

Klebsiella aerogenesのアスパラギン酸要求性 変異株の分離とその性質

福田敏克・浅田芳宏

〔I〕 緒 言

グルタミン酸発酵に代表されるアミノ酸発酵が確立する中で、培養条件等の違いにより、同一菌株が生産するアミノ酸を異にする、所謂、発酵転換が見い出された。¹⁾

著者等は先に*Klebsiella aerogenes* No 19-35 株が培地に6-メルカプトプリンを添加すると、グルタミン酸-バリン発酵転換を起すことを見出した。²⁾その後、本菌のグルタミン酸生成系、特にオキソグルタル酸への窒素導入経路について検討した結果、菌体内で合成されたアスパラギン酸のアミノ基がオキソグルタル酸に転移し、グルタミン酸が生成する可能性が強く示された。³⁾そこで、アスパラギン酸の窒素導入経路並びにグルタミン酸への転移を証明する手段として、まず、アスパラギン酸要求性変異株を分離し、若干の性質を調べ知見を得たのでここに報告する。

〔II〕 実験方法

(1) 使用菌株……*Klebsiella aerogenes* No19-35²⁾
(2) 変異株の分離……前培養は1%グルコース・ブイヨン培地(5ml)で15~20時間、30℃、好氣的に培養した。変異株の分離操作は図-1に示した。
(3) 変異株の要求アミノ酸の確認……(a) チューブ法……前培養した菌を集菌後、3回滅菌水で洗浄し、 $O.D_{660nm}$ 0.02に調製した細胞懸濁液を1滴、最少培地及びアミノ酸検定培地(5ml)に添加、30℃で振盪培養を1週間行った。アミノ酸の要求性については菌の生育度を測定することによって確認した。培地組成は表-1に示した。

(b) パルプデスク法……前培養後、集菌、洗浄した細

前培養(5ml)1%glucose-bouillon培地、
15~20時間振盪、30℃

↓

洗浄(2~3回)0.7%食塩水

↓

トリスマレート緩衝液(0.05M, pH6.0), 10mlに
NTG, 4mgを含むに細胞を懸濁し、35分間、
30℃振盪

↓

遠心、洗浄(0.7%, 食塩水)

↓

アスパラギン酸含有最少培地(300 μ g/ml)
10mlに懸濁、一夜振盪培養30℃

↓

遠心、洗浄

↓

最少培地10mlで3~4時間振盪培養

↓

ペニシリン(5万単位)を添加、1時間振盪培養

↓

遠心、

↓

5万単位ペニシリン含有最少培地10mlで再度振盪培養する。1時間。

↓

遠心、洗浄

↓

0.5ml中に 10^{-4} ~ 10^{-6} に稀釈し、細胞懸濁液
0.5mlをアスパラギン酸含有最少寒天培地8ml
に植えた。27℃、24時間平板培養した。

↓

最少平板培地を用いてレプリカ法により、要求株
を選択する。

図1. 変異株分離の操作法

胞を5mlの滅菌水で懸濁し、その1mlを7mlの寒天含有最少培地に加え、シャーレに流した。平板寒天培地

表1. 使用した培地の組成

培地名	組成 (%)
最少培地	グルコース 0.5, 塩化アンモン 0.3, リン酸第二カリウム 0.1, 硫酸マグネシウム 0.035, pH 7.2
アミノ酸要求性検定培地	最少培地+アミノ酸 (300 μ g/ml) を基本とする。寒天使用時は寒天を 1.2% 添加した。
アミノ酸生産培地	グルコース 7.5, 塩化アンモン 1.8, リン酸第二カリウム 0.05, 硫酸マグネシウム 0.035, 炭酸カルシウム 3, アミノ酸 (要求) 1 mg/ml, pH 7.2

上にアミノ酸を含むパルプディスクをのせ、30℃で静置培養を2日間行った。その結果、パルプディスクの周辺の生育リングの出現によって判定した。

(4) アミノ酸生産の確認……1%グルコース・ブイオン培地で20時間培養後、集菌、洗浄し、O.D_{660nm} 1.0に調整した細胞懸濁液1mlをアミノ酸生成培地(表1.) 30mlに加えて、4~5日間、30℃で振盪培養を行う。生育並びにアミノ酸の定量は前報に従った。²⁾

(5) 粗酵素の調製とAHASの測定……前報に従った。⁴⁾

〔Ⅲ〕 結果と考察

(1) アスパラギン酸要求株の分離と要求性の確認

レプリカ法によるアスパラギン酸要求株の一次選択で得られた株は74株であった。74株について最少培地で培養した結果、生育しなかった株は15株であった(二次選択)。目的とする変異株は次に述べる理由で、アスパラギン酸を要求すると同時にアミノ酸生産培地(アスパラギン酸含有)に生育可能であることが必要条件となる。①変異株には耐糖性を失いアミノ酸発酵培地の様な高濃度糖含有培地に生育出来なくなる傾向がある。②ア

スパラギン酸以外に他のアミノ酸を修飾的に要求する株が炭素源、窒素源の高濃度下で、完全な要求性に変換する。従って、アミノ酸生産の制御機構の解明手段として用いる場合には、これらの条件を満たすため、三次選択としてアミノ酸生産培地での生育実験を行った。その結果、6株を選択した。この6株について更にパルプディスク法により要求性を確認した結果を表2.に示した。

表2. *Klebsiella aerogenes* のアスパラギン酸要求性変異株(二次選択)におけるパルプディスク法による要求性の確認

菌株	(生育)			
	無添加	アスパラギン酸	酵母エキス	カザミノ酸
<i>K. aerogenes</i> No.4	—	++	++	++
" No.5-37	—	++	++	++
" No.35	—	+	+	+
" No.B-8	—	+	++	++
" No.B-12	—	++	+	++
" No.A-35	—	+	+	+

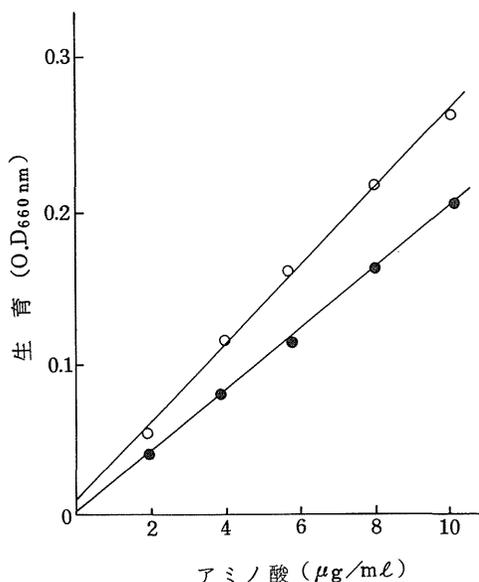
表3. *Klebsiella aerogenes* No.4株のアミノ酸要求性の再確認

アミノ酸	生育	アミノ酸	生育
無添加	—	ロイシン	—
アスパラギン酸	++	バリン	—
プローリン	—	フェニールアラニン	—
グルタミン酸	++	アラニン	—
スレオニン	—	アルギニン	—
トリプトファン	—	リジン	—
チロシン	—	グリシン	—
セリン	—	メチオニン	—
システイン	—	ヒスチジン	—
イソロイシン	—		

アミノ酸 (300 μ g/ml) 含有最少培地 5 ml に供試菌を接種、好氣的に培養した。

6株共にアスパラギン酸を要求することが確かめられた。次にアミノ酸18種に対する生育の対応を検討した結果を

表 3 に示した。この結果は *K. aerogenes* No. 4 について示した。本菌株はアスパラギン酸及びグルタミン酸の二種を要求することが判明した。菌の生育はどちらか一方のアミノ酸が存在すると可能であることから、アスパラギン酸とグルタミン酸の合成系が欠損しているが、相互の変換系は欠損していない。つまり、glutamate oxalacetate transaminase (GOT) は稼動出来る状態にあるものと推定される。^{*} 尚、これと同じ結果は他の変異株に於いても得られた。次に No. 4 株のアスパラギン酸とグルタミン酸濃度に対する生育の影響を検討した結果を図 2 に示した。アミノ酸濃度に対し、生育度は直線関係



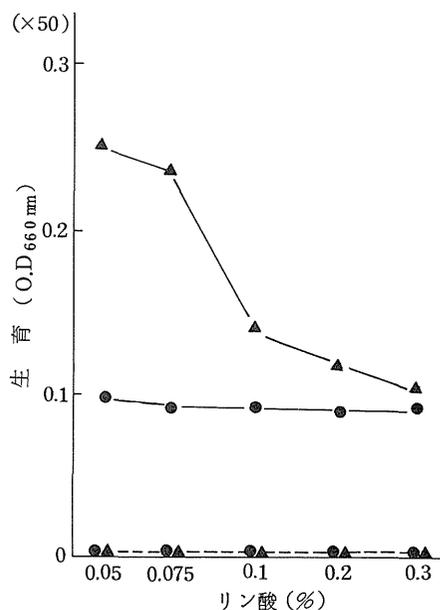
最小培地にアミノ酸を図に示した濃度添加し、24時間30℃で振盪培養を行った。

- : アスパラギン酸
- : グルタミン酸

図 2. *K. aerogenes* No. 4 の生育に及ぼすアスパラギン酸とグルタミン酸の濃度の影響

にあり、グルタミン酸培地での生育はアスパラギン酸培

地での生育に比べ若干低い値を示した。他方、親株 (*K. aerogenes* No. 19-35) は培地中のリン酸濃度によって生育度が異なる。²⁾ そこで、生育に及ぼす培地中のリン酸濃度の影響を No. 4 株と No. 5-37 株で調べた。図 3 から、



変異株はアミノ酸生産培地で 5 日間培養した。

▲ ; *K. aerogenes* No. 5-37

● ; *K. aerogenes* No. 4

— ; アスパラギン酸添加培地

--- ; アスパラギン酸無添加培地

図 3. 変異株の生育に及ぼす培地中のリン酸濃度の影響

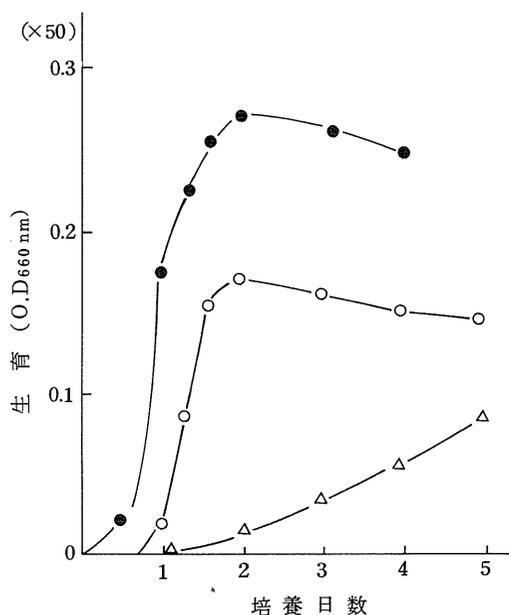
No. 4 株の生育は培地中のリン酸濃度の影響を全く受けていない。一方、No. 5-37 株の生育は親株と同様にリン酸濃度によって影響される。しかし、その影響の受け方は親株と全く逆で、リン酸濃度が高くなるに従って阻害された。以上の結果から、アスパラギン酸又はグルタミン酸要求変異株、6 株を分離し、その生育条件として、リン酸低濃度の培地を用いて培養すると安定した生育が得られることが明らかになった。

^{*} 現在酵素レベルで、変異株について検討中であるが、これらの変異株の GOT 活性は十分に認められている。

(2) アスパラギン酸要求性変異株の性質

(A) アミノ酸の生産

分離した変異株のアミノ酸生産培地における生育曲線を図4に示した。培地には1mg/ml相当のアスパラギン酸を添加し培養した。No.4株は生育が遅く、しかも最大生育もかなり低い。これに対し、No.5-37株は比較的生育もよく、2~3日で最高生育に達する。この場合



—●—; *K. aerogenes* No.19-35
 —○—; *K. aerogenes* No.5-37
 —△—; *K. aerogenes* No.4

図4. *K. aerogenes* No.19-35と変異株のアミノ酸生産培地における生育曲線

のアミノ酸生産を図5に示した。親株はこの培地でグルタミン酸のみを生産するのに対し、変異株はバリンのみ生産した。従って、変異株は発酵転換を起さなくなった株である。

アミノ酸生産培地に添加したアスパラギン酸とグルタミン酸濃度のアミノ酸生成に及ぼす影響を検討した。No.4株に於けるアスパラギン酸の添加量の増大はバリン生産を促進した(図6)。これに対し、アセトインの生成量は逆に抑制された(図7)。他方、もう一つの要求ア

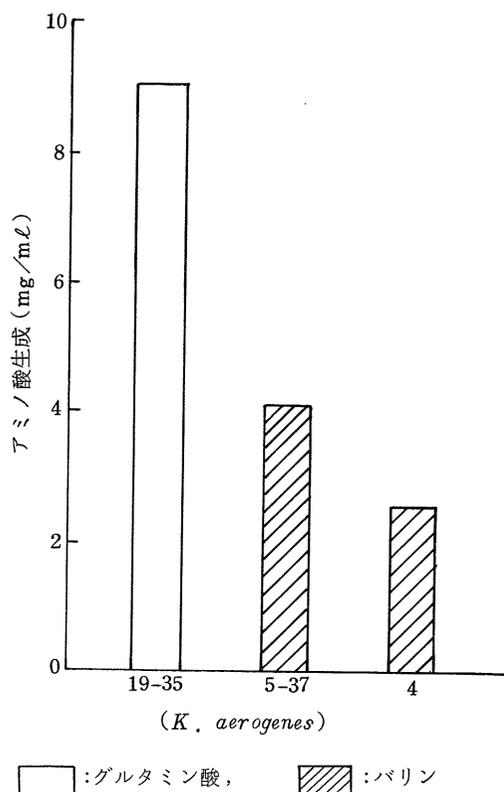


図5. アミノ酸生産培地に於ける *K. aerogenes* No.19-35, 4, 5-37のアミノ酸生産. No.19-35株は2日間,他は4日間培養した。

ミノ酸のグルタミン酸は、アスパラギン酸の場合に比較して、バリンとアセトイン生成を全体的に抑制していて、濃度変化に依る顕著な促進や抑制は認められなかった(図6, 7)。このグルタミン酸添加時の生産抑制は菌の生育と添加したグルタミン酸の消費から説明される。図8に示したように、グルタミン酸添加時の菌の生育はアスパラギン酸の場合に比べ抑制されている。この原因は添加したグルタミン酸の消費がアスパラギン酸のそれに比べ非常に低い(図9)ことによると推定される。アスパラギン酸濃度の増大による変異株の生育抑制の機構は不明であるが、バリンやアセトインの前駆体である α -アセト乳酸の生成がアスパラギン酸に依って調節を受けないと推定される。このことはグルコースの細胞へのとり込みや代謝(分解)速度を今後検討することで明ら

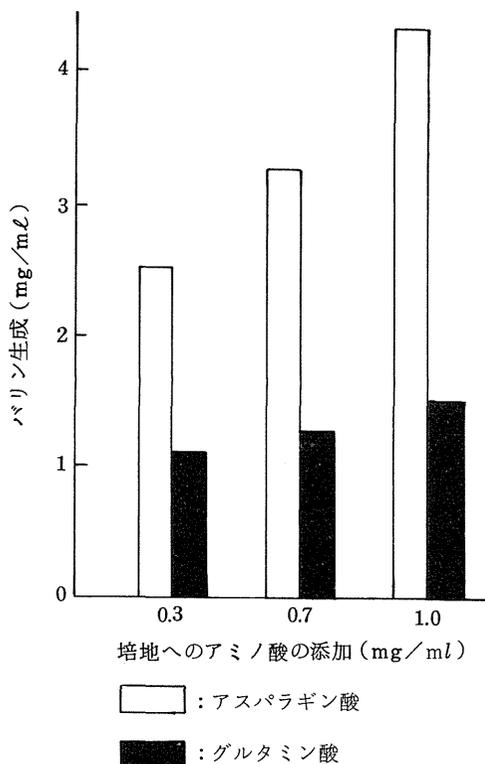


図6 *K. aerogenes* No. 4株のバリン生産に及ぼすアスパラギン酸, グルタミン酸の濃度の効果

かになるであろう。他方, α -アセト乳酸がバリン生成系に導かれるか, 又は, アセトイン生成系に導かれるかと言う調節機構はアスパラギン酸の濃度と深く係わっている。このような変異株に於ける現象は, 供試菌のイソロイシン要求株のバリン, グルタミン酸の生成で, 特にバリン生成の調節がイソロイシン濃度に依って変化する現象⁵⁾と類似している。同様の現象は *E. coli* K-12⁶⁾ や *Salmonella typhimurium* の変異株⁷⁾でも見出される一般的現象である。しかし, 現在までその詳細な機構は全く解明されていない。No. 4株で得られた結果は全体的傾向として, 他の変異株(5株)でも認められた。

(B) Catabolite repression 非感受性
acetoxy acid synthetase

親株のグルタミン酸生成細胞がバリンを生産しない機構は, バリン生成系の律速点に位置する終末産物阻害に

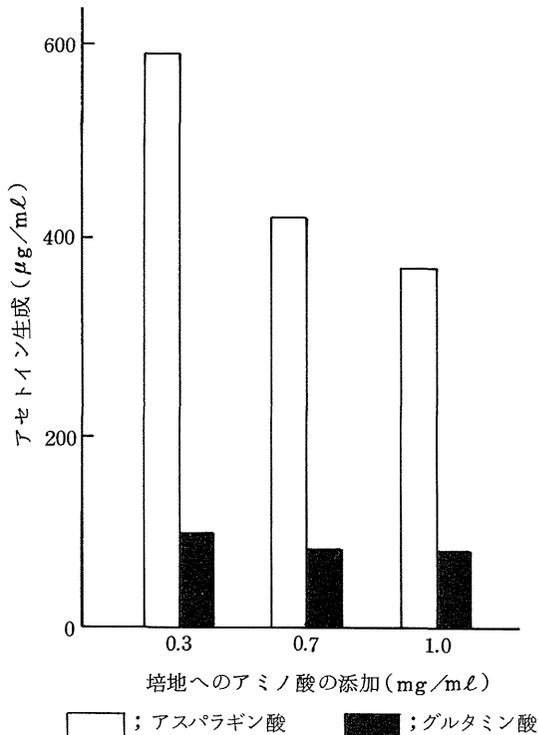


図7 *K. aerogenes* No. 4 のアセトイン生成に及ぼすアミノ酸の濃度効果

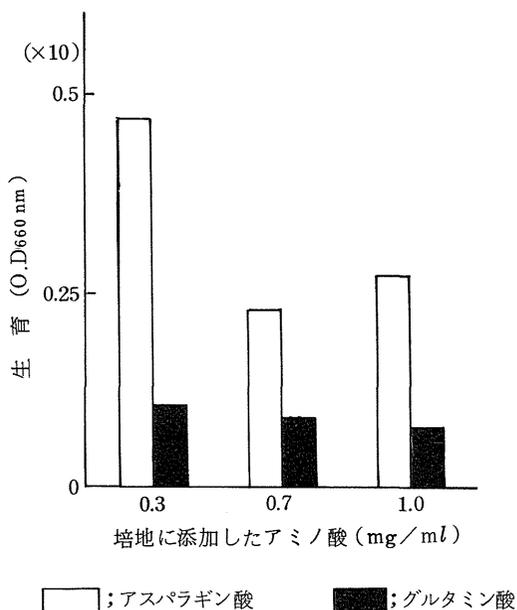


図8 *K. aerogenes* No. 4 のアミノ酸培地における生育に及ぼすアミノ酸濃度の影響

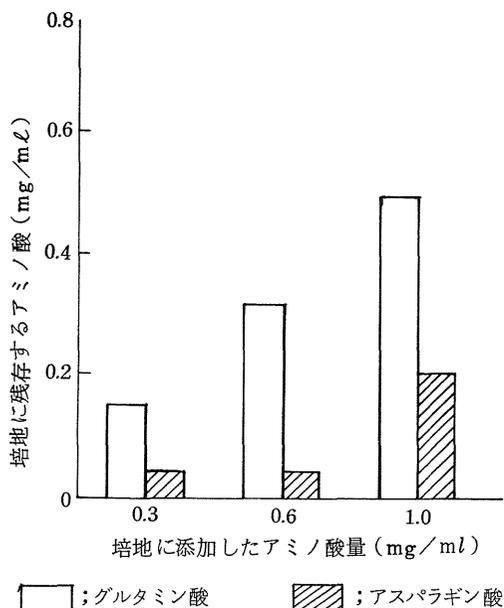


図9. アミノ酸生産培地における要求アミノ酸の残存量

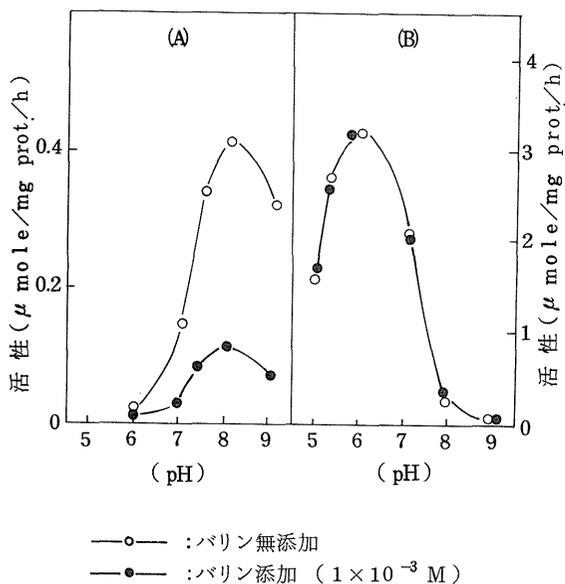


図10. *K. aerogenes* No. 19-35とNo. 5-37のAcetohydroxy acid synthetase活性とバリン感受性

非感受性の acetohydroxy acid synthetase (AHAS^r)が Catabolite repressionを受けていて、バリン生成系を稼働させ得ない為である⁸⁾。先に、アミノ酸生産培地で変異株はバリンを生産したことは、このAHAS^rが稼働出来る状態にあることを示唆している。そこで、変異株のAHASがどのような性質を持つか検討した結果を図-10に示した。終末産物阻害に非感受性のAHASには至適pHを6と8を持つ二種のイソ酵素が存在する⁹⁻¹²⁾ No. 5-37株のAHASの至適pHは6で終末産物に対し非感受性である。しかも、親株と対照的にCatabolite repressionを受けていない。従って、変異株のAHAS^r (pH6)はCatabolite repression非感受性酵素である。変異株ではAHAS^r (pH6)が稼働出来るためにバリンが生成可能となるものと推定される。

親株の発酵転換機構解明の結果、グルタミン酸発酵からバリン発酵への転換が起る為には、バリン生成系の強化、(つまり、AHAS^rの稼働)とグルタミン酸生成系の阻害(TCA回路の阻害)が同時に起る必要がある¹³⁾。

本変異株はグルタミン酸要求性で、しかもバリンを生産する。つまり、グルタミン酸生成系が欠損した状態で、バリン生成系は強化されている。従って、この結果は親株での発酵転換機構を一層強く支持するものである。先に、*K. aerogenes* No. 19-35のイソロイシン要求株が発酵転換を起さなくなり、バリンのみを生産すると述べたが、この場合、AHAS^r (pH8)が合成されていて、バリン生成系が強化される結果である¹²⁾。従って、アミノ酸要求性の獲得とAHAS^r合成の制御機構は密接な関係にあることを示唆している。

文 献

- 1) 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
- 2) Asada, Y., K. Yamaguchi, and T. Uemura Agr. Biol. Chem., **33**, 496, 1969
- 3) 福田敏克, 浅田芳宏, 相田徳二郎, 農芸化学会関東支部大会要旨集, P 42, III-15, 1979, (新潟大)。

- | | |
|--|---|
| 4) Asada, Y., K. Yamaguchi, and T. Uemura, J. Biochem., 69 , 633, 1971 | 39. 1371, 1975 |
| 5) 浅田芳宏, 奥沢洋平, 山口和夫, Amino acids and Nucleic acids. 31 , 59. 1975 | 9) Varga, J. M. and I. Horv'ath, J. Bacteriol., 92 , 1569, 1966 |
| 6) Blatt, J.M., W. J. Pledger, and H. E. Umbarger, Biochem. Biophys. Res. Commun., 48 , 444, 1972 | 10) Udaka, S., and S. Kinoshita, J. Gen. Appl. Microbiol., 5 , 159, 1960 |
| 7) O' Neill, J. P., and M. Freundlich, Biochem. Biophys. Res. Commun., 48 , 437, 1972 | 11) Halpern, Y.S., and H. E. Umbarger, J. Biol. Chem., 234 , 3067, 1959 |
| 8) Asada, Y., and K. Yamaguchi, Agr. Biol. Chem., | 12) Asada, Y., Y. Okuzawa, and K. Yamaguchi, Biochi. Biophys. Act., 429 , 1029, 1975 |
| | 13) 浅田芳宏, 学位論文(東北大), 1978 |

**Isolation of Aspartate less Mutants of Klebsiella
Aerogenes and Its Properties.**

TOSHIKATSU FUKUDA and YOSHIHIRO ASADA

Mutants of *Klebsiella aerogenes* requiring aspartate or glutamate have been isolated. These mutants accumulated only valine under any conditions, although, with parent strain, the conversion of fermentation from glutamate to valine was occurred by the addition of 6-mercaptopurine to medium.

Acetohydroxy acid synthetase (AHAS) played a important role of the regulation in valine biosynthesis. AHAS^f insensitive to feedback inhibition in mutants was insensitive to catabolite repression, while the enzyme was subjected to catabolite repression in glutamate producing cell of parent strain. Therefore, it was likely that the valine biosynthesis in mutants was dependent on the operation of AHAS^f in high level.

(Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., No. 27, 77~83, 1979)