

VII-106

活性汚泥における PHB 合成経路上の酵素 acetoacetyl-CoA reductase の活性測定

東京大学大学院工学系研究科	学生会員	野村拓哉
同上	正会員	味埜 俊
同上	正会員	佐藤弘泰
同上	正会員	松尾友矩

1.はじめに

閉鎖性水域での富栄養化は重要な水環境問題の一つであり、下水処理においては、その原因物質である窒素やリンを除去するために生物学的硝化脱窒プロセス、生物学的リン除去プロセスなどが実用化されている。硝化脱窒プロセスと比較すると生物学的リン除去プロセスは歴史が浅く不明な点も多い。特に、生物学的リン除去プロセスの中核を担う微生物(脱リン菌)の代謝機構は、早急に解明されるべき課題である。本研究では脱リン菌の行う代謝のうち嫌気条件での有機物摂取に関連の深い PHB(polyhydroxy butyrate)代謝に注目し、その経路上で働く酵素である acetoacetyl-CoA reductase 活性の測定を行った。

acetoacetyl-CoA reductase は、図 1 のように acetyl-CoA から PHB が合成される過程で、NADPH を水素供与体として acetoacetyl-CoA を D-3-hydroxybutyryl-CoA に還元する反応を触媒する。また NADH を水素供与体として用いる酵素もあり、この場合は生成物は L-3-hydroxybutyryl-CoA になる。また NADH 依存の酵素は D-3-hydroxybutyryl-CoA を分解する反応も触媒する。PHB 合成経路上では NADPH 依存の酵素が働くと考えられている。

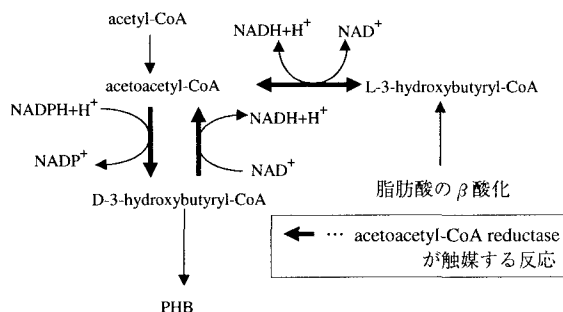


図 1:PHB 合成系と acetoacetyl-CoA reductase が関与する反応

2.実験の方法

対象とした汚泥は、東京大学都市工学科の実験室で馴致されている汚泥、および東京都芝浦水処理センターから採取した汚泥、合計 4 種類である(表 1 を参照)。

acetoacetyl-CoA reductase の活性は汚泥から得た酵素粗抽出液に基質である acetoacetyl-CoA と補酵素である NADPH を加え、NADPH による 340nm の吸光の減少を測定することにより求めた。酵素の抽出については、活性汚泥混合液を遠心にかけて汚泥を集め、緩衝液(0.1M TrisHCl, pH8.5)に溶かし、氷冷しながら超音波破碎(80W×5 分)で細胞壁を破壊し、遠心(11000rpm.×10 分、4℃)にかけた上澄をとりサンプルとした。活性の測定については、WAKO 純薬による、3-hydroxybutyrate dehydrogenase のプロトコルによる。一方、PHB 合成速度は好気条件で酢酸を基質として十分与え、初期 1 時間で蓄積された PHB 量を、メチル化分解 - GC 法で定量した。

キーワード：生物学的リン除去、酵素、PHB、活性汚泥、acetoacetyl-CoA reductase

連絡先 〒113-8656 文京区本郷 7-3-1 東京大学工学部都市工学科

TEL03(3812)2111 内線 6271

e-mail : nomura@env3rd.t.u-tokyo.ac.jp

3.結果と考察

acetoacetyl-CoA reductase が PHB 合成反応の制御に関与するかどうかを調べるために、横軸に PHB 合成速度、縦軸に酵素活性をとった図 2 を示す。測定点は帯のようにばらつき、平均 26.7unit、標準偏差 8.5(平均値の約 30%)であった。この結果からは両者の間に相関がないと判断できる。酵素レベルで代謝を理解しようとするとき、代謝反応の制御に関与する酵素(多くの場合律速段階となる酵素)に注目する必要があるが、今回の結果から判断する限り、この酵素が PHB 合成の制御に関わっている可能性は低そうである。

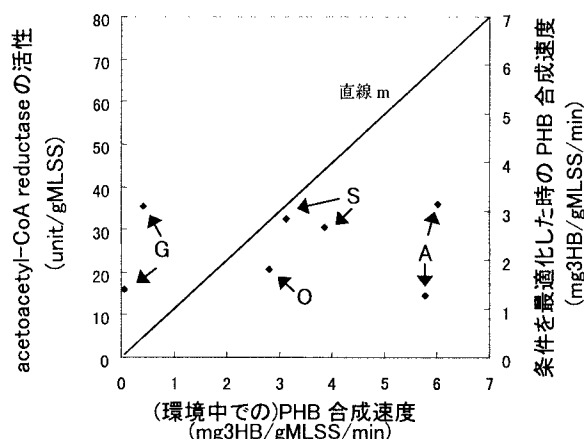


図 2:acetoacetyl-CoA reductase 活性と PHB 合成速度の関係

3-hydroxybutyryl-CoA が PHB に縮合される反応が極めて速やかに進行すると仮定すれば、図 2 の縦軸の単位は右軸のように変換できる。すると右軸は条件を最適化したときの反応速度、横軸は環境中での実際の反応速度と考えてよい。環境中でも酵素活性が最大に発揮されている汚泥は、直線 m 上に測定点が位置するはずである。すべての測定点が直線 m の上側の領域にあることが予想されたが、今回は測定条件の最適化が不十分だったため直線 m の下側にも測定点が存在する。今後、抽出条件、測定条件ともに見直す必要がある。

また、NADH を水素供与体とする acetoacetyl-CoA reductase(NADH reductase)の活性を測定した結果を図 3 に示す。NADPH を水素供与体とする酵素(NADPH reductase)と同じか、それ以上の活性を持っていることが分かった。NADH reductase が PHB 合成にどのように関わるかは現在のところ明らかになっていないが、脂肪酸の β 酸化によって生じる L-hydroxybutyryl-CoA を acetoacetyl-CoA に酸化する反応、もしくは 3-hydroxybutyryl-CoA を光学異性化するラセマーゼ、L-3-hydroxybutyryl-CoA と反応する PHB synthase と連携して PHB 合成に関わる可能性も否定できない。また NADH 依存で acetoacetyl-CoA から D-3-hydroxybutyryl-CoA を合成する酵素の存在も完全に否定されているわけではない。

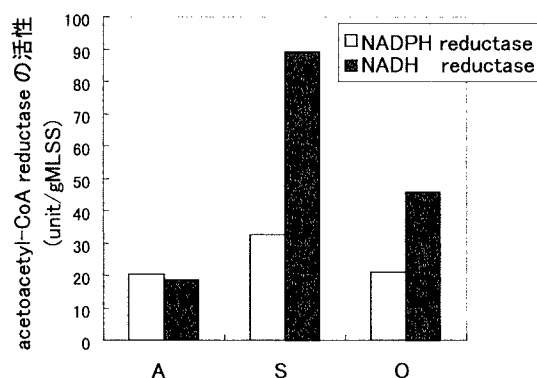


図 3:NADHreductase と NADPHreductase の活性

4.結論と今後の課題

acetoacetyl-CoA reductase の活性を測定したところ、測定条件の最適化が不十分ではあったが、この酵素が PHB 合成の律速酵素である可能性が低いことが分かった。PHB 代謝機構を解明するためには、経路上のその他の酵素についても調査し、律速となる酵素を見つけ、その制御メカニズムを解明する必要がある。

また活性汚泥から NADH を水素供与体とする acetoacetyl-CoA reductase が検出された。この酵素が PHB 代謝、またその他の代謝にどのように関わるかは今後さらなる研究が期待される場所である。

謝辞:本研究を進めるにあたって東京大学工学系研究科化学生命工学専攻、長棟輝行先生、喜多山篤先生から多大な御指導、御助言をいただきました。記して謝意を表したいと思います。

参考文献: A.J.ANDERSON,E.A.DAWES/Microbiological Reviews/Vol.54 No.4 pp456-472(1990)