

氏 名
授 与 学 位
学 位 授 与 年 月 日
学 位 授 与 の 根 拠 法 規
研 究 科 ， 専 攻 の 名 称

樋 口 昌 孝
農 学 博 士
昭 和 36 年 3 月 24 日
学 位 規 則 第 5 条 第 1 項
東 北 大 学 大 学 院 農 学 研 究 科
博 士 課 程 (農 芸 化 学 専 攻)

学 位 論 文 題 目

酵 母 に よ る ヌ ク レ オ チ ド の 分 泌

指 導 教 官
論 文 審 査 委 員

東 北 大 学 教 授 植 村 定 治 郎
東 北 大 学 教 授 植 村 定 治 郎
東 北 大 学 教 授 志 村 憲 助
東 北 大 学 教 授 柴 崎 一 雄

論文内容要旨

序

微生物による核酸系物質の分泌は突然変異や代謝阻害剤により、ヌクレオチド生合成系を阻害した場合のその前駆物質の排出や、細胞の自己消化の際の核酸分解物の遊離として、また、種々の要因による細胞内の核酸合成系とそれに共転する他の代謝系との一種の不均衡状態が生じた際にも観察されている。

本研究は酵母と乳酸菌の混合培養の際の酵母により核酸系物質が分泌されること、このような分泌が必ずしも混合培養系のみならず、酵母のみを適当な medium 中に incubate した際にも観察されるという現象(伊藤雄太郎, 植村定治郎 1957 年)を出発点とし、このような分泌に関係する諸要因、分泌と酵母の細胞構造並びに生理的性質との関連性に重点をおいて研究を進めた。そしてこれらの知見にもとづいてこの分泌の機作を明らかにすると共に、将来混合培養系における微生物相互の物質のやり取り—分泌と吸収—の研究の基礎となる知見をうることを目的とした。

菌種並びに培養条件

まづ、用いる酵母菌株としては当研究室保存の数種の菌株につき、その紫外部吸収性物質(以下 UV 物質と略称する)の分泌量を比較し、その単位菌体当りの分泌量の最も多いビール酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* Yebris) が選ばれた。以後はブドウ糖を炭素源とし、カザミノ酸、硫酸アンモンを窒素源とし、無機塩、7種のB群ビタミンを添加をした合成培地で静置培養した上記ビール酵母を主に用いて研究をすすめた。

UV 吸収性物質の分泌に及ぼす incubation medium の影響

生菌懸濁液での UV 物質の分泌に及ぼす物理的・化学的諸要因の影響につき汎く検討した結果、分泌を最も促進する要因としては、クエン酸、EDTA のような chelating agent の存在であり、反対に蒸留水や緩衝作用のない中性塩溶液、並びに完全合成培地ではその分泌が極めて少ないことが見出された。また、クエン酸緩衝液での分泌には通常の代謝阻害剤や抗生物質は殆んど影響しなかったが、 Mg^{++} や Ca^{++} のように chelating agent と反応し易い金属イオン添加により約 50% の分泌阻害が認められた。このように chelating agent が微生物細胞からの核酸系物質の分泌を促進するという現象は他にその報告なく、極めて興味深い現象と思われるので、以後この面に主力をおいて研究がすすめられた。

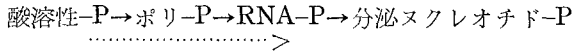
分泌物の分離同定

クエン酸緩衝液 incubation により分泌されてくる UV 吸収性物質は $258m\mu$ に吸収極大、 $240m\mu$ に極小点を有する典型的な核酸系物質の吸収スペクトルを現わすが、活性炭吸着、イオン交換樹脂 Dowex 2 (Cl型) column chromatography 並びに paper chromatography を併用して分泌物の分離同定が試みられ、その分泌物の大部分は、モノ、オリゴ、ポリヌクレオチドからなることが確められた。そして、その base 組成が酵母リボ核酸 (RNA) の組成とそれ異ならないこと、及び分泌ヌクレオチドの大部分が 5'-ヌクレオチドの反応を示さないことから、その由来としては酵母 RNA の分解物であることが推定された。

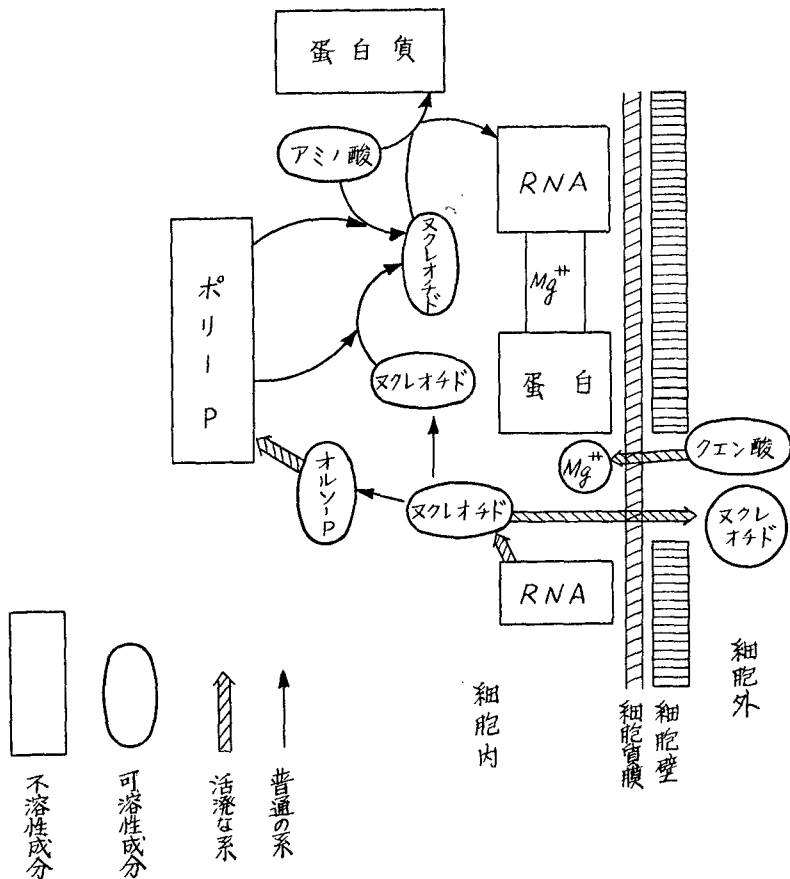
分泌と菌体構成々分

分泌ヌクレオチドの由来並びに菌体構成々分との関係を知るために、分泌前後における菌体の pool アミノ酸、蛋白含量及び核酸含量の変動が調べられ、また ^{32}P で部分的にラベルした菌体を用いて分泌前後のリン酸化合物の動きを解析した。酸溶性区分のアミノ酸及びヌクレオチドは incubation 開始後急激に減少し、以後あまり変化しなかった。RNA は分泌と平行してはゞ一定の割合で減少した。蛋白質及びデオキシ核酸 (DNA) は 6 時間までは殆んど変化しなかつた。

った。一方リン酸化合物の分析結果から、分泌ヌクレオチドは RNA 区分とほぼ同じレベルの比放射能を有し、これが菌体 RNA から由来したことが、この面からも裏づけられた。細胞内リン酸化合物の動きで最も注目される点は RNA-P がヌクレオチドとして分泌される結果、量的には減少するにもかかわらず、比放射能は逆に増加の傾向を示し、一方ポリ-P は incubation 中量的にも比放射能でも増加し、ヌクレオチド分泌にともない次のように P が代謝回転していることが示唆された。



クエン酸緩衝液存在下における酵母のヌクレオチド分泌の機作 (模型図)



分泌と細胞構成体

次に分泌と細胞構成体との関係を調べる目的で種々の時間、クエン酸緩衝液で incubate した菌体を音波発生機で破碎し、分画遠心法で細胞構成体を分画し、その各 fraction の核酸含量と蛋白質含量を測定した。その結果、最も興味深い現象は incubation 初期には細胞表面区分に相等する fraction の核酸は著しく減少するにもかかわらず、これに匹敵する程核酸含量の高い small granule fraction は殆んど減少せず、長期の incubation で細胞が明らかに自己消化の段階に入った頃に、後者の核酸も減少しはじめることである。このような分析と平行し

て、incubation 中の細胞の形態変化、生菌数の変化 small granule fraction の超遠心像の変化等も調べられた。

分泌と細胞の透過系

種々の人為的破損処理を加えた細胞でのヌクレオチド分泌について検討された結果、細胞の透過系を破壊するような処理により、分泌量が著しく増大することが認められた。

分泌と酵素活性

分泌が菌の生理的性質にどのような変化をもたらすかを知るため分泌前後の菌体での有機酸酸化能、醗酵能の変化を検討した。前著については、特に注目すべき変化は観察されなかったが、醗酵能ではクエン酸緩衝液 incubation (分泌大) と NaCl 溶液または醋酸緩衝液 incubation (分泌少) で大きな相違があった。ヌクレオチド分泌と最も密接に関係すると思われるリボヌクレアーゼ活性 (RNase) は、生菌では極めて弱い、音波処理により抽出されて来る細胞質区分ではその活性は著しく強かった。ヌクレオチド分泌並びに細胞構造と RNase の関係を追究する実験結果で最も興味ある現象として、ヌクレオチド分泌にともない、生菌及び細胞表面区分の RNase 活性が次第に高まるだけでなく、この活性を有する蛋白質が incubation 溶液中に分泌されてくることが見出された。

増殖条件下での分泌

この研究の最後として、増殖条件下でのヌクレオチド分泌について検討され、クエン酸、EDTA のような chelating agent 添加によって、酵母の増殖が著明な抑制効果をうけるが、適当な濃度のクエン酸添加により、増殖の過程で、多量のヌクレオチドを培地中に分泌することが確められ、この研究を将来醗酵工業的なヌクレオチド生産へ応用する手掛りが得られた。

以上の諸結果と、生体内での核酸の存在の様式についての、生化学上の最近の知見にもとづき、酵母によるヌクレオチド分泌の機作につき図のような scheme が考えられ、これは微生物による核酸系物質の分泌の、これまで知られない新しい type であろうと推察される。

審 査 結 果 要 旨

微生物によるヌクレオチドの分泌現象は核酸代謝の面のみならず最近注目されているイノシン酸製造の面でも重視されているが、本論文では酵母細胞をクエン酸塩培地に懸濁して著量のヌクレオチドを分泌することの発見に基いて、この分泌現象に対するクエン酸の効果並びにその分泌機作を検索して酵母の核酸代謝に対しても一知見を与えることを試みたものである。

まず最もよく諸物質を分泌する麦酒酵母菌株を選択し、また培地条件としてクエン酸添加時が最も有効であることを見出した。このクエン酸の効果は EDTA のような chelating agent でもよく認められるので両者に共通性のあることを認め、よってクエン酸塩培地に P^{32} で標識化した酵母細胞を懸濁した際 (30° 3時間) の分泌物を Dowex-2 (Cl型) の column chromatography で検索し、その大部分がモノー、オリゴー、ポリヌクレオチドよりなることをみた。

さらに分泌前後の細胞内貯留アミノ酸、蛋白、核酸等の含量の変動を検討し、また P^{32} 標識化細胞について分泌前後のリン化合物の動きを調べた結果、酸溶性区分のアミノ酸及びヌクレオチドは分泌開始後急減して以後変化しないのに反して、リボ核酸は分泌と平行して減少し、デオキシリボ核酸及び蛋白は殆ど変化しないことをみた。また分泌ヌクレオチドがリボ核酸区分とはほぼ同じレベルの比放射能を有する等の成績からこれらのヌクレオチドが菌体リボ核酸に由来することを帰結した。とくにリボ核酸 $-P$ が分泌による量的な減少に反して逆に比放射能が増加し、またポリリン酸 $-P$ は量的にも比放射能でも分泌時に増加したことから、酸溶性 $-P \rightarrow$ ポリリン酸 $-P \rightarrow$ リボ核酸 $-P \rightarrow$ 分泌ヌクレオチド $-P$ のような機作で代謝回転が行なわれるとした。更に分画遠心して得られる細胞表面区分の核酸は分泌初期に著減するのに反して、同じくリボ核酸に富む小顆粒体区分のそれは減少しない事実より、分泌ヌクレオチドへのリボ核酸崩壊は細胞表面部分で起ることを推定した。尚細胞表面区分及び生菌のリボヌクレアーゼ活性が分泌とともに漸増し、培地にも漸次この酵素活性の認められる等の興味ある現象も見出した。結局これらの成績よりクエン酸等の chelating effect が細胞表面部分のリボ核酸蛋白-Mg より Mg を奪う。この為蛋白は遊離されてリボヌクレアーゼ活性を得てリボ核酸を分解してヌクレオチドとして細胞外に分泌させると同時に、他方に無機 P よりポリリン酸を経てリボ核酸が再合成されるような代謝回転のもとにリボ核酸レベルが大体維持されるような機作を提出した。この機作に基いてクエン酸供与培地に供試酵母を培養し、相当量のヌクレオチドを液内に蓄積させることを認めたが、この成績よりヌクレオチド醗酵というべき現象を導きえたことは注目に値する。

これらの成績は微生物生理学の面のみならず、新しい型のヌクレオチド醗酵の可能性を示唆する点でヌクレオチド製造の面にも重要な寄与をなすものであって博士課程の論文業績として極めてすぐれていると認められる。