

ガラスビーズへのウイルス吸着タンパク質(Virus-Binding Protein: VBP)固定化手法の確立

東北大学大学院 学生会員 ○今井 崇博
 東北大学大学院 正 会 員 真砂 佳史
 バルセロナ大学 非 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

水系感染症の原因となる病原ウイルスは患者糞便に混入した形で下水処理場へ流入することになるが、従来の水処理技術では完全にウイルスを除去するのは極めて困難であるため、これらの病原ウイルスについて感染症被害の実態や遺伝系統を把握し、また水環境中での動態を把握することは、ウイルス感染症被害に対する対策を模索する上で非常に重要であると言える。

しかし、水環境中の病原ウイルスは非常に低濃度で存在するので、RT-PCR 法やブラック法等の手法を用いてウイルス検出を行う前段階において、大量の水サンプル(数十～数百 L)からウイルスを濃縮する必要がある。現行の主な水中ウイルス濃縮法として陽電荷膜法¹⁾、陰電荷膜法²⁾、及びポリエチレングリコール濃縮法などが開発されているが、膜を用いる手法は水試料の pH やイオン強度などの種々の条件によって回収率が大きく変動し²⁾、ポリエチレングリコール濃縮法は、1 度に濃縮できるサンプル量が最大 1L 程度でしかないといった問題点を抱えている。

これらの方法に変わる新しいウイルス濃縮技術を開発するために、Sano ら³⁾はよってある種のウイルスに特異的に吸着するタンパク質(virus-binding protein; VBP)を分離した。我々は、この VBP を担体に固定し、その担体に水サンプルを接触させることで、サンプル中のウイルスを効率的に濃縮することができると考えた。本技術を確認するには、まず担体への VBP の固定化方法を確立する必要がある。また VBP を用いることで特定のウイルスのみを濃縮することが可能となりうるが、そのためには VBP を固定した担体に対して目的ウイルス以外の非特異的吸着を抑制させる処理を施す必要がある。

そこで本研究では、モデルとして Sano ら³⁾が活性汚泥細菌から分離し、大量合成を可能としたポリオウイルスに親和性の高いタンパク質(poliovirus-binding protein: PoVBP)を用い、担体として選択したガラスビーズへの PoVBP 固定化法を確立し、ガラスビーズへの非特異的吸着を抑制するためのブロッキング手法の検討を行った。

2. 方法

2.1 ガラスビーズへの PoVBP 固定化

PoVBP のガラスビーズへの固定化は、グルタルアル

デヒドにより PoVBP のアミノ基とガラスビーズ表面に導入したアミノ基を架橋することによって行った。まず、ピラン液(H₂O₂:50ml, H₂SO₄:150ml)で一晩撹拌しながらガラスビーズ表面の不純物を除去し、その後、精製水でピラン液を洗浄し、乾熱滅菌器で十分に乾燥させた。次に、乾燥させたガラスビーズを 5% (v/v) アミノシランとなるように調整したトルエン溶液に浸し、1hr 撹拌した。撹拌後、精製水で洗浄し、10% (v/v) グルタルアルデヒド溶液中で 1hr 撹拌した。撹拌後、精製水で洗浄し、あらかじめ用意した PoVBP 溶液を添加し、2hr 撹拌した。精製水で洗浄後、ブロッキング剤に浸して 1hr 撹拌し、さらに精製水で洗浄することで PoVBP 固定化ガラスビーズを作成した。

2.2 ブロッキング剤の選定

ガラスビーズのブロッキング剤には、Grafting 効果と呼ばれる物質表面にブラシ状の修飾を施し、その熱力学的運動によって表面における物質の沈着を防ぐ効果を与えるものと⁴⁾、ガラス表面へのタンパク質の疎水性結合を防ぐために、ガラス表面に親水性を与えるものがある。ここで Grafting 効果とは、物質表面にブラシ状の修飾を施し、その熱力学的運動によって表面における物質の沈着を防ぐこと効果のことを指し⁴⁾、またガラス表面を親水性にすることは、タンパク質とガラス表面の疎水性結合を抑制する効果が期待される。本研究では、Grafting 効果を与えるものとして、タンパク質であるカゼイン⁵⁾と炭水化物であるキトサン⁶⁾を採用し、ガラス表面に親水性を与える物質としてエタノールアミンを採用した。エタノールアミンはタンパク質のカルボキシル基を不可逆的にカップリングすることが知られており⁷⁾、ガラスビーズに固定化した PoVBP の活性に影響を与える可能性が考えられたが、エタノールアミンと同様ガラス表面に親水性を与えることが可能な他の物質でも同じような現象が想定されること、さらにエタノールアミンは安価で扱いやすく、ガラス表面の親水性向上への寄与が確実であったことから採用することとした。

2.3 ガラスビーズへ固定化した PoVBP の検出

本研究では、PoVBP を固定化したガラスビーズに対して、Xpress 抗体のガラスビーズへの非特異的吸着の有無からガラスビーズ表面におけるブロッキング効果

Key Words; ウイルス吸着タンパク質, ELISA, ガラスビーズ, VBP 固定化

連絡先 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 Tel: 022-795-7482 Fax: 022-795-7482

を評価することとした。Xpress 抗体とは PoVBP の N 末端に存在するベクター由来のペプチド配列に特異的に吸着する抗体である。

まず、アミノシラン及びグルタルアルデヒドで処理したガラスビーズを 1.5ml マイクロチューブに 5 粒ずつ入れ、さらに PoVBP 溶液を添加し、2hr 撹拌した。その後、チューブ内のガラスビーズをリン酸緩衝液 (PBS) で 3 回洗浄し、1% (w/v) Blocking reagent (Roche) を含むマレイン酸バッファー (100mM マレイン酸, 150mM NaCl), 1%w/v キトサン溶液, 及び 10% (v/v) エタノールアミンのいずれかを 500 μ l/チューブ添加し、1hr 撹拌した。撹拌後、再度 PBS で洗浄し、チューブ内のビーズをあらかじめ Blocking reagent を用いてブロッキングしておいた新しい 1.5ml マイクロチューブに移し替えた。その後、ホースラディッシュペルオキシターゼ (HRP) 標識 Xpress 抗体を 100 μ l/チューブ添加し、1hr 静置後に PBS で洗浄した。最後にオルトフェニレンジアミン (OPD) 溶液 (クエン酸 1 水和物 0.51g, リン酸水素二ナトリウム 12 水和物 1.84g, OPD 1 錠, 30% 過酸化水素水 30 μ l, MilliQ 100ml) を 100 μ l/ウェル注入し、30 分間静置後に 2M 硫酸を 50 μ l/ウェル加えて反応を停止させ、チューブ内の溶液を 96 穴 ELISA プレート (greiner bio-one) に 100 μ l ずつ分注し、直ちに ELISA プレートリーダーによりウェルの吸光度を測定した。

この時、PoVBP を添加しない条件でも同様の実験を行い、ガラスビーズへの Xpress 抗体の非特異的吸着の有無を確認した。また、Xpress 抗体の分散バッファーには PBS と Blocking reagent 溶液の 2 種類を用意し、ブロッキング剤による効果は、PoVBP を添加したチューブから得られた吸光度と、PoVBP を添加しなかったチューブから得られた吸光度から Signal/Noise (S/N) 比を算出して評価した。

3.実験結果及び考察

Fig.1に、各ブロッキング剤とXpress抗体分散バッファーを用いた際に得られた吸光度を示す。Xpress抗体をPBSに分散した条件において、高いS/N比が得られた。PoVBPを用いない条件では、どちらのXpress抗体分散バッファーにおいても非特異的な吸着は見られなかったことから、Blocking reagentをXpress抗体分散バッファーに用いたことによるS/N比の低下は、Blocking reagentがXpress抗体の吸着サイトをブロッキングしてしまったことが影響していると考えられる。

エタノールアミンをブロッキング剤として用いた条件では、非特異的吸着は十分に抑制されていたものの、最も低いS/N比となった。これはPoVBPのカルボキシル基をエタノールアミンがカップリングしたことによる影響と考えられたことから、エタノールアミンはVBPを用いたウイルス濃縮技術におけるブロッキング剤としては適していないと考えられた。

カゼインをブロッキング剤として用いたガラスビーズでは、Xpress抗体分散バッファーの種類に関わらず、

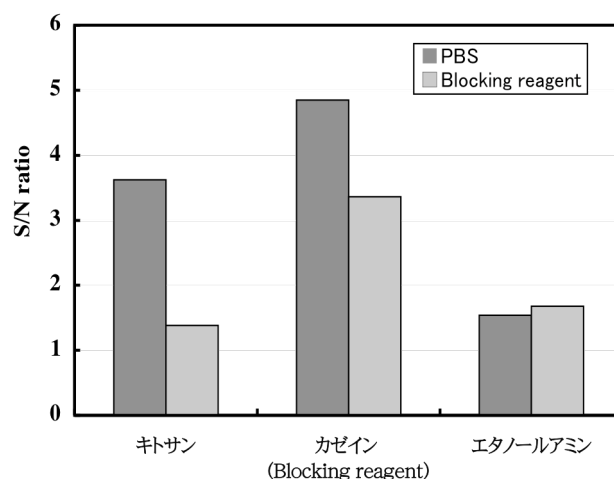


Fig.1 ELISA 法によるガラスビーズへのブロッキング効果の評価 (n=2)

最も高いS/N比を示したことから、カゼインが高いブロッキング効果をもたらすことが示された。また、キトサンをブロッキング剤として用いた条件では、カゼインの使用時よりは低いS/N比が得られたが、エタノールアミン使用時よりは高いS/N比となった。これらGrafting効果をもたらすブロッキング剤は、ガラスビーズ表面においてグルタルアルデヒドと化学的に結合したものと、ガラスビーズ表面に物理的に吸着したものが存在すると考えられ、このうち物理的に吸着しているものは時間と共に脱離していくことが想定される。VBP固定化ビーズを用いた水中ウイルス濃縮装置の連続運転を行う際、これらのブロッキング剤が時間の経過と共にはがれ落ちる可能性があるため、ブロッキング剤としての耐久性について十分に検討することが必要である。また、化学的に結合しているカゼインは、ガラスビーズ表面において微生物の基質となりうる事から、ガラスビーズ表面における微生物の沈着の原因になる可能性がある。それに対し、化学吸着をしたキトサンは、キトサンの生物利用性の低さを考えると、比較的長期間ガラスビーズ表面でブロッキング効果を発揮できるものと推測される。

今回の実験から、非特異的吸着を抑制するためのブロッキング手法として、Grafting 効果の高いブロッキング剤を用いることが望ましいことが明らかとなった。今後は、濃縮装置の連続運転によるブロッキング剤の耐久性について検討を行う必要がある。

参考文献

- 1) Wallis *et al*, (1967), *J. virol.*, **1**, pp472-477
- 2) Sobsey M. D. *et al*, (1979), *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, pp588-595
- 3) D. Sano, *et al*, (2005), *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, pp2608-2615
- 4) P. Irwin *et al*, (2004), *Carbohydrate Research*, **339**, pp613-621
- 5) A.G. Gehriq *et al*, (1996), *J. Immunol. Methods*, **195**, pp15-25
- 6) F. L. Mi *et al*, (2001), *Biomaterials*, **22**, pp165-173,
- 7) Y. S. Choi *et al*, (2007), *Current Applied Physics*, **7**, pp370-374