

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21686050

研究課題名（和文） プロテオーム解析と原子間力測定に基づいた MBR における膜ファウリングの制御

研究課題名（英文） Control of membrane fouling in MBRs on the basis of proteome analysis and measurements of atomic force

研究代表者

木村 克輝（KIMURA KATSUKI）

北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：10292054

研究成果の概要（和文）：本研究では、実都市下水を処理する MBR において膜ファウリングに関与しているタンパク質の詳細な構造解析を試みた。閉塞膜より抽出した試料の前処理方法を検討し、二次元電気泳動によるファウリングタンパク質の分離に成功した。分子量と等電点に基づき分離したファウリングタンパク質のアミノ酸配列解析により、Pseudomonas 属に属する細菌の外膜タンパク質が MBR における膜ファウリングに深く関与していることが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, structure of proteins that were involved in membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs) was investigated. Proteins causing membrane fouling were obtained from fouled membranes used in an MBR treating municipal wastewater. Modification of sample pre-treatment enabled application of two-dimensional gel electrophoresis and the protein causing membrane fouling could be separated on the basis of molecular weights and isoelectric points. The separated proteins were subjected to amino acid sequence analysis. It was shown that outer membrane proteins of bacteria belonging to the genus Pseudomonas played an important role in the evolution of membrane fouling in MBRs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：下水処理、膜処理、膜分離活性汚泥法、膜ファウリング、タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

膜分離活性汚泥法(MBR)は、既存の下水処理法と比較して様々な利点を有している一方で、膜の閉塞(膜ファウリング)の発生に伴う膜透過性能の低下が大きな問題となっている。MBR をより広範に普及させるためには膜ファウリングの抑制が重要である。膜フ

ァウリングを抑制するためには、膜ファウリング発生機構を正確に理解することが不可欠であるが、そのためには膜ファウリングを引き起こしている物質(膜ファウリング物質)の特性を把握することが重要である。既往の研究において、糖あるいはタンパク質が MBR における主要な膜ファウリング物質で

あることが報告されている。しかし、現段階においては具体的にどのような糖あるいはタンパク質が MBR における膜ファウリングの発生に大きく寄与しているのかは明らかになっていない。この点を明らかにすることによって、膜ファウリングを抑制するための対策を提案することができるようになると考えられる。

タンパク質については、アミノ酸配列に関する情報が得られればその起源および構造に関する詳細な情報が得られるが、MBR を含む生物学的下水処理プロセス中に存在するタンパク質の構造及び起源にまで踏み込んで検討を行った研究例はほとんど存在しない。

## 2. 研究の目的

2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(2D-PAGE)はタンパク質の分離・分析に非常に有用な手法である。2D-PAGE においては、試料に含まれるタンパク質は各々のタンパク質の分子量と等電点に基づいて分離される。本手法を用いて活性汚泥懸濁液中に含まれるタンパク質及び膜ファウリングの発生に寄与しているタンパク質を解析することによってどのようなタンパク質が膜ファウリングの発生に大きく寄与していたのかを検討することが可能となる。本研究では、実都市下水を処理するパイロットスケール MBR の連続運転を行い、運転期間中に採取した汚泥中有機物と運転終了時に閉塞膜より抽出した膜ファウリング物質の 2D-PAGE 分析を実施し、膜ファウリングに大きく寄与しているタンパク質の性質について検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) パイロットスケール MBR の連続運転

汚泥中有機物及び膜ファウリング物質は札幌市創成川水処理センター内に設置した、同処理場の最初沈殿池流入水を流入原水とするパイロットスケール MBR より採取した。本研究では、装置構成が同一である 2 台の MBR (MBR1 及び 2) を、汚泥滞留時間 (SRT) を変化させて同時に運転した。MBR1 及び MBR2 の SRT はそれぞれ 10 日及び 50 日に設定した。本実験で用いた膜(は公称孔径 0.4  $\mu\text{m}$  のポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜である。汚泥中有機物を含む水溶液は MBR 槽内汚泥を遠心分離 (4,800 rpm; 5 分間) したのち、0.45  $\mu\text{m}$  の膜でろ過することによって採取した。膜ファウリング物質は、パイロットスケール MBR の連続運転に使用していた閉塞膜を連続運転終了後に pH 12 の NaOH 水溶液に浸漬させることで抽出した。

### (2) 汚泥中有機物及び膜ファウリング物質

## の 2D-PAGE 解析

汚泥中有機物もしくは膜ファウリング物質を含む水溶液を分画分子量が 10 kDa の再生セルロース製限外濾過 (UF) 膜を装着した攪拌式膜ろ過装置を用いて濃縮した。UF 膜濃縮完了後の濃縮液に対し、三塩化酢酸 (TCA) を終濃度が 10% となるように添加し、氷上に 1 時間静置した後、遠心分離 (15,000 rpm; 5 分間) を行うことによって濃縮液中のタンパク質を回収した。遠心分離によって沈殿したペレットは冷却アセトン洗浄した後 2D-PAGE に供した。2D-PAGE は Atto 社製の泳動装置 (discRun 及び pageRun) を用いて、製造者の推奨に従って実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 汚泥中有機物及び膜ファウリング物質の 2D-PAGE

図-1 に両 MBR の汚泥中有機物の 2D-PAGE 泳動図を示す。両 MBR 間において、2D-PAGE 泳動図は大きく異なっていた。SRT を変化させることによって、性質の異なるタンパク質が活性汚泥懸濁液中に蓄積していたことが明らかである。図-2 に両 MBR に使用していた閉塞膜から抽出した膜ファウリング物質の 2D-PAGE 泳動図を示す。汚泥中有機物の場合と同様に、膜ファウリング物質についても両 MBR 間で 2D-PAGE 泳動図が大きく異なっていた。

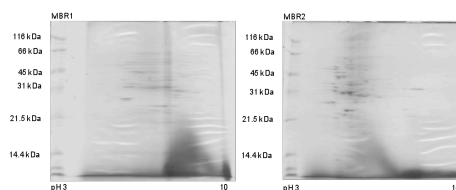


図-1 汚泥中有機物の2D-PAGE泳動図

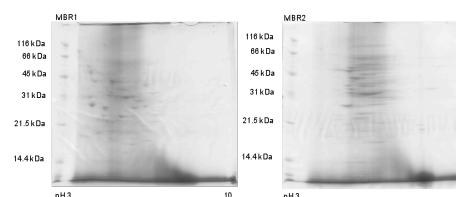


図-2 膜ファウリング物質の2D-PAGE泳動図

いずれの MBR においても膜ファウリング物質の 2D-PAGE 泳動図は汚泥中有機物のものと大きく異なっていた。このことより、一部の有機物が膜ファウリングの発生に大きく寄与していたことが明らかである。また、両 MBR 間において、活性汚泥懸濁液中と比較して膜ファウリング物質中において存在割合が増していたタンパク質の種類も異なっていた。SRT を長く設定していた MBR2 においては、中性 pH 領域に等電点を有するタンパク質が膜ファウリング物質中においてより存在割合が多くなっていたのに対し、SRT を短く設定した MBR1 においては、酸性 pH 領域に等電点

を有するタンパク質が膜ファウリング物質中において支配的であった。これらの結果は、それぞれの MBR において膜ファウリングの発生に寄与していたタンパク質の性質が異なっていたことを明確に示している。このような差異は、これまでの研究で行われていた全タンパク質濃度の測定やアミノ酸組成分析に代表される構成成分分析からでは明らかにできなかったものである。両 MBR 間において膜ファウリング発生機構が異なっていた可能性が示唆される。

## (2) 両 MBR における膜ファウリング発生機構

上述したように、SRT を長く設定していた MBR2 においては、中性 pH 領域に等電点を有するタンパク質の存在割合が汚泥中有機物と比較して膜ファウリング物質中において増加していた。運転期間中を通じて、活性汚泥懸濁液の pH はおおよそ中性付近 (pH 6.5~7) であり、MBR2 から抽出した膜ファウリング物質において存在割合が増加していたタンパク質の等電点とほぼ一致する。タンパク質は、等電点付近で溶解度が低下し、凝集性あるいは吸着性が増加する。以上のことを考慮すると、MBR2 の膜ファウリング物質中において存在割合が増加していた、中性 pH 領域に等電点を有するタンパク質は、膜に非常に吸着しやすい状態になっていたものと考えられる。MBR2 においては、有機物の膜への吸着に起因する膜ファウリングが卓越していた可能性が考えられる。

一方、SRT を短く設定していた MBR1 から抽出した膜ファウリング物質中においては酸性 pH 領域に等電点を有するタンパク質が支配的であった。これらのタンパク質は、活性汚泥中では負に帯電していることから、これらのタンパク質の膜に対する親和性が上述した等電点付近におけるタンパク質の吸着性の増加に起因する可能性は排除される。また、これらのタンパク質の膜に対する親和性は電荷からも説明することができない。本実験で使用した膜のゼータ電位は -25.2 V であり、酸性 pH 領域に等電点を有するタンパク質 (中性 pH 領域では負に帯電) は、電気的な反発力によって、膜面に到達しにくくなっているものと考えられる。

MBR1 における膜ファウリング発生機構を議論するためには、現段階では情報が不足しているが、MBR1 においては、細孔閉塞に起因する膜ファウリングが卓越していた可能性が考えられる。細孔閉塞は、主として細孔径近傍の粒径を有する粒子によって引き起こされると考えられるが、MBR1 から抽出した膜ファウリング物質中に多く存在していたタンパク質が細孔径近傍の粒径となるためには他の有機あるいは無機成分と重合する必

要がある。様々な有機あるいは無機成分が重合した粒子が膜ファウリングを引き起こす場合は、個々の有機物の特性と膜への親和性の間の関連性は認められにくくなると考えられる。前述したように、本研究で運転した 2 台の MBR を比較すると、SRT を短く設定した MBR1 において膜ファウリングの発生はより顕著であった。実際の MBR の長期運転における膜ファウリングを抑制していくためには、MBR1 における膜ファウリング発生機構を把握することが非常に重要となると考えられる。MBR1 において膜ファウリングに関与していたタンパク質の構造解析を通じて性質あるいは機能を解明することができれば、MBR1 における膜ファウリング発生機構に関する理解が大きく深まるものと期待される。

## (3) 膜ファウリング物質のアミノ酸配列解析

15 日間ろ過運転を行ったパイロットスケール MBR より膜ファウリング物質を採取し、2D-PAGE で分離した後にアミノ酸配列解析に供した。連続運転終了時点における MBR1 及び MBR2 における全ろ過抵抗値はそれぞれ 3.6 及び  $0.6 \times 10^{11} \text{m}^{-1}$  であり、SRT を短く設定した MBR1 において膜ファウリングがより顕著であった。連続運転終了後、それぞれの MBR に使用していた膜から膜ファウリング物質を抽出し、2D-PAGE に供した。図-3 に閉塞膜から抽出した膜ファウリング物質の 2D-PAGE 泳動図を示す。それぞれの MBR から抽出した膜ファウリング物質のスポットパターンは大きく異なっていた。運転条件の異なる MBR においては、膜ファウリングを引き起こしていたタンパク質の性質が大きく異なっていたことが明らかである。運転条件によって主要な膜ファウリング発生機構が異なっていた可能性が示唆される。

2D-PAGE を用いて分離したタンパク質を N 末端アミノ酸配列解析に供するため、PVDF 膜に対してブロットィングを行った。図-3 中の番号で示したタンパク質は、ブロットィング後、PVDF 膜上において回収することができたタンパク質である。

N 末端アミノ酸配列解析に供したタンパク質のうち、一部のタンパク質についてはアミノ酸配列を正確に決定することができなかった。これらのタンパク質については、N 末端がなんらかの修飾を受けていたことによってエドマン分解反応が進行しなくなっていたものと考えられる。アミノ酸配列解析に成功したタンパク質の中で、MBR1 の膜ファウリング物質に含まれていた 6 番のタンパク質は OprF、10 番のタンパク質は OprD であり、MBR2 の膜ファウリング物質中に含まれていた 2 番のタンパク質は OprF であると同定された。これは、筆者らが知る限り、実際の MBR

で膜ファウリングを引き起こしていたタンパク質の同定に世界ではじめて成功したものである。今回、同定されたタンパク質は、いずれも *Pseudomonas* 属に属する細菌の外膜タンパク質である。これらのタンパク質は、リポ多糖から構成される細胞組織内に固定化されていることから、疎水部を有しているものの、本来の構造では、疎水部はリポ多糖と接しており、水層には露出していない。加えて、タンパク質全体を考慮した場合の疎水度も比較的低い。これらのタンパク質が、疎水性相互作用によって膜へ吸着していた可能性は低いと考えられる。一方で、今回同定に成功したタンパク質はいずれも本来の立体構造を維持しやすいタンパク質である。本来の構造を維持しているタンパク質は、変性を受けたタンパク質と比較して、タンパク質分解酵素による分解を受けにくい。また、上述した通りこれらのタンパク質は細胞中では、リポ多糖から構成される細胞組織内に存在しているタンパク質であるが、リポ多糖と共存している場合には、単独で存在している場合と比較して、熱変性及びタンパク質分解酵素を受けにくいことも明らかとなっている。以上のことを考慮すると、MBR の活性汚泥懸濁液中においては、今回同定されたタンパク質を核として、細胞膜の一部が比較的大きい粒子のまま残存していた可能性が考えられる。これまで、膜孔径近傍の粒径を有する成分が膜ファウリングの発生に大きく寄与していた可能性を指摘してきたが、そのような成分の活性汚泥懸濁液中における挙動については不明であった。本研究で、膜ファウリングに実際に関与していたタンパク質を同定したことによって、膜ファウリングを引き起こしやすい成分の活性汚泥懸濁液中における挙動に関する理解が大幅に深まるものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Hoque, A., Kimura, K., Miyoshi, T., Yamato, N., Watanabe, Y., Characteristics of foulants in air-sparged side-stream tubular membranes used in a municipal wastewater membrane bioreactor. Separation and Purification Technology, 2012, in press. 査読有

② Hoque, A., Miyoshi, T., Kimura, K., Watanabe, Y., Performance of Membrane Bio-reactor Equipped with Air-sparged Side-stream Tubular Membrane: Treatment Efficiency and Membrane Fouling. Separation Science and Technology, 2012,

in press. 査読有

③ Miyoshi, T., Aizawa, T., Kimura, K., Watanabe, Y., Characteristics of proteins involved in membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs) treating municipal wastewater: the application of metaproteomic analyses. Desalination and Water Treatment Vol. 34(1-3), 2011, pp. 150-155. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① 安井信人、三好太郎、木村克輝、大和信大、渡辺義公、槽外型 MBR に装着したセラミック膜における膜ファウリング原因物質の分析、第 46 回日本水環境学会年会、2012. 3. 16、東洋大学 (東京都)

② 栗田宗大、三好太郎、木村克輝、渡辺義公、担体投入が浸漬型 MBR における膜ファウリングの発生に及ぼす影響、第 46 回日本水環境学会年会、2012. 3. 16、東洋大学 (東京都)

③ 田村尚也、三好太郎、木村克輝、渡辺義公、MBR ファウリング多糖の MALDI-TOFMS 分析における試料調製条件の検討、第 46 回日本水環境学会年会、2012. 3. 16、東洋大学 (東京都)

④ 安井信人、三好太郎、木村克輝、渡辺義公、槽外型セラミック膜に装着したセラミック膜における膜ファウリング、第 48 回環境工学研究フォーラム、2011. 11. 26、大同大学 (名古屋市)

⑤ 栗田宗大、三好太郎、木村克輝、渡辺義公、担体投入に伴う MBR の運転効率の改善、第 48 回環境工学研究フォーラム、2011. 11. 26、大同大学 (名古屋市)

⑥ 三好太郎、相沢智康、木村克輝、渡辺義公、膜分離活性汚泥法において膜ファウリングを引き起こしているタンパク質のメタプロテオーム解析、土木学会第 66 回年次学術講演会、2011. 9. 7、愛媛大学 (松山市)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 克輝 (KIMURA KATSUKI)  
北海道大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：10292054

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：