

VII - 1

活性汚泥による病原ウイルスの吸着除去

- 活性汚泥タンパク質の分子量分布 -

東北大学大学院 学生員 ○加藤 聖
正会員 福士謙介
正会員 大村達夫

1. はじめに

現在発展途上国では適切な衛生設備を利用できないため細菌、ウイルス、寄生虫などが飲料水を汚染している。たとえば下痢は今日子供の死亡原因のトップであり、毎年220万人の子供の命を奪っている(1)。衛生設備の普及が進まない原因にはコストの高さにある。そこで微生物の働きを利用した低コストの微生物処理システムが必要であると考えた。

昨年、筆者らは下水一次処理水中の細菌が産出するバイオポリマーを用いて、ワクチン株の弱毒小児麻疹ウイルスI型(1sc, 2 ab株)の吸着を試み、バイオポリマーにはウイルス吸着能力が存在することを明らかにした。また既往の研究から活性汚泥フロックはポリオウイルスやロタウイルスを吸着することが報告されている(2)。しかしウイルスがなぜバイオポリマーや活性汚泥に吸着されるのかというその吸着機構についての知見はほとんど得られていない。

バイオポリマーや汚泥の構成成分はタンパク質、糖鎖、脂質、DNAの混合物であるがその大部分はタンパク質である。タンパク質は様々な物質と親和性を持っていることから、筆者らは汚泥中のタンパク質に着目し、小児麻疹ウイルスに親和性の高いタンパク質の検索を行っている。活性汚泥中のタンパク質の分離は他の研究者も行っているが(3)、その研究目的は主に活性汚泥の凝集、脱水特性に着目したものである。本研究ではまず活性汚泥中のタンパク質を抽出し、FPLCによる分子画分を行い、汚泥中タンパク質の性質を調べる第一段階とした。

2. 実験方法

仙台市の下水処理場より返送汚泥 (MLSS 5800mg/l) を採取し、右に示す図1の手順に従いタンパク質を抽出した。タンパク質濃度の測定はLowry法 (タンパク質標準物質としては牛血清アルブミンを用いた。) と280nm吸光度を用いた。

次にゲルクロマトグラフィー (Superdex 75 HR10/30) を用いて分子画分を行った。(画分範囲: 3,000 ~ 7,0000) 実験にはAKTAFPLCシステム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。分子量を推定するための標準サンプルと

して分子量が既知の4種類のタンパク質、ribonuclease A (分子量13,700MW), chymotrypsinogen A (25,000), ovalbumin (43,000), albumin (67,000) を用いた。クロマトの流速は0.5ml/minである。

また陰イオン交換カラム (HiTrapQ) による抽出タンパク質の分子画分も試みた。開始緩衝液は0.02 M Tris-HCl, pH8.5で行い、溶出緩衝液として0.02 M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH8.5を用いた。流速0.25nl/min, 溶出の際に20カラム体積でグラディエントをかけて溶出を行う。

- ・ 汚泥の遠心分離 (1000×g, 10分, 4℃)
- ↓
- ・ 凍結融解 (ドライアイス+99.5%エタノール, 37℃ウォーターバス) (3回)
- ↓
- ・ 蒸留水で洗浄 (2回) (ペレットをPBS中に分散させる)
- ↓
- ・ 遠心分離 (10000×g, 10分, 4℃) 上清を回収
- ↓
- ・ 超音波処理 (5分)
- ↓
- ・ 硫酸アンモニウムで塩析 (溶液1Lにつき760~800g) 冷蔵庫に一晩静置
- ↓
- ・ 遠心分離 (16,000×g, 30分, 4℃) ペレットを回収
- ↓
- ・ ペレットを少量のPBSに懸濁、シリンジと0.2μmフィルターで濾過
- ↓
- ・ 脱塩

図1 タンパク質抽出方法

3. 実験結果

3-1, Lowry法による測定結果

Lowry法による測定結果より汚泥に含まれるタンパク質濃度は2,600mg/l程度であった。図1に示す抽出方法により可溶化、抽出されたタンパク質濃度は約750mg/lであり、30%ほどの抽出効率であった。

3-2. ゲルクロマトグラフィーによる結果

抽出タンパク質の分子画分を図2の淡色、分子量が既知の4種類のタンパク質, ribonuclease A, chymotrypsinogen A, ovalbumin, albuminの分子画分を図2の濃色で示す。汚泥中のタンパク質はalbumin (60,000) 程度の分子量のものから分離されはじめ、その後ovalbumin (43,000) 程度の分子までが一つのピークとしてでている。

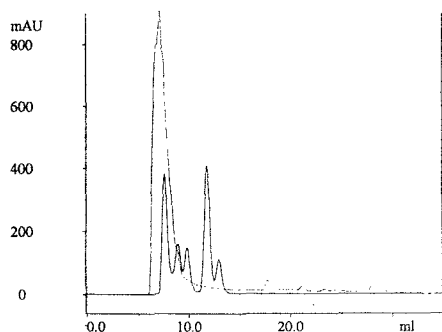


図2 分子量による分子画分
淡色は抽出タンパク質、濃色は分子量既知の標準タンパク質

3-3. 陰イオン交換カラムによる分子分画

抽出タンパク質の分子画分を図3の淡色で、分子量が既知の4種類の標準タンパク質の分子画分を図3の濃色で示す。抽出タンパク質において少なくとも3つのピークがでていることからこの抽出タンパク質は複数のタンパク質から構成されていることが分かる。

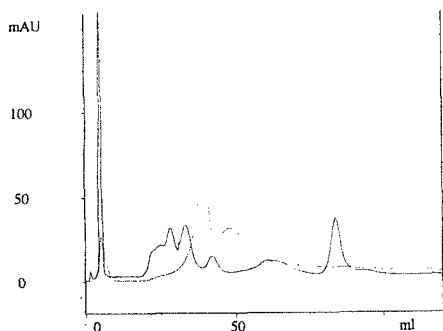


図3 陰イオン交換カラムによる分子分画
淡色は抽出タンパク質、濃色は分子量既知の標準タンパク質

4. 考察とまとめ

分子量分画によるクロマトグラフィーでは、汚泥中より albumin (分子量 65,000) 付近から ovalbumin (43,000) までのタンパク質が一斉に溶出していることが分かる。これは本実験の抽出効率で可溶化・抽出されているタンパク質の大きさがこの程度であることや、カラムの分離性能限界によるものが考えられる。また低分子のタンパク質が小さくでているが、分子量1万程度のタンパク質が抽出されていない。これは界面活性剤や酵素等の利用を試み、今後の抽出方法を改良することで解決できると思われる。

そこで次に陰イオン交換カラムによるタンパク質の分離を試み、汚泥抽出タンパク質が複数のタンパク質により構成されていることを明らかにした。複数のタンパク質が陰荷電の強さによって分離されている。今後この粗分離された各フラクション中からポリオウイルスのカプシドタンパク質との親和性の違いによってさらにタンパク質の分離を行う。ポリオウイルスのカプシドタンパク質は4種類のタンパク質によって構成されており、そのタンパク質の表面タンパクの1次構造は決定されており、1次構造の違いによって細胞や抗体に対し、特異的に結合する。その結合は物理的な拘束と疎水性結合が深く関与していると考えられている。本研究では、汚泥中のタンパク質にこのようなタンパク質が存在することによりウイルスが吸着除去されているものと考え、まずそのタンパク質を特定することを目指としている。その前段階として用いた分子量分画では単一のピークであったので今後抽出方法改良による分子量分画と、今回用いた分子量分画の他にイオン交換能力や疎水性能力によるタンパク質の分画も考慮し、最適な粗分画方法を確立する予定である。

5. 謝辞

本研究の一部は戦略的基礎研究事業((財)科学振興事業団)の助成により行われたことを報告いたします。

6. 参考文献

- (1) UNICEF, Progress of Nations (New York: 1995).
- (2) SAMUEL R. FARRAH et al. Appl. Env. Micro. 1978. 35: 360-363
- (3) Matthew J. Higgins et al. J. Env. Eng. 1997. 123. 479-485