

加熱変性リゾチームをベースとした 新規抗 SARS-CoV-2 ペプチド製剤の開発

帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター・助教 武田 洋平

■ 緒言

新型コロナウイルスである重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) は依然膨大な感染者及び死者を出し続けている。このような危機的状況下において SARS-CoV-2 に対する効果的な感染制御対策の拡充は喫緊の課題である。本研究では有効性の高い SARS-CoV-2 制御対策へ応用し得る新規 SARS-CoV-2 不活化物質のシーズとして加熱変性リゾチームに着目した。リゾチームは卵白等に豊富に含まれるムコ多糖類加水分解酵素であり、種々の細菌に対し溶菌作用を示す生体防御物質である。興味深い知見として、加熱処理したリゾチームでは酵素活性が失われるにも関わらず、加熱変性により抗菌スペクトルが拡大することが報告されている^{1,2)}。更に近年、この加熱変性リゾチームがノロウイルスや A 型肝炎ウイルス (HAV)、口蹄疫ウイルスを不活化することが示された³⁻⁶⁾。そこで予備試験において加熱変性リゾチームの SARS-CoV-2 に対する不活化活性を評価したところ、20 秒といった極めて短い反応時間において SARS-CoV-2 不活化活性が発揮されることを確認した (図 1)。そこで本研究において、そのウイルス不活化メカニズムを解析した。更に、加熱変性リゾチームの全長のアミノ酸配列のうち、SARS-CoV-2 不活化活性を担う活性中心部位のアミノ酸配列の特定を試みた。

■ 方法

ウイルス、細胞、試験サンプル

SARS-CoV-2 (2019-nCoV/Japan/TY/WK-521/2020 株) は国立感染症研究所 (東京、日本) より分与を受けた。細胞へのウイルス感染実験では、JCRB 細胞バンク (大阪、日本) より入手した VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いた。加熱変性リゾチームはキューピー株式会社 (東京、日本) より分与を受けた。この加熱変性リゾチームを超純水または他の溶媒に任意の濃度となる様に溶解し加熱変性リゾチーム液として用いた。なお、これら溶媒を陰性対照液として用いた。5 種類の合成ペプチド (Pep1 : 129 のアミノ酸残基を持つ全長リゾチームのうちの 1 ~ 35 番目のアミノ酸残基 ; Pep 2 : 36 ~ 61 番目 ; Pep 3 : 62 ~ 97 番目 ; Pep 4 : 98 ~ 129 番目 ; Pep 5 : 23 ~ 57 番目) はユーロフィンジェノミクス株式会社 (東京、日本) より購入した。これらペプチドを超純水に任意の濃度になる様に溶解しペプチド液として用いた。なお超純水を陰性対照液とした。またペプチド液を 90°C で 1 時間加熱することで加熱ペプチド液を得た。

加熱変性リゾチーム処理による SARS-CoV-2 構造タンパク質への影響の解析

SARS-CoV-2 液を陰性対照液または加熱変性リゾチーム液と混合した。加熱変性リゾチーム液群では、混合液中の加熱変性リゾチームの濃度が 0.2mM となる様に調整した。また混合液中のウイルス力価は約 $6.5 \log_{10}$ 50% 組織培養感染量 (TCID₅₀)/ml となる様に調整した。これら混合液を作製直後 (0h)、或いは 24h の間室温で反応させた後、常法により SDS-PAGE を実施した。その後、SARS-CoV-2 のウイルス粒子表面に発現するスパイク (S) タンパク質を標的としたウエスタンブロッティングを実施した。

加熱変性リゾチーム処理による SARS-CoV-2 ゲノムへの影響の解析

SARS-CoV-2 液を陰性対照液または加熱変性リゾチーム液と混合した。加熱変性リゾチーム液群においては、混合液中の加熱変性リゾチームの濃度は 0.8mM となる様に調整した。また、混合液中のウイルス力価は約 $5.75 \log_{10}$ TCID₅₀/ml となる様に調整した。これら混合液を作製直後 (0h)、或いは 24h の間室温で反応させた後、各混合液からウイルス RNA を抽出し逆転写反応を行い cDNA を得た。なお、逆転写反応に用いる RNA 量は全ての検体で 500ng に統一した。得られた cDNA を鋳型とし、SARS-CoV-2 の N 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR を実施し、各群における Ct 値を算出した。統計解析には Microsoft Excel 2013 (Microsoft Co., Ltd., Redmond, WA) を用いた。

加熱変性リゾチーム中の SARS-CoV-2 不活化活性を担う活性中心部位のアミノ酸配列のスクリーニング

SARS-CoV-2 液を陰性対照液、加熱変性リゾチーム液、非加熱ペプチド液、または加熱ペプチド液と混合した。加熱変性リゾチーム液群および各ペプチド液群においては、混合液中のペプチド濃度は 0.2mM となる様に調整した。また、混合液中のウイルス力価は約 $5.6\log_{10}$ TCID₅₀/ml となる様に調整した。これら混合液を 24h の間室温で反応させた後、VeroE6/TMPRSS2 細胞をあらかじめ播種しておいた 96well plate に添加した。この 96well plate 上で混合液を 10 倍階段希釈した後、3 日間 CO₂ インキュベーター内で細胞培養を行った。その後、ウイルス感染・増殖に伴い誘導される細胞形態の異常(細胞変性効果)の程度を基に、TCID₅₀ 法を用いて各混合液のウイルス力価(\log_{10} TCID₅₀/ml)を算出した。陰性対照液群のウイルス力価と加熱変性リゾチーム液群または各ペプチド液群のウイルス力価を比較することで、加熱変性リゾチームまたは各ペプチドの SARS-CoV-2 不活化活性の強さを評価した。統計解析には Microsoft Excel 2013 を用いた。

■ 結果

加熱変性リゾチーム処理による SARS-CoV-2 構造タンパク質への影響

陰性対照液または加熱変性リゾチーム液で処理した SARS-CoV-2 における S タンパク質を標的としたウエスタンブロッティングを実施したところ、反応時間が 0h の場合では、陰性対照液処理と加熱変性リゾチーム液処理によるバンドパターンに違いは認められなかった。一方、反応時間が 24h の場合は陰性対照液処理ウイルスと比較して加熱変性リゾチーム液処理ウイルスにおいて S タンパク質のバンドの強度が若干減少していた(図 2)。

加熱変性リゾチーム処理による SARS-CoV-2 ゲノムへの影響

陰性対照液または加熱変性リゾチーム液で処理した SARS-CoV-2 に対して N 遺伝子を標的としたリアルタイム逆転写 PCR を実施したところ、反応時間が 0h、24h の場合共に、陰性対照液処理と加熱変性リゾチーム処理ウイルスにおける Ct 値に違いは認められなかった(図 3)。

加熱変性リゾチームの活性中心部位のアミノ酸配列スクリーニング

非加熱および加熱した各ペプチド液群のウイルス不活化活性を評価したところ、非加熱 Pep1、加熱 Pep1、非加熱 Pep4 群において統計学的に有意なウイルス力価の低下、即ちウイルス不活化活性が認められた。これら 3 群の中では非加熱 Pep1 群において最も大きなウイルス力価の低下が認められた(約 $1.19\log_{10}$ TCID₅₀/ml の低下 = 約 93.5% のウイルスの不活化)(図 4)。

■ 考察

ウエスタンブロッティング解析の結果、加熱変性リゾチームと 24h 反応させた場合 SARS-CoV-2 の S タンパク質のバンド強度が低下することが確認された(図 2)。これは、加熱変性リゾチームが S タンパク質の破壊や構造変化と言った何らかの構造異常を誘導した可能性を示唆している。ただし、24h という長い反応時間に関わらず、バンド強度の減弱程度はあまり強くなく、この様なウイルスタンパク質への作用が図 1 で示したような極めて短時間でのウイルス不活化活性にどの程度寄与するかは今後詳細に検討する必要がある。一方、リアルタイム逆転写 PCR の結果からは加熱変性リゾチームがウイルスゲノムに影響を与える可能性は確認できなかった(図 3)。今後は、加熱変性リゾチーム処理によるエンベロープ(膜構造)を含むウイルス粒子構造全体への影響を評価するため、加熱変性リゾチーム液で処理したウイルス粒子を電子顕微鏡で観察する。また、活性中心部位の特定のためのスクリーニング試験では、非加熱 Pep1 が最も強いウイルス不活化活性を示した(図 4)。この結果より、リゾチーム全長のうち 1 ~ 35 番目のアミノ酸残基中にウイルス不活化を担う配列が存在する可能性が示された。しかし、その Pep1 の活性も 24h の反応時間で約 93.5% のウイルスを不活化する程度に留まっており、図 1 で示した短時間での加熱変性リゾチームのウイルス不活化活性と比較して弱いことが示された。この結果は、より強いウイルス不活化活性を発揮するためには、1 ~ 35 番目のアミノ酸配列以外にも必要な配列箇所が存在する可能性を示唆している。従って今後は、複数のペプチドを同時に SARS-CoV-2 に作用させて、相加・相乗的なウイルス不活化活性の増強が認められるか否かを解析する。

■ 要 約

依然世界中で猛威を振るっている SARS-CoV-2 に対する新規ウイルス不活化物質のシーズとして加熱変性リゾチームが見出された。この加熱変性リゾチームは 20 秒といった極めて短時間で SARS-CoV-2 を不活化可能である。本研究におけるウイルス不活化メカニズム解析の結果、加熱変性リゾチーム処理を受けた SARS-CoV-2 においては、S タンパク質に何らかの構造異常が誘導される可能性が示された。一方、ウイルスゲノムへの影響は認められなかった。本研究により加熱変性リゾチームのウイルス不活化メカニズムの一端が明らかとなったが、未だその全容の解明には至っておらず、今後更なる解析が必要である。なお、加熱変性リゾチームの全長アミノ酸のうち、1～35 番目のアミノ酸配列がウイルス不活化活性の一端を担っていることが示された。今後は、更にウイルス不活化を担う他のアミノ酸領域の特定を進めることで、加熱変性リゾチームのウイルス不活化における構造活性相関の解明を目指す。

■ 文 献

- 1) Ibrahim, H. R., Higashiguchi, S., Juneja, L. R., Kim, M. & Yamamoto, T.(1996)A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1416-1423.
- 2) Ibrahim, H. R., Higashiguchi, S., Kotetsu, M., Juneja, L. R., Kim, M., Yamamoto, T., Sugimoto, Y. & Aoki, T.(1996)Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills gram-negative and gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3799-3806.
- 3) Takahashi, H., Nakazawa, M., Ohshima, C., Sato, M., Tsuchiya, T., Takeuchi, A., Kunou, M., Kuda, T. & Kimura, B.(2015)Heat-denatured lysozyme inactivates murine norovirus as a surrogate human norovirus. *Sci. Rep.* 5, 11819.
- 4) Takahashi, M., Takahashi, H., Okakura, Y., Ichikawa, M., Kuda, T. & Kimura, B.(2020)Impact of pH and protein hydrophobicity on norovirus inactivation by heat-denatured lysozyme. *PLoS One* 15, e0237888.
- 5) Takahashi, M., Okakura, Y., Takahashi, H., Imamura, M., Takeuchi, A., Shidara, H., Kuda, T. & Kimura, B.(2018)Heat-denatured lysozyme could be a novel disinfectant for reducing hepatitis A virus and murine norovirus on berry fruit. *Int. J. Food Microbiol.* 266, 104-108.
- 6) Fukai, K., Inoue, K., Takeuchi, A. & Yamakawa, M.(2021)New possibilities for egg white lysozyme : heat-denatured lysozyme partially inactivates select foot-and-mouth disease virus strains. *Sci. Rep.* 11, 526.

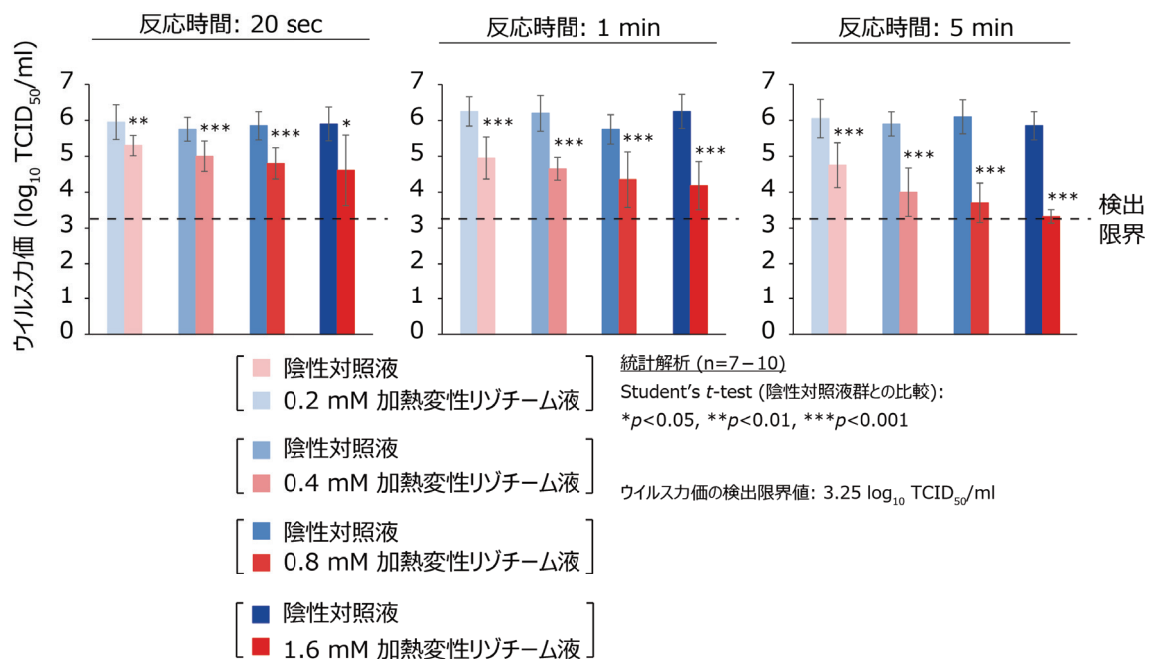


図 1. 加熱変性リゾチームの SARS-CoV-2 不活化活性

SARS-CoV-2 液を陰性対照液または加熱変性リゾチーム液と混合した。加熱変性リゾチーム液群においては、混合液中の加熱変性リゾチームの濃度は 0.2, 0.4, 0.8, 1.6mM となる様に調整した。これら混合液を 20sec, 1min, 5min の間室温で反応させた後、各群のウイルスカ価を算出した。陰性対照群のウイルスカ価と比較して加熱変性リゾチーム群のウイルスカ価が低い場合は、加熱変性リゾチーム処理により SARS-CoV-2 が不活化されたことを意味する。

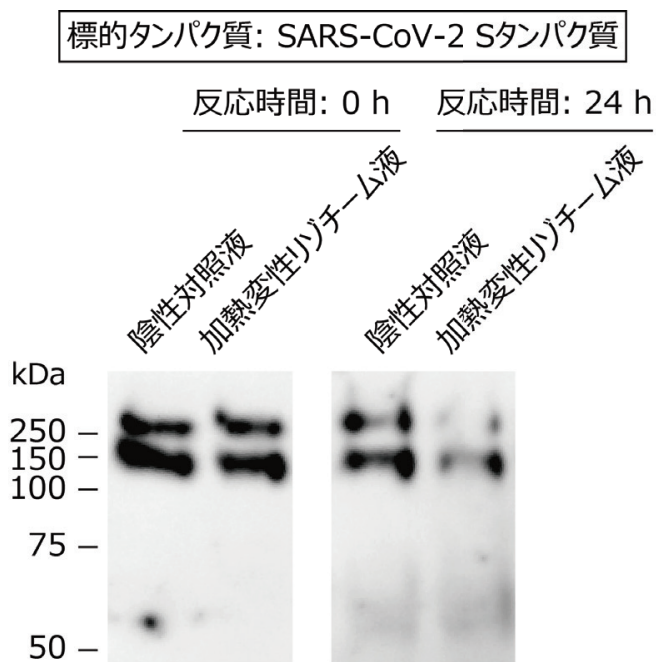


図2. 加熱変性リゾチーム処理による SARS-CoV-2 構造タンパク質への影響
0h または 24h の間室温で陰性対照液または加熱変性リゾチーム液と反応させた SARS-CoV-2 における S タンパク質の発現をウエスタンブロッティングで解析した結果。

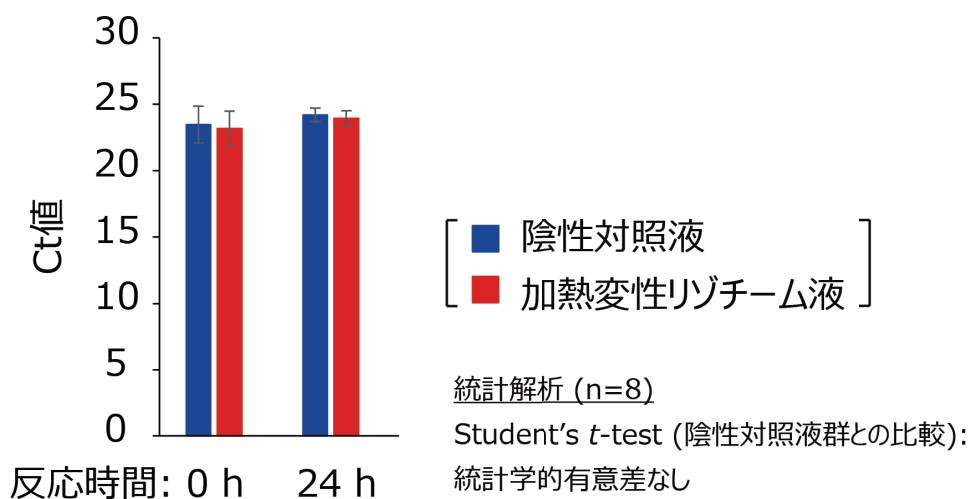


図3. 加熱変性リゾチーム処理による SARS-CoV-2 ゲノムへの影響
0h または 24h の間室温で陰性対照液または加熱変性リゾチーム液と反応させた SARS-CoV-2 について、N 遺伝子を標的としたリアルタイム逆転写 PCR を実施した結果。

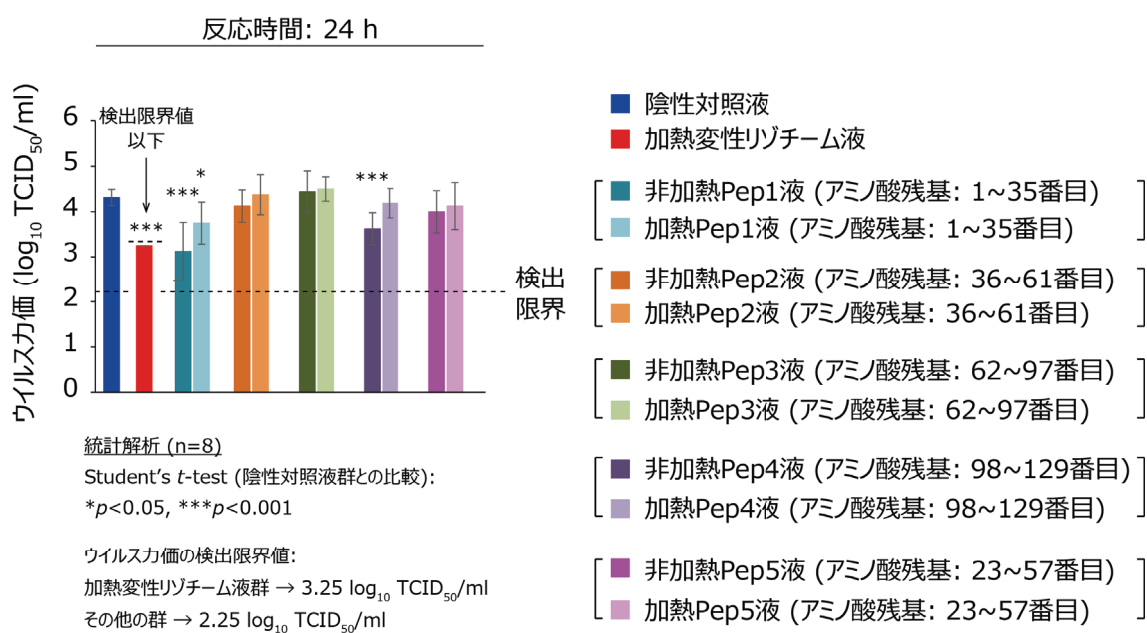


図4. 加熱変性リゾチームおよび各ペプチドの SARS-CoV-2 不活化活性
SARS-CoV-2 液を陰性対照液、加熱変性リゾチーム液、非加熱ペプチド液、または加熱ペプチド液と混合した。これら混合液を 24h の間室温で反応させた後、各群のウイルスカ価を算出した。