

水中ウイルス除去技術に用いるウイルス吸着タンパク質(Virus-Binding Protein: VBP)の特異的吸着能評価

東北大学大学院工学研究科 学生員 松尾崇宏
 東北大学 日本学術振興会特別研究員(PD) 正会員 佐野大輔
 東北大学大学院工学研究科 正会員 渡部 徹 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病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・不活化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、新たな水中ウイルス除去技術の開発が切望されている。

このような背景のもと、本研究ではウイルスに特異的に結合するウイルス吸着タンパク質(Virus-Binding Protein: VBP)を用いた水中ウイルス除去技術の開発を最終目標としている。これまでの研究において、ポリオウイルス1型(PV1)に親和性を有するVBPを活性汚泥中から分離することに成功した²⁾。今回は、PV1に親和性を有するVBPに対するPV1以外のウイルスの吸着活性を評価するため、PV1およびアデノウイルス41型(AD41)のVBPに対する吸着能評価を行ったので、その内容と結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 アフィニティクロマトグラフィによるVBPの分離

VBPの分離に関しては、既報で述べた手法を用いた²⁾。具体的には、PV1の外殻タンパク質において、抗原抗体反応に関与するペプチド配列を人工的に合成し、この合成ペプチドを固定化したカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィにより、PV1外殻ペプチドに親和性を有するタンパク質を活性汚泥細菌由来のタンパク質から分離した。分離されたVBP溶液を10mM重炭酸アンモニウム(pH:8.0)で一晩透析した。その後、60 で真空遠心を行い溶媒を蒸発させることにより、VBPの濃縮を行った。

2.2 VBPの固定化

炭酸バッファー50mM(pH:9.0)に溶解したVBPをELISAプレートに50 μ L/ウェルずつ注入し、室温で2時間静置することでプレート表面にVBPを固

定化した。その後VBP溶液を取り除き、PBS(Phosphate buffer saline)で2回洗浄した。洗浄後、5%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBSをウェル一杯に満たし、4 で一晩静置することでプレート上でVBPが吸着しなかった部分をブロッキングした。

2.3 VBPとウイルスの結合

プレートのBSA溶液を捨てた後、PBSで2回ウェルの洗浄を行った。その後、PV1懸濁液もしくはAD41懸濁液を50 μ L/ウェルずつ注入し、室温で1時間反応させることでVBPとウイルスを結合させた。

2.4 ウイルス懸濁液の細胞への接種

プレートの上清を採取し、600 μ Lにメスアップした。このサンプルを10倍希釈し、3段階の希釈列を作製した。上清採取後、プレートをPBSで2回洗浄し、洗浄に用いたPBSに関しても3段階の希釈列を作製した。それぞれのサンプルをHeLa細胞へ100 μ Lずつ接種し(1つの希釈段階に対して5サンプル)、培養後の細胞変性を調べることにより、ウイルス検出試験を行った。一方、プレートへ接種する前のPV1懸濁液およびAD41懸濁液についても同様に10倍希釈3段階の希釈列サンプルをHeLa細胞に接種し、ウイルス検出試験を行った。

2.5 ウイルス濃度算定とウイルス吸着能評価

それぞれの希釈レベルごとに細胞変性が見られたウェル数を数え、MPN法によりウイルス濃度を算定した³⁾。その後、式(1)によりVBPのウイルス吸着率を算出した。

$$\phi = \frac{MPN_{\alpha} - MPN_{\beta}}{MPN_{\alpha}} \times 100 \quad (1)$$

ここでMPN_αはプレートへ接種する前のウイルス濃度(MPN/mL)、MPN_βはプレートへ接種して1時間後の上清中および洗浄後のPBS中のウイルス濃度(MPN/mL)の和である。また同様の手法を用いて、BSAに対するウイルス吸着率も算出し、ウイルス吸着能の比較を行った。

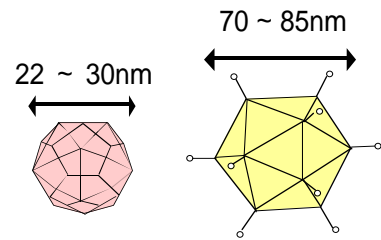
Key Words: ウイルス吸着タンパク質(VBP), ポリオウイルス1型, アデノウイルス41型, MPN法
 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06 TEL 022-217-7483 FAX 022-217-7482

3. 結果および考察

ポリオウイルスはピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属しており、1本鎖RNAが正二十面体（直径22～30nm）のタンパク質に覆われた構造をとっている（図1）。エンテロウイルス属には水系感染症を引き起こすウイルスが数多く存在し、それらの外部構造は属を通じて共通している。この理由から、ポリオウイルスはモデルウイルスとして様々な研究で用いられてきた。本研究でもPV1をモデルウイルスとして用いている。それに対しアデノウイルスは、2本鎖DNAが正二十面体（直径70～85nm）のタンパク質に覆われた構造をとっており、さらに各頂点にファイバーと呼ばれる突起物を有している。正二十面体のタンパク質から成ることがポリオウイルスと共通するが、直径がポリオウイルスの2倍以上であること、およびファイバーを有している点に違いがある。このような外部構造の違いがVBPへの吸着に対して影響を与えるか否かについての知見を得るために、本研究ではアデノウイルスを用いている。アデノウイルスには49の血清型があり、そのうち40及び41型が水系感染症を引き起こすとされており、本実験ではAD41を用いることとした。

式（1）により算出したVBPもしくはBSAに対するPV1およびAD41の吸着率を図2に示した。まず、ELISAプレートに固定化されたBSAに対するPV1及びAD41の吸着率は、それぞれ47%（±5%）及び47%（±11%）であった。これらの値は、BSAとウイルスとの間の非特異的な吸着により得られたものであり、本実験のバックグラウンドに相当するものであると考えられる。それに対し、ELISAプレートに固定化されたVBPに対するPV1及びAD41の吸着率は、それぞれ94%（±2%）及び62%（±4%）であった。PV1に関しては明らかに高い吸着率が得られており、VBPとPV1間に特異的相互作用が存在することが本実験においても確認された。AD41に関しては、有意水準0.05のt検定により、VBPおよびBSAに対するAD41の吸着率の間に有意な差があるという結果が得られた。しかしながら、AD41のVBPに対する吸着率は62%に止まっており、VBP-PV1間の吸着と比べると明らかに弱い結合であると考えられた。

本実験で見られたPV1とAD41のVBPに対する結合能力の違いは、ウイルス外部構造の違いと関連づけて考えることができるだろう。本研究で得られた成果は、既報²⁾に示した手法により特異的吸着能を有するVBPの分離が可能であることを示しており、今後、様々な種類のウイルスに対するVBPの分離に道を拓くものであると考えられる。



ポリオウイルス アデノウイルス

図1 ウイルスの模式図⁴⁾

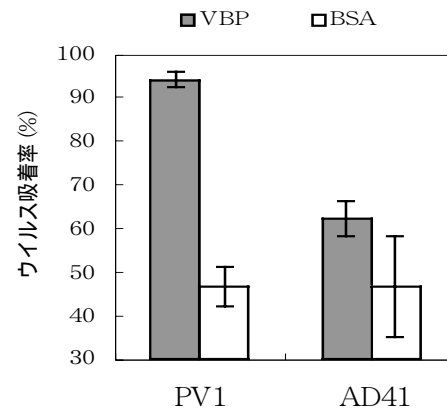


図2. VBPもしくはBSAに対するPV1及びAD41の吸着率. Error barは標準偏差（試行回数は3回）を表している。

4. おわりに

PV1の外殻タンパク質に対する親和性により分離されたVBPは、PV1感染粒子に対する吸着特異性を有していることが明らかとなった。本研究により開発されたVBP分離手法により、PV1以外のウイルスに対するVBPを分離することが可能である。これらのVBPを用いて水中ウイルス吸着除去技術の開発が実現できると考えている。

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。また、実験に用いたAD41は、東京都立衛生研究所の吉田靖子博士に分与頂きました。感謝致します。

参考文献

- 1) 矢野一好(2000)環境水を対象としたウイルス検索の目的と意義, 月刊水7月号, 42, 32-40
- 2) 松尾崇宏, 佐野大輔, 大村達夫(2002)アフィニティクロマトグラフィによる活性汚泥からのウイルス吸着タンパク質(Virus-Binding Protein: VBP)の分離と特性評価, 環境工学研究論文集, Vol.39, 345-353
- 3) 日本水道協会(1993): 上水試験方法
- 4) 財団法人日本公衆衛生協会.(1987)ウイルス・クラミジア・リケッチア検査. 第3版.