

II-602

かび臭產生藍藻類のゲラニルニリン酸(GPP)合成酵素活性

東北学院大学大学院 学生員 ○及川 栄作
同 工学部 正会員 石橋 良信

1. はじめに

上水においておいしい水供給の観点からかび臭問題の解決は、急を要する大きな課題になっている。かび臭物質は、主に藍藻のある種が湖沼の富栄養化によって異常増殖し2次代謝物質として产生する2-メチルイソバーベン(2-MIB)、ジエスミンとともに「イソバーベン」化合物が知られている。かび臭問題解決のためには、これらのかび臭物質を产生している藍藻の生理、生態、生合成メカニズムを解明しなければならない。2-MIBは、生物の主要な生合成経路の一つである図-1のメバロン酸経路によって合成される。詳細な合成に関与している酵素の性質や構造は明かにされていないが、複数の酵素の関与により段階を経て合成されるものと推定されている。本研究の着目している2-MIB合成の最終段階には、まず、イソバーベントランスフェラーゼによってゲラニルニリン酸(GPP)が合成される。次に、サイクレーゼによって環化されボルネオニリン酸または、これの異性体イソボルネオニリン酸ができる。これが内在性のフオスファターゼによって加水分解されそれぞれボルネオール、イソボルネオールという前駆物質ができ、さらにこの前駆物質は、メチルトランスフェラーゼによってメチル基が付加され2-MIBが生成する。本研究は、2-MIBの生合成に関与している酵素の性質を知るために2-MIBを产生している藍藻 *Phormidium* sp.のゲラニルニリン酸(GPP)合成酵素の活性を調べる研究を行った。

2. 研究方法

かび臭2-MIB产生藍藻 *Phormidium* sp.をCT培地で25°C、1500lux、光照射下で2~4週間静置培養した。培養液は、4°C、6000rpm、10分遠心して集菌し、菌体を次の操作まで-85°C凍結保存した。菌体は、菌体破碎用緩衝液(0.1M β-メルカプトイターノ、0.1M MgCl₂、0.1M Tris-HCl pH6.8)に懸濁し、超音波破碎機にかけて菌体を破壊した。その後、4°C、6000rpm、20分遠心し、さらにこの上清を引き続き4°C、10万g、1時間超遠心した。この時のペレットと上清を下記に示す酵素アッセイに用いた。また、10万g上清をさらに、硫酸アンモニウム分画、0~30%、30~50%、50~70%、70%以上に分画しそれぞれの分画ごとに酵素アッセイを行った。GPP酵素アッセイは、[1-¹⁴C]IPP(isopentenyl pyrophosphate)1Ci/mol、25μmol、DMAPP(dimethylallyl pyrophosphate)25μmol、Tris-HCl(pH6.8)10μmol、MgCl₂ 10μmol、タンパク質50μg、H₂Oで1mlに合わせた。栓付き試験管に反応液を入れ30°C、2時間インキュベーションした。なお、イソバーベントランスフェラーゼに必須のコファクターである2価の金属イオンをいろいろ換えた場合のGPP合成酵素活性についても調べた。その後、37°C、一晩アルカリ fosfataーゼ反応を行った。翌日、3mlのジエチルエーテルで抽出、さらにH₂Oで洗った。ジエチルエーテル層の一部を液体シンチレーションカウンターにより酵素活性を測定し、残りを約100μlになるまで窒素ガスで飛ばし、薄

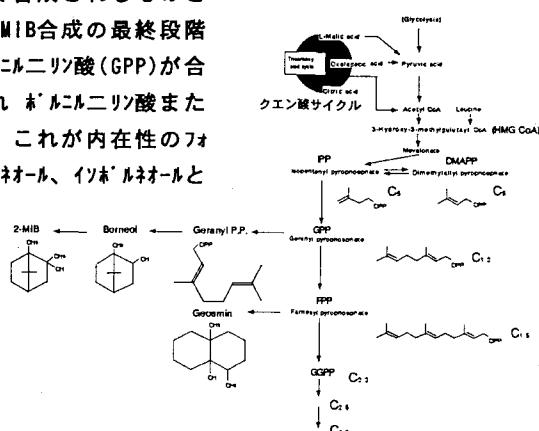


図-1 かび臭物質产生メバロン酸経路

層クロマトグラフィー(TLC)順相プレートにプロットして展開溶液ヘキサン:酢酸エチル(4:1,v/v)を用いて展開してTLC分析を行った。その後、プレートを風乾し、イメージングプレートに一晩露光しハイオイメージングアナライザ-BS1000またはBAS2000(富士写真フィルム)により画像解析した。

3. 研究結果

- 1)図-2に示されるように本GPP合成酵素酵素は、10万g上清に高い活性が検出され、今まで知られているGPP合成酵素と同様細胞質に存在する酵素であることが示された。
- 2)本酵素は、硫酸アノニウム分画により0~30%の分画に分画された。
- 3)本酵素活性は、培養したバッジによって異なったり透析チューブを用いた透析や、脱塩カラム、DEAEイオン交換カラムをかけた後に、活性が著しく減少するなど非常に不安定なもので精製が困難であることが示された。
- 4)図-3に示されるように本酵素は、2価の金属イオンMgCl₂、MnCl₂、CoCl₂を加えてアセイした時に高い酵素活性が示された。

4. おわりに

藍藻類は、種の多様性が知られる中で形態的な分類法によってのみ分類されているのが現状である。形態的分類により同種とされながら奥產生種、と非產生種が同定されているケースも生じている。本研究室では、最近、これらの種の16SrRNAの塩基配列の比較を行い、產生種と非產生種で異なる配列が多く奥產生種間どうしより相同性が低いことを明らかにしている。今後、奥產生種と非產生種のGPP合成酵素活性の違いについても研究を試みたいと考えている。

本研究を遂行するにあたり神戸市水道局、伊藤裕之氏より菌株を譲与を受けた。また、東北大工学部教授西野徳三博士、大沼信一博士には、多大なる御助言、御指導や実験施設を使用させていただいたことを記して感謝する。

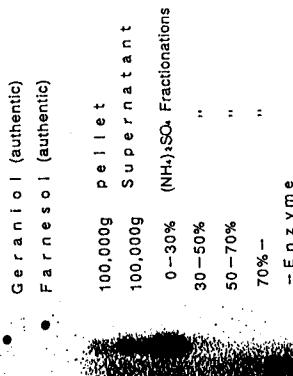


図-2 GPP合成酵素の分画

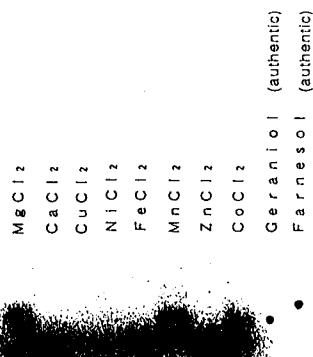


図-3 GPP合成酵素における異なる2価金属イオンの影響