

酵母の核酸集積に関する研究

第2報 酵母核酸集積に及ぼす単一アミノ酸の影響 及び酵母 RNA の塩基組成

山口 和夫・相田徳二郎・浅田 芳宏・荒 義明

Studies on the Accumulation of Nucleic Acid in Yeast Cell.

II. Effect of single amino acid on the accumulation of nucleic acid and the base composition of yeast ribonucleic acid isolated.

KAZUO YAMAGUTI, TOKUJIRO AIDA, YOSHIHIRO ASADA and YOSHIAKI ARA

緒 言

前報¹⁾において核酸集積力の強い酵母を検索し, *Candida utilis* IAM 4220 を選び, 本菌の種々の培養条件の核酸集積に及ぼす影響について検討し, 実験条件下で無機窒素源として硫酸が好適であることを報告した。本報では有機窒素源の影響を精査するためにアミノ酸添加の影響をしらべ, 得られた酵母 RNA の塩基組成をしらべたので, これらの結果について報告する。

実験方法

1) 供試菌株 *Candida utilis* IAM 4220

2) 培地組成

窒素源を除いた基礎培地, 硫酸存在下における単独アミノ酸添加培地及び硫酸無添加時における単独アミノ酸添加培地の組成は Table I に示すとおりである。対照として基礎培地に硫酸 0.4% (窒素として 0.8480 mg/ml) 添加の培地を用いた。

3) 培養法

i) 保存培養: 供試菌株は Yeast extract agar medium で 30°C, 72 時間培養後 4°C で保存した。本培地の組成は yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, glucose 1%, peptone 0.5%, agar 2.5%, pH 7.2 である。

Table I The composition of
culture medium

| | |
|--|----------------------|
| 1. Basal medium (pH 5.0) | |
| glucose | 2% |
| K ₂ HPO ₄ | 0.2% |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.2% |
| 2. Single amino acid medium supplemented with ammonium sulfate (pH 5.0) | |
| basal medium | 100 ml |
| (NH ₄) ₂ ·SO ₄ | 0.32% (0.678N mg/ml) |
| amino acid | 0.1696N mg/ml |
| 3. Single amino acid medium without ammonium sulfate (pH 5.0) | |
| basal medium | 100 ml |
| amino acid | 0.8480N mg/ml |

ii) 本培養: 保存培養から 1 白金耳量を取り, 大型試験管 (内径 22 mm, 長 193 mm) に分注した培地 10 ml に接種した後, 30°C, 72 時間振盪培養 (振盪数 125 回/分, 振盪幅 50 mm) した。

4) 乾燥菌体量

培養後の培地を 20 ml づつ遠沈管に集め pH を測定後, 3,000 r.p.m で 10 分間遠心分離を行ない, 沈殿する酵母を 2 回水洗, 遠心分離後, 10 ml に mess up し, その菌体懸濁液から 5 ml を秤量管にとり, 100~110°C で 12 時間乾燥したのち, デシケーター中に 3 時間放置し秤量した。

5) 核酸の定量

上記菌体懸濁液の残りの 5 ml を核酸の定量に用いた。RNA, DNA の分画は Ogur-Rosen の方法²⁾に準じ RNA 抽出段階で PCA 濃度を 1.5 N に変更した方法³⁾によって行なった。(Diagram I) 定量には日立分光光度計を用いて吸光度 (波長 260 m μ , スリット幅 0.43) を測定し、酵母 RNA (キリン科研), 胸腺 DNA の標準曲線に基づいて算出した。

6) RNA の塩基組成定量

RNA の分画, 加水分解は Schmidt-Thannhauser-Schneider 法⁴⁾ (S.T.S. 法) における酸可溶性物質の抽出段階を Ogur-Rosen 法で置きかえた方法によった (Diagram II)。この方法でえられた加水分解 RNA 区分を Henney 及び Storck の方法⁵⁾に準じて Dowex 1 \times 10 のカラムを用い蟻酸及び蟻酸アンモンの系で step-

wise に溶出し 280 m μ と 260 m μ の吸光度の比によって 4 種のヌクレオチド即ちシチジル酸, アデニル酸, ウリジル酸及びグワニル酸を分画の, 260 m μ の吸光度を分子吸光係数⁶⁾で割ってモル濃度を算出した。

実験結果

1) 硫安存在下における単独アミノ酸の影響

硫安存在下で 18 種類のアミノ酸のうちから, それぞれ 1 種のアミノ酸を Table 1~2 に示した培地に添加して殺菌後, *Candida utilis* の斜面培地より 1 白金耳量を接種し, 30°C, 72 時間振盪培養後, 菌体量, RNA 及び DNA 量を測定した結果は Table II に示すとおりである。

供試アミノ酸のうちグルタミン酸, アスパラギン酸及びシスチンは著るしく生育を促進し, フェニールアラニン及びヒスチジンは生育を阻害することが認められた。

Diagram I Modified Ogur and Rosen method

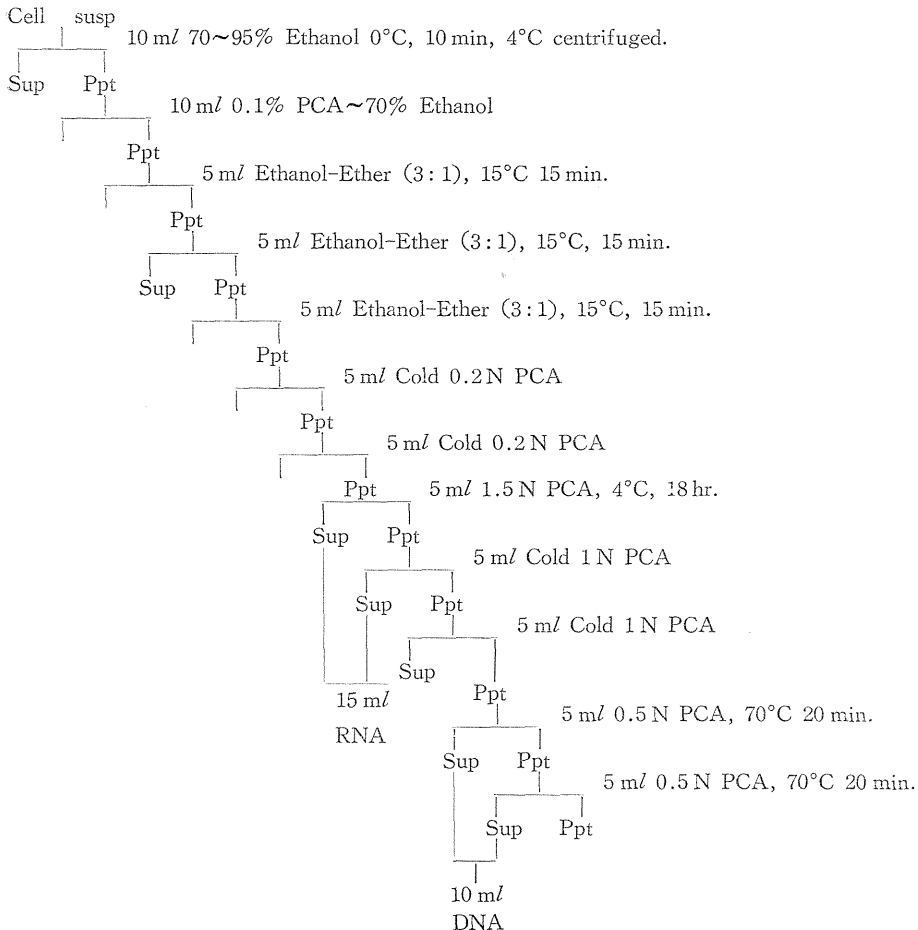


Diagram II Modified S.T.S method

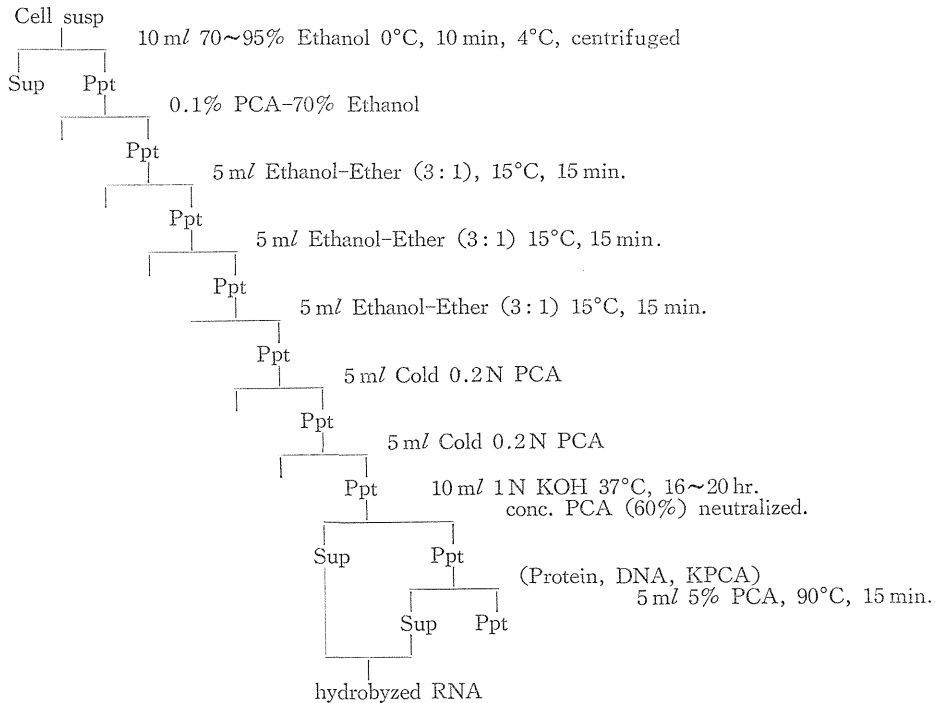


Table II. Effect of single amino acid addition with ammonium sulfate on the nucleic acid accumulation.

| Amino acid added. | Yield of dry yeast mg/ml | RNA per dry yeast % | DNA per dry yeast % |
|-------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| Control | 3.50 | 10.92 | 0.70 |
| Gly cine | 4.59 | 10.50 | 0.85 |
| L-Alanine | 4.17 | 9.77 | 0.80 |
| L-Valine | 4.34 | 11.98 | 0.80 |
| L-Leucine | 3.30 | 14.84 | 1.27 |
| L-Isoleucine | 4.00 | 10.62 | 0.73 |
| L-Serine | 4.56 | 10.58 | 0.63 |
| L-Threonine | 4.08 | 9.80 | 0.53 |
| L-Phenylalanine | 2.62 | 12.01 | 1.46 |
| L-Tyrosine | 4.37 | 8.58 | 1.20 |
| L-Tryptophan | 4.49 | 9.09 | 1.44 |
| L-Proline | 4.03 | 9.93 | 0.50 |
| L-Lysine | 3.82 | 11.78 | 0.59 |
| L-Arginine | 3.51 | 10.68 | 0.96 |
| L-Histidine | 2.92 | 9.07 | 1.46 |
| L-Aspartic acid | 5.74 | 5.23 | 0.71 |
| L-Glutamic acid | 6.43 | 7.38 | 1.17 |
| L-Methionine | 3.16 | 11.07 | 1.42 |
| L-Cystine | 5.22 | 7.32 | 0.85 |

ロイシンを添加した場合に RNA 含量は著るしく高まり、平均 14.84%を示し、菌体内集積 RNA 総量の点からもロイシンの効果が認められた。一方生育促進効果の認められたアスパラギン酸、グルタミン酸及びシスチンは RNA 集積に対し阻害的であった。このことは現象的には生育に好都合な条件は RNA 集積に不利な条件であると考えられた。DNA 集積に対してはロイシン、フェニールアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン及びメチオニンが効果が認められた。

2) 硫安無添加時における単独アミノ酸の影響

硫安を添加せず、単独アミノ酸を単一窒素源として添加した培地 (Table I ~ III) に *Candida utilis* の斜面培養より 1 白金耳量を接種して、30°C、72 時間振盪培養後、菌体収量、RNA 及び DNA 量を測定した結果は Table III に示すとおりである。

供試アミノ酸のうち、グリシン、アラニン、バリン、セリン、プロリン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸及びロイシンは対照の硫安培地に比して、生育促進効果が認められ、スレオニン、チロシン、フェニールアラニン、ヒスチジン、メチオニン及びシスチンは生育を抑制することがみとめられた。RNA 集積に対して

Table III. Effect of single amino acid addition without ammonium sulfate on the nucleic acid accumulation.

| Amino acid added. | Yield of dry yeast mg/ml | RNA per dry yeast % | DNA per dry yeast % |
|-------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| Control | 3.97 | 13.41 | 1.17 |
| Glycine | 7.30 | 6.99 | 0.80 |
| L-Alanine | 6.75 | 7.64 | 0.91 |
| L-Valine | 5.64 | 6.41 | 0.57 |
| L-Leucine | 4.52 | 6.60 | 0.77 |
| L-Isoleucine | 4.29 | 6.91 | 0.88 |
| L-Serine | 7.01 | 7.33 | 0.82 |
| L-Threonine | 3.63 | 3.46 | 0.47 |
| L-Phenylalanine | 3.02 | 6.98 | 1.09 |
| L-Tyrosine | 2.52 | 8.57 | 1.62 |
| L-Tryptophan | 2.68 | 5.27 | 1.23 |
| L-Proline | 6.75 | 6.12 | 0.87 |
| L-Lysine | 4.69 | 6.41 | 0.84 |
| L-Arginine | 6.23 | 7.36 | 0.74 |
| L-Histidine | 3.07 | 4.75 | 0.38 |
| L-Aspartic acid | 5.73 | 5.71 | 0.85 |
| L-Glutamic acid | 6.71 | 6.75 | 1.01 |
| L-Methionine | 2.84 | 3.64 | 0.45 |
| L-Cystine | 2.28 | 4.52 | 0.92 |

は硫安が存在しない場合のアミノ酸添加はすべて抑制的に作用し、特に生育に阻害的であったスレオニン、トリプトファン、ヒスチジン、メチオニン及びシスチンで著るしくみとめられた。結局、アミノ酸を添加する場合に硫安を添加せず単独アミノ酸を唯一の窒素源として添加することはRNA集積に対して一般に阻害的であって、

硫安存在下で顕著なRNA集積の認められたロイシン添加も硫安無添加時では却って抑制的に作用することがみとめられた。

DNA集積に対してはトリプトファンが促進的に作用し、バリン、スレオニン及びヒスチジンは抑制的であった。

3) ロイシン添加時の酵母RNAの塩基組成

硫安存在下でロイシンを添加した培地で培養した菌体は硫安培地で培養した菌体に比して高いRNA含量(最高15.99%)を示したので、そのRNA塩基組成に何らかの変化があるかどうかを知るために、それぞれ両培地で30°C、72時間振盪培養した菌体について前記(9)の方法で塩基組成をしらべた結果はTable IVに示すとおりである。本表に示された値は両培地で培養した*Candida utilis*菌体のRNAがほぼ同一のヌクレオチド(塩基)組成をもつことを示している。これらの値はパン酵母の既往の文献値とほぼ一致することがみとめられた。

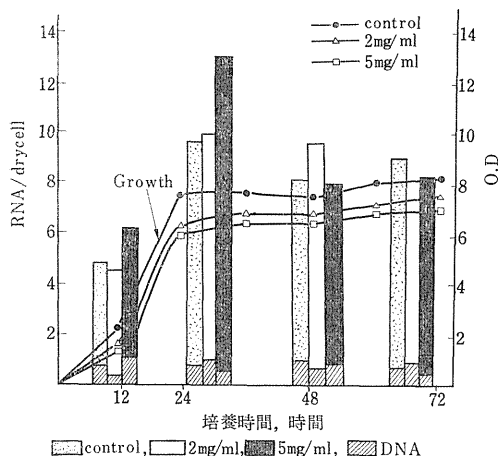
4) RNA集積に及ぼすロイシンの添加量と生育時との関係

これまでの実験は30°C、72時間培養菌体について行なったが前報¹⁾で報告したように菌体内集積RNA量はgrowth phaseにより、また培地組成によって異なるので硫安存在下ロイシン添加培地を用いて、ロイシンの添加量をかえてそれぞれのgrowth curveと各growth phaseにおけるRNA集積を試験した。ここで接種菌液は*Candida utilis*の斜面培地より1白金耳量をグルコース1%、酵母エキス0.3%、モルト・エキス0.3%、

Table IV. The base composition of ribonucleic acid from *Candida utilis*

| Base | RNA base composition (mol %) | | Baker's yeast | | |
|----------------------------------|---|---|---------------|------|------|
| | Cultures grown in the ammonium sulfate medium | Cultures grown in the ammonium and leucine medium | 17) | 28) | 39) |
| Cytidylic acid (C) | 20.97 | 24.14 | 20.5 | 22.6 | 21.2 |
| Adenylic acid (A) | 24.41 | 25.42 | 25.6 | 25.4 | 24.9 |
| Uridylic acid (U) | 27.87 | 24.64 | 26.4 | 27.4 | 23.6 |
| Guanylic acid (G) | 26.75 | 25.80 | 27.5 | 24.6 | 27.2 |
| G + C | 47.72 | 49.94 | 48.0 | 47.2 | 48.4 |
| <u>Purines (G+A)</u> | | | | | |
| <u>Pyrimidines (C+U)</u> | 1.05 | 1.05 | 1.14 | 1.00 | 1.09 |
| <u>6-Amino-nucleotides (A+C)</u> | | | | | |
| <u>6-Keto-nucleotides (G+U)</u> | 0.83 | 0.98 | 0.86 | 0.92 | 0.86 |
| <u>A+U</u> | | | | | |
| <u>G+C</u> | 1.10 | 1.00 | 1.08 | 1.12 | 1.07 |

Fig. 1. Effect of leucine on the accumulation of ribonucleic acid in *Candida utilis*



ペプトン 0.5% の培地に接種し、30°C、49 時間振盪培養後遠心分離して、得られた沈殿酵母を殺菌水で 2 回洗浄し、さらに殺菌水を用いて、島津 Spectronic 20 で 660 m μ で O. D.=1 になるように希釈したもので、これを本培養に 1% 接種した。その結果は Fig 1 に示すとおりである。本図で分るように log phase の後期において RNA の集積が最大となり、硫安存在下でロイシンを 5 mg/ml 添加した場合は対照に比して約 35% の RNA 含量の増加がみとめられた。なお stationary phase ではロイシン添加の促進効果がみとめられなかった。このことは前の実験で 72 時間培養後の菌体 RNA 含量を定量してロイシンの RNA 集積に対する促進効果をみとめたことと相矛盾するようであるが、前実験では斜面培養から直接 1 白金耳量を接種して培養したことから考えて、実際はこの場合も log phase の後期に相当する phase で RNA を定量していたと考えられる。

要 約

1. *Candida utilis* を用い、硫安存在下で単独アミノ酸の添加が RNA 集積に及ぼす影響をしらべた結果、ロ

イシンが顕著な促進効果を示すことがみとめられた。ロイシンを 5 mg/ml 添加した場合、ロイシンを添加しない対照に比して、約 35% の RNA 量の増加がみとめられた。

2. 硫安を添加しないで単独アミノ酸を唯一の窒素源として加えた場合は一般に *C. utilis* の RNA 集積に対して阻害的に作用するにみとめられた。

3. 硫安存在下でロイシンを添加して培養した *C. utilis* 菌体の RNA 塩基組成は硫安だけ加えて培養してえられた菌体のそれとほぼ等しいこと及び他のパン酵母のそれともほぼ等しいことがみとめられた。

4. 硫安存在下でロイシンを添加する場合は生育の log phase の後期に加えると効果があることがみとめられた。

本報告は昭和 39 年 7 月札幌で開催された日本農芸学会大会において発表した。なお、本実験の一部は昭和 38 年度・文部省各個研究費によったことを附記し感謝の意を表す。

文 献

- 1) 山口・三上：本誌投稿中 (1965)
- 2) Ogur, M and G. Rosen: Arch, Biochem, 25, 262 (1950)
- 3) 橋本・里見：農化, 37, 255 (1963)
- 4) Schneider, W. C.: J. Biol. Chem. 164, 747 (1946)
- 5) Henneg, H. and R. Storck: J. Bactriol. 85, 822 (1962)
- 6) Chargaff, E. and J. N. Davidson: The Nucleic Acid, 1, p 513 Academic Press Inc.
- 7) 三浦：核酸の化学 (現代化学シリーズ 13) p 60 (1962) 東京化学同人
- 8) Davidson, J. N. (石田・植田訳): 核酸の生化学, p 36 (1962) 共立出版
- 9) Chargaff, E. and J. N. Davidson: The Nucleic Acid, 1, p 205 (1955) Academic press Inc.

Summary

Authors recognized that the ribonucleic acid content in *Candida utilis* cells increased, when leucine only was added in the basal medium with ammonium sulfate. On the other hand, when ammonium sulfate was not contained in the basal medium, the ribonucleic acid content was inhibited by single amino acid addition. The base composition of the ribonucleic acid of *C. utilis* cell grown in leucine and ammonium sulfate medium was recognized as equal to that grown in ammonium sulfate medium. The distinguished effect of leucine addition was recognized at later stage of logarithmic phase of growth.