

Saccharomyces cerevisiae 由来グリセロール脱水素酵素の 精製と細菌由来酵素の基質特異性

趙 紅 梅**・白石 雄大*・田中 宏樹*・渡部 保夫*

Hong mei ZHAO**, Yudai SHIRAIISHI*, Hiroki TANAKA* and Yasuo WATANABE*:
Purification of Glycerol Dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae*
and the Substrate Specificity of Bacterial Enzymes

Abstract

We have obtained the dehydrogenases being specific for mannitol and arabitol with the gene cloning and over-expression in yeast cells, in order to measure the content of various sugar alcohols by using the dehydrogenases. In this study, we carried out the isolations of glycerol dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae* and determined its substrate specificities. Target proteins were purified by affinity chromatography with the addition of 'tag' at N-terminus or C-terminus by gene recombination. The obtained enzymes showed the low specificity for sugar alcohols. However, we found the bacterial enzymes that showed the high specificity for glycerol in commercial products. These glycerol dehydrogenases could be available in the enzymatic analysis of glycerol content.

キーワード：グリセロール脱水素酵素，基質特異性，酵素定量法

はじめに

糖アルコールとは、アルドース又はケトースを還元して得られるポリヒドロキシアルカン (polyhydroxy-alkane) をいう。三価アルコールとして、グリセロール、四価アルコールとして、エリスリトール、五価アルコールとして D-アラビトール、キシリトール、D-リビトール、六価アルコールとしてガラクトール、D-ソルビトール、D-マンニトール、七価アルコールとして β -セドヘプチトールがある。グリセロールは脂質として、また耐塩性酵母の浸透圧ストレスに対する細胞内浸透圧調節剤として広く自然界に存在し (Onishi, 1963; van Zyl and Prior, 1990)、エリスリトールは海藻、地衣類、菌類に、D-アラビトールはマッシュルーム、地衣類に、D-ソルビトールはリンゴ、桃、杏、海藻に、D-マンニトールは海藻、菌類、キノコ類、タマネギ、人参などに含まれている。糖アルコールは、低カロリー、難消化性、非う蝕性などの機能に加え、血糖値の急激な上昇を引き起こさない機能性がある。なお、う蝕とは口腔内の細菌が糖質から作った酸によって歯が脱灰化されることである。別に、

食品に含まれる場合の加工特性として、耐熱性、耐酸、耐アルカリなどが上げられる。

特定保健用食品として機能性成分をその効能を表示して販売することが日本の消費者庁により許可されている。虫歯の原因とならない甘味料として、キシリトールやエリスリトールを食品添加物として加えたチューインガムが販売されている (<http://www.caa.go.jp/foods/index4.html>)。

耐塩性酵母では、糖アルコールは、単糖類の代謝産物として広く見いだされるが、耐塩性酵母ではポリオールデヒドロゲナーゼ (糖アルコールの種類に対してブロードな基質特異性を示す) の働きによって、細胞内に合成・蓄積され、浸透圧変化に応答する適合溶質として機能することが知られている (Onishi, 1963; van Zyl and Prior, 1990)。

これまでの研究では我々の研究室では、日本独特の調味料である味噌や醤油の製造に用いられる耐塩性酵母の浸透圧調節機構について研究してきた (Onishi, 1963; Iwaki et al., 2001; Watanabe et al., 2004; Watanabe et al., 2008)。即ち、*Zygosaccharomyces rouxii* のグリセロール合成系の制御が、これまでに詳細に研究されてきた出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のそれと非常に類似していることを明らかにした (Iwaki et al., 2001)。特に、*Z. rouxii* ではグリセロールの再吸収系が重要であることも示されてきた (van Zyl et

2011年3月25日受領

2011年7月22日受理

*愛媛大学農学部生化学教育分野

**長江大学動物科学学院，中国湖北

al., 1990; Tang et al., 2005). 耐塩性酵母では, グリセロール以外の糖アルコールも合成蓄積されていることが例証された (de Figueroa and Lucca, 2001). 以上, 一般に酵母においては各種糖アルコールを合成する能力が高いので, いろいろな糖アルコールを基質とする脱水素酵素の遺伝子資源として適していると考えられた.

これまで当研究室で行ってきた研究から, マンニトールについては, 酵母 *S. cerevisiae* 由来のオープンリーディングフレーム (ORF) 名 *YEL070w* のマンニトールデヒドロゲナーゼの遺伝子の産物があり (Watanabe et al., 2006; 渡部保夫ら, 2008), ソルビトールについては, キッコーマン社製の大腸菌由来のソルビトールデヒドロゲナーゼがあり (Minamihara and Suzuki, 1997), アラビトールについては, *Kluyveromyces lactis* 由来のアラビトールデヒドロゲナーゼが, D-アラビトールに高い基質特異性を持っていることが分かった (未発表).

以上, 現在, 3種の糖アルコールに対して基質特異性の高い糖アルコール脱水素酵素を特定できたので, 次に, 食品に多く含まれるグリセロールに高い基質特異性をもつ脱水素酵素の選別を計画した. 上述の通り, 酵母では糖アルコール生産性が高いことから, 出芽酵母からグリセロール脱水素酵素を取得することを試みた. *S. cerevisiae* の全ゲノム配列はすでに決定されており (Dujon et al., 2004), さらに, すべての遺伝子が発現ベクターにクローニングされている (Gelperin et al., 2009). *S. cerevisiae* のデータベースよりグリセロール脱水素酵素の遺伝子として, *GCY1* と *YPR1* が報告されており (<http://www.yeastgenome.org/>), オープンバイオシステム社からこれらの遺伝子を発現ベクターに組み込んだ酵母クローンも市販されていた. そこで, これらの酵母クローンからグリセロール脱水素酵素を精製するとともに, 基質特異性を調べることにした.

タンパク質の精製法の一つにアフィニティークロマトグラフィーがある. 本実験では遺伝子組換えによりタンパク質の N 末端あるいは C 末端にいろいろなタグをつけ, それと相互作用を示す化学物質を固定化した樹脂を充填したカラムにロードすることで粗抽出液からの一段階でのタンパク質の精製を行った.

材料及び方法

1. 酵母株

S. cerevisiae *GCY1* 及び *YPR1* の ORF を発現ベクター BG1805 (His タグ) 及び pEGH (グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグ) に挿入した組換えプラスミ

ドを持つ酵母 ORF コレクションをオープンバイオシステム社から購入した.

2. 使用培地

使用した培地の組成は次の通りである. S パウダー・マイナス・ウラシル (S-Powder(-)ura) は, アミノ酸及び硫酸アンモニウム不含酵母ニトロゲンベース (Difco 製) 25.1g, 硫酸アンモニウム 75.4g, Ile 0.45g, Val 2.25g, Ade 0.3g, Arg 0.3g, His 0.3g, Leu 0.45g, Lys 0.45g, Met 0.3g, Phe 0.75g, Trp 0.3g, Tyr 0.45g を混合することで調製し, 次の培地試薬とした. 2%ラフィノースを含む SC マイナス ura 培地 (SC(-)ura 培地) は, 500ml 中に S-Powder(-)ura 3.75g, ラフィノース 10g を加えて調製した. 1%ガラクトース及び 1%ラフィノースを含む SC(-)ura 培地は, 500ml 中に S-Powder(-)ura 3.75g, ガラクトース 5g, ラフィノース 5g を加えて調製した. 6%ガラクトースを含む 3×YP 培地は 500ml 中に酵母エキス (Difco 製) 15g, ペプトン (Becton Dickinson 製) 30g, ガラクトース 30g を加えて調製した.

3. 酵母株の培養方法

2%グルコースを含む SC(-)ura 寒天培地に, グリセロール脱水素酵素の遺伝子 *GCY1* や *YPR1* を発現ベクターに組み込んだプラスミドを持つ酵母細胞を広げ 30°C 3日間培養し, 酵母保存プレートとした. 培養は次の 2つの方法で行った.

- ① 保存プレート上のコロニーを, 2%ラフィノースを含む SC(-)ura 培地 3ml に植菌し, 30°C 3日間培養し, 前培養液とした. 前培養液 1ml を 2%ラフィノースを含む SC(-)ura 培地 100ml に移植し, 30°C で本培養した. 対数増殖期後期の所定の濁度 (OD600nm) で遺伝子発現を誘導するために 6%ガラクトースを含む 3×YP 培地を 50ml 加えた後, 24時間振とう培養した.
- ② 保存プレート上のコロニーを, 1%ガラクトース及び 1%ラフィノースを含む SC(-)ura 培地 3ml で 30°C 3日間前培養した. 前培養液 1ml を同培地 100ml に移植し, 30°C で濁度 (OD600nm) が 2 になるまで振とう培養した.

4. 酵母破碎液の調製

培養液を氷冷後遠心分離 (1500×g, 10分間 4°C) した. 上清を除去後, 純水で酵母細胞を洗浄し, 遠心分離 (1500×g, 10分間 4°C) により酵母細胞を回収した. 酵母細胞 (5ml) に対して 300mM KCl を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH8.2, 15ml) を加え懸濁し

た。ステンレス製セルに細胞懸濁液とガラスビーズ (15g) を入れ、冷却水を循環しながら Vibrogen-Zellumuhle を用いて10分間激しく振とうし、酵母細胞をガラスビーズで破碎した。遠心分離 (1500×g, 10分間 4℃) によりガラスビーズを除いた後、細胞破碎液を遠心分離 (10,000×g, 10分間 4℃) して上清を回収した。フィルター (ポアサイズ0.45μm) でろ過した後、Bio-Rad 製の液体クロマトグラフィーシステム Profinia のためのサンプルとした。

5. アフィニティークロマトグラフィー

1 ml 容の IMAC カートリッジカラム (Bio-Rad 製) あるいは 1 ml 容の GST カートリッジカラム (Bio-Rad 製) を装着した Profinia を用いてグリセロール脱水素酵素を精製した。操作手順は同装置取扱説明書に従った。緩衝液等は同装置純正の試薬を用いた。

6. ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) -ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

Profinia 溶出液 (10μl) に、純水 (30μl)、サンプルバッファー (ナカライテスク製, 40μl) を加え、95℃ の沸騰水で5分間加熱した。ゲル (Bio-Rad 製ミニプロテアン TGX, 4 から15%) にロード後、200V で約30分間電気泳動した。ゲルは ORIOLE 蛍光ゲルステイン (Bio-Rad 製) を用いて90分間染色し、紫外線照射で観察した。

7. ウエスタンブロット分析

SDS-PAGE 後のゲルからタンパク質をセミドライトランスファー装置 (バイオクラフト製) を用いて 200mA で約60分間電気泳動し PVDF 膜に転写した。一次抗体として抗 HA 抗体 (Open Biosystems 製) と Invitrogen 製 Western Breeze キットを用いて目的のシグナルを検出した。

8. グリセロール脱水素酵素活性測定

分光光度計の 4 ml 容石英セルに純水 (1.7ml), 500 mM 炭酸-重炭酸緩衝液 (pH10, 0.6ml), 1 M 硫酸アンモニウム (0.1ml), 1 M グリセロール (0.3ml), 補酵素として 10mM NAD⁺ (0.1ml) を入れた。酵素液 (0.1ml) を加えた後、レシオビーム分光光度計日立 U-1800 (日立製) を用いて 340nm の吸光度の増加を 20分間タイムスキャンした。基質特異性試験に用いた基質は図中に示したものをを用いた。

結果および考察

1. *S. cerevisiae* GCY1 及び YPR1 遺伝子発現酵母株の細胞破碎液のグリセロール脱水素酵素活性

グリセロールに対して特異性の高いグリセロール脱水素酵素を得る目的で、*S. cerevisiae* 由来の遺伝子の産物について検討することにした。*S. cerevisiae* の GCY1 及び YPR1 遺伝子はグリセロール脱水素酵素の遺伝子であると記載されているが (Costenoble et al., 2000), その酵素作用機作については未知であった。*S. cerevisiae* の全ゲノム配列は既に決定されており、さらにほとんどすべての ORF は発現ベクター (BG 1805) にクローニングされ、宿主酵母に組換えられている (Gelperin et al., 2009)。酵母発現ベクター BG 1805では遺伝子は GAL1 プロモーターの下流に配置されているので、培地へのガラクトースの添加により各遺伝子は発現誘導できる (Gelperin et al., 2009)。そこで、GCY1 酵母株と YPR1 酵母株の培養液にそれぞれガラクトースを添加して再度培養した細胞の破碎液を調製した。ここで、GCY1 がコードするタンパク質を GCY1 タンパク質と、YPR1 がコードするタンパク質を YPR1 タンパク質と呼ぶことにした。これらを粗酵素液としてグリセロール脱水素酵素活性を測定したところ活性を検出したので、その最適 pH を決定した (データは示さない)。最適 pH は 9.5 であり、これまで知られているいろいろな糖アルコール脱水素酵素と類似していた (Cheng et al., 2005; Hallborn et al., 1995; Lin, 1961; Link et al., 2005; Stein et al., 1997; Wong et al., 1993)。その条件でこの脱水素酵素の基質特異性を調べた (データは示さない)。これらの結果は GCY1 タンパク質及び YPR1 タンパク質が糖アルコールに対して基質特異性の低い、いわゆるポリオール脱水素酵素の性質を持っていることが示唆された。しかしながら、宿主とした酵母細胞には多様な脱水素酵素が相当量含まれていると考えられたので、GCY1 タンパク質及び YPR1 タンパク質の精製を計画した。

2. 6×His タグを用いて精製した GCY1 タンパク質及び YPR1 タンパク質のグリセロール脱水素酵素活性

発現ベクター BG1805は ORF の塩基配列に続いて、6×His, ヘマグルチニンペプチド (HA), Protein A (ZZ ドメイン) をコードする配列が結合され、タンパク質の C 末端にこれらのタグが付加できるように設計されている。この特性を利用して GCY1 タンパク質と YPR1 タンパク質を精製した。Bio-Rad

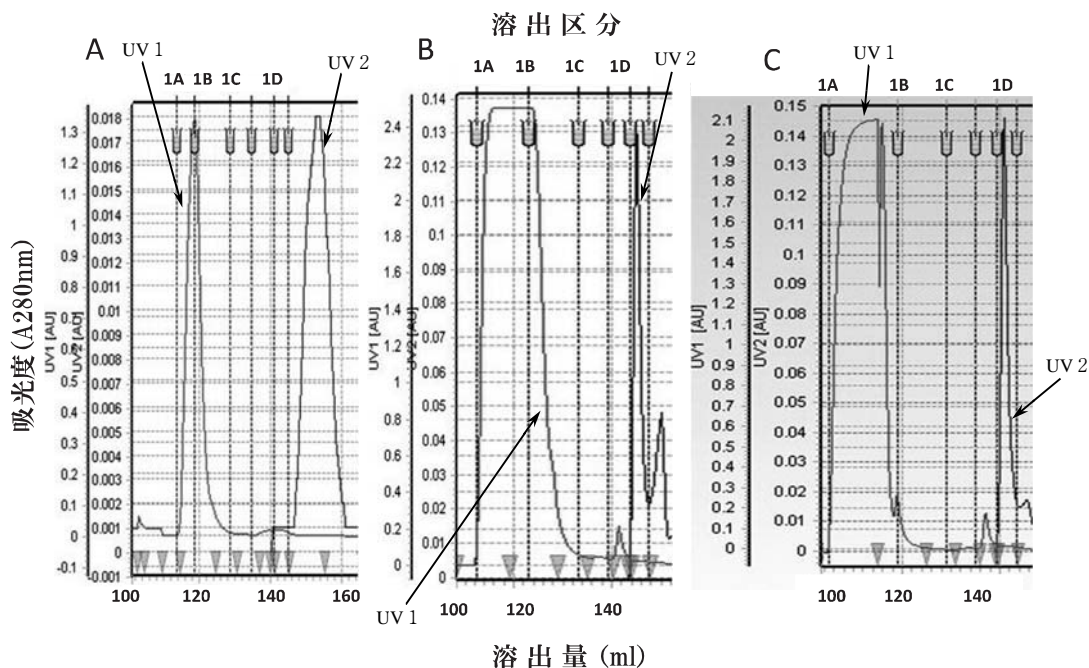


図1 His タグタンパク質の Ni 結合樹脂アフィニティークロマトグラフィー (Profinia)

A: 遺伝子非誘導酵母破砕液, B: *GCY1* 遺伝子発現酵母破砕液, C: *YPR1* 遺伝子発現酵母破砕液, 1A: カラム非吸着区分, 1B, 1C: カラム洗浄液, 1D: カラム吸着区分 (精製タンパク質), 薄い色の実線: UV 1 (280nm) Ni-カラム溶出パターン, 濃い色の実線 (140~160ml): UV 2 (280nm) 脱塩カラム溶出パターン

製 Profinia という金属固定アフィニティークロマトグラフ装置を用いて行った. IMAC カートリッジカラムからの溶出パターンは UV280nm でモニターした (図1). ここで, 溶出区分は 1A: 非吸着区分, 1B と 1C: 洗浄区分, 1D: 精製区分を示している. 図1-A に遺伝子を誘導していない (すなわち, 糖源としてラフィノースを用いた) 場合には 1D 区分にはほとんどタンパク質ピークがみられず, 遺伝子は誘導されていないことを確かめた. 図1-B に *GCY1* 遺伝子を発現し, *GCY1* タンパク質の精製を示しているが, 1D に明瞭なタンパク質ピークを認め, 遺伝子の発現誘導を確認した. 図1-C に *YPR1* 遺伝子の場合を示しているが, *GCY1* と同様にタンパク質を回収できた.

図2に *GCY1* タンパク質精製の各段階でのサンプルの SDS-PAGE による分析結果を示した. なお, *GCY1* がコードするタンパク質分子量35kDa と, 6×His などのタグに由来するもの19kDa で, 計54kDa と計算されるが, 1D 区分のサンプルはほぼ相当分子位置に明瞭のバンドを確認し, 精製が完了したことを確かめた.

上述の HA タグに対する抗体を用いて *GCY1* 及び *YPR1* タンパク質の精製各段階でウエスタンブロット分析を行った (図3). それぞれ 1D 区分の精製バン

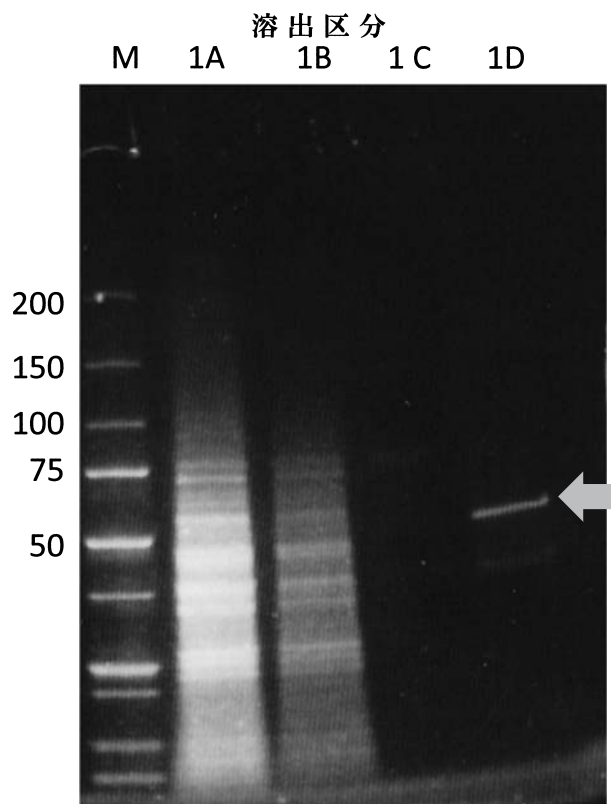


図2 *GCY1* 発現酵素の Profinia 溶出区分の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

M: マーカートンパク質, 1A, 1B, 1C, 1D: Profinia 溶出区分

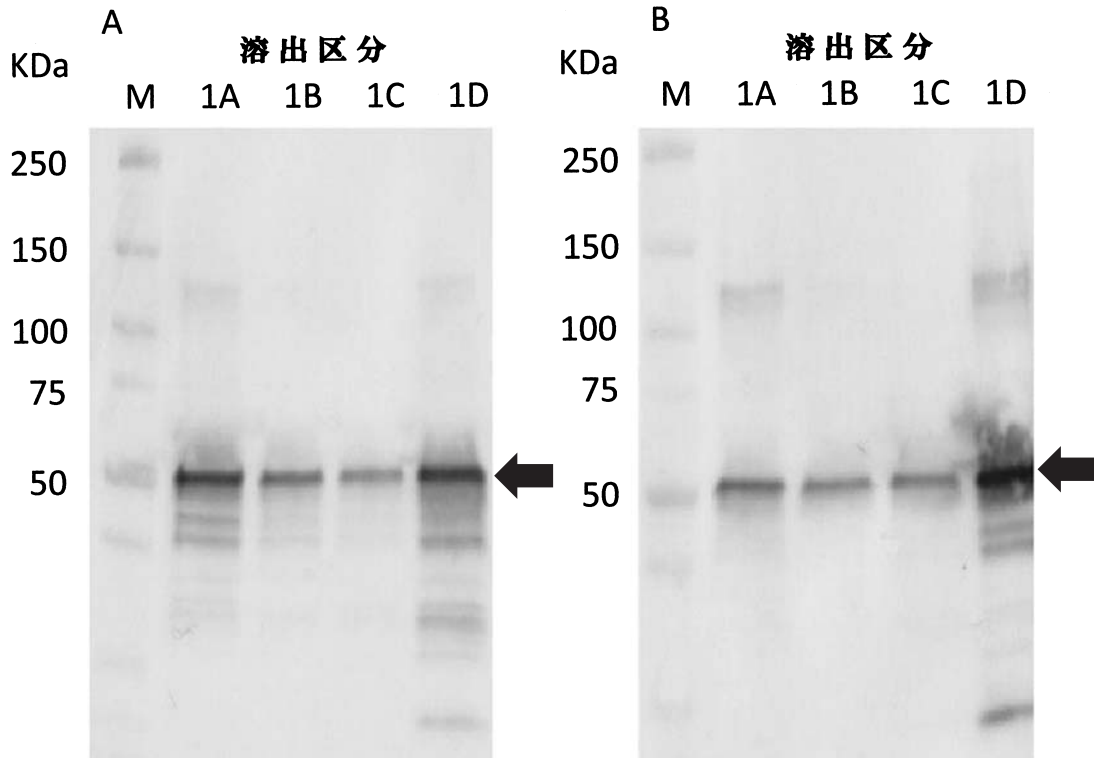


図3 *GCY1* 及び *YPR1* 発現酵素の Profinia 溶出区分のウエスタンブロット分析

A: *GCY1* 発現酵素, B: *YPR1* 発現酵素, M: マーカータンパク質, 1A, 1B, 1C, 1D: Profinia 溶出区分

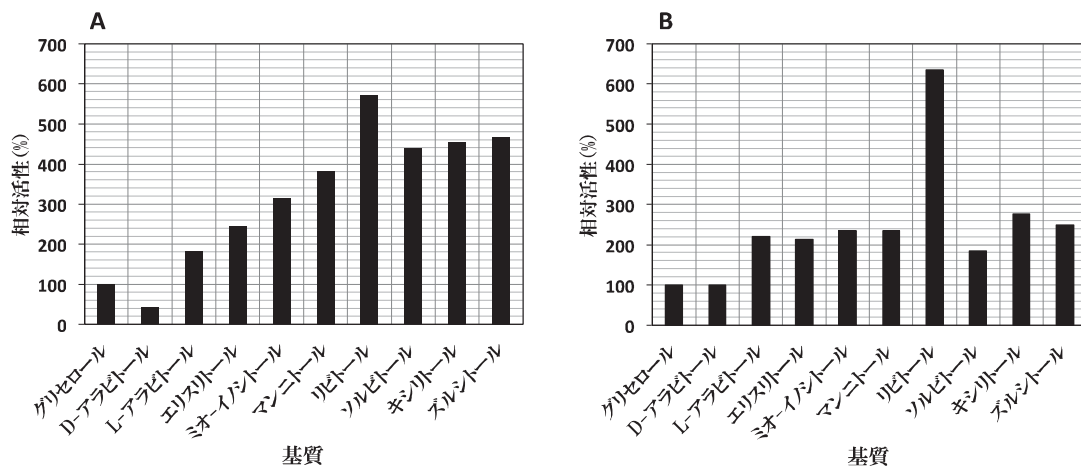


図4 精製した *GCY1* 及び *YPR1* 発現酵素の基質特異性

A: *GCY1* 発現酵素, B: *YPR1* 発現酵素 (グリセロールを基質としたときの活性を100%とした相対活性を示した)

ドに強い反応を確認した. 1D 区分以外の溶出区分にも同一分子量に強いシグナルを確認した. これは非吸着やカラム洗浄液に目的のタンパク質が存在することを示しており, 6×His タグ付き *GCY1* 及び *YPR1* タンパク質の Ni 固定化カラムへの吸着が弱いことを示している. 吸着条件を改善することで回収率の改善が

期待される.

6×His タグ付き *GCY1* 及び *YPR1* タンパク質が精製できたので, 得られた酵素について基質特異性を調べた (図4). 期待に反して, 試験した全ての糖アルコールを基質として反応することが分かった. これらの結果から, *GCY1* タンパク質はグリセロール脱水素

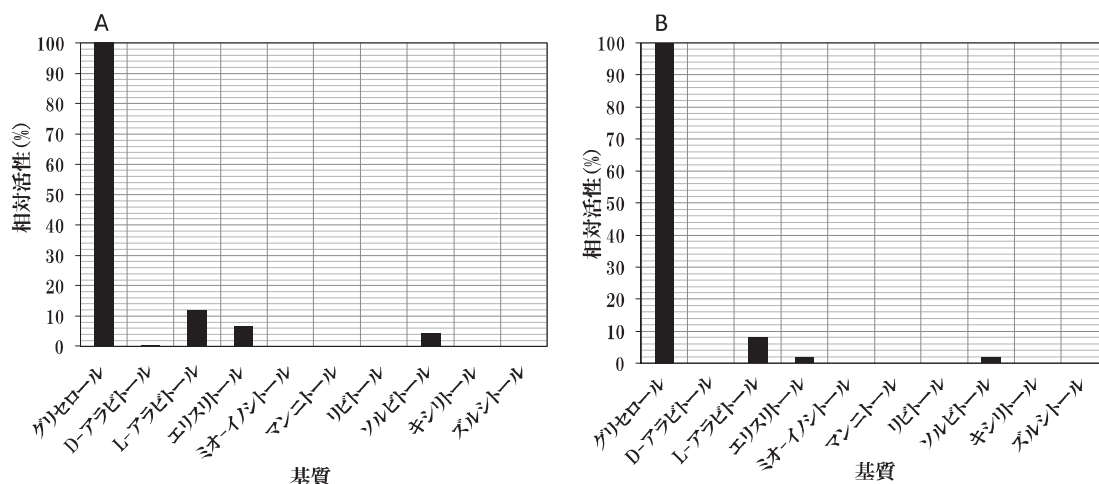


図5 *Cellulomonas* sp. 由来酵素 (G3512酵素) と *Enterobacter aerogenes* 由来酵素 (G4783酵素) の基質特異性

A: *Cellulomonas* sp. 由来酵素 (G3512), B: *Enterobacter aerogenes* 由来酵素 (G4783) (グリセロールを基質としたときの活性を100%とし, 相対活性を示した)

酵素活性を示すが, 基質特異性は低いと結論した. YPR1 タンパク質については別の遺伝子発現系を用いてさらに検討を行った.

3. GST タグを用いて精製した YPR1 タンパク質のグリセロール脱水素酵素活性

酵母発現ベクター pEGH ベクターは ORF がコードするタンパク質の N 末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と 6×His タグが付加されるように設計されている. この YPR1 遺伝子発現系について GST とグルタチオンとの相互作用を利用したアフィニティークロマトグラフィーを行った. GST-YPR1 タンパク質を含む酵母破碎液をグルタチオンカートリッジカラムにロードし, 緩衝液で十分に洗浄後, グルタチオンを添加して目的のタンパク質を用出した (データは示さない). 得られた GST-YPR1 タンパク質の基質特異性を調べたが (データは示さない), グリセロールに対してだけ特異性を示す酵素ではなく, ポリオールデヒドロゲナーゼの特徴を持っていることが分かった.

4. 市販グリセロール脱水素酵素の基質特異性

本実験の目的はグリセロールに特異的に反応する脱水素酵素を取得することであるので, シグマ試薬のグリセロール脱水素酵素について基質特異性を調べた (図5). 図5-A に *Cellulomonas* sp. 由来の酵素 (シグマ試薬 G3512), 図5-B に *Enterobacter aerogenes* 由来の酵素 (シグマ試薬 G4783) の基質特異性の結果を示したが, とともにグリセロールに対して特異性が高

いことを確認した (Oliveira et al., 2006; Dominguez et al., 2010).

本実験の目標は多種類の糖アルコールを酵素法により一括して定量するキットを作製するためにグリセロールに対して基質特異性の高い脱水素酵素を得ることであったので, シグマ試薬の酵素を利用することでグリセロールの簡易定量法が構築できると推察された.

摘 要

多種類の糖アルコールを一括して脱水素酵素を用いて定量するために, マンニトールとアラビトールについて, *Saccharomyces cerevisiae* と *Kluyvermyces lactis* からそれぞれ遺伝子クローニング及びタンパク質の多量発現により目的の酵素の単離精製を行った. 本実験では *S. cerevisiae* からグリセロール脱水素酵素の精製と基質特異性の決定を行った. 遺伝子組換えによりタンパク質の N-末端あるいは C-末端にタグを付加した後, アフィニティークロマトグラフィーにより精製したタンパク質は期待に反して基質特異性に低い酵素であった. しかしながら, 市販酵素にグリセロール含量の酵素的定量に利用できる基質特異性の高いグリセロール脱水素酵素を発見できた.

引用文献

- Cheng H, Jiang N, Shen A, and Feng Y (2005) Molecular cloning and functional expression of D-arabitol dehydrogenase gene from *Gluconobacter oxydans* in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 252 : 35-42.
- Costenoble R, Valadi H, Gustafsson L, Niklasson C, and Franzen CJ (2000) Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 16 : 1483-1495.

- de Figueroa LIC and Lucca ME (2001) Production of polyols by osmotolerant yeasts. *Food Microbiol. Protocols* 14 : 233–241.
- Dominguez KBH, Toth IV, et al. (2010) Sequential injection kinetic flow assay for monitoring glycerol in a sugar fermentation process by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 : 1664–1673.
- Dujon B et al. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430 (6995) : 35–44.
- Gelperin DM, White MA, et al. (2009) Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection. *Genes Developm.* 19 : 2816–2826.
- Hallborn J, Walfridsson M, Penttila M, Keranen S, and Hahn-Hagerdal B (1995) A Short-chain dehydrogenase gene from *Pichia stipites* having D-arabitoldehydrogenase activity. *Yeast* 11 : 839–847.
- Iwaki T, Kurono S, Yokose Y, Kubota K, Tamai Y, and Watanabe Y (2001) Cloning of glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene (*ZrGPD1* and *ZrGPD2*) and glycerol dehydrogenase genes (*ZrGCY1* and *ZrGCY2*) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast* 18 : 737–744.
- Lin ECC (1961) An inducible D-arabitol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.* 236 : 31–36.
- Link T, Lohaus G, Heiser I, Mendgen K, Hahn M, and Voegelé RT (2005) Characterization of a novel NADP(+)-dependent D-arabitol dehydrogenase from the plant pathogen *Uromyces fabae*. *Biochem. J.* 389 : 289–295.
- Minamihara T and Suzuki M (1997) Properties of sorbitol dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. KS-E1806 and comparison with other sorbitol dehydrogenases. *J. Ferment. Bioeng.* 84 : 254–256.
- Oliveira HM, Segundo MA, et al. (2006) Kinetic enzymatic determination of glycerol in wine and beer using a sequential injection system with spectrophotometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 54 : 4136–4140.
- Onishi H (1963) Osmophilic yeast. *Adv. Food Res.* 12 : 53–93.
- Stein R, Gross W, and Schnarrenberger C (1997) Characterization of a xylitol dehydrogenase and a D-arabitol dehydrogenase from the thermo- and acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Planta* 202 : 487–493.
- Tang XM, Kayingo G, and Prior BA (2005) Functional analysis of the *Zygosaccharomyces rouxii* Fps1p homologue. *Yeast* 22 : 571–81.
- van Zyl PJ and Prior BA (1990) Water relations of polyol accumulation by *Zygosaccharomyces rouxii* in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33 : 12–17.
- van Zyl PJ, Kilian SG, and Prior PA (1990) The role of an active transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34 : 231–235.
- Watanabe Y, Nagayama K, and Tamai Y (2008) Expression of glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*CvGPD1*) in salt-tolerant yeast *Candida versatilis* in stimulated by high concentrations of NaCl. *Yeast* 25 : 107–116.
- Watanabe Y, Takechi Y, Nagayama K, and Tamai Y (2006) Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* mannitol dehydrogenase gene (*YEL070w*) in glycerol synthesis-deficient *S. cerevisiae* mutant. *Enzyme Microbiol. Technol.* 39 : 654–659.
- Watanabe Y, Tsuchimoto S, and Tamai Y (2004) Heterologous expression of *Zygosaccharomyces rouxii* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*ZrGPD1*) and glycerol dehydrogenase gene (*ZrGCY1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 4 : 505–516.
- Wong B, Murray JS, Castellanos M, and Croen KD (1993) D-arabitol metabolism in *Candida albicans*: Studies of the biosynthetic pathway and the gene that encodes NAD⁺-dependent D-arabitol dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 175 : 6314–6320.
- 渡部保夫, 武智由紀, 金澤寛子, 森田安佳里, 山田寿, 玉井洋一 (2008) 酵母由来のマニトール脱水素酵素の特徴とマニトールの酵素法分析への応用. *Food Function* 4 : 1–6.