一方別のプリン代謝阻害剤である 8-アザグアニンも又, 供試 *major* 株の濃塩時の生育に特に著しい阻害的影響を及ぼすことをみた。

尚 *major* 株は濃塩時には尿素を利用しない事実をみとめた。

本報の一部は昭和 32 年 8 月, 日本農芸化学会東北支部第 9 回大会 (於仙台) で講演した。

終りに臨み, 本研究に終始貴重な助言を戴いた研究室員各位に深謝する。

(1) 佐藤正弘, 植村定治郎 : 本誌, 32, 79(1958).	baum, M.D. Hickey, S.J. Thannhauser : <i>Biochim. et Biophys. Acta</i> , 20, 135(1956).
(2) H. de Robichon-Szulmajster : <i>Biochim. et Biophys. Acta</i> , 21, 213 (1956).	(10) 佐藤正弘, 山田一弥, 植村定治郎 : 本誌, 30, 492 (1956).
(3) B. W. Agranoff, R. M. Bradley, R. O. Brady : <i>ibid.</i> , 25, 445 (1957).	(11) 佐藤正弘, 斎藤恭子, 男沢熙子, 小嶋尚夫, 植村定治郎 : 本誌, 31, 675 (1957).
(4) I. Lieberman, L. Berger, W. T. Gimenez : <i>Science</i> , 124, No. 3211, 81 (1956).	(12) H. Onishi : <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 21, 143 (1957).
(5) E. P. Kennedy : <i>J. Biol. Chem.</i> , 222, 185 (1956).	(13) B. Magasanik : <i>Ann. Rev. Microbiol.</i> , 11, 221 (1957).
(6) E. P. Kennedy, S. B. Weiss : <i>ibid.</i> , 222, 193 (1957).	(14) M. Ingram : <i>An Introduction to the Biology of Yeast</i> (1955).
(7) L. F. Borkenhagen, E. P. Kennedy : <i>ibid.</i> , 227, 951 (1957).	(15) G. L. Cantoni : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 74, 2942 (1952).
(8) Y. Sugino : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 79, 5074 (1957).	(16) M. B. Hoagland, E. B. Keller, P. C. Zamecnik : <i>J. Biol. Chem.</i> , 218, 345 (1956).
(9) G. Schmidt, K. Seraidarian, L. M. Green-	

醤油酵母の食塩耐性 (第5報)*

醤油酵母の耐塩性に及ぼす阻害剤の影響 (2)

佐藤正弘, 植村定治郎 (東北大学農学部)

昭和 33 年 4 月 19 日 受理

緒 言

メチオニンの antimetabolite であるエチオニンが醤油酵母の濃塩時の生育を特に著しく阻害^(1,2)することをみたので, 別のプリン代謝阻害剤として 8-アザグアニンを用い, その醤油酵母の生育に及ぼす影響を観察したところ, このものもやはりエチオニンと同様, 濃塩時に著明な阻害を示す傾向を有することをみとめた⁽²⁾。前報に於いてはこれらの成績から著者等は醤油酵母の耐性機作に於けるプリン代謝の重要性を想定したが⁽²⁾, この点を更に確めるためにひきつづき 8-アザグアニンの *major* 株の生育に及ぼす影響を精査し, 2, 3 の結果を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

- i) 供試菌株 研究室保存の醤油酵母 *Zygosaccharomyces major* st. *Kikkoman* を用いた。
 - ii) 培地並びに培養方法 前報⁽²⁾に準じたが, 供試ビタミンにはビオチン, イノシトール, パントテン酸, チアミン等 4 種のみを用い, N 源にはアミノ酸混合物を用いた。
- 以上特に記した外はすべて既報⁽¹⁻³⁾に準じた。

実 験 成 績

1. *Zygosacch. major* st. *Kikkoman* の生育に及ぼす 8-アザグアニンの影響 著者等はさきに培地に添加した 8-アザグアニンがほぼ 400 γ /ml の濃度で, 無塩時に約 3 日, 10% 加塩時に於ては少なくとも 20 日, *major* 株生育の誘導期を延長させることをみたが⁽²⁾, この阻害剤濃度では酵母に加えられる阻害の影響が大に過ぎ種々の検索に不適当と考えられたので, 供試の *major* 株に対する最少の生育阻害濃度を求めたところ 200 γ /ml

* On the Halophilic Character of Shōyu-Yeast. Part V. Effects of Inhibitors on the Halophilic Behaviour of the Yeast. (2)

By Masahiro SATO and Teijiro UEMURA (Faculty of Agriculture, Tohoku University)

第 1 図 *Zygosacch. major* st. *Kikkoman* の生育に及ぼす 8-アザグアニンの影響 (30°, 48 時間静置培養)

●-●: 無塩時 △~△: 4% 加塩時 ○~○: 10% 加塩時

第 2 図 *Zygosacch. major* st. *Kikkoman* の生育に及ぼす食塩の影響

- 1.....麹汁 (Bilg. 10°)
- 2.....合成培地 (カザミノ酸 N 源, 9 ビタミン添加-glucose-salt 培地)
- 3.....パントテン酸完全供与培地 (ビタミンとしてパントテン酸のみ 500 γ/l の濃度に添加)
- 4.....パントテン酸不完全供与培地 (ビタミンとしてパントテン酸のみ 10 γ/l の濃度に添加)
- 5.....全ビタミン欠除培地 30°, 72 時間静置培養 培地並びに培養方法は第 1 報参照

られる場合無塩時にはわずかしき阻害の出現がみられないのに反して 4% 並びに 10% 加塩時には著明な阻害が急激に出現した。これらの事実はいうまでもなく前項に述べた推定を強く裏書きしている。

III. *major* 株の 8-アザグアニン阻害に及ぼす含硫アミノ酸の影響

供試の *major* 株に対するエチオニの

以下にあることをみとめた*。そこでまず *major* 株について含硫アミノ酸添加の最少制限培地を用い、培地中 8-アザグアニンの濃度を逐次増大せしめる際、無塩及び 4%, 10% 加塩時の生育に如何なる影響が現われるかをみた。第 1 図は阻害剤添加区の生育度低下量と阻害剤欠除区の生育度との比を阻害度 (百分比) として、これと阻害剤濃度との関係を示したものであるが、このものはエチオニと同様濃塩時での阻害効果が著しく、無塩時の生育が 100 γ/ml の濃度でようやく 80% の阻害をうけるのに比して 20% 加塩時には 20 γ/ml の濃度で既に 100% に達した。しかもこの場合、通常無塩時に比してむしろ供試酵母の生育に良好な影響を与える 4% 加塩時に 10% 加塩時と殆んど同程度の阻害がみられることは大に注目される。供試の *major* 株の耐塩性 (第 2 図) から判断すれば、この酵母が食塩阻害をうける濃度限界は 6~7% にあるとみられるが、供試のような 8-アザグアニンによる阻害

状況からみるとその限界はむしろ 3, 4% 以下の食塩濃度にあると考えられる。

II. *Zygosacch. major* 株にみられる 8-アザグアニン阻害に及ぼすグアニンの影響

以上の成績からプリン代謝の阻害剤である 8-アザグアニンの阻害的影響が加塩時に強く現われることが明らかになったので、次いでこのものと拮抗する代謝物質、グアニンがこの種の阻害に如何なる効果を及ぼすかを検索した。

第 3 図は第 1 図の実験に用いた培地に 40 γ/ml の濃度にグアニンを添加して得た成績を第 1 図と同様に図示したものであるが、図に明らかなように、グアニンを添加すると無塩並びに加塩のいずれの場合にもその阻害は著しく回復した。しかし添加したグアニンに対して当量 (約 40 γ/ml) 以上の阻害剤が培地に加え

第 3 図 8-アザグアニンによる *Zygosacch. major* st. *Kikkoman* の生育阻害に及ぼすグアニンの影響 (30°, 48 時間静置培養)

●-●: 無塩時 △~△: 4% 加塩時 ○~○: 10% 加塩時 グアニン濃度: 40 γ/ml

* 8-アザグアニンが細菌の適応酵素生成を阻害する際の濃度に符合する⁽⁴⁾。

第4図 *Zygosacch. major* st. *Kikkoman* の生育に及ぼす 8-アザグアニンの阻害効果と含硫アミノ酸 (1)
(8-アザグアニン濃度 100 γ /ml の場合)

.....: シスチン, メチオニン無添加 —: 同添加時

第5図 *Zygosacch. major* st. *Kikkoman* の生育に及ぼす 8-アザグアニンの阻害効果と含硫アミノ酸 (2)
(8-アザグアニン濃度 200 γ /ml の場合)

.....: シスチン, メチオニン無添加 —: 同添加時

阻害とその含硫アミノ酸による回復については前報に述べたが、エチオニンの阻害効果がそのプリン代謝能に及ぶとすれば⁽⁶⁻⁹⁾, この種の阻害を打消すコリン-メチオニン系栄養因子は上述のような 8-アザグアニン阻害に対してもこれを妨げる効果を有すると期待される。そこでシスチン, メチオニンの両含硫アミノ酸の除去並びに添加時に於て 8-アザグアニンの阻害度がどのように変化するかを経時的に観察した。第4図は阻害剤濃度が 100 γ /ml の場合を示すが、この場合には無塩、加塩いずれの場合にも含硫アミノ酸の有無にかかわらず、培養時間の経過に伴って阻害が回復したから供与した含硫アミノ酸の阻害回復効果はとくにみとめられない。しかし添加する阻害剤濃度を倍加して 200 γ /ml の level にすると第5図に示すように、無塩時ではいずれの培地系でも阻害は培養時間の経過に伴って回復するが、4% 並びに 10% 加塩時に於ては含硫アミノ酸添加培地での阻害が無塩時のそれとほぼ同速度で逐次回復するに反して、含硫アミノ酸欠除培地培養がうける 100% の阻害は全く回復しない。

このようにメチオニンの 8-アザグアニン阻害回復効果が、阻害剤を比較的高濃度に添加する際にはじめて出現する機作については現在尚明確な解釈を下し得ないが、従来の成績からもうかがわれるように供試の酵母が不安定ながらもコリン-メチオニン系代謝物質の合成能を有するものとすれば^(1,2,10), 100 γ /ml 程度の 8-アザグアニン濃度による阻害は酵母自身の合成するこれ

らの代謝物質によってかなりの程度にうちけされることになり、その結果として培地に加えた含硫アミノ酸の効果が認識しうる程著明には現われ得なかったのであろうと考えられる。

最近 Schmidt 等⁽⁹⁾はパン酵母について、メチオニンのグアニン生成に対する促進効果をみとめたが、その際このようなメチオニンの効果が培地に添加するメチオニンの濃度によって異なることを指摘していることも供試の成績と密接な関連を予想させる。

何れにせよメチオニン等がこの種の阻害を回復しうる事實は、コリン-メチオニン系が供試の酵母に於いても核酸系物質の代謝に与ることを示唆するものとみることができる。

考 察

供試醤油酵母の耐塩性機作について研究するに当り、我々は濃塩時の代謝損傷から特定の栄養物質への要求性が高まるのではないかと考えて、特に濃塩時の酵母の生育に必要な栄養因子を検索した^(1,3)。その結果 *major* 株の濃塩時の生育に有効とみとめたイノシトール⁽³⁾, コリン並びに含硫アミノ酸⁽¹⁾の著明な効果が、これらのビタミン類及びアミノ酸相互の密接な栄養的関連に基づくことをみとめ、コリン-メチオニン系に属する代謝系が、

この種の酵母の耐塩性機作に何らかの重要な役割を演ずると推定した^(1,2)。しかしながら上に述べたコリン-メチオニン系栄養因子が常に醤油酵母によって要求されるということではなく、例えば供試の *major* 株は硫酸^(2,10)あるいは乳酸アンモン⁽¹⁰⁾のみを N 源とした加塩培養に於てもかなりの生育を示し、含硫アミノ酸等の供与を特に必要としない。従って供試の酵母は基本的にはこれら栄養因子の合成能を有するとみられるが、供試の成績が示すように、培養に最少制限培地を用い、又或は代謝阻害剤を添加することによって濃塩時には上述のような栄養因子に対する著明な依存性がみとめられるようになる。

一般に醤油酵母が濃塩時にも尚その安定性を保ちうる代謝系についてはこの場合検討されておらず、しかも供試の酵母についても他のより安定な系の存在が予想される以上、我々が注目したコリン-メチオニン系が耐塩性機作に主導的な代謝系とみなしうるか否かについては尚今後の検討にまたねばならない。

醤油酵母の耐塩性発生過程に於けるコリン-メチオニン系の主導性については尚暫らく措くとしても供試の成績が示すように、醤油酵母に与えた核酸代謝阻害がいずれの場合にも特異的に耐塩性の著しい低下を導いたこと、又更に遺伝耐性のこの種の失活がコリン-メチオニン系栄養因子の供与によって著明に妨げられることは供試酵母に於ける耐塩性の発生がその核酸代謝と密接な関係にあり、しかもこの代謝系にコリン-メチオニン系が寄与することを示唆しており、問題を解析する上の重要な鍵をなすものとみられる。

中村⁽¹¹⁾は *Endamoeba histolytica* についてアザセリンによる生育阻害がアデニン及びアデニル酸供与によって完全に回復されることをみとめた際、メチオニンも又セリン、4-amino, 5-imidazole carboxamide 並びに leucovorine 等とともに部分的ながら阻害回復効果を示すことを観察し、Schmidt 等⁽⁹⁾はメチオニンがパン酵母のプリン合成能を促進することをみとめている。一方イノシトールについても *Saccharomyces cerevisiae* の 1 変異株に於いて 2, 3 の核酸塩基との栄養的連関が指摘された⁽¹²⁾。又前報⁽¹⁾に於いて PABA が *major* 株の濃塩時に於ける含硫アミノ酸要求性をうちけす事実から含硫アミノ酸が PABA 関与の代謝系に関係するものと推定した。このことは勝沼等⁽¹³⁾による結核菌 PAS 阻害に関する研究からも当然示唆されるが、Gots 等⁽¹⁴⁾は *E. coli* の PABA 要求性変異株について、PABA の役割が Purine の合成系にあることをみとめ、しかもその際メチオン(並びに B₁₂) が PABA に対する代置活性を示すとともに、PABA 欠除時にみられる imidazole 誘導体の蓄積を妨げることを示した。これらの事実はいずれも微生物に於ける核酸系物質の代謝にコリン-メチオニン系が寄与することを示唆し、著者等の上述の推定を裏書しているが、一般に微生物の核酸合成能がその菌株の生育に必須なアミノ酸の供与によって維持されるものとすれば^(15,16)、供試酵母にあっても含硫アミノ酸の不完全供与乃至その利用を妨げるような阻害剤の添加がこの酵母の核酸合成能を減退せしめたとみることでもある。

コリン-メチオニン系については従来むしろ生体の脂質代謝との関係が多く論じられ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾、又 Smithies 等⁽²⁰⁾の研究も示すように耐塩性を裏付ける特殊な細胞構造の形成に脂質代謝が寄与しうることも当然予想されるが、最近この種の脂質系と核酸系が密接な共軛関係にあることを暗示する一連の事実⁽²¹⁻²⁵⁾も知られたことは極めて興味深い。

以上述べたことから明らかにように醤油酵母の耐塩性機作発生過程にコリン-メチオニン系が脂質並びに核酸系を介して寄与しうる可能性は充分認められるが、この場合これらの系の役割は細胞の構成代謝の unit としてむしろ菌体構成面から耐塩性を導く機作にあるものと推定される。

微生物の薬物耐性と核酸系物質との関連については、皆川等⁽²⁶⁾がみとめたように銅抵抗性酵母の RNA が非抵抗性酵母の銅培地中生存率を高める作用を示すこと、又 Smithies 等⁽²⁷⁾により好塩性の *Micrococcus halodentificans*, *Vibrio costicola* の加塩培養菌体が DNA slime を細胞周辺に蓄積する事実が知られている。しかしながら供試の成績をも含めてこれらの核酸代謝系が微生物の耐性機作に如何に寄与するかについては尚多くの問題が残されている。

著者等はさきに、醤油酵母の耐塩性機作を解析する際、この種の性質が後天的賦活系⁽²⁸⁾(適応耐性)並びに遺伝的構成系(遺伝耐性)より導かれると仮定してみても現在ではむしろ前者の面が主要な対象となることを述べたが⁽²⁹⁾、この面に於いて耐塩性の発生機作が 1 つには核酸代謝系の役割に帰結されたとすれば、この種の系を介して両者相互間の働き合の機作が解析の対象になりうるとも考えられる。

綜 括

前報にひき続き、*Zygosacch. major* st. *Kikkoman* の生育に及ぼす 8-アザグアニンの影響を検索し、このも

のもエチオニンと同様, 供試酵母の加塩時の生育を特に著しく阻害することを明らかにした。

8-アザグアニンの生育阻害効果は 100 γ /ml 以下の濃度でも観察されるが, この阻害はグアニンによって拮抗的にうちけされる。シスチン, メチオニンら含硫アミノ酸も又この阻害に対して部分的ながら回復効果を有することをみたが, 含硫アミノ酸のこの種の効果は供試の阻害剤濃度が比較的高レベルの場合に観察された。

これらの事実並びに前報の成績から, 供試酵母の耐塩性はその核酸代謝と密接な関係にあり, コリン-メチオニン系は一つにはこの種の代謝系を介して, むしろ菌体構成面から耐塩性を導く機作に与るものと推定した。

本報の一部は昭和 32 年 8 月, 日本農芸化学会東北支部第 9 回大会 (於仙台) で講演した。

終りに臨み, 本研究に終始貴重な助言を戴いた須藤恒二氏始め研究室の諸兄姉に厚く感謝する。

- (1) 佐藤正弘, 植村定治郎 : 本誌, 32, 79 (1958).
- (2) 佐藤正弘, 植村定治郎 : 本誌, 33, 13 (1958).
- (3) 佐藤正弘, 山田一弥, 植村定治郎 : 本誌, 30, 492 (1956).
- (4) E. H. Creaser : *Nature*, 175, 899 (1955).
- (5) G. L. Cantoni : *J. Biol. Chem.*, 189, 745 (1951).
- (6) G. L. Cantoni : *Federation Proc.*, 11, 330 (1952).
- (7) G. L. Cantoni : *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2942 (1952).
- (8) M. B. Hoagland, E. B. Keller, P. C. Zamecnik : *J. Biol. Chem.*, 218, 345 (1956).
- (9) G. Schmidt, K. Seraidarian, L. M. Greenbaum, M. D. Hickey, S. J. Thannhauser : *Biochim. et Biophys. Acta*, 20, 135 (1956).
- (10) H. Onishi : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21, 143 (1957).
- (11) M. Nakamura : *Nature*, 178, 1119 (1956).
- (12) H. Robichon-Szulmajster : *Biochim. et Biophys. Acta*, 21, 213 (1956).
- (13) 勝沼信彦 : 蛋白質・核酸・酵素, 31, 25 (1958).
- (14) J. S. Gots, E. C. Chu : *J. Bacteriol.*, 64, 537 (1952).
- (15) E. F. Gale, J. P. Folkes : *Biochem. J.*, 53, 483, 493 (1953).
- (16) F. Gros, F. Gros : *Biochim. et Biophys. Acta*, 22, 200 (1956).
- (17) 市原 硬 : 蛋白質及びアミノ酸の生化学 (共立出版), 199 (昭和 23 年).
- (18) S. W. Chaliner, N. W. R. Daniels : *Nature*, 176, 1267 (1955).
- (19) R. Posternak, W. H. Schopfer : *Arch. Sci. (Genova)*, 8, 316 (1955); *Chem. Abstr.*, 50, 14043 (1956).
- (20) W. R. Smithies, N. E. Gibbons, S. T. Bayley : *Can. J. Microbiol.*, 18, 605 (1955).
- (21) B. W. Agranoff, R. M. Bradley, R. O. Brady : *Biochim. et Biophys. Acta*, 25, 445 (1957).
- (22) I. Lieberman, L. Berger, W. T. Gimenez : *Science*, 124, 81 (1956).
- (23) E. P. Kennedy : *J. Biol. Chem.*, 222, 185 (1956).
- (24) E. P. Kennedy, S. B. Weiss : *ibid.*, 222, 193 (1956).
- (25) L. F. Borkenhagen, E. P. Kennedy : *ibid.*, 227, 951 (1957).
- (26) 皆川貞一 : 細胞化学シンポジウム, 1, 123 (1953).
- (27) W. R. Smithies, N. E. Gibbons : *Can. J. Microbiol.*, 18, 614 (1955).
- (28) 佐藤正弘, 植村定治郎 : 本誌, 30, 497 (1956).
- (29) 佐藤正弘 : 微生物生態論シンポジウム (昭和 32 年 4 月, 於東京) 講演; 同講演要旨, 25 頁 (昭和 32 年).