

●論文

メタノール資化性酵母 *Candida* sp. N-16 のエタノール代謝における酵素誘導

吉川 潤^{1,†}・小山麻理子²・
関 桂¹・藤井貴明^{1,2}・
天知誠吾^{1,2*}

¹ 千葉大学大学院 園芸学研究科
² 千葉大学 園芸学部
* 代表著者
† 現所属：東京農業大学 応用生物科学部

Enzyme induction during ethanol metabolism in a methylotrophic yeast, *Candida* sp. N-16.

Jun Yoshikawa^{1,†}, Mariko Koyama²,
Katsura Seki¹, Takaaki Fujii^{1,2},
Seigo Amachi^{1,2*}

¹ Graduate School of Horticulture, Chiba University

² Faculty of Horticulture, Chiba University

* Corresponding author

† Present address: Faculty of Applied Biosciences, Tokyo University of Agriculture

Abstract

The enzyme production was investigated to understand ethanol metabolism in a methylotrophic yeast, *Candida* sp. N-16. Alcohol dehydrogenase, which is a primary oxidative enzyme in the ethanol utilization, and isocitrate dehydrogenase, involved in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, were constitutively produced regardless of the carbon source and growth phase. During ethanol metabolism, isocitrate lyase (ICL), which is involved in the bypass pathway of the TCA cycle, and phosphoenolpyruvate kinase (PEPK), a key enzyme in the gluconeogenesis pathway, were induced in the log phase. On the other hand, ICL but PEPK not was detected at a very low level during cultivation in methanol.

KEYWORDS: *Candida* sp. N-16, methylotrophic yeast, ethanol

キーワード： *Candida* sp. N-16, メタノール資化性酵母, エタノール

はじめに

メタノール資化性酵母はメタノールを唯一の炭素源として生育することができる特殊な微生物であり、特徴的な代謝経路を有していることから細胞生物学ならびに遺伝子工学の分野で広く用いられている (Tani 1984; 阪井 1988; Yurimoto 2009)。メタノール資化性酵母がメタノールを利用する際、一般的に知られているアルコール脱水素酵素ではなく、アルコール酸化酵素が初発酸化酵素として利用される。その後、ホルムアルデヒド脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素を経て二酸化炭素まで酸化され、その際に二分子のNADHが生じることで最終的にATPを獲得できる。また、代謝の過程でペントースリン酸経路から解糖経路といった中心代謝経路にもつながっている。一方、メタノール資化性酵母は、Lee

and Komagata (1980) に示されている通り、エタノールをメタノールと同様に唯一の炭素源として利用できることが知られているが、エタノールの代謝に関する報告は少ない。本報告の供試菌株である *Candida* sp. N-16 においては、メタノールを炭素源としたときに初発酸化酵素としてアルコール酸化酵素が生産される一方、エタノールによる培養では生産されることが分かっている (Fujii and Tonomura 1972)。一方でアルコール脱水素酵素は炭素源に関わらず生産されることから、これがエタノール資化における初発酸化酵素として機能していると考えられるが、以降の代謝酵素については不明である。エタノールは、その入手のし易さならびに微生物培養における炭素源として利用性が高いため、その代謝を理解することは微生物利用の観点から非常に重要である。そこで、本研究ではメタノール資化性酵母におけるエタノールの代謝生理を理解するための第一段階として、*Candida* sp. N-16

代表著者：天知 誠吾

千葉大学大学院園芸学研究科 生物資源科学コース 応用生命化学領域

amachi@faculty.chiba-u.jp

doi: 10.20776/S18808824-74-P1

のエタノール代謝に関連すると思われる酵素の生産について検討を行った。

材料および方法

供試菌株

本研究で使用した菌株は、旧工業技術院生命工学工業技術研究所から分譲されたメタノール資化性酵母である *Candida* sp. N-16を用いた。

培地および培養

菌株の維持については、Fujii and Tonomura (1972) に記載の基本無機塩類培地をオートクレーブ後、1% (w/v) となるようにメタノールを添加したメタノール寒天培地で28℃、1週間培養した後に4℃で保存した。その後、同基本無機塩類培地に1% (w/v) のエタノールならびにメタノールをそれぞれ添加した液体培地を300 mL含む1 L容三角フラスコに、一白金耳となるように植菌し、28℃、180 rpmの条件で振とう培養した。得られた培養液を遠心分離 (3000×g, 7 min) にて集菌し、50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.2) で洗浄する操作を3回繰り返した後に再び集菌した。集菌した菌体を同緩衝液20 mLにて懸濁し、氷冷しながら100 Wで2 minの超音波破碎を3回行い、遠心後 (10000×g, 20 min) の上清を粗酵素液として以降の検討に用いた。

酵素活性測定

アルコール脱水素酵素 (Alcohol dehydrogenase, ADH) に関してはYabe et al. (1992) の方法、イソクエン酸脱水素酵素 (Isocitrate dehydrogenase, IDH) に関してはMartinez-Rivas and Vega (1998) の方法、リンゴ酸脱水素酵素 (Malate dehydrogenase, MDH) に関してはOshima and Sakurada (1988) の方法、イソクエン酸リアーゼ (Isocitrate lyase, ICL) に関してはTahama et al. (1990) の方法、リンゴ酸シンターゼ (Malate synthase, MS) に関してはDurchschlag et al. (1981) の方法、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPK) に関してはFujii et al. (1998) の方法に準じてそれぞれ活性を測定した。比活性についてはタンパク質当たりの活性値として示し、算出するためのタンパク質量に関しては、Lowry法を用いてBSAを標準タンパク質とした。

結果

エタノールならびにメタノールを炭素源としたときの酵素生産

Candida sp. N-16をエタノールならびにメタノールを単一の

炭素源として定常期まで培養した (図1)。本菌をエタノールを炭素源として対数増殖期後期まで培養したときに要した培養時間は約24時間であった。メタノールでは約48時間の培養時間であり、本菌のエタノールの利用性はメタノールよりも高かった。

次に各炭素源にて対数増殖後期まで培養したときの代謝酵素について活性測定を行った。炭素源に関わらず、エタノール利用時の初発酸化酵素として考えられるADH、TCAサイクルに関連するIDHやMDHで構成的な生産が確認された。その中でMDHだけはエタノールよりもメタノールを炭素源としたときの方が高い活性を示した。エタノールを炭素源としたときの特徴として、TCAサイクルの迂回経路となるグリオキシル酸経路に関連するICLやMS、糖新生の鍵酵素であるPEPKといった酵素の生産が誘導的に確認され、メタノールではほとんど検出されなかった (表1)。

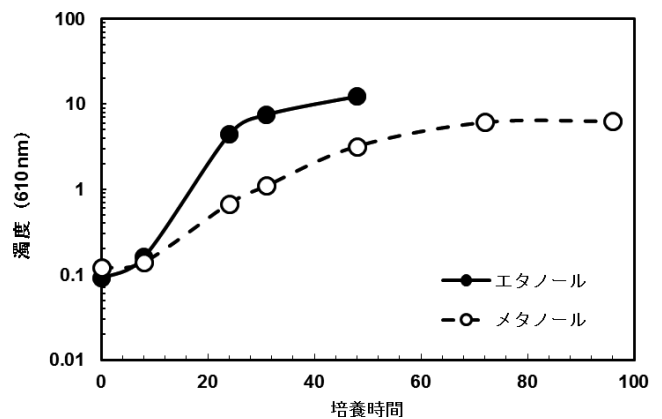


図1 エタノール、ならびにメタノール培地における *Candida* sp. N-16の生育曲線

各炭素源における生育曲線については、610 nmの濁度で示されている。エタノール利用時には、約24時間で対数増殖期後期に達する。一方、メタノール利用時には、対数増殖期後期に達するまでに48時間を必要とする。

表1 *Candida* sp. N-16におけるエタノールならびにメタノール利用時の代謝酵素

炭素源	酵素活性 (nmol/min/mg-protein)					
	ADH	IDH	MDH	ICL	MS	PEPK
エタノール	829	46.5	1050	164	132	12.5
メタノール	535	13.3	1890	1.3	検出不可	検出不可

用いた酵素については、Fig. 1におけるエタノール培養の24時間、ならびにメタノール培養の48時間で回収した菌体からそれぞれ調製した。エタノール利用時にICL、MS、PEPKといった酵素が誘導されており、ADH、MDH、IDHに関してはいずれの炭素源でも発現している。

ADH: アルコール脱水素酵素, IDH: イソクエン酸脱水素酵素, MDH: リンゴ酸脱水素酵素, ICL: イソクエン酸リアーゼ, MS: リンゴ酸シンターゼ, PEPK: フォスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ

エタノール利用時における酵素生産の経時変化

エタノールを炭素源として、培養24～48時間の間で継時的な酵素活性の変化を調べた(表2)。前項で構成酵素と考えられたADHやIDHは、代謝の盛んな対数増殖期から代謝が低下する定常期までの培養時期に関わらず、高い生産が確認された。一方、糖新生を行う上で重要となるICLやPEPKにおいては、対数増殖期をピークとして定常期以降でその発現が低下しており、細胞の増殖に連動して制御されていることが示された。

考 察

メタノール資化性酵母であるCandida sp. N-16をメタノールまたはエタノールを炭素源として培養したところ、エタノール培地での生育の方がメタノールの時よりも速かった。微生物の利用を考慮したとき、短時間で培養できる点はコスト効果が高いと言える。メタノール資化性酵母のメタノール利用時は、独自の代謝経路が発現し、一分子のメタノールからホルムアルデヒド脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素を介して二分子のNADHを生成することが知られている(Tani 1984; 阪井 1988)。一方でエタノールは、最初の段階でアルコール脱水素酵素の反応により一分子のNADHを生産し、TCAサイクルによって三分子のNADHと一分子のFADH、ならびに一分子のGTPを獲得する。エタノールとメタノールの分子量差を考慮したとしても、1%の重量から得られるATP量はエタノールの方が約1.7倍多い計算となる。このことは本菌にとってエタノールがメタノールよりも生育速度が速い理由の一つかもしれない。

図2に本研究結果から推測されたエタノールの代謝経路を示した。エタノール利用時には生育時期に関わらず、ADHを初発酸化酵素とし、異化経路としてTCAサイクルを恒常的に回転させることでエネルギーを獲得していること

表2 Candida sp. N-16のエタノール利用時における代謝酵素の経時変化

培養時間 (時間)	酵素活性 (nmol/min/mg-protein)			
	ADH	IDH	ICL	PEPK
24	829	46.5	164	12.5
36	603	43.2	60.1	18.5
48	558	37.6	25.4	検出不可

定常期以降においても初発酸化酵素として考えられるADHやTCAサイクルに関連するIDHの生産は変わらず、グリオキシル酸経路に関連するICLや糖新生の鍵酵素であるPEPKの生産量は低下した。

ADH: アルコール脱水素酵素, IDH: イソクエン酸脱水素酵素, ICL: イソクエン酸リアーゼ, PEPK: フォスフォエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ

が、IDHやMDHの結果から考えられる。さらに、細胞増殖期には同化経路として糖新生を行うため、ICLやMSといったグリオキシル酸経路からPEPKを誘導的に発現することで、効率的にTCAサイクルを迂回していることが推測される。一方、メタノール利用時には、ジヒドロキシアセトンリン酸から解糖系に入るの、これらの酵素を必要としないことが推測される(表1, 表2)。

また、本研究においてMDHのみがエタノールを炭素源としたときよりもメタノールを炭素源としたときの方が高い活性を示した(表1)。供試菌株であるCandida sp. N-16は、炭素源に関わらず構成的に生産されるMDH-M1の他に、エタノールを炭素源としたときには生産されずにメタノール条件下で誘導的に生産されるMDH-M2の存在が確認されている(Yoshikawa et al. 2001)。このことがメタノールでMDH活性が高い原因であると考えられる。

近年はゲノム解析技術の進歩により、多くの微生物ゲノムが解読されている。メタノール資化性酵母においても、例えばBorelli et al. (2016) によってCandida boidiniiのゲノムが公開されている。このゲノム情報を参照すると、本研究と同様にICL, MS, PEPKなどを保有している事が容易に分かる。しかしながら、炭素源の種類や生育段階での生産レベルの差を理解するためには、実際の酵素活性を検出しなければならない。本研究によってCandida sp. N-16のエタノール利用経路を実際の酵素活性値から推測することができた。今後はメタボローム解析などの代謝物レベルでの相関を調べることで、メタノール資化性酵母の特徴的な代謝経路をより理解することができると考えている。

和文抄録

メタノール資化性酵母であるCandida sp. N-16におけるエタノール代謝を理解するため、エタノールを炭素源として培養したときの酵素生産について調べた。炭素源や培養時期に関わらず、エタノール利用時の初発酸化酵素であるアルコール脱水素酵素や、TCAサイクルに関連するイソクエン酸脱水素酵素において構成的な生産が確認された。エタノールを炭素源としたときの特徴として、TCAサイクルの迂回経路であるイソクエン酸リアーゼ、糖新生の鍵酵素であるフォスフォエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの生産が対数増殖期で誘導的に生産され、これらはメタノール培養時で検出されないか、極めて低値であった。

引用文献

Borelli, G., José, J., Teixeira, P. J., Dos Santos, L. V., and Pereira, G. A. (2016) *De novo* assembly of *Candida sojae* and *Candida boidinii*

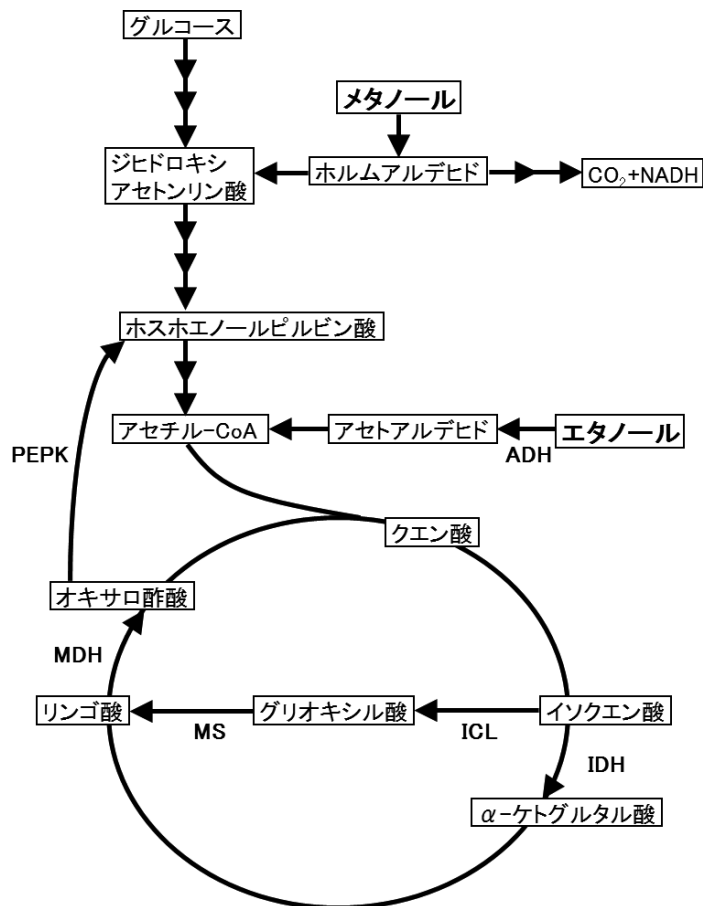


図2 *Candida sp. N-16*における代謝経路

各炭素源（エタノール、メタノール、ならびにグルコース）からの代謝が矢印によって示されている。エタノール利用時には、グリオキシル酸経路からPEPKを介して糖新生を行っていると考えられる。一方、メタノール利用時には、ジヒドロキシアセトンリン酸から解糖系に入るの、表1の結果を考慮してこれらの酵素を必要としないと推察できる。

ADH：アルコール脱水素酵素、IDH：イソクエン酸脱水素酵素、MDH：リンゴ酸脱水素酵素、ICL：イソクエン酸リアーゼ、MS：リンゴ酸シンターゼ、PEPK：フォスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ

genomes, unexplored xylose-consuming yeasts with potential for renewable biochemical production. *Genome Announc.*, 4: e01551-15. doi: 10.1128/genomeA.01551-15.

Durchschlag, H., Biedermann, G. and Eggerer, H. (1981) Large-scale purification and some properties of malate synthase from baker's yeast. *Eur. J. Biochem.* 114: 255-262. doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05144.x.

Fujii, T. and Tonomura, K. (1972) Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by a *Candida* species. *Agr. Biol. Chem.* 13: 2297-2306. doi: 10.1080/00021369.1972.10860585.

Fujii, T., Sadaie, M., Saijou, M., Nagano, T., Suzuki, T., Ohtani, M. and Shinoyama, H. (1998) Physiological properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Rhodospseudomonas sp. No.7*. *Stud. Surf. Sci. Catal.* 114: 463-466. doi:

10.1016/S0167-2991 (98) 80796-9.

Lee, J.D. and Komagata, K. (1980) Taxonomic study of methanol-assimilating yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 26: 133-158. doi: 10.2323/jgam.26.133.

Martinez-Rivas, J. M. and Vega, J. M. (1998) Purification and characterization on NAD-isocitrate dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 118: 249-255. doi: 10.1104/pp.118.1.249.

Oshima, T. and Sakurada, H. (1988) Purification and characterization of malate dehydrogenase from the phototrophic bacterium, *Rhodospseudomonas capsulate*. *Biochim. Biophys. Acta* 869: 171-177. doi: 10.1016/0167-4838 (86) 90291-8.

阪井康能 (1988) メタノール資化性酵母における細胞機能制御の分子機構と応用開発に関する研究. *日本農芸化学会誌* 72: 1333-

1344. doi: 10.1271/nogeikagaku1924.72.1333.
- Tahama, H., Shinoyama, H., Ando, A. and Fujii, T. (1990) Purification and characterization of isocitrate lyase from *Rhodopseudomonas* sp. No.7. *Agr. Biol. Chem.* 54: 3177-3183. doi: 10.1271/bbb1961.54.3177.
- Tani, Y. (1984) Microbiology and biochemistry of methylotrophic yeasts. *Methylotrophs: Microbiology, Biochemistry and genetics* 1st ed. (Hou, C. T. eds.). CRC Press, Boca Raton, 55-85. doi: 10.1201/9781351074513.
- Yabe, M., Shitara, K., Kawashima, J., Shinoyama, H., Ando, A. and Fujii, T. (1992) Purification and properties of an alcohol dehydrogenase isozyme from a methanol-using yeast, *Candida* sp. N-16. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 338-339. doi: 10.1271/bbb.56.338.
- Yoshikawa, J., Seki, K., Shinoyama, H. and Fujii, T. (2001) Purification and properties of two malate dehydrogenases from *Candida* sp. N-16 grown on methanol. *Biosci. Biotech. Biochem.* 65: 1659-1662. doi: 10.1271/bbb.65.1659.
- Yurimoto, H. (2009) Molecular basis of methanol-inducible gene expression and its application in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 73: 793-800. doi: 10.1271/bbb.80825.