

氏 名 福 井 哲 也
 学位の種類 薬 学 博 士
 学位記番号 薬 博 第 171 号
 学位授与の日付 昭 和 54 年 1 月 23 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
 研究科・専攻 薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
 学位論文題目 活性汚泥菌 *Zoogloea ramigera* I-16-M の
 ポリ-β-ヒドロキシ酪酸代謝に関する研究

論文調査委員 (主 査)
 教 授 富 田 謙 吉 教 授 高 木 博 司 教 授 山 科 郁 男

論 文 内 容 の 要 旨

今日、廃水処理には、好気性細菌を多量に含む活性汚泥が広く用いられているが、これらの細菌は旺盛な資化能と共にフロック（凝塊）形成能を持つことが不可欠な条件とされている。活性汚泥菌の一種 *Zoogloea ramigera* I-16-M (ACTT 19623) は適当な炭素源を含む培地で生育すると、菌体内に特異な貯蔵物質である疎水性高分子、ポリ-β-ヒドロキシ酪酸 (PHB) を多量に蓄積するとともにフロックを形成する特徴を有し、この菌による PHB 蓄積とフロック形成との関連、及び PHB の生理的役割が注目されている。著者はこの菌における PHB の代謝とフロック形成との関連を明らかにするため、まず PHB 合成経路の検討を行い、以下の知見を得た。

(1) PHB Synthase (β -hydroxybutyryl CoA $\xrightarrow{\text{PHB primer}}$ PHB) の精製とその諸性質

Z. ramigera I-16-M は炭素源の限定された培地で生育させると培地中に均一に分散した状態で生育するが、これにグルコースを添加すると菌体は急激にフロックを形成し、30分以内に凝集してしまうが PHB はフロック形成より遅れて直線的に増加した。そこでこの PHB の合成に直接関わる PHB synthase について検討を行った。

この酵素は *Bacillus megaterium* 等、ある種の細菌においては、PHB granule と呼ばれる、PHB を多量に含む顆粒に結合して局在するものと考えられて来た。著者が *Z. ramigera* I-16-M 株における PHB 合成酵素の細胞内分布を調べたところ、グルコース (10 mM) 培地で生育したフロック形成菌においては酵素活性はすべて細胞内の顆粒画分に局在していたが、グルコース無添加培地で生育させた、フロックを形成していない菌体では PHB 合成酵素の活性の約50%が菌体の粗抽出液の上清画分 (10,000×g, 60分) に存在することを見出した。グルコース添加後の、この酵素の菌体内分布の変動を蔗糖密度勾配下での遠心法で追跡したところ、可溶性画分に存在した PHB 合成酵素はグルコース添加後、菌体のフロック形成とともにすみやかに顆粒画分へと移行してゆくことが判明した。又さらに培養を続け、培地中のグルコースが消費しつくされると菌体に蓄積された PHB は減少しはじめ、それとともに顆粒画分のみ局

在していた PHB 合成酵素は再び可溶性画分へと放出されることが明らかとなった。

顆粒画分の酵素は蔗糖密度勾配遠心法で、粗抽出液から約20倍に精製され電子顕微鏡的にはほぼ均一な顆粒として得られた。一方可溶性画分の酵素は硫酸分画、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイトを用いて粗抽出液から約50倍に精製されたが、精製を進めるにつれて著しく不安定となった。両画分の酵素の至適 pH はともに7付近にあり、基質として β -hydroxybutyryl CoA のD型に対して特異的であった。又基質に対する K_m 値は顆粒画分の酵素が $210 \mu\text{M}$ 、可溶性画分の酵素は $53 \mu\text{M}$ であった。

部分精製した可溶性画分の PHB 合成酵素と $[^{14}\text{C}]$ D- β -hydroxybutyryl CoA とを 30° で10分反応させたのち蔗糖密度勾配下で遠心したところ顆粒様成分の生成、ならびに PHB への $[^{14}\text{C}]$ のとり込みが見られ、in vitro においても可溶性画分から顆粒画分への PHB 合成酵素の移行を再現することが出来た。従って両画分の PHB 合成酵素は本来同一のもので、PHB 顆粒との結合の有無により、その局在性を異にするものと推察された。

(2) PHB 合成経路について

(i) Acetoacetyl CoA reductase (acetoacetyl CoA $\xrightleftharpoons[\text{NADP}]{\text{NADPH}}$ D- β -hydroxybutyryl CoA) の精製とその諸性質

この酵素は *Z. ramigera* の粗抽出液より硫酸分画、DEAE-セルロース、セファデックス G-200、ハイドロキシアパタイトを用いて約1700倍に精製し、比活性約 300 の標品を得た。得られた酵素の acetoacetyl CoA の還元反応の至適 pH は 8.1, acetoacetyl CoA に対する K_m 値は $8.3 \mu\text{M}$ 、NADPH に対しては $21 \mu\text{M}$ であった。又高濃度の acetoacetyl CoA で顕著な基質阻害が認められた。又セファデックス G-200 によるゲル濾過法によりその分子量は約10万と求められた。

(ii) PHB 合成経路の検討

Z. ramigera と同様 PHB を産生する *Rhodospirillum rubrum* では PHB は acetyl CoA $\rightarrow$ acetoacetyl CoA $\rightarrow$ L(+)- β -hydroxybutyryl CoA $\rightarrow$ crotonyl CoA $\rightarrow$ D(-)- β -hydroxybutyryl CoA $\rightarrow$ PHB の経路で合成されることが明らかにされている。一方 *Azotobacter beijerinckii* では acetoacetyl CoA は直接 D(-)- β -hydroxybutyryl CoA に還元され、即ち PHB 生成は acetyl CoA $\rightarrow$ acetoacetyl CoA $\rightarrow$ D(-)- β -hydroxybutyryl CoA $\rightarrow$ PHB の経路をとることが知られている。

Z. ramigera についてこの点を検討したところ、まずこの菌の粗抽出液には acetoacetyl CoA から NAD^+ を補酵素として L(+)- β -hydroxybutyryl CoA、及び NADP^+ を補酵素として D(-)- β -hydroxybutyryl CoA を生成する2種の acetoacetyl CoA reductase が存在することが判明した。この菌にはまた crotonase も存在するので *R. rubrum* タイプの経路の存在も考えられる。しかし菌粗抽出液による crotonyl CoA よりの PHB 生成は全く見られないこと、及び $[1-^{14}\text{C}]$ acetyl CoA の PHB への取り込みは NADPH の存在下においてのみ行われることから PHB の生成は NADP^+ を補酵素とする acetoacetyl CoA reductase を介して *A. beijerinckii* と同様な経路で行われるものと推定された。

この菌からそれぞれ精製された β -ketothiolase (当研究室の西村等により精製された)、acetoacetyl CoA reductase、PHB synthase によって系を再構成すると NADPH の存在下においてのみ $[1-^{14}\text{C}]$ acetyl CoA からの PHB への ^{14}C -放射活性の取り込みが見られた。

PHB の生成には *A. beijerinckii* では嫌気条件が必要であるが *Z. ramigera* では逆に好気条件を要する。グルコース添加後の *Z. ramigera* の菌体内の種々の PHB 生成に関連する酵素の活性の変動を調べたところ、G-6-P dehydrogenase のみが著明な誘導をうけることがわかった。従って *Z. ramigera* I-16-M における PHB 合成は acetoacetyl CoA reductase の性質と考えあわせると、反応に必要な NADPH の供給によって調節されている可能性がある。又 acetocetyl CoA reductase が著しい其質阻害、 β -keto-thiolase が生成物阻害をうけることはこの菌の PHB 生成の調節に関与しているものと思われるが、この点について今後さらに検討を加えることが必要であると考ええる。

論文審査の結果の要旨

活性汚泥法は微生物学的汚水処理法であり、現在、都市、工場の廃水の二次処理に広く用いられている。活性汚泥菌の必要条件是旺盛な生育能、有機物資化能をもつと共に菌が凝集体（フロック）を形成して沈澱し分離除去が可能なことである。しかしながら、これまでは処理条件に適した汚泥菌の馴養、選択等は行われて来たが、重要な特性であるフロック形成機作に関する生化学的検討は殆んど顧みられなかった。著者は Crabtree らにより分離同定された *Zoogloea ramigera* I-16-M が、グルコース等の存在下、菌体内にポリ- β -ヒドロキシ酪酸（PHB）なる疎水性のエネルギー貯蔵物質を大量に蓄積すると共に、菌体外には粘稠多糖を生成することなくフロックを形成する特性に注目し、PHB 代謝とフロック形成との関連を検討して次の成果をあげた。(1)著者はまず PHB 合成酵素 (D(-)- β -hydroxybutyryl CoA $\xrightarrow{\text{PHB primer}}$ PHB) の細胞内分布をしらべ、グルコース無添加培地で生育し、フロックを形成していない *Z. ramigera* I-16-M にも酵素活性は十分に存在し、これが超音波処理菌体の $105,000 \times g$, 60分遠心の上清に局在することを見上した。これは従来、他の PHB 生成菌において、PHB 合成酵素は PHB 顆粒を囲む被膜に結合した不溶性酵素としてのみ存在するとされていた事に対する重要な新発見である。(2)グルコース添加により上清の PHB 合成酵素活性は数十分で、生成する PHB 顆粒画分に移行する。(3)上清 PHB 合成酵素と ^{14}C - β -hydroxybutyryl CoA との反応成績体を CHCl_3 で抽出、セフデックス LH-20 カラム分画を行ない、生成物が顆粒酵素で作られる分子量 2,000 以上の PHB と同じ挙動をとることを証明した。(4) PHB 合成酵素を顆粒画分より約20倍、上清画分より約50倍に精製、諸性質を検討した結果、両酵素は本質的には略々同一で、PHB 存在の有無により細胞内の局在性が変わることが判明した。(5)グルコース添加後の PHB 増分に比して、フロック形成は遙かに速かであり、両者の直接的関連は疑問である。(6)菌粗抽出液のアセトアセチル CoA 還元酵素の β -hydroxybutyryl CoA に対する立体特異性 NAD^+ , NADP^+ 依存性を検討し、PHB 生成には NADP^+ 依存性還元酵素が関与し、アセトアセチル CoA を一挙に D(-)- β -hydroxybutyryl CoA にすることを証明、ついでこの酵素をディスク電気泳動的に略々均一標品にまで精製した。(7)精製酵素の組合わせにより、この菌の PHB 生成は、 $2 \text{ Acetyl CoA} \xrightleftharpoons{\text{NADPH}} \text{acetoacetyl CoA} \xrightleftharpoons{\text{NADP}} \text{D(-)-}\beta\text{-hydroxybutyryl CoA} \rightarrow \text{PHB}$ と進行することを確かめた。

以上の成果は、活性汚泥菌のフロック形成及び PHB の生成、役割の解明に寄与する所が多い。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。