

放線菌の産生するバイオフィロキュラントに関する研究

1991

武田 護

①

# 放線菌の産生するバイオフィロキュラントに関する研究

筑波大学大学院

農学研究科

応用生物化学専攻

武田 種

## 目次

第1章	緒論	1
第2章	<i>Nocardia amarae</i> YK1 の菌体表層蛋白質の凝集促進作用	4
第1節	緒言	
第2節	実験方法	
第3節	実験結果と考察	
	1. <i>N. amarae</i> YK1細胞洗浄液の凝集作用	
	2. <i>N. amarae</i> YK1細胞表面の電子顕微鏡観察	
	3. 細胞表層成分の溶脱	
	4. 細胞表層成分の分画方法の確立	
	5. 各フラクションによる細胞表層構造の再構成	
	6. 各フラクションの組成	
	7. 各フラクションのプロテアーゼ感受性	
	8. 各フラクションの溶液中における分子量分布	
	9. SDS-PAGEによる分析	
	10. 各フラクションの荷電状態とアミノ酸組成	
	11. フラクション a の HPLC による分析	
	12. 各フラクションの共同作業によるカオリンの凝集	
	13. フラクション b の中性における凝集能	
	14. フラクション b の凝集能に及ぼす塩強度の影響	
	15. 金属イオンの影響	
第4節	要約	

第3章 疎水性物質による Nocardia amarae YK1 の浮上と細胞表 53

層物質の疎水性

第1節 緒言

第2節 実験方法

第3節 実験結果と考察

1. 疎水性炭素源による培養

2. 細胞表層物質の疎水性

第4節 要約

第4章 Rhodococcus erythropolis S-1 の産生する菌体外蛋白質 64

の凝集促進作用

第1節 緒言

第2節 実験方法

第3節 実験結果と考察

1. 凝集剤画分の培養液中での存在状態

2. 培養液からの凝集促進能を有する画分の回収

3. 凝集剤標品の組成

4. ゲル濾過による分析

5. 電気泳動

6. 凝集剤標品の添加濃度と凝集活性との関係

7. カチオンの添加効果

第4節 要約

第5章 疎水性物質による Rhodococcus erythropolis S-1 の浮上 87

と細胞表面への蛋白質の蓄積

第 1 節 緒言

第 2 節 実験方法

第 3 節 実験結果と考察

1. ペンタデカン培地における菌体フロックの形成

2. 菌体及び培養液の凝集能

第 4 節 要約

第 6 章 総括 .....98

文献 .....100

付記 .....106

謝辞 .....107

## 第 1 章 緒 論

現在最も広範に普及している廃水の生物学的処理法は、活性汚泥を利用した浄化法である。活性汚泥による廃水処理は、可溶性有機物の微生物細胞への変換、すなわち固定プロセスと微生物の凝集性を利用した自然沈降による処理水からの微生物の除去、すなわち分離プロセスというふたつの行程から成るといえる。そして、エネルギーを消費することなく、単に静置することによって処理水が得られるという分離プロセスの簡便さが、活性汚泥法の普及を促した一つの要因であった。活性汚泥の凝集は、汚泥を構成する微生物によって分泌された細胞外高分子物質による微生物細胞の連結、あるいは高分子物質によって形成されたマトリックス内への細胞の包括によってもたらされるという説が最も有力視されている。

ところが実際の廃水処理現場においては、活性汚泥の凝集性、沈降性に異変が生じて固液分離に支障をきたすという異常現象にみまわれることがある<sup>1,2)</sup>。それらの発生機構については未解明の部分が多く残されており、それらの発生機作の解明と、障害を未然に防ぐ廃水処理プラントの運転管理技術の確立とが、廃水処理法の主軸として定着した活性汚泥法の円滑な運用のために残された課題である。

分離プロセスにおける異常現象は、汚泥の膨化と汚泥の浮上とに大別される。これらの異常現象は、何等かの要因によって活性汚泥を構成する微生物相に異変が起こることに起因すると理解されている。活性汚泥の膨化は糸状性細菌の異常増殖によって、汚泥の緻密性が低下することが原因であると考えられている<sup>3)</sup>。一方、活性汚泥の浮上は放線菌の増加との関連性が指摘されている<sup>4)</sup>。この異常現象は、活性汚泥の一部が油脂状の発泡物となって浮上し固液分離ができなくなるという障害であって、その発泡物中からは放線

菌が高い頻度で検出される<sup>4-6)</sup>。放線菌の細胞表面は疎水性を示すため、その占有率が高まると活性汚泥全体の疎水度が上昇し、気泡や油滴を保持し易くなって浮上をもたらされると考えられている<sup>7,8)</sup>。廃水処理プラント内における放線菌の異常増殖は、疎水性物質の流入と密接な関係があると考えられている。炭化水素はもとより、全く代謝されないシリコンオイルのような疎水性物質でも、廃水処理プラント内での放線菌の滞留時間を増大させ、そのバイオマスを選択的に高める効果のあることが報告されている<sup>9)</sup>。

このように、放線菌は活性汚泥の沈降性を妨げる有害微生物とみなされているのである。ところが、放線菌 *Rhodococcus erythropolis* S-1を組込んだ活性汚泥は、同菌株を植菌しない活性汚泥よりも優れた凝集性を維持したことが報告された<sup>10)</sup>。さらに、*R. erythropolis* S-1の培養液中には、微生物細胞をはじめとする懸濁粒子の凝集を引起こす能力のあることが示された<sup>11)</sup>。そこで、著者は *R. erythropolis* によって産生されるフロキュラントの組成を明らかにするとともに、浮上汚泥より単離された放線菌 *Nocardia amarae*<sup>7)</sup> についてフロキュラントの検索を行うこととした。

本論文においては、放線菌の細胞外ないし細胞表層に分泌される蛋白質が、フロキュラントとして機能し得ることを論証し、活性汚泥凝集における放線菌の役割について考察する。また、疎水性物質の供給による放線菌の浮上と凝集促進作用をもつ細胞外蛋白質との関連性についても言及し、浮上汚泥の発生機構について考察する。

第2章においては、*N. amarae*の細胞表層成分が凝集促進作用をもつことを論証する。*N. amarae*を洗浄することによって得られた溶脱物には、分散性の細菌を凝集させる能力のあることが判明し、細胞表面に存在する物質が凝集促進作用を持つものと予想された。*N. amarae*を酸及びアルカリ溶液で洗浄すると3種類のペプチドが回収され、そのうち最も多量に得られる細胞

表層ペプチドは凝集促進作用を発揮した。その作用はイオン強度や多価カチオン添加量の上昇によって高められた。しかし、鉄イオンの過剰添加は作用を阻害した。また、ペプチドの添加濃度が上昇しすぎると凝集作用は低下した。

第3章においては、各種炭素源の *N. amarae* の増殖に及ぼす影響について論述する。中性脂質を炭素源として *N. amarae* を培養すると、培養液表面にフロックが形成され急速な増殖がもたらされた。このとき菌体は培養液中に分散せず、培養液表面のみに認められた。さらに、細胞表層蛋白質は中性脂質に対して高い親和性を示した。

第4章では、*R. erythropolis* S-1によって分泌されるバイオフィロキュラントの組成と、その凝集作用発現に及ぼす諸因子の影響について論述する。まず、*R. erythropolis* の培養液中に分泌されるフロキュラントの回収手段を考案した。得られたフロキュラントは、雑多なペプチドから構成されていた。培養液の濾液は凝集促進能を持たないことより、その物質は微粒子を形成していることが判明した。凝集作用は多価カチオンの添加によって促進されたが、鉄イオンを過剰に添加すると凝集は阻害された。フロキュラントの濃度が増大し過ぎてもやはり、作用は低下することが明かとなった。

第5章においては、疎水性基質による *R. erythropolis* の培養時に起こる菌体の浮上と、バイオフィロキュラントの細胞表面への蓄積について論述する。炭素源には通常グルコースを用いたが、炭化水素を用いるとより速やかな増殖が起こり、菌体は凝集体を形成して気液界面に浮上した。そのとき凝集作用を持つ蛋白質は、培養液中には拡散せず細胞表面に蓄積された。

第6章においては、以上のような結果を総括し、放線菌の生産するバイオフィロキュラントの性状と作用発現に及ぼす諸因子の影響、疎水性基質による放線菌の急速な増殖と浮上について論ずる。

## 第 2 章 *Nocardia amarae* YK1 の菌体表層蛋白質の凝集促進作用

### 第 1 節 緒言

活性汚泥の表面は蛋白質、核酸、多糖によって覆われており<sup>12,13)</sup>、活性汚泥中から抽出された雑多な高分子物質が、凝集作用を持っていることもすでに確認されている。例えば、活性汚泥をアルカリ性溶液によって溶脱して得られた物質は、蛋白質、核酸、糖を含み、酸性条件下でカオリンその他の懸濁粒子を凝集できたと報告されている<sup>14,15)</sup>。また、Tenneyらは活性汚泥から水酸化アンモニウム溶液によって抽出した多糖、蛋白質、核酸の複合体が凝集作用を示したとしている<sup>16,17)</sup>。

純粋培養された微生物の産生する細胞外高分子物質も、凝集能をもつことが報告されている。糸状菌の一種である *Paecilomyces* sp. の分泌するポリガラクトサミンは、懸濁粒子を凝集させる能力を有していた<sup>18,19)</sup>。同じく糸状菌の *Aspergillus sojae* によって細胞外に分泌されたポリヘキソサミンと蛋白質の複合体も、凝集作用を持っていた<sup>20)</sup>。さらに、シアノバクテリアの一種である *Phormidium* の産生する菌体外高分子物質は、糖、脂質、蛋白質の混合物であって、カチオン共存下でフロキュラントとしての能力を有していた報告されている<sup>21)</sup>。このように、生物由来の多糖ないし糖を含む高分子物質は、懸濁粒子に凝集をもたらすことが証明されているのである。蛋白質が作用の発現に寄与していたという例もあるが<sup>20)</sup>、その場合にも蛋白質が直接粒子間の連結を成すとは考えられていなかった。

本章では、*N. amarae* YK1 の細胞表面に繊維状の細胞外構造が存在し、その構築に関与する蛋白質が、凝集促進作用を発揮することを論証し、活性汚泥凝集における蛋白質の重要性について考察する。

## 第2節 実験方法

### 1. 菌株および培養方法

実験に使用した菌株は、廃水処理プラントに発生した異常発泡物より単離された *Nocardia amarae* YK1 である。本菌株は通産省工業技術院微生物工業技術研究所内の菌株保存施設において、識別番号 FERM P-9347 として登録、保存されている。

本菌株の培養には、グルコース7%、酵母エキス(Difco)0.5%、NaCl 0.5%を含む培地(LG<sub>7</sub>培地)、あるいはグルコース1%、酵母エキス0.4%、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02%を含む培地を用いた。そして、30℃で1-3週間静置培養を行った。

このほか、菌株の保存にはグルコース1%、ペプトン0.5%、肉エキス1%、NaCl 0.3%、寒天2%を含む放線菌保存用固体培地を用いた。30℃で4-5日間培養した後、4℃で保存した。

### 2. *Nocardia amarae* YK1菌体洗浄液の回収法

グルコースを炭素源とする培地2lから回収した *N. amarae* の菌体を濾紙(アドバンテック No.5A)上に集菌し、蒸留水で緩やかに洗浄した。つぎに、300mlの蒸留水に菌体を懸濁し激しく振盪した。蒸留水を入替えてこの操作を再度行った。得られた600ml洗浄液を菌体洗浄液とした。

### 3. *N. amarae* の細胞表層成分の抽出方法

培養液2lから濾紙上に回収した菌体(乾燥重量約10g)を約600mlの蒸留水で洗浄した。洗浄した菌体を600mlの0.1N HClおよび0.05N NaOHに懸濁し、4℃~室温で、1-3時間攪拌した。その後、遠心分離(10,000×G 15分)を行い

菌体を取除いた。得られた上澄液をそれぞれHCl溶脱液、NaOH溶脱液として回収した。

#### 4. *N. amarae* の細胞表層成分の分画法

細胞表層成分の分画法は、Figure 2-1のフローチャートに示した。上記のようにして得たそれぞれの溶脱液は、pH4 (B) およびpH8 (B<sup>-</sup>) で沈殿物を生じた。NaOH溶脱液から得られた沈殿物は、酸性条件下でジエチルエーテルを加え乳化させた (C)。遠心分離によって、このエマルジョンは3層に分れ、ジエチルエーテル可溶画分と水溶性画分は取除いた (D)。残った不溶画分はn-ブチルアルコールとともに乳化させた (E)。遠心分離後、n-ブチルアルコール可溶画分と不溶画分を回収し、水溶性画分は除去した (F)。n-ブチルアルコール可溶画分は乾固した後、希薄なアルカリ溶液に可溶性成分のみを回収した。そして、この画分をフラクションaとした。n-ブチルアルコールにも不溶であった画分をフラクションbとした。フラクションcはHCl溶脱液から得られた沈殿物である (B<sup>-</sup>)。

#### 5. 電子顕微鏡観察

観察に供する *N. amarae* 菌体を、0.3%の塩化ナトリウムを含む0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で3~4回洗浄した。洗浄菌体を2%のグルタルアルデヒドを添加した0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 中に18時間浸漬して菌体を固定した。固定操作の後、0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で3~4回洗浄し、過剰なグルタルアルデヒドを取除いた。つぎに50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 99.5, 100%のエチルアルコールにそれぞれ30分間浸漬し、脱水を行った。脱水後、エチルアルコールと酢酸イソペンチルの1:1、1:3の混合液、さらに100%の酢酸イソペンチルに30分間ずつ浸漬し、溶媒置換を行った。以上までの操作は4℃

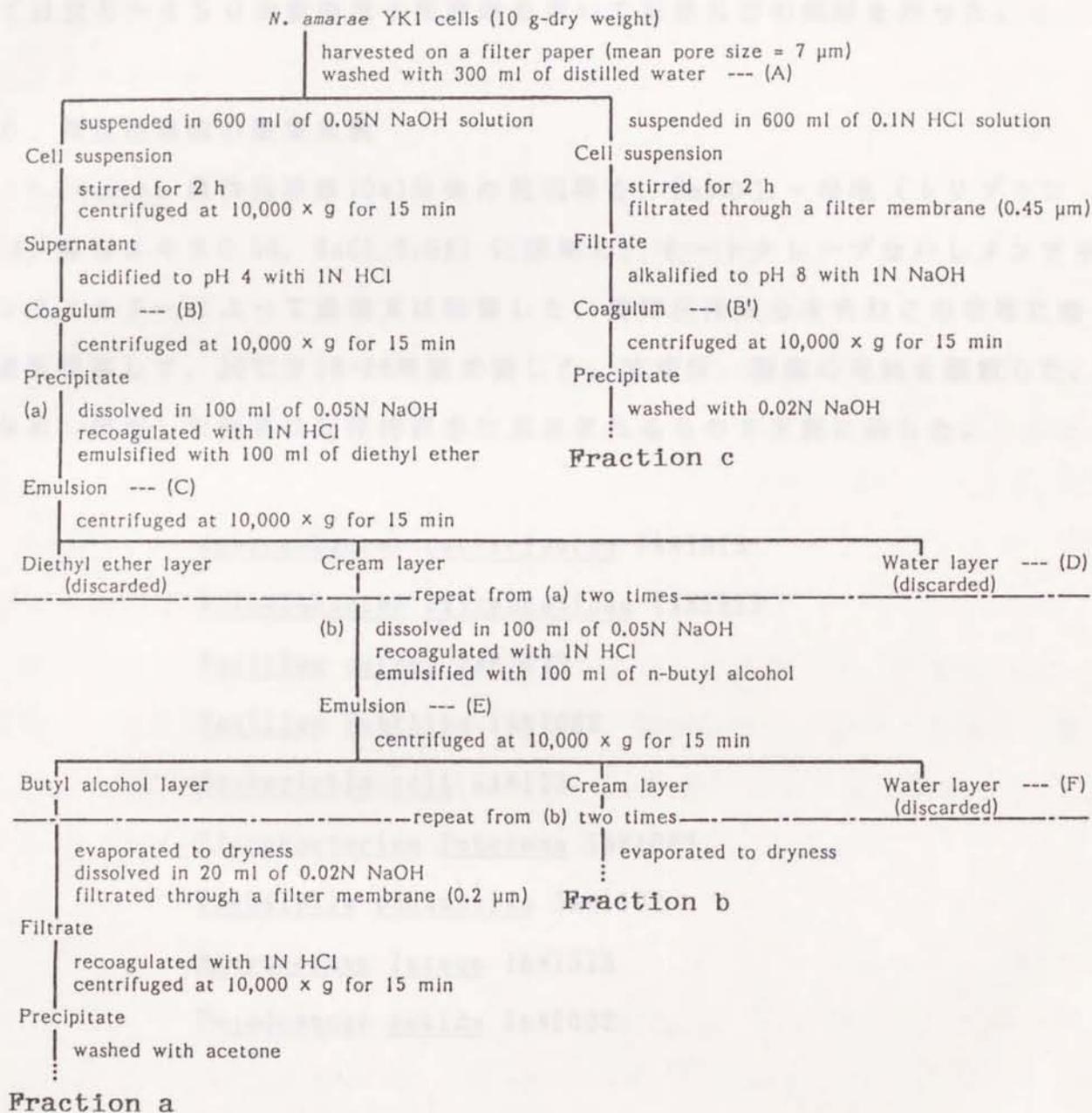


Figure 2-1

Preparation procedure of Fraction a, b and c.

において行った。このような前処理の後、臨界点乾燥を行い、金蒸着を施して日立S-450走査型電子顕微鏡を用いて細胞表面の観察を行った。

#### 6. 微生物細胞の凝集実験

N. amarae 菌体洗浄液10ml由来の乾固物を、6mlのL-培地（トリプトン1%、酵母エキス0.5%、NaCl 0.5%）に溶解し、オートクレーブないしメンブランフィルターによって滅菌又は除菌した。菌体洗浄成分を含むこの培地に細菌を植菌して、30℃で18-24時間培養した。培養後、凝集の有無を観察した。なお、使用した細菌は活性汚泥中に見出されるもので下記に示した。

Achromobacter cycloclastus IAM1013

Acinetobacter calcoaceticus IAM1517

Bacillus cereus IAM1029

Bacillus subtilis IAM1069

Escherichia coli IAM123

Flavobacterium lutecens IAM1667

Klebsiella pneumoniae IAM1102

Micrococcus luteus IAM1313

Pseudomonas putida IAM1002

このほかEscherichia coli C600-1については、詳細な凝集実験を行った。培養開始後2-4時間おきに培養液を回収し、濾紙（アドバンテック No.5A）を通過させた。濾紙上に残った菌体を凝集菌体とみなし、濾液中の菌体を分散菌体とした。培養液およびその濾液1mlから菌体を回収し、生理食塩水で洗浄した。洗浄した菌体を2N NaOH 2mlに懸濁して溶菌させた後、HClを加え

て中和した。その後、ローリー法によって蛋白量を測定し、菌体量に換算した。なお凝集した菌体の量は、培養液中の菌体量と濾液中の菌体量との差として算出した。

#### 7. カオリンによる凝集能の判定法

カオリン（和光）を50mM酢酸ナトリウム-HCl緩衝液(pH2.0-5.0)、50mMリン酸緩衝液(pH5.5-7.0)、及び50mMTris-HCl緩衝液(pH7.5-9.0)に1g/lの濃度で懸濁した。これらの懸濁液5mlに *N. amarae* 細胞表面から調製した各フラクションを0.5mg/mlになるよう添加し混和した。その後、5-30分静置し凝集の有無を観察した。

#### 8. 凝集活性の定量法

蒸留水ないし緩衝液に、5g/lの濃度でカオリンを懸濁した。懸濁液1mlに試料を含む試料溶液および塩溶液を添加し、混和した後、緩やかな遠心分離(40×G,15秒)を行った。液相を回収し、660nmにおける吸光度を測定した。そして、次のような式に従って凝集活性を算出した。

$$\text{凝集活性} = \frac{\text{OD}_{\text{blank}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{blank}}}$$

ここで、 $\text{OD}_{\text{blank}}$ は試料溶液ないし塩溶液を加えない対照区の吸光度であり、 $\text{OD}_{\text{sample}}$ はそれらを添加した試験区の吸光度を表している。

## 9. 蛋白質分解酵素処理

1 ユニットのプロナーゼ E (Protease, Type XXV: Sigma) を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.2) 10ml に、フラクション a, b, c をそれぞれ 10mg 溶解した。その後、30℃ で 18 時間 インキュベートした。水に対して透析後、各透析液の凝集活性を測定した。

## 10. ゲル濾過クロマトグラフィー

フラクション a および b 10mg を 2-3ml の 0.02N NaOH に溶解し、これを試料溶液として、トヨパール HW-60F によるゲル濾過クロマトグラフィーを行った。移動相は 0.02N NaOH、カラムは直径 2.5cm、長さ 90cm で、溶出液の検出は 280nm における吸光度を測定することによって行った。

フラクション c は移動相を 0.02N HCl として、トヨパール HW-60F によるゲル濾過クロマトグラフィーを行った。使用したカラムは直径 1cm、長さ 40cm で、溶出液の検出は 280nm における吸光度を測定することによって行った。

## 11. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli の方法<sup>22)</sup> に準じて行った。フラクション a, b, c、それぞれ約 1mg を 650  $\mu$ l の蒸留水に懸濁した。これらの懸濁液に 10% の SDS 溶液を 100  $\mu$ l、2-メルカプトエタノールを 10  $\mu$ l、0.5M Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) を 20  $\mu$ l を加え、密栓を施して 100℃ で 2-3 分加熱した。その後、0.1% のブロムフェノールブルーを含む 40% グリセリン溶液 0.8ml を加え、これを泳動用の試料溶液とした。

フラクション a の分析には 20% のゲルを用い、15mA の定電流で泳動した。この場合の分子量マーカーは、BRL 製 Protein MW Standards-Lows である。

フラクション b および c の泳動には 12.5% のゲルを用いた。そして、25mA

の定電流下で泳動を行った。分子量マーカーとしては、MW-markers(SDS) (オリエンタル酵母製) を使用した。

泳動後、ゲルを0.25%のクーマシーブリリアントブルー(CBB) R-250を含む染色液(酢酸:エチルアルコール:蒸留水=1:4:5)に18-24時間浸漬し、染色した。つぎに、脱色液(酢酸:メチルアルコール:蒸留水=7:25:68)に浸漬し、過剰な色素を除いた。

### 12. セルロースアセテート膜電気泳動

セルロースアセテート膜(ゲルマンサイエンス、Sepraphore III)を50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.9)、あるいは50mMリン酸緩衝液(pH4.0)に浸漬した。緩衝液を含ませた膜に試料液をスポットし、浸漬に使用したものと同じ緩衝液を電解質として、500Vの定電圧下で電気泳動を行った。泳動後、膜を0.5%のCBB G-250を含む10%の酢酸溶液に浸漬し染色した。その後、5%酢酸溶液で洗浄して過剰な色素を取除いた。

### 13. その他の分析方法

脂肪酸の分析はつぎのような方法によって行った。各フラクション10mgを1mlの1N NaOHに溶解ないし懸濁し、窒素置換を行い密栓を施した。100℃で1時間加熱した後、HClを加えpHを2-3に調整した。その後、石油エーテル1mlを加え混和し、静置した。エーテル層を回収し、ガスクロマトグラフィーによって脂肪酸の分析、定量を行った。使用したガスクロマトグラフ装置は、島津GC-15A、移動相はヘリウム、カラムはGLサイエンス社製Fused Silica Capillary Column FFAP Bonded (25m)、検出はFIDによって行った。

各フラクションの赤外吸収スペクトルは日本分光A-302型赤外分光光度計および島津DR-8000型フーリエ変換赤外分光光度計を用い、KBr錠剤法によつ

て分析した。

アミノ酸組成の分析には、日立835型自動アミノ酸分析装置を使用した。各フラクションを5.7N HClに溶解ないし懸濁し、脱気後封管した。110℃で24時間加熱することによって完全加水分解を行った。加水分解後、減圧下で乾固し、乾固物を少量の蒸留水に溶解させて分析に供した。

### 第3節 実験結果と考察

#### 1. *N. amarae* YK1細胞洗浄液の凝集作用

*E. coli* C600-1は通常のL-培地中で培養すると全くフロックを生じず、分散して増殖した。しかし、*N. amarae* YK1の細胞洗浄液中の成分を添加したL-培地では、増殖に伴ってフロック化がもたらされた。凝集は培養開始の後、4-6時間で起こり始めた (Figure 2-2,3)。フロック化が起こってからは菌体の増殖はほとんど停止し、最終的な菌体収量もコントロールより少量であった (Figure 2-2)。フロックは一旦形成されるとその後も維持され続けた。菌体は激しく振盪することにより分散したが、5-10分静置することにより再凝集した。

*E. coli* C600-1以外に活性汚泥より単離された9種の細菌についても同様に、*N. amarae* YK1の細胞洗浄液中の成分を添加したL-培地での凝集試験を行った。それらの結果はTable 2-1に示してある。*Bacillus cereus*以外に対しては、いずれも幾分かの効果認められた。

以上のような結果から、*N. amarae* の細胞表面には、細菌細胞の凝集を誘発する物質の存在することが示された。

#### 2. *N. amarae* YK1細胞表面の電子顕微鏡観察

*N. amarae* YK1を液体培地を用いて静置培養すると、菌体は培養液の表面

に浮上して増殖し、やがて数mmの厚さの膜を成して培地の表面を覆いつくした (Figure 2-4)。この浮上菌体は僅かな物理的衝撃で沈降することより、細胞表層の疎水的な性質により辛うじて浮上していたものと考えられた。一方、同じ培地で振盪培養を行うと、菌体の一部は分散したものの1-2mm程度の菌体グラニュールも存在していた。このような菌体膜及びグラニュールの形成は、*N. amarae* の細胞が相互に連結されていることを示唆していると考えられた。

そして、*N. amarae*の細胞は繊維状の物質で囲まれていることが、電子顕微鏡による観察の結果判明した (Figure 2-5)。この繊維状構造体は細胞の最表層にあつて、疎水性の維持と菌体の連結を成し、静置培養時の菌体の浮上や、振盪培養時における菌体のグラニュール形態の形成に関与するものと予想された。さらに、この構造体の構成成分が凝集促進作用をもつと考え、構成成分の回収とそれらの凝集促進能について検討を加えることとした。

### 3. 細胞表層成分の溶脱

静置培養によつて得た菌体は、グラニュールを形成しており、濾紙 (アドバンテック、No. 5A、平均孔径 $7\mu\text{m}$ ) でも充分回収可能だった。さらにその菌体グラニュールは、ヘキサン、ベンゼン、エチルアルコール、アセトンで洗淨しても全く破壊されなかった。したがつて、菌体の連結は疎水的な相互作用のみによるのではないことが示され、Figure 2-5に観られる菌体外の網目状構造によつて、物理的に連結されている可能性が高いと考えられた。

0.1NのHClに菌体を懸濁し、1-3時間攪拌したところ、菌体グラニュールの一部が破壊された。また、0.1NのNaOHに菌体を懸濁し、1-3時間攪拌した場合、菌体グラニュールはほぼ完全に破壊され、菌体は分散した。なお、NaOHの濃度は0.05Nでも充分に効果があつた。

電子顕微鏡観察を行ったところ、酸およびアルカリでの洗浄をしていない菌体の表面には多量の繊維状構造体が観察された (Figure 2-6A) のに対し、HClおよびNaOHによって洗浄した菌体の表面には、そのような構造体が全く観察されなかった (Figure 2-6B,C)。

したがって、*N. amarae*の細胞表層にある繊維状構造体はHClおよびNaOHによって溶脱され、同時に菌体の連結も解除されて菌体の分散が起こることが判明した。

#### 4. 細胞表層成分の分画方法の確立

NaOH溶脱液のpHをHClを添加することによって低下させ、生じた沈殿物を回収した。得られた沈殿物を希薄なNaOH溶液に溶解した後、HClを加えて酸性とし、さらにジエチルエーテルを加えて混和した。混合液は粘稠なエマルジョンとなり、これを遠心分離すると混合液は3層に分れた。すなわち、エーテル層と水層の境界面に不溶物の膜が現われた。エーテル層を回収し乾固して得られた物質は、水に不溶で収量も少なかった (乾重約10gの菌体から数mg)。そこで、収量の多い不溶物を主要な溶脱成分として回収した。

エーテルによって脱脂されたこの不溶画分を、エーテルの場合と同じ要領で酸性下においてブチルアルコールに可溶な画分と不溶な画分とに分画した。ブチルアルコール層を乾固して得られた乾固物のうち0.02N NaOHに可溶である部分を回収した。この画分の収量は菌体10gから10-40mgであって、中性からアルカリ性域で水に溶解し、酸性域 (pH4-5以下) で沈殿した。この画分をフラクションaとした。

ブチルアルコールに溶解しなかった残りの画分は、pH3-5で沈殿しその範囲以外のpH領域では水に溶解した。この画分の収量は菌体10gから100-400mgであり、フラクションbとした。

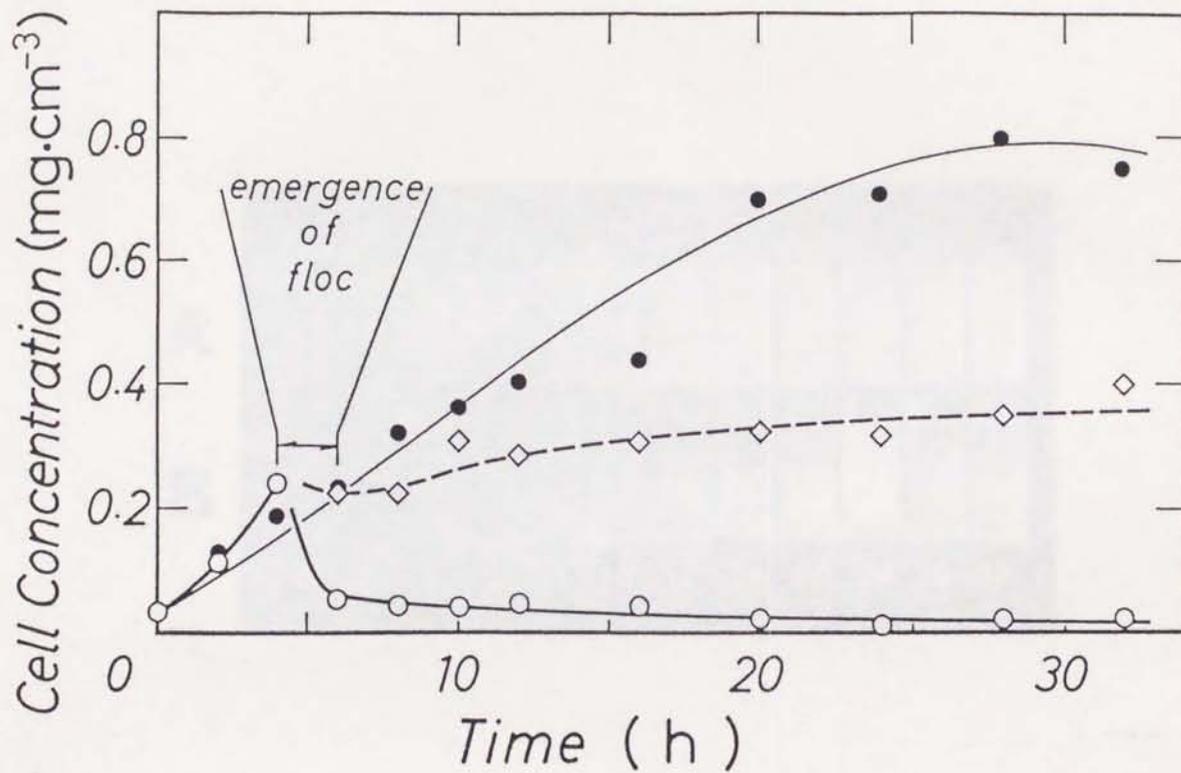


Figure 2-2

Cell proliferation and flocculation of *E. coli*.

Closed circles in the figure show cell concentration in L medium, whereas open circles and diamonds show cells in dispersion and those flocculating in L medium containing extracellular products of *N. amarae*.

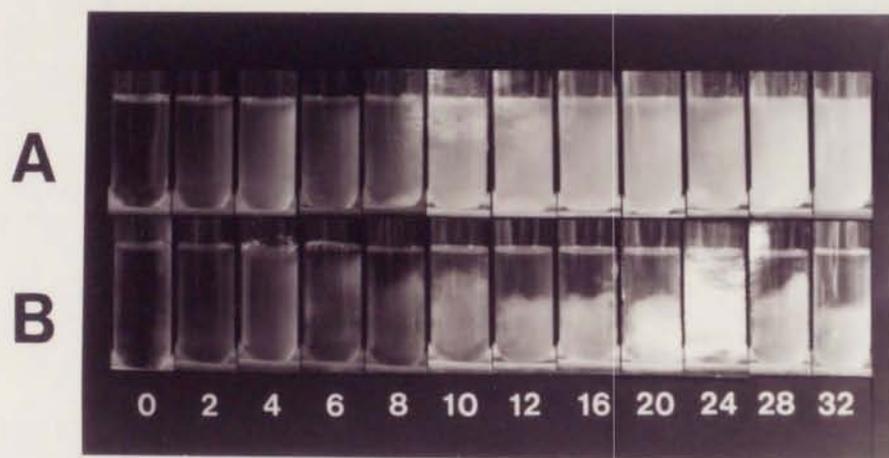


Figure 2-3

Floc formation for the duration of *E. coli* cell proliferation. The photographs of cultures were arranged with the elapse of time. A; L medium, B; L medium with extracellular products of *N. amarae* YK1.

Table 2-1

Floc forming function of extracellular products of N. amarae on various bacterial strains

Strains	Floc Formation
<u>Achromobacter cycloclastus</u> IAM1013	+
<u>Acinetobacter calcoaceticus</u> IAM1517	+
<u>Bacillus cereus</u> IAM1029	-
<u>Bacillus subtilis</u> IAM1069	+
<u>Escherichia coli</u> IAM1239	+
<u>Flavobacterium lutescens</u> IAM1667	+
<u>Klebsiella pneumoniae</u> IAM1102	+
<u>Micrococcus luteus</u> IAM1313	+
<u>Pseudomonas putida</u> IAM1002	+



Figure 2-4

Ten days culture of N. amarae grown on glucose.

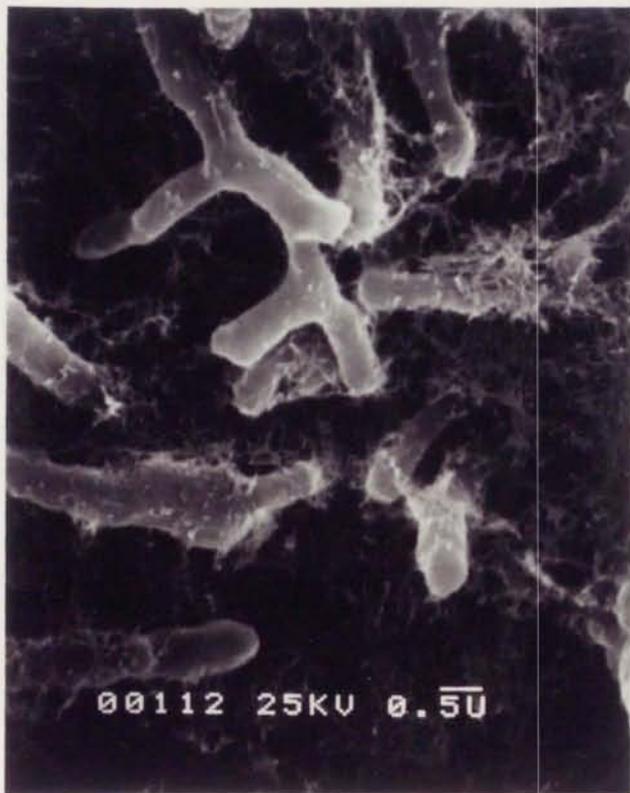


Figure 2-5

Cell surface structure of *N. amarae* YK1.

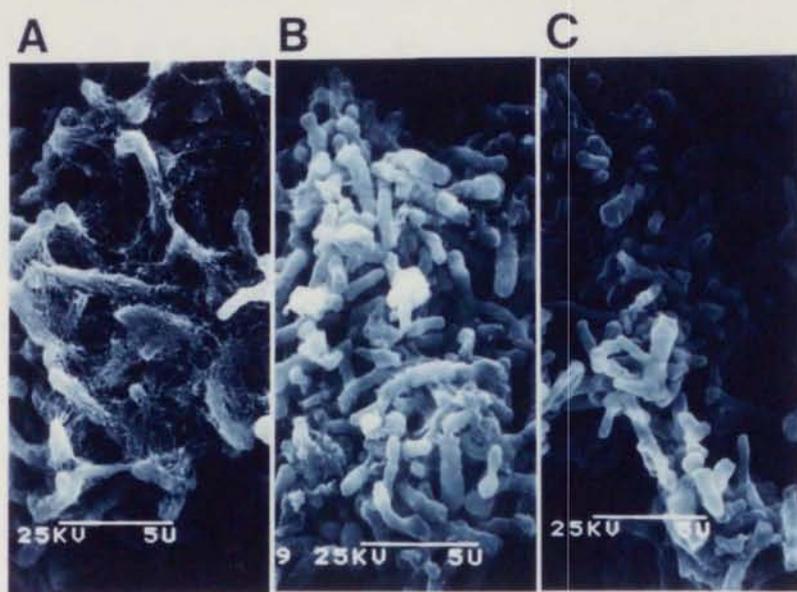


Figure 2-6

Removal of fibrous cell surface material with HCl  
and NaOH solution.

A; non-treated *N. amarae* cells, B; cells washed with  
0.1 N HCl, C; cells washed with 0.05 N NaOH.

一方、HCl溶脱液をアルカリ性に調整すると沈殿が生じたので、これを回収した。NaOH溶脱液からの沈殿と同様に、有機溶媒に対する溶解性の差異により分画することを試みたが、この沈殿は全く有機溶媒に溶解しなかった。したがって、さらなる分画は不可能であった。HCl溶脱液よりの沈殿物の収量は、菌体10gから40-100mgであり、これをフラクションcとした。

以上のような検討結果から、細胞表層成分の分画法としてFigure 2-1に示したような方法を確立するに至った。そして、電子顕微鏡による観察で明らかとなった細胞表面の繊維状構造体は、Figure 2-1の方法によって回収される各画分によって構築されているものと予想した。

#### 5. 各フラクションの混合による細胞表層構造の再構成

フラクションa, b, cのうち、細胞表層の構造体の構築に関与するものを明らかにするため、細胞表層構造体の再構成実験を行った。

まず、各フラクションを、2.8mg/mlの濃度で50mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した。そして、それらの溶液を混合することにより、沈殿が生ずるか否かを調べた。フラクションaとbの溶液を混合しても全く沈殿は生じなかった。しかし、フラクションbとcの溶液を混合すると、直ちに白濁が起こった(Figure 2-7A)。5分経過の後には肉眼で認められるほどの大きさの沈殿が生じ(Figure 2-7B)、30分経過すると沈殿はさらに(200-300 $\mu$ m)成長した(Figure 2-7C)。この実験は室温において行った。一方、フラクションaとcを混合しても、何等急激な変化は起こらなかった。しかし、混合後室温で18時間放置し続けると若干の沈殿が生じた。また、混合液を熱水中で加熱すると、数分間で沈殿が生じることがわかった。以上のような結果から、*N. amarae*の細胞表層構造体は、細胞洗浄液から回収したフラクションa及びbとフラクションcとの混合によって生じる沈殿として再構成されるので

はないかと考えられた。

## 6. 各フラクションの組成

前章において示した分画方法に従って得た三つのフラクションに対して、フェノール-硫酸法による糖の定量を行ったところ、いずれのフラクションの糖含量も0.1%に満たない（グルコース換算）ことが明かとなり、糖を主な構成要素とはしないと判断された。ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸（炭素数10以上の脂肪酸）含量の定量の結果、フラクションaのみが数%の脂肪酸を含み、フラクションbおよびcの脂肪酸含量は0.1%以下であることが判明した。フラクションaから検出された脂肪酸は炭素数16と18のものが大半であった。フラクションaは、酸性条件下でn-ブチルアルコールに溶解するため、脂肪酸の混入する可能性は高い。したがって、検出された脂肪酸が、構成要素として含まれていたものであるか、単に混入したものであるのかは、この段階では判断できなかった。

## 7. 各フラクションのプロテアーゼ感受性

各フラクションの赤外吸収スペクトルは類似しており、いずれもアミド基に由来する1540および1650 $\text{cm}^{-1}$ 付近の吸収帯を有していた（Figure 2-8）。また、フラクションaの吸収スペクトルには、メチレン基による2925 $\text{cm}^{-1}$ の吸収が他のフラクションよりも強く、これは脂肪酸を含むことを示すものと考えられた（Figure 2-8A）。

各フラクションはそれぞれ特定のpH領域において沈殿するという特徴を有していたが、プロナーゼEによる処理の後にはこのような性質は失われ、沈殿を生じなくなった。また、酵素処理後に各フラクションを混合しても沈殿は形成されなかった。したがって、全てのフラクションがプロナーゼEによ

り分解されることが示唆された。

各フラクションとも糖、脂肪酸の含量は低く、赤外吸収スペクトルではアミド基に由来する吸収帯が検出されたこと、さらにプロナーゼEによって分解されたと考えられることから、いずれも主として蛋白質から成るものと予想された。

#### 8. 各フラクションの溶液中における分子量分布

フラクションaおよびbはアルカリ域で、フラクションcは酸性域でそれぞれ水に溶解した。そこで、そうした可溶条件下でゲル濾過を行い、各フラクションの溶液中における分子量分布を明らかにするとともに、可能であれば分子量の差異によってさらに分画することとした。なお、各フラクションは蛋白質より構成されているという可能性がすでに示されていたので、検出は280nmにおける吸光度を測定することによって行った。

フラクションaの溶出プロフィールは、Figure 2-9に示してあり、三つのピークと一つのショルダーが検出された。最初のピークはボイドのピークであり、溶け残った試料が溶出したためと考えられた。孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した試料溶液を分画に用いれば、このピークは検出されなくなった。ショルダーは検出されない場合もあった。このような結果から、フラクションaは分子の大きさの違いにより、2種類ないし3種類にさらに分別できると考えた。ところが、一つのピークを回収し、再度同じカラムで濾過したところピークは一つにはならず、その前の溶出プロフィールとほとんど同じになった。すなわち、Figure 2-9のように複数のピークが再度検出されたのである。したがって、フラクションaは比較的分子量の小さい単位から構成され、その単位は水溶液中で何種類かの大きさの異なった会合体を形成する。さらに、それらの会合体の間には平衡関係があり、ある条件

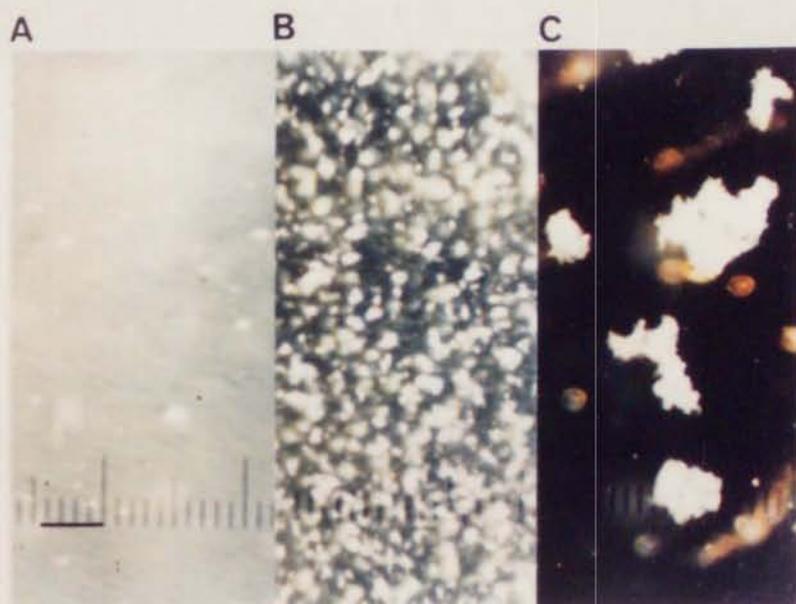


Figure 2-7

**Emergence of aggregates of fraction b and c .**

The solution of fraction b (0.28 mg/ml) was injected into a droplet of fraction c (0.28 mg/ml) on a slide glass.

Photographs of A, B and C were taken at 0, 5 and 30 min, respectively. Open bar indicates 0.12 mm.

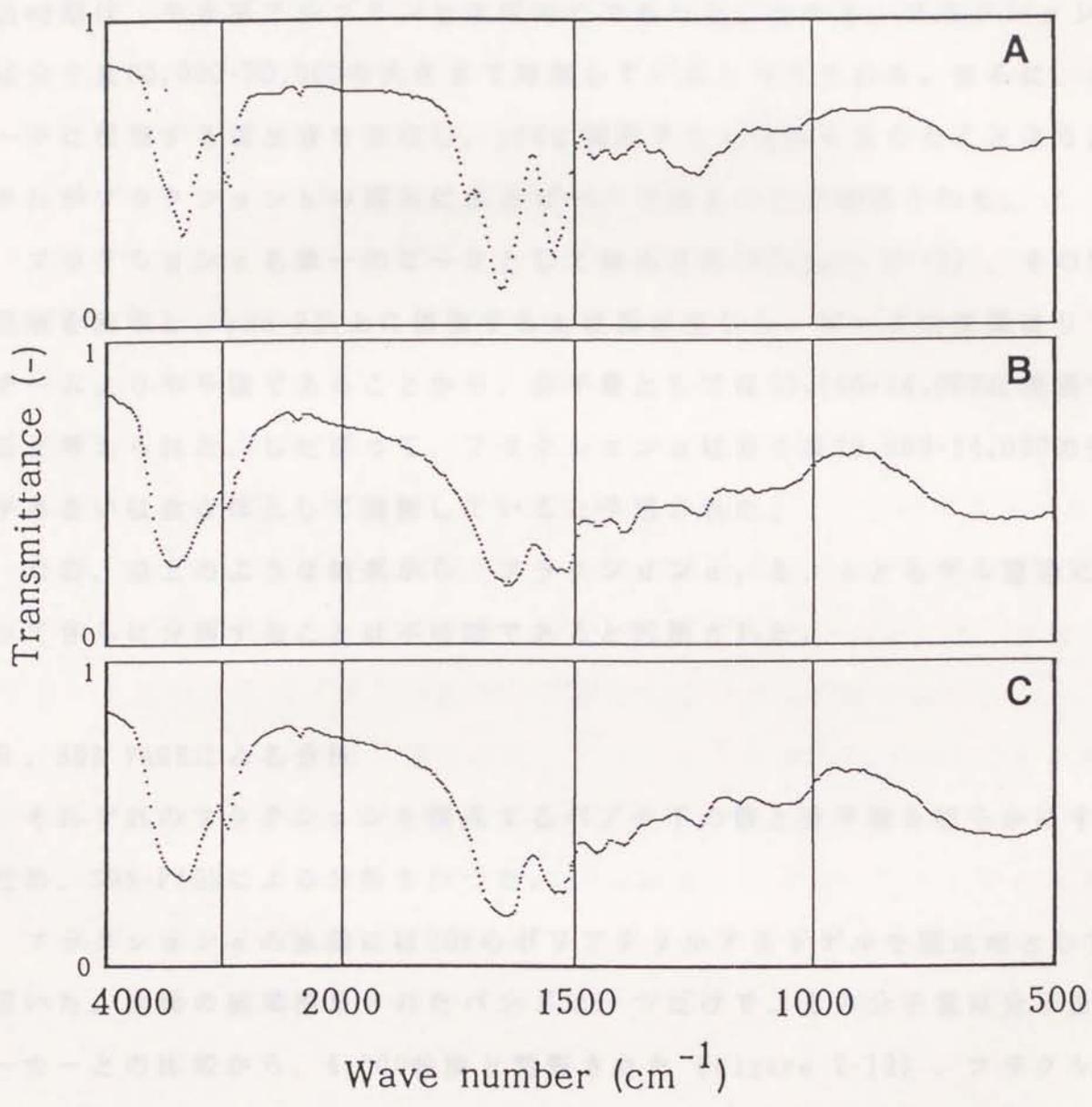


Figure 2-8  
 Infrared spectra of fraction a (A), b (B) and c (C)

下では一定の濃度比が保たれる、と解釈せざるを得なかった。

フラクションbのピークは単一だった (Figure 2-10)。そのピークの溶出時期は、牛血清アルブミンとほぼ同じであったことから、フラクションbは分子量60,000-70,000の大きさで溶解していると考えられた。さらに、ピークに相当する溶出液を回収し、pH4に調整すると沈殿を生じたことより、それがフラクションbの溶出によるピークであることが確認された。

フラクションcも単一のピークとして検出され (Figure 2-11)、その溶出液を回収し、pH8-9以上に調整すると沈殿が生じた。ピーク的位置はリゾチームよりやや後であることから、分子量としては10,000-14,000に相当すると考えられた。したがって、フラクションcは分子量10,000-14,000の分子あるいは会合体として溶解していると予想された。

なお、以上のような結果から、フラクションa, b, cともゲル濾過によってさらに分画することは不可能であると判断された。

## 9. SDS-PAGEによる分析

それぞれのフラクションを構成するペプチドの数と分子量を明らかにするため、SDS-PAGEによる分析を行った。

フラクションaの泳動には20%のポリアクリルアミドゲルを固定相として用いた。泳動の結果検出されたバンドは一つだけで、その分子量は分子量マーカーとの比較から、4,000前後と判断された (Figure 2-12)。フラクションaのバンドの検出は非常に困難で、検出できないこともあった。写真では解らないが、バンドは染色された微粒子の集合である。泳動後ゲルを染色液ではなく直接脱色液に浸漬し静置しておく、と、バンドが検出されるべき位置が白濁した。この白濁は微粒子の出現によるものであつて、その大半はゲルの表面に付着しており少量がゲル内に留っていた。緩やかな動揺により表面

にあった粒子は取り去られた。おそらく、染色を行った場合にも同様に微粒子が析出し、偶々ゲル内に残った粒子が多かった時に、バンドとして認められるものと考えられた。染色液、脱色液とも酢酸を含みpHが低いため、フラクションaが不溶化したものと思われる。つまり、フラクションaはSDSと2-メルカプトエタノールの存在下で加熱処理しても、本来の性質を失わないのである。ゲル濾過の結果と併せて考えると、フラクションaは分子量約4,000の単一のペプチドから成り、溶液中では何種類かの大きさの異なった会合体として溶解していると判断された。

フラクションbは12.5%のゲルで泳動した結果、分子量約12,600の位置に主要なバンドが認められた。しかし、レーンのほぼ全域に渡って淡く染色された (Figure 2-13, lane a)。分子量約12,600のペプチドがフラクションbの本来の成分であるが、精製が不完全であるために他のペプチドが混入しているものと思われた。ゲル濾過のデータよりフラクションbは、水溶液中で4~6個の単位ペプチドが会合して存在していると判断された。

フラクションcは容易に染色され、バンドは分子量約12,600の位置に唯一認められた (Figure 2-13, lane b)。したがって、特別な精製操作を行わなくても、フラクションcは純度の高い標品として得られることがわかった。ゲル濾過では分子量10,000-14,000の位置にピークが検出されたことより、フラクションcは単分子のままで溶解していることが判明した。

#### 10. 各フラクションの荷電状態とアミノ酸組成

すでにのべたようにフラクションbとcとを混合すると、速やかに沈殿が生じた。フラクションaとcでは加温することにより沈殿が生じた。また、フラクションaおよびbは酸性条件下で沈殿することから、等電点は酸性域にあると考えられた。一方、それらと相互作用を示すフラクションcはアル

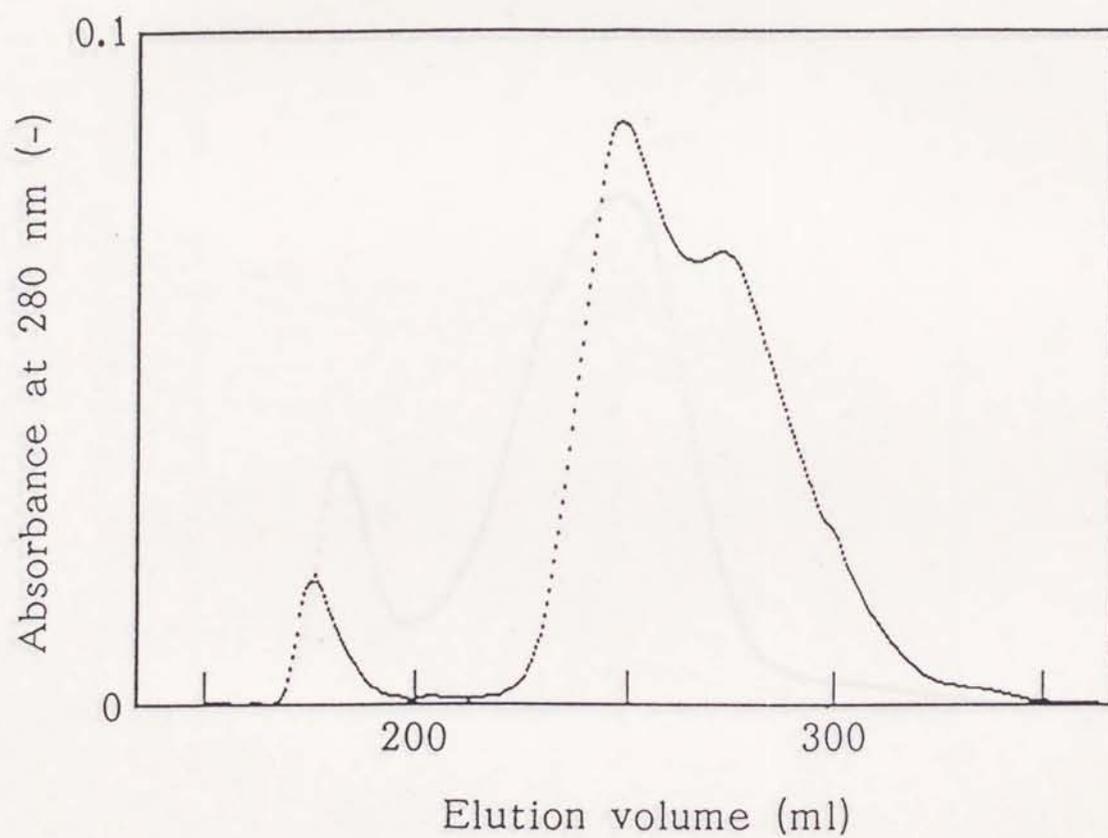


Figure 2-9

Gel filtration chromatography of fraction a .

Fraction a was applied on the column packed with TOYO PEARL HW-60F. The mobile phase was 0.02 N NaOH. Proteins were detected by monitoring the absorbance at 280 nm.

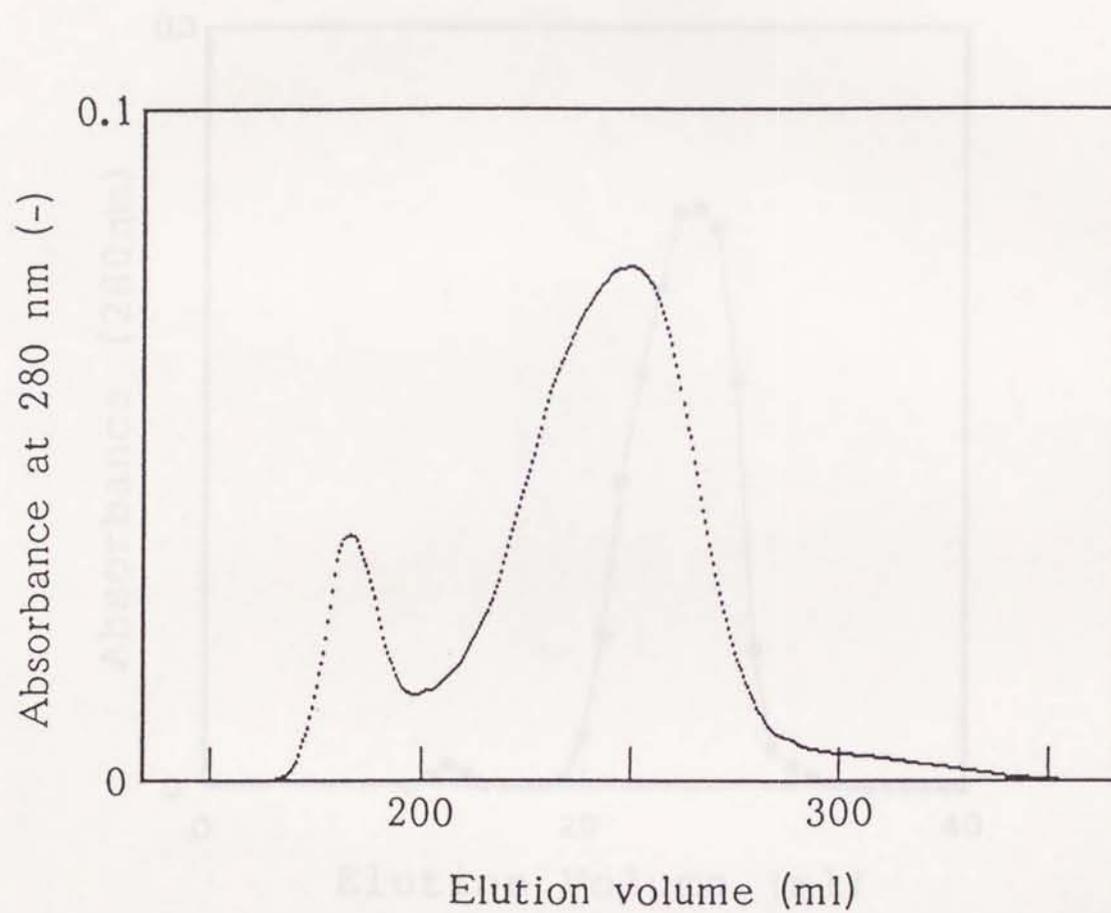


Figure 2-10

Gel filtration chromatography of fraction b .

Fraction b was applied on the column packed with TOYO PEARL HW-60F. The mobile phase was 0.02 N NaOH. Proteins were detected by monitoring the absorbance at 280 nm.

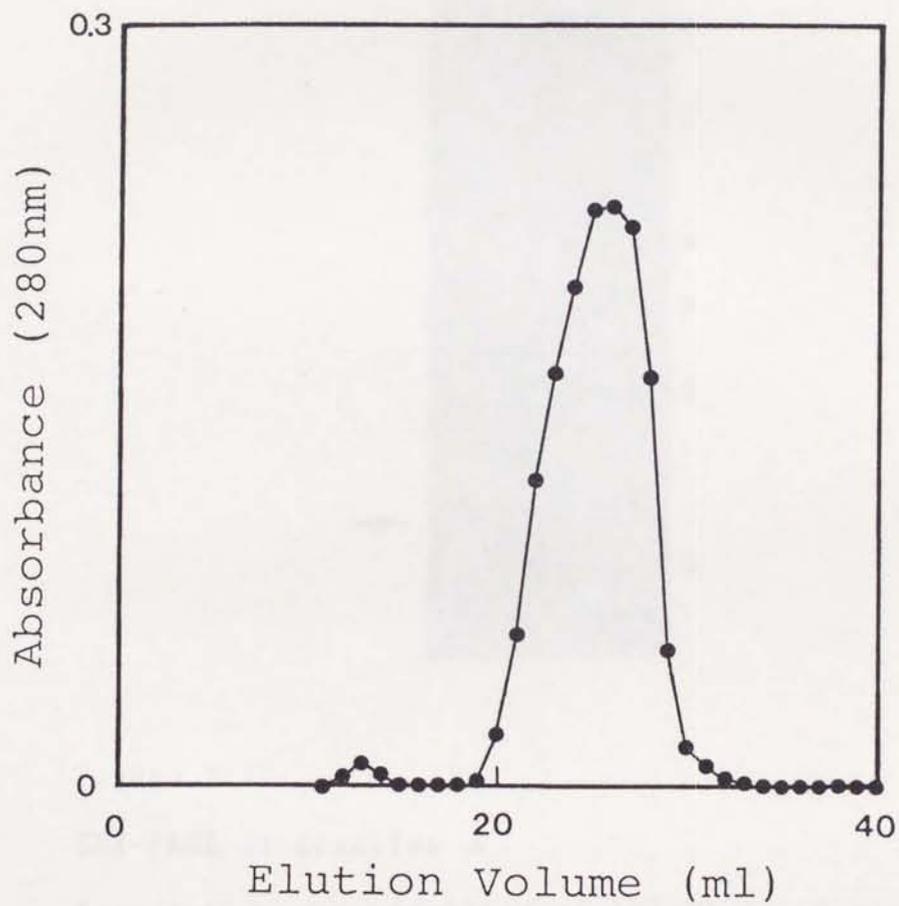


Figure 2-11

Gel filtration chromatography of fraction c .

Fraction c was applied on the column packed with TOYO PEARL HW-60F. The mobile phase was 0.02 N HCl. Proteins were detected by monitoring the absorbance at 280 nm.



Figure 2-12

SDS-PAGE of fraction a .

Fraction a was incubated at 100 °C for 2 min in the presence of 1 % 2-mercaptoethanol and 1 % SDS. The denatured fraction a solution thus prepared was supplied on 20 % polyacrylamide gel and electrophoresed at the constant current of 15 mA. Lane a; fraction a . Lane b; molecular size markers, MW 43,000 (1), MW 29,000 (2), MW 18,400 (3), MW 14,300 (4), MW 6,200 (5) and MW 3,000 (6).

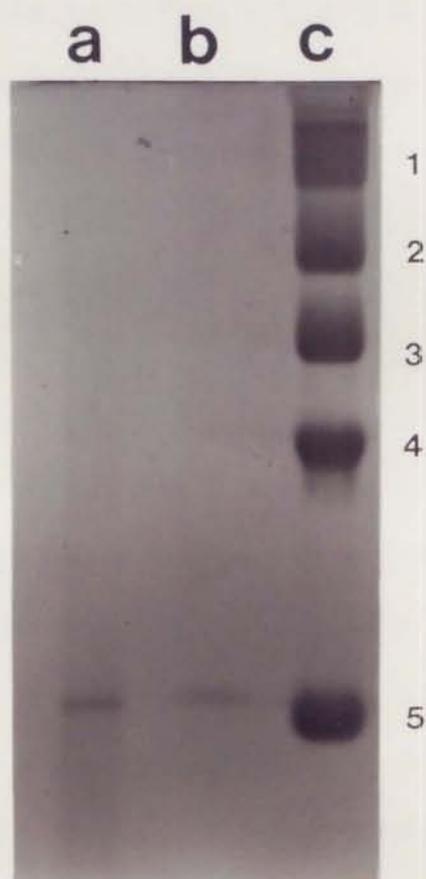


Figure 2-13

SDS-PAGE of fraction b and c .

Fraction b and c was incubated at 100 °C for 2 min in the presence of 1 % 2-mercaptoethanol and 1 % SDS. The denatured fraction b and c solution thus prepared were supplied on 12.5 % polyacrylamide gel and electrophresed at the constant current of 15 mA. Lane a; fraction b . Lane b; fraction c . Lane c; molecular size markers, MW 74,400 (1), MW 49,600 (2), MW 37,200 (3), MW 24,800 (4) and MW 12,400 (5).

カリ条件下で沈殿し、アルカリ域に等電点を持つと予想された。そこで、それらの相互作用には電気的な引力が重要な要因の一つとなっているのではないかと考え、各フラクションの荷電状態を調べるため、セルロースアセテートを支持体とする電気泳動を行った。

フラクション a および b は pH 8.9 において陽極側に泳動され、その移動度は、比較のために泳動した牛血清アルブミンとフラクション b が同程度であって、フラクション a はそれらよりも移動度が大きかった (Figure 2-14A)。したがって、フラクション a および b は、アルブミンと同様酸性蛋白質であり、中性域においてマイナスに帯電しているものと予想された。フラクション c は pH 4.0 において陰極側に泳動され、移動距離はリゾチームとほとんど同じであった (Figure 2-14B)。そこで、リゾチームと同様に塩基性であって、フラクション c は中性下でプラスに帯電していると予想された。以上のような結果から、フラクション a および b とフラクション c とは、中性域で互いに相反する電荷を帯びており、電気的な相互作用が働くと考えられた。

各フラクションに塩酸による加水分解を施して、それらのアミノ酸組成の分析を行った。結果は Table 2-2 に表した。塩基性のアミノ酸であるアルギニンとヒスチジンの含量の合計をそれぞれのフラクションで比較すると、フラクション a では 1.0%、フラクション b では 6.9%、フラクション c では 14.0% となっており、電気泳動の結果と矛盾しなかった。

このように、電気的な引力がフラクション間の相互作用の重要な要因であると考えられた。しかしながら、フラクション b と c との混合による沈殿が、フラクション a と c との混合による沈殿よりも容易に生じるということがそれだけでは説明できず、他にも要因があることが示唆された。

## 11. フラクション a の HPLC による分析

フラクション a は収量が他のフラクションよりも少ないので、細胞表層構造の構成要素としての役割は、他のフラクションと比較すれば大きくないと予想された。しかしながら、フラクション a は水溶液中で相互に変換可能な幾つかの異なった会合形態を取ったり、SDS-PAGE の後も低 pH 下において不溶化するという特徴を保持したり、グリシンを 25% 以上も含むなど特異な物質であった。さらにフラクション a は分子量約 4,000 と低分子だったので、アミノ酸の配列も比較的容易に決定できると予想された。そこで、まずアミノ酸配列の分析に供するための純度の高い標品を得るため、HPLC による精製を行うこととした。

精製は通常ペプチドの分離によく用いられる逆相吸着系で行った。使用したカラムは TSK gel ODS-120T (0.5mm × 25cm) であり、0.1% のトリクロロ酢酸を含む 80% アセトニトリル溶液を移動相とした。ペプチドの検出は 230nm における吸光度を測定することによって行なった。その結果、Figure 2-15A に示したような溶出パターンが得られた。12分過ぎの大きなピークがフラクション a ではないかと考えた。また、フラクション a 1mg を 10 μg のペプシンを含む 0.01N HCl 1ml に懸濁し、37°C で 24 時間インキュベートした。そして、その反応液を HPLC 分析に供した。その時の溶出パターンは、Figure 2-15B のとおりであって、12分過ぎのピークが消失しており、ペプチドであったことが示された。さらに、このピークに相当する溶出液を回収し、再度分析したところ完全に単一のピークとなった。また、回収した溶出液を乾固し希アルカリ溶液に溶解後 HCl を加えて酸性にすると沈殿した。そこで、これをアミノ酸配列分析の試料とした。ところが配列は判読できず、N 末端のアミノ酸がアシル化などの修飾を受けているのではないかと考えられた。なお、HPLC によって精製したフラクション a の脂肪酸（炭素数 10 以上）含量は 0.1% に満たず、

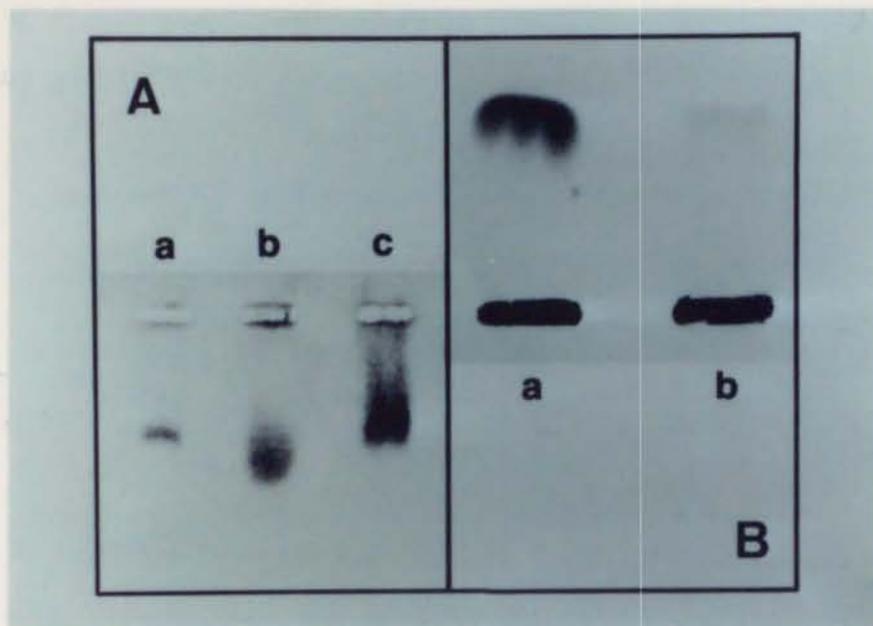


Figure 2-14

Cellulose acetate membrane electrophoresis of fraction a ,  
b and c .

Membranes of A and B were soaked with 0.2 M Tris-HCl buffer  
(pH 8.9) and 0.2 M acetate buffer (pH 4.0), respectively.

Fraction a and b were applied to lane b and c on the membrane  
A, respectively. Fraction c was applied to lane b on membrane  
B. Bovine serum albumin (lane a on A) or lysozyme (lane a on B)  
were prepared as typical protein charged negatively or  
positively. A constant current of 2.5 mA was supplied from  
bottom to top.

Table 2-2

Amino acid composition of fraction a, b and c.

Amino acid	Fraction		
	a	b	c
Ala	13.8	13.1	8.1
Arg	0.8	5.2	10.9
Asp+Asn	11.2	10.3	10.1
Glu+Gln	5.4	8.3	5.3
Gly	25.6	12.5	12.5
His	0.2	1.7	3.1
Ile	5.3	4.0	3.1
Leu	6.6	7.4	4.9
Lys	1.4	3.2	4.4
Met	0.5	1.7	0.4
Phe	1.2	3.1	2.5
Pro	2.5	5.0	6.1
Ser	12.3	7.6	6.6
Thr	2.8	6.8	10.0
Tyr	1.3	2.9	3.2
Val	9.1	7.2	8.8
	100.0	100.0	100.0

The data of Cys and Trp were omitted from the table, because the hydrolysis method used here decomposed them.

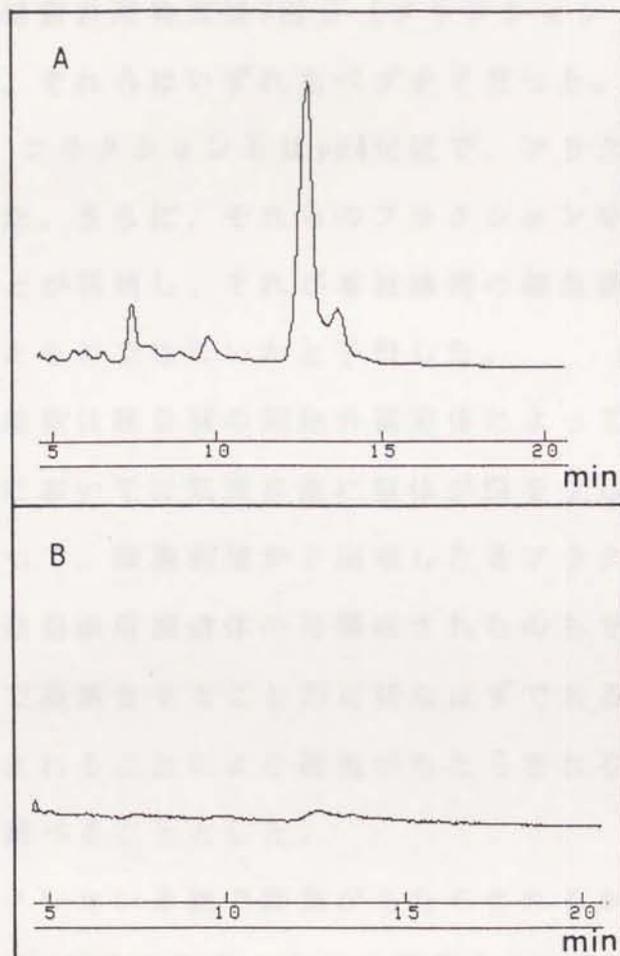


Figure 2-15

HPLC analysis of fraction a .

Non-treated (A) and pre-treated (B) fraction a with pepsin were analyzed on reverse phase HPLC. Peptides were detected by monitoring the absorbance at 230 nm.

脂肪酸はフラクシオン a の構成要素ではないことが明かとなった。

## 12. 各フラクシオンの共同作業によるカオリンの凝集

*N. amarae* の細胞表層物質は3画分 (フラクシオン a, b, c) に分画することが可能で、それらはいずれもペプチドだった。そして、フラクシオン a は pH4 以下で、フラクシオン b は pH4 付近で、フラクシオン c は pH8 以上でそれぞれ沈殿した。さらに、それらのフラクシオンを混合すると中性下でも沈殿の生じることが判明し、それが本放線菌の細胞表面にある網目状の構造体の再構成されたものではないかと予想した。

*N. amarae* の細胞は網目状の細胞外構造体によって相互に連結されているため、静置培養においては気液界面に菌体が膜をなして集合するものと考えられる。したがって、細胞表層から回収した各フラクシオンの混合によって生じる沈殿が、細胞表層構造体の再構成されたのもであるとすれば、粒子を沈殿内に取込んで凝集させることが可能なはずである。そこで、この沈殿に懸濁粒子が取込まれることにより凝集がもたらされるか否かを、カオリンを懸濁粒子として調べることにした。

まず、各フラクシオン単独で凝集がもたらされるか検討した。その結果、フラクシオン a は pH4 以下でカオリンの凝集をもたらし、生じた凝集体の体積は pH の低下に伴い減少した (Figure 2-16)。フラクシオン b を添加した懸濁液では、pH4 のみで凝集が観察された (Figure 2-17)。このように、特定の pH 下で生じる各フラクシオンの沈殿に懸濁粒子が取込まれることによって凝集がもたらされることが示された。しかし、フラクシオン c は沈殿の起こる pH8 以上でも凝集を引起こせなかった。これはアルカリ域では、カオリン粒子自体の電気的な反発力が強くなるためではないかと予想した。

フラクシオン b と c との混合によって中性下で生じる沈殿でカオリンを凝

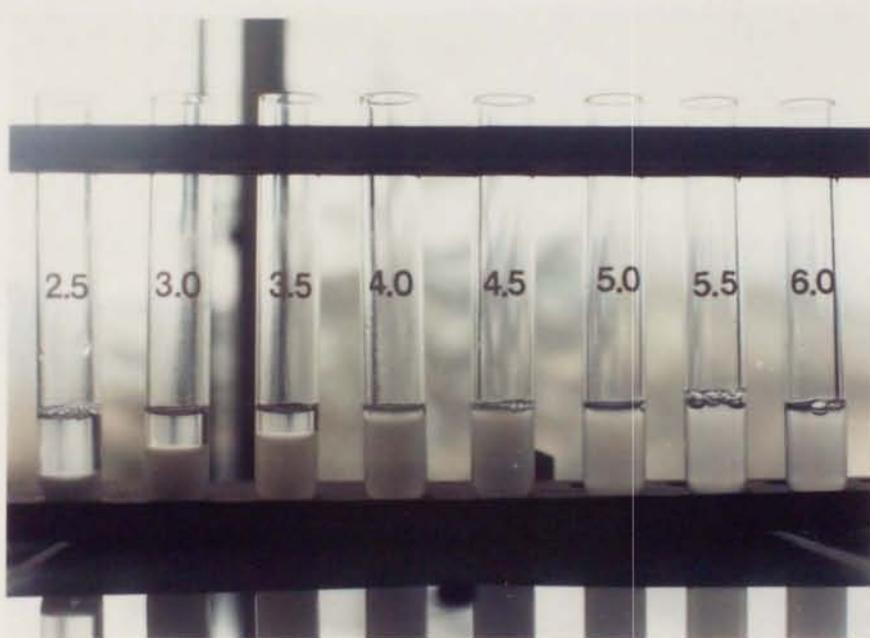


Figure 2-16

Flocculation of Kaolin suspension by fraction a .

Numerals on test tubes indicate pH values of the suspensions.

0.5 mg/ml of fraction a was added to each test tubes containing

0.1 % kaolin, then settled for 30 min.



Figure 2-17

Flocculation of Kaolin suspension by fraction b .

Numerals on test tubes indicate pH values of the suspensions.

0.5 mg/ml of fraction b was added to each test tubes containing

0.1 % kaolin, then settled for 30 min.

集させることができるか否かについては、次のような方法によって検討した。

まず、フラクションbとcを別々に2.8mg/mlの濃度で、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した。つぎに、両溶液を同量ずつ混合し、さらに同時に1g/lの濃度でカオリンを懸濁した。その結果、カオリン粒子は生じた沈殿に取込まれ凝集がもたらされた。

以上のような結果から、*N. amarae* 細胞表層から回収した各フラクションを混合して生じさせた沈殿が、中性下で粒子を保持することが可能であり、それが*N. amarae* の細胞を取囲んで細胞間の連結をもたらしていることが示唆された。

### 13. フラクションbの中性における凝集能

いずれのフラクションも単独では、中性域で懸濁粒子の凝集を引起こすことはできなかつた。しかし、これは各フラクションの濃度が、0.5mg/mlという高濃度下においての結果である。また、最初に示したように本放線菌の細胞表層成分中には、分散性細菌の凝集をもたらす作用があつた。そこで、中性条件下での各フラクションの凝集能を、より低濃度下で定量的に検討することとした。

50mMのリン酸緩衝液(pH6.8)に、5g/lのカオリンを懸濁した。ここに各フラクションを0.5mg/ml以下の濃度で添加し、凝集活性を定量した。その結果、フラクションaとcには活性が認められなかつたものの、フラクションbは、その添加濃度が56mg/l以下であれば、中性下でも十分な凝集能を持つことが明かとなつた (Figure 2-18)。50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)を用いた場合には、フラクションbの添加量が多くなつても凝集の起こらなくなることはなかつた (Figure 2-18)。これは生じた沈殿に粒子を取込むためである。しかし、中性域ではフラクションbは沈殿しない。したがって、こうし

た結果は、フラクシオンbが単に酸性条件下で生じる沈殿に懸濁粒子を取込むことによって凝集させるだけでなく、中性下で粒子間を連結することによって、凝集をもたらす可能性のあることを示唆するものである。

#### 14. フラクシオンbの凝集能に及ぼす塩強度の影響

中性下におけるフラクシオンbの凝集活性に及ぼす諸条件を検討した。まず、塩強度の影響について論述する。1mM, 10mM, 50mMと濃度の異なる三種類のリン酸緩衝液(pH6.8)で、フラクシオンbの凝集活性を比較した。それらの結果はFigure 2-19に示したとおりである。1mMの緩衝液中では、いかなる濃度下においても十分な凝集活性は発揮されなかった。10mMの緩衝液中では、2.8-14mg/lのフラクシオンbを添加したときに凝集が起こった。50mMの緩衝液を用いると、2.8-56mg/lの濃度範囲にまで凝集の起こる領域が拡大した。以上のような結果より、フラクシオンbの中性条件下における凝集促進能は、塩強度の上昇によって促進されることが判明した。

#### 15. 金属イオンの影響

フラクシオンb 5.6mg/lを含む蒸留水に、カオリンを5g/lの濃度で懸濁した。この懸濁液に環境中に普遍的に存在する数種の金属塩を添加して、凝集活性に及ぼす影響を検討した。

一価のカチオンとしては $\text{Na}^+$ ( $\text{NaCl}$ )を使用した。 $\text{Na}^+$ をフラクシオンbを含むカオリン懸濁液に添加したときには、5mM以上の濃度で添加すれば凝集をもたらす効果があった(Figure 2-20)。二価カチオンとしては $\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{CaCl}_2$ )を選択し、この場合には、2mM以上であれば効果が認められた(Figure 2-21)。三価のカチオンになると、添加効果はさらに低濃度下においても認められるようになった。 $\text{Al}^{3+}$ ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ )は0.2mM添加すれば充分であった(Figure 2-

22)。また、 $\text{Fe}^{3+}$ ( $\text{FeCl}_3$ )は0.1mMでは凝集を促進し、それ以上に添加すると阻害することが判明した (Figure 2-23)。

以上のようにフラクシオンbは、その添加量が適正な範囲にあり、しかもある程度以上のイオン強度下やカチオンの共存下において、懸濁粒子の凝集をもたらすことが判明した。

*N. amarae*の洗浄液には、微生物細胞の凝集を引起こす作用があった。凝集は菌体濃度がある程度以上上昇してからもたらされた。洗浄液中にフラクシオンbが溶脱されている可能性は充分にある。培養当初はフラクシオンbが過剰であるために凝集は起こらないが、懸濁粒子濃度の上昇に伴い相対的にフラクシオンbの濃度が低下すれば、凝集作用を発揮するはずである。したがって、洗浄液の凝集能はフラクシオンbによるものであると考えられた。



Figure 2-23  
Effects of the flocculant concentration on flocculation activity.  
Various amounts of flocculant b were added to 50 ml of culture  
buffer (pH 7.0, 0.1 M phosphate buffer, 0.1 M NaCl, & 1  
mg/ml yeast extract).

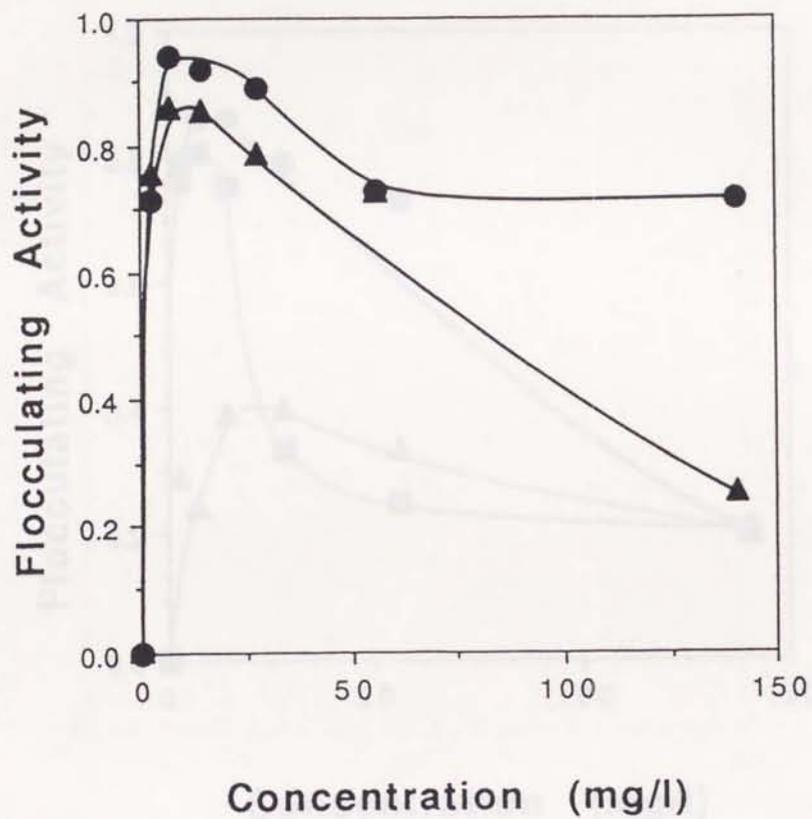


Figure 2-18

Effects of the flocculant concentration on flocculating activity.

Various amounts of fraction b were added to 50mM acetate buffer (pH 4.0, ●) and phosphate buffer (pH6.8, ▲) containing 0.5 % kaolin.

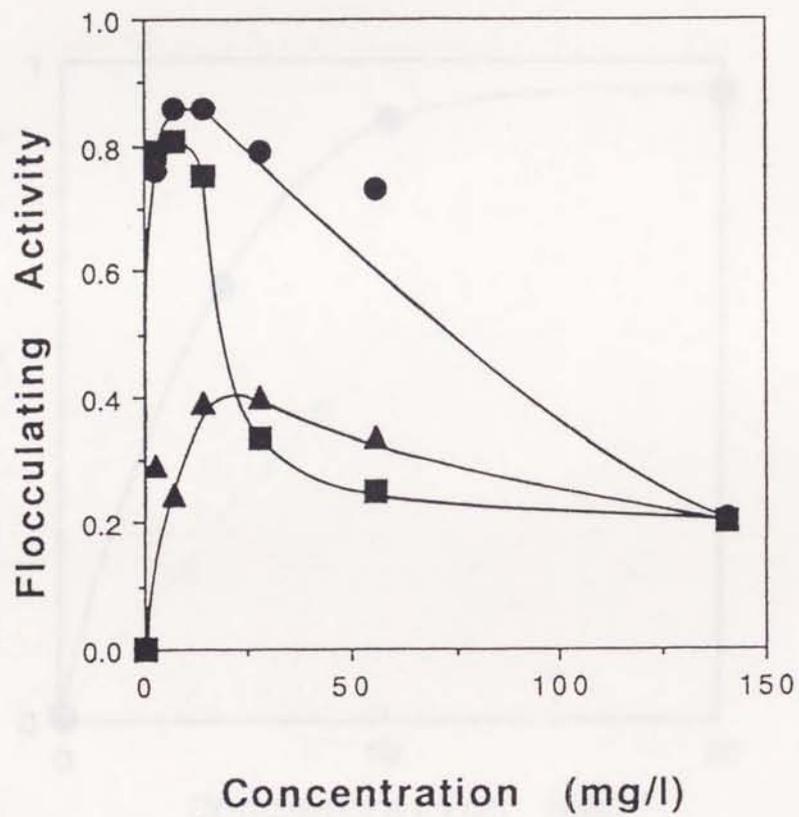


Figure 2-19

Effects of ion strength on flocculating activity.

Flocculating activities were measured at different fraction b concentrations in 1 (▲), 10 (■), 50 (●) mM phosphate buffer (pH6.8) suspended with 0.5 % of kaolin.

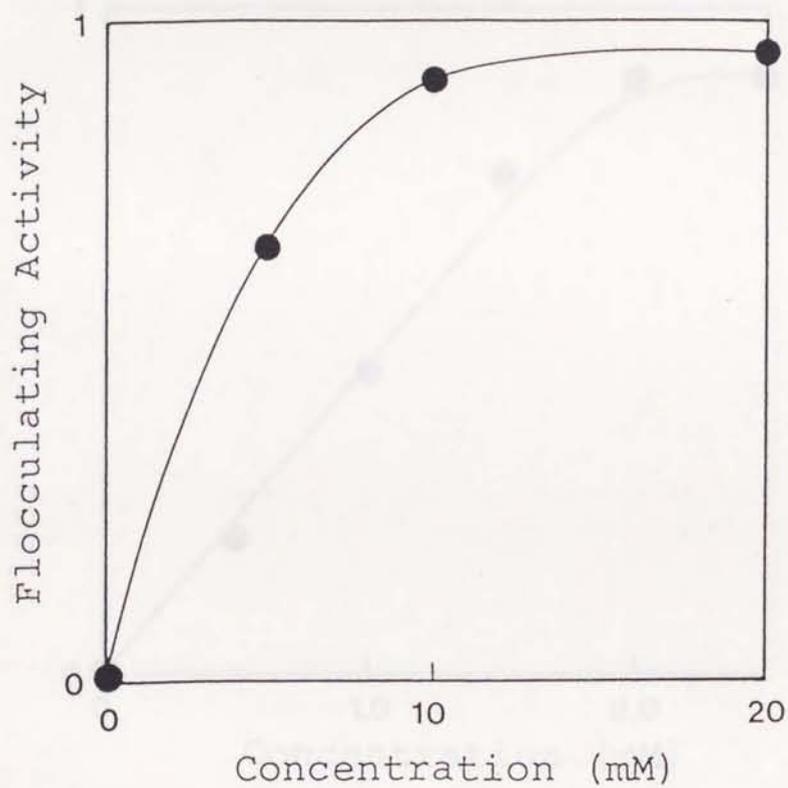


Figure 2-20

Effects of  $\text{Na}^+$  concentration on flocculating activity.

Different amounts of  $\text{Na}^+$  ( $\text{NaCl}$ ) were added to 0.5 % kaolin suspensions containing 5.6 mg/l of fraction b .

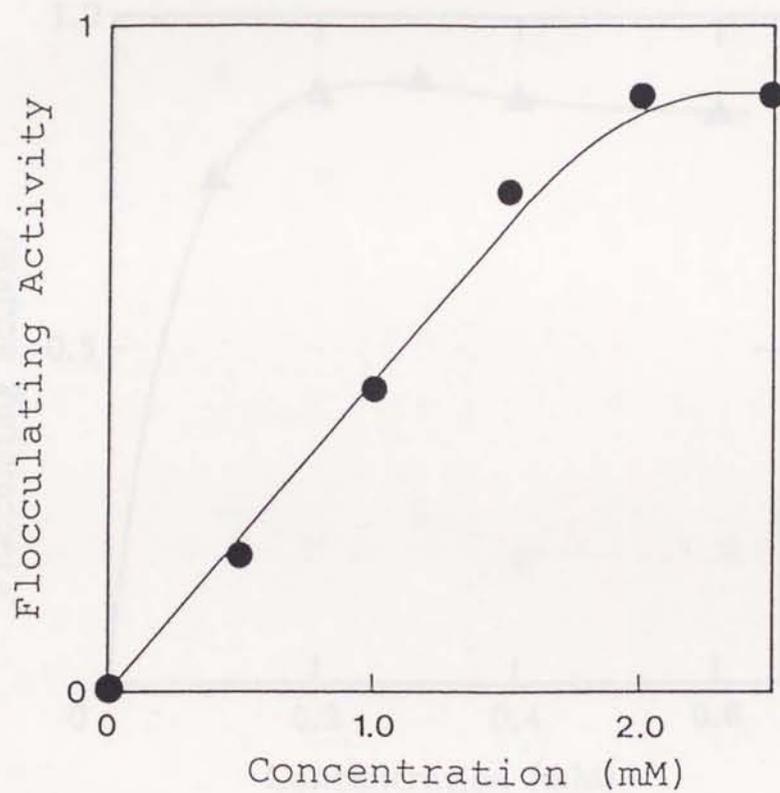


Figure 2-21

Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on flocculating activity.

Different amounts of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) were added to 0.5 % kaolin suspensions containing 5.6 mg/l of fraction b .

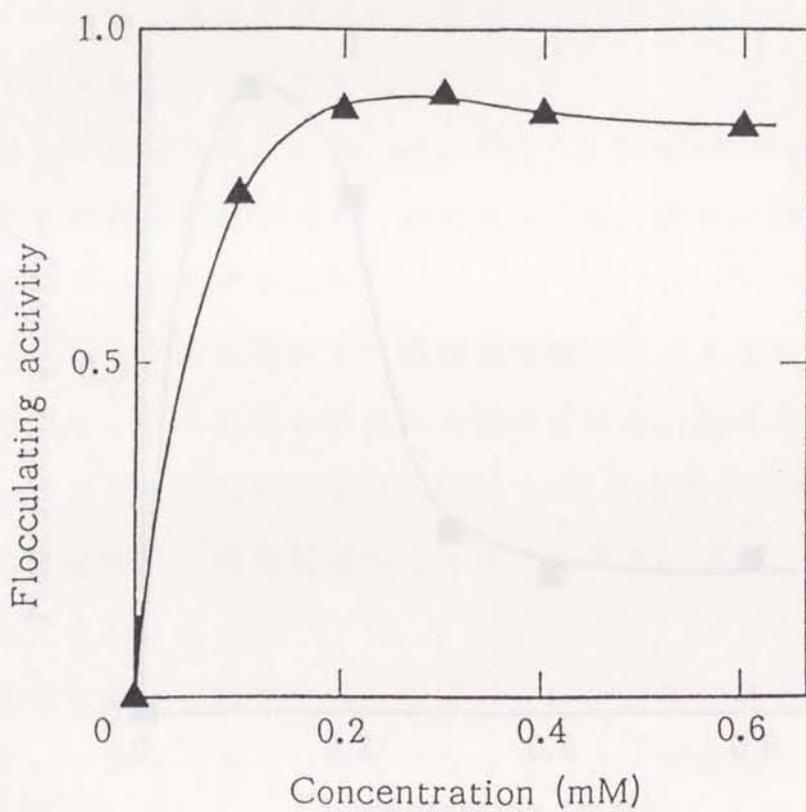


Figure 2-22

Effects of  $\text{Al}^{3+}$  concentration on flocculating activity.

Different amounts of  $\text{Al}^{3+}$  ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ) were added to 0.5 % kaolin suspensions containing 5.6 mg/l of fraction b .

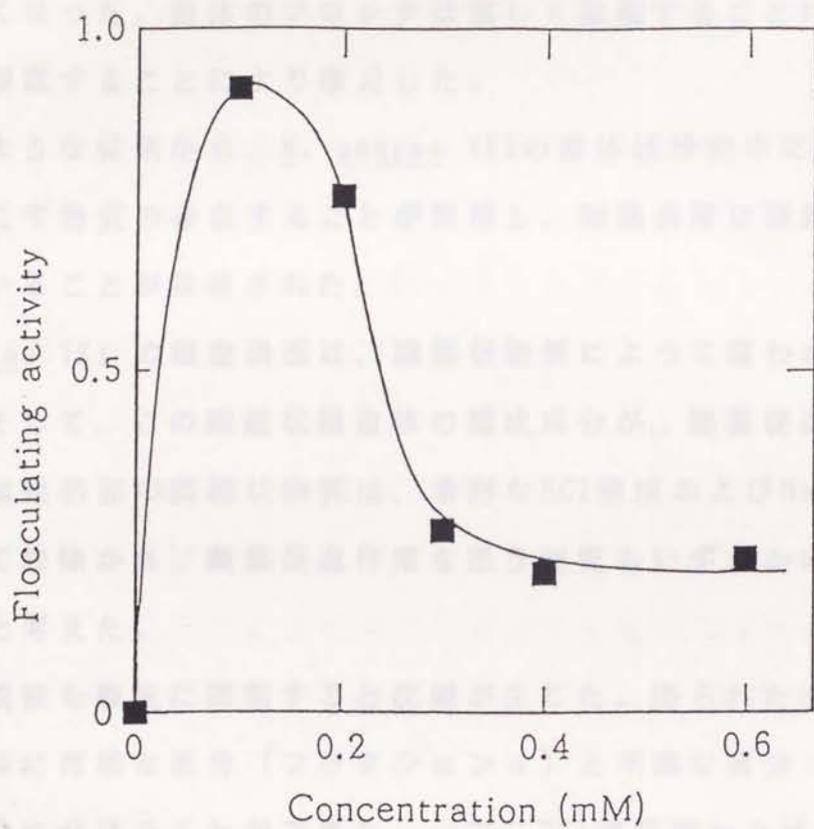


Figure 2-23

Effects of  $\text{Fe}^{3+}$  concentration on flocculating activity.

Different amounts of  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{FeCl}_3$ ) were added to 0.5 % kaolin suspensions containing 5.6 mg/l of fraction b.

#### 第4節 要約

*Nocardia amarae* YK1の菌体洗浄中の成分を添加した培地で、分散性細菌を培養するとフロック化した。フロック化は培養後比較的早い時期に起こり始め、その後もフロックは維持された。フロック化の後にはほとんど増殖は起こらなくなった。菌体のフロックは激しく振盪することにより一旦は分散したが、静置することにより復元した。

以上のような結果から、*N. amarae* YK1の菌体洗浄液中には、微生物の凝集を引起す物質の存在することが判明し、細胞表層に凝集能を持つ物質が含まれていることが示唆された。

*N. amarae* YK1の細胞表面は、繊維状物質によって覆われていることが判明した。そして、この繊維状構造体の構成成分が、凝集促進能をもつと予想された。細胞表面の繊維状物質は、希薄なHCl溶液およびNaOH溶液による洗浄によって取除かれ、凝集促進作用を担う物質もいずれかの溶液中に溶脱されたものと考えた。

NaOH溶脱液を酸性に調整すると沈殿が生じた。得られた沈殿物は、ブチルアルコールに可溶性画分（フラクションa）と不溶性画分（フラクションb）との2画分に分けることができた。一方、HCl溶脱液からは、塩基性条件下で沈殿物が生じたが、この沈殿物はこのような分画はできず、一つの画分とみなした（フラクションc）。フラクションbとフラクションcとを中性下で混合すると速やかに沈殿が生じた。この沈殿は細胞表面を取囲む繊維状構造体の再構成されたものであると考えられた。したがって、*N. amarae*の細胞表層構造は、主としてこれら二つの画分の相互作用によって形成されているものと考えられた。

HCl溶液およびNaOH溶液によって溶脱される細胞表層成分、フラクション

a, b, c はいずれもペプチドから構成されることがわかった。

フラクション a は分子量約4,000の酸性ペプチドであり、グリシンを25%含むという特徴を有していた。水溶液中では幾つかの大きさの異なった会合体を形成していた。

フラクション b は主として分子量約12,600の酸性ペプチドが構成単位になっていると予想された。水溶液中では4~6量体として溶解しているものと考えられた。

フラクション c は塩基性アミノ酸を比較的多く含む分子量約12,600の塩基性ペプチドであり、水溶液中でも単量体となっていると判断された。

相互作用を示すフラクション a および b とフラクション c が中性条件下で相反する荷電を持つことから、相互作用においては電気的な引力が重要な要因となっていることが予想された。

*N. amarae* YK1の細胞表層蛋白質の各フラクションのうち、フラクション a と b は酸性下で沈殿する際、カオリンを取込んで凝集させることができた。また、フラクション b と c との混合によって中性下で生じる沈殿によっても、同様に凝集をもたらすことが可能だった。*N. amarae*細胞間の連結は、このような複数の表層蛋白質の相互作用によって形成される三次元マトリクスに細胞が取込まれることによってもたらされると考えられた。

このほか、フラクション b は5,000mg/lの懸濁粒子を含む懸濁液に対して数~数十mg/lといった少量添加した場合には、中性下でも凝集をもたらすことが判明した。添加量を上げすぎると効果は失われた。また、塩強度の上昇や金属イオンの添加により、凝集作用は促進された。Na<sup>+</sup>(NaCl)は5mM以上の濃度で添加すれば効果があった。Ca<sup>2+</sup>(CaCl<sub>2</sub>)は2mM以上であれば効果が認められた。Al<sup>3+</sup>(Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>)は0.2mM添加すれば充分であった。Fe<sup>3+</sup>(FeCl<sub>3</sub>)の場合は0.1mMでも有効であるけれども、過剰に加えると逆に凝集を妨げるこ

とが判明した。そこで、本放線菌の洗浄液による微生物の増殖に伴う凝集は、洗浄液に含まれていたフラクシオンbによるものであると考えられた。

Brown and Lesterは世界各地の廃水処理プラントへの流入水中に検出される主な金属の種類と濃度についての報告をまとめており<sup>23)</sup>、それによればカルシウムが99-112mg/l(2.3-2.6mM)、アルミニウムが0.25-1.75mg/l(0.009-0.065mM)、鉄が0.457-2.95mg/l(0.008-0.05mM)の範囲内にあるとしている。したがって、フラクシオンbの凝集能が発揮され得るカチオン濃度範囲にあり、実際に活性汚泥のフロック化に関与することが予想された。

### 第 3 章 疎水性物質による *Nocardia amarae* YK1 の浮上と細胞表面 蛋白質の疎水性

#### 第 1 節 緒言

放線菌の異常増殖が原因の活性汚泥の浮上現象は、世界各地の廃水処理プラントにおいて発生の報告がなされている<sup>7,8,24-28</sup>)。本研究の対象とした *Nocardia amarae* YK1 は、国内の廃水処理施設で発生した浮上汚泥から単離された放線菌であつて<sup>7)</sup>、浮上汚泥の原因微生物のひとつと考えられている。*Nocardia* 属をはじめとする異常発泡物発生の原因とされる放線菌は、疎水性の細胞壁を持ち、疎水性物質に対して高い親和性を示すことが知られている<sup>7,8</sup>)。それゆえ、廃水中に含まれる疎水性物質の濃度が上昇すると、気液界面への放線菌の濃縮と装置の内壁への付着が起こりやすくなり、プラントにおける放線菌の滞留時間が増大することが予想されている。そして、ベンチスケールの活性汚泥処理装置を用いた実験では、疎水性物質の添加によって放線菌濃度が高まることが実証されている<sup>9)</sup>。しかし、このような機構によつてもたらされる放線菌のバイオマス増加は緩慢なものであり、突如として発生する放線菌障害を矛盾なく説明することはできない。そこで、著者は特定の基質によつて、放線菌の急速な増殖がもたらされるのではないかと考え、種々の炭素源の放線菌増殖に及ぼす影響を検討することとした。

また前章において、*N. amarae* の細胞表面には蛋白質から構成される網状の菌体外構造が存在することを論証した。細胞の疎水的な性質は、細胞壁よりもむしろ、その表層構造を構成する物質の性質が反映されたものであると考えられる。そこで本章においては、細胞表層構造体が疎水性物質に対して高い親和性を示すことを論証し、表層蛋白質の菌体浮上における重要性につ

いて考察する。

## 第2節 実験方法

### 1. 培養方法

本放線菌の培養には、炭素源1%、酵母エキス(Difco)0.4%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5%、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.6%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02%を含む培地を用いた。そして、30℃で振盪培養を行った。

水溶性炭素源としては、グルコースと酢酸ナトリウムとプロピオン酸ナトリウムを、疎水性の炭素源としては、n-ペンタデカン、大豆油、リノレン酸あるいはリノール酸を用いた。

### 2. 細胞表層構造体の再構成

前章において示したような方法で、細胞表層にある主要なペプチド、フラクシオンb及びcを調製した。各ペプチドを50mMリン酸緩衝液(pH6.8)に2.8mg/mlで溶解した後、等量ずつ混合して細胞表層構造体を再構成した。

再構成した構造体を含む緩衝液7mlに対して、大豆油1mlを加えて混和し、静置後構造体がどちらの層に集合するかを観察した。

## 第3節 実験結果と考察

### 1. 疎水性炭素源による培養

疎水性物質の供給によって、活性汚泥中の放線菌濃度の上昇がもたらされ、浮上汚泥の原因になるのではないかと考えられている。そこで、疎水性物質を炭素源として、*Nocardia amarae* YK1の培養を行うこととした。

通常の培養に使用している培地のうち、炭素源であるグルコースをペンタデカンに置き換えて *N. amarae* を振盪培養したところ、7日間経過しても増殖はほとんど認められなかった (Figure 3-1)。しかし、さらに培養を続けると、10日目ごろから Figure 3-2 のように、培養液表面にグラニュール化した菌体が現われはじめた。培養開始後14日目での菌体収量は、培養液100mlから100-150mgであった (Figure 3-1)。このように、*N. amarae* の炭化水素資化能は低く、増殖開始までには1週間以上を要することが判明した。

同じ培地で大豆油を炭素源として *N. amarae* を培養したところ、2-3日目で培養液表面に菌体フロックが形成された (Figure 3-3)。顕微鏡による観察では、細胞は水層中にはほとんど見出されず、培養液上層中にのみ多量に存在していた。このように中性脂質は急速に資化され、速やかに菌体の浮上をもたらす。培養開始後4日目の培養液100mlからは150-170mgの菌体を得られた (Figure 3-1)。一週間程度経過すると、600mg以上の菌体を得られ、中性脂質が非常に適した炭素源であることが明かとなった。培養3日目の菌体を光学顕微鏡によって観察すると、それらの細胞中には複数の光学的密度の高い顆粒が存在していた (Figure 3-4)。この顆粒はスダンブラック B によって染色されることから、PHB粒子であると判断された。PHB粒子はその後培養時間の経過とともに減少していった。これは中性脂質が消費され炭素源が、細胞内に蓄えられた PHB に転換されたためであろうと考えられた。

つぎに、脂肪酸による培養を試みた。ところが、リノレン酸、リノール酸といった脂肪酸を基質として、二週間から一箇月間培養しても菌体は回収されないことから、増殖はほとんど起こっていないと判断された。

中性脂質の資化能は非常に高いことから、*N. amarae* のリパーゼ活性及び  $\beta$  酸化酵素系の活性は高いと考えられる。それにもかかわらず、脂肪酸での増殖が起こらないのは、脂肪酸が細胞内に取込まれないからであると考えら

れた。ところが、脂肪酸と中性脂質を1%ずつ添加して培養したところ、一週間経過しても菌体の増殖はほとんど認められなかった。これは脂肪酸が中性脂質の代謝を阻害することを示しており、本菌株にとって脂肪酸は有害であると判断された。

グルコースを炭素源として振盪培養したときには、培養液100mlから3日目で7-10mg、10日目で250-260mgの菌体を得られた(Figure 3-1)。酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウムを炭素源とした場合にも、グルコースと同じような増殖プロファイルとなった(Figure 3-1)。最終的な菌体収量は、グルコースを用いた場合よりも若干減少しているが、これは有機酸の消費に伴ってナトリウムイオンが蓄積し、培地のpHを上昇させるためであると思われる。有機酸塩を添加して培養すると最終的なpHは9.0以上となった。また、このような水溶性炭素源を用いたときには、菌体は気液界面にはほとんど浮上せず、培養液中に分散するかグラニュールを形成して沈殿するかであった。

以上のような結果より、*N. amarae*に最も適した炭素源は中性脂質であり、中性脂質の供給によって活性汚泥中の*N. amarae*の占有率の増大と浮上が急速にもたらされることが予想された。

## 2. 細胞表層物質の疎水性

これまでのところで、疎水性の炭素源を用いると増殖した*N. amarae*は、油層ないし気液界面に濃縮されることを論述した。こうした現象は、細胞表面が疎水的で、疎水性物質に対する親和性が高いということを示している。前章において示したように、*N. amarae*の細胞表面には網目状の構造体があって、必ずしも細胞壁が露出しているわけではない。さらに、この構造体は主としてフラクシオンbとフラクシオンcとの二種類の蛋白質の相互作用によって形成されていることが示唆された。そこで、これら二種の蛋白質によ

って形成された沈殿物を細胞表層構造体の再構成されたものとみなし、疎水性物質に対する親和性を調べることにした。

50mMリン酸緩衝液(pH6.8)に2.8mg/mlの濃度でフラクションbとcを別々に溶解した後、両溶液を等量ずつ混合して表層構造体を再構成させた。両蛋白質の相互作用によって生じた沈殿を含むこの混合液7mlに大豆油1mlを加え、混和した後静置し、沈殿がどちらの層に移行するかを観察した。その結果、沈殿は速やかに中性脂質層に気泡を含むエマルジョンとなって濃縮された(Figure 3-5)。この状態は少なくとも一週間は維持され続けた。さらに、炭化水素や有機酸といった他の疎水性物質によっても同様な分配が起こった。このような結果は、細胞表層構造体の疎水性の高さを示すものであり、*N. amarae* 細胞の疎水性の決定に深く関与していることを示唆するものである。

なお、酸及びアルカリ溶液によって細胞表面構造体を取り去った細胞も、疎水性物質と水との二相系での分配では両相の境界ないし疎水相に濃縮されることから、従来から指摘されていたように細胞壁も疎水的な性質を持っていることが示された。

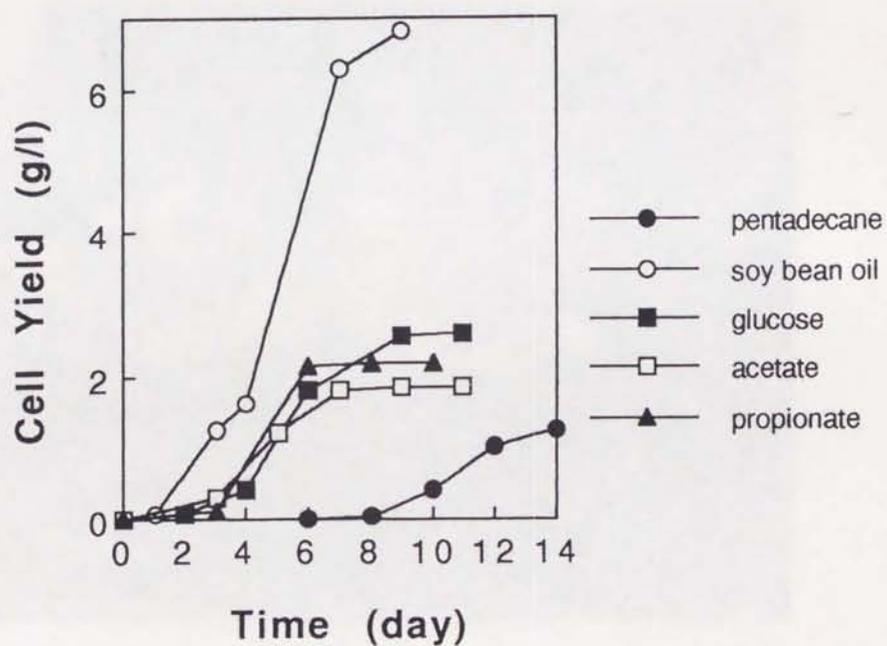


Figure 3-1

Cell proliferation of *N. amarae*.

*N. amarae* was cultivated using 100 ml of culture medium containing 1 % carbon source, 0.4 % yeast extract, 0.5 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.6 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.02 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Dry cell weights were measured at intervals of 1-3 days.



Figure 3-2

Floatation and granulation of *N. amarae* grown on n-pentadecane.

*N. amarae* was cultivated for 14 days using 100 ml of culture medium containing 1 % n-pentadecane, 0.4 % yeast extract, 0.5 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.6 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.02 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .



Figure 3-3

Floitation of cell flocs at the surface of culture broth.

N. amarae was cultivated for 3 days using 100 ml of culture medium containing 1 % soy bean oil, 0.4 % yeast extract, 0.5 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.6 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.02 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

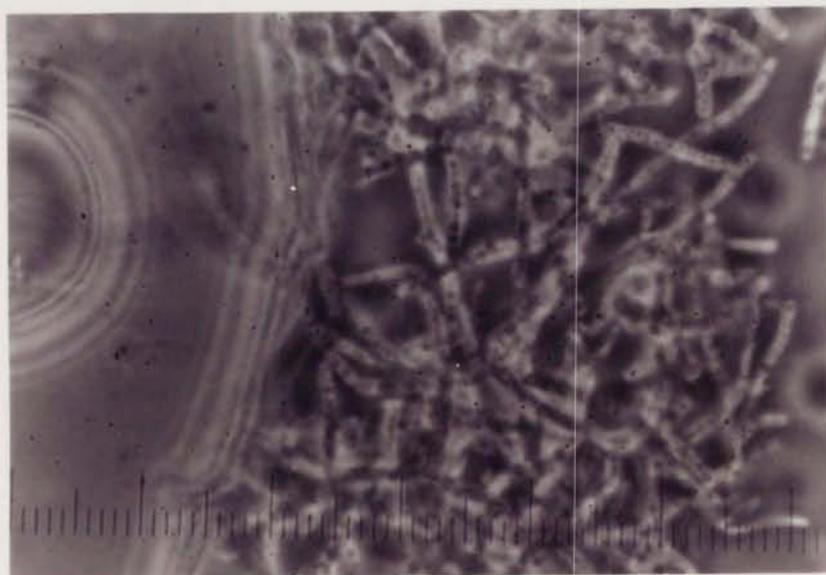


Figure 3-4

Phase contrast microscopic observation of N. amarae  
grown on soy bean oil.

N. amarae was cultivated for 3 days in the medium containing  
1% soy bean oil.

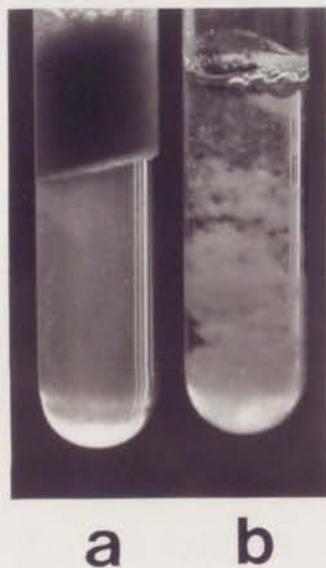


Figure 3-5

Hydrophobicity of the cell surface protein of *N. amarae*.

Seven ml of 50 mM phosphate buffer (pH6.8) with or without 2.8 mg/ml of the coagulum of fraction b and c were mixed with 1 ml of soy bean oil and settled for 5 min. Test tube a; with oil, test tube b; without oil.

#### 第4節 要約

N. amarae YK1は中性脂質を炭素源として添加したときに急速に増殖し、多量の菌体が回収された。培養開始後、数日で菌体はフロックを形成して培養液表面に浮上した。これは N. amarae が高い中性脂質資化能を有するとともに、疎水的な細胞表面構造を持つためであると予想された。第2章においてすでに論述したように、N. amarae 細胞表面は、蛋白質から構成される繊維状構造によって覆われており、この構造体が細胞表面の疎水性を決定づける重要な要因となっていると考えられた。

実際、再構成された細胞表層構造体は、疎水性物質に対して高い親和性を示し、疎水性物質による菌体の浮上に細胞表層蛋白質が重要な役割を担っていることが証明された。細胞壁の疎水性のみならず、そのさらに外側にある細胞表層蛋白質も疎水性物質に対する親和性を確保するために貢献していると考えられた。

中性脂質を代謝することによって増殖した菌体は、細胞内に多量のPHBを蓄積していた。したがって、中性脂質の消費後にもPHBの代謝によって増殖が継続する可能性のあることが示された。

以上のような実験結果から、廃水処理プラントで発生する放線菌由来の浮上汚泥の発生原因として中性脂質を注目すべきであるという結論に至った。

## 第4章 Rhodococcus erythropolis S-1の産生する菌体外蛋白質の凝集促進作用

### 第1節 緒言

活性汚泥中には自己凝集する性質を持った細菌が存在し、それらの細菌の凝集に関与する細胞外高分子物質に関する研究がなされている。最初に注目された凝集性細菌は Zoogloea ramigera である。この細菌は菌体外に粘質性の多糖を分泌してフロック化する<sup>29)</sup>。この細菌以外にも、自ら凝集する性質を有する凝集性細菌が単離され、その凝集機構が検討されている。その中には、デキストラン<sup>30)</sup>、セルロース<sup>31, 32)</sup>、ムコ多糖<sup>33)</sup>といった細胞外多糖によって菌体の包括ないし連結がもたらされるもののほか、細胞表面の蛋白質が重要な働きを担っている例もある。

Flavobacterium sp., Kluyvera cryoceroscensは、いずれもカルシウムの添加によりフロック化した<sup>34, 35)</sup>。そして、蛋白質分解酵素による処理の後には凝集は起こらなくなり、細胞表面の蛋白質が細胞間の連結には不可欠であると考えられた。また、同じく活性汚泥から単離された Pseudomonas sp. は、DNAの添加によりフロック化し、蛋白質分解酵素によりフロック化能を失った<sup>36-38)</sup>。このように、個々の微生物の凝集機構に蛋白質が関与することは明確に示されているのである。にもかかわらず、それらの混合培養系である活性汚泥における蛋白質の重要性はほとんど注目されていなかった。

Rhodococcus erythropolis S-1はフタル酸エステル資化性菌として土壌から単離された放線菌である<sup>10, 39)</sup>。活性汚泥法によるフタル酸エステル分解実験の際、本菌株を植菌しておいた活性汚泥が高いフタル酸分解効率とともに良好な沈降性を維持したのに対し、植菌しなかった汚泥ではデフロック化が起こったことより、本菌株がなんらかの凝集促進物質を生産しているので

はないかと推察された<sup>10)</sup>。その後の研究の結果、本菌株の培養液は、多価カチオンの共存下で微生物菌体を含む様々な懸濁粒子の凝集を引き起こすことが判明した<sup>11)</sup>。しかし、培養液中に含まれるいかなる成分が凝集促進能を担っているのかは不明であった。そこで本章では、培養液から凝集促進作用をもつ物質を回収する方法と、その物質の組成や凝集促進作用に及ぼす諸因子の影響について検討した結果について報告し、本菌株の分泌する菌体外蛋白質が、*N. amarae* YK1の表在性蛋白質と同様に、懸濁粒子の凝集をもたらすことを論証する。

## 第2節 実験方法

### 1. 培地および培養法

*Rhodococcus erythropolis* S-1の培養には、グルコース1%、酵母エキス(Difco)0.05%、尿素0.05%、 $K_2HPO_4$  0.5%、 $KH_2PO_4$  0.2%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%を含む液体培地を用いた。培養液100mlを500ml容三角フラスコに入れ、4-5日振盪培養を行った。

菌株の保存にはグルコース1%、ペプトン(Difco)0.5%、肉エキス(Difco)1%、NaCl0.3%、寒天2%を含む保存用固体培地を用い、30℃で4-5日培養した後、4℃で保存した。

### 2. 培養液の分画法

*R. erythropolis* を培養後、遠心分離(10,000×G、15分)によって菌体を取除いた。得られた培養液100mlに対し、硫酸アンモニウム40gと水飽和n-ブチルアルコール100mlを加え粘稠なエマルジョンとなるまで混和した。その後、遠心分離(10,000×G、15分)を行い有機溶媒層と水層に分離させた。

両層はそれぞれ保存し、両層の境界面に出現した固形物を回収し20mlの蒸留水に懸濁した。この懸濁液に、8gの硫酸アンモニウムと20mlの水飽和ブチルアルコールを加え混和した。遠心分離の後、再び固形物を回収し同様な操作を繰り返した。このようにして培養液は沈殿画分、ブチルアルコール可溶（脂溶性）画分(116ml)、水溶性画分(116ml)に分けられた。固形物画分は蒸留水に懸濁後、透析した。ブチルアルコール可溶画分は乾固後、蒸留水に懸濁し透析した。水溶性画分はそのまま透析した。

### 3. 凝集能の判定法

懸濁粒子としてはカオリン（和光）を用いた。5g/lの濃度でカオリンを蒸留水に懸濁し、この懸濁液5mlに上記のような方法によって得た各画分を添加した。さらに、0.1%の硫酸アルミニウム溶液0.2mlを加え、混和して静置した。試料を加えていない懸濁液を対照とし、これよりも液相の濁りが少なかったときに凝集作用があったものと判断した。

### 4. 凝集活性の定量法

第2章第2節において示した方法と同様である。

### 5. 酵素処理

フロキュラント標品3mgを60 $\mu$ gのプロナーゼE (Sigma, Type XXV)を含む0.041Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)および、60 $\mu$ gのペプシンを含む0.01N HCl溶液、それぞれ10mlに懸濁した。30 $^{\circ}$ Cで18時間加温した後、透析した。

### 6. ゲル濾過クロマトグラフィー

フロキュラント標品4mgを0.3mlの50%ピリジン溶液に溶解した。この溶液

を試料液として、トヨパール HW-75Fによるゲル濾過を行った。移動相は蒸留水、ジオキサン、ピリジン (20 : 10 : 1) の混合液とし、フロキュラントの検出は280nmの吸光度を測定することによって行った。使用したカラムのサイズは内径1cm、長さ45cmである。

#### 7. 濾紙電気泳動

濾紙 (アドバンテック No.6) を長さ10.0cm、幅2.0cmに成形した。これに、0.2M Tris-HCl緩衝液 (pH8.4) とピリジンの混合液 (9 : 1) で溶解したフロキュラント標品をスポットし、同混合液を電解質として500Vの定電圧下で電気泳動を行った。泳動後、濾紙を0.5%のCBB G-250を含む10%の酢酸溶液に浸漬し染色した。その後、5%酢酸溶液で脱色した。

#### 8. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGEはLaemmli<sup>22)</sup>の方法に準じて行った。フロキュラント標品約1mgを650 $\mu$ lの蒸留水に懸濁した。この懸濁液に10%のSDS溶液を100 $\mu$ l、2-メルカプトエタノールを10 $\mu$ l、0.5M Tris-HCl緩衝液 (pH6.8) を20 $\mu$ lを加え、密栓を施して100 $^{\circ}$ Cで2-3分加熱した。その後、0.1%のブロムフェノールブルーを含む40%グリセリン溶液0.8mlを加え、これを泳動用の試料溶液とした。25mAの定電流下で、5-20%の濃度勾配を施したポリアクリルアミドゲルを支持体として泳動を行った。分子量マーカーとしてはMW-markers (SDS) (オリエンタル酵母) を用いた。

泳動後、ゲルを0.25%のCBB R-250を含む染色液 (酢酸 : エチルアルコール : 蒸留水 = 1 : 4 : 5) に18-24時間浸漬し、染色した。つぎに、脱色液 (酢酸 : メチルアルコール : 蒸留水 = 7 : 25 : 68) に浸漬し過剰な色素を除いた。

## 9. その他の分析方法

脂肪酸の分析はつぎのような方法によって行った。フロキュラント標品10 mgを1mlの1N NaOHに溶解ないし懸濁し、窒素置換を行い密栓を施した。100℃で1時間加熱した後、HClを加えpHを2-3に調整した。その後、石油エーテル1mlを加え混和し、静置した。エーテル層を回収し、ガスクロマトグラフイーによって脂肪酸の分析、定量を行った。使用したガスクロマトグラフ装置は島津GC-15Aであり、移動相はヘリウムガス、カラムにはGLサイエンス製 Fused Silica Capillary Column FFAP Bonded (25m)を用い、検出はFIDによって行った。

赤外吸収スペクトルは日本分光A-302型赤外分光光度計を用いて、KBr錠剤法によって分析した。

アミノ酸組成の分析には日立835型自動アミノ酸分析装置を使用した。フロキュラント標品を5.7N HClに溶解ないし懸濁し、脱気後封管した。110℃で24時間加熱することによって完全加水分解を行った。加水分解後、減圧下で乾固し乾固物を少量の蒸留水に溶解させて分析に供した。

## 第3節 実験結果と考察

### 1. フロキュラント画分の培養液中での存在状態

*R. erythropolis* の培養液を孔径の異なったフィルターによって濾過し、培養液0.2ml由来の濾液の凝集能を前章に示した方法により1.2mMの $Al^{3+}$ の存在下で定量した。培養液を平均孔径が $5\mu m$ の濾紙(アドバンテック No.2)によって濾過した場合には、凝集作用は濾過前の培養液とほとんど変らなかつた(Figure 4-1)。しかしながら、平均孔径 $0.8\mu m$ のメンブランフィルター(MF type, Millipore)によって濾過すると凝集活性は培養液が保持してい

た活性の約半分に低下した(Figure 4-1)。また、平均孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブ  
ランフィルター(MF type, Millipore)による濾過では当初の活性の約 $1/3$ に  
低下した(Figure 4-1)。さらに、平均孔径 $0.22\mu\text{m}$ のメンブランフィルター  
(MF type, Millipore)の濾液はもはやほとんど活性を保持していなかった  
(Figure 4-1)。

以上のような結果から、凝集促進作用を持つ物質は培養液中で直径 $0.22-5$   
 $\mu\text{m}$ の微粒子として存在していることが示された。

## 2. 培養液からの凝集促進能を有する画分の回収

培養液に対して数倍量のアセトンないしエチルアルコールを加えても沈殿  
は生じず、多糖類や核酸はほとんど分泌されていないことが示唆された。ま  
た、培養液のpHを変化させても特定の領域で沈殿の生成することはなかった。  
ところが、数十%の濃度になるよう硫酸アンモニウムを加えると沈殿が生じ  
た。

沈殿と上澄液とを遠心分離によって分け、上澄液はそのまま透析し、沈殿  
は一旦蒸留水に懸濁した後透析した。両透析液の凝集能を調べたところ、沈  
殿画分のみ活性が認められた。沈殿には赤色ないし黄色の着色物質が混入  
していた。この物質はブチルアルコールに溶解することが判明したので、実  
験方法に記述したようにブチルアルコール存在下で塩析を行い、ブチルアル  
コール中にこの脂溶性成分を抽出して分離することとした。その方法によっ  
て培養液は3画分(水溶性画分、脂溶性画分、沈殿画分)に分画された。そ  
れぞれの画分を蒸留水に対して透析し、凝集試験を行ったところ各画分のう  
ち、凝集能を示したのは沈殿画分のみであった。そこで、この沈殿画分をフ  
ロキュラント標品として分析を進めることとした。

### 3. フロキュラント標品の組成

回収したフロキュラント標品をさらにアセトンによって充分洗浄し、混入している脂溶性物質を取除いた。これを試料として元素組成を検討した結果、炭素、水素、窒素の含有量はそれぞれ、50.3%, 7.6%, 11.0%であることが判明した。赤外吸収スペクトルでは $1500-1700\text{cm}^{-1}$ にかけての領域でアミド基によると考えられる二つの強い吸収帯が観察された(Figere 4-2)。これらの結果からフロキュラント標品は、窒素を含みアミド基を持つ物質であると判断された。したがって、仮に糖を主成分とする物質であればアミノ糖が構成要素となっているはずである。しかし、フェノール-硫酸法による糖の定量を行ったところ、その含量は全体の1%に満たなかった。そこで、蛋白質である可能性が示唆された。フロキュラント標品を蛋白質分解酵素によって処理すると凝集活性は処理前の試料に比べ1/10以下に低下した。なお、フロキュラント標品の加水分解物の脂肪酸(炭素数10以上の脂肪酸)の含量は0.1%以下であった。以上のような結果から、フロキュラント標品の主成分であり凝集能の発現に不可欠な成分は蛋白質であることが結論された。フロキュラント標品のアミノ酸組成をTable 4-1に示した。

### 4. ゲル濾過による分析

前述したようにフロキュラント標品は水中で微粒子となっており、完全には溶解していない。さらに、フロキュラント標品を一旦乾燥させるともはや容易には再懸濁することができなかつた。そこで、乾燥させた標品でも溶解し、透明な溶液をもたらす溶液を検索した。その結果、ピリジンと水ないしピリジン、ジオキサン、水の混合液には容易に溶解し、溶液も透明になることが判明した。そこで、このような両親媒性溶媒と水との混合液を移動相としてゲル濾過を行い、標品をさらに精製しようと試みた。充填剤にはこのよ

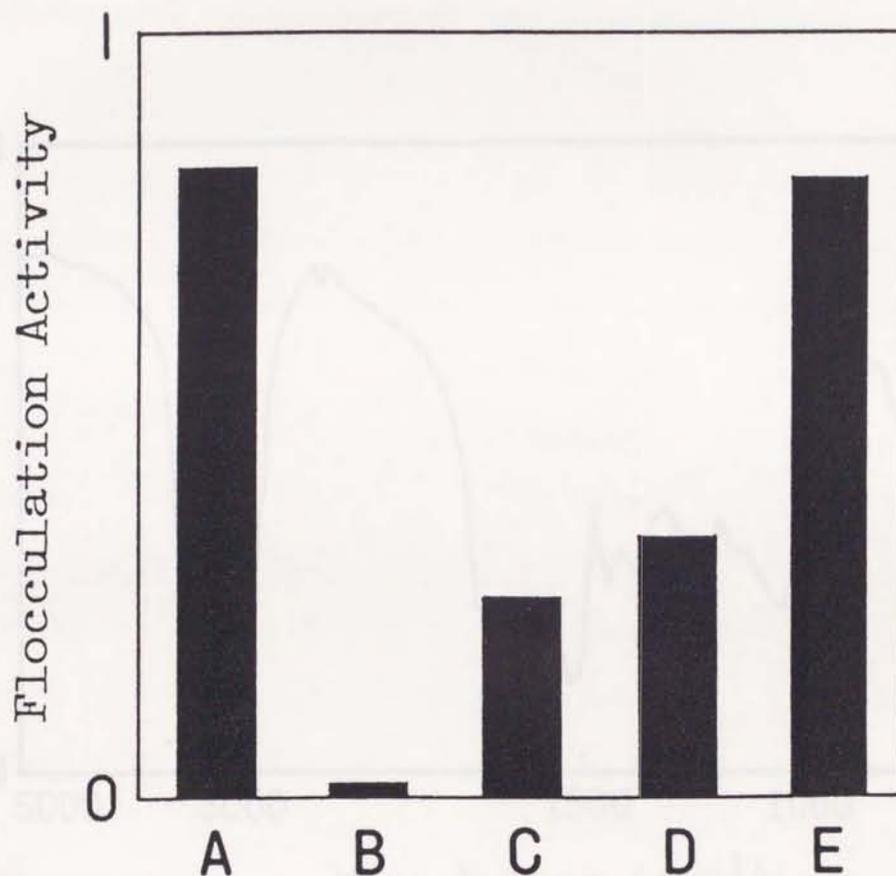


Figure 4-1

Flocculating activity of culture broth and its filtrates.

The dialysates derived from 15  $\mu$ l of culture broth (A) and its filtrates (B-E) were added to 1 ml of 0.5 % kaolin suspensions and flocculating activities were measured. The mean pore sizes of filters were 0.22 (B), 0.45 (C), 0.8 (D) and 5  $\mu$ m (E).

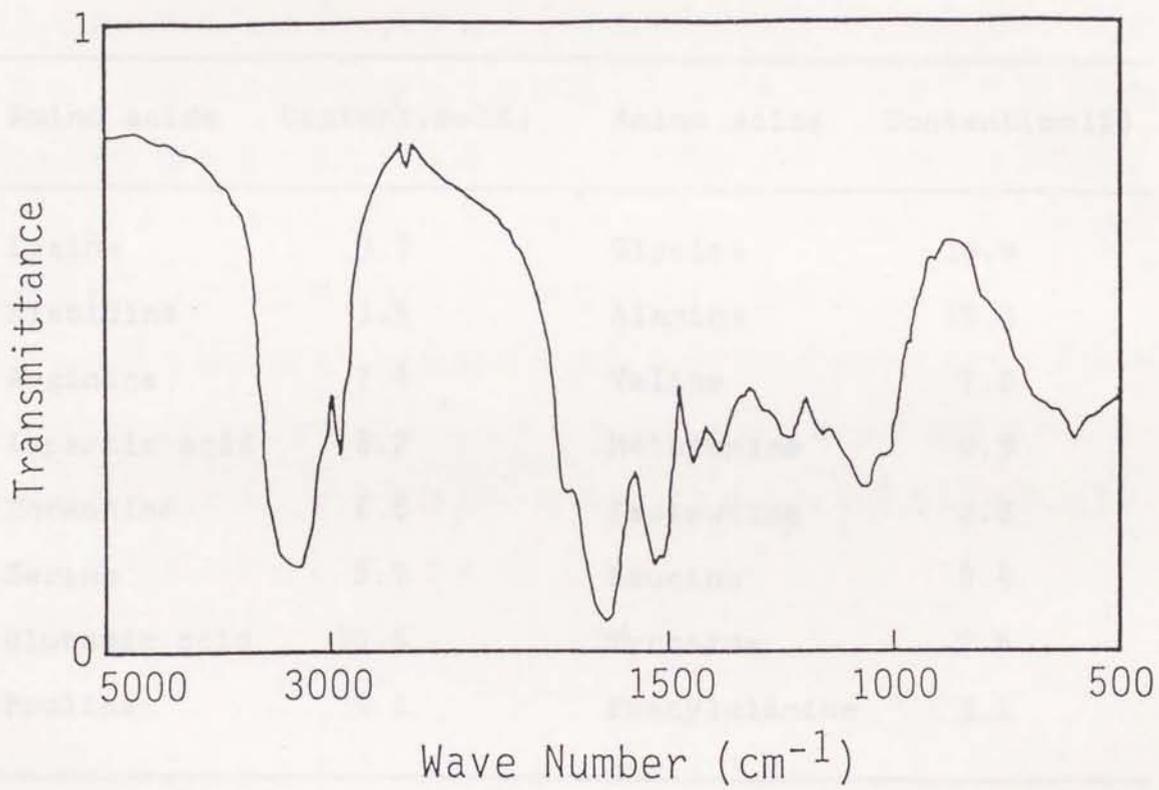


Figure 4-2

Infrared spectrum of the flocculant preparation.

The dryness of the flocculant preparation was milled and prepared to KBr tablet.

Table 4-1

## Amino acid composition of the flocculant preparation.

Amino acids	Content(mol%)	Amino acids	Content(mol%)
Lysine	3.2	Glycine	10.4
Histidine	1.6	Alanine	15.3
Arginine	7.4	Valine	7.0
Aspartic acid	8.2	Methionine	0.9
Threonine	6.8	Isoleucine	2.8
Serine	6.7	Leucine	8.4
Glutamic acid	10.6	Tyrosine	2.5
Proline	5.1	Phenylalanine	3.1

うな溶媒に耐えるよう、ポリビニルを基材とするトヨパールHW系を使用した。

トヨパールHW-75Fを使用した場合、Figure 4-3のような分離パターンとなった。最初の小さなピークはボイドの位置であり、溶け残った試料が溶出したものであると推察される。残る二つのピークをそれぞれ回収し、透析の後凝集能を調べた。その結果、30mlのピークに活性が認められ、38mlのピークには活性が認められなかった。38mlのピークに相当する溶出液には強いピリジン臭があったことより、試料液に含まれていたピリジンによるピークと予想された。同じカラムで蒸留水を移動相としてブルーデキストラン（平均分子量 $2 \times 10^6$ ）を分画すると、矢印で示した位置がピークであった。また、トヨパールHW-65F（排除限界分子量 $1 \times 10^6$ 、デキストラン換算）を充填剤とした場合には、凝集活性を有するピークはボイドの位置に現れた。

以上のような結果から、両親媒性溶媒と水との混合液中でもフロキュラント標品は $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^6$ （デキストラン換算）という高分子量状態にあることがわかった。また、ピークは単一だったことからゲル濾過によるより以上の精製は不可能であると考えられた。

## 5. 電気泳動

フロキュラント標品をピリジンと水の混合液に易溶であることを利用して、ピリジンとTris-HCl緩衝液の混合液を電解質とする濾紙電気泳動を行った。泳動後、CBBによって蛋白質を検出すると、Figure 4-4のようにバンドは一つであった。したがって、ピリジンと水の混合液に高分子量状態で溶解している本標品は、荷電的にもあまりばらつきがなく、電気泳動によるさらなる精製も困難であると判断された。

つぎに、フロキュラント標品をSDS-PAGEによって分析した。標品はゲル濾過、濾紙電気泳動では均一であったものの、SDS-PAGEでは分子量約 $1 \times 10^5$ 以

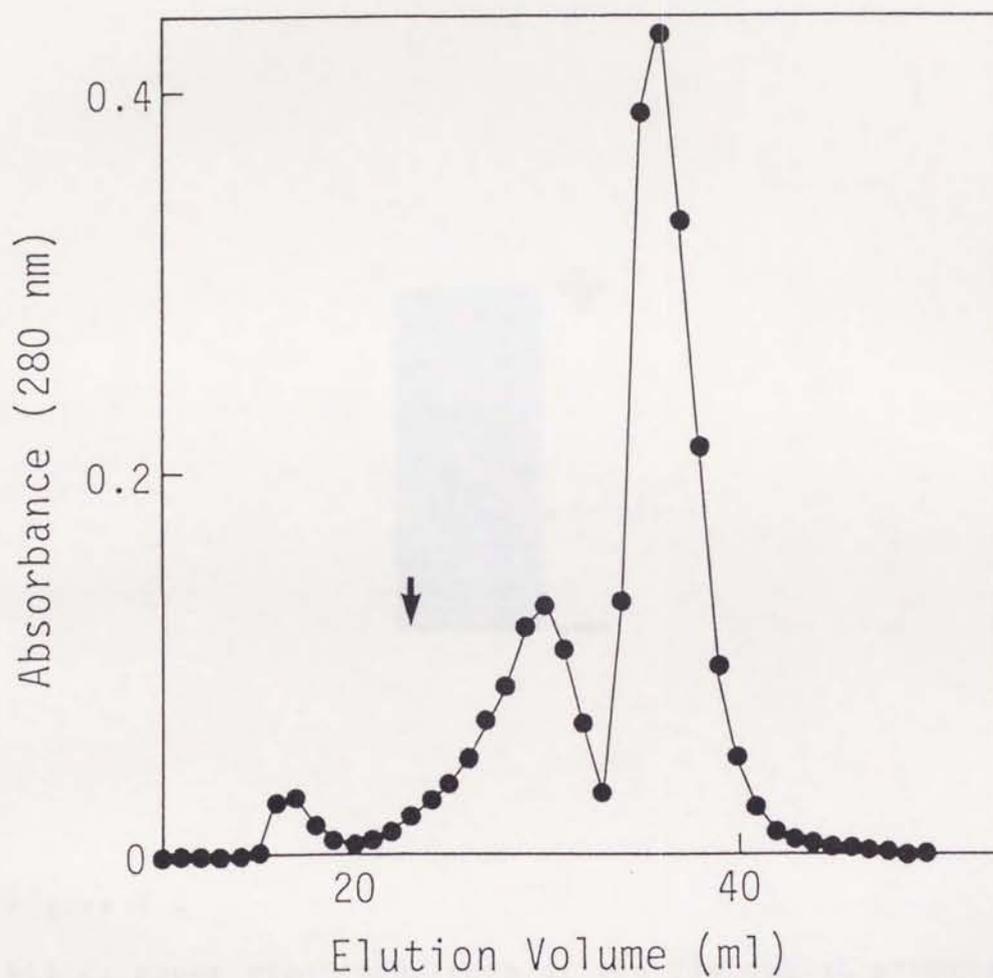


Figure 4-3

Gel filtration chromatography of the flocculant preparation. The flocculant preparation was applied on the column packed with TOYO PEARL HW-75F. The mobile phase was a mixture of pyridine, water and dioxane (1:10:20). Proteins were detected by monitoring the absorbance at 280 nm.

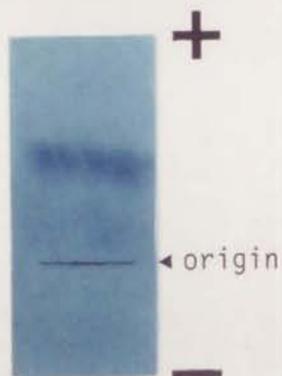


Figure 4-4

Filter paper electrophoresis of the flocculant preparation. The flocculant preparation was spotted on the filter paper (TOYO No. 6) soaked with a mixture of Tris-HCl buffer (pH 8.4) and pyridine (9:1) and electrophoresed at a constant voltage of 500 V. After the electrophoresis, the filter paper was stained with Coomassie Brilliant Blue G-250.



Figure 4-5

SDS-PAGE of the flocculant preparation.

The flocculant preparation was incubated at 100 °C for 2 min in the presence of 1 % 2-mercaptoethanol and 1 % SDS. The denatured flocculant preparation was electrophoresed with 5-20 % polyacrylamide gel at the constant current of 15 mA. Lane a; molecular size markers, MW 74,400 (1), MW 49,600 (2), MW 37,200 (3), MW 24,800 (4) and MW 12,400 (5). Lane b; the flocculant preparation.

下の範囲に多くのバンドが検出された (Figure 4-5)。このような結果から、*R. erythropolis* により産生されるフロキュラントは、分子量約 $1 \times 10^5$ 以下の雑多なペプチドから構成されており、その構成ペプチドが集合して、水中で微粒子を形成していると推察された。

#### 6. フロキュラント標品の添加濃度と凝集活性との関係

これまでのところでは、培養液からのフロキュラント標品の回収と得られた標品の組成について論述した。つぎに、フロキュラント標品の凝集作用に及ぼす諸因子の影響について検討した結果を報告する。

まず、フロキュラント標品の濃度の影響について検討した。カオリンの濃度を5g/lとし、 $Al^{3+}$  (硫酸塩) の濃度を1.2mMとして、添加するフロキュラント標品の濃度を変化させて凝集活性を測定した。

親水性ポリマーによる懸濁粒子の凝集においては、凝集のためのポリマー添加量にはある適正值があり、それ以上に添加すると粒子を核とする親水性保護コロイドを形成して逆に分散を促してしまうことが知られている。本フロキュラント標品についても同様な傾向が認められ、良好な凝集は標品の濃度が5-25mg/lの範囲にあるときであって、それ以上の濃度では凝集の度合いは低下した (Figure 4-6)。添加する $Al^{3+}$ 濃度を0.6mMにすると凝集のもたられる範囲は、5-10mg/lとなった。すなわち、フロキュラント標品の添加量が増加すると、それに対応してさらに多くのカチオンを添加することが必要であると判明した。

#### 7. カチオンの添加効果

つぎに、環境中に一般的に存在する種々のカチオンの凝集作用に対する添加効果を検討した。

懸濁粒子として5g/lのカオリンを含む懸濁液に5.6mg/mlの濃度でフロキュラント標品を加えた。これにカチオンを様々な濃度で添加して凝集試験を行った。一価のカチオンとしては $\text{Na}^+$ を添加した。 $\text{Na}^+(\text{NaCl})$ を添加した場合、8mM加えても十分な添加効果は認められなかった (Figure 4-7)。二価カチオンとしては $\text{Ca}^{2+}$ を選択した。 $\text{Ca}^{2+}(\text{CaCl}_2)$ を添加すると、2.0mM以上の濃度においてフロキュラント標品の作用を促進する効果が認められた (Figure 4-8)。三価のカチオンとしては $\text{Al}^{3+}$ と $\text{Fe}^{3+}$ を使用した。 $\text{Al}^{3+}(\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3)$ の場合には、 $\text{Ca}^{2+}$ よりも低い濃度でも添加効果が認められ、0.6mM添加すれば充分有効であった (Figure 4-9)。さらに、 $\text{Fe}^{3+}(\text{FeCl}_3)$ は0.3mMでも十分な添加効果があった。しかしながら、それ以上に添加するとかえって凝集を妨げるようになった (Figure 4-10)。

フロキュラント標品は濾紙電気泳動において陽極側に移動したことより酸性物質と予想される。したがって、カチオンの添加によってフロキュラント微粒子の電氣的な反発力が減少して、フロキュラント微粒子間の結合やフロキュラント微粒子と懸濁粒子との結合が起こり、凝集体が形成され懸濁粒子の沈殿がもたらされると考えられる。

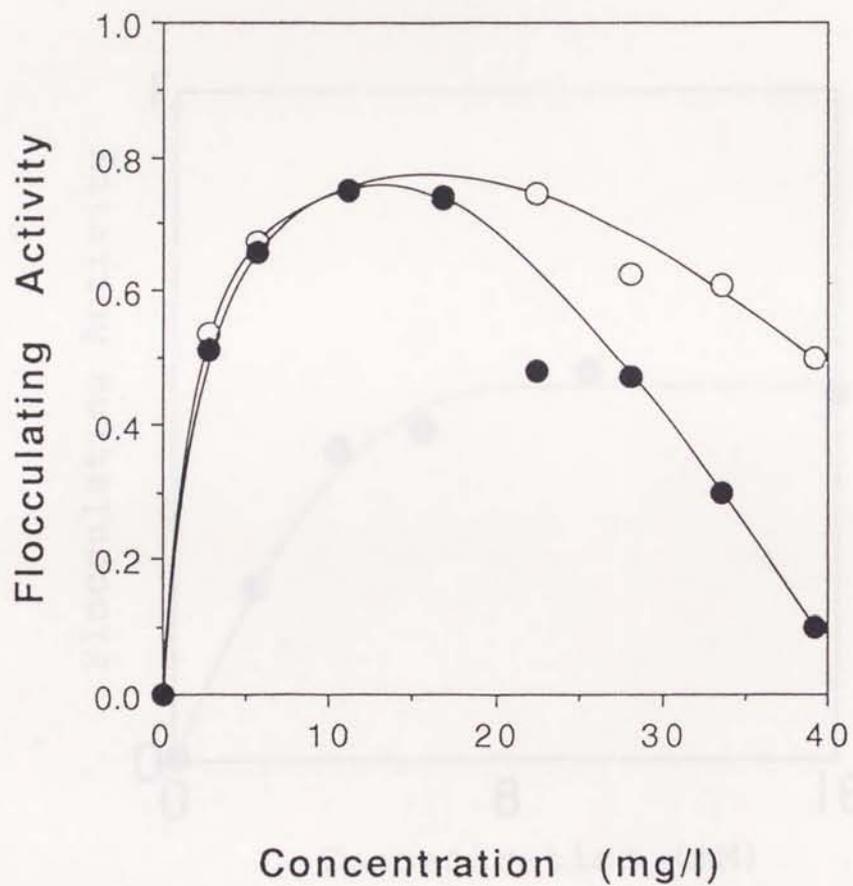


Figure 4-6

Effects of the flocculant concentration on flocculating activity.

Different amounts of the flocculant preparation were added to 0.5 % kaolin suspensions containing 0.6 (●) or 1.2 (○) mM Al<sup>3+</sup>.

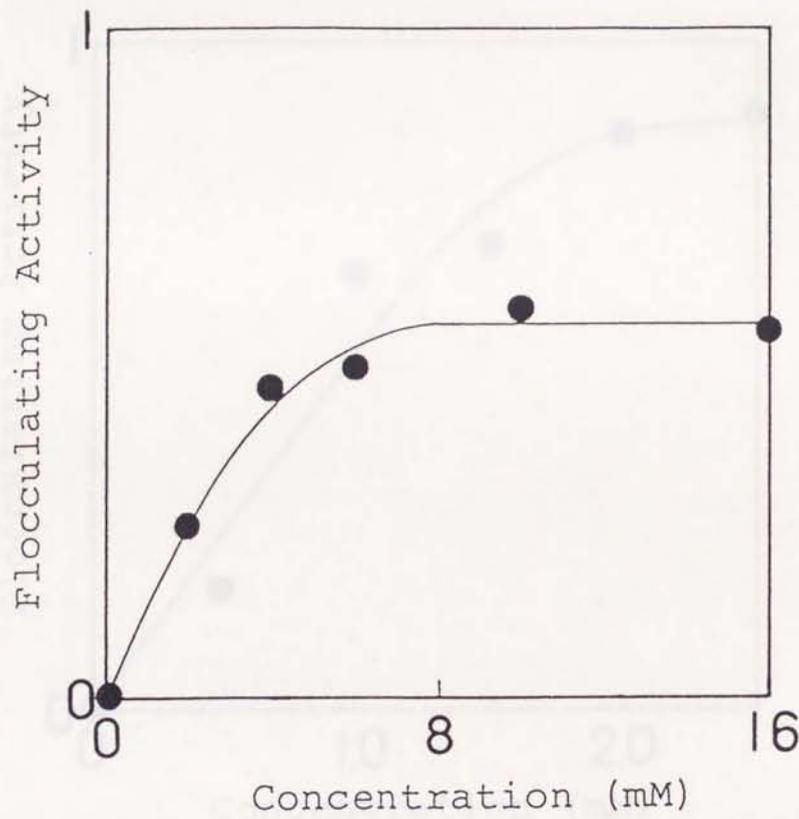


Figure 4-7

Effects of  $\text{Na}^+$  concentration on flocculating activity.

Different amounts of  $\text{Na}^+$  ( $\text{NaCl}$ ) were added to 0.5 % kaolin suspensions containing 5.6 mg/l of the flocculant preparation.

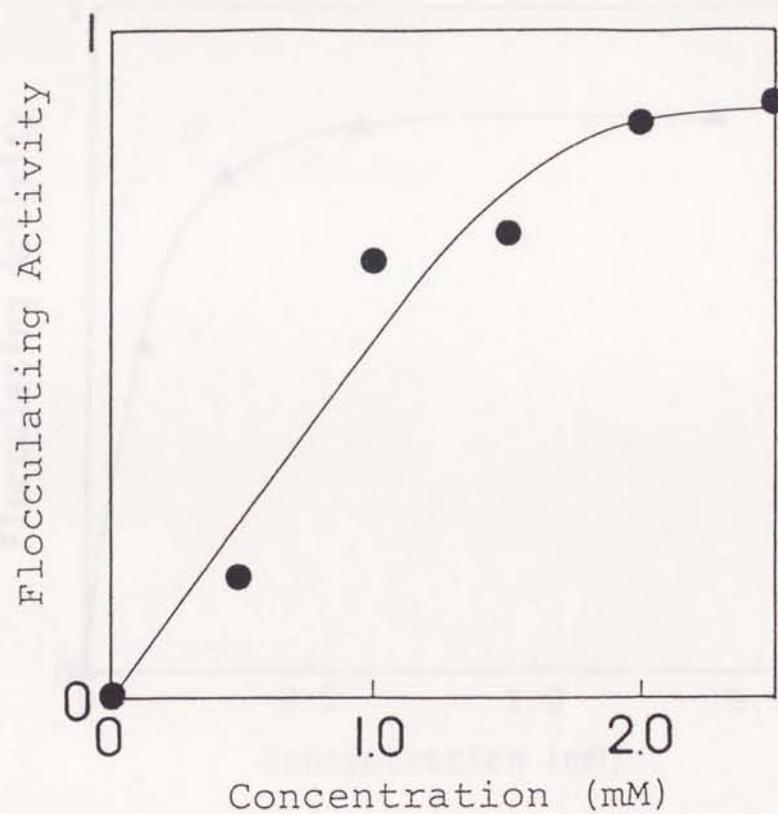


Figure 4-8

Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on flocculating activity.

Different amounts of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) were added to 0.5 % kaolin suspensions containing 5.6 mg/l of the flocculant preparation.

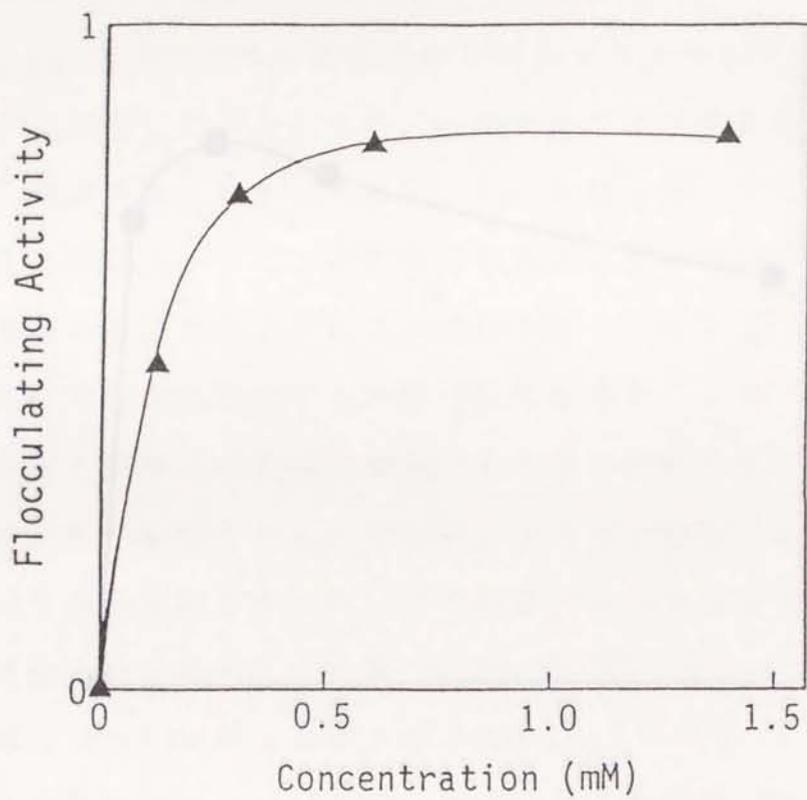


Figure 4-9

Effects of  $Al^{3+}$  concentration on flocculating activity.

Different amounts of  $Al^{3+}$  ( $Al_2(SO_4)_3$ ) were added to 0.5 % kaolin suspensions containing 5.6 mg/l of the flocculant preparation.

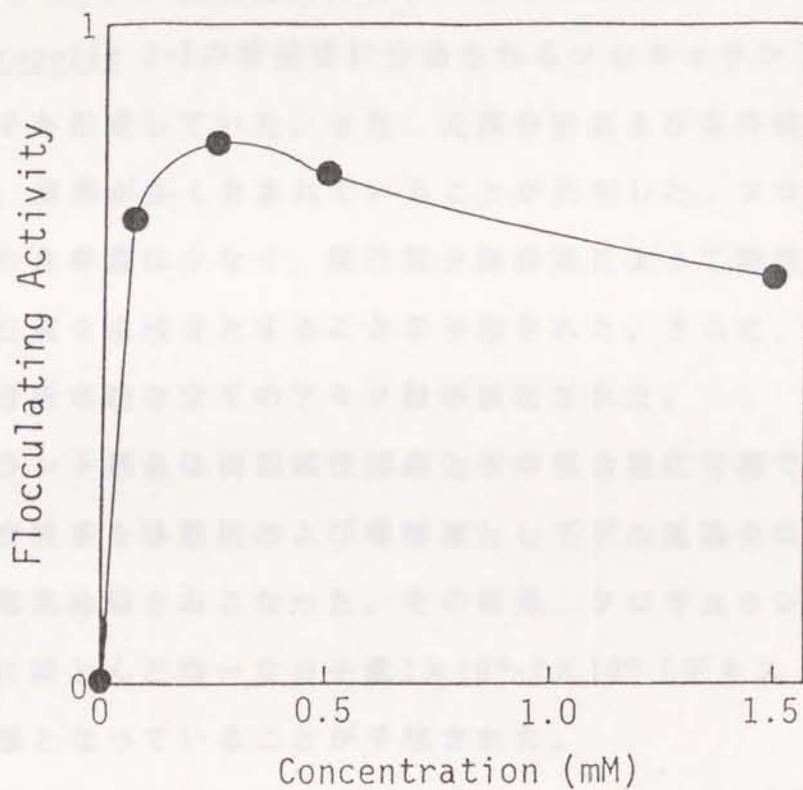


Figure 4-10

Effects of  $\text{Fe}^{3+}$  concentration on flocculating activity.

Different amounts of  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{FeCl}_3$ ) were added to 0.5 % kaolin suspensions containing 5.6 mg/l of the flocculant preparation.

#### 第4節 要約

*Rhodococcus erythropolis* S-1の培養液に硫酸アンモニウムとn-ブチルアルコールを加えることによつて、それを脂溶性画分、水溶性画分、沈殿画分の3画分に分けた。凝集促進作用は沈殿画分のみ認められたので、この画分をフロキュラント標品として分析することとした。

*R. erythropolis* S-1の培養液に分泌されるフロキュラントは、直径0.22-5 $\mu$ mの微粒子を形成していた。また、元素分析および赤外吸収スペクトルの分析の結果、窒素が多く含まれていることが判明した。フロキュラントの脂質および糖の含有量は少なく、蛋白質分解酵素によつて凝集活性が失われたことより蛋白質を主成分とすることが予想された。さらに、標品の加水分解物中からは分析可能な全てのアミノ酸が検出された。

フロキュラント標品は両親媒性溶媒と水の混合液に可溶であることが判明し、その混合液系を移動相および電解液としてゲル濾過クロマトグラフィーおよび濾紙電気泳動をおこなった。その結果、フロキュラント標品は混合液中で荷電的にほとんど均一な分子量 $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^6$  (デキストラン換算) の高分子の状態となっていることが予想された。

SDS-PAGEでは分子量約 $1 \times 10^5$ 以下の多くのバンドが検出された。以上のよ  
うな結果から、本フロキュラントは多くの異なったペプチドが会合しあつて微粒子を形成しているという結論に至った。

フロキュラント標品の添加濃度の凝集活性に及ぼす影響を調べたところ、添加濃度には適正值があつて、過剰の添加はかえつて凝集を阻害することが示された。このほかフロキュラント標品の濃度を5.6mg/lに保ち、種々のカチオンの添加効果について検討した。Na<sup>+</sup>(NaCl)はほとんど添加効果が認められなかった。Ca<sup>2+</sup>(CaCl<sub>2</sub>)は2.0mM以上、Al<sup>3+</sup>(Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>)は0.6mM以上の濃

度でそれぞれ添加すると効果があった。 $\text{Fe}^{3+}$ ( $\text{FeCl}_3$ )は0.3mM前後が最も有効であり、それ以上に加えると効果は低下した。

廃水処理プラントの流入水中に検出される主な金属の濃度は、カルシウムが99-112mg/l(2.3-2.6mM)、アルミニウムが0.25-1.75mg/l(0.009-0.065mM)、鉄が0.457-2.95mg/l(0.008-0.05mM)の範囲内にあるとされている<sup>23)</sup>。したがって、*Rhodococcus erythropolis* S-1の産生するフロキュラントの機能が発揮され得るカチオン濃度範囲にあり、*N. amarae* YK1の表在性蛋白質(フラクシオンb)と同様に、実際に活性汚泥のフロック化に関与することが予想された。

鉄イオンや蛋白質自体の過剰添加によって凝集作用が妨げられるという傾向は、フラクシオンbと同じであった。また、どちらのフロキュラントも添加量が数~数十mg/lの範囲でのみ凝集促進能を発揮するという点も類似していた。しかし、フラクシオンbによる凝集が塩強度や一価カチオン濃度の上昇によってもたらされるのに対して、*R. erythropolis*のフロキュラントにはそのような効果が認められないという点においては異なっていた。

## 第5章 疎水性物質による *Rhodococcus erythropolis* S-1の浮上と 細胞表面への蛋白質の蓄積

### 第1節 緒言

第3章においては、*N. amarae* が中性脂質を炭素源とした場合、気液界面に浮上して急速に増殖することと、細胞表面に存在する蛋白質が疎水性物質に対する細胞の親和性を確保する上で重要であることを論証した。

そこで、*R. erythropolis* S-1についても疎水性基質による培養を試みることにした。また、第4章において論証したように、*R. erythropolis* S-1は凝集促進作用をもつ蛋白質を分泌するが、この細胞外蛋白質の疎水性基質資化時における役割についても検討した。

*R. erythropolis* S-1を炭化水素を基質として培養すると、菌体は急速に増殖し、フロックを形成して培養液表面に浮上した。これは、本放線菌が高い炭化水素資化能を有するとともに、炭化水素資化時に細胞間を連結しフロック化をもたらす疎水性の細胞外高分子物質を分泌しているためであると予想した。

本章においては、疎水性基質を炭素源として *R. erythropolis* S-1を培養したときにおこるフロック化が、凝集促進作用をもつ細胞外蛋白質の細胞表面への蓄積によってもたらされていることを論証し、同蛋白質が細胞表面の疎水性の向上に寄与することについて考察する。

### 第2節 実験方法

#### 1. 培養方法

培養には、グルコースあるいはn-ペンタデカン1%、酵母エキス0.05%、尿素0.05%、 $K_2HPO_4$  0.5%、 $KH_2PO_4$  0.2%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%を含む液体培地を用いた。培養液100mlを500ml容三角フラスコに入れ、4-5日間振盪培養を行った。なお、グルコースを炭素源とする培地をグルコース培地、n-ペンタデカンを炭素源とする培地をペンタデカン培地とした。

## 2. 菌体収量の測定

それぞれの培地で培養後、遠心分離(8,000×G、10分)を行ったところ、グルコース培地では菌体は沈殿したが、ペンタデカン培地では表面に膜を成して浮上した。菌体を沈殿あるいは膜として回収し蒸留水とアセトンで洗浄した後、105℃で乾固して重量を測定した。

## 3. 細胞外蛋白質の回収法とSDS-PAGEによる分析

細胞表面に付着した蛋白質は、ピリジンと水との混合液によって溶脱した。培地100mlから回収した菌体を50%のピリジン溶液40mlで3回洗浄して、合計120mlの洗浄液を回収した。これに飽和硫酸アンモニウム溶液と水飽和n-ブチルアルコール、それぞれ120mlを加えた。混和した後遠心分離を行って、水層とブチルアルコール層との境界に現れた固形物を細胞表面由来の蛋白質として回収した。これを蒸留水に対して透析し、塩及び有機溶媒を除去した。

一方、培養液中の蛋白質は前章で示した方法によって回収した。さらに、前章と同様な方法で回収した両蛋白質をSDS-PAGEによる分析に供した。

## 4. 凝集能の判定法

懸濁粒子としてはカオリンを用いた。5g/lの濃度でカオリンを蒸留水に懸濁し、この懸濁液5mlに培養液0.2mlないし培養液0.2ml由来の菌体を添加し

した。さらに、0.1%の硫酸アルミニウム溶液0.2mlを加え、静置した。試料を加えていない懸濁液を対照とし、これよりも液相の濁りが少なかったときに凝集作用があったものと判断した。

### 第3節 実験結果と考察

#### 1. ペンタデカン培地における菌体フロックの形成

多くの放線菌は炭化水素などの疎水性物質を代謝する能力を有するとされている。*R. erythropolis* S-1も脂肪酸（リノール酸、リノレン酸）、中性脂質（大豆油）、炭化水素（*n*-ヘキサデカン、*n*-ペンタデカン）を炭素源として増殖することができた。

*n*-ペンタデカンを炭素源とした場合、培地100mlからの菌体収量は、培養2日目で0.07-0.15g、4日目で0.38-0.44gあった(Figure 5-1)。一方、グルコースを炭素源とした場合には、それぞれ0.02-0.04gと0.31-0.37gであった(Figure 5-1)。すなわち、グルコースよりもペンタデカンを炭素源としたときの方が、菌体はより速やかに増殖することが判明し、したがって、糖よりも炭化水素の方が適した基質であると判断された。

Figure 5-2は培養5日目の培養液の状態である。ペンタデカン培地で培養した菌体は静置するとただちに培養液表面に浮上し、しかも浮上した菌体は繊維状のフロックを形成していた(Figure 5-2A)。このような菌体の凝集と浮上はヘキサデカンを炭素源に加えたときにも観察された。さらに、脂肪酸や中性脂質を炭素源としたときにも菌体の浮上はもたらされた。一方、グルコース培地で培養した菌体は培養液全体に均一に分散していた(Figure 5-2B)。*R. erythropolis* は疎水性物質を資化する能力に優れていると同時に、その細胞表層は疎水性物質に対して親和性を持つことにより菌体の浮上が起

こるものと考えられる。

## 2. 菌体および培養液の凝集能

グルコース培地およびペンタデカン培地で、*R. erythropolis* S-1を培養して得られた培養液を透析し、両透析液の凝集能の比較を行ったところ、ペンタデカン培地から得た培養液にはほとんど凝集促進作用が認められなかった (Figure 5-3)。しかし、得られた菌体をカオリン懸濁液に加え、カチオンの共存下で凝集促進作用を比較したところ、培養液のときとは逆にペンタデカンを炭素源として得た菌体の方が高い効果を示した (Figure 5-4)。このような結果は、グルコースを炭素源としたときには培養液中に分散するフロキュラントが、ペンタデカンを炭素源としたときには細胞の表面に付着して留まっているためではないかと推察された。

すでに論述したように、グルコース培地由来の培養液100mlからは20-50mgのフロキュラントが回収された。ペンタデカン培地由来の培養液からも同様の回収方法でフロキュラントを得ることを試みたが、その物質は全く回収できなかった。そこで、つぎに細胞表面に付着しているフロキュラントを溶脱し、収量を比較することとした。フロキュラントはピリジンと水の混合液に易溶であることから、この混合液によって菌体を洗浄すれば溶脱できらうと考えた。

ペンタデカンを炭素源とした場合、菌体はフロックを形成していたがこれはピリジン溶液 (50%, v/v) による洗浄で破壊され菌体は分散した。そして、培地100mlから回収した菌体の洗浄液 (120ml) からは約5mgの蛋白質が回収された。グルコース培地 (100ml) から得られた菌体の洗浄液からでは1mg以下の収量であった。

さらに、グルコースを炭素源とし培養したときに培養液中に分散した蛋白



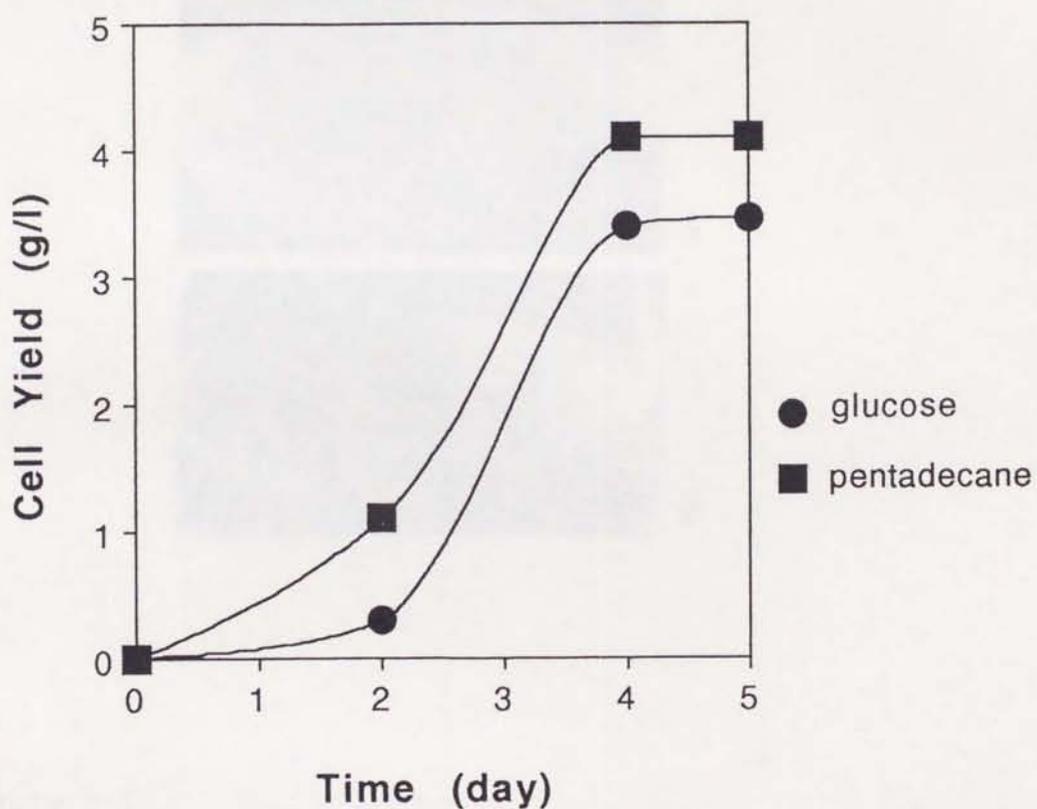


Figure 5-1

Cell proliferation of R. erythropolis.

R. erythropolis was cultured at 30 °C in 100 ml of glucose or pentadecane medium. At intervals of 1 or 2 days, cells were harvested by centrifugation and washed with water and acetone, then the dry cell weights were measured.

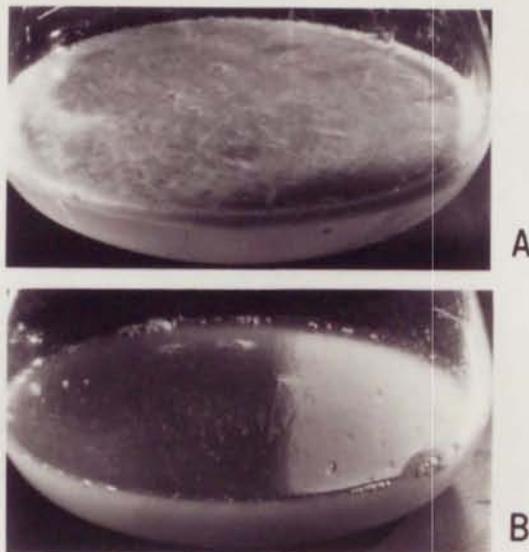


Figure 5-2

Flootation and flocculation of R. erythropolis S-1 grown on n-pentadecane.

Five days cultures of R. erythropolis S-1 with n-pentadecane (A) and glucose medium (B).

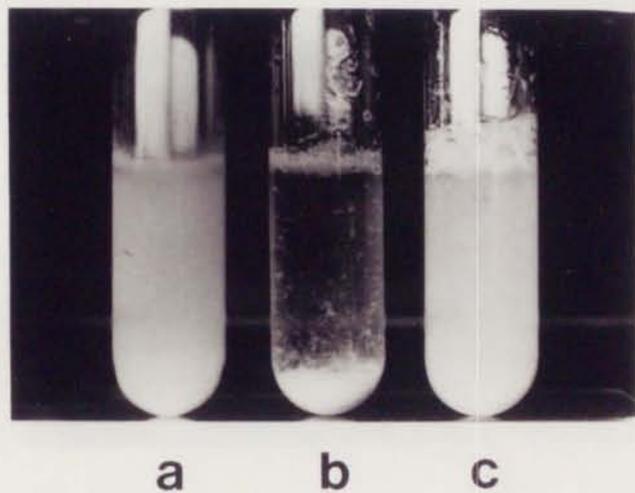


Figure 5-3

Flocculating activity of culture broth.

Flocculating activity of culture broth (0.2 ml) was measured with 5 ml of kaolin suspension containing 0.1 % of  $Al_2(SO_4)_3$ . a; without culture broth, b; with culture broth derived from glucose medium, c; with culture broth derived from n-pentadecane medium.

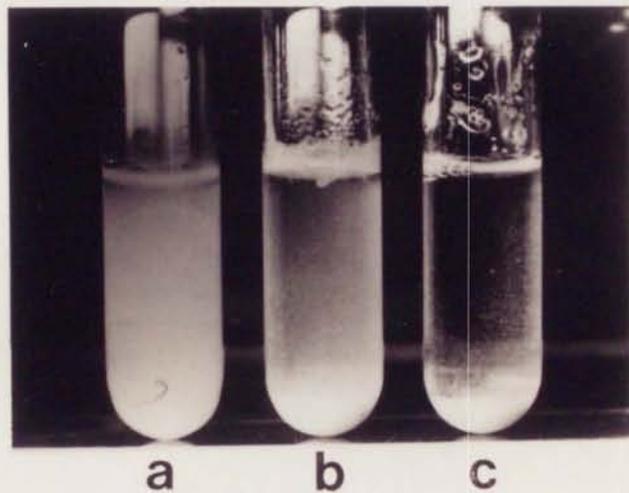


Figure 5-4

Flocculating activity of cells.

Cells collected from 0.2 ml of culture was suspended in 5 ml of kaolin suspension containing 0.1 % of  $Al_2(SO_4)_3$  and flocculating activity was measured. a; without cells, b; with cells grown on glucose, c; with cells grown on n-pentadecane.

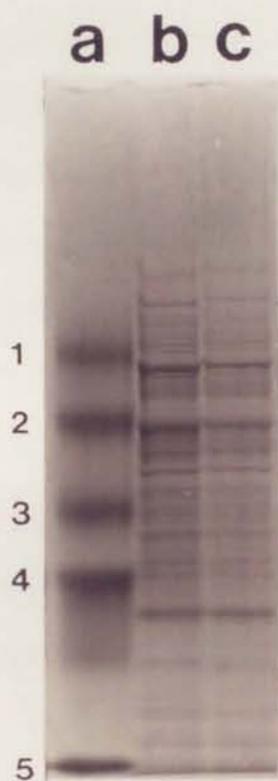


Figure 5-5

SDS-PAGE of released and cell surface protein.

Samples were incubated at 100 °C for 2 min in the presence of 1 % 2-mercaptoethanol and 1 % SDS. The denatured sample solutions were supplied on 5-20 % polyacrylamide gel and electrophoresed at the constant current of 15 mA. Lane a; molecular size markers, MW 74,400 (1), MW 49,600 (2), MW 37,200 (3), MW 24,800 (4) and MW 12,400 (5). Lane b; protein prepared from culture broth. Lane c; protein eluted from cell surface.

#### 第4節 要約

n-ペンタデカンを炭素源として用いて *R. erythropolis* S-1 を培養したところ、グルコースを用いた場合よりも速やかな増殖が起こった。そのとき、菌体はフロックを形成するとともに気液界面に浮上した。また、カオリンを凝集させる能力は培養液には存在せず菌体にのみ認められた。菌体フロックはピリジン溶液による洗浄で破壊され、洗浄液からは蛋白質が回収された。一方、培養液からは回収できなかった。

細胞表面より回収された蛋白質の SDS-PAGE における泳動パターンは、グルコースを炭素源として培養したときに培養液中に分散したフロキュラントのそれと一致した。

以上のような結果より、*R. erythropolis* が分泌する蛋白質（フロキュラント）は、炭化水素を資化する際、菌体表面に蓄積しフロック化をもたらすことが判明した。こうした蛋白質（フロキュラント）の菌体表層への蓄積とそれにもなうフロック化は、基質となる炭化水素との親和性を高め、その油滴を保持し易くするなどの利点があるのではないかと考えられる。

本章と第3章での実験結果を総合すると、放線菌によって分泌される蛋白質には、細胞の疎水性物質に対する親和性を向上させる働きがあり、単に細胞壁中のミコール酸の疎水性<sup>8,9)</sup> によってのみそうした性質が維持されているのではないという結論に至った。

## 第 6 章 総括

活性汚泥の凝集機構は *Zoogloea ramigera* の凝集機構をモデルとして研究され始めたという歴史的な経緯があり、多糖類が凝集の原因である<sup>40)</sup>とする考え方が大勢を占めている。活性汚泥から抽出される蛋白質は、抽出操作の際に起こる溶菌によって放出されるものであって、本来活性汚泥のフロック形態維持には関与しないとされている<sup>41)</sup>。しかし、溶菌によらなくても蛋白質を菌体外に多量に分泌する微生物は存在する<sup>42)</sup>。また、活性汚泥表面の多糖の量が増加しすぎると、沈降性はむしろ低下することが報告されている<sup>28, 42-47)</sup>。さらに、Goodwinらは活性汚泥の表面に働く相互作用にはイオンのものだけでなく疎水的な要素もあることを指摘し、細胞外の蛋白質や脂質の役割は従来予想されていたよりも大きいのではないかとする報告を行っている<sup>48)</sup>。

放線菌は疎水的な細胞壁を持ち<sup>7, 8)</sup>、そのため占有率が增大すると活性汚泥の疎水性が過度に高まり沈降性を低下させる有害微生物とされている。そして、活性汚泥への疎水性物質の供給によって放線菌の廃水処理プラント内での蓄積が起こり、固液分離を妨げる浮上汚泥障害の原因となることが予想されている<sup>9)</sup>。しかし、この機構によってもたらされる放線菌の増加は緩慢なものであり、突如として起こる放線菌障害を矛盾無く説明することはできない。

そして、本研究ににおいてはつぎのような知見が得られた。

1. 二種類の放線菌 *Nocardia amarae* YK1、*Rhodococcus erythropolis* S-1 は、細胞表面ないしは細胞外に蛋白質バイオフロキュラントを産生する。
2. これらのバイオフロキュラントの作用は、環境中に存在する程度のカチオンの添加によって促進された。

3. 疎水性炭素源によってこれらの放線菌を培養すると、水溶性基質を用いた場合よりも急速な増殖がもたらされた。しかもそのとき放線菌は、気液界面にフロックを形成して浮上した。
4. *N. amarae*細胞表面には網目状の構造体があり、再構成された細胞表層構造体は疎水性物質に対して高い親和性を示した。
5. 水溶性基質による培養時には培養液中に拡散する*R. erythropolis*のバイオフィキュラントは、疎水性基質による培養時には細胞表面に蓄積した。

以上のような知見を総合すると、従来の活性汚泥凝集機構や放線菌障害に関する認識を次のような点において改める必要のあることが示唆される。

1. 放線菌は蛋白質性バイオフィキュラントを産生する。したがって、占有率が過剰でない限りにおいては活性汚泥の凝集、沈降性を向上させる作用がある。
2. 多糖のみならず蛋白質もバイオフィキュラントとして機能する。
3. 特定の疎水性基質によって放線菌の占有率の迅速な増大がもたらされる。
4. 細胞壁のみならず細胞外蛋白質も放線菌細胞の疎水性の向上に寄与する。

活性汚泥法の凝集機構を解明するため、また活性汚泥法の運用上の問題である放線菌障害の発生機構を理解するために、本研究において得られた知見が活かされることを期待する。

## 文 献

### 第 1 章

- 1) 高橋正策 (1982) 三河島処理場におけるスカム異常発生に関する考察, 第35回関東水道衛生協議会研究発表概要集, 34-37
- 2) Pipes, O. W. (1969) Types of activated sludge which separate poorly. J. Wat. Pollut. Control Fed., 41, 714-724
- 3) Ziegler, M., Lange, M., Dott, W. (1990) Isolation and morphological and cytological characterization of filamentous bacteria from bulking sludge. Wat. Res., 24, 1437-1451
- 4) Milwaukee Mystery Unusual Operating Problem Develops. (1969) Water and Sea Workes, 116, 231
- 5) Lechevalier, M. P., Lechevalier, H. P. (1974) *Nocardia amarae* sp. nov., an actinomycete common in foaming activated sludge. Int. J. Syst. Bact., 24, 278-288
- 6) Pipes, O. W. (1978) Actinomycete scum production in activated sludge process. J. Wat. Pollut. Control fed., 50, 628-634
- 7) 本多和彦、森忠洋、矢野郁也、堺好雄、松本利道 (1984) 放線菌細胞壁中の強疎水性物質 (ミコール酸) の同定と浮上汚泥との関係について, 下水道協会誌, 21, 31-38
- 8) Mori, T., Sakai, Y., Honda, K., Yano, I., Hashimoto, S. (1988) Stable abnormal foam in activated sludge process produced by *Rhodococcus* sp. with strong hydrophobic property. Environ Tech. Lett., 9, 1041-1048
- 9) Lemmer, H., Baumann, M. (1988) Scum actinomycetes in sewage

- treatment plants-part 2, the effect of hydrophobic substrate.  
Wat. Res., 22, 761-763
- 10) Kurane, R., Suzuki, T., Takahara, Y. (1979) Microbial population and identification of phthalate ester-utilizing microorganisms in activated sludge inoculated with microorganisms. Agric. Biol. Chem., 43, 907-917
  - 11) Kurane, R., Takeda, K., Suzuki, T. (1986) Screening for and characteristics of microbial flocculants. Agric. Biol. Chem., 50, 2301-2307
  - 12) Kakii, K., Shirakashi, T., Kuriyama, M. (1984) Some properties of mucilage polysaccharides extracted from sewage activated sludge. J. Ferment. Technol., 62, 429-435
  - 13) Kakii, K., Kitamura, S., Shirakashi, T., Kuriyama, M. (1986) Comparison of mucilage polysaccharides extracted from sewage activated sludge. J. Ferment. Technol., 64, 51-56
  - 14) Sato, T., Ose, Y. (1980) Floc-forming substances extracted from activated sludge with sodium hydroxide solution. Envir. Res., 14, 333-338
  - 15) Sato, T., Ose, Y. (1984) Floc-forming substances extracted from activated sludge with ammonium hydroxide and EDTA solutions. Wat. Sci. Technol., 17, 517-528
  - 16) Pavoni, J. L., Tenney, M. W., Echelberger, W. F. (1972) Bacterial exocellular polymers and biological flocculation. J. WPCF, 44, 414-431
  - 17) Tenney, M. W., Verhoff, F. H. (1973) Chemical and

- autoflocculation of microorganisms in biological wastewater treatment. *Biotechnol. Bioeng.*, 15, 1045-1071
- 18) Takagi, H., Kadowaki, K. (1985) Flocculant production by Paecilomyces sp. taxonomic studies and culture condition for production. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 3151-3157
- 19) Takagi, H., Kadowaki, K. (1985) Purification and chemical properties of a flocculant production by Paecilomyces. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 3159-3164
- 20) Nakamura, J., Miyashiro, S., Hirose, Y. (1976) Purification and chemical analysis of microbial cell flocculant produced by Aspergillus sojae AJ7022. *Agric. Biol. Chem.*, 40, 619-624
- 21) Fattom, A., Shiro, M. (1984) Phormidium J-1 bioflocculant: production and activity. *Arch. Microbiol.*, 139, 421-426
- 22) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
- 23) Brown, M. J., Lester, J. N. (1979) Metal removal in activated sludge: The role of bacterial extracellular polymers. *Wat. Res.*, 13, 817-837
- 24) Lemmer, H., Kroppenstadt, R. M. (1984) Chemotaxonomy and physiology of some actinomycetes isolated from scumming activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.*, 5, 124-135
- 25) Goddard, A. J., Forster, C. F. (1986) Surface tension of activated sludges in relation to the formation of stable foams. *Microbs Lett.*, 46, 29-43
- 26) Seviour, E. M., Williams, C. J., Seviour, R. J., Soddell, J. A.,

- Lindrea, K. C. (1990) A survey of filamentous bacterial population from foaming activated sludge plants in eastern states of Australia. *Wat. Res.*, 24, 493-498
- 27) Blackbreard, J. R., Ekama, G. A., Marais, G. V. R. (1986) A survey of bulking and foaming in activated sludge plants in South Africa. *Wat. Pollut. Control*, 85, 90-100
- 28) Blackbreard, J. R., Gabb, D. M. D., Ekama, G. A., Marais, G. V. R. (1988) Identification of filamentous organism in nutrient removal activated sludge plants in South Africa. *Wat. SA*, 14, 29-33
- 29) Unz, R. F., Farrah, S. R. (1974) Bacterial Zoogloea formation. PB 235023 EPA 670/2-74-018, 1-86
- 30) Harris, R. H., Mitchell, R. (1975) Inhibition of the flocculation of bacteria by biopolymers. *Wat. Res.*, 9, 993-999
- 31) Friedman, B. A., Dugan, R. R., Pfister, R. M., Remsen, C. C. (1969) Structure of the Exocellular polymers and their relationship to bacterial flocculation. *J. Bact.*, 98, 1328-1334
- 32) Deinema, M. H., Zevenhuizen, L. P. T. M. (1971) Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their roll in bacterial flocculation. *Arch. Microbiol.*, 78, 42-57
- 33) Tago, Y., Aida, K. (1977) Exocellular mucopolysaccharide closely related to bacterial floc formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 308-314
- 34) Endo, T., Nakamura, K., Takahashi, H. (1976) Pronase-susceptible floc forming bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 40, 2289-2295

- 35) Kakii, K., Hasumi, M., Shirakashi, T., Kuriyama, M. (1990)  
Involvement of  $Ca^{2+}$  in the flocculation of Kluyvera cryocrescens  
KA-103. J. Ferment. Bioeng., 69, 224-227
- 36) Sakka, K., Endo, T., Watanabe, M., Okuda, S., Takahashi, H.  
(1981) Deoxyribonuclease-susceptible floc-forming Pseudomonas sp..  
Agric. Biol. Chem., 45, 497-504
- 37) Sakka, K., Takahashi, H. (1982) DNA binding activity of cells of  
deoxyribonuclease-susceptible floc-forming Pseudomonas sp..  
Agric. Biol. Chem., 46, 1775-1781
- 38) Sakka, K., Shimomura, T., Takahashi, H. (1984) Non-flocculating  
mutants derived from deoxyribonuclease-susceptible  
floc-forming Pseudomonas sp.. Agric. Biol. Chem., 48, 377-382
- 39) Kurane, R., Suzuki, T., Takahara, Y., Komagata, K. (1977)  
Identification of phthalate ester-assimilating bacteria. Agric.  
Biol. Chem., 41, 1031-1038
- 40) Wallen, L. L., Davis, D. N. (1972) Biopolymers of activated  
sludge. Environ. Sci. Technol., 6, 161-164
- 41) Brown, M. J., Lester, J. N. (1980) Compersion of bacterial  
extracellular polymer extraction methods. Wat. Res., 40, 179-185
- 42) Udaka, S. (1976) Screening of protein-producing bacteria. Agric.  
Biol. Chem., 40, 523-528
- 43) Magara, Y., Nanba, S., Utosawa, K. (1976) Biochemical and  
physical properties of an activated sludge on settling  
charasteristics. Wat. Res., 10, 71-77
- 44) Gehr, R., Henry, J. G. (1983) Removals of extracellular material.

- Techniques and pitfalls. Wat. Res., 17, 1743-1748
- 45) Forster, C. F., Lewin, D. C. (1972) Polymer interactions at activated sludge process. Water SA, 2, 119-125
- 46) Forster C. F. (1982) Sludge surface and their relation to the rheology of sewage sludge suspensions. J. Chem. Technol. Biotechnol., 32, 799-807
- 47) Horan, N., Eccles, C. R. (1986) Purification and characterization of extracellular polysaccharides from activated sludge. Wat. Res., 20, 1427-1432
- 48) Goodwin, J. A., Forster, C. F. (1985) A further examination into the composition of activated sludge surface in relation to their settlement characteristics. Wat. Res., 19, 527-533

## 付記

本論文の内容の一部は下記の投稿論文によって発表したものである。

Jun-ichi Koizumi, Minoru Takeda, Tadahiro Mori (1989) Extracellular product of Nocardia amarae induces bacterial cell flocculation.

FEMS Microbiol. Lett., 57, 61-64

Minoru Takeda, Ryuichiro Kurane, Jun-ichi Koizumi, Isei Nakamura (1991) A protein bioflocculant produced by Rhodococcus erythropolis.

Agric. Biol. Chem., 55, 2663-2664

Minoru Takeda, Ryuichiro Kurane, Isei Nakamura (1991) Localization of a biopolymer produced by Rhodococcus erythropolis grown on

n-pentadecane. Agric. Biol. Chem., 55, 2665-2666

Jun-ichi Koizumi, Minoru Takeda, Ryuichiro Kurane, Isei Nakamura (1991) Synergetic flocculation of the bioflocculant FIX

extracellularly produced by Nocardia amarae. J. Gen. Appl. Microbiol.

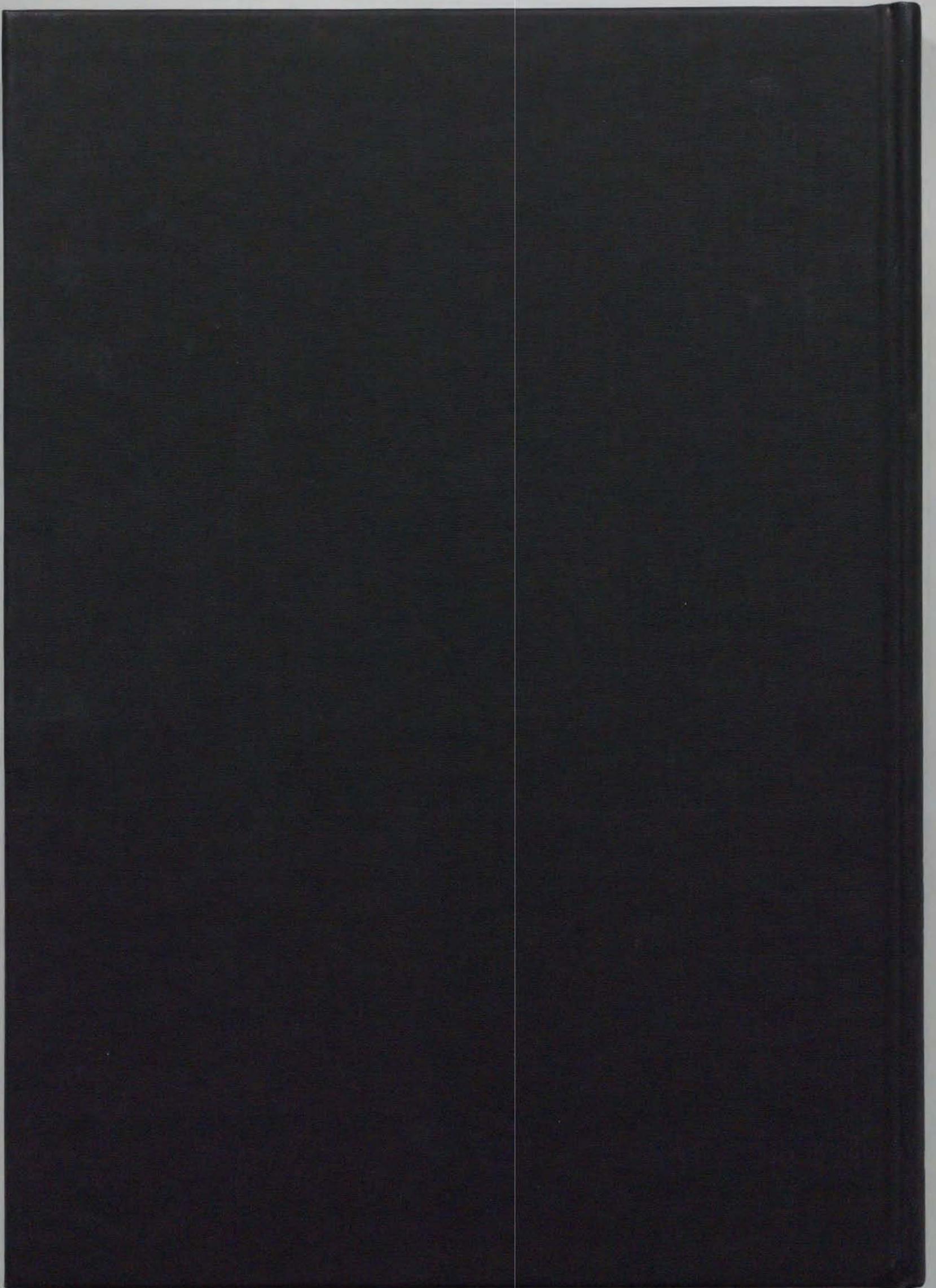
(in press)

## 謝 辞

本論文の作成にあたり、御懇篤なる御指導を賜った筑波大学教授中村以正博士に衷心より謝意を表します。

また、本論文の査読・御校閲を賜った筑波大学教授中原忠篤博士、同教授山口彰博士、同助教授国府田悦男博士に深謝します。

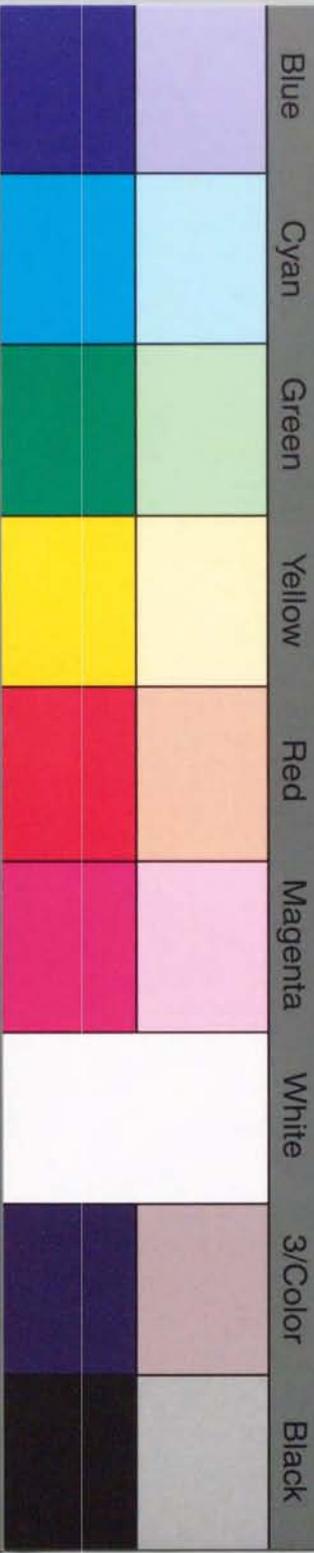
さらに、本研究の実施に御協力を賜り、有益な御助言をいただいた通商産業省微生物工業技術研究所倉根隆一郎博士、東京大学助教授小泉淳一博士、島根大学教授森忠洋博士に感謝します。



inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

