

さ の だ い す け
 氏 名 佐 野 大 輔
 授 与 学 位 博 士 (工 学)
 学 位 授 与 年 月 日 平 成 15 年 3 月 24 日
 学 位 授 与 の 根 拠 法 規 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項
 研 究 科 , 専 攻 の 名 称 東 北 大 学 大 学 院 工 学 研 究 科 (博 士 課 程) 土 木 工 学 専 攻
 学 位 論 文 題 目 Discovering, Characterizing and Cloning of Virus-Binding Proteins
 in Activated Sludge Culture for the Innovative Development of
 Virus Removal Technology
 (革 新 的 な ウ イ ル ス 除 去 技 術 開 発 の た め の 活 性 汚 泥 中 の
 ウ イ ル ス 吸 着 タ ン パ ク 質 の 分 離 , 特 性 評 価 お よ び
 ク ロ ー ニ ン グ に 関 す る 研 究)
 指 導 教 官 東 北 大 学 教 授 大 村 達 夫
 論 文 審 査 委 員 主 査 東 北 大 学 教 授 大 村 達 夫 東 北 大 学 教 授 野 池 達 也
 東 北 大 学 教 授 西 村 修

論 文 内 容 要 旨

1. 緒 論

水系感染症を引き起こすウイルスとして多種多様な病原ウイルスが知られているが、これらの病原ウイルスは、下水、下水汚泥、下水処理水、河川水、海水および飲料水といった様々なサンプルから分離されていることが報告されている。環境水中で長い間生存するウイルスは、急速ろ過等のろ過方式が主要な処理方式である浄水処理において、サイズが小さいために除去されにくい、したがって消毒プロセスがウイルス処理の最後の砦となるが、原虫ほどではないものの、ウイルスは細菌と比べて高い消毒剤耐性を有していることが知られている。水中病原ウイルスの除去に関しては、従来の水処理システムでは困難である。

以上の背景のもと、本研究では、これまでその存在が知られていなかった活性汚泥中の VBP を用いた革新的なウイルス除去技術を提案している (図 1)。この技術では、表面に VBP が固定化された担体を充填したカラムを作製し、そのカラム中にウイルス汚染水を通過させる。水中病原ウイルスは VBP に捕捉され、結果的にウイルスフリーの水資源が得られるものである。

本研究は、新たな水中病原ウイルス除去技術に用いる VBP を活性汚泥から分離することを目的とした。

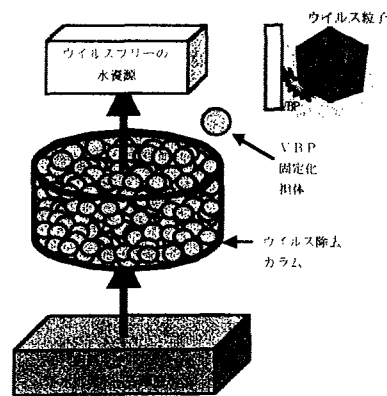


図 1. ウイルス除去カラムの模式図

2. 浄水および下水処理場から得られたサンプルからの病原ウイルス検出

環境水中における病原ウイルス濃度に関する報告は世界各国から得られてきているものの、十分な量のデータが存在するとは言えない。特に我が国では、どの自治体においても水中病原ウイルスのモニタリングは義務づけられておらず、必然的に水中病原ウイルス濃度に関するデータが少ないのが現状である。本章では、日本国内の浄水場および下水処理場からサンプルを採取し、病原ウイルス検出を試みることにより、環境水中の病原ウイルス濃度を把握するための実験を行った。サンプルとして、仙台市内の下水処理場および千葉県内の下水処理パイロットプラントから下水、下水汚泥および二次処理水を採取した。また、大阪府内の浄水場から水道原水を採取した。検出対象ウイルスは組織細胞で検出可能な病原ウイルスとした。調査の結果、下水および下水汚泥 1 リットル当たり数百感染粒子、下水処理水および水道原水 1 リットル当たり数感染粒子が、平均的な濃度として認識するという結論が得られた。

3. 活性汚泥からのVBP分離

3. 1 緒論

本章では、革新的なウイルス除去技術に用いるVBPを活性汚泥細菌から分離することを試みた。

3. 2 実験方法

① アフィニティークロマトグラフィによる活性汚泥細菌からのVBP分離

仙台市内の下水処理場の最終沈殿池から採取した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。培養後、遠心分離（15分、3,000×g、4℃）により菌体ペレットを回収した。得られたペレットからは、尿素 1M を溶解させた 20mM Tris-HCl バッファー（pH: 8.0）によりタンパク質を誘出した。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。

アフィニティークロマトグラフィのリガンドとしては、弱毒ポリオウイルス 1 型（PV1）の外殻タンパク質の中で、ウイルス粒子表面から外側へ突出し、かつ抗体による中和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）を人工的に合成して用いた。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ー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後、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。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 ELISA による VBP のポリオウイルス吸着活性評価

ELISA により、分離された VBP のポリオウイルス吸着活性の確認を行った。

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

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、HiTrap™SP (1mm)、RESOURCE™Q (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. 3 結果および考察

図 2 にアフィニティークロマトグラフィによる VBP 分離結果を示した。抽出タンパク質投入後すぐに大量のタンパク質が洗い流された（Elution volume = 0~4 ml）が、溶出バッファー添加後に VBP の存在を示すピークが得られた。図 1 のピーク高さは約 80mAU (280nm の吸光度) であるが、実験を行った期間内において 40~200mAU の範囲でのピーク高さの増減が認められた。しかしながら毎回 VBP の存在を示すピークが得られており、アフィニティークロマトグラフィを用いた VBP 分離に関しては再現性のある結果を得られたと言える。

図 3 に ELISA による VBP のポリオウイルス吸着活性評価の結果を示した。ELISA の実験条件は 3 つ存在する。1 つ目は VBP 固定化 well に PV1 を滴下した条件 A、2 つ目は VBP 固定化 well に PV1 を滴下しない条件 B、3 つ目は牛血清アルブミン（BSA）固定化 well に PV1 を滴下した条件 C である。実際には BSA 固定化 well に PV1 を滴下しない条件（negative control）でも行っており、図 3 には negative control で得られた値との差を示してある。

条件 A において、他の条件に比べて明らかに大きな吸光度を得た。棄却率 0.01 の t 検定により、A-B 間および A-C 間に有意な差があることが確認された。このことから、今回得られた VBP が PV1 Sabin1 に対する吸着活性を確かに有していることが確認された。

SDS-PAGE により得られた VBP の分子量を推定したところ、94kDa 付近および 67~43kDa にタンパク質の濃いバンドが確認された。またバンドの色は薄いものの、20~14kDa にもいくつかのバンドが確認された。

VBP の表面荷電を評価するためにイオン交換クロマトグラフィを行ったところ、ほぼすべての VBP が負に荷電していることが確認された。さらに等電点の計算から、アフィニティカラム中に固定化したウイルス外殻ペプチドも、負に荷電していることが推測された。したがって、ウイルス外殻ペプチドと VBP の間には、静電的な斥力が生じることとなる。それでもなお、VBP がアフィニティークロマトグラフィにより分離されたことから、VBP とペプチドの間には強い引力が存在することが示唆された。

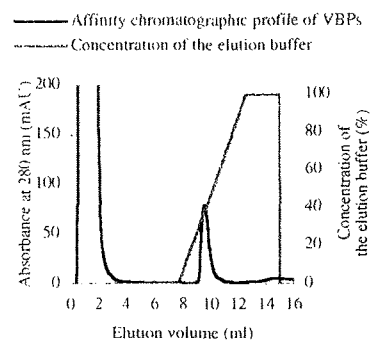


図 2. アフィニティークロマトグラフィによる VBP 分離結果

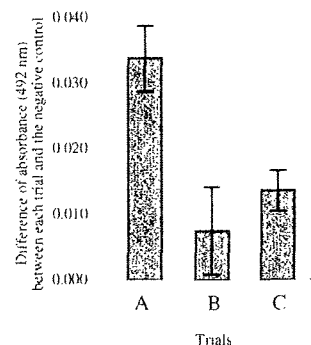


図 3. ELISA による VBP のポリオウイルス吸着活性評価

4. 活性汚泥からのVBP遺伝子分離

4.1 緒論

前章における SDS-PAGE の結果から、得られた VBP は数種のタンパク質が混合していることが明らかとなった。これらのタンパク質の同定を進めるため、二次元電気泳動による VBP の分離を行い、ゲルから VBP を抽出した後、VBP の N 末端アミノ酸配列解析を行った。さらに、その N 末端アミノ酸配列をもとに、VBP クローニングに用いる VBP 遺伝子の分離を試みた。以下にその方法と結果を示す。

4.2 実験方法

① VBP の N 末端アミノ酸配列解析

VBP に対し、まず等電点電気泳動を行い、その後 SDS で VBP を変性させ、等電点電気泳動の方向と直角の方向へ SDS-PAGE を行った。分離後のタンパク質は、CBB で染色することにより検出した。各スポットをカミソリを用いて切り出し洗浄した後、HP G1005A Protein Sequencing System により、VBP の N 末端アミノ酸配列解析を行った。決定された VBP の N 末端アミノ酸配列に関して相同性検索を行った。

② 活性汚泥細菌のゲノムDNAライブラリ構築

抽出された活性汚泥細菌のゲノムDNAはSau3AIで消化した。消化後のDNA断片は0.7%アガロースゲルを用いて電気泳動し、塩基長1~3kbpに相当する部分を精製した。精製後のDNAは、プラスミドベクターpUC118のBamHI消化物にライゲーションし、DNAベクターを完成させた。完成したベクターはE. coli DH5 α に導入することにより、活性汚泥細菌のDNAライブラリを構築した。

③ コロニーハイブリダイゼーションによるVBP遺伝子分離

VBP 遺伝子検索用 DNA プローブは VBP の N 末端アミノ酸配列をもとに作成した。コロニーハイブリダイゼーションは、プローブ濃度 0.01 μ g/ml、ハイブリダイゼーションおよび未反応プローブ洗浄温度 40 $^{\circ}$ C および洗浄液組成 0.1 \times SSC、0.1%SDS の条件下で行った。コロニーハイブリダイゼーションにより得られた大腸菌からプラスミドを抽出し、その DNA 配列を解析した。DNA シーケンシングには Dye terminator 法を用いた。

4.3 結果

① 二次元電気泳動による VBP 分離

図 4 に、二次元電気泳動による VBP の分離結果を示した。丸で示した部分に濃いスポットが得られている。丸で示したスポット以外にも細かいスポットが得られており、その多くが pH4~6 に分布していた。

② VBP の N 末端アミノ酸配列解析

Spot 1 と Spot 4 の VBP について、22 残基までのアミノ酸配列を決定することに成功したので、その配列に関して相同性検索を行った。Spot 1 の VBP に関しては、最も相同性が高かったタンパク質は *Aeromonas hydrophila* の外膜タンパク質 (Accession number : AAF87725) であり、相同性は 90% であった。Spot 4 の VBP に関しては、80% 以上の相同性を有するタンパク質として 2 種類がピックアップされた。そのうち相同性が高い方のタンパク質は、*Vibrio cholerae* の外膜タンパク質 OmpK (Accession number : NP231936) であり、相同性は 81% であった。これらのタンパク質については、相同性が高くても 90% もしくは 81% であり、また相同性の高い部位も N 末端に位置しないことから、データベース上に登録されていない、新規に見いだされたタンパク質であると考えられた。

③ コロニーハイブリダイゼーションによる VBP 遺伝子分離

比較的濃く発色しているスポットに対応したコロニーをピックアップし、培養およびプラスミド抽出後、DNA シーケンシングへと進めた。構築したライブラリから合計 11 個のコロニーをピックアップして DNA シーケンシングを行ったところ、Spot4 の VBP と類似した配列を有する 1 つの Open Reading Frame (ORF) が得られた (図 5)。Spot 4 の VBP と全く同じタンパク質ではないものの、非常に近い配列をもつこのタンパク質がウイルス吸着活性を有している可能性が考えられたので、この配列を VBP 候補遺伝子として単離し、以降の実験に用いることとした。

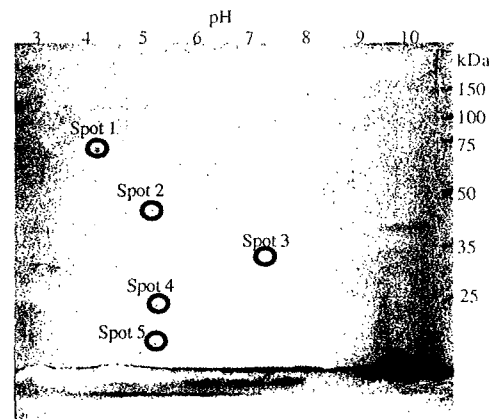


図 4. 二次元電気泳動による VBP 分離結果

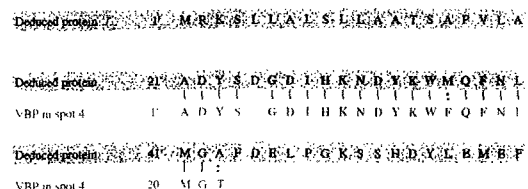


図 5. コロニーハイブリダイゼーションにより分離されたタンパク質と Spot 4 の VBP の配列アライメント。縦棒は一致しているアミノ酸、縦点線は類似アミノ酸である。

5. VBP クローニング及びウイルス吸着活性評価

5. 1 緒論

本章では、前章で得られた VBP 候補遺伝子を用いて VBP 候補のクローニングを行い、そのウイルス吸着活性を評価した。

5. 2 実験方法

① VBP 候補発現用ベクターの構築

VBP 候補遺伝子増幅用プライマーを設計し、VBP 候補遺伝子を PCR により増幅した。PCR 産物をプラスミドベクター pRSET にライゲーションさせることにより、VBP 候補発現用ベクターを構築した。

② VBP 候補の発現及び精製

構築されたベクターは、タンパク質発現用の大腸菌である *E. coli* BL21 に導入した。大腸菌培養後、IPTG によりタンパク質発現を誘導した。菌体を破碎して水溶性タンパク質を回収した後、不溶性タンパク質は尿素溶液に溶解させた。VBP 候補はニッケルカラムで精製した。

③ VBP 候補のポリオウイルス吸着活性評価

得られた VBP 候補のポリオウイルス吸着活性を評価するために ELISA を行った。

5. 3 結果および考察

① VBP 候補発現用プラスミドベクターの構築

VBP 候補発現用ベクターの構築後、ベクター中に VBP 候補遺伝子が適正に挿入されていることを確認した。構築されたベクターを用いると、N 末端に 6xHis タグを持つ、約 33kDa のタンパク質が発現されることが予想された。

② *E. coli* BL21 による VBP 候補の発現及び精製

構築したベクターを *E. coli* BL21 に導入後、VBP の発現を行った。培養後の菌体を SDS-PAGE に供したところ、VBP 候補の発現に成功していることが確認された。また、VBP 候補遺伝子は、菌体の不溶性（尿素溶解性）画分に含まれることも確認された。

不溶性画分中の VBP 候補はニッケルカラムを用いて精製した。図 6 は、精製の結果を SDS-PAGE で確認したものである。Lane4 が精製後サンプルであるが、約 33kDa の VBP 候補のみが残っており、精製が成功したことが分かる。

③ ELISA による VBP 候補のウイルス吸着活性評価

図 7 に ELISA による VBP のウイルス吸着活性評価の結果を示した。条件 A の場合、すなわち VBP を固定化し、そこに PV1 を添加した系において一番大きな吸光度を示している。この結果から、今回得られたタンパク質が PV1 に対する吸着活性を有しており、VBP としての利用が可能であると言える。

6. 結論

本学位論文における結論を以下に示す。

ポリオウイルスに対する吸着活性を有するウイルス吸着タンパク質 (Virus-Binding Protein: VBP) を、活性汚泥から分離することに成功した。分離された VBP の分子量は、94kDa 付近、67~43kDa、20~14.4kDa の範囲にあった。また、VBP はアフィニティクロマトグラフィの条件下 (pH8.0) で負に荷電していることが、イオン交換クロマトグラフィにより確認された。アフィニティカラムのリガンドであるポリオウイルス外殻ペプチドも同条件下で負に荷電していると推測されたので、VBP とペプチド間には、静電的な斥力を上回る強い引力が存在していることが示唆された。

分離された VBP の N 末端アミノ酸配列をもとに、活性汚泥細菌 DNA ライブラリから VBP 遺伝子を検索したところ、VBP と非常に良く似た配列をコードしている 1 つの Open Reading Frame (ORF) が得られた。この遺伝子は 807 塩基から成っており、268 残基のタンパク質をコードしていた。

得られた ORF を VBP 候補遺伝子と考え、大腸菌による VBP 候補のクローニングを試みたところ、約 33kDa の VBP 候補の発現に成功した。この VBP 候補のポリオウイルス吸着活性は ELISA 法により確認され、クローニングにより得られたタンパク質がまさに VBP そのものであることが示された。

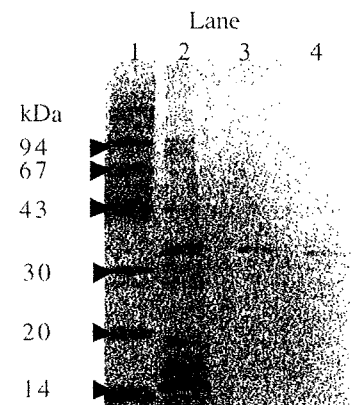


図 6. VBP 候補の精製度の確認。Lane1, サイズマーカー; Lane2, 大腸菌由来水溶性タンパク質; Lane3, 大腸菌由来不溶性 (尿素溶解性) タンパク質; Lane4, 精製後サンプル。

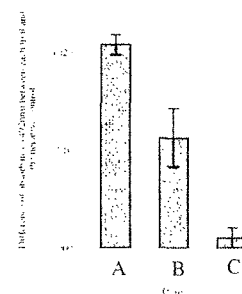


図 7. ELISA による VBP 候補のウイルス吸着能評価結果。A, test; B, a negative control of Poliovirus 1; C, a negative control of VBP.

論文審査結果の要旨

本論文は、これまで存在が知られていなかった活性汚泥中のウイルス吸着タンパク質（Virus-Binding Protein: VBP）を発見し、かつクローニングによる VBP の大量発現に成功したことにより、VBP を用いた革新的なウイルス除去技術の開発が実現可能であることを明らかにしたものである。

第 1 章では、本研究に関わる従来の知見をまとめた後、VBP を用いた革新的なウイルス除去技術開発の必要性について述べている。その中で、ウイルスの存在が将来、水を介した感染症の発生という重大な問題として顕在化する可能性について言及した。その上で、活性汚泥による高いウイルス除去効率に着目し、ウイルスに親和性の高いタンパク質（VBP）が活性汚泥中に存在するのではないか、ということを目指している。さらに、もし VBP が存在するのなら、VBP を分離、精製し、ウイルス吸着材として用いた革新的なウイルス除去技術が開発可能であるということも指摘している。

第 2 章では、種々のサンプル中のウイルス濃度に関する知見を得るため、下水、下水汚泥、下水処理水および水道原水を採取し、ウイルス濃度を測定した結果を示している。分離されたウイルスに関しては、アデノウイルス及びエンテロウイルスの同定まで行っている。その結果、エンテロウイルスに関して、下水および下水汚泥には 1 リットル当たり数百感染粒子、下水処理水および水道原水には 1 リットル当たり数感染粒子という濃度を得た。これはウイルスの水環境中での存在を明らかにした有用な知見である。

第 3 章では、活性汚泥細菌からの VBP 分離を試みている。その結果、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による VBP 分離に成功した。さらに、複数種の VBP が分離されており、それぞれ 94kDa 付近、67~43kDa、および 30~14.4kDa の分子量を有すること、これらの VBP は静電的な斥力を上回る強い引力によってウイルス外殻ペプチドと結合することが可能であることを明らかにした。

第 4 章では、第 3 章で得られた VBP を同定し、VBP をコードする遺伝子を活性汚泥細菌から分離することを試みている。その結果、VBP の N 末端アミノ酸配列と非常に相同性の高いタンパク質をコードした 1 つの Open Reading Frame (ORF) を、VBP 候補遺伝子として分離することに成功した。さらに、この VBP 候補遺伝子及びコードされているタンパク質は、データベース上に存在しない、新たに発見された遺伝子及びタンパク質であることが明らかにされた。

第 5 章では、第 4 章で得られた VBP 候補遺伝子を用いて VBP 候補のクローニングを行い、そのウイルス吸着活性を確かめることを試みている。その結果、大腸菌を用いた VBP 候補の発現及び精製に成功し、精製された VBP 候補がウイルス吸着活性を有することを ELISA 法で確かめ、このタンパク質がまさに VBP であることを明らかにした。この VBP クローニングの成功は、VBP の大量発現及びウイルス除去技術における利用を実現するものである。

第 6 章は結論である。

以上要するに本論文は、従来その存在が知られていなかった活性汚泥中 VBP の存在を明らかにし、さらに VBP をウイルス除去技術に利用するため、VBP 遺伝子を活性汚泥細菌から分離して VBP クローニングを行うことに成功した。このことより、VBP を短時間に低コストで大量生産し、革新的なウイルス除去技術に利用することを可能にしたものであり、環境工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。