

[生物工学会誌 第73巻 第1号 21-25. 1995]

ノ ー ト

Rhodobacter sphaeroides の 5-アミノレブリン酸 (ALA) デヒドラターゼに及ぼすプロピオン酸の阻害作用と ALA の菌体外生成田中 徹^{1*}・渡辺圭太郎¹・西川 誠司¹・佐々木 健³
西尾 尚道²・永井 史郎²(株)コスモ総合研究所,¹ 広島大学工学部,² 広島電機大学³
¹〒340-01 埼玉県幸手市権現堂1134-2
²〒724 東広島市鏡山1-4-1
³〒739-03 広島市安芸区中野6-20-1

(平成6年8月29日受付 平成6年10月24日受理)

Inhibitory Effect of Propionic Acid on the 5-Aminolevulinic Acid (ALA) Dehydratase from *Rhodobacter sphaeroides* and ALA Excretion —Note—TOHRU TANAKA,^{1*} KEITAROU WATANABE,¹ SEIJI NISHIKAWA,¹ KEN SASAKI,³ NAOMICHI NISHIO,² and SHIRO NAGAI² (Cosmo Research Institute Co., Ltd., 1134-2 Gongendo, Satte, Saitama 340-01¹; Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University, 1-4-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 724²; Hiroshima-Denki Institute of Technology, 6-20-1 Nakano, Aki-ku, Hiroshima 739-03³)
Seibutsu-kogaku 73: 21-25, 1995.

The role of propionic acid as an inhibitor of 5-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) from *Rhodobacter sphaeroides* was studied to elucidate the high extracellular accumulation of 5-aminolevulinic acid (ALA) in a volatile fatty acid (VFA) medium. Like levulinic acid (LA), propionic acid inhibited ALAD as a competitive inhibitor, but its K_i value (1.85 mM) was larger than that of LA (0.48 mM). The inhibitory effects of acetic and butyric acids in the VFA medium were negligible. Using the kinetic model equation of competitive inhibition, the relative enzyme activities were estimated for two cases—the presence of only LA and the presence of LA plus propionic acid. When propionic acid was present with LA, ALAD activity was reduced 60–50% as compared with the case of LA only. The high accumulation of ALA in a VFA medium might therefore be caused by the additional inhibitory effect of propionic acid for ALAD together with the inhibition of LA.

[Key words: 5-aminolevulinic acid production, 5-aminolevulinic acid dehydratase, *Rhodobacter sphaeroides*]

ポルフィリン、ヘムなどテトラピロール化合物生合成中間体である5-アミノレブリン酸(ALA)は、近年、生分解性で低毒性の除草剤,¹⁾ 殺虫剤,²⁾ および植物生長調節剤³⁾ として注目されている。ALAの構造は簡単だが、化学合成が容易でないことから、微生物生産が試みられている。⁴⁾ 我々はすでにALA合成活性の大

きい光合成細菌を用いたALA生産について報告しているが、その際ALA脱水酵素(ALAD)阻害剤であるレブリン酸(LA)を逐次添加し、菌体内のALAD活性を低く保ちつつ、ALAの菌体外高濃度生産を達成している。⁵⁻⁷⁾

しかし、テトラピロール生成に適したグルタミン酸リンゴ酸培地(GM培地)を使用しているにも関わらず、ALAの菌体外濃度は約4 mM程度で停止した。

* 連絡先, Corresponding author.

LA 添加量を増大しても、逐次添加法を種々改めても ALA の生産量は増大せず、むしろ多量の LA 添加は菌体を死滅させ、かえって ALA 蓄積は減少することが観察された。

一方、安価な基質として農産廃棄物のミカン外皮廃棄物や都市下水汚泥の嫌気消化脱離液に含まれる酢酸、プロピオン酸、酪酸など揮発性脂肪酸 (VFA) 培地を用いると、通常の LA 逐次添加で 9~16 mM の ALA 生産が可能であった。^{5,7)} テトラピロール合成に適さないといわれる VFA 培地で、ALA 生産が GM 培地を用いた場合に比べ、すぐれる理由が未解明であった。

VFA のうちプロピオン酸は防カビ剤として食品保存に利用され、微生物代謝を種々抑制することが知られている。ALAD の阻害剤の検索の過程でプロピオン酸が ALAD 活性に影響を与えている可能性が示された。¹⁰⁾

本研究では、VFA のうち主としてプロピオン酸の ALAD 活性に及ぼす影響を検討した。さらに、酵素阻害モデルを利用してプロピオン酸や LA の ALAD 活性に及ぼす速度論的解析を行い、GM 培地と VFA 培地における ALA 生産の特性について考察を行った。

使用菌株は前報同様 *Rhodobacter sphaeroides* IFO 12203 を用いた。⁴⁻⁹⁾ 培地は通常の GM 培地を用い、21 mmφ 試験管 (液量 10 ml) にて、嫌気明条件 (5 klux (600 W/m²), 30°C) で 48 時間培養し菌体を得た。光源はタ

ングステンランプ (東芝レフランプ) を用いた。上記培養で得た培養液を 15,000×g で 30 分間遠心分離し、菌体を 0.04 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.1) で 2 回洗浄後、前報同様に超音波破碎を行った (28 kHz, 50 w, 5 min)。この粗抽出液を遠心分離 (15000×g, 20 min) し、上清を粗酵素液として ALAD 活性の測定を行った。

酵素反応は前報同様 Satoh ら¹¹⁾ の方法に従って、18 mmφ×100 mm の試験管を用いて行った。酵素反応液組成は次の通りである。(w/w %, ALA·HCl 0.11, 0.053, 0.027, KCl 0.25, MgCl₂·6H₂O 0.17, トリスヒドロキシメチルアミノメタン 0.20, グルタチオン 6.0×10⁻⁴, pH 8.1, 全反応液量 0.6 ml)。

反応は 37°C で 1 時間行い、2.5 ml のトリクロロ酢酸 (0.1 M) を添加して反応を停止し、15000×g で 10 分間遠心分離後、上清中のポルフォビリノーゲン (PBG) をエールリッヒ試薬で発色させ、定量した。タンパク質量はバイオラッド社製プロテインアッセイキットを用いて測定した。酵素活性はタンパク質 1 mg あたり 1 時間に生成する PBG の量 (nmol) で表示した。

プロピオン酸の ALAD 活性に及ぼす影響を検討するため、酵素反応液に 0~10 mM のプロピオン酸を添加して PBG の生成速度を調べた。Fig. 1 に示すごとく、プロピオン酸の濃度増大にともない、PBG 生成速度は低下した。Dixon プロットした結果、プロピオン酸は ALAD の拮抗阻害剤として働くことが示唆

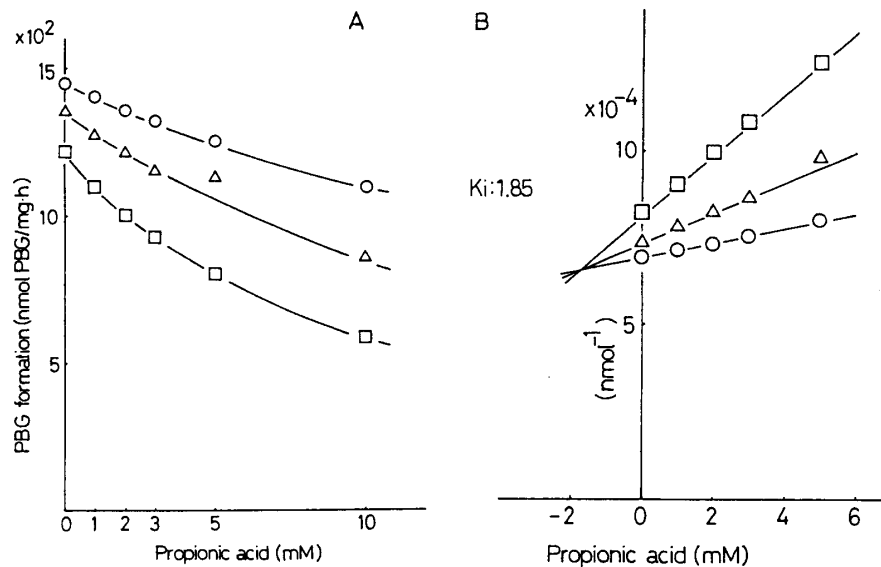


Fig. 1. Inhibition by propionic acid of ALA dehydratase activity of *R. sphaeroides* (A) and Dixon plots (B) for estimation of inhibition parameter of propionic acid ($K_{i,pro}$). ALA concentrations used were 6.6 (○), 3.3 (△) and 1.7 mM (□).

され、プロピオン酸に対する阻害定数 (K_i)_{pro} は 1.85 mM と計算された。

一方、本菌の ALAD 活性に対する LA の阻害定数 (K_i)_{LA} は前報において 0.48 mM と計算されている。¹⁰⁾ この値と比較するとプロピオン酸の阻害定数は大きいですが、VFA 培地中のプロピオン酸濃度を考慮すると、その影響を考慮する必要があると思われる。

VFA である酢酸の ALAD 活性に及ぼす影響も検討した。酢酸による阻害は弱く、10 mM の濃度でも 10% 程度の阻害が見られるだけであった。一方、酪酸についても酢酸の場合と同様、ごく弱い阻害が示されたが、VFA 培地に含まれる 0.5~1 g/l (8.35~16.7 mM) の範囲では ALAD 活性にはほとんど影響せず、阻害は現実的には無視できると考えられる。

次にこれら VFA の有する ALAD 阻害効果が ALA 蓄積にどの程度影響しているかを酵素反応速度論的に検討した。

ALA 生産においては、ALA 合成酵素 (ALAS) 活性が重要と考えられる。しかし、本菌では LA 添加によりヘムによる ALA 合成のフィードバック阻害が解除されており、そのために ALAS 活性の著しい増大が観察されている。⁵⁻⁸⁾ しかも LA, VFA は ALAS を阻害せずグリニンなどの前駆体も 30-60 mM と常に充分量培地に供給されているため、ALAS 活性の影響は大きくないと判断できる。いま、ALAD 活性が ALA 菌体外蓄積の律速段階になっていると仮定して以下の検討を行った。

ALAD による PBG 生成反応について、PBG の生成速度 v (nmol PBG/mg protein·h)、基質 ALA 濃度 S (mM)、阻害剤濃度 I_i (mM) とし、阻害剤濃度を 0 とした時の PBG 生成速度を v_0 とすると、拮抗阻害モデルより、¹²⁾

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1)$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{K_m[I_i]}{V_{\max}K_i[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2)$$

ここで、 V_{\max} は最大反応速度、 K_m は ALAD のミカエリス定数で *R. sphaeroides* では 0.406 mM である。

GM 培地で ALA 生産を行う場合は阻害剤は LA のみと考えられる。グルタミン酸やリンゴ酸 (GM 培地) は通常の濃度 (3-5 g/l) では ALAD に対する阻害は無視できるからである。しかし VFA 培地では、LA の他にプロピオン酸による阻害作用が無視できず、

Table 1. Estimation of ALA dehydratase (ALAD) activity in the presence of various concentrations of LA and propionic acid in the reaction mixture containing various concentrations of ALA.

Inhibitor	Relative ALAD activity* at ALA (mM)				
	0.1	1	2	4	7
None	100	100	100	100	100
LA (15 mM)	4	10	16	26	37
LA (30 mM)	2	5	9	15	23
Pro. (40 mM)	5	14	21	33	45
LA (15 mM)+Pro. (40 mM)	2	6	10	17	26
LA (30 mM)+Pro. (40 mM)	1	4	7	11	18

* Activities are expressed as relative values using Eq. (5), when $K_m=0.4$ mM, $K_{i\text{pro}}=1.85$ mM and $K_{i\text{LA}}=0.48$ mM.

LA, Levulinic acid; Pro., propionic acid.

PBG 生成速度 v_i は次式で表される。

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{K_m[I]_{\text{LA}}}{V_{\max}[K_i]_{\text{LA}}[S]} + \frac{K_m[I]_{\text{pro}}}{V_{\max}[K_i]_{\text{pro}}[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (3)$$

ここで添字の LA, pro はそれぞれレブリン酸、プロピオン酸を示す。さらに、 v_i と v_0 の比、いわゆる相対活性をとると、

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{1}{\frac{1}{\frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}} + \frac{K_m[I]_{\text{LA}}}{V_{\max}[K_i]_{\text{LA}}[S]} + \frac{K_m[I]_{\text{pro}}}{V_{\max}[K_i]_{\text{pro}}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}}} \quad (4)$$

整理して

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{1 + \frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[I]_{\text{LA}}}{[K_i]_{\text{LA}}} + \frac{[I]_{\text{pro}}}{[K_i]_{\text{pro}}} + \frac{[S]}{K_m}} \quad (5)$$

(5) 式を利用して複数の阻害剤が存在する場合と LA 単独の場合の PBG 生成速度を、阻害剤のまったく存在していない速度との比、いわゆる相対活性で計算し、%表示でまとめたのが Table 1 である。

PBG の生成速度は菌体内の ALA 濃度によって当然変化する。in vivo での菌体内の ALA 濃度を正確に測

定するのは容易ではない。そこで、ALAは膜透過性がよく、培地中のALA濃度と菌体内ALA濃度が同じであると仮定し、実際のALA生産によるALAの濃度、0.1-7 mMで各々相対活性の計算を行った。また、30 mMのLA逐次添加でALA生成が最大になることがわかっているが、このときLAは菌体に消費され、培養液中に30-15 mM存在している。^{6,7)}そこで、LA濃度として15と30 mMについて試算を行った。

Table 1から明らかなように、阻害剤としてLA単独の場合に比べ、プロピオン酸が3 g/l (40 mM)共存すると相対活性が常に40~50%ほど低下していた。つまり、プロピオン酸によりALAD活性が阻害され、LA単独の場合より強い阻害が示され、その程度はALA菌体外生産に充分寄与しうるレベルである。

Table 1の計算は*in vitro*での実験に基づき試算したもので、実際の*in vivo*の系でこの通りにプロピオン酸がALA菌体外蓄積に効果しているかは言及できない。しかしこれまでのVFA培地でのALA生産実験において、ALAの菌体外排出が活発なときは菌体のALAD活性はLA無添加の場合(505 nmol PBG/mg·h)の約20% (86-100 nmol PBG/mg·h)程度に低下していることが確認されており、培養経過に伴いLAが減少し阻害が添加前の活性の20%を上回るとALA排出の速度が低下することも認められている。⁷⁾Table 1の試算はこの前報⁷⁾の実験結果とよく対応している。

たとえば菌体濃度約2 g/lのGM培地を用いたALA生産系(グリシン60 mM添加, pH 7.0±0.1, 5 klux)では、LA 30 mMを24時間ごとに逐次添加しても、ALAの菌体外濃度は最大値4.6 mMで停止し、以後低下した(未発表データ)。一方、同じく菌体濃度2 g/lのVFA培地(ミカン外皮嫌気消化脱離液)でのALA生産系(グリシン60 mM添加, pH 7.0±0.1, 5 klux)では、ALAの最大蓄積量は16 mMまで達している。⁷⁾同じく、下水汚泥嫌気消化脱離液からのVFA培地を用いる系では、9 mMのALA蓄積が観察されている。⁹⁾Table 1の相対活性はこれらプロピオン酸を2~4 g/l含む培地がALAの菌体外蓄積に適していることを、間接的にはあるが示すものである。

本菌はメチルマロニル-CoA経路を有しており、プロピオン酸はメチルマロニル-CoAを経てコハク酸にすみやかに代謝され、ALAの前駆体となることをすでに報告しており、^{5,7)}このこともVFA培地におけるALAの高濃度生産に寄与していると考えられる。さらに、本研究によって、プロピオン酸によるALAD

阻害もALAの高濃度生産に寄与しうることが示唆された。

今後、ALAの高濃度生産を行うには、LAばかりではなく、プロピオン酸の逐次添加(流加培養)法の改良も必要と思われる。また、ALAD活性の低い変異株の取得も重要課題であり、^{8,13)}現在検討中である。

要 約

*Rhodobacter sphaeroides*において、プロピオン酸含有揮発性脂肪酸(VFA)培地で観察される著量のALA菌体外排出現象の原因を解明することを目的として、プロピオン酸のALA脱水酵素(ALAD)の阻害について検討した。プロピオン酸は、典型的なALAD阻害剤、レブリン酸(LA)と同様に、拮抗阻害を示したが、 K_i 値は1.85 mMとLAの0.48 mMと比較すると高かった。酢酸や酪酸の阻害作用は無視できる程度であった。拮抗阻害の酵素反応モデル式を用いて、LA単独の場合とLAとプロピオン酸が共存する場合のALADの相対活性を試算したところ、LA単独の場合に比べ、プロピオン酸が共存した場合、ALAD活性は40-50%低下した。プロピオン酸はALADの阻害剤としても作用し、ALAの菌体外排出に寄与していることが示唆され、VFA培地での高ALA生産の合理性が改めて確認された。

文 献

- 1) Rebeiz, C. A., Montazer-Zouhoor, A., Hoppen, H., Wu, S. M.: *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 390-401 (1984).
- 2) Rebeiz, C. A., Juvik, J. K., Rebeiz, C. C.: *Pesticide Biochem. Physiol.*, **30**, 11-27 (1988).
- 3) 堀田康司: 化学と工業, **46**, 936-938 (1993).
- 4) Sasaki, K., Ikeda, S., Nishizawa, Y., Hayashi, M.: *J. Ferment. Technol.*, **65**, 511-515 (1987).
- 5) Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y., Hayashi, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 727-731 (1990).
- 6) Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y., Hayashi, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 403-406 (1991).
- 7) Sasaki, K., Tanaka, T., Nishio, N., Nagai, S.: *Biotech. Lett.*, **15**, 859-864 (1993).
- 8) Tanaka, T., Watanabe, K., Hotta, Y., Lin, D., Sasaki, K., Nagai, S.: *Biotech. Lett.*, **13**, 589-594 (1991).
- 9) Tanaka, T., Sasaki, K., Noparantnarapon, N., Nishio, N.: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, in press.
- 10) 田中 徹, 柿園俊英, 西川誠司, 渡辺圭太郎, 佐々木健, 西尾尚道, 永井史郎: 生物工学, **73**,

- 13-19 (1995).
- 11) Satoh, K., Ishida, K., Kuno, T., Mizuno, A., Shimizu, S.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **27**, 439-447 (1981).
- 12) 合葉修一, A. ハンフリー, N. ミリス: 生物化学工学, p. 103-110, 東京大学出版会, 東京 (1976).
- 13) 田中 徹, 渡辺圭太郎, 西川誠司, 堀田康司, 佐々木健, 室岡義勝, 永井史郎: 生物工学, **72**, 461-467 (1994).