

VII-31

水中重金属除去技術開発を目的とする 重金属高吸着能タンパク質（Metal-Binding Protein: MBP）遺伝子分離

東北大学 学生員 明星賢

東北大学 学生員 佐野大輔

東北大学 正会員○大村達夫

1. はじめに

環境水中に存在する重金属は、たとえ低濃度であっても生物濃縮等により、その影響が顕在化する可能性がある。従来の技術では環境水中の重金属除去に関して経済性や処理効率の面で限界に直面しているのが現状である。そこで本研究室では、経済性や処理効率の問題を解決し得る技術として、高い重金属吸着能を有する活性汚泥細菌由来のタンパク質(Metal-Binding Protein: MBP)を用いた重金属吸着除去技術の開発を行っている。

本研究では、当研究室で既に分離された MBP のクローニングに必要な MBP 遺伝子を活性汚泥細菌から分離することを試みた。

2. 実験方法

2.1 活性汚泥細菌の培養および菌体ペレットの回収

仙台市内の下水処理場より返送汚泥を採取し、遠心分離（1000xg, 10分, 4℃）した汚泥上清を、銅濃度が 0.5mM となるように塩化銅を添加した普通ブイオン培地に加え好気培養した（20℃, 24時間）。同時に、銅濃度、ニッケル濃度、亜鉛濃度が 0.5mM となるように塩化銅、塩化ニッケル、塩化亜鉛を加えた培地での培養も行った。培養後、遠心分離（3000xg, 15分, 4℃）により、菌体ペレットを回収した。

2.2 ゲノム DNA ライブラリの作製

回収した細菌ペレットよりフェノール・クロロホルム抽出法を用いてゲノム DNA の抽出を行った。抽出した DNA を精製するためエタノール沈殿を行った。

得られた抽出 DNA をプラスミドベクターに組み込むため、制限酵素 Sau3A I により最適長さに断片化した。Sau3A I により断片化されたゲノム DNA は分子量が不揃いであり、そのままライゲーションを行うと効率が低下する。そこでアガロースゲル電気泳動を行った後、最適長（1~3kbp）の範囲のゲルを切断し、そこからゲノム DNA の分離・精製を行った。得られた DNA 断片をプラスミドベクターに組み込むインサート DNA とした。

作製したインサート DNA を宿主大腸菌に組み込むため、プラスミド DNA とインサート DNA のライゲーション（16℃, 16時間）を行った。プラスミドベクターには pUC118 BamH I /BAP を用いた。

次に宿主大腸菌の形質転換(トランスフォーメーション)を行った。宿主大腸菌には *Escherichia coli* DH5 α のコンピテント細胞を使用した。目的遺伝子を含むベクター DNA を増幅させるため形質転換された細胞のみを増殖させる必要があるが、本実験で用いている pUC118 がアンピシリン (Amp) 耐性遺伝子を有していることから、トランスフォーメーション後の宿主大腸菌を 1×LB+Amp 寒天培地に塗布し、37℃, 16時間の培養を行った。

2.3 コロニーハイブリダイゼーション法による MBP 遺伝子のスクリーニング

DNA ライブラリの中から MBP 遺伝子を分離するためコロニーハイブリダイゼーションを行った。ナイロンメンブレンフィルターにコロニーをトランスファーし、強アルカリ性（pH11.5 以上）の溶液に浸して DNA を 1本鎖にした後、80℃で2時間ベーキングを行いフィルターに変性 DNA を焼き付け固定化した。その後、3×SSC, 0.1%SDS 溶液に1~3時間浸し、不要な菌体細胞破片を除去した。

DNA を固定化したフィルターを用いてハイブリダイゼーションを行った。プローブは本研究室で既に分離された MBP の N 末端アミノ酸配列をもとに作製し、5' 末端に DIG 標識を施した。プレハイブリダイゼーション（50℃, 2時間）でフィルターをバッファーに馴染ませた後、熱変性（95℃, 10分）させ1本鎖にしたプローブを、濃度が 0.01 μ g/ml となるように加え 50℃で一晩のハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のフィルターに付着する残余のプローブの洗浄を洗浄液（0.1×SSC, 0.1%SDS）で2回行った（50℃, 15分）。その後、スキムミルクによるブロッキングでバックグラウンドを抑えた。目的遺伝子に特異的に結合したプローブに抗 DIG 抗体を結合させ、未反応抗 DIG 抗体を洗浄液で洗浄した後、標識酵素であるアルカリフォスファターゼと抗 DIG 抗体を反応させ青紫色に発色させた。

2.4 MBP 遺伝子の塩基配列解読

検出した大腸菌コロニーが保持するインサート DNA の配列を Dye Terminator 法を用いた DNA シークエンシングにより確認した。

3. 結果および考察

3.1 DNAライブラリの作製結果

トランスフォーメーション後の培養で、1 × LB+Amp寒天培地上に発現したコロニーの様子を図1に、DNAライブラリの作製結果を表1に示した。一般的に細菌のDNAの全長は約400万bpということが知られており、本実験ではインサートDNAの大きさを平均2kbpとしているためDNAライブラリに白色コロニーの数が2000個以上であれば十分であると考えられる。作製したDNAライブラリの中でこの条件を満たす3サンプルと、設定した基準を満たしていないがライゲーション効率が比較的高い2サンプルを使用することとした。

3.2 コロニーハイブリダイゼーションによる目的遺伝子の検出結果

発色後のフィルターの様子を図2に示した。この発色したスポットが、非特異的なプローブDNAの結合によるものでないことを確認するために2次スクリーニングを行った。2次スクリーニングで用いたフィルターの様子を図3に示した。フィルターに出現した発色の形と、プレート上のコロニーの形状が一致することから、MBP遺伝子が存在する可能性が高いと考えられるため、その塩基配列の解析を行った。

3.3 DNAシーケンシングの結果

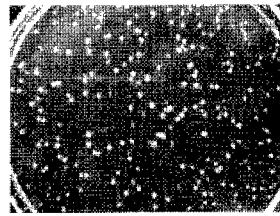
解析した塩基配列を図4に示した。得られた遺伝子は、目的とするタンパク質のアミノ酸配列を完全にコードするものではなかった。目的とするタンパク質の塩基配列27塩基に対して24塩基が一致し、アミノ酸配列は目的とする9残基に対して6残基の一致であった。

本実験での分離遺伝子とMBP遺伝子が完全に一致しなかった原因としては、相同配列に対するプローブの非特異的吸着が考えられる。しかしながら、コロニーハイブリダイゼーションにおける主要な4つの条件(プローブ濃度0.01 μg/ml、ハイブリダイゼーション温度50℃、洗浄液の塩濃度0.1 × SSCおよび洗浄温度50℃)は、塩基配列の相同性89%という遺伝子分離結果よりほぼ妥当であったと考えられる。

本研究では活性汚泥を用いているが、活性汚泥内には細菌、原生動物および藻類など種々の微生物が存在し²⁾、季節や汚染源などの諸条件が活性汚泥内の生物相に影響を与えている。このことから、DNAライブラリ作製に用いた活性汚泥内には、目的とするMBPを持つ微生物が存在しなかった、もしくは活性汚泥内に存在していたが個体数が少なかったため、本実験で作製したDNAライブラリの中には含まれなかったという可能性が考えられる。

4. おわりに

本研究では完全なMBP遺伝子の分離には到らなかったが、実験条件の妥当性は確認された。再度MBPの検索・分離を行い、MBPを分離した活性汚泥からMBP遺伝子の検出を行うことにより、MBP遺伝子の分離およびクローニングが可能であると考えている。

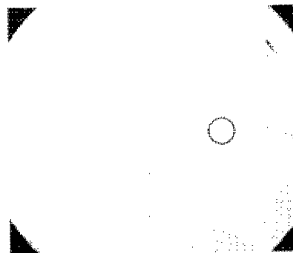


White Colony
(インサートDNAを含むプラスミドを保持する大腸菌コロニー)
Blue Colony
(インサートDNAを含まないで自己閉鎖したプラスミドを保持する大腸菌コロニー)
※インサートDNAを含むプラスミドが組み込まれなかった大腸菌はAmp^r耐性を持たないためコロニーを形成できない

図1 出現したコロニーの様子

表1 DNAライブラリ作製結果

Code number	Number of white colony	Number of blue colony	White/Blue
DL (Cu,Ni,Zn)A	1250	330	3.8
DL (Cu,Ni,Zn)B	2100	420	5.0
DL (Cu,Ni,Zn)C	2780	410	6.8
DL (Cu)A	1160	100	11.6
DL (Cu)B	3720	890	4.2



○・・・ハイブリダイゼーション後、発色を確認したスポット

図2 発色後のフィルターの様子



1. トランスファー前のプレート

2. 発色後のフィルター

図3 2次スクリーニング

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
分離遺伝子の塩基配列	I	C	C	A	T	G	A	T	G	A	A	T	G	C	A	C	C	G	A	C	A	A	A	A	A	A	A
プローブの塩基配列 (DIG)	G	C	A	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	K	C	T	T	K	G	A	T	E	C																	
	C	T																									
	T																										
分離遺伝子のアミノ酸配列	L	F	T	S	I	D	E	W	Q	P	T	I	P	V	R	K	E	※	W	D	G	H	G	H			
プローブのアミノ酸配列																											
	A	I	D	E	G	Q	L	T	I																		

(※は相同部分)

図4 分離遺伝子とプローブの相同性

参考文献

- 1) スタニエ, イングラム, ウィーリス, ペインター共著, 高橋甫, 斎藤日向等共訳: 微生物学上, 培風館, 2001
- 2) 洞沢勇著: 排水の生物学的処理, 技報堂, 1976