アルミニウムイオンに親和性を持つ *Microcystis aeruginosa* 莢膜由来有機物の組成分析

西村 直貴^{1*}・伊藤 絃晃²・八巻 哲也¹・真砂 佳史¹・大村 達夫¹

¹東北大学大学院工学研究科土木工学専攻（〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06）

²山形大学農学部食料生命環境学科（〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町1-23）

* E-mail: nishimura@water.civil.tohoku.ac.jp

浄水場における代表的な凝集阻害誘因藻類とされている*Microcystis aeruginosa*の莢膜から、アルミニウムと親和性を有する有機物を分離し、組成分析を行った。FPLCによる分析の結果、全莢膜試料からは糖とタンパク質が検出されたが、アルミニウムイオンに親和性を持つ莢膜試料からは糖のみ存在が確認された。後者についてキャピラリー電気泳動による構成糖分析を行った結果、グルコース、マンノースおよび酸性糖が存在することが確認された。これらの結果より、莢膜に含まれる糖鎖中の酸性糖が含有するカルボキシル基がアルミニウムと錯形成することによって、凝集阻害を引き起こしていることが示唆された。

Key Words : *Microcystis aeruginosa*, affinity chromatography, capsule, aluminum, saccharide

1. はじめに

現代社会の多様な水利用による水需要の拡大は莫大な量の水資源を必要としている。そのため、政令指定都市のように上水消費量の多い地域では、ダムや湖沼などの閉鎖性水域を水道水源にすることで、安定した上水供給量を確保していることが多い。しかしながら、水源としての重要な役割を担う閉鎖性水域の多くは滞留時間が長く、流入する栄養塩が蓄積しやすい特性を有することから、水質悪化が長年の問題となっている。中でも水温や日照時間が上昇する夏期を中心として生じる藻類の大量増殖は、閉鎖性水域における大きな問題の一つとなっている。藻類が大量増殖すると、集積して湖沼などの水面を濃緑色に呈する。この状況や、大量増殖している藻類はアオコと呼ばれる¹⁾。閉鎖性水域を水源とする浄水場では、アオコが引き起こす様々な水質問題への対応に苦慮している。

藻類が浄水処理システムに与える問題の中でも、凝集プロセスにおいて著しく凝集効率が低下する現象を凝集阻害と言う。凝集阻害発生の因子には、原水のpHの上昇、濁度の上昇、有機物濃度の増加などが挙げられ、いずれの因子においても藻類との関係が指摘されている¹⁾。

本来、凝集処理を行うことにより処理水中のコロイドおよび懸濁物質をフロック化させて沈降させるが、凝集阻害により凝集効率が著しく低下すると十分なフロックが形成されず、処理水の水質悪化を招く。原因藻類としては、藍藻類の*Microcystis*、珪藻類の*Synedra*や*Cyclotella*、緑藻類では*Dictyosphaerium*などが存在する¹⁾。中でもアオコを形成する*Microcystis aeruginosa*に起因する凝集阻害に関しては多くの報告があり^{2) 3)}、*M. aeruginosa*は凝集阻害を引き起こす藻類の代表種となっている。浄水場ではアオコ発生時の取水量の制限、凝集剤注入量の増強、前塩素および後塩素処理の調節などによって凝集阻害への対応を行っている¹⁾が、これらの対応は給水量の低下、アルミニウム等凝集剤成分の残留、塩素処理効率の低下等のデメリットを抱えており、根本的な解決には至っていない。特に凝集剤注入量の増強という対応策は、凝集剤に係る費用を増大させるだけでなく、発生汚泥量の増加にともなう汚泥処理費用の増大などの二次的問題を生み出すため、凝集阻害問題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おり、藻類由来有機物（Algal Organic Matter : 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

図1. AOMの分類

凝集阻害が考えられる。AOMは、細胞内有機物質 (Intracellular Organic Matter : IOM) , 細胞外有機物質 (Extracellular Organic Matter : EOM) , 細胞表面保持有機物質 (Surface retained Organic Matter : SOM) の3種類に分類される^{1) 4)} (図1) 。 Takaaraら⁵⁾は、実験室で培養された莢膜を持たない *M. aeruginosa* 中のIOMおよびSOM (細胞膜) 中のタンパク質が凝集阻害能を有していたと報告している。IOMは細胞の死滅および浄水処理場における前塩素処理に伴う細胞の破壊によって水中に放出される。EOMは光合成などの代謝活動に伴い、細胞外に放出される。そしてSOMは、細胞膜の外側に保持される。SOMのうち、細胞表面に保持される細胞外粘質物を莢膜と呼び、莢膜は細胞を取り巻くように形成されており、水中の物質と接する面積が一番大きい。また、アオコの主な構成藻類である *Microcystis* は莢膜を大量に生産する⁶⁾。そのため、*M. aeruginosa* 細胞表面の莢膜が凝集剤中のアルミニウムへ直接作用している可能性は十分考えられる。これまでに莢膜と凝集阻害の関係についていくつかの報告がなされている。浄水処理において藻類細胞の破壊を伴わない凝集阻害の例も報告されており、これは莢膜と凝集阻害との関係を示唆している。実際 *M. aeruginosa* の莢膜が凝集阻害能を有することを確認した報告もある⁷⁾。しかしながら、実験培養系で莢膜を保持した *M. aeruginosa* を培養し続けることは難しいため、莢膜に関する多くのことは未だ解明されていない。

Microcystis の莢膜はNa, Ca, Fe, Zn, Mnといった金属の吸着能を有する⁸⁾。また、印旛沼で採取した *Microcystis* 群体の莢膜にはアルミニウムイオンが濃縮されていることが確認されている⁷⁾。さらに、衰退期の *Microcystis* より回収した分子量1万~10万のEOMにはアルミニウムとの錯体形成能が認められている⁹⁾。これらの報告は、*Microcystis* の莢膜が凝集剤中のアルミニウムに作用していることを示唆している。*Microcystis* の莢膜の主成分は糖質であり、他にもタンパク質、金属等が含まれている^{8) 7) 9)}。しかし、それらの物質と凝集剤中のアルミニウムとの詳細な反応機構や、アルミニウムにどのような物質が吸着するかなどは未だ明らかにされておらず、莢膜に

よる凝集阻害のメカニズムについて十分な解明には至っていない。

本研究では、凝集阻害を引き起す代表藻類である *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。また、アフィニティークロマトグラフィー前後の莢膜由来有機物中の糖とタンパク質の有無を調べ、構成糖分析を行った。

2. 実験方法

2.1 *M. aeruginosa* の莢膜成分の回収方法の検討

平成23年8月18日にアオコの発生している三春ダムより *M. aeruginosa* 群体を含む水試料を採取した。採取の時点では、アオコが多く見られ始めた時期であり、*M. aeruginosa* が増殖している期間であった。前実験として、既存の *Microcystis* 群体の破壊および莢膜の回収方法の有効性を検討した。先行研究では、ボルテックスによる激しい攪拌により *M. aeruginosa* 群体を壊し、その後莢膜を藻体表面から超純水に溶出させている^{7) 9)}。本研究でも初めにこの手法を試したが、今回の試料においては、ボルテックスによる攪拌後、顕微鏡で確認したが群体は破壊されておらず、莢膜試料を得られなかった。一方、0.5 M 水酸化ナトリウム溶液により溶液中のpHを上昇させ莢膜を可溶化させる手法もある⁶⁾が、この手法では高いpHにより細胞が破壊されることが懸念される。そこで、莢膜を可溶化させる際に加える水酸化ナトリウムの濃度をそれぞれ 1.0×10^{-1} M, 1.0×10^{-2} M, 1.0×10^{-3} M, 1.0×10^{-4} M, 1.0×10^{-5} Mとした場合の莢膜回収量と水酸化ナトリウム溶液添加後の細胞の様子を目視または顕微鏡で比較し、最適な水酸化ナトリウム濃度の検討を行った。

M. aeruginosa 群体は立体的に形成されており、顕微鏡観察で細胞数を計数するのは非常に困難である。また、採取したアオコ試料は群体が水面に浮遊しており不均一であったため、今回の実験では群体数の計数を行わなかった。

2.2 *M. aeruginosa* の莢膜成分の回収

M. aeruginosa からの莢膜成分の回収は以下の手順で行った。平成23年8月18日に三春ダムより採取した *M. aeruginosa* 群体を含む試料水を40 ml遠心チューブに分注し、遠心分離 ($37,000 \times g$, 20°C) 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ベレットになるまで5セット繰り返した。遠心分離操作後、上清を破棄し、水酸化ナトリウム溶液を40 ml加え、10 sec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 hr静置することにより、莢膜を可溶化した。この藻体を含めた水酸化ナトリウム溶液40 mlを試料とし

て回収し、顕微鏡で莢膜成分が藻体から分離されているかを確認した。回収した試料に 1 M 塩酸を添加し、pH を中性付近に調整した。その後、孔径0.45 μm 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。回収したろ液をエバポレーター (EYELA) で濃縮を行った後、凍結乾燥 (Yamato) により莢膜成分の乾燥試料を得た。

2.3 GC-MSによる莢膜中多糖の構成糖分析

分析手法は、Pludeら¹⁰⁾の手法を参考にした。莢膜乾燥試料を5 mg量りとり、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のタンパク質分解酵素 Proteinase K (promega) 水溶液を115 μl 加え37°Cで1 hrタンパク質を分解した。Proteinase Kは、多くのタンパク質を分解可能で、至適pHが広いことから、本実験のタンパク質分解酵素として選択した。続いて、96%硫酸を345 μl 加えて72%硫酸とし、0°Cで1 hr加水分解を行った。その後超純水を加えて1 M硫酸にし、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1 M水酸化ナトリウム溶液を用いて中和し、0.45 μm のシリンジフィルター (MILLEX-HV Filter Unit, Millipore) でろ過した。得られた試料は凍結乾燥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。GC-MS分析にはGC-MS装置 (Agilent 5975C, Agilent) および無極性カラムのInert Cap 1MS (内径0.25 mm, 長さ30 m, 膜厚0.25 μm , ジーエルサイエンス) を使用し、キャリアガスにはヘリウムを用いた。温度条件は150°Cを2 min維持した後、8°C/minで250°Cまで升温した。

2.4 アルミニウムイオンをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー

アルミニウムイオン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、アルミニウムに親和性を持つ莢膜由来有機物を分離した。本研究では、AOMとの反応性の高い硫酸アルミニウム¹⁾をリガンドとして用いた。使用するバッファー等の条件はTakaaraら⁹⁾の手法を参考にした。クロマトグラフィー装置にはFPLC (ÅKTApurifier, Amersham Pharmacia Biotech) を、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の硫酸アルミニウム水溶液2.5 mlをカラムに導入し、一晩静置することでカラムにアルミニウムイオンを固定した。静置後、開始バッファーを送液し、カラム

に固定されていない余分なアルミニウムイオンを除去し、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1,000 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アルミニウムと親和性を持たない莢膜由来有機物を除去した。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、溶出液をアルミニウムに親和性を持つ莢膜由来有機物として回収した。

2.5 乾燥試料の分子量分画

アルミニウムに親和性を持つ莢膜由来有機物を分子量分画するにあたり、アフィニティークロマトグラフィーを行った際に使用したバッファー (酢酸アンモニウム, EDTA) や、リガンドとして用いたアルミニウムなどが悪影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、前処理として透析を行った。透析膜にはFloat-A-Lyzer G2 (500 Da~1000 Da, SPECTRUM) を用いた。500 mlメディウム瓶内に超純水を満たして18 hr 透析を行い、透析開始から2 hr 後と8 hr 後にはそれぞれメディウムビン内の超純水を全量交換した。

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 (Φ 1.0 $\times$ 30 cm, GE Healthcare) を用い、280 nmの紫外外部吸光UV (検出器はFPLCに付帯) 及び示差屈折率RI (RI-8020, TOSOH) を検出した。UV (280 nm) 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。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。

2.6 キャピラリー電気泳動による構成糖分析

アフィニティークロマトグラフィー後の試料は微量で、GC-MSによる分析では検出下限値を下回る恐れがある。そこで、アルミニウムに親和性を持つ莢膜由来有機物に含まれる糖鎖の構成糖分析にはキャピラリー電気泳動装置を用いた。

2.5で行った分子量分画でピークが観察された部分の試料を分画し、糖鎖を単糖に加水分解した。加水分解の手法は仲山¹¹⁾の手法を参考とした。分画した試料300 μl を1.5 mlチューブに分注し、遠心乾燥機 (EYELA) を用いて完全に乾固させた。その後、2 Mトリフルオロ酢酸を500 μl 加え、100°Cにて5 hrインキュベートし、再び遠心乾燥機にて十分に乾固させた。次に、Carbohydrate Labeling and Analysis Assay Kit (Beckman Coulter) を用いて以下の手順で蛍光標識を施した。十分に乾固した試料に、

1 Mシアノ水素化ホウ素ナトリウム (Sigma-Aldrich) を1 μ l加え, 0.9 Mクエン酸に溶解させた9-アミノピレン-1, 4, 6-トリスルホン酸溶液2 μ lを加えた後, 穏やかに混ぜた。その後, 60°Cに設定したヒートブロック恒温槽で90 minインキュベートした。最後に, 超純水97 μ lを加え攪拌し蛍光標識を施した糖試料を得た。この糖試料は, 解析の際には超純水で40倍に希釈して分析を行った。スタンダードとして8種類の単糖 (グルコース (Glu), マンノース (Man), ガラクトース (Gal), キシロース (Xyl), フコース (Fuc), ラムノース (Rha), グルクロン酸 (GluA), ガラクツロン酸 (GalA)) と二糖のマルトース (Mal) を用い, 同様の処理を施した後分析に供した。実験にはキャピラリー電気泳動装置及びレーザー誘導蛍光検出器 (PA800plus, Beckman Coulter) を用いた。泳動液にはホウ酸バッファー (120 mM, pH 10.2) を用い, 30 kV, 20 minで泳動を行った。検出器の励起波長, 蛍光波長はそれぞれ488 nm, 520 nmとした。キャピラリーの温度は20°Cに維持し, 試料は0.5 psiで20 sec注入した。

3. 実験結果

3.1 *M. aeruginosa*の莢膜成分の回収方法の検討結果

図2に水酸化ナトリウム濃度 1.0×10^{-1} M (a), 1.0×10^{-2} M (b), 1.0×10^{-3} M (c), 1.0×10^{-4} M (d)における藻体の破壊状況を示す。水酸化ナトリウム濃度を 1.0×10^{-1} Mとした場合, 細胞周辺に存在する莢膜が薄くなっており, 莢膜が一部溶解したと考えられるが, 目視による藻体の変色など明らかな藻体の破壊が確認されたため, 分析に供するためには不相当であると考えた。水酸化ナトリウム濃度が 1.0×10^{-2} と 1.0×10^{-3} Mの場合にも藻体の破壊が確認されたが, 破壊の程度は水酸化ナトリウムの濃度が低

図2. 各水酸化ナトリウム濃度における藻体の破壊状況 (数値は水酸化ナトリウム濃度)

図3. GC-MSによる構成糖分析結果

いほど少なく, 水酸化ナトリウム濃度が 1.0×10^{-4} M以下の場合には, 藻体の破壊は見られなかった。一方で, 得られる莢膜試料の量は水酸化ナトリウムの濃度が低いほど少なく, 水酸化ナトリウム濃度を 1.0×10^{-5} Mとした場合には, 乾燥試料を得ることができなかった。以上の結果より, 以下の分析においては, 莢膜試料を得ることができ, かつ藻体の損傷が少ない 1.0×10^{-4} Mの水酸化ナトリウム溶液を採用し, 莢膜を回収した。このときのpHは10.54であった。

3.2 GC-MSによる莢膜中多糖の構成糖分析結果

GC-MSを用いて全莢膜試料の構成糖分析を行ったところ, 莢膜中には少なくともMan, Xyl, Glu, Galが存在することが確認された (図3)。

3.3 アフィニティー前後の莢膜試料の分子量分画結果

図4にアフィニティークロマトグラフィー前の全莢膜試料 (a), およびアフィニティークロマトグラフィーで得られたアルミニウムに親和性を持つ莢膜由来有機物 (b) の分子量分画結果を示す。

全莢膜試料に対するUV測定の結果, 分子量6 kDa付近で最も強いピークが確認された他, 同58 kDa付近および52 kDa以下の領域にも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, アルミニウムに親和性を持つ莢膜由来有機物からは上記の大きなピークは全く見られなかったため, これらの有機物はアルミニウムに親和性を有していなかったことが示された。

一方, アルミニウムに親和性を持つ莢膜由来有機物において, UVのピークは検出されなかったことから, アルミニウムに親和性を持つタンパク質は存在しなかったと言える。RI測定の結果特徴的なピーク (図4bのA) が検出されたため, この部分を分画して構成糖分析に供した。

図4. 全莢膜試料 (a) とアルミニウムに親和性を持つ莢膜由来有機物 (b) のUVおよびRI測定結果

3.4 キャピラリー電気泳動による構成糖分析結果

図5にキャピラリー電気泳動による構成糖分析の結果を示した。図6に分析スタンダードのピークを示した。構成糖分析の結果、いくつかのピークが観察された。GC-MSによる全莢膜試料の構成糖分析の結果や分析スタンダードのピークの位置から考えて、5.6 minに観察されたピークはGlu、6.0 minに観察されたピークはManであり、また15 min付近のピークはGluAやGalAなどの酸性糖である可能性が高いといえる。3~5 minにかけて現れた大きなピークは、スタンダードにおいても同様のピークが見られた(図6)ため、蛍光標識の際に残った夾雑物であると考えられる。6~10 minにかけて現れた細かいピークに関しては、本実験の結果のみでは同定するに至らなかった。今回用いたスタンダード以外の単糖、またはマルトースのピークの位置などから考えて、分解しきれなかった多糖に由来すると考えられる。

4. 考察

福島県三春ダムは、上流の下水処理場からの流入水が流れ込み、栄養塩の蓄積しやすい環境のため、毎年アオコの対応に苦慮しているダムである。また、今江ら⁷⁾による千葉県印旛沼における*M. aeruginosa*莢膜の分子量分布は、今回のサンプルと同様の分布を示している。これらのことから、今回の福島県三春ダムにおけるアオコの環境サンプルは一般性の高いものと考えられる。

既往の方法^{7,9)}では、ボルテックスによる激しい攪拌により*M. aeruginosa*の群体を破壊することができたが、今回実験に用いた三春ダムで採取した*M. aeruginosa*群体に対しては、この方法によって莢膜を分離することができなかった。このことから、*M. aeruginosa*の生育環境や栄養条件、周囲の環境条件によって莢膜の性質が異なることが示唆された。また、今回の試料は水酸化ナトリウム溶液によりpHを上げることで莢膜を溶解させたが、水酸化ナトリウムの濃度が高い条件では藻体を破壊することがわかった。本研究で採用した水酸化ナトリウム濃度(1.0×10^{-4} M)は、今後莢膜試料を回収する際の1つの目安になると思われる。

GC-MSを用いた全莢膜試料の構成糖分析の結果、4種の糖(Man, Xyl, Glu, Gal)を検出することができた。Amemiyaら¹²⁾による諏訪湖由来の*Microcystis*群体に対する分析でもこの4種が検出されており、これらは他の*Microcystis*莢膜にも存在していることが示唆された。アルミニウムに親和性を持つ莢膜中有機物からはGluとManに加え、全莢膜試料からは検出されなかった酸性糖が検出された。GC-MSによる分析では酸性糖のピークが非常に小さくなり検出が困難であることから、これは検出手法の違いによるものであると考えられる。

図5. キャピラリー電気泳動による構成糖分析結果

図6．キャピラリー電気泳動による構成糖分析で用いた分析スタンダード

全莢膜試料におけるUVで検出されたタンパク質の分子量分布は、今江ら⁷⁾の結果と一致するものであり、*M. aeruginosa*莢膜の特徴的な分布であることが言える。また、Nakagawaら⁹⁾は実験室で培養された*M. aeruginosa*のSOM中には、アスパラギン酸、アラニン、スレオニン、グリシンなどのアミノ酸が多く含まれていることを報告している。今回の全莢膜試料中のタンパク質もそれらアミノ酸で構成されていることが考えられる。また、SOMとIOMとの間のアミノ酸組成には有意な差が見られたことも報告している。Takaaraら⁵⁾は、実験室培養系において培養された莢膜を持たない*M. aeruginosa*のIOMおよびSOM（細胞膜）中のタンパク質が凝集阻害能を有していたと報告している。本研究では、全莢膜試料においては分子量分画の際にタンパク質が検出されたが、アルミニウムに親和性を有する莢膜中有機物からはタンパク質は検出されなかった。UV（280 nm）は、ほぼ全てのタンパク質を検出し、カラムの出口から出てきたタンパク質を検出するので、検出漏れは考えにくい。ただし、UV（280 nm）での検出限界以下の微量なタンパク質の存在は考慮する必要がある。これに対して、糖は全莢膜試料とアルミニウムに親和性を有する莢膜中有機物の両方において検出された。したがって、莢膜に含まれる有機物については、糖が凝集阻害の要因となる可能性が示された。以上のことをふまえると、*M. aeruginosa*藻体破壊時と非破壊時において凝集阻害に関与する有機物が異なることが示唆された。これは、浄水場に流入する*M. aeruginosa*群体の状況が凝集阻害対策を行う上で大きく影響することを示唆している。また、今江らの研究⁷⁾により、莢膜由来有機物はアオコが発生している水中に存在している濃度において凝集阻害能を有していたこと、および凝集剤中のアルミニウムはまず莢膜と接触することから、アオコによる凝集阻害の要因としては糖の方が重要である可能性がある。

アルミニウムに親和性を持つ有機物には酸性糖が存在していることが示された。酸性糖は、主鎖の末端のヒドロキシメチル基（ $\text{-CH}_2\text{OH}$ ）のヒドロキシル基（ -OH ）がカルボキシル基（ -COOH ）に置換されたものであり、すなわち、分子中にカルボキシル基を有している。Pradhanら¹³⁾は、*Microcystis*の細胞壁に多くのカルボキシル基を有する有機物が存在し、それらが金属との吸着に寄与していると報告している。したがって、莢膜中に含まれる酸性糖がアルミニウムイオンに結合したと考えられる。今回の分析では多糖の状態ではアフィニティクロマトグラフィーを行ったため、中性糖については結合している酸性糖がアルミニウムイオンと結合したためカラムに吸着した可能性もある。

5. おわりに

これまで、莢膜が凝集阻害能を持つことは報告されているものの、その詳細な反応メカニズムの解明には至っていなかった。本研究では、アルミニウムイオンに親和性を持つ有機物を莢膜から分離し、その構成糖を分析した。その結果、*M. aeruginosa*の莢膜中にアルミニウムイオンに親和性を持つ糖が存在することが確認された。アルミニウム親和性を持つ糖鎖は、数種の糖によって構成されており、Glu, Man等の中性糖、および酸性糖の存在が示された。これらの糖のうち、特に酸性糖のカルボキシル基がアルミニウムに吸着し、凝集阻害の要因となることが示唆された。これらの結果は、凝集阻害のメカニズムを解明する上で重要な知見であると考えられる。

参考文献

- 1) 佐藤敦久, 眞柄泰基: 上水道における藻類障害 安全で良質な水道水を求めて, 技報堂出版, 1996.
- 2) 眞柄泰基, 国包章一, 相沢貴子: 藻類の生産する有機物の凝集阻害に関する基礎的研究, 水道協会雑誌, Vol.55, No.4, pp. 33-39, 1986.
- 3) 菅原繁, 黒川眞弓, 眞柄泰基, 胡建英: *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, Vol.68, No.8, pp.39-50, 1996.
- 4) 菅原繁, 黒川眞弓, 眞柄泰基: *Microcystis* spp.コロニーから得られた有機物質が凝集沈殿処理に与える影響, 水道協会雑誌, Vol.64, No.5, pp.2-11, 1995.
- 5) Takaara, T., Sano, D., Konno, H., Omuraa, T.: Cellular proteins of *Microcystis aeruginosa* inhibiting coagulation with polyaluminum chloride, *Water Research*, Vol. 57, pp. 1653–1658, 2007.
- 6) 雨宮由美子, 中山大樹: 藍藻 *Microcystis* より単離した粘質鞘物質の化学的性質と金属類に対する吸着特性, 陸水学雑誌, Vol.45, No.3, pp.187-193, 1984.
- 7) 今江泰貴, 真砂佳史, 高荒智子, 藤井学, 大村達夫: *Microcystis* spp.由来莢膜の化学的特性と凝集阻害能, 環境工学研究論文集, Vol.57, 2010.
- 8) 菅原繁, 黒川眞弓, 眞柄泰基, 胡建英: カオリン人工懸濁水の凝集沈殿に与える藻類由来有機物質の分子量の影響, 水道協会雑誌, Vol.66, No.8, pp.9-18, 1997.
- 9) Nakagawa, M., Takamura, Y. and Yagi, O.: Isolation and Characterization of the Slime from a Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* K-3A, *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 51, No. 2, pp. 329-337, 1987.
- 10) Plude, J. L., Parker, D. L., Schommer, O. J., Timmerman R. J., Hagstrom S. A., Joers J. M., Robert Hnasko.: Chemical Characterization of Polysaccharide from the Slime Layer of the Cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 57, No. 6, pp. 1696-1700, 1991.
- 11) 仲山賢一: オリーブの糖脂質糖鎖の構造決定法, 健康機能性成分分析マニユアル集, <http://unitaist.go.jp/shikoku/kaiyou/manual/61S.pdf>, 2010, アクセス日: 2012.08.27.
- 12) Amemiya, Y., Nakayama, O.: Some Properties of the Sheath Material of *Microcystis*, 山梨大学工学部研究報告, Vol.37, pp.70-75, 1986.
- 13) Pradhan, S., Singh, S., Rai, L. C.: Characterization of various functional groups present in the capsule of *Microcystis* and study of their role in biosorption of Fe, Ni and Cr *Bioresource Technology*, Vol. 98, pp.595-601, 2007.

(2012.5.25 受付)

Composition Analysis of Aluminum-Philic Organic Matters Isolated from Capsule of *Microcystis aeruginosa*

Naoki NISHIMURA¹, Hiroaki ITO², Tetsuya YAMAKI¹, Yoshifumi MASAGO¹ and
Tatsuo OMURA¹

¹Dept. of Civil and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

²Dept. of Food, Life and Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Yamagata University

Microcystis aeruginosa is a bloom-forming cyanobacterium which causes coagulation inhibition in drinking water treatment. Previous studies on algal organic matters (AOM) of *M. aeruginosa*, especially on its capsule, have suggested that AOM inhibit coagulation with polyaluminum chloride by forming complex with aluminum in coagulant. In this study, organic matters having high affinity with aluminum ion were isolated from the capsule of *M. aeruginosa* using affinity chromatography. Molecular size fractionation analysis on isolated organic matters showed no protein peaks and one saccharides peak. This saccharides contained glucose, mannose, and an acidic saccharide. Acidic saccharides have carboxylic radicals in its molecular structure, which enhances adsorption of the saccharides to metals. These results suggested that carboxylic radicals within acidic saccharides of *M. aeruginosa* capsule form complexes with aluminum ion and inhibit coagulation.