

Microcystis aeruginosa ゲノムを用いた Phage display system による凝集阻害誘因部位の解析

東北大学 学生員 ○石藤慎吾
福島高専 正会員 高荒智子
東北大学 正会員 大村達夫

1. はじめに

ダムや湖沼などの閉鎖性水域では、富栄養化による季節的な藻類の大量増殖が発生している。このような藻類の大量増殖が発生した際、これらの水域から取水している浄水場では、大量増殖した藻類由来有機物 (Algogenic Organic matter: AOM) による凝集阻害が発生している¹⁾。藻類の大量増殖に伴う凝集阻害に対しては、凝集剤の注入率の増加といった暫定的な対応がなされているが、これは処理水中のアルミニウム残留濃度の上昇や凝集剤コストの増大など副次的な問題を招いている。そのため、新たな凝集阻害対策が切望されている。

AOM に起因する凝集阻害メカニズムとしては AOM による凝集剤中金属との錯体形成や、AOM による水中懸濁物質への保護コロイド化などが提案されている。しかしながら、新たな凝集阻害対策を講じるためには、有機物レベルでの藻類由来の凝集阻害誘因物質の同定など、詳細な凝集阻害メカニズムの解明が必要であると考えられる。

本研究では、凝集阻害誘因物質として藻類細胞の主要な有機物成分であり、かつ凝集阻害能を有するタンパク質に着目し、藻類由来タンパク質中の凝集阻害部位を明らかにすることを試みた。凝集阻害を引き起す代表藻類である *Microcystis aeruginosa* (以下 *M. aeruginosa*) 由来ペプチドを提示したファージディスプレイを利用し、アフィニティクロマトグラフィによりアルミニウムと錯体を形成する凝集阻害誘因ペプチド提示ファージの分離を行った。その後、得られたファージの遺伝子配列を解析し、藻類由来タンパク質の凝集阻害誘因部位の解析を行った。

2. 実験方法

実験のフローチャートを図1に示す。

2.1 ファージディスプレイライブラリ溶液の作成

大腸菌 DNA ライブラリ²⁾にヘルパーファージ (VCSM13 Interference-Resistant Helper Phage) を感染させ一晩培養することで *M. aeruginosa* 由来ペプチドを提示したファージを産生した。培養後、培養液を遠心分離して上清を回収することで大腸菌の除去を行い、得られた上清に PEG 沈殿処理を行った後、遠心分離を行った。次いで沈殿したファージを PBS (pH3.0) に溶解させることでファージディスプレイライブラリ (以下 PDL) 溶液を得た。回収した PDL 溶液は *E. coli* JM109 competent cells に加え、1 時間培養することにより *E. coli* JM109 にファージを感染させた。ファージの感染した *E. coli* JM109 はアンピシリン耐性を獲得することから、アンピシリンを加えた寒天培地に散布し一晩培養後、コロニー

の数を測定することによりタイターを求めた。

2.2 キレートアフィニティクロマトグラフィによる Al^{3+} に親和性を有する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+} をリガンドに用いたキレートアフィニティクロマトグラフィを行った。カラムは HiTrap Chelating HP (GE Healthcare, 17-0408-01) を使用し、以下の手順でカラムの作成を行った。

まずカラムに Milli-Q 水 5mL を送液しカラムの洗浄を行い、次に開始バッファー (0.5M NaCl, 20mM リン酸, pH 3.0) を 5mL 送液することによりカラム内の平衡化を行った。その後、0.1M の $AlCl_3$ を加えた開始バッファー 1mL をカラムに導入し、一晩静置することによりカラム内に Al^{3+} を固定化した。その後開始バッファー 3mL を送液することで、余分な Al^{3+} を除去しカラムを作成した。

次に作成したカラムに PDL 溶液 1mL (これを 1st Input とする) を導入し、 Al^{3+} とファージを反応させた後、開始バッファー 6mL をカラムに送液し、カラム内を洗浄することで Al^{3+} に対して親和性の低いペプチドを提示するファージを洗い流した。次に溶出バッファー (0.5M NaCl, 20mM リン酸, 0.05M EDTA, pH 3.5) をカラムに導入し、カラム中のリガンドに結合したファージを回収した (これを 1st Output とする)。回収したファージは *E. coli* JM109 ($OD_{600}=0.3-0.5$) に感染させ、ヘルパーファージの重感染によりファージの個数を増幅させた (これを 2nd Input とする)。ここまでの作業を 1 round とし、同様の作業を 4 回繰り返す。各 round における Input と Output のタイターを測定した。得られたタイターから各 round の収率 ($Output(cfu)/Input(cfu)$) を求め、藻類由来ペプチドを提示させていないコントロールファージと比較した。

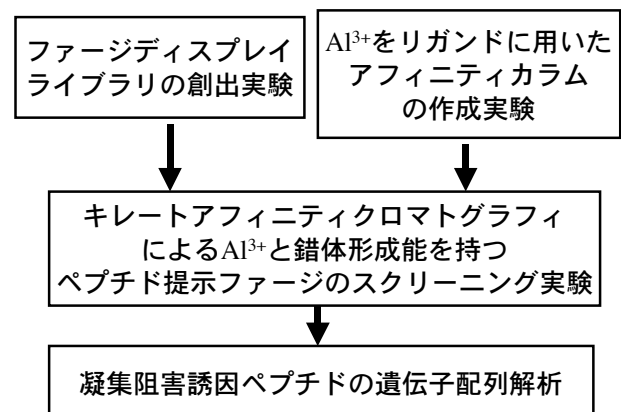


図1 実験のフローチャート。

Key Word Phage display, *Microcystis aeruginosa*, キレートアフィニティクロマトグラフィ, 凝集阻害, 藻類由来有機物
連絡先 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 TEL: 022-795-7483 FAX: 022-795-7482

2.3 藻類由来凝集阻害誘因ペプチド遺伝子解析

2.2 で行ったキレートアフィニティクロマトグラフィの 4th Output で得られたファージを, *E. coli* JM109 に感染させ, アンピシリンを含む寒天培地で一晚培養後, 70 個のコロニーをランダムにピックアップし, ファージミドベクターの抽出を行った. 得られたファージミドベクターは DNA シーケンサーを用いて *M. aeruginosa* 由来インサート DNA の解析を行った. 解析した凝集阻害誘因ペプチドの塩基配列解析結果を基に, 凝集阻害誘因部位のアミノ酸配列を決定した.

3. 結果及び考察

3.1 Al^{3+} と錯体形成するペプチド提示ファージの収率結果

キレートアフィニティクロマトグラフィの収率結果を図 2 に示した. ファージのスクリーニング操作は 4 round 行った. スクリーニングでは藻類由来ペプチドを提示していないコントロールファージの収率は 4 round 中 3 round ほぼ一定であったのに対し, 藻類由来ペプチド提示ファージの収率はラウンドを重ねるごとに増加の傾向を示し, 1st Output と比べ 4th Output の収率は約 30 倍と増加していた. このような収率の増加は, Al^{3+} と錯体形成能を有するペプチドを提示したファージが存在しており, これらのファージがアフィニティクロマトグラフィによりスクリーニングされたことを示している. また, 4th Output で得られたファージは Al^{3+} と特に強い親和性を有するファージが選択されたと考えられる. このことより, 4th Output で得られたファージに提示されているペプチドは凝集阻害に寄与しているペプチドである可能性が高いと言える.

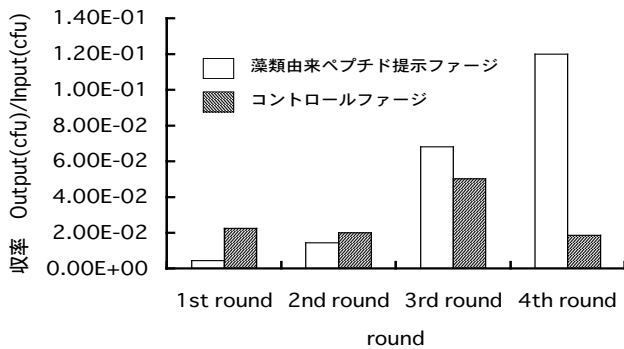


図 2 キレートアフィニティクロマトグラフィによる Al^{3+} と錯体形成能を有するペプチド提示ファージの収率結果.

3.2 凝集阻害誘因ペプチド配列解析結果

4th Output で得られたファージの中からランダムに 70 サンプルをピックアップし, 塩基配列の確認を行った. その結果, ファージの尾部に藻類由来ペプチドを提示し, かつ尾部を正常に産生したと考えられるファージは 13 クローン得られた. 他のファージは読み枠のずれや, 藻類由来 DNA 翻訳途中にストップコドンが含まれていたため正常にファージの尾部が産生されなかったと考えられるサンプルであった. 表 1 にキレートクロマトグラフィにより得られた藻類由来ペプチドのアミノ酸配列より 5 種について示した.

アルミニウムとの吸着に関与する可能性のある金属吸着性アミノ酸として, カルボキシル基を有するアスパラギン

酸やグルタミン酸, ヒドロキシル基を有するスレオニンやセリン, チロシンなどが存在することが知られている³⁾. 本実験で得られたペプチドにもチロシンやセリン, スレオニンなど, 金属に吸着能を有するアミノ酸の割合が期待値と比べ高いものが確認された. 得られたペプチドに含まれる金属吸着能を有するアミノ酸はキレートアフィニティクロマトグラフィの結果より, Al^{3+} との錯体形成により結合していると考えられる. また, 本実験で得られたペプチドにはこれらの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. このような錯体形成能を有するアミノ酸が集中して存在する部位は, アルミニウムと錯体形成を行うことで, 凝集に寄与するアルミニウム量を減少させる可能性が考えられる. このことより, 錯体形成能を有するアミノ酸が集中して存在する部位が, 凝集阻害誘因部位として凝集阻害に大きく寄与している可能性があると言える. また, 今回得られた凝集阻害誘因部位の遺伝子情報は, 遺伝子クローニング及び発現を行うことで, *M. aeruginosa* 由来凝集阻害誘因タンパク質の凝集阻害への関与を明らかにすることに利用可能であると考えられる.

表 1 スクリーニングで得られたペプチドのアミノ酸配列解析結果. 灰色で示したアミノ酸は金属吸着能を有するアミノ酸.

試料	アミノ酸配列									
①124-8	M	P	K	L	E	Y	S	Y	R	
②124-3	M	A	T	T	K	S	L	R		
③131-3	M	L	Q	L	R	I	D	L	F	N
	T	T	F	A	K	Y	D	R	S	F
	S	P	I	W	L	K	V	S	S	T
④126-17	M	I	M	S	S	L	P	T	Q	S
	D	T	L	E	N	S	T	R		
⑤130-16	M	V	E	K	G	L	A	P	A	T
	I	S	T	R	A	C	W	L	G	

4. おわりに

M. aeruginosa 由来ペプチドを提示したファージに対し, Al^{3+} をリガンドとしたキレートアフィニティクロマトグラフィを行った. その結果, Al^{3+} と錯体を形成しうる *M. aeruginosa* 由来ペプチドを提示したファージが分離された. また, 分離したファージが有する *M. aeruginosa* 遺伝子の配列を解読した. その結果, Al^{3+} への錯体形成能を有する凝集阻害誘因ペプチドはセリン及びチロシン, スレオニンなど金属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のあるペプチドであった. このことより, *M. aeruginosa* 由来のペプチドに含まれる錯体形成能を有するアミノ酸が集中して存在している部位が, 凝集阻害誘因部位として働くことで, 凝集阻害を引き起している可能性が示唆された.

参考文献

1. 佐藤敦久, 眞柄泰基, 上水道における藻類障害, 技報堂出版, 1996.
2. 佐野大輔, 高荒智子, 鈴木孝佳, 大村達夫, ファ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, pp.127-133, 2006.
3. 西尾元宏, 有機化学のための分子間力入門, 講談社, 2000.