*Microcystis aeruginosa*由来凝集阻害誘因タンパク質の同定

石 藤 慎 吾*
高 荒 智 子**

佐 藤 有 一*
佐 野 大 輔***
大 村 達 夫*

今 江 泰 貴*
真 砂 佳 史*

Identification of Coagulation Inhibitor Proteins from *Microcystis aeruginosa*

Shingo ISHIFUJI*, Yuichi SATO*, Hirotaka IMAE*,
Tomoko TAKAARA**, Daisuke SANO***, Yoshifumi MASAGO*
and Tatsuo OMURA*

* Department of Civil and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, 6-6-06, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8579, Japan

** Department of Civil Engineering, Fukushima National College of Technology, 30, Nagao, Tairakamiarakawa, Iwaki, Fukushima 970-8034, Japan

*** Division of Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Hokkaido University, North 13, West 8, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8628, Japan

Abstract

Excess growth of cyanobacteria in semiclosed water area caused by eutrophication induces coagulation inhibition in drinking water treatment processes. Thus, it is highly desirable to establish effective countermeasures against such coagulation inhibition by identifying the causative substances released by cyanobacteria. In this study, coagulation inhibitor proteins of *Microcystis aeruginosa* were screened using a phage display system and an aluminum-ion-immobilized affinity chromatography. From the results, algal proteins with a high level of metal-coordinating amino acids were identified as inhibitor proteins for the coagulation. One of the inhibitor proteins, a homologue of the metal sensor protein ArsR, showed strong inhibition of the coagulation of kaolin suspension with polyaluminum chloride (PAC). It was demonstrated that one of the mechanisms of the coagulation inhibition caused by *M. aeruginosa* is the inhibition of the cross-linking between aluminum clusters in PAC and suspended solids by the algal inhibitor protein.

Key words: *Microcystis aeruginosa*, coagulation inhibition, phage display, polyaluminum chloride, protein

1. はじめに

我が国ではダムなどの閉鎖性水域を上水道水源とする場合が多いが¹⁾、多くの閉鎖性水域では富栄養化に起因する藻類の大量発生が生じており、そのような水域から取水している浄水場においてさまざまな藻類障害が生じている²⁾。藻類による代表的な障害としては、凝集阻害、処理水への異臭味障害³⁾、及びトリハロメタンの生成⁴⁾などが知られている。中でも凝集阻害は水処理プロセス全体の効率に影響するため、克服すべき大きな課題となっている。現在、藻類に起因する凝集阻害に対しては凝集剤注入率の増加という対応が取られているが、この凝集剤注入率の増加は汚泥発生量や処理水中の残留凝集剤の増加等の様々な副次的問題を発生させている。藻類による凝集阻害に対するより根本的な対応策を講じることが求められているのが現状である。

この浄水プロセスにおける藻類による凝集阻害問題を

解決に導くためには、凝集阻害の誘因となる藻類由来物質を同定し、その誘因物質を除去もしくは不活性化することが最も効果的であると考えられる。そのような観点のもと、藻類由来凝集阻害誘因物質の同定に向けた研究が行われてきており、藻類の大量発生に伴う藻類由来有機物 (algal organic matter: AOM) の放出が凝集阻害の大きな一因となっていることが明らかとされてきている²⁾。また、この藻類由来有機物成分の大半をタンパク質が占めるという知見⁵⁾があることから、本研究グループはこれまでの研究において藻類由来タンパク質に着目し、その凝集阻害能を評価する研究を進めてきた。その結果、アルミニウムイオン及び鉄イオンと錯体形成能を有する藻類由来タンパク質の存在を報告⁶⁾した他、ファージディスプレイシステム⁷⁾を利用して *Microcystis aeruginosa* (以下 *M. aeruginosa*) 由来タンパク質の中から Polyaluminum chloride (PAC) 由来フロックに親和性を有するペプチド配列を同定することに成功した⁸⁾。

* 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06

** 福島工業高等専門学校建設環境工学科 〒970-8034 福島県いわき市平上荒川字長尾 30

*** 北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門 〒060-8626 札幌市北区北 13 条西 8 丁目

しかしながら、この凝集阻害に関与しうるペプチド配列が由来する藻類由来タンパク質は未だ同定されていないため、それらのタンパク質が凝集阻害を引き起こす能力（凝集阻害度）を評価するには至っていないのが現状である。

そこで本研究では、アルミニウムイオンに対する親和性を有する *M. aeruginosa* 由来ペプチドを新たに分離し、得られたペプチド配列が由来する藻類タンパク質のクローニングを行い、その凝集阻害度を評価することを行った。

2. 実験方法

2.1 ファージディスプレイライブラリ溶液の作製

終濃度で $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ となるようアンピシリンを加えた LB 培地で培養した *M. aeruginosa* DNA ライブラリ ($\text{OD}_{660}=0.3\sim0.5$)⁸⁾ に Helper Phage (VCSM13 Interference-Resistant Helper Phage, Stragagene) を加え 37°C で 1 時間培養後、カナマイシンを終濃度で $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ となるよう加え 37°C で 1 晩培養することで *M. aeruginosa* 由来ペプチド提示ファージを作製した。次いで、培養液を遠心分離 ($7000\times g$, 35min, 4°C) して回収した上清に 20% PEG6000・2.5M NaCl を最終濃度 4% PEG6000 となるように加え、手で穏やかに攪拌した後、水中に 1 時間静置した。静置後、遠心分離 ($9000\times g$, 30min, 4°C) を行い沈殿したファージを PBS (pH 3.0) に再度溶解させ、ファージディスプレイライブラリ (以下 PDL) 溶液とした。回収した PDL 溶液は大腸菌 JM109 (TAKARA) ($\text{OD}_{660}=0.3\sim0.5$) に加え、 37°C で 1 時間培養することでファージを感染させ、コロニーを計測しタイター (Colony Forming Unit: CFU) の把握を行った。

2.2 アルミニウム親和性ペプチド提示ファージの分離

2.1 で得られた PDL から、凝集阻害誘因部位として機能しうるペプチドを提示したファージを分離するため、 Al^{3+} をリガンドとして用いたアフィニティークロマトグラフィを行った。PAC を用いた凝集処理においては Al_{13} クラスタやアルミニウム水酸化物が凝集現象に寄与していることが報告されているが⁹⁾、有機物の存在により中性付近の pH 条件でフロック中のアルミニウムモノマー (Al^{3+}) 存在量が増加することが報告されており、これはポリマー構成成分がキレート形成によりモノマー化することによると考えられている¹⁰⁾。すなわち、アルミニウムモノマー (Al^{3+}) とキレートを形成することが可能なタンパク質の存在により、凝集に寄与する Al_{13} クラスタやアルミニウム水酸化物から凝集作用の低いモノマーが産生し、凝集効率の低下に至ることが推測される。実際、著者らによる既往の研究により、金属親和性ペプチドの存在により、 Al_{13} クラスタに由来する NMR ピークが消失することが確認された⁸⁾。以上のことから、 Al^{3+} に対する親和性の高いタンパク質が凝集阻害性を有していると考え、 Al^{3+} 固定化アフィニティークロマトグラフィによる藻類由来凝集阻害誘因タンパク質のスクリーニングを行うこととした。

まず、HiTrap Chelating HP column (GE Healthcare) に 5mL の超純水を送液後、開始バッファー (0.5M

NaCl, 20mM リン酸, pH 3.0) を 5mL 送液しカラム内の平衡化を行った。次いで 0.1M AlCl_3 を加えた開始バッファー 1mL をカラムに導入し、1 晩静置後、開始バッファーを 5mL 送液し、余分な Al^{3+} を除去した。続いてカラムに PDL 溶液 1mL (1st Input) を導入し、開始バッファーをカラムに送液することで洗浄した。次に溶出バッファー (0.5M NaCl, 20mM リン酸, 0.05M EDTA, pH 3.5) 4mL をカラムに導入し、後半の 2mL を回収した (1st Output)。回収したファージは大腸菌 JM109 ($\text{OD}_{660}=0.3\sim0.5$) に感染させ 37°C で 1 時間培養し、ヘルパーファージ投入後、1 晩培養することでファージの個数を増幅した (2nd Input)。ここまでの作業を 1 round とし、同様の作業を 4 回行い、各 round における Input と Output のタイターを測定した。得られたファージの濃度から各 round のファージ収率 (Output (CFU)/Input (CFU)) を求めた。

2.3 アルミニウム親和性ペプチドをコードした遺伝子の同定

2.2 の 4th Output で得られたファージを大腸菌 JM109 に感染させ、寒天 LB 培地で 1 晩培養後、コロニーをランダムにピックアップしてファージ遺伝子を抽出し、ファージ遺伝子に挿入されている *M. aeruginosa* (NIES-91) 遺伝子の配列解析を行った。解析した塩基配列解析結果からペプチド配列を決定し、そのアミノ酸配列に対し National Center for Biotechnology Information が WEB 上で提供している Protein-Protein BLAST (blastp) プログラム¹¹⁾ を用いることで相同性検索を行った。その検索により相同性を有する藻類タンパク質の全塩基配列情報を取得し、凝集阻害への関与が疑われる当該タンパク質遺伝子領域を増幅するプライマーを設計した。次いで、設計したプライマーを用いて *M. aeruginosa* (NIES-91) から抽出したゲノム遺伝子を鋳型とした PCR を行い、目的タンパク質の全長遺伝子の増幅及び遺伝子配列の解析を行った。

2.4 藻類由来タンパク質の大量生産

大量培養が容易な大腸菌の組換えタンパク質発現系を用いて、組換え藻類由来タンパク質の大量生産を行った。タンパク質の発現には Gateway クローニング法¹²⁾ を用いた。まず、目的とする *M. aeruginosa* (NIES-91) 由来タンパク質遺伝子をエンタリーベクター (pENTR/D/SD-TOPO, Invitrogen) と混合し、5 min 室温で静置することによりライゲーションを行った。その反応液を用いて宿主大腸菌 (One shot TOPO10 Chemically Competent Cell, Invitrogen) を形質転換し、終濃度で $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ となるようカナマイシンを添加した寒天 LB 培地に散布後、 37°C で 1 晩培養した。得られたクローンからベクターを抽出し、ネイティブタンパク質発現用ベクター (pDEST14, Invitrogen) または GST 融合タンパク質発現用ベクター (pDEST15, Invitrogen) 及び LR clonase (Invitrogen) と混合後、 25°C で 1 時間静置し LR 反応を行った。その後、得られた反応液を用いて宿主大腸菌 (DH5 α , TAKARA) を形質転換し、終濃度で $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ となるようアンピシリンを添加した寒天培地で 1 晩培養後、得られたクローンより発現ベクターを抽出した。得られた発現ベクターを用いて組換えタンパク質発現用宿主大腸菌 (BL21-AI, Invitrogen)

$$\text{凝集阻害度 (mg-Al/mg-protein)} = \frac{(25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{PAC 中のアルミニウム濃度 } [\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}]) - (15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{PAC 中のアルミニウム濃度 } [\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}])}{(15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{PAC 注入率の際に上澄水濁度 5 度に到達するタンパク質濃度 } [\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}]) - (25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{PAC 注入率の際に上澄水濁度 5 度に到達するタンパク質濃度 } [\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}])} \quad (1)$$

を形質転換し、終濃度で $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ となるようにアンピシリンを添加した寒天培地で 37°C で 1 晩培養することにより *M. aeruginosa* (NIES-91) 由来組換えタンパク質（以下、組換え藻類由来タンパク質）発現クローンを得た。得られた組換え藻類由来タンパク質発現クローンは終濃度で $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ となるようにアンピシリンを添加した LB 培地で $\text{OD}_{660}=0.4$ となるまで 37°C で培養後、L-アラビノースを終濃度で 0.2% となるように添加した。添加後、室温で 1 晩培養し、培養液から遠心分離 ($9000\times g$, 10min, 4°C) により菌体を回収した。得られた菌体から Bug Buster (Novagen) を用いて可溶性タンパク質を抽出することで、組換え藻類由来タンパク質を含む大腸菌由来可溶性タンパク質、及び GST タグ融合組換え藻類由来タンパク質を含む大腸菌由来可溶性タンパク質を得た。また対照系として、pUC19 ベクターを導入した大腸菌 BL21-AI から可溶性タンパク質を抽出した。得られた抽出液に含まれるタンパク質に対して SDS-PAGE を行い、CBB 染色もしくは銀染色により検出した。

続いて、発現した GST タグ融合組換えタンパク質に関して GST アフィニティークロマトグラフィによる精製を行った。まず、GSTrap FF column 1mL (GE Healthcare) に Binding Buffer (140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , pH7.3) 5mL を導入し、カラムの平衡化を行った。平衡化後、サンプル 1mL をカラムに導入し、30 分静置することでカラムに GST タグ融合組換えタンパク質を結合させた。次いで、Binding Buffer を 5mL カラムに導入し、夾雑タンパク質の洗浄を行った。その後、Cleavage Buffer (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM dithiothreitol: DTT, pH7.5) 10mL をカラムに導入し、カラムを再平衡化した。平衡化したカラムにプロテアーゼ (PreScission Protease, GE Healthcare) $10\mu\text{L}$ と Cleavage Buffer $990\mu\text{L}$ を混合した Protease mix を導入後、 5°C で 1 晩静置することで GST タグの切断を行った。静置後、3mL の Cleavage Buffer をカラムに導入し、溶出フラクションを回収した。得られたサンプルは超純水による透析を行った後、SDS-PAGE により精製の確認を行った。また、組換え藻類由来タンパク質を発現させていない大腸菌 (BL21-AI) より抽出したタンパク質を用いて同様の精製実験を行い、対照試料を作製した。得られたタンパク質試料に対して Lowry 法を用いることでタンパク質濃度の測定を行った。

2.5 凝集阻害能評価

2.4 で作製した試料及び対照タンパク質として等電点の異なるタンパク質試料（ペプシン (pI 1.0), 牛血清アルブミン (pI 5.8), リゾチーム (pI 11.1)) の存在下で PAC を用いた凝集実験を行った。まず、精製水に標準カオリン物質を $20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ になるように加え、 NaHCO_3 を用いてアルカリ度を 50 度になるように調節し、 1M HCl を用いて pH を 7.0 ± 0.05 に調整した。作製した

試料を 50mL ビーカーに取り、ジャーテスターにセット後、100rpm で 1 分間の攪拌を行った。続いて PAC を $15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の濃度となるように添加し、事前に濃度を測定した各タンパク質溶液を一定量添加し、2 分間の急速攪拌 (100rpm) の後、15 分間の緩速攪拌 (50rpm) を行った。攪拌後、10 分間静置させ、上清 10mL を回収して波長 660nm の吸光度 (OD_{660}) を分光光度計により測定した。得られた吸光度は、標準カオリン物質より作製した検量線を用いて濁度に換算した。また同様の実験を PAC 注入率 $25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の条件でも行い、凝集阻害が発生する各タンパク質濃度を求めた。

次いで、凝集実験の結果を用いて各タンパク質における凝集阻害度を算出した。凝集阻害度の算出は眞柄らが用いた方法^{13,14)}を参考とした。まず、濃度差 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の PAC 注入率 ($25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) を設定し、それぞれの PAC 注入率でタンパク質添加濃度を变化させた凝集実験を行い、凝集限界条件（上澄水の濁度 5 度）に到達するタンパク質濃度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) をそれぞれ求めた。次いで、式(1)に従い、 $25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及び $15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の PAC に含まれる Al 濃度（それぞれ 1.06 及び $0.63\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ）の差 ($1.06 - 0.63 = 0.43$) を、各 PAC 注入率において凝集限界条件（上澄水の濁度 5 度）に到達するタンパク質濃度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) の差で除した値を凝集阻害度とした。この値は 1 mg 当たり何 mg の Al を消費するかを示す値であり、各タンパク質の凝集阻害強度の評価に用いた。

3. 結果及び考察

3.1 ファージディスプレイ法による *M. aeruginosa* 由来アルミニウムイオン親和性ペプチドのスクリーニング

ファージのスクリーニング操作を 4 round 行った際、藻類由来ペプチドを提示していない対照ファージの収率は 2~5% に収まっていたのに対し、藻類由来ペプチド提示ファージの収率はラウンドの進行と共に増加し、4 round において 12% に達した (Fig. 1)。このことから、アルミニウムイオンとの錯体形成能を有するペプチドを

Fig. 1 Yield of phages in each round of a biopanning by an aluminum ion-immobilized affinity chromatography. Algal peptides are not conferred to control phages.

提示したファージがアフィニティークロマトグラフィによりスクリーニングされたことが示唆された。

4th Output で得られたファージからランダムにピックアップし、ファージ遺伝子に組み込まれた藻類由来遺伝子の塩基配列解析を行った。その結果、尾部を正常に産生し、且つファージの尾部に藻類由来ペプチドを提示したと考えられるファージに由来する遺伝子が19クローン得られた。得られたクローンにおける金属親和性アミノ酸残基の割合について **Table 1** に示した。アルミニウムイオンとの親和性を保持するアミノ酸として、カルボキシル基やヒドロキシル基等の官能基を持つことで金属イオンとの錯体形成能を有するアミノ酸が知られている¹⁵⁾。そのうちセリンについては、本実験で得られたペプチドである配列番号126-17及び配列番号721-10のアミノ酸配列中22%及び16%を占めており、期待値(6%)と比べて含有率が有意に高かった。佐野ら⁸⁾によって報告されたペプチド配列ではセリンやスレオニン、チロシンと言った金属吸着性のあるアミノ酸残基の

割合が高く、本実験得られたペプチドに関しても同様の結果が確認された。このことより、藻類由来のペプチドのAl吸着にはこれらの金属吸着性アミノ酸残基が大きく関わっている可能性が示された。また、本実験で得られたペプチドには、これら錯体形成能を有するアミノ酸が集中的に存在する部位が確認された。

3.2 アルミニウムイオン親和性ペプチド含有タンパク質をコードした遺伝子のクローニング

Blastp プログラムを用いた相同性検索により、スクリーニングで得られたアルミニウムイオン親和性ペプチド配列の中で *M.aeruginosa* 由来タンパク質と高い相同性を有し、かつ遺伝子にSD配列¹⁶⁾を持つことで強い発現が期待される2つのタンパク質が確認された。これら2つのペプチド配列は、それぞれチオールジスルフィド酸化還元酵素¹⁷⁾(配列番号126-17)、及びヒ素耐性リプレッサータンパク質(ArsR)¹⁸⁾(配列番号721-10)と高い相同性を有していた。その他の配列は読み枠ずれなどにより偶発的に産生されたペプチド配列であると考えられた。

次に、*M. aeruginosa* (NIES-91) より全DNAを抽出し、そのDNAからアルミニウム親和性ペプチド配列を含むタンパク質遺伝子をPCRにより取得し、配列解析を行った。得られたアルミニウムイオン親和性ペプチド保有タンパク質遺伝子及びアミノ酸配列を **Fig. 2** に示した。これらのアミノ酸配列においては、スクリーニングで得られたペプチド配列との相同性が高い部位以外にも、錯体形成能を有するアミノ酸が集中する部位が複数箇所確認された。配列番号721-10と高い相同性を持つArsR family proteins は、ヒ素抵抗性タンパク質遺伝子群をコードするオペロンのプロモーター領域に結合して転写制御を行う機能を有し、ヒ素抵抗性タンパク質群の発現を抑制するタンパク質として知られている。また体内外でヒ素濃度が上昇した際、ArsRはヒ素と結合し、プロモーター領域から脱離することでヒ素抵抗性タンパク質群の発現を増進する役割を担っているとされている。またArsRは代表的な金属親和性アミノ酸であるシステインなどのアミノ酸を多数有しており、3価及び5価のヒ素やアンチモンなどの半金属にも特異的な親和性を有することが知られている¹⁸⁾。通常、金属イオンと

Table 1 The ratio of metal-coordinating amino acids of algal peptides were acquired by the phage display system and the aluminum ion-immobilized affinity chromatography.

	Sample Number	The number of amino acid	%								
			S	T	Y	E	H	C	R	M	
1	124-3	8	13	25	0	0	0	0	13	0	
2	124-6	44	6.8	4.5	6.8	0	4.5	0	6.8	0	
3	124-8	9	11	0	22	0	0	0	11	0	
4	124-9	12	8.3	0	0	0	0	0	17	0	
5	126-6	15	0	0	0	0	6.7	6.7	20	0	
6	126-17	19	21	16	0	0	0	0	5.3	11	
7	129-2	6	17	0	0	0	0	0	17	0	
8	130-14	2	0	0	0	0	0	0	50	0	
9	130-16	20	5	10	0	0	0	5	10	0	
10	130-22	6	0	0	0	0	17	0	17	17	
11	131-3	44	11	6.8	4.5	0	0	0	9.1	2.3	
12	131-5	2	0	0	0	0	0	0	50	0	
13	131-8	6	0	17	0	0	0	0	0	0	
14	208-3	14	7.1	7.1	0	0	0	0	29	0	
15	210-16	10	0	10	0	0	0	0	10	10	
16	226-20	64	7.8	3.1	3.1	0	3.1	3.1	9.4	1.6	
17	226-22	19	21	5.3	0	0	0	5.3	5.3	0	
18	721-6	32	19	6.3	0	0	0	3.1	9.4	3.1	
19	721-10	19	21	5.3	0	0	0	0	11	5.3	

DNA sequence amino acid sequence	SD sequence	126-17																													
		ATG TCA TCT TTA CGG ACT CCA TCT GCT GAT ACC TTA GAA AAT TCT ACT CGA TGG CCC TGT TGG AAA ATT AAA GTC CTC TAG GAT GGA GAA	M S S L P T P S A D T L E N S T R S P S W K I K L L Y D G E																												
Isoelectric point pI 5.85	91'	TGT CCC CTC TGC TTG CGC GAG GTC AAT TTT CTG CAA AAA CAG GAT GCT GGG AGA GGA TTA GTT GCT TTT GTC GAT ATT GCC GCC GAA AAC																													
	31"	C P L C L R E V N F L Q K Q D A G R G L V A F V D I A A E N																													
	181'	TAT AAT CCG GAG GAA AAT GGC GGT ATT TCC TTC GCG GCA GCC ATG GGA CGA ATC CAC GCT GTA CTA GCT GAT GGT ACT ATT ATC CAA AAT																													
Molecular weight 17,893Da	61"	Y N P E E N G G I S F A A A M G R I H A V L A D G T I I Q N																													
	271'	GTG GAA GTG TTT CGC GAA GTC TAT GAT ATT TTG GGC ATT GGT TGG ATT TAT GCC GCT ACC AAA TGG CCG GTT ATC GGG TTT CTA GTG GAT																													
	91"	V E V F R Q V Y D I L G I G W I Y A A T K W P V I G F L V D																													
	361'	ATT ATC TAT GAA ATT TGG GGT TGT TGG CGA TTA ACC TTA ACC GGA AGA CCG AAT TTA ACT ACA ATC TTA GCA GAG CGT CAA AAA CGT CTG																													
	121"	I I Y E I W A S W R L T L T G R P N L T T I L A E R Q K R L																													
	451'	GAA TGC AAC TCA TCA AAT CGT TGT TCT CGC TGA																													
	151"	E C N S S N R C S R *																													
DNA sequence amino acid sequence	SD sequence	721-10																													
		ATG GAA GAT TCG ATC GAT ACC TCC CTT CAA CTT TCC GCT AAT AAC CGA TCA GGA AAA AAT ATG GCG CTA GAG AAA ATA GCA CGG GTT	M E D S I D T S L S Q L S L N N R S G K N M A L E K I A P V																												
Isoelectric point pI 5.78	91'	TGT GGG GAA TCC CAT CAC CAA GAG GCG AAA TTC CAG CAC TTG CAG GGA TTA GAA ATC GAA AAA GCC AAA AAA ATG GCC GAA TTT TTC AGC																													
	31"	C G E S H H Q E A K F Q H L Q G A L E I E K A K K M A E F F S																													
	181'	CTT TTG GGG GAT GCC AAC CGC CTA AGA ATT CTG TCG CTT TTA GCC AAA CAA GAA TTA TGT GTT TGT GAC TTA GCC GAC GAC TTA GGG ATG																													
Molecular weight 16,380Da	61"	L L G D A N R L R I L S L L A K Q E L C V C D L A D D D L G M																													
	271'	AGT GAA TCG GCC GTA TCG CAC CAG TTA AGA ACC CTA AGA GCC TTA AGA TTA GTT AAA TAC CAA AAA CAG GGA CGG AGA GTC TTT TAT CGT																													
	91"	S E S A V S H Q L R T L R A L L R L V K Y Q K Q G R R V F Y R																													
	361'	CTT GCC GAT CAT CAT GTT CTT GAC CTT TAT TAC GCG GTT TCG GCA CAT TTA GAA GAG CCA GCG GAC GAG GAC TAA																													
	121"	L A D C D H H V L D L Y Y A V S E H L F E P A D E F D *																													

Fig. 2 DNA and amino acid sequences of proteins from *M. aeruginosa* causing coagulation inhibition. Gray parts are algal peptide regions that were acquired by the phage display system and the aluminum ion-immobilized affinity chromatography.

タンパク質との相互作用は各金属のイオン半径, 価数, 配位数に大きく関与することが知られているが^{19, 20)}, ArsR 属と高い相同性を有する藻類由来タンパク質 (配列番号 721-10) は, 3 価の価数を有するアルミニウムイオンとも強く錯体を形成することは可能であると考えられる。また, それぞれのタンパク質についてアミノ酸の構成割合を計算したところ, 配列番号 126-17 及び配列番号 721-10 において酸性アミノ酸であるアスパラギン酸及びグルタミン酸の割合が期待値よりも高く, 特に配列番号 721-10 においてはヒスチジンの割合が 4.86% と期待値 (0.62%) と比べ非常に高い結果となった。これらのアミノ酸は金属と錯体を形成することが知られており, これらのタンパク質の存在が凝集阻害を引き起こす一因となりうる可能性が考えられた。

3.3 アルミニウムイオン親和性の組換え藻類由来タンパク質を用いた凝集阻害能評価

大腸菌のタンパク質発現機構を用いて藻類由来タンパク質 (配列番号 126-17 及び配列番号 721-10) を大量生産した。タンパク質発現結果を **Fig. 3** に示したが, 可溶性画分の目的タンパク質の分子量の位置にネガティブコントロールには見られないバンドが得られ, 培養時間の経過につれてバンドの色が濃くなることが確認できたことから, 目的タンパク質の発現に成功したことが示唆

Fig. 3 Expression of algal proteins (Protein code: 126-17 and 721-10). Proteins were stained by CBB. Expressed proteins were indicated in rectangular

された。

次いで, 発現した藻類由来タンパク質の凝集阻害度を評価するために, 2 種の藻類由来タンパク質 (126-17 タンパク質及び 721-10 タンパク質) を含む大腸菌由来タンパク質群 (未精製) を用いた凝集実験を行った。**Table 2** に各藻類由来タンパク質を含む大腸菌由来タンパク質群の凝集阻害度を示した。有意水準 0.05 の t 検定 (等分散性を仮定した両側検定) により, 藻類由来タンパク質を含まない (対照) 大腸菌由来タンパク質群と 120-17 タンパク質を含む大腸菌由来タンパク質群の間には凝集阻害度に関して統計的に有意な差は認められなかったが ($p=0.074$), 721-10 タンパク質を含む大腸菌由来タンパク質群を用いた場合には, 対照タンパク質群 ($p=0.001$) 及び含 126-17 タンパク質群 ($p=0.042$) との間に統計的に有意な差が見られた。大腸菌由来タンパク質群中の 721-10 タンパク質と 126-10 タンパク質の発現量を直接比較することは行っていないため, 本実験の結果から 126-10 タンパク質と比べて 721-10 タンパク質が高い凝集阻害度を有するとは判断できないものの, 少なくとも 721-10 タンパク質に関しては本実験系で凝集阻害性を証明しうると考えられたことから, この 721-10 タンパク質に関して精製を行い, このタンパク質の凝集阻害度を求めることとした。

3.4 組換え藻類由来タンパク質の精製及び凝集阻害能評価

前節 3.3 において組換え藻類由来タンパク質 (配列番号 721-10) を含む大腸菌由来タンパク質群は, 組換え藻類由来タンパク質 (配列番号 126-17) を含む大腸菌由来タンパク質群及び組換え藻類由来タンパク質を含まない大腸菌由来タンパク質群と比べ, 強い凝集阻害度を示していた。そこで, 藻類由来タンパク質 (配列番号 721-10) について, GST タグ付きの組換え藻類由来タンパク質 (配列番号 721-10) を発現し, GST アフィニティクロマトグラフィーを用いて精製を行うこととした。その結果, 大腸菌培養液約 10L から, 藻類由来タンパク質 (配列番号 721-10) 約 1 mg を回収した。精製結果は **Fig. 4** に示したが, 目的分子量付近にシングルバンドが確認されることから, 藻類由来タンパク質 (配列番号 721-10) が精製されたことが確認された。

Fig. 5 に精製済み藻類由来タンパク質 (配列番号 721-

Table 2 Potency of the coagulation inhibition of algal proteins acquired in this study.

		Concentration of PAC (mg·L ⁻¹)	Concentration of Al (mg·L ⁻¹)	Concentration of algal inhibitory protein (mg·L ⁻¹)	Potency of coagulation inhibition (mg-Al/mg-protein)	SD
Unpurified proteins	BL21-AI	15	0.63	4.97	0.068	0.001
		25	1.06	11.1		
	126-17	15	0.63	5.91	0.073	0.003
		25	1.06	12.4		
Purified protein	721-10	15	0.63	4.82	0.079	0.000
		25	1.06	10.7		
	721-10	15	0.63	0.22	0.46	
		25	1.06	1.17		
Control proteins	Pepsin	15	0.63	13.8	0.019	
		25	1.06	36.1		
	Bovine serum albumin	15	0.63	4.99	0.098	
		25	1.06	9.38		
	Lysozyme	15	0.63	78.5	0.0039	
		25	1.06	188

Fig. 4 Purified algal protein 721-10 that was stained by silver. Lane 1: marker; Lane 2: crude proteins from *E. coli* BL-21 including algal protein 721-10; Lane 3: purified algal proteins by GST tag affinity chromatography; Lane 4: the algal protein 721-10 in which a GST tag was excised.

10)を用いた凝集実験の結果を示した。本タンパク質の凝集阻害度として0.46 (mg-Al/mg-protein) という値を得たが、これは対照として用いた大腸菌由来タンパク質群の約7倍の値であった。この値は1 mgのタンパク質当り、約0.46mgのアルミニウムイオンと反応する可能性を示唆している。この藻類由来タンパク質(配列番号721-10)の凝集阻害度を各対照タンパク質と比較したところ、最も等電点の低いペプシンや同等の等電点を有する牛血清アルブミンよりも約22倍及び4.6倍高い結果であった。タンパク質による凝集阻害は、凝集剤成分による荷電中和作用及び架橋作用の両方を阻害することにより生じると考えられることから、凝集実験が行われた中性付近のpHにおいて強く負に荷電する低等電点のタンパク質分子の方が阻害度が高いと一般には考えられる²¹⁾。しかしながら、本実験で得られた藻類由来タンパク質(配列番号721-10)は等電点の低い対照タンパク質(ペプシン)より凝集阻害度が有意に高かったことから、藻類由来タンパク質の凝集阻害性は等電点に一概に依存せず、錯体形成などによる架橋作用に対する阻害が関与する可能性が示唆された。

実際の浄水処理における凝集阻害への藻類由来タンパク質(配列番号721-10)の寄与度を明らかにすることが次の課題となると考えられるが、藻類由来タンパク質(配列番号721-10)が細胞内に極微量存在していると考えられるヒ素リプレッサータンパク質と同一性が高いことから、藻類由来タンパク質(配列番号721-10)が単独で凝集阻害に関与している状況は考えにくいと言える。さらに、著者らによる既往の研究結果において、金属親和性アミノ酸残基を多く含む多数のペプチドが見出されていること⁸⁾を鑑みると、「藻類に由来する凝集阻害誘因タンパク質」は金属親和性アミノ酸を比較的多く含むタンパク質の集団であると考えられ、今回得られた藻類由来タンパク質(配列番号721-10)は、そのタンパク質集団の特性を代表するものであると考察できる。

Fig. 5 Coagulation test with the algal protein 721-10. Crude proteins from *E. coli* BL-21 without the algal protein that were prepared by the same purification procedures were used in the negative control.

この藻類由来タンパク質(配列番号721-10)に代表されるような藻類由来タンパク質集団が、富栄養化による藻類の大量発生時に死藻体等から細胞外に流出し、浄水処理における凝集阻害にどの程度寄与しているかを定量的に示すことを今後試みていきたいと考えている。

以上の結果より、金属親和性アミノ酸残基を多く含む藻類由来タンパク質は、凝集剤成分と懸濁物質との架橋作用を阻害することにより凝集阻害を引き起こしている可能性が推測された。この藻類由来タンパク質による架橋作用阻害に対する対策として、タンパク質の金属吸着サイトに親和性を持つことで架橋作用阻害を抑制することが可能な物質の探索や、高分子化合物などの新規凝集補助剤による架橋作用の強化が考えられる。

4. おわりに

M. aeruginosa 由来ペプチドを提示したファージのスクリーニングを行い、アルミニウムイオンと親和性を有するペプチドを分離し、その配列を解析した。その結果、得られたペプチドは金属イオンとの錯体形成能を有するアミノ酸が集中して存在している箇所が存在するペプチドであった。また、得られたペプチド配列をコードする領域を含む *M. aeruginosa* 由来 DNA 断片を取得し、大腸菌のタンパク質発現機構を利用してタンパク質を発現し、その凝集阻害能を評価した。その結果、ヒ素抵抗抑制体の機能を有する ArsR と高い同一性を有するタンパク質が強い凝集阻害性を有することが示された。この ArsR 相同タンパク質に代表されるような金属親和性アミノ酸残基を多く含む藻類由来タンパク質は、凝集剤成分が関わる架橋作用を阻害することで凝集阻害を引き起こしていることが示唆される結果を得た。

(原稿受付 2009年11月4日)

(原稿受理 2010年3月17日)

参考文献

- 1) 日本水道協会 (2005) 平成16年度水道統計施設・業務編, 日本水道協会出版, 東京.
- 2) 佐藤敦久, 眞柄泰基 (1996) 上水道における藻類障害, 技報堂出版, 東京.
- 3) Westerhoff, P., Rodriguex, M., Baker, L. and Sommerfeld, M. (2005) Seasonal occurrence and degradation of 2-

- methylisoborneol in water supply reservoirs, *Water Research*, **39** (20), 4899-4912.
- 4) Nigal, J., Graham, D., Wardlaw, V. E., Perry, R. and Jiang, J. Q. (1998) The significance of algae as trihalomethane precursors, *Water Science and Technology*, **37** (2), 83-89.
 - 5) Pivokonsky, M., Kloucek, O. and Pivokoaska, L. (2006) Evalation of the production, compopsition and aluminum and iron complexation of algogenic organic matter, *WaterResearch*, **40** (16), 3045-3052.
 - 6) 高荒智子, 丸山亜紀子, 佐野大輔, 今野弘, 大村達夫 (2003) アルミニウム錯体形成能を有する藻類由来有機物の分離, 環境工学研究論文集, **40**, 227-236.
 - 7) Clackson, T. and Lowman, H. B. eds. (2004) Phage Display, Oxford University Press, Oxford, UK.
 - 8) 佐野大輔, 高荒智子, 鈴木孝佳, 大村達夫 (2006) フェージディスプレイ法を用いた凝集阻害誘因タンパク質をコードする藻類遺伝子の分離, 環境工学研究論文集, **43**, 127-133.
 - 9) Lin, J.-L., Huang, C., Chin, C.-J.M. and Pan, J.R. (2009) The origin of AL (OH)₃-rich and Al₁₃-aggregate flocs compositionin PACl coagulation, *Water Research*, **43**, 4285-4295.
 - 10) Masion, A., Vilge-Ritter, A., Rose, J., Stone, W. E. E., Teppen, B. J., Rybacki, D. and Bottero, J.-Y. (2000) Coagulation-flocculation of natural organic matter with Al salts: speciation and structure of the aggregates, *Environment Science and Technology*, **34**, 3242-3246.
 - 11) Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, **25** (17), 3389-3402.
 - 12) Freuler, F., Stettler, T., Meyerhofer, M., Leder, L. and Mayr, L. M. (2008) Development of a novel gateway-based vector system for efficient, multiparallel protein expression in *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification*, **59** (2), 232-241.
 - 13) 真柄泰基, 国包章一, 相沢貴子 (1986) 藻類の生産する有機物の凝集阻害に関する基礎的研究, 水道協会雑誌, **55** (4), 33-39.
 - 14) 菅原繁, 黒川真弓, 真柄泰基 (1995) Mirocystisspp. 群体から得られた有機物質が凝集沈殿処理に与える影響, 水道協会雑誌, **64** (5), 2-10.
 - 15) 西尾元宏 (2000) 有機化学のための分子間力入門, 講談社, 東京.
 - 16) MaJ., Campbell A. and Karlin S. (2002) Correlations between Shine-Dalgarno sequence and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *Journal of Bacteriology*, **184** (20), 5733-5745.
 - 17) Gross, E., Sevier, C. S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, C. A., Thorpe, C. and Fass, D. (2006) Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p, *Biochemistry*, **103** (2), 299-304.
 - 18) Xu, C. and Rosen, B.P. (1997) Dimerization is essential for DNA binding and repression by the ArsR metalloregulatory protein of *Eschrichia coli*, *BioLogical Chemistry*, **272** (25), 15734-15738.
 - 19) Busenlehner, L. S., Pennella, M. A., Giedroc, D.P. (2003) The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressor: structural insights into prokaryotic metal resistance, *FEMS Microbiology Review*, **27** (2-3), 131-143.
 - 20) Branco, R., Chung, A. P. and Morais, P. V. (2008) Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different function in the highly arsenic-resistant strain *Ochrobactrum tritici* SCII24, *BMC microbiology*, **8**, 95.
 - 21) 小笠原紘一, 丹保憲仁 (1985) 浄水の技術 安全な飲み水を作るために, 技報堂出版, 東京.