

Microcystis aeruginosa 代謝産物からの AI 錯体形成能を有する有機物の分離

東北大学 学生員 高荒 智子
 東北大学 丸山亜紀子
 東北大学 正会員 大村 達夫
 東北工業大 正会員 今野 弘

1. はじめに

我が国における水道原水の約40%を供給しているダム湖では富栄養化が原因の藻類増殖が長年続いており、浄水処理プロセスに対して様々な影響を及ぼしている。中でも藻類由来有機物（AOM：algal organic matter）による凝集阻害¹⁾²⁾は、処理効率低下を引き起こすばかりでなく、水道水中にAIを残留させて健康被害を招く恐れもあるため、無視出来ない問題である。本研究では、凝集阻害メカニズム解明の研究の一端として、*Microcystis aeruginosa* (NIES-91)の純粋培養により採取したAOMについて分子量分布を調べ、さらにAI錯体形成能を有する物質の分離を試みた。

2. 実験方法

本実験のフローチャートを図-1に示す。

実験には *M. aeruginosa* を 25℃, 5000Lux のもと純粋培養を行ったものを使用した。各生長期における培養液から、AOMの分離を行った。

2-1 ゲルクロマトグラフィ

培養した藻類を 0.22 μm メンブレンフィルター (GSWPO4700, MILLIPORE) で濾過し、濾過液中の物質をゲルクロマトグラフィにより分子量ごとに分離した。使用カラムは Superdex 200 HR10/30 (M.W. 10-600kDa) である。バッファーは 0.05M リン酸ナトリウム 0.15M NaCl (pH7.0) を使用し、流速は 0.5ml/min とした。分画したサンプルは 2ml ずつ回収し、DOC および紫外吸光度 (260nm) を測定した。

2-2 アフィニティクロマトグラフィ

藻類から生産された物質のうち、溶解性で錯形成能を有する物質の分離のためにアフィニティクロマトグラフィを行った。ゲルクロマトグラフィ同様、サンプルは培養した藻類の濾過液とした。カラムには、Hitrap chelating (1ml) に凝集剤（硫酸アルミニウム）をリガンドとして吸着させたものを用いた。

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、溶出バッファーによりリガンドに結合した錯形成能を有する物質の溶出を行った。溶出バッファーは開始バッファーと同じ成分で pH3.5 とした。フラクションは 2ml ずつ回収し、錯形成能を有する物質を分離し回収した。この実験での流速は 0.4ml/min である。回収したフラクションを用いて SDS-PAGE によりタンパク質分析を行った。

3. 実験結果および考察

以下に実験結果の一部を示す。

3.1 ゲルクロマトグラフィによる AOM の分子量分画

定常期前期（培養日数11日目）、中期（培養日数16日目）に生産された有機物の分子量分画の結果を図-2に示す。サンプルはロータリーエバポレーターで10倍に濃縮した後、ゲルクロマトのバッファーを用いて透析を行ったものを 2ml 使用した。いずれも経過時間 20 分および 45 分付近に吸光を示した。これは、M.W.2,000kDa 付近のものと M.W.10-20kDa 付近に相

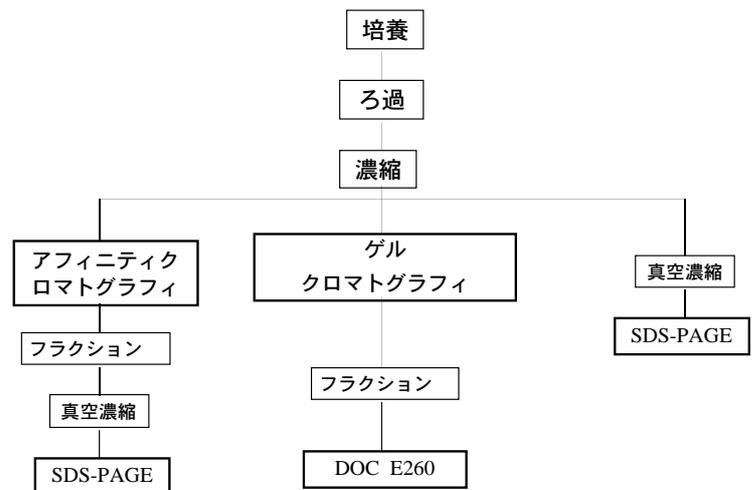


図-1 実験フローチャート

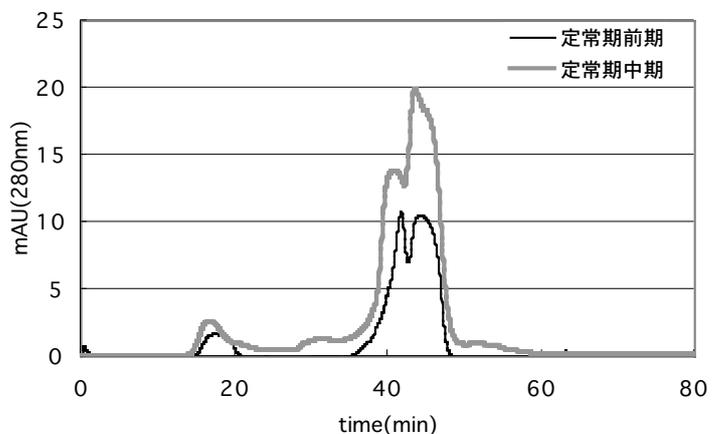


図-2 ゲルクロマトグラフィによる AOM（定常期前期、中期）の分子量分画

Key words: 凝集阻害, 藻類, Algal Organic Matter, アフィニティクロマトグラフィ, ゲルクロマトグラフィ, SDS-PAGE
 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 06 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 Tel 022-217-7483 Fax 022-217-7482

当していた。AOM 生産量をピーク高さから判断すると、培養日数が経つものほど増加しているという結果であった。特に M.W.10-20kDa 付近の物質の増加が大きく、代謝によるものであると予想された。

代謝物質と細胞内容物の比較を行うため、定常期中期の藻類に超音波処理 (60W 10min × 3) を施し、上と同様な方法で分子量分画を行った(図-3)。超音波処理後に得たサンプルは、濃縮作業を行わずに分子量分画を行った。その結果、M.W.40-2,000kDa 付近の有機物が著しく増加し、特に 2,000kDa 付近のものに対しては、超音波処理なし(10倍濃縮後)の場合と比べ、吸光度にして約18倍まで増加した。この結果から、藻体内の有機物分子量はM.W.40-2,000kDa付近の高分子のものが主に含まれているのに対し、光合成過程で分泌される有機物は、M.W.10kDa 付近、あるいはそれ以下の物質が水中に放出されることが示唆された。

3.2 アフィニティークロマトグラフィによる錯形成能を有する AOM の分離

リガンドにアルミニウムイオンを用いたアフィニティークロマトグラフィの結果を図-4に示す。担体に結合したアルミニウムイオンは実験開始直後 pH7 に調整した開始バッファーで平衡化されるため、サンプル注入時には殆どのアルミニウムが多価水和物の状態に変化していると考えられる。錯形成能を持たない有機物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ため、最初に大きなピーク (0-10min) が現れる。一方、錯形成能を有する有機物は溶出バッファーによって洗い流されるため、溶出バッファー添加後にピーク (24min 以降) となって現れている。

定常期前期、中期に生産された AOM において、アルミニウム多価水和物質に対して親和性を持つ物質が確認された。溶出バッファーに2つのピークが現れていることから、それぞれのピークに含まれる AOM 間には錯形成能の違いがあると考えられる。分離された有機物 (Fraction1,2) については、SDS-PAGE によるタンパク質検出を行った(図-5)。2つのフラクションのうちフラクション1中に M.W.40-70kDa に相当するタンパク質が確認された。これより、凝集阻害のうち多価水和物に吸着しフロック成長の妨害に関わる物質として 40-70kDa の物質が関与していることが推測された。

4 終わりに

Microcystis aeruginosa の各生長期ごとに生産される有機物の分子量分布、およびその Al 錯体形成能について検討した。その結果、AOM の分子量として、細胞内容物において M.W.40-2,000kDa 付近、藻体外への分泌物質として 10-20kDa 付近の物質が確認された。また、アフィニティークロマトグラフィによる Al 錯体形成実験では、Al 多価水和物と錯体形成能を有する AOM の存在が確認されたが、物質によって錯体形成能の違いがあることが示唆される結果を得た。タンパク質検出では M.W.40-70kDa の物質が確認され、フロック成長を妨げる物質の一つであると予想された。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、国立環境研究所微生物系統保存施設より *Microcystis aeruginosa* の株を分与していただいた。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) Bernhardt, H. et al. (1982) Proc. of Japanese and German workshop on Waster Water and Sludge Treatment, 593-637
- 2) 菅原ら (1996) *Microcystis* spp. コロニーの細胞由来有機物質 (AOM) が凝集沈殿処理に与える影響, 水道協会雑誌, 65 (8), 39-50

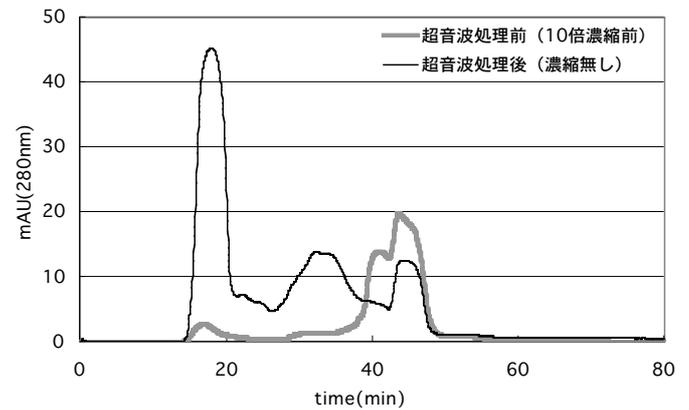


図-3 ゲルクロマトグラフィによる AOM (定常期後期、超音波による藻体破碎前後) の分子量分画

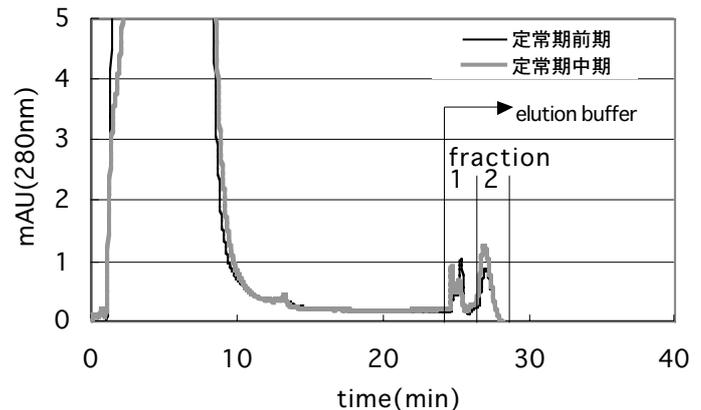


図-4 アフィニティークロマトグラフィによる多価アルミニウム水和物に対する錯形成能を有する AOM の分離



図-5 SDS-PAGE による錯体形成タンパク質の分離