報 文

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 70, No. 12, pp. 1351~1357, 1996]

Hasegawaea japonica の孢子形成過程および発芽過程 における炭水化物の変動

加藤美好*, 河東田茂義
(山形大学農学部)

平成 8 年 5 月 29 日 受 理

Carbohydrate Composition during Sporulation and Germination of Ascospores of *Hasegawaea japonica*

Miyoshi KATO* and Shigeyoshi KATOHD

Section of Bioresource Utilization, Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka 997

(*Present address : Wine & spirits technical research center,
Mercian Corporation, Johnan 4-9-1, Fujisawa 251)

Carbohydrate metabolism during sporulation and germination of ascospores of *Hasegawaea japonica* was examined to detect changes in the synthesis and degradation of intracellular and wall materials. The cellular materials in spores during sporulation and germination were fractionated into spore-cytoplasm and spore walls. Trehalose in the spore-cytoplasm was synthesized during spore formation, and then the sugar was degraded during germination. Wall carbohydrate was fractionated into KOH-soluble glucan and -an insoluble fraction. The KOH-soluble glucan, as a major component of the spore walls, was synthesized during spore formation, and then the glucan was degraded during germination. The study found that trehalose and KOH-soluble glucan synthesized during sporulation of *H. japonica* were degraded during germination. The results were similar to the previous results for *Saccharomyces cerevisiae*.

(Received May 29, 1996)

Key words : *Hasegawaea japonica* ; carbohydrate ; sporulation ; germination

結 言

分裂酵母の孢子形成過程における孢子の形態形成に関する研究は、主に *Schizosaccharomyces pombe* において行われている⁽¹⁻³⁾ が、*Hasegawaea japonica* (旧 *Schizo. japonicus*) における研究は少ない⁽²⁾。その孢子形成条件は *Schizo. pombe* とほぼ同様な生理的条件下で孢子形成を行うとされており⁽⁴⁾、形態形成過程も類似していることが示されている⁽²⁾。分裂酵母の発芽過程に

についても、*Schizo. pombe* においてその動力学^(5,6)、突然変異⁽⁷⁾ 及び DNA 合成⁽⁸⁾ との関連で研究されているものの、炭水化物の変動については、Inoue と Shimoda により検討されている^(9,10) のみである。

先に、著者らは *Saccharomyces cerevisiae* においては、孢子壁と細胞壁の構成多糖に差異があることを示し⁽¹¹⁾、その孢子形成過程⁽¹²⁾ 及び発芽過程⁽¹³⁾ における炭水化物の変動に関して報告した。一方、*H. japonica* は子嚢細胞内に 8 個の孢子を形成する特異的な分裂酵母であり、用いた Y-230 K 株においては栄養細胞の細胞壁と孢子壁ではその化学組成に大差のない結果を得た。これまで、*H. japonica* の孢子形成過程及び発芽過

* 現在、メルシャン株式会社、酒類技術センター。
〒251 藤沢市城南 4 丁目 9-1。

程における孢子壁及び細胞質の炭水化物の変動についての報告はなく, *S. cerevisiae* と比較するためにここで検討することとした。

実験方法

1. 使用菌株と培養方法

孢子形成培養は, トマト抽出液寒天培地から 2 白金耳の *Hasegawaea japonica* Y-230 K 株を 100 ml のトマト抽出液 3.6% (v/v) を含む Burkholder 改変培地⁽¹⁴⁾ (pH 5.0) に植え, 30°C で 12 時間, 静置培養した後, 遠心洗浄 (1,400×g, 5 分間) した菌体を 1×10^6 cells/ml になるように同新鮮培地 100 ml に植え, 30°C で 10 時間, 振とう培養した。その後, 遠心洗浄 (1,400×g, 5 分間) した菌体を同量の蒸留水に懸濁し, 30°C で 8 時間攪拌し, 飢餓処理を行った。この菌体を遠心洗浄 (1,400×g, 5 分間) し, 1×10^6 cells/ml になるように 100 ml のトマト抽出液 3.6% (v/v) を含む Burkholder 改変培地から硫酸を除去した孢子形成培地 (pH 5.0) に植え, 30°C で振とう培養した。孢子形成率は, 全細胞数当たりの孢子形成した細胞の占める割合を%で示したが, *H. japonica* Y-230 K 株は, 子嚢内に 8 個の孢子を形成後, 子嚢壁が破れ単離孢子となるために, 単離孢子 8 個を孢子形成細胞 1 個とみなした。

発芽培養は, 上記の培養方法により培養 30 時間目から得た単離孢子子を 1×10^8 spores/ml の濃度で, グルコース濃度 (w/v) のみを 2% から 4% に増加したトマト抽出液 3.6% (v/v) を含む Burkholder 改変培地 (pH 5.0) 100 ml に植え, 30°C で振とう培養した。孢子の発芽率は, 発芽による孢子の光屈折性の消失を位相差顕微鏡下で計測し, その細胞の占める割合 (%) で表した。

2. 孢子壁及び細胞質標品の調製と炭水化物の分画

単離孢子を得るために, 孢子形成過程の子嚢細胞は, 集菌洗浄後, Zymolyase 20 T (生化学工業㈱, EC 3.2.1.3) で子嚢壁を除去し, 単離孢子とした⁽¹²⁾。孢子壁及び細胞質標品は, 既に報告した方法⁽¹³⁾ に従って調整した。なお, 細胞の破碎にはブラウンホモジナイザーを用いた⁽¹⁵⁾。細胞を破碎後, 遠心分離 (1,400×g, 5 分間) により, 沈殿と上清に分けそれぞれを凍結乾燥し, 孢子壁及び細胞質標品とした。孢子壁標品の分画は, 既に報告した方法⁽¹⁶⁾ に従い, 1N KOH を用い, 30°C, 2 時間の抽出を行い, 遠心分離 (12,300×g, 15

分間) 後, 上清のアルカリ可溶性グルカン画分と沈殿のアルカリ不溶性画分に分け, それぞれの画分に含まれるグルコース総量をグルカン量とした。細胞質標品に含まれるグリコーゲン量は *Rhizopus* sp. アミログルコシダーゼ (Sigma, エキソ-1,4- α -グルコシダーゼ, EC 3.2.1.3) を用いて求め⁽¹³⁾, トレハロース量は, Bio-Gel P-4 によるゲル濾過⁽¹⁶⁾ により二糖画分を分画後, トレハラーゼ (Sigma, EC 3.2.1.28) によりトレハロースであることを確かめ, そのグルコース総量として算出した。

3. 構成成分の分析方法

構成糖の定量はガスクロマトグラフィーを用い⁽¹⁵⁾, タンパク質量は Lowry らの方法⁽¹⁷⁾ に従って測定した。

結 果

1. *Hasegawaea japonica* の孢子形成過程における炭水化物の変動

H. japonica の孢子形成過程と孢子に含まれる糖組成を Fig.1 に示した。孢子形成の開始に先立って栄養生長が認められ, 培養開始時に 1.0×10^6 cell/ml の細胞数は培養 16 時間目で 6.8×10^6 cell/ml まで増加し, その後はほぼ一定であった。孢子形成率は, 8 時間目以降培養時間の経過とともに増加し, 40 時間目で約 89% に達した (Fig.1 A)。孢子の収量は, 培養 30 時間目まで増加したが, その後は一定であり, 糖組成の培養過程における変動については, グルコースが主要な構成糖であり, その増加が顕著であった (Fig.1 B)。

孢子形成過程における孢子壁及び孢子の細胞質に含まれる糖組成の変化を調べるために, 孢子壁と細胞質に分画した。孢子壁の収量は, 培養過程をとおして孢子乾燥重量の約 27% であった。孢子壁及び細胞質に含まれる糖組成の分析結果を Fig.2 に示した。孢子壁には主にグルコースが含まれており, 孢子形成過程をとおして孢子壁乾燥重量の約 70% と一定であり, ガラクトース及びマンノースは 4% 以下であった (Fig.2 A)。一方, 細胞質にもグルコース, ガラクトース及びマンノースが含まれ (Fig.2 B), 孢子形成の進行に伴い, グルコース含量は著しい増加を示し, 培養 30 時間目では細胞質乾燥重量の約 28% となり, その後は一定であった。ガラクトース及びマンノースは, 培養 20 時間目以降ほぼ一定であった。比較のために Table に *H. japonica* の孢子壁に加え *H. japonica* の細胞壁⁽¹⁶⁾ 及び *S.*

Fig. 1 The Kinetics and Sugar Composition during Sporulation of *H. japonica*.

At intervals, samples were withdrawn for the determination of the percentage of asci and cell number by phase-contrast microscopy. For the subsequent determination of both dry weight and sugar composition of spores, samples were collected by centrifugation, degraded by Zymolyase for elimination of ascus wall and then lyophilized.

A : ○, percentage of asci ; ●, cell number.

B : ●, dry weight of spores ; ○, glucose ; △, mannose ; □, galactose.

Table 1 Chemical Composition of Spore Wall of *Hasegawaea japonica*.

Component	<i>H. japonica</i>		<i>S. cerevisiae</i>
	Spore wall	Cell wall ^a	Spore wall ^b
Glucose	72.7	70.5	46.8
Mannose	3.5	6.1	3.4
Galactose	2.8	7.6	N.D.
Hexosamine	0.4	0.3	11.7
Uronic acid	6.4	1.2	2.6
Protein	5.0	9.0	12.0

Values are expressed as % dry weight of spore wall or cell wall.

a : Ohno and Katohda⁽¹⁶⁾.

b : Katohda *et al.*⁽¹¹⁾.

N.D. : not detected.

Fig. 2 Sugar Composition of Spore Wall (A) and Spore Cytoplasm (B) during Sporulation of *H. japonica*.
○, glucose ; △, mannose ; □, galactose.

cerevisiae の孢子壁⁽¹¹⁾ の化学組成を示した。*H. japonica* の孢子壁に含まれる中性糖は、*H. japonica* の細胞壁に比べると、グルコースがわずかに多く、マンノース及びガラクトースが少なかったが、ウロン酸は約 4.3 倍多く含まれていた。*S. cerevisiae* の孢子壁の主要な構成糖であるヘキシサミンは、*H. japonica* の孢子壁では 0.4% とわずかにしか認められず、著しい差異を示した。Briza ら⁽¹⁸⁾ は、*S. cerevisiae* の孢子壁最外層がジチロシンで構成されていることを明らかにした。彼らの方法に従い、*H. japonica* の孢子壁を用い TLC 及びキサントプロテイン反応によるジチロシンの検出を試みたが、いずれも陰性であり、ジチロシンの存在は確認できなかった。

孢子形成過程における孢子壁構成多糖の質的差異を検討するために、アルカリ抽出を行い、アルカリ可溶性グルカン及びアルカリ不溶性グルカン量を求めた (Fig. 3 A)。アルカリ可溶性グルカンは孢子形成過程において、孢子壁乾燥重量に対する割合の差異は著しくはなかったが、アルカリ不溶性グルカン量は孢子形成の進行に伴い増加傾向を示した。細胞質に含まれる糖の質的差異を Fig. 3 B に示した。細胞質に含まれるグルコースにより構成される糖質は主にトレハロース及

Fig. 3 Carbohydrate Composition of Spore Wall(A) and Spore-Cytoplasm(B) during Sporulation of *H. japonica*.

びグリコーゲンであり、トレハロースは孢子形成の進行に伴い著しい増加を示し、培養30時間目では細胞質乾燥重量の約20%に達し、グリコーゲンは孢子形成過程において約3%とほぼ一定であった。図中には示さなかったが、孢子形成開始以前の培養0時間目及び5時間目の栄養細胞の細胞質には、それぞれ細胞質乾燥重量の3.0%及び1.8%のグルコース(ほぼ全てがグリコーゲン)しか含まれず、トレハロースが孢子細胞質にのみ著しく増加していた。

2. *H. japonica* の孢子の発芽過程における炭水化物の変動

発芽過程の経時変化を Fig. 4 に示した。単離孢子は発芽培地に移し変えるとただちに発芽を開始し、培養3時間目では発芽率は90%、5時間目ではほぼ100%となり発芽が完了した。光学顕微鏡観察の結果、*Schizo. pombe*⁽⁵⁾と同様に、培養5時間目で発芽管の形成がごくわずかに認められたが、細胞分裂は認められなかった(結果は示さない)。孢子の乾燥重量及び吸光度は、発芽開始に伴い培養1時間目に減少しその後増加した。培地に添加した4%のグルコースは、培養3時間目までに約0.4%、培養5時間目で1.0%のみが消費された。2%のグルコースを含む栄養生長培地では、発芽の開始の遅れと発芽率の低下が認められ(結果は示さない)、発芽培養には2%以上のグルコースが必要であった。

Fig. 4 The Kinetics during Germination of Spores of *H. japonica*.
○, percentage of germination; ●, percentage of reducing sugar remained in medium; △, A₆₆₀ of the spore suspension; □, dry weight of spores.

Fig. 5 Chemical Composition of during Germination of Spore of *H. japonica*.
○, glucose; △, mannose; □, galactose; ●, protein.

孢子の発芽過程における菌体成分の変化を Fig. 5 に示した。培養開始1時間目で、グルコース、マンノース、ガラクトース及びタンパク質はいずれも減少傾向

Fig. 6 Sugar Composition of Spore Wall (A) and Spore-Cytoplasm (B) during Germination of Spore of *H. japonica*.

○, glucose; △, mannose; □, galactose.

を示し、これらの成分の減少が菌体乾燥重量の減少の大きな要因であった。グルコースのみがさらに培養3時間目まで減少し続けたが、その後、培地に添加したグルコースの消費と発芽の完了 (Fig. 4) に伴って増加した。発芽過程における発芽孢子壁及び細胞質に含まれる糖組成の変化を Fig. 6 に示した。発芽過程をとおして、孢子壁には主にグルコースが含まれており、発芽培養開始時に孢子壁乾燥重量の約 70% を占めていたが、培養1時間目では 48% と著しく減少し、培養3時間目までわずかに減少し、その後増加した (Fig. 6 A)。一方、細胞質にはグルコース、ガラクトース及びマンノースが含まれ、発芽培養開始時に細胞質乾燥重量の約 30% を占めるグルコースは、発芽の進行に伴い著しく減少を示し、培養3時間目では約 12% となり、その後は増加して約 20% を占めていた (Fig. 6 B)。発芽孢子壁及び細胞質に含まれるガラクトース及びマンノースの変化はあまり認められなかった。

孢子の発芽過程における発芽孢子壁構成多糖の質的差異を検討するために、アルカリ抽出を行い、アルカリ可溶性グルコース及びアルカリ不溶性グルカン量を求めた (Fig. 7 A)。孢子の発芽過程において、アルカリ可溶性グルカンが発芽孢子壁の主要な構成多糖であ

Fig. 7 Carbohydrate Composition of Spore Wall (A) and Spore-Cytoplasm (B) during Germination of Spore of *H. japonica*.

ったが、培養1時間目で著しく減少し、培養3時間目では約 30% と培養開始時のほぼ半分までに減少し、その後は一定であった。アルカリ不溶性グルカン量は孢子の発芽の進行に伴い、培養3時間目まではアルカリ可溶性グルカンと同様の傾向を示したが、培養5時間目ではわずかな増加を示した。細胞質に含まれる糖の質的差異を Fig. 7 B に示した。発芽開始時に細胞質に含まれるグルコースにより構成されている糖質は主にトレハロースであり、そのほか少量のグリコーゲンが認められた。トレハロースは孢子の発芽の進行に伴い著しく減少し、培養5時間目ではほとんど認められなくなった。孢子壁の細胞質に 2.4% 含まれていたグリコーゲンは培養1時間目以降減少し、培養5時間目では約 3 分の 1 に減少した。

考 察

Hasegawaea japonica の孢子の形成には、既に Tsuboi ら⁽⁴⁾ が述べているように、グルコース、無機塩類及びビタミン類の添加と窒素源としての硫酸の除去が必要であった。彼らの場合と培養条件は若干異なるものの、培養40時間目でほぼ同程度である約 90% の孢子形成率を示したが、*Schizosaccharomyces pombe* において見られた⁽⁹⁾ と同様に、孢子形成に先行して栄養細

胞の増加が認められた (Fig.1 A). 接合体の形成率は測定していないが, 培養 8 時間目から接合体が認められたので, 増殖とともに接合体が形成され, 胞子形成過程に移行するものと思われる. 胞子形成率の上昇と共に胞子の乾燥重量も増加したが, 培養 40 時間目ではその約 50% がグルコースであり (Fig.1 B), *Saccharomyces cerevisiae* の胞子⁽¹¹⁾ に比べ高い含量であった. *H. japonica* の胞子壁組成をその細胞壁と比較すると, マンノース及びガラクトース含量は低く, ウロン酸含量は高かった. ウロン酸含量が *S. cerevisiae* の胞子壁よりも約 2 倍高く (Table), 胞子壁におけるその存在形態と機能の解明は今後の課題である. *Schizo. pombe* の胞子壁の化学組成の分析結果がなく, 比較することができなかった.

H. japonica の胞子壁は胞子形成過程をととして乾燥重量の約 70% のグルコースを含み, その多くがアルカリ可溶性であった (Fig.2 A 及び 3 A). *S. cerevisiae* の胞子形成過程における胞子壁⁽¹²⁾ に比べ, グルコース含量は約 30% 多かった. この胞子壁に含まれるアルカリ可溶性グルカンは, 少量のアルカリ不溶性グルカンとともに, 発芽過程においてその初期の培養 1 時間目で急速に減少し (Fig.7), エネルギー源や炭素源として利用されるものと思われる. *S. cerevisiae* の胞子の発芽過程においても, アルカリ可溶性グルカンは培養 1 時間目で急速な減少を示しており⁽¹³⁾, 子囊酵母の胞子壁の一部は, 貯蔵炭水化物としての機能を有していることを示唆している.

H. japonica の胞子形成過程における胞子の細胞質のグルコース含量の急速な増加は, トレハロースの合成によるものであり (Fig.2 B 及び 3 B), 発芽過程において発芽開始時に急速に減少し, 発芽完了時にそのほぼすべてが消費された (Fig.7 B). 発芽開始に伴う胞子の乾燥重量の減少は, 主にトレハロースとアルカリ可溶性グルカンの減少によるものであり, この細胞重量の減少が吸光度の減少にも関与していると思われる. トレハロースの胞子形成過程における合成と発芽過程における分解利用については, 既に *S. cerevisiae*^(12,13,20) 及び *Schizo. pombe*^(9,10) で明らかにされているが, *H. japonica* においても同様に, 発芽開始に必須のトレハロースが胞子形成過程において合成及び蓄積されるものと思われる. グリコーゲンも培養 3 時間目以降減少した (Fig.7) が, 細胞質に含まれるグルコース量は逆

に増加していた (Fig.6). このグルコースに相当する量は, Bio-Gel P-4 のゲル濾過で高分子画分に溶出してくる (結果は示さない) ので, グルコース重合体であることが予測されたが, その結合様式については明らかにできなかった.

以上の結果から, *H. japonica* の胞子壁の化学組成及び構造は *S. cerevisiae* とは異なるが, 胞子形成過程で合成された胞子壁に含まれるアルカリ可溶性グルカンは, *S. cerevisiae*^(12,13) と同様に, 発芽の開始に必要なエネルギー源や炭素源として再利用されることが示唆された. さらに, 胞子形成過程及び発芽過程における細胞質貯蔵炭水化物であるトレハロースの合成及び分解様式についても, *S. cerevisiae*^(12,13) と類似性が認めれた. 今後は, *H. japonica* の胞子壁の微細構造の解析を進め, *S. cerevisiae* との差異を検討したい.

- (1) B. Y. Yoo, G. B. Calleja and B. F. Johnson : *Arch. Microbiol.*, **91**, 1-10 (1973).
- (2) K. Tanaka and A. Hirata : *J. Cell Sci.*, **56**, 263-279 (1982).
- (3) M. Kishida, A. Hirata and C. Shimoda : *Plant & Cell Physiol.*, **31**, 433-437 (1990).
- (4) M. Tsuboi, K. Ohashi, M. Takahara and M. Hayashibe : *Plant & Cell Physiol.*, **19**, 1327-1332 (1973).
- (5) K. Nishi, C. Shimoda and M. Hayashibe : *Can. J. Microbiol.*, **24**, 893-897 (1978).
- (6) C. Shimoda : *Can. J. Microbiol.*, **26**, 893-897 (1980).
- (7) C. Shimoda : *Jpn. J. Genet.*, **54**, 465-466 (1979).
- (8) C. Shimoda and K. Nishi : *Jpn. J. Genet.*, **52**, 474 (1977).
- (9) H. Inoue and C. Shimoda, *Mol. Gen. Genet.*, **183**, 32-36 (1981).
- (10) H. Inoue and C. Shimoda : *Arch. Microbiol.*, **129**, 19-22 (1981).
- (11) S. Katohda, K. Konno, Y. Sasaki, K. Suzuki and S. Sakamoto : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 895-901 (1984).
- (12) S. Katohda, H. Ito, H. Takahashi and H. Kikuchi : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 349-355 (1988).
- (13) S. Katohda, M. Ito, K. Sasaki and M. Takahashi : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2975-2981 (1987).
- (14) M. Hayashibe and N. Sando : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16**, 15-27 (1970).
- (15) S. Katohda, N. Abe, M. Matsui and M. Hayashibe : *Plant & Cell Physiol.*, **17**, 909-919 (1976).
- (16) 大野正博, 河東田茂義 : 農化, **70**, 781-786 (1996).
- (17) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and

- R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- (18) P. Briza, A. Ellinger, G. Winkler and M. Breitenbach : *J. Biol. Chem.*, **265**, 15118-15123 (1990).
- (19) 河東田茂義 : 山形大学紀要 (農学), **11**, 907-956 (1993).
- (20) J. M. Thevelein : *Microbiol. Rev.*, **48**, 42-59 (1984).
-