

## マルチ酵素生成菌 *Aeromonas hydrophila* ST5 株を用いたウイルスの不活性化

### Inactivation of viruses using a multi-enzyme producing bacterium, *Aeromonas hydrophila* strain ST5.

<sup>1)</sup>松島雄大, <sup>2)</sup>遠矢将太郎, <sup>1,2)</sup>前田憲成\*

<sup>1)</sup>国立大学法人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, <sup>2)</sup> 国立大学法人九州工業大学大学院生命体工学研究科生命体工学専攻

<sup>1)</sup>Yuto Matsushima, <sup>2)</sup>Shotaro Toya, <sup>1,2)</sup>Toshinari Maeda

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

<sup>2)</sup> Department of Life Science and Systems 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が多様多様に存在し毎年多くの感染者や死者を出している。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[1]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、莫大なコストがかかることが示されている。よって、人体に対する治療薬やワクチンなどの開発のみならず、公衆衛生など、普段の生活環境からもウイルス対策を講じることで、感染症感染リスクを低減できる可能性がある。一方で、ウイルスは変異を起こすことにより、抗原抗体免疫反応を核とした生体防御を回避することも報告されており、これがワクチンが効かなくなる要因となっている。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、エンベロッ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(エンベロップウイルス)も存在している。更にエンベロップウイルスは、エンベロッ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、ノンエンベロップウイルスは主にタンパク質で、エンベロップウイルスは脂質とタンパク質で構成されている。本研究では、主にこのカプシドの構成成分であるタンパク質やエンベロップの構成成分である脂質などに着目し、これらの構成成分を、微生物が生成する酵素を用いて分解することで、ウイルスを不活性化することを目的とした。そのために、当研究室で過去に電気培養した下水汚泥より単離された、3種類の分解酵素(プロテアーゼ・リパーゼ・アミラーゼ)を生成する細菌である *Aeromonas hydrophila* ST5 株を用いてウイルスの不活性化能力につ

いて検討を行った。

#### 2. 材料と方法

##### 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 ファージを用いた。P1 ファージ溶液は、研究室で確立されているプロトコルに従い、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 を生理食塩水で 2 回洗浄した後 1 mL の生理食塩水で懸濁した。500 mL のフラスコに LB 液体培地を 100 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°C、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、ならびに限外ろ過により濃縮した後フィルター滅菌したものをウイルス不活性化実験の試料として用いた。P1 ファージ溶液 500  $\mu$ L に ST5 株の培養上清または限界ろ過濃縮液を 500  $\mu$ L 添加し、37°C、静置の条件で 24 時間反応させた。比較対象には、P1 ファージ溶液 500  $\mu$ L に LB 液体培地を 500  $\mu$ L 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。

#### 3. 結果と考察

*Aeromonas hydrophila* ST5 株を LB 培地で培養を行ったところ、培養後にプロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼの酵素群が生成されていることを確認した。また、タンパク質を唯一の炭素源とした M9 最少培地に ST5 株を接種し培養を行ったところ、菌の増殖が確認されたため、生成したプロテアーゼ酵素によりタンパク質が低分子化され、タンパク質を資化利用していることがわかった。次に、ST5 株の酵素群溶液を用いてウイルスが不活性化されるのかを調べた結果、ST5 株の酵素群溶液を添加し

た反応系では、酵素群液未添加系と比べて 40%以上プラークの数が減少しており、ST 株が生成する分解酵素群によりウイルスが不活性化されていることが明らかとなった。

*Aeromonas hydrophila* ST5 株は、ウイルスの構成成分である脂質やタンパク質を分解する酵素であるリパーゼやプロテアーゼを生成する特性を持っている。以上の結果より、その分解酵素によって P1 ファージの殻であるカプシドタンパク質が分解されたため、ウイルスのプラーク数が減少したと考えられる。今後は、ウイルスの不活性化に影響を与えた因子の特定と大量生産の方法を検討していく。また、ウイルスの不活性化の効果を高めるためにウイルス粒子数と酵素濃度との関係性を調べる。また、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調べる。最後に、使用した P1 ファージは脂質の膜を持たないノンエンベロープウイルスであったため、エンベロープウイルスでも不活性化を行うことが可能かを検討していく。

#### 4. おわりに

*Aeromonas hydrophila* ST5 株は、ノンエンベロープウイルスである P1 ファージに対して、40%以上のウイルス不活性化能力を有する物質を生成することが可能であることがわかった。

#### 参考文献

- [1] (1) 厚生労働省 医薬品産業ビジョン 2021  
<https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000831974.pdf>
- [2] 遠矢将太郎. 下水汚泥中の微生物機能と菌叢変化に対する電機培養の影響調査. 2020 年度修士論文