

(66) 活性汚泥細菌ゲノム DNA ライブラリから取得した新規重金属吸着タンパク質遺伝子

Gene of Heavy Metal-Binding Protein newly acquired from genomic DNA library of activated sludge bacteria

佐野大輔*, 明星賢*, 大村達夫*

Daisuke SANO*, Ken MYOJO*, Tatsuo OMURA*

ABSTRACT: Gene of heavy metal-binding protein (HMBP) was newly isolated from genomic DNA library of activated sludge bacteria. In order to obtain the objective gene on the strength of N-terminal amino acid sequence of HMBP, a set of gene screening method was constructed. The constructed screening method employs CODEHOP method, touchdown PCR and semi-nested PCR, which makes it possible to amplify the specific HMBP gene. Two acidic amino acids (aspartic acid and glutamic acid) occupied 24% of a deduced amino acid sequence of HMBP, and the rate of metal-coordinating amino acids (aspartic acid, glutamic acid, serine, methionine and histidine) among the deduced sequence of HMBP reached 35%. The estimated secondary and tertiary structures revealed that HMBP is composed of abundance of alpha helices in which amino acid side chains expose to outside. A lot of metal-coordinating residues projecting out from the alpha helices would confer the heavy metal-binding ability on HMBP.

KEY WORDS: *heavy metal-binding protein; CODEHOP method; semi-nested PCR; touchdown PCR; metal-coordinating amino acids*

1. はじめに

重金属汚染源への対応として、現在では舗装、覆土、立入禁止、原位置封じ込め、掘削除去等のいずれかの措置を施すことが義務づけられている¹⁾。しかしながら、近年における生産活動の多様化により汚染源の特定が著しく困難となっているのが現状である²⁾。これまでに重金属の蓄積・濃縮による被害の顕在化が河川床や水生生物を中心に報告されており³⁾、特に水環境を介した重金属汚染の拡大が懸念されている。

一方で、増加する重金属使用量に対して重金属の再資源化量はほとんど追いついていないのが現状である。環境問題に対する意識の高まりに呼応し、重金属を含む資源の再利用は1980年代後半から各方面で取り組まれてきたが、金属についてはスクラップの価格が高いアルミニウムや銅を除く非鉄金属回収技術が確立しておらず、十分な再資源化が行なわれていない。また、IT時代に問題となっている使用済みPCからの資源リサイクルに関する予見として、アルミニウム以外の金属ではビジネスモデルが成り立たず、他の金属の再資源化は経済的な面で課題を残しているという報告例もある⁴⁾。資源枯渇問題に対応するために、経済的かつ高効率な重金属の回収・再利用を可能とする新技術の開発が切望されている。

以上のような背景のもと、生物（微生物や植物）を用いた重金属除去・回収技術が注目を集めてきた。中でも生物の重金属蓄積及び代謝能力を利用するバイオレメディエーションを中心とした環境バイオテクノロジーに期待が寄せられている。環境バイオテクノロジーは利用する生物種や物質によって得られる効用に一長一短があるが、新たな汚染物質除去プロセスの構築に加え、資源リサイクルなどの付加価値を生み出すことが可能であり、既存の手法では解決が困難とされている問題の打破に寄与する可能性がある。しかしながら、これまで環境バイオテクノロジーを用いた重金属汚染対策に関する研究・開発において多くの成果が報告されているものの、未だ研究段階で留まっている場合も多く、実用化を視野に入れた今後の進展が期待されている。

本研究では、以上で述べたような要求を満たしうる新たな水中重金属除去技術の開発を最終目的としている。本研究グループのこれまでの研究により、水中重金属が活性汚泥によく吸着し⁵⁾、さらに活性汚泥細菌由来のタンパク質が特異的な重金属の吸着に関与していることが示された⁶⁾。このような重金属に対して高い特異性や親

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)

和性を有するタンパク質を分離し吸着材として用いることで、新規水中重金属除去・回収技術を開発することが可能であると考えた。

そこで本論文では、既に本研究グループにより活性汚泥細菌から分離された重金属吸着タンパク質 (Heavy Metal-Binding Protein : HMBP) の N 末端アミノ酸配列⁷⁾ を元に、HMBP 遺伝子を活性汚泥細菌ゲノム DNA から分離することを試みた。さらに、得られた HMBP 遺伝子の配列から二次及び三次構造を予測し、HMBP の重金属吸着材としての利用可能性についての考察を行った。以下にそれらの内容について報告する。

2. 実験方法

2. 1 HMBP 遺伝子のスクリーニング

HMBP 遺伝子を活性汚泥細菌からスクリーニングするため、まず活性汚泥細菌ゲノム DNA ライブラリを既報⁸⁾と同様の方法で構築した。すなわち、まず活性汚泥細菌から抽出したゲノム DNA をフェノール・クロロフォルム抽出及びエタノール沈殿により精製した後、RNase 処理を行い、再度フェノール・クロロフォルム抽出及びエタノール沈殿により精製した。精製されたゲノム DNA を制限酵素 MboI で 37°C、60 分間処理した後、0.7% アガロースゲル電気泳動を行った。1~3kbp の範囲のゲノム DNA 断片を GENE CLEAN II kit (BIO 101 Systems) を用いて精製し、それらの断片を pUC118 BamHI/BAP (TaKaRa) へ導入した。得られたクローニングベクターを用いて大腸菌 DH5 α (TaKaRa) を形質転換し培養することで、活性汚泥細菌ゲノム DNA ライブラリを得た。

得られた活性汚泥細菌ゲノム DNA ライブラリから HMBP 遺伝子を分離する際には PCR を用いたが、その際には非特異 DNA 断片の増幅を抑制する目的で以下の 5 点について工夫を施した。

1 点目の工夫として、プライマー設計において HMBP のアミノ酸配列をコードする塩基配列候補が複数存在する (degeneracy が多い) ことを考慮し、CODEHOP (Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) 法を採用した。CODEHOP 法は、PCR に用いるプライマーの 5' 側に consensus 部分、3' 側に degenerate 部分を作ることによって、非特異的増幅を抑制するものである⁹⁾。

2 点目として、degeneracy が多いプライマーを用いる場合にはプライマーの変性温度 (T_m 値) に幅が生じることを考慮し、Touchdown PCR を採用した。Touchdown PCR とは、PCR の反応初期においてアニーリング温度をプライマーの T_m 値より高い温度に設定し、サイクルが進むにつれて段階的に温度を下げることで、非特異的 DNA 断片の増幅を抑制する手法である¹⁰⁾。

3 点目として、本研究グループが既に分離した HMBP のアミノ酸配列は N 末端部分のみ明らかになっていることから⁷⁾、PCR に用いる 2 系統のプライマーの片方に pUC118 (ゲノム DNA ライブラリ作成に用いたプラスミドベクター) が保有する M13 site もしくは M13RV site の単一塩基配列を採用し、Touchdown PCR における degeneracy の低下を計った。

4 点目として、より確実に HMBP 遺伝子のスクリーニングを行うために semi-nested PCR を採用した。すなわち、既に得られている HMBP の N 末端アミノ酸配列から位置の異なる 2 通りのプライマーを設計し、N 末端アミノ酸をコードする先頭の塩基から 67 番目の塩基をの上流側で設計したプライマーを 1st PCR のセンスプライマーに、N 末端アミノ酸配列中の下流側で設計したプライマーを 2nd PCR のセンスプライマー用いることとした (図 1)。なお、2nd PCR を行う前に、1st PCR で得られたサンプル中から未反応プライマーを MicroSpin S-200 HR Columns (Amersham Bioscience) を用いて除去した。

5 点目として、さらに degeneracy を低下させるため、4 種類の塩基すべてと結合する分子であるイノシンを配列に加え、さらにプライマーの degeneracy が 8 である複数のグループに分けて PCR を行った。1st PCR では 8 系統の混合プライマー (表 1, HMBP111~HMBP118)、2nd PCR では 3 系統の混合プライマー (表 1, HMBP121~HMBP123) を設計した。

1st PCR 及び 2nd PCR で用いたプライマー配列は表 1 に、温度プロファイルは表 2 に示した。なお、すべての PCR 反応は PCR Master (Roche Diagnostics GmbH) を用いて行い、PCR 産物の確認は 1.5% アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色及び紫外線照射により行った。HMBP 遺伝子の特異的増幅により得られたと考えられる PCR 産物はアガロースゲル中から Miniprep DNA Purification Kit (TaKaRa) を用いて抽出・精製し、pGEM-T Easy (Promega) 及び *E. coli* DH5 α (TaKaRa) を用いてクローニングを行った。さらに *E. coli* DH5 α の培養後にプラスミドを抽出し、SP6 及び T7 プライマー (表 1) 及び Big Dye Terminator Ver.3 (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によって塩基配列解析を行った。

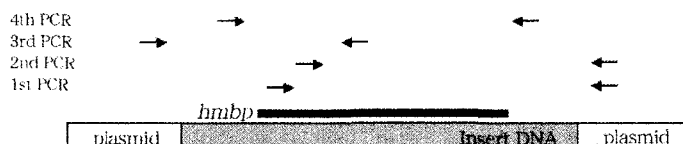


図 1. 活性汚泥細菌ゲノム DNA ライブラリからの *hmbp* 取得のための PCR におけるプライマーの位置。左向き矢印がセンスプライマー、右向き矢印がアンチセンスプライマーを表している。

表 1. HMBP 遺伝子分離及び塩基配列解析に用いたプライマー

Primer	Sequence (5'-3')	PCR	Length (bp)	Degeneracy
HMBP111	GAAGATAAAAAARTTYGARGA	First	20	8
HMBP112	GAAGATAAGAARTTYGARGA	First	20	8
HMBP113	GAAGACAAAAARTTYGARGA	First	20	8
HMBP114	GAAGACAAAAARTTYGARGA	First	20	8
HMBP115	GAGGATAAAAAARTTYGARGA	First	20	8
HMBP116	GAGGATAAGAARTTYGARGA	First	20	8
HMBP117	GAGGACAAAAARTTYGARGA	First	20	8
HMBP118	GAGGACAAGAARTTYGARGA	First	20	8
HMBP121	GTICARACICGAAAYCARGCIGA	Second	23	8
HMBP122	GTICARACIAGAAAYCARGCIGA	Second	23	8
HMBP123	GTICARACIAGGAAYCARGCIGA	Second	23	8
HMBP131	GCCTTGTCTGTCACCCCTTGAT	Third	20	1
HMBP141	GCCTCCTCTGGTCTGTCTGA	Fourth	20	1
HMBP142	TTATTTCCTGTCTGCTTTCACTTC	Fourth	24	1
M13	GTTGTAACGACGGCCA	First, Second and third	18	1
M13 RV	CAGGAAACAGCTATGACCAT	First, Second and third	20	1
SP6	ATTAGGTGACACTATAG	Sequencing	18	1
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequencing	18	1

R, A or G; Y, T or C; I, inosine.

表 2. HMBP 遺伝子分離のための PCR における温度プロファイル

First			Second			Third			Fourth		
Temperature (°C)	Time (min)	Cycle	Temperature (°C)	Time (min)	Cycle	Temperature (°C)	Time (min)	Cycle	Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
95	5	1	95	5	1	95	5	1	95	5	1
95	1		95	1		95	1		95	0.5	
51	1	5	60	1	5	54	1	35	50	0.5	35
72	4		72	2		72	2		72	1	
95	1		95	1		72	10	1	72	10	1
49	1	5	56	1	5						
72	4		72	2							
95	1		95	1							
47	1	5	52	1	5						
72	4		72	2							
95	1		95	1							
45	1	20	50	1	20						
72	4		72	2							
72	10	1	72	10	1						

2. 2 完全長 HMBP 遺伝子の取得

2. 1でのスクリーニングにより得られた HMBP 遺伝子は N 末端から 23 番目のアミノ酸から下流の領域をコードする配列であるため、完全長 HMBP 遺伝子を取得するために、より上流側の配列を取得するための操作を行った。まず 2. 1で取得した HMBP 遺伝子領域においてアンチセンスプライマーを設計し（表 1, HMBP131）、pUC118 が有する M13 site の塩基配列を持つ M13 プライマーもしくは M13RV site の塩基配列を持つ M13RV プライマーと共に用いて PCR を行った（3rd PCR）。3rd PCR における鋳型は、1st PCR で用いたものと同じ活性汚泥細菌ゲノム DNA ライブラリである。その後、得られた HMBP 遺伝子の上流側配列をもとに設計したセンスプライマー（表 1, HMBP141）と、HMBP 遺伝子の終止コドンの下流側配列をもとに設計したアンチセンスプライマー（表 1, HMBP142）を用いて、完全長 HMBP 遺伝子取得のための PCR を行った（4th PCR）。3rd PCR 及び 4th PCR で用いたプライマー配列を表 1 に、温度プロファイルを表 2 に示した。なお PCR 反応、PCR 産物の確認、PCR 産物のクローニング及び塩基配列解析は全て上述と同様にして行った。

2. 3 HMBP 遺伝子配列に関する解析

SIB（Swiss Institute of Bioinformatics）らが Web 上で提供している SWISS-MODEL（<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>）¹¹⁾を用いて HMBP の三次元構造を予測し、University of Massachusetts が提供しているタンパク質三次元構造図示ソフト RasMol（<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/index2.htm>）を用いて HMBP の三次元構造予測図を作成した。さらに、HMBP 遺伝子から予測されるアミノ酸配列に関し、二次構造予測を GENETYX-MAC（ソフトウェア開発株式会社）を用いて Chou-Fasman Protein secondary prediction¹²⁾で行った。

3. 実験結果および考察

3. 1 HMBP 遺伝子のスクリーニング

HMBP 遺伝子スクリーニングのための 1st PCR で得られた産物のアガロースゲル電気泳動の結果の一例を図 2A に示した。得られた PCR 産物のバンドの中からランダムに 8 個の PCR 産物を抽出し、バンド 1 本当たり 3 個のクローン（計 24 クローン）について塩基配列を解析した。その結果、解析したすべての PCR 産物はその両端に 1st PCR で用いたプライマー配列を有することが確認され、PCR による遺伝子増幅反応が適正に行われていることが示唆された。しかしながら、塩基配列解析を行った 8 個の PCR 産物についてはプライマー配列に挟まれた中間配列に HMBP の N 末端アミノ酸配列を保存する配列は存在せず、また図 2A で 1 本に見えるバンドには複数種の PCR 産物が混在していることが確認された。以上のことから、1st PCR では鋳型として用いた活性汚泥細菌ゲノム DNA ライブラリの配列多様性が高いために、プライマー配列を両端に有する多様な PCR 産物が得られたと考えられた。このことは、DNA ライブラリ中に目的とする HMBP 遺伝子が存在していれば、図 2A にバンドとして得られている無数の PCR 産物の中にそれが存在している可能性があると考えられた。

そこで、この 1st PCR で増幅した DNA 断片を鋳型 DNA として、HMBP の N 末端アミノ酸配列内の異なる領域（1st PCR で用いたプライマーよりも数塩基下流側）で設計したプライマーを用いた Semi-nested PCR を行うことで、HMBP 遺伝子のスクリーニングを行った。Semi-nested PCR 産物の確認は、1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動により行った（図 2B）。確認された PCR 産物のバンドの中からランダムに 8 個の PCR 産物を抽出し、バンド 1 本当たり 3 個のクローン（計 24 クローン）について塩基配列を解析した。その結果、解析した 24 個のクローンのうち 3 つのクローンが HMBP 遺伝子の部分配列を有していることが確認された。

3. 2 完全長 HMBP 遺伝子の取得

2nd PCR によって得られた遺伝子配列は HMBP の N 末端アミノ酸配列の 31 残基目から 42 残基目までの配列⁷⁾と完全に一致していたことから、HMBP 候補遺伝子の部分配列であると考えられた。そこで、次に完全長の HMBP 遺伝子を取得するための操作を行った。2nd PCR によって得られた遺伝子配列の中からアンチセンスプライマーを設計し、M13 プライマーと共に用いることで 3rd PCR を行った。図 3A は、3rd PCR により得られた PCR 産物のアガロースゲル電気泳動結果である。アガロースゲル電気泳動により確認された DNA 断片の中から、比較的 DNA 増幅量の多い 2 つのバンド（図 3A 矢印）に含まれる DNA について塩基配列解析を行った。その結果、1.5kbp 以上の領域に出現した DNA バンドに対応する PCR 産物の末端には各プライマー配列が存在し、さらに HMBP の N 末端アミノ酸配列（42 残基）と完全に一致するアミノ酸配列をコードする遺伝子領域が存在することが確認された。また、終止コドンの位置を考慮すると、この HMBP 候補遺伝子の全長が 420bp であることが予想された。

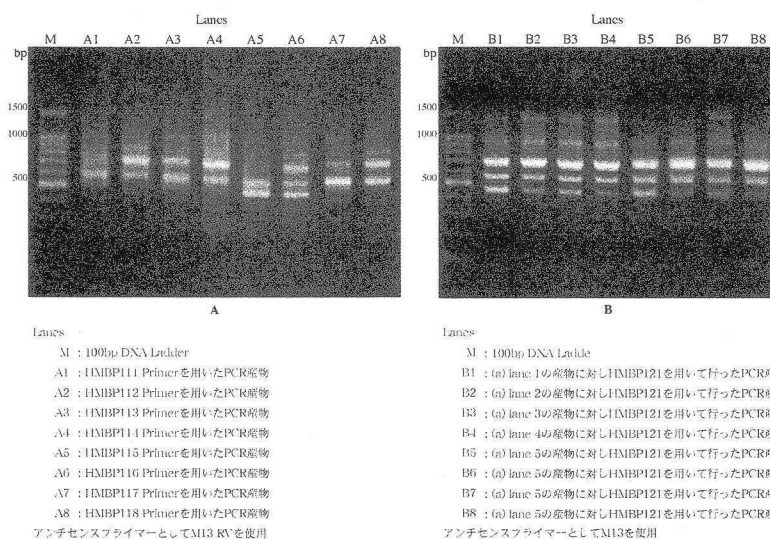


図2. 1st 及び2nd PCR により得られた増幅産物のアガロースゲル電気泳動結果。
A: 1st PCR により得られた増幅産物。 B: 2nd PCR により得られた増幅産物。

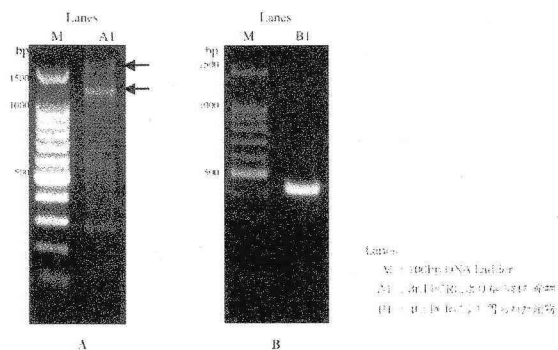


図3. 3rd 及び4th PCR により得られた増幅産物のアガロースゲル電気泳動結果。 A: 3rd PCR により得られた増幅産物。二本の矢印は塩基配列解析を行った PCR 産物を示す。 B: 4th PCR により得られた増幅産物。そこで、3rd PCR により得られた HMBP 候補遺伝子の上流領域からセンスプライマーを設計し、HMBP 遺

伝子下流領域から設計したアンチセンスプライマーと共に用いて 4th PCR を行った。図 3B には、4th PCR によって得られた PCR 産物のアガロースゲル電気泳動結果を示した。3rd PCR の産物に関する塩基配列解析結果から予想された通り、400～500bp の領域に一本だけバンドが得られており、目的とした HMBP 候補遺伝子が得られたことが示唆された。この PCR 産物をアガロースゲルから抽出してクローニングを行い、塩基配列解析を行った。その結果、塩基配列が部分的に変異した 3 個のクローンを得た (図 4)。これらの DNA クローンが保存するアミノ酸配列はお互いに一致していた (図 5)。このアミノ酸配列の上流部は既に得られている HMBP の N 末端アミノ酸配列⁷⁾ と完全に一致していたことから (図 5)、HMBP 遺伝子取得に成功したと考えられた。また、図 4 の配列中にはゲノム DNA ライブラリ作成時に用いた MboI の認識部位が見られるが、これは MboI によるゲノム DNA 切断時に数千塩基長の消化産物が蓄積する条件で消化を行っているため、すべての認識部位が切断されていないことが理由であると言える。

```

hmbp1    1  GCCTCCTCTGGTCTGTCTGATGACGAGATCGAACGCATGGTACGCGAGGCGGAAGCCAAC
hmbp1    61  GCGGCGGAAGACAAGAAGTTCAAGAGCTGGTGACACCGCAACCAGGCTGACGGTCTG
hmbp1   121  GTCCACTCGGTACGCAAGCAGGTGACCGAAGCCGGTGACGCCCTGCCAAGCGATGACAAG
hmbp1   181  ACCAAGATCGAGACTGCACTGTCCGAGCTGGAAGCCGCGATCAAGGGTGACGACAAGGCT
hmbp1   241  GCCATCGAAGCCAAGCAACAGGCCCTAATGGAAGCGTCCCAGAAGCTGATGGAGATTGCC
hmbp1   301  CAGCAGCAGGCTCAGGCGCAAGGCGCCGGTGCCGAGGCCGGTCAGTCCTCTTCTTCCGCC
hmbp1   361  AAGGCTGACGACGACGTGGTTCGACGCCGAGTTTGAAGAAGTGAAAGACGACAAGAAATAA

```

図 4. 4th PCR により得られた HMBP 遺伝子の塩基配列。* : 得られた 3 種類のクローン間で多型が見られた塩基の位置を示している。

```

Hmbp      1  ASSGLSDDEIERMYREAEANAEDKKFEELVQTRNQADGLVHSVRKQVTEAGDALPSDDK
Secondary structure*  cccccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaabbbbbbbcccbbbbbaaaattttt

Hmbp      61  TKIETALSELEAAIKGDDKAAIEAKQQALMEASQKLMEIAQQQAQAQGAGAEAGQSSSSA
Secondary structure  aaaaaaaaaaaaaaiaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaiaa

Hmbp      121  KADDDVVDAEFEVVKDDKK
Secondary structure  aaaaaaaaaaaaaaatiic

```

図 5. HMBP のアミノ酸配列。灰色で示した部分は HMBP の N 末端アミノ酸配列解析⁹⁾ で得られた配列と完全に一致した部分。*Chou-Fasman Protein secondary prediction により予測された HMBP の二次構造。c, コイル構造; a, α ヘリックス構造; b, β ストランド構造; t, ターン構造。

3. 3 HMBP のアミノ酸配列と予測される高次構造

重金属吸着に関与する可能性があるアミノ酸には、カルボキシル基を側鎖に有する酸性アミノ酸であるアス

パラギン酸及びグルタミン酸、ヒドロキシル基を有するチロシン及びセリン、チオール基を持つシステイン及びメチオニン、インドール環を有するヒスチジンが存在する。本研究で分離された HMBP 遺伝子がコードするアミノ酸配列は 139 残基存在し、その中で上記のアミノ酸は全配列の 35% (48 残基) を占めることが確認された (表 3)。中でも酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸は全配列中の 24% (33 残基) を占めており、これらのアミノ酸残基の官能基部分がレイス塩基として重金属との錯体形成能力を発揮しうることがその配列から強く示唆された。

表 3. HMBP に含まれる重金属錯体形成に関与するアミノ酸残基数とその割合

	残基数	割合 (%)
Total	139	
Metal-coordinating amino acids		
Glu	18	13
Asp	15	11
Ser	11	8
Met	3	2
His	1	1

図 6 には、SWISS-MODEL を用いて予測した HMBP の三次元構造を RasMol を用いて図示した。予測には HMBP とのアミノ酸配列相同性が 72.2~74.5% であった 6 つの既知タンパク質三次元構造 (1dkzA.pdb, 1dkxA.pdb, 1dkyA.pdb, 1kdyB.pdb, 1bpr.pdb, 2bpr.pdb) が鋳型として用いられ、HMBP の 1~108 残基 (総残基数 139) までの三次元構造予測図が得られた。図 6 から明らかなように、HMBP はほぼ全体が α ヘリックス構造の組み合わせによって成っていることが予測された。このことは、Chou-Fasman Protein secondary prediction による二次構造予測 (図 5) によっても支持されており、それによると、全 139 残基中 95 残基が α ヘリックス構造形成に寄与すると予測された。 α ヘリックス構造では構成アミノ酸の残基部分が外側に突出することが知られており¹³⁾、表 3 に示したアミノ酸の残基が溶媒方向へ露出することで、重金属との錯体形成に寄与することが示唆された。

今回得られた HMBP 遺伝子は、大腸菌その他の宿主の形質転換に用いることで、その遺伝子産物である HMBP を大量に合成することが可能である。重金属との錯体形成能力を確認した上で、新たな重金属除去・回収技術の開発に利用することが可能であると考えている。

4. 結論

CODEHOP 法、Touchdown PCR 及び Semi-nested PCR を用いた一連の手法により、N 末端アミノ酸配列情報を基に活性汚泥細菌ゲノム DNA ライブラリから HMBP 遺伝子を分離することに成功した。得られた HMBP 遺伝子がコードするアミノ酸配列は、その 35% 以上が重金属との錯体形成に寄与しうるアミノ酸であり、これらが HMBP としての能力を付与していると考えられた。また予測された HMBP の二次及び三次構造は α ヘリックス構造に富んだものであり、 α ヘリックス構造から外側に突出した形で存在するアミノ酸残基が重金属との錯体形成に寄与している可能性も示唆された。HMBP の重金属との錯体形成能力を確認し、HMBP を用いた新たな重金属除去・回収技術の開発を行なうことが可能であると考えられる。

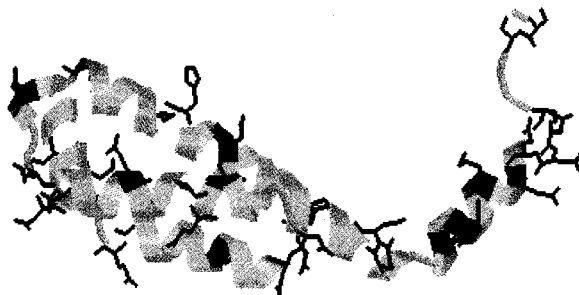


図 6. SWISS-MODEL により予測された HMBP の三次元構造予測図。重金属との錯体形成に関与するアミノ酸のみ残基部分を表示した。

参考文献

- 1) 環境省中央環境審議会. 2002. 土壤汚染対策法に係る技術的事項について.
- 2) J. O. Nriagu and J. M. Pacyna. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333, 134-139.
- 3) 山県登. 1978. 生物濃縮. 環境科学特論. 産業図書.
- 4) 刈谷宣照. 2002. PC の解体実験事業におけるリサイクルビジネスモデルの調査研究. 大阪大学. 博士論文.
- 5) Fukushi K., Kato S., Antsuki T. and Omura T. 2001. Isolation of copper-binding proteins from activated sludge culture. *Wat. Sci. Tech.*, 44(2-3), 453-460.
- 6) Antsuki T., Sano D. and Omura T. 2003. Functional metal-binding proteins by metal-stimulated bacteria for the development of an innovative metal removal technology. *Wat. Sci. Tech.*, 47(10), 109-115.
- 7) Sano D., Myojo K. and Omura T. 2005. Heavy metal-binding proteins from metal-stimulated bacteria as a novel adsorbent for metal removal technology. *Proceeding for 1st IWA-ASPIRE*, in press.
- 8) Sano D. and Omura T. 2005. Construction of a cloning system for the mass production of virus-binding protein for poliovirus type 1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(5), 2608-2615.
- 9) Timothy M. R., et al., 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nuc. Acid. Res.*, 26, 1628-1635.
- 10) 佐々木博己. 2003. ここまでできる PCR 最新活用マニュアル. 羊土社.
- 11) Schwede T., Kopp J., Guex N. and Peitsch M. C. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nuc. Acid. Res.*, 31, 3381-3385.
- 12) Chou P. Y. and Fasman G. D. 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.*, 47, 45-147.
- 13) Branden C. and Tooze J. 1999. *Introduction to protein structure*. Garland Publishing Inc. NY. USA.