

氏 名	宮 本 典 子 みやもと ふみこ
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 152 号
学位授与の日付	昭 和 44 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 植 物 学 専 攻
学位論文題目	Respiration and fermentation in relation to growth and copper resistance of yeast (酵母の成長および銅抵抗性と呼吸・発酵の関係)

論文調査委員 (主 査) 教授 芦田譲治 教授 北村四郎 教授 畠山伊佐男 教授 竹内郁夫

論 文 内 容 の 要 旨

末端呼吸系酵素に欠陥のある酵母変異株は、正常な呼吸を行わず、生活のエネルギーを発酵により得ているものと考えられる。しかし、こういう変異株も、微量の酸素吸収を行なうことが知られていた。主論文第1部と第2部は、通常の末端呼吸系を経由しないこの酸素吸収の役割りを追求したものである。

呼吸欠損菌の生長速度は、酸素の供給がなければ、著しく低く、嫌気状態での培養を繰返せば、一層低下し、遂に生長停止に至ることを認めた。これは呼吸欠損菌の物質代謝において、酸素が重要な意味をもつことを示す。

種々の欠損株の酸素吸収量は、無基質においても、グリコース基質においても、それらの母株における値の1—2%程度であった。エタノールは、正常株では、呼吸基質としてよく利用されるが、呼吸欠損菌では利用されない。また、酸素吸収活性は、正常株では、対数的増殖期に低く、定常期に高くなるのに対し、呼吸欠損株では逆に、対数的増殖期における方が、定常期よりも高いことがわかった。

呼吸欠損菌の酸素吸収は、青酸塩の阻害をうけ難いが、一酸化炭素には強く阻害をうける。後者による阻害は光照射によって解除される。

酸素吸収に対する酸素分圧の影響をみたところ、正常株の酸素吸収は酸素分圧 10mmHg で飽和するのに対し、呼吸欠損株の酸素吸収は広範囲にわたって酸素分圧に依存した。ミハエリス恒数に相当する値は、正常株では $7 \sim 8 \times 10^{-3} M$ であるのに対し、呼吸欠損では $1 \times 10^{-4} M$ であり、呼吸欠損細胞のもつ酸素受容物質の酸素に対する親和力は、正常株のそれに比しはるかに小さく、従って呼吸欠損細胞は、チトクローム酸化酸素以外の系により、酸素を利用するものと考えられる。

正常株において、嫌気培養のとき、不飽和脂肪酸とエスゴステロールを与えると、好気培養と同程度の生長が得られることが知られていたが、呼吸欠損株においても同じ事実が認められた。Tween 80 あるいはエルゴステロール片方だけでは、そういう効果はない。嫌気条件のため生長の止っている呼吸欠損株の培養に酸素を与えると生長がおこるが、酸素の代りに Tween 80 とエルゴステロールを与えても、同様に

生長がおこった。エルゴステロールを十分に与えた嫌気培養に、種々の量の酸素あるいはオレイン酸を与えた場合の生長量をみると、1分子のオレイン酸は1分子の酸素と同じ効果をもった。生長を支える効果において、2重結合1個をもつオレイン酸よりも、2個をもつリノール酸の方がより有効であり、3個をもつリノレン酸はオレイン酸の約3倍の効果を示した。また Tween 80 を十分に与えた嫌気培養の場合も、乾量増加は与えたエルゴステロール量と一定の関係を示した。これらの事実は、細胞の脂質含量が嫌気培養によって減少する事実と合わせ考え、分子状酸素が不飽和脂肪酸合成に必要であるという仮説を示唆する。

つぎに、銅は、酵母菌の酸素吸収よりも炭酸ガス排出をより強く阻害するといわれているので、銅による阻害を呼吸・発酵の面から検討し、また銅抵抗性をもつ変異株の抵抗性機作を、その面から考えようとしたのが第3部である。

普通の酵母株を母株とし、これを銅添加培地に継代培養して銅抵抗株を得た。銅無添加培地（有効脂質添加）では、好気条件・嫌気条件のいずれにおいても、両株の間に生長の差はほとんどない。銅を添加すると、銅抵抗性株の生長は、銅無添加の場合に比しやや劣るが、嫌気条件下の方が、好気条件下よりも銅阻害が大きいことがわかった。

種々の銅濃度の培地における生長を48時間培養での乾量によって比較すると、銅抵抗株では、好気・嫌気どちらの条件でも、銅1mMの存在で、かなりよい成長が見られた。しかし母株菌では、銅0.25mMの存在で、好気条件でかなりよく成長するのに、嫌気条件下ではかなりの阻害をうけた。

グリコースのみを含む緩衝液を用いた場合、銅の添加は、グリコースの消費・炭酸ガス発生、およびエタノール生成を著しく阻害する。グリコース吸収からエタノール生成に至る全過程の銅阻害の程度は、グリコース消費の銅阻害と、ピルビン酸を基質とした場合のエタノール生成の銅阻害との積にほぼ等しいので、銅の阻害部位は、グリコース吸収からピルビン酸までの過程と、ピルビン酸からエタノールに至る過程との両者にあると推定した。この点は、母菌株においても同様であった。しかし、生長しつつある銅抵抗株の培養に銅を与えた場合は、このような阻害がみられないので、銅抵抗株の抵抗性機作は、解糖・発酵系以外の系にあると推論している。

また、母株および銅抵抗株を、好気および嫌気条件下で、銅を添加あるいは添加しない培地で培養した場合の、生長経過に伴うグリコース消費、炭酸ガス発生およびエタノール生成の変化を追跡し、これらの代謝と菌体乾量増加との量的関係を、各条件において検討している。

論文審査の結果の要旨

酵母菌の呼吸欠損変異株は、通常の呼吸を行なう能力を欠くが、微量の酸素吸収を行なうことが知られていた。そこで申請者は、その微量の酸素吸収が、どういう生理的意味をもつかを調べようとした。

まず呼吸欠損株は、酸素の供給がなければ、生長が著しく阻害されることを確かめた。正常株の嫌氣的生長が、不飽和脂肪酸とエルゴステロールの添加によって促進されることが知られていたもので、これを呼吸欠損株について試したところ、同様の結果を得た。そこで生長に対する酸素の効果と、上記脂質の効果とを量的に比較して、分子状酸素が、不飽和脂肪酸とエルゴステロールの合成に必要なのであろうという

仮説に到達した。また呼吸欠損株細胞のもつ酸素受容媒体の酸素に対する親和力が、チトクローム酸化酵素のそれに比し、2ケタ余り低いことを証明した。またこの酸素吸収は一酸化炭素に強く阻害されるが、青酸塩の阻害は受けにくいことなどを見ている。

銅塩を添加した培地で培養をくりかえすと、銅抵抗性をもつ変異株が得られるが、この株にも青酸阻害をうけない微量の酸素吸収があることが知られていた。しかし不飽和脂阻酸とエルゴステロールを添加した培地を用いても、含銅培地における銅抵抗株の生長が、嫌気条件下では、好気条件下より劣ることがわかったので、銅抵抗性に関する研究の重点を発酵においた。

まず銅感性株と銅抵抗株との成長を銅の存否について比較し、同時にグリコース消費、炭酸ガス発生およびエタノール生成の経過を追ひ、それらの間の興味ある相互関係を、エネルギー供給の面から論じている。また、グリコースのみを加えた緩衝液に懸濁した細胞では、グルコース摂取からピルビン酸に至る解糖過程と、ピルビン酸からエタノールに至る過程との両者がともに銅阻害を受け易いこと、しかし、生長しつつある状態の銅抵抗性細胞では、その阻害のないことを発見し、銅抵抗性の機作が、解糖発酵系以外の系にあることを論じている。

これらの研究は、酵母菌の2種類の変異株の特性と、その酸素吸収あるいは発酵との間の関係につき新知見を得たものであって、生理学上寄与するところがある。

よって本論文は理学博士の学位論文として価値があるものと認める。