

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： 構造解析・生物進化学による学際融合は、迅速かつ有効なペプチド PPI 創製に有用である
A rational design of helical peptide inhibitors targeting protein-protein interactions based on structural analysis and protein evolution using virus.

研究開発実施期間： 令和 2 年 6 月 1 日～令和 5 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名： 児玉 栄一
Eiichi Kodama

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人 東北大学・災害科学国際研究所・災害感染症学分野 教授
Tohoku University・International Research Institute of Disaster Science・Professor

II 研究開発の概要

【研究概要】 本研究では、タンパク間相互作用 (protein-protein interactions; PPIs) を標的とするペプチドを用いて PPIs 形成過程で生じるタンパクの構造変化と機能発現の制御を可能にする薬剤のデザイン・開発手法の確立を目標とする。投薬手法の多様化や drug delivery system (DDS) の発展により、中分子やペプチドなどの薬剤開発が可能となりつつあり、PPIs を薬剤標的とするペプチドや有機中分子が着目されている。ウイルス膜融合過程で起こる膜融合タンパク (fusion protein; FP) の構造変化は、タンパクの「動き」や「構造変化」を制御する薬剤開発のモデルとして適している。代表者のグループは、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 由来タンパクの PPIs 制御法として α -ヘリックス構造を持つ SC34 等のウイルス膜融合阻害ペプチド開発に成功した。特に α -ヘリックス構造を用いた阻害剤開発では、特定の部位にグルタミン酸 (Glu; E) リジン (Lys; K) を配置し、ヘリックス形成割合を向上させることに成功している (EK モチーフ)。この知見をもとに、麻疹ウイルス (MeV) と RS ウイルス (RSV) を対象とした膜融合阻害ペプチドの開発と汎用性の高い設計戦略確立を目指すとともに、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 治療薬開発に応用する。本研究成果は、タンパクの構造変化と機能発現の制御を可能にする薬剤のデザイン・開発手法の発展に資する。

【研究背景】 過去に開発された多くの治療薬が示すように、酵素阻害剤やレセプターアンタゴニスト/アゴニストの開発は大きな成功を取めた。しかし、PPIsを制御する化合物の開発は未だ発展途上にある。現在、結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡といった構造解析技術を用いて構造変化を部分的に把握することは可能となりつつあるが、タンパクの「動き」や「構造変化」を分子レベルで追跡する技術は存在しない。

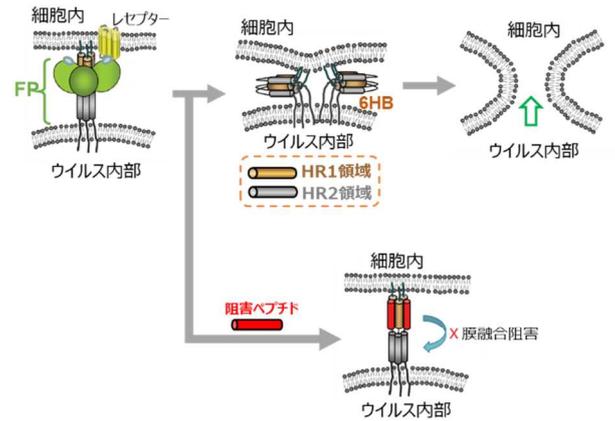
多くのウイルスは自身の遺伝子上にコードされたFPを使って宿主細胞内に侵入する。FPは構造相違により3種類のクラス(I、II及びIII型)に分類される。HIV-1やMeV、RSV、エボラウイルス(EboV)やインフルエンザウイルス、SARS-CoV-2は、いずれもI型FPを有している。I型FPは、宿主レセプターと相互作用した後、構造変化を起こしウイルスの細胞侵入を誘導する(図1)。代表者は、過去にHIV-1のI型FPを標的とした α ヘリックス型膜融合阻害ペプチド(SC34等)の開発と効率的な設計法を考案した。この設計手法はI型FPを有するウイルス全般への応用が可能であり、実際、HIV-1と同じ手法で抗MeVペプチド(M1)の開発に成功した。しかし、M1はMeVのFP上に単一アミノ酸変異の導入によって活性が100倍以上低下する。従って、薬剤耐性獲得に対する抵抗性が極めて高い膜融合阻害ペプチドの設計法を確立する必要がある。また、得られたデータを設計戦略へと還元し、より汎用性があり薬剤耐性を生じにくい膜融合阻害剤設計法の構築を試みた。

【研究成果】

(1) 新規膜融合ペプチドの作用機序及び相互作用様式の解明(児玉・大石・村山・林)

M1と標的タンパクの共結晶化を行い結晶構造解析により三次元構造を解明、詳細な結合様式を明らかにした。M1はN末端に存在する7アミノ酸が非構造部位、それ以降のアミノ酸が α ヘリックス構造を形成し標的タンパクと結合していた。一方で、CDスペクトル解析の結果から、標的タンパクに結合していないM1は特定の構造をとらないことが明らかとなった。すなわち、M1は、標的タンパクと相互作用する過程で α ヘリックス構造を形成する。M1のヘリックス形成とMeVのM1耐性の関連を調べるために、M1にEKモチーフを導入しヘリックス安定性を向上させたペプチド(MEK35GT)のM1耐性MeV変異株(MeV_{M1^R})に対する抗ウイルス活性を評価した結果、MEK35GTはMeV_{M1^R}に対しても高い抗MeV活性を発揮した。これ等の結果から、代表者等はM1の作用機序とMeVの薬剤耐性獲得機構に関して図2に示す仮説を提唱するに至った(論文投稿中)。更に、MEK35GTに対するMeVの耐性獲得機序を解明するために*in vitro*耐性誘導試験を実施し、高濃度MEK35GT存在下で複製可能なMeV変異株の取得に成功した。

a. I型FPによるウイルス膜融合過程と阻害ペプチドの作用機序



b. シード化合物開発におけるペプチド設計戦略

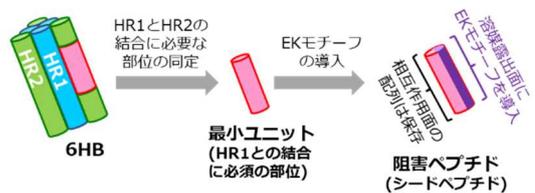


図1：膜融合阻害剤の開発概要 (a) ウイルスがレセプターに結合後、I型FPは構造変化を起こし宿主細胞膜に突き刺さる。更に、FP内のheptad repeat 1および2(HR1およびHR2)と呼ばれる部分構造間が相互作用しsix helix bundle(6HB)を形成する。阻害ペプチドはHR1に結合し6HB形成を阻害する。(b) 阻害ペプチドはHR2領域のアミノ酸配列を基に設計する。まず、HR1との結合に必須のアミノ酸を含む最小ユニットを特定する。その後、最小ユニット内のHR1相互作用面に位置するアミノ酸を保存し、溶媒面に位置するアミノ酸に種々の変異(EKモチーフなど)を導入し、活性の向上や薬物動態の改善を試みる。

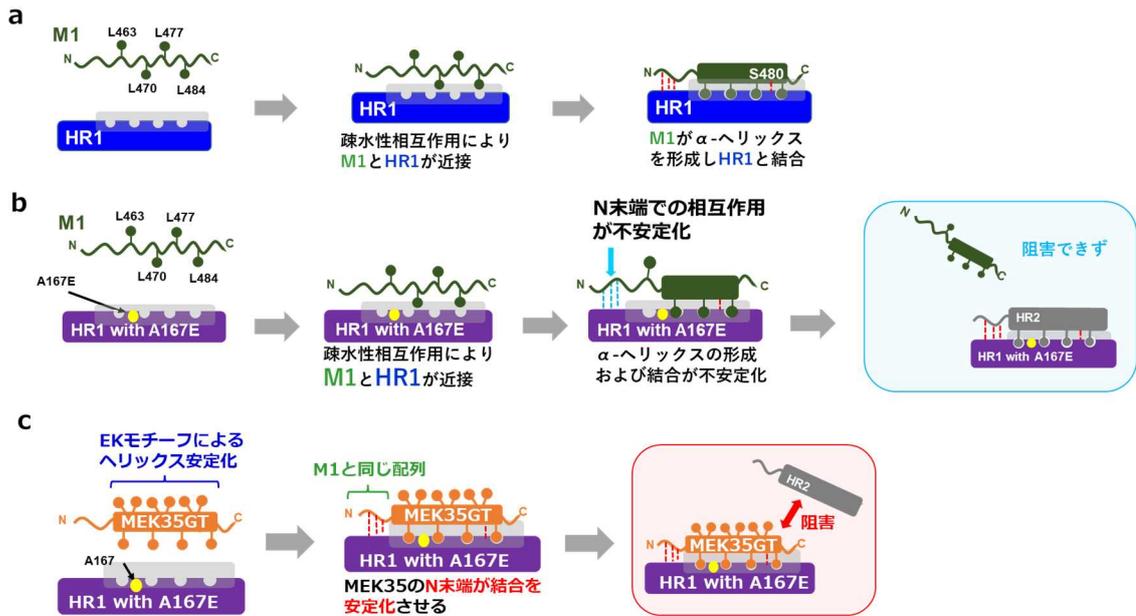


図2：MeVのM1耐性獲得機構とMEK35GTの活性発現機序に関する仮説 (a) M1のHR1結合過程を示す。M1単独でのCDスペクトルの結果、M1は水溶液中で変性状態であった。一方、構造解析結果からHR1と結合するとM1の一部がヘリックス構造を形成していた。M1はHR1と水溶液中で近接し疎水性相互作用を形成しつつ、アミノ酸配列の一部がヘリックス構造へと変化するHR1と結合、更にN末端領域の非構造部位がHR1と相互作用を形成することで安定な複合体を形成する。(b) M1耐性変異であるA167Eは、M1とHR1の結合過程で生じるヘリックス形成を不安定化し非構造部位の結合形成を不安定化することでM1-HR1間結合を阻害する。(c) MEK35GTは、EKモチーフの導入によりヘリックス部位が安定化されているためA167E変異の影響を受けずHR1に結合、その後、非構造部位がHR1と相互作用し安定な複合体を形成する。

(2) 新規MeV阻害ペプチドの設計と活性評価 (児玉・大石・村山・林)

本研究で実施したM1と標的タンパクの結晶構造解析結果を基に43種類のペプチドを設計・合成・活性評価を行い、上述のMEK35GTの開発に成功した。更に、20種類のMEK35GT誘導體から、MEK35GTと同等の抗MeV活性を発揮するMEK28GTを同定した。MEK28GTのN末端に様々な変異を導入したペプチドを設計・合成し活性評価を実施した結果、標的タンパクとの結合に重要なN末端部位のアミノ酸配列を特定できた。これらの結果から、MeVを強力に阻害するペプチドには、非構造領域とαヘリックス構造の組合せが必須である事が明らかになった。I型FPの阻害剤開発は、ヘリックス構造に着目した設計が行われてきたが、本研究成果により非構造領域の重要性が明らかとなり、I型FP阻害ペプチド設計における構造的多様性の拡大に成功した。

(3) 新規RSV阻害ペプチドの設計と活性評価 (児玉・大石・林)

RSVのA2株およびlong株とHep2細胞を用いてペプチドの抗ウイルス活性評価系を構築した(表1)。また、RSV由来I型FP株(RSV-FP)の構造変化に重要なHR1およびHR2領域の相互作用を利用してウイルスを用いない阻害ペプチド活性評価系やペプチドとI型FPに重要なアミノ酸配列(最小ユニット)を特定する実験系(SPICA法; 図3)を確立した。SPICA法を用いて計22種類のアミノ酸配列と標的タンパクの結合評価を実施、CDスペクトルの結果と併せてペプチドの活性に重要なアミノ酸配列の特定に成功した。特定した配列を基に13種類の誘導體とそれら誘導體にEKモチーフを導入した複数のペプチド群(45種類)を設計・合成し、抗ウイルス活性を評価した。結果、サブマイクロモラーの濃度でRSVの複製を抑制する5種類のシードペプチドを取得した(表1; 論文投稿中)。

(4) RSV 阻害ペプチドと RSV-FP の相互作用様式の解明 (児玉・大石・林)

同定したシードペプチド (表 1) に耐性を有する RSV 変異株を取得するために、*in vitro* 耐性誘導試験を実施した。一部のシードペプチドに対しては 100 μM のペプチド存在下で複製可能な耐性ウイルス取得に成功した。現在、配列確認により耐性変異を確認中である。また、既報の三次元構造を基にシードペプチドの構造を予測した結果、シードペプチドは、MeV 阻害ペプチドである MEK35GT や MEK28GT と同様に非構造領域と α ヘリックス領域を有していると示唆された。更に、SPICA 法による検討結果から明らかになった RSV-FP との結合に必須のアミノ酸が、RSV-FP 上のアミノ酸と水素結合や疎水性相互作用を形成することが示唆された。

表 1 シードペプチドの RSV に対する抗ウイルス活性

| Peptides | EC ₅₀ [†] (μM) [pEC ₅₀ \pm SD] | |
|----------|--|----------------------|
| | A2株 | Long株 |
| C45 | 0.74 [6.1 \pm 0.2] | >20 [<4.7] |
| RSP-01 | 0.80 [6.1 \pm 0.2] | 2.0 [5.7 \pm 0.2] |
| RSP-02 | 0.66 [6.2 \pm 0.2] | 1.1 [6.0 \pm 0.0] |
| RSP-03 | 0.86 [6.1 \pm 0.1] | 2.2 [5.7 \pm 0.3] |
| RSP-04 | 0.48 [6.3 \pm 0.2] | 2.0 [5.7 \pm 0.3] |
| RSP-05 | 0.35 [6.5 \pm 0.0] | 0.61 [6.2 \pm 0.1] |

RSV-A2 株、Long 株にサブマイクロモラーで活性を發揮するペプチドを既に取得している。C45 は陽性コントロールとして使用した。[†] EC₅₀ 値はウイルス増殖を 50%抑制する化合物濃度を示す。

(5) MeV 及び RSV の研究成果を基にした膜融合阻害剤デザインの最適化 (大石・村山・林)

I 型 FP の HR1 領域を阻害するペプチド (図 1) の設計には、HR1 および HR2 領域のヘリックス間相互作用が重要であると考えられてきた。本研究成果ではヘリックス構造周辺に位置する非構造領域での相互作用も重要な役割を果たすことを明らかとした。非構造領域は、これまで HR1 領域と定義されてきた部分以外のアミノ酸とも相互作用していた。従って、I 型 FP の HR2 を基に最小ユニットを探索する場合、 α ヘリックス領域の近傍にある非構造領域のアミノ酸配列も考慮した設計が重要となる。また、阻害ペプチドの構造として非構造領域と α ヘリックス領域の両方を有しており、 α ヘリックス構造を安定化する置換基の導入が活性向上に貢献する傾向が明らかとなった。

(6) SARS-CoV-2 阻害ペプチドの設計と活性評価 (児玉・大石・林)

SARS-CoV-2 および VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて抗ウイルス活性評価系を構築した。また、RSV と同様に SARS-CoV-2 由来 FP (SCV2-FP) と結合に必須となる最小ユニットを特定する目的で SPICA 法の構築を行った。SPICA 法を用いて最小ユニットを特定し、レムデシビルと同等のウイルス複製抑制効果を發揮するシードペプチドの同定に成功した。既存の結晶構造解析結果から、最小ユニットは RSV および MeV と同様に非構造領域と α ヘリックス領域を有していたが、これら 2 つのウイルスと比べ α ヘリックス領域が短いという特徴があった。

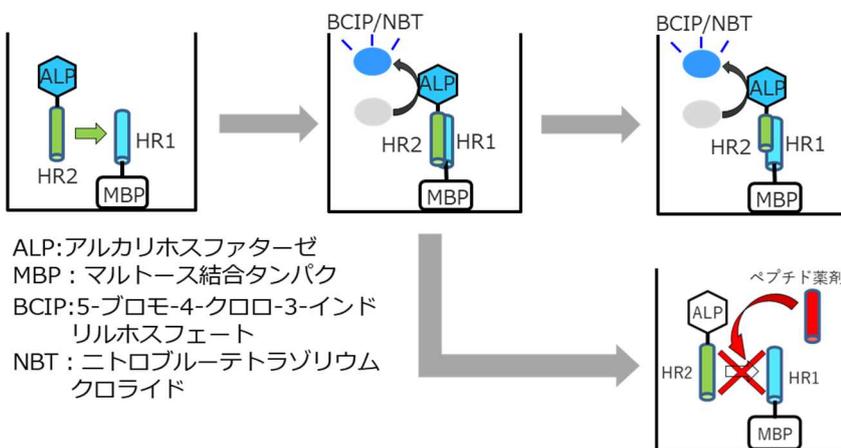


図 3 : SPICA 法の概要 MBP 融合 HR1 (MBP-HR1) と ALP 融合 HR2 (ALP-HR2) を用いて *in vitro* で HR1-HR2 間結合を検出する系を構築した。HR1 に HR2 が結合していた場合、ALP の酵素反応により BCIP が NBT へと変換され青色に呈色する。ALP-HR2 の削除変異体やアミノ酸置換体を作成し、HR1-HR2 間結合を検出することで HR1 と HR2 の結合に必要な不可欠な部位を明らかにした (左図の右上)。また、MBP-HR1 および ALP-HR2 に加え、阻害ペプチドを共存させ、阻害ペプチドの HR1-HR2 間阻害能 (IC₅₀) を測定した。

【意義および重要性】

呼吸器感染症はいったん拡大してしまうとグローバル社会では一気にパンデミックになることは新型コロナウイルスだけでなく 2009 年の新型インフルエンザのパンデミックでも経験済みである。RSV は、小児や高齢者で重症呼吸器感染症を引き起こすが有効な治療法が確立されておらず、少子高齢化が進む本邦では早急に対策を講じるべきウイルスである。MeV に対する効果的なワクチンが開発されているものの、近年、小規模ではあるが依然アウトブレイクが報告されている。MeV は致死性の亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の原因となるが、やはり有効な治療法は確立されていない。本課題では、RSV に対して高い抗ウイルス活性を発揮する膜融合阻害ペプチドを複数同定し、MeV に対しては、強力かつ耐性ウイルスに薬効を発揮できる MEK35GT を開発した。更に、膜融合阻害ペプチドに重要な構造的特徴とその作用機序に加えて、新たな設計指針を構築した。構造学的そして耐性変異を利用した生物進化学的側面をもる本研究成果は、将来起こり得るパンデミックに対する事前の備えとなるだけでなく、現在進行形で問題となっている感染症対策に資する。

α -ヘリックス構造は、生体内のタンパクを構成する二次構造の一つであり、PPI 形成や構造変化に寄与する代表的な構造である。PPI は生体内に約 65 万種が存在すると予想され、そのほとんどが創薬標的として手付かずのままであるため薬剤標的のブルーオーシャンとして注目されている。本研究で構築した SPICA 法はヘリックス-タンパク間の相互作用解析に有用な手法であり、 α ヘリックス間相互作用での PPI を阻害する薬剤の開発を加速度的に促進する重要な技術となる。

【全体研究計画書からの変更・理由】

変更点： R3 年度に分担研究者を追加

理由： 複数のシードペプチド同定と耐性ウイルスに効果を発揮するペプチドの設計が早期に実現したため、本研究をさらに加速するべくペプチド構造解析の面からの相互作用、作用機序の解明にかかわる研究者を新たに加えた。この研究推進力の増強は、耐性出現を許さない抗 MeV ペプチドや抗 RSV ペプチドの開発に役立つだけでなく、SARS-CoV-2 に効果を示すペプチド創製にも資する。

Most biological processes are controlled by protein-ligand interactions (PLIs) and protein-protein interactions (PPIs). There are approximately 650,000 PPIs in humans, although proteins encoded in genome are 200,000. Recently, drug discovery for PPI is highlighted. However, the development of PPI inhibitors remains challenging. α -Helix is one of the secondary structures constructing proteins and plays an important role for PPIs. Indeed, over 30% of proteins include α -helix in nature. Thus, the rational design for PPI inhibitors with α -helix contributes to establishing novel approaches for medical diagnostics of health and disease and developing new molecular therapeutics.

The viral entry process needs interaction with viral and host-cell surface proteins, resulting in viral fusion. Viral fusion proteins (FPs) play a key role in viral membrane fusion to the host cell membrane and are classified into three types (class I, II, and III) by the difference in fusion mechanisms. Class I FP induces the membrane fusion by interacting between helical domains located at N and C termini of the FP. Previously, we have developed the peptide-based fusion inhibitors inhibiting helix-helix interactions (HHIs) of class I FP from human immunodeficiency virus type I (HIV-1). Here, we aimed to further develop a rational design for class I FP inhibitors blocking HHIs by targeting respiratory syncytial (RSV), measles (MeV), and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as model viruses.

We established in vitro screening systems to identify seed peptides that were required to block helix-helix interaction by peptide inhibitors. Using the systems, we identified several seed peptides which exerted potent activities against each targeting virus. MEK35GT and -28GT inhibited MeV replication. Five peptides (RSP-01 to -05) were identified as RSV fusion inhibitors. SCP-01 was peptide-based SARS-CoV-2 inhibitor. Using MEK35GT and other several derivatives, we also identified that a combination of the disordered and helical region in peptide-based inhibitors was important to exert antiviral activity against not only wild-type MeV but also drug-resistant MeV mutants. This structural feature was shared with peptide inhibitors against RSV and SARS-CoV-2. Furthermore, we could propose a model for the inhibition process of peptide-based MeV inhibitors; the antiviral process of the MeV inhibitor involves three steps: (i) unstructured peptide inhibitor interacts with the MeV FP; (ii) the peptide inhibitor adopts a helical conformation and binds to MeV FP through hydrophobic interactions; and (iii) subsequent interactions involving the N-terminal disordered region gives rise to a tight inhibitor-FP interaction. These results contribute to the expansion of structural diversity for the design of peptide-based fusion inhibitors. Additionally, we induced the drug-resistant viruses against the identified inhibitors against RSV and MeV. Mechanisms of resistance to these peptides may provide a strategy for design of novel peptide-based viral fusion inhibitors.

In conclusion, we identified various peptide fusion inhibitors against RSV, MeV, and SARS-CoV-2. Moreover, we also revealed structural features and inhibition mechanisms of peptide-based viral entry inhibitors. These results enable us to develop not only a rational design of viral entry inhibitors but also of PPI inhibitors targeting HHIs.