薬理学および薬学年報

研究の

公開日：2021年6月18日

SARS-CoV-2コロナウイルススパイクタンパク質の変異体のヒト受容体への結合の阻害、二酸化塩素

緒方*および三浦隆典

研究開発部、大幸薬品株式会社、株式会社、日本

要約

目的：新しいコロナウイルス、SARS-CoV-2によって引き起こされるCOVID-19は、進行中の世界的な大流行となっています。人口保護するために、安全で強力な殺ウイルス消毒システムが緊急に必要とさをウイルスかられています。二酸化塩素（ClO2）は、両方を不活化することが知られている強力な消毒剤ですウイルスと細菌の。この研究の目的は、二酸化塩素の阻害するかどうかを調査するが、スパイクタンパク質（Sタンパク質）の受容体結合ドメインの変異コロナウイルス結合をことでした。（英国および南アフリカの変異体）からヒト受容体であるアンジオテンシン変換酵素2（ACE2）へ。

材料と方法：*インビトロ*の精製された受容体結合結合を決定するための実験スパイクタンパク質ドメインのACE2へのは、さまざまな濃度の存在下で実施されました二酸化塩素の。英国および南アフリカの亜種から精製されたスパイクタンパク質が使用されました。マイクロタイタープレートにコーティングされたスパイクタンパク質は、二酸化塩素水溶液または二酸化塩素スプレー溶液で処理されました。

結果：バリアントスパイクタンパク質の結合は、濃度依存的に阻害されました（50%阻害濃度（IC50）は、英国および南アフリカの7.6 μmol / Lおよび5.8μmol / Lバリアントでそれぞれ）。

結論：これらの発見は、二酸化塩素水溶液結合不活性化できることをがバリアントスパイクタンパク質のヒトACE2受容体タンパク質へのを示しており、この戦略がするの可能性ことを示していバリアントSARS-CoV-2ウイルスの感染を阻止に役立つがあります。

オープンアクセス

*連絡先：

尾形典男、大幸薬品株式会社研究開発部、*1-2-1*光台、精華町、*619-0237*京都、

日本、*Tel*：*81 774 98 2716;*ファックス：*81 774 98 2737;*

電子メール：*nogata7@yahoo.co.jpT.SARS*

受信日：*2021*年*5*月*21*日

承認日：*2021*年*6*月*16*日

公開日：*2021*年*6*月*18*日

引用：

緒方*N*、三浦*-CoV-2*コロナウイルスの変異体の結合の阻害二酸化塩素によるヒト受容体へのスパイクタンパク質。アンファーマコルファーム。*2021; 6*（*1*）：*1199*

著作権 ©*2021*則夫緒方。これは、クリエイティブ・コモンズ表示ライセンスの下で配布されるオープンアクセスの記事であり、元の作品が適切に引用されている限り、あらゆる媒体での無制限の使用、配布、および複製を許可します。

キーワード：二酸化塩素; **COVID-19**（新型コロナウイルス感染症;

SARS-CoV-2;ウイルス;消毒; **IC50**

はじめに

コロナウイルス病2019（COVID-19）は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（SARS-CoV-2）によって引き起こされ、2019年後半の出現以来深刻な健康問題になっています[1,2]。この病気の発生は、中国の湖北省武漢で発生し、その後急速に世界中に広がりました[2]。COVID-19パンデミックは2020年に国際緊急事態と宣言されました[3]。2021年5月の時点で、COVID-19による世界の死亡者数は約330万人と推定されています[4]。SARS-CoV-2はエンベロープウイルスであり、29.9キロベースの一本鎖ネガティブセンスRNAゲノムを持っています[5]。このウイルスは、I型およびII型肺細胞、内皮細胞、繊毛気管支上皮細胞の宿主細胞表面に付着します[6]。この病気に対するいくつかのワクチンがすでに開発され、投与されていますが[7]、パンデミックはまだ終わっていません。さらに、現在、SARS-CoV-2ウイルスのバリアントタイプがイギリス（B.1.1.7バリアント）および南アフリカ（バリアントB.1.351）から報告されており、元のウイルスよりも容易に拡散するようです[8]。これらの変異体は両方とも、スパイクタンパク質（Sタンパク質）の受容体結合ドメイン（RBD）に共通の変異（N501Y）を持っています[5]。この変異は、スパイクタンパク質がヒト細胞表面受容体であるアンジオテンシン変換酵素2（ACE2）、カルボキシペプチダーゼ活性を持つI型膜貫通糖タンパク質に結合する際に重要です[5]。

COVID-19の蔓延を抑えるには、新しい抗ウイルス薬やワクチンと一緒に、ウイルスに対する安全で効果的な消毒剤を開発して配備することが不可欠です[8]。エタノールはウイルスに対して効果的であることが知られていますが[9]、空気中に存在するウイルスを根絶することはできません。二酸化塩素（ClO2）（CD）は、室温で水溶性の黄色いガスであり、安定したフリーラジカルです[10]。CDは、ウイルスとバクテリアの両方を不活化するためのガスまたは水溶液として使用できます[11-15]。微生物に対するCDの強力な消毒作用は、タンパク質に対する強力な酸化活性によるものです[16]。さらに、CDの安全で許容可能な濃度は、十分に文書化されています

[17]。ここでは、CD水溶液、英国と南アフリカの両方の変異体のスパイクタンパク質のヒトACE2への結合を不活化できることを示しが*in vitro* 実験で、SARS-CoV-2ウイルスの感染を阻害するのに有効である可能性を示唆しています。

材料と方法

化学物質

CDは、以前に説明したように[16]、私たちの研究室で調製し、精製水に溶解し、しっかりと蓋をした琥珀色のボトルに4ºCで保存しました。ストックCDは、使用直前に精製水で目的の濃度に希釈しました。 Cleverin（大幸薬品、大阪、日本）のブランド名で販売されている市販のCDスプレー溶液もテストされました。クレベリンの組成は、1.48ミリモル/ LのCD、66.34ミリモル/ Lの亜塩素酸ナトリウム、8.70ミリモル/ Lのリン酸二水素ナトリウム、0.24％（重量/重量）のデカグリセロールモノラウレート、0.06％のシリコーンおよび98.97％の水、pH6.01であった。 3年前に製造され、室温に保たれ、光から保護された、しっかりと蓋をされたスプレー溶液のボトルが使用された。実験時のスプレー溶液のCD濃度は1.80mmol / L（121 ppm（重量/重量））でした。スプレー溶液は、実験の直前に必要に応じて精製水で希釈しました。

結合アッセイ

スパイクタンパク質結合アッセイキットは、BPS Bioscience（San Diego、California、USA）から購入しました。英国と南アフリカのバリアントアッセイのキットコードは、それぞれ78140と78151でした。キットは、対応するバリアントウイルスに由来するスパイクタンパク質の精製された受容体結合ドメイン（RBD）で構成されていました。キットは、いくつかの変更を加えて、メーカーの推奨に従って使用されました。キットで提供されるスパイクタンパク質RBDは、最初に、マニュアルに示されているように、キットの96ウェルマイクロタイタープレートにコーティングされました。適切な濃度に希釈したCDまたはCDスプレー溶液の50μLアリコートを各ウェルに入れ、25ºCで5分間インキュベートしました。次に、キットに含まれているブロッキングバッファー2中の10 mmol / Lチオ硫酸ナトリウムの20μLアリコートを各ウェルに添加して、CDとタンパク質の反応を停止させました。この条件下では、CDは急速にClO2-に変換され、タンパク質と反応しなくなります[16]。次に、ブロッキングバッファー2で1.5 μg / mLに希釈したビオチン標識ACE2の35μLアリコートを各ウェルに添加しました。次に、ビオチン標識ACE2をストレプトアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼに結合させ、キットに含まれている西洋ワサビペルオキシダーゼの基質を使用して検出しました。化学発光シグナルは、ルミノメーター（モデルSH-9000;コロナエレクトリック、ひたちなか、茨城、日本）を使用して1分後に測定されました。 CDの各濃度を4つのウェルでアッセイしました（n = 4）。化学発光強度は実験間で変動したため、最終データは正規化されました（つまり、0 μg / ml CDを100％として）。

結果と考察

図1に示すように、スパイクタンパク質RBDへのヒトACE2タンパク質の結合強度は、CDの濃度の増加とともに減少しました。 50％の結合阻害（IC50）を与えるのに必要なCD水溶液の濃度は、英国と南アフリカのバリアントでそれぞれ7.6 μmol / Lと5.8μmol / Lでした（表1）。 CDの抑制効果は、CDスプレー溶液を使用しても観察されました（図2）。具体的には、ACE2のスパイクタンパク質RBDへの結合のIC50は、英国と南アフリカのバリアントでそれぞれ15.3 μmol / Lと4.7μmol / Lでした（表1）。さらに、ウーハン株スパイクタンパク質RBDのACE2への結合も、IC50が6.5 μmol / LのCD水溶液によって阻害されました。

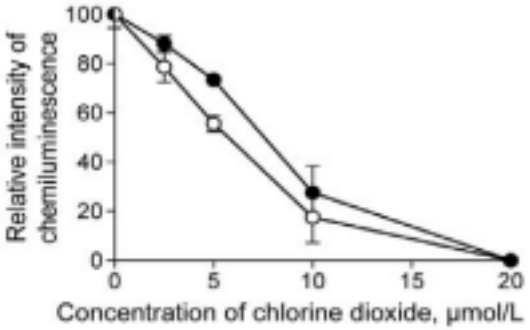

図1：受容体結合ドメインの結合に対する二酸化塩素（CD）水溶液の影響（におけるSARSCoV-2ウイルスのスパイクタンパク質の変異体のヒトアンジオテンシン変換酵素2（ACE2）へのRBD） インビトロ 実験。英国の変異体（黒丸）と南アフリカの変異体（白丸）のスパイクタンパク質のACE2への結合が示されています。各点は、4回の実験の平均±標準偏差を表します（n = 4）。

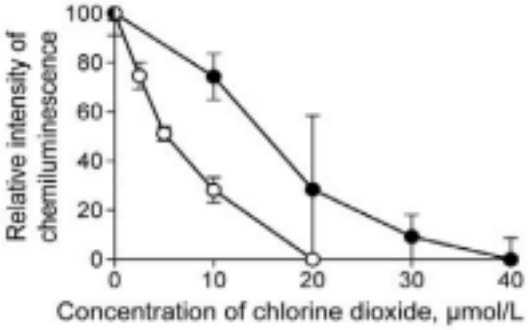

図2：におけるSARS CoV-2ウイルスのスパイクタンパク質の変異体の受容体結合ドメイン（RBD）のヒトアンジオテンシン変換酵素2（ACE2）への結合に対する二酸化塩素（CD）スプレー溶液の影響 *in vitro* 実験。英国の変異体（黒丸）と南アフリカの変異体（白丸）のスパイクタンパク質のACE2への結合が示されています。各点は、4回の実験の平均±標準偏差を表します（n = 4）。

表1： バリアントSARS-CoV-2スパイクタンパク質（Sタンパク質）の受容体結合ドメインのヒト受容体タンパク質ACE2への結合を50％（IC50）阻害するために必要な二酸化塩素（CD）水溶液の濃度を示します。

	IC_{50} (μmol / L)
に対するCD水溶液	
英国のバリアント	7.6
南アフリカのバリアント	5.8
に対するCDスプレー溶液	
英国のバリアント	15.3
南アフリカのバリアント	4.7

スパイクタンパク質受容体結合ドメイン（RBD）のバリアントは、二酸化塩素（CD）水溶液またはさまざまな濃度のCDスプレー溶液を、受容体タンパク質ACE2への結合能力についてアッセイしました

（Ogata N、未発表データ）。これらの実験では、CD水溶液とCDスプレー溶液の抑制効果にわずかな違いがありました。観察された違いは、スプレー溶液中の他の成分の影響によるものである可能性があり、これらは製品の貯蔵寿命を延ばすために追加されます。これらの結果は、すべてのCD溶液がSARS-CoV-2ウイルスのヒト細胞受容体ACE2への結合を不活性化するのに効果的である

ことを示唆しています。そのため、CDはウイルスの感染を抑制する作用がある可能性があります。

SARS-CoV-2ウイルスのスパイクタンパク質RBDは、S1、スパイクタンパク質サブユニット、およびACE2と相互作用するRBDの領域は、25アミノ酸残基の小さなパッチで構成されています[18]。

両方のウイルス変異体でチロシンに変異しているアスパラギン501（N501）残基は、スパイクタンパク質のRBDパッチ領域の一部を形成します[5]。 N501Y変異は、ヒトACE2への結合親和性を高めることにより、ウイルスの伝染性を高めると考えられています[18]。さらに、この突然変異により、ウイルスがウイルスに対して産生された多くの抗体から逃れることができ[18]、SARS-CoV-2ウイルスのこれらの変異株に対するワクチンの有効性が低いことを示唆していることは注目に値します。我々は以前、武漢株のスパイクタンパク質RBDのヒトACE2への結合がCD水溶液によって阻害されることを示しました[19]。これらの発見は、CDがウイルスに対する消毒剤として有用である可能性があることを示唆しました。この阻害のメカニズムは解明されていませんが、ACE2と水素結合を形成するスパイクタンパク質のRBDのチロシン453残基の酸化が関与しているのではないかと推測しました[19]。実際、CDはタンパク質のチロシン残基を酸化することが知られています[16]。変異株ではアスパラギン501がチロシン（Y）に変異しているため、CDでウイルスを処理すると501Yも酸化する可能性があります。ワクチンが変異型ウイルスに対する有効性を低下させているように見えることを考えると、CDを使用する消毒システムは非常に貴重である可能性があります。 CDは室温でガスであり、この形で使用して、人間の健康に安全と思われる濃度で空気中に浮遊する微生物を不活化できることに注意することも重要です[17]。そのため、ガス状のCDを使用して、混雑した部屋の空気中に浮遊しているSARS-CoV-2ウイルスを不活化することができます。

結論

CD溶液は、水中であろうと水中の配合スプレー溶液であろうと、濃度依存的にスパイクタンパク質RBDのヒト受容体タンパク質ACE2への結合を強力に阻害することがわかりました。これらの発見は、CDがSARS-CoV-2ウイルスのヒトへの感染を阻害するために非常に貴重である可能性があることを示唆しています。

謝辞

著者は大幸薬品株式会社の従業員です。この作品は同社の支援を受けています。

参考文献

1.Wang C、Horby PW、Hayden FG、GaoGF。世界的な健康問題の新しいコロナウイルスの発生。ランセット。2020; 395（10223）：470-3。

2. Guan WJ、Ni ZY、Hu Y、Liang WH、Ou CQ、HeJXなど。中国における2019年のコロナウイルス病の臨床的特徴。 N Engl JMed。 2020; 382：1708-20。

3. Trivedi N、Verma A、Kumar D. COVID-19の可能な治療と戦略：レビューと評価。 Eur Rev Med PharmacolSci。 2020; 24（23）：12593-608。

4.COVIDライブアップデート。www.worldometers.info›コロナウイルスから入手できます。

5. Naqvi AAT、Fatima K、Mohammad T、Fatima U、Singh IK、SinghAなど。SARS-CoV-2ゲノム、構造、進化、病因および治療法への洞察：構造ゲノミクスアプローチ。 Biochim Biophys Acta Mol BasisDis。2020; 1866（10）：165878。

6. Soni S、Jiang Y、Tesfaigzi Y、Hornick JL、ÇataltepeS。ベースライン時および損傷後のげっ歯類、非ヒト霊長類、およびヒト気道におけるACE2タンパク質発現の比較分析：COVID-19病因の難問。PLoSOne。2021; 16（2）：e0247510。

7. Wibawa T. COVID-19ワクチンの研究開発：倫理的問題。Trop Med IntHealth。2021; 26（1）：14-9。

8. Wang P、Nair MS、Liu L、Iketani S、Luo Y、Guo Y、他抗体中和に対するSARS-CoV-2変異体B.1.351およびB.1.1.7の耐性の増加。BioRxiv。2021; 2021.01.25.428137。

9.広瀬R、池ヶ谷H、内藤Y、渡邊N、吉田T、バンドウR他人間の皮膚でのSARS-CoV-2とインフルエンザウイルスの生存：COVID-19における手指衛生の重要性。臨床感染症2020; ciaa1517。

10.下倉秀樹、緒方直樹、川北恭子、大原健一、武田聡。フリーラジカル分子を含む液体の構造決定：液体二酸化塩素の分子間相関。分子物理学。2013; 111（8）：1015-22。

11.緒方直樹、柴田徹。A型インフルエンザウイルス感染に対する低濃度二酸化塩素ガスの保護効果。J GenVirol。2008; 89（Pt 1）：60-7。

12.緒方N、坂瀬川M、三浦T、柴田T、滝川Y、田浦K他非常に低濃度の二酸化塩素ガスを使用した空中浮遊細菌およびウイルスの不活化。薬理学。2016; 97（5-6）：301-6。

13. Ogata N.二酸化塩素によるインフルエンザウイルス血球凝集素の不活化：受容体結合部位の保存されたトリプトファン153残基の酸化。 J GenVirol。2012; 93（Pt 12）：2558-63。

14.森野秀樹、福田徹、三浦徹、柴田徹。湿った環境でのガラス表面のバクテリアやウイルスに対する低濃度二酸化塩素ガスの影響。 Lett ApplMicrobiol。2011; 53（6）：628-34。

15.森野秀樹、福田徹、三浦徹、李C、柴田徹、実方徹。ノロウイルス代用ネコカリシウイルスの二酸化塩素ガスによる不活化。生物的防除科学。2009; 14（4）：147-53。

16. Ogata N.二酸化塩素によるタンパク質の変性：トリプトファンおよびチロシン残基の酸化的修飾。生化学。2007; 46（16）：4898-911。

17.赤松A、リーC、森野H、三浦T、緒方N、柴田T.ラットにおける2週間の回復期間を伴う6か月の低レベル二酸化塩素ガス吸入毒性試験。 J Occup MedToxicol。2012; 7：2。

18. Zhou D、Dejnirattisai W、Supasa P、Liu C、Mentzer AJ、GinnHMなど。天然およびワクチン誘発血清からのSARS-CoV-2変異体B.1.351の脱出の証拠。細胞。2021; 184（9）：2348-61.e6。

19. Ogata N、Miura T. SARSCoV-2コロナウイルスのスパイクタンパク質のヒトアンジオテンシン変換酵素2への二酸化塩素による結合の阻害。アンファーマコルファーム。2020; 5（5）：1195。