

# *Microcystis aeruginosa* 由来 AOM の凝集阻害誘因部位 解析のための Phage display の導入

東北大学 学生員 ○高荒智子  
東北大学 学生員 石藤慎吾  
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おり、これらの水域から取水している浄水場では藻類由来有機物 (Algogenic Organic matter: AOM) による凝集阻害が発生している<sup>1)</sup>。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、より効果的な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、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。

本研究では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、藻類由来凝集阻害誘因ペプチドの同定を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 ファージディスプレイの作成

大腸菌 DNA ライブラリ<sup>2)</sup> にヘルパーファージ (VCSM13 Interference-Resistant Helper Phage) を感染させ一晩培養し、遠心して上清を回収することで大腸菌の除去を行った。得られた上清に PEG 沈殿処理を行った後、遠心し上清を捨てた。次いで沈殿したファージを PBS (pH3.0) に溶解させ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ため、アンピシリンを含む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の把握を行った。

### 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

得られた PDL から、凝集阻害誘因部位として機能す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。キレートアフィニティクロマトグラフィの原理を図 1 に示す。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, pH3.0) 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 となるように  $AlCl_3$  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  $Al^{3+}$  (塩化アルミニウム由来) を固定化した。静置後開始バッファー 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  $Al^{3+}$  と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, pH3.0) 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 ( $OD_{600}=0.3\sim0.5$ ) に感染させ、ヘルパーファージの再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 回繰り返すを行い、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。

### 2.3 藻類由来凝集阻害誘因ペプチド遺伝子解析

得られた凝集阻害誘因ペプチドを提示するファージは *E. coli* JM109 に感染させ、アンピシリンを含む寒天培地で一晩培養後、21 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に含まれる藻類由来インサート DNA を DNA シーケンサーで解析することにより、凝集阻害誘因ペプチドの塩基配列を解読し、その結果を基にアミノ酸配列を決定した。

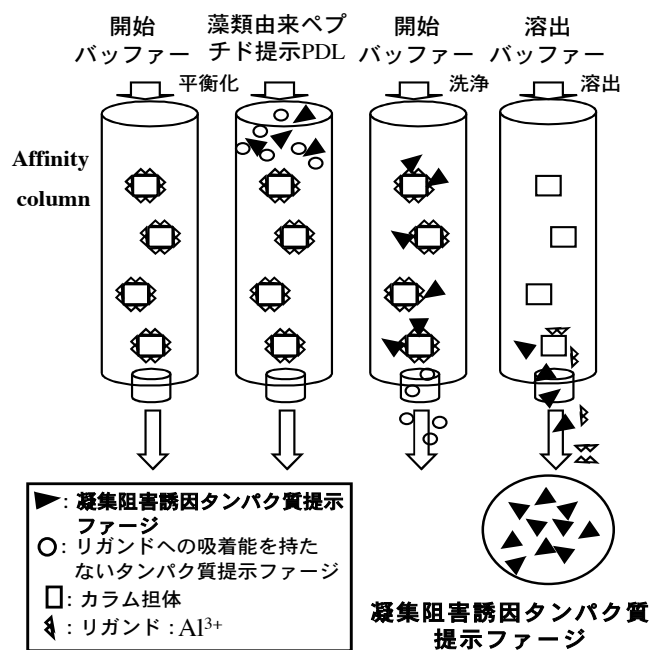


図1 アフィニティクロマトグラフィ原理.

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 キレートアフィニティクロマトグラフィ結果

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た. 収率の増加はキレートアフィニティクロマトグラフィによって  $Al^{3+}$  と錯体形成能を持たないファージが洗浄され, 目的のペプチドを提示したファージの割合が増加したためと考えられる. ファージの収率結果より 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であると予想されることから, 4th Output で得られたファージの遺伝子配列解析を行った.

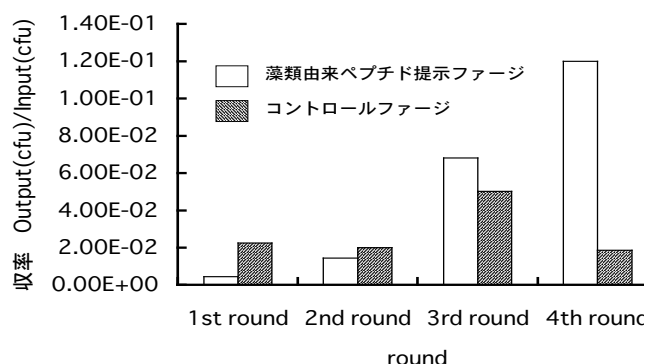


図2 キレートアフィニティクロマトグラフィ収率結果.

#### 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 21 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 4 クローン得られた. 他のファージは読み枠がずれたり, 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配列を示した

アルミニウムとの吸着に関与する可能性のあるアミノ酸として, 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, チロシンなどが知られている<sup>3)</sup>. 本実験で得られたペプチド 1 にはヒドロキシル基を有するチロシンの比率が 18% であり期待値 (3%) より高いことが確認された. またペプチド 4 はセリンを含む比率が 22% で期待値 (9%) より高く, さらにスレオニンに関しても 15% と期待値 (6%) より高い比率を示した. これらの結果より, 今回得られたペプチドに含まれるアミノ酸残基におけるヒドロキシル基が  $Al^{3+}$  との錯体形成に寄与した可能性があることが示唆された.

表1 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.

| 試料名   | 配列                                      | 残基長 |
|-------|-----------------------------------------|-----|
| ペプチド1 | MPKLEYSYR                               | 9   |
| ペプチド2 | MPARAFVLKFSR                            | 12  |
| ペプチド3 | MAQFNLWLKFFDIDNV<br>PLGNQETAYSIIISMP SR | 34  |
| ペプチド4 | MIMSSLPTQSADTLENSTR                     | 19  |

### 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にはセリン及びチロシン, スレオニンの割合が比較的高いことが示唆された.

### 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. Rongjun Zuo, Dogan Ornek, Thomas K. Wood, Aluminum-and mild steel-binding peptides from phage display, Appl. Microbiol. Biotechnol. 168, pp. 505-509, 2005.