

大豆イソフラボンの抗インフルエンザウイルス  
作用発現メカニズムの検討

武庫川女子大学大学院 生活環境学研究科

堀尾 侑加

2019年助成者(論文投稿完了した為掲載)

インフルエンザウイルス、特にインフルエンザ A ウイルス (IAV) は、毎年世界的な大流行を引き起こし、生命的な危機だけでなく多大な経済的損失などの被害をもたらす<sup>(1)</sup>。IAVはマイナス鎖 RNA ウイルスで、ウイルス粒子にはそれぞれウイルス蛋白をコードする 8 本のゲノム RNA が含まれている<sup>(2)</sup>。8 つの RNA セグメントには、PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS があり、転写され合成されるウイルス蛋白にはそれぞれに重要な役割がある。

インフルエンザの治療には、オセルタミビルやザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤が主流だったが、2018 年から臨床使用されているキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤のバロキサビルも用いられている。しかし、すでにこれらの薬剤耐性株が報告されている<sup>(3,4)</sup>。一方、T-705 (ファビピラビル) およびリバビリンは、インフルエンザウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 阻害剤として有効であることが報告されている<sup>(5,6)</sup>。これらの化合物はヌクレオシドの類縁体であり、ウイルスの RdRp による RNA 合成を阻害する効果がある。しかしファビピラビルの催奇形性を検証するための動物実験では、4 つの別々の生物種を用いて、第 1 期における発育遅延または胚死が実証されている<sup>(7)</sup>。このため、感染した宿主の RNA や DNA 合成に影響を与えることなく、インフルエンザの RdRp を特異的に阻害できる阻害剤の開発が求められている。

ウイルスの RdRp 阻害剤をスクリーニングするには、RdRp の活性を評価する方法が重要である。これまでに報告されている方法では、密度勾配超遠心法でウイルスを精製するが、この方法は遠心分離に時間がかかること、精製操作が複雑でテクニックが必要であることなどの問題がある。また、放射性同位元素、<sup>32</sup>P などで標識したヌクレオシドを用いて *in vitro* でポリメラーゼ反応を行い、合成された RNA をシンチレーションカウンターで測定する方法もある。この方法は、ごく微量の RNA 合成量でも測定できるという利点があるが、放射性同位元素の安全性の問題がある。

我々は以前、大豆抽出物が IAV の増殖に対して抗ウイルス活性を発揮したことを報告した<sup>(8)</sup>。さらに、その有効成分として、大豆イソフラボンのダイゼインであることを明らかにし<sup>(9)</sup>、そのメカニズムのひとつにウイルスの増殖に不可欠なウイルス RNA 合成を阻害する可能性が考えられた。

本研究では、ダイゼインの抗 IAV 作用機構として、ウイルス RNA 合成阻害に着目し、超遠心法および放射性同位元素を用いない新規 RdRp 活性測定法の開発およびダイゼインの阻害検証を行った。

## 実験方法

### 1. 細胞およびウイルス

Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞は 7% Fetal Calf Serum (FCS) を含む Minimum Essential medium (MEM ; 富士フィルム和光純薬) 培地を用いて培養を行った。

インフルエンザウイルス株は、インフルエンザ A ウイルス H1N1 (PR/8/34) (以下、IAV) を用いた。IAV は MDCK 細胞に 0.001 multiplicity of infection (MOI ; 感染多重度) 添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 1 時間吸着させた後、2µg/mL acetyltrypsin (Sigma-Aldrich) および 0.4% Bovine serum albumin (BSA) (富士フィルム和光純薬) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (富士フィルム和光純薬) を添加し、24 時間培養増殖させた。培養後、上清を回収し、使用時までウイルスストック溶液として -80°C で凍結保存した。

## 2. サンプル調製

ダイゼイン（東京化成）は Dimethyl sulfoxide（DMSO）（ナカライテスク）に 10 mg/mL の濃度で溶解し、ストックは -30℃ で保存し 2 週間以内に調製した溶解液を実験に用いた。リバビリン三リン酸（RTP）は Jena Bioscience より購入した。

## 3. ウイルス RNA 解析（改変 Real time PCR 法）

Kawakami ら<sup>(10)</sup>の報告を参考に、ウイルス RNA の segment 1、4、5（PB2、HA、NP）の mRNA の 0.5M 特異的 RT プライマーを設計・合成した（Table.1）。0.5M 特異的 RT プライマーとトータル RNA を 65℃ 10 分、4℃ 5 分、60℃ 5 分で RNA を変性させ、ReverTra ace（TOYOBO）により cDNA を合成した。Real-time PCR は Kawakami ら<sup>(10)</sup>の報告に従い、PR8 ウイルス用に改変した segment 1、4、5 のプライマーを設計し（Table.1）、THUNDER BIRD SYBR mixture（TOYOBO）を用いて解析した。データは、PCR 産物よりコピー数を定量化したもので検量線を作成しサンプルの定量を行った。

Table.1 特異的プライマー配列

Target	Purpose	Prime name	sequences (5' to 3')
Segment 1 mRNA	Reverse transcription	PR8 seg1 mRNA tag	CCAGATCGTTCGAGTCGTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACTATTCGA
	Realtime PCR	mRNA tag	CCAGATCGTTCGAGTCGT
		PR8 seg1 mRNA Re	GGAGATATGGGCCAGCATTA
Segment 4 mRNA	Reverse transcription	PR8 seg4 mRNA tag	CCAGATCGTTCGAGTCGTTTTTTTTTTTTTTTTCCTCATATTCT
	Realtime PCR	mRNA tag	CCAGATCGTTCGAGTCGT
		PR8 seg4 mRNA Re	GGCAATCAGTTTCTGGATGTGTCT
Segment 5 mRNA	Reverse transcription	PR8 seg5 mRNA tag	CCAGATCGTTCGAGTCGTTTTTTTTTTTTTTTCTTTAATTGTC
	Realtime PCR	mRNA tag	CCAGATCGTTCGAGTCGT
		PR8 seg5 mRNA Re	CGATCGTGCCTTCCTTG

## 4. RdRp の精製および活性解析（改変 Real time PCR 法）

ウイルスストック溶液（ $4.8 \times 10^6$  FFU/mL）500  $\mu$ L から製造元の指示に従い Viro-Adembeads（ademtech）によりウイルス粒子を吸着させ、エンベロープ溶出 buffer 70  $\mu$ L（50mM Tris-HCl, 100mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 1U/ $\mu$ L Rnase inhibitor, 0.25% Triton N-101）を添加後 30℃ 30 分でインキュベートし、vRNP 溶液を作成した。ポリメラーゼ反応液 50  $\mu$ L として、vRNP 溶液を 20  $\mu$ L、50mM Tris-HCl, 100mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 1U/ $\mu$ L RNase inhibitor, 0.25% Triton N-101, 500  $\mu$ M ATP, 500  $\mu$ M CTP, 500  $\mu$ M UTP, 500  $\mu$ M GTP, 200  $\mu$ M ApG を加え、Positive control（PC）では DMSO（0.5% DMSO）、Daidzein（DZ）では 275  $\mu$ M（0.5% DMSO）添加した。37℃ 30 分反応させたのち、3. のプロトコールに従い cDNA 合成を行い Real-time PCR を行った。

## 5.統計解析

対応のないt検定とSPSS version 21.0ソフトウェア (SPSS, Inc., Chicago, IL) を使用した Tukey-Kramer 検定による分散分析を使用して、統計分析を実施した。

## 実験結果

### 1. IAV の RdRp の反応時間条件

RdRp 反応のための最適条件を決めるために、RdRp 反応 0、15、30、60、120 分で検討したところ、セグメント 1 では 120 分 ( $7.8 \pm 0.39 \times 10^3$  copies)、セグメント 4 では 60 分 ( $3.6 \pm 0.23 \times 10^3$  copies)、セグメント 5 では 60 分 ( $1.1 \pm 0.01 \times 10^4$  copies) において、mRNA 産物が最大となった (図 1A,B,C)。したがって、各セグメントの最大反応速度の 1/2 に相当する 30 分とした。

### 2. IAV の RdRp の反応温度条件

RdRp 反応の最適温度は、4°C から 42°C の範囲で検討した。セグメント 1 では、30~37°C で最も高い活性が観察され (図 2A)、セグメント 4 と 5 では、15°C~37°C の間で温度依存的に mRNA の産生量が増加した (図 2B,C)。また、すべてのセグメントにおいて、42°C の高温条件下で RdRp 活性が低下した (図 2A,B,C)。そこで、RdRp の反応温度を 37°C に設定した。

### 3. リバビリン三リン酸 (Ribavirin-triphosphate; RTP) による IAV の RdRp 反応への影響

今回開発した RdRp 活性測定法が、RdRp 阻害化合物を評価できるかどうかを調べるために、インフルエンザウイルスの RdRp を阻害することが報告されているリバビリン三リン酸 (RTP) の阻害効果を解析した。セグメント 1 では、200  $\mu$ M および 300  $\mu$ M の RTP は、コントロールと比較して、それぞれ 46.4% および 47.9% の mRNA 合成を阻害した (図 3A)。セグメント 4 および 5 では、RTP の添加により、濃度依存的に mRNA の生成が阻害された。これらの RTP によるインフルエンザウイルス RdRp 活性の阻害効果は、これまでに報告されているもの<sup>(11,12)</sup>と同様の結果であった (図 3B,C)。

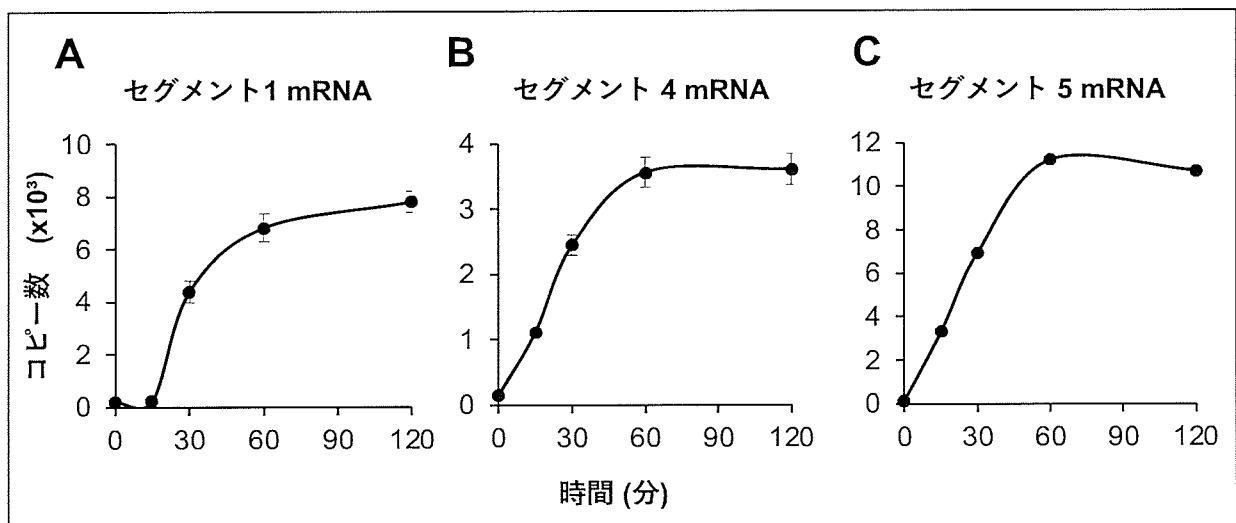


図 1 IAV の RdRp の至適反応時間。(A)セグメント 1 mRNA、(B)セグメント 4 mRNA、(C)セグメント 5 mRNA。データは平均値±標準偏差で示した(n = 3)。

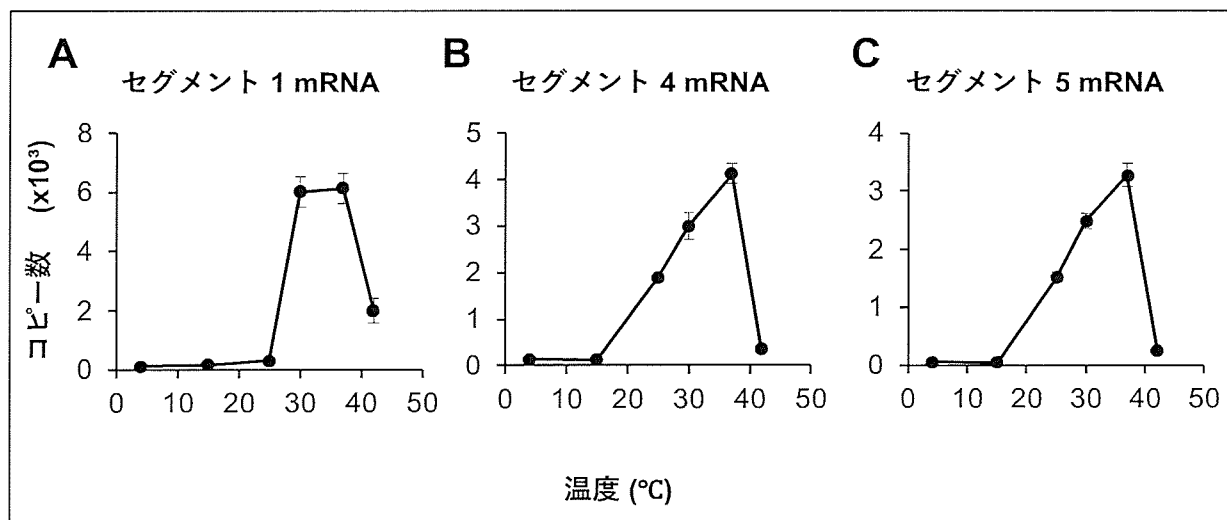


図 2 IAV の RdRp の至適反応温度。(A)セグメント 1 mRNA、(B)セグメント 4 mRNA、(C)セグメント 5 mRNA。データは平均値±標準偏差で示した(n = 3)。

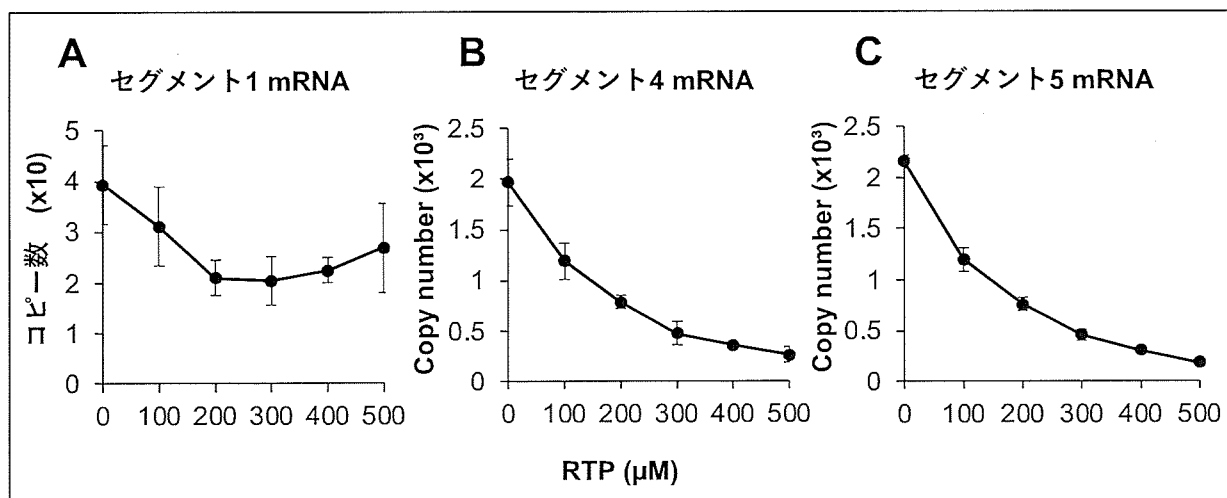


図 3 IAV の RdRp 反応における RTP の影響。(A)セグメント 1 mRNA、(B)セグメント 4 mRNA、(C)セグメント 5 mRNA。ポリメラーゼ反応液に 0-500μM の RTP を加えた。RTP は GTP 阻害剤として使用されるため、本実験の GTP 濃度は 5μM とした。データは平均値±標準偏差で示した(n = 3)。

#### 4. ダイゼインによる IAV の RdRp 活性への影響

感染細胞において、IAV 感染 4 時間における各セグメントの mRNA 合成を測定したところ、検討した全てのセグメントにおいてダイゼインのウイルス RNA 合成阻害が確認できた。そこで、上述の開発した RdRp 活性測定法によりダイゼインの抗 RdRp 活性を解析したところ、すべてのセグメントにおけるダイゼインによる阻害は認められなかった。このことから、ダイゼインは無細胞条件においてウイルスポリメラーゼに直接

的に影響しない可能性が示唆された。

## 考察

本研究では、超遠心法および放射性同位元素を用いずに、PCR 法によって検出可能な新規 RdRp 活性測定法を確立し、大豆イソフラボンのダイゼインによる抗 IAV 作用メカニズムの検証を行った。Kawakami ら<sup>(10)</sup>の手法を PR8 ウイルス株用に改変しウイルス RNA を vRNA、cRNA、mRNA の 3 つに分けて解析を行ったところ、ダイゼインによるウイルス mRNA の阻害がみられた。つまり、ダイゼインはウイルスの蛋白合成に必要な mRNA の転写を阻害することが示された。

Xiao らは、マグネシウム存在下での PA と宿主 mRNA の相互作用を分子動力学シミュレーション (MD) によって調べた<sup>(13)</sup>。ウイルスの RNA ポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼ活性にマグネシウムイオンが必要であることを報告した<sup>(13)</sup>。我々の確立したポリメラーゼ活性試験においても、マグネシウムイオンの濃度が下がるにつれポリメラーゼ活性が低下した (データは示さず)。さらに、RdRp 阻害剤の RTP の濃度依存的にセグメント 4、5 の mRNA 合成が低下したことから (図 3B,C) 本実験系が正確に評価できているといえる。セグメント 1 については合成された mRNA 量が少なかったことで、差がみられなかったと考えられる (図 3A)。また、これまで報告されている RdRp 活性のアッセイ法では放射性同位元素を用い新規合成された RNA を標識しているが<sup>(6,14)</sup>、本研究は放射性同位元素を用いず in vitro で RdRp 活性を測定した最初の研究であるといえる。しかしながら、本実験でダイゼインが IAV の RdRp 活性を低下させるという結果は得られなかった。一方で、Chen らは、ダイゼインが細胞内のマグネシウム濃度を低下させると報告している<sup>(15)</sup>。彼らはダイゼインによる細胞内の  $Mg^{2+}$  ATPase 活性を評価した<sup>(15)</sup>。我々が行った実験はウイルス粒子のみを取り出し in vitro でダイゼインの直接的なウイルスへの影響をみており宿主細胞の因子を考慮していない。ダイゼインが感染細胞においてウイルス RNA 合成を阻害していることから、ダイゼインはウイルス酵素に直接作用するのではなく、宿主細胞へ何らかのシグナルを動かし抗ウイルス RNA 合成作用を示している可能性が示唆された。

## 要約

大豆イソフラボンのダイゼインは抗 IAV 効果を発揮し、そのメカニズムのひとつにウイルス RNA 合成阻害があることを確認した。そこで、インフルエンザの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の活性を評価することとした。従来の方法では、超遠心機を用いてウイルス粒子を分離し、 $^{32}P$  などの放射性同位元素で標識したヌクレオシドを用いて定量していた。本研究では、超遠心機や放射性同位元素を用いずに RdRp の活性を評価する方法を開発した。培養上清から磁気ビーズを用いて精製したウイルス粒子から RdRp を抽出した。タグ付きプライマーを用いた逆転写法により、ストランド特異的な Real time RT-PCR 法を開発した。タグ配列をフォワードプライマーとし、segment 特異的なリバースプライマーを用いてリアルタイム PCR を行うことで、segment 1、4、5 の mRNA を特異的に定量することができた。RdRp による in vitro RNA 合成の最適条件として、温度、反応時間を検討した結果、 $37^{\circ}C$ 、30 分の条件が最適であ

ることがわかった。また、RdRp の阻害剤であるリバビリン三リン酸によって mRNA の合成量が減少したことから、この評価法は RdRp の阻害剤のスクリーニングに利用できることが示された。一方、ダイゼインの抗 RdRp 効果を検討したところ、阻害は認められなかった。このことから、ダイゼインは RdRp に直接作用するのではなく、何らかの宿主因子を介してウイルス RNA 合成を阻害する可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

## 文献

1. Fiore, A. E., Uyeki, T. M., Broder, K., Finelli, L., Euler, G. L., & Singleton, J. A., ... Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2010). Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*, 59(RR-8), 1–62.
2. Portela, A., & Digard, P. (2002). The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *The Journal of general virology*, 83(Pt 4), 723–734. doi:10.1099/0022-1317-83-4-723
3. Sheu, T.G., Deyde, V.M., Okomo-Adhiambo, M., Garten, R.J., Xu, X., Bright, R.A., Butler, E.N., Wallis, T.R., Klimov, A.I., Gubareva, L.V., 2008. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (9), 3284-3292.
4. Omoto, S., Speranzini, V., Hashimoto, T., Noshi, T., Yamaguchi, H., Kawai, M., Kawaguchi, K., Uehara, T., Shishido, T., Naito, A., Cusack, S., 2018. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci. Rep.* 8 (1), 9633.
5. Furuta, Y., Gowen, B.B., Takahashi, K., Shiraki, K., Smee, D.F., Barnard, D.L., 2013. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* 100 (2), 446-454.
6. Furuta, Y., Takahashi, K., Kuno-Maekawa, M., Sangawa, H., Uehara, S., Kozaki, K., Nomura, N., Egawa, H., Shiraki, K., 2005. Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (3), 981-986.
7. Pilkington, V., Pepperrell, T., Hill, A., 2020. A review of the safety of favipiravir - a potential treatment in the COVID-19 pandemic? *Journal of virus eradication* 6 (2), 45-51.
8. Nagai, E., Iwai, M., Koketsu, R., Sogabe, R., Morimoto, R., Suzuki, Y., ... Isegawa, Y. (2018).

- Inhibition of influenza virus replication by adlay tea. *Journal of the science of food and agriculture*, 98(5), 1899–1905.
9. Yuka Horio, Riho Sogabe, Mototada Shichiri, Noriko Ishida, Ryosuke Morimoto, Atsushi Ohshima and Yuji Isegawa *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 2020年 66卷 1号 pp36-42
  10. Kawakami, E., Watanabe, T., Fujii, K., Goto, H., Watanabe, S., Noda, T., Kawaoka, Y., 2011. Strand-specific real-time RT-PCR for distinguishing influenza vRNA, cRNA, and mRNA. *J. Virol. Methods* 173 (1), 1-6.
  11. Eriksson, B., Helgstrand, E., Johansson, N.G., Larsson, A., Misiorny, A., Norén, J.O., Philipson, L., Stenberg, K., Stening, G., Stridh, S., Oberg, B., 1977. Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11 (6), 946-951.
  12. Wray, S.K., Gilbert, B.E., Knight, V., 1985. Effect of ribavirin triphosphate on primer generation and elongation during influenza virus transcription in vitro. *Antiviral Res.* 5 (1), 39-48.
  13. Xiao, S., Klein, M. L., LeBard, D. N., Levine, B. G., Liang, H., MacDermaid, C. M., & Alfonso-Prieto, M. (2014). Magnesium-dependent RNA binding to the PA endonuclease domain of the avian influenza polymerase. *The journal of physical chemistry. B*, 118(4), 873–889.
  14. Shimizu, K., Handa, H., Nakada, S., & Nagata, K. (1994). Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors. *Nucleic acids research*, 22(23), 5047–5053.
  15. Chen, D., Xiong, Y., Tang, Z., Lv, B., & Lin, Y. (2012). Inhibitory effects of daidzein on intestinal motility in normal and high contractile states. *Pharmaceutical biology*, 50(12), 1561–1566.