

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） Preparation, detection and identification of enteric viruses in environmental samples using virus-binding proteins.

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

研究代表者の専門分野：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. 研究計画の概要

本研究では、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）を利用または応用し、全く新しい病原ウイルス濃縮・検出・同定技術を開発する。具体的には様々な固形物に付着している病原ウイルスを EVE 法により効率的に回収し、さらに VBP をウイルス吸着材及び検出プローブとして用いてウイルスを濃縮・検出した上でウイルス同定を行う包括的技術の確立を目指す。本研究は以下の4つの項目からなる。

(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 の分離を目指す。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

既にクロウニングが行われているポリオウイルス吸着タンパク質（Poliovirus-Binding Protein: PVBP）を用いることで、VBP 固定化カラムを用いた水中病原ウイルス濃縮・検出技術の確立を先行的に行う。本申請研究で開発する技術は、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 horseradish

peroxidase (HRP) で修飾した VBP (VBP プローブ) を用いて固定化 VBP に捕捉されたウイルスを検出するものである。

(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

水及び固形試料から回収、濃縮されたウイルス遺伝子を検出・同定する技術開発を行う。検出には、近年開発された LAMP 法などを適用し、高感度なウイルス検出・同定技術の確立を目指す。

#### 2. 研究の進捗状況

(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り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。

(2) VBP 固定化カラムによる水中病原ウイルス

### 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立証した。

また、リパーゼは流入下水をポリエチレングリコール(PEG)で凝集させた沈渣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)。

### (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。

### 3. 現在までの達成度

#### ②おおむね順調に進展している。

(理由) (1)(2)については、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が存在することを確認している。また、ガラスビーズへのVBP固定化法、及びVBP固定化ガラスビーズへの非特異的吸着を抑制するためのブロッキング手法を確立している。また(3)(4)については、現時点で既に酵素を用いたカキ中腸腺(EVE法)や下水(PEG-EVE法)からのウイルス回収技術、およびEMA-PCR法による感染力を持ったウイルスの検出技術の開発に成功している。

これらはVBPを用いた環境中ウイルス濃縮・検出・同定技術開発に繋がる重要な成果であることから、本研究は順調に進展していると判断した。

### 4. 今後の研究の推進方策

幅広い種類のウイルスを吸着するタンパク質を分離することの重要性を確認したので、今後は活性汚泥由来の雑多なタンパク質からのEVBPの分離を行う。具体的には、ウイルス粒子を固定したアフィニティークロマトグラフィーゲルを用意し、活性汚泥から粗抽出したタンパク質を投入し、ゲルに吸着し

たタンパク質をEVBPとして回収する。

また、VBP固定化カラムによる水中病原ウイルス濃縮・検出手法の開発も並行して推進させる。担体への非特異的吸着の抑制方法は既に確立したので、VBP固定化カラムにウイルス粒子を投入し、捕捉されたウイルス粒子を定量し、その回収率等を評価する。

(3)(4)に関しては、開発した手法を実試料に対して適用し、各手法の有用性を評価すると共に、環境試料からの感染力を持ったウイルスの検出・定量に用いることで、これまでの技術では不可能であった環境中に存在するウイルスの活性を評価することを目指す。

### 5. 代表的な研究成果

(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10件)

1) 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, 査読あり。

2) 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, 査読あり。

[学会発表] (計25件)

1) 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, Naxos, Greece, June 3-4, 2009.

2) 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, Sep. 10, 2007, Tokyo, Japan.

[図書] (計1件)

1) Sano, D. and T. Omura. Virus-binding proteins in the water environments: natural ligands for human viruses. *Environmental Microbiology Research Trends* (G.V. Kurladze ed.), 2007, 257-272.