

(16) 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

佐野大輔^{1*}・高荒智子¹・鈴木孝佳¹・大村達夫¹

¹ 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06)

*E-mail: sano@water.civil.tohoku.ac.jp

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処理効率の低下や浄水中へのアルミニウム残留等の凝集阻害を引き起こしている。凝集阻害メカニズムとして藻類由来有機物と凝集剤成分との錯体形成や荷電中和反応の阻害に関する報告はあるが、凝集阻害誘因物質を同定して凝集阻害メカニズムを解明する試みは少ない。本研究では藻類由来タンパク質を提示させたファージディスプレイライブラリからポリ塩化アルミニウムに親和性を有するファージを選択し、得られたファージの保持する DNA 配列を解読することで凝集阻害誘因タンパク質の同定を試みた。その結果、セリンやスレオニンなどヒドロキシル基を有するアミノ酸を保持するタンパク質や金属酵素が凝集阻害に関与していることが示唆された。

Key Words : phage display; *Microcystis aeruginosa*; algal protein; polyaluminum chloride; biopanning

1. はじめに

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処理効率の低下や浄水中へのアルミニウム残留等の凝集阻害を引き起こしている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 (Algal Organic Matter: AOM) が凝集剤成分の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⁾。さらに、凝集阻害は塩素と残留 AOM との反応によるトリハロメタン生成³⁾及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している。

凝集阻害が発生した場合には、現在のところ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、凝集剤のコストが嵩む上、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するためには、凝集剤注入率の増加以外の対策、例え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。

これまでの研究において、本研究グループは藻類細胞に含まれるタンパク質が凝集阻害に寄与していることを明らかにしている⁵⁾。さらに、*Microcystis aeruginosa* (以下 *M. aeruginosa*) 由来の凝集阻害誘因タンパク質を同定するために、藻類タンパク質をファージ表面上に提示させたファージディスプレイライブラリを構築した⁶⁾。ファージディスプレイの特長は、特異的相互作用に寄与するタンパク質を選択的に分離することが可能であること、ファージに提示されているタンパク質の表現型と、ファージ粒子内に存在する遺伝子型が 1 対 1 で対応していること、及び比較的短時間に選択されたタンパク質を合成することが可能である点にある。

本研究では、本研究グループにより既に構築された *M. aeruginosa* 由来タンパク質が提示されたファージディスプレイライブラリ及びポリ塩化アルミニウム (polyaluminum chloride: PAC) 由来のブロックを用いてバイオパンニングを行い、PAC と相互作用することで凝集阻害を引き起こすタンパク質の遺伝子を取得するを試みた。また、タンパク質を主な構成成分とする AOM 存在下における PAC の存在形態を核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて評価し、藻類由来タンパク質が関わる凝集阻害のメカニズムについて考察した。

2. 実験方法

(1) ファージディスプレイライブラリの構築

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 *M. aeruginosa* (NIES-91) である。藻類DNAの抽出、ファージミドベクターの調整、大腸菌の形質転換及びファージの調整等、ファージディスプレイライブラリの構築に必要なすべての操作は鈴木ら⁹⁾に従った。すなわち、まず *M. aeruginosa* 培地により照度4000lux (12時間明暗)、温度30℃の条件で無菌培養した *M. aeruginosa* を遠心分離により回収し、ゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAは *Sau3AI* により切断し、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り精製した。切断された *M. aeruginosa* のゲノムDNAは *Bam*HI サイトを持つ pSKAN8-EWQ に導入し、*E. coli* JM109 Competent Cells の形質転換に用いた。形質転換後、アンピシリン存在下で一晩培養し、ヘルパーファージ (VCSM13 Interference-Resistant Helper Phage) を加えて37℃で1時間培養した。続けてカナマイシンを最終濃度で0.05mg/mLになるように加え、37℃で1晩培養した。培養液を遠心分離して上清を回収することで大部分の大腸菌を除去し、続けて20%PEG6000及び2.5MNaClを上清量の20%加え、手で穏やかに攪拌してから水中にて1時間以上静置した。その後、遠心分離を行って上清を捨てた後、PBSを添加し1時間静置した。最後に残った大腸菌を除去するために0.22mmフィルター (Millex r-GV, MILLIPORE) でろ過を行い、ファージディスプレイ溶液を得た。得られたファージは *E. coli* JM109 ($OD_{600}=0.3\sim0.5$) に感染させてカナマイシンを添加した寒天培地で培養後、コロニー数を数えることでタイターの把握を行った。また、12個のコロニーをランダム

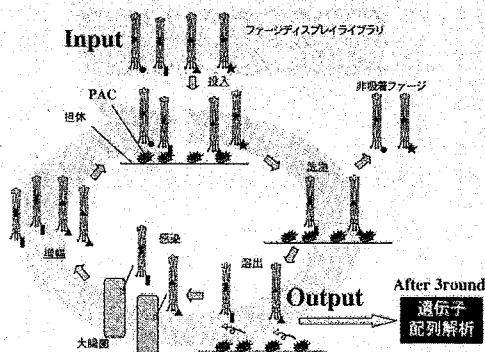


図1. バイオパンニングによるPACブロック親和性ペプチド選択の手順。

にピックアップし、pSKAN8-EWQ由来の配列を有するプライマーを用いて colony direct PCRを行い、アガロースゲル電気泳動及びエチジウムブロマイド染色によってインサートDNAの大きさの把握を行った。

(2) 凝集阻害誘因タンパク質の分離及び同定

アルカリ度250mg/LのNaHCO₃溶液を調整し、注入率が1000ppmになるようにPACを添加して緩やかに攪拌を行うことでPACブロックを作成した。1晩静置することでPACブロックを沈殿させ、沈殿したブロックをビーカーの底から慎重に1mL採取して1.5mLチューブに移した。その後、遠心分離 (5分、2000×g、室温) を行って上清を捨てることでPACブロックを分離した。

得られたPACブロック及びファージディスプレイライブラリを用いてバイオパンニングを行った (図1)。PACブロックにファージディスプレイライブラリ調整液1mL (これを1st Inputとする) を加えて軽い攪拌を行い、室温で5分間静置した。遠心分離 (2000×g、5分、室温) を行った後、上清を除去した。その後、リン酸緩衝液 (PBS) 1mLを穏やかに加え3回転倒混和し、遠心分離 (2000×g、5分、室温) を行って上清を除去した。PBSによる洗浄操作は3回行った。最後に溶出バッファー (PBS, 0.1M EDTA, pH4.9) 1mLを加えピペッティングを行い、室温で5分間静置した後、遠心分離 (5分、2000×g、室温) を行って上清を回収した。ここで上清として得られたサンプルを「1st Output」とした。その後、1st Output中のファージを *E. coli* JM109 ($OD_{600}=0.3\sim0.5$) に感染させることで増幅し、2 (1) で述べた手順で精製した。ここまでの作業を1 Roundとし、得られた精製ファージを含むサンプルを「2nd Input」と

した。同様の作業を計3 Round行い、「3rd Output」に含まれるファージが有する藻類由来DNAの塩基配列を決定した。DNA配列決定操作は鈴木ら⁶⁾に従った。対照サンプルとしてインサートなしのファージを用意し、上記同じ手順でパイオバンニングを3 Round行った。

(3) 相同性検索

パイオバンニングにより得られた藻類由来DNAがコードするペプチド配列については、National Center for Biotechnology InformationがWEB上で提供しているProtein-Protein BLAST (blastp) プログラムを用いて相同性検索を行った。

(4) ²⁷Al-NMRを用いたPACの形態評価

PAC 溶液 (Al³⁺=0.01M) に TOC 濃度が 34.8mg/L となるように AOM を加え ²⁷Al-NMR の測定を行った。実験に用いた AOM は既報⁹⁾ で用いたものと同様である。すなわち上述の条件で培養した *M. aeruginosa* を 0.45μm フィルターでろ過し、フィルター上の藻類細胞を集めて MilliQ 水中に分散し、超音波処理後に遠心分離を行って上清をサンプリングしたものである。²⁷Al-NMR の測定には共鳴磁場 14.10T、共鳴周波数 156.39MHz を用い、積算回数は1000回とした。化学シフトの計算のための標準物質には、1M AlCl₃ 水溶液を用いた。また、パルス系列にはシングルパルス法を使用し、パルス幅は 14.2ms、パルス繰り返し時間は 0.2s とした。

3. 実験結果および考察

(1) ファージディスプレイライブラリの構築

藻類ゲノム DNA を組込んだプラスミドにより大腸菌を形質転換して構築した DNA ライブラリにヘルパーファージを感染させ、ファージディスプレイライブラリを構築した。その際のタイターは 1.5×10^9 cfu/mL であった。タイターチェックで得られた大腸菌コロニー12個をランダムに選択し、colony direct PCR を行うことでインサート DNA の長さを確認した(図2)。プライマー間の塩基数は 264bp であるので、インサートの長さの分だけバンド位置が上にシフトしている。図2では、レーン1~12の全ての産物には様々な長さのインサートが挿入されていることが分かる。つまり少なくとも12個をランダムに選択した場合、様々な大きさの藻類ゲノム DNA が組込まれている事が確認された。

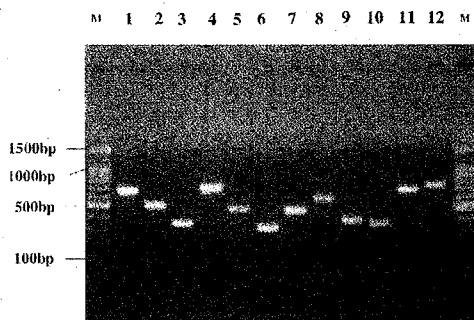


図2. ファージディスプレイライブラリにおける藻類由来 DNA の電気泳動結果。

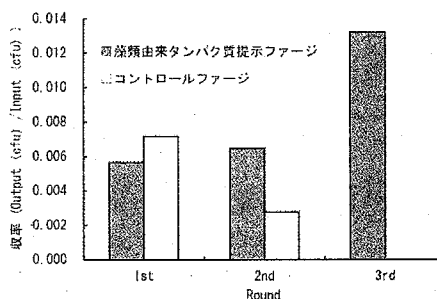


図3. パイオバンニングの各 Round における収率。

(2) パイオバンニング

各 Round の収率 (各 Round の「Output」のタイターを「Input」のタイターで除した値) を図3に示した。コントロールファージの場合、収率が Round を重ねるにつれて低下し、3rd Output のタイターは検出限界以下であった。このことは、藻類タンパク質を提示していないファージは PAC フロック吸着能が低いことを示している。それに対して藻類タンパク質提示ファージの収率は Round を重ねるにつれて増加し、Round 3 の収率は Round 1 の収率の 2.3 倍であった。パイオバンニングの操作において、Round を重ねるにつれて収率が増加することが他の研究においても同様に報告されている。例えば Ehrlich らは、ファージディスプレイによる抗体結合性ペプチドの選択において、12 残基のペプチドを用いた場合には 30 倍、7 残基のペプチドを用いた場合には 3 倍の収率の増加が 3rd Round 後に生じた事を報告している⁷⁾。また Heyd らはファージディスプレイによるステロイド結合性ペプチドの選択において、約 10 倍の収率増加 (収率の遷移は図示されているが正確な値の記述はなし) が 3rd Round 後において得られている⁸⁾。

表1. PACブロックを用いたバイオパンニングにより得られた藻類由来ペプチド配列とそのアミノ酸組成

コード番号	配列	残基 長	アミノ酸残基数(括弧内は出現率)								
			N	Q	S	T	Y	C	D	E	
3-24/SD+TTG	MISPARALLYNPFTS	15	1 (7)	0	2 (13)	1 (7)	1 (7)	0	0	0	
3-25/SD+ATG	MRSRACLL	8	0	0	1 (13)	0	0	1 (13)	0	0	
3-27/SD+TTG	MFSQNPISI	9	1 (11)	1 (11)	2 (22)	0	0	0	0	0	
3-35/SD+GTG	MALPSFSSIVLTIKIGAVCSTPINCPKSITE	34	1 (3)	0	5 (15)	3 (9)	0	2 (6)	0	1 (3)	
3-78/SD+TTG	MPTVDILIPTYNEPAFILKRTIIGCQALNYPHKNIYILDDTQ	42	3 (7)	2 (5)	0	4 (10)	3 (7)	1 (2)	3 (7)	1 (2)	
3-81/SD+TTG	MGKSLAIASQCFTPGTS	17	0	1 (6)	3 (18)	2 (12)	0	1 (6)	0	0	
-	ランダム配列	-	(3)	(3)	(9)	(6)	(3)	(3)	(3)	(3)	

バイオパンニングにおいてPACブロックと相互作用する藻類由来タンパク質の選択が行われていると仮定すると、Roundの進行に伴いファージが保持する藻類ゲノムDNAの多様性が低下すると考えられる。ファージが有する藻類ゲノムDNAの多様性が低下すること、すなわち目的とする藻類ゲノムDNAが占める割合が増加しているということである。つまり図3において見られた収率の増加は、本実験で行ったバイオパンニングの操作により、PACブロック吸着性の藻類由来タンパク質の選択が行われていることを示しているものであると考えられる。

(3) 選択された藻類タンパク質遺伝子の配列解析

3rd Output で得られたファージの中から86個をランダムに選択し、クローニング後DNAシーケンサーにより塩基配列解析を行った。その結果、ファージの尾部に藻類由来ペプチドを提示したと考えられる計6 clone が得られた(表1)。他の80 clone は、読み枠がずれることで藻類由来タンパク質を提示したファージ尾部が合成されていないもの、もしくは藻類由来DNAの中にストップコドンが存在したために翻訳がストップしていると考えられるものであった。

表1に示した6クローンは、インサートDNA内に大腸菌がスタートコドンとして用いるATG、GTG及びTTGを有し、その約10塩基前後上流にリボソーム結合サイトであるShine-Dalgarno (SD) 配列を有しているものである。SD配列は遺伝子の翻訳に必ず必要とされる

ものではないが、大腸菌の遺伝子の57%に付随しており、特に高発現性の遺伝子上流にはよく見られることが知られている⁹⁾。また、スタートコドンとして用いられる配列はATGが最も多く、大腸菌では約84%の遺伝子が使用しているが、その他の二つであるGTG及びTTGはSD配列の付随により遺伝子の発現効率が增加することが示唆されている⁹⁾。つまり表1に示した6クローンは、遺伝子の翻訳すなわちファージ尾部における提示が強く期待されるものである。

タンパク質は20種類のアミノ酸によって構成されるが、この中でアルミニウム吸着に関与する可能性があるアミノ酸としては、カルボキシル基を有す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スレオニン、チロシン及びセリン、ホルムアミド基を有するアルギニン及びグルタミン、そしてチオール基を有するシステインが知られている¹⁰⁾。Zuoらは、アルミニウム製のプレートに対する親和性を有するペプチドの選択をファージディスプレイを用いて行った際、セリン及びスレオニンに富むペプチドが多く得られたことを報告している¹¹⁾。セリンについては、アルミニウムと結合することでアルミニウムの溶解性を高めることも報告されている¹²⁾。Rezabalらは、セリンやスレオニンが有するヒドロキシル基が、カルボキシル基、ホルムアミド基及び水分子等と共にアルミニウムイオンを核とした6配位の中性キレートを作成することが可能であることを密度汎関数理論による計算を用いて証明している¹³⁾。つまり上述したアミノ酸残基は、そ

れぞれが電子供与体となってアルミニウムを核としたキレート形成に寄与しうると考えられる。

本研究で得られた遺伝子クローンがコードするペプチド配列では、特にヒドロキシル基を有するセリン及びスレオニンの出現率が高かった。セリンをコードするコドンは6種類、スレオニンをコードするコドンは4種類存在するので、ランダムな塩基配列におけるセリンとスレオニンの出現率の期待値は16% ($= (6+4)/64$) である。それに対し本実験で得られた6個のペプチド配列におけるセリン及びスレオニンの出現率の平均値は20%であり、コドン数から計算された期待値よりも高い値を示した。特に6個中4個のペプチド配列においては、セリン及びスレオニンの出現率が20~29%であり、これらのアミノ酸残基におけるヒドロキシル基がPACブロックとの相互作用に寄与していた可能性があると考えられた。

6個中2個のペプチド配列(コード番号:3-25/SD+ATG及び3-78/SD+TTG)は、セリン及びスレオニンの出現率が期待値よりも低かった。しかしながら、これらのペプチドはアルミニウムイオンとの吸着エンタルピーが比較的大きいチオール基¹⁰⁾を保持するシステインを有しており、さらに3-78/SD+TTGに関してはカルボキシル基やホルムアミド基を保持するアミノ酸の出現率も高かった。特にホルムアミド基を保持するアルギニン及びグルタミンの出現率(12%)が期待値(6%)よりも2倍高かった。カルボキシル基及びホルムアミド基も、吸着エンタルピーへの寄与度はそれぞれ異なるが、アルミニウムイオンとの錯体形成に寄与しうることが報告されている¹⁴⁾。つまりこれら2個のペプチド配列も、アミノ酸残基に存在する官能基とアルミニウムイオンとの相互作用により、キレートを形成することが可能であると言える。

本研究で得られた6個のペプチド配列に関して相同性検索を行ったところ、5個のペプチド配列は残基長の不足から結果を得ることが不可能であった。それに対して最も長い残基長が得られたペプチド配列(コード番号:3-78/SD+TTG)のみ、配列相同性の高いタンパク質としてGlycosyl transferaseが得られた。Glycosyl transferaseは多種多様な種類のものが知られているが、その多くが金属イオンを補助因子として用いている¹⁵⁾。アルミニウムイオンは、本来は二価金属イオンを補助因子として用いている酵素に強固に結合して酵素機能を低下させてしまうことが知られているが¹²⁾、そのことを考慮するとGlycosyl transferaseはアルミニウム吸着

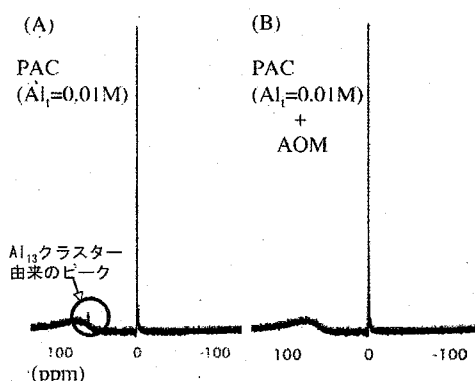


図4. ^{27}Al -NMR 測定結果. A, PAC のみ (アルミニウム濃度: 0.01M); B, AOM 存在下における PAC (アルミニウム濃度: 0.01M, TOC: 34.8mg/L)。

の対象となりうるものである。*M. aeruginosa* の Glycosyl transferase 遺伝子は公共データベースに現在のところ登録されていないが、遺伝子クローニング及び発現を行うことで、この酵素の凝集阻害への関与を明らかにすることが可能であると考えられる。

(4) AOM 存在下における PAC 存在形態

図4にPAC溶液の ^{27}Al -NMR測定結果を示した。AOM非存在下(図4A)では、 Al^{3+} イオンの存在を示す0ppmに位置するピークと、 Al_{13} クラスターの存在を示す63ppm付近に位置するピークが得られた。 $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$ と一般的に表記される Al_{13} クラスターはPACの主な構成成分であり、最も効果的に凝集に寄与するアルミニウムの分子種であるとされている^{16,17)}。この Al_{13} クラスターの存在を示す63ppm付近のピークは、AOM存在下では消滅した(図4B)。このことは、AOMの存在により Al_{13} クラスターが他のアルミニウム分子種(アルミニウム二量体やアルミニウムイオン)に変化したことを示している。 Al_{13} クラスター及び他のアルミニウム分子種の量は、温度等の条件により決定される平衡定数により決定されと考えられる¹⁸⁾。アルミニウムイオンに対する親和性の高いAOMが存在することで安定性の高いAOM-アルミニウム錯体が形成されると、 Al_{13} クラスターの量が低下した平衡状態へと遷移することが考えられる。本研究におけるバイオパニングにおいて得られたアルミニウムイオンとの吸着に寄与するアミノ酸を保持するペプチドは、アルミニウムイオンと錯体を形成することで Al_{13} クラスター量を減少させ、

凝集阻害をもたらしている可能性があると考えられる。

以上の結果から、ヒドロキシル基、ホルムアミド基、カルボキシル基及びチオール基を保持するアミノ酸を多く含むタンパク質や、藻体内で金属酵素として働いているタンパク質が、アルミニウムイオンと安定な錯体を形成することで Al_3 クラスター量が減少することが、凝集阻害メカニズムの一つとして考えられる。今後、*M. aeruginosa* のゲノム DNA ライブラリから凝集阻害誘因タンパク質と考えられる遺伝子をクローニングし、発現させることで凝集阻害への寄与度等を明らかにすることができれば、それらの凝集阻害能を消す作用を有する凝集助剤の開発などに応用することが可能であると考えている。

4. 結論

M. aeruginosa 由来ゲノム DNA を保持するファージディスプレイライブラリの中から PAC フロック吸着性を示すタンパク質を提示したファージの選択を試み、得られた遺伝子配列を解析した。その結果、ファージの尾部にタンパク質が提示されていると考えられる 6 個の遺伝子断片を得ることに成功した。これらの遺伝子にコードされているペプチド配列においては、セリン及びスレオニンの出現率の平均値は 20% であり、コドン数から計算された期待値 16% よりも高い値を示した。セリン及びスレオニンが残基中に保持しているヒドロキシル基が、アルミニウムとの相互作用に寄与していたと考えられる。また、6 個中 1 個のペプチド配列は 42 残基長を有していたが、セリン残基を一つも有していなかった。このペプチドでは、アルギニン及びグルタミンの出現率 (12%) が期待値 (6%) よりも 2 倍高く、これらのアミノ酸が残基中に有しているホルムアミド基がアルミニウムとの相互作用に寄与していることが予想された。また、得られたペプチド配列の相同性検索を行ったところ、金属酵素の一つである Glycosyl transferase と配列相同性の高いペプチドが得られていることが示された。これらのタンパク質は、アルミニウムイオンと安定な錯体を形成することで Al_3 クラスター量の減少をもたらす、凝集阻害を引き起こす可能性があると言える。アルミニウムイオンと相互作用可能な官能基を多く含むタンパク質、もしくは金属酵素と

して働いているタンパク質をコードしている遺伝子を *M. aeruginosa* のゲノム DNA から取得して発現させる事で、凝集阻害への寄与度を明らかにし、凝集助剤の開発に応用する予定である。

参考文献

- 1) 佐藤敦久, 真柄泰基: 上水道における藻類障害—安全で良質な水道水を求めて, 技法堂出版, 1996.
- 2) Bernhardt H., Schell H., Hoyer O. and Lusse O.: Influence of algogenic organic substances on flocculation and filtration, *The Water Institute of South Africa*, Vol. 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) Driscoll C.T. and Letterman R.D.: Chemistry and fate of Al(III) in treated drinking water, *Journal of Environmental Engineering*, Vol. 114, No. 1, pp. 21-37, 1988.
- 5) Takaara T., Sano D., Konno H. and Omura T.: Affinity isolation of algal organic matters able to form complex with aluminum coagulant, *Water Science and Technology*, Vol. 4, No. 5-6, pp. 95-102, 2005.
- 6) 鈴木孝佳, 高荒智子, 佐野大輔, 大村達夫: 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. 環境工学研究論文集, Vol. 41, pp. 339-346, 2004.
- 7) Ehrlich G.D. and Bailon P.: Identification of model peptides as affinity ligands for the purification of humanized monoclonal antibodies by means of phage display, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Vol. 49, pp. 443-454, 2001.
- 8) Heyd B., Pecorari F., Collinet B., Adjadj E., Desmadril M. and Minard P.: In vitro evolution of the binding specificity of Neocarzinostatin, an enediyne-binding chromoprotein. *Biochemistry*, Vol. 42, pp. 5674-5683, 2003.
- 9) Ma J., Campbell A. and Karlin S.: Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *Journal of Bacteriology*, Vol. 184, No. 20, pp. 5733-5745, 2002.
- 10) Mercero J.M., Mujika J.L., Matxain J.M. Lopez X. and Ugalde J.M.: Incremental binding free energies of

aluminum(III) vs. magnesium(II) complexes, *Chemical Physics*, Vol. 295, 1pp. 75-184, 2003.

11) Zuo R., Ormek D. and Wood T.K.: Aluminum- and mild steel-binding peptides from phage display. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 68, pp. 505-509, 2002.

12) Aremu D.A. and Meshitsuka S.: Accumulation of aluminum by primary cultured astrocytes from aluminum amino acid complex and its apoptotic effect, *Brain Research*, Vol. 1031, pp. 284-296, 2005.

13) Rezabal E., Mercero J.M., Lopez X. and Ugalde J. M.: A study of the coordination shell of aluminum(III) and magnesium(II) in model protein environments: Thermodynamics of the complex formation and metal exchange reactions, *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 100, pp. 374-384, 2006.

14) Mercero, J.M., Matxian, J.M., Rezabal, E., Lopez, X. and Ugalde, J.M.: The first solvation shell of aluminum (III) and magnesium (II) cations in a protein model environment, *International Journal of Quantum Chemistry*, Vol. 98, pp.

409-424, 2004.

15) Schwartz B., Markwalder J.A., Seitz, S.P., Wang, Y. and Stein, R.L.: A kinetic characterization of the glycosyltransferase activity of *Eschericia coli* PBP1b and development of a continuous fluorescence assay, *Biochemistry*, Vol. 41, 12552-12561, 2002.

16) Bottero J.Y., Axelos M., Tchoubar D., Cases J.M., Fripiat J.J. and Fiessinger F.: Mechanism of formation of aluminum trihydroxide from Keggin Al13 polymer, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 117, Nov. 1, pp. 47-57, 1987.

17) Furrer G., Ludwig C. and Schindler P.W.: On the chemistry of the Legging Al3 Polymer, I. acid-base properties, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 149, Nov. 1, pp. 56-67, 1992.

18) Lu G., Qu J. and Tang H.: The electrochemical production of highly effective polyaluminum chloride, *Water Research*, Vol. 33, No. 3, pp. 807-813, 1999.

平成 18 年 8 月 31 日

Acquisition of Algal Genes Coding Proteins Responsible for Coagulation Inhibition Using Phage Display Technique

Daisuke SANO¹, Tomoko TAKAARA¹, Takayoshi SUZUKI¹ and Tatsuo OMURA¹

¹Dpt. of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

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 bring about the inhibition of coagulation on the flocculation process in drinking water treatment systems. However, the inhibitory organic matters produced by algae have remained to be elucidated. In this study, phage display library of proteins from *M. aeruginosa* was used to isolate algal proteins responsible for the coagulation inhibition. Several algal genes coding possible inhibitory proteins were obtained by biopanning using polyaluminum chloride. Amino acid sequences of proteins deduced from the obtained gene suggested that hydroxyl groups in serine and threonine, formamide groups in glutamine and asparagine, thiol groups in cysteine and carboxyl groups in glutamic acid and aspartic acid were involved in the coagulation inhibition. The result of the homology search suggested that metalloenzymes such as glycosyl transferase could be also responsible for the coagulation inhibition.