

新しい PQQ 依存性アルコール脱水素酵素

山口大学農学部生物資源科学科 外山博英

ピロロキノリンキノン (PQQ) は NAD や FAD に次いで発見された、酸化還元酵素の第三の補酵素である。PQQ は自然界に広く存在し、この物質を補酵素とする酵素も現在までに多数報告されている。¹⁾ 哺乳類由来の酵素でも PQQ を含むとされたものがいくつか報告されたが現在ではほぼ否定されており、はっきりと PQQ を含むことが確認されている酵素はグラム陰性細菌のペリプラズム空間に存在する酵素のみである。PQQ の生理作用としては、微生物の生育促進や白内障の発症抑制などが知られている。¹⁾

PQQ 依存性アルコール脱水素酵素は、呼吸鎖と連結してアルコールの酸化発酵を行い、エネルギー産生に係っていることが示されている。この酵素のサブユニット構造に着目すると、大きく分けて3種類の酵素群に分類することができる。すなわち、PQQ のみを含むサブユニットからなる酵素 (I 型, キノプロテイン), PQQ とヘム *c* を一つずつ含む酵素 (II 型, キノヘモプロテイン), II 型のサブユニットとチトクロム *c* および機能不明のサブユニットの計3種のペプチドから構成される酵素 (III 型, キノヘモプロテイン-チトクロム複合体) である。

Pseudomonas aeruginosa などのアルコール脱水素酵素は分子量約6万のサブユニット2個からなる酵素で、サブユニット1個あたり1個のPQQを含んでいる。²⁾ メタノールに対しても活性を示すことや、活性の至適 pH (9 付近) やサブユニットの分子量、アンモニウムイオンによる活性化といった性質がメチロトロフのメタノール脱水素酵素と似ていることから、これらアルコール脱水素酵素がメタノール脱水素酵素とよく似たタンパク質構造を持つと考えられる。しかしメタノール脱水素酵素とは違い、メタノールに対する K_m 値はエタノール (13–18 μM) に比べ非常に大きい (約1,000倍)。最近、メタノール脱水素酵素はホモ二量体ではなく、分子量1万程度のペプチドをさらに含んでいることが示され、遺伝子上にも対応する配列が存在していた。³⁾ さらに *P. aeruginosa* の酵素も分子量1万程度のペプチドを含んでいる (私信)。この型のアルコール脱水素酵素は可溶性酵素として存在しており、生体内でチトクロム *c* を介して末端オキシダーゼと連結する呼吸鎖を形成しているものと予想されるが、現在のところ精製酵素を用いた再構成実験は、生体内での酸化速度を説明できるまでには成功していない。これらの酵素は基質特異性が広く、種々の分岐鎖アルコールやアルデヒドとも反応する。

II 型の酵素としては *Comamonas (Pseudomonas) testosteroni* の酵素が知られている。⁴⁾ この酵素は PQQ を含まないアポ型酵素であったが、PQQ を加え培養した菌体からはホロ型酵素として得られ、またアポ型酵素に PQQ を加えれば完全な活性が得られる。最近、この II 型のアルコール脱水素酵素をホロ型酵素として持つ *Pseudomonas* 属菌が単離され、酵素が精製された。さらにこの菌をグリセロールを炭素源として培養した場合には基質特異性の異なる酵素が誘導され、この酵素も同じく II 型の酵素であることが示された (私信)。これらの酵素は分子量は約7万で、PQQ とヘム *c* をそれぞれ1個含む単量体の可溶性酵素である。これらの酵素はメタノールとは反応せず、エタノールよりもブタノールなどの中鎖アルコールとよく反応する。種々の分岐鎖アルコールやアルデヒドとも反応する。至適 pH は I 型の酵素に比べ低い (7.7 付近)。また、アンモニウムイオンによる活性化はほとんどみられない。

III 型の酵素は *Acetobacter aceti* や *Gluconobacter suboxydans* などの酢酸発酵菌に存在し、上の二種の酵素とは違い膜結合型酵素である。⁵⁾ エタノールに対する比活性は上述の二つの型の酵素に比べ高く (約10倍)、至適 pH は低く (5 付近)、基質特異性は比較的厳密でメタノールや分岐鎖アルコールとは反応しない。アンモニウムイオンによる活性化もみられない。精製酵素を用いて試験管内で呼吸鎖の再構成に成功しており、⁶⁾ この酵素が連結する呼吸鎖の末端酵素はユビキノールオキシダーゼであることがわかっている。

分子進化が単純なものから複雑で精巧なものへと進むものだと考えると、アルコール脱水素酵素は I 型から II 型、III 型へと進化したものと想像される。現在のところ DNA レベルでの一次構造がわかっているものは III 型酵素のサブユニットのみであり、C 末端側 1/5 の部分に *Methylococcus capsulatus* のチトクロム *c*₅₅₅ と相同性のある領域が存在する以外はメタノール脱水素酵素と相同性が見られた。⁷⁾ この結果は上述の分子進化の仮説を支持する。しかし、I 型酵素はチトクロム *c* を介した呼吸鎖を形成しているだろうし、III 型酵素はユビキノールを介した呼吸鎖を形成しているから、起源となった原始タンパク質は同じであったとしてもその機能はかなりの変貌を遂げてきているようである。今後アミノ酸の一次配列の解明や呼吸鎖の再構成実験の結果が期待される。アルコール脱水素酵素は NAD 依存のものが古くから知られており、アルコールの酸化の問題は古びたもののように見られる。しかし、それらの酵素とは別に上述のような PQQ 酵素が機能していることは、それらが役割分担をしてい

るものと考えられる。グラム陰性菌はなぜ NAD や FAD の他に PQQ を補酵素として準備したのか。PQQ 依存性アルコール脱水素酵素の分子進化や PQQ の微生物に対する生育促進作用の問題と共に興味深い問題である。

- 1) Ameyama, M. et al.: *Vitamins and Hormones*, **46**, 229 (1991).
- 2) Rupp, M. and Görisch, H.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **369**, 431 (1988).
- 3) Anderson, D. J. and Lidstrom, M. E.: *J. Bacteriol.*, **170**, 2254 (1988).
- 4) Groen, B. W. et al.: *Biochem. J.*, **234**, 611 (1986).
- 5) Adachi, O. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2045 (1978).
- 6) Matsushita, K. et al.: *J. Bacteriol.*, **173**, 3440 (1991).
- 7) Inoue, T. et al.: *J. Bacteriol.*, **171**, 3115 (1989).

リパーゼ生産菌による脂質含量の高い廃水の処理

八戸工業大学食品工学研究所 奥田慎一

食品加工場をはじめ、食堂や家庭の廃水の水処理で動植物性油脂を除去することは一つの大きな課題である。われわれが見学した食肉処理場では、豚の内臓を煮沸しており、この過程で生じる廃水は処理場における他の廃水と異なり、脂質含量がきわめて高く温度も高い。そのため、この脂質含量の高い廃水は他の一般廃水と別の流路で一旦貯留槽に貯められる。この貯留槽の付近は悪臭が立ちこめていて、廃水の温度が下がると大部分の脂質が浮いてくるので、これをすくい出して処理業者に処理を依頼していた。また、別の食肉処理場では、加圧浮上により廃水中の脂質を分離し、浮上脂質の処理はやはり処理業者に依頼していた。このように、廃水中の動植物性脂質は主として物理的方法により除去されている。もちろん、物理的方法だけでは脂質の除去が不完全であり、残存脂質は曝気槽や回転円盤法などの生物的处理により除去される。上記のような脂質含量の高い廃水は通常の生物的处理法では処理することができない。

そこで、単離されたリパーゼ生産菌を用いて食肉処理場の廃水を生物的方法だけで処理することが検討された。通気攪拌には曝気槽を用いることができず、振とう培養が行われた。食肉処理場から分離された *Bacillus* sp. と同定された菌株はオリーブ油を資化してよく生育し、かつオリーブ油、ラード、牛脂、および揚げ物などに使用したサラダ油を効果的に除去した。また、上記の温廃水を用いても一晩振とう培養すると脂質のみならず、悪臭も除去された。この実験結果より、エアーストーン（曝気槽）を用いてこの菌によるオリーブ油の除去が試みられたが、振とう培養では水槽の内壁の脂質は除去できるものの、エアーストーンでは除去されなかった。この二つのシステムの違いを考えて、水槽の表面から脂質を含む廃水、菌体、および空気を吸い、水槽の底部に返送する「サーキュレーション法」と名づけた通気攪拌法が考案された。¹⁾ このサーキュレーション法で処理されると、脂質は浮上分離することなくほぼ90%の脂質が除去された。最終的に廃水の一時処理としてサーキュレーション法を、二次処理として活性汚泥法が採用された結果、含油廃水の生物的連続運転が可能となった。¹⁾

廃水中に脂質が存在すると、下水管や廃水処理施設にいろいろな問題を引き起こす。²⁾ また、脂質はボール状に固まったり、水の表面に汚泥状のブランケットを形成してポンプ場などの施設でトラブルの原因となる。³⁾ 上記のように比重の差を利用して脂質を物理的方法で除去するのがもっとも簡単な方法であるが、⁴⁾ 脂質がエマルジョンになっている場合にはこれらの方法で除去するのは困難である。

生物的处理により脂質を除去する方法は他にも報告されているが、今回開発された生物的处理法は実用化されており、既存の廃水処理施設を生かし、しかも効率よく処理することができるすぐれた方法と考えられる。

- 1) Okuda, S. et al.: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 624 (1991).
- 2) Metcalf and Eddy, Inc.: *Waste Water Engineering: Treatment, Disposal, Reuse*, p. 84, McGraw-Hill, Inc., New York (1979).
- 3) Gilde, L. C. and Aly, O. M.: In H. S. Azad (Ed.) *Industrial Wastewater Management Handbook*, p. 5, McGraw-Hill, Inc., New York (1976).
- 4) Metcalf and Eddy, Inc.: *Waste Water Engineering: Treatment, Disposal, Reuse*, p. 333, McGraw-Hill, Inc., New York (1979).