

新型コロナウイルス E Protein の相互作用解明

東海国立大学機構名古屋大学・大学院創薬科学研究科・
基盤創薬学専攻・構造分子薬理学分野
廣明 秀一

【背景】

2019 年冬に発見され、瞬く間に世界中に拡散・流行した新型コロナウイルス SARS-CoV-2 とその感染症 COVID-19 について、感染予防に有効なワクチンの開発、重症化時に患者体内で起こるサイトカイン・ストームを抑える対症療法の開発とともに、根本治療薬となる抗ウイルス薬の開発が急務である。通常、抗ウイルス薬の開発においては、ウイルスゲノムにコードされている非構造タンパク質のうち、ウイルスが複製するために必要不可欠な酵素を標的として開発されることが多い。ウイルスの酵素は、多くの場合、ヒトの酵素とはアミノ酸配列、立体構造、基質特異性、安定性が大きく異なっている。他方、異なるウイルス株間で保存されていることが多い。つまり、これらの酵素を標的とする抗ウイルス剤は、ヒトの細胞に害を及ぼす可能性が低く、複数のウイルス株に有効であることが期待される。現時点で良く知られている抗コロナウイルス薬の作用点は、宿主細胞へのエントリー阻害 (TMPRSS2)、宿主細胞内での脱殻阻害 (S タンパク質/ACE2)、ウイルスタンパク質の成熟阻害 (メインプロテアーゼ)、ウイルス RNA の複製と転写の阻害 (RdRp)、宿主細胞の免疫応答の阻害 (IL-6/IL-6 受容体)、などである。しかし、SARS-CoV-2 のように世界各地で多数の感染者が現れ、流行が長期にわたると、早いペースでゲノムに変異が蓄積し、病原性・感染性の異なる新たな変異株が定期的に観測されることとなる。既にウイルス外殻の S タンパク質を標的とした抗体医薬品や mRNA ワクチンでは、それらが有効でない変異株が複数報告されている。

そこで、我々は、異なる作用点で働く異なる抗コロナウイルス薬を開発するため、今まで注目されてこなかったコロナウイルスの出芽過程に着目して宿主タンパク質との相互作用を解析し、新たな抗ウイルス活性を示す化合物を探索した。コロナウイルスの出芽は細胞膜から直接細胞外に放出されるのではなく、宿主細胞の小胞体-ゴルジ体中間区画 (ERGIC) で起こると考えられており、ERGIC 内腔に出芽した子孫ウイルスはエキソサイトーシスによって細胞外に放出されるが、ERGIC 上の膜変形にはヒト細胞内の足場タンパク質の介助が必要である。その際、ウイルス側の N, M, S protein とゲノム RNA の他に E protein (SCV2-E) が関与する。先行研究では、2002 年に流行した SARS-CoV の E protein [SCV-E] の C 末端に存在するアミノ酸配列 DLLV は、粒子形成を助けるヒト細胞内の PDZ 足場タンパク質である Syntenin-1 と PALS1 の結合に必須であることが示されている。SCV-E の遺伝子およびアミノ酸配列は SCV2 にも高度に保存されている (図 1)。

```
SARS-CoV-2 MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVSLVKPSFYVYS
SARS-CoV   MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVSLVKPTVYVYS
*****.*****

SARS-CoV-2 RVKLNSSR-VPDLLV
SARS-CoV   RVKLNSSSEGVPDLLV
*****.*****
```

図 1 E protein のアミノ酸配列は SARS corona virus で高く保存され、C 末端に PDZ 結合モチーフが存在する。

以上のような背景のもと、これらについて、両者の間のタンパク質間相互作用を解析した。また、PDZ ドメインに結合する化合物群から、それを阻害する低分子医薬品候補を探索した。

【方法】

1. PALS1-PDZ, Syntenin-1 PDZ1, Syntenin-1 PDZ2, ARHGEF11-PDZ について、¹⁵N で均一標識した PDZ ドメインの NMR 試料を調製した。その後、NMR 試料管内で、SCV-E、SCV2-E それぞれの C 末端ペプチドと混合し、ペプチドの有無でのスペクトルの変化を観察した。

2. 1の結果を受けて、Syntenin-1 PDZ1 ドメインについて、その主鎖 NH 基のシグナルを、連鎖帰属法により残基特異的に帰属した。この結果は、今後、発見した薬剤が当該の創薬標的 PDZ ドメインが、E protein との結合部位を競合阻害するかどうかの判断の指標として用いられる。

3. 他方、我々はすでに研究室において、複数の PDZ ドメインの阻害剤の探索経験があり、N 置換アントラニル酸誘導体から複数の PDZ ドメイン阻害剤を発見している。そこで、研究室が保有していた化合物 40 種類からなるミニライブラリを用いて (図 2)、共同研究者の鈴木陽一講師に委託し、大阪医科薬科大学の BSL-3 施設での SCV2 を使った感染抑制効果を評価した。実験は、ヒト肺上皮細胞 Calu3 に、感染研が頒布している SCV2 (武漢株) を化合物とともにを感染させ、48 時間後に細胞上清を回収し、上清に含まれるウイルス数を、評価用の Vero-6 細胞に対する致死毒性を指標に評価した。

【結果と考察】

1. SCV-E、SCV2-E は、先行研究の報告通り、PALS1 の PDZ ドメインと結合した。また 2 つある Syntenin-1 の PDZ ドメインについては PDZ1 には結合するものの、PDZ2 にはどちらも結合しなかった。SCV2-E の配列からバイオインフォマティクス手法により結合が予測された、ARHGEF11 については、いずれのペプチドも結合しなかった。このことから、PALS1-PDZ または Syntenin-1-PDZ1 またはその両者と SCV2-E の結合を阻害する低分子化合物には、SCV2 の増殖を抑制する可能性があることが示唆された。また、興味深いことに、SCV-E と SCV2-E の C 末端は、多くの PDZ ドメインが認識する C 末端直近の 6 アミノ酸の配列は完全に一致しているにもかかわらず、SCV-E は 2 つの PDZ ドメインのうち Syntenin-1-PDZ1 により強く結合するのに対し、SCV2-E では、アフィニティの順序が逆転しており、PALS1-PDZ には強く、Syntenin-1-PDZ1 はやや弱く結合することがわかった。SCV と SCV2 では、疾病の重症度や致死率が大きく異なるが、そのことと、この E タンパク質の PDZ 足場タンパク質への特異性の間に関連があるかどうかは、現時点では不明である。

2. 1の結果を受けて、また細胞内のもとのタンパク質の活性と、ウイルスの生活環の関連性を考慮し、Syntenin-1-PDZ1 を抗 SARS-CoV-2 阻害薬探索の新規第一標的と位置付けた。そこで精密な相互作用の検証実験や、薬剤・標的複合体の構造解析に供するために、Syntenin-1-PDZ1 の NMR シグナルの全帰属をこころみ、これを完了した (図 2)。

3. 研究室が保有していた、PDZ ドメイン結合化合物ミニライブラリに含まれる化合物の一例を図 3 に示す。これらを、SARS-CoV-2 武漢株を感染させた、ヒト肺上皮細胞 Calu-3 の系を用いて、活性評価スクリーニングを実施したところ、N 置換アントラニル酸誘導体の 2 つに抗ウイルス活性を認めた。更に、化合物 2 番に類似した化合物 7 種 (第二世代阻害剤) を購入・準備し、同様の抗ウイルスアッセイを実施したところ、化合物 6 種の化合物にウイルス活性を認め、そのうちの 2 種は最初に発見した化合物 2 番よりも活性が強かった。NMR を用いた検証実験では、これらの化合物はいずれも、NMR 試料管内で Syntenin-1-PDZ1 と直接結合した。興味深いことに、これらの化合物のいくつかは、前述の PALS1 の PDZ ドメインにはほとんど結合しなかった。このことより、Syntenin-1-PDZ1 を用いた相互作用アッセイ、特に NMR スクリーニングを含む創薬探索法は、抗 SCV2 薬探索に極めて有効な手法であることが強く示唆された。

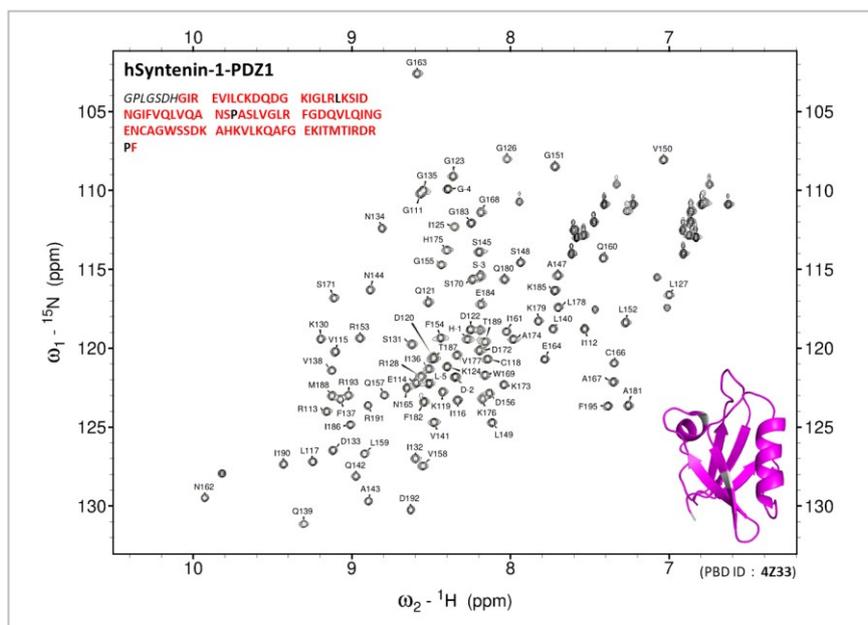


図 2. Syntenin-1-PDZ2 の NMR 主鎖シグナルの帰属

一方、本課題の研究期間中に、フランス・パスツール研究所の Caillet-Saguy らは、以下の 7 つの PDZ ドメイン足場タンパク質 (TJP1, PTPN13, HTRA1, PARD3, MLLT4, LNX2, NHERF1) が SCV2 の E, ORF3a, または N タンパク質のいずれかと相互作用してそのウイルス増殖を手助けしているという可能性を、遺伝子 knock down 実験により示した。そのため、我々が着目している SCV2-E の C 末端に作用する PDZ タンパク質も、PALS1、Syntenin-1 以外に存在している可能性がある。現在、我々は、複数のヒト細胞内 PDZ タンパク質が、お互い

に介助しあい、パケツリレーのように E タンパク質の細胞内局在を制御することで、結果的にウイルス粒子成熟を助けているのではないかと、この作業仮説を立てている (図 3)。低分子薬剤による COVID-19 の画期的な治療法を開発するために、E タンパク質の細胞内動態や、他の構造タンパク質との相互作用をより詳細に解明する必要がある。

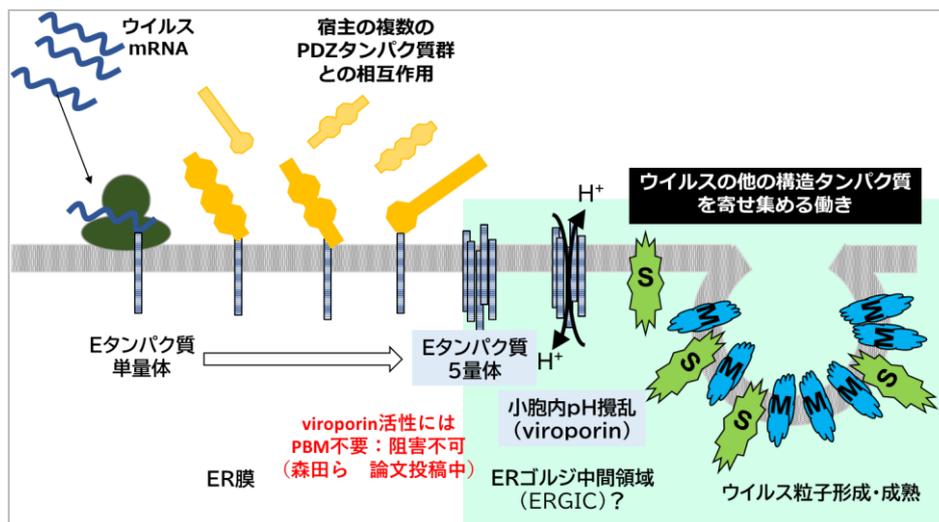


図 3. SARS-CoV-2 E タンパク質の機能のウイルス粒子形成・成熟促進に関わる作業仮説

今後、Syntenin-1 PDZ1 と化合物の複合体モデルを精密に決定したのち、更なる高活性の化合物を探索・分子設計するとともに、既に共同研究者が確立しているシリアンハムスターを用いた *in vivo* 実験系を活用して、非臨床試験を進める予定である。これにより、SCV2-E と宿主タンパク質の相互作用阻害という創薬戦略が、抗コロナウイルス薬開発に役立つことの PoC を順次取得してゆきたい。

最後になりましたが、本課題を遂行するにあたり、助成くださいましたアステラス病態代謝研究会の関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

【発表論文・特許など】

1. Miura, K., Suzuki, Y., Ishida, K., Arakawa, M., Wu, H., Fujioka, Y., Akino, E., Maeda, K., Hamajima, R., Nakano, T., Tenno, T., Hiroaki, H., and Morita, E. *, 2023, Distinct Motifs in the E Protein are Required for SARS-CoV-2 Virus Particle Formation and Lysosomal Deacidification in Host Cells. *J. Virology*, provisionally accepted, 2023.5.17.

2. 特願 2022-80000 「SARS-CoV-2 抑制剤」、発明者： 廣明秀一、天野剛志、森田英嗣、鈴木陽一、濱嶋竜生、高木春樺、中野隆史、呉紅、藤岡良彦、三浦滉矢、出願人：国立大学法人東海国立大学機構、学校法人大阪医科薬科大学、国立大学法人弘前大学、出願日：2022/5/16