

課題番号 37

新型コロナウイルス変異における免疫的变化の研究

[1] 組織

代表者：小菅 将斗

(東北大学大学院薬学研究科)

対応者：小笠原 康悦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

斉藤 芳郎 (東北大学大学院薬学研究科)

研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

世界に蔓延している新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、変異株の出現のたびに流行を繰り返している。本ウイルスは、変異株の出現が大きな問題となっており、変異の研究は、重要な研究課題の一つである。これまで我々は、病原体の進化を追跡する公共データベース GISAID より、世界の SARS-CoV-2 ゲノム情報を抽出した。ゲノム抽出の規模としては、約 8000 ゲノムを抽出して、これらゲノム情報から、武漢型をもとに系統樹を作成した。その結果、新型コロナウイルスの変異は、点変異が多いこと、そして、その変異は、ウラシル (U) への変異が顕著であることを報告してきた。

その後、イギリス株 (現在ではアルファ株)、ブラジル株、南アフリカ株など、種々の変異株が出現してきた。デルタ株が蔓延し、最近では、オミクロン株も出現している。そこで、本研究では、新型コロナウイルスのゲノム情報を抽出してその変異を調べ変異の特徴を明らかにして、変異によって引き起こされる免疫反応を解析することを目的として研究を行った。

以下、研究活動状況の概要を示す。

本年度は、主として加齢医学研究所にて実験を遂行した。必要に応じて研究の打ち合わせは、コロナ禍という状況もあり、電子メールや Zoom 会議により行った。

まず、ウイルスゲノム情報を収集し、その系統樹

を作成する。そして、ウイルス遺伝子変異を可視化しその特徴を解析する (図1)。

GISAIDよりVariants遺伝子Data 収集



武漢型をもとに系統樹作成



Variantsのアライメント



遺伝子変異の可視化

図1 研究の概要

次に、代表的な変異株の遺伝子配列をもとに、ウイルス感染に重要なスパイクタンパク質を人工合成する。人工合成したスパイクタンパク質は、ウイルス抗原になりうるので、抗原キットのシーズとなる。変異株によっては、人工合成が困難な場合があるので、本研究は変異株のウイルス抗原の作成方法を検討する貴重な情報になる。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

1) 新型コロナウイルスデルタ株の変異の特徴の解析

2021年8月時点でGISAIDに登録されている新型コロナウイルスのVariantsの登録データ数が300万シークエンスを超えており、すべてのVariantsを解析するには、通常のパソコンでは困難になっている。そこで、2021年8月14日に登録されたデルタ株のVariantsについて、変異パターンを解析することとした。2021年8月14日に登録されたデルタ株は、2054シークエンスであった。登録されたシークエンスにおいて、新型コロナウイルスの塩基配列の両端部分である5'-UTRと3'-UTR部分は、きちんとシークエンスできていない部分やシークエンスエラーが多く、シークエンス精度が低い部分なので、5'-UTR部分は150Bp、3'-UTR部分は100Bpトリミングした。これを用いて、武漢型の塩基配列 (NC_045512)を参照配

列として、系統樹作成、アライメントした。図2はその結果である。解析データはDNA表記のため、チミン (T) と記載されているデータは、実際には、ウラシル (U) である。図2で示すように、シトシン (C) からウラシル (U) への変異が顕著であった。これは、昨年我々が報告したデータと一致しており、デルタ株においても、点変異が多く、ウラシルへの変異が多いということが明らかとなった。

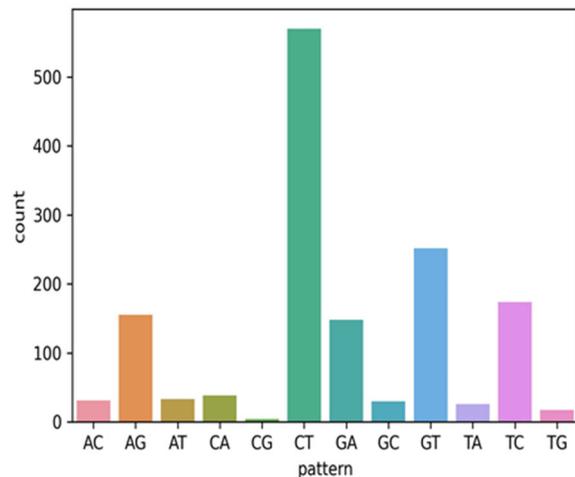


図2 デルタ株の変異の特徴

2) 新型コロナウイルス変異のゲノム情報を用いた抗原作成

次に、変異株を用いて、抗原検査に利用可能な人工抗原を作成できるか否かを明らかにするため、武漢株、およびデルタ株を用いてスパイクタンパク質の人工合成を試みた。武漢株、およびデルタ株の塩基配列を基に、スパイクタンパク質の塩基配列にイムノグロブリン Fc 部分を結合させた融合タンパク質を作成することにした。武漢株スパイクタンパク質、およびデルタ株スパイクタンパク質の人工合成は、通常用いられている方法で作成することができ、イムノグロブリン Fc 部分を利用して、これらスパイクタンパク質を精製することも可能であった。この結果から、少なくとも武漢株とデルタ株においては、スパイクタンパク質の人工合成が可能であり、抗原として利用可能であることが判明した。

2) 新型コロナウイルス患者抗体の遺伝子情報を用いた人工抗体の作製

上記の研究によって、新型コロナウイルススパイクタンパク質は、抗原検査のシーズとして利用可能である。そこで、新型コロナウイルス患者の抗体価の測定

法を開発することを試みた。まず、陽性対照の人工抗体の作成をおこなった。既に報告済みの論文より、武漢型感染患者の抗体の塩基配列情報を得て、これを用いて人工抗体の作成を行った。

H 鎖、L 鎖の塩基配列を基に、DNA を人工合成した。この DNA を用いて IgG 抗体ができるように遺伝子組換えを行った。発現プラスミドにこれら組換え DNA を組み込んだ後、動物細胞に遺伝子導入して、分泌型タンパク質を作成した。細胞培養上清を回収して、IgG-Fc 部分を指標に、精製を行った。その結果、人工抗体を作成、精製することが可能であった。

武漢型スパイクタンパク質を、96 well plate に吸着させて、この人工抗体を陽性対照として、ELISA 法を開発することができた。本実験により、新型コロナウイルス感染患者の抗体価の簡易測定法を作成することができた。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、学内研究者との交流が飛躍的に活性化した。本共同研究での交流を通じ、今後も大型研究費への申請に結び付けていきたいと考えている。また、本共同研究で明らかとなったウイルス変異について、さらなる研究へ展開していく予定である。

[4] 成果資料
なし。