

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07050

研究課題名（和文）SARS-CoV-2のプロテアーゼを標的としたウイルス増殖阻害薬の創出

研究課題名（英文）Development of inhibitors targeting enzymatic activity of SARS-CoV-2 proteases

研究代表者

星野 忠次 (Tyuji, Hoshino)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：90257220

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）：SARS-CoV-2に有効な抗ウイルス薬を創出するために、理論計算・X線結晶構造解析・有機合成・タンパク質レベルの生化学実験を融合させた複合的な研究を遂行した。3CLプロテアーゼ、PLプロテアーゼ、ポリメラーゼの3つの標的タンパク質に対して効果があると期待される薬物を選定し購入した。3CLプロテアーゼならびにPLプロテアーゼを、組み換えタンパク質として発現精製した。精製した酵素タンパク質を用いて、各プロテアーゼに対する購入薬物の阻害活性を測定した。その結果、5種の化合物に明確な阻害効果が認められた。3種類の化合物については、3CLプロテアーゼおよびPLプロテアーゼの両者に対して阻害活性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SARS-CoV-2増殖阻害薬の開発については、多くの研究が行われ、新型コロナウイルス感染症治療薬の一つとして、ウイルスの3CLプロテアーゼを阻害するエンシトレルビルが承認されている。ウイルスのPLプロテアーゼについても阻害薬の探索研究が行われているが、研究報告例は少ない。感染治療においては、変異ウイルスへの対処に向けて作用機序の異なる複数の薬物の準備が必要であり、PLプロテアーゼを標的とした薬物開発は重要である。今回、PLプロテアーゼを阻害する薬物を見出したことに意義がある。

研究成果の概要（英文）：In order to create an effective antiviral drug for SARS-CoV-2, we carried out a study combining theoretical calculations, X-ray crystallography, organic synthesis, and biochemical experiments. An original software, Orientation, was used for the optimization molecular mechanics calculation. We selected the compounds expected to be effective against three target proteins, 3CL protease, PL protease, and polymerase, by computer analysis. Then, we purchased them for experimental assay. 3CL protease and PL protease were expressed and purified as recombinant proteins. The purified enzymes were used to determine the protease inhibitory activity. Five compounds showed clear inhibitory effects from in vitro measurements. Three compounds showed inhibitory activity against both 3CL protease and PL protease. The predicted binding structures were examined on the five identified chemicals in terms of the interaction with the protease catalytic site.

研究分野：薬物探索設計

キーワード：抗ウイルス薬 計算機スクリーニング X線結晶構造解析 薬物有機合成 阻害活性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

COVID-19 の世界的な流行が大きな問題となっており、COVID-19 の治療法をできるだけ早く確立する必要があった。社会的要請に応えるために、まずは既存認可薬あるいはその組み合わせで、現時点で、最も有望な薬物選択を提案することとした。既存承認薬は、人での使用における安全性の評価がすでに完了しているため、抗ウイルス活性が確認できれば COVID-19 の治療に速やかに使用することが可能である。さらに長期的アプローチとして、既存承認薬から同定された SARS-CoV-2 増殖阻害薬剤について、X線結晶構造解析、酵素阻害実験、計算機シミュレーション、有機合成とウイルス感染実験を組み合わせることで改良を行うことにより、より高い抗ウイルス活性を持った新規薬剤を創出する。新規薬剤は、既存承認薬に比べ治療効果が大幅に向上し、人々の健康被害を低減させることが期待でき、将来的な COVID-19 の対策に大きく資するものとなる。

2. 研究の目的

SARS-CoV-2 増殖阻害薬の開発については、多くの研究が行われ、新型コロナウイルス感染症治療薬の一つとして、ウイルスの 3CL プロテアーゼを阻害するエンシトレルビルが承認されている。ウイルスの PL プロテアーゼについても阻害薬の探索研究が行われているが、研究報告例は少ない。感染治療においては、変異ウイルスへの対処に向けて作用機序の異なる複数の薬物の準備が必要であり、PL プロテアーゼを標的とした薬物開発は重要である。本研究では、SARS-CoV-2 の持つプロテアーゼ、特に PL プロテアーゼを標的とした阻害薬を開発する。

3. 研究の方法

有効な抗ウイルス薬の提案ならびに新規薬物の創出の実現に向けて、構造情報を生かした研究開発を行った。理論計算・X線結晶構造解析・有機合成・タンパク質レベルの生化学実験を融合させて得られる複合的知見に基づいて、ウイルス感染実験を行うことで、着実に目標の達成を目指した。

▶ 理論計算

HPCI の新型コロナウイルス感染症対応臨時課題により、東京大学情報基盤センターのスーパーコンピュータを用いて、3CL プロテアーゼ、PL プロテアーゼ、ポリメラーゼの3つの標的タンパク質に対して効果があると期待される薬物を選定した。

▶ タンパク質実験

標的タンパク質を発現し精製を行った。3CL プロテアーゼと PL プロテアーゼについては、酵素活性ならびに薬物の阻害活性を、FRET 技術を用いて評価した。

▶ X線結晶構造解析

標的タンパク質の組み換え体を発現精製できたことを受け、同定したプロテアーゼ阻害活性を示す薬物と標的タンパク質との共結晶化を試みた。

▶ 有機合成

阻害活性を増強させるための化合物の改変構造を、計算機を用いて設計した。設計した低分子化合物の有機合成を行った。

▶ ウイルス感染実験

連携研究者（東海大学医学部・山本典生教授）に依頼し、SARS-CoV-2 のウイルス感染実験により、薬物の阻害効果を測定した。

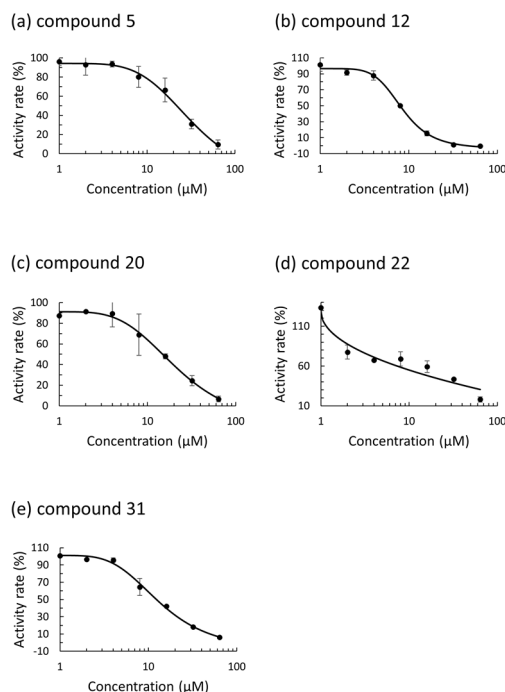
4. 研究成果

初めに、ドッキングシミュレーションと分子力学計算を組み合わせ、PL プロテアーゼ阻害薬の *in silico* スクリーニングを行った。ドッキング計算は、Autodock Vina プログラムを用いて行った。Autodock Vina では、タンパク質を構成する水素を含めた全原子を用いる。さらに結合部位に存在する幾つかのアミノ酸残基については、側鎖原子はコンフォメーションを計算中に変化させて結合予測構造を求めた。PL プロテアーゼの計算モデルは、PDB#:6wuu の結晶構造から構築した。6wuu 構造の酵素活性部位には、スクリーニング化合物が結合できる空間が存在した。38Å × 38Å × 48Å の探索ボックスを PL プロテアーゼの酵素活性部位の Cys 近傍の空間にセットした。Trp106, Asn109, Cys111, Leu162, Cys270 および His272 の6残基は PL プロテアーゼの酵素活性中心近くに位置することから、柔軟な残基であると判断した。

承認および治験化合物の化学データベースを用いて、スクリーニングを行った。ドッキングソフトウェアは、標的タンパク質への低分子量化合物の結合位置を予測するために用いた。ドッキングプログラムの結合スコアは精度が不十分であるため、候補化合物を確実に選択するためには、結合ポーズとその結合スコアを再評価する必要がある。本研究では、予測結合ポーズを、分子力場計算によりエネルギー最小化法により、最適化した。最適化結合ポーズに対応した結合スコアも、分子力場計算により算出される。分子力場計算に独自開発の Orientation を使用している。

分子力場結合スコアの上位 200 構造をピックアップし、それらの化学構造と結合ポーズを目視で検討した。化合物が結合ポケットの深い部位に、適切に適合しているかどうかを詳細に調べた。承認薬および治験薬のデータベースにある化学物質にもかかわらず、疎水性が過度に高い化合物は除外した。上位 200 構造には、同一の化合物で異なる結合ポーズが含まれていた。このような場合、最良のスコアを持つ結合構造を、その化合物に対して選択した。計算結果に基づいて、購入および実験アッセイのための 57 の候補化合物を選択した。

化合物の阻害活性を、*in vitro* 酵素測定により評価した。阻害活性は蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法により測定した。蛍光発生ペプチドである Z-RLRG-AMC を基質として利用し、励起波長 360 nm、発光波長 485 nm、バンド幅 20 nm のフィルターを用いて、マイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定した。反応混合物からの蛍光を 1 分毎に 50 分間モニターした。50%阻害濃度 (IC_{50}) 値は、64 μ M から二倍連続希釈における異なる化合物濃度を用いて、加水分解速度を求めることによって決定した。初めに 50 μ M の濃度で全 57 化合物に対して、FRET 測定を行った。化合物を含まないサンプルを比較対象として、加水分解による蛍光強度の変化を求めた。次に、濃度 50 μ M の測定から、阻害活性を有すると期待される化合物について、化合物の濃度を変化させた測定を行った。化合物の最終濃度を 2 倍希釈系列で 1 μ M から 64 μ M に変化させて、 IC_{50} 値を求めた。実験測定から、PL プロテアーゼに対する阻害活性を示す 5 つの化合物を同定した。FRET 測定は 2 回行った。酵素活性速度を化合物濃度に対してプロットし、5 つの化合物の IC_{50} 値を得た (右図)。



PL プロテアーゼはシステインプロテアーゼであるので、触媒 Cys 残基が酵素の結合ポケットに位置する。PL プロテアーゼ結合ポケットには明確な空洞がある。主要な 3 つの空洞を領域 1, 2, および 3 とする。領域 1 は Cys111 と Leu162 の近くの空洞である。Cys111 はこの酵素の中心的触媒残基である。領域 2 は Asp164 と Arg166 の近傍に位置する。領域 2 は、化合物の極性部分を受け入れることで、プロテアーゼと阻害剤との間に水素結合を確立して結合親和性を高めることができる。領域 3 は、Pro248, Tyr264 および Tyr 268 に近い空間である。領域 3 のこれらの残基は化合物と疎水的に接触する。

ドッキング計算による予測構造では、化合物 5 は、不飽和アルキル鎖の両側に 2 つのシクロヘキサノール部分を含んでいる。シクロヘキサノールは R1 にしっかりと収容されているが、R2 と R3 は占有されていない。長い鎖状形状が、化合物 5 の特徴的な化学構造である。Leu162 は化合物 5 のアルキル鎖と疎水性相互作用する。もう一方のシクロヘキサノールは CH- 相互作用を介して Trp106 と相互作用する。これらの強い相互作用にもかかわらず、化合物 5 の多くの領域は溶媒に露出しているため、化合物 5 の結合スコアは他の化合物と同程度である。

化合物 12 は PL 結合ポケットの溝にうまく適合し、官能基が R1, R2, および R3 のすべてを占めている。化合物 12 では 4 つの芳香環が中央の N 原子から広がっている。酢酸フェニル部分は R1 に位置し、末端カルボキシル基は Gln269 および Gly271 の主鎖原子と水素結合を形成する。クロロベンジル基の芳香環は Arg166 と NH- 相互作用をし、トリフルオロメチルは Thr301 と R2 で強く相互作用している。2 つのフェニルが R3 に位置し、Pro248 と疎水性相互作用をする。

化合物 20 は、ベツリン酸に結合したジメチル- α -コハク酸を特徴としている。コハク酸のカルボキシル基は R2 を占有し、Arg166 および Asp164 と強い水素結合を形成する。Tyr264 および Tyr268 はベツリン酸骨格と強固な CH- 相互作用を形成し、R1 への結合を安定化している。これらの強い相互作用にもかかわらず、化合物表面の多くは溶媒に曝されている。R3 は化合物によって占有されていない。

化合物 22 は、結合ポケットにおける溝とよく適合する。化合物部分はすべての R1, R2, および R3 を占める。トリフルオロメチル部位は R1 の内部に位置している。別のトリフルオロメチル-フェニル部分が R2 に位置する。トリフルオロメチルは R2 の内側に配向している。オキサゾリジンは Tyr273 と水素結合を形成し、Tyr264 と CH- 相互作用を形成する。フルオロ-メトキシ-プロパン-フェニル部分は R3 に位置し、フェニル環が Tyr268 と - 相互作用する。

化合物 31 では二つのフェニル環が結合している。末端のブチルフェニルは結合ポケットから完全に突き出ているが、化合物 31 の他の部分は PL プロテアーゼの溝とよく相補的である。トリフルオロメチル基は R1 に位置し、Leu162 および Tyr273 と疎水性相互作用を形成する。末端カルボキシル基は R2 に位置し、Arg166 と強い水素結合を形成している。

これらの構造情報は、化合物を改変して、より活性の高い薬物を設計するための指針になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Lu Huiyan, Komukai Yuji, Usami Koto, Guo Yan, Qiao Xinyue, Nukaga Michiyoshi, Hoshino Tyuji	4. 巻 62
2. 論文標題 Computational and Crystallographic Analysis of Binding Structures of Inhibitory Compounds for HIV-1 RNase H Activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Information and Modeling	6. 最初と最後の頁 6762 ~ 6774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jcim.2c00537	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 -
1. 著者名 Guo Yan, Hoshino Tyuji	4. 巻 22
2. 論文標題 Influence of Glycan Agents on Protein Crystallization with Ammonium Sulfate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Crystal Growth & Design	6. 最初と最後の頁 6751 ~ 6765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.cgd.2c00901	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 -
1. 著者名 Qu Liang, Qiao Xinyue, Qi Fei, Nishida Noritaka, Hoshino Tyuji	4. 巻 61
2. 論文標題 Analysis of Binding Modes of Antigen?Antibody Complexes by Molecular Mechanics Calculation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Information and Modeling	6. 最初と最後の頁 2396 ~ 2406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jcim.1c00167	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 -
1. 著者名 Guo Yan, Nishida Noritaka, Hoshino Tyuji	4. 巻 61
2. 論文標題 Quantifying the Separation of Positive and Negative Areas in Electrostatic Potential for Predicting Feasibility of Ammonium Sulfate for Protein Crystallization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Information and Modeling	6. 最初と最後の頁 4571 ~ 4581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jcim.1c00505	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 -

1. 著者名 Qiao Xinyue, Qu Liang, Guo Yan, Hoshino Tyuji	4. 巻 125
2. 論文標題 Secondary Structure and Conformational Stability of the Antigen Residues Making Contact with Antibodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 11374 ~ 11385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.1c05997	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 -

1. 著者名 Kamo Taichi, Kuroda Keiichi, Kondo Shota, Hayashi Usaki, Fudo Satoshi, Yoneda Tomoki, Takaya Akiko, Nukaga Michiyoshi, Hoshino Tyuji	4. 巻 69
2. 論文標題 Identification of the Inhibitory Compounds for Metallo-β-lactamases and Structural Analysis of the Binding Modes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1179 ~ 1183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-00611	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三輪 和範、郭 艶、畑 晶之、平野 秀典、山本 典生、星野 忠次
2. 発表標題 ドッキングシミュレーションと構造最適化計算を用いたSARS CoV-2 papain-like protease阻害薬の探索
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学・大学院薬学研究院・理論創薬研究室 https://www.p.chiba-u.jp/lab/riron/ 千葉大学・大学院薬学研究院・薬品物理化学研究室 https://www.p.chiba-u.jp/lab/bukka/index.html
--

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
---------	---------