合体構造解析

岸川 淳一

大阪大学 蛋白質研究所

## はじめに

2013 年頃の直接電子検出器 (Direct Electron Detector; DED) の出現により、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-Electron Microscopy; Cryo-EM)<sup>\*1</sup> による蛋白質構造解析の分解能は飛躍的に向上し、X 線結晶構造解析にならぶ蛋白質構造解析の主要な方法の 1 つとなった。実際に、Cryo-EM による構造解析の登録件数は、年々増加しており、数年後には X 線結晶構造解析の登録件数を超えると予想されている。また、Cryo-EM による構造解析は、100 kDa を下回る分子量の蛋白質の構造解析には向かない、という分子量の壁が存在したが、DED の出現以降の装置および解析手法の開発・進歩により、その壁も取り払われつつある<sup>\*2</sup>。Cryo-EM による構造解析では、対象の蛋白質に複数の状態があった場合でも、EM 画像上で分類する<sup>\*3</sup>ことで、それぞれの状態の構造を同時に明らかにできることが大きなメリットである。本稿では著者が行った新型コロナウイルスのスパイク蛋白質とコロナウイルスの感染を増強する抗体との複合体の構造解析を紹介する。その構造解析でも、大いに上記のメリットが発揮された。

## 新型コロナウイルスと感染増強抗体

2019 年 12 月、中国武漢を発端とした新型コロナウイルス (Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2; SARS CoV-2) は、またたく間に世界に拡がり、パンデミックの様相を呈している。これまでに、全世界で約 2 億人が感染し、約 420 万人の人命が失われた (2021 年 7 月時点)。日本でも、約 90 万人が感染し、1 万 5 千人が亡くなっている。現在でも収束の目処は立っていない。コロナウイルスは、RNA ウイルスの 1 種で、柔らかな脂質 2 重膜の殻 (エンベロープ) の中にその遺伝情報であるゲノム RNA が収まっている。ゲノム RNA には、ウイルスを構成する 29 種類の蛋白質がコードされている<sup>1)</sup>。コロナウイルスの蛋白質の構造を知ることは薬を作ることに繋がるため、世界中多くの研究者がコロナウイルスの蛋白質の構造解析に取り組んでおり、その結果、ほとんどの蛋白質の構造が明らかになった<sup>1)</sup>。その中で、とりわけ注力されているのが、ウイルスの感染に重要な役割を持つスパイク蛋白質の構造解析である。これまでに報告されている約 1,400 のコロナウイルス関連蛋白質のうち、実に 460 以上がスパイク蛋白質関連であることから注目度合いがよく分かる (2021 年 7 月時点)。スパイク蛋白質は 1 回膜貫通領域を持つ蛋白質で、N 末ドメイン (NTD)、レセプター結合ドメイン (RBD)、S2 ドメインを持ち、ホモ 3 量体でエンベロープの表面から突き出るような形で存在する<sup>\*4</sup>。RBD が、宿主細胞 (ここではヒト細胞) の ACE2 受容体に結合することがウイルス感染の最初の重要なステップとなるため、RBD を含むスパイク蛋白質の構造解析が盛んに行われている。ニュースを賑わせている変異株 (アルファ株、デルタ株など) の多くは、RBD に変異が入ることで ACE2 受容体との結合性が変化したもので、変異の結果、感染力がより強くなっていると考えられている。

RBD やその周辺に結合し、ACE2 受容体との結合を阻害するような抗体は感染を抑制する中和抗体となるが、その一方で、重篤な症状を示したコロナウイルス患者から単離した抗体を調べたところ、スパイク蛋白質と ACE2 受容体の結合を促進する抗体 (増強抗体) があることがわかった<sup>2)</sup>。増強抗体がスパイク蛋白質

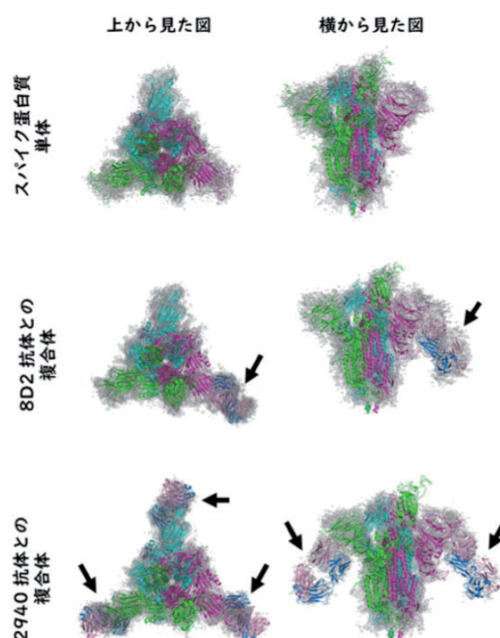


図 1. 構造解析で得られた新型コロナウイルスのスパイク蛋白質と増強抗体との複合体構造。矢印で抗体 (Fab) の位置を示す。8D2 抗体は 1 ケ所、2940 抗体は 3 ケ所の NTD に結合しているのがわかる。

蛋白質のどの部分に結合するかを生化学的に調べたところ、RBD とは直接関係しない NTD に結合することが示唆された。そこで私達は、感染を増強する抗体が NTD のどこに結合するかを調べるために、単粒子解析によるスパイク蛋白質と抗体複合体の構造解析に取り組んだ。

## 新型コロナウイルスのスパイク蛋白質構造解析

精製したコロナウイルスのスパイク蛋白質そのもの、スパイク蛋白質と感染増強を起こす 2 種類の抗体 (8D2 抗体、2940 抗体) をそれぞれ混ぜ合わせた溶液を使い、クライオ電子顕微鏡の観察用基板を調製した。調製した基板は、ハイエンドクライオ電子顕微鏡 Titan Krios を用いて撮影を行った。撮影したそれぞ

れ約 6,000 枚程度の電顕画像から解析を行い、スパイク蛋白質-増強抗体複合体の構造解析を行った。その結果、スパイク蛋白質単体は 3.6Å、8D2 抗体との複合体は 3.5~3.7Å、2940 抗体との複合体は 3.2~4.0Å の分解能で構造を得ることができた<sup>2)</sup>。どちらの抗体も NTD の下側に結合していることがわかった (図 1)。

これは、抗体の抗原 (エピトープ) 解析やそれを元にした結合シミュレーションの結果とよく一致していた。また、8D2 抗体は 3 つの NTD のうちいずれか 1 つに結合しているのに対し、2940 抗体は 2 つ、または 3 つの NTD に結合しており、それぞれの抗体の NTD に対する親和性を反映していることがわかった。このように複数の状態 (結合している抗体の数など) を含む蛋白質の構造解析を行えることは、前述の Cryo-EM を使った構造解析のメリットである。一方で、NTD への増強抗体の結合が RBD の構造に影響を与えることが期待されたが、抗体結合による明確な違いは見いだされなかった。別の実験から抗体の感染増強効果は、Y 字型の抗体の形が重要であるという結果が得られた。増強抗体は、エンベロープ上に存在する隣り合った 2 つのスパイク蛋白質の NTD を繋げ、下側に引き下げることで、RBD の構造変化を誘起するのではないかと考えられる (図 2)。今後、このモデルが正しいか、構造学・生化学の両面からさらに検証していく必要がある。

抗体に依存する感染増強自体は、以前から知られており、抗体依存性感染増強 (Antibody-Dependent Enhancement: ADE) と呼ばれる<sup>3)</sup>。この現象は、コロナウイルスやインフルエンザウイルス、HIV ウイルスなど様々なウイルスで観察される。そのメカニズムは、対象のウイルスに別のウイルスに対する抗体が結合することで、副次的に感染が増強されるものと考えられている。今回、我々が報告した増強抗体は、ADE とは全く異なる新たなメカニズムで感染増強を引き起こす。このメカニズムについて、さらに研究をすすめることで、コロナウイルスなどによる重篤化リスクの低減につながる可能性がある。

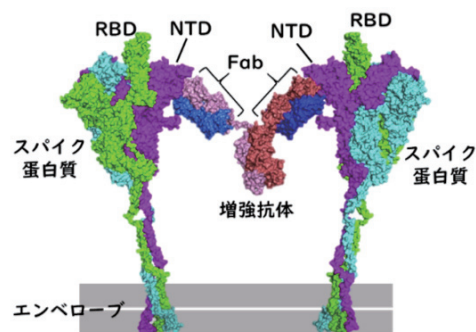


図2. 増強抗体の感染増強モデル。増強抗体がエンベロープ上に存在する2つのスパイク蛋白質のNTDに結合し、下方に引き下げることでRBDの構造変化を誘起する。その結果、宿主細胞のACE2受容体との結合が促進され、感染が増強される。

## これからの蛋白質の構造解析

構造生物学は転換期にある。2021年7月、深層学習による蛋白質構造予測ツールであるAlphaFold2が公開された<sup>4)</sup>。AlphaFold2は、タンパク質構造予測コンペ「CASP」で2位に圧倒的なスコアの差をつけ優勝したツールである。さらに、AlphaFold2でヒトのほとんどすべての蛋白質構造を予測したデータベースも公開された<sup>5), 6)</sup>。高精度の蛋白質の予測構造への容易なアクセスは、これからの蛋白質科学を変えていくだろう。配列比較と同じ感覚での構造比較や、予測構造を元にした実験のデザインが行われるだろうし、さらには反応機構の議論ができるかもしれない。「正確な構造予測」は、それだけインパクトがある技術である。では、蛋白質の構造解析が不要になったかというところ、そういうわけではない。AlphaFold2でも、巨大な蛋白質や複合体蛋白質、膜蛋白質の構造予測は、まだ十分ではないし、蛋白質折りたたみの過程<sup>6)</sup>や反応に伴う構造変化など、動的な構造情報を予測することも出来ていない。このような動的な構造情報を得るためにも、Cryo-EMを使った構造解析のような手法はまだまだ現役である。構造解析が進めば、構造予測も進む。もうしばらく構造生物学にとってエキサイティングな時代が続くだろう。

## 著者注

<sup>※1</sup> 低温電子顕微鏡。電子線損傷を防ぐために液体窒素温度下で対象を観察する電子顕微鏡。

<sup>※2</sup> 現在では、数10 kDaの蛋白質の構造解析も可能となった。しかし、小さい分子量の蛋白質の場合、サンプルへの要求が大きいので、一般には数100 kDa以上の蛋白質が好ましい。

<sup>※3</sup> EM画像上で単一の状態を取り出すので、in silico purificationとも呼ばれる。

<sup>※4</sup> エンベロープからスパイク蛋白質が突き出ている様子が、太陽のコロナのように見えるため、コロナウイルスと呼ばれる。

<sup>※5</sup> AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk>)

<sup>※6</sup> AlphaFold2は、折りたたまった構造予測を与えるが、なぜそのように折りたたまるかなどの情報は与えない。

## 引用文献

<sup>1)</sup> Evolution of the SARS-CoV-2 proteome in three dimensions (3D) during the first six months of the COVID-19 pandemic. Lubin et al. bioRxiv 406637 (2020)

<sup>2)</sup> An infectivity-enhancing site on the SARS-CoV-2 spike protein targeted by antibodies. Liu et al. Cell S0092-8674(21)00662-0 (2021)

<sup>3)</sup> Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. Lee et al. Nat. Microbiol. 5, 1185-1191 (2020)

<sup>4)</sup> Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Jumper et al. Nature (2021)

<sup>5)</sup> Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. Tunyasuvunakool et al. Nature (2021)



著者：岸川淳一

大阪大学蛋白質研究所助教。1981年長崎県出身。九州工業大学情報工学部生命システム工学科中途退学、同大学大学院情報工学研究科博士課程修了。博士 (情報工学)。理化学研究所、金沢大学、京都産業大学を経て現職。