

小角 X 線散乱による石鹸-ウイルス間の相互作用の研究 Study on Soap-Virus Interaction with Small-Angle X-ray Scattering

秋葉 勇, 酒匂 恵, 村上 慎一, 櫻井 和朗
Isamu Akiba, Megumi Sakou, Shinichi Murakami, and Kazuo Sakurai

北九州市立大学
The University of Kitakyushu

本研究では、高級脂肪酸塩とウイルス由来タンパク間の発熱相互作用により形成される複合体の形成過程を、時分割小角、広角 X 線散乱法により追跡し、その機構について検討した。時分割小角 X 線散乱から、石けん-タンパクの複合体形成は極めて速く行われることが見出された。一方、複合体内において極めて緩やかに脂肪酸アルキル鎖の結晶化が進行することを見出した。

キーワード： 石鹸、ウイルス、時分割 X 線散乱

背景と研究目的：

近年の新型インフルエンザの流行のように、感染性ウイルスによる健康被害が社会的問題となっている。このような感染症対策として、アルコール消毒液などの化学薬品を用いた感染症対策製品が多く市場に出ている[1]。しかし、化学薬品を用いた感染症対策製品は、繰返し使用による手荒れを引き起こし、より強い薬品を使う場合には、直接皮膚に接触させてウイルスの不活性化を行うことができないため、十分な感染防止効果が期待できない。これらの問題を解決するために、本申請課題では、手荒れを引き起こさない天然油脂由来の脂肪酸塩からなる石けんに着目し、抗インフルエンザウイルス活性が高く、手荒れ等、人体に対して副次的な被害を引き起こすことのない石けん製品を開発するために必要となる、石けんとインフルエンザウイルス由来タンパクの相互作用および分子集合体構造の変化およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

実験：

試料 ウイルス由来タンパク試料(VP)には、トリインフルエンザウイルス由来のタンパクを用い、これをリン酸緩衝溶液に分散させた溶液を実験に用いた。石けん試料には、炭素数 14 の飽和脂肪酸カリウム塩(C14)を用いた。C14 を所定の濃度でイオン交換水に分散させ、実験に用いた。

時分割 X 線散乱測定 VP と C14 を混合し、混合直後からの X 線散乱の時分割測定を行った。測定は、SPring-8 の BL40B2 にて、波長 1.0 Å、検出器 II-CCD、カメラ長 1.5 m、0.35 m にて行った。以降、カメラ長 1.5 m での実験を小角 X 線散乱(SAXS)、カメラ長 0.35 m での実験を広角 X 線散乱(WAXS)とする。

結果および考察：

図 1 に C14 と VP を混合した直後から測定した時分割 WAXS の結果を示す。 $q=4.7 \text{ nm}^{-1}$ に見られるピークは C14-VP 混合系特有のものであり、C14 および VP 単独またはドデシル硫酸ナトリウムなど、市販のハンドソープ等で良く用いられている他の脂質と VP の混合系では観察されない。このことから、C14 と VP が複合体を形成していることが示唆される。このピークは C14 と VP を含まない PBS 緩衝液を混合した際に生じる塩析により生じる脂質の結晶由来のピークよりやや低角側に現れているが、比較的近い領域に出現していることから、複合体中での脂質の結晶化によるものと考えられる。一般に、界面活性剤によるウイルスの不活性化は、脂質の疎水基との疎水性相互作用によるエンベロープの融解にあるとされているが、WAXS の結果から、高級脂肪酸の場合は、これとは異なるメカニズムで不活性化が進行すると考えられる。

図 2 にこの WAXS ピークの時間変化を示す。比較として、同図に塩析による C14 の結晶化を示す。塩析では極めて速く脂質の結晶化が進行するが、C14-VP 混合系では混合後 2 時間までは緩やかに結晶化が進行し、その後急激に速くなることが分かった。このピークの時間変化は C14 と VP の水溶液を混合したのち、白濁していく過程を目視観察した結果ときわめてよく対応しており、目

視で見られた状態の変化が、アルキル鎖の結晶化による複合体の析出過程をとらえていたと考えることができる。このような脂質アルキル鎖の結晶化速度の大幅な遅延は、先に複合体が形成され、その内部で空間的な制約を受けながら結晶化が進行するために生じると考えられる。VP 粒子および C14 ミセルのサイズや構造に関する情報はより小角側に現れることから、次に SAXS により複合体の形成について検討を行った。

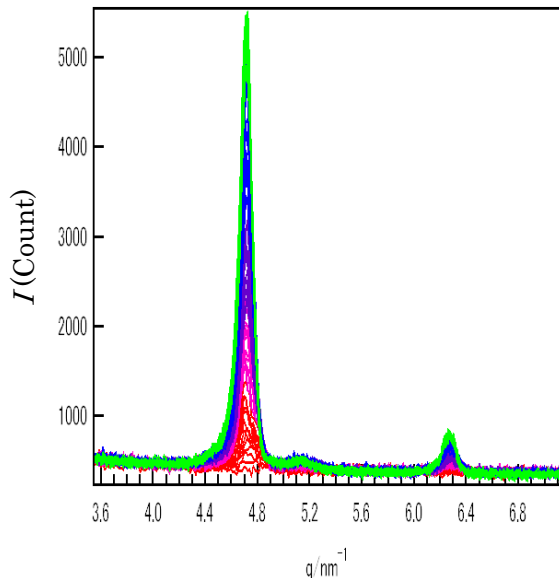


図 1. C14-VP 系の時分割 WAXS 測定結果

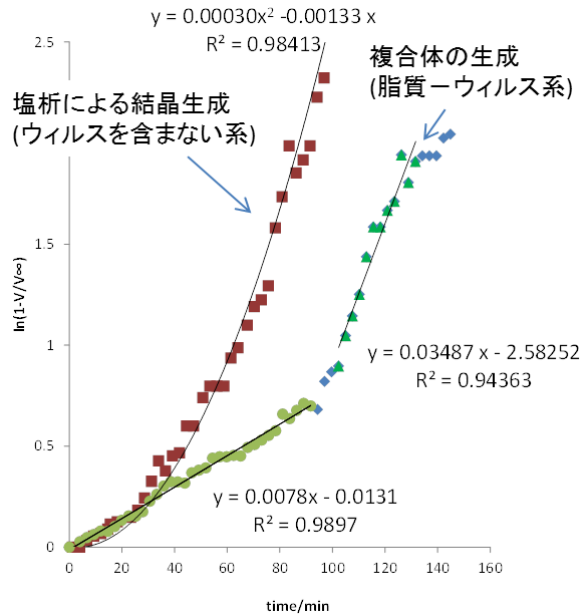


図 2. 時分割 WAXS で得られたピークの強度変化

図 3 に C14-VP の混合直後からの SAXS プロファイルの変化を示す。 $q=1\sim 2\text{ nm}^{-1}$ に見られるブロードな極大は C14 ミセルに由来する散乱である。混合直後は C14 ミセルからの散乱のみが観察されるが、混合から 10 秒経過後に $q=1.8\text{ nm}^{-1}$ にピークが出現し、時間の経過とともにそのピークが増大していくことが分かった。このピークは C14 や VP の単独水溶液あるいは他の脂質と VP の混合系には全く見られないことから、WAXS の場合と同様、C14-VP 複合体の形成に由来するピークであると考えられる。このピーク強度の時間変化を図 4 に示す。SAXS で見られた複合体形成に由来するピークの強度は、10 秒程度でほぼ最大強度に到達していることがわかる。これは、WAXS で見られた複合体由来のピーク強度の変化と比較して極めて速い。以前に行った、混合熱測定では、混合直後から数秒程度での発熱相互作用による C14-VP 複合体の形成を観察している[2]。C14-VP 間の発熱相互作用は、この SAXS で見られる複合体の形成過程に対応していると考えられる。このことから、混合後、極めて速く引力相互作用により C14 と VP は複合体を形成し、

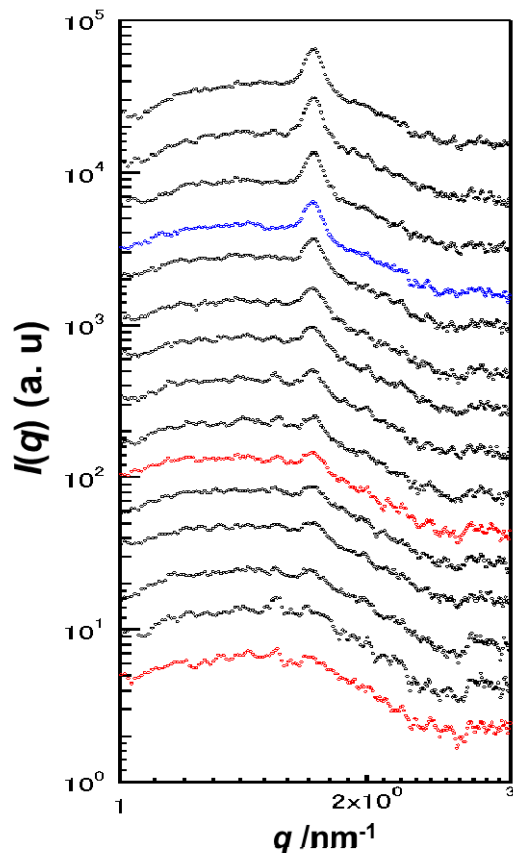


図 3. C14-VP 混合系の混合直後からの SAXS プロファイルの時間変化

その後、緩やかに C14 のアルキル鎖の結晶化が進行していくと考えられる。このことから、高級脂肪酸塩を用いた場合、他の界面活性剤とは異なるメカニズムでウィルスの不活性化が進行すると思われる。また、一般的な疎水性相互作用によるウィルス不活性化は、比較的遅いと考えられるが、本研究で見出された発熱相互作用による脂質と VP の複合体形成は極めて速く生じることから、従来よりも格段に速くウィルスの不活性化が達成されると期待できる。

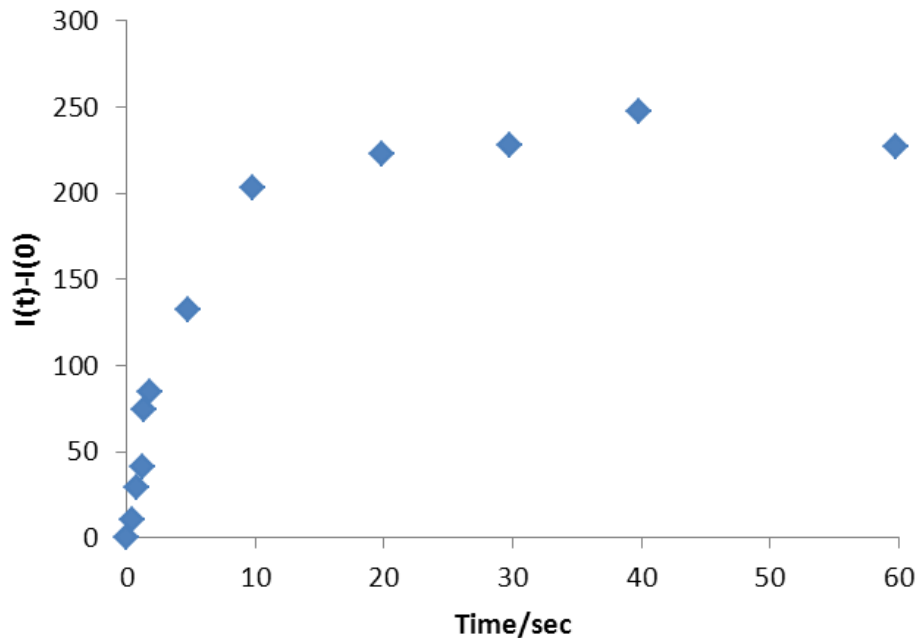


図 4. SAXS で見られた複合体形成に由来するピークの時間変化

今後の課題：

今回の研究から、高級脂肪酸とインフルエンザウィルスとの相互作用は他の界面活性剤とは大きく異なることを見出した。しかし、この違いがインフルエンザウィルスの不活性化にどのように関係しているかという点については、いまだ不明な部分が多い。この点を解明することがより高性能な石けんの開発には必要不可欠である。また、本研究で見出された相互作用は、インフルエンザウィルスのようなエンヴェロープウィルスのみならずノロなどの非エンヴェロープウィルスにも効果的であると期待できることから、今後は非エンヴェロープウィルスの不活性化についても検討を行う。

参考文献：

- [1] 谷口初美、池野貴子、平成 21 年度感染症対策センター研究報告書 (2009).
- [2] T. Kawahara, M. Sakou, I. Akiba, in preparation.