

(37) 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

Characterization of virus-binding proteins isolated from activated sludge culture
with affinity chromatography

松尾崇宏*, 佐野大輔*, 大村達夫*

Takahiro MATSUO*, Daisuke SANO*, Tatsuo OMURA*

Abstract; Water pollution with pathogenic viruses has been frequently reported in recent years. Since conventional water and wastewater treatment systems are not enough to inactivate or remove pathogenic viruses, a new technology for virus removal should be developed. In this study, virus-binding proteins (VBPs) were isolated from activated sludge culture with affinity chromatography. The ability of VBPs to capture intact particles of poliovirus I was confirmed with ELISA. SDS-PAGE analysis revealed that VBPs included a number of polypeptides that have molecular weight between 94.0 and 14.4kDa. The evaluation of surface charges of VBPs with ion exchange chromatography found that a majority of VBP molecules had a net negative charge under the condition of the affinity chromatography. On the other hand, the viral peptide, which was used as an affinity ligand, was expected to have a net negative charge. As a result, the VBPs must be captured by the viral peptide with stronger binding forces than the electrostatic repulsive force. The affinity adsorption could explain the strong attractive interaction between VBPs and viral peptide. These VBPs could be useful as an innovative material for the virus removal.

Key words; *Pathogenic viruses, Activated sludge culture, Virus-Binding Protein, Affinity chromatography, ELISA*

1. はじめに

近年、水環境における病原ウイルス汚染が数多く報告されている¹⁾。病原ウイルスは感染者の糞便を介して下水へ流入するが、下水処理場において塩素消毒がなされても完全には不活化されず、下水処理水に混入した形で水環境中へ放出される。その結果、病原ウイルスは河川、海洋、地下水といった様々な水環境を汚染することになる。さらに、病原ウイルスに汚染された水源から取水し、浄水処理の過程で十分なウイルス不活化がなされなかった場合、水道水からも病原ウイルスが検出される状況が生じる。

以上のような水環境における病原ウイルス汚染により、ウイルスによる水系感染症発生のリスクが生じる。検出が困難なほど低濃度のウイルス汚染であっても、ウイルスは細菌と比較して非常に少ない量の摂取でも感染を引き起こすため²⁾、感染症発生リスクは大きくなる。さらに、高齢化による抵抗力の低下した人々の増加、国際化・地球温暖化による外来ウイルスの出現等、社会構造や環境の変化に伴って病原ウイルスによる感染症発生リスクが増加することも懸念されている。

水中病原ウイルスによる水系感染症発生のリスクを十分に低減させることは容易ではない。なぜなら、水中病原ウイルスは比較的高い塩素耐性を持っており³⁾、塩素消毒のみでは十分な不活化は難し

*東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University)

いからである。他の消毒手法としてオゾンおよび紫外線消毒等が実用化されているが、ウイルスの種類や汚染のレベルにより不活化の効力が変動し、さらに高い運転コストが要求される。また、精密ろ過膜 (MF) や限外ろ過膜 (UF) がウイルス除去に利用できる可能性があるが、膜分離はエネルギー消費が大きいことやメンテナンスが煩雑であるといった短所がある。

既往の研究により、ウイルスが活性汚泥によく吸着することが知られており⁴⁾、特にバイオポリマーと呼ばれる細菌菌体外のタンパク質や多糖類などの高分子物質がウイルス吸着に関与していると考えられている⁵⁾。このバイオポリマーの構成成分としてタンパク質の占める割合が大きい⁴⁾ことから、活性汚泥中にウイルスを吸着するタンパク質が存在している可能性が高いと考えた。このようなタンパク質をウイルスの吸着材として用いることが可能であれば、水中ウイルスを特異的に吸着除去する新たな技術を開発することが可能である。

本研究の最終目標は、水中病原ウイルスを特異的かつ強固に吸着除去する手法を開発することであるが、ウイルスに特異的に結合す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することに成功し、またVBPの特性を実験的に明らかにしたので、その成果を示すこととする。

2. 実験方法

活性汚泥細菌が産出するタンパク質からVBPを分離し、その特性評価を行う実験方法を説明する。図1に実験手順のフローチャートを示した。図1中の番号は本章の節番号と対応している。

2.1 活性汚泥細菌由来のタンパク質抽出

(1) 活性汚泥細菌の培養・回収

本研究で用いる活性汚泥サンプルとして、仙台市内の2カ所の下水処理場の最終沈殿池から返送汚泥を採取した。採取した返送汚泥中の細菌を培養するため、返送汚泥を種汚泥として液体培地中で好気培養を行った。まず、採取した返送汚泥 100mL を遠心分離 (10 分, 1,000 × g, 4℃) し、上清を 2L の液体培地に混合した。液体培地には普通ブイヨン培地 (kyokuto) を用いた。培養中はポンプとガラスボールフィルターおよび滅菌済除菌用フィルター (0.45 μm) を用いて送気し、20 ± 3℃ の恒温室で 24 時間好気培養を行った。培養後、50mL 遠沈管を用いて培養液を遠心分離 (15 分, 3,000 × g, 4℃) し、上清を捨て菌体ペレットを回収した。回収したペレットは 20mM Tris-HCl バッファー (pH : 8.0) 中に分散後、再び遠心分離 (15 分, 3,000 × g, 4℃) を行い、上清を捨てることによって洗浄した。ペレットの洗浄は 2 回行った。洗浄した後、ペレットは -80℃ の冷凍庫中で保存した。

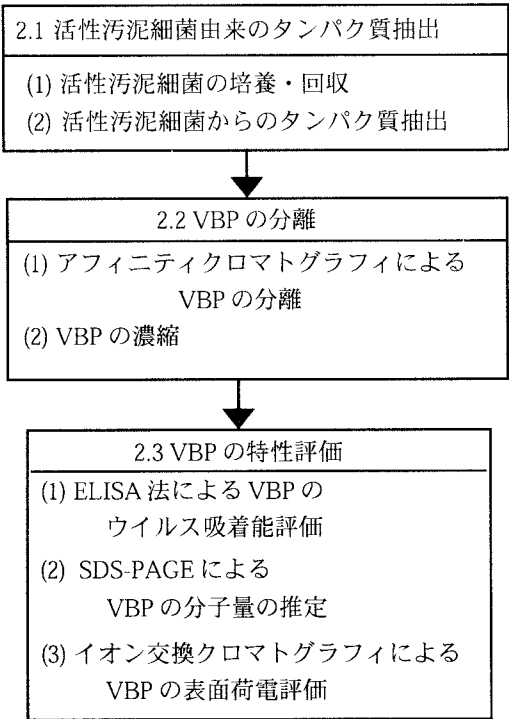


図1 活性汚泥細菌からの VBP 分離とその特性評価の実験手順フローチャート

(2) 活性汚泥細菌からのタンパク質抽出

細菌が産出するタンパク質を抽出する一般的な方法として、有機溶媒（n-ブタノール等）を用いて細菌外膜を可溶化する方法がある。しかし、この方法では疎水性および両親媒性タンパク質を回収することは困難であることが予想された。そこで、疎水性タンパク質の水溶性を増加させる働きのある尿素を用いることで、親水性タンパク質だけでなく疎水性および両親媒性タンパク質の回収を試みた。本研究では、有機溶媒としてn-ブタノールを用いる方法と尿素を用いる方法の2種類の抽出法で活性汚泥細菌からのタンパク質の抽出を行った。まず、(1)で収集し、-80℃で凍結保存した細菌ペレットを30℃で融解した。融解したペレットから、次の2種類の抽出法によりタンパク質を抽出した。

1) 尿素を用いた細菌タンパク質抽出法

尿素 1M を溶解させた 20mM Tris-HCl バッファー（pH : 8.0）をペレット 1g 当たり 1mL の割合で加え、ボルテクスミキサーで攪拌後、超音波処理（50W, 2 分）を行うことによってバッファー中にタンパク質を誘出させた。その後、遠心分離（30 分, 20,000 × g, 4℃）を行い、上清を回収して抽出タンパク質溶液とした。

2) 有機溶媒を用いた細菌タンパク質抽出法

ペレット 1g 当たりそれぞれ 1mL の割合で 20mM Tris-HCl バッファー（pH : 8.0）と n-ブタノールを加え、ボルテクスミキサーで攪拌後、超音波処理（50W, 2 分）を行うことによって緩衝液中にタンパク質を誘出させた。その後、遠心分離（30 分, 20,000 × g, 4℃）を行い、ペレットと n-ブタノール層の中間に位置する水層を回収して抽出タンパク質溶液とした。

それぞれの方法で抽出したタンパク質は直ちに 2mM Tris-HCl バッファー（pH : 8.0, 4℃）中で透析（透析バッファーは 3 時間後に交換後、一晚攪拌）を行い、脱塩及び有機溶媒、尿素の除去を行った。

2.2 VBP の分離

(1) アフィニティクロマトグラフィによる VBP の分離

本研究では、吸着除去対象ウイルスとして弱毒ポリオウイルス I 型（PV1）を選択した。PV1 は腸管系ウイルスの中で最もよく研究がなされており、物理的性質、化学的性質、RNA 配列、外殻タンパク質のアミノ酸配列および 3 次元構造、抗原サイト等が明らかになっている。さらに、PV1 が属するエンテロウイルス属には、エコーウイルスやコクサッキーウイルス等、水系ウイルス感染症を引き起こす種が数多く存在しており、これらのウイルスと PV1 の外形は類似するため、PV1 を用いて行われた実験はこれらの病原ウイルスへも適用できる可能性がある。

PV1 外殻タンパク質は VP1, VP2, VP3, VP4 の 4 種類のタンパク質で構成されている⁶⁾。これらのカプシドタンパク質の中で、ウイルス粒子表面から外側へ突出し、かつ抗原抗体反応に関与することが知られている VP1 の 93 ~ 104 番目のアミノ酸から構成されるペプチド（H₂N-DNPASTTNKDKL-COOH）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を行うことにより、PV1 外殻ペプチドに親和性を有するタンパク質の分離を試みた。0.45 μm のフィルターでろ過した抽出タンパク質をアフィニティクロマトグラフィに用いるサンプルとした。開始バッファー（2mM Tris-HCl, pH : 8.0）でサンプルをアフィニティカラムに導入し、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。次に、結合した VBP を溶出バッファー（0.02M 酢酸, 6M 尿素, 0.5M NaCl, pH : 3.0）でカラムから溶出させた。この際 1mL ずつフラクションを回収し、リガンドに特異的に結合したタンパク質の分離回収を行った。

(2) VBPの濃縮

アフィニティクロマトグラフィーの溶出フラクション20mLを10mM重炭酸アンモニウム (pH:8.0, 4℃) で透析した。その際、透析バッファーは3時間ごとに2回交換し、その後一晩透析した。その後、2mL容チューブ20本に1mLずつ分注し、60℃で真空遠心を行って溶媒を蒸発させ、各チューブ内のサンプル体積を100 μ Lまで減少させた。チューブ10本分を1本のチューブに集め、再び真空遠心を行い体積が0.5mLになるまで溶媒を蒸発させた。2本のチューブそれぞれに対して3倍容の冷却アセトン (-20℃) を添加し、-80℃で1時間静置した後、遠心分離 (15分, 10,000 $\times g$, 4℃) によりVBPのペレットを得た。上清を捨てた後、45℃で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。

2.3 VBP特性評価

(1) ELISA法によるVBPのウイルス吸着能評価

前節までに得られたVBPは、PV1外殻タンパク質の一部と同じ配列を持つ合成ペプチドへの吸着能力により分離されたものであり、PV1粒子そのものを吸着する能力に関しては確認されていない。そこで、このVBPがPV1粒子に対する吸着活性を持つことを確認するためにELISA法を行った。また、ウイルス吸着能力を比較するためにアフィニティクロマトグラフィーに導入する前の抽出タンパク質を用いたELISA法も行った。

1) ELISA法の手順

ELISA法の実験手順の概略を図2に示した。詳細を以下に記述する。

① プレートへのVBP (もしくは抽出タンパク質) の吸着とブロッキング

96穴プレートに50mM炭酸バッファー (pH:9.0) に溶解したVBP (もしくは抽出タンパク質) を50 μ L/ウェルずつ注入し、室温で2時間放置することでプレート表面にVBPを吸着させた。その後VBP溶液を取り除き、リン酸緩衝液 (PBS) で2回洗浄した。洗浄後、5%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSをウェル一杯に満たし、4℃で一晩静置することでブロッキングを行った。

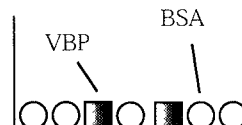
② PV1とVBP (もしくは抽出タンパク質) の結合

プレートのBSAを捨てた後、PBSで2回ウェルの洗浄を行った。その後、5%BSAを含むPBSで 10^6 PFU/mlに希釈したPV1懸濁液を100 μ L/ウェルずつ注入し、室温で1時間反応させることでVBP (もしくは抽出タンパク質) にPV1を結合させた。

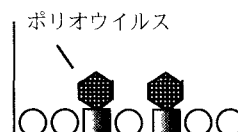
③ PV1と一次抗体の結合

PV1懸濁液を捨て、ウェルをPBSで2回洗浄した後、マウス抗PV1 (Funakoshi) を50 μ L/ウェルずつ注入し、室温で1時間反応させることで、PV1に一次抗体を結合させた。

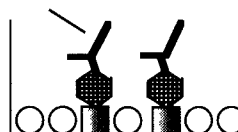
① VBP (もしくは抽出タンパク質) のプレートへの吸着とブロッキング



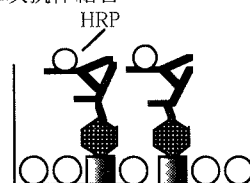
② PV1とVBP (もしくは抽出タンパク質) の結合



③ PV1と一次抗体の結合



④ 二次抗体結合



⑤ 発色

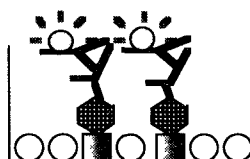


図2 ELISA法の概略図

④二次抗体結合

抗体を捨て、ウェルをPBSで2回洗浄した後、ホースラディッシュペルオキシターゼ（HRP）標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン抗体（Funakoshi）を50 μ L / ウェルずつ注入し、室温で1時間反応させることで、一次抗体に二次抗体を結合させた。

⑤発色

抗体を捨て、ウェルをPBSで3回洗浄した後、オルソフェニレンジアミン（OPD）発色基質溶液（クエン酸（1水）0.51 g, リン酸水素二ナトリウム（12水）1.84 g, OPD（SIGMA, P-7288）を一錠、30% 過酸化水素水 30 μ L, 蒸留水 100mL）を100 μ L / ウェルずつ注入し、30分間静置することで、二次抗体の標識を発色させた。反応後、2M硫酸を50 μ L / ウェルずつ加えて反応を停止させ、ELISAプレートリーダー（Multiskan MS, Labsystems）で吸光度 A_{492} を測定した。

2) VBPのウイルス吸着能評価方法

ELISAプレート中では、標識抗体がPV1粒子、BSA、VBP（もしくは抽出タンパク質）と結合することで様々な複合体を形成するが、そのうちVBP（もしくは抽出タンパク質）に吸着したPV1へ抗体が特異的に結合することで形成される、抗体-PV1-VBP（もしくは抽出タンパク質）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。表1に示す条件でELISAを行い、以下の式(1)を用いて換算することにより、抗体-PV1-VBP（もしくは抽出タンパク質）複合体による吸光度を得た（吸光度の線形性を仮定）。

表1 ELISAの実験条件

ELISA conditions	VBPもしくは抽出タンパク質	PV1 *
①	○**	○
②	○	×†
③	×	○
④	×	×

*：ポリオウイルスⅠ型 10^6 PFU / ml

**：ウェル中に添加，†：ウェル中に不添加。

抗体-PV1-VBP（もしくは抽出タンパク質）複合体による吸光度 A_{492}

$$= (\text{①の吸光度} - \text{③の吸光度}) - (\text{②の吸光度} - \text{④の吸光度}) \quad (1)$$

次に、式(1)で得られた吸光度をVBP（もしくは抽出タンパク質）の濃度1%（w/v）当たりの吸光度に換算し、この値を用いてウイルス吸着能を評価した。

(2) SDS-PAGEによるVBPの確認および分子量推定

濃縮後のフラクションに対してSDS-PAGEを行うことで、VBPの分子量を推定した。はじめに2.2(2)で濃縮したタンパク質を50mM炭酸バッファー（pH:9.0）180 μ Lで溶解した。このタンパク質溶液10 μ Lに対し、2×SDS処理バッファーを10 μ L加え、95℃で5分間ボイルすることでタンパク質を完全に変性させ、負に帯電した状態にした。その後、サンプルを10%ポリアクリルアミドゲルのウェルに10 μ L注入し、20mA/ゲルの定電流により90分間電気泳動を行った。泳動後のタンパク質を銀染色することで、分離タンパク質の確認と分子量の推定を行った。

(3) イオン交換クロマトグラフィによるVBPの表面荷電評価

本研究では、VBPと合成ペプチドの結合はタンパク質の3次元構造を利用した特異的な相互作用による吸着であると考えている。しかしながら、アフィニティカラムに固定化された合成ペプチドの等電点は3.88であり、アフィニティクロマトグラフィの開始バッファーの条件下（pH:8.0）では負に帯電しているため、正の総電荷を持つタンパク質が静電的な引力によって非特異的に結合した可能性

がある。そこで、イオン交換クロマトグラフィを用いてVBPの表面荷電評価を行った。

陽イオン交換クロマトグラフィおよび陰イオン交換クロマトグラフィのカラムとして、HiTrapTMSP (1mm), RESOURCETMQ (1mm)をそれぞれ用いた。開始バッファーには2mM Tris-HCl (pH: 8.0)を、溶出バッファーには1M NaClを添加した2mM Tris-HCl (pH: 8.0)をそれぞれ用いた。

3. 実験結果および考察

3.1 アフィニティークロマトグラフィによるVBPの分離

下水処理場Aで採取した汚泥において、尿素を用いた抽出タンパク質からのアフィニティークロマトグラフィによるVBP分離結果を図3①に、有機溶媒 (n-ブタノール) を用いた抽出タンパク質からのアフィニティークロマトグラフィによるVBP分離結果を図3②にそれぞれ示した。また、下水処理場Bで採取した汚泥において、尿素を用いた抽出タンパク質からのアフィニティークロマトグラフィによるVBP分離結果を図3③に、有機溶媒 (n-ブタノール) を用いた抽出タンパク質からのアフィニティークロマトグラフィによるVBP分離結果を図3④にそれぞれ示した。溶出バッファー添加後に検出されるピークがアフィニティカラム中でPV1 外殻ペプチドに結合していたタンパク質の存在を表している。

下水処理場Aで採取した尿素抽出タンパク質からのみ大きいピークが検出された (図3①)。同じ条件で繰り返し実験を行ったところ、ピーク高さは40～200 mAUの範囲で変動したものの、ピーク出現位置に関しては再現性が高かった。それに対し、n-ブタノールを用いた抽出タンパク質からはピークは確認できなかった。これらの結果については以下のように考察される。尿素にはタンパク質分子内の極性部位 (カルボニル基等) と強く水素結合することで、タンパク質分子全体の親水性を増加させる働きがある⁷⁾。すなわち、尿素を用いた抽出法では、この働きによって疎水性タンパク質の溶解度が高まり、有機溶媒を用いた抽出法では抽出されにくい疎水性および両親媒性タンパク質も抽出されると考えられる。このため、幅広い特性を持つ抽出タンパク質が得られ、その結果、VBPを高効率で得ることが可能であったと考えられる。

一方、下水処理場A, B由来の抽出タンパク質における結果を比較すると、どちらの下水処理場由来の抽出タンパク質においても、尿素抽出タンパク質の場合にはピークが確認できた。しかし、下水処理場B由来の

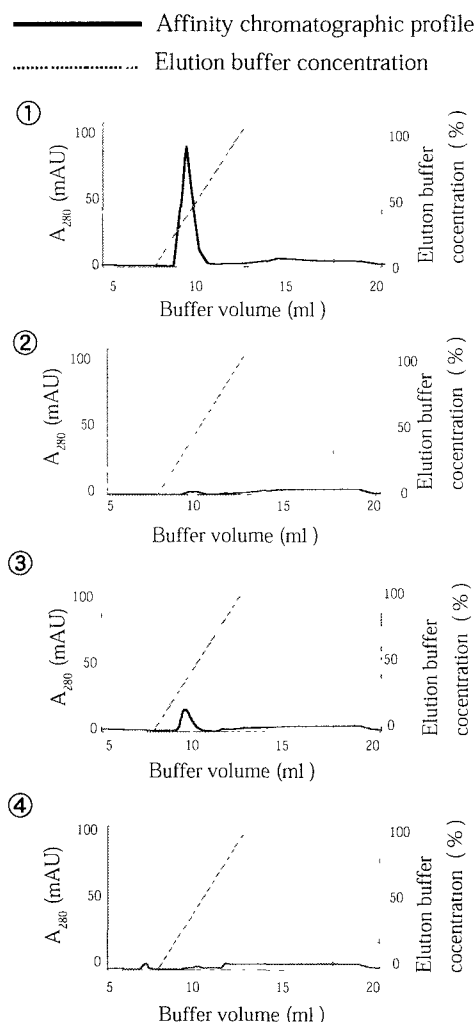


図3 アフィニティークロマトグラフィによるVBP分離結果。①下水処理場A由来の尿素抽出タンパク質使用時、②下水処理場A由来のn-ブタノール抽出タンパク質使用時、③下水処理場B由来の尿素抽出タンパク質使用時、④下水処理場B由来のn-ブタノール抽出タンパク質使用時。

尿素抽出タンパク質において検出されるピークは、下水処理場A由来の尿素抽出タンパク質において検出されるピークと比較して明らかに小さく、実験を繰り返した場合のピーク高さの変動は5～20mAUであった。この結果の違いに関しては明らかではないものの、下水処理場Aは嫌気好気法、下水処理場Bは標準活性汚泥法を採用していることから、この処理方法の違いにより汚泥中細菌相に違いが生じ、上述のようなピーク高さの違いが生じたのではないかと推測された。

3.2 VBP特性評価

(1) VBPのウイルス吸着能評価

ELISA プレートのそれぞれのウェルの吸光度 A_{492} を測定し、2.3 (1) で述べた方法で VBP および抽出タンパク質のウイルス吸着能を評価した。その結果を図4に示す。VBPは、VBPを含む様々な種類のタンパク質が混在している活性汚泥中からの抽出タンパク質（アフィニティークロマトグラフィに用いたサンプル）と比較して、約15倍の単位タンパク質量当たりの吸光度を示した。このことは、PV1 外殻ペプチドをリガンドとして利用したアフィニティークロマトグラフィにより、抽出タンパク質から効率的にVBPが分離されたことを示している。さらに、外殻ペプチドへの親和性により分離されたVBPが、PV1 粒子に対して高い吸着活性を有することが示されたことは、非常に興味深い結果である。この結果は、ウイルスの外殻ペプチドをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィを利用してVBPを分離する本研究の実験手法が有効であったことを示す同時に、PV1 以外の水中ウイルスに対して親和性の高いVBP分離への応用も可能であることを示唆している。

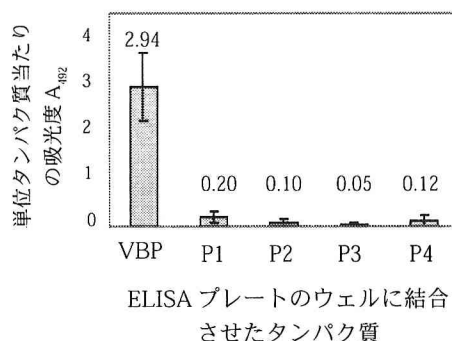


図4 VBP ウイルス吸着能評価. P1：下水処理場 A 由来の尿素抽出タンパク質、P2：下水処理場 A 由来の n- ブタノール抽出タンパク質、P3：下水処理場 B 由来の尿素抽出タンパク質、P4：下水処理場 B 由来の n- ブタノール抽出タンパク質。Error bar は単位タンパク質量当たり吸光度の標準偏差（試行回数はすべて 3 回）を示している。

(2) SDS-PAGE による分子量推定

図5にSDS-PAGEの結果を示した。レーンbに見られるバンドはタンパク質の存在を示している。レーンaの分子量マーカーとの比較から、VBPは、分子量94.0kDa付近に2本のバンド、43.0～67.0kDaに3本のバンド、さらに14.4～30.0kDaに数本のバンドが形成されていることが明らかになった。それぞれのバンドは複数のタンパク質から成るものと考えられ、VBPとして分離されたタンパク質は多種にわたることが推測された。

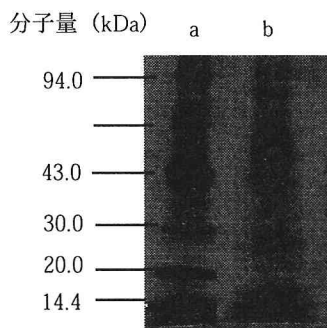


図5 SDS-PAGE による VBP の分子量推定。レーン a：分子量マーカー、b：VBP

(3) イオン交換クロマトグラフィによるVBPの表面荷電評価結果

図6に陽イオン交換クロマトグラフィの結果を、図7に陰イオン交換クロマトグラフィの結果をそれぞれ示した。陽イオン交換クロマトグラフィ（図6）では溶出バッファー添加前にピークが検出されているが、陰イオン交換クロマトグラフィ（図7）では溶出バッファー添加後にピークが

検出されている。これらの結果から、アフィニティクロマトグラフィにおけるVBPとリガンド（合成ペプチド）の結合時において、VBPのほとんどが負の表面荷電を持っていると考えられた。一方、前章で述べたように、アフィニティクロマトグラフィの条件下では、ペプチドは負に帯電している。すなわち、ペプチドとVBPの総電荷は共に負であるため、両者の間には静電的な引力は発生せず、逆に静電的な斥力が働いているはずである。それでもなおアフィニティクロマトグラフィによりVBPが分離されたことから、ペプチド-VBP間には静電的な斥力を上回る結合力が存在していたと考えられる。そのような強い結合力を生じさせるものとしては、抗原抗体反応に見られるような特異的相互作用が考えられるだろう。

4. VBPを用いた水中病原ウイルス吸着除去技術の提案

以上の結果から、本研究で分離されたVBPは水中ウイルス除去における吸着材として利用できる可能性が示唆されたが、その場合にはクローニング技術によりVBPを大量に複製する必要がある。そのためには、まず今回得られたVBPの遺伝子を活性汚泥細菌から抽出し、同定する計画である。VBP遺伝子が同定されれば、クローニング技術によりVBPを大量に複製して使用することが可能となる。また、ウイルス除去技術におけるVBPの利用に際しては、VBPは何らかの担体に固定化しなければならない。VBPを固定化する際には、担体の種類および固定化方法について、VBPのウイルス吸着活性を損なわない手法を模索することが重要である。

固定化VBPを用いた水中ウイルス吸着除去技術の模式図を図8に示した。この技術では、VBPを固定化した担体を充填したウイルス吸着カラムを作成し、このカラムにウイルス汚染が懸念される上水道水源水や下水処理水等を導入する。水中病原ウイルスは担体上のVBPに捕捉されるので、ウイルス除去を省エネルギーで連続的に行うことが可能である。使用済みのウイルス吸着カラムは、吸着状態のウイルスを不活化後に再利用することが望ましいが、担体として安価なものを用いることで、熱処理後に廃棄することも可能であろう。廃棄方法もしくは再利用方法を含めたウイルス除去カラムの運転方法に関しては、VBPクローニングおよび固定化の研究が進展した後に取りかかる計画である。

本研究の実験結果より、VBPはPV1吸着除去における吸着材として利用価値が高いと考えられる。

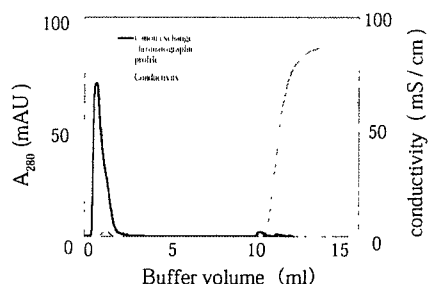


図6 陽イオン交換クロマトグラフィによるVBPの表面荷電評価

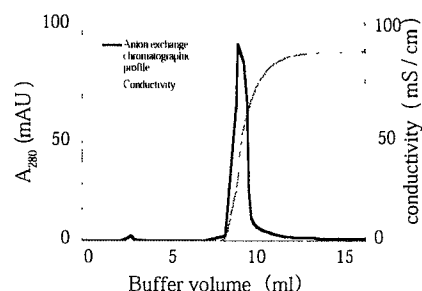


図7 陰イオン交換クロマトグラフィによるVBPの表面荷電評価

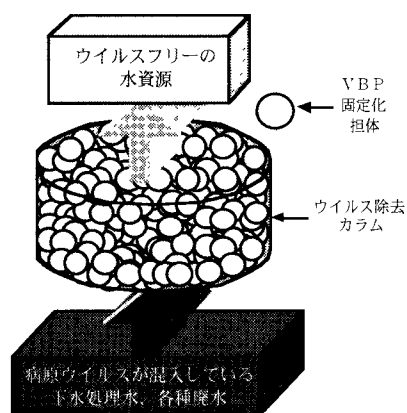


図8 固定化VBPを用いた水中ウイルス吸着除去技術の模式図

さらに2.2 (1) で述べたように、PV1が属するエンテロウイルス属には水系感染症を引き起こす多くの腸管系ウイルスが存在しており、それらのウイルスとPV1の外形が類似するため、PV1以外の水中ウイルスに対しての吸着材としても利用できる可能性がある。この可能性については今後の実験で確認するが、VBPがPV1以外の水中ウイルスを吸着しない場合においても、本研究で用いた実験手法(対象ウイルスの外殻ペプチドをリガンドとして用いたアフィニティクロマトグラフィ等)によりPV1以外の水中ウイルスを吸着するタンパク質を分離し、それらを吸着材として利用することで水中ウイルス吸着除去技術の開発が実現できると考えている。

5. 結論

本研究で得られた知見を以下に示す。

- ・ 活性汚泥細菌由来のタンパク質から、PV1 外殻ペプチドに親和性のある VBP が分離された。
- ・ PV1 外殻ペプチドとの親和性により分離された VBP が、PV1 粒子に対して吸着活性を有することが ELISA 法により確認された。
- ・ 分離された VBP の分子量を SDS-PAGE により推定した結果、VBP は 94.0kDa 付近、43.0～67.0kDa および 14.4～30.0kDa の分子量をもつことが明らかとなった。
- ・ イオン交換クロマトグラフィの結果より、PV1 外殻ペプチド-VBP 間には静電的な斥力を上回る特異的な相互作用による結合力が存在していると推測された。
- ・ 本研究で分離された VBP をウイルス吸着材として用いることで、水中病原ウイルスの吸着除去を高効率で行うことが可能であることが示唆された。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(B)「ウイルス吸着タンパク質を用いた下水処理水からの病原ウイルス除去技術の実用化」(研究代表者：大村達夫)および文部科学省産学官連携イノベーション創出事業費補助金(独創的革新技術開発研究提案公募制度)「機能性タンパク質による水中からの病原ウイルス除去に関する研究」(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) 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) Rose, J. B., and Gerba, C. P. : Assessing potential health risks from viruses and parasites in reclaimed water in Arizona and Florida, USA . Wat.Sci.Tech., Vol.23, pp2091-2098, 1991.
- 3) Kruse, C. W., V. P. Olivieri, and K. Kawata. : The enhancement of viral inactivation by halogens. Water & Sewage Works., Vol.118, pp187-193, 1971.
- 4) Kim T. and Unno . : The roles of microbes in the removal and inactivation of viruses in a biological wastewater treatment system. Wat.Sci.Tech., Vol.33, No.10, pp243-250, 1996.
- 5) Pancordo O., Scheuerman P., Farrah S and Bitton G. : Effect of sludge type on poliovirus association with and recovery from sludge solid. Ca. J. Microbiol., Vol.27, pp.279-287, 1981.
- 6) Hogle J., Chow M. and Filman D. : Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. Science., 229, pp.1358-1365, 1985.
- 7) 堀尾武一 編：蛋白質・酵素の基礎実験法，南江堂，1994.