

SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼの高活性阻害剤開発に向けた X線結晶構造解析

Crystal structure analysis of SARS-CoV-2 3CL protease complexed with inhibitors

千田美紀¹, 今野翔², 林良雄², 千田俊哉^{1,*}

¹ 高エネ機構, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

² 東京薬科大学, 〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1

Miki Senda¹, Sho Konno², Yoshio Hayashi² and Toshiya Senda^{1,*}

¹ Photon Factory, KEK, 1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan

² Department of Medicinal Chemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

1 はじめに

世界中で SARS-CoV-2 に対する薬剤開発が進んでいる。抗ウイルス剤開発のターゲットとしては、細胞への接着と取り込み阻害、遺伝情報転写阻害、プロテアーゼ阻害、ウイルス粒子形成阻害、ウイルス粒子放出阻害、ウイルスタンパク質と相互作用するヒトのタンパク質の阻害などが挙げられるが、その中でもプロテアーゼ阻害剤は AIDS や C 型肝炎の特効薬にもなっておりウイルスの阻害剤開発の最もポピュラーなターゲットのひとつである。3CL プロテアーゼは SARS-CoV-2 の複製に必須であり、その働きを阻害することはウイルスの増殖阻害に直結するため、世界中の多くのグループが 3CL プロテアーゼの阻害剤開発を進めている。林らのグループでは、3CL プロテアーゼがグルタミン残基を特異的に認識し切断するというユニークな特徴に着目し、明確な競合阻害メカニズムに基づくアリアルケトン型 SARS-CoV の 3CL プロテアーゼ阻害剤 YH-53 を開発した [1]。また、SARS-CoV と SARS-CoV-2 との間のプロテアーゼ相同性は 96% と極めて高く、YH-53 は SARS-CoV-2 に対しても強力な 3CL プロテアーゼ阻害活性を示すことが明らかになった。アリアルケトン型阻害剤は、活性中心のシステイン残基の SH 基と可逆的なヘミチオケタール構造を形成し、3CL プロテアーゼを強力かつ競合的に阻害するため副作用が起きにくいと考えられており、酵素阻害剤の創薬において理想的で優れた特徴を持つ。本研究では、3CL プロテアーゼに対する阻害活性をもつ YH-53 のほか SH-5 などの阻害剤と 3CL プロテアーゼとの複合体を X 線結晶構造解析で明らかにし、それらの構造情報を利用することにより阻害剤の構造最適化を進めていく。また、ウイルスの変異により阻害剤の効果が無効化されることを防ぐために、構造的見地、分子進化化学的見地から頑強性を持つ阻害剤の開発を試みたいと考えている。

2 実験

【結晶化】

3CL プロテアーゼと YH-53 との複合体の結晶化スクリーニングは、高エネルギー加速器研究機構・構造生物学研究センターの結晶化ロボット PXS [2] を用いて行った。その結果、沈殿剤として PEG4000 を含む結晶化条件で約 0.1mm の大きさの板状晶を得ることができた (図 1)。SH-5 との複合体の共結晶化は、YH-53 複合体の結晶化条件周辺で行い、約 0.1mm 程度の針状晶を得た。

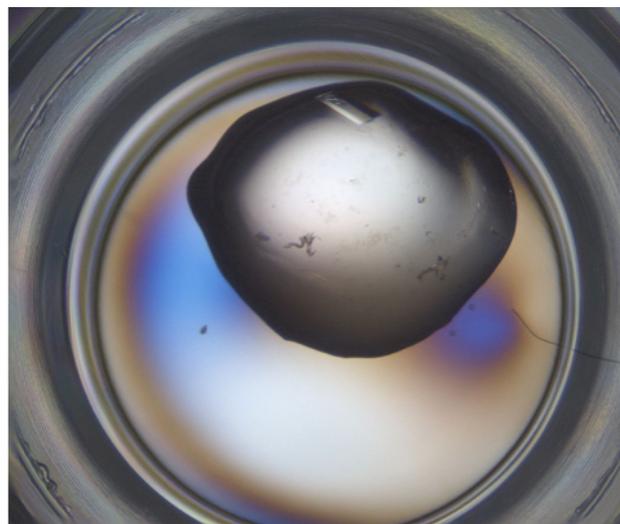


図 1: Crystals of the 3CL protease-YH-53 complex

【X線回折データの収集】

はじめに YH-53 複合体結晶についてクライオ条件の検討を行った結果、エチレングリコールを用いた場合に 1.65 Å の回折が生じることが明らかになった。SH-5 複合体についてもクライオプロテクタントとしてエチレングリコールを用いることで 2.15 Å 分解能のデータが収集できた。全自動測定を積極的に利用し主に BL-17A でデータ収集を行った。

【構造決定】

位相決定は、既存の 3CL プロテアーゼ (PDB ID: 6Y2F) をモデルとして用いた分子置換法を行った。Phenix.refine を用いた構造精密化の結果、活性中心に YH-53 及び SH-5 の明瞭な電子密度が確認でき、Cys145 と共有結合することでヘミチオケタール構造を形成していることが明らかになった (図 2) [3]。

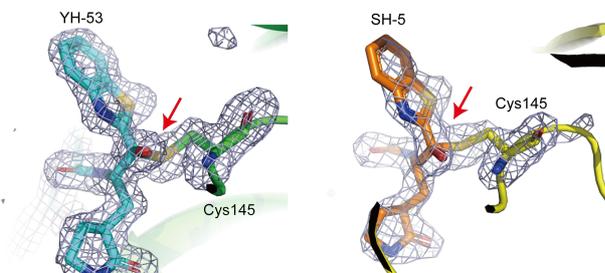


図 2: Simulated Annealing (SA) omit maps of Cys145, YH-53 and SH-5 (3sigma)

3 結果および考察

Apo 型と阻害剤複合体との構造の比較を行った結果、YH-53 の結合に伴い、ループ領域 (残基番号 188-194) が大きく構造変化していた (図 3)。

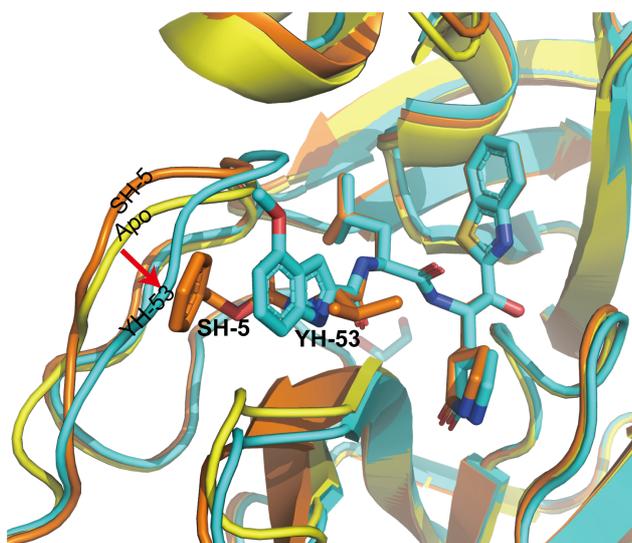


図 3: Superposition of Apo, YH-53 and SH-5 complexes

2021 年 2 月時点で PDB に登録されていた 345 個の SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ-阻害剤複合体の中で、ループ領域の構造が YH-53 と類似しているものはわずかに 12 構造のみであった [3]。

細胞を用いた実験の結果、YH-53 は薬剤として高いポテンシャルを持つ化合物であることが明らかとなった。しかし、P-gp による排出が強く疑われたため、今後はクライオ電顕による構造解析で P-gp と YH-53 との相互作用を明らかにし、P-gp に排出されない阻害剤の合理的設計を行いたいと考えている。

4 まとめ

PF の構造生物学ビームライン BL-17A で SARS-CoV-2 の 3CL プロテアーゼとその阻害剤である YH-53, SH-5 との複合体結晶から X 線回折データを収集し、それぞれ 1.65 Å, 2.15 Å 分解能で結晶構造を決定した。その結果、活性中心のシステイン残基と阻害剤が共有結合することでヘミチオケタール構造を形成していることが明らかになった。

参考文献

- [1] Thanigaimalai *et al.*, Eur J Med Chem. 68, 372-384, 2013.
- [2] Kato *et al.*, Acta F 77, 29-36, 2021.
- [3] Konno *et al.*, J. Med. Chem., 65, 2926-2939, 2021.

* toshiya.senda@kek.jp