

〔醸酵工学 第56巻 第5号 527-537. 1978〕

照井会長退任記念特集号

総 説

メ タ ノ ー ル の 微 生 物 利 用*

谷 吉樹・加藤 暢夫**・和泉 好計・清水 昌
緒方 浩一***・山田 秀明

京都大学農学部農芸化学科

1. は じ め に

微生物の工業的利用において、培養原料は極めて重要である。農産物から直接導かれる炭水化物をはじめとして、石油系の炭化水素およびその関連化合物、さらには炭酸ガス、水素などが既に利用され、あるいは今後利用されようとしている。その中でメタノールは、食飼料と競合しないこと、安価な大量供給の可能性があること、水溶性であることなどの利点を持つことから、1970年前後から single cell protein 生産のための新しい培養原料として注目されるようになってきた。そして種々のメタノール資化性微生物が分離され、培養工学的、生化学的および分類学的な研究が数多く行われている。¹⁻⁵⁾

われわれは1969年に初めてメタノール資化性酵母の存在を報告して以来、single cell protein および発酵代謝産物の生産へのメタノール利用という観点から研究を続けている。本論文は、メタノール資化性の酵母、放線菌および細菌を用いて行ってきたこれまでの研究成果をまとめたものである。

2. メタノール資化性酵母 *Kloeckera*
sp. No. 2201

分離と培養⁶⁻⁸⁾ メタン、メタノールなどの還元型 C₁ 化合物を単一の炭素源、エネルギー源として利用する微生物の存在は、古くより知られていたが、そ

れらはいずれも細菌であった。それまでその存在が報告されていないこと、ならびに single cell protein の生産を行う場合に有利であると考えられることから、メタノール資化性酵母の分離が試みられた。

2%メタノールを、単一炭素源とした無機塩およびビタミン混液から成る pH 6.0 の培地で集積培養を行った。得られた酵母のうち、最も良好な生育を示した1菌株、No. 2201 を選び、以下の実験に用いた。本菌株は、無孢子酵母で、両極出芽により増殖し、偽菌糸の形成は認められなかった。糖の発酵性、硝酸塩の資化性およびエタノールの資化性などの諸性質から、*Kloeckera* 属に属する新菌種であると同定した。ただし、まれに偽菌糸が観察されることもあり、この点、後にいくつかの研究グループが分離した *Candida boidinii* と近似した菌株ともいえる。なお現在までに分離された酵母が全てそうであるように、本菌株は、メタノール以外の炭素化合物をも資化する通性メタノール菌である。Fig. 1 は *Kloeckera* sp. No. 2201 の顕微鏡写真である。

生育の至適温度は 25~30°C、至適 pH は 4.5~6.0

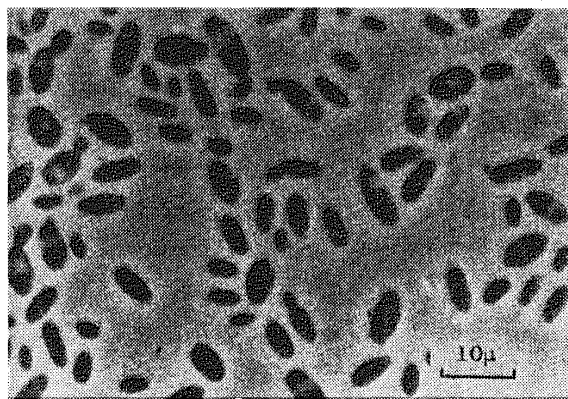


Fig. 1. Photomicrograph of *Kloeckera* sp. No. 2201.

* Microbial Utilization of Methanol. —A Monograph— TANI, Y., KATO, N., IZUMI, Y., SHIMIZU, S., OGATA, K., and YAMADA, H. (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606)

** 現在、鳥取大学工学部資源循環化学科

*** 昭和51年9月3日死去

Table 1. Cell composition of *Kloeckera* sp. No. 2201.

Moisture	4.05%
Crude protein	45.30
Crude fat	5.24
Crude fiber	4.84
Nitrogen-free extract	33.67
Ash	6.90

Table 2. Amino acid, RNA and DNA composition of *Kloeckera* sp. No. 2201.

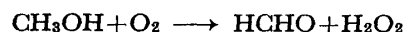
Lysine	3.4 g/100 g dry cells
Histidine	0.8
Arginine	2.4
Aspartic acid	4.7
Threonine	2.3
Serine	2.3
Glutamic acid	3.5
Proline	1.4
Glycine	2.4
Alanine	3.1
1/2 Cysteine	trace
Valine	2.4
Methionine	0.4
Isoleucine	2.3
Leucine	3.2
Tyrosine	1.5
Phenylalanine	1.8
RNA	4.4
DNA	1.0

であり、ビタミンおよびアミノ酸の栄養要求性はないが、チアミンによる著しい増殖促進効果が認められた。メタノール濃度が3%の時に最も良く生育したが、対メタノール乾燥菌体重量の収率は、1%濃度の時が最も良く、22.5%であった。この値はその後の培養条件の改善により39.5%となっている。¹⁾ また μ_{\max} は 0.13 hr^{-1} であった。菌体の一般食品分析ならびにアミノ酸および核酸の組成分析の結果を Table 1 および 2 に示す。他の酵母菌体組成と比べて、特に特徴は認められない。培養ろ液中の代謝産物として、ホルムアルデヒドを単離した。

メタノールの酸化経路⁹⁻¹⁵⁾ メタノールに生育する酵母のメタノールの酸化経路、すなわち主たるエネルギー獲得系について明らかにした。

まず、メタノールの酸化の第1段階、メタノール→

ホルムアルデヒドについて、当初、メタノール酸化性細菌において既に明らかにされているように、phenazine methosulfate などの電子受容体を要求する反応を予想した。しかし、種々の電子受容体の還元は認められず、しかもホルムアルデヒドの生成は認められた。このことから、いわゆる oxidase の存在を想定し、メタノールより cofactor の添加なしにホルムアルデヒドを生成する酵素の精製を行った。超音波破砕によって得た粗抽出液より、50~80%の硫酸飽和分画を調製した。これを DEAE-cellulose column chromatography にかける、活性区分を Sephadex G-200 のゲルろ過を行ったところ、ほぼ純粋と考えられる標品が得られた。さらに、この標品について固体硫酸添加法により結晶化を試み、極めて微細な黄色針状結晶を得た。この精製操作による結果を Table 3 にまとめた。粗抽出液から約12倍の純化で結晶酵素が得られる。このことは、菌体内可溶性たんぱく質の約8%を本酵素が占めることを示し、本酵素の重要性とともに、応用的に利用する場合の有利さをも示している。精製酵素によるメタノール酸化反応の化学量論より次の反応式を求めた。



本酵素はその後検討された全てのメタノール酸化性酵母に見出されているが、それ以外には Basidiomycetes などに知られているのみの珍しい酵素である。アルコール類に対する基質特異性が広いことから、alcohol oxidase と呼ばれている。本酵素の酵素化学的性質は、Table 4 に示すとおりである。本酵素は、280 nm の吸収以外に、373, 392 および 461 nm に極大吸収を有するフラビン酵素の性質を示した。TCA 処理により解離させた抽出液についてフラビンを同定したところ、FAD であることを認めた。さらに、本酵素が8個のサブユニットから構成されていること、および補酵素 FAD はそれぞれのサブユニットに1個ずつ含まれて

Table 3. Purification of alcohol oxidase of *Kloeckera* sp. No. 2201.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)
Cell-free extract	9,850	8,570	0.87
Ammonium sulfate	852	3,892	4.60
DEAE-cellulose	210	1,945	9.30
Sephadex G-200	180	1,890	10.50
Crystallization	150	1,650	11.00

Table 4. Properties of alcohol oxidase of *Kloeckera* sp. No. 2201.

Optimum temperature	35°C
Heat stability*	43°C
Optimum pH	8.0-9.0
<i>K_m</i> for methanol	0.44 mM
<i>K_m</i> for ethanol	2.5 mM
<i>V</i> for methanol	5.74 U/μmole
<i>V</i> for ethanol	6.10 U/μmole
A _{280 nm} ^{1%}	23.6
Molecular weight	673,000
Molecular weight of subunit	83,000
FAD content	8.4 mole/mole

* 50% of the initial activity of the enzyme was lost after 10 min at this temperature.

いることが明らかとなった。Fig. 2 は、本酵素の結晶標品を走査型電子顕微鏡で観察したものである。この写真から、各サブユニット4個ずつの単位が2段になった形で酵素1分子が構成されていることを明らかにした。

酵素生成は、メタノールを炭素源として培養した場合に顕著に誘導される。また本酵素によるメタノールの酸化反応では、過酸化水素の生成を伴うため、alcohol oxidase 誘導と同時に catalase も誘導生成される。種々のメタノール資化性酵母の粗抽出液について、alcohol oxidase および catalase 活性を測定した結果を Table 5 に示した。いずれの酵母でも、メタノール生育時に両酵素活性が誘導されていることが明らかである。

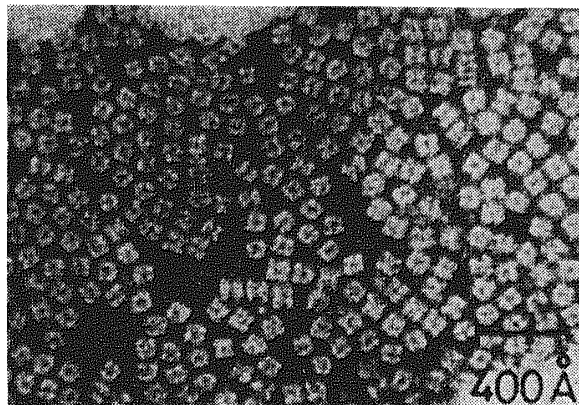


Fig. 2. Electron micrograph of alcohol oxidase.

なお、alcohol oxidase については、Cooney らによって分離された高温性メタノール資化性酵母 *Hansenula polymorpha* DL-1 から精製結晶化した。この酵素は *Kloeckera* sp. No. 2201 の酵素と種々の性質において類似していたが、生育適温と比例して酵素の反応至適温度は高く、また熱安定性もより優れていた。

メタノールの酸化の第2段階、ホルムアルデヒド→蟻酸の反応活性は NAD の添加によって認められた。



本酵素の精製は、超音波処理によって得た粗抽出液を出発物として、硫酸分画(40~70%飽和)、DEAE-cellulose column chromatography, hydroxylapatite column chromatography および Sephadex G-200 ゲルろ過により行った。精製結果を Table 6 に示した。精製標品の純度は約90%であり、菌体内の含量は可溶性たんぱく質の約0.8%程度である。しかし基質特異性は極めて高く、ホルムアルデヒド以外ではメチルグリ

Table 5. Activity of alcohol oxidase and catalase of methanol-utilizing yeasts.

Strains	Specific activity in extract of cells grown on			
	methanol		glucose	
	alcohol oxidase	catalase	alcohol oxidase	catalase
<i>Kloeckera</i> sp. No. 2201	0.13	12.9	—*	0.64
<i>Candida methanolica</i>	0.40	10.7	—	0.20
<i>Torulopsis pinus</i>	0.16	6.2	0.002	0.18
<i>Torulopsis methanolovescens</i>	0.08	9.4	—	0.18
<i>Hansenula capsulata</i>	0.07	5.7	—	0.09
<i>Pichia pinus</i>	0.24	6.9	—	0.35
<i>Pichia trehalophila</i>	0.48	3.2	0.002	0.20

* Nondetectable.

Specific activity: alcohol oxidase, μmole of H₂O₂/min/mg protein; catalase, ΔE₂₄₀/min/mg protein.

Table 6. Purification of formaldehyde dehydrogenase of *Kloeckera* sp. No. 2201.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)
Cell-free extract	22,780	134,000	6
Ammonium sulfate	5,520	66,240	12
1st DEAE-cellulose	1,000	115,200	115
2nd DEAE-cellulose	513	68,400	133
Hydroxylapatite	57.3	29,400	516
Sephadex G-200	19.5	12,200	629

Table 7. Substrate specificity of formaldehyde dehydrogenase of *Kloeckera* sp. No. 2201.

Substrate	Activity (ΔE_{340} for 1 min)
Formaldehyde	0.09
Acetaldehyde	0.00
Propionaldehyde	0.00
Butylaldehyde	0.00
Isobutylaldehyde	0.00
Glutaraldehyde	0.00
Glyceraldehyde	0.00
Glycolaldehyde	0.00
Benzaldehyde	0.00
Glyoxal	0.00
Methylglyoxal	0.08

オキザールが酸化されるに過ぎない (Table 7). 本酵素は、メタノール生育時に誘導生成された。反応に際しては、メタノール資化性細菌の一部および他の生物起源の formaldehyde dehydrogenase と同様に、還元型グルタチオンの存在が必須である。ホルムアルデヒドおよび NAD に対する K_m 値は、それぞれ 0.29 mM および 0.025 mM であった。

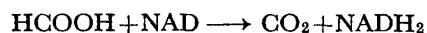
なお、ホルムアルデヒドは alcohol oxidase によっ

Table 8. Purification of formate dehydrogenase of *Kloeckera* sp. No. 2201.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)
Cell-free extract	6,240	25.7	0.0041
Heat treatment	975	20.9	0.021
DEAE-cellulose	105	9.16	0.087
Hydroxylapatite	51	7.70	0.139
Sephadex G-200	40	5.72	0.143

ても酸化される。これはホルムアルデヒドが水溶液中で水和された形をとるためであるが、この場合 K_m 値は 2.4 mM と高く、生理的意義は乏しいと考えている。

メタノール酸化経路の最終段階、蟻酸→炭酸ガスの反応を触媒する酵素として、formate dehydrogenase の存在を見出した。前段階のホルムアルデヒドの酸化反応の反応生成物が、グルタチオンと結合した状態 (*S*-ホルミルグルタチオン) とした場合、この2つの段階の間に *S*-formyl glutathione hydrolase を存在させるか、あるいは他の酵母で報告されているように、真の基質が蟻酸でなく、*S*-ホルミルグルタチオンであると考え必要がある。一応蟻酸を基質として酸化反応活性を測定し、NAD 関与の dehydrogenase を得た。本酵素活性はメタノールによって誘導された。超音波処理によって得た粗抽出液より熱処理 (55°C), DEAE-cellulose および hydroxylapatite column chromatography ならびに Sephadex G-200 のゲルろ過を行い、超遠心的および電気泳動的に均一な標品を得た (Table 8). 本酵素は、基質特異性は極めて高く、また蟻酸および NAD に対する K_m 値はそれぞれ 22 mM および 0.1 mM であった。 ^{14}C でラベルした蟻酸を用いて、本反応の化学量論を求め蟻酸の酸化が次式によることを認めた。



以上、*Kloeckera* sp. No. 2201 のメタノール酸化系に

Table 9. Flavin contents of *Kloeckera* sp. No. 2201.

Carbon source	Intracellular flavin				Extracellular flavin	
	Total	FAD	FMN	Riboflavin	Total	Riboflavin
(nmoles/g cells)						
Methanol	273	198	58	17	324	303
Ethanol	137	71	51	15	48	48
Glucose	144	86	42	16	115	114
Glycerol	119	64	44	11	73	68

Table 10. Activity of FAD biosynthesizing enzymes of *Kloeckera* sp. No. 2201.

Carbon source	Specific activity of		FAD pyrophosphorylase
	riboflavin synthetase	flavokinase	
	(nmol/mg/hr)		
Methanol	2.1	3.2	7.4
Ethanol	1.3	1.6	1.4
Glucose	1.4	1.0	0.9
Glycerol	1.5	1.3	1.2

ついて、これまでに得た実験結果をまとめた。ホルムアルデヒドの酸化の次の段階については、上に述べたようにまだ問題が残されており、現在検討を続けている。さらに酸化されたメタノールが、どのように菌体構成成分に資化されて行くかについては、メタノール資化性酵母に関する知見はきわめて乏しい。この問題についても現在検討中である。

FAD の発酵生産¹⁶⁻¹⁸⁾ メタノールの酸化の第1段階を触媒する alcohol oxidase には、1分子当たり8個のFADが含まれていること、さらには alcohol oxidase は菌体内可溶性たんぱく質の8%も占めていること、また培養後期の培養液が螢光を帯びてくることなどから、*Kloeckera* sp. No. 2201 は、FAD生成能が優れていることが推定された。そこで本菌を使って補酵素として有用なFADを発酵生産することを試みた。先ず、菌体内外のフラビン化合物の量を、メタノールおよび他の炭素源によって培養して比較した(Table 9)。メタノール生育時に、菌体内外とも明らかにフラビン化合物量は増加した。菌体外はどの炭素源の場合もリボフラビンが主であったが、菌体内のフラビン化合物のメタノール生育時の増加は、FADの増加によることを認めた。FAD生合成に関与する酵素活性に対する炭素源の影響を調べたのがTable 10である。FAD pyro-

phosphorylase 量の明らかな増加がメタノール生育時に認められた。フラビン化合物を前駆体としてメタノールを炭素源とした培地に添加し培養したところ、かなりのFADの生成が認められた(Table 11)。*Kloeckera* sp. No. 2201 以外のメタノール資化性酵母にも強い活性が認められ、FAD生産の最高値は、FMNおよびAMPを添加することによって45.4 µg/ml となった。

3. メタノール資化性放線菌 *Streptomyces* sp. No. 239¹⁹⁻²¹⁾

メタノール資化性酵母を分離後、さらに広範囲にメタノール資化性微生物を検索していたところ、ニューギニアの土壌を試料とした平板培養上に放線菌らしいコロニーを見出した。メタノール資化性放線菌の報告は、今までないことから、この放線菌を単離した。本菌は、メタノール以外の炭素源にも生育する通性メタノール菌で、気菌糸の形態、色(白色系)、胞子の形状(oval, in chains, smooth in surface)、色素生産(黄色)などから、*Streptomyces* 属に属する1菌種と考え、*Streptomyces* sp. No. 239 と呼ぶこととした。

生育時のメタノール濃度は、1~2%で最も高い生育度を与え、それより高濃度では阻害した。菌体収率は0.5, 1.0および2.0%のメタノール濃度で、それぞれ乾燥菌体重量としてメタノール1g当たり0.37, 0.35および0.18gであった。生育適温は37~40°Cであった。菌体構成成分を分析したところ、ケルダール窒素は10.1~10.5%で、この値から粗たんぱく質は、63.1~65.6%と算出され、また核酸は9.8~10.3%であった。アミノ酸組成はTable 12に示す通りで、シスチン含量の高いことが特徴的である。

本菌の無細胞抽出液を用いて、メタノールの酸化系の酵素活性を検討した結果をTable 13に示す。全体としては、メタノール資化性細菌に近い酸化系の存在を示唆している。しかし、第1段階のメタノールの酸

Table 11. Production of FAD by methanol-utilizing yeasts.

Strain	FAD formed (µg/ml) with addition of		
	None	FMN	FMN+AMP
<i>Kloeckera</i> sp. No. 2201	0.4	3.7	37.7
<i>Candida boidinii</i> S-1	0.4	10.0	45.0
<i>Hansenula polymorpha</i> DL-1	0.4	7.2	25.2
Unidentified yeast 12	1.0	24.7	32.8
Unidentified yeast 13	0.6	20.8	45.4
Unidentified yeast 14	0.6	15.2	33.6

Table 12. Amino acid composition of *Streptomyces* sp. No. 239.

Lysine	5.53 g/100 g protein
Histidine	2.13
Arginine	7.55
Aspartic acid	8.84
Threonine	5.81
Serine	3.11
Glutamic acid	15.47
Proline	5.03
Glycine	5.56
Alanine	9.31
Cystine	9.75
Valine	2.14
Methionine	1.28
Isoleucine	2.91
Leucine	7.27
Tyrosine	2.62
Phenylalanine	3.82

化において, phenazine methosulfate を電子受容体として検出される活性は, 細菌とは異なり, pH 9.0 およびアンモニウムイオン存在下では活性は示さず, またグリセロールを炭素源とした場合により高い活性が認められた. 馬心臓からの cytochrome *c* を電子受容体とする活性が最も強く, かつメタノール生育時に特異的であった. ホルムアルデヒドおよび蟻酸は, いずれ

も phenazine methosulfate を電子受容体として酸化されるが, 特に蟻酸のこの型の酸化酵素は, 他のメタノール酸化性微生物では見出されていない新しい酵素である. 酵素が不安定なため, 酵素精製などの実験は進展しなかった.

一方, 本菌のメタノール酸化経路を検討したところ, さらに珍しい特徴が認められた. すなわち Table 14 に示すように, セリン経路およびリビュロスモノリン酸経路のそれぞれの key enzyme 活性を同時に持つことを見出した. 2つの酸化経路が同時に存在する例は, メタノール酸化性細菌で1, 2報告されているのみである. Hydroxypyruvate reductase は, 培養初期に高く, 以後減少した. 3-Hexulose phosphate synthase は, logarithmic phase にその最大値を示した.

メタノール酸化性放線菌は, 今までのところ本菌以外には報告が見られない. 代謝の特異性および代謝産物(抗生物質)生産の可能性から, さらに広く検索する必要がある.

4. メタノール酸化性細菌

Methylomonas aminofaciens 77 a による分岐状アミノ酸の発酵生産^{22, 23)} single cell protein 生産を1つの大きな目標として始まったメタノール酸化性微生物の研究において, 代謝産物の蓄積の例がいくつか知られるようになってきた. われわれは, アミノ酸生産菌を得る目的でスクリーニングを開始した. 約

Table 13. Enzyme activities of methanol oxidation in *Streptomyces* sp. No. 239.

Substrate	Electron acceptor	Activities in cells grown on		
		methanol	glycerol	glucose
		(μmoles/min/mg protein)		
Methanol	PMS-DCPIP (pH 7.0)	0.129	0.161	—*
	Cytochrome <i>c</i>	0.210	—	—
	NAD or NADP	—	—	—
	PMS-DCPIP (pH 9.0, NH ₄ ⁺)	—	—	—
	Oxygen	—	—	—
Formaldehyde	PMS-DCPIP	0.816	0.197	0.033
	Cytochrome <i>c</i>	0.203	—	—
	NAD	—	—	—
Formate	PMS-DCPIP	0.432	0.438	—
	Cytochrome <i>c</i>	0.023	—	—
	NAD	—	—	—

* Nondetectable.

PMS, phenazine methosulfate; DCPIP, 2,6-dichlorophenolindophenol.

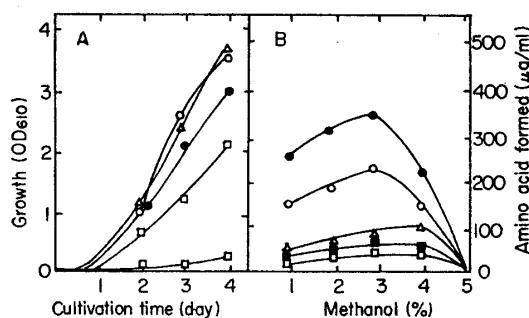
Table 14. Enzyme activities of methanol assimilation in *Streptomyces* sp. No. 239.

Enzyme	Activities in cells grown on	
	methanol	glycerol
	(nmoles/min/mg protein)	
Hydroxypyruvate reductase	26.0	11.0
Malate lyase (ATP-dependent)	0.67	—*
Isocitrate lyase	1.35	1.01
3-Hexulose phosphate synthase	55.0	—

* Nondetectable.

400株の培養液中のアミノ酸を検索したところ、アミノ酸生産性に関して2つのグループに分けることができた。1つはアラニンを生産物とし、他の1つは、バリン、ロイシンを生産物とした。アミノ酸発酵という観点から後者に属する1菌株を選んだ。本菌は偏性メタノール細菌で、グラム染色陰性の桿菌で単極鞭毛を持っている。その他の形態学的、培養的および生理的な性質を総合して、*Methylomonas* 属に属する新菌株と認め、*Methylomonas aminofaciens* 77a と命名した。

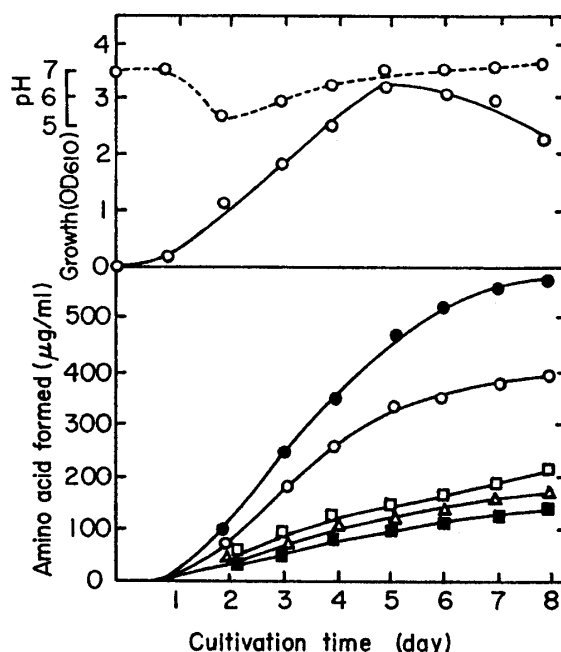
本菌は初発メタノール濃度1～3%で良好な生育を示し、L-バリンおよびL-ロイシンの生成はメタノール濃度3%で最大値を示した (Fig. 3)。なお、分岐状アミノ酸の他に、2, 3のアミノ酸も蓄積される。培養条件を検討した結果、Fig. 4 に示した培養方法が、アミノ酸生産に最適であった。すなわち、初発メタノール濃度3%とし、培養開始2日後から1日毎にメタノール1%および尿素0.025%ずつ feeding していく方法

Fig. 3. Effect of methanol concentration on amino acid production by *Methylomonas aminofaciens* 77a.

A; Growth with methanol concentrations of 1% (v/v) (○), 2% (△), 3% (●), 4% (□) and 5% (■).

B; Amino acid production after 4 days cultivation: L-valine (●), L-leucine (○), glutamic acid (△), alanine (■) and aspartic acid (□).

で、アミノ酸生産は8日後に最高値に達した。しかし、この最適条件下でも生成されるアミノ酸は1mg/ml以下で不十分である。そこで、アミノ酸発酵菌の改良に今まで用いられてきた方法のうち、アナログ耐性変異株誘導法により、生産能を向上させることを試みた。norleucine, norvaline および valine hydroxamate を用いて、それぞれ nitrosoguanidine 処理によって耐性株を誘導した。Table 15 は、norvaline 耐性株 M325 を誘導した過程である。M325 株を用いて培養条件を検討した。特にピルビン酸を添加した場合に顕著に増加し、またチアミンの添加も効果的であった。このことは、本菌における分岐状アミノ酸の生合成が、他の微生物で知られていると同様の経路、すなわちピルビン酸を経由し、またチアミンによるピルビン酸の活性化が起こる経路によっていることを強く示唆している。Fig. 5 は、メタノール濃度2%で、ピルビン酸およびチアミンを添加した条件での培養の経時変化である。用いた菌株は、親株 77a, M325 および valine hydroxamate 耐性株 X329 である。この条件では X329 株が最も高い生成量を示し、L-バリン 2.2mg/ml およ

Fig. 4. Time course of amino acid production by *Methylomonas aminofaciens* 77a.

Initial methanol concentration, 3% (v/v): Every day from the 2nd day to the 7th day, methanol and urea were added to 1% and 0.025%, respectively.

—○—, pH; —●—, Growth; —●—, L-Valine; —○—, L-Leucine; —□—, Aspartic acid; —△— Glutamic acid; —■—, Alanine.

Table 15. Production of L-valine and L-leucine by analog-resistant mutants of *Methylobacterium aminofaciens* 77a.

Strain	Parent strain	Resistant to	Amino acid formed (mg/ml)	
			L-Valine	L-Leucine
77a			0.20	0.25
2L308	77a	DL-Norleucine, 2 mg/ml	—*	0.50
BI314	2L308	DL-Norleucine, 3 mg/ml	—	0.50
D704	BI314	DL-Norleucine, 7 mg/ml	—	0.64
J528	D704	DL-Norvaline, 5 mg/ml	0.64	0.48
K723	J528	DL-Norvaline, 7 mg/ml	0.68	0.36
M325	K723	DL-Norvaline, 7 mg/ml	0.85	0.60

* Not tested.

びL-ロイシン 0.8 mg/ml の値が得られた。

***Methylobacterium aminofaciens* 77a のメタノール代謝^{24,25)}** 偏性メタノール菌である本菌の生育はきわめて良好であることから、従来、報告の少ないメタノール酸化経路の酵素の酵素化学的研究に好適な材料であろうと考えて実験を行った。他の多くの偏性メタノール菌と同様、本菌も強い 3-hexulose phosphate synthase (hexose phosphate synthase) 活性を示した。

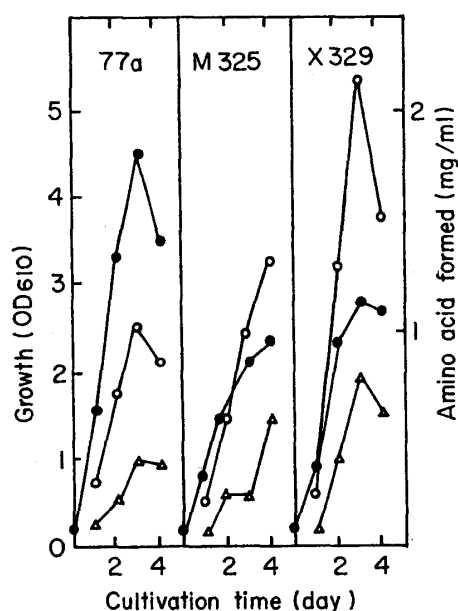


Fig. 5. Time course of amino acid production by *Methylobacterium aminofaciens* 77a, M325 and X329.

Methanol concentration, 2% (v/v): Sodium pyruvate and thiamine-HCl were added to concentrations of 10 mg/ml and 10 µg/ml, respectively.

●, Growth; ○, L-Valine; △, L-Leucine. (A), 77a; (B), M325; (C), X329.

本酵素反応の反応生成物を同定するために、ホルムアルデヒドとリビュロース5-りん酸を基質として縮合生成物の糖りん酸化合物を単離した。この糖りん酸化合物は、280 nm で最大吸収、250 nm で最小吸収を示した。また脱りん酸したものの薄層クロマトグラム上の挙動を Table 16 に示した。これらの性質から本糖りん酸化合物は、D-arabino-3-hexulose 6-phosphate であると同定した。次にこの縮合反応を触媒する酵素を精製した。超音波処理によって得た粗抽出液について、DEAE-cellulose および hydroxylapatite column chromatography, Sephadex G-150 および Sephadex G-100 によるゲルろ過ならびに DEAE-Sephadex A-50 column chromatography を行い、超遠心的および電気泳動的に均一な標品を得た。Table 17 は、その精製結果を示したものである。本酵素は、リビュロース5-

Table 16. Thin-layer chromatogram of product of 3-hexulose phosphate synthase reaction.

Solvent system	R _f value of dephosphorylated product
n-Butanol: pyridine: H ₂ O (6 : 4 : 3 v/v/v)	0.34
Acetone: acetic acid: H ₂ O (20 : 6 : 5 v/v/v)	0.36
Phenol (90% w/v): formic acid: H ₂ O (500 : 13 : 167 w/v/v)	0.68
Spray reagent	Color reaction of dephosphorylated product
Urea-phosphate	pink
Diphenylamine-aniline	yellow-brown
Resorcinol-HCl	yellow

Layer: Avicel plate SF®

Table 17. Purification of 3-hexulose phosphate synthase of *Methylobacterium aminofaciens* 77a.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)
Cell-free extract	6031	20,010	3.3
DEAE-cellulose	1251	7,010	6.3
Hydroxylapatite	350	6,200	17.7
Sephadex G-150	78	3,744	48.0
Sephadex G-100	50	2,622	52.0
DEAE-Sephadex A-50	31	1,645	53.0

りん酸に対して特異的であった。本酵素の理化学的ならびに酵素化学的諸性質を Table 18 にまとめた。

ホルムアルデヒドの縮合の次の段階、すなわち *D*-arabino-3-hexulose 6-phosphate の異性化を触媒する phospho-3-hexuloisomerase 活性も本菌の抽出液に認められた。プロタミン処理、硫酸沈殿、DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex および hydroxylapatite column chromatography ならびに Sephadex G-200 ゲルろ過によって部分精製酵素標品を得た。本酵素の *D*-arabino-3-hexulose 6-phosphate および fructose 6-phosphate に対する K_m 値はそれぞれ 0.029 mM および 0.67 mM であった。

なお、同時に、メタノール資化性酵母 *Kloeckera* sp. No. 2201 および *Hansenula polymorpha* DL-1 について、phospho-3-hexuloisomerase 活性を測定したところ検出されなかった。このことは、酵母が細菌と異なったメタノール資化経路を持つことを示唆している。

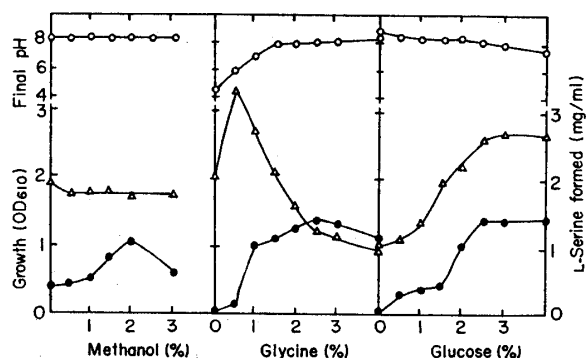
Table 18. Properties of 3-hexulose phosphate synthase of *Methylobacterium aminofaciens* 77a.

Optimum temperature	40°C
Heat stability*	80°C
Optimum pH	8
K_m for HCHO	0.29 mM
K_m for <i>D</i> -ribulose 5-phosphate	0.059 mM
K_m for <i>D</i> -arabino-3-hexulose 6-phosphate	0.036 mM
K_m for $MgCl_2$	0.17 mM
$\Delta_{20, w}^{20}$	3.19 S
Molecular weight	45,000-47,000
Molecular weight of subunit	23,000
pI	5.1

* Initial activity of the enzyme was total lost after 10 min at this temperature.

Arthrobacter globiformis SK-200 による L-セリンの発酵生産²⁶⁾ メタノールの資化経路の1つにセリン経路がある。一方、L-セリンは、発酵法による生産が報告されているが、その収量は充分ではない。これらの点から、メタノール資化性細菌による L-セリンの発酵生産を試みた。L-セリンは、アミノ酸代謝の中央に位置し、きわめて代謝回転の早いアミノ酸であるので通常の培養法では蓄積が困難であると考えられる。そこで前駆体としてグリシンを添加する方法をとった。グリシンは、一方で微生物の生育阻害物質であるので、メタノール資化性細菌を分離したのち、グリシン添加培地で生育することのできる菌株のみを選択した。L-セリン生成能の優れた1菌株、SK-200 は、グラム染色陽性の桿菌で、その形態学的、培養的および生理的な諸性質から *Arthrobacter globiformis* と同定した。

本菌の L-セリン生成のための培養条件を検討したところ、高濃度のメタノールおよびグリシンによって相乗的に生育阻害を受け、L-セリンの収量は上がらなかった。そこで他の糖類を添加したところ、グルコースによってメタノールおよびグリシンの生育阻害が軽減されることを見出した。Fig. 6 は、メタノール、グリシンおよびグルコースの各濃度の L-セリン生成に及ぼす影響を検討した結果である。さらに種々の化合物の添加効果について検討し、Table 19 に示す結果を得た。これらの化合物はいずれも L-セリンおよびグリシンの生合成、分解の経路に関連した化合物である。L-トリプトファンなどの促進効果が見られる他に、L-メチオニンの L-セリン生成に対する阻害効果が顕著にあらわれている。この現象は、*Escherichia coli* などの serine

Fig. 6. Effect of methanol, glycine and glucose concentrations on L-serine production by *Arthrobacter globiformis* SK-200.

Basal medium: methanol, 1.2% (v/v); glycine, 2%; glucose, 2%.

Cultivation for 3 days.

○, pH; △, Growth; ●, L-Serine.

Table 19. Effect of compounds on L-serine production by *Arthrobacter globiformis* SK-200.

Compound added		Growth (OD ₆₁₀)	L-Serine formed (mg/ml)
None		1.40	0.65
L-Threonine	0.2 %	1.65	0.78
	1.0	1.80	1.07
L-Tryptophan	0.2	2.00	1.30
	1.0	2.10	1.84
L-Cysteine·HCl	0.2	2.00	0.61
DL-Glycerate·Ca	0.2	1.88	0.61
Glyoxylate·NaHSO ₃	0.2	2.25	1.20
	1.0	1.50	0
Glycolate·Na	0.2	2.35	0.69
	1.0	2.70	0.59
Ethanolamine	0.2	2.00	0.88
	1.0	1.90	0
Pyruvate·Na	0.2	2.35	0.39
	1.0	2.86	0.39
Choline	0.2	2.06	0.71
	1.0	1.55	0.74
L-Methionine	0.005	1.85	0.69
	0.015	1.68	0.33
	0.05	1.64	0.11
Folic acid	0.01	1.40	0.56
	0.1	1.20	0.90
Pyridoxine·HCl	0.0005	1.42	0.11

transhydroxymethylase が L-メチオニンによって抑制される現象と類似している。そこでこの阻害を解除する目的で、L-メチオニン要求性変異株の取得を試みた。uv 照射によって得た 1 変異株は、優れた L-セリン生産能を示し、生成量は 5.2 mg/ml となった。

5. お わ り に

メタノール資化性微生物に関して、われわれが今まで行ってきた一連の研究を、動機および実験結果を中心にまとめてみた。微生物を利用した single cell protein の生産について論ずる場合、酵母、細菌、かび、あるいは放線菌のそれぞれの優位性を決定する因子は多様で、それぞれの特徴を充分把握した上で選択しなければならない。本研究は、single cell protein 生産のための基礎研究としては必ずしも充分であるとはいえないが、菌体生産のための培養条件を出発点としたメタノールの酸化経路および資化経路の解明を通して得られた知見は、single cell protein 生産に 1 つの有

力な手掛りを与えるであろう。さらに、メタノール資化性微生物の利用が single cell protein 生産のみならず、アミノ酸をはじめとする種々の代謝産物の生産にも適用しうることを示し、この面での今後の発展を示唆することを試みた。

本研究は、京都大学農学部発酵生理学研究室において行われたものである。初期の研究の共同研究者であり、その後の研究においても種々のご助言をいただいた京都大学教授・梶倉辰六郎先生ならびに各研究段階での共同研究者、大杉匡弘、西川英郎、美矢豊文、玉沖達也、加納正賀寿、辻和子、堀隆夫、大森康男、河盛幹雄、浅野泰久、大橋弘幸、金川貴博、Aran Hanpongkittikun、石田雅昭の諸氏に謝意を表します。

文 献

- 緒方, 加藤: 石油と微生物, No. 8, 4 (1972).
- 加藤, 緒方: 化学と生物, **14**, 138 (1976).
- 谷: 石油と微生物, No. 18, 15 (1977).
- 谷: 生化学, **50**, 26 (1978).
- Tani, Y., Kato, N., Yamada, H.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **24**, 165 (1978).
- Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1519 (1969).
- 緒方, 西川, 大杉, 梶倉: 醸工, **48**, 389 (1970).
- 緒方, 西川, 大杉, 梶倉: 醸工, **48**, 470 (1970).
- Tani, Y., Miya, T., Nishikawa, H., Ogata, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 68 (1972).
- Tani, Y., Miya, T., Ogata, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 76 (1972).
- Kato, N., Tamaoki, T., Tani, Y., Ogata, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2411 (1972).
- Kato, N., Kano, M., Tani, Y., Ogata, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 111 (1974).
- Kato, N., Tani, Y., Ogata, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 675 (1974).
- Ogata, K., Tani, Y., Kato, N.: *Microbial Growth on C₁-Compounds*, 99, The Society of Fermentation Technology, Japan, Osaka (1975).
- Kato, N., Omori, Y., Tani, Y., Ogata, K.: *Eur. J. Biochem.*, **64**, 341 (1976).
- Shimizu, S., Ishida, M., Tani, Y., Ogata, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 423 (1977).
- Shimizu, S., Ishida, M., Kato, N., Tani, Y., Ogata, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2215 (1977).
- Shimizu, S., Ishida, M., Tani, Y., Ogata, K.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 630 (1977).
- Kato, N., Tsuji, K., Tani, Y., Ogata, K.: *J.*

- Ferment. Technol.*, 52, 917 (1974).
- 20) Kato, N., Tsuji, K., Tani, Y., Ogata, K.: *Microbial Growth on C₁-Compounds*, 91, The Society of Fermentation Technology, Japan, Osaka (1975).
- 21) Kato, N., Tsuji, K., Ohashi, H., Tani, Y., Ogata, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 41, 29 (1977).
- 22) Ogata, K., Izumi, Y., Kawamori, M., Asano, Y., Tani, Y.: *J. Ferment. Technol.*, 55, 444 (1977).
- 23) Izumi, Y., Asano, Y., Tani, Y., Ogata, K.: *J. Ferment. Technol.*, 55, 452 (1977).
- 24) Kato, N., Ohashi, H., Hori, T., Tani, Y., Ogata, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1133 (1977).
- 25) Kato, N., Ohashi, H., Tani, Y., Ogata, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 523, 236 (1978).
- 26) Tani, Y., Kanagawa, T., Hanpongkittikun, A., Ogata, K., Yamada, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 印刷中.

(昭53. 5.30受付)