

学位論文の要旨

All-Trans Retinoic Acid Exhibits Antiviral Effect against SARS-CoV-2 by Inhibiting 3CLpro Activity

(オールトランス型レチノイン酸は 3C 様プロテアーゼ活性
を阻害し, SARS-CoV-2 に対して抗ウイルス効果を示す)

March, 2022
(2022 年 3 月)

Takeshi Morita
森田 武志

Department of Microbiology and Molecular Biodefence Research
Yokohama City University Graduate School of Medicine
横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 分子生体防御学

(Doctoral Supervisor: Akihide Ryo, professor)
(指導教員：梁 明秀 教授)

学位論文の要旨

All-Trans Retinoic Acid Exhibits Antiviral Effect against SARS-CoV-2 by Inhibiting 3CLpro Activity

(オールトランス型レチノイン酸は 3C 様プロテアーゼ活性を阻害し、
SARS-CoV-2 に対して抗ウイルス効果を示す)

<https://www.mdpi.com/1999-4915/13/8/1669>

1. 序論

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は重症な呼吸器症候群である新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) を引き起こすウイルスとして、2019 年 12 月に中華人民共和国、湖北省、武漢市で存在が報告された (Wang et al., 2020; Zhu et al., 2020). その感染は世界中で広がっている. 現在もなお、世界的に患者数は増加しており、公衆衛生上、最も大きな課題となっている. しかしながら、COVID-19 に対する抗ウイルス薬やその症状に応じた治療薬として承認されている薬剤は少なく、その開発が求められている.

SARS-CoV-2 は 2 種類のプロテアーゼを自身のゲノムにコードしており、その一つである 3C 様プロテアーゼ (3CLpro) はメインプロテアーゼとも呼ばれ、SARS-CoV-2 の複製過程において、ポリタンパク質を切断し、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼなどの機能をもつタンパク質とする、重要な役割を果たすプロテアーゼである. SARS-CoV-2 のもつ 3CLpro は SARS-CoV のそれと比べ、アミノ酸配列で 96% の相同性を持ち、コロナウイルス間で広く保存されている. これらの理由から、SARS-CoV-2 の複製を抑える有効な治療薬の標的として注目されており (Anand et al., 2003; Zhang et al., 2020), その阻害剤の開発が試みられている. 3CLpro の阻害作用をもつ候補化合物の阻害活性の評価には、これまで、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法が広く用いられており、いくつか抗ウイルス作用を示すとしての報告がある (Jin et al., 2020; Vuong et al., 2020; Zhang et al., 2020). しかし未だにどの薬剤も臨床承認はなされていない. このことから、より多くの候補化合物を選択するために、FRET よりも感度が良く、3CLpro の阻害活性を検出できる系の構築が必要である. AlphaScreen 法は FRET 法よりも感度が良く、また、ダイナミックレンジを検出することのできる評価法という報告がある (Glickman et al., 2002).

そこで本研究では、SARS-CoV-2 3CLpro の阻害活性を、AlphaScreen の技術を用いてハイスループットに検出できる評価系の構築を行なった. その後、この評価系を用いて、3CLpro の阻害活性を持つ化合物の探索を行い、その抗ウイルス作用についても検討を行なった.

2. 実験材料と方法

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて 3CLpro により切断される基質(Nsp4/Nsp5を含むペプチド)を合成し, 3CLpro, 候補化合物を混合し, 反応させた後に AlphaScreen の技術を用いて発光シグナルの強度を指標に阻害作用の評価を行える系の構築を行なった. また, 評価系の比較として, 同じ化合物セットを用いて, FRET 法による評価も行なった. その後, 阻害作用の確認された化合物について, 濃度勾配を作成し, 50 %阻害濃度 (IC₅₀) を算出した. さらに, その阻害様式の検討として, 3CLpro との結合部位をドッキングシミュレーションにて予測した. 得られた化合物の SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス作用として VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて, CellTiter-Glo を用いた細胞生存率と RT-PCR による培養液中に存在するウイルス RNA 数を測定した. さらに SARS-CoV-2 スクレオタンパク質(N)に対する抗体を用いて免疫染色を行うことで感染細胞の減少を確認した. そして, 化合物の抗ウイルス作用を示す過程を予測するために, 異なる時期に化合物を添加する検討を行なった. また, ヒト肺上皮細胞由来の細胞である Calu-3 細胞を用いても抗ウイルス作用と細胞毒性について検討を行なった. さらに, 変異を懸念される変異株である, α , β , γ , δ 株においても抗ウイルス作用の検討を行なった.

3. 結果

本研究で構築した評価系を用いて 3CLpro の阻害活性を持つ化合物を探索し, 複数の阻害活性を持つ化合物を得た. 同じ化合物セットを FRET 法による評価系と比較したところ, FRET よりもシグナルに対するバックグラウンドの比(S/N 比)よく, より多くの化合物で阻害活性を評価できた. その中で最も活性が高い化合物として All-trans-retinoic acid (ATRA)を見出した. ATRA の 3CLpro に対する阻害能は IC₅₀= 24.7 ± 1.65 μ M であった. ウェスタンブロッド法でも基質の切断バンドを確認したところ ATRA 10 μ M までは切断バンドが検出されたが, 25 μ M では基質の切断は阻害されたことが確認された. ドッキングシミュレーションにおいても 3CLpro の 190 番目のスレオニンと 2 つの水素結合をすることで相互作用し, 活性部位である 145 番目のシステインと 41 番目のヒスチジンを覆うように ATRA が結合することが予測された.

抗ウイルス作用の検討としてまず初めに VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて, SARS-CoV-2 感染により誘発される細胞死と培養上清中のウイルス RNA コピー数を指標に抗ウイルス作用を評価したところ, 細胞死の阻害は IC₅₀=8.09 ± 0.06 μ M, コピー数は IC₅₀=2.69 ± 0.09 μ M で有意に複製を阻害することが示された. また, ヒトの肺上皮細胞由来の細胞である Calu-3 細胞を用いた抗ウイルス作用の検討においても IC₅₀=0.82 ± 0.01 μ M で有意にウイルスのコピー数を減少させた. さらに, 懸念される変異株である (variant of concern: VOC) に指定されている Alpha, Beta, Gamma, Delta 株においても検討を行い, IC₅₀< 1 μ M で有意にウイルスのコピー数を減少させた.

4. 考察

本研究により AlphaScreen を用いた新たな 3CLpro 阻害活性評価系を構築し、それを用いてスクリーニングを行うことで 3CLpro に対して阻害作用を示す化合物として ATRA を見出した。さらに、ATRA が SARS-CoV-2 の複製を阻害する働きがあることが示され、VOC に対してもその作用を示した。本研究で用いた VOC は 3CLpro のアミノ酸変異は 1 つのみであり、活性部位への変異は認められず、保存されていることが分かった。以上のことより、3CLpro は SARS-CoV-2 の複製の制御に優れた薬剤標的であり、ATRA は新たな治療薬の候補になりうると考えられた。

引用文献

- Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J.R., Hilgenfeld, R., 2003. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* 300, 1763–1767. <https://doi.org/10.1126/science.1085658>
- Glickman, J.F., Wu, X., Mercuri, R., Illy, C., Bowen, B.R., He, Y., Sills, M., 2002. A Comparison of ALPHAScreen, TR-FRET, and TRF as Assay Methods for FXR Nuclear Receptors. *J. Biomol. Screen.* 7, 3–10. <https://doi.org/10.1177/108705710200700102>
- Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., Zhang, B., Li, X., Zhang, L., Peng, C., Duan, Y., Yu, J., Wang, L., Yang, K., Liu, F., Jiang, R., Yang, Xinglou, You, T., Liu, Xiaoce, Yang, Xiuna, Bai, F., Liu, H., Liu, Xiang, Guddat, L.W., Xu, W., Xiao, G., Qin, C., Shi, Z., Jiang, H., Rao, Z., Yang, H., Shanghai, in, Lab, Z., 2020. Structure of M pro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nat.* | 582. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>
- Vuong, W., Khan, M.B., Fischer, C., Arutyunova, E., Lamer, T., Shields, J., Saffran, H.A., McKay, R.T., van Belkum, M.J., Joyce, M.A., Young, H.S., Tyrrell, D.L., Vederas, J.C., Lemieux, M.J., 2020. Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. *Nat. Commun.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18096-2>
- Wang, C., Horby, P.W., Hayden, F.G., Gao, G.F., 2020. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* 395, 470–473. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30185-9)
- Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., Becker, S., Rox, K., Hilgenfeld, R., 2020. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved a-ketoamide inhibitors, *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>

論文目録

I. 主論文

All-Trans Retinoic Acid Exhibits Antiviral Effect against SARS-CoV-2 by Inhibiting 3CLpro Activity.

Morita, T., Miyakawa, K., Jeremiah, S.S., Yamaoka, Y., Sada, M., Kuniyoshi, T., Yang, J., Kimura, H., Ryo, A. :

Viruses. Vol. 13, No.8, P. 1669, 2021.

II. 副論文

なし

III. 参考論文

1. Highly specific monoclonal antibodies and epitope identification against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein for antigen detection tests.

Yamaoka, Y., Miyakawa, K., Jeremiah, S.S., Funabashi, R., Okudela, K., Kikuchi, S., Katada, J., Wada, A., Takei, T., Nishi, M., Shimizu, K., Ozawa, H., Usuku, S., Kawakami, C., Tanaka, N., **Morita, T.**, Hayashi, H., Mitsui, H., Suzuki, K., Aizawa, D., Yoshimura, Y., Miyazaki, T., Yamazaki, E., Suzuki, T., Kimura, H., Shimizu, H., Okabe, N., Hasegawa, H., Ryo, A. :

Cell Reports Medicine, Vol.2, No.6, p.100311, 2021.

2. Zika virus protease induces caspase-independent pyroptotic cell death by directly cleaving gasdermin D.

Yamaoka, Y., Matsunaga, S., Jeremiah, S.S., Nishi, M., Miyakawa, K., **Morita, T.**, Khatun, H., Shimizu, H., Okabe, N., Kimura, H., Hasegawa, H., Ryo, A. :

Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 534, p. 666-671, 2021.

3. Rapid quantitative screening assay for SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using HiBiT-tagged virus-like particles.

Miyakawa, K., Jeremiah, S.S., Ohtake, N., Matsunaga, S., Yamaoka, Y., Nishi, M., **Morita, T.**, Saji, R., Nishii, M., Kimura, H., Hasegawa, H., Takeuchi, I., Ryo, A. :

Journal of molecular cell biology, Vol.12, No.12, P.987-990, 2020.

4. Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2.

Jeremiah, S.S., Miyakawa, K., **Morita, T.**, Yamaoka, Y., Ryo, A. :

Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 533, No.1, p. 195-200, 2020.