

シンポジウム(代謝調節—II遺伝学)

251

L-バリン生合成の Positive Control とその遺伝的制御

(野田産研) ○杉崎善治郎, 古山洋一

〔目的〕 *E. freundii* による Val の生産蓄積は外因性 Val をオノ次の要因として発現する。即ち本誌における Val の過剰生合成は細胞レベルでの Positive feedback 様現象として把握され、細胞制御論上極めて特異な局面とみられる。当然この特殊な代謝応答を支配する機能単位(高次の遷移制御機構?)が存在するはずで、この素性から演者らは遺伝育種の一つの在り方を思ふべく、現在遺伝生化学的アプローチを試みている。解析は未だ不充分であるが競争の市指板により中間報告を申しあげる。茲では遺伝育種の常套手段である gene mutation (cf. auxotroph, analogue resistant mutant, revertant, conditional mutant, constitutive mutant, catabolite repression resistant mutant, etc.) よりも、Chromosomal variation に注目してみたい。

〔方法〕 ○供試菌株: *Escherichia freundii* var. *ureasaprophum* NISR-B-2086 (PC⁺ Val^r) の prototroph と auxotrophs. ○生育培地と条件: MD = Davis-Hingoli's minimal medium, MDV = MD + 0.25% L-Val, その他 CM, TB 等, pH 7.0, 5 ml/L 培養 (モノ式振盪装置, 60 rpm, 30°). ○生産培地と条件: GM = glucose medium (= 10% glucose - 1.8% urea - salts), GVM = glucose-valine medium (= GM + 0.25% L-Val), GYM = glucose-yeast extract medium (= GM + 0.5% yeast extract + 0.5% Meat extract), pH 7.0, 5 ml/試験管 (φ = 23 mm) 又は 40 ml/500 ml 肩付フラスコ (往復式振盪装置: 試験管, 350 rpm × 2 cm; 肩付フラスコ, 145 rpm × 7 cm; 30°). ○Biochemical mutant の造成: auxotroph は UV 又は NTG を mutagen としペニシリン透過, constitutive mutant は chemostat 法. ○Episomal factor の消去: アフリジン色素処理 (広田法) 又は SDS 処理 (友枝法)*. ○伝達実験: 常法通り. ○アッセイ法: α-acetolactate Synthetase (ALSase) 活性はピルビン酸 → αAL の反応後, 酸処理してアセトインに変え Westernfeld 法で比色, その他 reductoisomerase (RIase), dihydroxyacid dehydrase (DHase), transaminase (TRase) 活性の測定は常法に準ずる. Val の定量はペーパークロマトグラム切抜き = ニトリン比色法又は bioassay.

〔結果〕

A. Positive feedback 様 Val 産生現象: — *E. freundii* は G 培地で^{*}乳酸, GV 培地で^{*}Val を生産蓄積する E 型 Val 産生株である。この2つの生産物は何れも glucose^{*}由来であるから (トレーサー実験), 産物の面からは外因性 Val に支配される乳酸脱羧^{+V} Val 脱羧の転換現象即ちピルビン酸代謝の流路変更, 細胞制御の視点からは Endproduct による positive control (PC) 即ち皮相的には positive feedback 様現象とみられる。この Val 効果は Leu でも代替されるが, Val アナログ耐性依存ではない。

B. 生化学的アプローチ: — の本誌の Val 生合成経路は orthodox pathway と同様 glucose → pyruvate (X2) $\xrightarrow{\text{ALSase}}$ α-acetolactate $\xrightarrow{\text{RIase}}$ α,β-dihydroxyisovalerate $\xrightarrow{\text{DHase}}$ α-ketobisovalerate $\xrightarrow{\text{TRase}}$ L-valine で, ilv 酵素レベルは Val, Leu, Ile によるやゝ変則的な multi-valent repression 機構によって調節され, 又 mutagen 処理で容易に ilv-変異株が得られるなど, 基本的に *E. coli* の系によく似ている。即ち② G 培地生育細胞 (G 細胞) の ilv 酵素は coordinative repression をうけ, 又 ALSase (CE) は Val のフィードバック阻害に感受性でいわゆるアロステリックな性質を示し Val 合成系の律速酵素となっている。然るに③ GV 培地生育細胞 (V 細胞) の ilv 酵素は G 系に

シンポジウム(代謝調節—II遺伝学)

較べて2~3倍 derepress され且つ ALSase (CE')は Val 阻害に非感受性になつており最はアロステリックな性質を示さない。GVMにおける CE' の合成はクロマイで阻害され、CE'は CE と Val の単純結合理型 (アロステリック部位の埋没)ではないことを示した。

これらのことから、Val が存在する環境で本質は *ilv* 酵素の derepression と desensitized ALSase (CE') 合成の遷移制御 (Negative control の解除) を稼働していることは明かである。とりわけ後者の desensitization mechanism はこの Positive Control を解明する樞要と目されるが、ここではその仮想的な機能単位を PC-factor と略称することにする。尚 CE, CE' は Val の feedback sensitivity を異にする一種のアイソザイムと考えらるが、何か極めて不安定で高次の精製とタンパク化学的解析は進め難く隘路になつてゐる。

C. 遺伝学的アプローチ:—

(C-1) PC^+Val^r 株から PC^-Val^s 株の誘導; ① PC^+Val^r 株を mutagen 処理して導かれる auxotroph は殆ど全て $M^-PC^+Val^r$ で、 $M^-PC^-Val^s$ 株の獲得率は極めて低い。しかし $M = Thr$ 又は Met などのとき毎に $M^-PC^-Val^s$ を得ることがある。②アクリジン色素処理 (cf. $F^+ \rightarrow F^-$ 技法) 又は強い UV 照射 (cf. $Hfr \rightarrow F^-$ 技法) で $M^-PC^+Val^r \xrightarrow{*} M^-PC^-Val^s$ を導くことは出来ないうが、両者併用すれば低率から誘導可能である。③友枝らの SDS 処理法 (cf. $Hfr, F^+ \text{ or } R^+ \xrightarrow{*} F^- \text{ or } R^-$ 誘導の新技法) によれば比較的高率に $M^-PC^+Val^r \xrightarrow{SDS} M^-PC^-Val^s$ の誘導が可能である。このとき供試株のマーカー M に更に新しく栄養要求性 X が附加されることが多い (cf. $M^-PC^+Val^r \xrightarrow{SDS} M^-X^-PC^-Val^s$)、この X には $X = Trp, Pro, Cys, Met, Gua, Thr, His, Leu, etc.$ がある。④ PC^+Val^r 株は既述の通り環境に反応して CE, CE' 何れかの ALSase を合成しうるが、 PC^-Val^s 株の ALSase は CE 1 種に限られる。即ち PC は CE' にレスポンスしている。

(C-2) 育種の面; ① chemostat 法によつて $PC^+Val^r \xrightarrow{*} PC^-Val^r$ (PC-constitutive) を導くことが出来る。② PC^-Val^s 株を mutagen 処理して得られる Val^r 株は PC^-Val^r で PC^+Val^r ではない。③伝達実験により $X^-PC^-Val^s \times M^-PC^+Val^r \xrightarrow{*} X^-PC^+Val^r$ 又は PC^+Val^r が育種される。

D. 総括:—

これらのことから、Positive Control を支配する遺伝的単位はエピソーム性因子である可能性が強く、この Episomal factor は DNA 上の特定の座位 (恐らくは X の近傍) に integrate されて始めて PC-factor (機能単位) として潜在するようになるものと推定される。

この episomal factor が担う遺伝情報としては、① CE'-cistron の場合—即ち宿主の CE に CE' が持ちこまれる場合 (allelic)、② Controlling episome の場合—即ち宿主の CE 合成系に作用して (脱感作的修飾?) CE' に変換させる場合 (CE は unigenic)、の2通りの可能性が考えられる。しかし現在の処、未だ二者択一のキリ手なく、機能発現の秩序と共に今後の精査に俟たねばならない。

しかし少くとも、機能単位としての PC-factor を cell-to-cell に伝達し且つ発現させることが可能である事から、基礎遺伝学における chromosomal variation の技法をいふべく特異な episomal factor の利用が、工業用微生物の遺伝育種における有用性を示す一例と考へる。

* M. Tomoda, M. Inuzuka, N. Kubo, S. Nakamura: *J. Bact.*, **95**, 1078 (1968).

大塚孝, 北村玲子, 友枝宗光: 金沢大学薬学部シンポジウム (1971, 金沢), 要旨集 p. 121.