

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07044

研究課題名（和文）SARS-CoV-2レプリコンシステムによるNタンパク質dimer阻害剤の開発

研究課題名（英文）Development of inhibitors for dimerization of N-protein using SARS-CoV-2 replicon system

研究代表者

池田 正徳（Ikeda, Masanori）

鹿児島大学・医歯学域ヒトレトロウイルス学系・教授

研究者番号：30315767

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）：本研究ではウイルスの複製と粒子形成のいずれにも重要な役割を果たすSARS-CoV-2のNタンパク質に着目した抗ウイルス剤の探索を実施した。Nタンパク質のhomodimerの形成を評価するためにスプリットリットルシフェラーゼ法による評価系を開発した。2種類のプラスミドを細胞に導入し、dimerが形成されるとリットルシフェラーゼが活性化し基質を加えることで発光を確認できた。現在、FDA承認薬ライブラリー等を用いて化合物の評価を実施している。これまでに、dimer形成を阻害する化合物は得られていないが、引き続きスクリーニングを実施する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究者らはこれまでにSARS-CoV-2の自律増殖を安全に評価できるレプリコンを開発した。臨床応用されているSARS-CoV-2治療薬はウイルスのポリメラーゼやプロテアーゼの阻害薬であるが、本研究はSARS-CoV-2の複製と粒子形成に必要なNタンパク質を標的とした治療剤の開発を目指したもので既存の治療薬とは作用機序が異なる新規の治療剤の開発を目指している。研究期間内にNタンパク質のdimer形成の評価が可能なスプリットリットルシフェラーゼアッセイ系を開発することができた。現在、スクリーニングを実施しており、治療剤候補を見出すことができれば現在も流行中のCOVID-19に対して大きな社会貢献となる。

研究成果の概要（英文）：We conducted the research for antiviral agents targeting the N protein of SARS-CoV-2, which plays a crucial role in both virus replication and particle formation. If inhibitors of homodimer formation, an essential for N protein function, can be identified, it may be possible to suppress both replication and particle formation of SARS-CoV-2. Initially, we developed an evaluation system using the split-luciferase plasmids to assess homodimer formation of the N protein. By introducing the plasmids into cells, luminescence was observed upon dimer formation, indicating activation of the luciferase. Currently, we are evaluating compounds from an FDA-approved drug library to identify the candidates of antivirals. While compounds inhibiting dimer formation have not yet been obtained, we have continued the screening.

研究分野：ウイルス学

キーワード：SARS-CoV-2 COVID-19 Nタンパク質 抗ウイルス剤

## 1 . 研究開始当初の背景

2019年にアウトブレイクした SARS-CoV-2 感染による COVID-19 は 2024 年時点で収束傾向に向かっているが、SARS-CoV-1 感染のように終息には至っていない。コロナウイルスは 229E や HKU1 のように毎年流行して風邪の原因となるものが知られていた。COVID-19 のこれまでの経過を振り返ると、ワクチンをエスケープする変異株の出現からも毎年流行と収束を繰り返すことが予想される。また、SARS-CoV-2 感染後にも 3 ヶ月以上咳、倦怠感、集中力の低下などが続くコロナ後遺症も大きな社会問題となっている。このため、さらなる研究と治療法の開発が今後も求められている。

研究者らは HCV レプリコン研究の経験を活かしてこれまでに SARS-CoV-2 レプリコンを開発し治療剤候補を見出している

## 2 . 研究の目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)の抗ウイルス剤開発は治療剤開発の成功モデルとなり 2019 年には 99%以上の C 型慢性肝炎患者からウイルスを排除できるようになった。HCV は天然のウイルスを細胞で増殖させることができないためレプリコンが開発されるまで治療薬の開発を実施できないでいた。HCV の NS5A は複製と粒子形成のいずれにも必要なため C 型肝炎の治療で中心的な役割を果たしている。SARS-CoV-2 の N タンパク質も複製と粒子形成のいずれにも必要であることが知られている。N タンパク質はダイマー形成することが知られているため、ダイマー形成を阻害する化合物を見出すことができれば有力な治療剤候補として期待できる。

本研究では、これまでに開発されている治療剤とは作用機序の異なる N タンパク質のダイマー形成を阻害する治療剤開発のための評価系を開発し、治療剤候補を見出すことを目的とする。

## 3 . 研究の方法 ( 図 1 )

本研究ではウイルスの複製と粒子形成のいずれにも重要な役割を果たす SARS-CoV-2 の N タンパク質に着目した抗ウイルス剤の探索を実施した。N タンパク質はダイマーを形成するためダイマーの形成を阻害する阻害剤を見出すことができれば、SARS-CoV-2 の複製と粒子形成を抑制することができる。はじめに N タンパク質のダイマーの形成を評価するためにスプリットルシフェラーゼ法による評価系を開発する。NanoLuc (ルシフェラーゼ)の large domain を融合した SARS-CoV-2 の N タンパク質発現ベクターと small domain を融合した SARS-CoV-2 の N タンパク質発現ベクターを作製し Split luciferase アッセイ系を開発した。N タンパク質がダイマー形成すると 2 つの sNLuc domain が相互作用することによって初めてルシフェラーゼ活性が検出できる。2 つのベクターを哺乳類細胞(HuH-7, Vero, HEK293, Calu3 等)にトランスフェクションする。

N タンパク質のダイマー形成を阻害する化合物候補を、SARS-CoV-2 レプリコンを用いて複製阻害を検討する。

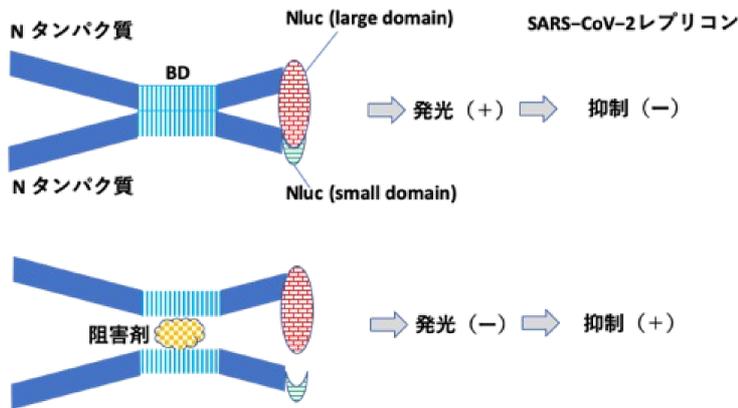


図1 スプリットルシフェラーゼの原理

4. 研究成果 (図2)

レニラルシフェラーゼ遺伝子を2つのドメイン(ラージドメイン及びスモールドメイン)にわけて、それぞれをNタンパク質遺伝子に融合させた2種類のプラスミドを細胞に導入した。ダイマーが形成されるとルシフェラーゼが活性化する。基質を加えることで発光を確認できた。現在、FDA承認薬ライブラリー等を用いて10 $\mu$ Mで処理したときに細胞毒性が10%以下で50%以上抑制する化合物の評価を実施している。これまでに、ダイマー形成を阻害する化合物は得られていないが、引き続きスクリーニングを実施する。

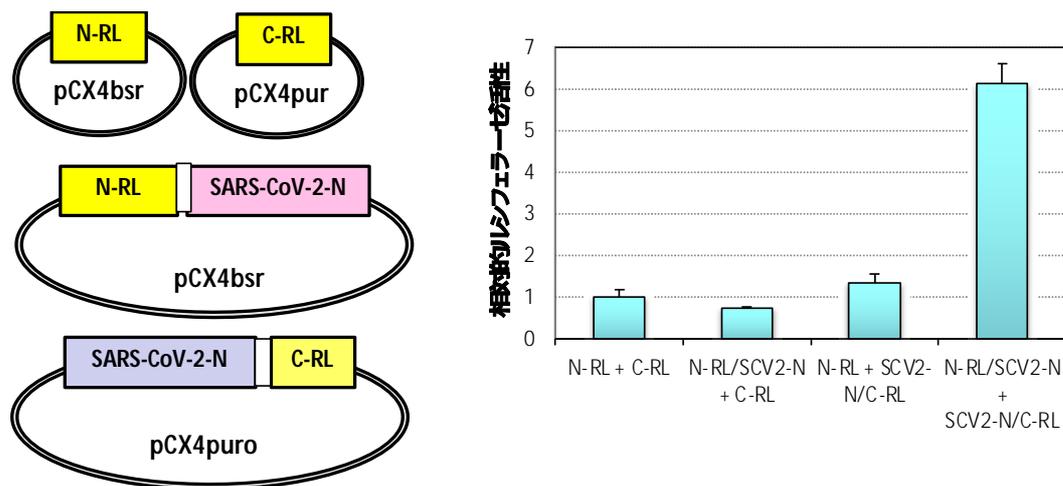


図2 スプリットルシフェラーゼアッセイ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Honma Y, Miyagawa K, Hara Y, Hayashi T, Kusanaga M, Ogino N, Minami S, Oe S, Ikeda M, Hino K, Harada M	4. 巻 54
2. 論文標題 Correlation of hepatitis C virus-mediated endoplasmic reticulum stress with autophagic flux impairment and hepatocarcinogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol.	6. 最初と最後の頁 108-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-020-00271-5. Epub 2021 Jan 1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田 緑、池田 正徳
2. 発表標題 リバースジェネティクス法を利用したSARS-CoV-2レプリコンの開発
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李 佳洲、武田 緑、池田 正徳
2. 発表標題 インフルエンザAウイルス複製・転写アッセイ系の構築と化合物のスクリーニング
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田 緑、池田 正徳
2. 発表標題 新型コロナウイルスRNA複製システムの開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李 佳洲、武田 緑、池田 正徳
2. 発表標題 インフルエンザウイルスの複製複合体を利用したアッセイ系の構築と新規抗インフル エンザ治療薬の探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------