

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15283

研究課題名(和文) SARS-CoV-2の膜タンパク質のプロセッシングを制御する生薬エキスの探索

研究課題名(英文) Screening for crude drug extracts that regulate spike protein cleavage in SARS-CoV-2

研究代表者

北村 雅史 (Kitamura, Masashi)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：10825392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：COVID-19の原因ウイルスであるSARS-CoV-2は2019年12月に発生以降、変異を繰り返し、現在に至るまで世界的な猛威を振り回している。本研究課題ではウイルス膜タンパク質であるSARS-CoV-2スパイクタンパク質(Sタンパク質)のプロセッシングを抑制する生薬エキスの探索を行った。Sタンパク質に存在するFurin認識配列(FCS)の切断活性化を標的として、130種の生薬エキスを用いてin vitroによるスクリーニングやmRNA発現解析を実施し、ジャシヨウシやOstholeを始めとしたFCS開裂抑制作用を有する生薬や化合物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではSARS-CoV-2のスパイクタンパク質(Sタンパク質)のプロセッシングを制御する生薬エキスの探索を行った。細胞内furin様活性はSARS-CoV-2 Sタンパク質のみならず、種々のウイルスの膜タンパク質のプロセッシングに関与している。今回furin様活性に対する阻害効果のある生薬エキスや化合物を同定することができたことで、これら感染症に対する治療薬・予防薬開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The spike (S) protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) contains a furin recognition site (FCS) for furin-like enzymes at the boundary of the S1/S2 subunits. The cleavage of the site is essential for S protein activation and virus entry. We screened the inhibitory effects of crude drugs on in vitro furin-like enzymatic activities and mRNA expression analysis. Out of 130 herbal medicine extracts, we identified herbal medicines and compounds such as Cnidii Monnieris Fructus and osthole.

研究分野：生薬学、分子生物学

キーワード：生薬 リポジショニング 漢方薬 SARS-CoV-2 furin

1. 研究開始当初の背景

COVID-19の原因ウイルスである SARS-CoV-2 は 2019 年 12 月に発生以降、変異を繰り返し、現在に至るまで世界的な猛威を振り回している。SARS-CoV-2 の宿主細胞への侵入は、ウイルス膜上のスパイクタンパク質 (S タンパク質) の標的細胞受容体への結合、および膜融合により引き起こされる。コロナウイルスの S タンパク質は S1 サブユニットと S2 サブユニットから構成され、S1 サブユニットには細胞膜受容体と結合する Receptor Binding Domain (RBD) を有し、S2 サブユニットには膜貫通領域および融合ペプチドを有する。SARS-CoV-2 S タンパク質の S1 と S2 の境界部分には「-RRARS-」という「R-x-x-R」の furin 認識配列 (Furin cleavage site: ; FCS) を有している[1]。FCS は宿主細胞のプロテアーゼである furin を始めとしたプロタンパク質転換酵素群 (Proprotein convertases: PCs) により認識・切断される。SARS-CoV-2 S タンパク質は S1/S2 境界領域でプロセッシングを受けることによりコンフォメーション変化を伴い、細胞膜受容体である Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) へ効率的に結合する。また、S タンパク質の開裂および SARS-CoV-2 の感染が furin 阻害剤により抑制されることから、S タンパク質の furin 活性によるプロセッシングがウイルス侵入・感染の重要なステップであると考えられている。これまで furin の阻害剤として、ペプチド (ヘキサ-D-アルギニンなど) が研究用試薬として使用されているが、臨床応用された阻害剤はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SARS-CoV-2 の S タンパク質のプロセッシングを制御する生薬エキスを探索することである。本研究では、ヒト結腸癌由来細胞 (Caco-2) を用いてプロテアーゼ活性を指標とした生薬エキスのスクリーニング、遺伝子発現制御を指標とした生薬エキスのスクリーニングを実施し、候補生薬による S タンパク質のプロセッシングに与える影響、を評価した。

3. 研究の方法

サンプル調製 生薬 130 種を 70% エタノールで加熱還流を 1 時間行った。抽出液を溶媒留去し、各生薬の 70% エタノール抽出物を得た。また、抽出物は DMSO で 10 mg/ml に溶解しストック溶液とした。

Furin 様酵素活性評価 Caco-2 細胞を 2×Lysis buffer で処理し、Whole Cell lysate を得た。Whole Cell Lysate 50 μ l, sample 10 μ l (生薬エキス終濃度 5 μ g/ml) を加え、37°C で 30 分インキュベートした後、蛍光基質である Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA または Arg-Arg-Ala-Arg-MCA 10 μ l 加え、遮光しながら 37°C で 30 分インキュベートを行い、蛍光 (Em. 380 nm/Ex. 460 nm) をマイクロプレートリーダーにて測定した。

Furin 遺伝子発現解析 Caco-2 細胞を播種後、24 時間後に生薬エキスを添加し、さらにサンプル添加後、13 時間培養した細胞について、RNA 抽出を行った後、RT-qPCR を行った。

細胞表面における Furin 様酵素活性及び阻害評価 Caco-2 細胞を播種し、24 時間後に無血清培地に交換し、ペプチド及び生薬または化合物を添加した。13 時間培養後の上清を回収し、蛍光 (Em. 380 nm/Ex. 460 nm) をマイクロプレートリーダーにて測定した。

また，MTT アッセイを行い，細胞生存率が 80%以上であることを確認したサンプル濃度を用いた。

4. 研究成果

プロテアーゼ活性を指標とした生薬エキスのスクリーニング

まず，本研究では FCS 開裂を制御する生薬エキスおよび成分の探索を実施した。FCS 配列ペプチドを基質として，細胞内 furin 様活性を用いた開裂効果について，生薬エキスのスクリーニングを実施した。まず，生薬エキス(70%エタノールエキス) 130 種を調製した。次に Caco-2 細胞の Whole cell lysate を酵素とした蛍光ペプチド (RTKR-MCA 及び RRAR-MCA) を基質とした furin 様活性に対する阻害効果を評価した。130 種生薬エキスのうち，ジャショウシ，アマチャ，マオウ，ゴシュユに furin 様阻害活性が認められた (Fig. 1a)。

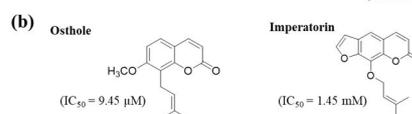
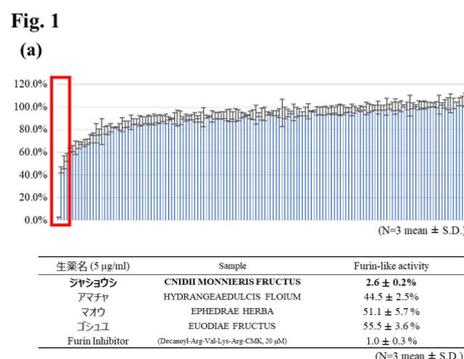
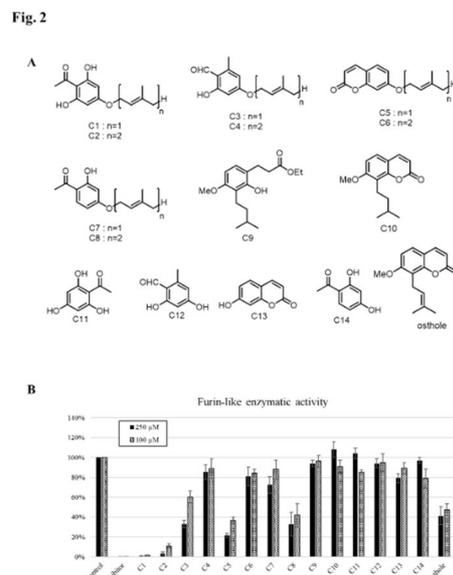


Fig. 1 Furin様活性阻害効果を有する生薬エキスのスクリーニング

特に強い阻害活性が認められた生薬ジャショウシ (蛇床子) はセリ科オカゼリの果実を基原とする搔痒薬や強壮薬として用いられる生薬であり，活性成分の探索を実施したところ，Osthole が強い活性阻害成分として同定された (Fig. 1b)。

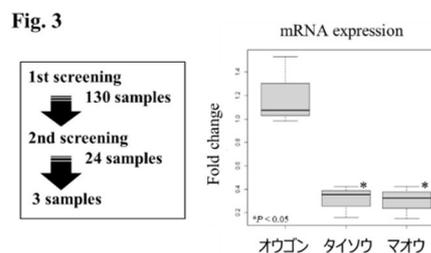
Osthole を基礎骨格とした類似化合物による Furin 様活性阻害効果

Osthole に認められた活性の構造的な特徴を理解するため，10 種の化合物を合成し計 14 種の化合物について Furin 様阻害活性評価を行った。その結果，2 種 (C1, C2) の化合物に Osthole と同等の Furin 様活性の阻害効果が認められた (Fig. 2)。



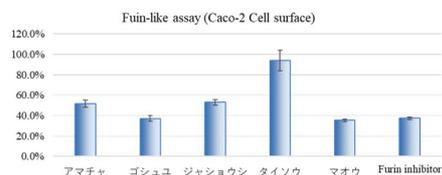
遺伝子発現制御を指標とした生薬エキスのスクリーニング

Furin の遺伝子発現変動に生薬エキスが与える影響を調べるため，生薬エキスを添加し，培養した 13 hr 後の Caco-2 細胞について RT-qPCR 実施を実施し，Furin mRNA の遺伝子変動について，主に抑制として機能する生薬エキスの探索を実施した。ACTNB 遺伝子をハウスキーピング遺伝子として，FURIN の遺伝子変化がコントロール処理群と比べ 0.5-fold 未満，2.0-fold 以上であったサンプルについてスクリーニングを行った (Fig. 3)。1 次(130 サンプルで実施)，2 次スクリーニング (24 サンプルで実施) を実施し，候補として挙がった，オウゴン，タイソウ，マオウについて，Furin の発現変動を評価したところ，タイソウ及びマオウで有意に発現抑制が認められた。



Caco-2 細胞表面上における FCS 開裂抑制効果
ジャショウシ, アマチャ, マオウ, タイソウについて, Caco-2 細胞表面上における FCS 開裂抑制効果を評価した. 各生薬エキス添加時の Furin 様活性はアマチャ (51.6 ± 3.6%), ゴシュユ (37.1 ± 2.7%), ジャショウシ (53.0 ± 2.8%), タイソウ (93.8 ± 10.1%), マオウ (35.3 ± 1.2%) であった (Fig. 4).

Fig. 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanikawa Takashi、Hayashi Tsuyoshi、Suzuki Ryuichiro、Kitamura Masashi、Inoue Yutaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibitory effect of honokiol on furin-like activity and SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Traditional and Complementary Medicine	6. 最初と最後の頁 69～72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtcme.2021.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北村 雅史，谷川 尚，林 豪士，騎馬 由佳，見沢 沙瑛，井上 裕，鈴木 龍一郎，横川 貴美
2. 発表標題 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の開裂を制御する生薬エキスの探索
3. 学会等名 第2回和漢医薬学会若手研究者フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村 雅史，林 豪士，谷川 尚，騎馬 由佳，見沢 沙瑛，井上 裕，鈴木 龍一郎，横川 貴美
2. 発表標題 スパイクタンパク質による合胞体形成を指標としたオウゴンエキスのSARS-CoV-2侵入抑制効果
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 騎馬 由佳，谷川 尚，林 豪士，見沢 沙瑛，大山 莉央，井上 裕，横川 貴美，鈴木 龍一郎，北村 雅史
2. 発表標題 ジャシヨウシエキス及びOstholeによるFurin様酵素活性の阻害効果
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 關 大志, 鎌内 等, 騎馬 由佳, 横川 貴美, 高尾 浩一, 杉田 義昭, 鈴木 龍一郎, 北村 雅史
2. 発表標題 Furin様酵素活性阻害作用を示すOsthole誘導体の探索
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村 雅史, 谷川 尚, 林 豪士, 見沢 沙瑛, 騎馬 由佳, 鈴木 龍一郎, 井上 裕, 横川 貴美
2. 発表標題 SARS-CoV-2スパイクタンパク質による細胞の合胞体形成を抑制する生薬エキスの探索
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 騎馬 由佳, 谷川 尚, 林 豪士, 鎌内 等, 關 大志, 横川 貴美, 鈴木 龍一郎, 井上 裕, 北村 雅史
2. 発表標題 ジャシヨウシ及びOstholeによるSARS-CoV-2 スパイクタンパク質の開裂抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 騎馬 由佳, 谷川 尚, 横川 貴美, 鈴木 龍一郎, 井上 裕, 北村 雅史
2. 発表標題 FCS (Furin cleavage site) の開裂を抑制する薬用資源の探索
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北村雅史, 谷川 尚, 林 豪士	4. 発行年 2022年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 -
3. 書名 月刊「細胞」	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------