

研究課題 (テーマ)	COVID-19 治療薬および診断薬としての応用を目指した、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質およびACE2 レセプターに対する一本鎖抗体の開発		
研究者	所属学科等	職	氏名
代表者	工学部生物工学科	講師	牧野祥嗣
分担者	工学部医薬品工学科 (株)TOPU バイオ研究所	教授 研究開発部長	磯貝泰弘 榊利之
研究結果の概要			
<p>これまでに、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の原因ウイルス SARS-CoV-2 とその変異株をターゲットとして、様々な予防、治療戦略が開発されてきた。SARS-CoV-2 に対する抗体カクテル療法は、感染患者の重症化を防ぐなどの目的で利用され、また、抗原検査でも抗体は必須である。加えて、将来の別の感染症でも、同様の治療および検査用抗体開発が必要である。そこで本研究では、SARS-CoV-2 および ACE2 レセプターへの結合活性を持ち治療・検査薬となる、低価格かつ迅速開発が可能な低分子化抗体の開発を目指した。</p> <p>まず、SARS-CoV-2 ウイルス表面のスパイクタンパク質のうち、ヒト細胞への感染に関与する、S1 ドメイン、および RBD ドメインタンパク質を発現する遺伝子を合成した。このとき、特異的な選択が可能となるように、それぞれの遺伝子産物に選択用の親和性タグを融合した。また、ウイルスタンパク質遺伝子を扱うにあたり、遺伝子構築はすべて試験管内で行い、タンパク質合成も試験管内タンパク質発現システムを使用し、遺伝子組み換え系は使用しなかった。</p> <p>一方では、ヒト由来一本鎖抗体ライブラリを調製した。ヒト末梢血白血球から抽出した total RNA から cDNA を合成した後に、抗体の V_L、V_H ドメイン特異的なプライマーで PCR を行い、それらを連結した低分子化抗体 (一本鎖抗体) 遺伝子を合成した。続いて、我々が独自に開発した大腸菌ディスプレイシステムを用いて、ライブラリ (ライブラリサイズ~2.3 x 10⁴) を構築した。</p> <p>その後、これらの SARS-CoV-2 ウイルスリガンドに対し、大腸菌ディスプレイライブラリを相互作用させ、結合するクローンのみを取得する、親和性スクリーニングを行った。得られたいくつかのモノクローンについて菌体の回収率を評価したところ、一部のクローンでは、リガンド有のときにリガンド無と比較して高いクローン回収率を示した。また、遺伝子を単独発現させ、S1 タンパク質への親和性を ELISA 法で見たところ、一部のクローンでは有意に高い S1 タンパク質結合シグナルを示した。</p> <p>これらのことから、10⁴程度の比較的小さなサイズのライブラリから、SARS-CoV-2 ウイルスリガンドに対し、親和性、特異性を示す一本鎖抗体遺伝子を獲得できた可能性が示唆された。</p>			
今後の展開			
<p>これら遺伝子産物は、通常の大腸菌発現系では不溶性となり、安定的な可溶化も困難であることがわかってきた。そこで現在、特殊な界面活性剤による再可溶化、可溶性発現が可能な大腸菌宿主を用いた組換え発現、より可溶性発現に適した真核細胞 (コムギ胚芽) 由来の試験管内発現系での発現、で検討を進めている。また、より大規模なライブラリを構築して選択する計画も進めている。これらにより、親和性および特異性に優れた一本鎖抗体を大量に調製可能な系を構築し、医薬品または診断薬とするための評価および改良を進めていく。</p>			