

新 制
工
957
京大附図

# 酵母の温度適応：その生化学的機構

山村みどり

1993



# 酵母の温度適応：その生化学的機構

山村みどり

1993





# 目 次

緒論 .....	1
第 1 部 酵母の増殖に及ぼす温度の影響 .....	11
第 1 章 天然培地における種々の酵母の高温増殖 .....	13
第 2 章 合成培地における高温増殖 .....	21
1. <i>Saccharomyces</i> 酵母 .....	23
2. <i>Phaffia rhodozyma</i> .....	33
第 3 章 合成培地における <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の 低温増殖 .....	36

第2部 酵母の温度適応の機構.....	40
第1編 脂質代謝.....	45
第1章 <i>Saccharomyces</i> 酵母の高温適応.....	45
1. 脂質組成の変化.....	46
2. アセチルCoA合成系の調節.....	62
第2章 <i>Saccharomyces</i> 酵母の低温適応.....	69
脂質組成の変化.....	70
第3章 <i>Phaffia rhodozyma</i> の高温適応.....	76
1. 脂質組成の変化.....	77
2. アスタキサンチン含量の変化.....	82
第2編 高温下の呼吸と発酵.....	86
第1章 呼吸活性低下と呼吸欠損変異の誘発.....	86
第2章 ミトコンドリアの脂質組成の変化.....	102
第3章 アルコール発酵の促進.....	106
第3編 高温下の細胞形態.....	110
第1章 出芽細胞の分裂抑制.....	110
第2章 膜を介するシグナル伝達の関与.....	117

第3部 高温下の膜の変化 .....	125
第1章 膜の流動性の上昇.....	125
第2章 膜系の崩壊.....	132
第3章 膜変化の応用.....	138
本論文の要約 .....	146
謝辞 .....	153
発表論文 .....	154



## 緒論

生物は地球上に出現して以来、多くの様々な環境の中であるものは絶滅し、あるものはそれらの環境に適応し進化して来た。比較的短期間で考えても生物が外的環境に対してどのように応答し適応して生命を維持し続けるのかということは、生命現象を研究する上で非常に興味ある課題である。本論文ではこのような短期間の環境の変化に対して、生物が特に細胞レベルでいかに応答し、適応できるかという点に焦点をあてて研究を行った。本論文においては、単細胞でありながら真核細胞であり、従って、真核細胞の機能を研究する上で好都合な酵母細胞を研究の材料として扱い、様々な“環境変化”を細胞に対する“ストレス”としてとらえ、細胞がそのストレスに対していかに応答するか、あるいはさらに、どのように適応して生命を維持するかを生化学的な面から研究した。様々なストレスの中でも生物にとって普遍的で身近な“温度”を取り上げ、主として高温に対する適応機構について研究を進めた。

温度、特に高温に対する応答はこれまで(1) 熱ショックタンパク質 (Heat shock protein : HSP) の合成、(2) トレハロースの蓄積、(3) 脂質組成の変化という現象でとらえられていて、それらは相互に関係して起こることが示唆されている。HSPは、細胞や個体が通常の温度より5~10°C程度高い温度変化を急激に受けたとき合成が誘発されるタンパク質の一群で、1974年にショウジョウバエの細胞で最初に報告された。その後、原核生物(バクテリア)からヒトを含む高等真核生物に至るまで広く生物界にその存在が認められ<sup>1-3)</sup>、熱ショックによる

HSPの合成は生物一般に共通して起こる現象として知られるようになった。しかし、HSPの合成は熱ショックに限らず低温<sup>4,5)</sup>、重金属(Hg<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>)<sup>6-8)</sup>、電子伝達系の阻害剤<sup>19)</sup>、アミノ酸アナログ、SH試薬、エタノール<sup>10-12)</sup>、細胞の外傷<sup>13)</sup>等の様々なストレスによって普遍的に誘導されることがわかって来た。このため今日ではこれら一連のHSPはストレスタンパク質ともよばれている。

一般的な熱ショック応答、HSPについてのすぐれた総説<sup>14,15)</sup>もあるが、*Saccharomyces cerevisiae*における熱ショックとHSPの関係についても多くの報告がある<sup>16-23)</sup>。その中でHSP合成に伴って耐熱性やエタノール耐性が獲得されることが知られているが、これらの耐性獲得にはshort termには必ずしもHSPの合成が必要でないという報告<sup>18-20)</sup>が多い。しかし、HSP 104は熱耐性誘導に必要であるという報告<sup>22,23)</sup>もあり、熱ショック応答におけるHSP合成の機能的な意義については明確ではない。

さらに、トレハロースについては、グリコーゲンと同様に貯蔵糖としての意義も指摘されているが、種々のストレスに対する役割が強調されてきた<sup>36)</sup>。熱ショックとトレハロース蓄積との関係についての報告も多い<sup>24-29,35)</sup>。特に、Wiemkenらによって*S. cerevisiae*<sup>24-27,29)</sup>と*Schizosaccharomyces pombe*<sup>28)</sup>について詳しく研究されている。これらの酵母では、熱ショックによってトレハロースが蓄積し熱や乾燥に対する耐性が生じるが、この時HSPの合成は必要でないことが示されている。また、トレハロースの蓄積は熱に限らず、浸透圧<sup>30)</sup>、栄養源の枯渇<sup>31-33)</sup>、エタノール<sup>34)</sup>、CuSO<sub>4</sub><sup>34)</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>34)</sup>等に対するストレス応答として、さらに、凍結乾燥菌体における細胞の脱水に対する保

護作用が報告されている<sup>31)</sup>。いずれにしても、種々のストレスから細胞を保護するためにトレハロースの蓄積が起こることは明らかである。

微生物が熱によって死滅する直接の原因の一つに、細胞膜の損傷が考えられる。細胞膜の損傷はこれを構成する脂質の変化、構造タンパク質の変化、あるいは膜中の物質の透過を調節する酵素の変性などの総合的な作用の結果と考えられるが、また、逆に、これらの適切な変化は、熱ストレスに対する細胞の応答・適応の結果と見ることができるとの考えのもとに研究を行った。

生体膜は脂質の二重層からできているということは、古く1925年に GorterとGrendelによって発見された<sup>37)</sup>。その後、研究が積み重ねられ、タンパク質がその構成物質として加えられた。そして、1972年に SingerとNicolsonによって、膜の流動モザイクモデル説が提唱された<sup>38)</sup>。Fig. 1 に示すように、脂質二重層は脂質分子とタンパク質分子が不均一(モザイク状)に分布し、しかもこれらの分子は膜内で移動する(流動的)ことができる。脂質分子の主なものは、リン脂質、ステロール、糖脂質である。これらのうち、リン脂質はFig. 2 に示すように親水性の部分と疎水性の炭化水素鎖からなり、この炭化水素鎖の長さや飽和度が膜の流動性に最も大きな影響を与えられているが、条件によっては親水基の寄与も無視できない。また、ステロールも膜の流動性を決定する重要な要因であり<sup>39,40)</sup>、Fig. 3 に示すようにリン脂質分子の間であって膜の流動性を調整するように働くとされている。

熱ショックストレス応答としてのHSPの合成、トレハロースの蓄積は本論文のテーマである“高温適応”において当然起こり得る現象で

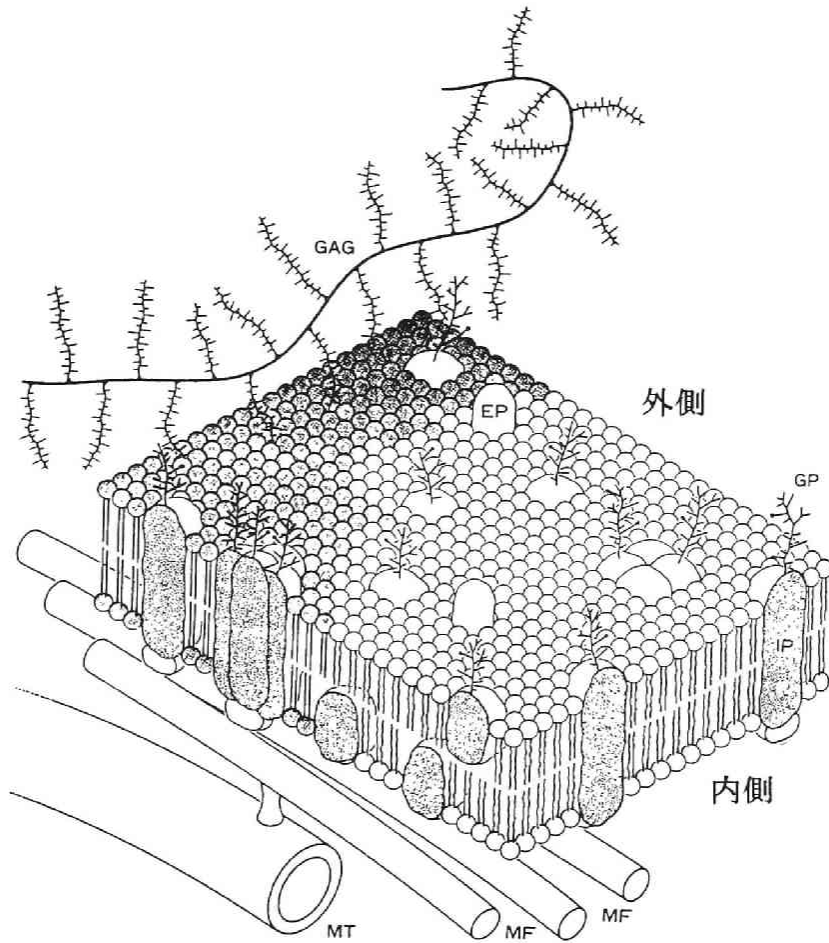


Fig. 1. Singer, Nicolson の流動モザイクモデル.

GAG:グリコサミノグリカン, GP: 糖タンパク,

EP: 表在タンパク, IP: 内在タンパク,

MF:マイクロフィラメント, MT: 微小管

(コーンスタンプ・生化学: 第5版, 1988, 東京化学同人)



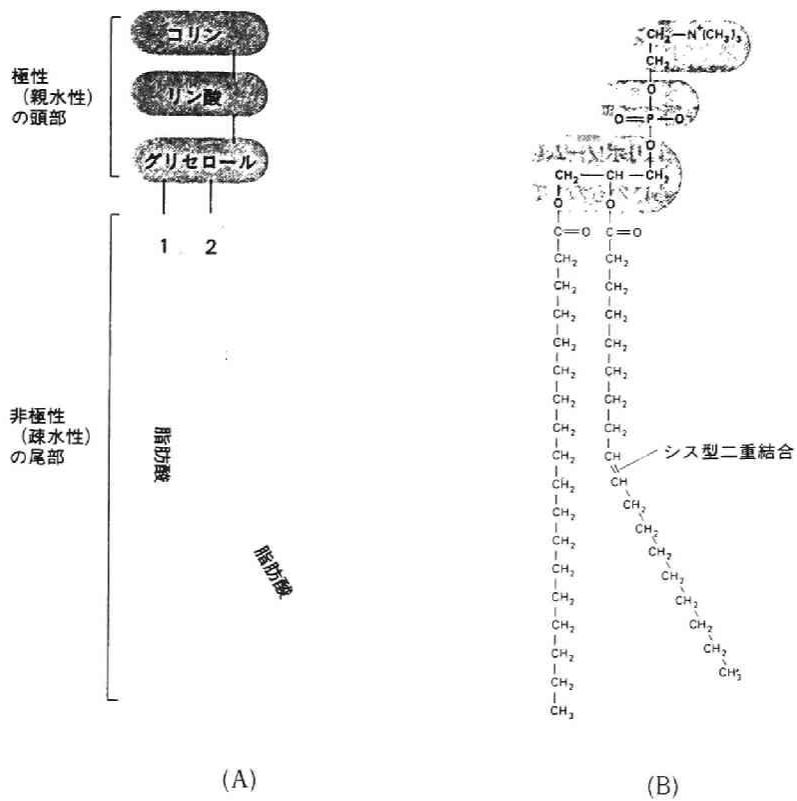


Fig. 2. リン脂質の構造

(A) ホスファチジルコリン分子の模式図

(B) ホスファチジルコリン分子の化学構造

(細胞の分子生物学: 第2版, 訳書, 1990, 教育出版社)

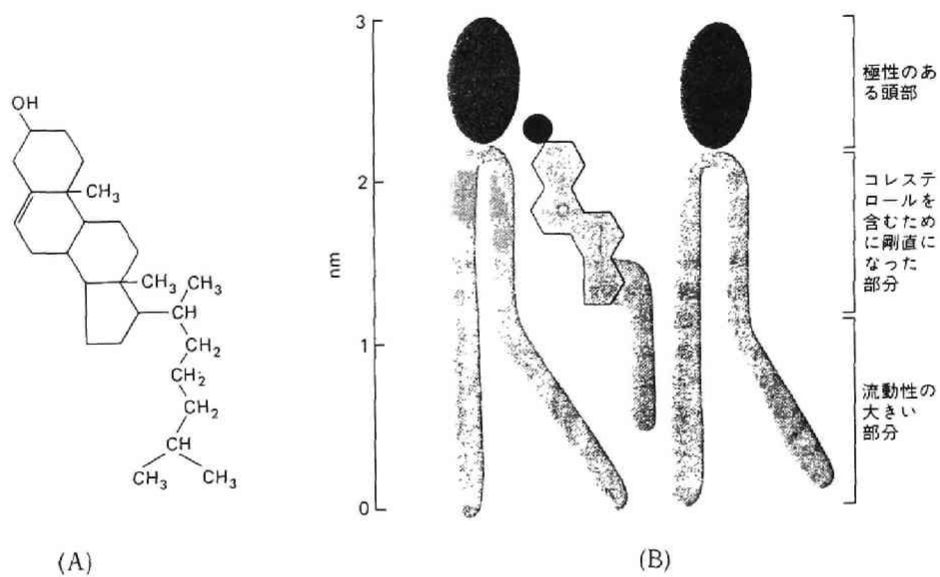


Fig. 3. コレステロールの構造

(A) コレステロールの化学構造式

(B) 単分子膜中のコレステロールとリン脂質分子の様子

(細胞の分子生物学: 第2版, 訳書, 1990, 教育出版社)

あり、それら、特にHSPに関しては非常に研究が多いが、本研究ではより直接的な温度と脂質との関係から、細胞の増殖と膜の流動性とのかかわりについて研究した。さらに、膜と密接な関係にある呼吸活性が温度によってどのように影響されるかを調べ、また、呼吸と相互調節の関係にある発酵についても同様の検討を加えた。一方、我々の研究グループでは膜の流動性と膜を介するシグナル伝達、さらに形態変化との関係が研究されていて、種々のストレスが流動性の変化を介してシグナル伝達の亢進をもたらし、形態変化を引き起こすことが明らかにされつつあるので、温度によるシグナル伝達を介する細胞の形態変化を新しい形のストレス応答として取り上げ研究を行った。

## 文献

1. Ashburner, M. and Bonner, J. (1979) *Cell* 17, 241-254.
2. "Heat shock: from bacteria to man" ed. Schlesinger, M. J., Ashburner, M. and Tissierres, A. 1982, Cold Springer Harbor, N.Y.
3. Tanguay, R. M. (1983) *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 61, 387-394.
4. Ketola-Pirie, C. A. and Atkinson, B. G. (1983) *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 61, 462-471.
5. Fink, K. and Zeuthen, E. (1980) *Expl. Cell Res.* 128, 23-30.
6. Levinson, W., Opperman, H. and Jackson, J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 606, 170-180.

7. Atkinson, B. G. Cunningham, R., Dean, R. L. and Somerville, M. (1983) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 404-413.
8. Hekkila, J. J., Schultz, G. A. Iatrou, K. and Gedamu, L. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 12000-12005.
9. Johnson, D., Opperman, H., Jackson, J. and Gedamu, L. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 6975-6980.
10. Landry, J. and Chretien, P. (1983) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 428-437.
11. Li, G. (1983) *J. Cell Physiol.* **115**, 116-122.
12. Plesset, J., Palm, C. and McLaughlin, C. S. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 1340-1345.
13. White, P.F. and Currie, W. R. (1982) "Heat shock : from bacteria to man", ed. by Schlesinger, L. M. et al., Cold Spring Harbor, N.Y., 1982, pp.379-386,
14. Lindquist, Susan (1986) *Ann. Rev. Biochem.* **55**,1151-1191.
15. Schlesinger, M. J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 12111-12114.
16. McAlister, L. and Finkelstein, D. B. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**, 819-824.
17. Miller, M. J., Xuong, N-H. and Geiduschek, E. P. (1982) *J. Bact.* **151**, 311-327.
18. Hall, G B.. (1983) *J. Bact.* **156**, 1363-1365.
19. Watson, K., Dunlop, G. and Cavicchioli, R. (1984) *FEBS Lett.* **172**, 299-302.
20. Barnes, A. C., Johnston, C. G. and Singer, A. R. (1990) *J.*

- Bact. 172, 4352-4358.
21. Virgilio, C. D., Peper, P. Boller, T. and Wiemken, A. (1991) FEBS Lett., 288, 86-90
  22. Sanchez, Y. and Lindquist, S. L. (1990) Science 248, 1112-1115.
  23. Yost, J. H. and Lindquist, S. (1991) Mol. Cell. Biol. 11, 1062-1068.
  24. Keller, F., Schellenberg, M. and Wiemken, A (1982) Arch. Microbiol. 131, 298-301.
  25. Hottiger, T., Schmutz, P. and Wiemken, A (1987) J. Bacteriol. 169, 5518-5522.
  26. Hottiger, T., Boller, T. and Wiemken A. (1987) FEBS Lett. 220, 113-115.
  27. Hottiger, T., Boller, T. and Wiemken A. (1989) FEBS Lett. 225, 431-434.
  28. De Vigilio, C., Simmen, U., Hottiger, T., Boller, T. and Wiemken A. (1990) FEBS Lett. 273, 107-110.
  29. De Vergilio, C., Burckert, N., Boller, T. and Wiemken A. (1991) FEBS Lett. 291, 355-358.
  30. Mackenzie, K. F. Singh, K. K. and Brown, A. D. (1988) J. Gen. Microbiol. 134, 1661-1666.
  31. Gadd, G. M., Chalmers, K. and Reed, R. H. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 48, 249-254.
  32. Inoue, H. and Shimoda, C. (1981) Mol. Gen. Genet. 183, 32-36.

33. Pnek, A. D. and Mattoon, J. R. (1977) *Archi. Biochem. Biophys.* **183**, 306-316.
34. Attfield, V. P (1987) *FEBS Lett.* **225**, 259-263.
35. Neves, J. M., Jorge, A. J., Francois, M. J. and Terenzi, F. H. (1991) *FEBS Lett.* **283**, 19-22.
36. Van Laere, A. (1989) *FEMS Microb. Rev.* **63**, 201-210.
37. Gorter, E. and Grender, F. (1925) *J. Exp. Med.* **41**, 439-443.
38. Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) *Science* **175**, 720-731.
39. Oldfield, E. and Chapman, D. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 610-616.
40. Demal, R. A. and de Kruyff, B. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **457**, 109-132.

## 第1部 酵母の増殖に及ぼす温度の影響

一般に酵母やかび類のような真核微生物は、原核生物の細菌類に比べて、比較的低い温度で生育するが、酵母においてもその生育温度によっていわゆる低温酵母、中温酵母、耐熱性酵母、高温酵母に分けられ、それぞれの生育温度の上限は、30°C、35°C、42°C、45°C<sup>1)</sup>とされている。

この第1部では、主として中温酵母を高温で増殖させることを目的として研究を進め、さらに温度と増殖との関係の普遍性を知るために、低温での増殖についても検討を加えた。

*S. cerevisiae* の35°C以上の高温培養については、過去にいくつか報告されているが<sup>2,4)</sup> いずれもその培養条件、特に菌体の接種量についての記載が不明確であり、かなり高い接種量を用いられたようである。唯一、Sherman(1959年)<sup>5)</sup> は天然培地を用いて $10^5$  cells/ml の接種量で高温(40°C)における本酵母の増殖に関して詳細に報告している。また、その後 Van Udenら<sup>6,7)</sup> によって、温度と増殖の速度論の関係について詳しく報告されている。本研究では、まず、種々の天然培地における中温酵母の高温増殖について調べ(第1章)、次に合成培地を用い、中温酵母のなかでも*S. cerevisiae*と、比較的低温を好む *Ph. rhodozyma* について通常の培養条件では増殖できない高温下での増殖を可能とする条件を検討した結果を述べる(第2章)。さらに*S. cerevisiae* の合成培地における低温増殖についても検討を加えた(第3章)。

*S. cerevisiae* は我々の日常生活に身近な酵母であり、その酵母をより高温で増殖させることができれば高温ストレスに対する応答、適応

の最も基本的な表れである菌の増殖機構の研究に役立つばかりでなく、応用面では、培養に伴う発酵熱による温度の上昇を防ぐに必要な冷却水を大幅に節約することができるし、また熱帯地方ではその地の常温でのエタノールの発酵生産が可能となるであろう。さらに、この酵母は酵母エキスとして菌の培養または医薬用として広く利用されており、工業的製品の材料としての利用価値も大きい。本論文では、応用的研究としては第3部第3章で高温培養と自己消化との関係についてまとめているが、それに先立ち第1部では、通常用いられている工業用培地で高温培養が可能かどうかを調べた結果を述べる。さらに、*Ph. rhodozyma* についても基礎的研究として *S. cerevisiae* と同様のことを目的として研究を行った。また、この酵母はアスタキサンチンという赤色色素を作ること知られており<sup>8)</sup>、その色素は天然着色料や塗料として近年多方面に利用されている<sup>9)</sup>。この酵母の特色は比較的低温を好み、通常は15~23°Cが最適培養温度で、27°Cが上限培養温度とされている。このように培養温度が低いことは、温度管理の必要性を意味しており、従って、中温又はそれに近い温度で増殖を可能にすることは工業的生産面から価値あることである。

また、高温増殖を可能にするために高温に適した変異株、すなわち耐熱性株を取得することは当然考えられる手段であるが、すぐれた株を取得するには幾多の困難を伴う。その点高温培養の条件を確立する方がより簡便で実際的な方法であると思われる。

## 文献

1. Arther, H. and Watson, K. (1976) J. Bacteriol. 128, 56-68.



2. Yčas, M. (1956) *Exp. Cell Res.* **10**, 746.
3. Starr, P. R. and Parks, L.W. (1962) *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 107-110.
4. Chang, S. B. (1972) *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **46**, 1529-1535.
5. Sherman, F. (1959) *J. Cell Comp. Physiol.* **54**, 29-35.
6. Sinoes-Mendes, B., Madeira-Lopes, A. and Van Uden, N. (1978) *Z. Allg. Microbiol.* **18**, 275-279.
7. Cabeca-Silva, Madeira-Lopes, A. and Van Uden, N. (1982) *FEMS Microbiol. Lett.* **15**, 149-151.
8. Jhonson, E. A. and Lewis, M. J. (1979) *J. Gen. Microbiol.* **115**, 173-183.
9. Jhonson, E. A. Villa, T. G. and Lewis, M. J. (1980) *Aquaculture* **20**, 123-134.

## 第1章 天然培地における種々の酵母の高温増殖

主として酵母エキス、ペプトンのような天然物を栄養源として酵母を生育させる場合、通常は酵母エキス1%、ペプトン1%、グルコース4%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1%という組成の天然培地が用いられる。この天然培地では30°Cで中温酵母はよく生育できる。しかし、培養温度を40°Cに上昇させるとほとんどすべての中温酵母の増殖は抑制される。このことを、まず種々の酵母を用いて確かめた<sup>1)</sup>。一方、高濃度(6%)の

酵母エキスを含む培地で培養すると、*S. cerevisiae* は40°Cでもよく生育できることが、Sherman によって1959年に報告されている<sup>2)</sup>。この研究の特徴は、耐熱性変異株ではなく中温酵母の *S. cerevisiae* の野生株を用い、 $10^5$  cells/ml という通常の接種量でも高温増殖が可能となる条件を確立したところにある。本章においても、*Saccharomyces* 属のいくつかの株について、Sherman の培養条件を含めて種々の条件で培養を試みたところ、その多くが40°Cでも増殖することがわかった<sup>3)</sup>。

本研究ではさらに、工業用培地として用いられている廃糖蜜培地においても本酵母は40°Cで増殖できることを見出した。なお、廃糖蜜培地での高温培養<sup>4)</sup> は、最後の第3部第3章記載の研究に利用した。

#### (1) 通常のYPD培地 [1%酵母エキス、1%ペプトン、1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、4%グルコース] における各種酵母の高温培養

#### 実験方法

使用菌株 以下の12株について調べた。*S. cerevisiae* ATCC 7753、*S. cerevisiae* JK 313 (J. Kumnuanta により単離された耐熱性変異株)、*S. sake* Kyokai No.7、*S. sake* 6-4-C (原、野白によって単離されたエタノール耐性変異株<sup>5)</sup>)、*S. carlsbergensis* ATCC 9080、*S. oviformis* IFO 0262、*Kluyveromyces fragilis* IFO 0288、*K. lactis* IFO 1090、*Schizosaccharomyces pombe* IFO 0346、*Saccharomycopsis lipolytica*

NRRL Y6795、*Candida utilis* IFO 1086、*C. tropicalis* Pk 233

**培養** 前培養は、500 ml の三角フラスコに200 ml の培地を入れ、保存培地から一白金耳接種して30°Cで定常期まで振とう培養(220 rpm/min)した。集菌後脱イオン水で2回洗浄し、新しい培地(上記と同組成) 200 ml に、1 ml あたり10  $\mu$ g (乾燥重量)になるように接種し、30°Cまたは40°Cで同様に振とう培養を行った。増殖度は、610 nmでの濁度を分光光度計により測定し、濁度と乾燥菌体量の検量線を用いて求めた。

## 結果と考察

Fig. 1 に示すように40°Cでは全く増殖が認められない株が4株あったのに対し、40°Cでも増殖する酵母がかなり存在することがわかった。一方、*S. cerevisiae* 7753 と耐熱性株 *S. cerevisiae* 313 では、40°Cで最高増殖度はともに30°C培養に比べて低かったが、後者では増殖開始に必要な時間と増殖速度は30°Cの場合と変わらなかった。また、多くの点で *S. cerevisiae* と類似している *S. carlsbergensis* では40°C培養での増殖が *S. cerevisiae* に比べてかなり優れていた。両者のこのような耐熱性の違いは興味深い。さらに、*C. utilis*、*C. tropicalis*、*K. fragilis* の3株も同様に耐熱性であることがわかった。

(2) 高濃度酵母エキスを含む6 YD培地 [6%酵母エキス、4%グルコース、0.5% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ] における *Saccharomyces* 酵母の高温培養

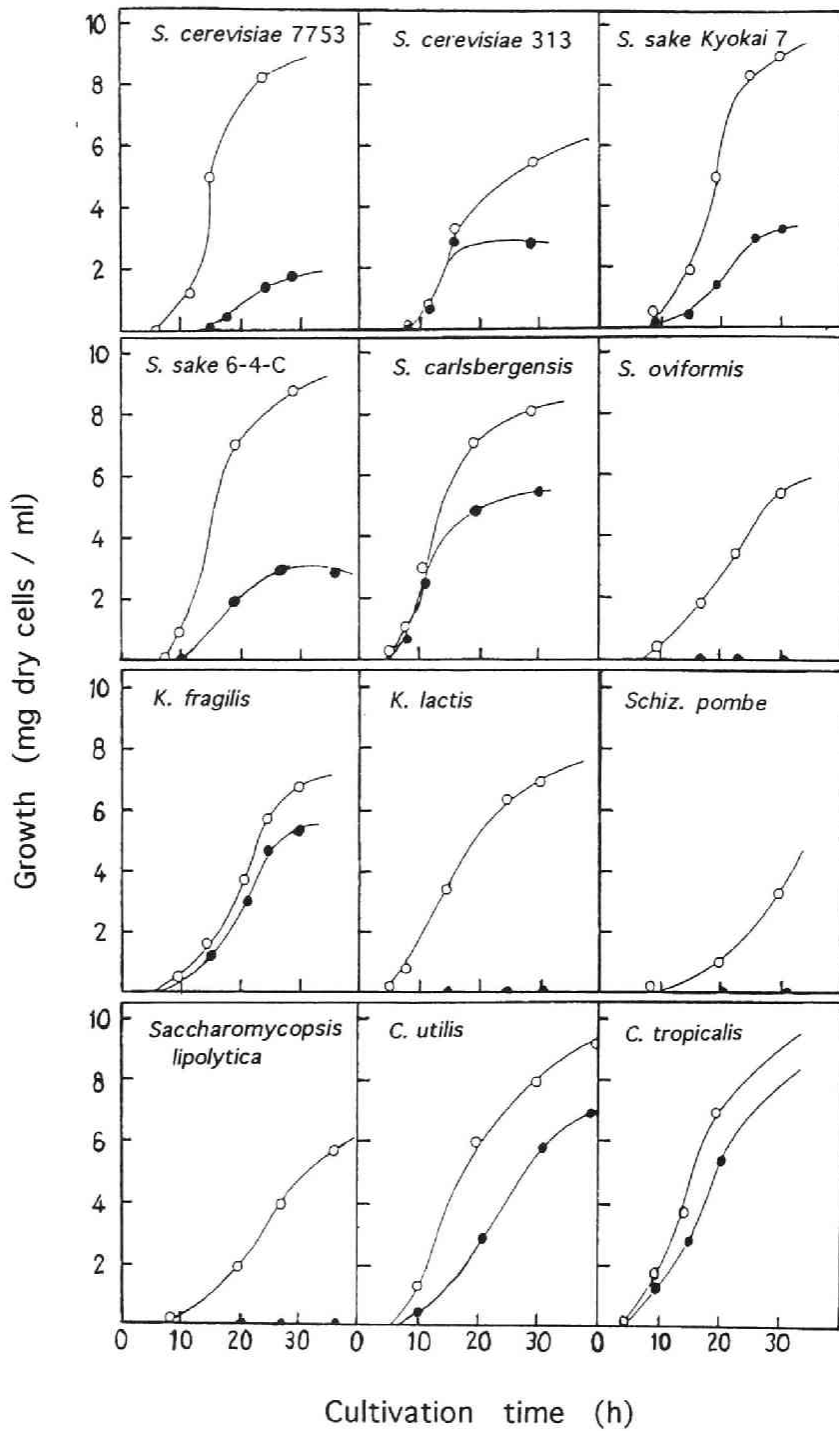


Fig. 1. Effect of elevated temperature on the growth of yeasts in YPD\* medium.

Cells were grown at 30°C (○) and 40°C (●).

\*See the text.

## 実験方法

**使用菌株** *S. cerevisiae* ATCC 7753、*S. cerevisiae* JK 313、*S. sake* Kyokai No.7 および *S. sake* 6-4-C の 4 株について調べた。

**培養** 前培養は 1% グルコース、0.5% 酵母エキスを含む寒天斜面培地上で 30℃、24h 行った。この菌体の懸濁液を、本培養培地 (pH5.2) に  $10^5$  cells/ml になるように接種した。酵母エキスはろ過滅菌し、グルコースと  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  は別々にオートクレーブした。対照として前記の YPD 培地に 1.2% の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を加えた培地 (YPDAm) で本培養し、40℃ 培養では接種量を  $10^6$  cells/ml とした。試験管 (25×200 mm) を用い、培養液 5 ml を入れて振とう培養 (120 strokes/min) を行った。増殖度は前記と同様の方法で測定した。

## 結果と考察

Fig. 2 に示すように用いた *Saccharomyces* 酵母の 4 種の株は全て 6YD 培地では 40℃ で増殖することができた。また比較のために用いた YPDAm 培地でも *S. sake* Kyokai No.7 を除いては、培養時間が長くなると有意な増殖が見られた。特に、耐熱性変異株 (JK 313) ではいずれの培地においても増殖開始に必要な時間も増殖速度も 30℃ 培養と同程度であった。また、6YD 培地では、40℃ での最高増殖度も YPDAm 培地における 30℃ 培養の場合に匹敵する程であった。しかし、同じ培地で比較すると、他の株と同様、40℃ 培養では最高増殖度の低下が見られた。このことは、後に述べるように高温では呼吸が低下し、エネルギー効率が減少するためであると考えられる。6YD 培地では 30℃ で *S. sake* Kyokai No.7 を除いて diauxie の傾向が認められた。

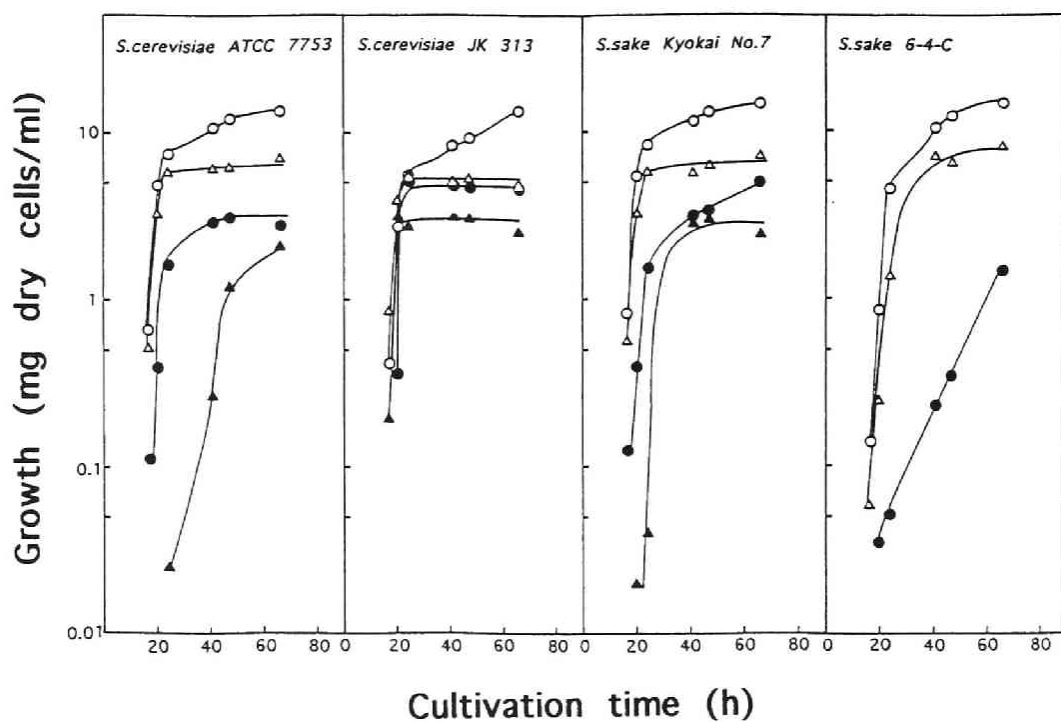


Fig. 2. Growth of yeasts at elevated temperature.

Cells were grown at 40°C in 6YD (●) and YPDAm (▲) media. Growth at 30°C [ 6YD (○), YPDAm (△) ] is also shown as control. For the media, see the text.

YPDAm 培地では diauxie は見られなかったので、6YD培地では高濃度の酵母エキスから diauxie の原因となる炭素化合物が供給されるのか、あるいはこの培地ではエタノールの利用が促進されるのかいずれかによると考えられる。清酒酵母は、特に40°C耐性が低いように思われる。中でもアルコール耐性変異株(6-4-C)の耐熱性が低いのは興味深い現象である。

*S. cerevisiae* ATCC 7753 株を6YD培地で、培養し、振とう速度の高温増殖への影響を調べた結果、振とう速度が大きい程40°Cにおける増殖がすぐれていることがわかった(Fig. 3)。通常は振とう速度が大きいと呼吸が促進されるためと考えられるが、高温培養では呼吸能自体がほとんどなくなるので(第2部第2編第1章)それが原因とはいえない。培養が始まると有害な老廃物が培地に増え、菌体周辺に濃縮されるのが振とうによって防がれるのかもしれない。

Sherman<sup>2)</sup>は通常の接種量( $10^5$  cells/ml程度)で高濃度(6%)酵母エキス培地(6YD培地)を用い *Saccharomyces* 酵母を高温(40°C)で培養することに成功した。酵母エキス中には40°C培養における増殖開始を促し、増殖速度を高めるような物質が含まれていると思われる。また、この物質は30°Cで最大増殖度を増大させる効果があると考えられることができる。

高温下では、膜の流動性が上昇するはずであるから高温下における菌の増殖についても膜の流動性との関わりは当然考えられる。従って、上記の高温増殖促進因子は膜の流動性を抑制する物質である可能性もある。あるいは高濃度酵母エキス培地の浸透圧が高く、それが影響するのもかも知れない。この点については後で述べる。

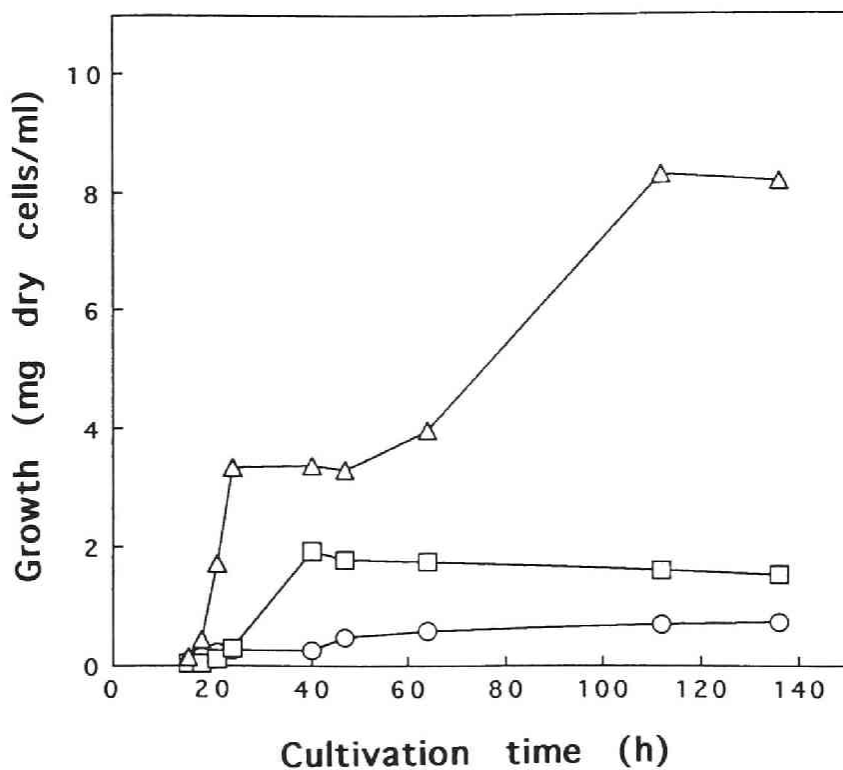


Fig. 3. Effect of aeration on growth of *S. cerevisiae* at elevated temperature.

Cells were grown at 40°C in 6YD medium (see the text) with shaking at 120 strokes/min (□) and 170 strokes/min (Δ). Growth without shaking (○) is also shown as control.



### (3) 廃糖蜜(10%糖)培地における *Saccharomyces* 酵母の高温増殖

#### 実験方法

使用菌株 *S. cerevisiae* ATCC 7753 を用いた。

培養 前培養では、300 ml の三角フラスコにYPD培地 50 ml を入れて、30°Cで定常期まで振とうした。集菌、洗浄(脱イオン水で2回)後、廃糖蜜培地 [25% 廃糖蜜(糖10%に相当)、0.28% 尿素、0.04%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.03%  $\text{MgSO}_4$ ] に $10^7$  cells/ml になるように接種し、上記の培地 50 ml を含む 300 ml の三角フラスコを用い種々の温度で振とう培養(120 strokes/min)を行った。増殖度は前記と同様の方法で測定した。

#### 結果と考察

温度を30°C、36°C、38°C、40°Cと変えて*S. cerevisiae* ATCC 7753 の増殖を調べた。Fig. 4 に示すように、培養温度が高くなるにつれ最大増殖度は減少した。培養温度30~38°Cでは、増殖開始および増殖速度にほとんど差はみられなかったが、40°Cでは増殖開始に必要な時間が長くなり増殖速度は低くなった。また、ここで用いた廃糖蜜濃度(10%糖)が増殖にとって最適であった(データ省略)。これは、おそらく浸透圧の影響によるものと思われる。

## 第2章 合成培地における高温増殖

前章で、高濃度の酵母エキスを含む天然培地では、通常接種量

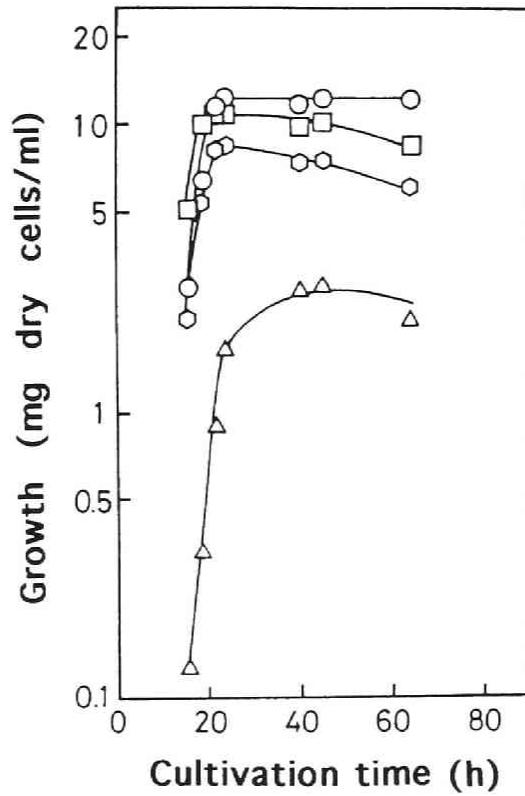


Fig. 4. Growth of *S. cerevisiae* at elevated temperatures.

Cells were cultivated in conventional cane molasses medium (see the text) at 30°C(○), 36°C(□), 38°C(◇) and 40°C(△).

( $10^5$  cells/ml)でも中温酵母を高温で培養することができることを示した。この章では合成培地を用いて中温酵母の高温下での増殖条件を確立し、あわせて高濃度酵母エキスの有効性を探ることを目的として研究を進めた。

典型的な中温酵母として *S. cerevisiae* ATCC 7753 を使用した。高温下では膜の流動性の上昇により菌の増殖が抑制されると推定される。従って、高温下の菌の増殖を可能にするには次のような三つのストラテジーを立てることが有効である。(1) 膜の流動性の上昇から膜を保護する。これには培地にソルビトールなどの膜安定化剤を加える。(2) 膜の流動性の上昇を防ぐ。このためには培地に膜の流動性を低下させるような脂質を添加して膜に取り込ませる。さらに、(3) 脂質の前駆体を培地に添加して高温に適した膜脂質の de novo の合成を促し膜の流動性の上昇を防ぐ。

また、比較的低温(27°Cが上限)を好む酵母 *Ph. rhodozyma* <sup>6)</sup> についても同様の観点から、合成培地を用いて28°Cで培養を試み、上記の条件の普遍的意義を探究した。

## 1. *Saccharomyces* 酵母の高温培養

### 実験方法

**培養** 基本合成培地は全量 100 ml (pH 5.2) 中にグルコース 4.0g、クエン酸 0.1g、クエン酸三カリウム 0.5g、カザミノ酸 1.2g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.11g、KCl 85mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  25mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  25mg、 $\text{MnSO}_4$  0.5mg、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5mg、トリプトファン 7.5mg、ミオイ

ノシトール 5.0mg、ナイアシン 0.75mg、パントテン酸カルシウム 0.38mg、塩酸チアミン 0.15mg、塩酸ピリドキシン 3.0 $\mu$ g、ビオチン 2.4 $\mu$ gを含む。培地の殺菌はオートクレーブにより 2 気圧、120°Cで 10 min 行い、グルコースは別殺菌した。膜を安定化するためには、上記の基本培地に、1 M D-ソルビトール、1 M D-マニトール または 0.26 M NaCl を添加した。また、脂質添加の場合はパルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸またはエルゴステロールを温エタノールに溶かし、20 $\mu$ g/ml培地になるように加えた(培地中のエタノール濃度は 0.3%になるが、増殖に影響はなかった)。また、脂質合成の前駆体として 100 mM 酢酸ナトリウムを上記合成培地に添加した。前培養は 300 ml の三角フラスコに50 ml の基本培地を入れ、斜面寒天培地から一白金耳植菌し、30°C、120 strokes/min で振とう培養した。本培養は  $5 \times 10^5$  cells/ml の接種量で前培養と同様に30°Cまたは40°Cで行った。

培地の浸透圧の測定 超過冷却方式による氷点降下法により Osmotic Pressure Auto & Statを用いて6YD培地と種々の濃度のソルビトールを含む合成培地の浸透圧値 (mOsm) を測定した。

## 結果

### (1) 膜安定化剤添加培地における高温培養

膜安定化剤として NaCl やマニトールを加えてもソルビトール添加の際と同様、40°Cにおける増殖促進がみられた(データ省略)。そこで以下に示す研究では安定化剤としてソルビトールを選んだ。40°Cでの増殖のソルビトール濃度依存性を Fig. 1 に示した。0.75 ~ 1 Mで増殖

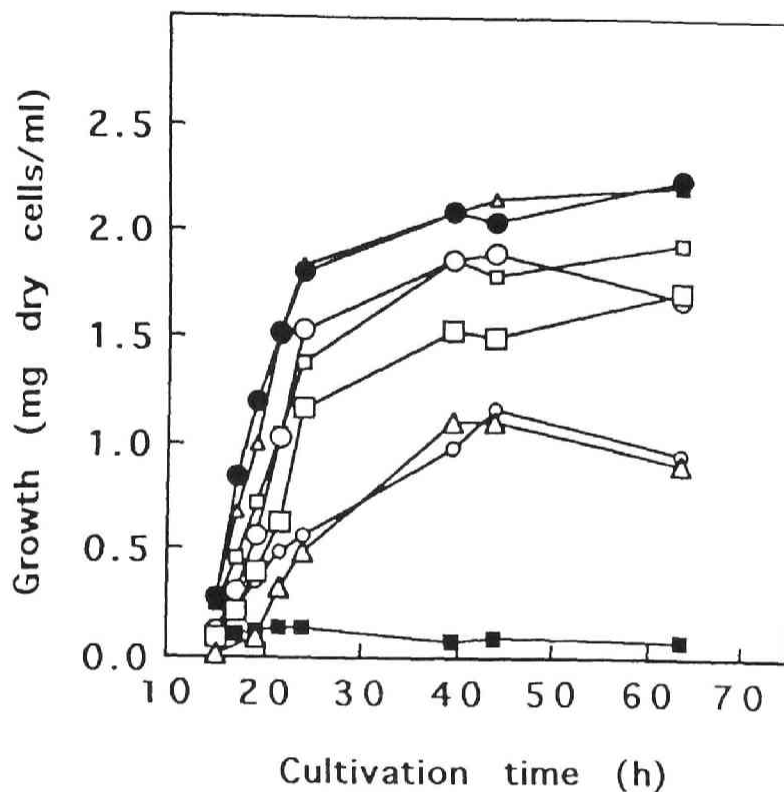


Fig. 1. Effect of sorbitol concentration on growth of *S. cerevisiae* at elevated temperature.

Cells were grown at 40°C with D-sorbitol : 0 M (■), 0.25 M (○), 0.5 M (□), 0.75 M (△), 1 M (●), 1.25 M (○), 1.5 M (□), 1.75 M (△).

効果が最も高く、これより濃度が低くても高くても増殖効果は低下した。ソルビトール添加培地および前章で用いた6YD培地の浸透圧を実測した値を Table 1 に示す。培地に及ぼすソルビトールの最適濃度 0.75 ~ 1 Mは、浸透圧 1676~1910 mOsm/kg に相当し、合成培地における高温増殖は培地の浸透圧によって影響されることが明らかになった。一方、6YD培地における浸透圧は610 mOsm/kgで無添加の合成培地と同じであった。従って、6YD培地での高温増殖は少なくとも浸透圧が原因ではないと考えられる。

## (2) 脂質添加培地での高温培養

Fig. 2 に40°Cにおける各種脂質添加物の増殖効果を示す。膜に取り込まれてその流動性の上昇を防ぐと考えられる飽和脂肪酸のパルミチン酸は予想通り40°Cでの菌の増殖をもたらした。しかし、本酵母のもう一つの飽和脂肪酸のステアリン酸や、あるいはエルゴステロールでは40°Cでの増殖がみられなかった(データ省略)。不飽和脂肪酸については、パルミトレイン酸では予想通り40°Cでの増殖が全く認められなかった(データ省略)。ところが、他の一つの不飽和脂肪酸のオレイン酸は40°Cで菌の増殖を可能とし、しかも、パルミチン酸の場合より効果が大きかった。しかし、オレイン酸の効果も前記のソルビトールの効果には及ばなかった。そこで、ソルビトールに40°Cで増殖効果のなかった脂肪酸を加えて、その影響を調べた(Fig. 3)。パルミトレイン酸を除いて、どの脂肪酸もソルビトールの効果に影響を与えなかった。パルミトレイン酸添加の場合にはソルビトールによる増殖促進効果は抑制された。

Table 1. Osmotic pressure of medium

Sorbitol (M)	Osmotic pressure (mOsm/kg)
0	602
0.25	845
0.5	1209
0.75	1676
1.0	1910
1.25	2098
1.5	2633
1.75	2900
6YD medium	610

Details are described in the text.

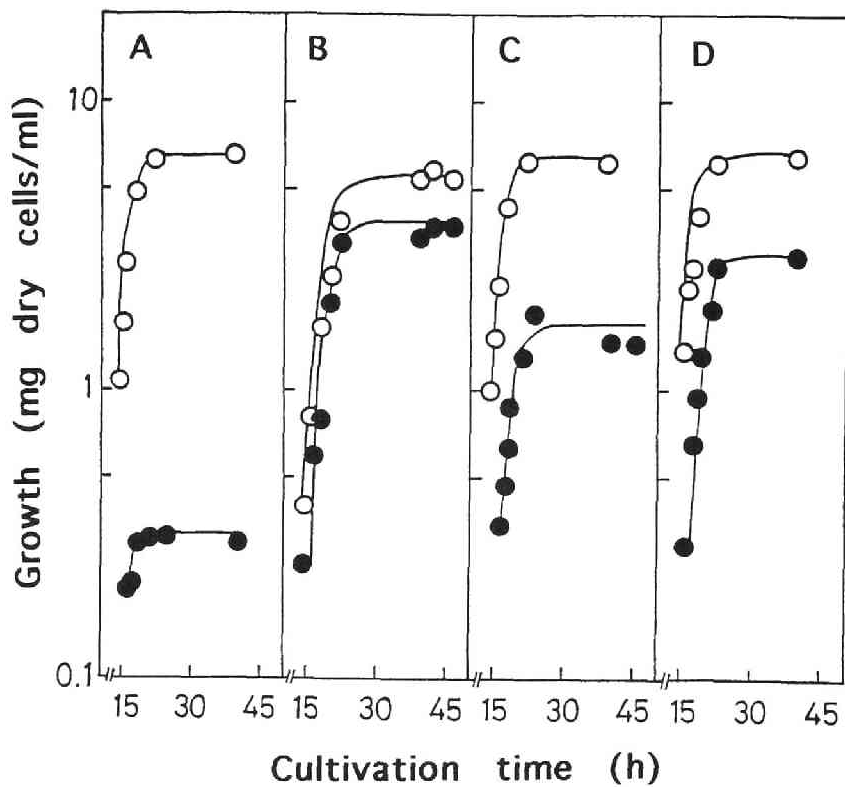


Fig. 2. Growth of *S. cerevisiae* at elevated temperature in defined medium\* supplemented with fatty acids.

Cells were grown at 30°C (○) and 40°C (●).

A: no supplement (control), B: D-sorbitol (1 M),

C: palmitic acid (20  $\mu$ g/ml), D: oleic acid (20  $\mu$ g/ml)

\*See the text.



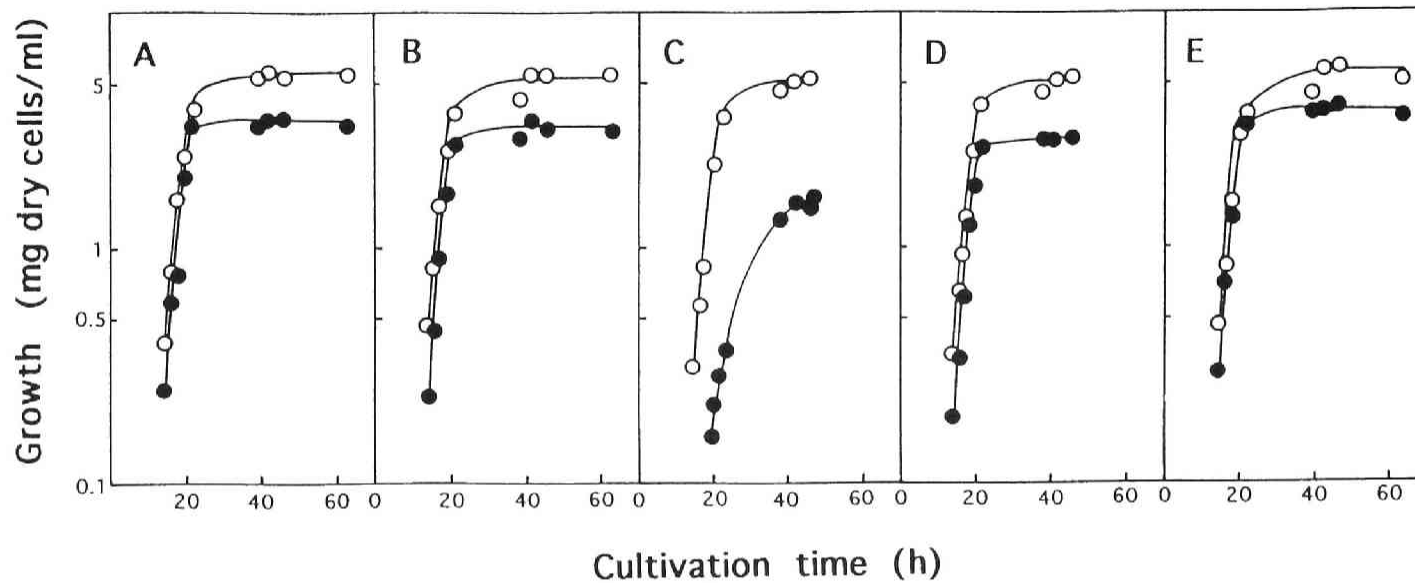


Fig. 3. Growth of *S. cerevisiae* at elevated temperature in defined medium\* supplemented with sorbitol and fatty acids.

Cells were grown at 30°C and 40°C supplemented with D-sorbitol (A), D-sorbitol + palmitic acid (B), D-sorbitol + palmitoleic acid (C), D-sorbitol + stearic acid (D) and D-sorbitol + oleic acid (E).

\*See the text.

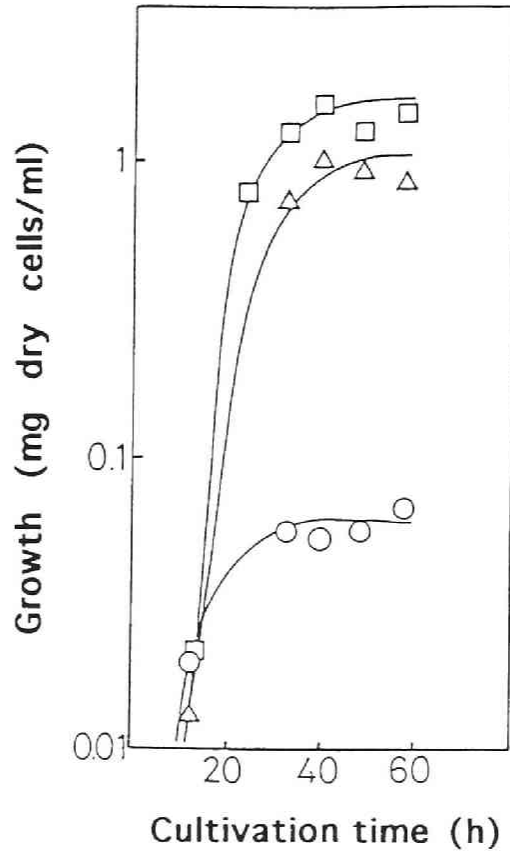


Fig. 4. Growth of *S. cerevisiae* at 40°C in defined medium\* supplemented with acetate or sorbitol.

Cells were grown with no supplement (○),  
0.1M Na-acetate (△) or 1M D-sorbitol (□).

\*See the text.

### (3) 酢酸添加培地での高温培養

先に述べたように、培地に膜の構成脂肪酸のうちパルミチン酸とオレイン酸を添加すると本酵母は高温で増殖できることから、これら脂肪酸の前駆体である酢酸の効果を調べた。その結果Fig. 4に示したように、酢酸ナトリウム 100 mMを培地に添加するとソルビトール 1 Mに匹敵する高温増殖効果が見られた。従って、40°Cでも酢酸から脂質への合成はなされており、ピルビン酸からのアセチルCoAの供給がブロックされていることが示唆された。

### 考察

中温酵母 *S. cerevisiae* を合成培地を用いて40°Cで培養する条件を確立した。一つは、培地の浸透圧を上げることによって膜を保護し安定化させる方法である。これは培地に 1 M ソルビトール、1 M マニトールまたは 0.26 M NaCl を添加することによって達成された。他の一つは、膜の脂質成分を培地に添加して酵母を培養し、それらの脂質を膜に取り込ませ、高温による膜の流動性の上昇を防ぐように脂質組成を変化させる方法である。飽和脂肪酸のパルミチン酸を添加すると予想通り菌は増殖したが、ステアリン酸やエルゴステロールの添加効果はこの実験系では見られなかった。おそらく、エルゴステロールは膜へ取り込まれなかったのであろう。また、ステアリン酸の結果はその菌体含量がもともと非常に低いことと関係があるのかもしれない。一方、予想に反して不飽和脂肪酸のオレイン酸は40°Cで増殖効果を示した。この結果は極めて興味深い。オレイン酸とパルミトレイン酸を比べてみると両者とも不飽和結合一個を持ち、炭素数がわずかに二つ違うだけ

である。膜の流動性は、リン脂質のアシル基の不飽和結合数と炭素鎖長によって大きく影響されるが、パルミトレイン酸が40℃で増殖を阻害し、逆にオレイン酸が増殖を促進することから40℃ではこのわずかの炭素鎖長の違いが重要であると考えられる。また、飽和のパルミチン酸よりも不飽和のオレイン酸の方が40℃で増殖促進効果が大きかったことは次のように説明できる。オレイン酸は、この菌の構成脂肪酸の最終産物であり、従ってオレイン酸を添加するとfatty acid desaturase がフィードバック制御をうける。パルミチン酸の不飽和化もステアリン酸の不飽和化も同じ酵素で触媒されるので、パルミトレイン酸の生成はオレイン酸で阻害されることになる。事実、オレイン酸添加の場合はパルミトレイン酸の含量が著しく低かった。一方、パルミチン酸添加の場合はパルミチン酸は膜に取り込まれるが、その不飽和化が進みパルミトレイン酸も増えることになり膜の流動性が上昇して40℃における増殖が部分的に抑制されたのであろう。

以上、合成培地ではソルビトールなどの膜安定化剤を加えて膜を保護するか、適当な脂肪酸を添加して膜を強化すると、高温培養が可能になることがわかった。そこで、先述の高濃度酵母エキスを含む培地(6YD)での高温増殖の機構について検討を加えた。6YD培地の浸透圧は、Table 1 に示したようにソルビトール無添加の合成培地と同じレベルであり、従ってこの培地における増殖は浸透圧が原因でないと結論された。一方、StarrとParks<sup>8)</sup>は合成培地にオレイン酸とエルゴステロールを添加すると *S. cerevisiae* が40℃で増殖することを示しており、酵母エキス中にはオレイン酸とエルゴステロールが含まれていることを指摘している。また、オレイン酸による高温増殖の促進は、

Shermanによっても示されており<sup>1)</sup>、本研究の結果と考え合わせると酵母エキス中の有効成分の一つはおそらくオレイン酸であろう。不飽和脂肪酸のオレイン酸が膜の流動性が高まる高温でなぜ増殖に有効であるのかについては、StarrやShermanらは考察を加えていないが、先にも述べたようにオレイン酸のフィードバック調節によってパルミチン酸の不飽和化が阻害され、その結果、パルミトレイン酸が減少することが原因であると考えられる。

さらに、酢酸によっても本酵母は40°Cで増殖できることが証明され、40°Cではピルビン酸からアセチルCoAの供給が抑えられていることがわかった。一方、ソルビトールを加えると40°Cでも増殖できるので、この場合にはアセチルCoAの供給が可能であることになる。通常はピルビン酸から、ミトコンドリアに局在する pyruvate dehydrogenase complex によってアセチルCoAが合成されるが、第2部第2編第1章で述べるように、40°C培養ではミトコンドリアが未発達であることからこの経路によるアセチルCoAの合成は不可能であると推定される。従って、ソルビトール添加によって40°CでもアセチルCoAの供給が可能となる機構を探ることは極めて興味深い。この点に関しては第2部第1編第1章で詳述する。

## 2. *Phaffia rhodozyma* の高温培養

### 実験方法

培養 基本合成培地は、全量 100 ml (pH 5.2) 中にグルコース 5.0g、フタル酸一カリウム 0.41g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.11g、カザミノ酸 0.8g、

KCl 85mg、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 25mg、FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.5mg、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 25mg、MnSO<sub>4</sub> 0.5mg、トリプトファン 8mg、ミオイノシトール 0.5mg、ナイアシン 0.5mg、パントテン酸カルシウム 0.25mg、塩酸チアミン 0.1mg、塩酸ピリドキシン 2.0 μg、ビオチン 1.6 μgを含む。ソルビトールの添加濃度は 0.5 M とした。培地の殺菌および培養は、*Saccharomyces* 酵母と基本的に同様の方法によったが、前培養は23°Cで 60 h 行い、本培養の接種量は23°Cでは10<sup>6</sup> cells/ml、28°Cでは10<sup>8</sup> cells/ml とした。

## 結果と考察

*Ph. rhodozyma* は通常は23°C付近で培養され、27°Cが増殖温度の上限である<sup>6)</sup> が、*Saccharomyces* 酵母の場合と同様、合成培地を用いて高温での培養を試みた。しかし、脂質を添加して膜を強化したり、熱ショックや飢餓培養によって菌にストレスを与えて温度耐性を高めたりする方法では顕著な効果はみられず、接種量を高めることで28°Cでの増殖が可能となった(Fig. 5)。この条件でソルビトールを添加(0.5 M)すると最大増殖度は上昇したが23°C培養のそれに及ばなかった。*S. cerevisiae* を40°Cで培養した場合と同様、28°Cでは菌の呼吸能が低下し、(データ省略)、エネルギー効率が低下しているためであると考えられる。一般に菌にとって過酷な条件では接種量が高いほうが増殖に適しているといわれているが、その真の原因は明らかにされていない。大腸菌では熱ショックを与える場合、単位体積あたりの菌数が多いほど熱抵抗性が高くなるという事実があり、たとえば、10<sup>8</sup> cells/mlの菌濃度の懸濁液に熱ショックをかけると、10<sup>7</sup> cells/mlの場合に

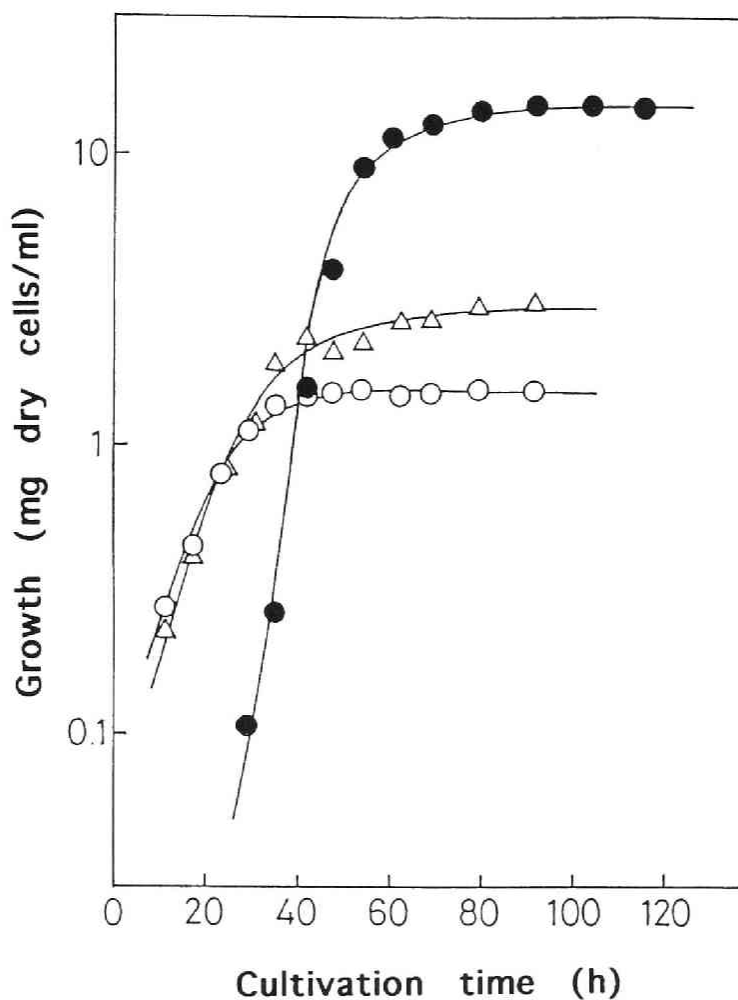


Fig. 5. Growth of *Ph. rhodozyma* at elevated temperature.

Cells were grown in defined medium (see the text) at 28°C with 0.5 M (Δ) or without (○) D-sorbitol. Growth at 23°C (●) is also presented as control. Inoculum size was  $10^6$  cells/ml and  $10^8$  cells/ml at 23°C and 28°C, respectively.

比べて2~3倍の熱抵抗性の増大があることが示されている<sup>7)</sup>。また、培養中では、増殖に有利となる何らかの物質が放出され、菌数が多いとその濃度が高まり耐性が高くなるのかもしれない。

### 第3章 合成培地における*Saccharomyces cerevisiae*の低温培養

*S. cerevisiae*の高温増殖については第2章で述べた通りであるが、ここではその機構の普遍性を求めて、逆に低温で培養することを試みた。低温では高温の場合とは逆に、低温による膜の流動性の低下を防ぐような膜脂質組成の変化(パルミトレイン酸の増加、遊離型ステロールの減少)によって増殖が促進されることが期待される。従って、低温培養ではパルミトレイン酸が増殖を促進し、逆にオレイン酸は阻害することが考えられる。本章ではこれらのことを確かめるために行った研究の結果を述べる。

#### 実験方法

**培養** 前章と同様の方法で、*S. cerevisiae* ATCC 7753 を15°C、20°C、25°Cで培養し、ソルビトール(1M)、パルミトレイン酸(20 $\mu$ g/ml)またはオレイン酸(20 $\mu$ g/ml)の添加効果を調べた。

#### 結果と考察

培養温度が低くなるにつれて、Fig. 1 に示すように増殖の誘導期が



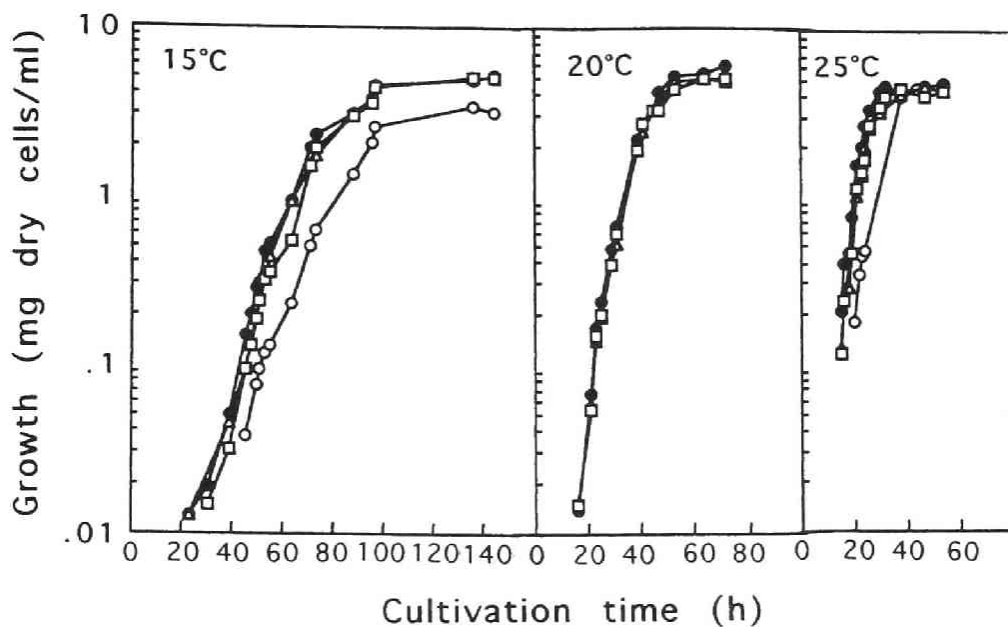


Fig. 1. Growth of *S. cerevisiae* at low temperatures in defined medium\* supplemented with sorbitol and fatty acids.

Cells were grown without supplement (●), and with 1 M D-sorbitol (○), 20 $\mu$ g/ml palmitoleic acid (Δ) and 20 $\mu$ g/ml oleic acid (□).

\*See the text.

延び増殖速度が遅くなった。しかし、高温(40°C)培養の場合とは異なり培養温度による最大増殖度の差はほとんど見られず、添加物がなくても、30°C培養とほとんど変わらなかった。この酵母の場合、この程度の低温では膜の流動性に及ぼす影響は少ないと考えられる。先に述べたように、パルミトレイン酸は低温では増殖を促進すると予想されたが、全くその効果は認められず、オレイン酸による増殖阻害もみられなかった。一方、ソルビトールを添加すると予想通り低温になるにつれて増殖抑制が顕著となり最大増殖度も低下した。1 M ソルビトールによる浸透圧の上昇は、40°Cの高温においては流動性の上昇に伴う膜の不安定化を防ぐ役割を果たしたが、30°C以下の低温では逆に膜の流動性が著しく低下し、細胞にとっては有害となることが示された。

以上のように、低温(~15°C) 培養では30°C培養に比べて増殖開始は遅れ、培養速度は小さくなるが、添加物がなくても最大増殖度は変わらなかったのが高温(40°C) の場合とは異なる膜脂質組成の変化があるものと推定される。

## 文献

1. Yamamura, M., Nagami, Y., Vongsuvanlert, V., Kumnuanta, J. and Kamihara, T. (1988) *Can. J. Microbiol.* **34**, 1014-1017.
2. Sherman, F. (1959) *J. Cell Comp. Physiol.* **54**, 29-35.
3. Kamihara, T., Yamamura, M., Nagami, Y., Nakamura, I., Vongsuvanlert, V. and Kumnuanta, J. (1984) *Microbial utilization of renewable resources*, **4**, 24-31.
4. Yamamura, M., Takeo, K. and Kamihara, T. (1991) *Agric. Biol.*

- Chem. 55, 2861-2864.
5. 原昌道、野白久雄 (1978) 醸造協会誌 73, 14-17.
  6. Johnson, E. A. and Lewis, M. L. (1979) J. Gen. Microbiol. 115, 173-183.
  7. Watkins, J. H. and Winslow, C-E (1932) J. Bacteriol. 24, 243-265.
  8. Starr, P. R., Parks, L. W. (1962) J. Cell Comp. Physiol. 59, 107-110.

## 第2部 酵母の温度適応の機構

第1部で酵母の増殖に及ぼす温度の影響について述べたが、第2部では酵母の環境温度に対する応答と適応の機構について述べる。全体は3編から成る。

第1編では、温度による脂質代謝の変化を示す。生物は“温度”という環境の変化に対して、膜の成分を変えることによって適応することができる。とりわけ膜の主成分であるリン脂質のアシル基はリン脂質分子の動きに最も大きな影響を及ぼす因子として注目される。Marr と Ingraham<sup>1)</sup>は1962年に *Escherichia coli* で、その培養温度を下げると飽和脂肪酸が減って、不飽和脂肪酸が増えることを発見した。また、温泉地のような高温環境下で生育できる好熱菌では、菌体脂質のアシル基はほとんど全てが飽和脂肪酸から構成されているというように、環境温度が低いときには膜の不飽和脂肪酸を増やし、高い時には飽和脂肪酸を増やして膜の流動性を調節し、温度に適応している。これらのことは真菌類においてもいくつかの報告<sup>2,12)</sup>があり、広く生物界に見られる現象である。しかし、これまでの報告のほとんど全ては、温度と膜の流動性の関係を脂肪酸の不飽和度で論じている。本論文では、高温における膜の流動性の調節が、脂肪酸に限っていえばその不飽和度だけでは説明できないことを指摘するとともに、特定の脂肪酸によって流動性が支配されていることを新たに提示する。

ところで、膜の流動性を支配するものとしては、ここで述べたリン脂質の脂肪酸を含めて次のような要因が挙げられる。

## 1. リン脂質

### (1) 脂肪酸

### (2) 極性基

## 2. 遊離型ステロール

## 3. 脂質とタンパク質の密度

## 4. 脂質とタンパク質の相互作用

前にも述べたように、リン脂質の動きは脂肪酸の炭化水素鎖長やシス型二重結合の数によって大きく影響されるが、極性基の種類によってもその動きは左右される。例えばホスファチジルコリンはホスファチジルエタノールアミンに比べて動きが少ないといわれている。しかし、極性基の影響は脂肪酸のそれに比べると小さいと考えられる。また、脂質とともに脂質二重層を構成しているタンパク質との関係によっても膜の流動性は影響され、当然これらの膜内での密度も問題となる。さらにタンパク質分子自身も脂質と同じように側方拡散や回転運動により膜内を移動することができ、流動性に関わっていると考えられるが、脂質分子に比べ分子が大きいため動きにくく、その速度もかなり遅く、タンパク質の場合はむしろ脂質層の流動的な性質に影響されるようである。一方、脂質二重層のもう一つの主要な構成成分であるステロールは、膜では遊離型ステロールとして存在し、膜脂質の流動性の調節因子として欠かすことができない物質である。以上の観点から、本研究では膜の流動性に大きく影響するリン脂質の脂肪酸および遊離型ステロールに着目して、環境温度の変化に対して細胞がいかに脂質変化を起こし、流動性を保って適応できるかを調べることに

した。

第2編では *S. cerevisiae* の呼吸と発酵は高温培養でどのような影響を受けるかを調べた。

*Saccharomyces* 酵母は、呼吸によって獲得されたエネルギーばかりでなく、発酵で得られたエネルギーをも利用できる。このためミトコンドリアの機能が低下して呼吸が抑制されても生命を維持することが可能である。酵母のミトコンドリアの発達は、培養条件によって左右される。例えば、糖濃度が高い時や酸素が欠乏している時、あるいは呼吸が阻害または抑制されている時にはミトコンドリアの発達は低く、チトクロム系の呼吸鎖も合成されない。しかしこのような環境下で呼吸能を失った菌は、糖が消費されたり、酸素を与えると直ちに呼吸能を回復する。すなわち、呼吸適応が起こる。一方、1940年代にフランスの Ephrussi<sup>13)</sup> によって呼吸欠損 (respiration deficient : RD) 変異株というミトコンドリアの機能を失った株が発見された。この変異は天然培地においては、自然発生的に数%という、おそらくは変異といえるものの中では最も高い頻度で起こることが知られている。このRD変異株は、アクリフラビンやエチジウムブロマイドのような薬剤によって、ほぼ100%の高率で誘導することができる<sup>14)</sup>。これらの薬剤を与えるとミトコンドリアDNAが断片化され、その多くは消失するが、残ったいくつかの断片は複製され、タンデムに環状化された結果、RD変異が生じることが知られている。RD変異はまた、高温<sup>15,16)</sup> や紫外線照射<sup>17,18)</sup> という物理的な環境下においても高頻度で誘導される。我々は、高温(40°C)で本酵母を培養すると、他の条件には無関係に呼吸能が低下するが、RD変異の誘導頻度は培養条件に依存するこ

とを見出し、その原因をミトコンドリアの脂質組成に求めて研究を行った。また、呼吸と発酵は相互に調節し合い、先に述べたように呼吸が低下しても発酵によってエネルギー獲得が可能である。そこで高温における呼吸能低下に伴って発酵はどのように変化するかを調べた。

さらに第3編では高温下の細胞形態について述べる。酵母は種々のストレスによって細胞の形態変化を引き起こすことが知られている。例えば、*C. tropicalis* Pk 233 においては、エタノールにより仮性菌糸が形成され、イノシトールがこの効果を抑制し<sup>19)</sup>、さらにこの二形性発現においてイノシトールリン脂質を介するシグナル伝達機構が関与する<sup>20,21)</sup>。一方、*Saccharomyces* 酵母においては、仮性菌糸と基本的に同じと考えられる菌の見かけの“凝集”が高温で起こることがわかったので、この高温環境下における形態変化とシグナル伝達系との関係を調べた。

## 文献

1. Marr, G. A and Ingraham, L. J. (1962) *J. Bacteriol.* **84**, 1260-1267.
2. Kates, M. and Baxter, M. R. (1962) *Can. J. Biochem. Physiol.* **40**, 1213-1227.
3. Kates, M. and Paradis, M. (1973) *Can. J. Biochem.* **51**, 184-197.
4. Brown, M. C and Rose, H. A. (1969) *J. Bacteriol.* **99**, 371-378.
5. Farrell, J. and Rose, H. A. (1971) *Arch. Mikrobiol.* **79**, 122-139.
6. McMurrough, I. and Rose, H. A. (1971) *J. Bacteriol.* **107**, 753-758.
7. McMurrough, I. and Rose, H. A. (1973) *J. Bacteriol.* **114**, 451-452.

8. Greshnykh, K. P., Grigoryan, N. A., Dikanskaya, M. E.,  
Dyatlovitskaya, V. E. and Bergel'son, D. L. (1968) *Microbiology*  
**37**, 208-210.
9. Hunter, K. and Rose, H. A. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **260**,  
639-653.
10. Thorpe, R. F. and Tatledge, C. (1973) *J. Gen. Microbiol.* **78**, 203-  
206.
11. Chang, B. S. and Matson, S. R. (1972) *Biochem. Biophys. Res.*  
*Commun.* **46**, 1529-1535.
12. Nordstrom, M. K. and Laakso, V. S. (1992) *Appl. Environm.*  
*Microbiol.* **58**, 1656-1660.
13. Ephrussi, B., Hottinguer, H. and Chimenes, A. M. (1949) *Ann.*  
*Inst. Pasteur* **76**, 351-364.
14. Slonimski, P., Perratin, G. and Croft, J. H. (1968) *Biochem.*  
*Biophys. Res. Commun.* **30**, 232-239.
15. Yčas, M. (1956) *Exp. Cell Res.* **10**, 746.
16. Sherman, F. (1959) *J. Cellular Comp. Physiol.* **54**, 37-52.
17. Raut, C. (1953) *Exptl. Cell. Research* **4**, 295-305.
18. Raut, C. (1954) *J. Cellular Comp. Physiol.* **44**, 463-475.
19. Tani, Y., Yamada, Y. and Kamihara, T. (1979) *Biochem. Biophys.*  
*Res. Commun.* **91**, 351-355.
20. Uejima, Y., Koga, T. and Kamihara, T. (1987) *FEBS Lett.* **214**,  
127-129.
21. Kamihara, T., Kono, K., Ito, T., and Omi, K. *Biochem.*  
*Biophys. Res. Commun.* (in preparation).



## 第1編 脂質代謝

### 第1章 *Saccharomyces* 酵母の高温適応

先に、中温酵母 *S. cerevisiae* の高温増殖とそれをもたらす条件を明らかにした。そこで、ここではその高温増殖の機構について述べる。

高温下では膜の流動性は高まっているはずであり、その状態で増殖が可能となるためにはなんらかの方法で膜の安定性が保たれ、流動性の恒常性が維持されねばならない。

合成培地における高温培養で得られた非常に興味ある結果の一つは *Saccharomyces* 酵母の2つの不飽和脂肪酸の作用が全く正反対であったということである。オレイン酸は高温増殖を促進する効果を持ち、パルミトレイン酸は逆に増殖阻害効果を示した。両脂肪酸は二重結合の数は同じで、炭素鎖長の数がわずか2つ異なるだけである。一般に膜の流動性を支配している因子の中では膜のリン脂質の脂肪酸の不飽和度すなわち不飽和脂肪酸の含有率が最も重要であるといわれている。もちろん、不飽和脂肪酸の中でも二重結合の数の影響も重視される。しかし、本研究でみられるように、二重結合の数が同じで、鎖長もほとんど変わらない二つの不飽和脂肪酸でありながら、決定的に相異なる生理活性を示す例は今までほとんど知られていない。そこでソルビトールや脂肪酸、あるいは酢酸存在下40℃で培養して得られた菌の脂肪酸を分析して、脂肪酸組成の変化に基づく高温適応の機構を探ることにした。

## (1) 脂質組成の変化

### 実験方法

培養 *S. cerevisiae* ATCC 7753 を、第1部第2章と同じ方法で培養した。

菌体内全脂肪酸の抽出および分析 対数増殖期の菌を集め、2回水洗後、乾燥重量 100 mg の菌体を、KOH 2 g およびピロガロール 1 mg を含むメタノール水溶液 (メタノール 7.5 ml, 水 2.5 ml) 中で、80°C、3 h、還流下で加水分解した。反応後、石油エーテル 5 ml で不ケン化物を取り除いた。これを3回繰り返した。残ったメタノール層を 6 N の HCl で酸性 (pH 1.0) にし、石油エーテル (b.p 60~70°C) 5 ml で脂肪酸を抽出した。抽出は3回繰り返し、抽出液を合わせて減圧乾固した。得られた脂肪酸は 14% BF<sub>3</sub> を含むメタノール液 1 ml 中で 80°C、2 min 反応させメチルエステル化した。反応液に水 5 ml を入れ、石油エーテル 5 ml で3回脂肪酸メチルエステルを抽出した。抽出液を減圧乾固後、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸の分析を行った。内部標準として n-ヘプタデカンを使用した。5% Shinchrom E71 を充填したガラスカラム (3.0 m × 3 mm) を用い、担体には Shimalite (AW) 201、80-100メッシュを使用した。キャリアガスは N<sub>2</sub> を用い、流速は 60 ml/min とした。カラムは 155°C から 220°C まで 1 min 8°C の速度で昇温を行った。

全脂質の抽出 集菌、水洗した菌 100 mg (乾燥重量) を 80% エタノール 5 ml で 80°C、15 min 処理した。遠沈後、上清は保存し、残渣にクロロホルム 5 ml とメタノール 2.5 ml を加えて室温で 2 h 攪拌し、

脂質を抽出した。遠沈後、上清は先の上清と合わせて保存した。残渣についてさらに2回、同様に抽出を繰り返した。全ての抽出液を合わせて、0.88 % KCl（全上清の容量の25%）で洗浄した。一昼夜放置（-20°C）、または遠沈によって脂質層を集めて減圧乾固した。

リン脂質画分の抽出 得られた全脂質から薄層クロマトグラフィーによってリン脂質画分を単離した。薄層は、シリカゲルG(Sigma)を使用し、展開溶媒はクロロホルム：メタノール：酢酸：H<sub>2</sub>O=85：15：10：4 または石油エーテル：ジエチルエーテル：酢酸=70：30：1を用いた。前者の場合にはリン脂質の各分子種を、後者の場合には全リン脂質画分をヨウ素で確認し、それぞれのバンドをかきとった。これらのリン脂質画分をクロロホルム・メタノール(1：1)の混合液 6 ml で3回抽出して減圧乾固した。

リン脂質画分の脂肪酸の分析 減圧乾固したリン脂質画分は、全脂質の場合と同様の方法で14% BF<sub>3</sub>メタノール液を用いて、その脂肪酸のメチルエステル化を行い、ガスクロマトグラフィーにより分析した。

全ステロールの抽出および分析 全脂質の場合と同様に菌体のアルカリ加水分解液から石油エーテルを用いて全ステロールを不ケン化物として抽出後減圧乾固し、ステロール成分をガスクロマトグラフィーにより定量した。内部標準にはコレステロールを用い、各ステロールのエルゴステロール相当量を求めた。島津GC12AまたはGC7Aに、水素炎イオン化検出器をつけ、2% Silicon OV-17 を充填したガラスカラム（2.0 m × 3 mm）を用い、Chromosorb W AW DMCS(メッシュ80-100)を担体とした。キャリアガスはN<sub>2</sub>を用い、流速は 60ml/min とした。カラム温度は 250°C に設定した。

遊離型ステロールおよびステロールエステルの分析 抽出した全脂質から、薄層クロマトグラフィーによって遊離型ステロールおよびステロールエステルの画分を分離した。シリカゲルG(Sigma)の薄層を用い、展開溶媒は石油エーテル：ジエチルエーテル：酢酸=70：30：1を使用した。両ステロールのバンドはローダミン6G(0.01%エタノール溶液)より確認し、バンドをかきとり、クロロホルム：メタノール(1：1)で3回抽出し、抽出液を合わせて減圧乾固した。遊離型ステロール画分は、上記の方法によりガスクロマトグラフィーで分析した。ステロールエステル画分は、アルカリ性メタノールでケン化して得られた遊離型ステロールを、同様にガスクロマトグラフィーで定量した。

## 結果と考察

Fig. 1 に30°Cで増殖した *S. cerevisiae* の全脂質の脂肪酸ガスクロマトグラフィーによる分析結果を示す。この酵母の脂肪酸は主として炭素数16の酸18の酸であり、それぞれ飽和脂肪酸 [パルミチン酸 ( $C_{16:0}$ )、ステアリン酸 ( $C_{18:0}$ )] と二重結合1個を有する不飽和脂肪酸 [パルミトレイン酸 ( $C_{16:1}$ )、オレイン酸 ( $C_{18:1}$ )] から成る<sup>1)</sup>。Fig. 1 から明らかなように、脂肪酸の約8割は2つの不飽和脂肪酸で占められ、残りが2つの飽和脂肪酸からなる。不飽和脂肪酸ではパルミトレイン酸の含量の方がオレイン酸より多く、飽和脂肪酸のうちステアリン酸の占める割合が著しく少ないのが特徴的である。このような脂肪酸の組成が、高温培養ではどのように変化するかを次に調べた。Fig. 2 にソルビトール、パルミチン酸、オレイン酸を添加して

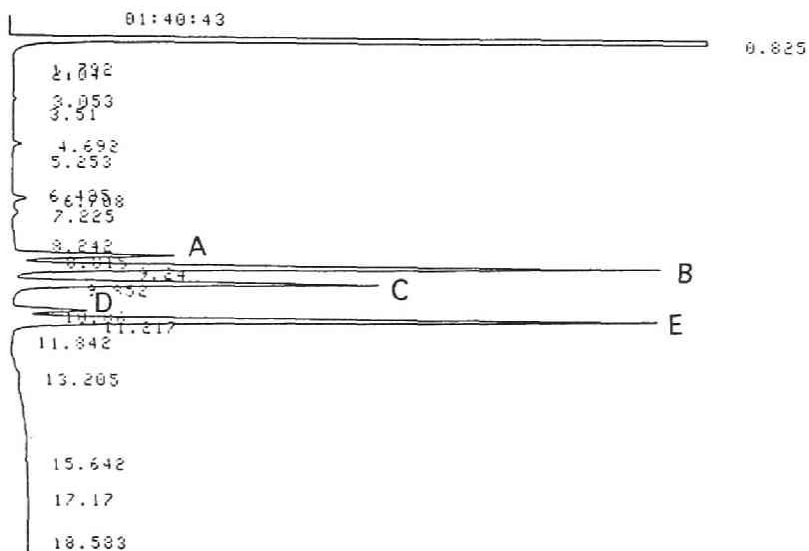


Fig. 1. Fatty acid composition in *S. cerevisiae* cells.

Peaks A, B, C, D and E correspond to palmitic ( $C_{16:0}$ ), palmitoleic ( $C_{16:1}$ ), heptanoic ( $C_{17:0}$ ) [internal standard], stearic ( $C_{18:0}$ ) and oleic ( $C_{18:1}$ ) acid, respectively.

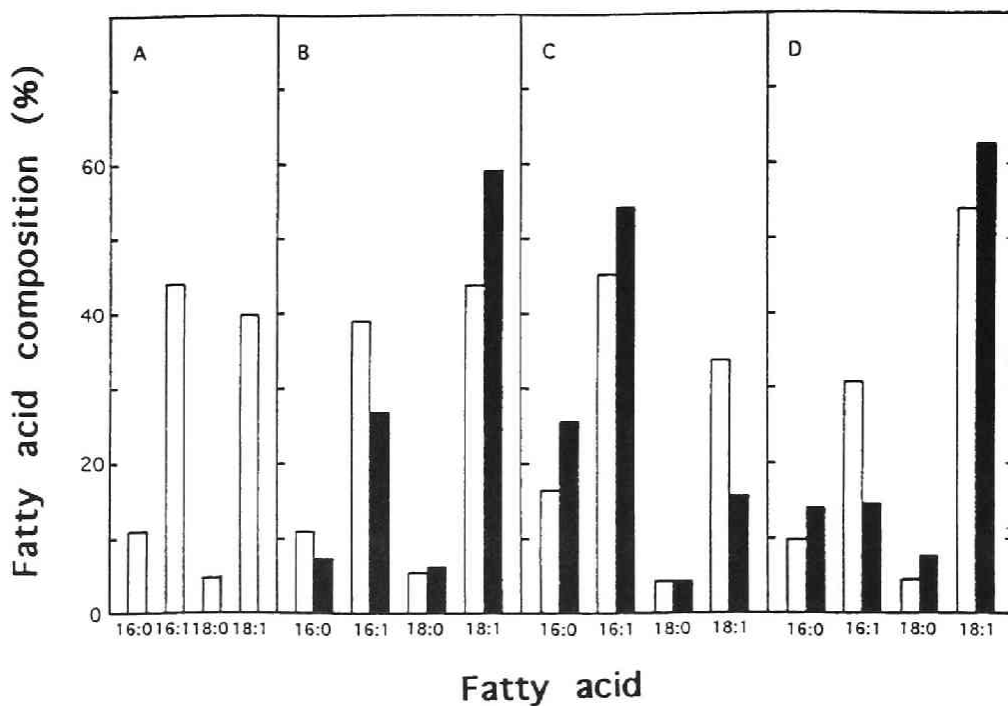


Fig. 2. Effects of growth temperature and supplements on fatty acid composition in *S. cerevisiae* cells.

The cells were grown to the late-log phase at 30°C (□) and 40°C (■) with or without supplements. A: control (without supplements at 30°C), B: with D-sorbitol, C: with palmitic acid (C<sub>16:0</sub>), D: with oleic acid (C<sub>18:1</sub>)

40°Cおよび対照として30°Cで培養した対数増殖後期の菌体の全脂質の脂肪酸組成を示す。ソルビトールを添加しても、30°Cでは無添加の場合と脂肪酸組成はほとんど変わらないが、40°Cではパルミトレイン酸の減少とオレイン酸の増加が顕著であった。一方、パルミチン酸を添加したときは当然パルミチン酸自体が増えるが、パルミトレイン酸もやや増加し、その分オレイン酸が減少した。そして興味あることにはその傾向は40°Cでより著しかった。オレイン酸を添加して培養すると、パルミチン酸の場合とは逆にオレイン酸の増加に伴ってパルミトレイン酸が減少し、とくに40°Cの場合はその傾向が強まり、ソルビトール添加40°C培養のパターンとほぼ類似した結果が得られた。菌体内の脂肪酸は膜を形成するリン脂質ばかりでなく、貯蔵脂質として油滴の形で細胞質に存在するトリアシルグリセロールやステロールエステルの構成成分でもある。従って全脂質の脂肪酸組成をもって膜の状態を論ずることはできない。そこで膜にのみ存在するリン脂質について脂肪酸の解析を行った。結果は Fig. 3 に示すように、Fig. 2 の全脂質の場合と基本的には同様の傾向が認められた。すなわち、高温培養で最も特徴的な脂肪酸組成の変化は、膜を構成するリン脂質においても、ソルビトールやオレイン酸添加培養で見られるパルミトレイン酸の減少とオレイン酸の増加である。一方、飽和脂肪酸であるパルミチン酸を加えた場合には、パルミチン酸は増加したが、パルミトレイン酸の高いレベルは高温でも維持され、オレイン酸は逆に著しく減少した。すなわちソルビトールやオレイン酸添加の場合とはちょうど逆の効果が得られた。本酵母の40°Cにおける増殖は、ソルビトールやオレイン酸添加の場合にはほぼ同じ程度でパルミチン酸添加時に比べてはるかに

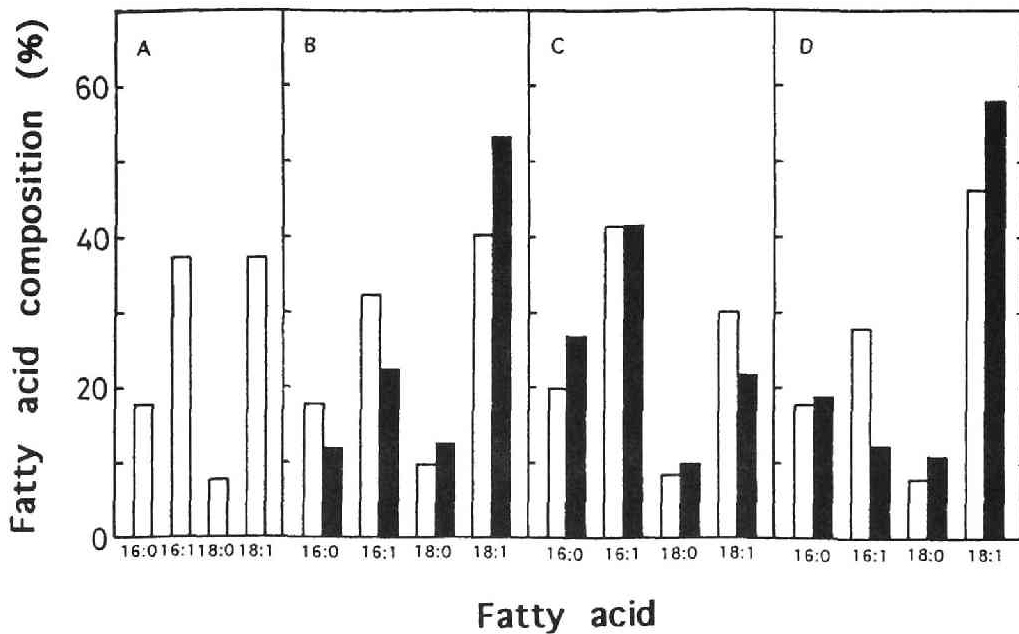


Fig. 3. Effects of growth temperature and supplements on fatty acid composition in phospholipid fraction isolated from *S. cerevisiae* cells.

The cells were grown to the late-log phase at 30°C (□) and 40°C (■) with or without supplements. A: control (without supplements at 30°C), B: with D-sorbitol, C: with palmitic acid ( $C_{16:0}$ ), D: with oleic acid ( $C_{18:1}$ )



優れていることと上記の結果を考え合わせると、ソルビトールやオレイン酸添加の際の脂肪酸組成、すなわち低パルミトレイン酸含量と高オレイン酸含量が高温増殖には適していることを強く示唆している。この場合注目されるのは、いわゆる脂肪酸の不飽和度は、30℃培養に比べて40℃培養で特に低下してはいないということである (Table 1)。パルミトレイン酸は減少するが、代わりにオレイン酸が増加し、飽和脂肪酸の含量はあまり変化しないからである。むしろ、増殖度が比較的悪いパルミチン酸を添加した場合に不飽和度の減少が目立っている。すなわち、一般に信じられているように膜の流動性を支配しているのは脂肪酸の不飽和度ではなくて、少なくともある場合には特定の不飽和脂肪酸の含有率の変化の方が重要であることがわかる。ここで見られる酵母の高温培養の場合には、おそらくパルミトレイン酸が膜の流動性を支配する最大の要因であり、その含量の低下が高温に伴う膜の流動性の上昇を防いで増殖を可能とすると考えられる。このことは Table1で見られるソルビトール+パルミトレイン酸添加培養の場合の不飽和度の値からも支持された。この場合、脂肪酸の不飽和度は30℃培養よりも40℃培養の方が有意に低い値を示した。先に述べたように、40℃におけるソルビトールの増殖効果はパルミトレイン酸によって抑制される。それはパルミトレイン酸を膜に取り込んで膜の流動性が上昇するためであると説明できる。ところが、不飽和度は40℃培養菌体の方が小さいという上記の事実と矛盾しているので不飽和度では膜の流動性との関係を説明できない。ここで、流動性を支配しているのはパルミトレイン酸であると考えると説明可能となる。このことはオレイン酸と違ってパルミトレイン酸を単独で添加すると菌は40℃では全

Table 1. Effects of supplements on the degree of fatty acid unsaturation in phospholipid fraction of *S. cerevisiae* cells

Supplements	Growth Temp. (°C)	$\frac{\text{UFA}}{\text{SFA}}$
None	30	2.9
Sorbitol	30	2.6
	40	3.1
Palmitic acid	30	2.5
	40	1.7
Oleic acid	30	2.9
	40	2.4
Sorbitol + Palmitic acid	30	2.5
	40	2.0
Sorbitol + Palmitoleic acid	30	2.2
	40	1.6
Sorbitol + Stearic acid	30	3.1
	40	2.6
Sorbitol + Oleic acid	30	3.3
	40	3.1

SFA: saturated fatty acid, UFA: unsaturated fatty acid

く増殖できないという先に示した事実と一致する。なぜ、パルミトレイン酸の方がオレイン酸よりも流動性に影響を与えるのであろうか、それに対する答えは今のところ一つしかない。それは炭素鎖長がパルミトレイン酸の方が二つ大きいためにその量的変化はオレイン酸のそれよりも流動性に大きな影響を与えるということである。次に問題となるのは、オレイン酸が増える理由である。パルミトレイン酸が減少するのはパルミチン酸からの生合成が抑制されるためであるとすれば fatty acid desaturase は共通であるからパルミトレイン酸による生合成阻害の程度が低くなりそのためにステアリン酸からオレイン酸の合成が進むものと推定される。その機構はともかく、オレイン酸が膜の流動性に全く影響しないとは考えられないので、オレイン酸が増えるのは、たとえばオレイン酸には膜の流動性とは直接関係のない高温における必須の役割があるのかもしれない。まだ不明の点は残るとしても本研究によって、膜の流動性は脂肪酸の不飽和度によって支配されるという一般に信じられてきた考え方が、少なくとも酵母の高温増殖には適用しないことが初めて示されたことになる。

次に、ソルビトール、パルミチン酸およびオレイン酸それぞれを添加して40℃で培養した場合の脂肪酸組成の変化 (Fig.3) の仕組みを考察して見る。40℃におけるソルビトールの増殖効果は、前にも述べたように、第一義的には膜の保護による安定化で説明できる。しかし、その増殖菌体の脂肪酸組成から判断すると、ソルビトールの保護下で増殖が開始されるとやがて高温に適した脂肪酸組成の変化、すなわちパルミトレイン酸の減少、それに伴うオレイン酸の増加が起こり高温下の増殖が一層確実になるものと考えられる。一方、この酵母では培

地への添加脂肪酸が直接菌体に取り込まれることが知られており、事実オレイン酸添加培養ではオレイン酸含量の増加が実証された。このことはとくに40°Cで顕著であり、これに伴ってパルミトレイン酸が著しく減少した。この現象は、前にも述べたようにこの菌の脂肪酸の最終産物であるオレイン酸によるfatty acid desaturase に対するフィードバック阻害によって説明できる。パルミチン酸添加の場合は、パルミトレイン酸の含量はむしろ増加した。取り込まれたパルミチン酸の不飽和化が進んだためと考えられる。第1部第1章で述べたように、パルミチン酸添加の場合、40°Cにおける菌の増殖がソルビトールやオレイン酸添加の場合より劣るのは、パルミトレイン酸の増加が原因であると考えられる。

次に、40°Cで増殖が認められなかったパルミトレイン酸およびステアリン酸とソルビトールを共存させた場合には菌体の脂肪酸組成がどのように変化するかを調べてみた (Fig. 4)。ソルビトールにパルミトレイン酸を添加すると、やはりパルミトレイン酸の顕著な増加が起こった。前記のように増殖はわずかながら認められたがソルビトール単独添加の増殖にははるかに及ばなかった。すなわち、ソルビトールにパルミトレイン酸が共存すると、パルミトレイン酸の取り込みによる膜の流動性の上昇が顕著でソルビトールによる膜の安定化が追いつかないことを示唆している。一方、ステアリン酸の場合は、ソルビトール単独添加とほぼ同様の結果が得られ、従って、ソルビトールが存在する場合、ステアリン酸の添加は増殖にも脂肪酸組成にも影響しないといえる。このことは、ステアリン酸単独添加では高温での増殖が見られなかったことと一致しており、ステアリン酸は菌体へ取り込まれに

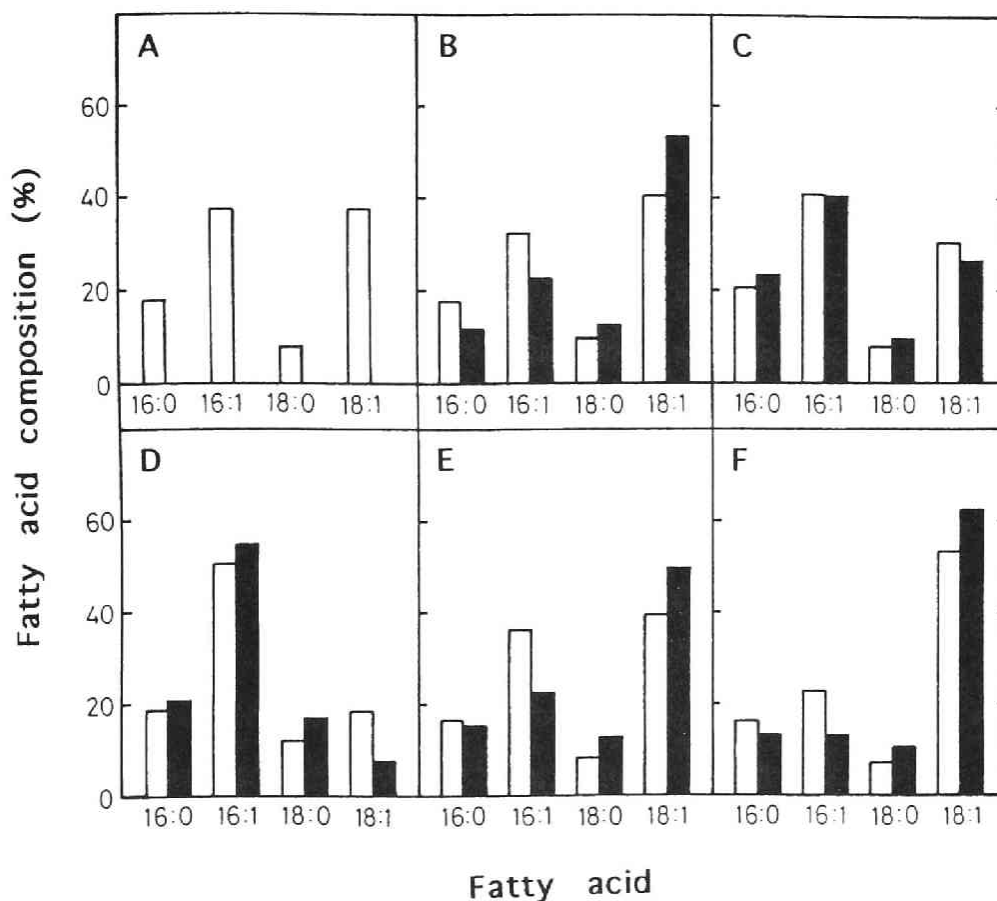


Fig. 4. Effects of growth temperature and supplements on fatty acid composition in phospholipid fraction isolated from *S. cerevisiae* cells.

The cells were grown to the late-log phase at 30°C (□) and 40°C (■) with or without supplements. A: control (without supplements at 30°C), B: with D-sorbitol, C: with D-sorbitol + palmitic acid (C<sub>16:0</sub>), D: with D-sorbitol + palmitoleic acid (C<sub>16:1</sub>), E: with D-sorbitol + stearic acid (C<sub>18:0</sub>), F: with D-sorbitol + oleic acid (C<sub>18:1</sub>)

くいか、もともこの酵母にとっては特に意味のない脂肪酸なのか、あるいはその含量を低く保つ必要があるのか、いずれかが原因であると思われる。

さらに、膜の流動性を支配するもう一つの重要な因子である遊離型ステロール含量を調べた。酵母の場合、ステロールは主としてエルゴステロールであることが知られているが、本酵母ではエルゴステロール以外のステロールも数種、しかもかなりの量が存在することがわかった (Fig. 5)。それらの中で特に多いのはガスクロマトグラフィーの保持時間から  $\Delta^{5,7}$ -エルゴスタジエン- $3\beta$ -オールと推定されるステロールである。 *S. carlsbergensis* ATCC 9080 でビタミンB<sub>6</sub>を含まない培地にビタミンB<sub>1</sub>を加えて培養した場合に、チトクロム b<sub>5</sub>や P-450 などミクロソームのチトクロムの欠乏によってC-22の不飽和化が抑制されてエルゴステロールの代りにこのステロールが蓄積することが Nishikawaら<sup>2)</sup> によって報告されている。

Fig. 5 は、ソルビトールおよびオレイン酸を添加して培養した菌体の全ステロール含量を測定した結果である。ソルビトールやオレイン酸を添加して菌を培養すると全ステロール含量は培養温度に関係なく減少した。その傾向はオレイン酸添加の場合に特に顕著であり、温度に関係なく全ステロール含量は対照の約 1/2 に低下していた。しかし分子種について見ると、40°C培養菌ではエルゴステロールの占める割合が減少し、代わって  $\Delta^{5,7}$ -エルゴスタジエン- $3\beta$ -オールと思われるステロールの含量が増加した。この傾向はソルビトール、オレイン酸いずれを添加した場合も同様であったが、オレイン酸添加培養の場合は、さらにエルゴステロールや  $\Delta^{5,7}$ -エルゴスタジエン- $3\beta$ -オールの

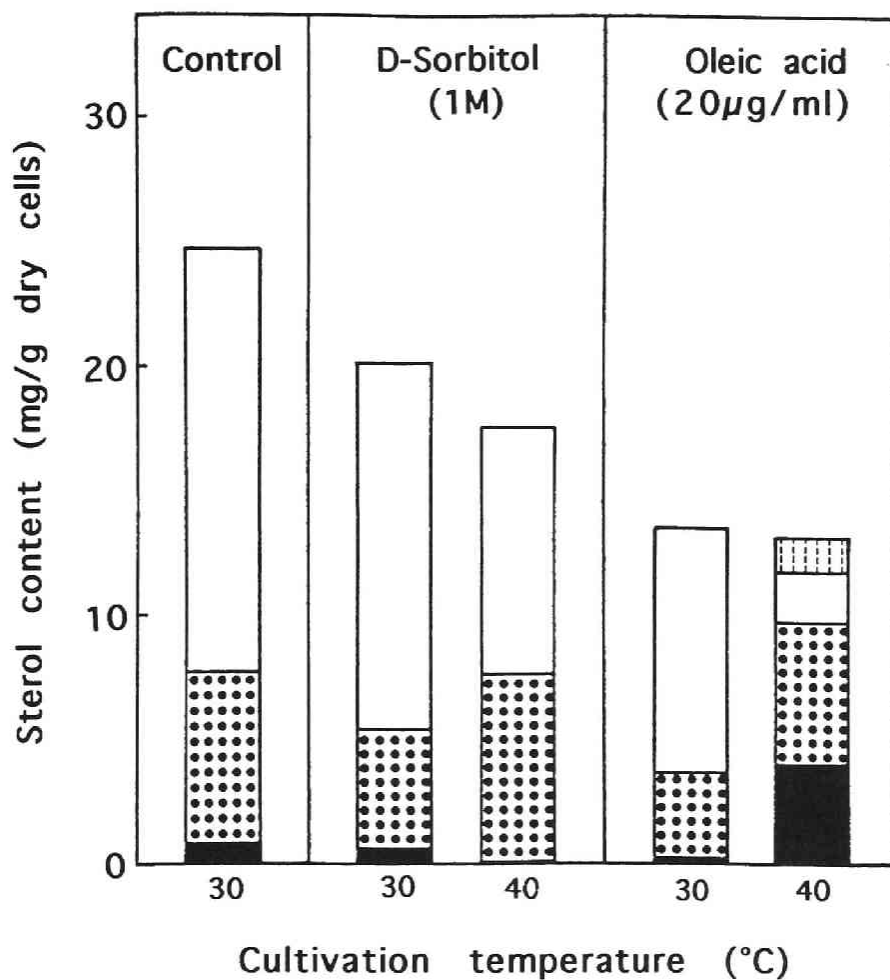


Fig. 5. Effects of growth temperature and supplements (D-sorbitol and oleic acid) on total sterol content and composition in *S. cerevisiae* cells.

: lanosterol     
  :  $\Delta^{5,7}$ -ergostadiene-3 $\beta$ -ol ?  
 : ergosterol     
  : squalene

前駆体であるラノステロール、さらにはスクワレンの蓄積が見られ、40°Cにおけるオレイン酸によるステロール合成の制御が顕著であることがわかった。脂肪酸合成の最終生成物が脂肪酸合成ばかりでなくステロール合成を制御し、それが高温で促進されることはきわめて興味深い事実である。また、ソルビトール添加の場合もその程度はオレイン酸の場合に比較して低いものの、同様の効果を示すことはソルビトール培養時に蓄積したオレイン酸がその原因であると考えられる。

以上のように菌体の全ステロールの合成は、とくに高温下、オレイン酸によって抑制されることが示された。一方、先にも述べたように膜には遊離型のステロールが存在し、エステル型のステロール(ステロールエステル)はグリセロールなどと共に細胞質で油滴を形成しているといわれているので、膜に局在する遊離型のステロールの含量を調べた。Fig. 6はその結果である。先の全ステロールの場合と異なり、遊離型ステロールはエルゴステロールのほかは $\Delta^{5,7}$ -エルゴスタジエン-3 $\beta$ -オールのみが存在し、ソルビトール、オレイン酸いずれを添加した場合も40°Cでその含量が増加していた。また、オレイン酸添加40°C培養菌ではエルゴステロールと $\Delta^{5,7}$ -エルゴスタジエン-3 $\beta$ -オールの含量の割合が他の場合と逆の関係にあり、後者の蓄積が目立った。

一方、30°C培養ではソルビトール、オレイン酸の添加によって全ステロール含量と同様、遊離型ステロール含量も減少した。特にソルビトール添加培養菌体での減少が著しく、ソルビトールの添加濃度に応じてステロール含量が大きく減少していることがわかる。このことは、L. Adlerら<sup>3)</sup>によっても報告されているように、30°Cではソルビトールによる高浸透圧のために細胞が萎縮したためと考えられる。膜が密



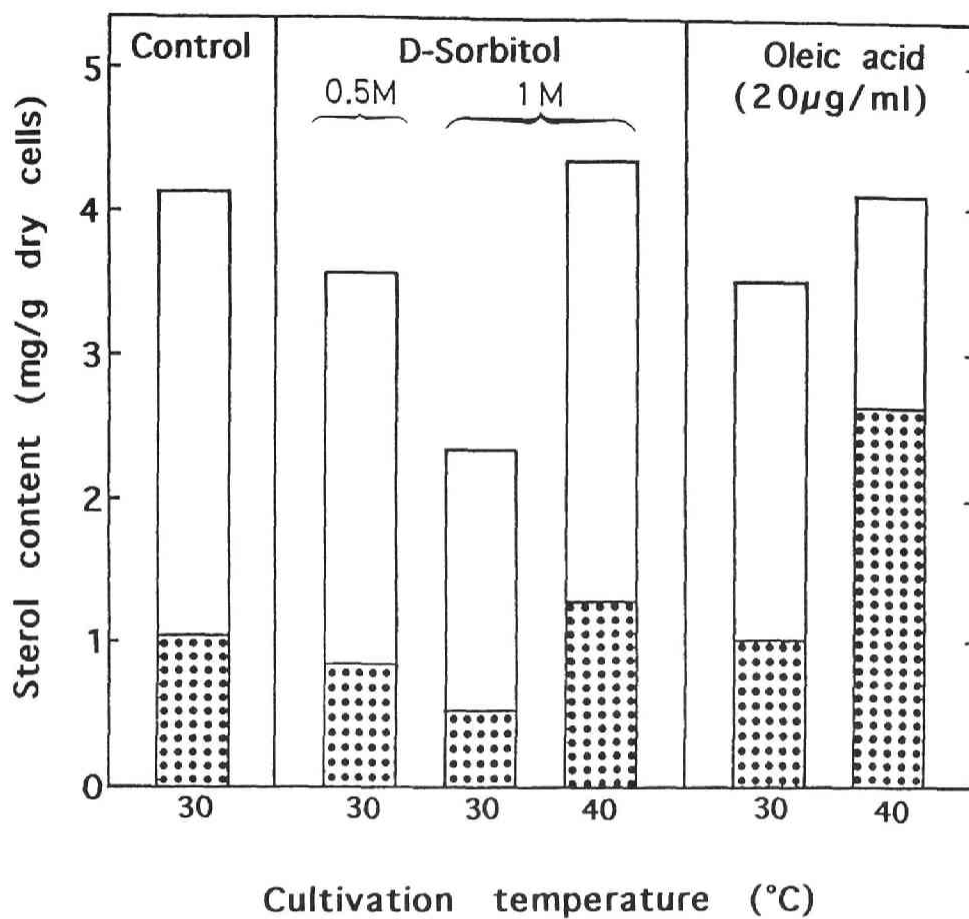


Fig. 6. Effects of growth temperature and supplements (D-sorbitol and oleic acid) on free sterol content and composition in *S. cerevisiae* cells.

□ : ergosterol      ▤ :  $\Delta^{5,7}$ -ergostadiene-3 $\beta$ -ol ?

となってその流動性が低下するのでそれを防ぐために遊離型ステロール含量の低下が起こったものと考えられる。

40°C培養でも、ソルビトール共存下では細胞が萎縮する傾向はあるはずであるが、それにもかかわらず高温による膜の流動性の上昇がそれにまさり、その上昇を防ぐために膜局在の遊離型ステロールの含量が増加したと考えられる。一方、オレイン酸の効果に関しては全ステロールのところで述べたように、オレイン酸添加の場合もステロール合成のフィードバック調節がかかっているにもかかわらず、40°Cでは膜の流動性の上昇を防ぐために膜への遊離型ステロールの配分が増えたことがわかる。これらの事実は、40°C培養ではパルミトレイン酸の減少だけでは高温による膜の流動性の上昇を防ぐのに不十分であり、膜の遊離型ステロールを増やす必要があることを示している。

## (2) アセチルCoA合成系の調節

第1部第1章で述べたように*S. cerevisiae*はソルビトールやオレイン酸またはパルミチン酸ばかりでなく酢酸塩(以下、単に酢酸という)によっても40°Cで増殖することができる。このことは、酢酸からアセチルCoAを経て脂質が合成される過程はもちろんのこと、ピルビン酸からアセチルCoAを供給する系を除く全ての代謝系が40°Cという高温に耐え得ることを示している。

オレイン酸などの脂肪酸を添加した場合は、そのまま膜に取り込まれたりあるいは適当に分解されて新たに必要な脂肪酸が合成されるから、ピルビン酸からアセチルCoAの供給は必要ではない。一方、ソル

ビトール添加の場合はどうであろうか。ソルビトールはこの酵母では資化されない。前から述べているように、高温によってもたらされる膜の流動性の上昇に対して膜を保護し、安定化する作用によって40°Cにおける増殖を可能としていると考えられる。しかし、増殖を維持するにはピルビン酸からアセチルCoAの供給が必要であり、ソルビトールはどのような機構でそれを可能としているのか、非常に興味ある問題である。その前に、ソルビトール存在下ではピルビン酸を経てアセチルCoAが供給されることを実証する必要がある。そこで、まずソルビトールを加えることによってグルコースからの脂質の合成が可能となることを明らかにするとともに酢酸から脂質が合成されることを確認するために以下の研究を行った。

## 実験方法

培養 *S. cerevisiae* ATCC 7753 をソルビトールまたは酢酸添加培地を用いて40°Cで常法により培養した。培養時にフラスコ(50ml培地を含む)当たり10 mmol ( $2.04 \times 10^5$  cpm) の [U- $^{14}$ C] -グルコースや 5 mmol ( $2.09 \times 10^5$  cpm) の [2- $^{14}$ C] -酢酸を加えて培養 40 h 後の脂質画分への放射能の取り込みを調べた。培養中に発生する $^{14}\text{CO}_2$ は培養フラスコ中に設けた容器中の 20% KOHに吸収させて除いた。

脂質の抽出 50 mg (乾燥重量)の菌体を集め、脱イオン水で2回洗浄後、第2部第1編第1章に記した方法でリン脂質画分を抽出した。

菌体およびリン脂質中の放射能の測定 集菌、洗浄した菌体およびリン脂質について、それらの放射能を液体シンチレーションカウンター

(Aloka LSC 1000)を用いて測定した。

## 結果と考察

Table 2 に示すように、ソルビトール添加40°C培養では、菌体に取り込まれたグルコースの 15.9 % が脂質の合成に使われ、その値は30°C無添加の対照( 16.1% )と一致した。このことは、ソルビトール添加培養では、40°Cでもグルコースからピルビン酸、アセチルCoAを経て脂質の合成が正常に進むことを示している。一方、40°Cで酢酸を添加して培養した時はグルコースからは脂質がほとんど合成されず、大部分が酢酸から合成されることがわかった。この場合グルコースが存在するから、酢酸の利用は抑制されるはずであるが、このような効果が見られたのはピルビン酸からアセチルCoA生成系が高温ではブロックされていることを支持している。このことは逆に40°Cでもソルビトールが存在するとピルビン酸からアセチルCoAがつくられ、脂質の合成が起こることを意味している。酵母におけるピルビン酸からアセチルCoAの生成については Fig. 7に示すように三つの経路が考えられる。一つはpyruvate dehydrogenase complex ( PDH complex ) (I) 関与の系であるが、これはミトコンドリアに局在して呼吸鎖とリンクしているので、40°C培養の場合は活性がないはずである。一方、嫌気性あるいは通性嫌気性の細菌では、pyruvate formate-lyase のように嫌氣的にピルビン酸からアセチルCoAの生成を触媒する酵素が存在する。酵母ではそのような酵素は知られていないが、高濃度( 1 M ≥ )のソルビトールを添加した培地では溶存酸素が減少して嫌氣的な状態になっていると考えられるので、このような嫌氣的なPDH (II) が働いている可能

Table 2. Effect of elevated temperature on lipid synthesis from glucose and Na-acetate in *S. cerevisiae* cells grown with sorbitol or Na-acetate

Culture	Additions	Radioactivity (cpm/100mg dry cells)		
		Whole cell (A)	Lipid fraction (B)	B/A (%)
30°C (control)	[U- <sup>14</sup> C] Glucose	9834	1584	16.1
40°C, sorbitol	[U- <sup>14</sup> C] Glucose	10000	1591	15.9
40°C, acetate	[U- <sup>14</sup> C] Glucose	10269	218	2.1
	[2- <sup>14</sup> C] Acetate	17333	9560	55.2

Details are described in the text.

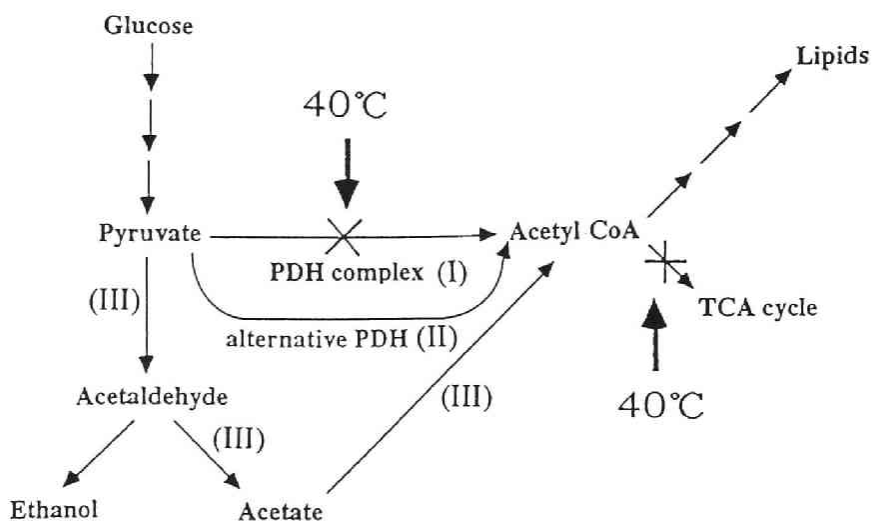


Fig. 7. Possible pathways of lipid biosynthesis from glucose via pyruvate-acetyl CoA at 40°C in *S. cerevisiae* cells.

The metabolic steps marked with X should be blocked at 40°C, because mitochondria are not developed and respiratory activity is extremely lowered at the elevated temperature.

性は否定できない。また、PDHとは別に (III) の経路、すなわち pyruvate decarboxylase (PDC)、 aldehyde dehydrogenase (ALDH) および acetylCoA synthetase (ACS) の作用で、ピルビン酸からアセトアルデヒド、酢酸を経てアセチルCoAを生成する代謝系が考えられる。40°Cでもエタノール発酵は進む(第2編第3章)からPDCは働くはずであり、また、酢酸を利用できるから当然ACSは存在する。従って、この系でソルビトール共存下初めて活性となる酵素があるとすればALDHということになる。ソルビトール添加で培地の浸透圧が上昇すると菌体内にグリセロールが蓄積することが知られており、グリセロールはグルコースからNADHの消費を伴って生成する。ここで、菌体内のNAD<sup>+</sup>/NADHのバランスを考えてみると、解糖系で生じたNADHは通常アルコール発酵で脱水素されてNADが再生されることになるが、前記のように40°C培養でアルコール発酵は盛んに行われていることからNAD<sup>+</sup>/NADHのバランスは保たれている。ところで、先の菌体内のグリセロール生成の際に消費されるNADHは、アセトアルデヒドから酢酸が生成される際に生じるNADHによって補われると考えると、ソルビトール存在下、ピルビン酸からアセトアルデヒド、酢酸を経てアセチルCoAが生成する経路(III)が働くことがうまく説明できる。ソルビトール添加培養で (II) と (III) いずれの経路が働くのか、今後の大きな研究課題である。

## 要旨

高温(40°C)下合成培地で*S. cerevisiae* ATCC 7753は、(1)ソルビトールなどを培地に加え、その浸透圧を上げることによって膜を保護して

安定化するか、あるいは(2) 適当な脂肪酸(パルミチン酸またはオレイン酸)を与えると、いずれの場合も高温に適した膜脂質組成への変化が起こり、その結果、膜の流動性の上昇が防がれて増殖可能となることが示された。ソルビトール添加培養ではパルミトレイン酸含量の低下と、これに伴うオレイン酸含量の増加が起こり、遊離型ステロール含量の上昇も認められた。一方、オレイン酸添加培養ではオレイン酸含量の増加に伴いパルミトレイン酸の含量が低下し、遊離型ステロール含量も上昇した。すなわちソルビトール、オレイン酸はともに同様の脂質組成を与えることがわかった。従って、高温での膜の流動性の低下に大きな役割を果たしているのは、パルミトレイン酸の減少と遊離型ステロールの増加であることが示された。パルミトレイン酸が流動性に最も大きな影響を与えることは、パルミトレイン酸添加によって高温増殖が完全に阻害されることから明らかであり、またパルミチン酸を添加した場合は、菌体に取り込まれたパルミチン酸の不飽和化が進みパルミトレイン酸の含量が増え、そのために高温下の菌の増殖がオレイン酸添加時に比べて著しく劣ることによっても支持された。以上の結果は、従来膜の流動性の指標とされてきた脂肪酸の不飽和度よりも特定の脂肪酸(本研究の場合はパルミトレイン酸)含量の方が、膜の流動性への寄与が大きいという全く新しい考え方を提示している。

また、酢酸が40°Cにおける本酵母の増殖を可能にすることから、40°Cではピルビン酸からのアセチルCoAの供給がネックになっていると考えられた。酢酸添加培養の場合、脂質の合成はもっぱら酢酸からのみ起こり、グルコースからの脂質への取り込みはほとんど認められなかったもので上記のことが立証された。一方、ソルビトール添加の場合はグ



ルコースからの脂質合成、言いかえるとピルビン酸からのアセチル CoAの合成が進むことがわかり、その経路と機構について考察を加えた。

## 文献

1. Nagai, J., Katsuki, H., Nishikawa, Y., Nakamura, I., Kamihara, T. and Fukui, S. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 555-560.
2. Nishikawa, Y., Kamihara, T. and Fukui, S. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **531**, 86-95.
3. Tunblad-Johansson, I., Andre', L. and Adler, L. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **921**, 116-123.

## 第2章 *Saccharomyces* 酵母の低温適応

生物の中には低温にさらされると高温の場合とは逆に不飽和脂肪酸の合成を進め、それらをリン脂質に取り入れることによって膜の流動性の低下を防ぎ、効率よく生命を保つことができるものがある。例えば植物の場合、冷害の程度は脂肪酸の飽和度に依存するところが大きいと言われている。すなわち、不飽和脂肪酸含量が多い植物、あるいはリン脂質の不飽和脂肪酸の割合を増やすことができる植物ほど冷害に強いわけである。

*Saccharomyces* 酵母を比較的低温で培養した場合、果たして不飽和

脂肪酸の含量が増えるであろうか。第1章の高温適応の結果から推測すれば、低温の場合には膜の流動性が低下するから、これに適応するためにパルミトレイン酸が増えることが予想される。しかし、第1部第3章に記したように、15~25°Cの低温でパルミトレイン酸を培地へ添加しても増殖促進効果は認められなかった。そこで、30°C培養を対照としてそれよりも10°C低い20°Cで培養した菌体の脂質組成を40°C適応の結果(第1章)と対比することによって、培養温度と脂質組成との関係の普遍性を知ることを目的として研究を行った。

## 脂質組成の変化

### 実験方法

培養 温度を20°Cにしたほかは、第1部第3章と同様の条件で *S. cerevisiae* ATCC 7753 を培養した。

全脂質の抽出、リン脂質、遊離型ステロールおよびステロールエステルの抽出と分画 第2部第1章と同様の方法によった。

トリアシルグリセロールとその構成脂肪酸の抽出と分画 第1章で薄層クロマトグラフィーによって遊離型ステロールとステロールエステルを分画したときに薄層板上に同時に現われたトリアシルグリセロールのバンドをかき取って、クロロホルム・メタノール(1:1)で抽出した後、アルカリ性メタノールでケン化して脂肪酸画分を得た。

ステロールおよび脂肪酸の分析 第1章と同様にガスクロマトグラフィーによって行った。

## 結果と考察

Fig. 1-A は全脂質の脂肪酸組成を各培養温度で比較したものである。20°Cの低温では顕著にパルミトレイン酸が増加しており、これに伴うオレイン酸の減少がみられた。予想通り、高温培養とは逆に低温では膜の流動性の低下にตอบสนองしてパルミトレイン酸の減少が起こることが示された。そこで高温の場合と同様、膜の変化を反映すると考えられるリン脂質の脂肪酸組成を調べた(Fig. 1-B)。20°C培養菌は30°C培養の対照菌とほぼ同様のリン脂質脂肪酸組成を示し、全脂質の脂肪酸の場合とは対照的にパルミトレイン酸の増加はみられなかった。一方、ステロールについては Fig. 2 に示したように20°Cでは全ステロール含量は30°Cよりやや減少しているが、膜に局在する遊離型ステロール含量はむしろやや増加していて、少なくとも30°Cより含量が減少していることはなかった。以上、リン脂質の脂肪酸組成と遊離型ステロール含量の結果から20°Cにおける膜の流動性は30°Cの場合とほとんど同程度に調節されていると考えられる。そこで、全脂質におけるパルミトレイン酸の増加がリン脂質以外のどの画分で起こるのかを調べた。その結果、Fig. 3 に示すようにトリアシルグリセロールとステロールエステル画分にパルミトレイン酸が多く存在することがわかった。前にも述べたようにこれらの脂肪酸エステルは、貯蔵脂質として細胞質で油滴の状態が存在する。20°Cでは低温に適応してパルミトレイン酸の合成が盛んとなるが、それが膜に配分される段階でその大部分が貯蔵型として細胞質内に留まると考えられる。第1部第3章で述べたように*Saccharomyces* 酵母では15~25°Cの低温では増殖の開始や速度が遅くなるが、最高増殖度は30°Cとほとんど変わらず、またパルミトレ

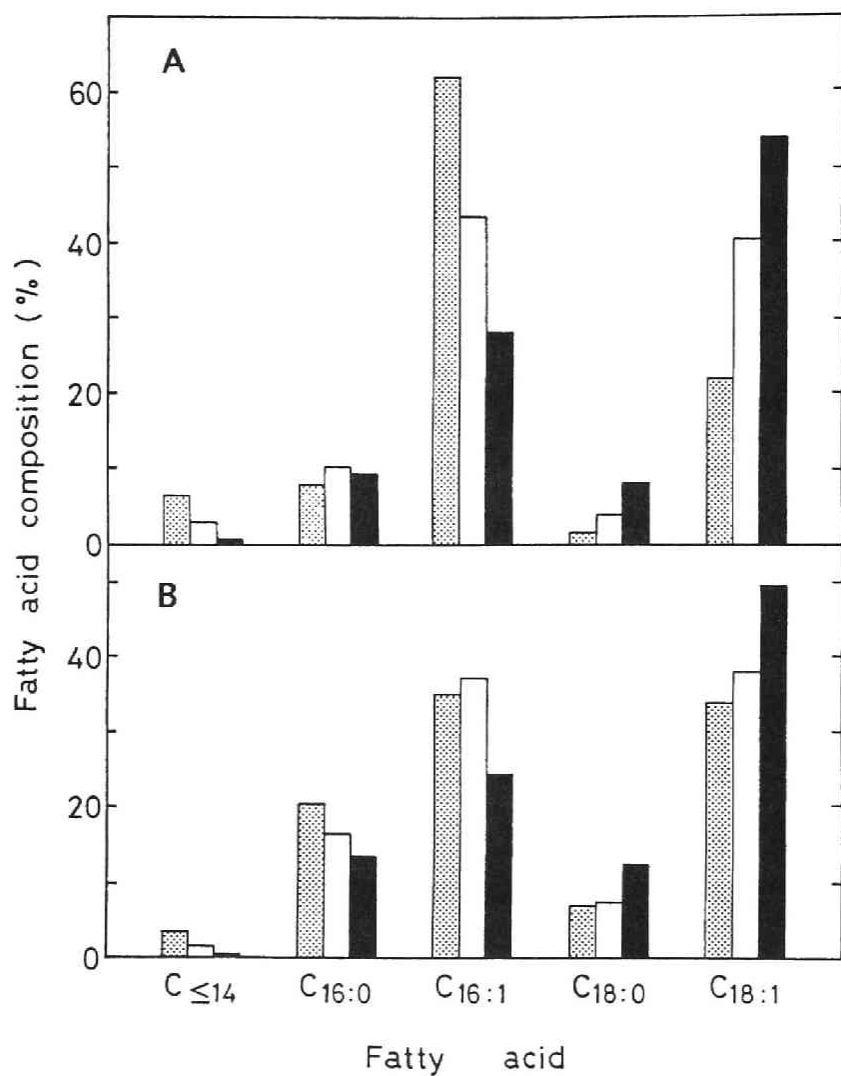


Fig. 1. Effects of growth temperatures on fatty acid composition in the total lipid (A) and in the phospholipid fraction (B) of *S. cerevisiae* cells.

Cells were grown at 20°C (▨), 30°C (□) and 40°C (■) supplemented with 1M D-sorbitol.

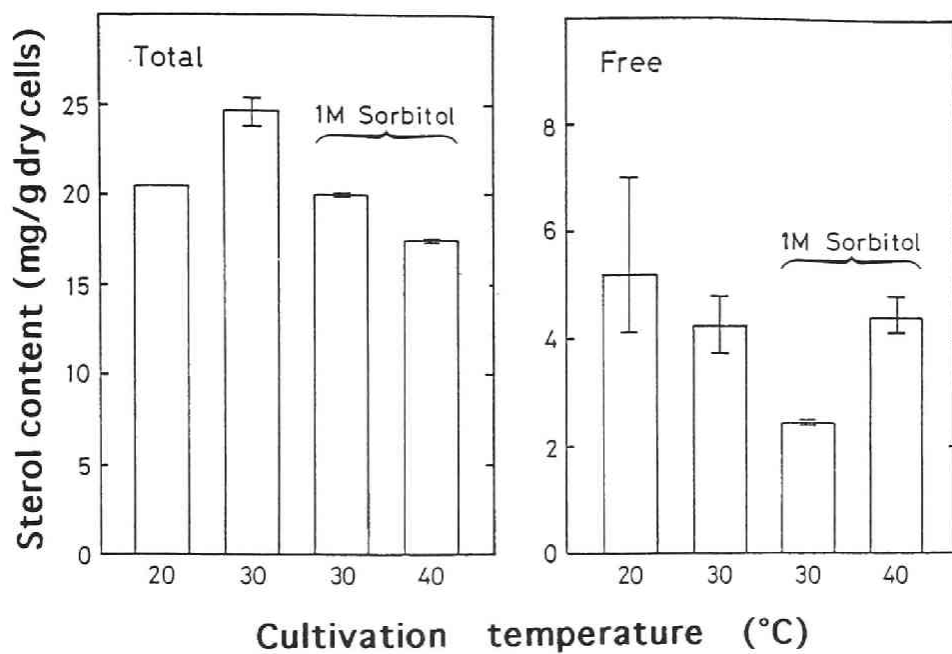


Fig. 2 Effects of growth temperatures and supplements on total sterol and free sterol content in *S. cerevisiae* cells.

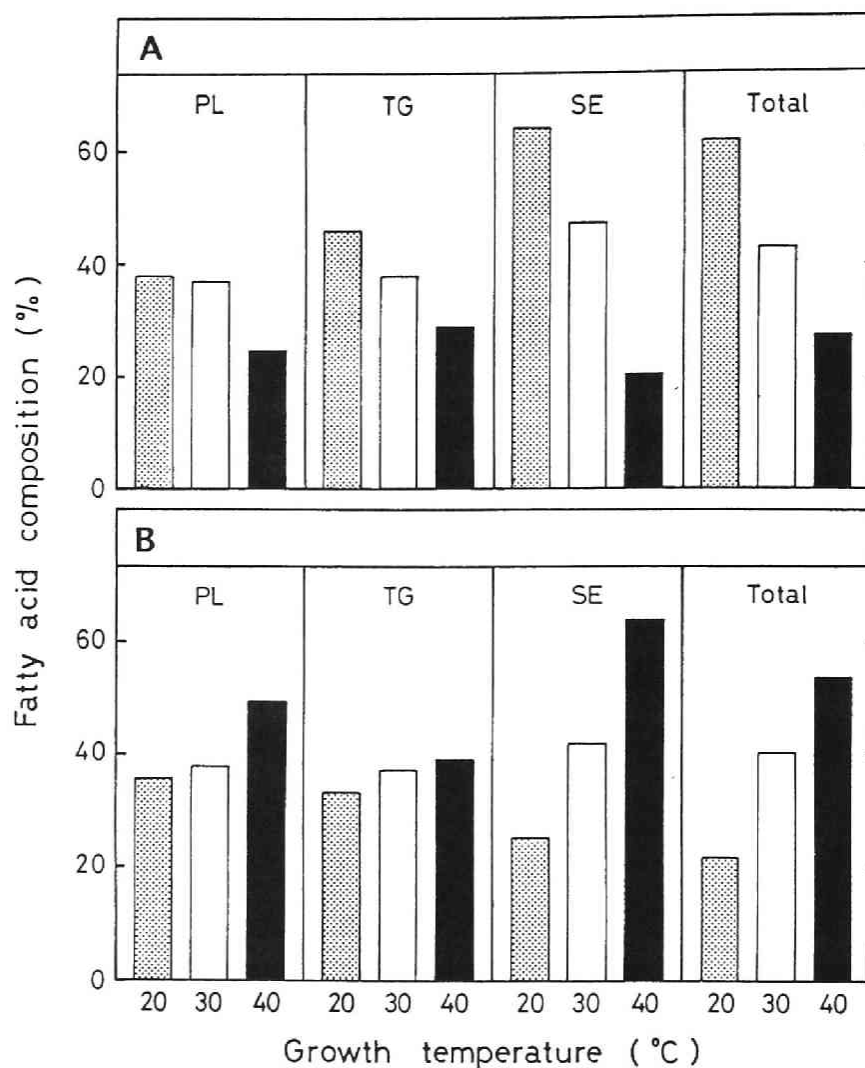


Fig. 3. Palmitoleic acid (A) and oleic acid (B) composition in the total lipid and individual lipid classes of *S. cerevisiae* cells.

Cells were grown in defined medium (see the text) without supplement at 20°C (▨), 30°C (□) and with 1 M D-sorbitol at 40°C (■).

PL: phospholipid, TG: triacylglycerol, SE: sterol ester.

イン酸の添加による増殖促進効果もみられなかったことからこの温度範囲でも30°Cに比べて膜の流動性は低いと考えられるが、その程度の流動性の変化は増殖にとって決定的な影響を与えないのか、あるいは低温の場合は流動性以外の要因が増殖を支えているのかもしれない。

*S. cerevisiae* における温度、特に低温(15°C)に伴う脂質変化についてRoseら<sup>1)</sup>は、トリアシルグリセロールとリン脂質の含量が増え、ステロールの合成が抑えられることを指摘している。また、最近ではSuutarisら<sup>2)</sup>が、数種の酵母の温度適応における全脂質の脂肪酸の役割について報告しており、その中で *S. cerevisiae* は低温(10~20°C)ではパルミトレイン酸の増加によって適応していると述べている。全脂質におけるパルミトレイン酸の増加という点では本論文の結果と一致しているが、かれらは、膜を構成しているリン脂質の脂肪酸については何も述べていない。

## 要旨

*S. cerevisiae* における増殖温度と膜脂質組成の関係を明らかにするために *S. cerevisiae* ATCC 7753を用いて、先の高温(40°C)培養と同様の方法で低温(20°C)における脂質適応の状態を調べた。低温でも高温と同様、全脂質ではパルミトレイン酸とオレイン酸の量の変化による適応が見られた。すなわち低温では高温とは逆にパルミトレイン酸が増加し、それに伴ってオレイン酸が減少した。しかし、高温の場合とは異なり、膜局在のリン脂質では脂肪酸組成の変化はほとんど無く、対照(30°C培養)とほぼ同じ組成を示した。また、遊離型ステロール含量にも顕著な差は見られなかった。一方、低温培養におけるパルミト

レイン酸の増加は、細胞質に存在する貯蔵型の脂質画分(トリアシルグリセロールとステロールエステル)、特にステロールエステル画分に顕著であることがわかった。以上のことから、低温でもその温度に適応してパルミトレイン酸の合成が盛んになり、それに伴ってオレイン酸が減少するが、その大部分は膜(リン脂質)へ配分されることはなく貯蔵型として存在することが明らかになった。すなわち、低温では膜脂質レベルでの温度適応はほとんど起こらないという点で高温の場合と大きく違っていた。脂質の合成は温度に敏感であるが、膜への配分の段階で必要性がチェックされるという興味ある調節機構の存在が明らかになった。

## 文献

1. Hunter, K. and Rose, H. A. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 260, 639-653.
2. Suutari, M., Liukkonen, K. and Laakso, S. (1990) *J. Gen. Microbiol.* 136, 1469-1474.

## 第3章 *Phaffia rhodozyma* の高温適応

*Ph. rhodozyma* は第1部第2章でその増殖について述べたように15°C~23°Cという比較的低温を好む酵母であり、27°Cを超えると通常の場合では増殖できない。種々の条件を検討したが、この酵母を28°Cで再現性よく生育させるには、今のところ接種量を $10^8$  cells/mlまで増



やすしか方法がない。多くの微生物は、悪い環境条件では接種量高めると増殖できることが知られている。先に述べたように様々なことが考えられるがその本当の理由はわかっていない。Saccharomyces 酵母の高温適応の場合にならってPh. rhodozyma についても脂質の分析を行い、この菌における高温適応の機構を膜脂質の面から探ってみた。一方、この酵母は菌体内にアスタキサンチンを蓄積することがよく知られており<sup>1)</sup>、このカロテノイド色素は種々の面で応用が期待される有用物質である<sup>2)</sup> ことからその生産については広く関心が持たれている。この色素は細胞内に蓄積され、その量は対数増殖後期から定常期にかけて急に増え始める。アスタキサンチンなどのカロテノイドはラジカルスカベンジャーとしての機能が知られている。比較的高温ではヒドロキシルラジカルやそれによって生じる過酸化脂質によって細胞機能が障害を受け増殖が阻害されるとしたらアスタキサンチンにはこれを防ぐ作用があると考えられる。通常は定常期の菌を接種するので、定常期でアスタキサンチンの菌体含量が高いことは、高接種量では28℃での増殖が可能となることの一つの理由になるかもしれない。そこで菌を23℃と28℃で定常期まで培養し、そのアスタキサンチンを抽出して含量を比較した。

## (1) 脂質組成の変化

### 実験方法

培養 第1部第2章と同様の方法で行ったが、本培養での接種量は23℃で $10^6$  cells/ml、28℃では $10^8$  cells/mlとした。

全脂質の抽出およびリン脂質の抽出と分析 いずれも第2部第1章の *Saccharomyces* 酵母の場合と同様の方法で行った。

全ステロールの抽出および分析 全ステロールは本編第1章の *Saccharomyces* 酵母の場合と同様に抽出した。分析には、日立 L-4200 の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた。カラムはSTR ODS-M (4.6 mm×25 cm)、溶媒はアセトニトリルを使用し、流速は1 ml/min、カラム温度は40°C、波長は210 nm とした。

遊離型ステロールとステロールエステルの抽出および分析 菌体50 mg (乾燥重量)を凍結乾燥後、ジメチルスルホキシド(DMSO) 2 mlで100°C、1 h インキュベートし、NaCl 3 g を含むメタノール、水の混合液(1:4)10 mlを加えた。この混合液からヘキサン10 ml で脂質を抽出した。抽出は3回繰り返す、抽出液を合わせて減圧乾固した。これ以降の操作は、本編第1章の *Saccharomyces* 酵母の場合と同様に行い、得られた中性脂質を薄層クロマトグラフィーで遊離型ステロールとステロールエステルに分画し、HPLCで分析した。

## 結果と考察

### 28°C培養における脂肪酸組成の変化

23°Cと28°C培養した酵母の菌体内全脂肪酸組成を比較した(Fig. 1)。本酵母では *S. cerevisiae* と異なり、パルミトレイン酸が極端に少なく、代わりに多価不飽和脂肪酸のリノール酸( $C_{18:2}$ )とリノレン酸( $C_{18:3}$ )が存在する。対数中期においては、28°Cでは23°Cに比べてパルミチン酸が増え、オレイン酸が顕著に増える一方、リノール酸の減少とリノレン酸の顕著な減少が見られた。つまり、28°Cでは脂肪酸の

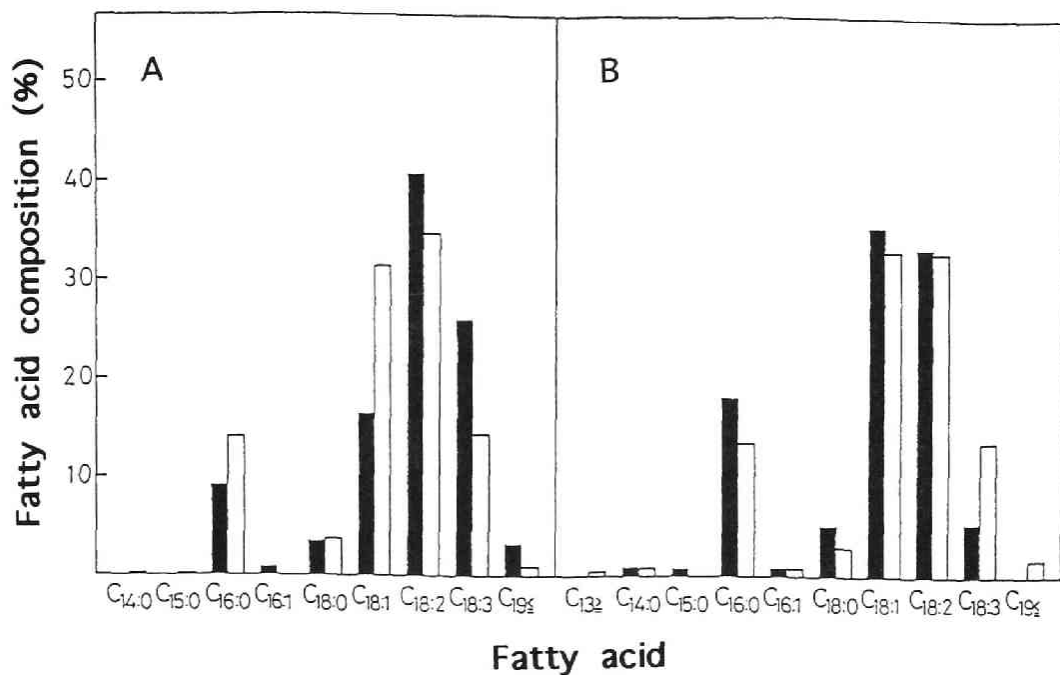


Fig. 1. Total fatty acid composition in *Ph. rhodozyma* cells.

Cells were grown at 23°C (■) and 28°C (□) to the middle-log phase (A) and the late-log phase (B).

合成そのものは膜を硬くする方向に進んでいるといえる。しかし、対数後期になると、23°Cと28°Cではそれほど大きな差は見られず、28°Cではむしろパルミチン酸が減り、リノレン酸の割合が増えていた。このことは、28°Cでも増殖が進むと、異常な温度に適した脂肪酸を合成する必要がなくなったことを意味する。次に、Fig. 2 に膜を構成しているリン脂質の脂肪酸組成について示す。28°C培養では対数中期にパルミチン酸が増えリノレン酸が減少し、ここでも高温適応が認められたものの全脂肪酸組成に比べてそれほど大きな差は見られなかった。このことは*S. cerevisiae* の低温適応の場合と同様に、温度に適応した脂肪酸合成の調節と、膜リン脂質への脂肪酸の配分の調節に違いがあることを示唆している。対数後期で比較すると、28°Cでは顕著にリノール酸が減っていた。もともとこの菌に多いこの不飽和脂肪酸を減らすことによって高温での膜の流動性の上昇を防いでいるものと思われる。予想に反し、28°Cでリノレン酸が増えていたが、この脂肪酸の含有率は小さいので流動性への影響は少ないと思われる。対数後期の全脂質画分を除いて、28°C培養では *S. cerevisiae* の40°C培養の時と同様に、オレイン酸が増加した。リノール酸はステアリン酸からオレイン酸を経て合成されるのでリノール酸の減少に伴ってオレイン酸が蓄積したためか、あるいは膜の恒常性を保つのにある程度の不飽和脂肪酸の存在が必要であるためか、それとも *S. cerevisiae* の40°C培養で論じたようにオレイン酸には何か他の脂肪酸では代替できない本質的な役割があるためかもしれない。

#### 28°C培養におけるステロール含量の変化

リン脂質のアシル基と並んで膜の流動性に影響を与える重要な因子

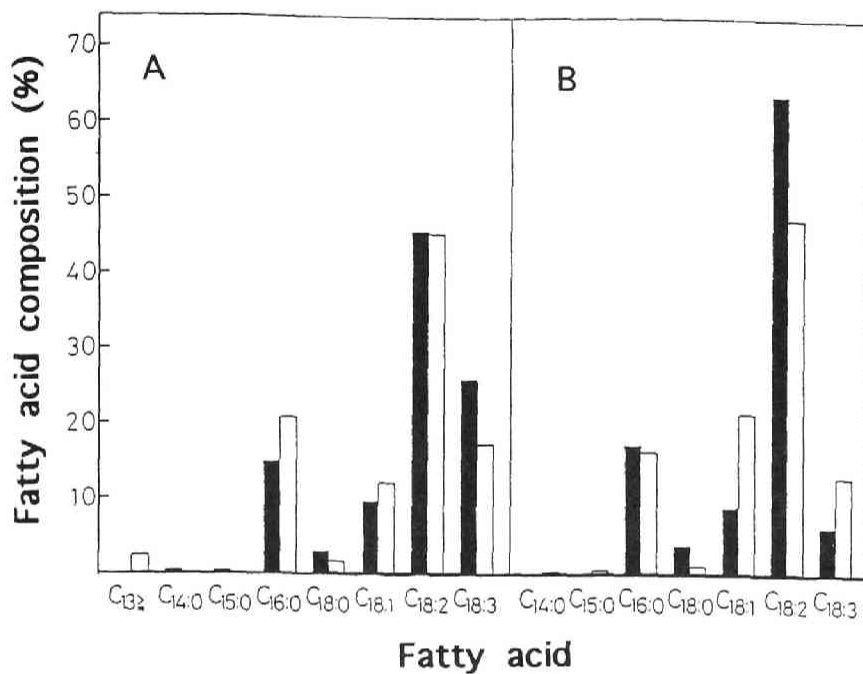


Fig. 2. Fatty acid composition in phospholipid fraction isolated from *Ph. rhodozyma* cells.

Cells were grown at 23°C (■) and 28°C (□) to the middle-log phase (A) and the late-log phase (B).

であるステロールの含量について28°C培養の効果を調べた。28°Cでは全ステロール含量が顕著に増加していた( Fig. 3-A, B )。高温による膜の流動性の上昇を防ぐためにステロール合成が促進されたと考えられる。次に、膜の流動性を直接制御する遊離型ステロールの含量を調べた( Fig. 3-A )。28°Cでは遊離型ステロールも増えており、膜の流動性の上昇を防ぐために、合成されたステロールが実際に膜に配分されていることがわかる。しかし、それでも膜に存在しない貯蔵型のステロールエステルの増加の方が顕著であった( Fig. 3-B )。従って、不飽和脂肪酸の場合とは異なり、温度の上昇に適応して合成されたステロールの少なくとも一部は実際に膜に配分されて、流動性の上昇を防ぐために使われるが、*Saccharomyces* 酵母に比べるとその程度は低いと推定される。膜への脂質の配分の効率が悪いことが、*Ph. rhodozyma* が28°Cという決して高温とは思えない温度でも生育できない理由の一つかもしれない。なお、本菌のステロールにはエルゴステロールのほかに*S.cerevisiae*の場合と同様、その前駆体と思われるものが何種類か含まれていることがわかった( Fig. 3 )。しかもそれらの量が培養温度および増殖時期によって著しく変化することは興味深い、それらの同定ならびに生理的役割については今後の研究をまたねばならない。

## (2) アスタキサンチン含量の変化

### 実験方法

アスタキサンチンの抽出および分析      菌体(乾燥重量5~10 mg) を凍

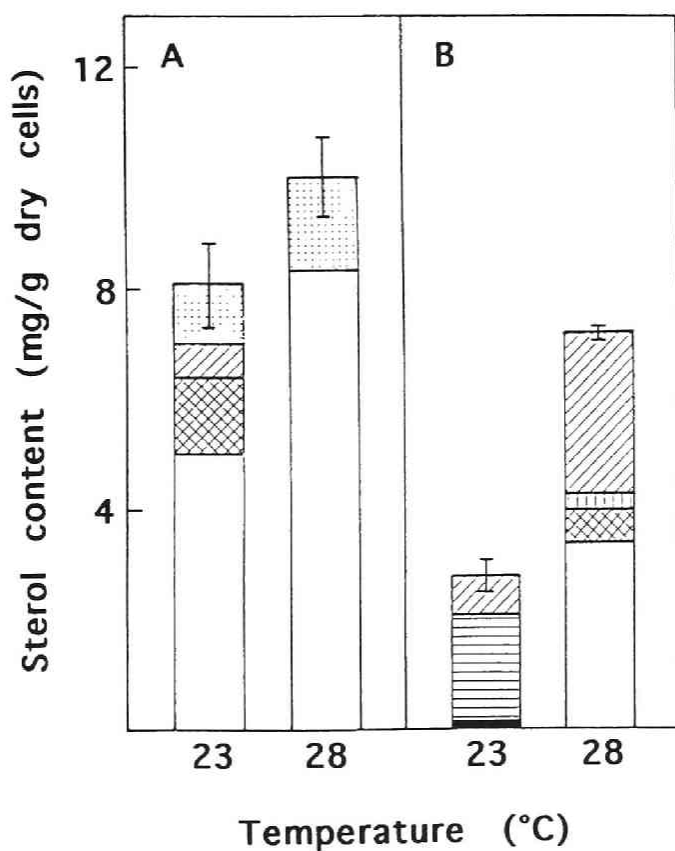


Fig. 3. Sterol content in *Ph. rhodozyma* cells grown at 23°C and 28°C.

Cells were cultivated at 23°C and 28°C to the late log phase. Each value is the mean of duplicates. (A) free sterol; (B) esterified sterol; (□), ergosterol; unidentified sterols are indicated as follows; (▤), (▥), (▧), (▨), (▩), (▪).

結乾燥後、DMSO 1 ml を加え、時々攪拌しながら超音波で 1 h 処理した。氷冷下でベンゼン 1 ml を混和し、氷冷した飽和 NaCl 水溶液 1 ml を加えて遠沈した。ベンゼン層を分取し、さらに非水系フィルターでろ過し、得られたアスタキサンチンを含む画分をHPLCで分析した。カラムは Shodex Silicapak E-411 (4.6 mm×25 cm) を用い、溶媒にはベンゼン/メタノール ( 99:1, vol/vol ) を使用した。流速は1 ml/min、カラム温度は 25°C、波長は 488 nmとした。

## 結果と考察

アスタキサンチンの菌体含量を23°Cと28°C培養で比較した結果を Fig. 4 に示す。28°C培養ではアスタキサンチン含量の顕著な増加が認められた。アスタキサンチンの菌体内での所在やその役割については今のところわかっていないが、28°Cで含量が増えた理由については次のように考えられる。すなわち、培養温度が上がると活性酸素の発生量が増え、その結果、膜脂質の過酸化が不飽和脂肪酸の二重結合の部分で起こり切断されて、膜の流動性が上昇するといわれている<sup>9)</sup>。従って、この菌ではラジカルスカベンジャーとしてのアスタキサンチン<sup>3, 4)</sup>を増やすことにより、膜脂質の過酸化を抑えて高温下における流動性の上昇を防いでいるのではないかと考えられる。

## 要旨

酵母 *Ph. rhodozyma* の高温(28°C)適応が、*Sacchromyces* 酵母と同じように膜脂質の変化によってなされていることが示された。28°Cでの培養では23°C培養に比べて菌体のリン脂質画分ではリノール酸含量



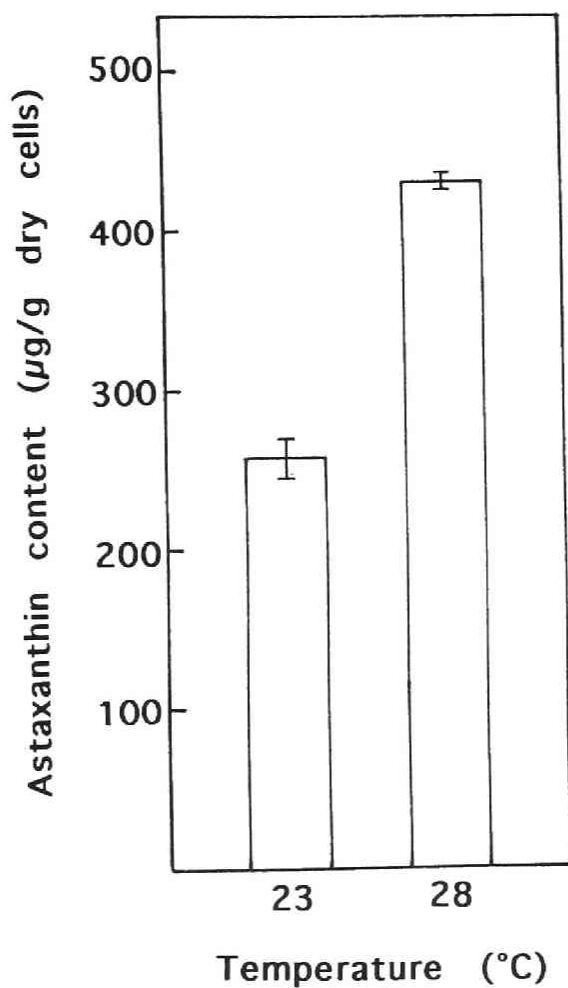


Fig. 4. Astaxanthin content in *Ph. rhodozyma* cells grown at 23°C and 28°C.

Cells were cultivated at 23°C and 28°C to the stationary phase. Each value is the mean of duplicates.

の減少が起こり、一方、遊離型ステロール含量の増加が見られた。しかし *Saccharomyces* 酵母ほどに顕著な変化は認められなかった。さらに、この酵母に特異的に存在するアスタキサンチンの菌体内含量が28℃培養で顕著に増えたことは、この菌の高温適応の一つの表われであることが示唆された。

## 文献

1. Johnson, E. A. and Lewis, M. L. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 115, 173-183.
2. Johnson, E. A., Villa, T. G. and Lewis, M. J. (1980) *Aquaculture* 20, 123-134.
3. Kurashige, M., Okimasu, E., Inoue, M. and Utsumi, K. (1990) *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR.* 22, 27-28.
4. 松野隆男, 幹 渉 (1990) 化学と生物 28, 219-227.
5. 宮沢陽夫 (1991) 化学と生物 29, 798-806.

## 第 2 編 高温下の呼吸と発酵

### 第 1 章 呼吸活性低下と呼吸欠損変異の誘発

1956年にYčas<sup>1)</sup> は、*S. cerevisiae* で 高温(40℃) によって呼吸欠損(RD)変異がもたらされることを、最初に発見した。その後1959年に Sherman<sup>2)</sup> は本酵母を6YD培地を用いて40℃で培養するとほとんど

100 % に近い高率でRD変異株ができることを明確に示した。ここではこれを確かめるとともに、高温では一般に呼吸は低下するがRD変異の頻度は培養条件に依存することを示し、さらに、合成培地においてもRD変異が高頻度で現われることを発見したのでその結果を述べる。

### (1) 天然培地におけるRD変異の誘導

#### 実験方法

培養 *S. cerevisiae* ATCC 7753 および耐熱性変異株 *S. cerevisiae* JK 313 につき、第1部第1章に示した3種類の培地、YPD、YPDAm、6 YD培地を用い、それら5 ml(25×200 mm 試験管)、50 ml、120 ml(500 ml 三角フラスコ)に、 $10^5$  cells/mlになるように接種し、30°Cまたは40°Cで振とう培養(120 strokes/min)を行った。

RD変異株の検出 培養液を適当に希釈し、寒天平板培地 [0.3% 酵母エキス、0.35% ペプトン、0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% グルコース、2% グリセロール、2% 寒天] 上に塗布し、30°Cで3日間培養した。RD変異株は正常菌に比べて小さなコロニーを形成するので容易に検出することができるが、これをさらに正確に判定するために以下の二つの方法で調べた。

#### (1) トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) の還元能<sup>3)</sup>

TTC 0.1% を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に寒天を1.5% になるように溶かし、これをコロニーを形成した寒天平板上に重層して約 2 h、30°C に保ち、コロニーの発色を観察した。正常菌は還元されてトリフェニルホルマゼンを生じ、

赤色になるが、RD変異株はTTCを還元できないのでコロニーは白色のままである。

## (2) グリセロール資化能

酵母はグリセロールを嫌氣的に代謝しないのでRD変異株はグリセロールを資化できない。このことを利用して寒天平板上で得られた小さなコロニーから菌を採取して2.5%グリセロール含む合成培地における生育の有無を調べた。

無細胞抽出液の調製 菌体 200 mg を2回水洗後、50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) 7 ml に懸濁し、ガラスビーズ (0.45~0.5 mm) 10 g を用い、ブラウンホモジナイザーで90 sec 処理し、得られたホモジネートを1,000 × g で10 min 遠沈してその上清を無細胞抽出液とした。

Cytochrome oxidase 活性測定 0.8 mM チトクロム c 1.9 ml に、13 mM アスコルビン酸 0.1 ml を加え、チトクロム c を還元型にした。その550 nm における吸光度の減少速度を測定してcytochrome oxidase 活性とした。1 μmol のチトクロム c を1 min に酸化する酵素の量を1 unit とし、1 mg タンパク質当たりの unit 数で比活性を表した。

タンパク質の定量 ウシ血清アルブミンを標準試料としてバイオラッドタンパク質定量法によって行った。

アミノ酸分析 京都大学理学部分析センターに依頼し、日立835 Analyzer で分析した。

## 結果と考察

40°Cで天然培地におけるRD変異の頻度を種々の酵母を用いて調べ

た。耐熱性変異株 *S. cerevisiae* JK 313 以外はその値は低かったので Table 1 に *S. cerevisiae* ATCC 7753 と *S. cerevisiae* JK 313 の結果のみを示す。培養条件に関係なく ATCC 7753 株では RD 変異の頻度は数%であり、これは天然培地で 30°C における自然発生率と同程度であった。

一方、耐熱性の JK 313 株では培養条件に応じて高頻度で RD 変異が発現することがわかった。YPD 培地で前培養した菌を、新しい YPD や 6YD 培地に移すと 70% 以上の頻度で RD 変異が出現し、その際酸素の供給が関係していることがわかった。すなわち、培養時の培養容器中の空気の占める割合が小さく、振とう速度が低い条件では RD 変異の頻度は 10% 程度に過ぎなかったが、酸素の供給が多い条件では 80% 以上であった。RD 変異は、ミトコンドリアの発達段階でその DNA が切断されることによって起こると考えられる。従って、より好気的な環境下の方がミトコンドリアの発達が盛んで、RD 変異の頻度も高くなると考えられる。一方、培地に硫安が存在すると、酸素の供給が高くても頻度が非常に低くなることが示された。NH<sub>4</sub><sup>+</sup> が過剰に存在すると、 $\alpha$ -ケトグルタル酸からグルタミン酸の合成が促進され、その分  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex の活性が低下し呼吸が著しく阻害される<sup>4)</sup>。このことが酸素の供給が少ない場合と同様の効果をもたらし、RD 変異の誘導を抑制したと考えられる。事実、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 添加培養によって cytochrome oxidase 活性が著しく低下した (Table 2)。以上のことから RD の誘導にはミトコンドリアの発達、言い換えればミトコンドリア DNA の複製が必要であることが示唆された。

ところで、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> を含む培地で前培養を行うと、これを接種して培

Table 1. Effect of elevated temperature on the induction of respiratory deficient mutation in the mesophilic yeast, *S. cerevisiae* ATCC 7753 and the thermo-tolerant mutant, *S. cerevisiae* JK 313 under various culture conditions

Preculture medium	Culture medium <sup>a</sup>	Aeration <sup>b</sup>	RD frequency (%)	
			7753	JK313
YPD	YPD	High	<10 <sup>c</sup>	80–90
	YPD	Low	<10	10
	YPDAm	High	<10	20–30
	6YD	High	<10	70–80
YPDAm	YPD	High	<10	90–100
	YPDAm	High	<10	90–100
	6YD	High	<10	90–100

a: See the text.

b: Cells were grown either in 300 ml conical flasks containing 50 ml medium on a reciprocating shaker (120 strokes/min:high aeration) or in 300 ml conical flasks containing 120 ml medium on a rotary shaker (220rpm:low aeration).

c: Occasionally 10-30% RD frequency were detected.

Table 2. Effect of elevated temperature on cytochrome oxidase activity of *S. cerevisiae*

Culture medium*	Temperature (°C)	Enzyme activity (nmol / min / mg protein)	
		ATCC 7753	JK 313
YPD	30	197	259
	40	4.4	1.7
YPDAm	30	14.9	6.9
	40	0.8	0.7
6YD	30	119	108
	40	0.7	0.7

\*See the text.

Cells were harvested at the early stationary phase.

Cultivation and enzyme assay were carried out as described in the text.

養した細胞は、そのほとんどすべてがRD変異株となることがわかった(Table 1)。これはNH<sub>4</sub><sup>+</sup>に対する適応現象の結果と考えられる。一般に定常期の菌では異化系の代謝活性に比べて同化系のそれは低下する。すなわち、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>が過剰に存在してもグルタミン酸への代謝は抑制される。従って、この定常期の菌を接種すると最初は、たとえNH<sub>4</sub><sup>+</sup>が存在してもミトコンドリアは発達し、呼吸代謝は活発でそのためにRD変異になりやすくなると考えれば説明できる。

以上、耐熱性の株を除いて試したすべての酵母におけるRD変異の発現頻度は数%であり、自然発生率と同程度であった。このことは、YcasらやShermanの報告とは大きく異なっている。この違いは恐らく次のようなことが原因であると考えられる。一つは彼らが使用した菌株が耐熱性の株であった可能性が挙げられる。もう一つは使用した酵母エキスの違いである。ことに、Shermanは高濃度の酵母エキスを含む培地で培養しており、酵母エキスの影響は大きいと考えられる。そこで数種の異なる酵母エキス製品を用い、Shermanと同様に6YD培地で*S. cerevisiae* ATCC 7753 を40°Cで培養して、RD変異頻度に及ぼす効果を調べた。

種々の酵母エキス製品によるRD変異誘導 Table 3 に示すように6YD培地ではShermanの報告のように高率でRD変異が誘導されることが確認された(D-IIの酵母エキス)。しかし、使用した酵母エキスによってRD変異誘導率には著しい差があることが示された。それは製造会社による違いだけでなく、同じ会社でも製造番号の違いによってたとえばD-IとD-IIでは顕著な差が認められた。Shermanが用いた酵母エキスとAは同じ会社の製品であるが、RD変異誘導に大きな違



Table 3. Effects of various products of yeast extract on respiratory deficient mutation caused by elevated temperature in *S. cerevisiae*

Yeast extract	RD frequency (%)
A	3.4
B	3.6
C	3.6
D-I	50.4
D-II	96.0

Cells were grown to the stationary phase at 40°C in 6YD medium.

いがみられた。この会社では、1959年 当時は *S. cerevisiae* から、最近 は *Candida* 酵母から酵母エキスを製造しているようであり、それが原因である可能性が大きい。いずれにしても、酵母エキス中に含まれる何らかの物質がRD変異誘導に影響することが示唆された。そこで酵母エキスに含まれる有効物質を探る目的で、先ずアミノ酸に着目し、カザミノ酸(ビタミンを含まない)を培地(Table 3 の酵母エキス(A)を使用)に添加して菌を40°Cで培養すると、RD変異が高率で誘導された(Table 4)。次にカザミノ酸中の有効なアミノ酸を同定するためにアミノ酸分析を行い、その組成に相当するアミノ酸混合液を調製して培地に加え、RD変異の誘導を試みたが、全く効果はなかった。一方、カザミノ酸にはカゼインの酸分解後、中和によって生じる NaCl が38%も含まれているので、NaCl の添加効果を調べたところ、RD変異の発現が明らかに認められた(Table 5)。しかし、例えばカザミノ酸 4% 添加で 81.2% のRD変異が見られた(Table 4) のに対して、Table 5 のカザミノ酸 4% に相当するNaCl 1.52% の添加ではその頻度は 47.1% に過ぎず、カザミノ酸と NaCl の効果には著しい差が見られた。アミノ酸混合物では RD 変異の誘導は全く認められなかったが、Table 4 と Table 5 の結果から、カザミノ酸の効果を説明するには NaCl だけでは不十分であり、アミノ酸との相乗効果によってRD変異の誘導が高まると考えられた。

RD変異誘導に及ぼす無機塩の影響 単独ではRD変異誘導効果がほとんどなかった酵母エキス(A)を用いた場合、NaCl の添加効果が見られたのでその他の種々の塩類の効果を調べた (Table 6)。NH<sub>4</sub><sup>+</sup> と CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> の塩を除いて種々の無機塩でRD変異誘導効果が示された。

Table 4. Effect of casamino acids on respiratory deficient mutation at elevated temperature in *S. cerevisiae*

Casamino acids (%)	RD frequency (%)
0.0	2.2
1.0	20.5
2.0	61.2
4.0	81.2

Cells were grown to the stationary phase at 40°C in 6YD medium.

Table 5. Effect of NaCl on respiratory deficient mutation at elevated temperature in *S. cerevisiae*

NaCl (%)	RD frequency (%)
0	3.1
0.38 (1.0)	4.8
0.76 (2.0)	12.8
1.52 (4.0)	47.1

( ): Corresponding concentrations of casamino acids.

Cells were grown to the stationary phase at 40°C in 6YD medium.

Table 6. Effects of various salts on respiratory deficient mutation in *S. cerevisiae*

Salt	Concentration (M)	RD frequency (%)
None		3.9
NaCl	0.13	17.9
	0.26	43.3
	0.52	48.0
KCl	0.13	65.7
	0.52	68.9
MgCl <sub>2</sub>	0.065	20.2
	0.13	34.4
	0.26	40.6
NH <sub>4</sub> Cl	0.13	1.0
	0.52	2.5*
NaNO <sub>3</sub>	0.13	21.8*
	0.26	22.8
	0.52	32.7
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.13	54.7
	0.26	74.5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.13	59.8
	0.26	84.4*
MgSO <sub>4</sub>	0.13	47.5
	0.26	58.4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.13	1.4
CH <sub>3</sub> COONa	0.13	6.3*
	0.52	0.6*

\* Result of single experiment.  
Other data are the mean values of two to six experimental results.

その程度は陽イオンでは、 $K^+ > Na^+ > Mg^{2+}$ の順であり、陰イオンでは $SO_4^{2-} > Cl^- > NO_3^-$ の順であった。また、 $NH_4^+$ は先にも述べた通りRD変異誘導を抑制したが、 $CH_3COO^-$ も同様の効果を示した。このようにイオンによってRD変異誘導効果は大きく異なったが、イオン強度による影響も考えられたのでイオン濃度で比較してみたが、たとえば 0.13 M NaCl と 0.13 M KCl あるいは、0.13 M KCl と 0.065 M  $MgCl_2$ ではRD変異誘導に違いが見られた。従って、無機塩の効果はイオン強度ではなくイオン自体の性質によるものであり、しかも陽イオンと陰イオンは相加的に効力を示すことがわかった。以上のことから、Shermanによって初めて系統的に報告された*S. cerevisiae*における高温でのRD変異発現は、培地の組成に大きく影響されることがわかった。そこで、RD変異発現に及ぼす培地組成の影響をより明らかにするために、次に合成培地を用いて研究を行った。

## (2) 合成培地におけるRD変異の誘導

### 実験方法

培養 *S. cerevisiae* ATCC 7753 を第 1 部第 2 章記載の方法で培養した。

RD変異の検出 本章 1 の場合と同様の方法で行った。

ミトコンドリアの形態観察 定常期まで培養した *S. cerevisiae* ATCC 7753 を集菌、水洗後、1.5%過マンガン酸カリウム溶液に懸濁して 1 h 冷蔵庫に放置した。遠沈して過マンガン酸カリウム溶液を除き、さらに 6 回水洗した。得られた菌体試料の超薄切片を調製し電子

顕微鏡で観察した(名古屋大学 医学部 田中健治教授に依頼)。

## 結果と考察

先に述べたように合成培地における高温増殖は、ソルビトールなどによる膜の保護と、それに続く菌体の脂質代謝と膜への配分の適応によるか、あるいはそのような高温に適した脂質組成をもたらすような脂肪酸の添加によって可能となる。これらの場合のRD変異発現率を調べた(Table 7)。ソルビトール添加培養ではRD変異の誘導が90%という高い値を示したのに対し、オレイン酸はソルビトールに匹敵する増殖効果と脂質組成の適応をもたらしたにもかかわらず、そのRD変異誘導率は低く、30%であった。ソルビトールとオレイン酸を共に加えて40°Cで培養するとソルビトールの効果は完全に失われ、RD変異率は30%程度に留まり、オレイン酸単独の場合と同程度に低くなった。これは、ソルビトール培地での適応よりも添加オレイン酸の取り込みの方が早いのでRD変異誘導率はオレイン酸の影響を強く受けて低くなったためと考えられる。

次に、ソルビトールまたはオレイン酸を添加して40°Cで培養した時のミトコンドリアの電子顕微鏡写真を Fig. 1 に示す。30°Cの対照菌 (Fig. 1-A)に見られるようにミトコンドリアは好氣的に増殖している時はクリステの発達した二重膜構造を有しており、クリステには呼吸系の酵素が局在している。ところが40°C培養では添加物には無関係に二重膜構造のオルガネラは観察されたがクリステの発達は見られなかった。(Fig. 1-B, Fig. 1-C)。このことは、40°Cではソルビトール添加の場合もオレイン酸添加の場合もRD変異率とは無関係に呼吸能が低

Table 7. Effects of supplements on respiratory deficient mutation in *S. cerevisiae*

Supplements	RD frequency (%)
Sorbitol (1 M)	>90
NaCl (0.25 M)	>90
Oleic acid (20 $\mu$ g/ml)	<30
Sorbitol + Oleic acid	<30

Cells were grown to the stationary phase at 40°C.



Fig. 1. Electron micrograph of *S. cerevisiae* cells.

A: Section through a cell grown at 30°C without supplements.

B: Section through a cell grown at 40°C with D-sorbitol.

C: Section through a cell grown at 40°C with oleic acid.



下したこと(データ省略)と一致している。ここで観察された二重膜構造のオルガネラは、おそらくミトコンドリアの前駆体、あるいは未発達のミトコンドリアというべきものであろう。無酸素の状態ではミトコンドリア自体が存在せず、高濃度のグルコース存在下では内膜のないプロミトコンドリアが観察されている。またビタミンB<sub>1</sub>によるビタミンB<sub>6</sub>欠乏を介して起こるヘム欠に基づく呼吸能の低下の際には、チトクロムの欠乏にもかかわらず発達したクリステが認められる(未発表)など、同じ呼吸能低下といってもミトコンドリアの形態には様々な状態が知られており興味深い。そのような形態変化を決定する要因は不明である。

以上のように、ソルビトールとオレイン酸添加培養におけるRD変異発現率の違いはミトコンドリアの超微構造には反映しなかったため、次に生化学的なアプローチの一つとしてミトコンドリア膜の脂質組成の相違を探ることとした(次章)。

## 要旨

高温(40°C)では、全ての培地条件で菌体の呼吸能は大きく低下した。しかし、RD変異の発現は培養条件によって著しく異なることがわかった。高濃度(6%)酵母エキスを含む培地ではRD変異が起こるが、その発現頻度は用いた酵母エキスによって様々な値を示した。酵母エキス中のRD変異誘発の有効成分を同定することはできなかったが、カザミノ酸とその成分のNaCl、およびNaClとアミノ酸の混合物、さらに、NaCl以外の無機塩も有効であることがわかった。

合成培地では、ソルビトール添加と脂肪酸(オレイン酸)添加では

RD変異誘発は大きく異なり、その発現頻度はソルビトールでは90%以上であったが、オレイン酸では20-30%に留まった。しかも、オレイン酸はソルビトールの効果を低下させた。これらRD変異発現頻度の違いは、電子顕微鏡で観察したミトコンドリアの超微構造には現われず、いずれの場合もクリステの発達しない二重膜構造が認められた。

## 文献

1. Yčas, M. (1956) *Exp. Cell Res.* 10, 746..
2. Sherman, F. (1959) *J. Cell Comp. Physiol.* 54, 29-35.
3. Ogur, M., St John, R. and Nagai, S. (1957) *Science* 125, 928-929.
4. Holzer, H., Witt, J. and Freytag-Hilf, R. (1958) *Biochem. Z.* 329, 467-475.

## 第2章 ミトコンドリアの脂質組成の変化

第1章で、高温下では呼吸活性が低下し、さらに培養の条件によってはRD変異が高頻度に発現することを示した。RD変異の頻度は、第1章で述べたように主としてミトコンドリアの膜の安定性と関係あると考えられる。ソルビトール添加の場合には脂質分析の結果、高温に適した脂質組成をとることがわかったが、ミトコンドリアの膜ではソルビトールの保護効果は及ばず、従って適応も起こらないと考えられる。このことを確かめるためにソルビトール添加培養菌からミトコン

ドリア画分を単離し、ミトコンドリアのリン脂質の脂肪酸組成を調べた。

## 実験方法

培養 *S. cerevisiae* ATCC 7753 をソルビトール添加合成培地を用い、40°Cで培養した。対照は無添加、30°C培養とした。

ミトコンドリアの単離 対数後期または定常期まで培養した菌(1.5 ~2 mg 乾燥重量)を集め、水洗後、0.8M ソルビトール、50 mg zymolyase(20T : 生化学工業)、0.1M 2-メルカプトエタノールを含む 40 mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.2) 200 ml 中で 30°C、60 min インキュベートして得られたプロトプラストを遠沈(2,500×g, 10 min)して集め、0.65 M ソルビトール、0.5 mM EDTAを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) で洗浄したのち、同じ緩衝液 20 ml に懸濁してテフロンホモジナイザーで破碎した。このホモジネートを遠沈(2,500 ×g , 10 min) して得られた上清を、さらに高速 (21,000×g , 15 min) で遠心し、得られた沈殿をミトコンドリア画分とした。

脂質の抽出及び分析 第1編第1章と同様の方法で行った。

## 結果と考察

ソルビトール存在下40°Cで増殖し、すでに脂質組成の変化が起こり、その高温に適応した状態で増殖を続けている対数中~後期の菌体のミトコンドリア画分のリン脂質の脂肪酸組成を調べた結果、Table 1 に示すように、30°Cの対照菌と比べていずれの増殖期でもパルミトレイン酸の減少とオレイン酸の増加が見られた。この傾向は全菌体のリン

Table 1. Fatty acid composition in phospholipid fraction of mitochondria isolated from *S. cerevisiae* cells

Cultivation conditions		Growth phase	Fatty acid composition (%)			
Temp.	Additions		C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>
30°C	None	Stationary	22.9	31.8	12.3	33.1
40°C	Sorbitol	Late-log	13.6	25.2	11.5	49.7
		Stationary	22.0	18.6	20.1	39.4

The fractionation of mitochondria is described in the text.

脂質と同じであり、従って、ミトコンドリアの膜においてもこの培養時期ではすでに高温への適応が起こっていることが示された。RD変異はミトコンドリアの発達が盛んな時期に、すなわちDNAの複製中にそのDNAの切断によって誘発されると考えられる。対数増殖中期以降では、ミトコンドリアの膜でもすでに脂肪酸による適応が起こった後なので対数初期のミトコンドリアの脂質組成を調べる必要がある。しかし、分析に必要な量のミトコンドリア画分を対数初期で集めるのは困難である。また、膜の脂質組成に変化があるとすると密度も変化している可能性も高いので適当なマーカーを選んで密度勾配遠心分離法でミトコンドリア画分を取る必要がある。呼吸系酵素の活性が低下しているのでマーカーとしてはミトコンドリア内膜に特異的に局在するリン脂質カルジオリピンを採用すべきであろう。高温による呼吸能の低下とRD変異の出現がそれぞれどのような機構で起こるのか、それを明らかにすることは今後の大きな課題の一つである。従って、それぞれの場合のミトコンドリアの単離法の確立が望まれる。

## 要旨

40℃培養におけるRD変異発現がソルビトール添加培養では100%に近い高頻度で起こり、オレイン酸添加ではその1/3程度で、しかもソルビトールの効果を抑えることを、ミトコンドリアの膜の安定性の違い、すなわち、流動性の違いを反映すると思われるミトコンドリアの膜の脂質組成の変化から証明しようと試みた。しかし、実験に供した対数中～後期の菌体では細胞全体の膜ばかりでなくミトコンドリアの膜でもすでに高温に適応した脂質組成の変化が見られたのでRD変異

発現とミトコンドリア膜の不安定さとの関係を明らかにするには至らなかった。

### 第3章 アルコール発酵の促進

ほとんどすべての生物は解糖系を有しており、この代謝系によって効率は低いエネルギーを獲得することができる。とくに酵母、とりわけ *Saccharomyces* 酵母では、好氣的条件でもエネルギー産生におけるアルコール発酵(正確にはエタノール発酵であるがここでは慣習に従いアルコール発酵と呼ぶ)の寄与は小さくない。しかし本酵母では呼吸と発酵は相互に調節し合い、一般的に言えば好氣的条件下では発酵はかなり抑制され(パストール効果)<sup>1)</sup>、嫌氣的条件下ではパストール効果は解除されて発酵が盛んになる。また、発酵によって呼吸が抑制される(クラブトリー効果)<sup>2)</sup> ことも知られている。前述のように、高温培養下では好氣的条件でも呼吸能の著しい抑制が見られたが、この場合のアルコール発酵の状態を知ることは興味ある研究課題である。また後に述べるように高温下のアルコール発酵には応用的な面からも重要な意義がある。

#### 実験方法

培養 *S. cerevisiae* ATCC 7753 と耐熱性の *S. cerevisiae* JK 313の培養は、第1章と同様の方法でYPDAmまたは6 YD培地を用いて30°Cまたは40°Cで行った。

培養液中のエタノールの定量 定常期初期の培養液中のエタノール

を定量した。その方法は、酵母の alcohol dehydrogenase(Sigma) を用いて、Bernt and Gutmann の方法<sup>3)</sup> によりNADHの生成量を測定して算出し、培養液 1 lあたりのエタノールの g 数で表わした。

菌体のエタノール発酵能 対数後期で菌を集め、水洗し、その 5 mg(乾燥重量)を 5 %のグルコースを含む 0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.2) 3 ml に懸濁した後、30°C、80 min 振とう(120 strokes/min) し、20 min 毎にその一部をとって遠沈し、上清のエタノールを経時的に上記の方法で定量し、菌体 1 mg (乾燥重量) 当り 1 h に生成するエタノールの量( $\mu$  mol)でその発酵能を表わした。

## 結果と考察

Table 1 に両酵母の培養液中のエタノール生成量とそれら菌体のエタノール生成能を示す。40°CではYPDAmと6YDのいずれの培地で生育した菌体も呼吸能は低いが、エタノールの生成量は 6 YD培地で盛んに呼吸しながら30°Cで生育した菌体に比べて遜色がなかった。このことは、40°Cという高温では解糖系を含む多くの代謝系の酵素の活性がある程度は低下することを考慮に入れると、40°Cでもパストール効果の解除の機構が十分に働いていることを示している。

次に、生育の盛んな対数初期における菌体の発酵能をエタノール蓄積量と同様に30°Cと40°Cで培養した通常株と耐熱性株につき比較した。第 1 章で述べたように、YPDAm 培地では30°Cでも $\text{NH}_4^+$ によって呼吸能が低下する。従って、パストール効果が抑制されて発酵能は高くなるはずであるが、事実は Table 1 に示すように著しく低い値を示した。これはおそらく $\text{NH}_4^+$ が過剰に存在するとグルタミン酸を経るア

Table 1. Effect of elevated temperature on ethanol production during cultivation and on the ethanol-producing activity of cells

Strain	Culture medium	Temperature (°C)	Ethanol produced (g/l) <sup>a</sup>	Ethanol-producing activity ( $\mu$ mol/h/mg cells) <sup>b</sup>
ATCC 7753	YPDAm	30	13.6	4.1
		40	13.4	9.9
	6YD	30	14.1	10.6
		40	14.4	8.3
JK 313	YPDAm	30	16.0	4.1
		40	12.9	11.2
	6YD	30	14.1	9.7
		40	15.4	9.9

a: Ethanol accumulation in culture medium up to the early stationary growth phase was estimated enzymatically as described in the text.

b: Cells harvested at the late-log phase of growth were incubated at 30°C in 0.5 M acetate buffer (pH5.2) containing 5% glucose and the time course of ethanol production was measured as described in the text.



ミノ酸の合成が盛んになるために、同化と異化の調節機構が働いて、呼吸と同様に異化過程である解糖、発酵も抑制されるためであろうと推定される。一方、40°C培養ではミトコンドリア自体が未発達でTCA回路はほとんど働いていないと考えられるので過剰のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>が与えられてもアミノ酸合成の促進は起こらない。従って、ただパストール効果の解除による解糖系の亢進だけが見られるはずである。事実、40°C培養菌ではその発酵能は高く、6YD培地での30°C培養菌体のそれと匹敵する値が得られた。先にも触れたように、40°Cにおける解糖発酵系の諸酵素の活性低下を考えると、これはパストール効果の解除の結果とみなしてよいであろう。

酵母の高温培養では先にも述べたように、発酵に伴う発熱に対処するための冷却水の供給が節約できるし、あるいは熱帯地方では特別に温度管理をすることもなく、酵母菌体の取得やアルコール発酵を進めることができるので工業的にも利用価値が高い。高温で発酵能も低下するなら問題であるが、本研究はその懸念はないことを明確に示している。

## 要旨

*S. cerevisiae* を高温(40°C)で培養すると呼吸が著しく低下する。この場合のアルコール発酵について研究を行い次の結果を得た。定常期までに培地に蓄積したエタノールの量は、通常酵母でも耐熱性酵母でも大差はなく、また培地組成の影響も顕著には認められず、いずれも対照の30°C培養に匹敵する値を示した。従って、高温における酵素一般の活性低下の可能性を考慮に入れると、呼吸活性低下によるパストー

ル効果の解除の機構が高温でも十分に作動していることがわかった。さらに、冷却水を節約できることや、温度管理の必要性が少ないことなどの利点を考えるとアルコール発酵における高温培養の有用性は高いといえる。上記の事実を反映して増殖が盛んな対数初期の菌体の発酵能は6YD培地では40°C培養と30°C培養とで差はなかった。40°C培養ではYPDAm培地でも6YD培地でもその発酵能はほぼ等しかった。一方、YPDAm培地における30°C培養では発酵能は著しく低かった。これは、30°CではTCA回路が働いているため過剰の $\text{NH}_4^+$ がアミノ酸合成に使われ同化が進むので異化代謝一般が抑制されるためであると推定された。

## 文献

1. Pasteur, L. (1861) C. R. Acad. Sci., 52, 1260-1264.
2. Crabtree, H. G. (1929) Biochem. J. 23, 536-545.
3. Bernt, E. and Gutmann, I. (1974) Methods in Enzymatic Analysis Vol. III, 1549-1552.

## 第3編 高温下の細胞形態

### 第1章 出芽細胞の分裂抑制

真菌類の中には条件によって酵母型と菌糸型（又は仮性菌糸型）の二つの形態をとるものがある。この二形性と呼ばれる現象は、最も簡

単な形態形成、細胞分化の表れの一つとして興味を持たれ、また、真菌症と密接な関係があるため広く研究が進められている<sup>1,2)</sup>が、その生化学的機構は不明であった。ただ、我々の研究グループで、*Candida tropicalis*<sup>3)</sup> やあるいは最近では *Saccharomyces*<sup>4)</sup> 酵母でも、イノシトールリン脂質シグナル伝達系の一過性の亢進が仮性菌糸形成の引き金となることが発見され、ようやく分子機構の研究の入口に達したという状態である。

*Saccharomyces* 酵母、特に *S. carlsbergensis* では以前からイノシトール欠乏培地では見かけ上“凝集”した形で増殖することが知られている<sup>5)</sup>が、この“凝集”は一つ一つの細胞が集まってできたものではなく、仮性菌糸と同様、細胞の分裂抑制によって生じたものである。エタノールや過剰のビタミンB<sub>1</sub>、さらには窒素源欠乏によっては仮性菌糸形成も起こり、やはりイノシトールリン脂質シグナル伝達系が関与することがKonoら<sup>6)</sup>によって見出されている。Finkら<sup>7)</sup>も窒素源枯渇により *S. cerevisiae* がコロニー上で仮性菌糸型を示すことを見出し、この際RASの活性化を伴うことから出芽の方向性とcAMPを介するシグナル伝達系が密接に関係していることを示唆しているが、それは単に推定に過ぎず、またイノシトールリン脂質を介するシグナル伝達系については何も述べていない。このような“凝集”や仮性菌糸はいわば酵母の多細胞化とみなすことができる。多細胞では個々の細胞でのストレスに対する接触面積が小さくなり、また、細胞間での物質、情報の流通が促進されるのでストレスに対する抵抗性が大きくなると考えられる。従って、これら多細胞化という形態変化もストレスに対する適応機構の一つと考え、温度ストレスにおける形態変化について研

究を行った。

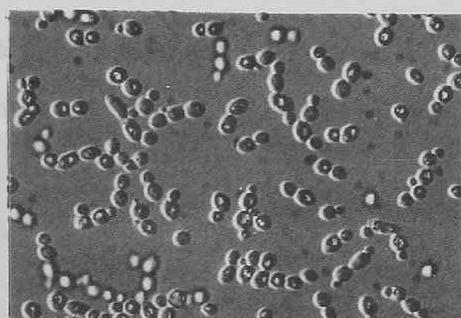
## 実験方法

菌の培養 *S. cerevisiae* ATCC 7753 と *S. carlsbergensis* ATCC 9080 を 100 ml 中、グルコース 0.5 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.11 g、クエン酸三カリウム 1.0 g、カザミノ酸 0.8 g、KCl 85 mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  25 mg、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5 mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  25mg、 $\text{MnSO}_4$  0.5 mg、ビオチン 1.6  $\mu$ g、パントテン酸カルシウム 0.25 mg、ニコチン酸 0.5 mg、塩酸ピリドキシン 2.0  $\mu$ g、ミオイノシトール 0.5 mg を含む培地(pH5.4) 50 ml を 300 ml 三角フラスコに入れて30°Cと40°Cで振とう培養 (120 strokes/min)した。必要に応じて塩酸チアミンを100 ml 中 0.1 mg、エタノールを終濃度 2.5%、ソルビトールを 1 M になるように添加した。菌の接種量は、30°Cでは  $3.5 \times 10^5$  cells/ml、40°Cでは  $1.75 \times 10^6$  cells/ml とした。

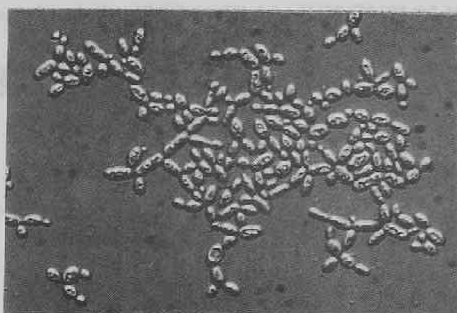
菌の形態の観察 対数後期の菌の形態を光学顕微鏡で観察した。

## 結果と考察

*S. carlsbergensis* は、上記の培地を用いて30°Cで培養するとFig. 1 - Aのように酵母型を示したが、そこにチアミンを加えて培養するとFig. 1 - Bのように仮性菌糸型で増殖することがわかった。*Saccharomyces* 酵母ではチアミンは膜に存在する特異的な蛋白質と結合して細胞内に取り込まれ多量に蓄積することが知られており<sup>8)</sup>、おそらく膜への継続的な結合がストレスとなって形態変化をもたらしたものと考えられる。ビタミンB<sub>1</sub>を含む上記の培地は過去から現在まで



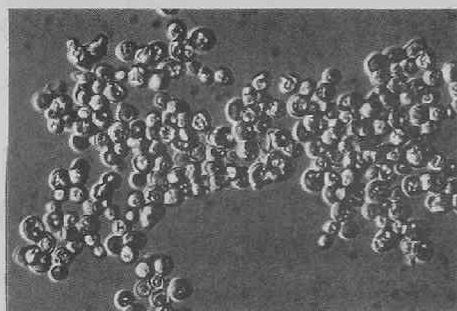
A: -thiamine (30°C)  
Control



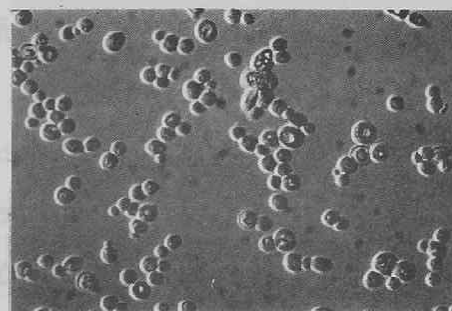
B: +thiamine (30°C)



C: +thiamine+sorbitol (30°C)



D: +thiamine (40°C)

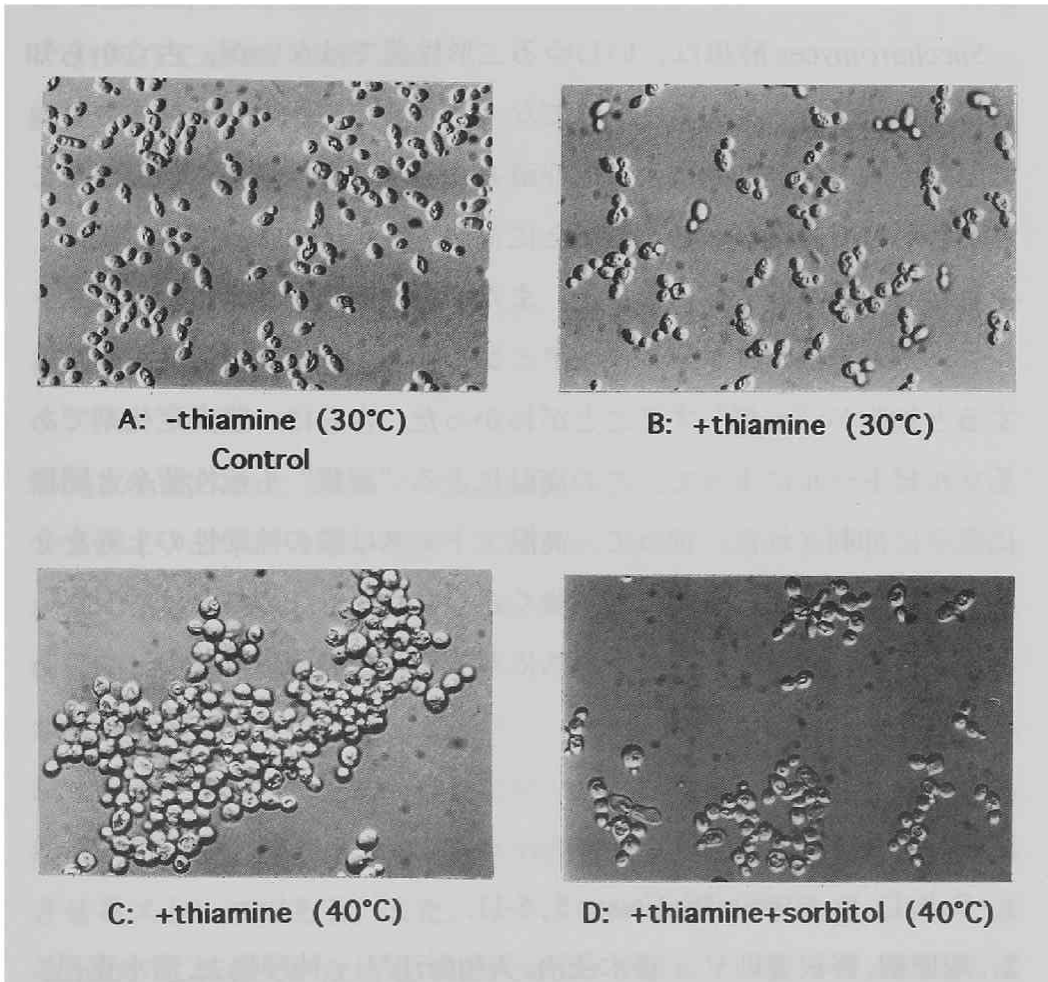


E: +thiamine+sorbitol (40°C)

**Fig. 1.** Effects of thiamine, D-sorbitol and elevated temperature on the morphology of *S. carlsbergensis*.

Cells were grown to the late-log phase at 30°C and 40°C.

多くの研究者によって *Saccharomyces* 酵母の培養に用いられてきたものであり、今まで仮性菌糸形成に誰も気がつかなかったのは不思議である。40°Cではチアミンがないと増殖度が低いのでこれを添加して培養した。Fig. 1-Dに見られるように、チアミン存在下30°Cでは仮性菌糸型であったのが40°Cでは“凝集”することがわかった。娘細胞の出芽の際に母細胞との間にくびれが生じるがその部分はほとんどキチンで構成されている。そこでキチンと特異的に結合するカルコフルオールホワイトで菌体を蛍光染色して顕微鏡観察した結果、細胞はキチンに富む隔壁で連なっていることが明らかになった。従って、この“凝集”体は先に述べたように細胞の分裂抑制によって形成されたもので、以前から知られているイノシトール欠乏培地で生育した *Saccharomyces* 酵母の“凝集”と同様のものではあった。また、*S. cerevisiae* の場合は30°C、チアミン無添加の条件でも *S. carlsbergensis* のような仮性菌糸型は認められず、凝集も起こらなかったが、40°CではFig. 2-Cのように“凝集”の形で増殖した。両株の30°Cにおけるチアミンによる形態変化の違いは、チアミン結合タンパク質を介するチアミンの集積の程度が *S. calsborgensis* のほうが圧倒的に大きいことによると考えられる。*S. carlsbergensis* をチアミン添加で培養した時でも40°Cでは仮性菌糸型の形成が抑制されて、“凝集”体のみとなったのは興味深い。一方、これらの“凝集”も仮性菌糸形成もソルビトール添加によって完全に抑制された(Fig. 1-C、Fig. 1-E、Fig. 2-D)。ソルビトールは前記のように培地の浸透圧を上げて膜を安定化する作用があり、従って、ソルビトールの効果はこれら多細胞化が膜の流動性の上昇によって起こることを強く示唆している。



**Fig. 2.** Effects of thiamine, D-sorbitol and elevated temperature on the morphology of *S. cerevisiae*.

Cells were grown to the late-log phase at 30°C and 40°C.

## 要旨

*Saccharomyces* 酵母は、いわゆる二形性菌ではないが、古くから知られたイノシトール欠乏ばかりでなく、種々の細胞外ストレスによって出芽細胞の分裂抑制による仮性菌糸や見かけの“凝集”が起こることがわかってきたが、ここに新たに高温ストレスによっても“凝集”を生じることが明らかになった。また、仮性菌糸を与えるようなストレス、たとえばエタノールやチアミンの存在下でも培養温度を40°Cにすると細胞が“凝集”することがわかった。さらに、膜安定化剤であるソルビトールによって、この高温による“凝集”も仮性菌糸と同様に完全に抑制された。従って、高温ストレスは膜の流動性の上昇を介して“凝集”をもたらすことが強く示唆された。このことは“凝集”という多細胞化は、高温ストレスに対する酵母の適応現象の一つであることを示している。

## 文献

1. Soll, D. R. (1986) *BioEssays* 5, 5-11.
2. 塚原勲、野沢義則<sup>a)</sup> ; 青木茂治、久和彰江<sup>b)</sup> ; 神戸俊夫、清水克己、田中健治<sup>c)</sup> ; 平谷民雄、浅黄友希世、永田淳子、白田秀明、山口英世<sup>d)</sup> ; 森田達也、柿沼英哉、矢野高、野沢義則<sup>e)</sup> (1989) *真菌誌* 30, 92<sup>a)</sup> , 93-102<sup>b)</sup> , 103-111<sup>c)</sup> , 112-129<sup>d)</sup> , 130-134<sup>e)</sup> ,
3. 上原梯次郎 (1990) *細胞* 22, 8-12.
4. Omi, K., Ito, T., Kono, K. and Kamihara, T. (in preparation).
5. Smith, R. H. (1951) *J. Gen. Microbiol.* 5, 772-780.
6. Kono, K., Suzuki, T., and Kamihara, T. (in preparation).



7. Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1992) *Cell* **68**, 1077-1090.
8. Iwashima, A., Nishimura, H. and Nose, Y. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **557**, 460-468.

## 第2章 膜を介するシグナル伝達の関与

先にも述べたように、*C. tropicalis* においてはエタノール等のストレスがイノシトールリン脂質シグナル伝達系の亢進をもたらし、それが引き金となって仮性菌糸が形成される<sup>1)</sup>。同様に *Saccharomyces* 酵母においても高温、イノシトール欠乏、エタノールその他のストレスが仮性菌糸ばかりでなく、見かけの“凝集”のような多細胞化を引き起こすことがわかったので、ここには共通の機構が存在すると考えられる (Fig.1)。高温とエタノールは膜に直接作用し膜の流動性を上昇させるストレスである。また、イノシトールは膜リン脂質の成分であるため、これを欠いた培地ではホスファチジルイノシトールの合成が進まず完全な膜が形成されないことから、イノシトールの欠乏も膜を不安定にするストレスであると言える。*C. tropicalis* のエタノールによるイノシトールリン脂質シグナル伝達系の亢進は膜の流動性の上昇を伴うことが立証されている<sup>2)</sup>。従って、*Sacchchromyces* 酵母でもこれらストレスによって同様の機構で形態変化が起こることは充分考えられることであり、その結果、“凝集”や仮性菌糸などの多細胞化が起きストレスに適応すると思われる。“凝集”と仮性菌糸を決定する

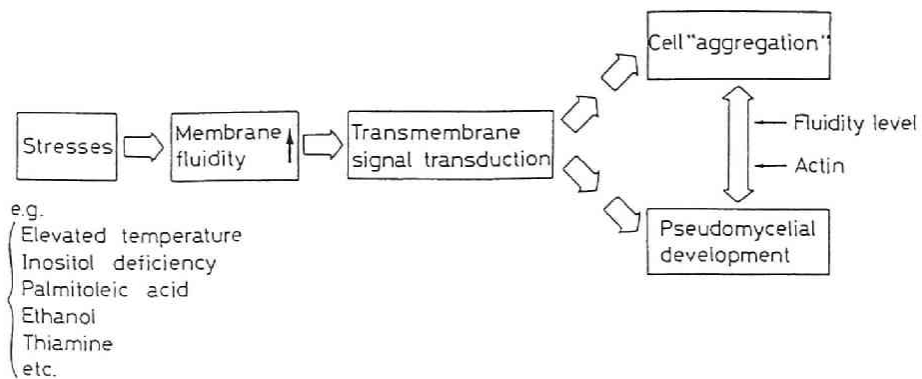


Fig. 1. Postulated mechanism of stress-induced morphological changes in *Saccharomyces* yeast.

要因は明らかではないが、膜の流動性上昇の程度や、あるいは細胞の形態を決定する重要な因子である細胞骨格系のアクチンの関与などが推定される。

膜を介するシグナル伝達は近来ますますその重要性が認識されるようになり、生命にとって本質的な意義を持つ細胞の増殖や分化と深い関わりがあることがわかってきた。よく知られたシグナル伝達系はイノシトールリン脂質とadenylate cyclase(AC)-cAMP系であり動物細胞を中心に研究が進められている (Fig. 2)。イノシトールリン脂質の系では、ホルモンなどの細胞外シグナルが細胞質膜に存在する受容体に結合するとGタンパク質(G)が活性化され、それが phospholipase C (PLC) の活性化を引き起こす。その結果、膜リン脂質のホスファチジルイノシトール 4, 5 二リン酸 (PIP<sub>2</sub>) の分解が促進され、その生成物であるジアシルグリセロール (DG) とイノシトール1, 4, 5 三リン酸 (IP<sub>3</sub>) が蓄積し、前者は protein kinase C (PKC) の活性化を、後者は Ca<sup>2+</sup>の細胞質への動員を引き起こす。一方、AC-cAMP系では細胞外シグナルがレセプターに結合し、Gタンパク質、ACの活性化が順次起こる。その結果、生じたcAMPによってプロテインキナーゼAが活性化されることになる。これら二つのシグナル伝達系は互いに促進的あるいは抑制的に作用することにより様々な細胞応答を引き起こす。

一方、エタノールによるイノシトールリン脂質シグナル伝達系の亢進は、先に述べた*C. tropicalis* や *S. carlsbergensis* ばかりでなく肝細胞<sup>3)</sup> や神経細胞<sup>4)</sup> でも報告されている。エタノールには受容体が存在するはずはなく、エタノールはGタンパク質または直接PLCの活性化を引き起こすと考えられる(神経細胞ではエタノールによるGタン

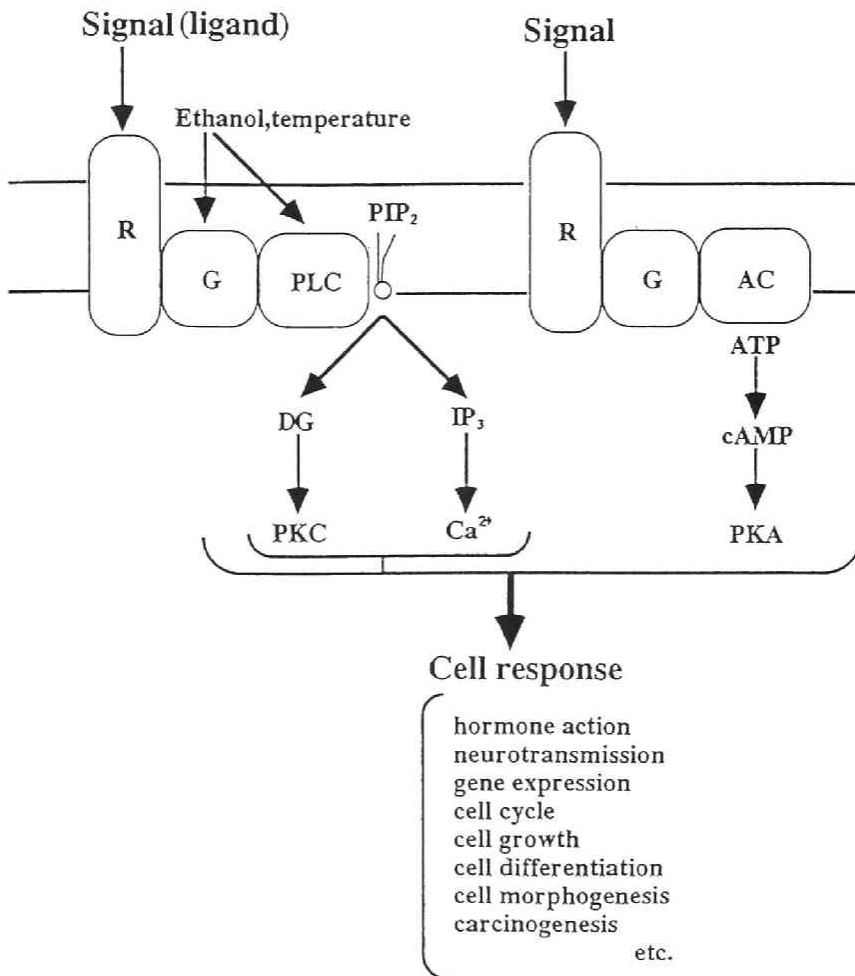


Fig. 2. Transmembrane signal transduction.

- R: receptor, G: G protein
- PLC: phospholipase C (phosphoinositide-specific)
- PKC: protein kinase C
- DG: diacylglycerol
- PIP<sub>2</sub>: phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate
- IP<sub>3</sub>: inositol 1, 4, 5-trisphosphate
- AC: adenylate cyclase
- PKA: protein kinase A

パク質の活性化が指摘されている<sup>5)</sup>)。一般に、エタノールは膜の流動性を上昇させると信じられている。最近Konoら<sup>6)</sup>は*C. tropicalis*のエタノールによるイノシトールリン脂質シグナル伝達系の亢進に先立って、無添加の場合に比べて相対的に膜の流動性が高いレベルを示すことを見出している。従って、エタノールによる膜の流動性の上昇が原因となってGタンパク質あるいはPLCの活性化が起こると考えられる。一方、高温が膜の流動性を高めるのは周知の事実である。そこで、それに伴ってイノシトールリン脂質シグナル伝達系の亢進が起こる可能性が大きいので検討を加えた。

## 実験方法

菌の培養と形態の観察 先の第1章と同様の方法で行った。

菌体内IP<sub>3</sub> 含量の測定 集菌、洗浄した菌(乾燥重量100g)を25 mM トリス緩衝液 (pH7.4)、2 mM EDTAを含む6% トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液に懸濁し、ガラスビーズ (0.45 mm)を用いて0°Cで破碎した。このホモジネートを遠沈して得られた上清に水飽和ジエチルエーテル 2.5 mlを加え、1 min 攪拌した後、上清を除去した。これを5回繰り返しTCAを完全に除いた。抽出物をデシケータで30 min 以上乾燥し、10% NaHCO<sub>3</sub> 溶液で pH7.5にし、-20°Cで保存した。IP<sub>3</sub>含量の測定はAmersham IP<sub>3</sub> [<sup>3</sup>H] 定量キットを用いて行った。

## 結果と考察

菌体内IP<sub>3</sub>はイノシトールリン脂質シグナル伝達の指標となる。そこで高温増殖の際に菌体内IP<sub>3</sub>含量を経時的に測定することによって

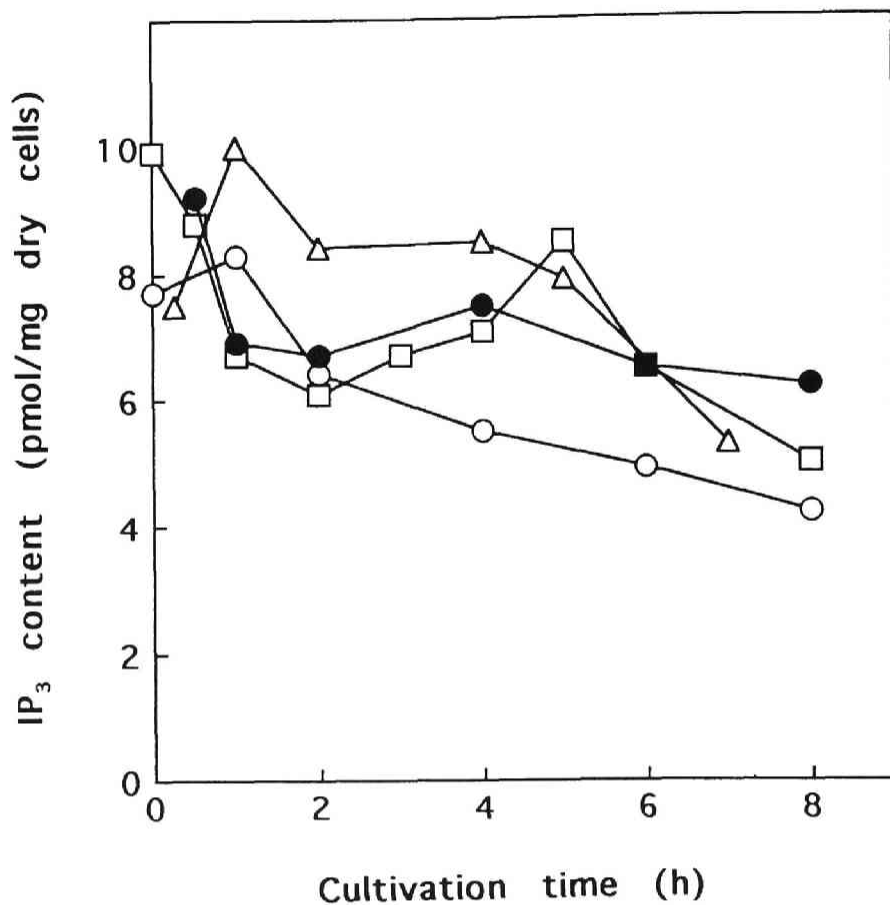


Fig. 3. Stress-induced accumulation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) in *S. carlsbergensis*.

Cells were grown at 30°C with no supplements (○: control), 40°C with no supplements (●), 30°C under inositol starvation (△) and 30°C with 2.5% ethanol (□).

この系が働いているかどうかを調べた(Fig. 3)。比較のため、すでにこのシグナル伝達系の亢進の関与が明らかになっている他のストレス(イノシトール欠乏とエタノール)によるIP<sub>3</sub>含量の変化を示した。高温もエタノールと同様、増殖開始後直ちにIP<sub>3</sub>含量の一過性の蓄積をもたらした。一方、イノシトール欠乏では、高温やエタノール添加の場合に比べてIP<sub>3</sub>蓄積のピークに遅れが見られた。このことは温度やエタノールでは直ちに膜の流動性が上昇するが、イノシトール欠乏の場合はその効果は脂質合成を経て現われるためと考えられる。また、エタノール添加培養5 hでIP<sub>3</sub>の明確な第2のピークが見られたが、高温では培養4 hに小さなピークらしいものが観察され、イノシトール欠乏の場合も培養4 hに極めて小さな第2のピークが認められた。その生理的意義、役割は不明であるが明確な第2のピークが現われるエタノール添加では仮性菌糸が形成され、他の場合は“凝集”が生じることと関係があると思われる。IP<sub>3</sub>の第1のピークが出芽細胞の分裂抑制の引き金となり、第2のピークが個々の細胞の伸張をコミットしているのかもしれない。ともあれ、*C. tropicalis*で見出されたストレスによるイノシトールリン脂質シグナル伝達の亢進に伴う仮性菌糸形成が*S. cerevisiae*や*S. carlsbergensis*でも同様に起こることは非常に興味深いことである。

## 要旨

*Saccharomyces* 酵母では高温ストレスに対する適応として、出芽細胞の分裂抑制による見かけの“凝集”という一種の多細胞化が起こり、しかもそれに先立って、エタノールによる仮性菌糸形成の場合と同様

に培養開始とほとんど同時にイノシトールリン脂質シグナル伝達の亢進が一過性に起こって、形態変化の引き金となることが強く示唆された。本論文ですでに述べたように、ストレス応答としてのシグナル伝達の亢進は、受容体が存在しない場合には膜の流動性の上昇が原因となって起こると考えられる。高温がシグナル伝達を促進することは、膜の流動性の上昇の介在を一層強く支持するものである。また、シグナル伝達の亢進は、エタノールのように仮性菌糸を形成する場合には培養開始時ばかりでなく増殖開始と共に第2回目が起こるが、“凝集”の際にはその第2回目の亢進はほとんど認められないか、あるいは非常に低い程度のものであることがわかった。このようなシグナル伝達の亢進がどのような機構で形態変化につながるかはまだ不明であるが、キチンの分解やアクチンの分布が介在すると推定される。

## 文献

1. 上原悌次郎 (1990) 細胞, 22, 8-12.
2. Omi, K., Ito, T., Kono, K. and Kamihara, T. (in preparation)
3. Hoek, B. J, Thomas, P. A. Rooney, S. T. Higashi, K. and Rubin, E. (1992) FASEB J. 6, 2386-2396.
4. Alling, C., Hansson, E. and Simonsson, P. (1989) Molecular Mechanisms of Alcohol 193-205.
5. Simonsson, P. Rodriguez, D. F. Loman, N. and Alling, C. (1991) J. Neurochem. 56, 2018-2026.
6. Kono, K. and Kamihara, T. (to be submitted).



## 第3部 高温下の膜の変化

第2部では高温に伴う膜の流動性の上昇を防ぎ増殖を可能にするような膜脂質の変化について述べた。この第3部では高温培養に伴う細胞膜の変化を細胞レベルで具体的に検討した結果を示す。まず第1章で、細胞膜の流動性を実測した結果を示し、膜脂質の変化との関係を考察するとともに温度と流動性との関係について述べ、第2章では、高温増殖した菌体の微細構造の変化を示し、さらに第3章では、その構造変化が原因となって起こる自己消化と、それを酵母エキス製造に応用する可能性を提示する。

### 第1章 膜の流動性の上昇

膜の流動性を測定した報告は数多くあり、その測定方法もいくつか知られている。しかし、それらの多くが人工膜を対象にしており、*in vivo* の生体膜の流動性を直接測定したものは少ない。本章では、酵母の *intact cell* の膜リン脂質アシル基を蛍光プローブでラベルし、膜内でのその動きを測定して膜の流動性を求めた結果を示す。

#### 実験方法

酵母の培養 *S. cerevisiae* ATCC 7753 を第1部第2章に記した方法で合成培地を用い、30°Cまたは40°C (1 M ソルビトールまたは20  $\mu$ g/ml オレイン酸添加)で対数中期まで培養した。ただし、ここでは培地5 ml を試験管(25×200 mm)に入れて振とう培養(120 strokes/min)

Table 1. Dependence of membrane fluidity on growth temperature and supplements

Growth conditions		Membrane fluidity
Temp.	Supplements	(1/P)*
20°C	None	2.79
30°C	None	2.46
40°C	D-Sorbitol (1 M)	4.03
	Oleic acid (20 µg/ml)	5.59

\* Assayed at 30°C as described in the text.

を行った。

**膜の流動性の測定** 菌体懸濁液に、蛍光プローブ(1, 6 ジフェニール 1, 3, 5 - ヘキサトリエン : DPH)を加えて膜内に取り込ませ、リン脂質のアシル基をラベルし、蛍光の偏光度(P値)がリン脂質の回転によって減少することを利用する方法<sup>1)</sup>で膜の流動性を測定した。従ってP値が小さいほど膜の流動性が大きいことを示す。培養菌体(0.4~0.6 mg 乾燥重量)を水洗後、エタノールに溶かした5  $\mu$ MのDPHを含む合成培地5 mlに懸濁し、30°Cで15 min インキュベートして膜をラベルした後、菌体を遠沈して水洗し、4.5 mlの水に懸濁した。偏光度測定時の温度は10、20、30、40、50°Cとし、DPHの励起波長は360 nm、検出波長は440 nmで、島津RF-5000 蛍光分光光度計を用いて測定した。

## 結果と考察

Table 1に20°C、30°C、および40°Cで対数中期まで増殖した菌体の懸濁液の蛍光偏光度(P値)を30°Cで測定した結果を示す。なお、40°C培養ではソルビトールまたはオレイン酸を添加した。P値は30°C $\approx$ 20°C $\gg$ 40°C(ソルビトール) $>$ 40°C(オレイン酸)の順であり、従って膜の流動性はその逆で30°Cと20°C培養で最も低く、オレイン酸添加40°C培養で最も高いことになる。まず、30°C培養菌体と40°C培養菌体の膜の流動性の差について考えてみる。第1部第3章で述べたように、40°Cではソルビトール添加、オレイン酸添加いずれの場合も高温による膜の流動性の上昇を防ぐような脂質組成をとる。従って、菌体を洗浄して同じ温度(この場合30°C)で測定した時にはむしろ40°C培養菌体の方

が低い流動性を示してもよいはずである。しかし、実際はその反対であった。このことを説明するには次のように考えることができる。菌は40°Cで増殖している間にその温度に適した脂質の合成と膜への配分を行っていることはすでに述べた通りであり、このような膜脂質組成の変化に加えて熱ショックタンパク質、トレハロースなどの合成、蓄積、あるいは細胞水の構造変化<sup>2)</sup> などあらゆる手段をつくして高温に適応しようとするが、やはり高温の影響は大きく、膜の流動性も致命的ではないにしても30°Cのそれと比べるとかなり高くなり、しかもその変化が少なくとも部分的には不可逆であると推定できる。その原因は不明であるが、たとえば高温で好氣的に増殖している間に膜が活性酸素の攻撃を受けてアシル基の過酸化、それに続く切断などが起こる可能性がある。もし、それが事実なら膜の脂質の適応が低下して流動性が上昇しても不思議ではない。

同じ40°C培養でも、ソルビトール添加に比べてオレイン酸添加菌の方が膜の流動性が高かった。この原因としてすぐに思いつくのは後者の方がオレイン酸含量が高いことである。前から述べているように膜の流動性に決定的な影響を与えるのはパルミトレイン酸の含量であるが、オレイン酸もある程度は流動性に寄与するはずである。従ってオレイン酸含量が非常に高い菌では膜の流動性が高くなると考えてもよい。しかし、それよりもオレイン酸添加培養ではオレイン酸の蓄積が脂質合成(脂肪酸ばかりでなくステロールも)のフィードバック抑制を引き起こし、そのために脂質組成の適応が不十分となって高温下の膜の流動性の上昇を防ぐことが困難となったためであると考えられる。いずれにしても、これらの結果は40°C培養では膜脂質の適応は起こる

が、やはり30°C培養に比べると増殖が劣り、同じ40°C培養でもオレイン酸はソルビトールよりも増殖効果が低いこととよく一致している。

一方、20°C培養と30°C培養では膜の流動性の違いはほとんどないことがわかった。このことは、先に20°Cでは30°Cに比べて増殖のラグ期がやや長く、速度もやや低いが高増殖度はほぼ同じで、また、膜脂質の組成にも大差はなかったことから膜の流動性にも差がないと推定したことの妥当性を示している。

Fig. 1 に、上記のような培養条件で増殖した菌の膜の流動性を測定する際に温度を変えてその影響をみた結果を示す。10°Cから50°Cまで測定温度を変えても流動性の順序は先の30°Cでの測定結果と同じで40°C (オレイン酸) > 40°C (ソルビトール) ≫ 20°C ≒ 30°Cであった。いずれの場合も、膜の流動性は測定時の温度に依存し、温度が高い程高くなることがわかった。ただし、30°C培養菌と20°C培養菌では、測定温度が10~30°Cの間ではその流動性には変化がほとんど認められなかった。40°Cになると急激に上昇し、50°Cでも上昇したがその程度は低かった。10~30°Cの結果は、先にも触れたようにこの温度範囲では相転移が起こらないことを示している。また、40°Cを超えると膜の流動性の温度依存性が低下するのはおそらく膜の崩壊によるのであろう。40°C(ソルビトール)増殖菌の特徴は、その膜の流動性が10~30°Cの間でも温度に依存して変化することである。逆に30~40°Cの間の流動性の変化は他の菌体に比べて小さかった。大まかに見ると10°Cから50°Cにかけて、その流動性はゆるやかにほぼ直線的に上昇することがわかった。酵母は脂質の組成を変えて高温下の膜の流動性の上昇を防ぐ機構を備えているが、先に述べたように高温で培養中に受ける何らかの不

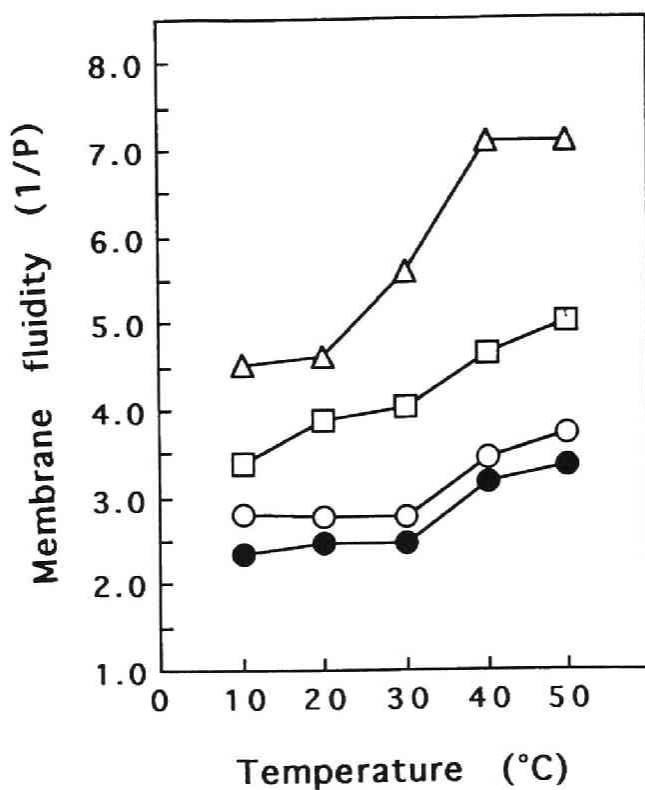


Fig. 1. Temperature dependence of membrane fluidity of *S. cerevisiae* cells.

Cells were grown at 20°C (○), 30°C (●), 40°C with D-sorbitol (□) and 40°C with oleic acid (Δ). Membrane fluidity was determined at various temperatures indicated as described in the text.

可逆的な変化の影響の方が大きいことを以上の結果は示唆している。ただ、*Saccharomyces* 酵母では蛍光プローブDPHが膜に入りにくいこともあって本法による膜の流動性の定量は困難を伴うので、定量を数回繰り返して再現性を確認するか、あるいは他の測定法を併用する必要があると思われる。

## 要旨

*S. cerevisiae* の生体膜の流動性を、膜のリン脂質のアシル基を蛍光プローブでラベルして *in vivo* で直接測定した。40°C培養菌では20°Cや30°C菌に比べて流動性は大きく、オレイン酸添加培養菌では特に顕著であった。このことは、40°Cにおけるソルビトールとオレイン酸の増殖効果の違いを反映していて、脂質分析の結果と考え合わせると、オレイン酸添加の場合、遊離ステロールの含量が少ないために膜の流動性が比較的高くなり、高温での増殖がソルビトール添加培養に比べて劣ると判断される。培養温度が30°Cと40°Cでは膜の流動性に大きな違いが見られたが30°Cと20°Cではほとんど差がなかった。このことは通常の培地では40°Cでは菌は増殖せず、逆に30°Cと20°Cでは増殖に大差がないことを反映しており、培養温度と菌の増殖との関係を少なくとも部分的には膜の流動性で説明できることを明確に示すことができた。一方では培養温度による脂質組成の変化よりも、培養時の不可逆的な膜の変化の方がその流動性に対する影響は大きいことが示された。

## 文献

1. Hosono, K. (1992) *J. Gen. Microbiol.* 138, 91-96.

2. Obuchi, K., Kaul, C. S., Iwahasi, H. and Komatsu, Y. in "Physics and Chemistry of Ice" ed. by Maeno, N. and Hondoh, T. 1992, pp270-276.

## 第2章 膜系の崩壊

一般に菌の増殖が定常期に入ると間もなく自己消化が始まる。その自己消化過程については生化学的な面から<sup>1-4)</sup>、あるいは超微構造的な面から<sup>5-6)</sup>も研究されている。しかし酵母の自己消化に関しては生化学的な研究<sup>7-9)</sup>はなされているが、超微構造的な研究はほとんど見当たらない。これは自己消化が起こる時期をタイミングよくとらえることができないことや、有機溶媒などによって自己消化を起こさせた場合では構造変化が速やかに起こるため自己消化過程の細胞構造の変化を細かくとらえることが困難なためであると思われる。一方、第3章で述べるように高温培養菌は増殖中は自己消化しないが、その懸濁液をインキュベートすると、有機溶媒などを加えなくても自己消化が起こることを見出した<sup>10)</sup>ので、この系を用いフリーズエッチング法で菌体を処理し、細胞表層と細胞内の変化を電子顕微鏡により観察した<sup>11)</sup>。

### 実験方法

**培養** *S. cerevisiae* IFO 1346と*S. cerevisiae* ATCC 7753を、YPD培地(4% グルコース、1% ペプトン、1% 酵母エキス)中、37°Cで対数増



殖期まで培養した。

自己消化 集菌、水洗後、30 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 4.7)に懸濁し、46°Cでインキュベート(0、2、5、24 h)した後、菌体を次の四つの方法で処理した。(1) 直ちに、液体窒素(-210°C)で凍結。(2) 一度水洗した後、(1)と同様に凍結。(3) 2.5 % グルタルアルデヒド / 70 mM (pH 7.0)リン酸カリウム緩衝液を用い、室温(約20°C)で菌を固定してから(1)と同様に凍結。(4) 上記(3)と同様に固定した菌体を一度水洗後、(1)と同様に凍結。

上記の方法によって処理した菌体を、-100°Cで20~60 sec フリーズエッチング(日本電子 JFD-7000 使用)し、電子顕微鏡(日立 H-700h)で観察した。

菌の生存の判定  $2 \times 10^{-4}$  M メチレンブルー溶液に菌体を懸濁し、光学顕微鏡により判別した。生細胞にはメチレンブルー還元能があるので無色の還元型メチレンブルーを生じ細胞は染まらないが、死滅細胞は還元能がないため青く染まる。

## 結果と考察

細胞の構造を観察する場合、それが本来の細胞の状態を示しているかどうか問題となる。すなわち、試料調製中の人為的な影響による変化を避けなければならない。フリーズエッチング法ではそのような変化は比較的少ないといわれているが、この点を考慮して試料の調製には上記四つの方法を試みた。その結果、両株とも四つの調製法によって作製した試料には本質的な違いは認められなかったため、(1)の方法で調製した試料のみを用いて以下の研究を行った。

## 光学顕微鏡による細胞の変化の観察

天然培地で対数期まで増殖した細胞は卵型で大きく、輪郭はスムーズで、細胞質には大きな液胞が見られた。これらの菌を水に懸濁して46°Cで2 hインキュベートしても生存率は80%と高かった。メチレンブルーで染まらなかった細胞は小さく、輪郭も不規則であった。おそらく細胞表層が損傷を受けて、細胞内外の浸透圧のバランスが崩れたためであると思われる。インキュベーション 5 h 後では、大部分の細胞が上記のような異常な形となり、液胞もほとんど見られなかった。24 h インキュベートするとほとんど全ての細胞が萎縮していた。

## 細胞の超微構造の変化

細胞の超微構造の変化をFig. 1~4 に示す。Fig. 1 は37°Cで培養後、46°Cでインキュベーションしないで直ちに固定して電顕観察したものである。細胞壁はスムーズで、形質膜は小枝状の窪み(invagination : I)以外は、顆粒(膜タンパク質であることが知られている<sup>12)</sup>) が密に点在しており、高温培養にもかかわらず正常な構造を示していた。このことは、37°C培養では少なくとも対数増殖期までは自己消化は起こらないことを示している。46°Cでインキュベーション 2 h 後ではほとんど全ての細胞でオルガネラ(核、ミトコンドリア、小胞体、液胞)が消失し(Fig. 2)、形質膜の大部分は invagination を失い顆粒のないスムーズな領域を生じ、つなぎ合わせたような構造を示した。このスムーズな領域は、細胞の死後現われてくることが知られていて、同様の領域が *S. cerevisiae* 細胞の凍結融解繰り返しによっても生じることが認められており<sup>13)</sup>、メチレンブルーによる細胞死滅の観察結果とも一致し

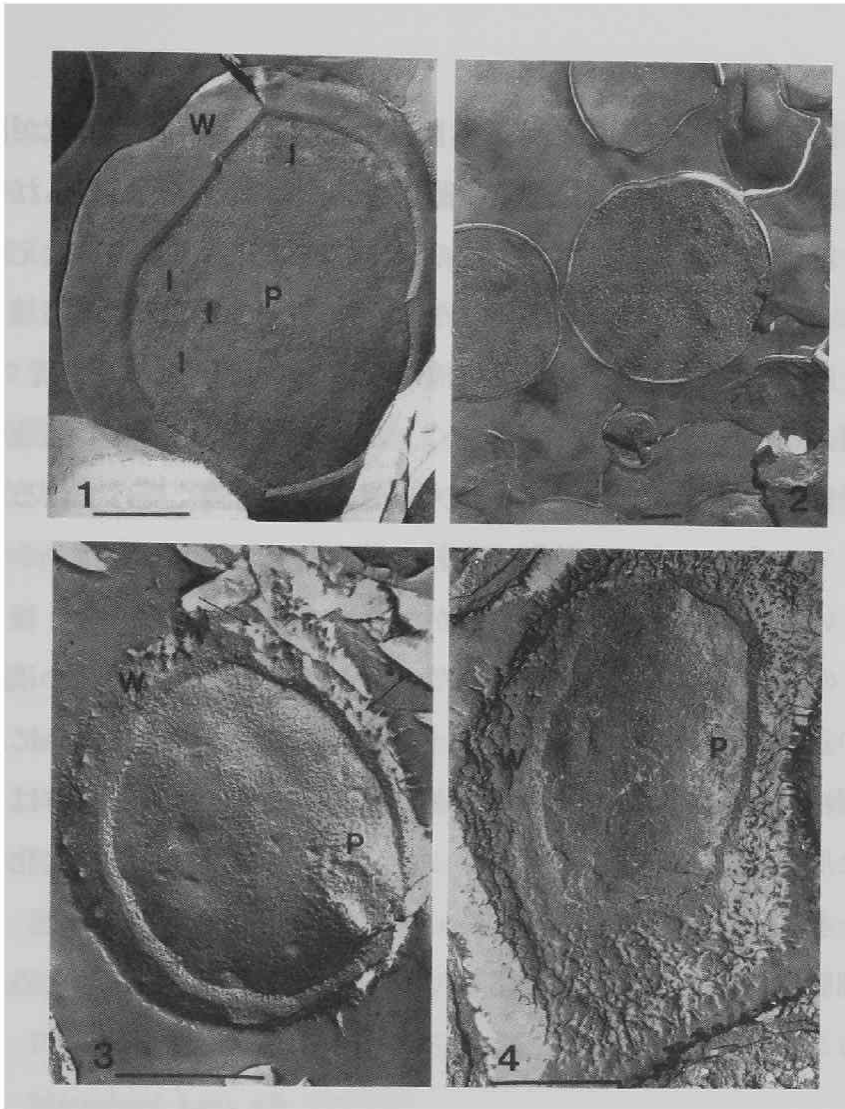


Fig. 1. Control cell. Note the smooth cell wall. The P face of the plasma membrane is densely embedded with particles except for invaginations (I). In all figures, *S. cerevisiae* cells were freeze-etched without chemical fixation (the pretreatment method (1) described in the text. The bar indicates 1 $\mu$ m; W, the cell wall; and P, the P face of the plasma membrane.

Fig. 2. Cross-fractured cell after 2 h autolytic incubation. Virtually all cytoplasmic organelles have disintegrated.

Fig. 3. Cell after 5 h autolytic incubation. Note granules on wall surface (arrows). Note also the occurrence on the plasma membrane of several smooth areas lacking particles.

Fig. 4. Cell after 24 h incubation. Note numerous granules on wall surface. The plasma membrane still exists, although it is only sparsely embedded with particles.

た。また、いくつかの細胞では細胞壁に直径20~40nmの顆粒が出現してきた。この顆粒は酵母や糸状菌を長時間培養した際に見られるもので、自己消化中の細胞壁の崩壊の最後の段階を示すものと考えられる。さらに5 h 後、Fig. 3 に示したように細胞はほぼ完全に崩壊し、油滴だけが細胞質に存在し、その他の構造物は見られなかった。また形質膜の顆粒の密度の減少が著しく、このことは自己消化の初期の段階で形質膜のタンパク質がプロテアーゼの影響を強く受けていることを示している。一方、細胞壁の顆粒の数は2 h 処理の場合よりかなり増え、いくつかの細胞では密度もかなり高くなっていった。24 h 後にはFig. 4 のように数多くの顆粒とひだができて変形してきたために、細胞壁の表面は非常にラフになった。細胞質のオルガネラは完全に崩壊し、顆粒はごくまばらにしか観察されなかったが、形質膜自体はほぼ完全な形を残していることがわかった。以上の結果は、自己消化後の細胞を水洗や固定という処理によって調製した試料でも起こった。従って、細胞壁の変化は人為的なものではなく純粹に自己消化による変化であることが示された。

## 要旨

*S. cerevisiae* を天然培地中、増殖上限を超える37°Cという高温で培養し、その後46°Cで適当な時間インキュベートした後、その細胞の超微構造の変化をフリーズエッチング法により電子顕微鏡で観察した。46°Cでのインキュベーションを行わないと自己消化は認められなかった。従って37°Cの高温培養でも少なくとも対数増殖期中は自己消化は起こらないことがわかった。酵母の自己消化による細胞の超微構造の

変化は、まず、細胞質のオルガネラが大きく崩壊し、ついで形質膜の顆粒、すなわち膜タンパク質の消失が起こり、それと並行して細胞壁の変化が見られ、直径が20~40nmの顆粒が出現して表面がラフになった。このように酵母の自己消化は、最後に細胞壁が崩壊したが、タンパク質を失った形質膜は崩壊せずに残った。以上の結果は自己消化の過程を明らかにしたばかりでなく、培養中は安定に増殖した菌体を簡単な方法で自己消化させることができることを示しており、その有用性が示唆された。

## 文献

1. Mitchell, R. and Sabar, N. (1966) *J. Gen. Microbiol.* **42**, 39-42.
2. Polacheck, Y. and Rosenberger, R. F. (1975) *J. Bacteriol.* **121**, 332-337.
3. Reyes, F., Lahoz, R. and Moreno, A. V. (1981) *J. Gen. Microbiol.* **126**, 347-353.
4. Reyes, F., Calatayud, J. and Martinez, M. J. (1988) *FEMS Microbiol. Lett.* **49**, 239-243.
5. Trinci, A. P. J. and Righelato, R. C. (1970) *J. Gen. Microbiol.* **60**, 239-249.
6. Peret-Leblic, M. I., Reyes, F., Lahoz, R. and Archer, S. A. (1982) *Can. J. Microbiol.* **28**, 1289-1295.
7. Sugimoto, H. (1974) *J. Food. Sci.* **39**, 939-942.
8. Saheki, T. and Holzer, H. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **384**, 203-214.

9. Behalova, B. and Beran, K. (1986) *Acta Biotechnol.* **6**, 147-152.
10. Yamamura, M., Takeo, K. and Kamihara, T. (1991) *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2861-2864.
11. Takeo, K., Yamamura, M. and Kamihara, T. (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* **61**, 297-300.
12. Branton, D. (1971) *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B.* **261**, 133-13.
13. Takeo, K., Nakai, E. and Tanino, T. (1981) *J. Electron Microsc.* **30**, 220.

### 第3章 膜変化の応用

第1部第1章で、*Saccharomyces* 酵母は工業用培地でも高温で増殖できることを示した。本章ではこの高温増殖菌体を、酵母エキス製造に利用することを目的に検討した結果を示す。

医薬や培養培地成分として利用されている酵母エキスの製造で最も重要な条件は、酵母の強固な細胞壁を効率よく破壊し、しかもできるだけ内容物を穏和な条件で抽出するということである。そのためには自己消化法が最も適しているが、酵母の菌体懸濁液を比較的穏和な条件でインキュベートしてもなかなか自己消化は起こらないので、それを促進するためにトルエンや酢酸エチルなどの有機溶媒が用いられている。しかし、有機溶媒除去の操作やそれ自身の有害性を考えると、簡便でより無害な方法の開発が望まれる。そこで本章では、先に述べ

たように高温下において膜の流動性が不可逆的に上昇し、しかも培養中には自己消化が起こらない<sup>1)</sup> ことに着目し、高温培養菌を適当な温度でインキュベートすることによって、有機溶媒を使用しなくても十分な自己消化を導き効率のよい酵母エキス製造に利用できることを示す<sup>2)</sup>。

## 実験方法

酵母の培養 *S. cerevisiae* ATCC 7753 を第 1 部第 1 章と同様の方法で培養した。

酵母細胞の自己消化の評価 集めた菌体(50–60 mg 乾燥重量)を、脱イオン水で 2 回洗浄後、 $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。この菌を解凍後、脱イオン水 10 ml に懸濁し、 $45^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。必要な場合は酢酸エチルおよびトルエンを菌体 50 mg 当たり 0.3 ml になるように加えた。インキュベーション後菌体を遠沈により除き、菌体から流出した Lowry 法<sup>2)</sup> に陽性な物質の量を自己消化の指標とした。

光学顕微鏡および電子顕微鏡による細胞の観察 種々の温度で培養した細胞の形態をインキュベーション前後で光学顕微鏡により観察し、細胞壁と細胞内膜系の形態の変化は第 1 章方法(3)により試料を調製し、フリーズフラクチャー法により電子顕微鏡で調べた。

細胞壁溶解酵素に対する感受性 細胞壁溶解反応は酵母細胞 60 mg (乾燥重量)を zymolyase 20T(生化学工業) 1 mg、1 M D-ソルビトールを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.2) 8 ml および脱イオン水 2 ml を含む全量 10 ml 中、 $30^{\circ}\text{C}$  で攪拌しながら行い、必要な場合は 2-メルカプトエタノール 0.1 ml を溶解補助剤として加えた。反応後、

反応液の一部を脱イオン水で100倍に希釈して610 nmでの濁度を測定し、反応開始時の濁度に対する比率を求め、細胞壁溶解の指標とした。

## 結果と考察

### 高温培養菌体の自己消化

第1部第1章記載の方法によって廃糖蜜培地で41 h 35~40°Cの高温で培養した菌体を45°Cでインキュベートすることによって起こる自己消化を経時的に測定した結果を Fig. 1-A に示す。自己消化指数 (autolysis index) は、タンパク定量で得られた660 nmでのO.D値を乾燥菌体1 mg 当りに換算し、これに100を乗じた値で表わした。30°C培養菌では30 hのインキュベーションを通じて自己消化能が低く、培養温度が高い菌体ほど45°Cにおける自己消化が顕著に起こることがわかった。特に、38°Cおよび40°C培養菌の場合は、超音波で破碎した同量の細胞から得られたLowry法陽性物質の量に匹敵する値が得られた。このことは自己消化がほぼ完全に起こったことを示している。Fig. 1-Bは、酢酸エチルの自己消化促進効果を30°C培養菌と40°C培養菌で比較したものである。いずれの場合も酢酸エチル添加による自己消化の上昇がみられ、30°C菌では特にその効果が大きいことが示された。しかし、酢酸エチルを添加した30°C培養菌よりも40°C生育菌の酢酸エチル無添加の方が自己消化能が高かった。トルエン添加についても同様の現象が観察された(データ省略)。高温になるほど最大増殖度が減少するが(第1部第1章のFig. 4)、自己消化能は増大することから、培養液当たりで自己消化を比較することが実際的であると考えられる。Table 1に示したように培養液当たりの自己消化能を



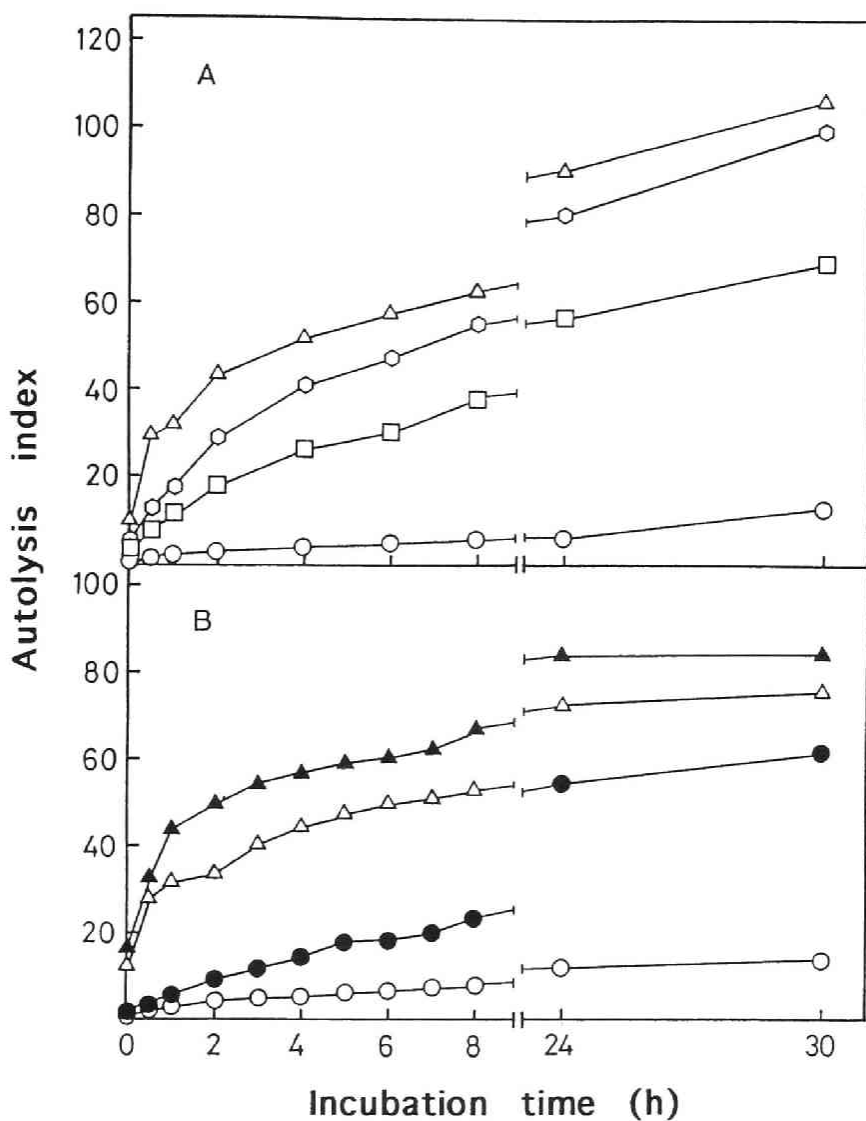


Fig. 1. Autolytic activity of *S. cerevisiae* cells.

Details in incubation and autolysis of cells, and in autolysis index are given in the text. (A) Comparison of autolytic activity of cells grown at 30°C (○), 36°C (□), 38°C (◇) and 40°C (△) to the stationary phase. (B) Effects of ethyl acetate on autolysis of yeast cells grown at 30°C and 40°C to the stationary phase. 30°C-grown cells incubated without (○) and with ethyl acetate (●); 40°C-grown cells incubated without (△) and with ethyl acetate (▲).

Table 1. Comparison of the degree of yeast cell autolysis on the basis of unit volume of cultures

Cultivation temp. (°C)	Growth <sup>a</sup> (mg/ml culture)	Autolysis index <sup>b</sup>	
		per mg cells	per ml culture
30	11.7	6.0	70.2
36	9.7	38.1	369.6
38	7.4	55.6	411.4
40	2.7	63.3	170.9

a: Cells were grown to the stationary phase at various temperatures indicated.

b: Incubation for autolysis at 45°C was done for 8 h. For the calculation of the autolysis index, see the text.

比較すると、36°Cと38°C培養菌では30°C培養菌の5～6倍高いことがわかった。一方、40°C培養菌では30°C培養菌の約2倍程度であった。以上の結果から、酵母エキス生産には36～38°Cの生育菌を使うことが最も効率的であることが明らかになった。

#### 高温培養および自己消化後の酵母細胞の構造変化

自己消化処理前の廃糖蜜培養菌は、どの培養温度でも形や大きさは正常で、超微構造的にも細胞壁、形質膜に変化は認められなかった(データ省略)。このことは、先の自己消化処理のインキュベーション開始時(0h)の自己消化指数が小さい、すなわち、細胞内容物の漏れがほとんどないことと一致する。なお、0hでの自己消化指数が0でないのは、おそらくインキュベーション前に菌の凍結融解を行ったためと考えられる。

#### 高温培養菌の細胞溶解酵素に対する感受性

前述のように廃糖蜜を用いて高温で培養した菌では、細胞壁を含めて構造的な変化は認められなかった。しかし、細胞壁溶解(zymolyase)に対する感受性は、2-メルカプトエタノール存在下でも培養温度が高くなるにつれて著しく低下した(Fig. 2)。このことは廃糖蜜培地における高温培養によって細胞壁に、電子顕微鏡では検出されないような何らかの変化が起こって細胞壁溶解酵素に対する耐性が獲得されていることを示している。なお、2-メルカプトエタノールを加えないと、高温培養菌ばかりでなく30°C培養菌でもzymolyaseによる溶解はほとんど起こらなかった(データ省略)。このことは廃糖蜜培地では温度とは無関係に細胞壁が強固になることを示している。

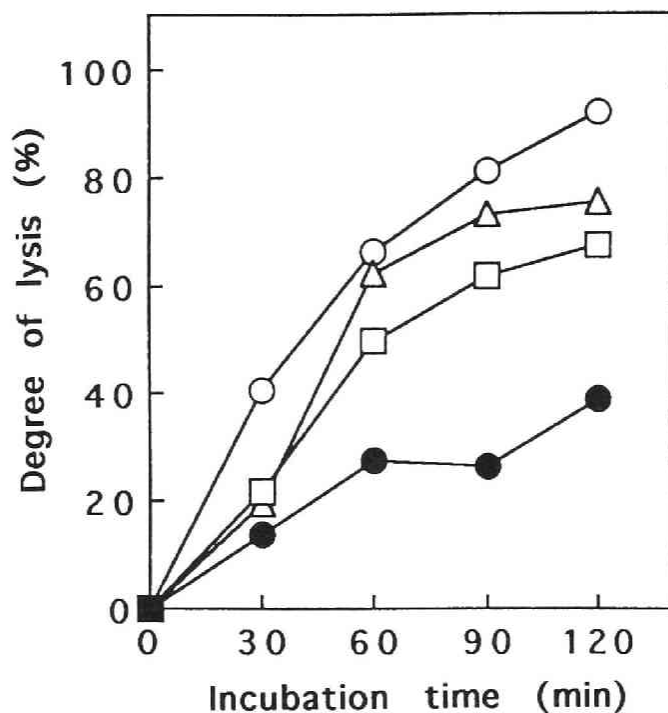


Fig. 2. Susceptibility to lytic enzyme of cells grown at elevated temperatures.

Cells grown at 30°C (○), 36°C (△), 38°C (□) and 40°C (●) to the stationary phase were lysed by zymolyase with 2-mercaptoethanol.

## 要旨

*Saccharomyces* 酵母を36~40°Cで廃糖蜜で培養した菌体を45°Cでインキュベートすることによって効率よく自己消化させる方法を開発した。有機溶媒を用いないため、無害でしかも簡便な方法として酵母エキス製造に利用できる可能性があることを示した。また、廃糖蜜培養菌では、2-メルカプトエタノール存在下でも細胞壁溶解酵素 (zymolyas) に対する感受性が減少し、膜だけでなく壁の構造にも高温に対する適応が起こることがわかった。

## 文献

1. Takeo, K., Yamamura, M. and Kamihara, T. (1989) FEMS Microbiol. Lett. **61**, 297-300.
2. Yamamura, M., Takeo, K., and Kamihara, T. (1991) Agric. Biol. Chem. **55**, 2861-2864.
3. Lowry, H.O., Rosebrough, J. N., Farr, L. A. and Randall, J. R. (1951) J. Biol. Chem. **193**, 265.

## 本論文の要約

生物にとって、環境の変化(ストレス)に対して応答し、適応することは生命を維持するうえで極めて重要な課題である。本論文は、“温度”という生物一般に最も普遍的な環境を取り上げ、対象としては真核生物を、その中でも温度変化の影響を直接受けると考えられる単細胞の酵母を選び、脂質代謝、呼吸と発酵、および細胞形態の面からその応答・適応の機構を生化学的に研究した結果をまとめたものである。

ここでは、典型的な中温酵母であり35°Cを増殖上限温度とする *Saccharomyces* 酵母と、比較的低温を好み27°Cが上限温度である *Ph. rhodozyma* を用い、まず、それぞれ40°C、28°Cという高温における培養条件を確立した。すなわち、*S. cerevisiae* では、Shermanによって記述された6%という高濃度の酵母エキスを含む天然培地を用いなくても、合成培地に高濃度(0.5 M~1 M)のソルビトールなどを加えてその浸透圧を上げることによって形質膜を保護するか、あるいは本酵母の構成脂肪酸のうちパルミチン酸またはオレイン酸を添加して膜の脂質組成を変えると、40°Cでも菌の増殖が可能となることを示した。これらの添加効果は、ソルビトールが最も高く、オレイン酸がそれに次ぎ、飽和脂肪酸のパルミチン酸は予想に反して最も低かった。さらに、40°Cでは酢酸塩を添加しても増殖可能となり、この温度ではピルビン酸からのアセチルCoAの供給がネックになることが示唆された。また、工業的に汎用される廃糖蜜培地でも接種量を $10^7$  cells/mlに上げると酵母は40°Cでも増殖し得ることがわかった。一方、*Ph. rhodozyma* では28°Cにおける菌の増殖にとって最も効果的な条件は、接種量を $10^8$

cells/ml まで上げることであり、ソルビトールは低いながらも促進効果を示した。

次に、このような条件下の酵母の高温増殖の機構を知るために、増殖と脂質組成との関係、さらに膜の流動性と脂質組成との関係を調べた。ソルビトールを添加して *S. cerevisiae* を培養した場合、ソルビトールの保護のもとに増殖が始まると次第に脂質組成が変化することがわかった。すなわち脂質のアシル基ではパルミトレイン酸の減少とオレイン酸の増加が見られ、その傾向は全脂質および膜に局在するリン脂質のいずれにおいても認められた。一方、全ステロール含量は減少したが、膜にのみ存在する遊離型ステロールの含量は増加した。一般に、膜の流動性に最も大きな影響を与えるのはリン脂質のアシル基であり、遊離型ステロールがそれを調整すると言われている。上記のような高温培養に伴う脂質組成の変化は、高温による膜の流動性に対する適応の結果であるとする、高温増殖に関して次のようなことが考えられる。(1) 膜の流動性にとって重要なのは、一般に信じられているような脂肪酸の不飽和度ではなく、特定の不飽和脂肪酸、この場合はパルミトレイン酸であり、高温ではその減少によって膜の流動性の上昇が防がれる。(2) パルミトレイン酸の減少は鎖長の伸長、すなわち  $C_{18}$  酸の生成とその不飽和化を促しオレイン酸が増加する。(3) オレイン酸は少なくとも高温増殖を著しく抑制しないことは確かであり、むしろなんらかの積極的な役割を果たしている可能性もある。(4) 脂肪酸組成の変化が全脂質とリン脂質の両方で認められたことは、脂肪酸合成と膜への配分は温度によって同様に調節されていることを示している。(5) 膜のステロール、すなわち遊離型ステロールの増加は膜の流動性

の上昇を防ぐことになるのでリン脂質の脂肪酸の変化と同様、高温への適応の結果であると考えられる。(6) 一方で全ステロールが減少することは貯蔵のためのステロールエステルの減少を意味しており、その生理的意味は不明であるが、少なくともステロールでは合成と膜への配分が別々に調節されていることを示している。

いずれにしても、高温ではパルミトレイン酸の減少と遊離型ステロールの増加によって膜の流動性の上昇が緩和され、本酵母は増殖可能となることがわかった。このことは、オレイン酸やパルミチン酸添加の際の脂質組成の変化からも支持された。すなわち、オレイン酸添加の場合には、オレイン酸はそのまま菌体に取り込まれ、そのフィードバック阻害によってパルミトレイン酸が減少し、ソルビトール添加高温適応の場合と同様の脂肪酸組成となることが明らかになった。この場合も、その変化は全脂質とリン脂質の両方で観察された。オレイン酸添加の場合、ステロール含量はかなり減少し全ステロールではエルゴステロールの前駆体の蓄積が見られた。このことはオレイン酸の増殖促進効果がソルビトールの場合よりも劣ることの少なくとも一つの原因であることを示すとともに、オレイン酸は脂肪酸合成ばかりでなくステロール合成をも制御するという新しい事実の存在を意味している。一方、膜を構成する遊離型ステロール含量は、オレイン酸添加で増加し、ソルビトール添加の場合と同様、流動性の上昇が防がれると判断された。一方、パルミチン酸を添加するとパルミチン酸自身は増えたが、その不飽和化も進み、その結果パルミトレイン酸が顕著に増加し、鎖長の伸長が妨げられてオレイン酸の減少を招いたと考えられる。パルミチン酸添加による増殖がソルビトールやオレイン酸の場合に比べ



で劣るのは、このようにパルミトレイン酸が増えてオレイン酸が減少するためであると推定される。

本酵母はソルビトールや脂肪酸ばかりでなく、脂肪酸の前駆体である酢酸を添加すると40°Cでも増殖できることから、ピルビン酸からアセチルCoAの供給に関わるピルビン酸脱水素反応が40°Cではネックとなっていることが示唆された。このことは、30°C培養とは異なり40°Cでは酢酸が共存すると[U-<sup>14</sup>C]-グルコースから脂質への放射能の取り込みがほとんど見られなかったことから支持された。一方、ソルビトール添加の場合は[U-<sup>14</sup>C]-グルコースからの脂質の合成が明確に示された。従って、ソルビトール共存下では膜が保護されている間にグルコースからピルビン酸を経てアセチルCoAが生成し、次いで高温に適した組成になるように脂質の合成と、膜への配分が起こることが明らかになった。ソルビトール存在下のピルビン酸からアセチルCoAの供給の機構は不明であるが、(1)ソルビトールの濃度が高い(1 M)ので培地の溶存酸素が欠乏し、その結果、嫌氣的なピルビン酸脱水素系が誘導されるのか、あるいは、(2)ソルビトールによって培地の浸透圧が高まりグリセロールが蓄積し、それを代謝するためにNADHが消費され、それを補うためにNAD-aldehyde dehydrogenase 活性が出現して、pyruvate decarboxylase、本酵素、および acetyl CoA synthetase が順次働いて、ピルビン酸からアセチルCoAが供給されるという二つの可能性が提示された。

以上のような、脂質組成の変化を介する温度と増殖との関係の普遍性を知るために、低温(20°C)における脂質組成の変化についても調べた。その結果、全脂質ではパルミトレイン酸が増えてオレイン酸が減

り、温度適応の普遍性が示されたが、膜の脂質組成は脂肪酸、遊離型ステロールはともに30°C対照菌とあまり変わらず、膜脂質レベルでの温度適応はほとんど起こらないことがわかった。全脂質で増加したパルミトレイン酸は、貯蔵型の脂質画分(トリアシルグリセロールとステロールエステル)にみられ、主としてステロールエステル画分に存在することがわかった。以上の事実は、低温でも温度に適応してパルミトレイン酸が増加しオレイン酸が減少するが、その大部分は膜へ配分されずに貯蔵型として存在することを示している。

蛍光プローブを用いる蛍光偏光消去法により intact な菌体の膜の流動性を測定した。その結果、20°Cと30°C培養菌ではその値はほとんど変わらないことが確認された。また40°Cでは膜脂質の変化にもかかわらず膜の流動性はかなり高くなっていることが示された。

一方、*Ph. rhodozyma* では28°C培養でパルミチン酸が上昇しリノレイン酸が減少したが、高温適応は主として遊離型ステロールの増加によることが示された。この酵母も基本的には *S. cerevisiae* と同様の膜脂質組成の変化によって高温(28°C)に適応していることがわかったが、*S. cerevisiae* のように顕著な脂肪酸組成の変化が起こらないので高温に対する適応が不十分となり、従って、接種量を上げないと28°Cで増殖できないと推定される。また、この酵母が生産するアスタキサンチンの含量が28°Cでは顕著に増加したことから、膜の流動性の上昇の原因の一つと考えられる活性酸素による膜脂質の過酸化を、ラジカルスカベンジャーとしてのアスタキサンチンがその含量の増加によって防ぐという可能性が示された。このことは、酵母の高温適応に新たな機構を加えたことになる。

高温に対する応答・適応は、膜の脂質組成以外に呼吸と発酵にも及んだ。高温下ではすべての条件で菌体の呼吸能が低下した。呼吸を司る器官であるミトコンドリアは、正常な場合は二重膜構造を有し、呼吸系の酵素が局在する内膜が発達しクリステを形成している。ところが、高温培養菌では、呼吸能が低いにもかかわらず二重膜構造は明瞭に認められたが、クリステは存在しなかった。さらに、高温下では条件によって呼吸欠損(RD)変異が高頻度で誘導されることがわかった。特に、合成培地でソルビトールを添加した場合にはその発現頻度は90%以上に及んだ。ところが、脂肪酸添加の場合には、20~30%に留まるばかりでなく、ソルビトールによる誘導も抑制された。高温ではミトコンドリアの膜の流動性が高まり、DNAが膜から離れやすくなり、分子内相同部分の組み換えによってDNAが断片化されてRD変異が発現すると考えられる。ソルビトール添加と脂肪酸添加の場合にRD変異の頻度が著しく違うのは、脂肪酸はミトコンドリアの膜にも取り込まれ膜が安定化されるのに対し、ソルビトールはミトコンドリアの内外の浸透圧には影響せず、従って膜は高温によって流動性が上昇し不安定な状態になるためと推定された。そこでミトコンドリアの膜の脂質組成を調べたところソルビトール添加培養でも対数中期ではすでに適応が起こっており、膜が安定化されていることがわかった。従って、増殖のごく初期のミトコンドリアを集めてその膜の分析をするという困難な実験の必要性が残された。

さらに、40℃という高温はイノシトール欠乏やエタノール添加のような他のストレスと同様出芽細胞の分離抑制をもたらし、その結果、イノシトール欠乏で見られるような見かけの凝集が起こることがわかっ

た。ここでも他のストレスによる形態変化の場合と同様に、イノシトールリン脂質シグナル伝達の指標となる菌体内イノシトール1,4,5三リン酸含量の一過性の上昇が見られた。そしてそれが引き金となって上記の細胞形態の変化、すなわち多細胞化が起こり、高温ストレスに対抗できるようになるという新しい考え方が示された。

以上は、高温ストレスに伴う応答、適応機構について、脂質代謝、呼吸と発酵、細胞形態の変化に焦点を当てて行った基礎的な研究の結果であるが、一方、高温増殖を応用面に取り入れる可能性も示された。*Saccharomyces* 酵母をエタノール生産菌として利用する場合、発酵熱による温度の上昇を防ぐために多量の冷却水を必要とする。そこで本研究で示された高温培養の方法をさらに発展させれば冷却水の大幅節減という利益をもたらすことになる。また40℃という高温でもエタノールの発酵生産が可能であることが明らかになったので、熱帯地方などの高温環境下のエタノール生産に利用できるであろう。さらに、酵母エキスの製造に高温増殖菌を用いることにより、酵母の自己消化を有機溶媒を用いずに行うことができることがわかったのでより安全で無害な製造方法の開発が可能となると期待される。

## 謝辞

この研究は、京都大学工学部技官の勤務のなかで、上原悌次郎教授の日常的、直接的なご指導のもとに行ないました。非才の私がようやく研究をまとめることができましたのも、ひとえに教授の並々ならぬ薫陶によるものであり、ここに改めて感謝いたします。

また、この研究を進めるにあたって、田中渥夫教授のあたたかい励ましをいただきました。さらに、研究室の皆様にもいろいろとご協力を受けました。特に、井上東彦氏と河野圭太氏からは、研究上のご助力を得ました。

研究の一部は、奈良女子大学 理学部 生物学教室 西村公臣前教授、高橋智恵子氏、および 千葉大学 真核微生物研究センター 竹尾漢治助教授との共同研究によって行なうことができました。

また、酵母の光学顕微鏡写真撮影は奈良女子大学 理学部 生物学教室 鈴木孝仁教授に、培地の浸透圧測定はサントリー（株）中谷和夫博士に、酵母の超薄切片法による電子顕微鏡写真撮影は名古屋大学 医学部 田中健治教授に、膜の流動性の測定は通産省工業技術院生命工学工業技術研究所 小松泰彦 研究室長、大淵 薫 主任研究員にお世話になりました。根本泰行博士（現農工大 助教授）には、酵母のミトコンドリアとそれに関する実験法について種々ご指導をいただきました。

また、三共（株）バイオサイエンス研究所 湊 貞正 前所長ならびに 滝口 洋 同所次長には、酵母の培養に使用した廃糖蜜をご恵与いただき、「酵母の高温培養法」に関する特許申請にあたりご高配を賜りました。

以上、多くの方々から受けたご指導、ご協力に深く感謝し、厚くお礼申し上げます。

## 発表論文

### 原著

- (1) Yamamura, M., Nagami, Y., Vongsuvanlert, V., Kumunuanta, J. and Kamihara, T.: Effects of elevated temperature on growth, respiratory deficient mutation, respiratory activity, and ethanol production in yeast (1988) *Can. J. Microbiol.* **34**, 1014-1017.
- (2) Takeo, T., Yamamura, M. and Kamihara, T.: Ultrastructural alterations in *Saccharomyces cerevisiae* cells in association with elevated temperature-induced autolysis (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* **61**, 297-300.
- (3) Yamamura, M. and Kamihara, T.: Respiratory deficient mutation at elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae*: Stimulatory effect of inorganic salts (1990) *Agric. Biol. Chem.* **54**, 827-828.
- (4) Yamamura, M., Takeo, K. and Kamihara, T.: *Saccharomyces* yeast cells grown at elevated temperatures are susceptible to autolysis (1991) *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2861-2864.
- (5) 上原悌次郎、山村みどり：酵母の温度適応 (1992) *日本醸造協会誌* **87**, 773-779.
- (6) Yamamura, M., Takahasi, C., Nishimura, K., Takeo, K. and Kamihara, T.: Effect of elevated temperature on lipid composition in *Saccharomyces cerevisiae* *J. Gen. Microbiol.* (to be submitted).

- (7) Yamamura, M., Inoue H. and Kamihara, T.: Regulation of Acetyl CoA biosynthesis at elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* Biosci. Biotech. Biochem. (to be submitted).

### 国際学会プロシーディング

- (1) Kamihara, T., Yamamura, M., Nagami, Y., Nakamura, I., Vongsvanlert, V. and Kumnuanta, J.: Effect of elevated temperatures on growth, ethanol production and respiration of yeasts; The fourth JSPS-NRCT seminar on biotechnology (1984) Microbial utilization of renewable resources 4, 24-31.
- (2) Kamihara, T. and Yamamura, M.: Effect of elevated temperature on lipid composition in yeast cells; 15th International specialized symposium on yeast (1991). Abstracts p.60.
- (3) Kamihara, T. and Yamamura, M.: Temperature adaptation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Changes in lipid composition, The eighth JSPS-NRCT seminar on biotechnology (1992) Microbial utilization of renewable resources 8, 560-568.

### 特許

「酵母の高温培養法」 (特願昭 62-130825 号)

### その他の発表論文

- (1) Yamamura, M., Teranishi, Y., Tanaka, A. and Fukui, S.: Preparation of protoplasts of hydrocarbon-utilizing yeast cells and their respiratory activities (1975) Agric. Biol. Chem. 39, 13-20.

- (2) Tanaka, A., Yamamura, M., Kawamoto, S. and Fukui, S.:  
Production of uricase by *Candida tropicalis* using *n*-alkane as a  
substrate (1977) Appl. Environ. Microbiol. **34**, 342-346.
- (3) Kawamoto, S., Tanaka, A., Yamamura, M., Teranishi, Y., and  
Fukui, S. :Microbody of *n*-alkane-grown yeast: Enzyme localization  
in the isolated microbody (1977) Arch. Microbiol. **112**, 1-8.
- (4) Kawamoto, S., Ueda, M., Nozaki, C., Yamamura, M., Tanaka A.  
and Fukui, S.: Localization of carnitine acetyltransferase in  
peroxisomes and in mitochondria of *n*-alkane-grown *Candida*  
*tropicalis* (1978) FEBS Lett. **96**, 37-40.
- (5) 植田充美、川本進、野崎周英、山村みどり、田中渥夫、福井三郎：  
*n*-アルカン生育酵母 *Candida tropicalis* におけるcarnitine  
acetyltransferase の細胞内分布 (1979) ビタミン **53**, 177-181.
- (6) 山村みどり：メタンを利用して生育する酵母 (1980) 化学と工業  
**33**, 639-640.
- (7) Takeo, K., Yamamura, M., Kamihara, T., Nishimura, K. and Miyaji,  
M.: Efficient autolysis in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*  
and *Candida albicans* after amphotericin B-induced death. J. Med.  
Vet. Mycol.( submitted).





