

Table 1. Maximum methane production rates from formate, methanol or acetate in fixed-bed reactors in contrast with usual chemostat culture.

Substrate	Fixed bed reactor		Chemostat culture <sup>a</sup>	Fixed bed reactor		Chemostat culture <sup>a</sup>	Fixed bed reactor		Chemostat culture <sup>a</sup>
	baked clay	melted slug		baked clay	melted slug		baked clay	melted slug	
Formate				Acetate			Methanol		
Substrate loading rate (mmol/l/day)	7152	4130	170	668	675	15	875	875	78
Substrate consumption rate (mmol/l/day)	6717	4065	161	398	393	13	465	495	78
Removal (%) <sup>b</sup>	94	98	95	60	58	87	53	57	99
Methane production rate (mmol/l/day)	1720	1010	37	382	335	13	350	339	75
Hydraulic retention time (h)	0.4	0.6	18	3.6	3.6	161	1.3	1.3	24
Methane yield (mol CH <sub>4</sub> /mol substrate)	0.26	0.25	0.23	0.96	0.85	0.97	0.72	0.70	0.60
Cell concentration (g/l)	20.1	14.9	0.07	44.0	29.4	0.48	NT <sup>c</sup>	NT <sup>c</sup>	0.25

<sup>a</sup> Without support material. <sup>b</sup> Removal efficiency of substrate added. <sup>c</sup> Not tested.

に短縮できることを示した。これはリアクター内に約20 g/lに相当する菌体(ケルダール窒素よりの見積り)を保持できたためと考えられる(Table 1). Fig. 2に発泡煉石を用いた場合のギ酸のメタン発酵を示す。308 g/l/day のギ酸負荷まで供給されたギ酸はほぼ完全にメタン化されることを示しており、消費ギ酸基準のメタン収率はほぼ理論値(0.25 mol CH<sub>4</sub>/mol HCOOH)を示している。

上述のように、ギ酸資化メタン生成菌の付着に発泡煉石、溶融スラグが有効であったので、これらの担体を用いてメタノールおよび酢酸資化メタン生成菌についても同様の検討を行った。これらの結果を前節で得られたケモスタットでの結果と併記してTable 1に示す。実験室規模で得られたデータではあるが、固定床メタン発酵は、槽内菌体濃度をケモスタット培養(0.07~0.48 g/l)に比べて200~300倍増加できるため、基質

の消費速度、メタンの生成速度の増大および滞留時間の著しい短縮(18 h→0.4 h(ギ酸)、161 h→3.6 h(酢酸)、24 h→1.3 h(メタノール))が図れることが判明した。

## 文 献

- 1) Nishio, N., Mazumder, T. K., Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, 62, 487 (1985).
- 2) Hughes, D. E., Stafford, D. A., Wheatley, B. I., Baader, W., Lettinga, G., Nyns, E. J., Verstraete, W., Wentworth, R. L.: *Anaerobic Digestion 1981*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam (1982).
- 3) Nishio, N., Eguchi, S. Y., Kawashima, H., Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, 61, 557 (1983).
- 4) Zeikus, J. G.: *Bacteriol. Rev.*, 41, 514 (1977).
- 5) Nishio, N., Kayawake, E., Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, 63, 205 (1985).

## 3. メタン生成細菌の脂質

メタン生成細菌の細胞(内)膜は、メタン生成反応と共にエネルギー獲得系の場として重要であるが<sup>13</sup>、この膜についての知見はきわめて乏しい。メタン菌の膜の主要構成成分である脂質はエーテル型のものだけで、他の生物のものと著しく異なっており、脂質生化学的にみても興味深いものがある。

メタン菌の極性脂質の骨格は、他の古細菌(高度好

塩菌、好熱好酸菌)と同様、diphytanyl glycerol diether(グルセロール1分子にC<sub>20</sub>のイソプレノイドアルコールである phytanol 2分子がエーテル結合したもの、diacylglycerol のエーテル型アノログ)と dibiphytanyl diglycerol tetraether (phytanol 2分子が頭一頭結合し、両端に水酸基をもつ2価アルコール2分子がグリセロール2分子の間を架橋するよう四つのエー

テル結合で結合したもの)の2種類である。<sup>2)</sup> *Methanococcus* や *Methanosaerina* など球形のメタン菌には diphytanyl glycerol diether だけがあり、その他の大部分のメタン菌には両方が含まれている。<sup>2)</sup> 高度好熱メタン菌 *Methanococcus jannaschii* だけは特殊で、monobiphytanyl glycerol diether (グリセロール1分子に biphytanol 1分子がマクロサイクリックなジエーテルをつくっているもの)が見いだされている。<sup>3)</sup>

メタン菌の極性脂質の構造が初めて明らかになったのは、Kates らによる *Methanospirillum hungatei* の7種のリン脂質、糖脂質、リン糖脂質である。<sup>4)</sup> リン脂質は phosphatidylglycerol のジエーテル型アノログであり、糖脂質は diphytanyl glycerol diether あるいは dibiphytanyl diglycerol tetraether に glucose, galactose などが2分子結合したもの、リン糖脂質は糖脂質に glycerophosphate の結合した構造をもっている。これらを含めて、これまでに研究された古細菌のエーテル型脂質ではアミノ基をもつもので構造の解明されたものがなかったが、われわれは、*Methanobrevibacter arboriphilus* A2 株にニンヒドリン陽性のリン脂質 (PNL2 と略称する) を発見し、その構造を決定した。

PNL2 はシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) や DEAE カラムクロマトグラフィーでエステル型 phosphatidylserine (PS) と挙動が一致した。赤外スペクトルでエーテル結合、アミノ基、リン酸基の存在が示され、エステル結合は見いだされなかった。PNL2 のアセトリシス生成物は diphytanyl glycerol diether のアセチル化物とマススペクトルが一致し、これからアセチル基をはずしたものは、*M. hungatei* の 2, 3-di-*O*-phytanyl glycerol と TLC 上で同一であった。さらに PNL2 の炭化水素鎖の構造を確かめるために、この脂質を HI 分解すると、alkyl iodide が得られ、それはガスクロマトグラフにより phytanyl iodide と確認された。これらの結果から PNL2 の骨格構造は diphytanyl glycerol diether と決定された。PNL2 の極性基部分を分離して構造を確認するために種々の加水分解法を試みたが、その中で HF 分解が最も効果的で、62%の PNL2 が分解し、水溶性物質として serine とわずかの phosphoserine およびアンモニアがアミノ酸分析計で確認され、これらの合計は分解した PNL2 にほぼ等しかった。有機溶媒可溶性のリン酸化合物としてはエーテル型の phosphatidic acid が得られた。FD マススペクトルと陰イオンモードの FAB マススペクトルにより、PNL2 の分子量は 819 と決定され、

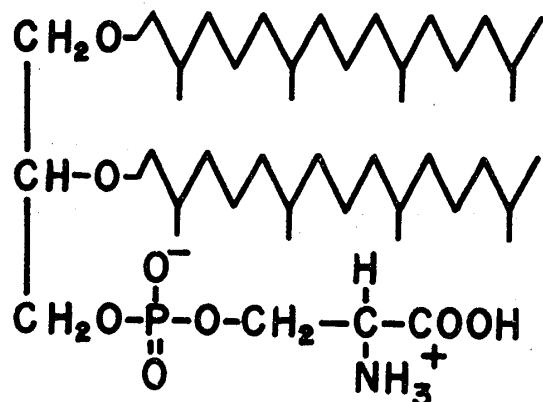


Fig. 1.

diphytanyl glycerol と phosphoserine で構造のすべてが説明でき、<sup>1</sup>H-NMR でもこの構造と矛盾しないスペクトルが得られた。従って、PNL2 の構造は phosphatidylserine のジエーテル型アノログ (Fig. 1) と決定された。<sup>5)</sup>しかし、serine や glycerol ether の立体構造は未定である。これ以外の脂質の構造はまだ予備解析の域を出ないが、glucose をもつ C<sub>20</sub> ジエーテル型および C<sub>40</sub> テトラエーテル型糖脂質 (GL1) や inositol をもつエーテル型リン脂質などが存在する。

アミノ基含有脂質の存在の一般性と極性脂質パターンとメタン菌の分類の関係を調べるために、7属12種17株のメタン菌の全脂質を TLC で展開後、ニンヒドリン陽性のスポットの有無とその移動度を検討した。<sup>6)</sup> そのうち 7属 9 株については PNL2 との微細な相違もはっきりさせるため、<sup>32</sup>P でラベルした *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH 株の PNL2 を各菌株の脂質と混合して TLC で展開し、オートラジオグラムとニンヒドリン陽性スポットの重なりを調べた。すべての株にニンヒドリン陽性のスポットが検出されたが、そのうち、PNL2 と完全に一致する脂質をもっているのは *Methanobacterium* 属、*Methanobrevibacter* 属、*Methanococcus* 属で、その前二者には特徴的なリン糖脂質 (PGL1) があった。*Methanospirillum hungatei* では、Kates らはアミノ脂質を報告していないが、われわれは既知のアミノ脂質とは異なるニンヒドリン陽性のスポット (PX) を検出した。PX は *Methanomicrobium paynteri*, *Methanogenium cariaci* など *Methanomicrobiaceae* 科に共通して存在するようである。以上のように、アミノ基をもつ脂質はメタン菌に広く存在し、それぞれの科によって特徴的である。

*M. thermoautotrophicum* で脂質の抽出条件を詳しく検討したところ、中性抽出では不完全にしか抽出さ

れず、酸性でよく抽出され、特にアミノリン糖脂質 PGL1 の抽出率に著しい相違があることがわかった。<sup>7)</sup> また酸性条件下では PGL1 が GL1 に転換（分解）することを示唆するデータもあり、この二つの脂質の構造的関連性に興味がもたれている。

エーテル結合型脂質の生合成研究はきわめて未開拓の分野であるが、*M. thermoautotrophicum* で <sup>32</sup>P をリン脂質へとりこませると、<sup>32</sup>P の比放射能が最も速く上昇し、かつ、速くチエイスされる微量の脂質が見つかった。<sup>8)</sup> この脂質の構造は未知であるが、リン脂質生合成経路上で他の脂質の前駆体のような位置を占める可能性があり、エーテル型脂質生合成解明の手がかりが得られるものと思われる。また、PNL2 やイノシトールリン脂質は速い代謝回転を示し、その主な生成物は PGL1 である。

## 文 献

- 1) Daniels, L, Sparling, R., Sprott, G. D.: *Biochim. Biophys. Acta*, 763, 113 (1984).
- 2) Tornabene, T. G., Langworthy, T. A.: *Science*, 203, 51 (1979).
- 3) Comita, P. B., Gagosian, R. B., Pang, H., Costello, C. E.: *J. Biol. Chem.*, 259, 15234 (1984).
- 4) Kushwaha, S. C., Kates, M., Sprott, G. D., Smith, I. C. P.: *Biochim. Biophys. Acta*, 664, 156 (1981).
- 5) Morii, H., Nishihara, M., Ohga, M., Koga, Y.: *J. Lipid Res.*, in press (1986).
- 6) 大神真美, 森井宏幸, 西原正照, 古賀洋介: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 259 (1985).
- 7) 西原正照, 森井宏幸, 古賀洋介: 生化学, 57, 1151 (1985).
- 8) 西原正照, 古賀洋介, 森井宏幸: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 259 (1985).

## 4. メタン菌電子伝達物質 $F_{420}$ の蛍光特性を用いたメタン菌の活性計測法

メタン発酵の運用・制御にとって最も重要な因子は、メタン菌の活性である。しかし、メタン発酵には多数の微生物が共生系として機能しているため、メタン菌のみを分離計測し、菌体活性を知ることは至難とされていた。筆者らは蛍光法を用いて、多数の微生物の中からメタン菌に由来する蛍光信号を分離計測することが可能のことを見いだし、メタン発酵時におけるメタン菌活性の計測法を開発した。本稿では、筆者らの研究成果に基づいたメタン菌活性蛍光計測法について紹介する。

### 1. メタン菌電子伝達物質 $F_{420}$ とメタン生成反応

メタン菌は、進化分類学的に古細菌 (*Archaeabacteria*) に分類され、<sup>9)</sup> 原核生物である一般の微生物とは異なる代謝系をもっている。メタン菌のエネルギー代謝系には、 $F_{420}$  という電子伝達物質が存在する。<sup>2,3)</sup>  $F_{420}$  は、メタン菌以外の微生物には存在しないメタン菌固有の電子伝達物質であり、メタン生成反応に電子供与体として中心的な役割を演じている。

Fig. 1 にメタン生成反応を示す。CO<sub>2</sub> のメチル化は、4段の還元反応で構成されており、各段共 2 電子還元反応で計 8 電子が  $F_{420}$  経由で供給される。<sup>4)</sup> 図中 X は、後 2 段に対しては補酵素 M(CoM) とされているが、<sup>5)</sup> 前 2 段における X は同定されていない。また、 $F_{430}$  という Ni を含む補酵素が最終段の還元反応に寄与して

いるとされているが、<sup>6)</sup> その詳細機構は知られていない。

上記したように、メタン菌活性を支配しているメタン生成機構 (ATP 生成系としての機能を合わせもつ) において、特に重要な役割を演じている  $F_{420}$  に着目し、メタン発酵液の中から  $F_{420}$  を分離計測できるか否かについて検討した。

### 2. メタン菌活性計測法

$F_{420}$  の計測手段としてさまざまな方法が考えられるが、筆者らは測定が簡便で精度の高い蛍光分光法を採用した。Fig. 2 にメタン菌から抽出精製した  $F_{420}$  の蛍光励起スペクトルを示す。これは中性条件下での結果であり、 $F_{420}$  は 405, 475 nm にそれぞれ励起、発光ピークをもつ特徴的なスペクトルを示す。<sup>7,8)</sup>

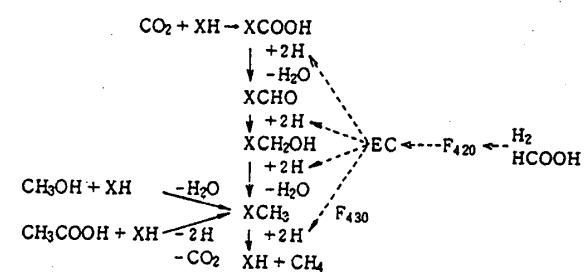


Fig. 1. Possible pathway of methane formation.  
EC: Enzyme complex  
→→: electron flow