〔農化 第 50 卷, 第 1 号, p. R 79~R 87, 1976〕

芳香族アミノ酸の発酵生産と生合成調節

(昭和 50 年度農芸化学奨励賞受賞)

萩 野 浩 志

(協和醸酵工業(株)東京研究所, 現在, 協和醸酵工業(株)防府工場)

Control Mechanisms in Aromatic Amino Acid Biosynthesis and the Amino Acid Production

By Hiroshi HAGINO

Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Machida-shi, Tokyo

はじめに

L-グルタミン酸の発酵生産が報告⁽¹⁾されて以来, 各種アミノ酸の発酵生産について数多くの研究が行われ, 多くのアミノ酸の工業的生産の技術が確立されてきた。しかしながら, 芳香族アミノ酸など一部のアミノ酸については, いまだ工業的に安価な製造法は確立されていない。芳香族アミノ酸の直接発酵生産が困難であることは, その生合成の調節機構が厳重であることによるものと考えられた。芳香族アミノ酸の生合成経路は Fig. 1 に示すごとく, 共通生合成経路と各個有分枝経路よりなるが, その生合成が複雑, 精細に調節されていることが, 大腸菌, 枯草菌などで詳細に研究されてきた。この複雑な分枝経路を有する芳香族アミノ酸の調節機構は微生物の種属間で異なり, 種々の巧妙な調節様式が存在が知られている。芳香族アミノ酸を多量に蓄積させるためには, この複雑な生合成調節機構を解除させることが必要である。著者らは, グルタミン酸生産菌である *Corynebacterium glutamicum* を用い, 変異処理を重ねることにより, 段階的に生合成調節機構を解除し, 著量の芳香族アミノ酸を直接発酵する変異株を得た⁽²⁻⁶⁾。そして, 本細菌における芳香族アミノ酸生合成の調節機構について明らかにした⁽⁷⁻¹⁰⁾。本稿では芳香族アミノ酸生産菌株, 芳香族アミノ酸の生合成調節について, *C. glutamicum* を中心に, 他の微生物についての報告をも混じえ, 紹介する。なお, 他の微生物についての詳細については Gibson ら⁽¹²⁾, および Jensen ら⁽¹³⁾ の優れた総説があるので参照されたい。

Fig. 1. Biosynthetic Pathway of Aromatic Amino Acids.

Abbreviations: PEP, phosphoenolpyruvate; EP, erythrose-4-phosphate; DAHP, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate; DHQ, 5-dehydroquinic acid; DHS, 5-dehydroshikimic acid; SA, shikimic acid; SAP, shikimic acid-5-phosphate; EPSAP, 3-enolpyruvyl shikimic acid; CA, chorismic acid; AA, anthranilic acid; PRA, N-(5'-phosphoribosyl)-anthranilic acid; CDRP, 1-(O-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphate; IGP, indoleglycerol phosphate; PA, prephenic acid; PPA, phenylpyruvic acid; HPPA, p-hydroxyphenylpyruvic acid.

Table I. Production of Aromatic Amino Acids by Auxotrophs

Product	Auxotroph	Microorganisms
L-Tyrosine	phenylalanine	<i>Escherichia coli</i> ⁽¹⁴⁾
		<i>Bacillus subtilis</i> ⁽¹⁵⁾
		<i>Corynebacterium glutamicum</i> ⁽¹⁶⁾
		<i>Corynebacterium</i> sp. ⁽¹⁷⁾
L-Phenylalanine	tyrosine	<i>E. coli</i> ⁽¹⁴⁾
		<i>C. glutamicum</i> ⁽¹⁸⁾
		<i>Arthrobacter paraffineus</i> ⁽¹⁹⁾
L-Tryptophan	phenylalanine and tyrosine	<i>C. glutamicum</i> ⁽²⁰⁾
	histidine	<i>C. glutamicum</i> ⁽²¹⁾
	histidine	<i>Brevibacterium</i> sp. ⁽²²⁾

I. 芳香族アミノ酸生産菌

芳香族アミノ酸の発酵生産については、従来から、各種微生物で数多くの研究がなされてきた。特にアントラニル酸、インドールからの L-トリプトファンへの変換など、生合成中間物からの発酵生産に関するものが主であって、直接発酵生産に関する研究は少なかった。直接発酵については、著者らが研究に着手した当時は、Table

Table II. Production of Aromatic Amino Acids by Analog-Resistant Mutants in Different Microorganisms

Microorganisms	Analog	Amino acid produced	References
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>m</i> -aminotyrosine	L-tyrosine	23
	<i>m</i> -fluorotyrosine		24
	D-tyrosine		25
	L-histidine		26
<i>Escherichia coli</i>	<i>p</i> -fluorophenylalanine		27
	β -2-thienylalanine		28
	<i>p</i> -aminophenylalanine		29
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>p</i> -fluorophenylalanine		30
<i>Escherichia coli</i>	β -2-thienylalanine	L-phenylalanine	28
	<i>o</i> -fluorophenylalanine		31
	<i>p</i> -fluorophenylalanine		31
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>p</i> -fluorophenylalanine		23
	β -2-thienylalanine		32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	β -2-thienylalanine		33
<i>Escherichia coli</i>	5-methyltryptophan	L-tryptophan	34~36
	5-fluorotryptophan		37
<i>Bacillus subtilis</i>	5-methyltryptophan		38, 39

I に示した栄養要求性変異株によるものと、Table II に示したアナログ抵抗性株を用いる調節変異株によるものが報告されていたが、その生成量は微量で工業的生産に供することはできなかった。このことは、芳香族アミノ酸の生合成の調節機構は複雑であって、著量の芳香族アミノ酸生産株を得るためには、一つの調節機構が解除されただけでは不十分であって、複数の調節機構の解除が必要であるものと考えられた。そこで、何段階もの変異処理によるこれらの複雑な調節の解除が試みられた。

1. *C. glutamicum*

(i) 多重栄養要求性変異株：フェニルアラニン要求性株 KY 10233 に種々の栄養要求性を付加したところ、特にシステイン、ヒスチジン、プリンなど特定の栄養要求性の付加により、L-チロシン生成量が原株に比較し、増加する変異株が得られた。特に、フェニルアラニン、プリン二重要求性株 LM-96 は、20% 量の糖より 15g/l の L-チロシンを蓄積した⁽²⁾。

(ii) 栄養要求性とアナログ抵抗性を組合せた変異株：栄養要求性を有する芳香族アミノ酸生産株を原株として、重ねて芳香族アミノ酸アナログ抵抗性を付加し、高収量の芳香族アミノ酸生産変異株を誘導した。Fig. 2 はフェニルアラニン要求性の L-チロシン生産菌 KY 10233 に各種フェニルアラニン、チロシンアナログ抵抗

性を付与することによる L-チロシン生産菌の改良課程を示したものであるが、かくして得られた L-チロシン生産菌 pr-20 は、糖 10% の培地で 17.6g/l の L-チロシンを蓄積し、その生産量は原株の 6 倍に増加した⁽⁴⁾。Fig. 3 はチロシン、フェニルアラニン二重要求性の L-トリプトファン生産菌 KY 9456 に各種トリプトファンアナログ、フェニルアラニン、チロシンアナログ抵抗性を付与することにより、高収量の L-トリプトファン生産菌を誘導する課程を示したものであるが、かくして得られた変異株 Px-115-97 株は、糖 10% の培地で 12g/l の L-トリプトファンを蓄積し、L-トリプトファン生産量は、原株の 80 倍に増加した⁽⁵⁾。Fig. 4 は、チロシン要求性

	L-Tyrosine produced (mg/ml)
KY 10108 (wild-type)	0
↓	
KY 10233 (Phe ⁻)	3.0
↓ 3AT ^r	
3AT-337	5.7
↓ PAP ^r	
PAP-45	7.4
↓ PFP ^r	
PFP-175	10.4
↓ Monocolony isolation	
PFP-175-33	12.2
↓ TyrHx ^r (200 µg/ml)	
Tx-200-98	(8.4)
↓ TyrHx ^r (500 µg/ml)	
pr-20	17.6

Fig. 2. The Process of the Improvement of L-Tyrosine Productivity of a Phenylalanine Auxotroph.

Abbreviations: 3AT^r, 3-aminotyrosine; PAP^r, *p*-aminophenylalanine; PFP^r, *p*-fluorophenylalanine; TyrHx, tyrosine-hydroxamate; r, resistant; s, sensitive.

	L-Tryptophan produced (mg/ml)
KY 9456 (Phe ⁻ , Tyr ⁻)	0.15
↓ 5MT ^r , TrpHx ^r , 6FT ^r , 4MT ^r	
4MT-11	4.9
↓ PFP ^r	
PFP-2-32	5.7
↓ PAP ^r	
PAP-126-50	7.1
↓ TyrHx ^r	
Tx-49	10.0
↓ PheHx ^r	
Px-115-97	12.0

Fig. 3. The Process of the Improvement of a L-Tryptophan Productivity of a Phenylalanine-Tyrosine Double Auxotroph.

Abbreviations: 5MT, 5-methyltryptophan; TrypHx, tryptophan-hydroxamate; 6FT, 6-fluorotryptophan; 4MT, 4-methyltryptophan; PheHx, phenylalanine-hydroxamate.

の L-フェニルアラニン生産菌 TL-3 に, チロシン, フェニルアラニンアナログ抵抗性を付与することにより,

	L-Phenylalanine produced (mg/ml)
ATCC 13032 (wild-type)	0
↓ TL-3 (Tyr ⁻)	1.0
↓ PFP (25 µg/ml) ^r	
PFP-19	4.6
↓ PFP (50 µg/ml) ^r	
PFP-19-31	6.7
↓ PAP ^r	
31-PAP-20-22	9.5

Fig. 4. The Process of the Improvement of L-Phenylalanine Productivity of a Tyrosine Auxotroph.

高収量の L-フェニルアラニン生産菌の誘導の課程を示したものであるが, かくして得られた変異株 PAP-20-22 は, 糖 10% の培地で 9.5 g/l と原株の 10 倍の L-フェニルアラニンを生産した. なお, この菌株は同時に著量の プレフェニル酸を副生した⁽⁶⁾.

2. その他の細菌

Moran ら⁽⁴⁰⁾は, *Mycobacterium rhodochrous* の 5-methyltryptophan 抵抗性株にチロシン, フェニルアラニン要求性, さらにヒスチジン要求性を付加することにより, グリセロールまたは *n*-パラフィンからの L-トリプトファン生成速度の増加した変異株を得ている. 椎尾ら⁽⁴¹⁾は, *Bacillus subtilis* の 5-fluorotryptophan 抵抗性株では 5 g/l の L-トリプトファンが蓄積したのに対し, アルギニン, ロイシン, プリンなどの栄養要求性を付加することにより, 最高 6.15 g/l の L-トリプトファンの蓄積することを報告している. さらに椎尾ら^(42,43)は *Brevibacterium flavum* でトリプトファンアナログ抵抗性と栄養要求性を組合せた変異株を分離し, その中で 5-fluorotryptophan, *o*-fluorophenylalanine 抵抗性, フェニルアラニン, ヒスチジン要求性の性質を有する変異株で 6.2 g/l の L-トリプトファンの蓄積することを報告している.

II. 芳香族アミノ酸生合成酵素の性質

芳香族アミノ酸の生合成は, Fig. 1 に示したように数多くの酵素反応よりなるが, その生合成酵素の性質については大腸菌, 枯草菌およびその他の微生物で詳細に研究されている. そのなかで調節酵素として知られているものは共通生合成経路の最初の反応を触媒する酵素 3-de-

oxy-D-arabino-heptulosonic acid 7 phosphate (DAHP) synthetase, L-トリプトファン生合成分枝の反応を触媒する酵素 anthranilate synthetase, L-チロシン, L-フェニルアラニン生合成分枝の共通反応を触媒する酵素 chorismate mutase, L-チロシン生合成分枝の最初の反応を触媒する酵素 prephenate dehydrogenase, L-フェニルアラニン生合成分枝の最初の反応を触媒する酵素 prephenate dehydratase の 5 つの酵素である。ここでは, *C. glutamicum* および他の微生物のこれら 5 つの酵素の調節に関する性質を記す。

1. DAHP synthetase

C. glutamicum では, Table III に示したように L-チロシン, L-フェニルアラニン, L-トリプトファンの個々では弱い阻害しか受けなかったが, L-チロシンと L-フェニルアラニンの組合せでは強い相乗阻害が認められ, さらに L-トリプトファンの共存下で阻害は強化され, 粗酵素で最大 88% の阻害が認められた⁽⁷⁾. *Escherichia coli*⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾, *Salmonella typhimurium*⁽⁴⁷⁾ など *Enterobacteriaceae* に属する細菌, *Neurospora crassa*⁽⁴⁸⁾, *Claviceps paspali*⁽⁴⁹⁾ などのカビ, *Saccharomyces cerevisiae*^(50,51) の酵母で, それぞれ末端産物によって調節を受ける 3 つの isozyme の存在が知られている。一方, *Bacillus subtilis* など *Bacillaceae* 属細菌^(52,53) では, 生合成の中間物である chorismate, prephenate によってフィードバック阻害を受ける一つの酵素蛋白の存在が報告されている。その他の調節様式としては, *Hydrogenomonas* に属する細菌⁽⁵²⁾ の cumulative type の阻害⁽⁵⁴⁾, *Rhodocrobium vannielii*⁽⁵⁵⁾ における特殊な相乗阻害,

Table III. Effect of Aromatic Amino Acids on DAHP Synthetase Activity

Addition (mM)			Inhibition (%)
L-Tyr	L-Phe	L-Trp	
—	—	—	0
1	—	—	7.7
—	1	—	18.9
—	—	0.1	15.4
—	—	0.01	17.3
1	1	—	73.6
0.1	0.1	—	72.7
0.01	0.01	—	34.2
1	—	0.1	13.3
—	1	0.1	39.0
1	1	0.1	87.6
0.1	0.1	0.1	80.5
0.01	0.01	0.01	47.0

Fig. 5. Inhibition of the Activity of Anthranilate Synthetase from *C. glutamicum* ATCC 13032 by L-Tryptophan.

Table IV. Effect of L-Tryptophan on Anthranilate Synthetase Formation in *C. glutamicum* KY 9285 (Trp⁻)

L-Tryptophan supplemented (μg/ml)	Growth (O.D. at 660 mμ × 1/60)	Anthranilate synthetase*
0	0.085	2.36
5	0.115	2.58
50	0.195	1.69
500	0.250	0.48

* Specific activity, nmoles of anthranilate formed per minute per mg of protein.

Pseudomonas 属細菌⁽⁵²⁾ の一つの末端産物 (L-チロシン) によっておもに阻害される unimetabolite control, *Brevibacterium flavum*⁽⁵⁶⁾ における L-フェニルアラニンと L-チロシンによる相乗阻害 (L-トリプトファンは阻害に関与せず) などの報告が存在する。

2. Anthranilate synthetase

この酵素は, L-トリプトファンによってフィードバック阻害, 抑制をうけることが, *E. coli*⁽⁵⁷⁾, *Aerobacter aerogenes*⁽⁵⁸⁾, *B. subtilis*⁽⁵⁹⁾, *Pseudomonas putida*⁽⁶⁰⁾, *Brev. flavum*⁽⁶¹⁾, *S. cerevisiae*^(62,63), *N. crassa*⁽⁶⁴⁾ で報告されている。 *C. glutamicum* でも Fig. 5, Table IV に示したように, L-トリプトファンに阻害, 抑制をうけた。さらにこの阻害は, 基質である chorismate に拮抗的であった⁽⁹⁾。

3. Chorismate mutase

E. coli⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾, *A. aerogenes*^(65,66), *S. typhimurium*⁽⁶⁸⁾, *Ps. aeruginosa*⁽⁶⁹⁾ では二つの isozyme の存在が知られ, その一つは prephenate dehydratase と complex を形成し, L-フェニルアラニンによって調節を受け, 他の一つは prephenate dehydrogenase と complex を形成し, L-チロシンにより調節をうける二つの蛋白よりなるこ

Fig. 6. Effect of Aromatic Amino Acids on Chorismate Mutase Activity from A Wild-Type Strain of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

—▲— L-tyrosine, —●— L-phenylalanine,
—△— L-tryptophan —○— L-tyrosine and
L-phenylalanine.

Table V. Effect of L-Phenylalanine on Chorismate Mutase Formation in *C. glutamicum* KY 10233 (Phe⁻)

L-Phenylalanine supplemented (μg/ml)	Growth (O.D. at 660 mμ × 1/60)	Chorismate mutase*
5	0.50	12.5
50	0.57	4.1
500	0.87	2.9

* Specific activity, nmoles of phenylpyruvate formed per minute per milligram of protein.

とが報告されている。 *B. subtilis*^(59,70) では三つの蛋白分子よりなるが、いずれも L-チロシン、L-フェニルアラニンにより阻害されない。 *N. crassa*⁽⁷¹⁾, *Claviceps paspali*⁽⁷²⁾ では一つの蛋白分子よりなり、 *S. cerevisiae*⁽⁶⁸⁾ では二つの蛋白よりなるが、前者および後者の一方はともに L-チロシン、L-フェニルアラニンにより個々に阻害され、L-トリプトファンによって促進された。 *C. glutamicum* の本酵素は、Fig. 6 に示したように L-フェニルアラニン単独で阻害され、L-チロシンとの組合せで完全阻害された。L-トリプトファンは本酵素を活性化するとともに、L-フェニルアラニン単独およびL-チロシンの共存下における阻害を拮抗的に解除した。さらに Table V に示したように、この酵素の生成は L-フェニルアラニンによって抑制された⁽¹⁰⁾。

4. Prephenate dehydrogenase

Fig. 7 に示したように、 *C. glutamicum* では本酵素活性はL-チロシンによって弱く阻害された(最大 50%)⁽⁸⁾。

Fig. 7. Effect of L-Tyrosine on the Activity of Prephenate Dehydrogenase from *C. glutamicum* ATCC 13032.

E. coli⁽⁷³⁾, *A. aerogenes*⁽⁶⁸⁾, *N. crassa*⁽⁷⁴⁾, *B. subtilis*⁽⁶⁹⁾, *S. cerevisiae*⁽⁶⁸⁾, *Brev. flavum*⁽⁷⁵⁾ で同様に、本酵素はL-チロシンにより阻害を受けることが報告されている。 *B. subtilis*⁽⁶⁹⁾ では L-チロシンのみならず、L-フェニルアラニンによっても阻害を受けた。 *N. crassa*, *S. cerevisiae* では、本酵素活性は L-フェニルアラニンによって活性化された。

5. Prephenate dehydratase

E. coli⁽⁶⁶⁾, *A. aerogenes*⁽⁶⁸⁾, *N. crassa*⁽⁷⁴⁾, *S. cerevisiae*⁽⁶⁸⁾, *Ps. aeruginosa*⁽⁷⁶⁾ では、本酵素活性は L-フェニルアラニンにより阻害された。 *B. subtilis*⁽⁶⁹⁾ では L-フェニルアラニンのみならず、L-トリプトファンによっても阻害された。 *Pseudomonas* の1菌種⁽⁷⁷⁾ および *Brev. flavum*⁽⁷⁶⁾ では、L-フェニルアラニンにより阻害

Fig. 8. Effect of Aromatic Amino Acids on the Activity of Prephenate Dehydratase from *C. glutamicum* ATCC 13032 (A) L-Phenylalanine or L-Tryptophan (B) L-Tyrosine.

—○— L-phenylalanine, —●— L-tryptophan,
—○— L-tyrosine.

され、L-チロシンにより活性化された。後者の細菌では、L-トリプトファンによっても阻害された。*C. glutamicum* では Fig. 8 に示したように、本酵素活性は L-フェニルアラニンにより、フィードバック阻害され (0.05 mM 濃度で 100%)、L-トリプトファンによっても阻害された (0.1 mM 濃度で 100%)。一方、L-チロシンは本酵素を活性化するとともに L-フェニルアラニン、L-トリプトファンによる阻害をも拮抗的に解除した⁽⁸⁾。

III. 芳香族アミノ酸生合成全般の調節

生物においては、生合成調節機構の存在によって、末端産物が必要量以上に合成されないよう調節ははかられている。その調節機構は、芳香族アミノ酸のような多分枝生合成経路を有する系においては、直線的な生合成経路における調節のように単純でない。このような系で特徴的なことは、i) DAHP synthetase, chorismate mutase のような共通経路の調節酵素が一部の末端産物によって調節されているのではなく、酵素反応生成物がすべての末端産物の生合成にとって都合よく、しかもむだなく供給されるような合理的な調節機構が存在すること、ii) chorismate, prephenate のような生合成経路上の分岐点化合物が、各末端産物の必要量に応じ、各分枝経路に均衡分配されるような調節機構が存在することである。これらの点に注目し、先述した個々の酵素の調節を総合し、芳香族アミノ酸生合成全般の調節について、各微生物につきまとめ、*C. glutamicum* の結果と比較した。

1. *C. glutamicum*

DAHP synthetase は、L-チロシン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファンの共存下で相乗的に阻害され、単独ではほとんど阻害されないことから、これらのアミノ酸が均衡して生合成されて、はじめて全体の生合成の流れが停止される。chorismate, prephenate の分配について考察すると、chorismate を基質とする酵素 anthranilate synthetase, chorismate mutase の chorismate に対する K_m 値はそれぞれ 4.8×10^{-5} M, 2.9×10^{-3} M であり、chorismate は anthranilate synthetase への親和性が強いために、トリプトファン経路に流れやすいものと考えられる。かくして、L-トリプトファンが十分量生成すると、anthranilate synthetase はフィードバック阻害され、chorismate のトリプトファン経路への流入は停止し、chorismate mutase によりチロシ

Fig. 9. Control of Aromatic Amino Acid Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*.

← feedback inhibition (←-- partial inhibition), <— activation, ●— repression.

I. DAHP synthetase, II. anthranilate synthetase, III. chorismate mutase, IV. prephenate dehydrogenase, V. prephenate dehydratase.

ン、フェニルアラニン経路に流入する。L-トリプトファンは chorismate mutase 活性を促進することにより、この流入は促進される。一方、L-チロシン、L-フェニルアラニンが十分量生成されると、chorismate mutase 活性は阻害される。この結果、chorismate は蓄積され、この濃度が高くなると、anthranilate synthetase の L-トリプトファンによる阻害は基質拮抗型であるため、一部解除され、再び L-トリプトファン生合成が開始される。prephenate の分配については、prephenate dehydrogenase は L-チロシンにより弱くしか阻害されないため、prephenate はチロシン経路に流れやすいものと考えられる。かくして生成した L-チロシンは、prephenate dehydratase 活性を促進することにより、prephenate はフェニルアラニン経路に流入する。L-フェニルアラニンが十分量生成すると prephenate dehydratase 活性は阻害されることから、再び L-チロシン生合成が開始される。このようにして chorismate, prephenate は酵素反応の阻害、活性化の組合せにより各分枝経路に巧みに分配されている。これらの結果はまとめ、Fig. 9 に図示した。後述するように、chorismate の分配機構は *N. crassa* のそれと似たパターンを呈するが、prephenate の分配、DAHP synthetase の調節様式は他の微生物のそれと異なった。

2. *E. coli*

Fig. 10 に図示したように、DAHP synthetase は三つの isozyme よりなり、chorismate mutase は二つの isozyme よりなる。chorismate mutase の一方は、それぞれ prephenate dehydratase, prephenate dehydro-

Fig. 10. Control of Aromatic Amino Acid Biosynthesis in *Escherichia coli*.

Fig. 11. Control of Aromatic Amino Acid Biosynthesis in *Bacillus subtilis*.

genase と同一蛋白よりなり、従って、この細菌においては、芳香族アミノ酸合成の末端産物への三つの流れは、それぞれ独立して調節されている。このような調節のパターンは *A. aerogenes*, *S. typhimurium* など *Enterobacteriaceae* に属する細菌に共通である。

3. *B. subtilis*

Fig. 11 に示したように、DAHP synthetase は chorismate, prephenate によりフィードバック阻害される。L-チロシン、L-フェニルアラニン、prephenate dehydrogenase, prephenate dehydratase のフィードバック阻害によって prephenate の濃度レベルを調節し、L-トリプトファンの anthranilate synthetase のフィードバック阻害、prephenate による chorismate mutase の阻害によって chorismate の濃度レベルは調節されている。このような機構を Jensen らは、sequential feed back inhibition と呼んでいる。

4. *Saccharomyces cerevisiae*

DAHP synthetase, chorismate mutase は、それぞれ三つおよび二つの isozyme よりなることは *E. coli* と同様であるが、chorismate mutase の一方は L-チロシンによって阻害されるとともに、L-トリプトファンによって活性化され、prephenate dehydrogenase は L-チロ

Fig. 12. Control of Aromatic Amino Acid Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.

Fig. 13. Control of Aromatic Amino Acid Biosynthesis in *Neurospora crassa*.

シンによって阻害されるとともに、L-フェニルアラニンに活性化されるなど、阻害と促進作用の組合せにより、prephenate, chorismate が各分枝経路に均衡分配されている。これらの結果は、Fig. 12 にまとめた。

5. *Neurospora crassa*

Fig. 13 に示したように、本菌の調節機構は *S. cerevisiae* と類似しているが、chorismate mutase が一つの蛋白分子よりなり isozyme でないこと、prephenate dehydratase が抑制によって調節されていないなど、細部で *S. cerevisiae* と異なっている。

6. *Claviceps paspali*

Anthranilate synthetase は L-トリプトファンに阻害、抑制をうけず⁽⁷⁸⁾、この点、他の微生物と異なるが、他の酵素の調節パターンは *N. crassa* と全く同一であった。

以上、芳香族アミノ酸合成の全体の調節について、おもな微生物について記したが、微生物の種属によって、種々の異なった巧妙な調節様式のあることは分類上からも興味深い。*C. glutamicum* における調節様式は、部分的には他の微生物と類似する点もみられたが、全体では異なり、新しい調節のパターンであった。

お わ り に

以上 *C. glutamicum* を中心に、芳香族アミノ酸の糖からの直接発酵生産とその調節機構を総説した。*C. glutamicum* の芳香族アミノ酸生産株の誘導の際には、その調節機構の詳細は解明されていなかった。しかしながら、栄養要求性株を原株に用いた場合、要求物質の制限下では共通生合成経路の調節が解除され、複雑な調節がより単純化されていたことは幸いであった。これらの芳香族アミノ酸生産株の調節の解除については、紙面の制限上省略した。*C. glutamicum* において著量の芳香族アミノ酸生産株の得られたことは、本細菌は顕著な芳香族アミノ酸分解能を持ち合せないことによることも重要な要素と考えられる。

芳香族アミノ酸生合成経路のごとく多分枝した経路の調節機構は、ここに記したようにたいそう複雑であったが、これらの生合成酵素は部分的に aggregate していることが、多くの微生物で報告されていることから、さらに複雑な様相を有しているものと考えられる。さらに、芳香族ビタミンの生合成調節については未解明な点も多く、芳香族化合物の生合成の全体の調節については、今後の解明を待たなければならない点も残されている。

- (1) S. Kinoshita, S. Udaka, S. Akita: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**, 193 (1957).
- (2) H. Hagino, H. Yoshida, F. Kato, Y. Arai, R. Katsumata and K. Nakayama: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2001 (1973).
- (3) H. Hagino and K. Nakayama: *ibid.*, **37**, 2007 (1973).
- (4) *idem*: *ibid.*, **37**, 2013 (1973).
- (5) *idem*: *ibid.*, **39**, 343 (1975).
- (6) *idem*: *ibid.*, **38**, 159 (1974).
- (7) *idem*: *ibid.*, **38**, 2125 (1974).
- (8) *idem*: *ibid.*, **38**, 2367 (1974).
- (9) *idem*: *ibid.*, **39**, 323 (1975).
- (10) *idem*: *ibid.*, **39**, 331 (1975).
- (11) *idem*: *ibid.*, **39**, 343 (1975).
- (12) F. Gibson and J. Pittard: *Bacteriol. Rev.*, **32**, 465 (1968).
- (13) R. A. Jesenn and J. L. Rebello: "Development in Industrial Microbiology," Vol. II, p. 105 (1970).
- (14) D. B. Davis: *Experientia*, **6**, 41 (1950).
- (15) 朝井勇宜: Amino Acid 発酵と代謝, No. 1, 11 (1959).
- (16) 中山 清, 佐藤善六, 木下祝郎: 農化, **35**, 146 (1961).
- (17) K. Yamaguchi, Y. Tokoro, K. Oshima, K. Tanaka and T. Suzuki: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2189 (1973).
- (18) 中山 清, 佐藤善六, 木下祝郎: 農化, **35**, 1421 (1961).
- (19) 所 洋, 大嶋和雄, 沖井三孔, 山口 健, 田中勝宜, 木下祝郎: Amino Acid and Nucleic Acid 発酵と代謝, No. 21, 49 (1970).
- (20) 渡辺 博, 佐藤尚武, 木下祝郎, 中山 清: 日本特許, 昭 38-14395 (1963).
- (21) 中山 清, 萩野浩志: 日本特許, 昭和 47-4505 (1972).
- (22) 大和谷三郎, 鈴木 勝, 中尾義雄: Amino Acid and Nucleic acid 発酵と代謝, No. 16, 126 (1967).
- (23) M. Polsinelli: *Giorn. Microbiol.*, **13**, 99 (1965).
- (24) E. W. Nester, R. A. Jensen and D. S. Nasser: *J. Bacteriol.*, **97**, 83 (1969).
- (25) W. S. Chamney and R. A. Jensen: *ibid.*, **98**, 205 (1969).
- (26) L. F. Chapman and E. W. Nester: *ibid.*, **96**, 1658 (1968).
- (27) G. N. Cohen and E. A. Adelberg: *ibid.*, **76**, 326 (1958).
- (28) E. A. Adelberg: *ibid.*, **76**, 326 (1958).
- (29) B. J. Wallance and J. Pittard: *ibid.*, **97**, 1234 (1969).
- (30) E. Gollub and D. B. Sprinson: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 389 (1969).
- (31) S. W. Kim and J. Pittard: *J. Bacteriol.*, **106**, 784 (1971).
- (32) J. H. Coats and E. W. Nester: *J. Biol. Chem.*, **242**, 4948 (1967).
- (33) D. H. Calhoun and R. A. Jensen: *J. Bacteriol.*, **109**, 365 (1972).
- (34) P. G. Lim and R. I. Mateles: *Science*, **140**, 388 (1963).
- (35) 喜田節子, 松代愛三: 醸工, **43**, 302 (1965).
- (36) 喜田節子, 松代愛三: 同上, **43**, 307 (1965).
- (37) M. Bandiera, G. Morpurgo and R. Ricci: *Experientia*, **23**, 724 (1967).
- (38) S. O. Hoch, C. W. Hoch, I. P. Crawford and E. W. Nester: *J. Bacteriol.*, **105**, 38 (1971).
- (39) J. F. Kane and R. A. Jensen: *J. Biol. Chem.*, **245**, 2384 (1970).
- (40) F. Moran and D. Raboin: Abstracts of 4th International Fermentation Symposium, p. 36 (1972).
- (40) I. Shiio, K. Ishii and K. Yokozeki: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1991 (1973).
- (42) I. Shiio, S. Sugimoto and M. Nakagawa: *ibid.*, **39**, 627 (1975).
- (43) S. Sugimoto, M. Nakagawa and I. Shiio: *ibid.*, **38**, 2327 (1974).

- (44) K. D. Brown and C. H. Doy : *Biochim. Biophys. Acta*, **104**, 377 (1965).
- (45) L. C. Smith, J. M. Ravel, S. R. Lax and W. Shieve : *J. Biol. Chem.*, **237**, 3566 (1962).
- (46) B. J. Wallance and J. Pittard : *J. Bacteriol.*, **93**, 237 (1967).
- (47) E. Gollub, H. Zalkin and D. B. Sprinson : *J. Biol. Chem.*, **242**, 5323 (1967).
- (48) D. M. Hallsall and C. H. Doy : *Biochim. Biophys. Acta*, **185**, 432 (1969).
- (49) F. Lingens, W. Goebell and H. Uesseler : *E. J. Biochem.*, **2**, 442 (1967).
- (50) *idem* : *Biochem. Z.*, **346**, 357 (1966).
- (51) C. H. Doy : *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 293 (1968).
- (52) R. A. Jensen, D. S. Nasser and E. W. Nester : *J. Bacteriol.*, **94**, 1582 (1967).
- (53) R. A. Jensen and E. W. Nester : *J. Mol. Biol.*, **12**, 468 (1965).
- (54) C. A. Woolfolk and E. R. Stadtman : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 313 (1964).
- (55) R. A. Jensen and W. C. Trentini : *J. Biol. Chem.*, **245**, 2013 (1970).
- (56) S. Sugimoto, R. Miyajima and I. Shiio : *Agr. Biol. Chem.*, **234**, 716 (1959).
- (57) T. I. Baker and I. P. Crawford : *J. Biol. Chem.*, **241**, 5577 (1966).
- (58) M. Gibson and F. Gibson : *Biochem. J.*, **90**, 248 (1964).
- (59) E. W. Nester and R. A. Jensen : *J. Bacteriol.*, **91**, 1594 (1966).
- (60) I. P. Crawford and I. C. Gunsalus : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **56**, 717 (1966).
- (61) I. Shiio, R. Miyajima and M. Nakagawa : *J. Biochem.*, **72**, 1447 (1972).
- (62) C. H. Doy and J. M. Cooper : *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 302 (1966).
- (63) F. Lingens, W. Goebel and H. Uesseler : *Eur. J. Biochem.*, **1**, 363 (1967).
- (64) J. A. DeMoss and J. Wegman : *Pro. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **54**, 241 (1965).
- (65) R. G. H. Cotton and F. Gibson : *Biochim. Biophys. Acta*, **100**, 76 (1965).
- (66) S. W. K. Im and J. Pittard : *J. Bacteriol.*, **106**, 784 (1971).
- (67) G. L. E. Koch, D. C. Shaw and F. Gibson : *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 795 (1965).
- (68) J. C. Schmit and H. Zalkin : *Biochem.*, **8**, 174 (1969).
- (69) D. H. Calhoun, D. L. Pierson and R. A. Jensen : *J. Bacteriol.*, **113**, 241 (1973).
- (70) J. H. Lorence and E. W. Nester : *Biochem.*, **5**, 1541 (1967).
- (71) T. I. Baker : *ibid.*, **5**, 2654 (1966).
- (72) B. Sprossler and F. Lingens : *FEBS Lett.*, **6**, 232 (1970).
- (73) G. L. E. Koch, D. C. Shaw and F. Gibson : *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 795 (1971).
- (74) D. E. A. Catcheside : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 651 (1969).
- (75) S. Sugimoto, R. Miyajima and I. Shiio : *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2372 (1973).
- (76) D. H. Calhoun, D. L. Pierson and R. A. Jensen : *J. Bacteriol.*, **113**, 241 (1973).
- (77) P. Cerutti and G. Guroff : *J. Biol. Chem.*, **240**, 3034 (1965).
- (78) F. Lingens, W. Goebel and H. Uesseler : *Eur. J. Biochem.*, **2**, 442 (1967).

(昭和 50 年 10 月 1 日受理)