

博士論文

新規コメ発酵エキス Y30 および
cyclobakuchiols A, B, C, D における
抗インフルエンザ活性の研究

徳島文理大学大学院薬学研究科

薬学専攻 博士課程

田 中 成 枝

指導教授 葛原 隆

令和三年提出

目次

略語一覧.....	3
諸 論.....	5
本 論.....	12
第一章 コメ発酵エキス（ライスパワー®エキス）による抗インフルエンザ活性の有無とその作用機序の検討.....	12
第一節 コメ発酵エキス：ライスパワー®エキスとは.....	12
第二節 Y30 の Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞に対する毒性の評価.....	15
第三節 A 型インフルエンザウイルスに対する Y30 の感染抑制効果.....	18
第四節 A 型インフルエンザウイルスに対する Y30 の増殖抑制効果.....	25
第五節 A 型インフルエンザ H1N1 ウイルスの血球凝集活性に対する Y30 の影響.....	30
第六節 A 型インフルエンザ H1N1 ウイルスの NA 活性に対する Y30 の影響.....	34
第七節 A 型インフルエンザ H1N1 ウイルスの RdRp 活性に対する Y30 の影響.....	38
第八節 A 型インフルエンザ H1N1 ウイルス粒子への Y30 による直接的影響.....	42
第九節 A 型インフルエンザ H1N1 ウイルスに対する Y30 の水画分または酢酸エチル画分の感染抑制作用.....	46
第十節 小括および考察.....	49
第二章 cyclobakuchiol 類の抗インフルエンザ活性の有無とその作用機序の検討.....	53
第一節 cyclobakuchiols A-D とは.....	53
第二節 cyclobakuchiols A-D の MDCK 細胞に対する毒性の評価.....	57
第三節 A 型インフルエンザウイルスに対する cyclobakuchiols A-D の感染抑制効果.....	60
第四節 A 型インフルエンザウイルスに対する cyclobakuchiols A-D の増殖抑制効果.....	66
第五節 A 型インフルエンザウイルスに対する cyclobakuchiols A-D の mRNA 発現抑制効果の検討.....	69

第六節 A型インフルエンザウイルスに対する cyclobakuchiols A-D のタンパク質発現抑制効果の 検討.....	76
第七節 A型インフルエンザウイルス感染細胞における cyclobakuchiols A-D の interferon- β (<i>Ifn-β</i>) および myxovirus-resistant protein 1 (<i>Mx1</i>) の mRNA 発現量に及ぼす影響.....	81
第八節 cyclobakuchiols A-D の Nrf2 活性化経路への影響.....	85
第九節 小括および考察.....	91
引用文献.....	103
発表論文.....	115
謝 辞.....	116

略語一覽

4-MU : 4-methylumbelliferone

A/Aichi/2/68 : strain A/Aichi/2/1968 (H3N2)

A/CA/7/09 : strain A/California/7/2009 (H1N1) pdm

A/PR/8/34 : strain A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)

A/WSN/33 : strain A/WSN/1933 (H1N1)

ANOVA : analysis of variance

BSA : bovine serum albumin

CPC : cetylpyridinium chloride

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

FBS : fetal bovine serum

Fluc : *Firefly* luciferase

HA : hemagglutinin

Ifn- β : Interferon- β

MDCK cell : Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell

MOI : multiplicity of infection

MTT assay : 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT)
assay

Mx1 : Myxovirus-resistant protein 1

NA : neuraminidase

NB : naphthol blue-black

NP : nucleoprotein

Nqo1 : NAD(P)H quinone oxidoreductase 1

Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

NS : non-structural protein

NS1 : non-structural protein 1

OC : oseltamivir carboxylate

P/S : penicillin and streptomycin

PBS : phosphate-buffered saline

PFU/mL : Plaque Forming Units per mL

RdRp : RNA-dependent RNA polymerase

RLU : Relative Light Unit

Rluc : *Renilla* luciferase

RNP : Ribonucleoprotein

RT-qPCR : reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction

TEM : Transmission Electron Microscope

TPCK : L-tosylamido-2-phenyl ethyl chloromethyl ketone

UI : Uninfected cells

WHO : World Health Organization

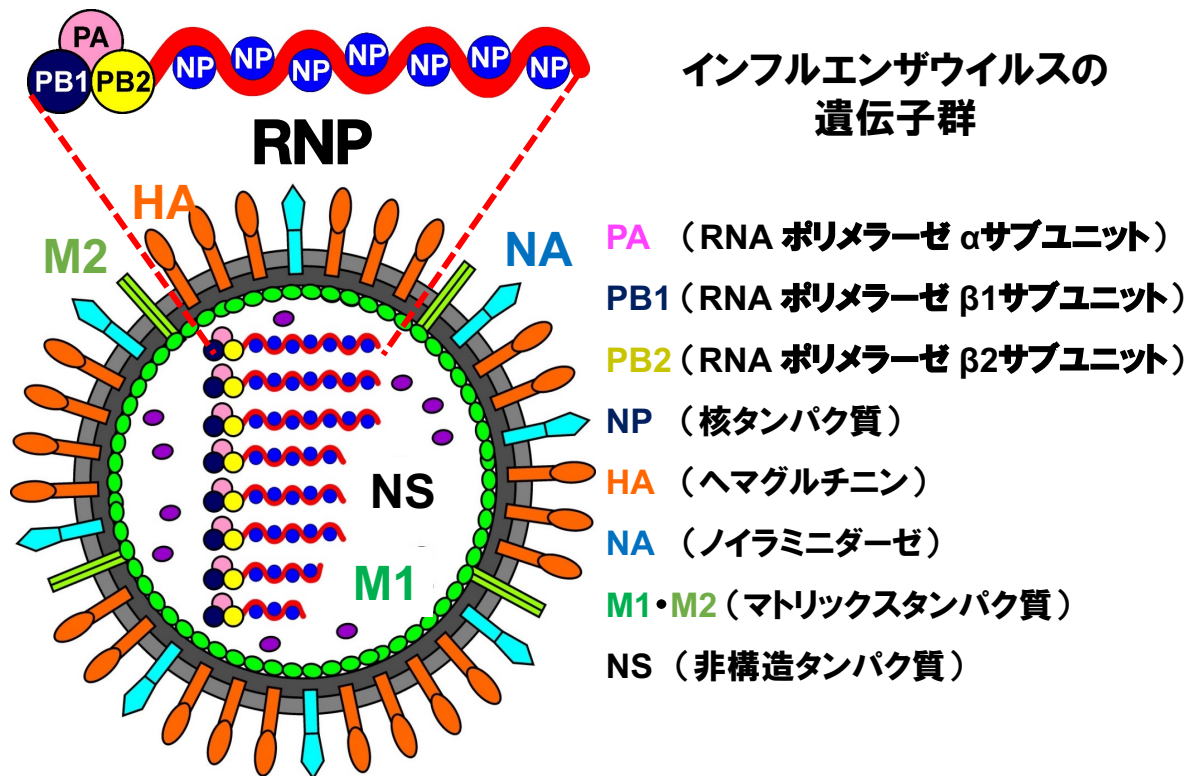
諸 論

インフルエンザウイルス・パンデミックの歴史

世界保健機関 (WHO) は、年間約 300～500 万件の重症インフルエンザ感染者が発生し、約 29～65 万人が死亡すると推計している[1]。これまで、インフルエンザウイルスのパンデミックは、1891年ロシアでの H3N8 型ウイルスパンデミックに始まり、1918 年の H1N1 型ウイルスによるスペイン風邪では世界で 5000 万～1 億人、1957 年の H2N2 型ウイルスによるアジア風邪では 200 万人、1968 年の H3N2 型ウイルスによる香港風邪では 100 万人もの死者を出した[2]。最近では、1997 年の H5N1 型鳥インフルエンザや 2009 年の H1N1 型豚インフルエンザ、2013 年の H7N9 型新型鳥インフルエンザによるパンデミックが起こっている[3]。このように、インフルエンザは定期的に変異を繰り返しながらパンデミックを引き起こしており、人類にとって大きな脅威となっている。

インフルエンザウイルスの型や構造

インフルエンザウイルスは、A 型、B 型、C 型および D 型が存在しており、季節性インフルエンザの流行を引き起こすのは、主に A 型と B 型インフルエンザウイルスである。A 型インフルエンザウイルスには、16 種類の hemagglutinin (HA) と 9 種類の neuraminidase (NA) が存在し、それぞれの番号の組み合わせにより、144 種類ものサブタイプが存在する。インフルエンザウイルスは、8 本に分節したマイナス鎖の RNA をゲノムとし、ウイルスを構成するタンパク質をコードしている。PA、PB1、PB2 タンパク質は、RNA 依存性 RNA 合成酵素 [RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)] を構成し、nucleoprotein (NP) と共に、分節単位である ribonucleoprotein (RNP) を構成している。ウイルス表面の膜上には、宿主細胞への吸着に関与する HA、宿主細胞内で増殖したウイルスの放出に係る NA、マトリックスタンパク質として知られる M2 で構成されており、内部には膜を裏打ちする M1、非構造タンパク質の non-structural protein (NS) が存在している (図 1)。

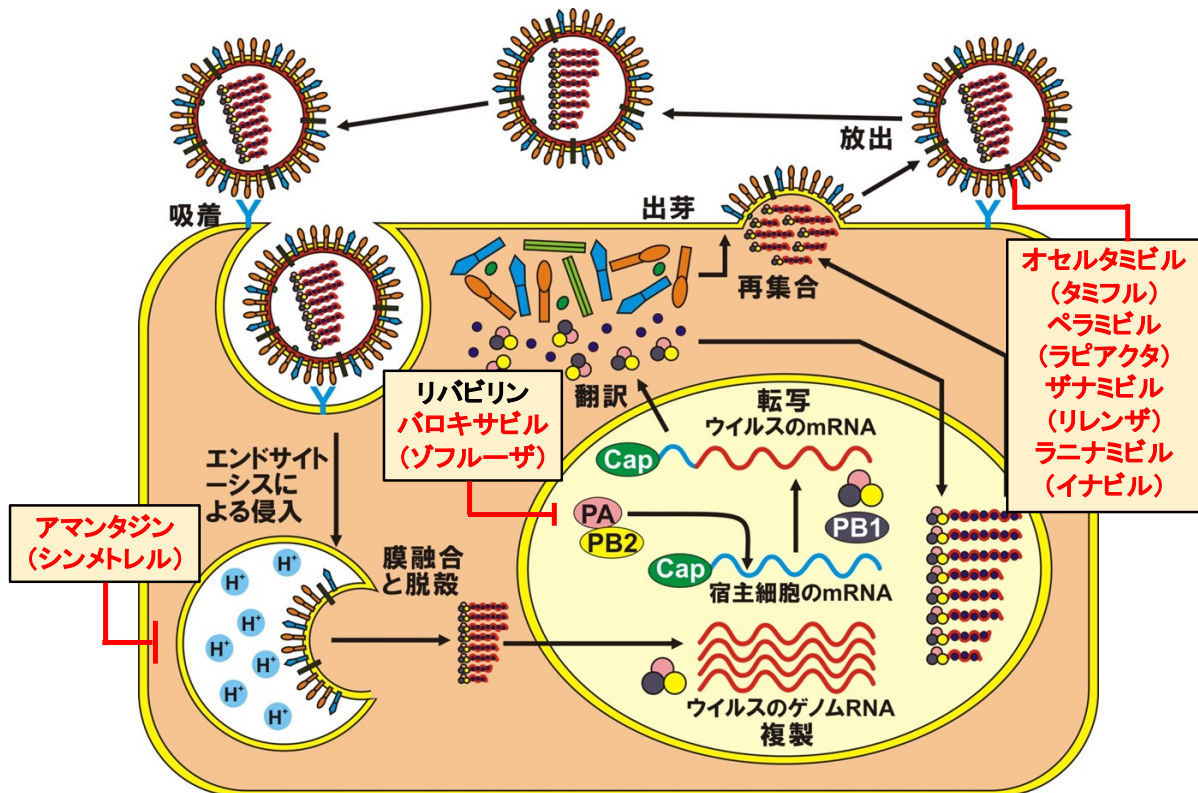


(図 1) A 型インフルエンザウイルスの構造

A 型インフルエンザウイルスは、8 本に分節する RNP 複合体とウイルスタンパク質で構成されている。表面にある HA や NA の種類によって流行株の表記が決定される。

インフルエンザウイルスの生活環

このウイルスの生活環は、ウイルス表面のタンパク質 HA が、宿主細胞膜表面上の糖鎖に吸着することから始まり、ウイルス粒子がエンドサイトーシスにより細胞内部へ侵入する。イオンチャネルの役割を果たす M2 が水素イオンを取り込むと、小胞内部が酸性に変化することで HA が小胞膜と融合し、ウイルス RNP が宿主細胞質内に放出される。ウイルス RNP は、宿主細胞の核内に移動し、ウイルス RNA 合成酵素の働きにより、ゲノム複製が起きると共に、ウイルス構成タンパク質の mRNA も合成され、宿主細胞質内にウイルス構成タンパク質が作られる。そして、核内で作られた RNP とウイルス構成タンパク質は宿主細胞膜下で集合し、細胞膜上に出芽、NA により細胞外に放出される (図 2)。



(図 2) インフルエンザウイルスの生活環と抗インフルエンザ薬

ウイルス生活環と抗インフルエンザ薬の作用機序を示す。

既存の抗インフルエンザウイルス薬

現在、一般的に使用されている抗インフルエンザ薬は、このようなウイルス生活環の一部を標的としている。アマンタジンは、脱殻に關与する M2 チャネルを阻害して、RNP の遊離および宿主細胞核内への移行を阻害する。脱殻を阻害されたウイルスは増殖することができなくなるが、アマンタジンは A 型インフルエンザウイルスの複製の初期段階の阻害にのみ有効である。オセルタミビルやザナミビルなどは、インフルエンザウイルスの NA を特異的に阻害し、宿主細胞からのインフルエンザウイルスの遊離を阻害することで、ウイルスが他の細胞へ拡散するのを防ぐことにより、ウイルス増殖を抑制する[4]。最近承認されたバロキサビルは、インフルエンザウイルス特有の酵素であるキャップ依存性エンドヌクレアーゼの活性を選択的に阻害し、ウイルスの mRNA 合成を阻害することで抗インフルエンザウイルスの増殖を抑制する[5]。

抗インフルエンザウイルス薬に対する耐性ウイルスの出現

現在流行しているインフルエンザウイルス株のほぼすべてが、アマンタジンに耐性を有している[1,2,4]。また、オセルタミビルに耐性を示す季節性 A 型インフルエンザ H1N1 型ウイルスも出現している[4,6-10]。一方、PA-I38T/M/F 変異を有する H1N1 型および H3N2 型インフルエンザウイルスは、バロキサビルに対して耐性を示すことが報告されている[11,12]。国立感染症研究所から報告されているように、これらの薬剤に対する耐性ウイルス株は、毎年検出されている状況である（図 3）。

これらの薬剤耐性ウイルス株は、インフルエンザウイルスの遺伝子変異が原因となって出現する。インフルエンザウイルスの遺伝子変異は、インフルエンザウイルスが持つ RdRp の複製エラーにより発生し、薬剤と結合する部分のアミノ酸が別のアミノ酸に置換されることで薬剤耐性を獲得する。

したがって、変異を繰り返すインフルエンザウイルスによるパンデミックを予防・制御するために、新規の抗インフルエンザ薬の開発が急務となっている。特に、インフルエンザウイルスのタンパク質ではなく、ウイルス粒子の直接的な破壊やウイルス生活環に關連する宿主細胞因子を標的とした、耐性ウイルス株を生み出し難い抗

インフルエンザウイルス薬の開発が求められている。

2018/2019シーズン											
A(H1N1)pdm09						A(H3N2)					
エンドヌクレアーゼ阻害薬		ノイラミニダーゼ阻害薬		M2阻害薬		エンドヌクレアーゼ阻害薬		ノイラミニダーゼ阻害薬		M2阻害薬	
ハロキサピル	オセルタミビル	ベラミビル	ザナミビル	ラニナミビル	アマンタジン	ハロキサピル	オセルタミビル	ベラミビル	ザナミビル	ラニナミビル	アマンタジン
耐性株数 (%)	6 ^a (1.8%)	21 ^b (1.0%)	21 ^b (1.0%)	0	188 (100%)	34 ^c (9.6%)	0	0	0	0	155 (100%)
解析株数	331	2,163	2,163	329	188	356	331	331	331	331	155
分離・検出報告数	3,038					4,675					
2019/2020シーズン											
A(H1N1)pdm09						A(H3N2)					
エンドヌクレアーゼ阻害薬		ノイラミニダーゼ阻害薬		M2阻害薬		エンドヌクレアーゼ阻害薬		ノイラミニダーゼ阻害薬		M2阻害薬	
ハロキサピル	オセルタミビル	ベラミビル	ザナミビル	ラニナミビル	アマンタジン	ハロキサピル	オセルタミビル	ベラミビル	ザナミビル	ラニナミビル	アマンタジン
耐性株数 (%)	1 ^a (0.12%)	41 ^b (1.5%)	41 ^b (1.5%)	0	82 (100%)	0	0	0	0	0	37 (100%)
解析株数	831	2,658	2,658	375	82	80	90	90	90	90	37
分離・検出報告数	5,119					132					
2020/2021シーズン											
A(H1N1)pdm09						A(H3N2)					
エンドヌクレアーゼ阻害薬		ノイラミニダーゼ阻害薬		M2阻害薬		エンドヌクレアーゼ阻害薬		ノイラミニダーゼ阻害薬		M2阻害薬	
ハロキサピル	オセルタミビル	ベラミビル	ザナミビル	ラニナミビル	アマンタジン	ハロキサピル	オセルタミビル	ベラミビル	ザナミビル	ラニナミビル	アマンタジン
耐性株数 (%)	0	0	0	0	1 (100%)	0	0	0	0	0	0
解析株数	1	2	2	1	1	0	2	2	2	2	0
分離・検出報告数	2					2					

(図3) 抗インフルエンザ薬耐性ウイルス株の検出状況

エンドヌクレアーゼ阻害薬、ノイラミニダーゼ阻害薬、M2阻害薬に対する A(H1N1)pdm09 株および A(H3N2) 株の耐性株検出状況。(出典：国立感染症研究所ホームページ 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス)

天然由来物質における創薬の歴史と現状

これまでの創薬の歴史として、20世紀半ばにカビ由来のペニシリンや放線菌由来のストレプトマイシンが抗生物質として実用化されて以来、多数の生理活性物質が微生物からスクリーニングされ、製剤化されてきた。脂質異常症治療薬のプラバスタチンや免疫抑制剤のタクロリムス、抗真菌薬のミカファンギン、駆虫薬のイベルメクチン、抗がん剤のエリブリンなど、多彩な薬理活性を持った薬が製剤化されている[13-19]。このように、微生物や植物などが産生する天然由来物質は構造の多様性が高く、生命活動によって産生されるため豊富な生理活性を示すが、その構造が複雑であるがゆえに、全合成や誘導展開が困難で、開発中止となるものも多い[20]。1990年代以降は、コンビナトリアルケミストリーにより、大量の人工的な化合物合成を行い、ハイスループットスクリーニングにより有効な化合物の同定がなされてきたが、合成できる化合物の数には限りがあることも明らかとなった[20]。現在、販売されている低分子医薬品のうち、およそ6割が天然物由来もしくは天然物由来物質を基に合成された化合物であることが報告されている[21]。以上のことから、天然物由来物質からの創薬は、再び注目を集めており、新規抗インフルエンザウイルス薬のリード化合物の探索を天然由来物質で行うことは、有用であるといえる。

本研究の目的

本研究では、微生物由来の抽出液であるコメ発酵エキスおよび植物由来化合物である cyclobakuchiol 類に着目し、これらが新規抗インフルエンザウイルス薬のリード化合物としての可能性を秘めているか検討を行なった。

コメ発酵エキスは、日本酒の醸造に使用される日本古来のコウジカビ (*Aspergillus oryzae*) を用いて日本独自の発酵技術により作製される。ライスパワー®エキスは、勇心酒造株式会社（香川県、日本）が開発したコメ発酵エキスである。今回検討したエキスは、*A. oryzae*、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、乳酸菌などの微生物を用いて糖化・発酵させて得られる新規のコメ発酵エキスであり、様々な生物学的・薬理学的特性を有している。その中でも、健康食品として販売されているライスパワー®エキス No. 101 は、ヘリコバクター・ピロリ菌 (*H. pylori*) に対する感染抑制作用が報告

されている[22]。

一方、**cyclobakuchiol** 類は、中国医学の伝統医学に使用されてきた植物のひとつであるオランダビユに含まれる化合物である。この類縁体である **bakuchiol** は、光学異性体選択的に抗インフルエンザウイルス活性があることが明らかとなっている[23]。そこで、**cyclobakuchiol** 類が抗インフルエンザウイルス活性を有するか検討し、類縁体である **bakuchiol** との効果を比較することで、抗インフルエンザ活性に必要な特徴を検出することが可能である。特徴を検出することができれば、新規抗インフルエンザ薬の開発にもつながると考える。

本博士論文では、第一章にてコメ発酵エキスの抗インフルエンザ活性とその作用機序について、第二章にて **cyclobakuchiol** 類の抗インフルエンザ活性と構造-活性相関についてそれぞれ示した。

本 論

第一章 コメ発酵エキス（ライスパワー®エキス）による抗インフルエンザ活性の有無とその作用機序の検討

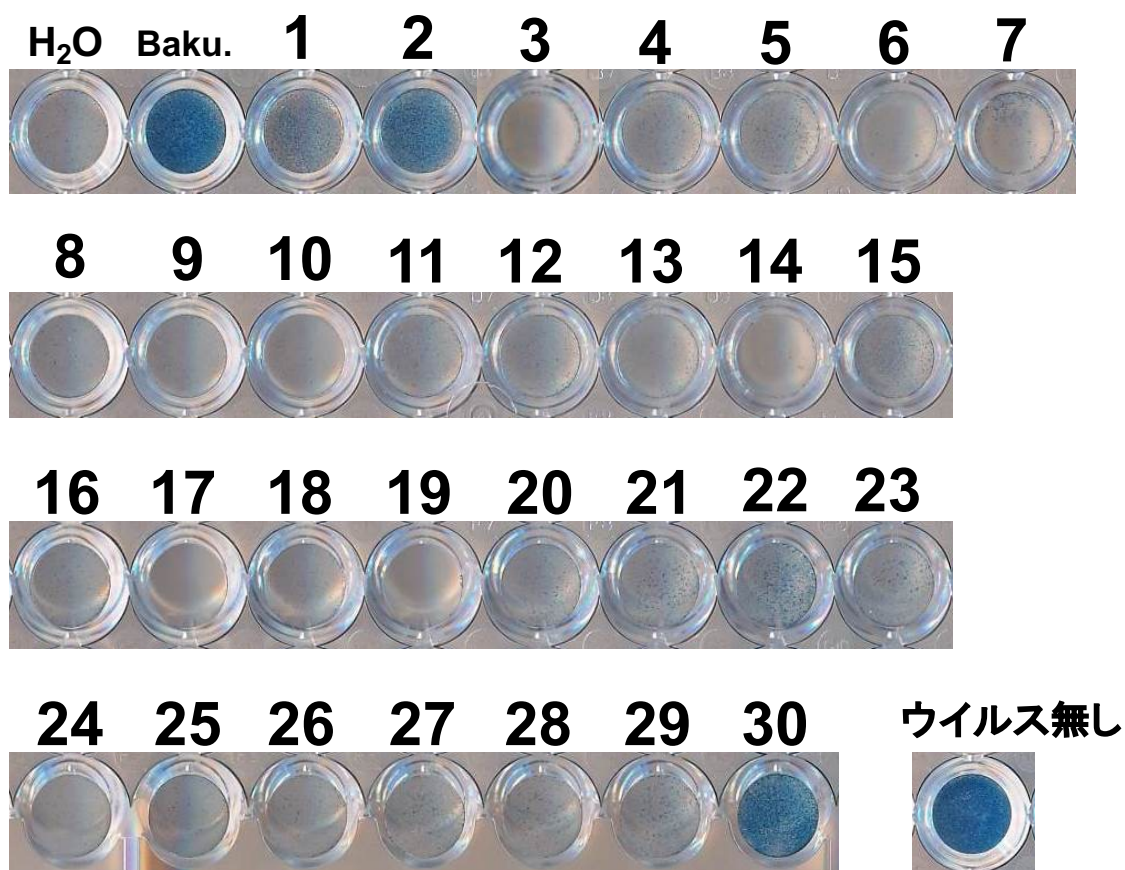
第一節 コメ発酵エキス：ライスパワー®エキスとは

コメ発酵エキスは、*H. pylori* に対する感染抑制作用 [22]、胃粘膜における NaCl やメトトレキサートによる細胞毒性の抑制作用 [24,25]、抗酸化作用 [26-29]、腸粘膜や平滑筋における抗炎症作用 [30,31]、抗腫瘍作用 [32-34]、抗白血病作用 [35]、アルツハイマー病やパーキンソン病における抗神経毒性作用 [36,37]、血中および肝臓中のコレステロール低下作用 [36]、脂質代謝促進作用 [38] など、様々な生物学的・薬理学的特性を示すことが報告されている。さらに、*A. oryzae* を用いたコメ発酵抽出物は、抗炎症活性 [22] および抗酸化活性 [29] を有しており、抗インフルエンザウイルス活性との関連性が報告されている [39-44]。

勇心酒造株式会社が開発したライスパワー®エキスは、*A. oryzae*、酵母 (*S. cerevisiae* など)、乳酸菌などの様々な微生物を用いて糖化・発酵させて得られる新規のコメ発酵エキスである。菌の種類や数、発酵条件を変えることで、様々な種類のライスパワー®エキスを作製できる。これまでに、32 種類のライスパワー®エキスが作製されており、生物学的および薬理的な活性を有することが報告されている。例えば、スキンケア商品として、化粧品やシャンプーや介護現場での皮膚保護入浴剤などが製品化されている。これらは、ライスパワー®エキスによる皮膚の保水力の上昇や、皮膚の皮脂分泌の減少などの生物学的活性を利用している。さらに、本エキスが胃粘膜における *H. pylori* 感染時の炎症および上皮細胞増殖を抑制すること [22] や、NaCl による胃粘膜の異常な細胞増殖を抑制すること [24] などが報告されている。しかし、ライスパワー®エキスが、抗インフルエンザ活性を有するかどうかは不明である。

徳島文理大学薬学部生化学研究室は、勇心酒造株式会社との共同研究により、提供された 30 種類のライスパワー®エキスを用いて、A 型インフルエンザウイルス感染による細胞死の抑制効果を指標としたスクリーニングを行った。その結果を図 4

に示す。図 4 の 1 から 30 番は、提供された 30 種類のライスパワー®エキスの本実験における識別番号として割り振った。その結果、2 番目および 30 番目のライスパワー®エキスが、A 型インフルエンザウイルス感染細胞の細胞死を抑制することが確認できた (図 4)。本章では、感染細胞死の抑制効果が明瞭な 30 番目のライスパワー®エキス (Y30) に着目し、Y30 の抗インフルエンザ活性について詳細に検討した。



Baku. :バクチオール

染色 + : 抗インフルエンザ活性 有
染色 - : 抗インフルエンザ活性 無

(図4) 30種類のライスパワー®エキスによるインフルエンザウイルス感染細胞の細胞死抑制効果

30種類のライスパワー®エキスを用いた網羅的スクリーニングの結果を示す。A/Puerto Rico /8/1934 (A/PR/8/34) (10 MOI) と各ライスパワー®エキス (12.5%) を5%CO₂条件下、37°Cで30分間培養した混合液を、Madin-Darby caine kidney (MDCK) 細胞に添加した。5%CO₂条件下、37°Cで3日間培養し、naphthol blue-black 染色 (NB染色) により生存細胞を観察した。生存細胞は青く染まり、生存細胞が存在しない場合には透明である。ネガティブコントロールとして水を、ポジティブコントロールとして bakuchiol を使用した。その結果、提供されたライスパワー®エキスの2番目および30番目に青い染色像が観察された。

第二節 Y30 の Madin-Darby caine kidney (MDCK) 細胞に対する毒性の評価

Y30 の細胞毒性を評価するために、Y30 添加 24 時間および 72 時間後の MDCK 細胞の生存率を、3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) アッセイにより評価した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

MDCK 細胞は、10% FBS/DMEM P/S [10% Fetal Bovine Serum (FBS)、100 units/mL penicillin および 100 µg/ml streptomycin (P/S) (Thermo Fisher Scientific (Thermo)社) 、4 mM L-グルタミン添加高グルコース培養培地 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (WAKO 社)] を用いて、5% CO₂ 条件下、37°C で培養した。

2) ライスパワー®エキスの調整

ライスパワー®エキスの 30 番目の抽出物である Y30 は、勇心酒造株式会社（香川県）から提供していただいた。*A. oryzae* を用いて米を糖化した後、*S. cerevisiae* を用いて発酵させ、85°C 加熱して得られた培養濾液を濃縮して Y30 を調製した。Y30 の pH は 6.50、比重は 1.05 で、抽出液からの残留物の蒸発率は 6.8%であった。本エキスにはエタノールは含まれていない。

3) MTT アッセイ

MTT 細胞数測定キット（ナカライテスク社）を使用した。説明書に従い、MDCK 細胞に Y30 を添加した後、24 時間または 72 時間後に各ウェルに MTT 溶液 10 µl ずつ加え軽く叩いて混和し、5%CO₂ 条件下、37°C で 4 時間反応させた。顕微鏡で青色のホルマザンの生成を確認後、可溶化溶液を 100 µl ずつ加えて、しっかりとピペッティングすることによりホルマザンを溶解した。96 ウェルプレートはマイクロプレートリーダー Spectra MAX 340 (Molecular Devices 社) を用いて 570 nm の吸光度を (Reference 650 nm) 測定した。

<実験方法>

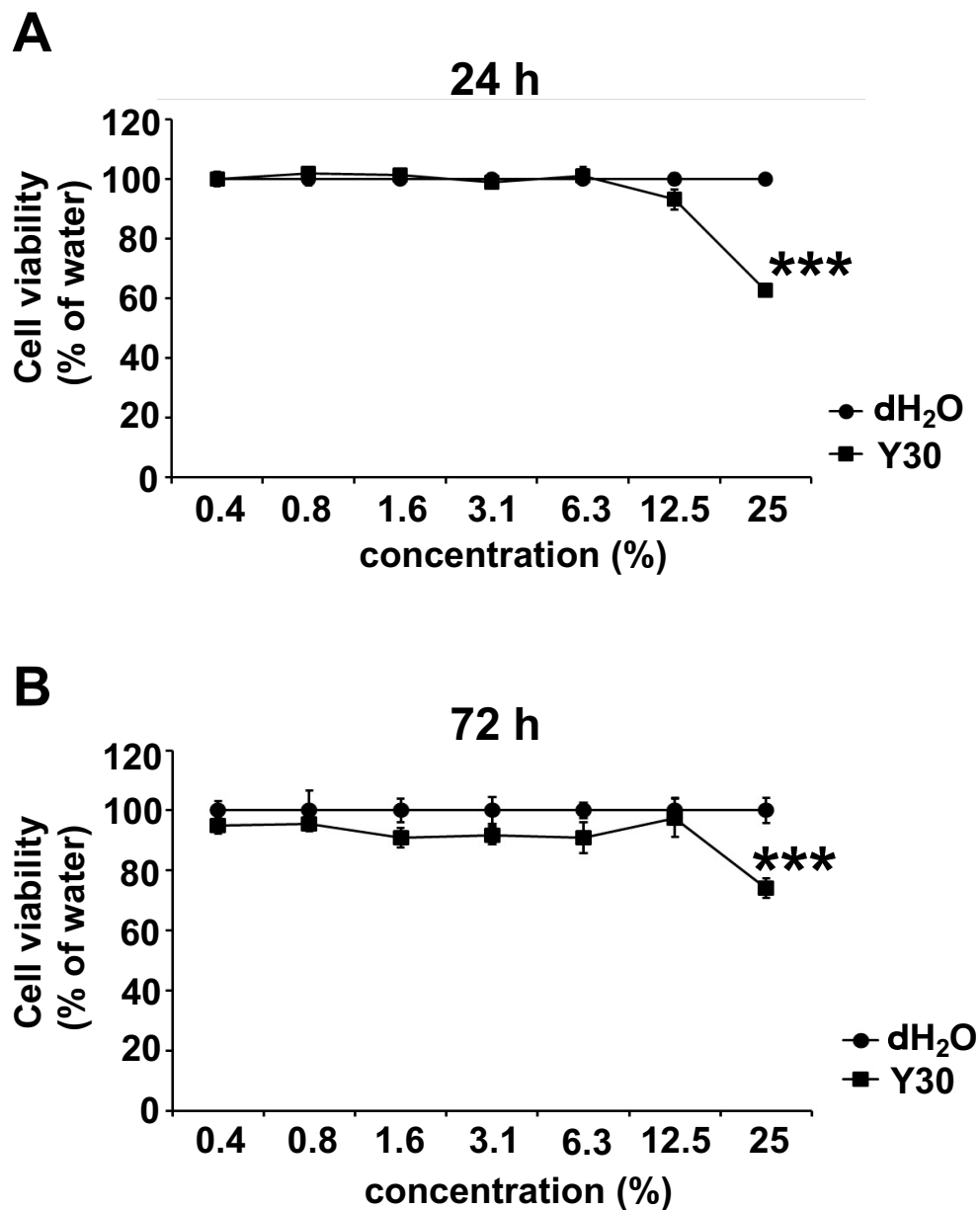
MDCK 細胞 (1×10^4 cells/well) を 96 ウェルプレートに播種した。Y30 (0.4 - 25%) およびコントロールの滅菌水 (dH₂O) (0.4-25%) をそれぞれの濃度になるように、感染培地[1 % Bovine serum albumin (BSA) (WAKO 社) 、P/S、DMEM]と混合した。この混合液を MDCK 細胞に添加し、5% CO₂ 条件下、37°C で 24 時間または 72 時間培養した。培養後、MTT 細胞数測定キットを使用して吸光度を測定し、細胞生存率を算出した[23,45]。

<統計学的処理>

データは 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表した。2 群間を student - t 検定にて比較し、*p* 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

【実験結果】

Y30 の細胞毒性を評価するために、24 時間および 72 時間培養後の MDCK 細胞の生存率を MTT アッセイにて算出した (図 5)。dH₂O のみを投与した MDCK 細胞と比較して、0.4-12.5% の Y30 を添加した場合には MDCK 細胞の生存率に影響を与えなかったが、25% の Y30 を添加した MDCK 細胞は、24 時間 (図 5A) および 72 時間 (図 5B) 培養後の生存率が有意に低下した (それぞれ****p* < 0.001) 。したがって、12.5% 以下の Y30 は、72 時間以内であれば MDCK 細胞に対して細胞毒性を示さないことが明らかとなった。



(図5) Y30のMDCK細胞に対する毒性の評価

MDCK細胞にY30(0.4-25%)を添加した。24時間($n=8$)(A)、72時間($n=12$)(B)後、MTTアッセイにて細胞生存率を算出した。コントロールとしてdH₂Oを使用した。データは3回の実験の平均値±標準誤差で表した。*** $p<0.001$ vs dH₂O群。

第三節 A型インフルエンザウイルスに対するY30の感染抑制効果

Y30がA型インフルエンザウイルスの宿主細胞への感染を抑制するのかを検討するために、A型インフルエンザ感染後のMDCK細胞の生存率をNB染色法により観察した。また、インフルエンザの感染細胞をインフルエンザNPの免疫染色法により測定した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) ライスパワー®エキスの製造

第一章、第二節に示した。

3) インフルエンザウイルス株

インフルエンザウイルスは、strain A/Puerto Rico/8/1934 (A/PR/8/34) (H1N1)、strain A/California/7/2009 pdm (A/CA/7/09) (H1N1)、strain A/Aichi/2/1968 (A/Aichi/2/68) (H3N2) の3種類を用いた[23]。

4) NB染色法

細胞固定には10%ホルマリン [37%ホルムアルデヒドを1×PBS (-)で希釈] [1×PBS (-) : 10×PBS (-) ; 1.37 M NaCl、27 mM KCl、100 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O、18 mM K₂HPO₄、MilliQを10倍に希釈] を使用した。10%ホルマリンを100 μl/well ずつ添加し、25℃で10分間浸透させて細胞を固定した。10%ホルマリンを取り除き、1×PBS (-)で5分間の洗浄を3回行った。NB染色液 [100% 酢酸 4.5 ml、10% 酢酸ナトリウム 0.5 ml、10%アミドブラック 0.5 ml、1×PBS (-) 44.5 ml] を50 μl/well ずつ添加し、遮光条件下、25℃で30分間反応させた。水道水で洗い、目視にて細胞の染色を確認した。

5) インフルエンザ NP の免疫染色法

細胞固定には 4%パラホルムアルデヒド [8%パラホルムアルデヒド：パラホルムアルデヒド (ナカライテスク社)、1×PBS (-) 、2.5M NaCl を感染培地と同量加えて2倍に希釈] を使用した。1×PBS (-) で5分間の振とう洗いを3回繰り返した。続いて0.3% Triton X-100 [Triton X-100 150 µl、1×PBS (-) 50 ml] を添加し、25°Cで20分間反応させた。PBS-T (0.01%) [10×PBS (-) 、Tween 20、dH₂O] で5分間の振とう洗いを3回繰り返した。一次抗体として抗 NP 抗体 (Mouse Anti-Influenza A, Nucleoprotein-UNLB; Sonehern Biotech 社) を1% BSA/PBS-T (0.01%) で1:500に希釈したものを使用した。二次抗体として蛍光標識ヤギ抗マウス抗体 (Alexa Flour 488 goat anti mouse IgG (H+L)) (Thermo 社) を1%BSA/PBS-T (0.01%) で1:500に希釈したものを使用した。一次および二次抗体反応後の洗浄には、PBS-T (0.01%) を使用した。細胞核の染色には4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) 液 (Thermo 社) を1×PBS (-) で1:1000に希釈して使用した。DAPI 希釈液反応後の洗浄には、1×PBS (-) を使用した。各ウェルを乾燥しないように1×PBS (-) 100 µl/well で満たし、蛍光顕微鏡 BIOREVO BZ-X700 (KEYENCE) を用いて細胞を観察した。

<実験方法>

1) NB 染色法

MDCK 細胞 (1×10^4 cells/well) を96ウェルプレートに播種した。Y30 (0.8-12.5%) と A/PR/8/34、A/CA/7/09、A/Aichi/2/68 のいずれかのウイルスを10% FBS/DMEM P/S でウイルス感染力価がすべて10 MOIになるように混合し、5% CO₂ 条件下、37°Cで30分間前培養した。ネガティブコントロールまたはポジティブコントロールとして、それぞれ dH₂O (0.8-12.5%) または (+)-*S*-bakuchiol (bakuchiol) (1.6 - 25 µM [23]) を用いた。前培養した混合物を MDCK 細胞に添加し、5% CO₂ 条件下、37°Cで72時間培養した。培養後、前述のように生存細胞を NB 染色法にて染色した [23,45,46]。ウイルス感染から生き残った生存細胞は、NB 染色液により青く染色されるため、ウェルは青く観察される。一方、ウイルス感染により死滅した細胞は、洗浄過程で排除されるためウェルは染色されず透明に観察される。

2) 蛍光免疫染色法

MDCK 細胞 (1×10^4 cells/well) を 96 ウェルプレートに播種した。A/PR/8/34 または A/Aichi/2/68 ウイルスの感染力価が 0.1 MOI になるように調整した感染培地に Y30 (3.1 -12.5%) を混合し、5% CO₂ 条件下、37°C で 30 分間前培養した。MDCK 細胞を DMEM 培地で洗浄後、前培養した各混合液を MDCK 細胞に添加し、5% CO₂ 条件下、37°C で 24 時間培養した。dH₂O (3.1-12.5%) または bakuchiol (3.1-12.5 μM) をそれぞれネガティブコントロールまたはポジティブコントロールとして使用した。24 時間後、前述のようにインフルエンザ NP を蛍光免疫染色法にて染色した。MDCK 細胞を 4% パラホルムアルデヒドにより 4°C で 30 分間固定し、続いて 0.3% Triton X-100 により 25°C で 20 分間透過させた。A/PR/8/34 または A/Aichi/2/68 ウイルスの NP を検出するために、一次抗体としてマウス抗 NP 抗体を 1% BSA/PBS-T (0.01%) で 1:500 に希釈し、25°C で 90 分間反応させた。一次抗体液を取り除き、PBS-T (0.01%) で 5 分間の振とう洗いを 3 回繰り返した。続いて、二次抗体として蛍光標識ヤギ抗マウス抗体を 1% BSA/PBS-T (0.01%) で 1:500 に希釈し 25°C、90 分間反応させた。二次抗体液を取り除き、PBS-T (0.01%) で 5 分間の振とう洗いを 3 回繰り返した。その後、DAPI 液を PBS (-) で 1:1000 に希釈し、各ウェルに添加して 25°C で 5 分間反応させた。DAPI 希釈液を取り除き、PBS (-) で 3 回軽く洗浄した後、PBS (-) 100 μl/well で満たして観察し、蛍光顕微鏡を用いて染色した MDCK 細胞を撮影した。インフルエンザ NP は緑色に染色されウイルスに感染していることを示す (NP 陽性細胞)。また、細胞核は DAPI 液により、青く染色される (DAPI 陽性細胞)。DAPI 陽性細胞あたりの NP 陽性細胞の割合は、BZ-X Analyzer ソフトウェア (Keyence 社) を用いて記録した測定値に基づいて算出した。

<統計方法>

データは 3 回の独立した実験の平均値 ± 標準誤差で示した。3 群間を analysis of variance (ANOVA) を用いて比較し、Ryan 法で p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

【実験結果】

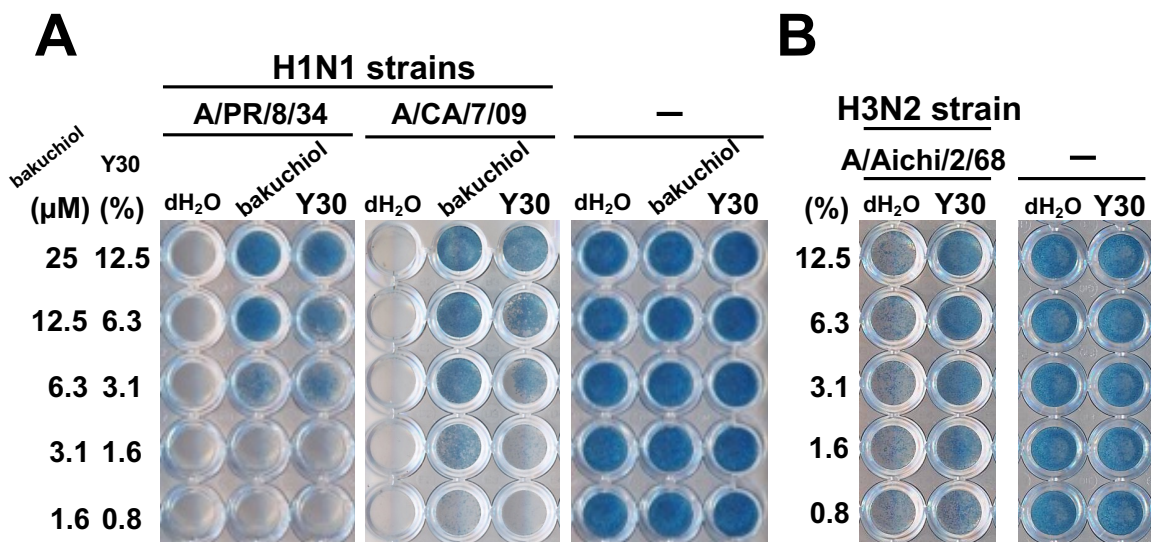
A型インフルエンザウイルスのMDCK細胞への感染をY30が阻害するかどうか、NB染色法とインフルエンザNP免疫染色法を用いて検討を行った（図6）。

A/PR/8/34、A/CA/7/09、A/Aichi/2/68のいずれのウイルスを添加した場合にも、dH₂Oを添加したMDCK細胞では、透明に観察されたことから（図6-1 A左および中央、図6-1 B左、dH₂O）、使用したすべてのインフルエンザウイルスが感染を引き起こすことが示された。3.1-12.5%のY30を添加した場合には、A/PR/8/34またはA/CA/7/09ウイルスに感染させた細胞が青く染色された（図6-1 A左および中央、Y30）。また、A/Aichi/2/68ウイルスに感染させた細胞も1.6-12.5%のY30を添加することによって青く染色された（図6-1 B左、Y30）。ポジティブコントロールとして使用したbakuchiol（3.1 - 25 μM）を添加した細胞も同様に青く染色された（図6-1 A左および中央、bakuchiol）。なお、ウイルスを感染させなかった細胞では、Y30の添加によって細胞はすべて青く染色されていたことから（図6-1 A右および6-1 B右、virus-）、使用した濃度のY30がMDCK細胞に対して細胞毒性を示さないことが示された。これらの結果は、Y30がA型インフルエンザH1N1およびH3N2ウイルス感染によるMDCK細胞の細胞死を抑制することを示した。

次に、Y30のインフルエンザウイルスに対する感染抑制効果を、インフルエンザNP免疫蛍光染色にて定量的に評価した（図6-2）。Y30（3.1-12.5%）をA/PR/8/34またはA/Aichi/2/68ウイルスと混合し、MDCK細胞に添加して24時間培養後、蛍光顕微鏡で観察した（図6-2 CおよびD上段）。観察画像のNP陽性細胞（緑）とDAPI陽性細胞（青）を数えて、DAPI陽性細胞に対するNP陽性細胞の割合を算出した（図6-2 CおよびD下段）。3.1-12.5%のY30とA/PR/8/34を添加した細胞では、dH₂Oを添加した場合と比較して、すべての濃度において有意に感染を抑制した（*** $p < 0.001$ ）（図6-2 C下段）。3.1-12.5%のY30とA/Aichi/2/68を添加した細胞では、dH₂Oを添加した場合と比較して、6.3%、12.5%のY30（*** $p < 0.001$ ）と3.1%のY30（** $p < 0.01$ ）で抑制効果に差があったものの、有意に感染を抑制した。bakuchiolを添加した細胞のすべての濃度で、dH₂Oを添加した場合と比較して、有意に感染を抑制した（*** $p < 0.001$ ）。これらの結果は、Y30がA型インフルエンザH1N1およびH3N2ウ

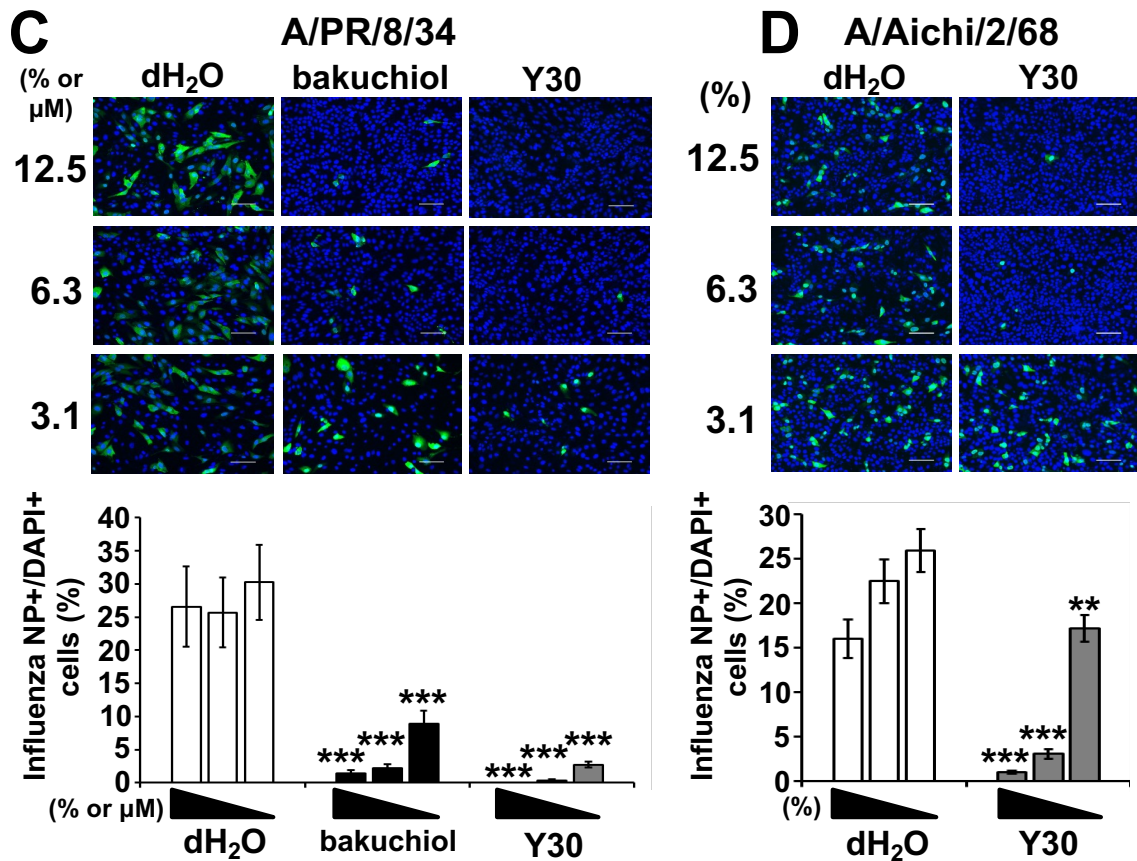
イルスの MDCK 細胞における感染を抑制することを示した。

以上の結果から、Y30 は A 型インフルエンザウイルスの MDCK 細胞への感染を阻害し、細胞死を抑制することが示された。



(図 6-1) Y30 は A 型インフルエンザウイルス感染細胞の細胞死を抑制する

Y30 (0.8-12.5%) を A/PR/8/34 (A)、A/CA/7/09 (A)、A/Aichi/2/68 (B) (各 10 MOI) と混合し、MDCK 細胞に添加して 72 時間培養した。NB 染色液にて培養後の生存細胞を染色することにより、Y30 によるインフルエンザウイルス感染細胞の細胞死の抑制効果を定性的に評価した。ネガティブコントロールとして dH₂O を、ポジティブコントロールとして bakuchiol を使用した。データは 3 回の独立した実験の代表例を示した。



(図 6-2) Y30 は A 型インフルエンザウイルスの感染を抑制する

Y30 (3.1-12.5%) と A/PR/8/34 (C) または A/Aichi/2/68 (D) (各 0.1 MOI) を混合し、MDCK 細胞に添加して 24 時間培養した (各 $n=9$)。ネガティブコントロールとして dH₂O を、ポジティブコントロールとして bakuchiol を使用した。染色細胞を蛍光顕微鏡により観察した (C、D 上段)。NP 陽性細胞 (緑) を DAPI 陽性細胞 (青) の数で除して NP 陽性細胞の割合を算出しグラフ化した (C、D 下段)。データは独立した 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差。画像は代表例を示す。** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ vs dH₂O 群。

第四節 A型インフルエンザウイルスに対する Y30 の増殖抑制効果

A 型インフルエンザウイルス感染細胞内におけるウイルスゲノムの複製およびウイルス粒子の放出を Y30 が抑制するかどうかを調べるために、ウイルスの増殖に対する影響をウイルス力価の測定により検討した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) ライスパワー®エキスの製造

第一章、第二節に示した。

3) インフルエンザウイルス株

第一章、第三節に示すうち、A/PR/8/34 および A/Aichi/2/68 を使用した。

4) ウイルス増殖実験

サンプル液作製

MDCK 細胞のウイルス希釈液添加前後の洗浄には DMEM 培地を使用した。ウイルスは、1% BSA/DMEM P/S [10% BSA/DMEM ; BSA 4 g、DMEM 40 ml を 5 ml 使用し、P/S 500 μ l と DMEM44.5 ml で total 50 ml とした] で希釈した。6.25%の Y30、3 μ g/mL の L-tosylamido-2-phenyl ethyl chloromethyl ketone (TPCK) 添加トリプシン (TPCK-トリプシン) (Sigma-Aldrich 社) および 1% BSA/DMEM P/S の混合液をウイルス感染した MDCK 細胞に添加し、24, 48, 72 時間培養した。培養した MDCK 細胞をそれぞれの時点で回収し、25°C、3000 rpm、5 分間遠心し細胞を除去、上清を回収し、これをサンプル液とした。トリプシンは、インフルエンザウイルスの HA 開裂、脱殻、放出といった一連の経路を成立させ、ウイルス複製を促進する作用がある。また、TPCK はトリプシンの自己消化による作用低下や、自己消化により生じるキモトリプシンの実験への悪影響を防ぐために添加されている。

免疫染色法

細胞固定には 4%パラホルムアルデヒド [8%パラホルムアルデヒドを感染培地と同量加えて 2 倍に希釈] を使用した。固定後の洗浄には 1×PBS (-) を使用した。0.3% Triton-X を 100 μ l 加えて 25°C で 20 分間反応させた。洗浄には PBS-T (0.01%) を使用した。一次抗体として、第一章、第三節で使用したマウス抗 NP 抗体を 1% BSA/PBS-T で 1:500 に希釈したものを使用した。二次抗体として、Horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス抗体 (Goat Anti-Mouse IgG1-HRP) (Southern Biotech 社) を 1% BSA/PBS-T で 1:500 に希釈したものを使用した。一次および二次抗体後の洗浄には、PBS-T (0.01%) を使用した。True Blue Peroxidase Substrate (funakoshi 社) で二次抗体の HRP を青く染色し、顕微鏡で染色具合を確認してから滅菌 MilliQ で洗浄した。

<実験方法>

MDCK 細胞 (1×10^5 cells/well) を 24 ウェルプレートに播種し、ウイルス希釈液を加える前に DMEM 培地で 1 回洗浄した。この細胞に、A/PR/8/34 または A/Aichi/2/68 ウイルスを、感染培地でウイルス感染力価がすべて 0.001 MOI になるように調整し、5 % CO₂ 条件下、37°C で 1 時間感染させた。感染培地を除去し、DMEM 培地で 2 回洗浄した。感染培地に 3 μ g/mL の TPCK トリプシンおよび Y30 (6.25%) を混合し、ウイルス感染 MDCK 細胞に添加した。Y30 の濃度は、第一章、第三節の結果から、細胞毒性を示さず感染抑制効果のある 6.25% とした。ネガティブコントロールまたはポジティブコントロールとして、それぞれ dH₂O (6.25%) またはリバビリン (25 μ M [46]) を用いた。5% CO₂ 条件下、37°C で 24 時間、48 時間、または 72 時間培養した。3 時点で各ウェルから培養液を採取し、サンプル液を作製した。

96 ウェルプレートに MDCK 細胞 (1×10^4 cells/well) を播種し、サンプル液を段階希釈して添加し、5% CO₂ 条件下、37°C で 16 - 18 時間培養した。添加したサンプル液中のウイルス力価 [Plaque Forming Units per mL (PFU/mL)] は、A 型インフルエンザウイルス NP を免疫染色することにより決定し、算出した [23,45]。免疫染色は、前述のように 96 ウェルプレート内の培養培地と同量の 8%パラホルムアルデヒドを添加し、4°C、30 分間細胞固定した。1×PBS (-) で 5 分間、3 回洗浄したあと、0.3% TritonX-

100 を加えて 25°C、20 分間反応させた。PBS-T (0.01%) で 5 分間、3 回洗浄したあと、一次抗体液を加えて 4°Cで一晩反応させた。一次抗体液を除去し、PBS-T (0.01%) で 5 分間、3 回洗浄した。二次抗体液を加えて 25°C、90 分間反応させた。二次抗体液を除去し、PBS-T (0.01%) で 5 分間、3 回洗浄した。二次抗体の HRP に反応してインフルエンザ NP を青く認識できる True Blue Peroxidase Substrate を 50 μ l/well ずつ添加し、遮光して 25°C、15 分を目安に顕微鏡で染色の程度を確認しながら反応させた。十分に染色されたことを確認し、滅菌 MilliQ にて 5 回程度洗浄した。十分に乾燥させたあと、染色細胞数の数を数えることにより、ウイルス力価 (PFU/mL) を算出した。感染前の実験で採取した培養液にはサンプルが含まれているが、ウイルス力価を測定する際には各培養液を 100 倍以上に希釈している。そのため、ウイルス力価の測定は、培地に含まれるサンプルの影響を受けないと考えられる。

<統計方法>

データは 4 回の独立した実験の平均値±標準誤差で示した。3 群間を ANOVA 検定にて比較し、Ryan 法で p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

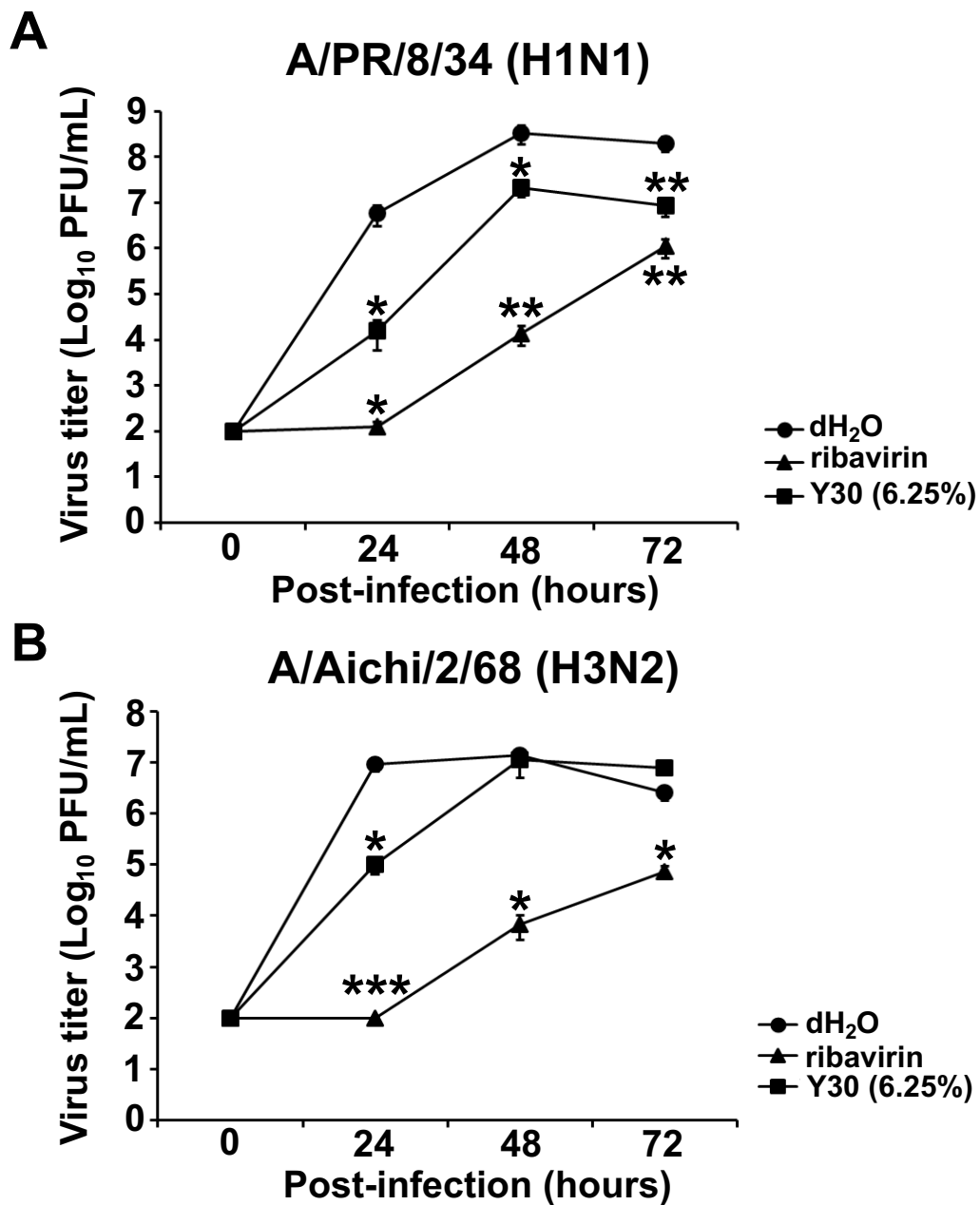
【実験結果】

Y30 が A 型インフルエンザウイルス感染細胞内でウイルスゲノムの複製およびウイルス粒子の放出を抑制するか検討するために、Y30 添加後のウイルス力価を測定した。

まず、Y30 を添加した A/PR/8/34 のウイルス力価は、dH₂O を添加した場合と比較して、24 時間、48 時間 ($*p < 0.05$) および 72 時間 ($**p < 0.01$) 後のすべてにおいて有意に低下していた (図 7A)。一方、Y30 を添加した A/Aichi/2/68 のウイルス力価は、dH₂O を添加した場合と比較して、24 時間後のみ有意に低下していた ($*p < 0.05$) (図 7B)。ポジティブコントロールとして、ウイルスゲノム複製を抑制するリバビリンを添加した場合には、A/PR/8/34 および A/Aichi/2/68 のウイルス力価は、それぞれ有意に低下した (図 7)。

以上の結果より、Y30 がウイルスに感染した宿主細胞における A 型インフルエンザ H1N1 および H3N2 ウイルスの増殖を抑制することが示された。さらに、その効

果がインフルエンザウイルスのサブタイプにより異なることから、Y30のA型インフルエンザウイルス増殖抑制作用は、ウイルスサブタイプ選択的であることが示された。したがって、以降の実験にはA型インフルエンザH1N1ウイルスを使用した。



(図 7) Y30 は A 型インフルエンザウイルスの増殖をウイルス株選択的に抑制する A/PR/8/34 (A) または A/Aichi/2/68 (B) (各 0.001 MOI) で 1 時間感染させた後、感染細胞を洗浄し、Y30 (6.25%) を添加した (各 $n = 11$)。ネガティブコントロールとして dH₂O (6.25%) を、ポジティブコントロールとしてリバビリン (25 μ M) を使用した。データは独立した 4 回の実験の平均値 \pm 標準誤差。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ vs dH₂O 群。

第五節 A型インフルエンザ H1N1 ウイルスの血球凝集活性に対する Y30 の影響

A型インフルエンザウイルス感染抑制実験において、あらかじめ Y30 とインフルエンザウイルスを混合し、MDCK 細胞に添加した場合、Y30 がインフルエンザウイルスの感染を抑制することを明らかにした (図 6)。この結果は、Y30 がウイルスの HA を標的とすることにより、A型インフルエンザウイルスの宿主細胞への吸着を阻害する可能性を示している。インフルエンザウイルスの感染は、ウイルス表面にある HA が、宿主細胞表面に存在するシアル酸糖鎖レセプターに吸着することで細胞内への侵入を開始するが (図 2) [48]、このシアル酸糖鎖レセプターへの結合は赤血球表面でも起こることが知られている。そこで、A型インフルエンザウイルス HA の赤血球における、シアル酸糖鎖レセプターへの結合を利用した赤血球凝集法を用いることにより、Y30 の HA に対する阻害効果について検討した。

【実験材料及び実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) ライスパワー®エキスの製造

第一章、第二節に示した。

3) インフルエンザウイルス株

第一章、第三節に示すうち、A/PR/8/34 および A/CA/7/09 を使用した。

4) 血球凝集阻害活性試験

赤血球はウサギの赤血球 [rabbit red blood cells (rRBCs)] (コスモバイオ社) を使用した。

<実験方法>

初めに、A/PR/8/34 または A/CA/7/09 ウイルスの HA 活性を測定した。各ウイルス (0.08 - 2.5%) を 1×PBS (-) で段階希釈して 96 ウェル丸底プレートに入れ、5% CO₂ 条件下、37°C で 30 分間培養した。rRBCs を PBS で 0.5% の濃度になるように各ウェルに添加した。25°C で 1 時間培養した後、プレートを撮影した。この結果から、Y30 の実験には、それぞれ 1.25% の A/PR/8/34 と 2.5% の A/CA/7/09 のウイルス濃度を用いることとした。

次に、Y30 の HA に与える影響を評価した。Y30 (0.8-25%) を 1×PBS (-) で段階希釈して 96 ウェル丸底プレートに添加した。コントロールとして dH₂O (0.8-25%) を用いた。段階希釈した Y30 の 96 ウェル丸底プレートに、1.25% の A/PR/8/34 または 2.5% の A/CA/7/09 ウイルスを添加し、5% CO₂ 条件下、37°C で 30 分間培養した。PBS で 0.5% の濃度になるように希釈した rRBCs を添加し、25°C で 1 時間培養した後、プレートを撮影した。

結果は、ウェルの赤血球の状態と血球凝集活性の有無を判断する。HA が存在する (赤血球凝集活性がある) 場合、HA が赤血球表面に付着することで網目構造を形成することから、視覚的にウェル全体に均一な赤色の懸濁液が確認できる。HA が存在しない、または HA の作用が抑制された (赤血球凝集活性がない) 場合、HA と赤血球による網目構造は形成されないため、視覚的にウェルの底に赤血球が沈んだドット形状が確認できる。

【実験結果】

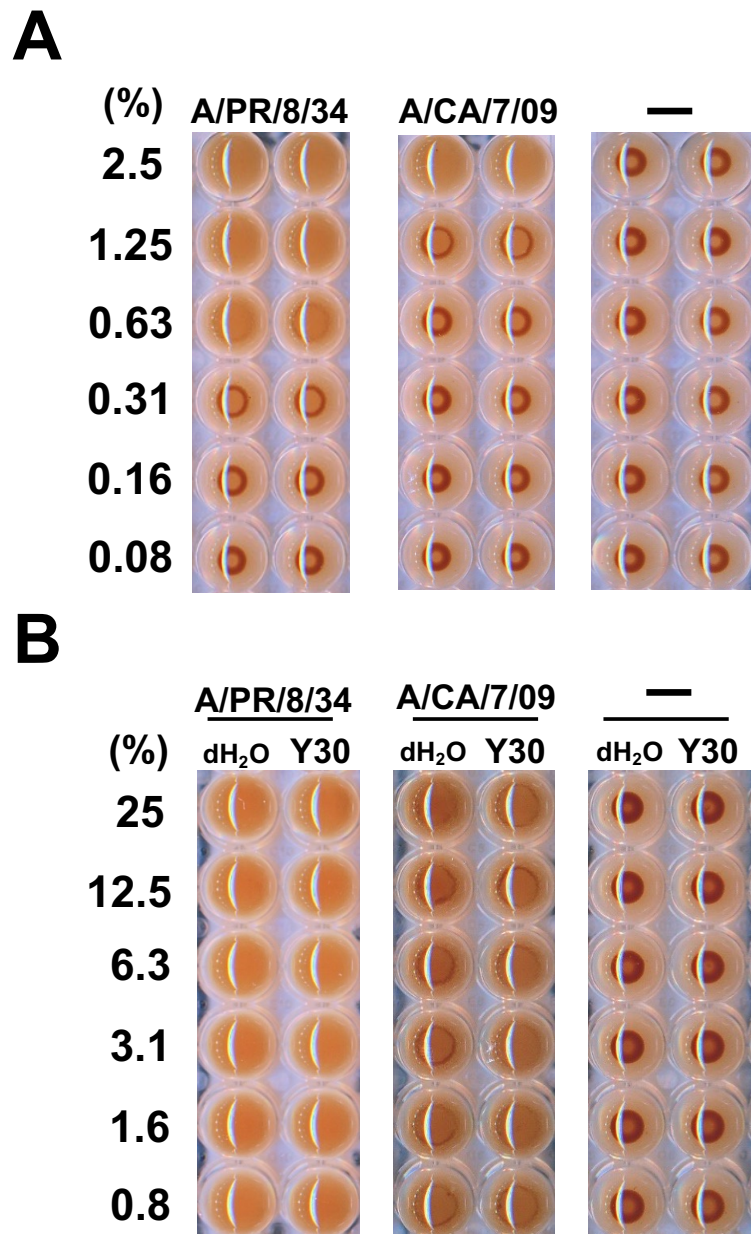
A 型インフルエンザ H1N1 ウイルスに対する Y30 の感染抑制効果において、インフルエンザウイルスが持つ HA 活性の抑制が関与するかについて、赤血球凝集法を用いて検討を行った (図 8)。

まず、A/PR/8/34 または A/CA/7/09 ウイルスの HA 活性を測定した (図 8A)。A/PR/8/34 ウイルスを添加したプレートでは、0.63-2.5% のウイルス濃度でウェルに均一に広がる赤血球の懸濁液が確認できた (図 8A 左)。また、A/CA/7/09 ウイルスを添加したプレートでは、2.5% のウイルス濃度でウェルに均一に広がる赤血球の懸濁液

が確認できた (図 8A 中央)。ウイルスなしのプレートでは、赤血球凝集活性が起こらないため、すべて赤血球がウェルの底に沈んだドット形状を呈した (図 8A 右)。このことから、A/PR/8/34 ウイルスは 0.63-2.5% で、A/CA/7/09 ウイルスでは 2.5% で、それぞれ赤血球凝集活性を示すことが明らかとなった。以上より、Y30 の赤血球凝集活性の検討には、1.25% の A/PR/8/34 または 2.5% の A/CA/7/09 を使用した。

Y30 を添加した A/PR/8/34 および A/CA/7/09 ウイルスのプレートでは、Y30 のいずれの濃度においてもウェルに均一に広がる赤血球の懸濁液が確認できた (図 8B 左および中央)。ウイルスなしのプレートでは、赤血球凝集活性が起こらないため、すべて赤血球がウェルの底に沈んだドット形状を呈した (図 8B 右)。このことから、Y30 はいずれの濃度においても、インフルエンザウイルスの HA 活性を阻害しないことが明らかとなった。

以上の結果は、Y30 による A 型インフルエンザウイルス感染抑制効果において、ウイルスが持つ HA 活性は関与していないことが示唆された。



(図 8) Y30 は A 型インフルエンザウイルスの血球凝集活性に影響を与えない

A/PR/8/34 または A/CA/7/09 の各ウイルス粒子の血球凝集活性の濃度検討 (A) 。
 ウイルスを段階希釈し、rRBCs (0.5%) を加えた。丸底プレートは 1 時間培養後を撮影した。(A) の濃度の H1N1 ウイルスの赤血球凝集活性に対する Y30 の阻害効果 (B) 。Y30 を段階希釈し、A/PR/8/34 (1.25%) または A/CA/7/09 (2.5%) のウイルス感染または無感染とした。コントロールとして dH₂O を使用した。プレートは 1 時間培養後を撮影した。データは 3 回の独立した実験の代表例を示した。

第六節 A型インフルエンザ H1N1 ウイルスの NA 活性に対する Y30 の影響

図 7 に示すように、Y30 を添加すると、A/PR/8/34 ウイルスを吸着させた MDCK 細胞におけるウイルス力価が低下することを示した。この結果は、Y30 がウイルスの NA 活性を介して、宿主細胞膜からウイルス粒子の放出を阻害したか、ウイルス RdRp 活性を阻害して宿主細胞核内でのウイルスゲノム複製を抑制したか、あるいはその両方に関与していることを示唆している[48]。

そこで、第六節では、Y30 による A 型インフルエンザ H1N1 ウイルスの NA 活性に対する影響を、NA 蛍光アッセイを用いて検討した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) ライスパワー®エキスの製造

第一章、第二節に示した。

3) インフルエンザウイルス株

第一章、第三節に示すうち、A/PR/8/34 および A/CA/7/09 を使用した。

4) NA 活性測定

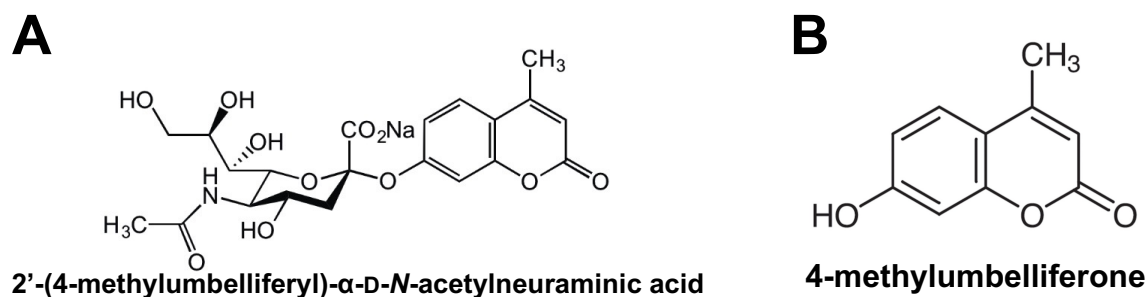
Y30 の希釈には assay buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.5) 、5 mM CaCl₂、200 mM NaCl] を作製し、使用した。NA 活性の評価には、NA により分解されると蛍光を発する 4-methylumbelliferone (4-MU) を放出する基質である 2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (Sigma-Aldrich 社) を使用した。4-MU の蛍光強度は Infinite 200 PRO (TECAN 社) を用いて測定した。

<実験方法>

Y30 (3.1-25%) を assay buffer で段階希釈し、96 ウェルブラックプレート (Thermo 社) に添加した。ネガティブコントロールまたはポジティブコントロールとして、それぞれ dH₂O (3.1-25%) または oseltamivir carboxylate (OC) (3.1 - 25 μM [48]) を用いた。段階希釈した Y30 に、A/PR/8/34 または A/CA/7/09 ウイルス粒子 (1×10⁴PFU) を添加するか、無添加とし、5% CO₂ 条件下、37°C で 30 分間培養した。培養後、96 ウェルプレート内で 12.5 μM の 2'-(4-methylumbelliferyl)-α-D-N-acetylneuraminic acid と混合した。5% CO₂ 条件下、37°C で 3 時間または 24 時間反応後、365 nm の励起波長と 445 nm の蛍光波長でプレートを測定した。

<統計方法>

データは 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差で示した。3 群間を ANOVA 検定にて比較し、Ryan 法で *p* 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。



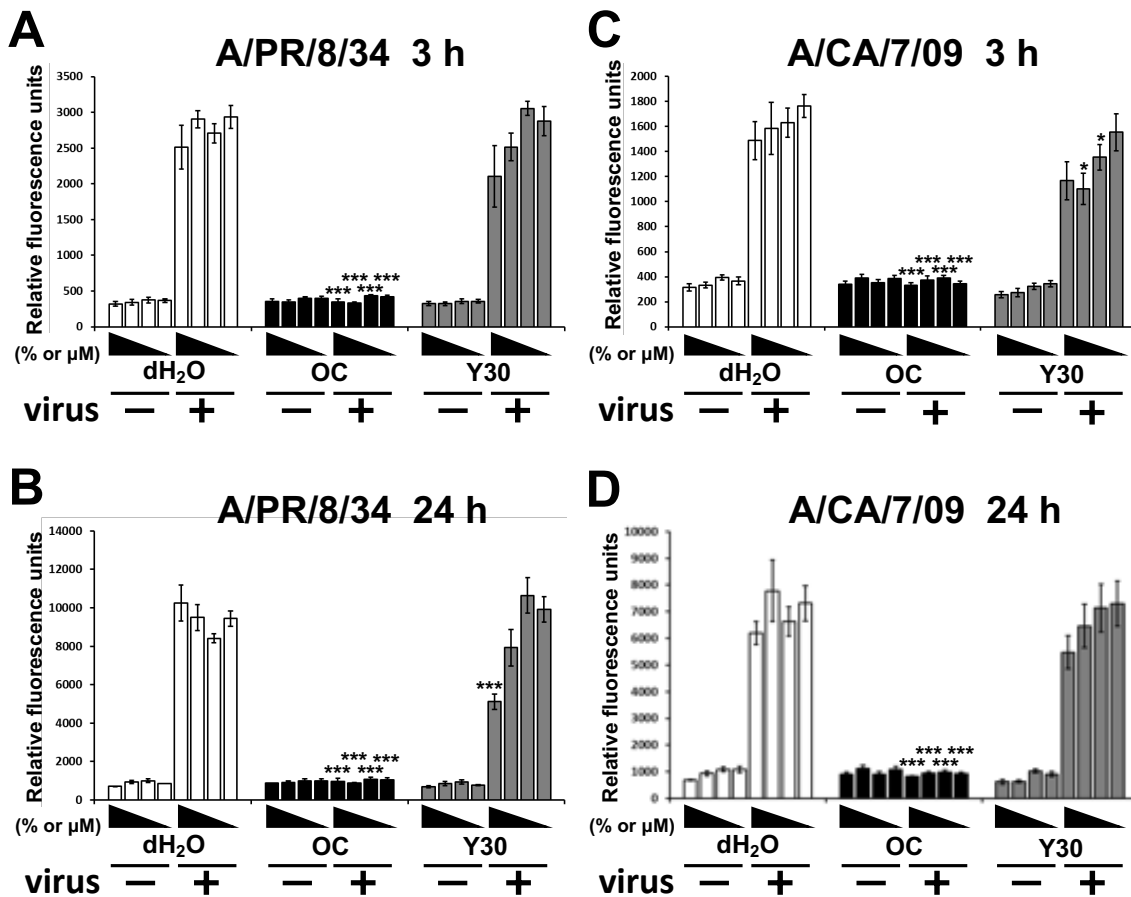
(図 9) NA 蛍光アッセイの基質と生成される蛍光物質

蛍光物質を生成する基質である 2'-(4-methylumbelliferyl)-α-D-N-acetylneuraminic acid (A) が NA により分解されると、蛍光物質の 4-methylumbelliferone (B) が生成される。

【実験結果】

Y30 がインフルエンザウイルスの NA 活性を阻害するかどうか検討するために、A 型インフルエンザウイルス粒子を用いて NA 活性を測定した (図 10)。まず、ウイルス粒子存在下 dH₂O を添加した場合には、4-MU が生成された (図 10A-D, dH₂O, virus+)。このことから、使用したすべてのウイルスは、NA 活性を有するウイルス粒子であった。Y30 を添加した A/PR/8/34 ウイルス粒子の場合、dH₂O を添加した場合と比較して、3 時間では有意な低下がみられず (図 10A, Y30, virus+)、24 時間では 25% の Y30 でのみ有意な低下が見られた ($***p < 0.001$) (図 10B, Y30, virus+)。また、Y30 を添加した A/CA/7/09 ウイルス粒子の 3 時間後では、6.25% および 12.5% の Y30 で有意な低下が見られたものの ($*p < 0.05$) (図 10C, Y30, virus+)、それ以外の濃度や 24 時間後ではその差は見られなかった (図 10C, D, Y30, virus+)。一方、ポジティブコントロールである NA 阻害剤の OC を添加したウイルス粒子ありの場合では、dH₂O を添加した場合と比較して、3 時間および 24 時間の両ウイルスで 4-MU の生成を有意に抑制した ($***p < 0.001$) (図 10 A-D, OC, virus+)。ウイルス粒子なしの dH₂O、OC、Y30 を添加した場合には、NA が存在しないため 4-MU は生成されなかった (図 10A-D, virus-)。これらのことから、Y30 は NA 活性をわずかに抑制するが、その効果は抗インフルエンザ活性を示す上で、非常に弱いものであることが考えられた。

以上の結果は、Y30 による A 型インフルエンザ H1N1 ウイルスの増殖抑制効果において、NA 活性の抑制は主作用でないことを示した。



(図 10) Y30 は A 型インフルエンザウイルスの NA 活性をほとんど抑制しない

Y30 (3.1 - 25%) を 96 ウェルプレートで希釈した。ネガティブコントロールとして dH₂O、ポジティブコントロールとして OC を使用した。各ウェルを A/PR/8/34 又は A/CA/7/09 ウイルス粒子ありまたは粒子なしとした。A/PR/8/34 を添加したウェルの 3 時間後 ($n = 6$) (A)、その 24 時間後 ($n = 6$) (B)、A/CA/7/09 を添加したウェルの 3 時間後 ($n = 6$) (C)、その 24 時間後 ($n = 6$) (D) の相対蛍光度を励起波長 365 nm、蛍光波長 445 nm で測定した。データは独立した 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差を示す。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ vs dH₂O 群。

第七節 A型インフルエンザ H1N1 ウイルスの RdRp 活性に対する Y30 の影響

図 7 に示すように、Y30 を添加すると、A/PR/8/34 ウイルスを吸着させた MDCK 細胞におけるウイルス力価が低下することを示した。この結果は、Y30 がウイルスの NA 活性を介して、宿主細胞膜からウイルス粒子の放出を阻害したか、ウイルス RdRp 活性を阻害して宿主細胞核内でのウイルスゲノム複製を抑制したか、あるいはその両方に関与していることを示唆している [48]。

第六節で NA 活性を評価したところ、わずかな抑制効果を示したが、抗インフルエンザ活性の主作用である可能性は低いと考えた (図 10)。

そこで、第七節では、Y30 が A 型インフルエンザウイルスの RdRp 活性を阻害するかどうかを、ウイルス RdRp ミニゲノムアッセイを用いて検討した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) ライスパワー®エキスの製造

第一章、第二節に示した。

3) ミニゲノムアッセイ

インフルエンザ RNA ポリメラーゼ (PA、PB1、PB2、NP) のミニゲノムを作製するために、ニワトリ由来の β -actin 遺伝子プロモーターおよびサイトメガロウイルス由来のエンハンサー (CAG プロモーター) によって転写される、pCAGGS ベクターを使用した。また、ヒト RNA ポリメラーゼ I プロモーターによって駆動される *Firefly luciferase* (Fluc) のマイナス RNA 鎖を発現している、pHH21-PolI/NP(0)Fluc(0)を使用した。これは、インフルエンザウイルスの RdRp によってプラス鎖 (mRNA) に変換されるベクターである。内部コントロールとして、単純ヘルペスウイルスの thymidine kinase (TK) プロモーターで駆動される *Renilla luciferase* (Rluc) 遺伝子を発現する pRL-TK-Rluc ベクター (Promega 社) を使用した。トランスフェクション試薬は

Lipofectamine 2000 (Thermo 社)、無血清培地は Opti-MEM (Thermo 社) を使用した。

<実験方法>

インフルエンザウイルスの RdRp の活性を Fluc の蛍光度により測定するミニゲノムアッセイを行った [23,50]。pCAGGS (pCA) ベクターに RNA ポリメラーゼ遺伝子とレポーター遺伝子からなるインフルエンザミニゲノムを作成した (pCA-PA、pCA-PB1、pCA-PB2、pCA-NP)。pCA-PA、pCA-PB1、pCA-PB2、pCA-NP は、CAG プロモーターによって駆動されるインフルエンザウイルス PA、PB1、PB2、NP 遺伝子をそれぞれ発現するプラスミドであった。内部コントロールとして、pRL-TK-Rluc ベクターを用いた。MDCK 細胞 (5×10^4 cells/well) に、pCA-PA、-PB1、-PB2、-NP、pHH21-PolI/NP(0)Fluc(0)、および pRL-TK-Rluc をそれぞれ 0.12 μ g ずつトランスフェクションした。トランスフェクション 6 時間後に、Y30 (6.25%) を添加した。dH₂O (6.25%) またはリバビリン (25 μ M) を、それぞれネガティブコントロールまたはポジティブコントロールとして使用した。各サンプルを添加して 24 時間培養後、トランスフェクションした MDCK 細胞の Fluc および Rluc 活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、dH₂O を添加した細胞の活性を 100%として、相対発光量 (Relative Light Unit ; RLU) で表した。

<統計方法>

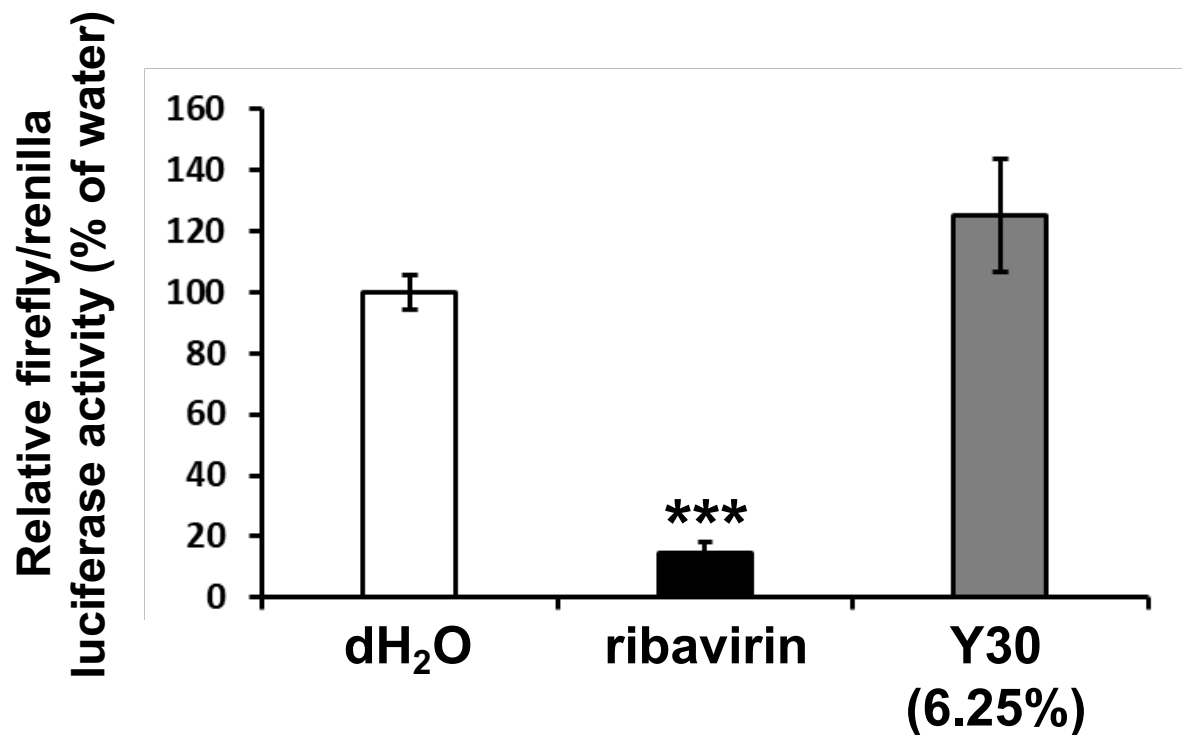
データは 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差で示した。3 群間を ANOVA 検定にて比較し、Ryan 法で *p* 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

【実験結果】

Y30 が、A 型インフルエンザウイルスの RdRp 活性を阻害するかどうかをミニゲノムアッセイにより検討した。

dH₂O を添加した RLU を 100%とした場合、6.25%の Y30 では、MDCK 細胞における A 型インフルエンザ H1N1 ウイルスの RdRp 活性は阻害されなかった (図 11)。一方、ポジティブコントロールであるウイルスゲノム複製阻害剤のリバビリンは、ウイルスの RdRp 活性を有意に阻害した (***p*<0.001) (図 11)。このことから、Y30 は、A 型インフルエンザ H1N1 ウイルスの RdRp 活性を阻害しないことが明らかとなった。

以上の結果より、Y30 による A 型インフルエンザ H1N1 ウイルスの増殖抑制効果において、RdRp 活性は関与していないことが示唆された。



(図 11) Y30 は A 型インフルエンザウイルスの RdRp 活性を阻害しない

A 型インフルエンザウイルスの RdRp 活性に対する Y30 の阻害効果を、A 型インフルエンザウイルスミニゲノムアッセイを用いて評価した。Y30 (6.25%)、ネガティブコントロールの dH₂O (6.25%)、ポジティブコントロールの ribavirin (25 μM) を添加したミニゲノムトランスフェクション細胞の、溶解液中の Fluc および Rluc 活性を測定した (各 $n = 9$)。ルシフェラーゼ活性は dH₂O を添加した場合を 100%として、これに対する相対値で示した。データは 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差で示した。*** $p < 0.001$ vs dH₂O 群。

第八節 A型インフルエンザ H1N1 ウイルス粒子への Y30 による直接的影響

Y30 は A 型インフルエンザウイルス感染抑制作用を示すが (図 6)、HA 活性を阻害しないことから (図 8)、Y30 が A 型インフルエンザウイルス粒子に対して、直接的な影響を与える可能性が考えられる。

そこで、Y30 による A 型インフルエンザウイルス粒子への直接的な影響を検討するために、Y30 を添加したウイルス粒子を Transmission Electron Microscope (TEM) で観察した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) ライスパワー®エキスの製造

第一章、第二節に示した。

3) インフルエンザウイルス株

第一章、第三節に示すうち、A/PR/8/34 ウイルスを使用した。

4) TEM 分析

ウイルス感染は 1% BSA/DMEM, P/S 中で行った。細胞固定には 1% パラホルムアルデヒド [8%パラホルムアルデヒド を 1×PBS(-)で希釈] を使用した。固定後の洗浄には、NTE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA] を使用した。ウイルス粒子の染色には、2%リンタングステン酸を使用した。写真撮影には、80 kV の Transmission Electron Microscope (TEM; HT-7700, Hitachi High-Tech) と XR81-B CCD カメラを使用した。

<実験方法>

A/PR/8/34 ウイルスを感染させた MDCK 細胞の上清を、感染 3 日目に回収した。低速遠心で細胞を除去した後、上清を感染培地中の Y30 (12.5%) と混合した。ネガティブコントロールまたはポジティブコントロールとして、ウイルス粒子のみ（未処理 PR8 株）および dH₂O (12.5%) またはインフルエンザウイルス粒子を完全に破壊する界面活性剤の Cetylpyridinium chloride (CPC) (50 µg/ml) を使用した。各サンプルを添加したウイルス粒子を、5% CO₂ 条件下、37°C で 30 分間培養した後、1% パラホルムアルデヒドで固定し、NTE 緩衝液で洗浄した。2% リンタングステン酸でウイルス粒子をネガティブ染色し、80 kV の TEM とカメラを用いて画像を取得した。各サンプルを添加して得られた画像について、約 100 個のウイルス粒子を記録し、その形態変化を目視で評価した。

各画像から無傷のウイルス粒子と破壊されたウイルス粒子の数をカウントし、破壊されたウイルス粒子の割合を算出した。

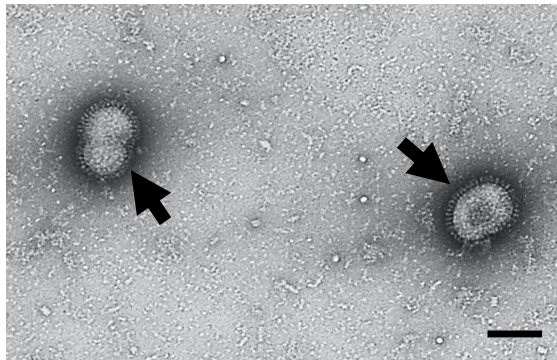
【実験結果】

Y30 による A 型インフルエンザ H1N1 ウイルス粒子への直接的な影響を TEM 分析にて検討した。TEM 分析の結果、未処理 PR8 株（図 12A）および dH₂O を添加した A/PR/8/34 ウイルス（図 12B）は、完全なウイルス粒子として観察された（図 12A,B、黒矢印）。しかし、Y30 を添加したウイルス粒子（図 12D）は、ウイルス粒子が変形し、一部欠損や膨張を呈していることから、ウイルス表面膜の性質が変化していることが示唆された（図 12D、黄矢印）。CPC を添加したウイルス粒子（図 12C）は、A/PR/8/34 ウイルス表面膜が強く破壊され、ウイルス粒子の原型が失われていた（図 12C、赤矢印）。Y30 と CPC を比較すると、異なるウイルス粒子の破壊を示す像が観察された（図 12C,D）。得られた各画像中の、無傷のウイルス粒子と破壊されたウイルス粒子の割合を算出したところ、Y30 を添加した場合 31.6% (31/98 [破壊されたウイルス粒子/無傷のウイルス粒子])、CPC を添加した場合 93.7% (119/127) で、それぞれウイルス粒子が変形または破壊された。一方、未処理 PR8 株または dH₂O を添加したウイルス粒子は、それぞれ 6.5% (6/93) または 16.2% (17/105) しか破壊され

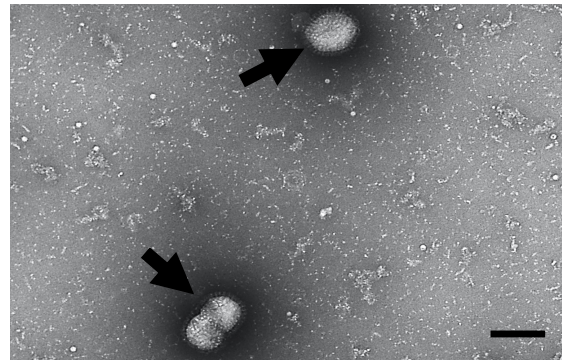
なかった。このことから、Y30 には、ウイルス粒子を直接破壊する効果があるものの、CPC とは異なる様式で破壊することを示している。

以上の結果より、Y30 による A 型インフルエンザ H1N1 ウイルス感染抑制効果は、Y30 がインフルエンザウイルス表面膜などに作用することで、ウイルス粒子をわずかに膨張させるというユニークな活性を有することが示された。

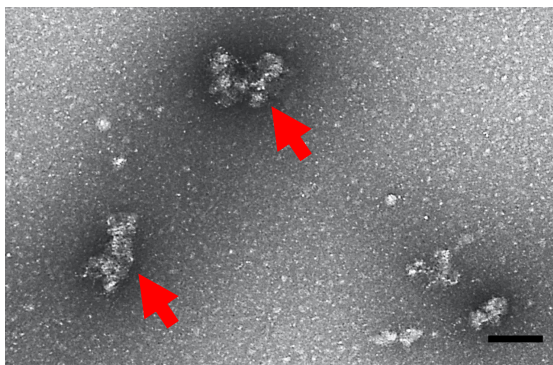
A 未処理 A/PR/8/34株



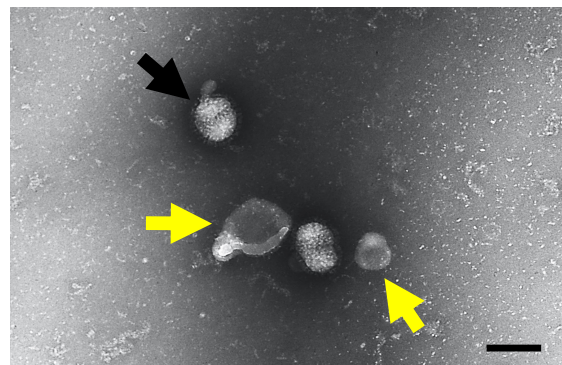
B dH₂O



C CPC (50 µg/mL)



D Y30 (12.5%)



(図 12) Y30 は A 型インフルエンザウイルスの粒子の変形を引き起こす

A/PR/8/34 ウイルスを感染させた MDCK 細胞の上清を、未処理 A/PR/8/34 株 (A)、dH₂O (12.5%) (B)、CPC (50 µg/mL) (C)、Y30 (12.5%) (D) と混合した。未処理 A/PR/8/34 株および dH₂O をネガティブコントロール、CPC をポジティブコントロールとした。30 分反応後、固定したウイルス粒子をネガティブに染色し、TEM で画像を取得した。各サンプルのウイルス粒子を目視で評価し、無傷のウイルス粒子 (黒矢印) と破壊されたウイルス粒子 (赤または黄矢印) とした。各画像中のウイルス粒子を数えて、破壊されたウイルス粒子の割合を算出した。各画像の黒いスケールバーは 100 nm を示す。データは 2 回の独立した実験の代表例を示す。

第九節 A型インフルエンザ H1N1 ウイルスに対する Y30 の水画分または酢酸エチル画分の感染抑制作用

Y30 に含まれる抗インフルエンザ活性を有する化合物を同定するため、Y30 から水画分および酢酸エチル (EtOAc) 画分を調製した。それぞれの画分による A/PR/8/34 ウイルス感染 MDCK 細胞での細胞死抑制効果を、NB 染色法で検討した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) ライスパワー®エキスの製造

第一章、第二節に示した。Y30 の異なるロット [Y30-different lot (Y30-dif. lot)] も同様に製造されたものを提供していただいた。

3) インフルエンザウイルス株

第一章、第三節に示すうち、A/PR/8/34 ウイルスを使用した。

4) Y30 の水または EtOAc 画分抽出液の調製

Y30 を EtOAc (WAKO 社) に加えた。抽出液を静置して水層と EtOAc 層に分離後、EtOAc 層を回収し、この手順を繰り返した。分離した水層または EtOAc 層を、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下で濃縮した。乾燥した抽出物を水に溶解し、水 (Y30-water) または EtOAc 抽出物 (Y30-EtOAc) を得た。EtOAc 層は完全に乾燥したため、抽出液中に EtOAc は存在しない。

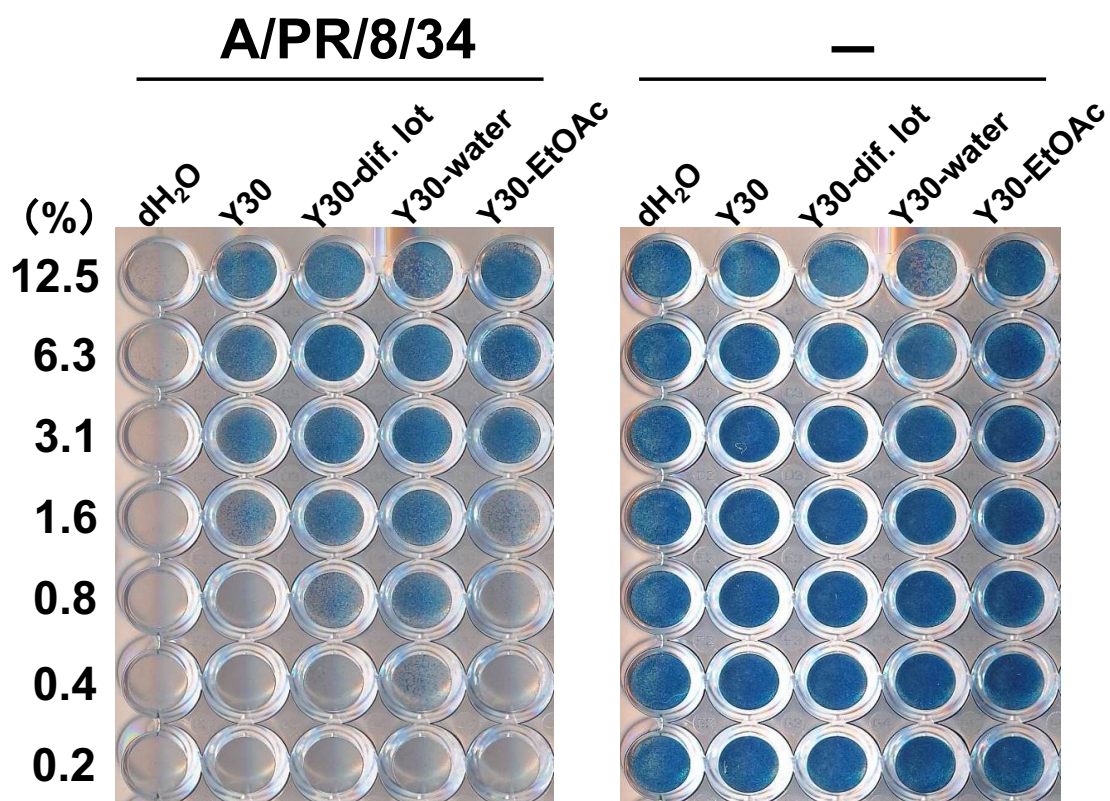
<実験方法>

NB 染色法は第一章、第三節に示した。感染細胞に添加するサンプルは、Y30、Y30 の異なるロット (Y30-dif. lot)、Y30 水画分 (Y30-water)、Y30 EtOAc 画分 (Y30-EtOAc) とし、コントロールには dH₂O を使用した。

【実験結果】

Y30 に含まれる抗インフルエンザ活性を有する化合物を同定するために、Y30 から水画分と EtOAc 画分抽出物を同量の dH₂O に溶解し、インフルエンザウイルス感染細胞における細胞死抑制効果を NB 染色法にて検討した。まず、A/PR/8/34 ウイルスと dH₂O を添加した MDCK 細胞は、ウイルス感染により細胞が死滅したため、すべて透明であった (図 13 左, dH₂O)。0.8-12.5% の Y30 水画分を添加し、A/PR/8/34 ウイルスを感染させた細胞は、青く染色された (図 13 左, Y30-water)。Y30 EtOAc 画分を添加した場合、3.1-12.5% の濃度で細胞が青く染色された (図 13 左, Y30-EtOAc)。Y30 (0.8-12.5%) または Y30 の異なるロット (1.6-12.5%) を添加した細胞も同様に青く染色された (図 13 左, Y30, Y30-dif.-lot.)。ウイルスを添加していないすべての細胞は青く染色されたことから、使用したすべてのサンプルは使用した濃度範囲において MDCK 細胞に対して毒性を示さないことが示された (図 13 右)。

以上の結果より、Y30 の水画分は、EtOAc 画分と比較して、より低濃度で A/PR/8/34 ウイルスに感染した MDCK 細胞の細胞死を抑制することを示したことから、Y30 の抗インフルエンザ活性を有する化合物は、EtOAc 画分よりも水画分に多く含まれていることが示唆された。



(図 13) Y30 の水画分および EtOAc 画分の A 型インフルエンザウイルス感染細胞における細胞死の抑制効果

Y30、Y30 の異なるロット (Y30-dif. lot) 、Y30 の水画分 (Y30-water) 、および Y30 の EtOAc 画分 (Y30-EtOAc) (各 0.2-12.5%) を、A/PR/8/34 ウイルス (10 MOI) と 37°C で 30 分間前培養し、MDCK 細胞へ添加したあと 3 日間培養した。培養後の生存細胞を NB 染色液にて染色し、サンプルによるインフルエンザウイルス感染細胞の細胞死の抑制効果を評価した。コントロールとして dH₂O (0.2-12.5%) を使用した。データは 3 回の独立した実験の代表例を示した。

第十節 小括および考察

第一章では、コメ発酵エキス Y30 の A 型インフルエンザウイルスに対する抗インフルエンザ活性について検討した。

Y30 は A/PR/8/34、A/CA/7/09、または A/Aichi/2/68 ウイルスと培養した MDCK 細胞の細胞死を抑制した (図 6-1)。また、Y30 の前処理は、A/PR/8/34 または A/Aichi/2/68 ウイルスの感染を抑制した (図 6-2)。さらに、A/PR/8/34 または A/Aichi/2/68 ウイルスを MDCK 細胞に感染させた後に Y30 を添加した実験では、Y30 はインフルエンザウイルスの増殖を抑制した。Y30 の増殖抑制効果は A/Aichi/2/68 よりも A/PR/8/34 ウイルスに対して有意に強いことから、Y30 の抗インフルエンザ活性はウイルス株に依存することが示された (図 7)。Y30 の A 型インフルエンザウイルスに対する感染抑制および増殖抑制効果が、ウイルス側の因子を標的とするのかを明らかにするために、ウイルスの HA、NA および RdRp 活性に対する Y30 の影響を評価した (図 8, 10, 11)。しかし、Y30 は A 型インフルエンザウイルスの HA および RdRp 活性を抑制しなかった (図 8, 11)。また、Y30 は A/PR/8/34 および A/CA/7/09 ウイルスの NA 活性を有意に抑制したものの、その抑制作用は弱く、Y30 によるウイルスの感染抑制作用の主な作用機序であるとは言い難い。これらのことから、Y30 に含まれる抗インフルエンザ活性を有する化合物は、他のウイルス因子または宿主細胞因子を標的として、A 型インフルエンザウイルスの感染および増殖を阻害することが示唆された。これまでの報告では、渡辺らは、ウイルスの複製に關与する宿主細胞側の因子として、Bcl2-associated athanogene 3、bromodomain-containing protein 8、coiled-coil domain-containing protein 135、DEAD-box helicase 55、dolichyl-phosphate mannosyltransferase subunit 3、eukaryotic elongation factor 2、insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2、keratin-14、S100 calcium-binding protein A4 の 9 種類を同定している[51]。これらのタンパク質は、ウイルス生活環において、HA、NA、M、NS および RdRp などのインフルエンザウイルスタンパク質と結合して RNP 複合体を核内に結合、内在化、または移動させるなど、重要な役割を果たすことが知られている。今回、Y30 がウイルス因子の HA および RdRp 活性のいずれも阻害せず、NA 活性阻

害作用も弱いものであったことから考察すると (図 8, 10, 11)、Y30 にはこれら 9 種類のタンパク質のような、ウイルス複製に関与する宿主細胞側の因子を阻害する化合物が含まれている可能性も考えられる。

Y30 は A 型インフルエンザウイルスの感染を阻害したが (図 6)、赤血球凝集反応実験では HA によるウイルス吸着を阻害しなかったことから (図 8)、Y30 の直接的な殺ウイルス効果が推測された。そこで、TEM による解析をおこなったところ、Y30 は A 型インフルエンザウイルスの表面膜などに作用し、ウイルス粒子の変形や膨張をもたらすことが明らかとなった (図 12D)。

TEM 解析結果から、Y30 はウイルス表面膜を変性させる直接的な殺ウイルス効果によって、A 型インフルエンザウイルスの感染を抑制することを示した (図 12)。ウイルスエンベロープを破壊する抗ウイルス剤は幅広い抗ウイルス効果を示す。エンベロープはウイルス粒子形成時に宿主細胞膜から誘導され、その形成をウイルスが選択できないことから、エンベロープに作用する薬剤に対する耐性をウイルスが獲得することは困難である [52-61]。このことから、ウイルスエンベロープを標的とする化合物は薬剤耐性を生じさせない抗ウイルス薬になり得る。インフルエンザをはじめとするエンベロープを持つウイルスは、ウイルス表面膜の変性、透過、穿孔を誘導する化学物質 [52,59,60]、ペプチド [54,57,58]、リポタンパク質 [55,61] に感受性を示すことが報告されている。しかし、表面膜の破壊は、ウイルスだけでなく宿主細胞にも誘発されるため、これらの薬剤は細胞毒性を有する。今回、高濃度 (25%) の Y30 を添加した場合には MDCK 細胞に対して毒性を示したが、12.5%以下の Y30 は細胞毒性を示すことなく、A 型インフルエンザウイルス表面膜を変性することによって殺ウイルス効果を示すことを明らかにした。このことから、Y30 は A 型インフルエンザウイルスに比較的選択性があり、ウイルス表面膜に直接作用することから、薬剤耐性を示しにくい特徴をもつ化合物を有していると考えられる。

TEM 解析の際 (図 12)、ウイルス表面膜の変性、透過、穿孔を誘導する化学物質として CPC を使用したが、ウイルス粒子の観察像は粒子の原型を留めておらず、Y30 を添加した場合の観察像とは異なるものであった。Y30 により観察されたウイルスの膨張作用については、ノロウイルスにおいて加熱変性リゾチームによる不活性化

用が検出される際に、同様の像が観察されている[62]。この加熱変性リゾチームによる不活化作用の標的として、ウイルス RNA を包むカプシドが考えられている。リゾチームは卵白などに含まれる低分子の単純タンパク質であり、グラム陽性菌の細胞壁を構成する多糖類を分解する酵素として知られている[63]。加熱変性リゾチームは、リゾチームの加熱添加によりタンパク質の立体構造が変化し、抗菌スペクトルがグラム陰性菌にも広がるという報告がされている[64]。これは、含有する特定のアミノ酸が影響し、抗菌ペプチドのような働きを持つようになるためと推測されている[64]。したがって、Y30 には、宿主細胞に影響を与えず、ウイルス表面膜を変性、透過、または穿孔し、エンベロープの構造を破壊することによって殺ウイルス効果をもたらす化合物が含まれている可能性がある。

Y30 の抗インフルエンザ活性を有する化合物を同定するために、Y30 の水画分と EtOAc 画分を調製して NB 染色を行ったところ、Y30 の水画分がより強く A/PR/8/34 ウイルスによる細胞死を抑制することが示された (図 13)。以上の結果は、Y30 の水画分に、EtOAc 画分よりも多くの抗インフルエンザ活性成分が含まれていることを示唆している。エタノールを含まないライスパワー®エキスは、日本酒の製造方法に似た技術で作られている。日本酒は、麴、モト、蒸した米、水で作られる。麴は、米のデンプンを糖に変換する *A. oryzae* を用いて製造され、モトは、麴と糖をエタノールに変換する *S. cerevisiae* を用いて製造される [65,66]。これらの発酵プロセスでは、いくつかの化学成分や代謝物が生成される。*A. oryzae* や *S. cerevisiae* から生成される化学成分や代謝物は、日本酒の風味、味、品質に関係している [65]。赤池らは、20 種類の日本酒に 24 種類の化学成分が含まれていることを示したが、特定はしていない [65]。清野らは、日本酒における 19 種類のピログルタミルペプチドを同定し、PyroGlu-Gln と PyroGlu-Leu が主な成分であるとした [67]。PyroGlu-Leu は、小腸で分泌される抗菌ペプチドのディフェンシンを増加させ、腸内細菌叢を改善させることによる抗菌活性や、大腸炎モデルマウスにおける抗炎症活性を有することが報告されている [68,69]。そのほか、[Leu/Ile]-[Leu/Ile]-[Leu/Ile]、Phe-Pro-[Leu/Ile]、[Leu/Ile]-[Leu/Ile]-Pro および [Leu/Ile]-[Leu/Ile]-[Leu/Ile]-Pro の 4 つのペプチドを同定した報告や、日本酒「山麴吟醸仕込み」の発酵過程において、 $C_{19}H_{28}O$ と同定されるアンドロ

ステロンと、 $C_{17}H_{26}N_2O_3$ と同定されるアングロイロキシペニンまたはアセトキシマトリンの 2 つの化合物が予測されている[66]。このように、*A. oryzae* や *S. cerevisiae* で発酵させた米からは、日本酒製造時に特徴的なペプチドが生成されることが明らかになっている。さらに、ヒト免疫不全ウイルス、デングウイルス、単純ヘルペスウイルス、C 型肝炎ウイルス、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス、インフルエンザウイルスなどの複数のウイルスに対する植物、節足動物、海洋生物、両生類、哺乳類由来の抗ウイルスペプチドについてまとめた報告もある [70]。さらに、Y30 の水画分は、EtOAc 画分と比較して、A 型インフルエンザウイルスに感染した細胞の生存を大幅に促進したことから、Y30 の水画分には、EtOAc 画分よりも多くの抗インフルエンザウイルス成分が含まれており、これらの成分は水溶性であることが示唆された。

以上のことから、Y30 には、水溶性の抗インフルエンザウイルスペプチドや糖などのような、複数の成分によって抗インフルエンザ活性を示すと考えられる。これらの成分は、インフルエンザウイルスの HA による宿主細胞への吸着に影響を与えず、ウイルスのエンベロープを破壊することにより、ウイルス増殖をも抑制する可能性がある。

また、インフルエンザ因子側への作用として、チャネルタンパク質の M2 タンパク質がウイルス粒子の変形に関与している可能性も残されている。M2 タンパク質はチャネルの働きをしているため、Y30 の作用によりチャネルが開くならば、ウイルス粒子外の成分がウイルス粒子内に流入することにより、TEM 解析の結果のようにウイルス粒子が膨張したような変形をもたらす可能性も考えられる。しかし、これまでにそのような報告はないので、M2 タンパク質の関連についても検討していく必要がある。

今後は、Y30 の抗インフルエンザ活性を示す成分を明らかにし、その成分ごとの抗インフルエンザ活性について検討していく予定である。

第二章 cyclobakuchiol 類の抗インフルエンザ活性の有無とその作用機序の検討

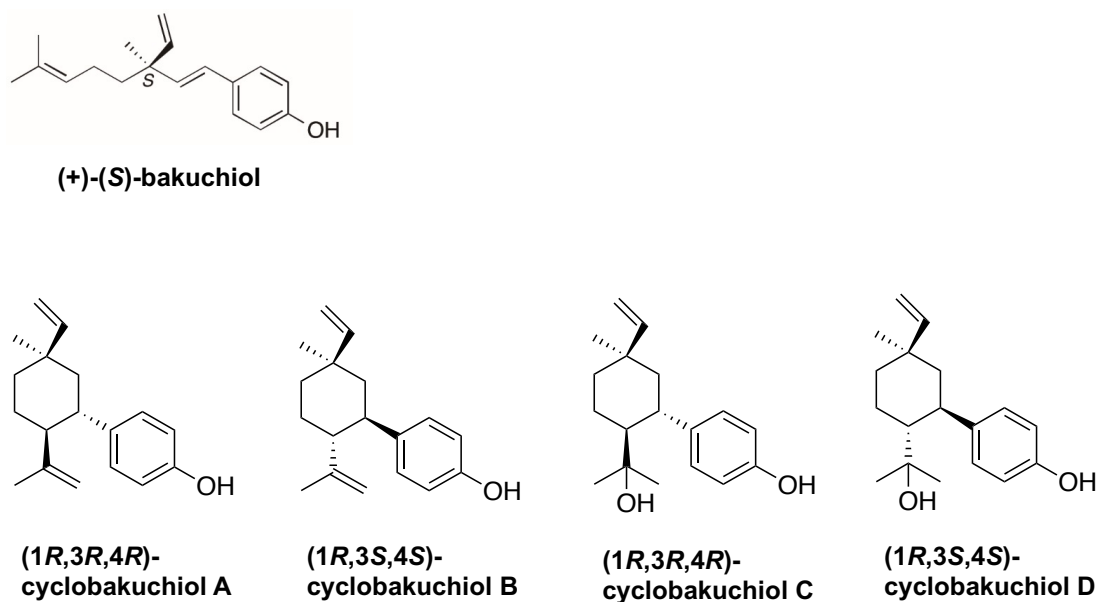
第一節 cyclobakuchiols A-D とは

bakuchiol (図 14) は、*Psoralea corylifolia* (*P. corylifoli*) の種子から単離されたテトラアルキル化不斉 4 級炭素を持つフェノール性イソプレノイドである[71]。cyclobakuchiol A (図 14) および B (図 14) は、*Psoralea glandulosa* のジクロロメタン抽出物の生理活性画分から立体異性体の混合物として単離され、抗炎症作用と抗解熱作用を有することが報告されている [72,73]。cyclobakuchiol C (図 14) は、*P. corylifolia* の種子の非極性画分から単離された [74]。cyclobakuchiol A および B はフェノール基とイソプロペニル基の立体配置が異なるジアステレオマーの関係であり、cyclobakuchiol C は cyclobakuchiol A のイソプロペニル基が水和された構造をしている (図 14)。徳島文理大学薬学部江角准教授は、cyclobakuchiol A、B および C は、bakuchiol を酸で処理することにより、1 段階で得られることを見出し、さらに、cyclobakuchiol A、B から 3 段階で効率よく cyclobakuchiol C に導けることも判明した。また、マイナー生成物として非天然物である cyclobakuchiol D も得られることがわかった (図 15)。

Backhouse らは、cyclobakuchiol A と cyclobakuchiol B の混合物が bakuchiol の単独化合物よりも強力な抗炎症・解熱作用を有することを報告している[72]。また、bakuchiol では、抗菌作用[75]、抗酸化作用[76,77]、抗炎症作用[78,79]、抗腫瘍作用[80,81]など、さまざまな生物学的・薬理学的作用を示すことが報告されている。

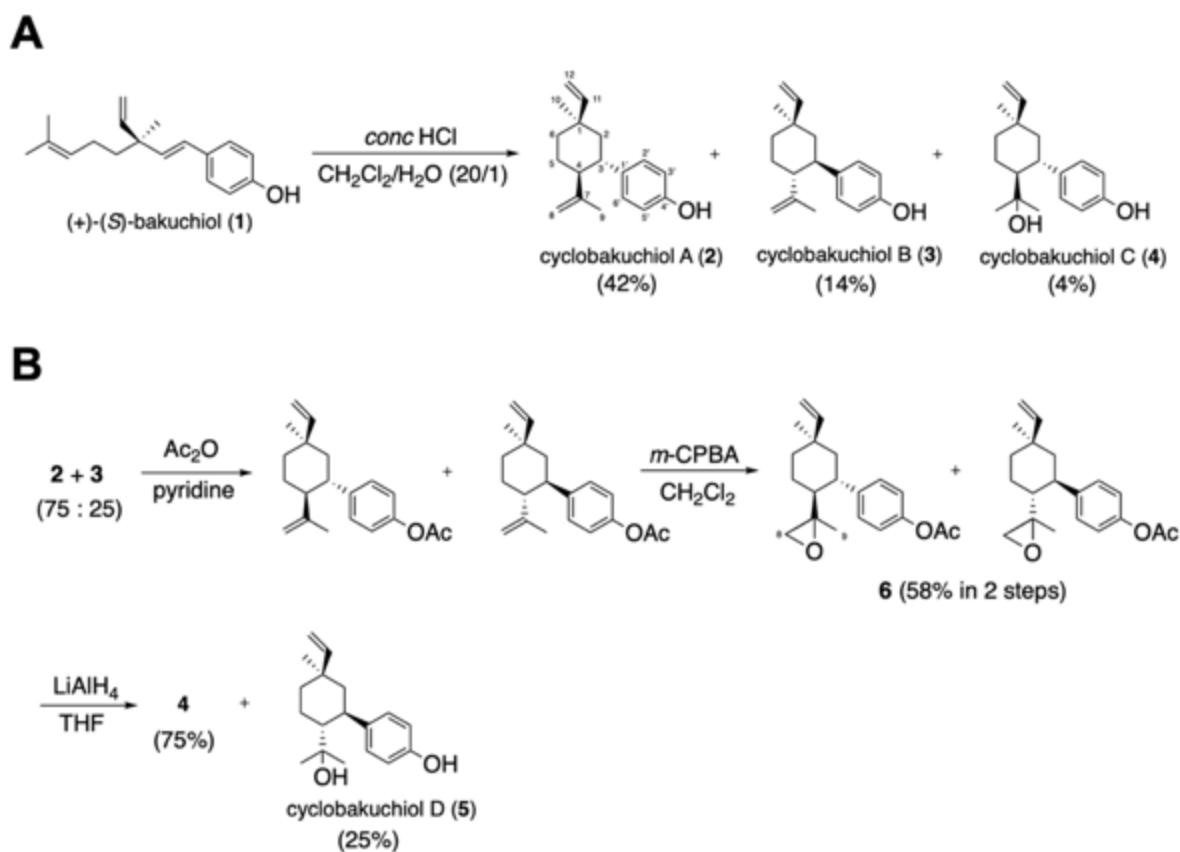
徳島文理大学薬学部生化学研究室は、bakuchiol が光学異性体選択的に Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) を活性化することで、A型インフルエンザ H1N1 ウイルスの感染および増殖の阻害に関与していることを報告している (図 16) [23]。一方、bakuchiol の類縁体である cyclobakuchiol A、B および C が、抗 A 型インフルエンザウイルス活性を有するかどうかは不明である。そこで、第二章では、cyclobakuchiol A、B および C、新規非天然物である cyclobakuchiol D (図 14、図 15 式 B) の 4 種類における抗 A 型インフルエンザウイルス活性を明らかにするとともに、

抗ウイルス活性に必要な構造を調べ、構造-活性相関を明らかにすることを目的とした。



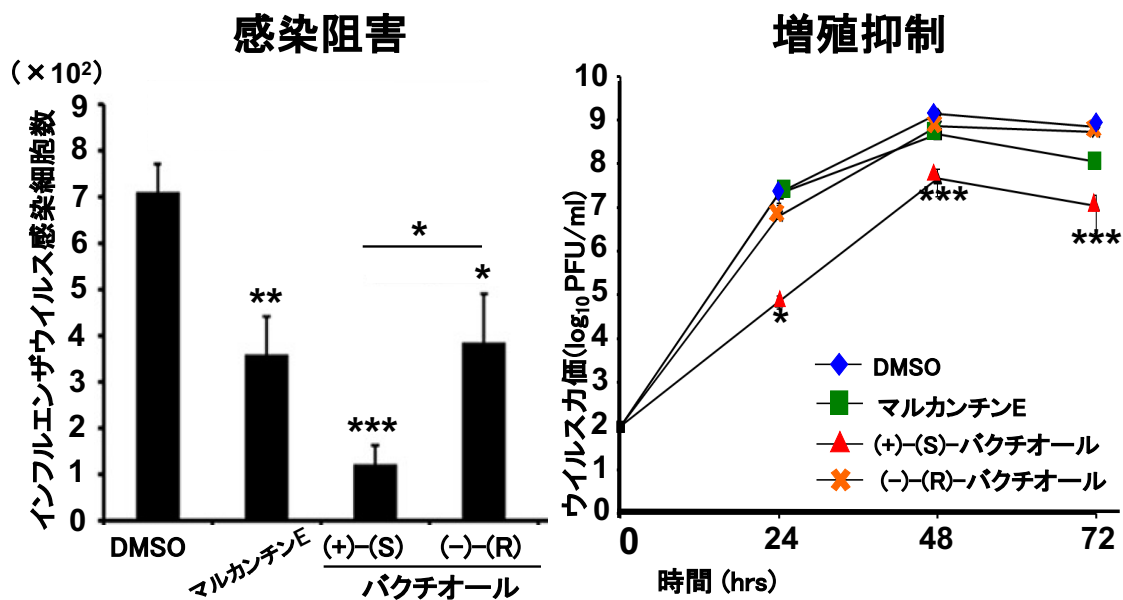
(図 14) (+)-(S)-bakuchiol と cyclobakuchiols A-D の構造式

(+)-(S)-bakuchiol (bakuchiol) は抗インフルエンザ活性を有する。cyclobakuchiol A と cyclobakuchiol B、cyclobakuchiol C と cyclobakuchiol D はそれぞれジアステレオマーの関係にあり、cyclobakuchiol A と cyclobakuchiol C、cyclobakuchiol B と cyclobakuchiol D はそれぞれイソプロピル基が脱水素化または酸素化した関係にある。



(図 15) cyclobakuchiols A-D の合成方法

cyclobakuchiols A-C は、bakuchiol を酸性条件下にすることで、それぞれ 42、14、4%で得ることができる (式-A)。さらに、cyclobakuchiol A, B を無水酢酸 (Ac_2O) でアセチル化後、メタクロロ過安息香酸 ($m\text{-CPBA}$) でエポキシ化し、次いで水素化アルミニウムリチウム (LiAlH_4) を用いて位置選択的に還元することにより、cyclobakuchiol C および cyclobakuchiol D がそれぞれ 75、25%の収率で合成できる (式-B)。上記合成ルートは徳島文理大学薬学部の江角准教授により開発されたものであり、また、本研究で使用した cyclobakuchiols A-D は、本反応を利用して合成されたものを提供していただいた。



(図 16) (+)-(S)-bakuchiol は A 型インフルエンザウイルスの感染および増殖抑制効果を有する

bakuchiol は、A 型インフルエンザウイルスの感染（左図）および増殖（右図）抑制効果において、光学異性体選択的に効果が異なることが報告されている[23]。感染阻害実験では、インフルエンザ NP 免疫染色法を用いて、インフルエンザ NP 陽性細胞数を DAPI 陽性細胞数で割った数値をグラフ化した（左図）。ネガティブコントロールとして DMSO (0.5%)、ポジティブコントロールとしてマルカンチン E (50 μM) を使用した[82]。(+)-(S)-bakuchiol および(-)-(R)-bakuchiol は 50 μM の濃度を用いた。(+)-(S)-bakuchiol は、DMSO および光学異性体の(-)-(R)-bakuchiol と比較して有意に感染を阻害した（左図）。増殖抑制実験では、細胞にウイルスを感染させたあと(+)-(S)-bakuchiol を添加し、感染細胞でのウイルス増殖抑制効果を、ウイルス力価の測定により評価した（右図）。ネガティブコントロールとして DMSO (0.25%)、ポジティブコントロールとしてマルカンチン E (50 μM) を使用した[82]。(+)-(S)-bakuchiol および(-)-(R)-bakuchiol は 25 μM の濃度を用いた。(+)-(S)-bakuchiol は、DMSO および (-)-(R)-bakuchiol と比較して有意に増殖を阻害した（右図）。なお、マルカンチン E は、インフルエンザ RNA ポリメラーゼを阻害し、抗インフルエンザ活性を示す[82]。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

第二節 cyclobakuchiols A-D の MDCK 細胞に対する毒性の評価

cyclobakuchiols A-D の細胞毒性を評価するために、cyclobakuchiols A-D 添加 24 時間および 72 時間後での MDCK 細胞の生存率を、MTT アッセイにより評価した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) MTT アッセイ

第一章、第二節に示した。

<実験方法>

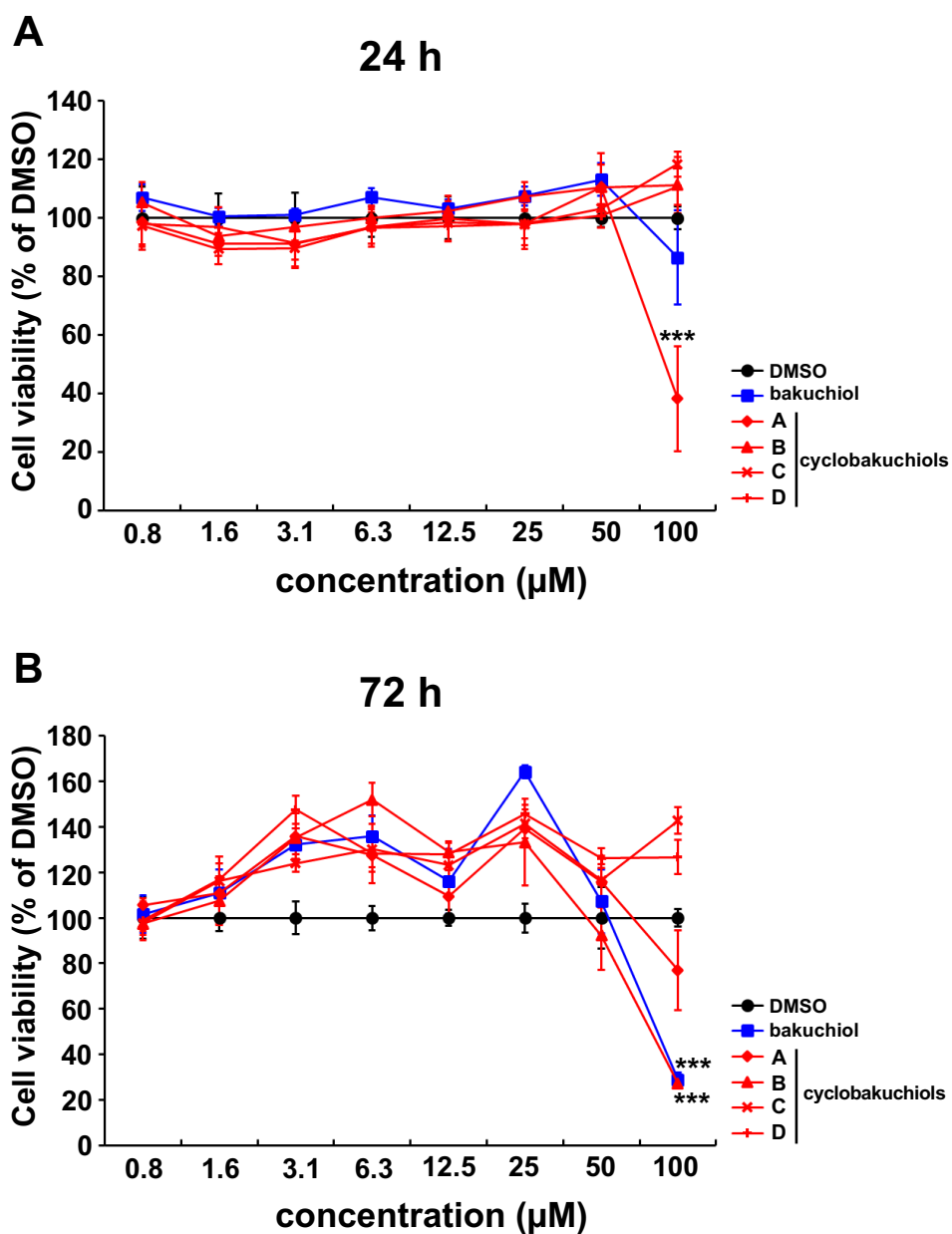
MDCK 細胞 (1×10^4 cells/well) を 96 ウェルプレートに播種した。cyclobakuchiols A-D (0.8-100 μ M)、ネガティブコントロールおよびポジティブコントロールとして DMSO (0.008-1%) および bakuchiol (0.8-100 μ M) をそれぞれの濃度となるように感染培地 (1% BSA/DMEM, P/S) と混合した。この混合液を MDCK 細胞に添加し、5% CO₂ 条件下、37°C で 24 時間または 72 時間培養した。培養後、MTT アッセイにより細胞生存率を算出した[23,45]。

<統計方法>

データは 3 回の独立した実験の平均値 ± 標準誤差で示した。3 群間を ANOVA 検定にて比較し、Ryan 法で p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

【実験結果】

cyclobakuchiols A-D の細胞毒性を評価するために、24 時間および 72 時間培養した後の MDCK 細胞の生存率を MTT アッセイにて算出した (図 17)。DMSO のみを添加した MDCK 細胞と比較して、0.8-50 μM の cyclobakuchiols A-D を添加した場合には MDCK 細胞の生存率に影響を与えなかったが、100 μM の cyclobakuchiol A、B および bakuchiol を添加した MDCK 細胞は、24 時間後 (図 17A) および 72 時間 (図 17B) 培養後に生存率の有意な低下を示した ($***p < 0.001$)。したがって、50 μM 以下の cyclobakuchiols A-D は、72 時間以内であれば、MDCK 細胞に対して毒性を示さないことが明らかとなった。よって、以降の実験では 50 μM 以下の cyclobakuchiols A-D を使用した。



(図 17) cyclobakuchiols A-D の MDCK 細胞に対する毒性の評価

MDCK 細胞に cyclobakuchiols A-D (0.8-100 μM) 添加した。24 時間 (A) 、72 時間 (B) (各 $n=5$ ずつ) 後、MTT アッセイにて細胞生存率を算出した。ネガティブコントロールとして DMSO (0.008-1%) を、ポジティブコントロールとして bakuchiol (0.8-100 μM) を使用した。データは 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差とした。*** $p < 0.001$ vs DMSO 群。

第三節 A型インフルエンザウイルスに対する cyclobakuchiols A-D の感染抑制効果

cyclobakuchiols A-D が抗インフルエンザウイルスの宿主細胞への感染を抑制するか検討するために、A型インフルエンザ感染後の MDCK 細胞の生存率を NB 染色法により観察した。また、インフルエンザ感染細胞をインフルエンザ NP の蛍光免疫染色法により測定した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) インフルエンザウイルス株

実験には、徳島大学先端酵素学研究所の高橋悦久助教、木戸博教授から提供していただいた、A型インフルエンザ H1N1 ウイルスの A/PR/8/34 株、A/CA/7/09 株、または A/WSN/1933 (A/WSN/33) (H1N1) の3種を用いた[83]。

3) NB 染色法

第一章、第三節に示した。

4) インフルエンザ NP の蛍光免疫染色法

第一章、第三節に示した。

<実験方法>

1) NB 染色法

MDCK 細胞 (1×10^4 cells/well) を 96 ウェルプレートに播種した。cyclobakuchiols A-D (0.4-25 μ M) と A/PR/8/34、A/CA/7/09、A/WSN/33 のいずれかのウイルスを 10% FBS/DMEM P/S 培地で感染力価がすべて 10 MOI になるように混合した。5% CO₂ 条件下、37°C で 30 分間培養した。ネガティブコントロールまたはポジティブコントロールとして、それぞれ DMSO (0.004-1%) または bakuchiol (0.4-25 μ M[23]) を用いた。得られた混合物を細胞に加え、5% CO₂ 条件下、37°C で 72 時間培養した。培養後、

NB 染色法にて生存細胞を染色した[23,45,46]。生存している細胞は、青く染色されるため、ウェルは青く観察される。一方、ウイルス感染により死滅した細胞は、洗浄過程で排除されるため、ウェルは染色されず透明に観察される。

2) 蛍光免疫染色法

MDCK 細胞 (1×10^4 cells/well) を 96 ウェルプレートに播種した。cyclobakuchiols A-D (3.1-12.5 μ M) と A/PR/8/34 または A/WSN/33 ウイルスを、感染培地にウイルス力価がすべて 0.1 MOI になるように混合し、5% CO₂ 条件下、37°C で 30 分間前培養したあと、各混合液を MDCK 細胞に添加した。ネガティブコントロールまたはポジティブコントロールとして、それぞれ DMSO (0.031-0.125%) または bakuchiol (3.1-2.5 μ M) を用いた。以降、細胞固定から検出までは第一章、第三節に示す方法と同様に行った。

<統計学的処理>

データは 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差で示した。3 群間を ANOVA 検定にて比較し、Ryan 法で p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

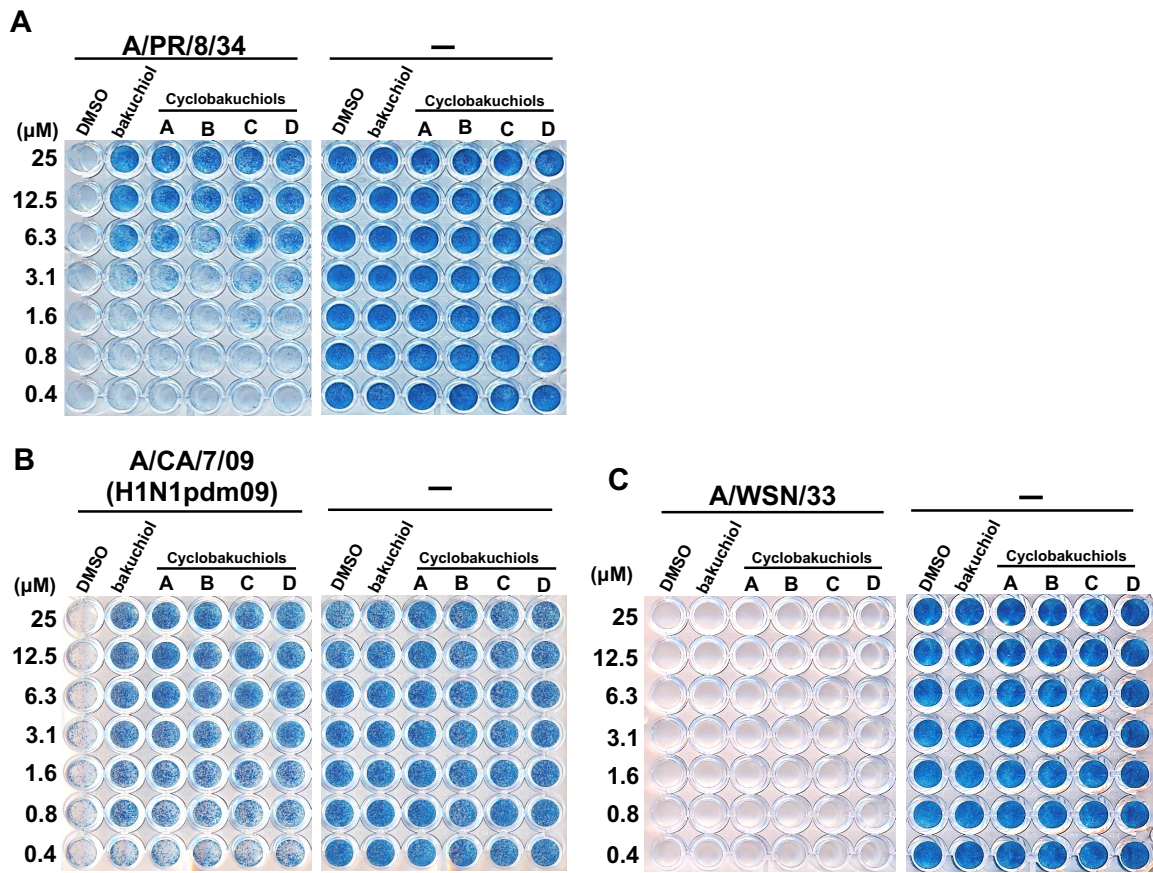
【実験結果】

cyclobakuchiols A-D が A 型インフルエンザ H1N1 ウイルスの MDCK 細胞への感染を阻害するのか、NB 染色法およびインフルエンザ NP 免疫染色法を用いて検討を行った (図 18,19)。A/PR/8/34、A/CA/7/09、A/WSN/33 のいずれかのウイルスを添加した場合に DMSO を添加した MDCK 細胞では、細胞が透明であったことから (図 18A-C 左, DMSO)、使用したすべてのインフルエンザウイルスが感染を引き起こすことが示された。6.3-25 μ M の cyclobakuchiols A-D を添加した場合には、A/PR/8/34 ウイルスを感染させた細胞が青く染色された (図 18A 左)。また、0.8-25 μ M の cyclobakuchiols A-D を添加した場合には、A/CA/7/09 ウイルスを感染させた細胞で青く染色された (図 18B 左)。しかし、0.4-25 μ M の cyclobakuchiols A-D を添加した場合には、A/WSN/33 ウイルスに感染させた細胞は透明であった (図 18C 左)。ウイルスを感染させなかった細胞では、cyclobakuchiols A-D の添加によって細胞は青く

染色されていたことから、使用した濃度の cyclobakuchiols A-D が MDCK 細胞に対して細胞毒性を示さないことが示された (図 18A-C 右)。これらの結果は、cyclobakuchiols A-D が A 型インフルエンザ H1N1 ウイルスに感染した MDCK 細胞の細胞死を抑制するが、その効果はウイルスのサブタイプによって異なることが示された。

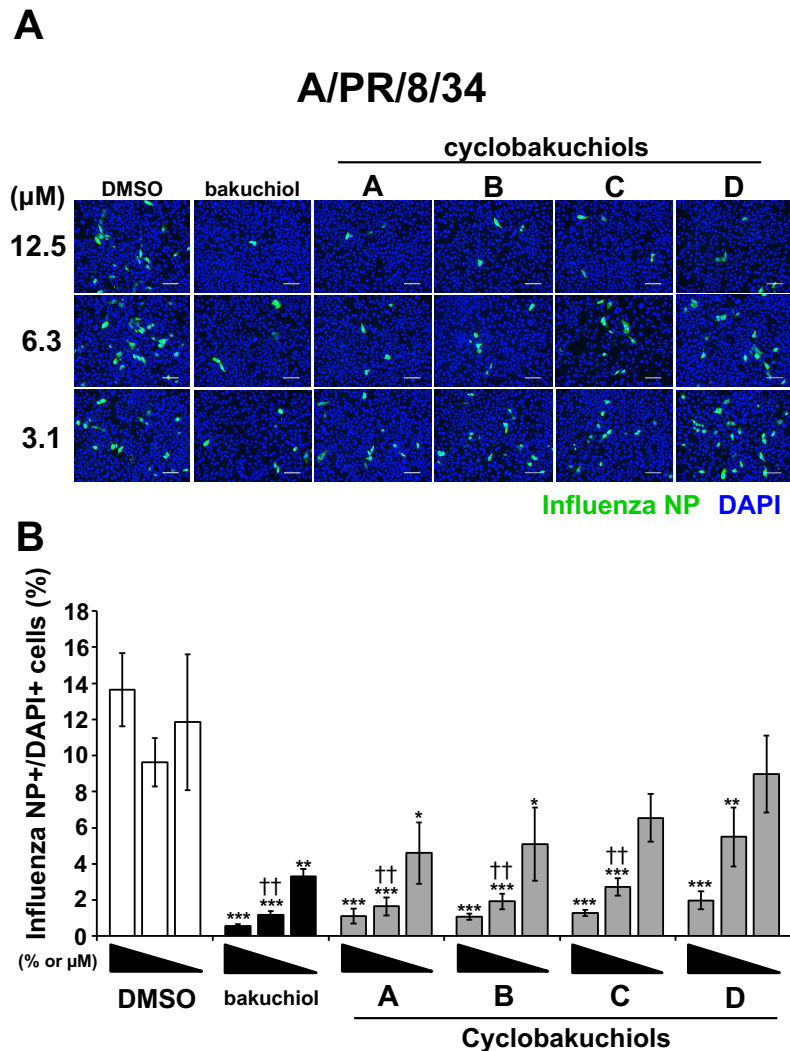
次に、cyclobakuchiols A-D の A 型インフルエンザウイルスに対する感染抑制効果をインフルエンザ NP 免疫染色法にて定量的に評価した (図 19)。cyclobakuchiols A-D (3.1-12.5 μM) を A/PR/8/34 または A/WSN/33 ウイルスと混合し、MDCK 細胞に添加して 24 時間培養後、蛍光顕微鏡で観察した (図 19-1A および図 19-2C)。観察画像の NP 陽性細胞 (緑) と DAPI 陽性細胞 (青) を数えて、DAPI 陽性細胞に対する NP 陽性細胞の割合を算出した (図 19-1B および図 19-2D)。cyclobakuchiols A-D (3.1-12.5 μM) と A/PR/8/34 ウイルスを添加した細胞では、DMSO を添加した場合と比較して、すべての濃度において有意に感染を抑制した (それぞれ $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$) (図 19-1B)。また、6.3 μM の cyclobakuchiols A-C と A/PR/8/34 ウイルスを添加した細胞では、6.3 μM の cyclobakuchiol D を添加した場合と比較して、有意に感染を抑制した ($^{\dagger\dagger}p < 0.01$) (図 19-1B)。しかし、cyclobakuchiols A-D と A/WSN/33 ウイルスを添加した MDCK 細胞では、染色された細胞の数に変化はなく (図 19-2C)、インフルエンザ NP 陽性細胞の割合は、いずれの濃度においても有意な差はなかった (図 19-2D)。

以上の結果から、cyclobakuchiols A-D は A 型インフルエンザ H1N1 株の MDCK 細胞への感染を阻害し細胞死を抑制するが、その効果は A 型インフルエンザ H1N1 株のサブタイプによって異なることが示された。



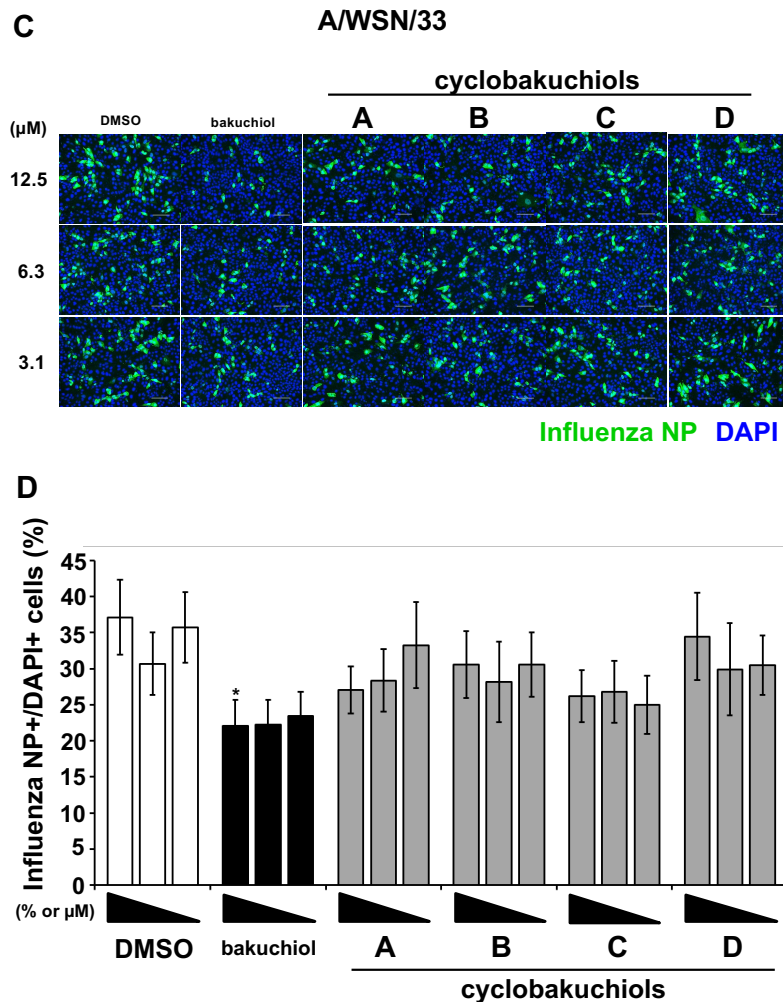
(図 18) cyclobakuchiols A-D は A 型インフルエンザウイルス感染細胞の細胞死を抑制する

cyclobakuchiols A-D (0.4-25 μM) を A/PR/8/34 (A)、A/CA/7/09 (B) または A/WSN/33 (C) (各 0.1 MOI) と混合し、MDCK 細胞に添加して 72 時間培養した。NB 染色液を用いて培養後の生存細胞を青く染色することにより、cyclobakuchiols A-D によるインフルエンザウイルス感染細胞の細胞死抑制効果を定性的に評価した。ネガティブコントロールとして DMSO (0.004-0.25%) を、ポジティブコントロールとして bakuchiol (0.4-25 μM) を使用した。データは 3 回の独立した実験の代表を示した。



(図 19-1) cyclobakuchiols A-D は A 型インフルエンザウイルス A/PR/8/34 ウイルスの感染を抑制する

cyclobakuchiols A-D (3.1-12.5 μM) と A/PR/8/34 ウイルス (0.1 MOI) を混合し、MDCK 細胞に添加して 24 時間培養した。培養した MDCK 細胞は A 型インフルエンザウイルス NP の免疫蛍光染色によって可視化し、顕微鏡で撮影した (A)。NP 陽性細胞 (緑) と DAPI 陽性細胞 (青) を数え、NP 陽性細胞数の割合をグラフ化した (B) ($n=9$)。各画像の白いスケールバーは 100 μm を表す。ネガティブコントロールとして DMSO (0.031-0.125%)、ポジティブコントロールとして bakuchiol (3.1-12.5 μM) を使用した。データは 3 回の独立した実験の平均値 \pm 標準誤差で示した。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ vs DMSO 群。 $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs cyclobakuchiol D 群。



(図 19-2) cyclobakuchiols A-D は A 型インフルエンザウイルス A/WSN/33 ウイルスの感染を抑制しない

cyclobakuchiols A-D (3.1-12.5 μM) と A/WSN/33 ウイルス (0.1 MOI) を混合し、MDCK 細胞に添加して 24 時間培養した。培養した MDCK 細胞は A 型インフルエンザウイルス NP の免疫蛍光染色によって可視化し、顕微鏡で撮影した (C)。NP 陽性細胞 (緑) と DAPI 陽性細胞 (青) を数え、NP 陽性細胞数の割合をグラフ化した (D) ($n=9$)。各画像の白いスケールバーは 100 μm を表す。ネガティブコントロールとして DMSO (0.031-0.125%)、ポジティブコントロールとして bakuchiol (3.1-12.5 μM) を使用した。データは 3 回の独立した実験の平均値 \pm 標準誤差で示した。 $*p < 0.05$ vs DMSO 群。

第四節 A型インフルエンザウイルスに対する cyclobakuchiols A-D の増殖抑制効果

A 型インフルエンザウイルス感染細胞内におけるウイルスゲノムの複製およびウイルス粒子の放出を cyclobakuchiols A-D が抑制するかを調べるために、ウイルスの増殖に対する影響をウイルス力価の測定により検討した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) インフルエンザウイルス株

第二章、第三節に示すうち、A/PR/8/34 または A/WSN/33 ウイルスを使用した。

3) ウイルス増殖実験

第一章、第四節に示した。ポジティブコントロールには bakuchiol を使用した。

<実験方法>

MDCK 細胞 (1×10^5 cells/well) を 24 ウェルプレートに播種し、ウイルス希釈液を加える前に DMEM 培地で 1 回洗浄した。この細胞に、A/PR/8/34 または A/WSN/33 ウイルスを、感染培地でウイルス力価がすべて 0.001 MOI になるように調製し、5% CO₂ 条件下、37°C で 1 時間感染させた。1 時間後、感染細胞を DMEM 培地で 2 回洗浄した。この感染細胞に cyclobakuchiols A-D (12.5 μM) と 3 μg/mL の TPCK-トリプシンを混合した感染培地を添加し、5% CO₂ 条件下、37°C で 12, 24, 48, 72 時間培養した。4 時点で各ウェルから培養液を採取した。ネガティブコントロールまたはポジティブコントロールとして、それぞれ DMSO (0.125%) または bakuchiol (12.5 μM) を用いた。ウイルス力価 (PFU/mL) は、第一章、第四節に示すように、A 型インフルエンザウイルス NP を免疫染色することにより決定し[23,45,83]、ウイルス力価を算出した[23,45]。また、感染前の実験で採取した培養液にはサンプルが含まれているが、ウ

ウイルス力価を測定する際には各培養液を 100 倍以上に希釈している。そのため、ウイルス力価の測定は、培地に含まれるサンプルの影響を受けないと考えられる。

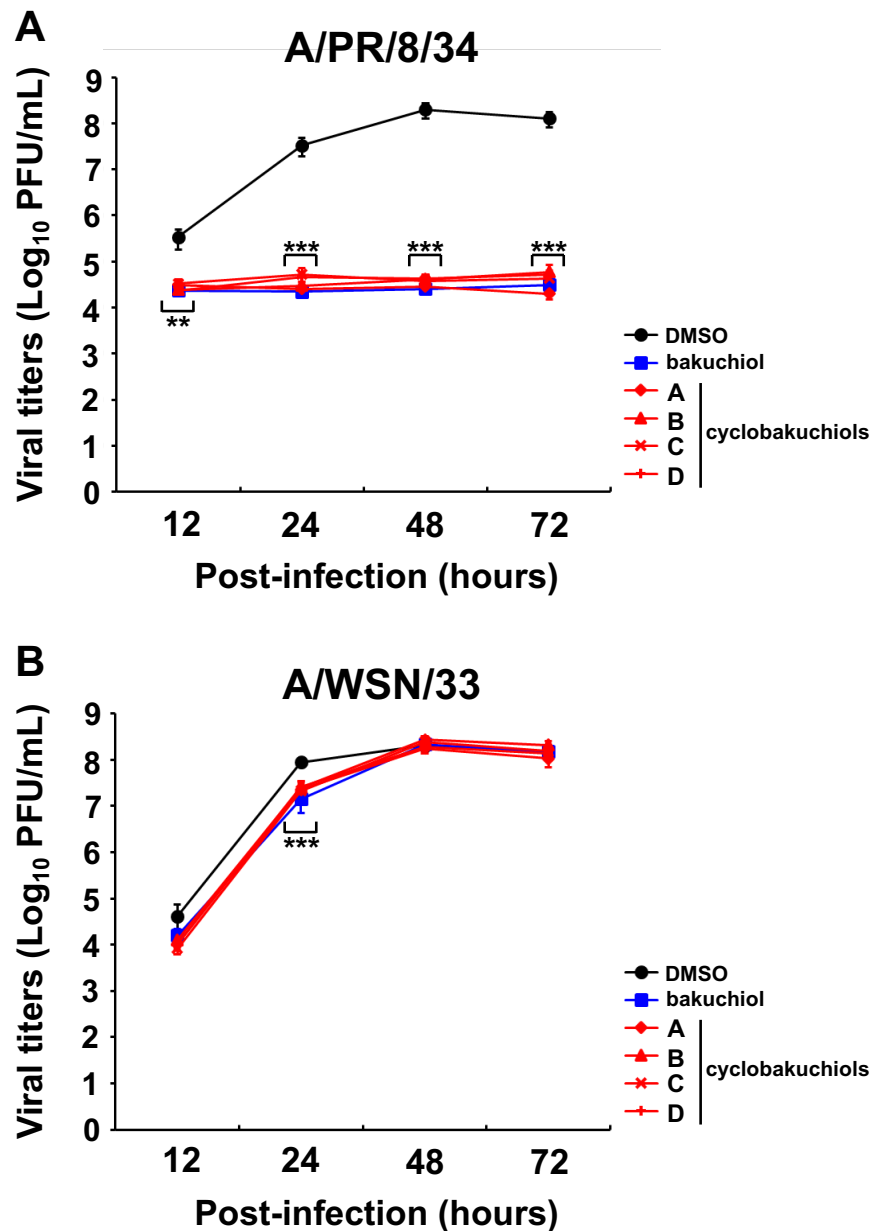
<統計学的処理>

データは 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差で示した。3 群間を ANOVA 検定にて比較し、Ryan 法で p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

【実験結果】

cyclobakuchiols A-D が A 型インフルエンザウイルス感染細胞内で、ウイルスゲノムの複製およびウイルス粒子の放出を抑制するか検討するために、ウイルス力価を測定した (図 20)。cyclobakuchiols A-D を添加した A/PR/8/34 ウイルスの力価は、DMSO を添加した場合と比較して 12 時間 (** $p < 0.01$)、24-72 時間 (***) $p < 0.001$) のすべてにおいて有意に低下していた (図 20A)。一方、cyclobakuchiols A-D を添加した A/WSN/33 ウイルスの力価は、DMSO を添加した場合と比較して、24 時間 (***) $p < 0.001$) 後に有意な低下が見られたが、12, 48-72 時間後では有意な低下はみられなかった (図 20B)。以上のことから、cyclobakuchiols A-D は、A 型インフルエンザウイルスの増殖抑制効果を示すが、その効果はウイルスのサブタイプによって異なることが明らかになった。

よって、以降の実験では、cyclobakuchiols A-D により感染抑制効果が示された A/PR/8/34 ウイルスを用い、cyclobakuchiol 類による抗インフルエンザ活性の機序について検討を進めることとした。



(図 20) cyclobakuchiols A-D は A/PR/8/34 ウイルスの増殖を抑制する

MDCK 細胞に A/PR/8/34 (A) または A/WSN/33 (B) (各 0.001 MOI) を感染させた後、cyclobakuchiols A-D (12.5 μM)、bakuchiol (12.5 μM)、DMSO (0.125%) をそれぞれ添加した (各 $n=9$)。グラフの時間で培養液を回収し、MDCK 細胞に添加して 16-18 時間培養した。培養後の細胞を免疫染色し、染色細胞数からウイルス力価を算出した。データは 3 回の独立した実験の平均値 ± 標準誤差とした。** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ vs DMSO 群。

第五節 A 型インフルエンザウイルスに対する cyclobakuchiols A-D の mRNA 発現抑制効果の検討

cyclobakuchiols A-D が A 型インフルエンザウイルスに対する感染抑制および増殖抑制効果を示すことから、A 型インフルエンザウイルス mRNA の発現を抑制すると考えられた。そこで、cyclobakuchiols A-D と A/PR/8/34 ウイルスの混合液を MDCK 細胞に添加し、各種ウイルスの mRNA 発現量を reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) で検出した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) インフルエンザウイルス株

第二章、第三節に示すうち、A/PR/8/34 ウイルスを使用した。

3) RT-qPCR 試薬とプライマー

RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を使用して total RNA の精製を行った。まず、各細胞抽出液に 70% EtOH/DEPC 水 (ナカライテスク社) を加えてスピнкаラムに乗せた。1000 rpm, 25°C, 15 秒間遠心し、濾過液は破棄した。スピнкаラムに Buffer RW1 を添加し、1000 rpm, 25°C, 15 秒間遠心、濾過液は破棄した。続いて Buffer RPE をスピнкаラムに添加し、1000 rpm, 25°C, 15 秒間遠心、濾過液は破棄した。同じく Buffer RPE をスピнкаラムに添加し、今度は 1000 rpm, 25°C, 2 分間遠心、濾過液は破棄した。スピнкаラムからしっかりと Buffer を除去するため、1000 rpm, 25°C, 1 分間空遠心し、濾過液は破棄した。スピнкаラムをコレクションチューブに乗せ、Rnase free 水をスピнкаラムに添加した。1000 rpm, 25°C, 1 分間遠心し、total RNA を回収した。NANO DOROP 2000 (Thermo 社) で total RNA 量を計測した。

この RNA を鋳型として SuperScript VILO (Thermo 社) を用いて cDNA の合成を行った。total RNA は 100 ng/μl になるように DEPC 水で希釈した。そこに DNase (NEB

社) を加え、サーマルサイクラー (PCR-Thermal Cycler) (TaKaRa 社) で 37°C、15 分間反応させた。続いて 50 mM EDTA を加え、サーマルサイクラーで 75°C、10 分間反応させたあと、氷上に静置した。SuperScript VILO (Thermo 社) を指示通り添加し、サーマルサイクラーで 25°C、10 分間→42°C、60 分間→85°C、15 分間反応させ、氷上に静置した。RNaseH (NEB 社) を添加し、サーマルサイクラーで 37°C、30 分間反応させた。精製した cDNA は滅菌 MilliQ にて 50 倍に希釈した。

得られた cDNA を鋳型として、SYBR Green real-time PCR Master Mix (TOYOBO 社) を用いて、表 1 に示す条件を qPCR 用プレートに混合した。使用したプライマーは表 2 に示す。PCR およびデータ解析は、Applied Biosystems StepOne Plus Real-time PCR system (Thermo 社) を用いて行った。

(表 1)

	μl
2×SYBR	10
Primer F	1
Primer R	1
Template (各 Sample)	1
滅菌 MilliQ	7
total	20

(表 2)

Primers	Nucleotide sequences (5'→3')
A/PR/8/34 NP forward	gaatggtgctctctgcttttga
A/PR/8/34 NP reverse	tccactttccgtttactctcctg
A/PR/8/34 NS1 forward	gcgatgccccattccttg
A/PR/8/34 NS1 reverse	atccgctccactatctgctttc
A/PR/8/34 PA forward	aagtgccataggccaggtttc
A/PR/8/34 PA reverse	cctcatctccattccccatttc
A/PR/8/34 PB1 forward	gacaacaaacaccgaaactggag
A/PR/8/34 PB1 reverse	ccatcgcctccaatacacaatc
A/PR/8/34 PB2 forward	ggtgcttacgggcaatcttc
A/PR/8/34 PB2 reverse	tgttcgtctctcccactcactatc
A/PR/8/34 M2 forward	gaaaggagggccttctacgg
A/PR/8/34 M2 reverse	tcgtcagcatccacagcac
18s ribosomal RNA forward	cggacaggattgacagattg
18s ribosomal RNA reverse	caaatcgctccaccaactaa

<実験方法>

MDCK 細胞 (1×10^5 cells/well) を 24 ウェルプレートに播種した。cyclobakuchiols A-D (12.5 μ M)、A/PR/8/34 ウイルス (0.1 MOI) と混合し、5% CO₂ 条件下、37°C で 30 分間前培養した。ネガティブコントロールまたはポジティブコントロールとして、DMSO (0.125%) または bakuchiol (12.5 μ M) をそれぞれ使用した。また、模擬感染 (Mock) は、感染していない細胞 [un-infected (UI)] を用いた。前培養した混合液を MDCK 細胞に添加し、24 時間培養後、実験材料に示すように RNeasy Mini Kit を用いて細胞抽出液から total RNA を抽出した。抽出した total RNA を鋳型として、SuperScript VILO を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型にして、SYBR Green real-time PCR Master Mix と表 2 に示すプライマーを用いて qPCR を行った。

PCR およびデータ解析は、Applied Biosystems StepOne Plus Real-time PCR system (Thermo 社) を用いて行った。

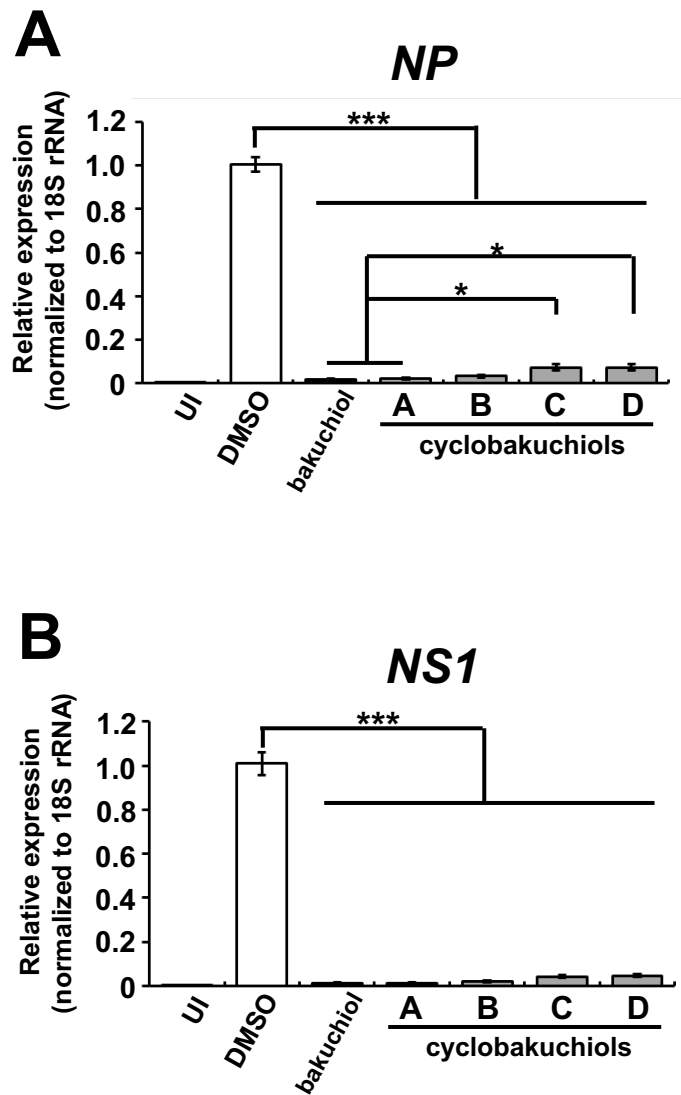
<統計学的処理>

データは3回の独立した実験の平均値±標準誤差で示した。相対的な発現量は、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した。NP、NS1、PA、PB1、PB2、M2 遺伝子をコードするウイルス mRNA 発現レベルは、宿主細胞の 18s リボソーム RNA (rRNA) 発現レベルで標準化した[23]。3 群間を ANOVA 検定にて比較し、Ryan 法で p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

【実験結果】

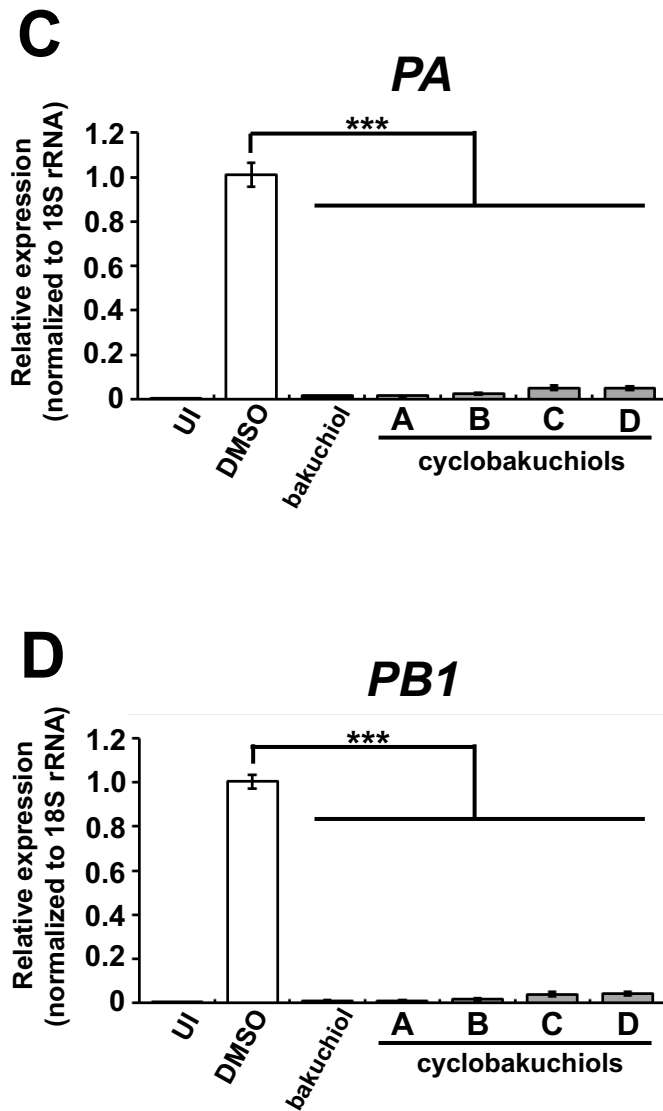
A 型インフルエンザウイルスの mRNA 発現量を RT-qPCR で評価した (図 21)。cyclobakuchiols A-D を添加した MDCK 細胞では、DMSO を添加した場合と比較して、すべてのウイルス mRNA 発現量を有意に抑制していた ($***p < 0.001$) (図 21)。特に、NP mRNA 量においては、その発現量の抑制効果において、cyclobakuchiol A または bakuchiol を添加した群と、cyclobakuchiol C または D を添加した群とを比較すると有意な差が検出された ($*p < 0.05$) (図 21-1A)。一方、PB2 mRNA 量においては、cyclobakuchiol A または bakuchiol を添加した群と cyclobakuchiol D を添加した群とを比較すると有意な差が検出された ($*p < 0.05$) (図 21-3E)。このことから、cyclobakuchiols A-D はインフルエンザウイルスの mRNA 発現量を抑制することが示された。さらに、一部の遺伝子では cyclobakuchiols A-D 間で効果に差があることが示された。

以上の結果から、cyclobakuchiols A-D によって、A 型インフルエンザウイルスの mRNA 発現量が抑制することが示された。



(図 21-1) cyclobakuchiols A-D は A 型インフルエンザウイルスの mRNA 発現量を抑制する

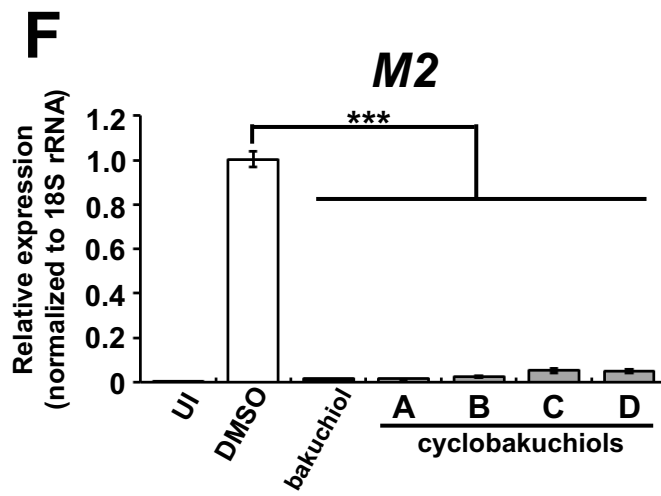
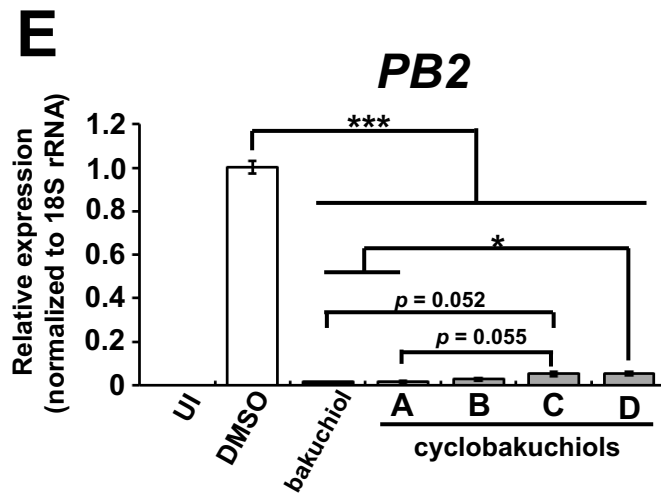
cyclobakuchiols A-D (12.5 μ M) あるいは bakuchiol (12.5 μ M) 、DMSO (0.125%) を A/PR/8/34 (0.1 MOI) と混合し、30 分間前培養した。前培養液を MDCK 細胞に添加し、24 時間培養後、細胞抽出液から total RNA を抽出した。ウイルスの mRNA [NP(A), NS1(B)] (各 $n = 9$) の相対的な発現レベルを RT-qPCR で測定した。これらの mRNA レベルを 18s リボソーム RNA で正規化し、DMSO を添加した場合を 1 として比較した。データは 3 回の独立した実験の平均値 \pm 標準誤差で示した。UI; 非感染細胞。* $p < 0.05$ vs bakuchiol or cyclobakuchiol A 群、*** $p < 0.001$ vs DMSO 群。



(図 21-2) cyclobakuchiols A-D は A 型インフルエンザウイルスの mRNA 発現量を抑制する

cyclobakuchiols A-D (12.5 μ M) あるいは bakuchiol (12.5 μ M) 、DMSO (0.125%) を A/PR/8/34 (0.1 MOI) と混合し、30 分間前培養した。前培養液を MDCK 細胞に添加し、24 時間培養後、細胞抽出液から total RNA を抽出した。ウイルスの mRNA [PA(C), PB1(D)] (各 n = 9) の相対的な発現レベルを RT-qPCR で測定した。これらの mRNA レベルを 18s リボソーム RNA で正規化し、DMSO 添加した場合を 1 として比較した。データは 3 回の独立した実験の平均値 \pm 標準誤差で示した。UI; 非感染細胞。

*** $p < 0.001$ vs DMSO 群。



(図 21-3) cyclobakuchiols A-D は A 型インフルエンザウイルスの mRNA 発現量を抑制する

cyclobakuchiols A-D (12.5 μ M)あるいは bakuchiol (12.5 μ M) 、DMSO (0.125%) を A/PR/8/34 (0.1 MOI) と混合し、30 分間前培養した。前培養液を MDCK 細胞に添加し、24 時間培養後、細胞抽出液から total RNA を抽出した。ウイルスの mRNA [PB2 (E), M2 (F)] (各 $n=9$) の相対的な発現レベルを RT-qPCR で測定した。これらの mRNA レベルを 18s リボソーム RNA で正規化し、DMSO を添加した場合を 1 として比較した。データは 3 回の独立した実験の平均値 \pm 標準誤差で示した。UI; 非感染細胞。* $p < 0.05$ vs bakuchiol or cyclobakuchiols A 群、*** $p < 0.001$ vs DMSO 群。

第六節 A 型インフルエンザウイルスに対する cyclobakuchiols A-D のタンパク質発現抑制効果の検討

cyclobakuchiols A-D が A 型インフルエンザウイルスタンパク質の発現量を抑制するかについて評価するため、cyclobakuchiols A-D と A/PR/8/34 ウイルスの混合液を MDCK 細胞に添加した細胞におけるウイルスタンパク質の発現量をウエスタンブロットティング法で検討した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) インフルエンザウイルス株

第二章、第三節に示すうち、A/PR/8/34 ウイルスを使用した。

3) ウエスタンブロットティング法

サンプルは、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (15 mA →25 mA) によりタンパク質を分離させた。トランスファーバッファー (1×TG、20%メタノール) に浸したスポンジとろ紙で、前処理 (メタノールに軽く浸した後、5 分間トランスファーバッファーで洗浄) したメンブレン (Immobilon-P Transfer Membrane) (Millipore 社) と泳動したゲルを挟み、ウェット法により 37V、90 分でメンブレンにタンパク質を転写した。転写したメンブレンは 5%スキムミルク/TBS-T (0.1%) (スキムミルク、1×TBS、0.1% Tween 20) (ナカライテスク社) に漬けて一晩ブロッキングを行なった。5%スキムミルク/TBS-T (0.1%) に希釈した一次抗体 (表 3) と室温で 2 時間反応させた。一次抗体反応終了後、TBS-T (0.1%) で 5 分間の振とう洗いを 3 回繰り返す、5%スキムミルク/TBS-T (0.1%) に希釈した二次抗体 (表 4) と室温で 1 時間反応させた。二次抗体反応終了後、TBS-T (0.1%) で 5 分間の振とう洗いを 3 回繰り返した。検出試薬の Immobilon Western Chemiluminescent

HRP Substrate (Millipore 社) とメンブレンを 1 分間反応させ、Amersham Imager 680 シリーズソフトウェアバージョン 2.0 (GE Healthcare Life Sciences 社) により検出した。

(表 3)

文中表記	一次抗体 (商品名)	希釈倍率
抗 NP 抗体	Mose Anti-Influenza A, Nucleoprotein-UNLB	1:1000
抗 NS1 抗体	Influenza A ns1 (vC-20) goat polyclonal IgG	1:1000
抗 β -actin 抗体	Beta-Actin (BE5) Rabbit mAb	1:1000

(表 4)

文中表記	二次抗体 (商品名)	希釈倍率
抗マウス抗体	Goat Anti-Mouse IgG1-HRP	1:4000
抗ヤギ抗体	donkey anti-goat IgG-HRP	1:4000
抗ウサギ抗体	Anti-Rabbit IgG-HRP	1:4000

<実験方法>

MDCK 細胞 (1×10^5 cells/well) を 24 ウェルプレートに播種した。cyclobakuchiols A-D ($12.5 \mu\text{M}$) と A/PR/8/34 ウイルス (0.1 MOI) を混合し、MDCK 細胞に添加する前に 30 分間前培養した。ネガティブコントロールおよびポジティブコントロールとして DMSO (0.125%) および bakuchiol ($12.5 \mu\text{M}$) をそれぞれ使用した。前培養した混合液を MDCK 細胞に添加し、4, 8, 12, 24 時間後に、緩衝液[125 mM Tris-HCl (pH6.8) 、5%ドデシル硫酸ナトリウム、25%グリセロール、0.1%ブロモフェノールブルー、10%メルカプトエタノール]で細胞を溶解し、5 分間煮沸した。この細胞抽出液を 10%ポリアクリルアミドゲルで分離し、タンパク質をメンブレンに転写した。それぞれのタンパク質を検出する一次抗体として抗インフルエンザウイルス NP 抗体 (SouthernBiotech 社) 、または抗インフルエンザウイルス NS1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社) を用いた。内部コントロールとして、 β -actin (一次抗体; Cell Signaling 社) を用いた。二次抗体として、抗マウス抗体 (SouthernBiotech 社) 、抗ヤギ IgG 抗体 (sc-2020 ; Santa Cruz Biotechnology 社) または抗ウサギ抗体を適宜使用した。シグ

ナルは検出試薬を用いて検出した。シグナル強度は ImageJ ソフトウェアを用いて測定し、NP と NS1 のタンパク質レベルを β -actin のタンパク質レベルで標準化した。

<統計学的処理>

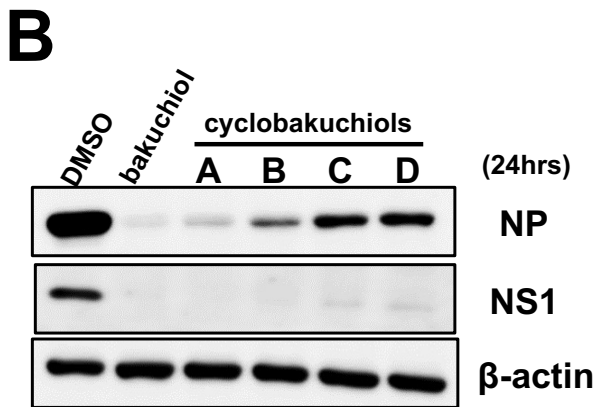
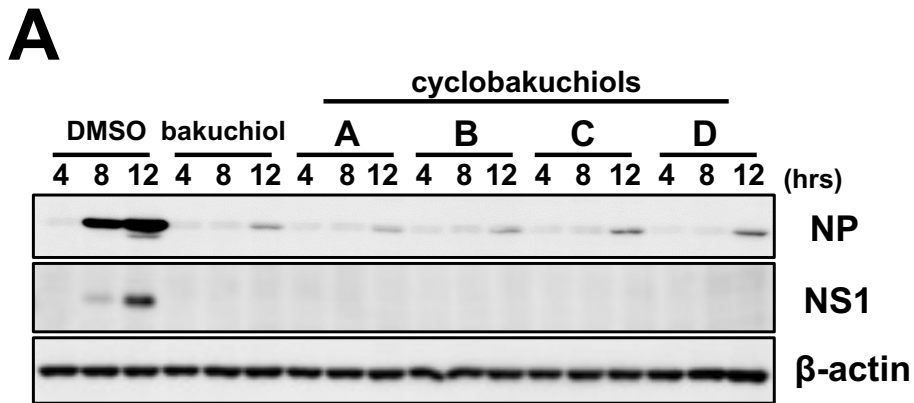
データは 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差で示した。3 群間を ANOVA 検定にて比較し、Ryan 法で p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

【実験結果】

A 型インフルエンザウイルスタンパク質の発現量を cyclobakuchiols A-D が抑制するかどうかをウエスタンブロッティング法で検討した。cyclobakuchiols A-D を添加し、4-12 時間培養した MDCK 細胞と、DMSO を添加した場合を比較して 8 時間、12 時間で有意に NP および NS1 のタンパク質の発現量を抑制した (図 22-1A)。cyclobakuchiols A-D を添加し、24 時間培養した MDCK 細胞では、DMSO を添加した場合と比較して、NP および NS1 タンパク質の発現量を抑制した (図 22-1B)。さらに、NP タンパク質では、cyclobakuchiols A-D 間でシグナル強度に差が見られた (図 22-1B, NP)。

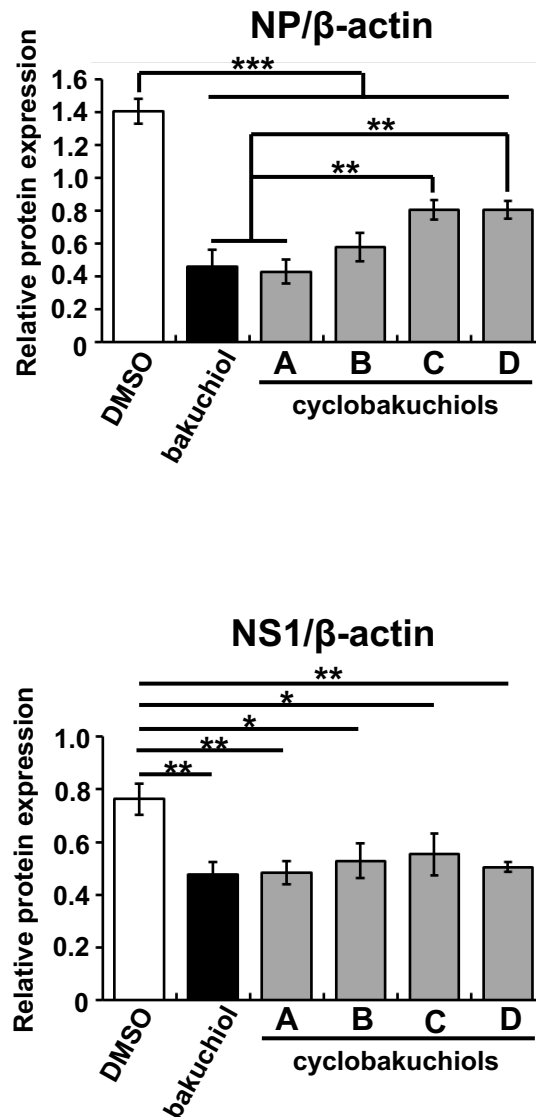
cyclobakuchiols A-D を添加し、24 時間培養した MDCK 細胞におけるシグナル強度から (図 22-1B)、NP または NS1 タンパク質の相対的な発現レベルを解析した (図 22-2C)。cyclobakuchiols A-D を添加した細胞の NP または NS1 タンパク質の発現量は、DMSO を添加した場合と比較して有意に減少した (それぞれ $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$) (図 22-2C)。また、NP タンパク質の発現量は、cyclobakuchiol A または bakuchiol を添加した MDCK 細胞と比較して、cyclobakuchiol C および D を添加した場合と比較して有意に減少した ($**p < 0.01$) (図 22-2C 上段)。このことから、cyclobakuchiols A-D は A 型インフルエンザウイルスタンパク質の発現を減少させ、その効果は cyclobakuchiols A-D 間で差があることが示された。

以上の結果から、cyclobakuchiols A-D によって A 型インフルエンザウイルスのタンパク質発現量が抑制することが示された。



(図 22-1) cyclobakuchiols A-D は A 型インフルエンザウイルスのタンパク質発現を抑制する

cyclobakuchiols A-D (12.5 μ M)、bakuchiol (12.5 μ M)、DMSO (0.125%) を A/PR/8/34 (0.1 MOI) と混合し、MDCK 細胞に添加する前に 30 分間前培養した。感染後 4-12 時間 (A) または 24 時間 (B) 後に、細胞抽出液中の A 型インフルエンザウイルス NP および NS1 タンパク質をウエスタンブロッティングで検出した。 β -actin は内部コントロールとして用いた。データは 3 回の独立した実験の代表を示した。

C

(図 22-2) cyclobakuchiols A-D は A 型インフルエンザウイルスのタンパク質発現を抑制する

感染後 24 時間のシグナル強度 (B) を Image J ソフトウェアにて測定し、NP/β-actin または NS1/β-actin のタンパク質レベルをグラフ化した (C)。データは 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ vs DMSO or cyclobakuchiol A or bakuchiol 群。

第七節 A 型インフルエンザウイルス感染細胞における cyclobakuchiols A-D の interferon- β (*Ifn- β*) および myxovirus-resistant protein 1 (*Mx1*) の mRNA 発現量に及ぼす影響

IFN- β は、A 型インフルエンザウイルスの感染・増殖によって引き起こされる宿主細胞の免疫応答における抗ウイルス性サイトカインとして知られている。また、*Mx1* は IFN- β によって上昇する抗ウイルス性のタンパク質として知られている[84-86]。これまでに、A 型インフルエンザウイルスの感染や増殖によって誘導される宿主細胞の免疫応答において、*bakuchiol* が *Ifn- β* および *Mx1* の mRNA の発現を抑制することを報告している [23]。したがって、A 型インフルエンザウイルスの感染および増殖を cyclobakuchiols A-D が抑制することを示す結果から、cyclobakuchiols A-D が宿主細胞における *Ifn- β* および *Mx1* の mRNA 発現量を低下させると仮定した。

そこで、cyclobakuchiols A-D と A/PR/8/34 ウイルスの混合液を添加した MDCK 細胞における *Ifn- β* および *Mx1* の mRNA 発現量を RT-qPCR で解析した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) インフルエンザウイルス株

第二章、第三節に示すうち、A/PR/8/34 ウイルスを使用した。

3) RT-qPCR 試薬とプライマー

試薬は第二章、第五節に示した。

プライマーは表 5 に示す。

(表 5)

Primers	Nucleotide sequences (5'→3')
canine Ifn- β forward	ccagttccagaaggaggaca
canine Ifn- β reverse	tgtcccaggtgaagttttcc
canine Mx1 forward	gaatcctgtaccaatcatgtg
canine Mx1 reverse	taccttctctcatattggct
canine β -actin forward	tgccttgaagttggaaaacg
canine β -actin reverse	ctggggcctaattgttctcaca

<実験方法>

第二章、第五節に示した。

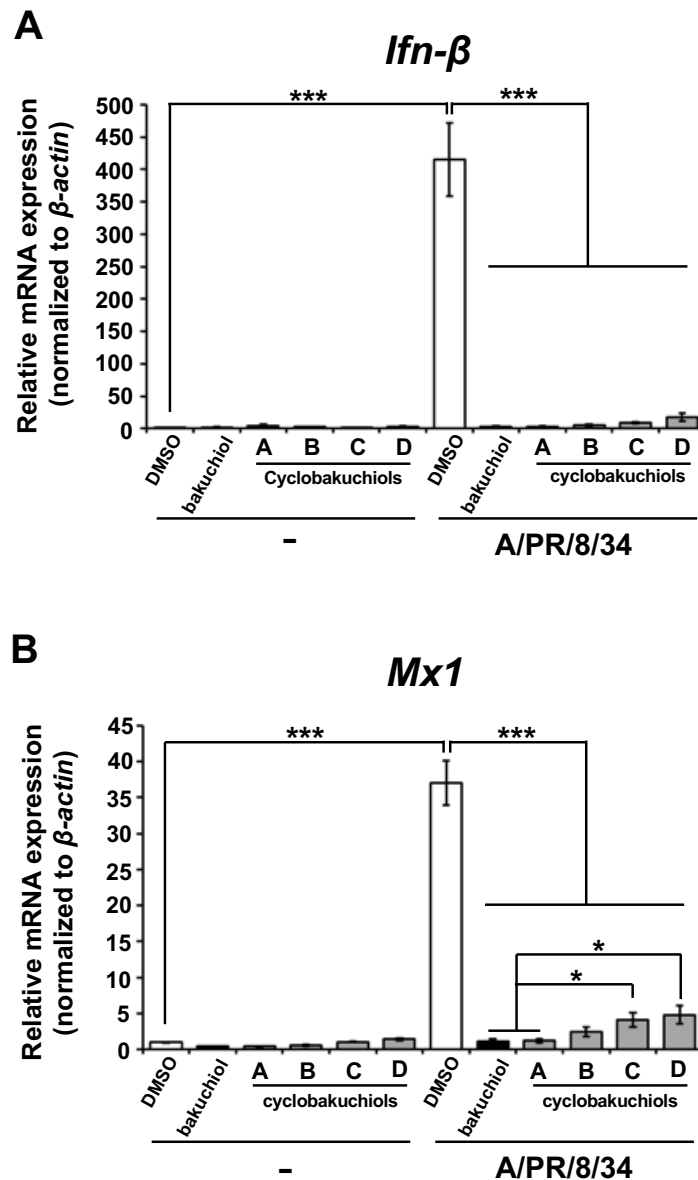
<統計学的処理>

相対的な発現量は、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した。*Ifn- β* および *Mx1* の mRNA レベルは、canine β -actin の mRNA のレベルで標準化した[23]。データは独立した3回の実験の平均値 \pm 標準誤差で示した。3群間をANOVA検定にて比較し、Ryan法で p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

【実験結果】

A 型インフルエンザウイルスと cyclobakuchiols A-D の混合液を添加した MDCK 細胞における *Ifn-β* および *Mx1* の mRNA 発現量を RT-qPCR で解析した。A/PR/8/34 ウイルスと、DMSO の混合液を添加した MDCK 細胞では、*Ifn-β* と *Mx1* の相対的な mRNA 発現量が上昇していることから (図 23)、*Ifn-β* および *Mx1* の mRNA 発現量は、ウイルス感染によって上昇する因子であることを示した。A/PR/8/34 ウイルスと cyclobakuchiols A-D を添加した MDCK 細胞では、*Ifn-β* および *Mx1* の mRNA 発現量を有意に抑制した ($***p < 0.001$) (図 23)。*Mx1* では、cyclobakuchiol A または bakuchiol を添加した MDCK 細胞と cyclobakuchiol C または cyclobakuchiol D を添加した場合と比較して、mRNA 発現量を有意に抑制した ($*p < 0.05$) (図 23B)。

以上の結果から、cyclobakuchiols A-D が、A 型インフルエンザウイルスの感染・増殖によって引き起こされる宿主細胞の免疫応答を抑制することを示し、cyclobakuchiols A-D が A 型インフルエンザウイルスの感染や増殖を阻害することを示した。



(図 23) cyclobakuchiols A-D は A 型インフルエンザウイルス感染細胞において

Ifn-β および *Mx1* の mRNA の発現上昇を抑制する

cyclobakuchiols A-D (12.5 μ M) 、 bakuchiol (12.5 μ M) 、 DMSO (0.125%) を A/PR/8/34 (0.1 MOI) と混合し、30 分間前培養した。混合液を添加した MDCK 細胞を 24 時間培養し、細胞抽出液を回収、total RNA を抽出した。*Ifn-β* (A) または *Mx1* (B) (各 $n=9$) の mRNA の相対レベルを RT-qPCR で測定し、 β -actin の mRNA 値で正規化し、DMSO を添加した非感染細胞を 1 として比較した値を示す。データは独立した 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ vs DMSO or bakuchiol or cyclobakuchiol A 群。

第八節 cyclobakuchiols A-D の Nrf2 活性化経路への影響

これまでに、A 型インフルエンザウイルス感染細胞における bakuchiol の細胞内活性化分子経路を次世代シーケンスにより解析し、bakuchiol が Nrf 経路を活性化することを明らかにしている[23] (図 26)。また、Nrf2 により転写が制御されている NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (*Nqo1*) は、酸化ストレスに対する細胞応答に関連していることが報告されている[87-92]。そこで、cyclobakuchiols A-D が A/PR/8/34 ウイルス感染および無感染 MDCK 細胞において、*Nqo1* 遺伝子の mRNA の発現を上昇させるかどうか RT-qPCR で検討した。さらに、cyclobakuchiols A-D が MDCK 細胞の Nrf2 活性化を誘導するかどうかを、Nrf2 レポーターアッセイを用いて解析した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) 細胞培養

第一章、第二節に示した。

2) インフルエンザウイルス株

第二章、第三節に示すうち、A/PR/8/34 を使用した。

3) RT-qPCR 試薬とプライマー

試薬は第二章、第五節に示した。プライマーは表 6 に示す。

4) レポーターアッセイ

ベクターは、Nrf2 の活性化によって駆動される Fluc 遺伝子を含む pNQO1-ARE-Fluc ベクター (antioxidant response element; ARE) と、内部コントロールとして単純ヘルペスウイルスの TK プロモーターによって駆動される Rluc 遺伝子を含む pRL-TK-RLuc ベクター (Promega 社) を使用した。pNQO1-ARE-Fluc ベクターは東北大学大学院山本雅之教授から提供して頂いた。トランスフェクション試薬は Lipofectamine 2000 (Thermo 社)、無血清培地は Opti-MEM (Thermo 社) を使用した。MDCK 細胞へのトランスフェクションは、Lipofectamine 2000 の説明書に従って行った。トランスフェクション後の細胞に添加するサンプルは 1% BSA/DMEM で希釈し

た。サンプル添加後 24 時間培養した細胞は 4°C の 1×PBS (-) にて 1 回洗浄し、Buffer RLT (QIAGEN 社) 350 µl で細胞抽出液を回収、1 分間攪拌した。この細胞抽出液から、第二章、第五節に示す方法で total RNA を抽出、cDNA を合成し、表 6 に示すプライマーを使用して、リアルタイム PCR を行った。

(表 6)

Primers	Nucleotide sequences (5'→3')
<i>Firefly</i> luciferase forward	tcgccagtcaagtaacaac
<i>Firefly</i> luciferase reverse	acttcgtccacaaacacaa
<i>Renilla</i> luciferase forward	aacgcggcctcttcttattt
<i>Renilla</i> luciferase reverse	gtctggataatacaccgcg
canine NQO1 forward	ggcactctgcatttctgtgg
canine NQO1 reverse	caggcgtttcttccatcc
canine β-actin forward	tgcttgaagtggaaaacg
canine β-actin reverse	ctggggcctaattgttctcaca

<実験方法>

1) RT-qPCR

RT-qPCR の方法は第二章の第五節に示した。*Nqo1* の *Fluc* または *Rluc* 遺伝子の mRNA レベルは、canine β-actin のレベルで標準化した。

2) Nrf2 レポーターアッセイ

デュアル・ルシフェラーゼ・システムに基づく Nrf2 レポーターアッセイを行った [23,92]。Nrf2 の活性化によって駆動される *Fluc* 遺伝子を、pNQO1-ARE-*Fluc* を用いて発現させた。内部コントロールとして pRL-TK-*Rluc* ベクターを使用した。MDCK 細胞 (1×10⁵ cells/well) を 24 ウェルプレートに播種し、pNQO1-ARE-*Fluc* (0.25 µg) および pRL-TK-*Rluc* (0.25 µg) を遺伝子導入した。遺伝子導入後 24 時間目に、5% CO₂ 条件下、37°C で感染培地中に 12.5 µM の cyclobakuchiols A-D を添加した。ネガティブコントロールとして DMSO (0.125%)、ポジティブコントロールとして bakuchiol

(12.5 μ M) をそれぞれ用いた。第二節、第五章に示すように、24 時間培養後の MDCK 細胞抽出液から total RNA を抽出し、合成した cDNA を鋳型にして qPCR を行った。PCR およびデータ解析は、Applied Biosystems StepOne Plus Real-time PCR system (Thermo 社) を用いて行った。Nrf2 レポーターアッセイでは、Fluc の発現量を Rluc の発現量で標準化した。なお、bakuchiol にてルシフェラーゼ活性が抑えられたという報告から[23]、cyclobakuchiols A-D でもその可能性があると考え、本実験では、相対発光量ではなく RT-qPCR での mRNA 発現量で検討した。

<統計学的処理>

データは独立した 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差で示した。3 群間を ANOVA 検定にて比較し、Ryan 法で p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

【実験結果】

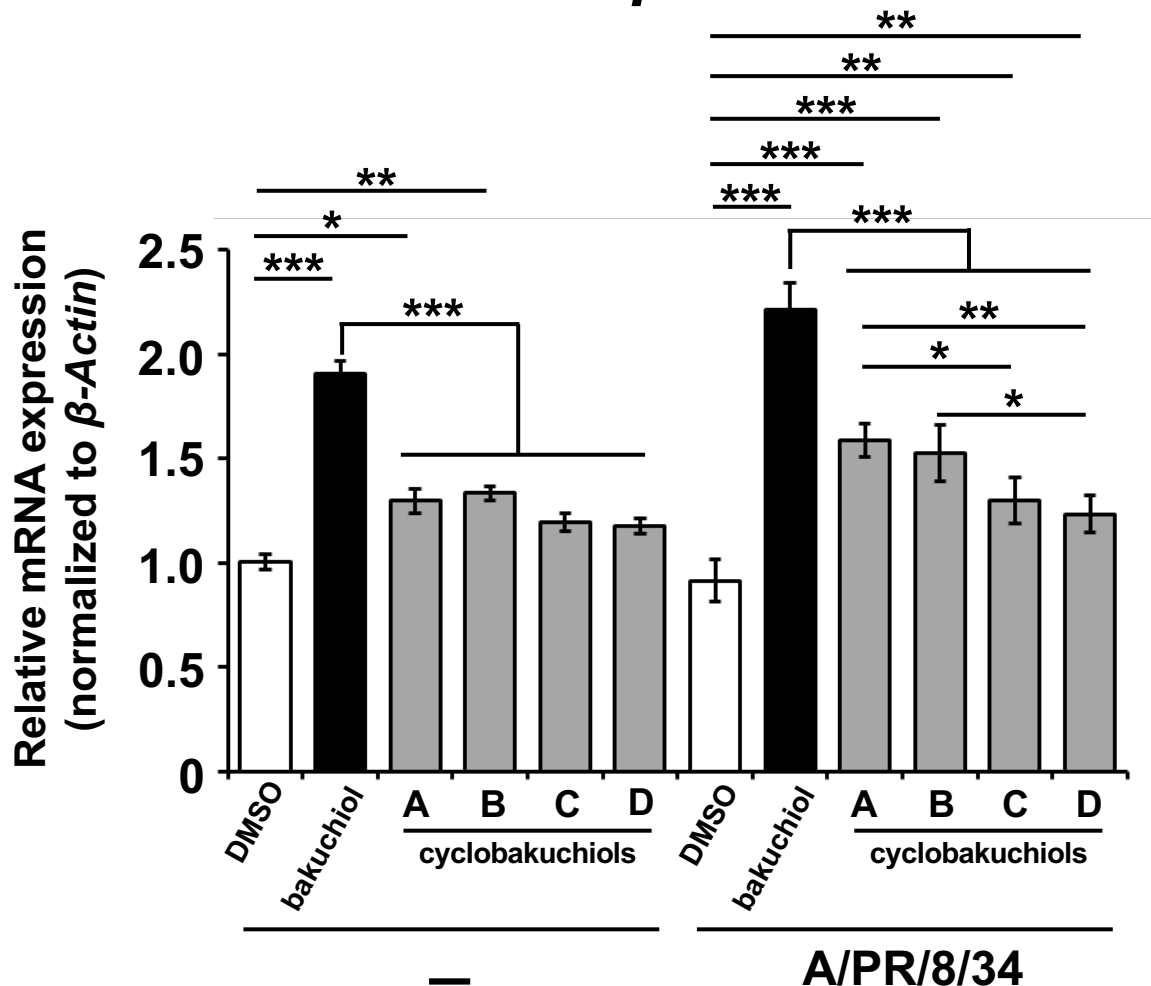
cyclobakuchiols A-D が、*Nqo1* の mRNA 発現量を上昇させるかどうかについて、RT-qPCR 法で検討した。まず、A/PR/8/34 の感染による *Nqo1* mRNA 量の変動を検討したところ、有意な差は見られなかった (図 24-1A, DMSO, white bar)。

次に、A/PR/8/34 の非感染下における cyclobakuchiols A-D による *Nqo1* mRNA 量の変動を検討したところ (図 24-1A, virus-)、DMSO と比較して cyclobakuchiol A および B において、約 1.4 倍上昇していた (図 24-1A, virus-)。一方で、cyclobakuchiol C および D では、上昇傾向は認められたものの、有意な上昇は検出されなかった (図 24-1A, virus-)。ポジティブコントロールとして使用した bakuchiol では、約 1.9 倍上昇しており、これらの bakuchiol 化合物のなかでは一番強い *Nqo1* mRNA 発現量の誘導作用を示した (図 24-1A, virus-)。

A/PR/8/34 の感染下における cyclobakuchiols A-D による *Nqo1* mRNA 量の変動を検討したところ (図 24-1A, A/PR/8/34)、DMSO と比較して cyclobakuchiols A-D により、有意な発現量の上昇を検出した (図 24-1A, A/PR/8/34)。cyclobakuchiols A-D 間で比較したところ、cyclobakuchiol A, B による *Nqo1* mRNA 量の誘導作用は D よりも強いことが明らかとなった (図 24-1A, A/PR/8/34)。また、A/PR/8/34 の感染下においても bakuchiol が強い *Nqo1* mRNA 発現量の誘導作用を示した (図 24-1A, A/PR/8/34)。

cyclobakuchiols A-D によって *Nqo1* mRNA 量が誘導されたので、*Nqo1* 発現を制御することが知られている転写因子 Nrf2 の活性化について、レポーターアッセイを用い検討した。レポーターアッセイでは、通常は基質であるルシフェリンを使用した化学発光量を検出するが、cyclobakuchiols A-D によってルシフェラーゼ活性が阻害されることが懸念されたため、*Fluc* mRNA 量の検出することにした。cyclobakuchiols A-D による Nrf2 の活性化を検討したところ、cyclobakuchiol A, B, C では有意な上昇が検出されたが、cyclobakuchiol D では、上昇傾向は見られたものの、有意な差は見られなかった (図 24-2B)。一方、これらの cyclobakuchiols A-D よりも強い *Nqo1* mRNA 誘導作用を示していた bakuchiol (図 24-1A) による Nrf2 活性化は、DMSO と比較して有意な上昇は検出されたものの、cyclobakuchiols A-D とほぼ同等であった (図 24-2B)。

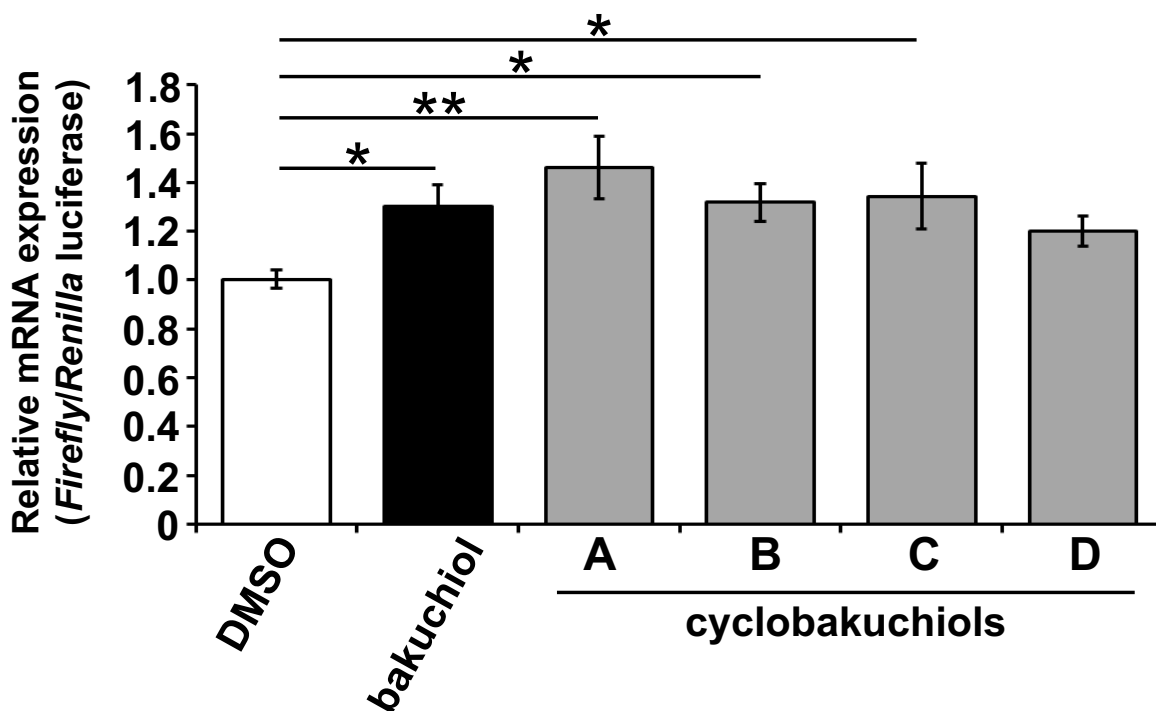
以上の結果から、cyclobakuchiols A-D によって転写因子 Nrf2 が活性化されることで、下流因子である *Nqo1* の発現量が誘導されることがわかった。しかしながらこれらの誘導作用は一様ではなく、cyclobakuchiols A-D 間で差があることが示された。

A***Nqo1***

(図 24-1) cyclobakuchiols A-D は MDCK 細胞の *Nqo1* の mRNA 発現を増加する cyclobakuchiols A-D (12.5 μ M) 、bakuchiol (12.5 μ M) 、DMSO (0.125%) を A/PR/8/34 (0.1 MOI) と混合し、MDCK 細胞に 24 時間添加した。細胞抽出液から total RNA を抽出し、RT-qPCR により *Nqo1* の mRNA 発現量を測定した (n=9)。 β -actin の mRNA 量で標準化し、DMSO を添加した非感染細胞を 1 とした相対値で示した (A)。ネガティブコントロールとして DMSO をポジティブコントロールとして bakuchiol を使用した。データは独立した 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

B

Nrf2 reporter assay



(図 24-2) cyclobakuchiols A-C は A 型インフルエンザ感染細胞において Nrf2 の活性化を誘導する

Nrf2 レポーターアッセイを MDCK 細胞で行なった。MDCK 細胞に Nrf2 活性化で駆動する Rluc 遺伝子を発現する pNQO1-ARE-Fluc と、単純ヘルペスウイルスの TK プロモーターで駆動する Rluc を発現する pRL-TK-Rluc を導入した。遺伝子導入後に cyclobakuchiols A-D (12.5 μ M)、bakuchiol (12.5 μ M)、DMSO (0.125%) で細胞に添加した。Fluc および Rluc の mRNA 発現量を 24 時間後に RT-qPCR で分析し、 β -actin の mRNA で標準化した。Fluc mRNA/Rluc mRNA の相対レベルを算出し、DMSO を添加した場合を 1 として相対的に示した (B)。ネガティブコントロールとして DMSO を、ポジティブコントロールとして bakuchiol を使用した。データは独立した 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ vs DMSO 群。

第九節 小括および考察

第二章では、cyclobakuchiols A-D が A 型インフルエンザウイルスの感染および増殖を抑制する (図 19,20) ことで MDCK 細胞の生存率を高めた (図 18)。さらに、A 型インフルエンザウイルス感染細胞におけるウイルスの mRNA およびタンパク質の発現を低下 (図 21,22) させることを明らかにした。cyclobakuchiols A-D は、A 型インフルエンザウイルスにより誘導される宿主細胞の免疫応答遺伝子の発現を抑制した (図 23)。また、cyclobakuchiols A-D は、A 型インフルエンザウイルス感染細胞において、転写因子 Nrf2 の活性化に伴い (図 24-2)、下流因子である *Nqo1* の mRNA 発現を増加させることを検出した (図 24-1)。

図 18、19 に示すように cyclobakuchiols A-D が抗インフルエンザ活性を示したこと、さらに以前の研究において、フェノール性水酸基を持たない bakuchiol の類似化合物を作製し、抗インフルエンザ活性を検討したところ、抗インフルエンザ活性は見られなかったことから (未発表データ)、標的分子への結合には、フェノール性水酸基の存在が重要であると考えられる。さらに、非天然物の(-)-(R)-bakuchiol において、抗インフルエンザ活性が検出されないことから[23]、1位の絶対配置も必須であると考えられる (図 15 式-A)。

本研究によって得られた結果を表 7 にまとめた。NB 染色によるウイルス感染細胞死の抑制効果、増殖抑制効果、NS1, PA, PB1, M2 の mRNA 量の抑制、NS1 のタンパク質量の抑制、*Ifn-β* の mRNA 量抑制では bakuchiol と cyclobakuchiols A-D の間で有意な差は無く、これらについての構造-活性相関の議論はできないことがわかる。感染抑制効果、NP, PB2 の mRNA 量の抑制、NP タンパク質量の抑制、*Mx1* の mRNA 量の抑制、*Nqo1* の mRNA 量の上昇については、cyclobakuchiol A および B と比較すると、cyclobakuchiol C および D で低い傾向が観察された。このことから、これらの作用においては、cyclobakuchiols A-D の 2-ヒドロキシイソプロピル基よりもイソプロペニル基を有している方がより活性を有していることが示唆された。これは、イソプロペニル基と 2-ヒドロキシイソプロピル基の極性の違いが、活性の違いに影響している可能性が考えられる。さらに、感染抑制効果、NP mRNA 量、タンパク質量

の抑制効果では、cyclobakuchiol A は B より活性が強い傾向が認められた (表 7)。このことは 3*R*, 4*R* 体が 3*S*, 4*S* 体よりも活性が強いことを意味している (図 25)。Nrf2 の活性化について着目すると、cyclobakuchiol C は D よりも活性が強く (表 7)、ここでも 3*R*, 4*R* 体が 3*S*, 4*S* 体よりも活性が強い傾向が認められた (図 25)。このことから、3 位および 4 位の官能基の立体配置は、抗インフルエンザ活性の強弱に重要な意味を持っていると考えられる。以上のことから、cyclobakuchiols A-D 間の抗インフルエンザウイルス活性の違いには、イソプロピル基が脱水素化された状態のイソプロペニル基であるのか、または酸素化された状態の 2-ヒドロキシイソプロピル基であるかの違いと、それら官能基とフェノール基の立体配置が影響していると考えられる (図 25)。

cyclobakuchiols A-D は、インフルエンザウイルス H1N1 株の A/PR/8/34 および A/CA/7/09 ウイルスを阻害したが、A/WSN/33 ウイルスに対しては阻害作用を示さなかった (図 18, 19, 20)。これは、ウイルスサブタイプ間のタンパク質の違いや、それに対する宿主細胞の反応の違いを反映している可能性がある。H1N1 株には、アミノ酸配列に応じて様々なサブタイプが存在する。A/WSN/33 株は、ヒトから分離された WSN 株を様々な宿主に適応させた後、マウスの脳内で培養をして確立されたものである [93,94]。一般に、A/WSN/33 ウイルスと A/PR/8/34 ウイルスでは、HA と NA のアミノ酸配列の違いが報告されている [95-97]。A/WSN/33 と A/PR/8/34 ウイルスの NA では、58-63 番目のアミノ酸が 5 個と 6 個で数が異なることと、すべて違うアミノ酸に置換されていることを除いてほとんど同じアミノ酸構成であることから、インフルエンザウイルスの特異性に関与している可能性がある [95]。しかし、以前の研究で、bakuchiol は A/PR/8/34 または A/CA/7/09 ウイルス HA によるニワトリ赤血球の血球凝集活性、組換え A/PR/8/34 ウイルス HA タンパク質のトリプシン消化、および A/PR/8/34 または A/CA/7/09 ウイルス NA の活性を阻害しないことが報告されている [23]。したがって、cyclobakuchiols A-D のウイルスサブタイプによる抗インフルエンザ活性の差は、A/PR/8/34 または A/CA/7/09 と A/WSN/33 ウイルスとの間で、ウイルス HA または NA タンパク質もしくは両者の活性に関与しないアミノ酸配列の

違いに基づいて、宿主細胞の酸化ストレス応答などに影響を与える機序において、効果に差が生じていると考えられた。

cyclobakuchiols A-D を添加した MDCK 細胞に A/PR/8/34 ウイルスを感染させ、RT-qPCR 解析と Nrf2 レポーターアッセイを行った結果、DMSO を添加した細胞と比較して、cyclobakuchiols A-D は *Nqo1* の mRNA レベルを上昇させ、cyclobakuchiols A-C は Nrf2 活性化を誘導した (図 24)。Nrf2 は、通常 Keap1 による捕捉されることでユビキチン化を受け分解されている[98]。しかしながら、Keap1 の分子中にあるシステイン残基のうち、Cys 151, Cys 273, Cys 288 が修飾を受けると、Keap1 の構造が変化し Nrf2 が活性化される[99-101]。bakuchiol や cyclobakuchiol 類によって Keap1 が修飾を受けているかについては明らかになっていないが、cyclobakuchiol 類にあるフェノール性水酸基が水素結合を介して Keap1 のシステイン残基に弱い結合をもたらす可能性が考えられる。

徳島文理大学薬学部生化学研究室の以前の報告では、bakuchiol と A/PR/8/34 を添加した MDCK 細胞における網羅的な遺伝子発現を次世代シーケンスにより検討している (図 26) [23]。そのネットワーク解析の結果、bakuchiol は Nrf2 経路を活性化することが明らかとなっている (図 26 上段) [23]。一方で、Kesic は、Nrf2 の活性化が A 型インフルエンザウイルスの侵入と複製を抑制することを示している[102]。これらのことから考察すると、本研究で明らかとなった cyclobakuchiol 類による Nrf2 の活性化が部分的に抗インフルエンザ活性に貢献していると考えられる。

bakuchiol は、転写因子 NF- κ B の阻害剤として報告されている[103,104]。実際に、我々の検討から、インフルエンザウイルス感染による *Ifn- β* の mRNA 量の上昇に対し、bakuchiol とほぼ同等の抑制効果が cyclobakuchiols A-D も有していることが明らかとなった。*Ifn- β* の mRNA の発現誘導において NF- κ B が関与していることを考えると、cyclobakuchiols A-D にも NF- κ B 阻害作用があり、そのことが抗インフルエンザ活性に関係することが推測された。今後、cyclobakuchiols A-D による Nrf2 活性化と NF- κ B 阻害作用が、抗インフルエンザ活性に寄与しているかについて検討する必要がある。

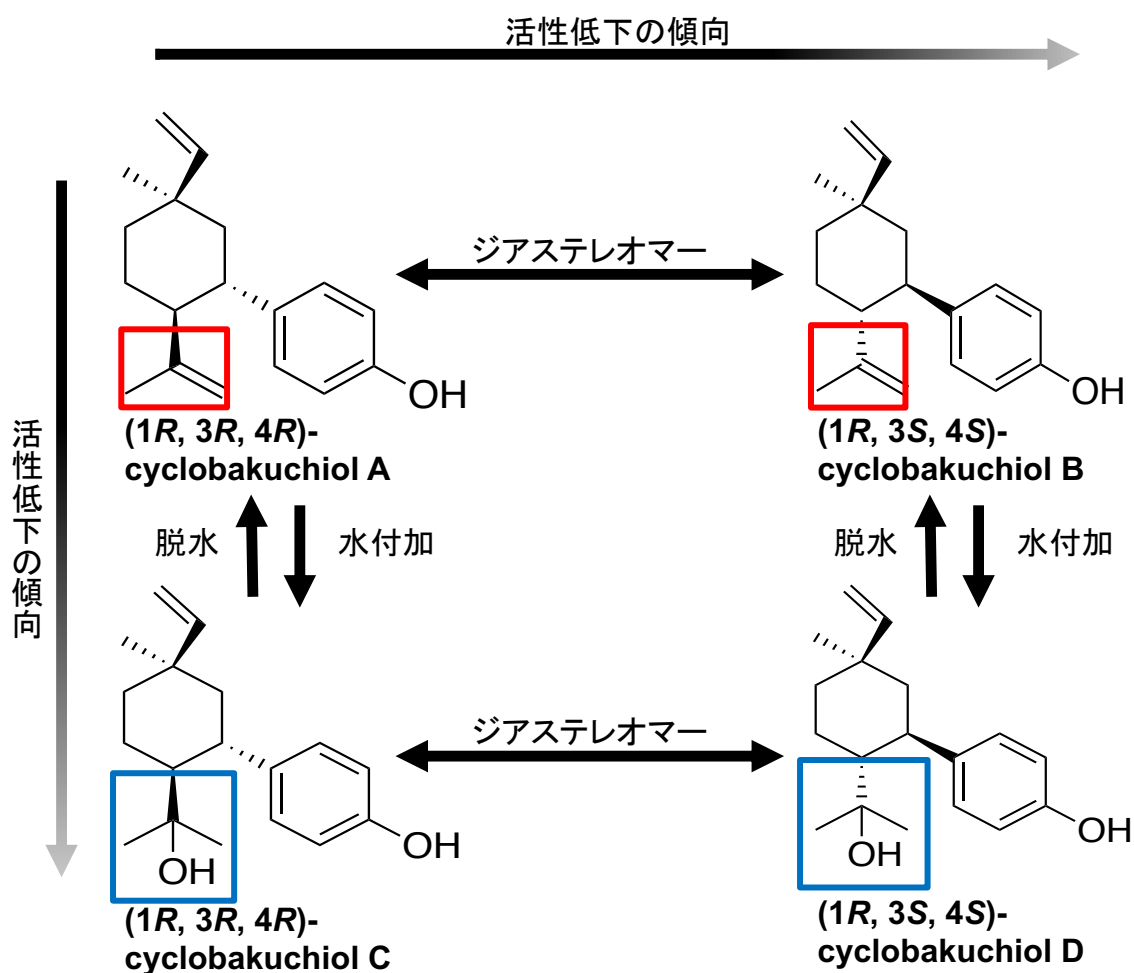
現在、bakuchiol の抗インフルエンザウイルス活性は、宿主細胞タンパク質への結合が必要であると仮定し、標的因子を解析中である。bakuchiol の活性を阻害しないビオチンリンカーを結合させた分子プローブを徳島文理大学薬学部の江角准教授から提供いただき、磁気ビーズを用いてプルダウンアッセイし、bakuchiol と直接結合するタンパク質 X を単離、LC/MS 解析により同定した。タンパク質 X は、ミトコンドリア内膜に存在し、類縁体であるタンパク質 Y と複合体を形成している。今回の博士論文には学術論文の関係で含めることはできないが、現在 bakuchiol による抗インフルエンザ活性におけるタンパク質 X の関与について、siRNA を用いて検討を進めている。

		bakuchiol	cyclobakuchiols			
			A	B	C	D
NB 染色による 感染細胞死の抑制効果		+	+	+	+	+
感染抑制効果		+++	++	++	+	+
増殖抑制効果		+	+	+	+	+
ウイルス mRNA 量の 抑制効果	NP	+++	+++	++	+	+
	NS1, PA, PB1	+	+	+	+	+
	PB2	+++	+++	++	++	+
	M2	+	+	+	+	+
ウイルス タンパク質量の 抑制効果	NP	+++	+++	++	+	+
	NS1	+	+	+	+	+
宿主 mRNA 量の 抑制効果	<i>Ifn-β</i>	+	+	+	+	+
	<i>Mx1</i>	+++	+++	++	+	+
<i>Nqo1</i> mRNA 量 の増強効果	Virus (-)	++	+	+	+	+
	Virus (+)	+++	++	++	+	+
Nrf2 活性化		+	++ (注1)	+	+	-

(表 7) bakuchiol および cyclobakuchiols A-D の抗インフルエンザ活性における効果の比較

各活性を半定性的に+の数で比較している。活性に差が無い場合は全ての項目で+、差がある場合は+の数で表現している。

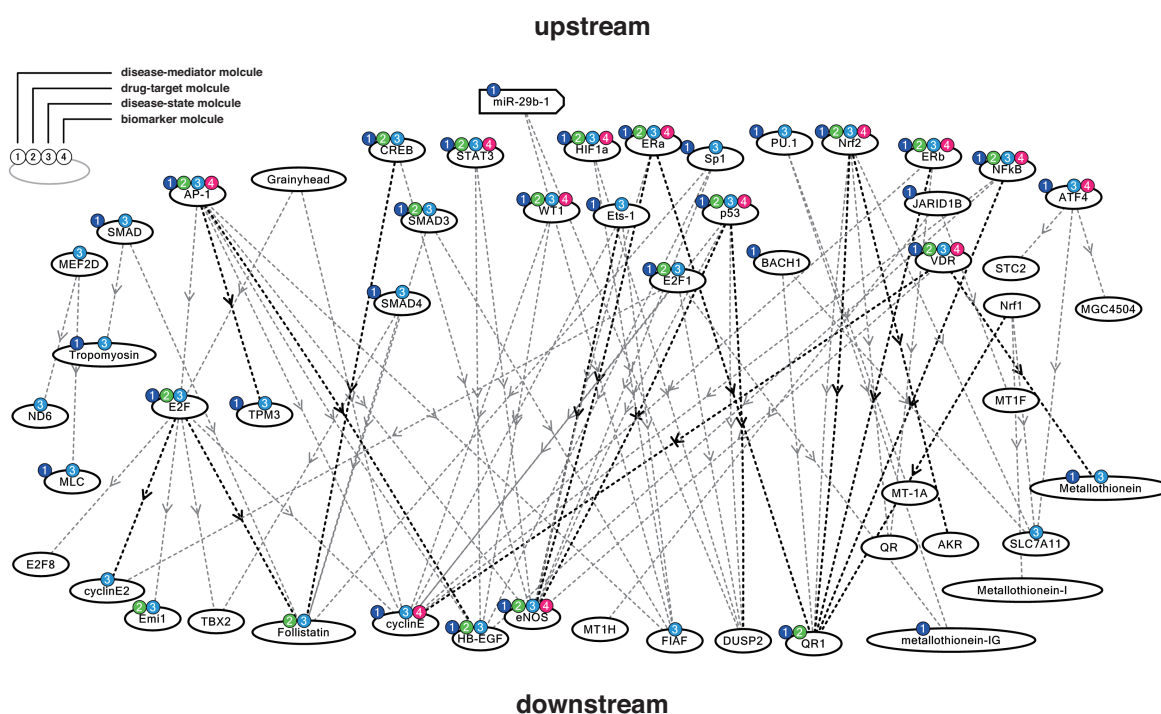
注 1) cyclobakuchiol A が bakuchiol より優れていることを示す。



(図 25) cyclobakuchiols A-D の構造と抗インフルエンザ活性の関係性

cyclobakuchiol A および B にはイソプロピル基が脱水素化されたイソプロペニル基 (赤枠) が存在し、cyclobakuchiol C および D にはイソプロペニル基が水和された 2-ヒドロキシイソプロピル基 (青枠) が存在する。cyclobakuchiol A と B はイソプロペニル基とフェノール基、cyclobakuchiol C と D は 2-ヒドロキシイソプロピル基とフェノール基の立体配置が異なる。

rank	pathway	score	score(p)
1	Transcriptional regulation by Nrf	18.734	2.29E-06
2	estrogen signaling pathway	16.631	9.85E-06
3	Transcriptional regulation by vitamin D receptor (VDR)	9.714	1.19E-03
4	Transcriptional regulation by AP-1	9.642	1.25E-03
5	Transcriptional regulation by p53	7.877	4.25E-03
6	Transcriptional regulation by RB/E2F	7.719	4.75E-03



(図 26) 次世代シーケンスによる bakuchiol の包括的遺伝子発現の変化

徳島文理大学薬学部生化学研究室は、以前に bakuchiol と A/PR/8/34 を添加した MDCK 細胞内における mRNA をすべてを解析し、生体細胞内における遺伝子の発現状況を網羅的に把握するトランスクリプトームの次世代シーケンス解析を行った(上段、表)[23]。また、bakuchiol によって細胞内で活性化される分子経路を特定するため、次世代シーケンス解析結果を用いて分子ネットワーク解析を行った(下段、図)[23]。その結果、Nrf 経路を特に活性化しているのが分かる。

総 括

第一章では、Y30 の抗インフルエンザウイルス活性の有無とその作用機序の検討を行った。その結果、Y30 は A 型インフルエンザの感染および増殖を抑制するが、その効果はウイルスのサブタイプによって効果が異なることが示された。このことから、A 型インフルエンザ H1N1 ウイルス感染における作用機序として、ウイルス生活環の中の HA、NA、RdRp 活性に何らかの影響を与えているのではないかと考えられた。そこで、インフルエンザウイルスの感染に関与する HA 活性に対する Y30 の影響を見たところ、Y30 は HA 活性を阻害しなかった。増殖抑制効果として NA および RdRp 活性に対する Y30 の影響を検討したところ、RdRp 活性を抑制せず、NA 活性では一部の濃度と時間において抑制効果を示した。しかし、これらの結果は、抗インフルエンザ活性において主作用とは考えられなかった。以上より、Y30 は HA、NA、RdRp 活性のいずれも抑制しないことが示された。感染は抑制するが HA 活性に関与しないというこれまでの結果を受けて、Y30 が宿主細胞に感染する前に直接ウイルス粒子に影響を与えているのではないかと考えた。そこで、Y30 をウイルス粒子に直接添加したところ、Y30 はウイルス表面膜に作用することで、A 型インフルエンザウイルス粒子をわずかに膨張させ、ウイルス粒子を変形させる作用を持つことが示された。次に、Y30 の抗インフルエンザ活性を有する化合物を明らかにするために、Y30 に EtOAc を加えて水層と EtOAc 層に分離することで Y30 の水画分と EtOAc 画分を調製し、ウイルス感染細胞死を抑制するかを評価した。その結果、Y30 の水画分は、EtOAc 画分と比較して、A/PR/8/34 ウイルス感染細胞の細胞死を抑制することが示された。このことから、Y30 の水画分には、EtOAc 画分よりも強力な抗インフルエンザ活性を有する化合物が存在することが示唆された。以上の結果から、Y30 には水溶性を主とする配糖体やペプチドなどのウイルス表面膜を破壊する化合物が含まれていると推察される。最近、抗新型コロナウイルス化合物として、10 nM レベルで作用する配糖体の化合物が報告されている。それと同様のものが、Y30 にも含まれている可能性がある。Y30 は抽出液であるため、様々な化合物が混合された状態である。現在、Y30 の詳細な成分は明らかになっておらず、化合物や分

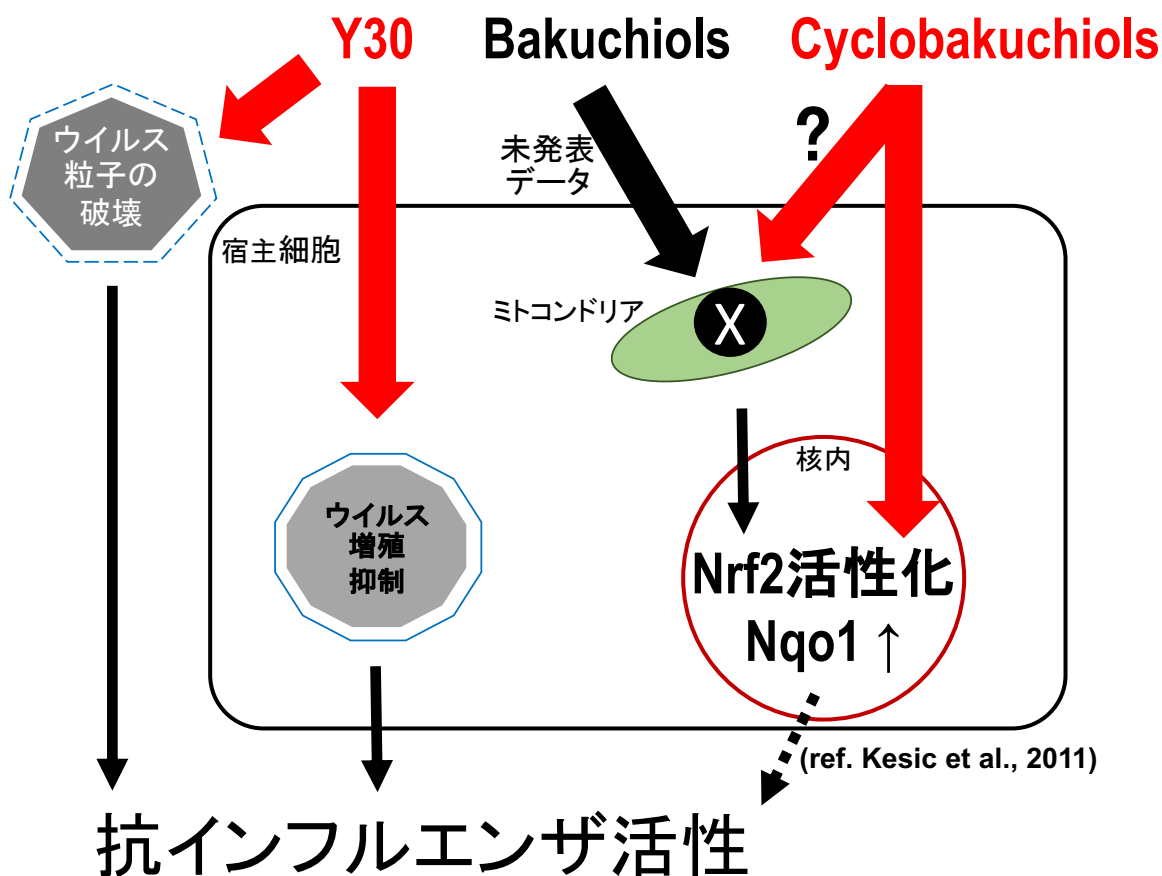
子量等も不明であるため、今後質量分析などによる分析を進めていく予定である。以上の結果から、Y30 は A 型インフルエンザ H1N1 ウイルス粒子への直接作用とわずかな NA 活性抑制作用など、複数の作用機序によって抗インフルエンザ活性を示す非常にユニークなものと考えられる。これらを総合して、Y30 の水画分は、抗インフルエンザ薬として、また抗インフルエンザ薬開発のための化合物の新しいリード化合物の可能性を秘めている。

第二章では、cyclobakuchiols A-D の抗インフルエンザウイルス活性の有無とその作用機序および構造-活性相関について検討した。まず、cyclobakuchiols A-D と A 型インフルエンザウイルスをあらかじめ混合してから MDCK 細胞に添加する共処理実験と、A 型インフルエンザウイルスを感染させてから cyclobakuchiols A-D を添加する前処理実験を行い、それぞれウイルスの感染と増殖を阻害するかについて評価した。その結果、cyclobakuchiols A-D は A 型インフルエンザの感染および増殖を抑制するが、その効果はウイルスサブタイプによって効果が異なることが示された。合わせて、cyclobakuchiols A-D は、A 型インフルエンザウイルスの mRNA およびウイルスタンパク質の発現量を抑制することから、インフルエンザウイルスの感染および増殖を抑制していることが示された。さらに、ウイルス感染によって宿主細胞内で上昇する *Ifn-β* および *Mx1* の mRNA 発現量も抑制することが明らかとなった。作用機序を明らかにするために、*Nqo1* の mRNA 発現量と、Nrf2 活性化の誘導について検討した。その結果、*Nqo1* の mRNA 発現量は cyclobakuchiols A-D において有意に誘導されていたが、Nrf2 活性化では cyclobakuchiols A-C でのみ有意に誘導されていた。このことから、cyclobakuchiols A-D の抗インフルエンザ活性には、Nrf2 の活性化誘導が関与しているが、そのほかの作用も関係している可能性が示唆された。全体の結果を通して、cyclobakuchiols A-D 間の抗インフルエンザ活性の効果に差が見られたことから、構造-活性相関を検討した。cyclobakuchiols A-D は bakuchiol が環化したフェノール性イソプレノイドである。cyclobakuchiol A および B にはイソプロペニル基が存在し、cyclobakuchiol C および D には 2-ヒドロキシイソプロピル基が存在する。主に、cyclobakuchiol A と比較して cyclobakuchiol C および D の抗インフルエンザ活性が劣っていたことから、cyclobakuchiols A-D ではイソプロペニル基と 2-ヒド

ロキシイソプロピル基の極性の違いが影響している可能性が考えられた。現在、**bakuchiol** による宿主細胞内の標的タンパク質の検討を行っており、未発表データとしてミトコンドリア内膜に存在するタンパク質 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察している (図 27)。しかしながら、**cyclobakuchiol** 類での Nrf2 経路活性化が間接的なものか、**bakuchiol** 同様宿主細胞側のタンパク質への作用が必要なのかは、今後の検討課題である (図 27)。

本研究では、パンデミックを引き起こす変異株や薬剤耐性株に対する、抗インフルエンザ薬のリード化合物の探索を目的とした。その結果、Y30 や **cyclobakuchiols A-D** による直接的殺ウイルス作用や Nrf2 経路活性化といった、これまでにない新しい作用機序を介した抗インフルエンザ活性を示すことができた。

本博士論文は、コメ発酵エキス Y30 および **cyclobakuchiols A-D** という非常にユニークな性質を持つ抗インフルエンザ化合物について発見、研究し、インフルエンザ治療薬の開発に利用可能な化合物の構造に関する重要な知見を示し、新規インフルエンザ治療薬の開発研究に貢献するものとする。



(図 27) 本研究で示した Y30 および cyclobakuchiols A-D の作用機序の概略図

Y30 はウイルス表面膜に作用し、直接的にウイルス粒子を破壊することで、抗インフルエンザウイルス活性を示す。bakuchiol は、ミトコンドリア膜電位の低下を引き起こすことから[81]、ミトコンドリアのタンパク質 X に何らかの形で作用することにより、Nrf2 経路の活性化とそれによる *Nqo1* の発現を上昇させ、抗インフルエンザ活性を示すと考えられる。したがって、cyclobakuchiol 類は、bakuchiol の類縁体であることから、bakuchiol と同様な作用を示すか、または直接 Nrf2 を活性化し、Nrf2 の核への移行を促進させることで抗インフルエンザウイルス活性を示すのではないかと考える。

結 論

天然物由来発酵エキスであるコメ発酵エキス Y30 は、抗インフルエンザ活性を有し、その効果はウイルス表面膜に作用し、ウイルス粒子を膨張させることによる殺ウイルス作用によって示される可能性を初めて明らかにした。

また、植物由来化合物の **cyclobakuchiols A-D** にも抗インフルエンザ活性があり、その効果は Nrf2 活性化誘導によるものと予測されたが、Nrf2 活性化誘導は **cyclobakuchiols A-D** 間で差があることから、他の因子も関与している可能性が示唆された。**cyclobakuchiol** 類が抗インフルエンザ活性を示すには、共通構造としてフェノール基と 1 位の絶対配置が必要であることが示唆された。さらに、**cyclobakuchiols A-D** の効果の差は、イソプロペニル基と 2-ヒドロキシイソプロピル基の極性の違いと、それら 4 位の官能基および 3 位のフェノール基との立体配置が活性の強さに影響していることが考えられた。

本研究は、コメ発酵エキスの嗜好品としてだけではなく、健康食品や薬としての新たな価値を創出し、植物由来化合物が耐性のない新規抗インフルエンザ薬開発の有力な候補となる可能性と、その化合物の構造決定に重要な知見を示すものである。

引用文献

1. WHO. Influenza (Seasonal) Fact Sheet (World Health Organization) [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
2. Gabriele N, T Noda, Y Kawaoka. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 2009; 459: 931-9.
3. Troy C S. The Pandemic Threat of Emerging H5 and H7 Avian Influenza Viruses. *Viruses*. 2018; 10: 461.
4. Fiore AE, Fry A, Shay D, Gubareva L, Bresee JS, Uyeki TM, et al. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza—recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2011; 60:1–24.
5. Hayden FG, Sugaya N, Hirotsu N, Lee N, de Jong MD, Hurt AC, et al. Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N Engl J Med*. 2018;379(10):913–23.
6. Hurt AC, Ho HT, Barr I. Resistance to anti-influenza drugs: adamantanes and neuraminidase inhibitors. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2006; 4:795–805.
7. Poland GA, Jacobson RM, Ovsyannikova IG. Influenza virus resistance to antiviral agents: a plea for rational use. *Clin Infect Dis*. 2009; 48:1254–6.
8. de Jong MD, Tran TT, Truong HK, Vo MH, Smith GJ, Nguyen VC, et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med*. 2005; 353:2667–72.
9. Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, Nguyen TH, Nguyen KH, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature*. 2005;437(7062):1108
10. Hatakeyama S, Sugaya N, Ito M, Yamazaki M, Ichikawa M, Kimura K, et al. Emergence of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *JAMA*. 2007;297(13):1435–42.
11. Checkmahomed L, M’Hamdi Z, Carbonneau J, Venable MC, Baz M, Abed Y, et al. Impact of the Baloxavir-Resistant Polymerase Acid I38T Substitution on the Fitness of

- Contemporary Influenza A(H1N1) pdm09 and A(H3N2) Strains. *J Infect Dis.* 2020; 221:63–70.
12. Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, et al. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis.* 2019; 25:2108–11.
 13. A Endo, M Kuroda, K Tanzawa. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-326A and ML-326B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 1976; 72:326-6.
 14. A Endo. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Bio Sci.* 2010; 86:484-93.
 15. R W Burg, B M Miller, E E Baker, J Birnbaum, A Currie, R Hartman, Y L Kong, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979; 15:361-7.
 16. S Omura, A Crump. The life and times of ivermectin-a success story. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:984-9.
 17. T Kino, H Hatanaka, M Hashimoto, M Nishiyama, T Goto, M Okuhara, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physioco-chemical and biological characteristics. *J Antibiot(Tokyo).* 1987;40(9):1249-55.
 18. A Fujie. Discovery of micafungin (FK463): A novel antifungal drug derived from a natural product lead. *Pure Appl. Chem.* 2007.Vol79, No4, pp.603-614.
 19. K V Sashidhara, K N White, P Crews. A selective account of effective paradigms and significant outcomes in the discovery of inspirational marine natural products. *J Nat Prod.* 2009; 72:588-603.
 20. M Feher, J M Schmidt. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J Chem Inf Comput Sci.* 2003; 43:218-27

21. D J Newman, G M Cragg. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.* 2016;25(3)629-61.
22. Murakami M, Ota H, Sugiyama A, Ishizone S, Maruta F, Akita N, et al. Suppressive effect of rice extract on *Helicobacter pylori* infection in a Mongolian gerbil model. *J Gastroenterol.* 2005;40(5):459–66. 10.1007/s00535-005-1570-7.
23. Shoji M, Arakaki Y, Esumi T, Kohnomi S, Yamamoto C, Suzuki Y, et al. Bakuchiol Is a Phenolic Isoprenoid with Novel Enantiomer-selective Anti-influenza A Virus Activity Involving Nrf2 Activation. *J Biol Chem.* 2015; 290:28001–17.
24. Furihata C, Ishida S, Ohta H, Tokuyama T, Katsuyama T, Ogita Z. Cytotoxicity of NaCl, a stomach tumor promoter, and prevention by rice extract in stomach mucosa of F344 rats. *Cancer Detect Prev.* 1996; 20:193–8.
25. Ochiai M, Shiomi S, Ushikubo S, Inai R, Matsuo T. Effect of a fermented brown rice extract on the gastrointestinal function in methotrexate-treated rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013;77(2):243–8.
26. Xu X, Hu W, Zhou S, Tu C, Xia X, Zhang J, et al. Increased Phenolic Content and Enhanced Antioxidant Activity in Fermented Glutinous Rice Supplemented with Fu Brick Tea. *Molecules.* 2019;24(4).
27. Kim D, Han GD. Ameliorating effects of fermented rice bran extract on oxidative stress induced by high glucose and hydrogen peroxide in 3T3-L1 adipocytes. *Plant Foods Hum Nutr.* 2011; 66:285–90.
28. Webber DM, Hettiarachchy NS, Li R, Horax R, Theivendran S. Phenolic profile and antioxidant activity of extracts prepared from fermented heat-stabilized defatted rice bran. *J Food Sci.* 2014;79:H2383–91.
29. Shin HY, Kim SM, Lee JH, Lim ST. Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. *Food Chem.* 2019; 272:235–41.

30. Oh WS, Jung JC, Choi YM, Mun JY, Ku SK, Song CH. Protective effects of fermented rice extract on ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate in mice. *Food Sci Nutr*. 2020; 8:1718–28.
31. Lin CP, Huang PH, Tsai HS, Wu TC, Leu HB, Liu PL, et al. Monascus purpureus-fermented rice inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced upregulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human aortic smooth muscle cells. *J Pharm Pharmacol*. 2011; 63:1587–94.
32. Ho BY, Wu YM, Hsu YW, Hsu LC, Kuo YH, Chang KJ, et al. Effects of Monascus-fermented rice extract on malignant cell-associated neovascularization and intravasation determined using the chicken embryo chorioallantoic membrane model. *Integr Cancer Ther*. 2010; 9:204–12.
33. Itoh M, Nishibori N, Sagara T, Horie Y, Motojima A, Morita K. Extract of fermented brown rice induces apoptosis of human colorectal tumor cells by activating mitochondrial pathway. *Phytother Res*. 2012; 26:1661–6.
34. Lee CI, Lee CL, Hwang JF, Lee YH, Wang JJ. Monascus-fermented red mold rice exhibits cytotoxic effect and induces apoptosis on human breast cancer cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013; 97:1269–78.
35. Horie Y, Nemoto H, Itoh M, Kosaka H, Morita K. Fermented Brown Rice Extract Causes Apoptotic Death of Human Acute Lymphoblastic Leukemia Cells via Death Receptor Pathway. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016; 178:1599–611.
36. Chun-Lin Lee W J-J P T-M. Red mold rice extract represses amyloid beta peptide-induced neurotoxicity via potent synergism of anti-inflammatory and antioxidative effect. *Applied Microbial and Cell Physiology* 2008; 79:829–41.
37. Bunnoy A, Saenphet K, Lumyong S, Saenphet S, Chomdej S. Monascus purpureus-fermented Thai glutinous rice reduces blood and hepatic cholesterol and hepatic steatosis concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15:88

38. Takahashi H, Chi HY, Mohri S, Kamakari K, Nakata K, Ichijo N, et al. Rice Koji Extract Enhances Lipid Metabolism through Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPARalpha) Activation in Mouse Liver. *J Agric Food Chem*. 2016;64:8848–56.
39. Li Z, Li L, Zhao S, Li J, Zhou H, Zhang Y, et al. Re-understanding anti-influenza strategy: attach equal importance to antiviral and anti-inflammatory therapies. *J Thorac Dis*. 2018;10: S2248–S59.
40. Liu Q, Xiong HR, Lu L, Liu YY, Luo F, Hou W, et al. Antiviral and anti-inflammatory activity of arbidol hydrochloride in influenza A (H1N1) virus infection. *Acta Pharmacol Sin*. 2013; 34:1075–83.
41. Busath BHaDD. Anti-Influenza Nutraceuticals: Antiviral and Anti-Inflammatory Effects. *Advances in Complementary & Alternative medicine*. 2019;4(3):358–73.
42. Zhang L, Cheng YX, Liu AL, Wang HD, Wang YL, Du GH. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-influenza properties of components from *Chaenomeles speciosa*. *Molecules*. 2010; 15:8507–17.
43. Di Sotto A, Checconi P, Celestino I, Locatelli M, Carissimi S, De Angelis M, et al. Antiviral and Antioxidant Activity of a Hydroalcoholic Extract from *Humulus lupulus* L. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018:5919237
44. Hamauzu Y, Yasui H, Inno T, Kume C, Omanyuda M. Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits. *J Agric Food Chem*. 2005; 53:928–34.
45. Shoji M, Woo SY, Masuda A, Win NN, Ngwe H, Takahashi E, et al. Anti-influenza virus activity of extracts from the stems of *Jatropha multifida* Linn. collected in Myanmar. *BMC Complement Altern Med*. 2017; 17:96
46. Shoji M, Takahashi E, Hatakeyama D, Iwai Y, Morita Y, Shirayama R, et al. Anti-influenza activity of c60 fullerene derivatives. *PLoS One*. 2013;8(6): e66337

47. Shigeta S, Mori S, Watanabe J, Soeda S, Takahashi K, Yamase T. Synergistic anti-influenza virus A (H1N1) activities of PM-523 (polyoxometalate) and ribavirin in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:1423–7.
48. von Itzstein M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6:967–74.
49. Hiasa M, Isoda Y, Kishimoto Y, Saitoh K, Kimura Y, Kanai M, et al. Inhibition of MAO-A and stimulation of behavioural activities in mice by the inactive prodrug form of the anti-influenza agent oseltamivir. *Br J Pharmacol.* 2013; 169:115–29.
50. Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, Yamada S, Yamayoshi S, Takada A, et al. Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J Virol.* 2007; 81:30–41.
51. Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJ, Matsuoka Y, Tomita Y, et al. Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell Host Microbe.* 2014; 16:795–805.
52. Popkin DL, Zilka S, Dimaano M, Fujioka H, Rackley C, Salata R, et al. Cetylpyridinium Chloride (CPC) Exhibits Potent, Rapid Activity Against Influenza Viruses in vitro and in vivo. *Pathog Immun.* 2017; 2:252–69.
53. Arakawa T, Yamasaki H, Ikeda K, Ejima D, Naito T, Koyama AH. Antiviral and virucidal activities of natural products. *Curr Med Chem.* 2009; 16:2485–97.
54. Skalickova S, Heger Z, Krejcova L, Pekarik V, Bastl K, Janda J, et al. Perspective of Use of Antiviral Peptides against Influenza Virus. *Viruses.* 2015; 7:5428–42.
55. Kong B, Moon S, Kim Y, Heo P, Jung Y, Yu SH, et al. Virucidal nano-perforator of viral membrane trapping viral RNAs in the endosome. *Nat Commun.* 2019; 10:185
56. Takeda Y, Murata T, Jamsransuren D, Suganuma K, Kazami Y, Batkhuu J, et al. Saxifraga spinulosa-Derived Components Rapidly Inactivate Multiple Viruses Including SARS-CoV-2. *Viruses.* 2020;12.

57. Holthausen DJ, Lee SH, Kumar VT, Bouvier NM, Krammer F, Ellebedy AH, et al. An Amphibian Host Defense Peptide Is Virucidal for Human H1 Hemagglutinin-Bearing Influenza Viruses. *Immunity*. 2017; 46:587–95.
58. Li Q, Zhao Z, Zhou D, Chen Y, Hong W, Cao L, et al. Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses. *Peptides*. 2011; 32:1518–25.
59. Ikeda K, Nishide M, Tsujimoto K, Nagashima S, Kuwahara T, Mitani T, et al. Antiviral and Virucidal Activities of Umesu Phenolics on Influenza Viruses. *Jpn J Infect Dis*. 2020; 73:8–13.
60. Oxford JS, Lambkin R, Gibb I, Balasingam S, Chan C, Catchpole A. A throat lozenge containing amyl meta cresol and dichlorobenzyl alcohol has a direct virucidal effect on respiratory syncytial virus, influenza A and SARS-CoV. *Antivir Chem Chemother*. 2005; 16:129–34.
61. Boonstra S, Blijleven JS, Roos WH, Onck PR, van der Giessen E, van Oijen AM. Hemagglutinin-Mediated Membrane Fusion: A Biophysical Perspective. *Annu Rev Biophys*. 2018; 47:153–73.
62. H Takahashi, M Nakazawa, C Ohshima, M Sato, T Tsuchiya, A Takeuchi, et al. Heat-Denatured Lysozyme Inactivates Murine Norovirus as a surrogate human Norovirus. *Sci Rep*. 2015; 5:11819.
63. Aminlari. L Hashemi, M. M. and Aminlari, M., Modified lysozyme as novel broad spectrum natural antimicrobial agents in foods. *J Food Sci*. 2014; 79:1077-1090.
64. Ibrahim.H.R., Kato A, Kobayashi K. Antimicrobial effects of lysozyme against gram-negative bacteria due to covalent binding of palmitic acid. *J Agric Food Chem*. 1991; 39:2077-2082.
65. Akaike M, Miyagawa H, Kimura Y, Terasaki M, Kusaba Y, Kitagaki H, et al. Chemical and Bacterial Components in Sake and Sake Production Process. *Curr Microbiol*. 2020; 77:632–7.

66. Tatsukami Y, Morisaka H, Aburaya S, Aoki W, Kohsaka C, Tani M, et al. Metabolite profiling of the fermentation process of "yamahai-ginjo-shikomi" Japanese sake. *PLoS One*. 2018;13: e0190040
67. Kiyono T, Hirooka K, Yamamoto Y, Kuniishi S, Ohtsuka M, Kimura S, et al. Identification of pyroglutamyl peptides in Japanese rice wine (sake): presence of hepatoprotective pyroGlu-Leu. *J Agric Food Chem*. 2013;61:11660–7.
68. Shirako S, Kojima Y, Tomari N, Nakamura Y, Matsumura Y, Ikeda K, et al. Pyroglutamyl leucine, a peptide in fermented foods, attenuates dysbiosis by increasing host antimicrobial peptide. *NPJ Sci Food*. 2019; 3:18 10.
69. Hirai S, Horii S, Matsuzaki Y, Ono S, Shimmura Y, Sato K, et al. Anti-inflammatory effect of pyroglutamyl-leucine on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*. 2014;117(1):1–6.
70. Vilas Boas LCP, Campos ML, Berlanda RLA, de Carvalho Neves N, Franco OL. Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76:3525–42.
71. Mehta URN G., Sukh Dev. Bakuchiol, a novel monoterpenoid. *Tetrahedron Letters*. 1966; 7:4561–7.
72. Nadine Backhouse CLD C., Rosa E. Negrete, Bruce K. Cassels, Christiane Schneider, Eberhard Breitmaier, Arturo San Feliciano. Cyclobakuchiols A and B from *Psoralea glandulosa*. *Phytochemistry*. 1995; 40:325–7.
73. Backhouse CN, Delporte CL, Negrete RE, Erazo S, Zuniga A, Pinto A, et al. Active constituents isolated from *Psoralea glandulosa* L. with antiinflammatory and antipyretic activities. *J Ethnopharmacol*. 2001; 78:27–31.
74. Yin S, Fan CQ, Yue JM. Cyclobakuchiol C, a new bakuchiol derivative from *Psoralea coryllifolia*. *J Asian Nat Prod Res*. 2007; 9:29–33.
75. Katsura H, Tsukiyama RI, Suzuki A, Kobayashi M. In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45:3009–13.

76. Haraguchi H, Inoue J, Tamura Y, Mizutani K. Inhibition of mitochondrial lipid peroxidation by Bakuchiol, a meroterpene from *Psoralea corylifolia*. *Planta Med.* 2000; 66:569–71.
77. Adhikari S, Joshi R, Patro BS, Ghanty TK, Chintalwar GJ, Sharma A, et al. Antioxidant activity of bakuchiol: experimental evidence and theoretical treatments on the possible involvement of the terpenoid chain. *Chem Res Toxicol.* 2003; 16:1062–9.
78. Pae HO, Cho H, Oh GS, Kim NY, Song EK, Kim YC, et al. Bakuchiol from *Psoralea corylifolia* inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase gene via the inactivation of nuclear transcription factor-kappaB in RAW 264.7 macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1:1849–55.
79. Lee SW, Yun BR, Kim MH, Park CS, Lee WS, Oh HM, et al. Phenolic compounds isolated from *Psoralea corylifolia* inhibit IL-6-induced STAT3 activation. *Planta Med.* 2012; 78:903–6.
80. Sun NJ, Woo SH, Cassady JM, Snapka RM. DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia*. *J Nat Prod.* 1998; 61:362–6.
81. Chen Z, Jin K, Gao L, Lou G, Jin Y, Yu Y, et al. Anti-tumor effects of bakuchiol, an analogue of resveratrol, on human lung adenocarcinoma A549 cell line. *Eur J Pharmacol.* 2010; 643:170–9.
82. Iwai Y, Murakami K, Gomi Y, Hashimoto T, Asakawa Y, Okuno Y, et al., Anti-influenza activity of marchantins, macrocyclic bisbibenzyls contained in liverworts. *PLoS One.* 2011; 6: e19825.
83. Mizuno D, Kimoto T, Sakai S, Takahashi E, Kim H, Kido H. Induction of systemic and mucosal immunity and maintenance of its memory against influenza A virus by nasal vaccination using a new mucosal adjuvant SF-10 derived from pulmonary surfactant in young cynomolgus monkeys. *Vaccine.* 2016; 34:1881–8.
84. Takahashi E, Kataoka K, Indalao IL, Konoha K, Fujii K, Chida J, et al. Oral clarithromycin enhances airway immunoglobulin A (IgA) immunity through induction of IgA class switching recombination and B-cell-activating factor of the tumor necrosis

- factor family molecule on mucosal dendritic cells in mice infected with influenza A virus. *J Virol.* 2012; 86:10924–34.
85. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 2006;441(7089):101–5.
86. Holzinger D, Jorns C, Stertz S, Boisson-Dupuis S, Thimme R, Weidmann M, et al. Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. *J Virol.* 2007; 81:7776–85.
87. Seitz C, Frensing T, Hoper D, Kochs G, Reichl U. High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state. *J Gen Virol.* 2010; 91:1754–63.
88. Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2009; 34:176–88.
89. Manandhar S, Cho JM, Kim JA, Kensler TW, Kwak MK. Induction of Nrf2-regulated genes by 3H-1, 2-dithiole-3-thione through the ERK signaling pathway in murine keratinocytes. *Eur J Pharmacol.* 2007; 577:17–27.
90. Klaassen CD, Reisman SA. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 244:57–65.
91. Johnson J, Maher P, Hanneken A. The flavonoid, eriodictyol, induces long-term protection in ARPE-19 cells through its effects on Nrf2 activation and phase 2 gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50:2398–406.
92. Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N, Kim SG, Yamamoto M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:2046–51.
93. Wilson Smith CHA, Laidlaw P.P. A Virus Obtained from Influenza Patients. *The Lancet.* 1933;222(5732):66–8.
94. Stuart-Harris CH. A Neurotropic Strain of Human Influenza Virus. *The Lancet.* 1939;233(6027):497–9.

95. Alan L. Hiti DPN. Complete Nucleotide Sequence of the Neuraminidase Gene of Human Influenza Virus A/WSN/33. *Journal of Virology*. 1982; 41:730–4.
96. Alan L. Hiti ARD, Debi P. Nayak. Complete sequence analysis shows that the hemagglutinins of the H0 and H2 subtypes of human influenza virus are closely related. *Virology*. 1981; 111:113–24.
97. Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell*. 1982;31(2 Pt 1):417–27.
98. L Baird, M Yamamoto. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1- NRF2 Pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 2020;40: e00099-20
99. N Wakabayashi, Albena T, Dinkova-Kostova W, David H, Moon I K, A Kobayashi et ai., Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cycteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *PNAS*. 2004; 101: 2040-2045
100. Albena T, Dinkova-Kostova W, David H, Robert N C, Ken I, N Wakabayashi, et al., Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are yhe sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 11908-13
101. A kobayashi, Moon-I K, Y Watai, Kit T, T Shibata, K Uchida, M Yamamoto. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 221-9
102. Kesic MJ, Simmons SO, Bauer R, Jaspers I. Nrf2 expression modifies influenza A entry and replication in nasal epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51:444–53.
103. L Miao, X Yun, R Tao, Y Wang, G Fan, Y Zhu, et al. Bakchiol exhibits anti- metastasis activity through NF- κ B cross-talk signaling with AR and Er β in androgen- independent prostate cancer cells PC-3. *J Parmacological Sci*. 2018;138 :1-8.
104. C Z Wu, S S Hong, X F Cai, N T Dat, J X Nan, B Y Hwang, et al. Hypoxia-inducible factor-1 and nuclear factor- κ B inhibitory meroterpene analogues of bakuchiol, a

constituent of the seeds of *Psoralea corylifolia*. *B&M Chemistry Letters*. 2008; 18:2619-2623.

発表論文

1. Shoji M, Sugimoto M, Matsuno K, Fujita Y, Mii T, Ayaki S, Takeuchi M, Yamaji S, **Tanaka N**, Takahashi E, Noda T, Kido H, Tokuyama T, Tokuyama T, Tokuyama T, Kuzuhara T, A novel aqueous extract from rice fermented with *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* possesses an anti-influenza A virus activity. *PLoS One*. 2021; 16; e0244885.
2. Shoji M, Esumi T, **Tanaka N**, Takeuchi M, Yamaji S, Watanabe M, Takahashi E, Kido H, Yamamoto M, Kuzuhara T, Organic synthesis and anti-influenza A virus activity of cyclobakuchiols A, B, C, and D. *PLoS One*. 2021; 16; e0248960.

謝 辞

本博士論文に関して、終始温かいご指導とご鞭撻を賜りました、本学生化学研究室・教授・葛原隆先生に心から御礼申し上げます。本研究の直接の指導者として、実験の基本的な操作から論文の構成・執筆に至るまで、時に厳しく熱心に接して頂き、忍耐強くご指導とご助言をくださいました、本学生化学研究室・講師・庄司正樹先生に深く感謝申し上げます。本論文を査読して頂き、有益なるご助言とご教示を賜りました、本学薬物治療学研究室教授・角大悟先生、病態分子薬理学研究室教授・深田俊幸先生、薬理学研究室教授・喜多紗斗美先生ならびに中部大学生命健康科学部教授・鈴木康夫先生に心から御礼申し上げます。基礎的な知識や実験操作、実験結果についてご助言とご指導頂きました、本学生化学研究室准教授・畠山大先生、cyclobakuchiol類を提供していただき、第二章におけるご助言とご指導を頂きました、本学生薬研究室准教授・江角朋之先生に心より感謝申し上げます。ライスパワー®エキスを提供していただきました、勇心酒造株式会社・松野孝祐氏をはじめとする研究開発部の皆様に心より感謝申し上げます。また、実験の実施にあたり、第一章は本学薬学部生化学研究室卒業生の杉本みなみさん、全体を通して本学在学生の竹内美紗さん、山路彩稀さん他、研究室のみなさんの熱心なご協力があったからこそ、今日に至ることができました。心より感謝申し上げます。本学香川薬学部の諸先生方、博士課程の同期をはじめ先輩や後輩には、温かい励ましと、多くのご支援、ご助言を頂きました。心より感謝申し上げます。さらに、勤務先である社会医療法人石川記念会 HITO 病院・病院長（現・理事長）石川賀代先生には、大学院進学をご快諾いただき、心から御礼申し上げます。私が進みたかった大学院への道を後押ししていただき、勤務と研究の両立にご理解とご協力を賜り、精神面でも多大なるサポートを頂きました、同病院薬剤部・部長・近藤祥代氏に心より御礼申し上げます。

最後に、大学院生活を送るにあたり、精神面および仕事面で支えて頂き、常に温かく励ましてくださいました、同病院薬剤部主任・合田貴史氏をはじめとする薬剤部の先輩や後輩、見守ってくれた友人諸氏に深く感謝申し上げます。

2021年 初秋