[農化 第 36 卷, 第 2 号, p.177~180, 1962]

アラニン発酵の機構に関する研究 (第 2 報)*

糖代謝と DL-アラニン蓄積について

北井淳夫, 刀根 弘, 佐々木浩, 宮地 昇 (三楽酒造株式会社中央研究所)

昭和 36 年 7 月 25 日 受 理

緒 言

前報⁽¹⁾において DL-アラニン生産菌 *Corynebacterium gelatinosum* No. 7183 菌⁽²⁾における DL-アラニン生成の path-way を次の如く推定した。

これらの事実より DL-アラニン蓄積の現象は、ピルビン酸、アラニン間のみの反応として考慮すべきではなく、α-ケトグルタル酸、L-グルタミン酸をも加えて 4 者の関係において考察すべきであることを推論した。

現在までにアミノ酸発酵の機作の面ではかなり明らかになっているものがあるが、蓄積の原因についての考察は少い。植村⁽³⁾は広くアミノ酸代謝の観点より、i) アミノ酸の吸収摂取、ii) アミノ酸の生合成、iii) 分解、IV) アミノ酸動員系、V) アミノ酸の分泌等の多面的考察を述べており、なかんづく細胞自己調節作用の重要性を提唱している。また鮫島⁽⁴⁾は L-アラニン発酵において該菌のトランスアミナーゼ活性の低いこと、ピルビン酸消費速度のアンバランスによる over flow 現象であろうと推論している。

著者らは本菌における糖代謝活性と DL-アラニン蓄積現象との関連について若干の実験を行い、前報において述べた結果を総合して、異常量の DL-アラニン蓄積の原因について考察を加えた。

実 験 方 法

- (i) 各種基質酸化能の測定： 常法によるワールブルグ検圧計を用いた。
- (ii) 菌生育度： 培養液一定量を 20 倍に稀釈し、日立製 Beckmann 分光光度計により 625 mμ, -log T 値をもって示した。
- (iii) その他： 前報に準じた。

実 験 結 果

1. 通気量と窒素濃度の影響 尾崎⁽²⁾の報告によれば、通気量の変化で DL-アラニン蓄積量は著しく左右される。そこで通気量、すなわちフラスコ中の液量を変化させ、これに窒素濃度を組合せた区、すなわちアラニン生成最適条件と然らざる培養条件とを設定し各区の経過を比較した。その結果は第 1 図の通りである。

菌の生育度には著しい差は認められないにもかかわらず、低窒素濃度区では残糖が極めて多い。また同時に行なったペーパークロマトグラフィーでは有機酸として、いずれの場合においても α-ケトグルタル酸、ピルビン酸以外には検出し得なかったもので、この 2 つにつき定量を行なった。この結果、第 1 図に示したように、通気量の多い方で α-ケトグルタル酸が集積するが、適量の通気により、培養初期に著量のピルビン酸が認められた。これら貯溜ケト酸類は高窒素濃度の存在によりアミノ酸に変化しているが、糖消費の終了と共にその増加は停止

* Studies on the Mechanism of Alanine Fermentation. Part II. Relation between Sugar Metabolism and DL-Alanine Accumulation.

By Atsuo KITAI, Hiroshi TONE, Kô SASAKI and Noboru MIYACHI (The Central Research Laboratory of Sanraku Distillers Co., Inc.)

第 1 表 培養時通気量と基質酸化能

基 質	QO ₂	
	E-20*	E-80*
グ ル コ ー ス	25.3 μ l	13.0 μ l
酢 酸	13.6	5.5
ビ ル ビ ン 酸	17.3	4.1
イ ソ ク エ ン 酸	4.3	2.6
α -ケトグルタル酸	2.8	14.9
コ ハ ク 酸	22.7	22.2
リ ン ゴ 酸	24.1	23.5
フ マ ル 酸	—	26.7

反応条件: ワールブルグ検圧法, 主室; 乾燥菌体懸濁液 1.0 ml (10 mg) M/10 燐酸緩衝液, pH 7.2, 1.0 ml. 側室: 基質 M/10 溶液 0.2 ml (20 μ M). 副室: 40% KOH 0.3 ml, 30° 気相.

* 500 ml 坂口コルペン中 20 または 80 ml 液量で培養した菌体を示す.

第 1 図 培養条件と生成物の関係

I 糖 II 菌の生育 III グルタミン酸 IV α -ケトグルタル酸
V ピルビン酸

第 2 図 アラニン培地における培養

基本培地: DL-アラニン 2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, ビオチン 2 γ /l, ビリドキサール燐酸 100 γ /l, Fe^{++} , Mn^{++} 2 p.p.m.

これらの事実, 前記の培養実験の結果とよく一致している。

3. DL-アラニンを炭素源とする培養試験 発酵末期に糖消費が完了すると, 生産物たる DL-アラニンが減少することは先に述べた。そこで本菌の糖代謝と DL-アラニン生成との関連を推定する一つの方法として, DL-

し, 直ちに消費逆行が起っている。

2. 培養時の通気量と基質酸化能の関係 500 ml 坂口コルペン中 20 ml の液量で培養すると, DL-アラニン生成量は著しく減少し, 対糖 10% 以下となるが⁽²⁾, 特に L-グルタミン酸が増加することはない。こゝようにアラニン発酵を順調に行い得ない状態における細胞と, アラニン生産条件下より収穫した細胞の種々な基質に対する酸化能を測定した。

第 1 表に示した結果について見ると, 500 ml 坂口コルペン中培養液 20 ml で培養の菌体は, 一般に糖代謝活性の高いことを示しているが, コハク酸, フマル酸, リンゴ酸等の dicarboxylic acids の QO₂ は培養条件とは無関係に一定である。

ピルビン酸, α -ケトグルタル酸酸化能については, 培養の条件により全く対称的な値を示し, DL-アラニン生産条件下で培養した菌体ではピルビン酸酸化能が著しく低い, 然らざる培養条件下より得た菌体においては, 該酸化能は高く, 逆に α -ケトグルタル酸酸化能に著しい低下が認められた。

第 3 図 各種アミノ酸酸化能

A: L-グルタミン酸, B: L-アラニン, L-チロシン,
L-ヒスチジン, DL-フェニルアラニン, D-アラニン
C: L-ロイシン, L-メチオニン, D: D-フェニルアラニン,
D-メチオニン, D-グルタミン酸
反応条件: 基質 10 μM, 燐酸緩衝液 200 μM, 細胞懸濁液
(乾燥量 15 mg), 30% KOH 0.2 ml, 総容量 1.9 ml, 30° 気相空気。

アラニンを唯一の炭素源とし, これに無機塩等を加えた培地で本菌の増殖を試験した。

培地組成, 培養条件及び結果を第 2 図に示した。本菌は DL-アラニンとコーンステープリカー 0.1% の存在で旺盛な生育を示し, この際生育に対応した急速な DL-アラニン消費が起った。この事實は比較的容易にこの基質が糖代謝系に導入され, 同化, 代謝されることを示すものと考えられる。

4. アミノ酸に対する酸化能 アラニンを消費することは前実験の結果から明らかであるが, 他のアミノ酸と比してアラニン代謝はどのような特殊性をもっているかを知る目的で, 各種アミノ酸酸化能を測定した。

第 3 図に示した如く, L-グルタミン酸に対しては極めて強い酸化能を認めたが, 他の数種のアミノ酸に対しては殆んど同等の酸化能を示した。また D-型にはアラニン以外, 活性を認めなかった。

考 察

以上, 前報⁽¹⁾の結果, 及び本報の結果より考察すれば, 本菌における DL-アラニン蓄積現象は糖代謝系路において窒素代謝調節機構と密接な関連をもった By-Path 反応であろうと考えられる。

すなわち, 本菌において DL-アラニンを発酵的に生産する条件下では, 糖代謝反応は完全酸化に至らず,

の如き一連の平衡関係によって支配され, 酸化能の低いピルビン酸, α -ケトグルタル酸を蓄積して, 糖消費は不完結の状態で終るものとする。ここに過剰の窒素源が存在すると, これをグルタミン酸脱水素酵素により L-グルタミン酸にとりこみ, さらにトランスアミナーゼにより L-アラニンに変化せしめ, 糖代謝系に By-Path が生じる。その結果見かけ上糖消費が促進される (第 1 図)。

これは DL-アラニンを炭素源として本菌が増殖し得ることも上記の推論を支持するものであろう。このような観点からいえば, 本菌における DL-アラニンは発酵の最終生産物ではなく, 一時的な貯溜物質と考えられる。

次に α -ケトグルタル酸, ピルビン酸, DL-アラニン, L-グルタミン酸の 4 物質のみに観点を絞る。静的な場, すなわち代謝の流れを考慮せず, 上記の推論より平衡関係について論ずれば次の如き平衡式が誘導される。

すなわち, L-グルタミン酸生成反応は,

トランスアミナーゼによる反応は,

の如く書ける。さらに (1)+(2)

となり, 見かけ上 L-アラニンは, ピルビン酸の直接還元アミノ化反応によって生成するが如くに表わされる。各反応の平衡恒数は,

$$K_1 = \frac{[\text{L-G}][\text{H}_2\text{O}][\text{TPN}]^n}{[\alpha\text{-KG}][\text{NH}_3][\text{TPN}\cdot\text{H}][\text{H}^+]}$$

$$K_2 = \frac{[\text{L-Alanine}][\alpha\text{-KG}]}{[\text{L-G}][\text{Pyruvate}]}$$

$$K_3 = \frac{[\text{L-Alanin}][\text{H}_2\text{O}][\text{TPN}]}{[\text{Pyruvate}][\text{NH}_3][\text{TPNH}][\text{H}^+]}$$

となり, 結局 $K_3 = K_1 \times K_2$ の関係になる.

文献によれば, 一般に $K_1^{(5)}$ は極めてグルタミン酸生成側に傾き, 10^{10} 以上であり, $K_2^{(6)}$ はそれほどのかたよりはなく大体 1.5 程度である. 従って K_3 は K_1 , K_2 いずれよりも大なる値を示し, 平衡はアラニン側に大きく傾き, かつそれは L-グルタミン酸脱水素酵素の平衡恒数によって支配される部分が大い. 換言すれば単純なアミノ基転移反応によっては L-グルタミン酸量に比してこのように多量のアラニンを蓄積し得ないのであって, L-グルタミン酸脱水素酵素との共転によってそれが可能になると考えることもできよう.

実際の場合については勿論, 他種基質との複雑な平衡関係, 代謝速度, TPN・H 供給系等を考慮に入れねばならない.

要 約

Corynebacterium gelatinosum No. 7183 菌における DL-アラニン蓄積の理由を解明するために実験を行い, 次の知見を得た.

(1) アラニン発酵に適した培地組成を採用したような条件下では, 窒素濃度が糖代謝に重要な影響を及ぼし窒素の少ない場合は糖代謝は不完全な状態にとどまるが, 窒素濃度が高いと見かけ上糖代謝は促進される.

(2) 通気量も重要な因子であり, 特にピルビン酸, α -ケトグルタル酸の酸化能に及ぼす影響は大である. 通気量が少いとピルビン酸酸化能は顕著に低下する.

(3) 本菌は DL-アラニンを炭素源として増殖しうる.

(4) 本菌は L-グルタミン酸, L-アラニン, D-アラニン, L-トリプトファン, L-ヒスチジンを酸化する能力を有する. 他の D-アミノ酸には作用しない.

(5) 本菌における DL-アラニン蓄積は, 窒素代謝と関連した糖代謝経路よりの By-Path 反応であり, また上記の事実より DL-アラニンは発酵の最終生産物ではなく, 一時的貯溜物であると結論した.

本研究を行うに際し, 御指導, 御激励を賜った三楽酒造(株)中央研究所長武田義人博士, 次長尾崎浅一郎博士に深甚なる感謝をいたします. また, 発表を許可された社長鈴木三千代氏に深謝いたします.

なお, 本報は第 3 回アミノ酸発酵集談会において講演したものの一部である.

(1) 北井淳夫, 刀根 弘, 佐々木浩, 宮地 昇,
山野井昭雄: 本誌, 35 , 862 (1961).	(4) 鮫島広年, 奈良 高, 藤田忠三, 木下祝郎:
本誌, 34 , 838 (1960).
(2) 尾崎浅一郎, 河野景明, 奥村信二, 岡田 弘,
坂口謹一郎: 第 2 回アミノ酸発酵集談会講
演 (1960 年 4 月).	(5) J. A. Olson, C. B. Anfinsen: <i>J. Biol.</i>
<i>Chem.</i> , 202 , 841 (1953).
(3) 植村定治郎: <i>Amino Acids</i> , 1 , 14 (1959).	(6) A. H. Krebs: <i>Biochem. J.</i> , 54 , 82 (1953).