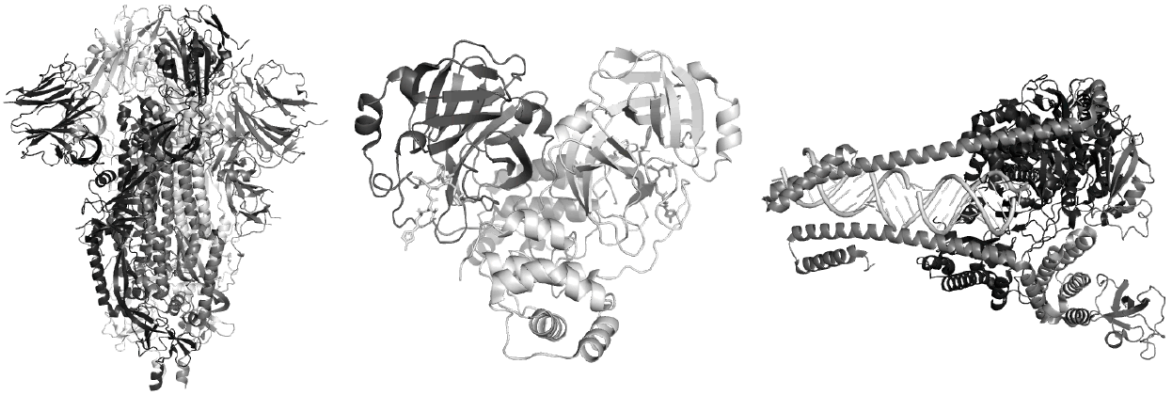
147　COVID-19治療薬シードの探索と構造基盤の解明	鈴木　千城

【目的】新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は世界全体で 5 億人以上の感染者と 600 万人以上の死者を出しており（2022 年 4 月 26 日現在）、その原因ウイルスである SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス薬の開発は喫緊の課題である。現在、ウイルスタンパク質の立体構造を利用したバーチャルスクリーニングのヒット化合物や、同じベータコロナウイルスに属する SARS-CoV、MERS-CoV に対して実験室レベルで有効な薬剤等の中から治療薬候補が探索されている。そして、これらの内で安全性や薬物動態が試験済みの既存薬を、短期間で COVID-19 治療薬として適用することを目指すドラッグリポジショニングにより、一定の治療効果が認められた薬剤が選定された。しかしながら、特効薬となる治療効果の高い薬剤はまだ存在しないことから、より効果的な新規抗ウイルス薬の開発が望まれている。本研究の目的は、COVID-19 新規治療薬開発に必要な治療薬シード–ウイルスタンパク質複合体の構造的基盤を提供することである。

【方法】SARS-CoV-2 由来の組換えスパイク（S）タンパク質、メインプロテアーゼ（M^{pro}）、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ（RdRp）を調製し、ウイルスタンパク質に対して阻害活性を持つ治療薬シード化合物のスクリーニング、ヒット化合物の評価、治療薬シード–ウイルスタンパク質複合体の立体構造解析を行った。

【結果】我々は日本国内の研究機関から S タンパク質に結合する創薬シード（中和抗体・ペプチドなど）の提供を受けており、クライオ電子顕微鏡を用いて S タンパク質と治療薬シード複合体の立体構造解析を行うための基礎的な検討を行った。ショウジョウバエ由来 S2 細胞から精製した S タンパク質をクライオ電子顕微鏡で解析したところ、解析に適した粒子は確認できなかった。そこで、S タンパク質の安定性の向上が必要と考え、S タンパク質に対して 6 つのプロリン変異の導入、ジスルフィド結合の導入を行ったところ、それぞれ 3.2 Å、2.7 Å分解能で構造解析に成功した。国立感染症研究所との共同研究により、ヒト化マウスを用いて SARS 関連コロナウイルスに対して広範な中和活性を持つ抗体 NT-193 を分離した。S タンパク質の受容体結合ドメイン（RBD）と NT-193 の複合体の結晶構造解析を行い、立体構造に基づいて中和メカニズムを明らかにした。東京大学創薬機構との共同研究により、組換え M^{pro} タンパク質に対して阻害活性を持つ化合物を、質量分析機を用いてスクリーニングした。ヒット化合物を、ウイルスを用いた細胞感染阻害実験で評価したところ、抗ウイルス活性を持つ 8 つの化合物が同定された。

ターゲットタンパク質の立体構造



スパイク(S)タンパク質　　メインプロテアーゼ(M^{pro})　　RNA依存RNAポリメラーゼ(RdRp)

147. COVID-19 治療薬シードの探索と構造基盤の解明

鈴木　干城

*九州大学 大学院医学研究院 ウイルス学分野

Key words：COVID-19，SARS-CoV-2，Spike protein，M^{pro}，RNA dependent RNA polymerase

緒　言

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は世界全体で 5 億人以上の感染者と 600 万人以上の死者出しており（2022 年 4 月 26 日現在）、その原因ウイルスである SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス薬の開発は喫緊の課題である。現在、ウイルスタンパク質の立体構造を利用したバーチャルスクリーニングのヒット化合物や、同じベータコロナウイルスに属する SARS-CoV、MERS-CoV に対して実験室レベルで有効な薬剤等の中から治療薬候補が探索されている。そして、これらの内で安全性や薬物動態が試験済みの既存薬を、短期間で COVID-19 治療薬として適用することを目指すドラッグリポジショニングにより、ウイルス RNA ポリメラーゼ阻害剤であるレムデシビルやファビピラビルなどが選定された。これらの中には臨床試験において一定の治療効果が認められた薬剤も含まれているが、特効薬となる治療効果の高い薬剤はまだ存在しないことから、より効果的な新規抗ウイルス薬の開発が望まれている。また、将来的に中間宿主を介して新たなコロナウイルス感染症が発生することが十分に考えられる。今後新たなコロナウイルス感染症が発生することを想定して抗ウイルス薬についての基礎的な治験を集約し、理想的にはコロナウイルス全般に有効な薬剤を開発しておくことが重要と考えられる。

本研究では、COVID-19 新規治療薬開発に必要な治療薬シード–ウイルスタンパク質複合体の構造的基盤の提供を目的として、組換えウイルスタンパク質の調製、ウイルスタンパク質に結合する治療薬シード化合物のスクリーニング、ヒット化合物の評価、治療薬シード–ウイルスタンパク質複合体の立体構造解析を行った。ターゲットタンパク質としては、既に立体構造が明らかになっている SARS-CoV-2 由来のスパイク（S）タンパク質、メインプロテアーゼ（M^{pro}）、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ（RdRp）の 3 つを選定し、それぞれを組換えタンパク質として精製した。我々は、日本国内の研究機関から S タンパク質に結合する創薬シード（中和抗体・ペプチドなど）の提供を受けており、クライオ電子顕微鏡を用いて S タンパク質と治療薬シード複合体の立体構造解析を行うための基礎的な検討を行った。

さらに、調製したウイルスタンパク質を用いて国内の研究機関と以下の共同研究を行った。

国立感染症研究所治療薬・ワクチン開発研究センターの高橋宜聖センター長らは、ヒト化マウスを用いて SARS 関連コロナウイルスに対して広範な中和活性を持つ抗体 NT-193 を分離した。NT-193 の中和メカニズムを明らかにするため、S タンパク質の受容体結合ドメイン（RBD）と NT-193 の複合体の結晶構造解析を行った［1］。本研究成果はコロナウイルス全般に有効な治療薬や、ワクチンの設計に役立つと考えられる。

東京大学創薬機構の小島宏建特任教授らは、組換え M^{pro} タンパク質に対して阻害活性を持つ化合物を、質量分析機を用いてスクリーニングした。ヒット化合物を、ウイルスを用いた細胞感染阻害実験で評価したところ、抗ウイルス活性を持つ 8 つの化合物が同定された［2］。本研究の成果により、M^{pro} -ヒット化合物複合体の立体構造解析を行うことが可能になった。複合体構造を基礎に、迅速な化合物最適化を行うことで治療効果の高い抗ウイルス薬の開発に貢献できると考えられる。

*現在の所属：京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 ウイルス制御分野

方　法

1.　SARS-CoV-2 全長 S タンパク質の調製と治療薬シード複合体の構造解析に向けた条件検討

膜貫通領域を除いた SARS-CoV-2 由来 S タンパク質全長の遺伝子配列をヒト由来 HEK293GnTI（－）細胞もしくはショウジョウバエ由来 S2 細胞発現用ベクターにクローニングし、His-tag もしくは strep-tag 融合タンパク質として培地中に分泌発現させた。His-tag もしくは Strep-tactin カラムを用いて培地中のタンパク質を回収し、ゲルろ過カラムを用いて高純度に精製した。京都大学医生物学研究所では国内の研究機関からウイルス中和能を持つ創薬シード（抗体やペプチド）の提供を受けている。そこで、これらの治療薬シードと S タンパク質全長との複合体の立体構造解析を行うための基礎的な条件検討を行った。S タンパク質全長単体についてはクライオ電子顕微鏡による立体構造解析法が既に報告されているため、まず単体での立体構造解析を試みた。HEK293GnTI（－）細胞と S2 細胞から精製した S タンパク質をネガティブ染色法を用いて電子顕微鏡で解析し、クライオ電子顕微鏡解析に適した粒子を観察できる発現系を選択した。この結果を基にクライオ電子顕微鏡解析を行ったが、良好な粒子は確認できなかった。そこで、S タンパク質の安定性の向上を狙って、6 つのプロリン変異導入、ジスルフィド結合の導入を行った。これら安定化変異体のクライオ電子顕微鏡解析を行い、観察した二次元粒子像から三次元構造の再構築を行った。

2.　SARS-CoV-2 S タンパク質受容体結合ドメイン（RBD）の調製と中和抗体との複合体の立体構造解析

SARS-CoV-2 由来 S タンパク質 RBD の遺伝子配列をヒト由来 HEK293GnTI（－）細胞発現用ベクターにクローニングし、His-tag 融合タンパク質として培地中に分泌発現させた。His-tag カラムを用いて培地中のタンパク質を回収し、ゲルろ過カラムを用いて高純度に精製した。国立感染症研究所治療薬・ワクチン開発研究センターの高橋宜聖センター長らはヒト化マウスを用いて SARS-CoV-2 を含む SARS 関連コロナウイルスを幅広く中和する抗体 NT-193 を同定した。そこで、調製した RBD と国立感染症研究所から提供を受けた中和抗体を混合し複合体の結晶化を行った。放射光施設にて得られた結晶に X 線を照射し、回折データを測定し、立体構造解析を行った。

3.　SARS-CoV-2 由来 M^{pro}、RdRp の調製と治療薬シードのスクリーニング

M^{pro} と RdRp を構成する 3 つのサブユニット（nsp7、nsp8、nsp12）の遺伝子配列をそれぞれ大腸菌発現用ベクターにクローニングし、His タグ融合タンパク質として発現させた。発現時の温度、IPTG 濃度を検討し、発現量が最大となる条件で大腸菌を大量培養した。M^{pro} と nsp7 については大腸菌を破砕した後、沈澱を除去し、上清を His-tag 精製カラムを用いて精製し、その後ゲルろ過カラムを用いて高純度に精製した。nsp8 と nsp12 については同様に His-tag 精製カラムを用いて精製した後、陰イオン交換カラムで核酸を除き、ゲルろ過カラムで高純度に精製した。精製した M^{pro} を用いて治療薬シードのスクリーニングを行った。治療薬シード、プロテアーゼ基質ペプチド、M^{pro} を混合した後、16 時間インキュベートし、反応液を質量分析機で解析して基質と生成物の濃度から阻害率を測定した。32,033 種類の化合物のスクリーニングを行った結果、阻害率 49%以上の化合物を選択した。再現性と用量依存性を確認し、候補化合物を絞り込んだ。さらにウイルス株を用いて細胞感染阻害実験を行い、治療薬シードとして有望な化合物を選択した。

結果および考察

1. SARS-CoV-2 全長 S タンパク質の調製と治療薬シード複合体の構造解析に向けた条件検討

HEK293GnTI（－）細胞と S2 細胞から精製した S タンパク質をネガティブ染色法を用いて電子顕微鏡で解析したところ、S2 細胞から精製した方が均一な粒子が得られることが分かった。そこで、S2 細胞から精製した S タンパク質をクライオ電子顕微鏡で解析したところ、解析に適した粒子は確認できなかった。S タンパク質の安定性の向上が必要と考え、S タンパク質の 6 つの残基をプロリンに変異させたところ、解析に適した粒子が確認され、3.2Å分解能で構造解析に成功した。解析した粒子の多くは受容体との結合が可能な状態である open form であった。さらなる安定化のために、S タンパク質にジスルフィド結合を導入したところ、2.7Å分解能で構造解析に成功した。解析した粒子の多くは受容体との結合ができない状態である closed form であった。S タンパク質は open form と closed form の 2 つ状態を取ることが知られており、open form は宿主受容体に結合できるが、closed form は結合できない。治療薬シードの

作用メカニズムとしては、open form の受容体結合部位に結合して宿主受容体との結合をブロックする、closed form に結合して、open form への移行を不可能にするなどが考えられる。今回の検討で、治療薬シードの作用メカニズムに適した S タンパク質を用いることができるようになったと考えられる。今後は今回の検討の結果得られた S タンパク質のコンストラクトを基礎に、抗体・ペプチドと安定に複合体を形成する条件を検討し、クライオ電子顕微鏡による複合体構造の解析を進める。

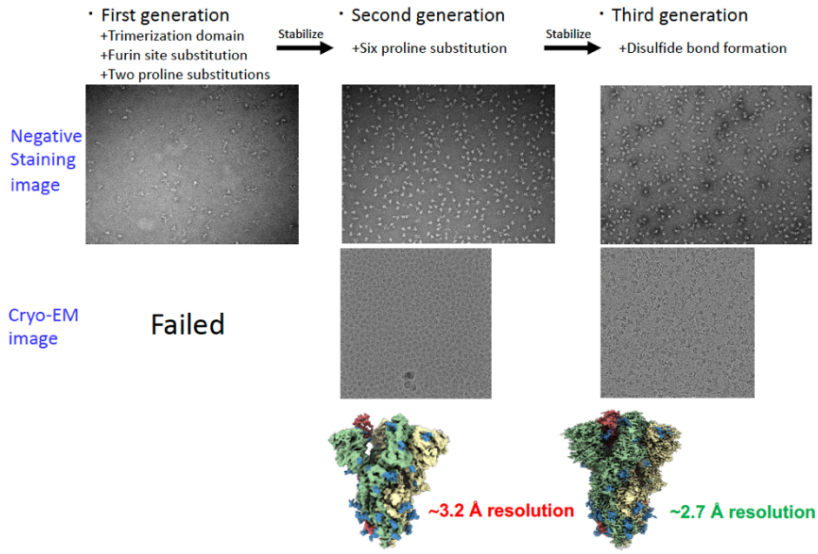


図 1. 変異導入による SARS-CoV-2 S タンパク質の安定化
6 つのプロリン変異とジスルフィド結合の導入により、それぞれ 3.2Å分解能、2.7Å分解能でクライオ電子顕微鏡による立体構造解析に成功した。

2. SARS-CoV-2 S タンパク質受容体結合ドメイン（RBD）の精製と中和抗体との複合体構造の解析

SARS-CoV-2 中和抗体の主要なエピトープは S タンパク質の RBD に存在する。しかし、SARS-CoV-2 と他のコロナウイルス間の RBD の配列保存性が低いため、RBD 中和抗体の交差反応性は低い。また、多くの RBD 抗体は、単剤では SARS-CoV-2 のエスケープ変異に対して脆弱である。国立感染症研究所の高橋センター長らはヒト化マウスを用いて、SARS-CoV-2 を含む SARS 関連コロナウイルスを幅広く中和する抗体 NT-193 を同定した。そして精製した RBD と NT-193 の結晶構造解析の結果から、中和メカニズムの構造基盤を明らかにした［1］。NT-193 は、その重鎖を使って RBD の保存配列を認識することで交差反応性を獲得し、軽鎖を使って受容体 Ace2 結合部位を認識することで中和活性を獲得していた。幅広い中和活性を持つ抗体の中和メカニズムが明らかになったことで、スペクトルの広い治療薬やワクチンの設計が可能になると考えられる。

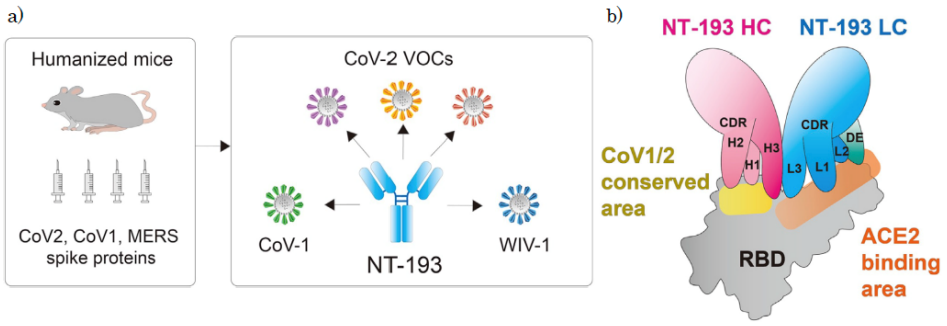


図 2. 幅広い中和活性を持つ SARS 関連コロナウイルス中和抗体の作製と中和メカニズム

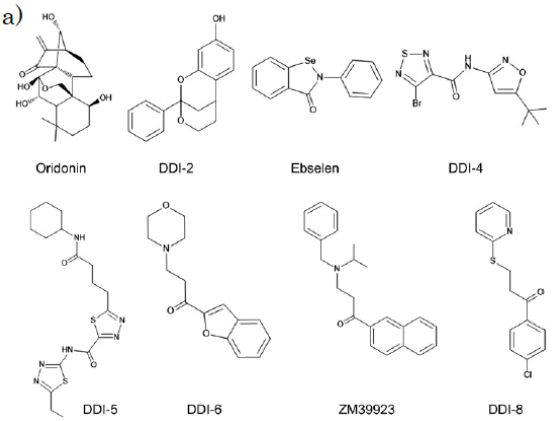
a) 中和抗体 NT-193 の作製方法。

b) NT-193 による中和メカニズム。NT-193 は重鎖を用いて RBD の SARS 関連コロナウイルスに保存された配列を認識し、軽鎖を用いて受容体 Ace2 結合部位を認識する。

3. SARS-CoV-2 由来 M^{pro}、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ（RdRp）の調製と治療薬シードのスクリーニング

精製した M^{pro} を用いて 32,033 種類の化合物のスクリーニングを行った結果、阻害率 49%以上の化合物が 242 個選択された。再現性と用量依存性を確認し、候補化合物を絞り込んだところ、23 種類の化合物が得られた。次にウイルス株を用いて細胞感染阻害実験を行った。その結果、図 3 に示す 8 つの化合物が有効であることが確認された［2］。今後、ヒット化合物と M^{pro} の複合体の結晶構造解析を行い、阻害メカニズムを明らかにすることで、更なる化合物構造の最適化が可能になると考えられる。RdRp についても研究機関から治療薬シードの提供があれば、複合体の立体構造解析を進める。

a)



b)

Compound name	Enzyme inhibitory activity	Virus inhibitory activity	Cytotoxicity
	IC_{50} (μM)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
Oridonin	3.2	0.6	6.9
DDI-2	3.4	1.2	>10.0
Ebselen	<0.25	2.1	9.1
DDI-4	3.2	2.2	6.4
DDI-5	2.7	3.1	7.8
DDI-6	2.9	4.1	10.0
ZM39923	1.2	4.5	7.3
DDI-8	2.9	4.9	5.2

図 3. SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害剤のスクリーニング

a) SARS-CoV-2 感染阻害能を示した 8 つの M^{pro} 阻害剤の化合構造。

b) M^{pro} 阻害剤の有効性。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立感染症研究所治療薬・ワクチン開発研究センターの高橋宜聖センター長、東京大学創薬機構の小島宏建特任教授である。

文　献

1) Onodera T, Kita S, Adachi Y, Moriyama S, Sato A, Nomura T, Sakakibara S, Inoue T, Tadokoro T, Anraku Y, Yumoto K, Tian C, Fukuhara H, Sasaki M, Orba Y, Shiwa N, Iwata N, Nagata N, Suzuki T, Sasaki J, Sekizuka T, Tonouchi K, Sun L, Fukushi S, Satofuka H, Kazuki Y, Oshimura M, Kurosaki T, Kuroda M, Matsuura Y, Suzuki T, Sawa H, Hashiguchi T, Maenaka K, Takahashi Y. A SARS-CoV-2 antibody broadly neutralizes SARS-related coronaviruses and variants by coordinated recognition of a virus-vulnerable site. Immunity. 2021 Oct 12;54(10):2385-2398.e10. doi: 10.1016/j.immuni.2021.08.025. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34508662; PMCID: PMC8382582.

2) Hasegawa T, Imamura RM, Suzuki T, Hashiguchi T, Nomura T, Otsuguro S, Maenaka K, Sasaki M, Orba Y, Sawa H, Sato A, Okabe T, Nagano T, Kojima H. Application of Acoustic Ejection MS System to High-Throughput Screening for SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitors. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2022 Mar 1;70(3):199-201. doi: 10.1248/cpb.c21-01003. Epub 2021 Dec 21. PMID: 34937844.