

センダイウイルス構成タンパク質,特にHNタンパク質とNPタンパク質の精製法

誌名	日本大学農獣医学部学術研究報告
ISSN	00780839
巻/号	44
掲載ページ	p. 68-73
発行年月	1987年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



センダイウイルス構成タンパク質, 特に HN タンパク質と NP タンパク質の精製法

加藤清士*¹・岩崎憲太郎*²・名取正彦*¹

(昭和61年10月24日受理)

Purification of Structural Protein of Sendai Virus(HVJ) Purification of HN Protein and NP Protein

Kiyoshi Katoh*¹, Kentaro Iwasaki*² and Masahiko Natori*¹

The HN and NP protein of Sendai virus were isolated by elution from gel after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Isolated virions by sucrose gradient centrifugation were electrophoresed on 4M Urea-8% polyacrylamide gel.

HN and NP protein in the gel detected with sodium acetate staining were then eluted by electrophoresis through agarose and acrylamide gels.

The isolated HN and NP proteins were nearly pure as judged from the Coomassie Brilliant Blue staining after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Key words: Purification of Sendai virus

パラミクソウイルスの最も代表的なウイルスであるセンダイウイルス[1, 2, 3]は, Fig. 1 に示すような構造をもち, マウスに感染して肺炎を引き起こすがヒトには病気を起こさない。ウイルス粒子は直径 100~300 nm の多形性球状で, 脂質二重膜エンベロープが一本鎖の⊖鎖 RNA をとり囲んでいる。⊖鎖 RNA に NP タンパク質 (Nucleocapsid protein) が付着し左巻らせん状のスクレオキャプシドを形成しており, RNA の保護, あるいは RNA をエンベロープ内にたたみ込む役割を果たしていると考えられる。さらに, このスクレオキャプシドには RNA ポリメラーゼ活性があると考えられる L タンパク質 (Large protein) と P タンパク質 (RNA polymerase protein) が付着して存在している。また, エンベロープからは二種類の糖タンパク質, HN タンパク質 (Hemagglutinin-neuraminidase) と F タンパク質 (Fusion protein) が突出しており, HN タンパク質は赤血球凝集とニューラミニダーゼ活性を有している。F タン

パク質は膜融合活性と溶血能を示し, これらの活性の発現のためにはトリプシンによって F₁, F₂ タンパク質に分解される。エンベロープの内側には M タンパク質 (Membrane protein) が存在し, エンベロープを裏打ちするとともに, さらにスクレオキャプシドと結合してウイルス粒子構造を保持していると考えられる。

最近, これら六種類のタンパク質の他に感染細胞内で合成されているがウイルス粒子に取り込まれない非構造タンパク質である "C" の存在が報告 [4] されているがまだ詳しくわかっていない。

現在, センダイウイルスゲノムの全塩基配列は決定されており, この塩基配列よりウイルスタンパク質のアミノ酸配列が推定されている [5, 6, 7]。

本研究では, 構成タンパク質のアミノ酸配列の確認, および一次構造の解析をすすめるための前段階として特に HN, NP タンパク質について精製を試みた。

*¹ 日本大学農獣医学部 酵素化学研究室 (Lab. Enzyme Chemistry, Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ.)

*² 東京都臨床医学総合研究所 (The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)

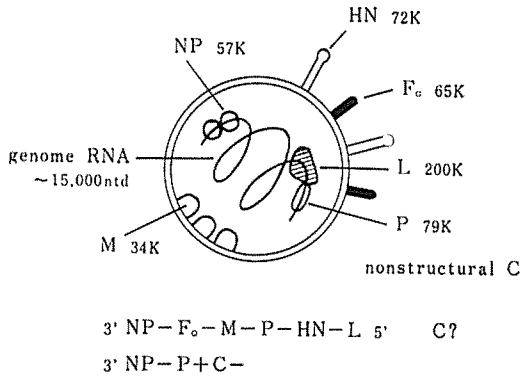


Fig. 1 Schematic representation of Sendai virus. HN, Hemagglutinin neuraminidase protein; NP, Nucleocapsid protein; F, Fusion protein; M, Membrane protein; L, Large protein; P, RNA polymerase protein.

材料および方法

1. 実験材料

1-1. ウイルス[5, 8]

材料はセンダイウイルスZ株を用いた。ウイルスの精製は洗田ら[8]および名取ら[12]の方法によった。即ち、シングルブランク分離を3回繰り返したウイルスを鶏卵の漿尿腔で増殖させた後漿尿液を16000×gで20分間遠心し上清を0.01 M リン酸 buffer (PBS) 中60%, 52%, 47%, 37%, 25%のショ糖を含む密度勾配遠心を25000 rpm, 4°Cで3時間行い、47%ショ糖上のバンドを集め精製ウイルスとした。

1-2. buffer

本研究に用いた buffer の組成は次のとおりである。

電気泳動用 Sample buffer

- 0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 5% SDS,
- 10% glycerol, 5% 2-ME (2-mercaptoethanol),
- 0.01% BPB (Brom Phenol Blue)

電気泳動用 buffer

- 25 mM Tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDS
- homogenizing buffer
- 63 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS

2. 実験方法

2-1. ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるタンパク質の分離

内径 1.8 cm, 長さ 10 cm のガラス管をカラムとして、あらかじめ下から 7.5 cm と 8.5 cm のところに印をつけたものに分離ゲル (4 M の Urea を含む 8% の SDS-ポリアクリルアミドゲル, Table 1) をカラムの底から 7.5 cm まで注入してゲル化し、さらにその上部に濃縮ゲル (4% の SDS-ポリアクリルアミドゲル, Table 1) を 8.5 cm のところまで重層させた。ゲル硬化後、ウイルスと泳動用 sample buffer を同量ずつ加えたものをゲル当り 300~400 μl ずつ、8~10 mA/cm² の条件で電気泳動した。

2-2. ゲル染色

CBB (Coomassie Brilliant Blue [G-250]) 染色したタンパク質はその後試料として使用できないため、酢酸ナトリウムによる染色[9]を以下に行った。泳動後ゲルを 4 M の酢酸ナトリウム水溶液に浸し室温に 40~60分放置した。SDS は酢酸ナトリウムにより沈澱するが、タンパク質との複合体は沈澱せずタンパク質の存在位置は透明なバンドとなる。次に、酢酸ナトリウムで染色したゲルを暗所で斜め方向から光をあて、目的とするタンパク質のバンドを切り出した。

2-3. 分離タンパク質の溶出

(a) ゲルのホモジナイズ

切り出したゲルに対して 1 cm³ 当り約 2.8 ml の homogenizing buffer を加え、ゲルが完全につぶれるまでテフロンホモジナイザーでホモジナイズした。

(b) 溶出

Table 1 Recipe for SDS-polyacrylamide gel (ml)

Reagent	Lower gel		Upper gel 4%	Agarose removal 7%
	7.5%	8%		
Acrylamide-Bis Acrylamide (30%-0.8 w/w)	2.5	2.67	1.33	2.33
2.5 M Tris-HCl (pH 8.7)	1.5	1.5	—	—
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	—	—	1.25	1.25
10% SDS	0.1	0.1	0.1	0.1
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01
8% (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0.05	0.05	0.05	0.05
10 M Urea	4	4	—	4
H ₂ O	1.84	1.67	7.26	2.26
Total	10	10	10	10

プラスチック遠沈管 (CORNING, 15 ml) の下部 (1 ml のライン) を切り取ったものをカラムとし, (a) でホモジナイズした液に 1/2 量の 4% アガロース (homogenizing buffer で溶解) を加えカラムに注入した。ゲルが固まった時点で, あらかじめ蒸留水で煮沸し十分に洗浄した透析チューブ (サイズ 20/30) をカラムの下部に取り付けた。透析チューブ内には泳動用 buffer を少量入れ, クリップでとめた。これを電気泳動装置にセットし, 約 13.3 mA/cm² で上槽を〇極にして泳動した。この時ゲルの上部に泳動用 sample buffer を 100 μ l 重層した。泳動時間は, BPB の色素バンドがゲルから抜けるのに要した時間の 2.5~3 倍以上行なった。

2-4. 有機溶媒によるデタージェントの除去

2-3 で行ったタンパク質の溶出過程において, 溶出液中にアガロース片の混在が認められたので, 3000 \times g, 10 min. 室温で遠心し, 上清を蒸留水に対して 10 数時間透析を行った。透析後溶液の 10 倍量の n-ブチルアルコールを加えタンパク質を沈澱させ, デタージェントを除去した。沈澱をエーテル洗浄し, 自然あるいは減圧下で乾燥させタンパク質試料とした。

2-5. 混在アガロースの除去

タンパク質試料中には若干のアガロースの混入があるため, これを除去する必要がある場合には以下の操作を行った。

沈澱を適量量の泳動用 sample buffer に溶解させ, 100°C, 5 分間煮沸した。CORNING のプラスチック遠心管をカラムとし, 7% SDS-ポリアクリルアミドゲル (Table 1) を約 1.4 cm の高さに固め, 下部に透析チューブを取り付けた。チューブ内には少量の泳動用 buffer を入れ, クリップで止めて泳動装置にセットした後, 一本当たり約 500 μ l の試料を, 約 18 mA/cm², 2 時間以上電気泳動した。溶出液は分離タンパク質の溶出過程と同様の操作を行い, デタージェントを n-ブチルアルコールを用いて除去した。n-ブチルアルコール添加によって沈澱したタンパク質を蒸留水あるいは 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解させた後, 蒸留水に対して over night で透析し, 凍結乾燥して精製標品とした。

2-6. タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度の測定は, Brad ford の方法 [10] を用いた。

2-7. タンパク質の検出, および精製度の確認

精製したタンパク質の検出, および精製度の確認は Laemmli [11] 法による電気泳動を行った。分離ゲルは 7.5%, 濃縮ゲルは 4% の SDS-ポリアクリルアミド (Table 1) を用いた。プレートは 1 mm (厚さ) \times 105 mm (幅) \times 80 mm (高さ) のものを用いた。泳動用

sample buffer に溶解した試料を 100°C, 5 分間加熱した後ひとつの溝に 10~40 μ l 注入し, 7 mA の電流で BPB をマーカーとして泳動した。泳動後ゲルを CBB 染色液 (20%, ethanol, 0.04% CBB [G-250]) に 30 分程浸した後, 10% 酢酸, 10% メタノール液で脱色した。

結 果

1. ウイルスタンパク質の電気泳動による分離

ウイルスからのタンパク質分離において, 4M の Urea を含む SDS-ポリアクリルアミドゲルの濃度を 7%, 8%, 9% とし分離条件を検討した。その結果, 8% のものが最も良い分離を示すことを見出した。以後ウイルスタンパク質を分離する時は 8% SDS-ポリアクリルアミドゲルを使用した。

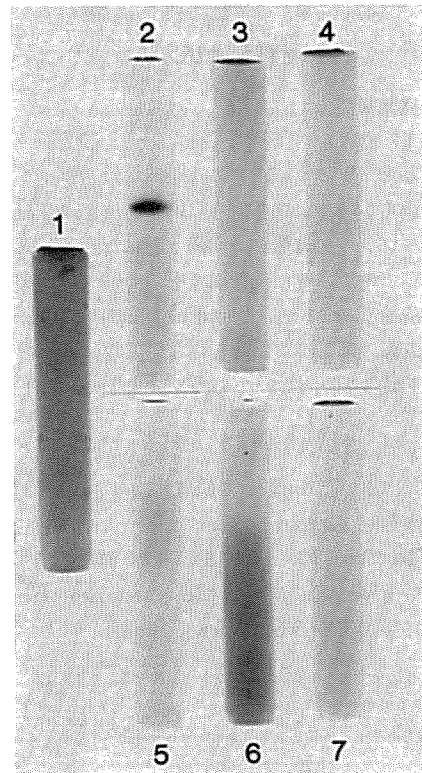


Fig. 2 Effects of composition of gel buffer on electroelution of the protein.

Stacking gel buffer (No. 2-4) and loading buffer (No. 5-7) for SDS-PAGE (see Material and Methods) were used in the agarose gel preparation.

Agarose gels containing BSA were stained with Coomassie Brilliant Blue after electrophoresis for 0 hr. (No. 1), 3 hr. (No. 2 and No. 5), 6 hr. (No. 3 and No. 6) and 15 hr. (No. 4 and No. 7) respectively.

2. タンパク質のゲルからの溶出

切り出したゲルを約 2.8 ml/cm² の homogenizing buffer 中でつぶれるまでホモジナイズした後同じ buffer で作製した 4% アガロースを等量加えてカラムに固め、電気泳動によってタンパク質を溶出させた。

(a) 電流

泳動に際しては、発熱によるアガロースの液化を防ぐために、ゲルの断面積に対して約 13.3 mA/cm² 以下の条件で電気泳動を行った。

(b) ゲル作製時の buffer の組成

①電気泳動用 buffer

②63 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS (ウイルスタンパク質分離での濃縮ゲルと同じ組成)

①と②について BSA を用いてカラム 1 本当たり 15 mA で 3 時間、6 時間、15 時間泳動したものを CBB 染色し、比較した。結果は Fig. 2 に示すとおり濃縮ゲルと同じ組成の buffer を用いた方が泳動 buffer を用いた時よりも効果的であった。

(c) 泳動時間

タンパク質溶出に必要な泳動時間はゲル 1 本当たり 15 mA で 15~20 時間行えば十分であることが BSA を用いた実験より明らかとなった。あるいは泳動に際してゲル 1 本当たり 100 μl の泳動用 sample buffer をのせ泳動し、BPB の色素が抜けるのに必要な時間の 2.5~3 倍以上の時間泳動すれば効率よくタンパク質を溶出できることが判明した。

3. n-ブチルアルコールによるデタージェントの除去

ゲルからの分離タンパク質の溶出液中には SDS が存在しており、SDS によって Bradford 試薬が発色してしまうため正確なタンパク質量を測定することができない。n-ブチルアルコールによってタンパク質を沈澱させることにより SDS を効率よく除去することができた。さらに、泳動用 buffer 中の Tris あるいは glycine も Bradford 試薬に反応して発色するが、これらは n-ブチルアルコールにより沈澱するため、n-ブチルアルコールでデタージェントを除去する前に蒸留水に対して 10 時間、4℃ で透析し、Tris, glycine を除去した。その結果、Bradford 試薬と反応する夾雑物は完全に除去することができた。

4. アガロースの除去

デタージェント除去後の沈澱中には多少のアガロースの混入が見られ、これはタンパク質分析の際、障害になるためアガロースの除去を行った。アガロースの除去はポリアクリルアミドゲルの電気泳動的溶出により行った。また HN, NP タンパク質の分子量を考慮し、それよりも分子量の大きい BSA を試料として実験条件の設定を

行った。

(a) ゲル

ゲルを作製する時の buffer は分離タンパク質の溶出同様の buffer (63 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS) を使用した。ゲルの濃度については 4 M の Urea を含む 4%, 5%, 6%, 7% の SDS-ポリアクリルアミドゲル (約 1.4 cm) を用いて溶出状態を比較し、溶出効率の良い 7% ゲルを使用した。

(b) 電流

ポリアクリルアミドゲルはアガロースゲルとは異なり、発熱によるゲルの溶解はないためゲル 1 本当たり 20 mA (17.7 mA/cm²) で泳動した。

(c) 泳動時間

上述の条件で 10 分、20 分、30 分、60 分、90 分、120 分と泳動を行った後、ゲルを CBB 染色した結果を Fig. 3-(A) に、その時のタンパク質の回収率を Fig. 3-(B) に示した。

試料中の BPB 色素は 20 分で溶出されるのに対し、タンパク質は約 2 時間で回収率は最高になった。これより BPB 色素が抜ける時間の 6 倍以上泳動しタンパク質を溶

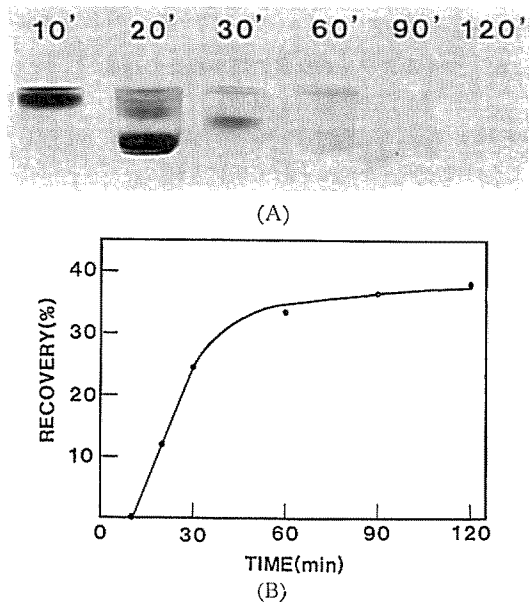


Fig. 3 Time required for electrophoresis to elute protein (A) and its recovery (B).

Agarose contaminated in the 1st step elution was removed through 7% PAGE. Proteins electrophoresed for the indicated time were collected at the bottom of the gel. 200 μg BSA was electrophoresed, and gel was stained with Coomassie Brilliant Blue (A), and eluted protein concentration was measured by Bradford solution (B).

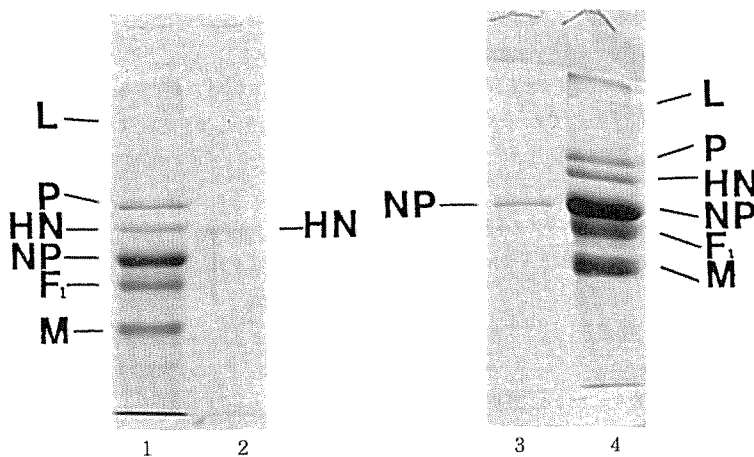


Fig. 4 Analysis of purified HN and NP proteins by 4 M Urea-7.5% polyacrylamide gel electrophoresis. Isolated virions (lanes 1 and 4), purified HN protein (lane 2) and purified NP protein (lane 3) were electrophoresed, and then gels were stained with Coomassie Brilliant Blue. Purified HN and NP proteins were detected as single band and there were not any contaminants, and their m.w. corresponded with virion HN, NP proteins, respectively.

出した。

5. ウイルスタンパク質の精製標品の純度

以上述べた方法に従って精製したウイルスタンパク質の HN タンパク質, NP タンパク質は Fig. 4 に示したようにほぼ単一の標品として精製されていた。

考 察

本研究の目標はセンダイウイルス構成タンパク質の一次構造を調べるためにセンダイウイルス構成タンパク質, 特に HN タンパク質, NP タンパク質を取率よく分離, 精製することであり, 従来の超遠心法による分離法[13]は名取らの報告[12]によると多量のコンタミネーションがあると指摘されていたため一次構造解析用の試料調製法としては不適當であると考えられる。

ポリアクリルアミドゲルによる精製タンパク質中にはコンタミネーションがほとんどなく一次構造の解析には極めて有効であるが収率の点で問題があり, 本研究ではセンダイウイルスタンパク質の分離, 精製をポリアクリルアミドゲル電気泳動法で行い, その収率の改善を目標とし, 泳動, 染色, 抽出等の各段階について検討した。ウイルスタンパク質の分離では 8% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた時, 最も良好で, 特に HN タンパク質, NP タンパク質はほぼ単一のタンパク質が得られた。電気泳動を行った SDS-ポリアクリルアミドゲルの染色は Higgins らの報告[9]に従って 4 M の酢酸ナト

リウム水溶液を用いた。

切り出したゲルをホモジナイズする時の buffer および 4%アガロース作製時の buffer を当初は泳動用 buffer を用いたが種々検討した結果, 電気泳動的に溶出させる際にタンパク質の濃縮を同時に行わせた方がより有効であることが判明したので homogenizing buffer および 4%アガロース作製 buffer としてポリアクリルアミドゲル電気泳動法の濃縮ゲルと同じ組成(63mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS) の buffer を使用することにより効率よくタンパク質を溶出することに成功した。泳動用 buffer と濃縮ゲルと同じ組成の buffer を使用した場合の溶出状態の相違を比較した結果は Fig. 2 に示したとおりであり, 後者の方が溶出状態が良いことが明らかである。さらに, この方法ではタンパク質が濃縮されながら溶出されるため, 溶出状態の確認および溶出時間の条件設定が容易である点で非常に有用な方法である。

しかし, この方法の難点は溶出液中にアガロースの混入が認められることである。この原因として考えられるのは, タンパク質溶出時の溶出ゲルからのアガロースの溶解, あるいは溶出液を取り出す時の固体アガロースの混入の 2つが考えられる。アガロースの混入が特に問題とならない場合にはこの方法で得られた試料が極めて有効であるが, 純粋なタンパク質を必要とする場合には混入アガロースを除去する必要がある。

混入アガロースの除去に際しても電気泳動的溶出の場

合同様にポリアクリルアミド電気泳動法を応用して溶出タンパク質を濃縮させながら溶出させる方法が有効であった。ただし、溶出を短時間内に完結させるためにポリアクリルアミドゲルの長さを短く(約 1.4 cm)した。

こうして得られた溶出液中に混在するアクリルアミドモノマー、Tris, glycine 等を除去するために液を 4°C で一夜、蒸溜水に対して透析し、さらに SDS を除くためタンパク質を n-ブチルアルコールによって沈澱させることにより精製タンパク質が得られた。しかし、アガロースを除去する操作をした後のタンパク質の収率には問題があり、これからの段階でのタンパク質の損失をいかに無くすかに今後の課題があるといえる。

要 約

センダイウイルスの HN, NP タンパク質の精製を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により行い次の結果を得た。

1. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用サンプルは、ショ糖密度勾配遠心によって精製したウイルスに泳動用 sample buffer を加え、100°C, 5 分間煮沸したものを用いた。

2. ウイルスタンパク質を分離するためのポリアクリルアミドゲルの条件は 4 M の Urea を含む 8%ゲルが適しており、この条件のゲルを用いて分離した。この時の染色液は酢酸ナトリウム水溶液を用いた。

3. 目的とするタンパク質のバンドを切り出し、これをホモジナイズし、アガロースで固め、電気泳動的にタンパク質を溶出した。

以上の実験により決定された条件により単一の HN, NP タンパク質の精製標品を大量に得ることができた。

文 献

1 塩田達雄, 浜田 博 1984: パラミクソウイルスのゲノム構造, ウィルス, 34, 99-108.

- 2 吉田哲也, 永井美之 1983: パラミクソウイルスの成熟機構, ウィルス, 33, 25-36.
- 3 渡辺格, 高野利也 1983: ウィルス学 [RNA ウィルスの紹介 (7.5 パラミクソウイルス)] 講談社, 287-295.
- 4 L. Dethlefsen and D. Kolakofsky 1983: In Vitro Synthesis of the Nonstructural C Protein of Sendai virus. J. Virology, 46, 321-324.
- 5 T. Shioda, Y. Hidaka, T., Kanda, H. Shibuta, A. Nomoto and K. Iwasaki 1983: Sequence of 3,687 nucleotides from the 3' end of Sendai Virus genome RNA and the predicted amino acid sequence of viral NP, P and C proteins. Nucleic Acids Res., 11, 7317-7730.
- 6 Y. Hidaka, T. Kanda, K. Iwasaki, A. Nomoto and H. Shibuta 1984: Nucleotide sequence of a Sendai virus genome region covering the entire M gene and the 3' proximal 1013 nucleotides of the F gene. Nucleic Acids Res., 12, 7965-7963.
- 7 塩田達雄, 浜田 博, 岩崎憲太郎 1985: HVJのゲノム解析, 第33回日本ウィルス学会抄録, 230.
- 8 H. Shibuta, T., Kanda, A. Adachi and Y. Yogo 1979: Characterization of bovine parainfluenza virus type 3. Microbiol. Immunol., 23, 617-628.
- 9 R.C. Higgins and M.E. Dahmus 1979: Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrylamide gel. Anal. Biochem., 93, 257-260.
- 10 M.M. Bradford 1976: A rapid, sensitive, and specific method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- 11 U.K. Laemmli 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 227, 680-685.
- 12 名取正彦, 石川知代子, 加藤 順, 岩崎憲太郎 1986: センダイウイルス構成タンパク質, 特に F₂ の可溶化と精製について. 日本大学農獣医学部学術研究報告. 43, 194-201.
- 13 A. Scheid and P.W. Choppin 1973: Isolation and purification of the envelope proteins of new castle disease virus. J. Virol., 11, 263-271.