

氏名	たかあらともこ 高 荒 智 子
授与学位	博士 (工学)
学位授与年月日	平成19年3月27日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 土木工学専攻
学位論文題目	<i>Microcystis aeruginosa</i> 由来の凝集阻害誘因物質の 分離同定とその阻害特性評価
指導教員	東北大学教授 大村 達夫
論文審査委員	主査 東北大学教授 大村 達夫 東北大学教授 原田 秀樹 東北大学教授 西村 修

## 論 文 内 容 要 旨

需要の多い都市部の水道は、ダムや湖沼などの閉鎖性水域を水道水源としている場合が多く、我が国における上水を目的とした取水量の約45%は閉鎖性水域から取られている。しかしながらこのような水域では、季節的な藻類の大量増殖が長年に渡って発生しており、浄水場では凝集阻害、ろ過閉塞、トリハロメタンの生成などの様々な藻類障害が生じている。中でも凝集阻害は、浄水処理システムの根幹を担う凝集プロセスにおいて発生し、原水中に含まれる大量の藻類細胞や藻類由来有機物によって凝集効率が著しく低下する問題として知られている。これまでに、凝集阻害に対する特別な対応策は講じられておらず、大半の水道事業者は低下した凝集効率を補うために凝集剤注入率を上げるという、あくまで暫定的な方法で対応されているという現状がある。凝集剤注入率の増加は、凝集剤や増大した発生汚泥処理にかかる費用の増加を招くなどの諸問題を引き起こすため、今後、新たな凝集阻害対策が切望される。

本研究は、副次的な問題を生じさせない効果的な凝集阻害対策として、原水に存在する凝集阻害誘因物質を失活させることで事前に凝集阻害を防止する、新規凝集助剤の開発を最終目標とした研究を行っている。これまでの知見では、凝集阻害は藻類由来有機物 (Algogenic organic matter, AOM) が寄与することが報告されており、そのメカニズムとして、AOMとアルミニウムとの錯体形成、懸濁物質への吸着による荷電中和反応の阻害、コロイド粒子に対する保護コロイドの形成などの説が多くの研究者によって明らかにされてきた。しかしながら、凝集阻害誘因物質として働く物質の有機物組成や、凝集阻害を受けるアルミニウム種に関する議論は十分になされておらず、詳細な凝集阻害メカニズムに関しては議論の余地が残っている。本研究が目指す新規凝集助剤の開発には、凝集阻害誘因物質を同定し、アルミニウムとの詳細な結合メカニズムを解明する必要がある。そこで本論文では、*Microcystis aeruginosa* (*M. aeruginosa*)から凝集阻害誘因物質を分離し、アルミニウム系凝集剤との相互作用から凝集阻害メカニズムを把握することを目的とした。

まず、硫酸アルミニウムをリガンドに用いたアフィニティクロマトグラフィから、凝集剤成分に親和性のある有機物を分離した。その結果、硫酸アルミニウムの多水和錯体と錯体を形成して凝集阻害に関与すると予想される物質として、40~70kDa のタンパク質を確認した。

また、PAC を用いた凝集実験において、上澄水に残留した物質の分析を行ったところ、タンパク質の残留が見られた。EOM 中に含まれるタンパク質は、PAC と親和性を持たずに、タンパク質そのものの状態で残留しているのに対し、IOM 中に含まれる物質には、PAC と結合して凝集阻害に関与する 25kDa, 30kDa 付近のタンパク質を確認した (図 1)。このようなタンパク質は、アルミニウムと錯体形成をすることで、アルミニウムの加水分解反応を阻止することで凝集阻害を引き起こしているものと予想された。

さらに、*M. aeruginosa* の細胞内および細胞表面に含まれる親水性有機物から凝集阻害誘因物質を分離するため、分画分析を行った。各分画分析で得られた有機物存在下における凝集実験を行い、凝集効率から凝集阻害誘因物質の定性的な特徴について調べた。

図 2 の結果より、*M. aeruginosa* 由来親水性有機物による強い凝集阻害が観察された。凝集阻害に寄与する親水性物質の特性としては、10 kDa 以上の分子量を持ち、凝集実験条件である pH 7 において負に帯電する物質であることが示唆され、細胞内に存在する核酸成分および細胞表面成分であるリポ多糖質であることが予想された。特に、核酸成分については、酵素処理の結果 RNA であることが明らかとなった。電気泳動の結果より、検出された核酸成分は 700~1000bp の鎖長であり 1bp 当たりの分子量を 750Da とすると、検出された RNA は凝集阻害誘因物質の特性として見られた 10 kDa 以上の分子を越えており、RNA が凝集阻害に寄与する可能性が考えられた。

有機物の凝集阻害メカニズムを考察するため、親水性有機物存在下におけるカオリン懸濁物質の ζ-電位測定を行った。その結果、カオリン粒子の ζ-電位は親水性有機物の存在量の増加に伴って上昇し、凝集しやすい方向に働いた。凝集実験の結果より、親水性有機物による凝集阻害は明らかに発生していることから、凝集阻害誘因物質として働く物質は、懸濁物質に対してではなく、凝集剤成分に作用することにより凝集阻害を招いたことが

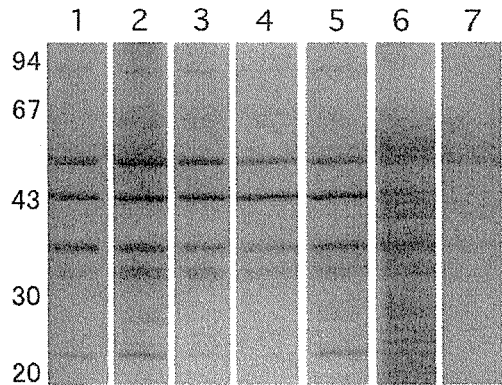


図 1 凝集実験後の上澄水 (IOM) に対するアフィニティクロマトグラフィのフラクションのタンパク質検出結果. 1: サンプル導入 10 mL 目, 2: サンプル導入 20mL 目, 3: サンプル導入 30mL 目, 4: サンプル導入 40mL 目, 5: サンプル導入 50mL 目, 6: 洗浄, 7: 溶出.

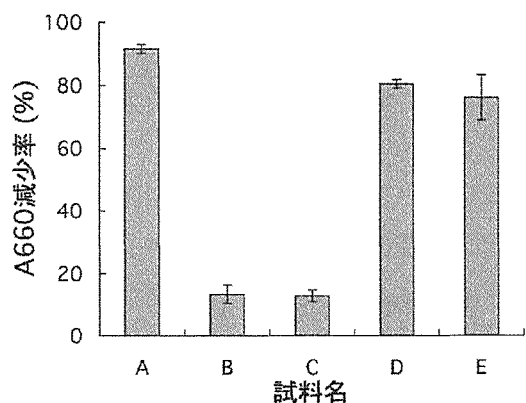


図 2 *M. aeruginosa* 由来親水性有機物の分画物質存在下における凝集実験の A<sub>660</sub> 減少率. A: 標準懸濁水, B: フェノール水抽出物, C: エタノール沈殿物, D: 限外ろ過水 (<10kDa), E: 陰イオン交換水.

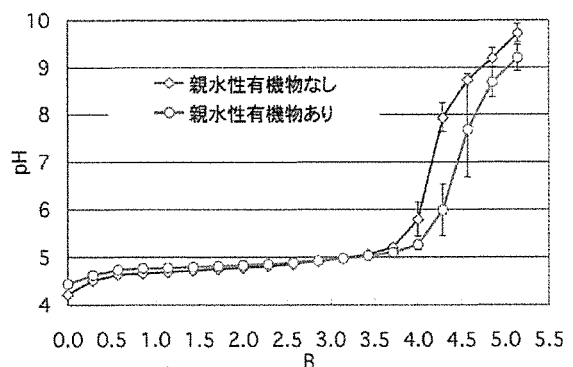


図 3 AlCl<sub>3</sub> (0.7mg-Al/L) に対する電位差滴定結果. ◇は親水性有機物を含まない試料, ○は親水性有機物 (TOC:68mg/L) を含む試料を示す.

予測された。

*M. aeruginosa* 由来の親水性有機物によるアルミニウムの加水分解の影響を調べるため、 $\text{AlCl}_3$  (Al 濃度 : 0.7mM) および PAC (Al 濃度 : 1.9mM) に対して電位差滴定法を行った。その結果、親水性有機物はアルミニウムに作用することで、溶解性のアルミニウム種の量を増加させ、溶液中の pH の上昇を抑制していることが考えられた。 $\text{AlCl}_3$  および PAC のいずれの場合に対しても、親水性有機物を含む場合には  $B=0$  時の pH がコントロール試料よりも高く、また、アルミニウムのポリマー化により多くの塩基を必要とした。このことから、藻類由来の親水性物質は水酸化アルミニウムと錯体形成することで、溶解性のアルミニウム種を増加させ、凝集効率を低下させていることが示唆された。親水性有機物はアルミニウムに作用することにより溶液中の pH の上昇を抑制していることが考えられた。 $\text{AlCl}_3$  および PAC のいずれの場合に対しても、親水性有機物を含む場合には  $B=0$  時の pH がコントロール試料よりも高く、また、アルミニウムのポリマー化により多くの塩基を必要とした。このことから、藻類由来の親水性物質は、アルミニウムの溶解性を増加させることによって凝集阻害に寄与することが示唆された。

本実験から、*M. aeruginosa* が産生する AOM による凝集阻害は、タンパク質および親水性有機物による凝集阻害メカニズムは異なることが明らかとなった。タンパク質による凝集阻害は、アルミニウムとの錯体形成によって発生することが明らかとなり、凝集反応で生じる化学種の中でも初期に存在するアルミニウム種 (アルミニウム多核錯体など) と錯体形成をすることが考えられた (図 4)。従って、凝集阻害誘因タンパク質はアルミニウムのモノマーやアルミニウム多核錯体に対して相互作用すると考えられ、アルミニウムの加水分解およびオール化の反応の進行を妨害されることによって凝集阻害に寄与することが考えられた。

一方、*M. aeruginosa* 由来の親水性有機物による凝集阻害には、分子量 10kDa 以上の負に帯電する物質によって発生することが明らかとなった。その凝集阻害メカニズムは、アルミニウム水酸化物と親水性物質の錯体形成による水酸化アルミニウムの溶解性の増大が考えられた。しかしながら、PAC などのアルミニウムポリマーを含む凝集剤については、原水に添加後すぐに不溶性のアルミニウム種であるアルミニウムポリマーが生じるため、水酸化アルミニウムの溶解性の増大以外の凝集阻害メカニズムが考えられる。アルミニウムポリマーが瞬時に形成される PAC に対する凝集阻害は、凝集阻害誘因親水性物質が不溶性のアルミニウム

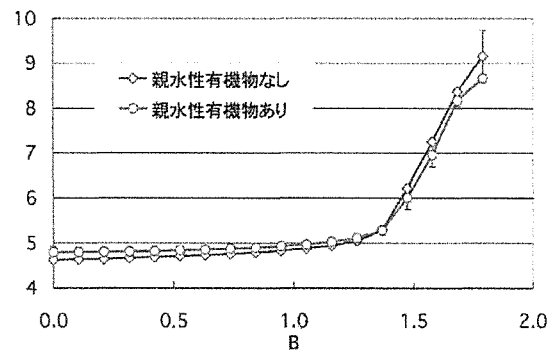


図 3 PAC (0.7mg-Al/L) に対する電位差滴定結果. ◇は親水性有機物を含まない試料, ○は親水性有機物 (TOC: 68mg/L) を含む試料を示す。

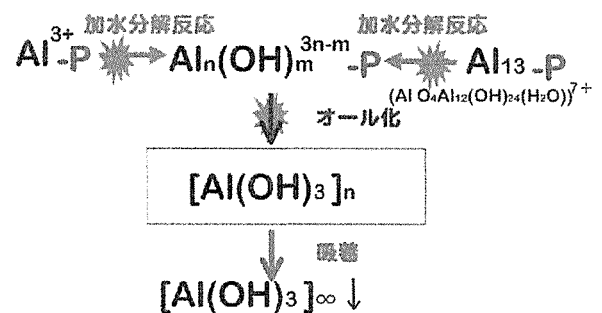


図 4 タンパク質による凝集阻害メカニズム. P はタンパク質を示す. -P は錯体結合したタンパク質を示す。

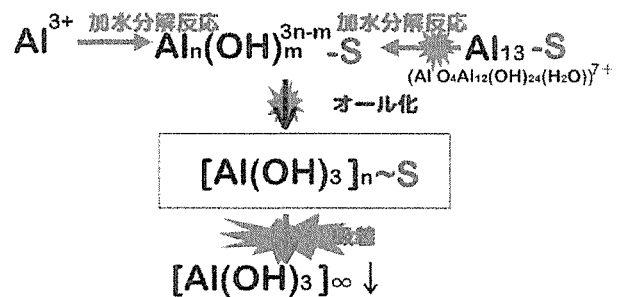


図 5 親水性有機物による凝集阻害メカニズム. S は親水性有機物を示す. -S は錯体結合した親水性有機物を示す. -S は吸着した親水性有機物を示す。

ムに吸着することによるフロック形成の成長阻害が発生していることが考えられた（図5）。PACのような高分子凝集剤を用いた場合に発生する凝集阻害は、錯体形成よりもフロック形成の妨害によって引き起こされる阻害の方が大きいと予想された。従って、親水性有機物は上述したタンパク質とは異なり、凝集プロセスの後段で生じる水酸化アルミニウムやポリマー化したアルミニウム種に対して作用することで凝集阻害が生じることが明らかとなった。

# 論文審査結果の要旨

本論文は、凝集阻害誘因物質として作用する藻類由来有機物 (Algogenic organic matter: AOM) の分離とその特性評価を行った。また、凝集剤中に含まれるアルミニウムとの相互作用を明らかにすることにより、AOM による凝集阻害メカニズムを凝集プロセスに基づいて解明した。

第 1 章では、研究の背景として、水道水源として利用されている閉鎖性水域における水質悪化の現状とそれに基づく藻類増殖について述べ、さらに浄水処理において発生する様々な藻類障害の内容と現行の対策についてまとめている。その中で、現在の凝集阻害対策に対する改善の必要性について言及している。

第 2 章では、本研究に関連する従来の知見について言及しており、その中で、AOM による凝集阻害のメカニズムは、金属と有機物とによる錯体形成や懸濁物質に対する保護コロイド形成などが提唱されているが、有機物レベルによる知見については議論の余地があり、新たな凝集阻害対策を講じる為には、有機物の組成に着目した詳細な凝集阻害メカニズムを解明する必要があることについて言及している。

第 3 章では、アルミニウムに作用することで凝集阻害に寄与する有機物の存在を確認するため、*M. aeruginosa* の各増殖期に産生された有機物に対して、硫酸アルミニウムをリガンドに用いたアフィニティクロマトグラフィを行うことにより、アルミニウム親和性を持つ有機物の分離を行っている。その結果、アルミニウムに親和性を持つ AOM として 40~70kDa のタンパク質が分離された。このことより、タンパク質による凝集阻害の発生を明らかにした。

第 4 章では、PAC を用いた凝集において凝集阻害に寄与することでアルミニウムを上澄水に残留させるタンパク質を分離するため、凝集処理後の上澄水に対して PAC をリガンドに用いたアフィニティクロマトグラフィによる分離を行っている。その結果、上澄水に残留しているアルミニウム結合タンパク質として、30~67kDa の分子量をもつタンパク質が検出された。ここで検出された物質はアルミニウムと強い親和性を持つことから、タンパク質は、アルミニウムと錯体を形成することによって凝集阻害に寄与していることを明らかにした。また、このように錯体を形成しうるタンパク質は、細胞内に多く含まれていることも明らかになった。

第 5 章では、*M. aeruginosa* が産生する親水性物質による凝集阻害を評価するため、分画分析で得られた有機物存在下で凝集実験を行うことにより、凝集阻害誘因物質として作用する親水性有機物の特性評価を行っている。その結果、*M. aeruginosa* 由来の親水性有機物による強い凝集阻害の発生が確認され、凝集阻害誘因物質として働く親水性有機物は分子量 10kDa 以上であり、原水中において負に帯電している物質であることを明らかにした。さらに、凝集阻害に寄与する物質として、細胞表面糖質や RNA などの高分子量の糖質成分が凝集阻害に寄与することも示した。

第 6 章では、親水性有機物によるアルミニウム化学反応への影響を調べるため、電位差滴定法を行った。その結果、アルミニウムモノマーの化学反応において、親水性有機物は水酸化アルミニウムと錯体を形成し、溶解性を高めていることを明らかにした。一方で、アルミニウムポリマーを含む PAC に対しては、親水性有機物がフロックに吸着することでフロックの成長阻害が生じていることを明らかにした。

第 7 章では、タンパク質および親水性有機物による凝集阻害メカニズムを、アルミニウムによる凝集機構に基づいてまとめた。タンパク質による凝集阻害は、凝集機構の初期段階で発生し、アルミニウムイオンや多核錯体との錯体形成によって生じることを明らかにした。一方、親水性有機物による凝集阻害は、錯体形成による水酸化アルミニウムの溶解性の増加、およびフロックへの吸着によるフロック成長阻害によって生じ、凝集機構の後段で発生することを証明した。

第 8 章は結論である。

以上要するに本論文では、AOM による凝集阻害を有機物レベルで検証し、凝集阻害誘因物質の分離および凝集プロセスに基づいて凝集阻害メカニズムを証明することに成功した。これは、新たな凝集阻害対策を講じる際の具体的な技術開発および改善策の考案に貢献する重要な知見であり、環境工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。