

酵母によるメタノールの同化

(微エ研, *大阪府大農化) ○藤井貴明 浅田泰男 外村健三* 上林明

メタン、メタノールなどの C₁-化合物を炭素源ならびにエネルギー源として生育できる微生物 *methylotroph* はこれらの化合物を炭酸ガスへと酸化する際に生じるエネルギーを利用して C₁-化合物より細胞構成成分を合成するとされている。これらの微生物による C₁-化合物の同化経路は、セリン経路とペントースモノリン酸経路が知られているが、これらは主として Quayle らの細菌を用いた研究によるところが大きい。メタノールを資化できる酵母については、1969年に緒方らによって最初にその存在が報告されて以来、これまでに多数が分離されており、それらを用いたメタノールの代謝に関する研究も現在ではしだいにその数を増し、かなりの知見が蓄積してきている。これまでに報告された酵母は、いずれも資化できる C₁-化合物はメタノールだけであるのに対して、他にグルコースやエタノール等も利用できるいわゆる *facultative methylotroph* であるとされている。従来、*facultative methylotroph* はセリン経路によって C₁-化合物を同化するとされていたため、酵母がこれまでの細菌の場合と比較してどのような経路を持っているかが興味の持たれるところであった。

我々は、まず Quayle らの方法に従って *Candida N-16* の洗浄細胞による¹⁴C-メタノールから細胞構成成分への放射能の取り込みを検討したところ、最初の10秒間に取り込まれた全放射能の40%以上がフルクトースのリン酸エステルに存在し、全糖リン酸成分の放射能は全体の70%近くにも達することが認められた。これに対してセリン及びグリシン成分への取り込みは4%程度にすぎなかった。さらにフルクトースリン酸成分に取り込まれた放射能の全放射能に対する割合(%)が時間の経過するに従って減少することがわかった。これらの結果よりフルクトースリン酸がメタノール取り込み経路上の初期安定生成物であると推定された。ついで順次メタノールの酸化経路上の化合物についても同様な検討を行なったところ、¹⁴C-ホルムアルデヒドの取り込み量はメタノールからのその5%程度のすくないものであったが、このものからの取り込みパターンもメタノールと同様な傾向を示し、さらに糖リン酸への放射能の取り込みはメタノールに生育した細胞に特徴的である事実は見出された。これに対して¹⁴C-ギ酸あるいは¹⁴C-重炭酸からの放射能の取り込みはメタノールからのものに比較して著しく少ない上に、ギ酸から短時間に最も多くの放射能が入ったのはセリンであり、重炭酸からはアスパラギン酸で、しかも両化合物からの取り込みパターンは、メタノール生育細胞とグルコース生育細胞の間で差のないことがわかった。以上の結果より、酵母によるメタノールの同化は主にメタノール→ホルムアルデヒド→六炭糖リン酸→→細胞の経路を経るものと推定された。同様な結果は Trotsenko らによっても報告されている。上記の¹⁴C-メタノールから各種の代謝中間体へ取り込まれる放射能は、10⁻³Mのモノヨード酢酸やモノフルオロ酢酸などによって著しく減少することが観察されたが、糖リン酸成分への取り込みに限っては、逆にかなりの放射能の蓄積が認められ、またこれとは別に、ホルムアルデヒドの濃度を600ppmに高めた場合にも¹⁴C-ホルムアルデヒド

シンポジウム (SCPとくにC₃微生物)

の取り込みが著しく影響を受け、この場合もやはり糖リン酸二分への放射能の蓄積が観察された。これらの結果は、メタノル代謝経路上の初期安定生成物が六炭糖リン酸エステルとする前述の推論を支持するものであると考えられた。このように酵母によるメタノルの取り込み経路上の初期安定生成物がセリンではなく、六炭糖リン酸であると推定されたことは、初めに予想しないところであった。

細菌におけるホルムアルデヒドより六炭糖リン酸の生成に關しては、当初 Kempらが *Pseudomonas methanica* の細胞抽出液にリボース-5-リン酸とホルムアルデヒドを縮合してアルロース-6-リン酸の生成を触媒する *hexose phosphate synthetase* の反応として報告されたものであるが、その後ホルムアルデヒドの真の受容体はリブローズ-5-リン酸とされ、反応生成物も D-arabino-3-hexulose-6-phosphate と修正されたもので、すでにその酵素も高度に精製されている。酵母のホルムアルデヒドから糖リン酸の生成が細菌と同様な酵素によって触媒されるかどうかに関心の持たれるところであったが、まず Dielらがリボース-5-リン酸の存在下に *Candida boidinii* あるいは *Kloeckera* sp. の細胞抽出液とホルムアルデヒドのインキュベーションで、Sahmらも *C. boidinii* で細菌と同様な活性の存在することを報告した。しかしながら、我々が用いた *Candida N-16* については各種の方法で細胞抽出液を調製し、これらと¹⁴C-ホルムアルデヒドもリボース-5-リン酸あるいはリブローズ-5-リン酸の存在下にインキュベーションを行なったにもかかわらずいずれの場合もその放射能の六炭糖リン酸二分への取り込みは認められなかった。本菌においてはこれらを ATP の存在下にインキュベートした場合に初めて [¹⁴C] でラベルされた六炭糖リン酸の生成がラジオオートグラム上に確認できた。その後、*Hansenula* 属、*Torulopsis* 属酵母の細胞抽出液でも同様な結果が得られており、さらに本活性はメタノル生育細胞に特徴的であることも認められている。また酵母のホルムアルデヒドから六炭糖リン酸も生成する反応においては ATP を直接必要とする反応のほかにも前段階の反応が存在する可能性を示唆する結果も得られている。次に上記反応のほかにも *Candida N-16* の細胞抽出液中に存在する [¹⁴C]-固定反応について検討したところ、*Transaldolase* の反応によると考えられるフラクトース-6-リン酸の存在下での¹⁴C-ホルムアルデヒドより¹⁴C-エリスロースの生成が認められ、また炭酸固定酵素として *Pyruvate carboxylase* の活性が検出された。しかしながら、両活性はメタノル生育細胞とグルコース生育細胞の間でほとんど差が認められなかった。一方、ギ酸よりセリンの生成に關与する *Serinehydroxymethyltransferase* やオートトロフ生物の炭酸固定に關与する *Carboxydismutase* の活性は検出できなかった。

従来より知られている細菌における *hexose phosphate synthetase* の直接關与する反応においては、ATP の必要性については知られておらず、従って酵母の場合には細菌とは異った糖新生の経路の存在することも予想される。しかしながら、これまでに我々がメタノル培地上に比較的良好に生育する菌株を選んで検討した結果においても、酵母細胞抽出液中の六炭糖リン酸生成活性は非常に弱く、また ATP 等も含めた反応の全貌も上述した以上にわかっていないのが現状である。