

# コロナウイルスプロテアーゼに対する分解誘導剤の開発

東京薬科大学薬学部薬品化学教室

今野 翔

## 【研究の背景】

2019年12月に中国武漢で報告された新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、瞬く間に世界中に拡散し、パンデミックを引き起こした。原因ウイルスとしてコロナウイルスが同定され、2002年から2003年にかけて流行した重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（SARS-CoV）との高いゲノム相同性からSARS-CoV-2と命名された。コロナウイルスは古くから風邪症候群の原因ウイルスとして知られていたが、自然治癒すること、そして致死性が低いことから治療薬の開発は行われていない。そのため、COVID-19に対する有効な治療薬は存在せず、重症化した場合、対症療法しか術がない。ワクチン開発に加え、既存薬の適応拡大が期待されているが、COVID-19の根本治療、そして新たな新型コロナウイルス感染症の襲来に備えるためにも、選択的かつ確実に効果のある治療薬の開発は急務である。

3CLプロテアーゼ（3CL-Pro）はウイルス由来のシステインプロテアーゼであり、SARS-CoV-2が増殖するための必須酵素である。我々は2003年のSARS発生以来、SARS-CoVの3CL-Proに対するペプチドミメティック型阻害剤の開発研究を行い、YH-53 ( $K_i = 6.3 \text{ nM}$ )を創製した（**図1**）。<sup>1-3</sup> YH-53は反応性基であるベンゾチアゾリルケトン部位が3CL-Proの活性中心システインと一時的な共有結合を形成し、可逆的阻害を示す（**図1**）。SARS-CoVとSARS-CoV-2の3CL-Proは96%のアミノ酸同一性があることから、YH-53はSARS-CoV-2の3CL-Proにも同様の阻害活性を示す可能性が高い。しかし、YH-53のSARS-CoVに対する抗ウイルス活性は中程度であり、医薬候補分子として有望であるものの、更なる活性向上が求められる。

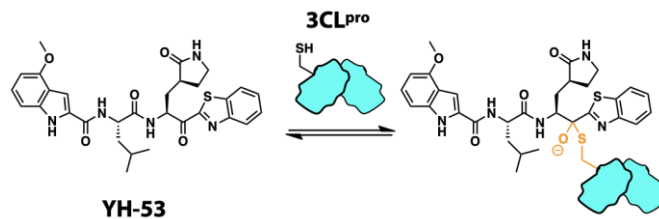


図1. YH-53の構造と3CL-Proの可逆的阻害メカニズム。

## 【研究の目的】

本研究の目的は、YH-53を基にPROTAC（Proteolysis targeting chimera）分子を開発し、SARS-CoV-2の3CL-Proを分解誘導できるか検証することである。一般的に、阻害剤の活性を改善するために実施される構造活性相関研究は、膨大な年月と労力を要する。しかしながら、COVID-19治療薬の創製は喫緊の課題であることから、本感染症の治療薬開発において構造活性相関研究を実施することは適していないと判断した。そこで、迅速なCOVID-19治療薬の創製に向けて、PROTACに代表されるケミカルプロテインノックダウン法に着目した。

細胞内で不要となったタンパク質は、E3ユビキチンリガーゼによってユビキチン化される。ポリユビキチン化されたタンパク質は最終的にプロテアソームと呼ばれるタンパク質分解酵素によって分解される。PROTACは、E3ユビキチンリガーゼと標的タンパク質の両方に結合する分子をリンカーで繋いだ中分子を用いて、標的タンパク質のユビキチン化を強制的に促し、標的タンパク質を選択的に分解する技術である。そこで、YH-53を基盤としたPROTAC分子を創製できれば、3CL-Proの阻害に加えてPROTACによる分解が誘導され、YH-53の抗ウイルス活性を飛躍的に向上できるのではないかと考え、本研究に着手することにした（**図2**）。

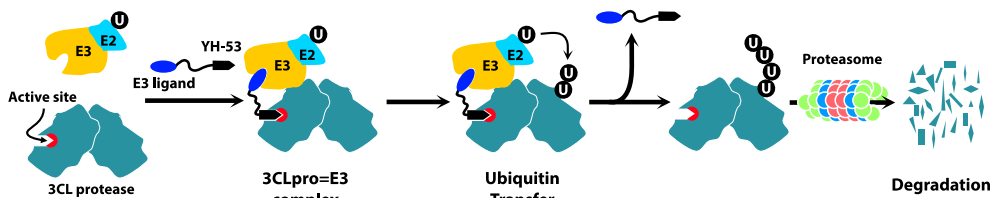


図2. 3CL-Proを標的としたPROTACの戦略。

## 【研究結果】

### 1. YH-53を基盤としたPROTAC分子の設計

最初に、YH-53とE3リガーゼリガンドを有するPROTAC分子の設計を行なった。まず、YH-53におけるE3リガーゼリガンドの導入部位を決定することにした。我々はすでにYH-53とSARS-CoV-2 3CL-Proの共結晶構造を取得しており、YH-53のインドール4位のメトキシ基がタンパク質の外側を向いていることを明らかにしていた。<sup>4</sup>そこで、インドール4位のメトキシ基にE3リガーゼリガンドを導入することを計画した。E3リガーゼリガンドについては、PROTAC研究で頻繁に用いられているポマリドミドとVH032を選択した。また、PROTACではリンカーの長さや性質が分解効率に大きく影響を与えることが報告されている。そこで、リンカーの異なる10種類のPROTAC分子を合成することにした(図3)。設計したPROTAC分子は、アルキン部を導入したYH-53とアジドリンカーを有するE3リガーゼリガンドをそれぞれ合成した後、最後に銅触媒を用いたHuisgen環化付加反応により二つの分子を結合した。

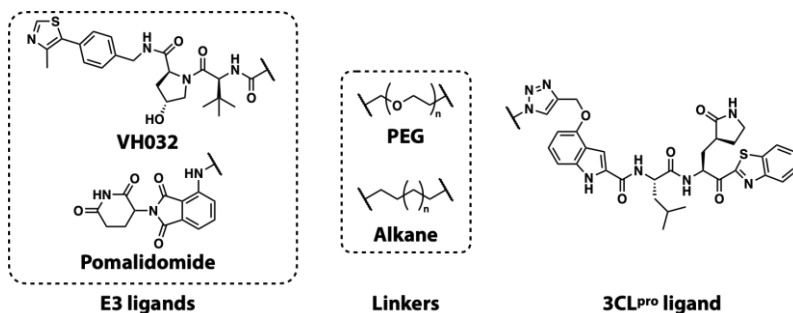


図3. YH-53を基盤としたPROTAC分子の構造。

### 2. 組換え3CL-Proを用いた酵素阻害活性評価

次に、合成したPROTAC分子がSARS-CoV-2の3CL-Proに対する阻害活性を維持しているか確認するため、組換え3CL-Proを用いた阻害活性評価試験を行なった。組換え3CL-Proは大腸菌で発現した後、Ni-NTA樹脂を用いたアフィニティー精製と、陰イオン交換樹脂による精製を行い、高純度で獲得した。阻害定数である $K_i$ は、各濃度のPROTAC分子存在下における酵素活性の初速度を測定し、Morrisonの式を用いて算出した。

VH032を結合した3CL-VHシリーズでは、全ての化合物がYH-53 ( $K_i = 34$  nM) に匹敵する阻害活性を示した(図4)。一方、ポマリドミドを結合した3CL-POMシリーズでは、脂肪族リンカーを介してポマリドミドを結合したPROTAC分子(3CL-POM-C4, 3CL-POM-C6)において阻害活性の大きな減弱がみられた。同様の脂肪族リンカーを有する3CL-VH-C4や3CL-VH-C6ではこのような阻害活性の低下は起こらなかったことから、リンカーとE3リガーゼリガンドの相性による問題であると考えた。これらの阻害活性評価から、YH-53のインドール4位への化合物導入は、期待どおり3CL-Proとの結合にほとんど影響を与えないことが明らかになった。

化合物名	$K_i$ (nM)	化合物名	$K_i$ (nM)
3CL-POM-P1	52.1	3CL-VH-P1	49.2
3CL-POM-P2	47.6	3CL-VH-P2	30.3
3CL-POM-P3	29.1	3CL-VH-P3	30.6
3CL-POM-C4	195	3CL-VH-C4	39.7
3CL-POM-C6	441	3CL-VH-C6	73.3

図4. PROTAC分子のSARS-CoV-2 3CL-Proに対する酵素阻害活性。

### 3. 哺乳類細胞を用いた3CL-Pro発現系の構築と分解誘導評価

まず、動物細胞を用いた3CL-Pro過剰発現系の構築を行った。3CL-ProのN末端は活性に極めて重要であり、N末端に開始コドン由来のメチオニンなどが存在すると活性が大幅に減弱することが知られている。そこで、3CL-ProのN末端にnsp4に相当する5アミノ酸を導入し、3CL-Proの自己切断によって野生型のN末端が生成する発現用コンストラクトを作製した。次に、3CL-Proを効率的に発現する哺乳類細胞について検討を行なった。HEK293、HeLa及びCOS-7細胞に3CL-Pro発現プラスミドをトランスフェクションし、ウエスタンブロットを行なった後、抗SARS-CoV-2 3CL-Pro抗体で3CL-Proを検出した。その結果、これらの細胞株の中ではCOS-7細胞が最も効率良く3CL-Proを発現できることがわかった。また、3CL-Pro発現細胞の細胞抽出液を用いた酵素活性評価から、発現した3CL-Proが酵素活性を有していることがわかった。続いてCOS-7細胞を用いて、合成したPROTAC分子による3CL-Proの分解誘導実験を行なった。3CL-Proプラスミドをトランスフェクションした細胞に対し、それぞれのPROTAC分子を処理し、ウエスタンブロットにて3CL-Proの発現量を定量した。その結果、全てのPROTAC分子において3CL-Proの分解誘導は観察されなかった(図5)。そこで、化合物濃度、処理時間などについて種々検討を行なったが、いずれの条件においても分解誘導は起こらなかった。また、これらの化合物はYH-53に匹敵する3CL-Pro阻害活性を有するにもかかわらず、抗ウイルス活性を示さなかった。これらの結果から、今回合成したPROTAC分子は膜透過性に問題がある可能性が示唆された。

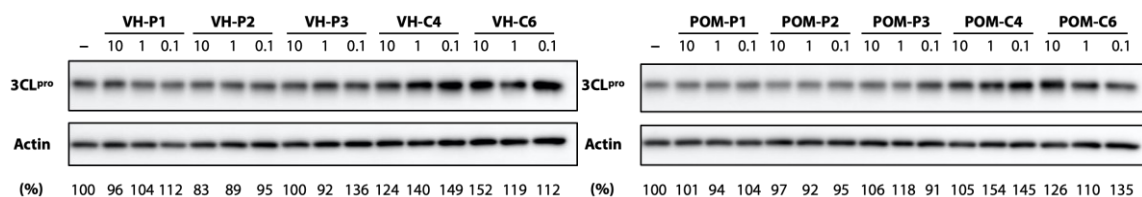


図5. COS-7細胞における3CL-Proの分解誘導評価。

#### 【結論】

本研究では、独自開発した3CL-Pro阻害剤であるYH-53を基盤に、3CL-Proに対するPROTAC分子を設計・合成し、機能評価を行なった。今回合成したPROTAC分子の多くは3CL-Proに対する阻害活性を維持したことから、YH-53のインドール4位がリンカー導入に適していることを見出した。一方で、今回合成したPROTAC分子において、目的である3CL-Proの分解誘導は観察されなかった。PROTACにおいて、二つのリガンドを結合することによる分子量の増大に起因した膜透過性の低下がしばしば問題となる。今後、膜透過性評価や細胞レベルでの3CL-Pro阻害活性評価を実施し、本化合物群の問題点を抽出するとともに、新たなPROTAC分子を設計し、本戦略の有用性を検証していく。

#### 【謝辞】

本研究は、東京薬科大学薬学部薬品化学教室の林良雄教授の研究室で行われました。本研究の遂行にご助力賜りました先生方、学生に厚く御礼申し上げます。最後に、本研究にご支援頂いたアステラス病態代謝研究会に厚く御礼申し上げます。

#### 【文献】

1. Konno, S.; Thanigaimalai, P.; Yamamoto, T.; Nakada, K.; Kakiuchi, R.; Takayama, K.; Yamazaki, Y.; Yakushiji, F.; Akaji, K.; Kiso, Y.; Kawasaki, Y.; Chen, S-E.; Freire, E.; Hayashi, Y. Design and synthesis of new tripeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors containing an electrophilic arylketone moiety. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 414-424, 2013.
2. Thanigaimalai, P.; Konno, S.; Yamamoto, T.; Koiwai, Y.; Taguchi, A.; Takayama, K.; Yakushiji, F.; Akaji, K.; Kiso, Y.; Kawasaki, Y.; Chen, S-E.; Tavakolian, N. A.; Schön, A.; Freire, E.; Hayashi, Y. Design, synthesis and biological evaluation of novel dipeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors: Structure-activity relationship study. *Eur. J. Med. Chem.* 65, 436-447, 2013.
3. Thanigaimalai, P.; Konno, S.; Yamamoto, T.; Koiwai, Y.; Taguchi, A.; Takayama, K.; Yakushiji, F.; Akaji, K.; Chen, S-E.; Tavakolian, N. A.; Schön, A.; Freire, E.; Hayashi, Y. Development of potent dipeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors with novel P3 scaffolds: Design, synthesis, biological evaluation and docking studies. *Eur. J. Med. Chem.* 68, 372-384, 2013.
4. Konno, S.; Kobayashi, K.; Senda, M.; Funai, Y.; Seki, Y.; Tamai, T.; Schäkel, L.; Sakata, K.; Pillaiyar, T.; Taguchi, A.; Taniguchi, A.; Gütschow, M.; Müller, C. E.; Takeuchi, K.; Hirohama, M.; Kawaguchi, A.; Kojima, M.; Senda, T.; Shirasaka, Y.; Kamitani, W.; Hayashi, Y. 3CL Protease Inhibitors with an Electrophilic Arylketone Moiety as Anti-SARS-CoV-2 Agents. *J. Med. Chem.* 2021, 65, 2926-2939.