

酵母の細胞壁について

大阪大学工学部 田 端 司 郎

1. ま え が き

すべての人間は酒類の欲求になやまされ、どんな未開の人民でも何とか智慧をしばって酒を作り出した。

彼らは果実をしばったり、いろいろな草根から汁をとったり、あるいは乳を酸敗させたりして酒を求めた。そして、酒に酔い、酒を贅美しながら酒とは何だろうかと考えるようになった。

時は流れ、顕微鏡が発明されるにおよんで、やっと酵母がおどろ酒中に見出されたのは17世紀も終りの頃であった。それ以来、醗酵という現象は幾多の化学者の中心課題となり、多くの論争を生み、空想に花を咲かせたが、ついに、Buchnerによって、酵母の無細胞系として醗酵が捕えられた時は20世紀の初頭であり、生化学の曙であった。

20世紀に入って生化学は急速な発展を遂げ、生命現象を物質の準位で説明しようと試みられ、無細胞系で蛋白合成が行なわれようとしているし、親が子に与える遺伝情報もDNAが担っていることも明確になってきた。こうして現在の生化学が細胞の皮をはぎ、歩一歩と生命の中に入って行ったが、細胞を覆っている皮、すなわち細胞表面物質（細胞壁、細胞膜）についてはしばらく忘れられていた。

ところが、細胞外から細胞内へ物質が輸送される際に、細胞壁、細胞膜が単に外部と内部を区別する境界物質として考えられない現象に遭遇したのである。まず、ある物質の濃度が細胞外より細胞内の方が高くなる程度に輸送し得る。すなわち、濃度勾配に逆って物質が輸送されること。第2に物質を細胞内に輸送するのに物質によって選択的に行なわれ、かつ誘導的に行なわれること。さらに、それが遺伝子によって支配されること。

これらのことが明確になるにつれて細胞表面物質の構造と機能について興味ももたれ、知見もわずかに蓄積されつつあるが、いまだに未解決のままに残されている問題が多い。ここでは特に酵母を取扱い、その細胞壁とそれを溶解する酵素についてのべることにする。

2. 酵母細胞壁の構造

酵母の細胞を模型的に示すと図1のようになり、細胞

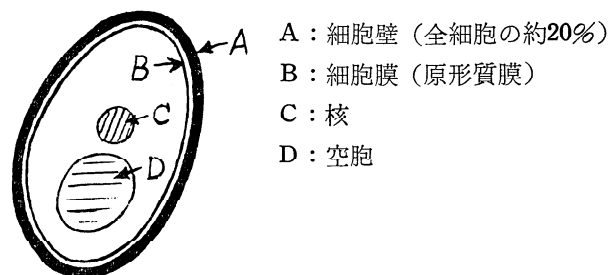


図 1 酵母細胞の模型図

壁の内側に細胞膜がある。この両者は互に分離されてはいないが、細胞壁をとり除いた後に出来るプロトプラストとして存在し得ることから、細胞壁と細胞膜との区別がなされている。

一般に物質の構造を決めるにはまずその物質を単一にとり出すことに始まるのであるが、細胞壁の場合、非常に困難である。しかも得られた細胞壁標品が正しく天然のそれを代表しているかどうかの基準も確立されていないことも大きな障害になっている。しかし一応の基準として電子顕微鏡による観察、グラム染色法が用いられ、それによって細胞壁と同定されたものは、蛋白質、脂肪質と少なくとも2種の多糖類から構成されている(表1)し

表 1

酵母細胞壁の多糖類¹⁾

菌 様	グルカン 蛋白質	GMP-I*	GMP-II*
	(%)	(%)	(%)
パ ン 酵 母	41.6	13.6	34.7
<i>S. cerevisiae</i> 18.29	28.3	55.8	11.9
<i>C. albicans</i> 582	47.4	3.0	27.2
<i>C. albicans</i> 806	45.0	2.1	34.3
	グ ル マ コ ノ ス	グ ル マ コ ノ ス	グ ル マ コ ノ ス
	(%)	(%)	(%)
パ ン 酵 母	95	5	47 53
<i>S. cerevisiae</i> 18.29	95	5	45 55
<i>C. albicans</i> 582	98	2	54 46
<i>C. albicans</i> 806	95	5	48 52

* GMP: グルコマンナン・蛋白質複合体

かも、この多糖類はそれぞれ単独に存在するのではなく蛋白と複合体を形成している。さらに、細胞壁の微細構

造にかんしては今のところ不明である。

3. 酵母細胞壁溶解酵素

細胞壁の構造の不明なことはそれを加水分解する酵素が見出されていないことに起因する。もっとも酵母を溶解するものにかたつむりの消化液のあることは古くから知られてはいたが、すべて酵素の複合物として扱われていた。

そこで、まず溶解酵素を生産する微生物の検索から始まった。各地の土壌を採取し、その懸垂液を酵母細胞壁を含む寒天培地上に塗布すると、寒天上にコロニーが生じてくる。この中酵母細胞壁を溶解する能力を有する菌株は寒天培地中に含まれている細胞壁粉末を溶かし、他の能力を有しないものと区別出来る。こうして得られた菌株には放線菌が多く、その中の1株を材料に供試した。その菌株の菌学的性質は表2に示す。

表 2 土壌より分離した選択菌の菌学的性質

条 件	形 状
有機物培地上の可溶性色素	黄金色～褐色
気生菌糸	白色、長ラセン状
孢子	球形
栄養 寒天培地	白色の気生菌糸を伴ってクリーム色に発育する
カルシウム・マレイト寒天斜面培地	中心部と周辺が白色気生菌糸で覆われる
ゼラチン培地	気生菌糸を伴ったコロニーを作り、急速に液化
グルコース寒天培地	白色気生菌糸
ツアベック蔗糖寒天培地	白色気生菌糸
ツアベック澱粉寒天培地	可溶性色素が黄色
馬鈴薯培地	から褐色白色気生菌糸を伴ってクリーム色に発育し、黄色の可溶性色素を生ずる
牛乳培地	ゆっくり発育し、白色気生菌糸で表面を覆う。凝固せず、ゆっくりペプトン化し、液は黄褐色を呈する
硝酸還元性	有
セルロース分解性	無
澱粉分解性	有

溶解酵素の性質を調べるに先立って、培養における諸性質を検討したのであるが、この酵素もやり誘導的に生

産される。すなわち、酵母細胞壁が存在していることが必要であるが、酵母細胞壁を構成する酵母グルカン（ β —1, 3—グルカン）とマンナンがinducerとなることがわかった。（表3）。このことから酵母細胞壁溶解酵

表 3 多糖類の誘導効果

添加した物質	終 末 P H	最低 L A	最高
ナ シ (対照)	7.0 ~ 7.5	0	5
粗 細 胞 壁	8.0 ~ 8.8	15	20
酵母 グルカン	7.5 ~ 8.0	30	50
キ シ ラ ン	7.2 ~ 7.8	20	28
ペ ク チ ン	7.4 ~ 7.6	0	3
デキストラン	6.5 ~ 7.0	0	1
澱 粉	7.0 ~ 8.0	0	8
酵母 マンナン	8.0 ~ 8.2	5	18
セル ロ ー ス	7.6 ~ 7.8	3	10

* : Lytic Activity (酵母細胞壁溶解酵素活性)

素中には酵母グルカンを加水分解する酵素とマンナンを加水分解する酵素の存在が示唆されるのであるが、種々の天然基質に対する作用を表4に示した。酵母細胞壁を

表 4 粗溶解酵素による種々の物質の加水分解

基 質	測 定 法	加水分解
酵 母 細 胞	濁 度 の 減 少	+
酵 母 細 胞 壁	"	+
酵 母 グルカン	還 元 力 の 増 加	+
酵 母 マンナン	"	±
ヤ シ ラ ン	"	+
ペ ク チ ン	"	—
デキストラン	"	—
澱 粉	"	—
C. M. C	"	—
カ ゼ イ ン	T C A 可溶性物質の増加	+

* カルボキシメチルセルロース

構成する多糖類の分解酵素の他に蛋白分解酵素を有している。この蛋白分解酵素が細胞壁溶解に関与するとすれば、細胞壁成分としての蛋白を証明する手がかりになるはずである。常法に従って培食液を硫酸塩析、アセトン沈澱法によって分画しようと試み、ある程度精製は出来たが、なお、蛋白分解酵素、酵母グルカン加水分解酵素が共存していたので、DEAE・セルロース樹脂を用いて分画し図2に示すように、この両者を分離することに成功したが、両者共、酵母細胞壁溶解活性を有していた。これを電気泳動法を用いてかなり高度に精製し、酵母細胞壁溶解酵素との関係を調べた。酵母グルカンを加

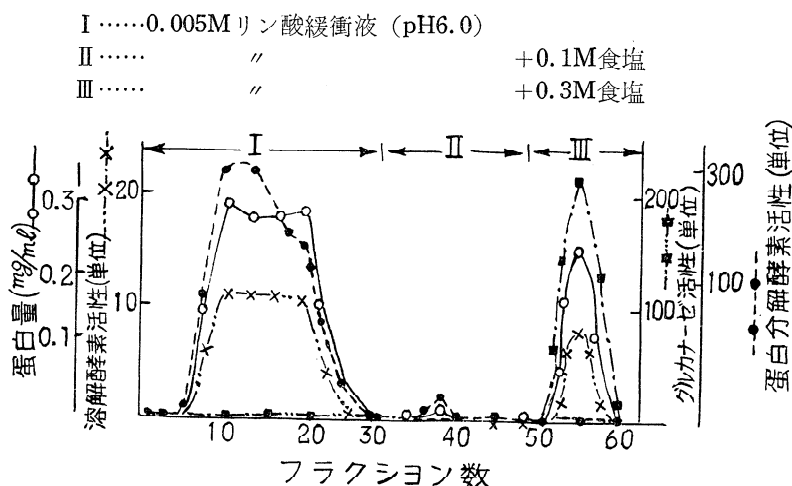


図2 DEAE—セルローズ樹脂を用いた溶解酵素の溶出パターン

水分解する酵素は酵母細胞壁または精製酵母グルカン (β —1, 3—グルコサイド結合の polymer) を加水分解し、還元力を増大する。従って、この酵素 (β —1, 3—グルカンナーゼ) は酵母細胞壁を構成する主要多糖類である酵母グルカンを加水分解し、酵母を溶解する能力があると結論するに至った。ところが、酵母細胞壁溶解素をもつもう一方の区分 (蛋白分解酵素を有する区分) の溶解能について若し、蛋白分解酵素によって酵母細胞壁が溶解されるならば、他種起因からの蛋白分解酵素は酵母細胞壁の溶解に如何にふるまうかが注目されるよう。それが表5に示す結果として表われ、他種蛋白分解酵素のみでは溶解能を

示さなかったが、唯一つの放線菌の生産する蛋白分解酵素 (*Streptomyces griseus* の生産する蛋白分解酵素) のみが有効であった。これは興味ある現象で放線菌の蛋白分解酵素は比較的広い基質特異性を有し、ペプチドをも加水分解してアミノ酸にまでする性質を特長とするところから酵母細胞壁中の蛋白はある限られたアミノ酸のみよりなる結合か、もしくはプチドのような短い結合を有している可能性が考えられる。さらに、また表4より β 1—3—グルカンナーゼと蛋白分解酵素が酵母細胞壁の溶解に相乗効果

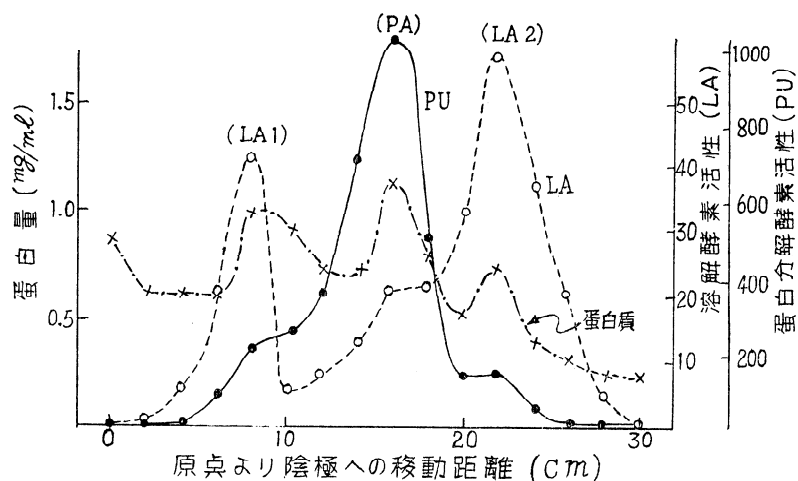


図3 蛋白質分解酵素区分ゾーン電気泳動パターン

のであるが、蛋白分解酵素を含む区分中で細胞壁の溶解に寄与するのは何であるかが不明である。これは蛋白目体の構造 (1次構造) が十分知り得ないからであるが、大まかな性質を把握するために、遊離アミノ基の増加 (ペプチダーゼ活性) と3塩化酢酸に可溶性のチロシン量 (プロタイナーゼ活性) との比を比較することによってプロタイナーゼ様酵素が酵母細胞壁の溶解に働くのかペプチダーゼ様酵素が関与するかを調べた。さきに DEAE—セルローズ樹脂で分画した蛋白分解酵素区分を澱粉ゲルを担体として電気泳動すると図3に示すように3つの蛋白成分に分離され、それぞれのピークと対応して蛋白分解酵素 (プロタイナーゼ活性) と溶解活性がある。それぞれのピークの蛋白の性質を比較したのが表5である。

こうして見ると、酵母細胞壁を溶解するのにあずかる酵素はプロタイナーゼではないこと、つまり蛋白質を人

表5 酵母細胞壁 (熱処理) の分解におけるプロテアーゼ区分と β —1, 3—グルカンナーゼ区分の相乗作用

酵 素	PU	GU	LA
P・区 分	280	—	15
プロナーゼ (科 研)	450	—	10
パ パ イ ン	450	—	3
細菌プロテアーゼ (アルカリ性)	500	—	1
“ (中 性)	500	—	0
β —1,3—グルカンナーゼ	—	230	8
“ P 区 分	280	“	30
“ プロナーゼ	450	“	25
“ 細菌プロテアーゼ (アルカリ性)	500	“	10
“ “ (中 性)	500	“	10
“ パ パ イ ン	450	“	10
分 画 前	280	230	33

表6 LA 1, LA 2, PAの性質

	LA 1	LA 2	PA
蛋白分解酵素活性 (アンソニン-カゼイン法)	200	180	1010
溶解活性	40	58	17
PA / LA	5	3	60
L-ロイシル・グリシル- グリシン ペプチダーゼ*1	1.2	3.6	6.0
ペプチド加水分解*2	187	245	137

*1: 酵素液 1 ml, 0.05M トリス緩衝液 (pH7.4) 1 ml
基質 (1 mM) 1 ml を 40°C で反応後 60 分のアミノ基 1 μ当量/ml の値

*2: 酵素液 (200 PU) 1 ml, 2% カゼイン 1 ml を 40°C, 60 分反応させた後の生成 COOH μ当量/分

大きく切断して行く酵素ではなさそうである。とすると、ペプチダーゼ活性を有している区分になるわけであるが、ペプチダーゼの特異性と酵母細胞壁中に存在するペプチドとを調べないかぎり明確な解答は与えられない。

これまでのことを少し考えてみると、酵母細胞壁中には少量ではあるがグルコサミンが存在することが注目される。バクテリアの細胞壁ではグルコサミンおよびムラミン酸が重要な役割を演じていること、すなわち、バクテリアの細胞壁は数種のアミノ酸、グルコサミン、ムラミン酸から出来ており、グルコサミンとムラミン酸よりなる Polymer とアミノ酸からなるペプチドがペプチド結合でつながっていることが明らかにされている。このことは酵母中のグルコサミンにもその役目を負わせることが可能であり、事実のそれを示唆している現象もある。

したがって、酵母細胞壁とその溶解酵素との関係を知るとき、単一の酵素ではなく、2 種以上の酵素が相剋的に効果をもつことから細胞壁の結合の複雑性も推察出来る。

4. 酵母のプロトプラスト

細胞壁の機能に関しては物質の輸送面から研究されているが、ここではそれを省略し、少し面を変えて細胞壁をとり除いた細胞つまり裸の細胞について調べてみようと思う。プロトプラストというのは全細胞壁をとり除いた構造というように定義されているが、さきにも述べた溶解酵素を作用させると細胞壁がとり除かれ、裸の細胞が出来るのである。このプロトプラストを用いて生理的な性質を調べれば、とり除かれた壁の生理的な意義も推論出来るものである。

細胞から細胞壁をとり除いてしまえば、普通の状態で

は細胞がこわれてしまう。したがって、まず細胞壁の役割としてある特定の形態を保つために存在することも、外部の圧力に対して耐え得るものであることが認められる。細胞壁をとり除いた形で保つために、内部の圧力に外部の圧力を調整してやればよい。そのために、NaCl 蔗糖、ラムノースなどが用いられる。

表7 プロトプラストの呼吸と醗酵

	* Q'O ₂	** Q'air CO ₂	*** Q'N ₂ CO ₂	阻害度*(%)
正常細胞	112	135	317	57
プロトプラスト	90	229	369	38
無細胞抽出液	5	7	4	—

* O₂ 摂取量 μl/時間/10⁸ 菌数

** 醗酵による CO₂ 発生量 μl/時間/10⁸ 菌数
(空気中)

*** " (窒素ガス中)

+ $(Q'_{CO_2}^{N_2} - Q'_{CO_2}^{air}) / Q'_{CO_2}^{N_2} \times 100$

こうして得た酵母のプロトプラストの呼吸と醗酵を正常な細胞のそれと比較した。(表7)

呼吸能は正常細胞とほとんど変わらず、正常な呼吸を行っているし、醗酵能もほぼ正常に存在するのであるが、ただプロトプラストの方が正常細胞より大きいのは空気中での炭酸ガスの放出である。これはいわゆる Pasteur 効果と呼ばれる現象、(すなわち、酸素存在下では醗酵が阻害される現象として理解されている) に関係したことに変化があると見受けられる。この現象に関しては幾多の解析が与えられて、呼吸と醗酵に共通している支配因子のうばい合いがおそらく Pasteur 効果の原因であるとされている。そうすれば、このプロトプラストの場合はどう解釈すればよいのか? 呼吸と醗酵に共通する因子と考えられるのは細胞内の無機リン酸とその受容体としての ADP のうばい合いであろう。無機リン酸を原因に考えるとすれば、細胞外のリン酸が細胞内に入り易いかどうかである。しかし、一般に酵母では細胞外のリン酸濃度をいくら高めても Pasteur 効果に影響を与えない。このことからすれば正常細胞ではリン酸の入り方に濃度による差はないが、プロトプラストではそれが認められることである。これを支持する知見として、酵母には認められなかったリン酸濃度の影響が、バクテリア(大腸菌)に認められるということである。すなわち、細胞外のリン酸濃度を高めることによって糖の消費が空気のないときと変らなくなつたと報告している。³⁾

こうして呼吸が正常な細胞と同程度に有しているの
その呼吸酸素系を調べてみた。好気的条件下（空気のある
状態）で発育した酵母の呼吸酸素系は主としてチトク
ローム酸素系であることが知られている。プロトプラ
ストも正常な細胞の呼吸酸素系と同じであることを示した
のが図4と表8である。

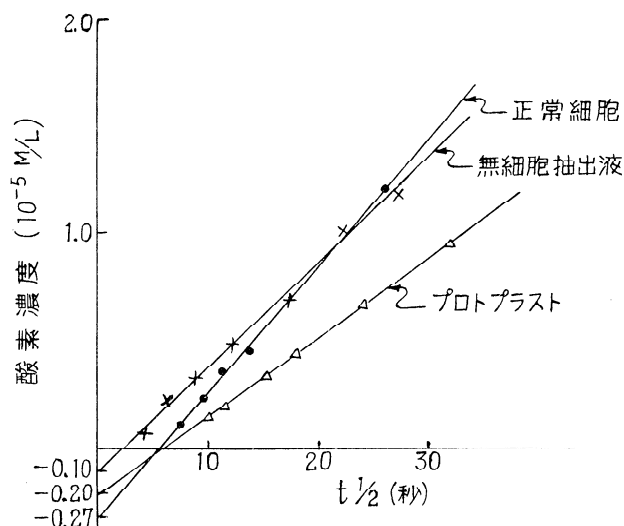


図4 任意時点の溶存酸素濃度 $[O_2]_i$ とその半減所
要時間 $t_{1/2}$ とのプロット

表8 プロトプラストの酸素濃度に対するミカエリス
恒数ミカエリス恒数 (k_m) は図4から得られ
た値である。

	k_m 値 (M/L)
正 常 細 胞	2.0×10^{-6}
プ ロ ト プ ラ ス ト	1.4×10^{-6}
無 細 胞 抽 出 液	0.7×10^{-6}

Saccharomyces cerevisiae の酸素に対するミハイリ
ス恒数は 10^{-6} M/L とされている。これはチトクロ
ーム呼吸酸素系であることを示すものであり、プロトプラ
ストも正常細胞と同じ order の値（それぞれ 1.4×10^{-6}
M/L, 2.0×10^{-6} M/L）を示すことから酸素末端因子
はチトクローム呼吸酸素系によって支配されていると結
論される。

細胞壁をとり去って裸にしても正常な細胞と相違なけ
れば（正常な代謝活性を備えている）、そのプロトプラ
ストを増殖させることが出来ないだろうか？

そこで、プロトプラストを栄養培地中に入れて、その
増殖を顕微鏡下で追跡した。対照に用いた正常細胞が2
ヶ3ヶと増えて行くのに、プロトプラストでは菌数が増
加せず、やや形が大きくなるのが認められた。

これは細胞壁がないために細胞を区別し得ないのでは
なからうか、もしそうならば、プロトプラスト中の DN
A や RNA が増加するだろう。さらに、注目出来ること
は DNA 量は1ヶの細胞当り一定の筈である。つまり
細胞分裂を起す直前には普通の2倍になるが、それ以外
は一定である。従って、どんな段階の菌の集団をもっ
てきても細胞当りの DNA 量は1から2の間になければ
ならない。ところが、さきの顕微鏡下の観察から菌数は
増えないのに膨大するとすれば、内部物資が増加してい
るかも知れない。そこで、内部の DNA 量に着目して菌
数当りの DNA 量を調べた。それが表9である。

増加しない。したがって菌数当りの DNA 量は増加す
る。このことはプロトプラストも増殖し得る機能を備え
ているにもかかわらず、細胞壁が合成されないために細
胞が分れて行かないのである。

さらに、もう少し可能性を考えてみると細胞壁のない

表9 成長過程におけるプロトプラストのデオキシリボ核酸 (DNA) およびリボ核酸 (RNA) の増加

培 養	細胞数	DNA	DNA/ 10 ⁸	最初の DNA との比	RNA	RNA/ 10 ⁸	最初の RNA との比	RNA/ DNA
止 常 細 胞 (時間)	(個数/ml)	($\mu g/ml$)	(μg)		($\mu g/ml$)	(μg)		
0	1.1×10^8	5.5	5.0	—	60	55	—	11.0
5	2.5×10^8	15.0	6.8	1.4	251	100	1.8	14.7
10	5.4×10^8	32.0	5.9	1.2	465	86	1.6	14.6
プロトプラスト								
0	3.2×10^7	3.0	9.4	—	26	80	—	8.5
5	3.5×10^7	8.1	23.5	2.5	148	423	5.3	18.0
10	3.0×10^7	11.2	37.3	4.0	121	405	5.1	10.8

これを見ると明らかに菌数当りの DNA 量に差があ
る。正常細胞では DNA の増加は細胞数の増加を伴な

い、細胞当りの DNA 量は一定の値 (1.0~1.4) を示す
が、プロトプラストでは DNA 量は増加するのに菌数は

ことが増殖出来ない原因だとすれば、細胞壁の出来ない原因を追求しなければならない。第1に細胞壁を合成する酵素系の位置である。現在のところ、細胞壁合成に関する知見は殆んどないが、⁴⁾Lampen は酵素の所在を調べ、細胞壁をとり去ると蔗糖を加水分解する酵素（インバーターゼ）が全くなり、細胞壁にのみ局在し、新たに合成されるインバーターゼも細胞内にとどまらないことを示している。これと関連して考えれば、酵母の細胞壁を合成する酵素も細胞壁に局在し、細胞壁をとり除けば、その合成酵素も存在し得なくなっているために細胞壁が作れない。第2は細胞壁合成において細胞壁の前駆物質が細胞表面に出るとすると液体培養では液内に流出してしまう。これは Nevcas もそれを主張しているのであるが、プロトプラストをゼラチンゲル中に入れると⁵⁾増殖することがあると報告している。

こうしてプロトプラストの生理的な性質を眺めて見る

と、正常細胞のそれと大差なく、細胞壁の機能的な面での役割は考えられない。その役割をもつものは恐らく細胞壁の内側にある細胞膜であると推論される。しかしながらある種の酵素が細胞壁部分に局在していることは何からの意味で細胞壁の役割を与えることになる。

いずれにしても細胞壁および膜の機能に関してはまだなされるべくして残されている問題が多い。

文 献

- 1) Kessler, G. and W.J. Nickerson; J. Biol. Chem.; 234, 2281 (1959)
- 2) 野本, 奈良橋, 村上: 酵素化学シンポジウム; 11, 103 (1959)
- 3) Holzer, H.: Cold Spring Harbor Sym. on Quantitative Biology, Vol. xxvi P.277 (1961)
- 4) Lampen, J.O., and Sutton, D.D.: Biochim. Biophys. Acta, 56, 303 (1962)
- 5) Nevcas, O.: Folia Biol. (Praha); 8, 256 (1962)