

(14) 銅吸着能を有する活性汚泥中タンパク質の検索

Survey of copper-binding proteins in the activated sludge culture

安附太郎*, 佐野大輔*, 福士謙介*, 大村達夫*

Taro ANTUKI*, Daisuke SANO*, Kensuke FUKUSHI*, Tatsuo OMURA*

Abstract; The toxic metal pollution is one of the major problems in environmental waters. Although the metal pollution has not been recently reported because of the development of successful removal technologies, the problem at relatively low concentration of metals still remains. The enhanced recovery of metals from water and wastewater becomes the social needs because metals have the toxicity to humans even at such low concentrations.

Metals in wastewater adsorb easily to proteins in activated sludge and metals adsorbed are immediately dissociated with the increase of hydrogen ion concentration. These properties are available for both a metal recovery from environmental waters and a recycling after the metal recovery.

In this study, proteins that had the high affinity to copper (copper-binding proteins) were isolated from activated sludge culture using the affinity chromatography. As the result of the SDS-PAGE, the proteins were divided into two groups by their molecular weights. One group was from 43kDa to 30kDa and another was less than 30kDa. The latter group was the copper-binding proteins produced when copper ion was present as an inducer in the activated sludge culture.

Key words; *copper-binding proteins; activated sludge; affinity chromatography; SDS-PAGE*

1. はじめに

重金属は家庭排水や一般廃棄物、また発電や各種工場など様々な人間活動を介して環境中に放出されており、その放出源は多様になっている¹⁾²⁾。さらに重金属の環境中への放出量は年々増大している²⁾。ところが過去における高濃度の重金属汚染とは異なり、現在では水質基準前後の希薄濃度での重金属汚染が問題となっており、1級河川においては信濃川、北上川、淀川、神通川等が重金属に汚染される河川として知られている。重金属は微量でも強い毒性を示し、また生体内に蓄積することにより悪影響を及ぼすことから、それら環境中に放出された微量重金属の除去対策が必要であると考えられている²⁾。高濃度の重金属除去に関しては物理化学的処理などで大部分が除去できるが、希薄濃度における重金属の除去に関してはそれぞれの除去方法において現在問題を抱えている。例えば、活性炭による吸着除去の場合、一度吸着した重金属を遊離するのが難しく³⁾、重金属の回収・再利用、もしくは吸着剤の再生という要望には応えられない。

そこで本研究では、下水処理場における活性汚泥法、その中でもとりわけ活性汚泥中のタンパ

*東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University)

ク質に着目した。活性汚泥は排水に含まれる重金属の大部分を吸着除去することが知られているからである⁹⁾。活性汚泥法は、生物処理であるためあまりに高濃度の重金属が流入する場合には汚泥中の微生物が障害を受ける反面、低濃度での重金属をよく吸着すること、少量の塩を加えたり、pHを変化させるだけで、吸着した重金属を比較的容易に遊離するといった、他の方法に比べて優れた特質を持っている。そしてこれらの特質は主にタンパク質に由来するものであると考えられている^{5) 6) 7)}。よって、現在問題となる希薄濃度での重金属の除去・回収、さらには、将来的な資源リサイクル問題を考えた場合、活性汚泥中タンパク質を利用した重金属の吸着除去技術は非常に有効な手段として期待できる。

そこで今回の実験においては、活性汚泥により吸着される重金属は細菌の細胞膜や細胞壁、細胞外高分子等に結合するという報告^{8) 9)}に基づき、銅を特異的に吸着するタンパク質や銅に親和性の高いタンパク質（以後銅吸着タンパク質）を汚泥中細菌の膜タンパク質の中から検索することを試みた。重金属を特異的かつ選択的に吸着するタンパク質が検索されれば、新規な重金属除去技術の開発、およびタンパク質の実用化の際に極めて有効な吸着剤となる可能性があるからである。

2. 実験方法

微生物が重金属のような毒性物質に対して耐性を持つように、それら毒性物質を吸着するような細胞外高分子等をより多く産出したり、重金属吸着能を有する新たな高分子を発現することが知られおり、新たな高分子の発現を誘発する重金属はInducerと呼ばれている^{5) 6)}。Inducerの濃度は出来る限り低い方が望ましいが、低すぎると新たなタンパク質の発現は起こらず、逆に高すぎると微生物の増殖に障害を与える可能性がある。そこで本実験ではまず始めに、活性汚泥中細菌に対するinducerとしての最適な培養時銅濃度の決定を行った。具体的には活性汚泥の細菌を、8段階の銅濃度を含む液体培地中で培養し、培養後に細菌のタンパク質を抽出した。各段階の培養時銅濃度における単位タンパク質当たりの銅吸着量を比較し、Inducerとして好ましい培地の銅濃度を決定した。培養時銅濃度の選択におけるフローを図1に示した。

続いて銅吸着タンパク質の検索を行った。まず銅を（選択された銅濃度で）添加した場合と添加しない場合について、活性汚泥中細菌の培養を行った。培養後に細菌中からタンパク質を抽出し、アフィニティークロマトグラフィによって、銅吸着タンパク質を分離した。その後、分離された物質が確かにタンパク質であることの確認と分子量の推定をSDS-PAGEにより行った。銅吸着タンパク質の検索方法のフローを図2に示した。

本実験においてはタンパク質の抽出は膜タンパク質の代表的な抽出方法¹⁰⁾を参考にして行っている。したがって、抽出タンパク質は主に膜タンパク質により構成されており、本論文では特に断りがない限りタンパク質は膜タンパク質を指すものとする。

2.1 培養時の最適銅濃度の決定までの実験手順

(1) 活性汚泥中細菌の培養および収集

標準活性汚泥法の行われている仙台市内の下水処理場より採取した返送汚泥(MLSS 5800mg/l)を遠心分離し(1000 × g, 10min, 4℃)、その上清を普通ブイヨン培地に加え好気培養した(24h, 20℃)。この際、重金属を添加した培地で培養した微生物は重金属吸着能力が増強されるという報告⁹⁾に基づき、培地の銅濃度がそれぞれ0, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5mMとなるように塩化銅を加えた。

培養後、培養液を遠心分離し(3000 × g, 15min, 4℃)、菌体をペレットとして収集した。その後、ペレットに50mM トリス塩酸緩衝液(以後 Tris-HCl)を加え、ペレットの洗浄(以後洗菌と記す)を行った。洗菌は2回繰り返した。

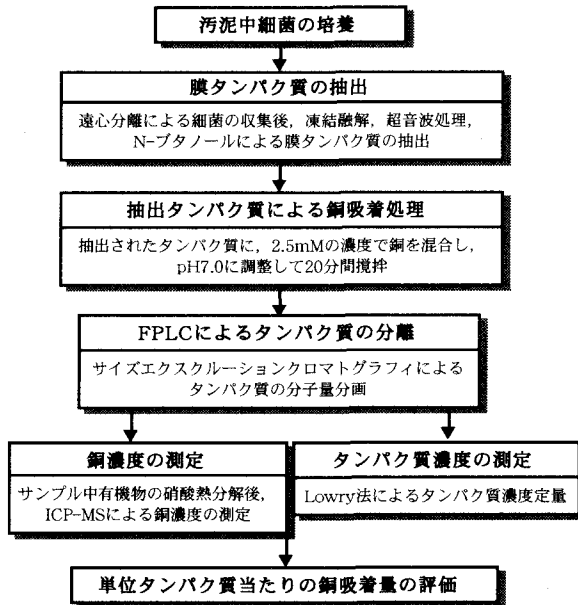


図1. 最適な培養時銅濃度決定までの実験フロー

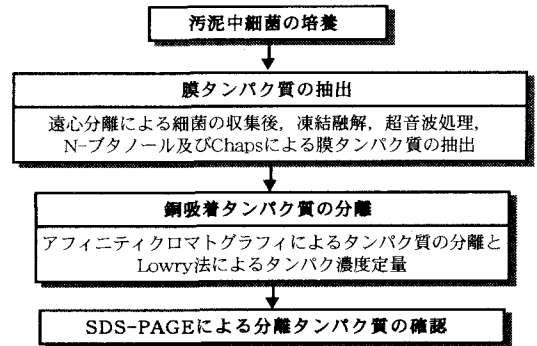


図2. 銅吸着タンパク検索の実験フロー

(2) 細菌由来のタンパク質の抽出

洗菌後のペレットを凍結融解後 (-80℃/30℃), 超音波処理 (50w, 2min) により細菌細胞の破碎を行い, Tris-HClを加え遠心分離 (20,000 × g, 90min, 4℃) を行った. 遠心分離後のペレットにノルマルブタノール (以後N-ブタノール) 10ml, Tris-HCl 10mlを加え, 再び超音波処理 (50w, 1min) を行った. その後, 遠心分離 (20,000 × g, 10min, 4℃) を行い, ペレットとN-ブタノール層の中間に生成される水層を回収し, 抽出タンパク質とした.

(3) 抽出タンパク質による銅吸着処理

抽出したタンパク質による銅吸着量を調べるために, まず抽出タンパク質による銅吸着処理を行った. 吸着は抽出タンパク質に塩化銅溶液を銅濃度2.5mMになるように混合し, pH7.0に調整後, スターラーで20分間攪拌することにより行った. この際, Tris-HClと塩化銅溶液のみを混合したものをcontrolとした. 吸着処理は $23 \pm 3^\circ\text{C}$ の条件下で行った.

(4) サイズエクスクルーションクロマトグラフィによるタンパク質の分子量分画

(3) の混合液を $0.45 \mu\text{m}$ のPVDFフィルターで濾過し, 濾過液をÄKTA FPLC (Amershampharmacia biotech) のサイズエクスクルーションクロマトグラフィにより分子量ごとに分画した. カラムはsuperdex75HR10/30(Amershampharmacia biotech)を用いた. バッファーは50mMのTris-HCl (pH 7.2) を使用し, 流速は0.5ml/minとした. 分画されたタンパク質溶液はフラクションとして2mlずつ回収し, Lowry法に従い直ちに濃度定量を行った. 定量はDC-PROTEIN ASSAY KIT (BIO-RAD, U.S.A.)を用い, 牛血清アルブミンを標準タンパク質としてタンパク質濃度の定量を行った. また, (2) の抽出タンパク質を $0.45 \mu\text{m}$ のPVDFフィルターで濾過したものも同様の条件でサイズエクスクルーションクロマトグラフィにより分画した. その後, 得られたフラクションのタンパク質濃度定量を行うことにより活性汚泥中の細菌が産出する膜タンパク質がどのように構成されるかについての検討を行った.

(5) 銅吸着量の評価

分画されたタンパク質に吸着された銅の量をICP-MS (4500 series, Hewlett Packard)により測定した。この際、前処理としてUSEPAに採用される方法¹³⁾により有機物の熱分解を行った。ここで測定された銅濃度および(4)で測定されたタンパク質濃度から、単位タンパク質当たりの銅吸着量を評価した。

2.2 銅吸着タンパク質検索の実験手順

(1) 銅吸着タンパク質検索のための活性汚泥中細菌の培養および収集

活性汚泥中細菌の培養は2.1 (1)と同様の手順で行った。この際、銅濃度が0.5mMとなるように培地に塩化銅溶液を加えた。ただし、洗菌は20mM リン酸ナトリウム緩衝液を用いて行った。

(2) 細菌由来のタンパク質の抽出

銅吸着タンパク質の検索は2種類の手法から抽出したタンパク質の中から行った。一つは有機溶媒(N-ブタノール)による抽出で、もう一方は界面活性剤(Chaps)による抽出である。以下にそれぞれの抽出方法を示す。

1) 有機溶媒(N-ブタノール)によるタンパク質の抽出

有機溶媒によるタンパク質の抽出は2.1 (2)と同様の手順で行った。ただし抽出タンパク質をアフィニティクロマトグラフィに用いる際、Tris-HClはリガンドとタンパク質の結合を弱める傾向があり、金属-タンパク質間の親和性がかかなり強い場合にしか用いられないので、ここではTris-HClの代わりに20mM リン酸ナトリウム緩衝液を用いた。また、抽出タンパク質を0.45 μ mのPVDFフィルターで濾過し、濾過後のタンパク質をアフィニティクロマトグラフィに用いるサンプルとした。

2) 界面活性剤(Chaps)によるタンパク質の抽出

湿重量1gのペレットに1%濃度Chaps溶液を1mlの割合で混合し、スターラーで攪拌した(4℃, 1h)。遠心分離後(20,000 $\times$ g, 30min, 4℃)、上層に形成される水層を回収し、抽出タンパク質とした。抽出したタンパク質は界面活性剤による変性を防ぐため、直ちに透析処理を行った。具体的には透析膜(分画分子量12,000~14,000)に抽出タンパク質を入れ、4℃の20mM リン酸ナトリウム緩衝液中で1時間スターラーを用いて攪拌を行うことにより、脱塩および界面活性剤の除去を行った。透析後のタンパク質を0.45 μ mのPVDFフィルターで濾過し、フィルター後のタンパク質をアフィニティクロマトグラフィに用いるサンプルとした。

(3) 抽出タンパク質のアフィニティクロマトグラフィによる分離

銅吸着タンパク質の分離には、金属キレートアフィニティクロマトグラフィを用いた。カラム担体に結合させるリガンドとして、Cu²⁺を用いて実験を行った。また、リガンドに吸着したタンパク質の溶出はpHの変化のみで行った。図3にアフィニティクロマトグラフィの概略図を示す。

実験手順は、AKTA FPLC (Amershampharmacia biotech)によるアフィニティクロマトグラフィハンドブックに従うものとし、抽出したタンパク質から銅に吸着するタンパク質の分離を行った。アフィニティクロマトグラフィカラムはHitrap chelating(1ml)を用いた。リガンドに用いる銅は、0.1mMのCuCl₂水溶液によりカラム担体に結合させた。

開始バッファーは0.5M NaClを含む20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)とし、サンプル添加後は5カラム分以上の十分な量の開始バッファーを流すことにより、リガンドに結合しなかったタンパク質を洗い流した。次に、溶出バッファーにより、リガンドに結合したタンパク質の溶出を行った。溶出バッファーは0.5M NaClを含む20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH3.5)とし、この際のフラクションを2mlずつ回収することにより、リガンドに特異的に結合したタンパク質の分離回収を行った。この実験は流速0.4ml/minとし、23 $\pm$ 3℃の条件下で行った。

回収したタンパク質はLowry法に従い直ちに濃度定量を行った。定量は2.1 (4)と同様に行った。

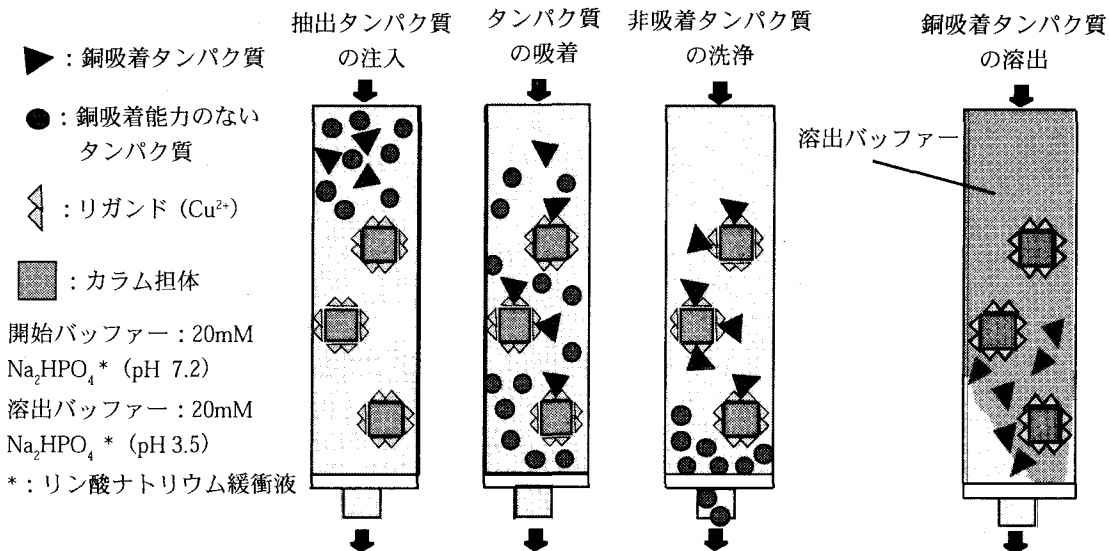


図3. アフィニティクロマトグラフィによる銅吸着タンパク質分離の概略図

(4) SDS-PAGEによる分離タンパク質の確認

アフィニティクロマトグラフィの結果とタンパク質濃度定量の結果から、分離回収したタンパク質の内、高濃度のタンパク質が含まれると判断されたフラクションに対しSDS-PAGEによる電気泳動を行い、分離された物質がタンパク質であることの確認および分子量の推定を行った。分離ゲル濃度は10%とし、ゲルサイズは100mm×100mm×0.75mmとした。泳動は20mA/ゲルの定電流のもとで1時間行った。染色はCBB染色および銀染色により行った。

3. 実験結果および考察

3.1 最適な培養時銅濃度の決定

(1) タンパク質の分子量分画の結果

抽出タンパク質（銅吸着処理前）の分子量分画の一例として、培養時銅濃度0.5mMの場合を図4に示す。他の銅濃度で培養したものについても、フラクション1とフラクション6にピークが現れる同様の結果が得られた。また全ての培養時銅濃度における、それぞれのフラクションのタンパク質濃度を表1に示す。

図4と表1の結果から、クロマトグラフィのピークとタンパク質濃度が必ずしも一致しないことが分かるが、全ての培養時銅濃度においてフラクション1とフラクション6に比較的高濃度のタンパク質が含まれることがわかった。そこで以後の実験においては高濃度のタンパク質が含まれると考えられた、フラクション1とフラクション6に含まれるタンパク質について銅吸着量を考察することにした。また、以後の考察においてはフラクション1の画分位置に含まれるタンパク質をタンパク質画分1、フラクション6の画分位置に含まれるタンパク質をタンパク質画分2とする。

表1においてタンパク質画分1の培養時銅濃度ごとのタンパク質濃度を比較した場合、培養時銅濃度の増加に伴いタンパク質濃度の減少が見られた。これは培養時に銅を添加することにより、細菌の増殖に障害が起きているためと解釈できる。銅無添加で培養した場合においては高濃度のタンパク質が検出されているため、銅添加培養での細菌増殖の障害が顕著に現れたと考えられた。一方、タンパク質画分2においては培養時銅濃度の増加に伴うタンパク質濃度の減少は顕著に見られなかった。こ

表1. 抽出タンパク質（吸着処理前）の各フラクションにおけるタンパク質濃度

Fraction No	培養時銅濃度 (mM)							
	0.00	0.01	0.10	0.25	0.50	1.00	1.50	2.50
	タンパク濃度 (mg/l)							
1 (タンパク質画分1)	443.9	217.8	147.8	209.1	213.3	228.9	165.8	137.9
2	169.5	250.0	131.9	122.4	115.4	112.5	140.2	96.0
3	69.3	84.5	90.6	97.6	75.1	87.3	82.2	61.1
4	55.3	80.5	100.7	68.5	59.9	82.4	79.5	74.3
5	51.7	84.0	84.3	108.4	113.7	88.9	75.0	82.4
6 (タンパク質画分2)	96.5	128.8	145.4	113.8	128.8	137.7	123.1	88.0
7	135.6	121.8	123.3	91.7	123.6	86.1	83.9	59.7

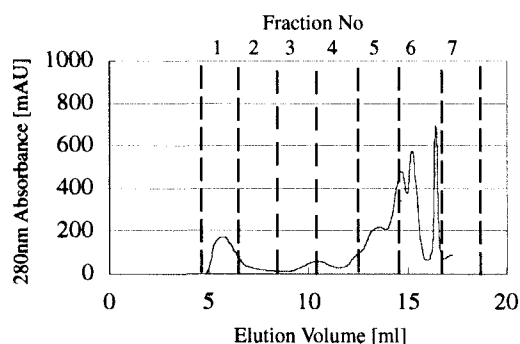


図4. 培養時銅濃度 0.5mM における抽出タンパク質（銅吸着処理前）の分子量分画の結果

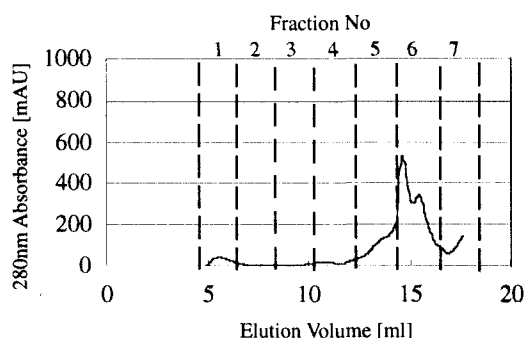


図5. 培養時銅濃度 0.5mM における銅吸着処理後のタンパク質の分子量分画の結果

れは培地に銅を添加することにより細菌が産出するタンパク質がこの画分位置に含まれるか、銅に耐性を持つ細菌が、この画分位置に含まれるタンパク質を多く産出する等の可能性が考えられるが、明確な理由については今後の研究で明らかにする必要がある。

銅吸着処理後のタンパク質の分子量分画の一例として培養時銅濃度 0.5mM の場合を図5に示す。図5から銅吸着処理後のタンパク質においても抽出タンパク質の分子量分画と同様に、フラクション1とフラクション6にピークが現れることが分かる。他の銅濃度で培養したものについても同様の結果が得られた。ただし、塩化銅溶液と Tris-HCl のみを混合した control については図5に見られるようなピークは見られなかった。

(2) 銅吸着量の比較

今回着目したタンパク質画分1とタンパク質画分2についての銅吸着量の比較を表2と表3に示す。ここで表中の単位(mg/l)は、分子量分画で得られたフラクションの単位体積に含まれるタンパク質の質量または銅の質量を表す。銅吸着処理後、タンパク質画分1とタンパク質画分2のどちらにおいても、control に比べて明らかに高濃度の銅が測定された。これらの銅はサイズエクスクルーシオンクロマトグラフィの性質上、タンパク質と吸着状態にあったと考えられる。そこで、単位タンパク質当たりの銅吸着量を評価した。

単位タンパク質当たりの銅吸着量を比較した場合、タンパク質画分1については培養時銅濃度を

表2. 吸着処理後における
タンパク質画分1の銅吸着量

培養時銅濃度 (mM)	タンパク質濃度 (mg/l)	吸着した銅濃度 (mg/l)	銅吸着量	
			(mg/g)*	(mol/mol)**
control	—	0.05	—	—
0.00	408.8	0.41	1.0	1.1
0.01	215.4	0.60	2.8	3.1
0.10	153.3	0.33	2.2	2.4
0.25	194.0	0.38	2.0	2.2
0.50	40.6	2.70	66.5	73.3
1.00	75.6	0.77	10.2	11.2
1.50	41.4	4.20	101.4	111.8
2.50	61.1	1.10	18.0	19.8

*単位タンパク質 (g) 当たりに吸着された銅質量 (mg)

**単位タンパク質(mol)当たりの銅吸着量(mol)

表3. 吸着処理後における
タンパク質画分2の銅吸着量

培養時銅濃度 (mM)	タンパク質濃度 (mg/l)	吸着した銅濃度 (mg/l)	銅吸着量	
			(mg/g)*	(mol/mol)**
control	—	0.06	—	—
0.00	139.3	0.47	3.4	0.5
0.01	123.2	0.18	1.5	0.2
0.10	143.6	0.17	1.2	0.2
0.25	128.4	40.00	311.5	49.1
0.50	44.9	21.50	479.3	75.5
1.00	91.2	18.90	207.2	32.6
1.50	73.9	0.34	4.6	0.7
2.50	34.0	6.67	196.2	30.9

*単位タンパク質 (g) 当たりに吸着された銅質量 (mg)

**単位タンパク質 (mol) 当たりの銅吸着量 (mol)

0.5mM以上にした場合、タンパク質画分2については0.25mM以上にした場合に、銅吸着量に明らかに大きな変化が見られた。これはInducerとして培地に添加した銅により、細菌が銅吸着能力の高いタンパク質を発現したためと解釈できる。タンパク質画分1、タンパク質画分2の二つのタンパク質について同時に銅吸着量を増加させるには0.5mM以上の銅濃度が必要となる。しかしながら培地の銅濃度を高くすると微生物の増殖に阻害がおき、回収されるペレットが減少する傾向があるため、銅に親和性をもつタンパク質の検索はタンパク質画分1、タンパク質画分2の両方に吸着量の増加が見られる最低の銅濃度0.5mMで培養した細菌から抽出したタンパク質により行うことにした。

3.2 銅吸着タンパク質の検索結果

(1) アフィニティクロマトグラフィによる銅吸着タンパク質の分離

銅をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィの結果を図6～図9に示す。図6および図7には銅無添加培養および銅添加培養のN-ブタノール抽出タンパク質、図8および図9には銅無添加培養および銅添加培養のchaps抽出タンパク質をアフィニティクロマトグラフィにより分離した結果を示す。全ての図から分かるように、銅に吸着しないタンパク質はカラムを素通りし開始バッファーにより洗い流されるので、最初の段階で大きなピークとなって現れるのが分かる。一方、リガンドの銅に吸着したタンパク質は溶出バッファーを流し始めた後に洗い流され、低いピークになって現れるのが分かる。

(2) 分離タンパク質のSDS-PAGEによる確認

アフィニティクロマトグラフィの結果から、銅吸着タンパク質の分離が行われたと考えられた。しかし、クロマトグラフィに用いる紫外線吸光度 (280nm) はベンゼン環に吸光を示すものであり、さらにCu²⁺にも吸光を示すことから、タンパク質以外の物質や溶出時にカラムから解離したCu²⁺が吸光を示した可能性も否定できないため、この結果だけから分離された物質がタンパク質であると結論するのは早計である。そこで、SDS-PAGEを行うことにより分離物質が確かにタンパク質であることを検証した。

溶出開始時からのフラクションを全て回収し、フラクションごとのタンパク質濃度を測定した結果を表4に示す。比較的高濃度のタンパク質が検出されたNF1～NF6、CF1～CF6の計12サンプルについてSDS-PAGEによる電気泳動を行った。ここでNF1～NF6、CF1～CF6の頭文字であるN、CはそれぞれN-ブタノール抽出、Chaps抽出を意味し、添え字の数字はSDS-PAGEに用いた際のゲルのウェル番号と対応させた。

SDS-PAGEの結果を図10と図11に示す。この結果から、NF6とCF6以外についてはアフィニティクロマトグラフィにより分離された物質がタンパク質であることが確認された。NF6とCF6については上に述べた理由等により、タンパク質以外の物質が回収されたものと考えられる。

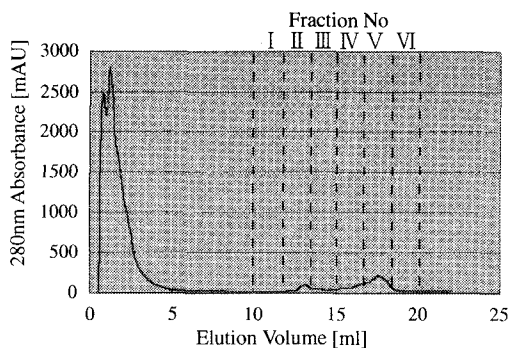


図6. アフィニティークロマトグラフィの結果
(培養時銅濃度 0mM, N-ブタノール抽出)

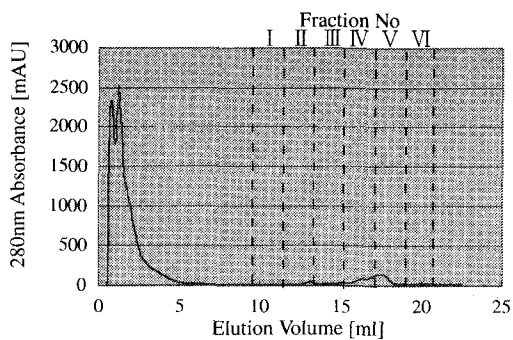


図7. アフィニティークロマトグラフィの結果
(培養時銅濃度 0.5mM, N-ブタノール抽出)

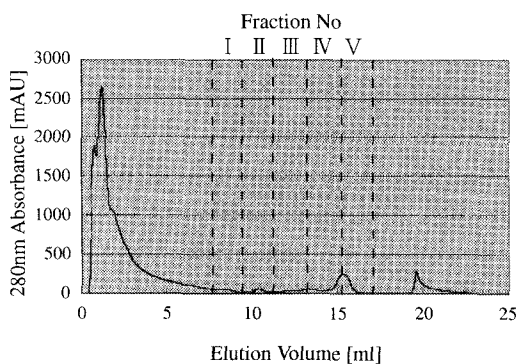


図8. アフィニティークロマトグラフィの結果
(培養時銅濃度 0mM, Chaps 抽出)

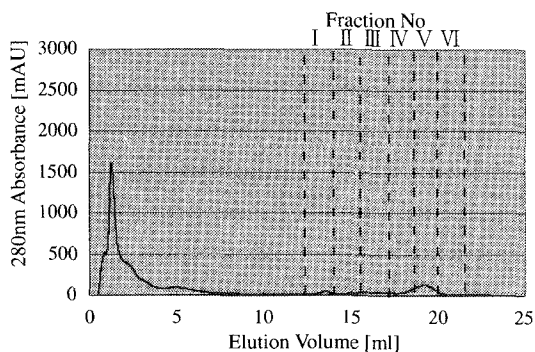


図9. アフィニティークロマトグラフィの結果
(培養時銅濃度 0.5mM, Chaps 抽出)

表4. アフィニティークロマトグラフィ後の各フラクションのタンパク質濃度

Fraction No	N-ブタノール抽出 培養時銅濃度		Chaps抽出 培養時銅濃度	
	0mM	0.5mM	0mM	0.5mM
	タンパク濃度 (mg/l)			
I	—	9.7	4.2	—
II	34.9 (NF1)	33.4	51.8	25.4
III	72.8 (NF2)	58.4 (NF4)	73.8 (CF1)	71.0 (CF4)
IV	88.5 (NF3)	99.1 (NF5)	104.9 (CF2)	84.9 (CF5)
V	7.7	62.2 (NF6)	76.1 (CF3)	28.2
VI	—	10.2	—	73.2 (CF6)

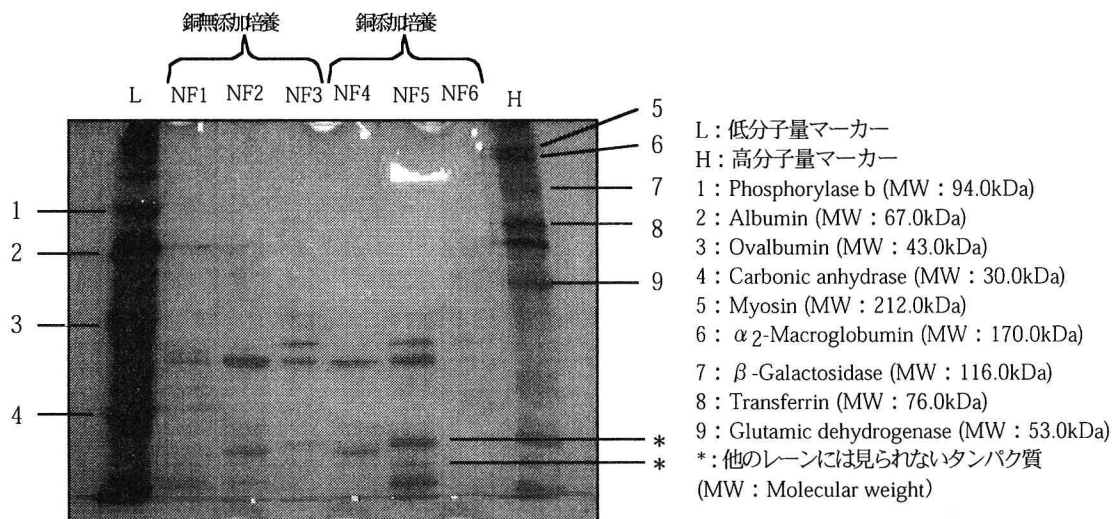


図 10. SDS-PAGE によるアフィニティ分離タンパク質の確認 (N-ブタノール抽出)

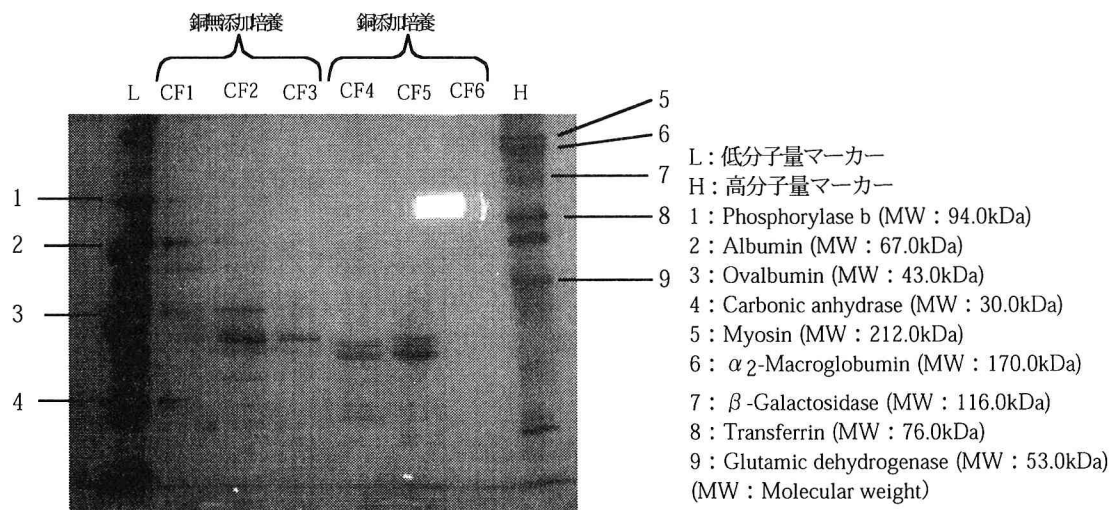


図 11. SDS-PAGE によるアフィニティ分離タンパク質の確認 (Chaps 抽出)

(3) N-ブタノール抽出タンパク質について

図10から銅吸着タンパク質は分子量43kDaと30kDa以下のグループに大別することができた。このことから、汚泥中細菌が産出するタンパク質のうち銅吸着タンパク質は比較的低分子量のタンパク質であることが判明した。分子量43kDaと30kDaのタンパク質では銅無添加培養と銅添加培養とで、SDS-PAGEにより確認されたバンドに差は見られなかった。それに対し、分子量30kDa以下のタンパク質では、銅無添加培養で抽出し分離されたタンパク質であるNF1～NF3には見られないバンドが、銅添加培養で抽出・分離されたタンパク質であるNF5に見られた(図10 *参照)。これは培養時にInducerとして添加した銅により、汚泥中の細菌が銅に親和性を持つタンパク質を発現した結果現れた可能性がある。環境中に存在する毒性物質に対して、汚泥中の細菌がそれらの物質を吸着するような細胞外高分子を産出することはこれまでも報告されている¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。しかしながら、阻害物質を

添加しない状態では産出されない、もしくは産出されていてもごく低濃度のタンパク質が、Inducerを用いたことにより発現し、実際に分離・確認されたことは非常に興味深い結果である。以上の結果からこれらの新たに発現されたタンパク質は、汚泥中細菌が銅という毒性物質から身を守るために産出したと考えられる。

(4) Chaps抽出タンパク質について

図11より、Chapsにより抽出したタンパク質のうち銅吸着タンパク質は主に分子量43～30kDaの間に存在することが分かった。銅添加培養と銅無添加培養の抽出タンパク質を比較すると、アフィニティークロマトグラフィによって分離されたタンパク質においてはSDS-PAGEのバンドに大きな違いは見られなかった。N-ブタノールで抽出したタンパク質に比べ、30kDa以下の低分子量のタンパク質が見られないのは、Chapsによる抽出では低分子量のタンパク質が回収できなかった可能性が考えられる。

4. 結論

本論文の結論を以下に示す。

- ・汚泥中細菌を培養する際の最適な培地の銅濃度は0.5mMであった。
- ・汚泥中細菌が産出するタンパク質には銅に親和性の高いものが存在することが確認された。
- ・銅に親和性の高いタンパク質の分子量は43kDa～30kDaと30kDa以下であった。
- ・銅をInducerに用いることにより30kDa以下のタンパク質が発現されることが示唆された。

参考文献

- 1) Nriagu, J., Pacyna, J., 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination air, water and solids by trace metals, *Nature*, **134**, 333.
- 2) 滝口洋, 1994. 重金属による地球環境汚染とバイオリメディエーション, バイオリメディエーション(6), 用水と廃水, **36** (12) .
- 3) 井出哲夫, 水処理工学 理論と応用 第2版, 技報堂出版.
- 4) Edward A., 水環境の基礎科学, 技報堂出版.
- 5) Chang D., Fukushi K. and Ghosh S., 1995. Stimulation of activated sludge culture for enhanced heavy metal removal. *Wat. Environ. Res.*, **67**(5), 822-827
- 6) Ghosh S. and Bupp S., 1992. Stimulation of biological uptake of heavy metals. *Wat. Sci. Tech.*, **26**, 227-236.
- 7) Fukushi K., Chang D. and Ghosh S., 1996. Enhanced heavy metal uptake by activated sludge culture grown in the presence of biopolymers. *Wat. Sci. Tech.*, **34** (5-6), 267-272.
- 8) Brown, M., Lester, J., 1979. Metal removal in activated sludge: the role of bacterial extracellular polymers. *Wat. Res.*, **13**, 817-837
- 9) 齊藤寛, 重金属と生物, 博友社.
- 10) 堀尾武一, 蛋白質・酵素の基礎実験法 (改定第2版) 南江堂.
- 11) *Standard Methods for the Examination of water and Wastewater*. 1995. 3030K. 19th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- 12) Shumate S. and Stranberg G., 1985. Accumulation of metals by microbial cells. *Comprehensive Biotechnology* (Moo-Young, M., et al. Eds.), **4**, 235, Press, New York.
- 13) Rudd T., Sterritt R. M. and Lester J. N., 1984. Complexation of heavy metals by extracellular polymers in the activated sludge process. *JWPCF*, **56**, 1260-1268.
- 14) Lion L. W., Shuler M. L., Hsieh K. M. and Ghiorse W. C., 1988. Trace metal interactions with microbial biofilm in natural and engineered systems. *CRC Critical Reviews in Environ. Control.*, **17**, 273-306.
- 15) Beveridge T. J. and Koval S. F., 1981. Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 325-335.