

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 28 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860083

研究課題名(和文) バクチオールを基盤とした新規抗インフルエンザ薬の開発

研究課題名(英文) The development of novel anti-influenza drug based on bakuchiol

研究代表者

庄司 正樹 (Shoji, Masaki)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：00636821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マメ科植物のオランダビユから単離された天然有機化合物バクチオールに抗インフルエンザ活性を見出したが、その詳細なメカニズムは分かっていない。そこで本研究において、バクチオールの抗インフルエンザ活性における詳細なメカニズムを検討したところ、ウイルス側因子でなく、宿主細胞側因子を標的とすることを見出した。また、バクチオールと直接相互作用する因子を特定しその作用機構を明らかにするために、バクチオールの1位水酸基を付与した化合物を作製した。

研究成果の概要(英文)：Bakuchiol is a phenolic isoprenoid compound present in *Psoralea corylifolia* Linn. seeds. We found that bakuchiol inhibited influenza A viral infection and growth, and reduced the expression of viral mRNAs and proteins in these cells. In vitro studies indicated that bakuchiol did not strongly inhibit the activities of influenza surface proteins. Next generation sequencing analysis revealed activation of transcriptional regulation by nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf), and a Nrf2 reporter assay showed that bakuchiol activated Nrf2. Additionally, bakuchiol up-regulated the mRNA levels of two Nrf2-induced genes, NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 and glutathione S-transferase A3. These findings demonstrated that bakuchiol had enantiomer-selective anti-influenza viral activity involving a novel effect on the host cell oxidative stress response. Furthermore, we synthesized biotin labeled bakuchiol derivatives to search the host cell proteins interacted to bakuchiol.

研究分野：分子生物学、ウイルス学、免疫学

キーワード：インフルエンザウイルス バクチオール 次世代シークエンサー Nrf2シグナル経路 相互作用因子
ビオチン標識化バクチオール誘導体

1. 研究開始当初の背景

4000 万人もの死亡者を出した 1912 年のスペイン風邪に代表されるように、インフルエンザは度々世界的な大流行を引き起こしている。また、最近では新型鳥インフルエンザウイルスが流行し始めており、世界的規模においてその流行が危惧される。現在、経口可能な唯一のインフルエンザ薬として汎用されているのがタミフルであるが、インフルエンザ H1N1 株のほとんどはタミフル耐性株へと変異していると云われている。また、鳥インフルエンザについても、すでにタミフル耐性株が発生しているとの報告がある。さらに、タミフルの合成には最短でも 14 段階以上の工程が必要であり、迅速かつ安価に供給することが困難である。したがって、タミフルに代わる新規抗インフルエンザ薬の開発は急務である。

バクチオールは、芳香族環上に 1 個のヒドロキシル基および不飽和炭化水素鎖をもつフェノール系化合物で

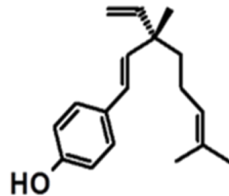


図1 天然型バクチオールの化学構造

ある(図1)。また、この化合物は、比較的単純な構造であるにも関わらず、抗腫瘍活性(*Eur. J. Pharmacol.* (2010) 643: 170-179)、抗菌活性(*Anti-microb. Agents Chemother.* (2001) 45: 3009-3013)、抗炎症活性(*J. Ethnopharmacol.* (2001) 78: 27-31)等、多彩な生物活性並びに薬理作用が報告されており、様々な疾患治療または予防への応用が期待されている。さらに、我々の協力研究者は、化学合成工程の短縮を検討し従来の工程数 14 段階よりも 4 段階にまで短縮する合成法を開発(*SYNLETT* (2013) 24: 1845-1847)したことから、既存の方法よりも圧倒的に迅速、大量かつ安価に試料の供給することが可能となった。

そこで我々は、バクチオールによる抗インフルエンザ薬のリード化合物としての可能性を探るため、培養細胞を用いてウイルス感染阻害効果を検討した結果、ウイルス感染細胞数を有意に減少させた(図2A)。また、培養液中に放出されたウイルス量を測定したところ、コントロールと比較し約 1000 倍減

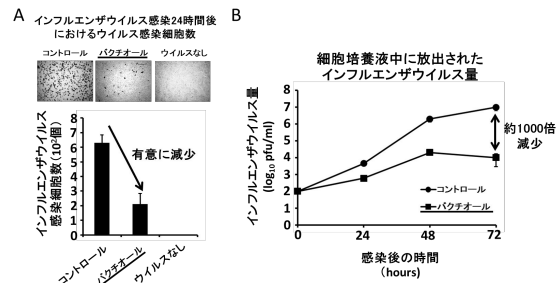


図2 バクチオールによるインフルエンザウイルス感染・増殖阻害作用

少した(図2B)。さらに、 IC_{50} がおよそ $10 \mu M$ という低濃度で効果が見られた。以上から、我々は、バクチオールがインフルエンザウイルス感染・増殖を阻害することを見出した。

これらの成果から、バクチオールは、抗インフルエンザ薬もしくはそのリード化合物として開発研究でき、将来的に新規抗インフルエンザ薬として迅速かつ安価に供給することが期待できる。しかしながら、バクチオールの抗インフルエンザ作用については報告がなく、その標的分子も不明である。そこで本研究では、インフルエンザウイルス感染時におけるバクチオールの標的分子を特定し、抗インフルエンザ作用機序を解明する。また、その結果に基づき、バクチオールを基盤とした候補化合物をデザインし、Molecular Operating Environment (MOE) システムを利用した結合シミュレーションにより選抜された誘導体を合成する。さらに、その活性試験を行うことで、作用の増強及び毒性の低減を図る。そして、それらの有効性と毒性を培養細胞及び動物感染モデルで検討することにより新規抗インフルエンザ薬の創出を目指す。

2. 研究の目的

バクチオールは、マメ科の植物であるオランダピユの種子から単離された天然有機化合物であり、比較的単純な構造であるにも関わらず、抗腫瘍活性、抗酸化活性、抗菌活性、抗炎症活性等々、多彩な生物活性並びに薬理作用が報告されていることから、様々な疾患治療または予防への応用が期待されている。

また、ゲラン酸よりわずか4段階で合成する方法が確立され、既存の方法より圧倒的に迅速、大量かつ安価に試料の供給することが可能である。そこで我々は、バクチオールが新規抗インフルエンザ薬開発のためのリード化合物となり得るかを探るため、インフルエンザウイルス感染・増殖阻害作用について培養細胞系を用いて検討した。その結果、低濃度でもその効果が認められることを見出した。しかしながら、バクチオールがどの標的に作用し、抗インフルエンザ作用を示しているのか全く分かっていない。そこで、本研究ではインフルエンザ感染時における標的分子を特定し、抗インフルエンザ作用機序を解明することで、バクチオールを基盤とした新規抗インフルエンザ薬を開発することを目指す。

3. 研究の方法

本研究は、インフルエンザウイルス感染時におけるバクチオールの標的分子の特定とその作用機序を解明する。

インフルエンザウイルス感染時におけるバクチオールの標的分子の探索

(1) ウイルス側因子

インフルエンザウイルスは、エンベロープを持つマイナス鎖の一本鎖 RNA ウイルスであり、そのゲノムは8つの分節に分かれている(図3)。これらの分節は、それぞれのコードしているタンパク質から PA、PB1、PB2、HA、NA、NP、M、NS である(図3)。これらのタンパク質は、ウ

イルスによる宿主への吸着 (HA) 侵入 脱殻 (HA、M2) ゲノム複製 (RNA ポリメラーゼ (PA、PB1、PB2)、NP、

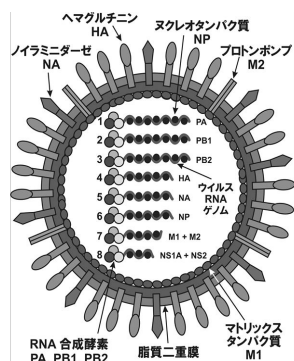


図3 インフルエンザウイルスの構造

NS1・2、M1) 粒子再構成 放出 (NA) という生活環中で働くことが知られている(図4)。

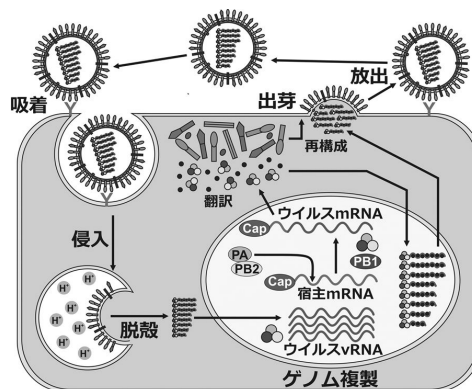


図4 インフルエンザウイルスの生活環

したがって、バクチオールがこれらのウイルスタンパク質に結合し働きを阻害し、ウイルス感染・増殖を抑制していることが予想される。そこで、現在報告されている種々のウイルスタンパク質を用いた in vitro アッセイを行い、バクチオールによって阻害を受ける分子を探索する。具体的には、NA によるシアル酸切断活性の測定、HA による赤血球凝集活性の測定、ウイルス RNA ポリメラーゼ (PA、PB1、PB2、NP) の活性をルシフェラーゼにより測定する mini-genome アッセイ (J. Virol. (2007) 81: 30-41)、M2 によるイオンチャネル作用を測定するパッチクランプ法 (PNAS (2008) 105: 10967-10972) を行った。

(2) 宿主側因子

インフルエンザウイルス感染時における宿主細胞側因子について検討するために、次世代シーケンサーを用いてバクチオールの抗インフルエンザ活性における宿主細胞の網羅的な遺伝子発現解析を行った。

また、ビオチン化法と釣竿法を組み合わせた方法 (J. Am. Chem. Soc. (2007) 129: 873-880) によりバクチオールと直接相互作用する宿主細胞側因子を特定することを目的として、ビオチン化したバクチオール誘導体を作製した。

4. 研究成果

インフルエンザウイルス感染時における バクチオールの標的分子の探索

(1) ウイルス側因子

天然型及び非天然型バクチオールによるインフルエンザウイルス因子の機能阻害について、NA によるシアル酸切断活性、HA による赤血球凝集活性、M2 によるイオンチャネル作用を測定するパッチクランプ法、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ (PA、PB1、PB2、NP) の活性をホタルルシフェラーゼにより測定するミニゲノムアッセイを行った。

始めに、NA のシアル酸切断活性を組換えタンパク質及びインフルエンザウイルスを使用し検討したところ、両バクチオール (25 μ M) は、コントロールと比較して活性を約 10% 減少させた。次に、ウイルスを用いた HA の赤血球凝集活性を検討した結果、両バクチオール処置でも赤血球の凝集が見られ、活性を阻害しなかった。天然型バクチオールによる M2 の H⁺ポンプチャネル機能の阻害効果を検討するために、M2 発現細胞を用いて H⁺の細胞内流入をパッチクランプ法で測定した。その結果、天然型バクチオール処置 (25、50 μ M) で阻害しなかった。最後に、両バクチオールによるウイルス RNA ポリメラーゼ活性の阻害効果は、ウイルス RNA ポリメラーゼ発現細胞に両バクチオールを作用後測定した。両バクチオール処置群における活性は、約 40% 減少した。しかしながら、コントロールとして同時に導入したウミシイタケルシフェラーゼの活性も減弱していたことから、導入タンパク質の発現自体を抑制することが示唆された。以上の結果より、抗インフルエンザ活性を反映する様な強い阻害効果を示さなかったことから、バクチオールの抗インフルエンザ活性には宿主細胞内因子を標的とする可能性が高いことが考えられる。

(2) 宿主側因子

天然型及び非天然型バクチオールとインフルエンザウイルスを共に培養した混合物をイ

又腎臓細胞に処置した。24時間後、それぞれの細胞からRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて網羅的なmRNA発現のデータを取得した。次に、そのデータを用いて、KeyMolnetソフトウェアにより活性化される細胞内シグナル経路を解析した。次世代シーケンサーにより宿主細胞における網羅的な遺伝子発現の解析から、バクチオール処置により酸化ストレス防御機構の中心的役割を果たす nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) シグナル経路が活性化することが分かった。また、その活性化は、ルシフェラーゼによるNrf2レポーターアッセイにより確かめられた。次に、リアルタイムPCR法により、Nrf2 で活性化される NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 と glutathione S-transferase の遺伝子発現が、コントロールと比較してバクチオール処置で有意に上昇したことが分かった。Nrf2 の発現低下は、インフルエンザウイルスの増殖を上昇させることが報告されている (*Free Radic. Biol. Med.* 2011, 51, 444-453) ことから、宿主細胞のNrf2 活性化がバクチオールによる抗インフルエンザ活性メカニズムの一端を担っていると考えられる。

次に、バクチオールと直接相互作用する宿主細胞側因子を特定することを目的として、ビオチン化したバクチオール誘導体を作製した。(S)-2-フェニルオキサゾリジノンに不斉補助基に持つ1に対するビニル基の1,4-付加反応と続く *p*-アニスアルデヒドとのアルドール/脱炭酸カップリング反応により、光学的にほぼ純粋な2を得た(図5)。さらに、数段階を経て鍵中間体3へと変換した(図5)。

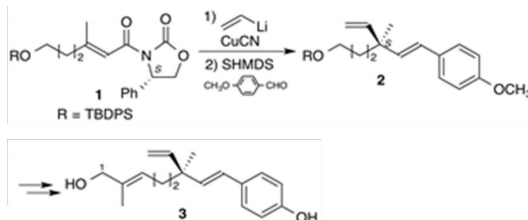


図5 1位水酸基付与された天然型バクチオールの合成経路

現在、3の1位水酸基を足場とし、種々のピ
オチン標識化誘導体を作成中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. **Masaki Shoji**, Yumie Arakaki, Tomoyuki
Esumi, Shuntaro Kohnomi, Chihiro
Yamamoto, Yutaka Suzuki, Etsuhisa
Takahashi, Shiro Konishi, Hiroshi Kido,
and Takashi Kuzuhara.
Bakuchiol is a Phenolic Isoprenoid
with Novel Enantiomer-Selective
Anti-Influenza A Virus Activity
Involving Nrf2 Activation. 査読有
The Journal of Biological Chemistry
(2015) 290 (46):28001-28017.
DOI:10.1074/jbc.M115.669465

[学会発表](計 5 件)

1. 渡辺珠汎、江角朋之、**庄司正樹**、葛原隆
ピオチン標識化バクチオール誘導体の
合成と抗インフルエンザウイルス活性
評価
日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26
~ 29 日、横浜
2. **庄司正樹**、新垣優美絵、江角朋之、鴻海
俊太郎、山本千尋、高橋悦久、鈴木穰、
小西史朗、木戸博、葛原隆
宿主因子を標的とするバクチオールの
抗インフルエンザ作用機序の解析
日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26
~ 29 日、横浜
3. **庄司正樹**、江角朋之、鴻海俊太郎、山本
千尋、高橋悦久、小西史朗、木戸博、葛
原隆
バクチオールが有する抗インフルエン
ザ活性におけるウイルス側の標的探索
第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年

11 月 25 ~ 27 日、神奈川

4. **庄司正樹**、江角朋之、鴻海俊太郎、山本
千尋、高橋悦久、鈴木穰、小西史朗、木
戸博、葛原隆
次世代シークエンサーを用いたバクチ
オールの抗インフルエンザ活性におけ
る遺伝子発現の網羅的解析
2015 年 11 月 22 ~ 24 日、第 63 回日本ウ
イルス学会学術集会、福岡
5. **庄司正樹**、江角朋之、鴻海俊太郎、山本
千尋、高橋悦久、小西史朗、木戸博、葛
原隆
バクチオールの抗インフルエンザ活性
における標的探索
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、
2014 年 11 月 10 ~ 12 日、神奈川

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

特になし。

6．研究組織

(1)研究代表者

庄司 正樹 (Shoji Masaki)

徳島文理大学 薬学部 助教

研究者番号：00636821

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：