

Antiviral activity and mechanisms of action of pentagalloylglucose (PGG) against Influenza A Virus (IAV)

(ペンタガロイルグルコース (PGG) の抗インフルエンザウイルス作用機序の解析)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻 劉 格

【目的】

インフルエンザウイルスは急性呼吸器感染症—インフルエンザの病原ウイルスであり、オルソミクソウイルス科に属し、8分節の1本鎖RNA(-)ゲノムを持つエンベロープ型ウイルスである。A、B、C型の3つに分類され、このうちA型インフルエンザウイルス(IAV)は20世紀から4回のパンデミックを引き起こし、その高い罹患率と病原性により、人類の健康と生命を脅かす重要な感染症の一つとして挙げられる。

現在使用している抗インフルエンザ薬はウイルスタンパク質を標的しており、「M2タンパク阻害剤」と「ノイラミニダーゼ阻害剤」の2つに分類される。近年薬物耐性を示す株の流行が広く認められ、新規抗インフルエンザ薬の開発が急務となる。伝統医薬に用いられる薬用植物は天然活性化合物の宝庫であり、その中から、毒性が低く、副作用の少ない新規抗IAV薬の開発が期待される。

本研究では、中国産薬用植物由来天然化合物の抗IAV活性を探索し、同定された活性化合物によるウイルスの感染複製抑制分子メカニズムの解明及び新規治療標的分子の確立を目指している。

【結果】

第一章 天然薬用植物由来抗IAV活性分子の探索

中国産薬用植物由来化合物の抗IAV活性のスクリーニングを行った結果、「余甘子」という植物由来の天然化合物、ペンタガロイルグルコース(PGG)はIAVの増殖に対して顕著な阻害活性を有することを判明した(図1)。

PGGの抗IAV機序を解析するため、Time-of-addition実験を行った(図2)。感染前の細胞をPGGで処理した場合、IAVの増殖阻害効果は認められず、感染前のIAVをPGGで1時間処理または感染中にPGGが培地中に存在した場合は、IAVの増殖が顕著に阻害された。また、感染した細胞をPGGで6時間、9時間及び12時間処理して、24時間におけるIAVの産生量も有意に阻害された。しかし、感染細胞におけるIAVタンパク質発現がPGG処理による

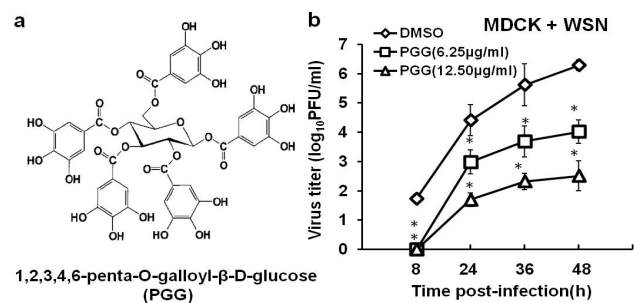


図1 PGGの化学構造式と抗インフルエンザウイルス活性

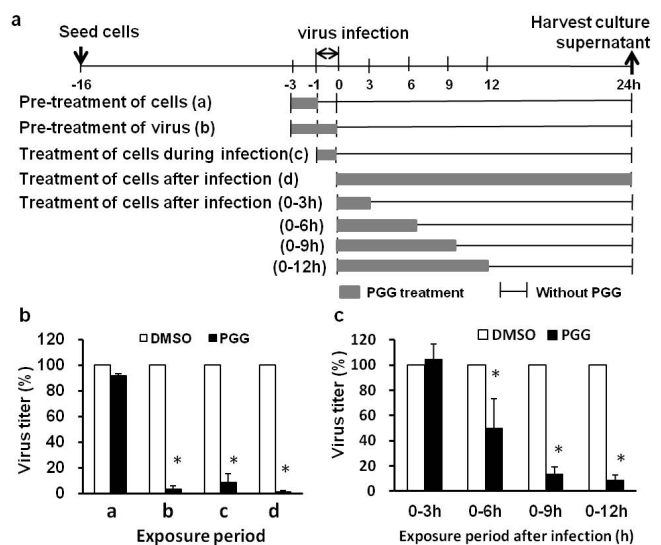


図2 Time-of-addition実験と結果

変化が認められなかった。NP タンパク質の細胞における局在を蛍光免疫染色による経時観察では、感染後 6 時間までの NP の核内と核外輸送には PGG による影響が認められず、感染 9 時間及び 12 時間において細胞膜上の NP の蓄積は抑制された。電子顕微鏡による観察では、ウイルス感染によって細胞表面に微絨毛様構造が増加し、多くの出芽ビリオンが認められたが、PGG 処理によって顕著に減少した。培養上清中に放出されたビリオンの量をウイルスゲノム RNA の real-time RT-PCR による定量比較した結果、PGG はウイルスの放出を有意に抑えた。

第二章 PGG 抗インフルエンザウイルス作用機序の解析

1. PGG とウイルス膜タンパク質ヘマグルチニン (HA) の作用機序の解析

PGG は IAV による赤血球凝集を抑えたことから、PGG は HA との結合が示唆された。そこで、PGG と HA との結合を *In silico* のドッキングシミュレーションや分子動力学 (MD) の解析を行った。その結果、PGG は HA の受容体結合部位に保存性が高い三つの二次構造 (130-loop、220-loop、190-helix) に結合することが示唆された。また、IAV を透過型電子顕微鏡観察や原子力顕微鏡による観察を行った結果、PGG はビリオン構造を破壊せず、その凝集を引き起こすことが確認された。さらに、PGG による IAV の細胞への侵入阻害も確認された。

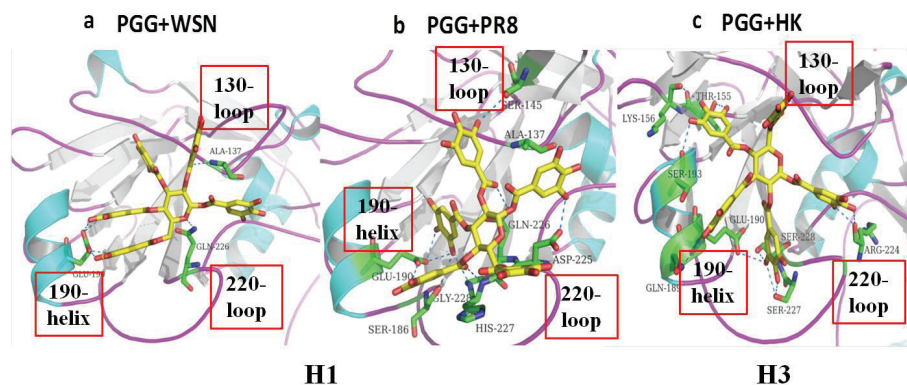


図3 PGG と HA タンパク質の受容体部位の結合ドッキングモデル

2. PGG によるウイルス集合と出芽の阻害作用機序の解析

細胞表面の微絨毛様構造は F-actin を基本とした構造であるため、PGG によるビリオンの集合と出芽阻害作用機序を解析するため、感染細胞膜表面における F-actin の局在を調べた。F-actin の重合が PGG 処理によって抑制されたことが示唆された (図 4)。また、F-actin の重合の調節に必須な cofilin タンパク質の発現レベルが PGG 処理により有意に減少したことが確認され、*cofilin* を siRNA によるノックダウンを行った感染細胞ではウイルスの放出が有意に抑制されたことから、PGG による F-アクチン重合抑制は *cofilin* の減少との関連性が示唆された。

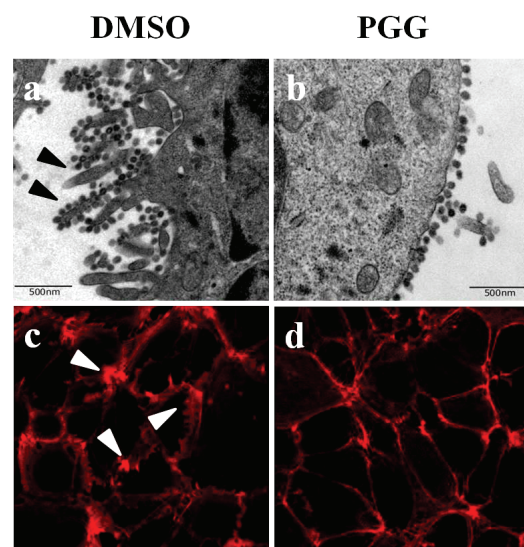


図4 感染細胞表面の電子顕微鏡観察 (a, b) と F-actin の局在 (c, d)。

3. Autophagy（自食作用）と PGG による抗ウイルス活性との関連性の解析

Autophagy は重要な細胞恒常性維持機構であり、抗ウイルス作用にも関与することが知られている。PGG は Autophagy を誘導する活性を有し、抗ヘルペスウイルス活性に関与することを共同研究によって明らかにしたが、PGG の抗 IAV 活性に関与するかは不明である。そこで、Autophagy 欠損細胞 (MEF atg7^{-/-}) を用いて、PGG の抗 IAV 活性を調べたところ、野生型 MEF と同様、PGG は Autophagy 欠損細胞においてもウイルス増殖を抑制した。PGG による Autophagy 誘導活性はその抗 IAV 作用に関与しないことを明らかにした。

[考察]

本研究では PGG は抗 IAV 活性を有することを初めて明らかにした。PGG は HA の受容体結合部位にある三つの保存性高い二次構造に結合し、HA による赤血球凝集活性および細胞表面への吸着を阻害したと考えられ、この結合はビリオンを破壊することなく、凝集させることにより、細胞への侵入を阻害したものと考えられる。

一方、細胞膜表面におけるビリオンの集合と出芽に対して、PGG は感染による F-actin 重合の増加を抑制したことが示唆され、興味深いことに、F-actin 重合の調節に必須な cofilin タンパク質レベルが PGG 処理によって有意に減少した。また、cofilin の siRNA によるノックダウンは IAV の放出を減少させたことから、cofilin は PGG による F-actin 重合抑制に関与する可能性が示唆されたが、今後更なる詳しい検証が必要であると考えられる。

ウイルス感染とビリオン集合・出芽の両方を阻害することにより (図 5) IAV の増殖を阻害する PGG は薬剤耐性株が産生しにくいと考えられ、新規抗 IAV 薬としての開発が期待される。

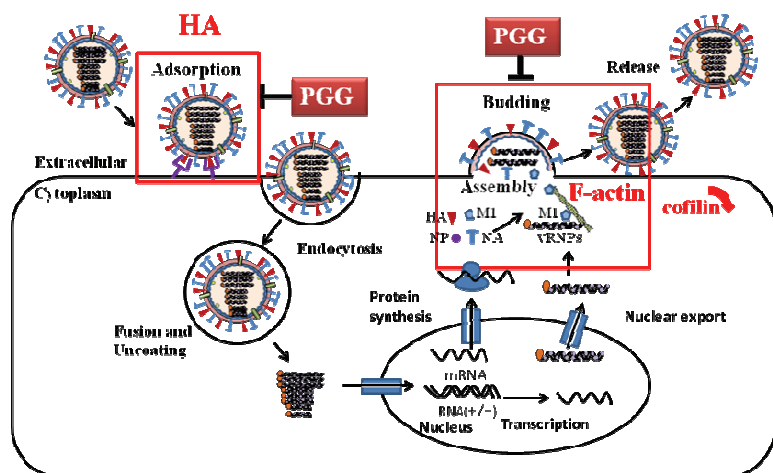


図 5 PGG による抗 A 型インフルエンザウイルスの作用機序

[基礎となった学術論文]

Liu G, Sheng X, Xiang Y, Guo C, Ge F, Yang C, Zhang Y, Wang Y, and Kitazato K. Antiviral activity and mechanisms of action of pentagalloylglucose (PGG) against influenza A virus. *Archives of Virology*. 156(8),1359~1369 (2011).

[参考論文]

Pei Y, Chen Z, Ju H, Komatsu M, Ji Y, **Liu G**, Guo C, Zhang Y, Yang C, Wang Y, Kitazato K. Autophagy is involved in anti-viral activity of pentagalloylglucose (PGG) against Herpes simplex virus type 1 infection *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 405 (2),186~191(2011).