

〔醸酵工学 第56巻 第5号 455-467. 1978〕

照井会長退任記念特集号

総 説

特殊合成化合物に対する微生物の作用能力*

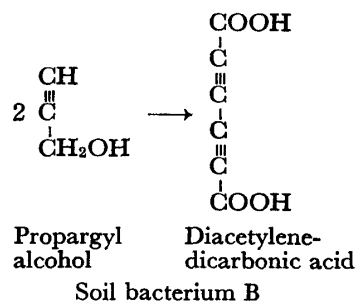
原 田 篤 也

大阪大学産業科学研究所

石油化学工業の発展にともない種々な新しい有機化合物が生まれ、これが地球の表層にひろがり、年々蓄積するようになってきた。そして応用微生物学者にとり石油化学製品に対する微生物の作用を、石油化学製品を有用物質にかえること以外に、毒性あるいは蓄積する石油化学製品をとりのぞくために活用することに関心がもたれてきた。この比較的未開拓の分野を進展させるには、まず特殊な代謝活性をもつ微生物を求めねばならない。原始的な微生物は、メタンとかアセチレンのような簡単な有機化合物を利用したことであろう。そしてそのような微生物の子孫は、簡単な有機化合物に作用する能力を保持しており、私どもの努力により新しく土などから分離されてくることであろう。また地球上の新しい環境にふれてきた微生物が、本来の菌から新しい環境に適し、特殊な合成化合物に作用する能力をもつ菌に変異してくることもあろう。私どもは今までに唯一の炭素源として特殊な有機化合物の高い濃度の培地で生育できる多くの微生物を分離してきた (Table 1)。特殊な合成化合物によく作用する菌は、その高い濃度の簡単な合成培地によく生育する菌であるという簡単な考え方から菌は分離された。特殊な合成化合物でよく生育する菌は、単にその化合物に対して特異性の高い酵素をもつだけでなく、特異な代謝系をもつものであろう。そしてそのような微生物は、その化合物から特殊な代謝生産物を生産したり、完全に分解したりするであろう。以下これらの例について説明する。

1. アセチレン化合物とフタル酸

ここにアセチレン化合物とフタル酸という題目をかかげたのは、アセチレン化合物である2-ブチン-1,4-ジオールを唯一の炭素源として利用できる微生物がこの化合物からフタル酸を生産することを、私どもが見出したことによる。まずアセチレン化合物の代謝について述べる。1952年私どもは、プロパルギルアルコールに作用する土壌細菌がこの化合物からジアセチレンカルボン酸を生成すること (Fig. 1) を報告した。¹³⁾ この報告はアセチレン化合物の代謝を扱った世界の最初の報告である。1970年に私どもは、グラム陰性の土壌細菌が2-ブチン-1,4-ジオールからジブチルフタル酸とγ-ヒドロキシテトラロン酸とを生成すること (Fig. 2) を見出した。¹⁴⁾ さらに私どもは、炭素源として3%の2-ブチン-1,4-ジオールを含む培地で生育できるある *Fusarium* の菌がその基質よりフタル酸とともに2,4,6-トリケトスベリン酸や2,4,6,8-テトラケトセバシン酸のようなポリケトン酸を生成することを報告した。¹⁵⁾ 天然物中の芳香環は、2つの重要な生合成中間体すなわち炭水化物の環化によってできたシキミ酸とアセチル CoA とマロニル CoA との縮合によってできたポリケタイドのいずれかから生成されるもの

Fig. 1.¹³⁾

* Abilities of Microorganisms to Act on Special Synthetic Organic Compound. —A Monograph— HARADA, T. (Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Suita-shi, Osaka 565)

Table 1. Special microorganisms and their products.

Strain	Enrichment medium for isolation	Products
<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogenes</i> 10C3 ¹⁾	10% ethyleneglycol medium	Succinoglucan and curdlan from ethyleneglycol and sugars
<i>Corynebacterium ethanolinophilum</i> E17 ²⁾	4% ethanolamine medium	Glycine from ethanolamine
<i>Corynebacterium acetophilum</i> A51 ³⁾	10% acetate medium	L-Lysine from acetic acid and O-alkylhomoserines from alcohol compounds
<i>Fusarium merismoides</i> var. <i>acetilereum</i> B11 ⁴⁾	3% 2-butyne-1,4-diol medium	Polyketides from 2-butyne-1,4-diol
<i>Corynebacterium</i> sp. HR3 ⁵⁾	4% acetonitrile medium	DL- α -Amino acids from α -amino nitriles
<i>Torulopsis candida</i> GN405 ⁶⁾	0.1% DL- α -hydroxy isovaleronitrile (as N source) medium	L- α -Hydroxy acids from α -hydroxy nitriles
<i>Candida tropicalis</i> OH23 ⁷⁾	n-Alkane medium	N-Acetyl-L-alanine and N-acetyl glycine from glucose; Glutaric and adipic acids from n-alkanes
<i>Trichoderma</i> sp. W15 ⁸⁾	Glucose (1%) and salicylic acid (0.1%) medium	Gentisic acid from salicylic acid and protocatechuic acid from m- and p-hydroxybenzoic acid
<i>Penicillium purpurogenum</i> W59 ⁹⁾	Glucose (1%) and 0.1% tryptophan medium	Red pigment from tryptophan
<i>Alcaligenes</i> MC11 ¹⁰⁾	1% ethyleneglycol monomethyl ether medium	Methoxy and ethoxy acetic acids from ethyleneglycol monomethyl and monoethyl ethers
<i>Alcaligenes</i> IP4 ¹¹⁾	2% isophthalic acid medium	Protocatechuic acid and 3-hydroxyphthalic acid from phthalic acid
<i>Hansenula miso</i> IFO 0146 ¹²⁾	Isolated from miso by M. Mogi (1942)	Protein and 5-hydroxy-4-keto hexanoic acid

といわれている。フタル酸の炭素骨格は、シキミ酸あるいはその前駆体からはつくられないので、シキミ酸はフタル酸の生合成中間体にはなり得ない。フタル酸は、私どもが分離し同定したポリケタイドから生成されるものであろう (Fig. 3)。すなわちポリケタイド I ($R=COOH$) がある還元酵素の作用で還元されアルコール II が生成され、このものがある脱水素酵素によって化合物 III ($R=COOH$) に変化する。3のケトン基の還元と脱水反応とが5のケトン基のそれらの作用の前に起こる。同様な還元・脱水反応は6-メチルサリチル酸 (VII) の生成にみられることが Lynen らによりすでに報告されている。¹⁶⁾ 化合物 III ($R=COOH$) はさらに還元され、脱水反応を受けケト酸の

誘導体 V ($R=COOH$) になる。このものは環化されフタル酸 VIII (アルドール縮合) になる。いかにしてポリケタイドが2-ブチン-1,4-ジオールからつく

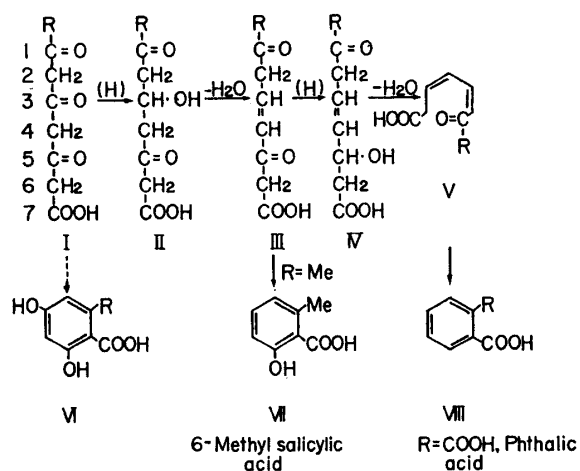


Fig. 3. Possible scheme for formation of phthalic acid.¹⁵⁾
[From Miyoshi, T., Sato, H., Harada, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1935 (1974)]

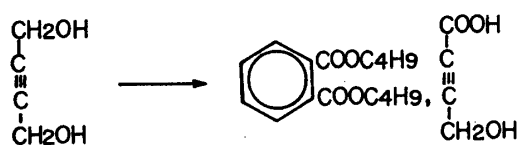


Fig. 2.¹⁴⁾

られるかは不明である。

私どもは、この菌が唯一の炭素源として2-ブチン-1,4-ジオールを含んだ培地で生育した時に、新しい特異なアルコール脱水素酵素、2-アルキン-1-オール脱水素酵素を誘導的につくることを報告した。¹⁷⁾ (Table 2) この菌体から脱水素酵素がとられ硫酸分別、O-(diethylaminoethyl)-cellulose, りん酸カルシウムゲルおよびセファデックス G-200 のクロマトグラフィーにより、320倍純化された。活性はNAD⁺, NADP⁺ 特にNAD⁺ に依存した、酸化を受ける基質の構造はR-C≡C-CH₂OHで、RはH, CH₃, CH₂OHとC≡C-CH₂-OHである。また1,4-ブタンジオールのみが例外的に基質になる。この菌(B11)は、英国の Common Wealth Mycological Institute の Booth に送られたが、こ

のものはオーストラリアの Perth 氏によって得られた IMI 175962 とほとんど同じであり、これもまた2-ブチン-1,4-ジオールを利用することが椿により明らかにされた。この2つの菌株のみが、他の *F. merismoides* の菌株とは2-ブチン-1,4-ジオールの利用性以外に、形態的生理的特徴も異なっており、私どもはこれに新しい variety の名を与え *Fusarium merismoides* Cda var. *acetilereum* TUBAKI, BOOTH and HARADA nov. var. とした。¹⁸⁾

フタル酸とジメチルフタル酸とが *Gibberella fujikuroi* によってつくられることは、1963年にすでに報告されている。¹⁹⁾ また私どもの研究の後、内藤と有川によってジブチルフタル酸はグルコース培地においてもある種の微生物によって生産されることが報告さ

Table 2. Substrate specificities of purified and crude enzyme.¹⁷⁾ Assays were performed in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5), in the presence of NAD⁺ as the cofactor. The reaction rate with 2-butyne-1,4-diol was taken arbitrarily as 100%.

Substrate	Purified enzyme (relative rate)	Crude enzyme (relative rate)
Methanol	0	0
Ethanol	0	46
<i>n</i> -Propanol	18	93
<i>n</i> -Butanol	0	0
1,2-Ethanediol	0	107
1,2-Propanediol	29	71
1,3-Propanediol	0	8
1,4-Butanediol	94	115
1,3-Butanediol	0	25
1,2-Butanediol	12	36
2,3-Butanediol	0	29
1,2,4-Butanetriol	24	71
1,6-Hexanediol	12	107
1,2,3-Propanetriol (Glycerol)	0	40
2-Propene-1-ol (Allyl alcohol)	18	36
2-Butene-1-ol (mixture of <i>cis</i> and <i>trans</i>)	8	10
<i>cis</i> -2-Butene-1,4-diol	0	0
<i>trans</i> -2-Butene-1,4-diol	33	115
1-Butene-3-ol	12	55
2-Propyne-1-ol	76	125
3-Butyne-1-ol	6	50
1-Butyne-3-ol	6	321
2-Butyne-1-ol	118	286
2,4-Hexadiyne-1,6-diol	58	42
2-Butyne-1,4-diol	100	100

[From Miyoshi, T., Sato, H., Harada, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **358**, 231 (1974)]

れている。²⁰⁾しかし、フタル酸の異性体であるイソフタル酸やテレフタル酸が微生物によって生産されたという報告はない。

私どもはフタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸に対する微生物の作用を研究した。そして唯一の炭素源として2%のフタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸をそれぞれ含む培地を集積培地に用いて、菌株 P3, P12 と P49 を、菌株 IP3, IP4 と IP5 を、また菌株 TP2 をそれぞれ分離した。¹¹⁾菌株 P49, IP4 と IP5, 菌株 P3 と P12, また菌株 IP3 と TP2 はそれぞれ *Corynebacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter* に属するものと同定された。これらの菌株の唯一の炭素源としてのフタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸培地での生育を Table 3, Table 4 に示す。P3 と P49 のフタル酸培地での生育は、P12 よりはるかに旺盛であった。フタル酸と同様テレフタル酸に対しても P3 はよい生育を示した。IP3 と TP2 はイソとテレフタル酸により生育を示したが、フタル酸ではあまり生育しなかった。IP5 はイソフタル酸のみによい生育を示した。3つの基質すべてに生育するものはみられなかったし、またテレフタル酸のみに生育するものもなかった。

次に菌株 IP4, P3, IP3 と TP2 によるフタル酸、

イソフタル酸あるいはテレフタル酸からの3日培養での生産物をペーパークロマトグラフィーで調べた。その結果 IP4 に酸性の強いスポットを与える A と B の物質が見出された。A の化合物は、プロトカテキ酸と同定された。B の化合物は元素分析、融点、uv とマスペクトルの測定によって3-ヒドロキシフタル酸と同定された。イソフタル酸によく生育し、フタル酸にあまり生育できない菌株 IP4 がフタル酸を含む培地で上記の化合物を集積することは興味がある。この菌は、フタル酸を完全分解する能力の弱い菌と思われる。私どもの結果から推定できるフタル酸の分解経路を Fig. 4 に示す。

Ribbons と Evans は、²¹⁾土壌細菌である *Pseudomonas* の菌株がフタル酸培地で生育した時にプロトカテキ酸を集積し、その菌体抽出液は4,6-ジヒドロキシフタル酸、プロトカテキ酸、シス・シス- β -カルボキシムコン酸を3-オクソアジピン酸に転換し得ることを見出し、フタル酸は4,5-ジヒドロキシフタル酸を通過してプロトカテキ酸に変化することを提案した。最近中沢と林は、²²⁾フタル酸の異化作用の阻害をうけた *Pseudomonas testosteroni* の変異株が Evans らの菌と同様な代謝系を有することを報告した。彼らの菌と菌株 IP4 とでは異なったフタル酸の異化経路を有するの

Table 3. Utilization of carboxylic benzene and phenolic compounds by strains isolated from phthalate medium.¹¹⁾

Substrate (1%)	Dried cells formed (mg/100 ml)		
	P3	P12	P49
Phthalic acid	98	30	111
Isophthalic acid	0	0	0
Terephthalic acid	114	0	0
Benzoic acid	0	17**	0
Salicylic acid	0	0	0
<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	114	16**	0
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	135	12	15**
2,3-Dihydroxybenzoic acid	0	0	0
2,4-Dihydroxybenzoic acid	0	0	0
Protocatechuic acid	94*	0	0
Gentisic acid	81**	0	0
Di- <i>n</i> -Butylphthalate	0	3	0
Pyrocatechol	0	0	0
Resorcinol	0	0	0
Hydroquinone	0	0	0

* The concentration used was 0.5%.

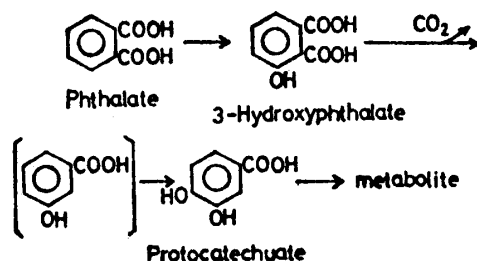
** The concentration used was 0.25%.

Table 4. Utilization of carboxylic benzene and phenolic compounds by strains isolated from isophthalate or terephthalate medium.¹¹⁾

Substrate (1%)	Dried cells formed (mg/100 ml)			
	IP3	IP4	IP5	TP2
Phthalic acid	0	16	0	0
Isophthalic acid	164	181	75	161
Terephthalic acid	212	0	0	227
Benzoic acid	79**	84**	0	85**
Salicylic acid	0	0	0	0
<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	69**	0	8**	82**
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	210	186	31*	214
2,3-Dihydroxybenzoic acid	0	0	0	0
2,4-Dihydroxybenzoic acid	0	0	0	0
Protocatechuic acid	0	0	0	0
Gentisic acid	0	0	0	52**
Di- <i>n</i> -Butylphthalate	0	0	0	0
Pyrocatechol	0	0	0	0
Resorcinol	0	0	0	0
Hydroquinone	0	0	0	0

* The concentration used was 0.5%.

** The concentration used was 0.25%.

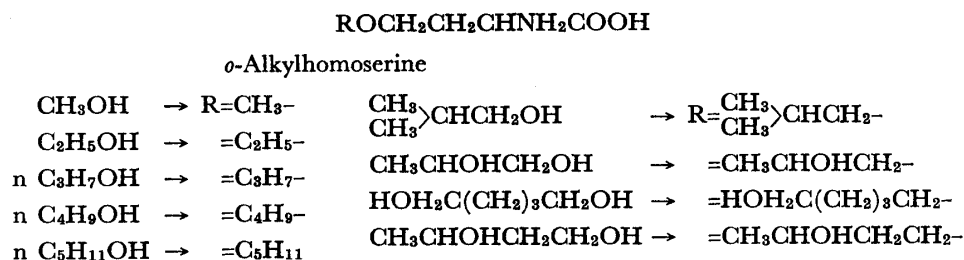
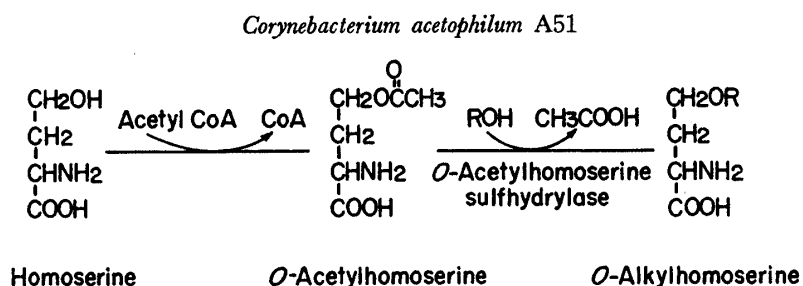
Fig. 4. Proposed metabolic pathway of phthalic acid by *Corynebacterium* IP4.¹¹⁾

であろう。

2. *o*-アルキルホモセリンと合成エーテル化合物

自然界にはエーテル化合物としてグリコサイド結合を有する種々な糖、配糖体、多糖類などが知られている。植物中のリグニンやバニリンのような物質は、芳香族のエーテル化合物である。また、高級アルコールとグリセリンとのエーテル結合をもつ脂質が知られている。私どもは、多くの微生物がアルコール化合物あるいはグリコール化合物を含む培地で生育すると、種々な o -アルキルホモセリンを生産することを見出した。²³⁾ これは、新しいアルキルエーテル化合物である。一方、多くの種類のアルキルエーテル化合物が、化学合成で多量に生産されている。そこで、 o -アルキルホ

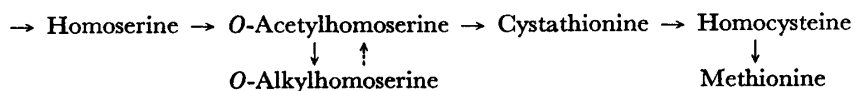
モセリンと合成エーテル化合物の題目で以下説明する。最初に、 o -アルキルホモセリンの生成について述べる。*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Brevibacterium*, *Bacillus* などのグラム陽性菌、また *Pseudomonas* のある菌やある酵母がこれを生産する。^{24,25)} Fig. 5 はアルコール、グリコール化合物とそれらから生産されるアルキルホモセリンを示している。 o -メチルホモセリンとペンチルホモセリンとはメタノールあるいはペンタノールとホモセリンとから、ある *Corynebacterium* の菌の菌体懸濁液を用いてつくられた。²⁶⁾ 他の生産物はそれぞれに相当するアルコール、グリコール化合物を含んだ培地に菌が生育した時に生産された、ホモセリンとアルコールからの o -アルキルホモセリンの生合成の経路は Fig. 6 のようである。^{27,28)} この生合成は新しい代謝である。*Corynebacterium acetophilum* A51 の菌から、この反応に関する酵素を分離純化した。そしてこの酵素は従来知られていた o -acetylhomoserine sulfhydrylase であることが明らかにされた。²⁹⁾ ポリアクリルアミドゲルの電気泳動で均一と思われる標品は o -アルキルホモセリン生合成活性と o -アセチルホモセリンスルフィドヒドラーゼ活性とを示した。その分子量は約22万で、2つのサブユニットからなっていた。そして2つの反応の最適pHと最適温度とは同じであった。 o -

Fig. 5.²⁴⁾Fig. 6. Pathways of biosynthesis of O-alkylhomoserines.^{27, 28)}

アセチルホモセリンとスルフィドからホモシスティンを生成する作用をもつだけでなく、このものは α -アセチルホモセリンとエタノール、 n -プロパノール、 n -ブタノール、メタノール、 n -ペンタノール（この順序のアルコールで活性は減少する）からそれらのアルコールに相当する α -アルキルホモセリンをつくる作用を有していた。Fig. 7 は微生物におけるメチオニンと α -アルキルホモセリンの生合成に関する代謝反応である。微生物の培養液に α -アルキルホモセリンの集積は α -アセチルホモセリンスルフィドリラーゼのレベルと培養液中のアルコールと α -アセチルホモセリンの濃度に依存するようである。エタノールは *C. acetophilum* によって能動輸送によって菌体に入り集積する。²⁹⁾ α -アルキルホモセリンは、メチオニンの代わりにメチオニン要求株の菌体により利用され、放射性の α -エチル- ^{14}C ホモセリンは α -アセチルホモセリンやメチオニンに代謝されていく。 α -アセチルホモセリンは α -アルキルホモセリンから可逆的な側道の反応によって合成されるようである。^{28, 30)} α -アセチルホモセリンスルフィドリラーゼの主な作用は、ホモシスティンやメチオニンの生合成とは直接関係なく、 α -アルキルホモセリンは α -アセチルホモセリンとアルコールからの副産物と

考えられる。たとえばこの酵素は、毒性の過剰のアルコール、スルフィドあるいはメチルメルカプタンを除去するのに役立つ α -アセチルホモセリンのレベルを制御するものであろう。

莫大な量のジ-, トリ-, ポリエチレングリコールとエチレングリコールモノメチルおよびモノエチルエーテルなどアルキルエーテル化合物が、世界中で工業的に生産、利用されている。これらの化合物は、化学的また微生物の作用に対しても分解されにくい物質と考えられている。そこでこれらの化合物を微生物で処理して完全に分解することはきわめて重要な問題となっている。Fincher と Payne は³¹⁾ 0.25%のトリエチレングリコールを含む培地で生育できるグラム陰性の桿菌を土より分離して、その休止菌体が平均分子量600までのオリゴおよびポリエチレングリコールを酸化することを見出した。自然界で知られているアルキルエーテル化合物は α -アルキルホモセリンとエーテル結合を含む脂質である。そこで私どもは、天然と合成の種々なアルキルエーテル化合物に対しての微生物の作用能力を知ることに関心をもった。まず私どもは1%のエチレングリコールモノメチルエーテル、3%のトリエチレングリコール、3%のポリエチレングリコール

Fig. 7. Metabolic courses of methionine and O-alkylhomoserine in gram-positive bacteria.^{28, 30)}

(分子量 400) と 0.2% *o*-エチルホモセリンをそれぞれ含む培地で生育できる菌株 MC11, TE8, PE18 と OEH8 を分離した.¹⁰⁾ そして MC11, TE8 と PE18 は *Alcaligenes* の属 OEH8 は *Corynebacterium* の属の菌株と同定した.

唯一の炭素源として, 種々なエーテル化合物を含んだ培地で MC11, TE8, PE18 および OEH8 の生育を Table 5 に示す. MC11 の生育はエチレングリコール, エチレングリコールモノメチルおよびモノエチルエーテル, トリー, テトラ-, ポリエチレングリコールで良好であり, エチレングリコールジエチルエーテルとジエチレングリコールモノエチルエーテルではわずかの生育しかみられなかった. MC11 は TE8 とはエチレングリコールモノメチルエーテルで生育できる点で異なっている. PE18 の生育に対する基質特異性は, MC11 や TE8 とは著しく異なっており, トリー, テトラ-, ポリエチレングリコールに対してのみよく生育した. 他の基質では, 0.1% の濃度でもなお生育がみられなかった. OEH8 は他の 3 菌株とは非常に異なっていた.

種々なエーテル化合物での生育試験中, ペーパークロマトグラフィーでの酸性のスポットがエチレングリコールモノメチルまたモノエチルエーテル化合物で生育した MC11 の培養液に検出された. この物質は分離, 純化されメトキシおよびエトキシ酢酸であることがわかった. これらの菌は, エーテル化合物を分解しエネルギーおよび菌体成分の材料として利用できるで, エーテル結合はこの菌によって切断されなければならない. そしていずれの菌株も唯一の炭素源としてエトキシ酢酸を利用した. また MC11 はメトキシ酢酸をも利用できた. したがってエチレングリコールモノエチルおよびモノメチルエーテルはまずエトキシ酢酸, メトキシ酢酸にそれぞれ変化するものと思われる. その後エーテル結合が切断される.

次に MC11 のエーテルアルコール化合物に対する脱水素酵素をしらべた.³²⁾ 唯一の炭素源として種々なエーテルアルコール化合物, エチレングリコール, エタノール, グルコース, こはく酸で生育した log phase の MC11 の菌体をまず超音波処理し, 遠心分離し生じた上澄液について, 種々な基質に対する NAD-依存

Table 5. Utilization of various ether compounds.¹⁰⁾

Carbon source 1%	Structural formula	Dried cells formed (mg/100 ml)			
		MC11	TE8	PE18	OEH8
Ethylene glycol	HO-CH ₂ CH ₂ -OH	136	47	0	0
Ethylene glycol monomethylether	CH ₃ O-CH ₂ CH ₂ OH ₃	66	1	0	0
Ethylene glycol dimethylether	CH ₃ O-CH ₂ CH ₂ -OCH ₃	0	0	0	0
Ethylene glycol monoethylether	C ₂ H ₅ O-CH ₂ CH ₂ -OH	21	74	0	0
Ethylene glycol diethylether	C ₂ H ₅ O-CH ₂ CH ₂ -OC ₂ H ₅	7	3	0	0
Ethylene glycol monopropylether	C ₃ H ₇ O-CH ₂ CH ₂ -OH	0	0	0	0
Ethylene glycol monophenyl ether	 -O-CH ₂ CH ₂ -OH	0	0	0	0
Diethylene glycol	HO-(CH ₂ CH ₂ -O) ₂ H	42	80	0	0
Diethylene glycol monomethylether	CH ₃ O-(CH ₂ CH ₂ -O) ₂ H	0	0	0	0
Diethylene glycol dimethylether	CH ₃ O-(CH ₂ CH ₂ -O) ₂ CH ₃	0	0	0	0
Diethylene glycol monoethylether	C ₂ H ₅ O-(CH ₂ CH ₂ -O) ₂ H	7	4	0	0
Diethylene glycol diethylether	C ₂ H ₅ O-(CH ₂ CH ₂ -O) ₂ OC ₂ H ₅	0	0	0	0
Triethylene glycol	HO-(CH ₂ CH ₂ -O) ₃ H	160	95	106	0
Tetraethylene glycol	HO-(CH ₂ CH ₂ -O) ₄ H	81	78	71	0
Tetraethylene glycol dibutylether	C ₄ H ₉ O-(CH ₂ CH ₂ -O) ₄ C ₄ H ₉	0	0	0	0
Polyethylene glycol-400	HO-(CH ₂ CH ₂ -O) _n H	66	69	80	0
<i>O</i> -Ethylhomoserine	C ₂ H ₅ OCH ₂ CH ₂ CHNH ₂ COOH	0	0	0	71
*Methoxy acetic acid	CH ₃ OCH ₂ COOH	20	0	0	0
*Ethoxy acetic acid	C ₂ H ₅ OCH ₂ COOH	31	4	0	0

* The concentration used was 0.2%.

Table 6. Comparison of NAD-dependent dehydrogenating activities in the crude extracts of *Alcaligenes* MC11 grown on various carbon sources towards various ether-alcohols, ethyleneglycol, and ethanol.³²⁾

Carbon source	Dehydrogenating activity (units/mg protein)						
	Substrate						
	Ethylene-glycol monomethyl ether	Ethylene-glycol monoethyl ether	Diethylene-glycol	Triethylene-glycol	Polyethylene-glycol 400	Ethylene-glycol	Ethanol
Ethyleneglycol monomethyl ether	10	40	16	20	6	12	34
Ethyleneglycol monoethyl ether	12	30	21	22	7	14	43
Diethyleneglycol	7	12	9	4	2	8	15
Triethyleneglycol	5	5	4	4	2	4	8
Polyethyleneglycol 400	1	5	3	2	1	1	3
Ethyleneglycol	16	39	5	19	4	19	20
Ethanol	8	10	11	13	7	12	16
Glucose	0	2	0	1	0	2	3
Succinate	1	3	1	1	0	3	4

の脱水素酵素活性をしらべた。唯一の炭素源としてエーテルアルコール化合物、エチレングリコールあるいはエタノールで生育した場合、その抽出液はエチレングリコールモノメチルおよびモノエチルエーテル、ジ-, トリ-, ポリエチレングリコール、エチレングリコール、エタノールに対して活性を示した。ポリエチレングリコールに対しての活性は低かった。またトリ-とポリエチレングリコールで生育した菌体の抽出液の活性に低かった。グルコースとこはく酸で生育した菌体の抽出液の活性はさらに低かった。

種々なエーテルアルコールに対する NAD 依存の脱水素酵素活性は唯 1 つの酵素によるのか数種の酵素によるのかを明らかにするために、粗抽出液をポリアクリルアミドのディスク電気泳動でわけ、ゲル中の NAD 依存の脱水素酵素のバンドを Ciriacy の方法で染色ししらべた。エチレングリコールモノメチル、モノエチルエーテル、ジ-, トリ-, とポリエチレングリコール、エチレングリコール、エタノールとこはく酸が生育の炭素源として用いられた。菌体中の脱水素酵素は、種々な生育基質によって異なるバンドを与えた。A, B, C と D のバンドは移動の程度にしたがい順序を示した。バンド A は最もおそいものである。エチレングリコールモノメチルとモノエチルエーテルで生育した菌体の抽出酵素は同様に B と C の 2 つのバンドを示した。ジエチレングリコールで生育した抽出液は、ジエチレングリコールを基質とした場合 A, B, C と D 4 つのバンドを示した。トリ-とポリのエチレングリコールで

生育した菌体の抽出液は A と C の 2 つのバンドを示し、エチレングリコールとエタノールで生育した菌体では B と C のバンドを与えた。こはく酸、フマル酸あるいはグルコースを生育の基質として用いた場合、C のバンドのみが観察された。したがってバンド C の酵素は構成的につくられる。この酵素はエタノール、エチレングリコール、エチレングリコールモノメチルとモノエチルエーテルに対し高い活性を示し、ジ-, トリ-, ポリエチレングリコールに対しては低い活性を示した。バンド B の酵素はエチレングリコールモノメチルおよびモノエチルエーテル、ジエチレングリコール、エチレングリコールあるいはエタノールで生育した時につくられ、その活性はエチレングリコールモノエチルエーテル、ジ-, トリ-, トリエチレングリコールに対して高かった。バンド A の酵素はジ-, トリ-, ポリエチレングリコールで生育した時につくられ、エチレングリコールモノエチルエーテル、ジ-, トリエチレングリコールに対して高い活性を与えた。これらの結果からこの菌は、1 つの構成的酵素と少なくとも 3 つの誘導的な NAD 依存のエーテルアルコール化合物に対する脱水素酵素をつくっていることがわかる。

バンド B の酵素をまず硫酸分別でわけ、ついで 10-カルボキシデシルセフェロースのクロマトグラフィーで精製した。このものは、ディスクゲル電気泳動でたんぱく質と酵素活性の唯 1 つのバンドを示した。この酵素の基質特異性を Table 7 に示す。エチレングリコールモノエチルエーテル、ジ-とトリエチレングリコ-

Table 7. Substrate specificity of purified enzyme B.³²⁾

Substrate	Dehydrogenase activity units/mg protein
Ethylene glycol monomethyl-ether	2
Ethylene glycol monoethyl-ether	53
Di-ethylene glycol	115
Tri-ethylene glycol	68
Poly-ethylene glycol 400	7
Ethylene glycol	0
Ethanol	0

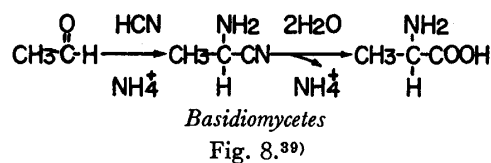
に対して高い活性を示し、エチレングリコールやエタノールに対しては活性を示さなかった。したがって R=H, OH, OCH₂CH₂OH の R-CH₂CH₂OCH₂CH₂-OH に対し高い活性を与えた。NADP や FAD は NAD のかわりにならなかった。

Payne と Todd は³³⁾ テトラエチレングリコールで生育した細菌 TEG-5 の菌体抽出液が、種々なエーテルアルコールを脱水素し、FAD あるいは Ferricyanide に依存し、NAD はこの反応に対しては電子受容体として役立たないことを示した。彼らはまたエーテルアルコールのヒドロキシ基の酸化がまず起こらねばならないといっており、この点私どもの考えと一致している。

Jonos と Watson は、³⁴⁾ ジー、トリ、ポリエチレングリコール200と400で生育できる *Acinetobacter* によってのポリエチレングリコールの分解について研究し、洗浄菌体のポリエチレングリコールの酸化能力は、きわめて不安定であると述べている。私どもの酵素もかなり不安定ではあるが、幸いにも1つの酵素を純化できた。また Haines と Alexander は³⁵⁾ *Pseudomonas aeruginosa* がポリエチレングリコール20,000をジエチレングリコールとエチレングリコールにかえる菌体外酵素を生成することを報告した。一方、緒方とその共同研究者は³⁶⁾ 混合培養中の菌体中にポリエチレングリコールに対して活性を示す FAD 依存の脱水素酵素を検出した。これらのものと私どもの酵素とは異なる。

3. ニトリル化合物の代謝

ニトリル基の代謝に関しては、多くの研究がなされている。1964年 Thimann と Mahadevan とは、³⁷⁾ インドールアセトニトリルのようなニトリル化合物を加水分解してそれに相当するカルボキシル酸にする Ni-



trilase をある植物に見出した。また Fowden と Bell は³⁸⁾ アスパラギンが多くの植物の seedling によって酵素的にβ-シアノアラニンからつくられることを示した。Strobel は、³⁹⁾ アセトアルデヒドから中間体としてα-アミノプロピオニトリルを通り、アラニンに変化する代謝系 (Fig. 8) が *Basidiomycetes* の菌株に存在することを報告した。さらに ricinine のニトリル基を加水分解する細菌のニトリラーゼを Hook と Robinson が見出した。⁴⁰⁾ また三村らは⁴¹⁾ 唯一の炭素源としてアセトニトリルを含んだ培地で生育できるある *Corynebacterium* の菌株を分離して、この微生物は多くのニトリル化合物を利用できることを報告した。一般に化学的にアミノニトリル化合物をそれに相当するアミノ酸に変えて合成することがなされている。しかしながら、化学反応では DL-アミノニトリルから DL-アミノ酸が合成される。そこで私どもは微生物を用いて DL-アミノニトリルから L-アミノ酸を得ることを目的として研究した。まず私どもは、唯一の炭素源として4%の

Table 8. Assimilation of various carbon compounds as carbon source by *Corynebacterium* HR3.⁵⁾

Carbon compound (1%)	Final pH	Dried cells mg/100 ml
Acetonitrile	9.4	140
n-Propionitrile	8.6	145
n-Butyronitrile	7.9	65
n-Valeronitrile	7.6	110
iso-Butyronitrile	8.0	80
n-Capronitrile	7.4	45
DL-Lactonitrile	7.3	0
DL-α-Aminopropionitrile	7.2	10
DL-α-Aminoiso-valeronitrile	7.2	0
Acetamide	9.2	90
n-Propioamide	9.0	140
n-Butyramide	9.1	140
Acetate	9.8	205
n-Propionate	9.3	210
n-Butyrate	9.3	235
n-Valerate	7.6	30
n-Capronate	7.2	0

Table 9. Assimilation of various nitrile compounds as nitrogen sources by *Corynebacterium* HR3.⁵⁾

Nitrogen compound (0.1%)	Final pH	Dried cells mg/100 ml
Acetonitrile	5.0	300
<i>n</i> -Propionitrile	6.8	295
<i>n</i> -Butyronitrile	6.6	255
<i>iso</i> -Butyronitrile	6.7	250
<i>n</i> -Valeronitrile	6.4	190
<i>n</i> -Capronitrile	6.2	115
DL-Lactonitrile	7.2	0
DL- α -Aminopropionitrile	6.6	10
DL- α -Aminoisovaleronitrile	7.5	75

アセトニトリルで生育できる *Corynebacterium* の菌株を分離した。⁵⁾ このものは、種々なニトリル化合物を炭素源として利用できる (Table 9)。Table 10 に窒素源としての利用性を示している。ついでこの菌の菌体懸濁液による α -アミノニトリルから、アミノ酸の生成を研究した。ところが意外にも、DL- α -アミノプロピオニトリルと DL- α -アミノバレロニトリルから DL-アラニンと DL-バリンがそれぞれつくられることがわかった (Fig. 9)。Fig. 10 は DL- α -ヒドロキシニトリル化合物から光学的に活性の α -ヒドロキシ酸の生成を示している。これに関与する微生物は、土から分離された *Torulopsis candida* である。⁶⁾ このものは、唯一の窒素源として多くのヒドロキシニトリル化合物を利用できる (Table 10)。菌体懸濁液の作用で DL- α -ヒドロキシ

Table 10. Assimilation of various nitrile compounds as the sole source of carbon or nitrogen by *Torulopsis candida* GN405.⁴⁶⁾

Nitrile compound	Dried cells mg/100 ml	
	Carbon source	Nitrogen source
Acetonitrile	0	135
Propionitrile	0	135
Butyronitrile	0	120
DL- α -Hydroxyisovaleronitrile	0	220
DL- α -Hydroxyisocapronitrile	0	145
DL- α -Aminopropionitrile	0	5
DL- α -Aminoisovaleronitrile	0	5

ニトリルから光学活性の α -ヒドロキシ酸が生成することがわかった。この生産物について元素分析、赤外分析、旋光度、融点などをしらべた結果、DL- α -ヒドロキシイソバレロニトリルと DL- α -ヒドロキシイソカプロニトリルから生産された α -ヒドロキシ酸は L- α -ヒドロキシイソバレリアン酸と L- α -ヒドロキシイソカプロン酸であることがそれぞれわかった。

4. 硫酸エステル化合物の加水分解

哺乳動物は、アリアル硫酸やエストロゲン硫酸などをつくり、これは尿中に排泄される。結締組織にはコンドロイチン硫酸やヘパリンなどが存在している。またある海藻は、寒天やカラゲナンのような多糖硫酸エステルをつくる。一方、多くのかびやある植物や細菌は、貯蔵硫黄化合物としてコリン硫酸をつくること

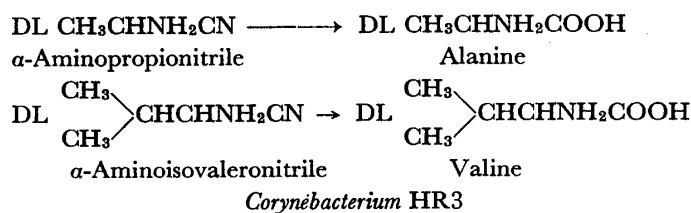
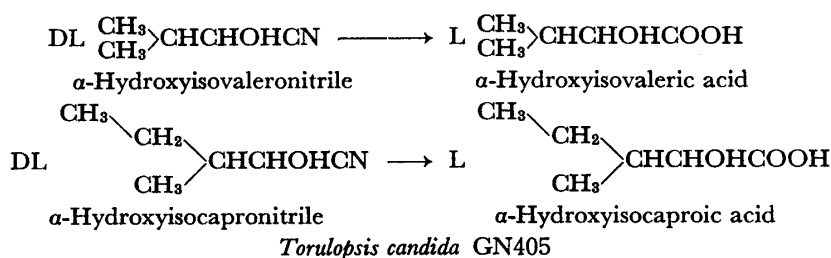
Fig. 9.⁵⁾Fig. 10.⁶⁾

Table 12. Comparison of desulfating activities of *K. aerogenes* W 70 and K 601 grown on various sulfur sources towards various sulfate esters.⁴⁴⁾

Sulfur source	Strain	Doubling time (min)	Desulfating activity, units (nmole SO ₄ ²⁻ -formed/min/mg cell)							
			Substrate							
			Phenyl sulfate	<i>p</i> -Nitro-phenyl sulfate	<i>p</i> -Carboxy-phenyl sulfate	Tyrosine <i>o</i> -sulfate	Choline sulfate	Dodecyl sulfate	Serine <i>o</i> -sulfate	Threonine <i>o</i> -sulfate
Na ₂ SO ₄	W 70	106	0	0	3.7	0	1.0	0.8	2.6	0.9
Methionine	W 70	107	2.0	9.6	2.0	7.5	6.2	3.2	4.7	8.6
Choline sulfate	W 70	100	2.5	7.8	3.8	7.6	4.6	8.3	5.2	6.8
Serine <i>o</i> -sulfate	W 70	101	0.9	2.2	2.3	2.0	1.6	3.1	3.0	5.7
Na ₂ SO ₄	K 601	129	0	0	1.2	0	1.8	2.7	3.3	1.2
Methionine	K 601	132	0	0	1.3	0	1.8	2.2	5.4	3.8
Choline sulfate	K 601	114	0	0	2.7	0	1.6	1.6	2.1	2.5
Serine <i>o</i> -sulfate	K 601	120	0	0	0.9	0	0.5	1.4	1.8	1.8

Table 13. Substrate specificities and inducer requirements of alkylsulfatases in *Pseudomonas* C12B.⁴⁵⁾

	Dodecan-1-ol	Octan-1-ol	Hexan-1-ol	Decan-5-ol	Pentan-3-ol	Inducer
P 1 Primary	+	+	+	—	—	None
P 2 Primary	+	+	+	—	—	Presence
S 1 Secondary	—	—	—	+	—	None
S 2 Secondary	—	—	—	+	—	None
S 3 Secondary	—	—	—	+	+	Presence

[From Dodgson, K. S., Fitzgerald, J. W., Payne, W. J.: *Biochem. J.*, **138**, 53 (1977)]

する微生物を見出すこと、ついでその菌を遺伝的に改良することが重要であると考えている。

文 献

- 1) Harada, T., Yoshimura, T., Hidaka, H., Koreeda, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 757 (1965).
- 2) 原田, 室岡: 醸工, **44**, 192 (1966).
- 3) Harada, T., Seto, K., Murooka, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 169 (1968).
- 4) Miyoshi, T., Harada, T.: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 388 (1974).
- 5) Fukuda, Y., Fukui, M., Harada, T., Izumi, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 1011 (1971).
- 6) Fukuda, Y., Harada, T., Izumi, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **51**, 393 (1973).
- 7) Okuhara, M., Kubochi, Y., Harada, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1376 (1971).
- 8) Harada, T., Watanabe, H.: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 167 (1971).
- 9) Watanabe, H., Yokoe, M., Harada, T.: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 360 (1974).
- 10) Harada, T., Nagashima, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **53**, 218 (1975).
- 11) Harada, T., Koiwa, S.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 97 (1977).
- 12) Hirabayashi, T., Harada, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 276 (1969).
- 13) 花岡, 原田, 滝沢: 農化, **26**, 151 (1952).
- 14) Miyoshi, T., Harada, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 684 (1970).
- 15) Miyoshi, T., Sato, H., Harada, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1935 (1974).
- 16) Domroth, P., Walter, H., Lynen, F.: *Eur. J. Biochem.*, **13**, 98 (1970).
- 17) Miyoshi, T., Sato, H., Harada, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **358**, 231 (1974).

- 18) Tubaki, K., Booth, C., Harada, T.: *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **66**, 355 (1976).
- 19) Gross, B.E., Galt, R.H.B., Hanson, J.R., Curtis, P.J.: *J. Chem. Soc.*, (1963) 2937.
- 20) 内藤, 有川: 農芸化学会大会要旨集, p. 15 (1972).
- 21) Ribbons, D.W., Evans, W.C.: *Biochem. J.*, **83**, 482 (1962).
- 22) Nakazawa, T., Hayashi, E.: *J. Bacteriol.*, **131**, 42 (1977).
- 23) Harada, T., Murooka, Y., Izumi, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 485 (1967).
- 24) 原田: 醸協誌, **33**, 248 (1975).
- 25) Murooka, Y., Harada, T.: *J. Bacteriol.*, **96**, 314 (1968).
- 26) Murooka, Y., Harada, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1059 (1968).
- 27) Murooka, Y., Seto, K., Harada, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 407 (1970).
- 28) Murooka, Y., Kakiyama, K., Miwa, T., Seto, K., Harada, T.: *J. Bacteriol.*, **130**, 62 (1977).
- 29) Murooka, Y., Harada, T.: *J. Bacteriol.*, **118**, 149 (1974).
- 30) Harada, T., Seto, K., Murooka, Y.: *J. Biochem.*, **65**, 493 (1969).
- 31) Fincher, E.L., Payne, W.J.: *Appl. Microbiol.*, **10**, 542 (1962).
- 32) Harada, T., Sawada, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 553 (1977).
- 33) Payne, W.J., Todd, R.L.: *J. Bacteriol.*, **91**, 1533 (1966).
- 34) Jonos, N., Watson, G.K.: *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 891 (1976).
- 35) Haines, J. R., Alexander, M.: *Appl. Microbiol.*, **29**, 621 (1975).
- 36) 河合, 深谷, 木村, 谷, 緒方, 農芸化学会大会要旨集, p. 203 (1977).
- 37) Thimann, K.V., Mahadevan, S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 133 (1964).
- 38) Fowden, L., Bell, E.A.: *Nature*, **206**, 110 (1965).
- 39) Strobel, C.A.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 3265 (1967).
- 40) Hook, R.H., Robinson, W.G.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 4263 (1964).
- 41) Mimura, A., Kawano, T., Yamaga, K.: *J. Ferment. Technol.*, **47**, 631 (1969).
- 42) Mayers, G. L., Haines, T. H.: *Biochemistry*, **6**, 1665 (1967).
- 43) Harada, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **81**, 193 (1964).
- 44) Sukhumavasi, J., Murooka, Y., Harada, T.: *J. Ferment. Technol.*, **53**, 62 (1975).
- 45) Fitzgerald, J. W., Dodgson, K. S., Payne, W.J.: *Biochem. J.*, **138**, 53 (1974).
- 46) Fitzgerald, J. W., Dodgson, K. S., Matcham, G. W. J.: *Biochem. J.*, **149**, 477 (1975).
- 47) Matcham, G. W. J., Dodgson, K. S., Fitzgerald, J. W.: *Biochem. J.*, **167**, 723 (1977).
- 48) Yamada, T., Murooka, Y., Harada, T.: *J. Bacteriol.*, **133**, 536 (1978).

(昭53. 5.27受付)