

別紙 HP 公開資料

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 関連 国際緊急共同研究・調査支援プログラム (J-RAPID) 終了報告書 概要

1. 研究課題名：「超好熱古細菌ウイルスを用いた抗原提示システムの開発：ワクチン緊急大量生産に向けて」
2. 研究期間：2020年8月～2021年3月
3. 主な参加研究者名：

日本側（研究代表者を含め6名までを記載）

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	望月智弘	特任助教	東京工業大学	代表・総括
共同研究者	井上啓子	技術員	東京工業大学	組換えウイルス作成
共同研究者	Juliarni	技術員	東京工業大学	組換えウイルス解析
共同研究者	里村武範	准教授	福井大学	組換えタンパク質の作成
研究期間中の全参加研究者数			4名	

相手側（研究代表者を含め6名までを記載）

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	Kenneth Stedman	Professor	Portland State University	組換えウイルスの配列検討
共同研究者	Mart Krupovic	Unit Leader	Institut Pasteur	組換えウイルスの配列検討
研究期間中の全参加研究者数			2名	

4. 共同研究調査の目的

現在、世界で使用されているワクチン生産用のウイルスベクターには、アデノウイルスやバキュロウイルスなどが挙げられる。これら既存のウイルスベクターの培養にはチンパンジー細胞、昆虫細胞や大腸菌などを用いるが、このような一般的な細胞培養では雑菌の混入による「コンタミ」のリスクが常に付きまとう。そのため、ワクチンの生産にはコンタミリスクを厳格に管理した大規模培養施設を要することになるが、今回の新型コロナウイルスのような世界的なパンデミックにおいては、世界レベルでの需要を賄うスピードでワクチンを生産することが困難となっているのが現状である。

本研究では、ワクチン生産におけるコンタミのリスクを最小化するため、極限環境に生息するウイルスを用い、遺伝子改変技術により新たなウイルスベクターを開発することを目的とした。本研究に使用する超好熱古細菌は、80℃以上の超高温域で増殖する。このような温度では、一般的な雑菌は全て死滅するため、培養におけるコンタミのリスクはほぼ皆無である。本研究では、そのような極限環境ウイルスの粒子表層に、病原体の抗原認識部位に見立てた外来ペプチドを付加させることで、将来的には新たなウイルスベクターへと発展さ

せることを目指した。

5. 共同研究調査の成果

5-1 共同研究調査の成果、今後の展開見込、社会への波及効果

本研究ではまず、遺伝子組換え技術が構築されている超好熱古細菌ウイルスの殻タンパク質に対する抗体を作成し、各構造タンパク質の粒子内局在の解明を試みた。配列特異性などにより抗体作成に至ったのは1つのみであったが、当該タンパク質はウイルス粒子の最表層に位置することが明らかとなった。また、熱水環境サンプルから本ウイルスの近縁種の単離培養に成功した。比較ゲノミクスを行ったところ、このタンパク質は高い配列多様性を示したことから、本研究の目標とする外来ペプチド付加に適したターゲットであることが明らかとなった。また遺伝子組換え技術を用い、当該タンパク質を含む全ての構造タンパク質にタグペプチドを付加した組換えウイルスの作成にも成功した。超好熱古細菌ウイルスにおける遺伝子組換え技術は他に2例あるが、殻タンパク質の配列改変に至ったのは本研究が世界初であり、特筆すべき成果と位置付けられる。ワクチンへの応用を見越し、現在どの挿入ペプチドが粒子表層に位置しているかを解析中である。ワクチン用のウイルスベクター実用化には未だ到達していないものの、本研究において開発した技術の特許化等を複数件計画中である。関連したバイオ企業との共同研究も含め、一日も早い実用化のために今後も研究を継続する予定である。

5-2 国際連携の成果

本研究では、既に超好熱古細菌ウイルスの遺伝子改変系を構築し、関連技術に造詣が深いアメリカとフランスのグループとの共同研究であった。本研究の代表者自身は遺伝子組換えウイルスの作成は未経験であったが、彼らとの共同研究により、より効率的な組換えウイルスの設計が可能となった。

6. 本研究調査に関連したワークショップ等の開催、主な口頭発表・論文発表・その他成果物（例：提言書、マニュアル、プログラム、特許）、受賞等（5件まで）

発表/ 論文/ 成果 物等	・主催したワークショップ、セミナーなど：名称、開催日 ・口頭発表：発表者名、タイトル、会議名 ・論文：著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年 ・その他成果物（例：提言書、マニュアル、プログラム、特許）、 ・メディア
発表	望月智弘、「熱水中の古細菌ウイルスと 生命の起源」、日本細菌学会、オンライン、2021年1月.
論文	望月智弘、世界一変り者のウイルス：古細菌ウイルスの世界、酵素工学ニュース、85:14-19, 2021.
書籍	河岡 義裕、岩見 真吾、大場 靖子、川口 寧、佐藤 佳、澤 洋文、鈴木 弘、高橋 英樹、朝長 啓造、中川 草、長崎 慶三、西浦 博、野田 岳志、古瀬 祐気、堀江 真行、牧野 晶子、松浦 善治、松野 啓太、村田 和義、望月 智弘、渡辺 登喜子、ネオウイルス学. 集英社. 227-245.
講演	望月智弘、超高温温泉のウイルスから探る生命とウイルスの進化史、地球生命研究所一般講演2021
メディア報道	週刊FLASH(光文社)、「目標は「新型コロナ撲滅」&生命の起源の解明 僕が「ウイルスハンター」だ!」、2021年4月20日号

Attachment to be posted on HP

International Urgent Collaborative Projects Regarding the Coronavirus Disease (COVID-19) within the J-RAPID Program

1. Title of the Project : " Development of antigen display system using hyperthermophilic archaeal viruses for emergent vaccine production "

2. Research/Investigation Period : 2020.8 ~ 2021.3

3. Main Investigators :

Japanese Team (up to 6 people including Principal Investigator)

	Name	Title	Affiliation	Project role
Principal Investigator	Tomohiro Mochizuki	Specially Appointed Assistant Professor	Tokyo Institute of Technology	Chief of project
Collaborator	Keiko Inoue	Technician	Tokyo Institute of Technology	Analysis of mutant virus
Collaborator	Juliarni	Technician	Tokyo Institute of Technology	Analysis of mutant virus
Collaborator	Takenori Satomura	Associate Professor	Fukui University	Protein expression
Total Number of participating researchers in the project: 4				

Counterpart Team (up to 6 people including Principal Investigator)

	Name	Title	Affiliation	Project role
Principal Investigator	Kenneth Stedman	Professor	Portland State University	Bioinformatic analysis
Collaborator	Mart Krupovic	Unit head	Institut Pasteur	Bioinformatic analysis
Total Number of participating researchers in the project: 2				

4. Objectives and Challenges

With an intention to eventually develop a new vaccine production system, objective of this study is to develop one of the hyperthermophilic archaeal viruses to display short peptides on its virion surface. Among the many obstacles in developing successful immune system against an emergent disease, efficiency in producing antigens both rapidly and abundantly is a key challenge. In conventional methods involving cell cultivation (e.g. E. coli, insect, animal, or human cells), contamination often becomes a serious concern, especially in the mass production stage. Our new proposed system using hyperthermophilic organisms with an optimal

growth temperature above 80 ° C can significantly minimize such risk.

Recently, we have succeeded in developing a genetic modification system for one of the hyperthermophilic archaeal viruses. In this project, after identifying the amino acid residues of the capsid structural proteins which are located at the surface of the virion particle, we aimed to modify the capsid protein genes to express external peptides that will be displayed as appendages on the virion surface. Eventually, by using part of the SARS-CoV-2 spike protein (S protein) as this insertion, we hope that the mutated archaeal virus can serve as an antigen for COVID-19 vaccination applications.

5. Results of the research/survey activities

5-1. Results of joint research. Expected future development, ripple effect on society

In this study, we first intended to create antibodies against all proteins consisting the virion of the targeted archaeal virus. Its purpose was to identify the locations of all capsid proteins within the virion. Unfortunately, due to sequence specificities of many of the targeted proteins, we were able to obtain only one antibody. But by performing immunoelectron-EM using it, we managed to figure out that this minor capsid protein is being located at the surface of the virion. This was an useful finding since virion surface proteins are generally ideal targets for peptide displays.

Using our in-house genetic modification system, we also managed to insert external tag peptides inside several capsid proteins. We are currently trying to locate where the tag peptides are being displayed within the infectious modified virions.

We have also managed to isolate a close relative of the studied archaeal virus. By performing comparative genomics analysis, we have identified the location within the capsid proteins where amino acid sequence shows low similarities. As a joint collaborative work with various collaborators, we are currently investigating on the possibilities to insert external peptides within such low conserved regions.

As a conclusion, over the course of this study, we have made steady progress in converting our hyperthermophilic virus to develop as a new virus based vector. By continuing the line of research, we hope to successfully develop our system to serve as a novel vaccine production system in the near future.

5-2. Added Value from International collaborative work

The principal investigator previously had only little experience in making modified viruses. The two international collaborators had great experience in the only two archaeal viruses which genetic systems existed previously. The success of this projects owes heavily to the expertise of these international collaborators.

6. Organized workshops/seminars, presentations, papers and other deliverables

	<ul style="list-style-type: none"> • Organized workshop/seminar: Title, date • Presentation: Presenters, title, conference • Papers: Authors, title, journals, vol, page, publish year • Other deliverables: • Media
Prese ntation	Mochizuki T. Hyperthermophilic archaeal viruses in hot springs and the origin of Life. Japanese Society of Bacteriology. Online. January 2021.
Paper	Mochizuki T. The world of archaeal viruses. Japanese Kouso Kougaku News. 85:14–19. 2021.
Book	Yoshihiro Kawaoka and others. Neoviorlogy. Shuueisha. 227–245.
Prese ntation	Mochizuki T. History of Life through viruses in hot springs. Earth–Life Science Institute Public Lecture. Online. January 2021.
Media	Weekly magazine Flash. Virus hunter aiming for the end of the pandemic and origin of life. April 2021.