

耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* と食塩耐性低下株 No. 3
 における長期の食塩ストレス条件下でのエルゴステロール、
 リン脂質および細胞膜 ATPase の変化について

山縣 敬*・西 敏明**・藤田藤樹夫*

Changes in Ergosterol, Phospholipids and Plasma Membrane ATPase
 during the Long Stages of Salt Stress in *Zygosaccharomyces rouxii*
 and Salt Tolerance-deficient Mutant No. 3

Kei YAMAGATA, Toshiaki NISHI and Tokio FUJITA

Synopsis

Zygosaccharomyces rouxii (wild-type) and salt tolerance-deficient mutant No. 3 were different in glycerol accumulation of intra and extra cellular during the long stages of salt stress in 1 M NaCl. Glycerol was retained with intracellular solute as osmotic balance function. Ergosterol was detected in sterol fractions of intracellular lipids by GC and TLC. Phospholipid contents of wild-type and No. 3 strain were indicated maximum amounts at 1 M NaCl, but wild-type decreased at 2 M NaCl and 3 M NaCl. Phospholipid contents of intracellular fraction of wild-type was increased by salt stress of 1 M NaCl and plasma membrane fraction was not increased. Plasma membrane ATPase activity was induced after 24hr, as salt stress of the long stage. Ergosterol, phospholipid and plasma membrane ATPase activity were concerned with salt stress in the case with the long stages.

I 結 言

耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* は高濃度食塩培地で良好な生育を示す。耐塩性酵母は高濃度の食塩ストレス条件下で細胞内の浸透圧を調節する。そのため培地の糖類をグリセロールに変換し、菌体内に蓄積する。一方、外部の濃度に対して菌体内の Na⁺, Cl⁻ 排出を行い、外界と浸透圧を保っている¹⁾。この調節は初期浸透調節の段階で巧みに行われ、グリセロール生産による蓄積が必要であり、グリセロールの合成、生産、蓄積にはエネルギー系、膜機能の抗進、細胞膜 ATPase 等が関与している^{2,3)}。

このような外界との浸透圧調節は細胞膜およびエ

ネルギー系の関与以外に脂質の動向についての報告もある^{4,5)}。著者らは耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* IFO 1130 とその食塩耐性低下株 No. 3 を用い、高塩環境下でのグリセロール生産に伴う長期的な動向としてエルゴステロールおよびリン脂質、細胞膜 ATPase について検討した。

II 実験材料および方法

供試菌株

Zygosaccharomyces rouxi IFO 1130 および紫外線照射により得られた食塩耐性低下株 (salt tolerance-deficient mutant, 以下低下株と略する。)

* 応用微生物学研究室 (Lab. of Applied Microbiology, Dept. of Agricultural Chemistry, Fac. of Agriculture, Kinki Univ., Nakamachi, Nara 631, Japan)

** 大阪市立大学 理学部 生物学科 一般生理学研究室 (Lab. of General Physiology, Dept. of Biology, Fac. of Science, Osaka City Univ., Sumiyoshi, Osaka 558, Japan)

No. 3 を使用した⁹⁾。

培地および培養方法

供試菌株の培養は YPD-10 培地 (グルコース 1%, ポリペプトン 0.5%, 麦芽エキス 0.5%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%) を食塩無添加培地とし, 食塩ストレス条件は培地中の食塩濃度をそれぞれ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 M に調整した培地を用いた。

培養方法は培養液 80 ml を入れた坂口フラスコ (500 ml) に接種菌量を 10^5 cells/ml になるよう接種し, 26°C にて 48 時間振盪培養した。

菌体破碎

菌体の洗浄は, 食塩無添加培地で培養した菌体は蒸留水, 食塩添加培地では培地と等濃度の食塩水で行い, 菌体の破碎は Vibrogen cell mill (Edmund Buhler, Tubingen, Germany) を用い, 4°C にて 10 分間破碎した。破碎後の菌体は, 遠心分離 (10,000 × g, 20 分) を行い, 沈澱物は細胞膜画分の前試料, 上清液はグリセロールの測定試料に供した。

グリセロールの定量

菌体外, 菌体内のグリセロールの測定は F-キット グリセロール (ペーリング・マンハイム) により定量した。

脂質の抽出

全脂質の抽出は渋谷らの方法に準拠した⁷⁾。細胞膜および細胞壁の分画は Zymolyase 100T を用いて⁹⁾, プロトプラストを分離・破碎後, 分別遠心分離法による分画を行なった。画分については脂質を抽出し, 薄層クロマトグラフィーとガスクロマトグラフィーによって脂質の定性, 定量を行なった。

薄層クロマトグラフィー (TLC)

抽出と精製は silica gel 60 プレート (E. Merck 社製) を使用した。展開溶媒はエーテル:ベンゼン:エタノール:酢酸 (40:50:2:0.2) とエーテル:ヘキサン (6:94) を用いて 2 重展開した。

ガスクロマトグラフィー (GC)

GC は柳本 G2800, カラムは DB17 0.53 mm × 30 M glass column を用い, 290°C, 窒素ガス流量 78 ml/min の条件で行なった。

脂質の定量

リン脂質 B-テストワコー (コリンオキシダーゼ・フェノール法, 和光製) および Bartlett 法, 過よ素酸化法により検討を行なった。

細胞膜 ATPase 活性の測定

細胞膜 ATPase 活性測定のための細胞膜画分は菌体破碎後, Rosa らの方法に準拠した⁹⁾。細胞膜 ATPase 活性の測定は Serrano の方法により測定した^{10,11)}。

III 実験結果および考察

グリセロール量の経時的変化

使用した 2 菌株は 10 日間の長期的培養で親株が 4M 食塩培地において生育を示し, 低下株は 2M 食塩培地で生育が認められず, 1.5M 食塩培地までが生育の限度である¹⁾。

初期浸透圧調節でグリセロール生産, 蓄積および Na^+ , Cl^- の排出と蓄積によって, 外界との浸透圧を保ち, 親株は外界の浸透圧と同等であるのに対し, 低下株は耐性適応が各食塩濃度で遅れていることが認められた¹⁾。この初期の影響が長期的にどのような影響を示すかを 1M 食塩培地で検討を行ないその結果を, Fig. 1 に示した。この図より菌体外, 菌体内ともに親株と低下株でグリセロール量に差異が認められた。菌体外は親株が 2 日目で最高値を示し, その後は減少傾向を示した。これは親株が菌体外に菌体内の浸透圧調節に必要なグリセロール以外の残りを

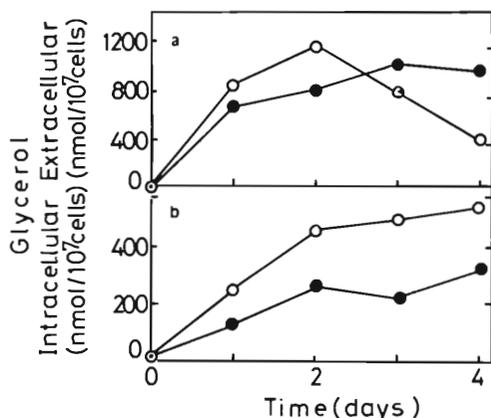


Fig. 1 Changes in intra (a) and extracellular (b) glycerol in cells of wild-type (open circle) and salt-sensitive (close circle) in media with 1M NaCl.

2日目まで排出し、その後、培地中のグルコース量が減少したためグリセロールを菌体内に取り入れて資化していることを示している。この結果から2日目以後減少傾向にあることを示している。一方、低下株は2日目まで親株よりも排出およびグリセロール生産能が低下していることを示した。

さらに親株では2日目以後菌体内に取り入れ、資化機能が低下していることを示した。このことは長期的培養で低下株が2M食塩培地で生育できないことを浸透圧調節および資化能の点から裏付けるものである。

菌体内は親株が4日目までグリセロール量が上昇傾向にあり、浸透圧調節の点から一部の溶質として Na^+ 、 Cl^- を蓄積していたが、経時的にグリセロールにより菌体内溶質を保っていることを示した。4日目以降グリセロール量は安定し、このことは初期段階として30分までに外界との浸透圧を一定にしていることにより、イオンからグリセロールへの変換が行なわれていると考えられる。一方、低下株は生産能が遅れており、生育および浸透圧調節による耐性適応の影響を及ぼしていると考えられる。また低下株は1M食塩培地で生育は出来るが菌体内に親株に足りない溶質分を Na^+ 、 Cl^- で補っていることを示した。

粗脂質からのステロール画分

グリセロール量の経時変化において長期的な変化が認められたので、細胞内の脂質としてステロール画分のうちで含量の多いエルゴステロールについて検討を行なった。渋谷らの方法で抽出した粗脂質についてGCによる検討を行なった結果をFig. 2に示した。6つのステロール標準物質よりエルゴステロール含量の多いことが認められ、親株および低下株ではエルゴステロール含量が高い値を示した。またこの結果の試料は食塩無添加培地での菌体であり、食塩濃度が増加すると粗脂質の増加が認められた。次にTLCにより展開、分取し、GCによる結果をFig. 3に示した。エルゴステロールは特に高いピークで検出され、このピーク量の、各塩濃度下における経時変化を4日間調べた。その結果をFig. 4に示した。親株では食塩無添加培地中でエルゴステロール量の変化が認められず、1M食塩培地中では2日目、2M食塩培地中では3日目、3M食塩培地中では4日目にそれぞれ最高値に達した。この増加傾向は、食塩ストレス下での耐性適応を示し、低下株は親株におけるような顕著な含量変化が認められな

かった。このことからエルゴステロール量は食塩濃度が高くなるにしたがって上昇し、エルゴステロール量が食塩濃度変化と対応していることが親株と低下株において観察された。

各画分のリン脂質含量変化
培地中の食塩濃度による細胞内エルゴステロール

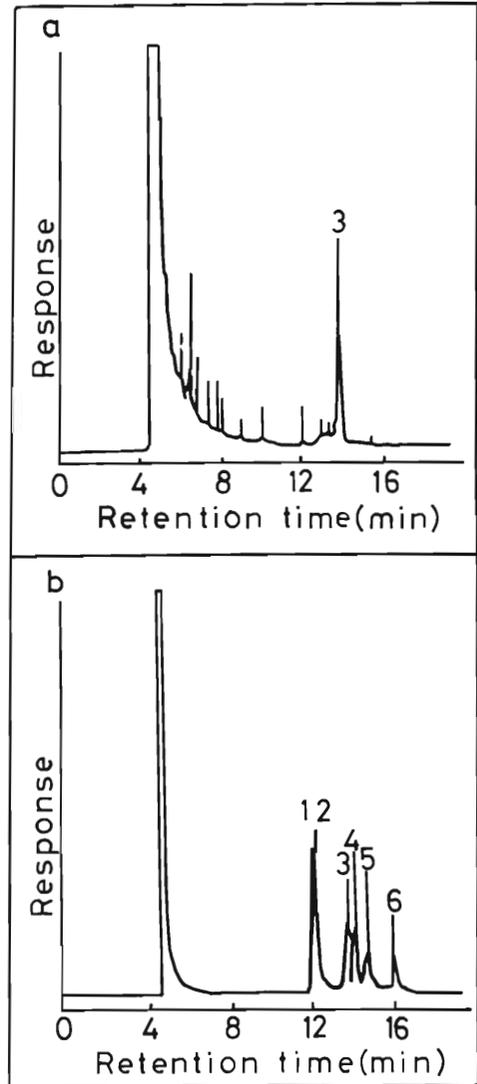


Fig. 2 Gas chromatograms of crude lipid in cells of wild-type in salt free medium.

a, wild-type; b, standard specimens
1, cholesterol; 2, cholestanol; 3, ergosterol; 4, campesterol; 5, stigmasterol; 6, sitosterol.

含量の変化は低下株では顕著に認められなかった。親株について食塩無添加培地と1M食塩培地の経時的变化をFig.5に示した。食塩無添加培地では細胞壁、細胞膜、菌体内にエルゴステロール含量の顕著

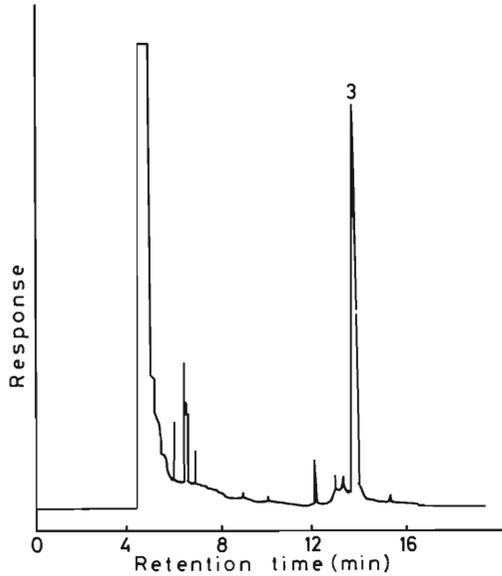


Fig. 3 Gas chromatograms of sterol fraction in cells of wild-type in salt free medium.

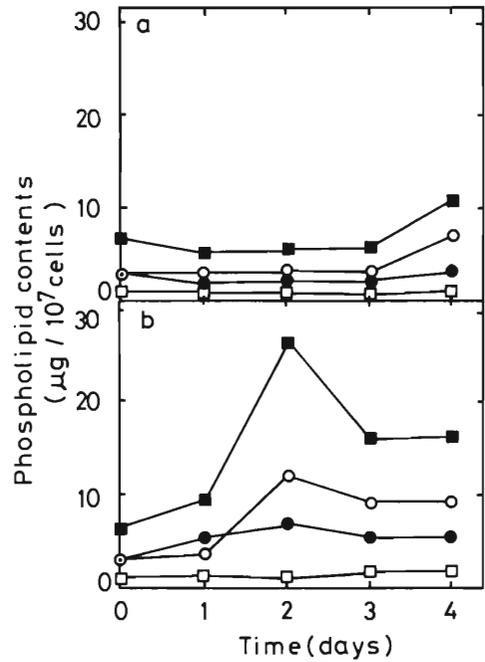


Fig. 5 Changes in phospholipid contents of various fractions of wild-type in media without (a) or with (b) 1M NaCl.

Symbols: ○, intracellular;
●, plasma membrane;
□, cell wall; ■, total.

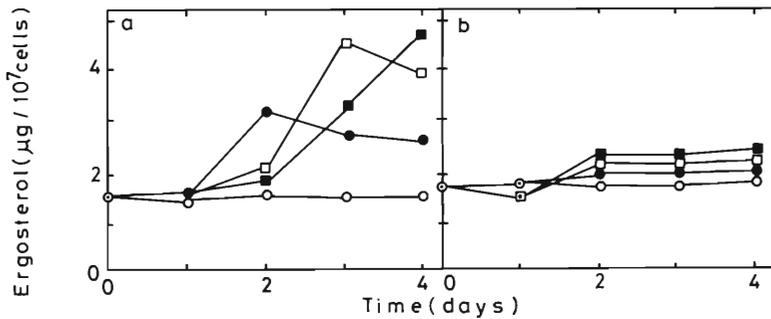


Fig. 4 Changes in ergosterol contents of wild-type (a) and salt-sensitive (b) in media containing various concentrations of NaCl.

Symbols: ○, salt free; ●, 1M NaCl; □, 2M NaCl; ■, 3M NaCl.

な変化が認められなかった。しかし1M食塩培地では1日目は細胞膜内の含量が多く、2日目になると菌体内にエルゴステロール量が増加し4日目まで高い値を維持した。すなわち食塩ストレス条件下では細胞壁、細胞膜のエルゴステロール含量の変化は微弱であり、菌体内においては顕著に増加することが

認められた。さらに各分画の総含量は食塩無添加培地では4日目で上昇傾向であるが増加量は少なかった。1M食塩培地では1日目で増加しており2日目で最高値に達し、3日、4日目になるに従い減少するが比較的高い値で安定していた。

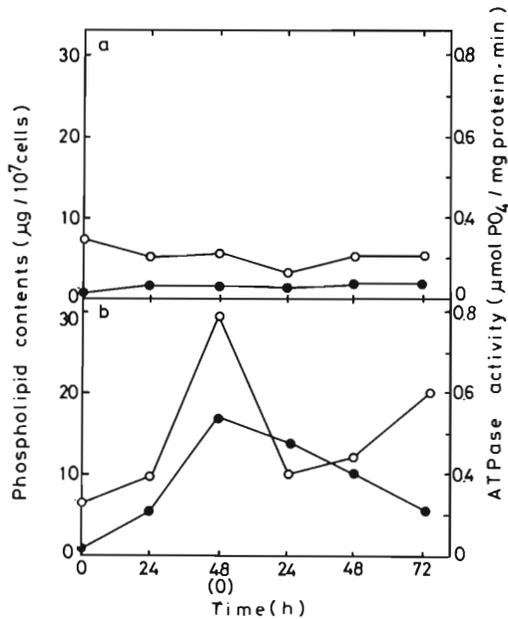


Fig. 6 Changes in phospholipid contents and ATPase activity in cells of wild-type in media without (a) or with (b) 1M NaCl. a, salt free; b, 1M NaCl
Symbols: O, phospholipid contents; ●, ATPase activity

リン脂質含量と細胞膜 ATPase 活性の変化

リン脂質含量と細胞膜 ATPase 活性の経時的変化を Fig. 6 に示した。細胞内のリン脂質含量はあらかじめ 1M 食塩培地で 48 時間培養後が最高値を示したことから、48 時間後の細胞を集菌して新しい食塩無添加培地および 1M 食塩培地に移し、その後のリン脂質含量と細胞膜 ATPase 活性の関係を経時的に測定した。リン脂質含量の経時的変化は食塩無添加培地では認められなかったが、新しい 1M 食塩培地に移植し、24 時間後に急激に減少し、さらに 48、72 時間経過するにつれて増加の傾向が認められた。1M 食塩培地中での細胞膜 ATPase 活性は新鮮な培地に移植後、24 時間から 72 時間にかけて経時的に減少した。1M 食塩培地ではリン脂質と細胞膜 ATPase 活性は、ともに上昇傾向にあるが新鮮な培地に移植後は異なる増減を示した。

IV 要 約

Z. rouxii と食塩耐性低下株 No. 3 を用いてエルゴステロール、リン脂質、細胞膜 ATPase の検討を

行なった。

長期的なグリセロール生産は 1M 食塩培地で菌体外、菌体内ともに親株と低下株で差異が認められ、グリセロールにより菌体内溶質を保持していた。細胞内の脂質としてステロール画分中、含量の多い物質は TLC, GC より定性、定量した結果、エルゴステロールであった。培地中のエルゴステロール量の経時変化は、親株が 1M 食塩では 2 日目、2M 食塩では 3 日目、3M 食塩では 4 日目にそれぞれ最高値に達していることが認められた。

一方、リン脂質含量は、1M 食塩培地が最高値であり、培地中の食塩濃度が 2M, 3M と増加するにしたがい減少傾向にあった。親株の菌体内の脂質含量は 1M 食塩培地で増加した。しかし、細胞膜の脂質含量は増加しなかった。

細胞膜 ATPase 活性は長期的な食塩ストレスとして 24 時間後に誘導された。エルゴステロール、リン脂質と ATPase 活性は食塩ストレスに関与することを認めた。

V 文 献

- 1) T. Yagi and T. Nishi: Microbios, (1992) (in press)
- 2) T. Yagi, A. Nogami and T. Nishi: FEMS Microbiol. Lett. **92**, 289~294 (1992)
- 3) T. Nishi and T. Yagi: FEMS Microbiol. Lett. (1992) (in press)
- 4) Y. Watanabe and M. Takakuwa: Agric. Biol. Chem., **48**, 2415~2422 (1984)
- 5) Y. Watanabe and M. Takakuwa: J. Ferment. Technol., **65**, 365~369 (1987)
- 6) K. Yamagata, T. Nishi, S. Komemushi and T. Fujita: J. Antibact. Antifung. Agents, **19**, 281~283 (1991)
- 7) 渋谷勲, 赤松稜, 土井脩, 鬼頭誠: 化学と生物, **10**, 672~681 (1972)
- 8) K. Ushio, H. Tatsumi, H. Araki, A. Toho and Y. Oshima: J. Ferment. Technol., **66**, 481~488 (1988)
- 9) F. M. Rosa and I. Sa-Correia: Appl. Environ. Microbiol., **57**, 830~835 (1991)
- 10) R. Serrano: FEBS Lett., **156**, 11~14 (1983)
- 11) R. Serrano: Mol. Cell. Biochem., **22**, 51~63 (1978)