

新規硫酸還元菌の単離と
発酵的代謝特性に関する研究

田崎 雅晴

1993

目次

第一章 総論	4
第一節 研究の目的	4
第二節 研究の背景	4
第三節 研究の構成	9
第二章 新しい代謝経路を有する硫酸還元菌の単離	11
第一節 はじめに	11
第二節 プロピオン酸酸化硫酸還元菌 <i>Desulfobulbus propionicus</i> MUD の 単離とその諸性質	11
1 分離源および実験方法	11
1-1 分離源	11
1-2 培地および培養方法	11
1-3 単離操作	12
1-4 各種生理試験	12
1-5 機器分析	13
2 結果および考察	14
2-1 集積および単離	14
2-2 MUD株の形態	14
2-3 生育条件および基質資化性	15
2-4 MUD株によるプロピオン酸の酸化	17
2-5 MUD株の栄養要求性	17
2-6 同定に関する考察	18
第三節 新規安息香酸酸化硫酸還元菌 <i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i> TSB の 単離とその性質	20
1 分離源および実験方法	20
1-1 分離源	20
1-2 培地および培養方法	20
1-3 単離操作	20
1-4 各種生理試験	21
1-5 機器分析	21
1-6 Carbonmonoxide dehydrogenase(CODH)の活性測定	22

2	結果および考察	22
2-1	集積および単離	22
2-3	TSB株の形態および生育条件	23
2-4	安息香酸および酪酸の酸化	24
2-5	安息香酸の分解に関する考察と新種としての提案	25
第四節 要約		27
第三章 Methylmalonyl-CoA経路およびCODH経路による発酵的代謝		
第一節 はじめに		28
第二節 <i>Desulfobulbus propionicus</i> MUDによるアルコールおよびアルデヒドからのプロピオン酸の生成		32
1	実験方法	32
1-1	培養および反応条件	32
1-2	酵素活性の測定	32
1-3	機器分析	33
2	結果および考察	33
2-1	アルコール類からのプロピオン酸の生成	33
2-2	アルデヒド類からのプロピオン酸の生成	35
第三節 <i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i> TSBによるメトキシ安息香酸の代謝と酢酸の生成		37
1	実験方法	37
1-1	培養および反応条件	37
1-2	酵素活性の測定	38
1-3	機器分析	38
2	結果および考察	38
2-1	メトキシ安息香酸類における生育とその特性	38
2-2	濃縮菌体によるメトキシ安息香酸類の変換と量論比	40
2-3	酢酸の生成と脱メチル反応	40
第四節 要約		43
第四章 異なる3種の硫酸還元菌によるピルビン酸の発酵的代謝の差異		
第一節 はじめに		45

第二節 実験方法.....	45
1 供試菌体.....	45
2 培地および反応条件	45
3 酵素活性の測定方法.....	46
4 機器分析.....	47
第三節 結果および考察.....	47
1 各硫酸還元菌の発酵特性.....	47
2 各硫酸還元菌の酵素活性.....	49
第四節 要約.....	52
第五章 総括および結論.....	53
参考文献	57
謝 辞	60

第一章 総論

第一節 研究の目的

硫酸還元菌は古くから地球上における硫黄循環に重要な役割を担っている細菌として知られてきたものの、これまでは乳酸などの限られた基質しか利用できないと考えられたり、また硫化水素を生成するために嫌気処理にとっては不都合な細菌として扱われる場合が多かった¹²⁾。しかし、最近になって次々と新しい種類の硫酸還元菌が発見され、それらの基質利用性がきわめて広いことが明らかになり²³⁾、自然界の有機物循環および嫌気処理における硫酸還元菌の役割が再認識されるようになってきた。

硫酸還元菌のエネルギー獲得は基質を酸化する際に放出される還元力[H]が電子伝達系を経て硫酸を還元する反応と共役して起る。しかし硫酸還元菌は硫酸イオンがない場合でも発酵的に代謝を行い生育することが古くから知られており^{45,67)}、この場合、基質の酸化により生成した還元力は他の物質などを還元することにより消費される。このような発酵においては呼吸系を持たない他の嫌気性細菌と同様に、基質レベルのリン酸化によって生成するATPが生育に利用されているものと考えられている。

しかし近年、多数の硫酸還元菌が単離され、それらの細菌が持つユニークな基質酸化経路が研究されてくるにしたがい、硫酸還元菌の発酵的代謝は従来から知られている単純な不均化反応による代謝のみではなく、プロピオン酸酸化経路（methylmalonyl-CoA経路）、酢酸酸化経路（CODH経路やcitrate回路）のような独特な代謝系を生かした発酵的生育が可能であることが示唆されてきた。しかしながらこのような経路が関与している発酵的代謝系についての研究はまだ少なく、例えばCODH経路については硫酸呼吸を伴う酢酸酸化そのものについての研究がなされているのみである。現実には自然界において、硫酸イオン濃度が極めて低い条件でも硫酸還元菌の存在が報告されており⁸⁾、硫酸還元菌の硫酸呼吸を伴わない発酵的生育を研究することは、生態系における硫酸還元菌の挙動を明らかにする上にも非常に重要であると思われる。

本研究では自然環境下あるいは嫌気リアクター内での硫酸還元菌の挙動を明らかにするための基礎的知見を得ることを目的として、嫌気環境から硫酸還元菌の単離を行うとともに、それらの分離株が持つ特異的な代謝経路と発酵的生育との関係を明らかにした。

第二節 研究の背景

近年、UASB（上向流嫌気汚泥床）法や各種の微生物保持担体を利用した嫌気処理法の技術開発には目ざましいものがある。このような中で嫌気処理に関与する有機酸生成細菌（共生細菌を含む）やメタン生成細菌などの性質や役割の解明に関する研究が進められてきている。また、嫌気条件下に存在する硫酸還元菌についても近年急速に研究が進展しつつある。

硫酸還元菌の存在は古くから知られていたが、硫酸呼吸の結果、硫化水素を生成するため、嫌気処理の観点からは不都合な細菌として扱われる場合が多かった¹⁾。しかし最近の研究により、硫酸還元菌の中には各種有機酸をはじめ、アルコール類、糖類さらにはフェノールなどの芳香族化合物も分解できる種が存在することが明らかになり、嫌気処理における硫酸還元菌の役割も再認識されるようになってきた²⁾。

硫酸還元菌の代謝様式は、大きく2つのグループに分けられる。すなわち*Desulfotomaculum acetoxidans*⁹⁾や*Desulfobacter*属細菌のような酢酸を利用できる硫酸還元菌の発見に伴い、硫酸還元菌は各種の基質を酢酸を経て二酸化炭素にまで酸化するグループと、最終生産物として酢酸を生成するグループとに分けられるようになった²⁾。前者を完全酸化型の硫酸還元菌、後者を不完全酸化型の硫酸還元菌と呼んでいる。酢酸を利用できる硫酸還元菌の発見の後、*Desulfococcus*、*Desulfobulbus*、*Desulfonema*、*Desulfobacterium*など、さまざまな性質を持つ硫酸還元菌が分離された。その結果、硫酸還元菌が分解利用できる物質は、今まで知られていた乳酸、エタノールなどのほかに、脂肪酸、糖類、芳香族化合物など多種多様にわたっていることが明らかになってきた。(Table 1 参照)。

Table 1. Properties of sulfate-reducing bacteria^{2,10)}

Species	G+C of DNA (mol%)	Optimum temperature (°C)	Type of oxidation	Electron donors							NaCl requirement (g/l)
				Hydrogen	Lactate	Ethanol	Acetate	Fatty acid (C-atms)	Benzoate	Others	
<i>Desulfotomaculum</i>											
<i>nigrificans</i>	49	55(max.70)	i	+	+	+	-	-	-	Fructose	-
<i>orientis</i>	45	37	i	+*	+	+	-	-	-	Methanol, MBA	-
<i>ruminis</i>	49	37	i	+	+	+	-	-	-	Alanine	-
<i>antarcticum</i>	nr	20-30	i	nr	+	nr	-	-	nr	Glucose	-
<i>acetoxidans</i>	38	35	c	-	-	+	+	4-5	-	Butanol	-
<i>guttoideum</i>	52	31	i	+	+	-	-	nr	nr	nr	-
<i>sapomandens</i>	48	38	c	nr	-	+	(+)	4-18	+	Phenylacetate, Phenylpropionate	-
<i>kuznetsovii</i>	49	60-65	c	+*	+	+	(+)	3-18	-	Methanol, fumarate	-
<i>geothermicum</i>	50	54	c	+*	+	+	-	3-5,6,8	-	Fructose, pelargonate	2-50
<i>thermoacetoxidans</i>	50	55-60	c	+*	+	-	+	2-5	-	Palmitate, stearate	-
<i>thermobenzoicum</i> **	52.8	62	c	+*	+	+	(+)	3-6	+	Alanine, butanol	-
<i>Desulfovibrio</i>											
<i>desulfuricans</i>	59	30-36	i	+	+	+	-	-	-	Choline, malate	-
<i>vulgaris</i>	65	30-36	i	+	+	(+)	-	-	-	nr	-
<i>gigas</i>	65	30-36	i	+	+	(+)	-	-	-	Malate	-
<i>africanus</i>	65	30-36	i	+	+	+	-	-	-	Malate	-
<i>salaxigens</i>	49	30-36	i	+	+	+	-	-	-	Malate	20
<i>sulfodismutans</i>	64	30-35	i	(+)	+	+	-	-	-	Propanol, butanol	-
<i>carbinolicus</i>	65	37-38	i	+*	+	+	-	-	-	Methanol, butanol	-
<i>simplex</i>	46	37	i	+	+	+	-	-	-	Glycerol	-
<i>giganteus</i>	55	35	i	+	+	+	-	-	-	Vanillin(+CO ₂)	-
<i>furfuralis</i>	61	38	i	nr	+	+	-	nr	nr	<i>p</i> -Anisaldehyde(+CO ₂) Syringaldehyde(+CO ₂) Glycerol, pentanol	2-50
<i>fructosovorans</i>	64	35	i	+	+	(+)	-	-	nr	Furfural, 2-furoic acid	-
<i>alcoholovorans</i>	64.5	35-37	i	+	+	+	-	-	nr	4-Hydroxybutyrate	-
<i>termitidis</i>	68	35	i	-	+	nr	-	-	nr	Fructose	-
<i>pigra</i>	66	37	i	+	+	+	-	-	nr	Propanediol(1,2- 1,3- 1,4-), 1,4-butanediol	7.5
										Glucose, xylose, fructose	-
										-	-

<i>Desulfomicrobium baculatus</i>	57	28-37	i	(+)	+	-	-	-	nr	Malate	-
<i>apsheronum</i>	52	25-30	i	+	+	-	-	-	nr	Malate, fumarate	-
<i>Thermodesulfobacterium</i>											
<i>commune</i>	34	70 (max.85)	i	+	+	-	-	-	nr	nr	-
<i>mobilis</i>	38	65 (max.85)	i	+	+	-	-	-	nr	nr	nr
<i>Desulfobulbus</i>											
<i>propionicus</i>	60	28-39	i	+	+	+	-	3	-	nr	-
<i>elongatus</i>	59	35	i	+	+	+	-	3	-	nr	-
<i>marinus</i>	nr	29	i	+	+	+	-	3	-	nr	20
<i>Desulfobacter</i>											
<i>postgatei</i>	46	28-32	c	-	-	-	+	-	-	nr	7
<i>hydrogenophilus</i>	45	28-32	c	+*	-	(+)	+	-	-	nr	20
<i>latus</i>	44	28-32	c	-	-	-	+	-	-	nr	20
<i>curvatus</i>	46	28-30	c	(+)	-	+	+	-	-	nr	10
<i>Desulfococcus</i>											
<i>multivorans</i>	57	35	c	-	+	+	(+)	3-16	+	Phenylacetate, Phenylpropionate	5
<i>biacutus</i>	56.5	37	c	-	-	+	+	3-7	-	Acetone, acetoacetate	-
<i>Desulfosarcina</i>											
<i>variabilis</i>	51	33	c	+*	+	+	(+)	3-14	+	Phenylacetate, Phenylpropionate	15
<i>Desulfobacterium</i>											
<i>autotrophicum</i>	48	20-26	c	+*	+	+	(+)	(3)-16	-	Succinate	20
<i>vacuolatum</i>	45	25-30	c	+*	+	(+)	(+)	(3)-16	-	Succinate	20
<i>phenolicum</i>	41	28	c	-	-	(+)	(+)	(4)	+	Phenol, p-cresol, Glutarate	20
<i>indolicum</i>	47	28	c	-	-	(+)	(+)	(3)	-	Indole	20
<i>catecholicum</i>	52	28	c	(+)	(+)	(+)	(+)	(3-20)	+	Catechol	-
<i>anilini</i>	59	35	c	+	-	-	+	1-18	+	Methanol, phenol, p-Cresol, aniline, Nicotinate, pimelate, Succinate, glutarate	14
<i>niacini</i>	46	29	c	+*	-	+	(+)	(3)-16	-	nr	15
<i>macestii</i>	58	35	nr	+*	+	+	-	-	-	nr	nr
<i>Desulfonema</i>											
<i>limicola</i>	35	30	c	+*	+	-	(+)	3-14	-	Succinate	15
<i>magnum</i>	42	32	c	-	-	-	(+)	3-10	+	Succinate	20
<i>Desulfomonile</i>											
<i>tiedjei</i>	49	37	(c)	+*	(+)	-	(+)	nr	+	3-Cl-Benzoate	nr
<i>Desulfhalobium</i>											
<i>reibaense</i>	57.1	37-40	i	+	+	+	+	-	nr	nr	100(<240)
<i>Desulfobotulus</i>											
<i>sapovorans</i>	53	34	i	-	+	-	-	4-16	-	Palmitate	-
<i>Desulfoarcus</i>											
<i>baarsii</i>	66	35-39	c	-	-	-	(+)	(3)-18	-	Methylbutyrate(2-,3-)	-

Symbols: c, completely oxidizing type; i, incompletely oxidizing type; +, utilized; +*, autotrophic growth; (+), poorly utilized; -, not utilized; MBA, methoxylated benzoic acids. nr, not reported or not determined. ***D. thermobenzoicum* was firstly described by the author in this study.

硫酸還元菌のエネルギー獲得は、多くの場合基質を酸化する際に放出される還元力 [H] が電子伝達系を経て硫酸を還元する反応と共役して起こる (Fig. 1参照)。硫酸還元反応において、硫酸イオンはまずATP-sulfurylaseによりAPS(adenosine-5'-phosphosulfate)に変換され、さらにAPSはAPS-reductaseにより亜硫酸とAMPになる。亜硫酸は最終的には硫化水素へと還元されるが、その反応は単純な酵素反応というよりは、酵素反

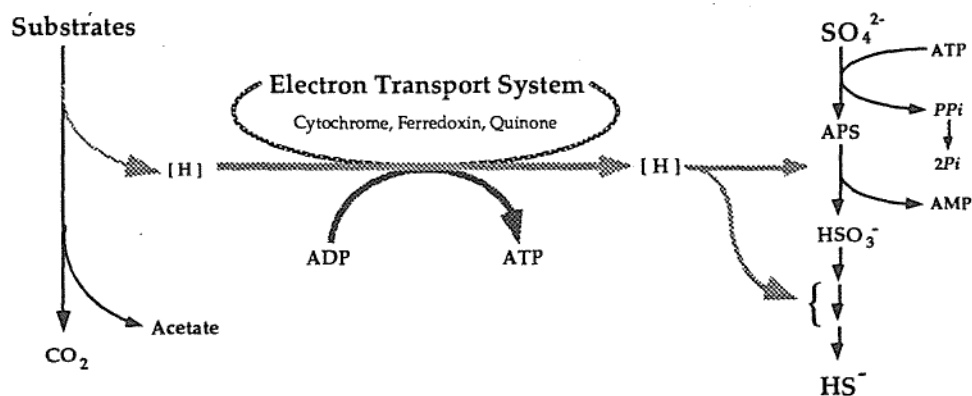


Fig. 1. Scheme for dissimilatory sulfate reduction. Substrates are oxidized to CO_2 by completely type of sulfate-reducing bacteria, and are oxidized to acetate and CO_2 by incompletely oxidizing type of sulfate-reducing bacteria.

応とその結果生ずる反応環境との化学反応とで成り立っていると考えられている¹¹⁾。

嫌気処理において重要な中間生成物である直鎖飽和脂肪酸や安息香酸は、完全嫌気でしかも硫酸イオン等がない条件では、嫌気共生細菌(syntroph)と水素資化性細菌との共生系でのみ酢酸へと分解される。共生細菌による有機酸などの酢酸、水素、二酸化炭素への分解反応は吸エルゴン反応でエネルギー的に進行しにくいですが、水素資化性細菌による水素からのメタンもしくは硫化水素生成反応が発エルゴン反応であるため、共生系においては全体の反応が発エルゴン反応となり分解反応が進行する¹²⁾(Table 2参照)。このように共生系による有機酸の分解には水素消費細菌の存在が必須である。

一方嫌気共生細菌に対して、硫酸還元菌は硫酸呼吸という特有の有利な代謝系をいかして、水素消費細菌との共生関係なしに各種の有機酸を分解し生育することができる。一例としてプロピオン酸と安息香酸を基質とした場合の硫酸還元反応を Table 2C に示した。プロピオン酸分解硫酸還元菌は、単独で嫌気共生細菌と水素資化性細菌の両方の反応を行っていることになる。つまり硫酸還元菌は、硫酸呼吸を行うことにより単独で嫌気処理の重要な中間生成物である安息香酸や有機酸を分解することができる。

硫酸還元菌が飽和脂肪酸や安息香酸を単独で酸化するという知見は、1977年以降に発見された細菌のなかで初めて明らかになったことであり、それ以前の硫酸還元菌には知られていなかった特徴である。硫酸還元菌による物質酸化に関する研究が進むにつれ、従来までは知られていなかった代謝経路の存在が次々と明らかになってきた。その代表的なものがプロピオン酸酸化経路である methylmalonyl-CoA 経路^{13,14)}、酢酸酸化経路である citrate cycle^{15,16,17)} および CODH 経路^{18,19)} である。このような経路の存在が明らかにされたことにより、近年硫酸還元菌によるプロピオン酸の分解、基質の二酸化炭素までの完全酸化などの、代謝経路に関する詳

Table 2. Degradation of propionate and benzoate under anaerobic conditions⁵⁾.

A. Acetate-producing reactions	
① $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2 + \text{H}^+$	$\Delta G^\circ = +76.1 \text{ kJ/reaction}$
② $\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^- + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2 + 3\text{H}^+$	$\Delta G^\circ = +89.7 \text{ kJ/reaction}$
B. Hydrogen-consuming reactions	
③ $4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	$\Delta G^\circ = -135.6 \text{ kJ/reaction}$
④ $4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	$\Delta G^\circ = -151.9 \text{ kJ/reaction}$
A + B	
①+③ $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{CH}_4 + \text{H}^+$	$\Delta G^\circ = -102.4 \text{ kJ/reaction}$
①+④ $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{HCO}_3^- + 3\text{HS}^- + \text{H}^+$	$\Delta G^\circ = -151.3 \text{ kJ/reaction}$
②+③ $4\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^- + 19\text{H}_2\text{O} \rightarrow 12\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{CH}_4 + 9\text{H}^+$	$\Delta G^\circ = -42.8 \text{ kJ/reaction}$
②+④ $4\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^- + 3\text{SO}_4^{2-} + 16\text{H}_2\text{O} \rightarrow 12\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{HCO}_3^- + 3\text{HS}^- + 9\text{H}^+$	$\Delta G^\circ = -97.1 \text{ kJ/reaction}$
C. Sulfate-reducing reactions	
$4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{HCO}_3^- + 3\text{HS}^- + \text{H}^+$	$\Delta G^\circ = -151.3 \text{ kJ/reaction}$
$4\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^- + 15\text{SO}_4^{2-} + 16\text{H}_2\text{O} \rightarrow 28\text{HCO}_3^- + 15\text{HS}^- + 9\text{H}^+$	$\Delta G^\circ = -165.8 \text{ kJ/reaction}$

細な研究が急速に発展しつつある。

これまで述べてきたように硫酸還元菌の利用できる基質が多様性を極めてくると、その中で実際の嫌気処理などで問題になるのは水素や酢酸のようにメタン生成細菌と競合する基質である。特に酢酸は、ほとんどの物質が酢酸を経由してメタンや二酸化炭素に変換されることが考えられていることから、最も重要な基質と言える。一般に硫酸還元菌の方が酢酸に対する親和性が高いものと推定されている。依田らは、嫌気性生物膜において処理水中の酢酸濃度が低い条件では酢酸資化性硫酸還元菌が優占になるが、逆に高い条件では酢酸資化性メタン生成細菌が優占になると報告している²⁰⁾。しかし正常に行われている嫌気処理においては、基質のほとんどが最終的にはメタン生成に使われており、硫酸還元菌が消費する還元力は1割程度であるとの報告もある¹⁾。これは実際の嫌気処理では、硫酸還元菌はメタン生成細菌と競合しない基質を利用しているか、また各種の有機酸などからメタンを生成するまでの反応に関与する細菌が互いにフロックを形成し、そのため硫酸還元菌が利用できる基質が減少していると考えられている²⁾。

硫酸還元菌は硫酸イオンが非常に押えられた環境でも普遍的に存在していることが知られている⁸⁾。これはひとつに前述したような基質に対する高い親和性が理由に上げられる。つまり微量に存在する硫酸イオンなどを効率的に利用し個体維持しているものと考えられる。また硫酸還元菌は硫酸還元を行わないで発酵的に利用できる基質をいくつか持っていることが古くから知られている^{4,5,6,7,8)}。一般に硫酸還元の場合、基質を酸化する際に放出される還元力が電子伝達系を通る時にエネルギーが生成され、その還元力は最終的に硫酸イオンを還元することにより消費される¹²⁾。硫酸イオンがない発酵的代謝の場合、基質の酸化により放出され

た還元力は他の物質などを還元することにより消費されなければならない。リンゴ酸やフマル酸、ピルビン酸は発酵的に利用できる基質の代表的なものであるが、例えばピルビン酸の場合、一部が酢酸にまで酸化され、残りが放出された還元力によりプロピオン酸に還元される。この際のエネルギーの獲得は他の嫌気性細菌と同様に、基質レベルのリン酸化によると考えられる。

近年、今まで利用できないとされてきた基質を資化する硫酸還元菌が次々に発見され、硫酸還元菌の発酵的代謝は、従来から知られている単純な不均化反応による代謝のみではなく、いろいろな可能性があることが示唆されてきた^{8,13)}。しかし実際の硫酸還元菌の発酵的生育に関する研究は、1960年前後から10年間ほど *Desulfovibrio* 属の細菌により行われてきただけで、その報告例は非常に少ない^{4,5,6,7)}。本研究はいくつかの硫酸還元菌の発酵的代謝の多様性を示すとともに、1980年代に発見された methylmalonyl-CoA 経路や CODH 経路のような代謝経路を持つ硫酸還元菌について、その経路を有効に生かした独特な発酵的代謝を明らかにしたものである。

第三節 研究の構成

本研究の構成は別図に示したように、methylmalonyl-CoA 経路および CODH 経路を有する硫酸還元菌を単離して、それぞれの硫酸還元菌が持つ代謝経路による特徴的な発酵的代謝について検討を行った。その後、単離した硫酸還元菌および古くから知られている硫酸還元菌を用いて、同一基質でのその発酵的代謝の差異について比較検討を行った。

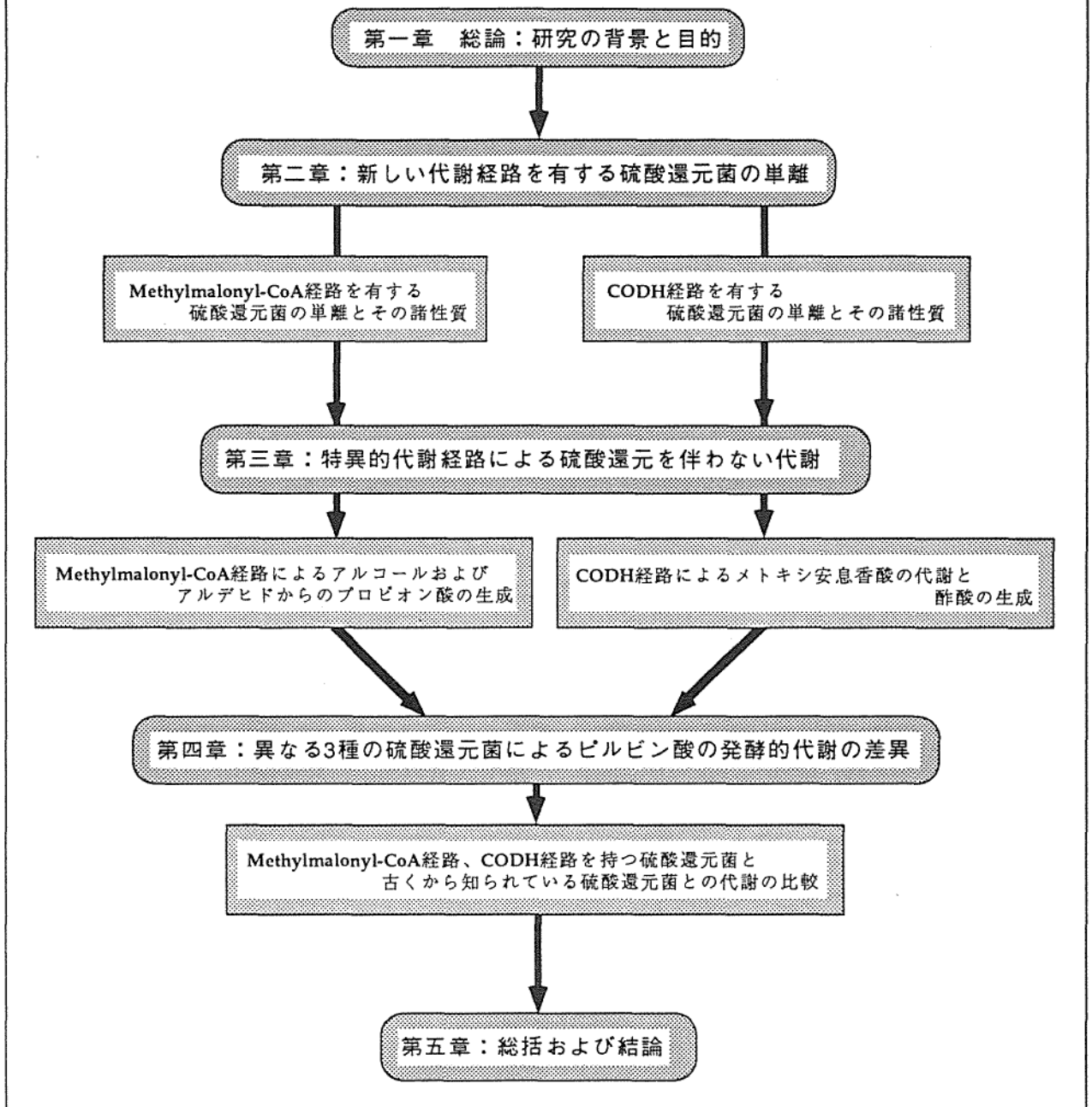
代謝経路としては「methylmalonyl-CoA 経路」と「carbonmonoxide dehydrogenase 経路(CODH 経路)」に注目した。methylmalonyl-CoA 経路はプロピオン酸酸化経路でプロピオン酸を利用する硫酸還元菌に必須の経路である。また CODH 経路は酢酸酸化経路であり、有機酸を完全酸化する硫酸還元菌の大半にこの経路が見出されている。まず第二章でこの二つの代謝系を有する硫酸還元菌をそれぞれ単離し、その生理・生化学的考察を行った。methylmalonyl-CoA 経路を有する硫酸還元菌はプロピオン酸で集積した培養から、また CODH 経路を有する硫酸還元菌は酪酸で集積した培養から純粋分離を行った。

続いて第三章で各硫酸還元菌が有する代謝系を利用した発酵的代謝についての考察を行った。プロピオン酸酸化硫酸還元菌については methylmalonyl-CoA 経路を利用してのアルコール、アルデヒドからの酢酸およびプロピオン酸の生成を休止菌体を用いて反応量論値等の検討を行った。また CODH 経路を有する硫酸還元菌については、メトキシ安息香酸のメトキシ基からの酢酸生成について検討を行った。

第四章では、上記2種の単離菌と従来から最も良く知られている *Desulfovibrio* 属の細菌とで、ピルビン酸の発酵的代謝についての差異を、反応量論、酵素活性等から比較検討し、各細菌の代謝様式を考察した。

最後に第五章で全体的な総括を行った。

新規硫酸還元菌の単離と発酵的代謝特性に関する研究



別図：研究の流れ

第二章 新しい代謝経路を有する硫酸還元菌の単離

第一節 はじめに

酢酸酸化経路であるcitrate回路やCODH経路、プロピオン酸酸化経路のmethylmalonyl-CoA経路は近年発見された硫酸還元菌が持つ代謝経路の代表である。硫酸還元菌がこのような代謝経路をどのように生かし、発酵的に生育しているかを検討することは、硫酸還元菌の生態を考える上でも非常に重要なことである。本章ではこのような代謝経路を持つ硫酸還元菌を得るために、嫌気リアクター汚泥からの単離を試みた。

第二節 プロピオン酸酸化硫酸還元菌*Desulfobulbus propionicus* MUD の単離とその諸性質

プロピオン酸は嫌気代謝において重要な代謝中間物質であるが、プロピオン酸分解細菌の研究は少ない。Booneらが報告した*Syntrophobacter wolinii*²¹⁾は唯一の硫酸還元菌以外のプロピオン酸分解細菌であるが、共生細菌であるため水素を消費するメタン生成細菌もしくは硫酸還元菌との共生系でなければ生育できない。これはプロピオン酸の酢酸への分解反応が進むためには極めて低い水素分圧が要求されるためである。一方、*S. wolinii*のような共生細菌に対して、硫酸還元菌は水素消費細菌なしに単独で分解を進めることができる。これまでにプロピオン酸分解能の高い硫酸還元菌として6属12種が知られている (Table1 参照)。プロピオン酸酸化硫酸還元菌はすべて、その分解経路である「methylmalonyl-CoA経路」を持つ¹³⁾。このことよりmethylmalonyl-CoA経路を持つ硫酸還元菌を得るためには、プロピオン酸で集積を行った培養系から単離操作を行うことが最適な方法であると考えられる。本節ではプロピオン酸酸化硫酸還元菌の単離を行い、その単離菌の細菌学的性質について検討を行った。

1 分離源および実験方法

1-1 分離源

プロピオン酸を含む揮発性有機酸を連続処理していた中温性UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blankets) リアクターの顆粒汚泥を分離源に用いた。

1-2 培地および培養方法

分離および培養に用いた基本培地はWiddelらの方法²²⁾に基づいて調製した (Table3)。培地中には唯一の炭素源としてプロピオン酸を10 mM、また電子受容体として硫酸イオン (Na_2SO_4) を10 mMとなるように添加した。各種基質利用性試験においてはプロピオン酸の代わりにpH調整済みの基質溶液を無菌的に添加した。

培養には20 ml容スクリーキャップつきネジ口試験管を用い、気相がないように培地を満たして行った。

Table 3. Composition of basal medium for sulfate reducing bacteria.

Fresh Water Basal Medium		Trace Elements Solution (nM)	
NH ₄ Cl	10 mM	FeCl ₂	10000
KH ₂ PO ₄	1 mM	CoCl ₂	1000
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1 mM	MnCl ₂	1000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 mM	ZnCl ₂	1000
NaHCO ₃	30 mM	H ₃ BO ₃	100
Trace Elements Solution	(1.0 ml / l)	NiCl ₂	100
Vitamin Solution	(1.0 ml / l)	AlCl ₃	100
Na ₂ S·9H ₂ O	1.5 mM	Na ₂ MoO ₄	100
		Na ₂ SeO ₃	10
		Na ₂ WO ₄	10
		CuCl ₂	10
		HCl	(conc. 1 ml/l)
Vitamin Solution			
20 nM of biotin, 4-aminobenzoic acid, pantothenate Ca, pyridoxine, nicotinamide, thiamine, lipoic acid, folic acid, vitamin B ₁₂ and riboflavin.			

また水素利用性の試験にはブチルゴム栓付きの50 ml容血清瓶に培地20 mlを入れ、気相をH₂/CO₂ (4:1, vol/vol) で置換し1kg/cm² (98 kPa) 陽圧として培養した。

補助栄養物質およびビタミン類の影響は次の6系の培地を用いて検討した。

1. Basal medium + Yeast extract(50mg/l) + vitamin solution + trace elements
2. Basal medium + Yeast extract(100mg/l) + vitamin solution + trace elements
3. Basal medium + Bactopectone(100mg/l) + vitamin solution + trace elements
4. Basal medium + vitamin solution + trace elements
5. Basal medium + trace elements
6. Basal medium (in tap water)

Basal medium 中には10m M NH₄Cl, 1 mM KH₂PO₄, 1mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 30m M NaHCO₃, 1.5m M Na₂S およびプロピオン酸 (10 mM)と硫酸ナトリウム (10 mM)を添加した。すべての系において植え継ぎによる各種成分の持込みの影響をなくすために、それぞれの培養での3代目の培養系で測定を行った。

すべての培養は36℃にて静置で行った。

1-3 単離操作

植菌量4%での集積を十分行い、あらかじめ十分洗浄して可溶性物質を除去した寒天を用いて、寒天希釈法 (agar-shake法)を繰り返すことにより行った。この際気相はN₂/CO₂ (4:1, vol/vol)で置換した。

純度の検定は硫酸イオン存在下および非存在下で、Yeast extract(0.1%) + Bactopectone(0.1%)、各種糖類、乳酸、水素・二酸化炭素で培養を行い、生育状況および夾雑細菌の有無を検鏡により調べた。

1-4 各種生理試験

各種基質の利用性試験は、基本培地に基質溶液を無菌添加した培地を用い、電子受容体として SO_4^{2-} を添加して、36℃で静置培養を行なった。2週間後に生育の有無および機器分析により基質の消費を測定してその利用性を検討した。

電子受容体としての各イオンの利用性は、亜硫酸 (SO_3^{2-})、チオ硫酸 ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$)、硝酸 (NO_3^-)、硫黄 (S^0) について検討した。炭素源としてプロピオン酸を用い、亜硫酸ナトリウムは 2mM、チオ硫酸ナトリウムは 10 mM、硝酸ナトリウムは 2 mM、また硫黄については過剰量添加してそれぞれの生育を検討した。

生育温度の測定は5~55℃での生育を濁度と基質利用性とによって行った。その際基質はプロピオン酸、電子受容体は硫酸イオンを用いた。また至適生育温度はそれぞれの温度での比増殖速度 (μ) より検討した。

MUD株によるプロピオン酸の分解経過を測定する培養には、ブチル栓つき500 mlメジウム瓶を用いた。気相を N_2/CO_2 (4:1, vol/vol)の嫌気ガスで置換して、36℃で静置培養を行った。滅菌シリンジを用いて1日2~3回の割合で試料採取を行った。試料採取後直ちに培養液のpH、吸光度、基質および生成有機酸濃度を測定した。

1-5 機器分析

1-5-1 生育測定

試験管培養での生育は、分光光度計 (日立製作所 Model 100-10) を用い、600 nmにおける吸光度により求めた。

生育の経時変化は、光路長10 mmのブラックセル (ガスクロ工業 QUARTZ CELL M20-B-2) に試料採取し分光光度計 (BECKMAN DU-50) を用い、600 nmにおける吸光度により求めた。

1-5-2 有機酸の測定

各種有機酸の濃度の測定はガスクロマトグラフを以下の条件で用いた。

Instrument	;	日立製作所 G-3000
Detector	;	FID Range 5×10^{-10} A/mV
Column	;	液相; PEG-6000 15%, 担体; Flusin P, 硝子 1.5mmID \times 3m
Carrier gas	;	高純度 N_2 ガス
Flow rate	;	30 ml/min
H_2	;	1.2 kg/cm ²
Air	;	0.8 kg/cm ²
Column temp.	;	160 °C
Injection temp.	;	200 °C
Detector temp.	;	200 °C
Sample size	;	2 μ l

1-5-3 糖類の測定

グルコースをはじめ各種の糖類、および蟻酸、乳酸、ピルビン酸、クロロプロピオン酸、ヒドロキシプロピ

オン酸は高速液体クロマトグラフを用いて以下の条件で測定した。

Pump	;	日立製作所 L-6200
RI-Detector	;	日立製作所 L-3300, RANGE 1×10^{-5} RIU
Column	;	シマズゲルSCR-101H
Column size	;	7.9mm ϕ \times 30cm
Eluent	;	酸性水 100% (過塩素酸 1.8ml/dH ₂ O 1l)
Flow rate	;	1.0 ml/min
Column temp.	;	40.0 $^{\circ}$ C
Sample vol.	;	20 μ l

1-5-4 GC含量の測定

GC含量の測定は駒形らの報告²³⁾を基に、デオキシリボヌクレオシドをHPLCを用いて定量することにより算出した。すなわち、DNAを常法に従い抽出した後、RNase処理を経てnuclease P1およびalkaline phosphataseで処理したものを、試料として測定した。デオキシリボヌクレオチドの標準はYAMASA GC-kitのATCGリボヌクレオチド等モル混合液をalkaline phosphataseで処理したものをを用いた。

2 結果および考察

2-1 集積および単離

集積は培養系（試験管）の濁度を測定し、生育が最高となった時点で、植菌量4%での植え継ぎを繰り返した。集積を進めるうちに、培養液中には楕円形もしくはレモン形をした細菌が優占種となった。集積を5回繰り返したときの培養では、10mMのプロピオン酸が約1週間で分解された。この時培養液中にはレモン形の細菌のみが存在していた。

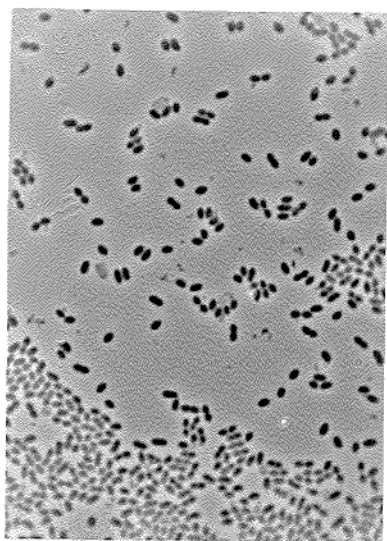


Fig. 2. Photomicrograph of strain MUD. Bar equals 5 μ m.

集積の進んだ培養液を寒天希釈法（agar shake法）を用いて細菌の単離を行った。寒天中には約3日目からコロニーが出現し出し、2週間後までに出現したコロニーはそのほとんどが茶褐色をしたレンズ状であった。ガラスマイクロチューブによりコロニーの摘出を行い、さらにその摘出したコロニーから同じ単離操作を繰り返すことにより、プロピオン酸を分解する硫酸還元菌(MUD株)を得た。

2-2 MUD株の形態

単離された菌株MUD株(Fig. 2)は各々の細胞の大きさが $1.0-1.3 \times 2.0-2.2 \mu\text{m}$ で、若干の運動性を持つ楕円もしくはレモン形の細菌で、細胞は単在もしくは二連であり、時に短い連鎖状を示すこともあった。Table 4に示すように、グラム染色の結果は陰性を示し、胞子の存在は顕微鏡下でも認められず、また熱処理後(80℃10分)の生育も認められなかったことより、本菌株は胞子形成能を持たない細菌であると考えられた。硫酸還元菌の分類の指標となる Desulfovirdin は、Postgate test²⁴⁾ および細胞からの抽出操作²⁵⁾ のどちらの試験によっても検出されなかった。

GC含量はHPLCによる測定から59.0 mol%と算出された。

2-3 生育条件および基質資化性

MUD株の生育可能な温度は15℃~44℃、至適生育温度は37℃であり、至適条件下(炭素源がプロピオン酸、電子受容体が硫酸イオン、培養温度37℃)での比増殖速度(μ)は0.05h⁻¹であった。

本菌株の生育には酵母エキスのような補助栄養物質は必要とせず、塩化ナトリウム(NaCl)の要求性も認められなかった。

プロピオン酸を炭素源および電子供与体としたとき、MUD株は硫酸イオンとチオ硫酸イオンを電子受容体として利用できたが、亜硫酸イオン、硝酸イオン、硫黄は利用できなかった。

MUD株によるプロピオン酸の分解経過をFig. 3に示す(電子受容体は硫酸イオン)。菌体の増殖と同時にプロピオン酸の酢酸への分解が観察され、最終的に10 mMのプロピオン酸を約3日で完全に等量(10 mM)の酢酸へと分解した。このときの比基質消費速度は0.1h⁻¹であった。

Table 4. Properties of strain MUD.

Characteristics	
Form	Short rods
Width	1.0 - 1.3 x 2.0 - 2.2 (μm)
Motility	motile
Gram reaction	negative
Growth factor	none
Temperature for growth	15 - 44 °C
Temperature optimum	37 °C
G + C content of DNA	59 mol%
Desulfovirdin	not present
Electron acceptor	
Sulfate	+
Sulfite	-
Thiosulfate	(+)
Sulfur	-
Nitrate	-

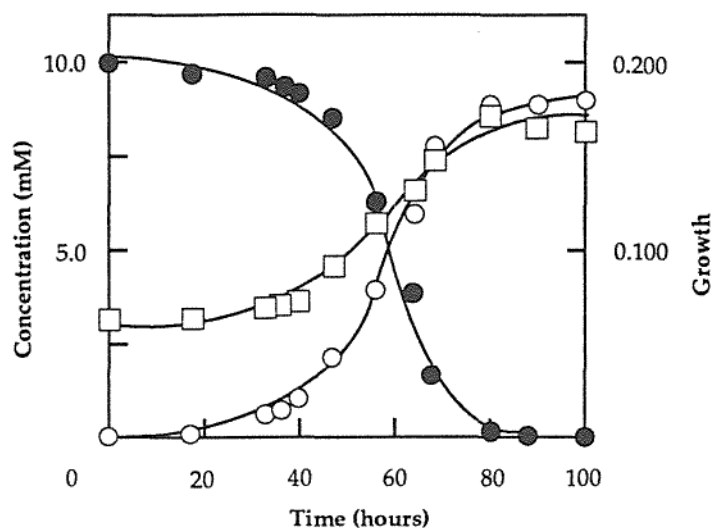


Fig. 3. Degradation of propionate by strain MUD. 500 ml medium bottles containing 300 ml medium with N₂/CO₂ (4:1, vol/vol) as a gas phase were used. Cultivation was performed at 36 °C. Symbols: ●—●; propionate, ○—○; acetate, □—□; growth (OD600nm).

電子供与体としての各基質の利用性を調べた結果をTable5に示す。MUD株はエタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、乳酸およびピルビン酸を利用した。また、1,2-プロパンジオールと1,3-プロパンジオールにおいては若干の利用性が確認できた。しかしプロピオン酸以外の飽和脂肪酸は利用できなかった。酢酸を炭素源として若干量培養系に添加することにより、水素・二酸化炭素または蟻酸をエネルギー源としての生育が確認できた。

乳酸およびピルビン酸は電子受容体がない培養系でも発酵的に生育が確認され、各基質からは酢酸とプロピオン酸が生成された。

Table 5. Organic compounds tested as electron donors and carbon sources in the presence of sulfate.

Utilized

H₂ /CO₂ plus acetate(5), formate(20) + acetate(5), propionate(10), Ethanol(10), propanol(10), 1,2-propanediol(10)*, 1,3-propanediol(10)*, Butanol(5), pentanol(2), pyruvate(10), lactate(10), Pyruvate(10) without sulfate, lactate(10) without sulfate.

Tested but not utilized

Acetate(10), 3-hydroxypropionate(5), acrylate(10), butyrate(10), Crotonate(10), valerate(5), methanol(10), ethyleneglycol(5), hexanol(2).

Concentrations (mM) in the medium are given in parentheses.

Each culture was incubated at 36 °C for 2 weeks. After cultivation, remaining substrates were measured by HPLC.

*Utilized slowly.

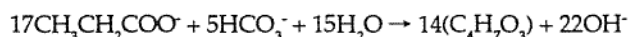
Table 6. Results of stoichiometric measurements with strain MUD on propionate as electron donor and carbon source, and sulfate as electron acceptor.

Substrate given (sulfate given) (mmol/l)	Substrate utilized (sulfate utilized) (mmol/l)	Acetate excreted (mmol/l)	Cell dry weight formed (mg/l)	Substrate consumed for cell material* (mmol/l)	Substrate oxidized by sulfate reduction (mmol/l)	Mol SO ₄ ²⁻ consumed per mol substrate oxidized	Growth yield g dry weight per mol substrate oxidized
5 (10)	5.0 (3.7)	4.8	25.0	0.30	4.70	0.79	5.3
10 (20)	10.0 (7.1)	9.4	48.7	0.57	9.43	0.75	5.2
20 (40)	20.0 (13.9)	19.1	92.1	1.09	18.91	0.73	4.1

*: Substrate consumed for cell material was calculated by the following equation.
 $17\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 5\text{HCO}_3^- + 5\text{H}_2\text{O} \rightarrow 14(\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2) + 22\text{OH}^-$; thus 0.0118 mmol propionate are required for 1.0 mg of cell dry weight.

2.4 MUD株によるプロピオン酸の酸化

MUD株によるプロピオン酸分解の量論式を求めるための測定および計算値をTable 6にまとめた。与えた基質と電子受容体としての硫酸イオンの量、消費された基質と硫酸イオン、生成された酢酸の量とそのとき生成された菌体量を測定した。また菌体成分として使われた基質量は常法により、 $[\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2]$ を菌体と見なし下式から算出した。



すなわち菌体1 mg (dry weight) を生成するためには0.0118 mmolのプロピオン酸が必要となる。消費された基質量より菌体成分に使われた基質量を引いた量を酸化に使われた基質と見なし、この値と消費された硫酸イオンより、基質1 mmolを酸化するのに必要な硫酸イオンの量を求めた。これらの結果よりMUD株のプロピオン酸の分解は次式に一致した(pH 7.0)¹²⁾。



$$\Delta G^\circ = -151 \text{ kJ / reaction}$$

この反応は今までに報告のあるプロピオン酸を酢酸に酸化する硫酸還元菌の反応と同型である²⁶⁾。

2.5 MUD株の栄養要求性

方法に記した各培地1~6におけるMUD株の比増殖速度と増殖曲線をTable 7およびFig. 4に示す。酵母エキスおよびBactopeptoneのような補助栄養物質は、これらを含まない系4と1、2、3の比増殖速度を比べてわかるように、MUD株の生育になんら影響を与えていなかった。またMUD株の生育においてビタミン類は、4と5の比増殖速度の比較やFig. 4からも、植え継ぎ3代までは影響を与えていなかった。さらに培地組成の簡素化を図ったtap water medium (6)でも、増殖の立ち上がりに多少の誘導期が生ずるものの、ほとんど通常の培養と同程度の比増殖速度を得た。

Table 7. Effect of organic nutrients and vitamins on the growth of strain MUD.

Medium	specific growth rate(h ⁻¹)
Basal medium + yeast extract(50 mg/l) + Vitamins	0.050
Basal medium + yeast extract(100 mg/l) + Vitamins	0.048
Basal medium + bacto-peptone(100 mg/l) + Vitamins	0.049
Basal medium + Vitamins	0.049
Basal medium	0.048
Tap water medium	0.041

All media contained 10mM propionate and 10mM sulfate. Vitamin solution was prepared according to "1-2". Tap water medium contained same inorganic salts without trace elements solution.

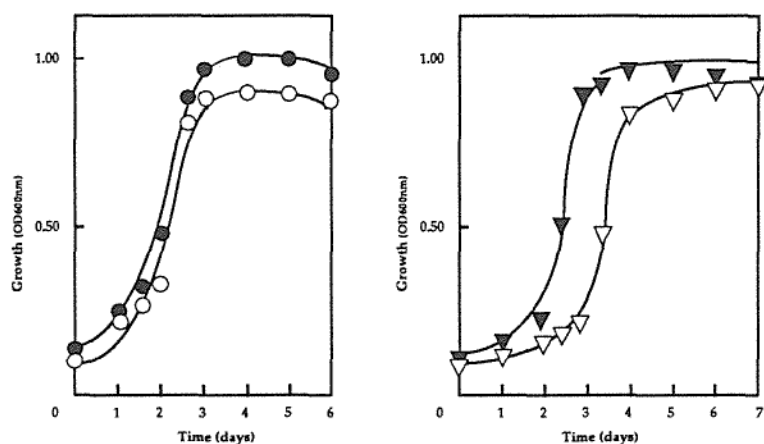


Fig. 4. Effect of yeast extract, vitamins and trace elements on the growth of strain MUD. 20 ml tubes with screw-cap containing 20 ml medium without gas space were used. After 3 times' transfer to same medium, growth was monitored spectrophotometrically at 600 nm. Symbols: ●—●; basal medium + yeast extract(50 mg/l) + vitamins, ○—○; basal medium + vitamins, ▼—▼; basal medium, ▽—▽; tap water medium. All media contained 10mM propionate and 10mM sulfate. Vitamin solution was prepared according to "1-2". Tap water medium contained same inorganic salts without trace elements solution.

MUD株は水道水を用いた非常に簡素な培地にも良好な生育を示した。今まで報告されているプロピオン酸分解硫酸還元菌がその生育に非常に制限された環境を要するのに比べ、本菌株は非常に扱い易い細菌であると言える。このような性質は現状の嫌気処理に組み込むのにも適したものと考えられる。プロピオン酸の嫌気処理リアクター中での蓄積は、処理効率を低下させ、メタン生成の阻害を引き起こす。このような酸敗状態が起きた場合には、リアクター内に蓄積した有機酸の濃度を下げるために液相の交換を行ったり、負荷を下げ自然に回復するのを待っているのが現状である。このような状況に対し効率よくプロピオン酸を分解する細菌を利用できるならば、リアクターの効率の良い性能復帰が期待できる。今回分離したMUD株は、このような酸敗リアクターへ有効に応用できるものと思われる。

2-6 同定に関する考察

硫酸還元菌の基質酸化は大きく二種類に分けられる。基質を二酸化炭素まで酸化するグループと、最終生産物に酢酸を生成するグループで、前者を完全酸化型の硫酸還元菌、後者を不完全酸化型の硫酸還元菌と呼ぶ³⁾。今日までにプロピオン酸を酸化分解する中温性硫酸還元菌は6属12種知られている。そのうち不完全酸化型のものは1属2種のみである。ひとつはWiddelらが単離した*Desulfobulbus propionicus*²⁶⁾であり、もう一種はSamainらが分離した*D. elongatus*²⁷⁾である。MUD株はその形態、諸性質およびGC含量等から考えると*D.*

Table 8. Morphological and physiological characteristics of the three strains of *Desulfobulbus propionicus*²⁶⁾ and strain MUD.

Characteristic	<i>Desulfobulbus propionicus</i>			
	strain 1pr3(type strain)	strain 2pr4	strain 3pr10	strain MUD
Width x length (µm)	1.0 - 1.3 x 1.8 - 2.0	1.0 - 1.3 x 1.8 - 2.0	1.0 - 1.3 x 1.8 - 2.0	1.0 - 1.3 x 2.0 - 2.2
Motility	immotile	motile	motile	motile
Gram reaction	negative	negative	negative	negative
Temperature for growth	10 - 43	10 - 36	15 - 36	15 - 44
Temperature optimum	39	30	29	37
Desulfovirodin	not present	not present	not present	not present
Growth factor	4-aminobenzoate	none	4-aminobenzoate	none
Electron acceptor				
Sulfate	+	+	+	+
Sulfite	+	ND	ND	-
Thiosulfate	+	ND	ND	(+)
Sulfur	-	ND	ND	-
Nitrate	(+)	ND	ND	-
Electron donor				
H ₂ /CO ₂ plus acetate	+	+	+	+
Formate plus acetate	-	-	+	+
Acetate	-	-	-	-
Propionate	+	+	+	+
Butyrate	-	(+)	-	-
Ethanol	+	+	+	+
Propanol	+	+	+	+
Pyruvate	+	+	+	+
Lactate	+	+	+	+

*propionicus*に属する株であると推測された。

しかしながらMUD株と既知の*D. propionicus*にはいくつかの違いがみられた(Table 8)。MUD株がgrowth factorを要求しないのに対して、*D. propionicus*のtype strainは4-アミノ安息香酸を要求する。また、電子受容体の利用範囲は*D. propionicus*が硫酸イオン、亜硫酸イオン、チオ硫酸イオン、硝酸イオンを利用できるが、MUD株は硫酸イオンとチオ硫酸イオンのみ利用可能であった。Type strainは蟻酸を電子供与体として利用できない。報告されている2pr4株はMUD株と同様にgrowth factorを要求しないが、その至適生育温度は30℃と、MUD株のそれより明らかに低い値を示した²⁶⁾。このような結果から考えて、MUD株は*D. propionicus*の新しいタイプの菌株であると推測された。なお本菌株はDSM(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen)に寄託した(DSM6523)。

第三節 新規安息香酸酸化硫酸還元菌*Desulfotomaculum thermobenzoicum* TSB の単離とその性質

完全酸化型の硫酸還元菌は必ず酢酸酸化経路であるCODH経路もしくはcitrate回路を有している。また、飽和脂肪酸を酸化する硫酸還元菌のほとんどが完全酸化型の細菌である (Table 1参照)。そこで本節では酢酸酸化の代謝経路を有す硫酸還元菌を、酪酸を基質として集積を行い、その中より目的微生物の単離を行った。得られた単離菌株は検討の結果、完全酸化型の代謝系を持っているのみならず安息香酸を酸化できることが判明した。

安息香酸は芳香族化合物の嫌気分解において重要な中間物質であり、環境汚染で問題となっている塩素化芳香族化合物を含め、フェノールやビフェニールなども、嫌気的な条件では安息香酸を経由して酢酸などの低分子有機酸に分解され、最終的には二酸化炭素やメタン等に分解されることが知られている^{28,29)}。しかし、安息香酸を分解する嫌気性細菌としては30℃から40℃の中温域で生育する数種の硫酸還元菌と、水素資化性細菌との共生系でのみ生育可能な2,3の嫌気共生細菌が分離されているだけである^{30,31)}。本節では単離細菌の完全酸化型硫酸還元菌としての特徴および安息香酸の酸化について詳しく検討を行い、さらに新種としての提案を行った。

1 分離源および実験方法

1-1 分離源

分離源として、クラフトパルプ製造過程から排出される廃水を、約一年間連続メタン発酵処理していた高温固定床式バイオリアクター (55℃) の汚泥を用いた。

1-2 培地および培養方法

分離および培養に用いた基本培地は前節1-2で述べたものと同様であり、その他に yeast extract (50 mg/ml) を無菌的に添加した。各培養に用いた培地は、必要な基質 (pH調整済み) および電子受容体を基本培地に無菌的に添加することにより調製した。培養はすべて55℃で行った。集積培養はエネルギー源として酪酸(10 mM)、電子受容体として硫酸イオン(10 mM)を用いて行った。

1-3 単離操作

単離操作および純度の検定は前節1-3と同様に、十分な集積後、寒天希釈法により単離し純度の検定を行った。

1-4 各種生理試験

各種基質の利用性試験は、基本培地に基質溶液を無菌添加した培地を用い、電子受容体として硫酸イオンを添加して、55℃で4週間静置培養を行った。

電子受容体としての亜硫酸、チオ硫酸、硝酸、硫黄の利用性の検討は、安息香酸を基質として、亜硫酸ナトリウムは10mM、チオ硫酸ナトリウムは10mM、硝酸ナトリウムは2mMになるように添加し、硫黄については過剰量添加してそれぞれの生育を検討した。生育温度は30~80℃での生育を濁度と基質利用性によって検討した。また至適生育温度はそれぞれの生育曲線から比増殖速度(μ)を求め決定した。

TSB株の安息香酸の分解経過の観察には、ブチル栓つき500mlメジウム瓶を用いた。気相を N_2/CO_2 (4:1, vol/vol)の嫌気ガスで置換して、55℃で静置培養を行い、滅菌シリンジを用いて1日2~3回の割合で試料採取を行った。試料採取後直ちに培養液のpH、吸光度、基質および生成有機酸濃度を測定した。

1-5 機器分析

生育測定、アルコールや有機酸類の定量、硫酸イオンの定量およびGC含量の測定は、前節1-5に従った。芳香族系物質の定量にはHPLCを下記の条件で使用した。

Pump	: Shimadzu LC-6A
Detector	: Shimadzu SPD-6AV (210 nm)
Column	: GL Science Corp. Inertsil ODS 5 μ m,
Column size	: 4.6 x 250 mm
Column temp.	: 40 °C
Eluent	: CH_3OH/H_2O (60/40) adjusted pH to 2.6 with H_3PO_4
Flow rate	: 1.0 ml/min
Sample vol.	: 20 μ l

1-6 Carbonmonoxide dehydrogenase(CODH)の活性測定

CODHはSpormannらの報告¹⁸⁾を基に活性を測定した。酪酸により生育した細胞をフレンチプレス処理(1,200 kg/cm²)した後、遠心分離(10,000 x g, 20 min)を行い、その上清部を粗酵素液として使用した。全量2 mlのスクリーキャップ・ブチルゴム栓つきのキュベットを用い、100mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.5)中にbenzyl viologen (2 mM), 2-mercaptoethanol (5 mM), および粗酵素液を添加し、液量を1 mlとした。気相を窒素ガスで置換後、シリンジを用いて一酸化炭素を若干量気相に添加・攪拌し、50 mM $Na_2S_2O_4$ 溶液を少量添加し若干の色をつけた後に、直ちに生成する還元型benzyl viologenの555nmの吸収の増大を分光光度計によって測定を行った(第四章参照)。

Table 10. Organic compounds tested as electron donors and carbon sources in the presence of sulfate.

Utilized

H₂/CO₂, formate(20), formate(20) + acetate(5), propionate(10), Butyrate(10), valerate(5), caproate(2), ethanol(10), propanol(10), 1,2-Propanediol(10), 1,3-propanediol(10)*, butanol(5), Crotonate(10), pyruvate(10), lactate(10), fumarate(10), malate(10)*, Pyruvate(10) without sulfate, lactate(10) without sulfate, Benzoate(5), *p*- or *m*-methoxybenzoate(5), vanillate(5), syringate(5), 3,4,5-trimethoxybenzoate(5).

Tested but not utilized

Acetate(10), acrylate(10), succinate(10), glucose(2), fructose(2), sucrose(1), Phenol(5), *o*-methoxybenzoate(5), *o*-, *m*-, *p*-hydroxybenzoate(5).

Concentrations (mM) in the medium are given in parentheses. Each culture was incubated at 56 °C for 2 weeks. After cultivation, remaining substrates were measured by HPLC. *Utilized slowly

2 結果および考察

2-1 集積および単離

植菌量4%での集積培養を数回行った結果、培養液中には孢子を形成する桿菌が優占種となり、10mMの酪酸が約2週間で分解された。寒天培養の中に出現したコロニーはそのほとんどが茶褐色をしたレンズ状であった。寒天希釈法を繰り返すことにより、酪酸を分解する硫酸還元菌（TSB株）を得た。このTSB株は安息香酸の分解能を持っていることが判明した。

2-2 TSB株の基質資化性

TSB株の基質の利用性を調べた結果をTable 10に示す。TSB株は蟻酸、プロピオン酸、酪酸などの有機酸、エタノール、プロパノール、ブタノールなどのアルコール類を利用できた。また水素・二酸化炭素での培養でも良好な生育がみられ、酢酸を生成した。安息香酸の分解性も認められた。高温性の嫌気性細菌で安息香酸の分解性が認められたのはこれが初めてである。また*p*-methoxybenzoate, vanillate, syringate, 3,4,5-trimethoxybenzoateなどのメトキシ安息香酸類の利用が確認された。これらのメトキシ安息香酸類は、乳酸やピルビン酸と同様に、硫酸イオン非存在下でも発酵的な生育が認められた（第三章第4節参照）。

2-3 TSB株の形態および生育条件

単離された菌株はTable 9に示した性質を有していた。酪酸での培養では単在もしくは二連鎖の桿菌（1.5-2.0 × 5-8 μm）であった（Fig. 5a）。また安息香酸で培養するとほとんどの細胞が紡錘形の桿菌となった（Fig. 5b）。孢子の形成は顕微鏡下でも確認でき、また熱処理後（95℃ 15分）の生育も認められた。Desulfovridinは、Postgate test²⁴⁾では検出されなかった。グラム染色およびグラムタイプテスト両試験とも陽性を示した。

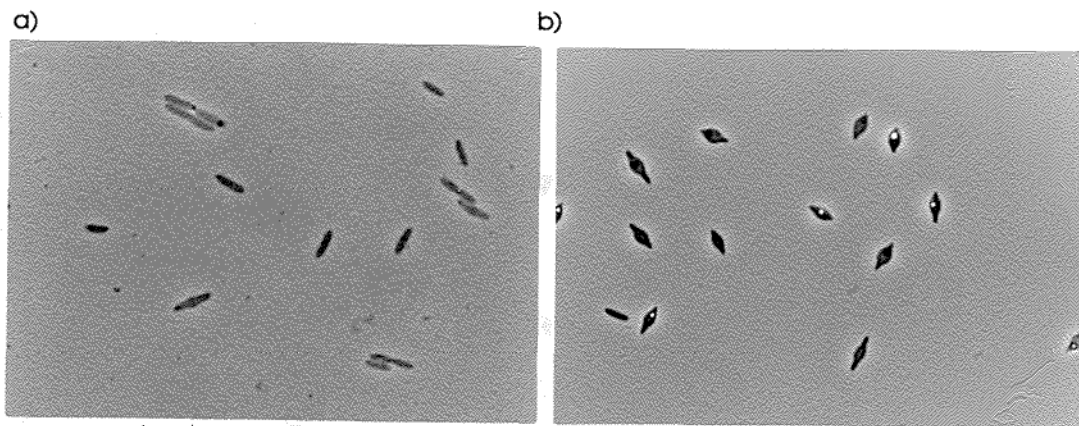


Fig. 5. Photomicrographs of strain TSB (bar equals 10 μ m). Phase contrast micrograph of cells grown on butyrate (a) and benzoate (b).

GC含量はHPLCの測定結果より52.8 mol%であった。

TSB株の生育可能な温度は40~70℃であり、至適生育温度は62℃であった。生育pH域は6.0~8.0で、至適pHは7.2であった。至適条件下でのTSB株による安息香酸の分解経過を Fig. 6 に示す。この菌株は生育に補助栄養物質としてyeast extractを要求した。yeast extractの代わりにbactopeptoneを用いても生育するが、生育はきわめて遅かった。

安息香酸を基質としたとき、TSB株は硫酸イオン、亜硫酸イオン、チオ硫酸イオン、硝酸イオンを電子受容体として利用できた。しかしチオ硫酸イオン、硝酸イオンを用いたときの生育はきわめて遅く、硫黄は利用できなかった (Table 9 参照)。

Table 9. Properties of strain strain TSB.

Form	rods or spindle-shaped rods
Width x length (μ m)	1.5 - 2.0 x 5.0 - 8.0
Motility	slightly motile
Gram reaction	positive
Spore formation	+
Temperature for growth ($^{\circ}$ C)	40 - 70
Temperature optimum ($^{\circ}$ C)	60
pH for growth	6.0 - 8.0
pH optimum	7.2
G + C content of DNA (mol%)	52.8
Desulfovibrin	-
Electron acceptor	
Sulfate	+
Sulfite	+
Thiosulfate	+
Sulfur	-
Nitrate	+

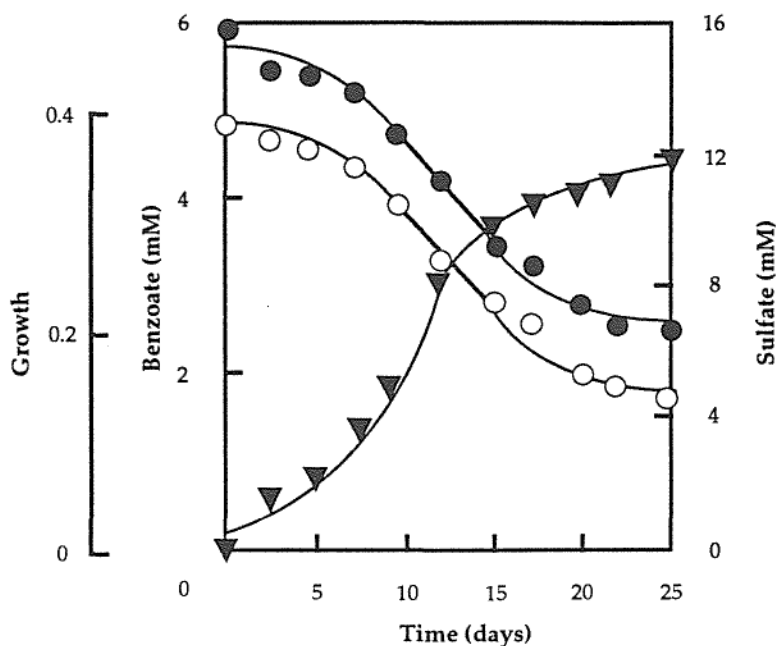


Fig. 6. Degradation of benzoate by strain TSB.

500 ml medium bottles containing 300 ml medium with N₂/CO₂ (4:1) as a gas phase were used. Cultivation was performed at 56 °C.

Symbols: ○—○ ; benzoate,
●—● ; sulfate,
▼—▼ ; growth.

2-4 安息香酸および酪酸の酸化

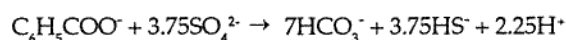
TSB株による安息香酸と酪酸を基質として用いた場合の代謝の量論式を求めるための各測定結果および計算値をTable 11にまとめた。この結果より各基質の酸化は次のように表される(pH7.0)¹⁷⁾。

酪 酸



$$\Delta G^\circ = -84.0 \text{ KJ/reaction}$$

安息香酸

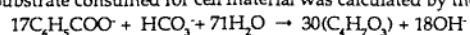


$$\Delta G^\circ = -165.8 \text{ KJ/reaction}$$

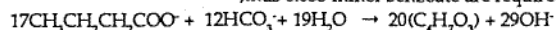
Table 11. Results of stoichiometric measurements with strain TSB on benzoate or butyrate as electron donor and carbon source, and sulfate as electron acceptor.

Substrate given (sulfate given) (mmol/l)	Substrate utilized (sulfate utilized) (mmol/l)	Acetate excreted (mmol/l)	Cell dry weight formed (mg/l)	Substrate consumed for cell material* (mmol/l)	Substrate oxidized by sulfate reduction (mmol/l)	Mol SO ₄ ²⁻ consumed per mol substrate oxidized	Growth yield g dry weight per mol substrate oxidized
Benzoate							
2	1.8	0.1	23.2	0.13	1.67	3.71	13.9
(10)	(6.2)						
4	3.4	0.2	37.8	0.21	3.19	3.13	11.8
(15)	(10.0)						
Butyrate							
5	5.0	4.7	20.2	0.17	4.83	1.51	4.18
(10)	(7.3)						
10	10.0	9.6	38.5	0.32	9.68	1.39	3.98
(20)	(13.5)						
20	20.0	19.2	58.8	0.49	19.51	1.48	3.01
(40)	(28.8)						

*: Substrate consumed for cell material was calculated by the following equation



;thus 0.055 mmol benzoate are required for 1.0 mg of cell dry weight



;thus 0.0083 mmol benzoate are required for 1.0 mg of cell dry weight

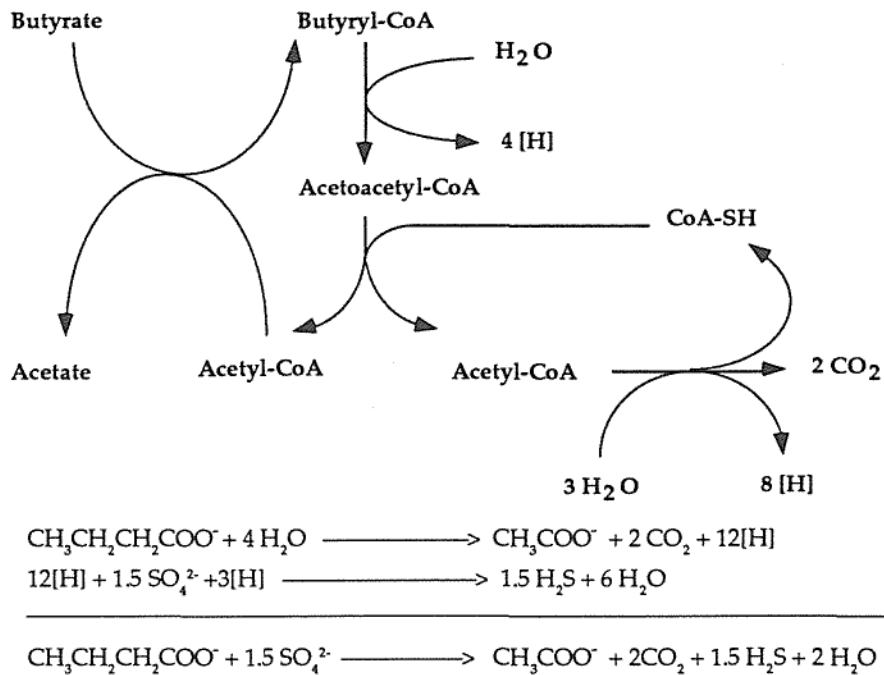
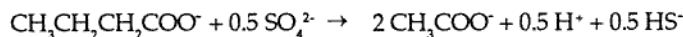


Fig. 7. Proposed scheme of butyrate metabolism (R. Schauder et al. 1986).

安息香酸の酸化様式やcarbonmonoxide dehydrogenaseの活性(0.57 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg-protein}$)が認められたことより、TSB株はCODH経路を持つ完全酸化型の硫酸還元菌と考えられる。しかし酪酸の酸化においてはすべてが二酸化炭素まで酸化されずに酢酸を生成した。酪酸から酢酸を生成する硫酸還元反応（不完全酸化型の硫酸還元菌による反応）は、通常次式に表されるように、1 molの酪酸から2 molの酢酸が生成される¹²⁾。



TSB株の場合、これと異なり1 molの酪酸から1 molの酢酸が生成された。この反応は1986年にSchauderらが報告している*Desulfobacterium autotrophicum*の代謝形式と一致した³²⁾。*D. autotrophicum*による酪酸代謝はFig. 7に示した通りである。すなわち酪酸は β 酸化により生成したacetyl-CoAのCoAを受けとることによりbutyryl-CoAとなり、そのときに酢酸が生成される。butyryl-CoAはacetoacetyl-CoAを経て、2つのacetyl-CoAとなり、1つは同様に酪酸をbutyryl-CoAへ活性化するのに用いられ、一方は二酸化炭素まで酸化される。TSB株も同様な代謝経路となっているものと推定される。

2-5 安息香酸の分解に関する考察と新種としての提案

安息香酸は芳香族化合物の嫌気分解におけるきわめて重要な中間体として知られている。高度に集積された嫌気性汚泥によるフェノールやクロロフェノールの分解過程においても、分解中間体として安息香酸が検出されている^{28,29)}。また、分離された細菌を用いた研究でも3-ヒドロキシ安息香酸からの脱ヒドロキシ³³⁾や、3-クロロ安息香酸から安息香酸への量論的な脱クロルが確認されている³⁴⁾。安息香酸を共生的に分解する細菌についてはすでに何種類か知られている。最初に発見された安息香酸分解共生細菌は*Syntrophus buswellii*³⁰⁾であ

Table 12. Properties of various *Desulfotomaculum* species*.

	TSB	<i>D. sapo-</i> <i>mandens</i>	<i>D. geo-</i> <i>thermicum</i>	<i>D. thermo-</i> <i>acetoxidans</i>
Temperature for growth (°C)	40 - 70	20 - 43	37 - 56	45 - 65
Temperature optimum (°C)	62	38	54	55 - 60
G + C content of DNA (mol%)	52.8	48	50.4	49.7
Growth (+SO ₄ ²⁻);				
H ₂ /CO ₂	+	-	+	+
Formate	+	+	+	+
Acetate	-	+	-	+
Propionate	+	-	+	+
Butyrate	+	+	+	+
Ethanol	+	+	+	-
Lactate	+	-	+	+
Pyruvate	+	+	ND**	+
Benzoate	+	+	-	-
Fructose	-	-	+	ND
Lactate without SO ₄ ²⁻	+	ND	ND	+
Pyruvate without SO ₄ ²⁻	+	-	ND	+
As e ⁻ acceptor;				
SO ₄ ²⁻	+	+	+	+
SO ₃ ²⁻	+	+	+	-
S ₂ O ₃ ²⁻	+	+	+	+
NO ₃ ⁻	+	-	-	ND
S ⁰	-	+	-	-

*Data from 40, 42 and 43.

**Not determined.

る。この細菌は水素消費細菌（水素利用メタン生成細菌もしくは硫酸還元菌）の存在下で安息香酸を酢酸に分解する。最近の報告ではヒドロキノン分解菌（strain HQGö 1）が混合培養系で安息香酸を分解したという報告もある³¹⁾。

水素消費細菌が生育に必須である共生細菌に対し、硫酸呼吸により単独で安息香酸を分解できる硫酸還元菌も広く自然界に分布していると考えられる。現在までに安息香酸を分解できる硫酸還元菌は6属8種が報告されている(*Desulfonema magnum*³⁵⁾, *Desulfobacterium phenolicum*³⁶⁾, *D. catecholicum*³⁷⁾, *D. anilini*³⁸⁾, *Desulfococcus multivorans*³⁹⁾, *Desulfosarcina variabilis*³⁹⁾, *Desulfotomaculum sapomandens*⁴⁰⁾, *Desulfomonile tiedjei*⁴¹⁾)。このすべてが完全酸化型の硫酸還元菌で、しかもすべての細菌は中温性であり、これまで高温域で安息香酸を分解する細菌の報告はなかった。高温性の硫酸還元菌のうちTSB株同様、有機酸資化能の高い細菌としては、*Desulfotomaculum geothermicum*⁴²⁾, *D. thermoacetoxidans*⁴³⁾の2種類が知られている(Table 12)。前者はTSB株が利用できないフラクトースを硫酸イオンの存在に関わらず利用することができる。後者の菌株は酢酸を用いた場合に非常に良好な生育を示す。また両者とも安息香酸は利用できない。TSB株は孢子形成能を持つ硫酸還元菌であることから*Desulfotomaculum*属の細菌であると考えられるが³⁹⁾、この属中の3種の高温性細菌 (*Desulfotomaculum geothermicum*⁴²⁾, *D. thermoacetoxidans*⁴³⁾, *D. nigrificans*⁴⁴⁾)とは上述のように基質の利用性に明らかな違いがみられた (*D. nigrificans*は有機酸資化能力がない)。TSB株は高温性安息香酸分解菌としての初めての報告であり、新種の細菌として*D. thermobenzoicum*と命名、提案した(Arch. Microbiol. 155, 348-352 (1991))。なお種名はInternational Journal of Systematic Bacteriology (1991)のvalidation listに掲載され、有効性が認められた。また本菌株はDSMに寄託した(DSM 6193)。

第四節 要約

Methylmalonyl-CoA経路およびCODH経路を持つ硫酸還元菌の単離を試みた。

まずmethylmalonyl-CoA経路を有する硫酸還元菌を得るために、プロピオン酸酸化硫酸還元菌の単離を行った。UASBリアクター汚泥から単離されたMUD株について検討した結果、以下のことが明らかになった。

1. MUD株は37℃に至適生育温度を持つ、胞子非形成、グラム陰性の硫酸還元菌であり、その生理的・形態的特徴から*Desulfohalobus propionicus*と同定された。
2. MUD株はその生理的性質から*D. propionicus*の新しいタイプの菌株であると推測された。
3. 他の*Desulfohalobus*属の細菌と比較して栄養要求性が非常に低いため、実リアクターなどに適応できる可能性が示唆された。

次にCODH経路を有する硫酸還元菌を得るために、酪酸酸化硫酸還元菌の単離を行った。高温固定床式リアクター汚泥から単離されたTSB株について検討した結果、以下のことが明らかになった。

1. TSB株は至適温度を62℃に持つ、胞子形成、グラム陽性の桿菌であった。
2. TSB株は安息香酸を二酸化炭素まで完全酸化できる高温性硫酸還元菌であった。
3. また本菌株は安息香酸や酪酸の他にも有機酸やアルコールなど広い物質分解能力を持つことが明らかにされた。
4. しかしTSB株は酢酸を酸化せず、しかも酪酸の酸化の際にも通常の不完全酸化を行わず、*Desulfobacterium autotrophicum*と同様の代謝を行うことが明らかになった。
5. TSB株は現在唯一高温域で安息香酸を利用できる嫌気性細菌であり、検討の結果*Desulfotomaculum*属の新種の細菌と同定し、*D. thermobenzoicum*と命名した。

第三章 Methylmalonyl-CoA経路およびCODH経路による発酵的代謝

第一節 はじめに

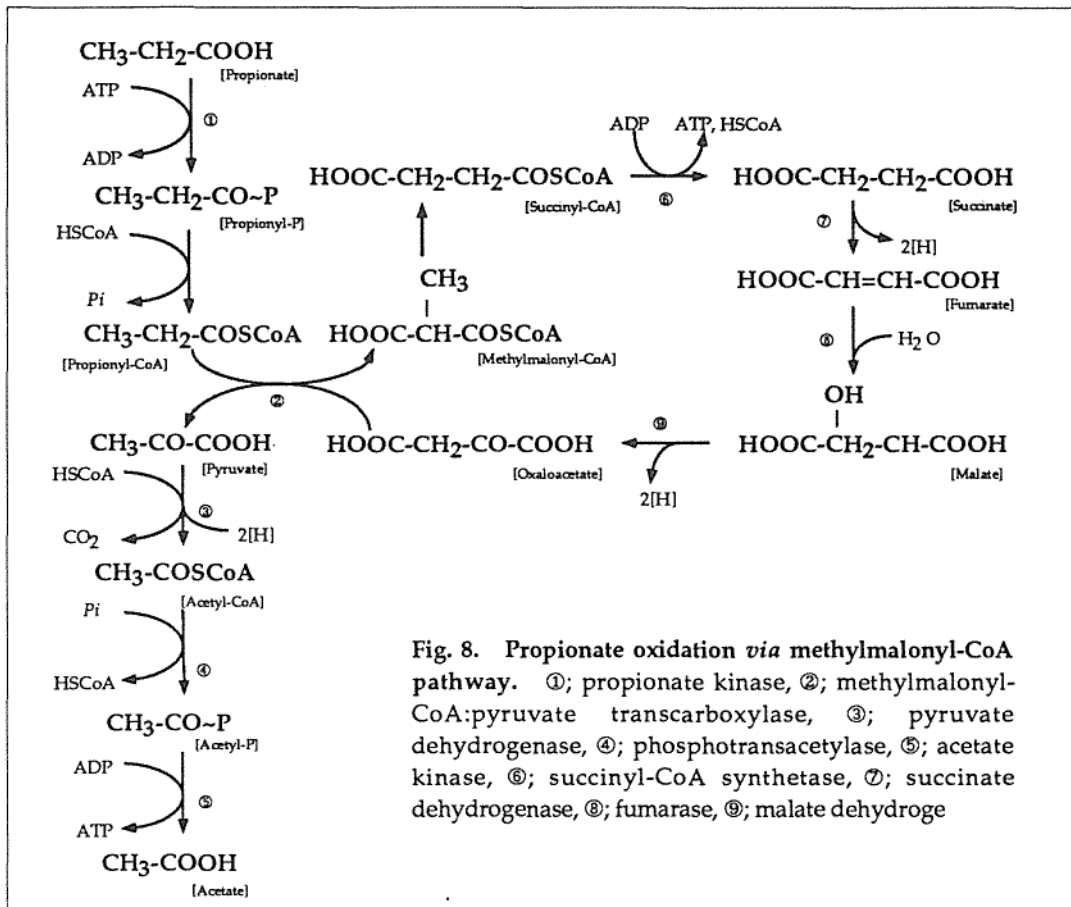
硫酸還元菌は比較的最近まで乳酸やエタノールなど限られた基質のみを利用し、酢酸を生成する細菌であると考えられていた。しかし乳酸やエタノールなどの単純な基質のみならず、飽和脂肪酸や各種の有機酸、糖類、また安息香酸、フェノール、クレゾールなどの芳香族物質も利用できる新種の硫酸還元菌が単離され^{2,3)}、さらにmethylmalonyl-CoA経路（プロピオン酸酸化経路）、CODH経路（酢酸酸化経路）などの新規な代謝経路が知られるようになって、硫酸還元菌の多様性や環境中での生態学的役割についての認識が大きく変わりつつあると言って良い。

しかしながら硫酸還元を伴わない代謝に関する報告は今のところ非常に少ない。硫酸還元を伴わないエネルギー獲得は、他の多くの嫌気性細菌と同様に発酵過程での基質レベルのリン酸化などによる。ピルビン酸や乳酸などが以前から知られている最も代表的な発酵基質であるが、利用できる基質が次々と見つかったことから、発酵基質になり得る物質種も新たに見出されて行く可能性が高い。実際、自然界において硫酸イオン濃度が極めて低い条件でも硫酸還元菌が普遍的に存在していると報告されていることから⁸⁾、このような硫酸呼吸以外での硫酸還元菌の生育を研究することは、硫酸還元菌の生態を明らかにする上でも重要なことである。

本章ではmethylmalonyl-CoA経路およびCODH経路が関与する発酵的代謝について検討を行った。

ところでmethylmalonyl-CoA経路は、1984年にStamsらにより*D. propionicus* Lindhorst を用いて初めてその存在が明らかにされた¹³⁾。この経路の大きな特徴はpropionyl-CoAからmethylmalonyl-CoAへの反応がオキザロ酢酸からのカルボキシル基転移で起こっている点である(Fig. 8)。すなわちpropionyl-CoAは methylmalonyl-CoA:pyruvate transcarboxylaseによりオキザロ酢酸のカルボキシル基を受け取りmethylmalonyl-CoAとなり、オキザロ酢酸はピルビン酸になる。続いてmethylmalonyl-CoAはコハク酸などを経てオキザロ酢酸となり、ピルビン酸はacetyl-CoAを経て酢酸へと酸化される。プロピオン酸の分解過程で、propionyl-CoAからmethylmalonyl-CoAへの反応にtranscarboxylaseが関与していることは、この反応にATPを必要としないためエネルギー的に非常に有利である^{13,14)}。

一方、CODH経路は酢酸酸化経路として1988年より報告され始めた。酢酸の二酸化炭素への酸化には、クエン酸回路(citrate cycle)によるものとCODH経路(acetyl-CoA / carbonmonoxide dehydrogenase pathway)によるものがある。Brandis-Heepらは1983年に*Desulfobacter postgatei*を用い酢酸がクエン酸回路を経由して代謝される



ことを示した¹⁵⁾(Fig. 9)。この回路は今まで知られていたクエン酸回路とは異なり citrate synthase や citrate lyase の代わりに ATP-citrate lyase が主に働いている^{15,16)}。つまり *D. postgatei* では 1 mol の酢酸がクエン酸回路を経由し 2 mol の二酸化炭素に酸化されると同時に、ATP-citrate lyase の働きにより基質レベルでのリン酸化が起こり、1 mol の ATP が生成されているものと推定されている。ATP-citrate lyase がクエン酸回路の中で機能していることは初めての知見であり、硫酸還元菌のクエン酸回路特有のものであると考えられる。

酢酸代謝の研究が進む中で、酢酸を利用する硫酸還元菌の中には *Desulfotomaculum* 属や *Desulfobacterium* 属の細菌のように、クエン酸回路を用いずに酢酸を分解しているものも報告されてきた³²⁾。Spormann らは *Desulfotomaculum acetoxidans* を用い、酢酸の酸化に関与すると考えられる酵素活性の測定を行い、まったく別の代謝系である CODH 経路を提唱した¹⁸⁾(Fig. 10)。この経路ではまず酢酸は ATP により活性化されアセチルリン酸を経てアセチル CoA となる。さらに carbon monoxide dehydrogenase (CODH) の働きにより CO と $\text{CH}_3\text{-FH}_4$ (FH_4 は tetrahydrofolate) とに炭素が分けられ、それぞれが酸化されて二酸化炭素となる。この系による酢酸の酸化ではクエン酸回路による反応とは異なり、基質レベルのリン酸化による ATP の生成は起こらず、エネルギーはすべて硫酸還元により得ているものと推定される。なお、 CHO-FH_4 から HCOO^- が生ずる過程で 1 ATP が生成するが、アセチルリン酸生成時に 1 ATP が消費される。

Desulfobacterium autotrophicum も CODH 経路により酢酸を代謝する^{45,46)}。*D. autotrophicum* と *D. acetoxidans* の CODH 経路はほとんど同じであり、その違いはメチル基の担体が *D. acetoxidans* では folate であるのに対し、*D.*

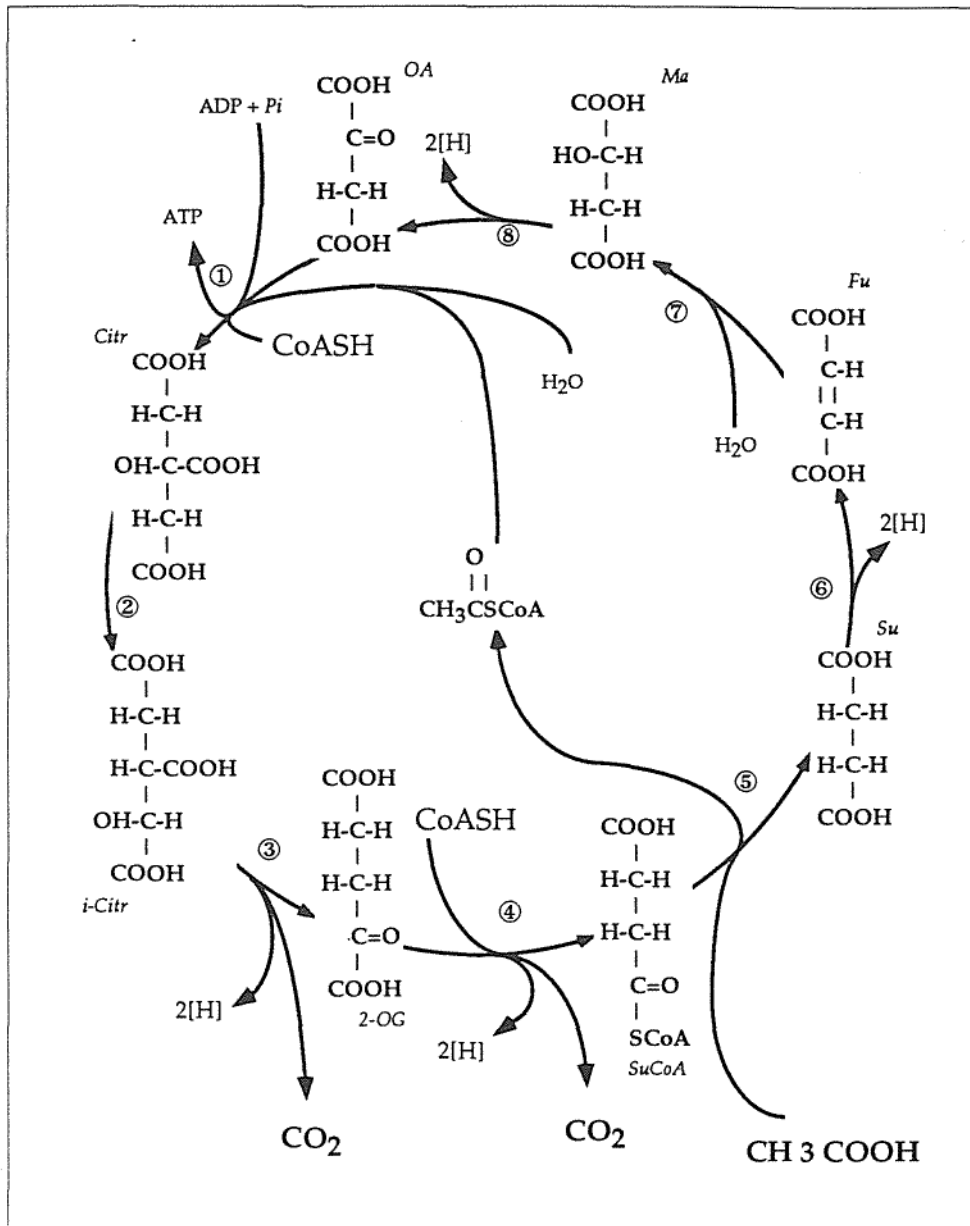


Fig. 9. Acetate oxidation *via* citrate cycle.

Citr; citrate, *i-Citr*; iso-citrate, 2-OG; 2-oxoglutarate, *SuCoA*; succinyl-CoA, *Su*; succinate, *Fu*; fumarate, *Ma*; malate, *OA*; oxalacetate.

①; ATP-citrate lyase, ②; aconitase, ③; iso-citrate dehydrogenase, ④; 2-oxoglutarate : ferredoxin oxidoreductase, ⑤; succinyl-CoA : acetyl-CoA transferase, ⑥; succinate dehydrogenase, ⑦; fumarate hydrogenase, ⑧; malate dehydrogenase.

autotrophicum では pterin が関与しているという点である。

CODH 経路を持つ細菌はその後の研究でメタン生成細菌を含む古細菌 (*Archaea*) の仲間にも見つかった (47,48)。

酢酸を利用する硫酸還元菌がクエン酸回路と CODH 経路のどちらの代謝形式を持つかは、各々の代表的な酵素である 2-oxoglutarate dehydrogenase (2-OGDH) と CODH の活性を調べることにより推定できる。クエン酸回路により酢酸を代謝する細菌は当然ながら高い 2-OGDH 活性を示すが、CODH の活性は認められない。逆に

CODH経路を持つ細菌では2-OGDHの活性は認められず、高いCODH活性が確認できる³²⁾。これらの活性は酢酸以外の基質（ピルビン酸、乳酸など）で生育した細胞にも存在する。

本章ではこれらの背景を踏まえ、前章で得た単離株2株(*Desulfobulbus propionicus* MUD, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* TSB)を用いて、硫酸イオン非存在下でのこれらの代謝系が関与する発酵的物質代謝を明らかにした。

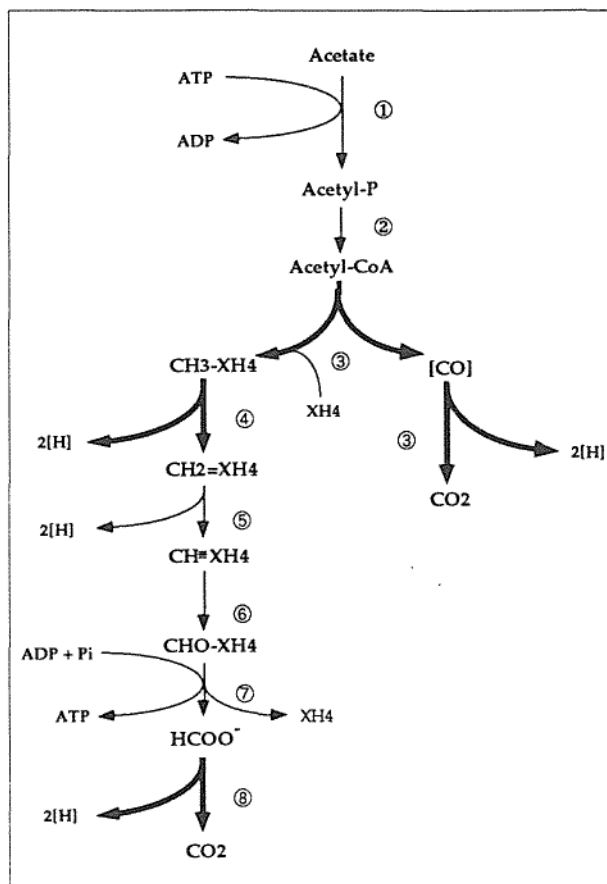


Fig. 10. Acetate oxidation via acetyl-CoA/carbonmonoxide dehydrogenase pathway.

Bold arrows; reactions catalyzed by membrane enzymes, Thin arrows; reactions catalyzed by cytoplasmic enzymes. X; *Desulfotomaculum acetoxidans* = folate, *Desulfobacterium autotrophicum* = pterin, *Desulfovibrio baarsii* = pteridine. ①; acetate kinase, ②; phosphate acetyltransferase, ③; carbon monoxide dehydrogenase, ④; methylenetetrahydro "X" reductase, ⑤; methylenetetrahydro "X" dehydrogenase, ⑥; methenyltetrahydro "X" cyclohydrolase, ⑦; formyltetrahydro "X" synthetase, ⑧; formate dehydrogenase.

第二節 *Desulfobulbus propionicus* MUDによるアルコールおよびアルデヒドからのプロピオン酸の生成

*Desulfobulbus propionicus*は前章で明らかにしたようにプロピオン酸酸化硫酸還元菌でmethylmalonyl-CoA経路を持つ。この経路は前節のようにStamsらにより報告された経路であるが¹³⁾、これより前にLaanbrokeらにより*D. propionicus*によるアルコール類の発酵的利用の可能性が示唆されていた⁸⁾。しかし当時はまだこの経路が解明されておらず、その詳しい量論や考察はなされていない。本節では*D. propionicus*によるmethylmalonyl-CoA経路を利用したアルコールおよびアルデヒドの発酵的利用を検討した。

1 実験方法

1-1 培養および反応条件

使用した*D. propionicus*は先に報告したMUD株(DSM 6523)を用いた。培地および培養方法は先と同様である。ただし、基質はピルビン酸(Na塩、10 mM)を用い、硫酸イオンを含まない培地で発酵的に生育させた。

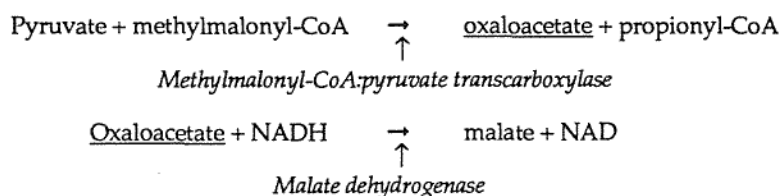
発酵代謝試験は正確な代謝産物量を得るために濃縮菌体を使用した。すなわちピルビン酸で発酵的に生育させた対数増殖期後期の菌体を、遠心分離(10,000 x g, 15min)により集菌し、基質および硫酸イオンを含まない新鮮な培地を用いて2回洗浄後、30ml容血清瓶に移した。このときの菌体量は、アルコールの変換試験については乾燥菌体として32 mg/20ml、アルデヒドの試験については17 mg/20mlに調製し、気相部はN₂/CO₂(4:1, vol/vol)もしくはH₂/CO₂(4:1, vol/vol)で置換し、1.5 kg/cm² (147 kPa)陽圧とした。反応は基質添加後36℃で行った。

1-2 酵素活性の測定

ピルビン酸を基質にして硫酸イオンを含まない培地で発酵的に生育した細胞を遠心分離(10,000 x g, 15min)により集菌し、50 mMリン酸緩衝液(1 mM Na₂S₂O₄を還元剤として含む)を用いて2回洗浄後、フレンチプレス処理(1,200 kg/cm²)した後、遠心分離(10,000 x g, 20 min)を行い、その上清部を粗酵素液として使用した。酵素活性の測定には全量2mlのスクリーキャップ・ブチルゴム栓付きのキュベットを用い、反応はすべて嫌気条件下で行った。

Hydrogenaseの活性は50 mMリン酸緩衝液(pH7.2)中にbenzyl viologen (2 mM), glutathione (0.2 mM), および粗酵素液を添加し、液量を1 mlとした。気相を水素ガスで置換後、Na₂S₂O₄溶液を少量添加し若干の色をつけた後に、直ちに生成する還元型benzyl viologenの555nmの吸収の増大を分光光度計によって測定を行った⁴⁹⁾(第四章参照)。

またmethylmalonyl-CoA:pyruvate transcarboxylaseの活性は、反応液（50 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に pyruvate: 10mM, methylmalonyl-CoA:0.2mM, glutathione:0.2mMを入れ、酵素液を添加後、NADHを0.2mMとなるように添加し、直ちにNADHの340nmの吸収を分光光度計で測定した。なおこの方法は、直接該当酵素を測定しているわけではなく、下記のような共役酵素反応系(coupling enzyme method)により、malate dehydrogenaseによるNADHの減少を測定するものである¹³⁾。



なお本菌株は以下の要領でmalate dehydrogenaseを測定し、十分にその活性が認められている。

50 mM リン酸緩衝液 (pH7.0)	
pyruvate	10.0 mM
methylmalonyl-CoA	0.2 mM
glutathione	0.2 mM
NADH	0.2 mM

NADHの340nmの吸収を分光光度計で測定。

すべての反応は36℃で行った。

総たんぱく量はBIO-RAD社製Protein Assay Dye-Reagent-Concentrateを用いた色素結合法により、595nmでの吸光度により定量した。

1-3 機器分析

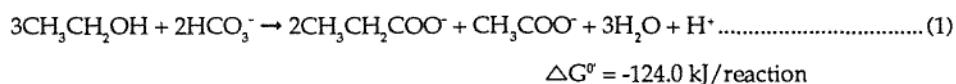
アルコール類、アルデヒド類および有機酸は前記と同様にガスクロマトグラフおよび高速液体クロマトグラフで定量した。

2 結果および考察

2-1 アルコール類からのプロピオン酸の生成

D. propionicus MUDは硫酸イオンのないN₂/CO₂雰囲気下で、エタノールを酢酸とプロピオン酸に変換し、またプロパノール+酢酸は同条件下でプロピオン酸に変換した(Table 13a, 13c)。培養系では約1週間で完全に変換されたが、生育は極めて低かった(O.D. < 0.03)。これらの変換反応は次の量論式に一致した(pH 7.0)¹²⁾。

Ethanol:



Propanol:

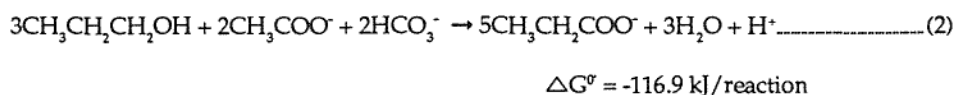


Table 13 Conversion of ethanol, propanol or acetate by *D. propionicus* MUD.

a) Ethanol under N₂/CO₂

Incubation time (h)	Substrate and products (mmol/l)		
	Ethanol	Acetate	Propionate
0	24.8	ND	ND
3	0.3	8.0	15.7
10	ND*	8.2	17.5

b) Ethanol under H₂/CO₂

Incubation time (h)	Substrate and products (mmol/l)		
	Ethanol	Acetate	Propionate
0	26.2	ND	ND
3	0.3	8.8	16.0
10	ND	9.0	17.5

c) Propanol plus acetate under N₂/CO₂

Incubation time (h)	Substrates and product (mmol/l)		
	Propanol	Acetate	Propionate
0	17.1	11.5	ND
3	4.1	3.2	21.4
10	ND	0.2	27.1

d) Propanol plus acetate under H₂/CO₂

Incubation time (h)	Substrates and product (mmol/l)		
	Propanol	Acetate	Propionate
0	15.2	12.1	ND
3	3.2	4.0	19.2
10	ND	1.9	25.1

Propanol was not converted without acetate.

Propanol was not converted without acetate.

e) Acetate under H₂/CO₂

Incubation time (h)	Substrate and product (mmol/l)	
	Acetate	Propionate
0	21.4	ND
3	24.7	ND
10	21.7	ND
20	21.0	0.2

*ND, Not detected.

これらの代謝は気相部に水素が存在していても、影響は受けなかった(Table 13b, 13c)。先にLaanbroekらが報告した*D. propionicus* Lindhorstも同様な代謝を行うが、Lindhorst株は水素ガスの影響を受け、プロピオン酸の生成比が高くなり酢酸の生成が抑えられる⁹⁾。またLindhorst株は酢酸+H₂/CO₂でプロピオン酸の生成が確認されているが、MUD株ではまったく反応はおきなかった(Table 13e)。同じ種である2つの株でこのように代謝に差がでるのは、水素の利用能に依存したものと思われる。Lindhorst株はエネルギー源としてH₂/CO₂を利用できるが⁹⁾、MUD株は硫酸還元基質としても水素の利用性は低かった。MUD株のhydrogenaseの活性は0.12 μmol/min/mg-proteinであり、ちなみに水素資化性に優れた*Desulfovibrio vulgaris*では、hydrogenaseの活性は0.66 μmol/min/mg-proteinであることから(後述)、この活性値はかなり低いものといえる。

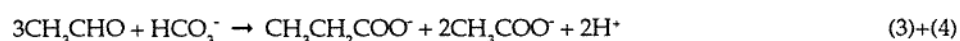
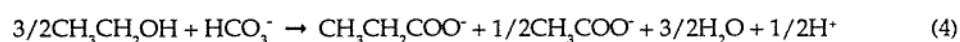
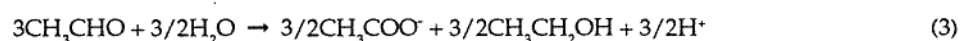
Table 14. Conversion of acetaldehyde or propionaldehyde by *D. propionicus* MUD.

a) Acetaldehyde (AceCHO) under N ₂ /CO ₂					b) Propionaldehyde (ProCHO) under N ₂ /CO ₂				
Incubation time (h)	Substrate and products (mmol/l)				Incubation time (h)	Substrates and products (mmol/l)			
	AceCHO	Ethanol	Acetate	Propionate		ProCHO	Propanol	Acetate	Propionate
0	9.0	ND	ND	ND	0	7.5	ND	8.3	ND
2	4.6	1.9	1.8	ND	2	5.8	0.7	8.2	0.8
10	ND	ND	5.7	2.8	10	ND	ND	6.0	9.9

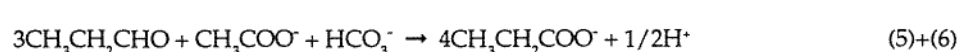
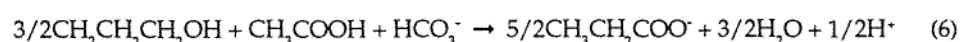
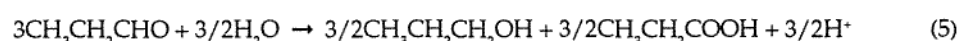
2-2 アルデヒド類からのプロピオン酸の生成

アルコール代謝の中間物質として考えられるアルデヒドも、*D. propionicus* MUDによりアルコールの代謝と同様な物質に変換された(Table 14)。しかしアセトアルデヒドからのプロピオン酸の生成は、アセトアルデヒドがエタノールと酢酸に変換された後に、反応が進んでいることが明らかになった。これはプロピオンアルデヒドでも同様な傾向が見られ、すなわちアルデヒドの変換は単純に反応が進むのではなく、下式の様に二段階の反応で代謝が進んでいることが明らかになった。最初の反応ではアルデヒドからの各有機酸とアルコールへの不均化反応(disproportionation reaction)が起こり、その反応が終了後に生成したアルコールが3-2)の反応と同様に進むと考えられた。

Acetaldehyde:



Propionaldehyde:



アセトアルデヒドでは、アセトアルデヒドからのエタノールと酢酸への不均化反応(Eq.3)が完全に終了した後に、生成したエタノールが酢酸とプロピオン酸へと変換される(Eq.4)。プロピオンアルデヒドも同様にプロピオン酸とプロパノールへの反応終了後にプロパノールと酢酸からのプロピオン酸生成が起こると考察された。

2-3 Methylmalonyl-CoA経路とプロピオン酸の生成

ピルビン酸を基質に硫酸イオンを含まない培地で生育した細胞を破碎し酵素活性を測定した。その結果、

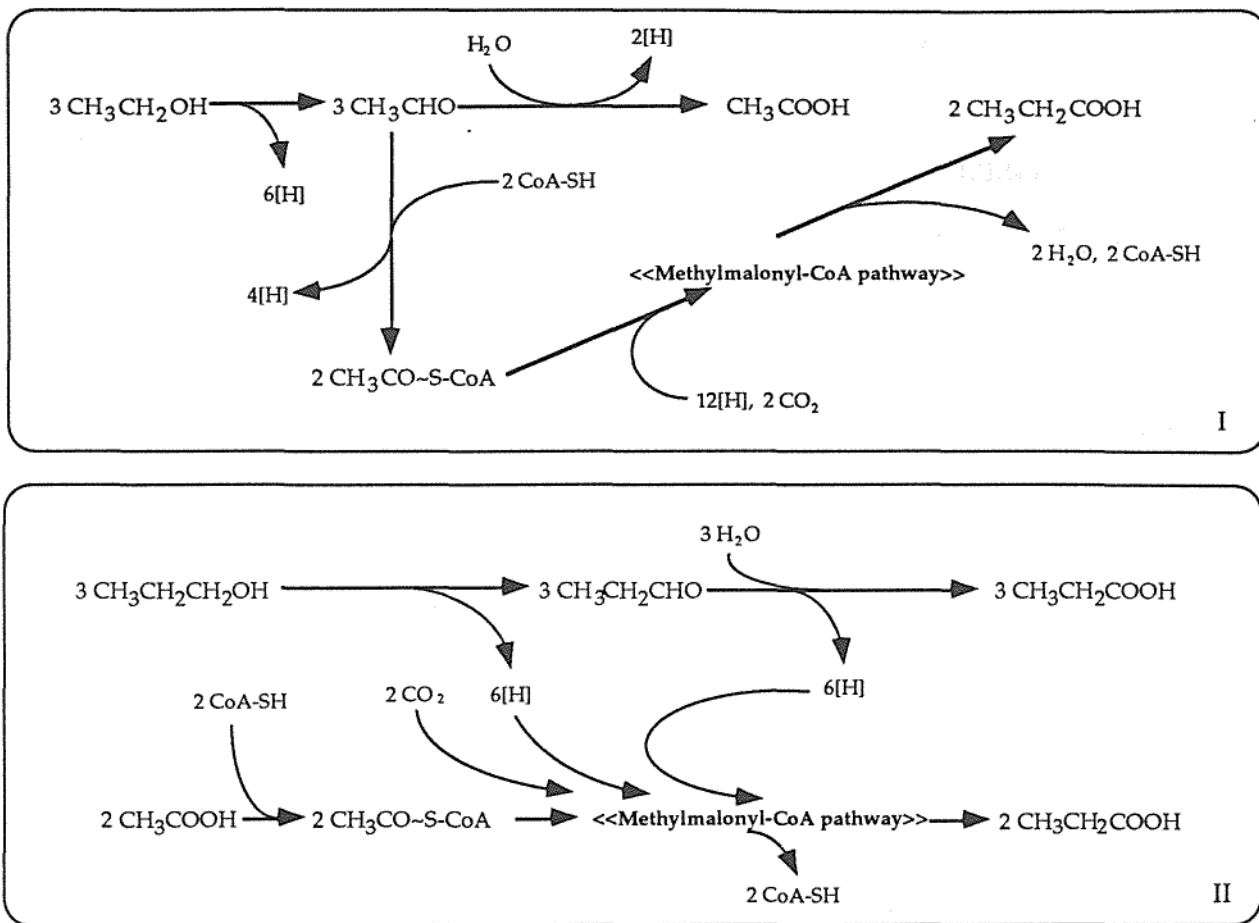


Fig. 11. Proposed pathways of conversion of alcohols and aldehydes by *Desulfobulbus propionicus* MUD. (I) Conversion of ethanol to acetate and propionate. (II) Conversion of propanol plus acetate to propionate.

methylmalonyl-CoA経路のkey enzymeであるmethylmalonyl-CoA:pyruvate transcarboxylaseの活性(0.338 μmol/min/mg-protein)が確認された。(ちなみに硫酸呼吸により生育した細胞では0.333 μmol/min/mg proteinであり、発酵的に生育した細胞とほぼ同値である(第四章参照))このことはプロピオン酸酸化経路であるmethylmalonyl-CoA経路が硫酸還元を行わない細胞内にも存在しており、この経路は発酵的代謝にも関与しているものと考えられる。Fig. 11にエタノールおよびプロパノールの推定代謝経路を示した。エタノールが酢酸へ酸化される際に放出される還元力[H]と、エタノールからacetyl-CoAまでの反応で放出される還元力は、methylmalonyl-CoA経路内でacetyl-CoAをプロピオン酸に還元するのに使用されると考えられる(Fig. 11 I)。またプロパノールはプロピオン酸に酸化される際に放出される還元力を、methylmalonyl-CoA経路に取り込んでプロピオン酸酸化の逆方向に経路を進めることにより、酢酸からプロピオン酸を生成していると推測される(Fig. 11 II)。Fig. 11 IIの反応系において水素利用性の高いLindhorst株は、プロパノールからプロピオン酸への反応より放出される還元力の代わりに、水素ガスを用いて酢酸と二酸化炭素からプロピオン酸を生成することができる⁸⁾。しかしMUD株はhydrogenaseの活性が低いことからわかるように分子状の水素を利用することはできなかった。

第三節 *Desulfotomaculum thermobenzoicum* TSBによるメトキシ安息香酸の代謝と酢酸の生成

D. thermobenzoicum TSBは嫌気性では唯一の高温性安息香酸分解細菌である。このTSB株は第二章第三節で述べたように、メトキシ安息香酸類を硫酸イオンの有無にかかわらず基質として利用し生育できる。メトキシ基を持つ芳香族物質はリグニンやその関連物質の構成物質として知られているが、このメトキシ芳香族物質の純粋系による嫌気分解については*Syntrophococcus sucromutans*⁵⁰⁾による電子受容体としての利用や、*Acetobacterium woodii*⁵¹⁾による利用が報告されている。また硫酸還元菌の一種である*Desulfotomaculum orientis*においても硫酸還元基質になりうるという報告³⁾だけはあるが、前記二株も含めその中間物質など代謝過程の検討はされていない。

そこで本節では、メトキシ安息香酸類を硫酸還元の基質としても、発酵基質としても利用できるTSB株を用いて、Fig. 12に示す様なメトキシ安息香酸類の発酵的代謝およびCODH経路によるメトキシ基の代謝様式について検討した。

1 実験方法

1-1 培養および培養条件

実験には先に分離した*D. thermobenzoicum* TSB (DSM 6193)を使用し、培地および培養方法は前章に準じ、必要に応じて基質を各5mM、電子受容体(SO₄²⁻)20 mMを添加した。基質として示した*p*-メトキシ安息香酸、バニリン酸 (4-hydroxy-3-methoxybenzoate)、シリンガ酸 (3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoate)、3,4,5-trimethoxybenzoateを用いた。

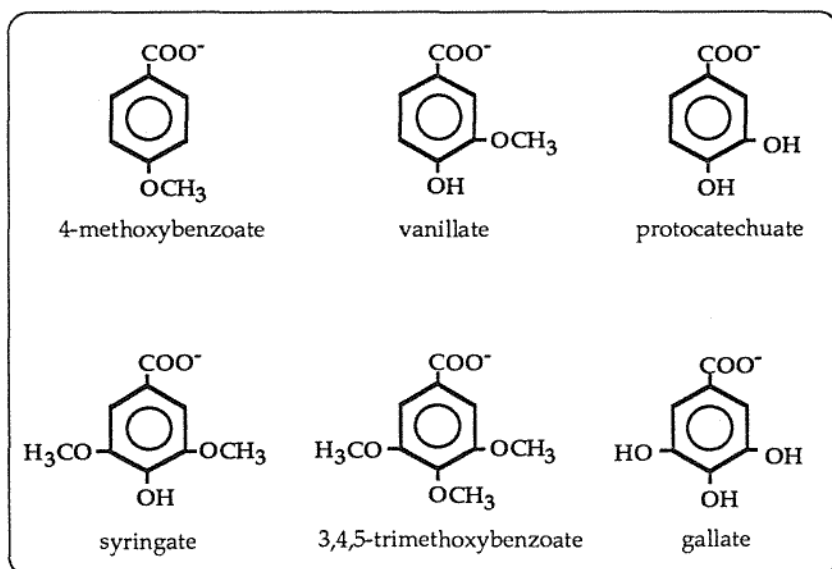


Fig. 12. Structure of methoxylated benzoates and hydroxylated benzoates.

量論試験では、3,4,5-trimethoxybenzoate (5 mM)を基質として硫酸イオンがない培地で培養した細胞を、前節と同じ方法で集菌洗浄後、濃縮菌体として使用した。細胞は30 ml容の血清瓶に乾燥菌体量で15 mg/20 mlになるように調製した。気相部はN₂/CO₂ (4:1, vol/vol)で置換し、1.5 kg/cm²(147 kPa)陽圧とした。

反応は基質添加後55℃で行った。

1-2 酵素活性の測定

3,4,5-trimethoxybenzoate(5 mM)を基質として硫酸イオンがない培地で培養した細胞を、前節に準じて粗酵素液を調製した。タンパク質量も同様な測定で行った。

CODH(carbonmonoxide dehydrogenase)の活性は、第二章第三節と同様に生成する還元型benzyl violgenの555 nmの吸収増大を分光光度計を用い測定した(第四章参照)。

1-3 機器分析

芳香族物質および生成物質の測定は、前記の方法に準じHPLCを用いた。

2 結果および考察

2-1 メトキシ安息香酸類における生育とその特性

Desulfotomaculum thermobenzoicum TSBは硫酸イオンの有無にかかわらず、メトキシ安息香酸類をエネルギー源として生育することができた。3-methoxybenzoateおよび4-methoxybenzoateはそれぞれ3-hydroxybenzoateと4-

hydroxybenzoateに変換され、バニリン酸(4-hydroxy-3-methoxybenzoate)はプロトカテキュ酸(3,4-dihydroxybenzoate)に変換された。またシリング酸(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoate)は3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoateを経由して没食子酸(3,4,5-trihydroxybenzoate)に変換され(Fig. 13 a)、3,4,5-trimethoxybenzoateは没食子酸に変換される過程で、中間代謝物質として3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoateとシリング酸が検出された(Fig. 13 b)。また硫酸イオンのない培養ではそのほかに酢酸

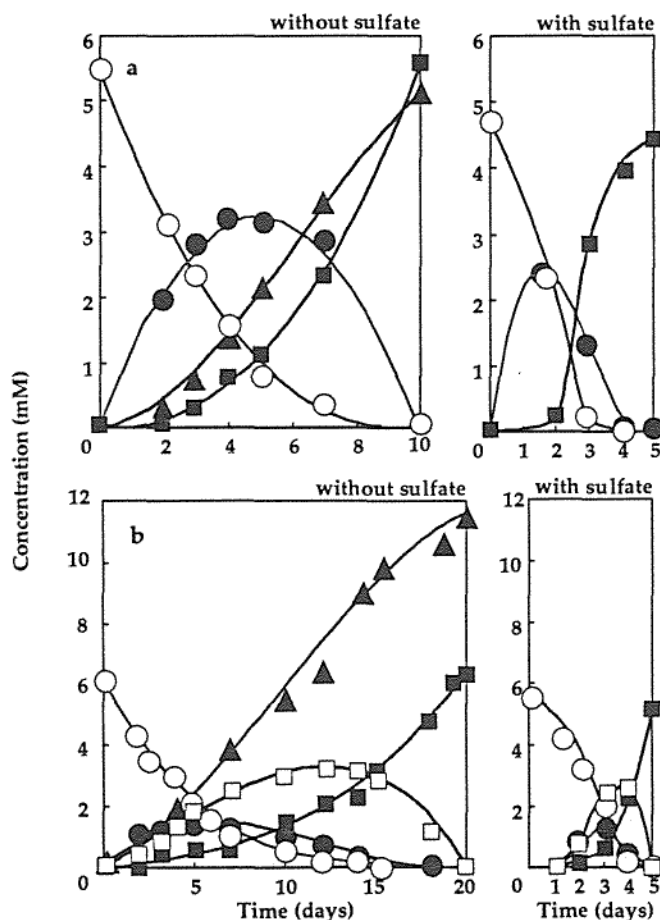


Fig. 13. Conversion of syringate (a) or 3,4,5-trimethoxybenzoate (b) by *Desulfotomaculum thermobenzoicum* TSB. Each left figure shows conversion without sulfate, right figure shows conversion with sulfate. a) conversion of syringate, b) conversion of 3,4,5-trimethoxybenzoate. Symbols; a) -○-: syringate, -●-: 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoate, -■-: gallate, -▲-: acetate. b) -○-: 3,4,5-trimethoxybenzoate, -●-: syringate, -□-: 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoate, -■-: gallate, -▲-: acetate.

Table 15. Growth of *Desulfotomaculum thermobenzoicum* TSB on some methoxylated benzoates with or without sulfate.

	Substrate added (mmol/l)	Sulfate added (mmol/l)	Dry cells (mg/l)	Growth yield; gram dry weight per mol substrate
4-Methoxybenzoate	4.8	0	17	3.5
	4.6	20	24	5.2
Vanillate	3.7	0	14	3.8
	3.9	20	22	5.6
Syringate	5.5	0	23	4.1
	4.2	20	36	8.6
3,4,5-Trimethoxy- benzoate	6.0	0	28	4.7
	5.5	20	54	9.8

が検出された。一方、硫酸イオンを含む培養では酢酸の生成は見られず硫化水素の生成が確認された。硫酸イオンの存在は菌体収率を上げ、変換速度も高めている (Table 15)。

1982年にKaiserらは嫌気性汚泥を用いてメトキシ芳香族物質の分解特性を調べ、3,4,5-trimethoxybenzoateの没食子酸への変換の考察を行っているが、それによると 3,4,5-trimethoxybenzoate は最初に4,5-dimethoxy-3-hydroxybenzoateに変換されると報告されている⁵²⁾。一方今回の結果では、Fig.13より3,4,5-trimethoxybenzoateの没食子酸への最初の変換過程は、3位や5位ではなく4位のメトキシ基のヒドロキシ基への変換であり、これによりシリング酸(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoate)が生成した。引き続きシリング酸は3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoateに変換され最終的に没食子酸に変換された(Fig.13)。嫌気性細菌群による分解特性と純粋系では直接比較はできないが、少なくともTSB株はFig. 14に示した代謝様式を持つと考えられる。

またTSB株は2-methoxybenzoate, 2,6-dimethoxybenzoateを利用することができなかったことより、2位のメトキシ基は利用できないものと推測された。2,3,4-trimethoxybenzoate, 2,3-dimethoxybenzoate, 2,4-dimethoxybenzoateはいずれも利用されたが、最終生成物は少なくともそれぞれ 2,3,4-trihydroxybenzoate, 2,3-dihydroxybenzoate, 2,4-dihydroxybenzoate ではなかった。3,4-Dihydroxy-2-methoxybenzoate, 3-hydroxy-2-methoxybenzoate, 4-hydroxy-2-methoxybenzoateといった標準物質が入手できなかったために、最終生産物の同定はできなかったが、後述する酢酸の生成比と2位のメトキシ基の非利用性などから考えて、それぞれ2位以

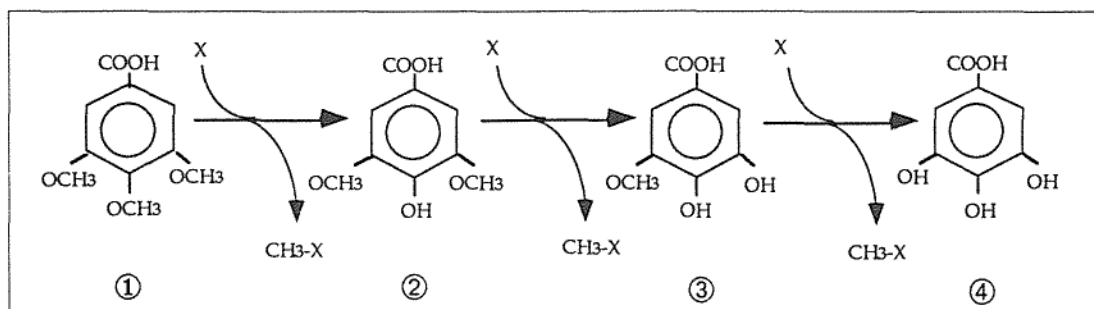


Fig. 14. Proposed pathway of conversion of trimethoxylated benzoate to hydroxylated benzoate.

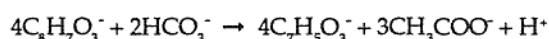
① 3,4,5-trimethoxybenzoate, ② syringate, ③ 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoate, ④ gallate.

外のメトキシ基がヒドロキシ基に変換された3,4-dihydroxy-2-methoxybenzoate, 3-hydroxy-2-methoxybenzoate, 4-hydroxy-2-methoxybenzoateと推定された。

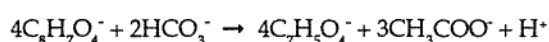
2-2 濃縮菌体によるメトキシ安息香酸類の変換と量論比

TSB株は硫酸イオンのない条件ではメトキシ安息香酸類から酢酸を生成した。酢酸およびヒドロキシ安息香酸の生成量を正確に調べるために濃縮菌体を用いて4種類のメトキシ安息香酸類(4-methoxybenzoate, バニリン酸、シリンガ酸、3,4,5-trimethoxybenzoate)の変換を調べた。すべてのメトキシ安息香酸類は直線的にヒドロキシ安息香酸類へ変換され、同時に酢酸が生成した。またシリンガ酸、3,4,5-trimethoxybenzoateでは2-1で示した中間物質も検出された。最終的な変換結果をTable 16に示す。これより1molのメトキシ基から0.75molの酢酸が生成されており、量論式は以下のように考察された。

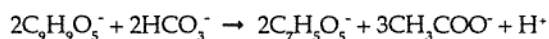
4-Methoxybenzoate;



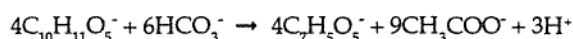
Vanillate;



Syringate;



3,4,5-Trimethoxybenzoate;



メタノールは利用できなかった。

2-3 酢酸の生成と脱メチル反応

TSB株の酢酸生成を伴うメトキシ安息香酸類の代謝は*Acetobacterium woodii*の代謝と非常に類似している⁵¹⁾。

*A. woodii*のメトキシ安息香酸類からの酢酸生成は、Fig. 15に示したように、メトキシ基が加水によりヒドロキ

Table 16. Conversion of methoxylated benzoates to hydroxylated benzoates by concentrated cell suspension without sulfate.

Substrate added (mmol/l)	Methoxyl-group per molecule	Total molecules of methoxyl-group per liter	Products (mmol/l)		Molar ratio of acetate formed per methoxyl- group consumed
			HB*	Acetate	
4-Methoxybenzoate 4.7	1	4.7	4.7	3.5	0.74
Vanillate 3.1	1	3.1	3.2	2.3	0.74
Syringate 3.3	2	6.6	3.3	4.7	0.71
3,4,5-Trimethoxybenzoate 3.9	3	11.7	4	8.5	0.73

*Hydroxylated benzoate

シ基となりその際にメタノールが生成される。A. woodii はメタノールからの酢酸生成能を有するため、メトキシ基からのメタノールは二酸化炭素とともに酢酸に変換される。一方TSB株はメタノールと二酸化炭素から酢酸を生成しなかった（データ省略）。またどの変換においてもその過程に中間物質としてメタノールの検出は認められなかった（データ省略）。これらのことよりTSB株のメトキシ基からの酢酸生成はA. woodiiのようなメタノール経由ではないと考えられる。

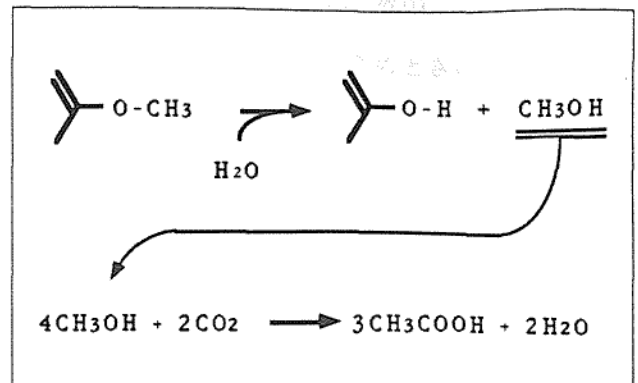


Fig. 15. Formation of acetate from methoxyl-group by *Acetobacterium woodii* (Bache and Pfennig 1981)

3,4,5-Trimethoxybenzoateを基質とした場合、CODH経路のkey enzymeであるCODH (carbonmonoxide dehydrogenase)の活性が、硫酸イオンを添加した培地で生育した細胞内(0.590 μmol/min/mg-protein)にも硫酸イオンを添加しない培地で生育した細胞内(0.700 μmol/min/mg-protein)にも確認された。CODH経路と代謝量論比から考え、酢酸はFig. 16に示すようにCODH経路による二酸化炭素固定によって生成されるものと思われる。メトキシ基はメチルキャリアにメチル基を渡しヒドロキシ基となり、メチルキャリアはCODH経路に入る。4molのメチルキャリアのうち1molが二酸化炭素に酸化され、その際放出される還元力[H]が、3 molのCO₂を還元してCOを生成し、3 molのメチル基(CH₃-X)と結合して3 molの酢酸を生成しているものと思われる。すなわち、ここでは通常酢酸の二酸化炭素への酸化に機能しているCODH経路が逆方向に機能しているものと考えられる。

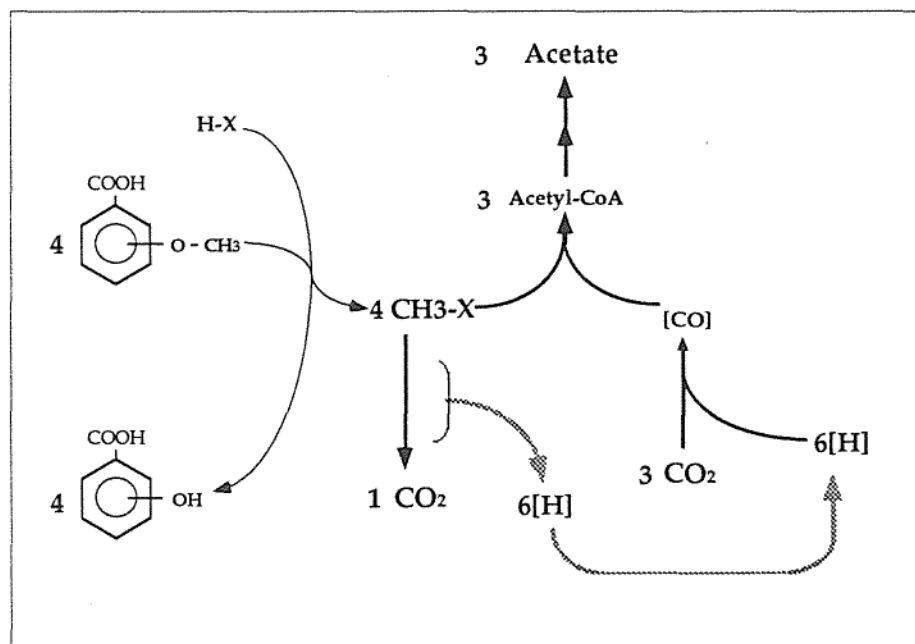
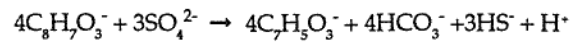


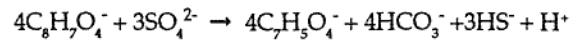
Fig. 16. Proposed pathway of acetogenesis from methoxylated benzoate by *Desulfotomaculum thermobenzoicum* TSB without sulfate.

また硫酸イオンが存在するとメチル化合物(CH₃-X)はすべて二酸化炭素に酸化され、放出される還元力は電子伝達系を經由し、最終的に硫酸を還元して硫化水素が生成されと考えられる。このときの反応は下記の式で表される。

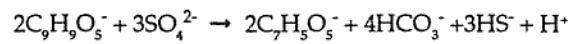
4-Methoxybenzoate;



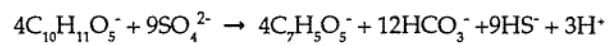
Vanillate;



Syringate;



3,4,5-Trimethoxybenzoate;



第四節 要約

本章では、近年発見された、本来硫酸還元と共役して働くプロピオン酸酸化経路（methylmalonyl-CoA経路）および酢酸酸化経路（CODH経路）が、硫酸呼吸以外の発酵的な代謝においても、還元力の受け渡しの場として働いていることを明らかにした。

まず*Desulfobulbus propionicus* MUDが持つプロピオン酸酸化経路であるmethylmalonyl-CoA経路が、硫酸イオンのない発酵的生育時にも関与していることを明らかにするべく、アルコール類の代謝を濃縮菌体を用いて検討を行った。その結果次のことが明らかになった。

1. 発酵的に生育した細胞内にもmethylmalonyl-CoA経路のkey enzymeであるのmethylmalonyl-CoA:pyruvate transcarboxylaseの活性が確認されたことより、この細胞内にもmethylmalonyl-CoA経路が存在するものと予想された。
2. MUD株は二酸化炭素の存在下でエタノールを酢酸とプロピオン酸に、プロパノール+酢酸をプロピオン酸に量論的に変換した。
3. アルデヒド類もアルコールと同様に変換されるが、その反応はアルデヒドからの有機酸とアルコールへの不均化反応が起こり、その後生成したアルコールが代謝されていることが明らかになった。
4. これらの代謝はmethylmalonyl-CoA経路により起こっていると考察された。
5. しかもこの場合、通常プロピオン酸酸化経路として機能しているmethylmalonyl-CoA経路が逆方向に進んでいるものと推定された。
6. このように*Desulfobulbus*属の硫酸還元菌がプロピオン酸を発酵的に生成することは、嫌気消化槽に見られるプロピオン酸の蓄積に関与している可能性も考えられる。

続いて酢酸酸化経路であるCODH経路が硫酸イオンの有無に関わらず代謝に関与していることを明らかにするべく、硫酸還元菌ではほとんど報告がないメトキシ安息香酸類の発酵的代謝を*Desulfotomaculum thermobenzoicum* TSBを用いて考察した。その結果次のことが明らかになった。

1. TSB株は硫酸イオンの有無に関わらずメトキシ安息香酸類を利用して生育することができた。
2. 硫酸イオンがある場合、メトキシ安息香酸をヒドロキシ安息香酸に変換し、この時硫酸還元反応が確認された。
3. 硫酸イオンがない場合、メトキシ安息香酸からヒドロキシ安息香酸の他に酢酸を生成してい

た。

4. 今まで硫酸還元菌によるメトキシ基の利用についての詳細な検討はなく、また今回嫌気純粋系でははじめて中間代謝物の蓄積を明らかにした。
5. TSB株は2位（6位）のメトキシ基を利用することができず、そのほかのメトキシ基は4位、3位、5位の順に利用されることが明らかになった。
6. 発酵的に生育したTSB株の細胞中にもCODH経路のkey enzymeであるcarbonmonoxide dehydrogenaseの活性が確認されたことより、CODH経路が関与している可能性が示唆された。
7. しかもこの場合、通常酢酸酸化経路として機能しているCODH経路が酢酸生成という逆方向の代謝系路として働いている可能性が示唆された。

第四章 異なる3種の硫酸還元菌によるピルビン酸の発酵的代謝の差異

第一節 はじめに

硫酸還元菌のエネルギー獲得は多くの場合、基質を酸化する際に放出される還元力[H]が電子伝達系を経て硫酸を還元する反応と共役して起こる。還元力は最終的に硫酸イオンの硫化水素への還元に使われる。一方、多くの嫌気性細菌は呼吸系を持たず、そのエネルギーの獲得は発酵過程での基質レベルでのリン酸化などによる。硫酸を還元する反応に共役する電子伝達系からエネルギーを得ている硫酸還元菌は、他の嫌気性細菌と同様に硫酸呼吸を行わずに基質を発酵的に利用して生育することが古くから知られている^{4,5,6,7}。硫酸還元菌のこのような発酵的代謝に関してはすでに1960年前後より研究されていた。しかし当時は*Desulfovibrio*属の硫酸還元菌と2,3の*Desulfotomaculum*属の細菌しか報告されておらず、その基質利用性は極めて狭いものであった。そのため発酵的に利用できる基質も限られ、リンゴ酸やフマル酸、ピルビン酸などほんの数種類と考えられていた。ところが、1980年前後から新しい種類の硫酸還元菌が次々に単離され、同時に methylmalonyl-CoA経路やCODH経路などの、今まで知られていなかった新しい代謝経路がいくつか発見されるに至った。これらの発見により、methylmalonyl-CoA経路やCODH経路が関与する硫酸還元菌の発酵的生育の可能性が示唆され始め、前章ではこれらの代謝経路が関与する硫酸還元菌の新規な発酵的代謝について明らかにした。

ところで硫酸還元菌が発酵的に利用できる代表的な基質であるピルビン酸は、硫酸イオン存在下では不完全酸化型の硫酸還元菌による硫酸呼吸によって酢酸と硫化水素に変換される。ではピルビン酸は、硫酸イオン非存在下では異なる代謝系路を持つ硫酸還元菌によってどのような発酵的代謝がなされるのであろうか。本章では前章まで用いてきた2種類の硫酸還元菌および古くから知られている最も一般的な硫酸還元菌を用い、それぞれのピルビン酸の発酵代謝について、代謝産物、生成比および酵素活性の比較等を行うことにより検討し、その違いを明確にした。

第二節 実験方法

1 試供菌体

供試菌体として、*Desulfotomaculum thermobenzoicum* TSB (DSM 6193), *Desulfobulbus propionicus* MUD (DSM 6523), *Desulfovibrio vulgaris* Marburg (DSM 2119)の3株を使用した。*D. vulgaris*は最も古くから知られている代表的な硫酸還元菌である。

2 培地および反応条件

使用した培地はそれぞれ前章に従い調製した。各菌株をピルビン酸を基質として硫酸イオンの含まない培

地で36℃ (*D. propionicus* MUD, *D. vulgaris* Marburg) および55℃ (*D. thermobenzoicum* TSB) で前培養を行った。反応に用いた菌体は、対数増殖期後期の細胞を遠心分離(10,000xg, 15 min)により集菌し、100 mMリン酸緩衝液で洗浄後同緩衝液に懸濁し、50 ml容バイアル瓶に約25mg dry cell/20ml bufferとなる様に分注した。気相部をN₂/CO₂(4:1 vol/vol)(*D. thermobenzoicum* TSB, *D. propionicus* MUD)およびN₂(*D. vulgaris* Marburg)に置換し、ブチルゴムおよびアルミシールにより密栓後内圧を1.5 cm²/kg (147 kPa) 加圧とした。反応は基質添加後、36℃および55℃で行った。

3 酵素活性の測定方法

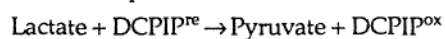
酵素活性はこれまでと同様に粗酵素溶液を用いて測定した。すべてスクリーキャップブチルゴム栓付き2ml用のキュベットを用い、反応液量1mlとして分光光度計を用い測定を行った。各反応液の組成、分子吸光係数(ε)および測定波長(λ)は次の通りである¹³⁾。

Lactate dehydrogenase;

Sodium lactate (10 mM)

2,6-Dichlorophenolindophenol (0.07 mM)

Phosphate buffer (pH 7.4, 100 mM)



$$\Delta\epsilon/\text{mM} = -11.3/\text{e}, \lambda = 600 \text{ nm}$$

Pyruvate dehydrogenase;

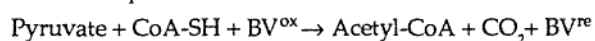
Sodium pyruvate (10 mM)

Benzyl viologen (5 mM)

CoA-SH (2 mM)

Na₂S₂O₄ (50 mM solutionで適量添加)

Phosphate buffer (pH 7.4, 100 mM)



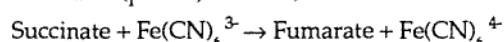
$$\Delta\epsilon/\text{mM} = -8.1/\text{e}, \lambda = 555 \text{ nm}$$

Succinate dehydrogenase;

Sodium succinate (10 mM)

K₃Fe(CN)₆ (1 mM)

Phosphate buffer (pH 7.4, 100 mM)



$$\Delta\epsilon/\text{mM} = -1.02/\text{e}, \lambda = 420 \text{ nm}$$

Malate dehydrogenase;

Sodium oxaloacetate (5 mM)

NADH (0.2 mM)

Tris-HCl buffer (pH 7.2, 50 mM)



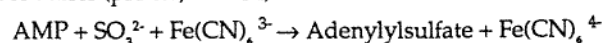
$$\Delta\epsilon/\text{mM} = 6.22/2\text{e}, \lambda = 340 \text{ nm}$$

Adenylylsulfate reductase;

AMP (2 mM)

Na₂SO₃ (2 mM in 5 mM EDTA)

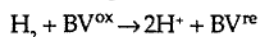
Tris-HCl buffer (pH 8.0, 50 mM)



$$\Delta\epsilon/\text{mM} = -1.02/\text{e}, \lambda = 420 \text{ nm}$$

Hydrogenase;

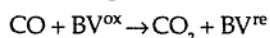
2-Mercaptoethanol (5 mM)
Benzyl viologen (5 mM)
Na₂S₂O₄ (50 mM solutionで適量添加)
H₂ (saturated)
Tris-HCl buffer (pH 8.5, 100 mM)



$$\Delta\epsilon/\text{mM} = -8.1/\text{e}, \lambda = 555 \text{ nm}$$

Carbonmonoxide dehydrogenase(CODH);

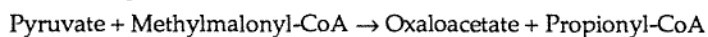
2-Mercaptoethanol (5 mM)
Benzyl viologen (5 mM)
Na₂S₂O₄ (50 mM solutionで適量添加)
CO (saturated)
Tris-HCl buffer (pH 8.5, 100 mM)



$$\Delta\epsilon/\text{mM} = -8.1/\text{e}, \lambda = 555 \text{ nm}$$

Methylmalonyl-CoA:pyruvate transcarboxylase;

Pyruvate (10 mM)
Methylmalonyl-CoA (0.2 mM)
NADH (0.2 mM)
Gultathione (2.5 mM)
Phosphate buffer (pH 7.0, 100 mM)



$$\Delta\epsilon/\text{mM} = -8.1/2\text{e}, \lambda = 555 \text{ nm}$$

4 機器分析

基質および生成物は前節と同様に高速液体クロマトグラフで測定した。水素および二酸化炭素の測定はガスクロマトグラフを下記の条件で使用した。

Column	Shimadzu porapak Q 50/80 mesh, 5m
Column temp.	60 °C
Carrier	30 ml-Ar/min
Detector	TC-detector, current: 60mA

第三節 結果および考察

1 各硫酸還元菌の発酵特性

硫酸イオンの存在する場合は*D. thermobenzoicum* TSB, *D. propionicus* MUD, *D. vulgaris* Marburg 3株いずれもとも硫酸還元によりピルビン酸を酢酸と二酸化炭素に変換する(データ省略)。しかし発酵的な代謝の場合は、その発酵パターンが3株ともそれぞれ異なっていた(Fig. 17)。*D. thermobenzoicum* TSBはピルビン酸を酢酸のみに変換したが*D. propionicus* MUDは酢酸とプロピオン酸に、また*D. vulgaris* Marburgは水素の生成も見られた。この代謝の最終的な量論をTable 17に示したが、この結果より*D. thermobenzoicum* TSBと*D. propionicus* MUDの代謝は次式と一致した(pH 7.0)¹²⁾。

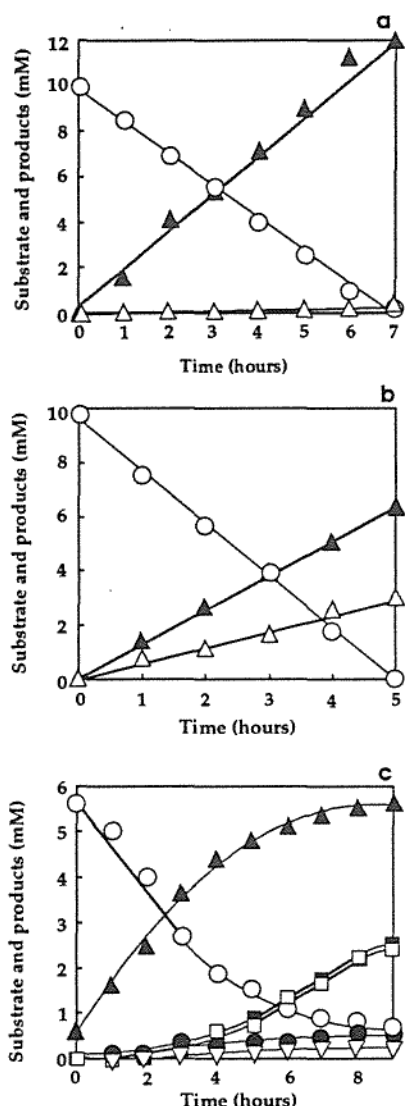
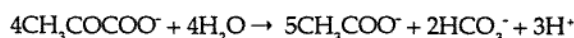


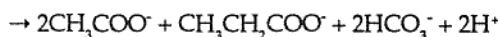
Fig. 17. Pyruvate conversion by the three sulfate reducers in the absence of sulfate. a) Conversion of pyruvate to acetate and propionate by concentrated cell suspension of *D. thermobenzoicum* TSB without sulfate. 20 ml of cell suspension in 50 ml serum vials with N₂/CO₂ as a gas phase was incubated at 56°C. b) Conversion of pyruvate to acetate and propionate by concentrated cell suspension of *D. propionicus* MUD without sulfate. 20 ml of cell suspension in 50 ml serum vials with N₂/CO₂ as a gas phase was incubated at 36°C. c) Conversion of pyruvate by concentrated cell suspension of *D. vulgaris* Marburg without sulfate. 20 ml of cell suspension in 50 ml of serum vials with N₂ as a gas phase was incubated at 36°C. Symbols: —○—; pyruvate, —▲—; acetate, —△—; propionate, —▽—; lactate, —●—; formate, —■—; H₂, —□—; CO₂.

D. thermobenzoicum TSB



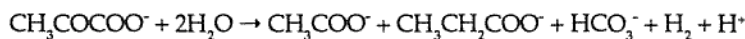
$$\Delta G^\circ = -293.1 \text{ kJ/reaction}$$

D. propionicus MUD



$$\Delta G^\circ = -217.9 \text{ kJ/reaction}$$

D. vulgaris Marburgの発酵パターンは上の二種の硫酸還元菌と異なり酢酸のほかに水素、蟻酸、乳酸が生成された。これまでの報告では1molのピルビン酸からそれぞれ1molの水素、二酸化炭素、酢酸が生成するとされているが⁵³⁾ (下式参照)、今回の反応は酢酸へ酸化される際に生成される還元力が、ピルビン酸から乳酸および[H]/CO₂から蟻酸の生成へ流れたと考察できる。



$$\Delta G^\circ = -74.1 \text{ kJ/reaction}$$

Table 17. Pyruvate conversion by concentrated cell suspension of *D. thermobenzoicum*, *D. propionicus* or *D. vulgaris* in the absence of sulfate. Each organism was suspended in 100 mM phosphate buffer with 1 mM Na₂S₂O₄ as reductant. Head space gas was replaced with N₂/CO₂ or N₂ gas. After addition of pyruvate, the cell suspension was incubated at 56 or 36 °C. Substrate and products were measured by HPLC and/ or GLC after 10 hours incubation

Organisms	Pyruvate added (mmol)	Residual pyruvate (mmol)	Products (mmol)					
			Acetate	Propionate	Formate	Lactate	CO ₂	H ₂
<i>D. thermobenzoicum</i> TSB	0.155	0	0.190	0.001	ND	ND	-	-
<i>D. propionicus</i> MUD	0.153	0	0.098	0.051	ND	ND	-	-
<i>D. vulgaris</i> Marburg	0.153	0.002	0.108	ND	0.012	0.006	0.055	0.049

ND, not detected; -, not measured

Table 17. Enzyme activities in the cell extracts of the three strains grown on pyruvate in the absence or presence of sulfate ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein).

Enzyme	<i>Desulfobulbus propionicus</i> MUD		<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i> TSB		<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Marburg	
	without SO_4^{2-}	with SO_4^{2-}	without SO_4^{2-}	with SO_4^{2-}	without SO_4^{2-}	with SO_4^{2-}
Lactate dehydrogenase	0.066	0.041	0.002	0.002	0.028	0.008
Pyruvate dehydrogenase	0.321	0.736	0.340	0.254	0.569	0.307
Succinate dehydrogenase	0.892	0.669	0.308	0.178	0.323	0.197
Malate dehydrogenase	0.440	0.360	0.276	0.206	1.223	0.186
Adenylylsulfate reductase	0.317	1.764	0.393	0.543	1.225	1.078
Hydrogenase	0.120	0.234	0.052	0.023	0.659	3.078
Carbon monoxide dehydrogenase	ND	ND	0.704	0.570	ND	ND
MM-CoA:pyr. transcarboxylase*	0.338	0.333	0.261	0.276	ND	ND

*MM-CoA, methylmalonyl-CoA : ND, not detected.

2 各硫酸還元菌の酵素活性

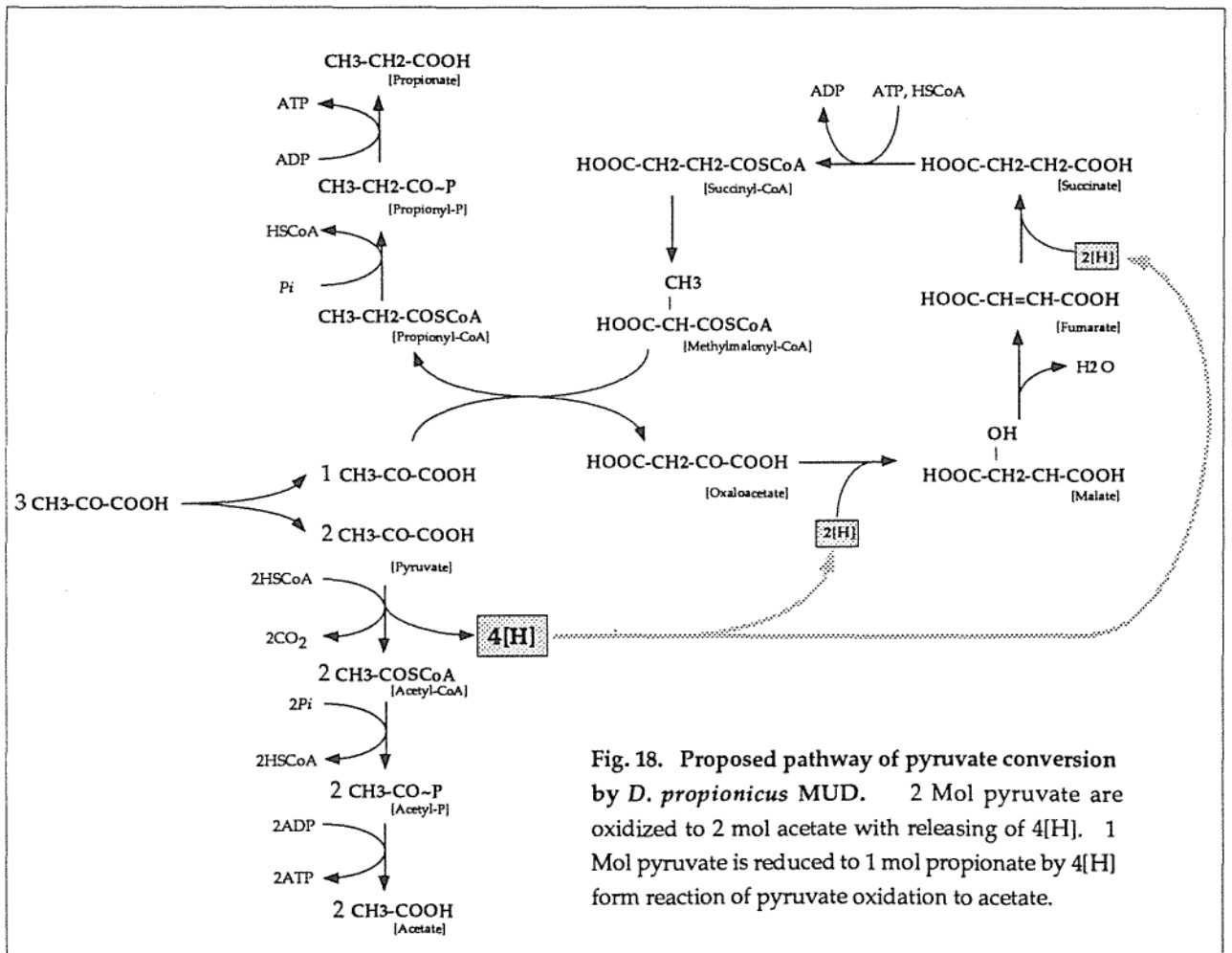
プロピオン酸酸化経路である methylmalonyl-CoA 経路および酢酸酸化経路である CODH 経路は、それぞれの key enzyme である methylmalonyl-CoA:pyruvate transcarboxylase と carbonmonoxide dehydrogenase の活性を確認することで、その存在を推定することができる^{13,14,22}。ピルビン酸を基質として発酵的に生育した細胞内のいくつかの酵素活性値を Table 18 に示した。比較のためピルビン酸とともに硫酸イオン(10mM)を加えて培養した際の活性値も併せて示した。この結果、発酵的に生育した *D. propionicus* MUD の細胞中にも methylmalonyl-CoA 経路の key enzyme である methylmalonyl-CoA:pyruvate transcarboxylase およびその経路の関連酵素が存在していることが明らかとなった。これはピルビン酸の酢酸とプロピオン酸への代謝に methylmalonyl-CoA 経路が関与していることを示唆している。また *D. thermobenzoicum* TSB の細胞中には CODH 経路の key enzyme である carbonmonoxide dehydrogenase と methylmalonyl-CoA:pyruvate transcarboxylase の両者の活性が認められ、methylmalonyl-CoA 経路と CODH 経路の両者が存在していることが示唆された。TSB 株が methylmalonyl-CoA 経路を持っていることは、本株が硫酸イオン存在下でプロピオン酸を資化できる(第二章参照)ことから考えても合理的である。しかし代謝生産物にプロピオン酸がほとんど生成されなかったことから、ピルビン酸の発酵的代謝には *D. propionicus* MUD のような methylmalonyl-CoA 経路による代謝ではなく、ほとんどすべてのピルビン酸は CODH 経路によって代謝されていると推定される。これに対し *D. vulgaris* Marburg は methylmalonyl-CoA 経路と CODH 経路のいずれも認められないが、他の2株に比べ hydrogenase の活性がきわめて高かった。

この結果は*D. vulgaris* Marburgのピルビン酸からの酢酸と H_2/CO_2 への変換には、hydrogenaseが重要な役割を担っていることを示唆している。

3 代謝経路についての考察

酵素活性を測定した結果から3種の硫酸還元菌は、ピルビン酸を発酵するにはそれぞれ異なる代謝経路を用いていることが示唆された。MUD株はmethylmalonyl-CoA経路のkey enzymeおよびその関連酵素が存在することから、ピルビン酸をmethylmalonyl-CoA経路によって、酢酸とプロピオン酸に変換していると考えられる(Fig. 18)。ピルビン酸がacetyl-CoAへ酸化される際に放出される還元力と、acetyl-CoAの一部(3 mol中2 mol)が酢酸へ酸化される際に放出される還元力を、ピルビン酸と二酸化炭素からのプロピオン酸の生成に利用していると考えられる。

Methylmalonyl-CoA経路とCODH経路のいずれも細胞内に存在していると考えられるTSB株は、実際のピルビン酸の発酵的代謝にはCODH経路のみが働いていると考察される(Fig. 19)。ピルビン酸はacetyl-CoAを経由し酢酸に酸化されるが、そのときに放出される還元力はCODH経路に導入され、この経路が通常酢酸酸化の反応の逆方向に進むことによる二酸化炭素からの酢酸生成に用いられると考察される。この反応により4 molの



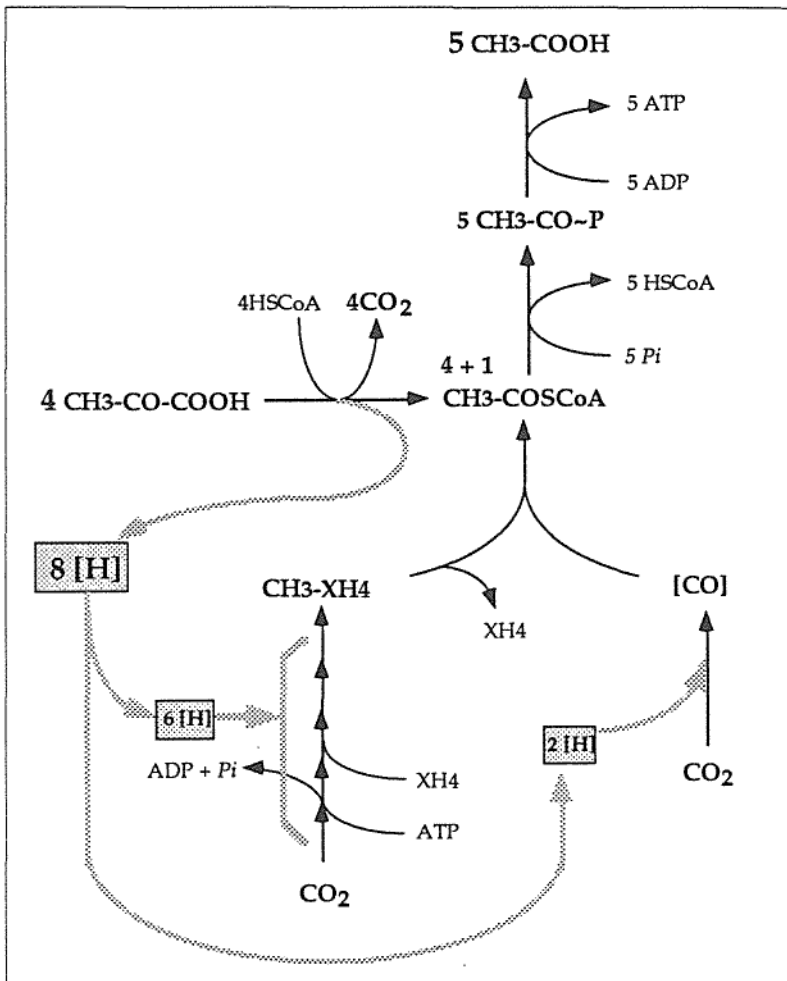


Fig. 19. Proposed pathway of pyruvate conversion by *D. thermobenzoicum* TSB. 4 Mol pyruvate are oxidized to 4 mol acetate, releasing 8[H]. 8[H] is utilized for acetate formation from CO₂ via CODH pathway.

ピルビン酸から5 molの酢酸が生成されることになる。

一方Marburg株は、methylmalonyl-CoA経路とCODH経路どちらの経路も持っていない。この株のピルビン酸の代謝は、ピルビン酸を酢酸に酸化する際の還元力をhydrogenaseの働きにより水素分子として系外に放出していると考えられる。また一部の還元力はピルビン酸からの乳酸への還元に使われていると予測された(Fig. 20)。

このように硫酸還元を伴わない発酵的代謝においては、それぞれの硫酸還元菌が持つ特異的な経路を生かした、代謝が行われていることが明らかになった。

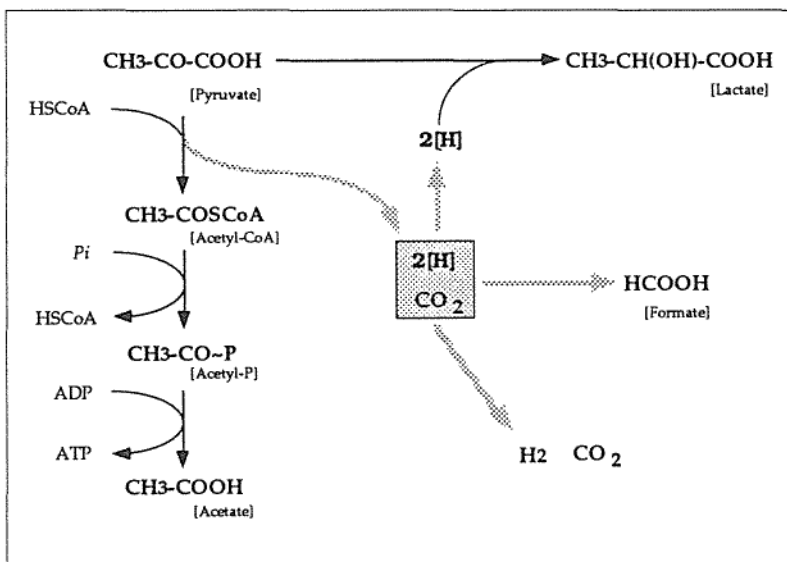


Fig. 20. Proposed pathway of pyruvate conversion by *D. vulgaris* Marburg. Pyruvate is fermented to acetate and H₂/CO₂ as main products, and to formate and lactate as minor products.

第四節 要約

Desulfobulbus propionicus MUD, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* TSBおよび*Desulfovibrio vulgaris* Marburgを用いて各代謝経路による発酵的代謝特性の違いを検討し、次のことが明らかになった。

1. 比較した3種の硫酸還元菌はピルビン酸を異なる代謝様式で発酵代謝する。すなわち、
2. MUD株はMethylmalonyl-CoA経路を利用して酢酸とプロピオン酸に変換する。
3. TSB株はMethylmalonyl-CoA経路とCODH経路の両者を持っているが、ピルビン酸の発酵的代謝にはCODH経路が働いていると考えられる。
4. 酢酸酸化経路の一つであるCODH経路が、全章で述べたメトキシ安息香酸類のみならず昔から発酵的基質として知られていたピルビン酸の代謝にも関与していることをはじめて明らかにした。
5. Marburg株はhydrogenase系を利用し、生成する還元力を水素ガスとして系外へ放出し反応を進めている。
6. methylmalonyl-CoA経路やCODH経路という特異的な代謝経路だけでなく、硫酸還元菌はその細菌がもつ各々の独特な性質を活かし、硫酸イオンなどの電子受容体のない条件でも生育していることが示唆された。

第五章 総括および結論

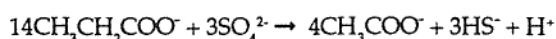
硫酸還元菌はこの十数年の間に新しい種が次々に報告され、現在では13属あまりの硫酸還元菌が知られている。かつては*Desulfovibrio*属、*Desulfotomaculum*属など数種の硫酸還元菌が知られていたのみで、しかも硫酸還元菌の基質利用性は非常に狭いとされてきた。また硫化水素を生成するために、嫌気処理等においてはメタン生成の阻害を引き起こすとの報告もあり、処理にとっては不都合な細菌群として扱われることが多かった。しかし近年、多くの種類の化合物の低分子化に硫酸還元菌が関与することが明らかにされつつあり、硫酸還元菌が持つ多様な代謝形式に対する興味も拡がりつつある。

硫酸還元菌の物質分解能の多様性が明らかになるにつれて、物質代謝様式に関しても新しい知見が発見され、その解析が行われてきた。完全酸化型の硫酸還元菌が持つcitrate回路やCODH経路、またプロピオン酸分解経路であるmethylmalonyl-CoA経路などが最も良い例である。一方硫酸還元菌は、硫酸イオンのような電子受容体の非存在下でピルビン酸のようなある特定基質を発酵的に代謝し、生育することが知られていた。しかし、発酵代謝様式についてはほとんど詳しい研究はなされておらず、しかも近年見出されたmethylmalonyl-CoA経路やCODH経路のような硫酸還元菌に特徴的な代謝系が発酵代謝にどのように関与しているかについてはほとんど知られていなかった。そこで本研究では、こういった代謝経路が関与する硫酸還元菌の発酵的代謝について、単離菌株および既知の菌株を用いて詳細に検討した。

第一章では硫酸還元菌の研究の歴史と基本的な性質を述べ、それを踏まえて研究の目的を明らかにした。

第二章ではmethylmalonyl-CoA経路およびCODH経路を有する硫酸還元菌の単離と各硫酸還元菌の諸性質について明らかにした。

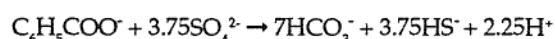
まずmethylmalonyl-CoA経路を有する硫酸還元菌を得ることを目的に、プロピオン酸酸化硫酸還元菌である*Desulfobulbus propionicus* MUDの単離と諸性質について検討を行った。中温性UASBリアクターのグラニュールを単離源とした集積培養系から単離されたMUD株は、1.0-1.3 x 2.0-2.2 μ mの楕円もしくはレモン形の孢子非形成、グラム陰性の硫酸還元菌であった。諸性質およびプロピオン酸酸化能からMUD株は*Desulfobulbus propionicus*に属するの硫酸還元菌と同定された。MUD株は37 $^{\circ}$ Cに至適温度を持ち、基質をプロピオン酸、電子受容体を硫酸イオンとしたときの比増殖速度(μ)は0.05h $^{-1}$ であり、プロピオン酸の酸化は次式に一致した。



さらに栄養要求性等を検討した結果、MUD株は*D. propionicus*の新しいタイプの株であることが判明した。

またMUD株は他の*D. propionicus*に比べ、水道水を用いた非常に簡素化された培地ででも良好な生育が得られ、嫌気リアクターへの応用が可能な菌株との結論を得た。

次の節ではCODH経路を有する完全酸化型の硫酸還元菌の単離を行いその諸性質を明らかにした。高温固定床式バイオリアクターの汚泥を分離源とした集積培養系から単離されたTSB株は、高温域で有機酸、安息香酸さらにはメトキシ安息香酸類などを酸化する硫酸還元菌であった。TSB株はグラム陽性で孢子形成能を有す硫酸還元菌であることより*Desulfotomaculum*属の硫酸還元菌と同定された。また本菌株は安息香酸での生育では紡錘形を呈し、酪酸での生育では桿菌状となり、培養条件で形態を変えることが明らかになった。TSB株の至適温度および至適pHは62℃、7.2で、硫酸イオンを電子受容体とした場合、安息香酸の酸化は次式の反応と一致した。



さらにTSB株は完全酸化型の硫酸還元菌ではあるが酪酸の酸化に際しては完全酸化は行わず、また一般の不完全酸化とも一致しない特異な代謝を行うことを明らかにした。

高温域で安息香酸を利用する嫌気性細菌の報告はこれが初めてであり、得られた結果をもとに既知の硫酸還元菌との比較検討を行い、新種の硫酸還元菌*Desulfotomaculum thermobenzoicum*と命名した。本種名はすでに有効な発表として認められている。

第三章では単離したそれぞれの硫酸還元菌が持つ特異的代謝経路、methylmalonyl-CoA経路およびCODH経路を利用した発酵的代謝について検討した。

まず*Desulfobulbus propionicus*の持つmethylmalonyl-CoA経路によるアルコール類およびアルデヒド類からのプロピオン酸の生成を検討した。これに先立ち発酵的に生育した細胞内の酵素活性を測定したところ、methylmalonyl-CoA経路のkey enzymeであるmethylmalonyl-CoA:pyruvate transcarboxylaseの活性が確認され、本経路の存在が示唆された。

この菌体を用いて発酵的代謝試験を行ったところ、エタノールは二酸化炭素の存在下で酢酸とプロピオン酸に変換され、プロパノールは酢酸と二酸化炭素の存在下でプロピオン酸に量論的に変換されることを明らかにした。さらに各中間物質と考えられるアセトアルデヒドとプロピオンアルデヒドもそれぞれ量論的に変換された。注目すべき点としてはアルデヒドの変換の第一段階は対応する有機酸とアルコールへの不均化反応で、この不均化反応が終了しなければ生成したアルコールからのプロピオン酸への反応は起こらないという点である。このプロピオン酸生成反応を代謝量論式などから検討した結果、methylmalonyl-CoA経路がこの発酵的代謝に関与していると結論づけた。つまりプロピオン酸酸化経路であるmethylmalonyl-CoA経路は、

硫酸呼吸時の代謝のみでなく、発酵的生育時にはプロピオン酸生成経路として働いているとの結論を得た。

つづいて *Desulfotomaculum thermobenzoicum* TSB を用いて CODH 経路が関与する発酵的代謝について検討を行った。CODH 経路を利用した発酵的代謝に関する研究はこれまでに詳しい報告がなかった。その結果 3,4,5-trimethoxybenzoate ではまず 4 位のメトキシ基がヒドロキシ基に変換されシリング酸となり、3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoate を経由して没食子酸 (3,4,5-trihydroxybenzoate) へ変換されていることがわかった。また 2 位のメトキシ基は変換されなかった。メトキシ基からの酢酸生成は、*Acetobacterium woodii* のそれと量論上では一致していた。しかしメタノールの利用性、細胞内の carbonmonoxide dehydrogenase の活性などから考察して、*A. woodii* の代謝様式とは異なり、メタノールを経由せずに CODH 経路により代謝されているものと推定された。つまりメトキシ基からのメチル基を受けたメチルキャリアが CODH 経路に入り、一部が二酸化炭素に酸化される際に還元力が生成され、この還元力によりメチル基と二酸化炭素から酢酸が生成されていると考察された。CODH 経路によるこのような発酵代謝は、今まで知られていた古典的な不均化反応による発酵的代謝とは大きく異なっており、硫酸還元菌が持つ硫酸呼吸を伴わない新たな代謝様式が示唆されたといえる。

以上のように各々の硫酸還元菌が持つ特異的な代謝経路による発酵的代謝を明らかにしたが、第四章ではそれぞれ異なった代謝経路による同一基質（ピルビン酸）の発酵的代謝の差異を比較した。なお、この際古くから知られている硫酸還元菌として *Desulfovibrio vulgaris* も同時に取り上げ比較した。これら 3 株の硫酸還元菌は硫酸イオンの存在下ではピルビン酸を酢酸と二酸化炭素に変換するとともに硫化水素を生成する。

しかしながら硫酸イオンのない条件下ではピルビン酸はそれぞれ異なる代謝経路によって代謝されることがわかった。発酵的に生育した菌体の酵素活性の測定結果から、*D. propionicus* MUD と *D. thermobenzoicum* TSB には methylmalonyl-CoA 経路が存在し、さらに TSB 株には CODH 経路も存在していることが明らかになった。また *D. vulgaris* Marburg の細胞中には両経路に関係する酵素活性はまったく認められなかったが、高い hydrogenase 活性が検出された。

D. propionicus MUD は methylmalonyl-CoA 経路を利用して 3mol のピルビン酸から 2mol 酢酸と 1mol プロピオン酸に変換していると考察された。これに対し、TSB 株はピルビン酸がほとんどすべて酢酸に変換されていることより、Methylmalonyl-CoA 経路よりもむしろ CODH 経路が優先的に働いていることが示唆された。つまり、TSB 株は 4mol のピルビン酸を acetyl-CoA を経由して酢酸に変換し、その際放出される還元力を CODH 経路により二酸化炭素からの酢酸の生成に利用し、最終的に 5mol の酢酸を生成するものと考察された。一方 *D. vulgaris* Marburg はピルビン酸を酢酸に酸化する際の還元力を hydrogenase の働きにより水素分子にして系外に放出して反応を進めているものと推定された。

以上一連の研究から、硫酸還元菌は呼吸系を持たない他の嫌気性細菌と同様に、基質によっては硫酸呼吸を行わずに発酵的に利用してエネルギーを獲得し、生育できることが明らかになった。発酵的生育には古くから知られていた単純な不均化反応のみならず、本来なら硫酸還元反応に共役して進む基質酸化経路を逆方向に進行させることによって利用、代謝していることが明らかになった。さらに、ピルビン酸のような硫酸還元菌にとって最も代表的な発酵基質に対して、硫酸還元菌は各々が有する代謝経路を有利に利用し、各々異なった代謝様式によって発酵することも明らかにされた。硫酸還元菌が硫酸呼吸を伴わずに、特異的な代謝経路を利用して生育できるという知見は、自然界や嫌気リアクター内の硫酸還元菌の挙動を考える上で有意義かつ重要な情報をもたらすものと考えられる。

参考文献

- 1) Isa, Z., Grusenmeyer, S., and Verstraete, W : Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 572-579 (1986).
- 2) 田崎雅晴、鎌形洋一、中村和憲：硫酸還元菌による酢酸、プロピオン酸の代謝と嫌気処理における役割。醗酵工学会誌, **70**, 29-39 (1992).
- 3) Widdel, F.: Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur- reducing bacteria. *In* Biology of anaerobic microorganisms, (Zehnder, A.J.B.) chap.10, pp469-586, John Wiley & Sons, New York, London (1987).
- 4) Postgate, J.R. : Growth of sulphate-reducing bacteria in sulphate-free media. *Research*, **5**, 189-190 (1952).
- 5) Baker, F.D., Papiska, H.R. and Campbell, L.L.: Choline fermentation by *Desulfovibrio desulfurivans*. *J. Bacteriol.*, **84**, 973-978 (1962).
- 6) Miller, J.D.A. and Wakerley, D.S.: Growth of sulphate-reducing bacteria by fumarate dismutation. *J. Gen. Microbiol.* , **43**, 101-107 (1966).
- 7) Miller, J.D.A. and Neumann, P.M.: Malate dismutation by *Desulfovibrio*. *Arch. Mikrobiol.*, **71**, 214-219 (1970).
- 8) Laanbroek, H. J., Abee, T., and Voogd, I. L. : Alcohol conversion by *Desulfohalobus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. *Arch. Microbiol.*, **133**, 178-184 (1982).
- 9) Widdel, F. and Pfennig, N.: A new anaerobic, sporing, acetate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum*(emend.) *acetoxidans*. *Arch. Microbiol.*, **112**, 119-122 (1977).
- 10) Widdel, F. and Bak, F.: Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. *In* Prokaryotes, (Balows, A. et al) chap. 183, pp3352-3378 (1977).
- 11) 石本 真：硫酸呼吸. *In* 嫌気性呼吸と硫黄代謝 (石本真教授業績集) , chap. 1, pp. 1-45, 北大石本真教授定年退官記念会 (1988).
- 12) Thauer, R.K., Jungermann, k. and Decker, K.: Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **41**, 100-180 (1977).
- 13) Stams, A. J., Kremer, D. R., Nicolay, K., Weenk, G. H., and Hansen, T. A.: Pathway of propionate formation in *Desulfohalobus propionicus*. *Arch. Microbiol.*, **139**, 167-173 (1984)
- 14) Kremer, D. R. and Hansen, T. A.: Pathway of propionate degradation in *Desulfohalobus propionicus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **49**, 273-277 (1988).
- 15) Brandis-Heep, A., Gebhardt, N. A., Thauer, R. K., Widdel, F., and Pfennig, N.: Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfobacter postgatei* 1. Demonstration of all enzymes required for the operation of the citric acid cycle. *Arch. Microbiol.*, **136**, 222-229 (1983).
- 16) Gebhardt, N. A., Linder, D., and Thauer, R. K.: Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfobacter postgatei* 2. Evidence from ¹⁴C-labelling studies for the operation of the citric acid cycle. *Arch. Microbiol.*, **136**, 230-233 (1983).
- 17) Möller, D., Schauder, R., Fushs, G., and Thauer, R. K.: Acetate oxidation to CO₂ via a citric acid cycle involving an ATP-citrate lyase : a mechanism from the synthesis of ATP via substrate level phosphorylation in *Desulfobacter postgatei* growing on acetate and sulfate. *Arch. Microbiol.*, **148**, 202-207 (1987).
- 18) Spormann, A. M. and Thauer, R. K.: Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfotomaculum acetoxidans* : Demonstration of enzymes required for the operation of an oxidative acetyl-CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway. *Arch. Microbiol.*, **150**, 374-380 (1988).
- 19) Spormann, A. M. and Thauer, R. K.: Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfotomaculum acetoxidans* :

- Isotopic exchange between CO₂ and the carbonyl group of acetyl-CoA and topology of enzymes involved. *Arch. Microbiol.*, **152**, 189-195 (1989).
- 20) 依田元之、北川幹夫、宮地有正：嫌気性生物膜における酢酸資化性硫酸塩還元菌とメタン生成菌の競合に関する動力学的考察。下水道協会誌、**25**, 42-52 (1988)
 - 21) Boone, D. R. and Bryant, M. P.: Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 626-632 (1980).
 - 22) Widdel, F. and Pfennig, N.: Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids, I. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.*, **129**, 395-400 (1981).
 - 23) Tamaoka, J. and Komagata, K. : Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**, 125-128 (1984).
 - 24) Postgate, J. R. : "The sulfate-reducing bacteria" , Cambridge University Press (1979).
 - 25) Seki, Y. Nagai, Y., and Ishimoto, M. : Characterization of a dissimilatory-type sulfate reductase, desulfovirodin, from *Desulfovibrio africanus* Benghazi. *J. Biochem.*, **98**, 1535-1543 (1985).
 - 26) Widdel, F. and Pfennig, N. : Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids, II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.*, **131**, 360-365 (1982).
 - 27) Samain, E., Dubourguier, H. C., and Albagnac, G.: Isolation and characterization of *Desulfobulbus elongatus* sp. nov. from mesophilic digester. *System. Appl. Microbiol.*, **5**, 391-401 (1984).
 - 28) Kobayashi, T., Hashinaga, T., Mikami, E., and Suzuki, T. : Methanogenic degradation of phenol and benzoate in acclimated sludges. *Wat. Sci. Tech.*, **21**, 55-65 (1989).
 - 29) Zhang, X., Morgan, T. U., and Wiegel, J. : Conversion of ¹³C-1 phenol to ¹³C-4 benzoate, an intermediate step in the anaerobic degradation of chlorophenols. *FEMS Microbiol. Lett.*, **67**, 63-66 (1990).
 - 30) Mountfort, D. O., Brulla, W. J., Krumholz, L. R., and Bryant, M. P. : *Syntrophus buswellii* gen. nov., sp. nov. : a benzoate catabolizer from methanogenic ecosystems. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 216-217 (1984).
 - 31) Szewzyk, U. and Schink, B. : Degradation of hydroquinone, gentisate, and benzoate by a fermenting bacterium in pure or defined mixed culture. *Arch. Microbiol.*, **151**, 541-545 (1989).
 - 32) Schauder, R., Eikmanns, B., Thauer, R. K., Widdel, F., and Fuchs, G. : Acetate oxidation to CO₂ in anaerobic bacteria via a novel pathway not involving reactions of the citric acid cycle. *Arch. Microbiol.*, **145**, 162-172 (1986).
 - 33) Tschsch, A. and Schink, B. : Fermentative degradation of monohydroxybenzoates by defined syntrophic cocultures. *Arch. Microbiol.*, **145**, 396-402 (1986).
 - 34) Shelton, R. D. and Tiedje, M. J. : Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic sulfate-reducing *Desulfobacterium catecholicum* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 840-848 (1984).
 - 35) Widdel, F., Kohring, G., and Mayer, F.: Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids, III. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. nov., sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, **134**, 286-294 (1983).
 - 36) Bak, F. and Widdel, F.: Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, **146**, 177-180 (1986).
 - 37) Szewzyk, R. and Pfennig, N.: Complete oxidation of catechol by strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfobacterium catecholicum* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, **147**, 163-168 (1987).

- 38) Schnell, S., Bak, F., and Pfennig, N.: Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzoates by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfotomaculum anilini*. *Arch. Microbiol.*, 152, 556-563 (1989).
- 39) Widdel, F. and Pfennig, N.: Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (Krieg, N.R. and Holt, J.G.) vol. 1, pp. 663-679, Williams & Wilkins, Baltimore, London (1984).
- 40) Cord-Ruwisch, R. and Garcia, J. L.: Isolation and characterization of an anaerobic benzoate-degradation spore-forming sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum sapomandens* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.*, 29, 325-330 (1985).
- 41) DeWeerd, K. A., Mandelco, L., Tanner, R. S., Woese, C. R., and Suflita, J. M.: *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.*, 154, 23-30 (1990).
- 42) Daumas, S., Cord-Ruwisch, R., and Garcia, J. L. : *Desulfotomaculum geothermicum* sp. nov., a thermophilic, fatty acid-degrading, sulfate-reducing bacterium isolated with H₂ from geothermal ground water. *Antonie van Leeuwenhoek*, 54, 165-178 (1988).
- 43) Min, H. and Zinder, S. H.: Isolation and characterization of a thermophilic sulfate-reducing bacterium *Desulfotomaculum thermoacetoxidans* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, 153, 399-404 (1990).
- 44) Werkman, C. H. and Weaver, H. J. : Studies in the bacteriology of sulphur stinker spoilage of canned sweet corn. *Iowa Stste. Coll. J. Sci.*, 2, 57-67 (1927).
- 45) Länge, S., Scholtz, R., and Fuchs, G.: Oxidative and reductive acyl CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway in *Desulfobacterium autotrophicum* 1. Characterization and metabolic function of the cellular tetrahydropterin. *Arch. Microbiol.*, 151, 77-83 (1989).
- 46) Schauder, R., Preuß, A., Jetten, M., and Fuchs, G.: Oxidative and reductive acyl CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway in *Desulfobacterium autotrophicum* 1. Demonstration of the enzymes of the pathway and comparison of CO dehydrogenase. *Arch. Microbiol.*, 151, 84-89 (1989).
- 47) Fischer, R. and Thauer, R. K. : Methanogenesis from acetate in cell extracts of *Methanosarcina barkeri* : Isotope exchange between CO₂ and the carbonyl group of acetyl-CoA, and the role of H₂. *Arch. Microbiol.*, 153, 156-162 (1990).
- 48) Zinkhan, D. M., Borner, G., and Thauer, R. K. :Function of methanofuran, tetrahydromethanopterin, and coenzyme F₄₂₀ in *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch. Microbiol.*, 152, 362-368 (1989).
- 49) Kamagata, Y., Kitagawa, N., Tasaki, M., Nakamura, K., and Mikami, E. : Degradation of benzoate by an anaerobic consortium and some properties of a hydrogenotrophic methanogen and sulfate-reducing bacterium in the consortium. *J. Ferment. Bioeng.*, 73, 213-218 (1992).
- 50) Krumholz, L. R. and Bryant, M. P. : *Syntrophococcus sucromutans* sp. nov., gen. nov. uses carbohydrates as electron donors and formate, methoxymonobenzenoids or *Methanobrevibacter* as electron acceptor system. *Arch. Microbiol.*, 143, 313-318 (1986).
- 51) Bache, R. and Pfennig, N. : Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.*, 130, 255-261 (1981).
- 52) Kaiser, J.-P. and Hanselmann, K. W. : Fermentative Metabolism of substituted monoaromatic compounds by a bacterial community from anaerobic sediments. *Arch. Microbiol.*, 133, 185-194 (1982).
- 53) Pankhania, I. P., Spormann, A. M., Hamilton, W. A., and Thauer R. F: Lactate conversion to acetate, CO₂ and H₂ in cell suspensions of *Desulfotomaculum vulgare* (Marburg): indication for the involvement of an energy driven reaction. *Arch. Microbiol.*, 150, 26-31 (1988).

謝辞

本研究をまとめるにあたり、御懇篤なご指導御鞭撻を賜りました島根大学農学部生物資源科学科教授森忠洋博士に厚く御礼申し上げます。

さらに研究をまとめるにあたり親身な教示、助言を頂きました、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所微生物機能部（旧微生物工業技術研究所応用生物部）部長三上栄一博士に深く感謝の意を表します。

研究の全般にわたって実験、検討など多大な御助力、御教示を賜りました、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所微生物機能部（旧微生物工業技術研究所応用生物部）複合微生物研究室室長中村和憲博士ならびに鎌形洋一博士に心からお礼申し上げます。また同研究室田中一裕博士には実験手法などの御教授頂きましたことを謹んで感謝いたします。

清水建設株式会社技術研究所常務取締役研究所長太田利彦博士、同所先端技術研究部部長南清司博士ならびに同部バイオグループリーダー岡村和夫博士にはこのような研究の機会を与えて頂いたことに深く感謝いたします。また、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所微生物機能部（旧微生物工業技術研究所応用生物部）複合微生物研究室の皆様、清水建設株式会社技術研究所先端技術研究部バイオグループの皆様には、本研究を行うにあたりご協力頂きまして誠に有難うございました。本研究は各氏のご協力なしには完成し得なかったものと、ここに深く感謝いたします。

本論文の基礎となる学術論文

1. タイトル Isolation of a propionate-using, sulfate-reducing bacterium.
著者 Masaharu Tasaki, Yoichi Kamagata, Kazunori Nakamura and Eiichi Mikami.
雑誌名 Microbiology and Biochemistry of Strict Anaerobes involved in Interspecies hydrogen Transfer (ed. by J-P. Belaich et al.), Plenum Press, New York, 477-479 (1990).
2. タイトル Isolation and characterization of a thermophilic benzoate-degrading, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* sp. nov.
著者 Masaharu Tasaki, Yoichi Kamagata, Kazunori Nakamura and Eiichi Mikami .
雑誌名 Arch. Microbiol., 155, 348-352 (1991).
3. タイトル Utilization of methoxylated benzoates and formation of intermediates by *Desulfotomaculum thermobenzoicum* in the presence or absence of sulfate.
著者 Masaharu Tasaki, Yoichi Kamagata, Kazunori Nakamura and Eiichi Mikami.
雑誌名 Arch. Microbiol., 157, 209-212 (1992) .
4. タイトル Propionate formation from alcohols or aldehydes by *Desulfobulbus propionicus* in the absence of sulfate.
著者 Masaharu Tasaki, Yoichi Kamagata, Kazunori Nakamura and Eiichi Mikami.
雑誌名 J. Ferment. Bioeng., 73, 329-331 (1992).
5. タイトル Acetogenesis from pyruvate by *Desulfotomaculum thermobenzoicum* and differences in pyruvate metabolisms among three sulfate-reducing bacteria in the absence of sulfate.
著者 Masaharu Tasaki, Yoichi Kamagata, Kazunori Nakamura, Kazuo Okamura and Kiyoshi Minami.
雑誌名 FEMS Microbiol. Lett. 106, 259-264 (1993)

参考論文

1. タイトル 硫酸還元菌による酢酸、プロピオン酸の代謝と嫌気処理における役割
著者 田崎雅晴、鎌形洋一、中村和憲
雑誌名 醗酵工学会誌. 70, 29-39 (1992)
2. タイトル Degradation of benzoate by an anaerobic consortium and some properties of a hydrogenotrophic methanogen and sulfate-reducing bacterium in the consortium.
著者 Yoichi Kamagata, Nobuhisa Kitagawa, Masaharu Tasaki, Kazunori Nakamura and Eiichi Mikami.
雑誌名 J. Ferment. Bioeng., 73, 213-218 (1992).
3. タイトル Anaerobic bacteria degrading low molecular chlorinated fatty acids and related compounds.
著者 Kazunori Nakamura, Yoichi Kamagata, Kazuhiro Tanaka, Kaoru Matsuda, Masaharu Tasaki and Eiichi Mikami.
雑誌名 Wat. Sci. Tech., 23, 1211-1218 (1991).
4. タイトル Screening growth inhibitors of sulfate-reducing bacteria and their effects on methane fermentation.
著者 Yuichi Tanimoto, Masaharu Tasaki, Kazuo Okamura, Makoto Yamaguchi and Kiyoshi Minami.
雑誌名 J. Ferment. Bioeng., 68, 353-359 (1989).
5. タイトル Influence of sulfate on methane fermentation in a defined medium.
著者 Kiyoshi Minami, Yuichi Tanimoto, Masaharu Tasaki, Shigemiti Ogawa and Kazuo Okamura,
雑誌名 Wat. Sci. Tech., 20, 451-453 (1988).
6. タイトル Influence of pH on methane fermentation and sulfide production from methanol.
著者 Kiyoshi Minami, Yuichi Tanimoto, Masaharu Tasaki, Shigemiti Ogawa and Kazuo Okamura,
雑誌名 J. Ferment. Bioeng., 66, 117-121 (1988).