

# オゾンの SARS-CoV-2 に対する不活化作用におけるオゾン標的部位の重要性

Importance of Ozone Target Sites in the Inactivation of Ozone against SARS-CoV-2

○中室克彦\*、錦 善則\*\*、内藤博敬\*\*\*

\*摂南大学名誉教授、\*\*デノラ・ペルメレック株式会社、\*\*\*静岡県立農林環境専門職大学

## 論文要旨

SARS-CoV-2 の不活化に関してウイルス構成分子に対するオゾンの標的部位を再解析した。生体分子に対するオゾンの反応性は、RNA、DNA>タンパク質>脂質の順に高いことが示されている。また、SARS-CoV-2 の不活化機構を見直した結果、タンパク質成分のトリプトファン、メチオニン、システイン、チロシンや脂質を構成するリノール酸に対するオゾンの酸化攻撃が不活化・感染抑制に寄与することが示唆された。

The target sites of ozone on viral components were reanalyzed with respect to the inactivation of SARS-CoV-2. The reactivity of ozone to biological macromolecules has been shown to be higher for RNA, DNA>protein>lipid, in that order. In addition, a review of the inactivation mechanism of SARS-CoV-2 suggests that the oxidative attack of ozone on the protein components tryptophan, methionine, cysteine, and tyrosine and the lipid component linoleic acid contributes to the inactivation and suppression of infection.

キーワード：オゾン、ウイルス、SARS-CoV-2、標的部位、官能基

## 1. はじめに

オゾンによる酸化反応は古くから有機化学の分野で広く研究されている<sup>1)</sup>。また、水処理分野におけるオゾン処理は、主として水中の有機汚染物質をオゾン酸化反応によって分解除去することを目的としている<sup>2)</sup>。

一方、酸化性殺菌剤の酸化力は、オゾン>二酸化塩素>塩素>次亜塩素酸>次亜塩酸イオン>クロラミンの順に強く、殺菌、殺ウイルス力も同様の順に強いといわれている<sup>3)</sup>。オゾンによる殺菌および殺ウイルス機構に関する多くの研究から、オゾンはその強力な酸化作用によって細菌・ウイルスの構成成分を構造的に破壊し、殺菌効果およびウイルス不活化効果を発揮することが明らかになっている。すなわち、オゾンの殺菌機構では細胞膜中の酵素の変性により菌体の代謝やエネルギー産生が不可能になるとともに細胞膜が破壊されて細胞内へ  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、細胞外へ  $\text{Mg}^{2+}$ 、RNA などが漏出する。さらに細胞内に透過したオゾンが RNA やリボゾームを分解、染色体成分の DNA を損傷することによって、細菌は構造的破壊を起こし死滅する。これに対してオゾンによるウイルス不活化は、コートタンパク質の破壊による宿主細胞への吸着阻害およびコートを透過したオゾンによる RNA、DNA の酸化的不活化で説明されている。このようなオゾンによる殺菌およびウイルス不活性化機構は認知されているものの<sup>2)</sup>、新たな視点からのウイルス不活性化機構の検討として、ウイルスの構成組成におけるオゾンの標的分子の同定も重要である。そこで今回は、ウイルスを構成する有機分子とオゾンとの反応についての *in vitro*、*in vivo* 実験の結果および SARS-CoV-2 およびインフルエンザウイルスの感染機序に注目し、ウイルス不活性化におけるオゾンの標的部位を考察する。

## 2. 脂質、タンパク質、核酸などの生体高分子におけるオゾン酸化の標的部位

細菌やウイルスにおいて細胞膜を構成する脂質、生命維持に重要な酵素などのタンパク質、生命を継承するための核酸 DNA や RNA、またあらゆる栄養源のキャリアーとして働く血漿に含まれる各種の有機分子のうち何がオゾンの標的になっているかを、先行研究を改めて解析しなおすことによって考察した。

### 2.1 脂質、タンパク質、核酸などを構成する脂肪酸、アミノ酸や核酸塩基におけるオゾン酸化の標的部位について

脂肪酸やアミノ酸、核酸塩基とオゾンとの反応に関する研究から、オゾン酸化を受けやすい生体分子は共通して電子密度の高い官能基を含んでいることが明らかになっている。すなわち、チオール基 (-SH) を有するシステインやグルタチオンはオゾンによって容易に酸化される。また、電子密度の高いプリン環を有するグアニンなどの核

酸塩基、同じく電子密度の高いインドール環やイミダゾール環を有するトリプトファンとヒスチジンあるいはフェノール構造を有するチロシン、C=C 二重結合を有するリノール酸などの不飽和脂肪酸もオゾンとの反応性が高い。たとえば、表 1 に示すごとくオゾンに対する二次反応速度定数 ( $k \times 10^4 M^{-1} sec^{-1}$ ) が測定されており、その値は、システイン>グルタチオン>アスコルビン酸>トリプトファン>メチオニン>ヒスチジン>尿酸>リノール酸、の順と報告されている。したがって、ウイルスタンパク質とオゾンの反応では、システインやトリプトファン、メチオニン、ヒスチジンなどのアミノ酸残基がオゾンの標的になる可能性が高い。

表 1 オゾンと生体分子との二次反応速度定数

		$k, \times 10^4 M^{-1} sec^{-1}$
糖	スクロース	0.0003
アミノ酸	アラニン	0.008
	ロイシン	0.01
	イソロイシン	0.01
	バリン	0.01
	グリシン	0.04
	スレオニン	0.04
	セリン	0.08
	フェニルアラニン	0.27
	ヒスチジン	220
	メチオニン	400
	トリプトファン	700
	システイン	>100,000
	不飽和脂肪酸	オレイン酸
リノール酸		100
リノレン酸		110
抗酸化剤	グルタチオン	>100,000
	アスコルビン酸	6,000
	$\alpha$ -トコフェロール	75
	尿酸	140

三浦敏明、「医療とオゾン」、p53 (1996) を改変

## 2.2 オゾンと一連の生体分子との反応におけるオゾン酸化の標的部位について

タンパク質、ヘモグロビン、RNA および DNA のオゾン分解についての Cataldo<sup>4)</sup> の報告では、オゾンに対するアミノ酸の反応性はトリプトファン>メチオニン>システイン>チロシン>>>フェニルアラニンの順に高いため、タンパク質の場合は、これらの特定のアミノ酸残基がオゾンで酸化分解され、タンパク質のフォールディングや結合能力の変化が確認されている。またタンパク質に比べて RNA や DNA の方がオゾンに対する反応性が高いと報告されている。

Berlett ら<sup>5)</sup> は、大腸菌のグルタミン合成酵素とウシ血清アルブミンに対するオゾンの反応性を比較し、これらタンパク質のオゾン酸化ではメチオニン > トリプトファン > チロシン~ヒスチジン > フェニルアラニンの順でアミノ酸残基が急速に酸化されることを示した。また、これら生体分子に対するオゾンの反応性は、RNA、DNA>タンパク質>脂質の順に高いことも認めている。

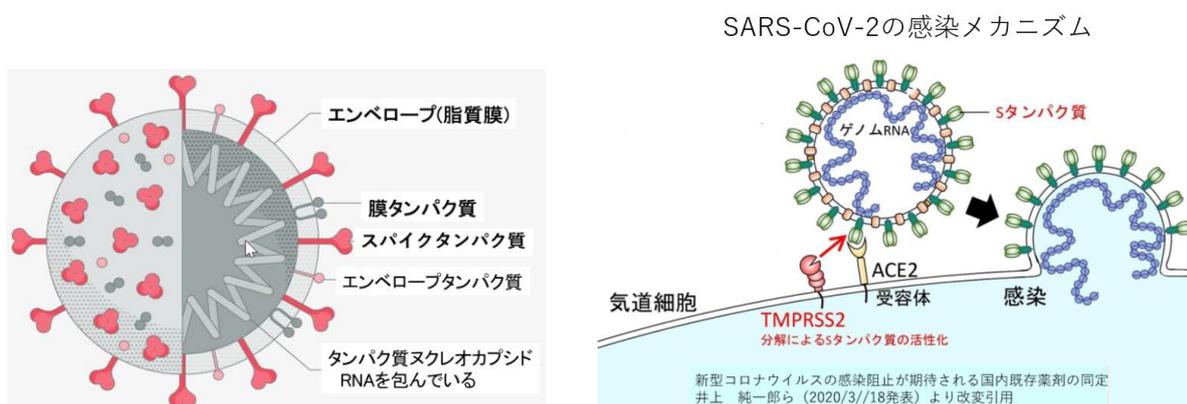
以上の事実から、細菌、ウイルスなどの不活化機構は、膜脂質の構成成分である不飽和脂肪酸の-C=C-のオゾン

酸化 (Criegee 反応)<sup>2)</sup> による開裂からはじまり、オゾンが菌細胞膜を通過して核内の DNA、RNA に達し、またウイルスのエンベロープを通過してコートタンパク質を破り DNA、RNA に達し、いずれもこれら核酸を破壊することによって細菌やウイルスが死滅することに基づくことが考えられる。

### 3. SARS-CoV-2 の感染メカニズムからみたオゾンの殺ウイルス作用のトリガーとしての酸化的攻撃の重要性

Tizaoui<sup>6)</sup> は SARS-CoV-2 構造中の代表的な主要分子に対するオゾンの反応性について分子モデリングを用いて評価した。彼は、宿主細胞の受容体と結合し膜融合に必須なスパイクタンパク質やエンベロープのタンパク質と脂質の攻撃部位を解析し、オゾンは特にアミノ酸のトリプトファン、メチオニン、システイン、チロシン、脂肪酸のアラキドン酸、リノール酸、オレイン酸を攻撃することで SARS-CoV-2 の不活化に寄与することを示している。また、スパイクタンパク質の受容体結合ドメイン (RBD) のサブユニット 1 と 2 の N-グリコペプチドにもオゾンが攻撃する可能性を示唆している。

下図に示すごとく、エンベロープを持つ SARS-CoV-2 のヒトに対する感染では、ウイルスのスパイク (S) 糖タンパク質の RBD 部位と宿主細胞膜上の ACE2 (Angiotensin Converting Enzyme 2 : アンジオテンシン変換酵素-2) 受容体がヒトの気道や肺細胞への侵入プロセスに大きな役割を果たしている<sup>7) -9)</sup>。



(SARS-CoV-2/abcam <https://www.abcam.co.jp>)

(井上純一郎(東京大学医科学研究所) <https://www.ims.u-tokyo.ac.jp>)

SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質の RBD に存在するチロシンとヒトの ACE2 受容体に存在するヒスチジンが結合し、さらに膜型セリンプロテアーゼ (TMPRSS2) が宿主細胞の細胞表面からの侵入を誘導することが報告されている。すなわち、スパイク (S) 糖タンパク質と宿主細胞膜上の ACE2 受容体が宿主細胞にウイルスを貫通させる重要な役割を果たしている<sup>10)</sup>。

ところで、Ogata<sup>11)</sup> は新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のスパイクタンパク質とヒト ACE2 受容体との結合に対する二酸化塩素 (ClO<sub>2</sub>) の阻害作用について検討し、0.25 mmol/L または 0.5 mmol/L (オゾン濃度 16.875 mg/L または 33.75 mg/L に相当) の ClO<sub>2</sub> で処理したスパイクタンパク質の ACE2 受容体への結合活性 (SARS-CoV-2 Spike: ACE2 Inhibitor Screening Assay で測定) が低下することを見出している。この活性低下は、ClO<sub>2</sub> がスパイクタンパク質 RBD の 453 位 (Y453) のチロシン残基を攻撃し、それによって ACE2 受容体の 34 位 (H34) のヒスチジン残基との結合を阻害することによって引き起こされることが明らかになった。オゾンは ClO<sub>2</sub> よりも強い酸化剤であることから、オゾン水中の溶存オゾンもスパイクタンパク質 RBD のチロシン残基に作用してヒト ACE2 受容体との結合を阻害し、SARS-CoV-2 感染を抑制することが推定される。

ヒトインフルエンザ A 型ウイルス (H1N1) では赤血球凝集とノイラミニダーゼの活性を持つ hemagglutinin-neuraminidase (HN) 糖タンパク質や fusion (F) 糖タンパク質がウイルスエンベロープ膜表面にスパイク状に多数突出して存在している、いわゆるスパイクタンパク質である。これら hemagglutinin (HA) が宿主細胞のシアル酸受容体と結合し、細胞融合することによって感染が成立することが報告されている<sup>12)</sup>。オゾンは HN

糖タンパク質に存在するチロシン、グリシン、スレオニン、セリン<sup>13)</sup>などを攻撃することで、SARS-CoV-2の不活化機序と同様に、ヒトインフルエンザ A 型ウイルス (H1N1) を不活化することが知られている。

#### 4. まとめ

SARS-CoV-2 およびインフルエンザ A 型ウイルスの感染機序に着目し、ウイルス不活性化作用におけるオゾンの標的分子種の重要性に関して既往の報告から考察を加えた結果、以下の結論が得られた。

- 1) SARS-CoV-2 およびインフルエンザ A 型ウイルスのオゾンによる不活性化作用には、特にアミノ酸のトリプトファン、メチオニン、システイン、チロシン、脂肪酸のアラキドン酸、リノール酸、オレイン酸が寄与していることが考えられた。
- 2) SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質およびインフルエンザ A 型ウイルスの hemagglutinin-neuraminidase (HN) 糖タンパク質に存在するチロシン、グリシン、スレオニン、セリンなどのアミノ酸に対するオゾンの酸化攻撃はこれらウイルスの感染を抑制する可能性を示した。

#### 5. 参考文献

- 1) M.Horvath, L. Bilitzky and J. Huttner, "Ozone : Chapter V. Fields of utilization of ozone", pp.257-330(1985).
- 2) 津野 洋, " オゾンハンドブック[改訂版] : 第 5 章オゾンの反応性", pp.67-121(2016).
- 3) 公益社団法人 日本プールアメニティー協会, pp.102-109(2019).
- 4) F. Cataldo, Ozone degradation of biological macromolecules: Proteins, hemoglobin, RNA, and DNA, *Ozone: Science & Engineering*, 28:5, 317-328 (2007).
- 5) B.S. Berlett, R.L. Levine and E.R. Stadtman, Comparison of the effects of ozone on the modification of amino acid residues in glutamine synthetase and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.*, 271:4177-4182 (1996).
- 6) C. Tizaoui, Ozone: A potential oxidant for COVID-19 virus (SARS-CoV-2). *Ozone: Science & Engineering*, 42(5): 378-385 (2020).
- 7) R. Yan, Y. Zhang, Y. Li, L. Xia, Y. Guo and Q. Zhou, Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 367(6485):1444-1448 (2020).
- 8) T. Meirson, D. Bomze and G. Markel, Structural basis of SARS-CoV-2 spike protein induced by ACE2. *Bioinformatics*, 37: 929-936 (2021).
- 9) J. Lan, J. Ge, J. Yu, S. Shan, H. Zhou, S. Fan, Q. Zhang, X. Shi, Q. Wang, L. Zhang and X. Wang. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581: 215-222 (2020).
- 10) M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger, T. Herrler, S. Erichsen, T.S. Schiergens, G. Herrler, N. Wu, A. Nitsche, M. A. Müller, C. Drosten, and S. Pöhlmann, SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 181: 271-280.e8 (2020).
- 11) N. Ogata, T. Miura, Inhibition of the binding of spike protein of SARS-CoV-2 coronavirus to human angiotensin-converting enzyme 2 by chlorine dioxide. *Ann. Pharmacol. Pharm.*, 5: 1195 (2020).
- 12) 鈴木隆、ヒトパラインフルエンザウイルスの糖鎖結合性と感染制御、 *Journal of Japanese Biochemical Society*、89(5): 660-665 (2017)
- 13) 高橋忠伸、インフルエンザが結合する糖鎖分子の機能解明、ウイルス、66(1): 101-116(2016)