

## 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：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22860001

研究課題名（和文） 膜分離活性汚泥法における膜閉塞発生機構の解明に向けた膜閉塞成分の特性解析

研究課題名（英文） Characterization of foulant in membrane bioreactors for elucidation of fouling mechanisms

研究代表者

三好 太郎 (MIYOSHI TARO)

北海道大学・環境ナノ・バイオ工学研究センター・博士研究員

研究者番号：80587791

研究成果の概要（和文）：膜分離活性汚泥法(MBR)において膜閉塞を引き起こす糖及びタンパク質の解析を実施した。糖については、レクチンアフィニティークロマトグラフィーを用いて回収した糖に対して、温和な酸性条件下における部分加水分解を実施し、MALDI-TOF/MS分析を行うことで、膜閉塞に関与する糖の糖鎖構造を解析できることを明らかにした。タンパク質については、閉塞膜より抽出したタンパク質を限外濃縮及び TCA 沈殿によって濃縮後、2D-PAGE を用いて分離することで膜閉塞に関与するタンパク質のうち 2 種類について、*Pseudomonas* 属の細菌に由来する外膜タンパク質であると同定することができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, detailed characterization of polysaccharides and proteins that caused membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs) was carried out. A mild acid hydrolysis of polysaccharides eluted from a lectin column followed by MALDI-TOF/MS analysis allowed us to have deeper insights into structures of polysaccharides that have high fouling potentials. The proteins extracted from fouled membranes were successfully concentrated by the combination of a crude concentration with ultra-filtration (UF) membrane and trichloroacetic acid (TCA) precipitation. The concentrated proteins were separated well by 2D-PAGE. Analyzing selected 2D-PAGE spots by N-terminal amino acid sequencing analysis led to the identification of two well-characterized outer membrane proteins originating from *Pseudomonas* genus

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木環境システム

キーワード：膜分離活性汚泥法、膜閉塞、膜閉塞成分特性解析

## 1. 研究開始当初の背景

膜分離活性汚泥法(MBR)は、既存の生物学的排水処理法と比較して様々な利点を有しており、特に排水再生利用を実施する際には

基幹技術となるものと期待されている。しかし、運転の継続に伴う膜の閉塞及びそれに起因する運転コストの高さが MBR の広範な普及に向けた最大の障壁となっている。MBR

を核とした新たな都市水代謝システムを構築するためには膜閉塞の発生を抑制することのできる運転条件の確立が極めて重要であるが、そのためにはまず膜閉塞の発生機構を正確に理解することが不可欠である。MBRにおける膜閉塞は主として有機物によって引き起こされると考えられることから、MBRにおける膜閉塞発生機構を解明するためには、膜閉塞を引き起こしている有機物を同定したうえで詳細な構造、性質、及び機能等に関する情報を蓄積することが非常に重要となる。

## 2. 研究の目的

MBRにおける膜閉塞成分の解析については、国内外の様々な研究グループが精力的に検討を行っている。これらの先行研究において、MBR汚泥中に含まれる様々な有機物のうち、特に糖及びタンパク質が膜閉塞に大きく寄与しているという点については、概ねコンセンサスが得られている。しかし、糖及びタンパク質のいずれについても、性質や機能は多岐にわたっており、糖やタンパク質といった次元で包括的に取り扱っては、膜・有機物間、あるいは有機物・有機物間の相互作用を正確に議論することは不可能である。膜閉塞発生機構を解明するためには具体的にどのような糖あるいはタンパク質が膜閉塞を引き起こしているのかを明らかにする必要があるが、これらの点については、先行研究ではほとんど知見が得られていない。そこで、本研究ではMBRにおいて膜閉塞を引き起こしている糖及びタンパク質を同定したうえで詳細な特性解析を実施することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 膜閉塞発生ポテンシャルの高い糖の解析

#### ① レクチンアフィニティークロマトグラフィー

図-1 にレクチンアフィニティークロマトグラフィーを用いた糖の膜閉塞発生ポテンシャル評価手法を示す。レクチンとはある特定の糖に対して高い親和性を有するタンパク質の総称であり、レクチンを用いたアフィニティークロマトグラフィーを実施することによって溶液中から一部の糖だけを選択的に除去することが可能となる。MBR反応槽内の活性汚泥懸濁液を採取し、遠心分離(4800 rpm; 5 min)を行った後、細孔径0.45 µmの膜を用いてろ過することによって、活性汚泥懸濁液中溶解性有機物を含む溶液を採取した。この溶液を試料溶液としてレクチンカラムに通水した。レクチンカラム通水時に当該レクチンに対して高い親和性を有する糖はカラム内に捕捉される。その後、レクチン

カラム通過液を回分ろ過実験に供し、レクチンカラム通過水が発生させる膜ろ過抵抗を測定した。また、対照系としてレクチンカラムを通過させていない溶液が発生させる膜ろ過抵抗も測定した。レクチンカラム通過前後の膜ろ過抵抗値の差によってレクチンカラム内に捕捉された糖の膜閉塞発生ポテンシャルを評価した。

レクチンアフィニティークロマトグラフィーにおいては、レクチンカラムに捕捉されている糖を溶出・回収することが可能である。ここで回収した糖は、MALDI-TOF/MS他の手法を用いて詳細な特性解析を実施することが可能である。

#### ② MALDI-TOF/MSを用いた糖鎖構造解析

レクチンカラムより溶出・回収した糖に対して、MALDI-TOF/MSを用いた構造解析を試みた。対象となる糖を、比較的温和な酸性条件下で加水分解することによって本来の糖鎖構造を部分的に保持した糖鎖断片が生成する。ここで生成した糖鎖断片については、MALDI-TOF/MS他の質量分析を用いた構造解析を実施することが可能である。前述したレクチンアフィニティークロマトグラフィーにおいて膜閉塞発生ポテンシャルが高いと考えられた糖に対して、本分析を適用することで、膜閉塞を引き起こしやすい糖の構造に関する情報を取得することが可能である。

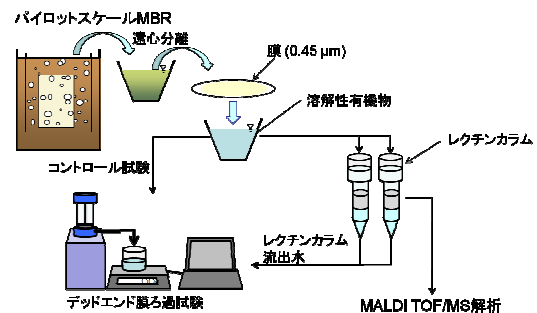


図-1 膜閉塞発生ポテンシャル評価手法

#### (2) 膜閉塞を引き起こしているタンパク質の構造解析

実下水処理を行うMBRの連続運転に使用していた閉塞膜より抽出した膜閉塞成分中に含まれているタンパク質の同定を試みた。連続運転終了後、膜をモジュールより切り取り、膜表面をスポンジを用いて拭き取ったのち、pH 12の水酸化ナトリウム水溶液に一晩浸漬させることによって膜閉塞成分を抽出した。抽出された膜閉塞成分中のタンパク質は適切な手法で濃縮することによって、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)によって分離した際に明確なバンドあるいはスポットとして検出することが可能である。PAGEによって分離されたタンパク質は後段のN末端アミノ酸配列解析もしくは質量分析を通じ

たタンパク質同定に供することができる。一連の解析を通じて膜閉塞を引き起こしているタンパク質を同定することができれば、膜閉塞発生機構の検討に重要なタンパク質の詳細な構造、性質、及び機能といった情報を取得することが可能となる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 膜閉塞発生ポテンシャルの高い糖の解析

レクチンアフィニティークロマトグラフィーにおいてレクチンカラム内に捕捉されていた糖の溶出方法として、従来は阻害糖を用いた溶出を実施していたが、溶出に用いる阻害糖が目的多糖を含む試料溶液中に混入し、後段の分析が困難となることが問題であった。そこで、本研究では酸を用いた目的多糖の溶出を試みた。レクチンカラムに酸溶液を通水することによってレクチンが変性し、結合していた多糖を溶出させることが可能である。本研究では、後段の分析を阻害する可能性が低い塩酸を用いてレクチンカラムからの目的多糖の溶出を試みたところ、pHを3まで低下させた段階で溶出可能な糖のほとんどを溶出させることができることを確認した。

レクチンカラムから溶出させた糖の特性解析を行うため、単糖組成の分析を行った。しかし、本分析においては膜閉塞発生ポテンシャルの大小を説明できる明確な傾向は認められなかった。多糖の膜閉塞ポテンシャルを説明するためにはより詳細な解析を行う必要があることが明らかである。

続いて、レクチンカラムから溶出させた多糖について MALDI-TOF/MS を用いた構造解析を行った。本研究で検討対象としている多糖については最適な部分加水分解条件に関する知見が事前に得られていなかったことから、部分加水分解条件を試行錯誤的に検討したところ塩酸を終濃度が0.085 Mとなるように添加し、80°Cにおいて14時間加水分解した場合、MALDI-TOF/MS分析において糖断片と考えられるピークを複数検出することができた。現段階においては、部分加水分解条件の最適化は完了していない。加水分解に用いる酸の種類、酸濃度、加熱時間、及び加水分解時の水温が部分加水分解結果に及ぼす影響を検討したところ、いずれの因子も部分加水分解に重大な影響を及ぼす因子であることが明らかとなっている。これら MALDI-TOF/MS 分析の前処理に相当する部分の最適化については今後の課題であるが、本研究で適用した手法により先行研究においてはほとんど知見が得られていない膜閉塞を引き起こしやすい糖の構造に関する知見が飛躍的に充実する可能性がある。

##### (2) 膜閉塞を引き起こしているタンパク質の構造解析

閉塞膜より抽出したタンパク質の濃縮法として、限外濾過膜を用いた濃縮を行ったうえで三塩化酢酸(TCA)沈殿を適用することが適していることは本研究期間の開始前に報告している。しかし、本手法で濃縮したタンパク質を分子量に基づいてタンパク質を分離することができる SDS-PAGE に適用したところ、各タンパク質が著しく近接した位置にバンドを形成したことから、それぞれのタンパク質に対してN末端アミノ酸配列解析を通じた同定を実施することができないことが問題であった。そこで、本研究期間においては、SDS-PAGEに代えてタンパク質を分子量と等電点の2つの性質に基づいて分離することができる 2D-PAGE を適用した。その結果、分子量が同程度であるタンパク質も等電点によって分離することが可能となり、後段の N末端アミノ酸配列解析に適用することができるタンパク質の種類が飛躍的に増加した。2D-PAGE ゲル上において強度の高いスポットを形成していたタンパク質の N末端アミノ酸配列解析を実施したところ、膜閉塞を引き起こしていたタンパク質のうち、2種類についてそれぞれ OprF 及び OprD(いずれも *Pseudomonas* 属の細菌由来の外膜タンパク質)というタンパク質であると同定された。図-2に OprD の立体構造を示す。これは、実下水処理を行う MBR の連続運転において膜閉塞を引き起こしていたタンパク質としては、世界で初めての同定成功例である。



図-2 OprD の立体構造

また、上述した実験結果の一般性を検証するため、運転条件の異なる MBR についても同様の検討を行った。本研究期間においては汚泥滞留時間(SRT)及び膜ろ過方式(浸漬型及び槽外型)の異なる MBR において膜閉塞を引き起こしていたタンパク質を検討対象としたが、いずれの MBR においても上述した2種類のタンパク質が膜閉塞成分中より検出された。これらの結果は、本研究で同定に成功したタンパク質が MBR の運転条件にかかわら

ず広く膜閉塞に関与していた可能性を示唆するものである。このような知見は、タンパク質を包括的に取り扱っていた既存の研究手法からでは明らかにすることができなかったものであり、本研究期間に得られた成果はMBRにおける膜閉塞に対する理解を飛躍的に深めることができるものであったといえる。今後は、同定することができるタンパク質の種類を増やしていくと同時に、同定に成功したタンパク質がどのように膜閉塞を引き起こしているのかを検討することが重要な課題となると考えられる。

#### 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1件)

- ① Taro Miyoshi, Tomoyasu Aizawa, Katsuki Kimura, Yoshimasa Watanabe, Characteristics of proteins involved in membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs) treating municipal wastewater: the application of metaproteomic analyses, Desalination and Water Treatment, 34, 2011, 150-155. (査読有)

[学会発表] (計6件)

- ① 田村 尚哉、木村 克輝、三好 太郎、渡辺 義公、MBR 膜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、水環境学会年会、2012年3月16日、東洋大学、東京
- ② 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、土木学会全国大会、2011年9月9日、愛媛大学、松山
- ③ 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に関与しているタンパク質の構造解析を通じた膜ファウリング発生機構の検討、水環境学会年会、2011年3月18日、北海道大学、札幌
- ④ 田中 一平、木村 克輝、三好 太郎、渡辺 義公、MBR の膜ファウリングを引き起こす糖類の特性解析、水環境学会年会、2011年3月18日、北海道大学、札幌
- ⑤ Taro Miyoshi, Tomoyasu Aizawa, Katsuki Kimura, Yoshimasa Watanabe, Characteristics of proteins involved in membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs) treating municipal wastewater: the application of

metaproteomic analyses, The 6th Conference of the Aseanian Membrane Society In Conjunction with the 7th International Membrane Science and Technology Conference, 2010年11月24日, Hilton Sydney, Sydney

- 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に関与しているタンパク質の構造解析、環境工学研究フォーラム、2010年11月13日、高知大学、高知

[図書] (計0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  
特になし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 太郎 (MIYOSHI TARO)

北海道大学・環境ナノ・バイオ工学研究センター・博士研究員

研究者番号：80587791