

II-360 藍藻の臭気物質生成における律速段階に関する研究

京都大学 正会員 住友 恒
 ○ 京都大学 正会員 伊藤 禎彦

1. はじめに: 水域の富栄養化に伴う臭気の発生が水道の重要な問題となつてすでに久しい。本研究は、わが国における臭気原因生物のうちで最も一般的な、藍藻 *Phormidium tenue* に焦点をあて、最も基本となる臭気物質の生成メカニズムについて検討を加えるものである。

2. 2-Methylisoborneol (2MIBと略記) 生合成経路と律速段階の推定: 臭気物質 2MIB, Geosmin はともに二次代謝産物のうちのテルペノイドに属する物質であり、アセチル CoA を分岐点とするメバロン酸経路から生合成されるものと一般に認められている。Fig. 1 は、アセチル CoA から 2MIB に至る経路を酵素反応段階ごとに推定をも含めて記述したものである⁽¹⁾。図中点線で示されているごとく、いまだ確定することのできない部分もある。この推定経路における最大の特徴は、2MIB 前駆体としてボルネオールを設定していることにある。⁽²⁾

さて、ステロール生合成の律速段階は、Fig. 1 の 3 番目の酵素 Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase と略記) によって触媒される HMG-CoA のメバロン酸への還元反応であることが医学分野で 1970 年前後に突きとめられている⁽³⁾。ステロール代謝もメバロン酸経路を通して行われ、Fig. 1 においては GPP までは全く同一の経路をたどる。したがって、最も単純に考えれば、少なくとも 2MIB 生合成の律速酵素が HMG-CoA reductase であると予想をつけることに不合理はないはずである。

3. 培養日数と 2MIB 生合成活性: Fig. 2, 3 は、*Phormidium tenue* を培養して得られた結果であるが、両図から、特に対数増殖期後期から定常期にかけて 2MIB 生合成が活発であることを指摘しうる。上記類推とあわせて、この 2MIB 生合成活性の増大は HMG-CoA reductase 活性の増大に起因するのではないかと推論される。

4. 実験的検討: 上記推論を検証するために以下の実験を行う。実験の目的から、HMG-CoA reductase 活性の変化とその他の酵素群の変化とを比較しなければならないが、現状では困難であるので、HMG-CoA reductase とつぎの酵素段階である Mevalonate kinase の活性とを比較することにした。

4. 1 培養日数と酵素活性の変化: <実験方法> ①CT 培

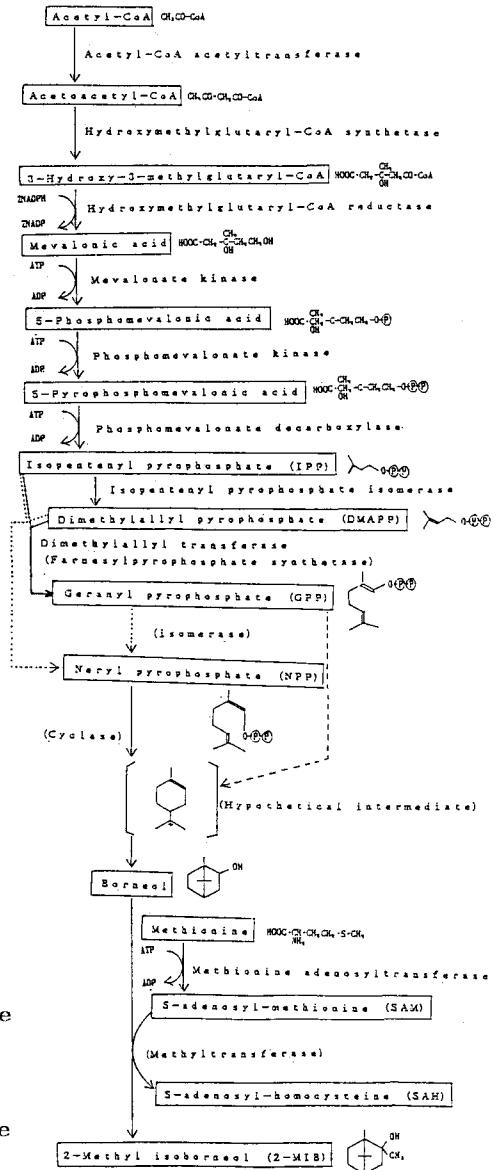


Fig. 1 2-MIB 生合成経路

地を用いて、温度20°C、照度2500luxの明暗交替条件にて振とう培養し、各培養令に達した *Phormidium tenue* を0.45μmメンブランフィルターでろ過、洗浄 ②緩衝液中に懸濁 ③氷冷しながら断続的に超音波破壊 出力は200W、照射時間の合計は20分 ④添加基質と等モル量の共役因子添加。ブランクには添加せず ⑤基質添加。反応液の全量は5.0ml ⑥25°C、暗所にてゆるやかに振とうしながら反応 ⑦6時間後、10N KOHをpH 12以上になるように添加して反応を停止 ⑧反応液中のメバロン酸の生成量または減少量をHPLC分析 それぞれの酵素反応で使用した基質、緩衝液、共役因子の相違をTable 1に、粗酵素濃度及び反応時pHをTable 2に示す。

<結果> 結果をFig. 4, 5に示す。Fig. 4より、HMG-CoA reductase活性は、対数増殖期にあるとみられる培養令のものでは低い、その後増大し、定常期には高い活性をもつようになることがわかる。この傾向はFig. 3とよく一致している。一方Mevalonate kinase活性については明瞭な関係は認められない。

4.2 2MIBによるフィードバック制御： つぎに、酵素反応の律速段階において特徴的にみられるフィードバック制御について検討する。培養令9日目に達した *Phormidium tenue* 培養液に市販の2MIBを所定の濃度になるように添加し、さらに24時間培養したものを供試 *Phormidium tenue* とした。以下の操作は前項と同一である。結果をFig. 6, 7に示す。両図より、HMG-CoA reductase活性が2MIBによって阻害されている様子がうかがえ、一方Mevalonate kinaseに対しては2MIBがその活性を強く阻害することはないように推察される。

5. 結論： *Phormidium tenue* は、対数増殖期後期から定常期にかけて2MIB生合成活性を増大させるが、その原因はHMG-CoA reductase活性の増大にあることがわかった。その結果この酵素反応段階が2MIB生合成における律速段階である可能性が極めて高いと判断された。また本酵素が2MIBによるフィードバック制御を受けることから、この段階が2MIB生合成の主要な代謝調節段階であることが推察された。

文献 (1) 丸尾, 田宮監修, 酵素ハンドブック, 朝倉書店(1982) (2) 伊藤禎彦, 藍藻の臭気物質合成に関する生態学的及び酵素学的研究, 京都大学修士論文(1986) (3) 丹沢, 蛋白質 核酸 酵素, Vol. 26, No. 6 (1981)

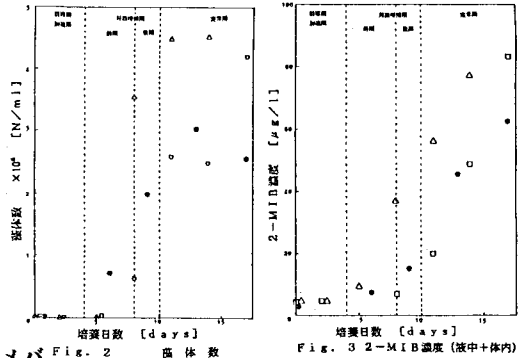


Table 1 基質、緩衝液、共役因子の相違

	HMG-CoA reductase	Mevalonate kinase
基質	HMG-CoA	メバロン酸
緩衝液	pH6.9リン酸緩衝液 0.01N 2-メルカプトエタノール 0.02M EDTA	pH6.9リン酸緩衝液 0.01N 2-メルカプトエタノール
共役因子	NADPH	ATP・Mg ²⁺

Table 2 粗酵素濃度及び反応時pH

	HMG-CoA reductase	Mevalonate kinase
反応液中濃度	3.0×10 ⁷ N/ml	2.4×10 ⁷ N/ml
初期pH	6.91±0.01	—
終了時pH	6.82±0.02	6.69±0.02

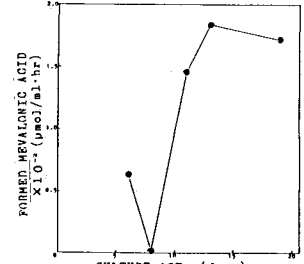


Fig. 4 Change of HMG-CoA reductase activity

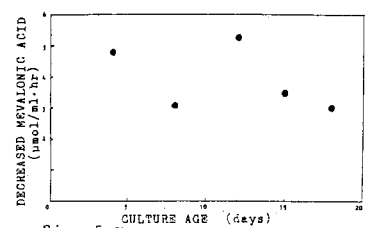


Fig. 5 Change of mevalonate kinase activity

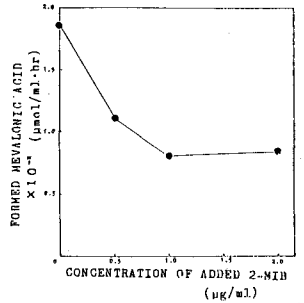


Fig. 6 Inhibition of HMG-CoA reductase activity

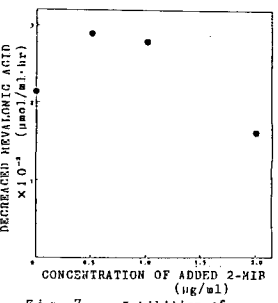


Fig. 7 Inhibition of Mevalonate kinase activity