

高級脂肪酸塩とタンパク質の複合体形成を利用した 抗ウイルスハンドソープの開発 Development of Anti-virus Hand Soap Using Complex Formation of Long-chain Fatty Acid Salt with Proteins

秋葉 勇, 木下 雅貴, 釘本 大輔, 中西 亮輔
Isamu Akiba, Masaki Kinoshita, Daisuke Kugimoto, Ryosuke Nakanishi

北九州市立大学国際環境工学部
The University of Kitakyushu

インフルエンザウィルスの予防対策に有効でかつ皮膚にやさしい高級脂肪酸塩の石けんを原料とするハンドソープを開発することを目的として、高級脂肪酸塩とインフルエンザウィルス粒子の複合体形成について検討を行った。等温滴定熱量測定、小角 X 線散乱測定の結果から、高級脂肪酸塩はインフルエンザウィルスの外膜に存在するスパイクタンパク(ヘマグルチニン)と発熱相互作用により複合体を形成することを見出した。この複合体形成により、ウィルスの感染価を低下させることが示唆された。

キーワード： 高級脂肪酸塩、インフルエンザウィルス、小角 X 線散乱、極小角 X 線散乱

背景と研究目的：

ウィルス感染症は、大きな社会問題となっており、有効な対策が求められている。一般的には、アルコールやヨウ素系消毒液を用いた手指消毒が広く活用されているが、これらの手法は、極めて頻繁に手洗いを行う看護師等にとっては手荒れの原因となり、細菌感染などの二次的な被害を引き起こす可能性が高い。筆者らはシャボン玉石けん(株)と共同で、手荒れを起こさずにウィルスを不活性化化するハンドソープの開発に取り組んでいる。その過程において、高級脂肪酸塩がインフルエンザウィルスの不活性化に極めて効果的であることを見出した。さらに、高級脂肪酸塩は、他の界面活性剤と比較してノロウィルス等の比較的強いウィルスに対しても効果が高いことを見出した。以前に行った BL40B2 における小角 X 線散乱(SAXS)実験から、高級脂肪酸塩とウィルス由来タンパク質が複合体を形成することを見出し、これが不活性化の要因であることが強く示唆された[1, 2, 3]。しかしながら、BL40B2 では、高級脂肪酸塩が形成するミセルの構造変化については観測できるものの、100 nm 程度の大きさを持つウィルス粒子の構造変化を追跡することは困難である。そこで、本研究では、BL19B2 を用いて極小角 X 線散乱(USAXS)測定を行い、ウィルス由来タンパク質と高級脂肪酸塩ミセルの複合体形成について検討することを目的とする。

実験：

試料 ウィルス由来タンパク質試料には、広島大学大学院 坂口教授より提供されたトリインフルエンザ由来のたんぱく質粒子(エンベロープ有)の PBS 分散液(VP)を用いた。高級脂肪酸塩には炭素数が 14 のミスチン酸カリウム(C14K)を用いた。C14K はイオン交換水中に 1.0 mg/mL の濃度で分散させた。VP、C14K およびそれらの混合物に対して以下の測定を行った。

等温滴定熱量測定(ITC) ITC の測定は、Microcal 社製 VP-ITC マイクロ熱量計を用いて行った。VP 分散液をリザーバー、C14K をシリンジに入れ、VP に対して C14K を滴下して、熱量を測定した。比較のために、VP の外膜モデルあるジラウリルイルホスファチジルコリンのベシクル(DLPC)、VP のスパイクタンパク質である HA タンパク(HA)に対しても同様の実験を行った。

小角 X 線散乱(SAXS)・極小角 X 線散乱(USAXS)測定 SAXS および USAXS 測定は BL19B2 にて、入射 X 線エネルギー 24 keV、検出器 Pilatus 2M、カメラ長は SAXS では 2 m、USAXS では 35 m で行った。カメラ長の校正は標準試料にベヘン酸銀、コラーゲンをを用いて行った。照射時間は SAXS では 5 分、USAXS では 30 分で測定した。得られた 2 次元 SAXS 像を円環平均し、散乱強度 $I(q)$ vs 散乱ベクトルの絶対値 q のプロットに変換した。

結果および考察：

Fig.1 に VP、DLPC、HA に対して C14K を滴下して得られた ITC 曲線を示す。C14K と VP は強い発熱を示したことから、C14K-VP 間に引力相互作用が働いていることがわかる。VP の外膜モデルである DLPC に対して同様の実験を行ったところ、熱量の変化は見られず、C14K は VP の外膜とは引力相互作用をしていないことがわかる。一方、VP の外膜に含まれる HA タンパクに対しては VP と同様に強い発熱を示した。このことから、C14K は VP の外膜に含まれる HA と引力相互作用していることがわかる。HA は VP が細胞に侵入する際に必要なスパイクタンパクであることから、C14K は HA と複合化し、その機能を VP から取り除くことで VP の感染価を低下させることができると考えられる。VP-HA の複合体形成を検討するために、SAXS、USAXS 測定を行った。

Fig.2 に SAXS の測定結果を示す。C14K と VP を混合すると 1.74 nm^{-1} に散乱ピークが出現する。このピークから形成される構造の長周期は 3.6 nm である。この距離は C14K 単独で形成する結晶の長周期よりも長いことから、C14K と HA の複合体に由来するものであると考えられる。このピークは C14K と VP を混合した後、1 秒程度で出現して時間とともに増大し、12 秒でピークの増大が終了する。それ故、C14K-VP の複合体形成は速度が速いことがわかった。一般にハンドソープなどを利用した手指洗浄は 1 分以内であることから、速い複合体形成による不活性化は、感染予防に効果的であると考えられる。

今後の課題：

Fig.3 に照射時間 1 時間、積算回数 5 回で得られた USAXS プロファイルを示す。極めて長時間の測定にもかかわらず、十分な散乱強度が得られず、S/N が低いデータとなった。これは、入射 X 線の強度が極めて弱いためであり、溶液系の USAXS 実験を行うためには、改善が必要である。また、ビームストッパー周辺での寄生散乱が強く、 $q > 0.03 \text{ nm}^{-1}$ の範囲のデータが有効なデータとして得られた。VP 粒子の半径は $100 \sim 200 \text{ nm}$ 程度であるため、精度のよい解析を行うためには、より低い q 領域のデータを精度よく集積する必要がある。また、VP-C14K 混合物に対しては、ITC や SAXS 測定において、高い精度で相互作用、構造変化が観測されていたにもかかわらず、本実験においては解析を行うことができる質を持ったデータを得ることができていない。これは、上記の装置上の問題に加え、混合することにより VP の濃度が低下したために、十分な過剰散乱が得られなかったことが原因である。

以上のことから、今後は装置のセットアップを含め、測定方法・条件を再検討し、高精度の解析を実施できるデータの集積を行う必要がある。

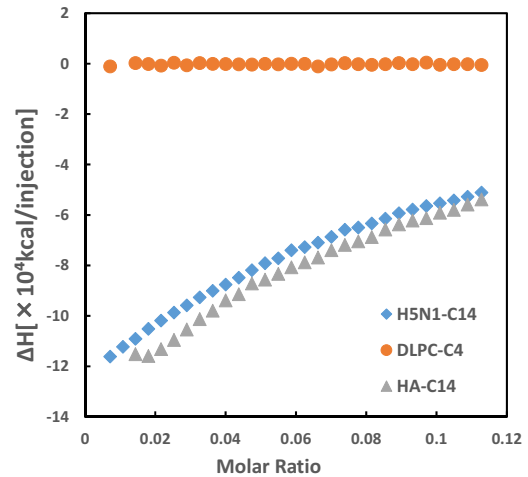


Fig.1. ITC 測定より得られた滴定熱量曲線。
青：VP-C14K、橙：C14K-DLPC、
グレー：C14K-HA

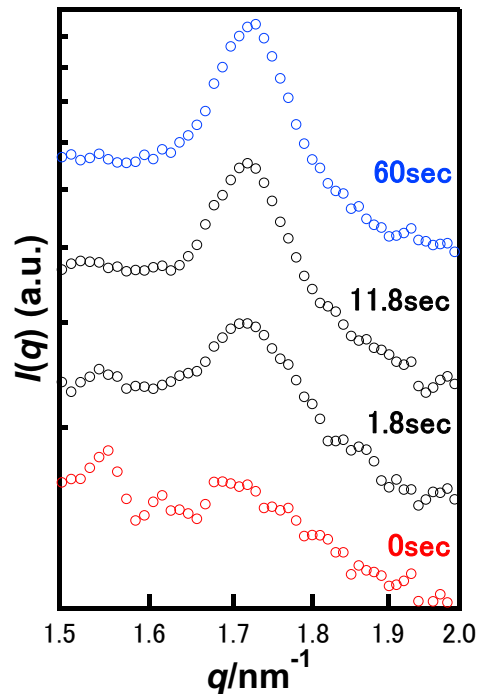


Fig.2. 時分割 SAXS 測定による C14K-VP の複合体形成過程の追跡

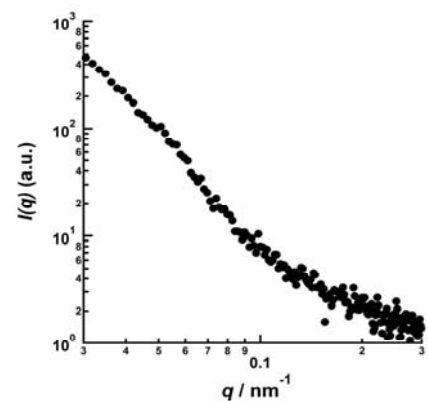


Fig.3. VP 粒子に対して得られた USAXS プロファイル

参考文献：

- [1] 秋葉勇 他、平成 23 年度 重点産業利用課題成果報告書(2011A), 2011A1715.
- [2] 秋葉勇 他、平成 24 年度 重点産業化促進課題・一般課題(産業分野)実施報告書(2012B), 2012B1799.
- [3] 秋葉勇 他、平成 25 年度 重点産業化促進課題・一般課題(産業分野)実施報告書(2013A), 2013A1635.