

兵庫県立大学 環境人間学部
富山県立大学 工学部

緑茶、紅茶、野菜などに含まれる成分がコロナウイルス酵素 (メインプロテアーゼ) を阻害する仕組みを解明

本研究で得られた主な成果は以下の通りです。

1. 信頼性の高いウイルス酵素メインプロテアーゼの測定法を構築
2. 食品成分・代謝物（37種）の中から酵素阻害活性の高い9種類の成分を確認（特にピセアタンノールによる阻害は初めての報告）
3. 阻害成分の多くがウイルス酵素に結合することを確認
4. エピガロカテキンガレート（EGCG）やミリセチンが酵素活性部位のシステインに共有結合し、活性を阻害していることを解明

（概要）兵庫県立大学環境人間学部（先端食科学研究センター兼務）の加藤陽二教授、富山県立大学工学部の生城真一教授らの研究グループは、お茶や紅茶、野菜・果物などに含まれるフィトケミカル成分が新型コロナウイルス酵素の一つであるメインプロテアーゼを阻害することを確認し、その阻害機構の一端を明らかにしました。オープンアクセスジャーナルである *Advances in Redox Research* に掲載されました。

【1. 背景（コロナウイルス蔓延と予防・治療）】現在世界中で蔓延する新型コロナウイルスに対し、様々な予防や治療が試され、また開発されています。ワクチンなどに加え、中和抗体薬による治療（抗体カクテル療法）も行われています。また、飲み薬の開発も進められています。効果的な飲み薬により、自宅で治療が可能になるなど医療崩壊を防ぐことにつながり、大きなメリットも生じます。メルク社ではウイルスRNA複製時にエラーを生じさせるモルヌピラビルに着目し、新型コロナウイルス患者に対する入院や死亡のリスク低減効果を発表し、実用化も目前となっています。また、ファイザーは薬剤名PF-07321332、塩野義製薬はS-217622により、ウイルス酵素のプロテアーゼ阻害による治療を目指しています。

【2. 標的とするウイルス酵素メインプロテアーゼについて】ファイザーや塩野義製薬が薬の標的としているのは、メインプロテアーゼと呼ばれるウイルス酵素です。チオール基（システイン残基）を活性部位に持つ酵素です。感染細胞内でウイルスの指令により合成されたペプチドをこの酵素メインプロテアーゼが切断し、ウイルス複製に必要なタンパク質を作ります。ウイルス複製には必須の酵素と言えます。この酵素メインプロテアーゼは類似した酵素が人には存在してお

らず、特異性の高い薬は誤って人の酵素を阻害することがなく、副作用が生じにくいと予想されています。また、変異が多いことで知られるコロナウイルスでも、この酵素については活性部位近くの遺伝子変異が少ないとされます。このため、変異株にも対応でき、長く使えることが期待されます。

【3. 食品成分フィトケミカルとウイルス抑制について】食は健康と深く繋がっています。食品には、薬のような劇的な効き目は期待できませんが、副作用も無く、様々な機能性が期待されています。例えば、お茶の成分であるエピガロカテキンガレート（EGCG）などは抗ウイルス作用が示唆されていますが、一方で、その他の食品を含めて新型コロナウイルスの予防や治療効果については、いまだ十分な証拠はありません。in vitro（試験管内）ではいくつかの食品成分（フィトケミカル）は新型コロナウイルスのメインプロテアーゼの阻害活性を示すことが報告されています。食事に伴い体内に吸収されるフィトケミカルの一部は代謝されます。このため、食後、血中にはフィトケミカルそのものに加えて、水酸化やグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受けたその代謝物も循環します。つまり、代謝物も体内での健康効果を期待したい成分となります。

【4. 酵素の阻害活性を調べる方法について】メインプロテアーゼの活性を調べる方法として、蛍光基質の切断に伴い生じる生成物の蛍光強度を測定するFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）法が主流です。本研究では予備的な検討で、食品成分フィトケミカルのいくつかは生成物の蛍光を消光したり、またフィトケミカル成分が持つ自己蛍光が測定結果に影響することがわかりました。このため切断された蛍光性の生成物をクロマトグラフィーで分離してから蛍光測定（定量）する手法を構築し、測定に関する問題を解決しました。

【5. 研究結果・成果】今回の研究では、食品成分によりコロナウイルス制御が可能かを調べるため、食品成分としてポリフェノールやイソチオシアネートなど、フィトケミカル（ファイトケミカル）に着目し、酵素メインプロテアーゼ（組換え体）の阻害について調べました。酵素の濃度0.5 μM に対して試験物質の濃度を20 μM に設定し、最初に37の成分・代謝物を幅広くスクリーニングしました。ミリセチン、EGCG、テアフラビン、ベンジルイソチオシアネートに強い阻害活性が、また、ピセアタンノール、ミリシトリン、ハーバセチン、バイカレイン、アリルイソチオシアネート、フェネチルイソチオシアネートにも阻害が認められました。ピセアタンノール、ミリセチン、EGCG、テアフラビンでは低濃度（1 μM ）でも酵素に各成分が結合していることが質量分析により確認されました。なお、ピセアタンノールは赤ワインに含まれるレスベラトロールの代謝物として知られており、本研究で初めてその阻害効果が確認されました。

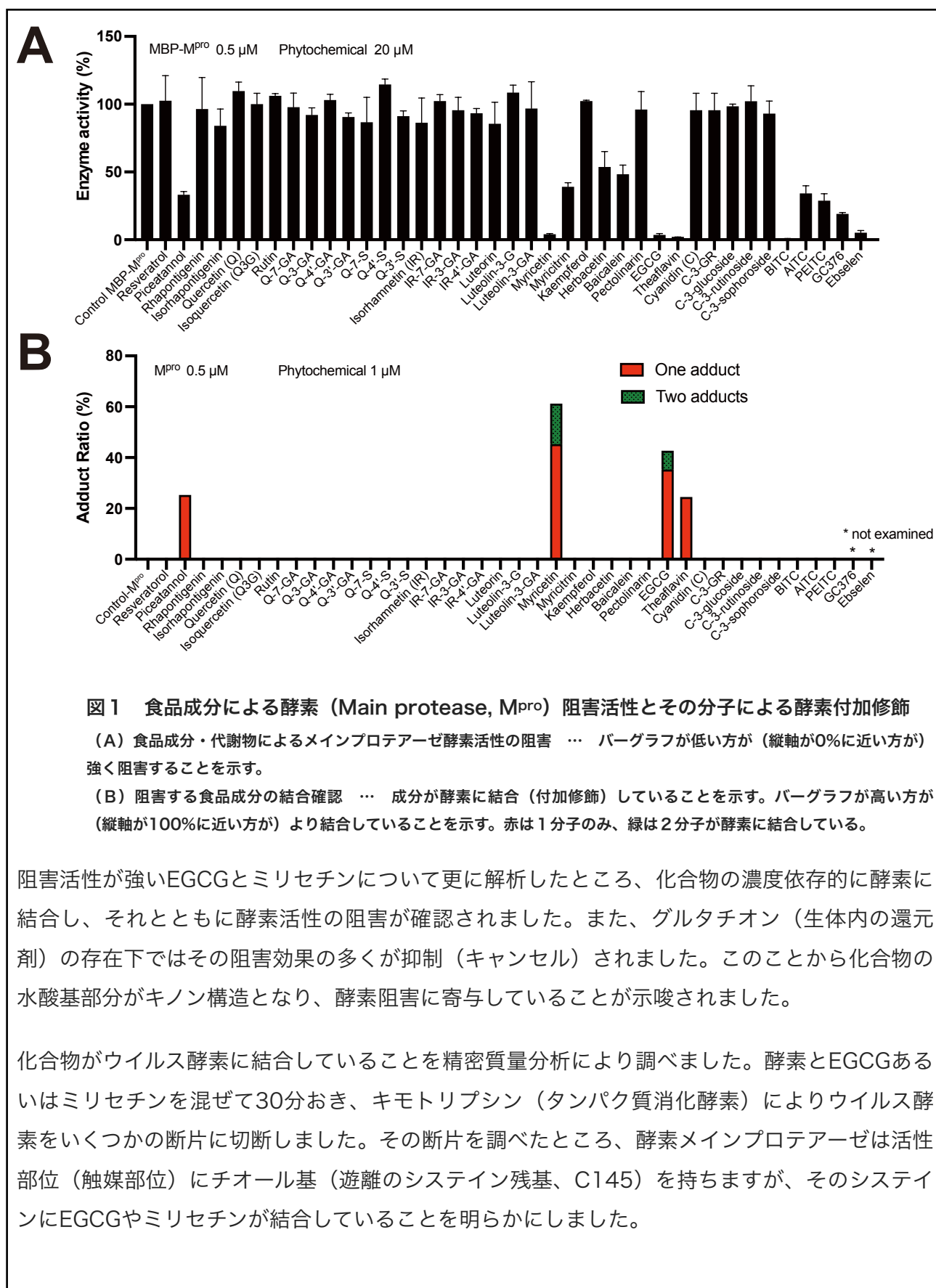


図1 食品成分による酵素 (Main protease, M^{pro}) 阻害活性とその分子による酵素付加修飾

(A) 食品成分・代謝物によるメインプロテアーゼ酵素活性の阻害 … バーグラフが低い方が (縦軸が0%に近い方が) 強く阻害することを示す。

(B) 阻害する食品成分の結合確認 … 成分が酵素に結合 (付加修飾) していることを示す。バーグラフが高い方が (縦軸が100%に近い方が) より結合していることを示す。赤は1分子のみ、緑は2分子が酵素に結合している。

阻害活性が強いEGCGとミリセチンについて更に解析したところ、化合物の濃度依存的に酵素に結合し、それとともに酵素活性の阻害が確認されました。また、グルタチオン (生体内の還元剤) の存在下ではその阻害効果の多くが抑制 (キャンセル) されました。このことから化合物の水酸基部分がキノン構造となり、酵素阻害に寄与していることが示唆されました。

化合物がウイルス酵素に結合していることを精密質量分析により調べました。酵素とEGCGあるいはミリセチンを混ぜて30分おき、キモトリプシン (タンパク質消化酵素) によりウイルス酵素をいくつかの断片に切断しました。その断片を調べたところ、酵素メインプロテアーゼは活性部位 (触媒部位) にチオール基 (遊離のシステイン残基、C145) を持ちますが、そのシステインにEGCGやミリセチンが結合していることを明らかにしました。

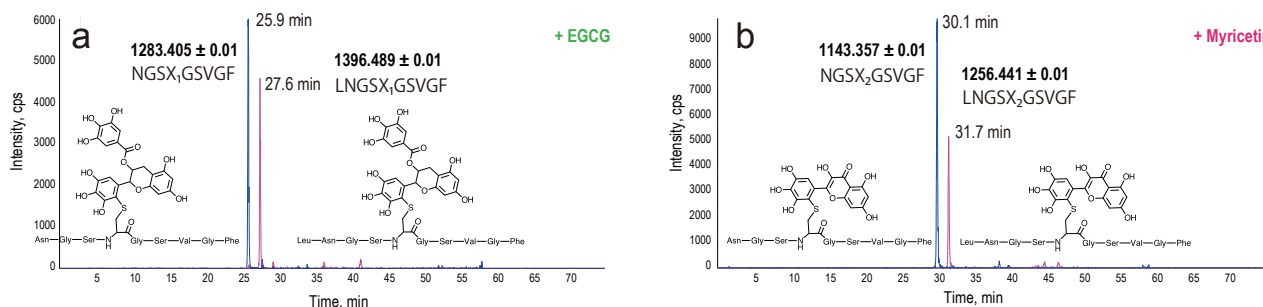


図2 EGCG及びミリセチンによる酵素活性部位への結合

- (a) EGCGが酵素活性部位のシステインに結合
 (b) ミリセチンが酵素活性部位のシステインに結合

本研究で得られた主な成果は以下の通りとなります。(1) 信頼性の高いメインプロテアーゼ酵素の測定法を構築、(2) 37の食品成分・代謝物から阻害活性の高い数種類の成分を確認、(3) 阻害成分が酵素に結合することを確認、(4) 阻害成分が酵素の活性部位のシステインに共有結合し、活性を阻害することを解明。

【6. 今後の展開・課題】 本研究で使用した酵素活性評価系は試験管内で組換え酵素と成分を混ぜて行いました。このため、実際にウイルスが感染した細胞においても同じように食品由来のフィトケミカル成分（代謝物含む）による酵素阻害が生じるかについては、更に感染細胞を用いた検討や動物試験などが必要となります。しかしながらウイルスを扱うにはバイオセキュリティの高い（安全な）施設が必要となるため、実施が困難です。最近ではウイルスを使わずにメインプロテアーゼ酵素の阻害を細胞レベルで調べられる方法が報告されています。本研究成果を検証するため、このような新しい研究手法の活用も期待されます。

このように、食事から体内に入った食品由来のフィトケミカル成分（代謝物含む）が感染細胞に到達できるか、また細胞内で実際に酵素を阻害するかについては、今後の課題となります。研究グループでは安全かつ取り扱いがたやすい感染細胞のモデル系を立ち上げることにより、発展的な研究を予定しています。

感染細胞内に到達する食品成分フィトケミカルを増やすことで、阻害するチャンスを高めることも検討課題です。この点については、脂質ナノデリバリー系などの利用を考えています。

【7. 用語解説】

- ・ **メインプロテアーゼ (Main protease, M^{pro})** : ウイルスが遺伝情報として持つタンパク質分解酵素プロテアーゼの一つ。3C-like Proteaseとも呼ばれる。メインプロテアーゼはウイルス遺伝情報から翻訳されたタンパク質 (ポリペプチド) を切断してウイルス複製に必要なパーツを作成するのに必須の酵素であり、酵素活性部位にチオール基を持つ。変異が激しい新型コロナウイルスにおいて、メインプロテアーゼの遺伝子配列は変異が少ないため、治療の良い標的と考えられている。ファイザーや塩野義製薬がメインプロテアーゼを標的とする飲み薬を開発している。
- ・ **フィトケミカル (別名ファイトケミカル)** : ポリフェノールなど、植物が生産する二次代謝産物である。人にとってタンパク質や糖、脂質などのような栄養素にはならないが、様々な機能性を示す報告がある。体内に取り込まれる際に、一部は水酸化、グルクロン酸抱合や硫酸抱合などをうけて構造変化した代謝物となる。エピガロカテキンガレート (EGCG) は緑茶に豊富に含まれ、テアフラビン は紅茶の成分である。ミリセチンはブドウ、ベリーなどの果物をはじめとして、植物に多く含まれている。ミリシトリンはミリセチンの配糖体の一つである。ピセアタンノールは一部の植物に含まれるほか、赤ワインに含まれるレスベラトロールの代謝物でもある。ハーバセチンは配糖体として亜麻 (アマ) に存在し、バイカレインは漢方薬の小柴胡湯などに含まれている。イソチオシアネート類 (ベンジル、フェネチル、アリルイソチオシアネート) はアブラナ科植物に由来する辛味成分である。
- ・ **酵素活性部位 (触媒部位)** : 酵素を構成するタンパク質の中で、酵素活性 (触媒作用) を担う部位を示す。その修飾などは酵素活性に大きな影響を及ぼす。メインプロテアーゼは145番目のシステイン残基 (C145) が活性部位に位置しており、酵素活性に必須の役割を担っている。ウイルス酵素メインプロテアーゼに対する阻害剤の標的の一つとなっている。

【8. 支援】 本研究の一部は、飯島藤十郎記念財団 (大型特定研究) の支援を受けています。

【9. 掲載論文の情報・著者】

- ・ **論文タイトル** : Food phytochemicals, epigallocatechin gallate and myricetin, covalently bind to the active site of the coronavirus main protease in vitro (参考訳: 食品フィトケミカルであるエピガロカテキンガレート (EGCG) 及びミリセチンは新型コロナウイルスのメインプロテアーゼの活性部位に共有結合する)

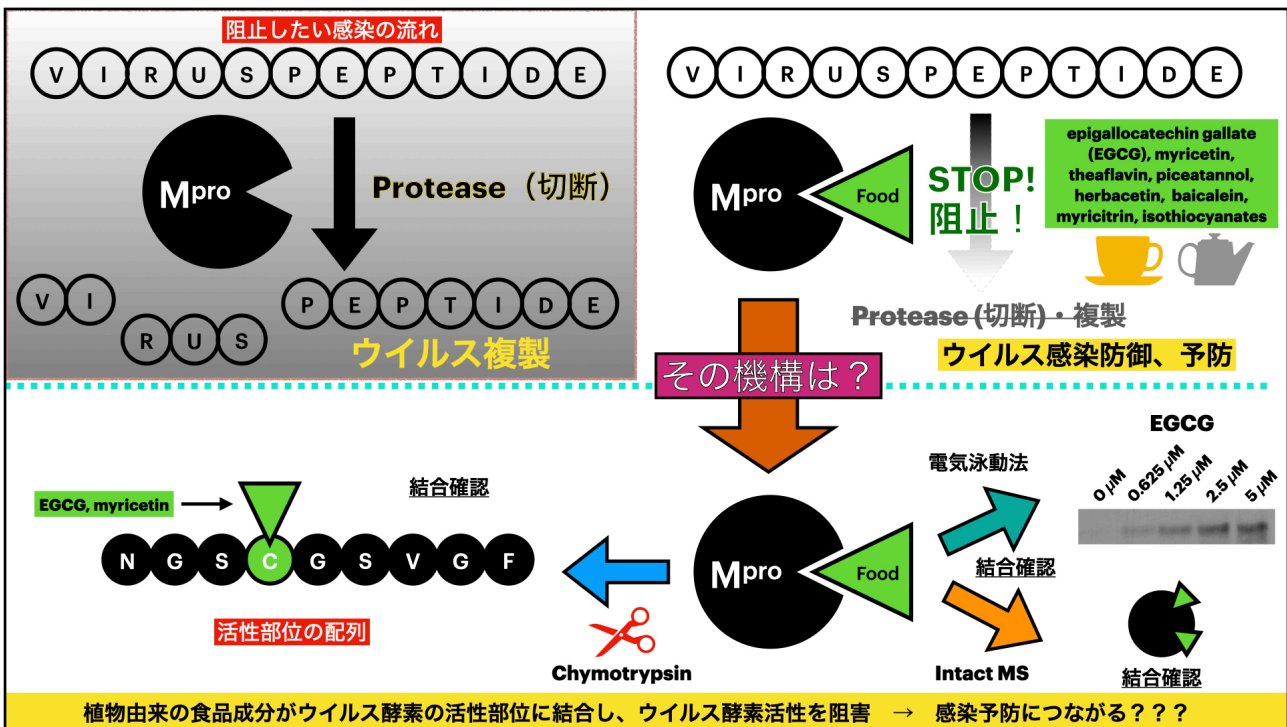
- ・ 著者：加藤陽二、東山明香里、高岡瑛未、西川美宇、生城真一
- ・ 掲載誌：Advances in Redox Research (Elsevier) Volume 3, December 2021, 100021 | DOI 10.1016/j.arres.2021.100021 (オープンアクセス)

著者（共同研究者）所属

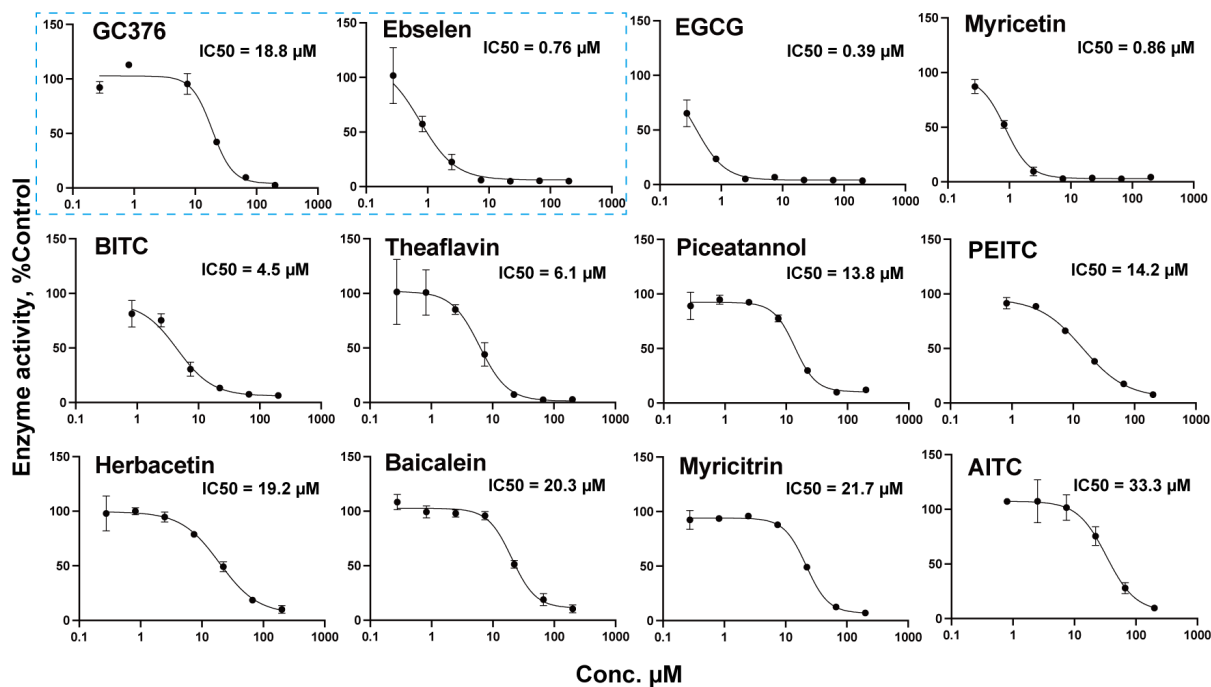
- ・ 兵庫県立大学環境人間学部（先端食科学研究センター兼務） 教授 加藤陽二
- ・ 兵庫県立大学環境人間学部 学部学生 東山明香里
- ・ 兵庫県立大学環境人間学部 学部学生 高岡瑛未
- ・ 富山県立大学工学部機能性食品工学 教授 生城真一
- ・ 富山県立大学工学部機能性食品工学 助教 西川美宇

【10. 問い合わせ先】

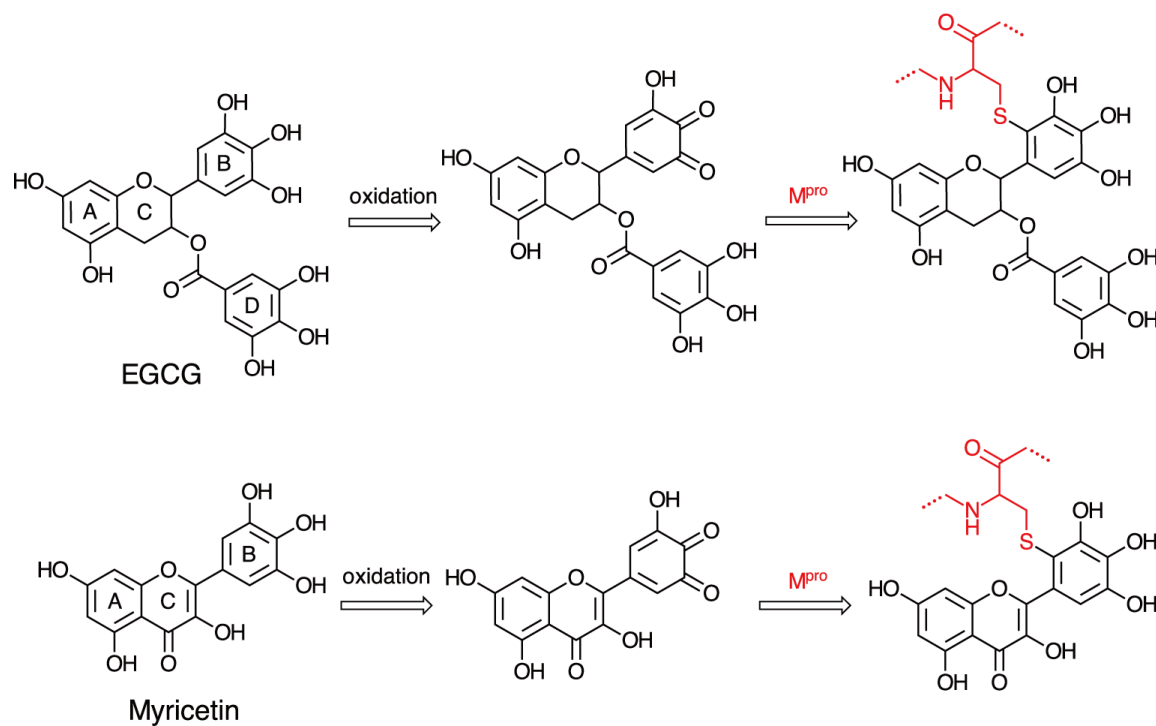
- ・ 兵庫県立大学環境人間学部 教授 加藤陽二
TEL 079-292-9413, E-mail: yojikato@shse.u-hyogo.ac.jp



【11. 参考図】



阻害効果が認められたフィトケミカルの濃度依存性阻害活性 (IC50値)
(GC376及びEbselenは既知の阻害対照コントロールとして使用)



EGCG、ミリセチンが酵素活性部位と結合して阻害する予想機構