

活性汚泥からのウイルス吸着タンパク質（Virus-Binding Protein：VBP） の分離およびその吸着能評価

東北大学 学生員 松尾崇宏
東北大学 学生員 佐野大輔
東北大学 正会員 大村達夫

1. はじめに

近年問題となっている水環境のウイルス汚染に伴い、水系ウイルス感染症の発生件数は増加傾向にあり¹⁾、今後さらに増加することが懸念されている。水中病原ウイルスを従来の水処理技術で除去することは困難であることから、水利用における安全性を確保するためには、新たな水中ウイルス除去手法の開発が必要である。

本研究の最終目的は、タンパク質間の結合特異性を利用して、水中ウイルスを特異的に吸着除去する手法を開発することである。本研究では、ウイルスに特異的な結合を示すウイルス吸着タンパク質（Virus-Binding Protein：VBP）を活性汚泥中から分離して、その吸着活性をELISA法により評価した。

2. 実験方法

2.1 活性汚泥中細菌由来のタンパク質抽出

仙台市内の下水処理場より返送汚泥を採取し、遠心分離（10分、1000×g、4℃）した汚泥上清を普通ブイオン培地に加え、20℃で24時間好気培養した。培養後、遠心分離（15分、3000×g、4℃）することで細菌ペレットを回収した。ペレットの洗浄後、ペレット1gに対して、1mlの割合で尿素1Mを溶解させた20mM Tris-HCl（pH：8.0）、もしくは20mM Tris-HCl（pH：8.0）1mlとn-butanol 1mlを加え、超音波処理（50W、2分）、遠心分離（30分、20000×g、4℃）を行い、タンパク質溶液を回収した。抽出タンパク質はLowry法による濃度定量後、2mM Tris-HClバッファー（pH：8.0）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

弱毒ポリオウイルスI型の外殻タンパク質において、抗原抗体反応に關与するペプチド配列を人工的に合成し、アフィニティカラム担体に結合させた。このペプチドを固定化したカラムを用いてアフィニティークロマトグラフィを行うことにより、合成したペプチドに親和性を有するタンパク質の分離を試みた。

開始バッファー（2mM Tris-HClバッファー、pH：8.0）でサンプル（0.45μmのフィルターでろ過した抽出タンパク質）を流し、抽出タンパク質中のVBPをアフィニティカラム中のリガンドに結合させた。結合したVBPは溶出バッファー（0.02M 酢酸、尿素6M、NaCl 0.5M、pH：3.0）でカラムから溶出させた。この際、1mlずつフラクションを回収した。

2.3 VBPの濃縮

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溶出フラクションを10mM重炭酸アンモニウム（pH：8.0）で一晩透析した。その後、真空遠心を行って溶媒を1/10量になるまで蒸発させた。溶媒に対して3倍容の冷却アセトン（-20℃）を添加して-80℃で1時間静置した後、遠心分離（15分、10000×g、4℃）によりVBPのペレットを得た。上清を捨て、10分間真空遠心を行うことによりアセトンを蒸発させ、VBPを乾燥させた。

2.4 SDS-PAGEによるタンパク質の確認

濃縮後のフラクションに対してSDS-PAGEを行うことで、分離物質がタンパク質であることを確認し、その分子量を推定した。

2.5 イオン交換クロマトグラフィによるVBPの表面荷電評価

VBPの表面荷電状態を評価するため、イオン交換クロマトグラフィを行った。開始バッファーには2mM Tris-HClバッファー（pH：8.0）を、溶出バッファーには1M NaClを添加した2mM Tris-HClバッファー（pH：8.0）をそれぞれ用いた。

2.6 ELISA法によるウイルス吸着能評価

弱毒ポリオウイルスI型の外殻タンパク質の一部を用いたアフィニティークロマトグラフィにより分離されたVBPが、ポリオウイルスI型粒子に吸着活性を持つことを確認するためにELISA法を行った。

96穴ELISAプレートに50mM 炭酸バッファー（pH：9.0）に溶解したVBPを注入し、2時間静置することでプレート表面にVBPを吸着させた。その後、5%ウシ血清アルブミン（BSA）を含むPBS（Phosphate buffer saline）をウェル一杯に満たし、4℃で一晩静置することによりブロッキングした。5%BSAを含むPBSで希釈した弱毒ポリオウイルスI型を注入し、1時間室温で静置した。PBSで洗浄後、マウス抗ポリオウイルスI型モノクローナル抗体を注入し、1時間静置後にPBSで洗浄した。次にホースラディッシュペルオキシターゼ（HRP）標識ウサギ抗マウス免疫グロブリンを注入し、1時間静置後、この標識抗体に発光基質を加えて発色させ、プレートリーダーにより吸光度 A_{492} を測定した。

Key Words: 水中病原ウイルス、活性汚泥、ウイルス吸着タンパク質（VBP）、アフィニティークロマトグラフィ、ELISA
〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 TEL 022-217-7483
FAX 022-217-7482

3. 結果および考察

3.1 アフィニティクロマトグラフィによるVBP分離

図1にアフィニティクロマトグラフィによるVBP分離結果を示す。溶出バッファーを添加後に検出されるピークがリガンドに吸着していたタンパク質の存在を示している。そこで、ピークが表れている部分のフラクション2, 3を回収した。

3.2 SDS-PAGE によるVBPの分子量推定

図1でピークを示したフラクション2, 3に含まれているVBPを濃縮後、SDS-PAGEを行うことで、VBPの分子量を推定した。その結果を図2に示す。図2よりVBPの分子量は約25 ~ 30kDa, 40kDa, 50kDa, 80kDaのグループに大別された。

3.3 陰イオン交換クロマトグラフィによるVBPの表面荷電評価

図3に陰イオン交換クロマトグラフィの結果を示す。VBPは正に帯電した陰イオン交換体と結合するが、イオン強度の増加に伴い静電的なイオン結合力が低下することで溶出されている。この結果よりリガンド結合時のVBPの表面荷電は負であることがわかる。一方、本実験でリガンドに用いたペプチドの等電点は6.93であり、pH 8.0の条件下では負に帯電している。したがってペプチドとVBPの結合は静電的な引力が原因ではなく、ペプチドの3次元構造による特異的結合であると考えられる。

3.4 VBPのウイルス吸着能評価

ELISAプレート中では、標識抗体がウイルス、BSA、タンパク質と結合することで様々な複合体を形成し吸光を示すが、そのうちタンパク質に吸着したウイルスへ抗体が結合することで形成される、抗体-ウイルス-タンパク質複合体の量により吸着ウイルス量を評価することができる。この複合体に対する吸光係数をELISAに用いたタンパク質の濃度1% (w/v) と光路長1cmあたりに換算した値である比吸光度 $E_{1cm}^{1\%}$ (492) は、ELISAプレート中に固定したタンパク質へのウイルス吸着量が大きいほど値が大きくなる。

図4にVBP、抽出タンパク質、BSAの比吸光度を示す。VBPはポリオウイルスI型粒子に対して、標準タンパク質として用いたBSAと比較して300倍以上、活性汚泥中細菌からの抽出タンパク質（アフィニティクロマトグラフィに用いたサンプル）と比較して15倍弱の比吸光度を示し、確かにポリオウイルス吸着能を有することが示された。

4. おわりに

本研究において分離されたVBPはポリオウイルスI型粒子に対して高い吸着活性を示したことから、このVBPをウイルス吸着除去の吸着材として用いることで、高効率の水中ウイルス除去が可能であることが示唆された。

最後に、本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金および文部科学省革新的技術開発研究推進費補助金の援助でなされたことを付記する。

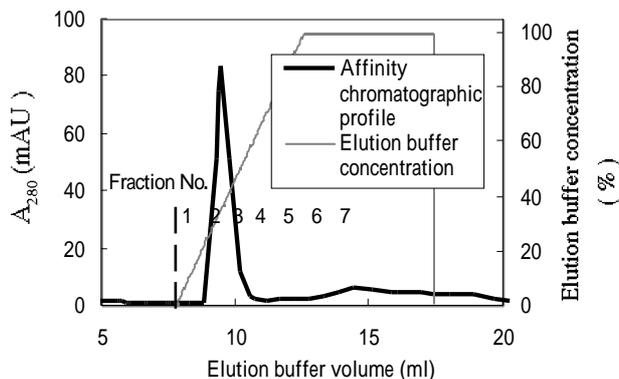


図1 アフィニティクロマトグラフィによるVBP分離結果。

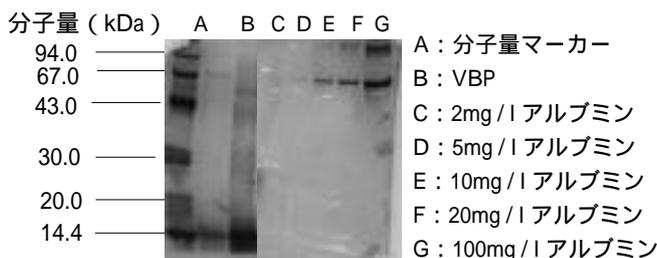


図2 SDS-PAGE によるVBPの分子量推定。

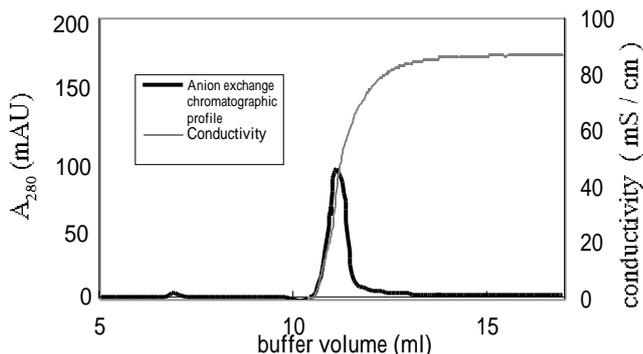
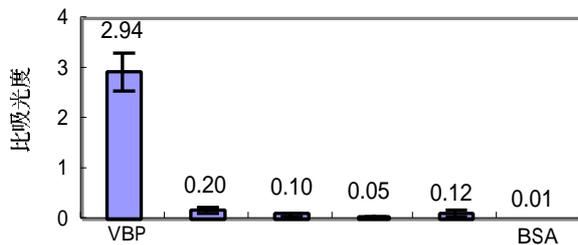


図3 陰イオン交換クロマトグラフィによるVBPの表面荷電評価。



ELISAプレートのウェルに結合させたタンパク質
 仙台市内下水処理場A, 尿素抽出タンパク質
 仙台市内下水処理場A, n-ブタノール抽出タンパク質
 仙台市内下水処理場B, 尿素抽出タンパク質
 仙台市内下水処理場B, n-ブタノール抽出タンパク質
 図4 VBPのウイルス吸着能評価。Error barは比吸光度の標準偏差（試行回数はずべて3回）を示している。

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)