

氏 名 (本籍) さつ か かず お  
粟 冠 和 郎

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 2 8 7 号

学位授与年月日 昭 和 5 7 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科  
(博士課程) 農芸化学専攻

学位論文題目 デオキシリボヌクレアーゼ感受性フロッ  
ク形成菌のフロック形成機構に関する研  
究

論文審査委員 (主 査)

教授 高 橋 甫 教授 志 村 憲 助

教授 古 坂 澄 石

# 論文内容要旨

## 第一章 緒 言

微生物の凝集現象に関して、細菌の抗体による凝集反応を始めとして、酵母の性的凝集および発酵過程における非性的凝集、細胞性粘菌の形態形成における集合、口内細菌による歯垢 (dental plaque) の形成など、広い範囲での研究が行なわれている。

一方、近年、有機物を含む産業廃水や家庭排水の処理に、活性汚泥法が広く用いられている。活性汚泥法は、細菌を主体とする微生物の凝集体 (フロック) により、廃水中の有機物を酸化的に分解除去した後、フロックを自然沈降させることによって処理水から分離するという廃水処理法である。したがって、活性汚泥法においては、沈降性の良いフロックを形成することが最も重要な点と考えられる。この様な観点から、活性汚泥細菌のフロック形成機構に関して、主として、単離された細菌の純粋培養系での研究が行なわれている。現在までに、たんぱく質、多糖などによるフロック形成について報告されており、一般に、高分子物質による細胞間の架橋という形で細胞が凝集すると説明されている。しかし、活性汚泥中のフロックの構成は複雑であり、多くのフロック形成機構が関与しており、未解明のフロック形成機構が存在すると考えられる。本研究室において活性汚泥から分離、保存されていた細菌の形成するフロックが、デオキシリボヌクレアーゼ (DNase) により崩壊することが、著者により、見出された。本研究は、DNase 感受性フロック形成菌のフロック形成機構を明らかにすることを目的とした。

なお、DNA による細菌の凝集現象に関して既に、ペスト菌について報告されている。しかし、この例では、使用菌株が活性汚泥から分離されたものではなく、病原菌であった。また、その凝集の程度は著しく低く、凝集機構についての詳細な検討は加えられていなかった。

## 第二章 Pseudomonas C-120 株の生育とフロック形成

本研究で使用した細菌 C-120 株は、圓尾らにより活性汚泥から分離され、渡辺らにより、Pseudomonas と同定された。同定の結果は、本研究においても確認された。Pseudomonas C-120 株をグリセロールを含むポリペプトン培地で振盪培養する時、

対数期後期から定常期にかけて、フロックを形成した。(Fig. 1)。

### 第三章 C-120株のフロックのDNaseに対する感受性 およびその他の性質

C-120株の形成するフロックは、電気泳動的に単一に精製したDNase Iにより、完全に崩壊したが、この反応には $Mg^{2+}$ が要求され、クエン酸などのキレート剤により阻害された(Table 1)。これはDNase I固有の性質を示すものであり、DNase そのものが、フロックの崩壊に関与していると推定された。また、DNase IIによってもフロックは完全に崩壊した。DNase との反応の際、多量のDNAを共存させることにより、フロックの崩壊は遅延された。これらの結果は、C-120株のフロック形成にDNAが直接関与している可能性を強く示唆した。DNase 処理によるフロックの崩壊に伴ない、フロックからのDNAの遊離が認められた。このDNAの塩基組成とMarmur法により細胞から抽出したDNAの塩基組成との間に大きな差は認められなかった(Table 2)。C-120株のフロックはDNase以外の処理によっても崩壊した。フロックをpH 1以下またはpH 11以上の緩衝液、あるいは2M NaCl溶液などに懸濁することにより崩壊した。この結果は、細胞同志の結合にイオン結合が関与していることを示唆した。また、フロックを蒸留水に対して透析して塩を除くとフロックは不安定となったが、これは、細胞表層およびDNAが負に荷電しているため、細胞同志または細胞とDNAが反発しあうためと思われた。緩衝液中などでは、カチオンが負の電荷を中和し、反発力を減少させ、フロックを安定に保つと推定された。しかし、Flavobacteriumなどで報告された様に、特定の金属イオンを要求することはなかった。フロックを走査型電子顕微鏡で観察したが、細胞間をつなぐ結合物質は検出できなかった。

### 第四章 凝集因子の抽出とフロックの再構成

フロックを3Mグアニジン塩酸中、30℃に保温することにより、フロック形成に直

接関与する物質（凝集因子）は抽出され、その結果フロックは崩壊した。凝集因子を抽出された細胞（抽出菌体）に凝集因子を加えることにより、フロックは再構成された（Fig. 2）。凝集因子と抽出菌体をそれぞれDNase処理した後にフロックの再構成実験を行なった結果、凝集因子をDNase処理した時のみ、フロックは再構成されなくなり、抽出菌体を処理した場合には変化はなかった（Table 3）。したがって、凝集因子はDNaseに感受性であるが、抽出菌体上にはDNase感受性物質はないと結論した。酵素感受性から凝集因子はDNAであると推定されたが、抽出液中のDNA濃度が低く、DNAを低分子化させることなく精製することは困難と思われた。そこで、大腸菌、枯草菌などの細菌からDNAを抽出し、精製DNAによる抽出菌体の凝集の有無について調べた（Table 4）。いずれの細菌から分離したDNAによっても抽出菌体は凝集し、凝集因子はDNAそのものであり、DNAに関して、C-120株に由来する特異的な因子は必要ないと推定された。DNAの起源により凝集活性に差が見られたが、これは、調製したDNAの分子量の差に基づくものと推定された。

## 第五章 大腸菌DNAによるフロックの再構成と凝集因子の性質

大腸菌から抽出した高分子DNAを機械的に低分子化し、DNAの分子量とその凝集活性の関係を調べた（Table 5）。その結果、約 $6 \times 10^6$ 以上の分子量を持つDNAのみが、抽出菌体を凝集させかつ抽出菌体に結合した。DNAを $100^\circ\text{C}$ で加熱後急冷すると、凝集活性は失なわれるが、 $\text{IMNaCl}$ 存在下での加熱は、凝集活性を低下させなかった。これは、凝集活性を持つのは2本鎖DNAのみで、1本鎖DNAは凝集活性を持たないことを示す。抽出菌体と大腸菌DNAから再構成されたフロックは肉眼的および電子顕微鏡的に自然のフロックに類似しており、DNaseにより崩壊した。また、ある範囲のPH、加熱、高濃度の塩の存在などは、フロックの再構成を阻害すると同時に、抽出菌体へのDNAの結合を阻害した。この事実は、DNAと抽出菌体の結合がイオン結合によることを示唆した。

## 第六章 抽出菌体のDNA結合能

中性付近の pH では、C-120 株は細胞全体として負の電荷を持つため、同じ負の電荷を持つ DNA と非特異的に結合する可能性は低く、特殊な DNA 受容体が存在すると推定された。細胞表面のアミノ基をトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) で修飾することにより、細胞の DNA 結合能が失なわれたことから、DNA との結合にアミノ基が関与している可能性が示唆された。DNA のりん酸基と受容体のアミノ基がイオン結合すると考えると、凝集活性を持つ DNA に特異性がない事実とも一致する。DNA 結合能はプロテアーゼ処理により失なわれることから、DNA 受容体はたんぱく質であると推定された (Table 6)。T<sub>4</sub> フェージ DNA を用いた再構成実験では、1 細胞あたり、約 10 分子の DNA が結合し飽和した (Fig. 3)。

## 第七章 cell envelope の DNA 結合能

DNA 受容体を同定するため、DNA 結合能を欠く突然変異株を分離した。cell envelope を調製し、膜たんぱく質組成について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) によって分析したが、野生株と突然変異株の間に明瞭な差は認められなかった。cell envelope を 1% SDS により抽出した残渣に DNA 結合能が存在しており、これを SDS-PAGE で分析した。しかし、たんぱく質のバンドは検出されず、DNA 受容体のたんぱく質量が少ないか、あるいは、ペプチドグリカンなどに結合しているためにゲル内に入らないものと推定した。cell envelope の DNA 結合能も TNBS、プロテアーゼ処理などにより消失した。

## 第八章 フロックの形成時期を決定する因子

C-120 株の DNA 結合能は、フロック形成時期のみならず、生育の各時期を通じて存在する (Table 7)。一方、フロックの形成と平行して培地への DNA の蓄積が見

られることから (Fig. 4), この条件では, DNAの遊離がフロック形成の重要な因子であると推定された。チミン要求株などの栄養要求突然変異株のあるものでは, フロック形成能が著しく上昇しており, DNAによる細胞の凝集性および培地へのDNAの遊離の両方が上昇していた。これらの結果は, フロック形成するための条件として, DNA受容体の形成および細胞外へのDNAの遊離が重要な因子であることを示唆した。

## 第九章 総 合 論 議

本研究で得た知見は, 次の様に要約される。

1. 活性汚泥から分離された Pseudomonas C-120 株は DNase に感受性のフロックを形成する。
2. フロックから 3 M ゲアニジン塩酸により凝集因子が抽出され, 凝集因子と抽出菌体によりフロックが再構成される。
3. 凝集因子は,  $6 \times 10^6$  以上の分子量を持つ 2 本鎖 DNA である。
4. 細胞上に DNA と結合するためのたんぱく質性の DNA 受容体を持つ。
5. DNA と DNA 受容体はイオン結合により結合し, DNA が細胞間を架橋することにより細胞を凝集させる。
6. DNA 受容体は常に細胞表面に存在し, 細胞外への DNA の遊離が起こるとフロックが形成される。

Pseudomonas C-120 株の様なフロック形成菌の活性汚泥中での重要性については明らかでない。しかし, 活性汚泥中に含まれる核酸の数十%は細胞外面分に存在するという報告もあり, 何らかの形で核酸がフロックの維持に役割を果している可能性は大きいと思われる。

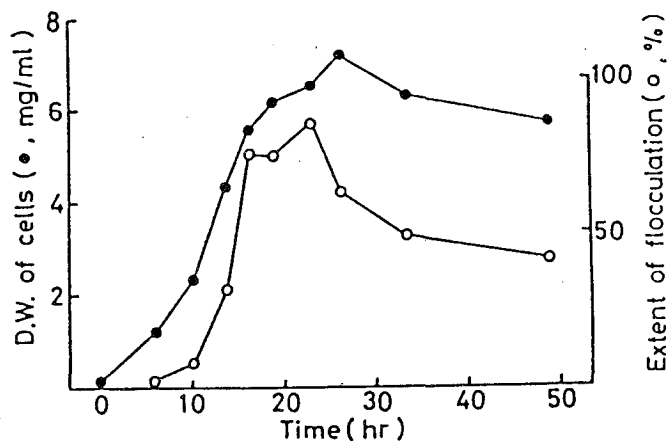


FIG. 1. Growth and Flocculation of *Pseudomonas* Strain C-120 in TG Medium.

Cultivations were carried out in test tubes. At time indicated, cell growth and the extent of flocculation were determined. The experimental results, shown, are the average of four measurements.

TABLE 1 SUSCEPTIBILITY OF FLOCS TO VARIOUS ENZYMES

Flocs were incubated with various reagents at 30°C for 5 min and then the extent of flocculation was determined.

Reagents	The extent of flocculation (%)
A None	100
0.1 mM MgCl <sub>2</sub>	99
Purified DNase I (2 μg/ml)	97
Purified DNase I+MgCl <sub>2</sub>	0
Purified DNase I+MgCl <sub>2</sub> +citrate (5 mM)	95
B DNase II (20 μg/ml)	0
Pronase E (20 μg/ml)	98
Ribonuclease A (20 μg/ml)	95

In experiment B, flocs washed twice with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) were used.

TABLE 2 BASE COMPOSITION OF DNA  
FROM STRAIN C-120

Source of DNA	Mol %			
	Adenine	Thymine	Guanine	Cytosine
Cell	16.9	19.1	32.1	31.9
Released by DNase I	13.5	18.1	33.0	35.4

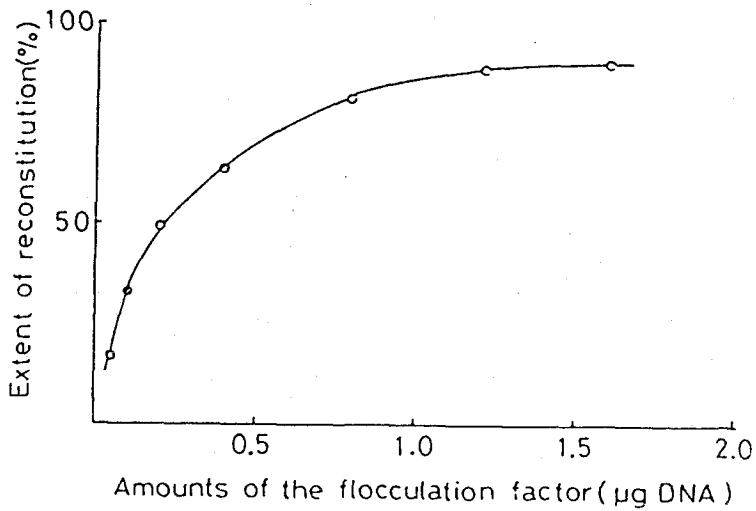


Fig. 2 Relationship between concentrations of the flocculation factor and the extents of reconstitution.



Table 3. Effect of treatment of the Gua-HCl extract and extracted cells with various enzymes on reconstitution of flocs.

Reconstituted with	Fraction treated with			Extent of reconstitution(%)
	DNase I	Pronase E	RNase A	
E* + C*		None		86
C +	E	-	-	3
E +	C	-	-	89
C +	-	E	-	84
E +	-	C	-	83
C +	-	-	E	81
E +	-	-	C	80

\* E; Gua-HCl extract

\* C; Extracted cells

Table 4 Reconstitution of flocs with extracted cells and DNAs from various origins.

Reconstitution experiments were performed with extracted cells and various amounts of DNAs. Amounts of DNA required to give the extent of reconstitution of 50% were determined.

DNA from	Amount of DNA required to give the extent of reconsti- tution of 50% (µg)
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> PAO 286	0.5
<u>Pseudomonas fluorescens</u> 6099	1.9
<u>Escherichia coli</u> W3110	2.7
<u>Bacillus subtilis</u>	1.4
<u>Proteus mirabilis</u> 6292	1.5
<u>Staphylococcus aureus</u> 6243	1.3
<u>Bacillus cereus</u> T	0.4
Strain C-120	3.2

Table 5 Effect of molecular weights of DNAs on flocculation activities and binding of DNAs to extracted cells.

<sup>3</sup>H-DNAs were prepared with or without shearing through a needle with a syringe. Their average molecular weights were determined by the sucrose gradient centrifugation. Amount of DNA added to each reaction mixture was 0.5µg. The binding of DNA was expressed as the ratio in percentage of radioactivity of DNA bound to extracted cells to total radioactivity of DNA added to the reaction mixture.

Molecular weight ( x 10 <sup>6</sup> )	Extent of reconstitution(%)	Binding of DNA to extracted cells (%)
91	88	91
24	57	60
15	24	18
6.4	0	1

Table 6 Effect of protease treatment of C-120 cells on reconstitution of flocs.

Extracted cells were incubated with indicated enzyme with or without chymotrypsin inactivator(NCDC) at 37°C for 3 hours. After incubation, cells were washed twice with 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.4) and suspended in the same buffer to give A<sub>660</sub> of 6. Reconstitution experiments were carried out using 0.5ml of cell suspensions and 0.5ml(0.25µg) of E. coli DNA solutions.

Enzymes	Extent of reconstitution(%)	Binding of DNA to extracted cells(%)
None	47	91
Pronase E (1mg/ml)	2	2
Heated Pronase E (1mg/ml)*	45	89
Pronase P (1mg/ml)	4	5
Trypsin (1mg/ml)	44	92
Chymotrypsin (1mg/ml)	22	57
Chymotrypsin (1mg/ml) +NCDC (500µg/ml)	40	88
NCDC (500µg/ml)	51	94

\* Heated at 100°C for 10 min.

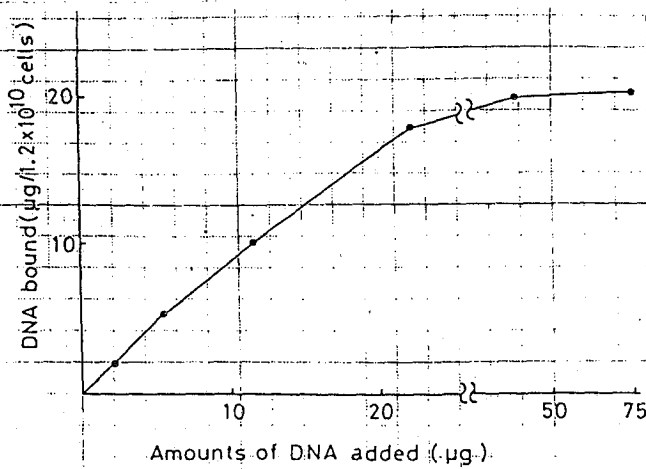


Fig. 3. Binding of phage T<sub>4</sub> DNA to extracted cells.

Extracted cells (0.5ml and A<sub>660</sub>=6, 2.4x10<sup>10</sup> cells/ml) were reflocculated with 0.5ml of various concentrations of phage T<sub>4</sub> DNA.

Table 7 Flocculation of C-120 cells at various growth phases induced by addition of E. coli DNA.

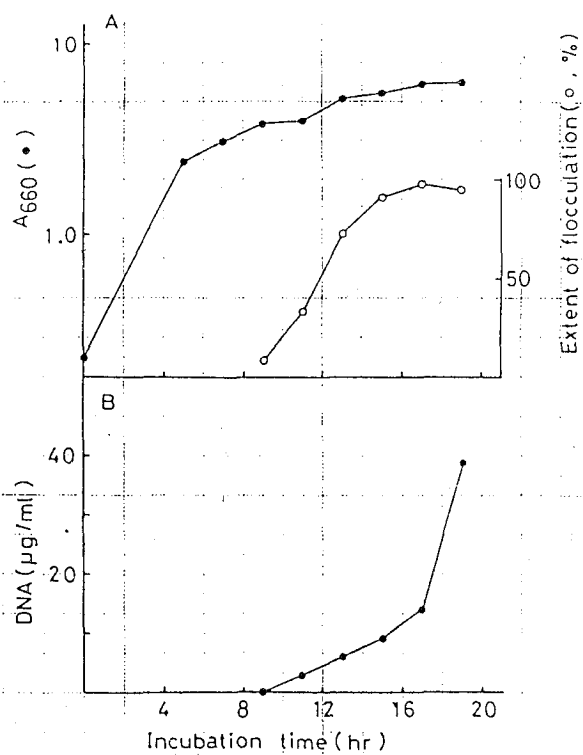
Growth phase (A <sub>660</sub> )*	Extent of flocculation (%)**	Amount of DNA required to give the extent of reconstitution of 50% (µg)
Logarithmic phase		
middle (0.4)	N. D.***	0.15
middle (0.9)	N. D.***	0.16
late (2.0)	9	0.17
Stationary		
early (4.0)	30	0.19
Extracted cells (6.0)	90	0.15

\* Total A<sub>660</sub> of culture was measured after DNase I (20µg/ml) treatment when C-120 cells were harvested .

\*\* Measured when cells were harvested .

\*\*\* Not determined. Few floccs were observed with the unaided eye.

Fig. 4. Relationship between flocculation of C-120 cells and DNA accumulated in growth medium.



## 審 査 結 果 の 要 旨

有機廃水の処理に活性汚泥法が広く用いられているが、微生物が凝集体（フロック）を形成する機構についての研究は少ない。本論文は活性汚泥より分離された細菌のフロックがデオキシリボヌクレアーゼ（DNase）処理により崩壊するという発見に端を発した、この細菌のフロック形成機構に関するものである。

著者はまず、本菌が *Pseudomonas* に属することを再確認し、この菌が対数期後期から定常的にかけてフロックを形成することを認めた。このフロックは精製した DNase I により完全に崩壊するが、この反応は  $Mg^{++}$  を要求し、クエン酸により阻害されるなど、DNase そのものが反応に関与することを示した。フロックの崩壊に伴ない、フロックから DNA の遊離が認められたがその塩基組成は細胞から抽出した DNA とほぼ同じであった。

つぎに著者はフロックをグアニジン塩酸で抽出し、フロック形成に関与する物質（凝集因子）と、凝集因子が抽出された細胞（抽出菌体）を得た。凝集因子と抽出菌体を合せるとフロックが再構成される。凝集因子は DNase 処理により、フロック再構成能を失なった。数種類の細菌から DNA を抽出精製し、精製 DNA と抽出菌体を合せて再構成実験を行った所、すべての場合フロックが再構成された。すなわち、凝集因子は DNA であることが証明された。

ついで著者は大腸菌 DNA を機械的に低分子化し、DNA の分子量と凝集活性の関係を調べた。その結果  $6 \times 10^6$  以上の分子量をもつ DNA が抽出菌体を凝集させ、かつ菌体に結合することを認めた。凝集活性をもつのは高分子 2 本鎖 DNA に限られる。また再構成されたフロックは天然のものに類似していた。

最後に著者は細胞表層に存在する DNA 受容体について研究した。菌体をプロテアーゼにより処理すると DNA 結合能が失なわれるので、受容体はたんぱく質であると考えた。ファージ DNA を用いた再構成実験により 1 細胞あたり約 10 分子の DNA が結合することを明らかにした。細胞より調製したエンベロープは DNA 結合性をもつが、さらに SDS 処理したエンベロープに DNA 結合能を認めた。DNA 結合能は培養条件などにかかわらず、細胞表層につねに存在し、細胞からの DNA の遊離が細胞のフロック形成を支配していることを明らかにした。

以上のように本論文はいくつかの新知見を含み、微生物学に貢献する所が大きい。よって三論文審査担当者とも著者は農学博士の学位を授与される資格があると判定した。