

## B-41 MALDI-TOF-MSを用いたアルミニウム系凝集剤によるウイルス不活化機構の検討

○白崎 伸隆<sup>1\*</sup>・松下 拓<sup>1</sup>・松井 佳彦<sup>1</sup>・大野 浩一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門（〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目）

<sup>2</sup>大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻（〒565-0871大阪府吹田市山田丘2-1）

\* E-mail: nobutaka@eng.hokudai.ac.jp

### 1. はじめに

凝集剤の添加による凝集沈澱処理は、自重沈降できないコロイド粒子の除去に広く用いられている。水道水源中に存在しているコロイド粒子のほとんどは負に帯電しており、粒子間の電气的反発力によって安定的に分散した状態で存在している。ここに、正に帯電した凝集剤を添加することにより、コロイド粒子の表面電位が中和され（荷電中和）、粒子間の引力（ファンデルワールス力）が電气的反発力に比べて大きくなることで粒子相互の衝突結合が生じ、更なる架橋吸着により自重沈降可能な大きさまで成長することで沈澱除去される。水系感染症を引き起こす病原性ウイルスもコロイド粒子に含まれるため、凝集沈澱処理による除去が期待される。

この凝集沈澱処理において、アルミニウム系凝集剤を用いた場合、ウイルスが除去されるのみならず、感染力を失う、すなわち不活化されることが報告されており、凝集剤の種類やウイルス種によって不活化効果が異なることが示されている<sup>12)</sup>。しかしながら、不活化のメカニズムを解明するまでには至っていないのが現状である。

そこで、本研究では、アルミニウム系凝集剤を用いた凝集沈澱処理におけるウイルスの不活化について、不活化前後におけるウイルス外套タンパク質の質量変化をMALDI-TOF-MS（マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計）を用いて分析することにより、アルミニウム系凝集剤によるウイルス不活化機構の検討を行った。ウイルス外套タンパク質は、細胞感染時におけるレセプター（細胞側標的分子）への特異的吸着能を有しているため、ウイルス外套タンパク質の変化は、レセプターへの吸着能、すなわち感染力の変化に大きく寄与しているものと考えられる。また、MALDI-TOF-MS法は、数千から10万を超える高質量領域まで測定可能な質量分析法であり、分子量の測定と構造解析が同時に且つ

短時間に行えること等から、タンパク質、ペプチド等の生体高分子の解析に広く用いられており、これまでにウイルス外套タンパク質の質量分析にも用いられている<sup>34)</sup>。

### 2. 実験方法

#### (1) 使用したウイルスと定量法

本研究では、病原性ウイルスの代替指標として広く用いられている大腸菌ファージQ $\beta$ （直径24-26 nm、外套タンパク質の分子量 14,123 Da）を使用した。なお、Q $\beta$ 濃度の定量には、ブラック形成法（感染性ファージを定量可）とリアルタイム定量RT-PCR法（感染性ファージ + 不活化ファージを定量可）を用いた。

#### (2) 凝集沈澱処理

精製したQ $\beta$ を $10^{11}$  PFU/mLになるように添加した豊平川河川水（北海道札幌市；DOC 0.9 mg/L, OD<sub>260</sub> 0.027 cm<sup>-1</sup>, 濁度 0.5 NTU）を原水とし、遠沈管に8 mL添加した。ここに、凝集剤としてポリ塩化アルミニウム（以下PAClと表記）を2,000, 3,000, 4,000  $\mu$ M-Al（54, 81, 108 mg-Al/L）になるように添加し、直ちにNaOHにてpHを6.8に調整した。これを1分間ボルテックス攪拌し、60分間静置した。この後、水相に残存するアルミニウムフロックを分離するために2,000  $\times$  gにて10分間遠心分離し、遠心分離後の上澄水をメンブレンフィルター（公称孔径0.05  $\mu$ m, ポリカーボネート, Millipore）を用いてろ過した。原水および膜ろ過水中のQ $\beta$ 濃度をブラック形成法およびリアルタイム定量RT-PCR法にて定量することにより、Q $\beta$ の処理性を評価した。また、原水および膜ろ過水の粒径分布を粒子径測定装置（Zetasizer Nano ZS, Malvern）にて測定した。

凝集沈澱処理前後のQ $\beta$ 外套タンパク質の質量変化を

MALDI-TOF-MSを用いて分析するために、Q $\beta$ の原水初期濃度を更に上げた凝集沈澱処理を行った。精製したQ $\beta$ を $10^{15}$  PFU/mLになるように添加した河川水（豊平川河川水）を原水とし、マイクロチューブに500  $\mu$ L添加した。ここに、PAClを4,000  $\mu$ M-Al（108 mg-Al/L）になるように添加し、直ちにNaOHにてpHを6.8に調整した。これを1分間ボルテックス攪拌し、60分間静置した後、 $1,000 \times g$ にて10分間遠心分離した。原水および遠心分離後の上澄水に含まれるQ $\beta$ 外套タンパク質の質量をMALDI-TOF-MSにて分析することにより、Q $\beta$ 外套タンパク質の質量変化の有無を確認した。

### (3) MALDI-TOF-MSによるQ $\beta$ 外套タンパク質の質量分析

シナピン酸（Sigma-Aldrich）を10 mg/mLになるように添加した0.1%トリフルオロ酢酸含有50%アセトニトリル（v/v）溶液をマトリックス溶液とし、凝集沈澱処理前の原水あるいは凝集沈澱処理後の上澄水とマトリックス溶液を1:1の割合で混合した後、混合試料1  $\mu$ L  $\times$  5回をサンプルプレート上に滴下し、自然乾燥させた。これらの試料のQ $\beta$ 外套タンパク質の質量を、MALDI-TOF-MS（Voyager-DE STR-H, Applied Biosystems）にて分析した。

## 3. 結果と考察

### (1) 凝集沈澱処理におけるQ $\beta$ の処理性

凝集沈澱処理（膜ろ過後）におけるQ $\beta$ の除去率を図-1に示す。なお、図の縦軸は $\text{Log}[C_0/C]$ （ $C_0$ ：原水のQ $\beta$ 濃度、 $C$ ：膜ろ過水のQ $\beta$ 濃度）にて表記した。図に示すように、凝集剤を添加しない場合、Q $\beta$ の除去率は0.2 log以下であったのに対し、凝集剤添加濃度を上げることにより除去率が向上し、4,000  $\mu$ M-Alの凝集剤添加濃度においては4 log以上の除去率が得られた。また、ブラック形成法によって評価したQ $\beta$ の除去率とリアルタイム定量RT-PCR法によって評価したQ $\beta$ の除去率の間に差が見られ、4,000  $\mu$ M-Alの凝集剤添加濃度においては約2 logの差となった。

2つの定量法によって得られた結果に差異が生じた原因として、感染力を失ったウイルス、すなわち、不活化したウイルスの存在と凝集塊形成の2つが考えられた。後者においては、いくつかの感染性のあるウイルスが集まって形成される凝集塊をブラック形成法によって定量した場合、実際の感染性のあるウイルス数に比べて定量値が小さく評価される、すなわち除去率が過大評価されることが指摘されている<sup>9)</sup>。そこで、2つの定量法によって得られた結果の差異が、凝集塊形成によるものでないことを示すために、膜ろ過水中のQ $\beta$ の粒径分布を測定した。結果を図-2に示す。図に示すように、膜ろ過水中のQ $\beta$ の粒径分布は、いずれの凝集剤添加濃度において

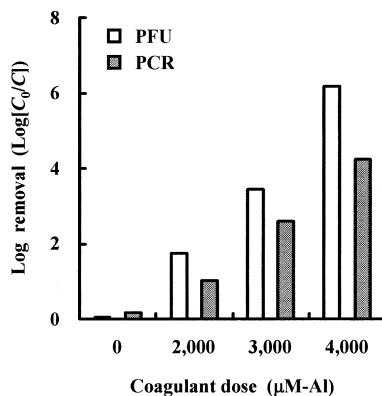


図-1. 凝集沈澱処理（膜ろ過後）におけるQ $\beta$ の処理性

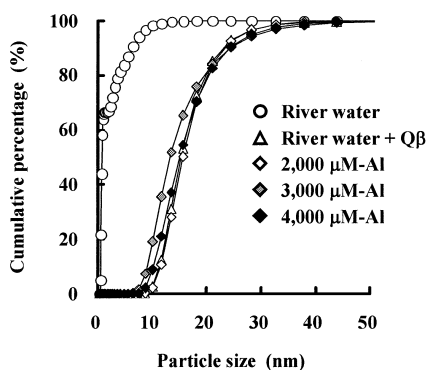


図-2. 膜ろ過水中のQ $\beta$ の粒径分布

も、凝集剤を添加しない場合のQ $\beta$ の粒径分布、すなわちQ $\beta$ の直径24-26 nmと同程度であった。従って、凝集剤を添加した場合は、膜ろ過水中のQ $\beta$ は単分散した状態で存在していたにも関わらず、2つの定量法によって得られた結果に差異が生じたことから、不活化したウイルスの存在により、2つの定量法によって得られた結果に差異が生じたことが明らかとなった。以上の結果から、PAClを用いた凝集沈澱処理によってQ $\beta$ が除去されるのみならず不活化されたことが示された。

### (2) 凝集沈澱処理におけるQ $\beta$ 外套タンパク質の質量変化

凝集沈澱処理前後におけるQ $\beta$ 外套タンパク質のMALDIマスペクトルの全体図および部分拡大図を図-3に示す。図に示すように、凝集沈澱処理前後において、Q $\beta$ 外套タンパク質のプロトン付加体イオン（ $[M + H]^+$  14,124 Da）ピークが検出された。これらのピークを拡大したところ、凝集沈澱処理後には、図中の矢印で示したQ $\beta$ 外套タンパク質のプロトン付加体イオンの質量よりも大きな質量のピークが検出された。従って、PAClを用いた凝集沈澱処理によって、Q $\beta$ 外套タンパク質の一部

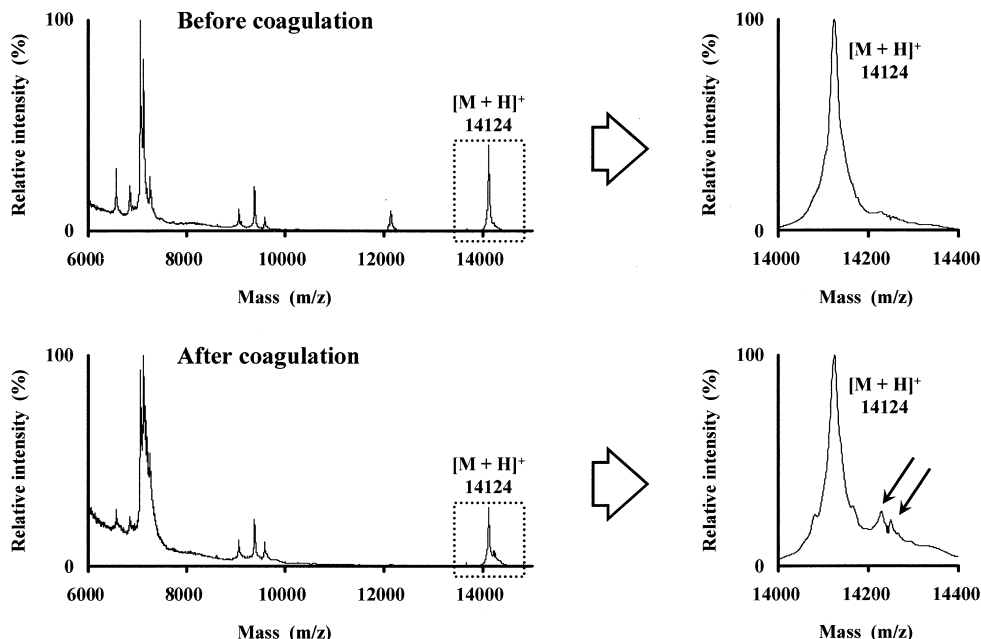


図-3. Q $\beta$ 外套タンパク質のMALDIマスペクトル

の質量が増加したことが確認された。本研究で行った凝集沈澱処理においては、凝集剤としてPACIを添加しているため、PACIに含まれるアルミニウム成分がQ $\beta$ 外套タンパク質に結合することにより質量が増加したものと考えられる。従って、PACIに含まれるアルミニウム成分がQ $\beta$ 外套タンパク質に結合することにより、Q $\beta$ 外套タンパク質のレセプターへの吸着が阻害され、結果として感染力を失う、すなわち不活化した可能性が示唆された。

#### 4. まとめ

本研究では、アルミニウム系凝集剤を用いた凝集沈澱処理におけるウイルスの不活化について、病原性ウイルスの代替指標として広く用いられている大腸菌ファージQ $\beta$ を用いて評価し、不活化前後におけるウイルス外套タンパク質の質量変化をMALDI-TOF-MSを用いて分析することにより、以下の知見を得た。

- (1) PACIを用いた凝集沈澱処理によって、Q $\beta$ が除去されるのみならず不活化されたことが示された。
- (2) PACIを用いた凝集沈澱処理によって、Q $\beta$ 外套タンパク質の質量が増加したことが確認された。従って、アルミニウム系凝集剤に含まれるアルミニウム成分がQ $\beta$ 外套タンパク質に結合することにより、Q $\beta$ が不活化された可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) Matsui Y., Matsushita T., Sakuma S., Gojo T., Mamiya T., Suzuoki H. and Inoue T.: Virus inactivation in aluminum and polyaluminum coagulant, *Environmental Science and Technology*, Vol. 37, No. 22, pp. 5175-5180, 2003.
- 2) Shirasaki N., Matsushita T., Matsui Y., Urasaki T. and Ohno K.: Comparison of behaviors of two surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophages Q $\beta$  and MS2, during the aluminum coagulation process, *Water Research*, Vol. 43, No. 3, pp. 605-612, 2009.
- 3) Swatkoski S., Russell S., Edwards N. and Fenselau C.: Analysis of a model virus using residue-specific chemical cleavage and MALDI-TOF mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, Vol. 79, No. 2, pp. 654-658, 2007.
- 4) Colquhoun D. R., Schwab K. J., Cole R. N. and Halden R. U.: Detection of norovirus capsid protein in authentic standards and in stool extracts by matrix-assisted laser desorption/ionization and nanospray mass spectrometry, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 4, pp. 2749-2755, 2006.
- 5) Grant S. B.: Virus Coagulation in Aqueous Environments, *Environmental Science and Technology*, Vol. 28, No. 5, pp. 928-933, 1994.

(2010.7.9 受付)