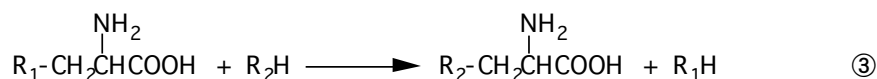
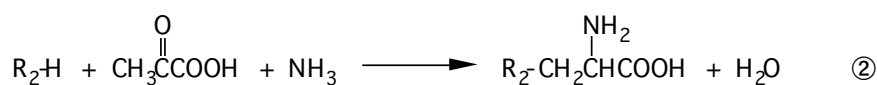
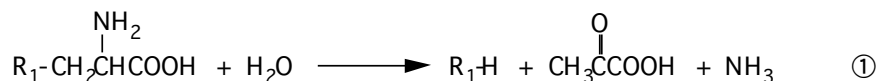


## 4 微生物生産—酵素法

### 4.1. L-チロシンの酵素合成

$\beta$ -チロシナーゼ ( $\beta$ -tyrosinase, tyrosine phenol-lyase) は、L-tyrosine を phenol, ammonia, pyruvate に分解する反応 (反応①) を触媒する酵素であるが、この逆反応である L-tyrosine 合成 (反応②) 及び L-tyrosine の phenol を他の基質 (例えば pyrocatechol) に置換 (反応③) する機能を持っている。このように分解反応、合成反応、置換反応と多彩な反応を触媒し、ビタミン B<sub>6</sub> を補酵素とすることから、多機能 B<sub>6</sub> 酵素と呼ばれる。また、これらの分解・合成・置換のいずれの場合も、L-tyrosine の側鎖にあたる部分がある程度異なっても、反応を触媒する能力を持っている。すなわち、基質特異性がかなり低い酵素である。従って、②、③の反応で R<sub>2</sub>H に pyro-catechol を用いるとパーキンソン病の治療薬として用いられる L-DOPA も効率よく合成することができる。



今回の実験では、最初に  $\beta$ -tyrosinase の生産菌である *Citrobacter intermedius* を L-tyrosine を含む培地で培養することで  $\beta$ -tyrosinase の誘導生成を行い、この酵素を含む菌体を直接触媒的に用いて phenol、pyruvate 及び ammonia から L-tyrosine の合成を行う。また、 $\beta$ -tyrosinase の誘導生成の際に、この酵素をコードする遺伝子の発現が、基質である L-tyrosine によって誘導されることを確認する。すなわち、L-tyrosine が存在しない状態で菌を培養した時と比較することにより、酵素の誘導生成とその機構を理解する。

#### 4.1.1. 菌体の培養

4人1組で2つの培養 (誘導培養と非誘導培養) を行う。

【実験方法】

1. 前培養培地\* (オートクレーブ済、L-tyrosine 非含有、5 ml/16.5×165 mm 試験管、シリコ栓) 2本に、*Citrobacter intermedius* (別途配布) 1白金耳を植菌する。
2. 28°Cで1日振とう培養を行う。
3. 本培養培地\* (オートクレーブ済、L-tyrosine 含有・非含有・各1本、60 ml/500 ml 容坂口フラスコ、シリコ栓) に前培養液をそれぞれ移植する。
4. 28°Cで15~18 時間振とう培養 (可能な限りこの培養時間が望ましい) を行う。
5. 培養液を各々2等分し、10,000 rpm、15 分間遠心分離した後、上清を捨てる。
6. 沈澱 (菌体) に2.5 ml の生理食塩水を加えて懸濁する (すぐに以下のチロシン合成実験を行えない時は、この食塩水を入れただけの状態で氷中に保存しておき、チロシン合成実験を行う直前に懸濁する方がよい。但し、何時間も放置したままはよくない)。
7. 誘導・非誘導菌体懸濁液が各々2本ずつ得られるので、以下2人1組で誘導・非誘導各1本ずつを用いて4.1.2 L-チロシンの酵素合成に供する。

\* 培地の組成

L-Tyrosine	0.2 % (w/v) …前培養培地には添加しない。本培養培地のうち
Meat extract	0.5 酵素誘導させる場合のみ加える。
Peptone	0.5
NaCl	0.2
Yeast extract	0.05
Tap water	pH 7.0 (BTBなどを指示薬として0.1 N KOHで調整)
オートクレーブした後、L-Tyrosine が析出するが、そのまま使用してよい。	

#### 4.1.2. L-チロシンの酵素合成

【実験方法】

1. 反応基質溶液\*15 ml (100 ml 容三角フラスコ、ゴム栓) 2本に、4.1.1. で調製した菌体懸濁液 (全量 2.5 ml、誘導・非誘導 2種) をそれぞれ加える。
2. 30°C水浴中で反応開始させる。
3. 反応開始直後 (0 時間) および 0.5 時間後に、両反応液から (反応液を振とうし均一に混ぜてから) 1 ml ずつ採取する (但し、採取する際は、未反応の phenol が有毒なので絶対に口で吸わず、安全ピペッターで吸うこと。析出したチロシン結晶のため採取しにくい場合は、ブルーチップ (1 ml 用チップ) の先端をハサミで少し切りとり、そのチップを付けたピペットマンで採取するとよい)。採取した反応溶液 1 ml に 0.1 N HCl 1 ml を添加し、反応を停止させる。
4. 反応 1 時間後、3.と同様に 1 ml ずつ採取し、0.1 N HCl 1 ml を添加して反応停止する。採取後、phenol 0.2 g を各反応液に追加する。
5. 反応 2 時間後、3.と同様に 1 ml ずつ採取し、0.1 N HCl 1 ml を添加して反応停止する。採取後、phenol 0.2 g および potassium pyruvate 0.63 g を各反応液に追加する。
6. 反応 3 時間後、phenol 0.2 g を各反応液に追加する。
7. 反応 4 時間後、3.と同様に 1 ml ずつ採取し、0.1 N HCl 1 ml を添加して反応停止する。
8. 反応停止した生成物溶液は、4.1.3. の定量操作を行うまで、実験台上に室温放置する。

\* Potassium pyruvate 0.63 g, phenol 0.2 g, ammonium acetate 1 g を 15 ml の H<sub>2</sub>O に溶解し、1 N KOH で pH 8.0 に調整する (実験当日調製。phenol は皮膚などにつけないこと。ついた時は直ちによく洗う。phenol を天秤や実験台の周りに撒き散らさないように !!)。

### 4.1.3. L-チロシンの定量

L-tyrosine が nitroso-2-naphtol・硝酸と反応すると、赤色物質 (不安定) が生成する。これを加熱することによって、安定な黄赤色物質に変えて定量する。この際、phenol が定量に大きな影響を及ぼすので、サンプル中に残存する phenol を isoamyl acetate で抽出除去してから定量を行う。

#### 【実験方法】

1. Tyrosine 標準溶液\* (50 μg/ml) を各自 0.1 N HCl で希釈して 6 種の希釈標準液 (0, 10, 20, 30, 40, 50 μg/ml 各 10 ml) を調製する。また、各反応時間 (0, 0.5, 1, 2, 4 時間) に対する反応生成物溶液 (誘導) の 50, 25, 10 倍希釈 (反応停止用 HCl が等量添加されているので、実質、100, 50, 20 倍希釈) と、反応生成物溶液 (非誘導) の 10 倍希釈 (実質 20 倍希釈) を、0.1N HCl を用いて調製する。標準液および反応液、計 26 種について以下の定量操作を行う。
2. 各測定サンプル 5 ml (16.5×165 mm 試験管) に isoamyl acetate 5 ml を安全ピペッターで添加し、ゴム栓をして十分に攪拌する。この操作により、未反応の phenol を有機溶媒で抽出除去することができる。
3. 上層を安全ピペッターで除去した後、下層 (水相) に対して 2.の操作をもう一度行う。
4. 上層を取り除いた下層 (水層) から、2 ml を 16.5 mm×100 mm 短試験管に採取する。
5. 0.1% nitroso-2-naphtol 溶液\* 1 ml および 0.5 mg/ml sodium nitrite 溶液\* 1 ml を加え、攪拌する。
6. 試験管にアルミキャップをかぶせて、55°C で 30 分間加熱する。
7. 未反応の nitroso-2-naphtol を除去するために、1,2-dichloroethane 3 ml を安全ピペッターで加え、ゴム栓をして激しく攪拌する。
8. ゴム栓をはずして、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上層を採取する (試験管を遠心ローターにセットする際、試験管が割れないようにローターの底にキムワイプを少しだけ詰める。但し、キムワイプを多く詰めすぎないこと。下層はクロル含有有機廃液溜めへ捨てる)。
9. 採取した上層について、450 nm での吸光度を測定する。

\* 50 μg/ml L-tyrosine 標準溶液 (0.1 N HCl に溶解)、0.1% nitroso-2-naphtol (95% ethanol に溶解)、0.5 mg/ml sodium nitrite (5 倍希釈の nitric acid に溶解) ・各 1000 ml を当番が調製する。

#### 参考文献

- (14) 日本農芸化学会誌, 52 巻 (8 号), R111 - R118 (1978)
- (15) Advances in Applied Microbiology, 19 巻, 249 - 288 (1975)