

# 植物バイオマス由来抗ウイルス活性物質の探索

應田 涼太<sup>1\*</sup>, Ruibo Li<sup>2</sup>, 成田 亮<sup>2,3,4</sup>, 渡辺 隆司<sup>2</sup>

## Antiviral compounds from plant biomass

Ryota Ouda<sup>1\*</sup>, Ruibo Li<sup>2</sup>, Ryo Narita<sup>2,3,4</sup>, Takashi Watanabe<sup>2</sup>

### 概要

本稿は、植物バイオマスと抗ウイルス活性の関連を科学的に解明する研究をまとめたものである。ウイルス感染の影響を最小限にすることにより、食の安全、畜産業の保護、人の健康維持につながり、脱石油社会における持続的な生存圏の創成に深く関与する。植物が産生する多彩な有機化合物資源のみならず、バイオマスそのものを人為的に構造変換したものから生理活性物質を見出す領域は未だ十分に確立されておらず、本研究により抗ウイルス活性が見出されれば、抗ウイルス活性物質にとどまらず、広範な生理活性物質を生み出す研究が創成、発展すると期待され、石油資源によらない生存圏の人間生活の質（quality of life）を支えることに資する。

### 1. はじめに

木材は、これまで建材や紙パルプへの利用が中心で、微量な抽出成分を分離して機能解析をする研究は活発に行われてきたが、木材そのものを人為的に分解して、生理活性物質を合理的に作り出す研究はほとんど行われていない。これまで、我々は学外研究機関と連携して木質バイオマスの熱分解産物、木竹炭を製造する際に副次的に得られる木竹酢液の抗ウイルス性物質の探索研究を行い、ウイルスに対する強い不活化活性をもつ多数のフェノールやカテコール誘導体を見出すとともに、原料樹種や製造条件により、木竹酢液の抗ウイルス活性が大きく変わることなどを明らかにしてきた。本稿では、これまで得られた知見について概説したい。

### 2. 木竹酢液に含まれるフェノール誘導体の抗ウイルス活性

#### 2.1 背景

世界人口は約 70 億人（2011 年 11 月現在）を超え、今世紀末までには 100 億人を突破すると言われている。化石資源に過度に依存した社会構造から、地球温暖化が進み、人や動植物などの移動が活発

---

2017 年 8 月 4 日受理。

<sup>1</sup> 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所生存圏学際萌芽研究センター

<sup>2</sup> 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所バイオマス変換分野

<sup>3</sup> 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53 京都大学ウイルス・再生医科学研究所ウイルス感染研究部門分子遺伝学

<sup>4</sup> Center for Structural Biology, Department of Molecular Biology and Genetics Aarhus University, Gustav Wieds Vej 10c, DK-8000 Aarhus C, Denmark

\* E-mail: ouda.ryota.6w@kyoto-u.ac.jp

化するにつれて、病原性ウイルスによる感染症の蔓延が深刻化している。このため、病原性ウイルスによる感染症の蔓延を予防する消毒薬や薬効成分を、再生可能資源から生産することの意義は大きい。

## 2.2 木竹酢液

木竹酢液の基となる粗木竹酢液は、広葉樹や針葉樹、タケ類などの木竹材を炭化炉や乾溜炉により炭化する際に生じる排煙を冷却・凝縮させることで得られる液体である。粗木竹酢液を90日以上静置すると三層に分離し、その上層の軽質油ならびに下層の沈降タールを除いた中間層が木竹酢液と呼ばれるpH 1.5~3.7の液体である(図1)<sup>1),2)</sup>。これには、木竹材を構成する主要三成分であるセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンの熱分解生成物が溶け込んでおり、酢酸を主とする有機酸類、アルコール類、エーテル類、アルデヒド類、ケトン類、フェノール類、アミン類、スルホン類ならびにその他の中性成分等、200種類以上が含まれる<sup>3-6)</sup>。木竹酢液は主に消毒殺菌剤、食品添加剤として使われ、またレタスなどの発芽、成長促進剤としても幅広く使用されている<sup>7),8)</sup>。発芽、成長促進剤として活性のある木竹酢液は250℃までの温度で回収されたものであり、250℃~400℃の条件で得られた木竹酢液には成長を抑制させる作用があることが知られている<sup>8),9)</sup>。

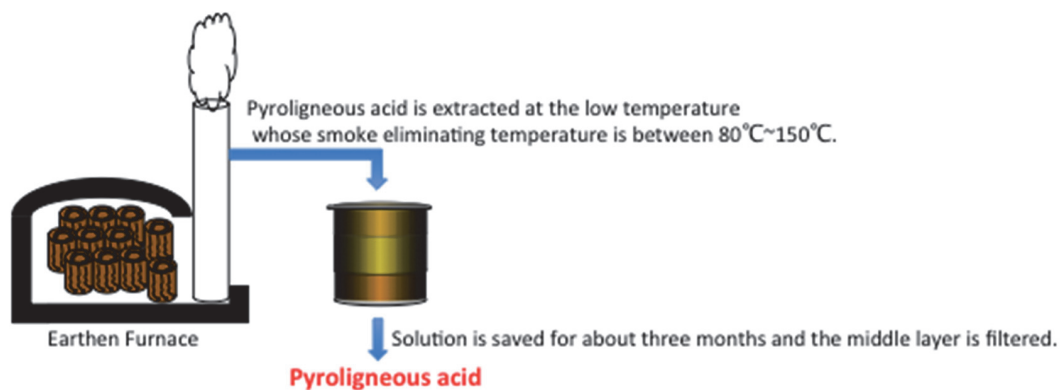


図1：木竹酢液製造法の概要

## 2.3 木竹酢液による免疫応答反応

ウイルス感染に対する生体防御は、自然免疫と獲得免疫が重要な役割を果たしている。このうち自然免疫応答は感染直後の速やかなものであり、様々なウイルス感染に対する強力な防御壁となっている。ウイルスは細胞内で複製・増殖し、それに伴って大量のウイルス由来RNAが細胞内に蓄積する。そこで細胞質内に存在する RIG-I-like receptors (RLRs)、Toll-like receptors (TLRs)、Nod-like receptors (NLRs) がこのウイルスRNAを非自己として認識し、下流にシグナルを伝達することによってI型インターフェロン (IFN) や炎症性サイトカインが産生されウイルス増殖抑制を引き起こすと同時に、抗原提示細胞の活性化を促して獲得免疫応答を誘導する<sup>10)-12)</sup>。一方、過剰なIFN、炎症性サイトカインの産生は有害であり自己免疫疾患の原因となることが知られている<sup>13)</sup>。これまで、木竹酢液に含まれる成分が様々な免疫応答を引き起こすことが知られている。孟宗竹から得られる竹酢液は、活性酸素の生成とタンパク質キナーゼC- $\alpha/\delta$ の活性を阻害することによって炎症反応を抑制することが知られている<sup>14)</sup>。また、桫欏から得られる木酢液はシグナル伝達兼転写活性化因子3 (STAT3)のリン酸化を阻害することが報告された<sup>15)</sup>。STAT3は種々の炎症性サイトカインを誘導するメディエーターであることから、桫欏から得られる木酢液によって炎症反応が抑制される。これらのことから、木竹酢液に含まれる成分は生体の免疫応答を制御する働きがあると考えられ、今後、自己免疫疾患に対する新たな治療薬としての応用が期待される。

## 2.4 木竹酢液における抗ウイルス活性探索の意義

2010 年、家畜伝染病である口蹄疫が宮崎県で発生し、29 万頭の牛や豚が殺処分された。口蹄疫は、ピコルナウイルス科の口蹄疫ウイルス (foot-and-mouth disease virus; FMDV) による感染症である。FMDV 感染による致死率は低いものの、その高い伝播性や罹患した動物の生産性減少のため、患者は全て速やかに殺処分される。したがって、FMDV 感染においては予防対策が重要である。しかし現時点で、環境および家畜に害を及ぼさない FMDV 予防対策は確立されていない。木竹酢液は環境への悪影響は少ないと考えられ、さらに、その人畜等に対する安全性も評価されている。

## 2.5 木竹酢液に含まれるフェノール類の同定

木竹酢液は材料、産地および製造法の違いによりその含有成分や生理活性が異なると予想されるが、科学的検証は十分されてこなかった。そこで我々は、6 種の異なる木竹酢液 (表 1) の成分解析をガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) 法によって行い、27 種類のフェノール誘導体を同定した (図 2)。また、それぞれの木竹酢液に含まれるフェノール類の含有量を調べた結果、竹酢液が最も高く、次いで白炭木酢液であった (図 3)。フェノール、2-メトキシフェノール、2-メトキシ-4-メチルフェノール、4-エチル-2-メトキシフェノールが木竹酢液に含まれる主なフェノール類であったが、フェノールと 2,6-ジメトキシフェノールの含有量が竹酢液で最も高かった (図 4)。また、1,2-ベンゼンジオールは針葉樹であるヒノキ木酢液とカラマツ木酢液で高かった (図 4)。このように、木竹酢液に含まれるフェノール類の含有量は産地、樹種によって異なっていることが明らかとなった。

表 1: 本研究で用いた木竹酢液

| No. | 試料名     | 種別    | 樹種    | 入手元・業者     | 産地  | pH  |
|-----|---------|-------|-------|------------|-----|-----|
| A   | 白炭木酢液   | 常緑広葉樹 | ウバメガシ | 三前商店       | 和歌山 | 2.3 |
| B   | 黒炭木酢液   | 落葉広葉樹 | ミズナラ  | 北部産業       | 岩手  | 2.9 |
| C   | 竹酢液     | 竹     | 孟宗竹   | 身延竹炭企業組合   | 山梨  | 3.5 |
| D   | アカマツ木酢液 | 針葉樹   | アカマツ  | 秋田木高研      | 秋田  | 3.7 |
| E   | ヒノキ木酢液  | 針葉樹   | ヒノキ   | 岐阜県小坂森林組合  | 岐阜  | 2.8 |
| F   | カラマツ木酢液 | 針葉樹   | カラマツ  | 北海道下川町森林組合 | 北海道 | 3.5 |

Phenol and Derivatives in Wood and Bamboo Pyrolysis Acid

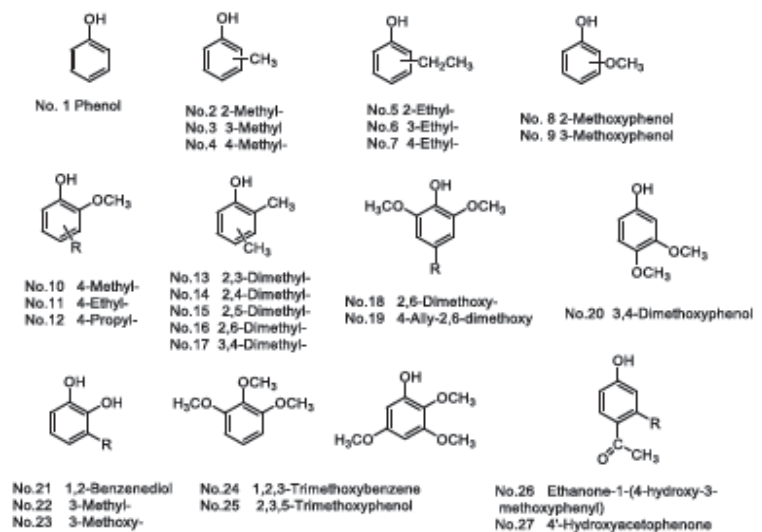


図 2: 同定された木竹酢液に含まれるフェノール類

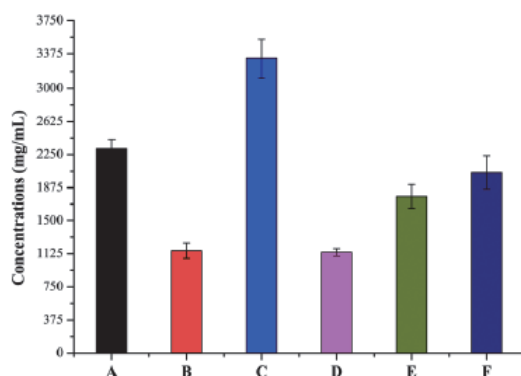


図 3: 木竹酢液 A-F 中のフェノール類の総量

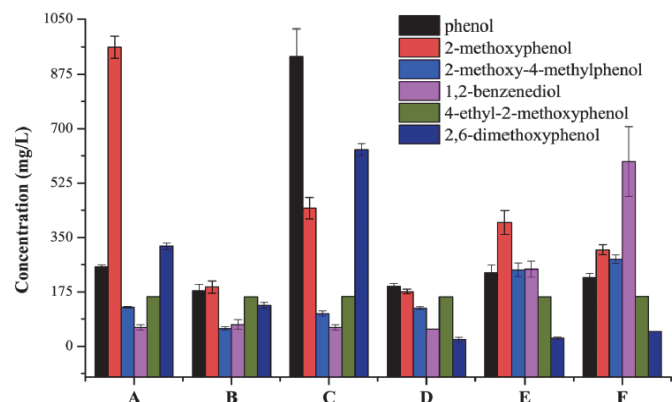


図 4: 木竹酢液 A-F に含まれる主要フェノール類の濃度

## 2.6 木竹酢液に含まれるフェノール類の抗ウイルス活性

これまで、木竹酢液に含まれるフェノール類を同定した。そこで、次にこれらの抗ウイルス活性を FMDV と同じピコルナウイルス科の脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus; EMCV) を用いて評価した。その結果、No.1-7, 9-10, 15, 17-23, 27-29 のフェノール類 (図 2) が EMCV に対して強い抗ウイルス作用を示した (図 5)。しかし、No.11-12, 25, 30 のフェノール類 (図 2) は抗ウイルス作用を示さなかった (図 5)。

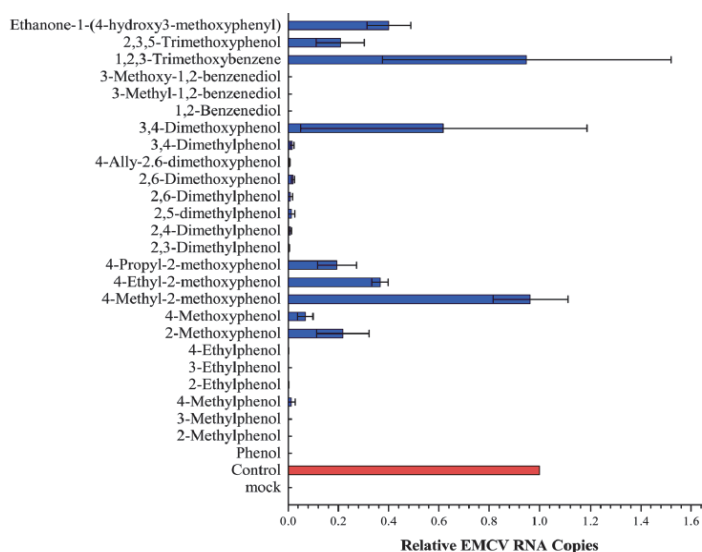


図 5: 木竹酢液に含まれるフェノール類の抗ウイルス活性

## 2.7 フェノール・カテコール誘導体の構造と抗ウイルス活性の相関性

これまで得られた結果より、①ベンゼン環に付与するヒドロキシ基の数が抗ウイルス活性の強さに影響を与える、②フェノールのメチル基、エチル基置換によって抗ウイルス活性は増減しない、③ 2-メトキシフェノールは木竹酢液の主要な成分であるが、そのメチル基、エチル基置換は抗ウイルス活性の減弱を引き起こす、④ 2-メトキシフェノールにおける長鎖炭素鎖の付与は抗ウイルス活性の増加をもたらす、⑤フェノールへのメチル基の付与はメトキシ基の付与に比べて抗ウイルス活性促進の効果が高いが、メチル基の数をさらに増加しても抗ウイルス活性は増加しない、⑥カルボキシル基の付与によって抗ウイルス活性が増加する、⑦電子吸引性基による置換によって抗ウイルス活性が減弱すること、が明らかとなった。

## 3. おわりに

これまで、成屋蘭 (*Arundina graminifolia*) から単離されたフェノール誘導体がヒト免疫不全ウイルス (HIV) やタバコモザイクウイルスに対して抗ウイルス活性があること、また常緑樹のユージェニア (*Eugenia Hyemalis*) に含まれるフェノール配糖体が HIV の RNase を阻害する作用があることが報告されている<sup>16,17)</sup>。このように天然から得られるフェノール誘導体の抗ウイルス活性の探索が近年活発に行われている。本研究において、木竹酢液に含まれるフェノール誘導体の EMCV に対する抗ウイルス活性が明らかとなった。フェノール誘導体の構造と抗ウイルス活性の相関に関する知見は、合成有機化学を用いた更なる効果的な抗ウイルス化合物の開発に繋がる事が期待される。また、脱化石社会の構築に向け、林地残材や廃材など未利用木質資源から石油由来製品を代替する有効な新規生理活性成分を得ることの意義は大きい。

## 参考文献

- 1) Mohan D, Pittman C.U, Steele P.H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. *Energy Fuels*, **20**, 848-889. 2006.
- 2) Mukarakate C, Evans R.J, Deutch S, Evans T, Starace A.K, Dam J, Watson M.J, Magrini K. Reforming biomass

- derived pyrolysis bio-oil aqueous phase to fuels. *Energy Fuels*, **31**, 1600-1607. 2017
- 3) Fagernäs L, Kuoppala E, Tiilikkala K, Oasmaa A. Chemical composition of birch wood slow pyrolysis products. *Energy Fuels*, **26**, 1275-1283. 2012
  - 4) Zhou S, Xue Y, Sharma A, Bai X. Lignin valorization through thermochemical conversion: Comparison of hardwood, softwood and herbaceous lignin. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **4**, 6608-6617. 2016
  - 5) Fagernäs L, Kuoppala E, Arpiainen V. Composition, utilization and economic assessment of torrefaction condensates. *Energy Fuels*, **29**, 3134-3142. 2015
  - 6) Zhang J, Choi Y.S, Shanks B.H. Tailoring the composition of bio-oil by vapor-phase removal of organic acids. *ChemSusChem*, **8**, 4256-4265. 2015
  - 7) Mu J, Uehara T, Furuno T. Effect of bamboo vinegar on regulation of germination and radicle growth of seed plants. *J Wood Sci.*, **49**, 262-270. 2003
  - 8) Mu J, Uehara T, Furuno T. Effect of bamboo vinegar on regulation of germination and radicle growth of seed plants II: composition of moso bamboo vinegar at different collection temperature and its effects. *J Wood Sci.*, **50**, 470-476. 2004
  - 9) Wu Q, Zhang S, Hou B, Zheng H, Deng W, Liu D, Tang W. Study on the preparation of wood vinegar from biomass residues by carbonization process. *Bioresour Technol.*, **179**, 98-103. 2015
  - 10) Takeuchi O and Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, **140**, 805-820, 2010
  - 11) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, **413**, 732-738, 2001
  - 12) Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, **303**, 1526-1529, 2004
  - 13) Funabiki M, Kato H, Miyachi Y, Toki H, Motegi H, Inoue M, Minowa O, Yoshida A, Deguchi K, Sato H, Ito S, Shiroishi T, Takeyasu K, Noda T, Fujita T. Autoimmune disorders associated with gain of function of the intracellular sensor MDA5. *Immunity*, **40**, 199-212. 2014
  - 14) Ho C.L, Lin C.Y, Ka S.M, Chen A, Tasi Y.L, Liu M.L, Chiu Y.C, Hua K.F. Bamboo vinegar decreases inflammatory mediator expression and NLRP3 inflammasome activation by inhibiting reactive oxygen species generation and protein kinase C-alpha/delta activation. *PLoS One*, **8**, e75738. 2013
  - 15) Lee C.S, Yi E.H, Kim H.R, Huh S.R, Sung S.H, Chung M.H, Ye S.K. Anti-dermatitis effects of oak wood vinegar on the DNCB-induced contact hypersensitivity via STAT3 suppression. *J. Ethnopharmacol.*, **135**, 747-753. 2011
  - 16) Hu Q.F, Zhou B, Huang J.M, Gao X.M, Shu L.D, Yang G.Y, Che C.T. Antiviral phenolic compounds from *Arundina graminifolia*. *J. Nat. Prod.*, **76**, 292-296. 2013
  - 17) Bokesch H.R, Wamiru A, Grice S.F.J.L, Beutler J.A, McKee T.C, McMahon J.B. HIV-ribonuclease H inhibitory phenolic glycosides from *Eugenia hyemalis*. *J. Nat. Prod.*, **71**, 1634-1636. 2008

## 著者プロフィール



應田 涼太 (Ryota Ouda)

＜略歴＞ 2013年 京都大学 大学院 生命科学研究科 博士課程 修了 (生命科学博士)／2012年～2013年 日本学術振興会特別研究員 (DC2)／2013年～2014年 日本学術振興会特別研究員 (PD) ／ 2014年～2017年 アメリカ国立衛生研究所 ポスドク／2015～2016 日本学術振興会海外特別研究員 (NIH)／ 2017年 京都大学 生存圏研究所 ミッション専攻研究員、現在に至る。＜研究テーマと抱負＞植物バイオマスと抗ウイルス活性の関連性の解明 ＜趣味など＞サッカー、チェス