

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：11301
 研究種目：基盤研究（S）
 研究期間：2007～2011
 課題番号：19106009
 研究課題名（和文） ウイルス吸着タンパク質を用いた環境中からの病原ウイルス濃縮・検出・同定技術開発
 研究課題名（英文） Development of virus-binding protein-based technologies for concentration, detection and identification of pathogenic viruses in water environment
 研究代表者
 大村 達夫（OMURA TATSUO）
 東北大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号 30111248

研究成果の概要（和文）：

本プロジェクトでは、活性汚泥細菌が産生するウイルス吸着タンパク質（virus-binding protein: VBP）や、加水分解酵素を用いた固形環境試料からのウイルス回収技術（enzymatic virus elution 法：EVE 法）を活用し、全く新しい病原ウイルス濃縮・検出・同定技術を開発することを目指した。その結果、幅広い種の腸管系ウイルスを捕捉可能な VBP である腸管系ウイルス吸着タンパク質（Enteric virus-binding protein：EVBP）の分離及びクローニングに成功した他、河川底泥・海底泥及び下水等の腸管系ウイルスの環境中動態に関わるサンプルからの効率的なウイルス回収・検出方法を確立し、さらにエチジウムモノアザイドを用いた感染性ウイルス検出技術を確立することで、当初目的を達成することができたと言える。

研究成果の概要（英文）：

The objective of this project was to develop novel technologies for recovery, detection and identification of pathogenic viruses in water environments by taking advantages of our own approaches including virus-binding protein (VBP) and enzymatic virus elution (EVE) method. As a result, enteric virus-binding protein (EVBP) that can capture diverse enteric viruses was successfully identified, and novel methodologies for virus recovery from environmental matrixes such as river and estuarine sediments were established. Furthermore, a novel methodology for detecting infectious pathogenic viruses in water by using ethidium monoazide was also developed. These achievements allow us to complete the original targets of this project.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	33,800,000	10,140,000	43,940,000
2008年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
2009年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
2010年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
2011年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
総計	85,600,000	25,680,000	111,280,000

研究分野：環境水質工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：感染症，ウイルス，タンパク質，酵素，検出技術

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは培養により増殖させることが

難しく、また光学顕微鏡では観察不可能なほど小さいため、その実態を掴むことが非

常に困難な病原体であった。しかしながら、ここ数十年における様々な技術革新によりウイルス分析技術が発達し、それに伴い感染症患者からのウイルス分離に関するデータが蓄積されつつある。その結果、人間社会にはインフルエンザやエイズウイルス等の社会的に大きな話題となっているウイルスだけでなく、多種多様な病原ウイルスが常在していることなど、人間社会における病原ウイルスの実態が少しずつ解明されてきた。しかしながら、多大な感染症被害をもたらしているノロウイルスやロタウイルスに代表される胃腸炎ウイルスの感染ルートを特定することは、従来から非常に困難であった。これは、想定される胃腸炎ウイルスの感染ルートが多岐に渡り、存在濃度が希薄で、さらに主要な媒体と考えられる食品や水環境中からのウイルス検出技術の感度に限界があることに大きな原因があった。病原ウイルスの感染ルート解明のため、環境中に存在する病原ウイルスの高感度な検出手法を開発することが切望されていたことが、本プロジェクト開始当初の背景であった。

2. 研究の目的

環境中から胃腸炎ウイルスを高感度で検出するためには、環境サンプル中から高効率でウイルスを濃縮する作業が必要不可欠である。本研究では、これまでに独自開発したウイルス吸着タンパク質 (virus-binding protein: VBP) や加水分解酵素を用いた固形試料からのウイルス回収技術 (enzymatic virus elution 法: EVE 法) を活用し、全く新しい病原ウイルス濃縮・検出・同定技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は以下の4つの項目から構成される。

(1) 複数種の病原ウイルスを吸着可能な VBP (enteric virus-binding protein: EVBP) の分離・同定

本項目では、複数種の病原ウイルスに対して吸着活性を有する EVBP の分離を目指した。アフィニティリガンドを固定化したカラムに活性汚泥細菌から粗抽出したタンパク質を投入し、アフィニティリガンドに吸着してカラム内に保持されたタンパク質を EVBP として回収する。回収された EVBP のウイルス吸着能力は、実際のウイルス粒子を用いた ELISA 法により確認する。

(2) VBP 固定化カラムによる水中病原ウイルス濃縮・検出手法の確立

VBP を固定化したカラムに試料を流し込むことでウイルスを固定化 VBP で捕捉し、さらに酵素で修飾した VBP プローブで検出する技術を開発する。

(3) EVE 法による固形試料からのウイルス回収技術の開発

ウイルスによる汚染が懸念される二枚貝 (カキ等) や下水中の懸濁物質のような固形試料からのウイルスの誘出技術の開発を行う。固形試料中の有機物をプロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼ等の酵素により消化することで、付着したウイルスを効率的に液相へ誘出する技術を開発する。

(4) ウイルス遺伝子検出・同定技術の開発

水及び固形サンプルから回収・濃縮されたサンプル中から、感染力を持つウイルス遺伝子を検出・同定する技術を開発する。

4. 研究成果

(1) 複数種の病原ウイルスを吸着可能な VBP (enteric virus-binding protein: EVBP) の分離・同定

急性胃腸炎患者から頻繁に検出されるノロウイルス GII/4 に吸着能を示すタンパク質の分離に成功し、その特性評価を行った。得られたノロウイルス吸着タンパク質はシャペロニンの構成タンパク質である GroEL と高い相同性を有していた。また、超音波処理と遠心分離を組み合わせた活性汚泥からのタンパク質抽出方法を確立し、さらに抽出タンパク質中に EVBP が存在することがポリオウイルス粒子を用いた ELISA 法により確認された。

EVBP のクローニングを行うために、EVBP 遺伝子を活性汚泥細菌のゲノム DNA ライブラリから分離することを試みた。その結果、EVBP 遺伝子の取得及びクローニングに成功し、さらに EVBP 遺伝子による大腸菌の形質転換及び大腸菌による EVBP の合成に成功した (図 1)。また、得られた遺伝子産物はノロウイルス、ポリオウイルス及びロタウイルス

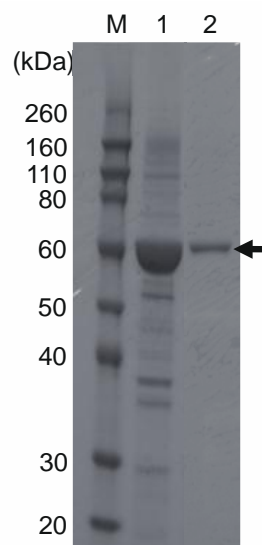


図 1 大腸菌による EVBP 合成 (矢印部)

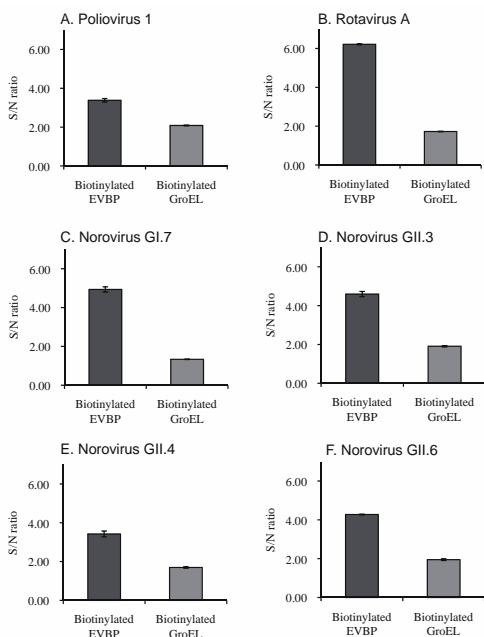


図2 ELISAによるEVBPのウイルス吸着能評価

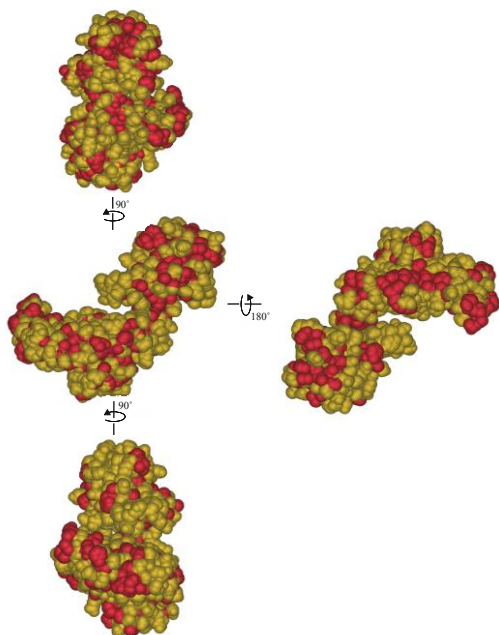


図3 EVBPの三次元構造
疎水性アミノ酸は赤で示した

スに対して吸着能力を有することが ELISA により示され、EVBP として利用可能であることが確認された (図2)。EVBP は様々なタンパク質を結合することが可能なシャペロンタンパク質である GroEL 由来であることから、分子全体に渡って疎水性アミノ酸が分布しており (図3)、これらの疎水性アミノ酸による疎水性結合がウイルス吸着の主な原動力であると考えられた。

EVBP に関する以上の成果は英科学誌 BMC Biotechnology (Open access) に掲載され

たが、編集者からプレスリリースが出され (<http://www.biomedcentral.com/presscenter/pressreleases/20111216b>), 2011 年 12 月 25 日から 2012 年 1 月 24 日までの論文アクセス数が第 1 位となった他、毎日新聞 1 月 5 日付け朝刊に掲載されるなど、研究成果の一般に向けた公表が積極的に行われている。

(2) VBP 固定化カラムによる水中病原ウイルス濃縮・検出手法の確立

ガラスビーズへの VBP 固定化法を確立した。また、カゼインをブロッキング剤として用いることで、VBP の活性を損なわずガラスビーズへの非特異的吸着が抑制できることが明らかとなった。

(3) EVE 法による固形試料からのウイルス回収技術の開発

カキの中腸腺から効率的にウイルス粒子を回収する手法として、リパーゼを用いた EVE 法を開発した。本手法は酵素を用いない手法と比べて約 80 倍ウイルス回収率が高く、実試料を用いた比較評価により本手法が既存の手法より格段に高効率であることを実証した。また、リパーゼは流入下水をポリエチレングリコール (PEG) で凝集させた沈査からの誘出にも効果的であることを発見し、下水からの高効率なウイルス誘出技術を開発した (PEG-EVE 法)。

また、胃腸炎ウイルスの環境中動態に大きく関わっていることが推定されていた河川及び感潮域の底泥についても、腸管系ウイルス回収手法の開発を行った。この場合、底泥の主要な構成成分は無機物質であることから、酵素を用いない手法を構築した。その結果、底泥中のウイルス粒子を EDTA 入りの SDS により破壊し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールによりウイルス RNA を抽出し、イソプロパノールで RNA を濃縮後、磁気ビーズにより精製する手法が最も回収効率が高いことを見出した。

(4) ウイルス遺伝子検出・同定技術の開発

感染力を持つウイルスの遺伝子のみを検出する技術として、エチジウムモノアザイドを用いた手法 (EMA-PCR 法) を開発した。本手法は外殻タンパクが損傷しているウイルスの遺伝子増幅を EMA により抑止する手法である。実証試験として熱処理および塩素処理によるウイルス不活化試験に EMA-PCR 法を適用し、本手法の有用性を確認した。ポリオウイルスおよびアデノウイルスを対象とし、EMA-PCR を用いてウイルスの遺伝子を定量した結果、中圧紫外線 300mJ/cm²以上の不活化において、ウイルス外套タンパクの損傷が見られた。様々な光学フィルタを合わせ、異なる波長を持つ光によりウイルスの損傷を調べ、230-240nm の光がカプシドの損傷に効果があることを突き止めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

- 1) Imai, T., D. Sano, T. Miura, S. Okabe, K. Wada, Y. Masago and T. Omura. Adsorption characteristics of an enteric virus-binding protein to norovirus, rotavirus and poliovirus. *BMC Biotechnology*, 11, 123, 2011, 査読有.
- 2) Miura, T., Y. Masago, D. Sano and T. Omura. Development of an effective method of viral genomic RNA recovery from environmental silty sediments for quantitative molecular detection. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 3975-3981, 2011, 査読有.
- 3) Sano, D., U. Perez, S. Guix, R. M. Pinto, T. Miura, S. Okabe and A. Bosch. Quantification and genotyping of human sapovirus in the Llobregat River catchment, Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1111-1114, 2011, 査読有.
- 4) Sano, D., R. M. Pintó, T. Omura and A. Bosch. Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environmental Science and Technology*, 44(2), 808-812, 2010, 査読有.
- 5) Sano, D., K. Wada, T. Imai, Y. Masago and T. Omura. Norovirus-binding proteins recovered from activated sludge microorganisms with an affinity to a noroviral capsid peptide. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 1923-1928, 2010, 査読有.
- 6) Ueki, Y., M. Shoji, Y. Okimura, Y. Miyota, Y. Masago, T. Oka, K. Katayama, N. Takeda, M. Noda, T. Miura, D. Sano and T. Omura. Detection of sapovirus in oysters. *Microbiology and Immunology*, 54, 483-486, 2010, 査読有.
- 7) Kim, K., H. Katayama, M. Kitajima, Y. Tohya and S. Ohgaki. Development of a real-time RT-PCR assay combined with ethidium monoazide treatment for RNA viruses and its application to detect viral RNA after heat exposure. *Water Science and Technology*, 63(3), 502-507, 2010, 査読有.
- 8) Kitajima, M, Y. Tohya, K. Matsubara, E. Haramoto, E. Utagawa and H. Katayama. Chlorine inactivation of human norovirus, murine norovirus and poliovirus in drinking water. *Letters in Applied Microbiology*, 51(1), 119-121, 2010, 査読有.
- 9) 村田有紗, 真砂佳史, 三浦尚之, 今井崇博, 大村達夫. Enzymatic Virus Elution 法を用いた流入下水からのウイルス検出技術の開発. 環境工学研究論文集, 46, 197-203, 2009, 査読有.
- 10) 佐野大輔, R.M. Pintó, 大村達夫, A. Bosch. 培養できない腸管系ウイルス不活化評価を目的とした外殻タンパク質酸化傷害検出手法の開発. 環境工学研究論文集, 46, 423-428, 2009, 査読有.
- 11) 今井崇博, 佐野大輔, 真砂佳史, 大村達夫. 水環境及び感染性胃腸炎患者から得られたノロウイルスカプシドタンパク質遺伝子の多様性及びアミノ酸配列変異の解析. 環境工学研究論文集, 45, 355-360, 2008, 査読有.
- 12) 奥村千恵, 真砂佳史, 佐野大輔, 植木洋, 大村達夫. Enzymatic Virus Elution 法によるカキ中腸腺からのウイルス誘出技術の開発. 環境工学研究論文集, 45, 179-186, 2008, 査読有.
- 13) Bosch, A., S. Guix, D. Sano and R. M. Pintó. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 295-301, 2008, 査読有.
- 14) Ueki, Y., M. Shoji, A. Suto, T. Tanabe, Y. Okimura, Y. Kikuchi, N. Saito, D. Sano, and T. Omura. Persistence of Caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5698-5701, 2007, 査読有.
- 15) 和田圭史, 佐野大輔, 今井崇博, 大村達夫. 活性汚泥細菌から分離されたノロウイルス吸着タンパク質 (Norovirus-Binding Proteins: NoVBPs) の特性評価. 水環境学会誌, 30(12), 731-736, 2007, 査読有.
- 16) Hansman, G.S., T. Oka, R. Okamoto, T. Nishida, M. Noda, D. Sano, Y. Ueki, T. Imai, T. Omura, O. Nishio, H. Kimura and N. Takeda. Detection of human sapovirus in clams, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 620-622, 2007, 査読有.
- 17) Hansman, G.S., D. Sano, Y. Ueki, T. Imai, T. Oka, K. Katayama, N. Takeda and T. Omura. Sapovirus in water, Japan. *Emerging Infectious Diseases*. 13, 113-135, 2007, 査読有.

[学会発表] (計 37 件)

- 1) Ueki, Y., Y. Takahashi, M. Abe, Y. Sato, Y. Okimura, Y. Masago and T. Omura. Oysters accumulating noroviruses as a tool for disease surveillance system. 16th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Sep. 18-23, 2011, Rotorua, New Zealand.
- 2) Imai, T., D. Sano, T. Miura, S. Okabe, Y. Masago and T. Omura. Virus binding-protein with an affinity to multiple genotypes of human norovirus. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sep.

- 6-16, 2011, Sapporo, Japan.
- 3) Sano, D., A. Suenaga, T. Nakagomi, O. Nakagomi and S. Okabe. Human enteric bacteria that capture norovirus particles with a specific interaction through histo-blood group antigen-like moiety. The 2nd COST 929 Symposium, Oct. 7-9, 2010, Istanbul, Turkey.
 - 4) Sano, D., K. Tojo, T. Nakagomi, O. Nakagomi, R.M. Pintó, A. Bosch and S. Okabe. Accumulation of oxidative damages on rotavirus capsid protein and its relationship with infectivity. The 2nd COST 929 Symposium, Oct. 7-9, 2010, Istanbul, Turkey.
 - 5) Sano, D., *Norovirus*-binding bacteria: significance in the environmental dissemination of gastroenteritis viruses. The 44th Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, June 28-30, 2010, Sapporo, Japan.
 - 6) Masago, Y., Y. Ueki and T. Omura. Health risk evaluation of *Norovirus* via oysters for raw consumption. 6th Netherlands-Japan Workshop on Water Technology, Oct. 15, 2009, Kyoto, Japan.
 - 7) Masago, Y., C. Okumura, T. Miura, Y. Ueki, A. Suzuki, M. Saito, L. T. Sombrero, S. P. Lupisan, H. Oshitani, R. M. Olveda and T. Omura. Possible seasonality in prevalence of viral gastroenteritis in the Metro-Manila, the Philippines. International Joint Forum on Infectious Diseases, Sep. 16, 2009, Bangkok, Thailand.
 - 8) Imai, T., D. Sano, Y. Ueki, Y. Masago and T. Omura. Genetic diversity and evolution in amino acid sequences of norovirus genogroup II strains in environmental and clinical samples. The 15th Symposium on Health-Related Water Microbiology, May 31-June 5, 2009, Naxos, Greece.
 - 9) Sano, D., R.M. Pintó, T. Omura and A. Bosch. Detection of oxidative damages on capsid proteins of norovirus: a new approach to evaluate the infectivity of non-culturable virus. The 15th Symposium on Health-Related Water Microbiology, May 31-June 5, 2009, Naxos, Greece.
 - 10) Ueki, Y., H. Uemura, Y. Okimura, Y. Masago, T. Miura, T. Omura and K. Miyota. Prevalence and genotypes of *Sapovirus* in wastewater, oysters and gastroenteritis patients in Japan. 15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, May 31-June 5, 2009, Naxos, Greece.
 - 11) Masago, Y., C. Okumura, D. Sano, Y. Ueki and T. Omura. New detection method for enteric viruses in digestive diverticulum of pacific oyster, *Crassostrea gigas* utilizing enzymes for virus elution. 15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, May 31-June 5, 2009, Naxos, Greece.
 - 12) Kim, K., H. Katayama, M. Kitajima, Y. Tohya and S. Ohgaki. Development of ethidium monoazide (EMA)-RT-PCR for selective detection of enteric viruses, 15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, May 31-June 5, 2009, Naxos, Greece.
 - 13) Masago, Y., C. Okumura, Y. Ueki, A. Suzuki, L. Sombrero, S. Lupisan, H. Oshitani, R. Olveda and T. Omura. Enteric infectious diseases in the Metro-Manila, the Philippines estimated from enteric viruses in water and bivalve shellfish. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections, Dec. 15-16, 2008, Sapporo, Japan.
 - 14) Imai, T., D. Sano, Y. Ueki, K. Fukushi and T. Omura. Genetically diverse strains of norovirus genogroup II in water environment. The 2nd International Water Association Asia-Pacific Regional Group Conference & Exhibition. Oct. 28 - Nov. 1, 2007, Perth, Australia.
 - 15) Sano, D., K. Wada, K. Fukushi and T. Omura. Affinity isolation of Norovirus-binding proteins from activated sludge microorganisms using a surface-exposed part of viral capsid protein. 14th International symposium on health-related water microbiology. September 10, 2007, Tokyo, Japan.
- [図書] (計 1 件)
- 1) Sano, D. and T. Omura. Virus-binding proteins in water environments: natural ligands for human viruses, pp. 257-272. In George V. Kurladze (ed.), Environmental Microbiology Research Trends. 2008. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, N.Y.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
大村 達夫 (OMURA TATSUO)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号 : 30111248
 - (2) 研究分担者
片山 浩之 (KATAYAMA HIROYUKI)
東京大学・大学院工学系研究科・准教授
研究者番号 : 00302779
佐野 大輔 (SANO DAISUKE)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：80550368

渡部 徹 (WATANABE TORU)
山形大学・農学部・准教授

研究者番号：10302192

真砂 佳史 (MASAGO YOSHIFUMI)
東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：50507895

(3) 連携研究者

植木 洋 (UEKI YO)
宮城県保健環境センター・微生物部・
副主任研究員

研究者番号：60501062