

(37) 凝集阻害を誘因する藻類由来タンパク質の同定を目的としたファージディスプレイの構築

Construction of phage display for identification of algal proteins responsible for the inhibition of coagulation

鈴木孝佳*, 高荒智子*, 佐野大輔*, 大村達夫*

Takayoshi SUZUKI*, Tomoko TAKAARA*, Daisuke SANO* and Tatsuo OMURA*

ABSTRACT; Seasonal overgrowth of cyanobacteria such as *Microcystis aeruginosa* (*M. aeruginosa*) is one of serious problems in semi-closed water area including reservoirs. It is known that algogenic organic matters (AOMs) bring about the inhibition of coagulation on the flocculation process in drinking water treatment systems. Our previous studies have shown that some kinds of protein in AOMs are responsible for the inhibition of coagulation, although the mechanisms of the inhibitory effects of algal proteins remain unclear. In order to reveal the inhibitory mechanism of algal proteins, it is necessary to identify the algal proteins closely related to the inhibition of coagulation. In this study, phage display using the genome of *M. aeruginosa* was constructed to extract algal proteins that exhibit the inhibitory effect on the coagulation. *M. aeruginosa* cells on steady growth phase were collected, and genomic DNA of *M. aeruginosa* cells was extracted. Then, extracted algal DNA was digested by the restriction enzyme *Sau3AI*. The phagemid vector named pSKAN8-EWQ was newly created, in which *Bam*HI recognition site was included as a single site for the restriction enzyme. Digested genomic DNA of *M. aeruginosa* was ligated with pSKAN8-EWQ, and the ligated phagemid vector was used to transform the competent cells of *E. coli* JM109. The cocktail of phages displaying algal proteins was obtained by introducing the helper-phage (VCSM13 Interference-Resistant Helper Phage) into the transformed *E. coli* cells. It was confirmed that obtained phages are able to infect *E. coli* JM109, and transform *E. coli* cells into the ampicillin-resistant strain. This thing indicated that the phage display system for algal proteins was successfully constructed. The phage display established in this study will definitely contribute to identifying the inhibitory algal proteins on the coagulation, and revealing the inhibitory mechanism in the further study.

KEY WORDS; phage display; *Microcystis aeruginosa*; algal proteins; pSKAN8-EWQ; *E. coli* JM109.

1. はじめに

我が国では水道原水全取水量の約 40%をダム湖などの閉鎖性水域から取水しており、これら閉鎖性水域の富栄養化は看過することのできない問題となっている。特に富栄養化によって大量増殖した藻類は、浄水処理において凝集阻害、ろ過障害、異臭味障害などの処理障害を引き起こしている¹⁾。藻類障害の中でも凝集阻害に関しては、1987～1991年の5年間、全国26浄水場において延べ49件もの藻類による凝集阻害が発生していたことが報告されている¹⁾。藻類による凝集阻害は、藻類が分泌する藻類由来有機物 (Algogenic Organic Matter: AOM) が凝集剤成分金属イオンあるいは多価水和物と錯体を形成することや、荷電中和反応を阻害することにより発生すると考えられている²⁾。凝集阻害は凝集処理効率の低下ばかりではなく、塩素とAOMとの反応によるトリハロメタン生成³⁾および処理水中へのアルミニウム残留⁴⁾といった弊害をもたらす。

現在のところ浄水場では、凝集阻害が発生した場合には主に凝集剤注入率を増加させることで対処している。しかし凝集剤注入率を増加することは、凝集剤消費のためのコストが高嵩上、処理過程で発生する汚泥量が増加するために汚泥処理のためのコストも加算される。また我が国ではほとんどの浄水場でアルミニウム系凝集剤が用いられていることから、処理水中へのアルミニウム残留の危険性が増すことが懸念される。凝集処理の効率化、および安全な水道水供給を実現させるためには、凝集剤注入率の増加以外の対策、例え

*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)

ば凝集処理条件の改善や新たな凝集促進剤の開発など、凝集阻害に関する新たな対策が必要不可欠である。

凝集阻害への新たな対策を講じるためには凝集阻害メカニズムの把握が必要であるが、現在のところその解明は完全にはなされていないのが現状である。AOM による凝集阻害は、上述したように AOM と凝集剤中の金属との錯体形成および AOM による荷電中和反応の阻害によるという報告はあるが²⁾、阻害誘因物質の分子構造および物理化学的特性に着目して、凝集阻害メカニズムを解明する試みはほとんど見られない。

そこで本研究では、凝集阻害誘因物質として藻類由来タンパク質に着目した。タンパク質は藻類細胞の主要成分であり、AOM の溶存有機炭素 1mg 中に 146 μ g-N 含まれていると報告されている⁵⁾。また、金属酵素に代表されるように、タンパク質の中には金属と高い親和性を持つ種類もあることから、藻類由来タンパク質が凝集阻害誘因の原因物質になりうると考えた。藻類由来タンパク質による凝集阻害メカニズムを解明するためには、凝集阻害を誘因する藻類由来タンパク質の同定を行い、各タンパク質について大量合成を行った後に、阻害度を決定する必要がある。

本研究では、AOM 中の凝集阻害誘因タンパク質の同定を実現するため、藻類由来タンパク質をファージの尾部に提示させるファージディスプレイ⁶⁾ (図 1) を構築することを目的とした。ファージディスプレイでは、藻類ゲノム DNA 断片をファージミドベクターと結合させ、大腸菌に導入後ヘルパーファージを大腸菌に感染させる。ヘルパーファージが大腸菌に注入する DNA は大腸菌内で子ファージの構成タンパク質を大量に複製する一方、子ファージの DNA はファージミドベクターからのみ与えられる。ファージミドベクターには藻類ゲノム DNA 断片が導入されており、その導入部分がファージの尾部構成タンパク質のコード領域であるため、産生される子ファージの尾部には藻類由来タンパク質が提示される。その後、子ファージは大腸菌内で大量に産生され大腸菌の溶菌によって放出される⁷⁾。したがって、ファージディスプレイを構築すれば、多種多様な藻類由来タンパク質が提示されたファージから凝集阻害に寄与するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィ (図 2) を用いて選択することが可能である⁸⁾。ファージディスプレイの特徴は、アフィニティークロマトグラフィを用いて選択的に凝集阻害誘因タンパク質の分離が可能であること、凝集阻害タンパク質の遺伝子情報が分かり、それに伴いアミノ酸配列も把握できる⁹⁾ので、タンパク質構造を分析できること、そして短時間に大量回収が可能であることが挙げられる。*Microcystis aeruginosa* の DNA を抽出し、ファージに組み込むことで藻類由来タンパク質をファージの尾部に提示させるという試みはこれまでに行われた事例が無く、ここに本研究の新規性があると考えられる。本研究の最終目標は、ファージディスプレイを用いて凝集阻害を引き起こす藻類由来タンパク質の構造を解明し、凝集促進剤の開発や最適な浄水処理条件の提案など、凝集阻害に対する新たな対策を提案することである。そのための第一歩として、今回は凝集阻害に寄与する藻類由来タンパク質を分離するためにファージディスプレイを構築することを目的とした。

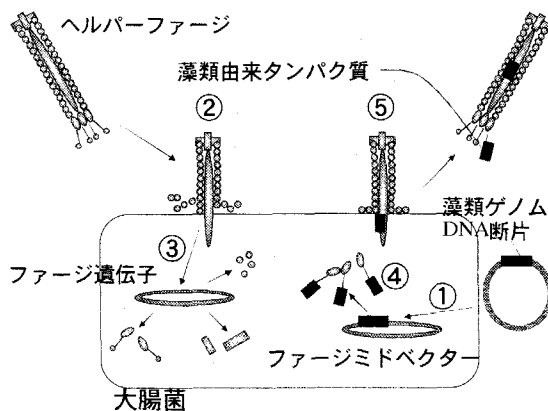


図 1 ファージディスプレイ構築の流れ⁷⁾。①藻類ゲノム DNA 断片を組み込んだファージミドベクターの大腸菌への導入。②ヘルパーファージの大腸菌への感染および一本鎖 DNA の注入。③ヘルパーファージ DNA による子ファージの構成タンパク質の形成。④ファージミドベクター由来の子ファージ遺伝子および子ファージ尾部の形成。⑤子ファージによる大腸菌の溶菌および子ファージの放出。

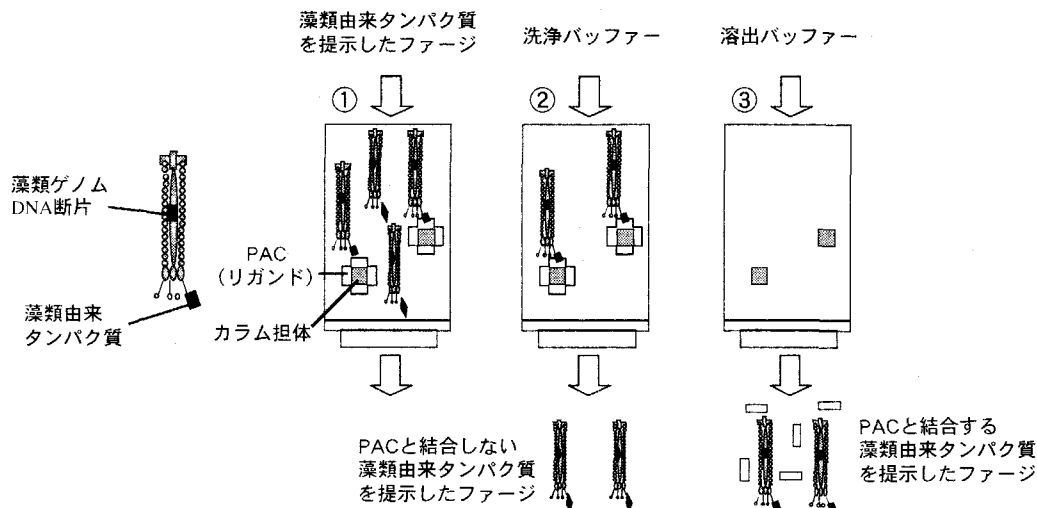


図2 PACをリガンドとして用いたアフィニティクロマトグラフィー実験.

①藻類由来タンパク質を提示したファージの注入. ②PAC と結合しない藻類由来タンパク質を提示したファージの洗浄③リガンドおよび PAC と結合する藻類由来タンパク質を提示したファージの溶出.

2. 実験試料および方法

藻類培養からファージディスプレイ構築までの実験フローチャートを図3に示した.

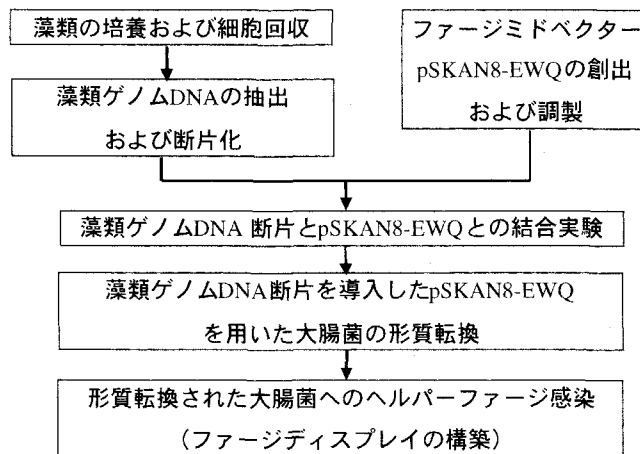


図3 ファージディスプレイ構築のための実験フローチャート.

2.1 藻類の培養および細胞回収

本研究で用いた藻類は、凝集阻害を引き起こすことで知られている藍藻類の *Microcystis aeruginosa* (以下 *M. aeruginosa*) (NIES-91) である. *M. aeruginosa* 培地¹⁰⁾ (以下 MA 培地) 300mL に株藻類を 5mL 入れ、照度 4000lx (12 時間明暗)、温度 25℃、振とう 50rpm の条件で無菌培養した. 初期細胞数をほぼ一定にした培養液

を 500mL 三角フラスコ 3 つを用いてそれぞれ培養し、各サンプル日におけるそれぞれのクロロフィル a 値を測定した。定常期（培養開始から 15 日目）に達した *M. aeruginosa* を 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過し、ろ紙上に残ったサンプルを滅菌棒で採取することで細胞を回収した。回収した藻類細胞は -80℃ で冷凍保存し、使用時に解凍して用いた。

2.2 藻類ゲノム DNA の抽出および断片化

M. aeruginosa はグラム陰性型である¹⁰⁾ことから、DNA 抽出にはフェノール・クロロホルム抽出法を採用した。抽出した DNA に対して制限酵素を混合して 37℃ で 1 時間インキュベートし、DNA 切断を行った。続いて、酵素を取り除くためのフェノール・クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行った。

2.3 ファージミドベクター pSKAN8-EWQ の創出

本実験ではベクターとしてファージミド pSKAN8 (Mo Bi Tec, Germany) を用いた。pSKAN8 と制限酵素 *SacI* および *KpnI* を混合し 37℃ で 1 時間インキュベートし、pSKAN8 を環状から直鎖状に切断した。次に脱リン酸化処理を行い、その後表 1 に示した配列を持つ *Bam*HI サイトを含むプライマーを用いて PCR (95℃ 1 分, 55℃ 30 秒, 72℃ 6 分を 1 サイクルとして合計 30 サイクル) を行うことで、*Bam*HI サイトを唯一の制限酵素認識部位として有する pSKAN8 を創出した（以後 pSKAN8-EWQ）。その後、制限酵素 *Bam*HI を混合して 30℃ で 1 時間インキュベートした。フェノール・クロロホルム処理およびエタノール沈殿によって酵素を取り除いた後、電気泳動を行い出現したバンドの中から pSKAN8-EWQ の塩基数である 5.6kbp に位置する部分を GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (12428, Amersham Pharmacia Biotech Inc) を用いて精製した。その後 pSKAN8-EWQ の自己閉環を目的としたライゲーションを行い、続けて大腸菌に導入した。大腸菌シングルコロニーから *Bam*HI サイトを持つ pSKAN8-EWQ を Miniprep DNA Purification Kit (9085, タカラバイオ株式会社) を用いて抽出・精製した。次に DNA シークエンシングにより pSKAN8-EWQ の塩基配列を解読し、*Bam*HI サイトが確かに存在することを確認した。

表 1 pSKAN8-EWQ 創出実験における PCR で用いたプライマーの塩基配列。

プライマー名	塩基配列 (5'to3')
pSKAN8-EWQ Primer1	TGCGGATCC*TGCGACGGCAACACTTACCCG
pSKAN8-EWQ Primer2	GCAGGATCC*GCAGTTGTAGCATTTAGCTTCACGAC

* *Bam*HI サイト

2.4 pSKAN8-EWQ の調製

pSKAN8-EWQ と制限酵素 *Bam*HI を混合して 30℃ で 1 時間インキュベートした。その後酵素を取り除くためにフェノール・クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行った。次に脱リン酸化処理を行い、その後フェノール・クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行った。

2.5 ファージディスプレイの構築

2.2 および 2.4 で得られた藻類ゲノム DNA 断片および pSKAN8-EWQ を適当な比率で混合し、Ligation high (LGK-101, 東洋紡績株式会社) を 10 μ L 加え 16℃ で 1 時間ライゲーションを行った後、*E. coli* JM109 Competent Cells (9052, タカラバイオ株式会社) に導入するためのトランスフォーメーションを行った。トランスフォーメーション液 1mL のうち 100 μ L をアンピシリンを含む 1 $\times$ LB 寒天培地に撒き、37℃ で一晚培養して大腸菌コロニーを得た。トランスフォーメーション後の残り 900 μ L は試験管内に用意した 1 $\times$ LB 液体培地 10mL に 100g/L のアンピシリン 10 μ L と共に加え 37℃ で一晚培養した。次に、培養液にヘルパーファージ (VCSM13 Interference-Resistant Helper Phage) 10 μ L を加え、37℃ で一晚培養した。その後、遠心分離を 2 回 (35 分, 7000 $\times$ g, 4℃ および 30 分, 10000 $\times$ g, 4℃) 行なって菌体を分離し、上清に存在するファージを回収することでファ

ージディスプレイ溶液 10mL を得た。ファージディスプレイの構築に成功していた場合、得られたファージを大腸菌と混合した際に pSKAN8-EWQ が大腸菌に注入され、pSKAN8-EWQ の持つアンピシリン耐性遺伝子の存在によりアンピシリン存在下で大腸菌が増殖可能となる。そこで 1×LB 液体培地 10mL 中で 37℃ の環境で一晩培養した大腸菌に対して得られたファージディスプレイ溶液 10μL を 100g/L のアンピシリン 10μL と共に加え 37℃で一晩培養した。

2.6 ファージディスプレイ確認実験

2.5 で回収された子ファージを用いてファージディスプレイ構築を確認のためのトランスフォーメーションを行った。まず、2.5 で回収したファージディスプレイ溶液を 0.22μm メンブレンフィルター (MILLIPORE, Ireland) によるろ過を行い、溶菌しなかった大腸菌を取り除くことで子ファージのみを含む水を準備した。その後、子ファージを含む水 10μL を LB 培地中の *E. coli* JM109 Competent (10mL) に添加し、さらにアンピシリン 10μL を加え 37℃で 1 時間培養することで子ファージを大腸菌に感染させた。その後培養液をアンピシリンを含む 1×LB 寒天培地に散布し 37℃で一晩培養後、大腸菌コロニー数を計測した。

3. 結果と考察

3.1 藻類の培養および細胞回収

M. aeruginosa によるファージディスプレイの構築を行うためには、ゲノム DNA を最も多く回収できる定常期において細胞回収することが望ましい。本実験では、培養開始から 15 日目においてクロロフィル a 濃度が最高値 (2.9mg/L) を示したことから、この時点下定常期とみなし培養液を 0.45μm メンブレンフィルターでろ過することにより *M. aeruginosa* の細胞を回収した。

3.2 藻類ゲノム DNA の抽出および断片化

藻類細胞からフェノール・クロロホルム抽出法により得られた抽出 DNA に対して 0.7% アガロースゲル電気泳動を行った結果、抽出された藻類ゲノム DNA は 23kbp 以上の領域に観察された (図 4, レーン 1)。ファージミドベクターと DNA 断片を結合させるためには、切断場所の切り口の形状が同一である必要がある。藻類ゲノム DNA を切断するために本実験では *SacI*, *KpnI* および *Sau3AI* の 3 種類の制限酵素を用いた。*SacI* および *KpnI* は 6 塩基認識で DNA を切断する酵素であり、pSKAN8 が *SacI* サイトおよび *KpnI* サイトを有していることから採用した。一方、*Sau3AI* は 4 塩基認識で DNA を切断するため、より効率的に藻類ゲノム DNA を切断することが可能であるため採用した。制限酵素処理したサンプルに対して 0.7% アガロースゲル電気泳

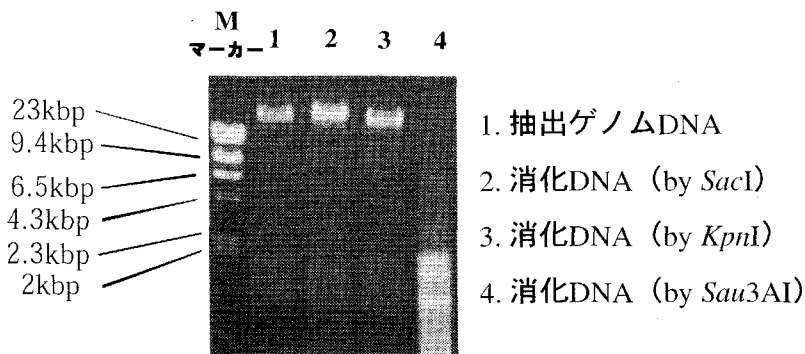


図4 *M. aeruginosa* ゲノム DNA の電気泳動結果。レーン 1 は抽出 DNA、レーン 2-4 は順番に *SacI*, *KpnI* および *Sau3AI* で消化された DNA。

動を行った結果, *SacI* では DNA がほとんど切断されず (図 4, レーン 2), *KpnI* でもわずかしき DNA が切断されない (図 4, レーン 3) ことが確認されたのに対して, *Sau3AI* では 2kbp 以下に DNA が切断されていることが確認された (図 4, レーン 4). *SacI* および *KpnI* は 6 塩基認識で DNA を切断する制限酵素であり, 藻類ゲノム DNA 中に認識配列がほとんど存在しなかったのに対して, *Sau3AI* は 4 塩基認識で切断するため認識配列が多く存在していたものと考えられる. *Sau3AI* 処理された藻類ゲノム DNA 断片をファージミドベクターとのライゲーションに用いた.

3.3 ファージミドベクター pSKAN8-EWQ の創出

前述したように藻類ゲノム DNA とファージミドベクターを結合させるには, 切断場所の切り口の形状が同一である必要がある. したがって, *Sau3AI* で切断された藻類ゲノム DNA とファージミドベクターを結合させるためには, *Sau3AI* と同一の切り口の形状をもたらし *BamHI* サイトがファージミドベクター側に必要となる. もともと pSKAN8 には *BamHI* サイトが存在しないため, 本実験では *BamHI* サイトを持つ pSKAN8-EWQ を PCR により創出する実験を行った. PCR 後の pSKAN8 に対してアガロース電気泳動を行った結果増幅が確認できた (図 5) ので, pSKAN8 に *BamHI* サイトが導入され pSKAN8-EWQ が創出されたと考えられた. この時点で pSKAN8-EWQ は直鎖状であることから, 自己閉環させて環状にするためのライゲーションを行い, 続けて大腸菌に導入し, 大量に複製した. pSKAN8-EWQ を創出した後, DNA シークエンシングにより pSKAN8-EWQ の塩基配列を解読したところ, *BamHI* サイトが確かに存在していることが確認された (図 6). この pSKAN8-EWQ を *BamHI* で切断し, 脱リン酸化処理を行いライゲーションに用いた.

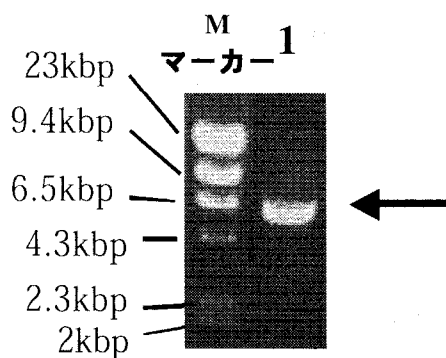


図 5 PCR 後の pSKAN8-EWQ の電気泳動結果. レーン 1 は PCR により得られた pSKAN8-EWQ. 矢印は PCR によって得られた pSKAN8-EWQ の位置を表す.

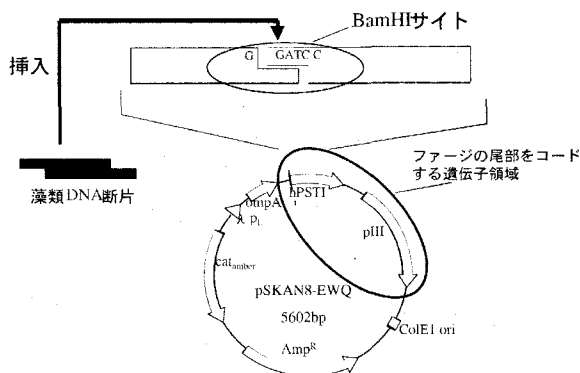


図 6 pSKAN8-EWQ の遺伝子地図.

Amp^R : ampicillin resistance, ColE1 ori : plasmid origin of replication, λ_{P_L} : λ -promoter, ompA : signal sequence for secretion, hPSTI : gene of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor, pIII : gene for the phage coat protein III, cat^{amber} : chloramphenicol resistance is inactive due to an amber mutation

3.4 ファージディスプレイの構築

藻類ゲノム DNA 断片と pSKAN8-EWQ を適当な比率で混ぜ (表 2) ライゲーションを行い, 続けてトランスフォーメーションを行った結果, *M. aeruginosa* ゲノム DNA のライブラリとして大腸菌コロニーが得られた (図 7). ライゲーション液 1 μ L 当たり的大腸菌コロニー数を陽性クローン数 (clones/ μ L) と定義し, その結果を表 2 に示した. これよりベクター量が多いと陽性クローン数が多いという結果が見て取れるが, ベクタ

一量が多いときに危惧されることはベクターが自己閉環してしまうことである。しかし、コントロール実験として故意に自己閉環させたサンプル⑥の陽性クローン数が $1.4 \times 10^6 \text{ clones}/\mu\text{L}$ であったという結果から、サンプル⑤で得られた $1.5 \times 10^2 \text{ clones}/\mu\text{L}$ の陽性クローン数のうち、自己閉環したものは僅かであると考えられた。

得られた $1.5 \times 10^2 \text{ clones}/\mu\text{L}$ の陽性クローン数の大腸菌コロニーの中から 20 個を無作為にピックアップし、DNA シークエンシングにより塩基配列を解読したところ、20 個全て異なる配列が pSKAN8-EWQ に組み込まれていることを確認した。陽性クローン数 $1 \text{ clones}/\mu\text{L}$ は、藻類ゲノム DNA 断片を結合させた pSKAN8-EWQ が $1 \text{ clones}/\mu\text{L}$ 存在することを意味している。トランスフォーメーション時にプレートに撒いたサンプル量がサンプル量全体の 1/割であること、および陽性クローン数が最大で $1.5 \times 10^2 \text{ clones}/\mu\text{L}$ 得られたということから考えると、本実験では $10^3 \text{ clones}/\mu\text{L}$ のオーダーで多種多様な藻類ゲノム DNA 断片が良好に大腸菌に導入されたものと考えられ、*M. aeruginosa* に関するゲノム DNA ライブラリが構築されたものと考えられた。

次に藻類由来タンパク質を提示させたファージ粒子を生産させるため、DNA ライブラリ培養液中の大腸菌にヘルパーファージを感染させた。大腸菌に感染したヘルパーファージはファージ粒子の構成タンパク質を生産する働きを有しているが、自己複製能が著しく低いことから、ヘルパーファージ自身は大腸菌内でほとんど増殖しない。大腸菌へのヘルパーファージ感染操作から一晩培養後、大腸菌内で大量に複製した *M. aeruginosa* ゲノムおよび *M. aeruginosa* 由来タンパク質を保持するファージは大腸菌を溶菌する。遠心分離を行いこれらのファージを回収することで子ファージを回収した。

表 2 ライゲーション時のサンプルの配合と陽性クローン数。
陽性クローン数とはライゲーション液 $1 \mu\text{L}$ 当たり的大腸菌コロニー数。

サンプル 番号	DNA 量 (μL)	ベクター量 (μL)	TE*量 (μL)	陽性クローン数 ($\text{clones}/\mu\text{L}$)
①	1	1	8	3.3×10^1
②	1	2	7	2.0×10^1
③	1	3	6	7.5×10^1
④	1	4	5	8.0×10^1
⑤	1	5	4	1.5×10^2
⑥	0	5	5	1.4×10^6

*10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mMEDTA

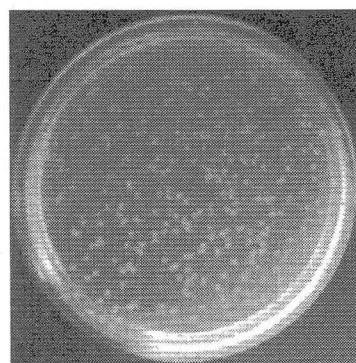


図 7 *M. aeruginosa* ゲノム DNA
ライブラリ。

3.5 ファージディスプレイ確認実験結果

3.4 で回収されたファージディスプレイサンプルを $0.22 \mu\text{m}$ メンブレンフィルターでろ過し、得られた子ファージのみを含むサンプルを用いてトランスフォーメーションを行った。その結果、 $1.2 (\pm 0.5) \times 10^4 \text{ CFU/ml}$ のコロニーが得られた。このことは、 $0.22 \mu\text{m}$ メンブレンフィルターでのろ過後に上清サンプル中に子ファージが存在しており、この子ファージが感染することで大腸菌がアンピシリン耐性を獲得し、アンピシリン存在下での増殖が可能となったことを示している。このことはすなわち、本研究の目指した藻類由来タンパク質のファージディスプレイの構築に成功したことを示していると言える。今後、アフィニティクロマトグラフィーを用いて多種多様な *M. aeruginosa* 由来タンパク質を提示したファージの中から凝集阻害に寄与するタンパク質を保持するファージを分離し、凝集阻害誘因タンパク質を同定することが可能であると考えられる。

4. 結論

凝集阻害を誘因する藻類由来タンパク質に着目し、その同定を目的としたファージディスプレイの構築を試みた。本研究で得られた成果について以下にまとめた。

- *M. aeruginosa* を MA 培地中で照度 4000lx (12 時間明暗)、温度 25℃、振とう 50rpm の条件で無菌培養した後、そのゲノム DNA を抽出した結果、塩基数 23kbp 以上の領域にゲノム DNA が得られた。
- *M. aeruginosa* ゲノム DNA と結合させるために用いたファージミドベクター pSKAN8 に *Bam*HI サイトを導入した pSKAN8-EWQ を新たに創出した。
- ファージミドベクター pSKAN8-EWQ に藻類ゲノム DNA 断片を結合した後、大腸菌に導入し、藻類ゲノム DNA ライブラリを構築した。このときの陽性クローン数は 1.5×10^3 clones/ μ l であった。藻類ゲノム DNA ライブラリから無作為に 20 個ピックアップし、DNA シークエンシングにより塩基配列を解読したところ、全て異なる配列を有していた。得られた陽性クローン数と使用したサンプル量を考慮すると、本実験では 10^3 clones/ μ L のオーダーで多種多様な藻類ゲノム DNA 断片が良好に大腸菌に導入されたものと考えられる。
- *M. aeruginosa* に関するゲノム DNA ライブラリにヘルパーファージを感染させることで、ファージディスプレイを構築した。得られたファージを 1×LB 液体培地で培養した大腸菌にアンピシリンと共に加えた後、アンピシリン存在下で培養を行った。その結果、 $1.2 (\pm 0.5) \times 10^4$ CFU/ml のコロニーが得られた。このことは、0.22 μ m メンブレンフィルターによるろ過後の上清サンプル中に子ファージが存在しており、この子ファージが感染することで大腸菌がアンピシリン耐性を獲得し、アンピシリン存在下での増殖が可能となったことを示している。このことはすなわち、本研究の目指した藻類由来タンパク質のファージディスプレイの構築に成功したことを示していると言える。

参考文献

- 1) 佐藤敦久・真柄泰基編, 上水道における藻類障害—安全で良質な水道水を求めて, 技報堂出版, 1996.
- 2) Bemhart, H., Clasen. : Influence of algogenic organic substances on flocculation and filtration, WISA, 1, pp. 41-57, 1991.
- 3) 福島博, 相沢貴子, 真柄泰基, 藻類増殖過程で生成されるトリハロメタン前駆物質の評価, 水質汚濁研究, Vol.6, No.3, pp.175-182, 1983.
- 4) Charles T. Driscoll and Raymond D. Letterman, CHEMISTRY AND FATE OF AL (III) IN TREATED DRINKING WATER, Journal of Environmental Engineering, 114 (1), 21-37, 1988.
- 5) 菅原繁, 黒川眞弓, 真柄泰基, 胡建英, *Microcystis* spp. コロニーの細胞由来有機物 (AOM) が凝集沈殿処理に与える影響-AOM 中に含まれる有機物の除去特性とその科学的属性-, 水道協会雑誌, No.743, pp.39-50, 1996
- 6) G. P. Smith, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, Science, 228, 1315-1317, 1985.
- 7) 大島泰郎・鈴木紘一・藤井義明・村松喬編, ポストシースエンスタンパク質実験法 3—構造・機能解析の基礎, 東京化学同人, 2002.
- 8) 近藤昭彦, ファージを用いたシステムの基礎および最近の進歩, コンピナトリアル・バイオエンジニアリング, 2 章, p.19-25, 2003.
- 9) 近藤昭彦・曾根崎修司, ファージディスプレイ法による新機能性分子創製の基礎, BIO INDUSTRY, Vol.18, No.6, 2001.
- 10) 西澤一俊, 千原光雄, 藻類研究法, 共立出版, pp.294-305, 1979.
- 11) 藤田善彦・大城香, ラン藻という生きもの, 東京大学出版会, p. 22, 1993.