

VII-22

水中重金属除去技術開発のための重金属吸着タンパク質 (Heavy Metal-Binding Protein : HMBP) クローニングシステムの構築

東北大学大学院工学研究科 学生員 明星賢
東北大学大学院工学研究科 正会員 佐野大輔
東北大学大学院工学研究科 正会員○大村達夫

1 はじめに

重金属による環境汚染および鉱物資源の枯渇は、緊急な対策が求められている世界的に重要な問題である。特に先進国においては、重金属放出源の多様化、生物濃縮等の重金属が引き起こす被害に関するメカニズムの解明、および資源循環技術の必要性など多岐に渡る要因により、重金属に対する問題意識が拡大している。こうした社会的要求に応えるためには、除去効率のみならず経済性・エネルギー効率性を考慮し、さらに除去金属の回収も可能とする新たな重金属除去システムの構築が必要である。

以上のような背景のもと、本研究では、重金属吸着タンパク質(Heavy Metal-Binding Protein : HMBP)を用いた水中重金属除去技術の開発を最終目標としている。これまでの研究では、活性汚泥細菌が産出するタンパク質の中から、重金属の中でも銅に対して強い親和性を有する HMBP の分離を行った¹⁾。HMBP を重金属除去技術に用いるためには大量の HMBP が必要であり、HMBP クローニング(大量発現)システム構築を行う必要がある。既に、分離した HMBP の N 末端アミノ酸配列を元にした HMBP 遺伝子検索により HMBP 遺伝子の分離に成功しており、本研究では HMBP 遺伝子を用いた HMBP クローニングシステムの構築を行った。

2 HMBP 遺伝子を用いた HMBP クローニングシステム構築の実験方法

HMBP 遺伝子を発現させるためには、HMBP 遺伝子を導入したタンパク質発現用ベクターを用いて、宿主大腸菌の形質転換を行う必要がある。本実験では、Gateway クローニング法を用いて HMBP 遺伝子のタンパク質発現用ベクターへのサブクローニングを行った。その後、その HMBP 発現ベクターによる形質転換体を用いて HMBP 発現を誘導し、HMBP クローニングを行った。

2.1 HMBP 発現クローンの作製

Gateway クローニング法では、まず HMBP 遺伝子

をエントリーベクターへ組み込むことでエントリークローンを作製する。エントリークローンの作製では PCR Directional TOPO クローニング法を用いてエントリークローン作製用ベクターへの HMBP 遺伝子導入を行った。PCR Directional TOPO クローニング法で用いる DNA 断片は、センスプライマーの目的遺伝子 5' 末端に 'CACC' の 4 塩基を付加したプライマーを用い、さらに校正活性のある酵素を用いて増幅する。これにより、CACC 配列が目的遺伝子の 5' 上流に付加された平滑末端 DNA 断片が作製される。なお、本実験で用いる発現クローン作製用デスティネーションベクター pDEST14 では、ベクター内に開始コドンが存在せず、目的遺伝子が有する開始コドンをタンパク質合成で用いることから、TOPO クローニングに使用するセンスプライマーには、付加配列 'CACC' に開始コドンを追加した 'CACCATG' 配列を HMBP 遺伝子領域の 5' 末端に付加した塩基配列を用いることとした。得られた 'CACCATG' 配列付加 PCR 産物を Directional TOPO エントリーベクターである pENTR/SD/D-TOPO と混合し、5min 室温で静置した反応液を用いて宿主大腸菌 One Shot TOP10 Chemically Competent Cell (Invitrogen) を形質転換することにより、HMBP 遺伝子エントリークローンの作製を行った。エントリークローンにより形質転換された宿主大腸菌は、LB+Kanamycin 培地に塗布し 37℃で培養を行った。

作製したエントリークローンから発現ベクターである pDEST14 デスティネーションベクター (Invitrogen) への目的遺伝子の移入を行うため、LR Clonase を用いた LR 反応による部位特異的組み換え反応を行った。LR 反応産物を用いて宿主大腸菌 *Escherichia Coli* DH5 α (TaKaRa) の形質転換を行い、LB+Ampicillin 培地に塗布し 37℃で培養を行った。作製した形質転換体から HMBP 発現クローンを抽出し、Dye Terminator 法を用いて塩基配列解析を行った。

2.2 宿主大腸菌を用いた HMBP の発現

作製した HMBP 発現クローンを用いたタンパク質発現用の宿主大腸菌 *Escherichia Coli* BL21-AI (Invitrogen) の形質転換を行った。その後、形質転換された *E. Coli* BL21-AI を用いた HMBP 発現実験を行った。まず形質転換体を LB+Ampicillin 液体培地で前培養 (37℃, 16h) を行った後、前培養液を新たに LB+Ampicillin 液体培地へ接種し、本培養 (37℃, 9.5h) を行った。なお、本培養開始から 2.5h 経過後に、L-Arabinose を 0.02% となるように本培養液へ添加し、HMBP 発現の誘導を行った。L-Arabinose 添加後は、L-Arabinose 添加時から 3h, 5h, 7h の 3 段階に分けて本培養液を採取し、SDS-PAGE を用いて HMBP 発現の確認を行った。

3 HMBP クローニングシステム構築結果および考察

図 1 に SDS-PAGE による HMBP 発現の確認結果を示した。

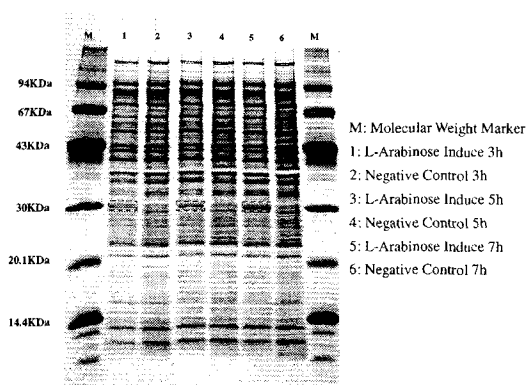


図 1 SDS-PAGE による HMBP 発現の確認結果

SDS-PAGE の結果より、L-Arabinose を添加した場合にのみ、30kDa の位置に濃いタンパク質のバンド (図中点線枠内) が確認された。L-Arabinose を投入しなかった Negative Control サンプルと L-Arabinose 添加により HMBP 発現を誘導したサンプルのタンパク質バンドを比較した場合、30kDa の位置に存在するバンド以外に明確な違いは検出できない。さらに、30kDa の位置に出現したバンドは、時間経過に比例して発現量が増加している。これらのことから 30kDa の位置に出現したバンドが HMBP

であると思われる。本実験で用いた HMBP 遺伝子がコードするアミノ酸配列から予測される HMBP の分子量は約 15kDa であることから、発現した HMBP は従来の位置とは異なる分子量を示していることとなる。

SDS-PAGE は、SDS イオンの結合によりタンパク質全体として多数の負電荷を帯びた変性タンパク質分子を電気泳動させることで、その移動度から分子量を推定する手法である。しかし、タンパク質の性質によって結合する SDS の量は変化することが知られており^{2,3)}、特に酸性タンパク質や低分子量タンパク質は分子量測定において誤差が大きくなることが知られている⁴⁾。本研究で用いた HMBP 遺伝子は、荷電アミノ酸を比較的多く含むアミノ酸配列を有している。そのため、SDS 結合量が減少し電気泳動での移動度が小さくなったことで、本来有する 15kDa の分子量の位置には出現せず、30kDa の位置に HMBP によるタンパク質バンドが出現したと考えられる。今後 HMBP 精製システムを構築して実用化を目指す。

4 おわりに

本研究では、重金属の中でも銅に対して親和性を有する活性汚泥細菌由来の HMBP をコードする HMBP 遺伝子を用いた HMBP クローニングシステムの構築に成功した。本研究で得られた HMBP 発現に関する様々な知見により、HMBP を用いた水中重金属除去技術の実現可能性が高まったと考えられる。

参考文献

- 1) T.Antsuki, et al. 2003. Functional metal-binding proteins by metal-stimulated bacteria for the development of an innovative metal removal technology. *Water Science and Technology* 47, 109-115
- 2) Rudolf F.Zirwes, et al. 1997. Identification of a small, very acidic constitutive nucleolar protein (NO29) as a member of the nucleoplasmin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11387-11392
- 3) Tsuruoka, N, et al. 2003. Collagenolytic Serine-Carboxyl Proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* Strain NTAP-1: Purification, Characterization, Gene Cloning, and Heterologous Expression. *Applied Environmental Microbiology*, Jan. 2003. 162-169
- 4) 東京化学同人, 日本生化学会編, 新生化学実験講座, タンパク質 I, 分離・精製・性質