

令和3年12月8日

各報道機関文教担当記者 殿

## 世界初！高速 AFM で新型コロナウイルス スパイクタンパク質の分子ナノ動態を可視化！

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・ウォング教授らは、同ナノ生命科学研究所の華山力成教授、安藤敏夫特任教授らとの共同研究において、高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）（※1）を用いることにより、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質の分子ナノ動態と、スパイクタンパク質が細胞外小胞（※2）と相互作用する瞬間のナノ動態を可視化することに世界で初めて成功しました（図1）。

新型コロナウイルスが宿主細胞に侵入する際には、まずウイルスのスパイクタンパク質が細胞膜表面にあるアンジオテンシン変換酵素2（ACE2）に結合します。これによりウイルスは宿主細胞膜に結合し、宿主細胞内への侵入が可能となります。今回、研究グループは、スパイクタンパク質と、膜表面に ACE2 が発現した細胞外小胞（sEV）の間の相互作用を、高速 AFM を用いてリアルタイムで可視化しました（図2）。

その結果、スパイクタンパク質の構造の不均一性と、柄の部分であるストークと受容体結合ドメイン（RBD）の柔軟性が明らかとなり、さらに pH や温度によってスパイクタンパク質の構造に変化が生じることがわかりました。特に酸性条件下では、RBD があるスパイクタンパク質の頭部が開き、かつストーク部分が延びる現象を捉えました。また、ストーク部分が sEV の脂質膜にドッキングし、スパイクタンパク質が持つ融合ペプチドを用いて sEV 内に侵入する様子も確認できました。これにより、研究グループは、阻害剤や中和抗体がウイルスに対してどのように働いているのかをリアルタイムで追うことができるプラットフォームを示すとともに、ACE2 発現 sEV が新型コロナウイルスを中和する薬剤となり得ることも示しました。

これらの知見は、コロナウイルス SARS-CoV-2 に対するワクチンや新規治療薬の開発に新たな可能性を拓くものです。

本研究成果は、2021年12月7日午前10時（米国東部時間）に国際学術誌『Journal of Extracellular Vesicles』にオンライン掲載されました。

## 【研究の背景】

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、新型  $\beta$ -コロナウイルスである SARS-CoV-2 を原因とするパンデミックであり、多くの国で社会経済的に壊滅的な影響をもたらしています。SARS-CoV-2 は、エンベロープに包まれた+鎖 RNA をゲノムとする RNA ウイルスであり、他のエンベロープ型ウイルスと同様に、宿主細胞内への侵入には膜融合が必要です。このプロセスには、グリコシル化されたホモ三量体のスパイクタンパク質の働きが重要となります。スパイクタンパク質は、球状の頭部 S1 サブユニットと、柄のような S2 サブユニットから構成されており、S1 サブユニットは宿主の認識をつかさどり、S2 サブユニットは膜融合に関与しています。SARS-CoV-2 の侵入を阻止し、合成ワクチンや標的薬剤の開発を促進するためには、スパイクタンパク質の構造と動的挙動を解明することが重要ですが、これまで、その詳細な挙動は可視化されていませんでした。

## 【研究成果の概要】

本研究では、まずスパイクタンパク質の構造や表面電荷のシミュレーションを行い、高速 AFM による観察に適した条件を見出しました。シミュレーションにより、スパイクタンパク質は秩序化された構造を保ちながらも柔軟なタンパク質であることが予測され、特に、柄のような構造の S2 サブユニットは、球状の頭部 S1 サブユニットよりもさらに柔軟性が高いことが示されました。実際に高速 AFM を用いてスパイクタンパク質を観察したところ、S1 サブユニットに存在する受容体結合ドメイン (RBD) が閉じた形 (クローズ型) と開いた形 (オープン型) の両方の存在が明らかになりました。観察対象が不均一なもの集まりの場合でも、高速 AFM であればどのタイプも 1 分子レベルで観察し識別することができます。そのため、さまざまなコンフォメーションを示すスパイクタンパク質の観察には高速 AFM が最適であることがわかりました。さらに、最初のシミュレーション通り、S2 サブユニットは S1 サブユニットよりも動的であることも高速 AFM による動画撮影で明らかになりました。RBD は、S1 サブユニットから伸びた触手のような形をしており、動的ではありましたが、S2 サブユニットほどではないことも示されました。

次に、pH と温度がスパイクタンパク質の構造に与える影響を調べたところ、酸性条件では、クローズ型のスパイクタンパク質頭部が解離し、さらに柄の部分が伸びて行く様子が高速 AFM 観察によって捉えられました。さらにこの柄の伸長が、pH 依存的な可逆的反応であることもわかりました。また、温度変化によるスパイクタンパク質の構造変化を高速 AFM で観察したところ、温度が高くなると、スパイクタンパク質の弾性が変化することも明らかとなりました (図 1)。

続いて、脂質に親和性のある融合ペプチドを持つ S2 サブユニットと、細胞外小胞 (sEV) の相互作用を高速 AFM で観察しました。これまでの研究でリン特任助教らは、高速 AFM を用い、sEVs と A 型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン (HA) が相互作用し、HA が sEVs の脂質膜に挿入される様子を明らかにしていました。今回、この観察技術を用いることにより、S2 サブユニットが sEVs の脂質膜に挿入され、その後 sEVs が変形する様子を観察することに成功しました。またこの時、脂質膜の剛性も失われていることを見出しました。これらのことから、S2 サブユニットが sEV 脂質膜を不安定化していることが明らか

となりました。

宿主細胞が分泌する sEVs はウイルス受容体を発現し、ウイルスに結合することによって、ウイルスを中和して侵入を防ぐことが知られています。そこで、新型コロナウイルス受容体 ACE2 を発現する sEVs と、スパイクタンパク質の相互作用について検証したところ、スパイクタンパク質は ACE2 を発現する sEVs と可逆的によく相互作用することがわかりましたが、逆に ACE2 をあまり発現していない sEVs と相互作用する様子は観察されませんでした (図 2)。

これにより研究グループは、ウイルスに阻害剤や中和抗体がどのように働いているのかをリアルタイムで追うことができるプラットフォームを示すとともに、ACE2 発現 sEVs が新型コロナウイルスを中和する薬剤となり得ることを明らかにしました。COVID-19 治療薬として、間葉系幹細胞由来の sEVs が臨床試験へと進んでいる現在、これらの知見は、新規治療薬の開発に新たな可能性を拓くものと言えます。

### 【今後の展開】

本研究により、高速 AFM が、新型コロナウイルスを始めさまざまなウイルスを標的とする種々のアプローチの抑制効果を、直接かつリアルタイムで確認するのに適したアプリケーションであることが示されました。近い将来、新型コロナウイルス、特に今後感染拡大が懸念されるウイルス変異株 (「オミクロン株」や「デルタ株」など) のスパイクタンパク質と宿主の ACE2 との相互作用や、S2 サブユニットを介した膜融合を阻害するといった、ウイルスの体内侵入を阻害する効果は、高速 AFM によって確認することが可能となることが見込まれます。また本研究グループは、SARS-CoV-2 が細胞内に侵入経路を構築して宿主の核膜孔 (※3) -細胞質間輸送システムをハイジャックする過程を、高速 AFM で可視化することも計画しています。本研究で得られた知見により、高速 AFM が、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質の挙動を深く知るためのナノイメージングに理想的なツールであることは明らかであり、今後、科学者が効果的な対策 (sEV を基本としたワクチンなど) を打ち出す際に重要な役割を果たすことが期待されます。

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)、JST 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構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。

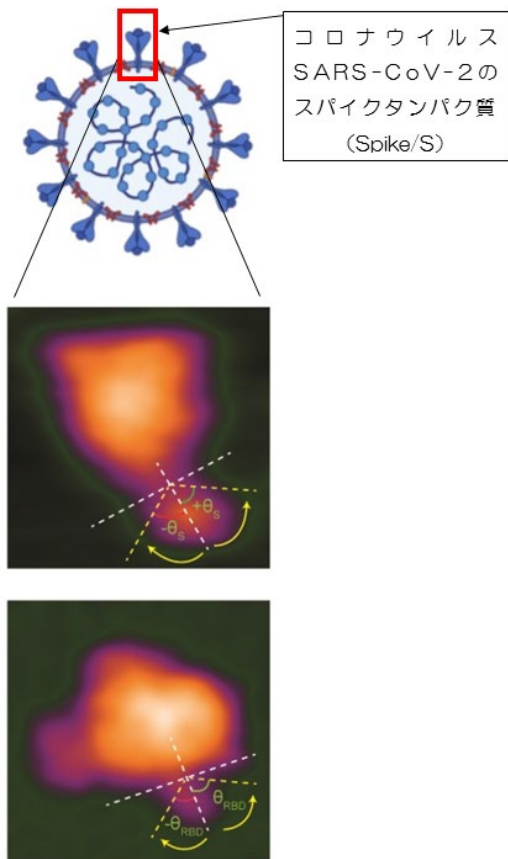


図1. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)の原因ウイルスである SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質 (Spike/S)の分子ナノ動態を、世界で初めて直接観察することに成功した。

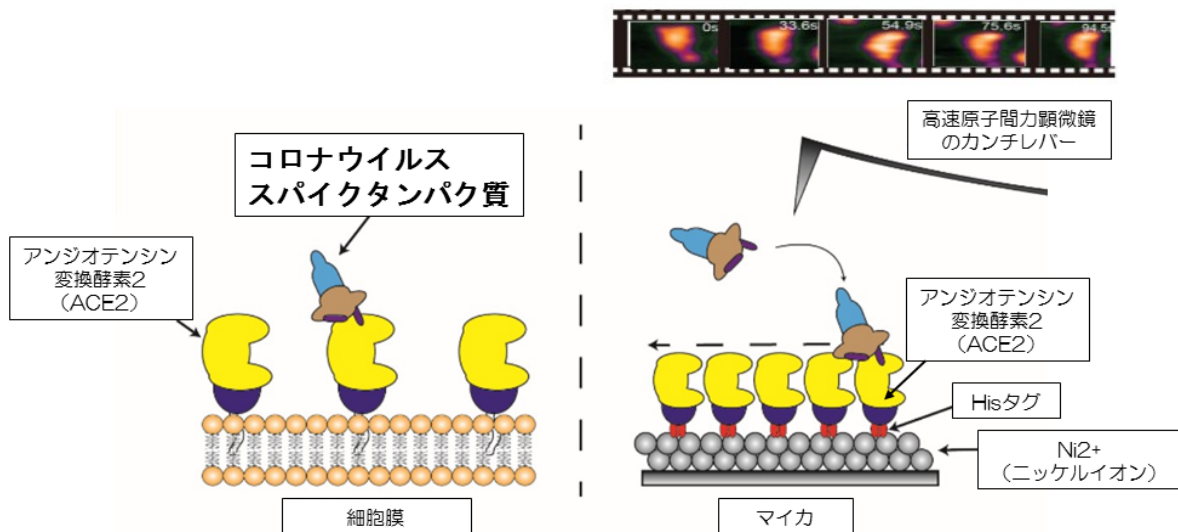


図2. 概要図：高速 AFM によって、コロナウイルススパイクタンパク質がアンジオテンシン変換酵素 2(ACE2)と結合する際に起こる相互作用をリアルタイムで直接的に可視化した。

## 【掲載論文】

雑誌名：Journal of Extracellular Vesicles

論文名：Millisecond dynamic of SARS-CoV-2 spike and its interaction with ACE2 receptor and small extracellular vesicles

(SARS-CoV-2 のスパイクのミリ秒単位の動きと、ACE2 受容体や小さな細胞外小胞との相互作用)

著者名：Keesiang Lim, Goro Nishide, Takeshi Yoshida, Takahiro Watanabe-Nakayama, Akiko Kobayashi, Masaharu Hazawa, Rikinari Hanayama, Toshio Ando, Richard W. Wong

(キイシヤン・リン<sup>1</sup>, 西出 梧朗<sup>2</sup>, 吉田 孟史<sup>1</sup>, 中山 隆宏<sup>1</sup>, 小林 亜紀子<sup>3</sup>, 羽澤 勝治<sup>1,3</sup>, 華山 力成<sup>1</sup>, 安藤 敏夫<sup>1</sup>, リチャード・ウォング<sup>1,2,3</sup>)

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博士前期課程
3. 金沢大学新学術創成研究機構

掲載日時：2021 年 12 月 7 日午前 10 時（米国東部時間）にオンライン版に掲載

DOI：10.1002/jev2.12170

## 【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である。

### ※2 細胞外小胞（sEV）

細胞が分泌する脂質二重膜に覆われた小胞のこと。分泌細胞由来のタンパク質や RNA などの核酸、脂質などを含んでおり、さまざまな細胞間情報伝達を担っている。

### ※3 核膜孔

細胞核を覆う膜にある穴である核膜孔を構成するタンパク質の集合体。普段は細胞質と核の間の物質輸送を担う。

**【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／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](mailto: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)

TEL : 076-234-4556

E-mail : [nanolsi-office@adm.kanazawa-u.ac.jp](mailto:nanolsi-office@adm.kanazawa-u.ac.jp)