

# Klebsiella pneumoniaeによるアセトイン系化合物の生合成機構について

誌名	岐阜大学農学部研究報告 = Research bulletin of the Faculty College of Agriculture Gifu University
ISSN	00724513
著者	堀津, 浩章 林, 素弘 河合, 啓一
巻/号	45号
掲載ページ	p. 137-143
発行年月	1981年12月

*Klebsiella pneumoniae* によるアセトイン系  
化合物の生合成機構について

堀津浩章・林 素弘・河合啓一

Biosynthesis of acetoin-related compounds  
by *Klebsiella pneumoniae*

Hiroyuki HORITSU, Motohiro HAYASHI and Keiichi KAWAI

Summary

Comparative studies were made on the formation of acetoin-related compounds by *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 and its amino acid auxotrophic mutants. Production of diacetyl and acetoin by the mutants was less than that by the parent. Both valine-isoleucine and phenylalanine-tyrosine auxotrophs did not produce acetoin.

The activities of  $\alpha$ -acetolactate synthetase, acetoin dehydrogenase and 2, 3-butanediol dehydrogenase of the valine-isoleucine auxotroph were almost the same with those of the parent. Although  $\alpha$ -acetolactate synthetase activity of the phenylalanine-tyrosine auxotroph was about one half that of the parent, the activities of both acetoin and 2, 3-butanediol dehydrogenases were much lower than those of the parent.

The acetoin dehydrogenase was purified by streptomycin treatment, ammonium sulfate fractionation, DE-32 column chromatography and 5'-AMP- aminoethyl-Sepharose 4B affinity chromatography. 2, 3-Butanediol dehydrogenase was copurified during all procedures for the purification of acetoin dehydrogenase. Moreover, both dehydrogenases were migrated together on 7% polyacrylamide gel disc electrophoresis. These results suggest that both dehydrogenase reactions are catalyzed by a single enzyme.

要 約

*Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 及びそのアミノ酸要求変異株によるアセトイン系化合物の生成機序について生理学的性質及び酵素レベルで比較検討した。親株に比べ変異株はジアセチル及びアセトインの生成量は低下しており、特にバリン-イソロイシン要求株とフェニルアラニン-チロシン要求株ではアセトインの生成はほとんど観察されなかった。

この両変異株と親株におけるアセトイン系化合物生合成経路上の2,3の酵素活性について比較したところ、フェニルアラニン-チロシン要求変異株の場合には全ての酵素活性が著しく低下しており、アセトイン系化合物の生合成諸酵素の調節機構を研究するうえで非常に興味深い変異株と言える。

アセトイン脱水素酵素を親株の無細胞抽出液からストレプトマイシン処理、硫酸分画、DE-32カラムクロマトグラフィー及び5'-AMP-アミノヘキシルセファロースアフィニティクロマトグラフィーで精製したところ、2,3-ブタンジオール脱水素酵素も全ての段階で同一の精製挙動を示し、さらにポリアクリルアミドゲルによる電気泳動での酵素活性染色位置も一致したことから、両酵素反応は単一の酵素により触媒されていることが示唆された。

緒 言

アセトイン、ジアセチル及び2,3-ブタンジオールは醸造製品や発酵食品中に含まれており、これらの化合

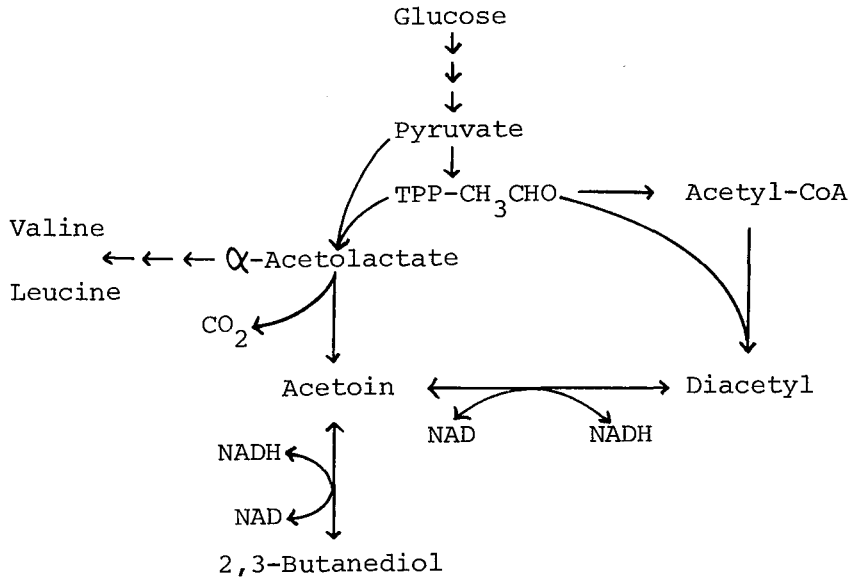


Fig. 1. Metabolic scheme of the formation of acetoin-related compounds by microorganism.

物は通常微生物により生産される。特にジアセチルは発酵乳製品の芳香成分であり、食酢においては香味成分の一要素となっているが、一方、清酒の火落臭やビールの異臭の原因ともなっている。以上のことから、これらの化合物の微生物における生成機構に関する多くの研究は乳酸菌、酢酸菌及び酵母などについてなされ、また *Aerobacter aerogenes* を用いた研究結果<sup>1,2,3)</sup> などから、現在 Fig. 1 に示される経路に従ってアセトイン系化合物が生成することが明らかにされている。この生成経路中の代謝中間体である  $\alpha$ -アセト乳酸はバリン及びロイシン生合成の中間体でもあるので、これらのアミノ酸代謝における制御機構と関連しても興味深い経路と言えよう。

本研究ではアセトイン系化合物生成能を有する *Klebsiella pneumoniae* から各種アミノ酸要求変異株を分離し、その生理学的性質を親株と比較検討すると共に、アセトイン系化合物の生成機序について酵素レベルで検討を加えたのでそれらの結果を併せて報告する。

## 実験材料及び方法

### 1. 使用菌株

*Klebsiella pneumoniae* IFO 3317及びそのアミノ酸要求変異株は Adelberg ら<sup>4)</sup>の方法に従い N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン処理法により分離した。各分離菌のアミノ酸要求性の決定は Berjerink<sup>5)</sup>の方法に従った。Table 1 にその結果を掲げる。

### 2. 培養方法

(a) 培地：本実験で使用した培地は、グルコース、1.0%；ポリペプトン、0.5%；酵母エキス、0.5%；KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05%及びMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.05% (pH7.0) である。但しアセトイン脱水素酵素精

Table 1. Character of amino acid auxotrophic mutants.

Strain No.	Requirement
1	Val and Ileu
2	Phe and Tyr
3	Cys or Met
4	Trp
5	Val and Ileu

製の際に使用した培地はグルコース濃度を3.0%とした。

(b)培養方法：500ml 容肩付フラスコに上記培地100ml を入れたものに1白金耳接種し、30℃で振盪培養した。

### 3. 無細胞抽出液の調製

培養菌体を10,000×g, 10分間遠心分離した後、得られた菌体を脱イオン水にて洗浄、遠心分離操作を3回繰り返し洗浄菌体を得た。この菌体を1.5倍量のM/10磷酸緩衝液(pH7.5)に懸濁し、氷水中で20kHz, 15分間超音波処理を行った後、12,000×g, 20分間遠心分離し、その上澄液を無細胞抽出液とした。

### 4. 定量法

(a)ジアセチル：Prill-Hammer<sup>6)</sup>法による比色定量法によった。

(b)アセトイン：アセトインはWesterfeld<sup>7)</sup>の方法に従がいジアセチルに酸化した後、上記のジアセチル定量法で測定し、先に定量したジアセチル量を差引くことにより求めた。

(c)蛋白質：卵白リゾチムを標準蛋白質として用い、Folin-Ciocalteu<sup>8)</sup>法に準じた。

(d)菌体量：波長660nmにおける吸光度を求め、先に作成した標準曲線により乾燥菌体重量として表示した。

### 5. 酵素活性測定法

(a)α-アセト乳酸合成酵素( EC 4. 1. 3. 18) : 80μmolの磷酸緩衝液(pH6.0), 100μmolのピルビン酸ナトリウム, 0.23μmolのチアミンピロリン酸, 10μmolのMgCl<sub>2</sub>及び適当量の酵素液を加え全量3.0mlで37℃10分間反応後、6 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2ml添加することにより反応を停止した。37℃30分間放置し生成したα-アセト乳酸を非酵素的にアセトインに定量的に変換し、Voges-Proskauer<sup>9)</sup>法により定量し酵素活性を求めた。

(b)アセトイン脱水素酵素( EC 1. 1. 1. 5) : 本酵素の正反応は120μmolの磷酸緩衝液(pH7.5), 10μmolのアセトイン, 0.41μmolのNAD及び適当量の酵素液からなる反応液3.0mlを用い、37℃で行なった。逆反応であるジアセチル還元活性は120μmolの磷酸緩衝液(pH7.5), 10μmolのジアセチル, 0.4μmolのNADH及び適当量の酵素液からなる反応液3.0mlを用い、37℃で測定した。ジアセチル還元活性はジアセチル存在下における吸光度変化から非存在下における吸光度変化を差引くことにより求めた。

(c)2,3-ブタンジオール脱水素酵素( EC 1. 1. 1. 4) : 正反応は150μmolの磷酸緩衝液(pH7.5), 44μmolの2,3-ブタンジオール, 0.41μmolのNAD及び適当量の酵素液を加え、全量を3.0mlとし37℃で反応させた。逆反応であるアセトイン還元活性は10μmolのアセトイン及び0.4μmolのNADHを用いたほかは全て同一条件で反応させた。

尚、ビリジン補酵素関与の酵素活性は全て波長340nmにおける吸光度の変化量から求めた。また酵素単位は1分間に0.1の吸光度を変化させる酵素量を1単位とした。

6. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法：Davis<sup>10)</sup>の方法に準じ、7%ポリアクリルアミドゲル(pH8.9)を使用した。蛋白質の染色にはアミドブラック10Bを用いた。酵素活性染色はアセトイン脱水素酵素の場合、正反応は130μmolのアセトイン及び0.82μmolのNADを含む300μmolの磷酸緩衝液(pH7.5)を使用し、逆反応は20μmolのジアセチル及び0.8μmolのNADHを同緩衝液中に含み、一方、2,3-ブタンジオール脱水素酵素の場合には正反応では88μmolの2,3-ブタンジオールと0.82μmolのNADを含む300μmolの磷酸緩衝液(pH7.5)を、逆反応では130μmolのアセトイン及び0.8μmolのNADHを含む同緩衝液をそれぞれ使用し、泳動後のゲルを各反応液(全量4ml)に浸し37℃15分間反応させた。直ちにゲルを0.025%ブルーテトラゾリウム-0.0125%フェナジンメソスルフェートを含む0.1M磷酸緩衝液(pH7.0)中に移すことにより染色を行なった。

### 7. 試薬類

NAD及びNADHはオリエンタル酵母工業株式会社より購入した。アセトイン及びジアセチルは特級試薬(99%以上)を半井化学薬品株式会社から、また2,3-ブタンジオールは一級試薬(99%以上)を東京化成工業株式会社より得た。

## 結果及び考察

## 1. ジアセチル及びアセトインの生成

親株及び各アミノ酸要求変異株によるジアセチル及びアセトイン生成の培養経過を Fig. 2 に示す。ジアセチル及びアセトインともその生成量は親株が最も高く、変異株は全て低下していた。バリンを要求する変異株 (No.1 及び No.5) は共に培養初期ではジアセチルの生成量は親株とさしたる差は見られなかったが、培養12時間目頃からその生成がほぼ停止し、特に No.1 では培養が進むにつれてその蓄積量が急激に減少することが観察された。

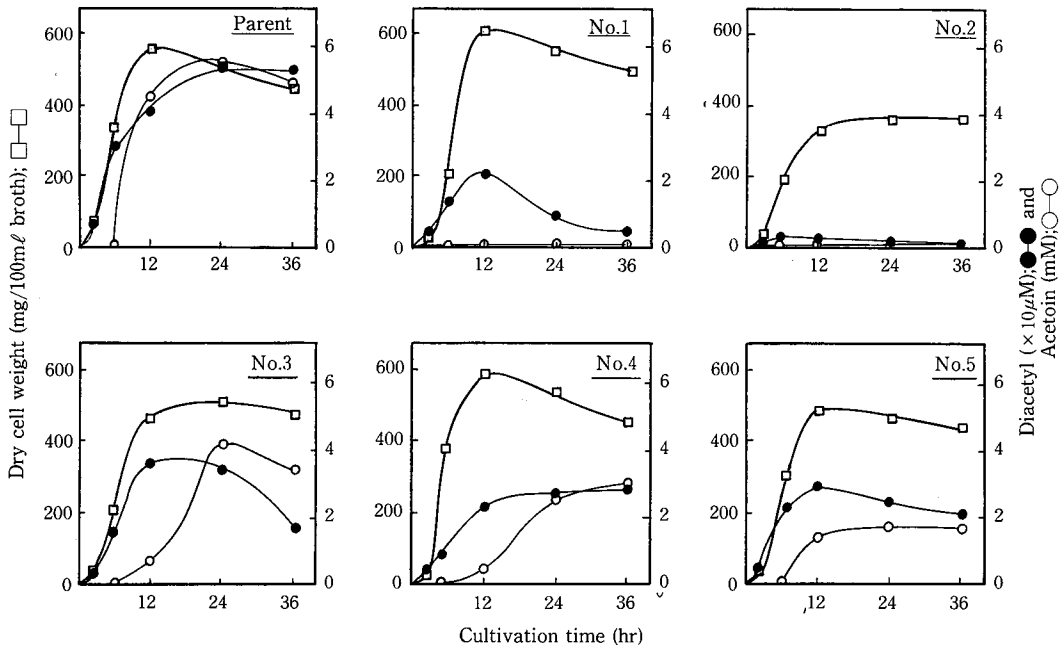


Fig. 2. Time course of acetoin and diacetyl productions by *Klebsiella pneumoniae* and its amino acid auxotrophs.

一方、アセトインの生成は、No.1 株及び No.2 株ではほとんど見られなかったが、親株及び他の変異株ともジアセチルの生成時期より幾分遅れてアセトインが生成されることを認めた。このようにアセトインは菌の生育の旺盛な時期には蓄積せず、その生育が緩慢になる時期から蓄積されることを示している。この現象は生育の旺盛な時期ではピルビン酸から生成する  $\alpha$ -アセト乳酸やアセチル-CoA はバリンやロイシンあるいはその他の菌体構成成分の合成に使用されるためにアセトインへ代謝されないものと推察される。この点に関して、変異株 No.2 のようにジアセチル及びアセトインともに蓄積不能になっている変異株が得られたことは、本菌のジアセチル及びアセトイン生成経路の生理学的意義を明らかにするために非常に興味深い変異株と考えられる。

## 2. アセトイン系化合物生成系に関与する酵素について

次にアセトイン系化合物の生成に関与する  $\alpha$ -アセト乳酸合成酵素、アセトイン脱水素酵素及び 2,3-ブタンジオール脱水素酵素について、親株及びアセトイン生成がほとんど認められなかった変異株 No.1 及び No.2 の両株を用いてそれらの活性を比較した。結果を Table 2 に示す。親株及び変異株 No.1 では、アセトイン脱水素酵素の場合正反応の活性は全く検出されず逆反応のみが観察された。また  $\alpha$ -アセト乳酸合成酵素についても親株及び変異株 No.1 とも同程度の活性を認めた。アセトイン脱水素酵素の正反応が検出され

Table 2. Comparison of enzyme activities of the parent with those of the mutants.

Enzyme	Specific activity (units/mg protein)		
	The parent	Mutant No.1	Mutant No.2
$\alpha$ -Acetolactate synthetase	0.24	0.25	0.13
Acetoin dehydrogenase			
Forward reaction	0	0	0
Backward reaction	3.60	3.85	0.22
2,3-Butanediol dehydrogenase			
Forward reaction	2.48	2.57	0
Backward reaction	8.00	11.1	0.14

なかったことは、ジアセチルからアセトインへの変換が実際上不可逆反応であることを示しており、本菌におけるジアセチルの生成はアセトインの脱水素反応によるものではなく、ジアセチル合成酵素によるものと思われる。

一方、変異株No.2においては $\alpha$ -アセト乳酸合成酵素は親株の半分程度の活性を保持していたが、その他の酵素活性は著しく低下しており、特に2,3-ブタンジオール脱水素酵素の正反応は検出不可能であった。

変異株No.1は各酵素活性を保持していたのでこの菌株のアセトイン及びジアセチル生成量の低下はこれらの化合物の排出機構における膜透過機能が何らかの損傷を受けたためと思われる。また変異株No.2においては、バリンーロイシン生合成経路上の酵素でもある $\alpha$ -アセト乳酸合成酵素の活性は半分程に低下した。この原因としてはUmbergerら<sup>11)</sup>は*A. aerogenes*にアセトイン生成に関与する $\alpha$ -アセト乳酸合成酵素とバリンーロイシン生合成に関与する酵素の2種類の酵素の存在を指摘しているため、変異株No.2の場合にはアセトイン生成に関与している酵素の活性が低下した結果である可能性も考えられる。この点については今後バリンーロイシン生合成との関連で研究する必要がある。

Table 3. Purification summary of acetoin dehydrogenase and 2,3-butanediol dehydrogenase of *K. pneumoniae*.

Step	Total activity ( $\times 10^3$ units)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)	Purification (fold)	Ratio**
Cell-free extract	23.2 (12.7)*	7.7 (4.2)	100 (100)	1 (1)	1.83
Streptomycin treatment	—	—	—	—	—
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14.6 (10.4)	9.3 (6.6)	62.9 (81.9)	1.2 (1.6)	1.40
DE-32	8.5 (5.0)	430 (253)	36.6 (39.4)	56 (60)	1.70
5'-AMP	6.5 (3.9)	2118 (1225)	28.0 (30.7)	275 (300)	1.70

\* ( ) ; Activity of 2,3-butanediol dehydrogenase

\*\* Activity of acetoin dehydrogenase

Activity of 2,3-butanediol dehydrogenase

### 3. アセトイン脱水素酵素及び2,3-ブタンジオール脱水素酵素について

アセトイン脱水素酵素及び2,3-ブタンジオール脱水素酵素の両酵素活性が同時に低下することを認めたが、この原因が同一の遺伝的支配を受けているためなのか両酵素活性が同一の酵素によって触媒されているためなのかを明らかにするために両酵素の分離精製を試みた。すなわちアセトイン脱水素酵素を親株の無細胞抽出液を出発物質としてストレプトマイシン処理、硫酸分画、DE-32カラムクロマトグラフィー及び5'-AMP-アミノヘキシルセファロース4Bによるアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。その結果、Table 3に示されるように収率28%で比活性の上昇は275倍であった。一方、2,3-ブタンジオール脱水素酵素活性は全ての精製段階においてアセトイン脱水素酵素と同一の挙動を示し、その活性比は1.4~1.8であり特にDE-32カラムクロマトグラフィー及び5'-AMP-アミノヘキシルセファロースアフィニティクロマトグラフィーではその

価は1.7と一定であった。さらに収率は30%、比活性の上昇は300倍程であり、アセトイン脱水素酵素の場合とよく一致していた。このように両活性を通常の精製法では分離することはできなかった。次にポリアクリルアミドゲル電気泳動による分離を試みた。試料は精製酵素を用い、蛋白質染色及び酵素活性染色を行なった。結果をFig. 3に示す。蛋白質の染色バンドは2本観察されたが、活性染色の結果はアセトイン脱水素酵素及び2,3-ブタンジオール脱水素酵素の両活性はともに移動度の速い蛋白質と一致する泳動位置に検出され、電気泳動的にも全く同じ挙動を呈した。これらの諸結果はアセトイン脱水素酵素と2,3-ブタンジオール脱水素酵素が同一の酵素によって発現しているものと推察されるが、両酵素が蛋白質化学的に極めて類似した酵素である可能性も考えられるので、今後酵素化学的な

面からの研究も必要である。Brynら<sup>12)</sup>は *A. aerogenes* から単一にまで精製したジアセチル還元酵素(アセトイン脱水素酵素の逆反応)が2,3-ブタンジオール脱水素酵素反応をも触媒することを報告しており、また *K. pneumoniae* においても同様の結果が得られたので、アセトイン脱水素酵素-2,3-ブタンジオール脱水素酵素の両活性が単一の酵素によって触媒されることが普遍性を有するものと思われる。本酵素がこのように多機能酵素として作用することは、細胞内の酸化還元反応系における本酵素の生理学的な役割を明らかにするうえで非常に興味深い。

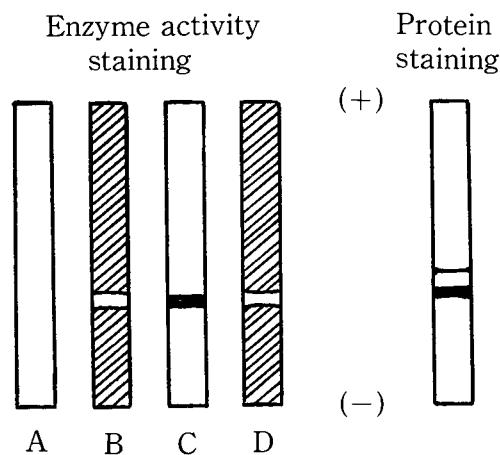


Fig. 3. Protein and enzyme activity patterns on polyacrylamide gel disc electrophoresis.

- A: Acetoin dehydrogenase (forward reaction)
- B: Acetoin dehydrogenase (backward reaction)
- C: 2,3-Butanediol dehydrogenase (forward reaction)
- D: 2,3-Butanediol dehydrogenase (backward reaction)

## 文 献

- 1) Happold, F. C. & Spencer, C. P.: The bacterial formation of acetylmethylcarbinol and 2,3-butylene glycol. *Biochim. Biophys. Acta* 8: 18-29, 1952.
- 2) Juni, E.: Mechanism of formation of acetoin by bacteria. *J. Biol. Chem.* 195: 715-716, 1952.
- 3) Strecker, H. J. & Harary, I.: Bacterial butylene glycol dehydrogenase and diacetyl reductase. *J.*

- Biol. Chem. **211** : 263—270, 1954.
- 4) Adelberg, E. A., Mandel, M. & Chen, G. C. C. : Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K 12. Biochem. Biophys. Res. Commun. **18** : 788—795, 1965.
  - 5) 東京大学農学部農芸化学教室 : "突然変異株のとり方" 実験農芸化学, 上巻, 東京 : 朝倉書店, 267—271, 1960.
  - 6) Prill, E. A. & Hammer, B. W. : A colorimetric method for the microdetermination of biacetyl. Iowa State Coll. J. Sci. **12** : 385—395, 1938.
  - 7) Westerfeld, W. W. : A colorimetric determination of blood acetoin and biacetyl. J. Biol. Chem. **161** : 495—502, 1945.
  - 8) Folin, O. & Ciocalteu, V. : On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. J. Biol. Chem. **73** : 627—650, 1927.
  - 9) 奥山典正 : "アセトイン, ジアセチル, 2,3-ブチレングリコール (Voges-Proskauer 法)" 生化学領域における光電比色法, 各論 **2**, 東京 : 南江堂, 116—128, 1958.
  - 10) 菊谷元資 : "Disc 電気泳動法" 化学と生物 **7** : 545—551, 1977.
  - 11) Halpern, Y. S. & Umbarger, H. E. : Evidence for two distinct enzyme systems forming acetolactate in *Aerobacter aerogenes*. J. Biol. Chem. **234** : 3067—3071, 1959.
  - 12) Bryn, K., Hetland, O. & Stoermer, F. C. : Reduction of diacetyl and acetoin in *Aerobacter aerogenes*. Evidence for one enzyme catalyzing both reactions. Eur. J. Biochem. **18** : 116—119, 1971.