

(36) アデノウイルス吸着タンパク質 (Adenovirus-Binding Protein : ADVBP) の
活性汚泥細菌からの分離

Adenovirus-Binding Proteins (ADVBP) from activated sludge bacteria

佐野大輔*, 石井哲平*, 大村達夫*

Daisuke SANO*, Teppei ISHII*, Tatsuo OMURA*

ABSTRACT; Outbreaks of waterborne infectious diseases caused by pathogenic viruses have been frequently documented over the world. Pathogenic viruses can survive for a long period in water environment, but there has been a difficulty in removing or inactivating viruses in conventional water and wastewater treatment systems. A new technology for the virus removal from water needs to be developed. In our previous study, virus-binding proteins (VBPs) demonstrating the ability to strongly bind Poliovirus type 1 (PV1) were recovered from a bacterial culture derived from activated sludge. It was expected that the isolated VBPs would be useful as viral adsorbents under the conditions of water and wastewater treatments. In order to develop new technology for virus removal, it is important to isolate not only VBPs for PV1 but also VBPs for other important pathogenic viruses in water. In this study, Adenovirus-Binding Proteins (ADVBP) for *Adenoviruses* type 3 (AD3) and type 40/41 (AD40/41) were newly isolated from activated sludge culture with the affinity chromatography technique. Three distinct peaks were sequentially obtained in each affinity chromatographic profile of ADVBPs for AD3 and AD40/41, respectively. The isolated ADVBP in the first peak include a number of proteins, and their molecular weights were widely distributed. ELISA revealed that the ability of binding Adenoviral particle of ADVBP in the second and third peaks were stronger than those in the first peak in the affinity chromatographic profile. It is speculated that the isolated ADVBPs can be useful as specific adsorbents for *Adenoviruses* in several fields including virus removal, concentration and detection.

KEY WORDS; *Adenoviruses, Activated sludge culture, Adenovirus-Binding Protein, Affinity chromatography, ELISA*

1. はじめに

戦後の高度経済成長と共に急速に進んだ上下水道の整備に伴い、我が国ではコレラや赤痢等の病原細菌による水系感染症は克服されつつある。しかしながら、水利用によって伝播し感染する病原微生物の問題がすべて克服されたわけではなく、特に近年になって水中病原ウイルスを起因とする水系感染症の被害が先進諸国からも数多く報告されている^{1) 2)}。水系感染症の原因となる水中病原ウイルスは被感染者の糞便と共に下水へ流入するが、下水処理場において塩素消毒が行われても完全には不活化されず、下水処理水に混入した状態で水環境中へ放出される。その結果、病原ウイルスは河川水や海水といった様々な環境水を汚染することとなる。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可能性がある。少子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を起因とする輸入感染症の発生等、社会構造や環境の変化に伴って水中病原ウイルスによる感染リスクは今後さらに増加することが懸念されている。また、都市部において下水処理水の再利用を含めた多角的な水利用システムの構築が望まれている現状を考慮すると、水中病原ウイルスに対してより高度な安全性レベルが求められる。

しかしながら、水中病原ウイルスの不活化効果が低いとされる塩素消毒を中心とした従来の水処理プロセスでは、水中病原ウイルスによる水系感染症発生リスクを十分に低減させることは容易ではない。新規消毒手法としてオゾンや紫外線消毒等が実用化されているが、ウイルスの種類や濁度レベルにより不活化の効率が変動する^{3) 4)}。また、精密ろ過膜 (MF) 等がウイルス除去に利用できる可能性があるが^{5) 6)}、膜処理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う短所があるため、汎用化に向けた研究の余地が未だ存在すると言える。水中病原ウイルスによる感染症発生リスクを低減するため、効率的な水中病原ウイルス除去技術の開発が切望されているのが現状である。

以上のような背景のもと、本研究グループは水中病原ウイルスを特異的かつ強固に吸着するタンパク質 (ウイルス吸着タンパク質, Virus-Binding Protein: VBP) を活性汚泥細菌から分離し、特異的なウイルス吸着材として利用することを試みてきた。これまでに、ポリオウイルス 1 型を特異的に吸着する Poliovirus-Binding Protein (PVBP) の活性汚泥からの分離に成功している⁷⁾。VBP を用いたウイルス除去技術を開発する際には、ポリオウイルスのみならず様々な種類の水中病原ウイルスに対する VBP を分離する必要がある。そこで本研究では、水中病原ウイルスの中でも感染事例が年間を通じて一定かつ高い頻度で報告されているアデノウイルスに着目した。アデノウイルスには 49 の血清型が存在するが、その中でも水系感染症の原因ウイルスとして知られているのはアデノウイルス 3 型、7 型、40 型及び 41 型であり、高熱、咽頭炎、胃腸炎及び結膜炎等の症状を引き起こすことで知られている⁸⁾。国内におけるヒトからのアデノウイルス分離株総数は 91 年から 99 年の 10 年間で 16119 件であるが、前述した水系感染が可能なアデノウイルス血清型の分離株数はそのうち 7021 件を占めていた⁹⁾。これは報告全体の 44% に相当する。アデノウイルスの主な被感染者は小児だが、集団の抗体保有率が低い場合には十代でも感染する恐れがある。また、アデノウイルスに対するワクチンや特効薬は現在のところ存在しない。これらのことは、アデノウイルスによる水系感染症発生のリスクを低減するためには水処理プロセスの中でアデノウイルスを適切に除去することが重要であり、その除去において ADVBP が利用されうることを示していると言える。さらに、ADVBP の示す吸着特異性は環境水中からのアデノウイルス検出に応用できる可能性があり、ADVBP を利用してアデノウイルスの環境水中における動態を解明することにより社会におけるアデノウイルス感染症発生やその伝播等を把握し、アデノウイルス感染症発生リスクの解析および制御に貢献することが可能であると言える。

以上のような背景から、本研究では、アデノウイルスを特異的に吸着することが可能なタンパク質 (Adenovirus-Binding Protein: ADVBP) を活性汚泥細菌から分離し、そのウイルス吸着能活性評価を行うことで、ADVBP がアデノウイルスに対する特異的な吸着材として有効であるか検討することを目的とした。

2. 実験方法

2. 1 活性汚泥細菌の培養及びタンパク質抽出

活性汚泥サンプルとして、仙台市内の下水処理場の最終沈殿池から返送汚泥を採取した (採集日は平成 15 年 12 月 8 日)。汚泥は 1000ml ビンに採取し、密栓後実験室に持ち帰った。採取した返送汚泥中の細菌の培養及びタンパク質抽出は既報⁷⁾と同様の手法で行った。端的に述べると、まず採取した返送汚泥 100mL を遠心分離し、上清を 2L の液体培地 (普通ブイヨン培地) に混合して 20±3℃ の恒温槽で 24 時間好気培養を行った。培養液を遠心分離して上清を捨て、回収した菌体ペレットを 20mM Tris-HCl バッファー (pH : 8.0) 中に分散し、遠心分離することにより洗浄した (2 回)。タンパク質を抽出するため、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）を行った。遠心分離後の上清を回収して抽出タンパク質溶液とした。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℃）中で透析を行い、脱塩及び有機溶媒、尿素の除去を行った。

2. 2 アフィニティークロマトグラフィによる ADVBP の分離

アフィニティークロマトグラフィとは、抗原抗体反応に見られるような特異的親和性を利用することにより目的タンパク質を分離・精製する方法である。この技術を用いることで、活性汚泥細菌からの抽出タンパク質中から、アデノウイルス粒子の外殻タンパク質の一部に対して特異的な結合親和性を有する ADVBP を分離した。

本研究では、吸着除去対象ウイルスとして、水中病原ウイルスの中でも被害報告の多いアデノウイルスを選択した。吸着除去対象の血清型としては、水系感染する血清型の中で検出報告が 7 割を占めるアデノウイルス 3 型（AD3）と、乳幼児性下痢症の原因としてロタウイルスに次いで検出報告が見られるアデノウイルス 40 型（AD40）及びアデノウイルス 41 型（AD41）を選択した。なお、AD40 と AD41 の対象ペプチド領域は配列が全く同じであるため、本研究では AD40/41 と表記した。図 1 にアデノウイルス粒子の模式図を示す。アデノウイルス粒子の外殻は正二十面体のカプシドタンパク質からなり、12 個の頂点にはファイバーと呼ばれる突起物（タンパク質）が存在する。本研究では、ファイバー先端部を構成する外殻タンパク質の中でも特に外側を向いているアミノ酸 12 残基を選択し、人工的に合成してアフィニティカラム担体にリガンドとして結合させた。表 1 にリガンドとして用いたペプチド配列を示した。ペプチド合成は（株）ペプチド研究所に依頼した。カラム担体に結合させたアデノウイルス由来ペプチドが特異的吸着活性を有することを確認するため、抗ペプチド血清を用いたアフィニティークロマトグラフィを行った。抗ペプチド血清の作成は（株）ペプチド研究所に依頼した。抗原であるペプチドとの高い結合特異性により、抗血清をサンプルとして流すことでカラムの吸着能を確認することが可能である。

抗ペプチド血清により吸着能を確認したアフィニティカラムを用いて、活性汚泥細菌からの抽出タンパク質中から ADVBP を分離した。開始バッファー（20mM Tris-HCl，0.01M NaCl pH：8.0）でサンプルを流し、抽出タンパク質中の ADVBP をアフィニティカラム中のリガンドに結合させた。カラム中に結合した ADVBP を溶出バッファー（0.02M 酢酸，6M 尿素，0.5M NaCl，pH：3.0）で溶出する際に 1ml ごと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。

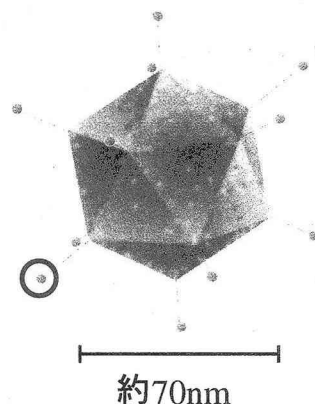


図 1. アデノウイルスの模式図。ファイバーと呼ばれる 12 本の突起物の先端（黒丸）に位置するペプチド（12 残基）を選択し、アフィニティークロマトグラフィのリガンドとして用いた。

表 1. アデノウイルス吸着タンパク質（Adenovirus-Binding Protein: ADVBP）分離のためのアフィニティークロマトグラフィのリガンドとして用いたペプチドのアミノ酸配列

アデノウイルス血清型	リガンドのアミノ酸配列
3型	I N C Y Y K A S D G A L F 12
40/41型	I M A L T Y T F L Q G D P 12

2. 3 SDS-PAGE による ADVBP の分子量推定

アフィニティークロマトグラフィーの溶出フラクション 20ml を既報⁷⁾と同様の方法により精製、濃縮し、SDS-PAGE を行った。泳動後のタンパク質を銀染色により染色することで、分離タンパク質の確認と分子量の推定を行った。

2. 4 ELISA 法によるアデノウイルス吸着能評価

アフィニティークロマトグラフィーにより得られた ADVBP はアデノウイルスのファイバータンパク質の一部に対する親和性により分離されたものであり、アデノウイルス粒子そのものに対する吸着親和性は別に確認しなければならない。本研究では AD3 および AD41 粒子を用いて ELISA を行うことにより、分離された ADVBP のアデノウイルス粒子に対する吸着親和性を確認した。ELISA の手法は既報⁷⁾と同様である。ただし、アデノウイルス抗体として Anti-Adenovirus 3, Mouse-Mono (MAB8047, CHEMICON International, Inc., CA, USA) 及び Anti-Adenovirus 41, Mouse-Mono (MAB8045, CHEMICON International, Inc., CA, USA) を用いた。

3. 実験結果および考察

3. 1 ペプチド抗血清によるカラムの吸着能の確認

AD3 の外殻ペプチドに対する抗血清を用いたアフィニティークロマトグラフィーの結果を図 2a に、AD40/41 の外殻ペプチドに対する抗血清を用いたアフィニティークロマトグラフィーの結果を図 2b に示した。溶出バッファー添加後に検出されるピークはタンパク質が極大吸収を示す紫外線 280nm の吸光度を表しており、このピークの出現の有無によりリガンドに結合、分離されたタンパク質の存在を確認した。どちらの場合も溶出バッファー注入後にピークが検出された。これらの結果から、カラム担体にペプチドが確かに結合されていることが確認された。

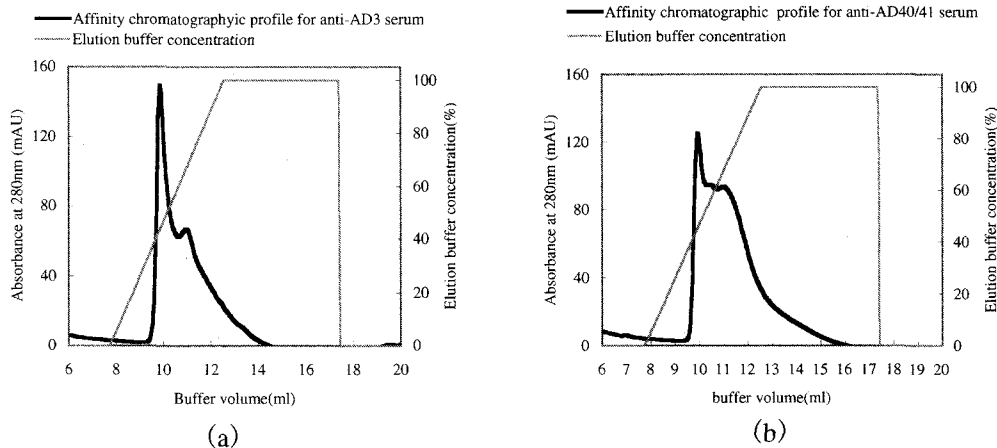


図2. 抗ペプチド血清を用いたアフィニティークロマトグラフィーの結果。(a) AD3 外殻ペプチド固定化カラムと抗 AD3 外殻ペプチド血清を用いたアフィニティークロマトグラフィーの結果。(b) AD40/41 外殻ペプチド固定化カラムと抗 AD41 外殻ペプチド血清を用いたアフィニティークロマトグラフィーの結果。

3. 2 アフィニティクロマトグラフィによる ADVBP 分離

AD3 に対する ADVBP の分離結果を図 3a に、AD40/41 に対する ADVBP の分離結果を図 3b にそれぞれ示した。どちらの血清型を対象とした場合でも、溶出バッファー投入後に 3 つのピークが検出された。溶出バッファー投入後の 1 つ目のピーク（図 3a の Peak①と図 3b の Peak④）は他の 2 つのピークよりも大きく、その高さの平均値及び標準偏差は、AD3 に対する ADVBP の場合が 209 及び 113、AD40/41 に対する ADVBP の場合が 151 及び 41 であった。どちらの ADVBP の場合でもピークの高さには多少変動が生じたものの、ピークが生じたフラクションの位置に関しては再現性が高かった。フラクションが後方に位置する場合ほど ADVBP をカラムから溶出させるための溶出バッファー注入率が大きくなるため、3 つ目のピークに含まれる ADVBP がアデノウイルス粒子に対して最も高い吸着能を示すことが予想された。それぞれピークが表れている部分のフラクションを回収し、以降の実験に進んだ。

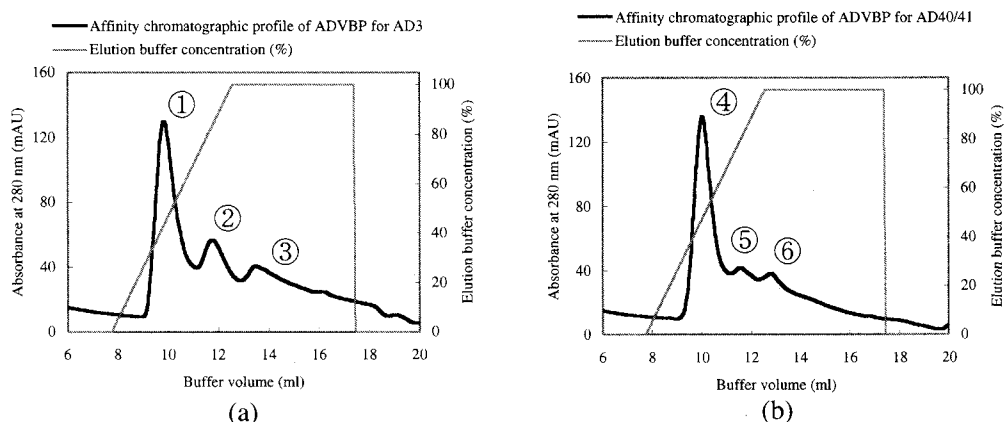


図 3. アフィニティクロマトグラフィによるアデノウイルス吸着タンパク質 (Adenovirus-Binding Protein: ADVBP) の分離結果. (a)アデノウイルス 3 型 (AD3) に対する ADVBP 分離結果. (b)アデノウイルス 40/41 型 (AD40/41) に対する ADVBP 分離結果.

3. 3 ADVBP の確認および分子量推定結果

アフィニティクロマトグラフィの各フラクションに対して SDS-PAGE を行った結果を図 4 に示した。図中のピーク番号は、図 3a および図 3b のピーク番号に対応している。

AD3、AD40/41 のいずれの場合においても、一番始めのピークで回収された ADVBP、すなわちピーク①及び④で回収された ADVBP の分子量は広範囲にわたって分布していた。これに対しピーク②、③、⑤及び⑥で回収された ADVBP は分子量分布の範囲が 67kDa 以下に見られた。アフィニティクロマトグラフィの結果と合わせて考、えると、ADVBP 分子間にはリガンドへの吸着能力の差が存在し、吸着能力が高い ADVBP 分子の数は ADVBP 全体数の中の比較的少数を占めていると言える。

次に SDS-PAGE と同じサンプルを用いて、ELISA による ADVBP のアデノウイルス吸着能力評価を行った。

3. 4 ELISA 法による ADVBP のアデノウイルス吸着能評価

アフィニティクロマトグラフィーで得られた各ピークに含まれる ADVBP のアデノウイルス吸着能評価を行うために ELISA を行った。図 5 は ADVBP 単位質量あたりの吸光度を示しており、この値が大きいほど ADVBP 単位質量あたりのアデノウイルス吸着能が高いことを示している。すべてのピークで分離された ADVBP に対してアデノウイルス吸着能の存在を示す吸光が確認された。また、アフィニティクロマトグラフィーにおいて 2 番目と 3 番目に検出されたピーク（図 3a 中の Peak②、③及び図 3b 中の Peak⑤、⑥）に含まれていた ADVBP のウイルス吸着能は、1 つ目のピーク（図 3a 中の Peak①及び図 3b 中の Peak④）に比べて高いという結果であった。この結果は、アフィニティクロマトグラフィーにおいて溶出バッファー濃度が上昇してから出現したピークには、溶出バッファー投入直後に出現したピークよりもアデノウイルス吸着能力の高い ADVBP が含まれていたことを示している。

以上の結果から、アデノウイルス外殻ペプチドをリガンドとして利用したアフィニティクロマトグラフィーにより分離された ADVBP が、アデノウイルス粒子に対し高い吸着活性を有することが示された。本研究で分離された ADVBP をアデノウイルス吸着材として用いることで、水中病原ウイルス除去技術や検出技術等の開発が可能であると考えられる。今後、得られた ADVBP の他の血清型や他種のウイルスに対する親和性について評価し、ADVBP が特異的なウイルス吸着材として利用可能であることを確認する必要がある。さらに二次元電気泳動およびアミノ酸配列解析¹⁰⁾を進め、ADVBP の同定、ADVBP 遺伝子の分離及び ADVBP クローニングシステムの構築を行っていく計画である。

5. 結論

アフィニティクロマトグラフィーに用いるカラムの ADVBP 吸着能をアデノウイルス外殻ペプチドに対する抗血清を用いて確認した。その後、活性汚泥細からの抽出タンパク質中から、アフィニテ

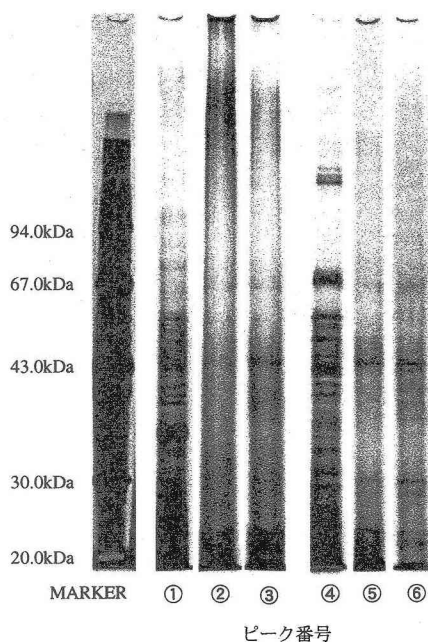


図 4. SDS-PAGE による ADVBP の分子量推定結果。ピーク番号は図 3 に対応している。

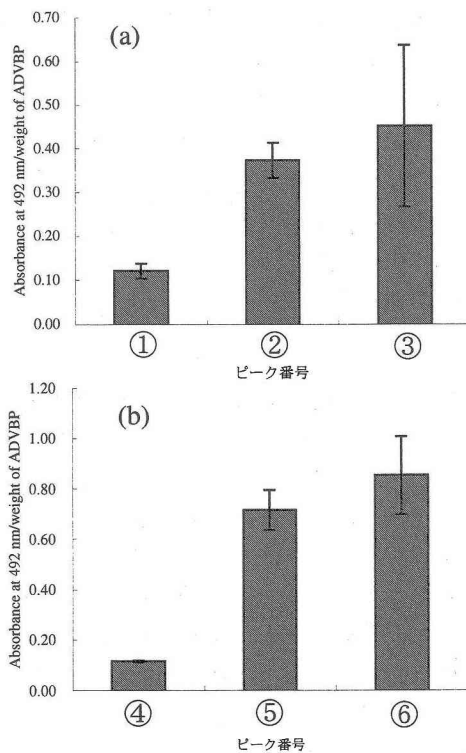


図 5. ADVBP のアデノウイルス粒子吸着能評価。(a) AD3 に対する ADVBP 単位質量当たりの吸光度、(b) AD40/41 に対する ADVBP 単位質量当たりの吸光度。ピーク番号は図 3 に対応している。

イクロマトグラフィによりアデノウイルス 3 型及び 40/41 型の外殻ペプチドに対して結合親和性のあるタンパク質 (Adenovirus-Binding Protein: ADVBP) を分離することに成功した。

アフィニティクロマトグラフィにより分離された ADVBP の分子量を推定するために SDS-PAGE を行った。アフィニティクロマトグラフィで溶出バッファー投入直後に得られたピークに含まれる ADVBP の分子量は広く分布していたが、その後に出現した 2 つのピークに含まれる ADVBP の分子量は 67kDa 以下であった。

アフィニティクロマトグラフィによって分離された ADVBP がアデノウイルス粒子に対して吸着能を示すことを確認するために ELISA 法を行った。すべてのピークで分離された ADVBP においてアデノウイルスに対する吸着能が認められた。また、アフィニティクロマトグラフィにおける溶出バッファー投入後、2 番目と 3 番目に得られたピークに含まれる ADVBP は、溶出バッファー投入直後に得られたピークに含まれる ADVBP よりも明らかに高いアデノウイルス吸着能を有することが確認された。

本研究で分離された ADVBP は、アデノウイルスに対する特異的な吸着材として、ウイルス除去技術や検出技術において利用可能であると考えられた。

謝辞

本研究の一部は、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（独創的革新技术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）および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）によって行われたことを報告する。

参考文献

- 1) Parshionikar, S. U., Willian-True, S., Fout, G. S., Robbins, D. E., Seys, S. A., Cassady, J. D. and Harris, R. 2003. Waterborne outbreaks of gastroenteritis associated with a Norovirus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(9), 5268-5263.
- 2) Center for Disease Control and Prevention. 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreaks - United States, 1997-1998.
- 3) Foster, D. M., Emerson, M. A., Buck, C. E., Walsh, D. S. and Sproul, O. J. 1980. Ozone inactivation of cell- and fecal-associated viruses and bacteria. *J. Water Poll. Control Fed.*, 52, 2174-2184.
- 4) Gerba, C. P., Gramos, D. M. and Nwachuku, N. 2002. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5167-5169.
- 5) Herath, G., Yamamoto, K. and Urase, T. 1999. Removal of viruses by microfiltration membranes at different solution environments. *Wat. Sci. Tech.*, 40, 331-338.
- 6) Otaki, M., Yano, K. and Ohgaki, S. 1998. Virus removal in a membrane separation process. *Wat. Sci. Tech.*, 37, 107-116.
- 7) 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*, 39, 345-353.
- 8) 金井興美, 山崎修道. 1987. ウイルス・クラミジア・リケッチア検査. 第II分冊. 各論1. 日本公衆衛生協会.
- 9) 国立感染症研究所, 感染症情報センター. 2003. Yearly reports of virus detection from human sources, 1982-2002 in Infectious Agents Surveillance Report (Data based on the reports received before December 22, 2003 from public health institutions).
- 10) Sano, D., Matsuo, T. and Omura, T. 2004. Virus-binding proteins recovered from bacterial culture derived from activated sludge by the affinity chromatography using a viral capsid peptide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(6), 3434-3442.