

アルミニウムに親和性を持つ

Microcystis aeruginosa 莢膜由来有機物からの糖とタンパクの検出

東北大学大学院	学生会員	○西村直貴
山形大学	正会員	伊藤紘晃
東北大学大学院	正会員	八巻哲也
東北大学大学院	正会員	真砂佳史
東北大学大学院	フェロー会員	大村達夫

1. はじめに

ダムや湖沼などの閉鎖性水域では、水温が上昇する夏期を中心として富栄養化による藻類の大量増殖が発生しており、これらの水域から取水している浄水場では藻類由来有機物 (Algogenic Organic Matter: AOM) による凝集阻害が発生している。凝集阻害を引き起こす藻類は数種存在するが、中でも *Microcystis aeruginosa* はその代表種となっている。凝集阻害に対して、処理場では凝集剤の注入率の増加といった暫定的な対応がなされているが、これは処理水中の残留凝集剤成分の増加や凝集剤コストの増大など副次的な問題を招いている。そのため、凝集阻害に対する抜本的な対策が切望されている。

凝集処理においては、主にポリ塩化アルミニウム (PAC) 等のアルミニウム系凝集剤が多く用いられている。AOM に起因する凝集阻害メカニズムの1つとして、AOM が凝集剤中のアルミニウムと錯体を形成することによる荷電中和作用の妨害が考えられる。*M. aeruginosa* 細胞表面の莢膜に由来するAOMがPACによる凝集を阻害することが報告されている¹⁾が、その機構はわかっていない。*Microcystis* は細胞表面に保持される細胞外粘質物である莢膜を大量に生産することが報告されており²⁾、その主成分は糖質、タンパク質、金属であるという報告がある^{1,3)}。そのような成分の中で、アルミニウムと親和性を持つ成分を特定することは凝集阻害の問題を解決する一助となると考えられる。

本研究では、凝集阻害を引き起こす代表藻類である *M. aeruginosa* から莢膜成分を分離し、アフィニティークロマトグラフィーによりアルミニウムと親和性を持つ莢膜由来有機物の分離を行った。その後、得られた莢膜由来有機物の組成分析を行った。

2. 実験方法

2.1 *M. aeruginosa* の莢膜成分の回収

平成23年8月18日に三春ダムより採取した *M. aeruginosa* を含む試料水を40 ml 遠心チューブに分注し、遠心分離 (37,000×g, 20°C, 15 min) を行った。遠心分離は15 min を1セットとし、遠心チューブ内の藻体がペレットになるまで5セット繰り返した。遠心分離操作後、上清を破棄し、 1.0×10^4 M の NaOH 溶液を40 ml 加え、10秒間ボルテックスを

行い、藻体を再懸濁させた。再懸濁後、20°Cで1時間静置することにより、莢膜を可溶化した。この藻体を含めた NaOH 溶液40 ml を試料として回収した。回収した試料に1 M HCl を3 μ l 添加し、孔径0.45 μ m のシリンジフィルター (MILLEX-HV Filter Unit, Millipore) でろ過を行い、藻体を除去した。回収したろ液は、エバポレーター (EYELA) で濃縮を行った後、凍結乾燥 (Yamato) を行うことで莢膜成分の乾燥試料とした。

2.2 アルミニウムをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー

アルミニウムをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーを行い、莢膜からアルミニウムに親和性を持つ有機物を分離した。装置には FPLC (ÄKTApurifier, Amersham Pharmacia Biotech)、アフィニティークラムには HiTrap Chelating HP Columns (5 ml, GE Healthcare) を使用した。まず、超純水を送液しカラムを洗浄した後、開始バッファー (20 mM 酢酸アンモニウム, pH 7.0) を送液しカラム内の平衡化を行った。次いで0.1 M の $Al_2(SO_4)_3$ 水溶液2.5 ml をカラムに導入し、一晚静置することでカラムに Al を固定化させた。静置後、開始バッファーを送液し、カラムに固定化されていない余分な Al を除去し、また、カラム内の平衡化を行った。開始バッファー中に莢膜試料を1000 mg/l となるよう溶解させ、この溶液2.5 ml を試料としてカラムに導入した。さらに開始バッファーをカラムに送液することで、Al と親和性を持たない莢膜成分を含有する試料を除去した。次に溶出バッファー (20 mM 酢酸アンモニウム, 50 mM EDTA, pH 7.0) 15 ml をカラムに導入し、溶出液を Al と親和性を有する莢膜成分として回収した。

2.3 乾燥試料の分子量分画

ゲルろ過クロマトグラフィーにより、アフィニティークロマトグラフィー前後の莢膜試料の分子量分布を調べた。分析には、FPLC 及びゲルクロマトカラム Superdex 75 10/300 GL ($\Phi 1.0 \times 30$ cm, GE Healthcare) を用い、示差屈折率 (RI-8020, TOSOH) 及び吸光度 (280 nm) を検出した。乾燥試料は50 mM 重炭酸アンモニウム緩衝液 (関東化学, pH 8.0 \pm 0.05) に溶解させ、分析に供した。

2.4 ピリジルアミノ化法 (PA 化法) による糖鎖解析

HPLC (SHIMADZU) および蛍光検知器 (SHIMADZU, RF-10AXL) を用いて AI 親和性莢膜成分に含まれる糖の検出を行った。分析手法は、高橋 (1996) ⁴⁾ の手法を参考にした。試料をタンパク質分解酵素 Proteinase K (500 $\mu\text{g/ml}$, promega) で酵素処理し、糖ペプチドへと分解した。次に Glycopeptidase A from Almonds (≥ 0.05 unit/ml, Sigma-Aldrich) で酵素処理を行い、糖ペプチドから糖鎖を切り出した。その後、エバポレーターによる濃縮を行い、凍結乾燥を行った後、Cellulose Cartridge Glycan Preparation Kit (タカラバイオ) により試料中の夾雑物の除去を行った。最後に Pyridylation Manual Kit (タカラバイオ) を用い、糖鎖の還元末端に対し 2-アミノピリジンによる PA 化を施した後、PA 化した糖鎖を再度精製し、分析に供した。HPLC による分析では、逆相カラム (Shim-pack CLC-ODS カラム 0.6 \times 15 cm, SHIMADZU GLC) を用いて、誘導体化した糖鎖の溶出曲線を調べた。カラムの溶出ピークを観察することで、試料中に含まれる糖鎖の存在確認を行った。

3. 結果及び考察

図 1 に全莢膜試料 (a) および AI 親和性を有する莢膜試料の FPLC 分析の結果を示す。本研究ではカラム出口にて、紫外外部吸光 (UV) 及び示差屈折率 (RI) を測定した。UV はタンパク質の存在を示す指標であり、RI は、UV では検出されない糖などの有機物や、無機物の存在を示す指標である。

全莢膜試料に対する UV 測定の結果、6 kDa 付近で最も強いピークが確認され、さらに 58 kDa 付近および 5.2 kDa 以下に複数のピークが確認され、これらの分子量のタンパク質の存在が示された。また RI 測定の結果、5 kDa 付近のみに強いピークが確認された。しかし、AI 親和性を有する莢膜試料からは上記の大きなピークは全く見られなかったため、これらの有機物は AI に親和性を有していなかったことが示された。

AI 親和性を有する莢膜試料からは、UV のピークが 2 つ (図 1 (b) の B, D) と RI のピークが 2 つ (同 A, D) 検出された。また RI の負のピークが 1 つみられた (同 C)。UV のピークが検出されたことから、B と D にはタンパク質が存在していたと考えられる。AI 親和性を有する莢膜試料の測定で UV と RI のベースラインが安定しなかったのは、アフィニティークロマトグラフィーの際に混入したアルミニウムイオンやバッファーによる障害が起きたためと考えられる。

図 1 (b) の 4 地点 (A, B, C, D) の試料を分取し、PA 化を施したのち HPLC で蛍光を測定したところ、C でのみ糖の存在を示すピークが確認され、A, B, D には糖の存在は確認できなかった。B, D は UV のピークがみられたことから、アルミニウム親和性を有するタンパクが存在していた可能性がある。特に D では UV, RI 共に大きなピークが確認さ

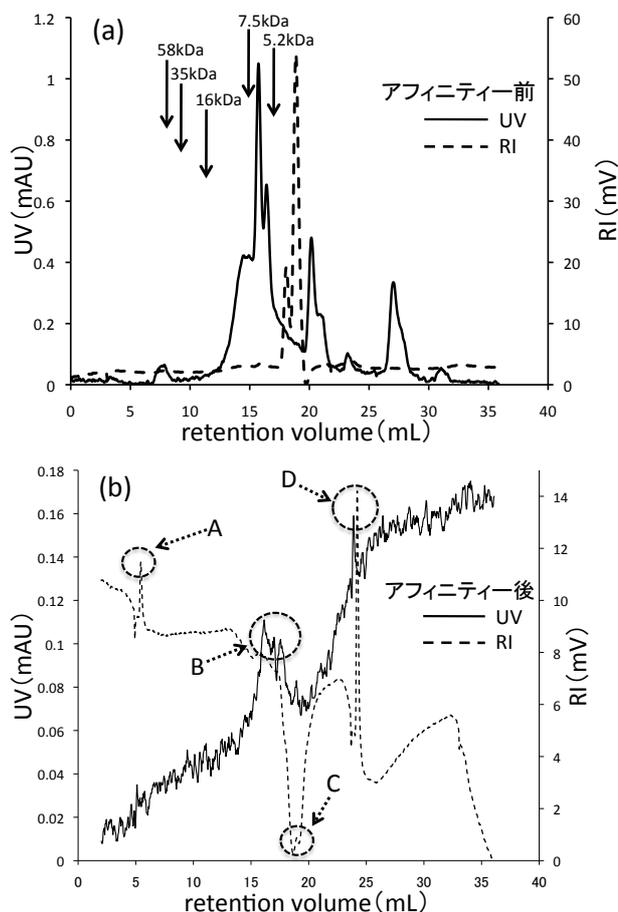


図 1. 全莢膜試料 (a) と AI 親和性を有する莢膜試料 (b) の UV および RI 測定結果

れたことから、AI 親和性を有する糖タンパクの存在が期待されたが、HPLC では糖は検出されなかった。アフィニティークロマトグラフィーでリガンドとして用いたアルミニウムが重合したものである可能性も考えられるが、今回の実験結果のみでは判断できなかった。A については、糖およびタンパク質以外の有機物であるか、アフィニティークロマトグラフィーの際に混入した気泡や夾雑物によるノイズである可能性が考えられる。AI 親和性を有する莢膜試料の分析では、試験に供することのできる試料の量に限りがあったことから、より多くの試料を供することで新たなピークが確認できる可能性がある。

4. おわりに

本研究の結果から、*M. aeruginosa* の莢膜中にアルミニウム親和性を持つ糖が存在することが確認され、また、アルミニウム親和性を持つタンパク質の存在が示唆された。本研究では定量的な分析を行っていないが、これらの有機物が凝集障害の要因であることが示唆された。

参考文献

1. 今江ら, 環境工学研究論文集, **47**, 643-650, 2010.
2. 雨宮ら, 陸水学雑誌, **45** (3), 187-193, 1984.
3. Nakagawa et al., *Agricultural and Biological Chemistry*, **51** (2), 329-337, 1987.
4. 高橋禮子, 糖蛋白質糖鎖研究法, 学会出版センター, 1996.