土木学会第 66 回年次学術講演会(平成 23 年 9 月)

膜分離活性汚泥法において膜ファウリングを引き起こしている タンパク質のメタプロテオーム解析

北海道大学大学院　正会員　○三好　太郎　相沢　智康
正会員　木村　克輝　フェロー　渡辺　義公

1. はじめに

膜の閉塞(膜ファウリング)は膜分離活性汚泥法(MBR)における最大の問題であり、膜ファウリングの原因物質(膜ファウリング物質)の特性を含めた膜ファウリング発生機構の解明が待望されている。タンパク質は MBR における主要な膜ファウリング物質であるため、膜ファウリングを引き起こしているタンパク質の性質や機能を明らかにすることができれば膜ファウリング発生機構に対する理解を大幅に深めることが可能となる。本研究では、実都市下水を処理するパイロットスケール MBR における膜ファウリング物質に対し、2D-PAGE(タンパク質を等電点及び分子量に基づいて分離) と N 末端アミノ酸配列解析から構成されるメタプロテオーム解析を適用することで、MBR において膜ファウリングを引き起こしているタンパク質の性質/機能解析を行うことを目的とした。

2. 実験方法

本研究では、札幌市創成川下水処理場内に設置した 2 系列のパイロットスケール MBR(MBR1 及び 2)を、汚泥滞留時間(SRT)を変化させて同時に運転した。MBR1 及び MBR2 の SRT はそれぞれ 10 日及び 50 日に設定した。パイロットスケール MBR の流入原水には、同処理場の最初沈殿池流入水を用いた。本実験で用いた膜(三菱レイヨン・エンジニアリング製)は公称孔径 0.4 μm のポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜である。連続運転終了後、MBR 槽内から閉塞膜を取り出し、スポンジを用いて膜表面をふき取ったのち、pH 12 の水酸化ナトリウム水溶液に 24 時間浸漬させることで膜ファウリング物質を抽出した。抽出した膜ファウリング物質を含む水溶液を分画分子量が 10 kDa の再生セルロース製限外濾過(UF)膜を装着した攪拌式膜ろ過装置を用いて濃縮した。UF 膜濃縮完了後の濃縮液に対し、三塩化酢酸(TCA)を終濃度が 10%となるように添加し、氷上に 1 時間静置した後、遠心分離(15,000 rpm; 5 分間)を行うことによって濃縮液中のタンパク質を回収した。遠心分離によって沈殿したペレットは冷却アセトン(80% (v/v))を用いて 2 度洗浄した後、2D-PAGE に供した。また、2D-PAGE で分離したタンパク質を PVDF 膜にブロッティングした後、N 末端アミノ酸配列解析に供した。2D-PAGE 及び PVDF 膜へのブロッティングはそれぞれ 2D-PAGE 泳動装置(discRun, Atto 社製)及び平板型ミニ転写装置(NA-1512S, 日本エイドー社製)を用いて、製造者の推奨に従って実施した。N 末端アミノ酸配列解析は、エドマン分解反応によって切り出したアミノ酸を HPLC で検出することで解析した。分析はペプチドシーケンサー(PERKIN ELMER、Procise 492)を使用して行った。

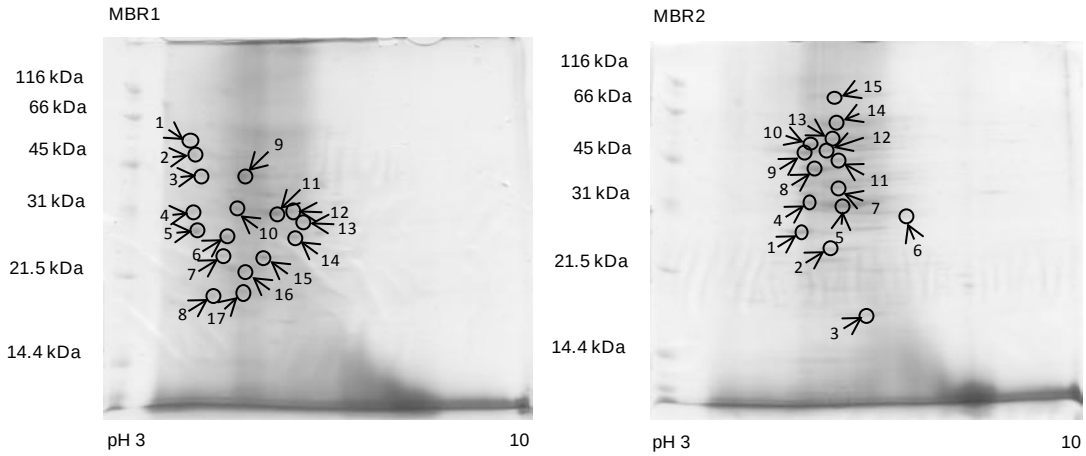
3. 実験結果

3.1 パイロットスケール MBR の連続運転

パイロットスケール MBR の連続運転は 15 日間継続した。連続運転終了時点における MBR1 及び MBR2 における全ろ過抵抗値はそれぞれ 3.6 及び $0.6\times10^{11}m^{-1}$ であり、SRT を短く設定した MBR1 において膜ファウリングがより顕著であった。連続運転終了後、それぞれの MBR に使用していた膜から膜ファウリング物質を抽出し、2D-PAGE に供した。**図−1** に閉塞膜から抽出した膜ファウリング物質の 2D-PAGE 泳動図を示す。それぞれの MBR から抽出した膜ファウリング物質のスポットパターンは大きく異なっていた。運転条件の異なる MBR においては、膜ファウリングを引き起こしていたタンパク質の性質が大きく異なっていたことが明らかである。運転条件によって主要な膜ファウリング発生機構が異なっていた可能性が示唆される。

2D-PAGE を用いて分離したタンパク質を N 末端アミノ酸配列解析に供するため、PVDF 膜に対してブロッティングを行った。**図−1** 中の番号で示したタンパク質は、ブロッティング後、PVDF 膜上において回収することができたタンパク質である。本研究では、膜ファウリングを引き起こしていたタンパク質を 2D-PAGE を用いて分離したことで、SDS-PAGE(タンパク質を分子量のみに基づいて分離)を適用していた我々の以前の検討[1)]と比較して、回収できたタンパク質の種類が飛躍的に増加した。

キーワード：膜分離活性汚泥法、膜ファウリング、メタプロテオーム解析
連絡先：〒060-8628 札幌市北区北 13 条西 8 丁目北海道大学環境ナノ・バイオ工学研究センター TEL:011-706-6267



図−1 膜ファウリング物質の 2D-PAGE 泳動図

3.2 膜ファウリングを引き起こしていたタンパク質の同定

N 末端アミノ酸配列解析に供したタンパク質のうち、一部のタンパク質についてはアミノ酸配列を正確に決定することができなかった。これらのタンパク質については、N 末端がなんらかの修飾を受けていたことによってエドマン分解反応が進行しなくなっていたものと考えられる。アミノ酸配列解析に成功したタンパク質の中で、MBR1 の膜ファウリング物質に含まれていた 6 番のタンパク質は OprF、10 番のタンパク質は OprD であり、MBR2 の膜ファウリング物質中に含まれていた 2 番のタンパク質は OprF であると同定された。これは、筆者らが知る限り、実際の MBR で膜ファウリングを引き起こしていたタンパク質の同定にはじめて成功したものである。今回、同定されたタンパク質は、いずれも *Pseudomonas* 属に属する細菌の外膜タンパク質である。これらのタンパク質は、リポ多糖から構成される細胞組織内に固定化されていることから、疎水部を有してはいるものの、本来の構造では、疎水部はリポ多糖と接しており、水層には露出していない。加えて、タンパク質全体を考慮した場合の疎水度も比較的低い。これらのタンパク質が、疎水性相互作用によって膜へ吸着していた可能性は低いと考えられる。一方で、今回同定に成功したタンパク質はいずれも本来の立体構造を維持しやすいタンパク質である。本来の構造を維持しているタンパク質は、変性を受けたタンパク質と比較して、タンパク質分解酵素による分解を受けにくい。また、上述した通りこれらのタンパク質は細胞中では、リポ多糖から構成される細胞組織内に存在しているタンパク質であるが、リポ多糖と共存している場合には、単独で存在している場合と比較して、熱変性及びタンパク質分解酵素を受けにくいことも明らかとなっている [2)]。以上のことを考慮すると、MBR の活性汚泥懸濁液中においては、今回同定されたタンパク質を核として、細胞膜の一部が比較的大きい粒子のまま残存していた可能性が考えられる。これまで、膜孔径近傍の粒径を有する成分が膜ファウリングの発生に大きく寄与していた可能性を指摘してきたが、そのような成分の活性汚泥懸濁液中における挙動については不明であった。本研究で、膜ファウリングに実際に関与していたタンパク質を同定したことによって、膜ファウリングを引き起こしやすい成分の活性汚泥懸濁液中における挙動に関する理解が大幅に深まるものと考えられる。

4. まとめ

2D-PAGE 及び N 末端アミノ酸配列解析を用いて、実都市下水を処理する MBR において実際に膜ファウリングに関与していたタンパク質の同定を試みた。タンパク質の分離に 2D-PAGE を適用したことによって、タンパク質の分離能が飛躍的に向上し、より多くのタンパク質について N 末端アミノ酸配列解析が実施できるようになった。本研究では、運転条件の異なる 2 系列の MBR から、合計 32 種類のタンパク質を分析したが、そのうち 3 種類のタンパク質を同定することに成功した。これは、筆者らが知る限り、世界で初めての成功例である。今回、同定に成功したタンパク質は、いずれも *Pseudomonas* 属の外膜タンパク質であり、その性質から、これらのタンパク質が核となり、細胞膜の一部が活性汚泥懸濁液中に比較的大きい粒子として残存していた可能性が示唆された。

参考文献

1) Miyoshi et al., In: Proceedings of 9th Membranes in Drinking and Industrial Water Treatment, Trondheim, June, 2010.
2) Freulet-Marrière et al., Res. Microbiol. 151 (2000) 873-876.