

重金属親和性を有する活性汚泥中タンパク質の検索

東北大学大学院 学生員 ○安附太郎
東北大学大学院 学生員 佐野大輔
東北大学大学院 正会員 大村達夫

1.はじめに

重金属は発電所や電気メッキ工場など様々な工場や家庭排水，一般廃棄物等から環境中に流出している．過去における高濃度の重金属汚染と異なり，現在では水質基準前後の希薄濃度での重金属の流出が問題となっている．そこで，本研究では希薄濃度における重金属除去技術の開発を最終目的とした．

既往の研究により下水処理場の活性汚泥フロックが重金属を吸着することが知られており，またそれらの重金属は主に活性汚泥中の細菌が産出するタンパク質と結合していることが知られている¹⁾．そこで，今回の実験では活性汚泥細菌から抽出したタンパク質の中から重金属に親和性を持つタンパク質を分離した．この際，重金属を添加した培地で培養した細菌は重金属耐性を持つために重金属親和性の高いタンパク質を産出するという報告²⁾から，培地に銅を添加した場合としない場合における重金属親和性のタンパク質の構成を比較した．

2.実験方法

2-1.タンパク質の抽出

仙台市内の下水処理場より採取した返送汚泥 (MLSS 5,800mg/l)を遠心分離 (1,000 × g, 10min, 4℃)後，上清を普通ブイヨン培地に加え好気培養した (24h, 20℃)．培養時の銅濃度はそれぞれ0, 0.5mMになるように設定した．培養後，遠心分離 (3,000 × g, 15min, 4℃)を行い，20mMのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH:7.2) でペレットの洗浄を行った．凍結融解処理 (-80℃/30℃)後，超音波処理 (50W, 2 min)により細菌細胞を破碎し，リン酸ナトリウム緩衝液を加え遠心分離 (20,000 × g, 90min, 0℃)を行った．遠心分離後のペレットにリン酸ナトリウム緩衝液 10ml, ノルマルブタノール10mlを加え，超音波処理 (50W, 1min)を行った．その後，遠心分離 (20,000 × g, 10min, 4℃)を行い，水層を回収し，これを抽出タンパク質とした．ここで培地の銅濃度0mMで培養した細菌から抽出したタンパク質をControlとし，培地の銅濃度0.5mMで培養した細菌から抽出したタンパク質をTestとした．

2-2.アフィニティークロマトグラフィによる重金属親和性を有するタンパク質の分離

重金属親和性を有するタンパク質の分離はアフィニティークロマトグラフィにより行った．開始バッファは0.5M NaClを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH:7.2) を用い，カラムからのタンパク質の溶出はバッファのpHを3.5に低下させることで行った．リガンドは銅，ニッケル，亜鉛の3種類を用いることにより，それぞれの重金属に親和性を有するタンパク質を分離した．また分離の際にはフラクションを2mlずつ回収した．

2-3.SDS-PAGEによる分離タンパク質の確認および分子量推定

アフィニティークロマトグラフィの結果から重金属親和性を有するタンパク質が含まれていると判断されたフラクションに対しSDS-PAGEを行った．分離ゲル濃度は10%とし，泳動は20mA/ゲルの定電流で行った．染色は銀染色により行った．

3.結果と考察

3-1.アフィニティークロマトグラフィによるタンパク質分離の結果

銅，ニッケル，亜鉛をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィの結果をそれぞれ図1，図2，図3に示す．結果から銅，ニッケルをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィにおいてはControl，Testのどちらの場合も重金属親和性を有するタンパク質の存在を示すピークが認められたのに対し，亜鉛をリガンドとした場合ではTestにおいてのみ明確なピークが検出された．これは培養時に培地に銅を添加することにより，細菌が重金属親和性のタンパク質を新たに発現したためであると示唆された．しかしながらクロマトグラフィに用いた280nmの紫外線吸光度はタンパク質以外の物質 (核酸など) にも吸光を示すことから，この結果だけから分離された物質がタンパク質であること，また亜鉛に親和性を示したタンパク質が細菌により新たに発現されたタンパク質であるとは言えない．そこで分離物質がタンパク質であることの確認をSDS-PAGEにより行うと共に，タンパク質を分子量ごとに分離することを試みた．

Key Words : activated sludge, heavy metals, affinity chromatography, metal-binding proteins

〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06 TEL022-217-7483 FAX022-217-7482

3-2. SDS-PAGEによるタンパク質の確認

クロマトグラフィにより得られたフラクションをサンプルとしたSDS-PAGEの結果を図4に示す．ここでは予備実験の段階でSDS-PAGEにより色濃いバンドが検出されたフラクションのみをサンプルとした結果を示す．図4からControl, Testのどちらの場合においても，銅とニッケルに親和性の高いタンパク質が数多く存在することが確認された．また銅に親和性を持つタンパク質は主に20～43kDaに分布するのに対し，ニッケルに親和性を有するタンパク質には43kDa以上のタンパク質も多く存在することが確認された．一方，亜鉛に高い親和性を示すタンパク質はTestからは数多く得られたものの（図4：ZT2参照），Controlからはほとんど得られなかった（図4：ZC2）．さらに，銅，ニッケル，亜鉛のすべてに共通して高い親和性を有するタンパク質が検出された（図4：*）．これはTestのみ認められるバンドであることから，培養時に培地に添加した銅がInducerとして作用する事により細菌が重金属親和性を有するタンパク質を発現した可能性がある．

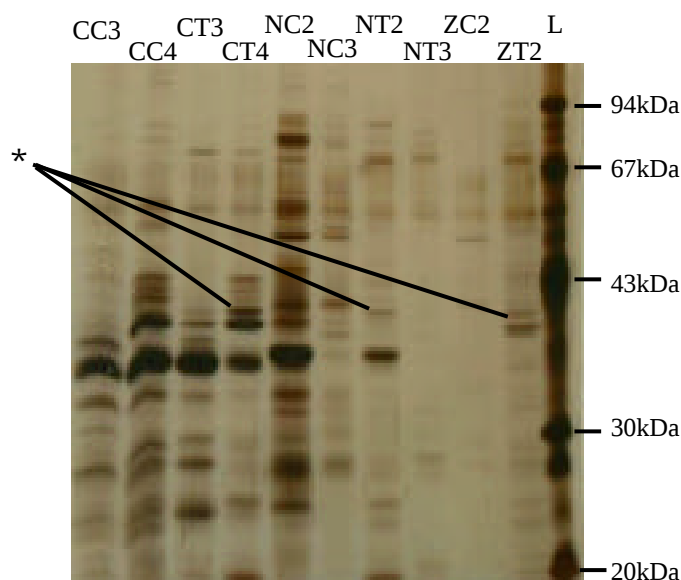


図4．SDS-PAGEによるタンパク質の確認

- 1文字目：リガンドの金属，2文字目：Control or Test
3文字目：Fraction No，L：分子量マーカー
*：Cu，Ni，Znに共通して親和性のあるタンパク質

4.まとめ

重金属をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィにより，それぞれの重金属に高い親和性を有するタンパク質が分離された．培養時に培地に銅を添加しなかった場合は亜鉛に親和性を有するタンパク質がほとんど分離できなかったのに対し，添加した場合は亜鉛に対して親和性を持つタンパク質が分離・確認された．また銅，ニッケル，亜鉛の3種の重金属に高い親和性を有するタンパク質が銅添加培養した細菌から得られた．今後はこのタンパク質を解析していくと共に実用に向けての研究を行う予定である．

5.参考文献

- 1) Lawson, P. S., Sterritt, R. M., Lester, J. N. Adsorption and Complexation Mechanisms of Heavy Metal Uptake in Activated Sludge. J. Chem. Tech., Biotechnol. 1984, 34B, 253-262.
- 2) Chang, D., Fukushima, K., Ghosh, S. Stimulation of activated sludge cultures for enhanced heavy metal removal. Water Environ. Reserch. 1995, 67, 822-827.

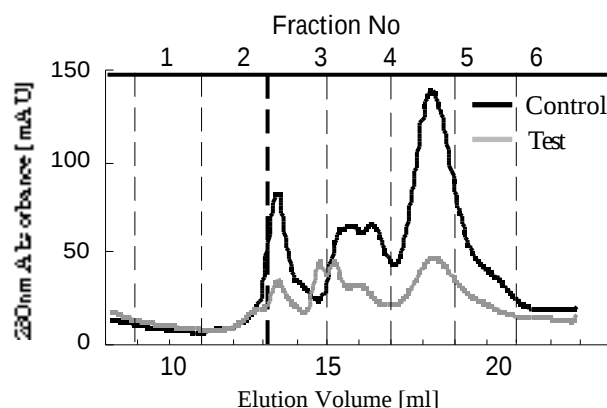


図1．クロマトグラフィの結果（リガンド：Cu）

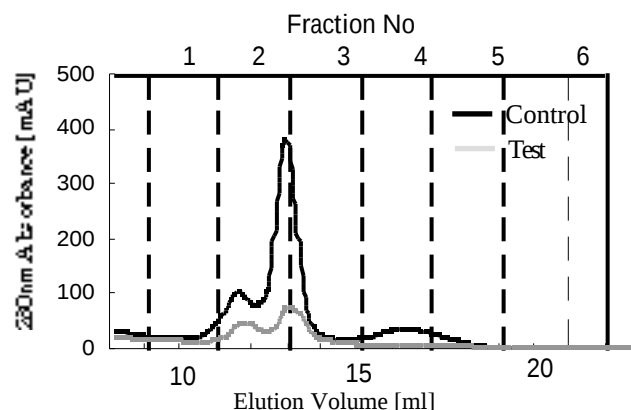


図2．クロマトグラフィの結果（リガンド：Ni）

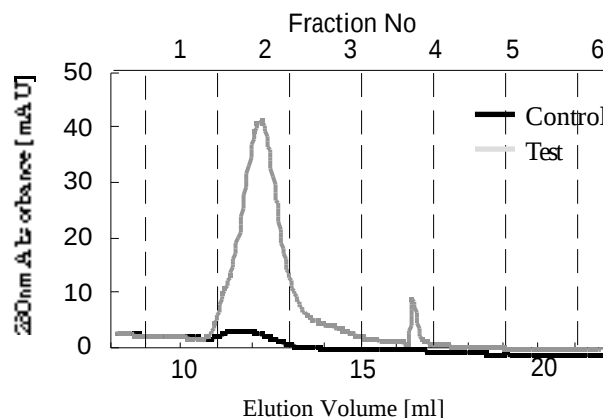


図3．クロマトグラフィの結果（リガンド：Zn）