

## 凝集阻害メカニズム解明のための藻類ゲノムを用いた ファージディスプレイシステムの構築

東北大学大学院工学研究科 学生員 鈴木孝佳  
 東北大学大学院工学研究科 学生員 高荒智子  
 東北大学大学院工学研究科 正会員 熊谷幸博  
 東北大学大学院工学研究科 正会員 大村達夫

### 1. はじめに

富栄養化によって大量増殖した藻類は、浄水処理において凝集阻害を引き起こす。凝集阻害は凝集処理効率の低下ばかりではなく、藻類が分泌する有機物 (Algogenic Organic Matter: AOM) と塩素との反応によるトリハロメタン生成および浄水中へのアルミニウム残留等の弊害をもたらす。凝集阻害メカニズムとして AOM および凝集剤中の金属との錯体形成や荷電中和反応の阻害に関する報告<sup>1)</sup>はあるが、阻害に関する物質の分子構造および物理化学的特性に着目して凝集阻害メカニズムを解明する試みは少ない。

そこで AOM の組成の中でも、細胞構造の主成分である藻類由来タンパク質の中で、金属と親和性のあるものに着目して研究を行うことにした。本研究では AOM 中の阻害関与タンパク質の分離を実現させるため、藻類由来タンパク質をファージ表面上に提示させたファージディスプレイシステム (図 1) の構築を行った。

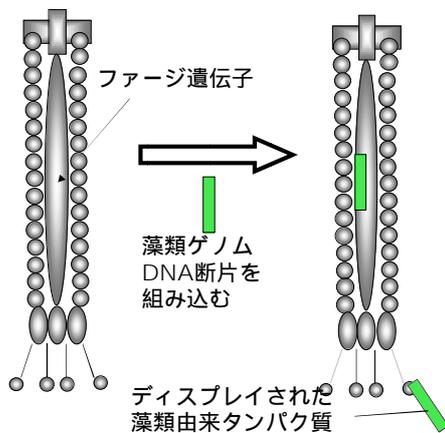


図1 ファージディスプレイの原理

### 2. 実験方法

ファージディスプレイ構築までの流れを図2に示した。

#### 2.1 藻類培養および細胞回収

本研究で用いた藻類は、凝集阻害を引き起こすことで知られている藍藻類の *Microcystis aeruginosa* (NISE-91) である。MA 培地 300mL に株藻類を 5mL 入れ、照度 4000lx (12 時間明暗)、温度 25℃、振とう 70rpm の条件で無菌培養した。定常期に達した藻類を、0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過し、ろ紙上に残

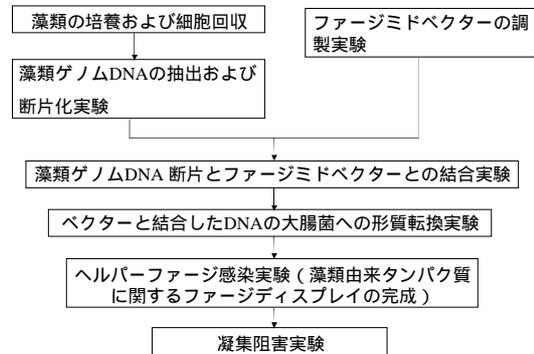


図2 実験のフローチャート

ったサンプルを爪楊枝で採取することで藻類細胞を回収した。回収した藻類細胞は-80℃で冷凍保存し、使用時に解冻して用いた。

#### 2.2 DNA抽出およびインサートDNA調製

*Microcystis aeruginosa* はグラム陰性型である<sup>2)</sup>ので、2.1で得られた藻類細胞からフェノール・クロロホルム抽出法を用いて藻類ゲノムDNAを抽出した。その後、抽出DNAに制限酵素 *Sau3A* を混合して 37℃で1時間インキュベートし、DNA切断を行った。続いて、酵素を取り除くためのフェノール・クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行った。

#### 2.3 ベクター調製

本実験ではベクターとしてファージミド pSKAN を用いた。pSKAN を TaKaRa Miniprep DNA Purification Kit を用いて大腸菌中から抽出・精製した。pSKAN に制限酵素 *Sac* および *Kpn* を混合し 37℃で1時間インキュベートし、環状から直鎖状に切断した。次に脱リン酸化処理を施し、その後 *BamH* サイトを持つプライマーを用いて PCR (95℃ 1分, 55℃ 30秒, 72℃ 6分を1サイクルとして合計30サイクル) を行うことで、*BamH* サイトを持つ pSKAN を創り出した。その後、制限酵素 *BamH* を混合して 37℃で1時間インキュベートした。その後酵素を取り除くためにフェノール・クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行った。次に電気泳動を行い、5.6kbp を示すバンドを切り出し、GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いて精製した。その後 pSKAN の自己閉環を目的としたライゲーションを行い、続けて大腸菌に導入した。大腸菌シングルコロニーから *BamH* サイトを持つ pSKAN を TaKaRa Miniprep DNA Purification Kit を用いて抽出・精製した。次にシーケンシングにより pSKAN の塩基配列を解読し、*BamH* サイトが存在するかを確かめた。確認後、制限酵素 *BamH* を混合

キーワード 凝集阻害, 藻類由来タンパク質, *Microcystis aeruginosa*, 藻類ゲノム DNA, ファージディスプレイ

連絡先 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 06, TEL022-217-7484, FAX022-217-7482

して 30 で 1 時間インキュベートした．その後酵素を取り除くためにフェノール・クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行った．次に脱リン酸化処理を施し，その後フェノール・クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行った．

#### 2.4 ファージディスプレイ構築

2.2 および 2.3 で得られたインサート DNA およびベクターを適当な比率で混ぜ，16 で 1 時間ライゲーションを行った．それを大腸菌に導入するトランスフォーメーションを行い，試験管内に用意した 1×LB 液体培地で一晚 37 で培養した．次に培養液にヘルパーファージ (VCSM13 Interference-Resistant Helper Phage) を加え，感染させた．一晚培養後，遠心分離 (35 分，7000×g，4 ) を行い，上清を回収し，続けて遠心分離 (30 分，10000×g，4 ) を行うことでファージディスプレイ溶液を得た．

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 藻類培養および細胞回収

*Microcystis aeruginosa* の増殖をクロロフィル a で評価した培養曲線を図 3 に示した．定常期 (培養開始から約 15 日目) に達した藻類の細胞を回収した．

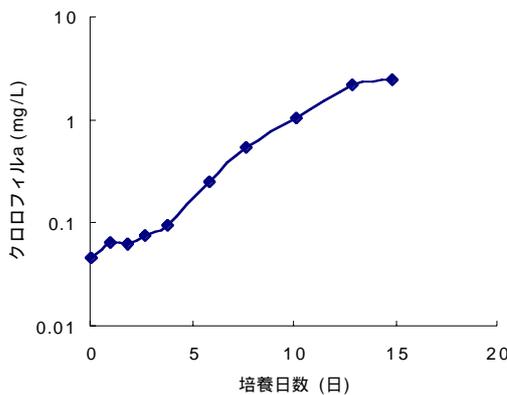


図 3 *Microcystis aeruginosa* の培養曲線

#### 3.2 DNA 抽出およびインサート DNA 調製

得られた抽出 DNA および Sau3A により切断されたインサート DNA に対して 0.7%アガロースゲル電

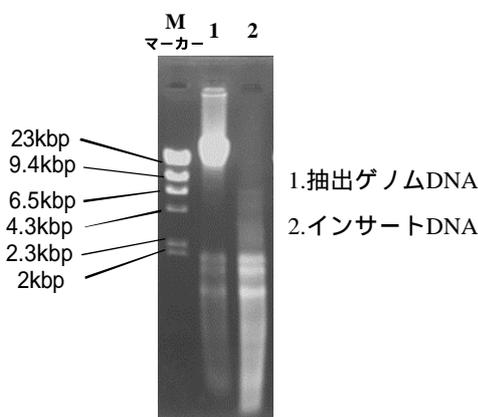


図 4 *Microcystis aeruginosa* ゲノム DNA の調製結果

気泳動を行った結果，図 4 に示すような結果を得た．抽出された藻類 DNA は，23kbp 以上の領域に観察された (図 4，レーン 1)．また，抽出 DNA が Sau3A 処理 (37 ，1 時間) により 2kbp 以下に切断されたことを確認した (図 4，レーン 2)．このインサート DNA をライゲーションに用いた．

#### 3.3 ベクター調製

DNA シークエンシングにより pSKAN の塩基配列を解読したところ BamH サイトが存在していることが確認された (図 5)．この pSKAN を BamH で切断し，脱リン酸化処理を行いライゲーションに用いた．

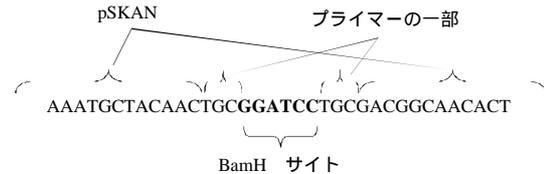


図 5 BamH サイト導入付近の pSKAN の配列

#### 3.4 ファージディスプレイ構築

インサート DNA 1 μl と pSKAN 3 μl を混ぜ，ライゲーションを行い，続けてトランスフォーメーションを行った．その結果大腸菌コロニーが約 1100 個得られた (図 6) ことから藻類ゲノム DNA 断片が良好に大腸菌に導入されたものと考えられる．すなわち *Microcystis aeruginosa* に関するゲノム DNA ライブラリが完成したものと考えて良い．

また，DNA ライブラリ培養液にヘルパーファージを感染させた．その結果藻類由来のファージディスプレイが構築された．



図 6 大腸菌コロニーの様子 (コロニー数約 1100 個)

### 4. おわりに

*Microcystis aeruginosa* に関して，ファージ表面上に藻類由来タンパク質を提示したファージディスプレイを構築した．

今後は，ファージ表面上に提示された藻類由来タンパク質の中から凝集阻害に関与するものを同定し，その遺伝情報を把握することで凝集阻害メカニズム解明を進める予定である．

#### 参考文献

- 1) Bernhart, H., Clasen. : Influence of algogenic organic substances on flocculation and filtration, WISA, 1, pp. 41-57, 1991
- 2) 藤田善彦・大城香, ラン藻という生きもの, 東京大学出版会, p. 22, 1993