パン酵母に集積されたビタミン B₁ の存在部位[†]

山 上 雅 子*, 高 野 克 己**

鴨 居 郁 三**, 小 原 哲 二 郎**

* 杏林大学保健学部保健学科

** 東京農業大学農芸化学科

Intracellular Localization of Thiamin Accumulated in Baker's Yeast

Masako YAMAGAMI,* Katsumi TAKANO,**

Ikuzo KAMOI** and Tetsujiro OBARA**

* School of Health Sciences, Kyorin University, Hachioji 192

** Department of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 44, 411~415 (1991)

Yeast accumulates large quantities of thiamin from thiamin-containing solutions. The intracellular localization of thiamin and thiamin pyrophosphate accumulated in baker's yeast was studied. About 40% of both thiamin and thiamin pyrophosphate were released during protoplast preparation. After homogenization of the protoplasts and fractionation of the homogenate, most of the thiamin and thiamin pyrophosphate remaining in the protoplasts were found in the S₂ fraction (20,000×g supernatant fraction), although some was also recovered in the P₂ fraction (20,000×g pellet fraction). The activity of a mitochondria-marker enzyme, succinate dehydrogenase was mostly found in the P₂ fraction and that of α-glucosidase, a cytosol-marker was found exclusively in the S₂ fraction, indicating that P₂ was particulate and that S₂ was mostly non-particulate.

Key Words baker's yeast, thiamin, accumulation, intracellular localization.

(Received December 21, 1990)

酵母をチアミン(ビタミン B₁)を含有する溶液中で培養すると、菌体のチアミン含有量は著しく増加する^{1)~22)}。著者らはさきに米糠抽出液を用いて、1時間の集積処理によって、チアミン濃度が乾燥菌体 1g 当り 6 mg 程度のパン酵母を製造できること、その場合の本質的なチアミン集積機構はチアミン塩酸塩水溶液からの集積の場合と同じであることを報告した²³⁾。

このようにして、通常のパン酵母の含有量の 200 倍以上ものチアミンが集積されるのであるが、これらの菌体内における存在部位を知ることは、得られたチアミン集積酵母の性質を明らかにするうえでも、また、集積機構や集積が代謝に及ぼす影響を解明するうえでも有用なことであろう。これまでにも、チアミンの菌体内での存在部

位に関して、いくつかの研究報告はあるが、明確な結論を与えるまでには達していなかったり、あるいは結果が相互に矛盾しており、決定的な結論には至っていない^{9)10)15)20)~22)24)25)}。著者らはチアミンを多量に集積したパン酵母からプロトプラストを調製し、細胞分画および蛍光顕微鏡観察によってチアミンの存在部位を検討したので、報告する。

実験方法

1. 実験材料

パン酵母はオリエンタル酵母工業株式会社製の市販圧搾パン酵母, *Saccharomyces cerevisiae* O-39 を使用した。

2. チアミン集積酵母の製造

グルコース 450 mg を含む 0.05 M リン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム水溶液 (pH 5.0) 99 ml に水洗したパン酵母 0.2 g を懸濁して前培養 (37°C, 1 時間振とう) を行った。これに 10 mM のチアミン塩酸塩

† 米糠中のビタミン B₁ の有効利用に関する基礎的研究 (第 2 報)

* 〒192 八王子市宮下町 476

** 〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

Table 1. Thiamin and thiamin pyrophosphate (TPP) contents in the yeast cells after thiamin uptake.

	Thiamin mg/g yeast (%)	TPP mg/g yeast (%)
Decrease from medium during incubation for thiamin uptake ^{a)}	5.52	
Intact cells	5.64 (100)	0.67 (100)
Protoplasts	3.17 (56)	0.40 (61)

^{a)} 37°C, 60 min.

溶液 1 ml を加え、再び 37°C で 1 時間振とうし、酵母にチアミンを集積させた。

3. プロトプラストの調製

チアミン集積酵母菌体を 2 回水洗し、塩化カリウム (濃度 0.8 M) と亜硫酸ナトリウム (濃度 0.1 M) を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中に細胞濃度が約 1.3 mg 乾燥菌体/ml になるよう懸濁し、ザイモリニス-20T (酵母細胞壁溶解酵素, 生化学工業株) 溶液を濃度が約 0.08 mg/ml になるよう加えて、35°C において 1 時間反応させ、プロトプラストを調製した²⁸⁾。プロトプラスト化は反応混合物を 10 倍に希釈し、800 nm における吸光度を測定することおよび検鏡によって確認した。

4. 細胞の分画

上記のプロトプラスト調製によって得られた反応混合物を遠心分離し (1,700 × g), 0.65 M のソルビトールを含むトリス-メス緩衝液 (pH 6.8) に懸濁し, Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーを用いて破碎した。この懸濁液をまず, 600 × g で 5 分間遠心分離し, 上清を S₁ とし, 沈殿を P₁ とした。次に S₁ を 20,000 × g で 15 分間遠心分離した。このときの上清を S₂ とし, 沈殿を P₂ とした。

5. チアミンの測定

前報²³⁾と同じく, ポストラベル法による高速液体クロマトグラフィーによって行った。

6. 酵素活性の測定

α-グルコシダーゼ [EC 3.2.1.20] 活性は p-ニトロフェニル-α-D-グルコピラノシド (生化学工業株) を用い²⁷⁾, コハク酸デヒドロゲナーゼ [EC 1.3.99.1] 活性は電子受容体としてフェリシアン化カリウムを用い²⁸⁾, リンゴ酸デヒドロゲナーゼ [EC 1.1.1.37] 活性は NADH とオキサロ酢酸を用いて²⁹⁾, いずれも分光光度法によって測定した。

7. タンパク質の定量

Peterson による改良 Lowry 法³⁰⁾によって行った。

8. 蛍光顕微鏡による観察

プロトプラストの 0.65 M ソルビトール懸濁液を常法

によりカバーガラスに塗抹, 乾燥, 固定し, 検鏡直前に, 7.2% 水酸化ナトリウム水溶液に溶かした 0.08% フェリシアン化カリウム溶液を滴下し, 無蛍光スライドガラスにのせて, オリジナル BHA-RF-A により, 励起フィルター U, 吸収フィルター L-420 および対物レンズ 100 x-oil を使用して油浸により 1,000 倍で検鏡した。また, 写真撮影にはオリジナル全自動写真撮影装置 PM-10AD, フィルムは Fujichrome RD135 を使用した。

実験結果と考察

1. プロトプラストの調製

ビール酵母や対数増殖期の酵母からは細胞壁溶解酵素を用いて比較的容易にプロトプラストを調製することができるが, 糖濃度の高い培地中で好氣的に培養された, 定常期にあるパン酵母のプロトプラスト化は困難であり, 2-メルカプトエタノールのごとき, SH 化合物による前処理が必要とされている²⁸⁾³¹⁾。そしてそのような前処理を行っても, ビール酵母ほどの細胞壁溶解成績は達成できないとされている²⁸⁾。著者らは, 圧搾パン酵母を前培養とチアミン集積のために合計 2 時間程度, 低糖濃度の培養液中で振とうした細胞では, 2-メルカプトエタノールによる前処理を行ってさえも, プロトプラスト化がまったく行われないことを経験した。しかし, Kitamura らの報告²⁸⁾にしたがい, 実験方法に記したごとき濃度の塩化カリウムと亜硫酸ナトリウムの存在下で反応を行うことにより, ほぼ完全にプロトプラスト化を達成することができた。すなわち, 反応後の OD₈₀₀ の減少率は 78% 程度に達し, また, 検鏡によっても, 95% 程度の細胞がプロトプラスト化していることを確認した。

2. プロトプラスト中のチアミン量

圧搾パン酵母を前培養した後, 培養液にチアミン塩酸塩を加えて 37°C で 1 時間振とうすることにより, 湿潤菌体 1 g 当り, 遊離チアミンに換算して約 6 mg 程度 (乾燥菌体に換算して約 18 mg/g) のチアミンを含有する酵母を得た。この菌体からプロトプラストを調製したときの, チアミンの収量を Table 1 に示す。

集積処理後の培養液内のチアミンの減少量は使用湿潤

菌体 1g 当り 5.5 mg で、培養液から分離し、水洗した菌体について測定したチアミン含有量（遊離チアミン換算で合計 6.56 mg/g）と比較すると、使用した酵母がもともと大部分をチアミンピロリン酸エステル形で含有していたチアミン量（約 0.03 mg/g）を勘案しても、後者は前者を超過する。この原因は不明であるが、少なくとも培養液からのチアミンの減少分はすべて酵母菌体中に集積され、かつ、一部はピロリン酸エステルの形に変化しているものの、大部分が遊離のチアミンの形で存在することを知ることができる。

プロトプラスト調製後にプロトプラストに残留するチアミンおよびチアミンピロリン酸エステル量はそれぞれ約 3.2 および 0.4 mg/g で、プロトプラスト調製前の菌体の含有量の約 40~44% がプロトプラスト調製中に消失した。

Suomalainen ら³²⁾ は対数増殖期にあるパン酵母細胞のプロトプラストをカタツムリの消化管酵素を用いて調製した際に、チアミンは 2-メルカプトエタノールで前処理を行えば、93% がプロトプラストに残留することを報告している。しかし、これは特別にチアミン集積処理を行った酵母ではなく、その含有量は通常程度のものであると思われる。

Table 1 に示した著者らの実験結果は、集積されたチアミンの少なくとも半分以上が細胞膜内に存在することを示唆するものと考えられる。プロトプラスト調製時における膜からの漏出の可能性³²⁾を考慮すれば、集積処理直後の細胞膜内の存在割合はもっと高いかもしれない。

3. チアミンのプロトプラスト内分布

破碎したプロトプラストを 600×g において遠心分離したときの沈殿である P₁ フラクシオンを光学顕微鏡によって観察したところ、未破壊のプロトプラストと微量のプロトプラスト化されていない完全な細胞がみられた。これらのほかに核も含まれるものと考えられる。上清である S₁ フラクシオンには完全細胞および未破壊のプロトプラストはみられなかった。このときに得られる S₁ および P₁ フラクシオン中へのチアミン、チアミンピロリン酸エステルおよび酵素類の分布状況は、チアミン、チアミンピロリン酸エステルと α -グルコシダーゼが S₁ のほうに多く、コハク酸デヒドロゲナーゼ活性が P₁ のほうに多い傾向があるものの、実験の都度異なっていた。これはプロトプラストの生成および分解の程度がその都度異なっていたためであると考えられる。

そこで、S₁ フラクシオンをさらに 20,000×g において遠心分離した。

得られた上清 S₂ および沈殿 P₂ の両フラクシオンにおけるチアミンおよびチアミンピロリン酸エステルの含有量と α -グルコシダーゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼお

Table 2. Intracellular distribution of thiamin, thiamin pyrophosphate (TPP) and enzyme activities in protoplast homogenate obtained from 29 mg (wet weight) of thiamin-accumulating baker's yeast.

	Thiamin content and enzyme activities					
	S ₁ fraction*			P ₂ fraction*		
	Total ^{a)}	Specific ^{b)}	Total ^{a)}	Specific ^{b)}	Total ^{a)}	Specific ^{b)}
Thiamin	55.0	(100)	47.9	(87)	9.6	(17)
TPP	5.6	(100)	5.4	(96)	0.5	(9)
α -glucosidase	176	(100)	186	(106)	0.0	(0)
Succinate dehydrogenase	83	(100)	15	(18)	73	(88)
Malate dehydrogenase	250	(100)	129	(51)	135	(54)
Protein	1.24	(100)	0.89	(72)	0.52	(42)

^{a)} Total quantity is expressed as μ g for thiamin and TPP and as mg for protein. Total activity is expressed as μ mol/min for enzymes. ^{b)} Relative to total quantity or activity in S₁ fraction as 100%. ^{c)} Specific activity is expressed as μ mol/min/mg protein.

* For preparation of these fractions, see "Materials and Methods."

よびリンゴ酸デヒドロゲナーゼの活性を Table 2 に示す。

チアミンおよびチアミンピロリン酸エステルはほとんどが S_2 フラクシオンに含有されていた。 α -グルコシダーゼ活性はもっぱら S_2 フラクシオンに、コハク酸デヒドロゲナーゼ活性は大部分が P_2 フラクシオンに見いだされる。また、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性は S_2 と P_2 の双方に見いだされた。

α -グルコシダーゼは細胞質ゾルのマーカー酵素であるとされている³³⁾。コハク酸デヒドロゲナーゼはミトコンドリアのみに存在する酵素であり、リンゴ酸デヒドロゲナーゼは培地中のグルコース濃度によって、活性もその細胞内分布も存在形態も変動するとされており、主として細胞質ゾルとミトコンドリアの両方に存在すると考えられている³⁴⁾³⁵⁾。これらのことから、本研究の細胞分画の結果、細胞質ゾルは S_2 フラクシオンのみに、また、ミトコンドリアは主として P_2 フラクシオンに分画されたことがわかる。そしてチアミンもチアミンピロリン酸エステルもほとんどが S_2 フラクシオンに含まれていたことから、大部分が細胞質ゾルに存在していると推定することができる。しかし少量のチアミンおよびチアミンピロリン酸エステルが顆粒分画 P_2 に存在するのも事実であり、これがミトコンドリアであるかどうかは今後の確認を要する。

なお、Hirai らは種々の炭素源で培養した *Candida tropicalis* を本研究におけるほぼ同じ条件で分画したが、酢酸塩またはアルカンで培養した場合は P_2 はミトコンドリアとマイクロボディから成るが、グルコースで培養した場合はミトコンドリアから成ると述べている³⁶⁾。

菌種は異なるが、ミトコンドリアが P_2 に含まれるという点は本報告の分画結果と共通である。

これまでに *Saccharomyces* 属酵母に集積されたチアミンの局在部位に関して、小野ら⁹⁾はチアミンは酵母表面の水分を除いただけで流失したり、アノイリナーゼによって容易に分解されるとして、チアミンは細胞膜外にあるとした。また、市川¹⁰⁾は電子顕微鏡的観察を行ったが、決定的な結論を得ていないと述べている。岩島らは *Saccharomyces cerevisiae* のプロトプラストも完全な細胞と同様に遊離のチアミンを集積することを見だし¹⁷⁾ またチアミン結合タンパク質が酵母の細胞膜に存在することを明らかにして、これがチアミンの細胞膜輸送に直接関与して、チアミンは細胞膜内に取り込まれるとしているが^{15)20)~22)}、完全な酵母菌体がどの部位にチアミンを多量に集積するかについては明らかにしていない。このように、*Saccharomyces* 属酵母において、多量に集積されたチアミンの存在部位は明確にされていないし、また細胞分画または蛍光顕微鏡観察などによって追究した報

Fig. 1. A fluorescence microphotograph of thiamin accumulating yeast protoplasts treated with an alkaline potassium ferricyanide solution.

告も見当たらない。*Saccharomyces* 属以外については、チアミンを多量に集積した *Kloeckera apiculata* において、川崎ら²⁴⁾は多量に集積されたチアミンの大部分はただちには原形質内部に透過せず、原形質膜もしくは原形質膜と細胞壁の間に局在すると推定したが、のちにビタミン B_1 - 3H を用いた電子顕微鏡的ラジオオートグラフィーを行って、「菌体中に入ったチアミンは細胞質中には少なく核、原形質膜に多く局在するものと思われる。」と述べている²⁵⁾。しかし詳細は明らかにされていない。

4. プロトプラストの蛍光顕微鏡による観察

チアミンを集積させた酵母細胞から調製したプロトプラストを常法により固定して得た標本にフェリシアン化カリウムのアルカリ水溶液を滴下して、蛍光顕微鏡で観察すると、明るいプロトプラスト像がみられた (Fig. 1)。

プロトプラスト内に1あるいは2カ所の大きな無発光部がみられ、細胞質部分は発光しており、その一部に顆粒状の、より明るい発光がみられる。一方、同様に固定したプロトプラスト標本にフェリシアン化カリウム溶液でなく、水を滴下した場合、およびチアミンを集積させていない酵母細胞から調製したプロトプラストの標本にフェリシアン化カリウムを滴下した場合は明瞭な蛍光を発しなかった。したがって、この蛍光発色はチアミンとフェリシアン化カリウムの反応によって生じるチオクロームによるものと考えられる。

この結果は、上記の細胞分画の結果からの推測を支持するものである。

なお、上記の1あるいは2カ所の大きな無発光部は核または液胞と推測されるが、未確認である。

要 約

パン酵母に通常の含有量の約 200 倍の量に当る 6 mg/g 湿潤菌体のチアミンを集積させ、菌体内におけるチアミンおよびチアミンピロリン酸エステルの存在部位を、プロトプラストを調製して、細胞分画および蛍光顕微鏡観察によって検討した。得られた知見は以下のとおりである。

1) チアミン集積酵母からプロトプラストを調製した際に、半分以上のチアミンがプロトプラストに残留した。また、プロトプラスト標本をフェリシアン化カリウムで処理して蛍光顕微鏡によって観察すると、明らかな蛍光がみられる。これらのことから、集積されたチアミンの少なくとも半分以上が原形質膜内に存在すると思われる。

2) プロトプラストをホモジナイズし、分画したところ、遊離のチアミンも、チアミンピロリン酸エステルも、大部分が細胞質ゾルの分画に検出された。しかし少量は顆粒の分画にも見いだされた。この結果は、蛍光顕微鏡による観察結果とも一致する。

終わりに、パン酵母をご提供いただいたオリエンタル酵母工業㈱、細胞分画についてご指導いただいた杏林大学保健学部の大木玲子博士および顕微鏡写真の撮影にご協力いただいた山本 寛氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 高田亮平：醸造誌，11，563 (1933)
- 2) 高田亮平：醸造誌，11，867 (1933)
- 3) 高田亮平：醸造誌，12，571 (1934)
- 4) 高田亮平，川村市郎：醸造誌，17，382 (1939)
- 5) 大嶽 了：農化，10，409 (1934)
- 6) Van Lanen, J.M., Broquist, H.P., Johnson, M.J., Baldwin, I.L. and Peterson, W.H. : *Ind. Eng. Chem.*, 34, 1233 (1942)
- 7) 東亜農業研究所：特許昭 20 第 170110 号
- 8) 高田亮平，市川邦介：ビタミン，7，535 (1954)
- 9) 小野恒一，市川邦介：ビタミン，7，1024 (1954)
- 10) 市川邦介：ビタミン，10，30 (1956)
- 11) Suzuoki, J. : *J. Biochem.*, 42, 27 (1955)
- 12) Iwashima, A., Nishino, H. and Nose, Y. : *Biochim. Biophys. Acta*, 330, 222 (1973)
- 13) Iwashima, A. and Nose, Y. : *Biochim. Biophys. Acta*, 399, 375 (1975)
- 14) Iwashima, A. and Nose, Y. : *J. Bacteriol.*, 128, 855 (1976)
- 15) Iwashima, A. and Nishimura, H. : *Biochim. Biophys. Acta*, 557, 460 (1979)
- 16) Iwashima, A., Nishimura, H. and Nose, Y. : *Biochim. Biophys. Acta*, 557, 460 (1979)
- 17) Nishimura, H., Senpuku, K. and Iwashima, A. : *J. Bacteriol.*, 150, 960 (1981)
- 18) Nishimura, H., Senpuku, K. and Iwashima, A. : *J. Bacteriol.*, 150, 960 (1982)
- 19) 岩島昭夫，西村 洋，西野輔翼：ビタミン，58，577 (1984)
- 20) Nishimura, H., Nosaka, K., Senpuku, K. and Iwashima, A. : *Experientia*, 42, 607 (1986)
- 21) 岩島昭夫：ビタミン，62，471 (1988)
- 22) 岩島昭夫：化学と生物，27，779 (1989)
- 23) 山上雅子，高野克己，鴨居郁三，小原哲二郎：栄養誌，43，197 (1990)
- 24) 川崎近太郎，篠田純男，小野照代：ビタミン，36，530 (1967)
- 25) 川崎近太郎，近藤雅臣，小野照代：ビタミン，37，429 (1968)
- 26) Kitamura, K. and Yamamoto, Y. : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 1761 (1981)
- 27) Halvorson, H. : *Methods Enzymol.*, VIII, 559 (1966)
- 28) Veeger, C., Der Vartanian, D.V. and Zeylemaker, W.P. : *Methods Enzymol.*, XIII, 81 (1969)
- 29) Ferguson, J.J., Jr. and Holzer, H. : *Eur. J. Biochem.*, 1, 21 (1967)
- 30) Peterson, G.L. : *Anal. Biochem.*, 83, 346 (1977)
- 31) 山本 康：化学と生物，10，709 (1972)
- 32) Suomalainen, H., Nurminen, T. and Oura, E. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 219 (1967)
- 33) Wiemken, A., Schellenberg, M. and Urech, K. : *Arch. Microbiol.*, 123, 23 (1979)
- 34) Perlman, P.S. and Mahler, H.R. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 136, 245 (1970)
- 35) Jayaraman, J., Cotman, C. Mahler, H.R. and Sharp, C.W. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 224 (1966)
- 36) Hirai, M., Shiotani, T., Tanaka, A. and Fukui, S. : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1979 (1976)

(1990 年 12 月 21 日受理)