

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19344

研究課題名(和文)細胞内新生Sタンパクを標的とした新規COVID-19治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of a novel therapeutic agent against COVID-19 by targeting newly synthesized spike protein in cells

研究代表者

西川 喜代孝(Nishikawa, Kiyotaka)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：40218128

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文): SARS-CoV-2の侵入に関わるSタンパクの受容体結合部位(RBD)を標的とし、新規阻害薬を開発することを目的とした。Sタンパクが3量体を形成して機能することに着目し、4価型構造を持つペプチドライブラリーを数百のレベルでセルロースシート上にスポット合成し、本シートをRBDに対する高親和性結合活性を指標にスクリーニングする新たな手法を開発した。その結果、RBDに高親和性結合活性を示す、10種の4価型ペプチドを同定した。このうち3種は、RBDとその受容体であるACE2との結合に対し、既知のACE2由来ペプチドに比べ数千倍以上の阻害活性を示すこと、すなわち優れた阻害薬となりうることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COVID-19はSARS-CoV-2を原因ウイルスとする感染症である。すでにワクチン開発が強力に進められその有効性が認められているが、その一方で未だに有効な治療薬は存在しない。本研究で取得した4価型RBD阻害ペプチドは、RBDとその受容体であるACE2との結合を極めて強力に阻害することが示されたことから、新たなCOVID-19治療薬として期待できる。これまでの技術では、RBDとACE2との3量体同士の極めて強い結合を阻害する分子の同定は極めて困難であった。本研究で取得した分子は、新たに開発した手法を用いて既知の配列に依存することなく同定したものであり、この点高い優位性を持つ。

研究成果の概要(英文): The main purpose of this study is to develop a novel therapeutic agent against SARS-CoV-2 by targeting the receptor binding region (RBD) of the spike protein (S-protein). Since S-protein functions by forming a trimeric structure, here we developed a novel technique, in which a series of tetravalent peptides with high-affinity binding capacity to RBD was identified by screening a cellulose sheet with hundreds of tetravalent peptide-libraries synthesized on it. We identified 10 tetravalent peptides with high affinity binding to RBD. Three of them inhibited the binding of RBD with its receptor ACE2 with thousands fold potency compared to a peptide derived from ACE2 that has been shown to inhibit the binding, indicating that these peptides can be a novel type of therapeutic agent against COVID-19.

研究分野：生化学

キーワード：COVID-19 Sタンパク ペプチドライブラリー スクリーニング 多価型ペプチド

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

SARS-CoV-2 の表面に存在している spike (S) 糖蛋白(S タンパク)は、肺胞上皮細胞等の標的細胞表面に存在している angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)を受容体として結合し、その後膜融合を介して細胞内にウイルス RNA を運び込む。すなわち S タンパクはウイルスの複製に必須の役割を果たしており、創薬標的として優れている。しかしながら S タンパクに対する阻害薬を開発するには以下の2つの問題がある。1) S タンパクはウイルス表面上で3量体構造を取っており、3分子の ACE2 を認識しうる。この多価型の結合により高い結合親和性が発揮され、この現象は一般的にクラスター効果と呼ばれている。しかしながら、低分子化合物スクリーニング等の従来技術では 1:1 の結合にしか対応できず、クラスター効果に基づく強い相互作用を阻害する分子の同定は原理的に極めて困難であること、2)さらに S タンパク阻害薬が得られたと仮定しても、初期感染時のウイルス量は極めて少量であるため、ウイルスの侵入を十分に阻害するには高濃度の阻害薬が必要となると予想されること、以上の2点である。

### 2. 研究の目的

本研究では、上記2つの問題を同時に解決する、これまで先例のない新たなコンセプトに基づく S タンパク阻害薬を開発し、優れた治療薬候補として確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 【問題1の解決戦略】

#### (1) S タンパクの RBD(S1-RBD)を標的としたペプチド性阻害薬の同定(西川・和久)

これまでに我々は、それ自体がクラスター効果を発揮するようデザインされた多価型ランダムペプチドライブラリーを開発している。本法は、クラスター効果に基づいて機能する標的分子に対する高親和性結合分子を同定するほぼ唯一の手法である。最近我々は本法を用いて、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA; 3量体をとって機能する)の受容体結合部位に対する4価型ペプチド性阻害薬(PVF-tet)を開発しているが、同じモチーフを持つ1価型ペプチド(PVF-mono)は HA に対する結合活性を全く示さない(Nat. Commun., 2020, 11(1):162)。すなわち従来技術であるファージディスプレイ法でこれと同じモチーフを取得することは不可能である。本研究では、さらに本法の精度を高めるため、新たに多価型ペプチドライブラリーシートスクリーニング法を確立し、S タンパクの受容体結合部位(S1-RBD)を標的として多価型阻害ペプチドを同定する。

#### 【問題2の解決戦略】

#### (2) 新生 S0 タンパクを標的とし、抗ウイルス amphisome を形成誘導する化合物の同定(西川)

初期感染時のウイルス量は極めて少量であるため、ウイルス増殖抑制のためには親ウイルスの侵入を阻害するよりも、感染細胞内で新生された S0 タンパクを標的とした方が優れている場合がある。すでに我々は先述した HA 阻害薬 PVF-tet が、親ウイルス粒子の HA を標的とするのではなく、感染後細胞内で新生された HA を標的として強く結合すること、その結果オートファジー経路が活性化し、HA が autophagosome の一形態である amphisome に隔離されることで子ウイルスの産生が顕著に抑制されること、を見出している (Nat. Commun., 2020)。HA と S タンパクは構造的・機能的に類似していることから、問題1の解決戦略として4価型ペプチド性 S タンパク阻害薬が取得できれば、同様に誘導性 amphisome 形成を介して機能する治療薬開発が可能である。

### 4. 研究成果

#### (1) S タンパクの RBD(S1-RBD)を標的としたペプチド性阻害薬の同定

##### RBDの大量調製ならびに活性確認(西川・和久)

バキュロウイルス発現系を用いて武漢株 S1-RBD の C 末端に His-tag を導入した S1-RBD-(H6)、ACE2 との結合に重要な役割を果たしているアミノ酸 (K417, F486, Q493) に個別に変異を導入した、一連の変異体 (S1-RBD-mut-(H6)) を調製した。

RBD の ACE2 結合阻害活性は ELISA にて評価した。作成した各 S1-RBD を用い、野生型では ACE2 との十分な結合活性が観察されること、一方で変異体では結合活性が減弱していることを確認した。使用した変異 S1-RBD の中でも F486A-S1-RBD で最も結合活性が減弱していること、すなわち F486 が ACE2 との結合に最も重要な役割を果たしていることを見出した。そこで、野生型 S1-RBD と F486A-S1-RBD を用い、多価型ランダムペプチドライブラリー法による高親和性モチーフの取得を行うこととした。

多価型ランダムペプチドライブラリーシートスクリーニング法による高親和性 RBD 結合モチーフの取得 (西川・和久)

今回以下に示すように、多価型ペプチドライブラリーをセルロースシート上に数百のレベルでスポット合成する新規技術を確認し、RBD 結合モチーフをゼロベースから 1 アミノ酸ずつ組み上げてゆく手法を開発した。

ここで使用するペプチドライブラリーは 4 価型とし、図に示すライブラリー部の X は Cys を除く 19 種のアミノ酸の混合物を示す (図 1a)。このペプチドライブラリーを、スペーサーを介してシート上にスポット合成する。1 次ライブラリーでは、1-7 番の各位置の X について Cys を除く 19 種のアミノ酸に一つずつ置換してゆく。その結果シート上には  $7 \times 19 = 133$  種のペプチドがスポット合成される。本シートを S1-RBD あるいは F486A-S1-RBD でプロットし、抗 His-抗体を用いて検出後結合量を定量し、F486 特異的結合活性を解析した。その結果、最も高い結合活性を示したアミノ酸とその位置を同定し、その情報を組み入れた 2 次ライブラリーを作成した。同様の検討を順次行うが、同程度の結合活性を示すアミノ酸が 2 種選択された場合には別系統として独立してスクリーニングを行った。なお具体的な配列については出願準備中のためアルファベットにて表記した。

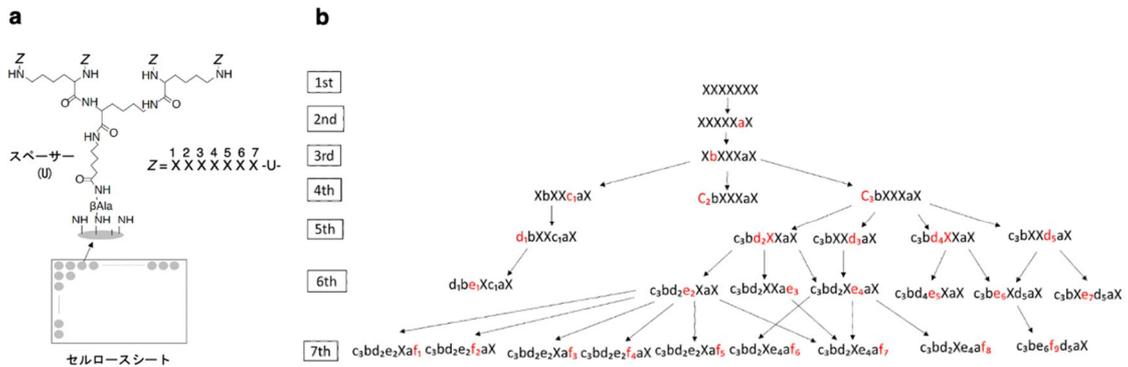


図 1 多価型ペプチドライブラリーシートスクリーニング法による RBD 結合モチーフの同定

最終的に図 1b に示す 9 種の 7 次ライブラリーを用いて、同様の検討を行なった。プロットの様子を図 2a に示す。その結果、上位 10 種の F486 特異的結合活性を示すモチーフを決定した (図 2b、#1 - 10 で表示)。これらモチーフをペプチドライブラリーと同じ核構造に組み入れ、10 種の 4 価型ペプチドを取得した。

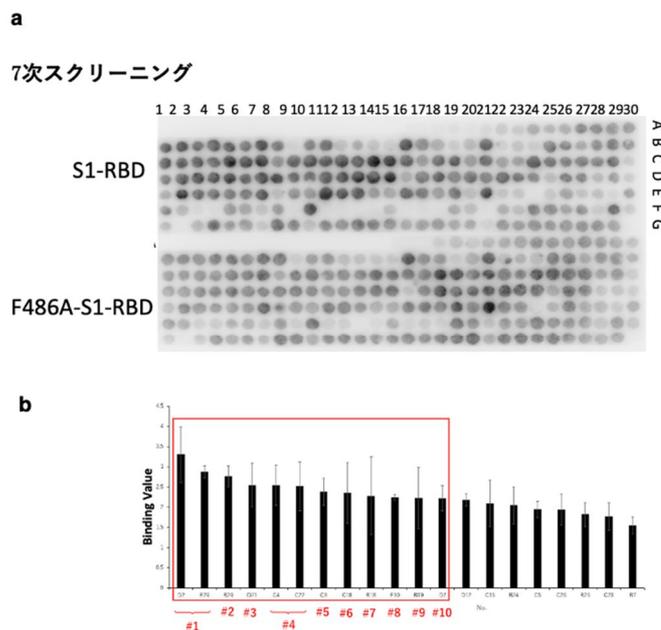


図 2 F486 特異的 RBD 結合モチーフの同定

### 取得した4価型ペプチドのRBD受容体結合活性阻害能の評価(西川)

RBDとACE2との結合活性はELISAにて評価した。本結合に対する、取得した10種(#1-10)の4価型ペプチドの容量依存的阻害活性を評価した。positive controlとして、RBDとの結合に参与することが知られているACE2領域の22アミノ酸からなるペプチド(ACE2pep; 22-EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSS-44)を用いた。これまでに4種について活性評価を行なった。その結果、ACE2pepは300 microMを使用しても50%阻害に至らないのに対し、3種(#2, 6, 10)については0.1-0.3 microMで50%阻害を引き起こすこと、さらに興味深いことに1種(#1)についてはRBDとACE2との結合を阻害するどころか、容量依存的に結合を増加させ、1 microMでは1.5倍に結合活性を増強させることを見出した。今後残りの4価型ペプチドについても同様の検討を進めてゆく予定である。

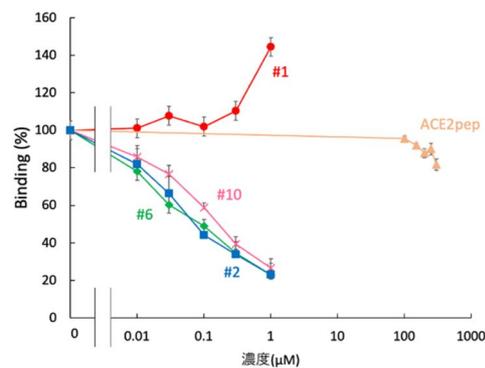


図3 RBDとACE2との結合に対する各種ペプチドの阻害活性

### (2) 新生S0タンパクを標的とし、抗ウイルスamphisomeを形成誘導する化合物の同定(西川)

これまでに4価型ペプチドの同定まで推進したところであり、本項目については検討を行うところまでは到っていない。今後、同定した全ての4価型ペプチドについて、S03量体との結合活性を指標にしたスクリーニング、共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞レベルでのamphisome形成能ならびにSタンパク隔離能に対する効果、を評価してゆく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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<br>村上絵理、福田協平、井深健太郎、高橋美帆、柴田剛明、近江純平、可野邦行、河野望、青木淳賢、西川喜代孝 |
| 2. 発表標題<br>抗A型インフルエンザウイルス活性を示す誘導性アンフィソームの形成機構の解明              |
| 3. 学会等名<br>3) 第94回 日本生化学会大会                                   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 和久 剛<br><br>(Wake Tsuyoshi)<br><br>(40613584) | 同志社大学・生命医科学部・准教授<br><br><br><br>(34310) |    |

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 |
|---------|---------|