

Effect and Mechanism of an Extract from Phyllanthus niruri on HBV-DNA Polymerase and Other DNA Synthetases

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8188

Phyllanthus niruri 抽出物が HBV-DNA ポリメラーゼ及び他の DNA 合成酵素に与える影響とその作用機序について

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

柳 昌 幸

(平成2年2月9日受付)

Phyllanthus niruri (*P. niruri*) は、古くからインドを中心に黄疸の民間治療に用いられてきた薬用植物であるが、試験管内での反応系において B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus; HBV) 及びウッドチャック肝炎ウイルス (Woodchuck hepatitis virus; WHV) の内在性 DNA ポリメラーゼ活性を抑制することが報告された。今回、*P. niruri* 水抽出物を用いて、内在性 HBV-DNA ポリメラーゼ活性及び他の DNA 合成酵素に与える影響とその作用機序について検討した。*P. niruri* 水抽出物は、試験管内において HBV-DNA ポリメラーゼ活性を用量依存性に阻害するとともに、他の T4-DNA ポリメラーゼ、Klenow フラグメント、DNA ポリメラーゼ I 及びトリ骨髄芽球性白血病ウイルス (Avian myeloblastosis virus; AMV) 由来の逆転写酵素による DNA 合成系に対しても同様に阻害効果を示すことが明らかとなった。またその作用機序に関して、阻害形式はテンプレートの量や基質となるヌクレオチドの濃度に関わらず、DNA 合成酵素と抽出物中の阻害物質との間の直接的な相互作用による可能性が示唆された。他の核酸関連酵素である T4 ポリヌクレオチドキナーゼや T4 リガーゼ及び各種制限酵素に対しては、DNA 合成酵素活性阻害効果を認める有効濃度下において酵素活性に影響を与えなかった。さらに HBV 産生培養細胞株 HB611 を用いた抗 HBV 薬剤評価系では、*P. niruri* 抽出物の濃度が約 $1.1 \mu\text{g/ml}$ で HB611 細胞内での HBV-DNA の複製が 50% 抑制され、また細胞毒性を示す最小濃度は、 $>16 \mu\text{g/ml}$ であった。*P. niruri* 抽出物中の有効阻害物質は、HBV の複製系に於て内在性 DNA ポリメラーゼ活性を抑制し、肝炎に対する治療薬としての有用性が示唆されると同時に、逆転写酵素を含む他の広範な DNA 合成酵素に対しても抑制効果を示すことから今後抗ウイルス剤としての有用性が示唆される。有効成分の精製・単離については現在検討中である。

Key words *Phyllanthus niruri*, HBV-DNA Polymerase, reverse transcriptase, antiviral agent, HB611 cell line

世界各地における B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus; HBV) の感染状況から、およそ 2 億人以上のキャリアーがいると推測されている。その大部分は無症候性キャリアーであるが、約 10% のキャリアーは、慢性肝炎、肝硬変に移行すると言われ、また、肝癌発生のリスクファクターであることが明らかとなっている。

B 型肝炎の慢性化、肝硬変への進展には HBV の持続感染が重要な役割を果たしている。HBV の持続感染による慢性肝炎では、増悪に先立って HBV の活発な増殖が認められること、逆に肝組織内の HBV 増殖の消退によって肝病変の改善する症例が存在することなどの臨床的観察は、感染症としての B 型慢性肝炎の原因療法、すなわち起因ウイルスの増殖を抑制し、さ

Abbreviations: AMV, avian myeloblastosis virus; [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP, deoxycytidine 5'- [$\alpha^{32}\text{P}$] triphosphate; dATP, deoxyadenosin 5'-triphosphate; dGTP, deoxyguanosin 5'-triphosphate; dTTP, deoxythymidine 5'-triphosphate; DNAP, DNA polymerase; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol bis

らに生体からウイルスを排除しうる抗ウイルス剤の開発が待ち望まれている。しかしながら、これまでB型慢性肝炎に対して治療薬として臨床的に検討されてきたインターフェロン¹⁾や Ara-A²⁾などの抗ウイルス剤に関しては、適応症例がある程度制限され、またその治療効果においても HBe 抗原の陰性化率は投与患者の10~30%程度と、必ずしも満足すべき臨床効果が得られていないのが現状である³⁾。

1987年に Venkateswaran⁴⁾らによって、古くからインドを中心に各地で黄疸の民間治療に用いられてきた *Phyllanthus niruri* (*P. niruri*) という薬用植物の水抽出物が、試験管内での HBV 及びウッドチャック肝炎ウイルス (woodchuck hepatitis virus; WHV) の複製系に於て DNA ポリメラーゼ活性を抑制し、血清中の HBs および WHs 抗原力価を下げる事が報告され、ウッドチャック (*Marmota monax*) を用いた動物実験でその効果について検討された。さらに1988年には Thyagarajan⁵⁾らによって、HBV キャリアー患者に対する人体投与実験が行われ血清中の HBs 抗原力価を下げる事が報告され、B型肝炎に対する治療薬としての臨床効果および有用性が示唆された。しかしながら、抽出物中の活性物質の分子量や構造などについては未だ十分解明されておらず、作用及びその機序についても明らかにされていない。

そこで今回著者は、本研究において *P. niruri* 水抽出物を用いて、試験管内での反応系を中心に HBV 内在性 DNA ポリメラーゼ活性及び他の DNA 合成酵素に与える影響とその作用機序について検討した。

材料および方法

I. *P. niruri* 水抽出物の調整

今回本実験で用いた *P. niruri* 水抽出物の調整法は、Venkateswaran⁴⁾らの方法に準じた。すなわち乾燥した *P. niruri* (植物全体) を細かく粉碎し、約40gを200mlの蒸留水と混合し、60°C 2時間、周期的に攪拌させながら抽出した。その混合物をナイロンメッシュにて濾過し、Beckman JA10 ローター (ベックマンジャパン, 東京) にて20°C 8000rpm 1時間遠心した。さらに、その上清を0.45μmミリポアフィルター (日本ミリポア, 東京) にて濾過した。*P. niruri* 水抽出物の濃度は、凍結乾燥させた際の乾燥重量にて表した。

II. 患者血清からの HBV 粒子の分離

慢性の HBe 抗原キャリアー患者から採取した新鮮凍結血清からシヨ糖密度勾配遠心法にて分離した⁷⁾。TEN 緩衝液 (10mM Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0, 100mM NaCl, 0.1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) を溶媒とした60%のシヨ糖液3mlの上に20%のシヨ糖液4mlを重層し、さらにその上に血清試料を重層し Beckman SW28 ローター (ベックマンジャパン) にて4°C 25,000rpm 5.25時間遠心し HBV 粒子画分を回収した。その試料に7mMになるように CaCl₂を添加し2単位/mlの *Staphylococcus aureus* ヌクレアーゼ S7 (ペーリンガーマンハイム山之内, 東京) にて37°C 30分処理し、最終濃度10mMの ethylene glycol bis (2-aminoethyl ether) tetraacetic acid (EGTA) を添加し反応を停止させた。

つぎにその混合液を、3mlの60%シヨ糖液に3mlの20%シヨ糖液を重層した上に載せ Beckman SW40 ローター (ベックマンジャパン) にて4°C 35,000rpm 13時間遠心し HBV 粒子画分を回収した。

III. 内在性 HBV-DNA ポリメラーゼ活性測定

HBV 粒子画分試料を界面活性剤 NP-40 処理し (HBV の core を露出させる), MgCl₂の存在下で4種のデオキシヌクレオシド3リン酸を基質に、(-) 鎖の HBV-DNA を鋳型として、試験管内で (+) 鎖の伸長反応を行わせた⁸⁾。DNA ポリメラーゼ活性は、DNA 合成に伴う [α -³²P] deoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP) の取り込みにより測定した。内在性 HBV-DNA ポリメラーゼの反応液組成は、50mM Tris-HCl 緩衝液, pH 8.3, 50mM NaCl, 7mM MgCl₂, 0.1% NP-40 (SIGMA, USA), 67μM 3dNTP (deoxyadenosine 5'-triphosphate (dATP)+deoxyguanosine 5'-triphosphate (dGTP)+deoxythymidine 5'-triphosphate (dTTP): SIGMA), 1μCi [α -³²P] dCTP (>3,000Ci/mmol) で行い、それぞれの反応液中に HBV 粒子画分10μlと一定の希釈濃度の *P. niruri* 水抽出物を加え総容量50μlとした。反応は37°C 3時間インキュベートした後、氷水にて急冷しフェノール添加により停止させた。フェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈澱を行い、HBV-DNA を30μlの TE 緩衝液 (25mM Tris-HCl 緩衝液, 1mM EDTA) に再溶解させた。試料の一部を1.5%アガロー

(2-aminoethyl ether) tetraacetic acid; HBV, hepatitis B virus; PBS, phosphate buffered saline; *P. niruri*, *Phyllanthus niruri*; SDS, sodium dodecyl sulfate; WHV, woodchuck hepatitis virus

スゲルにて電気泳動を行った。ゲルドライヤーにて乾燥させた後、サランラップに包み X 線フィルム (X-Omat AR フィルム XAR-5: Kodak, USA) にて 80°C でオートラジオグラフィを行った。さらに残りの試料の一部を、直径 2.3cm の Whatman DE81 セルロース・ペーパー (Whatman Ltd., England) にプロットした後、5% Na_2HPO_4 で洗浄し、その後水、エタノールで洗浄し乾燥させて、シンチレーター溶液 (トルエン 1000ml, PPO 5.0g, Dim-POPOP 0.14g: PACKARD, USA) に入れて液体シンチレーションカウンターにて測定した。

IV. 他の種類の DNA ポリメラーゼ活性測定

T4-DNA ポリメラーゼ, DNA ポリメラーゼ I, Klenow フラグメントを用いて *P. niruri* 水抽出物の効果及び作用機序について種々の検討を行った。テンプレートとして HindIII にて消化した pUC119DNA を用い、各種 DNA ポリメラーゼ反応液組成は以下の要領で行った。

1. T4-DNA ポリメラーゼ反応液組成

33mM 酢酸トリス緩衝液, pH 7.9, 66mM 酢酸ナトリウム, 10mM 酢酸マグネシウム, 5mM dithiothreitol (DTT: SIGMA), $67\mu\text{M}$ 3dNTP (dATP+dGTP+dTTP), $1\mu\text{Ci}$ [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dCTP ($>3000\text{Ci}/\text{mmol}$)

2. DNA ポリメラーゼ I 反応液組成

67mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.4, 10mM MgCl_2 , 1mM 2メルカプトエタノール, $67\mu\text{M}$ 3dNTP (dATP+dGTP+dTTP), $1\mu\text{Ci}$ [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dCTP ($>3000\text{Ci}/\text{mmol}$)

3. Klenow フラグメント反応液組成

DNA ポリメラーゼ I 反応液組成 {67mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.4, 10mM MgCl_2 , 1mM 2メルカプトエタノール, $67\mu\text{M}$ 3dNTP (dATP+dGTP+dTTP), $1\mu\text{Ci}$ [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dCTP ($>3000\text{Ci}/\text{mmol}$)} と同様のものを用いた。

各反応系に対してテンプレート DNA $1\mu\text{g}$, 各種酵素 (DNA ポリメラーゼ) 0.1単位使用し、一定の希釈濃度の *P. niruri* 水抽出物を加え総容量 $50\mu\text{l}$ とした。反応は 37°C 15分インキュベートした後、氷水にて急冷しフェノール添加により停止させた。フェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈澱を行い、反応産物 DNA を $30\mu\text{l}$ の TE 緩衝液に再溶解させた。試料の一部を 1.5% アガロースゲルにて電気泳動し乾燥させた後、オートラジオグラフィを行った。さらに残りの試料を、Whatman DE81 セルロース・ペーパーにプロットした後、5% Na_2HPO_4 で洗浄し、そ

の後水、エタノールで洗浄し乾燥させてシンチレーター溶液に入れて液体シンチレーション・カウンターにて測定した。

V. 逆転写酵素活性測定

トリ骨髄芽球性白血病ウイルス (Avian myeloblastosis virus; AMV) 由来の逆転写酵素 (ペーリンガーマンハイム山之内) を用いて *P. niruri* 水抽出物の効果及び作用機序について検討を行った。テンプレートとして逆転写酵素活性をみるために poly (A) \cdot (dT)¹⁵ (ペーリンガーマンハイム山之内) を用いた。逆転写酵素反応液組成は 50mM Tris-HCl 緩衝液, pH 8.3, 50mM NaCl, 10mM MgCl_2 , 5mM DTT, $10\mu\text{Ci}$ [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dTTP ($>3,000\text{Ci}/\text{mmol}$) で行い、それぞれの反応液中に逆転写酵素 0.1単位, テンプレート 500ng と一定の希釈濃度の *P. niruri* 水抽出物を加え総容量 $50\mu\text{l}$ とした。反応は 37°C 20分インキュベートした後、フェノール添加により停止させた。フェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈澱を行い、反応産物を $30\mu\text{l}$ の TE 緩衝液に再溶解させた。試料の一部を、Whatman DE81 セルロース・ペーパーにプロットした後、5% Na_2HPO_4 で洗浄し、その後水、エタノールで洗浄し乾燥させて、シンチレーター溶液に入れて液体シンチレーション・カウンターにて測定した。

VI. HBV 産生培養細胞株 HB611 における抗 HBV 効果

本実験において細胞内でのウイルス増殖系における抗 HBV 効果を検討するために、大阪大学細胞工学センター遺伝子構造機能調節部門、松原謙一教授から HBV 産生培養細胞株 HB611 の供与を受けた。

HB611 細胞株⁹⁾ は、ヒト肝芽細胞腫由来細胞株 Huh6 に図 1¹⁰⁾ に示すように 3 タンデムの HBV ゲノムが組み込まれ安定に HBV を産生し、抗 HBV 薬剤評価系としての有用性が確立された^{10,11)} 培養細胞株である。本実験では、Nagahata ら¹¹⁾ の方法に従って以下のごとく行った。

1. 細胞培養

HB611 細胞は、直径 35mm の 6 ウェルクラスター デイッシュ (Costar, USA) を用い、10% 牛胎児血清 (General Scientific Laboratories, USA) 加ダグルベッコ変法イーグル培地 (GIBCO, USA) に Geneticin (G418; SIGMA) $200\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた培地にて 2 日間培養した後、培地中にそれぞれ一定濃度で *P. niruri* 水抽出物を加えて 3 日間毎に培地交換して 2 週間培養した後、各デイッシュより DNA を抽出した。

2. DNA 抽出

Griffin ら¹²⁾ のアルカリ法に準じて以下のごとく

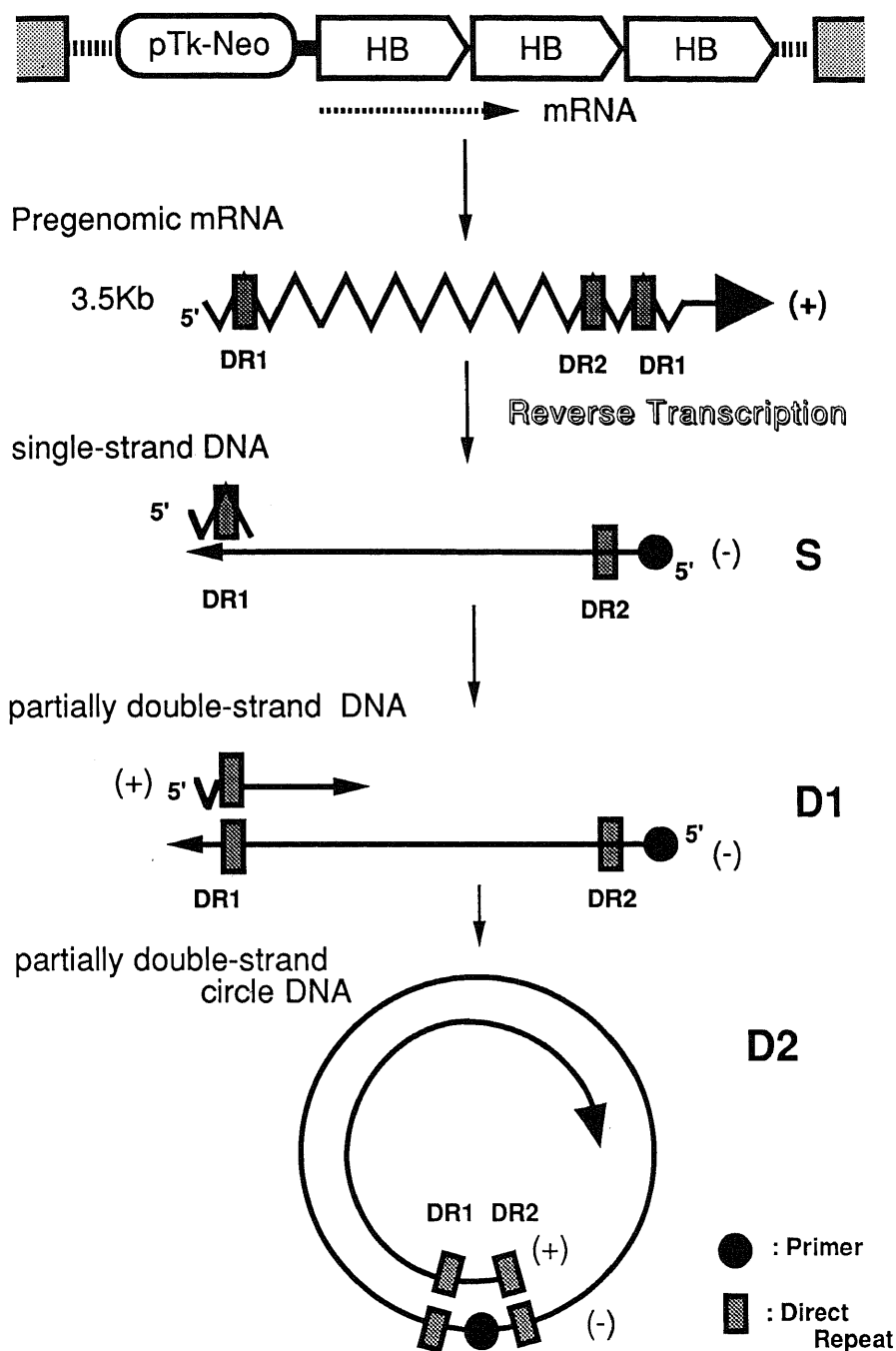


Fig. 1. The integrated HBV genome in HB611 cells and replicative intermediates of the viral DNA. Three tandemly arranged HBV genomes were linked to pTk-neo neomycin resistance gene under control of the thymidine kinase promoter from herpes simplex virus. The neomycin-resistant transfectants were selected and tested for those that expressed the s and e antigens at high levels. The 3.5-kb RNA acts as a pregenome and is reverse transcribed into full-sized single strand (-) DNA (S). S is then used as a template for the (+) strand DNA synthesis (D1). This (+) strand is incomplete and therefore the product is obtained as partially double-strand circles (D2) or its dissociated from D1. S, D1 and D2 can be separated by electrophoresis.

行った。各デブツの細胞を、リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline; PBS) にて2回洗浄し、デブツあたり0.5 ml の TESP 溶液 (10mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.4, 5mM EDTA, 1% SDS, 100 μ g/ml プロテアーゼ K (ペーリンガーマンハイム山之内)) を加え37°C 3時間消化し、さらにマイクロチューブに移し、24時間ゆっくり攪拌しながら消化した。100 μ g/ml のリボヌクレアーゼ A (RNase A) (ペーリンガーマンハイム山之内) を加え65°C 10分処理し、等量のフェノール及び CIAA (クロロホルムとイソアミルアルコールを24:1の割合で混合したもの) にて2回抽出した後、エタノール沈澱を行った。回収した DNA を TE 緩衝液150 μ l に溶解した。

3. サザンブロット法

ウイルス DNA の解析はサザンブロット法¹⁸⁾を用いた。

1) 制限酵素による DNA の切断と電気泳動

抽出した DNA 溶液70 μ l に対し HBV-DNA に対して切断部位を持たない制限酵素 HindIII を60単位用いて37°C 12時間消化しフェノール及び CIAA にて2回抽出後、エタノール沈澱し、回収した DNA を TE 緩衝液30 μ l に溶解した。うち3 μ l を1 μ g/ml のエチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルにて電気泳動を行った。DNA サイズマーカーとしては HindIII 消化 λ ファージ DNA 断片を用いた。

2) DNA 断片のフィルターへの移行

泳動終了後、1.5M NaCl を含む0.5M NaOH 溶液中にてアルカリ処理を30分し、次いで3M NaCl を含む0.5M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.0 にて20分2回の中和処理を行った。その後、毛細管現象により 20 \times SSC (3M NaCl, 0.3M クエン酸ナトリウム溶液) にてゲルからニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell, FRG) に DNA を移行させた。次に、そのニトロセルロース膜を 2 \times SSC にて洗浄し風乾後、80°C 3時間熱処理して DNA を膜に固定した。

3) プロープの作製

本実験において使用した HBV-DNA プロープは、大阪大学細胞工学センター遺伝子構造機能調節部門、松原謙一教授から供与を受けた。標識プロープの調整は、[α -³²P] dCTP (>3,000Ci/mmol) を標識基質としてマルチプライム DNA ラベリングシステムにて反応させた後、0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む TEN 緩衝液にてセファデックス G-50 (Pharmacia, Sweden) スピナラムにて未反応の [α -³²P] dCTP を除去し、95°C 5分間加熱しプロープ DNA を変性させ水で急冷した。本方法にて 7.7×10^8 cpm/

μ g DNA の比活性を有する標識プロープを得た。

4) ハイブリダイゼーション

プレハイブリダイゼーションは、プレハイブリダイゼーション溶液 {6 \times SSC, 0.1% SDS, 100 μ g/ml 熱変性サケ精子 DNA (SIGMA), 1mg/ml ウシ血清アルブミン (fraction V; 生化学工業, 東京), 1mg/ml フィコール (SIGMA), 1mg/ml ポリビニルピロリドン (SIGMA)} 中で65°C 2時間行った。プレハイブリダイゼーション溶液除去後、 9.6×10^8 cpm の標識プロープ DNA を含む新たなプレハイブリダイゼーション溶液を加え、65°C 18時間ハイブリダイゼーションを行った。2 \times SSC にて5分2回洗浄した後、0.1% SDS を含む 2 \times SSC にて65°C 30分処理を2回繰り返した。処理後、フィルターを乾燥させ、サランラップに包み X 線フィルム (X-Omat AR フィルム XAR-5) に密着させて-80°C で約20時間オートラジオグラフィを行った。阻害効果を定量的に解析するため、オートラジオグラフィしたフィルムをデンストメーターで測定した。

VII. 試薬類

特に会社名の記載のないアガロースおよび各種酵素は宝酒造株式会社 (京都) の製品を、マルチプライム DNA ラベリングシステム (コード RPN. 1601) および各種アイソトープはいずれもアマシャム・ジャパン株式会社 (東京) から購入した。これ以外の試薬で特に会社名の記載のないものはいずれも和光純薬株式会社 (大阪) の製品を用いた。

また、各種 DNA ポリメラーゼおよび逆転写酵素の

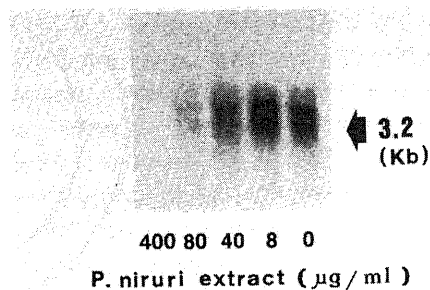


Fig. 2. Inhibition of endogenous HBV-DNAp by an extract from *P. niruri* in vitro. The 3.2kb band (arrow), which is a closed circular HBV-DNA, indicates HBV-DNAp activity. By addition of *P. niruri* extract in endogenous HBV-DNAp reaction, HBV-DNAp activity was inhibited. The activity became undetectable at the concentration of 400 μ g (dry weight)/ml.

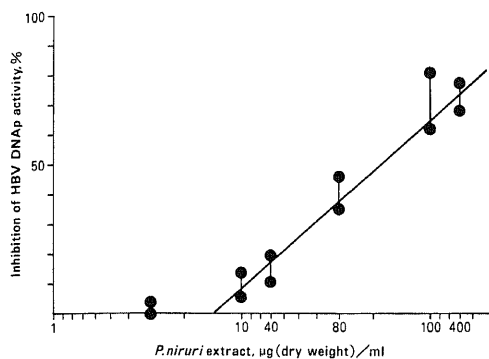


Fig. 3. Dose response of *P. niruri* extract on endogenous HBV-DNAp activity. Serial dilutions of *P. niruri* extract were assayed for their ability to inhibit HBV-DNAp activity. The logarithm of the *P. niruri* concentration vs. the inhibition rate of HBV-DNAp activity was plotted. Inhibition of endogenous HBV-DNAp by *P. niruri* extract was directly proportional to the *P. niruri* concentration.

反応液組成については、酵素を購入した際、ついてくる添付書を参考にして決めた。

成 績

I. 内性 HBV-DNA ポリメラーゼ活性に与える阻害効果

慢性の HBe 抗原キャリアー患者から採取した HBV (Dane) 粒子画分を用いて、*P. niruri* 抽出物が内性 HBV-DNA ポリメラーゼ活性に与える阻害効果について検討した。図 2 は反応産物 DNA を 1.5% アガロースゲル電気泳動により分画した結果である。約 3.2Kb のバンドがユニットサイズの線状 HBV-DNA に相当し、その濃淡が内性 HBV-DNA ポリメラーゼ活性を示している。*P. niruri* 抽出物の添加により、HBV-DNA ポリメラーゼ活性に対する阻害効果が認められた。さらにその阻害効果を定量的に解析するため、反応産物 DNA を液体シンチレーション・カウンターにて測定した。図 3 に示すグラフは、それぞれの反応系における *P. niruri* 抽出物の添加濃度と HBV-DNA ポリメラーゼ活性阻害率を片対数グラフにプロットしたものである。約 90 μg (乾燥重量)/ml にて 50% 阻害が観測され、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは抽出物濃度と HBV-DNA ポリメラーゼ活性阻害率との間には、比例関係が認められた。

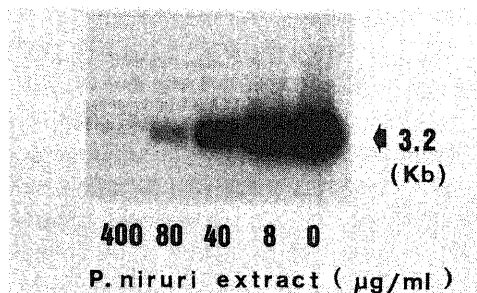


Fig. 4. Inhibition of T4-DNAp by an extract from *P. niruri* in vitro. The 3.2kb band (arrow), which is HindIII digest of pUC119-DNA, indicates T4-DNAp activity. By addition of *P. niruri* extract in T4-DNAp reaction, T4-DNAp activity was dose-dependently inhibited similarly to HBV-DNAp activity.

II. 種々の DNA 合成酵素における影響

P. niruri 抽出物が他の DNA ポリメラーゼに与える影響を調べる目的で、まず T4-DNA ポリメラーゼ反応系を用いた。図 4 は HindIII 消化 pUC119DNA をテンプレートとして T4-DNA ポリメラーゼによる修復反応において検討した結果である。ゲル電気泳動にて 3.2Kb のバンドが HindIII 消化 pUC119DNA に相当し、その濃淡が DNA ポリメラーゼ活性を示している。*P. niruri* 抽出物は、HBV-DNA ポリメラーゼの場合と同様に T4-DNA ポリメラーゼ活性に対して用量依存性に阻害効果を示した。

さらに逆転写酵素を含む他の各種 DNA 合成酵素活性に対する *P. niruri* 抽出物の阻害効果を検討した。本実験では、T4-DNA ポリメラーゼのほかに大腸菌 Klenow フラグメント、DNA ポリメラーゼ I、AMV 由来の逆転写酵素を使用した。AMV 由来の逆転写酵素活性は、poly (A) · (dT)¹⁸ をテンプレートとして [α -³²P] dTTP の取り込みにて測定し、他の DNA ポリメラーゼは、HindIII 消化 pUC119DNA をテンプレートとして [α -³²P] dCTP の取り込みにて測定した。各酵素は、それぞれ 0.1 単位使用した。*P. niruri* 抽出物は、内性 HBV-DNA ポリメラーゼだけでなく、T4-DNA ポリメラーゼ、大腸菌 Klenow フラグメント、DNA ポリメラーゼ I、AMV 由来の逆転写酵素などの各種 DNA 合成酵素に対して活性阻害効果を有し、その阻害濃度はそれぞれの DNA ポリメラーゼによって異なっていた。反応中の各酵素量は 0.1 単位に統一したが、活性定義が異なり、また標品の比活性が異なるため有効阻害濃度を直接相互比較す

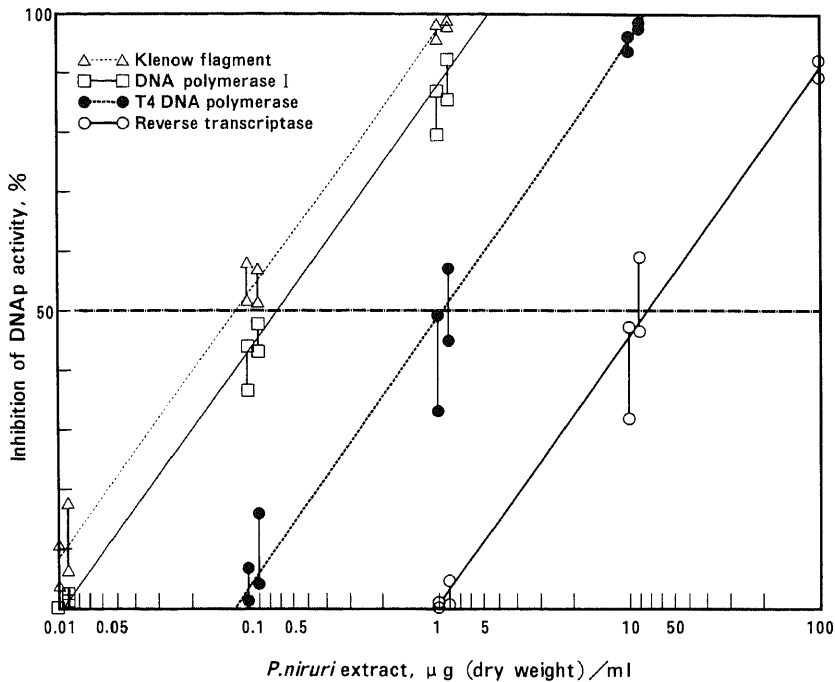


Fig. 5. Effect of *P. niruri* on various kinds of DNAP activity. *P. niruri* extract dose-dependently inhibited enzyme activities of not only HBV-DNA polymerase but also the other kinds of DNA polymerase; T4-DNAP, Klenow Fragment, DNA Polymerase I and Reverse Transcriptase from AMV. An approximately linear relationship exists between the inhibition of various kinds of DNAP activity and the concentration of *P. niruri* extract, and each gradient is approximately same.

ることはできなかった。図5に示すグラフは、反応系における *P. niruri* 抽出物の添加濃度と各種 DNA ポリメラーゼの活性阻害率を片対数グラフにプロットしたものである。 *P. niruri* 抽出物の添加濃度と各種 DNA ポリメラーゼの活性阻害率との間には、有効濃度において100%阻害濃度に至るまで比例関係を認め、またその傾きが各種 DNA 合成酵素間でほぼ等しい結果を得た。

そこで *P. niruri* 抽出物による阻害効果の作用機序を明らかにするために、T4-DNA ポリメラーゼを用いて以下の検討を行った。

III. *P. niruri* 抽出物による阻害効果における基質濃度の影響

T4-DNA ポリメラーゼによる反応系において、基質となる 3dNTP 濃度と *P. niruri* 抽出物による DNA ポリメラーゼ活性阻害効果との関係を検討した。図6にその結果を示す。 *P. niruri* 抽出物による DNA ポリメラーゼ活性阻害効果は、基質濃度を増加させても変わらず、基質濃度に影響されなかった。今

回データには示さないが、他の大腸菌 Klenow フラグメント、DNA ポリメラーゼ I、AMV 由来の逆転写酵素においても同様の結果を得た。

IV. *P. niruri* 抽出物による阻害効果におけるテンプレート量の影響

T4-DNA ポリメラーゼによる反応系において、テンプレートとなる DNA 量の変化と *P. niruri* 抽出物による DNA ポリメラーゼ活性阻害効果との関係を検討し、その結果を図7に示す。テンプレート DNA 量を増加させても、その阻害効果は影響されなかった。今回データには示さないが、AMV 由来の逆転写酵素において poly (A) · (dT)¹⁸ をテンプレートとして用いても同様の結果を得た。

V. DNA 合成酵素の量と *P. niruri* 抽出物による阻害効果との関係

T4-DNA ポリメラーゼの酵素量と *P. niruri* 抽出物による阻害効果との関係について検討した。その結果を図8に示す。抽出物を10µg/ml 加えた反応系では、酵素量を増やすにつれて阻害効果は低下し、酵素量4

単位にて、抽出物未添加のコントロール反応系において酵素量0.5単位を使用した時と同等の活性を認め、抽出物による阻害効果は殆ど解消された。また、抽出物を100 μ g/ml 加えた反応系においても、酵素量1単位以上加えていくと次第に阻害効果は低下した。したがって、*P. niruri*抽出物中の有効成分と DNA ポリメラーゼの結合による酵素活性阻害の可能性が示された。今回データには示さないが、他の大腸菌 Klenow

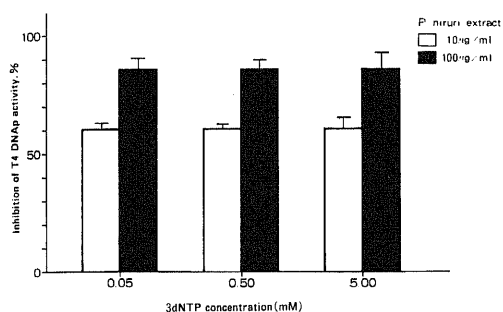


Fig. 6. Effect of substrate (3dNTP) concentration on inhibition by *P. niruri*. Serial concentration of 3dNTP (dATP+dGTP+dTTP; 0.05mM, 0.50mM, 5.00mM, [α 32P] dCTP was excess) were assayed for the ability of *P. niruri* to inhibit DNAp activity. In spite of substrate (3dNTP) concentration, *P. niruri* extract inhibited the T4-DNAp activity dose-dependently.

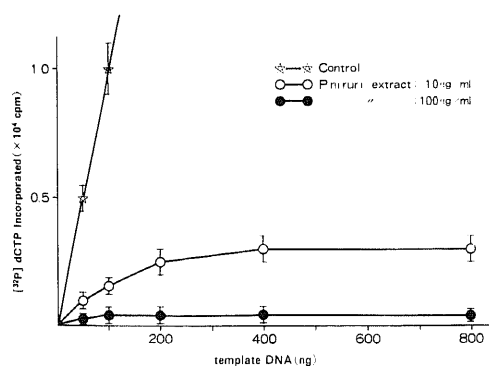


Fig. 7. Effect of template dose on the inhibition by *P. niruri*. On each dilutions of *P. niruri* extract (10 μ g/ml & 100 μ g/ml), the relation between the template dose and the ability of *P. niruri* to inhibit DNAp activity was investigated. In spite of template does, *P. niruri* extract dose-dependently inhibited the T4-DNAp activity.

フラグメント, DNA ポリメラーゼ I, AMV 由来の逆転写酵素においても同様の結果を得た。

VI. HBV 産生培養細胞株 HB611 における抗 HBV 効果

HB611 細胞内でのウイルス複製系における *P. niruri* 抽出物の抗 HBV 効果をサザンブロット法にて比較検討した結果を図9に示す。*P. niruri* 抽出物は、細胞内でのウイルス DNA の複製過程において、組み込まれた HBV ゲノム (I) から mRNA として転写されたプレゲノムに対し、HBV 由来の DNA ポリメラーゼの逆転写酵素活性により (-) 鎖 DNA (S) が複製されるプロセスでの阻害効果をまず認め、さらにそれをテンプレートとして HBV-DNA ポリメラーゼ活性により (+) 鎖 DNA (D) の伸長反応が起こり、さら

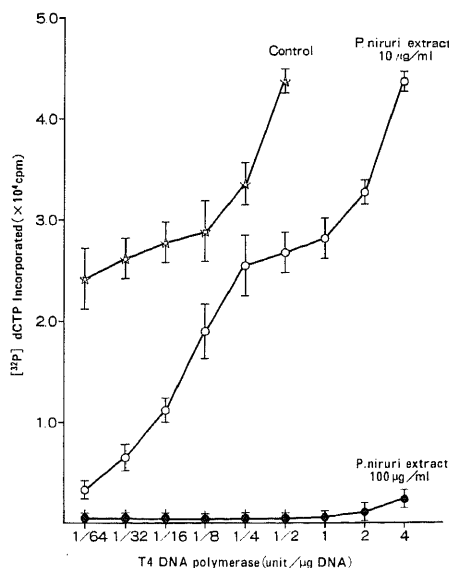


Fig. 8. Effect of Enzyme Dose on the Inhibition by *P. niruri*. On the reaction of *P. niruri* extract 10 μ g/ml, the inhibition effect of *P. niruri* deteriorated, as the enzyme dose of T4-DNAp was added in the reaction. By adding 4 units of T4-DNAp the maximum activity of T4-DNAp, which was equal to the maximum activity of 0.5 unit enzyme in the control reaction, was shown on this reaction. The inhibition effect of *P. niruri* could not be detected by adding 4 units of T4-DNAp. On the reaction of *P. niruri* extract 100 μ g/ml, the inhibition effect of *P. niruri* gradually deteriorated, as the enzyme dose of T4-DNAp was added more than 1 unit in the reaction.

に部分 2 重鎖環状 DNA (D₂) が形成されるプロセスにおいても、阻害効果を認めている。

その阻害効果を定量的に解析するためにデンストメーターで測定し、組み込まれた HBV ゲノム(I) をマーカーとしてそれに対するフリー・ウイルス DNA の量 (S+D₁+D₂) を比較して判定した。P. niruri 抽出物を 80 μg/ml 加えたデイッシュからは、細胞毒性のため DNA を回収できなかったが、0.8~16 μg/ml 加

えたデイッシュでは培養中の細胞形態および組み込まれた HBV ゲノム (I) をマーカーとした DNA 回収量からは、明らかな細胞毒性を認めなかった。添加した抽出物濃度とウイルス DNA の複製阻害率との間にはほぼ比例関係が認められ、0.8 μg/ml 加えたデイッシュでは 39.4%、16 μg/ml 加えたデイッシュでは 94.5% のウイルス DNA の複製阻害率を認めた。本実験のデータを片対数グラフにプロットし、50% 阻害濃度を求めると 1.1 μg/ml であり、細胞毒性を示す最小濃度は、>16 μg/ml であった (表 1)。

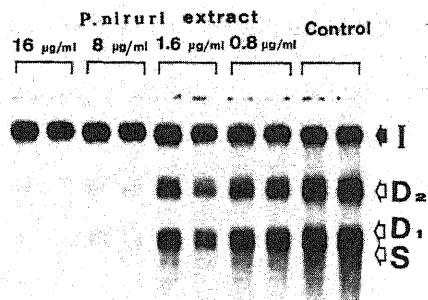


Fig. 9. Southern blot analysis of HindIII digested cellular DNA of HB611 cells cultured in the presence of *P. niruri* extract. The slow-migrating band (I) represents chromosomally integrated HBV-DNA, and the fast-migrating bands (S, D₁ D₂) are the extrachromosomal, replicative intermediates of HBV-DNA. *P. niruri* extract interfered with viral DNA replication without affecting cellular DNA replication in appropriate concentration ranges from 0.8 μg/ml to 16 μg/ml.

考 察

これまでのところ、B型肝炎ウイルス感染症に対して、画期的な治療効果を示した抗ウイルス剤はほとんどないといってよい。すなわち、ウイルスの複製サイクルは、基本的に宿主細胞の機能と密接に関連しており、ウイルス増殖だけを選択的に抑制することの難しさに起因している。B型肝炎ウイルスの増殖過程において、DNA ウィルスでありながらレトロウィルスでみられる逆転写の段階を通過して複製するという、特異的なウィルス核酸の合成ステップで、その重要な役割を演じているウィルス由来の核酸合成酵素は、抗ウイルス剤の研究開発の面で注目されているターゲットの一つである。

今回の研究において、*P. niruri* (植物全体) 抽出物は、試験管内での反応系において、内在性 HBV-DNA ポリメラーゼ活性を阻害し、さらに、T4-DNA ポリメラーゼ、大腸菌 Klenow フラグメント、DNA ポリメラーゼ I などの各種 DNA ポリメラーゼ、そしてレトロウィルスである AMV 由来の逆転写酵素によ

Table 1. Anti-HBV activity of *P. niruri* extract.

Compound	MTD (μg/ml)	ID ₅₀ (μg/ml)
<i>P. niruri</i>	>16	1.1

To quantitatively evaluate the inhibitory activity of compound (*P. niruri*), the band areas S, D₁, D₂ and I were measured by densitometric analyzer, and the inhibition percentage was calculated as follows:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{(S_{niruri} + D1_{niruri} + D2_{niruri}) / I_{niruri}}{(S_{cont.} + D1_{cont.} + D2_{cont.}) / I_{cont.}}\right) \times 100$$

MTD represents the minimum cytotoxic dose. Antiviral activity is represented by ID₅₀ on HBV-DNA synthesis. This value was obtained by plotting the logarithm of the concentration of *P. niruri* vs. the inhibition percentage of the viral DNA synthesis in the treated cells.

る DNA 合成系に対しても阻害効果を示すことが確認された。しかもそれぞれの反応系における *P. niruri* 抽出物の添加濃度と各種 DNA ポリメラーゼの活性阻害率との関係を片対数グラフにプロットするとほぼ比例関係を認め、阻害反応がほぼ 1 次反応をとり、その傾きが類似していることから、各種 DNA 合成酵素への有効成分の阻害効果が共通の作用機序に基づく可能性が示唆された。

今回データには示さなかったが、*P. niruri* 抽出物は、他の核酸関連酵素である T4 ポリヌクレオチドキナーゼや T4 リガーゼ及び各種制限酵素に対して、DNA 合成酵素活性阻害効果を認める有効濃度下で影響を与えなかったことは、抽出物質中の阻害物質が、DNA 合成酵素活性阻害群に比較的特異的であることが考えられる。また完全二重鎖 DNA と *P. niruri* 抽出物の共存下で、DNA の切断は全く観測されず、DNase 活性は認められなかった。

P. niruri 抽出物による DNA 合成酵素活性阻害効果の機序について検討したところ、反応系におけるテンプレートとなる DNA や poly (A) · (dT)¹⁵ の量や、あるいは基質となるデオキシヌクレオシド 3 リン酸濃度によって阻害効果は影響されなかった。すなわち *P. niruri* 抽出物中による DNA 合成酵素活性阻害効果が、抽出物中の阻害物質と基質との競合によるものではないこと、また阻害物質のテンプレートに対する結合あるいは修飾によるものではないことが推測された。酵素量と *P. niruri* 抽出物による阻害効果との関係について調べた結果は、抽出物中の阻害物質と DNA 合成酵素との直接的な相互作用により酵素活性を失わせる可能性が示された。また、高濃度の抽出物による酵素の前処理の効果はなく、阻害程度は反応時の抽出物の最終濃度に依存する結果を得ている。これらの結果は、抽出物中の阻害物質が化学量論的に酵素を可逆的に失活させている可能性が推測された。

さらに今回、*P. niruri* 抽出物の抗 HBV 効果を HBV 産生培養細胞株 HB611 を用いて検討した。培養細胞を用いた HBV 感染と増殖系が確立していない現状では、細胞内における B 型肝炎ウイルスの複製系モデルとして、ヒト肝芽細胞腫由来培養細胞株 Huh6 (Huh6-cl15) に 3 タンデムの HBV ゲノムが組み込まれ安定に HBV 粒子を産生する HB611 培養細胞株は、有用な抗 HBV 薬剤評価系である。しかしながら、この系では、ウイルスの感染、脱殻および core 粒子中の部分二重鎖ゲノムから完全二重鎖への複製過程に与える影響については観測できない。図 1 に示すように、Huh6 細胞内にて組み込まれた HBV ゲノム

(I) から mRNA として転写された 3.5Kb の RNA が プレゲノムとして、HBV 由来の DNA ポリメラーゼの逆転写酵素活性により (-) 鎖 DNA (S) が複製され、それをテンプレートとして HBV-DNA ポリメラーゼ活性により (+) 鎖 DNA (D₁) の伸長反応が起こり、さらに部分 2 重鎖環状 DNA (D₂) が形成され、安定かつ持続的に HBV (Dane) 粒子を産生している。したがって、HB611 細胞によるザンプロットの結果 (図 8) は、*P. niruri* 抽出物が、0.8~16 μg/ml の濃度範囲において宿主細胞である HB611 の DNA 量 (I) に影響を与えずに、HBV 由来 DNA ポリメラーゼの逆転写酵素活性および DNA ポリメラーゼ活性を阻害し、ウイルス DNA の複製を阻害していることを示している。また 50% 阻害濃度と細胞毒性を示す最小濃度との間に有意差が存在していた (表 1)。

今回の HB611 細胞を用いた系で、*P. niruri* 抽出物に細胞内での HBV の逆転写及び DNA 複製段階で阻害効果が観察されたことは、有効成分の抗 HBV 治療薬としての有用性を示している。試験管内での実験の結果からは、酵素量によって阻害濃度が変化し、*P. niruri* 抽出物中の阻害物質と酵素蛋白との結合が示唆されている。したがって有効阻害濃度は、結合可能な標的蛋白 (酵素) 量に依存していることが考えられる。一方、培養細胞系では、培地中に牛胎児血清蛋白および細胞由来の蛋白が多量に存在する条件にも関わらず、試験管内における DNA 合成系の DNA ポリメラーゼの阻害濃度と同程度であり、AMV 逆転写酵素の阻害濃度よりはるかに低濃度であることは興味深い現象である。このことは、有効成分の結合は、牛胎児血清蛋白等の他の蛋白との結合性が極めて低いか、あるいは細胞内では、代謝により試験管内での阻害物質より阻害効果の高い活性成分に転換された可能性が考えられる。いずれにしても、DNA 合成酵素活性との特異的相互作用の可能性を示唆している。

有効成分の作用機序を考える上で、最近、核酸合成酵素の遺伝子構造の解析が進み、原核生物から真核生物にわたる各種の核酸合成酵素の活性部位に比較的、進化的に保存されたアミノ酸配列が存在することが報告されている¹⁹⁾。この事実、今回用いた *P. niruri* 抽出物が、逆転写酵素を含む広範な DNA 合成酵素を阻害した結果を考える上で重要な示唆を与えているとともに、*P. niruri* 抽出物中の有効成分がレトロウイルスを含めた HBV 以外のウイルスに対しても複製阻害効果を持つ可能性を示唆している。

今回の実験では、原核細胞及びウイルスの DNA 依存 DNA 合成酵素活性と、レトロウイルス由来逆転写

酵素活性に対する *P. niruri* 抽出物の効果を検討した。検討したすべての DNA ポリメラーゼ活性に阻害的に働くことは、宿主細胞の各種 DNA ポリメラーゼ活性に対する阻害効果の可能性も推測される。したがって、今後宿主の DNA ポリメラーゼ活性に対する阻害効果の検討が、宿主との分別的な阻害薬剤の開発にとって、検討すべき点として残されている。また、各種 DNA ポリメラーゼおよび RNA ポリメラーゼが共通アミノ酸配列を保存していることが最近示されており、RNA ポリメラーゼ活性に対する効果の検討も残されている。

一方、有効成分についての予備的知見で、各種カラムクロマトグラフィーを用いて現在分離精製中で、有効成分の化学的・物理的特性の解析を進めている。80°C60分の熱処理で全く阻害活性は失活せず、耐熱性であり、蛋白分解酵素処理や酸処理によって、阻害活性は失われなかった。これらの点から、有効成分が非蛋白成分であることが推測される。阻害機序のより詳細な解明、より特異性の高い誘導体の開発にとって阻害物質の単離同定は欠くことができない。試験管内での簡便な DNA ポリメラーゼ阻害効果判定法の導入は、阻害物質の活性分画同定にとって、有用なファーストスクリーニング法として利用することが可能である。

今後、有効成分を明らかにし、分子量及び構造決定を目指すと同時に、今回検討できなかった各種 DNA ポリメラーゼ、真核細胞由来 DNA ポリメラーゼなどに対する影響を調べ、より詳細な作用機序について検討を進めていく予定である。

結 論

P. niruri 水抽出物を用いて、試験管内での反応系を中心に HBV 内在性 DNA ポリメラーゼ活性及び他の DNA 合成酵素に与える影響とその作用機序について解析した。

1. *P. niruri* 抽出物は、試験管内での反応系において内在性 HBV-DNA ポリメラーゼ活性を用量依存性に阻害し、さらに、T4-DNA ポリメラーゼ、大腸菌 Klenow フラグメント、DNA ポリメラーゼ I などの各種 DNA ポリメラーゼ、そしてレトロウイルスである AMV 由来逆転写酵素による DNA 合成系に対しても阻害効果を示すことが確認された。

2. *P. niruri* 抽出物による DNA 合成酵素活性阻害効果の機序について検討したところ、反応系におけるテンプレートやあるいは基質によって阻害効果は影響されず、抽出物中の阻害物質と DNA 合成酵素との直接的な相互作用により酵素活性を失活させる可能性が

示された。

3. 抗 HBV 薬剤評価系として確立された HBV 産生培養細胞株 HB611 において、*P. niruri* 抽出物の B 型肝炎に対する治療薬としての有用性が示された。

さらに逆転写酵素を含む他の広範な DNA 合成酵素に対しても抑制効果を示すことから、レトロウイルスを含めた他のウイルスに対する抗ウイルス剤としての有用性が示唆される。有効成分の精製・単離については現在検討中である。

謝 辞

稿を終えるに望み、終始、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った、恩師、服部 信前教授並びに小林健一教授に深甚の謝意を表します。また、直接の御指導をいただいた、金沢大学大学がん研究所生物物理部門、村上清史助教授に心から感謝致します。本研究に御援助下さった、金沢大学大学がん研究所生物物理部門、原田文夫教授に深謝致します。本研究のために HBV 産生培養細胞株 HB611 を提供していただき、かつ *in vivo* 阻害効果実験を御指導いただいた、大阪大学細胞工学センター遺伝子構造機能調節部門、松原謙一教授、長橋武光博士に深謝致します。また、御協力いただいた金沢大学医学部第一内科第二研究室各位、並びに金沢大学大学がん研究所生物物理部門各位に深く感謝致します。

尚、本論文の要旨は、第25回日本肝臓学会総会（平成元年度、金沢）及び、the 1989 meeting on HEPATITIS B VIRUSES (1989, Cold Spring Harbor, New York), 第48回日本癌学会総会（平成元年度、名古屋）で発表した。

文 献

- 1) Greenberg, H. B., Pollard, R. B., Lutwick, L. I., Gregory, P. B., Robinson, W. S. & Merigan T. C.: Effect of human leucocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, **295**, 517-522 (1976).
- 2) Chadwick, R. G., Bassendine, M. F., Crawford, E. M., Thomas, H. C. & Sherlock, S.: HBsAg-Positive chronic liver disease: Inhibition of DNA polymerase activity by vidarabine. *Br Med. J.*, **2**, 531-533 (1978).
- 3) 瀧野辰郎, 奥野忠雄, 阿部芳道, 武田 誠, 進藤道子: B型肝炎の治療 インターフェロン. *肝胆臓*, **13**, 503-510 (1986).
- 4) 渡辺省三, 伊藤哲朗, 生駒次朗, 梯 龍一, 加納右一郎, 田中 武, 鈴木司郎: B型肝炎の治療 Ara-A, Ara-AMP および Acyclovir. *肝胆臓*, **13**, 511-517 (1986).
- 5) Venkateswaran, P. S., Millman, I. & Blumberg, B. S.: Effect of an extract from

Phyllanthus niruri on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: In vitro and in vivo studies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 274-278 (1987).

6) **Thyagarajan, S. P., Subramanian, S., Thirunalasundari, T., Venkateswaran, P. S. & Blumberg, B. S.**: Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. Lancet, **1**, 764-766 (1988).

7) **Radziwill, G., Zentgraf, H., Schaller, H. & Bosch, V.**: The duck hepatitis B virus DNA polymerase is tightly associated with the viral core structure and unable to switch to an exogenous template. Virology, **163**, 123-132 (1988).

8) **Kaplan, P. M., Greenman, R. L., Gerin, J. L., Purcell, R. H. & Robinson, W. S.**: DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. J. Virol., **12**, 995-1005 (1973).

9) **Tsurimoto, T., Fujiyama, A. & Matsubara, K.**: Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 444-448 (1987).

10) **Ueda, K., Tsurimoto, T., Nagahata, T., Chisaka, O. & Matsubara, K.**: An in vitro system for screening anti-hepatitis B virus drugs. Virology, **169**, 213-216 (1989).

11) **Nagahata, T., Ueda, K., Tsurimoto, T., Chisaka, O. & Matsubara, K.**: Anti-hepatitis B virus activities of purine derivatives of oxetanocin A. J. Antibiot. (TOKYO), **42**, 644-646 (1989).

12) **Giffin, B. E., Bjorck, E., Bjursell, G. & Lindahl, T.**: Sequence complexity of circular Epstein-Barr virus DNA in transformed cells, J. Virol., **40**, 11-19 (1981).

13) **Southern, B. E.**: Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., **98**, 503-517 (1975).

14) **Wong, S. W., Wahl, A. F., Yuan, P. M., Arai, N., Pearson, B. E., Arai, K., Korn, D., Hunkapiller, M. W. & Wang, T. S. F.**: Human DNA polymerase α gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. EMBO J., **7**, 37-47 (1988).

Effect and Mechanism of an Extract from *Phyllanthus niruri* on HBV-DNA Polymerase and Other DNA Synthetases Masayuki Yanagi, Department of Internal Medicine (I) School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 372—384 (1990)

Key words *Phyllanthus niruri*, HBV-DNA Polymerase, reverse transcriptase, antiviral agent, HB611 cell line

Abstract

Phyllanthus niruri (*P. niruri*), which is a medicinal plant, has been and is used widely in Southern India and elsewhere for the treatment of jaundice. It has been reported that an aqueous extract from *P. niruri* inhibits endogenous DNA polymerase (DNAP) of the hepatitis B virus (HBV) and the woodchuck hepatitis virus (WHV) in vitro. In this study the effect and mechanism of *P. niruri* extract on the activities of HBV-DNAP and the other kinds of DNAP were investigated. *P. niruri* extract inhibits the dose-dependent enzyme activity of not only HBV-DNAP but also other kinds of DNAP; T4-DNAP, Klenow fragment, DNA polymerase I and reverse transcriptase from the avian myeloblastosis virus. The data suggest that the mechanism of the inhibitory effect of *P. niruri* extract on DNAP activity, might be based on a direct interaction between some active compounds in the extract and the DNAP enzyme, and that the inhibition is not affected by the concentration of substrate (dNTP) and template (DNA & polyA oligo-dT) in the reaction condition. The aqueous extract had shown no DNase activity and did not exhibit an inhibitory effect on the reaction of T4 DNA ligase, T4 polynucleotide kinase and several restriction enzymes, at the concentration which inhibited the DNAP activities. We used a HB611 cell line as a model system for the analysis of the antiviral effect, which was a human hepatoma cell line (Huh6-c15) transfected with the cloned viral DNA and which had the stable gene expression and the DNA replication of HBV. At about 1.1 μ g (dry weight of *P. niruri* extract)/ml in cell culture medium, the inhibition of gene expression and DNA replication of HBV, was 50%. The minimum cytotoxic dose was $>16 \mu$ g/ml. The results suggest that some active compounds in *P. niruri* extract, could be useful not only as an anti-HBV agent but also as an antiviral agent against other viruses including retrovirus. Using a variety of techniques for isolation, separation and purification, some active compounds in *P. niruri* extract, have been identified.