

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26709037

研究課題名(和文) プロテオーム解析を中心とした化学酸化処理によるウイルス不活化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Possible mechanism of virus inactivation by disinfections based on proteome analysis

研究代表者

浅田 安廣 (Yasuhiro, Asada)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60610524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,700,000円

研究成果の概要(和文)：水道水の微生物学的安全性を確保するためにはウイルス不活化に対する消毒処理の効果を把握することは重要である。そこで本研究では、各消毒処理(塩素処理、オゾン処理、紫外線単独処理、促進酸化処理(ラジカルによる不活化効果))における水中ウイルスの不活化機構の推定を試みた。その結果、ヒドロキシルラジカル自体がウイルス不活化に対して効果があることが示された。また、オゾン処理はウイルスタンパク質、遺伝子の損傷効果として最も効果が高いことを示した。そして、各化学酸化処理でウイルスタンパク質の損傷部位が異なり、消毒剤によってウイルスタンパク質への不活化効果がメカニズムの観点から異なる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study are to compare and to evaluate inactivation mechanisms by disinfection processes (Chlorination, Ozonation, UV radiation, Advanced Oxidation Process) based on gene analysis and proteome analysis. First, qPCR, PMA-qPCR, ICC-qPCR techniques were employed to determine the inactivation effect. Hydroxyl radicals affected on virus inactivation. And Ozonation is more effective on virus inactivation than other disinfection processes. Also, the obtained results of proteome analysis indicated that damages of proteins are different among Hydroxyl radicals, Chlorination, UV radiation, and ozonation.

研究分野：上水道工学

キーワード：上水道 健康関連微生物 消毒処理 ウイルス不活化 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

飲料水曝露後の急性影響として病原微生物による水系感染が挙げられ、上水道が整備されている現代においても水系感染事例が確認されている。このような水系感染症の原因病原微生物としては、病原大腸菌、カンピロバクターが主であるが、近年ではノロウイルスなどのウイルスによる水系感染も確認されつつある。わが国の水環境中にも様々な病原ウイルスが検出されており、水道原水中に病原ウイルスが存在する可能性があると考えておく必要がある。しかし、飲料水の安全性確保においてウイルスは細菌類と異なり、塩素消毒等の効果には限定的なウイルスも存在する。そのため、水道水の微生物学的安全性を確保するためには、ウイルスの不活化を塩素処理のみに頼るのではなく、消毒処理の組み合わせを考慮するマルチバリアの考え方が必要となる。

市民のニーズに答え、安全で快適な飲料水を提供するために、現在、浄水処理では様々な化学酸化処理(塩素処理, オゾン処理, 促進酸化処理など)の検討, 導入が実施されてきている。マルチバリアの考え方を導入する場合, このような様々な化学酸化処理が病原微生物の不活化にどの程度効果を及ぼすかを理解する必要がある。しかし, 各化学酸化処理による病原微生物の不活化メカニズムはその効果から予測はされているものの, 詳細なメカニズムの解明にはまだ至っていない。

ウイルスは, その構造はタンパク質の外殻と DNA, あるいは RNA のみでシンプルな構造であり, 不活化メカニズムとしてもタンパク質損傷, 遺伝子損傷が考えられる。特にウイルス構造を構成するタンパク質は, 宿主への感染に対して重要な因子であることから, 化学酸化処理前後によるタンパク質の変化を把握することが不活化メカニズムを明確にする上で重要となる。そのためにはウイルスタンパク質のどの部位が損傷するかを具体的に把握していく必要があり, そのためにはタンパク質自体を解析する手法(プロテオーム解析手法)を検討していく必要がある。

2. 研究の目的

以上の状況を踏まえ, 本研究では様々な化学酸化処理として塩素処理, オゾン処理, 紫外線単独処理, 促進酸化処理(ラジカルによる不活化)に着目し, 各処理によるウイルスのタンパク質, DNA, RNA の損傷を評価し, そのウイルス不活化メカニズムについて推定することを目的とする。そして, 得られた情報を統合しウイルス不活化に対して有効な処理の組み合わせを提示することを本研究の最終目標とする。

3. 研究の方法

本研究では質量分析によるタンパク質解析を行う。そのため, 十分量のウイルスタンパク質の精製が必要となる。この点を考慮し,

DNA ウイルスとして選定したアデノウイルス F 群(AdVF)については, 販売されているウイルスタンパク質を用いてウイルス不活化メカニズム推定に用いた。RNA ウイルスとしては高濃度の病原ウイルスが得ることが困難であったため, 指標ウイルスである MS2 ファージをウイルス不活化メカニズム推定に用いた。

また本研究ではラジカルの不活化効果の有無を確認するために, 紫外線—過酸化水素処理を適用した。

詳細な実験方法は以下の通りである。

(1) 各種ウイルスの高濃度試料精製について

MS2 ファージの高濃度精製試料の取得方法は以下の通りである。大腸菌(NBRC3301)と LB 寒天培地を用いて, 培養法によりバクテリオファージ MS2(ATCC15597-B1)を増殖させ, 回収後に $10,000 \times g$, 15 分間の遠心分離と $0.2 \mu\text{m}$ フィルターでろ過を行い, 高濃度の MS2 ファージ原液を得た。得られたファージ原液に対してポリエチレングリコール(PEG)沈殿法を用いて原液に含まれる夾雑物質を除去した後, さらに塩化セシウム溶液(密度 1.41 g/mL)と超遠心分離機(Optima MAX-TL, MLA-55 ローター(Beckman Coulter))を用いた等密度遠心法によりファージ溶液を精製した。このファージ精製液を PBS(pH: 7.2) 10 mL とともに Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units 10 kDa 分画フィルターで濃縮した。同様の操作を再度行うことで塩化セシウムの影響を軽減させた後, ファージの力価が約 10^{11} PFU/mL となるように PBS でメスアップした。

AdVF の高濃度精製試料の取得方法は以下の通りである。培養した A549 細胞が 90% コンフルエント状態に達したら Human Adenovirus 40(VR-931)を $10 \mu\text{L}$ 添加し, $5\% \text{CO}_2$ インキュベータで 37°C ・10 日間培養した。細胞が破壊されてフラスコ底面から剥離したら, -80°C の冷凍庫と 37°C インキュベータを用いて 3 回凍結融解を繰り返した。細胞懸濁液を全量 50 mL の遠沈管(IWAKI)に移して, 2500 rpm で 15 分間遠心分離して AdVF 原液を得た。得られた AdVF 原液に対してポリエチレングリコール(PEG)沈殿法を用いて原液に含まれる夾雑物質を除去した後, $0.22 \mu\text{m}$ フィルターでろ過したものを不活化試験に供した。なお, タンパク質解析では 0.5 mM PBS(pH:7.2) 10 mL に対して Human Adenovirus 40 full length protein(Abcom)を $20 \mu\text{L}$ 添加したプロテイン懸濁液を用いた。

(2) 各処理による不活化試験方法

オゾン処理には, 各ウイルス精製液を PBS(pH:7.2)で更に 10 倍希釈したものを供した。次に, 不活化試験用ウイルス懸濁液を作製した。水酸化ナトリウム溶液を過剰に加えた 1 L の超純水に pCBA(*p*-クロロ安息香酸)を 150 mg 溶かしたものを pCBA ストック溶液とし, 1 L の超純水に pCBA ストック溶液

を 1 mL 加え pH 7.2 に調製した。この溶媒をオートクレーブ滅菌した後、溶媒 100 mL に対してウイルス精製液 1 mL を添加し、紫外線、過酸化水素、促進酸化処理に供した。以下、各処理方法について述べる。

オゾン処理では、まず超純水を入れたリアクターにオゾンガスを連続的に供給して作製したオゾン溶液を 10 mL シリンジに採取し、オゾン水として不活化試験に供した。オゾン水を採取した直後にシリンジを三方コックに取り付け、2 分後にウイルス希釈液と反応させた。三方コックの一つ目のコックにはオゾン水が入ったシリンジ、二つ目のコックにはウイルス希釈液を 2 mL 入れたシリンジ、三つ目のコックには溶存オゾン除去のための 1% (w/v) チオ硫酸ナトリウムが 1 mL 入っているシリンジをそれぞれ取り付けた。ウイルス希釈液とオゾン水の反応の際には、まず流向をオゾン水-ウイルス懸濁液にしてオゾン水をウイルス溶液方向に押し出し、軽く振り混ぜて混合させた。時間毎にコックを回転させて流向をチオ硫酸ナトリウム溶液-ウイルス懸濁液とし、チオ硫酸ナトリウム溶液を注入して溶存オゾン除去した。得られた試料を遺伝子損傷解析、膜損傷解析、力価測定ならびにタンパク質解析に供した。

紫外線処理では、まずアルミホイルで覆った滅菌シャーレ (アズワン) に作製した不活化試験用ウイルス懸濁液を 20 mL ずつ入れ、各照射時間につき一枚のウイルス懸濁液入りシャーレを作成した。その後、液面から約 20 cm の高さで Handheld UV Lamp, 6 W, UVG-54, 254 nm, 100 V ランプ (UVP) を設置し、UV 照射を行った。得られた試料を遺伝子損傷解析、膜損傷解析、力価測定ならびにタンパク質解析に供した。

過酸化水素処理では、まず実験前に過酸化水素溶液原液の過酸化水素濃度を測定し、超純水を用いて希釈した後、不活化試験に供した。あらかじめ乾熱滅菌しておいたビーカーにウイルス懸濁液 100 mL を入れ氷上で保温しながら攪拌した。数秒攪拌した時間を反応時間 $t = 0$ とし、30 分後にあらかじめ 3 g/L チオ硫酸ナトリウム・2 g/L 硫酸マグネシウム溶液を 20 mL 分注しておいた 50 mL チューブに試料を 20 mL 採取した。得られた試料を遺伝子損傷解析、膜損傷解析、力価測定ならびにタンパク質解析に供した。

促進酸化 (UV/H₂O₂) 処理では、まず前述した過酸化水素・ウイルス混合液を紫外線処理と同様の操作を行い、紫外線照射を行った。そして上述したように過酸化水素を除去し、得られた試料を遺伝子損傷解析、膜損傷解析、力価測定ならびにタンパク質解析に供した。

塩素処理では、まず 30 mL のファージ懸濁液に対して、次亜塩素ナトリウム溶液を添加した 1 分後に、10 mL 不活化処理後の試料を採取し、DPD 法により残留塩素の測定を行った。残留塩素測定の試料を採取すると同時

に、3% (w/v) チオ硫酸ナトリウム溶液を 1 mL 添加し残留塩素を除去した。不活化処理後の試料のうち 1 mL を遺伝子損傷解析、膜損傷解析、力価測定に供した。また、MS2 ファージに関しては残った試料をタンパク質解析に供した。

(3) 遺伝子損傷解析、膜損傷解析、力価測定方法

遺伝子損傷解析では Sybr Green を用いた定量 PCR により確認を行った。膜損傷解析では、PMA(propidium monoazide) を核酸抽出前に各試料に添加し、LED Crosslinker (タカラバイオ) で照射、反応後に遺伝子損傷解析と同様の操作を行い、膜損傷していないウイルス粒子を検出した。力価測定では、MS2 ファージは培養法によるプラーク計数、AdVF は A549 細胞を用いた ICC-qPCR 法により感染価の変化を計測した。

(4) プロテオーム解析を用いたタンパク質損傷解析方法

ここでは 2 次元電気泳動によるタンパク質解析と質量分析による全タンパク質解析を実施した。以下に実験方法を示す。

タンパク質解析用サンプルに対して 2-D Clean-up Kit (GE Healthcare) で電気泳動阻害物質の除去処理を行い、一次元電気泳動 (10 時間のゲル膨潤及び等電点電気泳動) に供した。泳動後のゲルはそれぞれジチオトレイトール (DTT) を含んだ平衡化溶液中で 20 分間振とうした後に、ヨードアセトアミドを含んだ平衡化液中で 20 分間振とうし、タンパク質を還元・アルキル化した。二次元目の電気泳動時は、作製したポリアクリルアミドゲルの上端に平衡化済みの Immobiline DryStrip と分子量マーカーを染み込ませたる紙を接触させた。その上からアガロース溶液を重層して封入し、Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) にセットして、二次元目の泳動を行った。固定化と蛍光染色を行った後、ゲルを Gel Doc XR+ Imager (Bio-rad) で解析し、泳動像を得た。

質量分析による方法では、まず質量分析用サンプルにトリフルオロエタノール変性剤及び DTT 溶液を加えて加熱しタンパク質の変性・還元を行った。続いて、ヨードアセトアミド溶液を加えて室温の暗所で 1 時間静置しタンパク質をアルキル化した後、DTT 溶液を加えて 1 時間静置し余分なヨードアセトアミドの分解を行った。超純水を加えて変性剤を希釈した後に、炭酸水素アンモニウム溶液を加えて pH を調整し、酵素量と基質量の比率が 1:50 となるようにトリプシンを加えて混合した。チューブを 37 °C インキュベータ内で 18 時間程度静置し、ウイルス全タンパク質のトリプシン消化を行った。消化後、TFA を加え pH を下げてトリプシン活性を停止させ、質量分析に供した。

4. 研究成果

まず紫外線処理による不活化効果について、不活化速度は従来の文献と同様の結果は得られた。またタンパク質損傷解析では一部の capsid タンパク質に対して損傷効果があることが確認された。紫外線処理の効果は遺伝子損傷が主であるが、一部のタンパク質に対しても損傷効果があることが本研究で明らかとなった。

続いて促進酸化処理によるラジカルの不活化効果についてまとめる。なお、本研究では本試験で十分なラジカル量が発生していることを確認している。また、本試験で用いた過酸化水素による不活化効果は本試験での不活化時間内ではその効果は無視できるものであったため、紫外線処理の不活化効果と促進酸化処理(UV/H₂O₂)による不活化効果を比較することで、ラジカルの不活化効果について推定した。その結果、MS2 ファージにおいては UV/H₂O₂ 処理と UV 処理の処理性が統計的にも異なることが明らかとなった(図1)ため、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルによる不活化効果が確認された。そして各処理法の対数不活化 log₁₀ 数から、 $\cdot\text{OH}$ による不活化速度を計算した結果、MS2 ファージを 1 log₁₀ 不活化するのに必要な $\cdot\text{OH}$ の Ct 値を計算したところ、 2.3×10^{-11} M \cdot s と算出された。

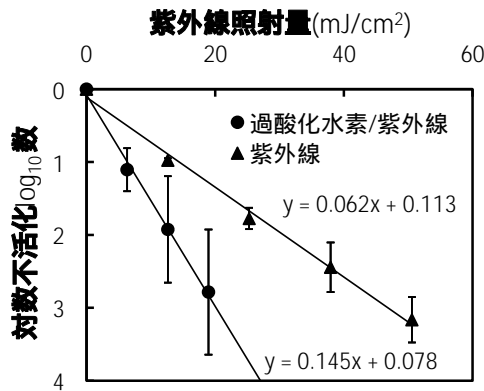


図1 UV 処理と UV/H₂O₂ の不活化効果の比較

$\cdot\text{OH}$ 自体の効果については MS2 ファージでは大きく確認できたものの、AdVF については MS2 ファージと比較して限定的である可能性を示した。しかし、タンパク質の損傷が両ウイルスともに確認できていることから、 $\cdot\text{OH}$ 自体はウイルスタンパク質損傷に影響していることがわかり、ウイルス不活化に $\cdot\text{OH}$ が寄与する可能性が指摘できた。

続いてオゾン処理の効果についてまとめる。オゾン処理においては PMA-qPCR(膜損傷解析) と qPCR(遺伝子損傷解析)の結果が連動しており、これはオゾンが外殻タンパク質を瞬時に酸化し、変性させるとすぐに核酸内に侵入して DNA を切断するなど、マルチ

ポイントでウイルスに作用するためだと考えられる。また、オゾン濃度が低い場合は capsid タンパク質のみに攻撃して不活化を起こすと考えられる。タンパク質解析では、同じ不活化 log₁₀ 数のサンプルにおいて、他の処理よりもタンパク質損傷度合いが大きいことが明らかとなり、オゾンによるウイルス不活化効果は高いと考えられた。

各種ウイルスの不活化結果から塩素処理は塩素がウイルスの外殻に作用してタンパク質を変性させ、内部に侵入してから初めて核酸を酸化させる可能性を指摘できる。また、タンパク質損傷解析の結果からは右側(塩基性側)にそれぞれ別のスポットが観察された。さらに異なる分子量の位置にもスポットが検出された。二次元電気泳動で同じスポットが別の等電点の位置で複数検出されるのは、リン酸や酢酸などの結合、ジスルフィド結合の切断による構造的変化など、タンパク質の翻訳後修飾によるものとされる。

最後に質量分析によるタンパク質損傷解析の結果を表2にまとめる。

表2 質量分析によるタンパク質損傷解析結果

a) MS2 ファージ

タンパク質	ペプチド(アミノ酸配列)	C10:0.05	C10:0.1	O:0.05	O:0.1
coat protein (カプシド)	VATQTVGGVLPVAAWR	x			
	SYLNMELTIPIFATNSDCELIVK	x	x	x	
	DGNPPIPSAIAANSQIY	x	x	x	
assembly protein (カプシド)	SPFSMVHTLDALALIR	x	x	x	

タンパク質	ペプチド(アミノ酸配列)	*UV	*H ₂ O ₂	*UV/H ₂ O ₂
coat protein (カプシド)	VATQTVGGVLPVAAWR	x		
	SYLNMELTIPIFATNSDCELIVK	x		
	DGNPPIPSAIAANSQIY		x	
assembly protein (カプシド)	SPFSMVHTLDALALIR	x		

*: スペクトル強度が10分の1未満に減少, : スペクトル強度が3分の1~10分の1に減少, x: 変化無し
*は2 log₁₀不活化試料

b) AdVF

タンパク質	ペプチド(アミノ酸配列)	*Cl	*O ₃	*UV	*H ₂ O ₂	*UV/H ₂ O ₂
hecon protein (カプシド)	NTELSVQLMDALGDR					
	VAVPSALDTVYVNGAR					
	FDSINLYANFFPMHNTASTLEAMLIR					
	VSMVFDSSVSWPGNDR					
pIIIa (カプシド)	TVDGEQYVNAQCENMTR					
	FSALLEAVPSR					
pVI (カプシド)	VLAIVNALVESK					
	ALGQDDTSSLEATNLFLLTNR					
pVII (カプシド)	VVDGLASGINGVVDIANKALQINQINOR					
	RRPDPLEETLVVESR					x
IX (カプシド)	DIPTPYMWSYQPMGLAGASQDYSSR					
	MNWLISAGPHMIGR					
pVII (コア)	NQLLEEQALITSPR					
	ROLNPPSWFAADVYQENPAPTIVLLPR					
pVII (コア)	GMAADRLGYNQLAASR					
	LEELSQLQSDMSAK					
pVII (コア)	TTVDDVIDSVVADQR			x	x	x
	YTRPVASTVDSVSVVANAR			x	x	x
pVII (コア)	QAAAIAIASMAQPR			x	x	x

: スペクトル強度が10分の1未満に減少, : スペクトル強度が3分の1~10分の1に減少, x: 変化無し
*は2 log₁₀不活化試料

より詳細にタンパク質部位の変化を確認できたことにより、各化学酸化処理に対する各ウイルスタンパク質への影響が異なることが示された。このように、タンパク質への影響を詳細に解明していくことで様々なウイルス種ごとに不活化効果の詳細を示すことができる可能性が指摘できた。また特に質量分析ベースの手法は、手順が少なく多数のサンプルを一斉分析することが可能であるため、消毒処理によるタンパク質の損傷が効率

良くデータベース化され、遺伝子解析等と組み合わせることで不活化機構推定の一助になり得るといえる。

最後に今まで得られた成果に基づいて浄水過程においてマルチバリアとして期待される浄水処理方法を検討した。結果としてオゾン処理がウイルスタンパク質、遺伝子の両方へ効果的にダメージを与えてウイルス不活化に大きく寄与することが明らかとなったことから、特に大規模浄水場でのマルチバリアとして有用性が高いと判断できる。一方、オゾン処理を設置できない小規模施設については、塩素処理と合わせて UV/H₂O₂ といった小面積で設置可能な処理システムを導入することが、マルチバリアの観点から有用であると言える。

ここで今までに得られた知見をまとめる。

- ・ MS2 ファージに対して・OH が効果を示すことを明らかにした。AdVF については MS2 と比較して限定的である可能性を示した。
- ・ オゾン処理がウイルスタンパク質、遺伝子の損傷効果として最も効果が高いことを示した。
- ・ 新たに構築したプロテオーム解析によりウイルス損傷評価を行った結果、各化学酸化処理に対してウイルスタンパク質への影響度合を詳細に評価することができた。
- ・ MS2, AdVF で各化学酸化処理に対するウイルスタンパク質への影響が異なることを示した。
- ・ 各化学酸化処理による病原微生物の不活化機構を明らかにすることで微生物リスク管理において必要な処理プロセスの一例を提示できた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計5件)

山口達也, 浅田安廣, 伊藤禎彦: ウイルス不活化メカニズム推定に向けたプロテオーム解析手法の適用, 第50回日本水環境学会年会, 2016年3月16日-18日, アスティとくしま.

Yamaguchi T, Asada Y, Echigo S, Itoh S: Possible mechanism of adenovirus inactivation examined by quantitative PCR and proteomics approach, *the 5th Food and Environmental Virology conference*, Kusatsu, September 13-16, 2016.

榊原崇, 浅田安廣, 越後信哉, 蔵岡凌平, 伊藤禎彦: ウイルス不活化に対してヒドロキシルラジカルが及ぼす影響, 第51回日本水環境学会年会, 2017年3月15日-17日, 熊本大学.

Kuraoka R, Asada Y, Sakakibara T, Echigo S, Itoh S: Comparison of Two-Dimensional Gel Electrophoresis -based and Mass Spectrometry-based Proteome Analysis of Virus Protein, *The 19th International Symposium on Health -Related Water Microbiology*, Chapel Hill, May 15-19, 2017.

蔵岡凌平, 浅田安廣, 榊原崇, 越後信哉, 伊藤禎彦: プロテオーム解析を用いた酸化処理によるウイルスタンパク質損傷の評価, 日本オゾン協会 第26回年次研究講演会, 東京都水道局 研修・開発センター, 2017年6月15日-16日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅田 安廣 (Yasuhiro ASADA)

京都大学大学院 工学研究科 助教

研究者番号: 60610524