The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	イソブテンの微生物生産に関する研究
Author(s)	藤井, 隆夫
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/438
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

イソブテンの微生物生産に関する研究

1989

藤井　隆夫

イソブテンの微生物生産に関する研究

1989

藤井　隆夫

目次

第１章　緒論

第 1 節　研究の背景　1

第 2 節　既往の研究　2

第 3 節　本研究の目的と研究の進め方　2

１．本研究の目的　2

２．本研究の進め方　2

第２章　イソブテン生産菌の選択

第 1 節　緒言　4

第 2 節　実験材料および方法　4

第 3 節　結果　6

１．C_4-ガス状炭化水素生産菌の分布　6

２．代表的なC_4-ガス状炭化水素生産菌　7

第 4 節　考察　9

第 5 節　要約　9

第３章　Rhodotorula minuta によるイソブテン生成

第 1 節　緒言　10

第 2 節　実験材料および方法　10

第 3 節　結果　12

１．生成イソブテンの同定　12

２．イソブテン生成に及ぼすアミノ酸の添加効果　14

３．イソブテン生成に及ぼす酸素の影響　16

４．イソブテン生成の最適pHと最適温度　17

第 4 節　考察　18

第 5 節　要約　18

第４章　Rhodotorula minuta のイソブテン生成に及ぼすＬ－ロイシン、Ｌ－フェニルアラニンの役割
第１節　緒言　19
第２節　実験材料および方法　19
第３節　結果　21
１．　Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの添加効果　21
２．　Ｌ－ロイシン代謝中間体とＬ－フェニルアラニンの添加効果　24
３．　Ｌ－フェニルアラニンの代替物質　26
４．　Ｌ－フェニルアラニンの作用機作　27
第４節　考察　28
第５節　要約　29

第５章　Rhodotorula minuta のアミノ酸アナログ耐性変異株によるイソブテン生成
第１節　緒言　30
第２節　実験材料および方法　31
第３節　結果　34
１．　アザロイシン耐性変異株の分離　34
２．　アザロイシン耐性変異株（ＫＡＺ－５）の生理的性質　35
３．　p-フロロフェニルアラニン耐性変異株の分離　38
４．　アザロイシン、p-フロロフェニルアラニン両耐性変異株の分離　39
５．　アミノ酸アナログ両耐性変異株（ＭＮＡＰ－３４）の生理的性質　41
第４節　考察　43
第５節　要約　44

第６章　無細胞抽出液中のイソブテン生成酵素の性質
第１節　緒言　45
第２節　実験材料および方法　45

第 3 節　結果　47
1．無細胞抽出液によるイソプテン生成系の構築　47
2．ミクロゾーム画分に存在するイソプテン生成酵素　52
3．イソプテン生成酵素のチトクローム P-450としての性質　54
4．イソプテン生成酵素の培養経時変化　57
5．チトクローム P-450, P-450 レダクターゼとイソプテン生成活性の相互関係　58
第 4 節　考察　60
第 5 節　要約　60

第７章　P-450 レダクターゼの精製と性質
第 1 節　緒言　62
第 2 節　実験材料および方法　62
第 3 節　結果　65
1．界面活性剤による可溶化　65
2．2'5'-ADP-セファロース 4B による精製　66
3．ハイドロキシアパタイトによる精製　67
4．精製フローの一貫データー　68
5．精製されたP-450 レダクターゼの性質　70
第 4 節　考察　71
第 5 節　要約　72

第８章　チトクローム P-450 の精製と性質
第 1 節　緒言　73
第 2 節　実験材料および方法　73

第 3 節　結果　75
1．界面活性剤による可溶化　75
2．2'5'-ADP-セファロース 4B による精製　77
3．ＡＨ－セファロース　４Ｂによる精製　78
4．ハイドロキシアパタイトによる精製　79
5．精製フローの一貫データー　79
6．精製されたチトクローム P-450の性質　81
第 4 節　考察　84
第 5 節　要約　85

第９章　イソプテン生成系の再構成
第 1 節　緒言　87
第 2 節　実験材料および方法　87
第 3 節　結果　88
1．コール酸透析法による再構成　88
第 4 節　考察　89
第 5 節　要約　92

第１０章　結果の要約と考察
第 1 節　要約　93
第 2 節　考察　95

参考文献　96

謝辞　101

本論文に関係のある報告　102

第１章　緒論

第１節　研究の背景

都市ガスやプロパンガスなどの燃料として使用されているガス状飽和炭化水素（パラフィン系）は、天然ガスや液化石油ガス（ＬＰＧ）から、製造されている。また、合成樹脂や合成ゴムの原料として使用されているエチレン，プロピレン，ブタジエン，イソブテンなどのガス状不飽和炭化水素（オレフィン系）は、ナフサを７５０°～８５０℃に加熱、分解して製造されている（図１－１）(1)。

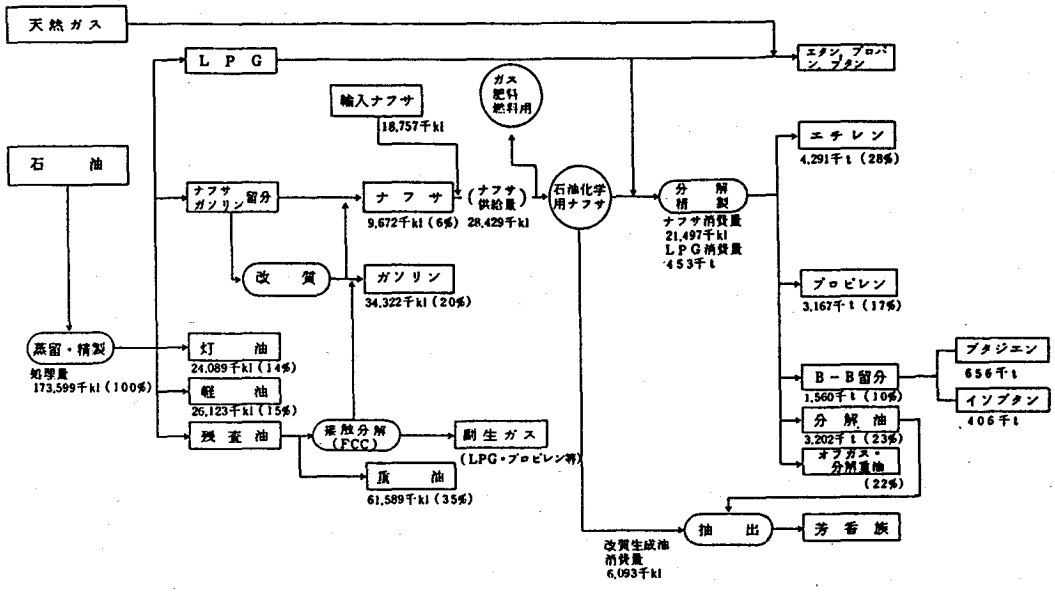


図１－１　天然ガスおよび石油からのガス状炭化水素生産の流れ

これらガス状炭化水素の出発原料である石油や天然ガスの地球上での埋蔵量には限界がある。

そこで、筆者らの研究室では、これらのガス状炭化水素を再生産可能なバイオマスを出発原料とし、微生物の機能を利用して人工的に作り出すことができれば、化石資源の枯渇に対するある程度の対応策になるのではないかと考え、国内、国外の菌株保存機関から分類学的性質の明らかで病原性のない微生物、　合計８０属，１５０種，１７８株の分譲を受け、昭和５７年４月からガス状炭化水素生産菌のスクリーニングを開始した。

第２節　既往の研究

ガス状飽和炭化水素の中で化学構造のもっとも簡単なメタンは嫌気的な条件下で微生物によって作られることは既に古くから知られていた（2～4)。 現在では生物学的排水処理法の一つとして幅広く実用化され、生成するメタンをエネルギー源として利用している。　しかし、メタン発酵には嫌気性菌を使用するため、生育が非常に遅く、その結果として所要発酵設備が大きくなる欠点がある。　また生成するメタンの燃焼熱が低いという欠点もある。

微生物の生成するガス状不飽和炭化水素の中で化学構造のもっとも簡単なエチレンは、植物ホルモンとして位置づけられ、植物自身が作る(5～9)だけでなく、多くの微生物も作ることが1940年代から知られていた（10,11)。　しかし、メタン以外のガス状炭化水素であるエタン，プロパン，ブタン，ペンタン，さらにエチレン以外のガス状不飽和炭化水素であるプロピレン，ブテンなどの微生物生産については、既往の研究報告がほとんどなかった。　ただ嫌気的なメタン発酵の副生物として、極微量のエタン，プロパン，プロピレン，ブタン，イソブタンが検出されたとの報告(12～15)、ある種のキノコ Agaricus bisporusが微量のエタン，プロパン，プロピレン，ｎ－ブタンを生成したとの報告(16)があるにすぎない。

福田は当初は嫌気条件下でこれらガス状炭化水素生産菌をスクリーニングしたが、目的とする菌株は全く得られず、好気条件下でのスクリーニングに切替えて、はじめて高頻度で目的生産菌が得られるようになった（17,18)。　福田等は、これらガス状炭化水素の微生物生産に関して、既に多数の報告を行っている(19～23)。本論文は、これら一連の研究の中で、主としてイソブテンの微生物生産に関する研究をまとめたものである。

第３節　本研究の目的と研究の進め方

１．本研究の目的

農、畜、水産廃棄物などの再生可能なバイオマスを出発原料とし、微生物の機能を利用して、人工的にC_4-不飽和炭化水素、とりわけイソブテンを生産することを目的として研究を行った。

２．本研究の進め方

本研究を進めるに当たって、次のような研究のアプローチ方法を計画立案した。

①菌株保存機関から分譲された菌株の中から、C_4-ガス状不飽和炭化水素生産菌、

とりわけイソブテンを生産する微生物をスクリーニングする。
②スクリーニングされたC_4-不飽和炭化水素生産菌株の中から、イソブテン生産候補株を選択し、その生理的性質および培養特性を調べる。
③得られた知見をもとに、イソブテン生産候補株の代謝制御技術による育種改良を試みる。
④イソブテン生産菌のイソブテン生合成経路を解明する。
⑤イソブテン生産菌のイソブテン生成酵素を抽出、分離、精製し、その性質を調べる。
⑥イソブテン生成酵素によるイソブテン生成反応の機構を解明する。
⑦得られた実験的事実を総合してイソブテン生産菌がイソブテンを生産する生理的意義を推測、考察する。

第２章　イソブテン生産菌の選択

第１節　緒言

C_4- ガス状炭化水素の生成に関する既往の研究報告はほとんどない、ただキノコの一種、Agaricus bisporus がn-ブタンを生成したとの報告(16)、ある種のメタン生成菌が嫌気培養条件下で　C_4-ガス状炭化水素を生成したとの報告(12～15) などがある。　しかし、いずれも極微量の生成であり、ましてその生成経路まで考察したものはない。

そこで、ｎ－ブテン，イソブテン，トランス－２－ブテン，シス－２－ブテンなどの C_4-炭化水素を好気的に生産する菌株を新たに見出す目的でスクリーニングを行った。　その結果、Rhodotorula 属酵母が比較的多量のイソブテンを生成する傾向が認められたので、この属の供試菌株の幅を広げて再スクリーニングし、イソブテン生成速度の大きい候補菌株の選択を試みた。

第２節　実験材料および方法

１．使用菌株

財団法人発酵研究所 (IFO), The American Type Culture Collection(ATCC), The Northern Regional Research Laboratory (NRRL)から80属，150種，178株の保存菌株の分与を受け、実験に使用した。

Rhodotorula属菌については、新たに追加分与を受けた5種17株も実験に使用した。

２．培地

糸状菌、酵母、細菌、放線菌の培養には通常表２－１に示した改変NB培地を、また糸状菌には表２－２に示したコーンスティープリカー(C.S.L.)培地も使用した。

３．培養方法

糸状菌については、前培養の培地にはペレット形成を阻止するため、３%の sodium carboxymethyl cellulose (C.M.C.)を加えた。　本培養にはいずれの菌も２０～５０mlの培地の入った１００～５００ml容のErlenmeyer flaskを用いた。他の条件については表２－３に示した通りで、ロータリーシェイカーは１８０rpm，７cm振幅、レシプロカルシェイカーは、１２０rpm，１１cm振幅で培養した。

表２－１　改変NB培地

Glucose	20-40 g/l
Meat ex.	3 g/l
Yeast ex.	2 g/l
Polypepton	5 g/l
NaCl	2 g/l
pH	6.0

表２－２　C.S.L.培地

Glucose	40	g/l
Corn steep liquor	40	g/l
K_2HPO_4	0.5	g/l
$CaCO_3$	3.5	g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25	g/l
pH	5.0	

表２－３　糸状菌、酵母、細菌、放線菌の培養条件

Culture condition	Fungi	Yeasts	Bacteria	Actinomycetes
Temperature (°C)	25	25	30	25
Medium pH	5.0 or 6.0	6.0	7.0	7.0
Shaking condition	Rotary	Rotary	Reciprocal	Rotary
Pre-culture period (days)	2	*	*	*
Cultivation period (days)	4～6	1～3	1～3	4～7

＊前培養は行わなかった

４．生成ガス状炭化水素の同定および生成速度の測定(シール培養法)

本培養で一定濃度に菌を増殖させた後、１-２mlの培養液を直径１８mm、容量３４mlの滅菌した試験管に入れ、すみやかにゴムキャップで密封した。この試験管を一定時間恒温水槽内で往復振とうして、ガスを生成させた。気相部の空気をガスシリンジで１ml採取し、ガスクロマトグラフィー法で分析した。なおシール培養条件は、糸状菌、酵母、放線菌では２５°C、細菌では３０°C，約２０時間で行い、振とうの条件は、１２０rpm、５.５cm振幅で行った。

ガスクロマトグラフは、Yanako G-３８.００(柳本製作所、京都）を使用した。ガラスカラム、4000x5 mm に充填剤として活性アルミナ（柳本製作所、京都）、Bond-GC/PIC（和光純薬株式会社、大阪）または、Unibeads ２S（ガスクロ工業株式会社、東京）を用い、１５０°Cまたは１２０°Cで操作した。キャリヤガスと

して、チッ素を流速４０ml/minで流した。　検出器はFIDを使用した。

ガス状炭化水素の同定は、各カラム充填剤での滞留時間（RT）を市販の標準ガスのRTと比較することによって行った。

ガス状炭化水素生成速度（Ｐ）は、次式から求めた。

$$P = E(V - x) / x \cdot t \quad (\mathrm{nl/ml\ culture\ broth/hr})$$

E：サンプリングした試験管の気相部１mlあたり生成したガス状炭化水素の量（nl/ml気相ガス）；V：試験管の全容量（ml）；ｘ：試験管に入れた被験培養液量（ml）；t：シール培養時間（ｈｒ）

第３節　結果

１．C_4-ガス状炭化水素生産菌の分布

表２－４はC_4-ガス状炭化水素生産菌の出現率を示している。　供試菌１７８株の中の約２９％がｎ－ブタン，２１％がイソブテン，１３％がイソブタン，８％が１－ブテン，４％がトランス－２－ブテン，２％がシス－２－ブテンの生産菌であった。　また、約４３％、７６株が少なくとも１種類のC_4-ガス状炭化水素を生

表２－４　C_4-ガス状炭化水素生産菌の分布

Kind of microorganism	Appearance of production strains (%)						
	Butane		Butene				At least one C_4
	Iso-,	Normal	1-,	Iso-,	*trans*-2-,	*cis*-2-	
Fungi	6	35	6	33	6	2	48
Yeasts	16	31	10	31	0	3	49
Bacteria	21	26	18	6	6	0	44
Actinomycetes	11	20	0	0	9	0	23
Total	13	29	8	21	4	2	43

産した。

図２－１はＣ₄-ガス状炭化水素の生成速度の分布を示す。　Ｃ₄-ガス状炭化水素生成速度の低い方に大部分の菌が分布していた。

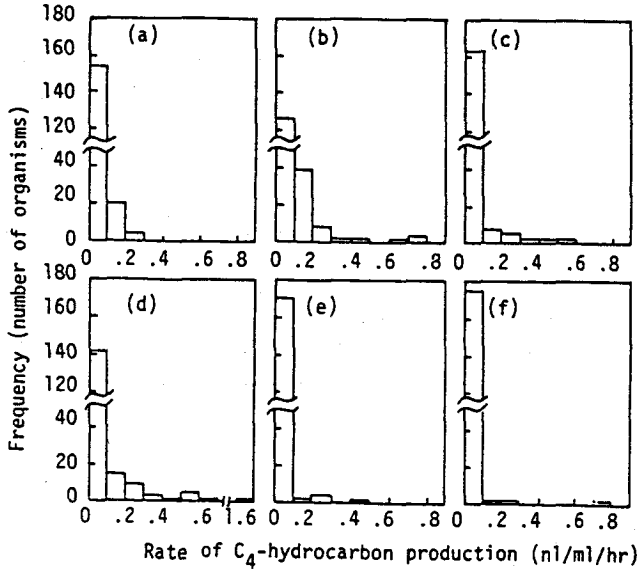


図２－１　Ｃ₄-ガス状炭化水素生成速度の分布

（ａ）イソブタン；（ｂ）ｎ-ブタン；（ｃ）１-ブテン；（ｄ）イソブテン；（ｅ）トランス-2-ブテン；（ｆ）シス-2-ブテン

２．代表的なＣ₄-ガス状炭化水素生産菌

表２－５に代表的なＣ₄-ガス状炭化水素生産菌を示した。　この表から分かるように、Ｃ₄-ガス状炭化水素生産菌の中で*Rhodotorula minuta* IFO 0387 が比較的高いイソブテン生成速度を示した。

そこで新たに５種１７株の*Rhodotorula* 属酵母を追加して、イソブテン生産菌を再スクリーニングした。　結果が表２－６に示されている。　この表からも分かるように、*Rhodotorula*属菌１８株のうち４株を除く１４株（８０％）がイソブテンを生成し、しかも*R. marina*と*R. minuta*の２種１０株（５６％）に集中していた。

R. minuta var. texensis IFO 1102 が16.4 nl/ml/hrという高いイソブテン生成速度を示した。

表２－５　代表的なＣ$_4$-ガス状炭化水素生産菌

C_4-Hydrocarbon	Species	Strain	Prod. rate (nl/ml/hr)
n-Butane	*Gliocladium aureum*	IFO 9055	0.7
	Corynebacterium fascians	IFO 12077	0.7
1-Butene	*Taphrina wiesneri*	IFO 7776	0.5
iso-Butene	*Rhizopus javanicus*	IFO 5441	0.5
	Gliocladium deliquescens	IFO 7062	0.6
	Rhodotorula minuta	IFO 0387	1.7
cis-2-Butene	*Cryptococcus flavus*	IFO 0407	0.7

表２－６　Rhodotorula酵母のイソブテン生成

Rhodotorula sp.	Strain	Prod. rate (nl/ml/hr)
Rh. glutinis	IFO 0389	trace
glutinis	IFO 0697	0.3
glutinis	IFO 1501	-
glutinis	IFO 1503	-
graminis	IFO 0190	trace
marina	IFO 0928	-
marina	IFO 1421	5.5
minuta	IFO 0387	1.7
minuta	IFO 0920	0.5
minuta	IFO 1435	3.0
minuta var. texensis	IFO 0879	1.0
minuta var. texensis	IFO 0932	2.5
minuta var. texensis	IFO 1006	1.6
minuta var. texensis	IFO 1102	16.4
minuta var. texensis	IFO 1434	trace
minuta var. texensis	IFO 1540	0.3
minuta var. texensis	IFO 1541	1.3
rubra	IFO 0001	-

－：イソブテンが検出されなかった

第４節　考察

前掲の表２－４に示すようにC_4-ガス状炭化水素生産菌が糸状菌、酵母、細菌、放線菌のかなり幅広い範囲に分布していることから、このようなガス状炭化水素は、ある特定の微生物によって特異的につくられるような生産物ではなく、幅広い微生物の一般的な代謝産物ではないかと考えられる。　しかし、一方、イソブテン生産菌の再スクリーニング結果を示す前掲表２－６によると、イソブテン生産菌はなぜかRhodotorula 属酵母に多く、ことに R. marina とR. minutaの２種に片寄る傾向が認められた。　微生物によるイソブテン生成には種特異性があると考えられる。

R. minuta var. texensis IFO 1102は、比較的高いイソブテン生成速度を示し、微生物によるイソブテンの生成経路、生成機構などの解明には、好適の研究材料であろうと考えられる。

第５節　要約

菌株保存機関(IFO, ATCC, NRRL) から分与を受けた８０属、１５０種、１７８株についてC_4-ガス状炭化水素生産菌のスクリーニングを行った。　その結果、C_4-ガス状炭化水素生産菌株は幅広く分布し、C_4-ガス状炭化水素のうちの少なくとも１種類を生成する菌株は、供試菌の約４３％にのぼることが判明した。

スクリーニングされたC_4-ガス状炭化水素生産菌の中で比較的高い生成速度を持っていたのはイソブテンを生成したRhodotorula minuta IFO 0387であった。そこで、新たにRhodotorula 属５種、１７株を追加してイソブテン生産菌を再スクリーニングした結果 16.4 nl/ml/hr の高い生成速度を示した R. minuta var. texensis IFO 1102を見出した。

第３章　Rhodotorula minuta によるイソブテン生成

第１節　緒言

イソブテンの生成速度の大きい R. minuta IFO 1102 を候補株として選定し、イソブテン生成条件を検討した。　通常、R. minuta の生育には、、チアミンとp-アミノ安息香酸の添加が必要と言われている（24）。　そこで、これらビタミンを添加した合成培地の組成について実験し、イソブテン生成に及ぼす諸因子の影響を調べた。　その結果、R. minuta IFO 1102によるイソブテンの生成にはL-ロイシンとL-フェニルアラニンが重要な役割を演じていることを見出した。

第２節　実験材料および方法

１．使用菌株

Rhodotorula minuta var.texensis IFO 1102 を実験に用いた。

２．培地

表２－１の改変 ＮＢ培地と表３－１に示す合成培地Ｃを使った。

表３－１　合成培地Ｃ

Glucose	20	g/l
$(NH_4)_2SO_4$	5	g/l
KH_2PO_4	1	g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1	g/l
NaCl	0.1	g/l
Vitamin mixture	10	ml/l
Oligoelement soln.	10	ml/l
$CaCO_3$	3	g/l
pH	5 － 6	

Oligoelement solution		
Na-Citrate	5	g/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	3	g/l
$ZnCl_2$	2	g/l
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	2	g/l
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.2	g/l
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.2	g/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.1	g/l
$K_2B_4O_7 \cdot xH_2O$	0.1	g/l

ただし、実験によっては種々の有機物、窒素化合物、各種アミノ酸を合成培地Ｃに添加した。

３．培養方法

１００ｍｌ容 Erlenmeyer flask に２０ｍｌの培地を入れ通常通り滅菌冷却し、１白菌耳の菌をスラントから植菌後、２５℃、２～３日間ロータリーシェーカー（１８０ｒｐｍ,７ｃｍ振幅）で前培養した。 本培養は Erlenmeyer flask（５００ｍｌ容）に培地を１００ｍｌ入れ、滅菌後、上記前培養液を２％(v/v) 移植し、前培養と同じ条件で２日間培養した。

４．休止細胞の調製法

合成培地Ｃを用い２日間培養し、その培養液を1000×g,１０分間遠心分離して集菌し、２回脱イオン水で洗浄した。 この洗浄菌体を下記緩衝液のいずれかにけん濁した。 ０.２MNa_2HPO_4 と０.１Ｍ クエン酸で作製したMcIlvaine緩衝液；３３ｍＭ Sφrensenリン酸緩衝液；３３ｍＭリン酸カリウム緩衝液 なお、ｐＨは実験によって適宜変化させた。

５．イソブテン生成速度の測定法

イソブテンの生成速度は、第２章 第２節,４に従ってシール培養し、その生成ガスをガスクロマトグラフ法にしたがって測定した。

６．菌体濃度の測定

菌体濃度は６６０ｎｍでの optical density によって測定した。

７．イソブテンの同定法

生成したイソブテンの同定法には、①ペーパークロマトグラフおよび②ガスクロマトグラフ － マススペクトロメーターの２種の方法を使用した。

①ペーパークロマトグラフによる方法：改変ＮＢ培地で２日間本培養し、フラスコの綿栓をゴムキャップに取り換え２５℃、１日間シール培養し、フラスコ内の気相部に生成したガスを０.１Ｍ 酢酸第二水銀－メタノール溶液中に通し、ガス状不飽和炭化水素を選択的に吸収させた。 この液をろ紙（東洋ろ紙，No.５０）に３００μｌ スポットし、１－ブタノール：９５％エタノール：２８％アンモニ

ア水　８：１：３の溶媒を用いて上昇法で展開した。　展開済のろ紙を乾燥後、０.２％ ジフェニルカルバゾン－エタノール溶液を乾燥ろ紙に噴霧し、ガス状不飽和炭化水素に由来するスポットを発色させた。スポットのＲｆ値と標準ガスのＲｆ値を比較することによってイソブテンを同定した。

②ガスクロマトグラフ－マススペクトロメーター（ガスマス）による方法：Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンを各１ｇ／ｌ添加した合成培地Ｃで、２日間本培養し、その５０ｍｌを３００ｍｌ容 Erlenmeyer flask に移し、ゴム栓で密栓して、２５℃,１日間シール培養した。　気相部に蓄積したガスをガスシリンジで採取し、ガスマス（ＪＭＳ－ＤＸ　３０３,日本電子株式会社,東京）にかけて分析した。　なお、この時のガスクロマトグラフは、ガラスカラム（５ｍｍ×４ｍ）に活性アルミナ（柳本製作所,京都）を充填し、カラム温度を ８℃／min の速度で５０℃～２５０℃に昇温、キャリアガスには流速４０ｍｌ／ｍｉｎのヘリウムを使用して、操作した。　マススペクトロメーターは、イオン化電圧７０ｅＶ，イオン加速電圧,３.０ｋＶ,イオン化電流３００μＡで操作した。

第３節　結果

１．生成イソブテンの同定

第２章では、ガスクロマトグラフのカラム充填剤を数種類変え、サンプルの滞留時間（ＲＴ）と標準サンプルのＲＴを比較することで、R. minuta の生成イソブテンを同定したが、ここでは、ペーパークロマトグラフとガスクロマトグラフ－マススペクトロメーターを用いて生成イソブテンの同定確認を試みた。

表３－２に標準不飽和炭化水素および R. minuta IFO 1102 の生成した不飽和炭化水素サンプルのペーパークロマトグラフィーによるＲｆ値及びそれぞれの文献値が示されている。　この表のＲｆ値から R. minuta IFO 1102 の生成不飽和炭化水素はエチレンとイソブテンであると同定された。

図３－１に、R. minuta IFO 1102の生成した炭化水素のマススペクトラムが示されている。　ガスクロマトグラムで８２７秒の滞留時間を示す炭化水素をマススペクトロメーターにかけた結果である。　図３－１から、この炭化水素の分子量は５６であり、標準物質のマススペクトラムのチャートと対比して、この炭化水素はイソブテンであると同定された。

ペーパークロマトグラムでエチレンが認められたのは、改変ＮＢ培地の成分中にエチレン生成に有効な成分が含まれているものと思われる。　いずれの方法によ

っても、R. minuta IFO 1102の生成するガス状炭化水素はイソブテンであると同定された。

表３－２　R. minuta IFO 1102の生成するガス状炭化水素のＲｆ値

Compound	R_f value	Ref.*
Ethylene	0.22	0.23
Propylene	0.28	0.28
1-Butene	0.42	0.41
cis-2-Butene	0.43	—
trans-2-Butene	0.40	—
Isobutene	0.35	—
Sample from Rh. minuta IFO 1102	0.22, 0.35	

展開溶媒は1－ブタノール:95%エタノール:28%アンモニア＝８：１：３を使った。

*参考文献(２５)参照

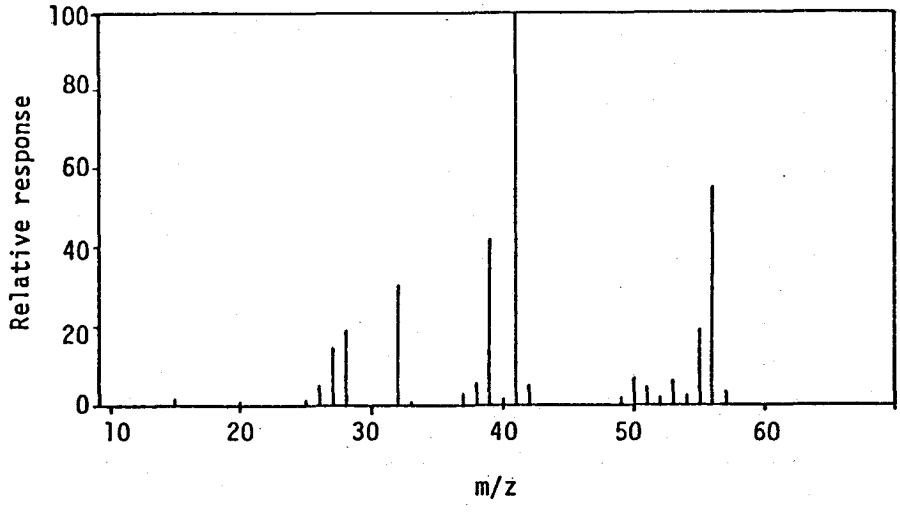


図３－１　R. minuta IFO 1102 の 生成ガス状炭化水素（Ｒ.Ｔ.：827秒フラクション）のマススペクトラム

2．イソブテン生成に及ぼすアミノ酸の添加効果

R. minuta IFO 1102を改変ＮＢ培地と合成培地Ｃで培養すると、菌の増殖にはそれほどの差は認められないが、合成培地Ｃでイソブテンの生成活性は改変ＮＢ培地の約1/10にすぎなかった。　改変ＮＢ培地に含まれている有機物質の中にイソブテンの生成を促進するような因子が存在するのではないかと考えられた。　そこで、合成培地Ｃに核酸混合物や有機窒素源を添加して、それぞれの添加効果を調べた。　結果が図３－２に示されている。

この図から、バクトトリプトン,ポリペプトン,イーストエキストラクトなどの有機窒素源の添加効果の大きいことが分かった。

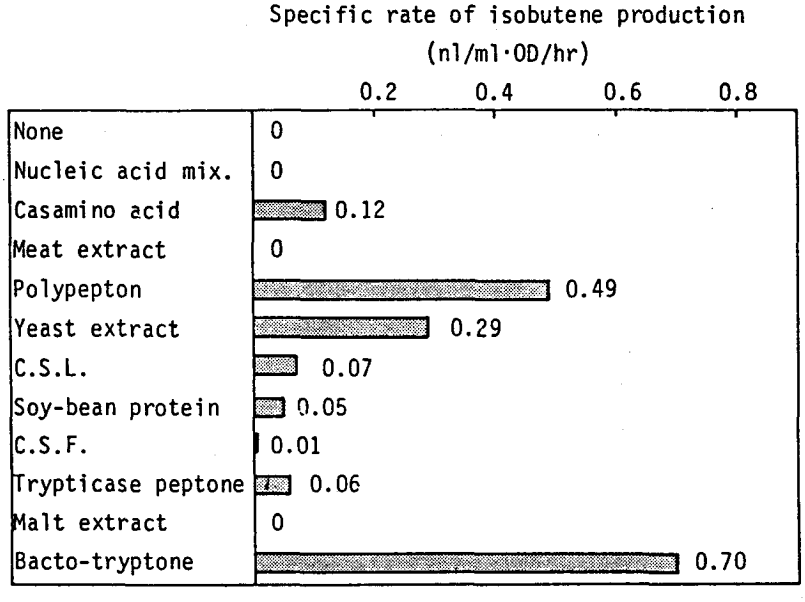


図３－２　イソブテン生成に及ぼす有機窒素源の添加効果

R. minuta IFO 1102を合成培地Ｃに各種有機窒素源をそれぞれ１g/lずつ添加して培養した。 C.S.L:コーンスティープリカー、C.S.F:綿実粕粉

有機窒素源の構成成分であるアミノ酸がイソブテンの生成を促進する物質ではないかと考え、培養細胞と休止細胞懸濁液に、２０種のアミノ酸をそれぞれ１ｇ／１になるように単独添加して、その影響を調べた。　結果が図３－３に示されている。

培養細胞、休止細胞いずれの場合にも、Ｌ－ロイシンに添加効果が認められ、Ｌ－フェニルアラニンとＬ－チロシンにもわずかな添加効果が認められた。　そこで、休止細胞懸濁液に、それぞれ１ｇ／１ずつのＬ－ロイシン，Ｌ－フェニルアラ

ニン，L－チロシン，およびL－トリプトファンも加えた４種のアミノ酸を２種ずつ同時添加し、複合添加効果を調べた。　結果が図３－４に示されている。

L－ロイシンとL－フェニルアラニン，L－ロイシンとL－チロシン，L－ロイシンとL－トリプトファンの同時添加が、イソブテンの生成を相乗的に増加させた。

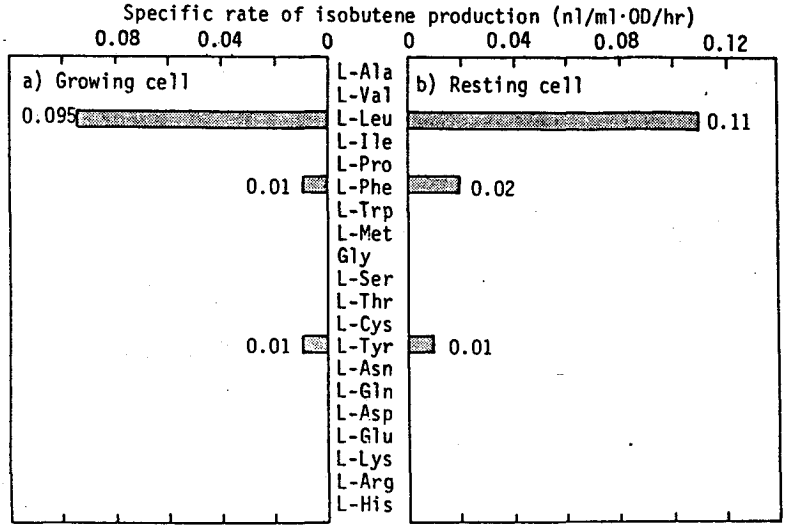


図３－３　イソブテンの生成に及ぼすL－アミノ酸の単独添加効果

a）R. minuta IFO 1102の増殖細胞；b）同休止細胞：それぞれの細胞を33mM Sφrensenリン酸カリウム緩衝液，pH6.0に懸濁し、それぞれのアミノ酸を1g/lずつ単独添加した。

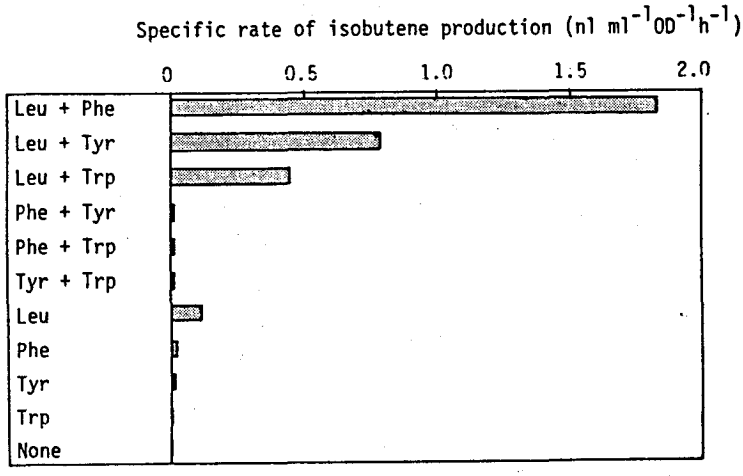


図３－４　イソブテンの生成に及ぼすL－アミノ酸の同時添加効果

R. minuta IFO 1102の休止細胞を33mM Sφrensen リン酸カリウム緩衝液，pH6.0に懸濁し、それぞれのL-アミノ酸を1g/lずつ添加した。

３．　イソブテン生成に及ぼす酸素の影響

R. minuta IFO 1102をＬ－ロイシン１ｇ／ｌ添加した合成培地Ｃで３８時間培養し、その１ｍｌを１８φ、３４ｍｌ容試験管に採取し、試験管内の空気を窒素ガスで置換後、ゴムキャップで密栓してシール培養した。　別途、試験管内の空気を窒素置換しない、従来通りのシール培養を行ってコントロールとした。　結果が図３－５に示されている。

空気を窒素で置換すると、イソブテンを全く生成せず、R. minuta のイソブテン生成には酸素が必須と考えられた。

さらに酸素の効果を確かめるためにシール培養の際に試験管内に入れる培養液量を種々変えて、酸素の効果を調べた。　結果が図３－６に示されている。

少量の培養液をシールするほどイソブテンの生成は長時間持続したが、シール培養の単位液量当りのイソブテン生成初期速度（０－２時間）は、シール培養液量に無関係にほとんど一定であった（図３－６,挿入図）。　シール培養液量の多いほど、イソブテン生成が早く停止したのは、酸素不足によるものと考えられる。

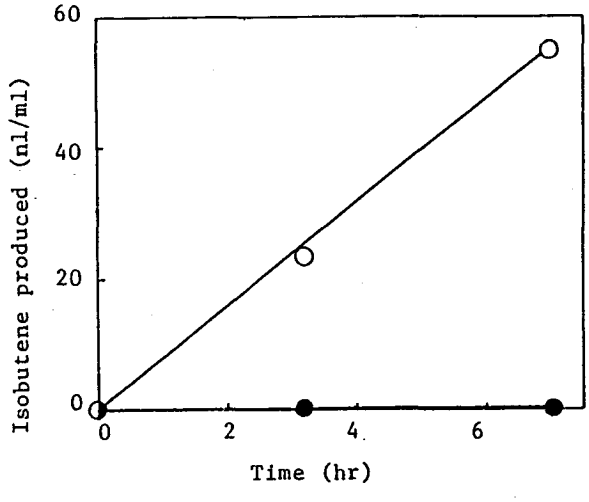


図３－５　イソブテン生成に及ぼす酸素の影響

○ 好気的条件，● 嫌気的条件

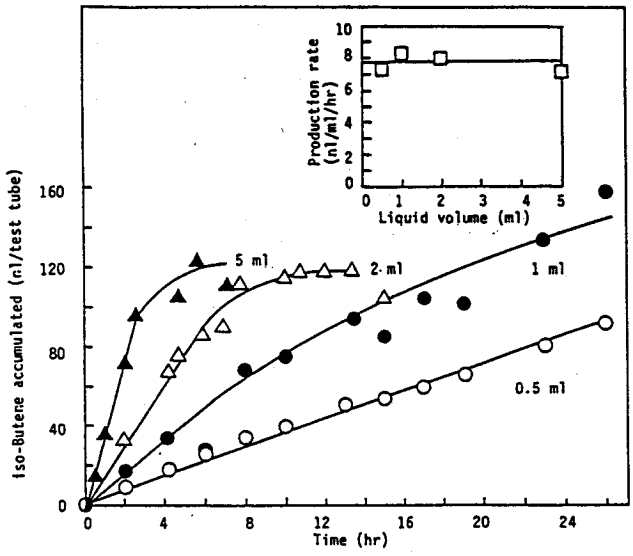


図３－６　イソブテンの生成経時変化に及ぼすシール培養液量の影響

R. minuta IFO 1102の合成培地Ｃ培養液をシール培養に使用した。

４．イソブテン生成の最適ｐＨと最適温度

R. minuta IFO 1102の合成培地Ｃ培養液から調製した休止細胞を用い、シール培養時のイソブテン生成に及ぼすｐＨと温度の影響を調べた結果が図３－７に示されている。　この図から、最適ｐＨは６.0,最適温度は２５°～２７℃であった。休止細胞の代わりに、増殖細胞を使った実験でもほとんど同じ結果が得られた。

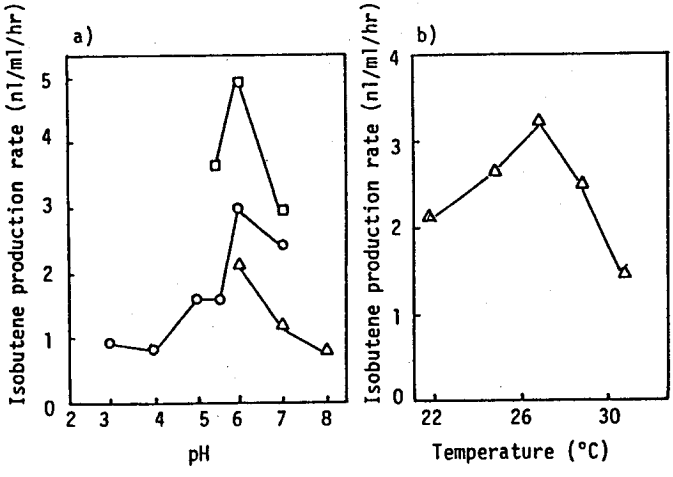


図３－７　イソブテン生成速度とｐＨ，温度の関係

ａ）休止細胞を○，McIlvaine 緩衝液；□,リン酸カリウム緩衝液；△,Sφrensen リン酸緩衝液にそれぞれ懸濁しシール反応した。　ｂ）休止細胞をリン酸カリウム緩衝液,pH6.0に懸濁し各温度でシール反応した。

第４節　考察

イソブテンの生成にアミノ酸の添加が有効であると分かった。　アミノ酸の単独添加ではＬ－ロイシンがもっとも効果があり、Ｌ－フェニルアラニン，Ｌ－チロシンも効果があった。　アミノ酸の複合添加ではＬ－ロイシンとＬ－フェニルアラニン，Ｌ－ロイシンとＬ－チロシン，Ｌ－ロイシンとＬ－トリプトファンがイソブテンの生成速度を相乗的に増加させた。　Ｌ－フェニルアラニンとＬ－チロシン，Ｌ－フェニルアラニンとＬ－トリプトファン，Ｌ－チロシンとＬ－トリプトファンの複合添加ではほとんど効果がなかったことから、Ｌ－ロイシンがイソブテンの生成にまず必要で、Ｌ－フェニルアラニン，　Ｌ－チロシン，　Ｌ－トリプトファンがＬ－ロイシンによるイソブテン生成を相乗的に増加させるものと思われる。

イソブテン生成に酸素が必須なのは、R. minuta の好気性菌としての生育に必要なのか、それとも、この菌のイソブテン生成反応自体に必要なのかは不明であるが、シール培養時に空気を窒素に置換するとイソブテン生成が急激に停止する事実から、酸素がイソブテン生成反応に直接関係しているように思われる。

イソブテンの生成反応におけるＬ－ロイシン，Ｌ－フェニルアラニンおよび酸素の役割については、この菌のin vitroイソブテン生成系の構築、および、この菌のイソブテン生成酵素を抽出、単離、精製した後に詳しい研究をする必要がある。

第５節　要約

R. minuta IFO 1102がイソブテンを生成することを、ガスクロマトグラフィーによる方法以外に、ペーパークロマトグラフィー法やガスクロマトグラフーマススペクトロメーターを使った方法によっても確認した。

R. minuta のイソブテン生成には、Ｌ－ロイシンの添加が必要であり、Ｌ－フェニルアラニンをＬ－ロイシンと共に添加するとイソブテンの生成速度は相乗的に増加した。　他にＬ－チロシン，Ｌ－トリプトファンにも若干の相乗作用が認められた。　酸素がイソブテン生成に必須な因子であることが判明した。

イソブテン生成の最適ｐＨは６.０、最適温度は２５°～　２７℃であった。

第４章　Rhodotorula minuta のイソブテン生成に及ぼすＬ－ロイシン，Ｌ－フェニルアラニンの役割

第１節　緒言

R. minuta IFO 1102のイソブテン生成には、Ｌ－ロイシンの添加が必須であり、Ｌ－フェニルアラニンはこのＬ－ロイシンからのイソブテン生成を相乗的に増加させる効果があった。　これら２種のアミノ酸がどの様にして、イソブテン生成を増加させているのか、生合成経路上の役割はどうなのか全く分かっていない。　そこで、Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンのイソブテン生成に及ぼす効果を、再度詳しく調べ、Ｌ－ロイシンの代謝中間体や、Ｌ－フェニルアラニン関連化合物のイソブテン生成への影響を調べた。　さらに、タンパク質合成阻害剤を使って、Ｌ－フェニルアラニンの持つ効果がある種のタンパク質のde novo 合成との関わりを検討した。　これらの結果をもとに、イソブテン生合成経路を推定し、Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの役割をイソブテン生合成経路との関連で考察した。

第２節　実験材料および方法

１．培地

培養中のｐＨ変動を少なくするために合成培地Ｃ（表３－１）を緩衝能をもたせた表４－１の合成培地ＣＤに改良し、以下の実験に使用した。　実験によっては１ｇ／ｌのＬ－ロイシンやＬ－フェニルアラニンを培地に添加した。

表４－１　合成培地ＣＤの組成

Glucose	20	g/l
$(NH_4)_2SO_4$	5	g/l
KH_2PO_4	5.74	g/l
Na_2HPO_4	9.26	g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0	g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1	g/l
NaCl	0.1	g/l
Thiamine·HCl	0.5	mg/l
p-Aminobenzoic acid	0.5	mg/l
Oligoelement soln.	10	ml/l
pH	7.0	

Oligoelement solution

Na-Citrate	5	g/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	3	g/l
$ZnCl_2$	2	g/l
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	2	g/l
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.2	g/l
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.2	g/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.1	g/l
$K_2B_4O_7 \cdot xH_2O$	0.1	g/l

2．培養方法

５００ｍｌ容 Erlenmeyer flaskと２.６ｌ容ジャーファメンター（いわしや生物科学（株），モデルＭＢ－Ｗ№１）を培養に使用した。 Erlenmeyer flaskによる振とう培養法は第３章，第２節，３．の方法に従った。ジャーファーメンター培養の場合には、１ｌの培地をジャーファメンターに入れて滅菌冷却後、２％の前培養液を植菌し、２５℃，撹拌速度３００ｒｐｍ、通気速度０.５ｖｖｍ で培養を行った。

3．休止細胞の調製法

Erlenmeyer flaskで６０～７０時間培養した培養液１００ｍｌを 1000×g，５分間遠心分離して集菌した。　　この菌体を２回脱イオン水で洗浄し、３３ｍＭ Sφrensen リン酸緩衝液，ｐＨ６.０または５０ｍＭ リン酸カリウム緩衝液， ｐＨ６.０に懸濁した。

4．イソブテン生成速度の測定法

培養液や休止細胞懸濁液のイソブテン生成速度（in vivo）は、 第２章，第２節，４．のシール培養法にしたがった。

ジャーファメンターによる培養では、ジャーファメンターの排気ガス中のイソブテンをガスクロマトグラフィーで測定し、その生成速度を次式によって求めた。

$$P = (C \times F) \times 60 / V$$

Ｐ：イソブテン生成速度（nl/ml-culture broth/hr）；Ｃ：排気ガス中のイソブテン濃度（nl/ml）；Ｆ：通気速度（ml/min）； Ｖ：ジャーファメンター中の培養液量（ml）.

5．培養液中のアミノ酸濃度の測定

培養液中のアミノ酸濃度は、 蛍光検出器を装着した高速液体クロマトグラフ（ＨＰＬＣ）(Waters Associates, Milfold, Massachusetts, USA)を使用して測定した。

培養液試料を1000×g，５分間遠沈し、上澄液に同量の ０.１Ｎ 塩酸を加え、

４.５μｍのポアサイズのメンブレン（エキクロディスク３，ジャーマン　サイエンス　ジャパン株式会社，東京）で濾過し、この濾液５０μｌをＨＰＬＣに注入した。

クロマトグラフィー用の純度の高い試薬を用い、調製した全ての溶液は０.４５μｍ　ＨＡ　フィルター（Millipore Corp., Bedfold, Massachusetts, USA）で濾過した。　ｐＨ勾配による分析のために、下記２種類の緩衝液を使用した。
①　１ｌの脱イオン水中に１９.６ｇのクエン酸ソーダと１.０ｇのフェノールを含有し、硝酸でｐＨを３.０５に調節した液。　②　１ｌの脱イオン水中に１.５ｇのホウ酸と２１ｇの硝酸ソーダを含有し、水酸化ナトリウムでｐＨ９.６０に調節した液。

６．タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度は、あらかじめ試料を１Ｍの水酸化ナトリウムで煮沸、抽出し牛アルブミンを標準物質とするLowry らの方法（26）にしたがって測定した。

７．グルコース濃度の測定

培養液を　1000×g，５分間　遠心分離した上澄液について、グルコスタット（Worthington Biochemical Co., Freehold, NJ.USA）法に従って測定した。

８．菌体濃度の測定

菌体の乾燥重量あるいは菌体のタンパク質量を測定し、g dry cell wt./lあるいはmg protein/lで表示した。

第３節　結果

１．Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの添加効果

合成培地ＣＤにＬ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンを各１ｇ／ｌ添加した培地で約７０時間培養し、その培養液を３時間シール培養しガスクロマトグラフにかけた結果を図４－１に示した。

滞留時間（ＲＴ）の短い２つのピークは空気中に含まれているメタンとプロパンであり、ＲＴ６８４秒のピークがイソブテンに相当する。　合成培地ＣＤで培養した場合、イソブテン以外の炭化水素ガスの生成はなかった。

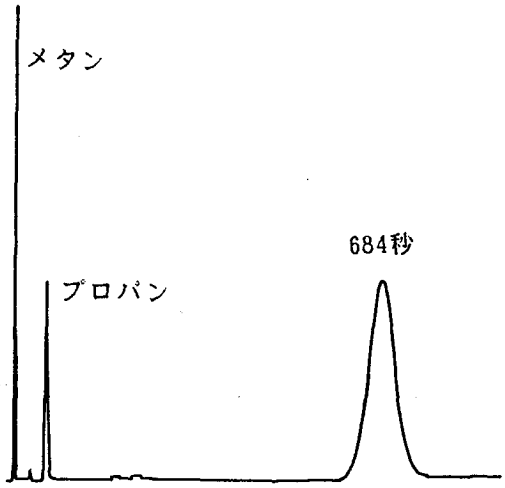


図４－１　R. minuta IFO 1102の生成するガス状炭化水素のガスクロマトグラム

島津ガスクロマトグラフＧＣ－８Ａ，カラムサイズ5mm×2m；キャリアガス:チッ素
；流速:50ml/min；カラム温度:80℃；カラム充てん剤:活性アルミナ

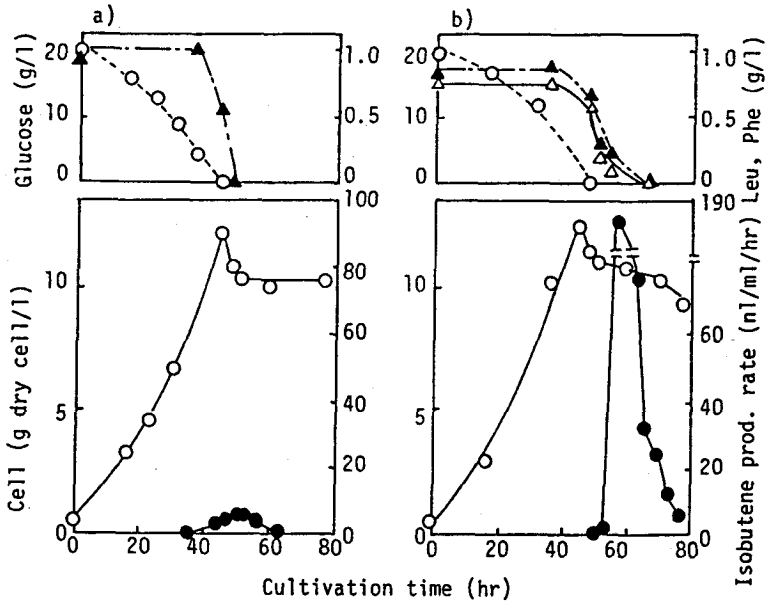


図４－２　R. minuta IFO 1102のジャーファーメンター培養経時変化

ａ）Ｌ－ロイシン（1g/l）を添加培養　ｂ）Ｌ－ロイシンとＬ－フェルニアラニン
（各1g/l）同時添加培養
－○－ 菌体濃度；－●－ イソブテン生成速度；--○-- グルコース濃度；
－-－▲－-－ Ｌ－ロイシン濃度；－△－ Ｌ－フェニルアラニン濃度

１ｇ／ｌのＬ－ロイシン単独添加、およびＬ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンを各１ｇ／ｌ同時添加した合成培地ＣＤでのR. minuta IFO 1102のジャーファーメンター培養経時変化を図４－２に示す。　Ｌ－ロイシン単独添加培養では、グルコース濃度がほとんど０まで消費され、菌の増殖が停止した頃から、Ｌ－ロイシンの消費が始まり、それに伴ってイソブテンの生成が始まり、Ｌ－ロイシンの消失とともにイソブテン生成速度も減少した。

Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの同時添加培養の経時変化もＬ－ロイシン単独添加の場合とほとんど同じであった。　しかし、Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの同時添加では、ｂ）図に示すように、イソブテン生成速度はＬ－ロイシン単独添加時の約２０倍まで増加した。

Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンのイソブテン生成に及ぼす効果をさらに詳しく調べる目的で、下記３種類の培養菌体をそれぞれ３３ｍＭのSφrensen リン酸緩衝液に懸濁した休止細胞を調製し、２５℃，１０時間シール培養してイソブテンの生成速度を調べた。　結果が図４－３に示されている。　それぞれの菌体は以下の通りである。

①Ｌ－ロイシン単独添加培養した菌体　②Ｌ－フェニルアラニン単独添加培養した菌体及び　③アミノ酸無添加で培養した菌体。

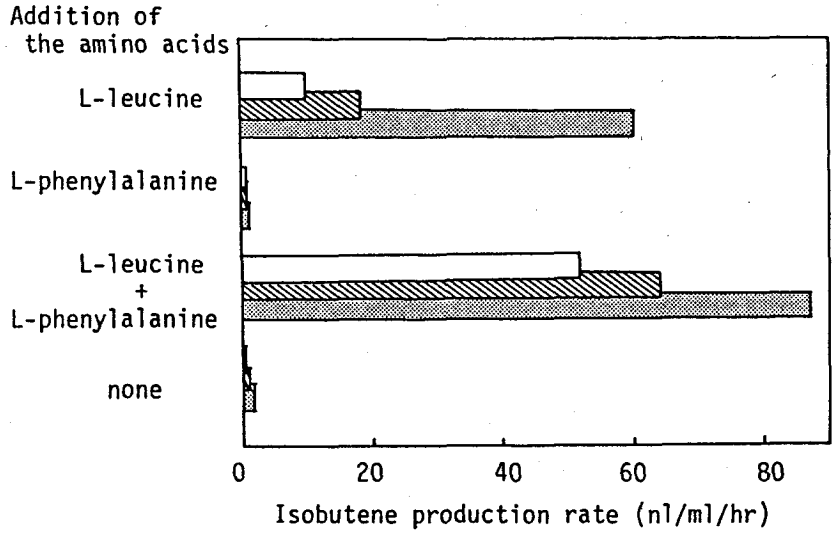


図４－３　イソブテン生成に及ぼすＬ－ロイシン，Ｌ－フェニルアラニンの添加効果

□ 合成培地ＣＤで培養した菌　▧ 合成培地ＣＤ＋Ｌ－ロイシン（1g/l）で培養した菌　▒ 合成培地ＣＤ＋Ｌ－フェニルアラニン（1g/l）で培養した菌

菌体濃度：12.6g dry wt./l

あらかじめ合成培地ＣＤ（Ｌ－フェニルアラニン無添加：□）、およびＬ－ロイシン添加培地（Ｌ－フェニルアラニン無添加：▨）で培養した菌体では、シール培養時にＬ－ロイシンだけを添加すると低いイソブテン生成速度であるが、Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンを同時添加すると相乗的に生成速度は増大した。

あらかじめＬ－フェニルアラニン添加培地（▩）で培養した菌体では、シール培養時にＬ－ロイシンだけ添加および、Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンを同時添加すると高いイソブテン生成速度を示した。　どのような培地で培養した菌体でも、シール培養時にＬ－ロイシンを添加、およびＬ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンを同時添加するとイソブテンを生成するが、シール培養時にＬ－フェニルアラニンだけ、および全く無添加、つまりシール培養時にＬ－ロイシン無添加では、イソブテンをほとんど生成しなかった。

以上の実験結果から、次のような推論が得られた。

①Ｌ－ロイシンの添加はイソブテンの生成には必須である。　Ｌ－ロイシンをあらかじめ菌の増殖培養時に添加すると、他の代謝に利用されるためか無効であり、シール培養時に添加することが必要である。　このことから、Ｌ－ロイシンはイソブテンの前駆物質であろうと考えられる。

②Ｌ－フェニルアラニンの添加は、強いイソブテンの生成には必要である。　しかし、Ｌ－ロイシンと異なって、あらかじめ増殖時に添加培養しても、あるいは、シール培養時に添加しても有効である。　このことから、Ｌ－フェニルアラニンはイソブテン生成酵素の誘導物質ではないかと考えられる。

２．Ｌ－ロイシン代謝中間体とＬ－フェニルアラニンの添加効果

Ｌ－ロイシンがイソブテンの前駆物質であることを明らかにし、イソブテンの生合成経路を推定するため、Ｌ－ロイシンの代謝中間体の添加実験を行った。　またＬ－フェニルアラニンとこれら代謝中間体との相乗効果についても調べた。　結果が図４－４に示されている。

アミノ酸無添加で培養した菌体にＬ－ロイシンおよびＬ－ロイシンの代謝中間体（各７．６ｍＭ）を単独に添加した。　Ｌ－ロイシン，Ｌ－フェニルアラニン無添加であらかじめ培養した菌体にＬ－ロイシンまたは、その代謝産物と考えられるα－ケトイソカプロン酸，イソ吉草酸をそれぞれ添加してシール培養するとＬ－ロイシンと同様にイソブテンを生成した（図４－４，a）目）。　しかしβ－メチル－クロトン酸の添加ではイソブテンを生成しなかった。　図４－４ a）のオープンシ

ンボル（□）から、Ｌ－ロイシンの代謝中間体とＬ－フェニルアラニンの同時添加による相乗効果がＬ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの同時添加の場合と比べて劣ってはいるが、認められた。

これは有機酸とＬ－フェニルアラニンの間で、細胞への取り込みの拮抗があり、イソブテンの前駆体が十分には取り込めないためではないかと考えた。　そこであらかじめ、Ｌ－フェニルアラニン添加合成培地ＣＤで培養した菌体にＬ－ロイシンまたは、その代謝中間体を単独に添加してシール培養した（図４－４，b））。

その結果、Ｌ－ロイシン，α－ケトイソカプロン酸およびイソ吉草酸に高いイソブテン生成があり、なかでもイソ吉草酸に最も高いイソブテン生成が認められた。

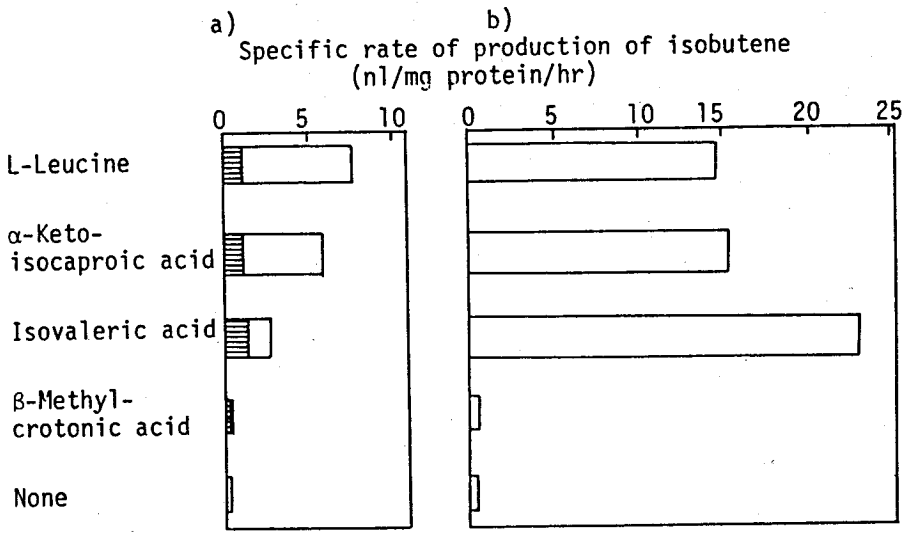


図４－４　Ｌ－ロイシン代謝中間体添加のイソブテン生成に及ぼす効果

ａ）合成培地ＣＤで培養した菌を用いた。▤，Ｌ－フェニルアラニン無添加；□，Ｌ－フェニルアラニン（1g/l）を各化合物（各7.6mM）と同時添加した。ｂ）Ｌ－フェニルアラニン（1g/l）を含む合成培地ＣＤで培養した菌を用いた。

３．Ｌ－フェニルアラニンの代替物質

Ｌ－フェニルアラニン以外にイソブテン生成に有効な化合物があるかを調べた。合成培地ＣＤで培養した菌体から休止細胞を調製し、これにＬ－ロイシン（１ｇ／１）と共に種々の化合物をそれぞれ同時添加した。　結果が図４－５に示されている。　各化合物単独添加ではイソブテン生成速度は０.６７ nl/mg protein/hr を超えなかったが、図４－５に示すようにＬ－ＤＯＰＡと p－フロロフェニルアラニンを除く、芳香族カルボン酸と芳香族アミノ酸はＬ－ロイシンとの共存下でイソブテンの生成を相乗的に増加させた。

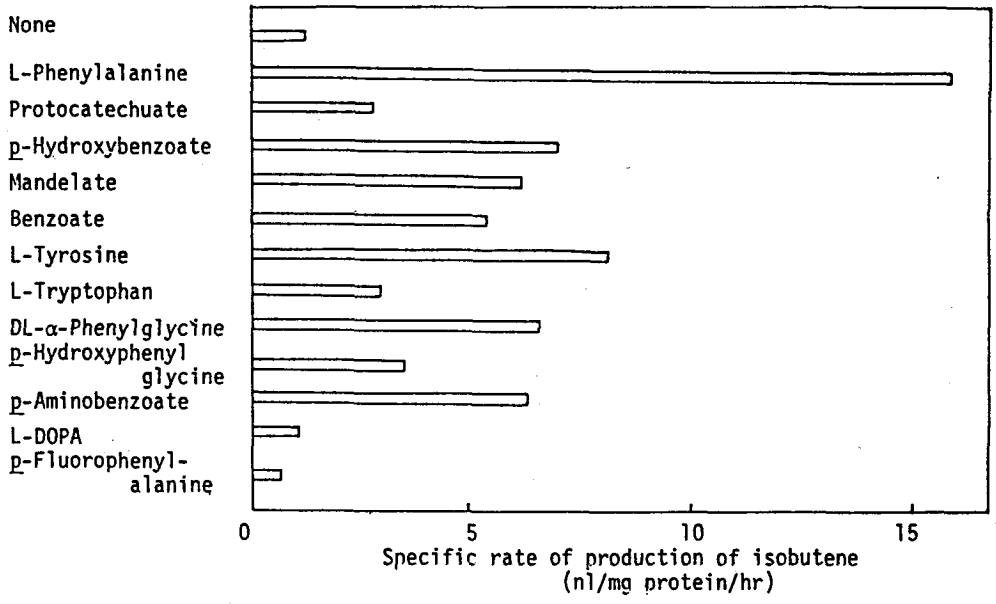


図４－５　Ｌ－フェニルアラニンおよび芳香族化合物添加のイソブテン生成に対する効果

0.6mMの安息香酸とＬ－ＤＯＰＡ以外の化合物は6.0mMずつ添加した。これらの化合物はＬ－ロイシン（1g/l）と同時添加した。Ｌ－ＤＯＰＡ：3-Hydroxy-L-Tyrosine

4．L－フェニルアラニンの作用機作

仮にL－フェニルアラニンが“イソブテン生成酵素”を誘導しているなら、タンパク質合成阻害剤で、L－フェニルアラニンの作用はなくなるのではないかと考えた。　合成培地CDで培養した菌と、合成培地CDにL－フェニルアラニン（1g／l）を添加して培養した菌の2種類の休止細胞を調製して実験に使った。　タンパク質合成阻害剤として最終濃度0.1mMのシクロヘキシミドを用いた。

実験結果を図4－6に示した。　合成培地CDであらかじめ培養した菌体（図4－6 a)）では、L－ロイシンとL－フェニルアラニンを同時添加することによって、短いラグの後にイソブテンの生成量は増加した。　しかし、同時にシクロヘキシミドを添加するとイソブテン生成量の増加を完全に阻害し、L－ロイシン単独添加時とほぼ同じレベルにとどまった。

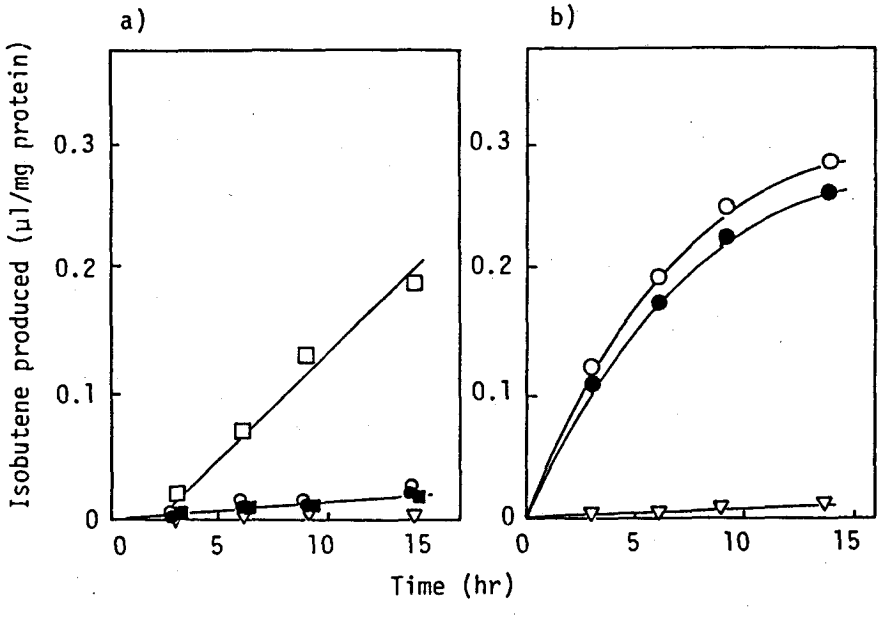


図4－6　シクロヘキシミドによるイソブテン生成の阻害

a）合成培地CDで培養した菌体を用いた　b）合成培地CDにL－フェニルアラニン（1g/l）を添加した培地で培養した菌体を用いた　□,■：L－ロイシンとL－フェニルアラニンを反応開始時に同時添加した。　○,●：L－ロイシンを反応開始時に単独添加した。　▽：アミノ酸は添加しなかった。　■,●:シクロヘキシミド0.1mM添加　□,○:シクロヘキシミド無添加

Ｌ－フェニルアラニン添加合成培地ＣＤであらかじめ培養した菌体（図４－６b））では、Ｌ－ロイシン単独添加でもかなり早い速度でイソブテンが生成されシクロヘキシミド添加によるイソブテン生成阻害はほとんど生じなかった。

これらの事実は、Ｌ－フェニルアラニンがある種のタンパク質（多分イソブテン生成酵素）合成の引金になること、Ｌ－フェニルアラニンで培養した菌では培養終了時には既にこのタンパク質が合成されていることを意味している。

第４節　考察

Ｌ－ロイシンの代謝中間体で、最も代謝の下流にあり、イソブテン生成を促進する物質は、イソ吉草酸であった。　このことから、イソ吉草酸はイソブテンの最も近い前駆物質であると考えられる。

Ｌ－フェニルアラニンとイソ吉草酸が相乗的にイソブテン生成を高めること、およびシクロヘキシミドを用いた実験の結果とあわせて考えると、Ｌ－フェニルアラニンはイソ吉草酸とイソブテンの間の反応を触媒する“イソブテン生成酵素”を誘導しているものと思われる。　図４－７にイソブテン生成経路と、Ｌ－ロイシン，Ｌ－フェニルアラニンの役割を推測して表した。

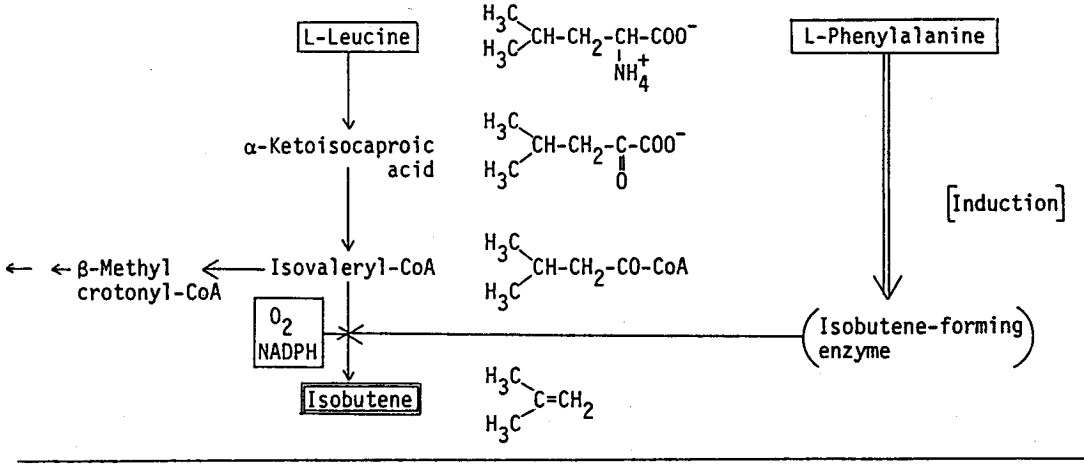


図４－７　イソブテン生成経路とＬ－ロイシン，Ｌ－フェニルアラニンの役割

Ｌ－ロイシンは、α－ケトイソカプロン酸からイソ吉草酸を経由してアセチルＣｏＡなどへ代謝されて行くが、中間代謝化合物イソバレリールＣｏＡからイソプテンが生成する。　この反応を触媒するイソプテン生成酵素をＬ－フェニルアラニンが誘導している。

図４－６ b)で シール培養時間に伴ってイソプテン生成速度は徐々に減少した。これは“イソプテン生成酵素”の不安定性によるものであろう。　この図よりこの酵素の半減期は４.５時間と推定された。

Ｌ－フェニルアラニン以外の様々な芳香族化合物や一般に代謝系の中間体としては存在しないような、合成のフェニルグリシンやヒドロキシフェニルグリシンもＬ－ロイシンとの同時添加でイソプテンの生成を相乗的に増加させる作用があった。Ｌ－フェニルアラニンの代替物質として、ベンゼン環とカルボン酸をもった多くの化合物が、この酵素の誘導剤となり得ることが判明した。　なぜ、このように広い範囲の化合物が“イソプテン生成酵素”の誘導剤として働くのか、現在のところ不明である。

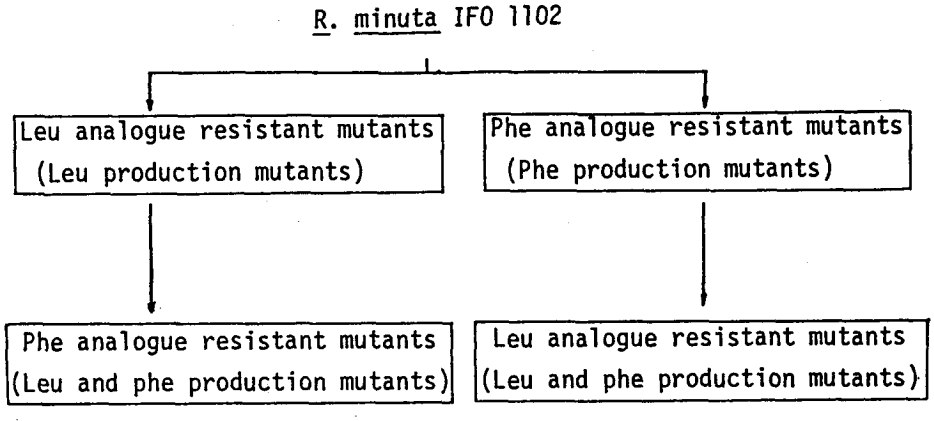
第５節　要約

Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンのイソプテン生成における役割について調べた。　Ｌ－ロイシンはイソプテンの前駆体であり、Ｌ－ロイシン代謝中間体のイソ吉草酸はイソプテンのより近い前駆体であることが判明した。　Ｌ－フェニルアラニンは“イソプテン生成酵素”の誘導物質として働くようであった。　Ｌ－フェニルアラニン以外にベンゼン環とカルボン酸をもった多くの化合物が、Ｌ－ロイシンからのイソプテン生成を相乗的に増加させた。

第５章　Rhodotorula minutaのアミノ酸アナログ耐性変異株によるイソブテン生成

第１節　緒言

前章までの知見からRhodotorula minuta IFO 1102 によるイソブテンの生成には、その培養培地にアミノ酸（Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニン）を添加することが、必要であった。　このことは、イソブテンの生成を律速しているのは、Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの生合成であることを示している。　そこでＬ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの外部からの添加なしでも、イソブテンを生成するような変異改良株の分離を試みることにした。　具体的には、ロイシンアナログとフェニルアラニンアナログの両耐性変異株を誘導分離することにした。



ロイシン、フェニルアラニン両アナログ耐性株の分離手順

アミノ酸アナログ耐性変異株は、従来から各種アミノ酸発酵において数多く利用されて、リジン，イソロイシン，トリプトファンなどの工業的生産用菌株として使われてきた（27）。　アミノ酸アナログ耐性株の中にはそのアミノ酸生合成の調節が解除され、そのアミノ酸を多量に生産する変異株の得られる確率が高くなることがある。　ここでいうアナログとは、その分子構造が天然のアミノ酸に類似し、かつ微生物に対して生育阻害作用を有し、その作用が対応するアミノ酸により拮抗されるようなアナログを指す。　実際にR. minuta IFO 1102に適用できるようなＬ－ロイシンアナログやＬ－フェニルアラニンアナログには、どのようなものがあるかを検討した結果、従来から他の菌株で使用された実績のある化合物の中から上記の基準に合致した化合物としてＬ－ロイシンアナログには４－アザ－ＤＬ－ロイ

シンを、Ｌ－フェニルアラニンアナログには p－フロロフェニルアラニンを選定した。　そこで 上図に示すように、R. minutaの４－アザ－ＤＬ－ロイシン，p－フロロフェニルアラニン耐性変異株を誘導分離し、 Ｌ－ロイシンやＬ－フェニルアラニン無添加でもイソブテンを生成できる生産菌への育種改良の実験を行った。

第２節　実験材料及び方法

１．使用菌株

R. minuta IFO 1102およびこの菌株から新たに分離したアミノ酸アナログ耐性株を使った。

２．培地

表３－１の合成培地Ｃの窒素源（硫酸アンモニウム）をアスパラギン(1g/l)に置き換えた液体合成培地ＣＬ、この培地ＣＬに２％寒天を加えた寒天合成培地ＣＡ、および窒素源をポリペプトンに置き換えた液体合成培地Ｄを用いた。　イソブテン生成能の測定用には表４－１の合成培地ＣＤを使った。

３．イソブテン生成速度測定法

菌の培養法や、シール培養法、イソブテンの生成速度の測定法などは第２章の方法に従った。　イソブテンの蓄積量はイソブテン生成速度にシール培養時間を乗じた値の総和として求めた。

４．菌体濃度

６６０ｎｍでのoptical density を測定して求めた。

５．アミノ酸アナログ耐性変異株の分離法

5.1.　ＮＴＧ処理

スラントから１００ｍｌ容Erlenmeyer flask中の２０ｍｌ液体合成培地Ｄに１白菌耳の菌を植菌し、２５℃ロータリーシェーカーで培養した。　培養した菌を０.０５Ｍマレイン酸緩衝液，ｐＨ６.０で２回洗浄し、一定量の同じマレイン酸緩衝液に懸濁した。　Ｎ－メチル－Ｎ’－ニトロ－Ｎ－ニトロソグアニジン（ＮＴＧ）を３００μｇ／ｍｌになるように菌懸濁液に添加し、３０℃，３０分間インキ

ュベートした。　その後、菌を滅菌水で洗浄後、再び液体合成培地Ｄに植菌し、１～２日間２５℃，ロータリーシェーカーで培養した。

5.2.　アザロイシン耐性変異株の分離

ＮＴＧ処理した菌を滅菌水で洗浄後、４－アザ－ＤＬ－ロイシン（アザロイシン）を入れた寒天合成培地ＣＡにプレーティングし、２５℃恒温室で６日間培養を行った。　増殖してきたコロニーを同じ濃度のアザロイシンを含むプレートにストリークして純化した。　得られたコロニーをアザロイシン耐性株として分離した。

5.3.　p－フロロフェニルアラニン耐性変異株の分離

アザロイシン耐性株と同じ方法でアザロイシンを p－フロロフェニルアラニン（Ｐｆｐ）に置き換えることで、Ｐｆｐ耐性株を得た。　また、これ以外の方法として、寒天合成培地ＣＡにＮＴＧ処理した菌をプレーティングし、その中央部にＰｆｐの粉末を置き、この粉末周辺で増殖するコロニーから、Ｐｆｐ耐性株として分離する方法も用いた。

６．各種酵素活性の測定法

6.1.　菌体破砕法及び無細胞抽出液の調製

親株（野性株）または変異株を合成培地ＣＤで２０時間培養して得られた培養液から菌を集菌し、５０ｍＭトリス塩酸緩衝液，ｐＨ７．５で２回洗浄し、同緩衝液に懸濁した。　この懸濁液をフレンチプレッシャー（1500kg/cm²）にかけ菌体を破砕した。　菌体の破砕液に適当量のアルミナを加えて20000×g，２０分間遠心分離し、上澄液を無細胞抽出液として調製した。

6.2.　α－イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性測定法（28）

１Ｍ トリス塩酸緩衝液，０．４Ｍ ＫＣｌ，４ｍＭ アセチルＣｏＡ，２０ｍＭ α－ケトイソバレリック酸と無細胞抽出液各０．０５ｍｌを混合し、３０℃、１０分間反応させた。　その後、０．７５ｍｌのエタノールと０．５ｍｌの１ｍＭ dithiobis-2-nitrobenzoic acidを含む２０ｍＭトリス塩酸緩衝液を添加し、α－ケトイソバレリック酸とアセチルＣｏＡとの反応によって遊離する ＣｏＡを ４１２ｎｍで測定した。

6.3. α－アセトヒドロキシ酸シンターゼ活性測定法（29）

次の試薬を含む混合液［４０ｍＭ　ピルビン酸ナトリウム，　０.０５ｍＭ　フラビンアデニンジヌクレオチド（ＦＡＤ），　０.２ｍＭ　チアミンピロリン酸（ＴＰＰ），１０ｍＭ　塩化マグネシウム，１００ｍＭ　リン酸カリウム緩衝液，ｐＨ８.０］、１ｍｌをあらかじめ３７℃で予熱し、次に無細胞抽出液を０.１ｍｌ添加した。　３７℃，１５分間反応を行った後、５０％硫酸を０.１ｍｌ加え反応を停止させた。　ピルビン酸とＴＰＰの反応によって生成したアセト乳酸を３７℃，３０分間保温してアセトインに転換した。　この液に、０.５％クレアチンと５％ナフトールを含む２.５Ｎの水酸化ナトリウム溶液を０.２ｍｌ加え、１時間室温で静置後アセトインを５４０ｎｍで測定した。

6.4. 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate（ＤＡＨＰ）シンターゼ活性測定法（30）

エリスロース－４－リン酸とホスホエノールピルビン酸の反応によって生成するＤＡＨＰを測定した。

２ｍＭ　エリスロース－４－リン酸と２ｍＭ　ホスホエノールピルビン酸および適当量の無細胞抽出液を含む２５ｍＭ リン酸緩衝液，ｐＨ７.０の反応液を３７℃，１０分間酵素反応させた。　その後 ２０％ トリクロロ酢酸を４０μｌ加え遠心分離（1000×g,５分間）後、上澄液１００μｌに対して　２５ｍＭの過よう素酸１００μｌを加え再び ３７℃，３０分間反応させた。　この液に、塩酸に溶解した亜ヒ酸ナトリウム２００μｌと０.３％のチオバルビツール酸８００μｌを加え、１００℃，１０分間反応させ、５４９ｎｍの吸光度を測定した。

6.5. コリズミン酸ムターゼ活性測定法

４０ｍＭリン酸緩衝液，ｐＨ７.０中に１ｍＭ コリズミン酸と無細胞抽出液の適当量を含む反応液２５０μｌを調製し、３７℃，１０分間反応させた。　生成したプレフェン酸をホスホエノールピルビン酸に変換させるために、１Ｎ塩酸を２５０μｌ反応液に加え、再び３７℃，１０分間反応させた。　この液に１Ｎ水酸化ナトリウムを１.５ｍｌ加えて３２０ｎｍの吸光度を測定した。

6.6. プレフェン酸デヒドラターゼ

４０ｍＭリン酸緩衝液，ｐＨ７.０中に１ｍＭ プレフェン酸と適当量の無細胞

抽出液を含む５００μｌの反応液を調製し、３７℃，１０分間反応させ、１Ｎの水酸化ナトリウムを加えてから３２０ｎｍの吸光度を測定した。

第３節　結果

１．アザロイシン耐性変異株の分離

アザロイシン５ｍＭを含む寒天合成培地ＣＡで増殖したコロニーを純化し、アザロイシン耐性株を分離した。　その中から、４株を選んでロータリーシェーカーで、培養し、イソブテンの生成量を測定した。　結果が図５－１に示されている。

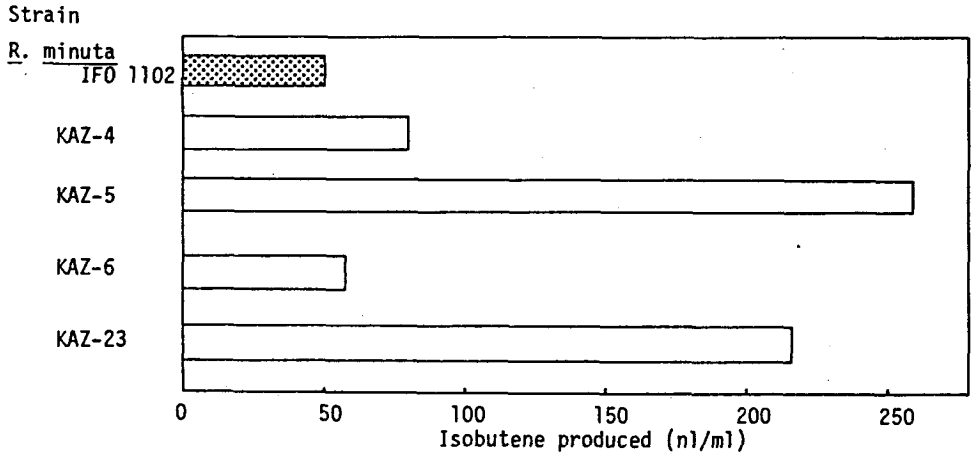


図５－１　アザロイシン耐性変異株のイソブテン生成量

R. minuta IFO 1102：親株；KAZ-4,-5,-6,-23アザロイシン耐性株，合成培地ＣＤを用いた。

この図に示すように、アミノ酸無添加で親株の５倍のイソブテンを生成するＫＡＺ－５株が取得できた。　ＫＡＺ－５株に、Ｌ－フェニルアラニン（１ｇ／ｌ）のみを添加した場合には、親株（野性株）が１３０ｎｌ／ｍｌのイソブテン生成量であったのに対して、ＫＡＺ－５株では１５２８ｎｌ／ｍｌと親株の約１０倍を超えるイソブテンを生成した。　図５－２にこの時の培養経時変化を示した。

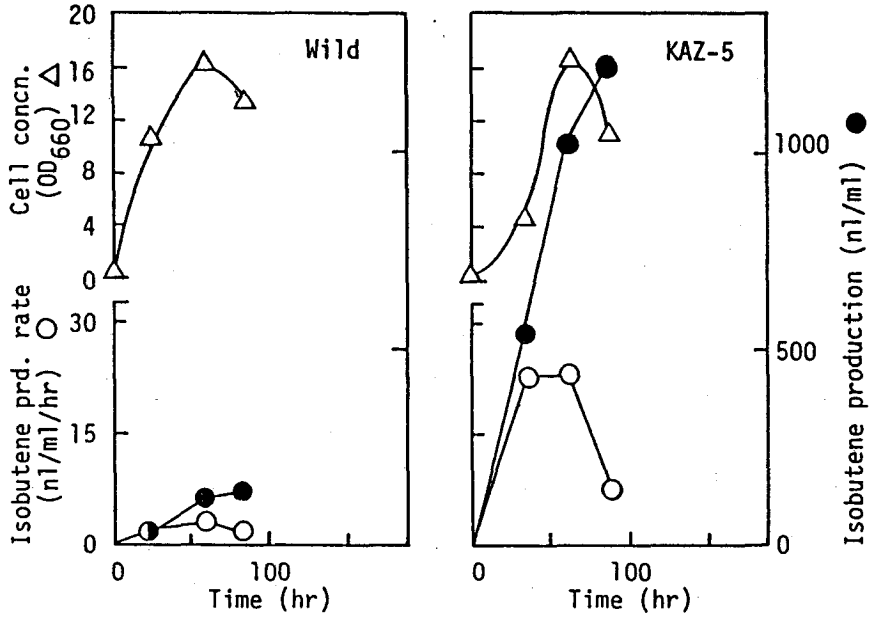


図５－２　親株（野性株）とアザロイシン耐性株（KAZ-5）の培養経時変化

合成培地ＣＤにＬ－フェニルアラニン（1g/l）を含む培地を使った。○，イソブテン生成速度（nl/ml/hr）；●，イソブテン生成量（nl/ml culture broth）；△，菌体濃度（OD_{660}）

２．アザロイシン耐性変異株（ＫＡＺ－５）の生理的性質

2.1.　ＫＡＺ－５株のアザロイシン耐性度

液体合成培地　ＣＬ（窒素源としてアスパラギンを含む）を使用し、アザロイシンをそれぞれ本培養培地に　０，５，５０，１００ｍＭ添加した。　親株とＫＡＺ－５株を前培養液から本培養液に２％植菌し、２５℃での菌の増殖を調べた。図５－３に示されているように、親株では５ｍＭのアザロイシンで増殖が抑えられているのに対し、ＫＡＺ－５株では１００ｍＭでも正常に増殖した。　したがって、ＫＡＺ－５株は少なくともアザロイシン１００ｍＭまでの耐性度を付与されていた。

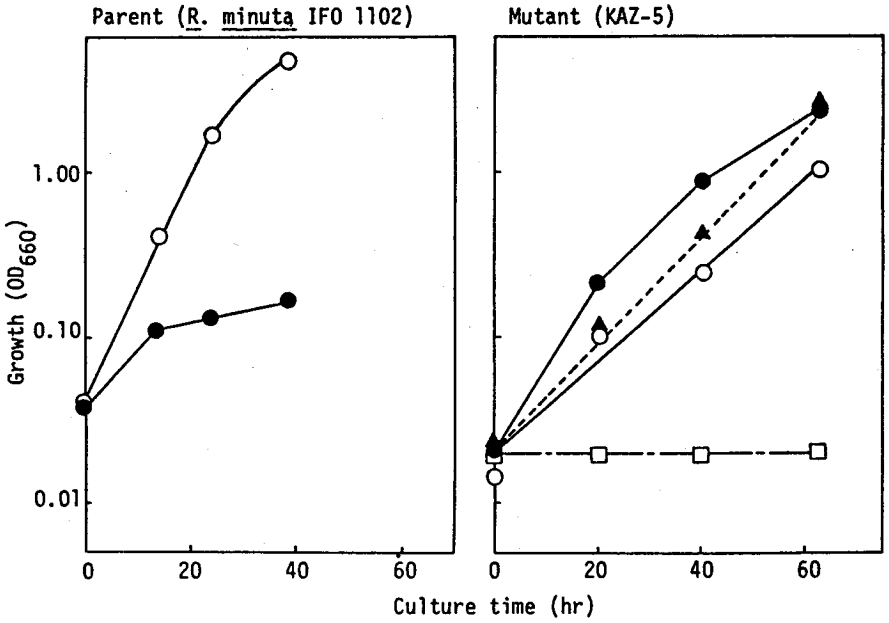


図５－３　親株とKAZ-5株のアザロイシン存在下での増殖

アザロイシン濃度：○,0mM；●,5mM；▲,100mM；□,200mM

2.2.　ＫＡＺ－５株の変異点

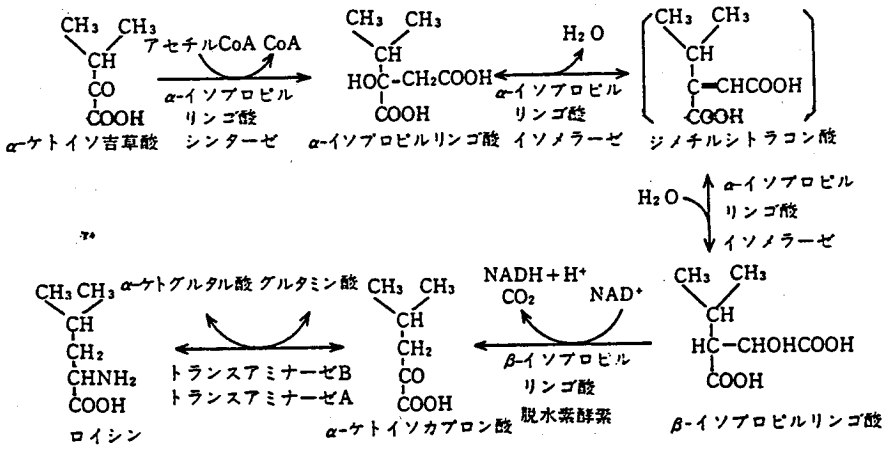


図５－４　ロイシンの生合成経路

一般にＬ－ロイシンは図５－４の経路を経由して生合成されると言われている。この経路の中でα－ケトイソイソ吉草酸からα－イソプロピルリンゴ酸への反応を

触媒する酵素であるα－イソプロピルリンゴ酸シンターゼがＬ－ロイシンによってフィードバック阻害を受けることが知られている（31）。　そこで親株とＫＡＺ－５株のα－イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性を比較したところ、図５－５に示す結果を得た。

α－イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性測定用反応混液に０から５ｍＭまでＬ－ロイシン添加量を逐時増加すると、親株では酵素活性が急激に低下し、２ｍＭ以上では無添加に対して１０％以下の活性となった。　これはα－イソプロピルリンゴ酸がＬ－ロイシンによってフィードバック阻害を受けるためと思われる。

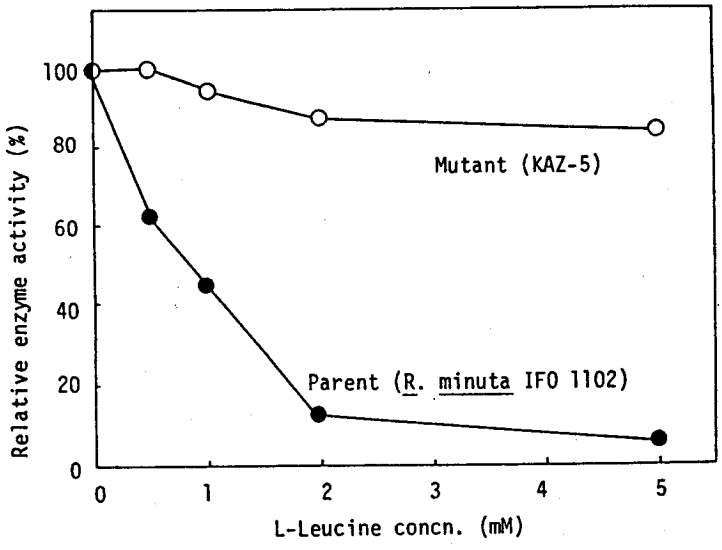


図５－５　Ｌ－ロイシンによるα－イソプロピルリンゴ酸シンターゼの阻害

Ｌ－ロイシン無添加の活性：親株は0.027μmol/mg protein/min, KAZ-5株は0.038 μmol/mg protein/min

これに対してＫＡＺ－５株ではＬ－ロイシンによる阻害はほとんど受けなかった。　したがって、ＫＡＺ－５株ではＬ－ロイシンからイソプロピルリンゴ酸シンターゼへのフィードバック阻害の解除された株であると考えられる。

なお、図５－６に示したＬ－ロイシン生合成経路の上流側にあるアセトヒドロキシ酸シンターゼも調節を受ける可能性があったので、 培地中に Ｌ－ロイシン，Ｌ－バリン，Ｌ－イソロイシンを添加して培養したが、親株、変異株ともにこの酵素活性には差が認められなかった。

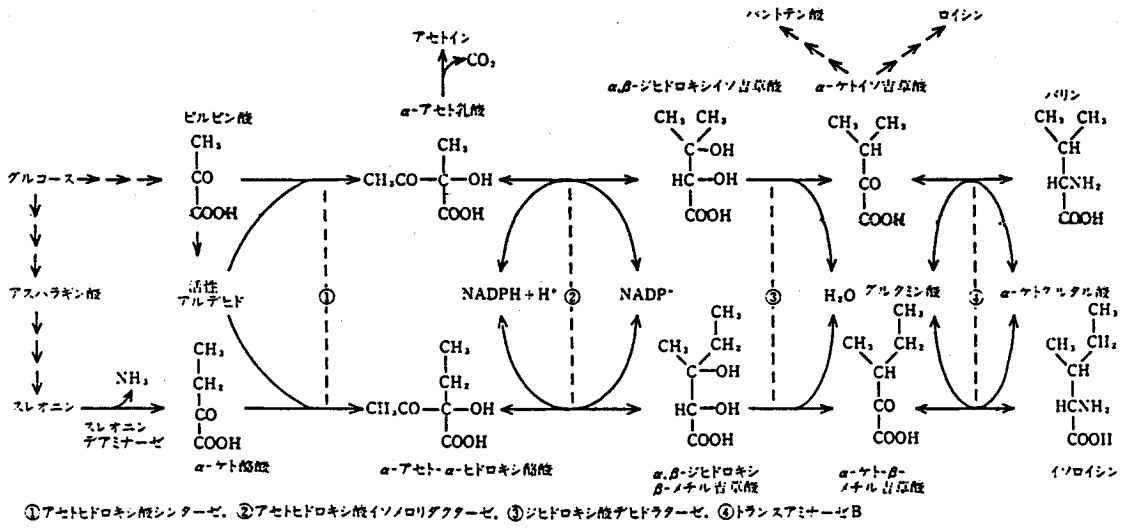


図５－６　バリン、イソロイシン、ロイシンの生合成経路

３．p－フロロフェニルアラニン耐性変異株の分離

寒天合成培地ＣＡのプレート上に p－フロロフェニルアラニンの粉末を置く方法で耐性株を分離した。　得られた耐性株をＬ－ロイシン１ｇ／１添加合成培地ＣＤで培養した結果が図５－７に示されている。

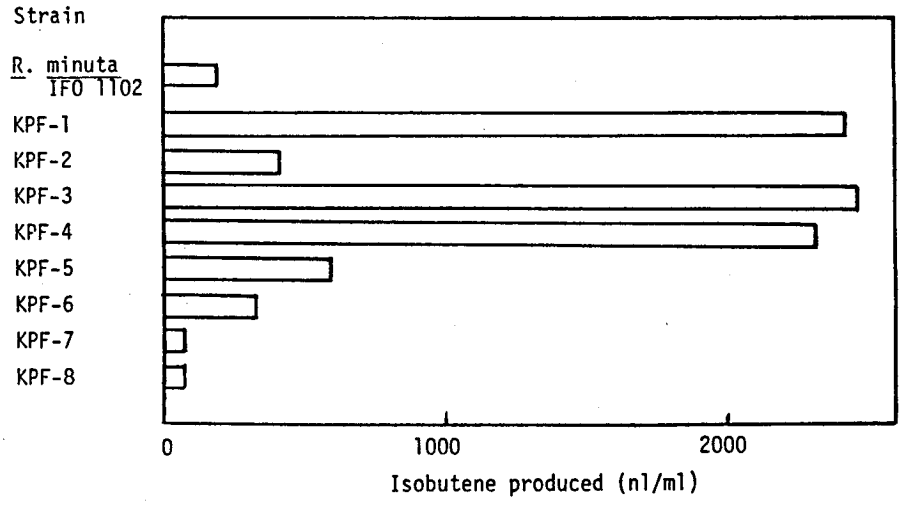


図５－７　p-フロロフェニルアラニン 耐性変異株のイソブテン生成量

培地は合成培地ＣＤにロイシン（1g/l）添加した。　（本培養約90～110hr）

これらの耐性株の中でＫＰＦ－３は親株の１２倍のイソブテン生成量を示した。このようにして、アザロイシン，p－フロロフェニルアラニン（Ｐｆｐ）それぞれの耐性変異株のなかに、イソブテン生成量の増加した変異改良株の取得できることが分かった。　しかし、アザロイシン耐性株には、Ｌ－フェニルアラニンの添加が、Ｐｆｐ耐性株にはＬ－ロイシンの添加が多量のイソブテン生成のために必要であった。

４．アザロイシン，p－フロロフェニルアラニン 両耐性変異株の分離

アザロイシン耐性のＫＡＺ－５株と、Ｐｆｐ耐性のＫＰＦ－３株を親株にして両アナログの二重耐性株の分離を試みた。　それぞれの親株をＮＴＧ処理した後、寒天合成培地ＣＡにプレーティングし、ＫＡＺ－５株の場合には、中央にＰｆｐ粉末を、ＫＰＦ－３株の場合にはアザロイシン粉末を置き、これら粉末の周縁部に生育してくるそれぞれの耐性株を分離した。

それぞれの親株から分離したアザロイシン，p－フロロフェニルアラニン両耐性株ＫＡＰ－３，ＭＰＡ－２について、イソブテンの生成量および各アミノ酸アナログに対する耐性度を親株と比較した結果が表５－１である。

表５－１　親株とアザロイシン，p-フロロフェニルアラニン耐性株の比較

Strain	Minimum concn. of Azl or Pfp causing the growth inhibition		Isobutene produced	Source
	Azl (mM)	Pfp (μM)	(nl/ml)	
R. minuta IFO 1102	5	82	51	-
KAZ-5 (Azl^r)	200	NT*	261	R. minuta IFO 1102
KAP-3 (Azl^r·Pfp^r)	200	275	490	KAZ-5
KPF-3 (Pfp^r)	NT*	>275	230	R. minuta IFO 1102
MPA-2 (Pfp^r·Azl^r)	200	>275	554	KPF-3

NT*: not tested,　Azl: DL-4-Azaleucine,　Pfp: *p*-Fluorophenylalanine

R. minuta IFO 1102 （野性株）は アザロイシン，Ｐｆｐのそれぞれ５ｍＭと８２μＭで増殖阻害され、またアミノ酸無添加で５１ｎｌ／ｍｌ culture broth のイソブテンを生成した。　二重耐性変異株のＫＡＰ－３やＭＰＡ－２株ではアザ

ロイシンの耐性度は約２００ｍＭと親株の４０倍、Ｐｆｐの耐性度は約２７５μＭと親株の３倍以上であった。　また二重耐性変異株ＫＡＰ－３株のイソブテン生成量は４９０ｎｌ／ｍｌ culture broth、ＭＰＡ－２株では５５４ｎｌ／ｍｌに増大した。　これらの結果から、ロイシンアナログ、フェニルアラニンアナログ耐性付与の順序に係わりなく、イソブテン生成量の増大した株が得られた。

ＫＡＰ－３株を用いて、Ｐｆｐ耐性度をさらに高めた両耐性変異株の分離を試みた。　ＮＴＧによる変異処理をせずに２７０μＭＰｆｐ寒天合成培地ＣＡのプレート上に、生育してくるコロニーを耐性株として分離した。　このようにして得られた耐性増強株ＭＡＰ－５，－８，－１５のイソブテン生成量が図５－８に示されている。　またＫＡＰ－３株を再度ＮＴＧ変異処理し、２７０μＭのＰｆｐを含む寒天合成培地ＣＡ上で生育した耐性増強株　ＭＮＡＰ－３，－１５，－１６，－１７のイソブテン生成量も図５－８に示した。　得られた両耐性株ＭＮＡＰ－１５株を親株にして、さらにＮＴＧ処理し、５５０μＭのＰｆｐを含む寒天合成培地ＣＡで増殖した耐性増強株ＭＮＡＰ－３４，－４１，－４２のイソブテン生成量も図５－８の中に記載した。　これらのアミノ酸耐性変異株の中で、ＭＮＡＰ－３４がアミノ酸無添加で2000nl/ml culture broth のイソブテン生成量を示した。

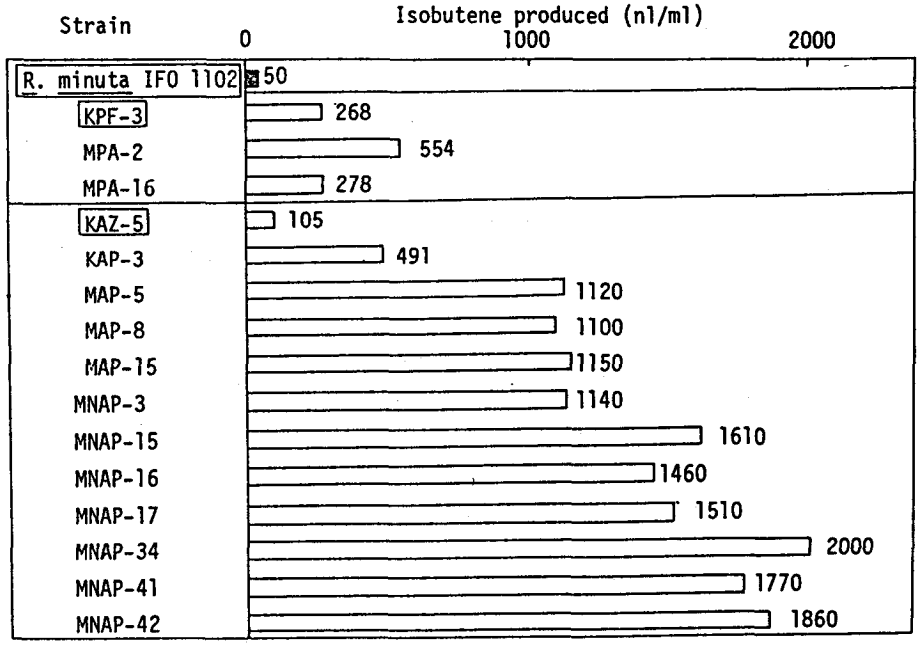


図５－８　アザロイシン，p-フロロフェニルアラニン両耐性株のイソブテン生成量

５．アミノ酸アナログ両耐性変異株（ＭＮＡＰ－３４）の生理的性質

5.1. ＭＮＡＰ－３４株のアザロイシンおよびＰｆｐ耐性度

ＭＮＡＰ－３４株の増殖を阻害するアザロイシン濃度は２００ｍＭで、親株にあたるＫＡＺ－５株と同様にアザロイシン１００ｍＭまでは増殖に全く影響を及ぼさなかった。　Ｐｆｐの耐性度については、１０９０μＭのＰｆｐでも増殖阻害されなかった。　なおＭＮＡＰ－３４株のビタミン要求性をチェックし、チアミンとｐ－アミノ安息香酸の要求性の維持されていることを確認した。

5.2. ＭＮＡＰ－３４と親株（野性株）の無細胞系イソブテン生成酵素活性の比較

本章，第２節，6.1.の方法にしたがって、培養菌体から無細胞抽出液を調製し、次章に記載する無細胞系による、イソブテン生成酵素活性を測定した。　酵素反応の基質として充分量のイソ吉草酸を反応混液に添加した。　結果が図５－９に示されている。

元の親株R. minuta IFO 1102（野性株）については、培地にＬ－フェニルアラニン（１ｇ／ｌ）を加えて培養したものと、無添加で培養したものの２種類の菌体から無細胞抽出液を調製し、それぞれのイソブテン生成酵素活性を測定した。　Ｌ－フェニルアラニンを添加して培養した菌体のみにイソブテン生成酵素活性が認められ、アミノ酸無添加培養の菌体では全く酵素活性は認められなかった。

ところが、アミノ酸無添加で培養した両アナログ耐性株ＭＮＡＰ－３４株ではかなり強いイソブテン生成酵素活性が認められた。

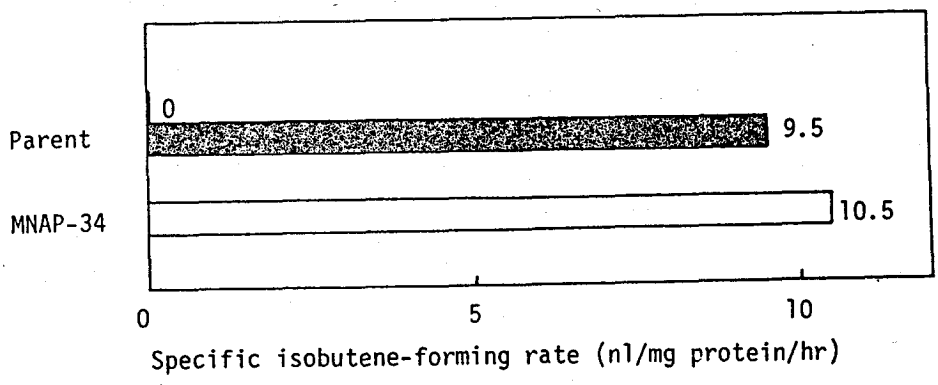
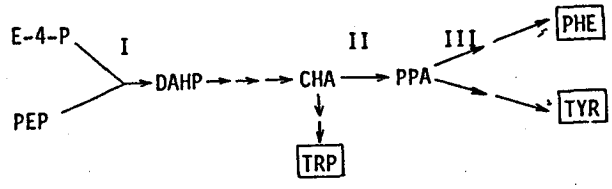


図５－９　親株とMNAP-34株のイソブテン生成酵素活性の比較

□：Ｌ－フェニルアラニンなしで培養した菌，■：Ｌ－フェニルアラニン（1g/l）を含む培地で培養した菌，培養時間　約６０時間

5.3. ＭＮＡＰ－３４株のＬ－フェニルアラニン生合成系路上の変異点



I: DAHP synthase, II: Chorismate mutase, III: Prephenate dehydratase

図５－１０　芳香族アミノ酸の生合成経路

E-4-P:エリスロース－4－リン酸，PEP:ホスホエノール，ピルビン酸，CHA:コリズミン酸，PPA:プレフェン酸，TRP:トリプトファン，PHE:フェニルアラニン，TYR:チロシン，DAHP:3-Deoxy-7-arabinoheptulosonate-7-phosphate

図５－１０に芳香族アミノ酸の生合成経路を示した。Ⅰ，Ⅱ，Ⅲの各酵素は一般に、Ｌ－フェニルアラニン（Ｐｈｅ），Ｌ－チロシン（Ｔｙｒ），Ｌ－トリプトファン（Ｔｒｐ）によって単独、または、複合的にフィードバック阻害を受ける（32）。そこでＰｈｅ，Ｔｙｒ，Ｔｒｐ各１ｍＭを単独または全部一緒に酵素反応混液に添加して、これら３種の酵素活性を測定した。結果が図５－１１に示されている。

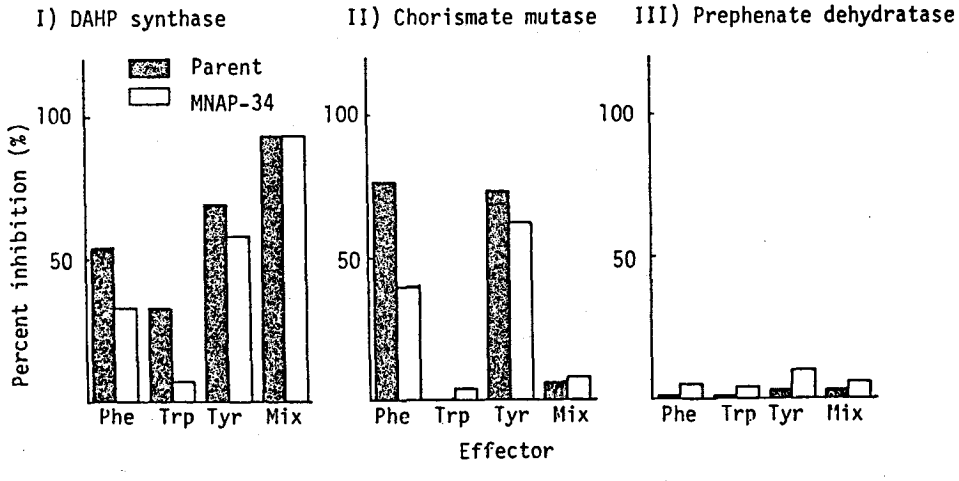


図５－１１　Ｌ－フェニルアラニン生合成経路上の各種酵素活性の阻害度

Phe:Ｌ－フェニルアラニン，Trp:トリプトファン，Tyr:チロシン，Mix:Phe+Trp+Tyr．各アミノ酸を酵素反応液中に1mM単独添加あるいは複合的に各1mM添加

Ⅰ)のＤＡＨＰシンターゼは親株、変異株ともにＰｈｅ，Ｔｙｒ，Ｔｒｐの複合添加時にはほとんど完全に阻害されたが、ＴｒｐとＰｈｅの単独添加時には、

ＭＮＡＰ－３４株では親株よりも阻害がかなり軽減された。Ⅱ）のコリズメートムターゼはＭＮＡＰ－３４株では親株よりも約５０％近くまでＰｈｅによる阻害が軽減された。

Ⅲ）のプレフェン酸脱水酵素はいずれの場合も、ほとんど阻害を受けなかった。以上のことからＭＮＡＰ－３４はＰｈｅによるフィードバック阻害の軽減した株であると思われる。

第４節　考察

アミノ酸発酵で利用されている方法をイソブテン生産菌 R. minuta IFO 1102（野性株）に適用して、菌株の育種改良を試みた。 すなわち、Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンのアナログの耐性変異株を分離した。

親株（野性株）による、イソブテンの生成には、培地へのＬ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの添加が必要であるのに対して、得られた変異株ＭＮＡＰ－３４（アザロイシン，p－フロロフェニルアラニン両耐性株）では 培養液にこれらのアミノ酸無添加でもイソブテンを生成した。 この変異改良株は、Ｌ－ロイシン，Ｌ－フェニルアラニンの生合成経路上の酵素が、フィードバック阻害のかかるのを解除あるいは軽減された菌株であり、Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンを自己供給できるようになった株であると思われる。 ＭＮＡＰ－３４株で Ｌ－ロイシン，Ｌ－フェニルアラニンの細胞外への漏出蓄積を調べたがほとんど検出不能であり、細胞内での蓄積も検出できなかった。 これは細胞破砕によって、細胞内成分がかなり希釈されるために検出が困難となるのではないだろうか。 あるいは、サンプル調製時に生成されたアミノ酸がターンノーバーして測定にはかからなかったのかも知れない。 Ｌ－フェニルアラニンが“イソブテン生成酵素”を誘導するのであれば、Ｌ－フェニルアラニンを自己供給できるようになった変異株では、細胞内に生成蓄積したであろうＬ－フェニルアラニンが“イソブテン生成酵素”を誘導したはずである。 図５－９に示すように、ＭＮＡＰ－３４株の菌体内には、培養時にＬ－フェニルアラニンを添加していないにもかかわらず、かなり強いイソブテン生成酵素活性が検出された。

イソブテン生産菌の育種改良法としてＬ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンのアナログ耐性変異株を分離することは有効であったが、さらに、生産菌の改良を進展さすためには、イソブテン生成酵素を単離、精製し、タンパク質としての本体を明らかにすると共に、この酵素自体をクローニング等の手段で増強する必要がある

であろう。　またＬ－フェニルアラニンによるイソブテン生成酵素の誘導機構を解明することも、イソブテン生産菌の育種改良にとって必要であろう。

第５節　要約

R. minuta IFO 1102によるイソブテン生成には、培地へのＬ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの添加が必要である。　そこで、Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンのアナログである、４－アザ－ＤＬ－ロイシン（Ａｚｌ）と p－フロロフェニルアラニン（Ｐｆｐ）の耐性変異株を誘導分離し、これらのアミノ酸の自己供給能の増大した変異株 ＭＮＡＰ－３４（Ａｚｌ^r.Ｐｆｐ^r）を得た。　この変異株ＭＮＡＰ－３４株は培地へのアミノ酸添加なしで、2000 nl/ml-culture brothのイソブテンを生成した。　この変異株のＡｚｌと Ｐｆｐの耐性度は少なくとも１００ｍＭと１.０９ｍＭまで強化され、 Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンによるそれぞれの生合成経路上の酵素である、α－イソプロピルリンゴ酸シンターゼ、ＤＡＨＰシンターゼおよびコリズメートムターゼのこれらアミノ酸によるフィードバック阻害の解除または軽減された変異株であった。　親株（野性株）とは異なりＭＮＡＰ－３４はＬ－フェニルアラニン無添加で細胞内にイソブテン生成酵素活性が認められた。　なお分離取得した主要変異株の系統図を図５－１２に示した。

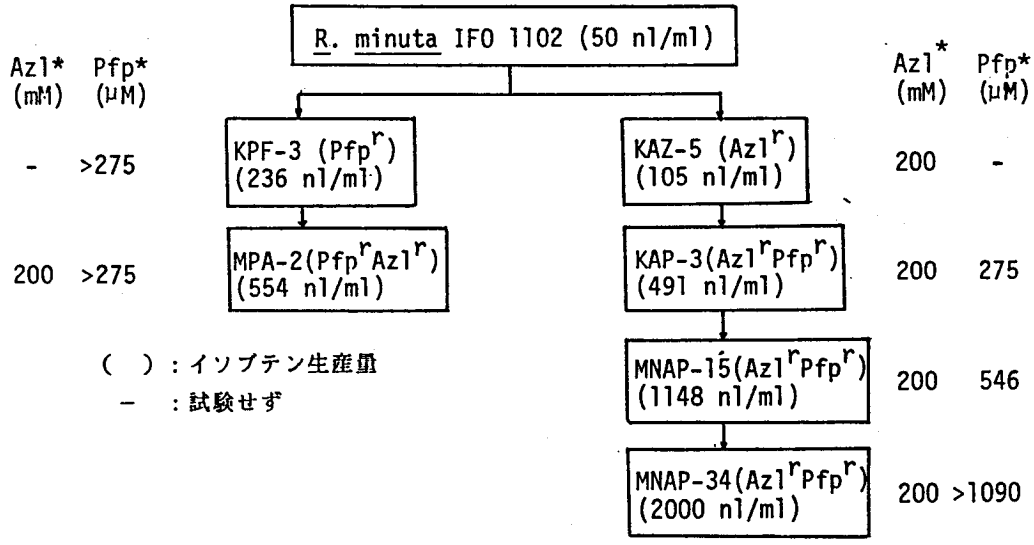


図５－１２　アミノ酸アナログ耐性変異株の系統図（培養時間100－120hr）

Ａｚｌ＊：増殖を阻害するアザロイシン濃度
Ｐｆｐ＊：　〃　　p-フロロフェニルアラニン濃度

第６章　無細胞抽出液中のイソブテン生成酵素の性質

第１節　緒言

Rhodotorula minutaによるイソブテン生成には好気的条件（酸素）と、Ｌ－ロイシンおよびＬ－フェニルアラニンの培地への添加が必要であること、Ｌ－ロイシンはイソブテンの前駆体であり、イソ吉草酸がより近い前駆体であること、Ｌ－フェニルアラニンはイソブテン生成酵素を誘導すること、などについて既に説明した。

そこで、R. minuta IFO 1102によるイソブテン生成を、より詳細に解明するために、無細胞抽出液によるイソブテン生成反応について実験し、反応混液の組成、および反応条件を選定して無細胞抽出液でのイソブテン生成系を構築すると共に、イソブテン生成酵素の本体を解明する手掛かりとして、無細胞抽出液の超遠心分画を試みた。

第２節　実験材料および方法

１．培養方法

R. minuta IFO 1102を２０ｍｌの合成培地ＣＤ（表４－１）を添加、滅菌した１００ｍｌ容のErlenmeyer flaskに植菌し、２５℃，２日間，ロータリーシェーカー（１８０ｒｐｍ，７ｃｍ振幅）で前培養し、１００ｍｌまたは２００ｍｌの合成培地ＣＤあるいはＬ－ロイシンまたはＬ－フェニルアラニン（各１ｇ／ｌ）を添加した合成培地 ＣＤを添加、滅菌した５００ｍｌ容の Erlenmeyer flaskに前記前培養液２ｍｌを移植し、前培養と同じ条件で培養した。

２．培養液のイソブテン生成活性の測定（in vivo）

１ｍｌの培養液を１８φ試験管（３４ｍｌ容）に入れ、ゴムキャップでシールした後、２５℃，３時間、シール培養し、試験管内の気相部から、１ｍｌのガスをガスタイトシリンジで採取し、ガスクロマトグラフ［ＧＣ－８Ａ，島津製作所，京都；カラム５ｍｍ×２ｍ，活性アルミナ；ＦＩＤ検出器；検量用には標準イソブテン（ガスクロ工業株式会社，東京）を使用］によってイソブテンを測定し、イソブテン生成速度を算出した。　イソブテン生成活性はイソブテン生成速度で表示した。

３．無細胞抽出液の調製

本培養を約２日間行った後、培養液を遠心分離（1000×g，５分）して集菌し、

脱イオン水で２回洗浄し、２０％グリセロールを含む２０ｍＭトリス塩酸緩衝液，ｐＨ ７.９に懸濁し、フレンチプレス（1500kg/cm²）で菌体を破砕した。 なお実験によっては、２０％ グリセロールと１ｍＭ ＥＤＴＡを含む４０ｍＭリン酸緩衝液，ｐＨ７.９を菌の懸濁に使い、 菌体破砕にはダイノミル（Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik, Basel, Switzerland）を用いた。 菌体破砕液を1000×g，５分間遠心分離し、得られた上澄液をさらに、15,000×g，１５分間遠心分離して、上澄液を調製し、無細胞抽出液として用いた。

４．無細胞抽出液のイソブテン生成活性の測定

基本的な反応液組成は次の通りである。ただし、実験によっては各成分を若干変化させた。 ２０ｍＭ イソ吉草酸；０.２ｍＭ 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（ＮＡＤＰＨ）；１ｍＭ ジチオスレイトール（ＤＴＴ）；４０ｍＭリン酸緩衝液，ｐＨ７.９および適当量の無細胞抽出液。

上記反応液１ｍｌを１５φ，１３ｍｌ容ワッセルマン試験管に入れ、ゴムキャップで密栓後、２５℃で通常３０分間シール反応した。 試験管上方の気相部からガスを１ｍｌ採取し、２の方法と同様にガスクロマトグラフィー法でイソブテン生成速度を測定、算出した。 なおイソブテン生成活性は無細胞抽出液１ｍｌあたり、１時間あたりのイソブテン生成量ｎｌで表示した。

５．ミクロゾームの調製

２００ｍｌの合成培地ＣＤを添加、滅菌した５００ｍｌErlenmeyer flaskで、通常６０～７０時間本培養し、その培養菌体から上記手順に従って、無細胞抽出液を調製した。 この無細胞抽出液を160,000×g，１時間超遠心分離し、生じた沈澱を２０％グリセロールを含む４０ｍＭ リン酸カリウム緩衝液，ｐＨ ７.２に懸濁し、ミクロゾームを調製した。

６．チトクローム P-450の測定

チトクローム P-450は、大村、佐藤によって報告されたＣＯ－差スペクトル法（33）によって測定した。

ミクロゾーム中のチトクローム P-450含量を測定する場合には、ミクロゾーム懸濁液を ２～３ｍｇタンパク質／ｍｌの濃度に調製し、適当量の ダイチオナイトを添加して キュベット（1.0×1.0×2.5 ｃｍ）に入れ、 スペクトロホトメーター

(Beckman DU7, Beckman Instruments, Inc., Irvine, California, USA) で バックグラウンドを記録し、次に、このキュベットに一酸化炭素を通気した後、バックグラウンドに対する差スペクトルを記録した。

培養菌体中の チトクローム P-450 含量を測定する場合は、培養液を遠心分離(1500×g, １０分)して集菌し、適当な濃度(ＯＤ$_{660}$：～１０)になるよう脱イオン水に懸濁した。 この菌体懸濁液をキュベットに入れミクロゾームの場合と同様にＣＯ－差スペクトルを記録した。 ただし、バックグラウンドの測定には、Schunck らの方法(34)にしたがってダイチオナイトは加えなかった。 いずれの場合も４４８ｎｍと４９０ｎｍの分子吸光度差９１ｍＭ$^{-1}$を用いて チトクローム P-450含量を測定、算出した(33)。

７．P-450レダクターゼ活性の測定

Masters らの方法(35)に従って 基質チトクロームｃの還元初速度を ５５０ｎｍで測定した。 ただし、緩衝液は ０.３５Ｍのリン酸カリ緩衝液,ｐＨ７.２を用い、反応温度は３０℃で行った。 また、シアン化カリウム１ｍＭを反応液に加え、酵素液としてミクロゾーム懸濁液を使った。

８．グルコース濃度、タンパク質濃度、培養液中の菌体濃度は、第４章に記した方法に従った。

第３節　結果

１．無細胞抽出液によるイソブテン生成系の構築(36)

1.1.　無細胞イソブテン生成系での基質

無細胞抽出液を用いて基質の選択を行った。 表６－１に結果を示す。

培養菌体で添加効果の認められたＬ－ロイシンやＬ－フェニルアラニンは全く効果を示さず、Ｌ－ロイシンの代謝産物であるα－ケトイソカプロン酸やイソバレリール－ＣｏＡ，イソ吉草酸に添加効果が認められた。 また、β－メチルクロトニル－ＣｏＡやβ－メチルクロトン酸の添加効果はなかった。

イソブテン生成速度の最も高かったイソ吉草酸について添加濃度の影響を調べた結果、図６－１に示すようにイソ吉草酸２０～３０ｍＭで飽和に達することが分かった。

表６－１　無細胞抽出液によるイソブテン生成系での基質の選定

Compound	Rate of formation of isobutene (nl/ml/hr)
L-Leucine	0
α-Ketoisocaproic acid	2.1
Isovaleric acid	9.1
Isovaleryl-CoA	3.8
β-Methylcrotonic acid	0
β-Methylcrotonyl-CoA	0
L-Phenylalanine	0

各化合物2.5mMを反応液に添加した。無細胞抽出液のタンパク質濃度は10.5mg/mlであった。

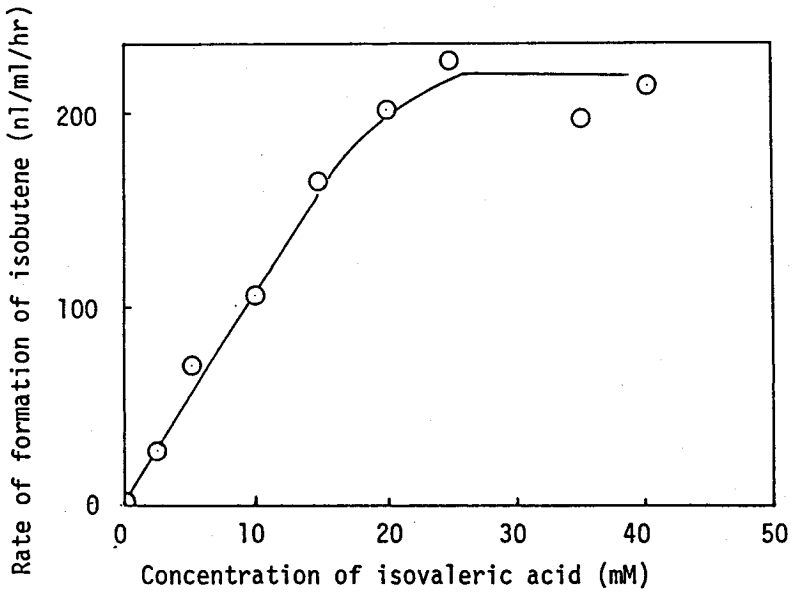


図６－１　無細胞抽出液イソブテン生成活性とイソ吉草酸濃度との関係

1.2. 賦活剤の選定

無細胞抽出液を用いて、イソブテン生成反応を賦活する化合物の選択を行った。種々の試薬を０.２ｍＭ となるように反応液に添加した。 結果が図６－２に示されている。

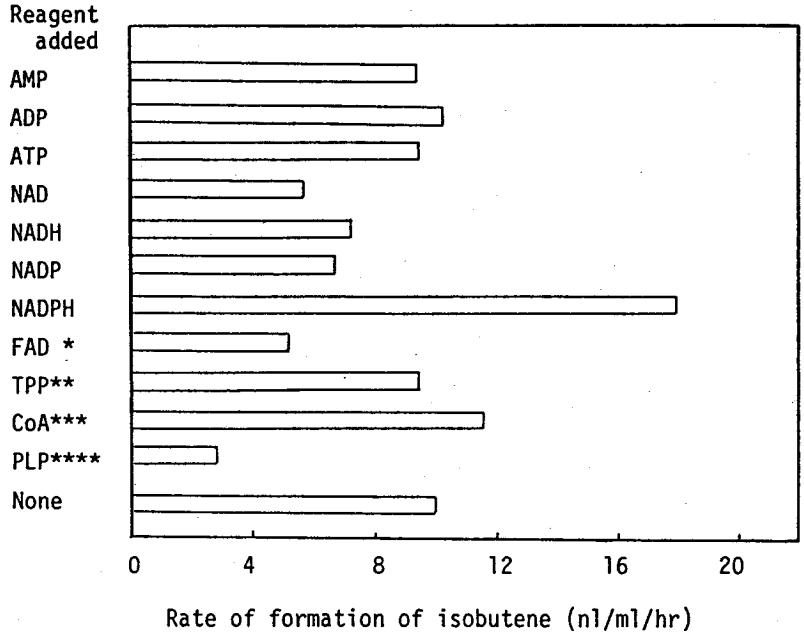


図６－２　無細胞抽出液イソブテン生成活性に及ぼす種々の化合物の影響

*FAD:フラビンアデニンジヌクレオチド，**TPP:チアミンピロリン酸，***CoA:コエンザイムＡ，****PLP:ピリドキサールリン酸

ＮＡＤＰＨの添加がこの反応を賦活することが分かったのでＮＡＤＰＨの添加濃度の影響を調べたところ、０.１ｍＭ 以上の濃度でイソブテン生成活性は飽和に達した。

1.3. その他の反応条件

図６－３から、反応の最適ｐＨは７.３～８.０，最適温度は２５℃であった。図６－４に示すように、この反応は約１０分間のラグの後、約５０分まで直線的にイソブテン生成量が増加した。

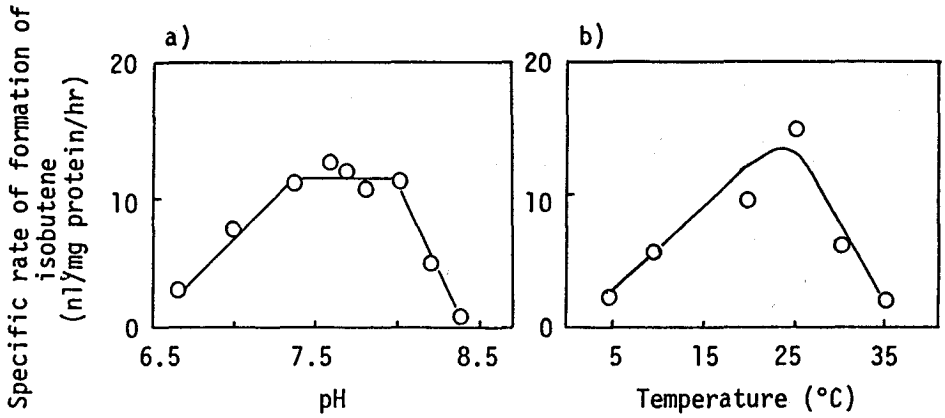


図６－３　無細胞抽出液イソブテン生成活性に及ぼすｐＨ a）と 温度 b）の影響

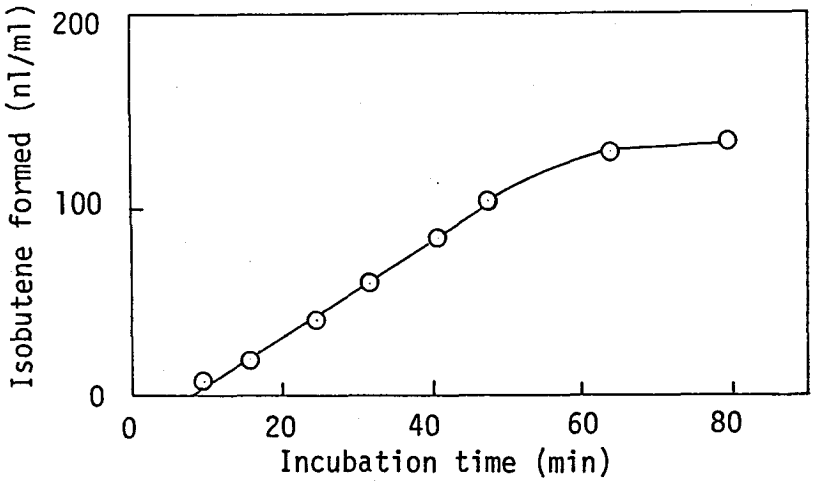


図６－４　イソブテン生成活性の経時変化

1.4.　無細胞抽出液によるイソブテン生成系の構築

1.1.～1.3.の結果を総合して、表６－２に示す組成の反応混液から成る無細胞抽出液によるイソブテン生成系を構築した。　なお反応条件は ２５℃,３０分間である。

表６－２　無細胞抽出液によるイソブテン生成系の反応混液組成

Cell-free extract		0.3 ml
Isovaleric acid	(100 mM)	0.2 ml
NADPH	(2 mM)	0.1 ml
DTT*	(10 mM)	0.1 ml
Phosphate buffer	(200 mM, pH 7.9)	0.2 ml
Deionized water		0.1 ml

* DTT: ダイチオスレイトール

1.5.　無細胞抽出液と生菌のイソブテン生成活性の相互関係

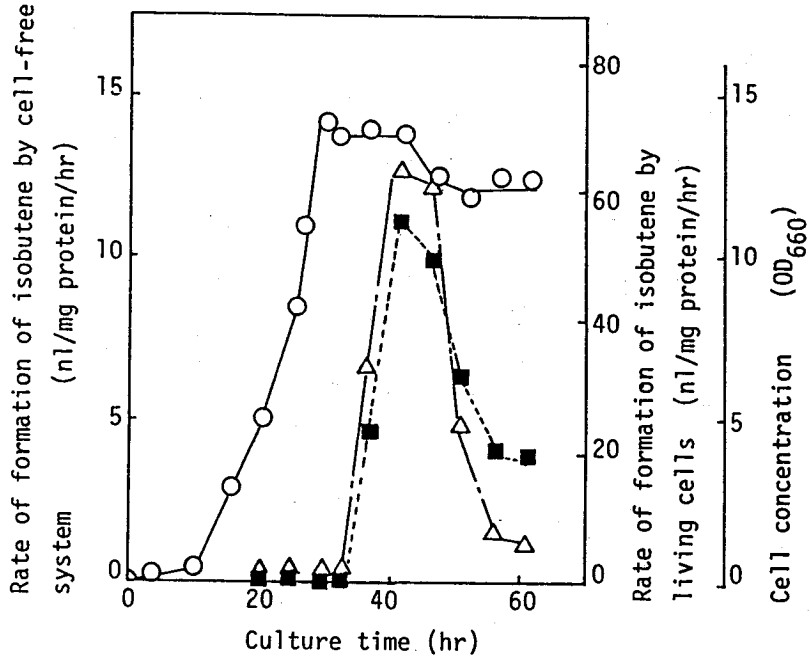


図６－５　イソブテン生成活性の経時変化

○.菌体濃度；△.生菌のイソブテン生成活性；■.無細胞抽出液のイソブテン生成活性　100mlの合成培地を入れた300ml容Erlenmeyer flaskで培養した。菌体破砕はフレンチプレスによって行った。

無細胞抽出液によるイソブテン生成系で求めた活性と生菌のイソブテン生成活性を培養の経時変化で対比した結果が図６－５である。　無細胞抽出液によるイソブテン生成系で求めたイソブテン生成活性と生菌での生成活性は経時的にもよく相

関していた。　このことは、無細胞抽出液によるイソブテン生成系が生菌内でも実際に作動し、両者のイソブテン生成反応をよく反映しているためと思われる。

1.6.　無細胞抽出液によるイソブテン生成系に及ぼすその他の因子

無細胞イソブテン生成系を用い、イソブテン生成に影響を与えるその他の因子について実験した。　結果が表６－３に示されている。

表６－３　無細胞抽出液によるイソブテン生成に及ぼすその他の因子

Treatment and reagent		Rate of formation of isobutene (% of control)
Heat treatment * (70°C, 10 min)		0
Nitrogen atmosphere **		0
Potassium cyanide ***	(4 mM)	90
Sodium azide ***	(1 mM)	72
Ethylenediaminetetraacetic acid ***	(1 mM)	113

*無細胞抽出液を70℃,10分間反応開始前に熱処理した。 **反応液を入れた試験管に窒素ガスを吹き込み、その後ゴムキャップでシールし、25℃,30分間シール反応した。 ***各試薬を上記の最終濃度となるように反応後に添加した。 100%の活性は、116nl/ml/hrであった。 無細胞抽出液によるイソブテン生成系で活性測定した。

表６－３に示すように、窒素気相下や熱処理した無細胞抽出液を用いた反応では、イソブテンは生成せず、熱に不安定な酵素がイソブテン生成反応を触媒し、この反応には酸素が必須と考えられる。　そこでチトクロームｃオキシダーゼや、呼吸系の電子伝達の阻害剤であるシアン化カリウムやアジ化ナトリウムを反応系に添加したが、イソブテン生成反応はほとんど阻害されなかった。　ＥＤＴＡを添加して遊離の金属イオンの必要性を検討したが、むしろイソブテン生成活性は少し増加し、金属イオンは反応に不要であった。

２．ミクロゾーム画分に存在するイソブテン生成酵素

無細胞抽出液によるイソブテン生成系を用いて、反応温度の影響を調べた。

図６－６に示すようにイソブテン生成活性の対数と絶対温度との間の関係をアレニウスプロットすると、１５℃を境にして折れた直線を示した。　この直線の傾きから １５℃以下の活性化エネルギーは ９６．３　kJ/mol，１５℃以上では３２．１ kJ/molと計算された。　膜結合型酵素活性のアレニウスプロットは一般に不連続な直線となることが知られている（37，38）。　したがって図６－６の折線はイソブテン生成酵素は膜結合型であることを示唆している。

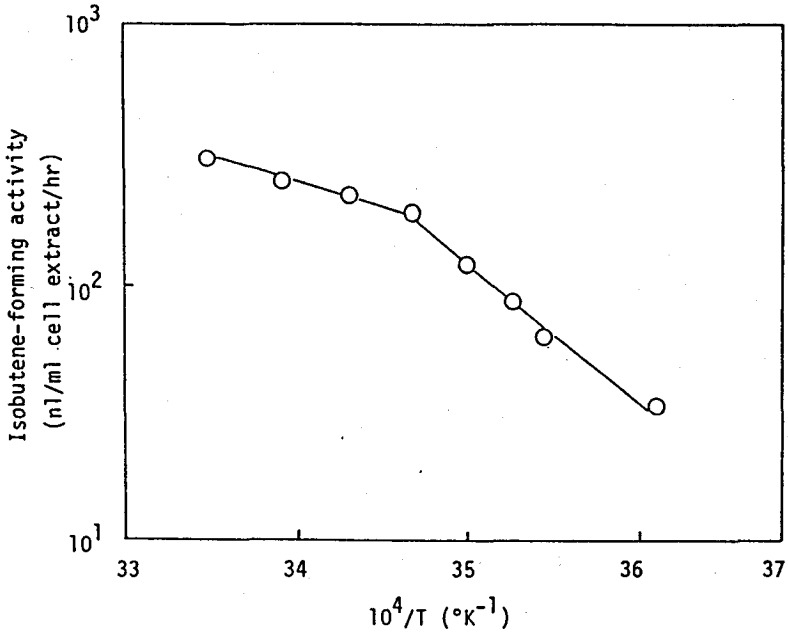


図６－６　無細胞抽出液のイソブテン生成活性のアレニウスプロット

無細胞イソブテン生成系を各温度でインキュベーションした。

そこで無細胞抽出液をさらに、超遠心分離（160,000×ｇ，1時間）によって分画することを試みた。　分画された上澄画分と沈澱画分を無細胞抽出液のかわりに使って、無細胞抽出液によるイソブテン生成系によってそれぞれのイソブテン生成活性を求めた。　その結果イソブテン生成活性が、沈澱（ミクロゾーム）画分に認められたが、この活性を増強する因子が上澄画分に存在し、上記沈澱のミクロゾーム画分だけでは、無細胞抽出液のわずか３０％の活性しか示さなかった。　この上澄画分中の有効因子を分離同定したところ、ある種のＮＡＤＰＨ－再生系と、フラビンアデニンジヌクレオチド（ＦＡＤ）およびフラビンモノヌクレオチド（ＦＭＮ）

が検出された。　そこで、ミクロゾームのイソブテン生成活性を測定する場合には、ＮＡＤＰＨ再生系として反応混液中に１０ｍＭ グルコース－６－リン酸（G-6-P）と１ユニットの G-6-Pデヒドロゲナーゼを、さらに１μＭ ＦＡＤと１μＭ ＦＭＮをそれぞれ最終濃度となるように反応混液に追加することとした。　このようにして測定した各画分のイソブテン生成活性が表６－４に示されている。

表６－４　無細胞抽出液の超遠心分画のイソブテン生成活性

Fraction	The yield of isobutene-forming activity (%)
Cell extract	100
Microsomes	123
Heat-treated microsomes *	0
Supernatant	0

*ミクロゾーム画分を80℃,10分間熱処理した。無細胞抽出を160,000×g,1時間超遠心し,ミクロゾームと,上澄画分を得た。　100%は456nl/ml無細胞抽出液/hrであった。無細胞抽出液濃度は9.1mg protein/mlであった。

この表から、イソブテン生成活性はミクロゾーム画分に存在していることが明かである。　イソブテン生成活性の回収率が１００％を超えているのは、追加した物質によるイソブテン生成活性の賦活効果が高いためと考えられる。　なお、ミクロゾームのイソブテン生成活性は、熱処理によって完全に失活した。

３．イソブテン生成酵素のチトクローム P-450としての性質

3.1.　阻害剤の検討

ミクロゾームによるイソブテンの生成には、ＮＡＤＰＨ、イソ吉草酸と酵素が必須であり、ＦＡＤとＦＭＮの添加は、活性増強の効果を示した。　このことから、ミクロゾーム膜での電子伝達の結果としてイソブテン生成が起こるのではないかと考えた。　そこで酸化還元に影響する化合物の添加が、イソブテンの生成に影響を

与えるかを調べた。　結果が、表６－５に示されている。　一酸化炭素の阻害効果も同時に測定した。

表６－５　ミクロゾームによるイソブテン生成反応の阻害剤

Reagent added (final concentration)		Relative activity (%)
None **		100
Phenazine methosulfate	(1 mM)	7.6
2,6-Dichlorophenolindophenol	(1 mM)	27
Cytochrome c	(18 μM)	7.0
Vitamin K_3	(1 mM)	9.0
CO : O_2 (95 : 5) *		0

各試薬を反応液に添加した。　**イソブテン生成活性は1380 nl/mlミクロゾーム懸濁液/hrであった。ミクロゾームの濃度は11.7mg protein/mlであった。

チトクロームｃ，２,６－ジクロロフェノールインドフェノール，フェナジンメタサルフェート，ビタミンK_3，一酸化炭素が ミクロゾームによるイソブテン生成反応を阻害し、なかでも一酸化炭素は完全にイソブテン生成を停止させた。　一酸化炭素によるこの阻害は、ミクロゾーム膜に結合しているある種のチトクローム P-450がイソブテン生成反応に関与していることを示している。

3.2.　Ｌ－フェニルアラニンによるイソブテン生成酵素とチトクローム P-450の誘導

第４章の生菌を用いた実験で、Ｌ－フェニルアラニンがイソブテン生成酵素を誘導していることを述べた。　無細胞抽出液を用いる無細胞イソブテン生成系で、Ｌ－フェニルアラニンの誘導効果を確認するためにＬ－ロイシン，Ｌ－フェニルアラニン添加、無添加で培養した菌体から調製した無細胞抽出液についてイソブテン生成酵素活性を測定した。　結果が表６－６に示されている。　Ｌ－フェニルアラニンを添加して培養した菌体から調製した無細胞抽出液の場合だけ、イソブテン生成酵素活性が認められた。

チトクロームP-450およびP-450 レダクターゼ活性が Rhodotorula minutaのミ

クロゾーム画分に検出できるか検討した。 その結果、図６－７に示すミクロゾームのＣＯ－差スペクトルが得られ、この図からチトクローム P-450の含量を計算すると、0.11 nmol/mg proteinであった。 しかし、Ｌ－フェニルアラニン無添加培養菌体から調製したミクロゾーム画分ではチトクローム P-450のＣＯ－差スペクトルは観察されなかった。 また、チトクロームｃを基質に用いてP-450 レダクターゼ活性を測定したところ、0.04 μmol/min/mg protein の値を得た。

表６－６　無細胞抽出液のイソブテン生成活性のＬ－フェニルアラニンによる誘導

Amino acid(s) added	Specific rate of formation of isobutene (nl/mg protein/hr)
L-Leucine	0.63
L-Phenylalanine	31.0
L-Leucine + L-Phenylalanine	31.4
None	0.38

表中のアミノ酸各1/lを添加した合成培地ＣＤで４６時間培養し、それぞれの菌体から無細胞抽出液を調製した。

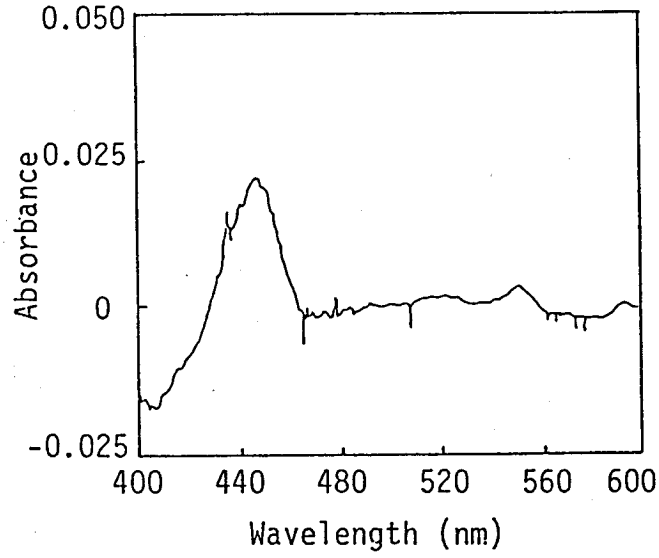


図６－７　R. minutaのミクロゾームのＣＯ－差スペクトル

Ｌ－フェニルアラニン（1g/l）を含む合成培地ＣＤで約６０時間培養し、その菌体から調製したミクロゾームを使用した。

これらの実験結果から、イソブテン生成酵素とチトクローム P-450が共に、L－フェニルアラニンによって誘導され、阻害剤の実験結果を考え合わせると、両者の間に、かなり強い相同性があると考えられる。

4．イソブテン生成酵素の培養経時変化

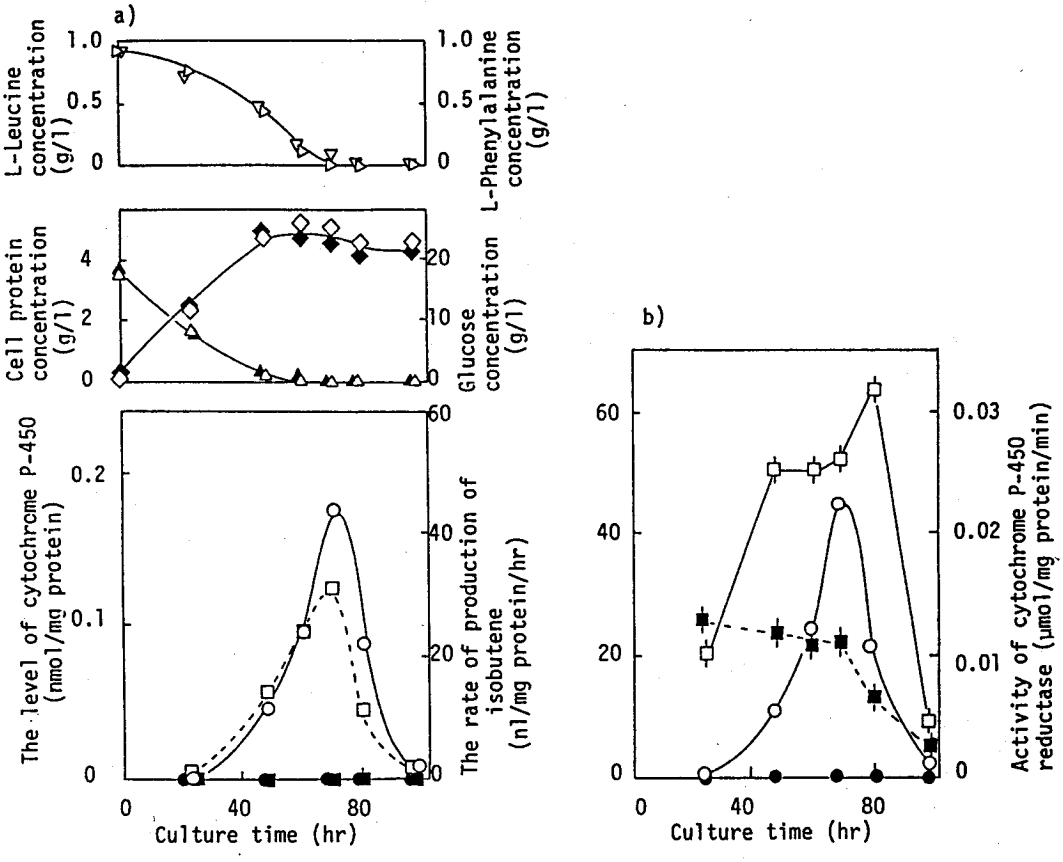


図６－８　典型的なR. minuta IFO 1102の培養経時変化

イソブテン生成速度,○ ●；チトクロームＰ－４５０含量, □ ■；タンパク質濃度,◇ ◆；グルコース濃度,△ ▲；Ｌ－ロイシン濃度,　；Ｌ－フェニルアラニン濃度,▽；チトクロームＰ－４５０レダクターゼ活性,□ ■、　白いシンボルはアミノ酸添加培養、黒いシンボルはアミノ酸無添加培養、　ａ），ｂ）は共に同じ培養で主にイソブテン生成活性とチトクロームＰ－４５０レベルをａ）図に、イソブテン生成活性とＰ－４５０レダクターゼ活性をｂ）にプロットした。

無細胞抽出液やミクロゾームのイソブテン生成酵素活性とチトクローム P-450との間に多くの共通する性質が認められたので、主として培養菌体について、イソブテン生成酵素活性とチトクローム P-450含量、およびP-450 レダクターゼ活性の培養経時変化を測定すると共に、これらの相互関係を調べた。 典型的な培養の経時変化の一例が図６－８に示されている。

Ｌ－ロイシン，Ｌ－フェニルアラニン無添加培養では、イソブテン生成もチトクローム P-450の形成も認められなかった。 ただP-450 レダクターゼ活性がわずかに検出された。 Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンを添加した培養では、増殖の定常期にイソブテン生成活性とチトクローム P-450が現れ、これらのアミノ酸の減少に伴って、逆に増大した。 これらのアミノ酸が培養液から消失後、イソブテン生成活性とチトクローム P-450含量は減少した。 P-450 レダクターゼ活性も培養初期の低いレベルから、イソブテン生成活性の増加に伴って増大して、一定のレベルに達し、イソブテン生成活性の低下後P-450 レダクターゼ活性も減少した。菌の増殖は、アミノ酸の添加、無添加にほとんど無関係であった。

５．チトクローム P-450，P-450 レダクターゼとイソブテン生成活性の相互関係

イソブテン生成活性とチトクローム P-450含量，P-450 レダクターゼ活性との相互関係をさらに詳細に解析するため、培養方法や培養時間を変化させてイソブテン生成活性とチトクローム P-450含量，P-450 レダクターゼ活性を測定した。 ただし、P-450 レダクターゼ活性については第２節，１で示した培養方法で培養した菌のみから求めた。 結果が図６－９，６－１０に示されている。

図６－９はチトクロームP-450 含量とイソブテン生成活性の間に明らかな正の相関関係の存在することを示している。

Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニン無添加培養菌でP-450 レダクターゼ活性は、ばらつきはあるが低い値を示した。 これに対してＬ－ロイシンとＬ－フェニルアラニン添加培養菌では、イソブテン生成活性が増加するとP-450 レダクターゼ活性も一定レベルに増加し、イソブテン生成活性とP-450 レダクターゼ活性にある程度の相関が認められた（図６－１０）。

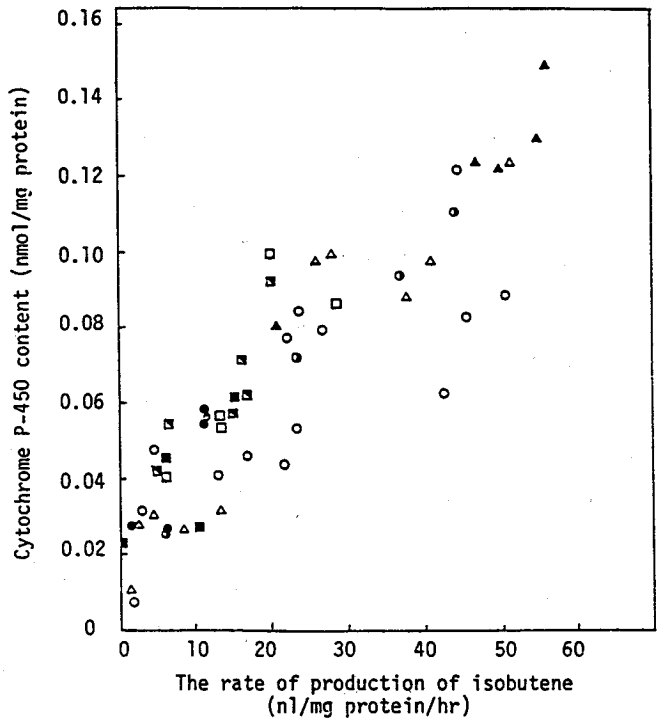


図６－９　チトクロームＰ－４５０含量とイソブテン生成速度の関係

Erlenmeyer flask（500ml容）に100mlの培地,△；150ml,▲；200ml,○；250ml,□；300ml,□を入れた。　坂口フラスコ（500ml容）に100mlの培地,■；200ml,●を添加して培養した。。

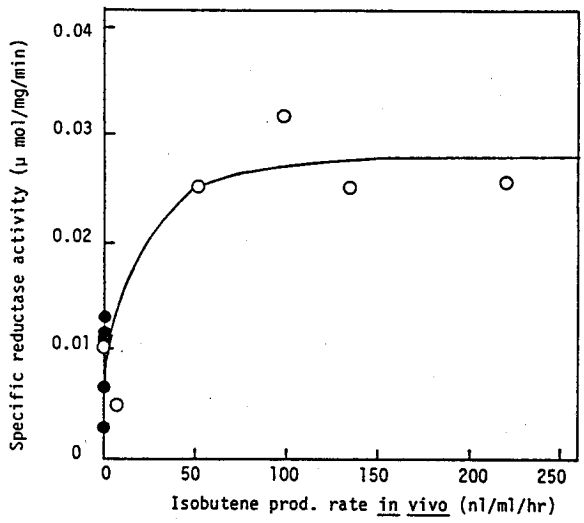


図６－１０　P-450レダクターゼ活性とイソブテン生成速度の関係

●：合成培地ＣＤ；○：L-ロイシンとL-フェニルアラニン(各1g/l)を含む合成培地ＣＤ

第４節　考察

有機酸からガス状炭化水素の生成を触媒するようなチトクローム P-450に関する報告は皆無である。　それにもかかわらず一酸化炭素がイソ吉草酸からのイソブテン生成を完全に阻害した事実は、反応にチトクローム P-450が関与していることを強く示唆している。　チトクローム P-450とP-450 レダクターゼがイソブテン生成活性の認められているミクロゾーム画分に見出された。

表６－５に示した阻害剤は、ＮＡＤＰＨからチトクローム P-450への電子伝達を乱すことによって、イソブテンの生成を阻害していると考えられる。　たとえば、チトクロームｃは、チトクローム P-450レダクターゼの活性測定に用いられ、チトクローム P-450にかわって P-450 レダクターゼ からの電子受容体になりうる（35）。　２,６－ジクロロフェノールインドフェノール も Saccharomyces cerevisiae のミクロゾームの レダクターゼによって還元されることが報告されている（39）。　フェナジンメトサルフェートを含めて上記の化合物は、R. minuta のミクロゾーム膜電子伝達で生じるＮＡＤＰＨからの電子を本来の受容体であるはずのチトクローム P-450と拮抗し電子の奪い合いを演ずるようである。　また、肝臓のレダクターゼはビタミンK_3 の存在で、ＮＡＤＰＨの酸素による酸化を触媒することが知られている（40）。　R. minutaのミクロゾームでは、ビタミンK_3による阻害は１ｍＭという高い濃度を添加しないとイソブテン生成活性を阻害できなかった（表６－５）。　この菌では、ＮＡＤＰＨの酸素による酸化が比較的低率で起こるのかも知れない。

イソブテン生成酵素とチトクローム P-450が共にＬ－フェニルアラニンによって誘導されることや、培養菌体のイソブテン生成活性とチトクローム P-450の含量, P-450 レダクターゼ活性に密接な相関関係の認められたことなどから、イソブテン生成酵素の本体が、ミクロゾームの電子伝達系とチトクローム P-450を含めた酵素系であることを示している。

第５節　要約

Rhodotorula minuta IFO 1102 の無細胞抽出液によるイソブテン生成系を構築した。　このイソブテン生成系を使ってイソブテン生成反応の特徴を解析し、イソブテン生成酵素がミクロゾーム画分に存在する膜結合型の酵素であることを見出した。

ミクロゾーム画分を用いた実験で、イソブテン生成酵素は種々の酸化還元剤で

阻害され、また一酸化炭素によって完全に阻害された。　さらに、L－フェニルアラニンによってイソブテン生成酵素とチトクローム P-450が共に誘導を受けること、生菌でイソブテン生成活性とチトクローム P-450含量，P-450 レダクターゼ活性との間に密接な相関が認められたことなどから、イソブテン生成酵素の本体はミクロゾームの電子伝達系とチトクローム P-450を含む膜結合型酵素系と推定した。

第７章　P-450 レダクターゼの精製と性質

第１節　緒言

P-450 レダクターゼはＮＡＤＰＨからの電子をチトクローム　P-450 に伝達する酵素であり、可溶性のP-450 レダクターゼも存在するが(41)、多くの場合は、膜結合型の不溶性タンパク質である。　分子量は比較的大きく、特殊な例外(42)を除けば、　70,000-80,000 ダルトンで、Ｎ末端側から分子量にして約10,000程度の疎水性領域を持ち、この部分をアンカーとして膜に結合している。　P-450 レダクターゼは電子伝達を行うためにＦＡＤ，ＦＭＮを補欠分子族として保有している一種のフラボプロテインである。

P-450 レダクターゼの活性は、チトクロームｃを電子受容体として用いるチトクロームｃレダクターゼ活性として表現される。　Rhodotorula 属菌の菌体から抽出分離されたP-450 レダクターゼに関する報告は今までに見当たらない。　そこでチトクロームｃ　レダクターゼ活性を指標にして、R. minuta IFO 1102のミクロゾーム画分からP-450 レダクターゼを可溶化、精製し、その性質を調べた。

第２節　実験材料及び方法

１．培養方法

R. minuta IFO 1102を２０ｍｌの合成培地ＣＤ（表４－１）を入れた　１００ｍｌ容の Erlenmeyer flask に植菌し、２５℃，３日間ロータリーシェーカー　（１８０ｒｐｍ，７ｃｍ振幅）で前培養した。　Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニン（各１ｇ／ｌ）を含む２００ｍｌ合成培地ＣＤが入った５００ｍｌ容Erlenmeyer flaskに前培養液を２％植菌し、２５℃で約７０時間、前培養と同じ条件で本培養した。　通常１回の培養は　２．４ｌ（フラスコ１２本分）のスケールで行った。

２．ミクロゾームの調製

本培養終了後、培養液から遠心分離（1000×g，１０分間）によって菌を集菌し、脱イオン水で１回菌体を洗浄した。　その後、２０％グリセロール，　１ｍＭＥＤＴＡ，１μＭＦＡＤと１μＭＦＭＮを含む４０ｍＭリン酸カリウム緩衝液，ｐＨ７．９ に懸濁し、ダイノミル　(Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik, Basel,Switzerland) によって菌体を破砕した。　菌体破砕液を15,000×g，１５分間遠心分離し、その上澄液を無細胞抽出液とし、この上澄液を160,000×g，１時間

超遠心分離し生じた沈澱をミクロゾームとして使用した。

3．P-450 レダクターゼの可溶化

ミクロゾームを約7mg protein/ml となるように２０％グリセロール，３ｍＭＥＤＴＡ，０.５ｍＭジチオスレイトール（ＤＴＴ），０.４μg/mlペプスタチンＡ，１μＭＦＡＤと１μＭＦＭＮを含む２０ｍＭリン酸カリウム緩衝液，ｐＨ７.５にテフロンホモゲナイザーを使って懸濁し、次に界面活性剤であるコール酸とデオキシコール酸をそれぞれ最終濃度が１％，０.５％になるように添加した。　氷中でこのミクロゾーム懸濁液を約１時間強く撹拌し、P-450 レダクターゼを可溶化した。撹拌終了後、160,000×g，１時間超遠心分離し、得られた上澄液を可溶化酵素液として使用した。

4．P-450 レダクターゼの精製

4.1.　塩析および透析

可溶化酵素液をゆるく撹拌し、これに硫酸アンモニウム粉末を３０％飽和になるまで徐々に添加した。　添加終了後３０分間撹拌を続け、次に10,000×g，１０分間遠心分離し、沈澱を取り除いた。　この上澄液にさらに６０％飽和に達するまで硫酸アンモニウム粉末を添加し、約３０分間撹拌を続け10,000×g，１０分間遠心分離して生じた沈澱を少量の２０％グリセロール，０.５ｍＭ ＥＤＴＡ，０.５ｍＭＤＴＴ，１μＭＦＡＤ，１μＭＦＭＮと０.１％コール酸を含む１０ｍＭリン酸カリウム緩衝液，ｐＨ７.５に溶解し、酵素液を調製した。

セロファンチューブに酵素液を詰め、上記組成の緩衝液で約１２時間透析を行った。

4.2.　2',5'-ADP-セファロース4Bカラムクロマトグラフィーによる精製

2',5'-ADP-セファロース4B（ファルマシア社製）ゲルをカラムに詰め２０％グリセロール，０.０５ｍＭＥＤＴＡ，０.１ｍＭＤＴＴ，０.４μg/mlペプスタチンＡ，１μＭＦＡＤ，１μＭＦＭＮと０.５％コール酸を含む２０ｍＭリン酸カリウム緩衝液，ｐＨ７.５でカラムを平衡化した。

透析済酵素液をカラムにチャージし、２０％　グリセロール，０.０５ｍＭＥＤＴＡ，０.１ｍＭＤＴＴ，０.４μg/ml　ペプチスタチンＡ，１μＭＦＡＤ，１μＭＦＭＮと０.５％ コール酸を含む２０ｍＭ リン酸カリウム緩衝液，ｐＨ７.５でカラ

ムを洗浄した。０.７ｍＭ,2'-AMPを含む上記の平衡化用緩衝液でP-450 レダクターゼを溶出し、これを2',5'-ADP-セファロース4B溶出酵素液とした。

4.3. ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによる精製

ハイドロキシアパタイト（Bio-Gel HTP,バイオラッド社製）を膨潤後、カラムに詰め、２０％グリセロール，０.０５ｍＭＥＤＴＡ，０.１ｍＭＤＴＴ，１μＭＦＡＤ，１μＭＦＭＮと０.５％ コール酸を含む２０ｍＭリン酸カリウム緩衝液，ｐＨ７.５でカラムを平衡化した。 2',5'-ADP-セファロース4B溶出酵素をカラムにチャージし、濃度を３０ｍＭとした上記組成の緩衝液でカラムを洗浄した。 次に同緩衝液のリン酸濃度を２５０ｍＭまで直線的に上昇させP-450 レダクターゼを溶出した。

4.5. P-450 レダクターゼ活性の測定法

P-450 レダクターゼ活性は好気条件下，３０℃でチトクロームｃを電子受容体としたチトクロームｃレダクターゼ活性として測定した。 下記組成の反応液を使用した。 ３５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液,ｐＨ７.８；０.１ｍＭ ＮＡＤＰＨ；２５μＭチトクロームｃ（シグマ社製,タイプⅢ）；１μＭ ＦＡＤ；１μＭＦＭＮおよび適当量の酵素液。 なお酵素液としてミクロゾームを用いる場合は、１ｍＭＫＣＮを反応液に添加した。 ＮＡＤＰＨと他の反応液構成成分とを混合し、反応を開始した。 分光光度計（ベックマンＤＵ７スペクトロホトメーター）でチトクロームｃの還元によって生じる５５０ｎｍの吸光度の増加を記録し、反応の初速度から酵素活性を求めた。 活性は１分間に還元されるチトクロームｃのμmol （μmol/ ml enzyme solution/min）で表現した。 なお、チトクロームｃの分子吸光係数は２１ｍＭ$^{-1}$,ｃｍ$^{-1}$(35)を使った。

4.6. 電気泳動

ＳＤＳ－ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動 （ＳＤＳ－ＰＡＧＥ） は０.１Ｍ リン酸ナトリウム緩衝液，ｐＨ７.０を用い、sodium dodecyl sulfate 存在下で WeberとOsbornの方法(43)にしたがって定電流で泳動を行った。

ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）は ０.１Ｍトリス－グリシン緩衝液,ｐＨ８.０を用い定電流で泳動を行った。 ＮＡＤＰＨ－ネオテトラゾリウム法(44,45) で活性染色を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ,native ＰＡＧＥともコマ

シブルーでタンパク質染色を行った。

4.7. タンパク質濃度の測定

Lowry らの方法(26), にしたがって測定した。

第３節　結果

１．界面活性剤による可溶化

図７－１中に記載した界面活性剤を使い、第２節，３．の方法に従ってミクロゾームのP-450 レダクターゼの可溶化を試みた。

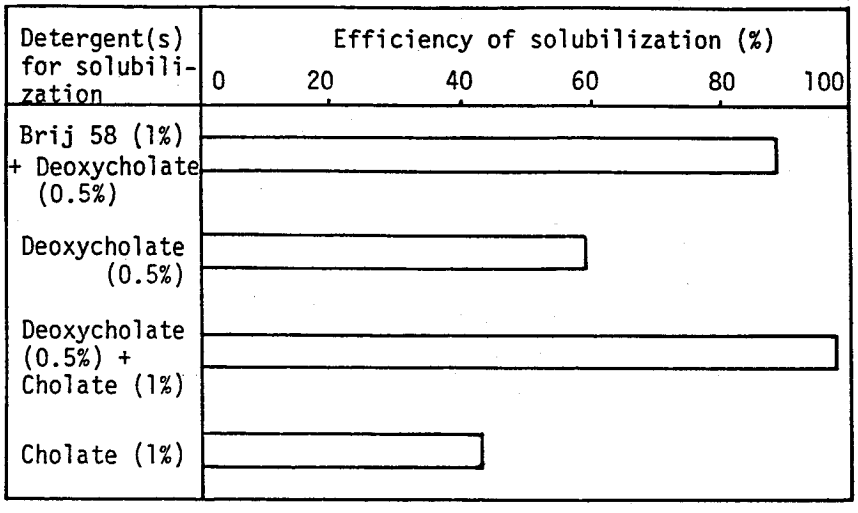


図７－１　界面活性剤によるミクロゾームからのP-450 レダクターゼ可溶化

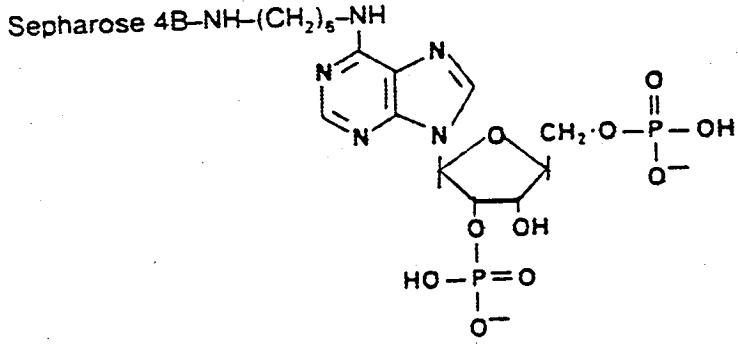
図７－１に示すように可溶化前の膜画分の活性を１００％とすると、Ｂｒｉｊ５８とデオキシコール酸を組み合わせたとき８９％の活性を回収し、Ｂｒｉｊ５８の代わりにコール酸をデオキシコール酸と組み合わせた場合に、９８％の活性を可溶性画分に回収できた。　Ｂｒｉｊ５８（非イオン性界面活性剤）を用いて可溶化するよりもコール酸やデオキシコール酸（イオン性界面活性剤）を用いて可溶化する方が塩析，透析が可能であり、従って酵素液からの界面活性剤（コール酸，デオキシコール酸）の除去も容易なことから、膜画分からのP-450 レダクターゼの可溶化処理を次のようにすることにした。　１％コール酸と０.５％デオキシコール酸、安定化剤として ２０％グリセロール，０.５ｍＭＤＴＴ，プロテアーゼ阻害剤とし

て３ｍＭＥＤＴＡと０．４ μg/mlペプスタチンＡを添加して可溶化処理を行う。なおフラボプロティンであるP-450 レダクターゼの失活を防ぐため可溶化処理とその後の精製各ステップに１μＭのＦＡＤとＦＭＮを添加した。

２．2',5'-ADP-セファロース4Bによる精製

上記の可溶化処理によって膜画分から可溶化酵素液を調製し、濃縮と分画を兼ねて３０－６０％飽和硫酸アンモニウムによる塩析を行った。 脱塩のために透析した後、2',5'-ADP-セファロース4Bカラムにチャージした。

2',5'-ADP-セファロース4Bは下記のように、ＮＡＤＰ⁺ との構造類似性のある、2',5'-ADP-をリガンドとして持っている。



そこでP-450 レダクターゼのＮＡＤＰＨに対するアフィニティーを利用し、ゲルリガンドへP-450 レダクターゼを吸着させ、2'-AMPによって溶出することを試みた。

図７－２に2',5'-ADP-セファロース4Bカラムによる P-450 レダクターゼの溶出パターンを示した。

大部分のタンパク質はカラムを素通りし、わずかなタンパク質しかゲルに吸着しなかった。 カラムゲルを洗浄した後、０．７ｍＭ 2'-AMPでP-450 レダクターゼをカラムから溶出した。 フラクションＮｏ．１５から２０までをプールし、2',5'-ADP-セファロース4B溶出酵素液とした。

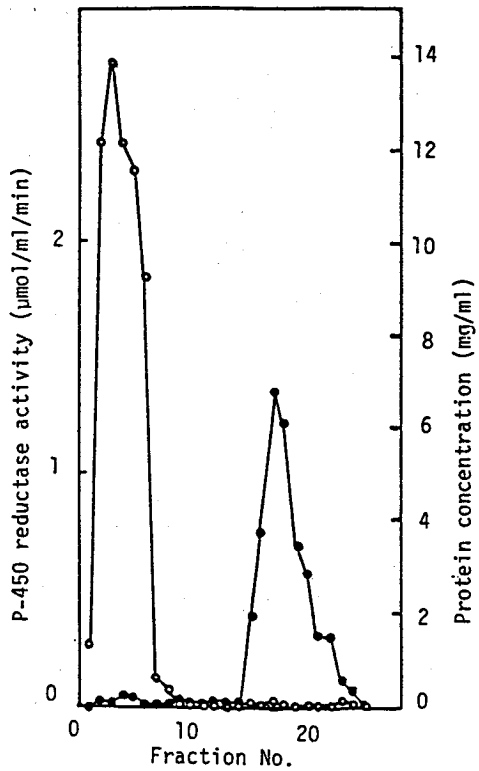


図７－２　2',5'-ADP-セファロース4BからのP-450レダクターゼの溶出パターン

○：タンパク質濃度；●：P-450レダクターゼ活性；カラム：φ１.５ｃｍ×３.４ｃｍ，ゲル容積６ｍｌ；素通り（各7.0ml），No.1-4；洗浄（各8.0ml），No.5-14；溶出（各8.0ml），No.15-25

３．ハイドロキシアパタイトによる精製

2',5'-ADP-セファロース4B溶出酵素液をハイドロキシアパタイトカラムにチャージし、３０ｍＭリン酸カリウム緩衝液でカラムゲルを洗浄後、３０ｍＭから２５０ｍＭのリン酸カリウム緩衝液濃度のグラジエントでP-450 レダクターゼを溶出した。この溶出のパターンを図７－３に示した。

素通りおよび洗浄の画分に大部分の不純タンパク質が溶出された。 リン酸カリウム緩衝液濃度を上げてゆくと、P-450 レダクターゼ活性が数フラクションに集中して溶出され、このフラクションに、わずかなタンパク質が検出された。 フラ

クションNo．２１と２２をハイドロキシアパタイト溶出酵素液とした。

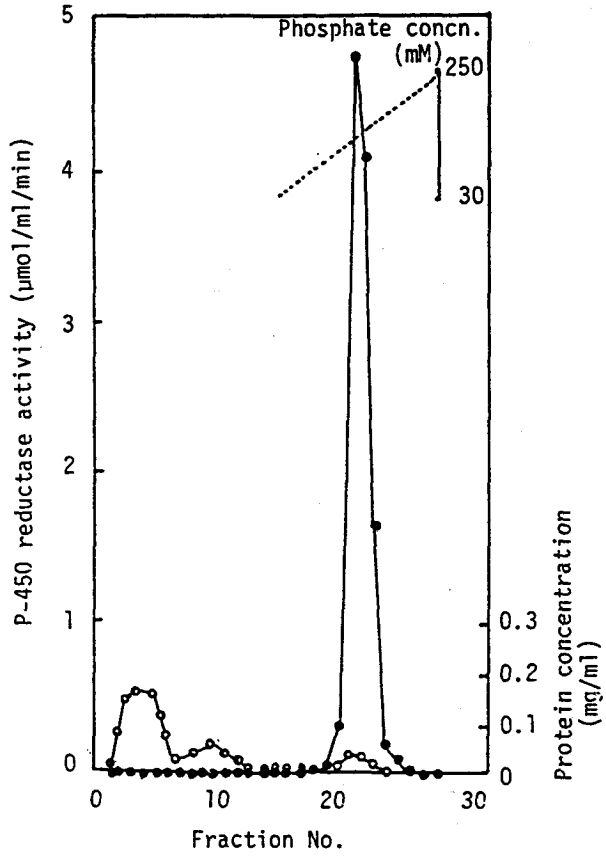


図７－３　ハイドロキシアパタイトからのP-450レダクターゼの溶出パターン

○：タンパク質濃度；●：P-450レダクターゼ活性；カラム：φ１．５ｃｍ×２．８ｃｍ，ゲル容積５ｍｌ；素通り（各7.0ml），No.1-7；洗浄（各9.0ml），No.8-14；溶出（各4.0ml），No.15-28

４．精製フローの一貫データー

ミクロゾーム画分の可溶化からハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーまでの精製フローの一貫データーを要約したのが表７－１である。

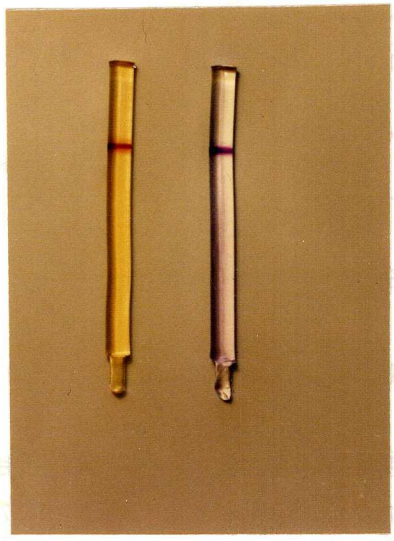
表７－１　P-450レダクタ-ゼの精製フローの一貫データー

Step	Total protein (mg)	Total activity (μmol/min)	Recovery (%) total	Recovery (%) step	Specific activity (μmol/mg/min)	Fold
Microsomes	1373	72.5	100	100	0.053	1
Solubilized enzyme	857	71.7	98.9	98.9	0.084	1.6
Salting-out dialized enzyme	403	60.6	83.6	84.5	0.151	2.8
2',5'-ADP-Sepharose 4B eluate	4.2	49.6	68.4	81.5	11.9	224
Hydroxyapatite eluate	0.28	34.9	48.1	70.4	125	2349

R. minuta IFO 1102の培養液1.2 l から精製を行った。

１％ コール酸と ０.５％ デオキシコール酸の組合せによってほとんどすべてのP-450 レダクターゼを可溶化できた。 なお、この可溶化液中にはチトクロームP-450のコンタミはなかった。　塩析、透析後、2',5'-ADP-セファロース4Bを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーで比活性が大幅に上昇し、さらにハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー によって　P-450 レダクターゼ 比活性は１２５まで増加した。　両カラムともに活性の回収率は良好で、ほとんどの活性が回収できた。

a)



b)

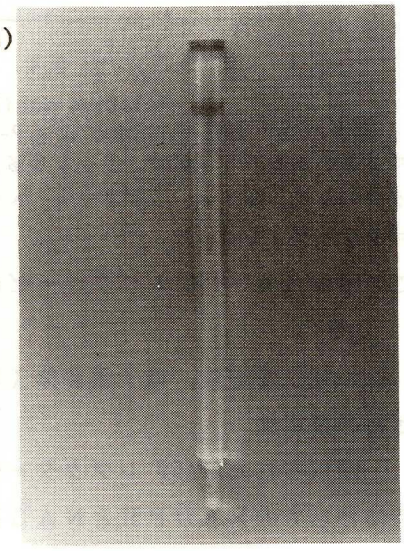


図７－４　ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動（PAGE）

a)nativePAGE；左：活性染色，右：タンパク質染色　b)SDS-PAGE；タンパク質染色

得られたハイドロキシアパタイトカラム溶出酵素液をポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動した結果を図７－４に示した。　左が活性染色、右がコマシブルーによるタンパク質染色である。　図７－４，a)から両染色法とも単一なバンドだけが認められ、しかも泳動位置はほとんど同じであった。

ＳＤＳ－ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）についても単一なバンドだけが見られ、電気泳動的に単一タンパク質まで精製できた。

５．精製されたP-450 レダクターゼの性質

5.1.　P-450 レダクターゼの分子量

精製P-450 レダクターゼの分子量をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって求めた。　図７－５に標準物質とともに、精製P-450 レダクターゼの電気泳動結果を示した。

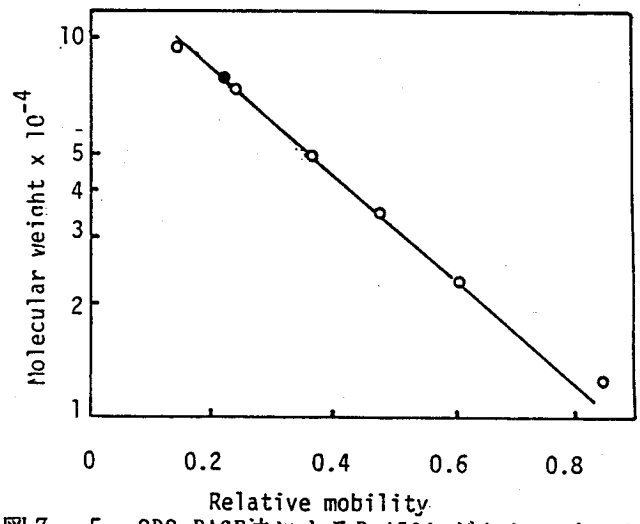


図７－５　SDS-PAGE法によるP-450レダクターゼの分子量推定
ポリアクリルアミドゲル，Ｔ：１０％，Ｃ：１.３％を用いた。　標準試料はチトクロームｃ，モノマー，ダイマー，トリマー，ヘキサマー，ペンタマーおよびホスホリラーゼａを用いた

この図から本P-450 レダクターゼの分子量は約79,000と推定される。

5.2.　電子受容体，電子供与体（ＮＡＤＰＨ、ＮＡＤＨ）と精製P-450 レダクターゼとの反応性

精製されたP-450 レダクターゼと種々の電子受容体との反応性、および電子供与体としてのＮＡＤＰＨとＮＡＤＨとの反応性を調べた。　結果が表７－２に示されている。

表７－２　電子受容体，電子供与体と精製P-450レダクターゼとの反応性

Donor*	Acceptor	Concentration of acceptor	Activity of oxidation of NAD(P)H (μmol/mg protein/min)
NADPH	Cytochrome c	25 μM	41.9
NADPH	Ferricyanide	1 mM	127
NADPH	DCIP**	50 μM	63.6
NADPH	PMS***	0.1 mM	88.8
NADPH	O_2 (Vitamin K_3, 20 μM)		34.2
NADPH	O_2		0
NADH	Cytochrome c	25 μM	0
NADH	Ferricyanide	1 mM	0

* Donor concentration: 0.1 mM; ***PMS: phenazine methosulfate;
**DCIP: 2,6-dichlorophenolindophenol.

ＮＡＤＰＨを電子供与体とした場合に、電子受容体としてのフェリシアナイド、ＰＭＳ，ＤＣＩＰがチトクロームｃよりも高い反応性を示した。　さらに分子状酸素にはほとんど電子を伝達しなかったが、ビタミンＫ₃を介して分子状酸素に電子を供与するようである。

反応性の高かったフェリシアナイドとチトクロームｃを電子受容体として、ＮＡＤＨとの反応を調べた結果、いずれの電子受容体を用いてもP-450 レダクターゼはＮＡＤＨを酸化しなかった。　P-450 レダクターゼは、ＮＡＤＰＨのみを電子供与体にできることが分かった。

第４節　考察

Rhodotorula 属菌の菌体から抽出，分離，精製されたP-450 レダクターゼに関する報告はいままでに見当たらない。　本P-450 レダクターゼが最初の報告である。

他の酵母については、 Saccharomyces cerevisiaeのP-450 レダクターゼが知られている(46,47)。

S. cerevisiae のP-450 レダクターゼの分子量は83,000、これに対して　R. minutaでは79,000であり、前者の最終比活性は、１３２に対して後者では１２５で

あり、両酵母間には若干の差がある。　電子受容体との反応性については、　R. minuta の P-450 レダクターゼ は　S. cerevisiaeの酵素と同様、フェリシアナイド，ＰＭＳ，ＤＣＩＰを電子受容体にできること、電子供与体としてＮＡＤＰＨのみを利用すること、ビタミンK₃依存性ＮＡＤＰＨオキシダーゼ活性を持っていることなど、S. cerevisiaeの P-450 レダクターゼと類似の点もあるが、電子受容体との反応性の程度は異なり、特にフェリシアナイドとの反応性は　R. minuta のP-450 レダクターゼの方がかなり高い値を示した。

一般にP-450 レダクターゼはフラボプロテインとして知られている。　R. minutaのP-450 レダクターゼのフラボプロテインとしての性質を検討し、本酵素の他のP-450 レダクターゼに対する位置づけを明確にする必要があるであろう。

第５節　要約

Rhodotorula minuta IFO 1102 のミクロゾーム画分からP-450 レダクターゼを可溶化し、塩析、透析後、2',5'-ADP-セファロース4B、およびハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによってP-450 レダクターゼを精製し、電気泳動的に単一なタンパク質に単離した。

本P-450 レダクターゼの分子量はＳＤＳ－ＰＡＧＥで約 79,000 と推定され、最終比活性は１２５であった。　またP-450 レダクターゼは電子供与体としてＮＡＤＰＨを利用し、ＮＡＤＨは利用できなかった。

第８章　チトクロームP-450の精製と性質

第１節　緒言

Rhodotorula minuta IFO 1102 のイソプテン生成酵素は膜結合型酵素であり、その性質はチトクローム P-450のそれとよく類似していた。　一方、本菌の膜画分にチトクローム P-450とP-450 レダクターゼが存在していることが確認された。さらにこの菌の培養菌体でのイソプテン生成活性と菌体内チトクローム P-450含量に密接な相関関係が認められた。　そこで、R. minuta IFO 1102の膜画分からチトクローム P-450を可溶化，精製し、精製チトクローム P-450とイソプテン生成酵素との相同性を調べることを目的として、以下の実験を行った。

チトクローム P-450は微生物、植物、動物に広く分布して存在するヘムタンパク質の一種であり、一酸化炭素と結合し４５０ｎｍまたは４４８ｎｍに特有の吸収がある(48)。　チトクローム P-450に関する研究は動物組織について、さかんに行われ、肝臓での異物の代謝（解毒）やステロイド，ビタミンD_3，脂肪酸などの内在性基質の酸化的代謝に、また副腎などではステロイドホルモンの生合成にかかわっている(49,50)。　バクテリアでは脂溶性化合物の資化に関与するもの(51,52)、酵母，Saccharomyces cerevisiae ではステロールの代謝に関与するもの(53)などが報告されている。　しかし、Rhodotorula 属菌についての報告は今まで見当たらない。

第２節　実験材料及び方法

１．培養方法

第７章，第２節に記載した方法でR. minuta IFO 1102を培養した。

２．ミクロゾームの調製

第７章，第２節の方法とほとんど同じ方法でミクロゾームを調製した。　ただ菌体を懸濁するための緩衝液にはＦＡＤ，ＦＭＮを添加しなかった。

３．チトクローム P-450 の可溶化

ミクロゾームを約７mg protein/ml となるように２０％グリセロール，３ｍＭＥＤＴＡ，０.５ｍＭジチオスレイトール（ＤＴＴ），０.４μg/mlペプスタチンＡを含む１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液，ｐＨ７.０に懸濁し、テフロンホモゲナイ

ザーで均一に混合し、これに界面活性剤であるコール酸を最終１％となるように添加した。　氷中でこのミクロゾーム懸濁液を約１時間強く撹拌した後、160,000×g，１時間超遠心分離して上澄液を得た。　この上澄液に最終濃度が２％となるようにコール酸を追加添加し、氷中で強く撹拌して、チトクロームP-450 を可溶化した。再度上記条件の超遠心分離を行い上澄液を得、これを可溶化チトクローム P-450溶液とした。

４．チトクローム P-450の精製

4.1.　2',5'-ADP-セファロース4Bカラムクロマトグラフィーによる精製

可溶化チトクローム P-450溶液にはP-450 レダクターゼ活性が検出され、前記のような可溶化条件ではP-450 レダクターゼも同時に可溶化された。　そこで P-450 レダクターゼを取除くため2',5'-ADP-セファロース4Bカラムクロマトグラフィーを用いて分離した。

2',5'-ADP-セファロース4B（ファルマシア社製）を膨潤後、カラムに充填し、２０％グリセロール，０.１％コール酸,０.０２ｍＭＥＤＴＡ,０.１ｍＭＤＴＴ,１μＭＦＡＤ，１μＭＦＭＮ，０.４μg/ml ペプスタチンＡを含む２０ｍＭリン酸カリウム緩衝液,ｐＨ７.２でカラムを平衡化した。　可溶化チトクロームP-450 溶液をチャージし、素通り画分を採取し、さらに上記平衡化用緩衝液で、カラム内に残っているチトクローム P-450を追い出した。　チトクローム P-450の含まれていた画分の混合液を2',5'-ADP-セファロース溶出酵素液とした。

4.2.　アミノヘキシル（AH）-セファロース4B カラムクロマトグラフィーによる精製

ＡＨ－セファロース４Ｂカラムを２０％グリセロール，０.３％コール酸,１ｍＭ　ＥＤＴＡ，０.５ｍＭＤＴＴ，０.４μg/ml　ペプスタチンＡを含む　１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液,ｐＨ７.２で平衡化し、これに2',5'-ADP-セファロース溶出酵素液をチャージし、上記平衡化用と同じ緩衝液で洗浄後、０.２％ エマルゲン913 （花王・アトラス株式会社製）を含む上記平衡化用と同じ緩衝液でチトクローム P-450を溶出した。　これをＡＨ－セファロース４Ｂ溶出酵素液とした。

4.3.　ハイドロキシアパタイト　カラムクロマトグラフィーによる精製

ハイドロキシアパタイト（Bio-Gel HTP,バイオラッド社製）粉末を膨潤後、カ

ラムに充填し、２０％グリセロールを含む１０ｍＭリン酸カリウム緩衝液，ｐＨ７．２で平衡化した。　ＡＨ－セファロース４Ｂ溶出酵素液を２０％グリセロールを含む蒸留水で５倍に希釈した後、ハイドロキシアパタイトカラムにチャージした。０．０８％エマルゲン913 を含有する１０ｍＭリン酸カリウム緩衝液，ｐＨ７．２でカラムを洗浄後、０．０８％エマルゲン913 を含むリン酸カリウム緩衝液，ｐＨ７．２のリン酸濃度を１０ｍＭから１００ｍＭまで直線的に上昇させて、チトクローム P-450を溶出した。

５．チトクローム P-450含量の測定法

チトクローム P-450含量は主として、大村，佐藤の方法(33)にしたがって一酸化炭素差スペクトルを測定して算出した。　分子吸光係数には９１ｍＭ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$の値を用いた。　実験によっては、４１８ｎｍのソレット吸収帯の吸収強度からチトクロームP-450 含量を算出した。

６．電気泳動

ＳＤＳ－ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）は、第７章，第２節に記載した方法に従って行った。

第３節　結果

１．界面活性剤による可溶化

文献によれば、チトクローム P-450の可溶化には、１％コール酸を用いる報告が多い、そこで１％コール酸を用いて可溶化を試みた。　ミクロゾーム懸濁液の濃度（タンパク質濃度）が可溶化率にどのように影響するのかを調べた結果が表８－１に示されている。　ミクロゾーム懸濁液のタンパク質濃度が７．４mg/mlの時に、チトクローム P-450の可溶化率の最も高い９５％を示した。　また、可溶化チトクローム P-450溶液の比含量も高い値となった。　したがって、以後の実験では可溶化時にミクロゾームの懸濁液濃度を約７mg protein/ml となるよう調製した。

つぎにコール酸１％添加によって可溶化したチトクローム P-450のカラムクロマトグラフィーによる精製を試みたが、比含量があまり増加せず、またP-450 レダクターゼの分離，除去ができなかった。　これはチトクローム P-450の可溶化が１％コール酸では不充分なためであると考えられた。　すなわち、超遠心の上澄画分にチトクローム P-450が回収できることで可溶化の判断基準としていたが、チトク

ローム P-450分子が界面活性剤に完全に囲まれた状態で可溶化しているのではなく、比較的小さな膜断片として上澄液に浮上して、回収されたものと考えられた。　そこで、可溶化を充分に行わせるために、超遠心の上澄液に、さらに１％のコール酸を追加添加した。

表８－１　ミクロゾームタンパク質濃度のチトクロームP-450可溶化率への影響

Protein concn.* (mg/ml)	Volume (ml)	Protein solubilized (mg/ml)	Cytochrome P-450 solubilized (nmol/ml)	The efficiency of solubilization of P-450 (%)
15.7	80	6.7	1.20	57
13.6	107	5.9	0.91	58
7.4	160	4.3	1.00	95

＊ミクロゾーム懸濁液のタンパク質濃度　各ミクロゾーム濃度の懸濁液に第２節の方法にしたがって可溶化処理を行った。ただし、超遠心後にコール酸の追加添加は行っていない。

なお、コール酸の追加添加でチトクローム P-450含量は若干低下し可溶化率は約７０％程度となった。

このような方法で可溶化したチトクローム P-450のｐＨ安定性を調べた結果を図８－１に示した。　図中のチトクローム P-450含量は各ｐＨのリン酸緩衝液に懸濁した可溶化チトクローム P-450の一酸化炭素差スペクトルを測定，算出した。

チトクローム P-450はｐＨ６．８以上では安定であったが、ｐＨが低くなるにしたがって４５０ｎｍの吸収は減少し、ｐＨ　６．２では４５０ｎｍの吸収が完全に消失した。　これとは逆にｐＨが低下するにつれて、４２０ｎｍの吸収が増加した。

ここで現れた４２０ｎｍの吸収は一般にチトクローム P-450の失活によって生ずる吸収と考えられており(33,54)、　ｐＨ　６．２で４５０ｎｍの吸収がなくなり、４２０ｎｍの吸収が最大となったのは、チトクローム P-450がすべて失活したことを意味している。

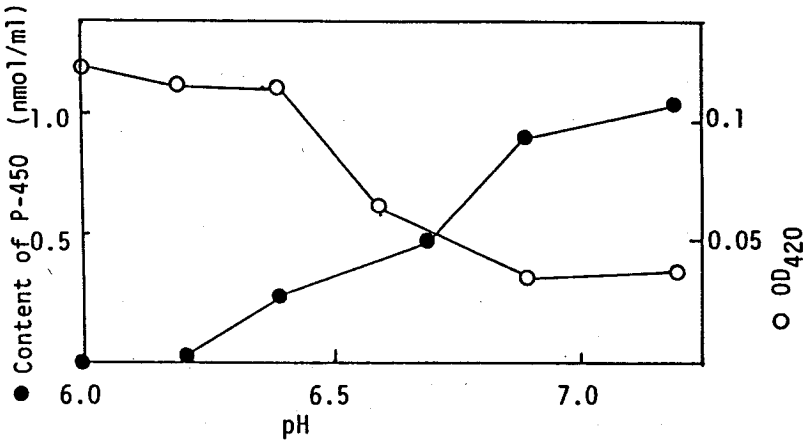


図８－１　可溶化チトクロームP-450のｐＨ安定性

●：チトクロームP-450含量；○：420ｎｍの吸光度

２．2',5'-ADP-セファロース4Bによる精製

可溶化チトクローム P-450溶液中には、P-450 レダクターゼの高い活性が認められた。 P-450 レダクターゼを分離，除去するために、2',5'-ADP-セファロース4Bカラムでの吸脱着を試みた。

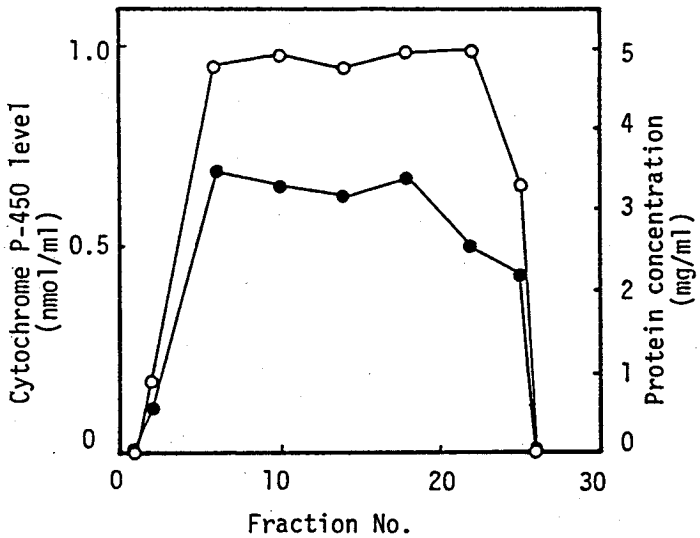


図８－２　チトクロームP-450の2',5'-ADP-セファロース4Bクロマトグラフィー

●：チトクロームP-450含量；○：タンパク質濃度；カラムφ１.５×４.５ｃｍ；ゲル容積６.４ｍｌ；４ｍｌ分画

図８－２にチトクローム P-450の溶出パターンを示した。　チトクローム P-450 はすべて素通り画分に回収され、この画分中に　P-450 レダクターゼ活性は全く認められなかった。　なお、吸着されたP-450 レダクターゼの溶出を試みたが、第７章，第３節に記載したようには溶出せず、何らかの原因でカラムに吸着後、失活するものと思われる。

３．ＡＨ－セファロース４Ｂによる精製

ＡＨ－セファロース４Ｂは、アミノヘキシル基を疎水性リガンドとする疎水性アフィニティークロマトグラフィーとして利用できる。　図８－３に2',5'-ADP-セファロース4B素通り画分すべてをＡＨ－セファロース４Ｂカラムにチャージし、溶出したパターンを示した。

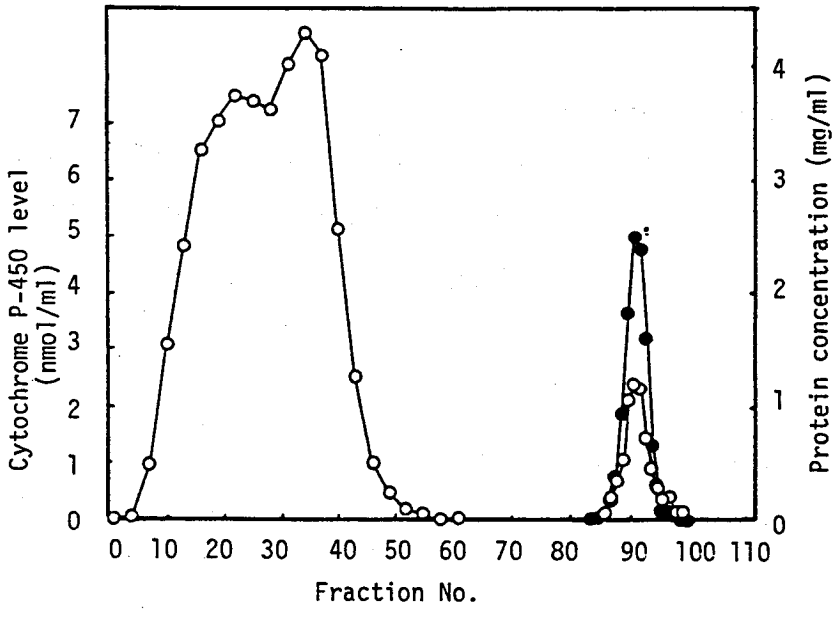


図８－３　チトクロームP-450のAH－セファロース4B溶出パターン

●：チトクロームP-450含量；○：タンパク質濃度；カラムφ１.５×１４ｃｍ；ゲル容積，約２５ｍｌ；素通り（各７.５ｍｌ），No.1－36；洗浄（各７.５ｍｌ）No.37-70；溶出（各２.５ｍｌ）,No.71以後；溶出は０.２％エマルゲン913によって行った。

図８－３から、大部分のタンパク質は素通り、洗浄で漏出除去でき、チトクロームP-450 の比含量はかなり上昇した。　フラクションNo.８９から９３をプールし、

これをＡＨ－セファロース４Ｂ溶出酵素液とした。

４．ハイドロキシアパタイトによる精製

ＡＨ－セファロース４Ｂ溶出酵素液を２０％グリセロールを含む蒸留水で５倍希釈し、この希釈酵素液をハイドロキシアパタイトカラムにチャージした。 第２節，４．4.3.に記した方法によってカラムを洗浄した後、0.08％エマルゲン913 を含むリン酸カリウム緩衝液，ｐＨ７．２のリン酸濃度勾配溶出法によってチトクローム P-450を溶出した。 溶出パターンを図８－４に示した。

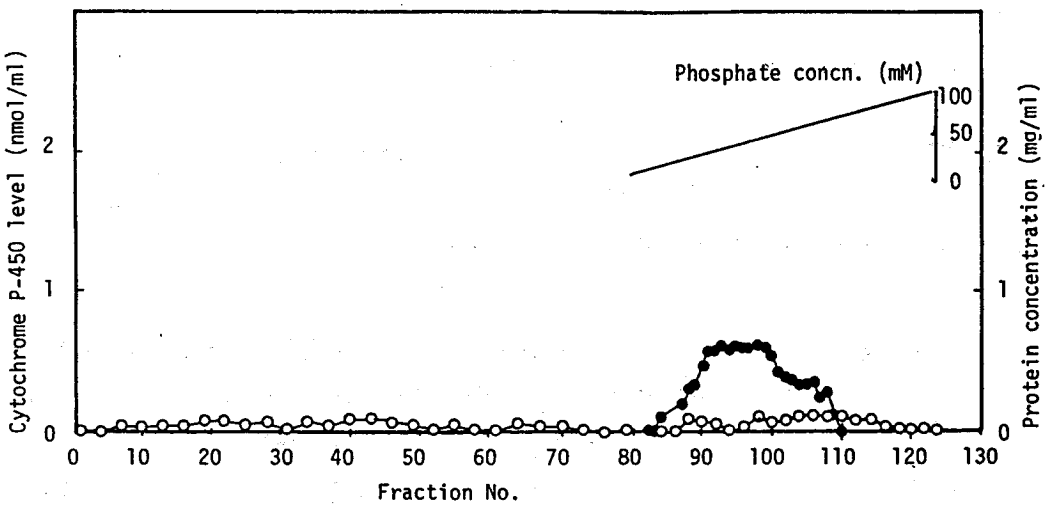


図８－４　チトクロームP-450のハイドロキシアパタイト溶出パターン

●：チトクロームP-450含量；○：タンパク質濃度；カラムφ１．５×２．８ｃｍ，ゲル容積，約５ｍｌ；素通り，No.1-72；洗浄，No.73-80；溶出，No.80-124

リン酸濃度を上げ始めた直後から、チトクローム P-450が溶出し始めたが、テーリング状にかなり広い範囲で溶出した。 これはおそらく０．０８％の低濃度エマルゲン913 しか含まない緩衝液を用いたため、ゲルと酵素の間に疎水的な関係が生じたためと思われる。 フラクション Ｎｏ．９１からＮｏ．１００までの溶出画分をプールして比含量を測定した結果１０ nmol/mgの高い値を示した。

５．精製フローの一貫データー

ミクロゾーム画分の可溶化から、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラ

フィーまでの精製フローの一貫データーを要約したのが表８－２である。

表８－２　チトクロームP-450精製フローの一貫データー

Step	Total protein (mg)	Total P-450 content (nmol)	Recovery (%) total	Recovery (%) step	Specific content of P-450 (nmol/mg)	Fold
Microsomes	977	101	100	100	0.104	1
Solubilized enzyme	523	77.0	76.1	76.1	0.147	1.4
2',5'-ADP-Sepharose 4B eluate	364	47.0	46.4	61.0	0.129	1.2
AH-Sepharose 4B eluate	11.8	46.4	45.8	98.7	3.95	38
Hydroxyapatite eluate	0.89	8.9	8.8	19.2	10.0	96

R. minuta IFO 1102の培養液１２１から精製を行った。

可溶化処理の際、ミクロゾーム懸濁液に１％コール酸を添加し、その超遠心上澄液に、さらに１％コール酸を添加したため、可溶化酵素の回収率が ７６.１％と若干低い値となった。 2',5'-ADP-セファロース4Bによる精製はP-450 レダクターゼを取り除くことが目的で、チトクローム P-450の比含量は少し減少したにもかかわらず、このカラム溶出酵素液にはP-450 レダクターゼ活性は全く検出されなかった。ＡＨ－セファロース４Ｂカラムによって大部分の不純タンパク質は除かれ、チトクローム P-450の比含量は４ nmol/mgまで上昇した。 さらに、ハイドロキシアパタイトカラムでチトクローム P-450の比含量は１０.０ nmol/mgとなった。 チトクローム P-450の分子量から逆算して、精製チトクロームP-450の比含量は、約１７ nmol/mgと予想される。 しかし、チトクローム P-450のヘムが酵素タンパクからはずれることもあり、単一タンパク質まで精製されたチトクローム P-450の比含量が１０nmol/mgとする報告(55,56)もいくつかある。

ハイドロキシアパタイト溶出酵素液をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、純度を調べたのが、図８－５である。 この写真では、メインのバンド以外にまだ淡く染色されたタンパク質がわずかに認められる。

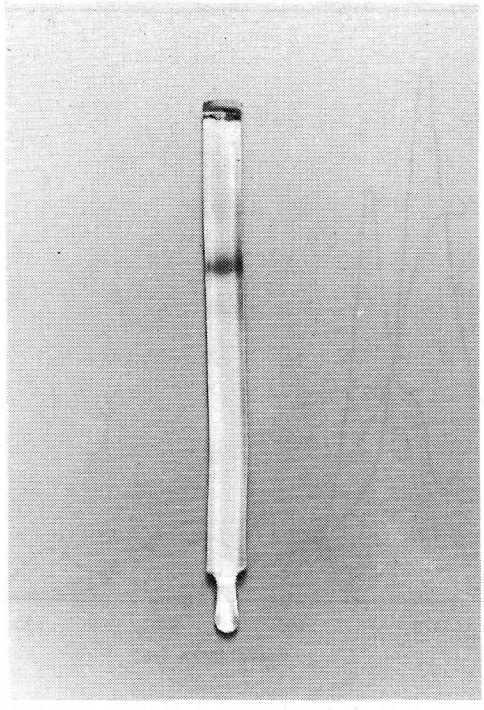


図８－５　精製チトクロームP-450のSDS-ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動

６．精製されたチトクローム P-450の性質

6.1.　チトクローム P-450の分光学的性質

ハイドロキシアパタイト溶出酵素液を用いて、分光光学的性質を調べた結果を図８－６に示す。

図８－６から、酸化型スペクトルのソレット吸収帯は４１８ｎｍにピークがあり、５３０および５７０ｎｍ付近に他の２つのピークが認められた。　ダイチオナイトの添加で、ソレット吸収帯は少しブルーにシフトし、淡色効果を示した。還元型の可視領域での他の吸収は、５５０ｎｍ付近に唯一つだけ認められた。　還元一酸化炭素複合型のソレット吸収帯は４４７ｎｍにピークがあり、　５５０および６２０ｎｍ付近にも他の二つのピークが認められた。　また４２５ｎｍ付近に肩がみられた。

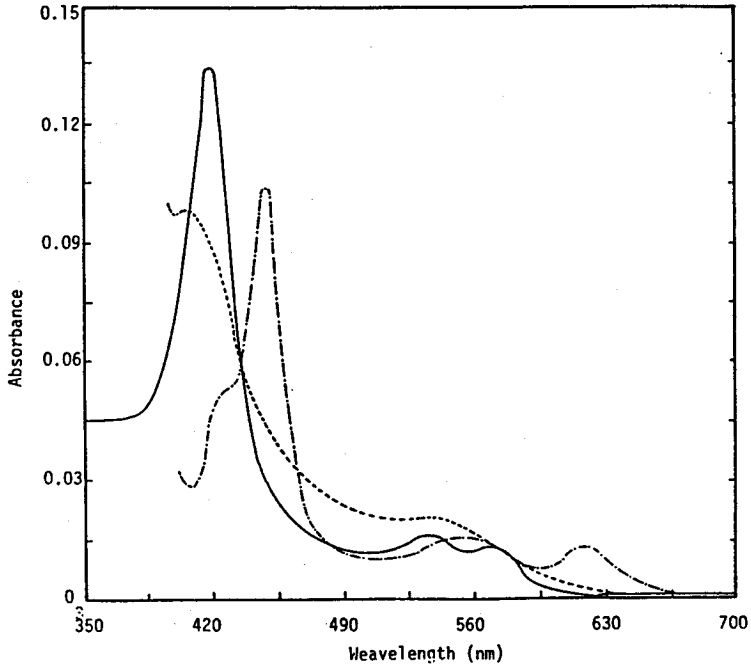


図８－６　ハイドロキシアパタイト溶出酵素の絶対スペクトル

酸化型 ―；還元型 - - -；還元一酸化炭素複合型 -・-・-

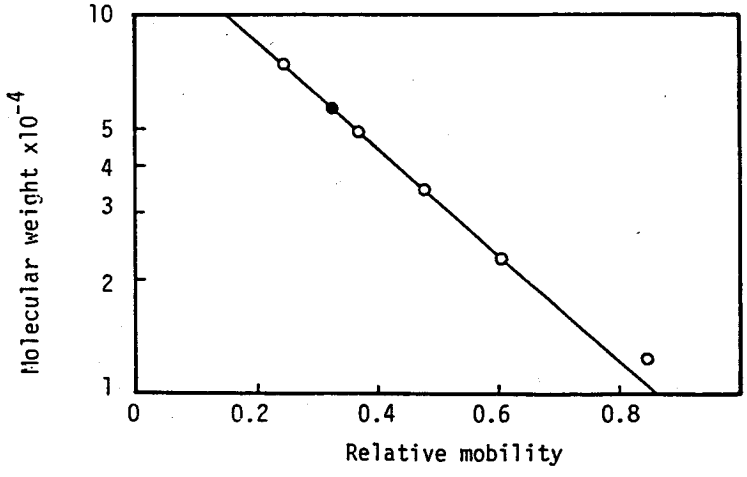


図８－７　チトクロームP-450の分子量の推定

ポリアクリルアミドゲル，Ｔ：１０％，Ｃ：１.３％を用いた。標準試料はチトクロームｃ，モノマー，ダイマー，トリマー，ヘキサマー，ペンタマー

6.2. チトクローム P-450の分子量

R. minuta IFO 1102 のチトクローム P-450の分子量をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって求めた。　図８－７に示す標準物質の相対移動度から、この菌のチトクローム P-450 の分子量はおよそ58,000と推定された。

6.3. イソ吉草酸のチトクローム P-450への結合

一般に、チトクローム P-450は酸化状態で特異的に基質と結合し、吸収スペクトルが変化することが良く知られている(48,57)。 このスペクトル変化を基質無添加に対する差スペクトルとして測定した場合、３８５ｎｍに山、４１５ｎｍに谷を生じるタイプＩスペクトル、４１０ｎｍに谷、４２７ｎｍに山を作るタイプⅡスペクトル、および、タイプＩの山と谷が逆転した、逆タイプＩスペクトルに分類される(49)。　ある種の化合物がチトクローム P-450にこれらスペクトル変化を起こさせるかどうかを調べると、逆に真の基質であるかの判定ができる。　イソ吉草酸をR.minutaの精製チトクローム P-450に添加し、イソ吉草酸無添加との差スペクトルを測定したのが図８－８である。

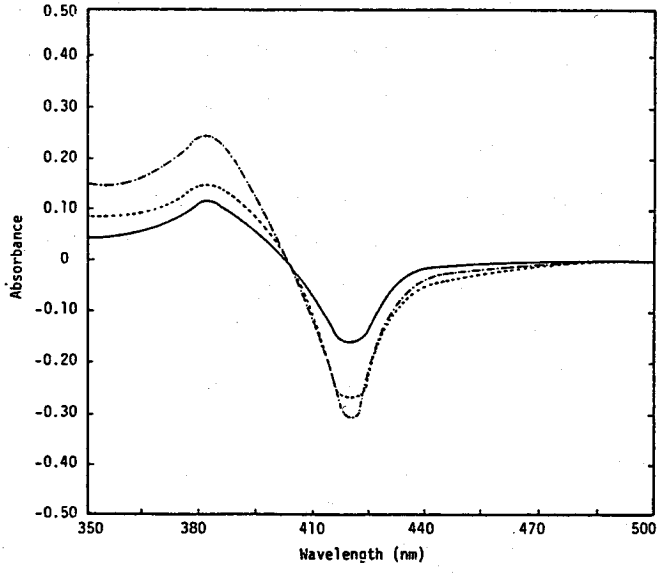


図８－８　イソ吉草酸の添加によって生じたチトクロームP-450のスペクトル変化
イソ吉草酸濃度２５ｍＭ，—；５０ｍＭ，- - -;７５ｍＭ；—·—·—
チトクロームP-450は2.22 n mol/mlに濃縮して用いた。

図８－８は典型的なタイプＩスペクトルを示し、イソ吉草酸に対する濃度依存

性も示している。　イソ吉草酸がこの菌のチトクローム P-450の基質であることが確かめられた。

第４節　考察

R. minuta の膜画分からのチトクローム P-450の可溶化には当初１％のコール酸を使って行った。　可溶化処理後、カラムクロマトグラフィーで精製を行ったが、P-450 レダクターゼ活性がどの段階の試料にも検出され、チトクローム P-450と挙動を共にした。　また、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによる精製の場合、チトクローム P-450はカラムに吸着したが、リン酸濃度を上昇させても溶出せず、逆にエマルゲン913 など界面活性剤がわずかに存在しただけで、低リン酸濃度でもチトクロームP-450が溶出し、しかもチトクロームP-450の比含量はカラムチャージ前とほとんど変化しなかった。

超遠心上澄液に含まれるチトクローム P-450 が可溶化されたチトクローム P-450 であると思っていたが、実は可溶化が不充分であり、比較的小さな膜断片として超遠心上澄液に浮遊回収されたために生じた現象であろうと考えなおした。　そこで、超遠心上澄液にコール酸１％をさらに添加し、2',5'-ADP-セファロースカラムクロマトグラフィーを追加したところP-450 レダクターゼを分離除去することができ、その結果として、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーでのリン酸濃度勾配溶出法を使って精製できた。

表８－３に微生物起源の既知のチトクローム P-450を表示した。　R. minuta のチトクローム P-450のように、基質にイソ吉草酸のような有機酸を利用し、不飽和炭化水素であるイソブテンを生成するようなチトクローム P-450は報告されていない。　また R. minutaではＬ－フェニルアラニンによってチトクローム P-450が誘導される。　Ｌ－フェニルアラニンによって誘導されるようなチトクローム P-450 については今まで全く知られていない。　このように R. minutaのチトクローム P-450は従来報告されているものと全く異なる可能性が強い。

この菌のチトクローム P-450は酸化型のソレット吸収帯のピークが４１８ｎｍにあり、ダイチオナイトの添加でこの吸収がブルーシフトし、淡色効果（hypochromicity）を示すこと、還元一酸化炭素複合型のソレット吸収帯は４４７ｎｍ（還元型との差スペクトルでは、４４８ｎｍ）にピークがあり、いわゆる“Ｐ－４４８グループ”に属すること、分子量が58,000であることなどから、

表８－３　微生物起源のチトクロームP-450

微生物	Cytochrome P-450 の機能	基質	誘導物質
（バクテリア）			
Corynebacterium (7EIC)	アルカン水酸化	n-オクタン	n-オクタン
Acinetobacter calcoaceticus	アルカン水酸化	n-ヘキサデカン	n-ヘキサデカンビフェニールフェナトレン
Bacillus megaterium (ATCC13368)	15-β水酸化	3-オキソ-Δ⁴ステロイド	未定
Bacillus megaterium (ATCC14581)	ω-1, ω-2, ω-3 水酸化	脂肪酸	フェノバルビタール
Pseudomonas putida	8-メチル水酸化	リナロール	リナロール
Pseudomonas putida PpG1 (ATCC17453)	5-ケト水酸化	カンファー	カンファー
Pseudomonase putida	7-メチル水酸化	p-シメン	p-メシン
Moraxella	O-脱メチル化	グアヤコール	グアヤコール
（カビ）			
Fusarium oxysporum	ω-1, ω-2, ω-3 水酸化	脂肪酸	フェノバルビタール
Aspergillus ochraceus	メチル水酸化	ベンツピレン	ベンツピレン
（酵母）			
Saccharomyces cerevisiae	14-α-脱メチル化	ラノステロール	低溶存酸素濃度
Candida maltose	アルカン水酸化	n-アルカン	n-アルカン
Rhodotorula minuta (IFO 1102)	イソブテン生成	イソ吉草酸	フェニールアラニン

Saccharomyces cerevisiaeのチトクローム P-450(59)と若干類似した性質を持っていた。

R. minuta のチトクローム P-450が，既に報告されているチトクローム P-450と比べどのような関係にあるのかについては、残された今後の課題であろうと考えられる。

第５節　要約

R. minuta IFO 1102のミクロゾーム画分からコール酸を用いてチトクロームP-450を可溶化し、 2',5'-ADP-セファロース4B，ＡＨ－セファロース４Ｂ，ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによって比含量１０.０nmol/mg protein のほぼ単一の蛋白質に近い状態までに精製した。

この菌のチトクローム P-450の性質は、４４７ｎｍに還元一酸化炭素複合型のソレット吸収帯のピークを持つこと、分子量はＳＤＳ－ＰＡＧＥで約58,000、イソ

吉草酸を基質とすること、L－フェニルアラニンで誘導されることなど、多くの特徴があり、従来から知られているチトクローム P-450とは全く異なる可能性が強くなってきた。

第９章　イソプテン生成系の再構成

第１節　緒言

一般にチトクローム P-450は膜内に埋め込まれた状態で存在する膜結合型酵素であり、ＮＡＤＰＨからP-450 レダクターゼのＦＡＤ，ＦＭＮを経由して伝達される電子と分子状酸素と様々な有機基質から、広汎な酸化生産物を生成する反応を触媒する酵素である。　精製されたチトクローム P-450とP-450 レダクターゼを使って、基質のイソ吉草酸からイソプテンの生成する反応を証明するためには、この両酵素をリン脂質などによって形成される人工膜中に埋め込み、イソプテンの生成反応系を再構成する必要がある。　リン脂質として、ダイラウロイルフォスファチジルコリン（ＤＬＰＣ）を用い、コール酸透析法によってイソプテン生成系の再構成を試みた。

第２節　実験材料および方法

１．材料および試料

1.1.　P-450 レダクターゼ溶液：第７章に述べたハイドロキシアパタイト溶出酵素液（活性：１２μmol/ml/min）を使用した。

1.2.　チトクローム P-450溶液：第８章に述べたハイドロキシアパタイト溶出酵素液を再びハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにかけ、酵素試料中の界面活性剤を０.０８％エマルゲン913 から１％コール酸に交換したチトクローム P-450 溶液（チトクロームP-450含量：１４nmol/ml）。

1.3.　ダイラウロイルフォスファチジルコリン(ＤＬＰＣ)溶液：３ｍｇのＤＬＰＣを１ｍｌの脱イオン水に懸濁後、約２秒間超音波処理し、最終濃度が１％となるようにコール酸を添加し、ＤＬＰＣを溶液状態にして使用した。

1.4.　イソ吉草酸溶液：３３０ｍＭイソ吉草酸溶液，ｐＨ８.０

1.5.　ＮＡＤＰＨ溶液：３ｍＭＮＡＤＰＨ溶液

２．イソプテン生成系の再構成法（コール酸透析法(65,66)）

チトクローム P-450溶液３００μｌ、P-450 レダクターゼ溶液１００μｌおよびＤＬＰＣ溶液１００μｌを混合し、透析用セロファンチューブにいれ、２０％グリセロール、１μＭＦＡＤと１μＭＦＭＮを含む１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液，ｐＨ７.３で約１５時間透析し、イソブテン生成系の再構成実験をした。　なおブランクとして、チトクローム P-450を除くかわりに透析用緩衝液を加えた混合液、またP-450 レダクターゼを除くかわりに透析用緩衝液を加えた混合液についても透析を行った。

３．イソブテン生成活性の測定法

上記３種類の透析済再構成酵素液３００μｌ，２μＭＦＡＤと２μＭＦＭＮを含むリン酸カリウム緩衝液,ｐＨ７.２，５００μｌ、イソ吉草酸溶液１００μｌ，ＮＡＤＰＨ溶液１００μｌを順にワッセルマン試験管（φ１５ｍｍ，１３ｍｌ容）に入れ、ゴム栓で密封後２５℃で往復振とうし、反応を行わせた。　一定時間後、ガスシリンジで試験管気相部からガスを採取し、ガスクロマトグラフで生成イソブテンを測定した。

第３節　結果

１．コール酸透析法による再構成

コール酸透析法を用いて、イソブテン生成系を再構成し、そのイソブテン生成活性を測定した結果を表９－１に示す。　チトクロームP-450と P-450 レダクターゼ両方を含む完全系の場合にだけイソブテンの生成が認められ、チトクローム P-450あるいは P-450 レダクターゼのいずれが欠けてもイソブテンは生成しなかった。

表９－１　イソブテン再構成系によるイソブテン生成

Enzyme composition	Isobutene formed (nl/ml)*	
	reaction time (min)	
	10	20
Cytochrome P-450 + P-450 Reductase (complete)	0.91	1.40
Cytochrome P-450 (- P-450 Reductase)	0	0
P-450 Reductase (-Cytochrome P-450)	0	0

１ｍｌの酵素液から生成したイソブテン　ｎｌ

以上の結果から、イソ吉草酸を基質とし、ミクロゾームのチトクローム P-450およびP-450 レダクターゼからなる酵素系と酸素の存在下で、イソブテンが生成されることが確認できた。

第４節　考察

チトクローム P-450, P-450 レダクターゼにリン脂質（ＤＬＰＣ）を組合せ、コール酸透析法によってイソブテン生成系を再構成し、イソブテンの生成が確認された。　これはコール酸透析法によって図９－１のように、チトクローム P-450とP-450 レダクターゼがＤＬＰＣの膜中に構成され、ＮＡＤＰＨからの電子を P-450レダクターゼ内のＦＡＤ，ＦＭＮを経由してチトクローム P-450が受け取り、活性化状態となってイソ吉草酸からイソブテンを生成したと考えられる。

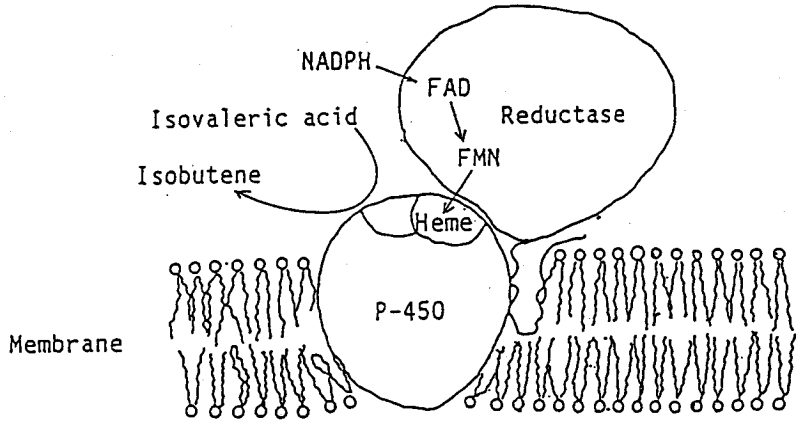


図９－１　チトクロームP-450とP-450レダクターゼの相互関係（モデル）

チトクローム P-450の反応機構については、図９－２のモデルが提案されている(67)。　チトクローム P-450の第５配位子はタンパク質のシステイン残基のチオール基から由来するチオレートであり、第６番目の配位座を水分子が占めている。チトクローム P-450の基質結合部位に結合した基質は立体的に第６配位座の近傍を占めることになる。この時、ヘム鉄がLow spinから high spinに変化し、チトクローム P-450特有のスペクトル変化を生じる。　次にチトクローム P-450の還元と酸素分子のヘム鉄への結合が起こり、最終的にＦ e^{V} ＝０の形で酸素原子が活性化され、酸素原子が基質に添加される。

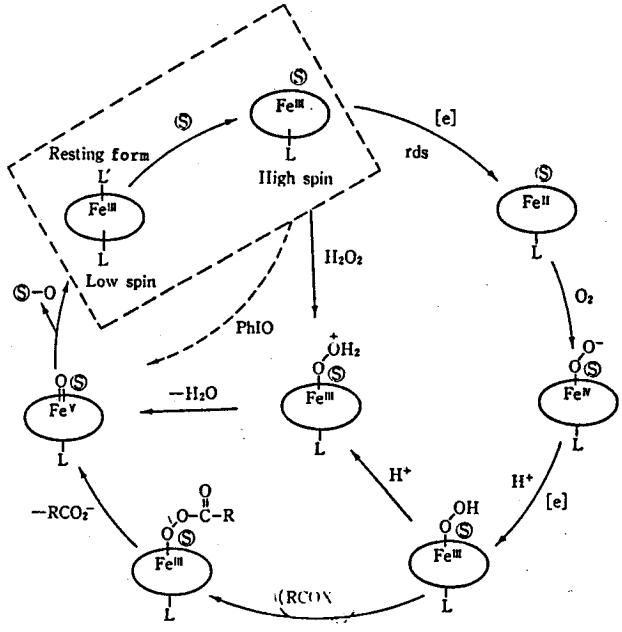
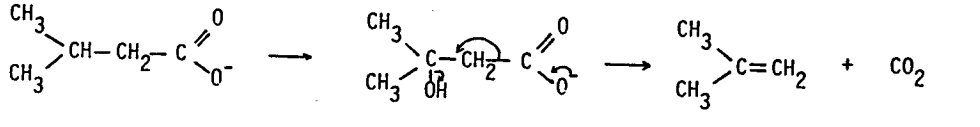


図９－２　チトクロームP-450の酸素酸化反応機構

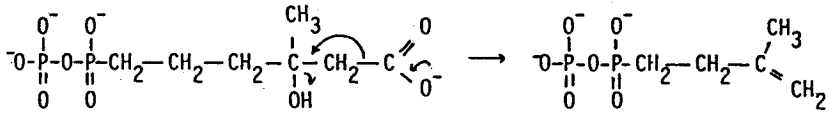
Ｓ　：基質　Ｆｅ：ヘム鉄

上記のチトクローム P-450の反応機構から考えて、イソ吉草酸からどのようにしてイソブテンが生成されるのであろうか。 R. minutaの チトクローム P-450にイソ吉草酸を添加すると、タイプＩスペクトル変化が観察され（図８－８）、イソ吉草酸のチトクローム P-450基質結合部位への結合は証明されている。 しかしイソブテン生成反応に酸素が必要であるが、生成物のイソブテンには酸素原子の添加はない。 一つの可能性として、下記の反応Ｉのようにイソ吉草酸のβ位に酸素が添加したβ－ハイドロキシイソ吉草酸を中間体として経由する反応が考えられる。



Ｉ

β－ハイドロキシイソ吉草酸から、デハイドレーション、デカルボキシレーションが起こりイソブテンが生成する。 同様な生化学反応として、メバロン酸ピロフォスフェートからイソペンテニルピロフォスフェートが生成する反応が知られている（反応Ⅱ）。

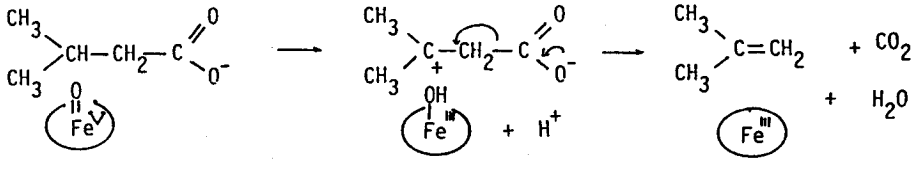


II

しかし、Ｉの反応が進行するためにはチトクローム P-450がリアーゼ（デハイドラーゼとデカルボキシラーゼ）活性をハイドロキシラーゼ活性と同時に持たねばならず、チトクローム P-450以外に別のリアーゼが反応に関与する可能性も否定できない。

そこでイソ吉草酸からイソブテン生成反応を触媒する活性のある無細胞抽出液を用いβ－ハイドロキシイソ吉草酸を添加し、イソブテン生成を調べたが反応は起こらなかった（data not shown）。 したがって、リアーゼの関与は否定されるだろう。 また、同時にチトクローム P-450がβ－ハイドロキシイソ吉草酸からのイソブテン生成を触媒しないことも示している。 β－ハイドロキシイソ吉草酸を中間体として経由してイソブテンが生成されるのだろうか。 イソ吉草酸からβ－ハイドロキシイソ吉草酸がチトクローム P-450表面で生成した場合と、外からβ－ハイドロキシイソ吉草酸を与えた場合では同じ様には考えられないのかも知れない。

もう一つの機構として、下記の反応Ⅲも考えられる。



Ⅲ

活性化したチトクローム P-450がイソ吉草酸のβ位の水素を引き抜き、次に通常はＯＨ⁻を添加するが、その前に速い反応で電子移動が起こり、イソブテンが生成する反応である。 これは、チトクローム P-450のハイドロキシ基添加の機構にも関わるもので興味がもたれる。 上記どちらの反応でもβ－ハイドロキシイソ吉草酸がイソ吉草酸から生成する可能性があり、これを検討する必要があろう。

チトクローム P-450には多様な分子種があることが知られている(54)。 また、チトクローム P-450が触媒する反応にも多種、多様な反応がある。 チトクロー

ムP-450 の種類、あるいはそれが触媒する反応によって、図９－２に示した反応で、チトクローム P-450を活性化するのに必要な２つの電子の内、両方がP-450 レダクターゼから供給される場合と、最初の電子は P-450 レダクターゼ、第２の電子はチトクロームb_5 から、それぞれ供給される場合の２通りがあると言われている(49,69)。

R. minutaの チトクロームP-450と P-450 レダクターゼを用いた再構成系はイソ吉草酸からのイソブテン生成反応を触媒したが、活性はかなり低かった。R. minutaのミクロゾーム画分にチトクロームb_5 が存在していること（data not shown） から考えて、イソブテン生成に関与するミクロゾームの電子伝達にチトクロームb_5が重要な役割を演じている可能性も考えられる。

第５節　要約

精製チトクローム P-450と精製P-450 レダクターゼとリン脂質（ＤＬＰＣ）を組み合せ、コール酸透析法によってイソブテン生成系を再構成した。 再構成した酵素系に、イソ吉草酸、ＮＡＤＰＨを添加したところ、イソブテンの生成が認められ、チトクローム P-450およびP-450 レダクターゼからなるミクロゾームの電子伝達酵素系がイソ吉草酸からイソブテンへの反応を触媒していることを確認した。

第１０章　結果の要約と考察

第１節　要約

現在、燃料として使用されているガス状飽和炭化水素や合成樹脂、合成ゴムなどの工業化学製品の原料であるガス状不飽和炭化水素は原油から生産されている。原油は化石資源であり、やがては枯渇するであろう。

農、畜、水産廃棄物などの再生可能なバイオマスを出発原料とし、微生物の機能を利用して、人工的にC_4-ガス状不飽和炭化水素、とりわけイソブテンを生産することを目的としてこの研究を行った。

第１章では、研究の背景、既往の研究、そして上記のような、この研究の目的と研究の進め方について概説した。

第２章では、C_4-ガス状炭化水素生産菌をスクリーニングした結果、C_4-ガス状炭化水素生産菌は特定の属、種、株に片寄っているのではなく、かなり幅広く分布すること、及び生成されるC_4-ガス状炭化水素の中ではイソブテンが生成速度、生成量ともに高いことなどが判明した。 イソブテン生産菌としてはRhodotorula属に属する酵母に比較的多く、なかでも、R. minuta IFO 1102が高いイソブテン生成速度を示すことから、本菌株を候補株として選択し、以下の実験に使用することとした。

第３章ではR. minuta IFO 1102によるイソブテンの生成に必要な要因を解析した。　本菌のイソブテン生成にはその培養液にＬ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの添加が必要であり、両者を同時に添加するとイソブテンの生成速度が相乗的に増加すること、さらに、酸素が必須であるなどの事実が判明した。　なお培養の最適ｐＨは６．０、 最適温度は２５°～２７℃であった。

第４章では、Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンのイソブテン生成に及ぼす役割を解明した。　Ｌ－ロイシンはイソブテンの前駆物質であり、その代謝中間体であるイソ吉草酸はＬ－ロイシンよりもより近いイソブテンの前駆物質であり、Ｌ－フェニルアラニンはイソ吉草酸からイソブテンへの反応を触媒するイソブテン生成酵素の誘導物質であること、などが判明した。

第５章では、第３章と第４章の知見をもとにして、R. minuta IFO 1102を変異、改良し、培地へのＬ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの添加なしで、イソブテンを生成するような菌株に育種、改良することを試みた。　Ｌ－ロイシンのアナログである４－アザ－ＤＬ－ロイシンと、Ｌ－フェニルアラニンのアナログであるp-フ

ロロフェニルアラニンの両耐性を付与した変異株ＭＮＡＰ－３４株を誘導分離し、これらのアミノ酸を添加しなくてもイソブテンを著量生成できるようになった。この変異菌の生理的性質を解析した結果、Ｌ－ロイシンとＬ－フェニルアラニンの生合成に関与する２つの酵素へのフィードバック阻害が解除され、これらのアミノ酸の自己供給能が増大したためと判明した。

第６章では、R. minuta IFO 1102の無細胞抽出液によるイソブテン生成系を構築すると共に、無細胞抽出液のイソブテン生成酵素としての性質を解明した。 無細胞抽出液でのイソブテン生成には、基質としてのイソ吉草酸、ＮＡＤＰＨおよび酸素が必須であること、この菌のイソブテン生成酵素がミクロゾーム画分に存在する膜結合型酵素であること、この酵素が一酸化炭素で完全に阻害されること、この菌のチトクローム P-450はＬ－フェニルアラニンによって誘導されること、イソブテン生成活性と菌体内チトクローム P-450含量との間には正の相関があること、などの事実が判明した。 これらのことを総合して、この菌のミクロゾーム画分にあるチトクローム P-450がイソブテンの生成反応に密接に関係していると推論した。

第７章では、ミクロゾーム画分からP-450 レダクターゼを可溶化し、各種カラムクロマトグラフィーによる処理を経て、電気泳動的に単一なタンパク質にまで精製した。 精製されたP-450 レダクターゼの比活性は約１２５ μmol/mg/min（ミクロゾーム画分の約２３００倍）、その分子量は約79,000で、ＮＡＤＰＨのみを電子供与体として利用できること、フェリシアナイド，ＰＭＳ，ＤＣＩＰも基質にできること、ビタミンK_3 存在下でＮＡＤＰＨオキシダーゼ活性があること、などの諸性質が判明した。

第８章では、チトクローム P-450をミクロゾーム画分から可溶化し、各種カラムクロマトグラフィーによる処理を経て、比含量約１０ nmol/mg protein（ミクロゾーム画分の約１００倍）まで精製した。 この酵素は、分子量が約58,000で、その分光光学的性質から酸化型スペクトルのソレット吸収帯は４１８ｎｍにピークがあり、５３０および５７０ｎｍ付近に他の２つのピークが認められた。 還元型スペクトルのソレット吸収帯は酸化型と比べブルーにシフトし淡色効果を示した。還元型スペクトルには、他に５５０ｎｍ付近のピークが認められた。 還元一酸化炭素複合型のソレット吸収帯は４４７ｎｍにピークがあり、“Ｐ－４４８グループ”に属する酵素と判明した。精製したチトクローム P-450にイソ吉草酸を添加した時、チトクローム P-450と基質との相互作用によって生じるタイプＩのスペクトル

変化が認められた。

第９章では、精製されたチトクローム P-450, P-450 レダクターゼ, リン脂質（ＤＬＰＣ）をコール酸存在下で混合し、透析によってコール酸を徐々に除去し、形成するＤＬＰＣのミセル中に各酵素を構成させた（コール酸透析法）。 この再構成系によってイソ吉草酸からイソブテンの生成が確認され、イソブテン生成酵素の本体はチトクローム P-450とP-450 レダクターゼなどのミクロゾームに存在する電子伝達系であると判明した。 さらにイソブテンの生成機構についても考察した。

第２節　考察

R. minuta がイソブテンを生成する生理的意義を考える場合、生成物のイソブテンと、このイソブテン生成反応を触媒している R. minuta のチトクロームP-450（酵素）が生理的にどのような働きを持っているのかを解明することが必要であろう。

イソブテンが R. minutaの増殖に何らかの影響を与えるのかを調べたが、植物におけるエチレンのような劇的な効果は認められなっかた。

R. minutaで初めて見出されたチトクローム P-450は、他の チトクローム P-450とは異なる特殊な性質を持っている。 たとえば、よく研究されている Saccharomyces cerevisiaeのチトクローム P-450と比較してみると S. cerevisiae のチトクローム P-450はラノステロールの１４α－デメチラーゼであり（ただし、最近別のチトクローム P-450も報告されている(72)。）、その誘導は、ミトコンドリアの増殖を抑える条件で起こる(54,73)。 これに対して、R. minutaのチトクローム P-450はイソ吉草酸のデカルボキシレーションを触媒すること、Ｌ－フェニルアラニンによって誘導されることなどの相違点がある。

このR. minutaのチトクローム P-450の特徴が、R. minuta固有のものか、そうでないのか知る必要があろう。 S. cerevisiaeとR. minutaのそれぞれのチトクローム P-450の特徴をもっと詳しく比較することは重要と思われる。 さらに、チトクローム P-450の分子多様性とその分子構造など、ｃＤＮＡのクローニングやチトクローム P-450遺伝子構造面の解析が盛んに進められている（74～82）が、 R. minutaのチトクローム P-450についても、このような研究が重要な知見を与えてくれるものと考えられる。

参考文献

1） 財団法人バイオインダストリー協会編； 昭和62年度 新燃料研究開発調査， 高効率炭化水素生産， 微生物による燃料生産システムに関する調査報告書，(1988)

2） 山口清三郎； 岩波全書 発酵， p111 (1953)

3） 永井史朗ほか； 発工誌， 64, 197 (1986)

4） W.E. Balch, G.E. Fox, L.J. Magrum, C.R. Woese and R.S. Wolf; Microbiol. Rev., 43, 260 (1979)

5） 増田芳雄，勝見允行，今関英雄編； 植物ホルモン， 朝倉書店 (1971)

6） 太田保夫； 植物の一生とエチレン， 東海大学出版会 (1980)

7） D.O. Adams and S.F. Yang; Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 170 (1979)

8） M. Liberman; Ann. Rev. Plant Physiol., 30, 523 (1979)

9） 兵藤宏； 化学と生物， 22, 339 (1984)

10） J.B. Biale; Science, 91, 458 (1940)

11） E.V. Miller, J.R. Winston and D.F. Fisher; J. Agric. Res., 60, 269, (1940)

12） J.B. Davis and R.M. Squires; Science, 119, 381 (1954)

13） K.A. Smith and R.S. Russell; Nature, 222, 769 (1969)

14） R.S. Oremland; Appl. Environ. Microbiol., 42, 122 (1981)

15） K.G. Gollakota and B. Jayalakshmi; Biochem. Biophys. Res. Commun., 110, 32 (1983)

16） E.M. Turner, M. Wright, T. Ward, D.J. Osborne and R. Self; J. Gen. Microbiol., 91, 167 (1975)

17） H. Fukuda, T. Fujii and T. Ogawa; Agric. Biol. Chem., 48, 1363 (1984)

18） H. Fukuda, T. Fujii and T. Ogawa; Agric. Biol. Chem., 49, 1541 (1985)

19） H. Fukuda, T. Fujii and T. Ogawa; Agric. Biol. Chem., 50, 977 (1986)

20） H. Fukuda, M. Takahashi, T. Fujii and T. Ogawa; J. Ferment. Biotechnol., in press.

２１）　福田秀雄；　化学と生物，　22，　752　(1984)
２２）　福田秀雄；　化学経済，　9，　２５　(1984)
２３）　H. Fukuda, Y. Kawaoka, T. Fujii and T. Ogawa; Agric. Biol. Chem., 51, 1529 (1987)
２４）　N.J.W. Kreger-van Rij ed.; The Yeasts　a taxonomic study, third revised and enlarged edition, 901 (1984)
２５）　M.S. Gibson and F.L. Crane; Plant Physiol., 38, 729 (1963)
２６）　O.H. Lowry, N.J. Rhosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall; J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
２７）　日本生化学会編，木住雅彦，千畑一郎；　アミノ酸代謝と生体アミン（上），　p313　(1979)
２８）　E.H. Ulm, R. Bohme and G. Kohlhaw; J. Bacteriol., 110, 1118 (1972)
２９）　W.W. Westerfeld; J. Biol. Chem., 161, 495 (1945)
３０）　R.A. Jensen and E.W. Nester; J. Biol. CHem., 241, 3365 (1960)
３１）　T. Satyanarayana, H.E. Umbarger and G. Lindegren; J. Bacteriol., 96, 2018 (1968)
３２）　M.J. Fiske and J.F. Kane; J. Bacteriol., 160, 676 (1984)
３３）　T. Omura and R. Sato; J. Biol. Chem., 239, 2370 (1964)
３４）　W.-H. Schunck, S. Mauersberger, E. Kargel, J. Huth and H.-G. Muller; Arch. Microbiol., 147, 245 (1987)
３５）　B.S.S. Masters, C.H. Williams, JR. and H. Kamin; Method Enzymol., 10, 565 (1967)
３６）　T. Fujii, T. Ogawa and H. Fukuda; Appl. Environ Microbiol., 54, 583 (1988)
３７）　M. Mitranic, J.M. Sturgess and M.A. Moscarello; Biochem. Biophys. Acta., 18, 715 (1976)
３８）　A.K. Matto, J.E. Baker, E. Chalutz and M. Lieberman; Plant and Cell Physiol., 18, 715 (1977)
３９）　S. Kubota, Y. Yoshida, H. Kumaoka and A. Furumichi; J. Biochem., 81, 197 (1977)
４０）　H. Nishibayashi-Yamashita and R. Sato; J. Biochem., 67, 199 (1970)

４１）　武森重樹，小南思郎；　蛋白質　核酸　酵素，　28，　1226　(1983)
４２）　A. Shafiee and C.R. Hutchinson; J. Bacteriol., 170, 1548 (1988)
４３）　K. Weber and M. Osborn; J. Biol. Chem., 244, 4406 (1969).
４４）　L.L. Fan and B.S.S. Masters; Archiv. Biochem. Biophys., 165　665 (1974)
４５）　K.M. Madyastha and C.J. Coscia; J. Biol. Chem., 254, 2419 (1979)
４６）　S. Kubota, Y. Yoshida, H. Kumaoka and A. Furumichi; Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 197 (1977)
４７）　Y. Aoyama, Y. Yoshida, S. Kubota, H. Kumaoka and A. Furumichi; Archiv. Biochem. and Biophys., 185, 362 (1978)
４８）　O. Kappeli; Microb. Reviews, 50, 244 (1986)
４９）　市川佳幸；　生化学，　53, 221 (1981)
５０）　J.T. Kellis, Jr. and L.E. Vickery; J. Biol. Chem., 264, 8840 (1987)
５１）　D. Sanglard, O. Kappeli and A. Fiechter; J. Bacteriol. 157, 297 (1984)
５２）　J.M. Lebeault, E.T. Lode and M.J. Coon; 42, 413 (1971)
５３）　M. Ohba, R. Sato, Y. Yoshida, T. Nishino and H. Katsuki; Biophys. Biochem. Res. Commun., 85, 21 (1978)
５４）　大村恒雄；　細胞工学，　16，　94　(1987)
５５）　M. L-Schwartzman, K.L. Davis, J.C. Mcgiff, R.D. Levere and N.G. Abraham; J. Biol. Chem., 263, 2536 (1988)
５６）　R.B. Palakodety, L.A. Clejan, G. Krikun, D.E. Feierman and A.I. Cederbaum; 263, 878 (1988)
５７）　Y. Aoyama and Y. Yoshida; Biochem. Biophys. Res. Commun., 82, 33 (1978)
５８）　W.H. Shunk, S. Mauersberger, E. Kargel, J. Huth, P. Riege and H.G. Muller;　Archiv. Microbiol., 147, 245 (1987)
５９）　Y. Yoshida and Y. Aoyama; J. Biol. Chem., 259, 1655 (1984)
６０）　K.T.W. Alexander, K.A. Mitropoulos and G.F. Gibbons; Biochem. Biophys. Res. Commun., 60, 460 (1974)

６１）　L.P. Wen and A.J. Fulco; J. Biol. Chem., 262, 6676 (1987)
６２）　H. Shoun, Y. Sudo and T. Beppu; 97, 755 (1985)
６３）　D. Dutta, D.K. Ghosh, A.K. Mishra and T.B. Samanta; Biochem. Biophys. Res. Commun., 115, 692 (1983)
６４）　古賀秀雄，堀内忠郎；　細胞工学，　16, 62 (1987)
６５）　E. Racker, T.F. Chien and A. Kandrach; FEBS Lett., 57, 14 (1975)
６６）　E. Racker; Federation Proc., 42, 2899 (1983)
６７）　田伏岩夫；　蛋白質　核酸　酵素，32, 1102 (1987)
６８）　今堀和友　訳；　代謝とその制御，東京化学同人，p100 (1976)
６９）　佐藤了，大村恒雄　編；　薬物代謝の酵素系，　講談社サイエンティフィク，　p65 (1988)
７０）　Y. Aoyama and Y. Yoshida; Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 28 (1978)
７１）　Y. Aoyama, Y. Yoshida and R. Sato; J. Biol. Chem., 259, 1661 (1984)
７２）　Y. Yoshida, Y. Aoyama, T. Nishino, H. Katsuki, U.S. Maitra, V.P. Mohan and D.B. Sprinson; Biochem. Biophys. Res. Commun., 127, 623 (1985)
７３）　K. Ishidate, K. Kawaguchi and K. Tagawa; J. Biochem., 65, 385 (1969)
７４）　Y. Fujii-Kuriyama, T. Taniguchi, Y. Mizukami, M. Sakai, Y. Tashiro and M. Muramatsu; J. Biochem., 89, 1869 (1981)
７５）　Y. Fujii-Kuriyama, Y. Mizukami, K. Kawajiri, K. Sogawa and M. Muramatsu; Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 2793 (1982)
７６）　J. Ozols, F.S. Heineman and E.F. Johnson; 260, 5427 (1985)
７７）　S.C. Khani, P.G. Zaphiropoulos, V.S. Fujita, T.D. Poter, D.R. Koop and M.J. Coon; Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 638 (1987)
７８）　H. Yoshida, K.-I. Morohashi, K. Sogawa, T. Miyata, K. Kawajiri, T. Hirose, S. Inayama, Y. Fujii-Kuriyama and T. Omura; J. Biol. Chem., 262, 1706 (1987)

７９）　A. Rampersaud and F.G. Walz, Jr.; J. Biol. Chem., 262, 5649 (1987)

８０）　E.F. Johnson, H.J. Barnes, K.J. Griffin, S. Okino and R.H. Tukey; J. Biol. Chem., 262, 5918 (1987)

８１）　E.J. Squires and M. Negishi; J. Biol. Chem., 263, 4166 (1988)

８２）　H. Kimura, H. Yoshida, K. Sogawa, Y. Sakai and Y. Fujii-Kuriyama; J. Biol. Chem., 263, 701 (1988)

謝辞

本研究を行うに際し、終始ご懇切にご指導下さいました熊本工業大学工学部応用微生物工学科・福田秀雄教授に深く感謝します。　また、本研究を遂行する過程で適切なご助言によってご指導頂きました同大学応用微生物工学科・小川隆平助教授にお礼申し上げます。

本論分を作製する際に、ご校閲ならびに、ご助言を頂きました大阪大学工学部醗酵工学科・岡田弘輔教授、山田靖宙教授、高野光男教授に厚くお礼申し上げます。

本研究の過程において、とくにチトクローム P-450に関連して有益なご教示を頂きました大阪大学蛋白質研究所・今井嘉郎助教授、中村正彦博士、また、とくに反応機構に関して、ご助言ならびに実りある討論をして頂きましたカリフォルニア大学デイビス校 Shang Fa Yang教授、熊本工業大学工業化学科・田崎正人講師に感謝致します。

本論文に関係のある報告

1. Microbial production of C_3- and C_4-hydrocarbons under aerobic conditions.
   Agricultural Biological Chemistry, 48, 1363 (1984)

2. Production of isobutene by Rhodotorula yeasts.
   Agricultural Biological Chemistry, 49, 1541 (1985)

3. Isobutene production by Rhodotorula minuta.
   Applied Microbiology and Biotechnology, 25, 430 (1987)

4. Preparation of a cell-free, isobutene-forming system from Rhodotorula minuta.
   Applied Environmental Microbiology, 54, 583 (1988)

5. The role of L-phenylalanine in the production of isobutene by Rhodotorula minuta.
   Journal of Fermentation and Bioengineering, 67, "in press" (1989)

6. A membrane-bound isobutene-forming enzyme from Rhodotorula minuta.
   FEMS Microbiology Letters, "in press" (1989)