

## 酵母細胞の耐塩性に関する研究

渡部, 保夫

<https://doi.org/10.11501/3059408>

---

出版情報 : 九州大学, 1991, 博士 (農学), 論文博士  
バージョン :  
権利関係 :

酵母細胞の耐塩性に関する研究

渡部保夫

1991

①

第1章 酵母の耐塩性に関する研究

**酵母細胞の耐塩性に関する研究**

- 1-1-1 耐塩性
- 1-1-2 耐塩性
- 1-1-3 耐塩性
- 1-1-4 耐塩性
- 1-1-5 耐塩性
- 1-1-6 耐塩性
- 1-1-7 耐塩性
- 1-1-8 耐塩性
- 1-1-9 耐塩性
- 1-1-10 耐塩性
- 1-1-11 耐塩性
- 1-1-12 耐塩性
- 1-1-13 耐塩性
- 1-1-14 耐塩性
- 1-1-15 耐塩性
- 1-1-16 耐塩性
- 1-1-17 耐塩性
- 1-1-18 耐塩性
- 1-1-19 耐塩性
- 1-1-20 耐塩性
- 1-1-21 耐塩性
- 1-1-22 耐塩性
- 1-1-23 耐塩性
- 1-1-24 耐塩性
- 1-1-25 耐塩性
- 1-1-26 耐塩性
- 1-1-27 耐塩性
- 1-1-28 耐塩性
- 1-1-29 耐塩性
- 1-1-30 耐塩性
- 1-1-31 耐塩性
- 1-1-32 耐塩性
- 1-1-33 耐塩性
- 1-1-34 耐塩性
- 1-1-35 耐塩性
- 1-1-36 耐塩性
- 1-1-37 耐塩性
- 1-1-38 耐塩性
- 1-1-39 耐塩性
- 1-1-40 耐塩性
- 1-1-41 耐塩性
- 1-1-42 耐塩性
- 1-1-43 耐塩性
- 1-1-44 耐塩性
- 1-1-45 耐塩性
- 1-1-46 耐塩性
- 1-1-47 耐塩性
- 1-1-48 耐塩性
- 1-1-49 耐塩性
- 1-1-50 耐塩性

**渡部 保夫**

- 1-2-1 耐塩性
- 1-2-2 耐塩性
- 1-2-3 耐塩性
- 1-2-4 耐塩性
- 1-2-5 耐塩性
- 1-2-6 耐塩性
- 1-2-7 耐塩性
- 1-2-8 耐塩性
- 1-2-9 耐塩性
- 1-2-10 耐塩性
- 1-2-11 耐塩性
- 1-2-12 耐塩性
- 1-2-13 耐塩性
- 1-2-14 耐塩性
- 1-2-15 耐塩性
- 1-2-16 耐塩性
- 1-2-17 耐塩性
- 1-2-18 耐塩性
- 1-2-19 耐塩性
- 1-2-20 耐塩性
- 1-2-21 耐塩性
- 1-2-22 耐塩性
- 1-2-23 耐塩性
- 1-2-24 耐塩性
- 1-2-25 耐塩性
- 1-2-26 耐塩性
- 1-2-27 耐塩性
- 1-2-28 耐塩性
- 1-2-29 耐塩性
- 1-2-30 耐塩性
- 1-2-31 耐塩性
- 1-2-32 耐塩性
- 1-2-33 耐塩性
- 1-2-34 耐塩性
- 1-2-35 耐塩性
- 1-2-36 耐塩性
- 1-2-37 耐塩性
- 1-2-38 耐塩性
- 1-2-39 耐塩性
- 1-2-40 耐塩性
- 1-2-41 耐塩性
- 1-2-42 耐塩性
- 1-2-43 耐塩性
- 1-2-44 耐塩性
- 1-2-45 耐塩性
- 1-2-46 耐塩性
- 1-2-47 耐塩性
- 1-2-48 耐塩性
- 1-2-49 耐塩性
- 1-2-50 耐塩性

1991

## 目次

緒章	1
第1章 耐塩性酵母 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> の脂質組成に及ぼす食塩の影響	13
1・1 緒言	13
1・2 実験方法	14
1・2・1 使用菌株	14
1・2・2 使用培地	14
1・2・3 培養方法	14
1・2・4 脂質の <sup>14</sup> Cラベリング	15
1・2・5 細胞形態観察	15
1・2・6 細胞脂質の抽出	15
1・2・7 脂質分析	16
1・2・8 二次元薄層クロマトグラフィー及び磷脂質に含まれる放射活性の測定	20
1・3 結果	20
1・3・1 <i>Z. rouxii</i> と <i>S. cerevisiae</i> 細胞の生育に及ぼす食塩の影響	20
1・3・2 <i>Z. rouxii</i> 細胞の形態に及ぼす食塩の影響	22
1・3・3 <i>Z. rouxii</i> 細胞の脂質組成に及ぼす食塩の影響	24
1・3・4 <i>S. cerevisiae</i> 細胞の脂質組成に及ぼす食塩の影響	27
1・3・5 <i>Z. rouxii</i> ATCC 42981 株以外の4菌株の脂質組成	29
1・3・6 <i>Z. rouxii</i> 細胞の脂質組成に及ぼす培養時間の影響	29
1・3・7 <i>Z. rouxii</i> 細胞の脂質組成に及ぼす培地転換の影響	32

1・3・8	磷脂質の極性基の組成に及ぼす食塩の影響	35
1・4	考察	39
1・5	小括	45
第2章	耐塩性酵母 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> 細胞のリノール酸 合成に及ぼす食塩の影響	47
2・1	緒言	47
2・2	実験方法	47
2・2・1	使用酵母株及び使用培地	47
2・2・2	培養方法	48
2・2・3	脂質抽出及び脂肪酸分析	48
2・2・4	脂質のパルス・ラベリングと放射性脂質抽出	48
2・2・5	脂肪酸の不飽和度による分析	50
2・3	結果	51
2・3・1	<i>Z. rouxii</i> 細胞の培養と生育度	51
2・3・2	磷脂質に含まれる脂肪酸残基の合成に及ぼす食塩の 影響	52
2・3・3	トリアシルグリセロール、ステロールエステル、遊 離脂肪酸に含まれる脂肪酸残基の合成に及ぼす食塩 の影響	55
2・3・4	高濃度食塩による18:2合成抑制の検討	59
2・4	考察	61
2・5	小括	64

第3章	好塩性酵母 <i>Candida versatilis</i> の脂質組成に及ぼす食塩	
	の影響	65
3・1	緒言	65
3・2	実験方法	66
3・2・1	使用菌株及び培地組成	66
3・2・2	培養方法	66
3・2・3	生育度検定	66
3・2・4	脂質抽出	67
3・2・5	脂質分析	67
3・2・6	膜区分の調製	68
3・2・7	酵素活性の測定	68
3・2・8	タンパク質の定量	69
3・3	結果	70
3・3・1	<i>C. versatilis</i> 細胞の生育に及ぼす食塩の影響	70
3・3・2	細胞形態に及ぼす食塩の影響	73
3・3・3	脂質組成に及ぼす食塩の影響	73
3・3・4	磷脂質の脂肪酸組成に及ぼす食塩の影響	75
3・3・5	磷脂質組成に及ぼす食塩の影響	75
3・3・6	細胞膜区分の純度	78
3・3・7	細胞膜区分の脂質組成に及ぼす食塩の影響	78
3・4	考察	81
3・5	小括	86
第4章	酵母細胞の易熱性抗原タンパク質TLAa及びTLAbの同定	88
4・1	緒言	88

4・2	実験方法	89
4・2・1	使用菌株	89
4・2・2	抗血清	90
4・2・3	TLAaの精製	90
4・2・4	TLAbの精製	91
4・2・5	オクタロニー免疫二重拡散試験	91
4・2・6	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)	92
4・2・7	イムノブロットィング	92
4・2・8	TLAaのアミノ酸組成分析	93
4・2・9	TLAa及びTLAbのN-末端アミノ酸配列の決定	93
4・2・10	TLAaのエノラーゼ活性測定	93
4・2・11	TLAbのGAPDH活性測定	93
4・2・12	タンパク質の定量	94
4・3	結果	94
4・3・1	TLAa、エノラーゼ、HSP48のアミノ酸組成の比較	94
4・3・2	TLAaと酵母エノラーゼの免疫学的性質の比較	96
4・3・3	TLAaのN-末端アミノ酸配列	96
4・3・4	TLAaのエノラーゼ活性	96
4・3・5	TLAbと酵母GAPDHの免疫学的性質と分子量比較	101
4・3・6	TLAbのN-末端アミノ酸配列	101
4・3・7	TLAbのGAPDH活性	103
4・4	考察	103
4・5	小括	107

第5章	酵母細胞の易熱性抗原タンパク質TLAaとTLAbのストレスに	
	対する応答	109
5・1	緒言	109
5・2	実験方法	110
5・2・1	使用菌株及び使用培地	110
5・2・2	培養方法	110
5・2・3	TLAa及びTLAbのイソタンパク質量の測定	111
5・2・4	タンパク質量の測定	112
5・3	結果	112
5・3・1	TLAaイソタンパク質量に及ぼす生育条件の効果	112
5・3・2	TLAbイソタンパク質量に及ぼす生育条件の効果	118
5・4	考察	125
5・5	小括	131
第6章	耐塩性酵母 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> の生育に及ぼす薬	
	剤の効果	133
6・1	緒言	133
6・2	実験方法	134
6・2・1	使用菌株及び使用培地	134
6・2・2	培養方法	134
6・2・3	生育度測定	135
6・3	結果	135
6・3・1	アジ化ナトリウムの効果	135
6・3・2	バナジン酸の効果	135
6・3・3	CCCPの効果	137

6・3・4	培地pHの効果	140
6・4	考察	140
6・5	小括	144
第7章 耐塩性酵母 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> 細胞膜に局在する		
	プロトンATPaseの性質	146
7・1	緒言	146
7・2	実験方法	147
7・2・1	使用菌株及び使用培地	147
7・2・2	培養方法及び生育度測定	147
7・2・3	酵母細胞のグルコース処理	147
7・2・4	部分精製細胞膜区分の調製	148
7・2・5	クルード(Crude)膜区分の調製	148
7・2・6	ATPase活性の測定	149
7・2・7	タンパク質量の定量	150
7・3	結果	150
7・3・1	部分精製細胞膜区分のATPase活性に及ぼす阻害剤の 効果	151
7・3・2	細胞膜ATPase活性に及ぼすpHの効果	155
7・3・3	細胞膜ATPase活性に及ぼす二価陽イオンの効果	155
7・3・4	細胞膜ATPase活性の基質特異性	157
7・3・5	細胞膜ATPase活性に及ぼすウアバインの効果	157
7・3・6	細胞膜ATPase活性に及ぼすナトリウム、カリウム イオンの効果	161

7・3・7	クルード膜区分中の細胞膜活性に及ぼすグルコース の効果	161
7・3・8	クルード膜区分中の細胞膜活性の培養中の経時的変 化	163
7・4	考察	163
7・5	小括	171
第8章	耐塩性酵母 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> 細胞膜プロトン ATPase遺伝子のクローニングと解析	173
8・1	緒言	173
8・2	実験方法	174
8・2・1	使用菌株、使用培地および培養方法	174
8・2・2	<i>E. coli</i> 細胞からのプラスミドDNAとアガロースゲル からのDNA断片の回収	175
8・2・3	プローブの調製および免疫的検出法	176
8・2・4	高分子量DNAの調製とサザン分析	179
8・2・5	<i>Z. rouxii</i> 細胞の細胞膜プロトンATPase遺伝子の クローニング	180
8・2・6	DNAの塩基配列の決定	182
8・2・7	全RNAの調製とノーザン分析	183
8・2・8	細胞膜タンパク質のSDSポリアクリルアミドゲル電気 泳動	186
8・3	結果	186
8・3・1	<i>Z. rouxii</i> プロトンATPase遺伝子クローンの単離	186

8・3・2	<i>Z. rouxii</i> プロトンATPase遺伝子の塩基配列とそれ から推定されるアミノ酸配列	190
8・3・3	他種の細胞膜プロトンATPaseとのアミノ酸配列比較	193
8・3・4	プロトンATPase機能領域の比較	198
8・3・5	プロトンATPase遺伝子の発現	198
8・4	考察	200
8・5	小括	206
	総括	208
	謝辞	222
	参考文献	223

## 緒章

酵母は分類学上の厳密な名称ではなく、大部分が球形や卵形などの単細胞で生活環を過ごし、主として出芽によって増殖する真菌類に属する真核微生物の総称である。これらは、Schizosaccharomyces 属・Saccharomyces 属・Zygosaccharomyces 属・Hansenula 属・Pichia 属・Debaryomyces 属などの子嚢胞子を形成する酵母、Sporobolomyces 属・Bullera 属などの担子菌類系の酵母、Rodotula 属・Candida 属・Kloeckera 属などの胞子を形成しない酵母に分けられる(図1)(1)。酵母は、古くから応用微生物学上極めて重要な微生物群で、清酒・ぶどう酒・ビールなどの酒類や味噌・醤油などの調味料の醸造、アルコール製造、製パン、さらにはビタミン類や核酸関連物質のなどの発酵に用いられる。子嚢胞子を形成する酵母のうち Saccharomyces cerevisiae はビール・ワイン・清酒・パンの製造に、Saccharomyces uvarum はビール製造、S. cerevisiae var. ellipsoideus はワイン製造に、Zygosaccharomyces rouxii は醤油・味噌の製造に用いられている。一方、Saccharomyces pasteurianus のようにビールに、Zygosaccharomyces japonicus のように醤油に、Zygosaccharomyces mellis のようにジャムや糖蜜に繁殖し、食品の品質を悪化させる有害菌もある。無胞子酵母のうち、Candida utilis や Candida lipolytica は飼料酵母として用いられ、Candida verstilis は醤油・味噌の製造に用いられる。このように、酵母は細菌や糸状菌などとともに日本の伝統的食糧製造において重要な位置を占めている。多数の酵母種のうち、特に、S. cerevisiae は生理学的・生化学的研究のためのモデル真核細胞として重要視

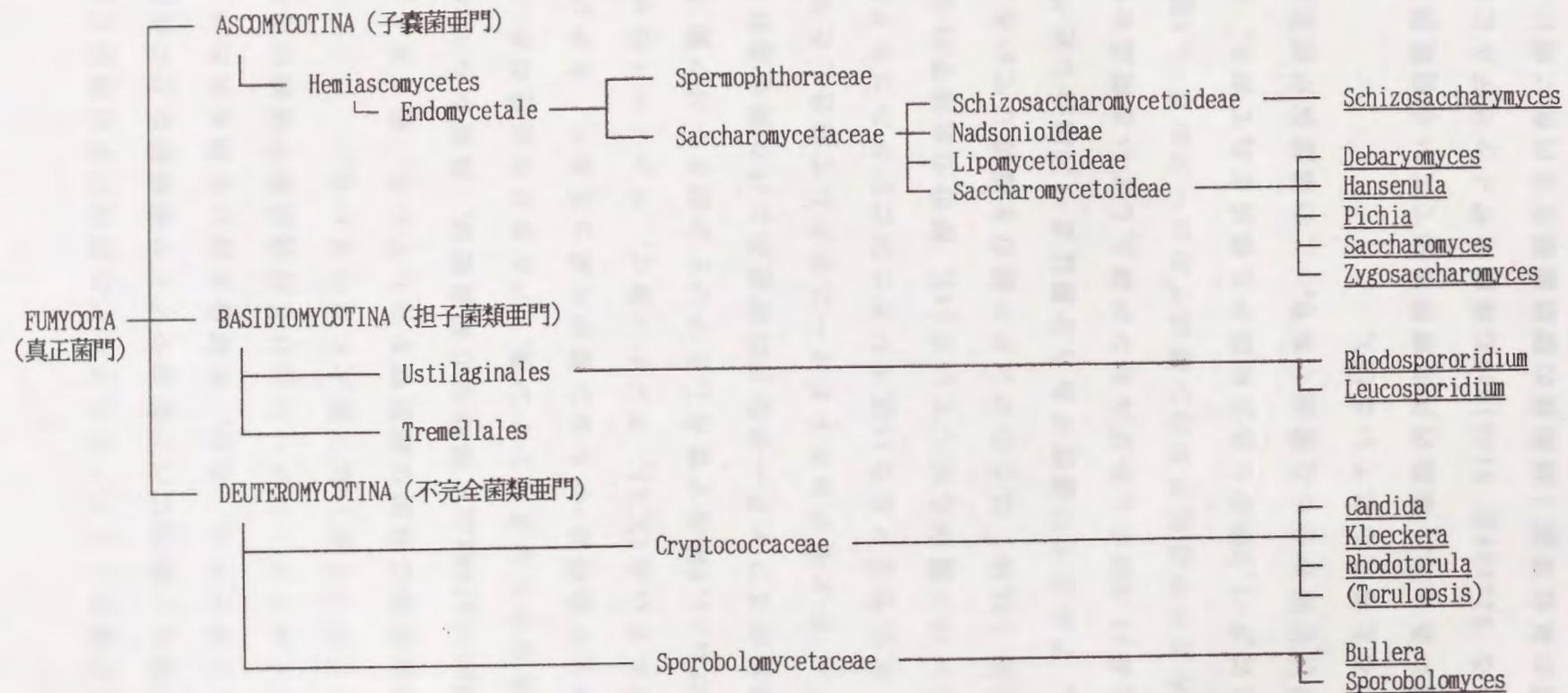


Fig. 1. Classification of Yeasts.

This figure was made by referring to "The Yeasts" ed. by N.J.W. Kreger-van Rij (1984).

されている。この理由として、生化学などの近代科学の発展した欧米で、本菌種が最も一般的にパン製造やブドウ酒発酵などに使用されたことによると思われる。今日、本酵母を用いて得られたバイオサイエンス・バイオテクノロジーにおける研究成果や情報は他の酵母とは比べることができないほど膨大になっている。

酵母細胞は細胞表層に強固な細胞壁を有している。最も良く分析の進んでいる *Saccharomyces* 属酵母の細胞壁は、外層からマンナン-タンパク質複合体からなるマンナン層、アルカリ可溶性の $\beta$ -グルカン層、アルカリ不溶性 $\beta$ -グルカン層から成っており、キチン及び少量の脂質を含んでいる(2,3)。マンナン層は、マンノースの $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,3及び $\alpha$ -1,6結合で重合したマンナンがタンパク質(インベルターゼ、酸性ホスファターゼなどの酵素タンパク質を含む)のアスパラギンにジ-N-アセチルキトピオースを介して結合したマンナンタンパク質、またセリンあるいはスレオニンにO-グルコシド結合したマンナンタンパク質から成っている(4)。酵母の血清学的分類に使用される抗血清(抗体)はこのマンナン部分を認識していると言われている(5)。アルカリ可溶性グルカン層は $\beta$ -1,3結合したグルコースの長い鎖に $\beta$ -1,6結合したグルカンが挿入している構造をなしている(3)。アルカリ不溶性グルカン層はグルコースの $\beta$ -1,6結合を主鎖とし、これに $\beta$ -1,3結合した分岐鎖から構成されており、細かい微繊維が編目状に絡み合った構造であり、この構造体が細胞壁に剛性を与えていると考えられている(6)。

細胞壁の内側にあつて、細胞内外の環境を隔てている細胞膜は、図2に示している Singerと Nicolsonの流動モザイクモデルに従えば、主に燐脂質の単位層膜(燐脂質の脂肪酸部分を内側に向け、燐

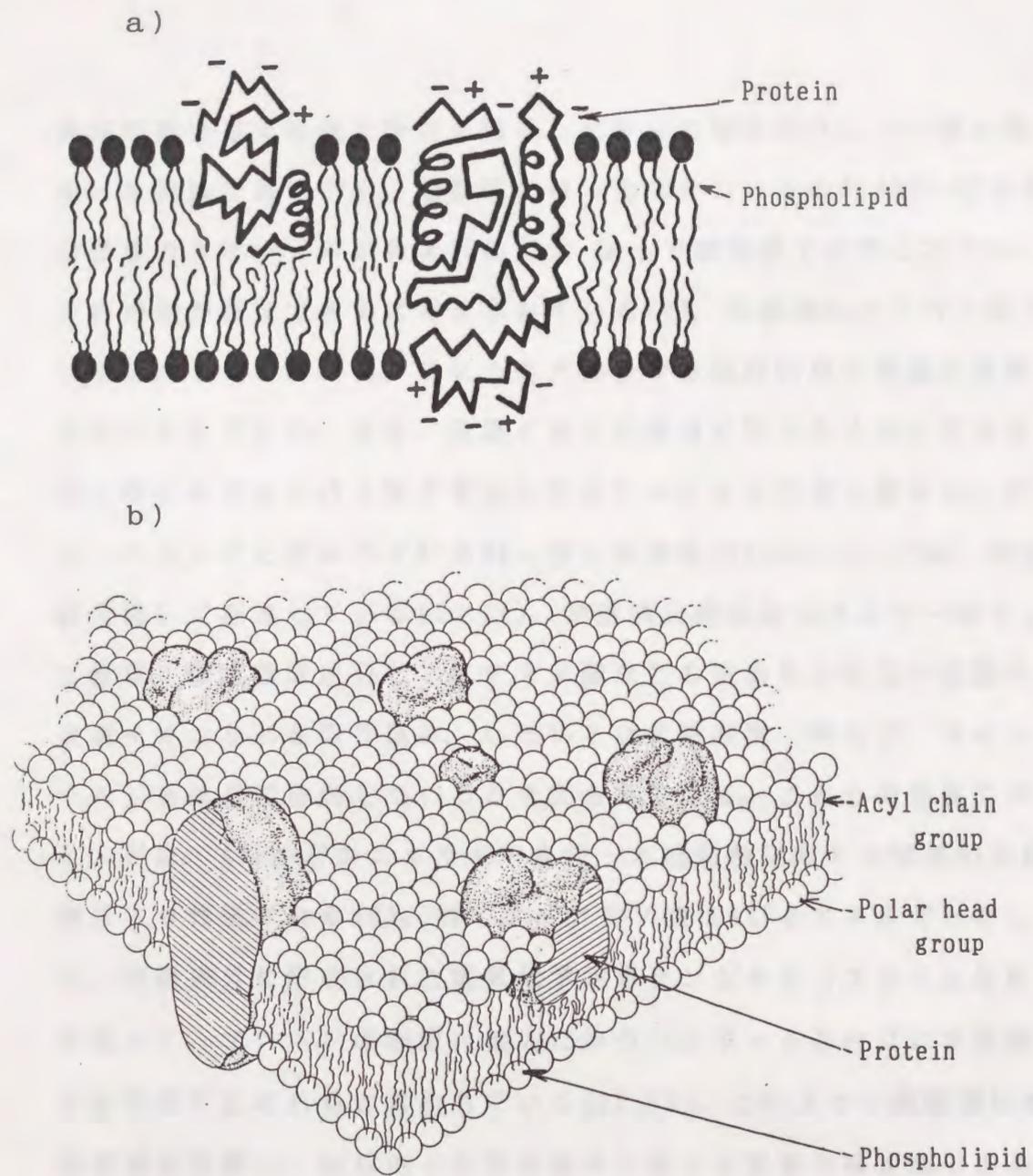


Fig. 2. Fluid Mosaic Model of Cell Membranes.

This figure was cited from Science, 175, 720-731 (1972) reported by S.J. Singer and G.L. Nicolson.

脂質の極性基を外側に向けた構造)に多くの種類のタンパク質が埋まった構造である(7)。細胞膜には、全ステロールの約60%に相当する多量のステロールが含まれる(8)。従って細胞膜では特にステロールの機能が重要であると考えられている(9)。細胞膜のタンパク質は、膜タンパク質と呼ばれ、これらの大部分が細胞膜の疎水領域に強固に組込まれている。また、金属イオンの透過に係わるイオンチャネルと呼ばれるタンパク質や電気化学ポテンシャル形成に関与し、プロトンポンプと呼ばれているMgイオン依存性ATPase(10-12)は、細胞膜を貫いて存在している(13,14)。細胞膜の機能はエネルギー源として糖質、細胞構成成分としてアミノ酸などの窒素化合物及び磷酸や金属イオンなどを取り込み、いろいろな代謝産物(例えば、アルコール)を体外に排出していると考えられている。これらの物質のほとんどは、ATPなどのエネルギーを使った能動輸送などの特異的な機構により輸送される(8)。例えば、アミノ酸はATPをエネルギーとして、細胞内外に形成された電気化学的ポテンシャル(プロトン勾配)に従って、プロトンの細胞内流入に伴うシンポートと呼ばれる機構により取り込まれると言われている(15,16)。このように細胞膜は物質透過を制御し、細胞内を外部環境から隔てる重要な構造体である。

酵母細胞膜の内側には、酸化的磷酸化やトリカルボン酸サイクルなどエネルギー生産機能を有する二枚の単位膜(二重膜)に包まれたミトコンドリア、細胞の遺伝情報を担っている染色体DNAなどを含む二重膜に包まれた核、各種加水分解酵素を含むマイクロボディ及び液胞、タンパク質合成に関与するリボソーム、リボソームを表面に付着した粗面小胞体、リボソームの付着していない滑面小胞体、タンパク質などの分泌において重要な役割を果たすゴルジ体、細胞

内部の構造維持や細胞分裂の際に重要な働きをする細胞骨格（サイトスケルトン）などの構造体を含んでいる。残りを占めるのが細胞質で解糖系などの酵素が存在している。酵母のこのような細胞内構造体（オルガネラ）は、酵母が表層に細胞壁を有すること以外、高等動物細胞のそれと大差ない。このことは、酵母細胞が高等生物のモデルと云われる理由である。従って、酵母において解明された機能は、若干の修正を加えねばならないとは言え、高等動物細胞においても適用できることが多い。また、酵母は他の真核生物と比べて生育速度が早く、簡単な培地で迅速に増殖するため、短期間で多量の細胞が容易に得られるので、真核生物の実験材料として適している。

*Z. rouxii*, *C. versatilis*, *Candida etchelse*, *Pichia miso*, *Debaryomyces hansenii* などの醤油・味噌の製造過程で見いだされる酵母は生育条件が他の酵母のそれと著しく異なる。古来より利用されてきた伝統的な調味料は製造過程において多量の食塩が使用されるため、これらの酵母は耐塩性を有する。また高濃度の糖質環境下で生育できる耐糖性も有しており、これら酵母のうち幾種類かは高濃度の糖を含む食品（例えばジャム・チョコレート・蜂蜜など）の腐敗菌としても見いだされている。一般的に、これらの酵母は高い浸透圧下で生育できるため、耐浸透圧性酵母と呼ばれている。一方、酵母の代表と言われる *S. cerevisiae* は、上記のような高濃度食塩や糖質を含む環境下では生育できない浸透圧感受性である。飽和濃度の食塩を含む環境においても生育できる *Z. rouxii* などの酵母は、進化の段階でそのような環境に適応するために生理的に特殊な機構を獲得したものと考えられる。本研究では、酵母の耐塩性機

構を論述する（耐塩性との関連があるので、併せて耐浸透圧性機構にも言及している）が、その機構の全容を明らかにできれば、アルコール発酵などに用いられる非耐塩性酵母の耐塩性化や、将来、塩化の進んでいる土壤に生育可能な非耐塩性の食料植物へ耐塩性の付与ができるなど応用・利用が期待される。これら耐塩性・耐浸透圧性酵母の持つ生理機能や環境適応機構として、現在、明らかにされていることを以下に要約する。

わが国では *Z. rouxii* などの醤油・味噌酵母は伝統的に利用されており、製造過程の短縮化など産業的な要求から、これら酵母の発酵産物(17)や最適生育条件(18-21)について多くの研究者により追究されている。これら酵母の特徴的な発酵産物として、まず後述のようなグリセロールなどのポリオールがあげられる(22)。また、醤油や味噌酵母の発酵過程で生ずる香気成分として、*Z. rouxii* では2-フェニールエタノールを、*Candida* 属酵母では4-エチルグアヤコール・4-エチルフェノール・2-フェニールエタノールを生産する(23-25)。官能試験で優れた市販醤油は4-エチルグアヤコールを多く含むと言われている。また、*Candida* 属酵母では酢酸を生産し、生産された酢酸が香味に関係していることが知られている(23-25)。耐浸透圧性酵母の生育条件の検討から高濃度食塩培地ではそれら酵母の最適生育温度は高温度側にシフトし(26)、最適生育pHが狭まることが明らかにされている(27,28)。

これらの酵母の耐浸透圧性機構については醤油・味噌酵母の発酵生産物と生育環境中に含まれる高濃度食塩や糖質に由来する浸透圧に関連して検討されている。仮に培地の食塩や糖質に由来する浸透圧に抗して細胞内の浸透圧が変化しないとすると、細胞膜を境とし

てその両側で浸透圧差が起こり、細胞膜に物理的力が掛かることになる。植物細胞ではそのような条件におかれると細胞膜が細胞壁から外れ、内側に縮んだ原形質分離と呼ばれる現象を起こす。しかし、高濃度の食塩などを含んだ環境で生育できる耐浸透圧性酵母はそのような現象を示さず、旺盛に生育する。従って、耐浸透圧性酵母は細胞外環境の浸透圧に答応して細胞内浸透圧を上昇させる機構が存在すると考えられ、その機構として、前述のポリオール生産との関係が示された。高濃度の食塩培地で培養した耐浸透圧性酵母は、グリセロール・D-マンニトール・エリスリトール・D-アラビトールなどの多価アルコール（ポリオール）を多量に生産する。生産効率を利用される糖の重量比で表示すると、*Candida mannitofaciens* と *C. versatilis* ではグリセロール・D-マンニトールをそれぞれ60%と46%(29)、*P. miso* でグリセロール・D-マンニトール・エリスリトールを42%(17)、*Z. rouxii* でグリセロール・D-アラビトールを40%(17,30)、*D. sake* でD-アラビトールを20%生産すると計算された(17)。浸透圧感受性酵母である *S. cerevisiae* では、通常その効率は2から8%であるので(17)、耐浸透圧性酵母では生産性が非常に高いことになる。耐浸透圧性酵母 *D. hansenii* を用いたGustafssonとNorkransの研究は、生産されたポリオールによる浸透圧が培地中の食塩の浸透圧にほぼ一致していたことを示し、これらポリオールが浸透圧の調節を行っていることを証明した(31)。ポリオール生産機構については、ペントースサイクルの中間体であるD-リブロース-5-リン酸がホスファターゼにより脱リン酸化されD-リブロースとなり、NADPH依存性酸化還元酵素（ポリオールデヒドロゲナーゼ）によりD-アラビトールとなること、また解糖系初期の中間産物であるジヒ

ドロキシアセトン磷酸がNADH依存性ポリオールデヒドロゲナーゼにより還元されグリセロ磷酸となり、ホスファターゼにより脱磷酸化されグリセロールとなることが明らかにされている(32)。

耐塩性酵母の耐塩性機構を考える場合、Staphylococcus aureus、Micrococcus halodenitrificans、Halobacterium cutirubrumなどの耐塩性・耐浸透圧性細菌類に関する成果が参考になるであろう。Halobacterium属の細菌は4M以上の食塩を含む培地で生育可能であり、極めて耐塩性(耐浸透圧性)である。また、これら耐塩性細菌のうち生育のために一定以上の食塩を要求する好塩性を示すものもある。畝本はこれら耐塩性・好塩性細菌を四種類に分類している(33)。第一のグループは非好塩性細菌で、S. aureusなどは0Mから3.8M食塩濃度の範囲で生育可能である(但し最適生育食塩濃度は0Mから0.5Mである)。第二は海洋細菌で、Vibrio alginolyticusなどは0.2Mから1.8M食塩濃度で生育可能である(最適生育濃度0.3Mから1.0M)。第三は中度好塩性細菌で、M. halodenitrificansなどは0.3Mから4Mの範囲で生育できる(最適生育濃度0.8Mから1.6M)。第四は高度好塩性細菌で、H. cutirubrumなどは2.5Mから4M以上の範囲で生育できる(最適生育濃度3.4M以上)。上記の酵母類の場合のポリオール生産による耐性機構とは異なり、これら耐塩性・耐浸透圧性細菌は浸透圧を調節するために有機酸・アミノ酸・カリウムイオン・ナトリウムイオン・塩素イオンなどの物質を細胞内に蓄積する(33)。これらの物質が浸透圧調節剤として選択され、かつ有効になる理由についてはBrownのCompatible solute説が有名である(34, 35)。即ち、ある物質が細胞内に多量に蓄積したとき、その物質が細胞内の酵素反応を阻害するとたとえ浸透圧が調節されたとしてもそ

の細胞は生育できない。それで、多量に細胞内に蓄積しても細胞代謝に悪影響を及ぼさない物質が有効になる。上記の物質は細胞内に高濃度存在しても酵素作用を機能的に保つ物質であり、Compatible soluteと呼ばれている。

これまでに述べたように酵母の耐塩性は、浸透圧とナトリウムイオンなどのイオン分布の調節の二面性によって成り立っていると言ふことができる。耐塩性酵母の浸透圧調節に関する研究は、耐浸透圧性機構をよく説明していると考えられるが、食塩に対する耐性機構（耐塩性機構）を説明するには不十分であると考えられる。その根拠となる事例として、*Z. rouxii* の塩感受性変異株の中に、耐塩性は失ったが、なお耐糖性（耐浸透圧性）を示す株が得られたことが上げられる(36,37)。このことは、*Z. rouxii* の耐塩性と耐浸透圧性が別々の機構により制御されていることを示唆している。食塩は水溶液中ではナトリウムと塩素イオンから成っており、また、耐塩性酵母は、高濃度食塩環境下でも細胞内ナトリウムイオン濃度を低く抑えているので(38,39)、食塩による浸透圧以外に両イオンに対する細胞の応答を考慮する必要がある。

本論文では耐塩性酵母細胞の持つ食塩に対する耐性機構の解明を目的とし、以下に述べる順序と理由で、①細胞脂質の変化、②解糖系酵素の変化、③細胞内イオン分布に関係すると推定される細胞膜ATPaseの性質について追究した。当然、食塩に対する耐浸透圧性についても考慮に入れて研究を進めた。

(1) ナトリウムや塩素イオンが影響する部位として細胞膜が考えられる。上述の通り細胞膜は磷脂質、ステロールなどの脂質からなる単位膜にタンパク質が埋もれた構造であるので、ナトリウムと

塩素イオンあるいは食塩自体が脂質単位膜の流動性などに影響を及ぼすと考えられる(40)。それ故、耐塩性酵母細胞はそれらの影響を緩和するために適応機構を持つものと推察される。しかしながら、培地食塩濃度と細胞脂質の関係を検討した研究は、Mogiらの脂肪酸組成の分析(41)がある程度で、ほとんど行われていなかった。そこで、本研究では、まず耐塩性酵母 *Z. rouxii* 及び *C. versatilis* を実験材料として培地食塩濃度に依存した細胞脂質組成の変化を検討した(第1章、第2章、第3章)。

(2) 非耐塩性酵母に分類されている *S. cerevisiae* 細胞の解糖系酵素エノラーゼ、グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素に対する抗血清(抗体)(42)を用いて、いろいろなストレスによる両酵素の量的変化を検討した結果、両酵素のアイソザイムの発現が食塩ストレスによって特異的に制御されていることを見いだした(第4章、第5章)。これは、解糖系酵素の発現が食塩ストレスに依存して制御されることを示す最初の知見である。

(3) 細胞は物質の能動的輸送のために細胞膜の内側と外側でナトリウムイオン・カリウムイオン・プロトンの濃度勾配を形成している(43)。従って、濃度勾配形成に関与する酵母細胞膜のATPase(マグネシウムイオン依存性ATPaseであるといわれている(12-14))の作用も耐塩性酵母の耐塩性において重要であると考えられるが、この酵素についての検討はこれまでほとんど行われていなかった。耐塩性酵母の生育に対するいろいろな薬剤の影響を検討し、耐塩性酵母の高濃度食塩を含む培地での生育にとってプロトン勾配が重要であることを示唆する結果を得た(第6章)。さらに、*Z. rouxii* の細胞膜プロトンATPaseの酵素的性質を検討し、非耐塩性酵母 *S.*

*cerevisiae* のそれとは異なる特性を持つことを見いだした (第7章)。また、*S. cerevisiae* 細胞膜プロトンATPase遺伝子DNAを用いたクロスハイブリダイゼーション法により *Z. rouxii* の細胞膜プロトンATPaseの遺伝子を単離し、構造解析を行い、そのタンパク質の構造や性質を推定し、耐塩性との関係を言及した (第8章)。

## 第 1 章

### 耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の脂質組成に及ぼす食塩の影響

#### 1・1 緒言

わが国の伝統的な調味料である味噌や醤油は高濃度の食塩(NaCl)を含む大豆食品である。耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* (旧名 *Saccharomyces rouxii*) は、高濃度食塩存在下で生育できるため、これらの食品の発酵段階に関与する主発酵性酵母である(46)。一般的に、高濃度食塩条件は生物が生存する上で非常に過酷な環境であるので、そのような環境下で生育可能な本酵母は高濃度食塩に対してある種の防御機構を獲得していると考えられる。

一般に、細胞が高濃度食塩培地で生育する場合、細胞内の浸透圧を何等かの方法で高めない限り細胞膜の内側と外側で浸透圧差が起こり、細胞膜に物理的な力が掛かることになる。その差を緩衝する機構として、本酵母を含む耐塩性酵母は細胞内にグリセロール、アラビトールなどいわゆるポリオールを蓄積し、細胞膜にかかる浸透圧差に起因する物理的力を緩和する(31,34,35,46,47)。この機構は食塩による浸透圧という物理的影響に対する適応現象をよく説明している。

耐塩性酵母 *Z. rouxii* は古来より利用されているため、本酵母の発酵生産物(17)や最適生育条件(18-21)などについて多くの研究がなされている。また、酵母細胞の生育に及ぼす培養温度や培地のアルコール濃度などの環境因子の影響について、細胞膜脂質との関連性に重点をおいた多くの研究もなされてきた。しかしながら、耐塩性

酵母の培地食塩濃度に依存した細胞脂質の変化に関する研究はこれまでほとんどなされていない。そこで、本章では耐塩性機構を追求する本論文の最初として、耐塩性酵母 *Z. rouxii* 細胞の脂質組成と培地食塩濃度の関係を検討した次第を記述する。なお、本章の大部分の内容は既に学会誌に報告している(44,45)。

## 1・2 実験方法

### 1・2・1 使用菌株

耐塩性酵母としては、主として *Z. rouxii* ATCC42981 株を使用し、また比較として IAM4028、S84、G10-1、S2-B (全て野生型) の4菌株を使用した。非耐塩性酵母としては、*Saccharomyces cerevisiae* 0-11-4株 (野生型) を使用した。*Z. rouxii* ATCC42981 株は農林水産省食品総合研究所から、*Z. rouxii* S84、G10-1 および S2-B 株は新潟県食品研究所から(27)、*S. cerevisiae* 0-11-4 株は三共株式会社から供与された。これらの酵母細胞は、2%(w/v)寒天を含む下記の組成のYM斜面培地で4°Cで保存した。

### 1・2・2 使用培地

使用した培地の組成は0.3%(w/v)酵母エキス、0.3%(w/v)麦芽エキス、0.5%(w/v)ポリペプトン、1%(w/v)グルコースであり、この培地を以下YM培地と呼ぶ。YM培地には必要に応じて1Mから3Mまでの食塩を添加した。培地のpHは食塩添加後に塩酸溶液によりpH4.8に調節した。但し、*Z. rouxii* S2-B 株用のYM培地はpH 4.6に調節した(27)。

### 1・2・3 培養方法

*Z. rouxii* 細胞は以下の方法により培養した。前培養として、保存用斜面寒天培地から一白金耳の酵母細胞をYM培地(5ml)に接種し、30°Cで二日間静置培養した。本培養として、前培養液を0M、1M、2M、3Mの食塩を含むYM培地(95ml)に移し、30°Cで振とう(95回/分)培養した。40時間培養後、細胞を遠心分離(1000xg, 10分間)により集菌し、水で三度洗浄した。*S. cerevisiae* 細胞の培養は本培養液として0M、0.3M、0.6M、1.0Mの食塩を含むYM培地を用いた以外、*Z. rouxii* 培養と同様であった。両酵母細胞の生育度はトーマ血球測定盤を用いた細胞数の計測及び培養液の濁度(660nm)の計測により見積った。

特定の食塩濃度の培地で培養した細胞を異なる食塩濃度の培地へ転移する方法は以下の通りである。即ち、30°Cで定常期(約42時間)まで振とう培養した細胞培養液(100ml)の一部(30ml)から細胞を集菌し、各濃度の食塩を含むYM培地(50ml)に懸濁し、30°Cで振とう培養した。

#### 1・2・4 脂質の<sup>14</sup>Cラベリング

細胞脂質の放射性ラベリングは細胞を2.5 $\mu$ Ciの(1-<sup>14</sup>C)酢酸ナトリウム(New England Nuclear, 59mCi/mol)を含むYM培地で振とう培養することにより行った。

#### 1・2・5 細胞形態観察

各種の食塩濃度の培地で培養した *Z. rouxii* 細胞の形態観察は顕微鏡下で行い、写真撮影した。

#### 1・2・6 細胞脂質の抽出

酵母細胞は細胞表層に強固な細胞壁を持つため、直接有機溶媒抽出の試料として利用できない。そこで、酵母細胞を以下に示した方法で処理することにより細胞壁を除去した。即ち、集菌して得られ一定量の細胞を4mlのチモリアーゼ緩衝液 [0.8M塩化カリウム、0.1M亜硫酸ナトリウムを含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)] に懸濁し、0.9mgのチモリアーゼ6000を加え、30°C、45分間インキュベートすることにより酵母細胞をスフェロプラスト化した。細胞脂質はスフェロプラストから図3に示したBlighとDyerの方法(48)に従い抽出した。

#### 1・2・7 脂質分析

中性脂質は以下のように分離した。1・2・6に示したように抽出した細胞脂質溶液(クロロホルム溶液)を濃縮乾固後、200 $\mu$ lのクロロホルム/エタノール混合液(2:1, v/v)に溶解した。その脂質溶液1 $\mu$ lをイアトロスキャン(ヤترونラボラトリー社製、TH-10型)用クロマロッドにスポットした。溶媒を除去した後、そのクロマロッド上の脂質をn-ヘキサン/エーテル/ギ酸混合液(90:10:1, v/v)を用いて分離した。

磷脂質は以下のように分離した。脂質溶液50 $\mu$ lをシリカゲルプレート(メルク社製、5cm $\times$ 20cm)にスポットした。そのプレート上の脂質を上記のn-ヘキサン/エーテル/ギ酸混合液を用いて分離した。磷脂質はスポット原点に残存するので、その区分のシリカゲルをプレートからかき取り、クロロホルム/エタノール混合液でシリカゲルから磷脂質を抽出した。溶媒を除去した後、磷脂質を50 $\mu$ lのクロロホルム/エタノール混合液に溶解し、1 $\mu$ lをクロマロッドにスポ

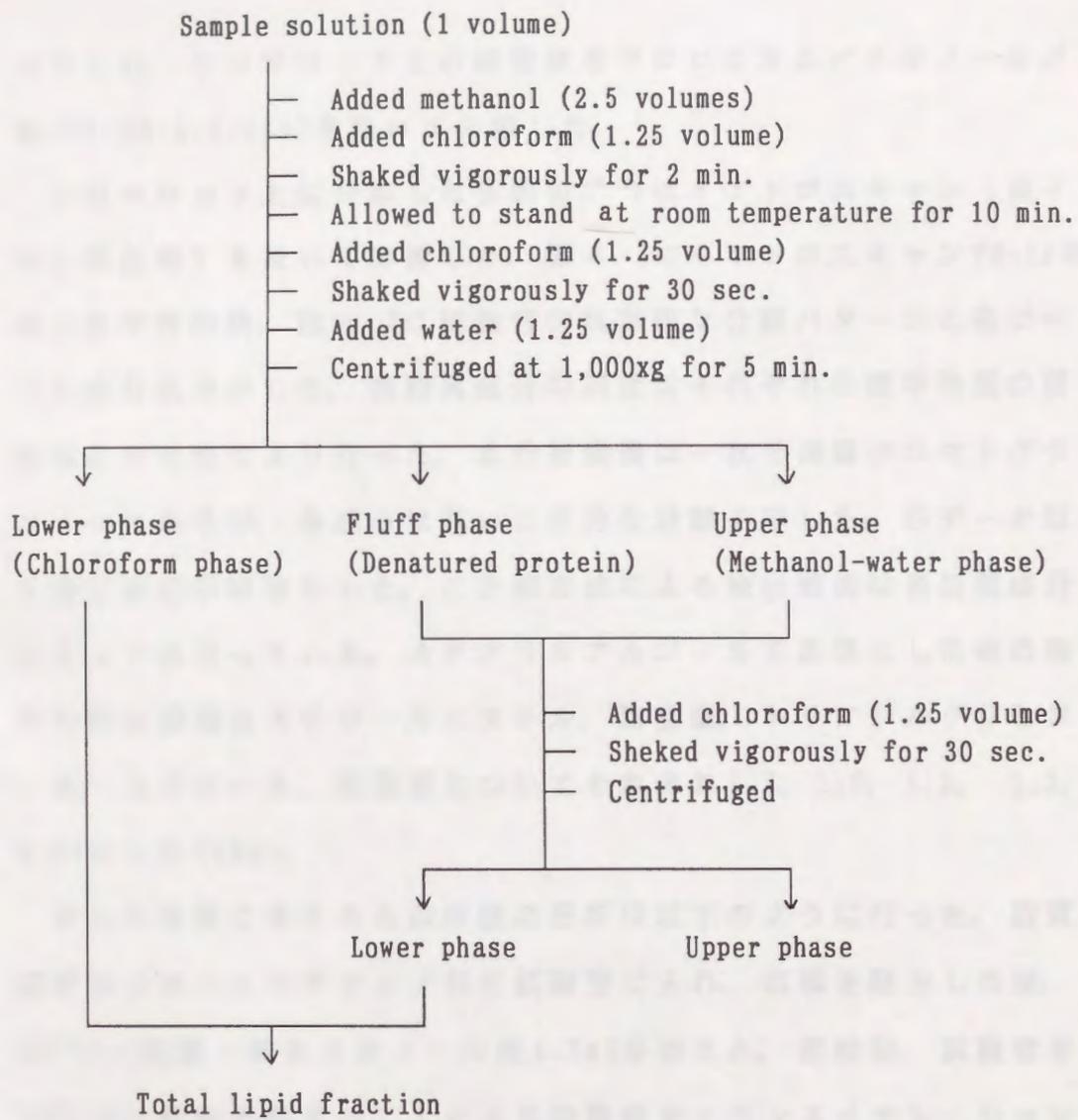


Fig. 3. Bligh and Dyer's Method for Extraction of Lipids.

ットした。クロマト上上の磷脂質をクロロホルム/メタノール/水(50:60:4.5,v/v)を用いて分離した。

クロマト上上に分離した各脂質成分はイアトロスキャン(炎イオン検出器)を用いて定量した。図4-AにイアトロスキャンTH-10を用いた中性脂質、図4-Bに磷脂質の典型的な分離パターンと各ピークの成分名を示した。各脂質成分の同定はそれぞれの標準物質の移動度との比較により行った。本分析装置は一次元薄層クロマトグラフィーであるが、各成分は互いに十分な分離を示した。各データは三測定値の平均値とした。この測定法による検出感度は各脂質成分によって異なっている。ステアリルアルコールを基準とした時の相対的検出感度はステロールエステル、脂肪酸、トリアシルグリセロール、ステロール、磷脂質についてそれぞれ1.2、1.0、1.3、1.2、0.85とした(49a)。

けん化脂質に含まれる脂肪酸の分析は以下のように行った。脂質溶液をスクリュウキャップ付き試験管に入れ、溶媒を除去した後、2%(v/v)硫酸-無水メタノール液4.5mlを加えた。密栓後、試験管を70°Cで一時間加熱することにより脂肪酸をトランスメチレーションにより脂肪酸メチルエステルに変換した。冷却後、メタノール溶液に0.5mlの水を加えた。その溶液に含まれる脂肪酸メチルエステルを5mlのn-ヘキサンで抽出した。溶媒除去後、脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーにより定量した。ガスクロマトグラフィーには1.5%シリコンSE-30のガラスカラム(2m×3mm)を装着したガスクロマトグラフ(島津製作所製、GC-4CM型)を用いた。分離は200°Cの一定温度で、キャリアガス(窒素ガス)流速60ml/分の条件下で行った。脂肪酸定量は既知の量のパルミチン酸メチルエステルを標準と

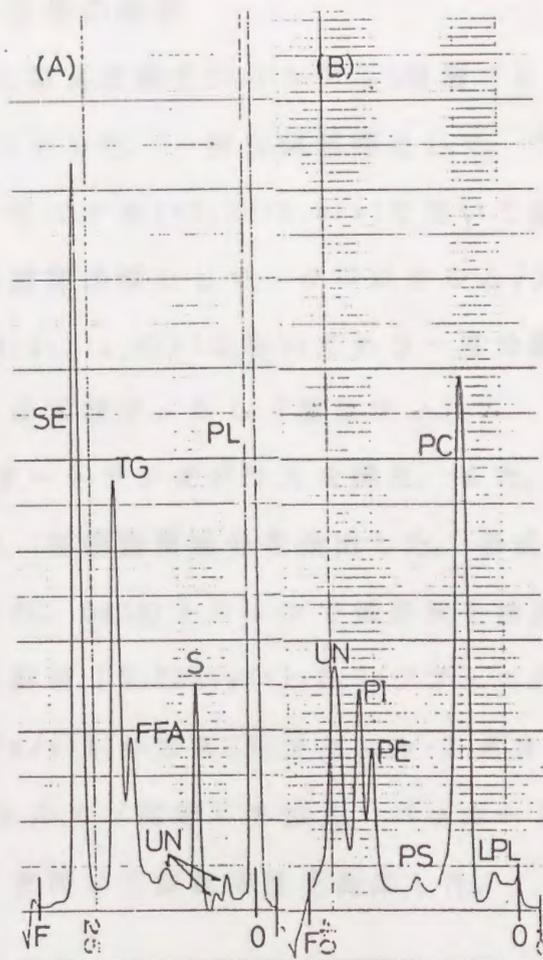


Fig. 4. Typical Patterns of Neutral Lipids (A) and Phospholipids (B) from *Zygosaccharomyces rouxii* Cells by Iatorscan TH-10.

Total lipids were extracted from cells cultured in YM medium containing 1M NaCl, and analyzed by Iatorscan TH-10 (TLC/FID Analyzer).

O, origin

PL, phospholipids

FFA, free fatty acids

SE, sterol-esters

PC, phosphatidylcholine

PE, phosphatidylethanolamine

UN, unknown components

F, front

S, sterol

TG, triacylglycerol

LPL, lysophospholipids

PS, phosphatidylserine

PI, phosphatidylinositol

して行った。各々のデータは三測定値の平均値とした(50)。

### 1・2・8 二次元薄層クロマトグラフィー及び磷脂質に含まれる放射活性の測定

$^{14}\text{C}$ でラベルした脂質溶液をシリカゲルG薄層プレート(20cm×20cm)の一隅にスポットした。一次展開溶媒として、クロロホルム/メタノール/28%アンモニア水(65:25:5, v/v)を用いて脂質を分離した。溶媒除去後、二次展開溶媒として、クロロホルム/アセトン/メタノール/酢酸/水(6:8:2:2:1, v/v)を用いてもう一度分離した。溶媒除去後、薄層プレートをX線フィルム(富士フィルム、RX)に押し当て、 $-50^{\circ}\text{C}$ で放置し、オートラジオグラムを得た。また、同プレートをヨウ素蒸気中に置き、各磷脂質成分を検出した。各成分をシリカゲルと共に試験管にいれ、5mlのトルエンで磷脂質を抽出後、10mlの液体シンチレーション溶液[0.75%(w/v) 2,5-ジフェニルオキサゾール(PPO)及び0.075%(w/v)1,4-ビス(5-フェニル-2-オキサゾイル)ベンゼン(POPOP)を含むトルエン溶液]を加え、パッカー液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した。

### 1・3 結果

#### 1・3・1 *Z. rouxii* と *S. cerevisiae* 細胞の生育に及ぼす食塩の影響

各種濃度の食塩を含むYM培地で培養した *Z. rouxii* ATCC42981 と *S. cerevisiae* 0-11-4 細胞の生育を検討した。図5-Aの生育タイムコースに示されたように、*Z. rouxii* 細胞は0M、1M、2M、3M食塩を含むYM培地(以下、それぞれ0M食塩、1M食塩、2M食塩、3M食塩培地

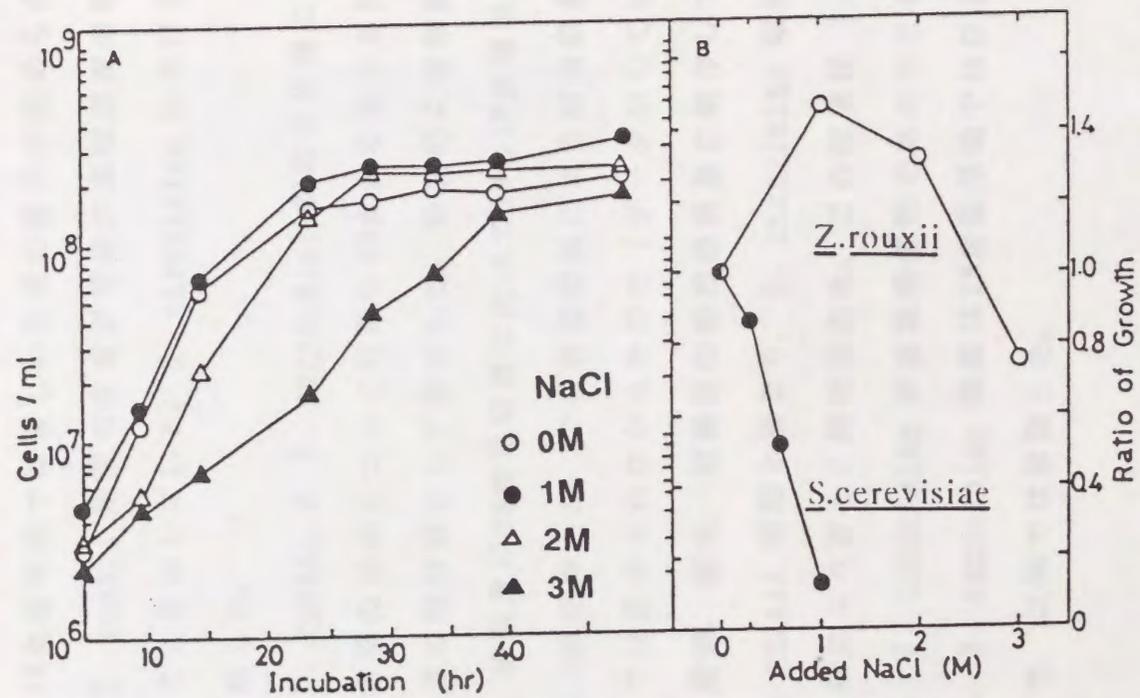


Fig. 5. Effects of NaCl on Growth of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

A, time courses of growth of *Z. rouxii* cells in YM medium containing 0M~3M NaCl.  
 B, Ratio of growth of *Z. rouxii* and *S. cerevisiae* cells.

と略)で培養したところ、*Z. rouxii* 細胞のダブリングタイムはそれぞれ3時間、3時間、3.5時間、6時間であった。*Z. rouxii* 細胞は、1M食塩培地では対照の0M食塩培地とほぼ同じ生育が、2M食塩培地では対照に比べの培養初期にラグ期が生じたが定常期に至り対照と同様の生育が、3M食塩培地では著しい生育の遅れが認められた。これらのことは、*Z. rouxii* 細胞の生育が培地の食塩濃度の増加によって阻害されることを示している。*S. cerevisiae* における生育タイムコースは省略した。

図5-Bに、*Z. rouxii* と *S. cerevisiae* 細胞の生育に及ぼす食塩の効果、定常期の細胞について対照の0M食塩培地から得た細胞数に対する生育度の相対値として表示した。最終的に定常期で得られた *Z. rouxii* 細胞量は0M食塩培地に比べて1Mと2M食塩培地ではそれぞれ1.5倍、1.3倍多かった。この食塩添加による細胞収量の増加は静置培養条件では認められなかったので(データ示していない)、振とう培養の効果、即ち、培養液の溶存酸素量に依存していると推察された。*Z. rouxii* 細胞と異なり、*S. cerevisiae* 細胞の生育は培地の食塩濃度により著しく抑制された。この結果は *Z. rouxii* が耐塩性であり、*S. cerevisiae* が食塩感受性であることを良く示している。特に、*S. cerevisiae* 細胞は1M食塩培地ではほとんど生育しなかったため、以降では削除した。

### 1・3・2 *Z. rouxii* 細胞の形態に及ぼす食塩の影響

0Mから3M食塩を含むYM培地で培養した *Z. rouxii* 細胞の形態を顕微鏡下で観察し、写真を図6に示した。また、細胞の最大直径に対する最小直径の比を各細胞の顕微鏡写真から計測したところ、その

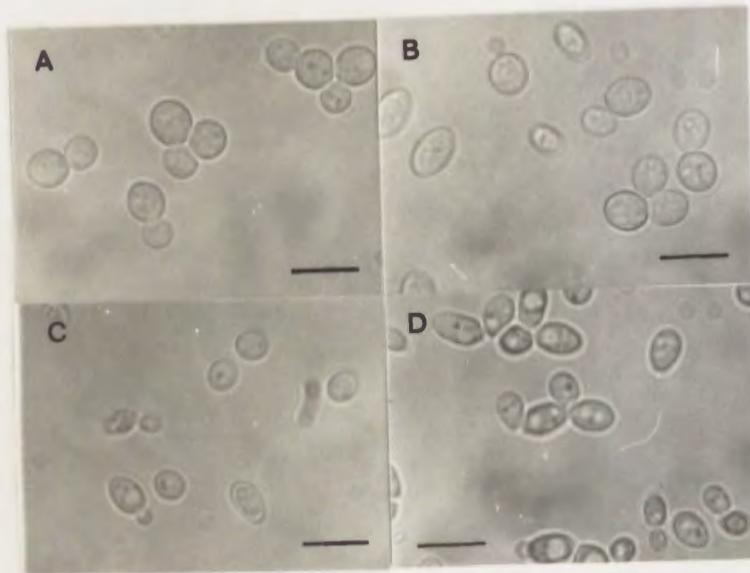


Fig. 6. Micrographs of *Zygosaccharomyces rouxii* Cells.

A, in 0M NaCl-YM medium

B, in 1M NaCl-YM medium

C, in 2M NaCl-YM medium

D, in 3M NaCl-YM medium

The scale bar represents 10 $\mu$ m.

値は0M、1M、2M、3M食塩培地で培養した細胞でそれぞれ0.90、0.67、0.65、0.50であった。この結果は培地の食塩濃度の増加とともに、培養細胞の形が球形から卵形に変化したことを示している。酵母細胞の細胞の形は細胞壁、細胞内骨格などにより決定されていると考えられるが、本実験ではこれ以上追究しなかった。

### 1・3・3 *Z. rouxii* 細胞の脂質組成に及ぼす食塩の影響

図7に脂質含量に対する培地食塩濃度の影響を示した。各脂質成分は凍結乾燥 *Z. rouxii* 細胞重量(mg)当りの含量( $\mu\text{g}$ )として表示した。1Mと2M食塩培地で培養した細胞では、0M食塩培地で培養した細胞と比べた時、ステロールエステル量が著しく増加し、トリアシルグリセロール量は減少した。3M食塩培地で培養した細胞では、それぞれは0M食塩培地で培養した細胞のレベルに戻った。さらに、ステロールと遊離脂肪酸量は培地の食塩濃度の増加とともに増加した。一般的に遊離型の脂肪酸は細胞毒性を持っていると言われてるので、高濃度の食塩が培地に存在するとき、遊離脂肪酸が細胞に蓄積することは、耐塩性酵母であっても脂質代謝が局部的に異常をきたしていると推測される。磷脂質は3M食塩培地でその含量が若干低い以外はほぼ一定レベルに維持されていた。ここで、磷脂質に対するステロールの比(ステロール/磷脂質,  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )を計算すると、0M、1M、2M、3M食塩を含む培地で培養した細胞でその比はそれぞれ0.06、0.13、0.14、0.18であった。この結果は培地食塩濃度の増加とともに磷脂質当りのステロール量が増加していることを示している。

図8に中性脂質組成(%)、磷脂質組成(%)、脂肪酸組成(%に及ぼす培地食塩濃度の影響を示した。培地に食塩が存在することによりホ

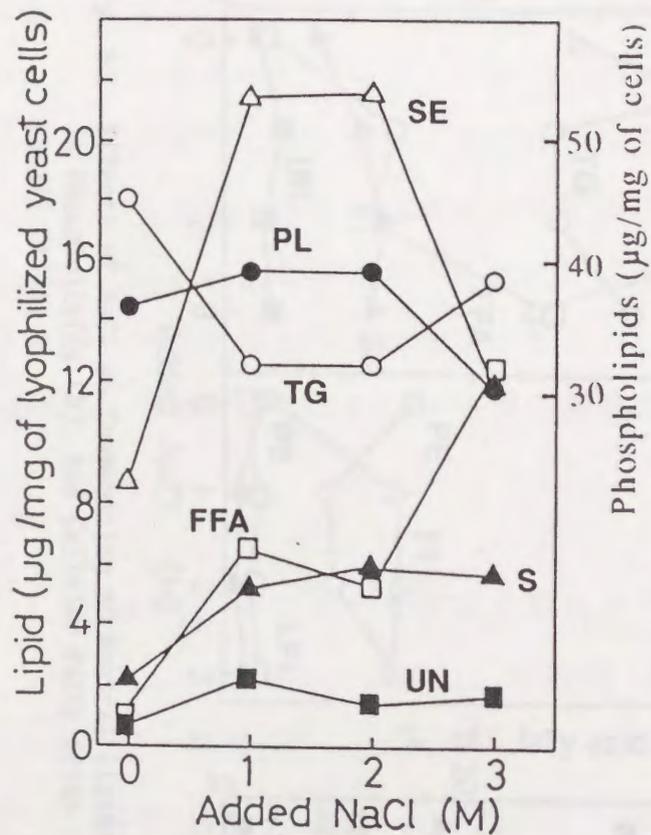


Fig. 7. Effects of NaCl on Content of Lipid Components in *Zygosaccharomyces rouxii* Cells.

PL, phospholipids	TG, triacylglycerol
SE, sterol-esters	S, sterols
FFA, free fatty acids	UN, unknown components

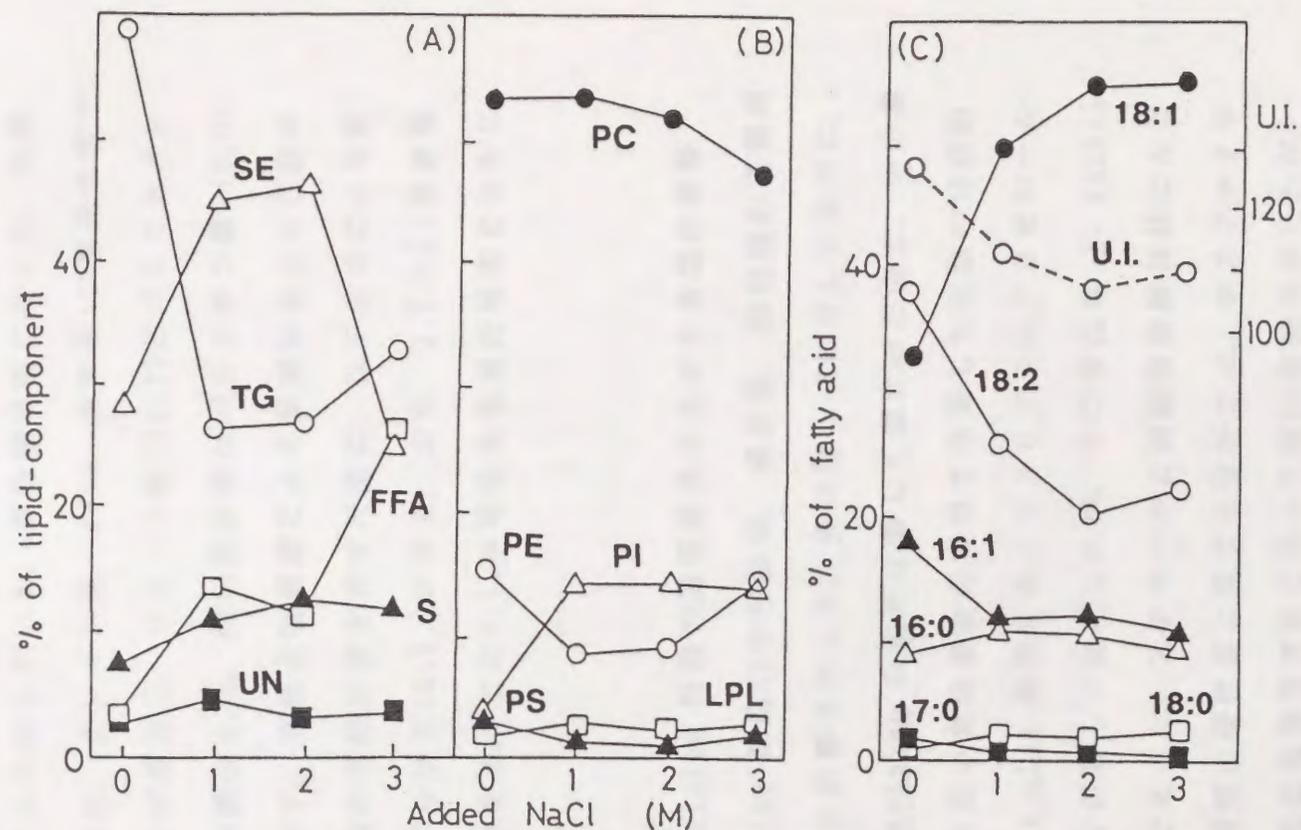


Fig. 8. Effects of NaCl on Composition of Neutral Lipids (A), Polar-head Groups in Phospholipids (B), and Cellular Fatty Acids (C) in *Zygosaccharomyces rouxii* Cells.

- (A) SE, sterol-esters                      TG, triacylglycerol                      S, sterols  
 FFA, free fatty acids                      UN, unknown components
- (B) PC, phosphatidylcholine                      PE, phosphatidylethanolamine  
 PI, phosphatidylinositol                      PS, phosphatidylserine  
 LPL, lysophospholipids

The percentage of unknown components was omitted.

- (C) 18:2, linoleic acid                      18:1, oleic acid                      18:0, stearic acid  
 17:0, heptadecanoic acid                      16:1, palmitoleic acid                      16:0, palmitic acid  
 U.I., unsaturation index ( $\Sigma\%$  fatty acids  $\times$  number of double bonds)

スファチジルイノシトールは3.5倍に増加した。ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの変化は小さかった。これらのことは培地に食塩が存在することにより、極性基に負の荷電をもつ磷脂質が増加することを示している。脂肪酸分析において、培地食塩濃度の増加とともに、オレイン酸(18:1、炭素数:二重結合数で表示している)の割合が増加し、リノール酸(18:2)とパルミトオレイン酸(16:1)の割合が減少した。飽和脂肪酸はパルミチン酸(16:0)以外わずかしか存在せず、培地食塩濃度による影響はほとんど認められなかった。脂肪酸の不飽和度を表す尺度に、以下の式により計算される不飽和インデックス(U.I.)がある。即ち、 $U.I. = \sum(\text{脂肪酸の}\% \times \text{二重結合の数})$ である。このU.I.は培地食塩濃度増加とともに減少した。

#### 1・3・4 *S. cerevisiae* 細胞の脂質組成に及ぼす食塩の影響

図9に *S. cerevisiae* 細胞の中性脂質、磷脂質、脂肪酸の各組成(%)に対する培地食塩の影響を示した。先の図5-Bに示したように、1M食塩培地で *S. cerevisiae* の生育は著しく悪かったので、十分量の細胞が得られるより低い食塩濃度の培地で培養した細胞の分析結果を示した。*S. cerevisiae* 細胞においてトリアシルグリセロールとステロールエステルが著しく変化したが、その変化は *Z. rouxii* 細胞での変化とは逆であった。ステロールと遊離脂肪酸はほとんど変化しなかった。磷脂質の極性基に関する分析では、ホスファチジルコリンにおいて培地食塩濃度増加に伴って増加傾向を示したが、それ以外の成分は変化しないかまたは減少した。脂肪酸種の割合の変化はわずかであり、U.I.もほとんど変化しなかった。

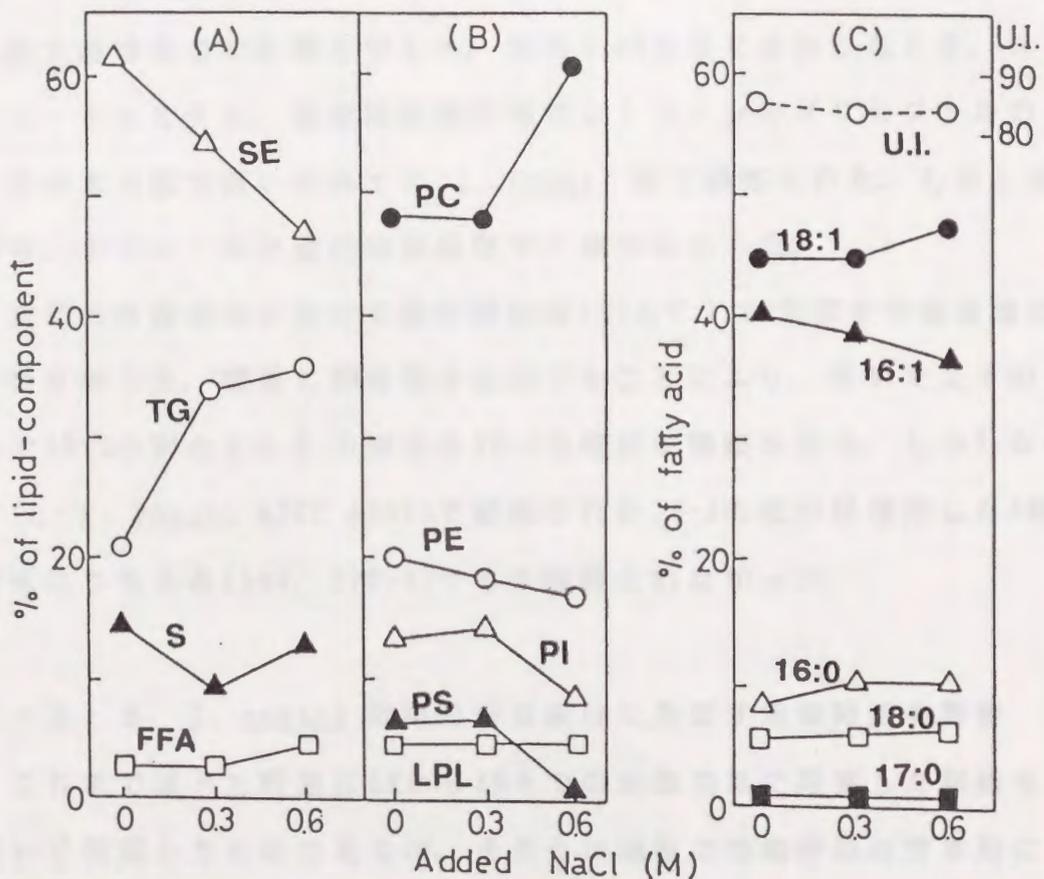


Fig. 9. Effects of NaCl on Composition of Neutral Lipids (A), Polar-head Groups in Phospholipids (B), and Cellular Fatty acids (C) in *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

- (A) SE, sterol-esters                      TG, triacylglycerol  
 S, sterols                                      FFA, free fatty acids  
 The percentage of unknown components was omitted.
- (B) PC, phosphatidylcholine              PE, phosphatidylethanolamine  
 PI, phosphatidylinositol              PS, phosphatidylserine  
 LPL, lysophospholipids  
 The percentage of unknown components was omitted.
- (C) 18:1, oleic acid                          18:0, stearic acid  
 17:0, heptadecanoic acid              16:1, palmitoleic acid  
 16:0, palmitic acid                      U.I., unsaturation index  
 The percentage of 18:2 was omitted, since it was only trace.

### 1・3・5 *Z. rouxii* ATCC 42981 株以外の4菌株の脂質組成

表 I に ATCC 42981 株以外の4菌株の中性脂質(ステロールエステル、トリアシルグリセロール、遊離脂肪酸、ステロール)組成(%)に及ぼす培地食塩の影響を示した。培地に2M食塩を添加したとき、ステロールエステル、遊離脂肪酸の増加とトリアシルグリセロールの減少が本実験で用いた全ての *Z. rouxii* 株で観察された。しかしながら、ステロールの変化は菌株間で一様でなかった。

表 II に各種菌株における脂肪酸組成(%)とU.I.に及ぼす培地食塩の影響を示した。培地に2M食塩を添加することにより、用いた全ての株で18:2の割合とU.I.の減少と18:1の増加が観察された。しかしながら、*Z. rouxii* ATCC 42981で観察された16:1の減少は使用した4種の株のうち2株(S84、G10-1)でしか観察されなかった。

### 1・3・6 *Z. rouxii* 細胞の脂質組成に及ぼす培養時期の影響

これまで述べた結果は0Mから3Mまでの食塩培地で培養した細胞を用いて測定したものであるが、それらの細胞の培養時期は定常期に限っていた。脂質代謝を考慮する場合、活発に代謝している対数期と生育の停止した定常期とでは脂質組成が異なっていると考えられたので、培養時期との関係を追究することにした。

図 10 に0M食塩培地(A)と2M食塩培地(B)で培養した細胞の各脂質含量と培養時期の関係を示した。それらの含量は乾燥細胞重量mg当りの $\mu$ gで表示した。0M食塩培地で培養した細胞では、貯蔵脂質であるトリアシルグリセロールとステロールエステル量が培養時間と共に増加した。2M食塩培地で培養した細胞では、ステロールエステル

Table I. Effect of NaCl on Composition of Neutral Lipids in Various Strains of *Zygosaccharomyces rouxii*.

Strains	NaCl (M)	Growth (A600)	% of neutral lipids			
			SE	TG	FFA	S
S84	0	13.8	31.5	39.7	trace	8.8
	2	23.6	38.4	21.3	19.8	8.9
G10-1	0	8.3	20.8	56.1	5.0	18.1
	2	19.8	29.8	41.3	21.9	7.0
S2-B	0	6.9	18.8	64.9	4.0	12.3
	2	17.2	26.3	30.2	35.0	8.4
IAM 4028	0	4.1	5.5	74.6	11.0	7.4
	2	17.1	26.2	34.5	24.9	14.5

SE, sterol-esters

FFA, free fatty acids

A600, absorbance at 600 nm

TG, triacylglycerol

S, sterols

Table II. Effect of NaCl on Composition of Cellular Fatty Acids in Various Strains of *Zygosaccharomyces rouxii*.

Strains	NaCl (M)	% of fatty acids					U.I.
		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	
S84	0	7.7	14.7	1.7	41.7	32.1	123.6
	2	10.3	12.5	2.5	55.9	17.8	104.0
G10-1	0	10.9	11.4	2.9	36.8	35.8	123.1
	2	10.5	8.5	2.8	47.9	27.6	116.4
S2-B	0	10.3	9.4	3.8	43.1	31.6	118.1
	2	9.8	12.9	3.8	54.9	16.5	104.1
IAM 4028	0	10.2	12.0	3.7	29.0	43.2	128.3
	2	11.0	13.2	3.6	47.1	24.5	109.3

U.I., unsaturation index.

16:0, palmitic acid

18:0, stearic acid

18:2, linoleic acid

16:1, palmitoleic acid

18:1, oleic acid

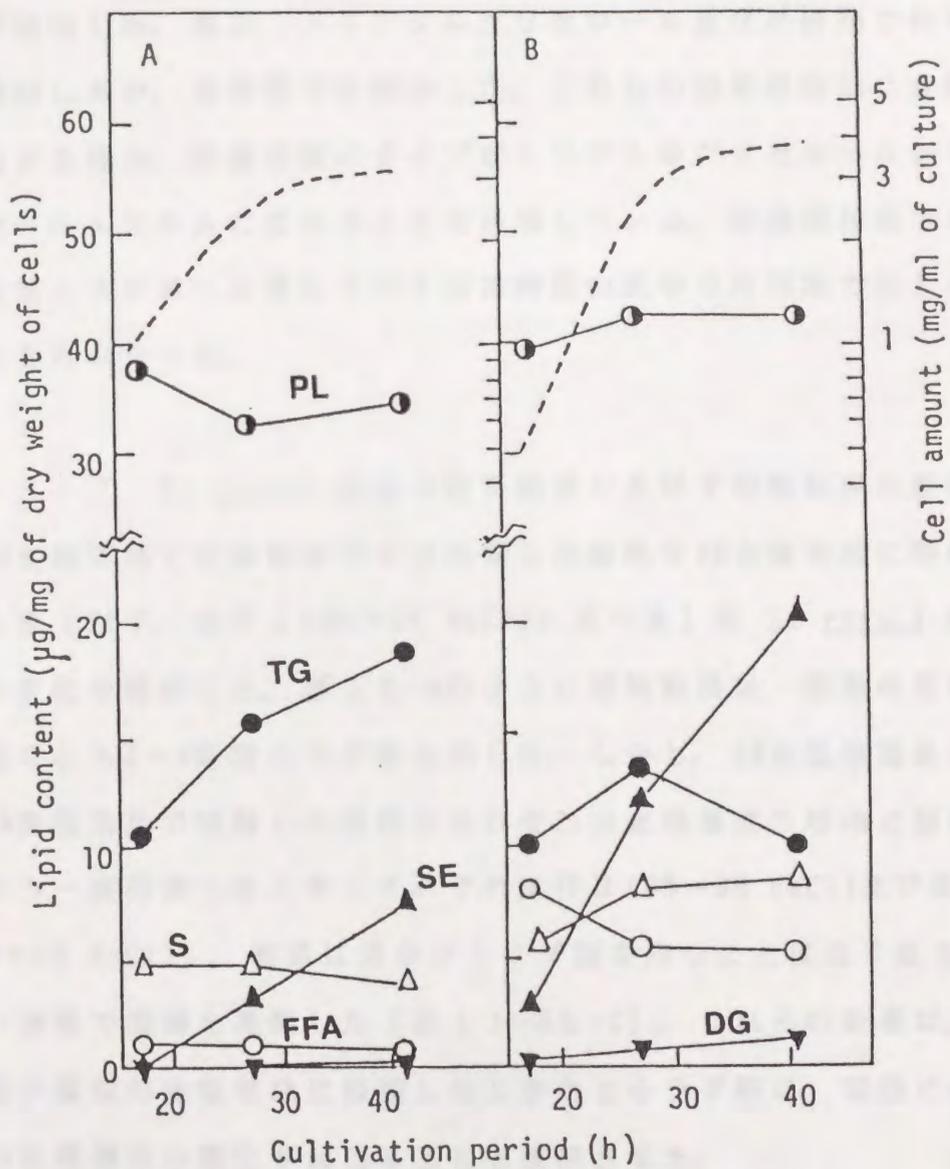


Fig. 10. Relationship Between the Content of Each Lipid Component in *Zygosaccharomyces rouxii* Cells Grown in the Presence of 0M NaCl (A) or 2M NaCl (B) and Their Culture Age.

Dotted lines, growth curve  
 TG, triacylglycerol  
 SE, sterol-esters  
 DG, diacylglycerol

PL, phospholipids  
 S, sterols  
 FFA, free fatty acids

量が増加した。他方、トリアシルグリセロール量は対数期でわずかに増加したが、定常期では減少した。これらの結果は培地に食塩が存在する場合、貯蔵脂質のタイプがトリアシルグリセロールからステロールエステルに変わることを示唆している。細胞膜脂質である磷脂質とステロール量に及ぼす培養時期の影響は両培地でほとんど認められなかった。

#### 1・3・7 Z. rouxii 細胞の脂質組成に及ぼす培地転換の影響

0M食塩培地で定常期前期まで培養した細胞を2M食塩培地に移植したとき〔以下、条件I (0M→2M NaCl)と述べる〕の Z. rouxii 細胞量の変化を検討した。図11-Aのように培地転換後、細胞の生育は少なくとも5~6時間のラグ期を示した。しかし、0M食塩培地あるいは2M食塩培地で培養した細胞をそれぞれ同食塩濃度の培地に移植してもう一度培養したとき〔それぞれ条件II (0M→0M NaCl)及び条件III (2M→2M NaCl)〕、細胞は見かけ上ラグ期を持つことはなく直ちに新しい培地で増殖を再開した(図11-Bと-C)。これらの結果は、より高い濃度の食塩培地に移植したとき生じるラグ期に、細胞に何らかの生理機能の変化が起こることを推測させた。

Z. rouxii 細胞が高濃度食塩環境にどの様に適応するかを脂質代謝面から明らかにするために、細胞を新しい培地に移植した後の細胞脂質含量の変化を分析した。図11-Aに条件I (0M→2M NaCl)、図11-Bに条件II (0M→0M NaCl)、図11-Cに条件III (2M→2M NaCl)の変化を示した。磷脂質量は条件I (0M→2M NaCl)の場合ラグ期では変化しないが、増殖再開とともに増加した。条件II (0M→0M NaCl)及びIII (2M→2M NaCl)の場合、磷脂質量は増殖中変化しなかったが、磷脂

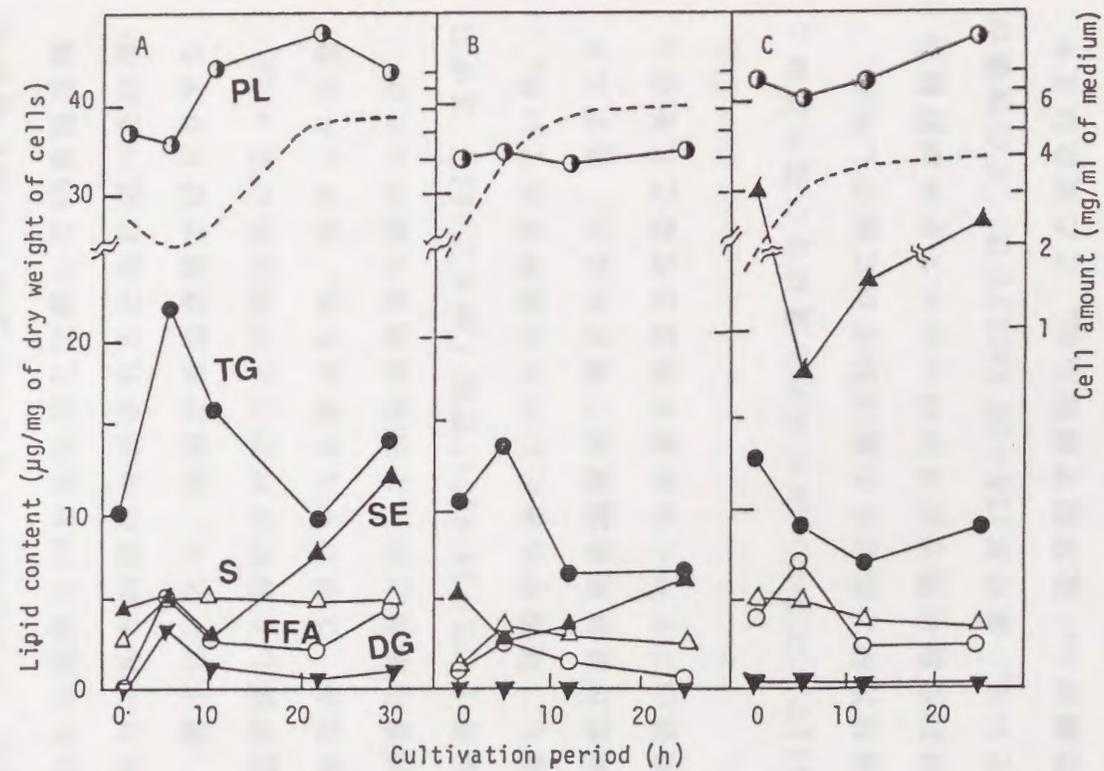


Fig. 11. Relationship Between Culture Age and Changes in Lipid Composition of *Zygoosaccharomyces rouxii* Cells.

A, 0M NaCl → 2M NaCl

Dotted line, growth curve

SE, sterol-esters

DG, diacylglycerol

B, 0M NaCl → 0M NaCl

PL, phospholipids

S, sterols

C, 2M NaCl → 2M NaCl

TG, triacylglycerol

FFA, free fatty acids

質量は条件 II (0M→0M NaCl) よりも条件 III (2M→2M NaCl) で高かった。この結果は *Z. rouxii* 細胞が高濃度食塩環境では磷脂質を活発に合成したことを示している。条件 I (0M→2M NaCl) では、トリアシルグリセロール量はラグ期に急増し、増殖再開と共に急減した。また、条件 I (0M→2M NaCl) で、ジアシルグリセロール量はラグ期に増加し、その後減少した。これらの結果と 2M 食塩培地と比較して 0M 食塩培地ではトリアシルグリセロールが活発に合成されると先に述べた結果 (図 7、図 8、表 III、図 10) より、高濃度食塩環境ではトリアシルグリセロールの合成が著しく抑制されたことが明らかになった。

次に微量成分ではあるが、ステロールに着目した。ステロール量は先に述べたように 0M 食塩培地と比べて 2M 食塩培地で高かったが (図 7、図 10)、条件 I (0M→2M NaCl) では (図 11-A)、ステロール量はラグ期に急増し、増殖中もそのレベルは維持されていた。このラグ期の増加は細胞が高濃度食塩環境に曝されると、先ずステロールを合成し、細胞膜のステロール含量を増加させることを示している。

条件 I (0M→2M NaCl) で、ステロールエステル量はラグ期ではほとんど変化しないが、増殖再開と共にその量はわずかに減少した後、増加した。この結果は 2M 食塩培地ではステロールエステルが貯蔵脂質であることを示している。条件 III (2M→2M NaCl) では、その含量が生育の活発な対数期で減少し、定常期で増加した。この変化はステロールエステルが貯蔵脂質であるという考えを支持している。また、高濃度食塩培地での生育にとって必須であると考えられるステロールの供給源としてステロールエステルが機能している可能性が示された。

同様の三条件で培養した細胞の磷脂質に含まれるアシル残基（脂肪酸）組成の変化を検討した。その結果を図12に示した。条件I (0M→2M NaCl)では、増殖再開と共にオレイン酸(18:1)の割合が増加し、リノール酸(18:2)の割合が減少した。しかし、ラグ期ではそれらの割合は変化しなかった。磷脂質のアシル残基の不飽和度(U.I.)は徐々に低下した。また、条件II (0M→0M NaCl)とIII (2M→2M NaCl)では、18:1、18:2、U.I.の変化は条件I (0M→2M NaCl)に比べて小さく、条件II (0M→0M NaCl)とIII (2M→2M NaCl)での18:1と18:2の割合は、それぞれ条件I (0M→2M NaCl)の培養前と培養後のレベルをほぼ維持していた。これらの結果は磷脂質のアシル残基の変化(18:2→18:1)が高濃度食塩環境での *Z. rouxii* 細胞の生育にとって必須な適応現象であろうことを示唆している。このアシル残基の合成に関与する酵素に対する食塩の影響については次章で述べる。

#### 1・3・8 磷脂質の極性基の組成に及ぼす食塩の影響

1・3・3で、一次元薄層クロマトグラフィーによる磷脂質の極性基の分析を行ったが、各磷脂質成分の分離は充分ではなかった。それ故、磷脂質を<sup>14</sup>Cでラベルした後、二次元薄層クロマトグラフィーにより分析した。図13に、そのオートラジオグラムを示した。ホスファチジルイノシトールとホスファチジルセリンは同じ位置に移動したが、それ以外の成分は完全に分離できた。そこで、細胞を<sup>14</sup>C-酢酸ナトリウムを含む0Mと2M食塩培地で対数期と定常期まで培養し、細胞脂質を二次元薄層クロマトグラフィーにより分離し、それぞれの磷脂質成分の放射活性を測定した。その結果を表IIIに示した。磷脂質の主要成分であるホスファチジルコリンは磷脂質全体の

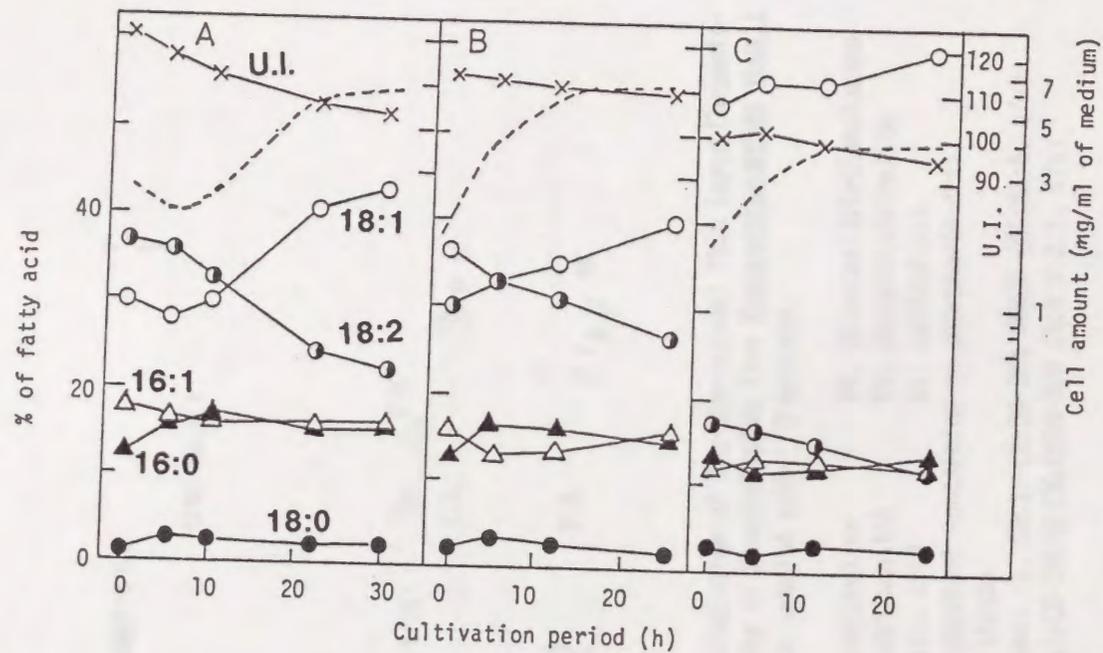


Fig. 12. Relationship Between Composition of Acyl Residues in Phospholipids and Culture Age in *Zygosaccharomyces rouxii* Cells After Transfer to Fresh Medium.

A, 0M NaCl → 2M NaCl  
 Dotted line, growth curve  
 18:0, stearic acid  
 U.I., unsaturation index

B, 0M NaCl → 0M NaCl  
 18:2, linoleic acid  
 16:1, palmitoleic acid

C, 2M NaCl → 2M NaCl  
 18:1, oleic acid  
 16:0, palmitic acid

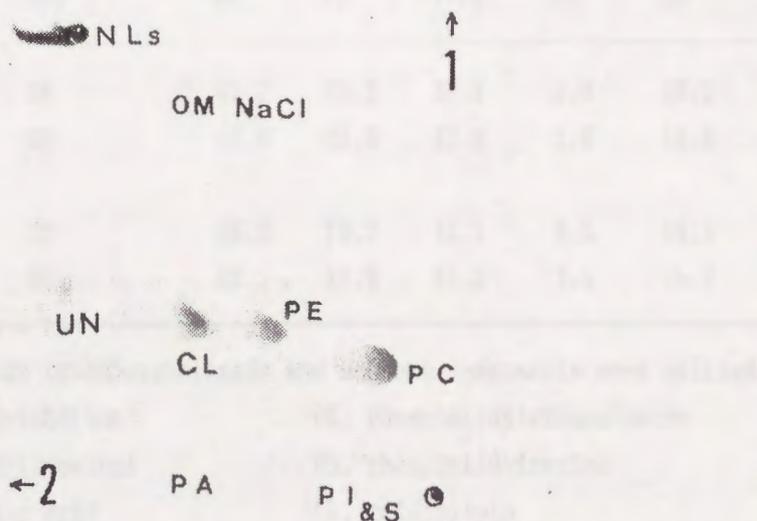


Fig. 13. Autoradiogram of Two-dimensional Thin Layer Chromatography of Phospholipids from *Zygosaccharomyces rouxii* Cells Labeled with  $^{14}\text{C}$ -acetate.

PC, phosphatidylcholine                      PE, phosphatidylethanolamine  
 PI, phosphatidylinositol                    PS, phosphatidylserine  
 PA, phosphatidic acid                      CL, cardiolipin  
 UN, unknown component containing no phosphoric acid  
 NLs, neutral lipids  
 Solvent systems: 1,  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-28\% NH}_4\text{OH}$  (65:25:5, v/v)  
 2,  $\text{CHCl}_3\text{-(CH}_3\text{)}_2\text{CO-CH}_3\text{OH-CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$  (6:8:2:2:1, v/v)

Table III. Distribution of  $^{14}\text{C}$  in Phospholipids from *Zygosaccharomyces rouxii* Cells Labeled with [ $^{14}\text{C}$ ] Sodium Acetate.

NaCl (M)	Growth period (hr)	% of phospholipids				
		PC	PE	PI+PS	PA	CL
0	18	41.2	22.1	16.2	2.9	10.1
	30	43.6	22.9	13.6	2.6	14.8
2	20	39.2	19.7	11.1	6.0	14.5
	30	42.3	16.9	11.3	2.4	19.1

Data on traces of lysophospholipids and unknown components were omitted.

PC, phosphatidylcholine

PE, phosphatidylethanolamine

PI, phosphatidylinositol

PS, phosphatidylserine

PA, phosphatidic acid

CL, caldiolipin

約40%、ホスファチジルエタノールアミンは約20%、ホスファチジルイノシトール+ホスファチジルセリン区分は11%~16%、ホスファチジン酸は2%~6%、カルジオリピンは10%~19%を占めていた。活発に生育している対数期の細胞を比較すると、2M食塩の存在によりホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルイノシトール+ホスファチジルセリンが減少し、カルジオリピンとホスファチジン酸が増加した。この結果は高濃度食塩培地で培養した細胞が負に荷電した磷脂質 [1・3・3では、ホスファチジルイノシトールの増加を認めたが(図8)、ここでは、ホスファチジン酸とカルジオリピンが増加した] に富む細胞膜であることを示唆している。

#### 1・4 考察

*Candida*、*Hansenula*、*Debaryomyces*、*Zygosaccharomyces* などの耐塩性酵母属の中で、本実験では、*Z. rouxii* について培地食塩濃度と脂質組成の関連性を検討した。

高濃度食塩を含む培地で生育した *Z. rouxii* 細胞では、0M食塩培地の細胞と比べて、ステロール量が増加し(図7)、ステロール/磷脂質比が上昇した。0M食塩培地で培養した細胞を2M食塩培地に移すと、5時間程度のラグ期の後、細胞は再び増殖を開始した(図11-A)が、そのラグ期でステロール含量が先ず増加した(図11-A)。ステロールは細胞膜に多く存在し、細胞膜の流動性(51,52)や物質透過性(53,54)を制御していること、またステロール(あるいはカロチノイド)を多く含む細胞は浸透圧差に起因する細胞膜にかかる物理的力により抵抗性であることが示されている(49b)。ここで、コレステロールなどのステロールの全く認められない原核生物では、カロ

チノイドがその役割を果たしているらしい。従って、増加したステロールは細胞の高濃度食塩環境下での生育を維持するために膜の流動性を制御し、細胞膜にかかる物理的影響に抵抗力を与えられ、このステロール量の増加は *Z. rouxii* 細胞の耐塩性における重要な適応能であると推察できる。

一方、ステロールエステルの細胞膜での局在や機能はなお不明な点が多い。現在、ステロールエステルの局在について二つの仮説がある(55)。Valicらはステロールエステルがそのエステル結合を外に向けて二重層膜に存在していると報告した(56)。他方、HossackとRoseは注意深く調製した細胞膜にはステロールエステルが検出できなかったと報告した(57)。また、ステロールエステルは細胞膜に強く結合した"droplets"あるいは"pockets"として存在すると報告された(58)。*Z. rouxii* 細胞は培地食塩濃度の増加に依存してより多くのステロールエステルを生成した(図7と8-A)。培地食塩濃度増加に伴って増加したステロールエステルは現在まで知られている機能を考え合わせると、貯蔵脂質としての役割以外に、細胞膜の内側に局在し、浸透圧に対する膜の保護やナトリウム・塩素イオンの受動輸送を防ぐ役割を持つのであろう。また、高濃度食塩培地での生育にとって必須であると考えられるステロールの供給源として機能していることも考えられる。*S. cerevisiae* 細胞は本来多量のステロールエステルを含むが、培地食塩濃度の増加とともにその存在割合が低下した(図9-A)。この結果は *Z. rouxii* 細胞中の増加したステロールエステルが *S. cerevisiae* 細胞のそれとは異なる役割を持つであろうことを示唆している。酵母細胞におけるステロールエステルの役割に関する情報がより多くなれば、耐塩性酵母細胞中の

ステロールエステルと培地食塩濃度の関連性がより明白になると期待される。

酵母細胞は貯蔵物質としてトリアシルグリセロールを蓄積することが知られている(59)。食塩非存在下で、*Z. rouxii* 細胞が *S. cerevisiae* 細胞よりも多量にトリアシルグリセロールを蓄積するという結果(図7、8-A、9-A)は注目に値する。*Z. rouxii* 細胞では、培地食塩濃度の増加とともにトリアシルグリセロールの含量が低下した(図7)。0M食塩培地で培養した細胞を2M食塩培地に移し、もう一度培養した時、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロールの合成が2M食塩培地に適応して増殖した細胞で抑制されることを認めた(図11-A)。このことはトリアシルグリセロールの合成が培地への食塩の添加により抑制されたことを示している。次に、食塩存在下で増殖した *Z. rouxii* 細胞は多量の遊離脂肪酸を含んでいることが認められた(図7、8-A)。このことは脂肪酸の合成が食塩の添加により阻害されないことを示している。さらに、磷脂質含量は培地への食塩の添加によりほとんど影響されない(図7)かまたは高濃度食塩培地では増加した(図11)。細胞当りの磷脂質含量を一定に保つことは細胞膜系の恒常性を考えると重要なことであると考えられる。また、高濃度食塩培地で生育している *Z. rouxii* 細胞では浸透圧調節剤としてグリセロールを細胞内に多量に蓄積することはよく知られた現象である(45,46)。現在まで明らかになっているトリアシルグリセロール、磷脂質合成およびグリセロール生成経路を図14に示した。トリアシルグリセロール、磷脂質、遊離脂肪酸、グリセロールなどの物質代謝系を考えると、グリセロールが浸透圧調整のために代謝系から離れて蓄積するためにトリアシ

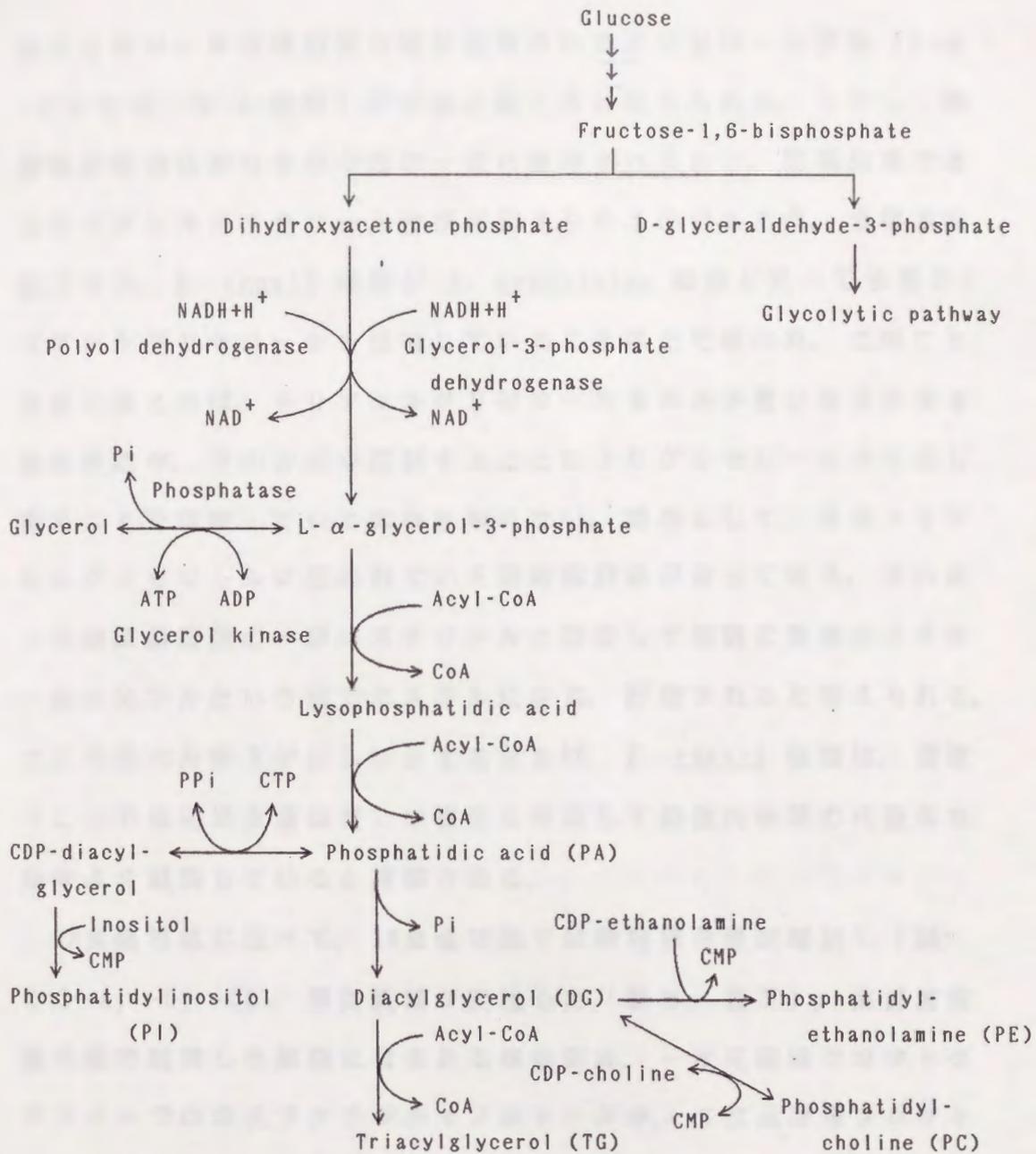


Fig. 14. Pathways of Production of Glycerol and Syntheses of Phospholipids and Triacylglycerol.

ルグリセロールや磷脂質合成に利用されるグリセロール骨格 (L- $\alpha$ -グリセロール-3-磷酸) の不足が起こると考えられる。しかし、磷脂質の恒常性からその合成は一定に維持されるので、貯蔵磷脂であるトリアシルグリセロール合成が抑えられるのであろう。食塩非存在下では、*Z. rouxii* 細胞が *S. cerevisiae* 細胞と比べて多量のトリアシルグリセロールを含有していることは上で述べた。このことは言い換えれば、トリアシルグリセロールを本来多量に合成出来る酵母細胞が、その合成を抑制することによりグリセロールを生成し得ることを意味しているのかも知れない。結果として、本来トリアシルグリセロールに使われていた遊離脂肪酸が余って来る。その余った遊離脂肪酸の一部はステロールと結合して細胞に無害のステロールエステルという形でエステル化され、貯蔵されると考えられる。ここで述べた考えが正しいとするならば、*Z. rouxii* 細胞は、環境 (ここでは培地食塩濃度) の変化に対応して細胞内物質の代謝系を効率よく調節していると推察される。

0M食塩培地に比べて、2M食塩培地では磷脂質含量が増加し (図 11-A, -B, -C)、磷脂質種が変化した (図 8、表 III)。高濃度食塩培地で培養した細胞に含まれる磷脂質は、一次元薄層クロマトグラフィーではホスファチジルイノシトールが、二次元薄層クロマトグラフィーではカルジオリピンやホスファチジン酸が増加した。これら磷脂質は全て負に荷電しており、全体的に負に荷電した磷脂質の割合が増加したことになる。また、耐塩性細菌 *Staphylococcus aureus* は主にホスファチジルグリセロール、リゾホスファチジルグリセロール、ジホスファチジルグリセロール (カルジオリピン) などの磷脂質を含んでいるが、細菌を高濃度食塩 (2M食塩) 培地で培

養した時、カルジオリピンが増加することが報告されている(60)。また、好塩性細菌 *Pseudomonas halosaccharolytica* はホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、リゾホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミンを含んでいるが、この細菌を高濃度食塩培地で培養した時、ホスファチジルエタノールアミンの合成が抑制され、ホスファチジルグリセロールの合成が増加し、全体として負に荷電した磷脂質の割合が増加することが示されている(61,62)。本実験で観察した磷脂質種の変化は上記細菌で観察された磷脂質種の変化に比べて小さかったが、負に荷電した磷脂質の増加はナトリウムイオンと塩素イオンの透過性の制御に関連して、特に負に荷電したイオン(塩素イオン)の透過を抑制する点で、耐塩性微生物の共通の適応現象と考えられる。

*Z. rouxii* 細胞の脂肪酸組成に関して、培地食塩濃度の増加とともに18:2とU.I.の減少と18:1の増加を観察した(図8-C)。また、0M食塩培地で培養した細胞を2M食塩培地に移植したとき、磷脂質のオレイン酸(18:1)量が増加し、リノール酸(18:2)量が減少した(図12-A)。同じ食塩濃度の培地に移植して培養したとき、それら二つの脂肪酸の組成は培養時期に係わりなくほとんど変化しなかった(図12-B, -C)。このことは細胞が高濃度食塩環境で生育するために細胞膜磷脂質の脂肪酸組成を変化させ、細胞膜の流動性を剛性の方向に変化させることを示唆している。Mogiらも0%と18%食塩培地で *Z. rouxii* について同様の現象を報告している(41)。但し、彼らは静置培養法を用いており、本実験と比べてより嫌气的条件であるので、18:2の割合やU.I.はかなり低かった。このような18:1、18:2、U.I.の変化は非耐塩性酵母 *S. cerevisiae* では観察されなかった

(図9-C)。S. cerevisiae の脂質組成の変化についてはエタノールによる影響に関する研究があり、18:1よりも18:2を多く含む S. cerevisiae 細胞がエタノールを含む培地で良好な生育を示すと報告されている(63)。本実験の Z. rouxii に対する食塩の効果と S. cerevisiae に及ぼすエタノールの効果が全く逆であることは注目値する。

Z. rouxii 細胞の形は培地の食塩濃度の上昇と共に球形から卵型に変化した。酵母細胞の形が細胞壁や細胞内骨格などにより決定されていることはよく知られているので、この細胞の形状変化は本酵母の耐塩性において細胞壁などの関与が無視できないことが推測される。

#### 1・5 小括

本章では、耐塩性酵母 Z. rouxii 細胞の培地食塩濃度に依存した細胞脂質組成の変化と形態学的変化を検討した。その結果、以下のことが明らかになった。

(1) 培地食塩濃度の上昇とともに、ステロール含量が著しく増加し、磷脂質含量もわずかに増加した。その結果、ステロール/磷脂質含量比が増加した。0M食塩培地で培養した細胞を2M食塩培地に移植培養すると、細胞は5~6時間のラグ期の後に増殖したが、そのラグ期にステロール含量が増加することが分かった。このステロールの顕著な増加が細胞の食塩適応において最初に現れる現象であることを示した。

(2) 培地食塩濃度上昇と共に、トリアシルグリセロール含量が低下し、ステロールエステル含量が増加した。高濃度食塩培地で生

育したとき、多量のグリセロールを細胞内に蓄積し、この生成と連関して、トリアシルグリセロール合成が抑制されることを示した。また、細胞毒性を示すと言われている遊離脂肪酸含量が増加したが、これを緩和するためにステロールにエステル化が起こるものと推測した。一方、非耐塩性酵母 *S. cerevisiae* は高濃度食塩中では生育できないので低濃度の中で実験を行ったが、これらの結果と全く異なっていた。この結果は高濃度食塩の顕著な影響を一層支持するものである。

(3) 培地食塩濃度上昇と共にカルジオリピン、ホスファチジン酸(ホスファチジルイノシトール)が増加した。その結果として、高濃度食塩培地で培養した細胞の細胞膜は負に荷電した磷脂質に富む膜に変化した。培地食塩濃度に依存した負に荷電した磷脂質の増加は耐塩性・好塩性細菌でも報告されているので、負に荷電した磷脂質の増加は耐塩性微生物において共通の現象であり、負に荷電したイオンの透過性に関連して重要であると推察した。

(4) 培地食塩濃度上昇と共に、オレイン酸(18:1)含量が増加し、リノール酸(18:2)含量が減少し、その結果、脂肪酸の不飽和度が低下した。また、0M食塩培地で培養した細胞を2M食塩培地に移植すると、18:1の合成が増加し、18:2の合成が抑制された。同様な結果が磷脂質の脂肪酸組成についても確認され、細胞膜の流動性に変化が起こるが示唆された。

## 第2章

耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 細胞のリノール酸合成に及ぼす食塩の影響

### 2・1 緒言

前章で、耐塩性酵母 *Z. rouxii* 細胞を高濃度食塩培地に移植したとき、磷脂質中のリノール酸残基の合成が抑制されること及び18:1から18:2への不飽和化反応の抑制が起こることが示唆された。このような変化は酵素的機構により引き起こされると推測された。本章ではこれらを明らかにする目的で、脂肪酸を構成成分として含む脂質（磷脂質、トリアシルグリセロール、ステロールエステル、遊離脂肪酸）中の脂肪酸含量を測定した。培養条件は次に示す四条件で行った。（A）0M食塩培地で培養した *Z. rouxii* 細胞を同培地に移植する。（B）0M食塩培地で培養した細胞を2M食塩培地に移植する。（C）2M食塩培地で培養した細胞を同培地に移植する。（D）2M食塩培地で培養した細胞を0M食塩培地に移植する。上記の条件で培養された細胞の脂肪酸合成量を比較すれば、不飽和脂肪酸の割合に及ぼす食塩の影響が明らかにできるものと考えられた。なお、本章の結果の大部分は既に学会誌に報告した(64)。

### 2・2 実験方法

#### 2・2・1 使用酵母株及び使用培地

本章では、*Z. rouxii* ATCC42981 株（野生型）を使用した。第1章で述べたYM培地を使用した。

### 2・2・2 培養方法

*Z. rouxii* 細胞の培養方法を図15に示した。条件B(0M→2M NaCl)では、まず斜面培地から一白金耳の細胞を0M食塩培地(5ml)に接種し、30°Cで二日間静置培養した。その前培養液を95mlの0M食塩培地に接種し、30°Cで振とう(95回/分)培養した。定常期前期で培養液を30ml採取し、細胞を回収した。回収した細胞は50mlの2M食塩培地に再懸濁し、30°Cでさらに振とう培養した。

### 2・2・3 脂質抽出及び脂肪酸分析

脂質抽出は1・2・6で述べた方法で行った。磷脂質、ステロールエステル、トリアシルグリセロール、遊離脂肪酸に含まれる脂肪酸の分離及び定量法は以下のように行った。抽出した脂質をシリカゲルプレートにスポットし、 $n$ -ヘキサン/エーテル/ギ酸(90:10:1, v/v)で脂質を分離し、ヨウ素蒸気により各スポットを確認し、上記四成分を各々シリカゲルと共に試験管にかき取り、クロロホルム/メタノール(2:1, v/v)で脂質を抽出した。溶媒を除去した後、1・2・7で述べたように脂肪酸をトランスメチレーション法により脂肪酸メチルエステルに変換した。得られた脂肪酸メチルエステルは1・2・7で述べたようにガスクロマトグラフィーにより定量した。

### 2・2・4 脂質のパルス・ラベリングと放射性脂質抽出

0M食塩培地で定常期まで培養した細胞(30ml培養液から)を0M食塩と2M食塩培地(50ml)に移植した。それぞれ、対数期中期まで30°Cで培養した後、各々の培養液に4 $\mu$ Ciの[1-<sup>14</sup>C]酢酸ナトリウム(56 mCi/mmol; New England Nuclear, MA)を加え、30°Cで30分間培養を

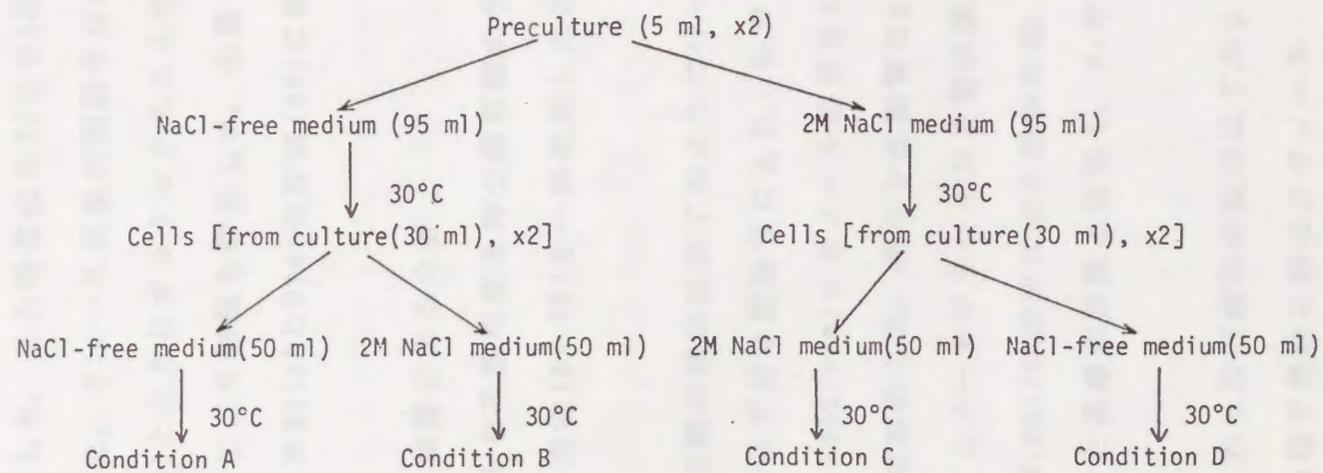


Fig. 15. Conditions for Cultivation of *Zygosaccharomyces rouxii* Cells.

続け、細胞の脂質を $^{14}\text{C}$ でパルス・ラベルした。細胞を集菌し、滅菌水で一度洗浄した後、 $^{14}\text{C}$ を加えていない同様の培養液から調製した無細胞上澄液(50ml)に懸濁した。その懸濁液を $30^\circ\text{C}$ で3時間振とう培養し、いわゆるチェースした。チェース前後の細胞を回収し、ガラスビーズ(直径0.45-0.50mm)とともにボルテックスミキサーで二分間二回激しく攪はんすることにより細胞を破碎した。全脂質は細胞破碎液から1・2・6で述べたBlighとDyerの方法(48)に従い抽出した。

#### 2・2・5 脂肪酸の不飽和度による分析

$^{14}\text{C}$ でラベルしたいろいろな不飽和度を持つ脂肪酸の分離・分析は以下に述べるFerranteらの方法(65,66)を一部改変した方法を用いて行った。

(a)脂質に含まれる脂肪酸の抽出は以下のように行った。ラベルした脂質をスクリーキャップ付き試験管に入れ、 $\text{N}_2$ ガス下で乾固し、0.3N水酸化ナトリウム-90%(v/v)メタノール溶液を5ml加え、脂質を溶解し、 $70^\circ\text{C}$ 、1.5時間加熱した。不ケン化脂質をn-ヘキサン(15ml)で抽出除去した。フェノールフタレインを指示薬として、メタノール・水相を6N塩酸(0.5ml)の添加により酸性化後、n-ヘキサン(15ml)で加水分解して生じた遊離脂肪酸を抽出し、 $\text{N}_2$ ガス下で溶媒を除去した。

(b)アシル-CoAに含まれる脂肪酸の抽出は以下のように行った。アシル-CoAは全脂質抽出過程で最後に残るメタノール・水相に存在するので、その相から抽出した。メタノール・水相(4.7ml)をスクリーキャップ付き試験管に入れ、40%(w/v)水酸化ナトリウム液を0.3ml加え、混合液を $70^\circ\text{C}$ 二時間加熱した。フェノールフタレインを

指示薬として濃塩酸(0.5ml)の添加により液を酸性化後、クロロホルム(10ml)で遊離脂肪酸を抽出し、 $N_2$ ガス下で溶媒を除去した。上記の二つの方法により得た遊離脂肪酸は1・2・7で述べたトランスメチレーション法に従いメチルエステル化した。

不飽和度の異なる脂肪酸の分離は以下のように行った。硝酸銀シリカゲル薄層プレートは10%(w/v)硝酸銀溶液にシリカゲルGプレートを一分間浸した後、乾燥し、 $100^\circ C$ 、30分間加熱することにより調製した。上述のように調製した脂肪酸メチルエステルを硝酸銀薄層プレートにスポットし、 $n$ -ヘキサン/エーテル(70:30, v/v)の展開溶媒を用いて展開した。プレートにローダミン6G溶液を噴霧し、UVランプ下で各成分を検出した。飽和脂肪酸区分[パルミチン酸(16:0)、ステアリン酸(18:0)]、モノ不飽和脂肪酸区分[パルミトオレイン酸(16:1)、オレイン酸(18:1)]、ジ不飽和脂肪酸区分[リノール酸(18:2)]の各成分をそれぞれシリカゲルと一緒にかけ取り、脂肪酸メチルエステルをトルエン(5ml)で抽出した。10mlの液体シンチレーション液[0.75%(w/v)2,5-ジフェニルオキサゾール(PPO)と0.075%(w/v)1,4-ビス(5-フェニル-2-オキサゾイル)ベンゼン(POPOP)を含むトルエン溶液]を加え、パッカー社液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した。

## 2・3 結果

### 2・3・1 *Z. rouxii* 細胞の培養と生育度

本章では、*Z. rouxii* 細胞を異なる食塩濃度環境で培養したとき脂肪酸合成がどのように変化するかを明らかにするために、下記の四条件で細胞を培養した(図15)。即ち、条件A(0M食塩培地で

培養した細胞を同じ0M食塩培地に移植培養、0M→0M NaCl)、条件B (0M食塩培地で培養した細胞を2M食塩培地に移植培養、0M→2M NaCl)、条件C (2M食塩培地で培養した細胞を2M食塩培地に移植培養、2M→2M NaCl)と条件D (2M食塩培地で培養した細胞を0M食塩培地に移植培養、2M→0M NaCl)である。四条件で培養したときの *Z. rouxii* 細胞の生育度を図16に示した。条件A (0M→0M NaCl)、C (2M→2M NaCl)、D (2M→0M NaCl)の三条件で培養したとき、細胞はそれぞれ新しい培地に移した後、直ちに生育したが、条件B (0M→2M NaCl)では、細胞は5から6時間のラグ期を示した。

### 2・3・2 磷脂質に含まれる脂肪酸残基の合成に及ぼす食塩の影響

条件A (0M→0M NaCl)、B (0M→2M NaCl)、C (2M→2M NaCl)で培養した細胞の磷脂質に含まれる脂肪酸残基量 (全培養液50ml当りの各残基量mgで表示した) の変化を測定した (図17-A、-B、-C)。また、各条件で培養直後 (0時間) の細胞の脂肪酸残基量に対する培養後の細胞の脂肪酸残基量の比率を示した (図17-D、-E、-F)。なお、各脂肪酸残基の合成量は各脂質に含まれる脂肪酸残基の経時的な増加量とし、それらの比率を算出して各残基の合成率とした。*Z. rouxii* 細胞の高濃度食塩培地に及ぼす適応を考える場合、条件A (0M→0M NaCl)とB (0M→2M NaCl)で得た結果を比較することが重要となる。条件B (0M→2M NaCl)での各脂肪酸残基の合成比率は、16:0=18:1>16:1>18:2であった。一方、条件A (0M→0M NaCl)では16:0>18:2>18:1>16:1であった。この18:1と18:2の量の逆転に注目した。即ち、条件B (0M→2M NaCl)では、18:2の合成に比べて18:1の合成が

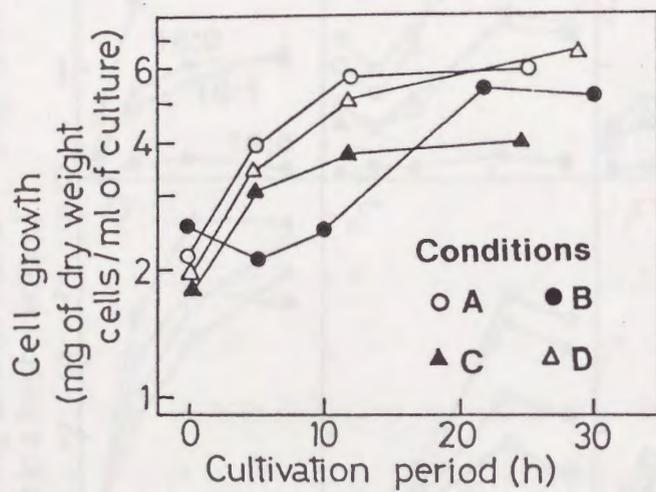


Fig. 16. Growth of *Zygosaccharomyces rouxii* Cells Under Various Conditions.

- |                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| A, 0M NaCl → 0M NaCl | B, 0M NaCl → 2M NaCl |
| C, 2M NaCl → 2M NaCl | D, 2M NaCl → 0M NaCl |

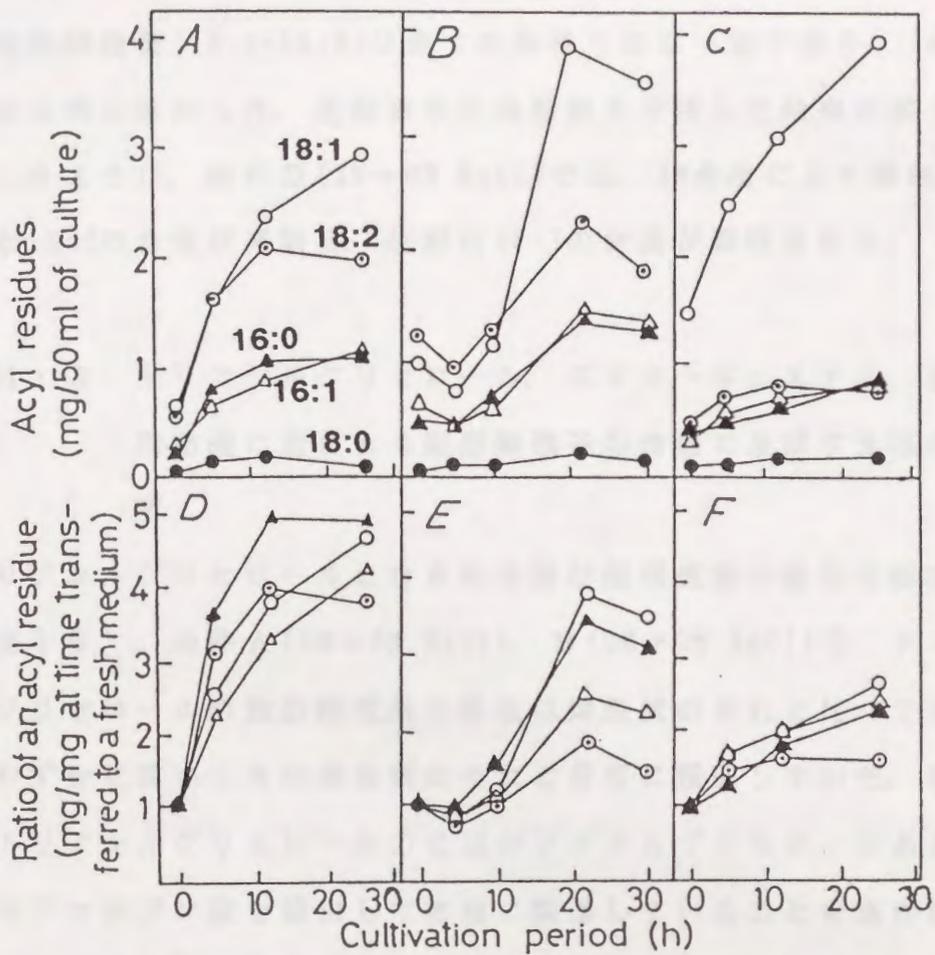


Fig. 17. Effect of NaCl on the Synthesis of Acyl Residues in Phospholipids of *Zygosaccharomyces rouxii* Cells Grown Under Conditions A, B, C.

A and D, 0M NaCl → 0M NaCl  
 C and F, 2M NaCl → 2M NaCl  
 18:2, linoleic acid  
 18:0, stearic acid  
 16:0, palmitic acid

B and E, 0M NaCl → 2M NaCl  
 18:1, oleic acid  
 16:1, palmitoleic acid

著しく促進していた。条件C (2M→2M NaCl)では18:1の合成は18:2の合成に比べて著しく高いレベルに保たれていた。また、炭素数18の不飽和脂肪酸量(18:1+18:2)は全ての条件でほぼ一定であり、18:0のレベルは常に低かった。全脂質中の脂肪酸を分析した結果の図18に示したように、条件D (2M→0M NaCl)では、2M食塩により抑制されていた18:2の合成が再開し、反対に18:1の合成が抑制された。

### 2・3・3 トリアシルグリセロール、ステロールエステル、遊離脂肪酸に含まれる脂肪酸残基の合成に及ぼす食塩の影響

トリアシルグリセロールに含まれる脂肪酸残基量の変化を測定した(図19)。条件A (0M→0M NaCl)、B (0M→2M NaCl)で、トリアシルグリセロールの脂肪酸残基の合成は磷脂質のそれと比べて18:2量がわずかに高い以外は磷脂質のそれと非常に類似していた。磷脂質とトリアシルグリセロールの合成がジアシルグリセロールあるいはホスファチジン酸を經由して密接に関連していることを裏付けている。

条件B (0M→2M NaCl)で培養した細胞のステロールエステルに含まれる脂肪酸残基量と遊離脂肪酸量の変化を測定した(図20-A)。ステロールエステルに含まれる脂肪酸はラグ期の細胞では主に18:2であったが、対数期では18:1と18:2がほぼ同量存在していた。ラグ期では2M食塩培地に移される前、即ち、0M培地で培養された細胞(0時間)の含量と変わらなかった。また、2M食塩培地で培養した細胞では、ステロールエステルは他の脂質に比べて18:2を高割合含んでいた。

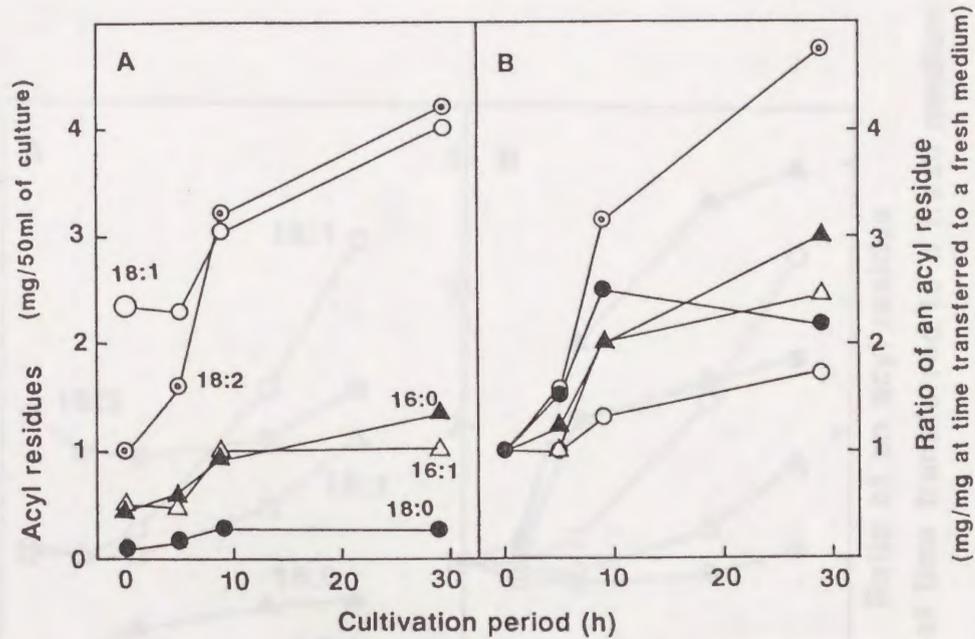


Fig. 18. Effect of NaCl on the Synthesis of Acyl Residues in Total Lipids of *Zygosaccharomyces rouxii* Cells Grown Under Condition D.

Condition D, 2M NaCl → 0M NaCl.

18:2, linoleic acid                      18:1, oleic acid  
 18:0, stearic acid                      16:1, palmitoleic acid  
 16:0, palmitic acid

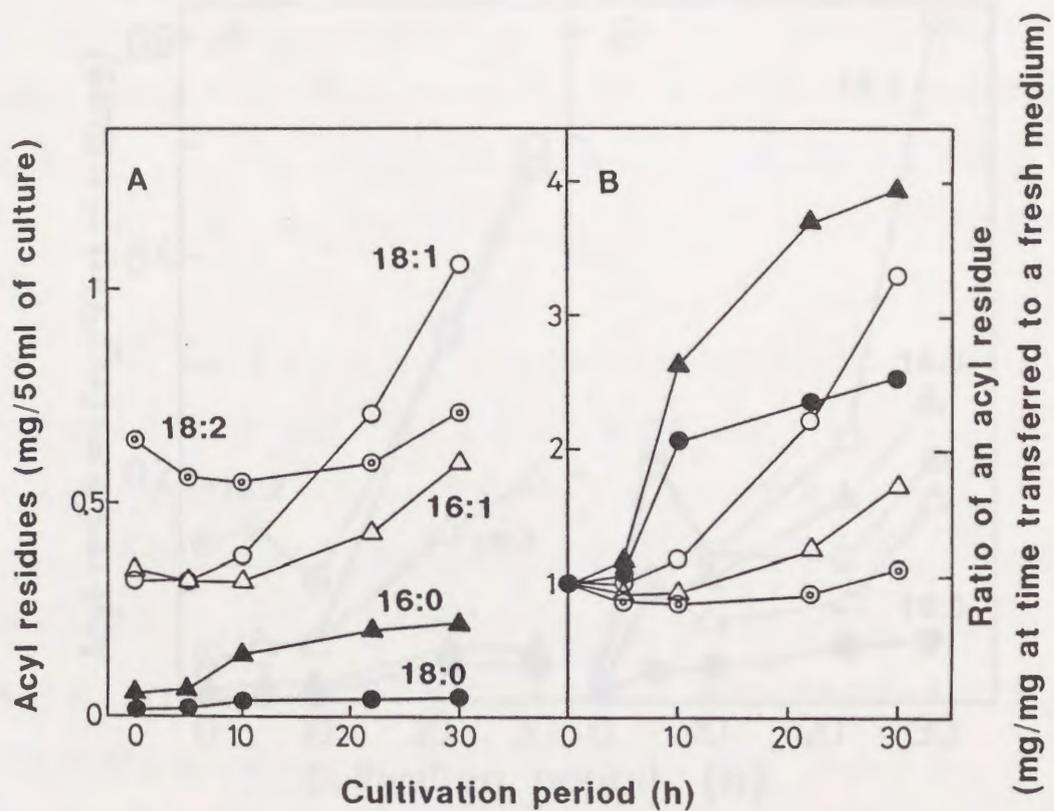


Fig. 19. Effect of NaCl on the Synthesis of Acyl Residues in Triacylglycerol of *Zygosaccharomyces rouxii* Cells Grown Under Condition B.

Condition B, 0M NaCl  $\rightarrow$  2M NaCl.

18:2, linoleic acid

18:1, oleic acid

18:0, stearic acid

16:1, palmitoleic acid

16:0, palmitic acid

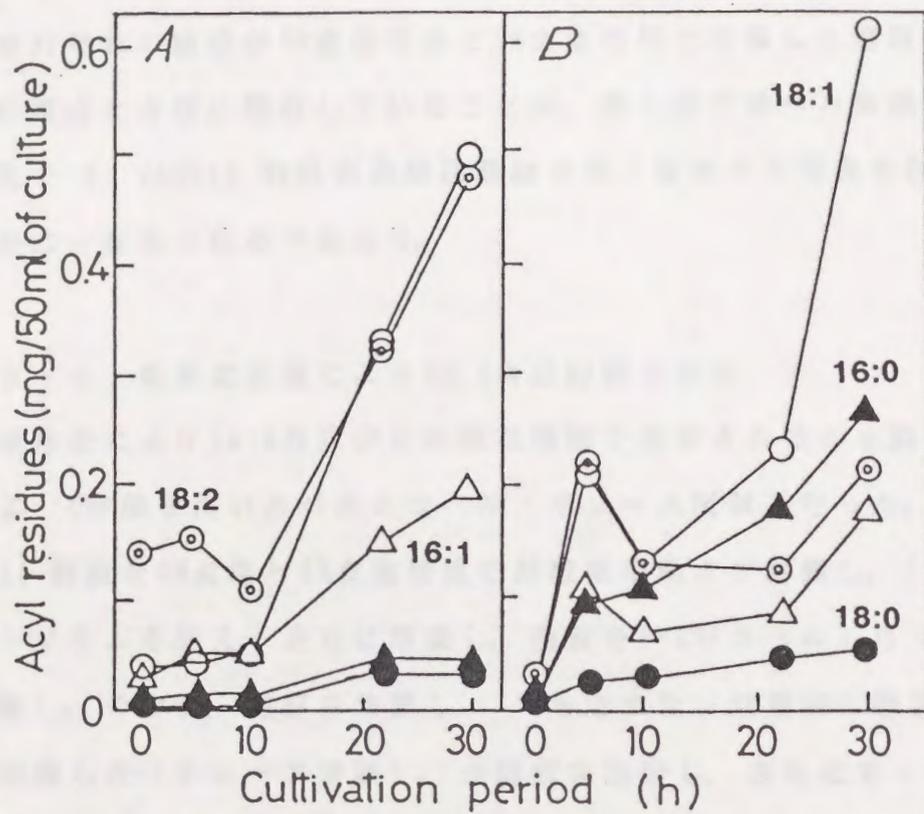


Fig. 20. Effect of NaCl on the Synthesis of Acyl Residues in Sterol-esters (A) and Free Fatty Acids (B) of *Zygosaccharomyces rouxii* Cells Grown Under Condition B.

18:2, linoleic acid  
 18:0, stearic acid  
 16:0, palmitic acid

18:1, oleic acid  
 16:1, palmitoleic acid

遊離脂肪酸はラグ期と生育の停止した定常期に増加した（図20-B）。その含量はラグ期ではおもに18:1と18:2であったが定常期では18:1であった。ラグ期と定常期に遊離脂肪酸含量が増加すること及びそれぞれの組成が0M食塩培地と2M食塩培地で培養した細胞の脂肪酸の組成と非常に類似していることは、第1章で述べた高濃度食塩培地で *Z. rouxii* 細胞が遊離脂肪酸を多く蓄積する現象を説明するための一証拠になるであろう。

#### 2・3・4 高濃度食塩による18:2合成抑制の検討

食塩存在により18:2合成がどのような機構で抑制されるかを調べるために<sup>14</sup>C酢酸を用いたパルスラベル・チェース実験を行った。*Z. rouxii* 細胞を0M食塩と2M食塩培地で対数期中期まで培養し、<sup>14</sup>C酢酸ナトリウムを加え、さらに培養し、脂質を<sup>14</sup>Cでラベルした（ラベル実験）。その後、細胞を集菌し、<sup>14</sup>Cを含まない培養液に懸濁し、再び培養した（チェース実験）。全脂質を抽出し、さらに2・2・5に従って不飽和度を検討した。硝酸銀シリカゲル薄層クロマトグラフィ法で脂肪酸の二重結合数の違いにより二重結合0個（飽和脂肪酸、16:0、18:0）、1個（モノ不飽和脂肪酸、16:1、18:1）、2個（ジ不飽和脂肪酸、18:2）に分け、また、アシル脂質（磷脂質、トリアシルグリセロール、ステロールエステル）とアシル-CoAの二種について検討した。無食塩培地ではチェース後、アシル脂質とアシル-CoA区分のジ不飽和脂肪酸の放射活性の割合(%)がそれぞれ6倍と2倍に増加した（表IV）。一方、2M食塩培地ではそれらはチェース後ほとんど変化しなかった。

Table IV. Distribution of  $^{14}\text{C}$  in Saturated and Mono- and Diunsaturated Acyl Residues in *Zygosaccharomyces rouxii* Cells Pulse-labeled and Chased with  $[1-^{14}\text{C}]$  Sodium Acetate.

NaCl (M)	Chase time (hr)	% of radioactivity in					
		Acyl-lipids			Acyl-CoA		
		Satu.	Mono.	Di.	Satu.	Mono.	Di
0	0	37.0	50.9	3.0	5.3	2.5	1.4
	3	21.2	43.3	17.1	7.9	7.6	2.9
2	0	20.8	66.6	1.0	5.4	6.0	0.2
	3	24.3	58.4	1.6	6.6	8.8	0.3

Satu., saturated acyl residues (16:0 and 18:0)

Mono., monounsaturated acyl residues (16:1 and 18:1)

Di., diunsaturated acyl residue (18:2)

## 2・4 考察

第1章の磷脂質に含まれる脂肪酸組成の変化に関する実験から、18:1→18:2の不飽和化反応が培地食塩濃度に影響されていると推測した。そこで、本章ではこのことをより詳細に検討するために、*Z. rouxii* 細胞の食塩に対する適応現象を最も反映していると考えられる条件（条件B：0M食塩培地で培養した細胞を2M食塩培地に移植培養、0M→2M NaCl）を基本として、他の三条件と比較することにより、各脂質成分（磷脂質・トリアシルグリセロール・ステロールエステル・遊離脂肪酸）に含まれる各脂肪酸残基の合成量の変化を測定し、また<sup>14</sup>Cでラベルした脂肪酸のチェース実験から18:2合成を検討した。

まず、細胞の主要脂質である磷脂質について検討した。条件B（0M→2M NaCl）では、ラグ期の後、18:1を含む磷脂質が活発に合成されていた。条件A（0M→0M NaCl）では、対数期で18:1と18:2を含む磷脂質が同程度合成されていた。条件C（2M→2M NaCl）では、18:2を含む磷脂質の合成はほとんど見られず、主に18:1を含む磷脂質が合成されていた。これらの脂肪酸の合成は第1章で述べた全脂質の脂肪酸組成の食塩に依存した変化に関する結果を支持していた。また、これらの結果は培地食塩濃度により影響を受ける磷脂質の不飽和脂肪酸合成経路の部位が18:0→18:1ではなく、18:1→18:2の不飽和化反応であることを示唆している。さらに、この示唆はパルスラベル・チェース実験において追認できた。即ち、0M食塩培地で培養した *Z. rouxii* 細胞では、アシル脂質及びアシルCoA区分のジ不飽和脂肪酸（18:2）の放射活性の割合がチェース後それぞれ6倍と2倍に増加したが、2M食塩培地で培養した *Z. rouxii* 細胞ではチェース後両区分のジ不飽和脂肪酸の放射活性の割合は変化しなかった。この結果

はジ不飽和脂肪酸(18:2)の合成が0M食塩培地で培養した細胞において活発であり、2M食塩培地で培養した細胞では抑制されていることを示している。また、2M食塩培地で培養した細胞を0M食塩培地に移植培養した場合(条件D)、全脂質についての分析結果ではあるが、18:2の合成が再び活発となった。このことは食塩による18:1→18:2反応の抑制が培地食塩濃度の低下により解除されることを示しており、この部位での不飽和化反応に対する食塩の影響が可逆的であることを示唆している。

18:0から18:1へ、18:1から18:2への不飽和化反応に関係する酵素系は酵母 *Candida lipolytica* (65,66)、*Torulopsis utilis* (67) 及び *Neurospora crassa* (68)で既に報告されている。18:2を含む磷脂質の合成は、図21に示した反応系により進むことが推測されている(65)。FerranteとKatesは、放射性物質を用いた研究から18:2合成主要経路が18:0-CoA→18:1-CoA→18:1-磷脂質→18:2-磷脂質であることを示し、二つの不飽和化酵素、即ち $\Delta^9$ -デシヤチュラーゼと $\Delta^{12}$ -デシヤチュラーゼにより触媒されることを示した(65)。本章の実験で培地中に高濃度食塩を含む場合、18:0から18:1の変化は影響を受けないが、18:1から18:2の変化が抑制されること、18:2合成に対する食塩の効果が可逆的であったことを示した。それ故に、*Z. rouxii* 細胞において食塩は18:0( $\Delta^9$ )デシヤチュラーゼ活性に影響を及ぼさないが、18:1( $\Delta^{12}$ )デシヤチュラーゼ活性を制御するのであろうと考えられる。*Z. rouxii* 細胞が高濃度食塩環境で生育するために重要である磷脂質の不飽和度の変化は主に18:1( $\Delta^{12}$ )デシヤチュラーゼの活性によりコントロールされることが明らかになった。

また、ステロールエステルに含まれる脂肪酸残基の合成量に関連

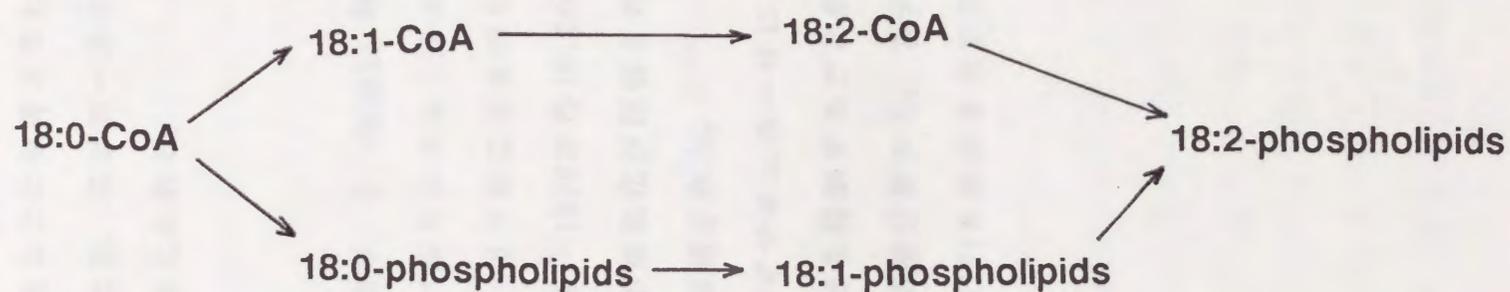


Fig. 21. Pathway of Desaturation of Acyl Residues in *Candida lipolytica* Cells.

This figure was cited from *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 61, 171-177 (1983)  
 reported by G. Ferrante, Y. Ohno and M. Kates.

18:0, stearic acid                      18:1, oleic acid                      18:2, linoleic acid  
 CoA, coenzyme A                      18:0-CoA, stearic acid esterified to CoA  
 18:0-phospholipids, stearic acid esterified to phospholipids

して、2M食塩培地で培養した細胞のステロールエステルは他の脂質成分と比べて18:2を比較的高い割合含んでいた。ここで、ステロールエステルが貯蔵脂質であり(58)、また、18:2まで不飽和化するためには多くのエネルギーが必要であることを考えると、*Z. rouxii*細胞を高濃度食塩培地で培養したとき、ステロールエステルが18:2を一時的に貯蔵するのであろうと考えられる。

## 2・5 小括

本章では、培地に高濃度食塩存在下、*Z. rouxii*細胞の各脂質の脂肪酸合成量の変化及び脂肪酸のパルスラベル・チェース実験によって脂肪酸の不飽和化を検討して、以下のことを明らかにした。

(1) 培地に食塩が存在するとき、18:0から18:1への不飽和化は変化しないが、18:1から18:2への不飽和化が阻害された。しかし、培地から食塩を除くとその阻害は解消された。

(2) 培地中の食塩は18:0( $\Delta^9$ )デサチュラーゼには影響を及ぼさないが、18:1( $\Delta^{12}$ )デサチュラーゼを抑制することが示唆できた。

(3) ステロールエステルの脂肪酸分析から、ステロールエステルは一時的に多不飽和の脂肪酸(18:2)を貯蔵するであろうことが示唆できた。

### 第3章

#### 耐塩性酵母 *Candida versatilis* の脂質組成に及ぼす食塩の影響

##### 3・1 緒言

醤油酵母には、主に主発酵型酵母 *Z. rouxii* と醤油の芳香成分を生成する熟成型酵母 *Candida versatilis* (旧名 *Torulopsis versatilis*) がある。これらの酵母は耐塩性であり、生育条件に関して以前から活発に研究されてきた(27,41,70-73)。*C. versatilis* は *Z. rouxii* に比べて発酵能が劣り、好気性であるために嫌気条件では生育が緩慢である(72)。そのため、*C. versatilis* 酵母は醤油製造過程の後期に関与し、また4-エチルグアヤコール、4-エチルフェノールなどの揮発性フェノールの生成能を持つため醤油に独特の香気を与えられている(23-25)。

本論文の第1章では耐塩性酵母 *Z. rouxii* 細胞の脂質組成に及ぼす食塩の影響を検討した。本章では、食塩に依存した耐塩性酵母の細胞脂質の普遍的变化を明らかにするために、一般に広く利用されている耐塩性酵母 *C. versatilis* を材料としその酵母の脂質組成に及ぼす食塩の影響を検討した。本章の大部分は既に学会誌に発表している(69)。

細胞膜は細胞内環境と外部環境を区別しており、培地の食塩濃度に適応して変化する現象は特に細胞膜区分の脂質に現れると考えられた。遠心分画法により得られる遠心沈澱は一般にミクロゾームと呼ばれ、細胞膜断片や小胞体断片を含むと言われている。従って、細胞膜に特異的なマーカー酵素(マグネシウム依存性ATPase(10-12))の活性の高い試料を用いれば、細胞膜脂質の組成分析において

は充分であると考え、以下、この区分を細胞膜区分と表示し、脂質分析に用いた。

### 3・2 実験方法

#### 3・2・1 使用菌株及び培地組成

耐塩性酵母 *C. versatilis* ATCC42980 株 (野生型) は農林水産省食料総合研究所から供与された。使用培地は0.3%(w/v)カザミノ酸、0.2%(w/v)酵母エキス、0.1%(w/v)磷酸一カリウム、0.05%(w/v)硫酸マグネシウム、0.01%(w/v)塩化カルシウムのカザミノ酸培地 (pH 4.5) を使用し、必要に応じて終濃度3%(w/v)か10%(w/v)になるようにグルコースを、0Mから3.5Mになるように食塩を添加した。特に述べない限り、3%(w/v)グルコースを含むカザミノ酸培地を単にカザミノ酸培地と記述する。なお、本酵母は2%(w/v)グルコース、5%(w/v)食塩、2%(w/v)寒天を含むカザミノ酸斜面培地で4°Cで保存した。

#### 3・2・2 培養方法

0.8M食塩を含むカザミノ酸培地(5ml)に一白金耳の斜面保存菌体を接種し、30°Cで80時間静置培養した。この前培養液(5ml)を各種濃度の食塩を含むカザミノ酸培地(150ml)に接種し、30°Cで90時間、振とう(95回/分)培養した。脂質の<sup>14</sup>Cによるラベルリングは前培養液を0.25mlの[1-<sup>14</sup>C]酢酸ナトリウム(0.05mCi/5mlエタノール溶液)を含むカザミノ酸培地に接種し、同様に培養することにより行った。

#### 3・2・3 生育度検定

本培養開始後、20、40、50、70、90時間で培養液を採取し、トー

マ氏血球計測盤を用いて細胞数を測定した。

### 3・2・4 脂質抽出

*C. versatilis* 細胞からの全脂質の抽出は細胞壁をチモリアーゼで消化後、1・2・6で述べたBlighとDyerの方法(48)に従った。

### 3・2・5 脂質分析

脂質分析は1・2・7で述べたようにイヤトロスキャンTH-10を用いて、脂肪酸分析は、1・2・7で述べたように脂肪酸をトランスメチレーション法によりメチルエステル化後、ガスクロマトグラフィーを用いた。二次元薄層クロマトグラフィーによる磷脂質の分離は一次展開溶媒としてクロロホルム/メタノール/28%アンモニア水(65:25:5, v/v)、二次展開溶媒としてクロロホルム/アセトン/メタノール/酢酸/水(10:4:2:2:1, v/v)を用いた以外、1・2・8で述べた方法に従った。磷脂質組成は全磷脂質に対する相対値(%)として表示した。

ステロールの分析は以下のように行った。即ち、ステロールは光により変化するので、操作は暗室中で赤色光の下で行った。抽出した脂質をクロロホルム/メタノール混合液(2:1, v/v)に溶解した。これをシリカゲルGプレートにスポットし、ベンゼン/クロロホルム/酢酸(55:20:1, v/v)の展開溶媒を用いて中性脂質を分離後、ステロール区分をかき取り、クロロホルムを用いて抽出した。このステロールに0.4mlのN,0-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド、0.05mlのトリメチルクロロシランを加えた後、60°Cで10分間加熱した。3mlの水を加えた後、3mlのクロロホルム/メタノール溶液(2:1, v/v)を加え、

トリメチルシリル化ステロールを抽出した。得られたトリメチルシリル化ステロールのガスクロマトグラフィーは下記の条件により行った。15%シリコンGE-SE30を充填したガラスカラム(3m×3mm)を用い、カラム温度260°C、窒素ガス流速60ml/分、水素ガス圧0.75kg/cm<sup>2</sup>、空気圧1.2kg/cm<sup>2</sup>にした。ステロールの同定は標準試料を同様にトリメチルシリル化後、同様の条件でガスクロマトクロマトグラフィーにより行った。

### 3・2・6 膜区分の調製

*C. versatilis* 細胞(湿菌重量約10g)を240mlの25mM亜硫酸ナトリウムと0.8M塩化カリウムを含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)に懸濁した。80mgのチモリアーゼ20Tを添加後、30°Cで1時間インキュベートし細胞壁を消化した。得られたスフェロプラストを遠心分離(1000×g、10分間)により回収し、40mlの0.6M塩化カリウムと0.5mM EDTAを含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)に再懸濁した。スフェロプラストはテフロンホモジナイザーを用いて破碎した。破碎液を遠心分離(5,200×g、10分間)し、得られた上清から遠心分離(20,000×g、20分間)によりミトコンドリア区分を除いた。次に、得られた上清を遠心分離(85,000×g、3時間)することにより沈澱を得た。得られた沈澱は8mlの50mMナトリウム-カリウムリン酸緩衝液(pH 7.4)に懸濁し、細胞膜区分として脂質分析に使用した。

### 3・2・7 酵素活性の測定

細胞膜区分の純度検定のためのマーカー酵素としてマグネシウム依存性ATPase(74)を用いた。対照として、ミトコンドリアのマーカー

—酵素、オリゴマイシン感受性ATPase(75)とシトクロームCオキシダーゼ(76)を用いた。

(a) マグネシウム依存性ATPase活性は以下のように測定した。0.9mlの基質溶液 [3.33mM ATPと0mMあるいは12mM塩化マグネシウムを含む27.8mMトリス-2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)緩衝液(pH 6.0)] に0.1mlの酵素溶液(細胞膜区分)を添加し、30°Cで10分間反応した。1%(w/v)モリブデン酸アンモニウムを含む2N硫酸を添加し、反応を停止した。生成する無機リン酸量はHodgesらの方法に従い測定した(77)。酵素活性は反応1分間に $1\mu\text{mol}$ の無機リン酸を生成する量として表示した。

(b) オリゴマイシン感受性ATPase活性は以下のように測定した。0.9mlの基質溶液 [3.33mM ATP、3.0mM塩化マグネシウムと0%あるいは0.001%(w/v)オリゴマイシンを含む27.8mMトリス-水酸化ナトリウム緩衝液(pH 9.0)] に0.1mlの酵素溶液を添加し、30°Cで10分間反応した。以降の操作及び活性表示法は(a)に準じた。

(c) シトクロームCオキシダーゼ活性は以下のように測定した。2.65mlの基質溶液 [0.23mg/ml還元型シトクロームCと0.57%(w/v)牛血清アルブミンを含む90mMリン酸カリウム緩衝液(pH 6.9)] に0.35mlの酵素溶液を添加し、25°Cで3分間反応した。反応による還元型シトクロームの酸化は還元型シトクロームCに由来する550nmの吸光度の減少により測定した。酵素活性は1分間に $1\mu\text{mol}$ の還元型シトクロームCが酸化型に変換する量とした。

### 3・2・8 タンパク質の定量

牛血清アルブミンを標準試料として、マイクロケルダール法を用い

て測定した(78)。

### 3・3 結果

#### 3・3・1 *C. versatilis* 細胞の生育に及ぼす食塩の影響

各種濃度の食塩を含む培地で培養した場合の細胞の生育度を図 22-A に示し、最終的に得られた細胞数(培養後90時間)を図 22-B に示した。0.4M から 2M 食塩を含む培地では活発な生育を示し、最終的に得られた細胞数もほぼ一定であった。また、0.2M 食塩培地では生育は幾分遅かったが、最終的には十分な細胞数が得られた。3M 食塩培地では生育は良いが、最終的に得られた細胞数が幾分低下していた。3.5M 食塩培地では生育速度及び得られる細胞数も低下していた。*C. versatilis* は 3.5M のような高濃度の食塩培地でも生育可能であったが、一方、0M 食塩培地では生育は著しく抑制された。この結果は *C. versatilis* が耐塩性であると言うよりむしろ好塩性であることを示している。また、食塩の代わりにソルビトールを加えた培地で同様の実験を行った(図 23-A)。0M、0.2M、0.6M、1.0M、2.0M のソルビトールを含む培地で培養した時、生育度は最良の生育を示す条件(1.0M ソルビトール培地)のそれぞれ 2%、23%、92%、100%、77% であった。従って、*C. versatilis* 細胞は耐(好)浸透圧性でもあった。上記の培養は 3% グルコース存在下で行ったが、10% グルコース存在下で各種食塩濃度の培地で培養したときの生育度を検討した(図 23-B)。10% グルコース存在下では 0M 食塩培地でも非常によい生育を示した。これは加えたグルコースにより培地の浸透圧が上昇したためであると考えられる。

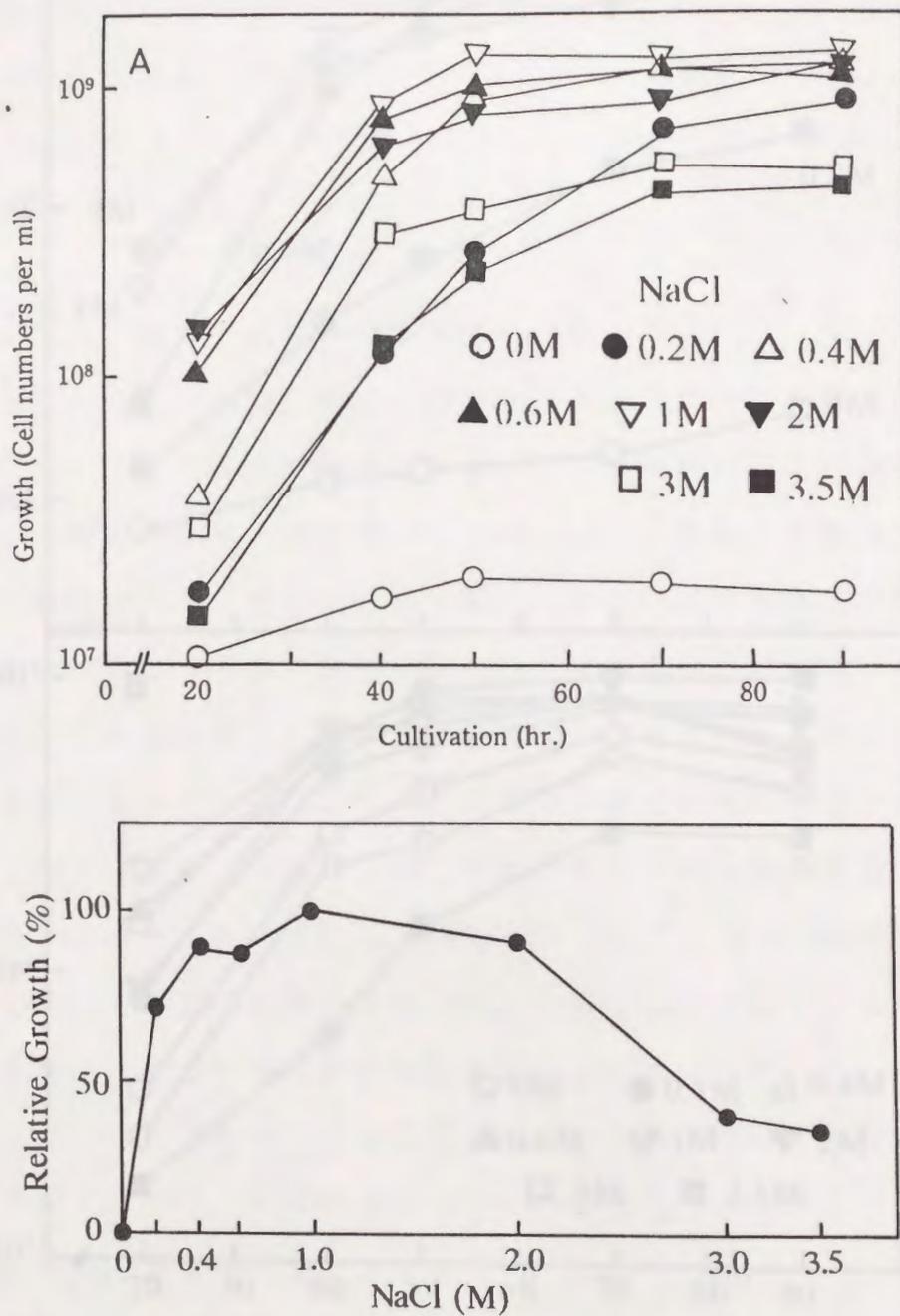


Fig. 22. Growth of *Candida versatilis* Cells in Media containing Various Concentrations of NaCl.

A, time courses of growth of *C. versatilis* cells in medium containing 0M~3.5M NaCl.

B, Relative growth is shown as the relative cell number.

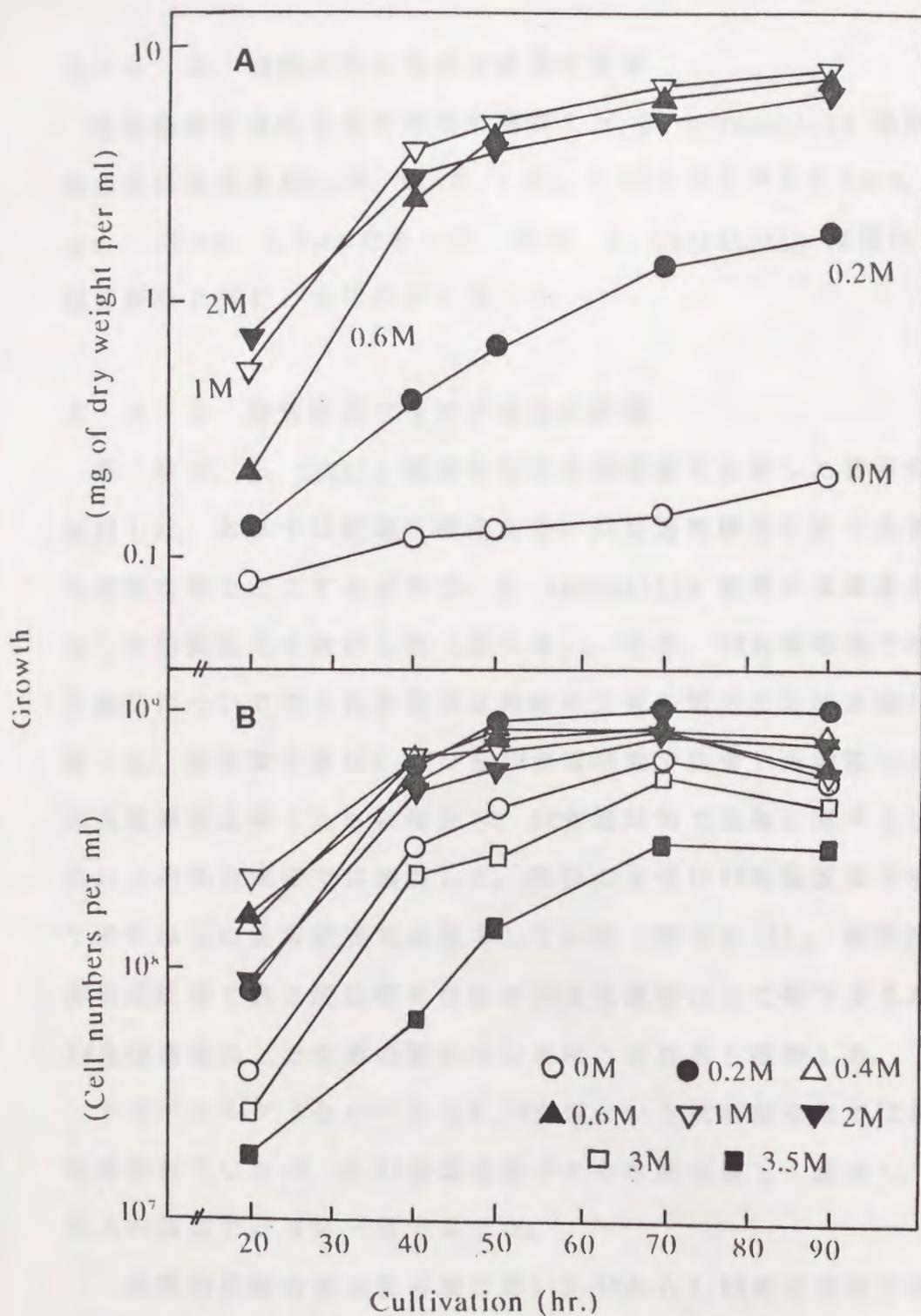


Fig. 23. Growth of *Candida versatilis* Cells in Media Containing Various Concentrations of Sorbitol (A) and Containing 10% Glucose Plus Various Concentrations of NaCl (B).

A, time courses of growth of *C. versatilis* cells in the presence of 0M~2M sorbitol.

B, time courses of growth of *C. versatilis* cells in the presence of 10%(w/v) glucose and 0M~3.5M NaCl.

### 3・3・2 細胞形態に及ぼす食塩の影響

各種濃度の食塩を含む培地で培養した *C. versatilis* 細胞の平均直径は食塩濃度0.2M、0.6M、1.0M、3.0Mでそれぞれ2.1 $\mu$ m、1.8 $\mu$ m、1.5 $\mu$ m、1.5 $\mu$ mであった。即ち、*C. versatilis* 細胞は培地食塩濃度の上昇とともに小さくなった。

### 3・3・3 脂質組成に及ぼす食塩の影響

第1章で、*Z. rouxii* 細胞の培地食塩濃度に依存した脂質変化を検討した。本章では耐塩性酵母あるいは好塩性酵母における普遍的な性質を明らかにする目的で、*C. versatilis* 細胞の食塩濃度に依存した脂質変化を検討した(図24)。なお、0M食塩培地で培養した細胞について得られた結果は細胞の生育の悪さのため本図から削除した。磷脂質含量は0.2Mから2M食塩培地で生育した細胞においては食塩濃度上昇とともに増加し、2M食塩培地で最高に達するが、それ以上の食塩濃度では減少した。細胞の生育は2M食塩濃度を境としてそれ以上の食塩濃度では低下していた(図22-A)。細胞膜の主要構成成分である磷脂質の合成が2M食塩濃度以上で低下するため、2M食塩濃度以上で生育の悪化が引き起こされると推測した。

トリアシルグリセロールは0.2M食塩という低濃度培地では多量に合成されていたが、0.4M食塩培地でその含量は著しく減少し、それ以上の濃度ではほぼ一定であった。

遊離脂肪酸含量は生育度の悪い3.0Mから3.5M食塩培地で高かった。上述したように、この食塩濃度範囲では磷脂質の合成が著しく低下していた。従って、磷脂質の合成に利用されない脂肪酸プールが増大したためであろうと考えられた。

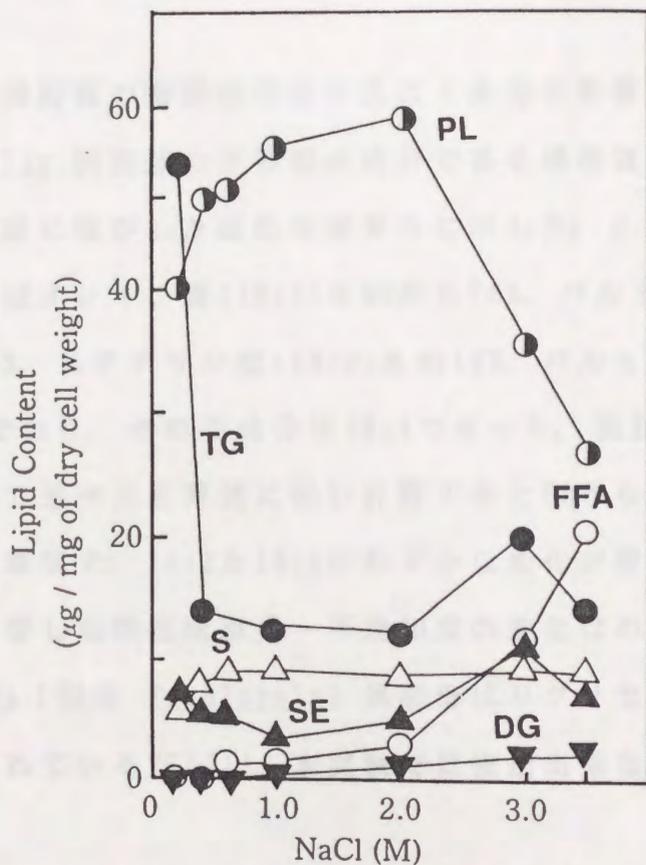


Fig. 24. Effect of NaCl on Content of Lipid Components in *Candida versatilis* Cells.

PL, phospholipids	TG, triacylglycerol
S, sterols	SE, sterol-esters
FFA, free fatty acids	DG, diacylglycerol

残りの脂質成分に関しては食塩濃度による変動は小さかったが、低い食塩濃度領域では食塩濃度上昇とともにステロール含量が増加した。ステロールに関しては次にミクロソーム画分について検討したのでここではこれ以上追及しなかった。

### 3・3・4 磷脂質の脂肪酸組成に及ぼす食塩の影響

*C. versatilis* 細胞膜の主要構成成分である磷脂質の脂肪酸組成の培地食塩濃度に依存した変化を図25に示した。*C. versatilis* 細胞の磷脂質はオレイン酸(18:1)を60から70%、パルミトオレイン酸(16:1)を約20%、ステアリン酸(18:0)を約10%、パルミチン酸(16:0)を2~3%含んでおり、その主成分は18:1であった。脂肪酸の不飽和度を1・3・3で述べた計算式に従い計算すると80から90になった。低い食塩濃度領域で、18:1と16:1にわずかな変化が認められたが、食塩濃度に依存した脂肪酸組成・不飽和度の変化はわずかであった。また、*Candida* (旧名 *Torulopsis*) 属酵母はリグノセリン酸(24:0)を含むと言われているが(41)、本実験では検出出来なかった。

### 3・3・5 磷脂質組成に及ぼす食塩の影響

$^{14}\text{C}$ 酢酸ナトリウムを含む培地で培養した *C. versatilis* 細胞から全脂質を抽出し、各磷脂質を二次元薄層クロマトグラフィーにより分離した。各区分に含まれる放射活性を測定し、全磷脂質に対する相対値(%)として表示し、図26に食塩濃度に依存した磷脂質組成の変化として示した。本実験ではホスファチジルエタノールアミンとカルジオリピンの標準物質が同じ位置に移動したので両磷脂質を合計した値を示した。0.2Mから1M食塩濃度では食塩濃度上昇とともに

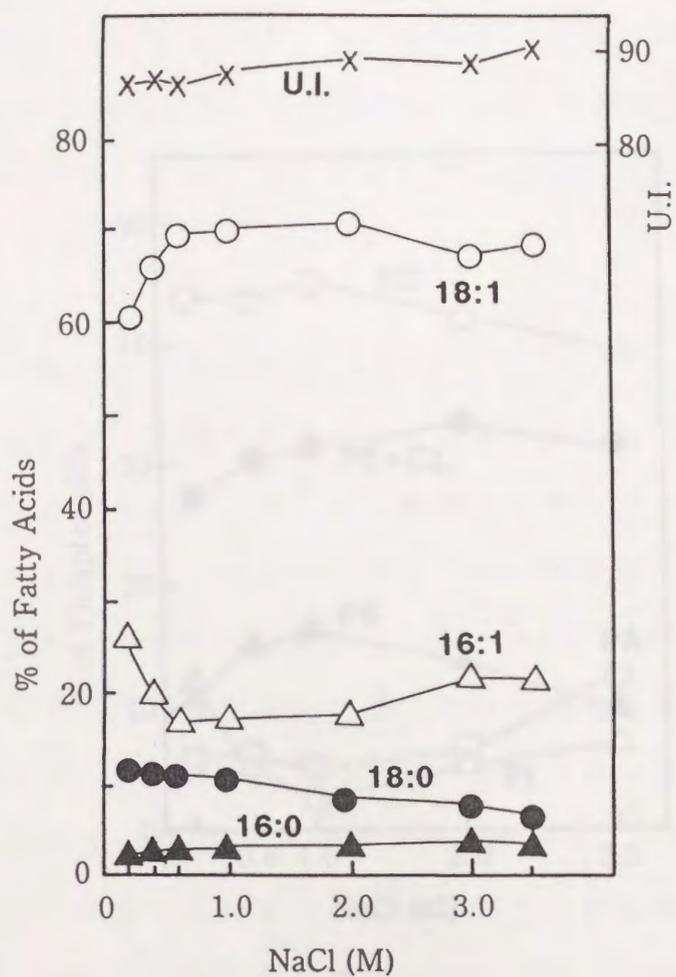


Fig. 25. Effect of NaCl on Fatty Acid Composition of Phospholipids from *Candida versatilis* Cells.

18:1, oleic acid

18:0, stearic acid

16:1, palmitoleic acid

16:0, palmitic acid

U.I., unsaturation index

The percentage of other components was omitted, since they were trace.

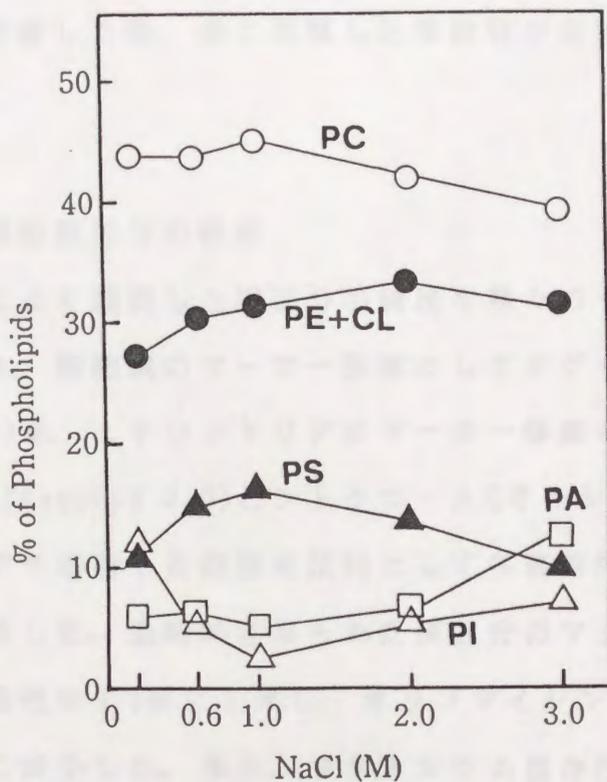


Fig. 26. Effect of NaCl on Composition of Polar-head Groups in Phospholipids from *Candida versatilis* Cells.

PC, phosphatidylcholine  
 CL, cardiolipin  
 PI, phosphatidylinositol

PE, phosphatidylethanolamine  
 PS, phosphatidylserine  
 PA, phosphatic acid

にホスファチジルセリンが1.5倍増加し、ホスファチジルイノシトールが1/5に減少した。1Mから3Mの濃度では逆にホスファチジルセリンが半分に減少し、ホスファチジルイノシトールが約3倍、ホスファチジン酸が約2倍に増加した。この結果から本酵母細胞を高濃度食塩環境(1M~3M)で培養した時、負に荷電した磷脂質が増加することが分かった。

### 3・3・6 細胞膜区分の純度

遠心分画法により調製した膜区分の純度を種々のマーカー酵素を用いて検討した。細胞膜のマーカー酵素としてマグネシウム依存性ATPase(pH 6.0)を、ミトコンドリアのマーカー酵素としてオリゴマイシン感受性ATPase(pH 9.0)とシトクロームCオキシダーゼを用いた。0.6M食塩存在下で培養した細胞を試料として各調製段階のそれらの活性を表Vに示した。最終的に得られた膜区分のマグネシウム依存性ATPaseの比活性は2.3倍に上昇し、オリゴマイシン感受性ATPaseの比活性は1/24に減少した。また、マグネシウム依存性ATPase/オリゴマイシン感受性ATPaseの比活性比は55倍に上昇し、最終的に得られた膜区分は細胞膜に富む区分であると判断した。

### 3・3・7 細胞膜区分の脂質組成に及ぼす食塩の影響

各種濃度の食塩を含む培地で培養した *C. versatilis* 細胞から調製した細胞膜区分に含まれる脂質の組成(%)を表VIに示した。培地食塩濃度上昇と共に磷脂質の割合がわずかに低下し、ステロールとトリアシルグリセロールの割合が増加した。それ以外の成分については3M食塩培地で培養した細胞の細胞膜には多くの遊離脂肪酸が含ま

Table V. Purification of Membrane (Microsomal) Fraction from *Candida versatilis* Cells.

Fractions	Protein (mg/ml)	Specific activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)			Ratio ATPase (pH 6.0) to ATPase (pH 9.0)
		ATPase		Cytochrome C oxidase	
		Mg <sup>2+</sup> -dependent (pH 6.0)	Oligomycin sensitive (pH 9.0)		
5,200×g supernatant	3.08	0.214	0.268	—	0.80
20,000×g supernatant	0.93	0.434	0.055	0.022	7.89
85,000×g pellet	0.40	0.494	0.011	0.040	44.9

Table VI. Effect of NaCl on Lipid Composition in Microsomal Fraction from *Candida versatilis* Cells.

NaCl (M)	% of lipids				
	PL	S	TG	FFA	SE
0.2	78.0	9.8	7.0	4.1	1.1
0.6	77.0	12.5	5.6	3.6	1.4
1.0	75.0	13.3	5.8	4.4	1.6
2.0	68.3	13.4	10.6	6.0	1.8
3.0	53.1	16.6	13.0	16.5	0.8

PL, phospholipids

S, sterols

TG, triacylglycerol

FFA, free fatty acids

SE, sterol-esters

れていた以外、顕著な変化は認められなかった。同細胞膜試料から得た脂質中の磷脂質とステロールの含量比(mol/mol)を計算した結果を図27に示した。その比は培地食塩濃度に依存して上昇した。なお、ガスクロマトグラフィー分析の結果、ステロールはほとんど(約85%)エルゴステロールとして同定された。

また、細胞膜区分の脂質に含まれる脂肪酸の組成と培地食塩濃度の関係を図28に示した。脂肪酸組成は培地食塩濃度に影響を受けず、また脂肪酸の不飽和度もほとんど変化しなかった。

#### 3・4 考察

*C. versatilis* 酵母は3.5Mのような高濃度の食塩を含む培地や高濃度ソルビトールを含む培地で生育できる耐塩性・耐浸透圧性酵母であるが、無食塩培地ではほとんど生育できなかつた。このことは無食塩培地でも活発に生育できる *Z. rouxii* 酵母と異なり、本酵母が好塩性(好浸透圧性)であることを示している。なお、無食塩培地にさらに10%グルコースを添加したり、高濃度ソルビトールを添加すると本酵母は生育可能である。この現象は本酵母が好浸透圧性であることを支持している。

細胞の大きさは培地食塩濃度に依存して小さくなった。第1章で述べたように、*Z. rouxii* 細胞でも培地食塩濃度の上昇とともに小さくなり、球形から楕円形になった。また、一般的に微生物(非耐塩性酵母 *S. cerevisiae*)では、高浸透圧下で細胞内水分含量が減少し、細胞の体積が減少すると報告されている(79)。従って、食塩濃度あるいは浸透圧の上昇に伴って細胞が小さくなる現象は微生物共通の特徴であり、耐塩性および好塩性酵母においては特に重要な

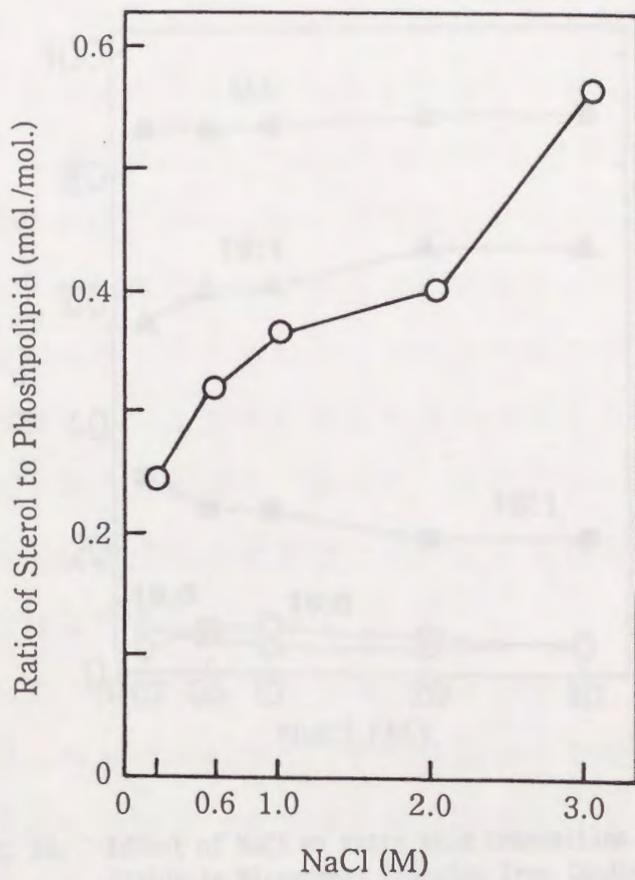


Fig. 27. Effect of NaCl on Ratio of Sterols to Phospholipids in Microsomal Fraction from *Candida versatilis* Cells.

The ratio was shown as mol/mol.

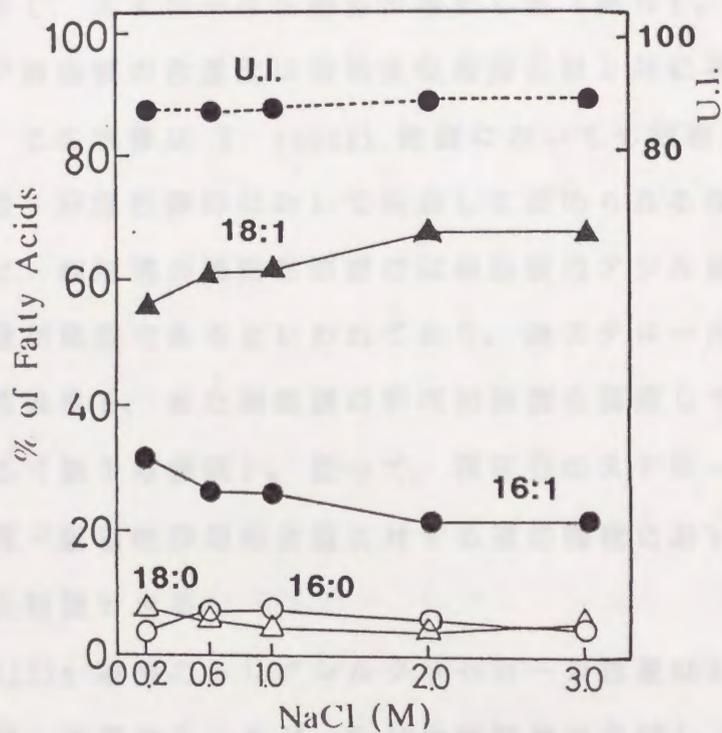


Fig. 28. Effect of NaCl on Fatty Acid Composition of Phospholipids in Microsomal Fraction from *Candida versatilis* Cells.

18:1, oleic acid

18:0, stearic acid

16:1, palmitoleic acid

16:0, palmitic acid

U.I., unsaturation index

The percentage of other components was omitted, since they were trace.

性質であると考えられる。

低濃度領域では、食塩濃度上昇と共にステロール（エルゴステロール）含量が増加した（図24）。この点を細胞膜を試料としてさらに検討した。その結果、培地食塩濃度の上昇にともなって磷脂質の割合が低下し、ステロールの割合が増加した（表VI）。さらに、ステロール／磷脂質の含量比は培地食塩濃度上昇と共に高くなった（図27）。この現象は *Z. rouxii* 細胞においても観察され（第1章）、耐塩性・好塩性酵母において共通して認められる現象であった。一般的に、細胞膜の流動性調節には磷脂質のアシル鎖組成とステロール含量が重要であるといわれており、膜ステロールは細胞膜の流動性と透過性を、また細胞膜の物理的強度を調節していると考えられている（第1章参照）。従って、膜区分のステロール含量の増加は好塩性・耐塩性酵母の食塩に対する適応機構において重要な因子であると結論できる。

*C. versatilis* 細胞のトリアシルグリセロール含量は0.2M食塩を含む培地では、多量であったが、0.4M食塩培地で急減し、それ以上の濃度の食塩を含む培地ではほぼ一定になった（図24）。緒論及び第1章で述べたように、耐塩性酵母は培地の浸透圧の上昇に呼応してグリセロールなどのポリオールを生成し、細胞内の浸透圧を上昇させる。従って、第1章で考察したように、*C. versatilis* でもグリセロールの生成によりトリアシルグリセロール、磷脂質の合成に必要なL- $\alpha$ -グリセロール-3-リン酸が不足することが予想される。また、*Z. rouxii* 細胞と同様に本酵母においても、磷脂質の合成は3.0Mや3.5Mの高濃度食塩培地で培養した場合を除いて抑制されないで、貯蔵脂質であり磷脂質の合成経路と関連しているトリアシル

グリセロールの合成が抑制されるのであろうと推察した（図14参照）。言い換えれば、低い食塩濃度で多量にトリアシルグリセロールを合成している酵母はその脂質代謝系を調節することによりグリセロールを生成し、耐塩性・好塩性を示す可能性が考えられる。

また、*C. versatilis* 細胞において、高い食塩濃度領域（1Mから3M）で培地食塩濃度上昇にともなって負に荷電した磷脂質（ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸）の含量が上昇することを認めた（図26）。*Z. rouxii* 細胞でも、負に荷電した磷脂質（カルジオリピン、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール）含量が増加することを認めた（第1章）。これらの結果は培地食塩濃度に依存した負に荷電した磷脂質の増加が耐塩性・好塩性酵母で共通して認められる変化であることを示唆している。耐塩性・好塩性細菌で負に荷電した磷脂質（ホスファチジルグリセロール、カルジオリピンなど）量が食塩濃度に依存していることが報告されているので（60-62）、負に荷電した磷脂質含量の変化は負に荷電したイオン（塩素イオン）の透過性を抑制することになるので、酵母の耐塩性・好塩性機構において重要な変化であると考えられる。

*C. versatilis* 細胞膜の主要構成成分である磷脂質の脂肪酸組成の変化は *Z. rouxii* 細胞に比べてわずかであった（図25）。細胞膜を試料とした場合でも、期待に反して脂肪酸組成の変化は小さく、ほとんど変化しなかった（図28）。これは *C. versatilis* 細胞が二重結合を二つ以上持つ脂肪酸（例えば、18:2）をほとんど合成できないことに起因しているのであろうと推察された。第1章で、*Z. rouxii* 細胞において培地食塩濃度に依存した磷脂質の脂肪酸組成の変化が認められたことから、細胞膜の磷脂質の脂肪酸組成の変

化が *Z. rouxii* 細胞の耐塩性機構において重要であろうと考察したが、*C. versatilis* 酵母では、そのような変化は確認できなかった。このことは磷脂質の脂肪酸組成の変化が耐塩性・好塩性酵母において共通して認められる現象ではないことを意味している。従って、この食塩濃度に依存した脂肪酸組成の変化は培養温度に依存して誘導される脂肪酸組成の変化などとは異なった機構を持つのかも知れない。また、*Z. rouxii* 細胞で見られた現象は18:1→18:2の不飽和化反応が培地食塩濃度上昇により抑制された結果として引き起こされる現象であると解釈している。

### 3・5 小括

第1章で、耐塩性酵母 *Z. rouxii* 細胞の培地食塩濃度に依存した脂質組成の変化を検討したが、耐塩性酵母の持つ食塩に対する脂質変化の普遍性を明らかにする目的で、本章では、別種の耐(好)塩性酵母 *C. versatilis* 細胞の脂質変化を検討した。以下に、*Z. rouxii* 細胞において観察された結果と比較して小括する。

(1) 培地食塩濃度上昇に依存して、*C. versatilis* 細胞膜中のステロール(大部分がエルゴステロール)含量が増加し、ステロール/磷脂質比は高くなった。この現象は *Z. rouxii* 細胞においても観察された。従って、細胞膜ステロールが耐塩性・好塩性酵母の食塩耐性機構において重要な因子であると結論した。

(2) 培地に食塩が高濃度存在するとき、トリアシルグリセロール含量が低下した。*C. versatilis* 細胞は高濃度食塩培地で生育したとき、多量のグリセロールを細胞内に蓄積した。グリセロールの生成とトリアシルグリセロール合成の抑制とには関連性があると考え

えられた。*Z. rouxii* 細胞においても、同様なトリアシルグリセロール合成の抑制が観察され、トリアシルグリセロールの抑制は好塩性・耐塩性酵母において共通して観察される現象であった。従って、無食塩培地で生育したとき、多量にトリアシルグリセロールを合成できる酵母はその合成系を調節することにより耐塩性（好塩性）を示すと推察した。

(3) *Z. rouxii* 細胞と同様 *C. versatilis* 細胞において、高食塩濃度領域（1Mから3M）では培地の食塩濃度上昇と共に、負に荷電した磷脂質（ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸）の含量が増加した。耐塩性・好塩性細菌の同様な報告と合わせて、この負に荷電した磷脂質の増加は耐塩性微生物に広く共通した適応現象であり、耐塩性・好塩性機構において重要な因子であると結論した。また磷脂質の増加が細胞膜表層を負荷電にし、負に荷電したイオン（例えば塩素イオン）の透過を抑制する機構が推察された。

(4) *C. versatilis* 細胞において、培地食塩濃度に依存して細胞が小さくなった。本現象は、*Z. rouxii*細胞においても観察され、さらに *S. cerevisiae* においても同様な報告があり、酵母の食塩耐性機構において重要であると推察した。

(5) *C. versatilis* 細胞の磷脂質の脂肪酸組成の変動は *Z. rouxii* 細胞の変化とは異なり非常に小さかった。従って、耐塩性酵母における培地食塩濃度に依存した磷脂質の脂肪酸組成の変化は限られた酵母種において見られる現象であると考察した。

## 第4章

### 酵母細胞の易熱性抗原タンパク質TLAa及びTLAbの性質

#### 4・1 緒言

前3章で培地食塩の影響が細胞内外を仕切っている細胞膜に表れるものと考え、耐塩性酵母の脂質組成に及ぼす食塩の影響を検討した。また、細胞膜の外側の細胞壁に及ぼす食塩の影響を検討することも重要であると考えられた。細胞壁の糖組成・アミノ酸組成の変化に及ぼす食塩の影響に関心が持たれはじめている。*S. cerevisiae* は前3章で述べた *Z. rouxii* や *C. versatilis* に比べて耐塩性の程度が劣るので、非耐塩性酵母と呼ばれている。しかしながら、菌株によっては1M程度の食塩を含む培地で生育できるものもあり、また本菌種に関する情報は他菌種を抜きんでていることもあり、このような酵母（弱耐塩性酵母と略）を用いた耐塩性機構の解明も試みられている。次章の第5章では、弱耐塩性酵母の *S. cerevisiae* について、細胞表層に存在する特定タンパク質（下記した抗原性タンパク質）の食塩に対する影響を検討し、これらタンパク質の役割を解析して、耐塩性機構の解明に役立てようとした。本章では、その予備過程として、当教室で研究されている非耐塩性酵母の同タンパク質の性質についてまず追究した。本タンパク質の抗体が既に調製されていることも研究を進展させるのに有利であると判断した。

玉井らは *S. cerevisiae* の生細胞を兔に免疫し調製した抗血清と抗原抗体反応をする物質としてこれまで五種のタンパク質を同定してきた(42)。これらのタンパク質は生細胞の100°C、10分間の加熱処理により抗原性を失うため易熱性抗原 (Thermolabile antigen,

TLA) と名付けられた(42)。一方、酵母細胞の抗原決定基として知られている細胞壁マンナン(82)は上述の加熱処理によっても抗原性を失わないため耐熱性抗原(Thermostable antigen)と呼べるであろう。五種類のTLAはそれぞれTLAa・TLAb・TLAc・TLAd・TLAeと命名され、各々に対する抗血清が調製された(42)。酵母細胞におけるTLAの役割は酵母細胞の細胞壁再構築に関する実験から、細胞壁の比較的内側に存在し、完全な細胞壁の再構築に重要な役割を果たしていると考えられたが(83)、細胞内にも多量に存在することが分かり、細胞壁区分以外での機能も示唆されている。特に、TLAa及びTLAbは酵母細胞内に多量に存在することから既知のタンパク質である可能性も推測された。

TLAaの同定を可能にする論文がIidaとYaharaによって報告された(84)。彼らは酵母の解糖系酵素エノラーゼが熱ショックタンパク質HSP48と同一であることをタンパク質化学的な比較から証明している。その論文に報告された両タンパク質のアミノ酸組成がTLAaのそれと著しく類似していることが分かった。それで、TLAaがエノラーゼ(HSP48)と同一タンパク質であるか否かを検討した結果、それらに同一性があり、またTLAbも解糖系酵素グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)と同一であることが示唆できた。本章ではこれらの次第を論述するが、本内容の大部分は既に学会誌に発表している(80,81)。

#### 4・2 実験方法

##### 4・2・1 使用菌株

TLAa及びTLAbの精製のためにオリエンタル酵母株式会社から供与

された添加物を含まない圧搾パン酵母 (*S. cerevisiae*, 野生型) を用いた。

#### 4・2・2 抗血清

抗TLAa血清及び抗TLAb血清は筆者の所属している研究室所有のものを用いた(42)。

#### 4・2・3 TLAaの精製

圧搾パン酵母(30g)を生理食塩水で三度洗浄後、1.2M塩化カリウムを含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)で洗浄した。洗浄細胞を1.2M塩化カリウムを含む同緩衝液に懸濁し、300mgのチモリアーゼ20-T(キリンビール社製)を加え、30°Cで90分間振とうした。チモリアーゼ消化液から低速遠心分離(750xg、10分間)により無細胞上清を得、高速遠心分離(15,000xg、5分間、0°C)により共雑物を除去した。

TLAaは得られた上清から以下述べる玉井らの方法に従って精製した(42)。得られた上清に終濃度60%飽和になるように結晶硫酸を添加後、生じる不溶性タンパク質を高速遠心分離により除去した。残った上清にさらに結晶硫酸を添加し、90%飽和にした。生じた不溶性タンパク質を高速遠心分離により回収し、30mlの50mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)に溶解し、同緩衝液に対して十分に透析した。透析液を同緩衝液で平衡化したDEAE-セルロースカラムに供与した。カラムは非吸着物質を除くために同緩衝液で十分に洗浄し、吸着タンパク質の溶出は0.05Mから0.4Mのトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)の濃度勾配により行った。4・2・5に記すオクタロニー免疫二重拡散法によって抗TLAa血清に対して沈降線を形成する画分を回収し、水に対して充

分に透析後、凍結乾燥した。凍結標品は2mlの水に溶解後、20mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で平衡化したセファデックスG-200カラムに供与した。ゲル濾過後、抗TLAa血清に対して沈降線を形成する画分を50mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で平衡化したDEAE-セファデックスA-50カラムに供与し、吸着タンパク質は上記のトリス-塩酸緩衝液の濃度勾配により溶出した。抗TLAa血清に対して沈降線を形成する画分について、デシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により純度を検定した。電気泳動ゲル上で単一のタンパク質バンドを与える画分を集め、水に対して十分に透析し、凍結乾燥した。その凍結乾燥標品は使用時まで4°Cで保存した。

#### 4・2・4 TLabの精製

压榨パン酵母(30g)を上記のTLAaの精製で述べたようにチモリアーゼで処理し、その処理液から無細胞上清を回収した。その上清を硫酸分画し、70%から90%硫酸飽和で沈澱するタンパク質を回収した。得られたタンパク質を試料としてTLAaの精製で述べた条件でDEAE-セルロースカラム、セファデックスG-200カラム、DEAE-セファデックスカラムによりTLabを精製した。TLabの検出は抗TLab血清を用いたオクタロニー免疫二重拡散法によって行った。最終調製品はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドを示した。

#### 4・2・5 オクタロニー免疫二重拡散試験

免疫二重拡散法はオクタロニーの方法に従い(85)、1%(w/v)寒天ゲル中で抗TLAa血清及び抗TLab血清を用いて行った。

#### 4・2・6 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)

精製したTLAa、TLAb、市販酵母エノラーゼ(オリエンタル酵母社製)、市販酵母GAPDH(シグマ社製)を常法(86)に従いSDS化後、SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル[7.5%(w/v)ゲル濃度]に供与し、室温でスラブゲル当り20mAで電気泳動した。ゲル中のタンパク質はクマシーブリリアントブルーR-250を用いて染色した。

#### 4・2・7 イムノプロットティング

以下の操作は室温で行った。上記のSDS-PAGEスラブゲル中のタンパク質を0.02%(w/v) SDSと20%(v/v)メタノールを含むトリス-グリシン緩衝液(pH 8.3)中でゲルからニトロセルロース膜(Advantec Toyo社製、0.45 $\mu$ m)に電気泳動的に転移した(87)。得られたニトロセルロース膜を0.15M食塩と2%(w/v)牛血清アルブミン(BSA)を含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)[0.15M食塩を含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)を以下TBSと述べる]中で1時間振とうすることによりブロックし、0.2%(w/v)BSAと0.2%(v/v)抗TLAa血清あるいは抗TLAb血清を含むTBS中で更に1時間振とうした。過剰の抗TLAa血清及び抗TLAb血清を除くために同膜を0.2%(w/v)BSAと0.1%(w/v)ノニデットP-40(NP-40)を含むTBS中で一時間振とうした。同膜を0.2%(w/v)BSAと0.1%(v/v)パーオキシダーゼ結合抗ウサギ免疫グロブリン血清を含むTBS中で一時間振とうし、次に過剰の血清を除くために0.1%(w/v)NP-40を含むTBS中で振とうした。膜上のTLAa及びTLAbの検出は0.4 mg/ml 3,3'-diaminobenzidineと0.01%(v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含むTBS中で行った。

#### 4・2・8 TLAAのアミノ酸組成分析

本実験で精製したTLAAをトリフルオロ酢酸-塩酸(1:1,v/v)に溶解し、スクリュウキャップ付き試験管中で166°C、55分間加水分解した。測定は自動アミノ酸分析装置(日立製作所社製、モデル835)を用いて行った。TLAAのトリプトファン量はタンパク質溶液の紫外吸収スペクトルから見積った(88)。この加水分解で一부분解されると考えられるセリン、トレオニン、チロシン量の補正は行わなかった。

#### 4・2・9 TLAA及びTLAbのN-末端アミノ酸配列の決定

精製したTLAA及びTLAbのN-末端アミノ酸配列は、Hewick等の方法(89)に従い、気相型自動シーケンサー(アプライドバイオシステム社製)を用いて決定した。TLAAはN-末端から22個のアミノ酸の配列が決定できた。TLAbはN-末端から27個のアミノ酸の配列が決定できた。

#### 4・2・10 TLAAのエノラーゼ活性測定

反応液(1ml)は67mMトリエタノールアミン緩衝液(pH 7.6)、0.5mM硫酸マグネシウム、1mM 2-ホスホグリセリン酸、酵素試料から成る。酵素反応は2-ホスホグリセリン酸の添加により開始し、30°Cで行った。エノラーゼ活性は生じたホスホエノールピルビン酸に由来する240nmの吸光度の増加率から決定した。酵素活性1単位は30°C、1分間当たり1 $\mu$ molのホスホエノールピルビン酸を生じる酵素量とした(90)。

#### 4・2・11 TLAbのGAPDH活性測定

反応液(1ml)は67mMトリエタノールアミン緩衝液(pH 7.6)、2mM硫

酸マグネシウム、0.9mM EDTA、1.1mM ATP、0.25mM NADH、18国際単位のホスホグリセリン酸キナーゼ、0.07mM 3-ホスホグリセリン酸と酵素試料から成る。酵素反応は3-ホスホグリセリン酸の添加により開始し、30°Cで行った。GAPDH活性はNADHの酸化に由来する340nmの吸光度の減少から決定し、酵素活性1単位は30°C1分間当り1 $\mu$ molのNADHをNAD<sup>+</sup>に変換する酵素量とした(90)。

#### 4・2・12 タンパク質の定量

タンパク質量の測定はBSAを標準物質としてLowryらの方法(91)に従って行った。

#### 4・3 結果

##### 4・3・1 TLAA、エノラーゼ、HSP48のアミノ酸組成の比較

本実験では、1.2M塩化カリウム存在下でチモリアーゼ処理した細胞から得た無細胞上清からTLAAを精製した。既に、玉井らにより報告された酵母細胞破碎液由来のTLAAのアミノ酸組成(42)と比較するために、本実験で精製したTLAAのアミノ酸組成を決定した。表VIIにTLAA、酵母エノラーゼ、HSP48のアミノ酸組成を示した。酵母エノラーゼのアミノ酸組成はHollandらにより決定されたエノラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列(92)から推測されるアミノ酸配列から計算した。HSP48のアミノ酸組成はIidaとYaharaのデータ(84)である。先にTLAAはシステインを含まないと報告された(42)が、本実験で精製したTLAAは酵母エノラーゼと同レベルのシステインを含んでいた。この表からTLAAアミノ酸組成は二つの酵母エノラーゼアイソザイム及びHSP48の組成とよく類似していた。

Table VII. Amino Acid Compositions of TLAA, Enolase, and HSP48.

Amino acids	mol (%)				
	TLAA	TLAA <sup>a)</sup>	Enolase 1 <sup>b)</sup>	Enolase 2 <sup>b)</sup>	HSP48 <sup>c)</sup>
Ala	13.7	11.5	12.6	13.3	13.3
Asx	11.1	10.3	11.5	11.7	11.7
Leu	10.1	9.1	9.2	8.7	9.7
Lys	9.6	7.6	8.5	8.0	8.2
Gly	9.3	9.7	8.5	8.0	8.8
Glx	8.5	8.5	7.8	8.5	8.2
Val	8.0	6.4	7.8	8.0	7.4
Ile	5.0	5.4	5.3	4.6	5.3
Ser	4.5	5.9	7.1	6.9	6.5
Phe	3.9	4.5	3.7	3.4	3.7
Pro	3.8	3.9	3.4	3.0	3.5
Arg	3.3	3.8	3.2	3.2	3.2
Thr	3.2	5.1	4.6	4.6	4.8
His	2.5	3.1	2.5	2.3	2.4
Tyr	1.8	2.7	2.3	2.3	2.1
Trp	1.0	1.0	1.1	1.1	- <sup>d)</sup>
Met	0.7	1.5	1.1	2.1	1.1
Cys	0.2	0.0	0.2	0.2	-

a) Data reported by Tamai *et al.*

b) Data calculated from amino acid sequences reproted by Holland *et al.*

c) Data reported by Iida and Yahara.

d) Not determined.

#### 4・3・2 TLAAと酵母エノラーゼの免疫学的性質の比較

TLAAと酵母エノラーゼの免疫学的類似性を明らかにするために、筆者の所属している研究室所有の抗TLAA血清を用いて免疫二重拡散試験（オクタロニー試験）とイムノプロットティング試験を行った。オクタロニー試験において、市販酵母エノラーゼと抗TLAA血清の間で沈降線が形成された（図29）。その沈降線はTLAAと抗TLAA血清の間で形成された沈降線とフューズした。さらに、TLAAと市販酵母エノラーゼをSDS-PAGEにより電気泳動した後、両タンパク質をニトロセルロース膜に転移した。その膜上のTLAA及びエノラーゼは抗TLAA血清と反応し、移動度は同じであった（図30）。これらの結果はTLAAがエノラーゼと免疫学的に同じエピトープを持つことを示している。

#### 4・3・3 TLAAのN-末端アミノ酸配列

TLAAのN-末端から22個のアミノ酸配列を決定した。図31にTLAAの配列と酵母エノラーゼ(92)及びHSP48(84)の相当する配列を示した。TLAAのN-末端から22個のアミノ酸配列はエノラーゼ及びHSP48のそれと同じであった。

#### 4・3・4 TLAAのエノラーゼ活性

アミノ酸組成、N-末端アミノ酸配列、免疫学的反応性及び考察中の表IXに示す物理化学的性質などの結果から、TLAAは酵母エノラーゼと同一であることが示唆されたので、精製したTLAAがエノラーゼ活性を持つか否かを検討した。表VIIIは精製したTLAA、酵母細胞のチ

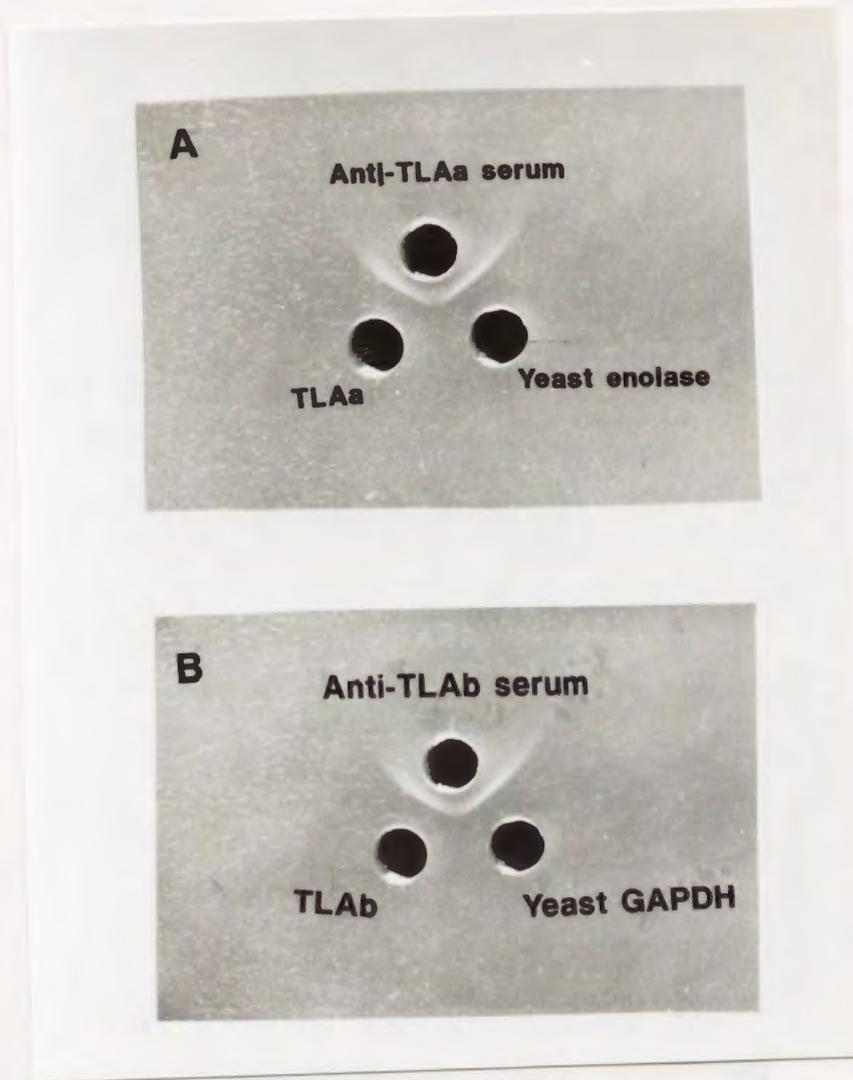


Fig. 29. Ouchterlony Immunodiffusion Tests of TLAa and Yeast Enolase with Anti-TLAa serum (A) and TLAB and Yeast Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) with Anti-TLAb serum (B).

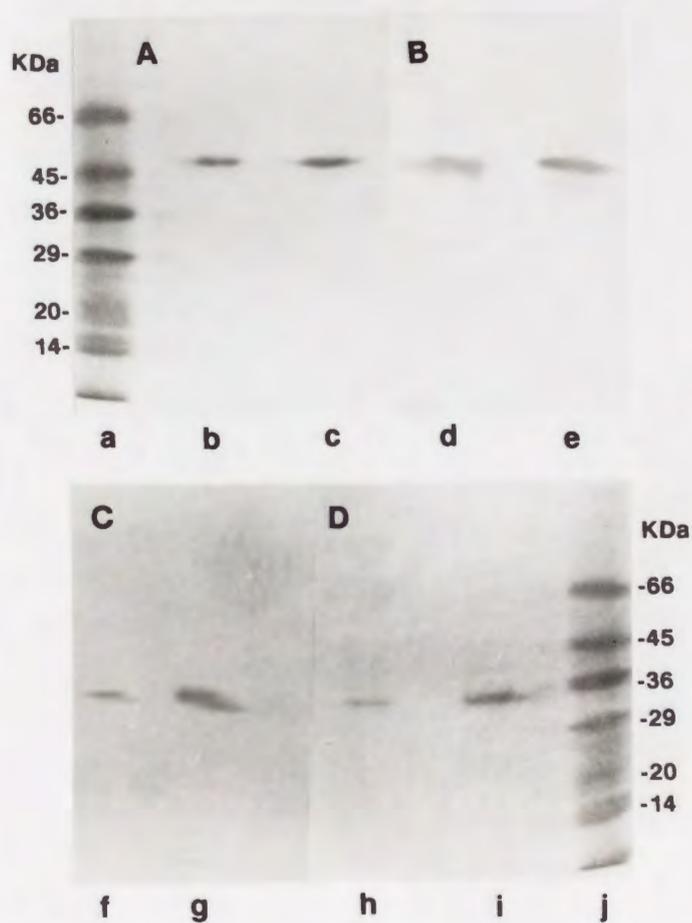


Fig. 30. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of TLAA, TLAB, Yeast Enolase and Yeast Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and Immunoblotting with Anti-TLAA and Anti-TLAB sera.

A and D, SDS-polyacrylamide gel stained with Coomassie Brilliant Blue R-250; B and D, nitrocellulose sheet immuno-stained with anti-TLAA or anti-TLAB serum.  
Lanes a and j, molecular weight marker proteins; lanes b and d, TLAA; lanes c and e, yeast enolase; lanes f and h, TLAB; lanes g and i, yeast GAPDH.

	1	10	20
TLAa	Ala-Val-Ser-Lys-Val-Tyr-Ala-Arg-Ser-Val-Tyr-Asp-Ser-Arg-Gly-Asn-Pro-Thr-Val-Glu-Val-Glu-		
Enolase	Ala-Val-Ser-Lys-Val-Tyr-Ala-Arg-Ser-Val-Tyr-Asp-Ser-Arg-Gly-Asn-Pro-Thr-Val-Glu-Val-Glu-Leu-Thr-		
HSP48	Ala-Val-Ser-Lys-Val-Tyr-Ala-Arg-Ser-Val-Tyr-Asp-Ser-Arg-Gly-Asn-Pro-Thr-Val-Glu-Val-Glu-Leu-		

Fig. 31. Comparison of Amino Acid Sequences of N-Terminus of TLAa, Yeast Enolase, and HSP48.

The sequences of yeast enolase and HSP48 were reported by Holland *et al.* and Iida and Yahara, respectively.

Table VIII. Enolase Activities of Purified TLAA, Zymolyase Digest Supernatant, Yeast Cell Suspension, and Culture Fluid.

Enzyme sources	Enolase activity (unit/mg proteins)
Culture fluid	N.D.*)
Yeast cell suspension	N.D.
Zymolyase digest supernatant	1.0
Purified TLAA	37

\*) Not detectable.

モリアーゼ消化後の上清、酵母細胞懸濁液、酵母細胞の培養液のエノラーゼ活性を示している。精製したTLAaはエノラーゼ活性を有しており、比活性は33単位/mgタンパク質であった。その活性は市販の酵母エノラーゼの比活性の約半分であった。酵母細胞のチモリアーゼ消化後の上清にエノラーゼ活性が認められたが、それ以外の試料ではエノラーゼ活性は検出されなかった。

#### 4・3・5 TLabと酵母GAPDHの免疫学的性質と分子量の比較

上述のように、*S. cerevisiae* のTLAaが解糖系酵素エノラーゼと同一タンパク質であることが明らかとなった。そこで、他のTLAが解糖系酵素であるか否かを検討した。筆者の所属している研究室所有の抗TLAb血清を用いてまずオクタロニー免疫二重拡散試験を行った。市販酵母GAPDHは抗TLAb血清と反応し、沈降線を形成した(図29)。次に、市販酵母GAPDHとTLAbをSDS-PAGEにより分離した。両試料はともに分子量36,000の単一タンパク質バンドを示し、イムノブロット法で両バンドは抗TLAb血清と反応した(図30)。

#### 4・3・6 TLabのN-末端アミノ酸配列

酵母GAPDHの三つの構造遺伝子(TDH1、TDH2、TDH3)は既にHollandらのグループによりクローニングされ、それらの塩基配列が決定されている(93-96)。図32に、三つのGAPDH遺伝子の塩基配列から推定されたN-末端アミノ酸配列と本研究で決定したTLAbのN-末端から27個のアミノ酸配列を示した。TLAbのN-末端アミノ酸配列は三つのGAPDHアイソマーの一つ、TDH3のそれと全く同じであった。

	1	10	20
TLAb	Val-Arg-Val-Ala-Ile-Asn-Gly-Phe-Gly-Arg-Ile-Gly-Arg-Leu-Val-Met-Arg-Ile-Ala-Leu-Ser-Arg-Pro-Asn-Val-Glu-Val-		
TDH1	Ile-Arg-Ile-Ala-Ile-Asn-Gly-Phe-Gly-Arg-Ile-Gly-Arg-Leu-Val-Leu-Arg-Leu-Ala-Leu-Gln-Arg-Lys-Asp-Ile-Glu-Val-Val-		
TDH2	Val-Arg-Val-Ala-Ile-Asn-Gly-Phe-Gly-Arg-Ile-Gly-Arg-Leu-Val-Met-Arg-Ile-Ala-Leu-Gln-Arg-Lys-Asn-Val-Glu-Val-Val-		
TDH3	Val-Arg-Val-Ala-Ile-Asn-Gly-Phe-Gly-Arg-Ile-Gly-Arg-Leu-Val-Met-Arg-Ile-Ala-Leu-Ser-Arg-Pro-Asn-Val-Glu-Val-Val-		

Fig. 32. Comparison of Amino Acid Sequences of N-Terminus of TLAB and Yeast Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH, TDH).

The sequences of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were reported by Holland *et al.*

#### 4・3・7 TLabのGAPDH活性

本実験で精製したTLabタンパク質はGAPDH活性(2.0単位/mgタンパク質)を示した。この活性は市販酵母GAPDHの約1/12であった。これまでの結果はTLabがGAPDHと同一タンパク質であることを示している。

#### 4・4 考察

TLAa及びTLabは当初酵母細胞の抗原性タンパク質の一つとして単離され、酵母細胞の細胞壁区分に局在すると考えられた(83,97,98)。しかし、その後TLAa及びTLabは細胞内にも多量に存在することが分かり、これらのタンパク質が本来どのような機能を持つのか興味を持たれた。一方、HSP48と解糖系酵素エノラーゼが同一タンパク質であることが明らかになったことから(84)、両タンパク質とTLAaの同一性が推測できた。これら三種のタンパク質の性質を比較したところ、これら三種のアミノ酸組成(表Ⅶ)と沈降係数、ストークス半径、分子量(表ⅨにはTLAa、酵母エノラーゼ、HSP48の沈降係数( $S_{0,20,w}$ )、ストークス半径(A)、SDS-PAGEより決定した分子量を示している: TLAaの結果は玉井らのデータ(42)を示し、HSP48の結果及びエノラーゼの沈降係数とストークス半径はIidaとYaharaのデータ(84)であり、エノラーゼの分子量はHollandらにより示されたアミノ酸配列(92)から計算した数値である)は類似していた。また、本実験ではTLAaのN-末端から22個のアミノ酸配列を決定できたので、エノラーゼ及びHSP48の相当する配列を比較したところ、全く同じであった(図31)。さらに、オクタロニー免疫二重拡散法(図29)及びイムノブロット試験(図30)により、TLAa及び市販酵母エノラーゼが分子中に共通の抗原決定基を持つこと、また本実験で精製

Table IX. Sedimentation Coefficients, Stokes Radiuses, and Molecular Weights of TLAA, Enolase, and HSP48.

	TLAA	Enolase	HSP48
Sedimentation coefficient ( $S_{20,w}^{\circ}$ )	6.3 S <sup>a)</sup>	6.0 S <sup>b)</sup>	5.3 S <sup>b)</sup>
Stokes radius (Å)	34 <sup>a)</sup>	36.2 <sup>b)</sup>	36.5 <sup>b)</sup>
Molecular weight from SDS-PAGE	47,600 <sup>c)</sup>	46,600 <sup>d)</sup>	48,000 <sup>b)</sup>
	48,800 <sup>c)</sup>	46,800 <sup>d)</sup>	

a) Data reported by Tamai *et al.*

b) Data reported by Iida and Yahara.

c) Data reported by Tamai and Takakuwa.

d) Data calculated from amino acid sequences reported by Holland *et al.*

したTLAaはエノラーゼ活性を持つことを示した(表IX)。これらの結果から、TLAaはエノラーゼと同一タンパク質であると結論した。

抗TLAa血清を用いる酵素免疫学的方法は二つのタンパク質染色バンドを検出したが、これはTLAaが二つの異性型を持つという玉井らの結果(99)と一致し、酵母エノラーゼが二つのアイソザイムからなるというHollandらの結果(100)とも合致する。HollandらはエノラーゼのmRNAは酵母細胞において最も豊富なmRNAの一つであると報告(103)しているが、これはTLAaが酵母細胞で多量に発現されており乾燥重量の約1%に達し、調製したmRNAを用いたインビトロ翻訳実験で全翻訳産物の約8.5%がTLAaであるとする玉井らの報告(101,102)と良く一致する。

TLAbについては(1)分子量がともに36,000で同じであること(図30)、(2)オクタロニー免疫拡散試験(図29)及びSDS-PAGEイムノブロットリング試験(図28)において抗TLAb血清が市販酵母GAPDHと反応したこと、(3)両タンパク質のN-末端アミノ酸配列が同じであったこと、(4)TLAbがGAPDH活性を持っていたことで酵母のGAPDHと同一タンパク質であると結論した。以上、TLAaとTLAbの二つのTLAが解糖系酵素であることを示したが、これら以外のTLAも解糖系酵素である可能性が推測された。

酵母エノラーゼの二つのアイソザイムの遺伝子は、Hollandらのグループにより既に単離され、その塩基配列から全アミノ酸配列が決定されていた(92)。上で述べたように、TLAaのN-末端アミノ酸配列はエノラーゼのそれと同じであった。TLAaのN-末端のアミノ酸は開始コドンのメチオニンの次のアミノ酸であり、タンパク質の分泌に重要であると考えられるシグナル配列(104)はTLAaのN-末端部位に

は見いだされなかった。また、TLAaは糖タンパク質ではなかった。さらに、酵母GAPDHの三つのアイソザイムの遺伝子もHollandらのグループにより単離され、その塩基配列から全アミノ酸配列が決定された(93-95,103)。それらのアミノ酸配列は互いに高い相同性(90%から94%)を持つことが示された(94,95)。また、TLAb(GAPDH)も同様に、糖タンパク質ではなく、N-末端アミノ酸配列にシグナル配列が見いだされなかった。それ故、TLAa及びTLAbが細胞壁抗原タンパク質であると述べた初期の結果を再考する必要性が生じた。*S. cerevisiae* 生細胞を免疫源として調製した抗血清は細胞表層を認識していると言うよりはむしろ、*S. cerevisiae* 細胞から遊離した多量に存在する細胞質成分を認識したものと考えられる。従って、*S. cerevisiae* 細胞のTLAa及びTLAbは細胞質抗原と見なすべきであると結論した。

免疫不全患者において *Candida* 酵母の感染がその患者の疾病率や死亡率の主要原因であることはよく知られており、そこで *Candida* 感染の診断を容易にするために血清試験が用いられている(105-108)。最近、*C. albicans* の細胞質抗原の一つが解糖系酵素エノラーゼと関係していることも報告された(109)。さらに、*C. albicans* 感染患者の47キロダルトンの免疫決定抗原をコードする遺伝子がクローニングされ、塩基配列が決定された(110)。その塩基配列から推定されるアミノ酸配列はいくつかのストレスタンパク質のアミノ酸配列と類似性を示し、特に *S. cerevisiae* の熱ショックタンパク質HSP90と最も類似していることが報告された(110)。しかし、この47キロダルトンタンパク質のアミノ酸配列はエノラーゼと類似性を示さなかった。しかし、ここで論述したように、エノラーゼやGAPDHが

熱ショックタンパク質であり、一般的なストレスタンパク質であることが示唆されており、酵母の耐塩性（食塩ストレス）及び耐浸透圧性（浸透圧ストレス）との関連して、両タンパク質に対する種々のストレスの影響を検討することは酵母細胞の耐塩性機構を解明するのに有益と考えられた。これらについて次章で論述・考察する。

本研究で同定された酵素タンパク質の構造からTLAaとTLAbは一般的な分泌タンパク質であるとは考えられず、解糖系酵素が細胞壁に局在しているとも考え難かった。これらのことから、TLAaとTLAbは細胞質抗原であったと結論した。しかしながら、エノラーゼとGAPDHが熱ショックタンパク質であり、ストレスタンパク質と考えられることから、両解糖系酵素と耐塩性との関連性は興味深い。

#### 4・5 小括

本章では非耐塩性酵母 *S. cerevisiae* 細胞の細胞壁に及ぼす食塩の影響を検討するために、先ず、これまで細胞壁タンパク質と考えられていた易熱性抗原タンパク質TLAaとTLAbを同定し、性質を検討した。

TLAのタンパク質化学的性質（アミノ酸組成・N末端アミノ酸配列・沈降係数・ストークス半径・分子量）、免疫学的性質、酵素活性の存在などから、TLAのうちTLAaとTLAbがそれぞれ解糖系酵素であるエノラーゼ（熱ショックタンパク質HSP48）とグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）であると結論した。また、得られた性質、特に解糖系酵素であったことから、これらのタンパク質が細胞壁に局在しているとは考え難く、*S. cerevisiae* 抗原性タンパク質TLAは細胞質抗原であると推測した。

本章の結果は耐塩性酵母として分類されていない *S. cerevisiae* 細胞を用いて得られたものであったが、得られた結果は酵母の耐塩性（耐浸透圧性）に関連して非常に興味深い結果と現象を含んでいると判断した。

この結果は、*S. cerevisiae* の耐塩性に関する研究の進展を示している。本研究では、*S. cerevisiae* の耐塩性を評価するために、異なる塩濃度の環境下で培養された酵母細胞の生理学的特性を調査した。結果として、特定の塩濃度条件下で酵母細胞の増殖率が顕著に低下する傾向が観察された。これは、高浸透圧環境が酵母細胞の代謝活動を抑制し、細胞の生存能力を低下させることを示唆している。また、耐塩性酵母の特性を評価するための実験的アプローチが、本研究を通じて明らかにされた。

本研究は、*S. cerevisiae* の耐塩性に関する重要な知見を提供している。高浸透圧環境下での酵母細胞の生理学的特性を調査した結果、特定の塩濃度条件下で酵母細胞の増殖率が顕著に低下する傾向が観察された。これは、高浸透圧環境が酵母細胞の代謝活動を抑制し、細胞の生存能力を低下させることを示唆している。また、耐塩性酵母の特性を評価するための実験的アプローチが、本研究を通じて明らかにされた。