

VII-23

水中病原ウイルスの新規検出技術に用いる
固定化ウイルス吸着タンパク質の活性評価

東北大学 学生員 佐々木健吉
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

人間の生活環境にはさまざまなウイルスが存在し、ウイルスに起因する感染症の発生はしばしば社会問題となっている。水中病原ウイルスもその例に漏れず、ロタウイルスやノロウイルスといった水中病原ウイルスは、毎年数千人規模の感染者を発生させている。

水中病原ウイルスは塩素耐性が高く、塩素消毒を中心とした現在の消毒技術では、水中病原ウイルスの完全な不活化は困難である。下水処理場から流出した水中病原ウイルスは海洋において魚介類の体内に蓄積され、それらを喫食することにより再感染が生じる等の被害をもたらすことが考えられる。

水環境の安全性を高めるためには、ウイルスの汚染状況を把握し、適切な対策を取りうる体制を構築する必要がある。しかし水中病塩ウイルスの研究は歴史が浅く、その実態の把握も不十分であるので、環境水中から定期的にウイルスを検出し、その挙動や消長の把握を図る必要がある。

環境水中に微量に存在する水中病原ウイルスを検出するためには、大量の水サンプルからウイルスを濃縮する必要がある。しかし、この過程でウイルスとともに環境水中に存在する有機物や塩類も濃縮され、PCR法等のウイルスの検出反応に障害を与える¹⁾。ウイルスのみを特異的に捕捉、濃縮する手法の開発により、水サンプルの迅速な濃縮と処理が可能となる。

以上の背景から、本研究グループでは環境水中から特異的にウイルスを濃縮する技術の開発を目標としている。本研究室では、活性汚泥細菌中からポリオウイルス1型を特異的に吸着するウイルス吸着タンパク質（Virus-Binding Protein: VBP）を分離、合成することに成功している²⁾。本研究の目標はこのVBPをウイルス吸着材として用いた、環境水中からの特異的なウイルス濃縮技術の開発である。今回はこのウイルス濃縮技術の開発のため、VBPを大量合成可能なシステムの構築を行い、さらにアフィニティゲルに固定化したVBPを用いて、弱毒性ポリオウイルス1型の吸着実験を行った。

2.実験方法

2.1 VBPの合成

VBP遺伝子が組み込まれた大腸菌を、アンピシリンを加えたLB培地10mlに植え、37℃で一晩撹拌しながら培養を行った。その後アンピシリンを添加したLB培地1lに

培養液を10ml加え、37℃で撹拌しつつ培養する。培養液中の菌体が大数増殖期に達した時点で、タンパク質発現剤IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside)を添加し、さらに37℃、緩速撹拌下で5時間培養し、培養液を回収した。

2.2 菌体からのVBP抽出

VBP合成細菌培養液を遠心分離（4℃、9000g、10分）した後に上澄みを捨て、菌体ペレットを回収した。菌体ペレットをバグバスター試薬（Novagen）を用いた温和な条件下で破壊し、遠心分離（4℃、9000g、20分）後、上澄みを捨てることで、封入体と呼ばれる不溶性タンパク質のペレットを回収した。タンパク質ペレットに尿素バッファー（6M 尿素、0.02M NaH_2PO_4 、1M NaCl）を加え、不溶性タンパク質を可溶化し、抽出液を回収した。

2.3 アフィニティクロマトグラフィーによるVBP精製

Ni イオンを固定化したアフィニティゲル（Chelating Sepharose Fast Flow）を充填したカラムにVBP抽出液をBind buffer（20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 5mM Imidazole, 6M 尿素, pH7.9）とともに流し、VBPをゲルへ吸着させた。ゲルをWash bufferA（20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 60mM Imidazole, pH7.9）及びWash bufferB（20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 100mM Imidazole, pH7.9）で洗浄した後、Elution buffer（20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 500mM Imidazole, pH7.9）でVBPをカラムから溶出させ、回収した³⁾。

2.4 VBPの濃縮

回収したVBP溶出フラクションを10mM 重炭酸アンモニウム溶液（pH8.0）中で一晩透析した後、60℃で真空遠心を行い、溶液を蒸発させた。途中、2回Milli-Q水を加え濃縮することで、サンプルを洗浄した。36mlのVBP溶出フラクションを200 μ lまで濃縮した。

2.5 吸着担体の作成

濃縮したVBPをカップリングバッファーで希釈し、アフィニティゲル（NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow）に添加した。このゲルを30分撹拌することでゲルにタンパク質を固定化した。その後洗浄バッファーでゲルを洗浄し、ウイルス吸着実験に用いる吸着担体とした。吸着担体はVBP, Lys-Tag VBP及び抗ポリオ抗体について作成した。

2.6 吸着実験

リガンドを持つ3種類のゲル及びリガンドネガティブゲルをチューブにそれぞれ50 μ lずつ分注し、20mM

Tris-HCl で希釈したポリオウイルスを添加した。チューブを撹拌した後、遠心分離して上澄を回収した。ウイルスの希釈率を変化させ、1時間拡販した。

3. 結果と考察

3.1 SDS-PAGE による VBP の発現と精製の確認

VBP 及び Lys-Tag VBP 抽出液と、精製フラクションに関して SDS-PAGE を行った。20mA/ゲルの電流で90分間泳動した後、泳動後のタンパク質を銀染色で染色し、結果を図3.1及び図3.2に示した。既往の研究との照合から、VBP 及び Lys-Tag VBP の発現を確認した。Elution buffer のフラクションを泳動した箇所に VBP を示すバンドが存在し、VBP のバンドは33kDaの位置に、Lys-Tag VBP のバンドは30kDaの付近に存在する。アフィニティクロマトグラフィによる VBP 及び Lys-Tag VBP の溶出挙動には再現性があり、ともに Elution buffer によってカラムから溶出された。アフィニティクロマトグラフィによる VBP 精製効率は高く、1l の LB 培地で培養した大腸菌から24回の精製作業が可能であり、VBP の大量合成システムの構築に成功したと考えられた。

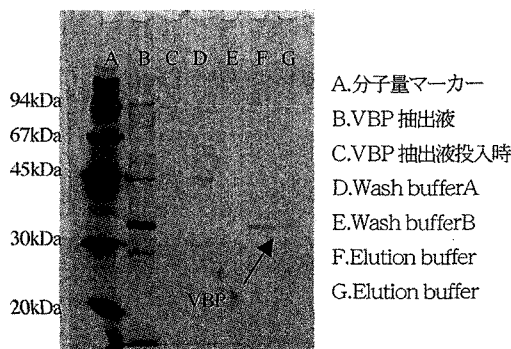


図 3.1 VBP 抽出液と精製フラクションの SDS-PAGE

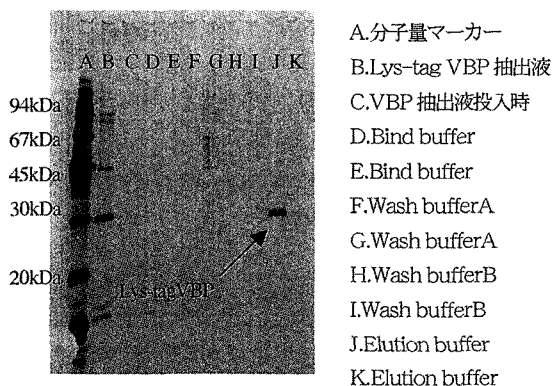


図 3.2 Lys-Tag VBP 抽出液と精製フラクションの SDS-PAGE

3.2 タンパク質を固定化したアフィニティゲルを用いた吸着実験によるウイルス吸着能の評価

6.6×10^8 PFU/ml のウイルスを原液として、吸着実験後の上澄に残存したポリオウイルスの感染価を plaque 法にて定量した。固定化作業を行わなかったネガティブゲルについても同じ手順で実験を行い、吸着実験の結果を図 3.3 に示した。タンパク質の有無にかかわらず、 6.6×10^5 PFU/ml 以下のウイルスを投入した場合にはウイルスはほぼ全量吸着されている。 6.6×10^7 PFU/ml 及び、 6.6×10^6 PFU/ml のウイルスを投入した場合には、ウイルスの一部が吸着されず、上澄に残存した。特に 6.6×10^7 PFU/ml のウイルスを投入した場合、VBP、Lys-Tag VBP 及び抗体を固定化したゲルとネガティブゲルとの間に顕著な差が生じている。この結果から濃縮 VBP 及び Lys-Tag VBP は、ポリオ抗体と同程度の吸着能を有すると考えられる。

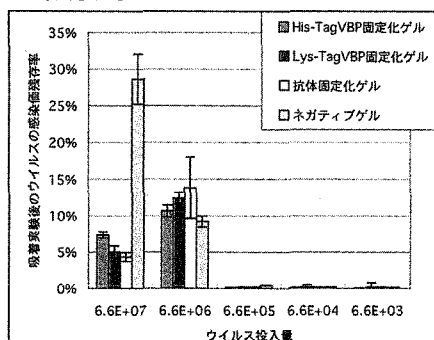


図 3.3 ウイルス吸着実験のウイルス投入量と残存率

4. 終わりに

VBP 合成遺伝子を組み込んだ大腸菌を 1l の LB 培地中で培養し、VBP の大量合成と精製を行った。得られた VBP をアフィニティゲルに固定化し、吸着担体として、ウイルス吸着実験を行い、吸着能力の評価を行った。

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) Suresh, D., Pillai 編 (2000) 金子光美監訳 地下水の微生物汚染
- 2) 松尾崇宏, 佐野大輔, 大村達夫 (2002) : アフィニティクロマトグラフィによる活性汚泥からのウイルス吸着タンパク質 (Virus-Binding Protein: VBP) の分離と特性評価環境工学研究論文集, 2002, 39, 345-353
- 3) 染岡田雅人, 宮崎香織編 (1996) タンパク質実験ノート 羊土社