

# Topics

1994年 トピックス委員

(投稿歓迎 各委員まで)

|           |                   |           |                   |
|-----------|-------------------|-----------|-------------------|
| 幹 事       | 根来 誠司 (阪大・工・応生)   |           |                   |
| 微生物・生態    | 五十嵐泰夫 (東大・農・農化)   | 発酵生産・培養工学 | 早出 広司 (東農工大・工・物生) |
| 遺 伝       | 松岡 正佳 (熊工大・応微工)   | 酵 素       | 喜多 恵子 (鳥取大・工・生応)  |
| 微生物代謝・生化学 | 片岡 道彦 (京大・農・農化)   | 廃液処理      | 高見澤一裕 (岐 阜 大・農)   |
| 醸 造       | 近藤 正夫 (愛 知 食 工 セ) | 単位操作・培養制御 | 大政 健史 (阪大・工・応生)   |
| 食 品       | 浅野 行蔵 (北海道食加研)    | 細胞工学      | 関根 政実 (阪大・工・応生)   |

## *Clostridium acetobutylicum* のソルベント生成遺伝子 *sol* operon

九州大学農学部農芸化学科 吉野貞蔵

アセトン・ブタノール菌として知られる芽胞性偏性嫌気性細菌 *Clostridium acetobutylicum* は、対数増殖期には基質依存性の ATP 生成に伴う酪酸・酢酸を生成し、定常期には基質酸化により生成される電子を廃棄するため、ブタノールをはじめアセトンとエタノールからなるソルベントを生成する。最終産物であるソルベントは、本菌エネルギー代謝に関連していることから、基本的代謝産物とみられるが、ソルベント生成能の欠損した株がしばしば出現すること、<sup>1)</sup> また *Clostridium butyricum* など大多数の *Clostridium* が有機酸生成のみにとどまることから、ソルベント生成系が生育に必須の代謝経路ではないことは明らかである。しかし、いまだソルベント生成開始機構の詳細は明らかにされていない。

一方、大腸菌などでは本菌代謝系の発現機構の解析が困難なことから、宿主ベクター系の開発が待たれていたが、本菌が偏性嫌気性で取扱いが困難であることから遅々として進まず、ようやく近年になって代謝系解析へ利用可能な形へとようになってきた。<sup>2)</sup> 最近、ソルベント生成に関与する重要ないくつかの遺伝子が、大腸菌でクローニングされ、さらに *C. acetobutylicum* 中での発現が試みられて、ソルベント生成遺伝子がクラスターを形成していることが見いだされた。<sup>3,4)</sup>

ソルベントの生成酵素は、その多くが有機酸生成酵素と共通しており、末端のいくつかの酵素が有機酸生成と異なるだけである。ソルベント生成の末端に位置する3種の酵素、すなわちアセトン生成の acetoacetate decarboxylase (ADC),<sup>5)</sup> エタノール生成の NADH-dependent alcohol dehydrogenase,<sup>6)</sup> ブタノール生成の NADH-dependent alcohol dehydrogenase A と B の遺伝子<sup>7)</sup> がクローニングされているが、これらの酵素はいずれも monocistronic operon として存在し、大腸菌中でも転写されて活性の発現が確認されている。

しかし有機酸生成経路からの分岐に位置するアセトン生成系酵素で、acetoacetyl-CoA から CoA moiety を酪酸や酢酸に転移し、ソルベント生成期においてこれら有機酸の取り込みにも関与している acetoacetyl-CoA : acetate/butyrate : CoA transferase (CoA-transferase) は、その mRNA の解析によって、ブタノール生成の重要な中間代謝物である butyryl-CoA から butylaldehyde の生成を触媒する butylaldehyde dehydrogenase (BYDH) とともに operon を形成していることが見いだされた。すなわち、アセトン生成の最終酵素である ADC の逆方向に隣接して存在する CoA-transferase 遺伝子 (*ctfA*, *ctfB*) と共に、大腸菌のⅢ型の alcohol dehydrogenase 遺伝子 (*adhE*) と高いホモロジー (56%) を有する ORF が転写されていることが見いだされた。本遺伝子上流には、大腸菌で認識されるが、*C. acetobutylicum* ではマイナーなプロモーター P1 と、*C. acetobutylicum* でのみ認識される P2 の連続した二つのプロモーター領域が存在していた。*C. acetobutylicum* における遺伝子増幅により、この遺伝子が NADH 依存性 butanol dehydrogenase, NAD 依存性 acetaldehyde dehydrogenase および butyraldehyde dehydrogenase 活性を担っていることが明らかになった。この operon にコードされた CoA transferase と BYDH は、それぞれアセトン生成とブタノール生成において、酸生成経路からソルベント生成経路への分岐を触媒する酵素である。

同一 operon での両酵素の発現制御は、本菌の酸生成からソルベント生成へ、あるいはソルベント生成から酸生成への迅速な生成物転換に有利な形態であろう。また *adc* 遺伝子も近傍に存在することから、ソルベント生成系の酵素がクラスター化している可能性を示しており、近傍の ORF の解析が進められている。さらに、*C. acetobutylicum* でのみ認識される *sol* operon プロモーター領域の認識機構の解明は、本菌ソルベント生成開始機構の解明に直結する知見となろう。

1) Hayashida, S. and Yoshino, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 427 (1990).

- 2) Mermelstein, L. D. *et al.*: *BIO/TECHNOLOGY*, **10**, 191 (1992).
- 3) Fischer, R. J. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **175**, 6959 (1993).
- 4) Nair, R. V. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **176**, 871 (1994).
- 5) Gerischer, U. and Durre, P.: *J. Bacteriol.*, **172**, 6907 (1990).
- 6) Youngleson, J. S. *et al.*: *Gene*, **78**, 355 (1989).
- 7) Walter, K. A. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **174**, 7149 (1992).

## テルペン系フレーバー成分の微生物変換

北海道東海大学工学部生物工学科 西村弘行

動物にはスカンクやカメムシのように、自衛のために妙なおいを発するものがあるが、植物にもワサビ、タマネギ、ニンニクなどのように、動物や微生物（病原菌）から身を守るために接触時に忌避物質や抗菌性物質などを出すものがある。このように生物間相互作用に、おい物質が大きな役割を演じていることが明らかにされつつある。

一方、食生活の中で食品の第二機能で規定されているフレーバーは、新しい食品工業を考える上で重要視されている。各種のフレーバー生産に、生物変換技術を用いての研究が多数行われている。フレーバー成分の中でも、植物に広く存在するテルペン系フレーバーについて最近の研究を紹介する。

植物中のテルペン類で、量的に多く存在するのが、炭素数10個からなるモノテルペン類で、生物変換の原料として利用しやすい。たとえば、タバコ培養細胞や光合成生物（ユーグレナ）によるモノテルペンの生物変換の研究<sup>1,2)</sup>さらに微生物変換の研究<sup>3)</sup>が多数行われている。化学変換と比較して、生物変換の特徴は、位置選択的、立体選択的な酸化あるいは還元反応を起しやすく、化合物によっては一段階の反応で目的物質が得られる場合がある。

さて、モノテルペン類の微生物変換で、有用物質へ誘導した著者らの研究例を紹介しよう。オーストラリア原産でコアラのエサとして知られるユーカリは世界に約600種知られており、その中でも精油含量のもっとも多いユーカリ種 *Eucalyptus radiata* var. *Australiana* が、バイオマス資源として提案された。<sup>4)</sup>この種の葉の精油のおよそ75%が1,8-cineoleで、新鮮葉重あたり31 mg/g (3.1%) も含まれていることがわかった。また、日本に輸入されているユーカリ油 (*E. globulus* の精油) の主成分も1,8-cineoleで、一般名をユーカリプツールと呼ばれている。蒸留などによって容易に得られる1,8-cineoleを *Aspergillus niger* によって変換させた結果、数種の水酸化された生成物が得られ、特に、新規の3-*endo*-hydroxycineoleが結晶状に単離された。<sup>5)</sup>ユーカリ臭の強い1,8-cineoleから、非常にマイルドなテルペン臭に変換された。この新規酸化物質を酸化白金触媒で水素化分解を行うと、蚊に対する強力な忌避物質で知られる *p*-menthane-3,8-*cis*-diol が得られた。<sup>5)</sup>このdiolは興味深いことに、人間に対してはほとんどにおわないのに対し、蚊には感じていることである。このような性質から、香粧品メーカーは、各種の香水原料と自由に調合できることから実用化を望んでいる。

さらに、スペアミント系ハッカ (*Mentha spicata*) の主成分 (-)-carvone の微生物変換の例を紹介する。ハッカの香りで知られる (-)-carvone は、放線菌の *Streptomyces* や *Nocardia* によって、主生成物である (-)-*cis*-carveol に立体特異的に還元される。さらに、単離された carveol は *Streptomyces bottropensis* によって変換されて、新規化合物 (+)-bottrospicatul を生成した。(+)-Bottrospicatul の立体絶対構造を明らかにするために、各種光学異性体を合成した。X線結晶回折によって、この物質を (4*R*, 6*R*, 8*R*)-(+)-6,8-oxido-menth-1-en-9-ol と決定した。<sup>6)</sup>本物質は、レタス、エノコログサ、ガーデンクレスなどの種子に対し、強い発芽阻害活性を示したが、合成した他の立体異性体には、あまり強い発芽阻害活性を示さなかった。この (+)-bottrospicatul の香りは弱いミントフレーバーで、香料としての活用が望まれる。また、スペアミント系ハッカのアレロケミカルズ (他感作用物質) として役割を演じているようである。<sup>6)</sup>

以上、微生物変換についてわずかな例を挙げたが、原料が低コストで入手され、変換生成物が高付加価値製品でなければ産業として成り立たず、今後さらなる研究が行われるであろう。

- 1) Suga, T. and Hirata, T.: *Phytochemistry*, **23**, 2393 (1990).
- 2) Noma, Y. and Asakawa, Y.: *Phytochemistry*, **31**, 2009 (1992).
- 3) 宮沢三雄: 第37回 TEAC 要旨集, 依-9 (1993).
- 4) Nishimura, H. and Calvin, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 432 (1979).
- 5) Nishimura, H. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2601 (1982).
- 6) Nishimura, H. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2697 (1983).