

## 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 :

## 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

### 5・1 緒言

第4章で述べたように、酵母細胞の易熱性抗原タンパク質TLAa及びTLAbはそれぞれ解糖系酵素エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-磷酸脱水素酵素(GAPDH)と同一タンパク質であることが明らかになった。両解糖系酵素は熱ショックにより誘導される熱ショックタンパク質(HSP)であることが報告されており(84,111)、いろいろなストレスにより誘導されるため、広義にストレスタンパク質と呼ばれている。また、TLAa(エノラーゼ、HSP48)が二つ、TLAb(GAPDH)が三つのイソタンパク質からなることが報告されている(99,100)。耐塩性機構を論じるのに、これらストレスタンパク質の追究を避けては通れないと考えられた。

本章では *S. cerevisiae* の弱耐塩性の菌株を用いて、各種ストレスによってTLAa(エノラーゼ)とTLAb(GAPDH)がどのように変化するかを検討した。当研究室では抗TLAa血清(抗エノラーゼ血清)及び抗TLAb血清(抗GAPDH血清)を所有しているので、これらの変化を検討することができた。その結果、熱ショックによる変化は確認できなかったが、食塩ショック、エタノールショック、グルコース飢餓、非発酵性炭素源を用いた培養などでTLAa、TLAbのイソタンパク質量が変化することを認めた。それらの結果は *S. cerevisiae* の弱耐塩性菌株を用いて得られたものであるが、解糖系酵素の発現が培地食塩濃度により変化することを示しており、耐塩性酵母の耐塩性

においても解糖系酵素の発現調節が重要であろうことを推測させる。  
なお、本章の大部分は既に学会誌に報告した(80,81)。

## 5・2 実験方法

### 5・2・1 使用菌株及び使用培地

*S. cerevisiae* X-2180-1B 株 (MAT $\alpha$ , SUC2, mal, mel, gal2, CUP1)  
を用いた。基本培地として、1%(w/v)酵母エキス、2%(w/v)ポリペプ  
トン、2%(w/v)グルコースから成るYEPD培地を使用した。同酵母は  
2%(w/v)寒天を含むYEPD培地から成る斜面寒天培地上で4°Cで保存し  
た。

### 5・2・2 培養方法

*S. cerevisiae* 保存細胞を5mlのYEPD培地に接種し、30°C二日間静  
置培養した。この前培養液を100mlのYEPD培地を含む坂口フラスコに  
移植し30°Cで振とう(100回/分)培養した。

非発酵性炭素源を用いた培養は1%(w/v)酵母エキス、2%(w/v)ポリ  
ペプトンから成るYEP培地に3%(v/v)エタノール、4%(w/v)グリセロー  
ル、4%(w/v)乳酸ナトリウムをそれぞれ添加した培地で行った。

熱ショック処理は酵母細胞をYEPD培地中23°Cで対数期中期まで培  
養後、培養温度を36°Cにシフトアップし、さらに培養を続け、適当  
な時間で細胞を遠心分離により回収した。

化学薬剤の効果に関する実験は以下のように行った。終濃度0.5M  
及び1.0Mになるように食塩(NaCl)を、終濃度0.5M及び1.0Mになるよ  
うにソルビトールを、終濃度0.1mM及び0.5mMになるようにアジ化ナ  
トリウム( $\text{NaN}_3$ )を、終濃度2 $\mu\text{g/ml}$ および4 $\mu\text{g/ml}$ になるようにツニ

カマイシンを、終濃度0.25mg/ml及び0.5mg/mlになるように2-デオキシグルコースを添加したYEPD培地に上記の酵母前培養液を添加し、対数期中期まで培養し細胞を回収した。

エタノールショック処理及び食塩ショック処理はYEPD培地を用い30°Cで対数期中期まで培養後、培地に終濃度10%(v/v)に成るように100%エタノールを、終濃度1.0Mになるように食塩を添加し、培養を続け、適当な時間で細胞を回収した。

グルコース飢餓処理は酵母細胞をYEPD培地中30°Cで対数期中期まで培養後、細胞を無菌的に遠心分離により回収し、グルコースを含まないYEP培地で培養を続け、適当な時間で細胞を回収した。培養中の酵母の生育度は培養液の濁度を660nmの吸光度で表した。

### 5・2・3 TLAA及びTLAbのイソタンパク質量の測定

いろいろな条件で処理した一定量の細胞（約 $2 \times 10^9$ 細胞）を遠心分離により回収し、0.5mlのTBS [0.15M食塩を含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)] に懸濁後、0.5gのガラスビーズ（直径0.45から0.50mm）を加え、適時冷却しながら10分間ボルテックスミキサーを用いて激しく振とうした。得られた破碎液を遠心分離（10,000xg、10分間）し、上清を得た。一定量のタンパク質（TLAA:30~40 $\mu$ g、TLAb:約50 $\mu$ g）を含む試料を未変性ポリアクリルアミドゲルに付加し、電気泳動し、タンパク質の全荷電の差に基づいてTLAAを二つのイソタンパク質に、TLAbを三つのイソタンパク質に分離した。この電気泳動は7.5%(w/v)ポリアクリルアミドスラブゲルを用いて、Davisの方法に従って行った（以降、ND-PAGEと記述する）(112)。電気泳動後、ゲルを1%(w/v) SDSを含む62.5mMトリス-塩酸緩衝液(pH 6.8)中

で室温で15分間振とう後、ゲル中のタンパク質を第4章で述べたようにニトロセルロース膜に電気泳動的に転写した。シート上のTLAa及びTLAbの各イソタンパク質は、それぞれ抗TLAa血清、抗TLAb血清を用いて第4章で述べたように酵素免疫学的に検出した。

#### 5・2・4 タンパク質の定量

タンパク質の測定法は第4章で述べた。

### 5・3 結果

#### 5・3・1 TLAaイソタンパク質量に及ぼす生育条件の効果

TLAa、酵母エノラーゼ、HSP48は、二つのイソタンパク質からなることが既に報告されてる(99,100)。本実験では、それらのTLAaのイソタンパク質の検出はタンパク質試料をND-PAGEにより分離し、タンパク質をSDS化後、電気泳動的にゲルからニトロセルロース膜に転写し、抗TLAa血清を用いた酵素免疫学的検出法で行った。各イソタンパク質をTLAa-1及びTLAa-2と名付けた(図33)。

(a)熱ショック細胞: 熱ショック細胞の生育度を図34-Aに示した。試験期間中酵母は良好に生育した。このとき、細胞破碎液のTLAaの両イソタンパク質量は熱ショックにより影響されなかった(図33、レーンaからd)。このことは、TLAa(エノラーゼ)は熱ショックタンパク質(HSP)ではないことを示している。

(b)定常期細胞: TLAa-1量が対数期中期の細胞よりも定常期の細胞で増加した(図33、レーンaとe)。

(c)非発酵性炭素源で培養した細胞: エタノール、グリセロール、乳酸を用いて培養した酵母細胞の生育度を図34-Bに示した。

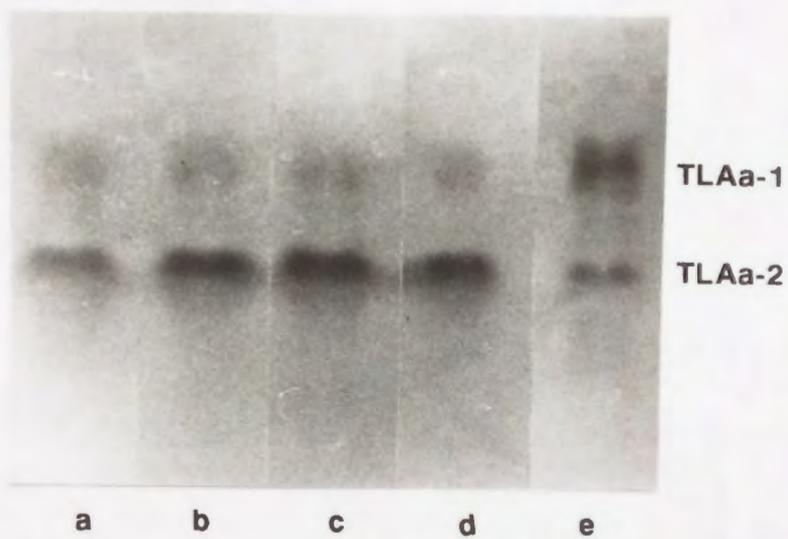


Fig. 33. Immunoblotting of Isoproteins of TLAA in Heat-shocked Cells and in Cells at Stationary Phase.

Lanes a-d, isoproteins in cells heat-shocked for 0, 0.5, 1, and 2 hr; lane e, in cells at stationary phase. 34.5~37.5 $\mu$ g of proteins were put on per lane.

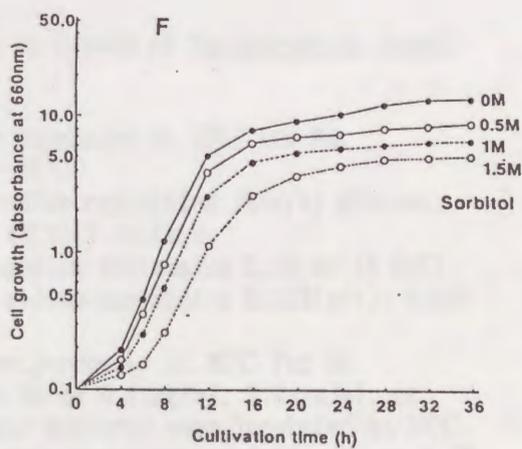
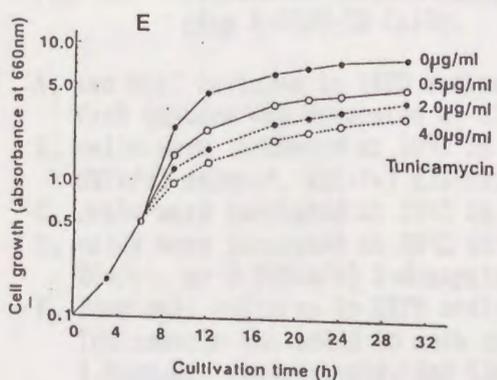
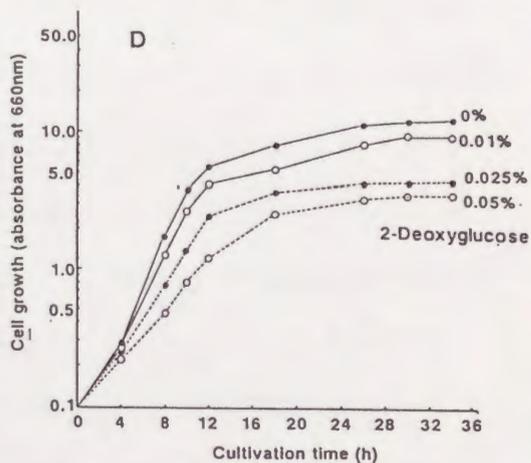
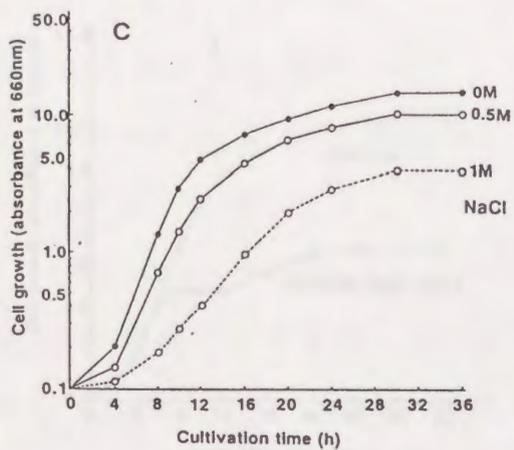
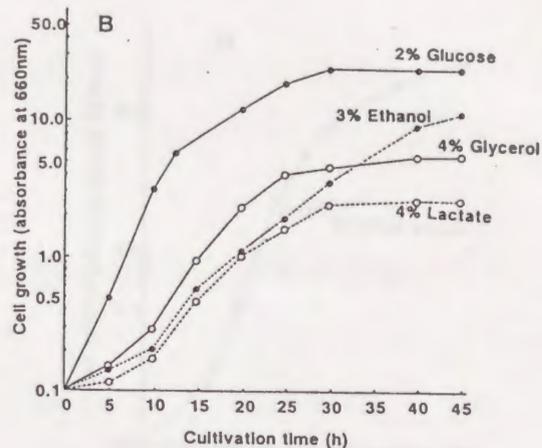
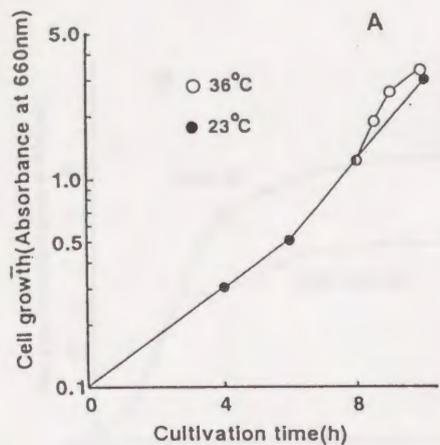


Fig. 34. (continued)

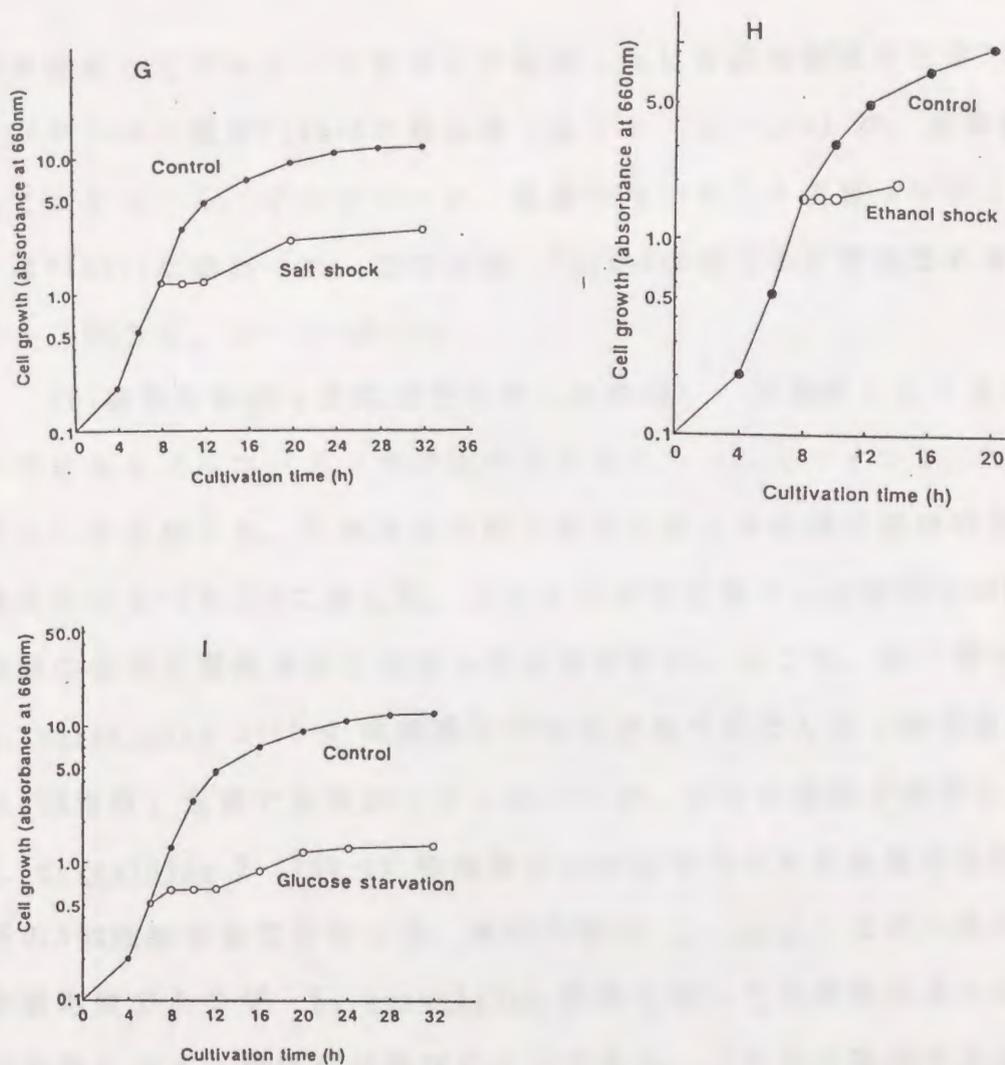


Fig. 34. Effects of Various Conditions on Growth of *Saccharomyces cerevisiae* X-2180-1B Cells.

- A, two cell cultures in YEPD medium were incubated at 23°C for 8h. Each culture was incubated at 23°C or 36°C.
- B, cells were incubated at 30°C in YEP medium containing 2%(w/v) glucose, 3%(v/v) ethanol, 4%(v/v) glycerol or 4%(v/v) lactate.
- C, cells were incubated at 30°C in YEPD medium containing 0.5M or 1M NaCl.
- D, cells were incubated at 30°C in YEPD medium containing 0.01%(w/v), 0.025%(w/v), or 0.05%(w/v) 2-deoxyglucose.
- E, four cell cultures in YEPD medium were incubated at 30°C for 6h. Tunicamycin was added to each culture to be 0.5 $\mu$ g/ml, 2.0 $\mu$ g/ml, or 4.0 $\mu$ g/ml, respectively, and then their cultures were incubated at 30°C.
- F, cells were incubated at 30°C in YEPD medium containing 0.5M, 1M, or 1.5M sorbitol.
- G, cells cultivated in YEPD medium at 30°C for 8h were harvested, and the half was incubated at 30°C in YEPD medium containing 1M NaCl.
- H, cells cultivated in YEPD medium at 30°C for 8h were harvested, and the half was incubated at 30°C in YEPD medium containing 10%(v/v) ethanol.
- I, cells cultivated in YEPD medium at 30°C for 6h were harvested, and the half was incubated at 30°C in YEPD medium without glucose.

炭素源としてグルコースを用いて培養したとき酵母細胞の主要TLAaイソタンパク質はTLAa-2であった(図35、レーンa)が、炭素源としてエタノール、グリセロール、乳酸を用いたとき主要イソタンパクはTLAa-1に変わった。このとき、TLAa-2はほとんど検出されなかった(図35、レーンbからd)。

(d)薬剤を添加した培地で培養した細胞: 添加剤として食塩、2-デオキシグルコース、アジ化ナトリウム、ツニカマイシン、ソルビトールを用いた。これらを培地に添加したときの酵母細胞の生育度を図34-CからFに示した。これらの薬剤を添加した培地での酵母細胞の生育は薬剤濃度に依存して阻害された。ここで、第一章では、*S. cerevisiae* 0-11-4 株細胞が1M食塩培地でほとんど(無食塩培地の10%程度)生育できなかつたと述べたが、本章の実験で使用した *S. cerevisiae* X-2180-1B 株細胞は1M食塩培地でも無食塩培地の場合の30%程度の生育を示した。耐塩性酵母 *Z. rouxii* に比べれば、非耐塩性であるが、*S. cerevisiae* 酵母においても菌株の違いにより食塩に対する感受性が異なるようである。これらの薬剤を添加した培地で対数期中期まで培養した酵母細胞のTLAaイソタンパク質の変化を図35に示した。培地に食塩(1M)(レーンf)と2-デオキシグルコース(0.025mg/ml)(レーンk)を添加したとき、TLAa-1量が増加した。しかしながら、アジ化ナトリウム(レーンgとh)、ツニカマイシン(レーンiとj)、ソルビトール(レーンmからo)の添加ではほとんど変化しなかつた。

(e)食塩ショック細胞: 対数期中期まで培養した酵母細胞に終濃度1Mに成るように食塩を添加した場合の酵母の生育度を図34-Gに示した。食塩ショックを受けた酵母細胞の生育は著しく阻害され

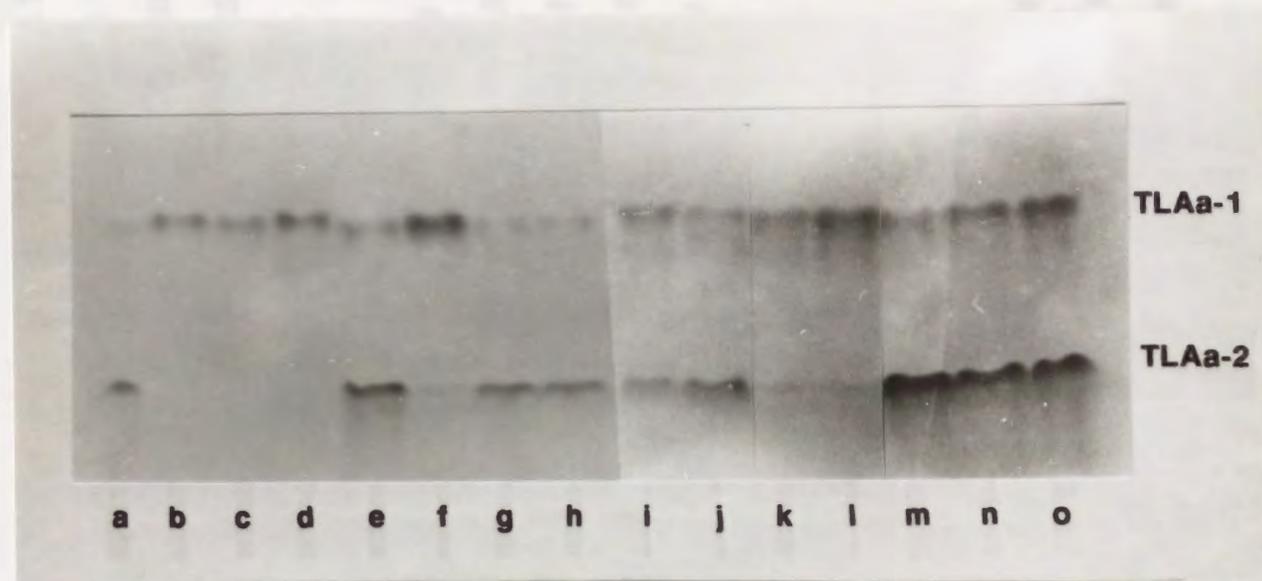


Fig. 35. Immunoblotting of Isoproteins of TLAA in Cells Grown under Various Growth Conditions.

Lane a, isoproteins in cells grown in YEPD; lane b, in 3%(v/v) ethanol; lane c, in 4%(w/v) glycerol; lane d, in 4%(w/v) lactate; lanes e and f, in 0.5 and 1.0M NaCl; lanes g and h, in 0.1 and 0.5mM  $\text{NaN}_3$ ; lanes i and j, in 2 and 4 $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin; lanes k and l, in 0.25 and 0.5mg/ml 2-deoxyglucose; lanes m-o, in 0.5, 1.0, and 1.5M sorbitol.

た。食塩ショック処理後の細胞中のTLAaイソタンパク質量の変化を図36-A(レーンeからi)示した。食塩ショック後、4時間以降でTLAa-1量が増加し、TLAa-2量が減少した。

(f)エタノールショック細胞: 対数期中期まで培養した細胞に終濃度10%に成るようにエタノールを添加した場合の酵母の生育度を図34-Hに示した。エタノールショックにより酵母の生育は抑制された。エタノールショック細胞中のTLAaイソタンパク質量の変化を図36-B(レーンaからd)に示した。エタノールショック後、5時間でTLAa-1量が増加し、TLAa-2量がわずかに減少した。

(g)グルコース飢餓細胞: 対数期中期まで培養した細胞をグルコースを含まない培地に移植し、培養した場合の酵母の生育度を図34-Iに示した。グルコース飢餓により酵母の生育は抑制された。グルコース飢餓細胞中のTLAaイソタンパク質量の変化を図36-A(レーンaからd)に示した。グルコース除去後10時間後、TLAa-1が増加し、TLAa-2が減少した。

上述のTLAaについて得られた結果を表Xにまとめた。

### 5・3・2 TLabイソタンパク質量に及ぼす生育条件の効果

TLabが三つの異性型を持つことは既に報告されているが(99)、その検出方法はかなり複雑であった。上述のTLAaと同様の方法を用い、抗TLab血清を用いてTLabの三つのイソタンパク質を酵素免疫的に検出した。各イソタンパク質をそれぞれTLab-1、TLab-2、TLab-3と名付けた(図37)。栄養増殖している酵母細胞ではTLab-3が多量に存在しており、TLab-1とTLab-2はマイナーであった。このことはTLab-3がTLab(GAPDH)の構成的タンパク質であることを示唆している。

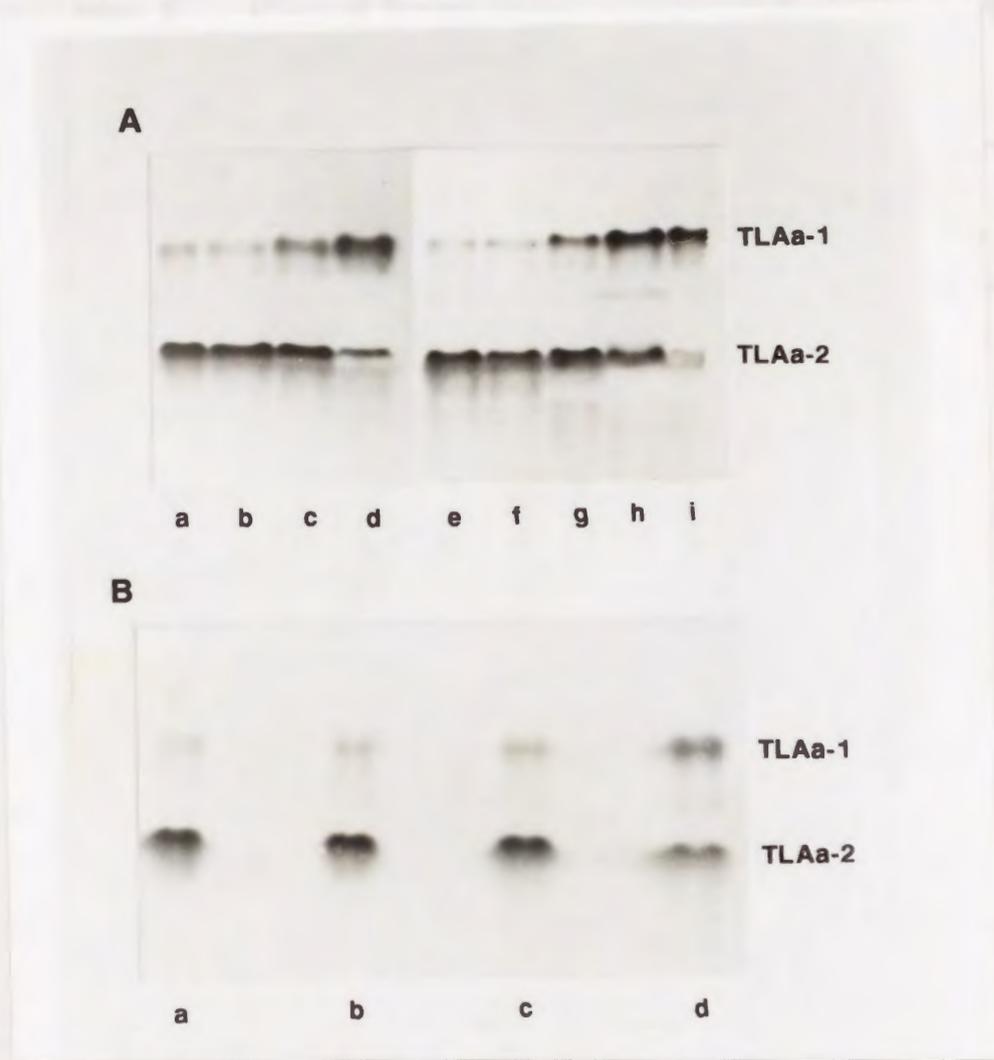


Fig. 36. Immunoblotting of Isoproteins of TLAA from Glucose-starved, NaCl-shocked, and Ethanol-shocked Cells.

A, glucose-starved and NaCl-shocked cells: lanes a-d, isoproteins in glucose-starved cells for 0, 2, 4, and 10 hr; lanes e-i, isoproteins in NaCl-shocked cells for 0, 2, 4, 12, and 24 hr; B, ethanol-shocked cells: lanes a-d, isoproteins in ethanol-shocked cells for 0, 1, 2, and 5 hr.

Table X. Effect of Various Growth Conditions on Expression of Iso-proteins of TLAA in *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

Conditions	Expression level	
	TLAA-1	TLAA-2
Additives: NaCl	↑	—
2-deoxyglucose	↑	—
NaN <sub>3</sub>	—	—
Tunicamycin	—	—
Sorbitol	—	—
Carbon sources: Ethanol	↑	↓
Glycerol	↑	↓
Lactate	↑	↓
Shocks: Heat	—	—
NaCl	↑	↓
Ethanol	↑	↘
Stationary phase	↑	—
Glucose starvation	↑	↓

By comparing with the expression in cells grown in YEPD medium, the level was indicated by the following.

↑, increase

↓, decrease

—, unchange

↘, slight decrease

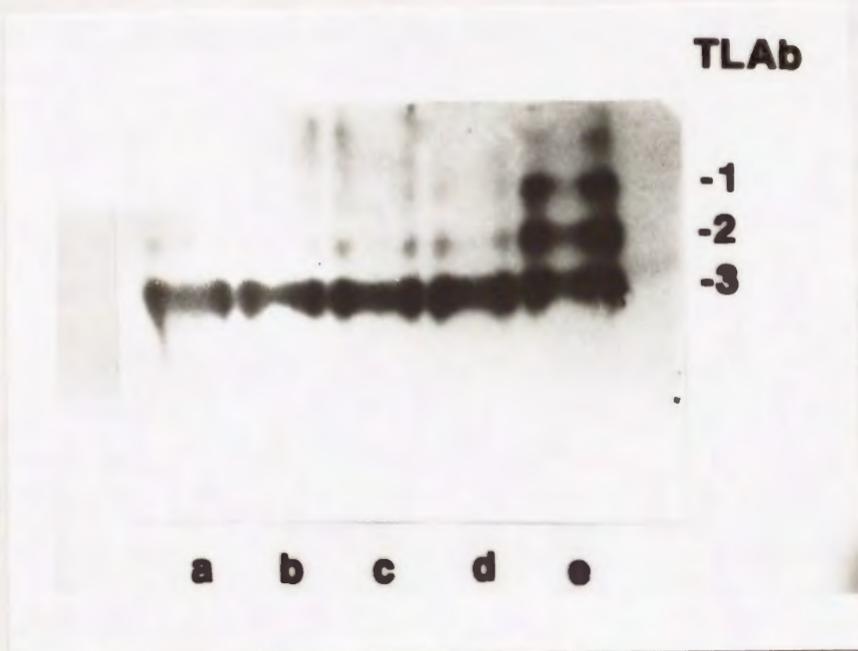


Fig. 37. Immunoblotting of Isoproteins of TLAB in Heat-shocked Cells and in Cells at Stationary Phase.

Lanes a-d, isoproteins in cells heat-shocked for 0, 0.5, 1, and 2 hr; lane e, in cells at stationary phase.

(a)熱ショック細胞: 酵母細胞のTLAbのイソタンパク質量は、対照細胞のTLAbイソタンパク質量(図37、レーンa)と比較して、ほとんど変化しなかった(図37、レーンbからd)。最近、GAPDHが熱ショックタンパク質の一つであることが提唱された(111)が、これらの結果はTLAa(GAPDH)もTLAaと同様にHSPではないことを示唆している。

(b)定常期細胞: TLab-1、TLab-2が明らかに増加した(図37、レーンe)。

(c)非発酵性炭素源で培養した細胞: 酵母細胞を炭素源としてエタノール、グリセロール、乳酸を含む培地で培養したときのTLAbイソタンパク質量の変化を図38(レーンbからd)に示した。TLab-2量が明らかに増加し、TLab-1がわずかに検出された。しかしながら、TLab-3はほとんど変化しなかった。

(d)薬剤を添加した培地で培養した細胞: 使用した薬剤はTLAaの場合と同じで、薬剤を添加した培地で対数期中期まで培養した細胞のTLAbイソタンパク質量の変化を図38に示した。0.5Mと1M食塩で(レーンeとf)、0.5mg/ml 2-デオキシグルコースで(レーンl)、0.5M、1M、1.5Mソルビトールで(レーンmからo) TLab-2及びTLab-1が検出された。

(e)食塩ショック細胞: 食塩ショック細胞中のTLAbイソタンパク質量の変化を図39(レーンjからn)に示した。処理後4時間でTLab-2が検出され、処理後12時間以降でTLab-2に加えてTLab-1も増加した。

(f)エタノールショック細胞: エタノールショック細胞中のTLAbイソタンパク質量の変化を図39(レーンfからi)に示した。



Fig. 38. Immunoblotting of Isoproteins of TLAB in Cells Grown Under Various Growth Conditions.

Lane a, isoproteins in cells grown in YEPD; lane b, in 3%(v/v) ethanol; lane c, in 4%(w/v) glycerol; lane d, in 4%(w/v) lactate; lanes e and f, in 0.5 and 1.0M NaCl; lanes g and h, in 0.1 and 0.5mM NaN<sub>3</sub>; lanes i and j, in 2 and 4μg/ml tunicamycin; lanes k and l, in 0.25 and 0.5mg/ml 2-deoxyglucose; lanes m-o, in 0.5, 1.0, 1.5M sorbitol.

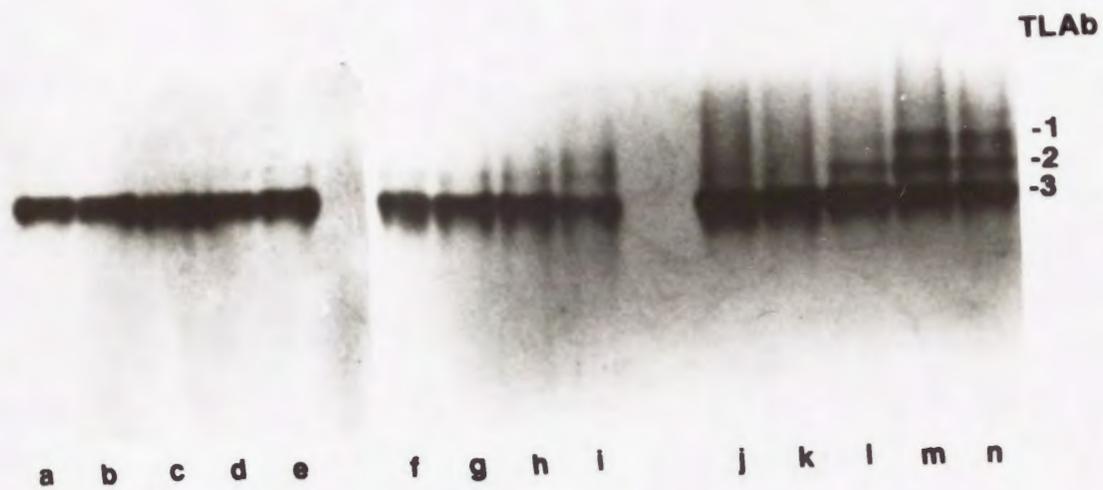


Fig. 39. Immunoblotting of Isoproteins of TLAB from Glucose-starved, Ethanol-shocked, and NaCl-shocked Cells.

Lanes a-e, isoproteins in glucose-starved cells for 0, 2, 4, 10, and 24 hr; lanes f-i, in ethanol-shocked cells for 0, 1, 2, and 5 hr; lanes j-n, in NaCl-shocked cells for 0, 2, 4, 12, and 24 hr.

処理後、5時間でわずかにTLAb-2及びTLAb-1が検出された。

(g)グルコース飢餓細胞: グルコース飢餓細胞中のTLAbイソタンパク質量の変化を図39(レーンaからe)に示した。期待に反して、TLAbの変化は小さく、飢餓後24時間でTLAb-2がわずかに検出された。

上述のTLAbについて得られた結果を表XIにまとめた。

一般に、TLAbイソタンパク質の変化はTLAaイソタンパク質の変化と比べて小さい。しかしながら、定常期及び食塩ショック細胞では明瞭なイソタンパク質の変化が確認できた。

#### 5・4 考察

TLAa(エノラーゼ)は二つ、TLAb(GAPDH)は三つのイソタンパク質からなっている(99)。従って、いろいろなショックにより引き起こされるTLAaとTLAbにおけるイソタンパク質の量的変化を検討した。本実験では、タンパク質をND-PAGEで分離後、タンパク質をSDS化し、ニトロセルロース膜に転写し、抗血清を用いて酵素免疫学的に検出する方法を用いた。一定量の試料タンパク質を用いた場合でも、発色の程度は実験毎に幾分異なり、TLAa・TLAb全量を比較することは方法論的に無理であるが、ある程度のイソタンパク質の増減を検討することは可能であった。

酵母エノラーゼが熱ショックタンパク質HSP48であること(84)、また酵母GAPDHが熱ショックタンパク質HSP35であることが報告されているので(111)、TLAa(エノラーゼ)及びTLAb(GAPDH)量が熱ショックによりどのように変化するかを追試した。本実験ではTLAa(エノラーゼ)及びTLAb(GAPDH)が熱ショックにより誘導されることは

Table XI. Effect of Various Growth Conditions on Expression of Iso-proteins of TLab in *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

Conditions	Expression level		
	TLab-1	TLab-2	TLab-3
Additives: NaCl	↗	↑	—
2-deoxyglucose	↗	↑	—
NaN <sub>3</sub>	—	—	—
Tunicamycin	—	—	—
Sorbitol	↗	↑	—
Carbon sources: Ethanol	↗	↑	—
Glycerol	↗	↑	—
Lactate	↗	↑	—
Shocks: Heat	—	—	—
NaCl	↑	↑	—
Ethanol	↗	↑	—
Stationary phase	↑	↑	—
Glucose starvation	—	↗	—

By comparing with the expression in cells grown in YEPD medium, the level was indicated by the following.

↑, increase      ↗, slight increase      —, unchange

確認できなかった。従って、筆者もエノラーゼ (TLAa) は熱ショックタンパク質のグループには属しないと結論したが、現在ではエノラーゼは熱ショックタンパク質ではないとするのが趨勢になりつつある。また、GAPDHも熱ショックタンパク質ではないと考えられるが、*Xenopus laevis* 胚のGAPDHにおいてGAPDHを高レベル発現している細胞では熱ショックの効果が小さくなるとする報告があるので(113)、酵母エノラーゼ・GAPDHが熱ショックにより誘導されるHSPではないと結論するのはまだ時期尚早かも知れない。

次に、定常期、非発酵性炭素源での培養、食塩や2-デオキシグルコース存在下での培養、エタノールショック、食塩ショック、グルコース飢餓などのいろいろな処理によりTLAa (エノラーゼ) とTLAb (GAPDH) のイソタンパク質量が変化することを認めた。これは、イソタンパク質量の変化はある条件で発現していない遺伝子が別の条件では発現されるということを示しており、両タンパク質遺伝子発現の調節機構に興味を持たれる。

検討したいろいろなストレスを与えた中で、特に培地に食塩を添加した場合や食塩ストレス (ショック) を与えた場合に得られた結果は、本論文の主題である酵母の耐塩性機構に関連していると考察された。即ち、培地に1M食塩を添加したとき、酵母細胞の生育は悪い (図34-C) が、得られた細胞のTLAa-1量が増加し、TLAa-2量が減少し (図35、レーンf、)、TLAb-2量がわずかではあるが増加した (図38、レーンf)。さらに、食塩を含まない培地で対数期中期まで培養後、培地に終濃度1Mになるように食塩を添加し食塩ストレスを与えると酵母細胞の生育はほぼ抑制されていた (図34-G)。この食塩ストレスを与えた細胞では、TLAa-1量が添加後4-12時間で

著しく増加し、TLAa-2量が減少した（図36、レーンeからi）。また、TLAbではTLAb-1及びTLAb-2が増加した（図39、レーンjからn）。他方、同モル濃度のソルビトールを培地に添加し培地の浸透圧を高めた場合、上記のTLAaおよびTLAbイソタンパク質の変化はほとんど観察されなかった（図35、レーンmからo及び図38、レーンmからo）。従って、上記の食塩ストレスにより誘導されるTLAa及びTLAbイソタンパク質の変化は浸透圧の変化というよりはむしろ食塩自体の影響であることを示している。一般に、熱ショックによるHSPの誘導は短時間（一時間程度）で起こると言われているが(114)、本実験の食塩ストレスによるエノラーゼ及びGAPDHの変化を引き起こすには比較的長時間のストレスに曝す必要があった。*S. cerevisiae* 酵母は耐塩性酵母には分類されていないが、*S. cerevisiae* の食塩ストレスによる変化は酵母の耐塩性機構を解明する上で重要な示唆を与えると推察された。そこで、次の二点についてさらに考察する。

第一は食塩ストレスと同様の変化がグルコース飢餓実験においても観察されたことである（図36-A、レーンaからd及び図39、レーンaからe）。細胞はグルコース飢餓になると乏しい炭素源をより効率よく利用し、エネルギーを獲得しなければならないと考えられる。従って、グルコース飢餓状態で観察されたTLAa（エノラーゼ）及びTLAb（GAPDH）の変化はエネルギー欠乏に適應した変化と捉えることができる。耐塩性酵母 *Z. rouxii* において高濃度食塩培地では生存維持のためにはグルコースなどの炭素源が必須であることも明らかにされている(19)。これは *Z. rouxii* 酵母が高濃度の食塩を含む環境で生存するためにより多くのエネルギーを必要としていることを意味しているのであろう。エネルギー飢餓と食塩ストレスに

においてTLAa (エノラーゼ) およびTLAb (GAPDH) イソタンパク質量の変化が類似していることは、食塩ストレス<sup>V</sup>に対して酵母が適応するとき、エネルギー生産に関連して解糖系の調節が重要であることを暗示していると考えられる。

第二は食塩ストレスにより誘導されたTLAaとTLAbイソタンパク質 (TLAa-1、TLAb-2あるいはTLAb-1) が非発酵性炭素源を用いて培養した酵母細胞で見いだされたことである (図35、レーンbからd及び図38、レーンbからd)。即ち、グルコースで培養した細胞は主にTLAa-2とTLAb-3を含むが、非発酵性炭素源で培養した細胞ではTLAa-1 (エノラーゼ1) であり、またTLAb-2が検出された。非発酵性炭素源を用いて培養した場合、解糖系は糖新生方向に傾いていると考えられるので、これらの結果はそのような条件下ではエノラーゼ及びGAPDHのアイソザイムの発現が変化することを示唆している。

*S. cerevisiae* X-2180-1B 株は5% (1Mに近い) 食塩培地で培養したとき、細胞内にグリセロールが蓄積し、細胞内外の浸透圧を調節していることも報告され (115)、また0.7M食塩培地で培養したとき、グリセロール生産酵素の一つであるsn-グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (図14参照) の活性が増大することが報告されている (116, 117)。しかし、このグリセロール-3-リン酸脱水素酵素は食塩ストレス (浸透圧ストレス) によって誘導されるが、熱ショックによっては誘導されないとしている。このグリセロール-3-リン酸脱水素酵素の誘導と食塩ストレス・熱ショックの関係がTLAaおよびTLAbのイソタンパク質の食塩ストレスと熱ショックの関係と類似していることは興味を持たれる。本実験のエノラーゼとGAPDHのアイソザイムの変化はソルビトール添加 (浸透圧上昇) によっては変化せず、食塩の添加により

変化する特異性を示したが、本実験で見いだした *S. cerevisiae* 細胞の食塩ストレスによるエノラーゼとGAPDHのアイソザイムの変化は食塩添加によって上昇した培地浸透圧に対して細胞内部の浸透圧を調節するためにグリセロール生成の方向に解糖系の流れを調節していると推察している。言い換えれば、*S. cerevisiae* 細胞において食塩ストレスによって変化するエノラーゼとGAPDHのアイソザイムの発現調節機構は浸透圧調節剤グリセロールの生成（耐浸透圧性）と関連していると考えられ、興味を持たれる。食塩ストレスとグリセロール生成と関連して耐塩性酵母 *Z. rouxii* (118)や *Debaryomyces hansenii* 細胞(119)においてもグリセロール-3-リン酸脱水素酵素活性が食塩によって増加することが報告されており、*Z. rouxii*細胞においても解糖系とグリセロール生成との関連した制御が考えられる。ただ、*S. cerevisiae* 細胞は耐塩性酵母とは異なり生成したグリセロールの大部分を培地に漏出してしまうと言われており(120)、グリセロールの細胞内蓄積機構も耐塩性機構にとって重要であると考えられている(121)。

酵母のエノラーゼ とGAPDHはこれまで得られた結果から食塩ショック、グルコース飢餓により各々のアイソザイムの発現が変化するが、熱ショックでは変化しないと考えられる。マウスBALB/c3T3細胞ではHSP70及びグルコース制御タンパク質GRP78・GRP95で、食塩ショックとグルコース飢餓において異なった制御を遺伝子の転写レベルで受けていることも示されている(122)。即ち、熱ショックにより誘導されるHSP70の一つのイソタンパク質は食塩ショックにより誘導されるがグルコース飢餓によっては誘導されない、またGRP78とGRP95は食塩ショックとグルコース飢餓によっては誘導されるが、熱シ

ックによっては誘導されない。このことから明らかなように、いろいろなストレスタンパク質はそれぞれストレスに特異的に発現が制御されているようである。また、酵母のエノラーゼとGAPDHの発現制御を遺伝子の転写レベルで検討することも今後、必要であろう。

本実験の *S. cerevisiae* 細胞において得られた結果がそのまま耐塩性酵母 *Z. rouxii* 細胞に適用できるとは言えないであろう。本実験で用いた二つの抗血清は *Z. rouxii* 細胞のエノラーゼ及びGAPDHと反応しなかったので、*Z. rouxii* 細胞を用いて実験できなかった。今後、*Z. rouxii* 細胞のエノラーゼ及びGAPDHに対する抗血清を調製し、本実験と同様の検討を行うことが重要と考えられる。

#### 5・5 小括

酵母 *S. cerevisiae* のエノラーゼとGAPDHは共に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と言われてきた。本章では両酵素タンパク質の抗血清を用い、イムノプロット法に従い、両タンパク質の発現量に対する熱ショックを含めたいろいろなストレスの影響を検討した。エノラーゼ・GAPDHの発現は共に熱ショックにより影響されなかった。また、TLAa (エノラーゼ) とTLAb (GAPDH) の絶対量の変化を検討することは困難であったが、いろいろなストレスによりTLAaとTLAbのそれぞれのイソタンパク質量に変化が認められることを明らかにし、これらの変化から酵母の耐塩性について考察した。

まず、TLAa (エノラーゼ) とTLAb (GAPDH) について、定常期細胞やグルコース飢餓細胞では、グルコース存在下で栄養増殖している細胞と比べて、異なるイソタンパク質 (アイソザイム) の存在を確

認した。また、食塩ストレスを与えた細胞において同様の変化を認めた。この食塩ストレスによるTLAaとTLAbの変化はソルビトールにより浸透圧を上昇させた場合では認められなかったので、食塩に特異的な現象であると推察した。また、酵母細胞が食塩ストレスに対応するために必要なエネルギーの供給と関連して解糖系酵素の発現を調節していると推察した。

次に、食塩ストレスを与えた酵母細胞において認められたTLAa（エノラーゼ）やTLAb（GAPDH）の変化がグリセロールとエタノールなどの非発酵性炭素源を用いて培養した酵母細胞においても認められた。非発酵性炭素源を用いて培養したとき、解糖系は糖生成に傾いていると考えられた。また、*S. cerevisiae* 細胞は1M程度の食塩存在下では生育可能であり、食塩を含む培地で生育した細胞では細胞内にグリセロールを蓄積し細胞内外の浸透圧を調節しており、既報のグリセロール生成酵素であるグリセロール-3-リン酸脱水素酵素活性の上昇と考え合わせ、食塩ストレス条件下では酵母はグリセロール生成の方向に解糖系を調節する可能性があることを指摘した。

## 第6章

耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の生育に及ぼす薬剤の効果

### 6・1 緒言

耐塩性酵母 *Z. rouxii* は高濃度の食塩が存在する環境下で生育するために特殊な生理機能を獲得していると考えられる。耐塩性酵母は高濃度食塩存在下でさえ細胞内ナトリウムイオン濃度を低く抑え、細胞内外で高い濃度勾配を形成している(38,39)。これは耐塩性酵母の細胞内酵素が高濃度食塩に対して稀にしか抵抗性を示さず、一般的に感受性であるので細胞内ナトリウム濃度を低く抑える必要があるのであろう。

一般的に、動物細胞においても細胞内外でナトリウムイオン濃度勾配が生じている(43)。この勾配は細胞膜に存在するナトリウム・カリウムイオン依存性ATPaseにより形成される(123)。酵母細胞(例えば、*S. cerevisiae* や *Schizosaccharomyces pombe*)の細胞膜に存在するATPaseはナトリウム・カリウムイオン依存性ではなく、マグネシウムイオン依存性のプロトンATPaseである(10-12)。酵母細胞では、炭素源や窒素源などの栄養素は細胞内外で生じたプロトン勾配に依存したシンポート系により取り込まれると言われている(15, 16)。従って、酵母細胞におけるプロトン勾配やさらにそのプロトン勾配を形成するプロトンATPaseは酵母の生育にとって必須である(124)。そこで耐塩性酵母の細胞膜にはナトリウム・カリウムイオン依存性ATPaseは存在せず、耐塩性酵母の生育にとっても細胞膜プロトンATPaseが重要な役割を果たしていると推測されるので、耐塩性

酵母の高濃度食塩環境下での生育とプロトン勾配及びプロトンATPaseとの関連性を想定し、プロトン勾配及びプロトンATPaseに対して影響を及ぼすと考えられる薬剤存在下での耐塩性酵母 *Z. rouxii* の生育を検討した。その結果、高濃度食塩培地での *Z. rouxii* 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。

## 6・2 実験方法

### 6・2・1 使用菌株及び使用培地

*Z. rouxii* ATCC42981 株（野生型）を使用した。使用培地（YM培地）及び酵母株の保存は第1章で述べた。YM培地に終濃度0Mから3Mになるように食塩を、0%(w/v)から50%(w/v)になるようにソルビトールを添加後、1N塩酸を用いてpHを調節した。また、緩衝化YM培地のpHはMcIlvaine緩衝液（クエン酸-磷酸一ナトリウム広域緩衝液）を1/2容量加え、0.1N水酸化ナトリウムあるいは0.1N塩酸を用いて所定の値に調節した。アジ化ナトリウム（シグマ社製）とオルソバナジン酸ナトリウム（シグマ社製、以下バナジン酸と略）はそれぞれ10mMと100mMの水溶液とし、フィルター濾過し保存溶液とした。カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン（シグマ社製、以下CCCPと略）は、25mMアルコール溶液としそのまま使用した。各種濃度の食塩あるいはソルビトールを含む培地に上記の薬剤を添加し、試験用YM培地を作製した。

### 6・2・2 培養方法

YM斜面培地上で保存した *Z. rouxii* 細胞を5mlのYM培地に接種し30°Cで二日間静置培養した。前培養液を100mlの試験用YM培地に接種

し、30°Cで振とう（110回/分）培養した。

### 6・2・3 生育度測定

酵母の生育度は本培養開始後、所定の時間培養した培養液の濁度値(660nm)で表した。

## 6・3 結果

### 6・3・1 アジ化ナトリウムの効果

アジ化ナトリウムはミトコンドリアのF<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase及び電子伝達系の阻害剤として知られている(125-129)。食塩を含まない培地（以下、無食塩培地と略）と2M食塩を含む培地（以下、2M食塩培地）に終濃度0から50μMのアジ化ナトリウムを添加し、*Z. rouxii* を培養した。培養三日後（定常期）の *Z. rouxii* の生育度を図40-Aに示した。*Z. rouxii* の生育を50%阻害する濃度は無食塩培地でも2M食塩培地でもほぼ同濃度であり約30μMであった。この結果は無食塩培地でも高濃度食塩培地でもアジ化ナトリウムの効果が同程度であることを示している。

### 6・3・2 バナジン酸の効果

バナジン酸は *S. cerevisiae* 及び *S. pombe* の細胞膜プロトンATPaseの特異的な阻害剤として知られている(125-128,130)。無食塩培地と2M食塩培地に終濃度0から5mMのバナジン酸を添加し、*Z. rouxii* を培養した。培養三日後（定常期）の *Z. rouxii* の生育度を図40-Bに示した。*Z. rouxii* の生育を50%阻害する濃度は無食塩培地で約4mM、2M食塩培地で約1.5mMであった。また、1mMと2mMのバ

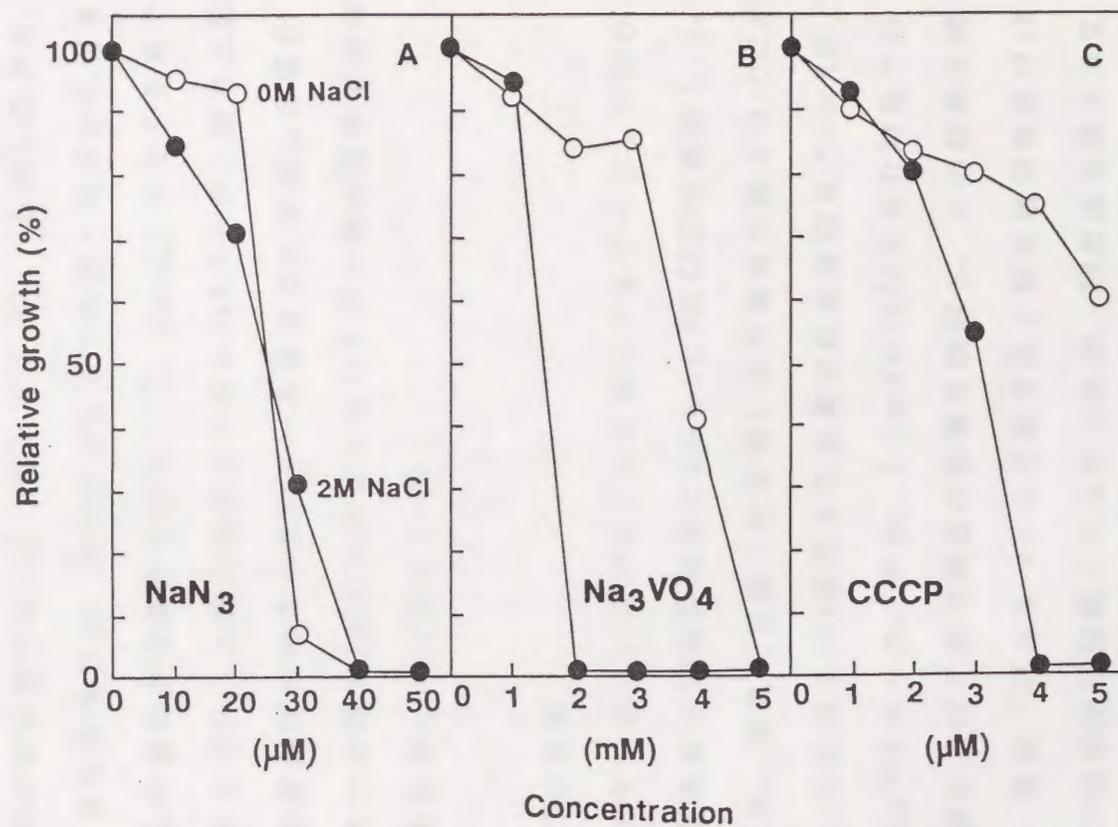


Fig. 40. Effects of Sodium Azide, Sodium Vanadate and CCCP on Growth of *Zygosaccharomyces rouxii* Cells in the Absence or Presence of 2M NaCl.

A, relative growth of *Z. rouxii* cells in YM media containing 10~50  $\mu\text{M}$  azide.  
 B, relative growth of *Z. rouxii* cells in YM media containing 1~5mM vanadate.  
 C, relative growth of *Z. rouxii* cells in YM media containing 1~5  $\mu\text{M}$  CCCP.  
 $\text{NaN}_3$ , sodium azide  
 $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , sodium vanadate  
 CCCP, carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone

ナジン酸を含む培地での *Z. rouxii* の生育に及ぼす食塩濃度の効果を調べた。図 4 1 にその結果を示した。対照として、バナジン酸を含まない各食塩濃度の培地での生育（対照）も示した（図 4 1 -A）。1mMバナジン酸を含む培地では、0Mから3M食塩存在下で *Z. rouxii* の生育は対照とほぼ同程度であった（図 4 1 -B）。しかしながら、2mMバナジン酸を含む培地では、食塩非存在下で対照と同様の生育を示したが、1M以上の食塩が存在する場合、*Z. rouxii* は全く生育できなかった（図 4 1 -C）。上記の濃度より高い3mMバナジン酸を上記の食塩濃度と同じ浸透圧を示すソルビトールを含むに添加した場合は高濃度ソルビトール培地（50%）においてもバナジン酸の阻害効果はほとんど観察されなかった（図 4 1 -D）。

### 6・3・3 CCCPの効果

CCCPはアンカプラーあるいはプロトンイオノフォアとして知られている。無食塩培地と2M食塩培地に0から5 $\mu$ MのCCCPを添加し *Z. rouxii* を培養した。培養三日後（定常期）の生育度を図 4 0 -Cに示した。*Z. rouxii* の生育を50%阻害する濃度は無食塩培地で5 $\mu$ M以上、2M食塩培地で約3 $\mu$ Mであった。また、2.5 $\mu$ MのCCCPを含む培地での *Z. rouxii* の生育に及ぼす食塩濃度の影響を検討し、その結果を図 4 2 -Bに示した。対照（図 4 2 -A）と比較すると無食塩培地及び1M食塩培地ではCCCPの効果は観察されなかったが、2M食塩培地では生育速度が著しく抑制された。さらに、3M食塩培地では2.5 $\mu$ M CCCP存在下では *Z. rouxii* は生育できなかった。これらの結果はCCCPの効果は培地の食塩濃度に依存していることを示している。また、食塩と同じ浸透圧を示すソルビトール培地にCCCPを添加した場合、バナ

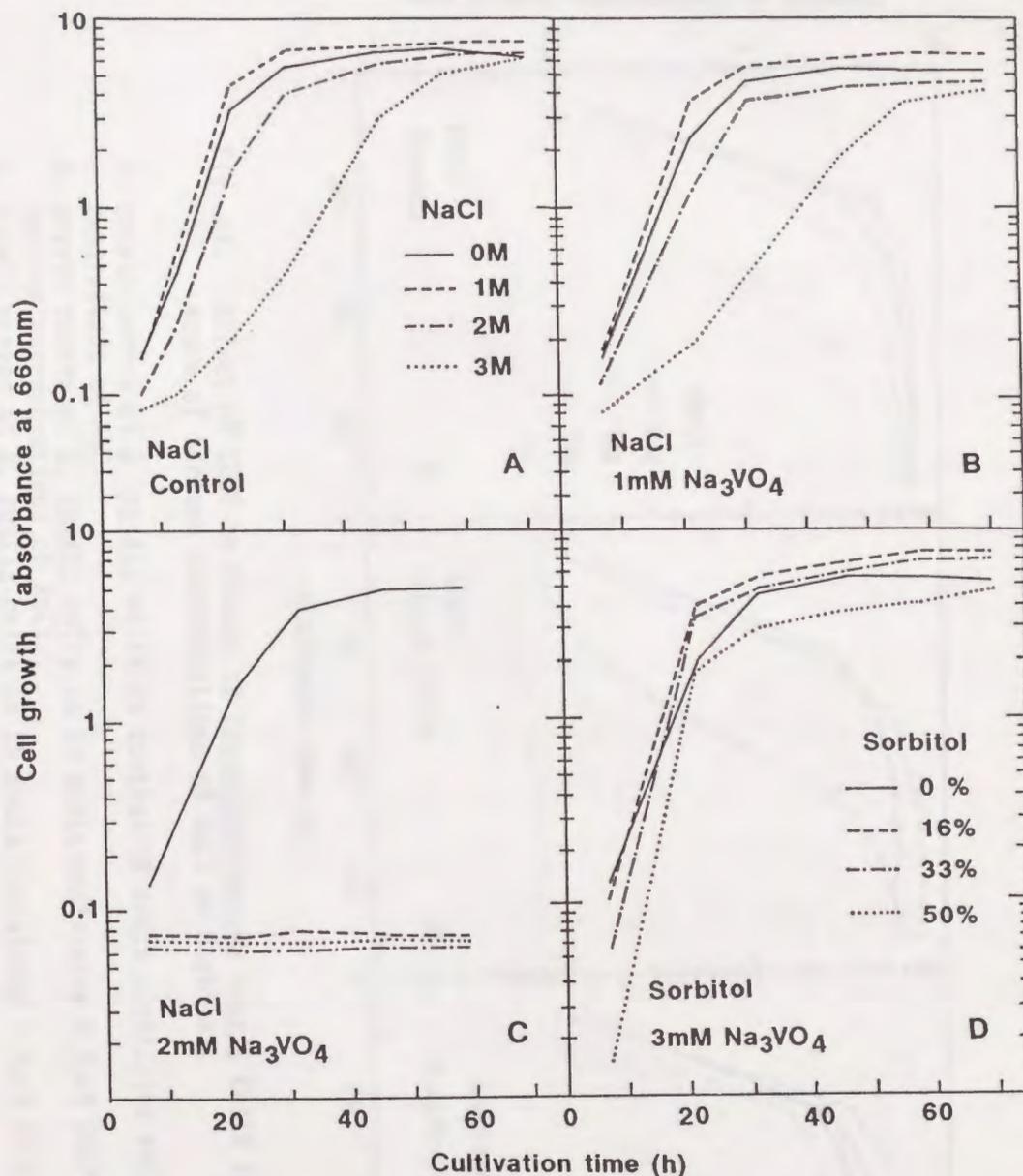


Fig. 41. Effect of Sodium Vanadate on Growth of *Zygosaccharomyces rouxii* Cells in the Presence of Various Concentrations of NaCl or Sorbitol.

- A, growth curves of *Z. rouxii* cells in control-YM media containing various concentrations of NaCl.
- B, growth curves of *Z. rouxii* cells in YM media containing 2mM sodium vanadate and various concentrations of NaCl.
- C, growth curves of *Z. rouxii* cells in YM media containing 2mM sodium vanadate and various concentrations of NaCl.
- D, growth curves of *Z. rouxii* cells in YM media containing 3mM sodium vanadate and various concentrations of sorbitol.
- $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , sodium vanadate

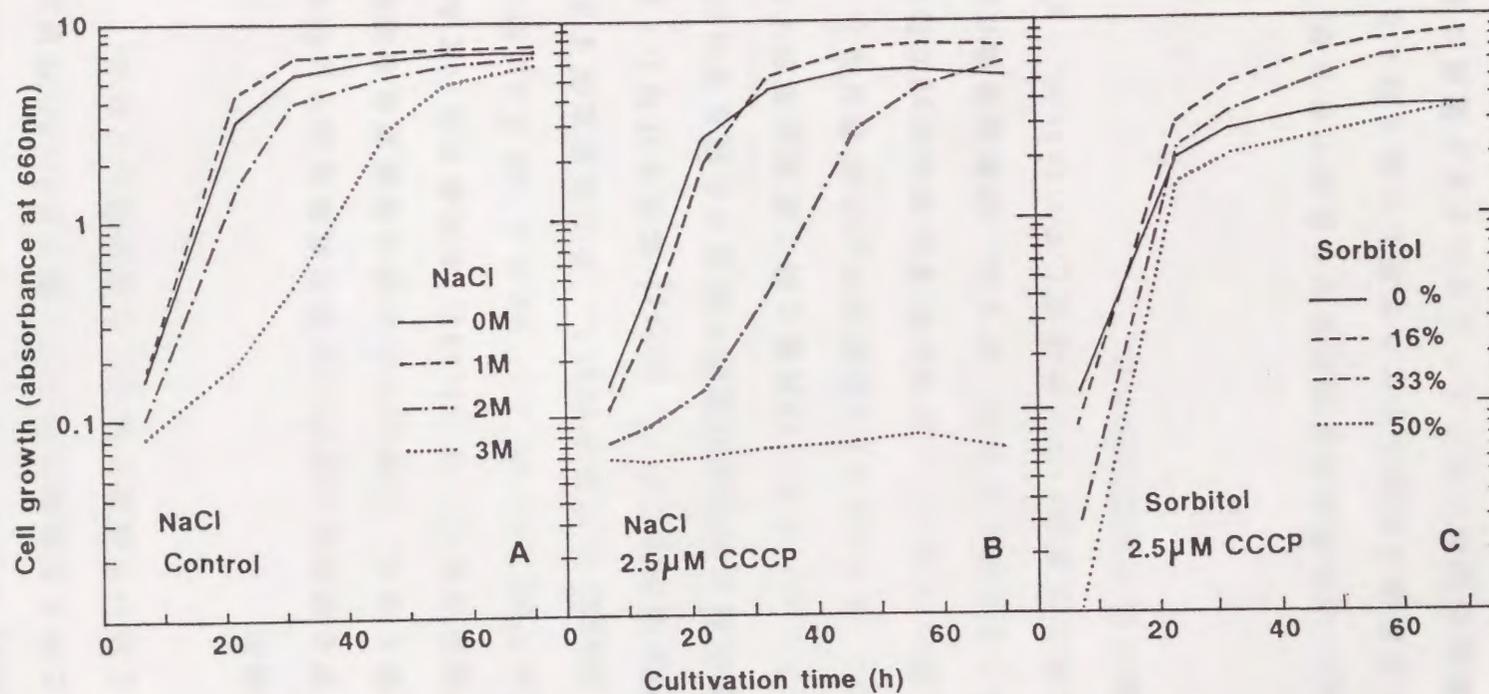


Fig. 42. Effect of CCCP on Growth of *Zygosaccharomyces rouxii* Cells in the Presence of Various Concentrations of NaCl or Sorbitol.

- A, growth curves of *Z. rouxii* cells in control-YM media containing various concentrations of NaCl.  
 B, growth curves of *Z. rouxii* cells in YM media containing 2.5µM CCCP and various concentrations of NaCl.  
 C, growth curves of *Z. rouxii* cells in YM media containing 2.5µM CCCP and various concentrations of sorbitol.  
 CCCP, carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone

ジン酸と同様に *Z. rouxii* の生育に対してCCCPはほとんど影響しなかった (図42-C)。これらの結果はバナジン酸及びCCCPの作用点が *Z. rouxii* の耐塩性において重要であることを示唆している。

#### 6・3・4 培地pHの効果

*Z. rouxii* の生育できる培地のpH範囲は高濃度食塩培地では無食塩培地と比べて著しく狭くなり、中性pHでの生育は高濃度食塩培地では抑制されることが報告されている(27,28)。本実験においても、培地のpHを緩衝液を用いてpH 3.5、pH 4.5、pH 5.5、pH 6.5に保った2M食塩培地での *Z. rouxii* の生育を検討し、その結果を図43-Aに示した。pH 6.5の2M食塩培地での *Z. rouxii* の生育は著しく抑制された。定常期の細胞数は培養液の濁度で推定する限りではpH 3.5とpH 6.5で約25%低下した。また、2M食塩と同じ浸透圧を示す33%ソルビトール培地では、pH 3.5から6.5の範囲でpHの影響はほとんど観察されなかった (図43-B)。これらの結果は培地のpHの効果が食塩に特異的であることを示している。さらに、2M食塩培地に終濃度2.5 $\mu$ MのCCCPを添加した場合、データは示していないが、pH 5.5とpH 6.5で生育速度の低下が観察された。

#### 6・4 考察

耐塩性酵母 *Z. rouxii* は高濃度食塩存在下でも生育できるが、その時細胞内のナトリウム濃度は細胞外に比べて著しく低く抑えられている(38,39)。動物細胞の細胞内外のナトリウムイオン濃度は主に細胞膜に存在するナトリウム・カリウムイオン依存性ATPaseの作用により調節されることはよく知られている。しかしながら、本酵母

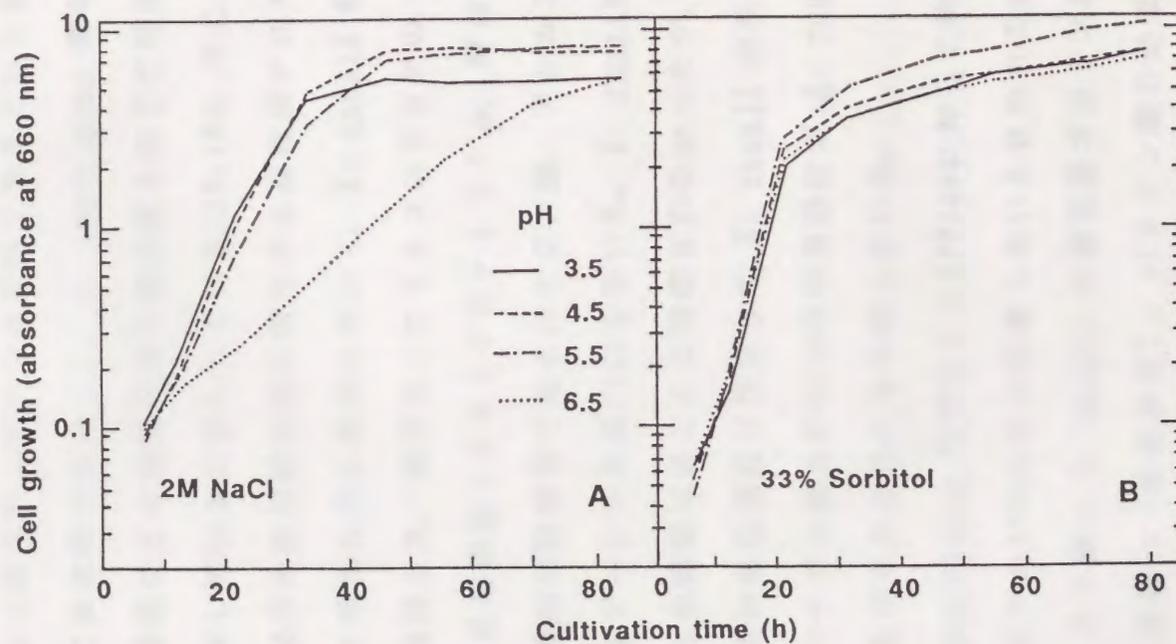


Fig. 43. Effect of pH of Culture Medium on Growth of *Zygosaccharomyces rouxii* Cells in the Presence of 2M NaCl or 33% Sorbitol

A, growth curves of *Z. rouxii* cells in pH-adjusted YM media containing 2M NaCl.  
 B, growth curves of *Z. rouxii* cells in pH-adjusted YM media containing 33%(w/v) sorbitol.

The pH of medium was adjusted by using McIlvaine buffer.

において細胞膜にナトリウム・カリウムイオン依存性ATPaseが存在するという確証は現在まで示されていない（但し、*Z. rouxii* の細胞膜ATPaseがナトリウム・カリウムイオン依存性であるという報告はあるが、それに関しては次章で述べる）。*S. cerevisiae* 酵母の細胞膜でのアミノ酸や糖類などの物質透過は細胞膜を隔てて形成されたプロトン勾配に依存していると言われている(15,16)。そこで、本実験ではプロトン勾配やその勾配形成に関与する細胞膜プロトンATPaseに影響を及ぼすと考えられる薬剤を用いて、*Z. rouxii* 細胞の生育に及ぼす影響を検討した。薬剤としてミトコンドリアの F1 Fo-ATPase及び電子伝達系阻害剤であるアジ化ナトリウム、酵母細胞膜プロトンATPaseの特異的な阻害剤であるバナジン酸、アンカプラー（プロトンイオノフォア）であるCCCPを用いた。*Z. rouxii* に対するアジ化ナトリウムの影響はほとんど観察されなかったが、バナジン酸及びCCCPは培地の食塩濃度に依存して *Z. rouxii* の生育を阻害した。その結果はバナジン酸及びCCCPの作用部位が *Z. rouxii* の耐塩性機構において重要であることを示唆している。

バナジン酸は *S. cerevisiae* のプロトンATPaseに対して特異的に作用し、ミトコンドリアのATPaseには影響しないと言われている(129,130)。なお、バナジン酸は *Z. rouxii* の細胞膜プロトンATPaseに対しても阻害作用を持つ（次章参照）。バナジン酸の効果はバナジン酸の構造が磷酸と類似していることによるといわれている。また、バナジン酸を *S. cerevisiae* に添加したとき、その作用部位がミトコンドリアであったという報告もある(131)が、現時点ではバナジン酸は先ず細胞膜プロトンATPaseに対して作用すると考えるのが妥当である。従って、バナジン酸の効果が食塩の存在により顕著

に観察されることは *Z. rouxii* の食塩存在下での生育には細胞膜プロトンATPaseの作用が重要であると考えられる。

プロトンイオノフォアであるCCCPの作用部位としては、CCCPがアンカプラーであることからミトコンドリアがまず考えられるが、細胞外からCCCPを加えた場合、CCCPが水不溶性であることから、まず細胞膜に作用していると考えられる。また、カルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン (FCCP、CCCPと同作用を持つ) を *S. cerevisiae* 細胞に添加するとFCCPは細胞膜に作用し、プロトン勾配を消失させると言われており、その状態は脱エネルギー化状態とも呼ばれている(132)。従って、*Z. rouxii* 細胞にCCCPを添加すると細胞膜に形成されたプロトン勾配を無効にすると考えられる。*Z. rouxii* 細胞におけるCCCPの効果が培地の食塩濃度に依存していたことは高濃度食塩培地での *Z. rouxii* の生育にとってプロトン勾配が重要であることを示唆している。培地に緩衝液を加え細胞外pHを一定にし細胞内外で形成されるプロトン勾配を緩衝すると、よりアルカリ側で食塩により *Z. rouxii* の生育が阻害されることを認めた。また、よりアルカリ側(pH 5.5や6.5)の培地にCCCPを添加すると生育はより一層抑制された。このことは *Z. rouxii* の高濃度食塩環境での生育にとって細胞膜でのプロトン勾配が重要であるとする考えを支持する。

食塩の代わりに同浸透圧になるようにソルビトールを加えた培地で行った同様の実験では、*Z. rouxii* 細胞の生育に対するCCCP・バナジン酸・pHの効果は確認できなかった。このことは細胞膜におけるプロトン勾配の作用が耐浸透圧性ではなく、耐塩性に特異的であることを示している。従って、細胞内のナトリウムイオン濃度を低

く抑えるためにプロトン勾配が利用されると考えられ、その機構として現在までの知識からナトリウムイオン・プロトンアンチポーターが考えられる。このアンチポーターは細胞膜に存在し、細胞膜の両側で形成されたプロトン勾配を利用して働き、その勾配（細胞外がプロトン濃度が高い）に依存したプロトンの細胞内への流入と共役してナトリウムイオンを細胞から排出すると考えられる。このアンチポーターは *S. cerevisiae* 細胞膜に存在することが示唆されており(133)、耐塩性藻類 *Dunaliella salina* の細胞膜に存在することが例証されている(134,135)。

#### 6・5 小括

耐塩性酵母 *Z. rouxii* を高濃度食塩存在下で培養しても細胞内のナトリウムイオン濃度は細胞外濃度と比べて著しく低く抑えられている。この勾配は酵母細胞に存在するプロトンATPaseが関与して生じるプロトン勾配によると考えられる。本章では、細胞内外に生じるプロトン勾配やこれに関与するプロトンATPaseに影響を及ぼす薬剤を用いて、*Z. rouxii* 細胞の生育に対するこれら薬剤の影響を検討した。

プロトンイオノフォアであるCCCP及びプロトンATPaseの特異的な阻害剤であるバナジン酸を培地に添加した場合、その効果は培地に含まれる食塩濃度に依存しており、ソルビトールによる浸透圧には依存していなかった。この結果は、細胞膜内外に形成されたプロトン勾配の解消及びプロトン勾配の形成阻害が *Z. rouxii* の高濃度食塩培地での生育にとって致命的であることを示している。さらに、細胞外のpHを緩衝液を用いてアルカリに一定に保つと、細胞の生育

が阻害された。このことは、細胞内外のプロトン勾配の重要性を支持する。これらの結果は *Z. rouxii* 細胞の高濃度食塩培地での生育と細胞膜でのプロトン勾配の関連性を示す最初のものである。

## 第7章

### 耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 細胞膜に局在するプロトンATPaseの性質

#### 7・1 緒言

第6章で、高濃度食塩環境での耐塩性酵母 *Z. rouxii* 細胞の生育に及ぼすプロトノフォア- (CCCP)・バナジン酸・培地pHの影響について検討した。その結果、高濃度食塩培地での生育にとって細胞膜内外で生じるプロトン勾配が重要であることが見いだされたが、高浸透圧培地ではこれら薬剤の影響は認められなかった。既に述べたように、*Z. rouxii* 細胞が高濃度食塩環境下で生育した時、細胞内ナトリウムイオン濃度は細胞外濃度に比べて著しく低く抑えられている(38,39)。一方、動物細胞においても細胞内外でナトリウムイオン濃度勾配が形成されており、それは細胞膜に存在するナトリウム・カリウムイオン依存性ATPaseの作用によると言われている(123)。しかしながら、酵母細胞 (*S. cerevisiae*)の細胞膜ATPaseはナトリウム・カリウムイオン依存性ではなく、マグネシウムイオン依存性プロトンATPaseである(10-12)。従って、細胞膜に形成されているプロトン勾配はおそらくナトリウムイオン・プロトンアンチポーター機構を通した細胞からのナトリウムの排出に関係しているものと推定される。

さらに、酵母細胞 (*S. cerevisiae*)における細胞膜のプロトン勾配(電気ポテンシャル)はアミノ酸・糖など生育にとって必須な栄養素の取り込みに関係しているといわれており(15,16)、このプロトン勾配の形成に関与する細胞膜プロトンATPaseは生育にとって必須

でもある(124)。従って、細胞膜プロトンATPaseは非耐塩性酵母 *S. cerevisiae* と耐塩性酵母 *Z. rouxii* 細胞では酵素の性質が異なっているものと推測できる。他方、耐塩性酵母の細胞膜ATPaseがナトリウム・カリウムイオンの輸送に関係するナトリウム・カリウムイオン依存性ATPaseではないとは否定できない。そこで、本章では耐塩性酵母 *Z. rouxii* 細胞の細胞膜ATPaseの性質を *S. cerevisiae* の弱耐塩性株のそれと比較検討した。なお、本章の大部分は既に学会誌に報告している(135)。

## 7・2 実験方法

### 7・2・1 使用菌株及び使用培地

*Z. rouxii* ATCC42981 株(野生型)及び *S. cerevisiae* X2180-1B 株 (*MAT $\alpha$* , *SUC2*, *mal*, *mel*, *gal2*, *CUP1*) を使用した。使用培地(YM培地)組成及び酵母株の保存法は第1章に記述した。YM培地は2%(w/v)グルコースを含む。

### 7・2・2 培養方法及び生育度測定

6・6・2及び6・2・3で述べた方法に従って行った。

### 7・2・3 酵母細胞のグルコース処理

定常期まで培養した *Z. rouxii* 及び *S. cerevisiae* 細胞を100 mM 2-(N-モリホリノ)エタンスルホン酸(MES)-トリス緩衝液(pH 6.5)に懸濁し(100mg湿菌重量/ml)、30°Cで5分間インキュベートした。その懸濁液に終濃度0.1Mになるようにグルコースを添加し、30°Cで15分間インキュベートした。対照として、グルコースを加えな

いで同様にインキュベートした。これらの処理を *in vivo* グルコース処理と称し、調製した細胞膜区分 (ATPase) に対する処理を *in vitro* 処理と称した。

#### 7・2・4 部分精製細胞膜区分の調製

*Z. rouxii* 及び *S. cerevisiae* 細胞のミトコンドリア膜や液胞膜を除いた細胞膜区分の調製は Goffeau らの方法 (11, 137) を一部改変した方法を用いて行った。即ち、7・2・3 で述べたグルコース処理細胞を開始試料として、処理細胞を遠心分離 (1000×g、5分間) により集菌し沈澱細胞を2.5倍量の250mMシヨ糖溶液に懸濁した。懸濁液に1.2倍量のガラスビーズを加え、ピブローゲン細胞破碎機を用いて氷冷水で冷却しながら10分間細胞を破碎した。破碎液を回収し遠心分離 (4°C、3000×g、5分間) を二度行い上清を得た。上清を15,000×gで遠心分離 (4°C、40分間) した。得られた沈澱を1mM ATP、1mM EDTAを含む10mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した。0.1M酢酸溶液を用いて懸濁液のpHを5.3に調節した。遠心分離 (4°C、7500×g、45秒間) 後、上清を回収し0.1Mトリス溶液を用いてpHを7.5に調節した。その溶液を超遠心分離 (4°C、45,000×g、12分間) し得られた沈澱を1mM ATP、1mM EDTA、10% (v/v) グリセロールを含む10mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し部分精製細胞膜区分 (ATPase) として使用時まで-85°Cで保存した。

#### 7・2・5 クロード (crude) 膜区分の調製

*Z. rouxii* 及び *S. cerevisiae* 細胞を培養液から遠心分離 (1000×g、5分間) により集菌し、脱イオン水で二度洗浄した。細胞

を100mM MES-トリス緩衝液(pH 6.5)に懸濁した(100mg湿菌重量/ml)。細胞懸濁液(4ml)にトリス、EDTA、ジチオスレイトール(DTT)、フェニールメチルスルフォニルフルオライド(PMSF)をそれぞれ終濃度50mM、5mM、5mM、1mMになるように添加し、直ちに液体窒素により急速凍結した。以下の操作は0から4°Cで行った。試料を融解し大型試験管に移し、試料4ml当り6gのガラスビーズ(直径0.45から0.5mm)を加え、5分間激しくボルテックスミキサで攪はんした。この細胞破碎液を6%(w/v)ソルビトール、5mM EDTA、2mM DTTを含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)を用いて5倍に希釈し、遠心分離(4°C、1000×g、5分間)した。得られた上清をもう一度同様に遠心分離し、上清を15,000×gで遠心分離(4°C、30分間)した。得られた沈澱を20%(v/v)グリセロール、0.1mM EDTA、0.1mM DTTを含む10mMトリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH 7.5)に懸濁し、ミトコンドリア膜や液胞膜を含むクルード膜区分(ATPase)として使用時まで-85°Cで保存した。

#### 7・2・6 ATPase活性の測定

(a)部分精製した細胞膜区分のATPase活性の測定は以下のように行った(138)。反応溶液(1ml)は50mM MES-トリス緩衝液(pH 6.5)、5mM 塩化マグネシウム、5mM ATP、50mM硝酸カリウム、10mMアジ化ナトリウム、0.2mMモリブデン酸アンモニウム、酵素(3.5から7μgタンパク質)からなる。反応はATPの添加により開始し30°Cで行った。50%(w/v)トリクロロ酢酸溶液(0.12ml)を添加することにより反応を停止した。硝酸カリウム、アジ化ナトリウム、モリブデン酸アンモニウムは、それぞれ共雑する液胞ATPase、ミトコンドリアATPase、ホス

ファターゼ活性を阻害するために添加した(125-127)。反応液(800  $\mu$ l)に1.6mlの0.5%(w/v)モリブデン酸アンモニウムを含む2%(v/v)硫酸溶液、16  $\mu$ lの10%(w/v)アスコルビン酸を加え、30°Cで30分間インキュベートし生じた青色を750nmで比色した。酵素活性は反応1分間当りに生じる無機リン酸量( $\mu$ mol)として表示した。なお、各データは三測定値の平均として表示し、さらに各データは同様に調製した別の酵素試料についても追試を行った。

(b)クルード膜区分の細胞膜ATPase活性の測定は50mM MES-トリス緩衝液(pH 6.5)、5mM塩化マグネシウム、5 mM ATP、酵素からなる反応液を用いて行い、80  $\mu$ Mバナジン酸により阻害されるATPase活性を細胞膜ATPase活性とした(127)。

(c)クルード膜区分のミトコンドリアATPase活性の測定は50mM トリス-塩酸緩衝液(pH 9.0)、5mM塩化マグネシウム、5mM ATP、酵素からなる反応液を用いて行い、10mMアジ化ナトリウムにより阻害される活性をミトコンドリアATPase活性とした(127)。

### 7・2・7 タンパク質の定量

試料溶液(50  $\mu$ l)に100  $\mu$ lの0.1M水酸化ナトリウム溶液を加え、100°C5分間加熱した。冷却後、100  $\mu$ lの0.1M塩酸溶液、250  $\mu$ lの50 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)を加えた。得られた試料溶液中のタンパク質量はPierce社BCAタンパク質アッセーキットを用い、Pierce社の操作法に従い測定した。

## 7・3 結果

### 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

7・2・4の方法で調製した部分精製細胞膜は主に細胞膜（形質膜）を含むと考えられるが、なおミトコンドリア膜、液胞膜を共雑している可能性が残った。細胞膜の純度を調べるために、*S. cerevisiae* と *Z. rouxii* 細胞の部分精製細胞膜中のATPase活性に対するいろいろな阻害剤の影響を検討した。なお、*Z. rouxii* 細胞は無食塩培地と2M食塩培地で培養したものを、*S. cerevisiae* 細胞は無食塩培地で培養したものを、以下三種の調製細胞膜と称した。細胞膜、ミトコンドリア膜、液胞膜の由来するATPase及び一般的なプロトンATPaseの阻害剤である阻害剤としてバナジン酸、アジ化ナトリウム、硝酸カリウム、*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCCD)を用いた。また、酸性ホスファターゼの阻害剤であるモリブデン酸アンモニウムも用いた(125-127)。

図44は *Z. rouxii*（無食塩及び2M食塩培地で培養した）及び *S. cerevisiae* 細胞から部分精製した細胞膜のATPase活性に対するバナジン酸とDCCDの効果を示している。三種の調製細胞膜のATPase活性は両阻害剤により阻害され、それらの阻害は同様の濃度依存性を示した。ミトコンドリア膜及び液胞膜のプロトンATPaseは1 $\mu$ M程度のDCCDにより阻害されることが報告されているが(128)、本実験においては、*S. cerevisiae* 及び *Z. rouxii* の細胞膜ATPaseの阻害はより高濃度のDCCDを必要とした（約20 $\mu$ Mで50%阻害）。また、耐塩性藻類 *Dunaliella salina* の細胞膜ATPaseは100 $\mu$ M DCCDにより阻害される事が報告され、その阻害より *D. salina* の細胞膜は一般的なプロトンATPaseを含んでいると結論付けられている(134)。従って *Z. rouxii* 細胞の細胞膜ATPaseも *D. salina* や *S. cerevisiae* と

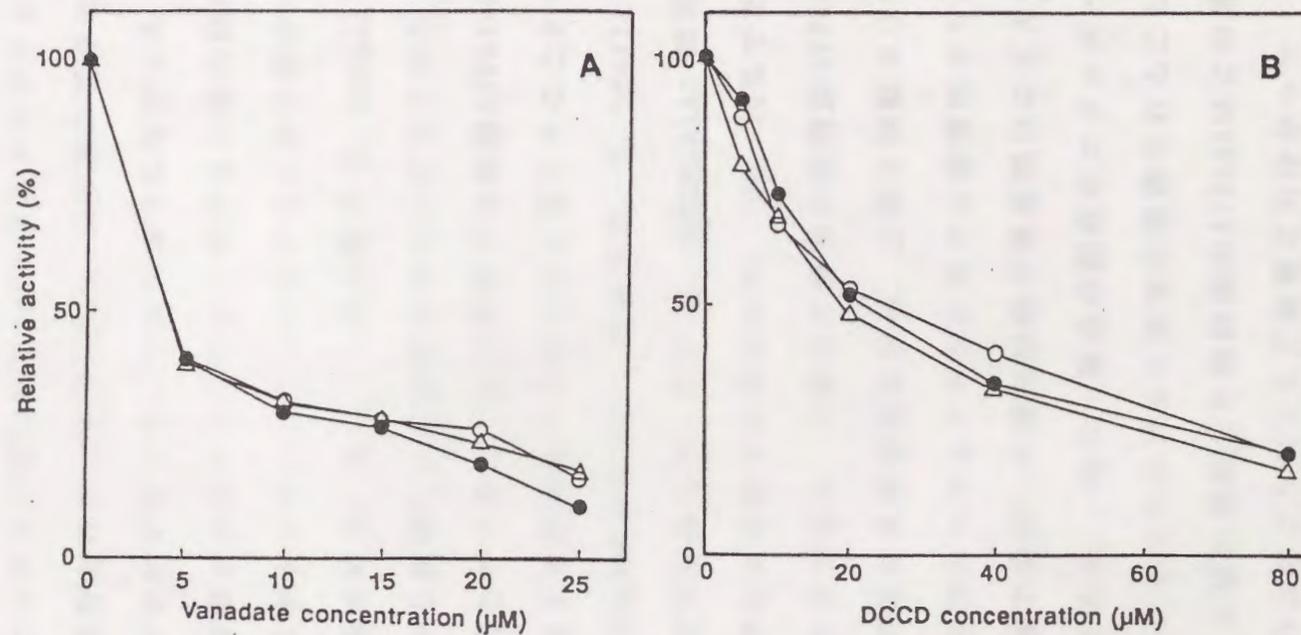


Fig. 44. Effects of Vanadate and DCCD on the Activity of Plasma Membrane ATPases from *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

The partial purified plasma membranes were used as enzyme source.

A, ATPase activity in the presence of 0~25 μM vanadate.

B, ATPase activity in the presence of 0~80 μM DCCD.

△, ATPase from *S. cerevisiae* cells grown in OM NaCl medium.

○, ATPase from *Z. rouxii* cells grown in OM NaCl medium.

●, ATPase from *Z. rouxii* cells grown in 2M NaCl medium.

同様にプロトンATPaseであると考えられる。

図45は上記の三種の細胞膜ATPase活性に及ぼすアジ化ナトリウム、硝酸カリウム、モリブデン酸アンモニウムの効果を示している。酵母細胞のミトコンドリアATPaseは2mMアジ化ナトリウムで完全に阻害されることが報告されているが(139)、本実験の場合の細胞膜ATPaseはこの濃度のアジ化ナトリウムでは阻害されなかった(図45-A)。より高濃度のアジ化ナトリウムに対する三種の酵素の感受性の差は後に述べるナトリウムイオンに対するこれら酵素の感受性の差により説明可能である。従って、本実験で *Z. rouxii* 及び *S. cerevisiae* 細胞から調製した細胞膜はほとんどミトコンドリア膜を含まないと言することができる。酵母細胞の液胞膜ATPase活性は50mM硝酸カリウム存在下で非存在下の約半分に低下することが報告されているが(128)、40mM硝酸カリウム存在下で、*Z. rouxii* (無食塩培地及び2M食塩培地で培養した) 及び *S. cerevisiae* 細胞の細胞膜ATPase活性はそれぞれ非存在下の場合の70、100、60%であった(図45-B)。後述するように、これらの酵母の細胞膜ATPaseはカリウムイオンに対して異なる感受性を示し、上記の硝酸カリウムによるATPase活性の低下はカリウムイオンに対する感受性から説明できる。従って、本実験で精製した酵母細胞の細胞膜はほとんど液胞膜を含まないと考えられる。次に、酵母の酸性ホスファターゼは0.2mMモリブデン酸アンモニウムにより完全に阻害されることが報告されているが(138)、三種の調製した細胞膜のATPaseはこの濃度のモリブデン酸アンモニウムによりほとんど阻害されなかった(図45-C)。以上のように、本実験で精製した細胞膜はミトコンドリア膜、液胞膜をほとんど含まず、また酸性ホスファターゼ活性も示さない、

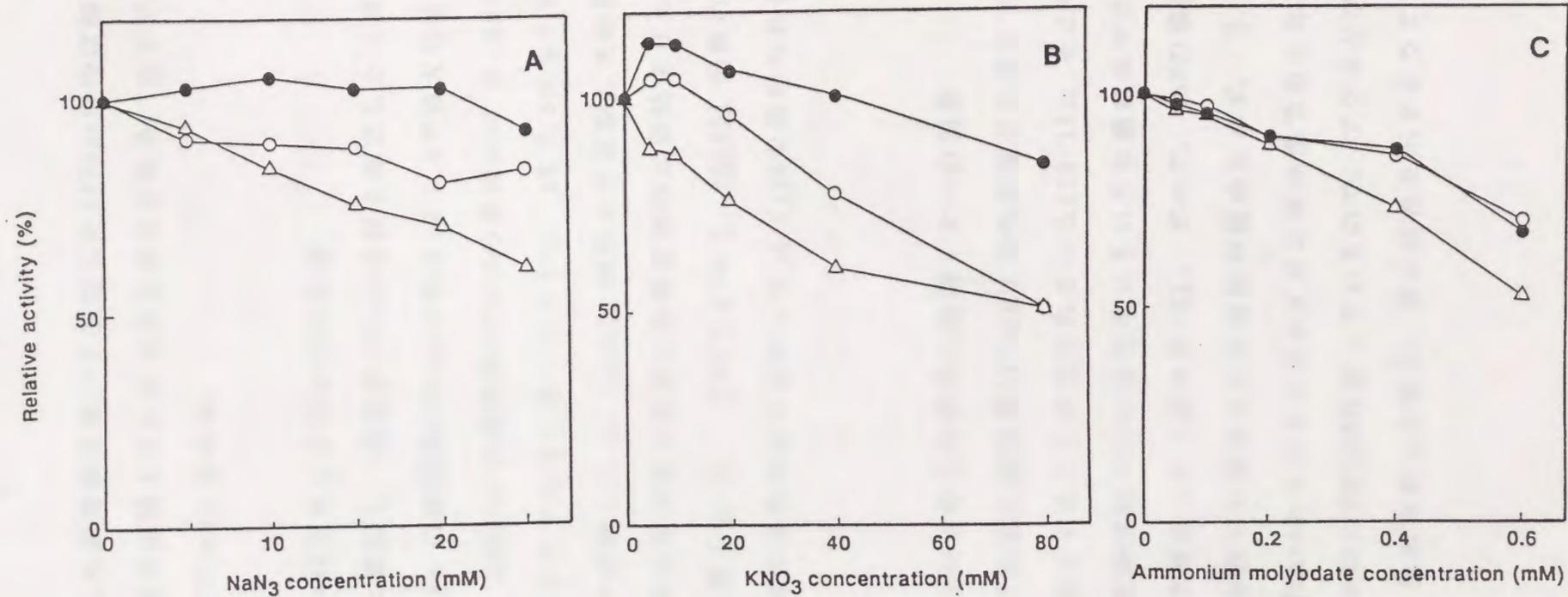


Fig. 45. Effects of  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ , and Ammonium Molybdate on the Activity of Plasma Membrane ATPases from *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

The partial purified plasma membranes were used as enzyme source.  
 A, ATPase activity in the presence of 0~25mM  $\text{NaN}_3$ .  
 B, ATPase activity in the presence of 0~80mM  $\text{KNO}_3$ .  
 C, ATPase activity in the presence of 0~0.6mM ammonium molybdate.  
 Symbols are the same as indicated in Fig. 44.

従って、本実験で精製した細胞膜を用いて測定したATPase活性は細胞膜プロトンATPase活性を反映しているものと考えられる。以下では調製品を単に細胞膜ATPaseと述べる。

### 7・3・2 細胞膜ATPase活性に及ぼすpHの効果

反応液のpHを5から8に調製し、細胞膜ATPase活性を測定した(図46-A)。S. cerevisiaeの細胞膜ATPaseはほぼpH 6.5で最大の活性を示した。一方、Z. rouxiiの細胞膜ATPaseの至適pHはS. cerevisiaeのそれより僅かにアルカリ側にシフトし、pH 6.5から7.0であった。2M食塩培地で培養したZ. rouxii細胞から調製した細胞膜のATPaseの比活性は無食塩培地で培養した同細胞の比活性よりもおよそ1.6倍高かった(図46-A)。このことはZ. rouxii細胞の細胞膜ATPase活性が培地の食塩濃度に依存してin vivoで高められることを示している。

### 7・3・3 細胞膜ATPase活性に及ぼす二価陽イオンの効果

S. cerevisiaeなどの細胞の細胞膜ATPaseは活性発現のためにマグネシウムイオンを必要とすることが知られている(10-12)。そこで、本実験で三種の精製した細胞膜ATPase活性をいろいろな濃度のマグネシウムイオン存在下で測定した(図46-B)。すべて、5mMの濃度で最大活性を示し、非存在下ではほとんど活性が認められず、Z. rouxii細胞の細胞膜ATPaseもマグネシウムイオン依存性であった。また、本活性測定条件ではATPが5mM存在しているので、マグネシウムイオンとATPが等モル濃度存在した場合、最大活性を示すようである。

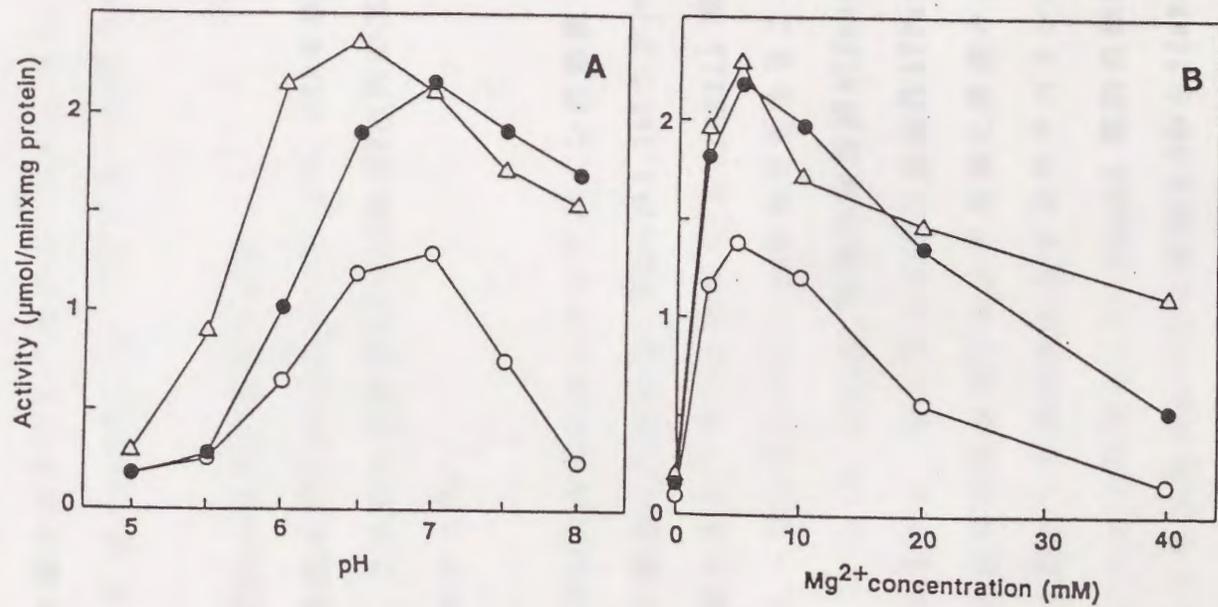


Fig. 46. Effects of pH and Mg Ion on the Activity of Plasma Membrane ATPases from *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

The partial purified plasma membranes were used as enzyme source.  
 A, Optimum pH of ATPases.  
 B, ATPase activity in the presence of 0~40mM MgCl<sub>2</sub>.  
 Symbols are the same as indicated in Fig. 44.

次に、マグネシウムイオン以外の二価陽イオンの効果を検討した（表XII）。それぞれ5mM存在する場合、コバルトとマンガンイオンはマグネシウムイオンの場合の約半分の活性を示した。一方、亜鉛とカルシウムイオンの場合はほとんど活性を示さなかった。これらの効果は *Z. rouxii* と *S. cerevisiae* 細胞で全く同様であった。

#### 7・3・4 細胞膜ATPase活性の基質特異性

調製した三種の細胞膜のATPase活性をUTP、GTP、CTPを基質として測定した（表XIII）。これらの細胞膜ATPaseはATP以外の基質に対してはほとんど作用しなかった。

#### 7・3・5 細胞膜ATPase活性に及ぼすウアバインの効果

*Z. rouxii* 細胞から調製した細胞膜ATPaseが0.1mMウアバインにより阻害されることが報告され、その阻害から *Z. rouxii* 細胞の細胞膜ATPaseがナトリウム・カリウムイオン依存性であろうことが示唆されている(139)。もし、*Z. rouxii* 細胞の細胞膜ATPaseが動物細胞などに存在するナトリウム・カリウムイオン依存性ATPaseであれば、*Z. rouxii* 細胞の耐塩性を説明する上で非常に重要な事柄である。そこで、本実験で調製した細胞膜に対するウアバインの効果を検討した（表XIV）。しかしながら、*Z. rouxii* 細胞の細胞膜ATPaseは反応液中のナトリウム及びカリウム濃度を0から20mMの間で変化させて測定してもウアバインにより阻害されなかった。従って、*Z. rouxii* 細胞の細胞膜ATPaseは *S. cerevisiae* 細胞と同様にナトリウム・カリウムイオン依存性ではないと判断した。

Table XII. Effect of Divalent Cations on Plasma Membrane ATPase Activities from *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

Cations (5mM)	Relative activity (%)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Z. rouxii</i> -0M NaCl	<i>Z. rouxii</i> -2M NaCl
-	13	9	11
Mg <sup>2+</sup>	100	100	100
Co <sup>2+</sup>	62	62	67
Mn <sup>2+</sup>	46	49	52
Zn <sup>2+</sup>	17	20	18
Ca <sup>2+</sup>	13	10	11

Chloride salts of divalent cations were used.

Table XIII. Substrate Specificity of Plasma Membrane ATPases from *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

Substrates (5mM)	Relative activity (%)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Z. rouxii</i> -0M NaCl	<i>Z. rouxii</i> -2M NaCl
ATP	100	100	100
UTP	15	11	11
GTP	13	5	7
CTP	8	4	6

Disodium salts of nucleotides were used.

Table XIV. Effect of Ouabain on Plasma Membrane ATPase Activities from *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

Concentration (mM)			Relative activity (%)		
Na+	K+	Ouabain	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Z. rouxii</i> -0M NaCl	<i>Z. rouxii</i> -2M NaCl
10	-	-	100	100	100
10	-	0.1	93	92	95
20	10	-	86	107	107
20	10	0.1	78	102	93
20	20	-	74	102	96
20	20	0.1	70	86	93

### 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

耐塩性藻類 *D. parva*、耐塩性植物 *Plantago maritima*、海洋性プランクトン *Heterosigma akashiwo* から調製された細胞膜のATPaseが *in vitro* でナトリウム、カリウムイオンにより活性化されることが報告されている(140-142)。そこで、*S. cerevisiae* と *Z. rouxii* 細胞の細胞膜ATPase活性を塩化ナトリウムと塩化カリウムの存在下で測定した(図47)。両酵母の細胞膜ATPaseに対する塩化ナトリウムと塩化カリウムの活性化効果は認められず、むしろ阻害的であった。低濃度の塩化ナトリウム存在下では、2M食塩培地で培養した *Z. rouxii* 細胞の細胞膜ATPaseが無食塩培地で培養した *Z. rouxii*、*S. cerevisiae* 細胞のATPaseよりも塩化ナトリウムに対してより耐性であった。また、低濃度の塩化カリウム存在下では、無食塩培地で培養した *Z. rouxii* 細胞のATPaseは塩化カリウムにより僅かに活性化され、2M食塩培地で培養した *Z. rouxii* 細胞のATPaseは塩化カリウムに対して耐性であった。これら塩化ナトリウムと塩化カリウムの効果は海洋性酵母 *Debaryomyces hansenii* 細胞の細胞膜ATPaseのそれと類似していた(143)。本実験で調製した三種の細胞膜ATPaseは塩化ナトリウム、塩化カリウムに対して感受性が僅かに異なっていたが、上述のウアバインの効果と考え合わせると、*Z. rouxii* 細胞の細胞膜ATPaseはナトリウム、カリウムイオン依存性ではないと結論した。

### 7・3・7 粗精製膜区分中の細胞膜活性に及ぼすグルコースの効果

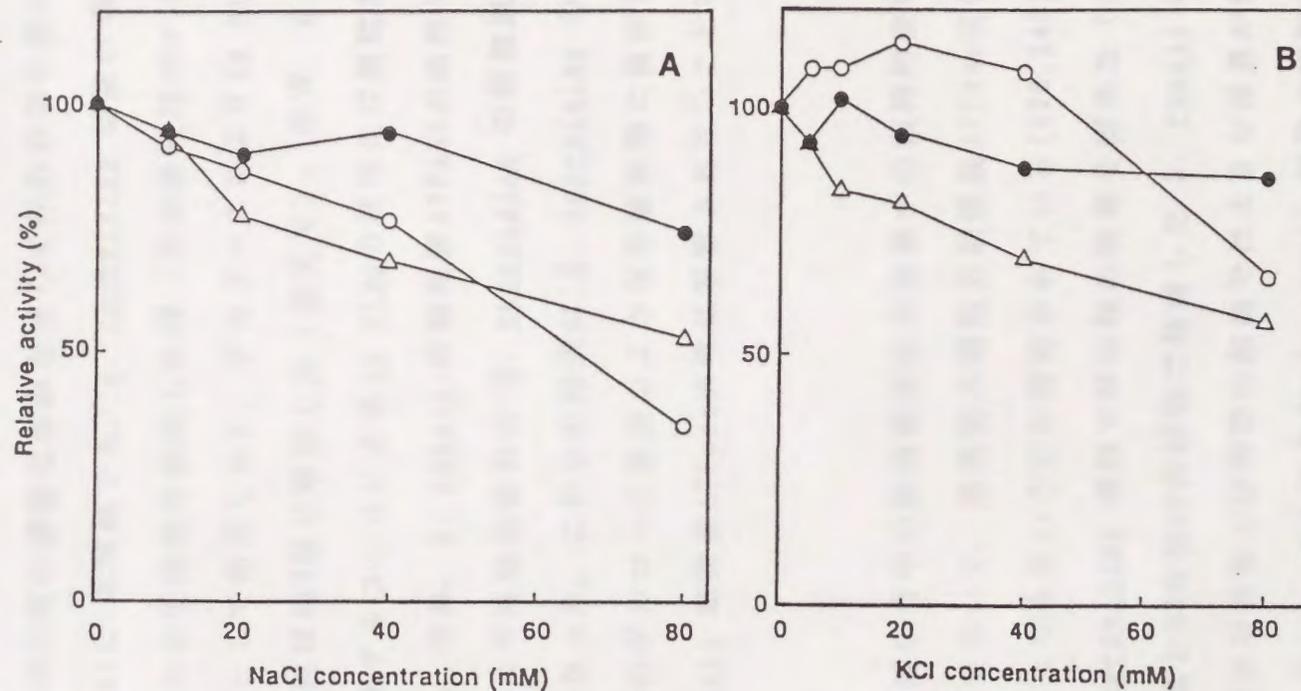


Fig. 47. Effects of NaCl and KCl on the Activity of Plasma Membrane ATPases from *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

The partial purified plasma membranes were used as enzyme source.  
 A, ATPase activity in the presence of 0~80mM NaCl.  
 B, ATPase activity in the presence of 0~80mM KCl.  
 Symbols are the same as indicated in Fig. 44.

S. cerevisiae 細胞の細胞膜プロトンATPaseがグルコースにより *in vivo*で活性化されることが報告されて(125)、その活性化は可逆的であり、ATPaseタンパク質の磷酸化修飾を通して行われると述べられている(125,127,144)。本実験でも、S. cerevisiae 細胞の粗精製膜区分を酵素試料として活性を測定した時(その活性はバナジン酸感受性ATPase活性として測定した)、グルコースにより *in vivo*でプロトンATPase活性は約2倍に増加した(表XV)。他方、Z. rouxii 細胞においてはグルコースによる *in vivo*の活性化は観察されなかった(表XV)。なお、Z. rouxii の細胞膜ATPaseの活性レベルは、グルコースにより活性化された S. cerevisiae の細胞膜ATPase活性とほぼ等しかった。これらの結果は S. cerevisiae の細胞膜ATPase活性は培地のグルコース濃度のような栄養状態に依存して変化するが、Z. rouxii 細胞膜ATPase活性は影響されないことを示している。

#### 7・3・8 粗精製膜区分中の細胞膜活性の培養中の経時的变化

S. cerevisiae 細胞において、対数期の細胞の細胞膜ATPase活性が定常期の細胞の活性よりも高いことが報告されている(126,145)。本実験において、S. cerevisiae 細胞では同様の現象を認めた(図48)。一方、無食塩と2M食塩の両培地で培養した Z. rouxii 細胞の細胞膜ATPase活性は対数期と定常期の細胞では大きな差異が認められなかった(図48)。このことは Z. rouxii 細胞の細胞膜ATPase活性は培養時期に影響受けないことを示している。

#### 7・4 考察

Table XV. Effect of Glucose Treatment on Plasma Membrane ATPases in Crude Membrane Fractions from *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

Strains	NaCl	Specific Activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	
		Glucose treatment	
		Before	After
<i>S. cerevisiae</i>	0 M	0.076	0.134
<i>Z. rouxii</i>	0 M	0.225	0.191
<i>Z. rouxii</i>	2 M	0.178	0.150

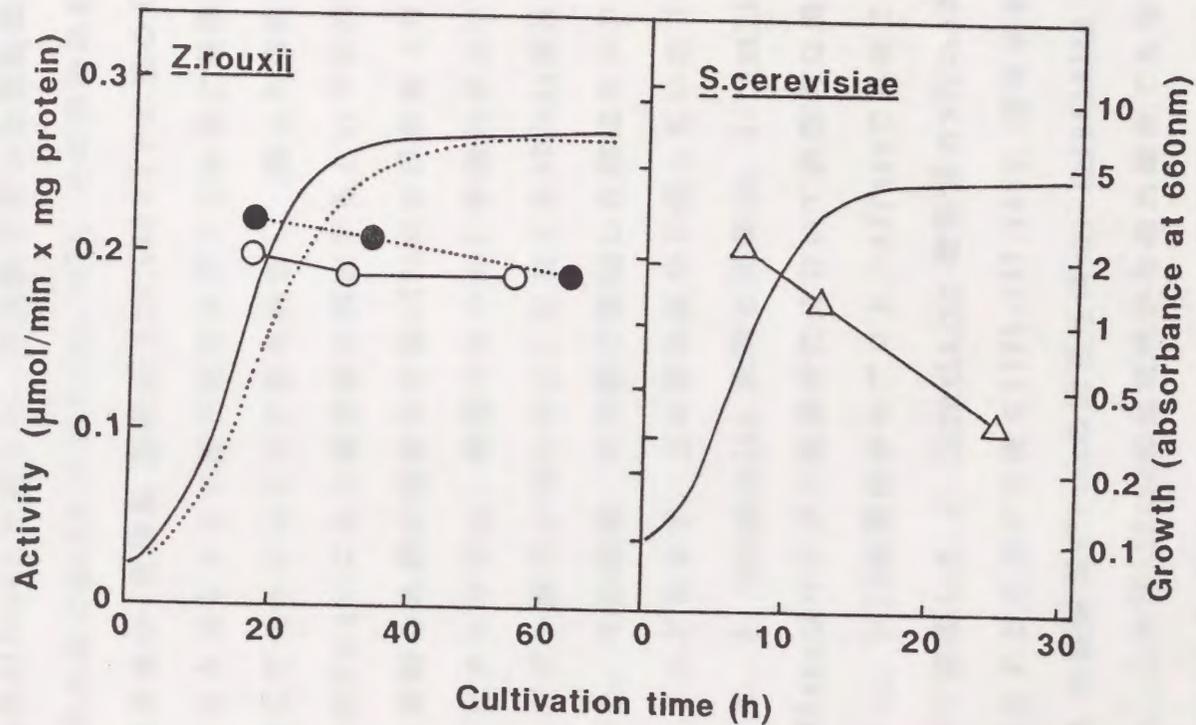


Fig. 48. Changes of the Activity of Plasma Membrane ATPases from Zygosaccharomyces rouxii and Saccharomyces cerevisiae Cells at Various Cultivation Phases.

The crude membrane fractions were used as enzyme source.  
 Solid and dotted lines, growth curves of S. cerevisiae and Z. rouxii cells.  
 Symbols are the same as indicated in Fig. 44.

耐塩性酵母 *Z. rouxii* 細胞の細胞膜ATPaseの性質を明らかにする目的で、*Z. rouxii* 細胞から細胞膜を調製し、*S. cerevisiae* の弱耐塩性菌株の細胞膜ATPaseと比較した。本実験で用いた細胞膜の調製法はGoffeauらの方法に基づいており(11,137)、その方法は細胞膜、ミトコンドリア膜を含む粗精製膜区分(20,000×gでの遠心分離の沈澱)を調製し、ミトコンドリア膜が酸性条件下で容易に凝集するという性質を利用してミトコンドリア膜を除去し、残った溶液から超遠心分離(100,000×g)により細胞膜を調製するというものである。本方法により調製した膜の純度を各種ATPaseの阻害剤(バナジン酸・DCCD・アジ化ナトリウム・硝酸カリウム)や酸性ホスファターゼ阻害剤(モリブデン酸アンモニウム)に対するATPase活性の感受性により検討した。その結果、本実験で調製した膜はミトコンドリア、液胞膜をほとんど含まず、主に細胞膜から成っていた(図44、45)。また、*S. cerevisiae* 細胞と同様に、*Z. rouxii* 細胞の膜調製品中のATPaseはバナジン酸感受性において典型的な細胞膜ATPaseの性質を示し、DCCD感受性からプロトンATPaseであることが分かった。本実験で精製した *S. cerevisiae* 細胞膜のATPaseの比活性はこれまで報告されたものより高く(125,127,143)、また同様に精製した *Z. rouxii* の細胞膜ATPaseの比活性は *S. cerevisiae* のそれと同様であった。これはATPaseの比活性からみた場合でも本実験で精製した *Z. rouxii* 及び *S. cerevisiae* の細胞膜が高度に精製されていることを示している。

次に、*Z. rouxii* 細胞の耐塩性に関連した本酵素の特性を明らかにするため、*Z. rouxii* と *S. cerevisiae* の両細胞膜ATPaseの性質を比較した。*Z. rouxii* の細胞膜ATPase活性の至適pHは *S. cere-*

*visiae* のそれと比べてわずかにアルカリ側にシフトしていた (図 46)。また、50mM以下の低い濃度の塩化ナトリウムと塩化カリウムに対する *Z. rouxii* の細胞膜ATPaseの活性は *S. cerevisiae* のそれと比べてわずかに耐性であった (図 47)。しかしながら、それ以外のATPaseの性質 (バナジン酸、DCCD、ウアバインに対する感受性、二価陽イオンの効果、基質特異性) は *Z. rouxii* と *S. cerevisiae* の細胞膜ATPaseで互いに非常に類似していた。

2M食塩培地で培養した *Z. rouxii* の細胞膜ATPaseの比活性が無食塩培地で培養した同細胞の比活性より高いことを見いだした (図 46)。これは *Z. rouxii* 細胞において、細胞膜ATPase活性が培地の食塩濃度に依存して *in vivo* で高められることを示しており、細胞膜ATPaseが *Z. rouxii* 細胞の高濃度食塩環境での生育にとって重要な役割を果たしていることを示唆している。*Z. rouxii* 細胞におけるこの塩化ナトリウムによる *in vivo* の活性化は以前に Ayresらにより報告されているが、彼らの活性は本実験のそれより低かった (146)。

また、Ayresらは *Z. rouxii* の細胞膜ATPaseがウアバインにより阻害されたことから、ナトリウム・カリウムイオン依存性であると報告した (139)。*Z. rouxii* の細胞膜ATPaseが動物細胞などに存在するナトリウム・カリウムイオン依存性ATPaseであれば *Z. rouxii* 細胞の耐塩性を説明する上で非常に重要なデータになると考えられる。しかし、本実験では *Z. rouxii* 細胞において *S. cerevisiae* 細胞と同様にウアバインによる阻害は観察されなかった (表 X IV)。さらに、*S. cerevisiae* と *Z. rouxii* 細胞においてナトリウム・カリウムイオンによる細胞膜ATPaseの *in vitro* 活性化は認められなかつ

た(図47)。それ故、本実験ではAyresらの結果を修正し、*Z. rouxii*の細胞膜ATPaseはナトリウム・カリウムイオン依存性ではないと結論した。

海洋性酵母 *Debaryomyces hansenii* の細胞膜ATPaseはマグネシウムイオン依存性を示し、無食塩培地で培養した細胞のATPaseはpH 6~6.5で至適活性を示すが、1.5M食塩培地で培養した細胞の酵素はそれに加えてpH 8での活性を示したと報告されている(143)。また、アルカリ側の活性は*in vitro*で100mMまでの塩化ナトリウムに対して酸性側の活性よりも耐性であることも述べられている。しかしながら、本実験の *Z. rouxii* 細胞では2M食塩培地で培養した細胞において、そのようなアルカリ側の活性は認められなかった(図46)。

細胞膜ATPaseの塩化ナトリウムと塩化カリウムによる活性化が耐塩性藻類 *Dunaliella parva* (1M以下の範囲で)、海洋性プランクトン *Heterosigma akashiwo* (100mM以下の範囲で)、耐塩性植物 *Plantago maritima* (100mM以下の範囲で)で*in vitro*で観察されている(140-142)。このことは仮に細胞膜ATPaseの周辺環境の塩化ナトリウム、塩化カリウム濃度が上昇しても上記の生物のATPaseは活性を示すこと、培地の食塩濃度に依存してATPase活性が上昇すること、またこれら生物のATPaseがナトリウム・カリウムイオン依存性であること示していると推測される。しかし、上述したように *Z. rouxii* の細胞膜ATPaseは *S. cerevisiae* や *D. hansenii* 細胞と同様に*in vitro*では塩化ナトリウムと塩化カリウムによる活性化は認められず(図47)、また、ナトリウム・カリウムイオン依存性である可能性も認められなかった。これは耐塩性酵母の細胞膜ATPaseが他の耐塩性生物とは性質を異にしていることを示唆している。

*D. parva* において、細胞膜ATPaseがマグネシウムイオンと同様にカルシウムイオンにより活性化されること、即ち、カルシウムイオンはマグネシウムイオンと置き換えられることが報告されている(140)。しかしながら、本実験では *Z. rouxii*、*S. cerevisiae* の細胞膜ATPaseに対するカルシウムイオンの活性化効果は観察されなかった(表XIV)。また、*D. hansenii* 細胞でも同様であることが示されている(143)。これは耐塩性酵母 (*Z. rouxii*、*D. hansenii*) の細胞膜ATPaseが他の耐塩性生物(藻類、植物、プランクトン)とは異なっていることを示している。

Serranoは *S. cerevisiae* 細胞の細胞膜ATPaseが *in vivo* でグルコースにより活性化されること、その活性化が可逆的であることを報告している(125)。また、*S. cerevisiae* 細胞膜ATPase遺伝子(PMA1)から調製したプローブを用いたノーザンブロット分析からそのATPaseのメッセンジャーRNA(mRNA)の量はどの培養時期でもほぼ一定であること、*S. cerevisiae* の細胞膜ATPaseの活性化は翻訳後修飾を通して行われること(多分磷酸化によるであろう)が示されている(126)。*S. cerevisiae* の細胞膜ATPaseのグルコースによる活性化の経路に関しては2報に述べられている(127,147)。本実験において *S. cerevisiae* の細胞膜ATPaseのグルコースによる活性化を観察した(表XV)。しかしながら、*Z. rouxii* 細胞においては細胞膜ATPaseのグルコースによる *in vivo* での活性化は検出できなかった(表XV)。無食塩、2M食塩両培地で培養した *Z. rouxii* 細胞において同様であった。

また、*S. cerevisiae* において、対数期の細胞の細胞膜ATPaseの活性は定常期の細胞の活性よりも高いことが報告されており(126,

143)、上記のグルコースによる活性化は定常期の細胞を用いて観察されるものである。このことは代謝能の高い *S. cerevisiae* 細胞が高い細胞膜ATPase活性を持ち、栄養素の付加などによる代謝能の上昇により細胞膜ATPaseが活性化状態に変換されることを示している。しかしながら、*Z. rouxii* 細胞では対数期と定常期の細胞で細胞膜ATPase活性に大きさ差異は見いだされなかった(表XV)。*Z. rouxii* と *S. cerevisiae* の細胞膜ATPaseの差異として最も顕著なものはグルコースによる活性化と培養時期に関する活性の変化であった。10%食塩溶液中で30あるいは40°Cでの *Z. rouxii* 細胞の生存率がエネルギー源としてグルコース(5%)の付加により改善される現象が報告されている(19)。既に述べたように、培地の食塩濃度が高い時、細胞膜ATPase活性が増加していた(図46)。従って、*Z. rouxii* の細胞膜ATPaseは本酵母の耐塩性において重要な機能を果たしていることが推測される。*S. cerevisiae* 細胞において、活性化プロトンATPaseのみがいろいろな二次的なプロトンとのシンポート系を駆動させるのに必要である膜ポテンシャルを供給できることが例証されている(148)。これらのことを考え合わせると、*S. cerevisiae* 細胞の細胞膜ATPaseは栄養素の取り込み等の必要に応じて誘導される酵素であると考えられる。しかしながら、*Z. rouxii* 細胞の細胞膜ATPaseは栄養素が豊富であるか乏しいか、増殖しているかしていないかに係わりなく、常に高い活性を示す酵素であった(図48)。*Z. rouxii* 細胞が高濃度食塩環境に置かれた場合、ナトリウムイオンなどの受動的な流入(あるいは物質透過と共役した流入)が起こることも考えられるが、実際には細胞内のナトリウムイオン濃度は低く抑えられている(38,39)。*Z. rouxii* 酵母においてその存在は現

在確認されていないが、一般に酵母にはナトリウムイオンを排出するためにナトリウムイオン・プロトン アンチポーターが細胞膜に存在していると言われおり(133)、耐塩性藻類 *D. salina* の細胞膜にも同アンチポーターが存在することが例証されている(134,135)。

*Z. rouxii* 細胞においても、おそらくナトリウムイオン・プロトンアンチポーター系を使って細胞内のナトリウムイオンを排出しているのであろうと推測される。

以上を総合して、*Z. rouxii* 細胞は、*S. cerevisiae* の細胞膜ATPaseとは活性制御機構の異なるATPase(栄養状態、生育状態に非依存的である)を持つため、常に活発にプロトンを細胞外に排出し、それにより上記のアンチポート系を駆動しナトリウムイオンを排出し、高濃度食塩環境で生存・生育できるのであると考える仮説を提唱した。

#### 7・5 小括

第6章で、高濃度食塩環境下で *Z. rouxii* 細胞が生育するために細胞膜内外で生じるプロトン勾配が重要であることを明らかにした。本章ではこのプロトン勾配の形成に関与する細胞膜ATPaseの性質を明らかにする目的で、*Z. rouxii* の細胞膜を単離し、その細胞膜ATPaseの特性を *S. cerevisiae* の弱耐塩性菌株細胞膜ATPaseと比較した。

調製した膜区分は各種阻害剤に対するATPaseの感受性からかなり純度の高い細胞膜であることを証明した。本細胞膜を用いて、含まれるATPaseの性質を検討し、以下のことを明らかにした。

(1) *Z. rouxii* の細胞膜ATPaseは *S. cerevisiae* と同様プロト

ンATPaseであった。

(2) *Z. rouxii* の細胞膜ATPaseの至適pHは6.5~7.0で、*S. cerevisiae* のそれ(pH 6.5)より若干アルカリ側であった。

(3) *Z. rouxii* の細胞膜ATPaseは *S. cerevisiae* の細胞膜ATPaseと同様マグネシウムイオン依存性であり、コバルトとマンガンイオン存在下ではマグネシウムイオンと比べ活性が約1/2になり、亜鉛とカルシウムイオン存在下では活性を示さなかった。

(4) *Z. rouxii* の細胞膜ATPaseは、*S. cerevisiae* の細胞膜ATPaseと同様にATPに特異的に作用した。

(5) ナトリウム・カリウムイオン非依存性であった。

(6) *Z. rouxii* の細胞膜ATPaseは他の耐塩性生物(藻類、植物、プランクトン)のATPaseとは多くの異なる性質を示した。

(7) *S. cerevisiae* 細胞膜ATPaseの活性は培養時期の違いや*in vivo*のグルコース処理により変化するが、*Z. rouxii* の細胞膜ATPase活性は *S. cerevisiae* と異なり、培養時期やグルコース処理によりほとんど影響されず、どのような条件下でも常に活性な状態にあることが明らかとなった。

これらの結果から以下のことが考察された。*Z. rouxii* の細胞膜ATPaseの酵素的諸性質は *S. cerevisiae* のそれと非常に類似しているが、活性制御機構が異なると推測した。即ち、*Z. rouxii* 細胞のATPaseは栄養状態・生育状態に非依存性であるので、*Z. rouxii* 細胞は常に活発にプロトンを細胞外に排出し、そのプロトン勾配を駆動力とするナトリウムイオン・プロトンアンチポーターを使ってナトリウムイオンを細胞外に排出していると推察した。

## 第8章

### 耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 細胞膜プロトンATPase遺伝子のクローニングと解析

#### 8・1 緒論

第6章で、高濃度食塩環境における耐塩性酵母 *Z. rouxii* 細胞の生育にとって細胞膜のプロトン勾配が重要であることを見出した。第7章で、その勾配の形成に関与するといわれている細胞膜プロトンATPaseの性質を検討した結果、*Z. rouxii* と *S. cerevisiae* の細胞膜ATPaseの酵素的性質は非常に類似しており、ナトリウム・カリウムイオン依存性ではなかった。しかしながら、両酵母において本酵素の活性発現機構が異なることが示唆された。即ち、*Z. rouxii* の細胞膜プロトンATPaseは *S. cerevisiae* のそれとは異なり、細胞の栄養状態（培地のグルコース濃度など）や生育状態（増殖時期の差）に非依存性であり、常に活性が高い。このことは *Z. rouxii* 細胞では常に活発にプロトンを細胞外に排出していることを意味しているであろう。そこで、*Z. rouxii* の細胞膜プロトンATPaseの構造とその活性発現の機構を明らかにするために、*Z. rouxii* の細胞膜ATPase遺伝子の単離を行うことにした。

*S. cerevisiae* 細胞の細胞膜ATPase遺伝子(PMA1)は、既にクローニングされており、PMA1の塩基配列から推定されたポリペプチドのアミノ酸配列から、そのタンパク質は918個のアミノ酸からなり、分子内に10個の疎水性領域を持つことが示されている(124)。さらに、酵母細胞の細胞膜プロトンATPaseのアミノ酸配列は動物の筋肉のカルシウムイオン依存性ATPase(149)、動物の腎臓のナトリウム・カリ

ウムイオン依存性ATPase(150)、大腸菌のカリウムイオン依存性ATPase(151)といくつかの領域で相同性を示すことが明らかにされた(124,152,153)。また、*S. cerevisiae* 細胞のプロトンATPaseの二番目の遺伝子(PMA2)がクローニングされ、PMA2の塩基配列から推定されたポリペプチドはPMA1のそれと高い相同性を持つことが示された(154)。

酵母細胞の細胞膜プロトンATPaseは膜ポテンシャルの形成、アミノ酸や他の栄養素の取り込み、有機酸の分泌に関与していると言われており(15,16,124)、*Z. rouxii* の耐塩性機構に関連して *Z. rouxii* の細胞膜プロトンATPaseの構造と機能を明らかにするために、*Z. rouxii* 細胞のプロトンATPase遺伝子をクローニングし、本酵素の構造を明らかにするとともにいろいろな培養条件での本遺伝子の発現状況を検討した。なお、本章の一部は既に学会誌に報告している(166)。

## 8・2 実験方法

### 8・2・1 使用菌株、使用培地および培養方法

本実験では、*Z. rouxii* ATCC42981(野生型)、*S. cerevisiae* X-2180-1B(MAT $\alpha$ , SUC2, mal, mel, gal2, CUP1)、*Escherichia coli* HB101(F<sup>-</sup>, hsdS20, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20(str), xyl-5, mtl-1, supE44, leuB6, thi-1)、*E. coli* DH-1(F<sup>-</sup>, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, supE44, relA1, mcrA<sup>-</sup>, mcrB<sup>+</sup>)、*E. coli* JM109(recA1,  $\Delta$ (lac-proAB), endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, relA1, supE44[F' traD36, proAB, lacI<sup>c</sup>  $\Delta$  M15])を用いた。*S. cerevisiae* 及び *Z. rouxii* は1・2・2

で述べたYM培地を用いて30°Cで振とう培養した。E. coli は前二者をLB培地 [1%(w/v)ポリペプトン、0.5%(w/v)酵母エキス、1%(w/v)食塩、pH 7.5] で、後者を2×TY培地 [1.6%(w/v)バクトトリプトン、1%(w/v)酵母エキス、0.5%(w/v)食塩、pH 7.5] を用いて37°Cで振とう培養した。また、E. coli のプレート培養は2%(w/v)寒天を含む上記培地から成るプレート上で37°Cで行った。

#### 8・2・2 E. coli 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

E. coli 細胞からのプラスミドDNA及びファージ複製型(RF型)DNAの回収はアルカリ-SDS法を用いて以下のように行った。

(1)ミニスケール: 2mlの培養液から回収したプラスミド及びファージRF型DNAを含む E. coli 細胞をリゾチーム(10mg/ml)、10mM EDTA、50mMグルコースを含む25mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に懸濁し室温で5分間放置した。2倍量の1%(w/v) SDSを含む0.2N水酸化ナトリウム液を加え、一度反転攪はんし氷上で5分間放置した。1.5倍量の氷冷7M酢酸アンモニウム(pH 7.5)を加え、一度反転攪はん後、氷上で5分間放置した。遠心分離により上澄みを得、等量のイソプロピルアルコールを加え室温で10分間放置した。遠心分離により沈澱を得、70%(v/v)エタノールで洗浄後、沈澱を乾燥した。RNase A (加熱処理済み、10 $\mu$ g/ml)を含む水を加え攪はんし遠心分離により上澄みを得た。

(2)ラージスケール: 250mlの培養液から回収したプラスミドDNAを含む E. coli 細胞をリゾチーム(2mg/ml)、10mM EDTA、5%(w/v)シヨ糖を含む25mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に懸濁し氷上で10分間放

置した。2倍量の1%(w/v) SDSを含む0.2N水酸化ナトリウム液を加え2、3回攪はん後、氷上で10分間放置した。1.25倍量の3M酢酸ナトリウム(pH 5.0)を加え2、3回攪はん後、氷上で10分間放置した。遠心分離により上澄みを得、50 $\mu$ gのRNase A(加熱処理済み)を加え37 $^{\circ}$ Cで50分間保温した。反応液を等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1,v/v)で二度抽出後、2倍量のエタノールを加え氷水中で30分間放置した。遠心分離により沈澱を回収し少量の水に溶解した。3倍量の5M食塩・13%(w/v)ポリエチレングリコール6000(1:5,v/v)を加え氷水中で一時間放置した。遠心分離により沈澱を回収し70%(v/v)エタノールで洗浄後、少量の水に溶解した。10分の1量の3M酢酸ナトリウム(pH 5.0)と2倍量のエタノールを加えDNAをエタノール沈澱した。

アガロースゲルからのDNAの回収は以下の二つの方法により行った。(1) DNA断片を含む低融点アガロースゲルを切り出し、ゲルを55 $^{\circ}$ Cで溶解した。フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1,v/v)で抽出しアガロースを除去した後、エタノール沈澱によりDNAを回収した。(2) 低融点アガロース(あるいは通常のアガロース)ゲルをヨウ化ナトリウム存在下で55 $^{\circ}$ Cで溶解後、グラスミルク(フナコシ社製)を加えDNAを吸着し、NEW溶液(食塩、トリス、EDTA、エタノールから成る水溶液、フナコシ社製)でグラスミルクを洗浄後、グラスミルクに水を加えDNAを遊離溶出した。

### 8・2・3 プローブの調製および免疫的検出法

*S. cerevisiae* のPMA1遺伝子はEMBO研究所(Heidelberg, FRG)のSerranoから分与を受けた。その遺伝子のDNA(約5 Kbp)はpUC18ベ

クターの HindIII 部位にクローン化されていた(124)。 PMA1を含む HindIII 断片の制限地図を図 49 に示した(124)。そのプラスミド DNA を E. coli DH-1 に形質転換し、上述の方法に従いプラスミド DNA をラージスケールで調製した。その DNA を EcoRI で切断後、1%(w/v) 低融点アガロースゲルを用いて電気泳動し 855 bp の EcoRI 断片を回収した。この EcoRI 断片を非放射的 DNA ラベリング・検出キット(ベーリンガー・マンハイム社製)のマニュアルに従い digoxigenin-dUTP でラベルした。簡単に述べると熱変性した EcoRI 断片(約 300ng)、ヘキサヌクレオチド(マルチプライマー) digoxigenin-dUTP を含むデオキシヌクレオチド混合液から成る反応液にクレノー酵素を加え、37°C で反応することにより digoxigenin-dUTP で DNA を非放射的にラベルし、エタノール沈澱により生じたプローブを回収した。本プローブを用いたサザンロット及びコロニーハイブリダイゼーションは Harper らが Avena sativa (oat) の細胞膜プロトン ATPase 遺伝子 DNA をプローブとして Arabidopsis thaliana の細胞膜プロトン ATPase 遺伝子をクローニングするときに用いた条件に従い(160)、以下のように行った。即ち、DNA を結合したニトロセルロースフィルターをハイブリダイゼーション溶液 [0.5%(w/v) ブロッキング試薬(ベーリンガー・マンハイム社製)、0.1%(w/v) N-ラウロイルサルコシン、0.02%(w/v) SDS を含む 5×SSC 溶液、但し、1×SSC は 0.15M 食塩を含む 15mM クエン酸ナトリウム(pH 7.0)である] に浸し、65°C で 2 時間保温後、30 ng/ml のプローブを含むハイブリダイゼーション液中で 55°C 一晩保温した。ハイブリダイズしたフィルターは 0.2%(w/v) SDS、5mM EDTA を含む 3×SSC 溶液で室温 5 分間二度洗浄し、さらに、0.2%(w/v) SDS、5mM EDTA を含む 0.3×SSC 溶液で 55°C 15 分間二度洗浄した。このフィ

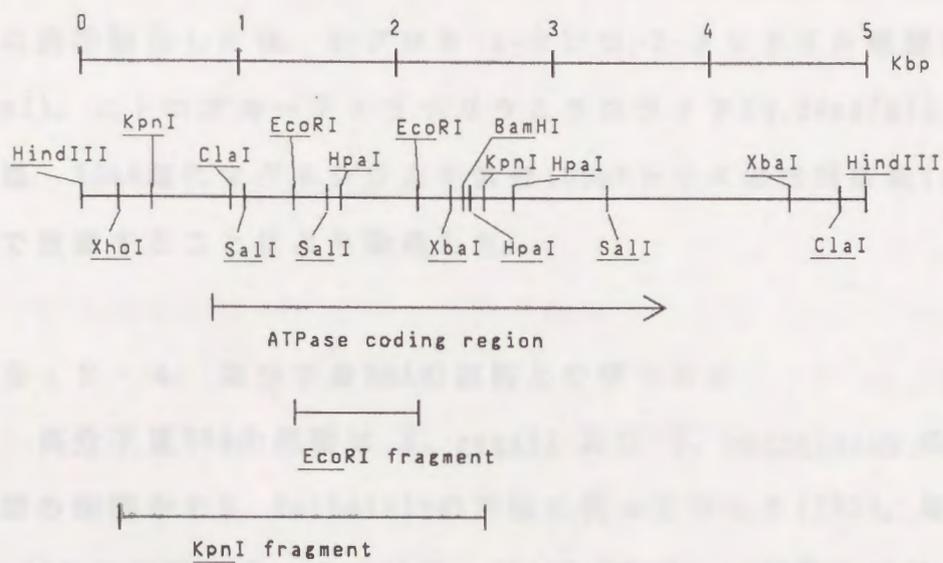


Fig. 49. Restriction Map of *Saccharomyces cerevisiae* PMA1 Gene.

ルター上の digoxigenin-dUTP を含む DNA の検出は以下のように行った。フィルターを 5000 分の 1 容量のアルカリホスファターゼ結合抗 digoxigenin 抗体 (ベーリンガー・マンアトム社製)、150mM 食塩を含む 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を用いて室温で 30 分間反応した。過剰の抗体を 150mM 食塩を含む 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で十分に洗浄除去した後、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイル燐酸 (0.16mg/ml)、ニトロブルーテトラゾリウムクロライド (0.24mg/ml)、150mM 食塩、50mM 塩化マグネシウムを含む 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.5) 中で放置することにより染色した。

#### 8・2・4 高分子量 DNA の調製とサザン分析

高分子量 DNA の調製は *Z. rouxii* 及び *S. cerevisiae* の対数期後期の細胞から R. Rothstein の方法に従って行った (155)。培養液 (40 ml) から細胞を得、チモリアーゼ 100-T を用いて細胞をスフェロプラスト化した。スフェロプラストを遠心分離により回収し、SDS (約 0.4%) 存在下で 65°C で加熱処理後、酢酸カリウム (約 0.8M) 存在下で水中で放置した。遠心分離により上澄みを得、エタノール沈澱により DNA を回収し RNase A (加熱処理済み、50  $\mu$ g/ml) を加え RNA を分解した。フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1, v/v) で抽出後、エタノール沈澱により DNA を回収し適量の TE [1mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)] に溶解し 4°C で保存した。調製した DNA 分子量はアガロースゲル電気泳動により 30 Kbp 以上であり、本方法で 10 から 40  $\mu$ g の DNA が得られた。

DNA 試料 (約 1  $\mu$ g) を適当な制限酵素 (HindIII、EcoRI、SalI、KpnI、BamHI、PstI) で切断し、0.7% (w/v) アガロースゲルを用いて電気泳動

後、ゲルを0.25M塩酸中で5分間、0.5M水酸化ナトリウム・1.5M食塩溶液中で15分間二度、多量の1.5Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)・1.5M食塩溶液中で30分間浸した。ゲル中のDNAを常法(156)に従い、10×SSCを用いて、毛細管現象的にニトロセルロースフィルターに移し80°C4時間フィルターをベークした。免疫的検出はdigoxigeninでラベルしたプローブを用いて8・2・3で述べた方法に従って行った。

#### 8・2・5 Z. rouxii の細胞膜プロトンATPase遺伝子のクローニング

2M食塩を含むYM培地中で対数期後期まで培養した Z. rouxii 細胞から、上述の R. Rothstein の方法に従い高分子量DNAを調製した(155)。DNA試料(約35 $\mu$ g)をHindIIIで切断し、1%(w/v)低融点アガロースゲルを用いて分離した。上述の方法に従い、3から6 Kbp長のDNA断片をゲルから回収した。Z. rouxii DNAのHindIII断片(約250 ng)とHindIIIで切断したCharomid 9-36コスミドベクター(約2 $\mu$ g、ニッポンジーン社製)をT4 DNAリガーゼを用いて結合した。このライゲートしたDNAをDNAパッケージングキット(TAKARA社製)を用いてin vitroでパッケージングした。生じたコスミドファージ顆粒を E. coli DH-1細胞に感染させた。Charomid 9-36ベクター上にはアンピシリン耐性遺伝子が存在するので、この組換え体を用いて形質転換した E. coli はアンピシリンを含むLBプレート上でコロニーを形成する。結果的に、全ライゲートDNAから $2 \times 10^6$ コロニー(クローン)の Z. rouxii 染色体DNAライブラリーを調製できた。図50に Z. rouxii 染色体DNAライブラリーの作製方法を図示した。アンピシリン(100 $\mu$ g/ml)を含むLBプレート上に乗せたニトロセルロースフィル

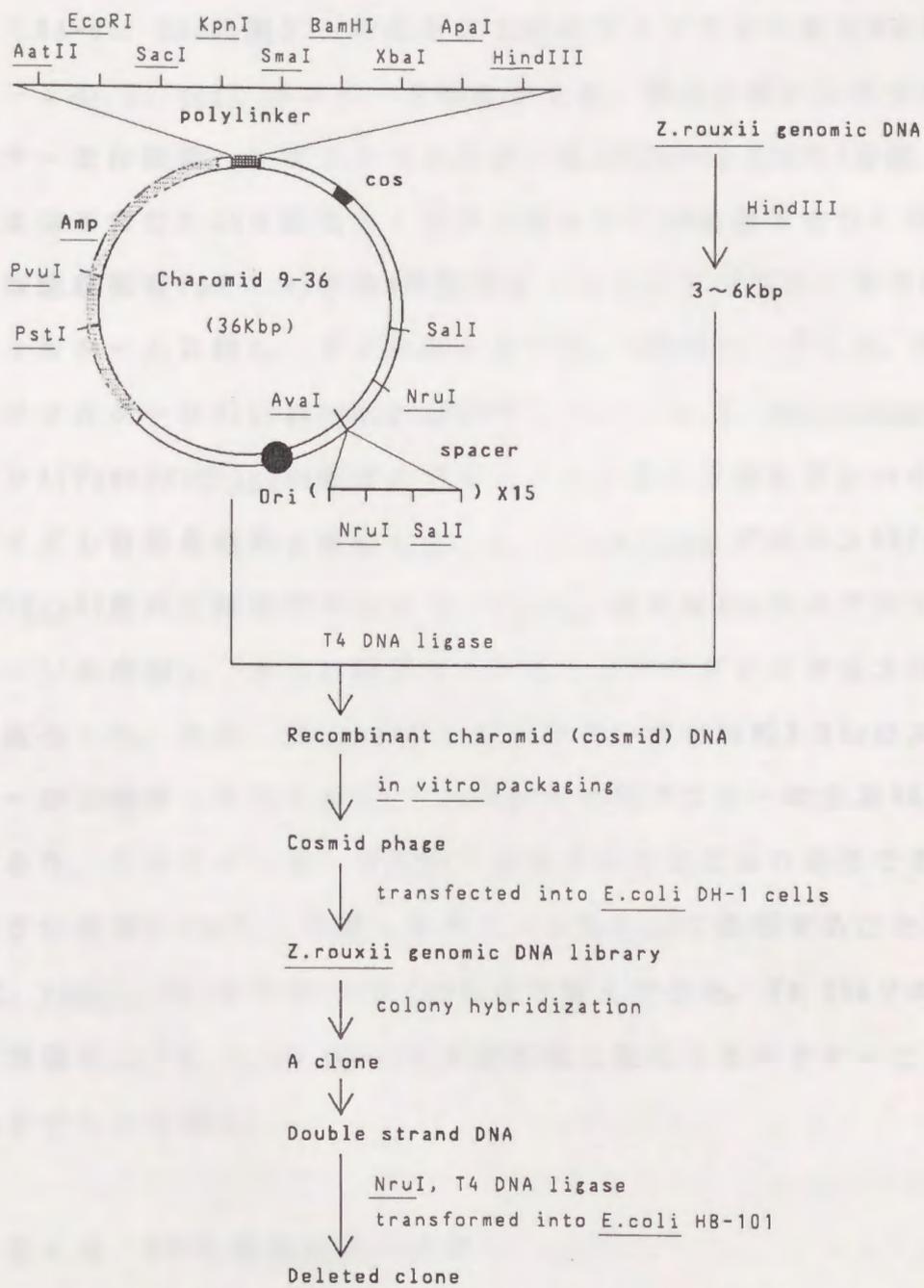


Fig. 50. Constructions of *Zygosaccharomyces rouxii* Genomic DNA Library and Deleted Clone.

ター (BA-85、S&S社製) 一枚の上に上記のライブラリーから  $5 \times 10^3$  クローンの *E. coli* コロニーを形成させた。常法に従いレプリカフィルターを作製後、レプリカフィルターを10%(w/v) SDSで3分間、1.5M食塩を含む0.5N水酸化ナトリウム液及び1.5M食塩を含む0.5Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)で各5分間浸すことによりコロニー中のDNAをフィルター上に移し、フィルターを80°C、4時間ベークした。得られたフィルターはdigoxigenin-dUTPでラベルした *S. cerevisiae* プロトンATPaseDNAのEcoRI断片のプロープと上述の方法に従いハイブリダイズし酵素免疫的に検出した。*S. cerevisiae* プロトンATPase DNAのEcoRI断片と相同性を示す *Z. rouxii* 染色体DNAライブラリークローンを選別し、さらに同プロープとハイブリダイズするコロニーを純化した。また、Charomid 9-36ベクター中には約2 Kbpのスペーサーが15個挿入されており、Charomid 9-36ベクターは全長36 Kbpであり、このスペーサーはNruIで処理することにより除去できる(図50参照)(157)。単離したクローンもNruIで処理することにより *Z. rouxii* DNAを含めて10 Kbpにまで短くできた。T4 DNAリガーゼで再環化し、*E. coli* HB101に形質転換し短化したベクターに由来するクローンを得た。

#### 8・2・6 DNAの塩基配列の決定

*Z. rouxii* プロトンATPase遺伝子は得られたクローンのHindIII断片(約6 Kbp)に存在するらしいので、上述した短化 *Z. rouxii* プロトンATPaseクローンからプラスミドDNAを回収しHindIIIで切断しアガロースゲル電気泳動後、ゲルから6 KbpのDNA断片を回収した。そのHindIII断片の制限酵素地図を6塩基認識酵素を用いて作製した(図

51)。それらの制限酵素により生じるDNA断片をM13ファージのmp18あるいはmp19ベクターにサブクローニングした。それらの組換えファージに由来する一本鎖DNAを以下に述べる方法に従い調製した。即ち、M13ファージを含む *E. coli* JM109培養液上澄み(約1ml)に200 $\mu$ lの40%(w/v)ポリエチレングリコール6000・5M食塩(1:1,v/v)を加え攪はん後、室温で15分間放置した。遠心分離によりファージ顆粒を回収後、少量のTEに溶解し1/2量のフェノール(TE飽和)で抽出し、ファージ顆粒を破壊した。得られた水層を等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1,v/v)で抽出した。得られた水層から2.5倍量のエタノールを用いたエタノール沈澱により一本鎖DNAを回収した。調製したDNAの約半分を一回のシーケンス反応に用いた。この一本鎖DNAを鋳型とし7-デアザ-dGTPを含むシークエナーゼDNAシーケンスキット(United States Biochemical社製)を用いてジデオキシチェーンターミネーション法(158)に従い、種々の長さの標識DNAを作製した。なお、 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ dCTP(アマーシャム社製、1000Ci/mmol)をトレーサーとしシークエナーゼを用いて行った。反応液を7M尿素を含む6%(w/v)ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動しゲルを乾燥した後、ゲルのシーケンスラダーのオートラジオグラムを得た。塩基配列の編集、塩基及びアミノ酸配列のホモロジー検索、タンパク質の疎水性度測定はGENETYX(ソフトウェア開発社製)のプログラムを用いて行った。

#### 8・2・7 全RNAの調製とノーザン分析

全RNAはCarlsonとBotsteinの方法(159)に従い調製した。対数期中期まで0M食塩培地で培養した *S. cerevisiae* と *Z. rouxii* 及び2M

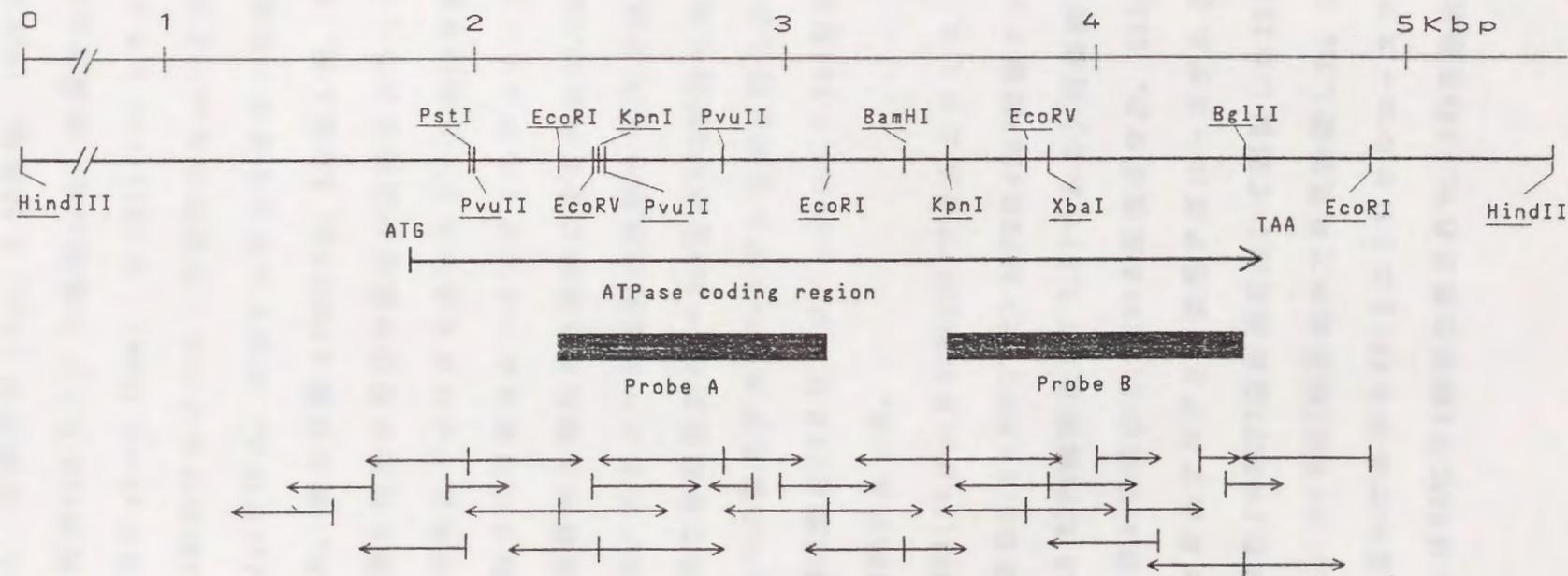


Fig. 51. Restriction Map of *Zygosaccharomyces rouxii* PMA1 Gene and Strategy for Sequencing

食塩培地で培養した *Z. rouxii* 培養液(100ml)から、遠心分離により細胞を集菌し、冷破碎液 [8ml; 0.5M食塩、10mM EDTAを含む0.2M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)] に懸濁した。懸濁液に8gの酸洗浄ガラスビーズ(直径0.45~0.50mm)、0.1%(v/v)ジエチルピロカーボネート(DEPC)、4mlのフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1,v/v)を加え、ボルテックスミキサーを用いて、5分間激しく攪はんした。遠心分離(1600×g、5分間)後、最上層(水相)を採取した。得られた水相は中間相が認められなくなるまでフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出を繰り返し行った。得られた水相はクロロホルム・イソアミルアルコール(24:1,v/v)抽出を行った。最終的に得られた水相に含まれるRNAはエタノール沈澱により回収した。エタノール沈澱の状態で-85°Cで使用時まで保存した。上記の条件で全細胞から2~4mgの全RNAが得られた。得られた全RNAは以下に述べる変性アガロースゲル電気泳動による25SリボソームRNA(3.4 Kb)量と18SリボソームRNA(1.7 Kb)量の比較から分解されていないRNAであった。

調製した全RNA(15μg)を50%(v/v)フォルムアミド、2.15Mフォルムアルデヒドを含む0.5×MOPS [5×MOPSは40mM酢酸ナトリウム、5mM EDTAを含む0.1M MOPS緩衝液(pH 7.0)である] 緩衝液に溶解し、65°C、5分間加熱し、次いで急冷し、RNAを変性させた。RNA溶液に色素液を加えた後、フォルムアルデヒド変性アガロースゲル [2.2Mフォルムアルデヒドを含む1×MOPS緩衝液を用いて調製した1%(w/v)アガロースゲル] に供し、1×MOPS緩衝液中で電気泳動した。20×SSCを用いて常法(156)に従いゲルからRNAをニトロセルロースフィルターに移し、フィルターは80°Cで4時間加熱された。RNAを結合したフィルタ

ーはハイブリダイゼーション溶液 [2%(w/v)ブロッキング試薬、0.1%(w/v) N-ラウコイルサルコシン、0.02%(w/v) SDSを含む5×SSC] に浸し、68°Cで2時間保温後、50ng/mlのdigoxigeninでラベルしたプローブを含むハイブリダイゼーション溶液中で68°Cで一晩保温した。ハイブリダイズしたフィルターは0.1%(w/v) SDSを含む2×SSC、68°Cで二度洗浄し、次いで0.1%(w/v) SDSを含む0.1×SSC、68°Cで二度洗浄した。以下の免疫的検出は8・2・3で述べた方法に従って行った。

#### 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

0M食塩培地で培養した S. cerevisiae と Z. rouxii 細胞、2M食塩培地で培養した Z. rouxii 細胞から7・2・5で述べた方法に従って細胞膜を調製した。60μgのタンパク質を含む細胞膜試料を4・2・6で述べた方法に従ってSDS-ポリアクリルアミドゲル [7.5%(w/v)] を用いて電気泳動した。

### 8・3 結果

#### 8・3・1 Z. rouxii プロトンATPase遺伝子クローンの単離

S. cerevisiae の細胞膜プロトンATPase遺伝子(PMA1)は既に抗酵母プロトンATPase抗体を用いてλgt11発現ライブラリーをスクリーニングすることによりクローン化されている(124)。Z. rouxii の細胞膜プロトンATPase遺伝子を単離するために、S. cerevisiae プロトンATPase遺伝子のDNAと Z. rouxii 染色体ライブラリーのDNAとのクロスハイブリダイゼーションを行うことにした。プローブとしてEcoRI断片(855 bp)を用いたが、その断片は S. cerevisiae プロト

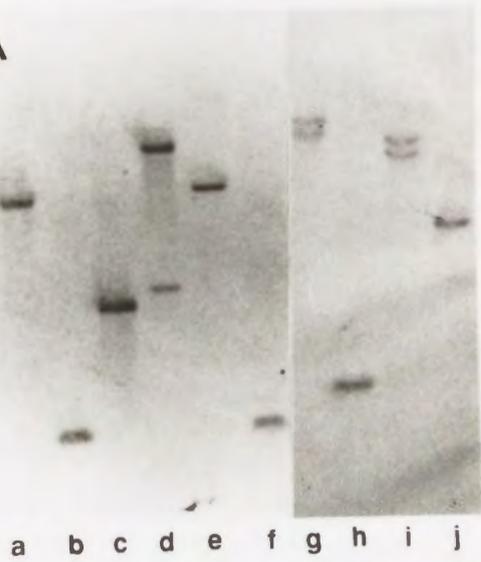
ンATPaseのコーディング領域を含み、また種々のATPaseにおいて保存されている10領域の中6領域を含んでいるものである。

*S. cerevisiae* 及び *Z. rouxii* 高分子量DNAをHindIII、KpnI、EcoRIで切断し、*S. cerevisiae* プロトンATPaseDNAのEcoRI断片をプローブとしてサザン分析を行った。その結果を示した図52のように、*Z. rouxii* の幾つかのDNA断片がそのプローブとハイブリダイズしたが、*Z. rouxii* のDNA断片から生じる発色の程度は *S. cerevisiae* のDNA断片の発色より弱かった。この差は *S. cerevisiae* と *Z. rouxii* のプロトンATPase遺伝子の塩基配列の部分的な差異を反映していると推測した。EcoRI断片は両酵母においてほぼ同じ長さであったが、*S. cerevisiae* の場合と比べて *Z. rouxii* のHindIII断片の長さは幾分長く、KpnI断片の長さは著しく短かった。*S. cerevisiae* のプロトンATPase遺伝子のコーディング領域はHindIII断片中に存在しており、*Z. rouxii* において *S. cerevisiae* のプローブとハイブリダイズするHindIII断片の長さが *S. cerevisiae* のHindIII断片よりも長かったので、*Z. rouxii* のプロトンATPaseの遺伝子もHindIII断片中に存在するであろうと推定した。そこで、*Z. rouxii* の染色体（高分子量）DNAのHindIII断片を *E. coli* ベクターのCharomid 9-36ベクターに挿入した。

*Z. rouxii* DNAのHindIII断片(3から6 Kbp)を挿入したCharomid 9-36ベクターで形質転換した $5 \times 10^4$ 個の *E. coli* コロニーを、前述の *S. cerevisiae* EcoRIプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。結果的に、45個のポジティブクローンが得られた。その中から最も強く反応した2つのクローン(Z1612、Z3551)を選び出し、各クローンからプラスミドDNAを調製し

Kbp **A**

9.4-  
6.6-  
4.4-  
2.3-  
2.0-  
0.56-



Kbp **B**

9.4-  
6.6-  
4.4-  
2.3-  
2.0-  
0.56-

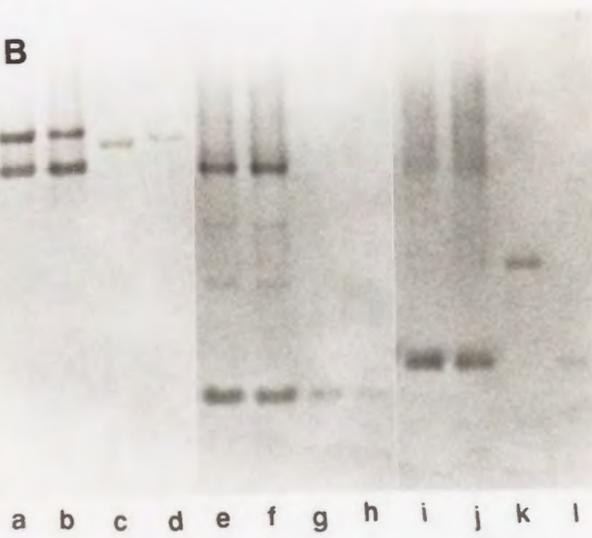


Fig. 52. Southern Blot Analysis of Genomic DNAs of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces rouxii* Cells and Cloned *Zygosaccharomyces rouxii* PMA1 Gene.

A, The genomic DNAs extracted from *S. cerevisiae* cells ( $2\mu\text{g}$ ) and *Z. rouxii* cells ( $4.6\mu\text{g}$ ) were digested with various restriction enzymes. Hybridization was carried out using the *EcoRI* fragment (855bp) from *S. cerevisiae* PMA1 gene as a probe.

Lanes a-d, *S. cerevisiae* genomic DNA digested with *HindIII*, *EcoRI*, *KpnI*, and *PstI*, respectively; lanes e-j, *Z. rouxii* genomic DNA digested with *HindIII*, *EcoRI*, *SalI*, *KpnI*, *BamHI*, and *PstI*, respectively.

B, The genomic DNAs extracted from *S. cerevisiae* cells ( $1\mu\text{g}$ ) and *Z. rouxii* cells ( $1\mu\text{g}$ ) and the DNAs isolated from charomid 9-36 clones containing *Z. rouxii* PMA1 gene ( $1\mu\text{g}$ ). Hybridization was carried out using *EcoRI* fragment from *S. cerevisiae* PMA1 gene.

Lanes a, e and i, a clone (Z1612) DNA; lanes b, f and j, a clone (Z3551) DNA; lanes c, g and k, *S. cerevisiae* genomic DNA; lanes d, h and l, *Z. rouxii* genomic DNA; lanes a-d, DNA digested with *HindIII*; lanes e-h, with *EcoRI*; lanes i-l, with *KpnI*.

The size (in Kbp) and positions of *HindIII*-cleaved Lambda DNA marker are indicated. The position of uncut charomid 9-36 clone DNA is indicated by arrow.

挿入した HindIII 断片を回収した。その断片の制限酵素地図を作製した。図 5 1 に Z3551 クローンの地図を示した。Z1612 クローンの地図は Z1612 HindIII DNA 中に XhoI 部位が存在したこと、PvuII 部位の数が異なっていたこと以外は調べた制限酵素について同じであった。制限酵素部位の異なるクローンが存在すること、SalI と BamHI 消化した染色体 DNA のサザン分析で二本のバンドを示したこと (図 5 2) は、Z. rouxii 細胞には少なくとも二つ以上のプロトン ATPase 遺伝子が存在することを示唆している。

#### 8・3・2 Z. rouxii 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

クローニングした Z. rouxii DNA の HindIII 断片 (約 6 Kbp) 中の EcoRI 断片と KpnI 断片が S. cerevisiae EcoRI プローブとハイブリダイズしたので (図 5 2)、上記 HindIII 断片の EcoRI 及び KpnI 部位周辺を図 5 1 に示したストラテジーに従い塩基配列を決定した。その結果を図 5 3 に示した。その配列には一つの大きなオープンリーディングフレームが存在した。さらに、上流 -143 bp の位置に共通 TATA 配列 (TATAAAA) が見いだされ、終止コドンから下流 180 bp にポリアデニレーション部位様配列 (AATAA) が見いだされた。そのフレームはメチオニンを含めて 920 個のアミノ酸をコードしており、本遺伝子 (以下、Z. rouxii PMA1 遺伝子と略するが、後述するように S. cerevisiae のプロトン ATPase の PMA1 に非常に類似することによる) から推定されるタンパク質の分子量は、100,060 であった。S. cerevisiae の PMA1 遺伝子のコードするプロトン ATPase は 918 個のアミノ酸からなり、推定分子量は 99,532 (124)、S. cerevisiae のもう一種の PMA2 遺伝子



Fig. 53. Nucleotide Sequence of *Zygosaccharomyces rouxii* Plasma Membrane ATPase Gene and the Deduced Amino Acid Sequence.

TATA box, initiation codon, stop codon, and polyadenylation site were boxed. The amino acid sequences that are homologous to the other plasma membrane ATPases were underlined. The peptide motifs that participate with ATPase functions were double-underlined. The transmembrane regions were broken-underlined.

由来のプロトンATPaseは947個のアミノ酸からなる分子量102,157 (154)、S. pombe プロトンATPaseは919アミノ酸、分子量99,765 (161)、N. crassa プロトンATPaseは920アミノ酸、分子量99,886であり(162)、これらは互いに非常に類似していた。特に、Z. rouxii PMA1遺伝子の塩基配列は S. cerevisiae PMA1とPMA2遺伝子に対してそれぞれ、82%と75%の相同性を示し、アミノ酸配列は83%と80%の相同性を示した。しかしながら、3'あるいは5'フランキング領域の塩基配列は相同性は認められなかった。但し、3'フランキング領域で S. cerevisiae PMA2遺伝子においてCACAの反復配列が存在するが(154)、Z. rouxii PMA1遺伝子の同領域に同配列が見いだされた(S. cerevisiae PMA1遺伝子では塩基配列が発表されていない)。また、S. cerevisiae と Z. rouxii 遺伝子のアミノ酸配列においてN末端領域(N末から約60アミノ酸)では著しい差異が認められた。

特に S. cerevisiae PMA1とPMA2遺伝子に由来するタンパク質のN末端領域はセリンに富むが、Z. rouxii PMA1遺伝子のタンパク質ではGluに富んでいた。

### 8・3・3 他種の細胞膜プロトンATPaseとのアミノ酸配列比較

Serranoら(124,152,153)及びHagerら(162)はそれぞれ S. cerevisiae プロトンATPase(PMA1)と N. crassa プロトンATPase遺伝子から推定されるアミノ酸配列をラット Sarcoplasmic reticulum のカルシウムイオン依存性ATPase(149)、羊腎臓のナトリウム・カリウムイオン依存性ATPase(150)、大腸菌カリウムイオン依存性ATPaseのアミノ酸配列(151)と比較し、非常に相同性の高い領域が存在しそれらの領域はいろいろなATPaseにおいてよく保存されていることを示し

た。そこで、*Z. rouxii* PMA1遺伝子から推定されるアミノ酸配列から、それらの領域の相当部分を図54に示した。上述の *S. cerevisiae* プロトンATPases(PMA1とPMA2)(124,154)、*S. pombe* プロトンATPase(161)と *N. crassa* プロトンATPaseの配列(162)を比較のために示した(図54)。*Z. rouxii* プロトンATPaseのそれらの領域は他種の酵母及び糸状菌の細胞膜プロトンATPaseと非常に類似していた。これらの結果は遺伝子の面からも *Z. rouxii* のATPaseはプロトンATPaseであることを証明している。

図55に *S. cerevisiae* PMA1と *Z. rouxii* PMA1遺伝子から推定されるアミノ酸配列から、KytoとDoolittle(163)により示された各アミノ酸についてのパラメーターを用いて前後15アミノ酸のウィンドウについてタンパク質の疎水度を計算した結果を示した。両タンパク質の疎水性プロファイルは非常に類似していた。また、*S. cerevisiae* PMA1遺伝子から推定されるATPaseのアミノ酸配列から、*S. cerevisiae* のプロトンATPaseが10個のtransmembrane領域を持つことが示された(図55)(124)。*Z. rouxii* PMA1から推定されるATPaseのアミノ酸配列はそれらの領域と高い相同性を示した。図56に *S. cerevisiae* プロトンATPases(PMA1とPMA2)(124,154)、*S. pombe* プロトンATPase(161)、*N. crassa* プロトンATPase(162)のアミノ酸配列の相同性の比較を示しているが、特に、領域v、vi、viiに著しい相同性が認められる。*Z. rouxii* と *S. cerevisiae*(PMA1)のATPaseで、これらの領域のアミノ酸の変化は主にロイシン、イソロイシン、バリンの間で起こっていることが認められた(約50%)。このことは *Z. rouxii* のプロトンATPaseタンパク質も膜を突き抜けた膜タンパク質であることを示している。

Regions	Yeasts	Sequences
a	<i>Z. rouxii</i>	193 APANEIVPGDILKLEDGAVIPTDGRLVTEECFLQVDDSSITGESLAVDKH
	<i>S. cerevisiae</i> 1	191 IPANEVVPGDILKLEDGTVIPTDGRIVTEDCFLQVDDSSAITGESLAVDKH
	<i>S. cerevisiae</i> 2	238 IPANEVVPSEIILQLESSTIAPNDGRIVTEDCFLQVDDSSAITGESLAAEKH
	<i>S. pombe</i>	188 LEANEVVPGDILKLEDGTVIICADGRVVTFDVHLQVDDSSAITGESLAVDKH
	<i>N. crassa</i>	191 IEAFEVVPGDILQVEEGTIIIPADGRIVTDDAFLOVDDSSAITGESLAVDKH
b	<i>Z. rouxii</i>	247 VFSSTVKPGEFGFMIVTATGDNTFVGRAASLVNAAAGGQGH
	<i>S. cerevisiae</i> 1	245 TFSSTVKRGEFGFMVVTATGDNTFVGRAAALVNKAAGGQGH
	<i>S. cerevisiae</i> 2	274 VFSSTVKTGEAFMVTATGDNTFVGRAAALVQAASGVEGH
	<i>S. pombe</i>	243 TFASSGVKRGEGLMVVTATGDSIFVGRAASLVNAAAGGTGH
	<i>N. crassa</i>	245 VFASSAVKRGEAFVVIITATGDNTFVGRAAALVNAASGSGH
c	<i>Z. rouxii</i>	329 LGITIVGVPVGLPAVVTTTNAVGAAYLAKKQAIQKLSAIESLAGVEILCSDKTGTLTKNK
	<i>S. cerevisiae</i> 1	327 LGITIIIGVPVGLPAVVTTTNAVGAAYLAKKQAIQKLSAIESLAGVEILCSDKTGTLTKNK
	<i>S. cerevisiae</i> 2	356 LGITIIIGVPVGLPAVVTTTNAVGAAYLAKKQAIQKLSAIESLAGVEILCSDKTGTLTKNK
	<i>S. pombe</i>	325 LAITIIIGVPVGLPAVVTTTNAVGAAYLAKKQAIQKLSAIESLAGVEILCSDKTGTLTKNK
	<i>N. crassa</i>	327 LAITIIIGVPVGLPAVVTTTNAVGAAYLAKKQAIQKLSAIESLAGVEILCSDKTGTLTKNK
d	<i>Z. rouxii</i>	473 TCVKGAPIFVLKTVEEDHPIPEDVHENYENKVAELA
	<i>S. cerevisiae</i> 1	471 VCVKGAPISALKTVEEDHPIPEDVHENYENKVAELA
	<i>S. cerevisiae</i> 2	500 VCVKGAPL FVLKTVEEDHPIPEDVHENYENKVAELA
	<i>S. pombe</i>	469 TCVKGAPL FVLKTVEEDHPIPEDVLSAYKQKVEDLA
	<i>N. crassa</i>	471 TCVKGAPL FVLKTVEEDHPIPEDVDAATKKNKVAEFA
e	<i>Z. rouxii</i>	536 DPPRDDTAATVNEAKRLGLSVKMLTGDVAVGIAK
	<i>S. cerevisiae</i> 1	534 DPPRDDTAVSEARHLGLRVKMLTGDVAVGIAK
	<i>S. cerevisiae</i> 2	563 DPPRDDTACTINEARMLGLRIKMLTGDVAVGIAK
	<i>S. pombe</i>	531 DPPRHDTARTISEAKRLGLRVKMLTGDVAVGIAK
	<i>N. crassa</i>	534 DPPRHDTYKTVCEAKTLGLSIKMLTGDVAVGIAR
f	<i>Z. rouxii</i>	605 NADGFAEVFPQHKFAVVPILQQRGYLVAHTGDGVNDAPSLKKADTGIAVEGATDAARSAAD
	<i>S. cerevisiae</i> 1	603 NADGFAEVFPQHKYRVVEILQNRGYLVAHTGDGVNDAPSLKKADTGIAVEGATDAARSAAD
	<i>S. cerevisiae</i> 2	632 NADGFAEVFPQHKYRVVEILQNRGYLVAHTGDGVNDAPSLKKADTGIAVEGATDAARSAAD
	<i>S. pombe</i>	601 AADGFGEVFPQHKYAVVDILQQRGYLVAHTGDGVNDAPSLKKADTGIAVEGATDAARSAAD
	<i>N. crassa</i>	603 AADGFAEVFPQHKYRVVEILQQRGYLVAHTGDGVNDAPSLKKADTGIAVEGSSDAARSAAD

Fig. 54. Amino Acid Homology between the Conserved Sequences in Various Kinds of ATPases and *Zygosaccharomyces rouxii* Plasma Membrane ATPases.

The corresponding sequences of four kinds of plasma membrane proton-ATPase from yeast and fungus cells were shown. Residues identical to one of *Z. rouxii* plasma membrane proton-ATPase were boxed.

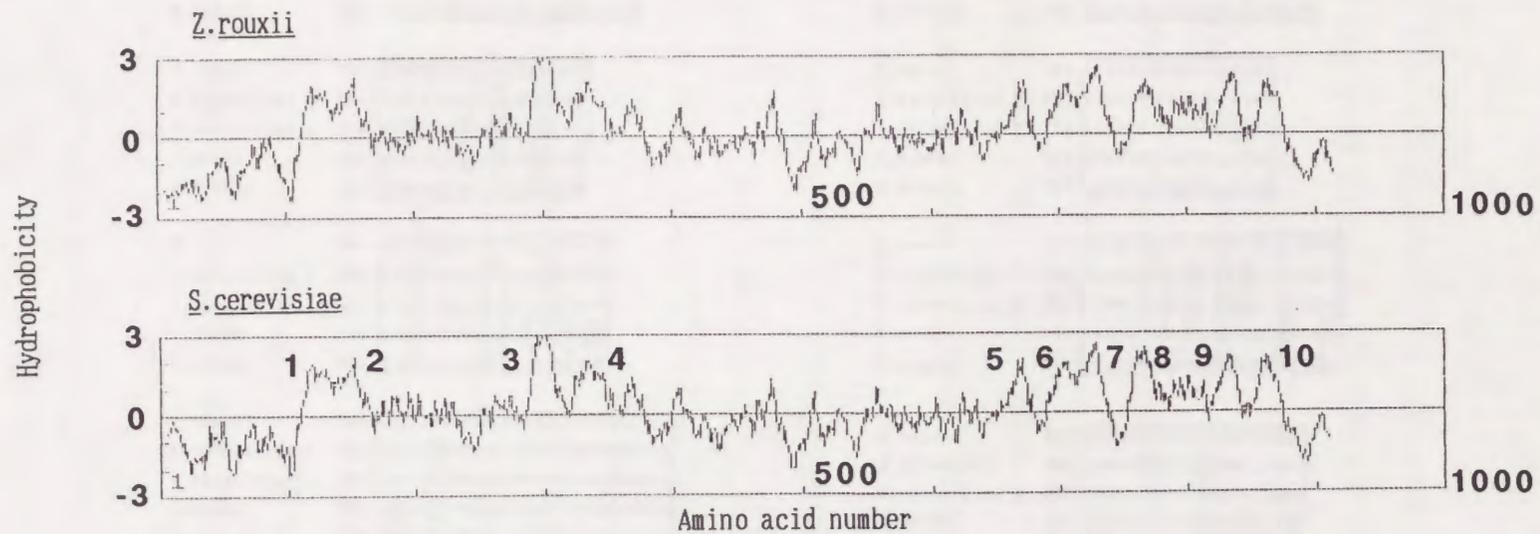


Fig. 55. Hydrophobicity Profiles of Plasma Membrane ATPases from *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

Hydrophobicity were determined as the averaged values over spans of 15 amino acids by using the amino acid parameter of Kyte and Doolittle (*J. Molec. Biol.*, 157, 105-132 (1982)).

Regions	Yeasts	Sequences	Regions	Yeasts	Sequences
i	<i>Z. rouxii</i>	114 LLVKFVNFVGPVGFVMEAAVLA	vi	<i>Z. rouxii</i>	694 VVYRIALSLHLEIFLGLVIAIL
	<i>S. cerevisiae</i> 1	112 LVVKFVNFVGPVGFVMEAAVLA		<i>S. cerevisiae</i> 1	672 VVYRIALSLHLEIFLGLVIAIL
	<i>S. cerevisiae</i> 2	141 LVVKFVNFVGPVGFVMEAAVLA		<i>S. cerevisiae</i> 2	721 VVYRIALSLHLEIFLGLVIAIL
	<i>S. pombe</i>	110 PFLKFNFFVGPVGFVMEAAVLA		<i>S. pombe</i>	690 VVYRIALSLHLEIFLGLVIAIL
	<i>N. crassa</i>	113 FLKFLGFFVGPVGFVMEAAVLA		<i>N. crassa</i>	692 VVYRIALSLHLEIFLGLVIAIL
ii	<i>Z. rouxii</i>	143 VVDFGVICGLLFLNAGVGFV	vii	<i>Z. rouxii</i>	723 LTVFIAIFADVATLAIAY
	<i>S. cerevisiae</i> 1	141 VVDFGVICGLLFLNAGVGFV		<i>S. cerevisiae</i> 1	721 LIVFIAIFADVATLAIAY
	<i>S. cerevisiae</i> 2	170 VVDFGVICGLLFLNAGVGFV		<i>S. cerevisiae</i> 2	750 LIVFIAIFADVATLAIAY
	<i>S. pombe</i>	139 VVDFGVICGLLFLNAGVGFV		<i>S. pombe</i>	719 LVVFIAIFADVATLAIAY
	<i>N. crassa</i>	141 VVDFGVICGLLFLNAGVGFV		<i>N. crassa</i>	721 LVVFIAIFADVATLAIAY
iii	<i>Z. rouxii</i>	294 GIGVILLVIVITLLLVITACF	viii	<i>Z. rouxii</i>	757 LVGNSIMMGIILAAGTWTITMFL
	<i>S. cerevisiae</i> 1	292 GIGVILLVIVITLLLVITACF		<i>S. cerevisiae</i> 1	755 LVGNSIMMGIILAAGTWTITMFL
	<i>S. cerevisiae</i> 2	321 GIGVILLVIVITLLLVITACF		<i>S. cerevisiae</i> 2	784 LVGNSIMMGIILAAGTWTITMFL
	<i>S. pombe</i>	290 GIGVILLVIVITLLLVITACF		<i>S. pombe</i>	753 LVGNSIMMGIILAAGTWTITMFL
	<i>N. crassa</i>	292 GIGVILLVIVITLLLVITACF		<i>N. crassa</i>	755 LVGNSIMMGIILAAGTWTITMFL
iv	<i>Z. rouxii</i>	329 LGITIVGVPVGLPAVVTTTMAVGAAYLA	ix	<i>Z. rouxii</i>	827 LAGAVFVVDVIVTMFTLFGWV
	<i>S. cerevisiae</i> 1	327 LGITIVGVPVGLPAVVTTTMAVGAAYLA		<i>S. cerevisiae</i> 1	825 LAGAVFVVDVIVTMFTLFGWV
	<i>S. cerevisiae</i> 2	356 LGITIVGVPVGLPAVVTTTMAVGAAYLA		<i>S. cerevisiae</i> 2	854 LAGAVFVVDVIVTMFTLFGWV
	<i>S. pombe</i>	325 LAITIVGVPVGLPAVVTTTMAVGAAYLA		<i>S. pombe</i>	825 LAGAVFVVDVIVTMFTLFGWV
	<i>N. crassa</i>	327 LAITIVGVPVGLPAVVTTTMAVGAAYLA		<i>N. crassa</i>	827 LAGAVFVVDVIVTMFTLFGWV
v	<i>Z. rouxii</i>	662 SAADIVFLAPGLSAIIDAL	x	<i>Z. rouxii</i>	854 IVTVVRIYVWSIGIFCCLGGAYY
	<i>S. cerevisiae</i> 1	660 SAADIVFLAPGLSAIIDAL		<i>S. cerevisiae</i> 1	825 IVTVVRIYVWSIGIFCCLGGAYY
	<i>S. cerevisiae</i> 2	689 SAADIVFLAPGLSAIIDAL		<i>S. cerevisiae</i> 2	881 IVTVVRIYVWSIGIFCCLGGAYY
	<i>S. pombe</i>	658 SAADIVFLAPGLSAIIDAL		<i>S. pombe</i>	853 IVTVVRIYVWSIGIFCCLGGAYY
	<i>N. crassa</i>	660 SAADIVFLAPGLSAIIDAL		<i>N. crassa</i>	854 IVTVVRIYVWSIGIFCCLGGAYY

Fig. 56. Amino Acid Homology in Transmembrane Regions between Four Kinds of Plasma Membrane ATPase.

The corresponding sequences of four kinds of plasma membrane proton-ATPase from yeast and fungus cells were shown. Residues identical to one of *Z. rouxii* plasma membrane proton-ATPase were boxed.

表XVIに *Z. rouxii* と *S. cerevisiae* 遺伝子(PMA1)のコドン利用度を示した。バリン、イソロイシン、セリン、スレオニン、アラニン、アルギニン、グリシンにおいて第三番目のヌクレオチドがTかCであるコドンの利用度が高く、両遺伝子のコドン利用度は非常に類似していた。この結果及び両遺伝子の塩基配列が類似していることは両遺伝子が同じ祖先から由来していることを示唆している。

#### 8・3・4 プロトンATPase機能領域の比較

*Z. rouxii* のプロトンATPase機能領域を他種のそれらと比較した。*S. cerevisiae* のプロトンATPaseのホスファターゼ領域としてTGESモチーフがホスファターゼ活性の活性中心に存在することが報告されているが(153)、*Z. rouxii* においても同じ配列が存在した(図54、領域a)。ATPaseのリン酸化中間体(phosphorylated intermediate)がDKTGTLTモチーフのアスパラギン酸(D)で形成されることが示されているが(153)、*Z. rouxii* においても同じ配列が存在し、その前後のアミノ酸配列はよく類似していた(図54、領域c)。また、ATP結合領域としてDPPRモチーフ、MLTGDモチーフ、GDGVNDAPSLKモチーフのアスパラギン酸(D)がATP結合に関与していることも示されている(153)、これらのモチーフも *Z. rouxii* ATPaseのアミノ酸配列に存在し、その前後のアミノ酸配列はよく類似していた(図54、領域eとf)。さらに、N末端近辺(98-101)のRR(K/R)KモチーフのKは細胞質のカリウムイオンやプロトンの結合に関係するらしい(154)。

#### 8・3・5 プロトンATPase遺伝子の発現

Table XVI. Codon Usage for Yeast Proton-ATPase Genes from *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

AA <sup>a)</sup>	Codon	<i>Z. rouxii</i>	<i>S. cerevisiae</i> <sup>b)</sup>	AA	Codon	<i>Z. rouxii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
F	TTT	9	6	A	GCA	7	2	
	TTC	31	31		GCG	2	0	
L	TTA	10	16	Y	TAT	2	2	
	TTG	65	62		TAC	17	20	
	CTT	4	0	H	CAT	3	7	
	CTC	0	0		CAC	11	7	
	CTA	10	8		Q	CAA	24	26
	CTG	1	0			CAG	2	1
I	ATT	43	41	N	ATT	5	4	
	ATC	22	21		AAC	20	22	
	ATA	0	2	K	AAA	4	9	
M	ATG	22	24		AAG	40	39	
	V	GTT	56	52	D	GAT	37	35
		GTC	21	28		GAC	15	24
		GTA	0	0	E	GAA	60	54
GTG		3	0	GAG		14	0	
S	TCT	35	37	C		TGT	8	9
	TCC	15	15			TGC	2	0
	TCA	1	5	W		TGG	14	15
	TCG	1	0		R	CGT	8	4
	AGT	1	2			CGC	0	0
AGC	1	1	CGA	0		0		
P	CCT	8	4	CGG		0	0	
	CCC	0	1	AGA		26	29	
	CCA	30	31	AGG	0	0		
	CCG	1	0	G	GGT	74	73	
T	ACT	37	40		GGC	1	2	
	ACC	16	16		GGA	3	0	
	ACA	0	1		GGG	1	1	
	ACG	0	0	A	GCT	60	74	
A	GCC	17	15		GCC	17	15	

a) AA, amino acid.

b) cited from *Biochim. Biophys. Acta*, 947, 1-28 (1988) reported by R. Serrano.

本実験でクローニングした *Z. rouxii* PMA1 DNAのEcoRI断片 (N末端領域)、KpnI-BglII断片 (C末端領域) 及び *S. cerevisiae* PMA1 DNAのEcoRI断片をプローブとして全RNAのノーザン分析を行った (図57)。*Z. rouxii* 細胞中には25SリボソームRNA (3.4 Kb) とほぼ同じ大きさのプロトンATPaseのmRNAが検出された。また、*S. cerevisiae* のPMA1のmRNAの移動度は *Z. rouxii* のそれと同じであった。この結果は本実験でクローニングしたPMA1遺伝子が *Z. rouxii* 細胞内で転写されており、そのmRNAの大きさが *S. cerevisiae* のPMA1のmRNAとほぼ同じで、3.4 Kbであることを示している。一方、2M食塩培地で培養した *Z. rouxii* 細胞中のPMA1のmRNA量は、ノーザン分析の結果からみる限り、0M食塩培地で培養した細胞中のmRNA量よりかなり少なかった (図57)。

同じ量のタンパク質 (60  $\mu$ g) を含む細胞膜試料をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したところ (図58)、分子量約100,000のタンパク質のバンドが分析した全試料で認められた。そのバンドの強さは三つの試料においてほぼ同じであった。この結果は細胞膜中のプロトンATPaseタンパク質量がどの細胞においてもほぼ同じであることを示している。これらの結果を総合すると、2M食塩培地で培養した *Z. rouxii* 細胞中のPMA1遺伝子のmRNA量が0M食塩培地の細胞に比べ、少ないにも係わらず、プロトンATPaseタンパク質量はほぼ同じであることから、2M食塩培地で培養した *Z. rouxii* 細胞におけるプロトンATPaseの翻訳効率は、0M食塩培地の細胞に比べて高いことが示唆される。

#### 8・4 考察

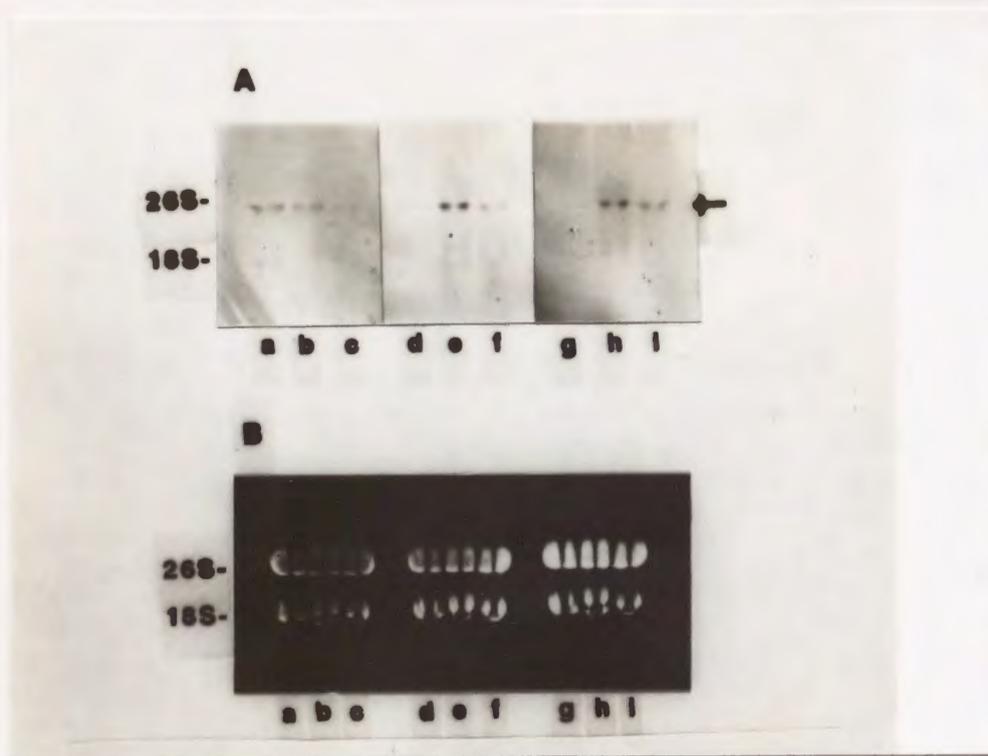


Fig. 57. Northern Blot Analysis of Total RNA prepared from *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces rouxii* Cells.

- A, Total RNAs ( $30\mu\text{g}$ ) prepared from *S. cerevisiae* cells grown without NaCl (lanes a, d, and g) and *Z. rouxii* cells grown with 2M NaCl (lanes b, e, and h) and without NaCl (lanes c, f, and i) were denatured with formaldehyde and electrophoresed on agarose gel containing formaldehyde. Hybridization was carried out using following labeled DNA, *EcoRI* fragment from *S. cerevisiae* PMA1 (lanes a-c), *EcoRI* fragment from *Z. rouxii* PMA1 (lanes d-f) and *KpnI-BglII* fragment from *Z. rouxii* PMA1 (lanes g-i).
- B, The denatured total RNAs were electrophoresed on formaldehyde-agarose gel. The gel was stained with ethidium bromide.

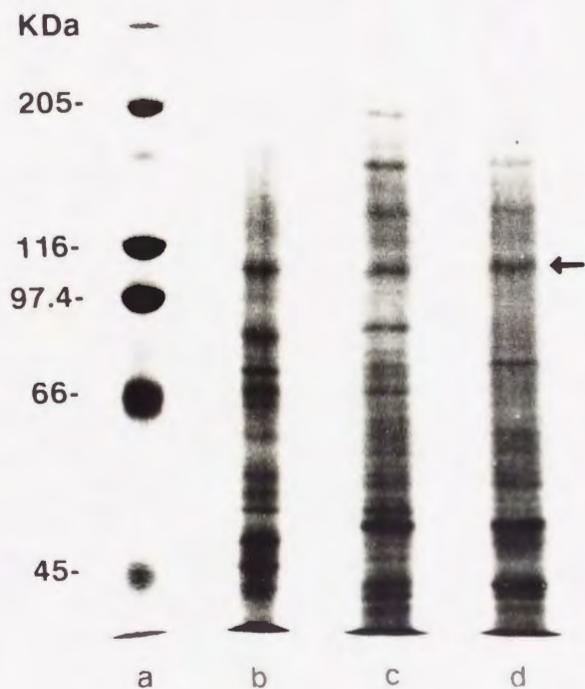


Fig. 58. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Plasma Membrane Proteins prepared from *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces rouxii* Cells.

Plasma membrane proteins ( $60\mu\text{g}$ ) was electrophoresed in SDS-polyacrylamide slab gel (7.5 %, w/v). The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane a, molecular weight marker proteins (myosine, 205,000;  $\beta$ -galactosidase, 116,000; phosphorylase b, 97,400; bovine serum albumin, 66,000; egg albumin, 45,000); lane b, plasma membrane proteins from *S. cerevisiae* cells grown without NaCl; lanes c and d, plasma membrane proteins from *Z. rouxii* cells grown without and with 2M NaCl, respectively. The arrow indicates the position of the H<sup>+</sup>-ATPase protein (110 kDa).

本実験では、*S. cerevisiae* PMA1遺伝子のEcoRI断片をプローブとして用いて、*Z. rouxii* 高分子DNAから作製したコスミドライブラリーから上記プローブと相同性を持つ遺伝子 (*Z. rouxii* PMA1)をクローニングし、得られたクローンの塩基配列を決定した (図53)。*Z. rouxii* ATPaseタンパク質は920個のアミノ酸からなり、推定分子量は100,060であった。また、*Z. rouxii* PMA1遺伝子のコーディング領域の塩基配列は *S. cerevisiae* PMA1遺伝子と82%の相同性を、両ATPaseタンパク質のアミノ酸配列は83%の相同性を示した。また、種々のATPaseのアミノ酸配列の比較から互いに相同性の高い領域が存在することが示されている(124,152,153,161)。*Z. rouxii* プロトンATPaseのアミノ酸配列はそれらの領域と非常に類似していた (図54)。*S. cerevisiae* ATPaseは10個のtransmembrane領域が存在することが示されているが(124)、*Z. rouxii* のアミノ酸配列はそれらのtransmembrane領域と高い相同性を示し (図56)、得られたクローンのコードしているタンパク質も膜タンパク質であることが示唆された。また、ATPaseには機能発現に必須であると考えられるペプチドモチーフが報告されているが(153,154)、*Z. rouxii* のタンパク質にもそれらのモチーフが全てに見いだされた (図54)。これらの結果は本実験でクローニングした遺伝子が *Z. rouxii* のプロトンATPase遺伝子であることを強く示唆しており、本遺伝子を *Z. rouxii* のPMA1遺伝子と結論することは妥当であると考えられる。さらに、ノーザン分析の結果から、*Z. rouxii* のPMA1遺伝子はmRNAに転写されることを認めた (図57)。

*S. cerevisiae* では細胞膜プロトンATPaseとして二種類の遺伝子 (PMA1とPMA2)が存在し、各々クローニングされ塩基配列が決定され

ている(124,154)。Z. rouxii 細胞においても別の遺伝子が存在することが以下のことから示唆された：① 制限酵素部位が異なる別のクローンの存在を見いだしたこと、② サザン分析において分析に用いた S. cerevisiae PMA1のEcoRI断片と相同性を示す Z. rouxii PMA1のEcoRI断片にはSalI及びBamHI切断部位は存在しないにも係わらず、染色体DNAについてのサザン分析ではSalI及びBamHIにより二つのバンドが認められたこと。

Z. rouxii PMA1と S. cerevisiae PMA1、PMA2遺伝子から推定されたアミノ酸配列において、三者のATPaseタンパク質のN末端領域ではアミノ酸配列の相同性は著しく低かった。このN末端領域のアミノ酸配列の違いは細胞膜ATPaseファミリー（P型ATPase）における一つの特徴であるらしい。

Z. rouxii 細胞は S. cerevisiae 細胞と異なり耐塩性を示すが、第7章で Z. rouxii のプロトンATPaseの酵素的性質が著しく類似していることを述べた。本章で得られたアミノ酸配列において、両細胞のATPaseタンパク質で83%の相同性を示す結果は上記の酵素的性質が類似しているという結果と矛盾しない。S. cerevisiae のPMA1のC末端領域をデレートしたデレーション変異株の細胞膜プロトンATPaseがグルコースによる *in vivo* の活性化を受けないことが報告されている(164)。第7章で述べたように、Z. rouxii 細胞ではプロトンATPaseはグルコースにより *in vivo* で活性化されない。従って、S. cerevisiae と Z. rouxii のプロトンATPaseにおいてC末端領域のアミノ酸配列が異なる可能性が推定されたが、上述のようにC末端の配列は両ATPaseにおいて高い相同性を示した。S. cerevisiae のグルコースによる *in vivo* の活性化は細胞内cAMP濃度に依存し、

cAMP依存性タンパク質キナーゼにより引き起こされるらしい(127)。  
*Z. rouxii* のプロトンATPaseではC末端近くにRRVSというモチーフが存在しcAMP依存性タンパク質キナーゼの基質と成り得ると考えられる(165)。これらの結果は「なぜ *S. cerevisiae* のATPaseがグルコースにより *in vivo* で活性化され、*Z. rouxii* のATPaseがされないか」という疑問に対する解答をより複雑にしている。一つの解釈として、Serranoが述べたように(153)、「*S. cerevisiae* ATPaseを活性化するタンパク質キナーゼをcAMP依存性タンパク質キナーゼが活性化し、そのタンパク質キナーゼはATPaseタンパク質のいろいろな(multiple)部位を磷酸化し、ATPaseを活性化する」という機構を考えなければならぬのかも知れない。また、第7章で述べたように、*S. cerevisiae* のATPase活性はグルコースにより活性化され、培養時期に依存する。このことは、*S. cerevisiae* 細胞ではグルコースの取り込みという必要性のためにプロトンATPase活性を誘導し、プロトン勾配を形成し、定常期のようなプロトン勾配の不必要なときは、ATPaseによる細胞内のATPの消費を防いでいると推察された。*Z. rouxii* のATPase活性はグルコースや培養時期に非依存性であり常に活発に機能し、常に高いプロトン勾配を形成・維持していると推測された。*Z. rouxii* 細胞ではプロトンATPaseにより活発にプロトンを細胞外に排出し、ナトリウムイオンを排出するナトリウム・プロトンアンチポーターを駆動させるためにプロトン勾配を形成するのであろうと推測した。さらに、定常期の *Z. rouxii* 細胞における高い活性は、定常期においても細胞内に流入するナトリウムイオンを排出する必要性を考慮すると理解できる。これらのことを総合すると、*Z. rouxii* のプロトンATPaseは磷酸化などの修飾を受けなくて

も高い活性を示すことが考えられる。このプロトンATPaseの磷酸化については今後の追究が必要になるであろう。

第7章で述べたように、*Z. rouxii* のプロトンATPaseの細胞膜における比活性は、0M食塩培地で培養した細胞に比べて2M食塩培地の細胞において高かった。ノーザン分析から、*Z. rouxii* 細胞の全RNA当りのプロトンATPaseのmRNA量は、逆に2M食塩培地の方が少なかった(図57)。一方、一定量の細胞膜タンパク質に含まれるプロトンATPaseタンパク質量はほぼ同じであった(図58)。これらの結果は、2M食塩培地で培養した *Z. rouxii* 細胞において翻訳効率の上昇、さらに、磷酸化などの翻訳後修飾による酵素活性の上昇を示唆している。従って、今後望まれる *Z. rouxii* 細胞のプロトンATPaseの磷酸化修飾の検討は、培地食塩濃度に依存した活性上昇の機構を明らかにする上で特に重要である。

#### 8・5 小括

本章では既にクローニングされている *S. cerevisiae* PMA1遺伝子のEcoRI断片をプローブとして *Z. rouxii* の染色体DNAライブラリーからプロトンATPase遺伝子を単離し、その塩基配列を決定した。その塩基配列から *Z. rouxii* プロトンATPaseの920個のアミノ酸残基からなり、分子量100,060であると推定した。*Z. rouxii* プロトンATPaseは *S. cerevisiae* プロトンATPaseと遺伝子塩基配列、アミノ酸配列で高い相同性を示した。さらに、アミノ酸配列から計算したタンパク質の疎水性プロファイルは *S. cerevisiae* プロトンATPaseのプロファイルと非常に類似しており、本酵素は膜タンパク質であることが示唆された。また、プロトンATPaseの活性発現に必須であると

報告されている数個のペプチドモチーフが、本実験で単離した遺伝子から推定されたアミノ酸配列中にも見いだされた。以上のことから、単離した遺伝子は *Z. rouxii* プロトンATPase遺伝子PMA1であると結論した。さらに、本遺伝子は *Z. rouxii* 細胞中で転写されていることを明らかにした。

第7章で *Z. rouxii* プロトンATPaseの酵素的性質が *S. cerevisiae* のそれと非常に類似していることを指摘したが、単離した遺伝子から推定した本章の結果も矛盾なくこれを支持した。培養時期やグルコース処理による *S. cerevisiae* と *Z. rouxii* のプロトンATPase活性の違いは解析することはできなかった。しかし、両酵母のプロトンATPaseの mRNA量、タンパク質量の測定から、プロトンATPase活性の培養時期やグルコース処理に対する依存性の差異が両遺伝子の翻訳効率と翻訳後修飾により制御されているのであろうと考察した。

## 総括

高濃度の食塩を含む環境下で生育できる生物は耐塩性生物と呼ばれている。典型的な耐塩性生物として、味噌や醤油製造に用いられる耐塩性酵母 (*Z. rouxii*, *C. versatilis* など) が上げられる。耐塩性酵母は単細胞真核生物であり、比較的単純な培地中で短時間に多量の試料細胞が得られるため耐塩性生物の生理特性を解明する上での最良の材料であると考えられる。本研究では主として *Z. rouxii* を対象とし、耐塩性酵母のもつ生理特性の解明を試み、さらに耐塩性機構を追究した。

耐塩性酵母の耐塩性機構を考える場合、その機構は二面性を持つと推測される。即ち、培地の食塩に起因する細胞外浸透圧に対する適応と食塩自体あるいはナトリウム・塩素イオンに対する適応である。耐塩性酵母における培地浸透圧上昇に呼応した細胞内浸透圧の調節機構はこれまで多くの研究者により検討されており、ほぼ解明されたと言える。その機構とは、培地浸透圧上昇に依存してグリセロールやアラビトールなどのポリオールが細胞内に蓄積し、細胞内の浸透圧を高め、細胞膜に掛かる物理的影響を緩衝するというものである。これらポリオールは酵母細胞内に多量蓄積しても細胞の生理機能に悪影響を及ぼさず、Compatible soluteと呼ばれている。これらポリオールは以下の経路により生成されるといわれている。D-リブローズ-5-リン酸がホスファターゼにより脱リン酸化されD-リブローズとなり、NADPH依存性酸化還元酵素（ポリオール脱水素酵素）によりD-アラビトールとなる。また、ジヒドロキシアセトンリン酸がNADH依存性ポリオール脱水素酵素（グリセロール-3-リン酸脱水素酵素）に

より還元されグリセロール-3-リン酸となり、ホスファターゼにより脱リン酸化されグリセロールとなる。耐塩性酵母 (*Z. rouxii* や *D. hansenii* など) において、後者の経路の重要性が示唆されており、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素活性が培地浸透圧に呼応して上昇することが示されている。一方、非耐塩性酵母は1M以下の食塩存在下で生育できるが、その場合ポリオールの蓄積はわずかしか認められない。グリセロールなどのポリオールは *S. cerevisiae* の細胞膜をかなり自由に透過できるが、耐塩性酵母ではナトリウムイオン・グリセロール共輸送系により細胞内に取り込まれ、内部浸透圧を維持していることが最近指摘されている。

他方、食塩あるいはナトリウム・塩素イオンが耐塩性酵母に対してどのような影響を及ぼすか、また細胞がそれに対してどのように適応あるいは応答しているのかについては不明な点が多い。例えば、耐塩性酵母が高濃度食塩存在下で生育した場合でも、細胞内のナトリウムイオン濃度は低く抑えられている。即ち、高濃度食塩環境下で耐塩性酵母細胞は細胞膜の内外で数モルにも及ぶナトリウム濃度勾配を形成している。上述のように、そのナトリウム勾配はグリセロールなどの取り込みと共役していることも示されている。従って、そのような輸送系や自然拡散により細胞内に入ったナトリウムイオンは何等かの機構により排出されなければならないと考えられる。その排出機構は現在解明されたとは言いがたい。いずれにしても、耐塩性を追究・論述するには細胞の内外を仕切っている細胞膜に食塩 (ナトリウム・塩素イオン) の特徴的な影響が表れるものと考え、それらを解析することにした。

先ず第1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。Z. rouxii は培地食塩濃度が高くなるとともに、ステロール含量が著しく増加した。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認められる変化であった。磷脂質含量もわずかに増加したが、磷脂質に対するステロールの含量比が高いので、ステロール含量の増加は細胞膜で起こることが示唆された。次に、食塩濃度に依存して、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することを認めた。これらの変化は高濃度の食塩で生育したときほど顕著であった。また、細胞毒性を示すと言われている遊離脂肪酸含量も増加したが、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。

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、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。また、培地食塩濃度上昇によってオレイン酸(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。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ことが示唆された。言い換えると、増加したステロールは細胞膜の流動性を制御し、細胞膜に掛かる物理的影響に抵抗性を与えると考えられることから、ステロールの重要性が示唆された。

第2章では、第1章で得られた結果を解析するために、各脂質の脂肪酸合成量の変化及び脂肪酸の不飽和化を検討した。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ることを認めた。しかし、培地から食塩を除くとその阻害は解消された。この脂肪酸組成の変化は18:1( $\Delta^{12}$ )デサチュラーゼが食塩によって抑制されることに起因することが分かった。また、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)を貯蔵することが推測された。

第3章では *Z. rouxii* 細胞において観察された脂質変化が耐塩性酵母において普遍的に見られる現象かどうかを確かめるために、別種の耐塩性酵母 *C. versatilis* の脂質変化について検討し、*Z. rouxii* 細胞において観察された結果と比較した。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。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する。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は関連性があると考えられた。*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。

*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。

*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。*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-磷酸脱水素酵素(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。

酵母 *S. cerevisiae* のエノラーゼとGAPDHは共に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と言われてきた。第5章では、TLAa(エノラーゼ)とTLAb(GAPDH)の抗血清を用いる方法により、両タンパク質の発現量に対する熱ショックを含めたいろいろなストレスの影響を検討し、TLAa(エノラーゼ)とTLAb(GAPDH)はそれぞれのイソタンパク質量に変化が起こることを明らかにし、これらの変化から酵母の耐塩性について考察した。まず、TLAa(エノラーゼ)とTLAb(GAPDH)について、定常期細胞やグルコース飢餓細胞では、グルコース存在下で栄養増殖している細胞と比べて、異なるイソタンパク質(アイソザイム)の存在を確認した。また、食塩ストレスを与えた細胞において同様の変化を認めた。この食塩ストレスによるTLAaとTLAbの変化はソルビトールにより浸透圧を上昇させた場合では認められなかったので、食塩に特異的な現象であると推察した。また、酵母細胞が食塩ストレスに対応するために必要なエネルギーの供給と関連して解糖系酵素の発現を調節していると推察した。次に、食塩ストレスを与えた酵母細胞において認められたTLAa(エノラーゼ)やTLAb(GAPDH)の変化がグリセロールとエタノールなどの非発酵性炭素源を用いて培養した酵母細胞に

においても認められた。非発酵性炭素源を用いて培養したとき、解糖系は糖生成に傾いていると考えられた。また、*S. cerevisiae* 細胞は1M程度の食塩存在下では生育可能であり、食塩を含む培地で生育した細胞では細胞内にグリセロールを蓄積し細胞内外の浸透圧を調節しており、既報のグリセロール生成酵素であるグリセロール-3-リン酸脱水素酵素活性の上昇と考え合わせ、食塩ストレス条件下では酵母はグリセロール生成の方向に解糖系を調節する可能性があることを指摘した。

耐塩性酵母 *Z. rouxii* を高濃度食塩存在下で培養しても細胞内のナトリウムイオン濃度は細胞外濃度と比べて著しく低く抑えられている。この勾配は酵母細胞に存在するプロトンATPaseが関与して生じるプロトン勾配によると言われている。第6章では、このナトリウムイオンの分布がどのような機構により維持されているかを明らかにするために、細胞内外に生じるプロトン勾配やこれに関与するプロトンATPaseに影響を及ぼす薬剤を用いて、*Z. rouxii* 細胞の生育に対するこれら薬剤の影響を検討した。プロトンイオノフォアであるCCCP及びプロトンATPaseの特異的な阻害剤であるバナジン酸を培地に添加した場合、その効果は培地に含まれる食塩濃度に依存しており、ソルビトールによる浸透圧には依存していなかった。この結果は、細胞膜内外に形成されたプロトン勾配の解消及びプロトン勾配の形成阻害が *Z. rouxii* の高濃度食塩培地での生育にとって致命的であることを示している。さらに、細胞外のpHを緩衝液を用いてアルカリに一定に保つと、細胞の生育が阻害された。このことは、細胞内外のプロトン勾配の重要性を支持する。これらの結果は *Z. rouxii* 細胞の高濃度食塩培地での生育と細胞膜でのプロトン勾

配の関連性を示す最初のものである。

高濃度食塩環境下で *Z. rouxii* 細胞が生育するために細胞膜内外で生じるプロトン勾配が重要であった。第7章ではこのプロトン勾配の形成に参与する細胞膜ATPaseの性質を明らかにする目的で、*Z. rouxii* の細胞膜を単離し、その細胞膜ATPaseの特性を *S. cerevisiae* の弱耐塩性菌株細胞膜ATPaseと比較した。調製した膜区分は各種阻害剤に対するATPaseの感受性からかなり純度の高い細胞膜であることを証明した。本細胞膜を用いて、含まれるATPaseの性質を明らかにした。*Z. rouxii* の細胞膜ATPaseは *S. cerevisiae* と同様プロトンATPaseであり、そのATPaseの至適pHは6.5~7.0で、*S. cerevisiae* のそれ(pH 6.5)より若干アルカリ側であった。*Z. rouxii* の細胞膜ATPaseは *S. cerevisiae* の細胞膜ATPaseと同様マグネシウムイオン依存性であり、コバルトとマンガンイオン存在下ではマグネシウムイオンと比べ活性が約1/2になり、亜鉛とカルシウムイオン存在下では活性を示さなかった。*Z. rouxii* の細胞膜ATPaseは、*S. cerevisiae* の細胞膜ATPaseと同様にATPに特異的に作用し、ナトリウム・カリウムイオン非依存性であったが、*S. cerevisiae* 細胞膜ATPaseの活性は培養時期の違いやin vivoのグルコース処理により変化するのに対し、*Z. rouxii* の細胞膜ATPase活性は *S. cerevisiae* と異なり、培養時期やグルコース処理によりほとんど影響されず、どのような条件下でも常に活性な状態にあることが明らかとなった。しかし、*Z. rouxii* の細胞膜ATPaseは他の耐塩性生物(藻類、植物、プランクトン)のATPaseとは多くの異なる性質を示した。これらの結果から、*Z. rouxii* の細胞膜ATPaseの酵素的諸性質は *S. cerevisiae* のそれと非常に類似しているが、活性制御機構が異なると推

測した。即ち、*Z. rouxii* 細胞のATPaseは栄養状態・生育状態に非依存性であるので、*Z. rouxii* 細胞は常に活発にプロトンを細胞外に排出し、そのプロトン勾配を駆動力とするナトリウムイオン・プロトンアンチポーターを使ってナトリウムイオンを細胞外に排出していると推察した。

最後に（第8章）、*Z. rouxii* 細胞膜プロトンATPaseの構造解明と上記活性発現機構の解明のために、*Z. rouxii* プロトンATPase遺伝子のクローニングと塩基配列の決定を行った。*Z. rouxii* ATPase遺伝子をクローニングするため、プローブとして *S. cerevisiae* ATPase遺伝子(PMA1)の *EcoRI*断片(800bp)を用いた。*Z. rouxii* の染色体DNAライブラリーからプロトンATPase遺伝子を単離し、その塩基配列を決定した。その塩基配列から *Z. rouxii* プロトンATPaseは920個のアミノ酸からなる配列と分子量100,060であること推定した。*Z. rouxii* プロトンATPaseは *S. cerevisiae* プロトンATPaseと遺伝子塩基配列、アミノ酸配列で高い相同性を示した。さらに、アミノ酸配列から計算したタンパク質の疎水性プロファイルは *S. cerevisiae* プロトンATPaseのプロファイルと非常に類似しており、本酵素が膜タンパク質であることを示唆した。また、プロトンATPaseの活性発現に必須であると報告されている数個のペプチドモチーフが、本実験で単離した遺伝子から推定されたアミノ酸配列中にも見いだされた。以上のことから、単離した遺伝子は *Z. rouxii* プロトンATPase遺伝子PMA1であると結論した。さらに、本遺伝子は *Z. rouxii* 細胞中で転写されていることを明らかにした。

第7章で *Z. rouxii* プロトンATPaseの酵素的性質が *S. cerevisiae* のそれと非常に類似していることを指摘したが、単離した遺伝

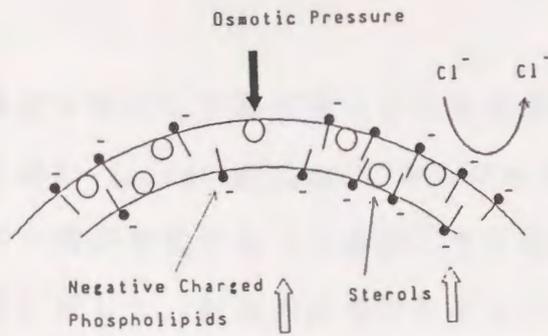
子から推定した本章の結果も矛盾なくこれを支持した。培養時期やグルコース処理による *S. cerevisiae* と *Z. rouxii* のプロトン ATPase活性の違いは解析することはできなかった。しかし、両酵母のプロトンATPaseの mRNA量、タンパク質量の測定から、プロトンATPase活性の培養時期やグルコース処理に対する依存性の差異が両遺伝子の翻訳効率と翻訳後修飾により制御されているのであろうと考察した。

本研究で得られた成果は酵母の耐塩性の解明に向けて多くの知識を提供したと考えられる。これまでに得られた結果を図59 (I、II、III) に要約し、細胞内外の浸透圧とイオン分布の調節機構との関連を考察した。

(I) 細胞膜の脂質レベルでは、*Z. rouxii* と *C. versatilis* 細胞について検討した結果、細胞膜のステロール含量の増加、負に荷電した磷脂質の割合の増加が認められた。ステロール含量の増加は、細胞外食塩濃度の増加に呼応して細胞膜の流動性を変化させ、細胞膜中の酵素機能を高濃度食塩存在下でも維持し、さらに食塩による浸透圧に対して細胞膜の抵抗性を高めると考えられる。負に荷電した磷脂質量の増加は細胞外からの陰イオン（例えば塩素イオン）の透過を抑制していると推察できる。*Z. rouxii* 細胞で認められたリノール酸含量の低下とオレイン酸含量の増加は上記の細胞膜の流動性の変化において重要であると示唆された。

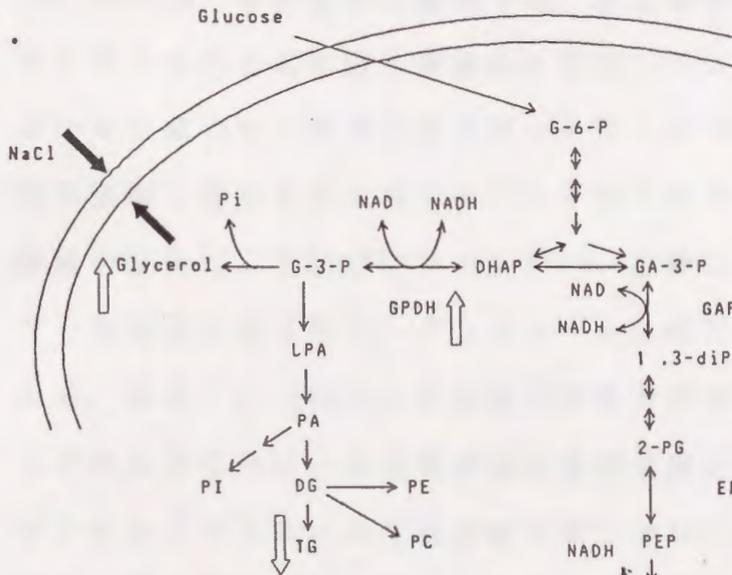
(II) *S. cerevisiae* 細胞について得られた結果であるが、培地の食塩濃度に依存して二種類のストレスタンパク質として知られている解糖系酵素（エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素）のイソザイム量が増加した。これは解糖系酵素の発現が培地食

I.



C 18:2-phospholipids  
 ↓ in *Z.rouxii*  
 C 18:1-phospholipids  
 × *C.versatilis*

II.



GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
 ENO: enolase  
 GPDH: glycerol-3-phosphate dehydrogenase  
 G-6-P: glucose-6-phosphate  
 GA-3-P: glyceraldehyde-3-phosphate  
 1,3-diPG: 1,3-diphosphoglycerate  
 2-PG: 2-phosphoglycerate  
 PEP: phosphoenolpyruvate  
 AA: acetoaldehyde  
 LPA: lysophosphatidic acid  
 PA: phosphatidic acid  
 DG: diacylglycerol  
 TG: triacylglycerol  
 PI: phosphatidyl-inositol  
 PE: phosphatidyl-ethanolamine  
 PC: phosphatidyl-choline

G-3-P: glycerol-3-phosphate  
 DHAP: dihydroxyacetone phosphate  
 NAD: nicotinamide-adenine dinucleotide (oxi.)  
 NADH: nicotinamide-adenine dinucleotide (redu.)  
 Pi: inorganic phosphate

III.

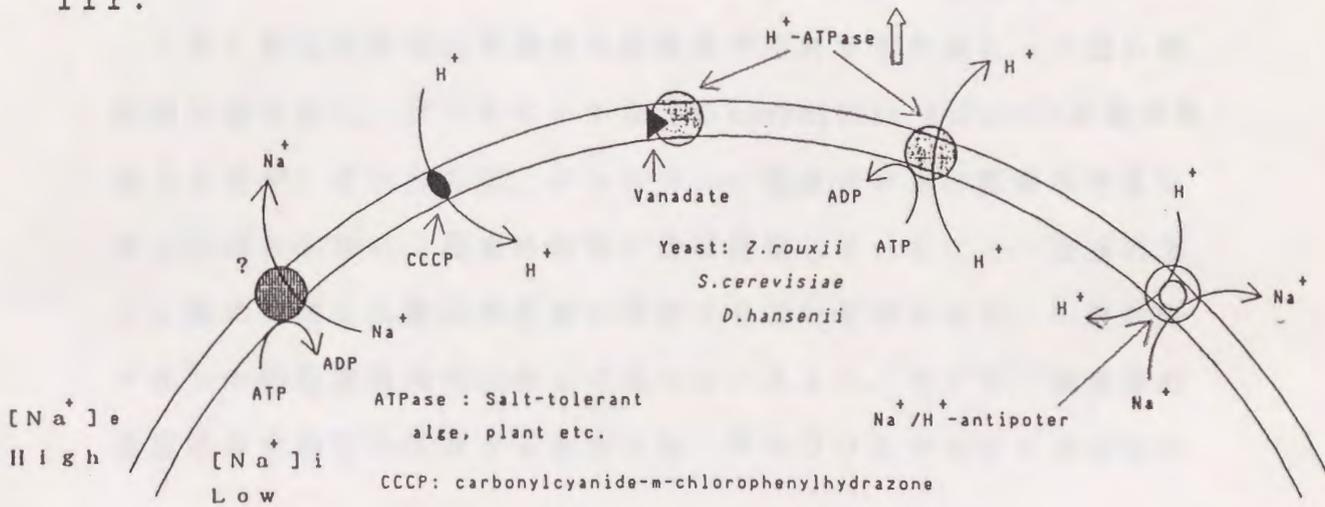


Fig. 59. Summary.

塩濃度に呼応して変化することを示唆する最初の知見であり、耐塩性の弱い *S. cerevisiae* においても食塩ストレスによりストレスタンパク質が変化することを示している。培地中の食塩に由来する浸透圧に対して、耐塩性酵母ではグリセロールなどの物質 (compatible solute) を細胞内に蓄積する。図59のIIに示したように、グリセロールの生成経路が解糖系と関連していること、さらにグリセロール生成のキー酵素であるグリセロール-3-リン酸脱水素酵素活性が培地食塩に依存して上昇することを考え合わせると、上記の解糖系酵素の変化は、下記のプロトンATPase駆動のための効率的なエネルギー獲得のため以外に、グリセロール生成と関係していると考えられる。また、*Z. rouxii* の脂質組成の分析から、貯蔵脂質であるトリアシルグリセロール含量が培地食塩濃度上昇と共に低下した。トリアシルグリセロール生合成系はグリセロール生成系とリンクしている。従って、このトリアシルグリセロール含量低下もグリセロール生成と関係していることを意味しており、この脂質を貯蔵脂質として多量に蓄積する酵母はグリセロールを生成でき、耐塩性 (耐浸透圧性) を示す可能性が考えられる。なお、*S. cerevisiae* は貯蔵脂質としてトリアシルグリセロールをそれほど多く蓄積しない。

(III) 耐塩性酵母の高濃度食塩環境で生育するために、上記の細胞膜の脂質変化、グリセロールなどの compatible solute の蓄積が重要であるが、それ以外に、ナトリウム・塩素イオンの影響を考慮しなければならない。細胞外表面が負に荷電していること、上述のように負に荷電した磷脂質含量が増加することを考えると、一般に陰イオンの細胞膜透過性は著しく低いといえよう。そこで、高濃度の食塩を含む培地で生育するためには、ナトリウムイオンの透過性の

制御を考えなければならないであろう。酵母の細胞膜における物質透過は細胞膜に形成されているプロトン勾配に依存しているといわれている。プロトン勾配を解消し、いわゆる脱エネルギー状態を形成するプロトンイオノフォア（CCCP）を添加した場合、*Z. rouxii* 細胞は、高い浸透圧条件で生育できるが、高い食塩濃度の条件では生育できなくなる。さらに、その勾配の形成に関与する細胞膜プロトンATPaseの阻害剤（バナジン酸）を添加すると同様に高濃度食塩環境では生育できない。従って、*Z. rouxii* 細胞の耐塩性において細胞膜プロトン勾配及びプロトンATPaseが重要な因子であると考えられた。また、*Z. rouxii* を含めた酵母の細胞膜ATPase活性はナトリウムイオン依存性を示さない。即ち、酵母の細胞膜にはナトリウムポンプは存在しないことが示唆される。次に、*S. cerevisiae* と *Z. rouxii* 細胞のプロトンATPaseの性質と、遺伝子クローニング・塩基配列決定によって明らかにした両タンパク質の構造を比較すると、酵素的性質および構造は両者非常に良く類似していることが明らかとなった。しかし、両酵母においてATPase活性の発現機構が異なることを見いだした。即ち、*S. cerevisiae* のATPase活性はグルコースなどにより誘導されるが、*Z. rouxii* のATPase活性は常に高い活性を示し、高い食塩濃度で活性が一層上昇する。言い換えれば、*S. cerevisiae* 細胞は栄養素の取り込みのために必要に応じてプロトン勾配を形成するが、*Z. rouxii* 細胞では常に高いプロトン勾配を形成・維持し、高濃度食塩環境ではより高い勾配を形成していると考えられる。酵母においては高濃度食塩存在下では物質の共輸送や自然拡散により細胞内にナトリウムイオンが流入すると考えられるが、実際はその濃度は低く保たれている。酵母ではナト

リウムイオンの排出はプロトン・ナトリウムイオンアンチポーターにより行われている。従って、*Z. rouxii* 細胞では培地食塩濃度の上昇に伴ってプロトンATPaseを活性化し、より高いプロトン勾配を形成し、その勾配を駆動力とするプロトン・ナトリウムイオンアンチポーターを介してナトリウムイオンを排出し、細胞内のナトリウムイオン濃度を低く抑えることにより高濃度食塩存在下でも生育できるものと結論できる。

## 謝辞

本論文作製に有益な御助言を賜った九州大学 緒方靖哉教授、林田晋策教授並びに山崎信行教授に対し深甚な感謝の意を表す。また、本研究の遂行に終始御懇篤な御指導をいただいた愛媛大学 高桑正義名誉教授並びに玉井洋一教授に深謝する。さらに、ご協力いただいた愛媛大学農学部院生 峰時俊貴氏（現大関酒造株式会社研究員）、池内喜郎氏（現東亜医用電子株式会社研究員）、山口誠博氏、愛媛大学農学部生 白水正直氏（現昭和化工株式会社研究員）、実光優美氏、およびアミノ酸配列の決定をしていただいた三菱化成株式会社総合研究所の近藤淳博士に感謝する。

## 参考文献

- 1) N.J.W. Kreger-van Rij, "The Yeasts, a taxonomic study", Elsevier Science Publishers (1984).
- 2) P.H. Northcote and R.W. Horne, Biochem. J., 51, 212-236 (1952).
- 3) G.H. Fleet and D.H. Manners, J. Gen. Microbiol., 94, 180-192 (1976).
- 4) T. Nakajima and C.E. Ballou, J. Biol. Chem., 249, 7685-7694 (1974).
- 5) C.E. Ballou and W.C. Rashke, Science, 184, 127-134 (1974).
- 6) D.J. Manners, A.J. Masson and J.C. Patterson, Biochem. J., 135, 31-36 (1973).
- 7) S.J. Singer and G.L. Nicolson, Science, 175, 720-731 (1972).
- 8) 安楽泰宏、大隅正子、大隅良典、"酵母の解剖"、講談社サイエンティフィック、p.11-18 (1981).
- 9) 齊藤佑尚, 生化学, 51, 1205-1225 (1979).
- 10) R. Serrano, Mol. Cell Biochem., 22, 51-63 (1978).
- 11) J. Dufour and A. Goffeau, J. Biol. Chem., 253, 7026-7032 (1978).
- 12) G.R. Willsky, J. Biol. Chem., 254, 3326-3332 (1979).
- 13) R. Serrano, M.C. Kielland-Brandt and G.R. Fink, Nature, 319, 689-693 (1986).
- 14) M. Ghislain, A. Schlessler and A. Goffeau, J. Biol. Chem., 262, 17549-17555 (1987).
- 15) A. Eddy and J. Nowacki, Biochem. J., 122, 701-711 (1971).
- 16) A. Seaston, C. Inkson and A. Eddy, Biochem. J., 134, 1031-1043 (1973).
- 17) H. Onishi, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 24, 131-140 (1960).
- 18) H. Onishi, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 21, 143-150 (1957).
- 19) H. Onishi, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 23, 351-358 (1959).
- 20) H. Onishi, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 23, 359-363 (1959).
- 21) H. Onishi, N. Saito and I. Koshiyama, Agric. Biol. Chem., 25, 124-130 (1961).
- 22) J.F.T. Spencer and H.R. Sallons, Can. J. Microbiol., 2, 72-79 (1956).
- 23) 横塚保, 逆井利夫, 浅尾保夫, 農化, 41, 428-433 (1967).
- 24) 横塚保, 逆井利夫, 浅尾保夫, 農化, 41, 434-441 (1967).
- 25) 横塚保, 逆井利夫, 浅尾保夫, 農化, 41, 442-447 (1967).
- 26) L. Restaino, S. Bills, K. Tscherneff and L.M. Lenovich, Appl. Environ. Microbiol., 45, 1614 (1983).
- 27) 松本伊佐尾, 今井誠一, 日食工, 20, 513-518 (1973).
- 28) 森治彦, 鳥海博次, 醱酵工学, 63, 47-53 (1985).
- 29) H. Onishi and T. Suzuki, Appl. Microbiol., 16, 1847-1852 (1968).

- 30) H. Onishi, *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 24, 126-130 (1960).
- 31) L. Gustafsson and B. Norkrans, *Arch. Microbiol.*, 110, 177-183 (1976).
- 32) H.J. Phaff, M.W. Willer and E.M. Mrak, "The life of yeast", Harvard Univ. Press (1978): 永井進 訳、"酵母の生活"、学会出版センター、(1982).
- 33) 敵本力、"好塩性微生物"、医歯薬出版、p.92-115 (1979).
- 34) A.D. Brown and J.R. Simpson, *J. Gen. Microbiol.*, 72, 589-591 (1972).
- 35) A.D. Brown, *Bacteriol. Rev.*, 40, 803-846 (1976).
- 36) T. Yagi and K. Tada, *FEMS Microbiol. Lett.*, 49, 317-321 (1988).
- 37) K. Ushio and Y. Nakata, *J. Ferment. Bioeng.*, 68, 165-169 (1989).
- 38) H. Onishi, *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 23, 332-339 (1959).
- 39) T. Yagi, *FEMS Microbiol. Lett.*, 49, 25-30 (1988).
- 40) N.J. Russel, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 21, 93-113 (1989).
- 41) 茂木恵太郎, 内田金治, 茂木孝也, *農化*, 46, 657-663 (1972).
- 42) Y. Tamai, H. Shinmoto and M. Takakuwa, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2713-2721 (1981).
- 43) K.J. Sweader and S.M. Goldin, *New England J. Med.*, 302, 777-783 (1980).
- 44) Y. Watanabe and M. Takakuwa, *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2415-2422 (1984).
- 45) Y. Watanabe and M. Takakuwa, *J. Ferment. Technol.*, 65, 365-369 (1987).
- 46) H. Onishi, *Adv. Food Res.*, 12, 53-94 (1963).
- 47) A.D. Brown, *Adv. Microb. Physiol.*, 17, 181-242 (1978).
- 48) E.G. Bligh and W.J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917 (1959).
- 49a) 安藤進、"生化学実験講座、第3巻、脂質の化学"、東京化学同人、p.58-61 (1974).
- 49b) 中谷陽一, A. Milon, G. Ourisson, *化学と生物*, 28, 568-576 (1990).
- 50) M. Takakuwa and Y. Watanabe, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2167-2173 (1981).
- 51) E. Oldfield and D. Chapman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, 610-616 (1971).
- 52) R.A. Demel and B. de Krunff, *Biochim. Biophys. Acta*, 457, 109-132 (1976).
- 53) R.D. Kornberg and H.M. McConnell, *Biochemistry*, 11, 1111-1120 (1971).
- 54) Y. Saito and D.F. Silbert, *J. Biol. Chem.*, 245, 1102-1107 (1979).

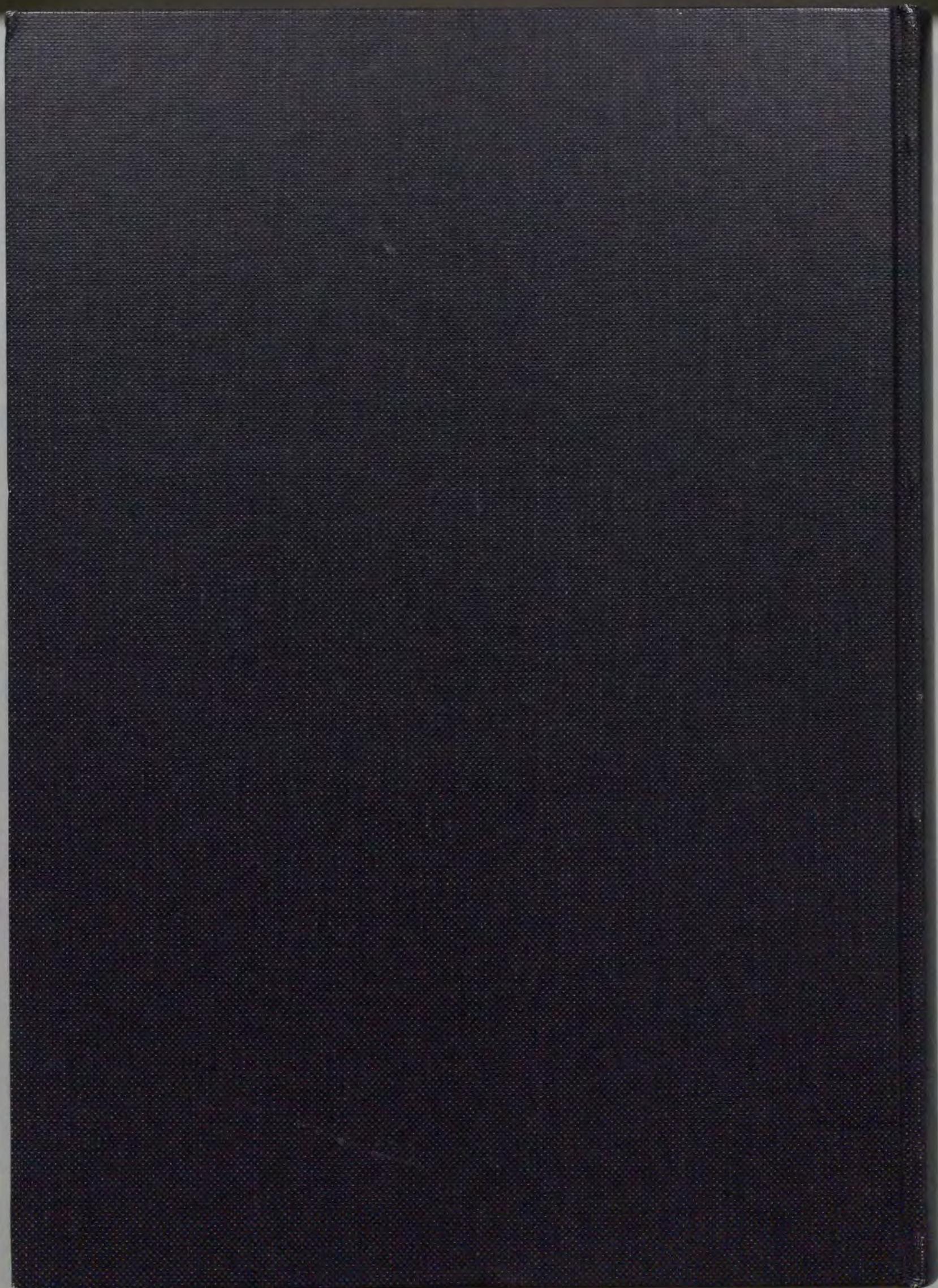
- 55) 西野徳三、"生物化学実験法、第17巻、生体膜成分の構造と機能"、学会出版センター、p. 292 (1982).
- 56) M.I. Valic, H. Gorriseen, R.J. Cushley and M. Bloom, Biochemistry, 18, 854-859 (1979).
- 57) J.A. Hossack and A.H. Rose, J. Bacteriol., 127, 67-75 (1976).
- 58) D.L. Melchior and S. Rottem, Eur. J. Biochem., 117, 147-153 (1984).
- 59) H. Suomalainen and E. Oura, "The Yeasts", Vol. II, Academic Press Inc., p.3-74 (1971).
- 60) Y. Kanemasa, T. Yoshioka and H. Hayashi, Biochim. Biophys. Acta, 280, 444-450 (1972).
- 61) Y. Ohno, I. Yano, T. Hiramatsu and M. Masui, Biochim. Biophys. Acta, 424, 337-350 (1976).
- 62) Y. Ohno, I. Yano and M. Masui, J. Biochem., 85, 413-421 (1979).
- 63) D.S. Thomas, J.A. Hossack and A.H. Rose, Arch. Microbiol., 117, 239-245 (1978).
- 64) Y. Watanabe and M. Takakuwa, J. Ferment. Technol., 66, 461-465 (1988).
- 65) G. Ferrante, Y. Ohno and M. Kates, Can. J. Biochem. Cell Biol., 61, 171-177 (1983).
- 66) G. Ferrante and M. Kates, Can. J. Biochem. Cell Biol., 61, 1191-1196 (1983).
- 67) B. Talamo, N. Chang and K. Block, J. Biol. Chem., 248, 2738-2742 (1973).
- 68) N. Baker and F. Lynen, Eur. J. Biochem., 19, 200-210 (1971).
- 69) 渡部保夫, 峰時俊貴, 高桑正義, 愛媛大学農学部紀要, 23, 89-96 (1988).
- 70) 今井誠一, 松本伊佐尾, 醸協, 69, 587-589 (1974).
- 71) 松本伊佐尾, 今井誠一, 醸協, 69, 590-594 (1974).
- 72) 今井誠一, 松本伊佐尾, 醸協, 70, 893-898 (1975).
- 73) 大西博, 農化, 28, 546-550 (1954).
- 74) J. Delhez, J. dufour, D. Thines and A. Goffeau, Eur. J. Biochem., 79, 319-328 (1977).
- 75) R. Schmidt, R. Ackerman, Z. Kratky, B. Wasserman and B. Jacobson, Biochim. Biophys. Acta, 732, 421-427 (1983).
- 76) E.S. Polakis, W. Barthey and G.A. Meek, Biochem. J., 90, 369-374 (1964).
- 77) T.K. Hodges and R.T. Leonard, Method Enzymol., 32, 392-406 (1974).
- 78) 菅原潔, 副島正美, "生物化学実験法、第7巻、タンパク質の定量法(第二版)"、学会出版センター、p.162-165 (1977).
- 79) 坂口正明, 発酵工学, 65, 360-361 (1987).

- 80) Y. Watanabe, Y. Ikeuchi and Y. Tamai, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2543-2551 (1990).
- 81) Y. Watanabe, Y. Ikeuchi and Y. Tamai, *Biotech. Appl. Biochem.*, 13, 269-276 (1991).
- 82) C.E. Ballou and W.C. Rashke, *Science*, 184, 127-134 (1974).
- 83) Y. Tamai, C. Kawabe and M. Takakuwa, *Agric. Biol. Chem.*, 48, 1063-1064 (1984).
- 84) H. Iida and I. Yahara, *Nature*, 351, 688-690 (1985).
- 85) O. Ouchterlony, *Prog. in Allergy*, 5, 1-78 (1958).
- 86) K. Weber and M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412 (1969).
- 87) 宮崎香、紀平安則、堀尾武一、"続生化学実験講座、第2巻、タンパク質の化学"、東京化学同人、p. 41-57 (1987).
- 88) H. Edelhoich, *Biochemistry*, 6, 1948-1954 (1967).
- 89) R.H. Hewick, M.W. Hunkapiller, L.E. Hood and W.J. Dreyer, *J. Biol. Chem.*, 256, 7990-7997 (1981).
- 90) 香川靖雄、"生化学実験講座、第12巻、エネルギー代謝と生体酸化"、東京化学同人、p. 117-120 (1976).
- 91) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 92) M.J. Holland, J.P. Holland, G.P. Thill and K.A. Jackson, *J. Biol. Chem.*, 256, 1385-1395 (1981).
- 93) J.P. Holland and M.J. Holland, *J. Biol. Chem.*, 254, 9839-9845 (1979).
- 94) J.P. Holland and M.J. Holland, *J. Biol. Chem.*, 255, 2596-2605 (1980).
- 95) J.P. Holland, L. Labieniec, L. Swimmer and M.J. Holland, *J. Biol. Chem.*, 258, 5291-5299 (1983).
- 96) L. McAlister and M.J. Holland, *J. Biol. Chem.*, 260, 15013-15018 (1985).
- 97) 玉井洋一、新本洋士、高桑正義、*農化*, 57, 667-669 (1983).
- 98) Y. Tamai and M. Takakuwa, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1559-1565 (1985).
- 99) Y. Tamai and M. Takakuwa, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2385-2387 (1986).
- 100) L. McAlister and M.J. Holland, *J. Biol. Chem.*, 257, 7181-7188 (1982).
- 101) Y. Tamai, H. Shinmoto and M. Takakuwa, *J. Biochem.*, 94, 37-41 (1983).
- 102) Y. Tamai and M. Takakuwa, *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1603-1604 (1988).
- 103) M.J. Holland and J.P. Holland, *Biochemistry*, 17, 4900-4907 (1978).

- 104) L.M. Gierasch, Biochemistry, 28, 923-930 (1989).
- 105) J.E. Edwards, Jr., R.I. Lehrer, E.R. Steihm, T.J. Fischur and L.S. Young, Ann. Intern. Med., 89, 91-106 (1978).
- 106) J.M. Jones, Infect. Immun., 30, 78-89 (1980).
- 107) R.A. Greenfield and J.M. Jones, Infect. Immun., 34, 469-477 (1981).
- 108) J.M. Jones, J. Lab. Clin. Med., 96, 845-860 (1980).
- 109) A.B. Mason, M.E. Brandt and H.R. Buckley, Yeast, 5, S231-S239 (1989).
- 110) R. Matthews and J. Burnie, FEMS Microb. Lett., 60, 25-30 (1989).
- 111) S. Lindquist, Ann. Rev. Biochem., 55, 1151-1191 (1986).
- 112) B.J. Davis, Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404-427 (1964).
- 113) R.W. Nickells and L.W. Browder, J. Cell Biol., 107, 1901-1909 (1988).
- 114) H. Iida and I. Yahara, J. Cell Biol., 99, 199-207 (1984).
- 115) R.H. Reed, J.A. Chudek, R. Foster and G.M. Gadd, Appl. Environ. Microbiol., 58, 2119-2123 (1987).
- 116) C. Trollmo, L. Andre, A. Blomberg and L. Adler, FEMS Microb. Lett., 56, 321-326 (1988).
- 117) A. Blomberg, C. Larsson and L. Gustafsson, J. Bacteriol., 170, 4562-4568 (1988).
- 118) K. Tajima and H. Yoshizumi, J. Ferment. Technol., 53, 841-853 (1975).
- 119) L. Adler, A. Blomberg and A. Nilsson, J. Bacteriol., 162, 303-306 (1985).
- 120) A.D. Brown, Adv. Microb. Physiol., 17, 181-242 (1978).
- 121) A.D. Brown, K.F. Kackenzie and K.K. Singh, FEBS Microbiol. Rev., 39, 31-36 (1986).
- 122) K. Tanaka, G. Jay and K.J. Isselbacher, Biochim. Biophys. Acta, 905, 138-146 (1988).
- 123) K.J. Sweader, Biochim. Biophys. Acta, 988, 185-220 (1989).
- 124) R. Serrano, M.C. Kielland-Braudt and G.R. Fink, Nature, 319, 689-693 (1986).
- 125) R. Serrano, FEBS Lett., 156, 11-14 (1983).
- 126) P. Eraso, A. Cid and R. Serrano, FEBS Lett., 224, 193-197 (1987).
- 127) S. Ulaszewski, F. Hilger and A. Goffeau, FEBS Lett., 245, 131-136 (1989).
- 128) Y. Anraku, N. Umemoto, R. Hirata and Y. Wada, J. Bioenerg. Biomembr. 21, 589-603 (1989).
- 129) 浅野朗、"代謝マップ 一経路と調節一"、東京化学同人、p.30-33 (1980).

- 130) N. Nelson and L. Taiz, TIBS, 14, 113-116 (1989).
- 131) G. Herderson, I.H. Evans and I.J. Bruce, Antonie van Leeuwenhoek, 55, 99-107 (1989).
- 132) C.G. Vallejo and R. Serrano, Yeast, 5, 307-319 (1989).
- 133) A. Rodriguez-Navarro and M. Ortega, FEBS Lett., 138, 205-208 (1982).
- 134) A. Katz, H.R. Kaback and M. Avron, FEBS Lett., 202, 141-144 (1986).
- 135) A. Katz, U. Pick and M. Avron, Biochim. Biophys. Acta, 983, 9-14 (1989).
- 136) Y. Watanabe, M. Yamaguchi, Y. Sanemitsu and Y. Tamai, Yeast, 7, (in press).
- 137) S. Ulaszewski, M. Grenson and A. Goffeau, Eur. J. Biochem., 130, 235-239 (1983).
- 138) R. Serrano, Method Enzymol., 157, 533-534 (1988).
- 139) K.H. Steinkrans, R. Ayres, A. Olek and D. Farr, Int. J. Food Microbiol., 1, 291-199 (1985).
- 140) H. Gimmler, L. Schneider and R. Kaaden, Z. Naturforsch., 44C, 128-138, (1989).
- 141) W. Bruggemann and P. Janiesch, J. Plant Physiol., 135, 20-25 (1989).
- 142) M. Wada, S. Satoh, K. Kasamo and T. Fujii, Plant Cell Physiol., 30, 923-928 (1989).
- 143) J.P. Comerford, P.T.H. Spencer-Phillips and D.H. Jennings, Trans. Br. Mycol. Soc., 85, 431-438 (1985).
- 144) F. Portillo and M.J. Mazon, FEBS Lett., 192, 95-98 (1985).
- 145) P. Tuduri, E. Nso, J.-P. Dufour and A. Goffeau, Biochem. Biophys. Res. Commun., 133, 917-922 (1985).
- 146) R. Ayres, K.H. Steinkrans, A. Olek and D. Farr, Int. J. Food Microbiol., 4, 331-339 (1987).
- 147) M.J. Mazon, M.M. Behrens, F. Portillo and R. Pinon, J. Gen. Microbiol., 135, 1453-1460 (1989).
- 148) H. Synchronova and A. Kotyk, FEBS Lett., 183, 21-24 (1985).
- 149) D.H. MacLennan, C. Brandl, B. Korczak and N.M. Green, Nature, 316, 696-700 (1985).
- 150) G.E. Shull, A. Schwartz and J.B. Lingrel, Nature, 316, 691-695 (1985).
- 151) J.E. Hesse, L. Wieczore, K. Altendorf, A.S. Reicin, E. Dorus and W. Epstein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4746-4756 (1984).
- 152) R. Serrano, Biochim. Biophys. Acta, 947, 1-28 (1988).

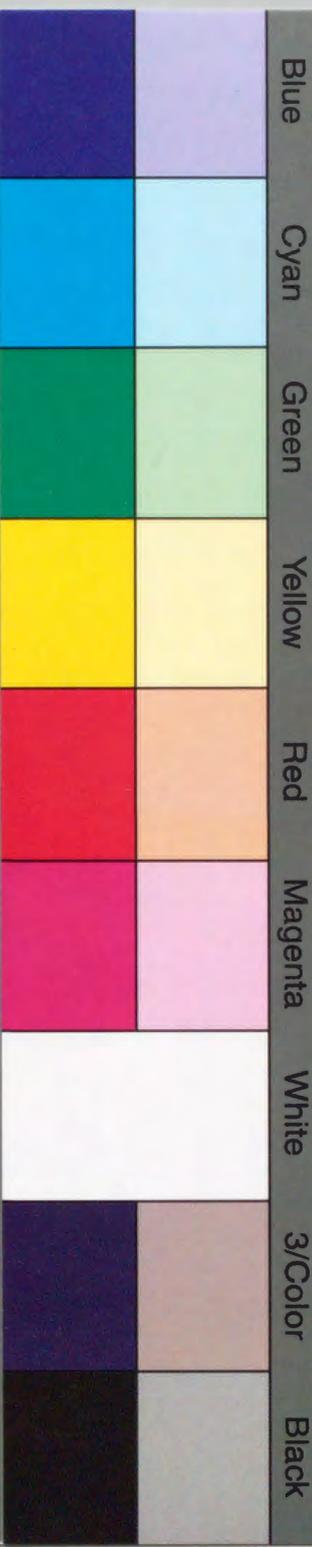
- 153) R. Serrano, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 40, 61-94 (1989).
- 154) A. Schlessner, S. Ulaszewski, M. Ghislain and A. Goffeau, J. Biol. Chem., 263, 19480-19487 (1988).
- 155) R. Rothstein, "DNA cloning — a practical approach— Vol. II", IRL Press, England, p. 45-66 (1985).
- 156) J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, "Molecular Cloning — A Laboratory Manual— 2nd Ed.", Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA (1989).
- 157) I. Saito and G.R. Stark, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8664-8668 (1986).
- 158) F. Sanger, S. Nicklen and A.R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467 (1977).
- 159) M. Calson and D. Botstein, Cell, 28, 145-154 (1982).
- 160) J.F. Harper, T.K. Surowy and M.R. Sussman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1234-1238 (1989).
- 161) M. Ghislain, A. Schlessner and A. Goffeau, J. Biol. Chem., 262, 17549-17555 (1987).
- 162) K.L. Hager, S.M. Mandala, J.W. Devenport, D.W. Speicher, E.J. Benz, Jr. and C.W. Slayman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 7693-7697 (1986).
- 163) J. Kyte and R.F. Doolittle, J. Mol. Biol., 157, 105-132 (1982).
- 164) F. Portillo, I.F. deLarrinoa and R. Serrano, FEBS Lett., 247, 381-385 (1989).
- 165) S. Shenolikar and P. Cohen, FEBS Lett., 86, 92-98 (1978).
- 166) Y. Watanabe, M. Shiramizu and Y. Tamai, J. Biochem., 110 (in press).



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

