

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630242

研究課題名(和文) 精密質量分析を応用した新手法による水系感染症ウイルスの消毒不活化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the waterborne virus inactivation mechanism during drinking water disinfection processes by using a novel method based on mass spectrometry

研究代表者

白崎 伸隆 (SHIRASAKI, NOBUTAKA)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60604692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、精密質量分析を応用し、消毒処理におけるウイルス構造タンパク質の変性をアミノ酸レベルで捉えることにより、水系感染症ウイルスの不活化メカニズムを解明することを試みた。その結果、紫外線照射-過酸化水素処理において生じたヒドロキシルラジカルによるウイルス構造タンパク質の酸化が確認されたと共に、精密質量分析を応用することにより、酸化されたウイルス構造タンパク質由来ペプチドの箇所を特定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to elucidate the waterborne virus inactivation mechanism during drinking water disinfection processes by using a novel method applying mass spectrometry. As a result, chemical oxidation in the virus capsid protein by OH radical was observed after UV254-H2O2 process and oxidized peptides of virus capsid protein were successfully identified by using the novel method based on mass spectrometry.

研究分野：水環境工学，水処理工学

キーワード：水系感染症 水系感染症ウイルス 精密質量分析 タンパク質 ペプチド 消毒処理 不活化メカニズム

## 1. 研究開始当初の背景

PCR法の発展に伴い、水環境における病原微生物汚染の実態調査が広く行われ、水道水源と成り得る水環境中に水系感染症を引き起こす病原性ウイルスが存在していることは周知の事実となっている。従って、ウイルスによる水系感染症を制御していくためには、浄水処理における水系感染症ウイルスの処理性を詳細に把握した上で、効果的且つ効率的な処理を施すことが重要となる。浄水処理、特に塩素処理に代表される消毒処理における水系感染症ウイルスの処理性評価はこれまでに数多く行われており、ポリオウイルス等の培養可能なウイルスについては、感染力価の評価が可能なブラック形成法が確立されているため、消毒処理過程におけるウイルスの感染性の消長が詳細に把握されているものの、不活化メカニズムの詳細については未だ明らかになっていない。また、ノロウイルス等の培養不可能なウイルスに関しては、人体実験以外に感染力価を評価する手法が確立されていないため、感染性の消長すら未だ把握されていないのが現状である。これらのことから、消毒処理過程におけるウイルスの感染性の消長及び不活化メカニズムについて、培養法に頼ることなく詳細に把握可能な新規の評価手法の確立が強く求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では、精密質量分析を応用することにより、ウイルスの感染性を決定づける構造タンパク質の変性をアミノ酸レベルで捉える全く新しい手法を開発し、培養可能なウイルスのみならず、培養不可能なウイルスの消毒処理における不活化メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用したウイルス

本研究では、水系感染症ウイルスの代替として広く用いられている大腸菌ファージMS2及び代表的な水系感染症ウイルスであるアデノウイルス(AdV, Dugan株, 40型)を実験に使用した。MS2, AdVは、それぞれ宿主大腸菌, A549細胞を用いて培養し、ブラック形成法にて濃度を定量した。なお、AdVの培養においては、DMEM培地中のウシ胎仔血清濃度<sup>37</sup>、5%CO<sub>2</sub>濃度条件下における培養期間、培養期間中の培地添加頻度を検討することにより、培養条件の最適化を図った。また、AdV濃度の定量においては、上記の条件に加え、染色液の種類及び濃度、染色タイミングを検討することにより、A549細胞を用いたブラック形成法を構築した。加えて、培養不可能なノロウイルスについては、遺伝子組換えバキュロウイルスとカイコ細胞を用いたタンパク質発現法によりノロウイルス(Chiba virus株, GI.4型)のウイルス様粒子(Virus-Like Particles: VLPs)を作製し、実

験に使用した。

### (2) 消毒処理

本研究では、紫外線照射処理、紫外線照射-過酸化水素処理におけるウイルスの処理性を評価した。精製したMS2, AdV,あるいはVLPsを10<sup>11-12</sup> PFU/mL, 10<sup>6</sup> PFU/mL,あるいは10<sup>12</sup> VLPs/mLになるように添加したPBSあるいはMilli-Q水を実験原水とした。ここに、波長254 nmの紫外線を照射し、経時的に処理水を採水した。また、過酸化水素(10 mg/L)を添加した実験原水についても同様に紫外線を照射し、経時的に処理水を採水した。なお、代表的な消毒処理である塩素処理についても実験を実施したが、試料中の残留塩素の中和に使用したチオ硫酸ナトリウムにより、質量分析の際のタンパク質のイオン化が著しく阻害されたことから、本研究では、チオ硫酸ナトリウムの添加が不要な紫外線照射処理及び紫外線照射-過酸化水素処理を研究対象とした。

### (3) タンパク質の質量分析

シナピン酸を10 mg/mLになるように添加した0.1%トリフルオロ酢酸含有50%アセトニトリル溶液(v/v)をマトリックス溶液とし、実験原水あるいは処理水とマトリックス溶液を1:1(v/v)の割合で混合した後、混合試料をステンレス製のサンプルプレート上に滴下し、自然乾燥させた。これらの試料中のウイルス構造タンパク質の質量を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF-MS, リニアモード)にて分析した。

### (4) ペプチドの質量分析

実験原水あるいは処理水を95℃にて20分間インキュベートすることにより、試料中のウイルス構造タンパク質を熱変性させた。ここに、TEバッファー(50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>)にて希釈したトリプシンを0.5 µg/mLになるように添加し、37℃にて12時間インキュベートすることにより、ウイルス構造タンパク質をペプチド化した。その後、CHCAを3 mg/mLになるように添加した0.1%トリフルオロ酢酸含有50%アセトニトリル溶液(v/v)をマトリックス溶液とし、実験原水あるいは処理水とマトリックス溶液を1:1(v/v)の割合で混合した後、混合試料をステンレス製のサンプルプレート上に滴下し、自然乾燥させた。これらの試料中のウイルス構造タンパク質由来ペプチドの質量を、MALDI-TOF-MS(リフレクターモード)にて分析した。

## 4. 研究成果

### (1) 消毒処理におけるウイルスの不活化

紫外線照射処理におけるMS2の不活化率を評価したところ、照射時間2分で約5 log、照射時間5分で8 log以上の不活化率が得ら

れた。一方、紫外線照射-過酸化水素処理においては、照射時間 2 分で 8 log 程度の不活化率が達成された。従って、紫外線照射-過酸化水素処理においては、紫外線によるウイルス遺伝子の損傷のみならず、処理過程で生成したヒドロキシルラジカルによるウイルス構造タンパク質の酸化により、短い照射時間で高い MS2 の不活化率が得られた可能性が示唆された。

## (2) 消毒処理によるタンパク質の変性

MS2 の粒子は同一の 180 個のカプシドタンパク質により構成されていることから、紫外線照射処理前後のカプシドタンパク質の質量分析を MALDI-TOF-MS にて実施したところ、照射時間の経過に伴うカプシドタンパク質の酸化が確認された(図 1)。従って、紫外線照射処理においては、ウイルス遺伝子の損傷のみならず、ウイルス構造タンパク質の酸化も不活化に寄与している可能性が示唆された。一方、AdV においては、MALDI-TOF-MS による分析により、AdV の粒子を構成するカプシドタンパク質 (IIIa, VI, IX) 及びコアタンパク質 (V, VII) を検出することには成功したものの、紫外線照射処理前後におけるこれらのタンパク質の質量変化は確認されなかった。従って、上述したタンパク質以外のカプシドタンパク質 (II, III, IV, VIII) 及びコアタンパク質 (X, TP) についても、MALDI-TOF-MS による分析条件を確立した上で、処理前後の質量変化の有無について検討する必要があると考えられる。

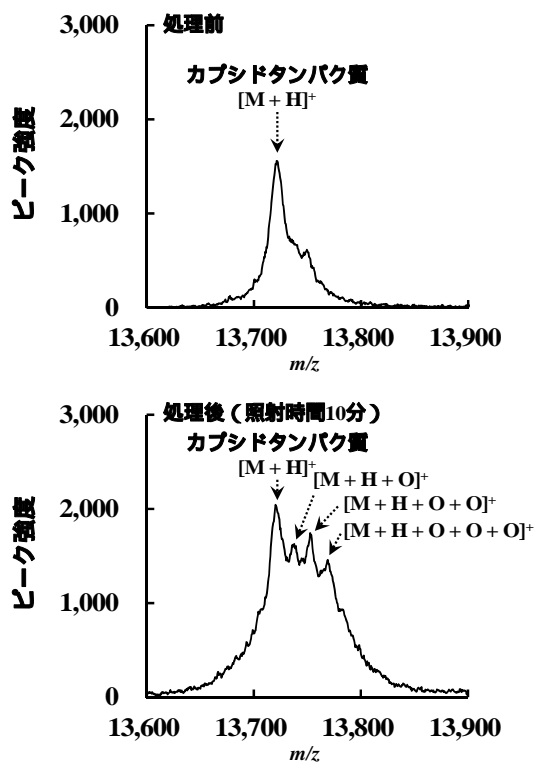


図1. 紫外線照射処理前後のMS2のカプシドタンパク質の質量変化

## (3) 消毒処理によるペプチドの変性

紫外線照射処理前後において、MS2 のカプシドタンパク質の酸化が確認されたことから、カプシドタンパク質をペプチド化することにより、カプシドタンパク質のいずれの箇所が酸化されたかを特定することを試みた。カプシドタンパク質を消化することにより得られたペプチドの質量分析を MALDI-TOF-MS にて実施したところ、複数のペプチドを検出することには成功したものの、紫外線照射処理前後におけるペプチドの質量変化は確認されなかった。一方、紫外線照射-過酸化水素処理においては、処理過程で生成したヒドロキシルラジカルによるカプシドタンパク質の酸化が確認され、分子量 1753.96 のペプチド (アミノ酸配列 VATQTVGGVELPVAAWR) の箇所が酸化されたことが明らかとなった。ノロウイルスの VLPs においても、カプシドタンパク質を消化することにより得られたペプチドの質量分析を MALDI-TOF-MS にて実施したところ、複数のペプチドを検出することには成功したものの、紫外線照射処理前後におけるペプチドの質量変化は確認されなかった。一方、紫外線照射-過酸化水素処理においては、カプシドタンパク質の酸化が確認され、分子量 1702.80 のペプチド (アミノ酸配列 NVLYHNNDTQPTMR) 及び分子量 2670.29 のペプチド (アミノ酸配列 IPNPIEGMSLSPDQTQNVQFQNGR) の箇所が酸化されたことが明らかとなった。以上の結果から、MALDI-TOF-MS による質量分析を応用することにより、消毒処理過程におけるウイルス構造タンパク質の変性箇所の特が可能であることが示され、ウイルスの不活化メカニズムの解明に繋がる重要な知見が得られることが明らかとなった。

## 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 0 件)

[学会発表](計 6 件)

村井一真, 白崎伸隆, 松井佳彦, 松下拓. 消毒耐性ウイルスの膜ろ過処理性評価および代替指標候補ウイルスとの処理性比較. 第 50 回日本水環境学会年会, 2016 年 3 月 16 日, 徳島県徳島市.

山下玲菜, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. トウガラシ微斑ウイルスは水系感染症ウイルスの浄水処理性指標となるのか? : 凝集沈澱・砂ろ過における処理性比較. 第 50 回日本水環境学会年会, 2016 年 3 月 16 日, 徳島県徳島市.

Marubayashi, T., Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Oshiba, A. Development of novel high-basicity polyaluminum chloride for effective virus removal. IWA

World Water Congress and Exhibition, 23  
September 2014, Lisbon, Portugal.

白崎伸隆, 丸林拓也, 村井一真, 松下拓,  
松井佳彦. Contaminant Candidate List に掲  
載された水系感染症ウイルスの凝集処理  
性評価. 第 51 回環境工学研究フォーラム,  
2014 年 12 月 21 日, 山梨県甲府市.

白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. ウイルス  
による水系感染症の制御に向けた浄水処  
理技術の高度・高効率化. 第 22 回衛生工  
学シンポジウム, 2014 年 11 月 21 日, 北海  
道札幌市.

村井一真, 白崎伸隆, 松井佳彦, 松下拓.  
腸管アデノウイルスの凝集処理性. 平成  
26 年度全国会議 (水道研究発表会), 2014  
年 10 月 31 日, 愛知県名古屋市.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白崎 伸隆 (SHIRASAKI NOBUTAKA)

北海道大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 60604692