

# TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

加熱変性リゾチームのノロウイルス不活化製剤としての応用性と不活化機構に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-06-17 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高橋, 迪子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1765">https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1765</a>

博士学位論文内容要旨  
Abstract

専攻 Major	応用生命科学	氏名 Name	高橋 迪子
論文題目 Title	加熱変性リゾチームのノロウイルス不活化製剤としての応用性と不活化機構に関する研究		

ノロウイルスは急性胃腸炎の主たる原因ウイルスであり、激しい下痢や嘔吐、腹痛等を引き起こす。本ウイルスの不活化に広く使われているのが次亜塩素酸ナトリウムであるが、使用できる場面が限られている等の問題点がある。

これまでの研究で、卵白リゾチームを加熱変性することで Human norovirus GII.4 や Murine norovirus strain 1 (MNV-1) に対して不活化効果を示すことが報告されている。食品由来成分であるリゾチームがノロウイルスに対して不活化作用を示したという事実は学術的にも産業的にも価値のある知見といえる。しかし、加熱変性リゾチームをノロウイルス不活化製剤としてどのように応用できるか、また、加熱変性リゾチームがなぜノロウイルスに対して不活化効果を示すのかについては明らかになっていない。本研究では、加熱変性リゾチームの新規ノロウイルス不活化製剤としての応用性を検討するとともに、不活化機構について詳細に解析することを目的とした。

第1章では、加熱変性リゾチームをノロウイルスの新規ウイルス不活化剤としての応用性を検討することを目的として、第1節では加熱変性リゾチームの非加熱喫食食品中におけるノロウイルス不活化効果を、第2節ではノロウイルス以外の食水系感染症ウイルスとして HAV に対する不活化効果を検証した。第1節より、加熱変性リゾチームは複数のサラダおよびパンフィリング中において MNV-1 に対して不活化効果を示すことが明らかになった。加熱工程を伴わず、従事者の手指による取り扱いが比較的多い食品であるサラダやパンフィリングにおいても加熱変性リゾチームによる不活化効果が発揮されたことから、加熱変性リゾチームを食品に添加できるウイルス不活化剤として利用拡大できる可能性が示唆された。しかし、加熱変性リゾチームによる不活化効果には食品の種類によって差異があり、タマゴサラダなど一部の食品では加熱変性リゾチームによる不活化効果が十分に発揮されなかった。この現象は、食品成分が MNV-1 に保護的に働いたことによるものであると推察されたが、加熱変性リゾチームによるウイルス不活化機構が判然としていないことから、その解明が必要である。

第2節より、ノロウイルスに対して不活化効果を示す加熱変性リゾチームが系統学上遠縁な HAV に対しても効果を発揮したことが明らかになった。加熱変性リゾチームが遺伝子型の異なる複数株の HAV に対しても不活化効果を示したことから、加熱変性リゾチームによる不活化スペクトルは特定の種や型に限定的ではないことが示唆された。さらに、HAV 食中毒で世界的に問題となっているベリー類の洗浄剤として、加熱変性リゾチームが次亜塩素酸ナトリウムと同様に高い不活化効果を示すことも確認された。HAV やノロウイルスなどの食水系感染症ウイルスがベリーに混入しやすいポイント（生産に使用される水や作業従事者の手指）に応じて加熱変性リゾチームを利用することで、ベリーに付着したウイルスを効果的に洗浄できるものと考えられた。

続く第2章では、加熱変性リゾチームのノロウイルス不活化機構を明らかにすることを目的とした。第1節では、加熱変性リゾチームが MNV-1 に対して不活化効果を強く発揮する条件を探索し、加熱時の pH を 6.5 以上に調整することで加熱変性リゾチームの不活化効果が増大することを示した。加熱変性によってリゾチームのジスルフィド結合が開裂し、近傍に位置する疎水性アミノ酸が露出することでウイルスに対して不活化効果を示すようになるが、加熱時の pH がリゾチームの構造変化をもたらすきっかけであることが示唆された。

第2節では、加熱変性リゾチームがどのステージでウイルスに対して作用しているのか明らかにす

るため、加熱変性リゾチーム曝露した MNV-1 を接種した際の宿主細胞におけるサイトカインの発現解析を行った。加熱変性リゾチーム処理した MNV-1 は粒子として宿主細胞内に侵入できず、サイトカインの発現を誘導しなかったことから、加熱変性リゾチームのウイルスに対する不活化作用は細胞外で起きていることが明らかになった。

第3節では、加熱変性リゾチームにおけるウイルス不活化ドメインを探索するため、はじめに断片化試薬を用いて断片化したリゾチームの加熱変性体による MNV-1 不活化効果を検討した。加熱変性リゾチームは構造タンパクとして働いており、細断したリゾチームの加熱変性体では不活化効果が失われることが明らかになった。次に、既報で MNV-1 に対して不活化効果を示すことが確認された領域 (Lzm 5-39) に任意の変異を加えた際の不活化効果について検討した。その結果、加熱変性リゾチームによる不活化効果には疎水性アミノ酸ならびに正電荷が寄与していることが明らかになった。さらに、Lzm 5-39 以外の領域による不活化効果についても検討したが、リゾチーム配列の N 末端寄りに存在する 2 つのヘリックス構造が不活化効果に重要であることが示唆された。

本研究では加熱変性リゾチームを用いて複数の食品中においてノロウイルスに対して不活化効果を示すこと、さらにその不活化機構として、リゾチームの前半領域における立体構造と、疎水性アミノ酸ならびに正電荷が重要であることが示唆された。これらは加熱変性リゾチームをノロウイルスの不活化製剤として利用拡大するにあたり有用な知見になると考えられる。