

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「異分野融合による新型コロナウイルスを
はじめとした感染症との共生に資する技術基盤の
創生」
研究課題「GTP 代謝制御によるウイルス複製阻害
技術の開発」

研究終了報告書

研究期間 2021年02月～2024年03月

研究代表者：千田 俊哉
(高エネルギー加速器研究機構 物質
構造科学研究所 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

本研究では一般的な抗ウイルス薬の開発を目指し、ウイルスの生活環を阻害する化合物を開発するのではなく、宿主である人体の方にその作用点を求める手法を検討した。具体的には、我々の GTP 代謝研究の成果を応用し、細胞内の GTP センサーである PI5P4K β や IMPDH2 という GTP エネルギー代謝の鍵分子を阻害して宿主細胞の GTP エネルギー代謝を制御し、ウイルスの複製を抑えることを試みた。同時に、SARS-CoV-2 の 3CL プロテアーゼの阻害剤開発も進め、両者の併用も視野に入れウイルス治療に革新をもたらすことを狙った。

ウイルス感染細胞のメタボローム解析から、SARS-CoV-2（デルタ株とオミクロン株）の感染によって細胞内のグルタチオンレベルが低下し酸化ストレスの増加につながる可能性が示唆されるとともに、核酸代謝にも変化が見られ GTP の顕著な増加が起こった。これらは、ウイルス感染が細胞内の代謝経路に影響を与えていることを示すもので、これまでの GTP 代謝研究の結果を総合すると、PI5P4K β の阻害し GTP 代謝を制御することで抗ウイルス活性を発揮させられる可能性があることを強く示唆するものであった。実際に我々が開発した PI5P4K β 阻害剤である Link15 および Link17 をウイルスの感染細胞に対して作用させたところ、細胞毒性を示さずに SARS-CoV-2 および A 型インフルエンザウイルスの感染も阻害することがわかった。感染した細胞ではウイルスの mRNA が細胞内に蓄積しても、ウイルスタンパク質の翻訳が減っていること、多くのウイルスが利用するエンドサイトーシス経路も阻害されることが明らかになり、PI5P4K β がパンスペクトラムな抗ウイルス薬開発に適した分子標的となる可能性が示された。さらに強力な阻害剤を開発するために、次世代阻害剤の開発を各種阻害剤と PI5P4K β の複合体結晶構造に基づき進めている。また、PI5P4K β の阻害剤開発の基礎となる本酵素の GTP 認識機構の獲得を結晶構造のみならずデータベース探索や分子進化も含めて解析し、ごく短いフラグメント（GEA モチーフ）により GTP 認識がおこなわれていることを明らかにしている。

GTP 合成を抑える IMPDH2 の阻害剤に関してもアロステリック阻害剤の開発を進め、インシリコスクリーニングと NMR バリデーションを組み合わせ、数個の有望な阻害剤候補を得た。これらの化合物は IMPDH2 の活性を完全には阻害しないため、アロステリック阻害剤である可能性が高いと判断された。クライオ電顕を利用した単粒子解析と結晶構造解析から、本阻害剤は活性調節ドメインの Site 1 と呼ばれる領域に結合することがわかり、アロステリック阻害剤であることが確かめられた。

また、SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ（3CLpro）阻害剤 YH-53 に関しても、これを元にした activity-based probe（ABP）の開発、不可逆的に 3CLpro を阻害する YH-200 シリーズの合成をおこなったところ、YH-200 の強力な抗ウイルス活性が明らかになった。さらに、ニルマトレルビルの母骨格に YH-200 の warhead を導入した TUP-4 は、ニルマトレルビルより約 2 倍強い抗ウイルス活性を示すことがわかった。さらに、これまで 3CLpro 阻害剤は成熟化した 3CLpro のみ阻害すると考えられていたが、我々の TUP-4 は成熟化の初期段階から阻害可能であることが示唆された。不可逆的阻害剤やプローブの可能性を見出した本研究は、既存薬を上回る抗ウイルス薬の創製だけでなく、3CLpro が感染細胞内で引き起こす現象の

解明につながると期待している。また、3CLpro 阻害剤の作用部位は、分子進化的な解析から、変異の見られる部位ではなく、ターゲットとして適切であることも示されている。

(2)顕著な成果
＜優れた基礎研究としての成果＞

1. PI5P4K β 阻害が SARS-CoV-2、A 型インフルエンザウイルスの増殖を阻害することを発見

概要：パンスペクトラムな抗ウイルス薬の開発には、多様なウイルス間で共通して利用される宿主遺伝子を同定し、分子標的とすることが必須である。本研究では、PI5P4K β を阻害することで、SARS-CoV-2 だけでなく、A 型インフルエンザウイルス感染も阻害できることを明らかにした。PI5P4K β は、PI5P4K α と共にウイルス粒子のエンドサイトーシスに関与することを明らかにしたとともに、ウイルスタンパク質の翻訳も減少していることを捉えている。

2. SARS-CoV-2 の感染による細胞内の代謝変化をとらえた点

概要：代謝解析から、SARS-CoV-2（デルタ株とオミクロン株）感染によって細胞内のグルタチオン（GSH）レベルが低下することや、GTP の顕著な増加が起こることを見いだした。生化学的なデータを照らし合わせると、ウイルスが IMPDH2 の活性制御をハイジャックし、GTP 合成を増大させ、PI5P4K β を活性化させるなど自身の増幅を高めるシステムが想定された。これらの成果は、本プロジェクトで検証を狙う GTP 代謝を標的としたウイルス感染防御メカニズムの POC ともいえるものであり、今後の研究開発への重要な基礎データとなると考えられる。

3. IMPDH2 の活性調節機構の解明とアロステリック阻害剤を開発した点

概要：IMPDH2 に関しても活性制御に関わる Bateman ドメインを標的とし、アロステリックに IMPDH2 活性を制御する化合物の取得に成功した。得られた化合物は、IMPDH2 の活性を介するウイルス感染機構の解明に活用できると期待されるだけでなく、不明な点が多い IMPDH2 の細胞機能の解明にも資する極めて重要なツールとなる。また、その過程で、IMPDH2 の Bateman ドメインに存在する 3 ヶ所の GTP/ATP 結合部位がそれぞれ異なる GTP/ATP 特異性を示すとともに、各サイトへのヌクレオチドの結合が協同性を示すことを明らかにした。このことは GTP 合成のカギ酵素である IMPDH2 の環境に応じた精緻な活性制御メカニズムの解明につながる重要な知見である。

＜科学技術イノベーションに大きく寄与する成果＞

1. FTY720 のドラッグリポジショニングの可能性の発見

概要：免疫抑制剤として臨床応用に投入されている KRP203 と FTY720 がイノシトールリン脂質キナーゼの活性を攪乱する新規活性を持つことを見いだした。KRP203 は免疫抑制剤として知られ、FTY720 は結節性硬化症の治療で使用されている。両化合物とも、イノシトールリン脂質シグナリング経路に影響を与えることから、ウイルス感染への新しい治療戦略につながる可能性が示された。特に、FTY720 を用いた実験から、SARS-CoV-2 ウイルス量を減少させる効果が確認された。FTY720 の

ドラッグリポジショニングにより、新たなウイルス感染治療薬となる可能性が示された。

2. 3CLpro に対する不可逆的な阻害剤の開発

概要：複数の 3CLpro 阻害剤や機能性分子を開発する中で、3CLpro に対して不可逆的な阻害活性を示し、既存薬であるニルマトレルビルより強力な抗ウイルス活性を有する TUP-4 の開発に成功した。また、3CLpro の成熟化過程に着目した成熟化阻害実験から TUP-4 がニルマトレルビルより強力に 3CLpro の成熟化を阻害することを明らかにした。本結果は、3CLpro 阻害剤の新たな一面であり、今後の阻害剤設計における重要な知見となる。

3. 新型コロナウイルスのゲノム変異解析のためのバイオインフォマティクス解析パイプライン構築

概要：新型コロナウイルスのゲノム変異を効率的に解析するためのバイオインフォマティクス解析パイプラインを構築し、それを週 2 回ほど運用して常に最新の変異に関する情報を収集した。更に、そのデータマネージメントの仕組みなどについても検討し、効率的に行える環境について提唱した。また、そのデータをもとに様々なチームと共同研究を進め、ゲノム変異がウイルスの性状に与える影響について、また、ウイルスの日本国内の流行伝播について明らかにしてきた。

<代表的な論文>

1. The GTP responsiveness of PI5P4K β evolved from a compromised trade-off between activity and specificity. Takeuchi K*, Ikeda Y, Senda M, Harada A, Okuwaki K, Fukuzawa K, Nakagawa S, Yu HY, Nagase L, Imai M, Sasaki M, Lo YH, Ito D, Osaka N, Fujii Y, Sasaki AT*, Senda T*. *Structure* **30**, 886-899. (2022) (Selected as the top cover of the issue)

概要：本研究では、PI5P4K β 阻害によりウイルス増殖阻害が引き起こされることを実証するために PI5P4K β 阻害剤の取得を行ってきた。これらの論文においては、PI5P4K β の特異な GTP 認識機構がどのように進化的に成立したかを明らかにした。構造生物学、生化学、遺伝学的解析を行うことで、GTP 結合ポケットの最深部に位置する 2 つのアミノ酸残基の変異が、PI5P4K β の GTP 認識の成立に特に重要であることが示された。本研究の成果は、これらのアミノ酸を含む GTP 結合部位を標的とする我々の PI5P4K β 阻害剤の構築戦略が、有効であったことをさらに明確化するものである。

2. Multimodal action of KRP203 on phosphoinositide kinases in vitro and in cells. Ikeda Y, Mindy I. D, Sumita K, Zheng Y, Kofuji S, Sasaki M, Hirota Y, Pragani R, Shen M, Boxer M, Takeuchi K, Senda T, Simeonov A, Sasaki AT. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* **679**: 116-121 (2023)

概要：ホスホイノシチドシグナル伝達経路は、がんや感染症の病理に深い関連がある。これまで、「一薬剤一標的」アプローチによるイノシトールリン脂質代謝酵素の阻害薬が開発されてきた。しかし「一薬剤多標的」のアプローチについては知見が乏しい。本研究では、免疫抑制剤 KRP203 がイノシトールリン脂質代謝ネットワークを構成する

複数の酵素分子種に対して活性化および抑制化など、多様な作用を示すことを見いだした。KRP203 のもつ新規の生理活性により、ホスホイノシチドシグナル伝達経路を多角的に標的とした治療開発の可能性が示唆された。がん治療において新たな展望を提供するとともに、ウイルス感染等、他の疾患への治療戦略にも示唆を与える発見となった。

§2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

グループ名	氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
構造解析(千田)グループ	千田俊哉	高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所教授	GTP代謝制御によるウイルス複製阻害技術の開発
生化学・インシリコ解析(竹内)グループ	竹内 恒	東京大学大学院薬学系研究科 教授	PI5P4K β 及び IMPDH2 の次世代阻害剤の開発
GTP 代謝制御解析(佐々木)グループ	佐々木敦朗	慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科(先端生命科学研究所) 特任教授	ウイルス増殖の阻害を促すGTP代謝制御
3CL 阻害剤開発(林)グループ	林 良雄	東京薬科大学生命科学部 教授	3CLプロテアーゼ阻害剤の開発とPROTACなどへの展開
SARS-CoV-2 解析(川口)グループ	川口敦史	筑波大学医学医療系 教授	SARS-CoV-2感染によるタンパク質合成恒常性維持破綻機構の解析
分子進化解析(中川)グループ	中川 草	東海大学医学部 准教授	創薬の為のSARS-CoV-2の分子進化解析

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

PI5P4K β 阻害剤開発中に取得した KRP203 を解析するなか国内外の研究者との連携が形成された。国外においては、米国国立衛生研究所の National Center for Advancing Translational Sciences (NCAT)、コーネル大学医学部、シンシナティ大学のグループ、国内においては東京医科歯科大学、広島大学、芝浦工業大学のグループとの連携である。ここに我々のグループである KEK・東京大学・慶應義塾大学を含め、9つの研究機関の連携によるネットワークが形成により、KRP203 における最初の論文を報告した (Ikeda *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2023)。KRP203 および FTY720 の細胞内における作用、抗ウイルス作用についてのプロジェクトも目下進めており、日米でのさらに大きな規模のネットワーク形成が展開されている。

川口 G と林 G の共同研究として、ドイツ・ボン大学の Prof Michael Guetschow と連携を開始し、SARS-CoV-2 の 3CL プロテアーゼに対する抗ウイルス薬開発を進めている。R5 年度では、ボン大学から筑波大学に大学院生 1 名が 2 か月間派遣され、化合物スクリーニングを進めている。

PI5P4K β による GTP の認識機構やその進化を扱った論文において、結晶構造を元にした

量子化学計算を行なった。具体的には、PI5P4K β と基質との間の相互作用メカニズムを明らかにするために、大阪大学の薬学研究科の福澤教授に結晶構造に基づいた量子力学的計算（フラグメント分子軌道法（FMO））を依頼した。その結果、各原子の結合へのエネルギー的寄与が明らかになった。本研究の成果は Takeuchi *et al.* **Structure** (2022), Takeuchi *et al.* **FEBS J** (2023) に論文として発表もされており、PI5P4K β 化合物の活性強化にも活用することが可能であることから継続的な研究開発を共同で進めている。