

1.はじめに 重金属イオンの混入が廃水の生物学的処理に障害を与えることは広く知られているが、その機構に関する報告は少ない。本研究では、水銀イオン(以下Hg)、あるいはカドミウムイオン(以下Cd)によりひき起こされる活性汚泥の障害の機構を明らかにすることを目的とし、スキムミルク水で培養した活性汚泥を用い、培養液の主要成分である乳糖の加水分解を触媒する β -galactosidase(以下 β -Gase) および活性汚泥菌体内で行われる生体酸化に関与する dehydrogenases(以下DHases)の2つの酵素におよぼすHgおよびCdの影響について酵素反応速度論的考察を試みた。

2.実験方法 スキムミルク水を人工下水とし、乳業廃水処理施設の活性汚泥を植種して、回分法で培養した活性汚泥を供試汚泥とした。 β -Gase活性はKubyらの方法¹⁾、DHases活性は下水試験方法を各々一部改変して測定した。Hgは HgCl_2 を用いて、 $0 \sim 1 \text{ mM}$ ($0 \sim 200.6 \text{ mg/l}$)、Cdは $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ を用いて、 $0 \sim 2 \text{ mM}$ ($0 \sim 224.8 \text{ mg/l}$)の濃度範囲で実験を行った。HgあるいはCdによる β -GaseおよびDHases活性阻害の可逆性の検討には、2,3-dimercapto-1-propanol, dithiothreitol, 2-mercaptoethanol, glutathioneを用いた。酵素の阻害のタイプの判別にはHofsteeプロット²⁾を用いた。

3.結果および考察 Hgによる β -GaseおよびDHases活性の阻害を、Figs. 1および2に各々示した。Hgによる阻害の程度は、 β -Gaseでは $3 \sim 5 \times 10^{-3} \mu\text{mole/ss mg}$ で約50%の阻害、DHasesでは多シバラツキはあるが $0.9 \sim 1 \times 10^{-2} \mu\text{mole/ss mg}$ で約50%の阻害となり、Hgの阻害は、酸化還元酵素であるDHasesよりも、加水分解酵素である β -Gaseに対して著しかった。Cdによる β -GaseおよびDHases活性の阻害をFigs. 3および4に各々示した。Cdによる阻害の程度は、Hgよりもかなり低く、 β -Gaseでは

$2 \mu\text{mole/ss mg}$ で約50%の阻害、DHasesでは $0.2 \sim 0.5 \mu\text{mole/ss mg}$ で約50%の阻害となった。Cdによる阻害は、 β -GaseよりもDHasesに対して大であった。

熱や酸などによる不可逆的な変性とは異なる、酵素

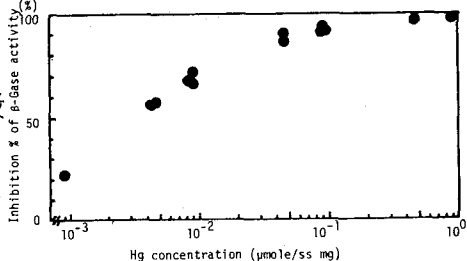
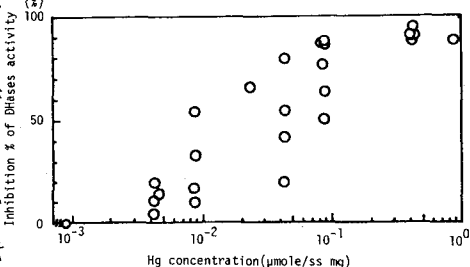
Fig. 1 Effect of Hg on the activity of β -galactosidase

Fig. 2 Effect of Hg on the activity of dehydrogenases

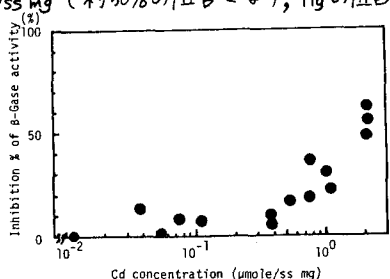
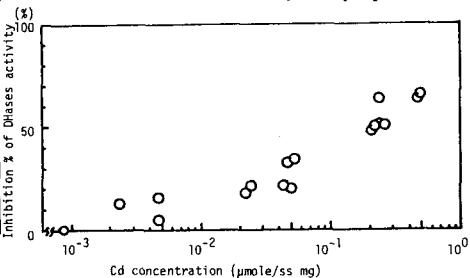
Fig. 3 Effect of Cd on the activity of β -galactosidase
Table 1 Reactivation by thiols of the activities of β -Gase and DHases inhibited with Hg

Fig. 4 Effect of Cd on the activity of dehydrogenases

Table 2 Reactivation by thiols of the activities of β -Gase and DHases inhibited with Cd

Thiol	β -Gase		DHases		Thiol	β -Gase		DHases	
	Activity as % of original activity		Activity as % of original activity			Activity as % of original activity		Activity as % of original activity	
None	8.1 ^{g)}	13.8 ^{h)}	9.3 ⁱ⁾	13.0 ^{j)}	None	63.6 ^{g)}	91.9 ^{h)}	35.4 ⁱ⁾	50.6 ^{j)}
BAL ^{a,e)}	100.0 ^{g)}	100.0 ^{h)}	96.3 ⁱ⁾	90.7 ^{j)}	BAL ^{a,e)}	100.0 ^{g)}	100.0 ^{h)}	100.0 ⁱ⁾	100.0 ^{j)}
DTT ^{b,e)}	99.4 ^{g)}	93.1 ^{h)}	9.3 ⁱ⁾	96.3 ^{j)}	DTT ^{b,e)}	100.0 ^{g)}	100.0 ^{h)}	24.6 ⁱ⁾	55.9 ^{j)}
MCE ^{c,f)}	72.4 ^{g)}	71.3 ^{h)}	11.1 ⁱ⁾	61.1 ^{j)}	MCE ^{c,f)}	77.3 ^{g)}	95.7 ^{h)}	64.6 ⁱ⁾	66.2 ^{j)}
GSH ^{d,f)}	32.5 ^{g)}	55.0 ^{h)}	18.5 ⁱ⁾	37.0 ^{j)}	GSH ^{d,f)}	97.3 ^{g)}	88.6 ^{h)}	20.0 ⁱ⁾	66.2 ^{j)}

a) 2,3-dimercapto-1-propanol, British anti-lewisite b) dithiothreitol c) 2-mercaptoethanol d) glutathione e) dithiol f) monothiol g) the initial concentration of Hg: 0.1 mM ($0.09 \mu\text{mole Hg/ss mg}$) h) the initial concentration of Hg: 0.01 mM ($0.009 \mu\text{mole Hg/ss mg}$) i) the initial concentration of Hg: 0.5 mM ($0.43 \mu\text{mole Hg/ss mg}$) j) the initial concentration of Hg: 0.1 mM ($0.085 \mu\text{mole Hg/ss mg}$) Thiols at the concentration of 4 times the concentration of Hg

a-f) See foot notes of Table 1 g) the initial concentration of Cd: 1.0 mM ($0.75 \mu\text{mole Cd/ss mg}$) h) the initial concentration of Cd: 0.5 mM ($0.38 \mu\text{mole Cd/ss mg}$) i) the initial concentration of Cd: 1.0 mM ($0.49 \mu\text{mole Cd/ss mg}$) j) the initial concentration of Cd: 0.5 mM ($0.25 \mu\text{mole Cd/ss mg}$) Thiols at the concentration of 4 times the concentration of Cd

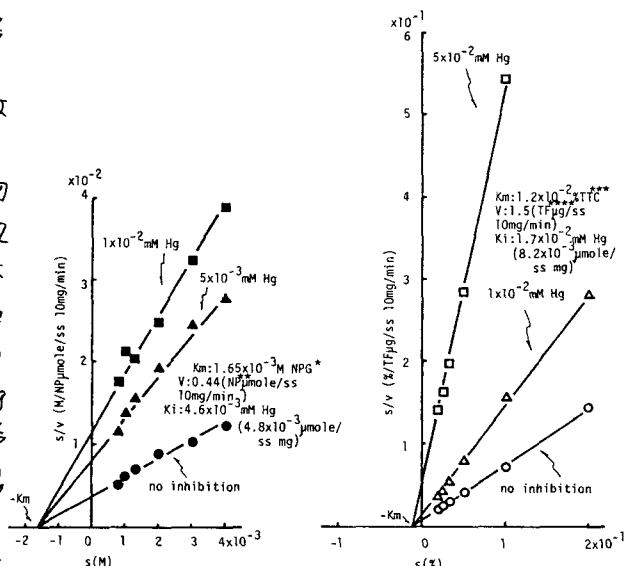
の可逆的阻害は、透析または化学的方法で阻害剤を酵素からとり除けば活性が回復する場合に、酵素反応速度論的取扱いが可能となる²⁾。ここではあらかじめHgあるいはCdを添加した活性汚泥に、重金属添加量の4倍量(モル比)のチオール化合物を加え活性回復の検討を行った。Tables 1および2は、チオール化合物の添加によるHgあるいはCdにより阻害された β -GaseおよびDHases活性の回復を要約したものである。添加したチオール化合物の種類により、活性回復の程度は若干異なるが、HgあるいはCdによる β -GaseおよびDHases活性の阻害はチオール化合物の添加によりほぼ回復しており、可逆的阻害であることが判明した。また、チオール化合物の添加により活性の回復がみられることから、酵素のSH基とHgないしCdがメルカプトドを形成することにより、両酵素の阻害を生ずることが推察された³⁾。

次に、HgあるいはCdによる β -GaseおよびDHases活性の阻害のタイプを判別するため、基質濃度(S)を変えて、初速度(v)を測定し、Hofsteeプロット²⁾に基き解析を行った。得られたグラフから、Michaelis定数(K_m)、最大速度(V)、阻害剤定数(K_i)を算出し、Hofsteeプロットと共にFigs. 5および6にあらわして示した。HgあるいはCdによる β -GaseおよびDHases活性の阻害は、阻害の程度に差はあるが、どの場合も、阻害された酵素の K_m が阻害されない酵素の K_m に等しく、y軸上の切片は阻害された酵素の方が阻害されない酵素よりも大となった。従

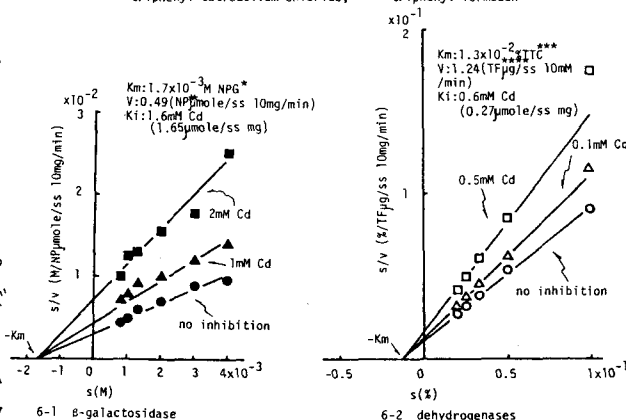
ってHgあるいはCdによる β -GaseおよびDHases活性の阻害のタイプは非拮抗阻害であることが推察された。また、 K_i 値は、Figs. 1~4に示した酵素の阻害レベルが各酵素において50%となる濃度にはほぼ等しい値となった。これは非拮抗阻害では、阻害剤濃度が K_i と等しい時、最大速度が $V/2$ すなわち、50%阻害される²⁾ということに一致するものである。

4.まとめ 1) 50%の酵素活性阻害が現れるHg濃度は、 β -Gaseでは $3 \sim 5 \times 10^{-3} \mu\text{mole/ss mg}$, DHasesでは $0.9 \sim 1 \times 10^{-2} \mu\text{mole/ss mg}$, Cd濃度は、 β -Gaseでは $2 \mu\text{mole/ss mg}$, DHasesでは $0.2 \sim 0.5 \mu\text{mole/ss mg}$ であった。2) HgあるいはCdによる β -GaseおよびDHases活性の阻害は、チオール化合物の添加により活性の回復がみられることから、可逆的阻害であり、HgあるいはCdがこれらの酵素の活性発現に必要なSH基と結合することにより、阻害を生ずるものと推察された。3) HgあるいはCdによる β -GaseおよびDHases活性の阻害のタイプは、非拮抗阻害であった。

参考文献 1) Methods in Enzymology, 1, 241-248, Academic Press, New York, 1955 2) 入門酵素化学, 南江堂, 1972 他 3) Advance in Enzymology, 11, 201-266, 1951 他



5-1 β -galactosidase
Fig. 5 Non-competitive type of inhibition of β -galactosidase and dehydrogenases activities with Hg
* o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, ** nitrophenol, *** triphenyl tetrazolium chloride, **** triphenyl formazan



6-1 β -galactosidase
Fig. 6 Non-competitive type of inhibition of β -galactosidase and dehydrogenases activities with Cd
*, **, ***, ****: see foot notes of Fig. 5