

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19380

研究課題名（和文）SARS-CoV-2増殖におけるPin1の役割と治療薬への可能性

研究課題名（英文）Role of Pin1 in the proliferation of SARS-CoV-2

研究代表者

浅野 知一郎（ASANO, TOMOICHIRO）

広島大学・医系科学研究科（医）・教授

研究者番号：70242063

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）：プロリン異性化酵素とは、プロリンとそのN端側のアミノ酸と間のペプチド結合をcis体からtrans体に変化させることで標的タンパクの機能変化を誘導するユニークな酵素である。我々は、Vero/TMPRSS2細胞にPin1 siRNA処理あるいはPin1阻害剤添加を行うと、SARS-CoV-2の増殖がほぼ完全に抑制され、Vero/TMPRSS2細胞も障害されない結果を得た。また、Pin1がSARS-CoV-2のNタンパクに結合することを見出した。さらに、新規のPin1阻害薬をスクリーニングを行い、COVID-19に対する新規治療としての可能性を検討した。

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SARS-CoV-2によるパンデミックが起こり、多くの方が亡くなるなど多大な損失が生じ、私たちの生活も大きく変わってしまった。この感染症COVID-19を制御するための抗ウイルス剤は、まだ種類が限られており、新たな薬剤の開発が急務である。我々は、Pin1 siRNAによるPin1の阻害、あるいはPin1阻害薬の添加によって、培養細胞でのSARS-CoV-2の増殖を阻害することを見出した。我々が研究開発したPin1阻害薬は、他のCOVID-19治療薬とは異なる作用点をもつ薬剤であり、このようにPin1阻害薬をCOVID-19に対して使用することは新規の試みである。

研究成果の概要（英文）：Pin1 is involved in the pathogenesis of many diseases including cancers and metabolic syndrome. Furthermore, Pin1 is required to grow human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other viruses. In this project, it was demonstrated that applying Pin1 knockdown or Pin1 inhibitors inhibited SARS-CoV-2 growth. Indeed, Pin1 was reported to bind to phosphorylated Ser79 in the Ser79-Pro sequence of the N protein. In addition, viral transcription of SARS-CoV-2 is inhibited by the use of Pin1 inhibitors, suggesting RNA synthesis of SARS-CoV-2 to likely be promoted by Pin1. The N protein has a sequence that is highly conserved among coronaviruses, but this Ser79-Pro sequence is not found in closely related viruses such as SARS-CoV and MERS-CoV and is specific to SARS-CoV-2. The Ser-Pro site of this N protein might be one of the causes of SARS-CoV2 exacerbation and spread of the infection.

研究分野：病態生化学

キーワード：Pin1 SARS-CoV-2 COVID-19

1. 研究開始当初の背景

プロリン異性化酵素とは、プロリンとその N 端側のアミノ酸と間のペプチド結合を *cis* 体から *trans* 体に変化させることで標的タンパクの機能変化を誘導するユニークな酵素である。プロリン異性化酵素は FKBP、cyclophilin、Pin1 の 3 種類に大別され、それぞれ異なった標的タンパクに作用する。Pin1 は、pSer/Thr-Pro を含むモチーフを有する標的タンパクに作用する特徴を有する。しかし、intact な細胞内でプロリンの構造変化を検出する方法が確立していないため、この研究分野には未知の部分が多く残されている。我々は、Pin1 の発現が過栄養状態で増加すること、Pin1 が種々のタンパクと相互作用することで肥満や脂肪肝の発症に不可欠であることを見出し報告してきた。今回、肥満者や糖尿病患者で COVID-19 が重症化することから Pin1 の関与を推測し、検討したところ、Pin1 が SARS-CoV-2 の増殖に必須の役割を果たしていることを発見した。具体的には、Vero/TMPRSS2 細胞に Pin1 siRNA 処理あるいは Pin1 阻害剤添加を行うと、SARS-CoV-2 の増殖がほぼ完全に抑制され、Vero/TMPRSS2 細胞も障害されない結果を得た。

2. 研究の目的

本研究の目的は (1) SARS-CoV-2 の増殖に関わる Pin1 の標的タンパクを同定し、増殖を誘導するメカニズムを解明すること、さらに、(2) Pin1 あるいは、その標的タンパクをターゲットとする COVID-19 に対する新規治療へ進めるためのエビデンスを得ると共に、Pin1 が担う新しい機能を発見することが第一である。さらに、我々が合成してきた新規の Pin1 阻害化合物をスクリーニングし、COVID-19 に対する新規治療方法としての応用につなげることを、最終的な目的とする。

3. 研究の方法

SARS-CoV-2 の増殖に関わる Pin1 結合タンパクの網羅的同定には、2 種類の方法を用いる。一つは、SARS-CoV-2 感染有無の Vero/TMPRSS2 細胞からの cell lysate を可溶化した後、GST-Pin1 を取り付けたビーズと混合し、結合タンパクを pull-down する手法である。もう一つは、Vero/TMPRSS2 細胞に免疫沈降用のタグ (myc タグ、TEV 切断部位、FLAG タグを連結させた myc/TEV/FLAG タグを用いる) を取り付けた Pin1 を発現させ、SARS-CoV-2 感染の有無で、myc/TEV/FLAG タグによって Pin1 とその結合タンパクを網羅的に回収する方法である。いずれも、回収したサンプルから LC/MS/MS によって Pin1 結合タンパクを同定する。

肝心の Pin1 結合タンパク (仮に X とする) に Pin1 が結合することで機能変化が生じることが、結果として、SARS-CoV-2 の増殖に必須と考えられる。従って、タンパク X を siRNA 等で発現抑制する、あるいは、タンパク X 内の Pin1 結合モチーフを変化させると、SARS-CoV-2 が増殖できなくなることが期待される。有望と考えられるタンパクに関して、CAS9/Crisper のシステムで Vero/TMPRSS2 細胞内のタンパク X 内の Pin1 結合モチーフを変化させる手法を採用する。また、Pin1 による構造と機能制御についても詳細に検討する。

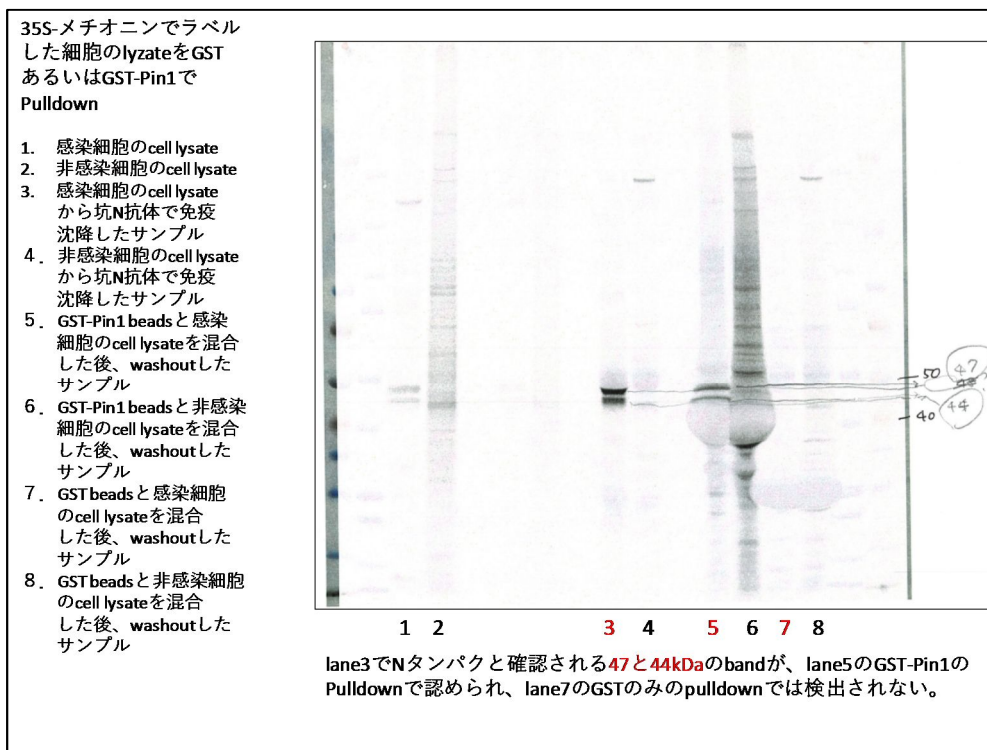
我々は、約 470 種類の新規 Pin1 阻害薬の開発に成功し、以下の 4 件の物質特許を出願済である。この中で、10 μ M 以下の濃度で、SARS-CoV-2 の増殖をほぼ完全に抑制できる Pin1 阻害薬化合物は 25 個ほどである。現在、これらの化合物からの最適化を進めているが、(3)に記載したように SARS-CoV-2 の増殖抑制のメカニズムも含めて明らかにし、治療薬の開発につなげたい。さらに、必要に応じて Pin1 標的蛋白側の阻害薬の開発・最適化も検討する。

4. 研究成果

Pin1 が SARS-CoV-2 の増殖に関わる作用の解明

ウイルスを感染させた Vero 細胞を用いて、Pin1 の結合タンパクの検索を行った。その結果、Pin1 が N タンパクに強く結合する結果が得られた。また、double membrane vesicle に存在する nsp3 を免疫染色する検討を行ったところ、H-77 の添加で大きな変化が認められており、この結果も、double membrane vesicle の形成抑制を意味するものと考えられた。H-77 の添加では、細胞内の N タンパク量も顕著に減少している。我々は N タンパクに作用する Pin1 が抑制されると、N タンパクの安定性がフォールディングが障害され、結果として double membrane vesicle の形成が障害されるのではないかと考えている。N タンパクは変異が入りにくい部位であるので、Pin1 阻害薬は今後も発生してくる変異株に対しても、有効性を維持できる可能性が高い。N タンパクと Pin1 の結合を電子顕微鏡も用いて明らかにする。N タンパクには、Pin1 が結合する可能性がある Ser/Thr-Pro モチーフを 6 か所持しているため、これらに変異を入れて、Pin1

の N タンパク内の結合部位を明らかにする実験を進行中である。

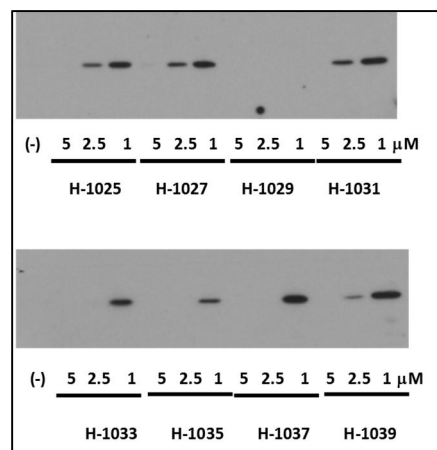


SARS-CoV-2 への増殖抑制効果を指標にした化合物の最適化とスクリーニング (VeroE6/TMPRSS2 細胞)

アントラニル酸系化合物 H-77 の他、アミド系化合物 H-103、3,5-ジアミノ安息香酸系化合物 H-596 についても、これらを基にして、毎月 40-50 個程度の新規化合物の合成を作成し、それぞれについて、VeroE6/TMPRSS2 細胞における SARS-CoV-2 の増殖抑制効果を指標に最適化を進めた。最初の数ヶ月は、H-77 を超える効果 (培養細胞での 50%有効濃度 (ED50) 3.2 μM) を有する化合物が得られなかったが、効果を発揮する化合物の構造上の特徴が次第に分かるようになり、H-77 を超える効果の化合物が多数、得られるようになった。(右図はアッセイの一例である。)

現在、ED50 で 10 μM 以下のものは、約 90 個あり、その中で 5-7 個程度の化合物が、ED50 で 1 μM 前後か、それ以下である。我々が既に出願したアントラニル酸系化合物とアミド系化合物の特許に含まれない、新規のアントラニル酸系化合物で強い効果が認められる化合物が得られてきたので、右図に示す一連の化合物について新たな物質特許としての出願を近日中に行う準備をしている。

さらに、得られた化合物が、細胞毒性ではなく真に Pin1 阻害効果によって、SARS-CoV-2 の増殖抑制効果を発揮しているか否かを、個々の化合物において検討しなければ、in vivo への検討に進めることはできない。我々は、主に 293 細胞を、また一部は VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて細胞毒性を評価しており、ウイルス増殖抑制効果と細胞毒性の濃度の間には明らかな乖離があることを認めている。そこで、ED50 で 10 μM 以下のものは約 90 個の化合物について、recombinant の Pin1 タンパクを用いる in vitro の Pin1 阻害活性を測定し、一方、VeroE6/TMPRSS2 細胞に対する細胞毒性の検討を進めている。すなわち、抗ウイルス活性、in vitro での Pin1 阻害活性、細胞毒性の3つのデータを信頼性の高い形で取得し、これらから、最も有効な化合物を明らかにできる見通しである。



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 1件）

1. 著者名 Yamamotoya T, Nakatsu Y, Kanna M, Hasei S, Ohata Y, Encinas J, Ito H, Okabe T, Asano T, Sakaguchi T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Prolyl isomerase Pin1 plays an essential role in SARS-CoV-2 proliferation, indicating its possibility as a novel therapeutic target.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports.	6. 最初と最後の頁 18581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97972-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	中津 祐介 (Nakatasu Yusuke) (20452584)	広島大学・医系科学研究科（医）・准教授 (15401)	
研究分担者	山本屋 武 (Yamamotoya Takeshi) (50760013)	広島大学・医系科学研究科（医）・助教 (15401)	

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