

〔醸酵工学会誌 第69巻 第5号 373-378, 1991〕

ノート

酵母におけるレボグルコサン (1,6-anhydro- β -D-glucopyranose) の資化様式

北村 義明*・安井 恒男

筑波大学応用生物化学系
〒305 つくば市天王台1-1-1

(平成3年2月12日受付 平成3年6月12日受理)

Assimilation of levoglucosan (1,6-anhydro- β -D-glucopyranose) by several yeasts. —Note—
YOSHIAKI KITAMURA* and TSUNEO YASUI (Institute of Applied Biochemistry, University of
Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305) Hakkokogaku 69: 373-378, 1991.

The utilization of levoglucosan (1,6-anhydro- β -D-glucopyranose) by several yeasts was studied. The assimilability of levoglucosan in all of the yeasts capable of utilizing levoglucosan as a sole carbon source was shown to be inducible, but it was so high as to be comparable to that of glucose in *Cryptococcus albidus* IFO-0378. The effects of metabolic inhibitors on the levoglucosan-consumption and ^{14}C -tracing experiments of the intracellular metabolites showed that the metabolic pathway was very similar to that of glucose, though the general β -glucosidases seemed not to take part in the levoglucosan assimilation. These data showed that levoglucosan would be introduced into the general glycolytic pathway from the initial stage of its assimilation in these cells.

レボグルコサン (1,6-anhydro- β -D-glucopyranose) は、グルコピラノースの1位と6位の炭素原子間で分子内グルコシド結合を形成した無水糖であり、セルロースまたはデンプンを減圧下で熱分解 (pyrolysis) した際に生成するタール中に多量に含まれる。¹⁾ 近年、資源の有効利用の立場から、セルロース性物質の糖化手段の一つとして、木材や紙の熱分解による本物質の生産、ならびに微生物による有用物質への変換などが報告された。Shafizadeh ら,²⁾ 三浦ら³⁾ は生産条件の検討を行い、綿などのセルロース性物質より最高58%の収率でのレボグルコサン生産を報告している。また、中川らは *Aspergillus terreus* が、グルコースを発酵基質とした場合と同収率、同速度でレボグルコサンをイタコン酸に変換し得ることを報告した。⁴⁾

レボグルコサンは、酸触媒の存在下で加熱することによってグルコースに加水分解されるが、そのとり得る立体配座は非常に制限されており、これに作用する酵素は既知のものとは異なる特殊な性質を持つことが考えられた。我々は、現在までまったく報告のない無水糖の代謝系路ならびにその分解酵素の解明に着手し、レボグルコサンを資化できる真核微生物がレボグルコサンを遊離のグルコースを経ずに直接グルコース6リン酸へとリン酸化する特異的キナーゼ (仮称、レボグルコサンキナーゼ) を持つことを明らかにした。^{5,6)} 本報では、そのレボグルコサンキナーゼの菌体内でのレボグルコサン代謝への関与を検証することを目的として、菌体内へのレボグルコサン吸収を観察するのに取扱いが容易なレボグルコサン資化性酵母菌株、*Cryptococcus albidus* IFO-0378, IFO-1419 株、*Pichia haplophila* IFO-0947 株および *Sporobolomyces salmonicolor* IFO-0375 株を用いて、レボグルコサン代謝の第一段

* 連絡先, Corresponding author.
現在, 農林水産省食品総合研究所.

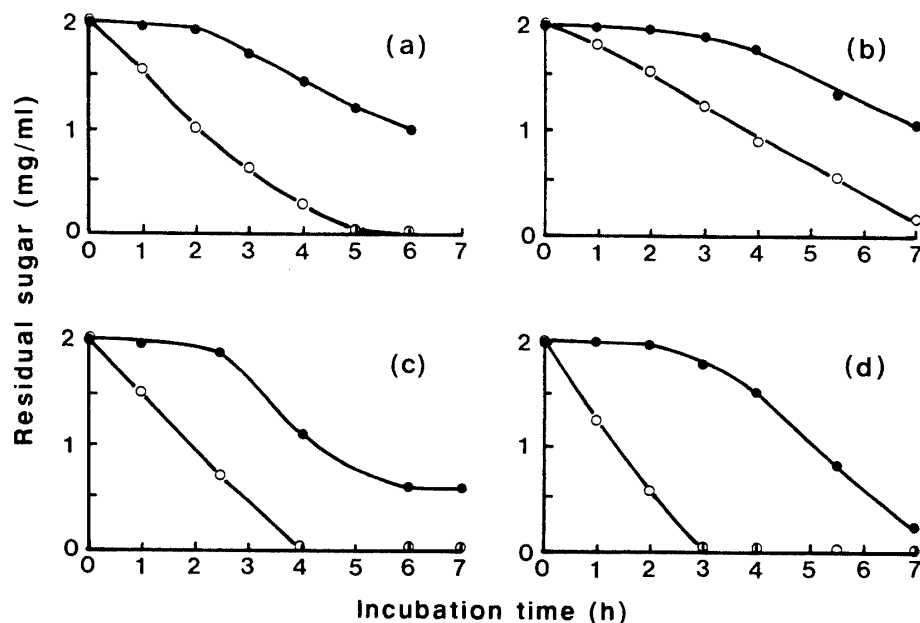


Fig. 1. Levoglucosan and glucose assimilation by glucose-grown yeasts, *Cryptococcus albidus* IFO-1419 (a), IFO-0378 (c), *Sporobolomyces salmonicolor* IFO-0375 (b), and *Pichia haplophila* IFO-0947 (d). Cell concentrations are shown in Table 1. Symbols: ●, levoglucosan; ○, glucose.

階である菌体内への吸収とその菌体内での変換を調べた。

レボグルコサン資化性酵母は、グルコース 1%，peptone 0.2%，yeast extract 0.2%， KH_2PO_4 0.1%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%の完全培地で 30°C，2 日間振盪して前培養を行い，これを同組成の培地に植菌し，同様に 2 日間培養した。遠心分離によって集菌後， KH_2PO_4 0.1%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%の塩溶液で二回洗浄し，同溶液に菌体を懸濁して 30°C で 4 時間飢餓培養をした。同様に集菌，洗浄後，菌体濃度を調整して，以下のレボグルコサン吸収実験に供試した。これらの菌体を，30°C に予熱した各糖質（終濃度 0.2%）を含む上記の塩溶液に再懸濁後 30°C にて振盪した。経時的にサンプリングを行い，遠心分離後の上清中の残糖量をフェノール硫酸法⁷⁾で定量することによって，レボグルコサンおよび他の糖質の消費・吸収を追跡した。

これらのレボグルコサン資化性酵母のグルコース生育菌体のレボグルコサン資化能は，Fig. 1 に示すとおり誘導性である。対照としたグルコースは直線的に消費されているのに対して，レボグルコサンは約 2 時間のラグタイムの後にその消費が始まる。タンパク合成阻害剤である cycloheximide (1 mM) をこのレボグルコサン吸収または代謝系の誘導以前に添加した場合は，グルコースの消費にはあまり影響をおよぼさないが，

レボグルコサンの消費は完全に抑制され (Fig. 2)，吸収系を含めた代謝系のある部分が *de novo* 合成による誘導を受けていることが示された。Fig. 1 より算出した単位菌体あたりのレボグルコサンならびにグルコース消費速度を Table 1 に示した。*Cryptococcus albidus* IFO-

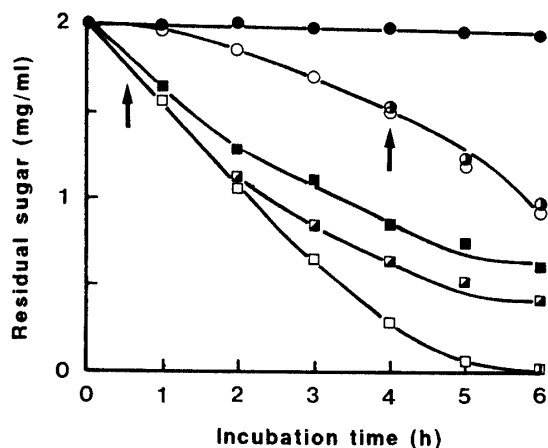


Fig. 2. Effects of cycloheximide on levoglucosan and glucose assimilation by glucose-grown cells of *Cryptococcus albidus* IFO-1419. ○, □; levoglucosan and glucose in the absence of cycloheximide. ●, ■; levoglucosan and glucose in the presence of cycloheximide (1 mM). ◎, ▣; levoglucosan and glucose with the addition of cycloheximide (1 mM) at the times indicated by the arrows.

Table 1. Levoglucosan and glucose uptake by glucose-grown yeasts.

Strain	Cell concn. (mg/ml)	Sugar	Uptake velocity (mg/ml/h)	Velocity per mg cell (μ g/mg/h)	v_L/v_G
<i>Cryptococcus albidus</i> IFO-1419	6.9	G	0.45	65	0.56
		L	0.25	36	
<i>Cryptococcus albidus</i> IFO-0378	12.0	G	0.53	44	1.00
		L	0.53	44	
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> IFO-0375	7.7	G	0.29	38	0.66
		L	0.19	25	
<i>Pichia haplophila</i> IFO-0947	13.2	G	0.70	53	0.57
		L	0.40	30	

Cell concn., cell concentration (dry weight); G, glucose; L, levoglucosan; v_L/v_G , velocity of levoglucosan uptake/velocity of glucose uptake.

0378 株は、誘導後にはレボグルコサンをグルコース消費の場合と同等の速度で消費し、この菌株のレボグルコサン資化能がグルコースの資化と同程度の活性を有することが判明した。

各種代謝阻害剤のレボグルコサン消費に及ぼす影響を Fig. 3 に示す。sodium azide ならびに monoiodoacetic acid (おのおの 1 mM) は、この基質濃度 (0.2%) では、それぞれこの吸収系に加えた時点よりグルコースならびにレボグルコサンの消費をほぼ完全に阻害したが、sodium fluoride (1 mM) はどちらの糖の消費にもまったく影響を与えなかった。

また、 ^{14}C -レボグルコサンを用いた低濃度の吸収実験を Fig. 4 に示す。 ^{14}C -レボグルコサンは $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ グルコースを原料として、G. H. Coleman らの方法⁸⁾をスケールダウンして合成した。ここでは酵母 *Sporobolomyces salmonicolor* IFO-0375 のレボグルコサン生育菌体とグルコース生育菌体を洗浄後 1 mM の ^{14}C -レボグルコサン中に懸濁し、経時的にその遠心上清のラジオアクティビティーを測定した。この基質濃度では、Sodium azide が高基質濃度の場合と同様にレボグルコサンおよびグルコースの吸収を、その添加時よりただちにほぼ完全に阻害したのに対し、monoiodoacetic acid はどちらの吸収にもほとんど影響を与えなかった。Sodium azide が呼吸系を阻害して、効率的な ATP の生産を即座に停止させるが、monoiodoacetic acid は SH 酵素の阻害剤として解糖系等の異化代謝を阻害するといういわば緩慢な代謝阻害効果を示すことを考えれば、上記の結果は、レボグル

コサンの菌体内代謝において、その吸収または代謝の初期段階に ATP が関与していることを示すと考えられる。また、これらの代謝阻害剤が、レボグルコサンとグルコースの消費の双方にまったく同じ影響を与えたという事実は、吸収系を含めた広い意味のレボグルコサン代謝が、初期の段階でグルコースの場合と同様な経路をたどることを示唆する。

なお、この低レボグルコサン濃度の吸収実験系では、レボグルコサン生育菌体に比べ速度は遅いものの、グルコース生育菌体においても、レボグルコサンの吸収ならびに、図には示さなかったが、菌体内での他物質への変換がラグタイムなしに観察され、構成的なレボグルコサン代謝系も活性は低いが存在すると考えられる。

次に、 ^{14}C -レボグルコサンの吸収途中に菌体を洗浄後、熱エタノール (80%) で菌体内 ^{14}C 物質を抽出し、TLC オートラジオグラフィーによって ^{14}C -レボグルコサンの代謝を追跡した一例を Fig. 5 に示す。Fig. 5-(a) に示された各時点での TLC オートラジオグラムが Fig. 5-(b) である。図中 (T) で示した生成物は、何紙電気泳動による同定の結果、トレハロースであることが判明した。トレハロースは休止期の酵母細胞に多量に蓄積する菌体内蓄積物質であり、⁹⁾ これらの菌体内中間体は、レボグルコサン代謝の比較的后期の生成物であると考えられる。また、これらの中間体は ^{14}C -グルコースを投与した場合にも同様に観察されることから、菌体内に吸収されたレボグルコサンはグルコースと同様な代謝経路によって代謝されていることが再び

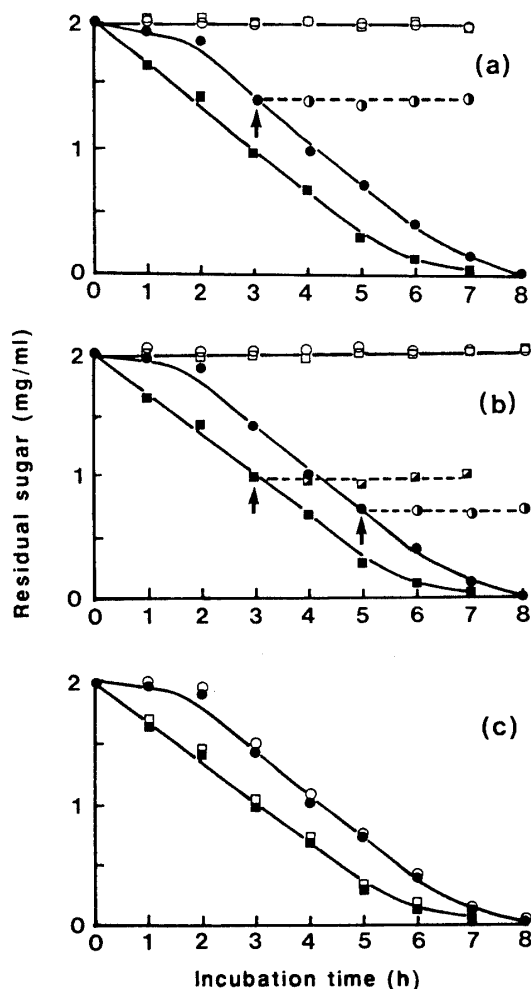


Fig. 3. Effects of sodium azide (a), monoiodoacetic acid (b) and sodium fluoride (c) on levoglucosan and glucose assimilation by glucose-grown cells of *Cryptococcus albidus* IFO-0378. The concentration of each metabolic inhibitor was 1 mM.

●, ■; levoglucosan and glucose in the absence of the inhibitors.

○, □; levoglucosan and glucose in the presence of the inhibitors.

◐, ◑; levoglucosan and glucose with the addition of the inhibitors at the times indicated by the arrows.

示唆された。

各種グルコシダーゼの有効な阻害剤である glucono- δ -lactone の、レボグルコサン吸収に対する影響を調べたものが、Fig. 6 である。この場合、その菌体内での代謝の第一段階が β -グルコシダーゼによる加水分解であると考えられるセロビオースの消費を対照に測定したが、セロビオースの場合は glucono- δ -lactone が代謝されたと考えられる約 6 時間までその吸収はほぼ完全に抑えられた。一方、レボグルコサンの吸収は、

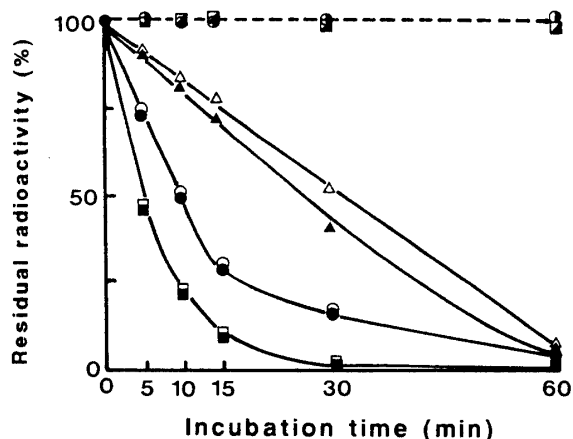


Fig. 4. Assimilation of levoglucosan and glucose at a low concentration (1 mM) by *Sporobolomyces salmonicolor* IFO-0375. Levoglucosan- or glucose-grown cells were incubated with ^{14}C -levoglucosan or glucose (1 mM) at 30°C; the radioactivity of the supernatant after centrifugation was then measured. $\blacktriangle$, $\triangle$; levoglucosan assimilation by glucose-grown cells in the absence and presence of monoiodoacetic acid (1 mM). $\bullet$, $\circ$, $\bigcirc$; levoglucosan assimilation by levoglucosan-grown cells in the absence and presence of monoiodoacetic acid (1 mM) or sodium azide (1 mM). $\blacksquare$, $\square$, $\square$; glucose assimilation by levoglucosan-grown cells in the absence and presence of monoiodoacetic acid (1 mM) or sodium azide (1 mM).

誘導時間が若干伸びただけにとどまり、その吸収速度は glucono- δ -lactone の存在に影響を受けなかった。これは、菌体内のレボグルコサン代謝酵素が glucono- δ -lactone によって影響を受けないことを意味するものであり、レボグルコサンが通常のグルコシダーゼ系の加水分解酵素によって代謝されているのではないことを示唆すると考えられる。なお、レボグルコサンをグルコースに加水分解する酵素活性は、現在のところ、どのレボグルコサン資化性糸状菌および酵母からも検出されていない。

以上の結果をまとめれば、1) レボグルコサン資化能を有する酵母菌株は、*de novo* 合成で誘導される代謝または吸収系によってその資化能を獲得し、この中には糸状菌と同様にレボグルコサン資化能がグルコース資化能と同等に高いものが存在すること、2) これらの菌体のレボグルコサン消費におよぼす代謝阻害剤の影響、ならびに菌体中での代謝中間体への変換が、グルコース代謝の場合とまったく同様であり、ATP が非常に重要な働きをしていると考えられること、また、

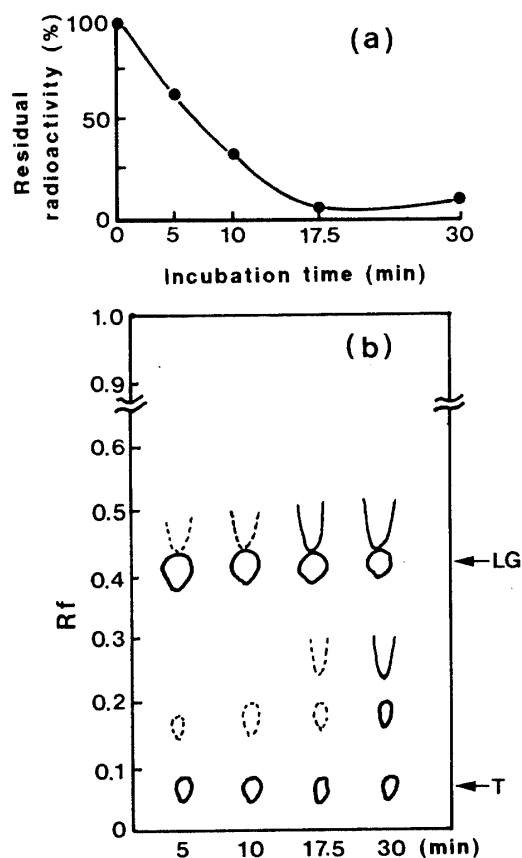


Fig. 5. Conversion of ^{14}C -levoglucosan in the cells of levoglucosan-grown yeasts, *Pichia haplophila* IFO-0947.

During the assimilation of ^{14}C -levoglucosan (1 mM, 1 μCi), at each of the times indicated in (a), an aliquot was removed for centrifuging; the cell pellets were washed three times, then the intracellular ^{14}C -compounds were extracted with hot 80% ethanol. The radioactivity equivalent to 2×10^4 cpm was spotted on a TLC plate (Merck No.5748); the plate was then developed with methanol: chloroform: acetone: 27% ammonia water (5:2:3:2, by volume), dried, and autoradiographed for a week (b). LG, corresponding to levoglucosan; T, corresponding to trehalose. Other spots were not identified.

3) レボグルコサンの資化能が glucono- δ -lactone の存在にほとんど影響を受けず、その代謝の初期に通常の β -グルコシダーゼが関与していない可能性が高いことが示された。これらの結果は、レボグルコサンのグルコース 6 リン酸への直接リン酸化反応により容易に説明できる。このことは、先に報告したレボグルコサンキナーゼが *in vivo* のレボグルコサン代謝の主経路を担っているという仮説を支持するものである。

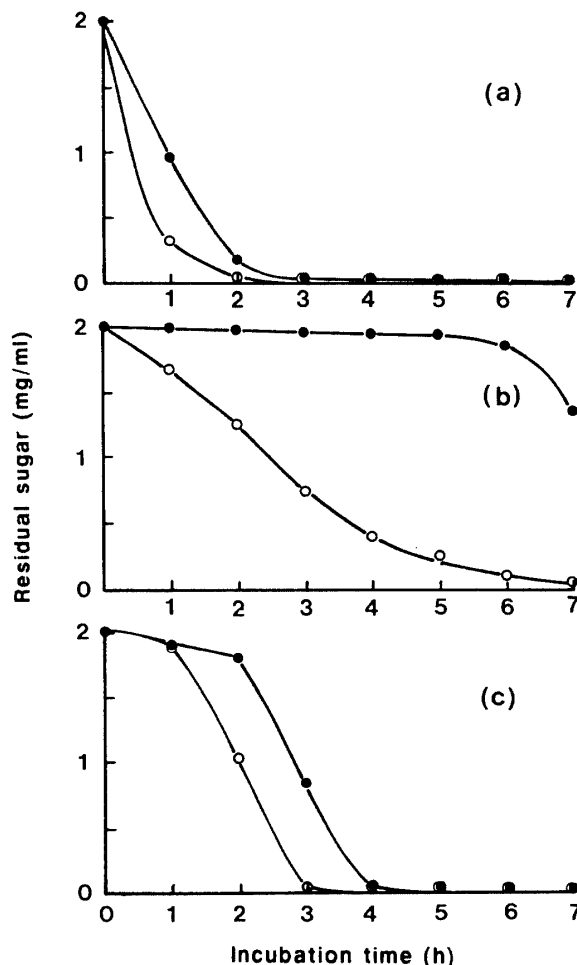


Fig. 6. Effects of glucono- δ -lactone on glucose-(a), cellobiose-(b), and levoglucosan-(c) assimilation by glucose-grown cells of *Pichia haplophila* IFO-0947. Symbols: ○, in the absence of glucono- δ -lactone; ●, in the presence of glucono- δ -lactone (2 mg/ml).

要 約

著者らは、レボグルコサン (1,6-anhydro- β -D-glucopyranose) を資化し得る酵母ならびに糸状菌は、この無水糖を遊離のグルコースを経ることなく直接グルコース 6 リン酸にリン酸化する特異的キナーゼ (仮称、レボグルコサンキナーゼ) を持つことを報告した。本報では、このレボグルコサンキナーゼの *in vivo* でのレボグルコサン代謝への関与を明らかにすることを目的とし、代謝の第一段階である菌体内への吸収とその菌体内での変換を調べた。

レボグルコサン資化性酵母菌株は、*de novo* 合成で誘導される代謝または吸収系によってその資化能を獲得し、この中には糸状菌と同様にレボグルコサン資化能がグルコース資化能と同等に高いものが存在した。し

かし、レボグルコサンの資化能は glucono- δ -lactone の存在にほとんど影響を受けず、その代謝の初期に通常の β -グルコシダーゼが関与していないことが示された。これらの菌体のレボグルコサン消費におよぼす代謝阻害剤の影響ならびに菌体中での代謝中間体への変換を調べたところ、これらはグルコース代謝の場合とまったく同様であり、また、ATP が重要な働きをしていることが示された。これらの結果より、レボグルコサンは、通常 β -グルコシダーゼが関与しないにもかかわらず、その代謝の極初期段階に通常の糖代謝系に導入されると考えられ、レボグルコサンキナーゼが *in vivo* においてもレボグルコサン代謝に大きく寄与していることが示された。

文 献

- 1) Pictet, A., Sarasin, J.: *Helv. Chim. Acta.*, **1**, 87-96 (1918).
- 2) Shafizadeh, F., Furneaux, R. H., Cochran, T. G., Scholl, J. P., Sakai, Y.: *J. Appl. Polym. Sci.*, **23**, 3525-3539 (1979).
- 3) 三浦正勝, 加我晴生, 西崎寛樹: 木材学会誌, **29**, 756-762 (1983).
- 4) Nakagawa, M., Sakai, Y., Yasui, T.: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 201-205 (1984).
- 5) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 6) Kitamura, Y., Abe, Y., Yasui, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 515-521 (1991).
- 7) Kitamura, Y., Yasui, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 522-529 (1991).
- 8) Coleman, G. H.: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, (Whistler, R. L., Wolfrom, M. L., BeMiller, J. M.), Vol. II, p. 397-399, Academic Press, New York (1963).
- 9) Sols, A., Gancedo, C., Delafuente, G.: *The Yeasts*, (Rose, A. H., Harrison, J. S.), Vol. 2, p. 271-307 (1971).