

令和元年5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20054

研究課題名(和文) DNAを封入したウイルス外套蛋白粒子を用いた培養困難なウイルスの浄水処理性評価

研究課題名(英文) Evaluating removal of unculturable human enteric viruses during drinking water treatment by using DNA-encapsulated virus-like particles

研究代表者

松下 拓 (Matsushita, Taku)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：30283401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、臨床医学分野で開発が進む非ウイルスベクター作製技術を応用し、DNAを封入したウイルス外套タンパク粒子(VLPs)を作製し、これを用いた室内浄水処理実験により、生体外での培養が困難な水系ヒト感染ウイルスの浄水処理性を評価しようとするものである。作製条件の最適化により、ノロウイルスVLPs中へのDNAの封入に成功した。しかしながら、DNA封入率は0.001%程度であった。この原因は、VLPs再合成の際に、DNAとVLPsの親和性が低いためであることが分かった。今後、VLPsと親和性の高いDNAを選択するか、アビジン/ビオチン修飾等の導入により、封入率を増加させる必要があると判断された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行う、DNA封入VLPsにより浄水処理性を評価しようとする試みは世界的にも全く前例がなく、いかなる「培養不可能なウイルス」に対しても適用可能であるため、これまで浄水処理性を調べることができなかったサポウイルスやE型肝炎ウイルスなどの他のウイルスの浄水処理性の評価が可能となる。また、得られる結果は、実際の処理場の技術者にも大きなインパクトを与え、ウイルスの水道水質基準への組み込みについての議論にも大きく貢献でき、社会的に大きい意義を持つのみならず、これまでの病原性微生物の浄水処理性評価法を大きく変革・転換させる可能性を持った極めて意欲的な研究となり、学術的な意義も極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the removals of unculturable viruses during drinking water treatment, we attempted to lower the quantification limit of virus-like particles (VLPs) of the viruses by encapsulating foreign DNA to the VLPs, which enables us to evaluate the removals of unculturable viruses by measuring the encapsulated DNA with PCR. We firstly confirmed the followings by using a phage (model virus): (1) a reductant addition unfolded the phage capsid to a constituent protein, (2) an Au nanoparticle (model DNA) addition to the unfolded protein followed by a ClC12 addition refolded the protein to the same structure as the native phage, and (3) the Au nanoparticles were encapsulated in the refolded proteins. We secondly attempted to encapsulate foreign DNAs to the norovirus VLPs, but the encapsulating ratio was lower (0.001%) than expected. Mass balance revealed that the low ratio was due to the low affinity between the VLPs and the DNA used.

研究分野：土木環境システム

キーワード：環境保全学 土木環境システム ウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体外での培養が不可能であったため、その浄水処理性を実験的に調べることができなかったノロウイルスに対し、研究代表者は、遺伝子組み換え技術によりノロウイルスの外套タンパク粒子 (VLPs) を人工合成し、浄水処理実験 (通常の浄水場で用いられる凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理) に用いることで、その浄水処理性を評価することに世界で初めて成功した (Shirasaki et al., 2010)。通常、環境水中等でのノロウイルスの定量には遺伝子定量法である高感度な PCR 法が用いられるが、この研究で用いた VLPs には遺伝子が含まれていないため、感度の低いイライザ法により VLPs を定量した。

次に、VLPs の高感度な定量法 - 免疫 PCR 法 - を確立し、先の研究にて用いたイライザ法の定量下限値を 1/1,000 まで下げることに成功した。この手法を用い、ノロウイルスの凝集 - MF 膜処理における処理性 (処理効率が高いため、凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理後より VLPs 濃度が低くなるため、イライザ法では定量できない) を、世界で初めて評価した (Matsushita et al., 2013)。

しかしながら、いずれの実験でも (免疫 PCR 法ですら) 定量感度が低いため、処理水中の濃度が定量可能範囲内にて評価できるように、実験装置に添加する VLPs の濃度を高くする必要があった。この添加濃度は、実環境水中でのヒトノロウイルス濃度を大きく上回っていたため、これらの研究で得られた処理性が、実浄水処理場での処理性を反映しない可能性が常に付きまとった。

近年、医学分野では、アデノウイルスやレトロウイルスなどに目的の遺伝子を組み込み (ウイルスベクター) それをヒト細胞に感染させることにより、目的の遺伝子をヒト細胞内に発現させる遺伝子治療が実用化され、末期がんなどの臨床にも用いられ始めている。その半面、変異の導入、あるいは変異体の出現などの安全性に懸念があるため、非ウイルスベクターの開発が精力的に行われている。その一つとして、ヒトパピローマウイルスの VLPs を非ウイルスベクターとして用いる研究が行われており、作成した VLPs の中に無関係な DNA を封じ込めることに成功したとの報告がある (Clomar et al., 1993)。この技術を導入することにより、我々が実験に用いたノロウイルス VLPs の中に DNA を組み込むことができる可能性があり、その DNA を PCR 法にて定量すれば、VLPs の定量感度を著しく上げることができるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、培養ができないためにこれまで浄水処理性を調べることができなかった水系ヒト感染ウイルスの浄水処理性を、臨床医学分野で開発が進む非ウイルスベクター作製技術を応用して、外来 DNA を封入したウイルス外套タンパク粒子 (DNA 封入 VLPs; virus-like particles) を作製することにより、実験的に調べようとするものである。

3. 研究の方法

(1) バクテリオファージ Q β (モデルウイルス) と金ナノ粒子 (モデル DNA) を用いたナノ粒子封入 Q β 粒子の作製

まず、モデルウイルスとしてバクテリオファージ Q β を、モデル DNA として金ナノ粒子を用いて実験を行った (図 1)。

50 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に、150 mM となるように NaCl を添加し、さらに Q β を 200 mg/L となるように添加した。ここに、グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA) とジチオトレイトール (DTT) をそれぞれ 1 mM, 20 mM となるように添加し、室温で 30 分間インキュベートした。この操作により、Q β の外套タンパク (カプシド) の構成タンパク間のジスルフィド結合が DTT により還元され、Q β のカプシドの分解が期待される (Clomar et al., 1993)。これを分画分子量 10 kDa の再生セルロース膜でろ過することにより精製した後、金ナノ粒子 (直径 5 nm) を 20 mg/L になるように添加した。さらに、CaCl₂ を 50 mM になるように添加し、室温で 60 分間インキュベートした。この操作により、カプシド構成タンパクがジスルフィド結合により結合し、カプシドの再合成が期待される (Clomar et al., 1993)。最後に、分画分子量 100 kDa の再生セルロース膜でろ過することにより、金ナノ粒子が封入された Q β を精製した。Q β の分解と再合成および金ナノ粒子の封入を確認するため、Q β 原液、分解操作後の膜精製試料、再合成操作後の膜精製試料を電子顕微鏡を用いて観察した。

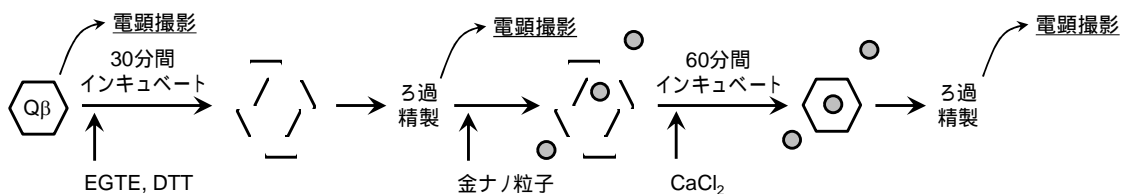


図1. ナノ粒子封入Q β 粒子の作製手順

(2) ノロウイルス VLPs と外来 DNA を用いた DNA 封入 VLPs の作製

次に、本研究の目的である、ノロウイルス VLPs への外来 DNA の封入を試みた (図 2)。ノ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

ロウイルス VLPs は、既報 (Shirasaki et al., 2010; Matsushita et al., 2013) の通り、カイコ - パキユロウイルス発現系により発現させた。また、バクテリオファージ MS2 のもつ塩基配列のうち 590 bp 分の cDNA を外来 DNA として用いた。

50 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に、150 mM となるように NaCl を添加し、発現させたロウイルス VLPs を 200 mg/L (4×10^{13} VLPs/mL に相当) となるように添加した。ここに、EGTA と DTT をそれぞれ 1 mM、20 mM となるように添加し、室温で 30 分間インキュベートすることにより、VLPs の立体構造を崩壊させた。これを分画分子量 12 ~ 14 kDa の再生セルロース膜を用いた透析により精製した後、外来 DNA を 2×10^{13} copies/mL になるように添加した。ここに CaCl_2 を 25 mM になるように添加し、室温で 60 分間インキュベートすることにより、VLPs を再合成した。さらに、ベンゾナーゼ (DNA 分解酵素) を 100 IU になるように添加し、室温で 60 分間インキュベートすることにより、VLPs に封入されなかった外来 DNA を分解した。最後に、塩化セシウムを用いた密度勾配遠心法 ($287,000 \times g$ で 4°C にて 40 時間) により、DNA 封入 VLPs を分離した。VLPs の分解と再合成を確認するため、VLPs 原液、分解操作後の透析試料、再合成操作後の超遠心精製試料を電子顕微鏡により観察した。また、超遠心精製後の各密度フラクションに含まれる VLPs 量を ELISA 法により、VLPs 中の DNA 量を PCR 法により定量した。

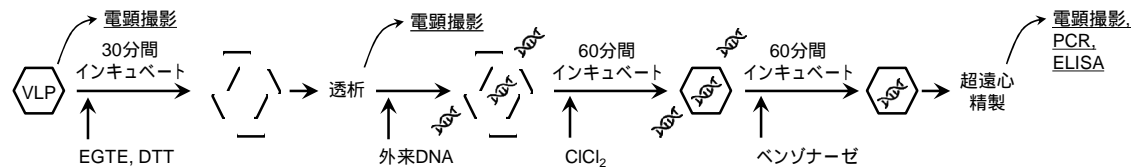
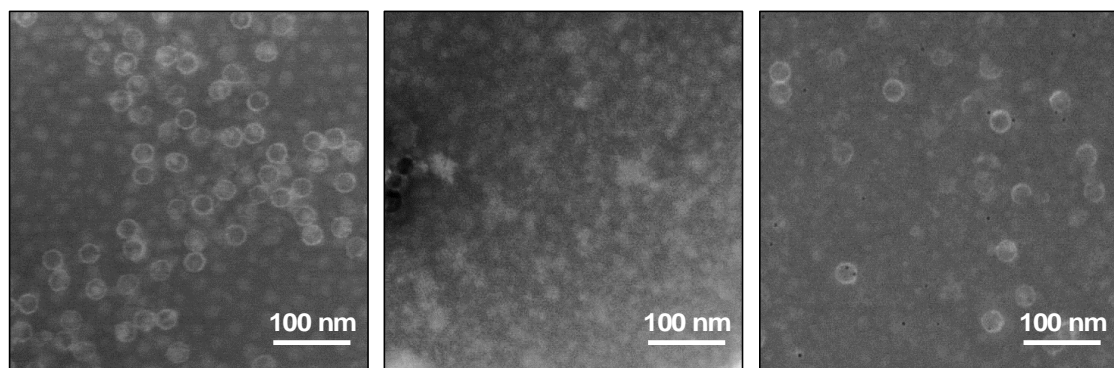


図2. DNA封入VLPsの作製手順

4. 研究成果

(1) バクテリオファージ Q β (モデルウイルス) と金ナノ粒子 (モデル DNA) を用いたナノ粒子封入 Q β 粒子の作製

図 3 に、分解前後と再合成後の Q β の電子顕微鏡写真を示す。分解前の試料 (a) には、同一サイズの粒子が多数観察された。これらの粒子の直径は 25 nm 程度であり、報告されている Q β の粒径 (23.5 ± 0.8 nm, Shirasaki et al., 2009) とほぼ一致した。すなわち、分解前試料中にて観察された粒子は Q β であると判断された。一方、分解後試料 (b) では、分解前試料にて観察されたような粒子が確認できなかった。すなわち、DTT により、構成タンパク間のジスルフィド結合を還元的に切断することにより、Q β 粒子の立体構造を崩壊させることができることが示された。また、再合成後試料 (c) では、いくつかの粒子が観察された。これらの粒子の直径は 25 nm 程度であり、分解前の Q β 粒子の直径と同等であった。すなわち、 CaCl_2 の添加により、いったんバラバラになったタンパクを、再び元の形状へと合成することができることが分かった。



(a) Q β 原液 (分解前)

(b) Q β 分解後試料

(c) Q β 再合成後試料

図3. 分解前後と再合成後の Q β の電子顕微鏡写真

また、再合成後試料の Q β 粒子には、再合成前に添加した金ナノ粒子が封入されていることが確認された (図 4 の黒い粒子)。すなわち、 CaCl_2 の添加により Q β 粒子を再合成する際に試料中に共存する他の粒子が、再合成時に Q β 粒子中に取り込まれる可能性があることが分かった。一方、膜ろ過による精製時の、保持液中とろ液中のタンパク量をそれぞれ定量した (図 5)。Q β 粒子の外殻タンパクの分子量は 2,500 kDa 程度であり、これは 178 個の同一タンパクから形成されている。従って、一つの構成タンパクの分子量は 14 kDa 程度である。DTT により、Q β 粒子のカプシドが構成タンパクにまで分解されていれば、「分解後試料」の精製に用いた分画分子量 10 kDa の膜では保持液側に存在するが、「再合成後試料」の精製に用いた分画分子量

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

100 kDa の膜ではる液側に存在するはずである。しかしながら、再合成後試料でも、タンパクは保持液側から回収された。すなわち、再合成後の試料中には、いったん粒子構造が崩壊して精製された構成タンパクは残っておらず、再合成されて粒子構造へと戻ったことが示唆された。

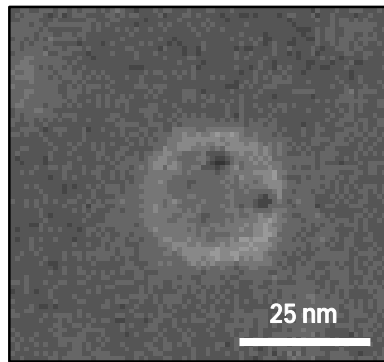


図4. 金ナノ粒子が封入された Qβ (再合成後試料)

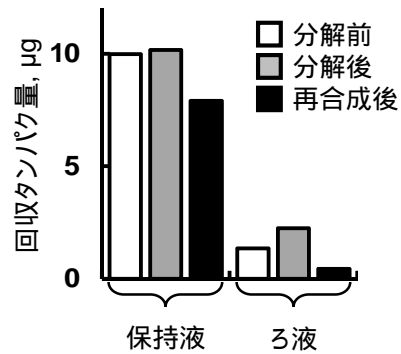
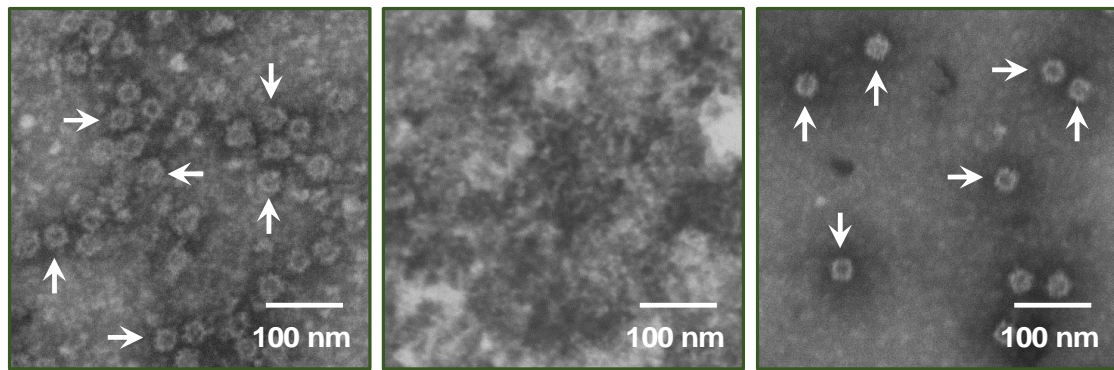


図5. 各精製段階における回収タンパク量

(2) ノロウイルス VLPs と外来 DNA を用いた DNA 封入 VLPs の作製

図 6 に、分解前後、および再合成後のノロウイルス VLPs の電子顕微鏡写真を示す。分解前試料には、多くの粒子が観察された (a)。電子顕微鏡写真から判断される粒子の大きさは、30 ~ 40 nm 程度であり、これは既報の野生ノロウイルスの粒径 (38 nm, Someya et al., 2000) と一致した。すなわち、分解前試料で観察された粒子は、ノロウイルス VLPs であると判断された。次に、これを DTT により処理すると、分解前試料で観察された VLPs が観察されなくなった (b)。すなわち、バクテリオファージ Qβ と同様に、ノロウイルス VLPs も DTT により分解されることが分かった。さらに、ここに CaCl₂ を添加すると、分解後試料には観察されなかった粒子が観察されるようになった (c)。すなわち、CaCl₂ の添加により、ノロウイルス VLPs も再合成されることが示された。



(a) VLPs 原液 (分解前)

(b) VLPs 分解後試料

(c) VLPs 再合成後試料

図6. 分解前後と再合成後のノロウイルス VLPs の電子顕微鏡写真

そこで、再合成された VLPs にどの程度外来 DNA が封入されているかを確認するため、再合成後試料を、塩化セシウムを用いた密度勾配遠心法により密度に応じたフラクションに分け、それぞれのフラクションに含まれる VLPs と DNA の量を定量した (図 7)。中空のノロウイルス VLPs の比重は 1.28 g/cm³ であると報告されている (Shirasaki et al., 2010)。これに対し、本研究の DNA 封入後の VLPs を密度ごとに分けると、中空 VLPs の比重より大きい、比重 1.29 g/cm³ にピークが観察された。すなわち、このフラクションの VLPs には、外来 DNA が封入されていた可能性が示唆された。

一方、このフラクションから、 1.9×10^7 copies の外来 DNA が検出された。また、密度勾配遠心法に供した試料には、最初に 2.0×10^{12} particles の VLPs が含まれていた。1 つの VLP に 1 copy の外来 DNA が封入されていたとすると、VLPs への外来 DNA は、 $(1.9 \times 10^7) / (2.0 \times 10^{12}) \times 100 = 0.001\%$ 程度と、極めて小さいことが分かった。今後、今後、外来 DNA の塩基配列を外套タンパクと親和性の高いものを選択するか、アビジン / ビオチン修飾の導入により、封入率を増加させる必要があると判断された。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

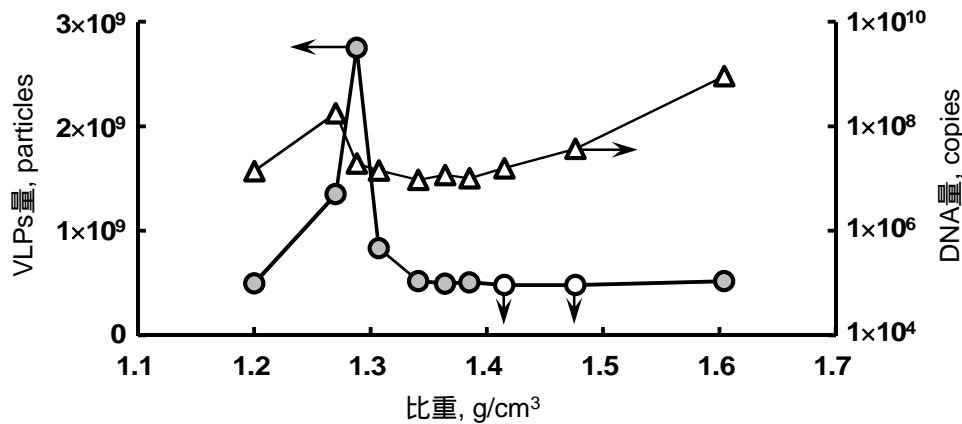


図7. 密度勾配遠心法の各フラクションにおけるノロウイルスVLPs量と外来DNA量 (下向き矢印: 定量下限未滿)

参考文献

- Colomar, M. C., Degoumois-Sahli, C. and Beard, P. (1993) Opening and refolding of simian virus 40 and *in vitro* packaging of foreign DNA, *Journal of Virology*, **67**, 2779–2786.
- Matsushita, T., Shirasaki, N., Tatsuki, Y. and Matsui, Y. (2013) Investigating norovirus removal by microfiltration, ultrafiltration, and pre-coagulation-microfiltration processes using recombinant norovirus virus-like particles and real-time immuno-PCR, *Water Research*, **47**, 5819–5827.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Kobuke, M. and Ohno, K. (2009) Comparison of removal performance of two surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophage Q β and MS2, in a coagulation–ceramic microfiltration system, *Journal of Membrane Science*, **326**, 564–571.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A. and Ohno, K. (2010) Estimation of norovirus removal performance in a coagulation-rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs, *Water Research*, **44**, 1307–1316.
- Someya, Y., Takeda, N. and Miyamura, T. (2000) Complete nucleotide sequence of the Chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protease in *Escherichia coli*, *Virology*, **278**, 490–500.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 培養困難なウイルスの浄水処理性評価に向けた遺伝子封入ウイルス様粒子の創製, 第26回衛生工学シンポジウム, 札幌, 2018/11/8–9.
2. 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 培養困難な水系感染症ウイルスの浄水処理性評価に向けた遺伝子封入型ウイルス様粒子の創製, 第52回日本水環境学会年会, 札幌, 2018/3/15–17, (学生ポスター発表賞(ライオン賞)).

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 白崎 伸隆

ローマ字氏名: Nobutaka Shirasaki

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 大学院工学研究院

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9、C K - 1 9 (共 通)

職名： 准教授

研究者番号 (8 桁)： 60604692

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 白川 大樹

ローマ字氏名： Daiki Shirakawa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。