

# 高病原性鳥インフルエンザ制御への 加熱変性リゾチーム応用を目指した萌芽研究

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・特任研究員 Jamsransuren Dulamjav

## ■ 緒 言

A 型インフルエンザウイルス (IAV) の中の一部の株である H5 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) は世界中に蔓延し養鶏産業に甚大な被害をもたらしている。とりわけ、過去数年間においては日本を含む多くの国でこれまでに例を見ない大規模な家禽の被害が生じていることから、現行の対策の限界が指摘されており新たな制御対策の構築の必要性が議論されている。その様な状況において、既存の消毒薬や抗ウイルス薬の応用のみならず、HPAIV 感染制御に寄与し得る新たな抗ウイルス物質の探索研究も盛んに行われている。当研究室では、複数のウイルス種に対する不活化活性が報告されているユニークな食品由来素材として加熱変性リゾチーム (heat-denatured lysozyme: HeDeL) に着目して研究を行ってきた。卵白等に含まれるムコ多糖類加水分解酵素であるリゾチームは、様々な病原体に対する殺菌作用を有することが知られている。興味深い知見として、リゾチームを加熱処理した場合、酵素活性は失活する一方、タンパク質の立体構造変化 (変性) が起こり加熱前よりも抗菌スペクトルが拡大することが報告されている<sup>1,2)</sup>。なお、HeDeL のウイルス不活化活性については、口蹄疫ウイルスや A 型肝炎ウイルス、ノロウイルスに対する活性が報告されている<sup>3-6)</sup>。これらウイルスは何れもエンベロップ (脂質膜構造) を有さないウイルス種であったが、当研究室の過去の研究によりエンベロップを有する新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対しても不活化活性を示すことが明らかとなった。そこで本研究では、SARS-CoV-2 と同等にエンベロップを有する IAV について、H5 亜型および H7 亜型の HPAIV 株、更にヒトに馴化した H1 亜型 IAV 株に対する HeDeL の不活化活性の有無を評価し、不活化活性が認められる場合はそのメカニズムを解明することを目的として解析を行った。

## ■ 方 法

### ウイルス、細胞、試験サンプル

H5 亜型 HPAIV として以下の株を使用した：A/white-tailed eagle/Japan/OU-1/2022 (H5N1 亜型、clade 2.3.4.4b に属する、当研究室にて分離)。H7 亜型 HPAIV として以下の株を使用した：A/duck/Japan/AQ-HE29-52/2017 (H7N9 亜型、動物検疫所より分与を受けた)。H1 亜型 IAV として以下の株を使用した：A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1 亜型、ATCC 社より購入)。これらウイルスを接種する細胞としては Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いた。試験サンプルについては、キューピー株式会社 (東京、日本) より非加熱リゾチームおよび HeDeL の分与を受けた。これら試験サンプルは超純水に任意の濃度となる様に溶解し実験に用いた。また、HeDeL のウイルス不活化を担うペプチド領域を特定するための実験では 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; Pep2: 36~61 番目; Pep3: 62~97 番目; Pep4: 98~129 番目; Pep5: 23~57 番目) を用いた。これら合成ペプチド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。またペプチド液を 90℃ で 1 時間加熱することで加熱ペプチド液を得た。なお、超純水を陰性対照液として用いた。

### 試験サンプルのウイルス不活化活性評価試験

ウイルス液を様々な濃度の試験サンプルと混合し、25℃ で一定時間反応させた後、混合液を MDCK 細胞に接種し培養した。その後、常法 (TCID<sub>50</sub> 法) に従い各試験群のウイルス力価 (log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml) を算出した。その後、陰性対照群と各試験サンプル群間のウイルス力価の差から、各試験サンプルのウイルス不活化活性を評価した。統計解析には Microsoft Excel 2021 を用いた。

## ■ 結 果

### 非加熱リゾチームおよび HeDeL の H5 亜型 HPAIV 不活化活性の比較

まず、非加熱リゾチームおよび HeDeL の H5 亜型 HPAIV に対する不活化活性を評価した。反応時間

が6時間の場合、0.16 mMの非加熱リゾチーム群では超純水群と比較して有意なウイルス力価の低下は認められなかった。これは、非加熱リゾチーム処理では6時間の反応時間においてウイルス不活化活性が認められなかったことを意味する。一方、HeDeL群においては統計学的に有意なウイルス不活化活性が認められた(ウイルス不活化率:  $\geq 99.76\%$ ) (図1)。

#### HeDeLのH5亜型HPAIV不活化活性における濃度および反応時間依存性の有無の評価

次に、複数の濃度のHeDeLのH5 HPAIV不活化活性を、様々な反応時間において解析した。5分の反応時間では何れの濃度(0.08、0.16、および0.32 mM)のHeDeLにおいてもウイルス不活化活性は認められなかった一方、10分以上の反応時間においては何れの濃度においても統計学的に有意なウイルス不活化活性が認められ、反応時間依存性にウイルス不活化率が増加していた。なお、各濃度間で比較すると0.08、0.16、0.32 mMの順にHeDeLによるウイルス不活化効率が増加する傾向が認められ、濃度依存性が確認された(図2)。

#### HeDeLの複数の亜型のIAV株に対する不活化活性の比較

次に、H5亜型HPAIV、H7亜型HPAIV、およびH1亜型IAVに対するHeDeLのウイルス不活化活性の比較を行った。0.16 mMのHeDeLは1時間および6時間の反応時間においてH5亜型HPAIVをそれぞれ93.02%および $\geq 99.75\%$ 不活化した(図3A)。また、H7亜型HPAIVに対しては、1時間および6時間の反応時間においてそれぞれ76.29%および $\geq 98.35\%$ 不活化した(図3B)。また、H1亜型IAVに対しては、1時間および6時間の反応時間においてそれぞれ $\geq 99.86\%$ および $\geq 99.92\%$ 不活化した(図3C)。この様に、HeDeLによるウイルス不活化効率は異なるウイルス株間で差が認められ、H1亜型IAV株、H5亜型HPAIV株、H7亜型HPAIV株の順にHeDeLに対する感受性が高いことが示された。

#### HeDeLの活性中心部位のアミノ酸配列スクリーニング

0.20 mMのHeDeLおよび非加熱または加熱した各ペプチド液群のH5亜型HPAIV不活化活性を評価したところ、HeDeLおよび加熱Pep5群において統計学的に有意なウイルス不活化活性が認められた。なお、この2群でのウイルス力価はともに検出限界値以下となっていた(図4)。

## ■ 考 察

本研究において、非加熱リゾチームはH5亜型HPAIVに対し不活化活性を示さなかったのに対し、加熱処理を行うことにより不活化活性を獲得することが明らかとなった。過去のSARS-CoV-2を標的とした実験においても同様の結果が得られており、非エンベロープウイルスと同様、エンベロープウイルスに対しても加熱変性によるリゾチームの構造変化が不活化活性の発揮に重要であることが示された。また、HeDeLに対する感受性は異なる亜型のIAV株間で大きく異なることが明らかとなった。異なる亜型株間でこのような差が生じた理由として、IAVのウイルス粒子表面に発現しているヘマグルチニン(HA)タンパク質のアミノ酸配列が各亜型株間で異なっている点が影響している可能性が考えられる。過去のSARS-CoV-2の解析においても、ウイルス粒子表面のスパイクタンパク質のアミノ酸配列が異なる複数の変異株間ではHeDeLに対する感受性が異なることが示されている。IAVのHAやSARS-CoV-2のスパイクタンパク質のアミノ酸配列が各株間で異なる場合、それらタンパク質の電位も異なるため、この電位の違いがHeDeLとウイルスタンパク質間の相互作用の強さに影響を与えている可能性が考えられる。また、本研究によりH5亜型HPAIV不活化に重要なHeDeLの活性中心部位として、23～57番目のペプチド領域を見出した。一方、過去のSARS-CoV-2を対象とした解析では、このペプチド領域はウイルス不活化に関与しない可能性を示唆する結果が得られており、ウイルス種の違いによりウイルス不活化を担う活性中心領域が異なることが明らかとなった。

## ■ 要 約

現在、世界中で猛威を振るっているHPAIVやヒト馴化IAVに対するウイルス不活化物質の新規シーズとしてHeDeLが見出された。この加熱変性リゾチームはH5亜型およびH7亜型HPAIVやヒト馴化H1亜型IAV株を不活化可能であることが示された。しかし、各亜型株間のHeDeLに対する感受性には差が認められるため、今後は各亜型株間での感受性の差に起因する原因を特定し、その知見を基に全ての株に対してより強い不活化活性を発揮できる様にHeDeLへの修飾を試みる等の発展研究が必要と考えられる。また、加熱変性リゾチームの全長アミノ酸のうち、23～57番目のペプチド配列がH5亜型HPAIV不活化に重要であることが示された。今後は、このペプチド領域と他の領

域を組み合わせるウイルス不活化活性の増強が認められるか等を解析し、HeDeL のウイルス不活化における構造活性相関のより詳細な解明を目指す。

## ■ 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) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.

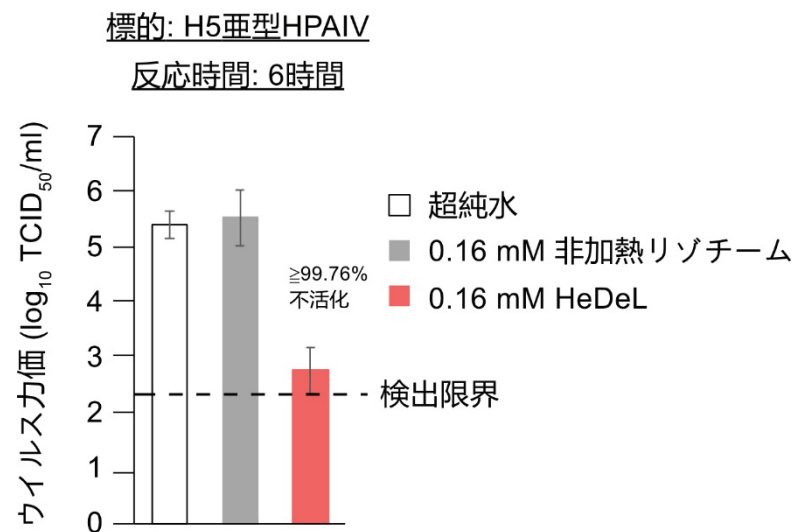


図 1. 非加熱リゾチームおよび HeDeL の H5 亜型 HPAIV 不活化活性  
超純水(陰性対照液)または各試験サンプルをウイルス液(H5 亜型 HPAIV)と混合した。25°C でこれら混合液を 6 時間静置し、常法に従い各群のウイルス力価を算出した。表中の数字はウイルス不活化率を示している。統計解析: Student's *t* test または Welch's *t* test を用いた; \*\*\* $p < 0.001$ )。

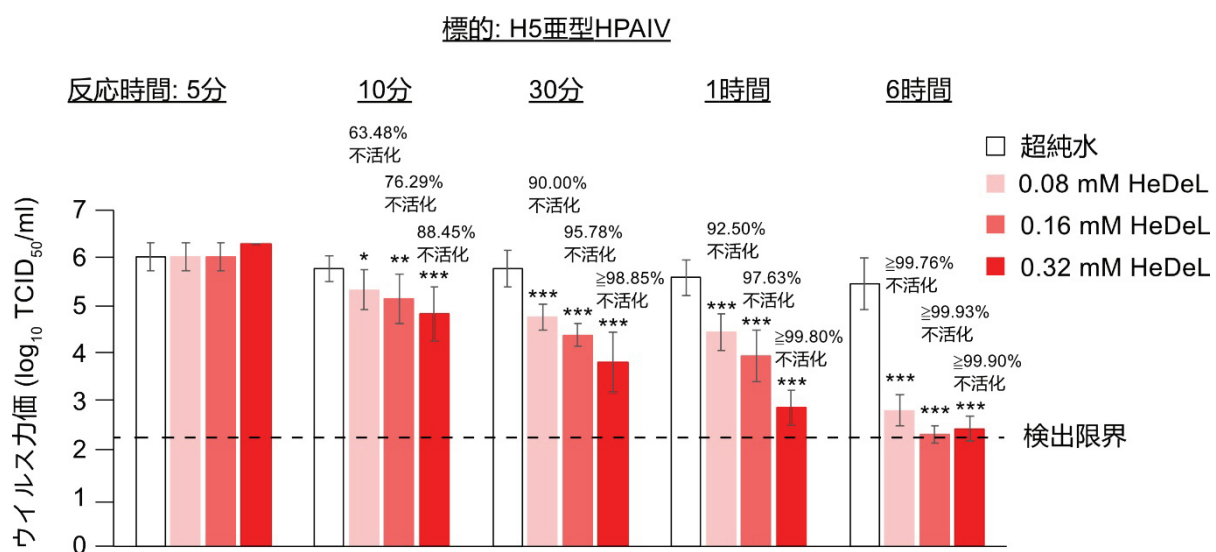


図2. 様々な濃度および反応時間における HeDeL の H5 亜型 HPAIV 不活化活性  
超純水(陰性対照液)または各試験サンプルをウイルス液(H5 亜型 HPAIV)と混合した。25℃でこれら混合液を 5 分～6 時間静置し、常法に従い各群のウイルス力価を算出した。表中の数字はウイルス不活化率を示している。統計解析: Student's *t* test を用いた; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 。

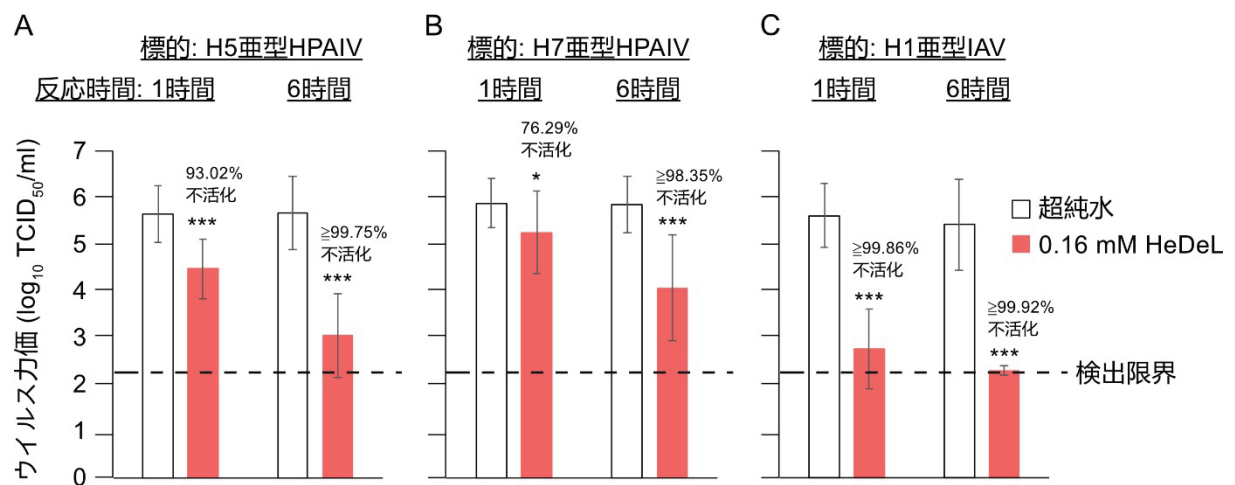
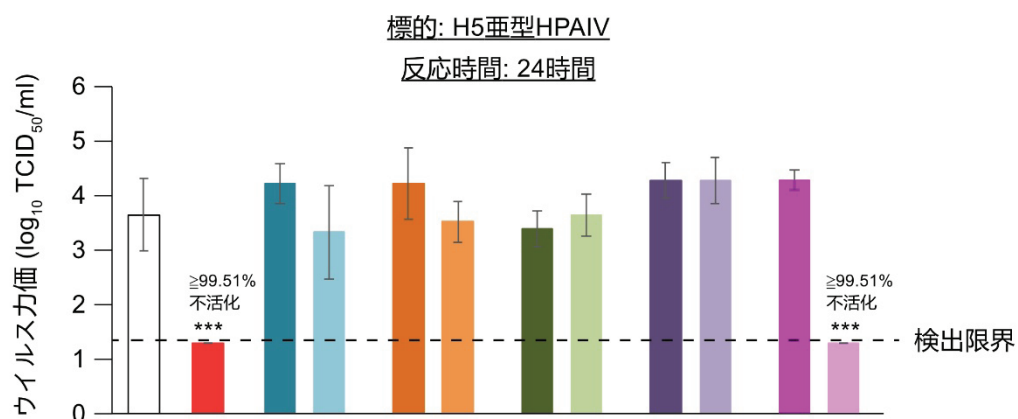


図 3. HeDeL の複数の亜型の IAV 株に対する不活化活性

超純水(陰性対照液)または 0.16 mM HeDeL をそれぞれ H5 亜型 HPAIV(A)、H7 亜型 HPAIV(B)、または H1 亜型 IAV(C)のウイルス液と混合した。25℃でこれら混合液を 1 時間または 6 時間静置し、常法に従い各群のウイルス力価を算出した。表中の数字はウイルス不活化率を示している。統計解析: Student's *t* test または Welch's *t* test を用いた; \**p*<0.05, \*\*\**p*<0.001)。





- 超純水 [ 非加熱Pep1液 (アミノ酸残基: 1~35番目) ] [ 非加熱Pep4液 (アミノ酸残基: 97~129番目) ]  
 ■ HeDeL [ 加熱Pep1液 (アミノ酸残基: 1~35番目) ] [ 加熱Pep4液 (アミノ酸残基: 97~129番目) ]  
 [ 非加熱Pep2液 (アミノ酸残基: 36~61番目) ] [ 非加熱Pep5液 (アミノ酸残基: 23~57番目) ]  
 [ 加熱Pep2液 (アミノ酸残基: 36~61番目) ] [ 加熱Pep5液 (アミノ酸残基: 23~57番目) ]  
 [ 非加熱Pep3液 (アミノ酸残基: 62~97番目) ]  
 [ 加熱Pep3液 (アミノ酸残基: 62~97番目) ]
- 各試験サンプル液の濃度は0.20 mM

図 4. HeDeL の活性中心部位のアミノ酸配列スクリーニング

超純水(陰性対照液)または 0.20 mM 各試験液をウイルス液(H5 亜型 HPAIV)と混合した。25℃でこれら混合液を 24 時間静置し、常法に従い各群のウイルス力価を算出した。表中の数字はウイルス不活化率を示している。統計解析: Student's *t* test または Welch's *t* test を用いた (\*\*\*) $p < 0.001$ 。