酵母のストレス応答

上原悌次郎*

膜の流動性とシグナル伝達を介する二形性の発現

真菌類の中には、条件によって酵母型と菌糸型の2つの異なる形態をとるものがある。この二形性の現象は、真菌症と細胞の形態形成の両面から広く興味をもたれている。二形性の発現は細胞のストレス応答の一つであり、エタノールなど種々の外的ストレスが、膜の流動性の上昇と、それに続くイノシトールリン脂質関与のシグナル伝達の亢進を介して形態変化をもたらすことが明らかになってきた。

生命の単位である細胞は、環境の変化によって様々なストレスを受け、それに耐え、あるいはそれを利用しながら生きている。したがって、このようなストレス応答は基本的に重要な生命現象の一つである。近年、生体膜の構造と機能、膜を介するシグナル伝達と、それに基づく遺伝子発現、さらには細胞周期の調節などの研究が目覚ましい発展を遂げつつあり、この線に沿って高次の生命現象を解明しようとする機運が高まってきた。ストレス応答の研究もその一つである。酵母は外からのストレスを直接受けやすい単細胞の真核生物であり、ここでも高等生物の格好のモデルとなる。

一方、酵母を含む真菌類には、条件によって酵母型と菌糸型の2つの形態をとるものがある。この二形性と呼ばれる現象は最も簡単な形態形成の表われとして、また免疫活性低下の際の日和見感染との関係で広く興味をもたれている。二形性、すなわち酵母型と菌糸型の形態変化をひき起こす要因はあまりにも多岐にわたり、因果関係を解析することはきわめて難しいとされてきた。

筆者らが用いている *Candida tropicalis* も、後で述べるように、実に様々な要因によって仮性菌糸型で生育する。ここで仮性菌糸とは、真性菌糸では母細胞から発芽管 (germ tube) が出て伸長し、後から順次隔壁が入るのに対し、出芽した娘細胞が母細胞から分離しないままに細胞の長軸の対極から順次出芽し、個々の細胞が伸長して菌糸

型となるものを指す。すなわち、仮性菌糸形成は出芽細胞と母細胞の分離抑制で始まり、細胞の伸長を伴って進行すると考えることができる。仮性菌糸を構成している個々の細胞の間に隔壁が存在するのは真性菌糸と同じであるが、この部分にくびれがあるのと、先に行くほど細胞の長さが短くなるのが仮性菌糸の形態的な特徴である。

実験系を単純化するために合成培地を選び、*C. tropicalis* で仮性菌糸を与える種々の条件を調べたところ、前記のように一見互いに関係のないような多くの要因が見つかった。炭素源が *n*-アルカンの場合、トウモロコシ煎汁によって仮性菌糸となることはすでに知られていた⁽¹⁾が、その他、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキスなどが有効であり、これら天然物に普遍的に含まれる有効物質の存在が示唆された⁽²⁾。また、隔壁の主成分キチンの構成単位である *N*-アセチルグルコサミンの前駆体グルコサミンの添加によっても仮性菌糸が出現した。キチンが多いと隔壁が強固となり、出芽細胞の分離抑制につながると考えられる。さらに、適量のシクロヘキシミドやクロラムフェニコール、テトラサイクリンなどを培地に加えた場合にも、菌は仮性菌糸型で増殖した。このことは、1つまたは複数のタンパク質の合成が阻害されると仮性菌糸が作られ、しかもその特定のタンパク質分子の少なくとも一部はミトコンドリアで合成されることを示唆している。多彩な生理作用で知られるポリアミンとそれらの前駆体であるメチオニンなどのアミノ酸の添加によっても仮性菌糸が生じたが、それらの効果は不安定であり、機構

Stress Response in Yeasts : Dimorphism Involving Changes in Membrane Fluidity and Signal Transduction

* Teijiro KAMIHARA, 京大名誉教授

図 1 ■ エタノールによる *C. tropicalis* Pk 233 の仮性菌糸形成（ノマルスキー顕微鏡像）

A：酵母型（対照菌），B：仮性菌糸型（エタノール菌），いずれも 35°C 培養定常期菌体，培養開始時エタノール濃度 2.5%

解明は今後の課題である。一方，炭素源飢餓のあとで *n*-アルカンを加えると菌は基本培地でも仮性菌糸型で増殖した。この事実から，このような形態変化にストレスの介在が示唆された。

当初から二形性の発現に膜の関与を考えていたので，種々の脂質の効果を調べたところ，脂質の溶媒に用いたエタノールが，菌の増殖に大きく影響することなく終濃度 2.5% で発達した仮性菌糸を与えた⁽³⁾（図 1-B）。しかも，エタノールは他の要因とは異なり，炭素源がグルコースの場合にも有効であった。エタノールのこの効果は，低濃度（ $\geq 1.5 \mu\text{g/ml}$ ）のミオイノシトールの添加で完全に抑制された。この事実は，二形性の発現，少なくとも仮性菌糸の形成における膜の関与を明確に示すものであった。

一方，エタノールは温度の変化と並んで，代表的な膜へのストレスの一つとされている。主に真性菌糸となる *C. albicans* では高温（37°C）がその形態変化の大きな要因の一つであり，筆者らは程度は低い *C. tropicalis* でもこの温度で仮性菌糸が出現することを認めている。エタノールや高温はもちろん，前記の炭素源飢餓ばかりでなく，一見雑多に思われる仮性菌糸形成の要因も，隔壁形成の前駆体となるグルコサミン以外はすべて細胞へのストレスと見なすことができる。

このようにして，今では仮性菌糸形成もストレス応答の一つとして捉えるようになった。仮性菌

糸形成はまた一種の多細胞化であり，それを構成する個々の細胞をつなぐ隔壁には孔が開いていて細胞間の連絡が容易であることが，ストレス応答としての仮性菌糸形成のメリットの一つであると考えることができる。さらに，二形性の発現がストレス応答であるとする，その機構を明らかにするには培養のごく初期の特異的な細胞の変化を知ることが重要となる。

本稿では，エタノールのストレスによる *C. tropicalis* の仮性菌糸形成と，種々のストレスで生じる *Saccharomyces* 酵母の仮性菌糸とそれに類似した多細胞化について，特にそれらの形態変化の引き金となる培養初期の出来事に焦点を当てて解説する。なお，エタノールによる *C. tropicalis* の仮性菌糸形成についての知見の一部はすでに総合論文の形でまとめている⁽⁴⁾が，そこには後の研究の基礎を成す部分が含まれており，しかも追加すべき内容もあるので，その項には*印を付して概略を述べる。

C. tropicalis におけるエタノールによるシグナル伝達を介する仮性菌糸形成とイノシトールの抑止効果

1. 菌の増殖と形態変化*

2.5% のエタノールが存在しても，培養の初期にはほとんどすべての細胞は酵母型であったが，それらは出芽細胞の分離抑制によって隔壁を介し

て鎖状に数個連なった形態をとり（奈良女子大学 鈴木孝仁教授の観察による）、対数中期に至って初めて個々の細胞が伸長した仮性菌糸が現われ始め、ほぼ完全な形態変化は対数後期以降で達成された。エタノールの効果はそれを培養初期に添加したときのみ発現し、増殖開始後に加えると菌の大部分は定常期に入っても酵母型を維持した⁽⁴⁾。このことは、エタノールによる形態変化の引き金反応は培養のごく初期に起こることを示唆している。

一方、イノシトールも増殖が始まった後では添加効果が低下し、対数中期以降で与えてもほとんど無効で、エタノールの影響のみが現われて菌は仮性菌糸型で増殖した。イノシトールを培養の初めから加えた場合も、初期には大部分の細胞は隔壁で連なった鎖状の酵母型を呈したが、増殖に伴ってすべての細胞が単細胞の酵母型となった。おそらく、イノシトール存在下ではキチナーゼ活性が高まり、それら鎖状の細胞も互いに分離したものと思われる。なお、イノシトールと同様にリン脂質の成分であるコリン、エタノールアミン、セリンの添加は無効であった。

以後、エタノール添加培養菌をエタノール菌、エタノールとイノシトールをともに加えて培養した菌をエタノール+イノシトール菌、無添加培養菌を対照菌と呼ぶ。

2. エタノール菌におけるイノシトールリン脂質に特異的なホスホリパーゼCの活性化*

上記の結果から、エタノールによる仮性菌糸形成には、増殖時期と、ホスファチジルイノシトール (PI) の挙動が密接に関係していると推定された。エタノール菌では、PI 代謝回転亢進に伴い増殖初期に PI 含量が著しく低下するが、イノシトールはその効果を妨げることがわかった⁽⁵⁾。PI 代謝回転は、イノシトールリン脂質に特異的なホスホリパーゼ C (PLC) が触媒する PI-4,5 ニリン酸 (PIP₂) の分解、すなわちイノシトール 1,4,5 三リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DG) の生成で始まる。そこで、IP₃ の菌体内蓄積の経時変化を調べた。

対照菌では培養初期から定常期に至るまで IP₃ 含量はほぼ一定であったが、エタノール菌では対数期のごく初期から対照菌の約 2 倍の高い値を示し、増殖とともに急激に減少して対数中期で対照値に、後期の終りにはきわめて低いレベルにまで低下し、定常期ではそのまま推移した。エタノール+イノシトール菌ではここでも対照菌とほぼ同じ結果が得られた。この研究でエタノールによる培養初期の一過性の PLC の活性化とイノシトールの抑止効果が実証され、イノシトールリン脂質シグナル伝達、とりわけ IP₃-Ca²⁺ 系の亢進が仮性菌糸の引き金となることが強く示唆されるに至った。その後、増殖のラグ期でも IP₃ の定量ができる程度の高接種量で実験を行ない、エタノール菌における PLC の活性化は増殖開始と同時に起こることを明らかにした。

3. イノシトールリン脂質シグナル伝達亢進に基づく仮性菌糸形成の際の IP₃-Ca²⁺ 系と DG-プロテインキナーゼ C (PKC) 系の役割*

エタノール菌では IP₃ の一過性の蓄積にやや遅れて、同様に Ca²⁺ 取り込みの一過性のピークが生じた。これは IP₃ による細胞内の Ca²⁺ プール（酵母では液胞と言われている）からの内部動員に続く細胞外からの Ca²⁺ 取り込み能の増大を示している。次に、エタノール菌では実際に細胞内 Ca²⁺ 濃度が高いことを示すために、電気穿孔を施した細胞に Ca²⁺ と結合して蛍光を発する物質フラ 2 (fura 2) を加え、個々の細胞内の蛍光強度を測定して Ca²⁺ 濃度を算出した。菌の増殖開始直後、IP₃ 蓄積のピークとはほぼ同時に、一過性の Ca²⁺ 濃度のピークが観察された。したがって、エタノール菌では増殖開始とともに IP₃-Ca²⁺ 系が亢進すると考えてよい。予期に反して、対数中期でも大きな Ca²⁺ 濃度のピークが見られた。前記のように、増殖のこの時期には IP₃ の蓄積量は対照値よりもはるかに低いので、このような Ca²⁺ 濃度の増大の機構と仮性菌糸形成における意義は不明である。しかし、仮性菌糸は対数中期で初めて出現するので、この Ca²⁺ 濃度の第 2 のピークは仮性菌糸の形成に何らかの重要な役割を

担っているのかもしれない。

もう一方のシグナル伝達系である DG-PKC 系の役割を知るために、エタノールの代わりにカルシウムイオノホアの A 23187 を加えて菌を培養すると、少なくとも一部の細胞が仮性菌糸型で増殖した。A 23187 とともに膜透過性の合成 DG、たとえばジオレインや 1-オレオイル-2-アセチルグリセロールを加えると仮性菌糸の割合が増え、特に DG よりも PKC 活性化作用が大きいと言われている TPA (12-*O*-テトラデカノイルホルボール 13-アセテート) などのホルボールエステルの A 23187 との共存効果は著しく、エタノール添加の場合に匹敵するほどの仮性菌糸が出現した。しかし、DG や TPA は単独ではほとんど無効であったので、仮性菌糸形成には IP_3 - Ca^{2+} 系が中心的に働き DG-PKC 系は補助的に作用すると結論できる。

なお、本菌では PKC の存在は知られておらず、筆者らも活性検出を試みたが成功しなかった。これは、使用した基質 (H1 ヒストン) に問題があると思われる。おそらく、*C. tropicalis* でも PKC は *S. cerevisiae*⁽⁶⁾ の場合と同様に機能していると思われるが、*S. cerevisiae* の PKC は TPA では活性化されないと言われているので検討を要する。

4. エタノールによる仮性菌糸形成に関する変異株

鈴木ら⁽⁷⁾が分離した *C. tropicalis* Pk 233 のコロニー形態変異株の中で、それぞれドーナツ型、フリル型、ウニ型、クルミ型のコロニーを形成する M1, M2, M3, M4 の4株について、液体培地におけるエタノールによる仮性菌糸形成、および IP_3 の菌体内蓄積と Ca^{2+} の取り込み能の変化を調べた。

M1 と M2 はエタノール培地でも酵母型で増殖し、 IP_3 の蓄積も Ca^{2+} 取り込み能の増大も起こらなかった。一方、M3 では親株と同様にシグナル伝達の亢進と仮性菌糸の形成がみられ、いずれもイノシトールによって抑制された。これら変異株の挙動は、イノシトールリン脂質関与のシグナル伝達と仮性菌糸形成の密接な関係を一層明確

に示している。なお、M4 はエタノールが存在するとまったく生育できなかった。

5. エタノールによる PLC の活性化と膜の流動性

エタノールは膜の流動性を上昇させることが知られているが、それはリボソームなどを用いた *in vitro* の系で得られた結果に基づくものである。筆者らは工業技術院生命工学工業技術研究所の小松泰彦研究室長、大淵 薫主任研究員らとの共同研究において、蛍光偏光消去法を用いて生菌の膜の流動性を経時的に測定し、エタノールとイノシトールの効果を調べた。増殖の盛んな対数期では膜の流動性が高く、定常期では低いという予想に反して、定常期の前培養からの接種菌は膜の流動性が高く、対照菌では増殖開始と同時にその値は急激に減少して対数初期で最低に達し、対数後期まで低いレベルを保ったあと増加に転じ、定常期で元の高い値に戻った。これは、生理的活動が盛んで、それ故に細胞の状態が不安定な増殖時に膜を固くして恒常性を保とうとする適応の表われであり、興味深い現象である。一方、エタノール菌では増殖が始まって膜の流動性は低下せず、しばらく接種時の値を保ち、その後、対数中期にかけて逆にかなり上昇し、対数後期から定常期に至って元の値に戻った。

このように、エタノールは *in vivo* でも膜の流動性を上昇させることが立証されたが、単にそのことに留まらず、細胞増殖に伴う流動性の急激な減少を妨げるという新しい事実が明らかになった。膜の流動性が高いということは、膜が活動性に富み、それだけに不安定であることを示唆している。したがって、エタノールは膜の流動性を高めることによって膜酵素 PLC を活性化すると考えることができる。エタノール+イノシトール菌では、エタノールの効果は抑えられて対照菌と同様に増殖開始と同時に膜の流動性の急激な低下が見られた。また、蛍光偏光法と同様に生菌体の示す ^{13}C -NMR スペクトル⁽⁸⁾ を調べたところ、エタノール菌ではリン脂質のアシル基に大きな変化が認められ、イノシトールでその効果が抑制されることがわかった。この事実、上記の膜の流動

性に及ぼすエタノールとイノシトールの効果を支持している。

膜の流動性が本菌の二形性の発現，すなわち仮性菌糸形成に決定的な重要性をもつことは，膜の流動性を下げてその安定性を高めると言われているソルビトールを加えると，その濃度に応じてエタノールによる形態変化が抑制され，2.5% エタノールの効果が 1 M ソルビトールで完全に阻止されたことによって支持された。また，エタノールの代わりに 1 mM のパルミトレイン酸，リノール酸，またはリノレン酸を添加すると，わずか 1~2% ながら確実に 仮性菌糸が出現し，エタノールの効果もこれら不飽和脂肪酸によって促進された。さらに，前記のように本菌でも *C. albicans* と同様に高温 (37°C) 培養で仮性菌糸が生じることを見だし，次いで温度と膜の流動性との関係もここで示した非破碎菌体を用いる方法で実証した。これらの事実は，すべて膜の流動性と仮性菌糸形成との密接な関係を明示している。

6. 膜の流動性に 及ぼす エタノールと イノシトールの効果の解析

上記の結果から，エタノールには *in vivo* でも膜の流動性を上昇させる作用があることが明らかになった。エタノールは膜のリン脂質のアシル基にも極性基にも親和性があるので，膜の流動性に影響するのは当然であろう。一方，膜の流動性は膜自身の性質，とりわけ膜脂質，中でもリン脂質の組成に大きく影響されるはずである。そこで，膜の流動性の変化が最も顕著な培養初期に重点をおいて，菌体リン脂質含量の変化を調べた。

対照菌の PI は増殖開始後間もなく急激に増加したが，エタノール菌では逆に著しく減少した。これは前記のエタノールによる PLC の活性化に伴う PI 代謝回転の亢進が原因で起こると考えられる。一方，PI は構成脂肪酸としてパルミチン酸に富み，リノレン酸が少なく，しかもその割合はエタノールやイノシトールの添加ではほとんど影響を受けないので，エタノールによる PI の減少は少なくともその周辺の膜の流動性の上昇につながるであろう。エタノールのこの効果は，前記の

ような直接の物理化学的作用を助長して，菌の増殖に伴う膜の流動性の急激な低下を防ぎ，それを高水準に保つことに役立っていると考えられる。

PI よりも含量の高いホスファチジルエタノールアミン (PE) とホスファチジルコリン (PC) はエタノールによってわずかながら有意に増加した。PE と PC は，PI とは逆にパルミチン酸が少なく，リノレン酸が多いので，エタノール菌の膜の流動性の上昇はこの変化によっても助長されることになる。また，エタノール菌のホスファチジルセリン (PS) は PI とは逆に対数期で急激に増加し，しかも PI と同様にパルミチン酸の含有率が高いので膜の流動性を低下させるようにみえるが，リノレン酸含量も比較的高く，そのうえ何よりも PS 含量自体が著しく低いので，膜の流動性への影響は少ないと考えられる。一方，本菌でも高等生物におけると同様に，PS が PKC の活性化に一役果たしているとする，対数期のエタノール菌での PS の急激な増加は，上記のエタノールによる仮性菌糸形成における DG-PKC 系の関与の可能性を支持している。イノシトール添加の場合には，PI の増加に伴い，リン脂質組成に及ぼす上記エタノールの効果はすべて阻止され，膜の流動性とリン脂質組成との関係が裏づけられた。

一方，ステロールには一般に膜の流動性を低下させる作用があると言われている。本菌では調べていないが，後で述べる *Saccharomyces* 酵母の場合，高温による出芽細胞の分離抑制の際には，特定の不飽和脂肪酸（この場合はパルミトレイン酸）の増加に加えて，膜局在性の遊離型ステロールの減少がみられた。これは，高温に伴う膜の流動性の上昇をできるだけ抑えようとするストレス応答の表われの一つと考えられる。

7. エタノールによる 仮性菌糸形成とヒドロキシラジカル (OH $\cdot$)

エタノールは OH $\cdot$ スカベンジャーとしても知られている。OH $\cdot$ は還元型の遷移金属イオンと H₂O₂ の反応で生じるので，エタノールによる仮性菌糸形成に及ぼす FeSO₄ 添加の影響を調べた

ところ、濃度依存的に抑制がみられ、100 μM ですべての菌が酵母型で増殖した。この Fe^{2+} の効果は H_2O_2 が共存すると著しく促進された。 H_2O_2 無添加でも効果がみられたのは、本菌には電子伝達系やカタラーゼが存在するにもかかわらず、常にある程度の量の H_2O_2 が生成、蓄積していることを示唆している。

また、アスコルビン酸にも促進効果がみられた。これは、反応過程で生じた Fe^{3+} から Fe^{2+} を再生させる作用によると判断できる。 Fe^{3+} の添加もある程度有効であり、これは菌体中の還元物質によって Fe^{2+} が再生して $\text{OH}\cdot$ が生じるためと思われる。他の還元型の遷移金属イオン、たとえば Cu^+ にも効果がみられた。さらに、 Fe^{2+} はエタノールによる PLC の活性化も抑制することが実証された。したがって、エタノールが $\text{OH}\cdot$ スカベンジャーとして働いて PLC を活性化すると推定されるが、その機構、とりわけ $\text{OH}\cdot$ と膜の流動性との関係の解明が今後の重要な課題である。なお、以上の事実は、出芽酵母の母細胞からの正常な分離にはある程度の $\text{OH}\cdot$ の存在が必要であるという興味深い内容を含んでいる。

8. エタノールによるアデニル酸シクラーゼ (AC)-cAMP シグナル伝達系の亢進⁽⁹⁾

AC-cAMP 系は、イノシトールリン脂質系と並ぶ主要なシグナル伝達系である。この系に及ぼすエタノールとイノシトールの影響を調べた。対数増殖期のエタノール菌に特異的に cAMP の細胞内蓄積が起こり、 IP_3 の蓄積や Ca^{2+} 動員の場合と同様に一過性であったが、そのカーブは緩やかでピークは対数中期にみられた。cAMP 合成を触媒する AC の活性もエタノール菌で高く、cAMP とほぼ同様のパターンで変化し、いずれもイノシトールで抑制された。一方、cAMP を分解する cAMP ホスホジエステラーゼの活性はエタノールやイノシトールの影響を受けなかったもので、エタノール菌における cAMP の蓄積は AC の活性上昇によってその生合成が促進されたためであると結論された。

AC の活性と膜の流動性との関係は明らかでは

図 2 ■ エタノールによる *C. tropicalis* Pk 233 の仮性菌糸形成と、イノシトール、ヒドロキシルラジカルによるその抑制の機構

$\text{C}_{16:0}$: パルミチン酸, $\text{C}_{18:3}$: リノレン酸, ↑: 増加, (活性) 上昇, ↓: 減少, (活性) 低下, ➡: 促進, ⇐: 抑制, 阻害, その他の略語, 記号は本文参照。

ないが、その活性化は IP_3 - Ca^{2+} 系よりも遅れて現われるので、後者の亢進が原因かもしれない。仮性菌糸形成における cAMP の役割は今のところまったくわかっていない。cAMP や膜透過性の高いジブチジル cAMP を培地に加えても形態変化は起こらないし、AC の触媒ユニットを直接活性化して cAMP 濃度を上げるフォルスコリンの添加効果も認められなかった。また、これらは DG や TPA のようにカルシウムイオノホア A 23187 の効果を促進することもなかった。仮性菌糸形成における AC-cAMP 系の役割の解明は今後に残された研究課題の一つである。

以上の研究を通じて、おぼろげながら見えてきたエタノールによる *C. tropicalis* の仮性菌糸形成、およびイノシトールと $\text{OH}\cdot$ によるその抑制の機構を図 2 に示す。

Saccharomyces 酵母の二形性

Saccharomyces 酵母は、古くから仮性菌糸に似た形態をとることが記載されているが、それを正面から論じたものはなかった。一方、特に *S.*

図 3 ■ *S. cerevisiae* ATCC 9080 の形態変化

A: 酵母型 (対照菌), B: 見かけの凝集体 (イノシトール欠乏菌), C: 仮性菌糸型 (エタノール菌, ただしイノシトール共存)

carlsbergensis で、イノシトールが欠乏すると PI の不足によって膜の生合成が抑制され、いわゆる unbalanced growth が起こり菌は死滅に至る⁽¹⁰⁾ が、それに先立って菌体が凝集することが知られていた。実はこれは見かけの凝集であって個々の細胞の集合体ではなく、出芽細胞が母細胞から分離しないままに次々にランダムな方向に出芽して生じたものであることは、イノシトール欠乏による凝集 (以下、イノシトール欠凝集) を最初に記載した Smith⁽¹¹⁾ も述べている通りである。

このように見かけの凝集は仮性菌糸と類似の現象であり、ただ、出芽に方向性がなく、個々の細胞が細長くないばかりか、酵母型よりも球形に近いという点で著しく異なっている (図 3-B)。その機構については細胞壁との関係を指摘した報告⁽¹²⁾ があるが、仮性菌糸との類似性やシグナル伝達との関与を論じたものはない。今後、アクチンなどの細胞骨格の細胞内分布を調べて仮性菌糸との比較を厳密に行ないたい。この凝集体も見かけは違って仮性菌糸と同様に個々の細胞が隔壁で連なった多細胞型であり、前述の考え方によればイノシ

トール欠乏という死滅につながるストレスに何とか耐えるための細胞応答と見なすことができる。

そこで、*S. carlsbergensis* ATCC 9080 を用いてイノシトール欠凝集の生成条件を検討した⁽¹³⁾。アトキン改変培地からイノシトールだけを除いて培養した場合には凝集が起こったが、同時にピリドキシンも除去すると菌は正常な酵母型で増殖することを見いだした。ところが、その条件でチアミンも与えないとイノシトール欠の効果が現われて菌は凝集した。

先に筆者ら⁽¹⁴⁾は、本酵母によるビタミン B₆ のバイオアッセイの機構を研究し、培地に加えたチアミンが菌体内に多量に蓄積してビタミン B₆ の生合成を阻害し、その結果、ビタミン B₆ 酵素、とりわけ δ -アミノレブリン 酸合成酵素の活性低下に伴ってヘム、チトクロムの欠乏が起こり、呼吸能の低下ばかりでなく、不飽和脂肪酸含量の低下と、エルゴステロールの減少、その前駆体の蓄積などの脂質組成の変化、さらには発酵の促進やアミノ酸代謝の変化を招き、好気的な増殖が抑えられるが、ピリドキシンなどのビタミン B₆ 化合物を添加すると、その量に応じてこれらの影響が除かれ、菌は正常に増殖することを報告した。種種検討の結果、上記のイノシトール欠凝集の場合にもチアミン、ピリドキシンは同様の効果を及ぼすことがわかった。

そこで、出芽細胞の分離抑制と膜の流動性との

関係を考慮して、本酵母の主要な不飽和脂肪酸（パルミトレイン酸とオレイン酸）の添加効果を調べたところ、チアミン添加、ピリドキシン無添加の場合でもイノシトール欠凝集が起こり、特にパルミトレイン酸の効果が顕著であった。不飽和脂肪酸の効果はイノシトールによって拮抗的に阻止された。イノシトール欠凝集を伴って増殖中の菌ではパルミトレイン酸含量と凝集度の間には高い相関が認められた。これらの結果と、本酵母の PI はパルミチン酸に富み、パルミトレイン酸が少ないことから、イノシトール欠、つまり PI 欠では膜の流動性が高まり、シグナル伝達の亢進を介して出芽細胞の分離が抑えられ、見かけの凝集が起こると考えられた。事実、本菌のイノシトール欠凝集に先立って培養開始時に PLC の活性上昇が認められた。このように、イノシトール欠凝集の機構の研究から、本酵母でも *C. tropicalis* の場合と同様に、ストレス応答としての出芽細胞の分離抑制が認められたので、次に仮性菌糸の形成との関係を追求するべく研究を進めた。

まず、見かけの凝集を防ぐのに十分なイノシトール ($\geq 1 \mu\text{g}$) が存在しても、2.5% 以上のエタノールを添加して *S. carlsbergensis* や *S. cerevisiae* を培養すると仮性菌糸が現われることを認めた (図 3-C)。同じ頃、Fink ら⁽¹⁵⁾ が窒素源欠乏培地で *S. cerevisiae* が仮性菌糸を形成することを報告し注目を集めたが、それは寒天平板上でのコロニー形成の場合に限られており、液体培地での仮性菌糸形成の観察は筆者らが最初である。エタノールのほかにも A 23187 や cAMP、またはチアミンの添加、あるいは窒素源欠乏によっても仮性菌糸が出現した。どの場合も見かけの凝集体が混在していた。A 23187 の効果は、本酵母の二形性発現においても $\text{IP}_3\text{-Ca}^{2+}$ 系が重要な役割を担っていることを示唆している。cAMP の効果は、本菌ばかりでなく *C. tropicalis* でも二形性発現に AC-cAMP 系が関与する可能性を示唆している。チアミンは形質膜の特異的なタンパク質に結合してから本酵母菌体に取り込まれ、遊離の形で蓄積することが知られている⁽¹⁶⁾。チアミンの結合が間断なく続くことが膜へのストレスとなるのである

う。窒素源の欠乏も一種のストレスと考えられる。

一方、高温培養ではイノシトール欠と同様に見かけの凝集体のみが生じた。いずれの場合にも培養初期に PLC の活性上昇が認められ、出芽細胞の分離抑制に基づく多細胞化において、イノシトールリン脂質シグナル伝達が普遍的な役割を演じていることが示されたが、*Candida* 酵母と *Saccharomyces* 酵母、仮性菌糸形成と見かけの凝集の間で興味ある違いが認められた。すなわち、*Candida* 酵母と *Saccharomyces* 酵母における仮性菌糸形成の場合、前者では IP_3 の蓄積は増殖開始と同時に始まり、短時間でピークに達したのち、対数初期から後期にかけて減少し、その後は低い値を保ったが、後者では IP_3 は培養開始とともに最高値を示し、ラグ期の間に急速に減少し、増殖が始まると再び増加して対数中期で第 2 のピークが出現した。一方、*Saccharomyces* 酵母の見かけの凝集では、培養開始時の IP_3 の蓄積は仮性菌糸形成の場合と同様であったが、第 2 のピークは検出されなかった。したがって、本酵母における IP_3 蓄積の第 2 のピークは細胞の伸長に関わる可能性も考えられる。前記の細胞内 Ca^{2+} 濃度の第 2 のピーク、cAMP 蓄積のピークもほぼ同じ時期に現われることと関係があるのかもしれない。これらの現象は、シグナル伝達と形態形成との間の興味深い関係を示している。

*

以上述べたように、真菌二形性の生化学的機構の一端が明らかになってきた。さらにここに示した研究の過程で得られた新しい事実の中には、二形性の枠を超えてそれぞれ独立に発展する可能性のあるものも含まれている。これらの現象の分子機構の解明が今後の大きな課題である。

文献

- 1) M. Hirai, S. Shimizu, Y. Teranishi, A. Tanaka & S. Fukui: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2335 (1972).
- 2) Y. Yamada, Y. Tani & T. Kamihara: *Trans. Microl. Soc. Japan*, **23**, 137 (1982).
- 3) Y. Tani, Y. Yamada & T. Kamihara: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 351 (1979).
- 4) 上原徹次郎: *細胞*, **22**, 44 (1990).
- 5) Y. Uejima, T. Koga & T. Kamihara: *FEBS Lett.*, **214**, 127 (1987).

- 6) K. Ogita, S. Miyamoto, H. Koide, T. Iwai, M. Oka, K. Ando, A. Kishimoto, K. Ikeda, Y. Fukami & Y. Nishizuka : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5011 (1990).
- 7) T. Suzuki, Y. Miyamae & I. Ishida : *J. Gen. Microbiol.*, 137, 161 (1991).
- 8) K. Obuchi, S. C. Kaul, H. Iwahashi, M. Ishimura & Y. Komatsu : *Cryo-Letters*, 11, 287 (1990).
- 9) K. Omi & T. Kamihara : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162, 646 (1989).
- 10) G. J. Ridgway & H. C. Douglas : *J. Bacteriol.*, 75, 163 (1958).
- 11) R. H. Smith : *J. Gen. Microbiol.*, 5, 772 (1951).
- 12) B. A. Hanson : *J. Bacteriol.*, 159, 837 (1984).
- 13) T. Kamihara, T. Fujimura, H. Nishihara & K. Nishimura : "Enzymes Dependent on Pyridoxal Phosphate and Other Carbonyl Compounds as Cofactors", Pergamon Press, 1991, p. 605.
- 14) T. Kamihara & I. Nakamura : *Adv. Biochem. Engineering/Biotech.*, 29, 35 (1984).
- 15) G. Fink : *Cell*, 68, 1077 (1992).
- 16) A. Iwashima, H. Nishimura & Y. Nose : *Biochim. Biophys. Acta*, 557, 460 (1979).

プロフィール

浮田 正夫 (Masao Ukita) 昭和18年11月21日生<略歴>昭和42年京都大学農学部農芸化学科卒業/44年同大学大学院農学研究科修士課程修了/同年山口大学工学部土木工学科助手/57年同講師/60年同助教授/平成元年同教授(社会建設工学科), 現在にいたる<研究テーマと抱負>生態経済システム, 富栄養化水質管理, 山林流出水質解析, 水処理など<趣味>テニス, 旅行

梅沢 洋二 (Yoji Umezawa) 昭和25年10月21日生<略歴>昭和49年慶応義塾大学工学部応用化学科卒業/50年(財)微生物化学研究会付属微生物化学研究所勤務/平成2年同研究所薬化学部主任研究員, 現在にいたる。昭和56年慶応義塾大学工学部にて学位取得<研究テーマと抱負>薬物設計, 生体高分子の構造と機能の解明<趣味>スキー, テニス, ゴルフをしてビールを飲むこと

緒方 朋行 (Tomoyuki Ogata) 昭和42年8月1日生<略歴>平成2年大阪大学工学部応用化学科卒業/4年同大学大学院工学研究科プロセス工学専攻博士前期課程修了/同年後期課程進学, 現在にいたる。平成5年より1年間米国ブルックヘブン国立研究所に滞在<研究テーマと抱負>芳香族化合物を光増感剤とする光誘起還元反応<趣味>ドライブ, バレーボール

加納 健司 (Kenji Kano) 昭和29年8月18日生<略歴>昭和52年京都大学農学部農芸化学科卒業/54年同大学大学院修士課程修了/57年同博士後期課程単位取得退学/同年岐阜薬科大学薬学部助手/平成3年同講師/4年同助教授/6年京都大学農学部助教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>細胞, 酵素, 活性中心の電子移動とそのバイオミメティック反応の解明<趣味>園芸

垣沼 淳司 (Atsushi Kakinuma) 昭和10年1月23日生<略歴>昭和32年東京

大学農学部農芸化学科卒業/同年武田薬品工業(株)入社/61年同社生物工学研究所所長/平成5年同社退社, 名古屋大学農学部応用生物科学科教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>プロテアーゼ/プロテアーゼインヒビター複合体の新しい生理機能<趣味>囲碁(6段), 歌唱, クラシック音楽, 野菜づくり

上原悌次郎 (Teijiro Kamihara) 昭和5年7月27日生<略歴>昭和29年京都大学理学部化学科卒業/31年同大学大学院理学研究科修士課程修了/34年同大学大学院工学研究科博士課程単位取得退学/同年京都大学助手/48年同助教授/平成2年同教授/5年同大学大学院教授/6年同大学名誉教授/7年大阪体育大学教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>細胞のストレス応答の解析: ①酵母の形態形成の生化学的機構, ②微生物における呼吸と嫌氣的代謝の調節<趣味>歩くこと, 読書, 旅行

河田 照雄 (Teruo Kawada) 昭和28年11月14日生<略歴>1983年京都大学大学院農学研究科修了/同年日本学術振興会奨励研究員/1984年京都大学農学部助手/1994年同助教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>生体のエネルギーバランスと健康<趣味>旅行, 食べ歩き

金 武 祚 (Mu-jo Kim) Vol.31, No. 5, p.311参照

城田 久岳 (Hisatake Shirota) 昭和29年9月22日生<略歴>昭和55年山口大学工学部化学工学科卒業/同年宇都短期大学環境衛生学科助手/60年同講師/平成元年同助教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>生態経済システム, 廃棄物の資源リサイクル<趣味>スキー, テニス

瀬戸 治男 (Haruo Seto) Vol.33, No. 1, p.28参照

高橋 秀久 (Hidehisa Takahashi) 昭和27年9月18日生<略歴>昭和59年岐阜薬科大学大学院薬学研究科博士前期課程修了(薬博)/同年太陽化学(株)総合研究所勤務, 現在にいたる。この間, 61~63年聖マリアンナ医科大学研究生(臨床医学教室)<研究テーマと抱負>生活活性物質の探索<趣味>家庭菜園

西尾 元宏 (Motohiro Nishio) 昭和11年9月5日生<略歴>昭和34年東京大学薬学部薬学科卒業/同年明治製菓(株)入社後, 研究部門で化学, 薬物代謝, 薬理部門を経て, 薬品開発本部勤務, 現在にいたる。この間, 36~38年東京大学農学部農芸化学科出向, 40~41年フランス・パリ大学薬学部留学<研究テーマと抱負>化学, 生化学におけるCH/ π 相互作用概念の定式化<趣味>旅行, 読書, 芸術(音楽, 美術, 美味)鑑賞, 園芸

西谷 和彦 (Kazuhiko Nishitani) 昭和28年7月25日生<略歴>昭和51年大阪市立大学理学部生物学科卒業/56年同大学大学院理学研究科博士課程修了(理博)/同年日本学術振興会奨励研究員/58年鹿児島大学教養部講師/59年同助教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>形態形成の制御機構<趣味>18世紀の西洋音楽

樋江井祐弘 (Yukoh Hiei) 昭和34年11月22日生<略歴>昭和57年岐阜大学農学部農学科卒業/同年日本専売公社金沢地方局入社/60年日本たばこ産業(株)会社発足後, 磐田試験場, 宇都宮試験場に勤務, 平成元年同社遺伝育種研究所に在籍, 現在にいたる<研究テーマと抱負>イネにおけるアグロバクテリウム法の特徴をさらに詳しく調べていきたい<趣味>TVスポーツ観戦。今年はジュビロスタジアムに少なくとも3回は足を運びたい