

II-98

かび臭産性藍藻類のイソプレノイド合成酵素活性

東北学院大学大学院 学生員 ○及川 栄作
同 大沼 孝宏
同 工学部 正会員 石橋 良信

1. 研究目的

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次代謝物質として産生する2-メチルイソボルネオール(2-MIB)、ジエチルシシンのともにイソプレノイド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産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、イソプレニルトランスフェラーゼによってゲラニル二リン酸(GPP)が合成される。次に、サイクラーゼによって環化されボルネル二リン酸または、これの異性体 イソボルネル二リン酸ができる。これが内在性のフォ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を産生している藍藻 *Phormidium* sp. のゲラニル二リン酸(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産生藍藻 *Phormidium* sp. をCT培地で25℃、1500lux、光照射下で2～4週間静置培養した。培養液は、4℃、6000rpm、10分遠心して集菌し、菌体を次の操作まで-85℃凍結保存した。菌体は、菌体破砕用緩衝液(0.1M β -メルカプトエタノール、0.1M $MgCl_2$ 、0.1M Tris-HCl(pH6.8))に懸濁し、超音波破砕機にかけて菌体を破壊した。その後、4℃、6000rpm、20分遠心し、さらにこの上清を引き続き4℃、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、 $[1-^{14}C]$ IPP(isopentenyl pyrophosphate)1Ci/mol、25 μ mol、DMAPP(dimethylallyl pyrophosphate)25 μ mol、Tris-HCl(pH6.8)10 μ mol、 $MgCl_2$ 10 μ mol、タンパク質50 μ g、 H_2O で1mlに合わせた。栓付き試験管に反応液を入れ30℃、2時間インキュベートした。なお、イソプレニル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℃、一晩アルカリフォスファターゼ反応を行った。翌日、3mlのジエチルエーテルで抽出、さらに H_2O 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100 μ lになるまで窒素ガスで飛ばし、薄層クロマトグラフィー(TLC)順相プレートにスポットして展開溶液ヘキサ: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スイメージングアナライザー-BAS 1000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-1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内に存在する酵素であることが示された。
- 2) 本酵素は、硫酸アモニウム分画により0~30%の分画に分画された。
- 3) 本酵素活性は、培養したバッチ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-2に示されるように本酵素は、2価の金属イオン $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $CoCl_2$ を加えてアッセイした時に高い酵素活性が示された。

4. おわりに

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、東北大学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。記して感謝する。

Geraniol
Farnesol
100,000g pellet
100,000g Supernatant
0-30% $(NH_4)_2SO_4$
30-50% Fractionations
50-70% "
70% "
- Enzyme



図-1 GPP合成酵素の分画

$MgCl_2$
 $CaCl_2$
 $CuCl_2$
 $ZnCl_2$
 $FeCl_2$
 $MnCl_2$
 $ZnCl_2$
 $CoCl_2$
Geraniol
Farnesol



図-2 GPP合成酵素における異なる2価イオンの影響