アフィニティークロマトグラフィによる
活性汚泥中タンパク質からのVirus Binding Protein (VBP) の分離

東北大学大学院　学生員○佐野大輔
東北大学　　学生員　長山恒紀
東北大学大学院　正会員　大村達夫

1. はじめに

近年，下水処理水が重要な水資源として認識されつつある．しかし下水処理水を再利用することに対し，衛生学的な安全性に関してはいまだ疑問が残されている．都市下水中には様々な病原微生物が存在しているが，特にウイルスは粒径が極めて小さいため下水処理水中からの除去が非常に難しい上に，大腸菌群等の指標微生物に比べて高い塩素耐性を持ち，塩素消毒による不活化が困難である[1)]．したがって，現在の浄水プロセスでは，下水処理水の再利用において病原ウイルスに関する衛生学的な安全性を保証するには不十分であり，新規なウイルス除去技術の開発が切望されている．

本研究ではタンパク質間の特異的吸着作用を利用した水中からのウイルス除去技術の開発を最終目的とし，ウイルスを吸着するタンパク質（Virus Binding Protein: VBP）を下水処理場の活性汚泥から分離した．

2. 実験方法

2.1　活性汚泥中細菌の培養およびタンパク質の抽出

仙台市内の下水処理場より返送汚泥（MLSS：6000mg/l）を採取し，遠心分離（10分，1000×g，4℃）した上清を種汚泥とし，普通ブイヨン培地で24時間好気培養した後，再び遠心分離（15分，3000×g，4℃）することで細菌ペレットを得た．ペレットはTris-HClバッファー（pH8.0）に拡散させ，遠心分離（15分，3000×g，4℃）することで洗浄した．この作業は2度行った．ペレットからのタンパク質抽出にあたっては，以下の2通りの抽出方法で細菌外膜タンパク質を抽出した．

・尿素を用いる方法では，ペレット1gに対して尿素を溶解させたTris-HClバッファー（pH8.0）1mlを加え，超音波処理（50W，2分）を行った．なお，尿素濃度は1M，8Mの二通りとした．
・有機溶媒を用いる方法では，lペレット1gに対してTris-HClバッファー（pH8.0）1mlとn-butanol 1mlを加え，超音波処理（50W，2分）を行った．

抽出処理後，遠心分離（30分，20000×g，4℃）を行い，水層を回収し抽出タンパク質溶液とした．抽出タンパク質はLowry法による濃度定量後，20mM Tris-HClバッファー中で透析し，脱塩及び尿素の除去を行った．

2.2　アフィニティークロマトグラフィによるVBPの分離

抽出タンパク質からポリオウイルスI型に親和性のあるタンパク質（VBP）を分離するために，ポリオウイルスI型のカプシドタンパク質のうち抗体との結合に関与しているペプチド配列を人工的に合成し，これをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィを行った．Tris濃度を2mM，20mMとした2種の開始バッファー（Tris-HCl，pH8.0）中で，抽出タンパク質に含まれるウイルス吸着能を有するタンパク質をリガンドに結合させた．リガンドに結合したウイルス吸着タンパク質は溶出バッファー（6M尿素，0.5M NaCl，0.02M酢酸）によりカラムから溶出させた．その際，1mlごとにフラクションを回収した．なお，それぞれの実験系に対するコントロールとして，ペプチドをカラム担体に結合していないカラムを用いて同様の実験を行った．

2.3　SDS-PAGEによるタンパク質の確認

アフィニティークロマトグラフィでピークが認められた部分のフラクションについては，SDS-PAGEによりタンパク質であることを確認し，同時にその分子量を推定した．

3. 結果および考察

図1に抽出タンパク質の濃度定量の結果を示す．この図より，尿素の添加によるタンパク質抽出効率の増加が認められた．細菌の膜タンパク質には，親水性のものと疎水性のもの，両親媒性のものが存在するが，有機溶媒（n-butanol等）を抽出に用いた場合，疎水性のタンパク質のほとんどは有機溶媒層に溶出し，両親媒性のタンパク質は溶媒層と水層の境界に膜状となって現れ，これらは水層に溶出しないため回収が難しい．これに対し尿素には水分子の格子構造を破壊し，疎水性分子の水溶性を増加させる働きがある[2)]．図1の結果は，尿素を加えたことにより疎水基を持つタンパク質が水層へ溶出されたことを示している．

抽出方法の違いによる抽出タンパク質の差異を見るために，それぞれの抽出タンパク質についてSDS-PAGEを

Keyword: affinity chromatography, SDS-PAGE, urea, Virus Binding Protein
〒980-8579　宮城県仙台市青葉区荒巻青葉06，Tel: 022-217-7483, Fax: 022-217-7482

行った．その結果を図2に示す．n-butanol抽出タンパク質では見られなかったバンドが尿素を用いた場合では検出されたことから，尿素を添加することでより多くの種類のタンパク質を水層に溶出させることが可能であることが確認された．

次に各抽出タンパク質をサンプルとして，前述のペプチドをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィを行った．この際，開始バッファー濃度が2mMの実験系からはウイルス吸着タンパク質の存在を示すピークが確認されたが，20mMの実験系からはいずれもピークが認められなかった．図3に,開始バッファーのTris濃度2mMでのクロマトグラフィの結果を示す．リガンドとして用いたペプチドの等電点は6.93なので，pH8.0の条件下ではペプチドは負に帯電していると考えられる．塩濃度が低い場合，ペプチドは自らの負電荷間の反発によって直鎖に近い構造を取りやすいが，塩濃度が高くなると遮蔽効果によってアミノ酸間の静電的斥力が減少し，直鎖状になりにくくなる．このようなTris濃度の変化によるペプチドの3次元構造の違いによって，異なるアフィニティークロマトグラフィの分離結果が得られたと考えられる．また図3より，有機溶媒を用いた抽出タンパク質ではほとんどピークを示さなかったのに対して，尿素を用いた抽出法では高いピークが見られた．すなわち尿素を用いることにより，有機溶媒に比べて効率よくウイルス吸着タンパク質を抽出することが可能であった．

図3でピークを示したフラクションF2およびF3に対し，SDS-PAGEを行うことによって，分離物質がタンパク質であることを確認した．その結果を図4に示す．この図より，クロマトグラフィにおいてピークが確認されたフラクションからはいずれもバンドが検出されたため，ここで分離された物質は確かにタンパク質であることが証明された．

また図4における分子量マーカーとの比較から，尿素を用いて抽出されたＶＢＰの分子量はおよそ160kDa，90kDa～70kDa，60kDa～50kDaおよび40kDa～30kDaのグループに大別された．それぞれのバンドが1つのタンパク質から成るのか，それとも多種のタンパク質から成るのかについては，今後調査する必要がある．

４．おわりに

本研究で提案された尿素を用いた細菌の膜タンパク質抽出手法は，従来の有機溶媒により膜を可溶化する方法に比べて，より多くの量および種類のウイルス吸着タンパク質を下水汚泥中の細菌から抽出することが可能であった．

参考文献

1)Gordon A. McFeters編，金子光美 監訳 ：飲料水の微生物学，技報堂出版 (1992)
2)堀尾武一：タンパク質・酵素の基礎実験法，南江堂
3)J. N. イスラエルアチヴィリ著，近藤保 他 訳：分子間力と表面力，第2版，朝倉書店 (1996)

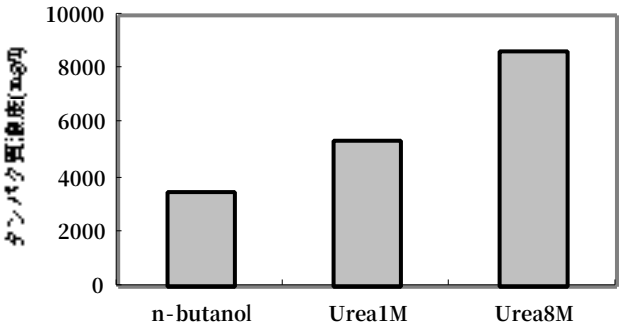
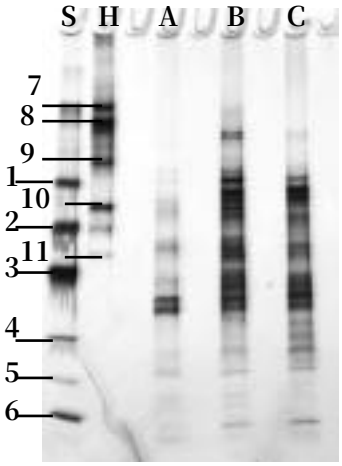


図1　抽出タンパク質濃度



A：n-butanol抽出タンパク
B：尿素 1M抽出タンパク
C：尿素 8M抽出タンパク
S：低分子量マーカー
H：高分子量マーカー
1：94.0kDa　2：67.0kDa
3：43.0kDa　4：30.0kDa
5：20.0kDa　6：14.4kDa
7：212.0kDa　8：170.0kDa
9：116.0kDa 10：76.0kDa
11：53.0kDa

図2　SDS-PAGEの結果（抽出タンパク質）

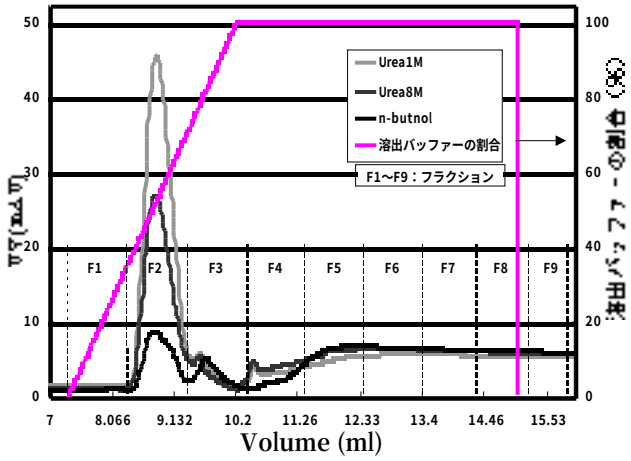
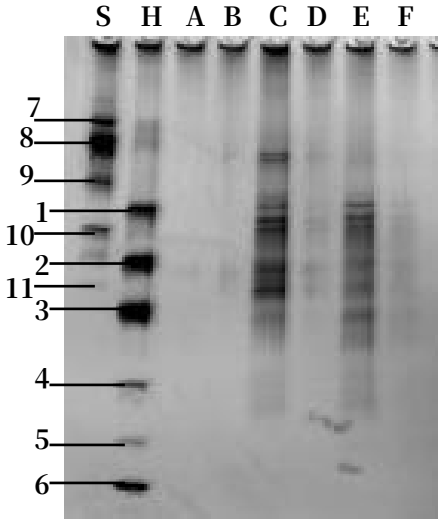


図3　クロマトグラフィの結果
（開始バッファー濃度2mM）



A：n-butanol F2
B：　〃　F3
C：尿素1M　F2
D：　〃　F3
E：尿素8M　F2
F：　〃　F3
S：低分子量マ-カ-
H：高分子量マ-カ-

マ-カ-の分子量値は図2を参照.
F2：フラクション

図4　SDS-PAGEの結果（VBP）