なN摂取の促進が Cy 脱硫系のこの種の低下に対してなんらかの意義を有すると考えられる。尚清酒醸造過程で各時期の醪から分画遠心して酵母区分を直接に分離し, Cy よりの H_2S 生成能を検索した結果, 若い時期(留後 3~5 日目)のものが最大の Cy 脱硫能を示したが, これらの醪酵母はいずれも硫酸塩より H_2S を生成しなかった。

(1) 小平了二, 植村定治郎 : 本誌, 32, 49(1958); 33, 626 (1959).	<i>Chem.</i> , 207, 767 (1954).
(2) C. M. Johnson : <i>Anal. Chem.</i> , 24, 736 (1952).	(6) J. A. Stekol : "Synthetic pathways of methionine, cysteine and threonine" in "Amino acid metabolism" ed by W. D. McElroy and H. B. Glass, Baltimore, p. 509 (1955).
(3) T. Uemura et al. : <i>Tohoku J. Agric. Res.</i> , 3, 185 (1952).	(7) 福井三郎 : ビタミン, 14, 715 (1958); 中村雄次, 伊藤雄太郎, 植村定治郎 : 醸酵工学, 33, 481 (1955).
(4) K. Schlossmann, F. Lynen : <i>Biochem. Z.</i> , 328, 591 (1957).	
(5) M. B. Hoagland, G. D. Novelli : <i>J. Biol.</i>	

[農化 第 35 卷, 第 2 号, p. 102~106, 1961]

清酒酵母の硫化水素発生現象 (第 4 報)*

硫化水素生成に及ぼすメチオニンの抑制的效果

小平了二**, 植村定治郎 (東北大学農学部)

昭和 35 年 8 月 4 日 受理

緒 言

前報⁽¹⁾にひきつづいてパントテン酸 (PaA と略) 不完全供与の清酒酵母を使用して $SO_4^{35}S$ 並びにシステイン (Cy と略) の菌体内とりこみに対するメチオニン (Met と略) 或いは PaA の影響を検索した。その結果, Met は $SO_4^{35}S$ 或いは Cy の菌体内とりこみを部分的に阻害するが, Cy よりの H_2S 生成作用へのその阻害が主として細胞内 Cy 脱硫系でおこると認められるので, ここに報告する。

実 験 方 法

供試酵母菌株 : 前報⁽¹⁾と同様に清酒酵母協会 6 号株を使用した。

培地並びに培養方法 : 既報⁽¹⁾に準じて行い, PaA 不完全供与時の若い菌体として前報⁽¹⁾既載のように PaA 不完全供与培地に 30° , 48 時間培養のものをを用いた。

$H_2^{35}SO_4$ 添加反応混液の組成とそれよりの $H_2^{35}S$ 生成条件 : 既報⁽²⁾の PaA 不完全供与菌体の $SO_4^{35}S$ よりの H_2S 生成条件にならって, 葡萄糖 3 g, $MgCl_2$ 30 mg, 硫安 600 mg, $H_2^{35}SO_4$ 0.5 mc, M/5 磷酸塩緩衝液 (pH 5.2) 10 ml を含む全容 40 ml の混液を基幹とし, 必要に応じてこれに L-Met 37 mg ($250 \mu M$) 或いは PaA 50 μg を添加した。これらの混液に PaA 不完全供与菌体の懸濁液 10 ml (4 mg 乾菌/ml) を加えて 30° , 3 時間 incubate した。

$H_2^{35}S$ の捕収と ^{35}S 標語菌体の処理 : 上述の incubation 後前報⁽¹⁾と同様に直ちに通気して反応混液から $H_2^{35}S$ を酢酸亜鉛-酢酸ソーダ液に完全に駆逐且吸収させた。菌体は遠心して集め第 1 図に示した操作にしたがって液体空気処理を行い, 30° , 1 時間の振盪で水に抽出される区分と, 100° , 30 分の熱水抽出区分とを得た。前者を温水抽出区分とする。また菌体の全放射能を測定するために, 液体空気処理菌体の懸濁液 0.5 ml に 4N-HCl 0.5 ml を加えて 110° , 48 時間水解して放射能の測定に供した。

放射能の測定 : 酢酸亜鉛-酢酸ソーダの混液に吸収させた $H_2^{35}S$ は既報⁽²⁾のように Johnson 法によってメチレン青に発色させたのちに, 田宮ら⁽³⁾にしたがって活性炭液 (5 mg/ml) 1 ml を加えて生成したメチレン青を完全に吸着させ, 吸引濾過後乾燥して放射能を測定した。また上述の温水または熱水抽出区分或いは HCl 水解区

* On the Production of Hydrogen Sulphide by Sake Yeast. Part IV. Inhibitory Effect of L-Methionine upon Hydrogen Sulphide Production by Pantothenate-deficient Cells.

By Ryoji KODAIRA and Teijiro UEMURA (Faculty of Agriculture, Tohoku University)

** 現在旭化成工業株式会社技術研究所

第 1 図 液体空気処理菌体の ^{35}S 活性分布の検索

PaA 不完全供与菌体の洗滌菌懸濁液 1 ml (4 mg 乾菌/ml) を葡萄糖 25 mg, L-Cy 塩酸塩 10 μM , M/5 磷酸塩緩衝液 (pH 5.2) 1 ml を含む全容 4 ml の反応液に加え, 30° で一定時間放置して H_2S の定量に附した. この反応液に L-Met 或いは PaA を加える際にはそれぞれ 10 μM , 5 μg とした.

Cy の定量法: Kassell ら⁽⁶⁾の燐タングステン酸法によった.

H_2S の定量: 既報と同じく Johnson 法⁽⁷⁾によった.

実験結果並びに考察

1. SO_4^{2-} - ^{35}S よりの H_2^{35}S の生成と ^{35}S の菌体内とりこみに対する L-Met の作用 PaA 不完全供与時の培養初期の供試酵母菌体を葡萄糖硫酸培地に懸濁して H_2S の生成されることは既報⁽²⁾のように確実であるが, 生成する H_2S が与えた硫酸塩に由来するか否かは, まだ確実に実証していない. またこの場合に Met 或いは PaA が硫酸塩の菌体内とりこみに対して, どのように影響するかも確実に知られていない. これらへの確証を得るために, 葡萄糖-硫酸培地に $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ を既述のように 0.5 mc 添加し, そのままか或いはこれに PaA または Met, さらにそれらの両者を加えたそれぞれの培地に PaA 不完全供与時の若い菌体を 30° , 3 時間懸濁し, 生成される H_2^{35}S , 及び incubation 後の菌体を既述のように液体空気中で処理してそれよりの温水または熱水抽出物, 或いは HCl 水解物についてそれぞれの放射能を測定した. その結果は第 1 表に掲げたが, PaA 或いは Met のいずれをも加えない場合には, 通常みられるようにかなりの量の H_2^{35}S が生成された. したがって推定されるように PaA 不完全供与菌体によって生成される H_2S が培地中の硫酸塩に由来することは確実である. この PaA または Met のいずれをも添加しない場合に比べて, PaA 添加時には H_2^{35}S の生成が殆んどみられないのに反して菌体よりの温水或いは熱水抽出区分のいずれも ^{35}S に活性のかなり著しいことは注目値する. 恐らく PaA 供与は菌体への SO_4^{2-} - ^{35}S のとりこみを促進すると考えられるが, この点についてはもとより今後の精査を必要とする.

第 1 表 $^{35}\text{SO}_4$ -S からの H_2^{35}S の生成と ^{35}S の菌体内分布 (C.P.M./10 mg dry cell)

	反応液の種類			
	I	II	III	IV
H_2^{35}S	166	3	34	2
液体空気処理 30° , 1 時間の抽出区分	850	961	440	750
液体空気処理 100° , 30 分の抽出区分	1180	1476	658	871
菌体の全放射能	1500	—	706	—

反応液の種類:

I: 葡萄糖 3 g, 硫酸 600 mg, MgCl_2 30 mg, S^{35}O_4 0.5 mc, M/5 磷酸塩緩衝液 (pH 5.2) 10 ml, PaA 不完全供与菌体 42 mg dry cell, 全容 50 ml

II: I にパントテン酸-Ca 塩 50 μg を添加

III: I に L-メチオニン 250 μM を添加

IV: I にパントテン酸-Ca 塩 50 μg , L-メチオニン 250 μM を添加
反応条件: 30° , 3 時間

分については, それぞれ 0.2 ml をとり常法にしたがって放射能を測定した.

温水或いは熱水抽出区分のペーパークロマトグラフィー: 上述の両抽出区分のアミノ酸組成をペーパークロマトグラフィー (東洋濾紙 No. 50 使用) で検討する場合にはブタノール-酢酸-水 (4:1:1 v/v) を展開剤とし, 常法のようにニンヒドリンで発色させた. さらに諸種のチオニウム化合物の存在をみる場合には Schlenk-DePalma⁽⁴⁾ にしたがって展開剤としてエタノール-水-酢酸 (65:34:1 v/v) を用い, 紫外外部吸収性スポットを検し, 必要に応じて Toennies の方法⁽⁵⁾ で 2 価硫黄を検出した.

Cy 含有反応液とその脱硫 (H_2S 生成) 反応の条件:

さらに Met の単独添加時には両抽出区分の放射能或いは菌体の全放射能もともに PaA 又は Met の両者の無添加時に比して極めて低く, 同様に PaA, Met の両者を与えた場合にも両抽出区分の放射能は著しく低い成績である. これらの事実については, いわゆる preformed metabolite としての Met がその先駆体である SO_4^{2-} の菌体内とりこみを抑制すると解すべきであろう. また Met 単独添加時と Met, PaA 無添加時について, 生成された H_2^{35}S と菌体内にとりいれられた ^{35}S とを比較してみると, 前者の比は約 1/20, 後者の比は約 1/10 となっている. したがって Met は上述のように SO_4^{2-} の菌体内とりこみを抑制する反面, 一度とりこまれた S については, H_2S 生成のような形で S

の体外への逸散を防ぐ性質のあることがうかがえる。いわゆる cellular economy の見地からすれば、この場合 Met は供試酵母の S 代謝に対して極めて合理的な役割を演ずると考えられる。

尚、上述の4種の菌体よりそれぞれ得られる熱水抽出物について、ブタノール-酢酸-水を展開剤としてペーパークロマトグラフィーにかけ、ニンヒドリン発色を試みたところ、Met 添加時の抽出物では無添加時のものに比してかなり大きい Met のスポットが検出された。さらに Toennies 法による二価硫黄の検出を行った場合には、Met 添加時の抽出物にのみ Met に相当する位置とその下のところに極めて大きなスポットが検出された。これらのペーパークロマトグラムを常法に従って X 線フィルムに感光させ ^{35}S の分布を検索したところ、Met に相当する位置にはいずれの抽出物についても感光物質の存在は認められなかった。これらの成績から Met 添加時に菌体内に多量に貯溜される Met は外部より与えられた Met そのものに由来し、同時に与えられた $\text{SO}_4\text{-}^{35}\text{S}$ には殆んど依存していないと考えられる。尚、シスチン区分については PaA 添加時の抽出物のスポット（ニンヒドリン発色）が最も大きく、Met 添加時のものでは小である傾向がみられ、X 線フィルム板ではいずれの抽出物にもシスチンの下位に最も強い感光物質の存在を認め、とくにその感光の強さは PaA 添加時のものは最大で、Met 添加時のものが最小であった。これらの点は今後の精査をまわって詳報するが、PaA の供与が硫酸塩の菌体内へのとりこみを促進すると推定される。

これらの加熱抽出物における Met の成績を Schlenk ら⁽⁴⁾の結果にもとづいて考えると、外部より菌体内にとりいれられた Met の一部分は S-アデノシルメチオニンに転化すると推定される。よって上述の4種の菌体の温水又は熱水抽出物について Schlenk らの展開剤（エタノール-水-酢酸）を使用して再びペーパークロマトグラフィーを行い、紫外線照射のもとに U. V. 吸収物質の分布をみると第2, 3図に示すように Met 添加時の温水抽出物では R_F 0.3, 0.58, 0.73 の位置に、またその熱水抽出物では R_F 0.58, 0.74 の位置にそれぞれ U. V. 吸収物質の存在を認めた。Schlenk らに従えばこれらの R_F 値から 0.3 物質は S-アデノシルメチオニンであり、0.58 及び 0.73 物質は夫々アデノシン及びメチルチオアデノシンであると推定される。即ち供試のような 100°, 30 分という過激な熱水抽出処理では Schlenk らの指摘するように S-アデノシルメチオニンである R_F 0.3 物質は殆んどすべて R_F 0.73 物質に分解し、このために供試の熱水抽出物では R_F 0.3 物質の存在を認めえなかったと考えられる。したがってまたこれらの成績から、供試酵母にあっても菌体内にとりいれられた Met の多くは S-アデノシルメチオニンの形で存在していると考えられる。

第2図 メチオニン供与菌体の温水抽出物 (30°, 1時間) 中の U. V. 吸収物質
展開剤: エタノール-水-酢酸 (65:34:1v/v)
1: メチルチオアデノシン (R_F 0.73)
2: メチオニン (R_F 0.72)
3: アデノシン (R_F 0.58)
4: S-アデノシルメチオニン (R_F 0.3)

第3図 メチオニン供与菌体の熱水抽出物 (100°, 30分) 中の U. V. 吸収物質
1: メチルチオアデノシン (R_F 0.74)
2: アデノシン (R_F 0.58)

第4図 パントテン酸, メチオニン添加時のシステインからのH₂S生成

反応液組成:

(I): 葡萄糖 25mg, L-システイン 10μM, M/5 磷酸緩衝液 (pH 5.2) 1ml, パントテン酸不完全供与菌体 4mg dry cell, 全容 5ml

(II): (I) にパントテン酸-Ca 塩 5μg 添加

(III): (I) にL-メチオニン 20μM 添加

反応条件: 30°

第2表 システインの摂取に及ぼすメチオニン, パントテン酸の影響

システイン μg/mg dry cell	反応液	パントテン 酸供与 (5 mg/tube)	メチオニン 供与 (3 mg/tube)
I システイン添加量	対照	352	352
II 消費システイン		116	94
III H ₂ S になったシステイン		13	5
IV II/I × 100 (%)		33	26
V III/II × 100 (%)		14	5
VI II-III/II × 100 (%)		86	95

反応液組成: 葡萄糖 25mg, L-システイン 1550 μg, M/5 磷酸緩衝液 (pH 5.2) 1ml, パントテン酸-Ca 塩 5μg, あるいは L-メチオニン 20μM, PaA 不完全供与菌体 4.4 mg dry cell, 全容 5ml

反応条件: 30°, 2 時間

第3表 メチオニン, パントテン酸培地に preincubate した菌体のシステインの透過性

システイン μg/mg dry cell	菌体の種類	対照	パントテン 酸供与菌体	メチオニン 供与菌体
I システイン添加量		207	210	119
II 消費システイン		76	96	81
III H ₂ S になったシステイン		18	15	9
IV II/I × 100 (%)		37	46	43
V III/II × 100 (%)		24	16	11
VI II-III/II × 100 (%)		76	84	89

preincubation の培地組成と反応条件: 葡萄糖 3g, 硫酸 600mg, MgCl₂ 30mg, M/5 磷酸緩衝液 (pH 5.2) 10ml, パントテン酸不完全供与菌体 40mg dry cell を含む全容 50ml を対照として, これにパントテン酸-Ca 塩 50μg, あるいは L-メチオニン 250μM を加えて, それぞれ 30° で 3 時間 preincubate した。

反応液組成: 葡萄糖 25mg, M/5 磷酸緩衝液 (pH 5.2) 1ml, L-システイン 1200 μg, パントテン酸-メチオニン無供与菌体 (対照) 5.8mg, パントテン酸供与菌体 5.7mg, メチオニン供与菌体 6.3mg dry cell, それぞれ全容 5ml。

反応条件: 30°, 2 時間

2. Cy からの H₂S 生成に及ぼす Met の抑制機作に関する検討

上述の成績から Met は SO₄²⁻ の菌体内とりこみをかなり強く抑制すると認められるが, したがって又 PaA 不完全供与菌体による Cy よりの H₂S 生成に及ぼす Met の抑制的効果についても, Cy と Met との間におこる細胞内透過性の競合の結果であるとも想像される。

よってこの可能性を検討するために Met 添加時の Cy よりの H₂S 生成状況を経時的に追跡することを試みた。即ち PaA 不完全供与時の若い菌体を Cy-葡萄糖-磷酸緩衝液を含む培地に 30°, 2 時間懸濁して, そのままか或いはこれに Met を加えて生成する H₂S 量を 30 分ごとに測定した。その結果は第4図に掲げるように, Met の添加時には約 50 分まで無添加時と殆んど差異なく H₂S を生成した後, H₂S 生成は急激に衰え, H₂S 生成曲線は平衡の状態を示した。Met のこの成績は明らかに上の可能性を拒否すると理解され, 反応初期の Met の無効性からみてこの期間は脱硫系の抑制に必要な量まで Met が細胞内蓄積に要する時間か, 或いは Met が他の有効物質に転化するために必要な時間であると考えうる。なおこれらの試験で PaA を加えた場合には, 同図に示すように無添加時と殆んど差異のない H₂S 生成曲線を示した。

次に上述の 30°, 2 時間の incubation 時に生成される H₂S を Cy 量に換算し, これと Cy 消費量とを比較することにより Met 或いは PaA 添加の効果を検討してみた。第2表はその成績をまとめているが, Cy 消費量についてみると, PaA または Met のいずれをも添加しない対照では添加した Cy 量の 33% が消費されたのに反して, PaA 添加時には 36%, Met 添加時には 26% の消費率であって, Met の供与によって Cy の菌体内とりこみはやや抑制されるが, しかし無添加時の約 70% の Cy が菌体内にとりこまれている。次に H₂S に転化した Cy 量をみると, 無添加時の対照では Cy 消費量の 14%, PaA 添加時には 11% がそれぞれ H₂S に転化しているのに対して, Met 添加時には 5% で最も低く, 対照の約 40% 以下である。これら両者の成績からみれば, Met の添加によって菌体内への Cy のとりこみは約 30% 程度に阻害されるが, 細胞内にとり入れられた後の Cy が H₂S へ脱硫される系に対しては Met は 60% 以上に阻害するから, この場合の Met の H₂S 抑制効果は細胞内への Cy とりこみが行われて後に主として起るとみるべきであろう。

前報⁽¹⁾でまた PaA 又は Met 添加時の硫安-葡萄糖培地で PaA 不完全供与菌体を 30°, 3 時間前処理すると、これらの菌体の示す Cy 脱硫作用 (H₂S の生成) が対照の菌体よりも 50% 近くに低下することをみて、これによっても Met が菌体内にとりいれられて後に Cy 脱硫系を干渉することを推定した。同様の実験を再びここに戻して、これらの前処理後の洗滌菌体について 30°, 2 時間の Cy 脱硫反応において生成する H₂S を Cy 量に換算し、上と同様に Cy 消費量との比較を試みた。その結果は第 3 表に示すように Cy 消費量についてみると、PaA または Met 添加時の前処理菌体の方が対照よりも大であるのに反して、生成 H₂S に相当する Cy 量を Cy 消費量と比較する場合には、両菌体ともにいずれも対照よりも低く、とくに Met 添加時の前処理菌体は最も低く、対照の菌体の約 1/2 以下であった。この故に硫安培地で PaA または Met を添加して前処理を行うと、それに応じて酵母は Cy をよく摂取しうようになる反面、逆にその Cy 脱硫作用は弱化し、この検討からも Met の効果が透過の面よりも細胞内での Cy 脱硫系に対して支配的に関係することが推定される。

この推定をさらに確実にするために、供試酵母の細胞外標品についてその Cy 脱硫系に対する Met の効果を検討したが、詳細は後報にゆずる。しかしいずれにしても PaA 不完全供与時の若い菌体でみられる硫酸塩よりの H₂S 生成が細胞内 S 代謝の不完全さから起る Cy 脱硫系の活性化にもとづくとする、さきの我々の作業仮説は、前報並びに本報の成績からみてかなりの裏づけを得たといえよう。

総 括

清酒酵母協会 6 号株を使用して SO₄-³⁵S の菌体内とりこみと生成 H₂S への分布について検索し、PaA 不完全供与系で生成される H₂S に ³⁵S がかなりいりこむことを認め、また ³⁵S の菌体内とりこみが PaA の供与で促進され、Met の供与では抑制されることをみた。さらに Met 供与時には Schlenk らに従って行った液体空気処理菌体の温水抽出物中に S-アデノシルメチオニンの存在を認めた。

また PaA 不完全供与菌体の Cy 脱硫作用において Met が存在する場合にのみ時間の経過に伴って H₂S 生成が停止することを観察し、さらにこの反応時、或いは予め PaA または Met を添加して行った前処理菌体の示す Cy 脱硫反応時に、それぞれ Cy 消費量と生成 H₂S に相当する Cy 量とを比較検討した成績から、Met の抑制効果が Cy との競合的な透過関係の面よりも、細胞内にとりこまれて後に Cy 脱硫系に対して直接に発揮される方が主であると帰結した。

(1) 小平了二, 植村定治郎 : 本誌, 35, 98 (1961).	(5) G. Toennies, J. J. Kolb : <i>Anal. Chem.</i> , 23, 823 (1951).
(2) 小平了二, 植村定治郎 : 本誌, 32, 49 (1958); 33, 626 (1959).	(6) B. Kassell, E. Brand : <i>J. Biol. Chem.</i> , 125, 115 (1938).
(3) N. Tamiya : <i>J. Biochem.</i> , 41, 199 (1954).	(7) C. M. Johnson : <i>Anal. Chem.</i> , 24, 736 (1952).
(4) F. Schlenk, R. E. DePalma : <i>J. Biol. Chem.</i> , 229, 1037 (1957).	

〔農化 第 35 卷, 第 2 号, p. 106~110, 1961〕

清酒酵母の硫化水素発生現象 (第 5 報)*

システイン脱硫酵素系に対する S-アデノシルメチオニン区分の阻害

小平了二**, 植村定治郎 (東北大学農学部)

昭和 35 年 8 月 4 日 受 理

緒 言

清酒酵母協会 6 号株において、パントテン酸 (PaA と略) 不完全供与時の若い細胞の示すシステイン (Cy と略) からの H₂S 生成作用に対してメチオニン (Met と略) は著しくこれを抑制するが、この Met の効果については既報⁽¹⁾の成績から菌体内にとりいれられた Met の Cy 脱硫酵素系に対する阻害作用がその主因であると想定される。しかし、さきに Met 供与菌体を液体空気中で処理して得られる温水抽出物中には Schlenk ら⁽²⁾と同様

* On the Production of Hydrogen Sulphide by Sake Yeast. Part V. Inhibition of L-Cysteine Desulphhydrase by S-Adenosyl-methionine Fraction obtained from Yeast Cells.

By Ryoji KODAIRA and Teijiro UEMURA (Faculty of Agriculture, Tohoku University)

** 現在旭化成工業株式会社技術研究所