

## 活性汚泥の処理と利用に関する研究

### Studies on the utilization and disposal of activated sludge

代表研究者	京都大学名誉教授 Emeritus Prof., Kyoto Univ. Kenkichi TOMITA	富田 謙吉
協同研究者	京都大学薬学部教授 Prof., Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ. Atsushi ICHIKAWA	市川 厚
	京都大学薬学部助教授 Assoc. Prof., Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ. Terumi SAITO	齊藤 光實
	京都大学薬学部助手 Instructor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ. Tetsuya FUKUI	福井 哲也

The activated sludge is widely utilized for the processing of waste water but the studies on the microorganisms which play a central role in the activated sludge treatment have not been fully performed yet. In this report, based on the study of the metabolism of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) in the bacteria isolated from the activated sludge, we investigated the following three items:

#### 1. Mechanism of PHB degradation by the extracellular PHB depolymerizing enzymes.

A strain of *Alcaligenes faecalis*, *A. faecalis* T<sub>1</sub>, which was isolated from the activated sludge, excreted extracellular D(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase and PHB depolymerase. It was found that the purified oligomer hydrolase hydrolyzed only water-soluble D(-)-3-hydroxybutyrate oligomers but not water-insoluble PHB. Analysis of hydrolysates of the oligomer esters with (3-<sup>14</sup>C) D(-)-3-hydroxybutyrate at the hydroxyl terminus suggested that the enzyme hydrolyzed these substrates from the carboxy terminus, releasing D(-)-3-hydroxybutyrate units one by one.

The PHB depolymerase was purified with a high yield by chromatography on butyl-Toyopearl. The purified depolymerase hydrolyzed not only hydrophobic PHB but also water-soluble D(-)-3-hydroxybutyrate oligomers larger than trimer, regardless of their solubilities in water. Kinetic analyses and modification experiments of PHB depolymerase with various reagents such as Triton X-100, dithiothreitol and trypsin suggested the presence of hydrophobic site, which interacts with PHB, in addition to the substrate cleaving site which is common to both PHB and the water-soluble oligomers.

For determination of the primary structure of the depolymerase, the cloning of PHB depolymerase of *A. faecalis* was undertaken. The enzyme expressed in *E. coli* by inserting pUC 8 containing the cloned PHB depolymerase gene of *A. faecalis* was not distinguished from that of *A. faecalis* in the various properties examined.

#### 2. Physiological role of acetoacetyl-CoA synthetase in animals.

Based on the known properties of acetoacetyl-CoA synthetase in *Zoogloea ramigera* I-16-M, which was demonstrated to be involved in the metabolism of PHB, acetoacetyl-CoA synthetase was purified from rat liver to electrophoretic homogeneity. The purified enzyme was active only on acetoacetate and to a lesser extent on L(+)-3-hydroxybutyrate. Using the antibody raised against the purified acetoacetyl-CoA synthetase in rabbit, the enzyme concentration in various rat tissues was examined. The enzyme concentration in rat liver cytosol was increased several

fold by feeding rats diet containing hypocholesterolemic agents and decreased by fasting the animals or by feeding them a diet containing cholesterol. Among the various rat tissues examined, the concentrations of immunologically crossreactive enzyme were higher in lipogenic tissues, such as brain, adipose tissues and liver, than in other tissues, such as lung, spleen, heart and kidney.

3. Development of new enzymatic clinical assay for D(-)-3-hydroxybutyrate and acetoacetate.

Using several enzymes which are involved in PHB metabolism, the new enzymatic assays for D(-)-3-hydroxybutyrate and acetoacetate were developed to overcome the defect of Williamson's methods which have been used as standard assay methods. Acetoacetyl-CoA synthetase from *Z. ramigera* I-16-M was used to make the equilibrium of the reaction of D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase favorable for the assay of D(-)-3-hydroxybutyrate by converting acetoacetate formed to acetoacetyl-CoA. In the assay of acetoacetate, acetoacetyl-CoA synthetase which has a very strict substrate specificity was also used to convert acetoacetate to acetoacetyl-CoA which was then reduced to L(+)-3-hydroxybutyryl-CoA by the action of 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. Both methods had a good correlation to the Williamson's methods in determination of D(-)-3-hydroxybutyrate and acetoacetate in the blood from control, starved or diabetic rats.

## 研究目的

現在、都市下水や各種産業廃水の浄化処理には微生物の旺盛な有機物、無機物の資化能を利用した活性汚泥法が広く用いられているが、活性汚泥法の主役である活性汚泥菌の生化学的研究、その生成物の代謝およびその実際の応用についての研究はいまだ十分には行なわれていない。

代表研究者らは、活性汚泥菌の一種 *Zoogloea ramigera* I-16-M が増殖に伴い菌体内に D(-)-3-ヒドロキシ酪酸のポリマーエステルであり、水に全く不溶のポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) をエネルギー源、炭素源として大量に蓄積する特性に注目して、この菌の細胞内 PHB 代謝系の検討を行ってきた。本研究は、細菌由来の酵素による PHB の段階的分解、あるいは化学合成により種々の分子量の D(-)-3-ヒドロキシ酪酸オリゴマーを調製し、PHB ならびにこれらの PHB 関連化合物の微生物、動物における分解、代謝過程を検討し、これらの基礎知見を基に、生医学材料、生分解性ポリマーなどへの応用を試み、活性汚泥に由来する資源の活用と余剰汚泥の減少化処理に貢献することを目的とする。このために、(I) 活性汚泥菌 *Alcaligenes faecalis* T<sub>1</sub> における菌体外 PHB 分解系に参与する酵素による PHB ならびに関連化合物の加水分解の機構、(II) これまでの研

究で *Z. ramigera* I-16-M における PHB 代謝に参与していることが明らかとなったアセトアセチル CoA 合成酵素の動物における役割、(III) PHB 代謝に参与する細菌由来の諸酵素を組み合わせた新しいケトン体測定法の開発の 3 項目について検討を加えた。

## 研究の経過・成果

### (I) *A. faecalis* T<sub>1</sub> の PHB 分解系

活性汚泥中には PHB を資化する菌が当然存在することが予想されるので、我々は PHB 資化菌の分離を試み、京都市の污水处理場の活性汚泥より PHB を唯一の炭素源としてこれを分解し、生育し得る菌を得、そのうち PHB 資化能の最も高い桿菌の一種を *Alcaligenes faecalis* と同定し T<sub>1</sub> と命名した。この菌が菌体外に分泌する PHB 分解酵素系を検索したところ、水溶性の D(-)-3-ヒドロキシ酪酸オリゴマー (重合度 2~約 12) を加水分解するオリゴマーヒドロラーゼと水に全く不溶の PHB を加水分解する PHB デポリメラーゼとが存在することを見だし、両酵素を精製し、加水分解機構について検討を加えた。

#### a) オリゴマーヒドロラーゼによる D(-)-3-ヒドロキシ酪酸オリゴマーの分解

PHB デポリメラーゼとともに菌体外に分泌されるオリゴマーヒドロラーゼは水溶性の D(-)-3-

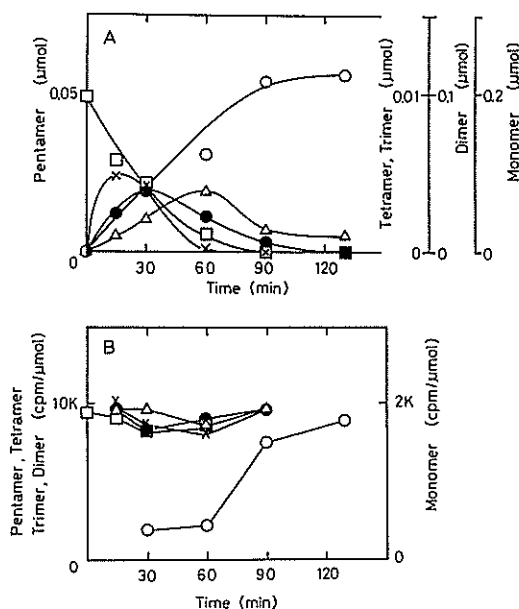
**Table 1.** Km values of oligomer hydrolase and PHB depolymerase with various oligomer esters and PHB

D(-)-3-Hydroxybutyrate oligomer	$M_n$	Solubility in water (mM)	Km ( $\mu$ M)	
			Oligomer hydrolase	PHB depolymerase
Dimer	190	100	33	—
Trimer	276	100	5.2	6,900
Tetramer	362	100	11	1,900
Pentamer	448	100	4.0	240
Octamer	706	1.17	1.5	170
Dodecamer	1,056	0.13	1.3	260
Partially hydrolyzed*				
PHB (methanol fraction)	1,700**	0	—	180
PHB (ethyl acetate fraction)	6,870**	0	—	110
PHB (chloroform fraction)	32,500**	0	—	21

\* PHB was partially hydrolyzed with 0.4 N NaOH and successively extracted with each solvent indicated in parenthesis.

\*\* Number average molecular weight.

ヒドロキシ酪酸オリゴマーを加水分解する。この酵素を菌の培養液上清より硫酸分画および TEAE-セルロース, セファデックス G-100 ならびに PHB ゲルのクロマトグラフィを順次行なうことにより, 電気泳動的に均一な標品にまで精製した。この酵素の分子量はゲルろ過による推定では 74,000 で, ジイソプロピルフルオロリン酸 (DFP) により失活するセリンエステラーゼの一種であった。この酵素は水溶性の D(-)-3-ヒドロキシ酪酸のダイマーからドデカマーまでのオリゴマーをほぼ同程度の速度で加水分解し, その際の Km は 4~30  $\mu$ M であったが, 水に不溶のより高分子の PHB 部分分解物 (平均分子量約 1,700) ならびに PHB (平均分子量約 32,500) を全く分解しなかった (Table 1)。ペンタマーの水酸基側末端に [ $^3\text{-}^{14}\text{C}$ ]D(-)-3-ヒドロキシ酪酸をもつ基質 (\*DDDDD-ペンタマー) を合成し, オリゴマーヒドロラーゼによる加水分解産物と, それらの比放射能の経時変化を検討したところ, ペンタマーの減少に伴い, 反応液中でテトラマー, トリマー, ダイマーの順でその濃度が最大に達した後再び減少し, 最終的にモノマーが蓄積された (Fig. 1A)。また, テトラマー以下のオリゴマーの比放射能は時間に対しほぼ一定であったが, モノマーの比放射



**Fig. 1.** Time course of radioactive DDDDD-pentamer hydrolysis.

(A) Time course of hydrolysis, and (B) specific radioactivity (cpm/ $\mu$ mol).

$\square$ , DDDDD-pentamer;  $\times$ , DDDDD-tetramer;  $\bullet$ , DDD-trimer;  $\triangle$ , DD-dimer;  $\circ$ , monomer.

Each oligomer, dimer or monomer was separately scraped off from the TLC-plate, put into a counting vial, and counted.

Table 2. Purification of PHB depolymerase

Protein (mg)	PHB depolymerase (units)	Specific activity (units/mg)	Oligomer hydrolase (units)	Yield (%)
Culture medium	498	12.0	302	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0-50%)	120	37.7	179	76
TEAE-Cellulose	80	50.3	147	67
Butyl-Toyoparl	44	80.0	0	59

能は時間とともに上昇し、最終的にオリゴマーの約 1/5 の値となった (Fig. 1B)。この結果からオリゴマーはそのカルボキシル末端よりモノマー 1 個単位ずつ切断されて分解されるものと考えられる。さらに広海らの方法<sup>1)</sup>を応用して水解様式を解析したところ、酵素により基質が一度加水分解を受けた後、分解を受けた基質が酵素の活性部位である程度横すべりを起こして、さらに水解を受ける、いわゆる“multiple attack”を受けていることが示唆された。

b) PHB デポリメラーゼによる PHB の分解

PHB デポリメラーゼは従来の方法<sup>2)</sup>をさらに改良して培地上清より精製した。すなわち、従来法より等電点電気泳動を除き、疎水ゲルの一種、ブチルトヨパールによるクロマトグラフィーを加えることにより、収量は約 2 倍に上昇し、しかもより迅速な精製が可能となった (Table 2)。この酵素は分子量が約 5 万であり、オリゴマー-ハイドロラーゼと同じく DFP で阻害されるセリンエステラーゼであった。精製酵素は PHB の他に D(-)-3-ヒドロキシ酪酸のトライマー、テトラマー、ペンタマーなどを加水分解したが、ダイマーは全く分解しなかった。したがって PHB デポリメラーゼは水に不溶のポリマーも水に可溶のオリゴマーも共に水解するが、分子量のより大きい基質により高い親和性をもつことが判明した (Table 1)。そこで PHB のような疎水性高分子が水溶性基質と同じ機作で分解されるか否かを検討した。セリン酵素の阻害剤フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、ジスルフィド結合の還元剤ジチオスレイトール (DTT) による処理および加熱処理により、デポリメラーゼの PHB 分解活性とトライマー分解活性はほぼ同様の時間経過で失活した

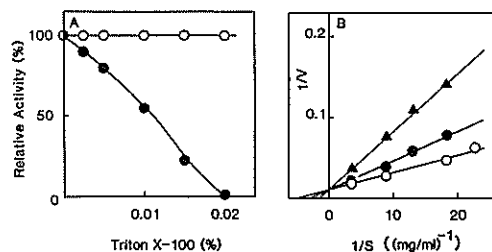


Fig. 2. Effect of Triton X-100 on PHB depolymerase.

(A) Triton X-100 (final 0-0.5%) was added to the assay mixture, and PHB (●) and DDD-trimer (○) hydrolyzing activities were assayed. (B) Double reciprocal plots. Triton X-100 (final 0% (○), 0.002% (●), 0.004% (▲)) was added to the assay mixture and PHB hydrolyzing activity was assayed spectrophotometrically.

ので、両者は同じ活性部位で水解されるものと考えられた。ところが疎水性相互作用を妨害すると考えられる Triton X-100 では低濃度でその PHB 分解活性は完全に抑えられたのに対し、トライマー分解活性は高濃度でも全く影響を受けなかったため、不溶性基質である PHB の分解の際には活性部位の他に、基質と疎水的な相互作用を示す部位が必要であり、この部位と PHB との結合がトリトン X-100 により阻害されるものと考えられた (Fig. 2)。また、末端の水酸基を *tert*-butyldimethylsilyl 基で保護したもの (*t*-BDS-トライマー, +SiO-DDD-COOH) はデポリメラーゼにより加水分解されないが、PHB デポリメラーゼのトライマー分解活性を拮抗的に、PHB 分解活性を非拮抗的に阻害し、*t*-BDS-トライマーが基質と拮抗して結合する活性部位の他に PHB のみに相互作用を示す部位も存在することが示唆され、トリトン X-100 の場合と同様の結論となった。

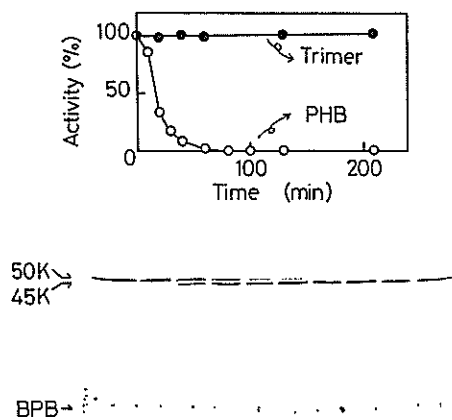


Fig. 3. Effect of trypsin treatment on PHB depolymerase.

The reaction mixture (50  $\mu$ l) contained 200  $\mu$ g of PHB depolymerase, 10  $\mu$ g of TPCK-treated trypsin, 0.5  $\mu$ mol of  $\text{CaCl}_2$  and 2.5  $\mu$ mol of Tris-HCl (pH 7.5). At intervals, the reaction mixture was assayed for PHB- (○) and trimer- (●) hydrolyzing activities, and proteins were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

*N*-tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone (TPCK) 処理によりキモトリプシン活性を完全に除去したトリプシンを用いて PHB デポリメラーゼを処理したものを、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析したところ、酵素タンパクは処理時間とともに分子量が5万から4万5,000へと減少して行き、それに伴って PHB 分解活性は消失した (Fig. 3)。一方、トライマー水解活性はこのトリプシン処理により影響を受けなかったことから、この疎水性部位は分子量約5,000のドメイン構造を持つと考えられる。トリプシン処理をした酵素および未処理酵素を PHB 存在下にショ糖密度勾配遠心したところ、未処理酵素は PHB と挙動を共にしたのに対し、処理酵素は PHB との結合能を失っているため PHB と共沈しないことがわかった (Fig. 4)。また、トリプシン処理酵素のトライマーに対する  $K_m$  は未処理酵素の  $K_m$  とほぼ同じであったが、テトラマー、ペンタマーに対する  $K_m$  は5~20倍程度高くなっており、この結果からトリプシン処理により除かれる疎水

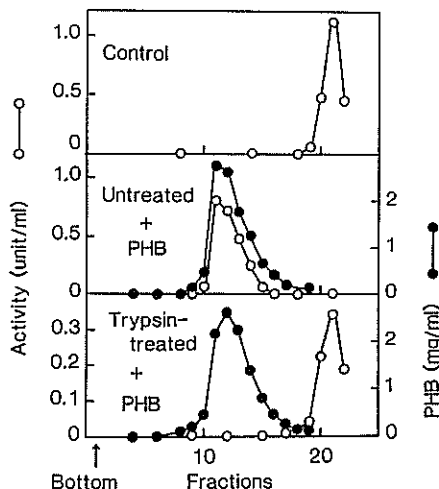


Fig. 4. Sucrose density gradient of PHB depolymerase.

Trypsin-treated and untreated PHB depolymerase were mixed with PHB and subjected to linear sucrose gradient (1.0–2.5 M) centrifugation at  $64,000 \times g$  for 4 h. Each fraction was assayed for trimer hydrolase activity and the amount of PHB. Upper, PHB depolymerase only; middle, PHB depolymerase + PHB; bottom, trypsin-treated PHB depolymerase + PHB. ○, PHB depolymerase; ●, PHB (mg/ml).

性ドメインはテトラマー以上の基質に対する酵素活性に重要な役割を持つと考えられる。デポリメラーゼの活性部位は酵素動力学的検討から4個のサブサイトからできていると考えられるが、トリプシン処理により比較的鎖長の短いオリゴマーも加水分解されにくくなることから、この疎水性部位は活性部位の近傍に位置しているものと考えられる。以上の結果より推定される PHB デポリメラーゼの活性中心付近の模式図を Fig. 5 に示した。PHB が水に全く不溶で、また結晶性の高い高分子であるため、酵素が結合する際その界面を認識する可能性が考えられるが、種々の合成ポリエステルの中でエステル間の炭素数が PHB と同じ2個であるポリ(3-プロピオラクトン)のみが PHB デポリメラーゼにより分解されたことにより、おそらく基質の高次構造がこのような界面の認識に寄与しているものと推定される。

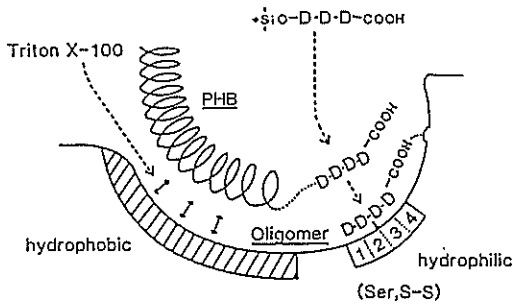


Fig. 5. Speculative active center of PHB depolymerase.  
D indicates D(-)-3-hydroxybutyrate.

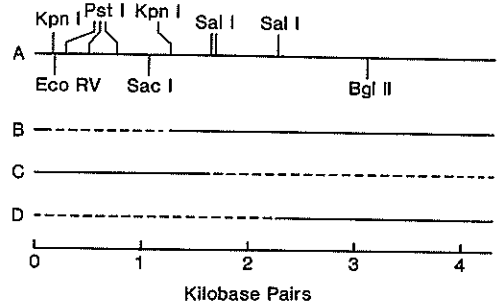


Fig. 6. Restriction map of pDP 14 (A) and its derivatives (B-D).  
The dotted lines define the region deleted.

Table 3. Localization of PHB depolymerase in *E. coli* carrying pDP14

	PHB depolymerase	Alkaline phosphatase (%)	Alcohol dehydrogenase (%)
Culture supernatant	9.5	10.1	0
Shocked fluid	59.4	58.1	4
Cytosol	24.6	20.3	96
Membrane	6.5	11.5	0

PHB depolymerase was measured by the quantitative dot-immunosorbent assay.

一方、PHB デポリメラーゼの構造と機能との関係をさらに検討するために *A. faecalis* T<sub>1</sub> の PHB デポリメラーゼ遺伝子のクローニングを行ない、大腸菌における発現を調べた。*A. faecalis* T<sub>1</sub> の染色体 DNA を制限酵素 Sau 3 AI により部分消化し、4~9 キロ塩基対の DNA 断片を得た。この DNA 断片をベクター pUC 8 に組み入れ、大腸菌 DH 1 に導入した。得られた約 8 万個のアンピシリン耐性コロニーから、PHB デポリメラーゼに対するウサギの抗体を用いたスクリーニングにより 29 個の陽性クローンを得た。これらのクローンは約 4 キロ塩基対の共通した *A. faecalis* T<sub>1</sub> ゲノム断片をもっており、そのうちの一つのクローン (プラスミド pDP 14 を含む) を選んで発現させたタンパクの検討を行なった。大腸菌で発現させた酵素タンパクをブチルトヨパールカラムを用いる方法で精製したところ、この酵素は *A. faecalis* T<sub>1</sub> の菌体外デポリメラーゼと電気泳動における移動度、免疫反応性、阻害剤に対する挙動、基質特異性、 $\alpha$ -キモトリプシンによるペ

プチド地図などにおいて差異が認められなかった。大腸菌で発現された PHB デポリメラーゼはその 60% がペリプラズム画分に局在し、培地中には約 10% 程度認められた (Table 3)。細胞質に存在するアルコール脱水素酵素は培地中には全く認められなかったため、この酵素の菌体外への放出は細胞の崩壊によるものではなく、PHB デポリメラーゼ (遺伝子) が存在することによって大腸菌の外膜構造に変化が起こっている可能性がある。pDP 14 の制限地図を Fig. 6 に示す。PHB デポリメラーゼの培地中への放出は PHB 粉末を含む培地で生育した菌体のまわりが透明化することによって検出できる。5' 側の Kpn I 断片を欠く pDP 14 を含む大腸菌では菌体のまわりが透明化しており、PHB デポリメラーゼの培地中への放出が認められた (Fig. 7B)。一方、3' 末端から Sal I 断片 (約 2.3 キロ塩基対) を欠く pDP 14 を含む大腸菌では PHB の分解は認められなかった (Fig. 7C)。さらに Sal I で pDP 14 を分解して得られる 3' 側の約 2 キロ塩基対の DNA 断片を含む大腸

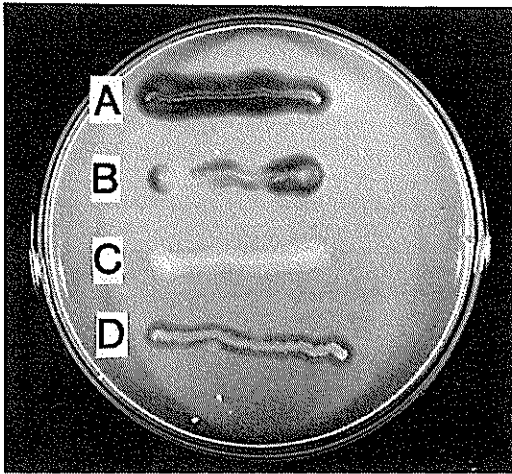


Fig. 7. Expression and excretion of PHB depolymerase from *E. coli* containing pDP 14 and its derivatives.

Both expression and excretion of PHB depolymerase were detected on M9 medium containing PHB (0.15%). With pDP 14 (A) and its derivatives (B-D) corresponding to A-D in Fig. 6, respectively, *E. coli* JM103 were transformed and streaked on PHB plates.

菌では酵素の培地中への放出が認められたので (Fig. 7D), PHB デポリメラーゼの構造遺伝子と菌体外分泌に関する情報 (もしあるとすれば) がこの Sal I 断片に存在するものと思われる。今後、この約 2 キロ塩基対の Sal I 断片の塩基配列を分析することにより、デポリメラーゼの一次構造が明らかとなり、PHB と相互作用する疎水性部位も明らかとなるものと考えられる。

(II) アセトアセチル CoA 合成酵素の動物での役割

D(-)-3-ヒドロキシ酪酸とアセト酢酸は、生理学では従来よりケトン体と呼ばれ、D(-)-3-ヒドロキシ酪酸は通常生体においてはアセト酢酸へと酸化された後、活性化されてアセトアセチル CoA となり代謝されるものと考えられている。哺乳動物において糖尿病などの疾患時にケトン体の血中濃度が上昇するが、正常時においてもケトン体は肝臓で生成されて各臓器に供給される重要なエネルギー源の一つとして知られている。最

近、ケトン体が脂質合成の前駆体となることが明らかにされてきており、特に肝臓においてはコレステロール生合成に重要な寄与をなすものと考えられている。その際のアセト酢酸の活性化には細胞質でのアセトアセチル CoA 合成酵素の関与が想定されるが、この酵素の実態はこれまでほとんど不明であった。ところで我々は活性汚泥菌 *Z. ramigera* I-16-M の PHB 代謝に関する研究において、この菌はサクシニル CoA トランスフェラーゼ ( $\text{AcAc} + \text{succinyl-CoA} \rightleftharpoons \text{AcAcCoA} + \text{succinate}$ ) 活性を欠き、アセトアセチル CoA 合成酵素 ( $\text{AcAc} + \text{CoA} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{K}^+, \text{Mg}^{++}} \text{AcAcCoA} + \text{AMP} + \text{PPi}$ ) が PHB 代謝に関与していることを見だし、この酵素を初めて精製して、その性質を明らかにした<sup>3)</sup>。我々は動物においても同様な酵素が存在する可能性があると考え、ラット肝臓からのアセトアセチル CoA 合成酵素の精製を行った。S. D. ラット (♀, 6 週令) に 2% コレステラミン (胆汁酸再吸収阻止剤) を含む食餌を 4 日間投与することにより、肝臓上清中の酵素活性を普通食餌を与えたラットにおける活性の 2~3 倍に誘導し、その肝臓上清より酵素の精製を行った。まず、45~75% の硫酸分画を行ない、DEAE-Sephrose CL-6 B, Blue Sepharose CL-6 B, Red Sepharose CL-6 B, CoA Sepharose CL-6 B, Ultrogel AcA 44, 2nd DEAE-Sephrose CL-6 B の 6 段階のカラムクロマトグラフィーを行なうことにより、肝臓上清に比べて約 1,000 倍に精製し、比活性 2.3 unit/mg-protein の標品を得た。この酵素の性質は *Z. ramigera* のものとほぼ同じで、ATP, CoA および一価カチオン ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  など) と二価カチオン ( $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  など) を必要とし、アセトアセチル CoA を生成すると同時に AMP と PPi を等モル生成した。逆反応も可能である。分子量はゲルろ過で約 8 万であり、SDS 存在下のポリアクリルアミドゲル電気泳動では約 7 万 1,000 であるので 1 本鎖構造をとっているものと考えられた。この酵素はアセト酢酸のみを活性化し、そのほか非生理的な脂肪酸と考えられる L(+)-3-ヒドロキシ酪酸をわずかに活性化したが、この性質も *Z. ramigera* I-16-M の酵素

**Table 4.** Specific activity and concentration of acetoacetyl-CoA synthetase in liver supernatant fractions of rats under various dietary conditions

Groups of six female rats of the Sprage-Dawley strain were fed the various diets or fasted as described in the text. The livers were homogenized, and the supernatant fractions were dialyzed overnight and then assayed for the enzyme activity by two different methods. Enzyme concentrations ( $\mu\text{g}$  immunoreactive protein/mg protein) were estimated by the enzyme-linked immunosorbent assay as described in the text. \* $P < 0.01$  compared to control data.

	Specific activity		Concentration	Ratio
	NADH formation (munits/mg protein)	Acetyl-CoA formation	( $\mu\text{g}$ immunoreac- tive protein/mg)	(munits/ $\mu\text{g}$ immunoreactive protein)
A. Control	0.96 $\pm$ 0.082	0.86 $\pm$ 0.039	0.66 $\pm$ 0.040	1.3 $\pm$ 0.081
B. 2% Cholestyramine	3.8 $\pm$ 0.20	2.7 $\pm$ 0.049	1.6 $\pm$ 0.058	1.7 $\pm$ 0.067*
C. 5% Cholestyramine	4.2 $\pm$ 0.35	3.3 $\pm$ 0.20	1.8 $\pm$ 0.083	1.8 $\pm$ 0.10*
D. 0.2% ML-236 B	1.7 $\pm$ 0.53	1.3 $\pm$ 0.26	1.2 $\pm$ 0.28	1.2 $\pm$ 0.034
E. 5% Cholestyramine +0.2% ML-236B	8.9 $\pm$ 0.41	6.5 $\pm$ 0.30	4.5 $\pm$ 0.20	1.4 $\pm$ 0.062
F. 5% Cholesterol	0.73 $\pm$ 0.12	0.61 $\pm$ 0.11	0.49 $\pm$ 0.041	1.2 $\pm$ 0.13
G. Fasted	0.37 $\pm$ 0.057	0.30 $\pm$ 0.021	0.37 $\pm$ 0.028	0.86 $\pm$ 0.094*

**Table 5.** Acetoacetyl-CoA synthetase specific activity and concentration in cytosol fractions of rat tissues

Tissues from six female rats were combined, homogenized and centrifuged, and then the supernatant fractions were dialyzed and assayed as to the enzyme activity and concentration. Data represent the mean of four determinations  $\pm$  S. E. \*The enzyme specific activities and enzyme concentrations were correlated with  $r=0.980$ .

Tissue	Specific activity (munits/mg protein)	Concentration ( $\mu\text{g}$ immunoreactive protein/mg)	Ratio (munits/ $\mu\text{g}$ immunoreactive protein)
Liver	0.82 $\pm$ 0.034*	0.81 $\pm$ 0.037*	1.0
Brain	0.42 $\pm$ 0.005*	0.33 $\pm$ 0.013*	1.3
Adipose tissue	1.5 $\pm$ 0.048*	1.1 $\pm$ 0.057*	1.4
Lung	0.16 $\pm$ 0.003*	0.19 $\pm$ 0.011*	0.84
Spleen	0.14 $\pm$ 0.007*	0.25 $\pm$ 0.034*	0.56
Heart	0.089 $\pm$ 0.007*	0.16 $\pm$ 0.019*	0.56
Kidney	<0.05	0.16 $\pm$ 0.023	<0.3

と同じであった。このアセトアセチル CoA 合成酵素をウサギに注射して、それに対する抗体を作り、これを用いて enzyme-linked immunosorbent (ELISA) 法によってラットの各組織中の酵素量を定量してこの酵素の生理的役割の推定を試みた。Table 4 は種々の食餌を与えたラット肝臓上清中のアセトアセチル CoA 合成酵素とその濃度を示している。酵素の比活性は対照に比べて

5% のコレステラミンを含む場合は 4 倍、0.2% の ML-236 B (HMGCoA 還元酵素の阻害剤) を含む場合は 1.5 倍、5% コレステラミンと 0.2% ML-237 B を共に含む場合は 8 倍に上昇した。一方、絶食によっては 2.9 倍、5% コレステロールを含む食餌を与えた場合は 1.4 倍それぞれ比活性は低下した。ELISA 法で測定した酵素濃度は上の各条件下で、酵素の比活性の値とほぼ平行して



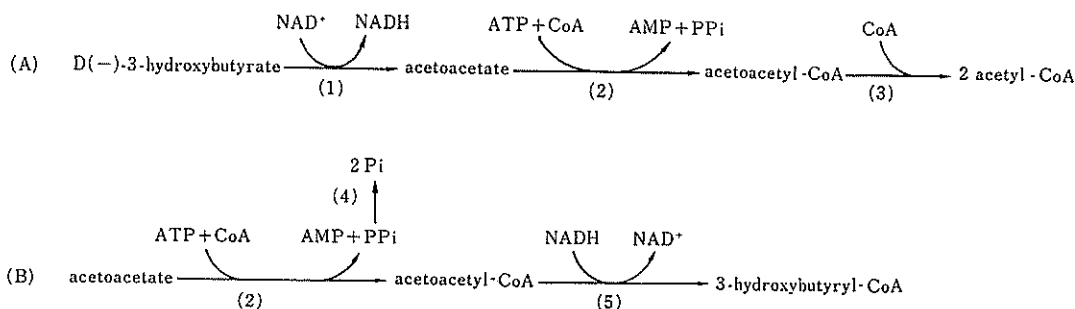


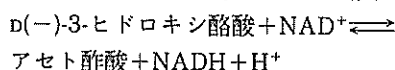
Fig. 8. Principle of assay of ketone body ((A): *D(-)-3-hydroxybutyrate*, (B): *acetoacetate*). (1) *D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase*, (2) *acetoacetyl-CoA synthetase*, (3) *3-ketothiolase*, (4) *pyrophosphatase*, (5) *3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*.

変化したが、詳細にみれば両者の比は対照の値 (1.3) より大きな値を示す場合もあり (2% あるいは 5% コレステラミン食など), また絶食の場合は最低 (0.86) となった。したがって酵素活性の増大は主として酵素タンパク量の増大によるものであるが、それに加えて動物の栄養状態や薬物の投与により酵素の触媒効率が増大する可能性も考えられる。Table 5 はラットの各組織の可溶性画分におけるアセトアセチル CoA 合成酵素の濃度と比活性を表している。肝臓、脳、脂肪組織において高い比活性がみられ、抗体により測定される酵素濃度も高かった。一方、肺、脾臓、心臓、腎臓においては比活性も酵素濃度も共に低かった。また比活性と酵素濃度の比も組織によって多少の相違が認められた。したがってアセトアセチル CoA 合成酵素はラットの各組織におそらく異なる型で広く分布し、特に脂質を合成する組織に存在するものと思われる。以上により、アセトアセチル CoA 合成酵素は肝臓、脳、脂肪組織において上清画分に存在するアセト酢酸を直接アセトアセチル CoA に変換し、コレステロール合成、脂肪酸合成に関与していることが示唆された。

(III) PHB 代謝に関与する諸酵素の組み合わせによるケトン体の新測定法

活性汚泥菌 *Z. ramigera* I-16-M の PHB 代謝に関与する諸酵素を組み合わせるケトン体の新しい測定法の開発を試みた。従来より用いられている *D(-)-3-ヒドロキシ酪酸* の酵素的測定法は *Rhodospseudomonas spheroides* の *D(-)-3-ヒドロキシ酪*

酸脱水素酵素を利用する方法である (次式)。



この式の平衡定数は  $1.42 \times 10^{-9}$  であり、中性の pH においては反応の平衡は左に片寄っている。そこで Williamson らは生じたアセト酢酸をかなり高濃度のヒドラジン存在下にヒドラゾンとして捕捉することによって反応を右にずらせ、生じる NADH の吸収より *D(-)-3-ヒドロキシ酪酸* を測定する方法を考案した<sup>4)</sup>。しかし、ヒドラジンはかなり強い毒物 (発癌物質)<sup>5)</sup> であるために日常の測定に用いるのは好ましくない欠点がある。加えて、ヒドラジンの存在下では反応の終結に比較的長時間を要する。一方、アセト酢酸は通常 *D(-)-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素* を用いて還元し、その際の NADH の吸収減少から測定されている<sup>4)</sup>。我々は *Z. ramigera* I-16-M のアセトアセチル CoA 合成酵素<sup>3)</sup> を用いて、新しい原理に基づくケトン体の測定法を検討した。*D(-)-3-ヒドロキシ酪酸* とアセト酢酸の測定の原理は Fig. 8 に示されている。*D(-)-3-ヒドロキシ酪酸* の濃度を測定する場合は (Fig. 8 A), *D(-)-3-ヒドロキシ酪酸* を脱水素酵素<sup>6)</sup> (1) でアセト酢酸に変換し、生じたアセト酢酸はアセトアセチル CoA 合成酵素 (2) によりアセトアセチル CoA に変換する。このアセトアセチル CoA は 3-ケトチオラーゼ<sup>7)</sup> (3) の作用によりアセチル CoA となるが、この反応は著しくアセチル CoA 生成に片寄っているため、全体としてはほぼ完全に *D(-)-3-ヒドロキシ酪酸* は消

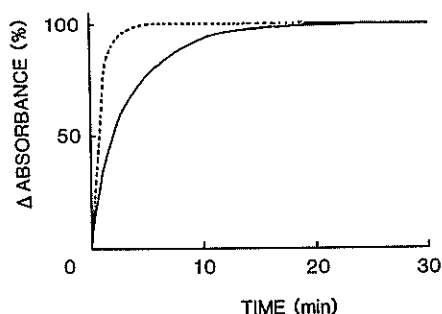


Fig. 9. Comparison of the time courses of two different assay methods for D-3-hydroxybutyrate.

The time courses of the new method (---) and hydrazine-based method (—) were compared with the same amount of D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase (0.32 unit).

失し、それに対応した NADH が生成することになる。よって 340 nm の増加量より D(-)-3-ヒドロキシ酪酸量を定量することができる。一方、アセト酢酸の定量においては (Fig. 8 B), アセト酢酸をアセトアセチル CoA に変え、さらに NADH の存在下に 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素 (5) により 3-ヒドロキシブチリル CoA に変化させた。この際、平衡をさらに右にずらすためピロホスファターゼ (4) を加えた。新しい測定法によって D(-)-3-ヒドロキシ酪酸とアセト酢酸はいずれも 13~107  $\mu\text{M}$  の濃度範囲で 10 分程度で測定できた。また、これらの測定法においては D(-)-3-ヒドロキシ酪酸とアセト酢酸のそれぞれ 0.2 mM, 0.05 mM までは 340 nm の吸収と濃度との間に直線関係が成立した。Fig. 9 は同じ量の D(-)-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素の存在下に、0.1 mM の D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を新測定法と Williamson らのヒドラジンをを用いる方法とで測定したときの反応の時間経過を比較したものである。Williamson らの方法では反応終了まで 20 分以上かかるのに対し、新測定法では 5 分以内に測定が完了した。そこで抱水ヒドラジン (0.33 M) 存在下で D(-)-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素の基質に対する  $K_m$  を測定したところ、 $V_{max}$  の値は変化しないのに対し、 $K_m$  が control の値 (0.38 mM) に比べ約 3 倍に増加していた。また、0.2 M

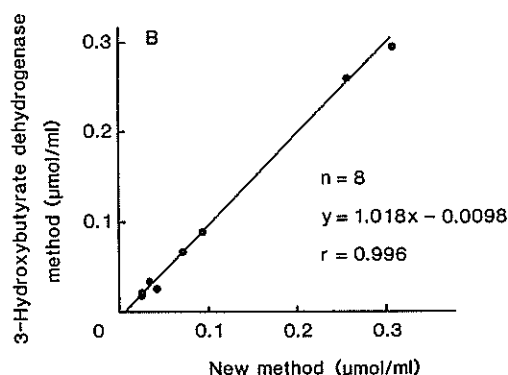
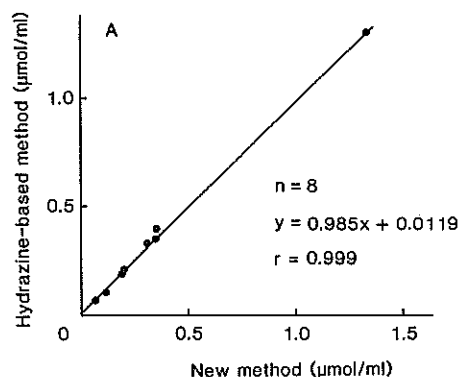


Fig. 10. Correlation between the new method and Williamson's hydrazine-based method (D(-)-3-hydroxybutyrate assay) (A), and that between the new method and Williamson's D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase method (acetoacetate assay) (B).

NaCl を加えても同様の現象がみられたので、抱水ヒドラジンを加えることによりイオン強度が上昇し、D(-)-3-ヒドロキシ酪酸に対する  $K_m$  値が上昇して反応がすすみにくくなるものと推定された。正常、飢餓あるいは糖尿ラットの血中の D(-)-3-ヒドロキシ酪酸とアセト酢酸を新測定と Williamson らの方法とで測定し、両方法の相関性をみた (Fig. 10)。新しい測定法は Williamson らの方法とよい相関を示した。D(-)-3-ヒドロキシ酪酸の新しい測定法は毒性のあるヒドラジンをを用いなくてもすむ点と、反応がすみやかに終了する点において Williamson らの方法より優れていると思われる。また、D(-)-3-ヒドロキシ酪酸脱水

素酵素を用いないアセト酢酸の新しい測定法は、アセトアセチル CoA 合成酵素が極めて高い特異性をもっているため、特異性の高い測定法であり、血中や組織中のケトン体の測定に有効であると思われる。

おわりに

本研究では、(I) *A. faecalis* T<sub>1</sub> の PHB 分解系、(II) アセトアセチル合成酵素の動物での役割、および (III) PHB 代謝に関与する諸酵素を組み合わせた新しいケトン体の測定法の 3 項目について検討を行なった。

(I) においては、活性汚泥中の細菌により作られるバイオポリマー、PHB を分解する細菌の分泌する菌体外オリゴマーヒドロラーゼ、PHB デポリメラーゼについてそれらの加水分解機構を中心に検討した。これから得られた結果は自然環境における PHB 分解の仕組みの一端を明らかにするとともに、生分解性高分子設計の基礎資料となるものと考えられる。(II) においては活性汚泥菌 *Z. ramigera* I-16-M の PHB 代謝に関与するアセトアセチル CoA 合成酵素の研究に基づいて、従来ほとんどその実態が不明であった動物でのアセトアセチル CoA 合成酵素の性質を明らかにし、さらにその生理的役割を明確にすることができた。(III) においては PHB 代謝に関与している諸酵素を組み合わせることにより、全く新しい原理に基づいた、従来の測定法の欠点を補う測定法を考案し、その有効性を示すことができた。このようにいまだ十分に行なわれていない活性汚泥菌の PHB 代謝を中心とする生化学的研究を通じて、種々の有意義な基礎的あるいは応用的な成果が得られ、活性汚泥菌の生化学研究の今後の発展が期待される。

謝辞

終りに当たり、3 年間にわたり本研究の助成をしていただいた日産科学振興財団および選考委員各位、ならびに当初研究計画を推薦いただいた日本生化学会に対し心からお礼申し上げる次第である。

文献

1) K. Hiromi, Y. Nitta, C. Numata and S. Ono:

Subsite Affinities of Glucoamylase: Examination of the Validity of the subsite theory. *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 362-365 (1973).

- 2) T. Tanio, T. Fukui, Y. Shirakura, T. Saito, T. Tomita, T. Kaiho and S. Masamune: An Extracellular Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *Eur. J. Biochem.*, **124**, 71-77 (1982).
- 3) T. Fukui, M. Ito and K. Tomita: Purification and Characterization of Acetoacetyl-CoA Synthetase from *Zoogloea ramigera* I-16-M. *Eur. J. Biochem.*, **127**, 423-428 (1982).
- 4) D. H. Williamson, J. Mellanby and H. A. Krebs: Enzymatic Determination of D(-)- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid and Acetoacetic Acid in Blood. *Biochem. J.*, **82**, 90-96 (1962).
- 5) B. Toth: Synthetic and Naturally Occurring Hydrazines as Possible Cancer Causative Agents. *Cancer Research*, **35**, 3693-3697 (1975).
- 6) T. Nakada, T. Fukui, T. Saito, K. Miki, C. Oji, S. Matsuda, A. Ushijima and K. Tomita: Purification and Properties of D- $\beta$ -Hydroxybutyrate Dehydrogenase from *Zoogloea ramigera* I-16-M. *J. Biochem.*, **89**, 625-635 (1981).
- 7) T. Nishimura, T. Saito and K. Tomita: Purification and Properties of  $\beta$ -Ketothiolase from *Zoogloea ramigera*. *Arch. Microbiol.*, **116**, 21-27 (1978).

発表論文

- 1) Y. Shirakura, T. Fukui, T. Tanio, K. Nakayama, R. Matsuo and K. Tomita: An Extracellular D(-)-3-Hydroxybutyrate Oligomer Hydrolase from *Alcaligenes faecalis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **748**, 331-339 (1983).
- 2) T. Saito, M. Ito, T. Fukui and K. Tomita: Purification and Properties of Acetoacetyl Coenzyme A Synthetase from Rat Liver. *Fed. Proc.*, **42**, 1854 (1983).
- 3) T. Fukui, T. Saito, Y. Shirakura and K. Tomita: An Extracellular Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) Depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *Fed. Proc.*, **43**, 2007 (1984).
- 4) M. Ito, T. Fukui, M. Kamokari, T. Saito and K. Tomita: Purification and Characterization of Acetoacetyl-CoA Synthetase from Rat Liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **794**, 183-193 (1984).
- 5) 富田謙吉, 福井哲也, 齊藤光實: 微生物によってつくられるポリヒドロキシブチレートとその応用, *高分子*, **33**, 370-386 (1984).
- 6) K. Nakayama, T. Saito, T. Fukui, Y. Shirakura and K. Tomita: Purification and Properties of Extracellular Poly(3-hydroxybutyrate) Depo-

- lymerase from *Pseudomonas lemoignei*. *Biochim. Biophys. Acta*, 827, 63-72 (1985).
- 7) 齊藤光實, 竹村典子, 伊藤正樹, 福井哲也, 市川厚, 富田謙吉: ケトン体の新酵素の定量法, 第 58 回日本生化学会, 生化学, 57, 843 (1985).
  - 8) 福井哲也, 白倉ゆり, 成川豊子, 市川厚, 富田謙吉: ポリ- $\beta$ -ヒドロキシ酪酸の酵素的分解機構。第 58 回日本生化学会, 生化学, 57, 883 (1985).
  - 9) 鈴木健二, 福井哲也, 齊藤光實, 三輪桂子, 市川厚, 富田謙吉: 活性汚泥菌 *Alcaligenes faecalis* の菌体外 PHB テポリメラーゼ遺伝子のクローニング。日本薬学会第 106 年会講演要旨集, p. 305 (1986).
  - 10) Y. Shirakura, T. Fukui, T. Saito, Y. Okamoto, T. Narikawa, K. Koide, K. Tomita, T. Takemasa and S. Masamune: Degradation of Poly-(3-hydroxybutyrate) by Poly (3-hydroxybutyrate) Depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T. *Biochim. Biophys. Acta*, 880, 46-53 (1986).
  - 11) M. Ito, T. Fukui, T. Saito and K. Tomita: Acetoacetyl-CoA Synthetase Specific Activity and Concentration in Rat Tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 879, 280-287 (1986).