

## 91. 広域スペクトルを有する抗 SARS-CoV-2 ペプチドの創製

辻 耕平

\*東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 メディシナルケミストリー分野

Key words : SARS-CoV-2, COVID-19, 膜融合, ペプチド, 二量体

### 緒言

2019 年末に発生した新型コロナウイルス感染症 COVID-19 は、2024 年 3 月現在においてもなお感染報告が続いている。最近までにコロナウイルス感染症として severe acute respiratory syndrome (SARS、2002 年 11 月)、middle east respiratory syndrome (MERS、2012 年 9 月) の流行が確認されている。そして 2024 年 3 月 10 日現在、COVID-19 の累計感染者数は 7 億 7,000 万人を超え、700 万人以上の死亡者が確認されている。次々と現れる新たな変異株にも対応可能な SARS-CoV-2 に有効な阻害剤の開発は喫緊の課題である。現在までに、メルクやファイザー、塩野義製薬により SARS-CoV-2 に対する経口投与可能な酵素阻害剤が開発されている。一方で、これまでに開発されたモノクローナル中和抗体の点滴剤などは変異株への対応力に課題が残されている。そこで注射剤および点鼻剤として投与可能なペプチド性医薬品が嚥下困難な重症患者などに対する治療法開発の一助になると考え、新規ペプチド性 SARS-CoV-2 阻害剤の創製を試みることにした。

### 方法

本研究ではウイルスの宿主細胞との膜融合に必須の Heptad Repeat (HR) 領域に着目した。膜融合過程において、3 量体の HR1 領域に対し、3 本の HR2 領域が外側から相互作用し 6 量体構造 (6-helix bundle : 6HB) を形成することで膜融合が進行する (図 1)。この 6HB の形成を阻害することで抗 SARS-CoV-2 活性を発揮する種々の HR2 誘導体ペプチドの合成、活性評価を行った。

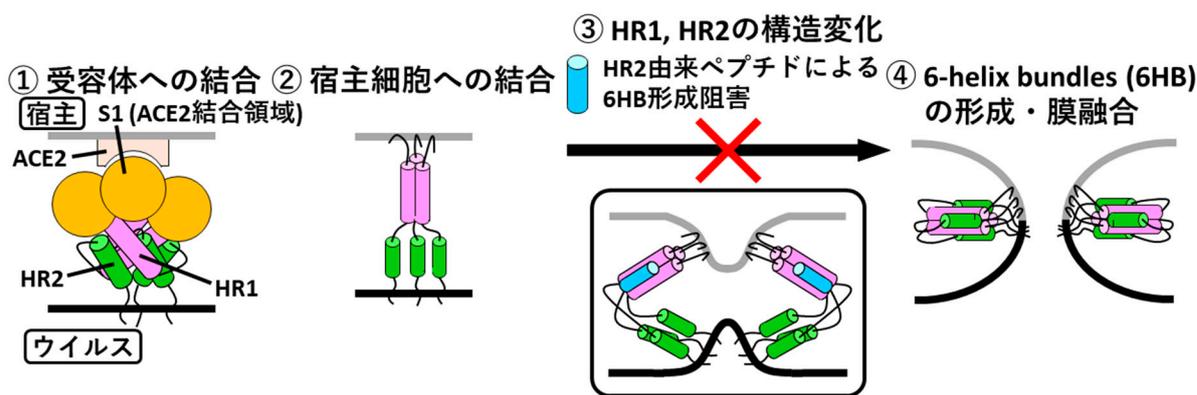


図 1. SARS-CoV-2 膜融合および阻害剤による膜融合阻害機構の概略

- 1) SARS-CoV-2 S1 領域の宿主細胞表面の受容体 (ACE2) への結合。
- 2) ウイルス表面タンパク質の活性化と HR1 N 末端領域の宿主細胞への挿入。
- 3) HR1、HR2 の構造変化に伴う膜融合の進行とその HR2 由来ペプチドによる阻害。
- 4) HR1–HR2 相互作用による 6 量体 (6HB) 形成とウイルス膜–宿主細胞膜の融合。

標的としている HR2 領域は高度に保存されており、特に SARS の原因ウイルスである SARS-CoV と SARS-CoV-2 においては完全に同一配列である。我々はこれまでに SARS-CoV-2 と同様の膜融合過程を経る human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) の阻害剤開発において HIV-1 の HR2 領域を模したペプチド C34 誘導体が強力な抗 HIV-1 活性を有し、その C 末端側二量体が単量体に比しさらに 100 倍以上の抗 HIV-1 活性を有することを明らかにしている [1, 2]。そこで本研究ではこの二量体化戦略を基に SARS-CoV-2 HR2 ペプチドおよびその二量体の合成、活性評価により新規 SARS-CoV-2 膜融合阻害剤の創製を行った。

SARS-CoV-2 武漢株由来 HR2 ペプチドや報告されている SARS-CoV HR2 ペプチド誘導体 SR9EK13 [3]、HR1-HR2 複合体の構造 (PDB : 6LXT) を基に新規 SARS-CoV-2 HR2 ペプチド誘導体をデザインした (図 2)。

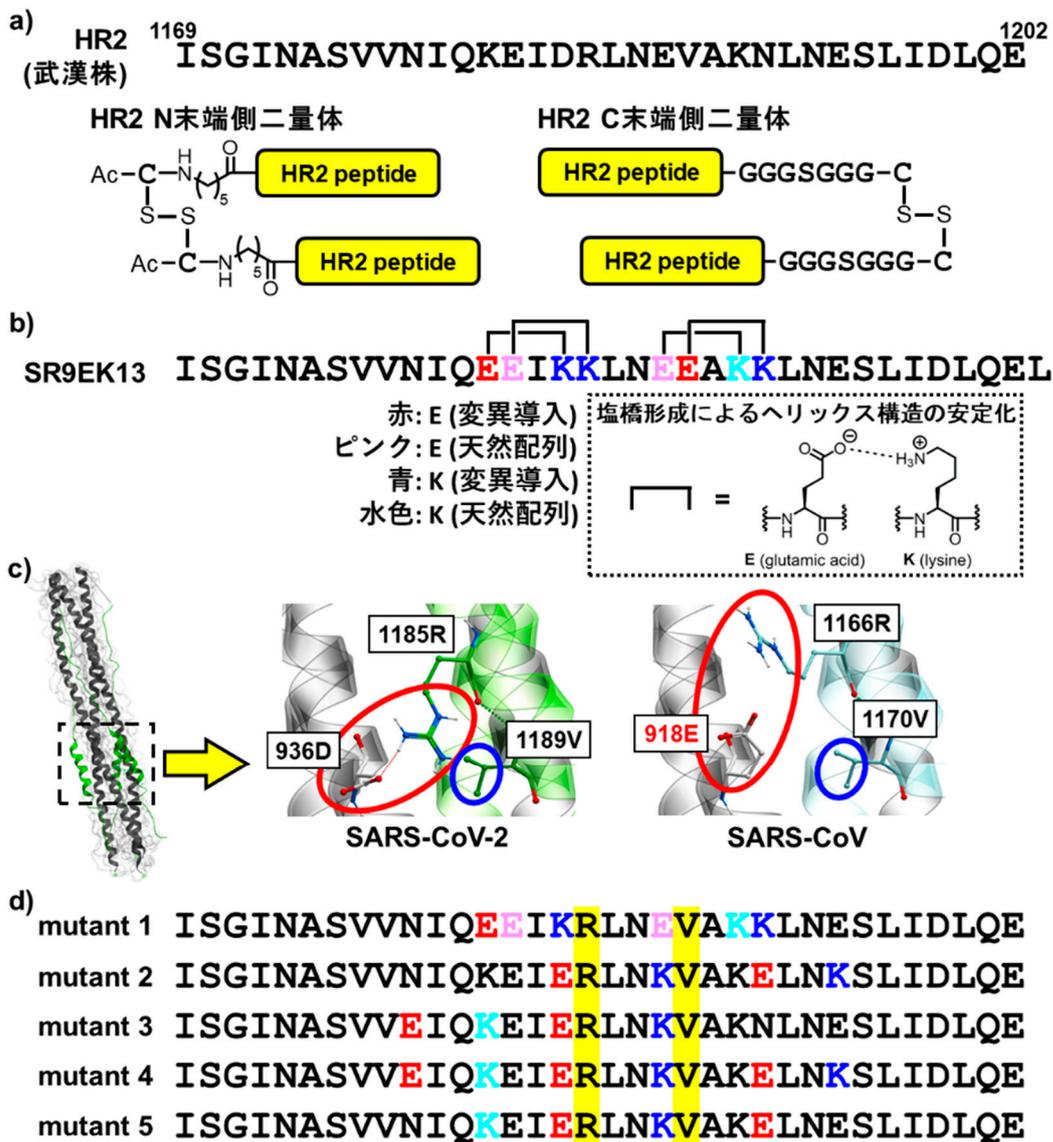


図 2. SARS-CoV-2 膜融合阻害ペプチドの設計

- 武漢株由来 HR2 ペプチドとその C 末端側および N 末端側二量体。
- SARS-CoV 膜融合阻害ペプチド SR9EK13。
- SARS-CoV-2 (PDB : 6LXT) および SARS-CoV (PDB : 1WYY) の 6HB 構造。
- 新規 SARS-CoV-2 膜融合阻害ペプチドの設計。

これら HR2 ペプチド誘導体に関してその単量体、N 末端側および C 末端側二量体をそれぞれ合成した。HR2 ペプチドおよび中間体フラグメントは、手動および自動合成機を用いた Fmoc 固相ペプチド合成法にて調製した。合成したペプチドは VeroE6 細胞および SARS-CoV-2 武漢株を用いたプラークリダクションアッセイ [4] により抗 SARS-CoV-2 活性を評価した。また、CD スペクトル測定により合成ペプチドの二次構造を評価した。

## 結果および考察

### 1. SARS-CoV-2 HR2 由来膜融合阻害ペプチドの合成

HIV-1 膜融合阻害剤の開発戦略、SARS-CoV の膜融合阻害剤および標的領域の結晶構造情報を基に種々の HR2 誘導体ペプチド（単量体、C 末端側二量体、N 末端側二量体）を設計、合成した（図 2）。

### 2. 合成ペプチドの抗 SARS-CoV-2 活性の評価

合成した HR2 ペプチド誘導体のプラークリダクションアッセイによる活性評価の結果、新たにデザインした mutant 1 およびその C 末端側二量体、mutant 2 の C 末端側二量体において最も良好な結果が得られた（図 3 および図 4）。また、HIV 膜融合阻害剤同様、SARS-CoV-2 HR2 ペプチドにおいてもそれぞれの誘導体の C 末端側二量体において阻害活性の向上を確認した。紙面の都合上、詳細は参考文献 [5] をご参照いただきたい。

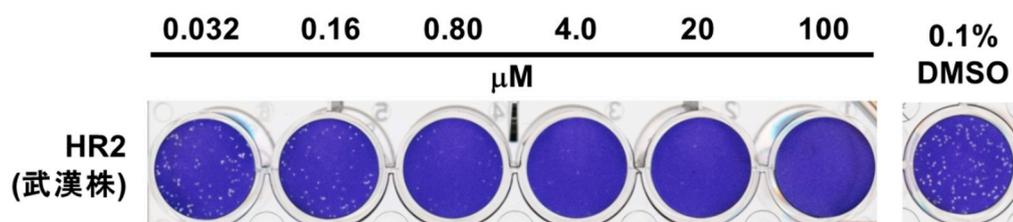


図 3. プラークリダクションアッセイによる抗 SARS-CoV-2 活性評価  
クリスタルバイオレットによる生細胞の染色。ウイルス感染により死滅した細胞群がプラークとして非染色領域を形成している様子。阻害剤濃度に応じたウイルス感染阻害によるプラーク数の減少。

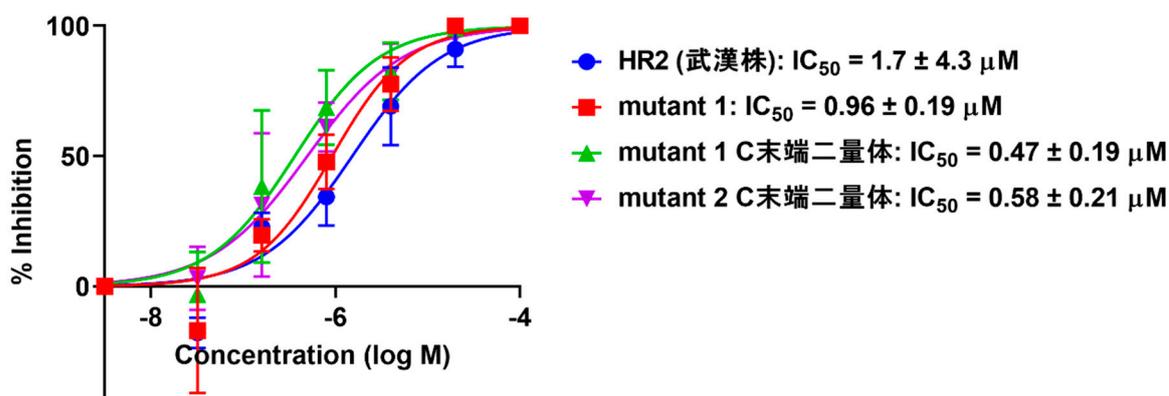


図 4. 有望化合物の抗 SARS-CoV-2 活性の評価結果  
プラークリダクションアッセイによる各阻害剤濃度での阻害活性をプロットし、50% 感染阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。武漢株由来 HR2 ペプチドに比し、今回設計、合成した誘導体およびその二量体は有意にその抗ウイルス活性が向上した。

### 3. 合成ペプチドの CD スペクトル測定による二次構造の評価

CD スペクトル測定の結果、HR2 ペプチドのみの  $\alpha$ -ヘリックス性と抗 SARS-CoV-2 活性にはよい相関がみられなかった (図 5)。このことから、これら HR2 ペプチドは HR1 領域と相互作用する際に  $\alpha$ -ヘリックスを形成していることが示唆された。

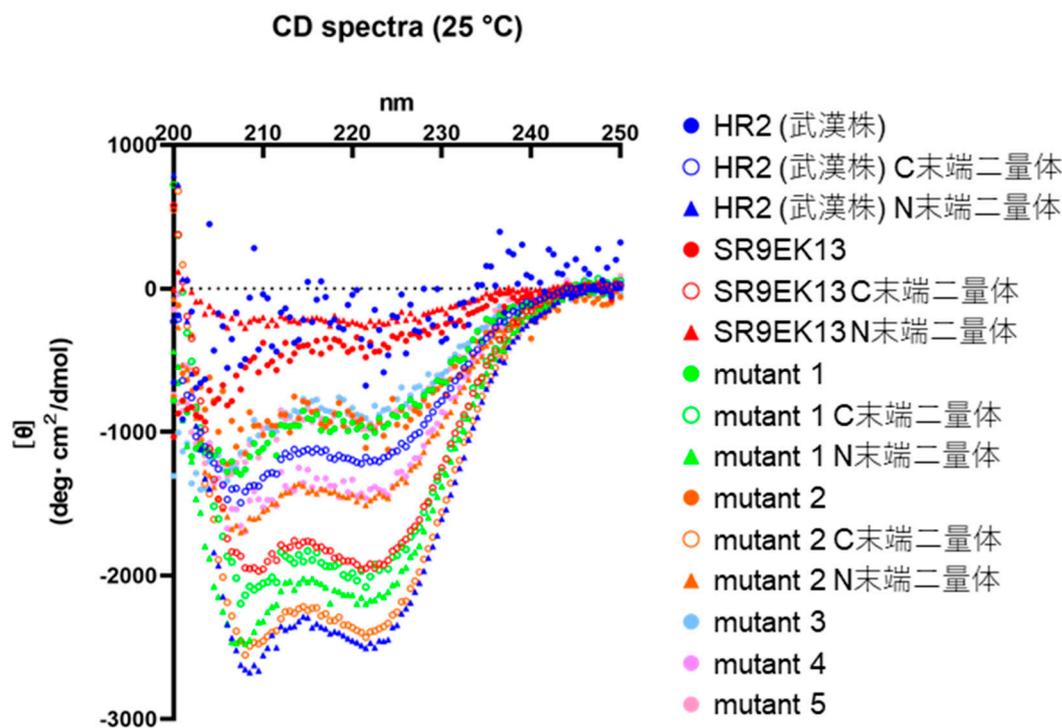


図 5. 合成ペプチドの CD スペクトル測定による二次構造の評価

HR2 ペプチド単体での  $\alpha$ -ヘリックス構造 (208 および 222 nm に負の極大) 形成能の評価結果。

### 4. 今後の展望

本研究において標的とした SARS-CoV-2 HR2 領域はこれまでに流行した変異株間でも非常に高度に保存されているため [6]、今後発生しうる新たな変異株も含めて広範な阻害活性が期待される。

さらに、6HB 形成を経る膜融合は HIV-1 やコロナウイルスだけでなく、麻疹ウイルス、インフルエンザウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) など多くの疾患原因ウイルスに共通のメカニズムであることから、本研究 [5] および HIV-1 の研究 [1, 2] に用いたこの HR2 領域ペプチド二量体化戦略はこれらウイルス感染症を含む新興・再興感染症の阻害剤開発における創薬基盤構築の一助となることが期待される。

#### 共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、ご助力いただきました大阪医科薬科大学の鈴木陽一講師、早稲田大学の小出隆規教授、増田亮次席研究員 (理工総研) にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。また、本研究は東京医科歯科大学生体材料工学研究所メディシナルケミストリー分野にて行われたものであり、ご指導、ご助言賜りました玉村啓和教授ならびに Kofi Baffour-Awuah Owusu 博士をはじめとする学生諸氏に改めて御礼申し上げます。最後に、多大なご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Multimerized CHR-derived peptides as HIV-1 fusion inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2013 Aug 1;21(15):4452-8. Epub 2013 Jun 5. PMID: 23800723 DOI: 10.1016/j.bmc.2013.05.060
- 2) Kobayakawa T, Ebihara K, Honda Y, Fujino M, Nomura W, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Dimeric C34 derivatives linked through disulfide bridges as new HIV-1 fusion inhibitors. *Chembiochem*. 2019 Aug 16;20(16):2101-2108. Epub 2019 Jul 4. PMID: 31012222 DOI: 10.1002/cbic.201900187
- 3) Ujike M, Nishikawa H, Otaka A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N, Taguchi F. Heptad repeat-derived peptides block protease-mediated direct entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus but not entry via the endosomal pathway. *J Virol*. 2008 Jan;82(1):588-92. Epub 2007 Oct 17. PMID: 17942557 DOI: 10.1128/JVI.01697-07
- 4) Suzuki Y, Hishiki T, Emi A, Sakaguchi S, Itamura R, Yamamoto R, Matsuzawa T, Shimotohno K, Mizokami M, Nakano T, Yamamoto N. Strong alkaline electrolyzed water efficiently inactivates SARS-CoV-2, other viruses, and Gram-negative bacteria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Oct 20;575:36-41. Epub 2021 Aug 23. PMID: 34455219 DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.08.048
- 5) Tsuji K, Owusu K B-A, Miura Y, Ishii T, Shinohara K, Kobayakawa T, Emi A, Nakano T, Suzuki Y, Tamamura H. Dimerized fusion inhibitor peptides targeting the HR1-HR2 interaction of SARS-CoV-2. *RSC Adv*. 2023 Mar 20;13(13):8779-8793. eCollection 2023 Mar 14. PMID: 36950081 DOI: 10.1039/d2ra07356k
- 6) Papanikolaou V, Chrysovergis A, Ragos V, Tsiambas E, Katsinis S, Manoli A, Papouliakos S, Roukas D, Mastronikolis S, Peschos D, Batistatou A, Kyrodimos E, Mastronikolis N. *Gene*. 2022 Mar 10;814:146134. Epub 2022 Jan 4. PMID: 34990799 DOI: 10.1016/j.gene.2021.146134