

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05301

研究課題名（和文）親和性競合を利用したウイルスプロテアーゼの活性検出法の確立

研究課題名（英文）Establishment of method for detecting viral protease activity using affinity competition

研究代表者

日高 興士（HIDAKA, Koushi）

神戸大学・研究基盤センター・特命技術員

研究者番号：30445960

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：新型コロナウイルスの2種のプロテアーゼを標的にリムーバブル阻害剤を合成し、モデル検体からの酵素活性検出により感染細胞有無を判定する検査薬開発に向けた新規検出法の確立をめざした。ストレプトアビジンの添加による親和性競合評価を行うための4種の新規蛍光基質を合成した。SARS-CoV-2 Mproの複合体X線構造情報を基にニルマトレルビルルのビオチン化部位を決定して誘導体合成を試みた。MproおよびPLproのリコンビナント調製に大腸菌発現を試み、共に大腸菌抽出液の可溶性画分に発現タンパク質と思われるバンドが検出され、特に、PLproに関しては最も主要なバンドとして検出され大量発現に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルスのような感染症の制圧は人類にとって重要な課題であり検査による感染拡大防止が鍵となる。しかし、有効なPCR法でさえ偽陽性や偽陰性の問題があり、抗原検査では無症状者への感度低下が問題である。これらの問題を克服するための研究が進められているがその殆どがPCRや抗原-抗体反応と組み合わせたものであり、ウイルス有無に焦点があてられ感染細胞有無は判断できない。本研究成果は、検体サンプルからSARS-CoV-2の2種のプロテアーゼの酵素活性検出につながることから、更なる研究進展により原理が確立され直接的な感染有無の判明が可能となり、現在の検査が抱える問題が解決できると期待される。

研究成果の概要（英文）：We aimed to establish a new detection method for the development of a test reagent that determines the presence or absence of infected cells by detecting enzyme activity from a model sample, by synthesizing removable inhibitors targeting two types of proteases of SARS-CoV-2. Four new fluorescent substrates were synthesized to evaluate affinity competition by adding streptavidin. Based on the complex X-ray structure information of SARS-CoV-2 Mpro, the biotinylation site of nirmatrelvir was determined and derivative synthesis was attempted. E. coli expression was attempted in the recombinant preparation of Mpro and PLpro. In both cases, a band thought to be an expression protein was detected in the soluble fraction of the extract, particularly, PLpro was detected as the most major band and succeeded in mass expression.

研究分野：生物有機化学

キーワード：酵素活性 阻害剤 ストレプトアビジン ビオチン プロテアーゼ SARS-CoV Mpro PLpro

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2019年11月に中国湖北省武漢市にて発生した新型コロナウイルス感染症(COVID-19)はパンデミックを起こして人命と経済に甚大な被害を与え続けており、COVID-19の制圧は人類にとって緊急の課題である。根本的な治療薬やワクチンの開発には長期間を要するために検査による感染拡大の防止が重要となるが、有効なPCR法でも偽陽性や偽陰性の問題があり、抗原検査では無症状者に対して感度が劣ることから、一刻も早い判断を必要とする医療現場ではより正確で簡便な新しい検査法が求められる。また、既存の検査法ではウイルスがあるかどうかには焦点があてられ、感染細胞の有無は判断できない。

### 2. 研究の目的

SARS-CoV-2感染細胞内ではウイルスRNAから前駆体タンパク質が翻訳され、ウイルス固有のメインプロテアーゼ(Mpro)とパピリン様プロテアーゼ(PLpro)により切断が起こり、遺伝子が複製されてウイルス粒子が放出される。ウイルス増殖により感染細胞が破壊されるとこれらのプロテアーゼは細胞外へと出ていく。我々の研究グループはX線結晶構造を基に結合を妨げずにHIVプロテアーゼ阻害剤をビオチン化し、プロテアーゼに結合した阻害剤をストレプトアビジンにより任意に取り除いて酵素活性を回復させる「リムーバブル阻害剤」を報告しており、SARS-CoV-2プロテアーゼの検出に応用できると考えた。本研究課題ではSARS-CoV-2のMproやPLproの阻害剤の直接的ビオチン誘導体を合成して、血液成分や唾液などの検体モデルサンプルを用いてウイルスプロテアーゼの酵素活性を親和性競合により検出し(図1)SARS-CoV-2の感染診断において迅速で簡便な画期的検査法の開発につなげる。

### 3. 研究の方法

・SARS-CoV-2 Mpro 酵素活性評価のための蛍光基質合成

2-クロトリチルクロリド樹脂を用いて通常のFmoc固相ペプチド合成法によりP2-P5配列のFmoc-保護ペプチドを合成し、AcOH/TFE/DCMを用いて樹脂から切り出した。得られたFmoc-保護ペプチドとH-Gln(Trt)-メチルクマリルアミドおよび(H-Gln(Trt))<sub>2</sub>-ローダミン110をCOMU-TMP法により縮合させ、TFA/TIS/H<sub>2</sub>Oにより保護基を除去した。得られた粗生成物は逆相HPLCにより精製して凍結乾燥後、HPLC分析および質量分析により同定した。

・SARS-CoV-2 Mpro 阻害剤の可逆化とビオチン化

タンパク質データベースにSARS-CoV-2のMproのX線結晶構造が公開された。結合する既知の阻害剤N3はビニル基がMproの活性中心のCys145残基と共有結合形成するビニル基をニトリル基やケトン基などの可逆的なコア構造へ変換して阻害剤の可逆化を試み、結合を妨げない箇所へビオチンを導入した(図2)。

・SARS-CoV PLpro 阻害剤のビオチン誘導体の設計

SARS-CoV-2のPLproは立体構造が解明されたことから既知の可逆的阻害剤から結合を妨げない部位にビオチンを繋いだ誘導体を設計した(図2)。

・SARS-CoV-1のMproおよびPLproのリコンビナントタンパク質調整

SARS-CoV-1のMproおよびPLproの大腸菌による発現を行いSDS-PAGE分析を行った。Mproは野生型に加え、分子表面にある疎水性アミノ酸の変異I59R、F223E、F223E/L232Rを導入した3種の変異体の発現プラスミドを作製して大腸菌発現を行った。

### 4. 研究成果

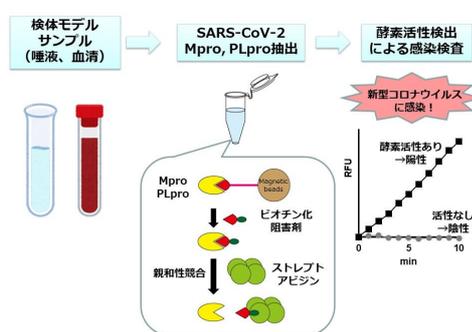


図1. リムーバブル阻害剤を用いるモデル検体からのSARS-CoV-2プロテアーゼ活性検出.

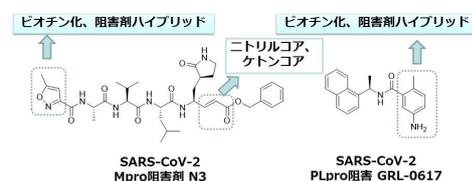


図2. SARS-CoV-2のMproおよびPLproのビオチン誘導体の設計.

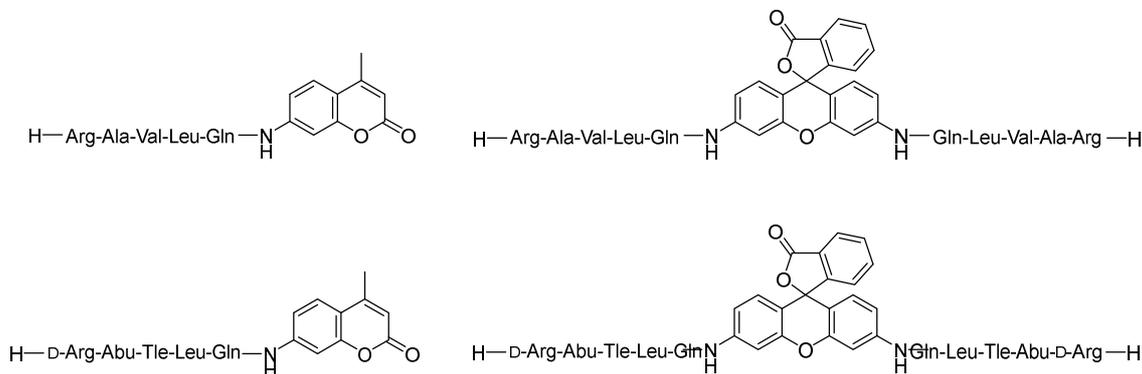


図3. C末端にAMCおよびRDM110を導入したP1-P5蛍光基質の構造.

ストレプトアビジンの添加による親和性競合の評価を行うための4種の新規蛍光基質を合成した。M. Dragらの報告(Rut, W., *et al. Nat Chem Biol* 17, 222 (2021))を基に、Mproの酵素反応に用いるP1-P5ペプチド基質配列として、Arg-Ala-Val-Leu-GlnおよびD-Arg-Abu-Tle-Leu-Glnを選択し、蛍光基としてC末端にそれぞれアミノメチルクマリン(AMC)およびローダミン110(RDM110)を導入した4種類の基質を合成した(図3)。

SARS-CoV-2のMpro複合体のX線構造情報より後にFDA承認されたファイザー社が開発したSARS-CoV-2 Mproの可逆型阻害剤PF-07321332阻害剤(ニルマトレルビル)のビオチン化部位を決定してビオチン誘導体の合成を検討した。ビオチン誘導体の合成を検討した。研究開始当初はPF-07321332との複合体情報が未公開であり、タンパク質データベースからSARS-CoV-2Mproの阻害剤N3との複合体(6lu7)とボセプレビルとの複合体(7c6s)の構造を重ね合わせ、PF-07321332と共通する部分構造を取り出して化学構造を構築し、エネルギー最小化計算により複合体モデルを構築した。このモデルの結合様式からビオチン化部位は阻害剤のN末端が相応しいと判断した(図4)。合成経路は当初は未報告であったため、C末端をアミド体で出発し、3つの非天然アミノ酸をペプチド縮合剤により結合して伸張した。そして、N末端をビオチンのカルボキシ基と縮合してトリフルオロ酢酸無水物

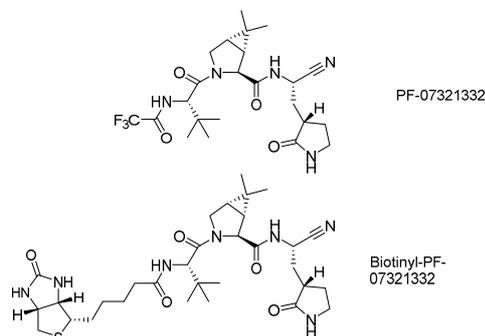


図4. PF-07321332 ビオチン誘導体設計.

によるC末端アミドのニトリル変換を行ったが、最終目的物は同定できなかった。この原因として、側鎖ピロリジノン環を持つアミド体および合成中間体の水溶性が非常に高いことや、中間体や目的物は芳香族のUV吸収がなく各反応の追跡が難しいことが考えられた。そこで、公開されたPF-07321332合成経路を参考に経路を修正してリムーバブル阻害剤の合成を試みた。

MproおよびPLproに関して大腸菌での発現を試みた結果、SDS-PAGE分析により、ともに大腸菌抽出液の可溶性画分に発現タンパク質と思われるバンドが検出された。特に、PLproに関しては最も主要なバンドとして検出され、大量発現に成功したことが示された。そこで、Mproの可溶性画分での発現量の増大を目的とした。分子設計に関しては、すでに報告されているMproの立体構造を参考にして、分子表面の一部のアミノ酸を改変することとした。今回は、アミノ酸側鎖が分子表面に存在する疎水性アミノ酸のうちから、比較的溶媒への露出が高く、酵素の触媒部位に影響を与えないと考えられる部位を選択した。変異体としては、I59R、F223E、F223E/L232Rの3種を作製することとし、変異体の発現プラスミドを作製したのちに、大腸菌発現を試みた。しかしながら、SDS-PAGEにて分析したところ、発現量の顕著な増大は認められなかった。精製した野生型Mproについてニルマトレルビルとの共結晶構造解析を試みた。

その後、R4年度末の職場火災による研究環境に大きな被害を受け、その影響により研究環境が復旧するまでに想定外の時間がかかり実施計画どおりには研究は進まなかった。今後、本研究成果を踏まえビオチン化阻害剤の合成研究を進展させることにより、ストレプトアビジンとの親和性競合の評価を基に酵素活性が十分に回復するリムーバブル阻害剤を獲得され、そして、ヒト唾液および血液成分中にMproおよびPLproを混入したモデル検体を調整し、磁気ビーズによるアフィニティー精製、続いてビオチン化阻害剤による溶出、親和性競合によりMproとPLproの酵素活性を検出することにより、画期的な検査法の確立につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Koushi Hidaka and Motoyasu Adachi
2. 発表標題 ENZYME ACTIVITY AND PEPTIDOMIMETIC INHIBITOR AFFINITY FOR DRUG-RESISTANT MUTANT INTERMEDIATES OF HIV PROTEASE
3. 学会等名 The 60th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koushi Hidaka, Yuko Tsuda, and Motoyasu Adachi
2. 発表標題 ACTIVITY DETECTION OF HIV-1 PROTEASE WITH DRUG-RESISTANT MUTATIONS USING BIOTINYLATED PEPTIDOMIMETICS AND STREPTAVIDIN
3. 学会等名 The 59th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日高 興士(Koushi Hidaka) - マイポータル - Research map <a href="https://researchmap.jp/read0137088">https://researchmap.jp/read0137088</a> Koushi Hidaka <a href="https://www.researchgate.net/profile/Koushi-Hidaka">https://www.researchgate.net/profile/Koushi-Hidaka</a> Koushi Hidaka   LinkedIn <a href="https://www.linkedin.com/in/koushi-hidaka-777568136/">https://www.linkedin.com/in/koushi-hidaka-777568136/</a>
--

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
研究分担者	安達 基泰 (ADACHI Motoyasu)  (60293958)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・上席研究員  (82502)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	津田 裕子  (TSUDA Yuko)  (10098478)	神戸学院大学・薬学部・教授    (34509)	

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