

光依存性細菌の細胞外物質の分子量解析

Analysis on molecular weight of extracellular material from photosynthetic bacteria

0540404 伊藤瑞希, 大瀧雅寛

Mizuki ITO and Masahiro OTAKI

お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 ライフサイエンス専攻

1 はじめに

Rhodobacter sphaeroides は、光依存性細菌の一種であり、可視光照射下において高い脱色速度を持つ細菌である。また、光依存性細菌の菌体外に分泌される細胞外物質にも、可視光照射下において染料や一般排水二次処理水の脱色効果を持つことがわかっている。この細胞外物質による染料の脱色反応は、対象とする染料の反応機構が構造式に依存することもわかっている。¹⁾

しかしながら、この細胞外物質の脱色反応がどのような物質によって行われているのかは解明されていない。そこで本研究では、光依存性細菌の細胞外物質の脱色反応を起こす物質の特定のための第一段階として分子量測定を行うこととした。今回は、分画分子量 3,000 の限外濾過膜によって分画することにした。分子量 3,000 で分ける目的としては、脱色反応がたんぱく質・酵素反応によるものであるかを知るためである。

2 限外濾過膜, 分画分子量

限外濾過膜は、膜濾過よりも操作圧力が大きいいため、分子量 3,000 程度のもので分画することができ、高分子や、コロイド、たんぱく質などの分離に使用されることが多い。限外濾過膜の細孔径はばらつきがあるので、膜の分離性能を表すには細孔径では不十分である。そこで限外濾過膜の分離性能の指標として分画分子量が使われている。ある膜の分画分子量を決めるには、分子量の異なる数種類のマーカー分子を用いて、分子量毎の阻止率を測定する。それを分子量に対してプロットし、これを分画曲線と呼ぶ。分画曲線から、阻止率が 90 % の分子量をその膜の分画分子量としている。

3 実験方法

光依存性細菌を単離培養し、2,900×g で約 4 分間遠心分離させ、上澄みだけを分取した。この溶液を濾過（孔径 0.45 μm）して細胞を完全に除去した濾

液を細胞外物質溶液として以下の各実験に供した。

3.1 分画毎の脱色能力比較実験

細胞外物質溶液を分画分子量 3,000 のマイクロコン（遠心式濾過ユニット）に 0.5 mL 投入した。2,900×g で約 30 分間遠心分離させ、分子量 3,000 以上が含まれる溶液、および 3,000 以下を含む溶液を得た。また細胞外物質溶液原液、MilliQ 水を対象試料として用意した。

Fig.1 にマイクロコン（遠心式濾過ユニット）の写真を示す。上部溶液に試料を投入し、遠心分離させることによって、限外濾過膜を通ったものを 3,000 以下溶液と呼び、上部容器に残存したものを 3,000 以上溶液と呼ぶ。

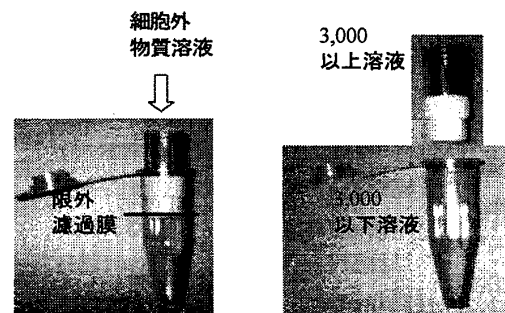


Fig.1 Picture of Microcon

各溶液 1 mL に MilliQ 水を 5 mL 加え、5 倍希釈とし、染料 Acid Blue92（以下 AB92 と略す）1,000 mg/L を 0.1 mL 加えた。蛍光灯による光照射下、37°C で保持した。また、時間経過ごとに溶液の吸光度（AB92 吸光ピーク：560 nm）を測定し、脱色率を調べた。

3.2 再分画毎の脱色能力比較実験

3.1 の実験で分取し得た 3,000 以上溶液に、脱色能力を持つ 3,000 以下の物質が含まれているかを調べるため、3.1 と同様の方法と同様に、分画分子量 3,000 で 3,000 以上が含まれる溶液のものを再び同様に分画分子量 3,000 で遠心分離させた。分取し、得られた 3,000 以上を含む溶液を再 3,000 以上溶液とし、得

られた 3,000 以下溶液を再 3,000 以下溶液とした。

Fig.2 に全体の実験のフローチャートを示す。

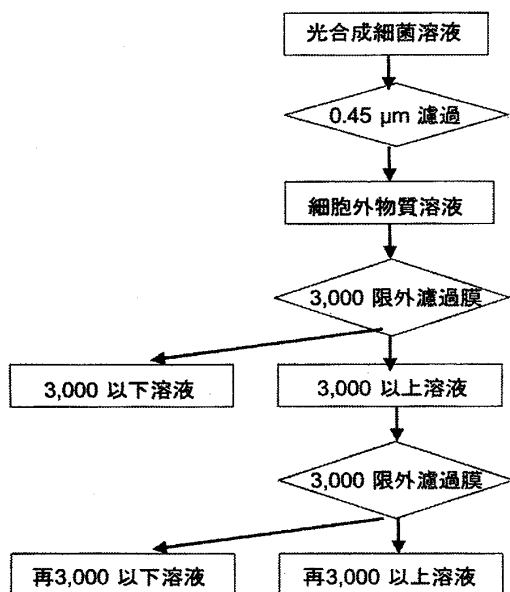


Fig.2 Flowchart of experiment

4 実験結果

4.1 分画毎の脱色能力比較実験

Fig.3 に各溶液の AB92 の脱色率を示す。

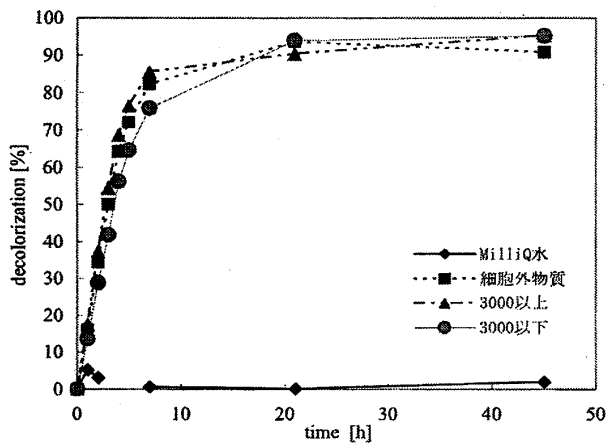


Fig.3 Decolorization time of AB92

予想としては、脱色能力を持つ物質が分子量 3,000 以下であると考えていたので、脱色率の速度は 3,000 以下溶液 > 細胞外物質溶液 > 3,000 以上溶液の順になると予想していたが、この 3 つの溶液の AB92 脱色率は、あまり変わらなかった。これは、3 つとも脱色反応を起こしている主体が同じ物質、すなわち分子量 3,000 以下の物質であると考えられる。3 つの溶液の差がなかった原因としては、マイクロコンの分画分子量 3,000 で分ける膜が遠心分離中に目詰まりを起こし、3,000 以上溶液に 3,000 以下の脱色反

応を起こす物質が残存したためと考えられる。このことを検証するため、3.2 の実験を行った。

4.2 再分画毎の脱色能力比較実験

Fig.4 に各溶液の AB92 の脱色率を示す。

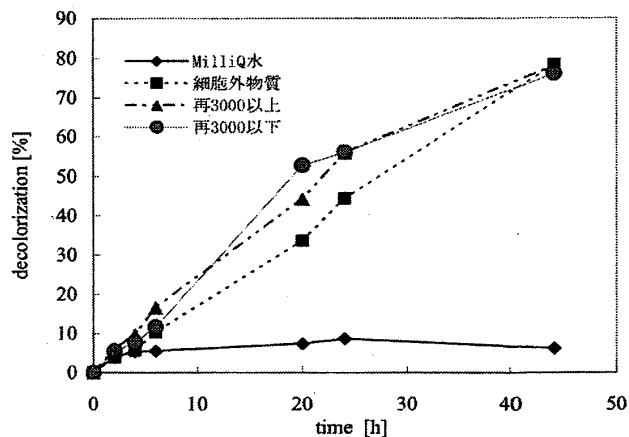


Fig.4 Decolorization time of AB92

細胞外物質溶液、再 3000 以上溶液、再 3,000 以下溶液の 3 つを比較すると、速度に多少差がみられるものの最終脱色率に差はみられなかった。この 3 つの溶液の脱色反応を起こす物質は同じであり、膜の目詰まりにより再 3,000 以上溶液中にも分子量 3,000 以下の物質が残存して、脱色能力が同じになったと考えられる。従って、3,000 以下の分子量物質に脱色能力があると考えられる。

なお、分画毎の比較実験、再分画毎の比較実験では用いた光依存性細菌溶液の濃度および状態が異なっているため、得られた細胞外物質溶液の濃度が異なり、Fig.3 と 4 の間の脱色速度の差が生じたと思われる。

5 まとめ

光依存性細菌の細胞外物質溶液の脱色能力がある物質の分子量は 3,000 以下であることがわかった。

今後、同定方法を考えて進めていく予定である。

6 参考文献

- 1) 伊藤瑞希 平成 16 年度 卒業論文 光依存性細菌の細胞由来物質による排水の光脱色反応
- 2) ヴォート基礎生化学 東京化学同人
- 3) 高浪龍平 有坂大樹 尾崎博明 林新太郎 第 42 回環境工学研究フォーラム講演集・2005 白色腐朽菌が生産する酵素によるアゾ染料の分解とその分解機構