アセトン還元してイソプロパノールを 生成する細菌に就て (第6報)*

Lactobacillus brevis var. *hofuensis* のイソプロパノール

脱水素酵素と酒精脱水素酵素について

星野一雄, 宇田川清 (協和醸酵工業株式会社)

昭和34年12月21日受理

著者は前報⁽¹⁾に於て *Lactobacillus brevis* var. *hofuensis* のもつイソプロパノール, アセトン酸化還元反応とエタノール, アセトアルデヒド酸化還元反応に関する検討を行い, 両反応に関与する酵素の異同に論及した. 即ち, 両系の酸化及び還元反応の速度及び阻害剤に関する実験の結果は明らかに両酵素の別種である事を示唆するものである, その結果としてイソプロパノール, アセトン等の反応に関与する酵素に対し isopropanol dehydrogenase なる新酵素名を付与した.

従来酵素反応としてイソプロパノール, アセトン間の反応を記載するものは Barron⁽²⁾, Racker⁽³⁾ の報ずる yeast alcohol dehydrogenase 及び最近 Burton⁽⁴⁾ が *A. aerogenes* の glycerol dehydrogenase を報告しているが, 何れも side reaction としてのもので基質特異性低く前者ではエタノールの 6.6%, 後者では glycerol の 17.0% とされているのみである. 又 alcohol dehydrogenase は Wurff⁽⁵⁾, Racken⁽⁶⁾, Theorell⁽⁷⁾ によって酵母, 肝臓から結晶化されているが, 細菌性のものは DeMoss⁽⁸⁾ による乳酸菌のものが一部純化されているに過ぎない.

本報においては本菌の isopropanal dehydrogenase に関する知見, 更に alcohol dehydrogenase と別種である裏付けを得る為, isopropanol dehydrogenase と alcohol dehydrogenase 両酵素の純化精製を試み, 純化に伴う基質特異性の推移及び difference spectrum 等について実験と検討を行った.

実験材料及び方法

前報⁽⁹⁾と同様であるが, 未記載のものについては実験項目中に記述した.

単位: 第3報及び第5報に述べた如く 2,6-ジクロールフェノールインドフェノール 1.54×10^{-10} M を1分間に還元する活力をもって 1 unit とした.

実験結果

酵素精製の概略は第1表にまとめた. 本操作において酵素安定の為 isopropanol dehydrogenase については Na_2MoO_4 , As_2O_3 , alcohol dehydrogenase には cysteine を添加した. 前者に関しては本報第3報に記述, 又後者については Racker⁽⁶⁾ の yeast alcohol dehydrogenase 分離操作を参考とした.

酵素の精製比率は isopropanol dehydrogenase で5倍, alcohol dehydrogenase では40倍である.

基質特異性の推移: 既述の如く本菌は多数の基質を脱水素する性能をもつものであるが, 純化過程における基質特異性の推移は酵素の性質を決定する重要な要素となる. 本実験において isopropanol dehydrogenase 純化液と原抽出液について行なった結果を第2表に示した. 特異性は 2,6-ジクロールフェノールインドフェノールの脱色に要する時間を以て示した. イソプロパノールと共に活性を増加するものは 1,2-propyleneglycol, secondary butanol であって, isobutanol, 1,3-butyleneglycol は明らかに減少した. またエタノール, ブタノール, グリセロールは原抽出液で既に活性微弱であってイソプロパノール脱水素酵素との特異性は低いものと考えられる.

スペクトラム: 本菌の isopropanal dehydrogenase が flavoprotein と結合する可能性については数次の実験によって例証した. 同酵素は精製と共に黄色を増し dehydrogenase と flavoprotein が同時に集積することは略々疑無い事実と考えられる. flavoprotein は特異的な difference spectrum を示し, Straub⁽¹⁰⁾, Hogness⁽¹¹⁾ の報ずるものは 370 m μ 及び 450 m μ に peak をもつと言われる. 然しながら酵素源により変動することが報告

* Studies on the Organism Producing Isopropanol from Acetone. Part IV. Isopropanol Dehydrogenase and Alcohol Dehydrogenase of *Lactobacillus brevis* var. *hofuensis*.

By Kazuo HOSHINO (Kyowa Fermentation Industry Co., Ltd.)

第 1 表 酵素精製過程

L. brevis var. *hofuensis* 2 号培地 36 時間培養液 (26 l)

第 2 表 基質特異性の推移

基 質	1	2
ethanol	60'	120'
propanol	4'50"	12'
isopropanol	5'25"	5'
butanol	60'	120'
isobutanol	8'10"	120'
sec-butanol	4'30"	6'30"
1,2-propyleneglycol	9'45"	7' 6"
1,2-butyleneglycol	11'	120'
1,4-butyleneglycol	60'	120'
2,3-butyleneglycol	4'20"	10'40"
glycerol	60'	120'

1: 抽出液 2: 純化液 4 倍稀釈

され *Vermor*⁽¹²⁾ によって純化された reductase は 355 m μ と 440 m μ に peak を見たと記載されている。本酵素の酸化型, 還元型及び difference spectrum は第 1 図に示す如く 380 m μ 及び 445 m μ 近傍に difference の peak を認めた。測定法は, Theorell⁽¹³⁾ の cytochrome c 酸化還元法を踏襲し, 酸化剤に ferricyanide, 還元剤には dithionite を使用した。

考

察

アセトンを特異的に還元したイソプロパノールを脱水素するヘテロ型乳酸菌 *L. brevis* var. *hofuensis* が alcohol dehydrogenase とは別種の isopropanol dehydrogenase をもつと考えられることは cell 及び cell-free extract による諸実験によって証明したが, 本実験における isopropanol dehydrogenase と alcohol dehydro-

log I₀/I

第 1 図 イソプロパノール脱水素酵素スペクトラム

genase の分離精製によって更に具体性を得た。

従来イソプロパノールを主基質とする酵素の報告は無く, yeast alcohol dehydrogenase では specificity としてエタノールの6.6%, 又 Burton⁽⁴⁾ の研究による *A. aerogenes* の glycerol dehydrogenase ではグリセロールの17%と報告されているに過ぎない。本菌の isopropanol dehydrogenase は5倍の濃縮に止ったが, 少く共エタノール, ブタノール, グリセロールとは基質特異性の推移を異にすることが認められ, この点からも既報の諸酵素とは別種なりと断定することが可能である。

本酵素の純化率が低いことは多分にその不安定性に基くものと考えられるが, 一面関連反応が多いことによるものと思われる。脱水素系と flavoprotein との結合が強いことは既にしばしば述べたが, 反応としては更に磷酸獲得反応等に link することが考えられる。本菌のイソプロパノール酸化が磷酸獲得に関連することは推測の域を脱し得まいが, 脱水素反応の buffer として磷酸塩が最も好適と認められて, 安定した結果が得られることはしばしば引用した。Pinchot⁽¹⁴⁾ は *E. coli* の alcohol dehydrogenase が phosphate metabolism に couple することを示唆している。

Clark⁽¹⁵⁾, Kaplan⁽¹⁶⁾ は酸化還元系の電位を下げる因子として補酵素結合の重要性を指摘した。Bonnichsen⁽¹⁷⁾ は liver alcohol dehydrogenase が DPN と結合して 0.06 volt 電位の低下を来すことを報じ, Green⁽¹⁸⁾ は xanthine oxidase が flavoprotein との結合によって 0.25 volt 電位が低下することを明らかにした。本菌のイソプロパノール酸化の電位が -0.3 volt 或はそれ以下と推定される事実は第3報において論じた処であるが, この数値は Wurmser⁽¹⁹⁾ が酵母について測定した数値 -0.261 volt より遙に低く, ここに flavoprotein が重要な役割を果たすと考えられる理由がある。Barron は yeast alcohol dehydrogenase による各種の alcohol の酸化に関する報文において isopropanol specificity はエタノールの 6.6% に過ぎないと結論した。この事実は酵母においてはイソプロパノールは寧ろ酸化され難いことを示し, yeast alcohol dehydrogenase と flavoprotein の結びきは弱いものと解され, 上述の Wurmser による酵母のイソプロパノール酸化の電位かつ本菌の場合より positive であることと考え合わせ興味深い事実である。

本酵素精製過程において活性と黄色とは平行して増加が観察された。加之精製液について flavoprotein 特有の difference spectrum が見られることは両酵素の連関が強いことを示すものであって, 殊に酸化反応において flavoprotein が重要な役割を果たすことを示唆する。即ち flavoprotein と結合する結果脱水素系の電位は下降し, 酸化速度を増加するものと考えられる。本実験において flavoprotein を随伴する isopropanol dehydrogenase を純化し得たことによりこの二酵素が特異な結付をもって isopropanol oxidase system なる酸化系を形成し, 酸化反応に関与するものと推測される。

要 約

- (1) *Lactobacillus brevis* var. *hofuensis* を音波又は SiO_2 磨砕で処理し, 前者より alcohol dehydrogenase, 後者より isopropanol dehydrogenase を純化した。
- (2) 精製純化率は alcohol dehydrogenase 40 倍, isopropanol dehydrogenase 5 倍である。
- (3) Isopropanol dehydrogenase 精製過程における基質特異性推移を検討した。
- (4) Isopropanol dehydrogenase のスペクトラムを測定し flavoprotein 特有の difference spectrum を認めた。
- (5) 本菌の flavoprotein は 380 $\text{m}\mu$ 及び 445 $\text{m}\mu$ に peak を示す。

本研究に当り終始御懇切な御指導を頂きました応用微生物研究所長朝井教授, 農学部山田教授, 有馬教授に深甚なる感謝を捧げます。又実験に種々御教授を頂きました応用微生物第一研究部北原教授, 第五研究部丸尾教授, 第一研究部福井助教授に厚く御礼申し上げます。又研究と発表に便宜を与えられました協和醸酵工業株式会社社長加藤升三郎氏, 副社長桑田 猛氏, 専務渡辺 博氏に感謝申し上げます。

(本報告は昭和34年11月1日, 宇都宮市における日本農芸化学会関東支部大会講演会において講演した。)

(1) 星野一雄: 本誌, 34, 608 (1960)。

(2) E. S. G. Barron, S. Levine: *Acta Biochem.*, 41, 175 (1952)。

(3) E. Racker: *Physiol. Revs.*, 35, 1 (1955)。

(4) R. M. Burton: *Meth. Enz.*, 1, 397 (1955)。

(5) J. Wulff, F. Negelein: *Biochem. Z.*, 293,

- 351 (1950).
- (6) E. Racker : *J. Biol. Chem.*, 184, 313 (1950).
- (7) H. Theorell, B. Chance : *Acta Chem. Scand.*, 5, 1127 (1951).
- (8) R. D. DeMoss : *J. Bact.*, 68, 252 (1954).
- (9) 星野一雄, 宇田川清, 渡辺賢三 : 本誌, 34, 391 (1960).
- (10) F. B. Straub : *Biochem. J.*, 33, 787 (1939).
- (11) T. R. Hogness, E. Haas, B. L. Horecker : *J. Biol. Chem.*, 136, 747 (1940).
- (12) L. P. Vernon, N. K. Starker, H. R. Mahler : *J. Biol. Chem.*, 199, 585 (1952).
- (13) H. Theorell : *Biochem. Z.*, 285, 207 (1936).
- (14) G. B. Pinchot, E. Racker : Phosphorous Metabolism, 1, 366 (1955).
- (15) W. M. Clark : *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 7, 18 (1950).
- (16) N. O. Kaplan, M. D. Kamen, W. M. Clark : *Bact. Revs.*, 19, 234 (1955).
- (17) R. Bannichsen, H. Theorell : *Acta Chem. Scand.*, 5, 1105 (1951).
- (18) D. E. Green, B. Mackler, H. R. Mahler : *J. Biol. Chem.*, 210, 149 (1952).
- (19) R. Wurmser, S. Filitti-Wurmser : *J. Chem. Phys.*, 33, 577 (1936).