

バリン生産菌 *Escherichia coli* 32 に於ける Acetohydroxy acid 合成酵素の調節機構

大川 実・浅田芳宏

〔I〕 緒 言

一般に細菌に於けるバリン生成経路の調節点は、経路の初発反応を触媒する Acetohydroxy acid synthetase (AHAS) である。¹⁾ AHAS には、至適 pH が 8 で、バリンで活性が阻害される、所謂バリン感受性酵素 [AHAS^S (pH 8)]¹⁻²⁾ と活性阻害を受けない非感受性酵素 [AHAS^R (pH 8)]³⁻⁴⁾ がある。⁵⁻⁶⁾ その他に、至適 pH 6 のバリン非感受性酵素 [AHAS^R (pH 6)] の計、3 種のイソ酵素が知られている。⁵⁻⁶⁾ これらの酵素は活性¹⁻²⁾ と合成⁷⁾ の二点で調節される。前者は微調節で、後者は粗調節である。バリン非生産菌では、生体内の酵素レベルで、これらの調節機構が働き過剰のバリン生成が起らないようにしている。これに対し、バリン生産菌では、バリン生成系の調節が解除される機構によって、バリン生成系が強化される結果、バリン生産は可能になると考えられている。⁸⁾ 現在まで知られている強化機構は、(1) 構成的非感受性酵素の合成⁵⁾、(2) 感受性酵素の multivalent repression の解除による合成促進⁹⁾、(3) 非感受性酵素の catabolite repression の解除による合成が知られている。¹⁰⁻¹²⁾

大腸菌のバリン生産は、2,3 知られているが、バリン生成系の強化機構としては、大腸菌のストマイ耐性株による AHAS^R (pH 8) 合成の遺伝的解除であり、¹¹⁾ バリン依存性変異株の multivalent repression の解除による AHAS^S (pH 8) の合成促進と脱感作が知られている。¹³⁾ 著者等は *Escherichia coli* 32 がバリンを生産することを見出し、本菌におけるバリン生成系の強化機構を AHAS について検討した。その結果、バリン感受性 AHAS (pH 8) の合成抑制の解除と、細胞熱水抽出液による

AHAS^S (pH 8) の活性阻害の解除を新たに見出した。特に供試菌の細胞内に AHAS^S (pH 8) のバリン阻害を打ち消す物質の存在が強く示唆された。

〔II〕 実験材料及び方法

(1) 使用菌株

Escherichia coli 32 (バリン生産菌) は東北大学農学部応用微生物研究室より分譲された。

(2) 培地及び培養方法

供試菌を 1% グルコース・ブイヨン培地 (5 ml) に 20 時間前培養後、遠心、洗滌、O. D. 1.0 に調整した細胞懸濁液 0.9 ml を本培養培地 30 ml (坂口コルベン 500 ml 容量) に接種し、30°C で振盪培養を行う。

培地組成

(a) 最少培地; グルコース 7%, 塩化アンモン 1.8%, 硫酸マグネシウム 0.035%, リン酸第 2 カリウム 0.2%, 炭酸カルシウム 3%, pH 7.2

(b) yeast extract 培地 (Y-培地); 最少培地に酵母エキスを 0.05% 添加する。pH 7.2

(c) グルコース・ブイヨン培地 (B-培地); 肉エキス 1%, ペプトン 1%, 食塩 0.5%, グルコース 3%, pH 7.2

(3) 粗酵素の調製

培養液を 1000 r. p. m., 2 分遠心して炭酸カルシウムを除去した後、10000 r. p. m., 10 分遠心集菌する。菌体を 0.05 M, トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) で洗滌を 3 回くり返し、同緩衝液 15 ml に懸濁、音波細胞破砕機で 10 Kc, 5 分処理した。その後、12000 r. p. m., 20 分遠心し、その上澄液を粗酵素とした。

(4) 細胞熱水抽出液の調製

対数期後期の細胞を集菌し、1回水洗後、水に懸濁、100℃ 5分熱抽出を行う。水中で冷却後、12000 r.p.m、10分遠心し、その上澄液を抽出液として用いた。単位は抽出液中の蛋白質質量当り (mg) の阻害解除率で算出した。

(5) 酵素活性の測定

反応系にピルビン酸塩を添加することによって反応を開始した。反応は37℃ 15分間行い、12N硫酸0.2mlを添加して反応を停止した。オートクレーブで5分加熱処理し冷却後、6N水酸化ナトリウム0.4mlで中和した。生じたアセトインをWesterfeld法で測定した。¹⁴⁾ 酵素活性の単位は生成したAcetohydroxy acidの $\mu\text{mol/h}$ で、比活性はUnit/mg proteinで表示した。反応系はトリス緩衝液200 μmoles 、チアミノピロリン酸80 μg 、塩化マグネシウム10 μmoles 、ピルビン酸塩40 μmoles 、酵素3mg。

(6) その他の測定

生育の測定、アミノ酸、蛋白の測定は前報に従った。¹⁵⁾

III 結果と考察

(1) 生育とアミノ酸の生産

供試菌は最少培地で生育せず、同培地に酵母エキスを0.05%添加すると生育した。グルコース・ブイオン培地での生育は、yeast extract培地 (Y-培地) の生育に比べて早く立ち上るが、最高生育度は両培地においては同じであった (図-1)。他方、Y-培地で、供試菌

はバリン、アセトイン、グルタミン酸を多量に蓄積した。グルコース・ブイオン培地 (B-培地) ではなにも蓄積しなかった (表-1)。本来、大腸菌はアセトインを生

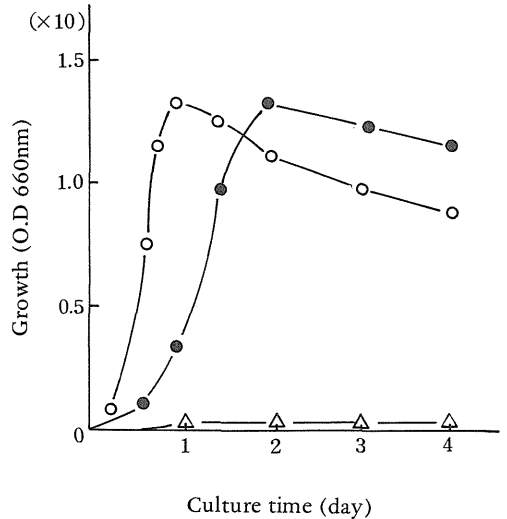


Fig. 1 Growth of *Escherichia coli* 32 in various media.

After preculture on glucose (1%) bouillon medium for one day, cells were washed with sterilized water at twice and cells were inoculated into minimum medium (glucose 7%, NH_4Cl 1.8%, MgSO_4 0.035%, K_2HPO_4 0.2%, CaCO_3 3%, pH 7.2), yeast extract medium (minimum medium plus 0.05% of yeast extract) and glucose-bouillon medium (meat extract 1%, peptone 1% NaCl 0.5%, glucose 3%).

The cell growth was measured by the photometrical method at 660nm.

- Δ - minimum medium (M-medium)
- \bullet - yeast extract medium (Y-medium)
- \circ - glucose-bouillon medium (B-medium)

Table. 1 Effect of culture condition on the accumulation of products with *Escherichia coli* 32.

Medium	Product (mg/ml)		
	Valine	Glutamate	Acetoin
Glucose-bouillon	Trace	0	0
Yeast extract	3.8	5.0	1.4

Cells were grown aerobically on yeast extract or glucose bouillon medium for 48h at 30°C. The supernatants obtained by a centrifugation were used to determination of products.

産せず、Vp反応陰性である。¹⁶⁾ 供試菌も勿論、分類試験用培地ではVp反応陰性である。しかし、表-1に示した様に、培養条件によってアセトインを生成し、Vp反応陽性となることから、供試菌は若干性質の異った菌株であると同時にアセトインの生成は培養条件によって変化することが明らかになった。他方、大腸菌のバリン生産菌は現在2株知られている。^{9~10)} そのバリン生成系の強化機構は終末産物阻害に非感受性のAHAS (pH8)の合成抑制の解除であり、¹³⁾ AHAS^S (pH8)のCatabolite

repression の解除¹⁰⁾ によることが明らかになっている。そこで、バリン生産を行う供試菌でいかなるバリン生成系の強化機構が働いているか検討した。

(2) 終末産物に対するAHASの感受性

Y-培地に生育したE. coli 32 (Y-細胞)のAHASは至適pHを8に有している。B-培地に生育した菌(B-細胞)のAHASも同様に至適pH8であった(図-2)。終末産物に対するAHASの感受性を検討した結果を表-2に示した。Y-細胞のAHASはバリンによって最も強く活性阻害を受ける。その阻害率は85%であった。V+L+ILの場合でも阻害率は80%で、バリン単独時の阻害に比べ弱かった。従って、*Salmonella*⁷⁾等で認められている多重阻害、又は協奏阻害は本酵素で

Table. 2 Inhibition of acetoxy acid synthetase by isoleucine, leucine and valine.

Amino acid (1×10 ⁻³ M)	Activity (μmol/mg prot./h)	Inhibition rate (%)
None	1.32	0
Valine (V)	0.20	85
Isoleucine (IL)	0.59	55
Leucine (L)	0.86	35
V+L+IL	0.26	80

The enzyme was prepared from cell grown on yeast extract medium (Y-cell).

は認められなかった。B-細胞のAHASについても同様の結果を得た。Y-細胞のAHAS^S(pH8)を用いて、バリンによる阻害形式を図-3に示した。ピルビン酸に

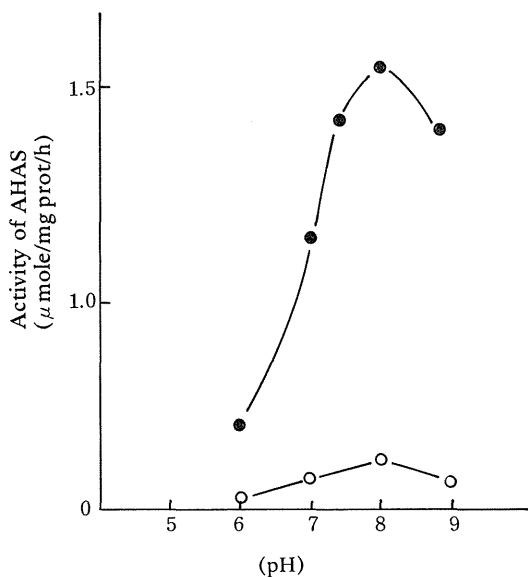


Fig. 2 Optimum pH of acetoxy acid synthetase of *Escherichia coli* 32.

Cells were grown on glucose-bouillon medium (B-cell) and yeast extract medium (Y-cell). Cells were harvested at max growth and enzymes were prepared from B-cell and Y-cell.

The reaction mixture contained 40 μ moles of sodium pyruvate, 80 μg of thiaminepyrophosphate, 10 μ moles of MgCl₂, 200 μ moles of phosphate buffer (pH6, 7) or of Tris HCl buffer (pH8, 9).

After incubation at 37°C for 15 min, the reaction was stopped by adding 12N H₂SO₄. Formed acetolactate was converted to acetoin.

Acetoin was measured by the method of Westerfeld.

— ● —; Y-cell, — ○ —; B-cell.

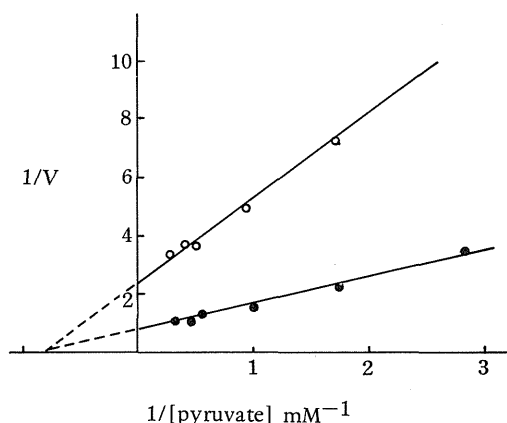


Fig. 3 Double reciprocal plot of acetoxy acid synthetase for pyruvate.

The enzyme was prepared from Y-cell.

— ○ —; presence of valine (1×10⁻³M).

— ● —; absence of valine.

に対するバリンの阻害は非拮抗的であり、他のバリン非生産菌で得られたAHAS^S(pH8)の性質と同じであった。²⁾以上の結果から、供試菌にはAHAS^S(pH8)のみ存在し、バリン生産菌で見られる非感受性酵素(AHAS^T)は合成されないことが明らかになった。従って、この結果は供試菌のバリン生産と一見矛盾する。そこで、バリン生成系の強化機構として、酵素合成の促進によるAHAS^S(pH8)のlevel upが考えられるので、この点につい

て検討した。

(3) AHAS^S (pH 8) の合成の調節

B-細胞はバリンを生産せず、この細胞のAHASの比活性は0.18 ($\mu\text{mol}/\text{mg. protein}/\text{h}$)であった。これに対し、Y-細胞はバリンを生産し、AHASの比活性は1.1で、B-細胞の約6倍であった(表-3)。

Table. 3 Effect of growth condition on the formation of acetoxy acid synthetase.

Medium	Carbon source*	Activity ($\mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{h}$)
Bouillon	glucose**	0.18
Yeast extract	glucose	1.10
Yeast extract + valine***	glucose	0.64
Yeast extract	glycerol	2.10

*7%, **3%, *** $3 \times 10^{-3}\text{M}$.

Y-培地に $3 \times 10^{-3}\text{M}$ のバリンを添加して培養した細胞のAHASはY-細胞の酵素レベルに比べ約1/2に抑制されていた(表-3)。それでも、B-細胞に比べれば約3倍の比活性を維持している。この結果から、バリン生産細胞のAHAS^S (pH 8)は抑制解除(Derepression)を受けていることが明らかになった。一方、*E. coli B*のAHASはグルコースによってCatabolite repressionを受ける¹⁷⁾。供試菌の場合、表-3に示したように、炭素源をグルコースからグリセロールに換えると、AHAS^S (pH 8)の比活性は2倍になった。この結果は*E. coli B*と同様に供試菌のAHASがCatabolite repressionを受けることを示すものである。しかしながらCatabolite repressionの解除率は、B-細胞からY-細胞へ変換する場合、つまり、バリン生産細胞になる場合のAHASの解除率に比べ小さいことから、バリン生成系の強化にとって、Catabolite repressionは重要な意味を持たないと推定した。

先に、Y-細胞のAHAS^S (pH 8)が抑制解除されていること、そして、バリンが部分的にAHAS^S (pH 8)の抑制をすることを明らかにした。他方、AHAS合成は

バリン以外の終末産物によっても調節される⁷⁾。特にイソロイシン、ロイシン、バリンが共存する場合に強く抑制を受ける。多重抑制(Multivalent repression)として知られている⁷⁾。供試菌のAHASについてこれらのアミノ酸の作用を検討した。それぞれの単独添加では、イソロイシンがバリンと同程度の50%抑制をした(表-4)。

Table. 4 Repression of acetoxy acid synthetase by isoleucine, leucine and valine.

Added to medium ($3 \times 10^{-3}\text{M}$)	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{h}$)	repression rate (%)
None	1.12	0
Valine (V)	0.48	57
Isoleucine (IL)	0.56	50
Leucine (L)	0.89	42
Threonine (TH)	0.78	30
V+IL+TH	0.43	62
V+L+TH	0.49	56
V+IL+L	0.44	61
IL+L+TH	0.78	31
V+IL+L+TH	0.42	63

Cells were grown on Y-medium containing different amino acids. Enzymes were prepared from cells grown on various media.

しかし、他のアミノ酸はこれに比べ弱い抑制であった。各々のアミノ酸の組合せをした場合、若干抑制が強まる傾向が認められたが、10%内外であった(表-4)。従って、供試菌では典型的なmultivalent repressionは認められなかった。以上の結果から、供試菌のY-細胞では、AHAS^S (pH 8)は抑制解除されていて、高い酵素レベルを保持する結果、バリン生成系は強化されバリン生産が可能になると云う強化機構の一つが明らかになった。この場合、バリン蓄積に伴って、AHAS^S (pH 8)の抑制が若干進行する可能性が示されたが、しかし、バリンを生産しないB-細胞のAHAS^S (pH 8)の酵素レベルに比べかなり高く保持されていることから、バリン生成が停止するには至らないものと推定される。

(4) バリンによるAHAS阻害に及ぼすアミノ酸・核酸等の影響

供試菌のバリン生成系強化機構の一つとして, AHAS^S (pH8) 抑制の解除 (derepression) が明らかになった。しかし, 表-2 に示した様に, 抑制解除された AHAS はバリンに高い感受性を持つことから考えて, 抑制解除だけを強化機構とするのでは不十分である。そこで, AHAS^S (pH8) のバリンによる阻害を妨げる物質の存在を仮定すれば強化機構が一層十分説明される。他方, *E. coli* の Carbamyl phosphate 合成酵素で, ピリミジンによる活性阻害をオルニチンが解除すること,¹⁸⁾ 又, *B. subtilis* の Threonine deaminase で, イソロイシンによる阻害をバリンが解除する¹⁹⁾。先の仮定とこれらの報告から, 阻害物質の類縁の物質等に解除作用がある可能性大と推定される。従って, バリン, イソロイシンのアナログを始めとする種々の物質について検討した。アナログの結果を表-5 に示した。いずれの物質も解

Table. 5 Effect of valine analogue on the inhibition of acetohydroxy acid synthetase by valine.

Analogue (1×10 ⁻³ M)	Activity (μmol/mg prot./h)	
	presence of valine*	absence of valine
None	0.25	1.42
N-valine	0.21	1.04
D-valine	0.22	1.21
DL-N-leucine	0.19	1.17
α-ketoisovalerate	0.17	0.92
α-ketobutyrate	0.29	1.86
DL-α-actobutyrate	0.20	0.91

The enzyme was prepared from Y-cell. *1×10⁻⁴M.

除作用を示さなかった。そこで, 他のアミノ酸, ビタミン, 核酸等についても検討したが, 解除作用は見い出されなかった。

他方, Magee 等は酵母の AHAS の反応系にマントニトール, 血清アルブミンを共存させるとバリン阻害が弱まると報告している。²⁰⁾ 供試菌の AHAS^S (pH8) につい

て同様の作用を検討した結果を表-6 に示した。酵母の

Table. 6 Effect of buffer composition on the sensitivity to valine of acetohydroxy acid synthetase.

Buffer	Activity (μmol/mg prot./h)		Inhibition rate (%)
	presence of valine*	absence of valine	
Phosphate	1.40	0.14	90
Phosphate-mannitol	1.28	0.18	86
Phosphate-bovine serum albumin	1.32	0.14	89
Phosphate-mannitol-bovine serum albumin	1.38	0.18	87
Phosphate-glycerol	1.40	0.20	86
Phosphate-glycerol-mannitol	1.29	0.26	80
Phosphate-glycerol-bovine serum albumin	1.33	0.27	80
Phosphate-glycerol-mannitol-bovine serum albumin	1.10	0.13	80

The enzymatic activity was assayed by 0.2M potassium phosphate buffer (pH 7.5). 25% of glycerol, 10% of mannitol, and 1% of bovine serum albumin were added to the buffer, respectively. *1×10⁻³M.

場合と異なって, 供試菌でバリン阻害の解除は認められなかった。以上検討した範囲内ではバリン阻害の解除作用を持つ物質は見い出されなかった。先にも述べた様に, もし菌体内で AHAS^S (pH8) 酵素の抑制解除と同時に, バリン阻害の解除が起るのであれば供試菌のバリン生産は矛盾なく説明される。既知物質の検索は成功しなかったが, 前述の仮定に立つなら, 細胞中に解除作用を持つ物質が存在するのであれば, 細胞抽出液についてその作用を検討する必要がある。

(5) 細胞熱水抽出液によるバリン阻害の解除

5% cold TCA 抽出, エタノール抽出, 熱水抽出等によって得た抽出液を用いてバリン阻害の解除作用をみた結果, 熱水抽出液でバリン阻害を解除する作用が認められた (図-4)。イソロイシン阻害も同抽出液で解除さ

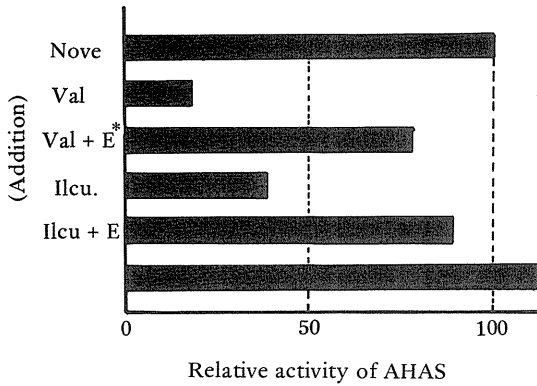


Fig. 4 Effect of boiled cell-extract on the inhibition of aceto-hydroxy acid synthetase by endproducts.

The enzyme was prepared from Y-cell. The end-product (1mM) and/or boiled cell-extract (0.8mg) were added to reaction system. *E; Boiled cell extract.

れた。抽出液の単独添加ではAHAS活性は若干促進することが認められた。AHAS^S (pH 8) のバリンによる阻害はピルビン酸に対して非拮抗的であるが(図-3, 5), 抽出液の解除作用はバリンに対して拮抗的であると推定される(図-5)。細胞熱水抽出液によるAHASの終末産物阻害の解除は現在まで見い出されていない。

以上の結果から、供試菌のバリン生成系の強化機構として明らかになったことは、第1に、AHAS^S (pH 8) がバリン生産細胞で抑制解除の状態にある。第2に、AHAS^S (pH 8) のバリンによる阻害を解除する物質がバリン生産細胞中に存在している。この二つの働きによって、供試菌のバリン生成系は調節を受け、強化されているものと推定される。尚、解除作用を持つ物質については目下不明で今後の精製に期するものである。

〔Ⅳ〕 文 献

(1) Umbarger H. E., Science, 123, 848, 1956
 (2) Umbarger, H. E., and B. Brown, J. Biol. Chem., 233, 415, 1958
 (3) Varga, J. M., and I. Horváth, J. Bacteriol., 92, 1569, 1966
 (4) Asada, Y., Y. Okuzawa, and K. Yamaguchi,

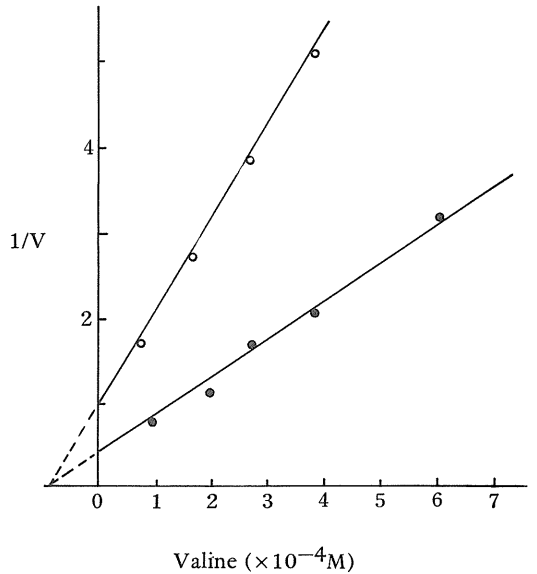


Fig. 5 Effect of the concentration of inhibitor on the activity of aceto-hydroxy acid synthetase under the presence of boiled cell-extract.

The reaction system (A) composed 200 μmoles of buffer, 40 μmoles of pyruvate, 80 μg of thiamine-pyrophosphate, 10 μmoles of MgCl₂, 0.8 mg of boiled cell-extract and valine as indicated (—●—). The reaction system (B) was the same component as (A) excepting the boiled cell-extract (—○—).

Biochi. Biophys. Act., 429, 1029, 1975
 (5) Udaka, S., and S. Kinoshita, J. Gen. Appl. Microbiol., 5, 159, 1960
 (6) Halpern, Y. S., and H. E. Umbarger, J. Biol. Chem., 234, 3067, 1959
 (7) Freundlich, M., R. O. Burns, and H. E. Umbarger, Proc. Natl. Acad. Sci., 48, 1804, 1962
 (8) 植村定治郎, 高村義親, 浅田芳宏, 杉崎善治郎, “アミノ酸発酵” 下巻, p. 189. 1972. 共立出版
 (9) 杉崎善治郎, 水沢清, Amino acids and Nucleic acids, 4, 111, 1961
 (10) Kisumi, M., S. Komatsubara, and I. Chibata, XII, Int'l—Congr. Genetics, Abstract, 2—1—5, 1968

- (11) Coukell, M.B., and W.J. Polglase, *Biochem. J.*, **111**, 279, 1969
- (12) Asada. Y., and K. Yamaguchi, *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1371, 1975
- (13) 杉崎善次郎, 古山洋一, 農化大会要旨集, p. 273, 1968
- (14) Westerfeld, W.W., *J. Biol. Chem.*, **161**, 495, 1945
- (15) Asada. Y., K. Yamaguchi, and T. Uemura, *Agr. Biol. chem.*, **33**, 496, 1969
- (16) Cowan, S.T., *Manual for the identification of Medical bacteria*, 2nd. ed., 1974, Cambridge university Press.
- (17) Coukell, M.B., and W.J. Polglase, *Biochem. J.*, **111**, 273, 1969
- (18) Pierad, A., *Science*, **154**, 1572, 1966
- (19) Hatfield, W.G., *Doctoral. Thesis.*, Purdee. Univ., Lafayette, In.,
- (20) Magee. P.T., and H.D.E. Robinson - Szülmaysten, *European, J. Biochem.*, **3**, 507, 1968

Regulation of Acetohydroxy Acid Synthetase in *Escherichia coli* 32, Valine Producing Bacteria.

MINORU OKAWA and YOSHIHIRO ASADA

Large amounts of valine and acetoin were accumulated in *E. coli* 32 grown on yeast extract medium, although bouillon grown cells did not accumulate. Since acetohydroxy acid synthetase (AHAS) played an important role in the valine biosynthesis of bacteria, the regulation of AHAS was investigated.

AHAS of *E. coli* 32 has a pH optimum of 8.0 and was sensitive to endproduct inhibition by valine. On the other hand, de-repression of AHAS^S was observed in valine producing cells, while AHAS^S of bouillon grown cells was repressed. Furthermore, it was found that the inhibition of AHAS^S by valine was released by the addition of a boiled cell extract obtained from valine producing cells to reaction mixture.

From the results obtained, one might conclude that the mechanism of valine biosynthesis in *E. coli* 32 was due to operation of de-repressed AHAS^S and to release from the valine inhibition of AHAS^S by the boiled cell extract.

(*Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ.* No. 27, 69~75, 1979)