

VII-59

アフィニティクロマトグラフィーによる
ウイルスカプシドタンパクと
親和性の高い汚泥由来タンパク質の検索

東北大学大学院
東北大学大学院
東北大学
東北大学大学院

学生員 ○加藤 聖
正会員 福士謙介
正会員 熊谷幸博
正会員 大村達夫

1. はじめに

昨年, 筆者らは下水一次処理水中の細菌が産出するバイオポリマーを用いて, ワクチン株の弱毒小児麻痺ウイルスI型(Lsc, 2 ab株)の吸着を試み, バイオポリマーにはウイルス吸着能力が存在することを明らかにした. また既往の研究から活性汚泥フロックはポリオウイルスやロタウイルスを吸着することが報告されている⁽¹⁾. しかしウイルスがなぜバイオポリマーや活性汚泥に吸着されるのかというその吸着機構についての知見はほとんど得られていない.

バイオポリマーや汚泥の構成成分はタンパク質, 糖鎖, 脂質, DNAの混合物であるがその大部分(重量比で50~60%)はタンパク質である. タンパク質は様々な物質と親和性を持っていることから, 筆者らは汚泥中のタンパク質に着目し, 小児麻痺ウイルスに親和性の高いタンパク質の検索を行った. 本研究ではまず活性汚泥中のタンパク質を抽出し, FPLCによる分子画分を行った後, 小児麻痺ウイルスカプシドタンパク表面のペプチド配列を合成し, それをリガンドとしてアフィニティクロマトグラフィーを行い, ウイルスと親和性の高いタンパク質を検索した.

2. 実験方法

仙台市の下水処理場より返送汚泥(MLSS 5800mg/l)を採取し, 遠心分離してペレット中の疎水性タンパク質を採取し, 凍結融解, 音波処理によりタンパク質を上清側に誘出させ, その上清を硫酸アンモニウムで沈殿させることにより粗精製, 濃縮を行い汚泥タンパク質を抽出した. タンパク質濃度の測定はLowry法により行った.(タンパク質標準物質としては牛血清アルブミンを用いた.) 抽出後, サイズエクスクリュージョンクロマトグラフィー(Superdex 75 HR10/30, 画分範囲: 3,000~7,0000)を用いて分子画分を行った. 実験にはAKTAFPLCシステム(Amersham Pharmacia Biotech)を用いた. 分子量を推定するための標準サンプルとして分子量が既知の4種類のタンパク質, ribonuclease A (分子量 13,700MW), chymotrypsinogen A (25,000), ovalbumin (43,000), albumin (67,000)を用いて汚泥より抽出したタンパク質の分子量を推定した. タンパク質濃度の測定は280nm吸光度を用いた. クロマトの流速は0.5ml/minであり緩衝液としてはpH7のリン酸緩衝液を用いた. また陰イオン交換カラム(HiTrapQ)による抽出タンパク質の分子画分も試みた. 開始緩衝液は0.02 M Tris-HCl, pH8.5で行い, 溶出緩衝液として0.02 M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH8.5を用いた. 流速0.5nl/min, 溶出の際に20カラム体積でグラディエントをかけて溶出を行う. その後アフィニティクロマトグラフィーを用いて分画したタンパク質の親和性の評価を行った. 汚泥タンパクの吸着を行う合成ペプチドとしては, ワクチン株の弱毒小児麻痺ウイルスI型(Lsc, 2ab株)のRNAを覆うVP1~VP4までのカプシドタンパクのなかで, 特にウイルス表面から突出しており, 抗体との活性も高いVP1の93~104部分をリガンドとして用いた^{(2),(3)}. 以下にその配列を記す.

N-term-Asp(93)-Asn-Pro-Ala-Ser-Thr-Thr-Asn-Lys-Asp-Lys-Leu(104)-C-term

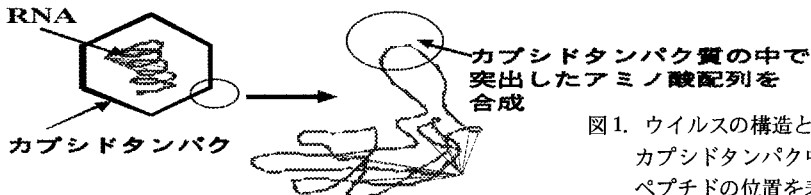


図1. ウイルスの構造と今回使用したカプシドタンパク中におけるペプチドの位置を表した模式図

Key Words : 弱毒小児麻痺ウイルスI型, カプシドタンパク, アフィニティクロマトグラフィー

〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 TEL 022-217-7483 FAX 022-217-7482

3. 結果

ゲルクロマトグラフィーによる結果

汚泥中のタンパク質はalbumin (60,000) 以上の分子量のものから分離されはじめ、その後 ovalbumin (43,000) 程度の分子量までが一つのピークとしてでてくる。また二回目に分子量の小さなタンパクが溶出する。

標準サンプルより分子量を推定すると1つ目のピークは分子量12万、2つ目のピークは分子量7,000程度のペプチドと推定できる。

陰イオン交換カラムによる分子分画

汚泥抽出タンパク質の図2の一つ目のピークを陰イオン交換カラムにかけた結果を図3に示す。図3において少なくとも3つのピークがでてくることからこの抽出タンパク質は複数のタンパク質から構成されていることが分かる。

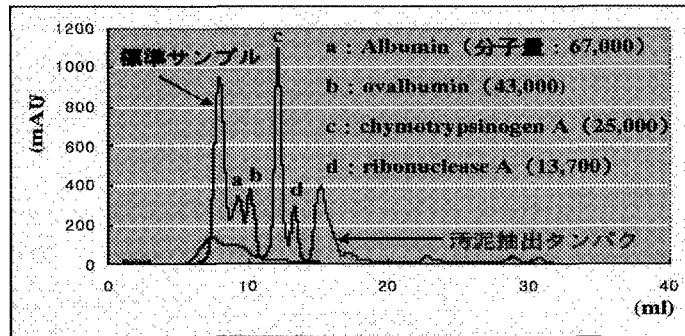


図2. サイズエクスクリュージョンクロマトグラフィーによる汚泥タンパクの分画

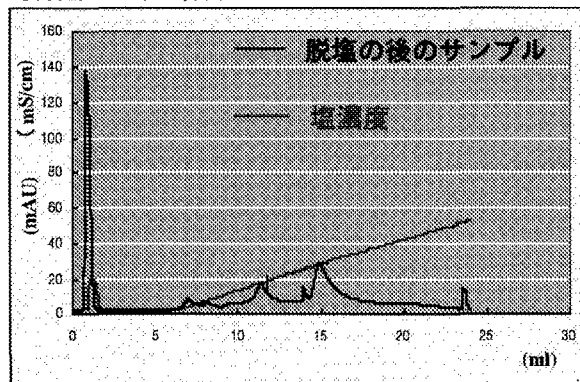


図3. 陰イオン交換カラムによる汚泥タンパクの分画

4. 考察

分子量分画によるクロマトグラフィーでは、汚泥中より albumin (分子量 65,000) を超える分子量 10 万以上のタンパク質から ovalbumin (43,000) までのタンパク質が溶出していることが分かる。これは本実験の抽出効率で可溶化・抽出されているタンパク質の大きさがこの程度であることや、カラムの分離性能限界によるものが考えられる。また低分子のペプチド類が析出しているが、分子量 1 万程度のタンパク質が抽出されていない。これは破碎されたタンパク質がペプチドの大きさにまで細分化されていると考えられ、抽出の方法を検討する必要がある。そこで次に陰イオン交換カラムによるタンパク質の分離を試み、汚泥抽出タンパク質が複数のタンパク質により構成されていることを明らかにした。複数のタンパク質が陰荷電の強さによって分離されている。この粗分離された各フラクション中からポリオウイルスのカプシドタンパク質との親和性の違いによってさらにタンパク質の分離を行う。ポリオウイルスのカプシドタンパク質は4種類のタンパクによって構成されており、そのタンパク質の表面タンパクの1次構造は既往の研究により決定されており、1次構造の違いによって細胞や抗体に対し、特異的に結合する。その結合は物理的な拘束と疎水性結合が深く関与していると考えられている。本研究では、汚泥中のタンパク質にこのようなタンパク質が存在することによりウイルスが吸着除去されているものと考え、まずそのタンパク質を特定することを目標としている。その前段階として用いた分子量分画では複数のピークを確認したので今後抽出方法改良による分子量分画と、今回用いた分子量分画の他に疎水性能力によるタンパク質の分画も考慮し、最適な粗分画方法を確立する予定である。

5. 参考文献

- (1) Samuel R. Farrah et al. Comparison Between Adsorption of Poliovirus and Rotavirus by Aluminum Hydroxide and Activated Sludge Flocs. Appl. Env. Micro. vol 35 p.360-363 (1978)
- (2) Emilio A Emini et al. Priming for and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides. Nature. vol 304 699-703 (1983)
- (3) J.M.Hogle et al. Three-Dimensional Structure of Poliovirus at 2.9 Å Resolution. Science. vol 229 p1358-1365 (1985)