

水溶液中でのプロテアーゼの縮合作用

厳格な反応特異性など酵素本来の触媒特性に由来する利点に加えて、固定化などの各種の修飾法による酵素の安定化やリアクターへの高機能化、さらには有機溶媒を用いる反応の確立など酵素利用技術の進歩とも相まって、近年、有用物質の生産手段として酵素が盛んに用いられている。

酵素法によるペプチド合成では、反応条件の設定が重要なポイントであり、とくに、カルボキシル成分としての基質やアミン成分の選択および逆反応（加水分解反応）の防止などを考慮する必要があるとされている。例えば、逆反応の防止については、生成物が溶解度の減少によって沈殿するように反応に用いる溶媒を選択する一方、矛め反応に関与しない官能基を保護した基質を用いるいわゆる沈殿系による方法や、原料成分の濃度を高めることにより逆反応を抑制する水を溶媒とする可溶系による方法などが採用されている。⁴⁾しかし、前者の方法では、比較的小さい保護ペプチドの合成には利用できるが、高分子ペプチドやタンパク質の半合成には不適當であるだけでなく、タンパク食品の加工などでは用いる有機溶媒が厳しく制限されている。また、後者の方法では、用いる基質によっては水に対する溶解性に限界があり、生成物の収率を高めることが困難な場合も多い。一方、水溶媒中における効率のよいプロテアーゼの合成反応を達成するにあたっては、反応条件だけでなく、用いる酵素の性質も重要な因子であることは当然であり、例えば、特定のペプチドを合成する場合、酵素の活性部位におけるサブサイトの特性がその反応に大きな影響を与えることも報告されている。²⁾

Streptomyces cellulosae の生産するプロテアーゼは、中性付近に作用最適 pH をもつキモトリプシンタイプのセリンプロテアーゼであるが、水溶液中で顕著な縮合作用を発現し、遊離のジペプチドから80～85%の収率でその二量体や三量体を合成するという特徴をもっている。³⁾ 本酵素のサブサイトの特性を検討するために、Leu-Gly 単独あるいは Leu-Gly と Leu-NH₂ の混合系を用い、とくに縮合反応に主眼をおいた速度論的解析が行われた。その結果、酵素の触媒中心をはさんで、サブサイト S₂ と S₁ および S₁' と S₂' に Leu-Gly が結合する場合の解離定数は、それぞれ 0.65 M と 0.016 M であることが明らかにされた。したがっ

て、本酵素の活性部位のサブサイト S₁' と S₂' がサブサイト S₂ と S₁ に比べ Leu-Gly に対する親和性が非常に大きいことが加水分解に優先して (Leu-Gly)₂ や (Leu-Gly)₃ を合成することの主な原因であると考えられた。^{4,5)}

このように、活性部位におけるサブサイトの特性など酵素本来の性質をも考慮し、新しい視点で酵素を選択すれば、水溶液中での酵素による有用ペプチド合成の可能性がさらに拡大するのではないかと考えられる。

- 1) 森原, 岡: 化学の領域, 36, 444 (1982).
- 2) Morihara, K., Oka, T.: *J. Biochem.*, 89, 385 (1981).
- 3) Muro, T., Tominaga, Y., Okada, S.: *Agric Biol. Chem.*, 48, 1231 (1984).
- 4) Muro, T., Tominaga, Y., Okada, S.: *J. Biochem.*, 99, 1625 (1986).
- 5) Muro, T., Tominaga, Y., Okada, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2657 (1987).

(大阪市工研 富永嘉男)

原生動物纖毛虫類による水道カビ臭の除去

富栄養化の進行した湖沼水を上水源とする地域においては、水道水にカビ臭が着臭するということで大きな問題となっている。このカビ臭の原因物質としては *Streptomyces* 属放線菌の産生する臭気物質および *Phormidium tenue*, *Oscillatoria tenuis* などの糸状藍藻類の産生する臭気物質などが挙げられる。これらの臭気物質としては 2-MIB (2-methylisoborneol), geosmin などが同定されている。これらはガスクロマトグラフィーで検出できるが、一般的には TON (Threshold odor number) という官能試験で評価される。これらのカビ臭は飲料水として大きな問題であることからその対策に力がそそがれるようになってきた。

ところで現在の上水処理工程は、取水→前塩素→凝集沈殿→砂ろ過→活性炭→後塩素からなるが、この工程の中でカビ臭除去能に大きな効果を有するのが活性炭である。通常の湖沼水の場合はこの処理工程で十分であるが、富栄養化の進行した湖沼水を上水源とする浄水場では、前塩素の前に接触材を充填した生物膜法の一つである接触曝気法が活用されるようになってきた。その目的は、排水の生物処理における生物膜法の場合と同様に、生物膜中に存在する細菌、原生動物、微小後生動物の働きにより、藻類をはじめとする汚濁物質を酸化分解させることにある。これらの生物膜

の中にカビ臭を生成する糸状藍藻類を捕食分解する *Trithigmostoma cucullulus* という原生動物が生息していることが見い出された。

この原生動物は築器（やなぎ）という特殊な細胞小器官を有し、糸状藍藻類を 30 μm /秒前後の速度で捕食できる。この糸状藍藻類は、捕食後食胞膜で包みこまれ代謝・分解される。

カビ臭生成糸状藍藻類 *P. tenue* を原生動物 *T. cucullulus* が捕食することによりカビ臭物質が除去されることについては、*T. cucullulus* の存在する場合としない場合における二者培養実験より確認されている。二者培養実験によると、*T. cucullulus* の存在する系では *P. tenue* は捕食され効果的にクロロフィル *a* は減少し、同時にカビ臭 TON も著しく低下することが明らかにされている。また、この場合、*P. tenue* の生成するカビ臭除去能に対する細菌および *T. cucullulus* の効果を比較すると、細菌のみではカビ臭除去能は小さいことから、*T. cucullulus* が捕食することがカビ臭を分解除去する上で重要であることが明らかにされている。

以上の事実は、汚濁湖沼水を生物膜を活用して処理する場合、反応槽内にこれらの原生動物を大量に定着させる技術が確立できれば、カビ臭問題の解決に大きく貢献できることを意味している。今後の研究成果が期待される。

- 1) 稲森, 国安, 須藤: 下水道協会誌, 23 (8) 74 (1986).
- 2) 稲森ら: 日本水処理生物学会第24回大会講演要旨集 (1987).

(国立公害研 稲森悠平)

酢酸からのメタン生成経路

酢酸は、 H_2/CO_2 、ギ酸などと共にメタン生成の基質となるが、とくに廃水処理のメタン発酵では生成メタンの70%近くが酢酸由来のため、酢酸資化性メタン生成細菌の役割が非常に重要となる。

酢酸資化性メタン生成細菌として、*Methanococcus halophilus*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanosarcina vacuolata*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanothrix concilii* および *Methanothrix soehngenii* が現在知られている。 H_2/CO_2 、ギ酸からのメタン生成経路は、Wolfe ら¹⁾によってその全容

がほぼ解明されているのに対し、酢酸の場合は研究が遅れている。これは、 H_2/CO_2 、ギ酸を資化するメタン生成細菌（例えば、*Mathanobacterium thermoautotrophicum*; $\mu=0.69\text{ h}^{-1}$ ）に対して酢酸資化性菌（*Methanosarcina*; $\mu=2\sim3\times10^{-2}\text{ h}^{-1}$, *Methanothrix*; $\mu=3\times10^{-3}\text{ h}^{-1}$ ）の増殖は非常に遅く、培養が困難なことに起因する。また研究対象は大半が *Methanosarcina* であるが、この菌は酢酸以外に H_2/CO_2 、メタノール、メチルアミン類を利用できることから、基質の違いによるメタン生成機構の差異を比較する上でも多く用いられている。

酢酸からのメタン生成反応は、主に酢酸の開裂 ($^*\text{CH}_3^*\text{COOH}\rightarrow^*\text{CH}_4+^*\text{CO}_2$) により、メタンはメチル基から、 CO_2 はカルボキシル基から生成されるが、一部のメチル基を CO_2 に酸化して、その際に生じる還元力を用いて CO_2 からメタンを生成する経路も存在すると言われる。このメチル基の酸化反応は、一般に H_2/CO_2 、メタノール、メチルアミン類の基質が共存する場合に顕著となり、酢酸の酸化による生成還元力を利用して、これらの他基質からメタンが生成され、他基質消失後は、酢酸からのメタン生成が増加する。

酢酸の開裂²⁾では、acetate kinase および phosphotransacetylase によりアセチル成分に変換、活性化された後にメチル中間体とカルボキシル中間体が生じる。メチル中間体のメチル基は、メタン生成細菌に共通の補酵素 $\text{HS-C}_0\text{M}$ に転移されて $\text{CH}_3\text{-S-C}_0\text{M}$ を生じるが、このメチルトランスフェラーゼ系では、メタノールからのメタン生成と同様に、コリノイド ($\text{CH}_3\text{-B}_{12}$) が関与すると推定される。カルボニル中間体は、carbon monoxide dehydrogenase により CO_2 に酸化され、生成した還元力は $\text{CH}_3\text{-S-C}_0\text{M}$ のメタンへの還元反応に利用される。このメチルレダクターゼ系は、*M. thermoautotrophicum* で明らかにされた経路に従うと予想されるが、異なる点は、還元反応に関与するメタン生成細菌特有の補酵素 F_{420} の還元型は、hydrogenase および formate dehydrogenase で生成されるのに対して、酢酸では carbon monoxide dehydrogenase が作用し、また電子運搬体として F_{420} が果たして働いているか否かは確認されていない。

このように酢酸基質のメタン生成経路は未だ不明な点が多く、メタン発酵槽ではとくに重要とされている *Methanothrix*³⁾ ではほとんど研究されていない。ま