# 活性汚泥細菌由来タンパク質群からのノロウイルス吸着タンパク質 (Norovirus-Binding Protein: NVBP)の分離

# 1 はじめに

ノロウイルス (Norovirus: NV)を起因とするウイルス性 胃腸炎は,近年になってその被害が顕在化し,社会的な 問題として広く認知されつつある.進行著しい高齢化に よって今以上に免疫力が低下した人々が増加すると,NV により社会が受ける被害はさらに拡大することが予想さ れる.

NV は人間の体内でのみ増殖し、また被感染者の糞便 中に多量に排出されるため、下水中に高濃度で存在する ことが知られている.しかし、現行の水処理においては NV の十分な除去が困難であることから、一部は処理水 とともに水環境中へと放出されている.将来の水利用に おいて NV を起因とする水系感染症を未然に防止するた めには、水処理における NV 除去は必要不可欠であり、 新規除去技術の開発が切望されている.

本研究室では、活性汚泥細菌由来タンパク質のウイル ス吸着能力に着目し、このウイルス吸着タンパク質 (Virus-Binding Protein: VBP)をウイルス吸着材として用い た水中病原ウイルス除去技術の開発を試みている.これ までの研究により、活性汚泥細菌から分離した VBP をク ローニングする一連の手法を確立した<sup>1)</sup>.本研究では、そ れらの手法を適用することで、ノロウイルス吸着タンパ ク質 (Norovirus-Binding Protein: NVBP)の分離を試みた.

#### 2 実験方法

2.1 活性汚泥細菌からのタンパク質の抽出

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℃)後の上清を普通ブイヨン培地に加 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(200W,20kHz),遠心分離(30分,20000 ×g,4℃)後,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 アフィニティリガンドの選定

アフィニティリガンドとして、NV 粒子カプシドの一

東北大学大学院工学研究科 学生員 和田圭史 東北大学大学院工学研究科 正会員〇佐野大輔 東北大学大学院工学研究科 正会員 大村達夫



図1 NV カプシドタンパク質のペプチド合成部位
(a): Norwak virus のウイルス粒子3次元構造<sup>2</sup>.
(b): ウイルス粒子カブシドサブユニットの3次元構造 着色した部分がペプチドの合成部位 (Ras Mol v2.5 で作成).

部を人工合成したペプチドをリガンドとして用いた. ペ プチド合成には遺伝子群 GIの Norwalk virus および遺伝 子群 GIIの Lordsdale virus 由来の配列をそれぞれ採用した. Norwalk virus 由来の配列については,図1 に示した Protruding domain, C 末端及び Shell domain の3 つの領域 のペプチドを合成した. また, Lordsdale virus については C 末端のみ合成した.

<u>2.3 アフィニティクロマトグラフィによる活性汚泥細</u> 菌由来タンパク質からの NVBP 分離

ペプチドを固定化したアフィニティカラムに,開始バ ッファーでサンプル(0.45 µm 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 NVBP をリガ ンドへ吸着させた.吸着した NVBP は溶出バッファー (0.02M 酢酸,6M 尿素,0.5M NaCl, 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.

#### <u>2.4 SDS-PAGE によるタンパク質の確認</u>

2.3 で回収したフラクションを凍結乾燥し, NVBP を粉 末状にした. その後 SDS-PAGE を行い, 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 NVBP 吸着活性評価

アフィニティクロマトグラフィにより分離された NVBP が NV 粒子への吸着活性を持つことを確認するた め, ELISA 法を行った. なお, NV は組織細胞での培養 が困難なことから,本実験では, ELISA 抗原として NV カプシドタンパク質を人工的に合成した NV 中空粒子 (Virus-like Particle: VLP,国立感染症研究所 武田直和博

キーワード ノロウイルス (Norovirus: NV), 活性汚泥細菌, Norovirus-Biding Prorein (NVBP), アフィニティクロマトグラフィ 連絡先 〒980-8795 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学大学院工学研究科, TEL 022-795-7483, FAX 022-217-7482 士のご好意により提供を受けた)を使用した.

96穴ELISAプレートに、50mM 炭酸バッファー (pH:90) に溶解したNVBPを注入し、2時間静置してプレート表面に NVBPを吸着させた.その後、5%牛血清アルブミン (BSA) を含むPBS (Phosphate buffer saline)をウェルに満たし4℃で 一晩静置してブロッキングした.5%BSAを含むPBSで希釈 したNVのVLPを注入し、1時間室温で静置した.PBSで洗 浄後、抗NVVLPウサギ血清を注入し、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)標識ヤギ抗ウサギ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<sub>492</sub>を測定した.

### 3 結果及び考察

<u>3.1 アフィニティクロマトグラフィによるNVBP分離結果</u>

アフィニティリガンドとして用いた4種類の配列それぞ れに対して吸着特性をもつタンパク質が分離された.図2に, 各リガンドを用いたアフィニティクロマトグラフィの結果 を示した. 溶出バッファー添加後に現れたピークが,リガ ンドに親和性を有する物質の存在を示している.

## 3.2 SDS-PAGEによるNVBPの分子量推定

SDS-PAGEの結果を図3に示す.得られたNVBPの分子量 は10kDaから100kDaまで広範囲に分布した.また,それぞ れバンドのパターンが異なることから,各NVBPは分離に 用いたリガンド固有のタンパク質であるといえる.なお, S由来のリガンドにより分離された物質についてはバンド が存在せず、タンパク質ではないことが確認された. 3.3 NVBPのNV粒子への吸着活性評価

図4に、ELISA 法による NVBP の吸着活性評価結果を 示した.各NVBPを固定化したウェルの吸光度は、NVBP を固定化しなかったウェルに比べ明らかに大きかった. 有意水準 0.05のt 検定により、これらの吸光度の間に有 意な差があるという結果が得られた.この結果は、アフ ィニティクロマトグラフィにより分離された NVBP が NV 粒子への吸着活性を持つことを示している.本実験 では、ELISA 抗原として、遺伝子群 G I から Norwalk virus および Desert Shield virusの VLP を、遺伝子群 G II から Lordsdale virusの VLP を、遺伝子群 G II から NVBP も各 VLP に対して高い吸着活性を有することが確 認された.

### 4 おわりに

NV粒子カプシドタンパク質から合成した4種類のペプチ ドをアフィニティリガンドに用い、そのうち3種類のリガン ドに対して特異的親和性を有するNVBPの分離に成功した. また、分離された NVBPは、血清型や遺伝子群の異なる株 に対しても吸着活性を有することが確認された.この結果



(c): Norwalk virus Shell domain由来







から、今回、得られたNVBPは水処理におけるウイルス吸 着材としての利用価値の高いタンパク質であるといえる.

#### 謝辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(B) 「水環境中の病原ウイルス除去技術開発に関する研究」(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

 D. Sano et al., 2004. Virus-binding proteins recovered from bacterialculture derived from activated sludge by affinity chromatography assayusing a viral capsid peptide. Appl. Environ. Microbial., 70 (6), 3434-3442.

 B. V. V. Parasad et al., 1999. X-ray Crystallographic Strusture of Norwalk Virus Capsid. Science, 286, 287-290.