

マルチ酵素生成菌 *Aeromonas hydrophila* ST5 株を用いた抗ウイルス活性の向上化

Enhancement of antiviral activity using a multi-enzyme producing bacterium, *Aeromonas hydrophila* ST5 strain.

松島雄大¹⁾, 遠矢将太郎¹⁾, 前田憲成¹⁾

¹⁾九州工業大学 大学院生命体工学研究科 生体機能応用工学専攻

Yuto Matsushima¹⁾, Shotaro Toya¹⁾, Toshinari Maeda¹⁾,

¹⁾ Department of Biological Functions Engineering, Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

E-mail address: toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp

1. はじめに

現在世界中には、ノロウイルスやインフルエンザウイルス、コロナウイルスなど、人間の健康を脅かす有害なウイルスや農作物や家畜に感染するウイルスが存在し、毎年多くの被害を出している[1]。また、鳥インフルエンザウイルスなど、次のパンデミックを引き起こすリスクのあるウイルスも存在している[2]。こうしたウイルスに対抗するため治療薬やワクチンなどの研究・開発が行われているが、それには莫大な資金と時間を必要とする。厚生労働省のデータ[3]では、新薬の開発には10年以上の時間と、数百億～数千億円の費用と、莫大な労力とコストがかかることが示されている。また、ウイルスは変異を起こすことも知られており、抗原抗体免疫反応を核とした生体防御を回避し、場合によっては病原性が高まることも報告されており、これらの変異に対しても万能に対処できる技術の開発が課題となっている。こうした背景より、従来のアプローチとは異なる着眼点でのウイルス不活性化技術の確立が求められている。ウイルス粒子は、RNAやDNAなどの核酸を、カプシドと呼ばれるタンパク質の殻が覆っている。また、インフルエンザウイルスなどやエイズウイルスなど、エンベロープという脂質二重膜がカプシドを覆う形で存在するウイルス（エンベロープウイルス）も存在している。更にエンベロープウイルスは、エンベロープの表面にスパイクタンパク質をもっている。このように、エンベロープを持たないタイプのウイルスは主にタンパク質で、エンベロープ型のウイルスは脂質とタンパク質で構成されている。すなわち、本研究では、ウイルスを構成するタンパク質および脂質を分解することで、ウイルス自体が破壊され、不活性化できるのではないかと仮説提唱し、そのコンセプトを実証するための研究に取り組んだ。

そこで当研究室では、はじめにより強力なタンパク質分解活性および脂質分解活性を示す菌株の探索を行った。その結果、電気培養した下水汚泥の試料から、3種類の分解酵素（プロテアーゼ・リパーゼ・アミラーゼ）を生成する菌株を単離し、その菌株が *Aeromonas hydrophila* ST5 株[4]と命名した。そして、この菌株が生成する酵素を用いて、ウイルスカプシドの構成成分であるタンパク質やエ

ンベロープの構成成分である脂質などの構成成分を分解し、ウイルスを不活性化できるのかを調査した。また、ウイルスの不活性化に関わる因子の調査も行った。

2. 抗ウイルス活性の向上化方法の検討

2. 1 材料

本実験では試験ウイルスとして、大腸菌を宿主として増幅するバクテリオファージである P1 ファージと、*Pseudomonas syringae* を宿主として増幅する φ6 ファージを用いた。各種ファージ溶液は、研究室で確立されているプロトコルで調製した。

2. 2 方法

5 mL の LB 液体培地で前培養した ST5 株の菌液 1 mL を LB 液体培地で 2 回洗浄した後 1 mL の LB 液体培地で再懸濁した。500 mL のフラスコに LB 液体培地を 120 mL 注ぎ、その菌液を初期濁度 0.01 になるように LB 液体培地に添加し、20℃、120 rpm の条件で 24 時間振盪培養した。培養試料を遠心分離(13,000 rpm, 10 分間)し、その上清を得た。その上清、ならびに塩析・脱塩処理により濃縮した後フィルター処理したものをウイルス不活性化実験の試料として用いた。ファージ溶液 650 μL に ST5 株の培養上清または濃縮液を 650 μL 添加し、37℃、静置の条件で 24 時間反応させた。比較対象には、ファージ溶液 650 μL に LB 液体培地又はリン酸緩衝液を 650 μL 添加したものを使用した。培養後、残存しているウイルス数を測定するため、二層平板法によりプラークの数を測定した。プラーク数の測定の際に、P1 ファージは大腸菌、φ6 ファージに対しては *Pseudomonas syringae* の培養液を用いて評価した。

3. 電気泳動による、不活性化後 P1 ファージの分解確認

Yang らによると、バクテリオファージのタンパク質構造は、SDS-PAGE により評価できるため[5]、この手法によりファージの不活性化前後の P1 ファージタンパク質の構造変化を調査した。

3. 1 材料

電気泳動には、研究室で確立されているプロトコルで調製した 12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いた。

3. 2 方法

作成したゲルに、2.2 に示した方法で不活性化した P1 ファージ・ST5 株酵素混合液をロードし電気泳動を行い、ゲルの染色・脱色を行いタンパク質バンドを測定した。比較対象には、ST5 株酵素溶液と P1 ファージ溶液を、それぞれ同様の条件で反応させたものと冷蔵保存したものを使用した。上述のようにバクテリオファージは、タンパク質で構成されているため、通常の染色液で染まるため、バクテリオファージのバンドがどのように変化するかを調べた。

4. ウイルスを不活性化する因子の調査

4. 1 材料

金属酵素阻害剤である EDTA、セリンプロテアーゼ阻害剤 PMSF、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤である Pepstatin A を研究室で確立されているプロトコールで調製し、ST5 株酵素溶液に添加し、酵素溶液中の酵素群の不活性化処理を行った。

4. 2 方法

ST5 株酵素溶液に各種酵素阻害剤を添加し、2.2 に示した方法で P1 ファージのプラーク数を評価することで、不活性化の変化を調べた。すなわち、その不活性化の阻害率を測定すると共に、ウイルス不活性化に関与する酵素の種類を調査した。

5. 結果と考察

はじめに P1 ファージに対する ST5 株の酵素溶液の抗ウイルス活性を調べたところ、酵素群液未添加系と比べて、非濃縮系ではウイルスの不活性化が約 40%であったが、酵素群の濃縮系では約 99%のウイルスが減少していることがわかった。すなわち、塩析による酵素タンパク質の濃縮が、抗ウイルス活性の向上化に有効な方法の 1 つであることが明らかとなった。また、φ6 ファージにおいても酵素群液未添加系と比べて、酵素群の濃縮系で 99.99%の抗ウイルス活性があることが分かった。すなわち、ST5 株が生成する酵素群のうち、リパーゼ活性も、エンベロープ型ウイルスである φ6 ファージの不活性化に有効であることが分かった。また、塩析により濃縮操作しても、プロテアーゼ酵素と同時に、リパーゼ酵素も濃縮できることが示唆された。

次に、SDS-PAGE によるバクテリオファージのバンドが酵素群の処理によって低分化されるのか調べたところ、P1 ファージウイルスの不活性化が確認されたバクテリオファージ由来のタンパク質のバンドが消失していたため、ST5 株酵素溶液によるウイルス不活性化は、ファージを構成しているタンパク質の分解によってもたらされるという証拠を得た。

また、酵素阻害剤添加によるウイルス不活性化の阻害試験の結果より、EDTA 添加系においてこれまで見られ

ていた抗ウイルス活性が低下したこと、またそれ以外のプロテアーゼ阻害剤の有無で抗ウイルス活性に変化がなかったこと、EDTA とバクテリオファージの混合系においても抗ウイルス活性がなかったことより、ST5 株が生成するウイルスの不活性化に関わる酵素が、金属イオンを保持するメタロプロテアーゼなどであることが明らかとなった。

SDS-PAGE の結果から、ウイルスの構造が破壊されていることが示唆されたため、今後、さらなる証拠を得るため、ウイルスを不活性化させた試料中においてウイルス核酸が検出されるのか調査する。また、これに関係して、ウイルスのもう一つの構成成分であるウイルス核酸もカプシド分解と同時に処理すると、その効果の増大が期待できるため、ST5 株が細胞外にヌクレアーゼを放出できるかなども検証する必要がある。今回の調査より、非エンベロープ型およびエンベロープ型、2 種のウイルスが、ST5 株の酵素群によって不活性化できることが明らかとなったが、この抗ウイルス活性があらゆるウイルスに対しても同様な効果を持つのか、あるいは選択性があるのかを調査するため、その他のウイルスに対しても同様に調査を行う予定としている。

引用・参考文献

- [1]WHO 「 WHO COVID-19 dashboard 」
<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c>
- [2]NIID 国立感染症研究所「高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)感染事例に関するリスクアセスメント 対応」
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ta/bird-flu/2621-cepr/12630-h5n1-riskassess-2404.html>
- [3]厚生労働省 医薬品産業ビジョン 2021
<https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000831974.pdf>
- [4]遠矢将太郎.非生物学的/生物学的処理による下水汚泥の減容・資源化に関する研究.令和 5 年度博士論文
- [5]Yang, Hongjiang, et al. "Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*." *BMC microbiology* 10 (2010): 1-10.