Candida lipolytica のフルオロ酢酸耐性変異株の誘導および

それらの有機酸生産性*

田淵 武士, 原 誠五**

(東京教育大学農学部)

昭和 49 年 6 月 3 日 受理

Induction and Organic Acids Productivity of Fluoroacetate-tolerant Mutants of *Candida lipolytica**

By Takeshi TABUCHI and Seigo HARA**

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education, Komaba, Meguro-ku, Tokyo

For the purpose of the improvement of isocitric acid fermentation by yeasts, an attempt was made to obtain some mutants having higher activities of aconitate hydratase. As a means of obtaining such mutants, fluoroacetate-tolerant mutants were induced from *Candida lipolytica* IFO 1209 and 1659. The fluoroacetate-tolerant mutants thus obtained were examined for their citrate and isocitrate productivities from *n*-paraffins. Contrary to the expectation, no significant difference was found in regard to the ratios of the amounts of isocitrate to those of citrate between the parent strain and the mutants.

Some of the mutants, however, were found to produce an unknown hydroxy-acid, which markedly inhibited the activity of NADP-linked isocitrate dehydrogenase, in appreciable amounts from *n*-paraffins.

The mutant strain, No. R-2, which was chosen as the most excellent producer of the unknown acid, was clearly insensitive to the inhibitory effect of fluoroacetate than the parent strain, whereas, in comparison with the parent strain, the mutant showed a delay in the beginning of the growth on the medium containing no fluoroacetate.

(Received June 3, 1974)

** Present address : Chigasaki-Hokuryo High School

緒 言

Candida lipolytica によるクエン酸・イソクエン酸発酵では、培地中の鉄イオン濃度を制限すると、クエン酸の生産量が増し、それに見合ってイソクエン酸の生産量が減少した⁽²⁾。さらに、この発酵は、アコニターゼ活性が比較的に高いことによって特徴づけられることも指摘してきた^(1,3)。最近 Akiyama ら⁽⁴⁾は、イソクエン酸の生産を抑えてクエン酸の生産を増すため、*C. lipolytica* からアコニターゼ活性の弱い菌株、すなわち生体内でア

コニターゼ作用を特異的に阻害するフルオロ酢酸に対して感受性を示す変異株を造成して、その目的を達成している。このように、クエン酸の生産性を高める観点からこの発酵は主として検討されてきている。すなわち、酵母のほかにはイソクエン酸を多量に生産しうる微生物は知られていないにもかかわらず⁽⁵⁾、イソクエン酸の生産量を増す観点からは、ほとんど検討されていない。そこで今回、著者らは酵母のイソクエン酸の生産性を高めることをおもな目的として、フルオロ酢酸に耐性を示す変異株の誘導を試みてみた。これは前述の Akiyama らの方法とは逆に、フルオロ酢酸耐性変異株ではアコニターゼ活性がいっそう高まって、イソクエン酸をより多量に生産しうる菌株が得られることを期待したものである。

* 酵母の有機酸発酵に関する研究 (第 11 報)。前報 : 文献 (1) 参照。

** 現在、茅ヶ崎北陵高等学校。

なお、アミノ酸、核酸など、いわゆる同化的代謝に関する発酵では、各種の代謝阻害アナログ耐性変異株が誘導、利用されており、代謝制御発酵と呼ばれるほどに発展していることは周知のとおりであるが、有機酸発酵にアナログ耐性菌を適用した例は少ない。したがって、予測し得ない代謝異常によって発酵型式が変化することも、一部期待された。

まず、クエン酸・イソクエン酸生産性優良株である *C. lipolytica* を親株として、フルオロ酢酸耐性と考えられる多数の変異株を分離し、それらのクエン酸類生産性を調べてみた。しかし、親株に比べて、イソクエン酸を特に多量に生産しうる変異株は取得できなかった。ただし、この検索過程で、イソクエン酸脱水素酵素活性を著しく阻害する不明のオキシン酸を多量に生産しうる変異株が、フルオロ酢酸耐性変異株のなかから高率に出現する事実が認められた。本報では、フルオロ酢酸耐性変異株の誘導、得られた変異株によるクエン酸類の生産性、ならびに不明有機酸の示すペーパークロマトグラフィー上の挙動などについて報告する。

実験方法

(1) 供試菌株 親株として *Candida lipolytica* IFO 1659⁽¹⁾ および IFO 1209 を用い、さらにこれらか

Fig. 1. Procedure for Induction of Fluoroacetate-tolerant Mutants.

* The composition of the medium is shown in Table I.

** NG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.

Table I. Composition of Media

Ingredient	Medium No.			
	1	2	3	4
Glucose (%)	10	10		1
n-Paraffins (ml/dl)			8	
Span 80 (%)			0.05	
NH ₄ Cl (%)			0.3	0.2
Polypeptone (%)	0.5	0.5		
KH ₂ PO ₄ (%)	0.1	0.1	0.05	0.3
MgSO ₄ ·7 H ₂ O (%)	0.05	0.05	0.05	0.05
Yeast extract (%)	0.1	0.1		0.1
Thiamine HCl (ppm)			0.05	
Sodium monofluoroacetate (%)		1		0~1
Agar (%)		2		
CaCO ₃ (%)			8	

ら誘導された約 350 株の変異株を実験に供試した。

(2) 変異株の誘導方法 紫外線および N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンを変異源として用い、Fig. 1 に示した方法によって実施した。なお、平板培養にはフルオロ酢酸を含有する培地 (Table I の No. 1) を用いた。この培地では、炭素源としてブドウ糖が使用されたが、これは水に不溶性な n-パラフィン混合物を炭素源にすると、平板作製の操作が煩雑となるからである。

26°C のもと 3~5 日間、平板培養後、この平板上でやや大形のコロニーを形成したものをフルオロ酢酸耐性菌と考えて、ポテト・ブドウ糖寒天斜面培地に釣菌した。

(3) 培養法 分離した変異株に関するクエン酸類の生産性は、つぎのようにして調べた。すなわち、300 ml 容三角フラスコに、Table I の No. 3 に示した組成の培地 20 ml ずつを分注、殺菌後、これに親株および変異株のポテト・ブドウ糖斜面培養 4 白金耳ずつを接種するとともに、殺菌炭酸カルシウム 1.6 g を加え、26°C のもと 220rpm の回転振盪機上で 7 日間培養した。

(4) 分析方法 これまでと同様に、クエン酸はペンタプロモアセトン比色法⁽⁶⁾によって、またイソクエン酸はイソクエン酸脱水素酵素を

用いる方法⁽⁷⁾によって、それぞれ測定した。

ペーパークロマトグラフィーは、濾紙として東洋濾紙 No. 51 を、展開溶剤として酢酸エチル：酢酸：水 (50：12：10) の混合溶媒を用い、上昇法によって展開した。それぞれの培養物は、(1：3) 硫酸溶液を加えて酸性 (トロペオリソ 00 赤色) としたのち遠心分離し、その上澄を試料として濾紙上に塗布した。呈色剤には 0.1% BPB エタノール溶液のほか、ヒドロキシルアミン-塩化鉄試薬⁽⁸⁾も用いた。

(5) アコニターゼ活性の測定 無細胞抽出液の調製、ならびにアコニターゼ活性の測定は、ともに前報⁽³⁾に述べた方法によって行なった。

(6) 生育度の測定 フルオロ酢酸ソーダを各種の濃度で含む Table I の No. 4 に示した組成の培地各 5 ml をモノ型試験管に分注、殺菌後、これらに被検菌の懸濁液を接種し、26°C のもとモノ型振盪機にかけて培養し、580 m μ における吸光度を経時的に測定した。

実験結果ならびに考察

(1) フルオロ酢酸耐性変異株の誘導

変異剤で処理したそれぞれの親株の懸濁液を、0.5～2.0% のフルオロ酢酸ソーダを含ませた培地 (Table I, No. 2) 上で平板培養すると、3～5 日後に出現する集落の大きさには、ともに明瞭に差が認められた。すなわち、この濃度範囲内では、フルオロ酢酸ソーダの濃度にはあまり関係なく、大部分の集落は直径 1 mm 以下であるのに対して、3 mm に及ぶやや大形の集落が 10^{-2} ～ 10^{-3} の割合で出現した。そこで、大形の集落を形成したものをフルオロ酢酸耐性変異株と考えて、ポテト・ブドウ糖培地斜面培地上にそれぞれ釣菌した。この場合、フルオロ酢酸ソーダの濃度が 0.5% 以下になると、集落間の大きさに差異を認めにくくなったので、通常フルオロ酢酸ソーダ 1% を含有する平板培地を用いた。

なお、これまでの *C. lipolytica* の変異株造成実験⁽²⁾では、斜面培養の菌体から細胞懸濁液を調製し、多量に含まれる多核の菌糸状細胞を除くため、滅菌グラスフィルターで濾過した濾液を実験に用いたが、短い菌糸状細胞の混入を完全に阻止することはできなかった。しかし、二形性を示す本菌を十分好気的な条件下に振盪培養すれば、菌糸状の細胞が全く形成されないことを前報⁽⁹⁾で報告した。そこで今回、Fig. 1 に示したように、あらかじめ振盪培養によって増殖してきた細胞を供試することに

よって、変異剤処理のための菌体懸濁液中に菌糸状の細胞が混入する問題を解決しえた。

(2) フルオロ酢酸耐性変異株のクエン酸・イソクエン酸生産性

フルオロ酢酸含有寒天平板上でやや大形の集落を形成したので、この薬剤に対して耐性を有すると考えられ、供試の親株、2 菌株からそれぞれ誘導された変異株について、*n*-パラフィンからの有機酸の生産性を調べてみた。この場合、生体内でアコニターゼを特異的に阻害するフルオロ酢酸耐性株では、アコニターゼ活性が高まり、イソクエン酸の生成比率が増大している菌株が得られる可能性が最も大きいと考えられたので、それぞれの培養液について、クエン酸とイソクエン酸との生成量をまず測定してみた。

それぞれの菌株が生成したクエン酸・イソクエン酸の合計生成量に対するイソクエン酸の生成量比のヒストグラムの一例を Fig. 2 に示した。この場合、親株が示したイソクエン酸生成量比の 3 個の平均値は 0.54 であり、その 95% 信頼限界は ± 0.08 であった。すなわち、フルオロ酢酸耐性菌であるとして分離された菌株の示したイソクエン酸の生成量比も、親株の示した比率にくらべて、期待されたほどには増加しなかった。なかには、その比率が親株のそれより若干高いものも認められたが、これらでもイソクエン酸の生成量そのものは親株にくら

Fig. 2. Distribution of Ratios of Amounts of Isocitrate to Combined Amounts of Citrate and Isocitrate Produced by Fluoroacetate-tolerant Mutants Derived from *C. lipolytica* IFO 1659.

The strains were grown at 26°C for 9 days on a rotary shaker in 300-ml Erlenmeyer flasks containing each 20 ml of the medium shown in No. 3 of Table I. The arrow indicates the result of the parent strain.

べて、とくに増加してはいなかった。なお、Fig. 2 は親株 IFO 1659 から誘導された変異株について得られた成績をとりまとめたものであるが、IFO 1209 に関しても、ほぼ同様な傾向の成績が得られた。

フルオロ酢酸耐性菌として分離された変異株のクエン酸類生成量比が、親株のそれとほとんど変らなかったの、これら変異株では、はたしてアコニターゼ活性が高まっていたのかどうかを調べてみた。すなわち、Fig. 2 に掲げたヒストグラムの各グループに属する菌株のなかから、それぞれ1株ずつ合計7株を無作為にえらび、それらを Table I の No.1 に示した組成の培地を用いて2日間培養し、得られた菌体の無細胞抽出液について、それぞれアコニターゼ活性を測定してみた。その結果、いずれの菌株においても、アコニターゼ活性は親株のその1.2~2 倍に高まっていることが知られた。しかし調べた菌株間においても、クエン酸類生成量比とアコニターゼ活性との間に、相関関係はほとんど見出しえなかった。

Akiyama ら⁽⁴⁾は、アコニターゼ活性が低下した *C. dipolytica* の変異株を造成することによってイソクエン酸の生産をおさえ、クエン酸の生産を増すことに成功している。しかし、反対に親株にくらべてアコニターゼ活性のみをより高めた変異株を造成して、イソクエン酸の生産を改善しようとした本実験当初の目的は達成しえなかった。前報⁽¹⁾で、親株の菌体内アコニターゼ活性は、ほかの諸酵素にくらべて高い比活性を示したので、すでに過剰に存在しているものと考察した。これは、本実験結果とも符合するところであろう。したがって、当初の目的のためには、他の機構に基づく変異株の造成が望まれよう。

Nakanishi ら⁽⁵⁾は、*C. zeylanoides* の培養に黄血塩を添加するとイソクエン酸脱水素酵素活性が阻害されて、イソクエン酸生成量比が若干高まることを報告している。

(3) イソクエン酸脱水素酵素活性を阻害する生産物の検索

上述の実験では、培養物中のイソクエン酸は、イソクエン酸脱水素酵素を用いる酵素法⁽⁷⁾によって測定したがこの実験の過程で、一部の変異株の培養物中に、イソクエン酸脱水素酵素作用を強く阻害する生産物が含有されている事実が知られた。すなわち、これらの試料ではイソクエン酸脱水素酵素反応が阻害されるため、還元型助

酵素の生成速度が著しく低下し、測定がほとんど不可能であった。したがって、これらの培養物に関する成績はさきに示した Fig. 2 のなかには含まれていない。

そこで、イソクエン酸脱水素酵素活性を阻害した試料について、初めに不揮発性酸の存在をペーパークロマトグラフィーに展開して調べてみた。その結果、これらの試料にはすべてラクトン環を形成しうる同一の不明オキシ酸が含有され、イソクエン酸脱水素酵素活性は、この酸によって阻害される事実が知られた。

すなわち、これらの培養物を酸性とし、遠心分離後の上澄をただちに濾紙に塗布し、冷風で乾燥後に展開すると、一例として Fig. 3 に示したように、クエン酸に相当するスポット ($R_f=0.34$) のほかに、リンゴ酸部位 ($R_f=0.44$) に大きな、またコハク酸部位 ($R_f=0.75$) に小さなスポットが認められた。しかし、酸性にしたこれら試料は1夜室温に放置するか、あるいは酸性のまま数分間煮沸後に展開すると前者のスポットは小さくなり、一方、後者のスポットは大きくなることが観察された。さらに、この試料を水酸化ナトリウム溶液でアルカリ性 (フェノールフタレン赤色) にしたのち10分間煮沸し、冷却後再度硫酸酸性としてから展開すると、リン

Fig. 3. Paper Chromatographic Behavior of an Unknown Acid Produced by a Fluoroacetate-tolerant Mutant, No. R-2.

(1) The culture broth was spotted soon after acidification with H_2SO_4 . (2) After acidification with H_2SO_4 and boiling for 10 min, the culture broth was spotted. (3) Sample (2) was adjusted to a pH 11 with NaOH, boiled for 10 min, acidified again after cooling, and then spotted.

Solvent system: ethyl acetate-acetic acid-water=50:12:10.

ゴ酸部位のスポットは再び大きくなり、同時にコハク酸部位のスポットは小さくなった。なお、コハク酸部位のスポットは、ラクトン検出反応としても知られるヒドロキシルアミン-塩化鉄試薬⁽⁸⁾に対して陽性を示すことも知られた。以上の事実から、これら 2 個のスポットに対応する有機酸は、リンゴ酸およびコハク酸そのものではなく、相互に変換しうる、すなわち容易にラクトン化しうる 1 種類の有機酸の遊離型とラクトン型とのスポットであると推定された。

ついで、この酸がイソクエン酸脱水素酵素活性を阻害する物質であるかどうかを調べてみた。すなわち、ペーパークロマトグラフィーに展開後、それぞれの相当部位を切り取り、0.1 N NaOH 水溶液で抽出し、 $R_f=0.44$ に相当する区分は中和後、また $R_f=0.75$ に相当する区分は加熱、ケン化処理後に中和して、それぞれ実験に供した。その結果、イソクエン酸脱水素酵素活性は、両区分によって著しく阻害されることが確認された。

なお、このオキシン酸を生成しうる変異株は、供試の親株 2 菌株のいずれからも収得でき、紫外線照射によるよりも、ニトロソグアニジン処理によってより高率に出現した。後者の場合の出現率は、約 2% にも及んだ。ただし、このオキシン酸を最も多量に生産しうる変異株として選択された No. R-2 株は、親株 IFO 1659 株から紫外線照射によって誘導されたものである。

(4) 生育に対するフルオロ酢酸濃度の影響

分離後、ポテト・ブドウ糖寒天斜面上に継代培養され

ている変異株のフルオロ酢酸に対する耐性の性質を調べてみた。この場合、モノ型振盪機を使用して親株および変異株 No. R-2 株の生育におよぼすフルオロ酢酸添加濃度の影響を調べ、得られた結果の一例を Fig. 4 に示した。すなわち、まずフルオロ酢酸無添加の場合には、変異株 No. R-2 株は親株に比べて常に生育開始が著しく遅れることが知られ、この変異株の代謝系には親株に比べて若干の欠陥が生じていることが予測された。これに対して、フルオロ酢酸が添加された場合には、親株の生育が著しく阻害されるのにくらべて、No. R-2 株の生育はフルオロ酢酸添加による影響を親株ほどには受けなかった。すなわち、親株にくらべ No. R-2 株は、フルオロ酢酸に対して耐性であると一応解される性質が維持されていることが確認された。不明のオキシン酸を最も多量に生産しうる No. R-2 株の示したこれらの生理学的性質に関しては、現在さらに検討中である。なお、Akiyama ら⁽⁴⁾によって誘導された感受性株は、フルオロ酢酸を 0.1% 含有した培地にはほとんど生育しえないことが報告されている。

要 約

酵母のイソクエン酸の生産性を改善することをおもな目的として、*C. lipolytica* からフルオロ酢酸に耐性を示す変異株の誘導を試みてみた。得られた変異株では、アコニターゼ活性が若干高まっている傾向が認められたが、これらの菌株によるクエン酸とイソクエン酸との生成量比は、親株のそれとほとんど変わらなかった。

しかし、イソクエン酸脱水素酵素活性を強く阻害する不明のオキシン酸を、クエン酸類とともに *n*-パラフィンから多量に生産しうる変異株が、フルオロ酢酸耐性変異株のなかから高率に出現する事実が見出された。

不明のオキシン酸を最も多量に生産しうるフルオロ酢酸耐性変異株 No. R-2 株は、親株にくらべて、生育の開始に遅れを示した。

終りに、本実験に協力くださった清水博之氏に謝意を表します。

(1) 田淵武士, 原 誠五: 農化,

Fig. 4. Growth Response to Fluoroacetate.

Cells grown on potato-glucose agar were washed, transferred to the Monod tubes containing each 5 ml of the medium shown in No. 4 of Table I and incubated at 26°C with shaking.

(A) *C. lipolytica* IFO 1659. (B) The fluoroacetate-tolerant mutant, No. R-2, derived from (A).

Amounts of sodium monofluoroacetate added (mg/ml):
○---○ 0, ○---○ 1, ●---● 2, ●---● 5, ■---■ 10.

- 48, 417 (1974).
- (2) 田淵武士, 田中優行, 田原康孝, 阿部又三: 農化, **44**, 562 (1970).
- (3) 田淵武士, 田原康孝, 田中優行, 柳内志保子: 農化, **47**, 617 (1973).
- (4) S. Akiyama, T. Suzuki, Y. Sumino, Y. Nakao and H. Fukuda: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 339 (1972); *idem: ibid.*, **37**, 879, 885 (1973).
- (5) M. Abe and T. Tabuchi: *ibid.*, **32**, 392 (1968); 阿部又三, 田淵武士, 田中優行: 農化, **44**, 493 (1970).
- (6) 田淵武士, 田中優行, 阿部又三: 農化, **42**, 440 (1968).
- (7) "Method of Enzymatic Analysis," ed. by H. U. Bergmeyer, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1963, p. 318.
- (8) M. Abdel-Akher and F. Smith: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 5859 (1951).
- (9) 田淵武士: 農化, **47**, 479 (1973).
- (10) T. Nakanishi, M. Yamamoto, K. Kimura and K. Tanaka: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 855 (1972).
-