

活性汚泥細菌から分離されたウイルス吸着タンパク質（Virus-Binding Protein: VBP） の二次元電気泳動およびN末端アミノ酸配列解析

東北大学大学院 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 正会員 大村達夫

1. はじめに

水中病原ウイルスによる感染症は、衛生状態の改善が進んだ本邦においても毎年のように報告が相次いでいる。また、従来から水系感染症発生件数に占める原因不明の胃腸炎発生件数の割合は大きい。この原因不明胃腸炎の大部分が水中病原ウイルスによるものである可能性があると言われており、今後、都市過密化、高齢化および国際化の進行により、下水処理水再利用における用途の多様化、抗体非保有人口比率および輸入感染症の増加がもたらされ、水中病原ウイルスによる被害が従来の予想を上回る規模で顕在化する可能性がある。

しかしながら、環境中で数ヶ月から数年生存するウイルスは、急速砂ろ過等のろ過方式が主要な処理方法である浄水処理において、サイズが小さいために除去されにくい¹⁾。したがって消毒プロセスがウイルス処理の最後の砦となるが、原虫ほどではないものの、ウイルスは細菌と比べて高い消毒剤耐性を有している¹⁾。水中病原ウイルスを効率的に除去する新たな技術の開発が望まれている。

以上の背景のもと、著者らは新たな水中病原ウイルス除去技術を開発することを念頭に、ポリオウイルス1型に対する親和性を有するウイルス吸着タンパク質（Virus-Binding Protein: VBP）を活性汚泥から分離することに成功した²⁾。このVBPをウイルス吸着材として用いることにより、革新的なウイルス除去技術の開発が可能となると考えられる。今回は、分離されたVBPの二次元電気泳動を行った後にN末端アミノ酸配列解析を行い、タンパク質データベース上で相同性解析を行ったので、その内容と結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 活性汚泥細菌の培養およびVBP分離

活性汚泥サンプルは、仙台市内の下水処理場から返送汚泥を採取した。サンプリング期間は平成13年10月～11月および平成14年9月～11月である。活性汚泥細菌の培養およびVBPの分離方法は、既報と同様の方法により行った²⁾。

2.2 二次元電気泳動

VBPの二次元電気泳動はタカラバイオ株式会社に依頼して行った。まずVBPを290 μ Lのタンパク質溶解Buffer（5.2M尿素、2Mチオ尿素、2% CHAPS、2% Zwittergent 3-14、1% Tributylphosphine、0.2% Bio-Lyte 3-10）に投入して軽くVortexし、室温で26時間攪拌した。溶解したVBPに対し等電点電気泳動を行い、その後SDSでVBPを変性させ、等電点電気泳動の方向と直角の方向へSDS-PAGEを行った。泳動後のタンパク質はCBBで染色することにより検出した。

2.3 N末端アミノ酸配列解析

VBPのN末端アミノ酸配列解析はタカラバイオ株式会社に依頼して行った。二次元電気泳動後の各スポットをカミソリを用いて切り出した後、蒸留水に浸して4℃で一晩攪拌することによりゲルを洗浄し、ホモジナイザーでゲルを破碎した。その後、タンパク質抽出用バッファー（0.1%SDS、0.1M重炭酸アンモニウム）中に破碎後のゲルを浸し、37℃で一晩抽出した。抽出後、タンパク質抽出用フィルター（0.45 μ m）でろ過し、フィルターを50%アセトニトリル及び100%アセトニトリルでフィルターを1回ずつ洗浄した。ろ過液と洗浄液は混合し、濃縮遠心により乾固させた。蒸留水を加え、濃縮遠心、乾固の操作を3回行ってから、HP G1005A Protein Sequencing Systemにより、VBPのN末端アミノ酸配列解析を行った。

2.4 アミノ酸配列の相同性解析

VBPのN末端アミノ酸配列に関する相同性解析を、National Center for Biotechnology Information (NCBI) がWeb上で提供している「BLAST」を利用して行った。

Key Words: ウイルス吸着タンパク質 (Virus-binding protein: VBP), 二次元電気泳動, N末端アミノ酸配列, 相同性解析, 水中病原ウイルス, ポリオウイルス1型.

〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06 TEL022-217-7483 FAX022-217-7482

3. 結果および考察

3.1 VBPの二次元電気泳動

図1に、平成13年度に分離されたVBPの二次元電気泳動結果を示した。丸で示した部分に濃いスポットが得られている。これらのスポット中にVBPが含まれていると考えられたので、分子量の大きいスポットから番号を付け、N末端アミノ酸配列解析を行った。

3.2 VBPのN末端アミノ酸配列解析及び相同性解析

表1に、VBPのアミノ酸配列解析結果を示した。表中のSpot numberは図1のSpot numberに対応している。Spot 1とSpot 4のVBPについて、22残基までのアミノ酸配列を決定することに成功した。

表2には、Spot 1およびSpot 4に関して行った相同性解析の結果を示した。Spot 1のVBPに関しては、最大90%の相同性を有するタンパク質として2種類がピックアップされた。そのうちの一つは、*Aeromonas hydrophila*の外膜タンパク質（Accession number: AAF87725）であった。Spot 4のVBPに関しては、最大90%の相同性を有するタンパク質として3種類がピックアップされ、そのうちの一つは *Vibrio cholerae*の外膜タンパク質 OmpK（Accession number: NP_231936）であった。

これらのタンパク質については、相同性が90%にとどまることから、Spot 1とSpot 4のVBPとは異なるタンパク質であると判断できる。したがって、今回分離されたVBPは、データベース上に登録されていない、新規に見いだされたタンパク質であると考えられた。また、相同性の高いタンパク質はすべて細菌の外膜タンパク質であり、VBPが活性汚泥細菌の外膜上でウイルス吸着に寄与していることが示唆された。

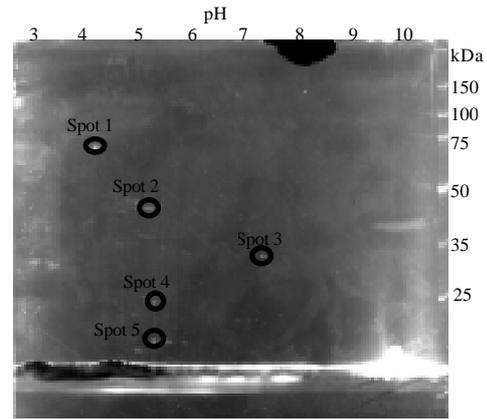


図1. VBPの二次元電気泳動結果。用いたVBPは、平成13年度に分離された。

表1. VBPのN末端アミノ酸配列解析結果

スポット番号	N末端	解析方向				
		1	5	10	15	20
1	A V V Y D K D G T S F D I Y G R V Q A N Y Y					
2	V D F H G Y F R P Q V G					
3	M D X Q E D X A					
4	A D Y S G D I H K N D Y K W F Q F N L M G T					
5	G D A F S Y A K G S X T G A H T K S D Y					
		1	5	10	15	20

表2. VBPのN末端アミノ酸配列の相同性解析結果^a

スポット番号	残基数	推定分子量 (kDa)	90%以上の相同性を有するデータベース上のタンパク質の種類	最大の相同性を示したタンパク質の例			
				タンパク質の名前 (Accession number)	残基数	相同性 (%)	相同性の高い部分の配列番号
1	22	75	2	<i>Aeromonas hydrophila</i> outer membrane protein (AAF87725)	355	90	21-42
4	22	25	3	<i>Vibrio cholerae</i> outer membrane protein OmpK protein (NP_231936)	296	90	51-72

a. この相同性解析は平成15年3月6日に行った。

4. 結論

本研究グループにより活性汚泥から分離されたVBPは、N末端アミノ酸配列の相同性解析の結果、データベース上に存在しない、新規に見出されたタンパク質であることが明らかとなった。また、VBPは活性汚泥細菌の外膜上で、ウイルス吸着に寄与している可能性が示唆された。

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により行われたことを付記する。

参考文献

- 1) Payment. 1998. Waterborne viruses and parasites: resistance to treatment and disinfection. OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water. Interlaken 198. 1-11.
- 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, 39, 345-353.