

メタノール資化性酵母 *Candida* sp. N-16 の ギ酸脱水素酵素の固定化とその性質

藤井貴明・安藤昭一・矢吹 稔

(応用微生物学研究室)

Immobilization and Properties of Formate Dehydrogenase from Methanol-Utilizing Yeast, *Candida* sp. N-16

Takaaki FUJII, Akikazu ANDO and Minoru YABUKI

Laboratory of Applied Microbiology

Abstract

Formate dehydrogenase was purified 18-fold from *Candida* sp. N-16 grown on the medium containing methanol by procedures including heat-treatment and chromatographies on DEAE Sephadex A-50 and Sephadex G-200. The final enzyme preparation was homogeneous in polyacrylamide gel disc electrophoresis. Its optimum pH and temperature of the enzyme activity were pH 6.5 - 8.0 and 50°C. The activity was lost by treatment at 60°C for 15 min. The K_m values were found to be 16 mM for formate and 0.056 mM for NAD. The purified enzyme was immobilized by covalent bonding on Sepharose 4B, which was activated by cyanogen bromide. The specific activity of the immobilized enzyme was 0.01 unit/mg resin. The K_m values were found to be 19 mM for formate and 0.11 mM for NAD. Its optimum pH and temperature were pH 6.8 - 8.0 and 55°C. The pH and thermal stability of the immobilized enzyme were higher than those of the native enzyme.

緒 言

微生物機能の利用は多岐に渡っているが、近年、特にバイオリアフターとして微生物ならびに微生物の生産する酵素を利用するという試みに多くの関心が寄せられている。しかしながら、このような見地よりメタノール資化性微生物の利用を拡大するという試みは、現在までのところほとんど検討されていない。メタノール資化性酵母を例にとると、酵母はメタノールをホルムアルデヒド、ギ酸を経て炭酸ガスへと酸化し、主にこの経路で得られるエネルギーを利用して生育していくものと考えられている。また、これら酸化反応の各段階に関与する酵素、アルコール酸化酵素、カタラーゼ、ホルムアルデヒド脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素はいずれも培地中のメタノールによって著しく誘導生成されることが知られている (TANI *et al.*, 1978; COBOY *et al.*, 1979)。この場合、特にギ酸脱水素酵素はNADの

存在下にギ酸を酸化し、NADHと炭酸ガスを生成することから、この反応系を減圧下あるいは弱酸性に保つことにより炭酸ガスを反応系外に取り除き、常に反応をNADHの生成する方向に傾けることも可能と考えられる。

そこで著者らは、メタノール資化性酵母のギ酸脱水素酵素によるNADよりNADHの生産やNADH依存反応への応用を目標に、まず *Candida* sp. N-16より本酵素を精製し、得られた精製酵素標品とCyanogen bromide activated Sepharose 4 B (CNBr-活性化Sepharose 4 B)を用いて固定化酵素を調製した。本報においては、これら標品の酵素化学的性質について検討した結果を報告する。

メタノール資化性酵母 *Candida* sp. N-16 を分譲して下さいました工業技術院微生物工業技術研究所に感謝致します。

実験方法

使用菌株ならびに培養方法

メタノール資化性酵母は工業技術院微生物工業技術研究所から分譲された *Candida* sp. N-16 を使用した。菌株の培養は前報 (FUJII & TONOMURA, 1972) に従い 1% (wt/v) のメタノールを含む塩類培地 300ml を 1ℓ 三角フラスコに入れ、これに供試菌株を接種し、30℃にて40時間回転振盪培養 (200rpm) した。菌株の保存は上記組成の培地に 1.5% (wt/v) の寒天を加えて調製した斜面培地を用いて行った。メタノールはいずれの培地においてもオートクレーブ滅菌したのち添加した。

ギ酸脱水素酵素活性の測定

ギ酸脱水素酵素活性は 50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) 2ml; NAD, 2μmoles; ギ酸ソーダ, 100μmoles に酵素液と水を加え全量を 3ml とし、30℃における NADH の生成を 340nm における吸光度の増加より求めて測定した。酵素 1 単位は上記反応条件において 1 分間に 1μmole の NADH を生成するに要する酵素量とした。比活性はタンパク質 1mg 当りの酵素の単位数で表した。

タンパク質の定量

タンパク質の定量は牛血清アルブミンを標準として LOWRY ら (1951) の方法に従って行った。またクロマトグラフィーにおいては 280nm における吸光度を測定した。

ディスク電気泳動

ミツミ科学産業製の電気泳動装置を使用し DAVIS ら (1964) の方法に準じて行った。すなわち 7.5% ポリア

クリルアミドゲルを用いて pH9.5 でカラム当り 3mA, 2 時間通電した。ゲルは amidoblack 10B で染色し、7.5% 酢酸で脱色した。

結果

ギ酸脱水素酵素の精製

KATO ら (1974) は *Kloeckera* sp. No. 2201 のギ酸脱水素酵素が硫安処理によって著しくその活性を失うと報告している。そこで *Candida* sp. N-16 から酵素を精製するにあたり、まず、本酵素に対する硫安の影響を検討した。*Candida* sp. N-16 の酵素は、細胞抽出液に硫安を 0.4~0.8 飽和の濃度で添加し、4℃にて 1 夜以上放置したのちもほとんど活性を失うことがなく、0.7 飽和以上の濃度の硫安で沈澱する区分に 90% 以上の活性が回収された。またこのような沈澱状態のままで 1 ヶ月以上経過したのちにもほとんど活性が失われることはなかった。しかしながら、0.4~0.7 飽和の硫安分画を行った結果得られた区分を DEAE-Sephadex A-50 カラムで処理した場合には、すでに前報 (FUJII & TONOMURA, 1975) に示したようにカタラーゼを含まないギ酸脱水素酵素を収率よく精製することは困難であった。またこれとは別に、粗酵素液を熱処理したのち硫安分画を試みた場合、その理由については明らかになっていないが、ギ酸脱水素酵素は熱処理溶液からきわめて沈澱回収が困難となり、大部分の活性は溶液中に残ることが観察された。

以上の結果をもとに以下の方法に従って *Candida* sp. N-16 の 1% (wt/v) メタノール培地に生育した菌体よりギ酸脱水素酵素を精製した。すなわち 5ℓ の培

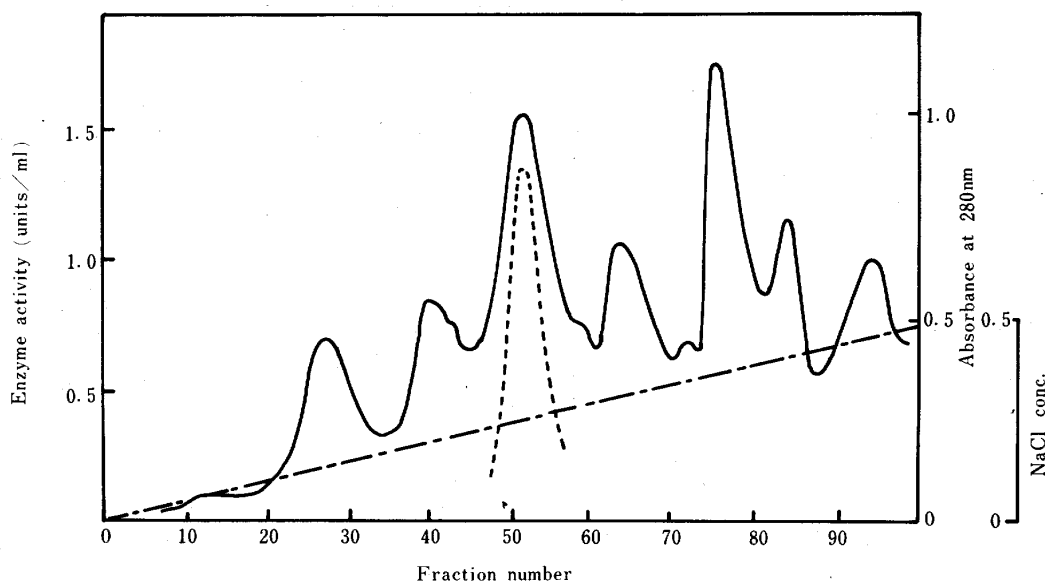


Fig. 1. Chromatography of formate dehydrogenase on a DEAE Sephadex A-50 column. The method is described in the texts. (—), absorbance at 280 nm; (----), activity of formate dehydrogenase; (- - -), concentration of NaCl.

Table 1. Purification of formate dehydrogenase from *Candida* sp. N-16

Step	Total protein (mg)	Total enzyme activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	1,357	293	0.216	100	1
Heat treatment	390	267	0.684	91	3.2
DEAE Sephadex A-50	67	221	3.30	75	15.2
Sephadex G-200	49	187	3.82	64	17.7

地より得られた菌体8.5 g (乾物重) を50mMリン酸緩衝液 (pH7.2) にて3回洗浄したのち、120mlの同緩衝液に懸濁し、この30mlについてそれぞれに30 gのガラスビーズ (径0.25mm) を加えブラウン社製セルホモゲナイザーを用いて破碎した。破碎処理は炭酸ガスで冷却しながら1分間ずつそれぞれについて3回行った。菌体破碎後、25,000xg、30分間の遠心分離を行い、残渣を除いた上澄液を粗酵素液とした。粗酵素液を50°C 15分間加熱し、熱変性して不溶性になった区分を10,000xg、15分間の遠心分離によって取り除いたのち透明な上澄液を50mMリン酸緩衝液に対して1夜透析した。透析内液をそのまま濃縮せずにあらかじめ同上緩衝液で平衡化したDEAE Sephadex A-50 (2.5×45cm) のカラムに添加吸着させ、同一緩衝液で洗浄したのち、

酵素を0～500mMの塩化ナトリウム濃度勾配にて溶出した。その結果は第1図に示すようにNo47～57フラクションにギ酸脱水素酵素活性が認められた。これを集めたのちコロジオンバックにて濃縮および透析を行い、得られた透析液を50mMリン酸緩衝液で平衡化したSephadex G-200カラム (2.5×90cm) に添加したのち同一緩衝液で溶出した。その結果は第2図に示すように、No.30～40フラクションにギ酸脱水素酵素活性が認められ、タンパク質のピークと活性のピークはよく一致していた。この画分を集め精製ギ酸脱水素酵素標品として以下の実験に供した。以上の結果、粗酵素液よりギ酸脱水素酵素を17.7倍に精製し、比活性 3.8 (units/mg protein) の標品を得た。活性の回収率は64%であった。これら各精製過程における結果を第1表にまとめた。精製酵素標品はディスク電気泳動的に単一であった。

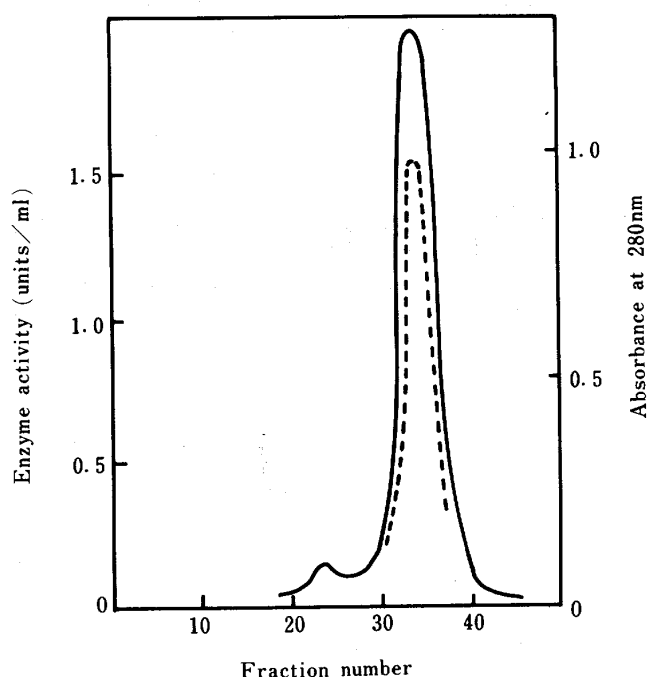


Fig. 2. Gel filtration of formate dehydrogenase on a Sephadex G-200 column. (—), absorbance at 280 nm; (----), activity of formate dehydrogenase.

ギ酸脱水素酵素の固定化

酵素の固定化は担体として市販のCNBr 活性化Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals) を用いて Pharmacia manual (1979) に準じて行った。

すなわち膨潤化したCNBr-活性化Sepharose 4 B (1 g) をガラスフィルター上で50mlの1 mM HClを用いて洗浄したのち、0.5 M NaClを含む0.1 M 重炭酸ソーダ緩衝液 (pH8.3) からなるカプリングバッファーに懸濁し、これに1 mlの精製ギ酸酵素溶液 (12mg/ml) を加え室温でゆるやかに攪拌しながらカプリング反応を行い固定化酵素を調整した。担体の活性残基は少量の1 Mエタノールアミンを用いて不活性化し、固定化酵素はカプリングバッファー、0.5 M NaClを含む0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4), 更にカプリングバッファーを用いて洗浄したのち蒸留水に懸濁して4°Cにて保存した。これとは別にカプリング反応を前述の0.1 M 重炭酸ソーダ緩衝液のかわりに50mMリン酸緩衝液 (pH7.2) を用い、他は同様な条件で固定化酵素を調製し、カプリングバッファーの影響についても検討した。これらの結果を第2表に示す。リン酸緩衝液中でカプリ

Table 2. Immobilization of formate dehydrogenase

	Total enzyme activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Recovery of activity (%)
Native enzyme (12 mg of protein)	45.8	3.8	100
Enzyme immobilized (1 mg of resin)		units/mg resin	
in NaCO ₃ buffer, pH 8.3	4.9	0.005	11
in phosphate buffer, pH 8.0	9.0	0.01	20

ングを行った場合、通常使用されている重炭酸ナトリウム緩衝液に比較して担体当りの活性の高い固定化酵素を調製することができた。また、その時の活性の回収率は約20%であった。以後の実験にはリン酸緩衝液中でカップリング反応を行って調製した標品を用いた。

精製酵素ならびに固定化酵素の諸性質

1. 最適pH

各pHにおいて30℃におけるギ酸脱水素酵素活性を求め第3図に示した。精製酵素、それを固定化した酵素は

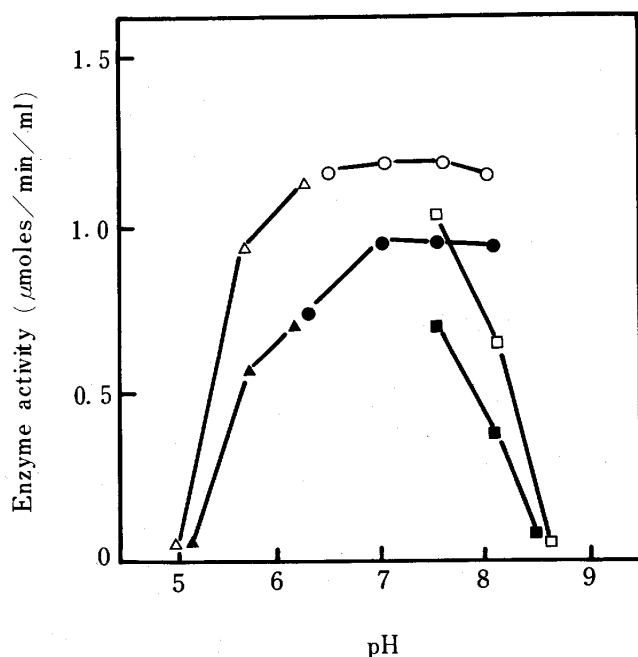


Fig. 3. Effect of pH on activity of enzymes. The enzyme activity was measured under the standard assay conditions using following buffers; Sodium phosphate-citrate buffer (Δ, ▲), sodium phosphate buffer (○, ●), boric buffer (□, ■). (Δ, ○, □), native enzyme; (▲, ●, ■), immobilized enzyme.

ともに活性の最適pHは6.5~8.0であった。また、両標品はいずれもホウ酸緩衝液 (pH8.0) 中ではリン酸緩

衝液 (pH8.0) 中に比較して50%近い活性の低下がみられた。この結果は *Kloeckera* sp. No.2201からの酵素の活性がホウ酸緩衝液中ではむしろ高いという結果 (KATO *et al.*, 1974) と異なった傾向を示すものであった。

2. pH安定性

酵素標品をpH3.8~12の範囲の緩衝液 (0.05M) でそれぞれ5倍に希釈し30℃にて60分間放置したのち、6倍量の0.05M緩衝液でpH7.2に調整して残存活性を測定した。その結果は第4図に示すように、精製酵素は

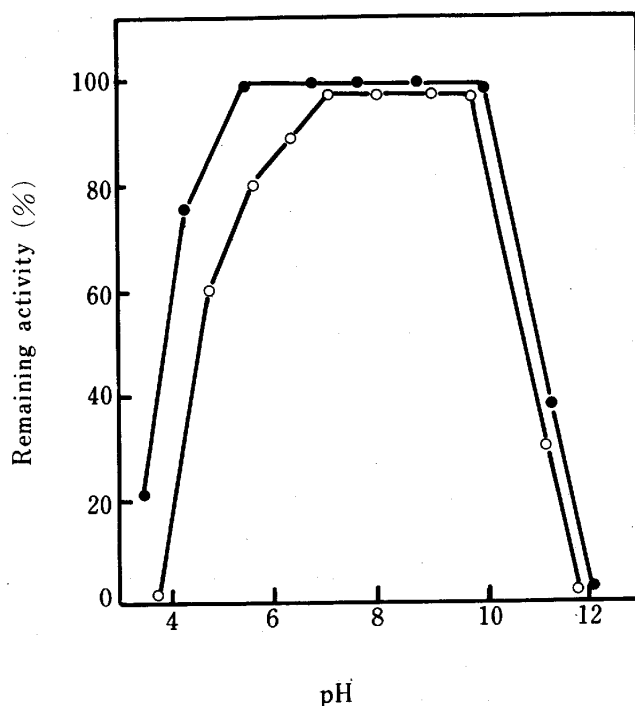


Fig. 4. Effect of pH on stability of enzymes. The enzyme, in each pH indicated in Fig. 3, was preincubated at 30℃ for 60 min. The remaining activity was measured under the standard assay conditions. (○), native enzyme; (●), immobilized enzyme.

pH6.5~11の間で安定であるのに対して、固定化することによって酸性領域での安定性が増加し、pH4.8まで活性の低下はみられなかった。

3. 活性におよぼす温度の影響

各温度における活性を測定したところ第5図に示したように活性の最適温度は精製酵素については約50℃と *Kloeckera* sp. No. 2201の酵素 (KATO *et al.*, 1974) とほぼ等しい結果であった。それを固定化することにより最適温度は約5℃上昇し55℃付近となった。なお本実験の場合は、あらかじめ所定の温度にてプレインキュベートした反応液に酵素標品を加えて、反応を開始した。

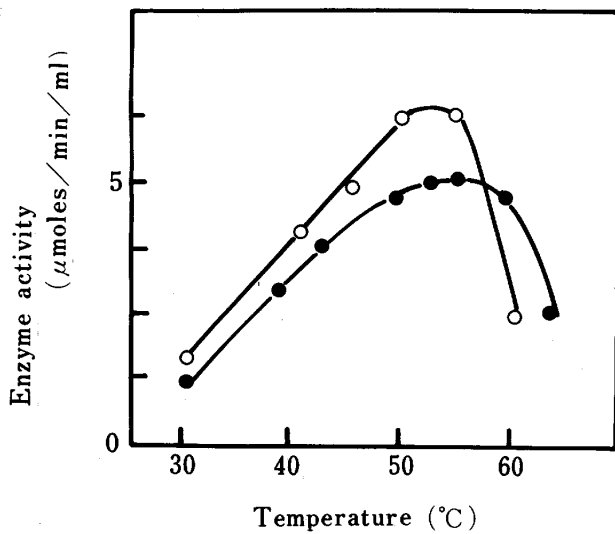


Fig. 5. Effect of temperature on activity of enzymes. The enzyme activity was measured under the standard assay conditions at various temperatures. (○), native enzyme; (●), immobilized enzyme.

4. 熱ならびに保存中における安定性

酵素を pH7.2 で各温度に 15 分間保持したのち、30 °C で活性を測定した結果を第 6 図に示す。精製酵素は加

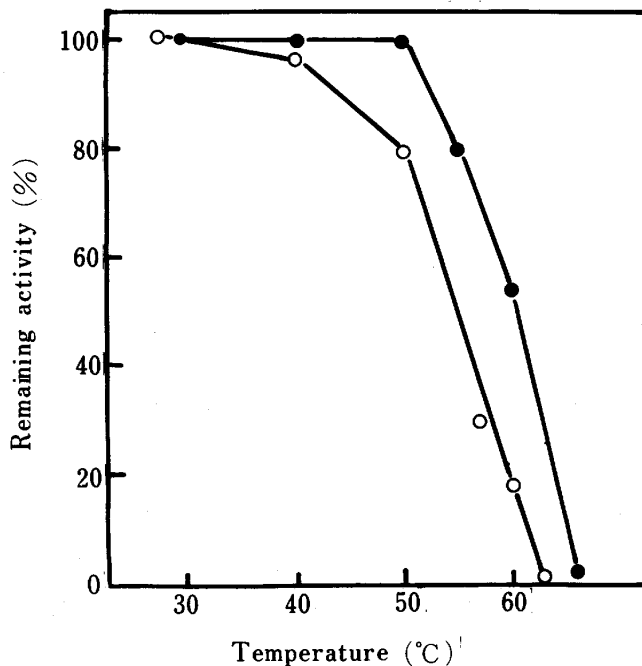


Fig. 6. Effect of temperature on stability of enzymes. The enzyme was preincubated for 15 min at each temperature as indicated. The remaining activity was measured under the standard conditions. (○), native enzyme; (●), immobilized enzyme.

熱温度の上昇に伴い徐々に活性を失い、残存活性は 50 °C において 80%, 60 °C において 20% 以下に低下するのに対して、固定化した酵素については 50 °C でほとんど活性を失うことなく、60 °C においても約 50% の活性が存在した。

これとは別に酵素を 4 °C にて保存した場合には、バクテリア等による変敗がなければ長時間安定であった。特に、固定化酵素を Tris-HCl 緩衝液に懸濁して保存したものは細菌による汚染も少なく、3 ヶ月以上経過した場合にもほとんど活性が失われなかった。

5. ミカエリス定数

ギ酸および NAD に対する精製ならびに固定化した酵素のミカエリス定数を Lineweaver-Burk の式にもとづいて求めた。(第 7, 8 図) ギ酸に対する K_m 値はそれ

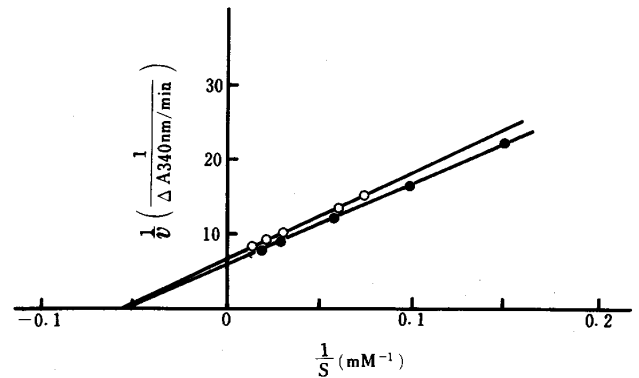


Fig. 7. Determination of K_m value for formate by Lineweaver-Burk plot. The enzyme activity was measured under the standard assay conditions with various concentration of formate and native enzyme (○), and immobilized enzyme (●).

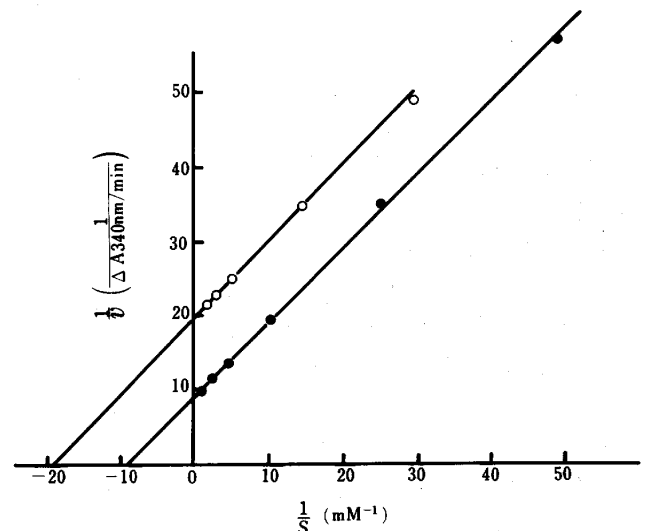


Fig. 8. Determination of K_m value for NAD by Lineweaver-Burk plot. The enzyme activity was measured under the standard assay conditions with various concentration of NAD and native enzyme (○), and immobilized enzyme (●).

ぞれ16mM, 19mMとほぼ等しい値を示した。これに対して、NADに対する K_m 値は精製酵素が0.05mM, 固定化したものが0.11mMと、固定化することにより若干 K_m 値が大きくなることがわかった。なお、精製酵素のギ酸ならびにNADに対する K_m 値は既報のもの(KATO *et al.*, 1974; SCHÜTTE *et al.*, 1976)と近い値であった。

考 察

メタノール資化性酵母のギ酸脱水素酵素については、すでに*Kloeckera* sp. No. 2201(KATO *et al.*), *Candida boidinii* (SCHÜTTE *et al.*)の細胞抽出液よりそれぞれ35倍, 19倍の割合で精製されている。これら精製酵素はいずれも電気泳動的に均一と報告されているにもかかわらず、それらの比活性は0.143(units/mg protein) 2.4 (units/mg protein) と両酵素の間に約17倍近くの著しい差が認められている。その後*Kloeckera* sp.

No. 2201については分類学的に再検討され、*Candida boidinii* であると同定されたため(OGATA *et al.*, 1969; LEE and KOMAGATA, 1980), 酵母のギ酸脱水素酵素の比活性がいずれの値であるのかは本酵素の利用を考える上からも関心の持たれるところである。これに対して、本研究における*Candida* sp. N-16よりの精製酵素の比活性が3.82 (units/mg protein) とさきの*Candida boidinii* の値に近い結果が得られていることから、酵母の比活性はほぼ2.4~3.8の付近にあるものと考えられる。これとは別に、*Kloeckera* sp. No. 2201の細胞抽出液においては硫安の添加によってギ酸脱水素酵素の活性が著しく影響を受け失活すると報告されている(KATO *et al.*, 1974)。今回*Candida* sp. N-16の細胞抽出液について検討したかぎりにおいては、硫安による活性の低下はほとんど観察されなかったのみならず、ギ酸脱水素酵素は硫安0.7飽和沈澱区分に大部分が回収され、沈澱物中の活性は長期間保持されると*Kloeckera* sp. No. 2201と異なった結果が得られている。また緩衝液に対する性質についても両菌株の間には若干の差が観察されている。以上3種の酵母からの酵素に関して、2, 3の性質に著しい差が認められているのに対して、基質NAD, ギ酸に対する K_m 値や熱等に対する性質に関しては類似していることがわかった。

酵母のギ酸脱水素を固定化するという試みはこれまでに報告をみないが、本研究に示したように臭化シアンで活性化された担体に容易に固定化された。臭化シアン化された担体への酵素のカプリングは通常重炭酸ソーダ緩衝液が用いられている(AXÉN *et al.*, 1967; Pharmacia manual, 1979)。本研究に示したように、*Candida* sp. N-16からのギ酸脱水素酵素についても同緩衝液中での固定化が可能であったが、リン酸緩衝

液を用いることによりさらに活性の高い固定化酵素を調整できることがわかった。炭酸は本酵素の反応生成物の1つであることから、これが酵素と担体の結合にあたってなんらかの影響をおよぼしているのかもしれないと考えられる。

現在、NADHの生産にはパン酵母のアルコール脱水素酵素を用いる例が一部に行われている。ところで、アルコール脱水素酵素の触媒する反応は平衡がアセトアルデヒドをNADHの存在下に還元し、エタノールを生成する方向に傾いている。(SUND & THEORELL, 1963)。したがって、この反応系を用いたNADよりNADHの生産は技術的にいくつかの問題点を含んでいると考えられる。これに対してギ酸脱水素酵素の触媒する反応は、前述したように反応生成物の1つが炭酸であるため、反応系全体を減圧条件下等に置くことによって反応の平衡を常にNADからNADH生成の方向に傾けることも可能と考えられる。本研究で示したように、メタノール資化性酵母からギ酸脱水素酵素は比較的簡単に精製ならびに固定化が可能で、酵素も比較的安定なため取り扱いが容易な上に、すでに酵母を大量に培養する技術も確立している(TANI *et al.*, 1978)。以上の点を考え合せると、上述のギ酸脱水素酵素のNADH生産等への利用はメタノール資化性微生物の応用の一方向を示すものと思われる。

摘 要

メタノール資化性酵母のギ酸脱水素酵素を精製ならびに固定化し、得られた標品の性質を比較した。

メタノールを炭素源として生育した*Candida* sp. N-16の細胞抽出液より、熱処理、DEAE Sephadex A-50およびSephadex G-200を用いてギ酸脱水素酵素を約18倍に精製した。精製酵素はディスク電気泳動的に均一であった。これを臭化シアンで活性化したSephadex 4Bを用いて固定化した。固定化による活性の回収率は約20%で、得られた固定化酵素の比活性は0.01 μ mole (基質)/min/mg 担体であった。NAD, ギ酸に対する K_m 値については、精製酵素はそれぞれ0.056mMおよび16mM, 固定化酵素は、0.11mMおよび19mMであった。最適pH, 最適温度については、精製酵素はpH6.5~8.0と50°C, 固定化酵素はpH6.8~8.0と55°Cであった。熱およびpHに対する安定性は固定化することによって増加した。

引 用 文 献

AXÉN, R., J. PORATH & S. ERNBACK (1967) Chemical of peptides and protein to polysaccharides by means of Cyanogen halides. Nature

214: 1302 - 1304.

COLBY, J., H. DALTON & P. WHITTENBURY (1979) Biological and biochemical aspects of microbiology growth on C_1 -compounds. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**: 481 - 517.

DAVIS, B. J. (1964) Disc electrophoresis. II Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**: 404 - 427.

FUJII, T. & K. TONOMURA (1972) Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by a *Candida* species. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 2297 - 2309.

FUJII, T. & K. TONOMURA (1975) Purification and properties of catalase from a methanol-utilizing yeast, *Candida* sp. N-16. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 1891 - 1892.

KATO, N., M. KANO, Y. TANI & K. OGATA (1974) Purification and characterization of formate dehydrogenase in a methanol-utilizing yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 111 - 116.

LEE, J. & K. KOMAGATA (1980) Taxonomic

study of methanol assimilating yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **26**: 133 - 158.

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL (1953) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265 - 275.

OGATA, K., H. NISHIKAWA & M. OHSUGI (1969) A yeast capable of utilizing methanol. *Agric. Biol. Chem.* **33**: 1519 - 1520.

Pharmacia manual (1979) Affinity chromatography; principles & methods. pp. 12 - 18.

SHÜTTE, H., J. FLOSSDORF, H. SHAM & M. KULA (1976) Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.* **62**: 151 - 160.

SUND, H. & H. THEORELL (1963) Alcohol dehydrogenase. In : *The Enzymes*, Vol. 7, pp. 25 - 83 (Ed. P. D. BOYER, H. LARDY and K. MYRBACK).

TANI, Y., N. KATO & H. YAMADA (1978) Utilization of methanol by yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.* **24**: 165 - 186.