- (12) E. Szego : *Bull. assoc. chimistes sucr. dist.*, 48, 268 (1931); (11) による.
 (13) J. Grüss : *Wochenschr. Brau.*, 49, 389 (1932); (11) による.
 (14) M. Sprockhoff, A. Parlow : *Z. Spiritus-ind.*, 53, 63 (1930); (11) による; *C.A.*, 24, 4651 (1930).
 (15) J. Janicki : *Roczniki Chem.*, 12, 402 (1932); (11) による.
 (16) 高橋礼治, 島川忠夫, 渋谷新四郎 : 澱粉工誌, 5, 66 (1957).
 (17) 川村信一郎 : 本誌, 32, 749 (1958).
 (18) 横沢一二 : 農産加工技研誌, 2, 66 (1955).
 (19) 横沢一二, 桜井芳人 : 同誌, 2, 208 (1955).
 (20) 鈴木繁男, 田村太郎, 根本芳郎, 荒井克祐 : 日本農芸化学会大会での講演 (1957年4月9日).

酵母によるヌクレオチッドの分泌 (第1報)*

生菌懸濁液の分泌に及ぼす物理的, 化学的諸要因の影響

樋口昌孝, 植村定治郎 (東北大学農学部)

昭和 33 年 8 月 4 日 受 理

緒 言

さきに清酒酵母, 協会 6 号株と清酒乳酸菌との混合培養の際, 酵母より乳酸菌の生育に必要な各種ビタミン及び核酸塩基類が分泌されること, 又このような分泌は酵母のみを単独で適当な溶液中に incubate するだけでも起りうることをみたが^(1,2), 同様の現象は Rose 等によっても報告されている⁽³⁾. 特に核酸塩基類は他のビタミン類と比較してその量も多く, 又生体内に於ける核酸及び各種補酵素類の構成成分としての役割から考えると, このような物質が比較的短時間の incubation 中に細胞から分泌されるという事は注目に値する. 従ってこのような分泌と細胞の生理的条件や細胞のおかれた物理的, 化学的環境条件との関連を明らかにする事は単に微生物細胞内におけるこれら核酸塩基類のあり方について新しい知見を提供するだけでなく, これら物質の挙動を指標として, 現在余り研究が進められていない微生物細胞における分泌の機構を解明する上にも何らかの寄与をなしているものと思われる.

本報に於ては酵母の生菌懸濁液による分泌を基礎とし, incubation の諸条件中 pH, 温度, 好気度等の物理的要因の影響及び incubation に用いる緩衝液の組成, 種々の代謝阻害剤, 栄養因子等の化学的要因の影響につき検討した結果を報告する.

実 験 方 法

供試菌株 : 特にことわらない限り, ビール酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, Yebis) を用いた.

培養条件 : 次のような完全合成培地を基礎として, 実験の必要に応じて適当にその組成を変えた. 即ち, ブドウ糖 20 g, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.2 g, カザミノ酸 0.6 g, チアミン, ビリドキシン, Ca-pantothenate, ニコチン酸, イノシトール, para-aminobenzoic acid を各 200 γ , ビオチン 0.2 γ を水道水で 1 l に溶解 (pH 5.0). 培養は麴汁寒天培地に生育させた保存菌株より約 1 白金耳を上記完全合成培地 5 ml に接種, 30°, 48 時間静置した. 供試菌体を得る為にはこの subculture を更に上記合成培地 100 ml 当り 0.05 ml の割合で接種し, 通常は 30°, 72 又は 96 時間静置培養後, これを遠心し, 菌体を滅菌蒸留水で 2 回洗浄後, 滅菌蒸留水に懸濁し, original cell suspension とした (この菌体量, 通常は 10~15 mg dry weight/ml).

Incubation の条件 : 上記 original cell suspension 1.0 ml を適当な溶液 (標準条件は 2% ブドウ糖含有 0.08 M クエン酸-クエン酸塩緩衝液) で 10 ml に希釈, 内径約 2 cm, 高さ約 20 cm の試験管で静置 incubation を行なった.

分泌量の比較 : incubate 後の溶液を遠沈により菌体を除去, その上清を Beckman DU 型分光光度計で 240~280 $\mu\mu$ の吸収を測定, 酵母を懸濁しない incubate した同じ組成の溶液を対照として差引いた 260 $\mu\mu$ の

* The Secretion of Nucleotides by Yeast Cells. Part I. Influences of Physical and Chemical Factors on the Secretion by Yeast Cell Suspension.

By Masataka HIGUCHI and Teijirō UEMURA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University)

第 1 図 酵母による分泌物の紫外外部吸収曲線

96 時間培養 ビール酵母
2% ブドウ糖-0.08M クエン酸-Na 緩衝液 (pH 6.0)
30°, 3 時間 incubation.

第 1 表 菌種による分泌能の差異

菌 種	分泌量 ($\mu\text{M}/\text{mg}$)
ビール酵母 (<i>Sacch. cerevisiae</i> , Yebis)	0.41
清酒酵母 (協会 6 号)	0.30
醤油酵母 No. 2 (<i>Zygosaccharomyces</i> 型)	0.12
" No. 6 (<i>Torulopsis</i> 型)	0.20
サイレージ酵母 No. 32 (産膜性)	0.12
パン酵母 (<i>Sacch. cerevisiae</i> , Fleischmann O)	0.14

96 時間培養菌体, 2% ブドウ糖-0.08M 燐酸緩衝液 (pH 6.0),
30°, 3 時間 incubation.

第 2 図 老、若細胞における分泌能の比較

実験条件は第 1 図に同じ。

第 3 図 分泌に及ぼす温度の影響

96 時間培養 ビール酵母
incubation 条件は第 1 図に同じ

であることが予想される。

分泌の最適 pH は第 4 図に示すように pH 6~7 の中性附近にある。しかし分泌物の内容は pH の変化によっても異なるようである。即ちそのスペクトルを比較すると、pH 酸性側と中性、アルカリ性側では前者の方が比較的短波長 (240~260 $\text{m}\mu$) 吸収性の物質が多い傾向がみられた。

4. 緩衝液濃度及び好気度の影響 Incubation 溶液の浸透圧又はイオン強度の分泌に及ぼす効果をみる目的でクエン酸-Na 緩衝液の濃度を M/5 から M/50 まで変化させた。その結果は一応 M/20 附近が最適となつてはいるが、余り顕著な差はなかった。又 M/10 緩衝液に 1M NaCl を添加しても幾分促進的効果は認められた。

吸光度 (E_{260}) とヌクレオチドの平均分子吸光係数 10,816⁽⁴⁾ とから算定したヌクレオチドの μM 数を乾燥菌体 1.0mg 当りに換算し分泌量とした。

実験結果

1. Incubation 濾液の紫外外部吸収スペクトル Incubation 後、遠心して酵母を除いた液は第 1 図に示すように 258 $\text{m}\mu$ に吸収極大、240 $\text{m}\mu$ に吸収極少を有するが、既知の核酸系物質より短波長の吸収はかなり大きくなっている。また、紫外部に吸収を有する物質はこの外にも各種ビタミン類や芳香族アミノ酸等があり、吸収スペクトルだけではこの吸収の本体が核酸系物質であるとは断定できない。しかし、伊藤等の結果⁽²⁾と同様に最も多量に分泌されていると思われるニコチン酸でも pulp disc 法⁽⁵⁾での測定限界 (0.2 γ/ml) 以下に過ぎなかった。又アミノ酸はニンヒドリン呈色法⁽⁶⁾では 0.013 μM という結果がえられた。更に後に報告するように、この紫外外部吸収性物質の約 80% はアデノシン一リン酸 (AMP) 等のヌクレオチドであることが確められた。

2. 酵母の種類及び老若細胞による分泌能の比較

当研究室保存の数種の酵母について、その分泌能の比較を試みた。その結果は第 1 表の通りで同じ *Saccharomyces* でもビール酵母や清酒酵母では分泌能が高いのに反し、パン酵母では最も低くなっている。以後の実験には主としてビール酵母を用いることにした。又 incubation に用いる菌の培養時間を変えて、その培養時間の長い程細胞の age は古いものとし、老、若細胞について分泌試験を行なった (第 2 図)。一般に細胞の age の古いもの程分泌能が高い傾向がある。なおこの場合の菌の生育曲線からみると、48 時間は対数期の前期、96 時間では定常期初期に相当する。

3. Incubation の温度及び pH と分泌量

Incubation の温度を 0°, 15°, 30°, 37° の 4 種に分けて分泌量を比較した (第 3 図)。その結果、0° と 15° では分泌量に余り差がないのに反し、30° では 15° の 2 倍以上となり、37° では更に増大している。従って酵母細胞によるこれら物質の分泌は単なる物理的現象 (例えば pool 物質の拡散や吸着物の溶離等) ではなく生体内反応

第4図 pH の影響

120 時間培養ビール酵母

● 2% ブドウ糖-0.08M グリシン-Na 緩衝液
○ 2% ブドウ糖-0.08M グリシン (Na, K) 緩衝液
30°, 3 時間 incubation.

第2表 阻害剤及び抗生物質の効果

添加物	分泌量 (μM/mg)
蒸留水 (対照)	0.30
10 ⁻³ M NaN ₃	0.29
10 ⁻³ M CH ₃ COOH (モノヨード醋酸)	0.24
5×10 ⁻⁴ M 2,4-DNP (ジニトロフェノール)	0.26
300 γ/ml ストレプトマイシン	0.29
20 γ/ml クロロマイセチン	0.28
20 γ/ml ペニシリン	0.29

73 時間培養ビール酵母, 上記添加物を含む
2% ブドウ糖-0.08M グリシン-Na 緩衝液 (pH 6.0), 30°, 3 時間 incubation.

第5図 Incubation 溶液のイオン組成と分泌

A: 0.08M グリシン-Na 緩衝液 (pH 6.0)
B: 0.08M グリシン-K 緩衝液
C: 蒸留水 (pH, incubation 前 5.0, 後 4.5)
D: C+0.1g CaCO₃ (pH, incub. 前 5.0, 後 5.5)
E: 0.08M NaCl (pH, incub. 前 5.0, 後 4.1)
F: 0.08M KCl (pH, incub. 前 5.0, 後 4.0)
(いずれも 2% ブドウ糖を含む)
72 時間培養ビール酵母, 30°, 3 時間 incubation

次に shaking incubation (好氣的) と窒素気流中での shaking incubation (嫌氣的) 並びに通常の stand incubation (半嫌氣的) につき比較した。後 2 者については分泌量には余り差がなかったが、空気層で shaking incubation した場合は stand incubation の場合より約 50% 近く分泌量の増大が認められた。しかし両者の紫外吸収スペクトルには特に差異は認められなかった。

5. 阻害剤並びに抗生物質の効果 その結果は第 2 表に示す通りであり、わずかに阻害的傾向の認められるものはモノヨード醋酸のみで、他はいずれも著しい効果はない。又磷酸化反応の阻害剤であり、大腸菌のヌクレオチド生成と分泌を抑制する事が認められている arsenate の影響⁽⁷⁾をみたが(第 3 表), M/50 までは顕著な効果がなく, M/20 ではじめて微弱な抑制効果が認められた。しかし、これ位の濃度でわずか数パーセントしか効果がないとすれば、arsenate の特異的な効果とは考え難く、むしろもっと一般的な効果(例えばイオン強度等の影響)によるものと思われる。

第3表 Arsenate の効果

Na ₂ AsO ₄ 濃度 (M)	分泌量 (μM/mg)
0	0.44
2×10 ⁻³	0.43
10 ⁻²	0.46
2×10 ⁻²	0.44
5×10 ⁻²	0.42

72 時間培養ビール酵母, 上記添加物を含む
2% ブドウ糖-0.08M グリシン-Na 緩衝液 (pH 6.0), 30°, 3 時間 incubation.

6. Incubation

溶液のイオン組成
Incubation を緩衝液の代りに蒸留水(2% ブドウ糖含有)で行うと、第 5 図のように分泌量はグリシン-Na 緩衝液の約 30% まで低下する。

この原因として、主に次の 2 つの可能性が考えられる。(1) 分泌には適当な塩類の存在が必要か、(2) 緩衝液を含まない為に incubation 中に pH が低下し、これが分泌を押える。(1) の可能性についてはグリシン緩衝液の代りに、同濃度の NaCl, KCl 溶液で incubation を行なったが、分泌量は増大するどころかむしろ幾分抑制される傾向がある。この場合 pH の低下は 1.0 内外であった。次に若し (2) の可能性が正しいとすれば、CaCO₃ を添加すると pH の変化が殆んどないので、分泌量が増大してもよいはずであるが、結果は水だけの場合と殆んど変りない。従って、(2) の原因のみに帰することもできない。結局ヌクレオチドの分泌には中性附近の pH に加えて、塩類のうちでもグリシン酸や磷酸のような多価陰イオンの存在が必要と思われる。この事は緩衝液の種類を変えた時の分泌量の変化によっても裏付けられる(第 4 表)。即ち、同じ有機酸緩衝液でも醋酸やコハク酸緩衝液では分泌されるヌクレオチド量は水の場合と余り変らない。この多価陰イオンの分泌促進の意義については、EDTA (Ethylene-diamine-tetra-acetic acid) のような chelating agent でも同様な効果を有すること、又 1 価イオン(醋酸イオン)と 2 価イオン(コハク酸イオン)の間では特にその効果に差が認められないこと等から考えて、恐らく chelating agent としての作用に基づくものと思われる。

第 4 表 緩衝液及び EDTA の影響

Incubation の条件	分泌量 ($\mu\text{M}/\text{mg}$)
蒸 留 水	0.15
10^{-2}M EDTA* (pH 4.2)	0.22
10^{-2}M EDTA* (pH 5.0)	0.33
0.08 M クエン酸-Na 緩衝液	0.37
0.08 M 酪 酸-Na "	0.21
0.08 M コハク酸-Na "	0.20
0.08 M 磷 酸-Na "	0.26

72 時間培養 ビール酵母
2% ブドウ糖含有上記溶液 (pH 5.0) にて 30° ,
3 時間 incubation
* Ethylenediamine tetra acetic acid を
NaOH にて所定の pH に調整.

第 6 図 栄養物質の効果 (I)

72 時間培養 ビール酵母, 9.8mg dry weight
 30° , 3 時間 incubation.

註) 完全合成培地の組成は実験方法に記した通り,
但しこの場合 N 源は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の代りに
0.6% カザミノ酸を使用した。

* M/100 クエン酸-K 緩衝液 (pH 5.0) を含む。

生体組織に於ての Na^+ と K^+ の拮抗的作用については広く知られているが, Na^+ を K^+ でおき代えたクエン酸緩衝液では分泌が約 30% 抑制されているのは注目される。 K^+ のこのような効果は磷酸緩衝液でもみられ, 又クエン酸-Na 緩衝液に KCl を添加しても認められた。

7. 栄養物質の効果 ヌクレオチッドの分泌を最も抑制する条件としては蒸留水での incubation のほかに完全合成培地での incubation がある。この抑制効果を解析する為完全合成培地より栄養物質を除去し, その影響を調べた。その結果は第 6 図のように完全合成培地では最も分泌量少く, これより窒素源, ビタミン

第 7 図 栄養物質の効果 (II)

96 時間培養 ビール酵母, その他の実験条件は第 6 図と同じ。

混液の除去により幾分分泌が増大するが, これら有機栄養源の除去よりもむしろ無機塩 (KH_2PO_4 , MgSO_4) を除去し, 代りにほぼ同濃度のクエン酸-K 緩衝液を添加した場合の方が著しく分泌量を高め, 0.08 M クエン酸-K 緩衝液単独の場合と余り変りない分泌量を示した。この現象は完全合成培地での分泌抑制が主に上記無機塩の存在に基づくものか, それとも無機塩の代りに加えられたクエン酸緩衝液がたとえ他の栄養物があっても分泌を著しく促進することによるかのどちらかであると考えられる。しかし [無機塩+2% ブドウ糖] 溶液での incubation でも完全培地の約 2 倍, クエン酸-Na 緩衝液での約 74% 程度の分泌がみられた。一方第 7 図の実験結果に示すようにたとえ完全培地でもクエン酸-Na 緩衝液添加の場合にはかなりの分泌が起っている。但しこの場合でも供試酵母の生育に好適な栄養条件に近い程, 分泌量は減少する傾向が認められる。なおこの実験のいずれの場合でも, incubation 中の酵母の増殖は殆んど認められなかった。

結局, これらの実験によっても, ヌクレオチッドの分泌を促進する最も大きな要因はクエン酸イオンや EDTA のような chelating agent の存在であるという推定が更に確実になった。

8. 分泌物について 以上の実験に於いて, 酵母から分泌される紫外吸収性の物質がいかなる物質であるかは極めて興味ある問題である。これに関しては続報に於いて詳細に報告する予定であるが, Potter 等の方法⁽⁸⁾に従いイオン交換樹脂 Dowex 1 (HCOO^- 型) によるイオン交換樹脂クロマトグラフィーを行なったところ, $260\text{ m}\mu$ 吸収性物質の約 40% はシチジナーン-リン酸 (CMP), アデノシン-リン酸 (AMP), グアノシン-リン酸 (GMP)

等の mono-nucleotide であるが、この他に強酸性イオン交換樹脂 (Dowex 50) と、弱塩基性イオン交換樹脂 (Amberlite IR-4B) による脱塩操作の過程でこれらの樹脂に吸着される物質 (約 10~20%) や、Dowex 1 (HCOO^-) に吸着されたまま 4N 蟻酸-1M 蟻酸アンモン溶液でも溶離されてこない物が含まれる。後者は種々の点から mono-nucleotide が幾つか結合した所謂 oligo-nucleotide であろうと推定されている。

考 察

上記の実験結果のうちで最も興味を引く点は酵母細胞よりのヌクレオチドの分泌が生育に好適な環境条件 (完全合成培地) や蒸留水中での incubation では余り顕著でないのに反し、クエン酸や EDTA のように金属イオンと錯塩を作りやすい chelating agent がこれらの分泌を非常に促進するという事実である。

結晶リボヌクレアーゼ (RN-ase) を用いての実験に於いて、 Mg^{++} がその活性を強く阻害する一方、NaCl のような塩類がこの酵素を活性化する事が報告されているが⁽⁹⁾、このような事実から上記の実験結果を考えると、クエン酸、EDTA によるヌクレオチドの分泌促進効果はこれらが細胞内 Mg^{++} の chelating agent として作用し、このイオンと結合する結果、 Mg^{++} により inactive な状態にあった RN-ase を活性化し、細胞内の RNA の分解をうながし、これが細胞外に排出されてくる為ではないかとの想像も成立つ。一方、グラム陰性菌にリゾチームを働かせる場合、EDTA 存在下に於いてのみはじめて溶菌が起り、しかもその際に核酸様物質が菌体外に放出されることがみられており⁽¹⁰⁾、chelating agent が細胞の表面構造に作用し、細胞の物質透過調節系に強い影響を与える結果、分泌を促進する可能性も考えられるが、これらの点については今後の研究を通じて明らかにしていきたい。

終りに本研究に対し種々の御援助を戴いた阪大理学部巖佐耕三氏、武田薬品研究所の米田雅彦氏並びに紫外線フィルターを御贈与下された科学研究所岩瀬研究室にあつく感謝致します。

(1) 伊藤雄太郎, 松木 翠, 植村定治郎 : 本誌, 31, 779 (1957).	(7) D. Billen : <i>Arch. Biochem. Biochys.</i> , 67, 333 (1957).
(2) 伊藤雄太郎, 植村定治郎 : 本誌, 31, 783 (1957).	(8) R. B. Hurlbert, H. Schmitz, A. F. Brumm, V. R. Potter : <i>J. Biol. Chem.</i> , 209, 23 (1954).
(3) S. W. Challinor, A. H. Rose : <i>Nature</i> , 174, 877 (1954).	(9) C. Lamanna, M. F. Malette : <i>Arch. Biochem.</i> , 24, 451 (1949).
(4) M. Ogur, G. Rosen : <i>Arch. Biochem.</i> , 25, 262 (1950).	(10) R. Repaske : <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 22, 189 (1956).
(5) 小嶋尚夫, 松谷 豊, 男沢熙子, 今野 周, 植村定治郎 : 本誌, 32, 33 (1958).	
(6) S. Moore, W. H. Stein : <i>J. Biol. Chem.</i> , 176, 367 (1948).	