

氏名・（本籍）	おく だ しん いち 奥 田 慎 一（東京都）
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農博第 26号
学位授与年月日	昭和39年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専門課程	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	パントテン酸欠乏下における 酵母の硫黄代謝に関する研究
論文審査委員	教授（主査）志 村 憲 助 教授 柴 崎 一 雄 教授 古 坂 澄 石 教授 植 村 定 治 郎

論 文 内 容 要 旨

小平らは清酒酵母をパントテン酸欠乏下で生長させると生長の対数期に培地中の硫酸イオンから硫化水素を発生することを見出した。その後研究を更に発展させ、硫化水素の発生はメチオニン、ロイシンおよびアルギニンによつて抑制され、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニンなどによつて促進されることを明らかにした。更に生菌のシステイン脱硫能が硫酸からの硫化水素発生能と平行関係にあり且メチオニンはこのシステイン脱硫能をも抑制することから、この硫化水素発生現象の機構としてシステイン脱硫系が関与すると推定した。また上記のようなアミノ基転移反応に密接に関係するアミノ酸が硫化水素の発生を促進する事実から、システイン合成系のどこかで

これらのアミノ酸がアミノ基供与体として関与していると考え、更にパントテン酸欠乏下では一般にビルビン酸が蓄積することから亜硫酸がビルビン酸と反応してβ-スルフィニルビルビン酸が生成されると想定した。上記の仮定は既往の硫酸還元代謝系のうち硫酸→亜硫酸→β-スルフィニルビルビン酸→システインスルフィン酸→システイン→硫化水素（以下間接系という）なる系に相当するものである。このことから小平らはパントテン酸欠乏下における硫化水素発生の機構を間接系と想定した。しかし代謝系そのものについては研究していない。

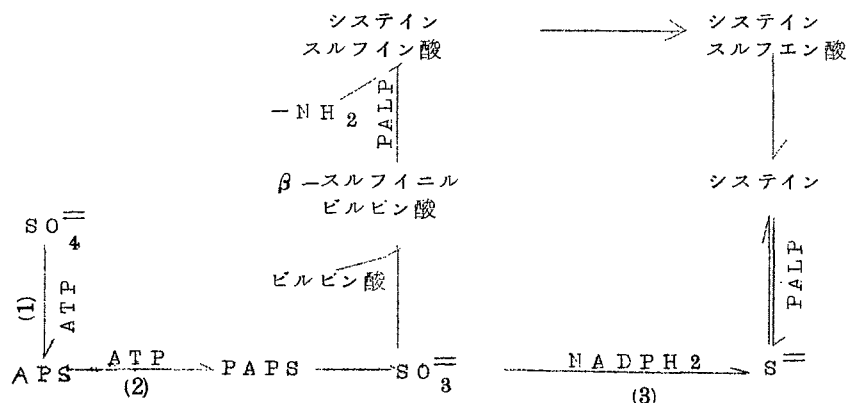
酵母の硫酸還元系の研究で間接系が存在するという報告は現在までのところわずかに1報しか見当らず、硫酸→亜硫酸→サルファイドと還元され（以下直接系という）システインが生成されるという説が強く支持されている（第1図）。

従つて小平らが想定した機構が実際に硫化水素発生に関与しているか否かは問題のあるところであり、小平らが殆んど触れていない直接系についても十分検討しなければならない。

一方、倉石はパン酵母をパントテン酸欠乏下で生長させ、この際窒素源としてメチオニン、ロイシンあるいはアルギニンを用いると多数の死細胞が出現することを見出した。しかもこの場合小平らの成績と同様に硫化水素の発生が抑えられることが認められた。

第 1 図

酵母による硫酸還元系の推定図



APS : アデノシン-5'-フオスフォ硫酸

PAPS : 3'-フオスフォアデノシン-5'-フオスフォ硫酸

PALP : ビリドキサール燐酸

酵 母

- (1) ATP sulfurylase
- (2) APS kinase
- (3) Sulfite reductase

このようにバントテン酸欠乏下における硫化水素の発生と死細胞の出現とは現象的に関連性が認められる。

以上の点から考えるとバントテン酸欠乏下における硫黄代謝、特にサルファイドの生成は酵母にとって重要な問題であると考えられる。また小平らの想定した硫化水素発生機構についてもバントテン酸あるいはメチオニンと関連を保ちながら特に直接系についても再検討しなければならないと考える。

本研究では先ずバントテン酸完全供与菌体と不完全供与菌体の生理的性質を硫黄代謝の面を中心に検討し、これに基づいて硫化水素発生機構を無細胞系で精査し新たな知見が得られたので以下に要約する。

1. 供試菌体の撰択

小平らは清酒酵母を用いて研究をすすめたが、本研究をはじめに当りその追試を行つたところ傾向としては一致するが硫化水素発生能が低く、実験を継続する上に不利であると考えた。そこでパン酵母を用いて清酒酵母と比較したところ硫化水素発生能が強く、やはりメチオニンやロイシンによつて硫化水素の発生が抑制された。

このことからパン酵母による硫化水素発生現象は清酒酵母による現象と相似なものと考え、以下硫化水素発生能の高いパン酵母を用いて研究することにした。

2. 菌体分析

先ずパントテン酸完全供与菌体と不完全供与菌体の硫黄代謝が如何なる特徴をもつかを明らかにし、合わせて硫化水素発生の機構について何らかの示唆をうるために S^{35} の細胞内分布を調べた。即ち S^{35} 硫酸を含むパントテン酸完全供与及び不完全供与培地で酵母を培養し、対数期に入つた菌体を集め、それぞれの菌体を冷酸可溶部、熱酸可溶部及び熱酸不溶部の3区分に分画し、各区分の放射能を測定した。パントテン酸不完全供与菌体は完全供与菌体よりも硫黄含量が多く、各区分の放射能を両菌体について比較すると次の如くである。(第1表)

第 1 表
 S^{35} の菌体内分布 (24時間振とう培養)

細胞内区分	パントテン酸 ($\mu g/l$)			
	200	10	200	10
	cpm/mg 乾 菌			
冷酸可溶部	91	205	88	250
活性炭吸着部	54	70	58	126
活性炭非吸着部	0.6	59	0.24	72
活性炭残存部	—	—	0.19	4.8
熱酸可溶部	68	16	65	11
熱酸不溶部	474	563	466	474
合計	633	784	619	735

パントテン酸 $200 \mu g/l$: 完全供与、 $10 \mu g/l$: 不完全供与

熱酸不溶区分のカウントはパントテン酸不完全供与菌体がやや高いが、熱酸可溶区分は完全供与菌体が4~6倍も高い。また冷酸可溶部区分は不完全供与菌体の方が

高い。特に硫化水素の発生ということを考慮して冷酸可溶部を更に活性炭吸着部と非吸着部とに大別すると活性炭吸着部の放射能もパントテン酸不完全供与菌体で高いが活性炭非吸着部に著しい差を認められた。即ち完全供与菌体ではこの区分に殆んど放射能を検出しえないが、不完全供与菌体では比較的多量に蓄積している。活性炭非吸着区分には遊離のアミノ酸、ある種のペプチド、無機の硫酸あるいは無機硫黄化合物などが含まれていると考えられる。そこでこの区分にベンチジン塩酸塩を加え沈澱区分と上清区分の放射能を測定したところ、大部分が沈澱区分で検出された。従つてパントテン酸不完全供与菌体では遊離の含硫アミノ酸に較べて無機の硫酸あるいは無機の硫黄化合物の蓄積が著しいことが明らかとなつた。

以上のことからパントテン酸不完全供与菌体では低分子の硫黄化合物、特に無機硫酸あるいは無機硫黄化合物に S^{35} の蓄積していることが特徴的であり、完全供与菌体では熱酸可溶区分に S^{35} のとり込みが多くなることが特徴的といえよう。

パントテン酸不完全供与菌体の場合に無機硫酸あるいは無機硫黄化合物が蓄積しており、アミノ酸区分の蓄積が少いことはこの菌体において直接系が活発であることを推定せしめる。

上記の実験だけでは各区分の放射能の高低換言すれば硫黄化合物の量がそれぞれと対応する遊離アミノ酸、ヌクレオチド、核酸、蛋白質などに見合う量であるのか、あるいは特殊な含硫化合物の蓄積を意味するものであるかは明かでない。

この点を検討するために上記冷酸可溶区分についてはアミノ酸と紫外部吸収性物質の量を、熱酸可溶区分については核酸量を、熱酸不溶部については蛋白質量を定量したところ、蛋白質はパントテン酸完全供与菌体と不完全供与菌体とで大差なく、他の化合物についてはいずれもパントテン酸不完全供与菌体の方がやや多いことがわかつた。

この結果と先の S^{35} の分布で得られた結果と比較すると熱酸可溶区分に差が認められた。即ち熱酸可溶部（核酸区分と考えられる）の放射能はパントテン酸完全供与菌体の方が4～6倍も高いのに反して、 $E_{260} - E_{290}$ で測定した核酸は不完全供与菌体の方がやや多いのである。このことから考えてパントテン酸完全供与菌体では紫外部に吸収をもつ比較的高分子の硫黄化合物の合成が活発であり、この物質の生成に

パントテン酸が関与しているものと推定される。

3. 硫化水素発生能の出現

前項においてパントテン酸不完全供与菌体は間接系よりも直接系が活発であると推定した。このことは硫酸からの硫化水素発生機構として直接系が関与していることを暗示している。若し間接系が関与するならばパントテン酸完全供与菌体をパントテン酸欠乏の状態に追い込んだときに硫酸からの硫化水素発生能とシステイン脱硫能とはともに増大しなければならない。そこで本項においては硫化水素発生能の出現という面から発生機構について検討した。

パントテン酸完全供与の定常期の細胞をパントテン酸不完全供与培地にインキュベートし、その間に現われるシステイン脱硫能と硫酸からの硫化水素発生能について検討した。その結果システイン脱硫能は生長が起らない場合にも増大するが、硫酸からの硫化水素発生能は生長が起らなければ出現してこない。このことから考えて硫酸を基質にして硫化水素を発生しうるようになるには代謝系がかなり変動しなければならないと考える。また硫酸を基質とした場合の活性が増大するにも拘わらずシステイン脱硫能が低下することも観察されたので、硫化水素発生機構として小平らが想定した間接系が実際に関与しているか否か疑問が生じた。

このように菌体分析及び硫化水素発生能の出現の実験は硫化水素発生機構としてむしろ直接系を支持している。

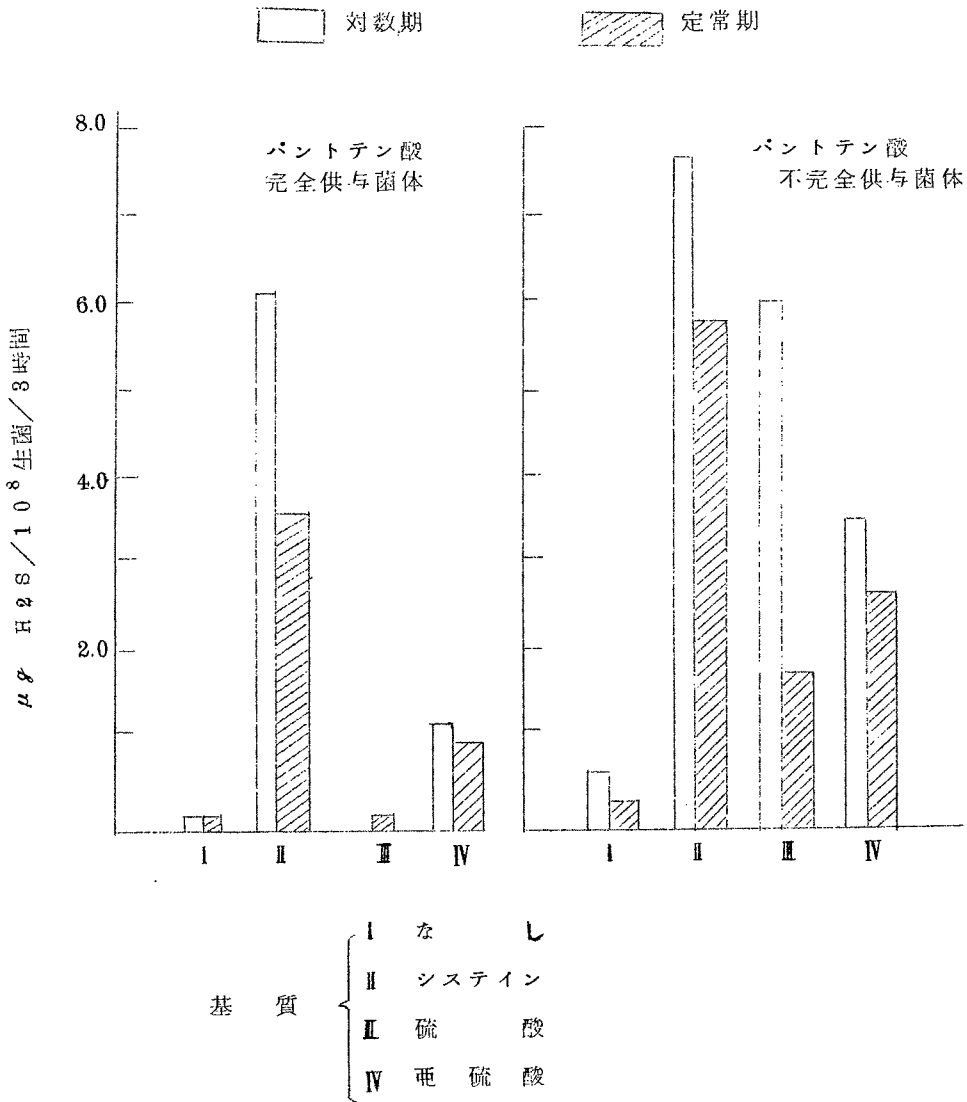
硫酸から硫化水素への還元系は硫酸から亜硫酸、亜硫酸から硫化水素と2段階に分けて考えることが出来る。間接系、直接系の問題は後者の段階についてであり、小平らの研究においても前者即ち亜硫酸までの代謝系とパントテン酸 deficiency との関係については何ら検討されていない。

この点を検討するために、次にパントテン酸完全供与及び不完全供与菌体の硫酸、亜硫酸及びシステインからの硫化水素発生能を検討した(第2図)。パントテン酸完全供与菌体は硫酸を基質として硫化水素を発生しえないが、亜硫酸を基質にすると硫化水素を発生する。またパントテン酸不完全供与菌体は硫酸からの発生能が亜硫酸からの発生能よりも強いことが観察された。これらのことから考えると、硫酸から亜硫

酸の系にパントテン酸が直接的にあるいは間接的に関与していると考えられる。

第 2 図

パントテン酸完全及び不完全供与菌体のシステイン、
硫酸、亜硫酸からの硫化水素発生能



事実生菌による硫酸の uptake はパントテン酸により促進されるのである (4を参照)

4. 硫酸の uptake 及び糖消費に及ぼすメチオニン、パントテン酸の影響

パントテン酸あるいはメチオニンを加えて培養すると硫化水素を発生せず、また上記の如くパントテン酸完全供与菌体は硫酸から硫化水素を発生しないが、亜硫酸からは発生する。従つてパントテン酸及びメチオニンが硫酸の uptake に如何なる影響を及ぼすかを明らかにすることは重要である。硫酸の uptake は Active transport であるといわれており、グルコース、塩化アンモン、磷酸塩、硫酸ソーダ、 Mg^{++} 、 S^{35} —硫酸を含む培地をつくり、これに菌体をけん濁する。3時間インキュベート後菌体の放射能を測定し硫酸の uptake とし、またその間の ATP 生成のメルクマールとして残糖量を測定した。

メチオニンは糖消費を抑制し、小平らの成績と同様硫酸の uptake を抑制した。パントテン酸は糖消費を抑制し、硫酸の uptake に対しては小平らの報告と同様促進的に作用する。またパントテン酸とメチオニンが共存するとメチオニンの影響が強く現われ、糖消費及び硫酸の uptake を抑制した。

パントテン酸完全供与菌体が硫酸からの硫化水素発生能をもたないのはパントテン酸が硫酸の uptake を抑えるからではなく、細胞内における硫酸の代謝系に問題があると考えられる。事実このような菌体にあつてはシステイン合成の一過程として亜硫酸からサルファイドが生成されると考えられている。

5. 無細胞標品による硫化水素生成

以上 1～4 項に記したことから硫化水素の発生は細胞内における硫酸の代謝系に問題があると考えた。硫酸から硫化水素への還元系は前記の如く硫酸→亜硫酸の系と亜硫酸→硫化水素の系と大別することが出来る。前者の系にパントテン酸が何らかの影響を及ぼしていることは第 3 項で明らかにした通りである。小平らの後者の系のうち間接系が硫化水素の発生に関与していると想定したが、他方直接系については殆んど検討されていない。しかも本研究の上記第 1.2 項において指摘された如く、硫化水素の発生には直接系が関与している可能性が強いのである。

そこでこの点を明らかにするために無細胞標品を用いて亜硫酸からの直接系及び間

接系による硫化水素の生成について精査し、硫化水素発生現象の一端を明らかにすることが出来た。

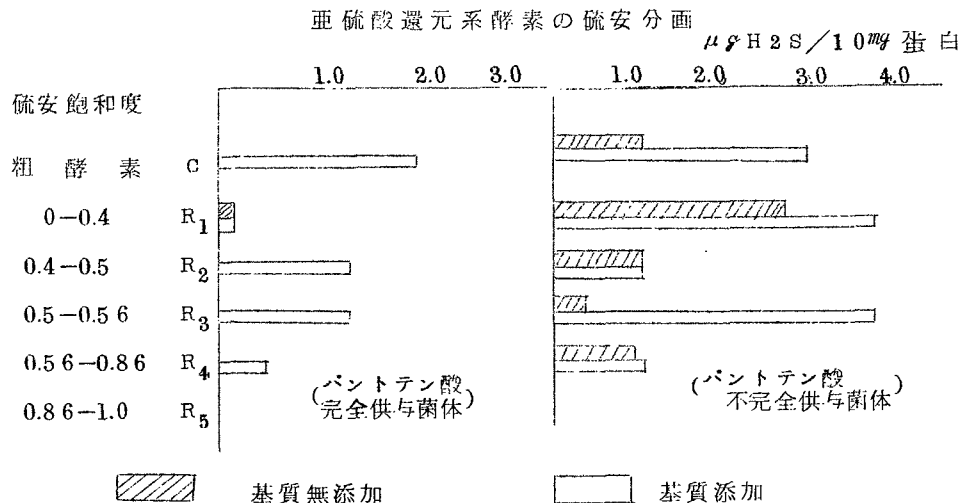
先ず無細胞標品の調製法について検討し、硫酸から硫化水素を生成しうる酵素液を得ることが出来たのでこの標品を以下の実験に供した。

I) 先ず直接系が間接系と異なることを明らかにするために、プロタミン処理により亜硫酸還元系酵素（直接系）と間接系の最終段階であるシステイン脱硫系酵素との分離を試みた。その結果亜硫酸還元系酵素は沈澱区分に、システイン脱硫系酵素は上清区分に存在することが認められた。

このことから本研究で扱う直接系が間接系と別個の系であることは明らかである。

II) そこでまず直接系から検討することにする。前記の如く酵母はシステイン生成の一過程として亜硫酸還元酵素により亜硫酸をサルファイドに還元することが知られている。この酵素は0.5～0.56 硫安飽和（R₃区分）で沈澱すると報告されている。本研究の場合にもパントテン酸完全供与菌体はこれに相当する酵素をもっている（第3図）が、パントテン酸不完全供与菌体はこの他に0～0.4 硫安飽和（R₁区分）で沈澱する新しい亜硫酸還元系酵素をもつことが見出された（第4図）。またメチオン添加且パントテン酸不完全供与菌体ではR₁区分に活性がない。更に第4図に示すように、パントテン酸不完全供与菌体ではR₁区分に全体の約 $\frac{1}{3}$ の蛋白を検出し

第 3 図



うるが、他の2種の菌体ではわずか3%しか認められない。

同じパントテン酸不完全供与菌体でも対数期の菌体（硫化水素発生能が大）と定常期の菌体（硫化水素発生能の小）とを比較すると、R₃区分の比活性には大差が認められないが、R₁区分の比活性は前者が大である。またR₁区分の蛋白の占める割合は定常期に入ると著しく低下する。

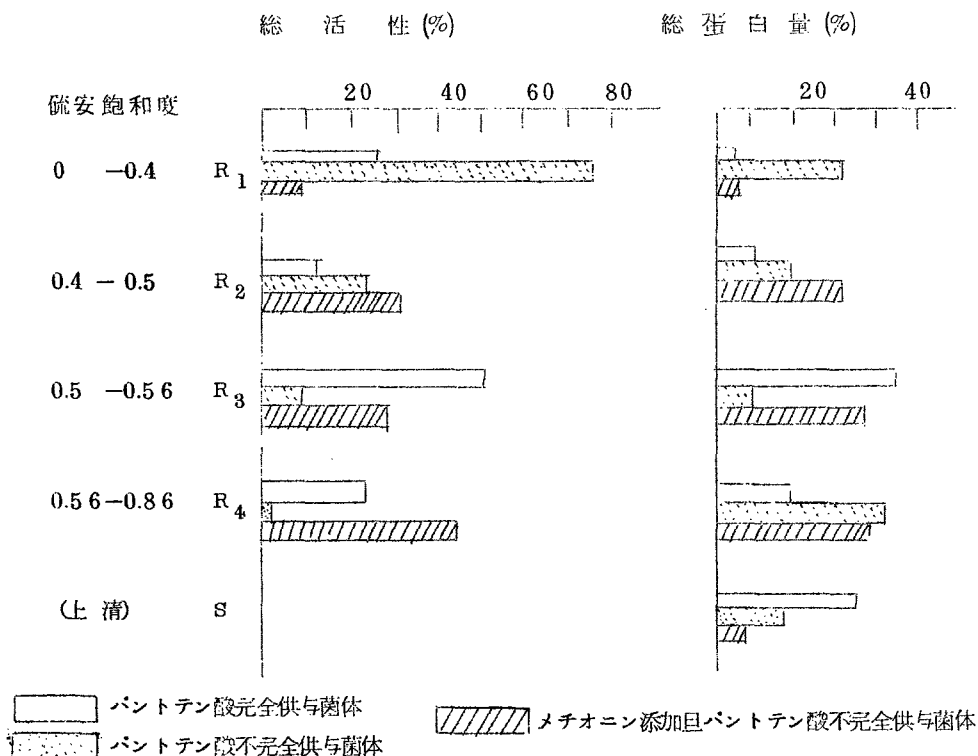
以上のことからR₃区分の活性はいずれの菌体にも存在するが、R₁区分の活性は生菌の硫化水素発生能と平行関係にあることが明らかとなった。

更にパントテン酸不完全供与菌体から得たR₁とR₃区分の活性は凍結融解に対する安定性に相違が認められたので、別々の酵素であると判断した。この点については更に精査したい。

第 4 図

硫安分画による亜硫酸還元系酵素と可溶性蛋白の分画

(プロタミン未処理)



従つて R_1 区分の酵素が硫化水素発生の機構であり、直接系が関与していると考えられる。

Ⅲ) 次に間接系の検討に入る前に小平らが精査したシステイン脱硫系酵素について二三検討した。

この酵素は 0.56 - 0.86 硫安飽和区分に認められる。小平らは清酒酵母のシステイン脱硫系酵母が ATP により阻害されると報告しているが、本研究において更に検討したところアデニン及びアデノシンも ATP と同様の阻害をもつが ATP 水解物 (ATP を 1 N 塩酸で 100°, 7 分加水分解し、中和後使用する) は更に強く阻害した。ATP 水解物はパン酵母のシステイン脱硫系酵素をも強く阻害するのでこの酵素の阻害剤として後の実験に適用した。

既往のシステイン脱硫系酵素の活性は ATP あるいは AMP により促進され、反応時の気相は嫌氣的であることが適当とされている。これに反して本研究の場合には ATP 及び AMP により阻害されるばかりでなく、好氣的 (空気) 条件下で活性が強いことが明らかとなつた。このことから本研究の酵素と従来の酵素とは異つた性質のものであるので酵素化学的にも興味ある問題である。

Ⅳ) Ⅱ) において硫化水素の発生に直接系が関与していることが明らかとなつたが小平らの想定した間接系についても検討しなければならないので以下の実験を行つた。パントテン酸完全供与菌体の粗酵素液を硫安塩析し、0.5~0.86 飽和区分 ($R_3 + R_4$) の酵素液を実験に供した。この酵素製品中には直接系の酵素が含まれているが、間接系に必要と考えられるピルビン酸、グルタミン酸、ピリドキサルリン酸及び NADPH₂ の存在下でも硫化水素が生成される。しかもこの両者を混合した反応系では生成される硫化水素がそれぞれの和として測定されることからこの 2 つの系は別個のものであると考えられる。ここで新たに見出された系の基質は別に添加していないので塩析により得た酵素液中に蛋白のようなものと結合した状態で混在している自己基質であろうと推定される。

ここで見出された系には上記の 4 因子が総て必要であり、直接系は先の ATP 水解物により全く阻害されないのに反して、この系は阻害された。従つてここで見出された系が小平らのいう間接系であると結論した。

そこでこの間接系がパントテン酸不完全供与菌体及びメチオニン添加且パントテン酸不完全供与菌体に存在するかどうかを検討したところ存在しないことが明らかになった。従つて硫化水素の発生には間接系が関与していないと考えられる。

以上の実験から亜硫酸還元系について要約すると第2表に示す通りである。

第 2 表

亜硫酸還元の直接系（亜硫酸還元系酵素）及び間接系の有無

菌 体	直接系	間接系
パントテン酸完全供与	有 (R ₃)	有
パントテン酸不完全供与	有 (R ₁ ・R ₃)	無
メチオニン添加 パントテン酸不完全供与	有 (R ₃)	無

本研究の成績から硫化水素発生機構について総括すると、

1) 硫酸の uptake に対しパントテン酸は促進的であり、メチオニンは抑制的である。

2) 細胞内に入った硫酸はパントテン酸欠乏下では無機の硫酸あるいは無機硫黄化合物の形で蓄積されやすく、パントテン酸完全供与の場合には紫外部吸収性の高分子硫黄化合物が生成されることに特徴をもつ。

3) 硫酸から亜硫酸の系にパントテン酸が影響を及ぼす。

4) 硫化水素の発生には直接系が関与し、しかも R₁ 区分の亜硫酸還元系酵素の作用による。従つてパントテン酸不完全供与菌体は2つの亜硫酸還元系酵素をもち、もう一方の酵素は他の菌体にも認められる。

5) 間接系はパントテン酸完全供与菌体にのみ見出された。従つてこの菌体においてシステインがどちらか系によつて合成されるかは今後の問題である。

6) この他、メチオニンの生理作用、基質による代謝の調整、栄養物質と代謝調整機構、システイン脱硫系酵素の性質などについて考察した。

審査結果の要旨

パントテン酸要求性酵母のパントテン酸不完全供与培養における旺盛な硫化水素発生現象については、さきにメチオニンの抑制効果及び同時に見られる旺盛なシステイン脱硫酵素作用から、システイン経由の径路が提出されたが（小平ら）、奥田はこの現象についてパントテン酸不完全供与菌体の S^{35} とりこみから検討した結果、この種の菌体には細胞に無機Sが多量に蓄積されることを認めて上述の間接径路に対して疑問をいだき、折からLezineによつて発見された亜硫酸還元酵素系について検討したその結果パントテン酸不完全供与菌体ではLezineの酵素区分と異なる硫安飽和度区分に旺盛な亜硫酸還元酵素作用を見出すことに成功し、パントテン酸が酵母のS代謝の調整機作に重要に関係することを指摘した。この奥田の発見は最近の微生物に関する栄養生理の面で重要な新知見を提出したものであり、また実際の清酒醸造に屢々みられるいわゆる「硫化」現象の解明に重要な示唆を与えるもので、農学博士の学位に充分値するものと認める。