

Microcystis aeruginosa 細胞外多糖の凝集阻害能及び特性評価

東北大学
東北大学大学院 学生会員 ○石藤慎吾
東北大学大学院 須藤丈
バルセロナ大学 佐野大輔
東北大学大学院 正会員 大村達夫

1. はじめに

我が国において重要な水源であるダム湖等の閉鎖性水域では、富栄養化により藻類が大量発生し、その水を水源とする浄水場における浄水処理に様々な障害を生じさせている¹⁾。中でも凝集阻害は、現在の浄水処理システムの根幹を担う凝集プロセスで発生するため、浄水処理システム全体の効率に多大な影響を与えることとなる。この凝集阻害を引き起こす物質として、藻類に由来する有機物が検討されているが²⁾、詳細なメカニズムの解明や抜本的な対策には未だ至っていない。

実際の浄水処理プロセスにおいて、藻類細胞の破壊を伴わない凝集阻害が報告されているが³⁾、これは藻類細胞の表面が凝集剤と直接反応することで凝集効率が低下し、藻類細胞自体の難凝集性が発揮されている可能性がある。凝集阻害を引き起こすとされる代表的藻類種 *Microcystis aeruginosa* はグラム陰性細菌に分類され、その細胞表面にはリポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS) が存在することが知られている。本研究では凝集阻害誘因物質としてこの LPS に着目し、*M. aeruginosa* の LPS の分離精製と化学組成の分析、および凝集阻害能評価を行った。

2. 実験方法

2. 1. 藻類の培養

供試藻類には、国立環境研究所より分与された藍藻類 *M. aeruginosa* (NIES-87 株) を用いた。培養は *M. aeruginosa* 培地 (MA 培地)⁴⁾ で温度 30 °C、照度 4000 Lux (12 h 明暗) の条件下で無菌培養し、定常期に達した藻体を使用した。定常期の藻体を含む MA 培地を遠心分離し (4000 ×g, 20 °C, 10 min)、ペレットを 0.9 % 生理食塩水に懸濁させ藻体を洗浄した。その後再び遠心分離 (4000 ×g, 20 °C, 10 min) を行うことで藻体細胞を回収した。回収した藻体は凍結乾燥後 -80 °C で保存した。

2. 2. LPS の分離精製

LPS の抽出はフェノール-水抽出法にて行った⁵⁾。MA 培地 400 mL から回収した藻体を 68 °C に加熱した滅菌超純水 12 mL に懸濁させた後、同じく 68 °C に加熱した等量の 90% フェノールを加え、68 °C を保ったまま 15 分間激しく攪拌することで細胞の破壊と可溶化を行った。その後 2 °C の氷中で 15 分間を静置した後、遠心分離 (4000 ×g, 2 °C, 30 min) を行い、水層、中間層、フェノール層に分離した試料から水層のみを回収することで、LPS を含む親水性有機物を得た。水層回収後のフェノール残渣に 68 °C の等量の滅菌超純水を加え、再度フェノール-水抽出を行い先に回収した試料に加えた。また、得られた試料を精製水中で 48 時間透析 (MWCO 3500, Spectra) することで試料中に残存しているフェノール分を除去した。

次に、フェノール-水抽出法によって得た親水性有機物を 0.1 M Tris/HCl Buffer (pH 7.4) に懸濁させ、Ribonuclease A (SIGMA) を 1 mg/mL の濃度となるよう添加し、37 °C で 3 時間反応させた。反応後の試料を超純水中で 24 時間透析し、続いて遠心分離 (105000 ×g, 20 °C, 4 h) を行った。遠心分離後、ペレットを超純水に懸濁させ凍結乾燥を行うことで精製した LPS 試料を得た。

2. 3. LPS の凝集阻害能の評価

凝集阻害能の確認は、ポリ塩化アルミニウム (Polyaluminum chloride : PAC) を用いた凝集実験により行った。コントロール原水は、滅菌水道水に標準カオリン物質を 20 mg/L となるように加え、100 g/L NaHCO₃ を用いてアルカリ度 50 度に調整し、1 M HCl または 1 M NaOH を用いて pH=7.00±0.05 に調整したものを使用した。凝集実験は、コントロール原水に LPS 試料を添加した後、PAC を 10 mg/L となるように注入し、急速攪拌 (100 rpm, 2 min) および緩速攪拌 (50 rpm,

15 min) を行い, 10 min の静置によってフロックを沈殿させた. また, 凝集実験前後の上澄水に対し波長 660 nm の吸光度 (A_{660}) を分光光度計により測定し, 懸濁物質の除去率を算定した.

2. 4. LPS 試料の組成分析

LPS の組成は, 主に Raziuddin⁶⁾ らの方法に従って分析した. 糖質の全量は, 標準物質としてグルコースを用いたフェノール-硫酸法により測定した. タンパク質は Dc Protein Assay キット (BIO-RAD) を用いた Lowry 法により測定し, 牛血清アルブミンを標準物質とした. RNA は分光光度計 (ND-1000, NanoDrop) の核酸測定モード (Nucleic Acid Measurement RNA-40) で行った.

3. 実験結果および考察

3. 1. 夾雑物の除去

藻体に対しフェノール-水抽出を行って得られた試料に対し 1.5%アガロースゲル電気泳動を行った結果, 抽出物中に核酸成分の存在が認められた. 続いて, RNase 処理及び透析処理を行った後の抽出物に対し電気泳動を行ったところ, 処理前に見られていた核酸成分が消失していたことから, フェノール-水抽出物に含まれる核酸成分は RNA であり, 上記処理により除去できることが確認された.

3. 2. LPS の凝集阻害能

図 1 は, RNA 除去操作後の LPS の添加量を変化させ凝集実験を行った結果である. 原水の TOC が 41.8 mg/L 以下の濃度で行った実験では, 除去率は 90%以上と良好な凝集が見られたが, TOC が 103 mg/L 以上の条件下では除去率は 20%以下にまで低下し, 凝集阻害が認められた. この結果により, LPS が凝集阻害誘因物質としての特性を有していることが明らかとなった.

3. 3. LPS の化学組成

今回の分離精製操作によって得られた LPS 試料にはタンパク質は検出されず, フェノール-水抽出法によって有効に除去されたことが示された. 一方 RNA は, 除去操作後もわずかながら存在した (0.99 %). これは RNA 除去操作である透析の条件を検討することで更に除去率の向上が期待できる. また糖質は, 82.9 %と高い割合で存在し, 恐らくは O 抗原の繰り返し糖鎖が, LPS

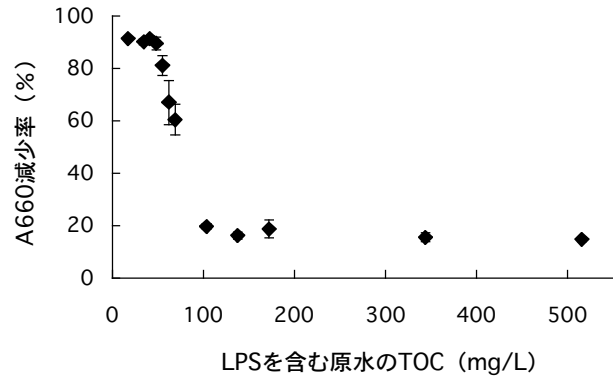


図 1. LPS 添加による A_{660} 減少率の変化

全体の中で高い存在割合を占めていることが示唆された. さらにこの LPS 試料については, リピド A に由来した脂質が存在しているものと考えられる.

4. 結論

本研究では, *M. aeruginosa* から LPS を含む親水性有機物をフェノール-水抽出法により抽出し, さらに RNase A による RNA 分解処理を施すことでその精製を行った. 得られた LPS 試料にはタンパク質, RNA はほとんど存在せず, 糖質が大部分を占めていることが明らかとなった. この LPS 試料に対しジャーテストを行うことで凝集阻害能を評価し, TOC = 103 mg/L で凝集阻害が起きることが示された.

参考文献

- 1) 佐藤敦久, 真柄泰基 (1996), 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, 155pp.
- 2) 菅原繁, 黒川眞弓, 真柄泰基, 胡建英 (1996), *Microcystis* spp. コロニーの細胞由来有機物 (AOM) が凝集沈殿処理に与える影響—AOM 中に含まれる有機物の除去特性とその化学的属性—, 水道協会雑誌, 68 (8), pp.39-50
- 3) 真柄泰基 (1992), 水道における生物障害に関する実態調査, 凝集阻害に関する研究—平成 4 年度研究報告書, pp.8-29
- 4) 西原一俊, 千原光雄 (1979), 藻類研究法, 共立出版, pp.294-305
- 5) O. Westphal, K. Jann (1965), Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure, *Methods in Carbohydr. Chem.*, 5, pp.83-91
- 6) S.Raziuddin, H. W. Siegelman, T. G. Tornabene (1983), Lipopolysaccharides of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Eu. J. Biochem.*, 137, pp.333-336