OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Saccharomyces uvarumにおけるトリプトファン代謝に関する研究
Author(s)	新, 眞理子
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3058291
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

Saccharomyces uvarum における トリプトファン代謝に関する研究

新　　眞理子

Saccharomyces uvarum における トリプトファン代謝に関する研究

新　　眞理子

目次

緒論 …… 1

本論 …… 4

第一章　酵母におけるトリプトファン代謝フラックスの全体像 …… 4

第一節　トリプトファン代謝フラックスの定量法と基礎的検討 …… 4

第二節　酵母におけるトリプトファン代謝フラックス …… 9

第三節　主代謝経路と代謝物の同定 …… 15

第四節　考察および小括 …… 23

第二章　酵母におけるトリプトファン－ナイアシン系の代謝フラックス …… 27

第一節　前駆体とナイアシン合成能 …… 27

第二節　キヌレニン代謝フラックス …… 30

第三節　トリプトファン代謝関連酵素の諸性質 …… 36

第四節　考察および小括 …… 38

第三章　酵母におけるトリプトファン－ナイアシン系の調節に関する検討 …… 41

第一節　長期培養によるナイアシン生合成能の変動 …… 41

第二節　外来性ヘミンのトリプトファン－ナイアシン系に及ぼす影響 …… 44

第三節　トリプトファンのインドール環開裂活性の存在とその性質 …… 50

第四節　考察および小括 …… 59

第四章　ロイシンによるペラグラ惹起説のモデルとしての酵母トリプトファン－ナイアシン系利用の試み …… 62

第一節　ロイシンのナイアシン生合成に及ぼす影響 …… 62

第二節　酵母およびラット肝 L-キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼ活性に対するロイシン関連物質の影響 …… 69

第三節　考察および小括 …… 74

第五章　総括および結論 …… 77

謝辞 …… 82

引用文献 …… 83

緒論

トリプトファン代謝を概観すると、化学的にはインドール核、ベンゼン核、ピリジン核、キナルジン核などを有する多彩な誘導体に転換される。他方、生物学的に見ても酸化還元の補酵素であるNAD(P)、神経ホルモンとしてのセロトニンやメラトニン等の主要物質にとどまらず、植物では成長ホルモンとして知られるオーキシン、ヨヒンビン等のアルカロイド群、さらに昆虫では眼色素のキサントマチンなど多彩な生理活性物質に転換され、このように多岐にわたる代謝は他に例を見ない。一方、糖や脂質と同様、完全燃焼を受けてエネルギー源としても利用される。

ところで、酵母に於けるトリプトファン代謝に関する報告は少なくないが、個々の報告は極めて断片的であり、そのほとんどが、蓄積された代謝物あるいは代謝酵素に関する報告である。そこで、著者は既報のトリプトファン代謝フラックス定量法[1]の酵母への適用を検討し、その有効性を確認すると共に、酵母に於けるトリプトファン代謝の全体像を明らかにした。(第一章)

トリプトファンのナイアシンへの代謝は、補酵素としてのNAD(P)の重要性を反映している。NADはsalvage経路によりナイアシンから合成されるばかりではなく、好気的に増殖した酵母では動物の肝と同様トリプトファンからもde novo合成される[2]。酵母は無酸素状態では、異なるde novo合成経路でNADを合成する能力を有している[3]。このような興味ある対象であるにもかかわらず、酵母に於けるNAD合成の詳細ならびにその調節に関しては動物の肝における程明らかにされていないのが現状である。著者は酵母におけるトリプトファン代謝全体に占めるナイアシン合成フラックスの割合を明らかにし、さらにナイアシン生合成経路の調節部位についても検討を加え、調節の一端を明らかにした。(第二章、第三章)

ところで、ヒトにおけるナイアシン欠乏症としてペラグラが古くから知られている。主食とするjowarやトウモロコシの高ロイシン含量が原因である可能性が指摘され[4]、数々の動物実験が行われてきた。しかしながら動物は種々の臓器から成り、吸収、排泄、代謝の臓器分担など複雑な因子を考慮せねばならず、原因の解析が困難である。そこで単純化したモデル系として酵母を用い、トリプトファン－ナイアシン系に及ぼすロイシンの影響について比較生化学的な観点から検討を加えた。(第四章)

なお、本論では特に述べない限り酵母としてSaccharomyces uvarum(carlsbergensis)を用いた。

なお、本文中に使用した略号は、次に示すとおりである。

AA : anthranilic acid
Ala : alanine
Asp : aspartic acid
Cyt.ox. : cytochrome c oxidase
DTT : dithiothreitol
EtOH : ethanol
FAD : flavine adenine dinucleotide
GAP : general amino acid permease
^{1}H-NMR : proton nuclear magnetic resonance
HPLC : high-performance liquid chromatography
IAA : indole 3-acetic acid
IAAld : indole 3-acetoaldehyde
IAld : indole aldehyde
IAN : indole acetonitrile
IDO : indoleamine 2,3-dioxygenase
ILA : indole lactic acid
Ile : isoleucine
IPA : indole pyruvic acid
KA : kynurenic acid
α-KG : α-ketoglutaric acid
KIC : α-ketoisocaproic acid
KN : kynurenine
KNase : kynureninase

KNOHase : L-kynurenine 3-hydroxylase

KTase : kynurenine transaminase

LDH : L-lactate ferricyanide reductase

Leu : leucine

MDH : malate dehydrogenase

Met : methionine

Mt : mitochondria

NA : niacin

NAD : nicotinamide adenine dinucleotide

NADP : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADPH : reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

OHAA : 3-hydroxy anthranilic acid

OHKN : 3-hydroxy kynurenine

Phe : phenylalanine

PLP : pyridoxal 5-phosphate

PPC : paper partition chromatography

pTDO : peptidyl tryptophan 2,3-dioxygenase

Pyr : pyruvic acid

QA : quinolinic acid

QnA : quinaldinic acid

SOD : superoxide dismutase

TCA : trichloroacetic acid

TCE : tryptophan cleavaging activity

TDO : tryptophan 2,3 dioxygenase

TLC : thin layer chromatography

TOH : tryptophol

Trp : tryptophan

TTase : tryptophan transaminase

XA : xanthurenic acid

本論

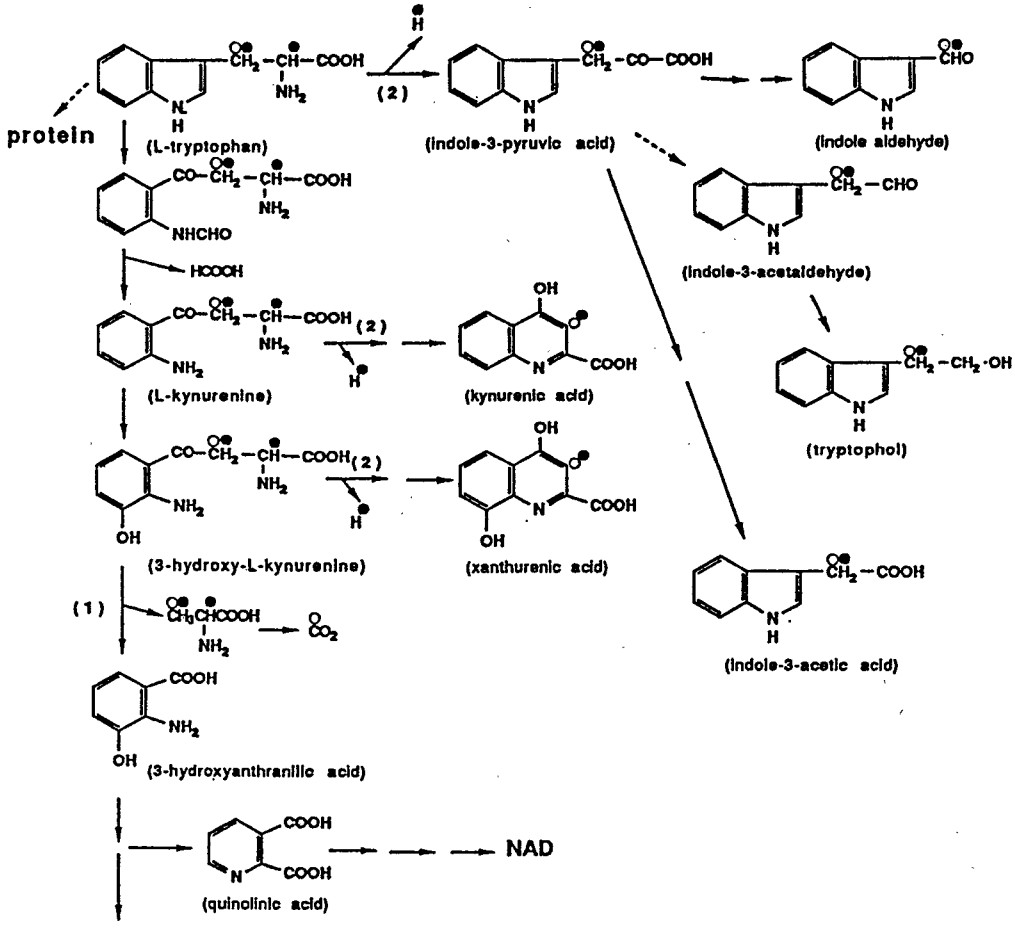
第一章　酵母におけるトリプトファン代謝フラックスの全体像

酵母において、トリプトファン(Trp)はインドールピルビン酸(IPA)を経てトリプトホール(TOH)へ代謝されると仮定されてきた[5, 6]。比較的最近になって、Saccharomyces cerevisiaeにおけるTrpの主代謝物はTOHであると報告された[7]。一方、アントラニル酸(AA)[8]あるいは3-ヒドロキシアントラニル酸(OHAA)[9, 10]へ代謝されるとの報告もあり、好気的に培養した酵母では、Trpからナイアシン(NA)を合成する事も明らかにされた[2]。このように数々の報告があるにもかかわらず、各代謝フラックスがどの程度 Trp 代謝に寄与しているかと言った定量的な研究はほとんど無い。Smithらは、ラット単離肝細胞におけるTrp代謝の全体像を新規な分析法を用いて解析し、種々の栄養条件における代謝変動を検討した[1]。この方法は芳香族アミノ酸の特異性をうまく利用し、簡便で全体的な流れを捕らえるのに有効と考えられる。そこで著者は酵母における Trp代謝フラックスの解析にSmithらの方法の適用を検討し、代謝物とフラックス両面から本法の有効性を確認すると共に主代謝物の同定ならびに代謝経路の検討を行なった。

第一節　トリプトファン代謝フラックスの定量法と基礎的検討

1．トリプトファン代謝フラックス定量法の理論的背景

Trp代謝フラックスの定量法としてSmithらの方法を検討した。すなわち種々のラベル位置の異なる放射性Trpを用いて、代謝によって生じた遊離の$^{14}CO_2$量および活性炭に吸着しない非芳香族化合物(^{14}C-alanine、^{14}C-HCOOH等)を捕捉することにより各経路を流れる代謝量を測定する方法である。本研究では放射性TrpとしてL-[methylene ^{14}C]tryptophanならびにL-[side chain 2,3-^{3}H]tryptophanを用いた。Scheme 1 に酵母におけるTrpの主代謝経路の推定図を示している。



Scheme. 1. Metabolic fate of radioisotope from specifically radiolabelled L-tryptophan

Outline of L-tryptophan metabolism expected in the yeast is shown. Radioisotope nomenclature: ○, L-[methylene -^{14}C]tryptophan; ● L-[side chain-2,3-^{3}H]tryptophan. The metabolic fates:(1),alanine liberation(kynureninase flux); (2),2-H liberation (transaminase flux).

L-[methylene^{14}C]Trpからの非芳香族性[^{14}C]はkynureninase経路を介してのみ遊離される。遊離した[^{14}C]alanine(Ala)の一部はさらに代謝され$^{14}CO_2$を生成する。それ故、kynureninaseを通るTrp代謝フラックスは、$^{14}CO_2$と[^{14}C]Alaの総和として示され次式を用いて求められる。

($^{14}CO_2$ dpm ｜^{14}C 活性炭非吸着dpm)÷([^{14}C] Trp比放射能)

一方、L-[side chain 2,3-^{3}H]Trpからの非芳香族性放射性物質の遊離は、以下に示す幾つかの反応段階で起こると考えられる。(1).kynureninaseあるいは3-hydroxy kynureninaseの作用による[2,3-^{3}H]Alaの遊離　(2).transaminaseによるTrp、キヌレニン(KN)および3-ヒドロキシキヌレニン(OHKN)からの2-^{3}H遊離が考えられる。それ故、この放射性Trpから遊離した放射性物質の総量はkynureninase[9]フラックスおよびKN-あるいはOHKN-transaminase(EC2.6.1.7)[11]およびtryptophan transaminase(EC2.6.1.27)[7]を介して代謝された総計を表していると考えられる。そこで、transaminaseフラックスは^{3}H原子の1/3が遊離することを考え合わせ次式を用いて求められる。

(活性炭非吸着^{3}Hdpm - 生成Ala × [^{3}H]Trp比放射能)÷([^{3}H]Trp比放射能/3)

2.　トリプトファン代謝フラックス定量の基礎的検討

本法は芳香族化合物の活性炭吸着性、言い換えれば非芳香族化合物の活性炭非吸着性を利用したものである。原法と比較すると培地組成ならびに基質濃度等の相違があり定量性の問題が残る。そこでフラックス実験と同様の条件下における主なTrp代謝物の活性炭吸着性を検討した。

さらに、定量において最も考慮しなければならない点は、細胞内外の基質濃度と比放射能の希釈の問題である。そこで、本実験で使用するS培地で培養した酵母におけるTrpの細胞内濃度ならびに細胞内への取り込み（第二章）を検討した。

また、原法が適用されたラット単離肝細胞に比べ、酵母ではタンパク画分への取り込みが高い寄与率を占めることが想定される。とすれば、一旦遊離した非芳香族化合物がタンパク画分へ再取り込みされることも考えられ、フラックスが過小評価される危険性もある。そこで、放射性Trpでパルスラベルした細胞から抽出した酸不溶性画分における放射性物質の確認を行った。

①　トリプトファン代謝物の活性炭吸着性の検討

実験方法

S培地（第二節）2mlに種々のTrp代謝物0.4ml（培養時0.5mM相当量、対照群には蒸留水添加)さらに過塩素酸（終濃度、0.55N)を加えた混合物を二分し、一方の1.3mlには活性炭（Norit A:ナカライテスク，50mg/ml)、他方には対照として蒸留水を0.4ml添加し、よく混和後30分間氷冷放置。遠心分離（13,000xg,3min)後、上清の紫外部吸収スペクトルを調べ極大吸収波長における吸光度の変動から主なTrp代謝物の活性炭吸着性を検討した。また、Alaおよびギ酸の場合には、L-(1-^{14}C)alanineならびに^{14}C formic acid sodium saltを用いて同様に活性炭処理し、上清に残存する放射能より吸着性を検討した。

実験結果

Trpをはじめとしてほとんどの芳香族化合物(キヌレニン、3-ヒドロキシキヌレニン、3-ヒドロキシアントラニル酸、キヌレン酸、キサンツレン酸、キノリン酸、ナイアシンおよび NAD)が97%以上の高率で活性炭に吸着された。AAの吸着性が90%程度と少し低かったが、第二章における代謝物の検討より本実験ではほとんど生成せず問題のないことが分かった。一方、脂肪族のAlaおよびギ酸は吸着せず、98~94%が上清に回収された。以上の結果から、酸によるタンパク除去後の上清を直接活性炭処理し、定量的に酵母におけるTrp代謝フラックスを求めることが可能なことが明らかとなった。

② 酵母におけるトリプトファンの細胞内濃度の測定

実験方法

酵母をS培地で30℃、24時間培養後集菌し（37.2mg乾燥重量）生理食塩水で２回洗浄後、30mlの60%エタノール(EtOH)あるいは5%TCAで氷中30分間抽出した。抽出液を濃縮後、少量の蒸留水に溶解し、Denckla and Deweyの方法[12]あるいは high-performance liquid chromatography(HPLC)法で細胞内Trp量を定量した。

HPLC：Fine pack SIL C_{18-5}(4.6x250mm,日本分光）、5%メタノール、254nm

また、S培地で前培養した菌体をミリポアフィルターで洗浄し新たに0.5mMTrpを含む

培地で培養し、経時的に培養液と培養上清のTrp量を求めその差から細胞内Trp量(nmol/mg dry cells)を求め時間経過による細胞内プールの変動を調べた。

実験結果

酵母細胞からのTrpの抽出は、60%エタノールの方が75%TCAよりも有効であった。さらに両定量法とも0.1nmol程度まで定量可能であり、測定結果は良く一致した。細胞内濃度は0.32~0.33nmol/mg dry cellsであり約80μMと考えられる。また、細胞内プールの変動を調べると30分で100倍に拡大し代謝は比較的遅く数時間で元のレベルへ復帰した。この事実は細胞内へ取り込まれた放射性Trpの比放射能の希釈をほとんど考慮せずに代謝を考察することができることを示している。

③ タンパクのアルカリ加水分解物中の放射性アミノ酸の同定

実験方法

0.05mM L-[methylene^{14}C]tryptophanを添加し、30℃、2時間インキュベートしてパルスラベルした酵母細胞（約1mg dry wt.）から調製した酸不溶性タンパク画分は、可溶性澱粉10mgと共に、N_2ガス置換下に4N-$Ba(OH)_2$ 0.5mlでアルカリ加水分解（110℃、23時間）した。硫酸でpH調整濃縮後一部を標準のアミノ酸と共に paper chromatography(PPC)で分析した。展開後の濾紙を1cm毎に切断し、放射能を測定した。

PPC：東洋濾紙No.51A、上昇法、展開溶媒：methanol-water-pyridine(20:5:1)、
n-butanol-acetone-water(12:3:5)

実験結果

アルカリ加水分解によるカウント回収率は105~109%と良好であった。さらに2種のPPCを比べてみると、72~84%のカウントがTrp画分で回収され、Ala画分の分布は4.6~4.8%と非常に低かった。標準のTrpおよびAlaのアルカリ加水分解処理後の回収率

(85%、95%)から判断して、大部分のカウントはTrpとして存在することが明らかとなった。以上の事実は、L-[methylene^{14}C]tryptophanからkynureninaseの作用によって遊離した^{14}C-Alaの二次的なタンパクへの取り込みは、ほとんど考慮する必要のないことを示唆している。

第二節　酵母におけるトリプトファン代謝フラックス

前節ではSmithの方法を適用して酵母におけるTrp代謝の全体像が解析出来る可能性を示した。本節ではTrp代謝フラックスの全体像、添加するTrp濃度によるフラックスの変動、さらに培地、増殖時期による変動を検討した。

実験方法

1). 使用菌株：　Saccharomyces uvarum(carlsbergensis)ATCC 9080（ただし、一部はSaccharomyces cerevisiae(ATCC 7752)を使用)を以下のすべての実験において使用した。

Table 1. Composition of basal media

S medium		YPG medium	
Glucose	20 g	Glucose	10 g
KH_2PO_4	3 g	Yeast extract	3.5 g
$(NH_4)_2SO_4$	3 g	Peptone	3.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25 g	KH_2PO_4	2.0 g
$CaCl_2 \cdot 7H_2O$	0.25 g	$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
Inositol	10 mg	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0 g
Ca pantothenate	1 mg		per liter
Thiamine·HCl	1 mg		
Pyridoxine·HCl	1 mg		
Biotin	2.2 μg		
	per liter		

2). 酵母菌体調製: 大部分の実験では、菌体はTable 1. に示すS培地[13]で培養した。一部の実験では、YPG培地を使用した。酵母は、250mlの培地を含む1Lマイヤ-で30℃で好気的（110 oscillations/min)に前培養した。対数増殖中期の菌体を集菌し、新鮮な培地で洗浄後再懸濁（2.5mg/mg dry wt.cells)して本実験に供した。

3). $^{14}CO_2$捕集： 細胞懸濁液250μlを試験管（1.6x10.4cm)に分注し、O_2でガス化後、centre well付きrubber stopperでキャップする。マイクロシリンジで放射性Trp(L-[methylene^{14}C]TrpあるいはL-[side chain 2,3-^{3}H]Trp: あらかじめHPLCで精製)溶液50μlを添加した後すばやくrubber stopperでキャップをしなおし30℃、110 oscillations/minで反応を開始する。2.2N-$HClO_4$ 0.1mlの注入により反応停止後、25%phenylethylamine(methanol) 0.2mlあるいは3N-KOH 0.3mlをcentre well（濾紙を含む)に添加した。両溶液ともstopperを通して添加した。試験管はさらに75 oscillations/min、30min室温でインキュベートすることにより、$^{14}CO_2$を完全に捕集した。centre wellから、濾紙とメタノール洗液500μlを回収し、ACSII 10mlを含む液シン用バイアルに移し、放射能を測定した。

4). 活性炭非吸着物質の定量： 酸処理した反応液を遠心分離した上清の一部を定量に供した。酸抽出液200μlに60μlの活性炭懸濁液（Norit A 50mg/ml)を添加してよく混和後、30min氷冷した。遠心分離（13,000xg、3min)後、上清180μに、ACSIIを加えて放射能を計測した。

5). タンパク画分へのTrpの取り込み： Mans and Novelliのfilter disk法[14]の変法を用いた。すなわち、20~40μlの酸処理懸濁液をglass fiber filter(アドバンテック東洋、GC50,φ24mm)で濾過後、0.5mlの0.5N-$HClO_4$およびEtOHで洗浄した。洗浄濾紙はSoluene350(Packard) 0.5ml、N-HCl 0.2mlおよびACSII 10mlを含む液シン用バイアルに入れ、放射能を計測した。

6). 残存Trpの定量： 反応液の酸抽出物中の残存Trp量の定量は、Denckla and Deweyの方法[12]を用いた。

7). 代謝フラックスのTrp濃度依存性： 細胞懸濁液250μl(0.62mg dry cells) 中の内在性Trp量は、0.25nmolとして加算し、各Trp濃度で希釈された比放射能を用いた。

8). YPG培地における代謝フラックス： 細胞内のTrpプールはS培地の場合と比較し

てかなり高く（44 nmol/2.3 mg dry cells/250μl cell suspension)、この値を考慮してTrpの比放射能を計算した。

9). 増殖時期と代謝フラックスの定量： 酵母菌体は30℃、YPG培地で培養し、適当な時期にサンプリングし、培養液250μlは50μlの放射性Trpと共にO_2置換下に1時間インキュベートし前述と同様にフラックスを求めた。

実験結果

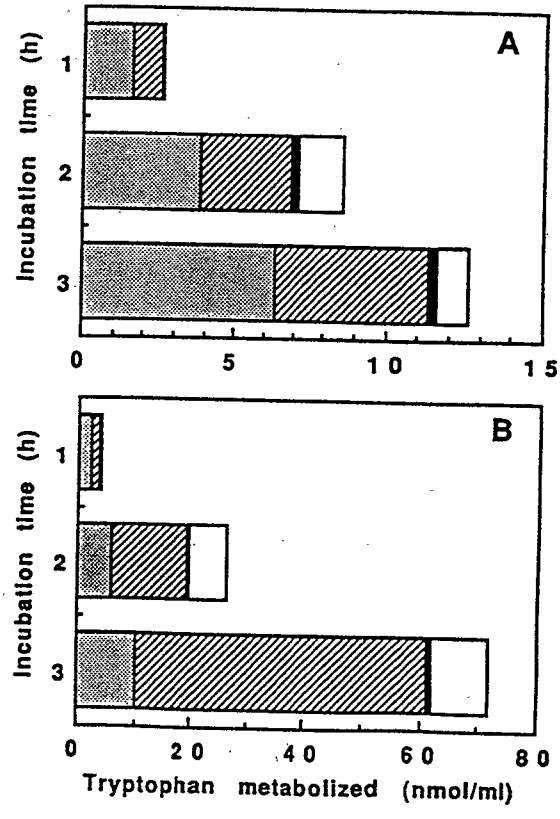


Fig. 1. Time course of the main fluxes of L-tryptophan metabolism.

Yeasts were cultivated in S medium with 0.05 mM (A) or 0.5 mM (B) radiolabelled tryptophan in a test tube containing 300 μl of broth. ⊡ ,acid insoluble fraction; ■ ,alanine liberation ; ▨ ,2-H liberation; □ ,unidentified.

1．トリプトファン代謝フラックス概観

S培地で培養した酵母における全体的なTrp代謝フラックスをFig. 1. に示している。0.05mMTrp添加時(A)の代謝フラックスは、タンパク合成への流れが中心であり、代謝量の40-50%を占めることが明らかとなった。ほぼ同じ割合（40%）で2-H遊離反応が認められ、これらのフラックスは時間経過と共に有意に増加した。Ala遊離で示されるkynureninaseフラックスは非常に低く2~4%であった。一方、0.5mM添加時(B)には、2-H遊離反応は代謝全体の75%を占め、0.05mM添加時に比べて約10倍量に増加した。kynureninase フラックスならびにタンパク合成への流れの増加も幾分認められたが、増加の程度は少なかった。以上の事実は、酵母に於けるTrp代謝フラックスの中心はタンパク合成であり、kynureninaseフラックスおよび完全酸化の割合は極めて小さい事を意味する。また多量に添加したTrpは、ほとんどが2-H遊離反応へと流れることが判明した。この反応はkynureninaseフラックスに比べKm値が高く、さらに時間的な比例関係に乏しいことから基質による誘導の可能性が考えられた。

2． 主代謝フラックスのトリプトファン濃度依存性

主なTrp代謝である2-H遊離反応ならびにkynureninase フラックスは、基質濃度に対して異なる様相を呈する事が前項において示された。そこで、Trp無添加培養時の細胞内濃度に匹敵する濃度からTrp濃度を変化させて代謝フラックスの変動を検討した。その結果をFig. 2. に示している。kynureninaseフラックスは内在レベルのTrpで既に認められ、Trpを培地に添加するとTrp濃度の上昇にともない、約7倍程フラックスは増加した。単一反応と仮定して計算したTrpに対するKm値は1.2×10^{-5}Mであり、0.02mM以上のTrpではもはや有意な増加が認められず、プラトーに達した。一方、2-H遊離反応は 0.05mM以上のTrpではじめて検出され、Trpに対するKm値は5.0×10^{-4}Mと高いが、Vmaxは kynureninaseフラックスの10倍以上であった。

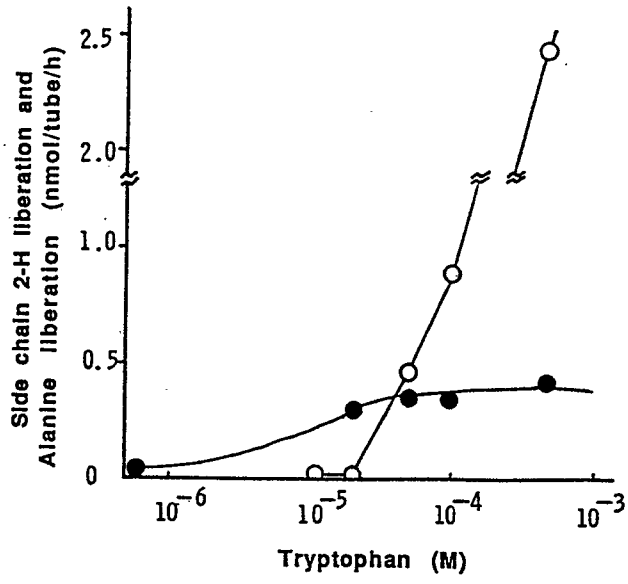


Fig. 2. Dose response of side chain 2-H liberation and kynureninase flux.

Yeasts were cultivated in S medium with various concentrations of tryptophan at 30°C for 1 h in a test tube containing 300 µl of broth. ○ ,2-H liberation (transaminase flux); ●, alanine liberation (kynureninase flux).

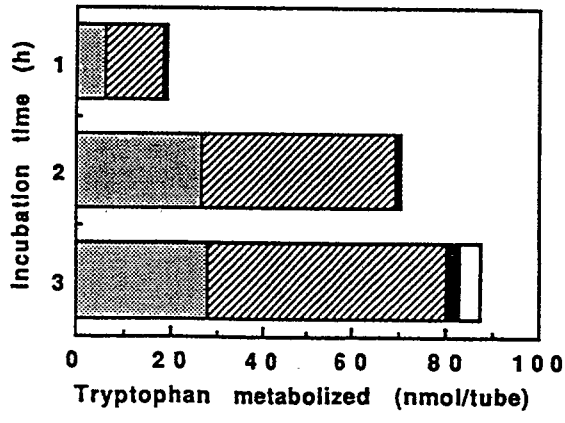


Fig. 3. Time course of the main fluxes of L-tryptophan metabolism.

Yeast were cultivated in YPG medium with 0.5 mM (155nmol /300 µl of broth) radiolabelled tryptophan. ⊠ ,acid insoluble fraction; ■ ,alanine liberation; ▨ ,2-H liberation; □ , unidentified.

3. 培地の違いによる代謝フラックスの変動

前項の実験では、簡単な合成培地であるS培地を用いたが、成分の豊富なYPG培地を用いてTrp代謝フラックスを検討し前項の結果と比較考察した。Fig. 3. に示すように0.5mM Trp添加培養時には、S培地に比べてタンパク画分への取り込みが増大した(Trp総代謝量の30-40%)。これはS培地と異なり他のアミノ酸が多量に存在し、Trpがタンパク合成の律速因子になるためと考えられた。kynureninaseフラックスはS培地の場合と同様に非常に小さかった。2-H遊離反応はS培地に近い代謝割合を占め、量的な増加は認められなかった。これらの結果から、Trp代謝は他のアミノ酸との関連で量的な変動はあるもののタンパク合成への流れが第一義的である事が明らかとなった。

4. 増殖に伴う代謝フラックスの変動

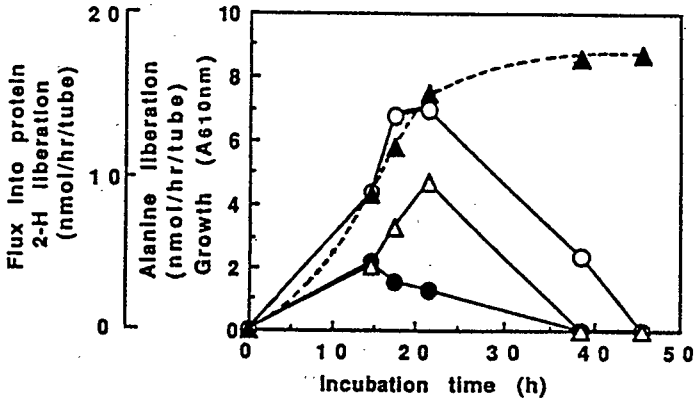


Fig. 4. Tryptophan metabolism via each flux throughout the growth phase.

Yeasts cultivated in YPG medium were reincubated with radiolabelled tryptophan in a test tube containing 300 µl medium (150 nmol tryptophan added) for 1 h. --▲--, growth; —●— ,alanine liberation; —○— ,2-H liberation; —△— , flux into protein.

主なTrp代謝フラックスの増殖時期による変動を検討した結果をFig. 4. に示した。タンパク画分へ取り込まれたTrp量は、細胞増殖と平行していた。一方、

kynureninaseフラックスは対数増殖期に最大活性を示したのに対し、2-H遊離反応はむしろ対数増殖期の後期に最大活性が認められた。

5. 他のSaccharomyces属のトリプトファン代謝フラックス

Saccharomyces cerevisiae (ATCC 7752)に於けるTrp代謝フラックスを検討し前述（第一章）の結果が広くSaccharomyces属に一般的であるかどうかを検討した。その結果をFig. 5. に示した。総Trp代謝の約40%がタンパク画分への取り込みであり、約56%が2-H遊離反応であった。さらに、後者の反応にはlagが認められ、この点もS. uvarumと一致した。このように、NA生成量がわずかに多いという理由で選択したS. uvarumもS. cerevisiaeとほぼ同様のフラックスを示し、Saccharomyces属一般にみられる代謝特性である可能性を示した。

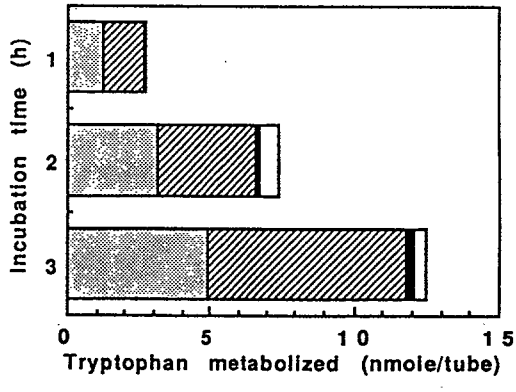


Fig. 5. Time course of the main fluxes of L-tryptophan metabolism in S.cerevisiae.

Cells were cultivated in S.medium with 0.05mM radiolabelled tryptophan in a test tube containing 300µl of broth. ▨ ,acid insoluble fraction; ■ ,alanine liberation; ▨ ,2-H liberation; □ ,unidentified.

第三節　主代謝経路と代謝物の同定

第二節において、Saccharomyces属酵母における主なTrp代謝フラックスはタンパク合成と2-H遊離反応であることが判明した。ところで2-H遊離反応、すなわち、transaminase反応は、幾つかの反応の総合として捕らえられていると考えられる。そこで、transaminase反応の生成物として考えられるインドールピルビン酸(IPA)、トリプトホール(TOH)、キヌレン酸(KA)およびキサンツレン酸(XA)等の生成について検討し、本反応の主要代謝物の同定を試みるとともに、代謝中間体および代謝経路についても検討した。また、代謝物からえた結果が前節で求めたフラックスの結果とどの程度一致するか、さらに、Trp濃度依存性についても検討を加えた。

1. 主代謝物の同定

実験方法

1). 培養および代謝物の抽出： 0.5mMTrpを添加したS培地で好気的に3時間培養し、培養液はN-NaOHで中和後、60%EtOHで代謝物を抽出した。抽出上清を濃縮し以下の分析に供した。

2). IPAの定量: 安定なインドール乳酸(ILA)へ還元して HPLCで定量した。回収は、培養液にIPAあるいはILAを添加してNaOHで中和後$NaBH_4$で還元しHClで弱酸性にしてHPLCによる分析を行った。
HPLC；カラム(Finepak SIL C_{18-5}、4.6x250mm、日本分光)、移動層 (10mM, pH4.0, phosphate buffer-methanol-acetonitrile=18:2:1)、波長 (280nm).

3). TOH、インドール-3-酢酸(IAA)およびインドールアセトニトリル(IAN)の定量：培養液上清を中和し、適当量を直接あるいは酸性下酢酸エチルで抽出後、HPLC分析した。さらに、TLCにて確認同定した。
HPLC；カラム 2)と同様、移動層 (10mM, pH4.0, phosphate buffer methanol-acetonitrile=9:1:1)、波長 (280nm).

4). KAおよびXAの定量： サンプル (約8mlの培養液相当量) をDowex 1x8($HCOO^-$、200~400mesh、7x50mm)カラムで前処置し、それぞれの溶出画分(6Nあるいは8N-HCOOH)を濃縮後HPLCにて分析し、さらにTLCにて確認同定した。

HPLC；カラム 2)と同様、移動層（10mM, pH4.0, phosphate buffer-methanol=9:1)、波長(340nm)

5). Thin layer chromatography(TLC)： HPLCで分離した代謝物について、固定層(Kiesel gel $60F_{254}$, Merck)；移動層（$CHCl_3$-CH_3COOH=95:5、benzene-ethanol=80:20、n-butanol-CH_3COOH-water=4:1:5の上層、蒸留水)を用いてTLCを行い紫外線ランプ(365nm)あるいはエールリッヒ試薬の噴霧により検出した。

6). ^{1}H-NMR：Trp添加ならびに対照(Trp無添加)培養液は酸性下酢酸エチル抽出後、主代謝物を、HPLCで数回に分けて分取濃縮した。メタノールに溶解して再クロマトを行った後、$CDCl_3$に溶解して^{1}H-NMR(400MHz、Brucker社製)による分析を行った。

実験結果

HPLC分析の結果、抽出液中の主な代謝物は標準化合物のretention timeとの一致からTOH, IAAおよびKAであったが、IANおよびXAは検出されなかった。それぞれのピークを分取してTLC分析を行い、Rf値ならびにエールリッヒ反応の呈色から確認同定した。またTOHのretention timeに一致した化合物は、HPLCで分取後、^{1}H-NMR分析を行い標準TOHのスペクトル(化学シフトδ)と完全に一致することからTOHと確認同定した(Fig.6.)。2-H遊離反応の結果生成する主代謝物はTOHであることが明らかとなりKradolferらの報告[7]を化学的により明白に疑いのないものとすることができた。KAの生成も確認されたが、TOHに比べてかなり少ないことから、2-H遊離反応の主反応はtryptophan transaminase(TTase)によるTOH生成であると言える。XAの生成がほとんど認められなかったことから、Trpのインドール環開裂によるキヌレニン(KN)の生成が少ないことがうかがえた。このことは前節で得られたkynureninaseフラックスがきわめて細いという結果とも一致している。一方、TTaseの直接の生成物と考えられるIPAの存在を確認するために還元処理してILAの存在を検討した。この処置によるIPAのILAへの変換効率は74%、ILAの酢酸エチルによる抽出効率は90%であったが、培養液を還元後酢酸エチル抽出しHPLCを行った結果、ILAは検出されなかった。

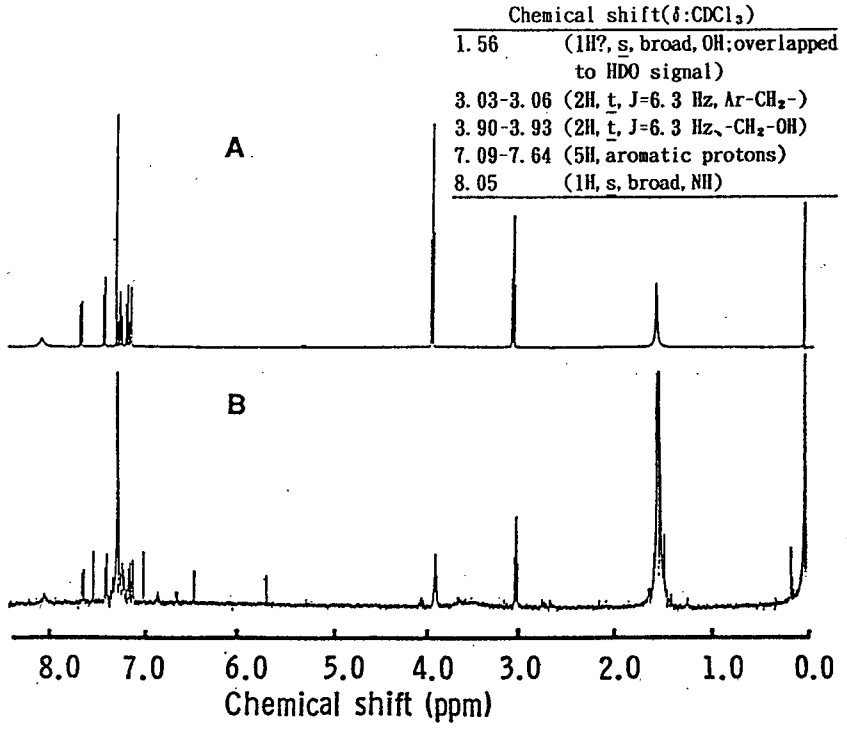


Fig. 6. ^{1}H-NMR spectrum of sample C prepared by HPLC.

Sample C prepared by HPLC was dissolved in CDCl3 to analyze by 1H-NMR(400MHz). A; authentic tryptophol, B;sample C.

2. 2-H遊離反応と代謝物の量的関係

第二節で求めた2-H遊離反応の内容を明らかにするため、前項では想定される代謝物の同定を行い、幾つかの代謝物の存在を明らかにした。本項では、2-H遊離反応フラックスおよび代謝物の両面から定量を行い、フラックス定量法の妥当性を確認し、主反応の内容をさらに明らかにした。

実験方法

1). 2 H遊離反応フラックスの定量： 第二節と同様。

2). 代謝物の抽出ならびに定量： Trpを添加したS培地で3時間培養した酵母培養液中の代謝物は、直接あるいは酸性下に酢酸エチル抽出後HPLCによる分析を行った（条件：前項と同様）。

3). 代謝Trp量の定量： 第二節と同様。

実験結果

2 H遊離反応を、フラックスならびに代謝物両面から検討した結果をTable 2. に示した。0.05mM Trp添加時には47.9%が2-H遊離反応を経て代謝され、しかもKA、TOH、およびIAAの総量(46%)は代謝量とほぼ一致した。その内訳は、総代謝量の36.9%がTOH、7%がIAA、2.1%がKAであった。0.5mM Trp添加時においても69.9%が2-H遊離反応を経て代謝され、主要代謝物の総量は75.9%とほぼ一致した。また、この時の内訳は73.1%がTOH、KAとIAAはそれぞれ1.3~1.5%であった。Trp量の増加により代謝物は約10倍と増加したが、そのほとんどがTOHの増加に依存していた。以上のように本実験で使用したTrp代謝フラックスは定量的に代謝物の面からも確認され、本フラックス定量法の妥当性が確認された。さらに主代謝物がTOHであることも明らかとなった。

Table 2. Comparison of the amount of tryptophan metabolized via side chain 2-H liberation with the amounts of metabolites formed following 2-H liberation

Yeast was cultivated in S.medium.at 30°C for 3h. 2-H liberation was determined by the flux assay using L-[methylene-^{14}C]- and L-[side chain-2,3-^{3}H]tryptophan. Metabolites were analyzed by HPLC directly or after ethyl acetate extraction. Data are means ± S.D. for three experiments.

Added Tryptophan (nmol in test tube)	0.05mM (15 nmol)		0.5mM (150 nmol)	
Metabolites	(nmol)	(%)	(nmol)	(%)
Metabolized Tryptophan	12.70±0.76	100.0	75.20±7.76	100.0
Side Chain 2-H liberation	6.09±0.90	47.9	52.50±4.82	69.9
Kynurenic acid	0.25±0.05	2.1	0.97±0.16	1.3
Tryptophol	4.70±1.20	36.9	54.90±10.1	73.1
Indole-3-acetic acid	0.89±0.28	7.0	1.14±0.06	1.5

3．　主代謝物の生成経路の検討

2-H遊離反応の主代謝物はTOHであり、IAAも合成されることが明らかになったが、詳細な代謝経路ならびに中間体については明らかではない。現にTrpからTOHへの最初の代謝中間体と考えられるIPAもほとんど検出されていない。そこで、想定される主な中間体を前駆体として酵母によるTOHならびにIAAの生成を検討した。

実験方法

1). 培養方法:　酵母菌体は6mlのS培地を含む30mlのマイヤーで30℃、3時間培養した。前駆体は60%メタノールに溶解して終濃度5~500μMとなるように添加した。前駆体の非酵素的な変換を確認するために細胞無添加の条件でも同様に行った。

2). 抽出および代謝物の定量：　培養液から酸性下に酢酸エチルで抽出しTOH, IAA並びにインドールアルデヒド（IAld)は、HPLC（第三節と同様）にて分析した。

3). 代謝物の確認：　HPLCで標準化合物とretention timeが一致した化合物はさらにTLC（第三節、第一項と同様）で確認した。

実験結果

Table 3. から明らかな通り、最終産物と考えられるTOHならびにIAAには非酵素的な変化は認められなかった。TOHは菌体が存在する状態でも変化せず、最終産物であることは明らかであるが、IAAは47%に減少した。酵母では知られていないが、Lacan[15]らが報告している様な代謝物への変換の可能性も考えられる。一方、IPAは非酵素的にすみやかに未知物質への変換が認められた。この物質はTLCによりIAldであることが明らかになった。菌体が存在する場合、IAldが共存しIAAへの変換が認められたが、TOHへの変換はIPA濃度が上昇しても全く認められなかった。また、インドール-3-アセトアルデヒド(IAAld)が前駆体の場合、すみやかなTOHの生成が認められたが、IAAは検出されなかった。以上の結果から、TOH代謝の中間体としてIPAならびにIAAldが考えられ、これらの物質はほとんど蓄積される事なくすみやかに代謝されると思わ

Table 3. The metabolism of IPA, IAAld, TOH and IAA

Yeast was incubated with each substrate in 30 ml flasks containing 6 ml of S medium at 30°C for 3 h. Metabolites were extracted with acidic ethyl acetate and analyzed by HPLC. n.d; not detected

Substrate	Final conc. (x10-6M)	Presence of cells	Metabolites (x10-6M)		
			TOH	IAA	Indole aldehyde
Indole-3-pyruvic acid (IPA)	5	-	n.d	n.d.	3.2
	100	-	n.d.	n.d.	14.6
	500	-	n.d.	n.d.	79.7
	5	+	n.d.	1.0	1.3
	100	+	n.d.	8.2	16.0
	500	+	n.d.	17.3	25.6
Indole-3-acetaldehyde (IAAld)	500	-	n.d.	1.1	0.7
	10	+	1.9	n.d.	n.d.
	100	+	36.6	n.d.	n.d.
	500	+	218	n.d.	n.d.
Tryptophol (TOH)	100	-	102	n.d.	n.d.
	100	+	102	n.d.	n.d.
Indole-3-acetic acid (IAA)	100	-	n.d.	108	n.d.
	100	+	n.d.	47	n.d.

れる。TOHとIAAの生成にどの中間体を共有するのかは不明であるが、両者の生成割合がかなり異なることからSaccharomyces属におけるTrp代謝の主経路は、Trp→IPA→IAAld→TOHであることが判明した。

4. 主代謝物生成のトリプトファン濃度依存性

第二節で2-H遊離反応のTrp濃度依存性を明らかにした。TOH生成の中間代謝物がほとんど検出されなかった事から、TOH生成量を対象にしてもほとんど同様の結果が得られることが予想された。そこで、本項では代謝物の面からTrp濃度依存性を検討した。

実験方法

1). 培養ならびに代謝物の抽出： 前節と同様にS培地で3時間好気的に培養した。TOHならびにKAは前節と同様に抽出を行った。KNの抽出はKAと同様に行った後、Dowex 50Wx8(H^+、200~400mesh、7x50mm)で前処置し、5N-HCl溶出画分をHPLCにて分析した。

2). KNの定量： 定量はHPLCで行い、ピークの確認にはkynureninaseを用いた。すなわちHPLC用サンプル(あるいは標準KN)をTris-HCl buffer(pH8.5), pyridoxal phosphate(PLP)ならびにkynureninase存在下に30℃、3時間前処置することによりkynureninase無添加時に検出されたピークの消失を確認した。また、TLCによる確認も行った。

HPLC: 溶媒（10mM、pH4.0、phosphate buffer-methanol=95:5）、波長（360nm)、他の条件は1項 4)と同様

TLC: 1項 5)と同様。

実験結果

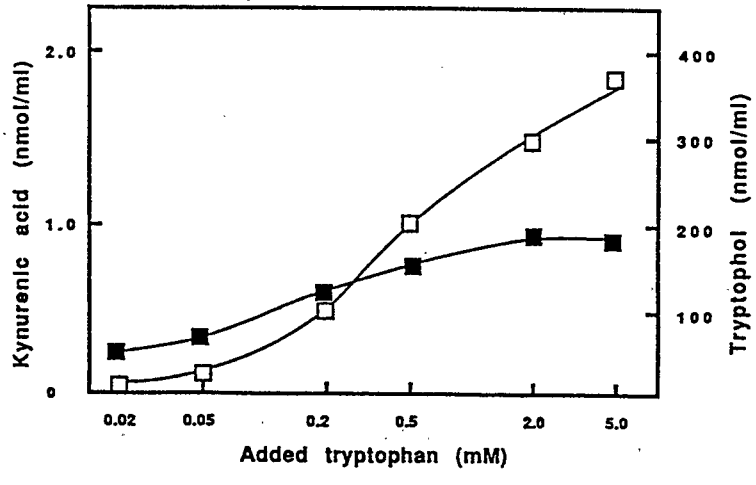


Fig. 7. Dose response of tryptophol and kynurenic acid production.

Yeasts were cultivated in S medium at 30°C for 3 hrs. Samples were analyzed by HPLC after acidic ethyl acetate extraction (TOH) or pretreatment with Dowex column (KA).
□ ,tryptophol; ■ ,kynurenic acid.

2-H遊離反応の生成物としてのTOHならびにKA生成量のTrp濃度依存性について検討した。その結果(Fig. 7.)、TOHは0. 05mM以上のTrp濃度で検出され、3時間で360nmol/mlの生成が認められたが、ほとんどが菌体外に放出されていた。一方、KAは0. 02mM Trpでも生成し、0. 05mM Trp添加時には3時間の生成量は0. 9nmol/mlであり、細胞内には10~20%存在していた。TOH/KAの比率は、Trp濃度の増加につれて上昇し、260~400:1であった。2-H遊離反応とTOH生成のTrpに対するKm値はよく一致($5x10^{-4}$M)しており、平衡がTOHに偏り、速い反応であることがうかがえた。酵素系の複合として捕らえた実験結果であるが、両測定結果における動力学定数は、精製酵素のaromatic aminotransferasesで報告された値(0. 4mM)[7]とよく一致していた。中間代謝物はほとんど検出されず（3項）圧倒的にTOHが代謝物の中心を占め、TOHにかたよった速い反応であることが示された。

第四節　考察および小括

考察

酵母におけるTrp代謝の全体的な流れを考察する手段として、Smithらの方法[1]は簡便で、定量的な方法として使用しうることが判明した。AA以外の主な芳香族性のTrp代謝物は活性炭に完全に吸着され、反対に全く吸着されない遊離の非芳香族性の化合物を測定することにより、簡単に代謝フラックスを求めることが可能であった。酵母ではタンパク画分への流れが多いため、いったん遊離した化合物（たとえばAla)がタンパク画分へ再取り込みされ、フラックスが過小評価される危険性が心配された。しかしながら、パルスラベルしたタンパク中の放射性アミノ酸のほとんどはTrpであり代謝の途上で生じるAlaなどの二次的なタンパクへの取り込みは考慮する必要のないことが明らかになった。これは、酵母における細胞内のTrpプールが他のアミノ酸のそれに比べはるかに小さい事[16, 17]によると考えられた。

Smithらの方法を用いて酵母のTrp代謝の全体像を検討した結果、フラックスの中心はタンパク合成であり、アミノ酸の基本的な役割の重要性が再認識された。さらに、主代謝反応は2-H遊離に基づくTOH生成が中心であった。また、Ala遊離に基づく

kynureninaseフラックスは、前者に比べて極めて細い流れであることが判明した。フラックスとして捕らえられなかった代謝Trp量は、蓄積しているKN（第二章）あるいは、さらに存在量が低いと報告されている3-hydroxykynurenine[18]によると考えられるが、これらを考慮しても依然としてkynureninaseフラックスの流れは細いことに変わりはない。さらに、この様なTrp代謝の傾向は、S. cerevisiaeでも認められ、Saccharomyces属の一般的なTrp代謝の特徴と考えられる。

酵母におけるTOH生成に関する報告のほとんどがTLCにより同定がなされただけの定性的なものであり[7]、Trp代謝全体に占める割合はほとんど不明の状態であった。本論では、さらにはっきりとした同定を行い、フラックスから捕らえた2-H遊離反応と代謝物として捕らえたTOH生成量が極めてよく一致した。このことから、本反応の中心がTOH生成であり使用した代謝フラックス定量法の妥当性が示された。 また、NAD合成へと導く重要なkynureninaseフラックスとの比較は今までほとんどなされていなかったが、本実験では、代謝の流れを定量的に捕え、各フラックスのTrp濃度依存的な特性の違いを明確にした。酵母においてTrpの細胞内プールはanthranilate synthaseがTrpによりfeed back inhibitionを受けることにより常に低く調節されていると言われてきた[19]。しかしながら、feedback inhibition非感受性酵素を持つ変異株では細胞内Trpプールの増加が認められ、Trpを含む培地中でも同様の現象が認められることが報告された[16]。著者も、標準培地における細胞内Trpレベルが極めて低いことを示すと共に、培地にTrpを添加した場合に著しく細胞内Trpレベルが上昇し、すみやかに代謝される事を認めた。この様な代謝状況においてタンパク合成ならびにAla遊離に導くkynureninaseフラックスは極めて調節のとれたものであったのに対し、2-H遊離反応に基づくTOH生成は、0.02-0.05mM以上のTrp添加で著しく増加した。TOHの生成は他の芳香族アミノ酸の添加でもほとんど影響されず、芳香族アミノ酸同志の調節とは独立していると報告されている[6]。従って、多量のTrp添加時に認められるTOH生成は細胞からの単なるTrp消去としての働きだけではない可能性がある。また流れが極めて制限されているkynureninaseを通るTrpの代謝は細胞にとって本質的に重要な役割を担っていることも暗示された。

各フラックスの活性上昇と増殖時期との関連性について検討した結果、当然の事ながら、タンパク画分への取り込みは細胞増殖と平行していた。kynureninaseフラック

スは対数増殖期に最大に達しており、本代謝経路が酸化還元反応の補酵素として重要なNAD(H), NADP(H)の合成に関わっていることと無関係とは考えられない。一方、2-H遊離反応に基づくTOH生成はやや対数増殖後期に偏って最大活性が認められる傾向にあった。これは、Candida albicansで報告されているように、発芽管の発育を抑制し酵母様型を増加させる自己調節物質[20, 21]としてのTOHの特別な生理作用を暗示させる。

主代謝物であるTOHに至る代謝経路について、Saccharomyces属以外でその中間代謝物についての報告は幾つかある[22, 23]。しかしながら、詳細な経路については依然として明らかではない。S. cerevisiaeにおいて、初発段階を触媒する酵素として2種類のaromatic aminotransferaseが報告[7]されており、構成酵素はTyrおよびPheの代謝に関与すると考えられ、Trpに対するKm値は20倍も高く、親和性は低い。一方、誘導酵素は、Trp, Tyr, Pheに対して同程度のKm値を示すものの、実際Trpの分解に関わっているのは本酵素と言われている。精製酵素のTrpに対するKm値が0.4mM[7]であるのに対し、本実験でフラックスから求めた結果は0.5mMと近似した値が得られた。初発の代謝物と考えられるIPAの確認は出来なかったが、中間体添加実験の結果から、Trp→IPA→IAAld→TOHという代謝の概略が明らかになった。しかも、それら中間体の蓄積がほとんどない事は、代謝物とフラックス定量の一致ならびに aromatic amino-transferaseのTrpに対するKm値とフラックスから求めた値の一致から強く支持された。また、2-H遊離反応による生成物として少量のKAが検出されたが、kynureninaseフラックスの流れの細さとも併せて本経路の生理的意義を考えるとき、Trp－NA経路が何らかの因子により調節されていることが強く示唆された。

小括

［1］ 酵母におけるTrp代謝の全体的定量的な解析にSmithらの方法の適用が基本的に可能であった。

［2］ 酵母におけるTrp代謝フラックスを定量的に解析し、中心的な流れはタンパク合成であり、高濃度のTrp添加時には2-H遊離反応(transaminaseフラックス)が

著しく増大するのに対し、Ala遊離反応(kynureninaseフラックス）は極めて細い流れであることを明らかにした。増殖時期によるTrp代謝の変動を明らかにし、Saccharomyces属一般にみられる現象であることを示唆した。

[3] 主代謝反応である2-H遊離反応の主代謝物としてTOHを同定した。少量のKA並びにIAAの生成も認められ、三者の総生成量は、フラックスから求めた2-H遊離反応と定量的によく一致した。

[4] TOH生成の代謝経路は、Trp→IPA→IAAld→TOHであることが示唆された。中間体の蓄積はほとんど認められず、フラックスから求めたKm値が精製酵素の報告値とほぼ一致し、平衡がTOHに偏った、速い反応であることが明示された。

第二章　酵母におけるトリプトファン－ナイアシン系の代謝フラックス

NAは、酸化還元の補酵素として重要なNAD(H)、NADP(H)としての働きが中心と考えられるが、他のビタミン類と異なりTrpからキノリン酸(QA)を経て生合成される。Trp－NA経路の存在は動物の肝[24]で明らかにされ、その代謝経路ならびに関連酵素について幅広く研究されてきた。Neurospora[25]、好気的に増殖した酵母[2]、さらに細菌では唯一Xanthomonas[26]においてもその経路の存在が報告された。他の細菌および植物は本経路をもたずアスパラギン酸やグリセロールからNADを合成することが報告されている[27]。しかしながら、これらの生合成の詳細ならびに全Trp代謝に占める割合については明らかでない。さらに、酵母におけるNA合成の調節については動物肝程明らかでないのが現状である。また、各生物間の調節を比較すると、一様ではない[2, 3, 28-34]。酵母においてこれらの関心事が未だに解明されていない理由の一つとして第一章で述べた Kynureninase経路の流れの細さがあげられる。本章では、種々の前駆体からのNA合成を検討し、前駆体をKNにした場合の代謝フラックスならびに代謝物の生成と分布、さらに代謝関連酵素の性質について検討した。

第一節　前駆体とナイアシン合成能

1．　前駆体によるナイアシン合成能の相違

第一章で述べたように、酵母ではNAへの流れの指標となるkynureninase フラックスは非常に細い。この原因を解明するためTrp以外の種々の前駆体からのNA合成について検討した。

実験方法

1)．　培養：　前駆体の添加量は0.5mMとし、第一章と同様に行った。

2)．　NAの抽出ならびに定量：　培養液あるいは洗浄菌体からの総NA(nicotinamide

nucleotides, nicotinamide, niacin)の抽出は、冷60%EtOHあるいは85℃、5分、70 %EtOH抽出によった。定量はLactobacillus plantarum (ATCC 8014) を用いた微生物定量法[35] (濁度法) によった。

3). 増殖および菌体量の測定：菌体の増殖は適当に希釈した培養液を濁度(OD_{610nm})測定により、また菌体量は、0.24mg dry cells/ml(OD_{610nm}=0.35)として計算した。

実験結果

Fig. 8. に示すように、Trp無添加時のNA含有量は8 nmol/ml(2.8nmol/mg dry cells)であり、グルコース由来の内在性のTrpから合成されたと考えられる。合成されたNAはほとんど細胞内に存在し、わずかに2%程度が細胞外に放出されていた。3時間培養後の菌体量は、前駆体の添加で殆ど変化しなかったが、KNあるいはOHAAの添加でNAレベ

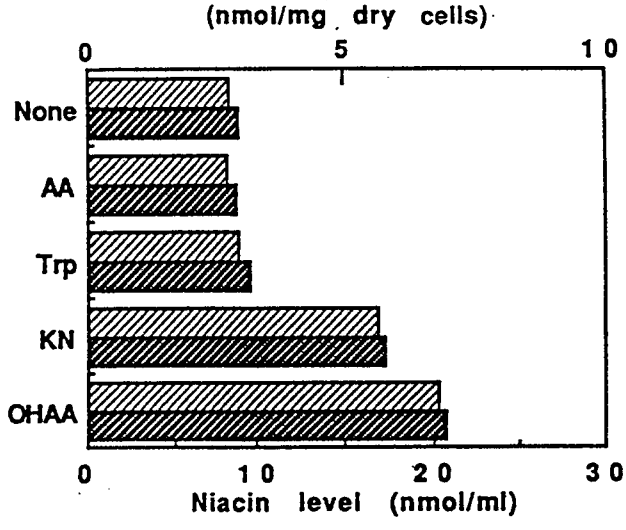


Fig. 8. Effects of various precursors on niacin level.

Cells were incubated aerobically with 0.5 mM each of substrate at 30°C. After 3 h-incubation, total niacin in the broth was determined and expressed as nmol/ml (▨) or nmol/mg dry cells(▨).

ルは有意に増加した。AAあるいはTrpでは無添加とほとんど変化が認められず、TrpとKNの間にNA生成能に関して著しいギャップがあることが明らかとなった。AA添加時にはTrpの生成が認められたことから、AAはTrpの前駆体であることが明らかである。

2．前駆体の細胞内取り込みとナイアシン合成能の関連性

前項でNA合成に対してTrpとKNには著しい効果の違いが認められた。そこで、この違いが両者の細胞内取り込み速度の違いによるものかどうかを検討した。

実験方法

1). TrpおよびKNの細胞内取り込み実験： 15mlの菌体に3mlのTrpあるいはKN(0.3mM)を添加し、一定時間30℃でインキュベート後、15mlの培養液を遠心チューブに移し、2℃ですばやく遠心分離（1,000xg,5分）し、上清を残存量測定に用いた。沈澱画分は、25mlの培地で洗浄後60%EtOHで2回抽出した後、抽出液を濃縮乾固して少量の蒸留水に溶解し細胞内含量の定量に用いた。初期の取り込みはさほど問題ではないので0 hrの値を用いて細胞に吸着した細胞外の値を補正した。細胞内へ取り込まれた量ならびに細胞内プールサイズは次式を用いて求めた。

取り込み量：添加量－上清中の残存量、 細胞内プール：細胞内量、

代謝量：取り込み量－細胞内量

2). TrpおよびKNの定量： 第一章と同様。

実験結果

Fig.9.から明らかな通り、TrpならびにKNは、細胞内へ時間依存的に取り込まれたが、Trpの取り込み速度はKNのそれよりも速く、細胞内プールも大きかった。細胞内へ取り込まれたKNは時間経過に伴い、すみやかに直線的に代謝された。一方、取り込まれたTrpは15分程度のlagを経てすみやかに代謝された。以上の事実は、TrpとKNのNA生成能の違いの主たる原因が細胞内への取り込みの差異に基づくものではなく、む

しろ、代謝能そのもの、言い換えればTrp--KN代謝に関わる酵素の反応律速性によることが暗示された。

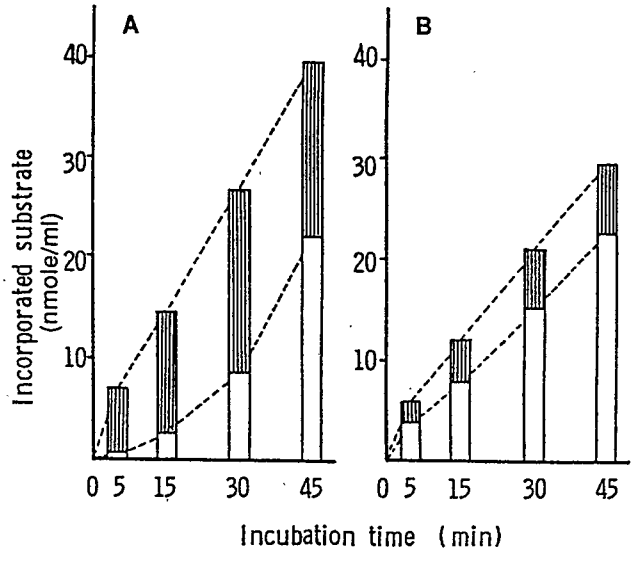


Fig. 9. Incorporation and intracellular pool of tryptophan.

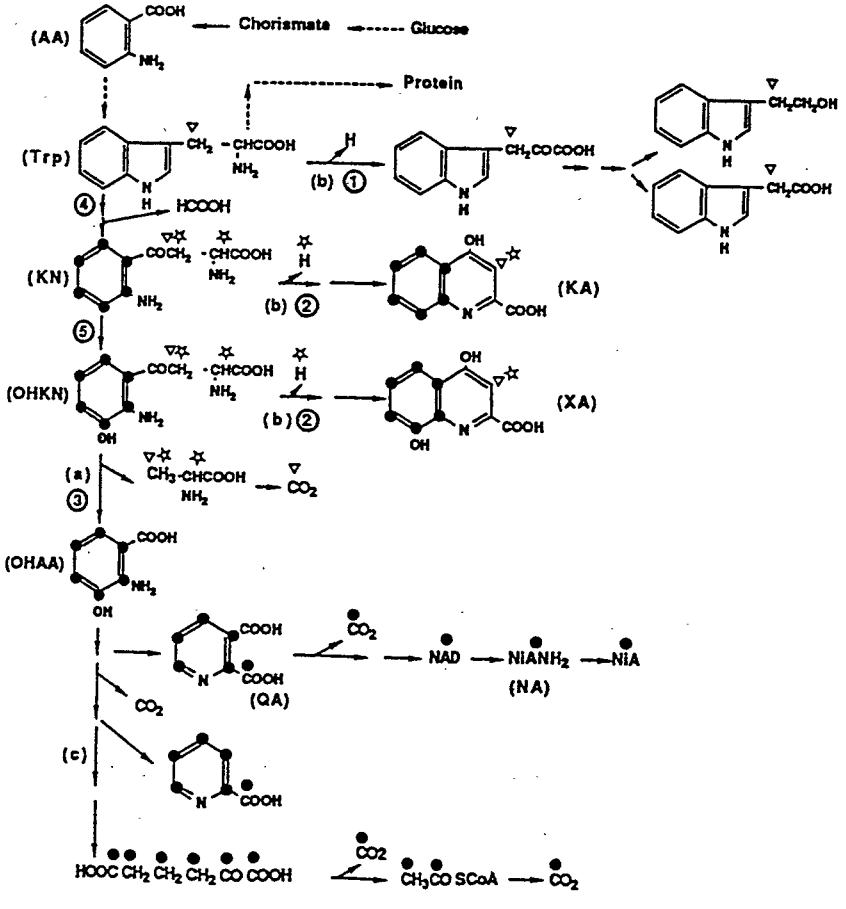
Cells were incubated with 0.05 mM Trp (A) or KN (B) at 30°C. At indicated time, Trp or KN incorporated into cells was determined .□, metabolized ; ▥, intracellular; ▤, incorporated.

第二節. キヌレニン代謝フラックス

第一章においてTrp代謝フラックスを検討し、その殆どがTOH生成に偏りkynureninaseフラックスは極めて細い流れであることを示した。一方、前節で前駆体をKNにするとTrpに比べて kynureninaseを介する流れが太くなることが明らかとなった。そこで放射性KNを用いてフラックスおよび代謝物の両面からKN以降の代謝を詳しく検討し、Trp－NA系の調節に関して手掛かりを得ることを目的とした。さらに、代謝に関わる酵素の性質についても検討を加えた。

1. キヌレニン代謝フラックス定量の理論的背景

KN代謝フラックスは、種々の放射性KN（対照としてTrp)を用いて第一章と同様、放射能の活性炭非吸着および酸不溶性画分への移行ならびに$^{14}CO_2$を測定することにより求められる。Scheme 2 に放射性TrpならびにKNの予想される代謝を示した。以下に使用する放射性KN(Trp)の種類ならびにフラックス(Fx)を求める式を示した。



Scheme 2. Metabolic fate of radioisotope from specifically radiolabelled L-kynurenine or L-tryptophan

Outline of Trp- or KN- metabolism expected in the yeast was shown with radiolabelled substrates (Trp: ▽, L-[methylene ^{14}C]; KN: ●,L-[benzene ring-U-^{14}C]; ▽, L-[methylene ^{14}C]; ☆,L-[side chain 2,3-^{3}H]). (a), the KNase flux(alanine liberation); (b), the transaminase flux (2-H liberation); (c) the acetyl-CoA flux; ①, TTase; ②,KTase; ③,KNase, ④,TPase; ⑤,KNOHase.

Trp代謝

① kynureninase Fx: L-[methylene^{14}C]Trp; 活性炭非吸着nmol+$^{14}CO_2$nmol

KN代謝

② kynureninase Fx: L-[methylene^{14}C]KN; 活性炭非吸着nmol+$^{14}CO_2$ nmol + 酸不溶性画分 nmol

③ transaminase Fx: L-[side chain 2,3-^{3}H]KN; (^{3}H-酸不溶性画分dpm+活性炭非吸着dpm-遊離Ala nmolx^{3}H比放射能)÷(^{3}H比放射能/3)

④ acetyl-CoA Fx: L-[benzene ring-U-^{14}C]KN; ($^{14}CO_2$dpmx6/比放射能)-(NA nmol)+(活性炭非吸着dpm+酸不溶性画分dpm)÷比放射能

2. キヌレニン代謝フラックスの定量

実験方法

1). 放射性キヌレニンの調製: 雄性ラット（体重400g）にL-Trp(0.5mmol)を腹腔内投与し5.5時間後に切除した肝は、3倍量の0.14M KClでホモゲナイズし、20,000xg 20分遠心上清を酵素液とした。あらかじめHPLCで精製した放射性Trp (L-[methylene^{14}C]Trp, L-[side chain2,3-^{3}H]Trp, DL-[benzene ring-U-^{14}C]Trp) (約140nmol/ml)は各々酵素液150μlと共にリン酸緩衝液 (pH7.0)中で、37℃、3.5時間インキュベートした。$HClO_4$で反応停止後、上清および回収洗液は、Dowex 50Wx8(H^{+},7x50mm)カラムにアプライし、蒸留水50ml、N-HCl 20ml、2.5N-HCl 30mlで洗浄後、放射性KNは5N-HCl 20mlで溶出した。濃縮乾固後、少量の蒸留水に溶解してHPLC (Finepak SIL C_{18-5}, 10%methanol)で精製した。KNに相当するピークは、PPC (東洋No.51A濾紙、上昇法、pyridine-methanol-water=4:1:1)でさらに確認した。DL-[benzene ring-U-^{14}C]Trpの場合には、混入したD-KNをさらに分離するため、PPCで分離精製した。精製したKN (L-[methylene^{14}C], L-[benzene ring-U-^{14}C], L-[side chain 2,3-^{3}H])には、混在する放射性の不純物は認められず、比放射能(dpm/nmol)はそれぞれ、1500, 800, 1400であった。

2). フラックスの定量: 放射性KNならびにTrpを用いて第一章と同様に行った。

3). 代謝物（KN, OHKN, OHAA, KA, XA, AA, キナルジン酸(QnA)）の定量： 0.05mM Trpならびに KNを添加し3時間培養した後、0.45N-$HClO_4$で抽出しHPLCにより定量した。AAは酸性下酢酸エチルで抽出濃縮し、同様にHPLCにより定量した。KNおよびKAはDowex 50Wx8(200-400mesh, H^+, 7x50mm)[36]およびDowex 1x8(200-400mesh, formate, 7x50mm)[37]でそれぞれ前処置してから同様に分析した。HPLC条件；Finepak SIL C_{18-5}, 10mM, pH4.0, phosphate buffer-methanol=19:1, 0.8ml/min, 360nm。QnAはDowex 1x8カラムで前処置後、HPLCにより分析した。HPLC条件；10 %methanol, 320nm.

4). 代謝物（QAならびにNA）の定量：総NAは、第一節と同様に行った。QAの定量は、Henderson and Hirschの方法[38]により、氷酢酸で脱炭酸後、NAとして定量した。

実験結果

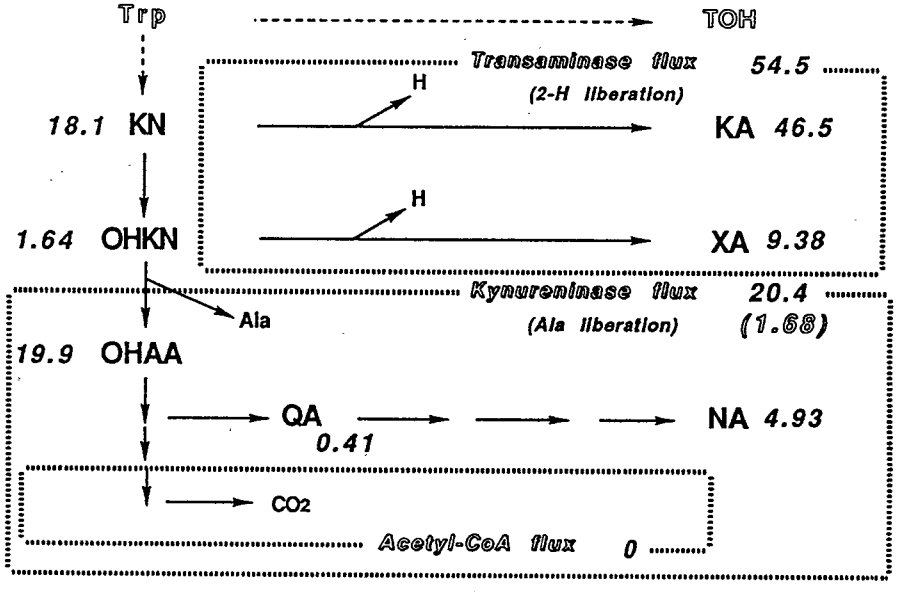


Fig. 10. Metabolic fates of kynurenine or tryptophan

Cells were incubated with 0.05mM each of radiolabelled substrate ([methylene-^{14}C]-Trp, [methylene-^{14}C]-KN,[benzene ring-U-^{14}C]-KN and [2,3-^{3}H]-KN) at 30°C under O_2. After 3h -incubation,Trp metabolized via each flux and amounts of metabolites were determined. Values were expressed as percentage to an amounts of substrate added.

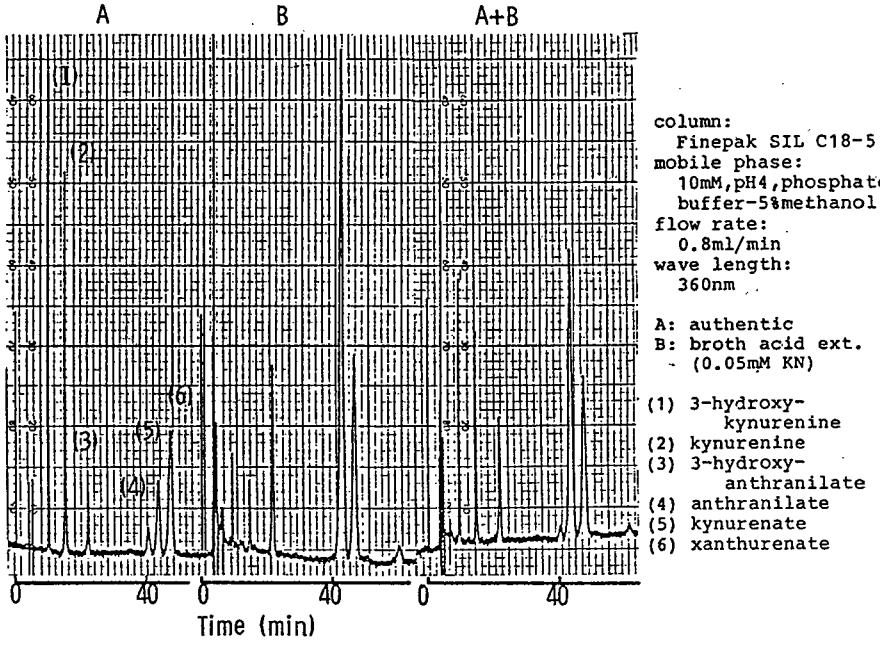


Fig. 11. Chromatograms of kynurenine metabolites by high-performance liquid chromatography.

Fig. 10. にKNフラックスならびに代謝物測定の結果を示している。HPLCにおけるKN代謝物の溶出はFig 11. に示す通りである。添加KN量の54.5%が2-H遊離反応を受けており、Ala遊離反応は20.4%もの高値で認められた。Trpを基質にした場合、Ala遊離反応は1.68%と低く、Trpに比べてKNからのkynureninaseフラックスが著しく増大したことがわかる。一方、Acetyl-CoA フラックスは検出されず、完全酸化系へはほとんど流れない事が判明した。これらのフラックスをさらに詳細に検討するため代謝物の検出と定量を行った。AAおよびQnAは抽出液を濃縮後にHPLCを行っても検出されなかったが、その他の代謝物については前処置せずにHPLC分析が可能であった。分析の結果、KAならびにXAの生成総量は添加量に対し55.8%であり、2-H遊離フラックスと一致した。KA/XA生成比は5であり、KNはOHKNに水酸化されてからよりも直接transaminateされる方が圧倒的に高いことがわかった。また、19.9%のOHAA、0.41%のQAならびに4.93%のNAが検出され、これらの総量はkynureninase フラックス値とおおよそ一致した。さらに残存KNも含めて総代謝物の回収は100.5%であった。以上フラックス測定、代謝物定量の両面からほぼ同様の流れを捕らえることができ、Trpの場合ほとん

ど検出不可能であったNAへの流れと主要な代謝物の量的な分布が判明した。

3. キヌレニン代謝物の細胞内外分布

酵母は、代謝物を大量に菌体外へ排泄することが知られている。KN代謝物の場合も例外ではない。ところで、生合成について考える場合、菌体内の中間体含量が問題となる。そこでKNから生成した代謝物の菌体内外の分布を検討した。

実験方法

1). 培養方法： 0.05mMおよび0.5mMTrp添加S培地で30℃、3時間培養した。

2). 菌体内外代謝物の分離、抽出ならびに定量： 培養液を遠心分離により上清と菌体に分離した。上清はそのまま、あるいは酸性下に酢酸エチルで抽出した。洗浄菌体は、60%EtOHで抽出し、濃縮乾固して蒸留水に再溶解後、そのままあるいは酸性下に酢酸エチル抽出し、HPLCにより定量した。上清あるいは菌体抽出液中のNAとQAは 第二節の方法で定量した。

実験結果

Fig.12.から明らかなように、基本培地ではNAとQA以外の代謝物はほとんど検出されなかった。このことは、中間代謝物のレベルは極めて低く、素早くNAへと代謝される事を意味する。0.05mMのTrp添加時には少量のKAとOHAAが検出された。一方、0.05mM KN添加時にはNA生成量は174%に増大し、細胞内量も増加した。生成したKA, XAおよびOHAAはほとんど菌体外へ排泄されたが、細胞内のOHKN量は増大した。添加するKN量を10倍量に増加した場合、NAレベルは無添加時の240%まで増大した。中間体のほとんどが菌体外へ放出されたのに対しOHKNの細胞内量はさらに増大した。この事実は、細胞内OHKNの増加とNA生成の間には密接な関係が存在することを示唆している。一方、KAはほとんどが細胞外へ排泄された。その量は無添加時の15倍から100倍へと増大した。QnAの生成は認められず、またKAの代謝も認められなかった事からKAは恐らく最

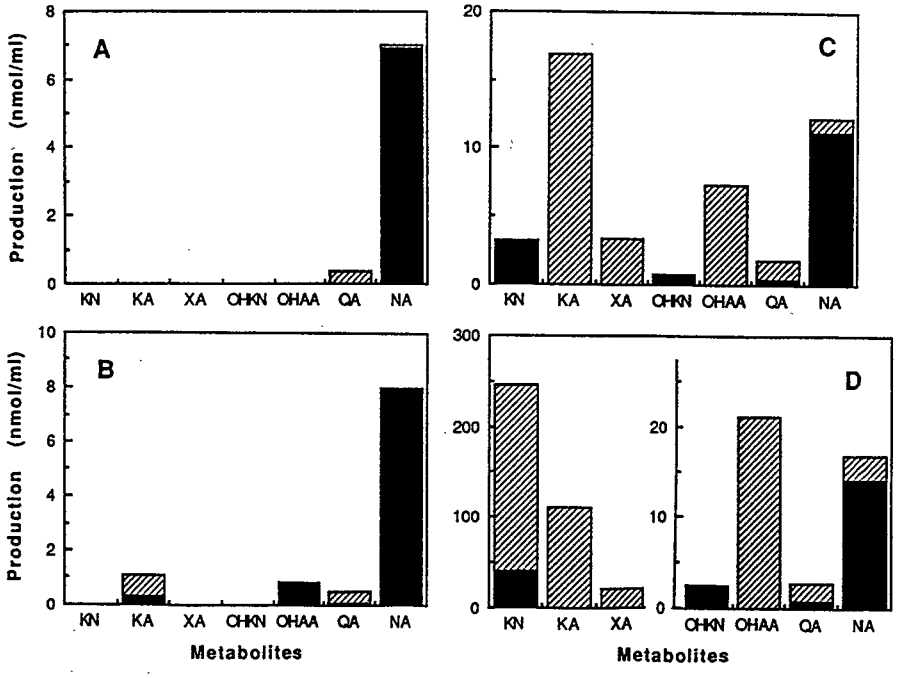


Fig. 12. Cellular distribution of kynurenine metabolites.

Cells were incubated in the absence (A), or in the presence of 0.5 mM Trp (B), 0.05 mM KN (C) and 0.5mM KN (D). After 3 h-incubation, metabolites were extracted from both culture medium (▨) and cells (■) and determined .

終産物であろうと考えられた。代謝されたKNの約50%がKAとして回収された。XAの生成も添加KN量の増加に伴って増大したが、KAのそれにくらべて変動が少なかった。一方、AAは全く検出されなかった。

第三節. トリプトファン代謝関連酵素の諸性質

前節の代謝様相をさらに詳しく検討するため、主な代謝関連酵素（kynureninase、tryptophan transaminaseならびにkynurenine transaminase）の活性ならびに諸性質について検討した。

実験方法

1). 粗酵素液の調製： S培地で3時間培養後、集菌体は、緩衝液（10mM, pH 7.0, potassium phosphate buffer)で洗浄し、同緩衝液に再懸濁してglass beads(MK-2GX, 0.25-0.5mmφ, Shinmaru Enterprises)と共に超音波破砕（UR-200P, Tomy Seiko)した。7,000xg 10minの遠心分離上清を粗酵素液とし、tryptophan transaminase(TTase)ならびにkynurenine transaminase(KTase)活性の測定に供した。KNaseについては、10 μM PLPおよび0.01% 2-mercaptoethanol を含む上記 bufferに懸濁した菌体を破砕し、20,000xg 20min遠心上清を酵素液とした。

2). 酵素活性の測定：

TTase, Linら[39]; KTase, Nakamuraら[40]; KNase, Tanizawa and Sodaらの方法[41]を用い、分光法あるいは蛍光法にて測定した。

1 unit; 1 時間に1 nmolの基質の変換を触媒する酵素量とした。

3). タンパク量の定量： 標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いて、Lowryらの方法[42]で定量した。

実験結果

3酵素いずれもPLPを補酵素とするため、Table 4. にはPLPの有無による活性の変動を示した。KTaseのPLPに対する飽和度は低く、補酵素との結合が極めて弱い酵素で

Table 4. Enzyme activities related to tryptophan metabolism.

Values were expressed as specific activity (units/mg protein) in the absence or presence of PLP. KNase activity was assayed with OHKN or KN as a substrate. nd; not determined.

Enzyme \ Incubation (PLP in assay)	None -	None +	0.5mM Trp -	0.5mM Trp +	0.5mM KN -	0.5mM KN +	Km value (M)
Tryptophan transaminase	198	456	114	417	nd	nd	3.30×10^{-3}
Kynurenine transaminase	20.9	230	23.7	339	nd	nd	1.11×10^{-2}
Kynureninase (OHKN)	32.9	36.4	27.0	29.8	32.3	35.7	1.47×10^{-6}
(KN)	2.75	2.81	nd	2.63	nd	nd	1.84×10^{-4}

ある事がうかがえた。PLP添加時のTTase、KTaseの最大活性はKNaseに比べて著しく高く、TOHとKAの生成反応が圧倒的にkynureninaseフラックスを上回る流れであることを裏づけた。0.5 mM Trp添加時にはTTase活性は若干減少したが、KTase活性は、特にPLPの添加時に増加が認められた。KNase活性はTrp添加で減少傾向が認められたが、KNの添加では影響されなかった。TTaseならびにKTaseに対するKm値は精製酵素について報告された値[7,9]よりかなり高かった。KNaseのVmaxはKNよりもOHKNに対して10倍高く、しかもKm値は100倍も低く、圧倒的にOHKNの方が好い基質であることが明らかになった。このことは、前節（第二節）においてTrpまたはKNを前駆体とした場合、AAが検出されなかった事実を裏づけた。

第四節. 考察および小括

考察

Ahmad and Moatにより、酵母におけるTrp－NA生合成経路が初めて報告された[2]。彼らは放射性TrpのNAへの取り込みを明らかにし、好気的条件下でのみ本経路が作動することを示した。しかしながら、詳細な代謝経路ならびに代謝調節についてはいまだに動物肝と同様であろうとの推測の域をでていないのが現状と言える。Trp代謝フラックスを検討した結果、既に第一章で述べたように、kynureninaseフラックスへの流れは極めて細かった。動物肝においてタンパク合成以外にかなりの割合でkynureninaseフラックスを通りNAD合成ならびに完全酸化系へ代謝される[1]のとは著しい相違である。本章では、Trp以外の前駆体からのNA合成能について検討し、TrpとKNとの間にNA生成能の大きな差を認めた。酵母において、Trpを含む多くのアミノ酸はgeneral amino acid permease(GAP)系[43]を介して細胞内へ取り込まれる事が報告されている。KNもTrpに類似した一種のアミノ酸であり、同様の取り込み系の関与が考えられた。また、Shetty and Gaertnerは S. cerevisiaeにおいて、細胞外から与えられたTrpは窒素源としてのみ利用され、Trp分解速度が遅い事を報告した[9]。さらに、Neurospora crassaでは細胞外から与えられたTrpは細胞内で合成されたTrpと異なる

作用を示すことを報告した[44]。Saccharomyces属において、vacuoleは細胞のhomeostasis維持のために機能している事が報告されている[45]。また、最小培地で増殖した酵母のTrpプールは非常に低く、Alaのそれに比べ1/1000近いレベルであると言われている[16,17]。これらの報告から、細胞内に取り込まれたTrpはvacuoleに存在することが予想される。NA生成の前駆体としてのTrpとKNの細胞内分布については明らかでないが、少なくとも細胞内への取り込みにおいてはNA生成の大きな違いの原因となる様な差は認められなかった。むしろTrpの細胞内への取り込みの方が速かった。このように、TrpとKNの間に反応律速段階の存在することが示されたためTrpの代わりにKNを用いてそのフラックスを検討し、Trp－NA系の生合成について手掛かりを得た。KNは圧倒的に2-H遊離反応により代謝されるもののkynureninaseを通る流れはTrpからの流れの10倍近くであった。KNからkynureninaseを通って代謝された中間体は主にOHAAとNAであったが、OHAAは細胞外へほとんど排泄された。一方、量的には低いもののKNレベルの上昇により細胞内OHKNは上昇し、その結果NA生成が上昇したと思われる。またAcetyl-CoAフラックスは存在するとしても検出限界以下であり、酵母ではTrpはほとんど完全酸化されないと結論された。この経路についてはこれまで定量的報告が行われたことがない。一方、KAならびにXAの生成は認められたものの、動物における代謝物として知られているキナルジン酸[46]へは代謝されず、酵母においてはこれらが最終代謝産物であることが明らかとなった。またNeurospora[47]やPseudomonas[48]でも報告されているAAは全く検出されなかった。この点については S. cerevisiaeで精製されたkynureninaseがKNよりもむしろOHKNに高い親和性をもつと報告[9]されており、今回 S. uvarumにおいても同様の結果が得られたことから裏づけられた。結局、酵母におけるTrp代謝は、動物肝に近い代謝様相を示すものの、部分的には明らかな相違が認められた。

小括

[1] NA生成能においてTrpとKNの間に著しい差が認められ、この差は菌体内への取り込みよりむしろTrp－KN段階に関与する酵素の反応律速性によることが示された。

[2] KN代謝をフラックスならびに代謝物測定の両面から解析した。2-H遊離反応による代謝が圧倒的に多く、KAとわずかなXAを生成した。kynureninaseフラックスはTrpが前駆体の場合に比べて著しく増大し、OHAA、総NA、QAならびにOHKNの順に生成の増加が認められた。Acetyl-CoAフラックスへの流れは全く検出されず、キナルジン酸ならびにAAの生成も認められなかった。フラックス測定の結果はさらに酵素の諸性質によっても裏づけられた。

[3] KN代謝物の細胞内分布を検討したところ、KA、XAならびにOHAAはほとんど菌体外へ排泄されていたのに対し、OHKNは細胞内に蓄積しておりNAの増加との関連性が示唆された。

第三章.　酵母におけるトリプトファン－ナイアシン系の調節に関する検討

Trp-NA経路の最初の段階を触媒するtryptophan 2,3-dioxygenase(tryptophan pyrrolase; TDO)[EC 1.13.11.11]は種々の生物において異なる様式で調節されている。Neurosporaでは、最終産物であるNADPHによりfeedback[29] あるいは repression[28] により阻害を受け、Xanthomonas pruni では初発の3酵素がTrpにより協同的に誘導され[30]、しかもTDO は、還元型 pyridine nucleotides によりfeedback阻害をうけることが報告されている[31]。またラット肝ではTDO はNADPHによりfeedback 阻害を受ける[32]とともにTrpで活性化[33]あるいは安定化[34]を受ける。しかし、酵母においては本酵素活性は現在までのところ検出されていない。酵母ではNADは通気状態に依存して2つの異なる経路で合成され、酸素が律速酵素とされているL-kynurenine 3-hydroxylase(KNOHase)[EC 1.14.13.9]の調節因子の一つであると報告されてきた[3]。ところが前章の結果から、酵母において初発酵素も何らかの調節をうけている可能性が示された。このように酵母におけるTrp-NA経路およびその調節については完全に明らかにされているとは言えない。第一章ならびに第二章では Trp－NA系が極めて細い流れであること、またKNからの流れはTrpからのそれに比べて増大することを示した。しかし KNからの代謝物はNA合成の中間体よりむしろ圧倒的にKAである。このような事実はTrp－KNの段階あるいはKN代謝の初期段階が全体的な流れを制限していることを示している。Trp－NA系の鍵酵素が他の生物でも同様の位置にあることを考えれば、酵母においてこの段階を詳しく検討することは意味深いと考えられる。

第一節.　長時間培養によるナイアシン生合成能の変動

1.　培地成分の消費とナイアシン生合成能の関連性

本節では長期培養時の培地成分の消費とNA生合成の関連性について検討をおこなった。

実験方法

1). 培養方法： S培地に添加物を加え30℃で好気的に培養し、経時的にサンプリングして基質および代謝物の定量を行った。

2). 菌体増殖の測定: 第二章と同様。

3). グルコースおよびTrpの定量： 培養液は、0.5N $HClO_4$で抽出後中和し、Bergmeyer and Bernt[49]およびDenckla and Deweyの方法[14]により定量した。

4). 総NA量の定量： 培養液は60%EtOHで抽出し、定量は第二章と同様。

5). TOHの定量： 培養液は酸性下酢酸エチルで抽出後、定量は第一章と同様。

6). Trp代謝フラックスの定量： 放射性Trp(L-[methylene^{14}C]Trpならびに L-[side chain 2,3-^{3}H]Trp)を用いて、第一章と同様、kynureninaseフラックスならびに2-H遊離フラックスを求めた。

実験結果

Fig.13.にはTrpの主代謝物であるTOHならびにNAの生成とグルコースならびにTrpの消費を平行して時間経過を追って検討した結果を示している。0.5mM Trp添加の有無は増殖にほとんど影響しなかった。培地に添加したグルコースおよびTrpは速やかに消費され、Trp添加時にはTOHの生成が認められ、Trpがすべて消費しつくされると、TOHの生成は頭打ちになった。一方、NA生成はTrp添加で増加し、グルコースおよびTrpがほとんど消費しつくされた頃から急速に増加した。Trp無添加時にも同様の傾向が認められた。この事実は、グルコースはNA生成に対して抑制的に働いており、培地中のグルコースが消費し尽くされて初めて中間代謝物からNAへと変換されることを示しており、Trp－NA系の初発段階がグルコースによるcatabolite repressionを受けることが暗示された。

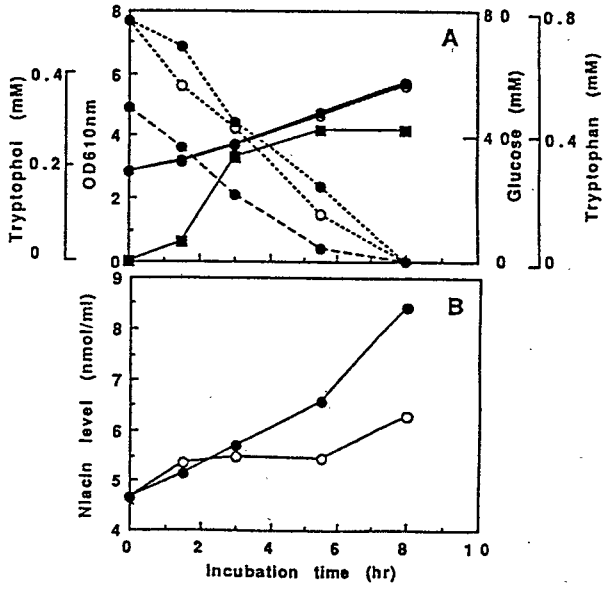


Fig. 13. Time course of niacin- or tryptophol- production and glucose- or tryptophan- consumption.

Cells were incubated in the absence (○) or in the presence of 0.5 mM Trp (●). A: —●—, —○—, growth (O.D.610nm); —■—, TOH; ---●---, ---○---, glucose; --●--, Trp. B: —●—, —○—, niacin level.

2. 長期培養時における前駆体のナイアシン合成におよぼす影響

第二章で明らかにしたように、短時間培養でNA生成能を比較すると、前駆体として添加したTrpあるいはKNの間には著しい差が認められた。本項では長時間培養時の前駆体の添加効果を検討した。

実験結果

Fig. 14. は総NA生成量の増加と細胞増殖との関連性を示している。前駆体がTrpの場合、培養初期には緩やかにNA生成が増加し、添加したTrpのほとんどが消費しつくされてから急速に増加した。一方、KNからのNA生成は培養初期から認められ、Trpよりも有意に高く、促進効果にはほとんど遅延が認められなかった。KNはTDOによって触媒

される段階をスキップするためTrpとの間にNA生成能の差が生じたと考えられる。以上の結果は、KNからのNA合成ではグルコースによる抑制がTrpに比べて弱く、TDO が catabolite repression の第一の標的となる事が示唆された。

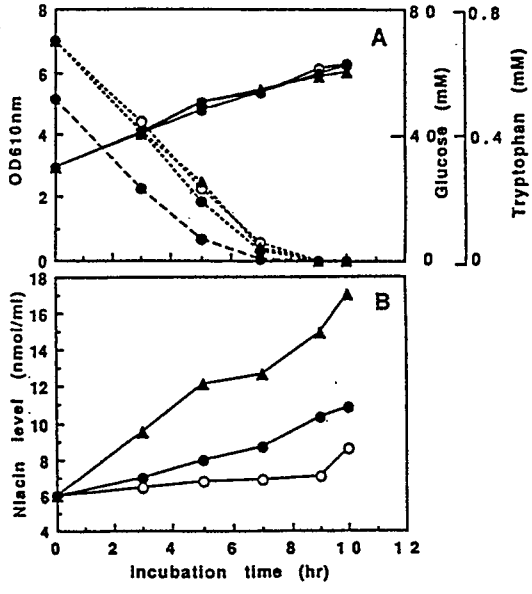


Fig. 14. The effect of exogenous tryptophan or kynurenine on niacin level.

Cells were incubated in the absence (○) or in the presence of 0.5 mM tryptophan (●) or kynurenine (▲). A: growth(O.D.610nm) (-●-○-), glucose (-●-○-), tryptophan (--●--); B: niacin.

第二節. 外来性ヘミンのトリプトファン－ナイアシン系におよぼす影響

酵母ではグルコースによりミトコンドリアの生成ならびにクエン酸回路の酵素がcatabolite repressionを受け[50]、外来性ヘミンはこれを解除する事が報告[51]されている。前節では、長期培養による検討からTrp－NA代謝はcatabolite repressionを受けることが暗示された。そこで、本節では外来性ヘミン添加による影響を検討した。

1．　外来性ヘミンとナイアシン合成

本項では、外来性ヘミンのNA生成におよぼす効果ならびにその濃度依存性、さらにヘム合成の阻害剤であるレブリン酸[52]のNAレベルに対する影響について検討し、ヘムとNA生合成の関連性について検討した。

実験方法

1)．　培養方法：　ヘミン(Sigma, bovine, type 1)はNaOHで溶解後、HClで弱塩基性にした後培養系にレブリン酸（ナカライテスク)とともに添加し、前節と同様に培養した。経時的に増殖を測定し、冷60%EtOHによりNA抽出を行った。

2)．　増殖ならびにNAの定量：　前節と同様。

実験結果

Fig. 15. は、0.5mM Trp添加時を対照として、2.5μg/mlのヘミン添加の影響を検討

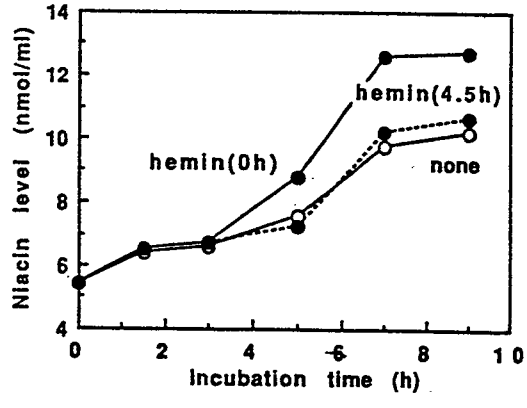


Fig. 15. The effect of exogenous hemin on niacin level.

Cells were incubated in the presence of 0.5 mM tryptophan without (—○—) or with hemin (2.5 μg/ml) added at 0 h (—●—) or 4.5 h (···●···).

した結果である。培養初期からヘミンを添加した場合、5時間目以降、NAレベルの有意な増加が認められた。しかしrepressionが解除されかけた、培養開始4.5時間後に、ヘミンを添加した場合にはほとんど効果は認められなかった。ヘミンの添加効果にlag timeが認められることは、NA合成に関与する蛋白の合成あるいはミトコンドリアの会合(assembly)[53]に時間がかかるためと考えられる。また、Fig. 16. には、NAレベルと増殖に対するヘミンのdose responseを調べた結果を示している。無添加に比べ、高濃度(50μg/ml)のヘミン添加では増殖に対して若干の促進効果が認められるが、NAレベルに対してより顕著な促進効果が認められ、外来性ヘミンとNAとの密接な関連性が示唆された。さらにヘム合成の鍵酵素であるδ-aminolevulinate dehydratase(E.C 4.2.1.24)の拮抗阻害剤として知られるレブリン酸の増殖とNAレベルに対する効果を検討した。その結果、高濃度(53μM以上) のレブリン酸の添加で増殖およびNAレベルともほとんど完全に抑制されたのに対し、低濃度(26μM以下)ではNA生成により選択的に抑制が認められた。この事実は、外来性ヘミンと同様、内在性のヘムとNA生成には関連性があることを示唆するものである。

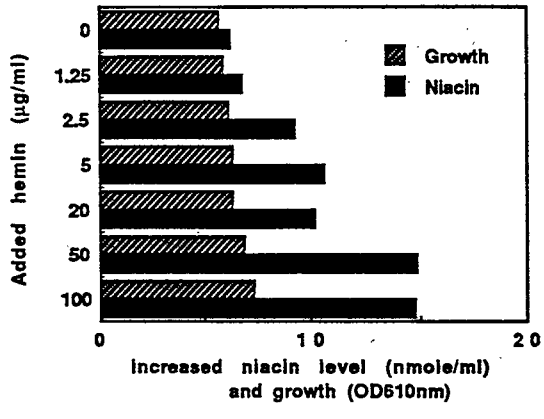


Fig. 16. The effects of increasing amounts of hemin on niacin level and cell growth.

Cells were incubated for 6.5 h in the presence of 0.5 mM tryptophan with various concentrations of hemin. Niacin was expressed as a difference from the 0 h- value. Growth (O.D.610nm) and niacin level (nmol/ml) at 0 h were 2.5 and 5.0, respectively.

2. 外来性ヘミンによるミトコンドリア機能の促進

酵母ではcatabolite repressionによりミトコンドリア機能が抑制されること[54]、またヘム合成酵素活性の低下によりヘム含有酵素レベルが低下することが報告[55]されている。そこで酸素消費、ミトコンドリアに局在する酵素の活性ならびにヘム含有酵素の活性がヘミン添加培養時にどのように変化するかについて検討した。

実験方法

1). 培養方法： 第一節と同様、0.5mM Trpの存在下または非存在下において0.5μg/mlのヘミンを添加して6時間培養後集菌した細胞を用いた。対照にはヘミン無添加で同様に培養したものを用いた。

2). 増殖の測定： 第二章と同様。

3). 酸素消費速度ならびに菌体量の測定： 培養液3mlを遠心分離(2,000rpm,5min)し、菌体を蒸留水500μlに再懸濁して、その一部を希釈して濁度法により菌体量(mg dry cells/ml)を測定した。また、懸濁液50μlを用いて、グルコース(36mM)を含むリン酸緩衝液(0.1M,pH7.4)1.95ml中で酸素電極法[56](Clark型電極YS15331、Gilson社製)により酸素消費速度(O_2 nmol/min/mg dry cells:30 ℃)を測定した。溶存酸素量は、PMSを用いるRobinson and Cooperの方法[57]により定量した。

4). 酵素の抽出と活性測定： 集菌した菌体（60ml 培養液分）はリン酸緩衝液(0.1M,pH7.5)で洗浄後、同緩衝液3.5mlに懸濁して3.5g glass beadsと共に第二章と同様に超音波破砕後、遠心分離（15,000xg,20min)で得られた上清を粗酵素液として活性測定に供した。

lactate dehydrogenase(LDH; EC 1.1.2.3)活性はMorton and Shepleyの方法[58]、catalase(EC 1.11.1.6)活性はRoggenkampらの方法[59]により分光法(Hitachi U-3200)により定量した。1 unitは、1分間に基質1 μmolの変換を触媒するのに必要な酵素量とした。

5). タンパク量の定量： 第二章と同様。

実験結果

Table 5. に外来性ヘミンの添加によるミトコンドリア機能促進の結果を示している。NA前駆体としてのTrpの添加如何にかかわらず、細胞の酸素消費には約20%の促進が認められ、呼吸活性の増進が示された。また酵母のミトコンドリア(inter mitochondria space)に局在し、ミトコンドリア成熟の好指標となるLDH(L-Lactate ferricyanide reductase, cytochrome b_2)[60]活性には51~29%の促進効果が認められた。さらに、マイクロボディーに局在し、ヘム酵素として知られるcatalase[61]活性には51~32%の促進が認められ、ヘム合成が促進されたことがうかがえた。ヘミンのこのような効果はin vitroでは認められないため酵素系に対する直接作用ではなく、むしろグルコースによるミトコンドリア合成抑制の解除に基づく機能亢進の結果と考えられる。

Table 5. Effect of exogenous hemin on mitochondrial functions and heme-requiring enzyme

Cells were incubated for 6h in the presence or absence of 0.5mM tryptophan with or without 0.5μg/ml of hemin.

Addition / Substrate	None		Tryptophan	
Hemin	-	+	-	+
O2 uptake (O2 nmole/min/mg dry cells)	39.4	47.4	39.5	47.0
Lactate dehydrogenase (EC 1.1.2.3) (U/mg protein)	46.9	71.0	51.5	66.5
Catalase (EC 1.11.1.6) (mU/mg protein)	9.40	14.2	11.2	14.8

3. 外来性ヘミンとトリプトファン代謝フラックス

これまでNA生成に対するヘミンの効果を検討し、その結果、NA生成とglucose repressionとの相関性が示唆された。さらにglucose repression の解除により酵母

のミトコンドリア機能が増進する事も認められた。酵母のNA生成にミトコンドリアが関与していることは知られており、ミトコンドリア成熟とヘム合成は平行して進行すると考えられる。そこで、本項では、外来性ヘミンがNA合成に対して作用する段階をさらに詳しく検討するためフラックスの定量を行った。

実験方法

1). 培養方法: 第一章と同様、閉鎖系で反応した。すなわち10 mlのマイヤー中900μlの培養系でヘミン(5 μg/ml)の存在下または非存在下においてO_2置換して培養し、4時間あるいは6時間後の各Trp代謝フラックスを定量した。また、同様の系を用いて増殖測定ならびにNA定量を行った。

2). 増殖ならびにNAの定量: 第一章と同様。

3). 各Trp代謝フラックスの定量: 第一章と同様。

実験結果

Fig. 17. は培養後4時間目ならびに6時間目におけるTrp各代謝フラックスを示している。 catabolite repressionがかかった状態の4時間目の時点では、培養系に添加したヘミンの効果はほとんど認められず、増殖ならびにNA生成はヘミン無添加群とほとんど変化がない。タンパク画分ならびにtransaminaseフラックスへの流れはわずかに増加していた。一方、6時間後においてはNAレベルにはヘミンの添加で35%の増加が認められ、それと対応してkynureninaseフラックスの増加が同程度認められた。他のフラックスは4時間目と変化が認められず、ヘミンの効果はcatabolite repressionの解除と平行してkynureninaseフラックスに特異的であった。以上のように、前項で述べたヘミンのNA生成に対する効果がkynureninaseフラックスに至る段階に対する促進であることが明らかになった。さらに、フラックスの増加割合が、NA量の増加割合と同程度であることを考え合わせると、この段階が主原因と考えられた。ヘミンがkynureninaseフラックスに至るどの段階に関与するかは明白ではない。しかしながら、前項で明らかにしたようにヘミンがミトコンドリア成熟に関与していることを考え合

わせれば、Trp－NA系で唯一ミトコンドリアに局在するL kynurenine 3 hydroxylase [62] あるいは、他の起源でヘム酵素として知られるTDOが最も影響を受けやすいと考えられ、これらの酵素活性がヘミンの添加により変動していることが十分考えられた。

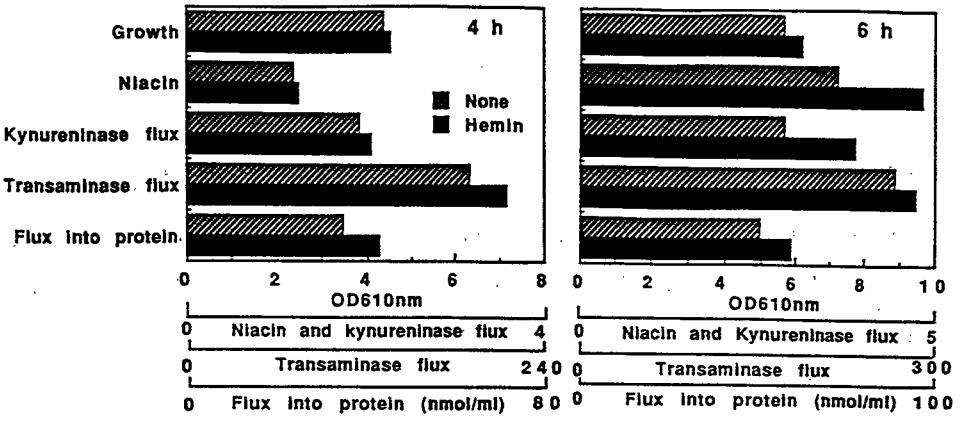


Fig. 17. The effects of exogenous hemin on the metabolic fluxes of tryptophan and niacin level.

Cells (1.9 mg dry wt) were incubated in the presence of tryptophan (0.5 mM) and hemin (5 μg/ml) in a final volume of 0.9 ml in a 10 ml flask capped with a rubber stopper under an atmosphere of O2 at 30° C. After 4 or 6 h, growth (O.D.610nm at 0 h; 2.8) and metabolic fluxes (nmol/ml) [kynureninase flux; 2-H liberation flux; flux into protein] were determined.

第三節　トリプトファンのインドール環開裂活性の存在と性質

Trpのインドール環を開裂し、分子状酸素を導入する反応を触媒する代表的な酵素は、動物肝で報告されているtryptophan 2,3-dioxygenase(tryptophan pyrrolase: TDO ; EC 1:13:11:11)[63]である。D-Trpや他のインドール化合物にも作用し、肝以外の臓器に広く分布するindoleamine-2,3-dioxygenase(IDO)も報告[64,65]されている。また動植物に存在し、ペプチド性のTrpにも作用するpeptidyl tryptophan 2,3-dioxygenase(pyrrolooxygenase: pTDO ;EC 1:13:11:26)の報告[66]もある。さらに、Trpは光酸化によって非酵素的に開裂しやすいとも言われる[67]。酵母では、Trp－NA系の存在が報告されているものの、初発段階を触媒する酵素活性は検出されていない。

前節では、酵母におけるTrp代謝においてインドール環が開裂する初発段階はKNOHaseで触媒される段階とともに、NAへの全体的な流れを決定する重要な位置を占めることが示唆された。そこで本節では酵母におけるTrpのインドール環を開裂する触媒活性の検出とその性質について検討した。

1．　トリプトファンのインドール環開裂活性の存在

微量活性の検出が可能な放射性Trpを用いる方法を利用してcofactorを種々検討し、インドール環開裂活性の検出とその諸性質について検討した。

実験方法

1). 菌体の培養ならびに粗酵素液の調製：　YPG培地で増殖させた菌体を10mM pH7.3 potassium phosphate bufferで洗浄後、1 mM Trpを含む同bufferに懸濁し、glass beadsとともにDyno-Mill(3,000rpm、2 minx3回)を用いて破砕し、105,000 xg、60 min 遠心上清を透析あるいはSephadex G 25処置を行い調製した。

2). 活性測定方法：　Peterkofskyによる原法[68]を改変して用いた。

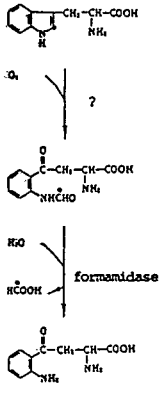
3). 活性画分の部分精製：　粗酵素抽出液を4℃, 16 時間 透析(20 mM pH7.3 potassium phosphate buffer)後、遠心分離で不溶物を除去し、同bufferで倍希釈し、DEAE-cellulose column chromatography(1.2x32.5 cm, 20 mM potassium phosphate buffer)を行った。非吸着ならびに0.35 M NaCl溶出画分はそれぞれSephadex G-100 column chromatography(2.1x49.5cm)を行い、rechromatograpyの後、部分精製標品とした。性質の検討には本調製物を使用した。

実験結果

①．トリプトファンのインドール環開裂活性(TCE)の測定

還元剤(Na dithionite)、formamidase(ラット肝より部分精製) ならびにmethemoglobin存在下に、L-［ring-2-^{14}C］Trpを基質として反応させ、生成した

^{14}HCOOHを陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分離し、放射能を計測することにより活性を測定した。なお、非酵素的な分解を補正するため、酵素液の代わりに蒸留水を添加して同様に反応したものをblankとした。詳細な測定方法はFg. 18. に示した。本法により、活性と酵素量(タンパク量0. 2mgまで)、反応時間(1~3時間) との間に比例関係が認められた。反応は3時間行った。



Reaction mixture (250 µl)

L-(ring-2-^{14}C)Trp (40,000 dpm)	0.25	µmol
K phosphate buffer (pH 7.2)	12.5	µmol
Na dithionite	0.75	µmol
Methemoglobin	100	µg
Formamidase (rat liver)	5	munit
Enzyme (ref: water)		

↓

Incubation at 37°C with shaking (130 rev/min)

↓

Addition of 250 µl of 10 % TCA

↓

Dowex 50Wx8 (H+), 200~400 mesh, φ 5x25 mm

↓

Washed with 1 ml of water

↓

Eluate (^{14}C-HCOOH) —— radioactivity determ.

Fig. 18. The assay method of tryptophan - cleaving enzyme (TCE) activity.

Table. 6. Requirement of factors for crude enzyme activity

Test mixture	Relative act. (%)
Complete	100
− Na ditionite	0
− Methemoglobin	63
− Formamidase	100
+ Boiled enzyme	0

Enzyme : Extract of cells grown on YPG medium ; 105,000 x g sup.
Boiled enzyme : 95°C, 1 min.

②. cofactorの要求性

Table 6. から明らかなように、酵素活性は95℃、1 min処理により完全に失活し、熱に不安定であった。さらに、還元剤は活性発現に必須であることが明らかになった。粗酵素の段階ではformamidaseは全く必要ではなく、methemoglobinの添加効果も少なかった。

③. 分子種の異なる活性画分の存在

インドール環開裂活性を有する画分はFig. 19. に示すように、酸性域に等電点をもち分子量の大きな活性分子種 (I) とDEAE-celluloseに非吸着性の弱塩基性で分子量が小さい画分 (II) の存在が明らかになった。これらの画分の推定分子量は、ゲル濾過の結果、63, 000(I)および30, 500(II)であった。

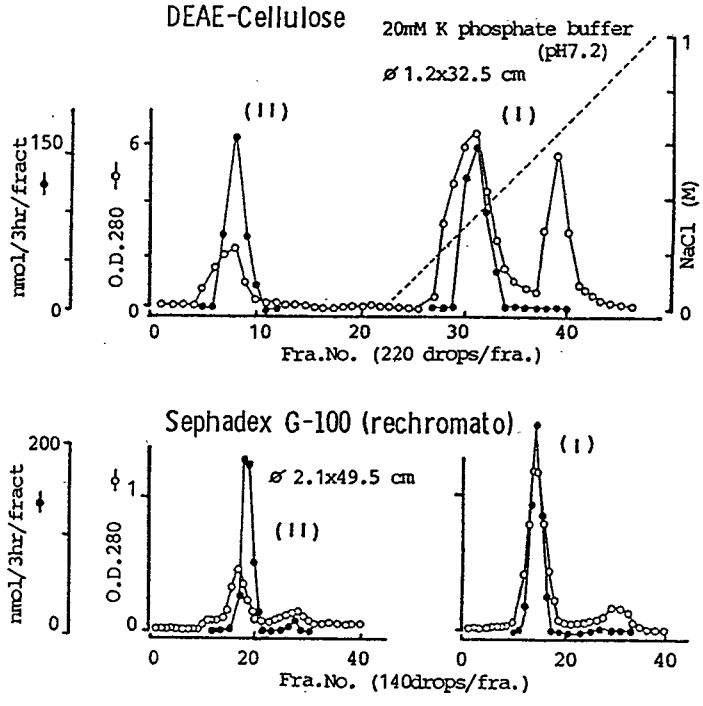


Fig. 19. Chromatograms of enzymes on DEAE-cellulose and Sephadex G-100 columns.

2. トリプトファンのインドール環開裂活性の細胞内分布

TDOならびにIDOは細胞質に存在することが知られている。ところでトリプトファンのインドール環開裂活性の酵母における細胞内分布を検討する場合、酵母は堅固な細胞壁[69]に覆われているため、細胞顆粒を傷つけないように穏やかに分画することは困難である。そこで機械的処理方法と酵素的処理方法を平行して行い、指標酵素活性の分布から本酵素(TCE)の細胞内分布を解析した。

実験方法

1). 細胞の酵素処理と分画： 酵母細胞は、A buffer(0.8 M sorbitol, 50 mM pH7.2, 1 mM tryptophan, 20 mM β-mercaptoethanol)で洗浄後再懸濁し、Zymolyase-5000 (キリンビール)で 30℃, 2 hr 濁度 (A_{800nm})が80 %近く低下するまで消化させ、

2,500xg、10 min遠心分離後の上清をさらに20,000xg,20min遠心分離した。上清(沈澱画分はP2)はさらに105,000xg,60min遠心分離し、沈澱画分(P3)と上清(Sup)に分離した。

2). 超音波破砕処理と分画： 酵母細胞は、B buffer(0.65 M sorbitol,50 mM pH7.2 phosphate buffer,1 mM tryptophan)で洗浄後再懸濁し、glass beadsと共に超音波破砕し、1)と同様に分画調製した。

3). 分子種の確認： 蛋白約10mg相当量をSephacryl S-200 column chromatography (20 mM pH7.2 phosphate buffer,1.2x48.5cm,40 drops/fract)によって分析した。

4). 指標酵素活性の測定：
Cytochrome c oxidase(Cyt.ox.),Perlman and Mahler[70]； Malate dehydrogenase(MDH),Bergmeyerら[71]； Catalase,第二節と同様; Monoamine oxidase,Taborらの方法[72]に従った。 1 unit;1μmole/min at 30℃
蛋白量の測定;第二章と同様。

5). 蔗糖密度勾配遠心： Fukui and Tanaka の方法[73]に従った。すなわち 1)で得られたP2画分は2回B bufferで洗浄後、C buffer(20% sucrose,10 mM EDTA,10 mM KCl,50 mM pH7.2 phosphate buffer)に穏やかに懸濁し、蔗糖密度勾配層に重層し、40,000rpm,70min,バーチカルロータで遠心後、定流ペリスタポンプを使用して空気を送り込みながら下層から分画した。

実験結果

Zymolyase処理(E処理) ならびに超音波破砕(S処理)細胞におけるTrp環開裂活性(TCE)の分布を指標酵素の分布と比較した結果をTable 7.に示した。E処理細胞においてP2に65%、supに30%の活性分布が認められMDHと類似していた。Cyt.ox.活性は90%がP2に存在した。一方、S処理細胞では、P3に40%,supに60%の活性が認められ、P2の損傷と酵素のsupへの遊離がみられたが、cyt.ox.は85%がP3に保持されており、酵素の膜への結合の強さに相違が認められた。さらにこれらの活性の分子種を検討したところ、Fig.20.に示すようにS処理細胞のsupには3分子種の存在が確認され、voidに溶出さ

Table 7. Cellular distribution of TCE derived from sonicated or Zymolyase-treated yeast cells.

Treat.	Fraction \ Enzyme	TCE Sp.act. (mU/mg p.)	TCE Total act. (mU)	TCE (%)	Cytochrome c oxidase Sp.act. (U/mg p.)	Cytochrome c oxidase Total act. (U)	Cytochrome c oxidase (%)	Malate dehydrogenase Sp.act. (U/mg p.)	Malate dehydrogenase Total act. (U)	Malate dehydrogenase (%)
E	P2 none	0.13	2.37		0.76	15.6	94.5	1.81	37.0	
	sonic.	0.23	4.23	63.8	0.52	8.93		4.24	73.2	55.0
	sonic. Triton	0.27	5.00		–	–		–	–	
	P3	0.02	0.32	4.8	0.06	0.89	5.4	0.52	7.95	6.0
	Sup	0.03	2.08	31.4	0	0	0	0.66	52.0	39.0
S	P2 none	0.02	0.06		0.43	1.30	5.5	0.32	0.97	
	sonic.	0.07	0.21	4.6	0.09	0.33		0.50	1.77	1.6
	sonic. Triton	0.07	0.21		–	–		–	–	
	P3	0.09	1.73	37.6	1.05	19.8	84.3	1.42	26.7	24.7
	Sup	0.09	2.66	57.8	0.08	2.35	10.0	2.53	79.2	73.3

E: Zymolyase-treatment, S: Ultrasonic-treatment

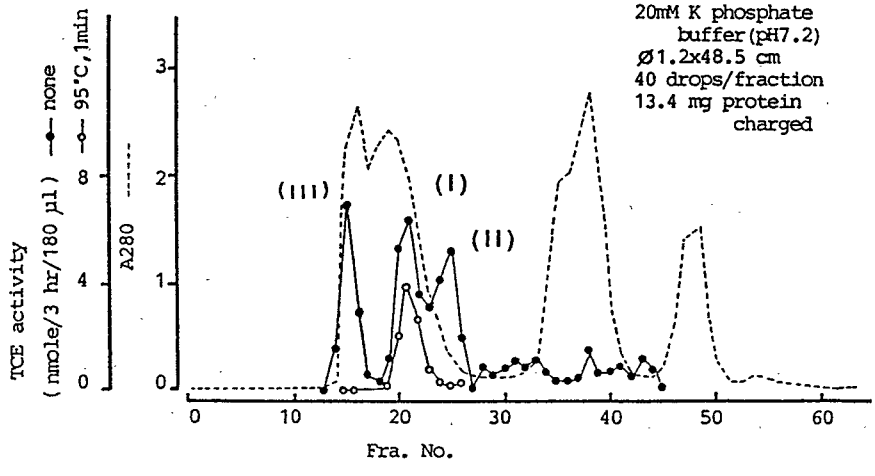


Fig. 20. Sephacryl S-200 column chromatogram of TCE derived from sonicated cells.

れるⅢと順次Ⅰ、Ⅱが溶出された。E処理細胞から得られたP2の超音波上清には、ⅢとⅠが存在し、これら2種はミトコンドリアに局在する可能性が高い。またⅡはおそらく原形質に存在すると考えられる。ⅠおよびⅡは分子量の類似性から、前項で示した(Ⅰ)および(Ⅱ)に相当するものであると考えられる。分画したミトコンドリアにはcatalase、D-アミノ酸酸化酵素等の局在が知られているマイクロボディ－[61]の混入が考えられる。しかしながら、蔗糖密度勾配遠心分画の結果、本活性の大部分はミトコンドリアに局在していた。また熱処理（95℃, 1 min)後の残存活性を検討したところ、ⅢおよびⅡは、完全に活性が消失したのに対し、Ⅰは比較的安定であり、約60%の活性が残存していた。ⅢはⅡと同様、熱に不安定であり、細胞抽出液では検出される量は少ない事から、活性Ⅱが膜に結合しているかあるいは凝集したものではないかと想定された。また多分子種の存在が抽出時におけるartifactである可能性を検討するため蛋白分解酵素の阻害剤の添加効果を検討したが影響は認められず、インドール環開裂活性 TCEⅠおよびⅡの存在が明らかになった。

3.　トリプトファンのインドール環開裂活性の諸性質

①.　安定性

活性分画過程で、TCEⅠはⅡに比べ熱安定性が高い事が示された。ここでは熱、蛋白分解酵素に対する安定性を検討した。Trypsin処理で双方とも活性が21.4%(TCE Ⅰ)と12.4%(TCE Ⅱ）に低下し活性の本体が蛋白であることが明らかになった。熱処理では95℃、1 minで57.0%(TCE Ⅰ）と1.3%(TCE Ⅱ）、60℃、3minで77.4%(TCE）と21.2%(TCEⅡ）に活性が低下したが、Ⅰの方が熱安定性は高かった。

②.　電子供与系の影響

本酵素活性の発現には還元剤が必須であるため、種々の還元剤の効果を検討した(Table 8.)。その結果、Na dithionite以外の還元剤はほとんど効果が認められなかった。TCEⅠではglutathioneが、TCEⅡではascorbate + methyleneblueがやや有効であった。さらにTCEⅠではFADの著しい促進効果が認められた。

Table 8. Effects of electron donor systems on the enzyme activities.

Reducing systems	Conc. (mM)		Conc. (μM)	Relative activity (%) (I)	(II)
None				0	0
Na dithionite	3	FAD	0	100	100
			1	152	101
			100	478	102
Ascorbate	30	FAD	0	8	1
			100	3	4
		Methyleneblue	100	32	58
NADPH system (G6P, G6PDH, NADP)		FAD	100	29	0
		Methyleneblue	30	3	0
β−Mercaptoethanol	5			0	11
Dithiothreitol	5			15	20
Glutathione	5			86	14

None : Omit Na dithionite from complete system.

Table 9. Effect of tryptophan metabolites on the enzyme activities.

Compound	Conc. (mM)	Inhibition (%) (I)	(II)
D-Tryptophan	2	60	67
Tryptophol	1	38	15
Kynurenine	1	4	0
Kynurenate	1	21	0
Nicotinamide	1	12	0
Niacin	1	7	0
NAD^+	1.5	0	7
$NADP^+$	1.5	0	5
NADH	1.5	88	71
	0.15	51	51
	0.015	0	0
NADPH	1.5	89	77
	0.15	57	55
	0.015	0	1

③. トリプトファン代謝物の影響

ラット肝ならびにXanthomonasのTDOはTrpの最終産物で調節を受けることが報告されている[31, 32]。TCE活性に対するTrp代謝物の影響を検討した結果、Table 9.に示すように還元型のpyridine nucleotidesで強い阻害を受けることが明らかになった。D-Trp以外の他の主な最終産物はほとんど効果を示さなかった。

④. superoxide dismutase(SOD)の影響

IDOは、TDOと異なり、活性発現にsuperoxide anion(O_2^-)が必須であり、SODで活性は阻害されると報告されている[74]。TCE IおよびIIに対する効果を検討したところ、TCE Iは75%、TCE IIでは40%の阻害が認められ、O_2^-の関与が示唆された。

⑤. 諸性質の既知酵素との比較

本節で得られたTCE IおよびIIの諸性質を既知のTDO、IDO、pTDOならびに光酸化と比較した(Table 10.)。分子量的には、TDOと全く異なり、IDOに近い大きさを示したが、多分子種を示し、oligomerの可能性がある点でpTDOと類似していた[66]。さらに還元剤としてNa dithioniteが最も有効であった点もpTDOと類似している[66]。しかしながら、酵母における還元剤については現在のところ不明である。反応にO_2^-が関わって

Table 10. Comparison of enzymes cleaving indole ring of tryptophan

	molecular weight	cofactor	inhibitor
TDO	167,000(rat liver)	hematin+ ascorbate	NADPH(rat liver)
IDO	41,500(small intestine)	methyleneblue+ ascorbate	Trp SOD(50%)
pTDO	25,50,100,150kDa oligomers(wheat germ)	Na-dithionite	EDTA NaCN
photo oxidation		riboflavin+ ascorbate methylene blue	NaN_3 EDTA
TCE I	63,000	Na-dithionite FAD	SOD(75%) NaN_3 EDTA
II	30,500	Na-dithionite	SOD(40%) NADPH

いる点でTDOと異なっている。さらに、TCE I はFADで強く活性化されることから光酸化と非常に類似した反応特性を持つ可能性が示された。以上の結果から、TCE I およびIIはTDOよりもむしろIDOあるいはpTDO型の酵素であると考えられるが、還元型のpyridine nucleotidesで阻害される点ではTDOとも類似していた[32]。

第四節　考察および小括

考察

酵母のTrp－NA生合成経路の調節に関する報告は現在のところほとんどない。唯一の報告はL-kynurenine 3-hydroxylaseに関するものであり、好気的な状態の時に限ってミトコンドリアの成熟と連動して外膜に局在する活性が上昇し、Trp－NA経路が作動することから本酵素の律速性が指摘されてきた[3]。

本章では長期培養実験結果から、NA生合成はglucose repressionを受けていること、しかもKNからのNA生成は、Trpが前駆体の場合に比べて影響が少ない事から、Trp－KN段階が repression の標的であることが示唆された。ところで、大腸菌でcatabolite repressionに関与することが知られている cyclic AMP(cAMP)[75]は、酵母ではグルコース添加でむしろ上昇し、catabolite repressionとは無関係と言われている[76,77]。

従って、酵母におけるcatabolite repressionの機構については現在ほとんど不明の状態である。酵母をグルコースで増殖させた場合、ミトコンドリアの呼吸鎖酵素活性は低レベルに抑制されていることが知られている[78]。また S. cerevisiaeにおいて、細胞外に与えたヘミンはミトコンドリアの機能を促進することによりglucose repressionを解除することが報告されている[51]。本章においても外来性のヘミンのNA合成におよぼす影響を検討した結果、catabolite repressionの状態に添加したヘミンは、lagがあるものの、NA合成に対して明らかに促進効果を示し、repressionが解除されかけた時期に添加してもほとんど効果が認められなかった事から、NA生成に対するcatabolite repressionの関与が間接的に示された。さらに内在性のヘム合成を阻害することにより、低濃度で選択的にNAレベルの抑制が認められた事から、外来性ヘミンと同様、内在性のヘムとNA合成の密接な関連性が示唆された。さらにヘミン添

加時にはミトコンドリア機能の増進が明らかに認められた。動物肝のTDOは分子状酸素を基質とし、補欠分子族としてプロトヘムIXを必要とする[79]。本酵母におけるTrp環開裂活性にもヘムの効果が認められた（第三節）。したがって、ヘミンによりcatabolite repressionが解除され、ヘム合成が促進された結果、Trp環開裂活性が増加したと考えられる。活性が低く測定が不可能であったKNOHaseも恐らく活性が増加していることが予想された。これら2段階での促進の可能性は明らかであるが、単独あるいは協同的いづれとも結論づけることは現時点では困難である。これらの段階での影響は、Trp代謝フラックスからも裏づけられ、ヘミン添加時のNA生成の増加の主原因がkynureninaseフラックスの増加に由来することが明らかにされた。

インドール環開裂活性(TCE)IおよびIIの存在を明らかにしたが、細胞内分布も異なり、in vivoにおいてNA合成に実際関わっているかどうかは不明である。しかしながら、分子量的にも allosteric 酵素とは考え難いものの、還元型 pyridine nucleotides によって阻害を受けるといった点はTDOと類似しており[32]、TCEがNA生合成に重要な意味合いをもつことが暗示された。

小括

[1] 酵母のNA合成において、Trp→KN段階が標的となり、catabolite derepressionによりNA合成が促進された。derepression作用をもつ外来性のヘミンはNAを増加させた。

[2] 外来性ヘミンは、内在性ヘムと同様、NA合成を促進し、NA合成とヘムの関連性を示した。

[3] 外来性ヘミンはミトコンドリア機能を促進し、Trp環開裂活性あるいはKNOHase活性の上昇により、kynureninaseフラックスを増加させ、その結果NA合成の増加を引き起こしたことが示唆された。

[4] Trpのインドール環開裂活性IおよびIIを検出し、既知酵素と比較考察した。分

子量、分子種の多様性、還元剤ならびにO_2^-の関与から、IODならびにpTOD型の酵素と考えられたが、TODと同様、還元型pyridine nucleotidesによる阻害を受け、NA合成との関連性を暗示した。

第四章　ロイシンによるペラグラ惹起説のモデルとしての酵母トリプトファン－ナイアシン系利用の試み

ヒトのナイアシン(NA)欠乏症として知られるペラグラの発症の一原因としてロイシン(Leu)が報告されている。Gopalan and Srikantiaは、jowar(Sorghum vulgare)やトウモロコシを主食とする人々の間にペラグラが多発することから、これら主食に共通してみられる高Leu含量が主原因であると提唱した[4]。以来、約30年にわたって論争が続けられているが研究のほとんどが代謝物の尿中排泄量の変動から考察[80,81]されてきたため、再現性に問題が残る。またNA代謝の指標としてNADを取り上げ、Leuによるラット肝NADレベルの低下を示す報告がいくつかあるが、その機作についての統一した見解は得られていない[80-85]。

ところで、動物における代謝を考えるとき、吸収、排泄、代謝の臓器分担等、単細胞生物では見られない複雑な因子を考慮に入れなければならないのは当然であるが、一方で、細胞あるいは酵素レベルで考察することも必要である。動物肝と同様のTrp－NA系を有する酵母は、NA合成に対するLeuの影響を単純化した酵素系で検討するためのモデル系として有用な示唆を与え得ると考えられる。また、NA合成系に関しては、生物種による調節の多様性が報告されており、比較生化学的な面からも興味がもたれる。以上の観点から、酵母のTrp－NA系に及ぼすLeuの影響について検討した。なお、ペラグラを誘発する主食におけるLeu/Trp比は約30であるとの報告結果[4]も考慮に入れ、比較的高濃度のLeuの影響を検討した。また、それらの効果がLeuに特異的かどうか他のアミノ酸でも検討した。さらに、ラット肝細胞のNADレベルを低下させたLeu代謝物の律速酵素に対する影響についても検討し、酵母およびラット肝で比較考察した。

第一節　ロイシンのナイアシン生成におよぼす影響

1．短時間培養時におけるロイシンの影響

Trp－NA経路におよぼすLeuの影響について、Trpの酸不溶性画分への取り込みと平

行してkynureninaseフラックス、NAの生成を測定することにより検討した。またLeu以外のアミノ酸の共存の影響についても検討した。

実験方法

1). Trp代謝フラックスの定量： S培地(0.05 mM L-[methylene^{14}C]Trp)で3時間培養し、第一章と同様にTrp代謝フラックス(酸不溶性画分への取り込みならびにkynureninaseフラックス)を測定した。種々のアミノ酸は終濃度 1 mMとなるよう添加した。

2). Trp代謝物の定量： S培地(0.5 mM Trp)で3 時間培養後の60%EtOH抽出濃縮液は、第一章の方法で直接HPLC分析してKAならびにTOHを定量した。KNは第二章の方法でDowex 1x8を使用して前処理後HPLC分析した。Trp定量は第一章と同様。種々のアミノ酸は終濃度 5 mMとなるよう添加した。

3). Trp代謝酵素活性に対する各種アミノ酸の影響: 第二章の方法で抽出し、TTase、KTase、KNase活性を測定した。各反応系へのアミノ酸の添加は10 mMとした。

実験結果

Fig.21.に示すようにTrp代謝フラックスは全Trp代謝、酸不溶性画分への取り込み、Ala 遊離反応のいずれもLeu濃度依存的に抑制された。一方、Trp代謝物についてはFig.22.から明らかなように、Leuの添加によりTOHならびにKAの蓄積は抑制されたのに対しKNは有意に増加した。これらの事実は、Trpの取り込み抑制以外に、KA生成の抑制、あるいは、KN以降のNA生成反応に対するLeuの抑制効果を暗示した。

Leu以外のアミノ酸としてIle、Ala、Asp、Met、Pheの共存の影響を調べたところ、Ile、Met、PheでLeu同様Trpの取り込みを抑制し、同時にTOHの生成抑制が認められた。特にLeuの抑制効果が強くまたKNの蓄積はMetを除くほとんどのアミノ酸、特にPheの添加で増加した。Trp代謝の各フラックスも取り込みとほぼ同程度に抑制された。従って、取り込み抑制が第一義的であるとしても、KN以降の他の段階への影響が示唆された。

そこでTrp、KN代謝の分岐点に位置する酵素としてTTase、KTase、KNaseを選び各種

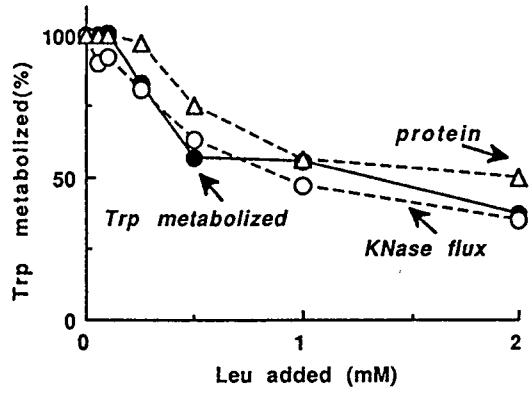


Fig. 21. Effect of leucine on tryptophan metabolism.

Cells were incubated at 30°C for 2 hrs in the presence of 0.05mM tryptophan(L-[methylene-^{14}C]Trp) with various concentration of leucine.

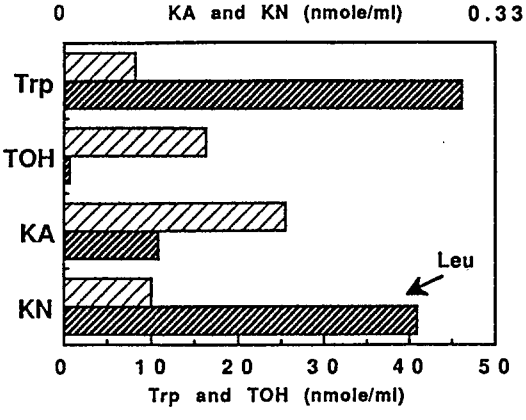


Fig. 22. The effect of leucine on tryptophan metabolites.

Cells were incubated with 0.05mM tryptophan in the absence or presence of 1mM leucine at 30°C for 3 hrs. Tryptophan metabolites were extracted from broth and assayed.

アミノ酸の in vitro 添加効果を検討した。KNase活性はAsp以外のすべてのアミノ酸で強く抑制され、TTase活性はLeuならびにPheで、KTaseはLeu、Pheで抑制された。

以上、Trpの細胞内への取り込みならびにTrp代謝酵素活性は酸性アミノ酸以外の種々のアミノ酸により強く抑制されたが、短時間の培養実験のため、取り込み抑制の影響が大きく、代謝フラックスに対する影響は明白ではなかった。

2. 長時間培養時におけるロイシンの影響

前項でLeuはTrpの細胞内取り込みを強く抑制するため短時間培養の実験では代謝に対する影響は明白でないことを示した。本項では長期培養によるNA関連物質の生成に対するLeuの影響と前駆体効果について検討した。

実験方法

1). 培養方法： S 培地を含む試験管ならびにコルベンで30℃、110 oscillations/minで好気的に培養した。

2). 総NAの抽出ならびに定量: 培養液を1 N H_2SO_4、120℃、30min処理後、中和した抽出液を用いて、第二章と同様に行った。

3). NA関連物質の抽出ならびに定量: 培養液から70%EtOH、85℃、5min 抽出濃縮液をPPC(Toyo No.51, n-buthanol-water-25%ammonia=110:19:1、上昇法) で分離し、各NA関連物質の画分を 2)の方法(酸度滴定法)で定量した。

4). NAD(H)およびNADP(H): 酸化型ならびに還元型はKlingenbergの方法[86]により、それぞれ$HClO_4$ならびにalcoholic KOHで抽出し、サイクリング法[87]で定量した。

5). TrpおよびLeuの細胞内取り込みの測定： 各時間毎に培養液をsamplingし、遠心分離上清を0.5 M $HClO_4$で処理し、上清をKOHで中和しアミノ酸分析(Toyo JCL-6AH, JOEL Ltd.)を行った。また、取り込まれたTrpは添加量から上清に残存している量を差し引くことによって細胞単位量当たりの値として求めた。

6). KICの抽出ならびに定量: 経時的にsamplingした培養液ならびに培養上清 4 ml

に90% TCA 0.5mlを添加して、0 ℃ 30 min 抽出後、遠心分離上清を定量に供した。KICの定量は、Ichihara and Koyamaの方法[88]に準じた。すなわち、Tris-ketoglutarate buffer(0.02M α-ketoglutarate, 0.2M Tris-HCl(pH8.6))1 ml、TCA 抽出液（標準KIC)2 ml、dinitrophenylhydrazine溶液1 mlを混和後、室温10min 放置し、cyclohexane 5mlで抽出した。有機層4mlをさらに10% Na_2CO_3 1.5mlで抽出した後、Na_2CO_3層1ml に1N NaOH 2mlを添加して、5~20分後に440nmで吸光度を測定した。

実験結果

Fig. 23. から明らかなように、0.5 mM Trpの添加で48時間培養後の総NAは約2倍に増加したが、Leuの同時添加により対照レベルまで抑制した。Trp添加時の総NA増加に対する各成分の寄与は、主としてnicotinamide nucleotides(2倍)とNA(14倍)によるものであり、Leuの共存によりNAは低下した。対数増殖期にはnicotinamide nucleotidesはほとんど菌体内に存在したが、定常期には、菌体外へ放出された。一方、NAにおいてはTrp添加で増加した分はほとんど菌体外へ対数増殖期からすでに放出された。Trp添

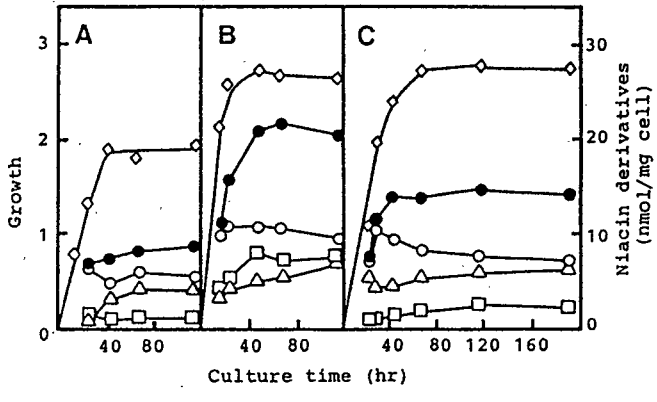


Fig. 23. The changes in the concentration of total niacin and niacin derivatives accumulated in the culture broth.

(A) basal medium, (B) tryptophan added medium, (C) tryptophan and leucine added medium. ◇, growth (A_{610}); ●, total niacin; ○, niacinamide nucleotides; △, niacinamide; □, niacin.

加時にはnicotinamide nucleotidesの内、総NADは約50%増加し増加分は酸化型に依存しており、総NADP量は有意に減少した。以上の結果から、酵母におけるNAの生成は極めて狭い範囲で調節されていることがうかがえた。すなわちTrp添加時においてもnicotinamide nucleotidesの細胞内レベルの増加は2 倍程度であり、増加分はほとんどNAへと代謝され、しかも大部分菌体外へ放出された。Leuによる総NA生成の抑制がTrpの細胞内への取り込み抑制によるものか否かを検討した結果をFig. 24. に示した。

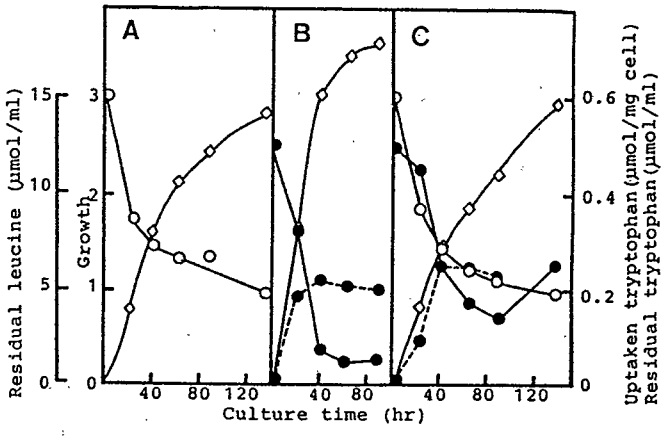


Fig. 24. Cellular uptake of tryptophan and leucine from the medium.

(A) leucine- supplemented medium, (B) tryptophan-supplemented medium, (C) tryptophan- and leucine-supplemented medium. ◇, growth (A_{610}); ○, residual leucine; ●—●, residual tryptophan; ●---●, incorporated tryptophan.

Trpの取り込みは対数増殖期の初期にはすみやかに行われるが、対数増殖期の後期には取り込みはほとんど認められなかった。Leu添加により増殖の遅延が認められた事から、細胞mg当たりのTrpの取り込みについてLeuの影響を比較検討したところ、Leuの影響はほとんど認められなかった。LeuによるTrpの取り込み以外の作用部位に関してヒントを得るため、前駆体としてKNならびにOHAAを用いて実験を行い、Trpの結果と比較した。その結果(Fig. 25.)、KNが前駆体の場合LeuによるNA生成(nmol/mg dry cells)は抑制されたが、細胞内への取り込みは初期に若干の抑制が認められたものの、対数増殖期中期以後はほとんど差がなく、これらの結果はTrpの場合と同様であった。一方、前駆体としてOHAAを用いた場合Leuの影響は認められず、むしろ総NA生成は増加した。これらの事実は、LeuがTrpの細胞内への取り込み以外にkynureninaseフラック

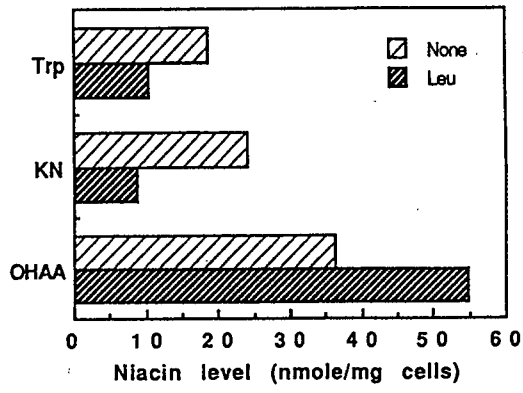


Fig. 25. Effects of leucine on the production of niacin from various precursors.

Cells were incubated at 30°C for 48hrs and total niacin was extracted from the culture broth. Niacin level of no addition was 10.1 nmole/mg dry cells.

スあるいはそれ以前の段階にも影響を持つ事を示唆している。Leuの添加によってひきおこされるNA生成の抑制が、直接Leuによるものかあるいは代謝物に起因するものかを明らかにするため、Leuの代謝について検討した。Fig. 26. から明らかなように、Leuはすみやかにに代謝され、その大部分は菌体外に放出された。

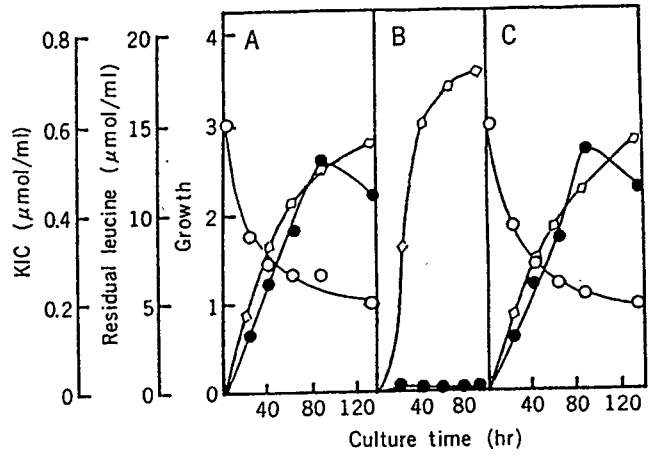


Fig. 26. Disappearance of leucine and appearance of KIC in the culture filtrate.

(A) leucine-supplemented medium, (B) tryptophan-supplemented medium, (C) tryptophan-and leucine-supplemented medium. ◇ ,growth (A610); ○ ,residual leucine; ● ,KIC formed.

第二節　酵母およびラット肝 L-キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼ活性に対するロイシン関連物質の影響

前節において、TrpからのNA合成は、Leuの添加で抑制されることを示した。また前駆体を用いた実験からKN－OHAAの段階へのLeuの関与が示された。そこで、酵母のTrp－NA系の律速酵素とされる L-kynurenine 3-hydroxylase (KNOHase)活性に対するLeu関連物質の影響を検討するため、酵素の部分精製を行った。本酵素がミトコンドリア(Mt)外膜に局在することは既に報告[62]されているが、活性は極めて低く、酵母における本酵素の精製報告はない。さらに、ラット肝のKNOHaseに対する影響も検討し、酵母で認められた現象が動物起源の酵素でも起こり得るかを考察した。

1．　酵母 L キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼの部分精製と性質

実験方法

1). ミトコンドリアの調製：　30℃、通気量 7.5 l/min で YPG培地を含むjar fermentor中20時間培養し、集菌洗浄後、菌体を-20℃凍結保存した。菌体はpH7.5, 10mM mercaptoethanol存在下にZymolyase-5000(Kirin Brewery)でプロトプラスト化した。1.3M sorbitol, 0.1mM EDTAを含む10mM pH 7.5 Tris-HCl buffer中でhomogenizeし、2,500xg 5min遠心分離後の上清を20,000xg 30min 遠心分離してミトコンドリアを調製した。

2). ミトコンドリア外膜の調製：　Okamoto and Hayaishi の方法[89]を用いてdigitonin (半井化学)処理し、希釈懸濁液を12,000xg 12 min遠心分離処理して得られた沈澱画分に含まれる内膜およびマトリックスを除去後、105,000xg、90 min遠心分離して調製した。

3). 酵素の可溶化と部分精製：　外膜をmannitolに懸濁し、1% digitonin 溶液(20 μM FAD, 5 mM DTTを含む）を添加し、氷浴中で3時間撹拌して可溶化させた。105,000xg 90min遠心上清を透析膜（三光純薬）につめ、polyethylene glycol 20,000(和光純薬)粉末で、4℃、5 時間濃縮後、Sephadex G-200 カラムクロマ

トグラフィー(1.2x42 cm, 50 mM pH8.0 Tris-HCl buffer containing 20 μM FAD 5mM DTT)を行った。タンパク量は、280nm の吸収で、digitonin量は フェノール硫酸法[90]にて定量した。

4). KNOHase活性の測定： Schottらの方法[3]に準じた。1 ml の反応系に、L-KN 1μmol, NADPH 0.5 μmol, KCN 10 μmol, PCMB 40 μmol, pH8.0 Tris-HCl buffer 100 μmolと酵素を加えて30℃で振盪しながら反応した。0.2 M $K_3Fe(CN)_6$(in 1 M pH 6.8 phosphate buffer)0.5 mlの添加で反応停止させ、生成したxanthomatineと過剰のferricyanide はascorbic acid で還元し、dehydroxanthomatineを1.5 mlの butanol-HClで、素早く抽出し、有機溶媒層の吸収を492 nmで測定した。1 unit:30℃、1 min間に、1 nmol の3-hydroxykynurenineの生成を触媒する酵素量。タンパク定量は第二章と同様。

実験結果

Mt含量の高い細胞を得るため、YPG培地で最大通気条件で得られた対数増殖期後半の細胞を、酵素処理にてプロトプラスト化し、得られたMt画分からさらにジギトニンで外膜を分画し、可溶化して部分精製酵素を得た。

① 酵素の安定性

種々のpHの緩衝液（100 mM)に懸濁させたMt状態の活性の安定性（30℃、2 時間）を検討したところ、pH 5~10の範囲内で緩衝液組成に無関係に90%以上の安定性が認められたので、処理pHを8.0に設定した。外膜状態では、-20℃で少なくとも15日間安定であったのに対し、可溶化酵素は、-20℃、20 時間で約20%にまで活性は減少した。安定化剤を検討した結果、FADならびにDTTに効果が認められた。比較的高い安定化効果は5 mM DTT + 20 μM FAD に認められたが、可溶化前の活性の66%であった。

② 酵素の部分精製

Mt外膜からdigitoninで可溶化後、Sephadex G-200カラムクロマトグラフィーを行い、主たる不純タンパクならびに可溶化剤と分離し、比較的、比活性の高い画分を分

取（部分精製酵素）したが、安定性は極めて悪く、Table 11. に示すように、比活性の上昇はほとんど認められなかった。

Table 11. Purification of L-kynurenine 3-hydroxylase from S.uvarum.

Fraction	Total protein (mg)	L-Kynurenine 3-hydroxylase	
		Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg protein)
Mitochondria	6,250	12,700	2.0
Outer membrane	877	2,180	2.5
Solubilized Enz.	400	1,690	4.2
Sephadex G-200 (Fraction III)	48	193	4.0

Table 12. Effect of various compounds on partially purified L-kynurenine 3-hydroxylase.

Compound added	Conc. (mM)	L-Kynurenine 3-hydroxylase	
		Specific activity (unit/mg protein)	Relative activity (%)
None	—	2.53	100
L-Leucine	20	2.88	114
L-Isoleucine	20	2.94	116
L-Valine	20	3.03	120
α-Ketoisocaproate	17.0	0.326	12.9
DL-α-Keto-β-methyl-n-valerate	28.8	0.021	0.8
α-Ketoisovalerate	15.5	0.029	1.2
Acetoacetate	20	2.19	86.6
α-Ketoglutarate	20	0.041	1.6
Pyruvate	20	0.049	1.9

③ 酵素活性に対するロイシン関連物質の影響

酵素標品としてMtならびに部分精製酵素を使用し、Leu関連物質の影響を検討した。Table 12. に示すように、Leuを始めとする分岐鎖アミノ酸は全く阻害効果を示さなかったが、それらのケト酸は強い阻害を示した。また、他のケト酸は、Mt酵素に対してほとんど阻害しないか、弱い阻害にとどまっていたのに対し、部分精製酵素に対しては、分岐鎖アミノ酸と同程度阻害した。acetoacetic acidはあまり阻害しなかった。pyruvic acid(Pyr)ならびにα ketoglutaric acid(αKG)は、インタクトなMtでは、

pyruvate dehydrogenase ならびに TCA回路の酵素によりすばやく代謝されてしまうために、阻害効果が認められなかったと考えられる。阻害様式ならびに阻害定数を検討したところ、KICは非拮抗阻害[Ki:4.2mM(KN),8.3mM(NADPH)]、またPyr ならびにαKG は混合型阻害を示した。

以上の結果から明らかにされた酵母のKNOHaseの性質と、前節で明らかにされたKICの蓄積結果とを考え合わせ、Leu添加時のNA生成抑制の一因として、KNOHase活性に対するKICの阻害が示された。

2. ラット肝 L-キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼの部分精製と性質

実験方法

1). 動物： 雄性、SD系ラット、400g体重 (Charles River)、固形食(MF,オリエンタル酵母)自由摂取

2). 肝Mtの分画： 断頭し、すばやく摘出したラット2匹分の肝を9倍量の0.25M sucroseでhomogenateし、Hogeboomの方法[91]でMtを調製した。さらに、外膜の調製はOkamotoらの方法[92]に準じた。すなわち Mt(300mg protein,0.25M sucrose)6 mlに3倍量の冷2%digitonin(0.25M sucrose)溶液を添加し、20min、0℃で撹拌処理後、冷0.25Msucrose30mlで希釈した(unfractionated,digitonized)。9,500xg 10 min 遠心分離(9,500xg ppt)後、上清とfluffy層は40,000xg 10min遠心分離(40,000xg ppt、褐色pellet)した。上清はさらに105,000xg 90min遠心分離して、赤褐色pellet(105,000xg ppt)と上清(105,000xg sup)を分離した。

3). 酵素活性の測定：

KNOHase; 若干変法し、前項に準じた。すなわち1 mlの反応系に、0.2μmol KN,0.4μmol NADPH,10μmol KCl,100μmol potassium phosphate buffer(pH8.0),適当量の酵素を加え、24℃で振盪しながら反応した。

monoamine oxidaseおよびMDHは第三章、タンパク量は第二章の方法と同様。

実験結果

① ミトコンドリアの分画と酵素の局在

KNOHaseは、Table 13. に示す様に、63%(分画活性の70%)の活性が105,000xg pelletに認められ、分画前の比活性に比べ、約15倍に上昇した。また、外膜の指標酵素であるmonoamine oxidaseは、同画分に45%(分画活性の57%)の活性が認められ、ほぼ同程度の挙動を示したが、後者の方が、当画分における回収が若干悪く、膜結合性の差異によると考えられた。またmatrixの指標酵素であるMDHは94%の活性が9,500xg pptに存在し、他の画分への移行はほとんど認められなかった。以上の事実から、本分画法は極めて有効で、外膜を高純度で分画する事が出来た。また、酵素は可溶化しない限り、かなり安定であった。

Table 13. Intramitochondrial distribution of L-kynurenine 3-hydroxylase.

Fraction	Protein		Kynurenine 3-hydroxylase		Monoamine oxidase		Malate dehydrogenase	
	(mg)	(%)	Sp. act.[a]	Total act. (%)	Sp. act.[a]	Total act. (%)	Sp. act.[b]	Total act. (%)
Unfractionated (Digitonized)	297	100	1.24	100	5.37	100	1.01	100
9,500×*g* ppt	234	79	0.18	12	1.19	17	1.21	94
40,000×*g* ppt	13.4	4.5	2.87	11	12.0	10	0.12	1.1
105,000×*g* ppt	12.5	4.2	18.7	63	57.6	45	0.14	0.6
105,000×*g* sup	36.4	12	0.46	4.5	3.05	7.0	0.31	3.8
Recovery		100		90		80		100

[a] Nanomoles of product formed per min per mg protein. [b] Picomoles of product formed per min per mg protein.

② 酵素活性に及ぼすロイシン関連物質の影響

酵素として、105,000xg pelletのMt外膜(0.05mg protein)を使用し、Leu関連物質の酵素活性におよぼす影響を検討したところ(Table 14.)、分岐鎖アミノ酸ならびにそのケト酸は20 mM濃度においても抑制を示さなかった。PyrやαKGによる阻害も全く認められず、酵母L-キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼとの間に明らかな差異が認められた。

Table 14. Effect of branched chain amino acids and various ketoacids on L-kynurenine 3-hydroxylase from rat liver.

Compound added	Conc. (mM)	L-Kynurenine 3-hydroxylase	
		Specific activity[a] (unit/mg protein)	Relative activity (%)
None	—	18.0	100
L-Leucine	10	20.5	114
	20	16.5	91.7
L-Isoleucine	10	16.2	90.0
	20	15.7	87.2
L-Valine	10	19.6	109
	20	16.4	91.1
α-Ketoisocaproate	4.5	21.5	119
	9	20.7	115
	18	13.8	76.7
DL-α-Keto-β-methyl-*n*-valerate	9	17.7	98.3
	18	22.6	126
	36	13.1	72.8
α-Ketoisovalerate	4.5	19.1	106
	9	20.7	115
	18	13.1	72.8
α-Ketoglutarate	5	19.6	109
	10	16.9	93.9
	20	17.6	97.8
Pyruvate	5	19.1	106
	10	21.4	119
	20	15.9	88.3
Oxaloacetate	10	21.2	118
	20	19.8	110
Acetoacetate	5	19.3	107
	10	18.4	102
	20	13.6	75.6

[a] Nanomoles of product formed per min per mg protein.

第三節　考察および小括

考察

ペラグラのモデル実験の一つとして、ラット肝NADレベルを指標としてLeuの影響を検討した報告例は多い。飼料中に過剰に存在するLeuによって肝ニコチンアミドヌクレオチドの有意な低下がおこるが、この原因として、Lojkinはアミノ酸インバランスによる血中、組織中Trpレベルの低下を[82]、Magboul and BenderはLeuによるkynureninase阻害を[80]、さらにSakakibaraらはLeuによるTrpの腸管吸収阻害を[83]その主原因であると報告した。また、YamadaらはLeuの過剰投与時に認められるケトン体レベルの上昇がTrpのみならずNAからのNAD合成を抑制することが原因であると報

告した[85]。これらの報告を分析してみると、Trpの他種アミノ酸との競合あるいはTrp－NA代謝酵素へのLeu等の直接の影響に集約される。

好気的に培養した酵母では、前章からも明らかなようにTrpから動物肝と類似の代謝経路でNAを合成する。調節に関しては依然として明白でない点が多いものの、単純化したモデル系としての条件は備えていると言える。

酵母によるNA合成に対してLeuは明らかな阻害を示し、短時間培養ではTrpの細胞内への取り込みが強く抑制された。Ile, Met, Pheでも同様の作用が認められた。TrpとLeuは異質のアミノ酸であるが、大過剰に存在するLeuはTrpの取り込みを明らかに抑制した。酵母におけるアミノ酸輸送の制御機構として、nitrogen catabolite repression が知られている。アンモニアが存在する限り、アミノ酸を窒素源として利用するうえで重要な役割を果たす GAP(general amino acid permease)系は抑制される[43]。この系は塩基性アミノ酸およびプロリンを除く中性アミノ酸に低い特異性をもち、特異性の高い輸送系と区別される[93]。さらに、アミノ酸の細胞内濃度の上昇に伴い、輸送能が急激に減少する feedback 阻害[94]、また、構造的に類似していない別のアミノ酸プールによるtransinhibition[95]をうけるなど複雑である。従って、TrpならびにLeuがどの系によって取り込まれ、どの機構で抑制されたかを考察することは困難である。しかも、酵母では細胞内のアミノ酸プールとして液胞(vacuole)[45]が知られており、この器官への能動輸送の問題もある。第一章で明らかにしたように、Trpの主たる代謝経路はタンパク合成である。従って、優先的にGAP系で取り込まれるために強い競り合いが、あるいはtransinhibitionにより阻害が認められたとも考えられる。しかしながら、第一章で明らかにしたように酵母におけるNA生成に関与する kynureninaseフラックス の最大活性は対数増殖期の中期に認められることから、初期に認められる取り込み抑制が最終的なNA生成のレベル低下を引き起こした可能性は排除出来ない。LeuによるNA合成の抑制効果の程度が対照レベル以下に抑制されなかった事からも可能性が示唆される。Sakakibaraらは、腸切片を用いた実験から、TrpがL系を介して取り込まれ、同様の系で取り込まれるLeu、Ile, Val, Met, Pheで強く抑制されることを示した[83]。しかしながら、PheやMetの過剰食ではNADの低下が認められない点、肝タンパクへのTrpの取り込みがLeuの同時投与で影響されない点からUmezawaらはこの腸管吸収抑制説をむしろ否定している[96]。動物では、腸管吸収部

位に密度差がある点、Leuは肝以外特に骨格筋でアミノ基転移を受けた後、血流を介して肝に運ばれて代謝される[97]といった特殊性から、酵母との相違が生じたことは当然とも考えられる。また、本章では、Leuの過剰添加によって 酵母のTrp－NA 系の代謝抑制が起こることも示唆された。前駆体効果ならびに酵素系に対するLeuおよびその代謝物の影響から明らかにしたように、KN－OHAAの段階を触媒する KNOHase ならびに KNase活性抑制が、NA合成低下の一因と考えられる。また酵母ではLeuの代謝物であるKICで KNOHase活性が抑制されたが、ラット肝酵素では認められず、両酵素の相違点が明らかになった。

小括

[1] 酵母では、多量のLeuはTrpの細胞内への取り込みを強く抑制した。同様の効果は、Ile、Met、Pheでも認められたが、Aspでは認められなかった。取り込み抑制の結果、すべてのTrp代謝フラックスが抑制された。長期培養では、これらの抑制効果が認められなかった。

[2] 酵母では、多量のLeu添加により、NA生成ならびにTOHとKA生成は抑制されたが、KNレベルは増大しており、LeuはTrpの取り込み抑制以外にTrp代謝系へも影響を及ぼした。

[3] LeuによるNA生成抑制は、TrpならびにKNが前駆体の場合にのみ認められ、OHAAでは認められず、Leuの作用部位としてKN－OHAAの段階が示唆された。

[4] Leuは、in vitroで、KNase、KTase、TTase活性を強く抑制し、NA合成が抑制される可能性が示された。Ile、Pheでも類似の抑制効果が認められた。

[5] 酵母から初めて部分精製したKNOHaseに対して各種ケト酸が阻害作用を有することを見いだし、NA合成抑制の一因である可能性を指摘した。ラット肝酵素ではケト酸による阻害は認められず、酵母酵素との違いを明らかにした。

第五章　総括および結論

トリプトファンはタンパク合成の素材並びにエネルーギー源としてのみならず、多岐にわたる代謝を受け、数々の重要な生理活性物質へと変換される。酵母におけるトリプトファン代謝の全体的な流れを定量的に解析した報告はない。また、生理的に重要なNAD合成への流れならびにその調節に関する報告[2,3]は限られており、動物肝[24]ほど明らかにされていない。本論文ではNAD生合成に重点をおいて酵母 Saccharomyces uvarumにおけるトリプトファン代謝の全体像を明らかにし、その調節の一端を明らかにした。さらに、S. uvarumをトリプトファン－ナイアシン経路のモデル系としてロイシンによるペラグラ惹起説[4]の検討を試み、ロイシンによるナイアシンレベル低下機序の解明ならびにラット肝との比較生化学的検討を行った。

1．　Saccharomyces uvarum におけるトリプトファン代謝の全体像

トリプトファン代謝の全体的な流れを考察する手段として、芳香族アミノ酸の特異性をうまく利用した簡便な Smith法[1]が酵母における代謝研究にも適用できることを明らかにした。本法を用いてトリプトファン代謝フラックスを定量的に解析した結果、フラックスの中心はタンパク合成であり、アミノ酸の基本的な役割の重要性が再認識された。さらに主代謝反応は2-H遊離に基づくtransaminase反応であり、代謝物の大部分は、トリプトホールに変換された。この事実は Kradolferらの報告[7]と一致したが、本論では定量的かつ化学的に明白に同定した。他の少量の代謝物として、キヌレン酸ならびにインドール酢酸を検出し、これら代謝物総量と2-H遊離反応を介する代謝フラックスの値はよく一致しており、使用した代謝フラックス定量法の妥当性が示された。また、中間体の添加実験から、Saccharomyces属におけるトリプトホールにいたるトリプトファン代謝経路の概略は、トリプトファン→インドールピルビン酸→インドール-3-アセトアルデヒド→トリプトホールであることを示唆した。トリプトホールへの反応は低濃度のトリプトファン添加では認められず、高濃度のトリプトファン添加で著しく増大した。一方、NAD合成に関わる kynureninase フラックスは極めて細い流れであり、両反応のトリプトファン濃度依存的な特性の違いを明らか

にした。さらに各トリプトファン代謝フラックス活性の増殖時期に依存した変動を明らかにした。

2. Saccharomyces uvarum におけるトリプトファンからのナイアシン生合成とその調節

Ahmad ら[2]により、好気的に培養した酵母では動物肝と同様トリプトファン－ナイアシン経路が存在することが報告された。しかしながら、詳細な代謝経路ならびに代謝調節に関してはいまだ推測の域を出ていない。第一章では、ナイアシン合成に関わる kynureninaseフラックスは他のトリプトファン代謝経路と比較して極めて細い流れであることを明らかにした。第二章では、トリプトファン以外の前駆体からのナイアシン合成能を検討し、トリプトファンとキヌレニンとの間にナイアシン合成能の大きな差を認めた。この差が基質の細胞内への取り込みの差異に基づくものではなく、むしろ代謝酵素の反応律速性に由来することを暗示した。放射性キヌレニンを使用して代謝フラックスならびに代謝物両面からキヌレニン以降の代謝を検討した結果、キヌレニン代謝フラックスの中心は圧倒的にtransaminase反応によるキヌレン酸生成であったが、kynureninaseを介するキヌレニンの代謝量はトリプトファンのそれの約10倍であった。この増加分は3－ヒドロキシアントラニル酸ならびにナイアシンの増加に依存していた。トリプトファン－ナイアシン経路中間体の細胞内外分布の測定結果から、3－ヒドロキシキヌレニンの細胞内レベルの増加がキヌレニンからのナイアシン合成をもたらしたと考えられる。Acetyl-CoA フラックスはほとんど検出されず、動物肝の完全酸化系への流れの太さ[1]との相違が明らかとなった。

酵母におけるナイアシン合成の調節酵素として、すでにSchott and Staudinger[3]によりL-kynurenine 3-hydroxylaseが報告されている。本酵素は酸素の存在で活性化されることから、酸素によるトリプトファン－ナイアシン合成系作動の調節の鍵をにぎることが示唆されている。しかしながら、好気的条件下における律速段階であるかどうかは明らかではない。第二章では、トリプトファンからのナイアシン合成の律速段階として、トリプトファンからキヌレニンにいたる段階の可能性を示した。第三章では、ナイアシン生合成が catabolite repressionを受けていることを示し、

catabolite repression解除作用を持つ外来性のヘミン[51]の添加により明らかなナイアシン生成の増加を認めた。キヌレニンよりもむしろトリプトファンを前駆体とした場合にヘミンの効果は強く認められたことから、トリプトファンからキヌレニンにいたる段階が catabolite repression をうけることを示唆した。また、ヘミン添加によるミトコンドリア機能ならびにヘム合成の促進、さらに内在性ヘムの合成とナイアシン合成の関連性を示した。これらの事実はミトコンドリアに局在するL-kynurenine 3−hydroxylase活性ならびにヘムを要求するトリプトファンのインドール環開裂活性がcatabolite repressionをうけている可能性を強く示唆し、外来性ヘミンによるナイアシン合成の促進が kynureninaseフラックスの増加に由来することからも裏づけられた。酵母におけるトリプトファンのインドール環開裂活性を初めて検出し、多分子種の存在を明らかにした。既知の酵素と比較してtryptophan 2,3-dioxygenase[32]とはかなり異なる性質を示すものの、還元型 pyridine nucleotidesで阻害される点は本酵素がナイアシン合成に重要な役割を持つ可能性を示した。

3. ロイシンによるペラグラ惹起説のモデルとしての酵母トリプトファン−ナイアシン系利用の試み

ペラグラ発症の一原因としてロイシンが報告[4]されている。複雑な動物代謝の解析には、細胞あるいは酵素レベルから考察することも必要と考えられる。トリプトファン−ナイアシン経路を有する単細胞生物として酵母を用いてロイシンのナイアシン合成系に及ぼす影響を比較生化学的に考察した。ロイシンは酵母細胞内へのトリプトファンの取り込みを強く抑制した。その結果、主代謝経路であるタンパク合成への流れをはじめとし、kynureninaseフラックスを含むトリプトファン代謝が添加ロイシン濃度に依存して強く抑制され、ナイアシン合成が抑制された。ロイシンと同様の作用はイソロイシン、メチオニンならびにフェニルアラニンでも認められたが、アスパラギン酸では認められなかった。さらにトリプトファン代謝物の面からナイアシン、トリプトホールならびにキヌレン酸の生成がより強く抑制されたが、キヌレニンレベルは増大し、取り込み抑制以外に代謝系への抑制が示唆され、酵素活性の検討からも裏づけられた。長期培養では、前駆体がトリプトファンならびにキヌレニンの場合にはロイシ

ンによるナイアシン合成抑制が認められるが 3-ヒドロキシアントラニル酸では認められないことから、キヌレニン－ 3-ヒドロキシアントラニル酸の段階をロイシンの作用点として想定した。Saccharomyces uvarum から初めて部分精製した L-kynurenine 3-hydroxylase活性に対して種々のケト酸が強い阻害作用を有することを見いだし、ロイシン添加時に生成される α-ketoisocaproate がナイアシン生合成抑制の一因である可能性を指摘した。ラット肝 L-kynurenine 3-hydroxylaseではケト酸による阻害は認められず、酵母酵素との相違を明らかにした。

以上、Saccharomyces uvarumにおけるトリプトファン代謝に関する研究を行い、以下の結論を得た。

【1】 Saccharomyces属酵母におけるトリプトファン代謝フラックスを定量的に解析し、タンパク合成への流れが中心的であり、高濃度のトリプトファン添加時には2-H遊離反応(transaminaseフラックス)が著しく増加するのに対し、Alanine遊離反応(kynureninaseフラックス)は極めて細い流れであることを明らかにした。2-H遊離反応による代謝物としてトリプトホールを同定し、代謝経路を明らかにするとともに、代謝フラックス測定と代謝物定量の両面から、主代謝物としての位置づけを明確にした。

【2】 キヌレニン代謝をフラックスならびに代謝物両面から解析し、2-H遊離反応によるキヌレン酸生成が圧倒的に太い流れであることを認めた。またトリプトファンに比べてkynureninaseフラックスが著しく増加しており、3-ヒドロキシキヌレニンならびにナイアシンの細胞内レベルが上昇していることから、トリプトファン－キヌレニンの過程がナイアシン合成における律速段階であることを明らかにした。

【3】 酵母のナイアシン合成は catabolite repressionを受けることを外来性ヘミンの効果から明らかにした。ヘミンによるderepressionによりミトコンドリア機能ならびにヘム合成が促進され、L-kynurenine 3-hydroxylaseならびにトリプトファンのインドール環開裂活性が増加することによりナイアシン生成を促進する可能

性を示した。さらに酵母におけるインドール環開裂酵素活性を初めて検出し、本酵素の諸性質を明らかにした。

【4】 S. uvarumにおいて多量のロイシンの添加はトリプトファンの細胞内への取り込みを抑制すると同時に キヌレニンレベルの上昇をひきおこした。さらに酵母から初めて部分精製したL-kynurenine 3-hydroxylaseに対する各種ケト酸の阻害を見いだし、またロイシンはS. uvarumにおいてすみやかにα-ケトイソカプロン酸に代謝されることから、ケト酸による L-kynurenine 3-hydroxylase阻害がナイアシン合成抑制の一因である可能性を指摘した。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始変わらぬ暖かい御指導と御鞭撻、更に本論文の御校閲を賜りました神戸学院大学薬学部 梅澤智佐江教授に心から感謝の意を表します。

また、本論文の作成にあたり、有益なる御指導、御助言ならびに御校閲を賜りました大阪大学薬学部 近藤雅臣教授に深く感謝致します。

さらに、本研究の遂行にあたり有益な御協力をいただきました神戸学院大学薬学部 新宮徹朗教授、終始にわたり有益な御助言とご指導をいただきました、神戸学院大学薬学部 紀氏健雄教授、佐野圭二助教授ならびに尾谷三枝子博士をはじめとする第八講座の皆様に心から御礼申し上げます。

最後になりましたが、有益な討論に参加して下さり、御協力いただきました大阪大学薬学部衛生化学講座の皆様に感謝致します。

引用文献

1) S. A. Smith, F. P. A. Carr, C. I. Pogson, Biochem. J., 192, 673 (1980).
2) F. Ahmad, A. G. Moat, J. Biol. Chem., 241, 775 (1966).
3) H. Schott, H. Staudinger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 1654 (1971).
4) C. Gopalan, S. G. Srikantia, Lancet, 1, 954 (1960).
5) F. Hagemann, Naturwissenschaften, 22, 626 (1965).
6) F. Lingens, W. Goebel, H. Uesseler, Eur. J. Biochem., 1, 363 (1967).
7) P. Kradolfer, P. Niederberger, R. Hütter, Arch. Microbiol., 133, 242 (1982).
8) F. Schindler, H. Zähner, Arch. Microbiol., 79, 187 (1971).
9) A. S. Shetty, F. H. Gaertner, J. Bacteriol., 113, 1127 (1973).
10) F. H. Gaertner, Acta. Vitaminol. Enzymol., 29, 332 (1975).
11) T. Noguchi, Y. Minatogawa, E. Okuno, M. Nakatani, M. Morimoto, R. Kido, Biochem. J., 151, 399 (1975).
12) W. D. Denckla, H. K. Dewey, J. Lab. Clin. Med., 69, 160 (1967).
13) A. H. Rose, W. J. Nickerson, J. Bacteriol., 72, 324 (1956).
14) R. J. Mans, G. D. Novelli, Arch. Biochem. Biophys., 94, 48 (1962).
15) G. Lacan, V. Magnus, S. Simaga, S. Iskric, P. J. Hall, Plant Physiol., 78, 447(1985)
16) P. A. Fantes, L. M. Roberts, R. Huetter, Arch. Microbiol., 107, 207 (1976).
17) F. Messenguy, D. Colin, J. Ten Have, Eur. J. Biochem., 108, 439 (1980).
18) H. H. Schott, U. Krause, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 360, 481 (1979).
19) C. Doy, J. Cooper, Biochim. Biophys. Acta., 127, 302 (1966).
20) B. T. Lingappa, M. Prasad, Y. Lingappa, Science, 163, 192 (1969).
21) K. C. Hazen, J. E. Cutler, Infect. Immun., 24, 661 (1979).
22) J. P. Rosassa, R. Juhl, P. Davis, Appl. Microbiol., 26, 98 (1973).
23) K.-W. Glombitza, T. Hartmann, Planta, 69, 135 (1966).
24) Y. Nishizuka, O. Hayaishi, J. Biol. Chem., 238, 3369 (1963).
25) C. W. Partridge, D. M. Bouner, C. Yanofsky, J. Biol. Chem., 194, 269 (1952).
26) R. G. Wilson, L. M. Henderson, J. Bacteriol., 85, 221 (1963).
27) M. V. Ortega, G. M. Brown, J. Biol. Chem., 235, 2939 (1960).
28) G. Lester, J. Bacteriol., 107, 448 (1971).
29) S. Brody, J. Biol. Chem., 247, 6013 (1972).
30) A. T. Brown, C. Wagner, J. Bacteriol., 101, 456 (1970).
31) C. Wagner, A. T. Brown, J. Bacteriol., 104, 90 (1970).
32) Y. S. Cho-Chung, H. C. Pitot, J. Biol. Chem., 242, 1192 (1967).
33) W. E. Knox, Adv. Enz. Regul., 4, 287 (1966).
34) R. T. Shimke, E. W. Sweeney, C. M. Berlin, J. Biol. Chem., 240, 322 (1965).
35) E. E. Snell, L. D. Wright, J. Biol. Chem., 139, 675 (1941).
36) R. R. Brown, J. Biol. Chem., 227, 649 (1957).
37) J. M. Price, L. W. Dodge, J. Biol. Chem., 223, 699 (1956).

38) L. M. Henderson, H. M. Hirsch, J. Biol. Chem., 181, 667 (1949).
39) E. C. C. Lin, B. M. Pitt, M. Civen, W. E. Knox, J. Biol. Chem., 233, 668 (1958).
40) J. Nakamura, T. Noguchi, R. Kido, Biochem. J., 135, 815 (1973).
41) K. Tanizawa, K. Soda, J. Biochem., 85, 1367 (1979).
42) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
43) M. Grenson, C. Hou, M. Crabeel, J. Bacteriol., 103, 770 (1970).
44) W. H. Matchett, J. A. Demoss, Biochim. Biophys. Acta., 86, 91 (1964).
45) A. Wiemken, M. Duerr, Arch. Microbiol., 101, 45 (1974).
46) H. Takahashi, J. M. Price, J. Biol. Chem., 233, 150 (1958).
47) W. H. Matchett, Biochim. Biophys. Acta., 107, 222 (1965).
48) M. Suda, O. Hayaishi, Y. Oda, J. Biochem., 37, 355 (1950).
49) H. U. Bergmeyer, E. Bernt, Methods of EnzymaticAnalysis, Vol. 3, pp. 1212, Academic Press, New York (1974).
50) A. Tzagoloff, J. Biol. Chem., 244, 5027 (1969).
51) G. Gopalan, J. Jayaraman, C. Rajamanickam, Arch. Biochem. Biophys., 235, 159 (1984).
52) D. L. Nandi, D. Shemin, J. Biol. Chem., 243, 1236 (1968).
53) G. Schatz, T. L. Mason, Annu. Rev. Biochem., 43, 51 (1974).
54) P. S. Perlman, H. R. Mahler, Arch. Biochem. Biophys., 162, 249 (1974).
55) H. R. Mahler, C. C. Lin, Biochem. Biophys. Res. Commun., 83, 1039 (1978).
56) B. Chance, G. R. Williams, J. Biol. Chem., 217, 383 (1955).
57) J. Robinson, J. M. Cooper, Anal. Biochem., 33, 390 (1970).
58) R. K. Morton, K. Shepley, Biochem. J., 89, 257 (1963).
59) R. Roggenkamp, H. Sahm, F. Wagner, FEBS Lett., 41, 283 (1974).
60) C. A. Appelby, R. K. Morton, Biochem. J., 71, 492 (1959).
61) M. Osumi, F. Imizumi, M. Imai, H. Sato, H. Yamaguchi, J. Gen. Appl. Microbiol., 21, 375 (1975).
62) W. Bandlow, Biochim. Biophys. Acta., 282, 105 (1972).
63) O. Hayaishi, S. Rothberg, A. H. Mehler, Y. Saito, J. Biol. Chem., 229, 889 (1957).
64) F. Hirata, O. Hayaishi, Biochem. Biophys. Res. Commun., 47, 1112 (1972).
65) F. Hirata, T. Tokuyama, S. Senoh, O. Hayaishi, J. Biol. Chem., 249, 1311 (1974).
66) R. B. Frydman, M. L. Tomaro, B. Frydman, Biochim. Biophys. Acta., 284, 63 (1972).
67) J. D. Kanner, O. Fennema, J. Agric. Food Chem., 35, 71 (1987).
68) B. Peterkofsky, Arch. Biochem. Biophys., 128, 637 (1968).
69) G. H. Fleet, D. H. Manners, J. Gen. Microbiol., 94, 180 (1976).
70) P. S. Perlman, H. R. Mahler, Arch. Biochem. Biophys., 136, 245 (1970).
71) H. U. Bergmeyer, K. Gawehn, M. Grassl, Methods of Enzymatic Analysis(H. U. Bergmeyer ed.), Vol. 1, pp. 485 , Academic Press, New York(1974).
72) C. W. Tabor, H. Tabor, S. M. Rosenthal, J. Biol. Chem., 208, 645 (1956).

73) S. Fukui, A. Tanaka, J. Appl. Biochem., 1, 171 (1979).
74) F. Hirata, O. Hayaishi, J. Biol. Chem., 246, 7825 (1971).
75) H. R. Mahler, P. K. Jaynes, J. P. McDonough, D. K. Hanson, Current Topics in Cellular Regulation (B. L. Horecker, E. R. Stadtman, eds), Vol 18, pp. 454, Academic Press, London(1981).
76) K. Matsumoto, I. Uno, A. Tohe, T. Ishikawa, Y. Oshima, J. Bacteriol., 150, 277 (1982).
77) B. S. Montecourt, S. -C. Kuo, J. O. Lampen, J. Bacteriol., 114. 233 (1973).
78) D. G. Fraenkel, The Molecular Biology of Yeast (J. N. Strathern, E. W. Jones, J. R. Broach, eds) pp. 1, Cold Spring Harbour Laboratory, New York. (1982).
79) P. Feigelson, F. O. Brady, Molecular Mechanisms of Oxygen Activation(O. Hayaishi, ed.) pp. 87, Academic Press, New York.
80) B. I. Magboul, D. A. Bender, Brit. J. Nutr., 49, 321 (1983).
81) N. E. Cook, K. J. Carpenter, J. Nutr., 117, 519 (1987).
82) M. E. Lojkin, J. Nutr., 100, 51 (1970).
83) S. Sakakibara, K. Fujii, S. Nasu, H. Iimai, K. Yamaguchi, I. Ueda, J. Nutr., 112, 1688 (1982).
84) O. Yamada, M. Shin, K. Sano, C. Umezawa, Internt. J. Nutr. Res., 53. 184 (1983).
85) O. Yamada, M. Shin, K. Sano, C. Umezawa, Internt. J. Nutr. Res., 53, 192 (1983).
86) M. Klingenberg, Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 4, pp. 2045, Academic Press, New York(1974).
87) J. V. Passonneau, O. H. Lowry, Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 4, pp. 2059, Academic Press, New York, (1974).
88) A. Ichihara, E. Koyama, J. Biochem., 59, 160 (1966).
89) H. Okamoto, O. Hayaishi, Arch. Biochem. Biophys., 131, 603 (1969).
90) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K., Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, Anal. Chem., 28, 350 (1956).
91) G. H. Hogeboom, Methods in Enzymology, Vol. 1, pp. 16, (S. P. Colowich, N. D. Kaplan eds), Academic Press, New York (1955).
92) H. Okamoto, S. Yamamoto, M. Nozaki, O. Hayaishi, Biochem. Biopys. Res. Commun., 26, 309 (1967).
93) J. Rytka, J. Bacteriol., 121, 562 (1975).
94) M. Crabeel, M. Grenson, Eur. J. Biochem., 14, 197 (1970).
95) C. E Morrison, H. C. Lichstein, J. Bacteriol., 125, 864 (1976).
96) C. Umezawa, Y. Maeda, K. Haba, M. Shin, K. Sano, Brit. J. Nutr., 54, 695 (1985).
97) F. L. Shinnick, A. E. Harper, Biochim. Biophys. Acta., 437, 477 (1976).