

アフィニティクロマトグラフィによる活性汚泥細菌からのアデノウイルス吸着タンパク質 (Adenovirus-Binding Protein: ADVBP) の分離

東北大学大学院工学研究科	正会員○佐野	大輔
東北大学大学院工学研究科	石井	哲平
東北大学大学院工学研究科	正会員 松尾	崇宏
東北大学大学院工学研究科	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、衛生状態が改善されている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いる。水中病原ウイルスは被感染者のふん便と共に大量に排出されるので、適切な処理を行わなければ水環境がウイルスにより汚染されることとなる。しかしながら、ウイルスは粒径が小さいために物理的除去が困難であり、また比較的高い消毒剤耐性を持っているために従来の水処理プロセスではウイルスの十分な除去、不活化は難しい²⁾。

以上のような背景から、水利用における安全性を確保するために新たな水中病原ウイルス除去技術の開発が必要であると考えた。本研究では、ポリオウイルス1型を特異的に吸着するタンパク質 (Poliovirus-Binding Protein: PVBP) を活性汚泥細菌から分離することに成功している³⁾。本研究の最終的な目標は水中病原ウイルスを特異的に吸着するタンパク質を用いた新しいウイルス除去技術を開発することであるが、今回はこのウイルス除去技術の開発のため、PVBP 分離技術を応用してアデノウイルスを特異的に吸着するタンパク質 (Adenovirus-Binding Protein: ADVBP) を活性汚泥細菌から分離することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 活性汚泥細菌からのタンパク質抽出

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, $1000 \times g$, 4°C) した汚泥上清を普通ブイオン培地に加え 20°C で24時間好気培養した。培養後、遠心分離 (15分, $3000 \times g$, 4°C) 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当たり1mlの割合で尿素1Mを溶解させた20mM Tris-HClバッファー (pH: 8.0) を加え、超音波処理 (50W, 2分)、遠心分離 (30分, $20000 \times g$, 4°C) を行い、上清を回収して抽出タンパク質溶液とした。抽出タンパク質は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 アフィニティクロマトグラフィによるADVBPの分離

本研究ではアデノウイルスの中でも水系感染症の原因となる3型及び40/41型を吸着するADVBPの分離を目的とした。アデノウイルス粒子においてファイバーの先端部を構成するタンパク質の中でも、位置が外側にあるアミノ酸12配列を選択し、人工的に合成して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 (20mM Tris-HCl, 0.01M NaCl pH: 8.0) でサンプルとなる抽出タンパク質を流し、タンパク質中のADVBPをアフィニティカラム中のリガンドと結合させた。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ごとにフラクションを回収した。

2.3 SDS-PAGEによるタンパク質の確認及びADVBPの分子量推定

濃縮後のフラクションに対してSDS-PAGEを行うことで、アデノウイルスの外殻ペプチドに親和性のある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 ELISA法によるウイルス吸着能評価

アデノウイルスの外殻タンパク質の一部を用いたアフィニティクロマトグラフィによって分離されたADVBPが、アデノウイルス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°C 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で希釈したアデノウイルス3型及び40/41型を注入し、1時間室温で静置した。PBSで洗浄後、抗ウイルス血清を注入し、1時間静置後にPBSで洗浄した。次に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。

キーワード アデノウイルス吸着タンパク質, 活性汚泥, アフィニティクロマトグラフィ, SDS-PAGE, ELISA

連絡先 〒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. 結果及び考察

3.1 アフィニティクロマトグラフィによるADVBPの分離

図1にアデノウイルス3型およびアデノウイルス40/41型の外殻タンパク質の一部を用いたアフィニティクロマトグラフィによるVBP分離結果を示した。溶出バッファー添加後に検出されるピークがリガンドに吸着するタンパク質の存在を示している。ともに溶出バッファー注入後に大きなピークの出現が確認された。また、ともに大きなピークの出現の後に小さなピークの出現が2つ確認された。ピークの大きさは多少変動があるものの、出現位置に関しては再現性が高かった。

3.2 SDS-PAGEによるADVBPの分子量推定

図1でピークを示したフラクションを濃縮後、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。その結果を図2に示す。図2よりVBPの分子量は広く分布しており、3型は43kDa以下、40/41型は67kDa以下に存在が認められた。

3.3 ELISA法によるウイルス吸着能評価

SDS-PAGEに供したサンプルと同じサンプルを用いてELISAを行った結果を図3に示した。図3には単位タンパク質量当たりの吸光度を示してある。図3から明らかなように、先頭のピーク（ピーク①及び④）に比べ後ろ二つのピーク（ピーク②、③及び⑤、⑥）で明らかに大きな値が得られた。このことは、アフィニティクロマトグラフィにおいて時間的に後半に得られたピークに含まれるADVBPの方が高いウイルス吸着能を持つことを示している。後ろ二つのピーク間（ピーク②③間及び⑤⑥間）については、統計的に有意な差は見られなかったものの、平均値はわずかに最後尾のピーク（ピーク③及び⑥）が高いという結果であった。

4. おわりに

本研究においてアフィニティクロマトグラフィを用いて分離された物質は、SDS-PAGEによりタンパク質であることが確認された。得られたADVBPはアデノウイルスを特異的に吸着する能力を有しており、タンパク質を利用したウイルス除去技術におけるアデノウイルス吸着材として利用可能であることがELISA法により確認された。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(B)「ウイルス吸着タンパク質を用いた下水処理場からの病原ウイルス除去技術の実用化」（研究代表者：大村達夫）によって行われたことを報告する。

参考文献

- 1)金井興美, 山崎修道 編(1987): ウイルス・クラミジア・リケッチア検査 第3版, 日本公衆衛生協会
- 2)金子光美(1997): 水の消毒, 財団法人日本環境整備教育センター
- 3)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, 環境工学論文集 第39巻.

— Affinity chromatographic profile of ADVBP
— Concentration of elution buffer

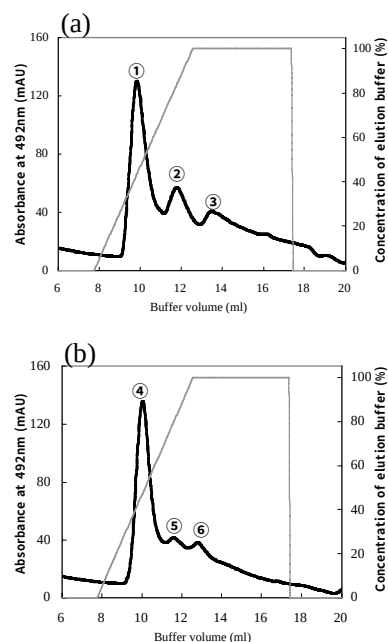


図1. アフィニティクロマトグラフィによるADVBP分離結果。(a)アデノウイルス3型に対するADVBP, (b)アデノウイルス40/41型に対するADVBP. 図中の丸数字はピーク番号。

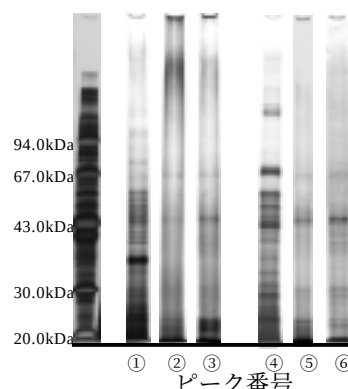


図2. SDS-PAGEによるADVBPの分子量推定結果。ピーク番号は図1に対応している。

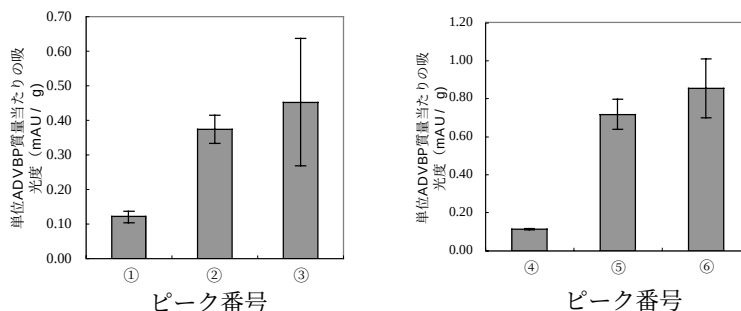


図3. ELISAによるADVBPのウイルス吸着能評価。(a)アデノウイルス3型に対するADVBP, (b)アデノウイルス40/41型に対するADVBP. ピーク番号は図1に対応している。