

L1211-1	計算的手法を用いた猫伝染性腹膜炎ウイルス II 型の受容体結合ドメインに対する VHH の開発				
	氏名	小島 賢	主査	黒田	副査

【背景】猫伝染性腹膜炎ウイルス II 型 (FIPV2) は、猫に感染する致死的なウイルスであり、現在、有効な治療薬が存在するが、薬剤耐性株の出現が懸念され、新規治療薬が開発されている。mAb と比較して、VHH 抗体は、高い安定性、低コスト、Fc 領域の欠如により抗体依存性感染増強(ADE)リスクの低さが利点である。VHH 開発は主に動物免疫や実験的スクリーニングにより行われ、コストや時間、倫理的問題があるが、計算的手法の活用で、この点を解決できる。本研究では、計算的手法の中で高度な計算リソースを必要としない、CDRH3 のフラグメントベースの設計法(図 1)を用い、FIPV2 の受容体結合ドメイン (RBD) の宿主受容体結合領域を抗体の結合の標的領域とし、宿主受容体との結合を阻害する VHH の設計を目的とした。

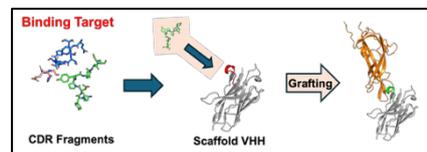


図 1.CDRH3 のフラグメントベースの設計法

【手法・結果】MD シミュレーションによる RBD の構造サンプリング後、それぞれの構造に関して標的領域を断片化した (図 2)。これに対して、抗体-抗原複合体データベース(Sab-Dab)から構築した CDR-エピトープフラグメントの構造データベースにて、構造的・配列的に類似するエピトープフラグメントを見つけることで (図 2)、RBD のターゲット領域に結合する CDR フラグメントを 3 つ見つけた。その内、2 つのフラグメントは RBD に結合する部位が近かったため、グリシンにより連結し、最終的に、2 つのフラグメントをスキュフォールド VHH の CDRH3 に移植した(VHH-1 と VHH-2)。その後、剛体ドッキングと高解像度なドッキングを行い、さらに、変異導入により親和性の向上を図った (VHH-1-mutated と VHH-2-mutated)。4 つの VHH-RBD 複合体において、100 ns の MD シミュレーションを行い、MM/GBSA 法による結合自由エネルギー(ΔG),BSA(Buried Surface Area)の算出、および相互作用解析を行った。結果として VHH-2 が、NbBC II と比較して一番低い ΔG と Sab-Dab 上の抗原-VHH 複合体の平均 (約 804 Å²) を上回る BSA を示し、高い結合親和性が示唆された (表 1)。VHH-2 では導入したフラグメント由来の 2 つのチロシンが標的領域の残基と複数の相互作用を形成し、結合のホットスポットとして機能していた。

【結論】本研究は、計算機的手法のみで FIPV2 RBD の宿主受容体との結合領域をターゲットとし、結合親和性がある VHH の設計を試みた。特に VHH-2 は、主にフラグメント由来の相互作用にて、ターゲット領域を中心に結合する有望な候補であった。今後は実験的な結合親和性アッセイによる実証が課題である。

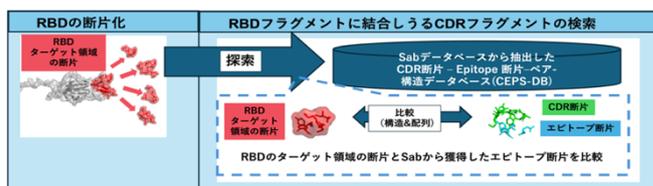


図 2.CDR フラグメントベースの設計法

VHH名	結合自由エネルギー (MM/GBSA)	BSAの平均
VHH-1	-57.21 kcal/mol	761.4 Å ²
VHH-2	-67.52 kcal/mol	857.9 Å ²
VHH-1-mutated	-64.14 kcal/mol	805.19 Å ²
VHH-2-mutated	-56.05 kcal/mol	781.88 Å ²
NbBC II	-50.91 kcal/mol	645.36 Å ²

表 1.MD simulation の解析結果