

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15173

研究課題名（和文）バクチオールを基盤とした宿主因子を標的とする新たな抗インフルエンザ薬の開発応用

研究課題名（英文）Development of a novel anti-influenza drug for targeting host factor based on bakuchiol

研究代表者

庄司 正樹（Shoji, Masaki）

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：00636821

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、バクチオールと結合する宿主因子を同定するための分子プローブを合成し、結合する宿主タンパク質を発見した。さらに、このタンパク質をLC-MS/MS解析したところ、宿主因子Xであると同定された。次に、宿主因子Xがバクチオールと結合することを確かめるために、様々な細胞株のタンパク抽出液でプルダウンアッセイ後、特異抗体でウェスタンブロット解析した。その結果、バクチオールを結合させたプローブでのみ、タンパク質Xが検出されたことから、バクチオールが宿主因子Xと結合することが示された。したがって、バクチオールは、宿主タンパク質Xと結合することで、抗インフルエンザ活性を示すのではないかと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により同定された宿主因子Xは、これまでの研究により、インフルエンザウイルスの感染で発現上昇し、siRNAで発現抑制させると産生ウイルス量が減少することが報告されている。したがって、バクチオールを基盤として、宿主因子Xと強く結合する誘導体をデザイン後合成し、有効性および安全性の高い候補化合物を作製することができる。また、宿主因子Xを標的とした他の候補化合物も探索できる。さらに、有望なバクチオール誘導体およびその他化合物がインフルエンザウイルスのみならず他のウイルスにも効果を示すか調べることで、宿主因子Xを標的とした耐性ウイルスが出現しにくい新たな抗ウイルス薬の開発に繋がられる。

研究成果の概要（英文）：We synthesized molecular probes to identify host factors targeted by bakuchiol and found its targeted host protein. Additionally, a host factor X was identified by LC-MS / MS analysis of this protein. To confirm that a host factor X binds to bakuchiol, we performed pull-down assay with protein extracts of various cell lines, and then western blot analysis with a specific antibody of host factor X was performed. As a result, a host protein X was detected in various cell lines with the probe to which bakuchiol was bound, indicating that bakuchiol bound to a host factor X. Therefore, these results suggest that bakuchiol would exhibit anti-influenza activity by targeting to a host protein X.

研究分野：生化学、分子生物学、ウイルス学

キーワード：抗インフルエンザ薬 バクチオール 標的宿主タンパク質 LC-MS/MS解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、最も有効な抗インフルエンザ薬としてウイルス膜表面タンパク質: ノイラミニダーゼを標的とする薬剤(タミフルやリレンザ等)が汎用されている。しかし、ノイラミニダーゼは変異を起こしやすいことから、耐性ウイルスが出現しやすく、実際にタミフル耐性ウイルス株が世界中で増加している。したがって、耐性ウイルスを生み出しにくい新たな抗インフルエンザ薬の開発や新規標的分子の発見が望まれている。

バクチオールは、マメ科オランダビユ属 *Psoralea corylifolia* Linn. から単離された天然有機化合物である。我々は、培養細胞でバクチオールの抗インフルエンザ活性を検討したところ、ウイルス増殖の阻害活性を見出した(Shoji. et al. *JBC* 2015)。しかし、*in vitro* で再現できるすべてのアッセイ法を試験したが、バクチオールによってインフルエンザウイルスタンパク質の機能はどれも阻害されなかった。以上より、我々は、バクチオールの抗インフルエンザ活性は、ウイルス側ではなく宿主側因子がかかわるのではないかと考えた。

バクチオールは、DNA 合成阻害や細胞周期調節、細胞死の誘導、p53 タンパク質発現の上昇、活性酸素種の増加等の宿主応答に作用することが報告されている。これらにより、我々は、バクチオールがインフルエンザウイルスの増殖にかかわる宿主応答の中で機能する宿主タンパク質を標的とし、抗インフルエンザ活性を示すと考えた。

これまで、抗インフルエンザ活性におけるバクチオールの結合タンパク質は、報告されていない。我々は、本研究に先立ち、抗インフルエンザ活性に重要な化学構造を探索するために、さまざまな化学構造を欠失させた誘導体を合成した。その結果、バクチオールのフェノール部分およびテトラアルキル四級炭素の欠失により、抗インフルエンザ活性が消失したことから、これらの構造が重要であることが分かった。

この結果から、結合する宿主タンパク質を見出すために、抗インフルエンザ活性に影響しないバクチオールのホモプレニル側鎖末端部にリンカーを結合し、その逆側のリンカー末端部にビオチンを結合させる分子プローブを合成した。さらに、このバクチオール分子プローブを用いて、プルダウンアッセイをしたところ、バクチオールと結合する宿主タンパク質を発見した。

以上より、これらの宿主タンパク質は、抗インフルエンザ活性における宿主応答の中で機能すると考えられるが、その正体は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、バクチオールの抗インフルエンザ活性における宿主タンパク質を同定し、その分子メカニズムを解明するものである。さらに、標的となる宿主タンパク質と強く結合するバクチオール誘導体をデザイン後合成し、有効性および安全性の高い候補化合物を選抜する。そして、有望なバクチオール誘導体がインフルエンザウイルスのみならず他のウイルスにも効果を示すか調べることで、宿主タンパク質を標的とした耐性ウイルスが出現しにくい新たな抗ウイルス薬の開発につなげる。

3. 研究の方法

初めに、抗インフルエンザ活性に重要な化学構造を探索するために、バクチオールのフェノール部分やテトラアルキル四級炭素の欠失させた化合物を作成した。これらの化合物は、イヌ腎臓由来細胞株(MDCK 細胞)を用いて、A 型インフルエンザウイルス(A/PR/8/34 株)の感染による細胞生存性を解析した。次に、この結果を基にして、抗インフルエンザ活性に影響しないバクチオールのホモプレニル側鎖末端部にリンカーを結合し、その逆側のリンカー末端部にビオチンを結合させる分子プローブを合成した。また、コントロールとして、バクチオールの抗インフルエンザ活性に重要なフェノール部分およびテトラアルキル四級炭素の欠失させた化合物にビオチンリンカーを結合させた分子プローブも合成した。

バクチオールの宿主細胞内の標的タンパク質を同定するために、これらの分子プローブと MDCK 細胞のウイルス感染細胞或いは通常細胞抽出液を混合し、ストレプトアビジンが結合された磁気ビーズを用いて、標的タンパク質をプルダウンアッセイにより精製した。精製したタンパク質は、SDS-PAGE 後銀染色し、コントロールと比較してバクチオール特異的なタンパク質を LC-MS/MS 解析により、同定した。そして、同定したタンパク質がバクチオールと結合することを確かめるために、様々な細胞株のタンパク抽出液でプルダウンアッセイ後、同定タンパク質の特異的な抗体を用いてウェスタンブロット法で解析することにより、同定タンパク質が含まれているか確認した。

4. 研究成果

初めに、抗インフルエンザ活性に重要な化学構造を探索したところ、バクチオールのフェノール部分およびテトラアルキル四級炭素の欠失により、抗インフルエンザ活性が消失した。この結果から、結合する宿主タンパク質を見出すために、抗インフルエンザ活性に影響しないバクチオールのホモプレニル側鎖末端部にリンカーを結合し、その逆側のリンカー末端部にビオチンを結合させる分子プローブを合成した。また、コントロールとして、バクチオールの抗インフルエンザ活性に重要なフェノール部分およびテトラアルキル四級炭素の欠失させた化合物にビオチンリンカーを結合させた分子プローブも合成した。

次に、これらの分子プローブを用いてプルダウンアッセイ後銀染色したところ、コントロールプローブと比較して、バクチオールと結合する宿主タンパク質を発見した。さらに、このタンパク質を LC-MS/MS 解析した結果、宿主因子 X であると同定された。この宿主因子 X は、Y という高度に類似したタイプが存在している。そこで、宿主因子 X および Y がバクチオールと結合することを確認するために、様々な細胞株のタンパク抽出液でプルダウンアッセイ後、X および Y に特異的な抗体でウェスタンブロット解析した。その結果、バクチオールを結合させたプローブでのみ、タンパク質 X および Y が検出されたことから、バクチオールが宿主因子 X および Y と結合することが示された。

これまでの研究により、宿主タンパク質 X および Y は、インフルエンザウイルスの感染で発現上昇し、siRNA で発現抑制させると産生ウイルス量が減少することが報告されている。したがって、バクチオールは、宿主タンパク質 X と結合することで、抗インフルエンザ活性を示すのではないかと考えられる。今後は、バクチオールと宿主因子 X との結合がウイルス感染細胞内で起る宿主応答について、解析していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 成枝、庄司 正樹、増田 豪、渡辺 珠汎、江角 朋之、増田 豪、大槻 純男、葛原 隆.
2. 発表標題 バクチオールの抗インフルエンザ活性における標的宿主タンパク質の同定.
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----