

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22723

研究課題名（和文）SARS-CoV-2の3CLプロテアーゼに対する分解誘導化合物の開発

研究課題名（英文）Development of a degrader for SARS-CoV-2 3CL protease

研究代表者

今野 翔（Konno, Sho）

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70882190

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではCOVID-19治療薬の開発に向けた新たなアプローチとして、SARS-CoV-2の主要酵素である3CLプロテアーゼに対する分解誘導薬の創製をめざした。独自開発したYH-53を基に、タンパク質分解系を利用して3CLプロテアーゼを分解へと導く化合物の合成と機能評価を実施した。その結果、3CLプロテアーゼ阻害活性を維持した複数の候補化合物を見出し、さらに分解誘導する可能性があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COVID-19は人類共通の災禍であり、治療薬開発は急務である。一方、新薬開発は膨大な資金と時間、人的資源を必要とすることから、新たな創薬アプローチの提案および確立は喫緊の課題である。本研究では、タンパク質分解誘導と呼ばれる技術をCOVID-19治療に応用可能か検証しており、SARS-CoV-2を含めたウイルス感染症に対する新しい治療戦略となる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：The novel coronavirus, SARS-CoV-2, has been identified as the causative agent for the current coronavirus disease (COVID-19) pandemic. 3CL protease plays a pivotal role in the processing of viral polyproteins. Herein, we developed 3CL protease degraders based on our original 3CL protease inhibitor YH-53. We demonstrated that most of synthesized 3CL protease degraders showed comparable inhibitory activities of SARS-CoV-2 3CL protease with YH-53, which suggests that these molecules have a potential to induce the degradation of 3CL protease. This study would offer a new therapeutic strategy for a development of antiviral agents.

研究分野：ケミカルバイオロジー

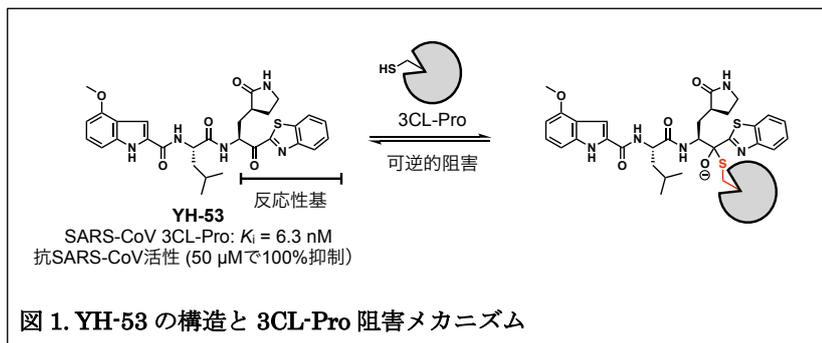
キーワード：3CLプロテアーゼ SARS-CoV-2 プロテアーゼ阻害剤 プロテインノックダウン COVID-19 PROTAC

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

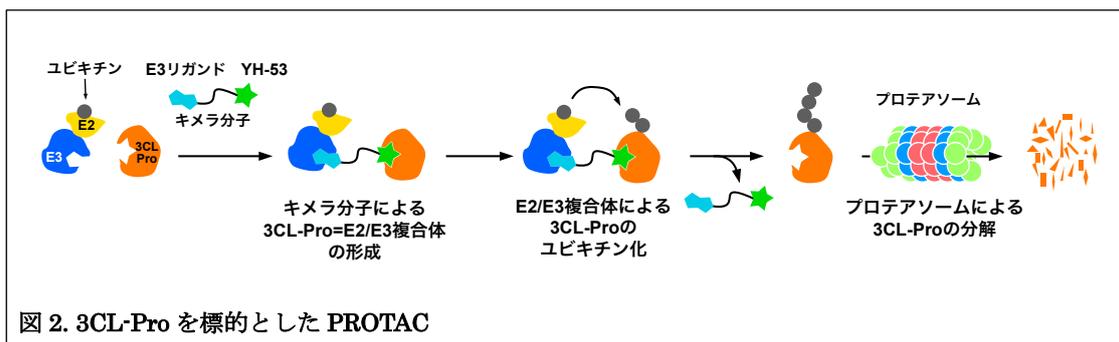
2019年12月に中国武漢で報告された新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、瞬く間に世界中に拡散し、パンデミックを引き起こした。原因ウイルスとしてコロナウイルスが同定され、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV) との高いゲノム相同性から SARS-CoV-2 と命名された。COVID-19 に対する有効な治療薬は存在せず、重症化した場合、対症療法しか術がない。ワクチン開発に加え、既存薬の適応拡大が期待されているが、COVID-19 の根本治療、そして新たな新型コロナウイルス感染症の襲来に備えるためにも、選択的かつ確実に効果のある治療薬の開発は急務である。

3CL プロテアーゼ (3CL-Pro) はウイルス由来のシステインプロテアーゼであり、SARS-CoV-2 が増殖するための必須酵素である。我々はこれまでに、SARS-CoV の 3CL-Pro に対するペプチドミメティック型阻害剤の開発を行い、YH-53 ($K_i = 6.3 \text{ nM}$) を創製した (図 1)。¹⁻³ YH-53 は反応性基であるベンゾチアゾリルケトン部位が 3CL-Pro の活性中心システインと一時的な共有結合を形成し、可逆的阻害を示す (図 1)。SARS-CoV と SARS-CoV-2 の 3CL-Pro は 96% のアミノ酸同一性があることから、YH-53 は SARS-CoV-2 の 3CL-Pro にも同様の阻害活性を示す可能性が高い。しかし、YH-53 の SARS-CoV に対する抗ウイルス活性は中程度であり、医薬候補分子として有望であるものの、更なる活性向上が求められる。



2. 研究の目的

本研究では、YH-53 を基盤とした抗 SARS-CoV-2 薬の創製に向けて、PROTAC (Proteolysis targeting chimera) に代表されるタンパク質ノックダウン法に着目した。すなわち、YH-53 による 3CL-Pro 阻害活性に加え、3CL-Pro を分解へと誘導することができれば、効率的にウイルスの複製を抑制できると考えた (図 2)。PROTAC はユビキチン-プロテアソーム系を利用して、標的タンパク質を選択的に分解する技術である。E3 ユビキチンリガーゼと標的タンパク質の両方に結合するキメラ分子をリンカーで繋ぐことで、標的タンパク質のユビキチン化を引き起こし、プロテアソームによる分解へと導くことができる。本研究の目的は、独自開発した 3CL-Pro 阻害剤 YH53 を基にキメラ分子を開発し、SARS-CoV-2 の 3CL-Pro を分解誘導できるか検証することである。本研究の遂行により、コロナウイルス感染症に対する新たな創薬アプローチの基盤構築をめざす。



3. 研究の方法

(1) SARS-CoV-2 の 3CL-Pro 発現系および阻害活性評価系の構築と、YH-53 の阻害活性評価

YH-53 は SARS-CoV の 3CL-Pro 阻害剤として開発された化合物であり、SARS-CoV-2 の 3CL-Pro に対する阻害活性は明らかにされていない。そこでまず、YH-53 が SARS-CoV-2 の 3CL-Pro に対して阻害活性を示すかどうかを検証する。SARS-CoV-2 の 3CL-Pro 遺伝子をコードしたプラスミドを作製したのち、大腸菌による異種発現と精製を行い組換え 3CL-Pro を調製する。続いて、蛍光基質を用いた 3CL-Pro 阻害活性評価系の構築を行い、YH-53 の SARS-CoV-2 の 3CL-Pro に対する阻害活性を評価する。阻害活性は各阻害剤濃度における初速度を測定し、Morrison の式から阻害定数 K_i 値を算出する。

(2) YH-53 を基盤としたキメラ分子の分子設計・合成と、3CL-Pro 阻害活性評価

YH-53 と E3 リガーゼリガンドをリンカーで結合したキメラ分子の設計・合成を行う。YH-53 のインドール 4 位メトキシ基は 3CL-Pro の基質結合部位の縁に存在することから、リンカー導入部位とすることにした (図 3A, B)。E3 リガーゼリガンドとしては、CRBN と結合するポマリドミドおよび VHL と結合する VH032 を利用することにした (図 3C)。キメラ分子合成では効率化を図るため、YH-53 にアルキン、E3 リガーゼリガンドにリンカーを介してアジド基を導入し、CuAAC (Cu^I-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition) を利用することで最後に架橋反応を行うこととした。合成したキメラ分子は(1)で構築した評価系にて阻害活性評価を行う。

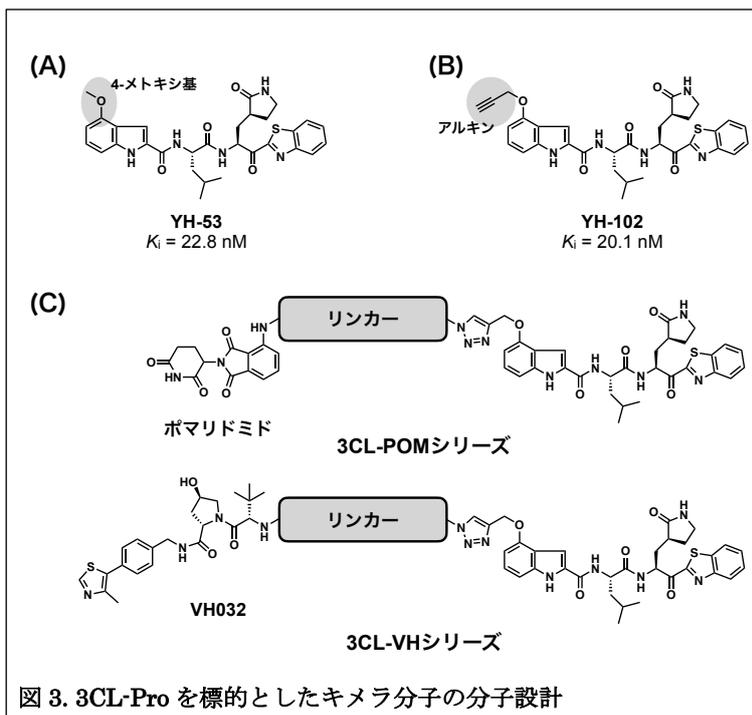


図 3. 3CL-Pro を標的としたキメラ分子の分子設計

(3) 動物細胞を用いた 3CL-Pro 発現系の構築と分解誘導評価

動物細胞用の 3CL-Pro 発現プラスミドを作製し、一過性発現系における 3CL-Pro の発現およびキメラ分子による分解誘導を調べる。まず、異なる細胞における 3CL-Pro 発現量を調べ、最適な細胞株の選定を行う。3CL-Pro の検出には抗 SARS-CoV-2 3CL-Pro 抗体を用いる。次に、キメラ分子処理により、3CL-Pro の分解が引き起こるか評価する。

4. 研究成果

(1) SARS-CoV-2 の 3CL-Pro 発現系および阻害活性評価系の構築と、YH-53 の阻害活性評価

まず、SARS-CoV-2 の 3CL-Pro を発現し、精製 3CL-Pro の獲得を実施した。3CL-Pro 発現プラスミドは、ドイツ Lübeck 大学の Rolf Higenfeld 教授から頂いた。大腸菌 BL21 (DE3) 株にて、C 末端 His タグ融合タンパク質として発現した後、Ni-NTA における精製と PreScission プロテアーゼによる His タグの切断を行い、天然配列の 3CL-Pro を得た。さらに陰イオン交換樹脂による精製を行い、SDS-PAGE にて 90%以上の純度の 3CL-Pro を獲得した。

次に、FRET を利用した消光性蛍光基質 (Dabcyl-Lys-Thr-Ser-Ala-Val-Leu-Gln-Ser-Gly-Phe-Arg-Lys-Met-Glu(Edans)-NH₂) を用いて、精製した 3CL-Pro の酵素活性を調べた。本基質を用いた評価から組換え 3CL-Pro が酵素活性を有していることが確認できたため、ミカエリス・メンテン式から K_m 値を求め、 K_i の算出に利用した。次に、YH-53 の阻害活性を評価したところ、 K_i は 22.8 nM であった (図 3A)。SARS-CoV の 3CL-Pro に対する阻害活性 ($K_i = 6.3$ nM) と比較すると阻害活性は若干低下したが、nM オーダーの阻害活性を示すことが明らかとなった。

(2) YH-53 を基盤としたキメラ分子の分子設計・合成と、3CL-Pro 阻害活性評価

まず、YH-53 にアルキン分子を導入した YH-102 の合成を行なった。文献既知の方法と改良合成法を利用して順次縮合を行い、HPLC 精製することなく高純度の YH-102 を得た。リンカー長の異なるポマリドミドおよび VH032 は文献に従い合成した。アジド体としてそれぞれ 5 種類 (PEG リンカー 3 種: P1~P3、脂肪族リンカー 2 種: C4, C6) を合成した。これらの分子を CuAAC にて結合した後 HPLC にて精製し、計 10 種類のキメラ分子を合成することに成功した。次に、これら化合物の SARS-CoV-2 の 3CL-Pro に対する阻害活性を評価し

化合物名	K_i (nM)	化合物名	K_i (nM)
3CL-POM-P1	52.1	3CL-VH-P1	49.2
3CL-POM-P2	47.6	3CL-VH-P2	30.3
3CL-POM-P3	29.1	3CL-VH-P3	30.6
3CL-POM-C4	195	3CL-VH-C4	39.7
3CL-POM-C6	441	3CL-VH-C6	73.3

図 4. キメラ分子の SARS-CoV-2 3CL-Pro 阻害活性

た。まず、YH-102 の阻害活性を評価したところ、YH-53 と同等の阻害活性を示すことがわかった (図 3B)。次に、キメラ分子の阻害活性を評価した。VH032 を結合した 3CL-VH シリーズではほとんどの化合物が YH-53 に匹敵する阻害活性を示した (図 4)。一方、3CL-POM シリーズでは、脂肪族リンカーを介してポマリドミドを結合したキメラ分子 (3CL-POM-C4, 3CL-POM-C6) において阻害活性の大きな減弱がみられた。これらの結果から、YH-53 のインドール 4 位メトキシ基への修飾は、ほとんどの化合物において 3CL-Pro との結合に影響を与えないことが明らかになった。多くのキメラ分子で 3CL-Pro に対する強力な阻害活性が維持されることが確認できたため、これらの分子による 3CL-Pro 分解誘導実験を実施することにした。

(3) 動物細胞を用いた 3CL-Pro 発現系の構築と分解誘導評価

まず、動物細胞を用いた 3CL-Pro 一過性発現系の構築を行った。HEK293、HeLa 及び COS-7 細胞に 3CL-Pro 遺伝子をコードしたプラスミドをトランスフェクションし、3CL-Pro 発現能を調べた。それぞれの細胞抽出液をウエスタンブロットし、抗 SARS-CoV-2 3CL-Pro 抗体で検出したところ、COS-7 細胞が効率良く 3CL-Pro を発現できることがわかった。そこで COS-7 細胞を用いて、キメラ分子による 3CL-Pro 分解誘導実験を行なった。COS-7 細胞に 3CL-Pro プラスミドをトランスフェクションした後、それぞれのキメラ分子を処理したところ、一部のキメラ分子処理によって 3CL-Pro の分解が示唆された。次に、化合物濃度、処理時間などの検討を行なったが、分解誘導の再現性に課題が残った。今後、アッセイ条件の最適化などを通して再現性の確保、そして本戦略の有用性を実証していく。

<引用文献>

1. **Konno, S.**; Thanigaimalai, P.; Yamamoto, T.; Nakada, K.; Kakiuchi, R.; Takayama, K.; Yamazaki, Y.; Yakushiji, F.; Akaji, K.; Kiso, Y.; Kawasaki, Y.; Chen, S-E.; Freire, E.; Hayashi, Y. “Design and synthesis of new tripeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors containing an electrophilic arylketone moiety” *Bioorg. Med. Chem.* 21, 414–424, 2013.
2. Thanigaimalai, P.; **Konno, S.**; Yamamoto, T.; Koiwai, Y.; Taguchi, A.; Takayama, K.; Yakushiji, F.; Akaji, K.; Kiso, Y.; Kawasaki, Y.; Chen, S-E.; Tavakolian, N. A.; Schön, A.; Freire, E.; Hayashi, Y. “Design, synthesis and biological evaluation of novel dipeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors: Structure-activity relationship study” *Eur. J. Med. Chem.* 65, 436–447, 2013.
3. Thanigaimalai, P.; **Konno, S.**; Yamamoto, T.; Koiwai, Y.; Taguchi, A.; Takayama, K.; Yakushiji, F.; Akaji, K.; Chen, S-E.; Tavakolian, N. A.; Schön, A.; Freire, E.; Hayashi, Y. “Development of potent dipeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors with novel P3 scaffolds: Design, synthesis, biological evaluation and docking studies” *Eur. J. Med. Chem.* 68, 372–384, 2013.

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Konno S., Kobayashi K., Senda M., Funai Y., Seki Y., Tamai I., Schakel L., Sakata K., Pillaiyar T., Taguchi A., Taniguchi A., Gutschow M., Muller C. E., Takeuchi K., Hirohama M., Kawaguchi A., Kojima M., Senda T., Shirasaka Y., Kamitani W., Hayashi Y.	4. 巻 65
2. 論文標題 3CL Protease Inhibitors with an Electrophilic Arylketone Moiety as Anti-SARS-CoV-2 Agents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 2926 ~ 2939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.1c00665	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 該当する

〔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 Sho Konno at al.
2. 発表標題 3CL protease inhibitor with an arylketone warhead group as anti-SARS-CoV-2 agents
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
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
---------	---------