

ウイルス吸着タンパク質を用いた環境中からの 病原ウイルスの濃縮・検出・同定技術開発

Development of virus-binding protein-based technologies for concentration, detection and identification of pathogenic viruses in water environment

大村 達夫 (OMURA TATSUO)
東北大学・大学院工学研究科・教授



研究の概要

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。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。

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

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、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、感染症被害をもたらしている病原ウイルスの感染ルート特定することは従来から非常に困難であった。これは、想定される病原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る。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るのが現状である。

2. 研究の目的

病原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。

3. 研究の方法

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

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. これまでの成果

(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。

5. 今後の計画

幅広い種類のウイルスを吸着する EVBP を分離することの重要性が示されたので、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。

6. これまでの発表論文等

- 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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 capsid 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.