[農化 第 40 卷, 第 7 号, p. 283~288, 1966]

ニコチンアミド添加二次培養による酵母 NAD 含量の増加について (第 1 報)

NAD 蓄積条件の検討

武井 修 三 (三共株式会社田無工場)

昭和 41 年 2 月 22 日 受理

Studies of Increasing NAD Content in Yeast Cells by Second Culture with Nicotinamide Part I. Optimum Condition for NAD-Accumulation

By Shūzo TAKEI

Tanashi Factory, Sankyo Co., Ltd., Tanashimachi 1450, Kitatama, Tokyo

NAD-accumulation in yeast cell on incubation with NAD-precursors under the condition without growth was studied. The following results were obtained: 1) Nicotinamide was most effective as the precursor. Nicotinic acid and quinolinic acid followed in this order. 2) NAD accumulation occurred more excellently on acid range than on neutral. Optimum pH was 3. 3) Fermentable sugars showed inhibitory effect on NAD-accumulation. 4) Inorganic acids except H_3PO_4 had not any effect on NAD-accumulation. Organic acids of TCA-cycle and their related acids had inhibitory effect, but only citric acid accelerated NAD-accumulation. 5) Aeration was favorable for NAD-accumulation. 6) H_3PO_4 and adenine had a little favorable effect, but nitrogen compounds had no effect.

The inhibition by sugars and organic acids seems not to be the true inhibition of the total NAD-accumulation, but to be mainly due to the decrease of NAD/NADH₂ value owing to its fermentation. On the contrary, the acceleration by aeration seems to be due to the increase of NAD/NADH₂ value. NAD accumulated in cell decreased when the cell was incubated again in neutral buffer (pH 7), but the NAD remained constant when incubated in acid buffer (pH 3). These facts seem to be a cause of the excellent NAD-accumulation on acid range.

(Received February 22, 1966)

生体内 NAD レベルの消長を論じた従来の報告は、動物組織に関するものが多く、微生物菌体に関するものは少ない。酵母培養時の NAD レベルに関しては建部⁽¹⁾、早野^(2,3)、Suomalainenら^(4,5)、北原⁽⁶⁾の報告があり、酵母の resting cell にニコチンアミド等の前駆体を与えた場合の NAD レベルの増大を論じているものとしては Hofmann⁽⁷⁾、高桑ら⁽⁸⁾の報告があるに過ぎない。しかし後者を検討することは NAD 標品の調製という応用面に必要であるばかりでなく、増殖の要因を取り除いた実験条件下における NAD の蓄積および生合成を論じ得るという点では、生化学的研究にも不可欠である。また細胞中の NAD 存在形式等に関する知見も得られるものと期待される。

本報告では NAD 標品の調製を考慮に入れて *Saccharomyces oviformis* の菌体に前駆体を与えた場合の NAD、特に NAD 調製に際して対象となる酸化型 NAD の二次的な蓄積条件を検討し、若干の考察を加えたので報告する。

材料および実験方法

(1) 酵母: 使用酵母は *Saccharomyces oviformis* (M-2 株) で、窒素源および Mg 塩等を添加した糖蜜を流しながら通気培養し、得られた菌体を水洗後、水分約 66% にプレスしたものをを用いた。

(2) 試薬類: ニコチン酸、キノリン酸は東京化成、ニコチンアミドは岩井化学、アデニン是三共、G-6-P、G-6-P 脱水素酵素はシグマの各社製品を用いた。アルコ

ール脱水素酵素は Racker⁽⁹⁾ の方法に準じて, パン用酵母から精製し, 結晶とせず用いた. その他の試薬類は市販品で JIS 1 級またはそれに相当する純度のものを用いた. 水はモノベット脱イオン水を用いた.

(3) NAD, NADH₂ および NADP の抽出測定法: NADH₂ の抽出法は Bassham⁽¹⁰⁾ の方法によった. すなわち 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.2) 4.5 容と 1 N NaOH 0.5 容の混液 5 ml を乾燥菌体として約 425 mg 相当の生酵母に加え充分懸濁させてから 100°, 2 分間熱処理後 16° の流水で急冷し, 遠心上清を NADH₂ の抽出液とした. NAD を抽出する場合には Bassham の酸性抽出法と同一値が得られる水抽出法をもって代用した. すなわち緩衝液-NaOH 混液の代わりに水を用いる以外 NADH₂ の抽出法と全く同じである. NADP は NAD と同じ抽出液について測定した.

抽出液中の NAD, NADH₂ はアルコール脱水素酵素を用いる常法^(11,12)により測定し, 340m μ における NADH₂ の分子吸光係数を 6.3×10^3 として計算した. NADP は G-6-P 脱水素酵素を用いる Horecker⁽¹³⁾ の方法によって測定し, 340m μ における NADH₂ の分子吸光係数を 6.3×10^3 として計算した. Total NAD は NAD と NADH₂ の和である.

(4) 乾燥菌体の測定: 乾燥菌体は水洗菌体を 105~110°, 5 時間乾燥して求めた. 菌体量はすべて乾燥菌体で表わした.

(5) 二次培養法: 500 ml の坂口フラスコ中に酵母懸濁液, 前駆体およびその他のものを入れ pH を適当に調整し, 振幅 7.3cm, 振盪数毎分 125 往復の振盪機上に 30°, 一定時間振盪した. ただし報文中 starting cell の coenzyme 含量測定の場合は酵母懸濁液だけを同一条件で振盪したものを使用した. 特に指定がない限り, 酵母濃度は 42.5 mg dry cell/ml の高濃度とし, 栄養源を不均衡にすることにより, 細胞の増殖はほとんど零と見なし得る範囲に止め得た. また坂口フラスコ中の酵母懸濁液量は 100 ml とした.

実験結果および考察

(1) 前駆体の比較検討: Kornberg⁽¹⁴⁾, Preiss⁽¹⁵⁾, 中村⁽¹⁶⁾によって報告された 3 種の前駆体 (ニコチン酸, ニコチンアミド, キノリン酸) について, Fig. 1 に示す条件で比較検討した.

NADH₂ の蓄積効果は 3 者とも大差なく, original content とほとんど変わらなかったが, NAD に関して

Fig. 1. NAD Accumulation in Yeast Cell by Addition of Precursors.

100 ml of yeast suspension (pH 5), containing yeast (4.25 g as dry cell), KH₂PO₄ (0.2 m moles), adenine (10 mg) and each precursors, was shaken at 30°C for 5 hrs. NAD was extracted and assayed. Details in the text.

— NAD — x — nicotinamide
 --- NADH₂ — o — nicotinic acid
 —□— quinolinic acid

は, ニコチンアミド, ニコチン酸, キノリン酸の順に効果は減少した. 3 種の前駆体とも濃度に比例して NAD の蓄積効果が高めるがニコチンアミドの場合は 4.14 μM (0.51 mg)/g dry cell でほぼ飽和し, NAD 含量は original level の約 2 倍になった. なお, 前駆体を添加しないで酵母菌体のみを同様に振盪しても NAD 含量に変化は見られなかった.

蓄積量は一般に生合成量と分解量の差を意味するものと思われるが, すでに著者⁽¹⁷⁾が報告したように, 使用酵母株には NADase による分解経路は認められないので, 添加したニコチンアミドによる NADase の活性阻害を考える必要はない. 従って Fig. 1 に示した各前駆体による NAD 蓄積量の差はそのまま生合成量の差と見なし得るであろう. しかし Sundaram⁽¹⁸⁾ は酵母細胞中でも, ニコチンアミドが脱アミドして生じたニコチン酸が NAD の直接の前駆体とする経路が主であるとしており, Fig. 1 の結果と矛盾するが, なお, 膜透過等の生合成以前の問題が関与しているのであろう.

(2) pH の影響: 前述の実験で, ニコチンアミド添加が最も NAD 含量を上昇させたので, 本実験以降は

Fig. 2. Effect of pH to NAD Accumulation in Cells.

Yeast suspension was incubated at various pHs with 15 mg (1.22 mM/ml) of nicotinamide.

The other conditions were same as Fig. 1.

—○— NAD —○— incubated for 24 hrs.
—×— NADH₂ —×— incubated for 8 hrs.
—△— —□— incubated for 2 hrs.

すべてニコチンアミドのみを前駆体として用いた。pH と NAD 蓄積量の関係を検討した。結果は Fig. 2 に示すように、pH 3 が最も良好で中性域に近づくほど蓄積量は少ない。NAD は経時的に増加しているが、特に振盪の初期ほど蓄積は著しい。北原⁽⁶⁾は *Candida utilis* が増殖中、培地の pH が低下するにつれて細胞内の NAD

TABLE I. DECREASE OF ACCUMULATED NAD BY INCUBATION AT pH 7.

Incubation pH	Coenzyme	Incubation time (hr)		
		0	2	8
7	NAD	2.87	2.16	1.32
	NADH ₂	0.55	0.4	0.31
	NADP	0.1	0.07	0.06
3	NAD	2.87	2.92	2.94
	NADH ₂	0.55	0.51	0.53
	NADP	0.1	0.08	0.09

After NAD accumulated yeast, which had been incubated in basal* medium, was washed with ice cold water to eliminate free nicotinamide, it was resuspended and shaken in 0.05 M McIlvaine buffer (pH 3 or 7) for 2 or 8 hrs. Coenzymes were extracted and assayed.

* Basal medium (in 100 ml)

pH 3
Yeast 4.25 g (as dry cell)
KH₂PO₄ 0.2 mmoles
Adenine 10 mg
Nicotinamide 15 mg

が培地中に漏出すると報じているが、本実験では NAD 漏出は認められなかった。また NADH₂ も NAD 蓄積量にほぼ比例し、中性では Total NAD の蓄積が少なかった。この原因は Table I の実験が示唆していると思われる。すなわち Fig. 2 と同じ方法で pH 3 においてニコチンアミドを与えて NAD を蓄積させた酵母細胞を十分量の冷水で遠心洗滌して細胞周囲の遊離ニコチンアミドを除去した後、菌体を再びもとの濃度に懸濁し、pH を 3 および 7 に維持しながら振盪し、coenzyme 量の経時変化を測定した。結果は Table I に示すように pH 3 で蓄積した NAD および NADH₂ はニコチンアミド除去後 pH 3 に維持しても不変であるが、pH 7 に維持すると経時的に低下する。消失する NAD が NADH₂ や NADP に移行していないことは表より明らかである。すなわち本実験からは生合成について中性域、酸性域のいずれが好適であるか不明であるが、中性域より酸性域の方が NAD 蓄積の良い理由の一つは、酸性域においては一旦生合成された NAD が分解消失され難く、中性域では分解されやすいためであろう。したがって中性域では分解酵素の関与が考えられるが、その詳細の確認については後報する。

(3) 糖の影響：以上の全実験は無糖状態で実施しているので菌体の自己消化に伴う NAD の消失⁽¹⁷⁾が考

Fig. 3. Inhibitory Effect of Glucose on NAD accumulation.

Glucose was added to the suspension (100 ml) having same components as Fig. 2 and its was incubated at pH 3.

—○— glucose 0g —△— glucose 2g
—□— glucose 5g

えられた。従って糖の添加により、いっそう多くの NAD 蓄積が見られるのではないかと推定された。しかし結果は Fig. 3 に示すようにグルコースの添加量に比例して蓄積阻害が見られた。次に Table II に示すように発酵性糖であるグルコース、蔗糖、マンノース、ラフィノースおよび非発酵性糖であるアラビノース、乳糖を添加して NAD 蓄積を測定した。NAD の蓄積阻害は発酵性糖に共通して見出され、非発酵性糖には見られなかった。一方、NADH₂ は発酵性糖では増加し、非発酵性糖ではほとんど変化しなかった。Total NAD としてはいずれの糖もそれほど大きな差は認められず、また全く糖類を添加しないものとも変らなかった。したがって Fig. 3 に見られたグルコースによる阻害は Total NAD の蓄積

TABLE II. EFFECTS OF SEVERAL SUGARS

	wt. added	Content (mg/g dry cell)			
		NAD	NADH ₂	NAD/ NADH ₂	Total
Starting cell		1.34	0.25	5.29	1.59
None	0	2.85	0.58	5.13	3.43
Glucose	2.5 g	1.54	2.31	0.67	3.85
Saccharose	2.5	1.74	2.48	0.70	4.32
Mannose	2.0	1.43	2.06	0.69	3.49
Raffinose	5.0	1.80	1.43	1.25	3.23
Arabinose	2.0	3.17	0.59	5.33	3.76
Lactose	4.0	3.16	0.73	4.36	3.89

Basal medium+Each sugar
Incubation : 6 hrs.

TABLE III. EFFECTS OF ORGANIC AND INORGANIC ACIDS

	Content (mg/g dry cell)			
	NAD	NADH ₂	Total	NAD/ NADH ₂
Starting cell	1.34	0.25	1.59	5.29
None	2.79	0.54	3.30	5.18
Fumaric acid	1.40	1.47	2.87	0.95
Malic "	1.95	1.00	2.95	1.95
Propionic "	1.75	1.25	3.00	1.40
Acetic "	1.83	1.10	2.93	1.66
Succinic "	1.86	1.00	2.86	1.86
Lactic "	1.95	1.03	2.98	1.90
Citric "	2.98	0.59	3.57	5.05
Tartaric "	1.82	1.40	3.22	1.30
HCl	2.71	0.53	3.24	5.10
H ₂ SO ₄	2.65	0.49	3.14	5.42
H ₃ PO ₄	2.83	0.60	3.43	4.73

Six mmoles of each acid was added to the medium (100 ml), which had the same components as basal medium except lacking H₃PO₄. In the case of blank test, none of acid was added.

All tests were carried out at pH 2.8~3.2.

阻害ではなく、NAD の NADH₂ への移行が主因であらう。Hofmann⁽⁷⁾ もグルコース添加による NAD/NADH₂ 比の減少を観察している。しかし高桑⁽⁸⁾ はグルコースの有無にかかわらず NAD 含量の上昇率が同一といっているので著者が観察した現象は酵母に共通した性質ではなく、菌株または酸素供給量等により変動する現象と思われる。しかし本実験条件下では糖類の添加は不要である。

(4) 酸類の影響 : NAD 蓄積は pH 3 が最も良好であることが明らかとなった。そこで培地を pH 3 に保つための調整用ないし緩衝液用の酸について検討した。結果は Table III に示すように燐酸以外の無機酸は全く影響なく、クエン酸を除く TCA サイクル上またはそれに類縁の有機酸はすべて NAD 蓄積を阻害し、NADH₂ の蓄積を促進した。しかし Total NAD としては顕著な差は認められなかった。この場合も発酵性糖の阻害と同様、NAD の NADH₂ への移行に主因があると思われる。しかしクエン酸だけは同系の酸にもかかわらず、NAD および Total NAD の蓄積を若干促進する。これらの有機酸のガス発生を検討した結果、クエン酸からは酵母によるガス発生がほとんど見られないのに反し、その他の有機酸からはガス発生が見られた。すなわち有機酸の NAD 蓄積阻害も糖と同様、資化性の有無によるものとわかった。

理由は不明であるが、クエン酸およびリン酸の添加は NAD 蓄積を若干促進する。

(5) 各種化合物の影響 : Table IV に検討結果を

TABLE IV. EFFECTS OF SOME COMPOUNDS

	Content (mg/g dry cell)			
	NAD	NADH ₂	Total	NAD/ NADH ₂
Starting cell	1.25	0.34	1.59	3.68
None	2.23	0.41	2.64	5.44
KCN	1.55	0.76	2.31	2.04
Iodoacetate	1.80	0.22	2.02	8.19
FeCl ₃	2.11	0.28	2.39	7.56
NaF	0.33	0.07	0.40	4.71
Na ₂ HASO ₄	1.63	0.40	2.03	4.08
o-Phenanthroline	1.84	0.31	2.14	5.94
NiCl ₂	2.12	0.47	2.59	4.51
Benzamide	2.07	0.46	2.53	4.50
Isonicotinic acid hydrazide	2.25	0.46	2.71	4.89

Basal medium+Each compound
(final concentration 10 mM)

Incubation : 4 hrs.

示した, FeCl_3 , NiCl_2 等の重金属は NAD, NADH_2 の蓄積にはほとんど影響なく, KCN は Total NAD に余り差はないが, 対照に比べて NAD/NADH_2 が小さく, チトクローム系の阻害による NADH_2 の酸化阻害が推定される. モノヨード酢酸は NAD/NADH_2 を大きくするがその原因は不明である. イソニコチン酸ヒドラジド, ペンツアミドは, ニコチンアミドの 8 倍の濃度を共存させても NAD の蓄積に大きな影響を与えないことから推定して, 酵母の NAD 生合成系はニコチンアミド類似体を基質として NAD 類似体を作ることはないと考えられる. 特記すべきものは NaF で蓄積阻害はいうまでもなく, starting cell の含量より低いレベルとなり, NAD 消失効果をもっていると思われる.

したがって NAD 蓄積のために特に好結果を与える物質は見出されなかった.

(6) 磷酸とアデニンの影響: 磷酸およびアデニン添加の影響を Table V, VI に示す. 両者とも添加した方が良い結果を来すが顕著ではなく, NAD/NADH_2 比に影響を与えない.

(7) N源の影響: 尿素, 塩化アンモンとも NAD, NAD/NADH_2 比に影響しない (Table VII).

(8) 通気の影響: 500 ml 坂口フラスコに細胞濃度 3.4, 8.5, 13.6% の懸濁液を各々 100, 200, 300 ml ずつ入れて振盪し, NAD 蓄積量に及ぼす通気効果を検討

TABLE V. EFFECTS OF PHOSPHATE CONCENTRATION

	KH_2PO_4 (in 100 ml of Med.)				
	0 M	$1/1 \times 10$	$1/25 \times 10$	$1/10 \times 10$	$1/15 \times 10$
NAD (mg/g dry cell)	2.70	2.75	2.86	2.79	2.84
$\frac{\text{NAD}}{\text{Total}} \times 100$	88.4	86.1	87.5	84.1	88.5

Amount of KH_2PO_4 in basal medium was varied as indicated in Table.
Incubation: 5 hrs.

TABLE VI. EFFECTS OF ADENINE CONCENTRATION

	Adenine (in 100 ml of Med.)				
	0 mg	5	10	20	40
NAD (mg/g dry cell)	2.70	2.82	2.78	2.84	2.90
$\frac{\text{NAD}}{\text{Total}} \times 100$	88.4	87.6	88.0	87.1	87.9

Amount of adenine in basal medium was varied as indicated in Table.
Incubation: 5 hrs.

した. ただしこの際ニコチンアミドは乾燥菌体 1 g 当り 3.53 mg 添加した. 結果は Table VIII に示すように同一細胞濃度の場合は液量の少ない方が, さらに同一量の場合は細胞濃度の薄い方が NAD 蓄積は良好であるといえる. しかし Total NAD に大差なく, この場合の主因はグルコース, 有機酸とは反対に, NADH_2 の酸化がその主因と思われ, これらの効果は Jar fermenter の通気量に関する実験でも確認された.

(9) NAD の蓄積条件: 以上の実験を考慮し, さ

TABLE VII. EFFECTS OF NITROGEN COMPOUNDS

N-Source	(g in 100 ml added)	Content mg/g dry cell	
		NAD	$\frac{\text{NAD}}{\text{NADH}_2} \times 100$
None	0	2.70	88.4
NH_4Cl	0.3	2.71	88.2
	0.6	2.72	87.8
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	0.15	2.69	87.0
	0.3	2.70	88.0

Basal medium+N-compound
Incubation: 5 hrs.

TABLE VIII. EFFECT OF AERATION RATE

Cell wt.	Vol.	Content (mg/g dry cell)			
		NAD	NADH_2	Total	$\frac{\text{NAD}}{\text{NADH}_2}$
3.4 %	100 ml	2.92	0.59	3.51	4.95
	200	2.49	0.90	3.39	2.77
	300	2.04	0.41	3.45	4.98
8.5	100	2.78	0.22	3.00	1.26
	200	1.93	1.38	3.31	1.40
	300	1.89	1.01	2.90	1.87
13.6	100	1.90	1.20	3.10	1.58
	200	1.79	1.51	3.30	1.19
	300	1.82	1.16	2.98	1.57

After the suspension, indicated in Table, was shaken at 30°C for 5 hrs., coenzymes were extracted and assayed.

The used medium was basal one showed in Table I, in which amount of added nicotinamide was proportional to cell weight.

TABLE IX. THE OPTIMUM CONDITION FOR NAD ACCUMULATION

pH	3 (with NaOH)
Aeration rate	15 l/min, or more
Temp.	30~33°C
Yeast cell	5% (as dry cell)
Incubation	5 or 6 hrs.
Components of medium	
Nicotinamide	750 mg
Adenine	75 mg
KH_2PO_4	M/25 (final conc.)
Citric acid	1%

In 5 l of Yeast suspension.

らに Jar fermenter で検討した結果, プレス酵母に前駆体を与えて, Jar fermenter 中で NAD を蓄積するには Table IX の条件が最適と認められた.

要 約

増殖しない条件で, 酵母 (*Sacch. oviformis*) に前駆体を与えて NAD 菌体内の蓄積条件を検討し, 次の結果を得た.

- (1) 前駆体としての効果は, ニコチンアミド>ニコチン酸>キノリン酸の順序である.
- (2) 酸性域とくに pH 3 で NAD の蓄積は最高である.
- (3) 発酵性糖は NAD 蓄積を阻害する.
- (4) リン酸を除く無機酸の影響は全くない. TCA サイクル上またはそれに類縁の有機酸は阻害効果をもつ. ただし, クエン酸のみは逆に促進効果を有す.
- (5) 好気条件は好結果を与える.
- (6) リン酸, アデニンは効果が少なく, 窒素にはほとんど効果はない.

糖および有機酸の阻害効果は, 資化に伴う NAD/NADH₂ 比の減少が原因であり, Total NAD の蓄積阻害に原因するものではないと思われる. 反対に好気条件の促進効果は, NAD/NADH₂ 比の増大に原因すると思われる. いったん前駆体から生合成された細胞中の NAD は, その細胞が再び中性緩衝液 (pH 7) 中で保温される際減少していくのに反して, 酸性緩衝液 (pH 3) 中では減少しなかった. この現象は酸性域における NAD の著しい蓄積の原因と思われる.

終りに, 本研究を進めるに当り終始御指導と御鞭撻を賜った当社取締役中村路一田無工場長, 当工場石橋慶次郎博士, ならびに当社中央研究所生物第三室長中西一夫博士に深謝いたします. また実験に御協力いただいた寺

本進君に謝意を表します.

(本研究は昭和 40 年, 本会関東支部大会において発表したものの一部である.)

- (1) I. Takebe, K. Kitahara : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9**, 31 (1963).
- (2) 早野恒一, 建部 到, 北原覚雄 : *Amino Acid and Nucleic acid*, **9**, 37 (1964).
- (3) 早野恒一, 建部 到, 北原覚雄 : 本誌, **38**, 515 (1964).
- (4) H. Suomalainen, A. Björklund, K. Vinervara : *J. Inst. Brew.*, **71**, 221 (1965).
- (5) H. Suomalainen, T. Norminen, K. Vihervara : *ibid.*, **71**, 227 (1965).
- (6) 北原覚雄 : ビタミン, **29**, 296 (1964).
- (7) E. Hofman : *Biochem. Z.*, **333**, 263 (1960).
- (8) 高桑正義, 小田恒郎 : 昭和 39 年本会大会講演.
- (9) E. Racker : *J. Biol. Chem.*, **184**, 313 (1950).
- (10) J. A. Bassham, L. M. Birt, R. Hems, V. E. Loening : *Biochem. J.*, **73**, 491 (1959).
- (11) H. Holzer, S. Goldschmidt, W. Lamprecht, E. Helmreich : *Z. Physiol. Chem.*, **297**, 1 (1954).
- (12) R. K. Bonnichsen : *Acta Chem. Scand.*, **4**, 714 (1950).
- (13) B. L. Horecker, A. Kornberg : "Method in Enzymology", III, Academic Press.
- (14) A. Kornberg : *J. Biol. Chem.*, **182**, 779 (1950).
- (15) J. Preiss, P. Handler : *ibid.*, **233**, 493 (1958).
- (16) 中村重信, 市山 新, 西塚泰美, 早石 修 : 酵素化学シンポジウム第 16 回, 1964, p. 227.
- (17) S. Takei, J. Totsu, K. Nakanishi : *J. Agr. Biol. Chem.*, **30**, 169 (1966).
- (18) J. Totsu, S. Takei, K. Nakanishi : 生化学. 投稿中.
- (19) T. K. Sundaram, K. V. Rajagopalan, C. V. Pichappa : *Biochem. J.*, **77**, 145 (1960).