

氏 名 (本籍) あさ だ よし ひろ  
浅 田 芳 宏

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 175 号

学位授与年月日 昭和 53 年 12 月 14 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 細菌に於ける 6-プリンチオールによる  
アミノ酸発酵転換に関する研究

論文審査委員 (主査)

教授 高橋 甫 教授 志村 憲助

教授 古坂 澄石

# 論文内容要旨

## 〔I〕 緒 言

細菌によるグルタミン酸発酵が1957年に見い出されて以来、数多くの所謂アミノ酸発酵が確立した。特定のアミノ酸の生産は微生物の糖代謝系、アミノ酸生成系とその関連代謝系の制御が何んらかの機構に依ってはずれる結果、アミノ酸生成系が強化され、系の稼働が強力に進行する。これに対し、アミノ酸非生産菌は前述の代謝系の制御が十分に働いているものと理解される。

近年、アデニル酸を初めとする核酸系物質は解糖系等多くの代謝系を制御する重要な作用を有することが明らかになった。そこで、アミノ酸生成系の強化機構に核酸系物質とその代謝が何んらかの関連性を持つかどうか興味ある問題である。本研究は前述の観点からアミノ酸生産菌を用いてプリン、ピリミジンアナログのアミノ酸生産に対する作用を検討した。

アミノ酸生産菌として、バリン、イソロイシン生産菌を次の理由で用いた。(1)バリン、イソロイシン生成経路とその代謝制御機構が比較的良く研究されている。(2)アミノ酸生産が培養条件に支配され易い特徴がある。

他方、アミノ酸生成系と核酸系物質の関連性を求める方法として核酸系物質の代謝拮抗体であるプリン、ピリミジンアナログを用いた。

## 〔II〕 6-プリンチオールによるグルタミン酸-バリン発酵転換

供試菌6株中、Aerobacter aerogenes No 19-35のみ高濃度アナログ存在下で生育した。本株はリン酸低濃度培地(PD-培地)でグルタミン酸のみ生産するが、同培地に6-プリンチオールを添加する場合(MP-培地)、グルタミン酸生産は完全に阻止され、代って、バリンのみを生産する。6-プリンチオールによる所謂グルタミン酸-バリン発酵転換を見出した(図-1)。更にA. aerogenes No 19-35を親株とするイソロイシン要求株A. aerogenes I-12は培地中にイソロイシン十分量を存在する時、親株と同様の発酵転換を行う。しかし、イソロイシンを制限するとPD-培地でグルタミン酸とバリンを生産し発酵転換を起さない。この培地に6-プリンチオールを添加するとバリンのみ生産し発酵転換は完結する。これらの現象は明らかに核酸系物質がアミノ酸生成系の調節に密接に関与していることを示す新しい知見である。尚、発酵転換は6-プリンチオール(6-メルカプトプリン、6-メチルメルカプトプリン、6-チオグアニン)に特異的であった。以下、主として6-メルカプトプリン(6-MP)を用いて転換機作を検討した。

### 〔Ⅲ〕 6-MP 耐性機構とその代謝

供試菌は、6-MP存在下、リン酸低濃度培地で硫化水素の生成を伴い生育するが、リン酸濃度が増大するにつれ生育阻害が出現し、ついに完全に阻害する(図-2)。6-MP存在、又は非存在下で生育した細胞は、リン酸濃度に拘らず、IMP・GMP、ピロホスホリラーゼの作用で6-MPとPRPPから6-MPRPを形成する。しかし、PRPP合成がリン酸濃度に依存するため、リン酸低濃度時にはPRPPの供給が緩慢となり、6-MPRP合成も抑制される。同時にこの条件下で6-MPRP脱硫酵素が6-MPで誘導され、6-MPRPはIMPに変換する(図-3)。この6-MPRPの正常プリンヌクレオチドへの変換(解毒)が耐性機構である。

他方、リン酸高濃度の場合、十分なPRPPの供給によって6-MPRPが多量に生成され、しかも6-MPRP脱硫酵素が合成されない為、解毒機構は働かない。そして6-MPRPが核配合成系を阻害する結果生育阻害が起こるものと推定される。

特に6-MPRP脱硫酵素の誘導を新たに見出したが、本酵素によって生成する硫化水素並びにプリンヌクレオチドは発酵転換の要因にならない。それ故、常時細胞内に低濃度に存在すると思われる6-MPRPが発酵転換機作に関与するものと推定した。

### 〔Ⅳ〕 酸化的糖分解とTCA回路の6-MPによる抑制

動物細胞で得られている結果と異なり、供試菌のグルコース資化を6-MPは阻害せず、むしろ若干促進した。

一方、6-MPはグルコース-6-リン酸脱水素酵素の合成を著しく抑制し、HMS経路の稼動を弱め、グルコースの同経路への流入を阻止する。他方、ホスホフラクトキナーゼの合成を促進し、EMP経路の動きを強化している(表-1)。従って、MP-細胞はEMP経路を主とするより嫌氣的糖分解を行うもので、この結果はグルコース酸化能の結果PD-細胞を嫌氣的に培養するとバリン発酵を行うことから一層支持される。

PD-細胞のTCA回路の諸酵素はMP-細胞の酵素に比べ高いレベルを保っていて、TCA回路が活発に働いている。この活発な稼動で生成するケトグルタル酸は、弱いケトグルタル酸脱水素酵素の為に以降の反応が緩慢になり、蓄積してグルタミン酸生成へと導かれる。

これに対し、MP-細胞のTCA回路の酵素は全般的に抑制されていて、ケトグルタル酸の生成も抑制されている(表-1)。

両細胞に於いて、ケトグルタル酸への窒素導入に関与するグルタミン酸脱水素酵素やグルタミ

ン酸-オギザロ酢酸トランスアミナーゼのレベルに差異が認められないことから、6-MPによるグルタミン酸生成阻害機構はHMS経路の抑制によるNADPH供給制限とTCA回路の阻害に依ると思われる。

6-MPによるグルタミン酸-バリン発酵転換は前述の酵素の成績及び細胞の他の生理的性質から、「呼吸型細胞」から「発酵型細胞」への転換であると認識される。

## [V] バリン生合成系の強化機構

(A) 6-MPによるALS<sup>Y</sup>(pH 6.0)のCatabolite抑制の解除

ピルビン酸からバリンが合成される系の律速酵素はアセト乳酸合成酵素(ALS)である。

A. aerogenes No 19-35でグルタミン酸を生産するPD細胞のALSは至適pHを8.0に有し、ILV<sup>\*</sup>によるフィードバック阻害に感受性酵素である[ALS<sup>A</sup>(pH 8.0)]。本酵素は他のバリン非生産菌の酵素と同じ性質で、PD細胞が必要以上のバリンを生成しないように調節されている。

これに対し、バリンを生産するMP細胞は至適pH 6.0のILVに非感受性の酵素[ALS<sup>Y</sup>(pH 6.0)]を有している(図-4)。ALS<sup>Y</sup>(pH 6.0)はPD細胞でCatabolite抑制を受けているが、6-MPはこの抑制を解除する(図-5)。更にcAMPの添加又は嫌氣的培養でこの抑制は解除される。従って、6-MPはcAMPの合成を調節することでALS<sup>Y</sup>(pH 6.0)のCatabolite抑制を解除するものと思われる。

MP細胞では6-MPによるALS<sup>Y</sup>(pH 6.0)のCatabolite抑制解除でバリン生成系が強化され、TCA回路への流入を阻止されたピルビン酸がバリン生成系へと導かれると推定した。

(B) イソロイシン制限によるALS<sup>Y</sup>(pH 8.0)の終末産物抑制の解除

A. aerogenes I-12のイソロイシン十分量添加時に於けるバリン生成系強化機構は親株と全く同じで、ALS<sup>Y</sup>(pH 6.0)のCatabolite抑制解除である(図-6)。これに対し、イソロイシンを制限した場合、その強化機構はイソロイシン制限でALS<sup>A</sup>(pH 8.0)のイソ酵素であるALS<sup>Y</sup>(pH 8.0)合成の終末産物抑制からの解除である(図-6)。

このALS<sup>Y</sup>(pH 8.0)の出現でバリン生成系はフィードバック調節から解放される。ALS<sup>Y</sup>(pH 8.0)の終末産物抑制の解除はイソロイシンに特異的であった。

イソロイシン制限下での6-MPの作用はグルタミン酸生成系の阻害のみで、ALS<sup>Y</sup>(pH 8.0)の制御には全く影響を与えない。

他方、ALSの三種のイソ酵素、ALS<sup>A</sup>(pH 8.0)、ALS<sup>Y</sup>(pH 8.0)、ALS<sup>Y</sup>(pH 6.0)が同一

※、イソロイシン、ロイシン、バリン、

株に存在し、それぞれ異なった制御を受けることを初めて明らかにした。又本酵素の補酵素である FAD が酵素活性促進作用以外に新たに ALS<sup>r</sup> ( pH 8.0 ) の安定化を行う機能を見出した。

## [VI] 総 括

A. aerogenes No 19-35 並びに A. aerogenes I-12 における 6-プリンチオールによる グルタミン酸-バリン 発酵転換は アミノ酸生成系の強化機構に核酸系物質とその代謝が関わりを持つことを示すものである。

6-MP の作用は HMS 経路を抑制し、NADPH の供給を制限すると同時に TCA 回路を阻害する。その結果、グルタミン酸生成は阻止される。

一方、6-MP は EMP 経路を強化し、ALS<sup>r</sup> ( pH 6.0 ) の Catabolite 抑制を解除して、バリン生成系を強化する。この二つの機構が 6-MP に依って同時に起る場合、発酵転換は完結することが明らかになった。

本研究に於いて、6-MP の耐性機構を始めとして、多くの代謝系に及ぼす 6-MP の作用が明らかになったが、特に ALS<sup>r</sup> ( pH 6.0 ) の Catabolite 抑制を 6-MP、cAMP が解除する作用は、高濃度炭素源存在下に生育する細胞に於いても、アミノ酸非生産菌同様、酵素蛋白合成が cAMP による制御を受けることを示した点で重要な意義があると考えられる。

6-MP による発酵転換を "呼吸型細胞" から "発酵型細胞" への転換ととらえたが、エネルギー生成と他の代謝調節の関係を示した、例えば、ホスホフラクトキナーゼ活性の ATP、ADP、AMP による調節、"Adenylate control" は供試菌の主要な酵素の活性調節に全く見い出せず、発酵転換は酵素合成の制御を伴って起ることが明らかになった。

従って、高濃度 C・N 源存在下でのエネルギー生成と物質生産調節の関係については今後更に検討される必要がある。

供試菌のバリン生産系強化機構として、ALS<sup>r</sup> ( pH 6.0 ) と ALS<sup>r</sup> ( pH 8.0 ) の合成抑制の解除機構が明らかになった。特に変異株 A. aerogenes I-12 で ALS<sup>r</sup> ( pH 8.0 ) の終末産物抑制解除機構はアミノ酸非生産菌の E. coli のバリン耐性機構の研究結果と一致した。この結果はバリン生産菌がバリン耐性であることから当然視されるが、しかし、ALS<sup>r</sup> ( pH 8.0 ) の存在が即ちバリン生産に結びつかないことから、アミノ酸発酵の代謝制御を考える上でアミノ酸生成系と糖代謝系を始めとする他の系との一連の関わりを重視する必要性が指摘される。

ALSの合成の調節因子としてスレオニン脱アミノ酵素, tRNA等が働く「自動制御モデル」が提唱されているが、供試菌はスレオニン脱アミノ酵素を欠損している変異株故、このモデルを容易に当てはめることは出来ない。

更に補酵素FADの新しい機能あるいは三種のイソ酵素の存在等を明らかにしたが、生理的意義等についても詳細に将来研究されることが期待される。

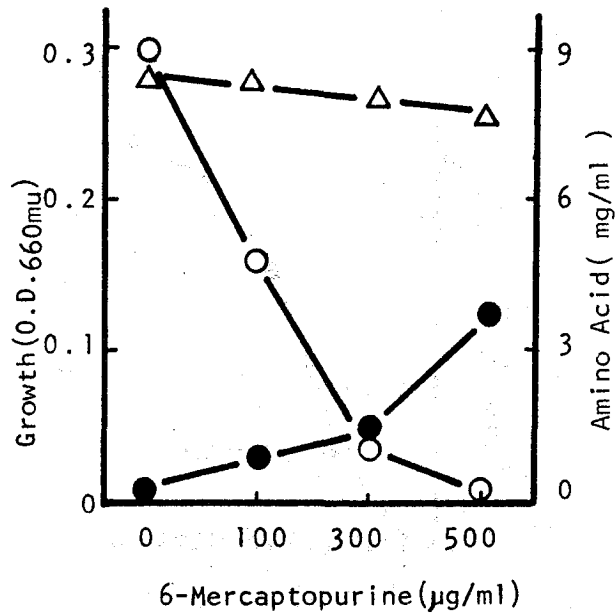


Fig.1 Effect of 6-Mercaptopurine on Growth and Amino Acid Accumulation with Aerobacter Aerogenes No.19-35

△:Growth, ○:Glutamic Acid, ●:Valine.  
 A.aerogenes No.19-35 was grown on phosphate deficient medium (PD-medium) with or without 6-MP for 48 hrs.

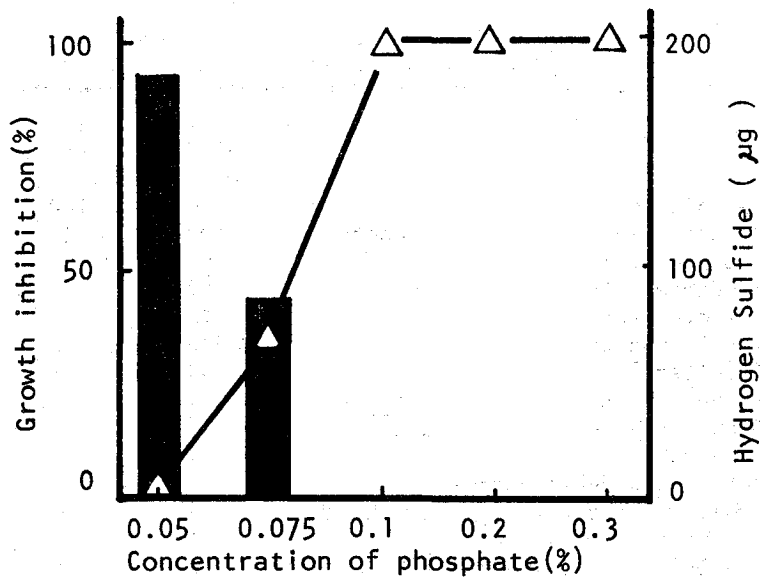


Fig.2 Effect of Phosphate Concentration on Growth and Production of Hydrogen Sulfide with A.aerogenes No.19-35.

△:Growth, ■: Hydrogen Sulfide.

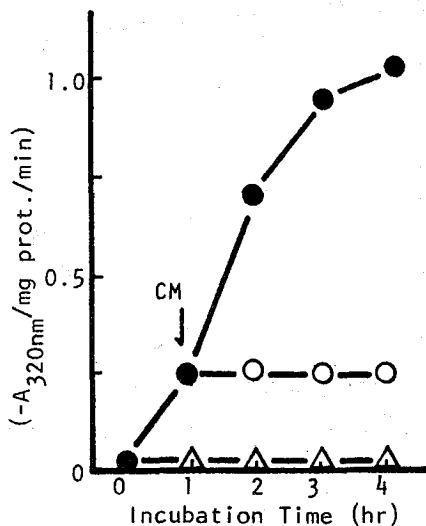


Fig.3 Induction of 6-Mercaptopurine Nucleotide-Hydrogen Sulfide Lyase by 6-Mercaptopurine  
 ●:With 6-MP( 500µg/ml ), ○:with 6-MP and chloramphenicol( 100µg/ml ), △:without 6-MP(Control)

Table 1 Specific activities of various enzymes in Glu.-producing cells and Val.-producing cells

Enzyme	Specific activity* ( unit/ mg protein)	
	Glu.-cell	Val.-cell
Hexokinase	150	160
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	100	20
Phosphofructokinase	90	195
Fructose-1.6-diphosphatase	40	85
Citrate synthetase.	20	7
Isocitrate dehydrogenase	600	240
Aconitase <sup>1)</sup>	33	33
Ketoglutaric acid dehydrogenase	0.9	0.4
Succinic acid dehydrogenase <sup>2)</sup>	3	1
Fumarase <sup>3)</sup>	10	3
Malic acid dehydrogenase	14	8
Phosphoenol pyruvate carboxylase <sup>4)</sup>	8	6
Pyruvate carboxylase <sup>4)</sup>	0.5	1.3
Glutamic acid dehydrogenase	8	8
Glutamic acid-Oxalacetic acid trans-aminase	120	80

\*One Unit: 0.001 A<sub>340</sub> nm/ min, 2) One Unit: A<sub>490nm</sub>/min.  
 1) One Unit: 0.001 A<sub>240nm</sub>/min 3) One Unit: A<sub>285nm</sub>/min.  
 4) One Unit: 1 c.p.m/min.



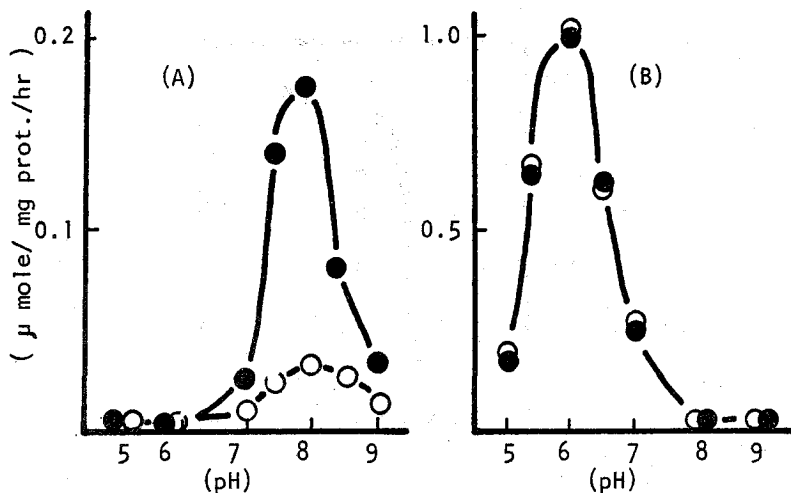


Fig.4 Optimum pH and Valine sensitivity of Acetolactate Synthetase in Different Cells.  
 (A) Glutamic acid producing cell, (B) Valine producing cell.  
 ○: without valine, ●: with valine ( $1 \times 10^{-3}$  M)

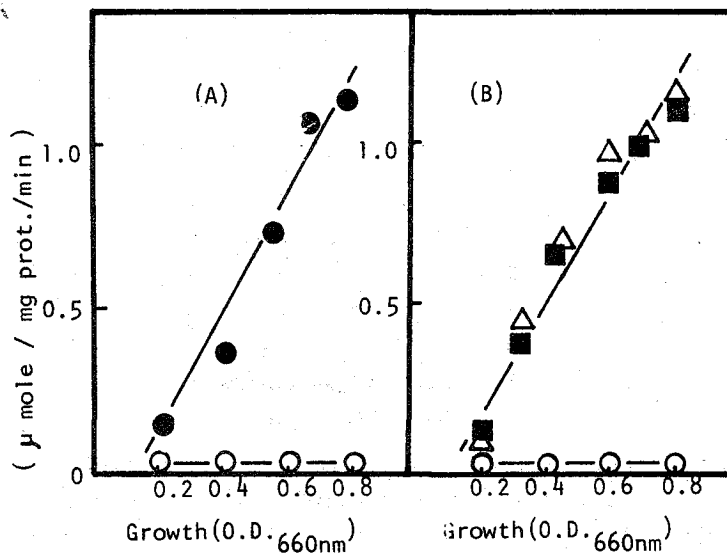


Fig.5 Catabolite repression of Acetolactate synthetase and Release of Catabolite repression in *A.aerogenes* No.19-35.

(A) Catabolite repression of acetolactate synthetase: cells were grown on PD-medium containing glucose as carbon source (○) and containing glycerol as carbon source (●).  
 (B) Release of catabolite repression by 6-MP and cAMP; cells were grown on PD-medium containing glucose as carbon source (○), Plus 6-MP (500 ug/ml) (■), or cAMP (3 mM) (△).

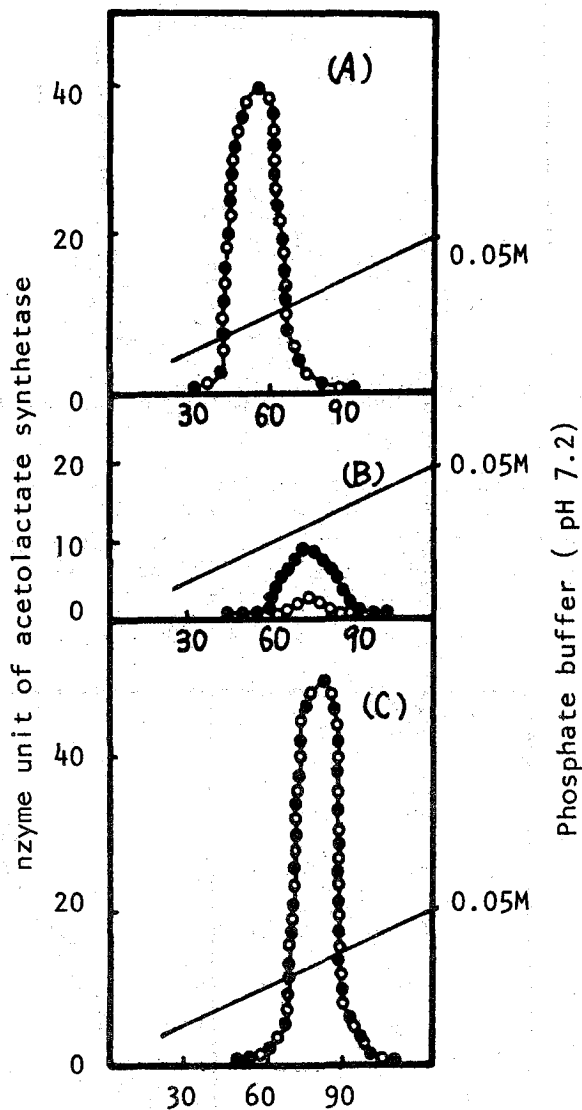


Fig.6 Hydroxyapatite Column Chromatography of isozyme of acetohydroxy acid synthetase (A) Insensitive pH 6.0 enzyme, (B) Sensitive pH 8.0 enzyme, (C) Insensitive pH 8.0. Enzymatic activity was assayed with ( O ) and without ( ● ) valine.

(本研究に関する報告Ba 著書)

- (1) 浅田茅宏, 藤井義昭, 植村定治郎 L-グルタミン酸-L-バリン発酵転換にかんして  
*Amino acids*, 7, 43~50, 1963.
- (2) Y.Asada, K.Yamaguchi, T.Uemura, Studies on the conversion of amino acid fermentation in *A.aerogenes* No.19-35: Effect of purine and pyrimidine analogues on the growth and accumulation of amino acid, *Agr. Biol. Chem.*, 33, 496-501, 1969.
- (3) Y.Asada, K.Yamaguchi, T.Uemura, Studies on the conversion of amino acid fermentation in *A.aerogenes* No.19-35: Effect of 6-mercaptapurine on the formation of acetolactatynthetase, *J.Biochem.*, (Tokyo), 69, 633-639, 1971.
- (4) Y.Asada, K.Yamaguchi, Studies on the conversion of amino acid fermentation in *A.aerogenes* No.19-35: Repression of acetolactate synthetase by glucose, *Agr. Biol. Chem.*, 39, 1371-1377, 1975.
- (5) 浅田茅宏, 奥沢洋平, 山口和夫, *A. aerogenes* のイソロイシン要求株におけるバリン生成制御にかんして, *Amino acid and Nucleic acid*, 31, 59~66, 1975
- (6) Y.Asada, Y.Okuzawa, K.Yamaguchi, The existence of three types of acetohydroxy acid synthetase in an isoleucine-requiring mutant of *A. aerogenes*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 429, 1029-1035, 1976.
- (7) 浅田茅宏, 高村義親, 植村定治郎, L-グルタミン酸-L-バリン発酵転換の要因にかんして, 東京大学応用微生物研究所シンポジウム 第8集, "微生物の酵素", p104-110, 1967.
- (8) 植村定治郎, 高村義親, 浅田茅宏, 杉崎善治郎, "バリン発酵", p189~215, 柳夜郎他編, アミノ酸発酵 (1972) 下巻, 共立出版.
- (9) T.Uemura, Y.Asada, Effect of 6-mercaptapurine on the conversion of glutamic acid to valine as accumulation product in *A.aerogenes*, 7 th. Intern. Congr. Biochem., (Tokyo), G-2-10, 1967.

## 審査結果の要旨

グルタミン酸の発酵生産が開発されたのは1957年のことであるが、それ以来多くのアミノ酸の発酵生産が可能となった。これらの微生物では、いわゆる代謝制御の働きが不十分であるため、通常は蓄積されることのないアミノ酸が多量に蓄積されるものと考えられる。近年アデニル酸をはじめとする核酸系物質が多くの代謝系に対し調節的作用を有することが明かになった。本論文はアミノ酸生成系の強化機構に核酸系物質が関連性をもちうることを、核酸系物質の代謝拮抗体を用いて明かにしたものである。

著者はまず *Aerobacter aerogenes* の一株が低リン酸濃度培地ではグルタミン酸のみを生成するが、培地に6-プリンチオールを添加すると、グルタミン酸の生産は完全に阻止され、代りにバリンが蓄積することを明かにした。すなわち6-プリンチオールによるグルタミン酸-バリンの発酵転換の発見である。次に著者は6-プリンチオールの一つ、6-メルカプトプリン(6-MP)を用いて、本菌株が何故6-MPに対し耐性を示めすかを検討した。本菌は培地のリン酸濃度が低い時に6-MPに対し耐性を示すが、この理由は6-MPが6-MPリボシルリン酸(RP)に変換され、さらに脱硫によりイノシン酸が生成し、正常な核酸合成系に入るためである。培地のリン酸濃度が高い時には6-MP RPの脱硫酵素が合成されず、そのため上述の解毒機構が作用しない。発酵転換に関与する有効な物質は6-MPRPであると推定した。

次いで著者はグルタミン酸生成型細胞と、6-MPを供与してバリン生成型となった細胞の糖分解およびTCA回路の諸酵素の活性を調べた。グルタミン酸生成型細胞では糖分解についてはHMS経路の比重が大きく、 $\alpha$ -ケトグルタル酸までのTCA回路も活発で、経路全体がグルタミン酸の生成の方向にかたよっているが、バリン生成型の細胞では糖分解についてはEMP経路の作動が大きく、またTCA回路の活性も低く、むしろバリン生合成の前駆体であるピルビン酸生成の方向に経路がかたよっていることを明かにした。すなわち、6-MPによるグルタミン酸-バリン発酵転換は呼吸型細胞から発酵型細胞への転換である。

最後に著者はバリン生成細胞において何故バリン生合成系が強化されているかを律速酵素アセト乳酸合成酵素(ALS)活性の面から検討した。グルタミン酸生成細胞はイソロイシン・ロイシン・バリン(ILV)によりフィードバック阻害を受ける至適pH 8.0のALSを含み、細胞が必要とする以上のバリンを合成しない様に調節を受けている。バリン生成細胞では至適pH 6.0のILVに対し非感受性のALSを含み、ピルビン酸がバリンへと導かれやすくなっている。このILV非感受性ALSは正常な条件ではカタボライト抑制を受けているが、6-MPにより抑制が解除されることが発酵転換の重要な一原因であることを明かにした。

以上のように本論文はいくつかの新知見を含み、応用微生物学に貢献するところが大きい。よって三論文審査員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。