

VII-23

水中ウイルス除去技術開発のための
活性汚泥中ウイルス吸着タンパク質の分離およびその吸着能評価

東北大学 学生員○佐野大輔
東北大学 学生員 松尾崇宏
東北大学 正会員 大村達夫

1. はじめに

近年、様々な水系において病原ウイルス汚染が報告されており、水系ウイルス感染症の被害が増加している¹⁾。しかしながら、細菌や原虫の消毒処理に関する研究と比較して、ウイルス消毒処理に関する研究は十分ではないのが現状である。都市部における下水の再利用を含めた多角的な水利用システムの構築が求められていることを考慮すると、水利用における安全性を確保するために新たな水中ウイルス除去手法の開発が必要である。

本研究の最終目的は、タンパク質間の結合特異性²⁾を利用して、水中ウイルスを特異的に吸着除去する手法を開発することである。本研究では、ウイルスに特異的な吸着材として用いるウイルス吸着タンパク質（Virus-Binding Protein: VBP）を活性汚泥中から分離して、その吸着活性を評価した。

2. 実験方法

2.1 活性汚泥中細菌由来のタンパク質抽出

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×g、4℃）した汚泥上清を普通ブイオン培地に加え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（50W、2分）、遠心分離（30分、20000×g、4℃）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Lowry法による濃度定量後、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ーによるVBPの分離

弱毒ポリオウイルスI型の外殻タンパク質において、抗原抗体反応に関与するペプチド配列を人工的に合成し、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ーを行うことにより、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（2mM Tris-HClバッファー、pH: 8.0）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VBPをアフィニティカラム中のリガンドに結合させた。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 VBPの濃縮

アフィニティクロマトグラフィーでピークが認められた部分の溶出フラクションを10mM重炭酸アンモニウム（pH: 8.0）で一晩透析した。その後、真空遠心を行って溶媒を蒸発させることにより、VBPを10倍に濃縮した。溶媒に対して3倍容の冷却アセトン（-20℃）を添加して-80℃で1時間静置した後、遠心分離（15分、10000×g、4℃）によりVBPのペレットを得た。上清を捨て、10分間真空遠心を行うことによりアセトンを蒸発させ、VBPを乾燥させた。

2.4 SDS-PAGEによるタンパク質の確認

濃縮後のフラクションに対して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。

2.5 イオン交換クロマトグラフィーによるVBPの表面荷電評価

VBPの表面荷電状態を評価するため、イオン交換クロマトグラフィーを行った。開始バッファーには2mM Tris-HClバッファー（pH: 8.0）を、溶出バッファーには1M NaClを添加した2mM Tris-HClバッファー（pH: 8.0）をそれぞれ用いた。

2.6 ELISA法によるウイルス吸着能評価

弱毒ポリオウイルスI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ーによって分離されたVBPが、ポリオウイルスI型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℃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で希釈した弱毒ポリオウイルスI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。次にホースラディッシュペルオキシターゼ（HRP）標識ヒツジ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_{492} を測定した。

3. 結果および考察

3.1 アフィニティクロマトグラフィーによるVBP分離

図1にアフィニティクロマトグラフィーによるVBP分離結果を示す。溶出バッファーを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。ピークが表れている部分のフラクション2, 3を回収した。

3.2 SDS-PAGEによるVBPの分子量推定

図1でピークを示したフラクション2, 3を濃縮後、SDS-PAGEを行うことで、VBPの分子量を推定した。その結果を図2に示す。図2よりVBPの分子量は約25～30kDa、40kDa、60kDaのグループに大別された。

3.3 陰イオン交換クロマトグラフィによるVBPの表面荷電評価

図3に陰イオン交換クロマトグラフィの結果を示す。VBPは正に帯電した陰イオン交換体と結合するが、イオン強度の増加に伴い静電的なイオン結合力が低下することで溶出されている。この結果よりリガンド結合時のVBPの表面荷電は負であることがわかる。一方、本実験でリガンドに用いたペプチドの等電点は6.93であり、pH 8.0の条件下では負に帯電している。したがってペプチドとVBPの結合は静電的な引力が原因ではなく、ペプチドの3次元構造による特異的結合であると考えられる。

3.4 VBPのウイルス吸着能評価

ELISA プレート中では、標識抗体がウイルス、BSA、タンパク質と結合することで様々な複合体を形成し吸光を示すが、そのうちタンパク質に吸着したウイルスへ抗体が結合することで形成される、抗体-ウイルス-タンパク質複合体の量により吸着ウイルス量を評価することができる。この複合体に対する吸光係数をELISAに用いたタンパク質の濃度1% (w/v) と光路長1cm当たりに換算した値である比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (492)は、ELISAプレート中に固定したタンパク質が示す平均的な値であり、ウイルス吸着量が大きいほど比吸光度は大きくなる。

図4にVBP、抽出タンパク質、BSAの比吸光度を示す。VBPはポリオウイルスI型粒子に対して、標準タンパク質として用いたBSAと比較して300倍以上、活性汚泥中細菌からの抽出タンパク質（アフィニティクロマトグラフィに用いたサンプル）と比較して15倍弱の吸着能力を持つことが示された。

4. おわりに

本研究において分離されたタンパク質はポリオウイルスに対して高い吸着活性を示したことから、このタンパク質をウイルス吸着除去の吸着材として用いることで、高効率の水中ウイルス除去が可能であることが示唆された。

参考文献

- 1) Gordon A. McFeters 編, 金子光美 監訳: 飲料水の微生物学, 技報堂出版 (1992)
- 2) Voet D., and Voet J 著, 田宮信雄, 村松正実, 八木達彦, 吉田浩訳: ヴォート生化学 (上), 第2版, 東京化学同人 (1996)

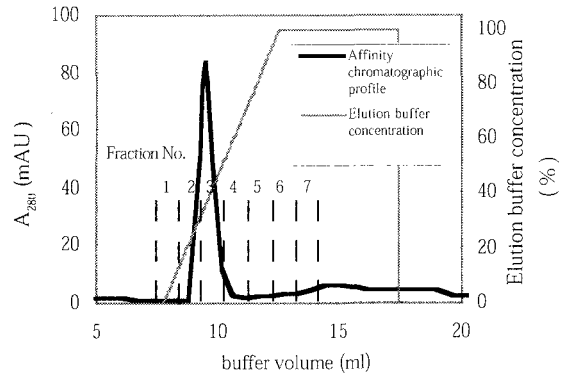


図1 アフィニティクロマトグラフィによるVBP分離結果。

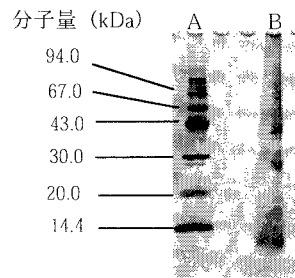


図2 SDS-PAGEによるVBPの分子量推定。
(A: 分子量マーカー B: VBP)

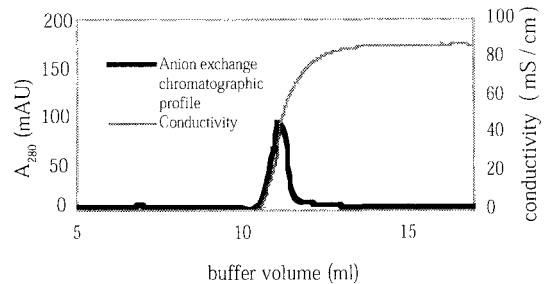
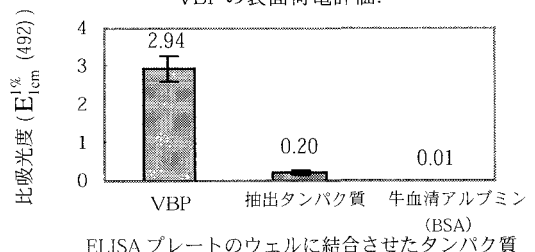


図3 陰イオン交換クロマトグラフィによるVBPの表面荷電評価。



ELISA プレートのウェルに結合させたタンパク質

図4 VBPのウイルス吸着能評価。比吸光度は、タンパク質濃度1%および光路長1cmに換算した吸光係数で、値が大きいほどウイルス吸着能が高いことを示す。Error barは比吸光度の標準偏差（試行回数はすべて3回）を示している。