

学位（博士）論文要旨

(Doctoral thesis abstract)

論文提出者 (Ph.D. candidate)	工学府博士後期課程 生命工学専攻 (major) 2021 年度入学 (Admission year) 学籍番号 21831012 氏名 吉末賢広 (student ID No.) (Name)
主指導教員氏名 (Name of supervisor)	黒田 裕 教授
論文題目 (Title)	大腸菌にて作製した低分子量タンパク質ドメインを用いたワクチンシーズ開発及びモノクローナル抗体の確立～新型コロナウイルス・スパイクタンパク質受容体結合ドメイン (RBD) を例に用いた実証研究～
<p>本博士論文は 5 章で構成されている。1 章は序論であり、大腸菌発現系と新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に関する基本的な情報と研究背景及び目的を説明している。SARS-CoV-2 は 2019 年に中国の武漢市で発見されてから瞬く間に全世界に蔓延し、7 億人以上が感染し、600 万人以上が死亡した。現在、パンデミックは沈静化しているものの、ウイルスの強毒化やパンデミックに備えて迅速かつ安価に生産可能なワクチンの開発と既存の mRNA の供給が困難なインフラが整備されていない貧困国への供給可能なワクチンの開発が必要と考えられたことから、これらを解決できると考えられる大腸菌発現系を用いてワクチンシーズ開発とモノクローナル抗体単離を行い、大腸菌発現系の有用性を実証することとした。</p> <p>2 章では SARS-CoV-2 の Receptor binding domain (RBD : 分子量 25kDa) を大腸菌発現系にて作製し、バキュロウイルス発現系にて作製されたスパイクタンパク質の立体構造と比較した。さらに、RBD の免疫原性をマウスに投与して検証した。そして、マウスから得た血清の中和活性を SARS-CoV-2-偽ウイルスと Vero E6/TMPRSS2 細胞を用いた感染中和試験にて検証した。これらの検証の結果、大腸菌産生 RBD は二次構造の点で天然構造に類似した構造を持つこと、マウスにてアジュバントの有無にかかわらず長期免疫原性を誘導すること、RBD 免疫後のマウスから得られた血清は偽ウイルスに対して中和活性を有することが示された。</p> <p>3 章では大腸菌発現系にて作製した RBD と哺乳類細胞 (HEK293) にて作製されたスパイクタンパク質の免疫原性の比較とこれらのタンパク質を交互に投与することによる相乗効果をマウスにて検証した。これらの検証の結果、RBD とスパイクタンパク質を交互に投与した群は非常に高い中和活性を示した。この相乗効果は蛋白質が糖鎖修飾されたことによるものなのか、構造によるものなのかはまだ議論の余地があるが、ワクチンの有効性を簡単に高めるための汎用性のある戦略になる可能性がある。</p> <p>4 章では大腸菌発現系にて作製した RBD-C9R を免疫したマウスからモノクローナル抗体を確立し、哺乳類発現系 (HEK293) にて作製されたスパイクタンパク質に対する結合親和力を測定した。これらの検証の結果、モノクローナル抗体はスパイクタンパク質と RBD のどちらにも結合し、非常に高い結合親和力を持つことが分かった。</p> <p>5 章は本論の結論を述べている。我々は SARS-CoV-2 の RBD をモデルタンパク質にして大腸菌を用いて作製した低分子量タンパク質ドメインのワクチンとしての有用性とモノクローナル抗体の確立のための抗原としての有用性を検証した。大腸菌発現系は組換えタンパク質の系としては迅速かつ安価な手法であり長い歴史もあるが、菌体内が還元状態である</p>	

ことやジスルフィド結合のミスフォールドを修正する機構が無いことから、ジスルフィド結合を有するタンパク質の発現などには不向きと考えられていた。しかし、我々は適切な方法にて大腸菌発現系産生のタンパク質に立体構造を持たせることにより、大腸菌発現系がワクチン開発や中和抗体薬を開発する際に、非常に有用な系として利用できる可能性を示した。また、本論にて標的にした SARS-CoV-2 はあくまで大腸菌発現系の有用性を検証するためのモデルであり、高いポテンシャルを持つ大腸菌発現系は SARS-CoV-2 以外の多くのウイルスやバクテリアなどへの応用が期待される。

This doctoral thesis consists of five chapters. Chapter 1 is an introduction, explaining basic information and research background on the new coronavirus (SARS-CoV-2), vaccine, and medicines targeted in this paper. Though the global COVID-19 pandemic has now subsided, emerging new mutant virulent strains demand the use of new vaccines. This motivated us to develop vaccine candidate and monoclonal antibodies from a rapid and inexpensive *E. coli* expression system.

In Chapter 2, the receptor binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 was produced in an *E. coli* expression system and the immunogenicity of RBD was tested in mice model and neutralisation was tested using pseudoviruses. The result of these examinations showed that RBD produced by *E. coli* has a native-like structure and it exhibited immunogenicity with the sera having neutralization of 50% (with adjuvant) and 30% (without adjuvant).

In Chapter 3, we compare the immune response generated by the *E. coli* produced RBD with a full-length S1 spike protein produced in mammalian cells. The group that was treated with alternating doses of RBD and spike protein showed very high neutralizing activity. The question of whether this interaction is caused by glycosylation or by structure is still open to discussion, but it could be a simple and generalizable strategy to increase the efficacy of a vaccine.

In Chapter 4, we have established monoclonal antibodies (mAb) from mice that were immunized with RBDs produced in the *E. coli* expression system. The results showed that the mAb bind to the spike protein and RBD with very high binding affinity.

Chapter 5 presents the conclusions of this thesis. We tested the merits of using *E. coli* produced SARS-CoV-2-RBD as a vaccine model and as antigens for the production of monoclonal antibodies. The *E. coli* expression system is a quick and cost-effective method having a long history, but it was unsuitable for expression of proteins with disulfide bonds. However, we showed that *E. coli* system can be used for the development of vaccines and the neutralizing antibody medicine through effective refolding strategy. The SARS-CoV-2 target in this paper is serves as a model to verify the efficacy of the *E. coli* expression system, can be applicable to other viruses and bacteria.