

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17921

研究課題名(和文) ノロウイルスをモデルとしたウイルス横断的創薬研究の基盤構築

研究課題名(英文) Development of cross-virus drugs using norovirus as a model

研究代表者

林 宏典(hayashi, hironori)

東北大学・災害科学国際研究所・助教

研究者番号：00752916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ノロウイルス(NoV)をモデルとした「ウイルス横断的な創薬研究」の基盤構築を目的とした。NoVのORF1にコードされている、p22, VPg, Proおよび RdRpをコードしたDNAをクローニングした。新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)パンデミック下における社会的な必要性、緊急性を考慮し、NoVとSARS-CoV-2の共通点に着目した創薬研究を実施、国立国際医療研究センターの満屋裕明等が開発した新規化合物とSARS-CoV-2プロテアーゼの結晶構造解析により相互作用様式を明らかにした(Hattori S. et al. Nat Commun. 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト-ヒト間で高い感染性を獲得したウイルスの台頭は、世界的パンデミックを引き起こし、人類の生命だけでなく、経済、社会、文化にまで影響を及ぼすパンデミックとなる。ウイルス間の共通項や差異に着目した「ウイルス横断的な創薬研究」の基盤構築は、現在進行形で起こっているパンデミックや、将来起こり得る新興再興感染症のアウトブレイクの予防や早期鎮圧に必要な治療薬を迅速に開発するための研究基盤構築に資する。本研究で行った結晶構造解析の成果は、レムデシビル以上の抗ウイルス活性を持つ新規SARS-CoV-2治療薬だけでなく抗NoV薬の開発を加速する重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：As novel coronavirus (SARS-CoV-2) showed, viruses acquiring high infectivity between humans cause global pandemic and threaten not only the life but also economy, social and cultural activity of human. To take measure these pandemics, the research platform, which enable to promptly develop the therapeutic agents, is indispensable. This research focused on common points among viruses belonging different species. Norovirus (NoV) and SARS-CoV-2 need 3C-like protease (3CL-Pro) cording their genomic DNA to replicate in host cells. To develop anti-NoV and anti-SARS-CoV-2 agents, we targeted 3CL-Pro and make crystals, which were constructed with complex of novel compound and 3CL-Pro of SARS-CoV-2 (Mpro). The results of 3D structural analysis showed interaction way between the compound and Mpro. Additionally, the plasmid coding NoV 3CL-Pro was constructed for protein expression and crystallization. These results would contribute to develop anti-SARS-CoV-2 and anti-NoV agents.

研究分野：創薬研究

キーワード：ウイルス横断的研究 薬剤開発 プロテアーゼ ノロウイルス 新型コロナウイルス

1. 研究開始当初の背景

ウイルスの中には種類や生活環は全く異なるが、同じような機能又は構造を発揮するタンパク質を有するものが多く存在する事に着目して「ウイルス横断的な創薬研究」を行う事を目指している。例えば、B型肝炎ウイルスは二本鎖DNAを自身のゲノム情報として有するDNAウイルスであり、HIV-1はRNAをゲノム情報として有するレンチウイルスに分類されるが、これら二つのウイルスは共通点としてRNAをDNAに変換する酵素 (reverse transcriptase; RT) を有している。抗HBV剤のRT阻害剤であるエンテカビル (entecavir; ETV) は抗HIV-1効果を発揮せず、抗HIV-1剤のRT阻害剤であるEFdAは抗HBV効果を発揮しない。一方で、テノホビル (tenofovir; TFV) はHIV-1やHBVといったウイルスの種を越えた抗ウイルス効果を発揮する。近年アフリカ諸国でエボラウイルスがアウトブレイクした際に話題となった抗インフルエンザ薬、ファビピラビル (favipiravir) や抗エボラウイルス薬として開発され新型コロナウイルス薬として認可を受けたレムデシビルもその一つである。このように、ウイルスの種に着目するのではなくウイルスの有するタンパク質及びその機能、構造に着目して創薬研究を行い、開発した化合物の作用機序を解析、データを蓄積する事で新たな脅威となるウイルスがアウトブレイクを起こした際により迅速に治療薬を開発し被害を最小限に止める為の研究基盤が構築できる。

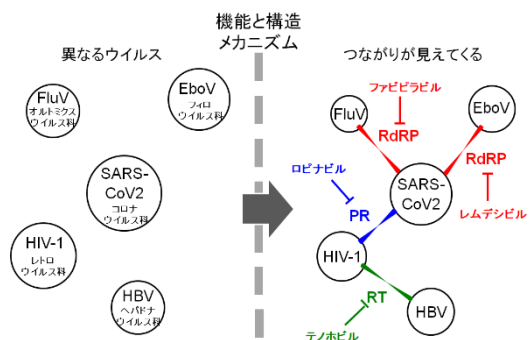


図1 ウイルス横断的研究の概念図:異なる「科」に属し、全く異なるように見えるウイルスも視点を変えて、構造や機能といった視点で見ると共通点がある。この共通点を創薬研究に活かし迅速な薬剤開発基盤を構築する。

2. 研究の目的

- (1)異なるウイルス間で共通の特徴を利用する事で、「ウイルス横断的な創薬開発」が可能か?
- (2)どの様な実験系を構築すれば、ノロウイルス (NoV) に対する基礎研究及び創薬開発がより発展するか?

という2点を本研究における学術的な問いとし、研究開始当初は、NoVを持続的に産生する細胞株を樹立する事とヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) と NoV のプロテアーゼの共通点に着目した化合物スクリーニング系の構築と、NoVを持続的に産生する細胞株の樹立を目的とした。一方で、2019年に発生した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、半年の間に世界規模のパンデミックとなり、今なお人類の生命、経済、社会的・文化的活動を脅かしている。パンデミック下における社会的な必要性、緊急性を考慮し、新たな研究目的として、NoVとSARS-CoV-2の共通点に着目した創薬研究を新たに追加した。

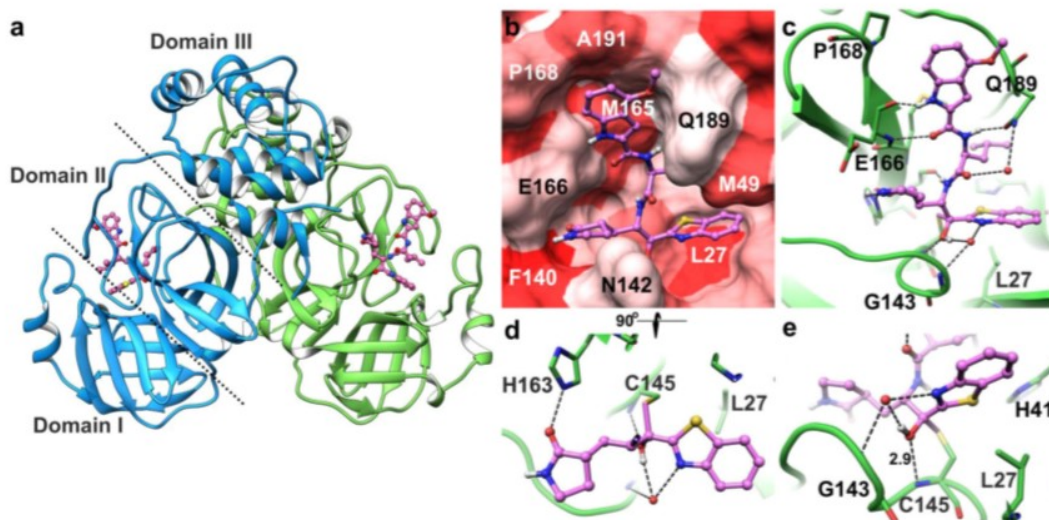
3. 研究の方法

**プラスミドの構築:** G-II4に分類されるNoV (gene bank code: DQ658413)の遺伝子配列を基に、NoVのORF1にコードされているウイルスタンパク質の内、p22, VPg, ProおよびRdRpの4種類をコードしたDNA (3027 bp)をpMXベクターに導入し配列確認を行った。

**タンパク発現:** SARS-CoV-2のメインプロテアーゼ (M<sub>pro</sub>)とGSTタグの融合タンパクをコードしたプラスミドをタンパク発現用の大腸菌 BL21 CodonPlus (DE3) RILに形質転換した。形質転換した大腸菌をカナマイシンとクロラムフェニコールを含むLB培地 (LB<sub>Km<sup>+</sup>/Cn<sup>+</sup></sub>)で一晩培養 (37 °C)し、グリセロールストック (グリセロール濃度15%)を作成し-80 °Cに保存した。大量発現前の前培養として20 mLのLB<sub>Km<sup>+</sup>/Cn<sup>+</sup></sub>に上記で作成したグリセロールストックを加え37 °Cで一晩培養した。1 LのLB<sub>Km<sup>+</sup>/Cn<sup>+</sup></sub>に前培養した菌体を加え、波長600 nmの

表1 構造解析結果

M <sup>pro</sup> /5h (PDB ID: 7JKV)	
<b>Data collection</b>	
Space group	P 1 2 1
Cell dimensions	
<i>a, b, c</i> (Å)	55.25, 99.14, 58.90
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 107.86, 90
Resolution (Å)	56.06 - 1.25 (1.295 - 1.25) *
<i>R</i> <sub>sym</sub> or <i>R</i> <sub>merge</sub>	0.06192 (1.256)
<i>I</i> / $\sigma$ <i>I</i>	10.5 (1.0)
CC1/2	0.998(0.465)
Completeness (%)	95.2 (60.5)
Redundancy	6.1 (3.2)
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	56.06 - 1.25
No. reflections (refined/free)	154907 / 3202
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>	0.145, 0.177
No. atoms	5313
Protein	4727
Ligand/ion	98
Water	488
<i>B</i> -factors	26.31
Protein	25.28
Ligand/ion	23.31
Water	36.95
<b>R.m.s deviations</b>	
Bond lengths (Å)	0.013
Bond angles (°)	1.955



**図 2 新規 SRAR-CoV-2 阻害薬と  $M_{pro}$  の構造解析結果：** a)  $M_{pro}$  は二量体を形成しそれぞれの活性中心近傍に阻害剤が結合している。b) 結合部位周辺の疎水性アミノ酸の位置を示す。c) 化合物と  $M_{pro}$  間で形成される水素結合を示す。d) 新規化合物は、活性中心近傍の C145 と共有結合を形成していた。e) 共有結合後に生じた水酸基は C145 の主鎖と強力な水素結合を形成すると共に、水を介して G143 の主鎖とも水素結合を形成していた。(Nature Communications, 2021, Jan 28;12(1):668. doi: 10.1038/s41467-021-20900-6)

吸光度 ( $OD_{600}$ ) の値が 0.5~0.6 になるまで 37 °C で培養した。終濃度が 1 mM となるように IPTG を加え、25 °C で 6 時間タンパク質を発現させた。発現後の菌体を遠心沈降させ、上清を除去後に -80 °C に保存した。

**タンパク精製：** -80 °C に保存していた菌体を PBS に再懸濁し、ソニケーションにより破碎した。破碎後の溶液を 12000 rpm で 30 分間遠心沈降させ、上清を回収した。5 mL の Glutathion-Superflow 樹脂に、破菌後上清を添加し、GST 融合  $M_{pro}$  を結合させた (結合時間 1 時間、結合温度 4 °C)。結合反応後、上清を除去し、PBS で樹脂を洗浄 (5 回) した後、40 mL の PBS を樹脂に加え、100 Units のトロンビンを添加し GST タグを切断した (切断時間 16 時間、切断温度 25 °C)。切断反応後の上清を回収し、3 倍量の buffer A (10 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA) を添加した。Buffer A 添加後の溶液を Hi-Trap Q に添加し、トロンビンを除去した。トロンビンは Hi-Trap Q に結合し、 $M_{pro}$  はフロースルーに得られる。トロンビン除去後のタンパク溶液をアミコンウルトラ (10 kDa) を用いて buffer 置換 (buffer A へと置換) と濃縮操作を行った。

**タンパク結晶化：** 6 mg/mL 程度まで濃縮した  $M_{pro}$  に終濃度 300  $\mu$ M となるように  $M_{pro}$  を添加した。化合物を添加したタンパク溶液を 4 °C で 30 分間インキュベートし、12000 rpm で 30 分間遠心沈降させ上清を回収した。市販の結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化条件を探索後、結晶化条件の最適化を行った。0.1M MES pH 5.8, 15% polyethylene glycol (PEG) 6000, and 3% DMSO の溶液条件で新規化合物と  $M_{pro}$  からなる複合体の結晶が得られた。得られた結晶をピックアップし、クライオ溶液 (0.1M MES pH 6.0, 35% PEG 400 5% DMSO) 中に保存し、X 線回折実験を行った (表 1)。

**構造解析：** X 線回折によって得られたデータを基に、構造解析用ソフトウェア Phaser を用いて分子置換法 (molecular replacement) により三次元構造を求めた (図 2)。分子置換法を用いる際に過去に報告された  $M_{pro}$  の三次元構造 (PDB code : 6LU7) を使用した。

#### 4. 研究成果

本研究により、NoV の ORF1 にコードされているウイルスタンパク質の内、p22, VPg, Pro および RdRp の 4 種類をコードしたプラスミドが得られた。現在、SG promoter 下にルシフェラーゼ (nano-Luc) 及び蛍光性の RNA aptamer (Spinach) 配列を組みこんだベクターの構築を行っており、nano-Luc コード領域の上流に導入する Spinach 配列をコードした DNA を設計中である。今後は、これ等の構築した遺伝子をヒト細胞発現用のプロモーター下に導入し、スクリーニング系として実際に機能するかどうかを検討する。また、新規 SARS-CoV-2 阻害剤と  $M_{pro}$  からなる複合体の三次元構造を解明し、その相互作用様式から新規化合物が  $M_{pro}$  の 145 番目のシステインと共有結合を形成すると共に、その主鎖と強力な水素結合を形成することが解った (図 2)。本研究で行った結晶構造解析の成果は、本研究で解析に用いた新規化合物以上の活性を有し、レムデシビル以上の抗ウイルス活性を持つ新規 SARS-CoV-2 治療薬だけでなく抗 NoV 薬の開発を加速する重要な成果である。また、現在進行形で起こっている SARS-CoV-2 によるパンデミックの早期鎮圧に資する成果となる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Hattori Shin-ichiro, Higashi-Kuwata Nobuyo, Hayashi Hironori et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 A small molecule compound with an indole moiety inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-20900-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Oikawa Yoshitsugu, Izumi Rumiko, Koide Masashi, Hagiwara Yoshihiro, Kanzaki Makoto, Suzuki Naoki, Kikuchi Koichi, Matsunashi Tetsuro, Akiyama Yukako, Ichijo Mariko, Watanabe Shun, Toyohara Takafumi, Suzuki Takehiro, Mishima Eikan, Akiyama Yasutoshi, Ogata Yoshiaki, Suzuki Chitose, Hayashi Hironori et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Mitochondrial dysfunction underlying sporadic inclusion body myositis is ameliorated by the mitochondrial homing drug MA-5	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0231064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0231064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Bulut Haydar, Hattori Shin-ichiro, Aoki-Ogata Hiromi, Hayashi Hironori, Das Debananda, Aoki Manabu, Davis David A., Rao Kalapala Venkateswara, Nyalapatla Prasanth R., Ghosh Arun K., Mitsuya Hiroaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Single atom changes in newly synthesized HIV protease inhibitors reveal structural basis for extreme affinity, high genetic barrier, and adaptation to the HIV protease plasticity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10664 - 10675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65993-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakagawara Kohsuke, Hayashi Hironori, Kawaji Kumi, Sasano Mina, Kodama Eiichi N	4. 巻 28
2. 論文標題 Application of human lymphoid cells for the evaluation of antivirals against human adenovirus type 19: Zalcitabine has superior activity compared to cidofovir	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antiviral Chemistry and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2040206620921319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsukada Kento, Shinki Shono, Kaneko Akiho, Murakami Kazuma, Irie Kazuhiro, Murai Masatoshi, Miyoshi Hideto, Dan Shingo, Kawaji Kumi, Hayashi Hironori, Kodama Eiichi N., Horii Aki, Salim Emil, Kuraishi Takayuki, Hirata Naoya, Kanda Yasunari, Asai Teigo	4. 巻 11
2. 論文標題 Synthetic biology based construction of biological activity-related library of fungal decalin-containing diterpenoid pyrones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1830 - 1841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15664-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oe Chihiro, Hayashi Hironori, Hirata Kazushige, Kawaji Kumi, Hashima Fusako, Sasano Mina, Furuichi Maaya, Usui Emiko, Katsumi Makoto, Suzuki Yasuhiko, Nakajima Chie, Kaku Mitsuo, Kodama Eiichi N.	4. 巻 1
2. 論文標題 Pyrimidine Analogues as a New Class of Gram-Positive Antibiotics, Mainly Targeting Thymineless-Death Related Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsinfectdis.9b00305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Nao, Radwan Mohamed O., Amano Masayuki, Endo Shinya, Fujii Eri, Hayashi Hironori, Ueno Shikiko, Ueno Niina, Tatetsu Hiro, Hata Hiroyuki, Okamoto Yoshinari, Otsuka Masami, Mitsuya Hiroaki, Matsuoka Masao, Okuno Yutaka	4. 巻 110
2. 論文標題 Novel p97 / VCP inhibitor induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in both bortezomib sensitive and resistant multiple myeloma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3275 ~ 3287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takamatsu Yuki, Aoki Manabu, Bulut Haydar, Das Debananda, Amano Masayuki, Sheri Venkata Reddy, Kovari Ladislau C., Hayashi Hironori, Delino Nicole S., Ghosh Arun K., Mitsuya Hiroaki	4. 巻 63
2. 論文標題 Novel Protease Inhibitors Containing C-5-Modified bis-Tetrahydrofuranylurethane and Aminobenzothiazole as P2 and P2 Ligands That Exert Potent Antiviral Activity against Highly Multidrug-Resistant HIV-1 with a High Genetic Barrier against the Emergence of Drug Resistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00372-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Amano Masayuki, Salcedo-Gomez Pedro MigueI, Yedidi Ravikiran S., Zhao Rui, Hayashi Hironori, Hasegawa Kazuya, Nakamura Tomofumi, Martyr Cuthbert D., Ghosh Arun K., Mitsuya Hiroaki	4. 巻 63
2. 論文標題 Novel Central Nervous System (CNS)-Targeting Protease Inhibitors for Drug-Resistant HIV Infection and HIV-Associated CNS Complications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00466-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hattori Shin-ichiro, Hayashi Hironori, Bulut Haydar, Rao Kalapala Venkateswara, Nyalapatla Prasanth R., Hasegawa Kazuya, Aoki Manabu, Ghosh Arun K., Mitsuya Hiroaki	4. 巻 63
2. 論文標題 Halogen Bond Interactions of Novel HIV-1 Protease Inhibitors (PI) (GRL-001-15 and GRL-003-15) with the Flap of Protease Are Critical for Their Potent Activity against Wild-Type HIV-1 and Multi-PI-Resistant Variants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.02635-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 服部真一朗、Haydar Bulut、林 宏典、青木 学、青木宏美、長谷川和也、Arun K. Ghosh、満屋裕明
2. 発表標題 HIVプロテアーゼ阻害剤GRL-142と その誘導体の強力な抗ウイルス活性発揮 機序の解明
3. 学会等名 第33回 日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高松悠樹、青木 学、Haydar Bulut、Debananda Das、天野将之、Venkata Reddy Sheri、Ladislau C. Kovari、林 宏典、Nicole S. Delino、Arun K. Ghosh、満屋裕明
2. 発表標題 P2-bis-THF基およびP2'-CpAbt基 を有し、多剤耐性HIV変異株に対しても 強力な抗ウイルス活性を発揮する新規プロテアーゼ阻害薬の同定
3. 学会等名 第33回 日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------