

アルミニウムに親和性を持つ *Microcystis aeruginosa* 由来莢膜の組成分析

東北大学

○西村直貴

東北大学大学院

学生会員

伊藤絃晃

東北大学大学院

学生会員

八巻哲也

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。

凝集剤には主にアルミニウム系のもの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凝集阻害が考えられる。*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¹⁾、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^{2,3)}。*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³⁾が、その機構はわかっていない。

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 GC-MS による莢膜中多糖の構成糖分析

莢膜乾燥試料を 5 mg 量りとり、100 μ g/ml のタンパク質分解酵素 Proteinase K (promega) 水溶液を 115 μ l 加えて 37°C で 1 hr タンパク質を分解した。続いて、96% H₂SO₄ を 345 μ L 加えて 72% H₂SO₄ とし、0°C で 1 hr 加水分解を行った。その後超純水を加えて 2 N H₂SO₄ にし、さらに 110°C で 1 hr 加水分解を行った。加水分解後の試料を NaOH を用いて中性化し、0.45 μ m のシリンジフィルターでろ過した。得られた試料は凍結乾燥機による濃縮を行い乾燥試料とした。次に、乾燥させた試料に無水ピリジン (Wako) 7 ml を加えて糖成分を溶解させ、さらにトリメチルシリルイミダゾール (Wako) 2.3 ml を加えてトリメチルシリル誘導体化を行い、この試料を GC-MS 分析に供した。

2.3 アルミニウムをリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィー

アルミニウムをリガンドとするアフィニティ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 Fast Protein Liquid Chromatography: FPLC (ÄKTA purifier, Amersham Pharmacia Biotech)、アフィニティカラムには 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 Al₂(SO₄)₃ 水溶液 2.5 ml をカラムに導入し、一晩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

キーワード：凝集阻害, *Microcystis aeruginosa*, 莢膜, アルミニウム, アフィニティクロマトグラフィー, 糖

連絡先：宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06, TEL : 022-795-7483, E-mail : nishimura@water.civil.tohoku.ac.jp

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、莢膜中の Al と親和性を持たない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、溶出液を莢膜中の Al と親和性を有する成分として回収した。

2.4 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 (Φ1.0×30 cm, GE Healthcare) を用い、示差屈折率出器 (RI-8020, TOSOH) 及び吸光度 (280 nm) で検出した。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±0.05) に溶解させ、分析に供した。

3. 結果及び考察

GC-MS を用いてアフィニティ前における莢膜中多糖の構成糖分析を行ったところ、莢膜中には少なくともマンノース (Man), キシロース (Xyl), グルコース (Glu), ガラクトース (Gal) の存在が確認された (図 1)。アフィニティ後に回収されたアルミニウム親和性を持つ糖にも、これらの糖のいずれかが関与していると考えられる。

図 2 にアフィニティクロマトグラフィー前後の分子量分画の結果を示す。本研究ではカラム出口で、紫外吸光 (UV) 及び示差屈折率 (RI) を検出した。UV はタンパク質の存在を示す指標となる。また RI は、UV では検出されない糖や無機質の存在を示す指標となる。アフィニティ前の UV のピークは、7.5 kDa 付近にて最も強いピークが確認された他、5.2 kDa 以下の領域においても複数のピークが確認された。また 58 kDa 付近でも弱いピークが確認できた。今江ら³⁾の報告においても、7.5 kDa 付近に強いピークが確認されていることから、7.5 kDa 付近のタンパクは *M. aeruginosa* に特徴的なものであると考えられる。一方、RI では 5.2 kDa 付近にて強いピークが確認された。アフィニティ後の UV のピークは 7.5 kDa 付近の強いピークと、58 kDa 付近のピークが確認できた。一方、RI では 5.2 kDa 付近のピークが確認された以外は主立ったピークは確認されなかった。

以上の結果から、7.5 kDa 及び 58 kDa 付近のタンパク質にアルミニウム親和性が認められた。また糖に関しては、GC-MS によって多数の糖が検出されたことを考慮すると、RI での 5.2 kDa 付近のピークは糖に対応するものと予想される。ゆえに、5.2 kDa 付近にアルミニウム親和性を有する糖が存在すると考えられる。

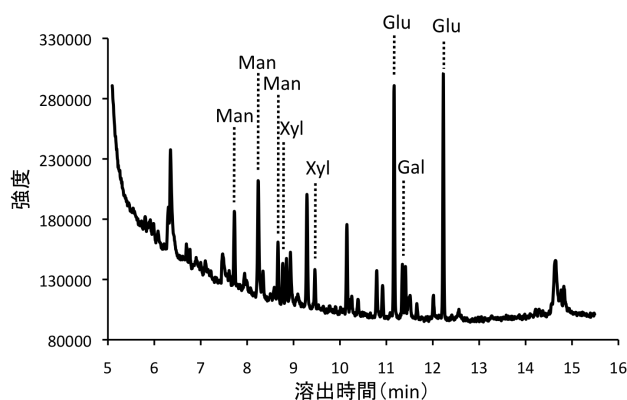


図 1. GC-MS による構成糖分析結果

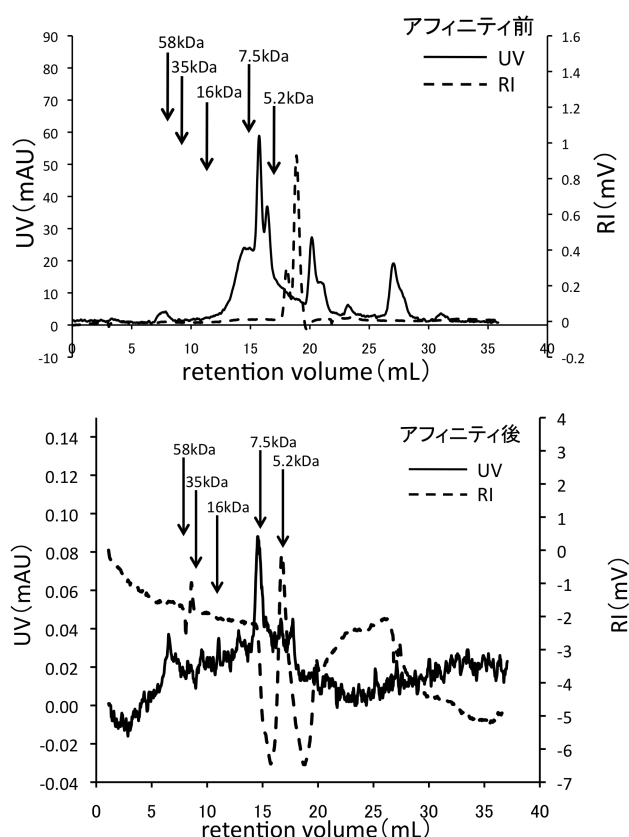


図 2. アフィニティクロマトグラフィー前後の分子量分布

4. おわりに

本研究では、アフィニティクロマトグラフィーを用いて *M. aeruginosa* 莢膜中のアルミニウム親和性成分の分離と分子量分画を行った。莢膜にアルミニウム親和性を持つ物質が存在することが確認され、莢膜と凝集阻害との関係が示唆された。

参考文献

1. 雨宮ら, 陸水学雑誌, **45** (3), 187-193, 1984
2. Nakagawa et al., *Agricultural and Biological Chemistry*, **51** (2), 329-337, 1987.
3. 今江ら, 環境工学研究論文集, 47, 643-650, 2010.