

ダイズ・納豆成分によるウイルス酵素
メインプロテアーゼの阻害

兵庫県立大学 環境人間学部

加藤 陽二

食は健康の維持増進に大きく関与している。我が国においてダイズは様々な形で幅広く食されている。なかでも納豆の場合は発酵に伴う成分変化も生じ、機能性が強化されることが期待される。この20年のうちに、コロナウイルス関連だけでも、限られた地域ではあるが中東呼吸器症候群 MERS や重症急性呼吸器症候群 SARS が流行した。現在は、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) による感染症 COVID-19 が世界中に蔓延している。このため、日々の食による感染症の予防・制御に関する知識を得て、食を通じて現在および未来の健康を守る必要がある。食成分は薬のように極めて高い特異性や作用は期待できないかもしれないが、副作用の恐れも少なく、毎日苦痛もなく摂取できる優れたツールである。本研究では、食 (ダイズ・納豆) の機能性として新型コロナウイルス制御を設定し、ウイルス酵素メインプロテアーゼ (Main protease, M^{Pro}) 阻害活性に着目した。この酵素 M^{Pro} は変異が少なくウイルス複製に必須の酵素であることから、ファイザーや塩野義製薬が開発した経口治療薬の標的分子にもなっている [1,2]。標的分子の変異が少ないため、将来的な同類のウイルスにも阻害効果が期待できる。具体的にはダイズ・納豆成分による阻害について検討した。研究を通じて、ダイズ・納豆の良さをアピールするのみならず、健康に対する日々の食の重要性を人々に伝えることにつなげたい。

実験方法

試薬類

サンプル (精製品) として、ダイズイソフラボン (ダイゼイン、ゲニステイン、グリシチン)、配糖体 (ダイジン、ゲニスチン、グリシチン)、Vitamin K を用いた。組換え体酵素 M^{Pro} は生城真一教授 (富山県立大学工学部) より提供を受けたものを使用した。陽性コントロール (既知の阻害剤) として、GC376 及びエピガロカテキンガレート (EGCG) を用いた。Ala-Val-Leu-Gln-Gly-Phe-Arg (AVLQSGFR) などのペプチド基質、生成物、安定同位体ペプチドは外部に合成を依頼した。その他の試薬は特級以上の高品質のものを用いた。

酵素活性測定法

既報 [3] に従い、非特異的な阻害を避けるため、0.01% となるように Triton X-100 を加えてプロテアーゼ酵素活性を測定した。酵素活性の変化は、2つの手法を併用した。1つは、消光分子を含む蛍光団含有ペプチド性基質の切断に伴う蛍光ペプチドの生成を HPLC-蛍光検出器により分離して定量する手法であり [3]、標品の阻害活性を評価するために用いた。また2番目の手法として、8つのアミノ酸からなる AVLQSGFR を基質とし、切断物 AVLQ を精密質量分析器 (UHPLC-Q-TOF/MS, X500R, Sciex) により定量した。質量分析による活性測定は、夾雑物の多い納豆成分の阻害評価に利用した。

納豆（自作）の作成

予め市販納豆に湯を入れてかき混ぜ、納豆菌を取り出した。鍋に市販の水煮ダイズとややかぶるくらいの水を加えて3分間煮沸した。温度が下がってから更に納豆菌を混ぜ合わせ、容器に濡れ布巾をかぶせ、恒温機を用いて50°Cで24時間発酵させた。

納豆成分の抽出

自作納豆、市販納豆に対し、水を加えてそれぞれ攪拌し、納豆の粘性成分を取り出した。粘性部分を取り除いた豆は水メタノール混合液（1:1）で粉碎した。粘性成分（溶液）、粉碎した豆溶液をそれぞれ遠心分離して、上清を回収した。沸騰水中で3分間加熱し、再び遠心分離にかけ、上清を回収し、実験に用いた。

実験結果

豆に多く含まれる配糖体含むイソフラボン類（20 μ M）を中心に、ウイルス M^{pro} 酵素阻害活性を調べた。用いた濃度ではいずれもコントロールに対してやや抑制傾向が認められた（図1）。しかしながら同じ濃度で比較のために用いた EGCG は95%以上の阻害を示しており（結果示さず）、イソフラボン類は弱い阻害活性であることがわかった。また、納豆に含まれる Vitamin K1 を用いたところ、ばらつきが大きいものの強い阻害作用は認められなかった。

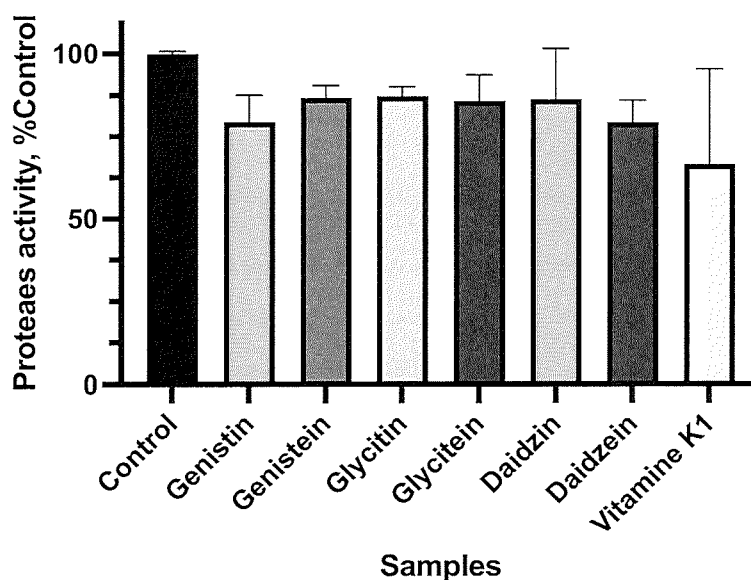


図1 イソフラボン類（配糖体含む）及び Vitamin K1 によるウイルス M^{pro} 酵素活性に与える影響

Vitamin K の中でも K3（メナジオン）はウイルス酵素 M^{pro} に対する阻害作用が報告さ

れている[4,5]。そこで K3 の阻害の濃度依存性を調べたところ、図 2 に示すようにマイクロモルオーダーで阻害が認められ、50%阻害を示す濃度 (IC50 値) は約 10 μ M であった。同じアッセイ系で調べた阻害成分 (ミリセチン、ピセアタンノール、イソチオシアネート類など) と比べても同等レベルの強い阻害活性と言える [3]。

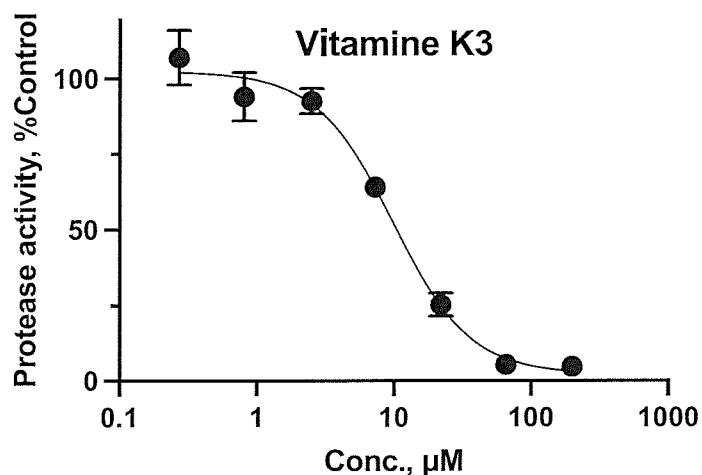


図 2 ウイルス M^{pro} 酵素阻害に対する Vitamin K3 の濃度変化

納豆は大豆を発酵させた食品であり、発酵過程で成分の変化が生じる。そこで、納豆を「ネバネバ」と「豆」に分け、それぞれの成分による M^{pro} 酵素阻害を検討した。なお、納豆は市販品に加え、納豆菌を用いて自家作成した納豆も用いた。なお、納豆成分の酵素阻害アッセイについては夾雑物の影響を最低限に抑えるため、8 残基のペプチド基質 (AVLQSGFR) を用い、生じた 4 残基の消化ペプチド断片 (AVLQ) を質量分析器で定量する手法を用いた。図 3 に示すように、対照 (陽性コントロール) としては、既知の阻害剤である GC376 [6] も用いた。GC376 は強力に阻害活性を示し、測定が正しく行われていることを示している。一方、納豆の場合、「ネバネバ」(粘性) 成分では M^{pro} 酵素阻害が認められず、豆の抽出物からは 50% 前後の阻害が認められた。市販品と自家作成の間では大きな差は認められなかった。

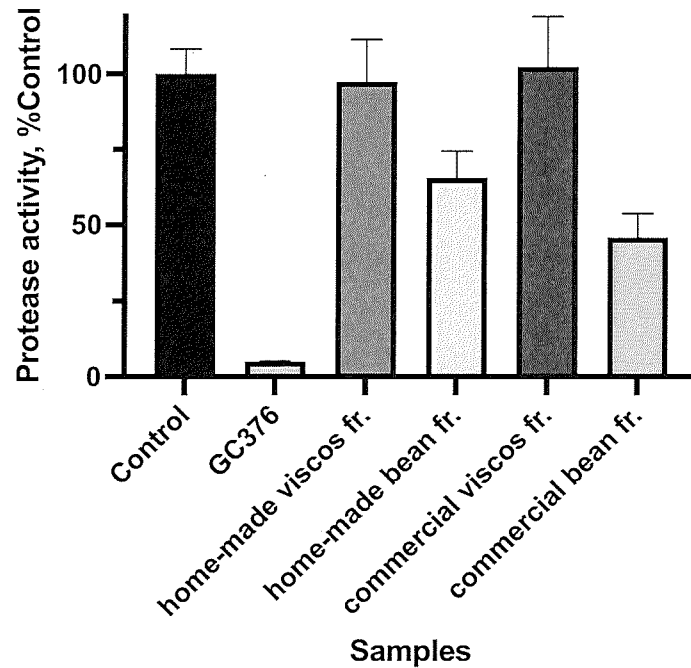


図3 納豆成分（分画）によるウイルス M^{Pro} 酵素阻害活性の比較

考察

新型コロナウイルスに対して、納豆抽出物に含まれるセリンプロテアーゼを介して感染防御に役立つ可能性が示唆されている[7]。今回着目した M^{Pro} 阻害に関しては、納豆の研究ではないものの、納豆に豊富に含まれる Vitamin K3 が M^{Pro} を阻害することが報告されている[4]。加えて原料のダイズにはイソフラボンが豊富に含まれており、M^{Pro} 阻害活性を示すことも考えられ、実際、大豆の煮豆による酵素阻害も報告されている[8]。食成分として、植物由来のフラボノイド、ポリフェノールには *in silico* 研究を含めれば阻害作用が数多く報告されているものの、十分に検証されていない現状にある。そこで、最初にダイズに含まれるイソフラボン類及びその配糖体に焦点をあて、酵素阻害活性を検討した。既存の阻害活性を示す食成分（EGCG やミリセチンなど）に比べるとその阻害活性はわずかであった。これは、用いたイソフラボン類は、キノン構造を生じやすいカテコールやピロガロール基を有していないためと考えている。キノンは化学反応性に富み、容易にチオール基などと反応することから酵素阻害などを誘導しやすい[9]。キノンを有する Vitamin K 類については生体とも親和性が高いと考えられ、酵素阻害薬候補としての期待から検討が進みつつある[4,5]。本研究でも検証したところ、Vitamin K3 については強い阻害活性が認められたが、長い疎水性側鎖を有する K1 では阻害活性がほとんど無かった。阻害に寄与すると考えられるキノン構造を有しているのにも関わらず、側鎖の違いで阻害活性が大きく異なることから、溶解性あるいは酵素の活性部位への親和性が影響していることが示唆される。実際の食品・食事では様々な成分と共存しており、K1 などの疎水性の高い成分も

脂質と複合体を形成するなどして安定に分散している可能性もあるため、今後更なる検討も必要である。

一般的に、発酵に伴い、食成分の変化が報告されている。納豆はダイズの発酵食品であり、機能性の向上も期待できる。納豆のウイルス酵素阻害について検討したところ、ネバネバに含まれる粘性の高い分画ではウイルス酵素の阻害活性が認められなかった。つまり、ネバネバに含まれることが予想されるグルタミン酸やフラクタンには阻害作用がないことが示唆される。ただし、作用濃度など様々なファクターが影響すると考えられるため、現時点では阻害活性を否定することはできない。加えて、感染したウイルスに由来する酵素の阻害、つまりは体内での阻害作用を考えた場合、粘性を生じる主成分である高分子成分は分解されて吸収代謝されることが予想されるため、実際の体内ではネバネバ成分そのものによるウイルス酵素阻害が生じる状況は考えにくい。

一方、納豆の豆部分の抽出物では50%程度のウイルス酵素活性阻害が認められた。しかしながらその阻害成分の同定には至っておらず、今後の検討が必要である。また、煮豆と納豆の比較、及び、発酵プロセスが阻害活性に与える影響についても調べる必要がある。本研究では納豆の自家作成も行っており、今後、発酵に伴う経時的な酵素阻害活性の変化や成分変動の検討に活用したい。

本研究では、精製組換酵素と精製品／納豆分画成分を試験管内で混合した系を評価に用いた。実際のウイルス感染細胞では、細胞内でウイルス遺伝子情報の翻訳によりウイルス酵素が作られ、細胞内でその酵素活性が発現してウイルス複製へと進む。食による酵素阻害で感染制御を示すためには、感染細胞内で食成分が酵素に対して阻害することを証明する必要がある。実際のコロナウイルスを感染させた細胞はそのモデルとして最適であるが、生物安全性の高い施設や取り扱いに熟練した研究者が実施する必要がある。そこで現在、ウイルス酵素遺伝子を含むプラスミドを細胞に取り込ませて細胞内でウイルス酵素が発現する安全・安心なウイルス感染細胞モデルの構築[10]を進めており、細胞外から投与した納豆成分が実際の細胞内まで到達し、細胞内で発現したウイルス酵素を阻害するか、調べていく予定である。

要約

コロナウイルス酵素(Main protease)に対する食成分(ダイズ・納豆)の阻害を調べた。精製イソフラボン標品では弱い阻害活性が認められた。Vitamin KではK1は弱いものの、K3に強い阻害(IC₅₀=約10 μM)が認められた。Vitamin Kにおいてはキノン構造が阻害活性に寄与すること考えられるが、側鎖の影響も大きいことがわかった。納豆のネバネバ(粘性)成分と豆部分を分けて阻害活性を調べたところ、粘性成分には阻害作用は認められなかったが、豆の抽出物に約50%程度の酵素活性阻害を見出した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りましたタカノ農芸化学研究助成財団に深く感謝申し上げます。

文献

1. M. Sasaki, K. Tabata, M. Kishimoto, Y. Itakura, H. Kobayashi, T. Ariizumi, K. Uemura, S. Toba, S. Kusakabe, Y. Maruyama, S. Iida, N. Nakajima, T. Suzuki, S. Yoshida, H. Nobori, T. Sanaki, T. Kato, T. Shishido, W.W. Hall, Y. Orba, A. Sato, and H. Sawa, S-217622, a SARS-CoV-2 main protease inhibitor, decreases viral load and ameliorates COVID-19 severity in hamsters, *Sci Transl Med* 15 (2023) eabq4064, doi: 10.1126/scitranslmed.abq4064.
2. D.R. Owen, C.M.N. Allerton, A.S. Anderson, L. Aschenbrenner, M. Avery, S. Berritt, B. Boras, R.D. Cardin, A. Carlo, K.J. Coffman, A. Dantonio, L. Di, H. Eng, R. Ferre, K.S. Gajiwala, S.A. Gibson, S.E. Greasley, B.L. Hurst, E.P. Kadar, A.S. Kalgutkar, J.C. Lee, J. Lee, W. Liu, S.W. Mason, S. Noell, J.J. Novak, R.S. Obach, K. Ogilvie, N.C. Patel, M. Pettersson, D.K. Rai, M.R. Reese, M.F. Sammons, J.G. Sathish, R.S.P. Singh, C.M. Steppan, A.E. Stewart, J.B. Tuttle, L. Updyke, P.R. Verhoest, L. Wei, Q. Yang, and Y. Zhu, An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19, *Science* 374 (2021) 1586-1593, doi: doi:10.1126/science.abl4784.
3. Y. Kato, A. Higashiyama, E. Takaoka, M. Nishikawa, and S. Ikushiro, Food phytochemicals, epigallocatechin gallate and myricetin, covalently bind to the active site of the coronavirus main protease in vitro, *Adv Redox Res* 3 (2021) 100021, doi: 10.1016/j.arres.2021.100021.
4. Z. He, W. Zhao, W. Niu, X. Gao, X. Gao, Y. Gong, and X. Gao, Molecules inhibit the enzyme activity of 3-chymotrypsin-like cysteine protease of SARS-CoV-2 virus: the experimental and theory studies, *bioRxiv* (2020) 2020.2005.2028.120642, doi: 10.1101/2020.05.28.120642.
5. R. Wang, Q. Hu, H. Wang, G. Zhu, M. Wang, Q. Zhang, Y. Zhao, C. Li, Y. Zhang, G. Ge, H. Chen, and L. Chen, Identification of vitamin K3 and its analogues as covalent inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro, *Int J Biol Macromol* 183 (2021) 182-192, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.129.
6. W. Vuong, M.B. Khan, C. Fischer, E. Arutyunova, T. Lamer, J. Shields, H.A. Saffran, R.T. McKay, M.J. van Belkum, M.A. Joyce, H.S. Young, D.L. Tyrrell, J.C. Vederas, and M.J. Lemieux, Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication, *Nat Commun* 11 (2020) 4282, doi: 10.1038/s41467-020-18096-

- 2.
7. M. Oba, W. Rongduo, A. Saito, T. Okabayashi, T. Yokota, J. Yasuoka, Y. Sato, K. Nishifuji, H. Wake, Y. Nibu, and T. Mizutani, Natto extract, a Japanese fermented soybean food, directly inhibits viral infections including SARS-CoV-2 in vitro, *Biochem Biophys Res Commun* 570 (2021) 21-25, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.07.034.
8. 吉村 美紀, 加藤 陽二, 和田 裕子, 島田 良子, 小林 美幸, 赤松 成基, 鯛 かおる, 高山 裕貴, 兵庫県産黒大豆のミネラル及びポリフェノール類に着目した成分分析と機能性, 兵庫県立大学環境人間学部研究報告 25 (2023) 41-46, <http://id.nii.ac.jp/1214/00006600/>
9. Y. Kato, and N. Suga, Covalent adduction of endogenous and food-derived quinones to a protein: its biological significance, *J Clin Biochem Nutr* 62 (2018) 213-220, doi: 10.3164/jcbrn.18-26.
10. S.J. Resnick, S. Iketani, S.J. Hong, A. Zask, H. Liu, S. Kim, S. Melore, F.Y. Lin, M.S. Nair, Y. Huang, S. Lee, N.E.S. Tay, T. Rovis, H.W. Yang, L. Xing, B.R. Stockwell, D.D. Ho, and A. Chavez, Inhibitors of coronavirus 3CL proteases protect cells from protease-mediated cytotoxicity, *J Virol* 95 (2021) e0237420, doi: 10.1128/jvi.02374-20.