

氏 名 (本籍)	えん とう たか かず 遠 藤 隆 一
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 2 1 6 号
学位授与年月日	昭和 5 3 年 3 月 2 4 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	プロナーゼ感受性フロック形成菌 のフロック形成機構

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

## 序論

1935年, Butterfield は活性汚泥から純粋培養で凝集体(フロック)を形成する細菌である Zoogloea ramigera を分離した。また1953年, McKinney らにより Zoogloea 以外にも純粋培養でフロックを形成する細菌 Bacillus, Escherichia, Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Paracolobacterium, Nocardia などの存在が示された。現在ではさらに多くの細菌が純粋培養でフロックを形成することが知られている。

これら細菌のフロック形成機構として現在、以下の4つの説が提唱されている。

- ①ゼリー状細胞間物質説 (Zoogloea)
- ②動電力説 (Alcaligenes)
- ③重合説 (Zoogloea)
- ④イオン結合説 (Flavobacterium)

以上の様に純粋培養でフロックを形成する細菌のフロック形成機構は菌種によりかなり異なっていると考えられる。おそらくいくつか

の機構が複合することにより活性汚泥のフロックが形成されていると考えるのが自然であろう。

さて、蛋白質を媒体としてフロックを形成する細菌が活性汚泥中に存在することはすでに加藤らにより示されたが、分離株はフロック形成について不安定であったため、私はこの様な性質を持ち、かつ安定なフロック形成菌を分離、同定しそのフロック形成機構を明らかにすることを目的として研究を行なった。

### プロナーゼ感受性細菌の分離、同定。

菌分離の材料となる活性汚泥は蒲生の污水处理施設のものを当研究室においてポリペプトンで馴養しながら保存した。この保存汚泥を蛋白質分解酵素であるプロナーゼと共にインキュベートした時に遊離してくる細菌の中から、目的とするプロナーゼによりフロックが崩壊するフロック形成細菌を分離した。

20 数回の分離実験の結果、6 株が得られ、いずれも Flavobacterium と同定された。

### フロックの性質

分離した B 株について主に実験を行なった。本菌は  $0.3\text{mM}$  の  $\text{Ca}^{++}$  が培地中に存在するとフロックを形成しながら生育する。このフロックは定常期中期に達するまで培養中に見られるが、それ以降は崩壊し始め約 10 時間で完全に消失する。またこのフロックの形成と崩壊の時期は培地中の  $\text{Ca}^{++}$  濃度に依存して変化した (Fig. 1)。プロナーゼ処理により培養の O.D.  $660\text{nm}$  の吸収増加を伴ってフロックが崩壊され、ニンヒドリン発色成分の遊離、対数期における生育速度の上昇 (Fig. 2)、または細胞から  $\text{Ca}^{++}$  が洗浄除去されやすくなるなどの現象が認められた。培養中の  $\text{Ca}^{++}$  濃度が  $0.1\text{mM}$  以下では本菌はほとんどフロックを形成せずに生育した。また  $0.5\text{mM}$  以上の  $\text{Ca}^{++}$  を含む培地中ではよくフロック形成が起こる

が形成されたフロックはプロナーゼ処理によつては崩壊しない性質のものであつた。

## フロックの再構成

菌体を凝集させる作用を持つ物質（凝集因子）の分離、精製を行なうためにはその凝集因子の活性を測定する系を組み立てる必要がある。この目的のために菌体から抽出した凝集因子を再び菌体と混合することにより菌体を再凝集させる系（再構成系）を開発した。

a. 抽出菌体の調製—— O.D. 1.5 の対数生育期に 2mM EDTA を添加しフロックを崩壊させた後に 0.1% ホルムアルデヒドを含む緩衝液中で 15 分処理した。1 回洗浄後に 5M グアニジン塩酸で 10 分間菌体を抽出した。この菌体懸濁液 1ml ずつを遠心チューブに入れ 10,000×g 15 分遠心を行ないその沈澱した菌体を抽出菌体とした。

b. 凝集因子の抽出—— O.D. 1.5 の対数生育期に 2mM EDTA を添加しフロックを崩壊さ

せた。菌体を数回洗浄した後に 5M グアニジンで 10 分間抽出処理を行ない 10,000×g 30 分の遠心で菌体を沈殿させた。この上清を凝集因子を含む粗抽出液とした。

c. 再構成法——抽出菌体に 1ml の抽出液またはその分画液を混合し 0.01M トリス酢酸 pH 7.2 で一夜透析後 0.3mM  $\text{CaCl}_2$  を含む同じ緩衝液で二日間透析した。この時、抽出液またはその分画液中に凝集因子が存在すると  $\text{Ca}^{2+}$  に特異的で凝集因子の量に比例した量のフロックを形成する (Fig. 3)。また再構成されたフロックは EDTA とプロナーゼにより崩壊する。

d. フロック形成率 (Fig. 3) ——再構成した菌体を 30 分静置した時に沈殿するフロックの蛋白質量を全体の蛋白質量に対するパーセントで表現した。

e. 凝集単位 (Fig. 3) ——再構成した菌体を 2 時間静置したときに沈殿するフロックの量が 20% のフロック形成率となる活性を 1 凝集

単位とした。

## 凝集因子の精製と性質

上記の粗抽出液は全く再構成活性を示さなかった。しかし粗抽出液を 2.5M グアニジン塩酸の存在下でセファデックス G-150 を用い分画すると、その溶出液中に強い再構成活性が出現した (Fig. 4)。この活性区分を 6M 尿素を含む 0.01M トリス酢酸 pH 7.2 で透析し充分にグアニジン塩酸を除去した後、6M 尿素で平衡化した CM-セルロースで分画した。溶出した活性部をさらに焦点電気泳動で精製を行なった。その結果、セファデックス溶出部の活性を基準とした時の活性の回収率は 8%、比活性は 42 倍に精製された (Table 1)。この凝集因子の活性はトリプシン処理により失活し、等電点は pH 8.3 で、沸騰水中での 30 分の処理によっても全く失活されなかった。また 2.5M グアニジン塩酸存在下でセファデックスを用いて測定した分子量は約 140,000 であった。

## 他の因子の関与

フロックを形成しない変異株 (M3, M7, M9, M11, M12) と M11 変異株からのフロックを形成する復帰変異株 (R11) を分離した。これら変異株と親株さらにトリプシン処理菌の抽出菌体をそれぞれ調製した。これに部分精製した凝集因子 10 $\mu$ g を添加しその再構成活性を測定した (Table 2)。その結果, 凝集因子の添加により親株, R11, M3 さらに M12 株がフロックを再構成した。しかレトリプシン処理菌, M7, M9, M11 株は凝集因子の存在下でもフロックを再構成することはできなかった。このことはトリプシンにより消化された成分は抽出菌体の再構成に必須の成分であり, また M7, M9, M11 も添加された凝集因子以外の必須成分を欠如しているものと考えられる。

次にこれらの抽出菌体から細胞表層画分を調製し SDS-アクリルアミドスラブゲル電



気泳動でその蛋白質組成を比較した。その結果、トリプシンにより消化される物質と M7, M9, M11 変異株について減少している成分は同じもので分子量 98,000 と 93,000 の蛋白質であることが示唆された。

### Ca<sup>++</sup> の結合部位

抽出菌体と粗抽出液またはその混合物に対する <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> の結合能を透析平衡法で測定した結果、粗抽出液には全く <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> 結合能がないこと、また抽出菌体が全ての <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> を結合することが明らかとなった。また部分精製した凝集因子にも全く結合活性は見られなかった。

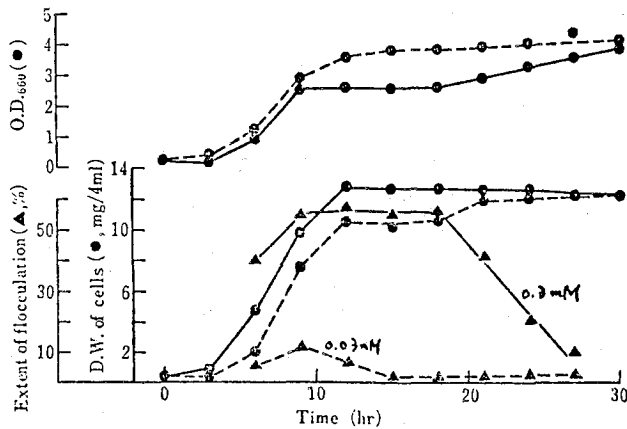
一方、親株、変異株さらにトリプシン処理菌の抽出菌体から調製した細胞表層画分に対する <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> の結合は分子量 98,000 と 93,000 の蛋白質を多量に含んでいる B, M3, R11, M12 株のものが上記蛋白質を少量含んでいるトリプシン処理菌, M7, M9, M11 のものよりも多量の <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> を結合することが示された。

## 総合考察

細胞表層蛋白質の関与により安定なフロックを形成する細菌を分離した。分離株が Flavobacterium と同定されたこと、菌体の凝集には  $Ca^{++}$  が必要であることなどから、手塚らが Flavobacterium のフロック形成機構として提唱したイオン結合説を支持する性質を持っている。しかし手塚らは彼らの使用した株に対してトリフシン処理を行なったが全くフロック形成には影響が見られなかったと報告しているので、本実験で分離された Flavobacterium 株は手塚らの株と異なるフロック形成機構を持っていると考えられる。

従来細菌のフロックが再構成され、それに必要な成分が明らかにされた例はない。フロック形成機構の解明のためには再構成法が有効であることが本実験で初めて明らかにされた。しかし、この再構成率の測定法は経験的に誤差が5~7%と大きいこと、グアニジ

ノ塩酸可溶性の凝集因子の精製にあたって回収率が現在の方法では大変低いことなどのため、この因子の完全な精製を行なうことはできなかった。また細胞表層画分中のフロック形成に関係すると思われる成分についても可溶化に成功していない。これらの点を解決するためには今後新しい技術の開発が必要であろう。 Fig. 1



Growth and Flocculation in the Media Containing Different Concentrations of Calcium.

Cells were grown in the medium containing either 0.3 mM or 0.03 mM of calcium. O.D. of the culture was measured with 10-fold diluted sample. Solid and dashed lines represent the cultures with 0.3 mM and 0.03 mM of calcium, respectively.

Fig. 2

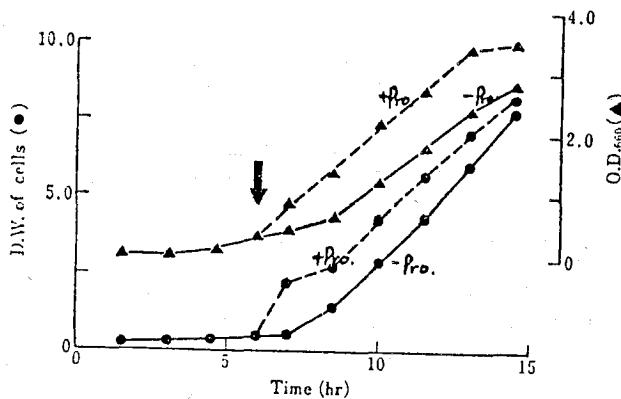
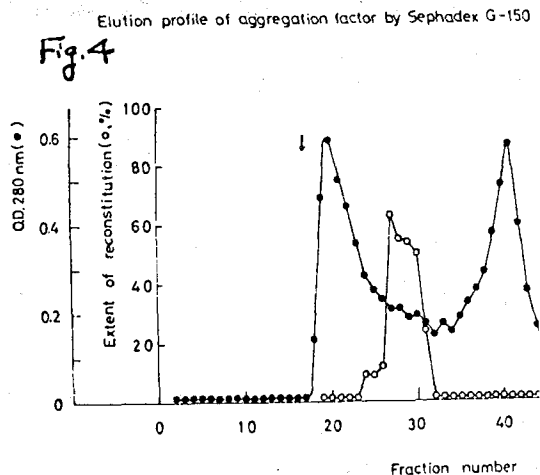
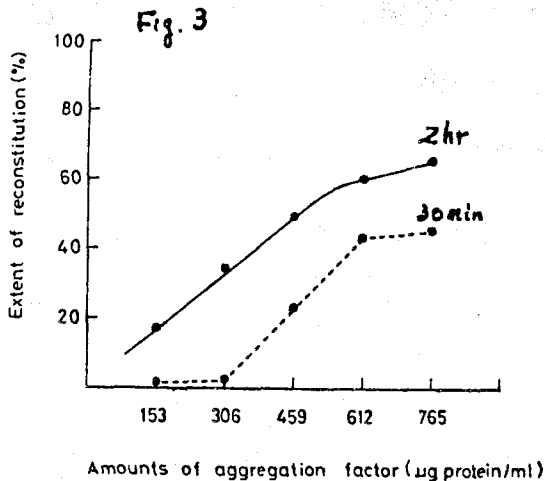


FIG. 1. Effect of Pronase on Cell Growth.

Pronase E was added at the time indicated by an arrow to one culture but not to the control (solid lines). O.D. and dry weight of the cells in culture with Pronase were shown by dashed lines.

▲, O.D. at 660 nm was determined with 10-fold diluted culture; ●, dry weight of cells per 2 ml culture.



~~Purification~~ Purification of the aggregation factor

**Table 1**

	Total activity (units)	Total protein (mg)	Recovery (%)	Specific activity (units/mg protein)
Crude extract	0	633.40		
Sephadex eluate	860	156.04	100	5.5
CM-cellulose eluate	198	1.75	23	113.1
After electrofocussing	71	0.31	8	229.0

Reconstitution of flocs from mutant strains.

**Table 2**

Strains	Extent of reconstitution (%)	
	- Extract	+ Extract
B	12	45
B (Tryp)	0	0
M. 3	0	23
M. 7	0	0
M. 9	0	0
M. 11	0	0
R. 11	9	48
M. 12	12	36

## 審査結果の要旨

活性汚泥法は生活廃水、工業廃水の生物的浄化処理法として広く用いられている。活性汚泥とは細菌、原生動物などを含む微生物の凝集体であり、このような凝集体の生成が固液分離を容易にするため活性汚泥の管理、運転上もっとも重要である。微生物凝集体の生成の原因は細菌によるフロックの形成のためであり、従来純培養においてフロックを形成する細菌種については多数の報告がある。しかしフロック形成機構についての詳細な研究はこれ迄行なわれていなかった。

本論文はタンパク質分解酵素、プロナーゼによりフロックが崩壊する一細菌のフロック形成機構を再構成法により明かにしたものである。

著者はまず活性汚泥よりプロナーゼ処理によりフロックが崩壊するフロック形成細菌の分離を試み、6株を得てこれらは何れも *Flavobacterium* に属することを明かにした。以下主として分離株の一つB株について実験を行った。著者はB株のフロック形成の条件について検討し、フロックの形成には培地中に適量のカルシウムイオンが存在することが必要であることを明かにした。またフロックはEDTA処理によっても崩壊する。

次いで著者はフロックの再構成実験を行った。すなわち、フロックをEDTA処理により崩壊させた後、ホルムアルデヒドにより固定した菌体を5Mグアニジン塩酸により抽出した残渣（抽出菌体）と、EDTAによりフロックを崩壊させた菌体の5Mグアニジン塩酸抽出物をセファデックスG-150により分画した成分を合せ、グアニジン塩酸を透析により除去した後、0.3mMのカルシウムイオンに対し透析するとフロックが再構成されることを明かにした。再構成されたフロックは天然のものと同様にEDTAあるいはプロナーゼ処理により崩壊する。

次に著者はグアニジン塩酸抽出物中に存在する凝集因子の精製を試み、CM-セルローズ、集点電気泳動により約4.2倍の比活性まで精製した。この凝集因子はトリプシン処理により失活し、等電点はpH 8.3で加熱に対し安定であり、分子量は約1.4万と推定された。精製凝集因子により再構成されたフロックはEDTA、プロナーゼに対し感受性である。

最後に著者はフロック形成に関してこの凝集因子以外の成分が関与する可能性を調べるため、フロックを形成しない変異株5株を分離し、それらの抽出菌体を得て、これに精製した凝集因子を添加し再構成実験を行った。変異株の内2株はフロックが再構成されたので、これら変異株はこの凝集因子の生合成に欠陥があるためフロックが形成されないものと考えられた。残りの3株は精製した凝集因子を添加してもフロックが再構成されず、他の因子もフロック形成に関与する可能性が示された。これら3株の細胞表層に含まれるタンパク質は電気泳動による分析で親株に比べかなりの差があることが示され、またカルシウムイオンの結合性についても親株に比べ有意に低いことが明かとなった。

以上のように本論文は細菌におけるフロックの形成機構について始めて再構成法による解析を行ったものであり、微生物学の学理および応用に貢献するところが大きい。よって三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。