

氏名	やまむら 山 村 みどり
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	論 工 博 第 2846 号
学位授与の日付	平成 6 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	酵母の高温適応：その生化学的機構

論文調査委員 (主 査)
 教 授 上原悌次郎 教 授 一瀬光之尉 教 授 齋藤 烈

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、温度ストレスに対する酵母細胞の応答・適応の生化学的機構に関する研究をまとめたもので緒論、3部、14章、及び要約より成っている。

緒論では本研究の背景と目的を記し、第1部で酵母の増殖に及ぼす温度の影響を述べている。第1章では種々の酵母の30°Cと40°Cの増殖を比較し、増殖の上限温度が35°Cの *Saccharomyces cerevisiae* は通常の天然培地でも高接種量 ($10^6 \sim 10^7$ cells/ml) では40°Cで増殖し、6%酵母エキス培地では低接種量 (10^5 cells/ml) でも40°Cで培養できることを示した。第2章では合成培地を用い、特に *S. cerevisiae* の40°Cにおける培養条件を研究し、ソルビトール等で培地の浸透圧を上げて形質膜を保護するか、あるいはパルミチン酸やオレイン酸、または前駆体の酢酸を加えて菌を培養し膜を強化すると40°Cでも増殖することを示した。第3章は、低温(20°C)培養では30°C培養に比べてラグ期の延長、増殖速度の低下が見られるが最高増殖度には差がないことを示している。

第2部は温度適応の機構に関するもので、第1編は増殖と脂質代謝の関係を示し、第1章では、*S. cerevisiae* の高温適応につき次の事実を明らかにしている。(1)ソルビトールの保護下、増殖が始まると全脂質とリン脂質でパルミトリン酸の減少とオレイン酸の増加が見られ、一方、全ステロールは減少するが、遊離型ステロールは増加する。このような脂質組成の変化は高温による膜の流動性の上昇への適応の結果であり、特に流動性に影響するのは脂肪酸の不飽和度ではなく、特定の不飽和脂肪酸であるという新しい事実を示した。(2)オレイン酸添加培養でも同様の変化が見られ、またオレイン酸によるステロール合成の制御が示された。(3)パルミチン酸添加では、パルミチン酸ばかりでなく、パルミトリン酸も増加し、オレイン酸は減少するという上とは逆の変化が起こり、低い増殖度を裏づけた。(4)酢酸の増殖効果は、40°Cではピルビン酸脱水素酵素複合体の活性低下を反映している。ソルビトールの効果は、膜を保護するばかりでなく、ピルビン酸からアセチル CoA の供給を別の系で支えることを示唆しており、[U- 14 C] グルコースと [2- 14 C] 酢酸ソーダからの脂質合成を調べてこれを実証した。第2章では、低温でも同様の機構に基づく適応が起こりパルミトリン酸が増加し、オレイン酸が減少するが、その大部分は膜へ配

分されず貯蔵型として細胞内に存在することを示した。

第2編は高温適応ではエネルギー代謝の低減のために呼吸能が低下することを示している。第1章は、高温培養では呼吸能が低下し、条件によっては呼吸欠損変異が誘導され、特にソルビトール添加培養では90%以上の高頻度で起こり、オレイン酸添加の際にはその発現率は低く、しかもソルビトールによる誘導も抑制されることを見出し、第2章ではこのような添加物による変異発現の違いはミトコンドリア膜の安定性に依存すると推定した。第3章では、高温培養による呼吸能の低下に伴いアルコール発酵はむしろ促進されることを示した。第2章では、イノシトールリン脂質依存性の膜を介するシグナル伝達の亢進が高温による多細胞化の引き金となることを明らかにし、高温ストレス→シグナル伝達→出芽細胞の分離抑制→多細胞化という興味ある機構を提示している。

第3部では、上記の高温適応が高温下の膜の変化に基づくことを明らかにした。第1章で、培養温度による膜の流動性の変化を実測し、膜脂質組成に大差のない20°Cと30°C培養菌体では流動性もほぼ等しいことを実証した。40°C培養菌では膜脂質の適応にもかかわらず流動性の上昇が観察され膜密度の低下が示唆された。第2章では高温培養菌は膜の流動性の上昇を反映して細胞膜系が弱く、まず内膜系が崩壊し、次いで形質膜タンパク質の消失と細胞壁の変化が起こり、最後に細胞壁が崩壊するが、形質膜は残ることを示した。第3章では実用的な廃糖蜜培地を用い、高温で培養した菌の自己消化には有機溶媒は不要であり、また36~38°Cでの培養が菌体収量と自己消化率との関係で最適であることを見出し、安全で効率のよい酵母エキス製造法開発の可能性を示した。

最後に本論文全体の要約が記されている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、温度ストレスに対する酵母細胞の応答・適応の生化学的機構に関する研究の結果をまとめたもので、得られた主な成果は次のとおりである。

1. *Saccharomyces* 酵母の生育温度の上限は35°Cであるが、ソルビトール等で培地の浸透圧を上げて細胞膜を保護したり、適当な脂肪酸やその前駆体の酢酸塩を加えると高温(40°C)でも本酵母は増殖できることを見出した。

2. 40°Cにおける増殖と膜脂質組成の変化から、膜リン脂質のバルミトレイン酸残基の減少と、それに伴うオレイン酸残基の増加、及び遊離型ステロールの増加が高温による膜の流動性の上昇を防ぐのに適していることを示した。

3. 40°Cではミトコンドリア内膜の発達の抑制と呼吸能の低下が起こり、条件によっては呼吸欠損変異が高頻度に発現した。また、呼吸能低下に伴い、ピルビン酸からアセチル CoA の供給が抑制され、高温培養における脂肪酸や酢酸塩の添加の必要性が裏づけられた。さらに、ソルビトール添加培養ではピルビン酸からアセチル CoA 生成のバイパスが働くことを見出した。

4. 高温ではイノシトールリン脂質関与のシグナル伝達系が亢進し、その結果、出芽細胞の分離が抑制され、多細胞化が起こることを明らかにした。

5. 高温増殖酵母では有機溶媒を用いなくても自己消化が容易に起こることを見出し、安全で効率のよ

い酵母エキス製造方法開発の可能性を示した。

以上、本論文は温度ストレスに対する酵母細胞の応答・適応について、リン脂質を構成する特定脂肪酸による膜の流動性の調節、エネルギー代謝（呼吸活性）の低減、シグナル伝達を介する多細胞化という全く新しい機構を見出し、さらに高温培養の応用についても成果を挙げており、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成5年12月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。