

Zoogloea ramigeraのポリ-β-ヒドロキシ酪酸代謝とフロック形成

(京大・薬) ○富田謙吉, 齊藤光實, 福井哲也, 池田典秋, 田中良昌

1. 目的 汚水の二次処理に現在広く用いられている活性汚泥法では, 汚泥中の細菌群が (1) 好気条件下で旺盛に繁殖して汚水中の有機物を資化分解すると共に, (2) 菌の凝集体(フロック)を形成して沈澱し, 分離除去が容易であることが必要とされている。活性汚泥から分離された *Zoogloea ramigera* I-16-M¹⁾ は, 糖類の存在下にフロックを形成すると同時に菌体内に疎水性の高分子, poly-β-hydroxybutyrate (PHB), を蓄積することから, PHBとフロック形成との関連が示唆されている。本研究はこの菌のPHB代謝とその生理的意義を検討してフロック形成機構の解明に資することを目的とする。

2. 方法 この菌のPHB生成に関与すると思われる β-ketothiolase, acetoacetyl CoA reductase, 及び PHB synthase を夫々分離精製しその諸性質と調節機構を検討する。更に PHB 生成とフロック形成の変動を種々の条件下に比較検討する。

3. 結果 (1) PHB Synthase²⁾ (β-Hydroxybutyryl CoA $\xrightarrow{\text{PHB synthase}}$ PHB) は, *Bacillus megaterium* と *Rhodospirillum rubrum* 等の PHB 生産菌では PHB 顆粒に結合した不溶性の酵素である。Z. ramigera における PHB synthase の細胞内分布を調べたところ, 10mM グルコースを含む培地で生育しフロックを形成している菌体では, 酵素活性はすべて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, フロックを形成していない菌体では, PHB 顆粒は殆んど含まれておらず, 酵素活性の約50%が菌体粗抽出液の上清画分(100,000×g, 60分)に存在していた。この酵素の細胞内分布の変動を蔗糖密度勾配遠心法で追跡したところ, 可溶性画分の酵素はグルコース添加後速かに顆粒画分へと移行したが, 更に培養を続け, 培地中のグルコースが枯渇すると PHB は減少し, PHB synthase は顆粒画分から再び可溶性画分へと放出された。部分精製した可溶性画分の PHB synthase と [¹⁴C]-D-β-hydroxybutyryl CoA とを 30°で 10分反応させた後, 蔗糖密度勾配下で遠心すると, 顆粒画分の生成ならびに PHB への ¹⁴C 取り込みが見られ, in vitro においても可溶性画分から顆粒画分への酵素の移行が再現された。従って両画分の酵素は本質的には同じものであるが 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考えられる。(2) Acetoacetyl CoA reductase³⁾ は硫酸分画, DEAE-cellulose, Sephadex G-200, hydroxylapatite, 等電気泳動を用いて菌体粗抽出液から約3600倍に精製され, 比活性約600の標局が得られた。Acetoacetyl CoA 還元反応の最適 pH は 8.1, acetoacetyl CoA 及び NADPH に対する K_m は夫々 8.3 μM, 21 μM であった。また高濃度の acetoacetyl CoA による顕著な基質阻害が認められた。(3) β-Ketothiolase⁴⁾ は, プロタミン処理, DEAE-cellulose, phosphocellulose, Sephadex G-200 を用いて粗抽出液から 140 倍に精製され, 比活性 91 のディスク電気泳動的に単一の標局が得られた。この酵素の分子量はゲル濾過法で約 19 万であり, SDS-ディスク電気泳動法により分子量 4 万 4 千の単量体 4 個からなることが分った。2 CH₃CoA → CH₃COCH₂CO CoA + CoA の反応は高濃度の CoA で阻害された。(4) PHB の生成経路 この菌の粗抽出液には, NADPH 依存性で acetoacetyl CoA から D-β-hydroxybutyryl CoA, 及び NADH 依存性で L-β-hydroxybutyryl CoA

を生成する2種の acetoacetyl CoA reductase と共に crotonase の活性も見出された。しかし、菌粗抽出液による crotonyl CoA からの PHB 生成は全く見られず、また [14 C]acetyl CoA の PHB への取り込みは、NADPH 存在下には見られるが、NADH 存在下には見られなかった。従って PHB synthase の基質である D- β -hydroxybutyryl CoA は NADPH 依存性酵素により acetoacetyl CoA が直接還元されて生ずるものと考えられる。また、培地に glucose を添加すると、G6P dehydrogenase の比活性が菌体で急速に上昇することが観察された。(5) PHB とフロック形成 (a) この菌を C 源の限定された培地で生育させた後 glucose を添加すると菌体は約30分で急速に凝集してしまうが、細胞内 PHB は、この時点ではかなり少く、両者の生成は必ずしも平行していない。(b) 代謝阻害剤、KCN (10^{-4} M), DNP, PCMB (10^{-3} M) はフロック形成、PHB 蓄積を共に完全に阻害するので、グルコース、PHB の代謝とフロック形成は一応密接に関連しているものと思われる。(c) グルコースの代謝中間体、pyruvate、乳酸、酢酸はフロック形成を阻害するが、細胞内 PHB 蓄積は阻害しない。特に pyruvate は PHB 蓄積を促進する。(d) 界面活性剤、Tween 20 (1%), Triton X-100 (0.1%), cholate Na (1%) はフロック形成を阻害したが、それ以下の濃度では殆んど阻害が認められない。現在のところ、細胞表面の疎水性の増加によるフロック形成の可能性は不明である。(e) この菌の外膜を単離し、その蛋白成分を SDS-尿素存在下でのスラブゲル電気泳動で検討したが、現在のところ、フロック形成ならびに非形成の菌相互の顕著な差は認められない。(6) 菌体外多糖とフロック形成 *S. namigera* 115 は、PHB を蓄積する一方、*S. namigera* I-16-M とは異なり菌体外に多量の高粘稠多糖体を産出する。*S. namigera* 115 を 0.25% glucose 添加培地で培養すると若干の lag の後フロックを形成しつつ生育し、同時に細胞内に PHB を蓄積するが、菌体外多糖体はそれ以上にやがて capsule 状に徐々に増加する。その後、glucose の枯渇に伴い、まず PHB の減少、フロックの急速な消失が起り、多糖体は capsule 状から slime 状となり、培地は粘稠、黄化する。この多糖体を精製して詳細な構造を検討し、いわゆる 200glucal matrix 形成機構の解明を行いつつある。精製多糖は重金属イオン、殊に鉄イオンを顕著に吸着して沈降する。(7) 目下のところ、*S. namigera* が、特異な物質を細胞表面に生成し、これを介してフロックを形成しているか否かは不明である。かかる物質の存在の有無、細胞膜構造の変化、chemotactic factor 等の詳細な検討が必要と思われる。

- 1) K. Crabtree et al., Appl. Microbiol., 13, 218 (1965).
- 2) T. Fukui et al., Arch. Microbiol., 110, 149 (1976).
- 3) T. SAITO et al., Arch. Microbiol., 114, 211 (1977).
- 4) T. Nishimura et al., Arch. Microbiol., 116, 21 (1978).