

VII-25

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

東北大学 学生員 和田圭史

東北大学 正会員○佐野大輔

東北大学 正会員 大村達夫

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認知されてきた。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していくと予想される。

NV は人間の体内でしか増殖でず、また被感染者の糞便中に多量に排出されるため、下水中で高濃度に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。

本研究グループでは、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¹⁾。本研究では、それらの手法を適用することで、NV に対する VBP (Norovirus-Binding Protein: NVBP)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(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 粒子カプシドタンパク質の一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 G I の Norwalk virus,

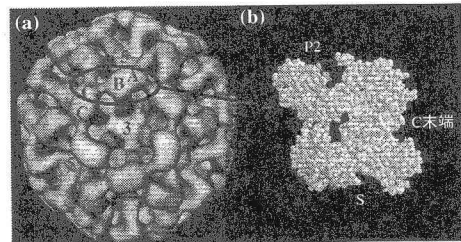


図1 NV カプシドタンパク質のペプチド合成部位。

(a): Norwalk virus のウイルス粒子3次元構造²⁾, (b): ウイルス粒子を構成する3つのカプシドタンパク質からなるサブユニットの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)を利用した。

遺伝子群 G II 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 P2, C 末端, S 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。

2.3 アフィニティクロマトグラフィによる活性汚泥細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(0.45μm 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。NVBP の分離状況はカラム先に取り付けた UV モニターで確認した。

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NVBP分離結果

アフィニティリガンドとして用いた4種類のペプチド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及び図3に、Norwalk virus P2及びC末端の配列をリガンドに用いたアフィニティクロマトグラフィの結果を示した。

図2に示すようにNorwalk virus カプシドタンパク質におけるC末端をリガンドに用いたクロマトグラフィでは、目的タンパク質分離のピークは、buffer volume10~13mlの広範囲に緩やかに分布した。一方、その他3種類のリガンドについては、図3に示すように10~11mlに狭い範囲に分布した。また、目的タンパク質のリガンドへの吸着条件(開始

バッファー組成)は、表1に示すようにペプチドの種類により異なった。

3.2 アフィニティクロマトグラフィにより分離されたNVBPに関する考察

本研究グループでは、これまでにポリオウイルス及びアデノウイルスに対するVBPの分離を行ってきた。その際、アフィニティリガンドには、ウイルス粒子のカプシドタンパク質の中で最外殻に位置するペプチドを人工合成したものを使用した¹⁾。カプシドタンパク質最外殻のアミノ酸配列は、そのウイルスの血清型を決定する部分である。そのため、この領域由来のペプチドへの特異的親和性から分離されるVBPの吸着特性は、血清型特異的となると考えられる。

本研究が対象とするNVは、特にこの血清型を決定するP2の配列の多様性が高く、その感染症被害は多数の血清型を起因とすることが報告されている。したがって、従来のアプローチをNVに適用した場合に得られるVBPは、NV感染症の起因となる血清型のうち、1種類の血清型への吸着特性しか持たない状況となり、水処理におけるNV吸着除去に用いる吸着材としての利用価値は低い。

そこで本研究では、血清型の異なる複数株に対して吸着特性を有するNVBPの分離を目的とし、アフィニティリガンドの合成部位としてC末端を選定した。C末端は、同一遺伝子群内の株間においてアミノ酸配列がよく保存していることから、これらの領域から株間に共通な配列をリガンドとし、分離したNVBPの吸着特性は遺伝子群特異的となる可能性が高い。C末端に関しては、図1に示すようにNV粒子の窪み内の表面に位置する。この窪みは直径9nm、深さ4nmであり、一般的なタンパク質粒子の大きさが5nm程度であることを考えると、NVBPがNV粒子表面の窪みに入り込んでカプシドタンパク質C末端に吸着するという形は不可能ではない。したがって、C末端由来の配列をリガンドとして分離されたNVBPに遺伝子群特異的な吸着特性を有するならば、得られたNVBPの利用価値は高いといえる。

また本研究では、図1に示すようにカプシド中に埋もれた領域であるS由来のペプチドをアイニティリガンドとして用いたNVBPの分離も行った。VBPのウイルスへの吸着は、VBPとアフィニティリガンド合成部位への吸着であると考えられるため、S由来のペプチドをリガンドとして分離されたNVBPはNVウイルス粒子への吸着特性を持たないと考えられる。P2やSをリガンドとして得られたNVBPの吸着特性等については、今回、得られたNVBPのNV粒子への吸着能力を評価することで検証し、NVBPがウイルス吸着材として利用可能であるかを検討する必要がある。

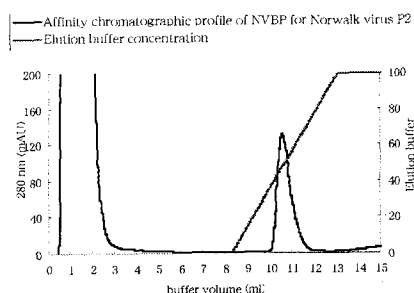


図2 アフィニティクロマトグラフィによるNVBP分離結果 (Norwalk virus P2由来)

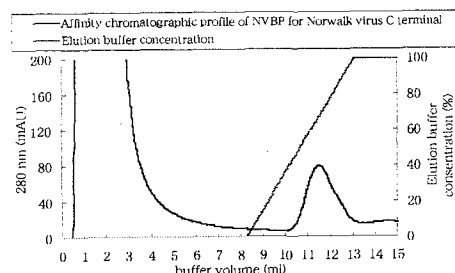


図3 アフィニティクロマトグラフィによるNVBP分離結果 (Norwalk virus C末端由来)

表1 各クロマトグラフィの吸着条件

リガンド合成部位	吸着条件
Norwalk virus P2	2mM Tris (pH=8.0)
Norwalk virus C末端	20mM Tris, 0.1M NaCl (pH=8.0)
Norwalk virus S	20mM Tris (pH=8.0)
Lordsdale virus C末端	2mM Tris (pH=8.0)

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、それぞれのリガンドに対する特異的親和性を有するタンパク質を分離することに成功した。今後は、得られたNVBPのウイルス吸着能力を評価し、水中からのNV除去への応用を検討する予定である。

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

- 1) D. Sano et al., 2004. Virus-binding proteins recovered from bacterial culture derived from activated sludge by affinity chromatography assay using a viral capsid peptide. Appl. Environ. Microbiol., 70 (6), 3434-3442.
- 2) B. V. V. Parasad et al., 1999. X-ray Crystallographic Structure of Norwalk Virus Capsid. Science, 286, 287-290.