〔農化 第 51 巻, 第 3 号, R13~R18, 1977〕

酵母の代謝と応用に関する研究

(昭和 51 年度農学賞受賞)

緒 方 浩 一*

(京都大学農学部)

Studies on the Metabolism and the Application of Yeasts

By Koichi OGATA

Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University

酵母は人類にとって最も関連の深い微生物であり、たとえば酵母の代謝産物であるアルコールは数千年以前から人類の飲料であり、各民族固有の酒類として発展し、また酵母の生産する炭酸ガスや香気成分は製パンの発酵に利用されてきた。わが国においても、清酒や味噌・醤油などの伝統的産業に広く利用されてきた。また酵母のアルコール発酵の機構の解明は、19 世紀末から 20 世紀初頭にかけて、Pasteur-Liebig の論争をはじめとしてヨーロッパ生化学の中心課題であり、さらにその後 1940 年代に至って動物筋肉中の解糖系の解明とともに、Embden-Meyerhof-Parnas の経路として完成されるに至った。

このように人類とかかわりの深い酵母は、近年になって、特にわが国において発展の著しい応用微生物学の領域で、アルコール発酵とは全く異なった面で利用されるようになった。すなわち、酵母菌体のもつタンパク質は良質の飼料資源として注目され、また酵母の核酸はすでに工業的に生産されている。その他、菌体中に含まれる各種のビタミン類あるいはグルタチオンなどは医薬品として利用されており、さらに代謝産物としては、クエン酸が *n*-パラフィンを炭素源とした酵母の培養液中に大量に蓄積することが見い出され、すでに工業的レベルにある。

著者も、近來発展の著しい応用微生物学の展開と軌を

一にして、新しい観点から酵母の新しい能力をひきだすべく多年にわたり、多数の共同研究者とともに酵母の代謝の解明とその応用に関する研究を行ってきた。以下、それらの研究の概要を概括する。

1. 酵母のタンパク質生産と代謝生理に関する研究

酵母菌体の生産に関しては、従来炭水化物が培養原料として用いられており、また近年 *n*-パラフィンをはじめとする種々の石油系化合物を用いることが試みられている。著者は新しい培養原料、新しい酵母を見い出すことを主眼とし、特に多量に安定供給しうるメタノールを対象として研究を行った。

1948 年 Wickerham および Burton が、酵母にはメタノール資化能を持つものはいないと報告して以来、酵母はメタノールを資化しないものと考えられ、メタノール資化の研究は、もっぱら細菌を用いて行われてきた。しかし 1969 年、著者らがメタノール資化性酵母を分離し、*Kloeckera* sp. No. 2201 として報告⁽¹⁾して以来、世界各国でメタノール資化性酵母の研究が盛んとなり、これまで報告されているものだけでも 7 属 36 株に及んでいる。メタノールのような C_1 化合物がいかにして酵母の増殖のエネルギーとなり、またいかにして菌体構成成分に組み込まれていくのかは、きわめて興味のある問題であった。すでに細菌におけるメタノールの酸化経路については、Quayle ら、Anthony らによってほぼ明らかにされており、第 1 図に示すように、メタノールはまず phenazine methosulfate などを電子受容体とする脱

* 本受賞者は昭和 51 年 9 月 3 日急逝されたため、本総説は同学部助教授谷吉樹が受賞者の総説などに基づいて代筆した。

第 1 図 メタノールの酸化経路

第 2 図 メタノール酵母のアルコール酸化酵素の電子顕微鏡写真

水素酵素によってホルムアルデヒドに酸化され、さらに phenazine methosulfate あるいは NAD 関与の脱水素酵素によって、ギ酸を経て CO_2 へ酸化されることが認められている。そこで、酵母について酵素化学的に詳細に検討したところ、メタノールから CO_2 に至る細菌と同じような酸化経路が存在することが明らかとなった。特に第 1 段階の酸化反応において、細菌の場合とは異なる酵素が関与していることを見出した。この酵素を結晶状に単離し検討したところ、本酵素はメタノールによって誘導生成され反応生成物として、ホルムアルデヒドと H_2O_2 を生成する酸化酵素であること、および補酵素として FAD を持つことなどを認め、メタノール細菌に見出された酵素とは全く異なる新しい型の酵素であることを明らかにした⁽²⁾。第 2 図は、単離結晶化した本酸化酵素の電子顕微鏡写真である。この写真からも見られるように、本酵素は 8 個のサブユニットからなり 8 個の FAD を含んでおり、分子量は約 670,000 である⁽³⁾。反応生成物である H_2O_2 を分解するカタラーゼも誘導生成されるが、後に福井らによって著者らの分離したメタノール酵母中に多量に認められるマイクロボディ中に、本酸化酵素およびカタラーゼが局在することが指摘されている。酵母のメタノール酸化系については、さらに NAD 関与のホルムアルデヒド脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素の存在およびその酵素化学的性質の詳細を明らかにした。

Candida utilis 菌体

←熱水抽出
RNA 溶液
←*Streptomyces aureus* 培養濾液
分解液
←活性炭, イオン交換樹脂
5'-ヌクレオチド

第 3 図 酵母より 5'-ヌクレオチドの調製

しかし、 C_1 化合物の細胞構成成分への取り込みの機構については、細菌によって明らかにされているセリン経路、ペントースモノリン酸経路のような経路が酵母に存在しているかどうかなどについてまだ明確な結論が得られておらず、今後に残された問題である⁽⁴⁾。

このほか酵母菌体の生産に関しては、 C_2 化合物である酢酸を炭素源とする酵母の培養⁽⁵⁾、駿河湾の 1200 m の海底泥から分離した海洋性 *Candida* 属酵母の *n*-パラフィンによる培養⁽⁶⁾などの問題をてがけた。また、*n*-パラフィンの酵母による利用と関連して、 C_{10} の *n*-デカンから同じ炭素数のジカルボン酸であるセバチン酸の生産について、*Torulopsis candida* をもちいて検討した⁽⁷⁾。

2. 酵母核酸およびその関連化合物に関する研究

酵母の菌体構成成分としては、ビタミン類、色素類および脂質などが従来利用されていたが、著者は酵母核酸を出発物質として、種々の核酸関連化合物の生産ならびに代謝について研究し、新しい分野を開発した。まず呈味性ヌクレオチドである 5'-イノシン酸、5'-グアニル酸をはじめとする各種ヌクレオチド類の核酸分解法による生産を確立した。核酸の分解に関与する酵素は、多岐にわたっているが、酵母核酸の分解産物として、5'-ヌクレオチドを生成する酵素、5'-ホスホジエステラーゼ(ヌクレアーゼ)を多量に得ることによって、呈味性ヌクレオチドを生産することが可能になる。著者らは、坂口、国中につづいて、本酵素を多数の微生物に見出し、*Candida utilis* の核酸および *Streptomyces aureus* の酵素をもちいて、第 3 図に示すような 5'-ヌクレオチド

第 1 表 CoA およびその生合成中間体の調製

System	Amount of products found in	
	reaction mixture	culture broth
$\text{PaA} \xrightarrow{\text{ATP}} \text{P-PaA}$	4mg/ml	3mg/ml
$\text{P-PaA} \xrightarrow{\text{CTP, CySH}} \text{P-PaSH}$	4mg/ml	—
$\text{PaA} \xrightarrow{\text{UTP}} \text{P-PaA} \xrightarrow{\text{CTP, CySH}} \text{P-PaSH}$	4mg/ml	3mg/ml***
$\text{PaA} \xrightarrow{\text{ATP}} \text{P-PaA}^* \xrightarrow{\text{CySH, ATP}} \text{DP-CoA}^* \xrightarrow{\text{ATP}} \text{CoA}$	2mg/ml	5mg/ml**

* by-product, ** AMP system, *** UMP+CMP system.

の生産方式を確立した^(8,9)。その成果が調味料として市販されて久しいが、さらにこれらの工業生産によって容易に供給可能となった各種のヌクレオチド類への利用へと研究を進展させた。

Coenzyme A (CoA) は、アデニル酸をその構成成分としてもつパントテン酸の活性型化合物であり、生体代謝において重要な役割を演じていることから、生化学の研究用としてはもちろん、最近では医薬品としての開発にも努力が払われている。CoA の調製法としては、従来ビール酵母の菌体などからの抽出法および化学合成法が知られていたが、いずれも収量が十分でなくまた工程も複雑なため、CoA はきわめて高価な化合物であった。著者らは、微生物生産の 1 分野として微生物反応と有機合成反応を組み合わせた生産方法に興味をもち、化学的に得られるパントテン酸とシステインおよび酵母核酸の 1 構成成分であるアデノシンまたはアデニル酸を原料として、微生物反応によって CoA を生合成させる生産方法について検討した。その結果、種々の微生物によって CoA が生成蓄積されることを認め、特に *Brevibacterium ammoniagenes* をもちいると、多量の CoA が生成蓄積することを見出し、本菌をもちいる乾燥菌体法ならびに培養法による CoA の生産方式を確立した^(10,11)。本方法により、CoA の工業生産がより容易に行われるようになり、生化学の研究などに貢献し得たものと信じる。CoA の生合成機構は、動物および一部の細菌について、Brown らによって明らかにされているが*、*Br. ammoniagenes* においても同様の生合成経路が存在することを、生合成中間体および各段階の酵素の存在を明らかに

することにより証明した。第 1 表は異なった反応条件、培養条件を設定することによって、各中間体を生成蓄積させることに成功した結果をまとめたものである。すなわち、反応系よりシステインを除去し ATP のみを存在させることによって、phosphopantothenic acid が、CTP、システインの存在下に phosphopantothenic acid より phosphopante-

theine が生成蓄積すること、また ATP 以外のヌクレオチド類添加条件では phosphopantetheine へのヌクレオチル基の転移、すなわち dephospho-CoA の生成が起らないことを利用したパントテン酸よりの phosphopantetheine の生成、完全系における CoA の生成蓄積、さらに完全系で反応させた反応液に *Bacillus subtilis* の 3'-ヌクレオチダーゼを添加することによる dephospho-CoA の調製などを、それぞれ乾燥菌体法ならびに培養法によって表に示したような収量で蓄積することを認めた。パントテン酸よりの CoA の生合成経路において、1 分子の CoA の生成に対し、4 分子の ATP を必要とする (第 4 図)。本方法による CoA の発酵生産においては、グルコースの解糖によって生じるエネルギーが、アデニンあるいはアデノシンより生成するアデニル酸に転移され、ATP を生成する系と CoA 生合成系が共役し、パントテン酸およびシステインならびにアデニン化合物よりの CoA の多量蓄積を可能ならしめたものと説明できる。

さらに同様に、酵母が糖を発酵する際に示すヌクレオシド、ヌクレオチドのリン酸化能力を利用して、ATP な

第 4 図 Coenzyme A 蓄積の機構

どのヌクレオシドトリリン酸 (パン酵母) および多糖類合成の中間体である UDP-glucose (パン酵母), GDP-mannose (*Hansenula jadinii*), UDP-galactose (*Torulopsis candida*) などの糖ヌクレオチドの発酵生産についても検討を加え, 酵母の種類を選ぶことによって, 種々のヌクレオシド誘導体が生産できることを示し⁽¹²⁾, 多糖生化学発展の道をひらいた。また, 酵母核酸分解により副産物として得られるピリミジンヌクレオチドの利用と関連して, ピリミジンヌクレオチドからプリン塩基へのリボース転移に関する現象の発見とその反応の酵素化学的解明⁽¹³⁾, あるいは核酸系補酵素 NAD の新しいリン酸化反応の研究⁽¹⁴⁾なども, 酵母核酸に関する研究の延長上に位置するものである。

3. 酵母の生産する酵素に関する研究

酵母によるフェニルアラニン, チロシンなどの芳香族アミノ酸の代謝に関する研究に, *Rhodotorula* 属および *Sporobolomyces* 属に属する酵母は, 他の微生物とは異なった代謝系を持っていることを見出した。すなわち, 一般の微生物ではフェニルアラニン, チロシンの代謝の第 1 段階は酸化脱アミノ反応によって, それぞれフェニルピルビン酸, *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸になることが知られているが, 上述の酵母では, 脱アミノ反応によって *trans*-ケイ皮酸および *α*-クマール酸をそれぞれ生じた後に代謝されていくことが明らかとなった⁽¹⁵⁾。この反応を触媒する酵素フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (EC 4.3.1.5) は, 高等植物にはすでにその存在が知られていたが, 微生物では知られておらず, わずかに本研究とほぼ時を同じくして担子菌 *Basidiomycetes* に見い出されたのみである。本酵素について, *Rhodotorula texensis* より得た超遠心的に均一な標品をもちいて検討したところ, フェニルアラニンおよびチロシンは同一酵素によって脱アミノされること, またその他の多くのアミノ酸は作用を受けないことなどが明らかとなった。そこでこの性質を利用して, フェニルアラニンおよびチロシンの微量定量に本酵素をもちいることを試みた。すなわち, 反応生成物である *trans*-ケイ皮酸および *α*-クマール酸は, それぞれ 268 nm および 333 nm に吸収を示すので, 試料に本酵素を作用させた後エーテル抽出処理を行い, 反応液の吸光度を測定することによって定量が可能となる。この方法により, 天然物中のフェニルアラニンおよびチロシンの定量法を確

第 5 図 全卵の加水分解物からのフェニルアラニンおよびチロシンの酵素による除去

立した⁽¹⁶⁾。さらに, 本酵素をフェニルケトン尿症用食の調製に利用することを試みた。フェニルケトン尿症とは, フェニルアラニンがチロシンへ代謝される経路が先天的に欠損しているために生じる疾病で, 乳幼児期に低フェニルアラニン食を与えてフェニルピルビン酸の生成を抑えることによって防ぐことが可能である。低フェニルアラニン食を調製する試みの一例として, *Rh. texensis* のアセトン乾燥菌体によるフェニルアラニン除去について検討した結果を第 5 図に示す。この図は, 全卵の加水分解物に, 菌体を添加して 6 時間反応させた後, アミノ酸自動分析計によって分析した結果で, 反応前に含まれていたフェニルアラニンおよびチロシンはほとんど完全に除去された⁽¹⁷⁾。アセトン乾燥菌体のフェニルアラニンアンモニアリアーゼは, プロテアーゼの作用を受けないこと, および本酵素の至適 pH が 8.5 にあることから, 患者に通常食を与え, アセトン乾燥菌体を投与することによって, 腸内でフェニルアラニンを除去することも可能と考えられるが, 今後の厳密な動物実験を要する問題である。

またパン酵母の乾燥菌体をもちいて, ビタミン B₆ 化合物の 1 つであるピリドキシンからピリドキサルを得ることを試みた。パン酵母のピリドキシン脱水素酵素は, 反応の平衡が著しく逆反応の方向に傾いているため, ピリドキシンの酸化に当り反応液中に種々のカルボニル試薬を添加すると, 生成したピリドキサルはカルボニル誘導体として反応系外に除外できるので, 多量に蓄積させることが可能であることを見出した⁽¹⁸⁾。たと

つかの新しい反応を見出すことができた^(22,23)。たとえば、ピリドキサミンリン酸からピリドキサルリン酸を生成する反応では、好気性菌に存在する酸化酵素の他に嫌気性菌において、 α -ケトグルタル酸から D-グルタミン酸を生じるアミノ基転移酵素が存在することを見出した⁽²⁴⁾。また遊離型ビタミン B₆ のリン酸化については従来知られていた ATP 関与のキナーゼ以外に、種々の有機リン酸化合物をリン酸基供与体とするフォスファターゼによるリン酸転移反応を見出すとともに、本酵素の結晶化にも成功した。これら相互転換系以外にも、新ビタミン B₆ 誘導体、ピリドキシングルコシドの単離あるいは、遊離型ビタミン B₆ の培養液への著量蓄積などについても多くの知見を得ている。

以上、著者らの研究の概要を述べたが、人類に酒とパンを与え、また核酸系調味料として食味にうま味を加えた酵母が、将来その不足が憂えられているタンパク性飼料あるいは食糧として貢献しうるか、またさらに新しい機能を開発しうるかは、われわれ実験科学者に与えられた任務であろうと考える。

本研究は、主として京都大学発酵生理学研究室において多くの共同研究者の協力のもとに行われたものであり、酵母核酸の分解法の研究を遂行されました武田薬品工業株式会社の共同研究者に対してとともに、心よりの謝意を表するものであります。また多年にわたりご指導、ご鞭撻をいただきました、恩師片桐英郎、故北原覚雄両先生ならびに故中沢亮治、佐藤喜吉、植村定治郎先生にあつくお礼申しあげる次第であります。

- (1) K. Ogata, H. Nishikawa and K. Osugi : *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1519 (1969).
- (2) Y. Tani, T. Miya, H. Nishikawa and K. Ogata : *ibid.*, **36**, 68 (1972).
- (3) N. Kato, Y. Omori, Y. Tani and K. Ogata :

Eur. J. Biochem., **64**, 341 (1976).

- (4) 加藤暢夫, 緒方浩一 : 化学と生物, **14**, 138 (1976).
- (5) 緒方浩一, 西川英郎, 大杉匡弘 : 醸工, **48**, 478 (1970).
- (6) N. Kato, Y. Kumada, Y. Tani and K. Ogata : *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1469 (1971).
- (7) K. Ogata, H. Kaneyuki, N. Kato, Y. Tani and H. Yamada : *J. Ferment. Technol.*, **51**, 227 (1973).
- (8) 緒方浩一 : 化学と生物, **1**, 11 (1963).
- (9) K. Ogata : *Adv. Appl. Microbiol.*, **19**, 209 (1975).
- (10) 緒方浩一 : ビタミン, **48**, 27 (1974).
- (11) 清水 昌, 谷 吉樹, 緒方浩一 : Amino acid and Nucleic acid, No.30, 30 (1974).
- (12) 緒方浩一, 川口吉太郎 : 醸工, **50**, 46 (1972).
- (13) T. Sakai, T. Tochikura and K. Ogata : *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 533 (1967).
- (14) M. Kuwahara, T. Tachiki, T. Tochikura and K. Ogata : *ibid.*, **36**, 745 (1972).
- (15) K. Ogata, T. Tochikura, K. Uchiyama and H. Yamada : *ibid.*, **31**, 200 (1967).
- (16) K. Uchiyama, H. Yamada, T. Tochikura and K. Ogata : *ibid.*, **32**, 764 (1968).
- (17) K. Kawaguchi, T. Izumitani, Y. Tani, H. Yamada and K. Ogata : *J. Ferment. Technol.*, **49**, 222 (1971).
- (18) K. Ogata, T. Tochikura, S. Kawata, S. Yamamoto and S. Kawai : *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1479 (1968).
- (19) 緒方浩一, 和泉好計 : ビタミン, **48**, 159 (1974).
- (20) 和泉好計, 谷 吉樹, 緒方浩一 : Amino acid and Nucleic acid, No.31, 140 (1975).
- (21) S. Iwahara, Y. Emoto, T. Tochikura and K. Ogata : *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 64 (1966).
- (22) 谷 吉樹, 緒方浩一 : 化学と生物, **7**, 662 (1969).
- (23) 緒方浩一 : ビタミン, **48**, 93 (1974).
- (24) S. Yamamoto, T. Tochikura and K. Ogata : *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 605 (1965).

(昭和52年1月27日受理)