

種々の酵母の呼吸に及ぼすモノヨード醋酸 と弗化ソーダとの影響

西 上 一 義

(昭和36年5月6日受理)

Kazuyoshi NISHIGAMI : The Effects of Monoiodoacetic Acid
and Sodium Fluoride on Respiration
of Various Yeasts

酵母の分類法として、従来は孢子形成の有無¹⁾、孢子形成の型式²⁾、栄養体の形、孢子の形³⁾など形態的要素が用いられて来ている。最近はさらに液体培養の際の皮膜形成能、炭水化物の発酵・同化能、硝酸塩の同化能、carotinoid色素の有無、arbutinの分解能、酸の生成、vitaminの要求、脂肪の分解能など酵母の持つ機能・生化学的な性質も取り入れて行われるようになって来た³⁾。

酵母の生化学的分類法として発生した酵母の比較生理的研究には、炭水化物同化能の比較に関して、すでに Wickerham による広範な研究があり⁴⁾、最近では Barnett の多価 alcohol を用いての報告がある⁵⁾。

一方、炭水化物分解にさいしてモノヨード醋酸^{6,7,8,9)}ならびに弗化ソーダ^{10,11,12)}が、ある反応過程を特異的に阻害することは、すでに多数の研究者達によって調べられ、その阻害機構も明らかとなっている。

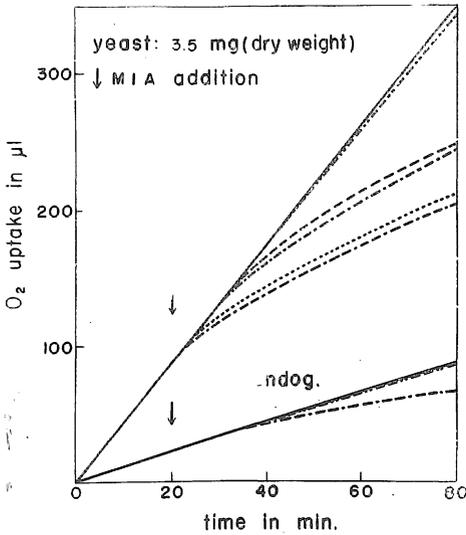
この2種類の酵素阻害物質を、種類の異なる酵母に与えるとき、酵母の感受性に差があるかどうか、また葡萄糖の分解能にそれぞれどのような影響を与えるかを比較生理の立場からみたのがこの報告である。

材料及び方法

8種類の酵母を用いた。*Candida utilis*, *Mycoderma cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torula candida* は財団法人大阪発酵研究所より、*Saccharomyces carlsbergensis* は北海道大学農学部農芸化学応用菌学教室より、*Rhodotorula glutinis* は広島大学教養学部生物学教室より恵贈を受けた。*Saccharomyces cerevisiae* は日本甜菜糖株式会社のパン酵母種より、*Saccharomyces sake* は日本酒酏より分離した。

培養には Henneberg 氏液を用いた。その組成は、蔗糖 100g., peptone 5g., KH_2PO_4 5g., MgSO_4 2g., yeast extract 0.5%, 蒸留水 1000ml. 培養条件は 300ml. Erlenmeyer flask に

Figure 1

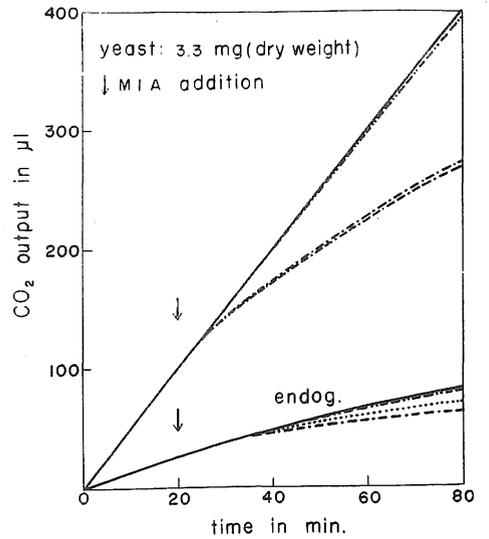


The effect of monoiodoacetic acid on O₂ uptake of *Rhodotorula glutinis*. concentration of added monoiodoacetic acid (from Figure 1 to Figure 16) :



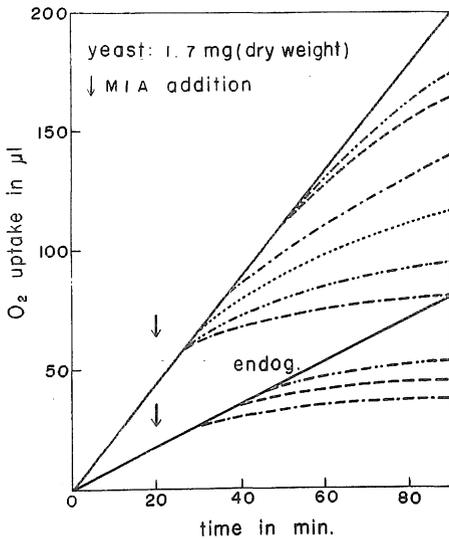
MIA : monoiodoacetic acid

Figure 2



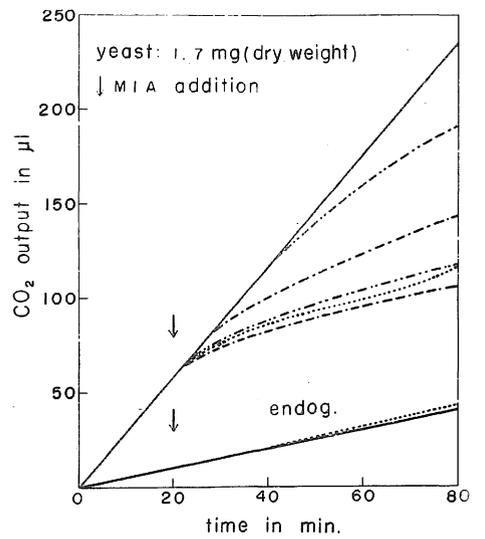
The effect of monoiodoacetic acid on CO₂ output of *Rhodotorula glutinis*.

Figure 3



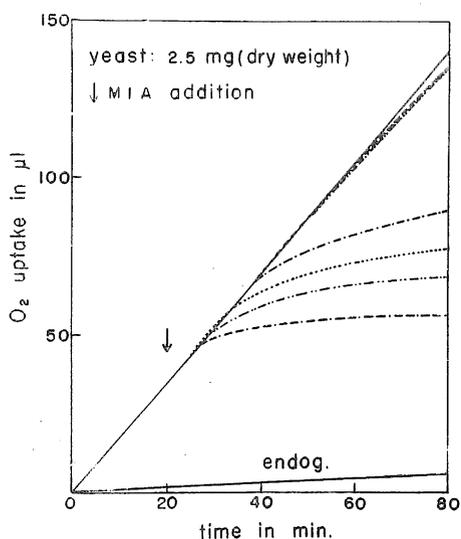
The effect of monoiodoacetic acid on O₂ uptake of *Candida utilis*.

Figure 4



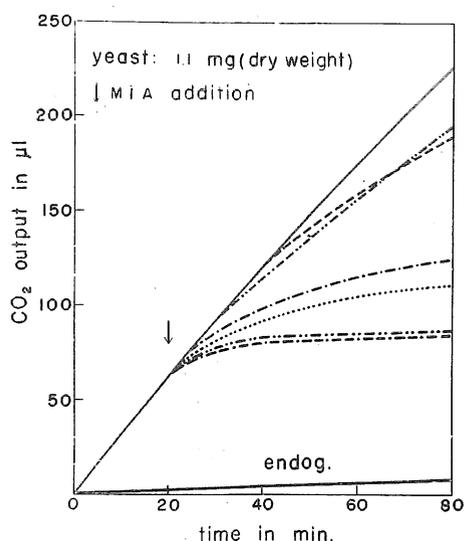
The effect of monoiodoacetic acid on CO₂ output of *Candida utilis*.

Figure 5



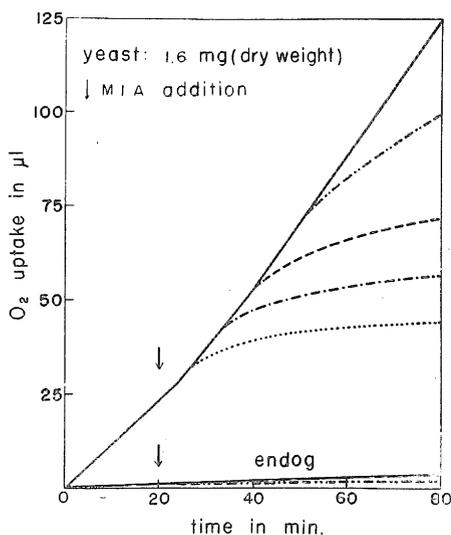
The effect of monoiodoacetic acid on O₂ uptake of *Schizosaccharomyces pombe*.

Figure 6



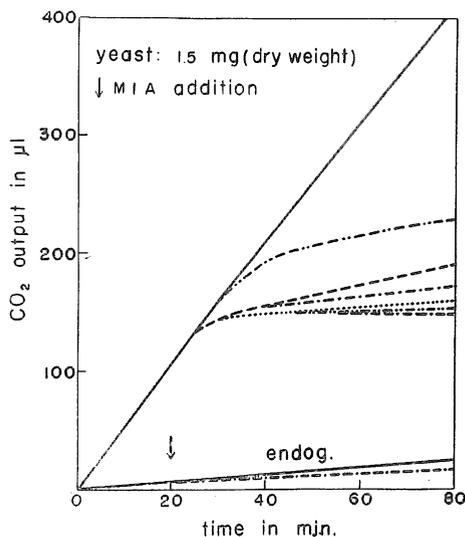
The effect of monoiodoacetic acid on CO₂ output of *Schizosaccharomyces pombe*.

Figure 7



The effect of monoiodoacetic acid on O₂ uptake of *Saccharomyces cerevisiae*.

Figure 8



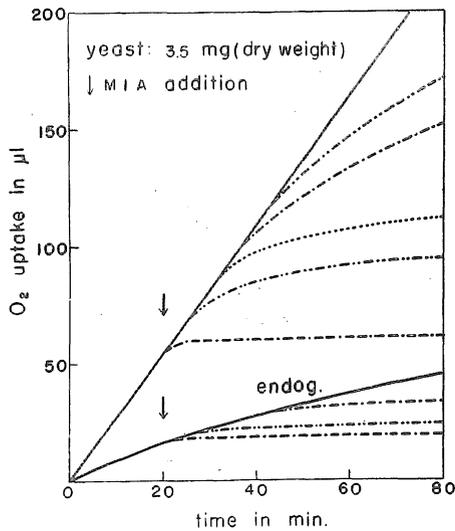
The effect of monoiodoacetic acid on CO₂ output of *Saccharomyces cerevisiae*.

培養液 50 ml. を入れ, reciprocating shaker を使用した。温度は 30°C, 培養時間は 16 時間, 培養した酵母は遠心分離して蒸溜水で 3 回洗って使用した。

O₂ 吸収能, CO₂ 排出能は Warburg 検圧計によって測定した。酵素阻害物は測定開始後 20 ないし 30 分後に側室より加えた。反応液の組成は次のとおりである。

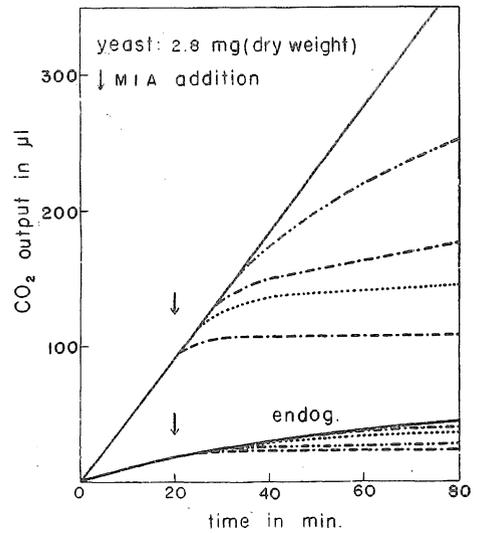
yeast suspension, 0.5ml.; 0.1M 葡萄糖, 0.5ml.; 0.1M 酸性フタル酸カリ——苛性ソーダ

Figure 9



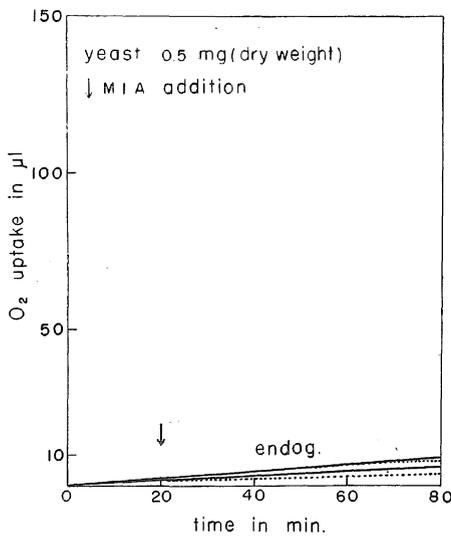
The effect of monoiodoacetic acid on O_2 uptake of *Saccharomyces sake*.

Figure 10



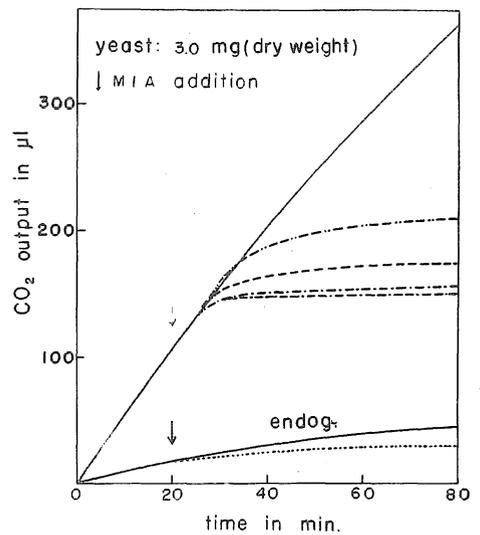
The effect of monoiodoacetic acid on CO_2 output of *Saccharomyces sake*.

Figure 11



The effect of monoiodoacetic acid on O_2 uptake of *Saccharomyces carlsbergensis*.

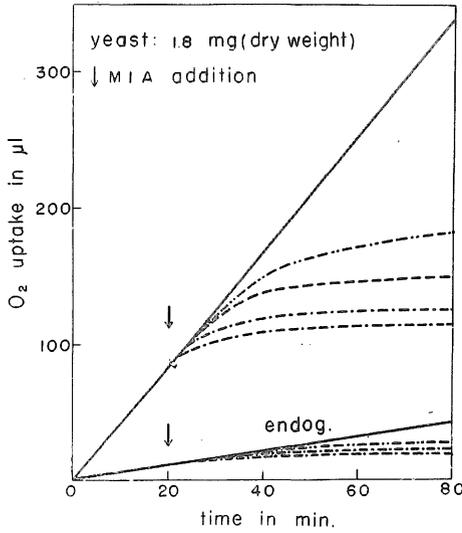
Figure 12



The effect of monoiodoacetic acid on CO_2 output of *Saccharomyces carlsbergensis*.

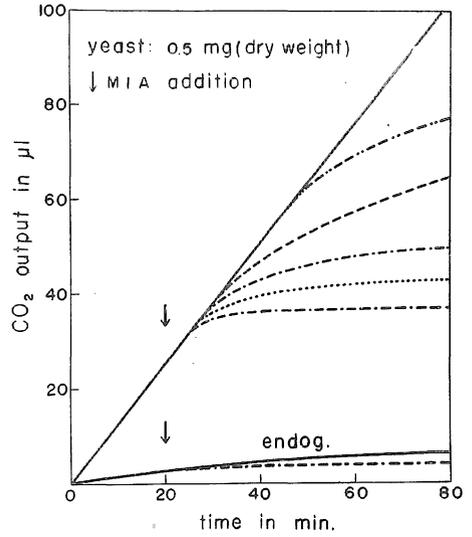
緩衝液, pH 4.8, 0.5ml; 酵素阻害物, 0.5ml, 合計2.0ml; 副室えは 20% KOH 0.5ml. を入れた。測定温度は 30°, 酵素阻害物質としては, モノヨド醋酸と弗化ソーダを使用した。もちいた阻害物の最終濃度はモノヨド醋酸は $5 \times 10^{-4}M$ ないし $5 \times 10^{-3}M$, 弗化ソーダは $1 \times 10^{-2}M$ ないし $2 \times 10^{-2}M$ である。

Figure 13



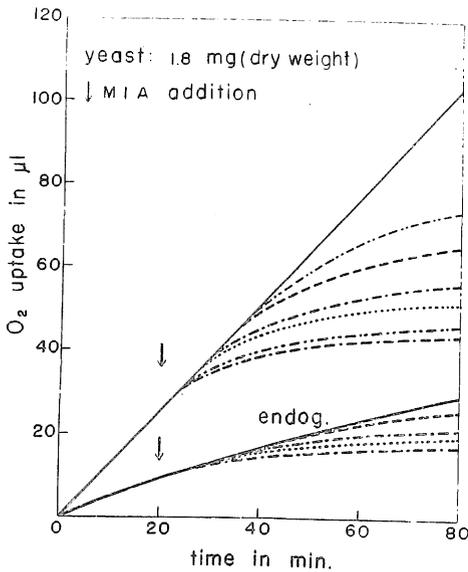
The effect of monoiodoacetic acid on O₂ uptake of *Mycoderma cerevisiae*.

Figure 14



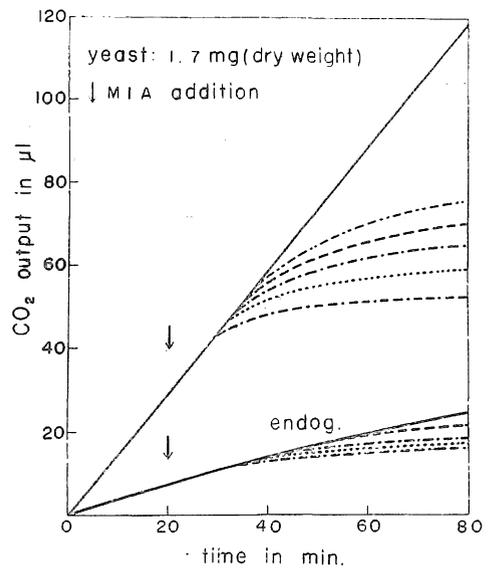
The effect of monoiodoacetic acid on CO₂ output of *Mycoderma cerevisiae*.

Figure 15



The effect of monoiodoacetic acid on O₂ uptake of *Torula candida*.

Figure 16



The effect of monoiodoacetic acid on CO₂ output of *Torula candida*.

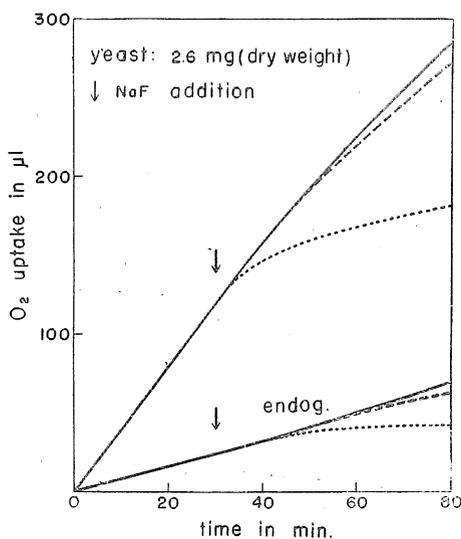
実験結果

モノヨード醋酸による阻害

Rhodotorula glutinis

葡萄糖添加呼吸に対して $5 \times 10^{-4} M$ モノヨード醋酸は、殆ど阻害

Figure 17

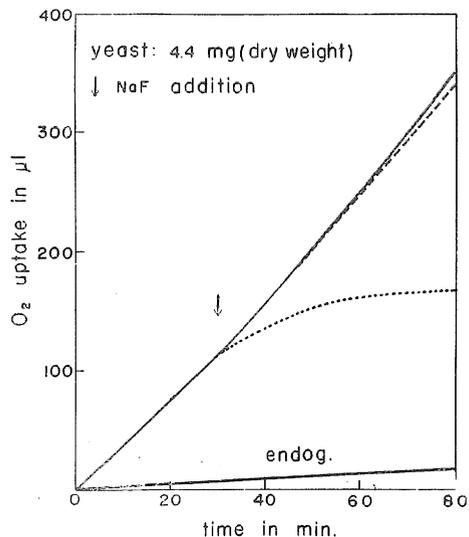


The effect of sodium fluoride on O_2 uptake of *Rhodotorula glutinis*.

concentration of added sodium fluoride (from Figure 17 to Figure 18) :

————— non
 - - - - - 1×10^{-2} M
 ········ 2×10^{-2} M

Figure 18



The effect of sodium fluoride on O_2 uptake of *Saccharomyces cerevisiae*.

Table 1. The inhibition rate of O_2 uptake and CO_2 output of eight kinds of yeasts in presence of monoiodoacetic acid.*

spp.	monoiodo- acetic acid (M)	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	R Q	rate of inhibition (%)	
					Q_{O_2}	Q_{CO_2}
<i>Rhodotorula glutinis</i>	non	75	91	1.2	0	0
	5×10^{-4}	75	91	1.2		
<i>Candida utilis</i>	non	92	104	1.1	0	26
	5×10^{-4}	92	77	0.8		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	non	42	148	3.5	7	16
	5×10^{-4}	39	125	3.2		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	non	65	201	3.1	26	60
	5×10^{-4}	48	80	1.7		
<i>Saccharomyces sake</i>	non	48	98	2.0	29	43
	5×10^{-4}	34	56	1.6		
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	non	13	85	6.5	31	60
	5×10^{-4}	9	34	3.8		
<i>Mycoderma cerevisiae</i>	non	146	154	1.1	64	29
	5×10^{-4}	52	110	2.1		
<i>Torula candida</i>	non	43	53	1.2	51	55
	5×10^{-4}	21	24	1.1		

* It was compared with uptaken O_2 and outputed CO_2 in 60 min. after the addition of inhibitor.

的影響がなかった。 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ まで濃度をあげてもなお相当強い呼吸能を示し、試験した8種類の酵母の中では最もモノヨード醋酸の感受性の弱い種類であった(Figure 1)。 CO_2 排出に対しても全く同様に阻害的影響は極めて弱かった(Figure 2)。

Candida utilis 葡萄糖添加呼吸に対して $5 \times 10^{-4} \text{M}$ モノヨード醋酸は殆ど阻害しなかった。しかし高濃度では強い阻害を示し、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ では阻害物質添加後60分で完全に阻害した(Figure 3)。 CO_2 排出は $5 \times 10^{-4} \text{M}$ でやゝ顕著な阻害がみられたが、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ でも完全阻害の現象は見られなかった(Figure 4)。 endogenous の CO_2 排出は $3 \times 10^{-3} \text{M}$ でも殆ど阻害を示さなかった。一般的には *Rhodotorula glutinis* で見られるごとく、野生酵母では endogenous の呼吸能が添加呼吸に比して大きいという現象がみられる。

Schizosaccharomyces pombe 葡萄糖添加呼吸に対して $5 \times 10^{-4} \text{M}$ モノヨード醋酸は非常にわずかな阻害を示したのみであるが、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ では完全に阻害した(Figure 5)。 endogenous 呼吸能は極めてわずかであった。 CO_2 排出能は $5 \times 10^{-4} \text{M}$ で比較的強い阻害を示した(Figure 6)。

Saccharomyces cerevisiae 葡萄糖添加呼吸に対して $5 \times 10^{-4} \text{M}$ モノヨード醋酸は、やゝ顕著な阻害を示し、 $3 \times 10^{-3} \text{M}$ で殆ど完全に阻害をした(Figure 7)。これに対して CO_2 の排出にはさらに強度の阻害がみられ $3 \times 10^{-3} \text{M}$ で殆ど完全に阻害をした(Figure 8)。

Saccharomyces cerevisiae 葡萄糖添加呼吸に対して $5 \times 10^{-4} \text{M}$ モノヨード醋酸はかなり強い阻害を示し、 $3 \times 10^{-3} \text{M}$ で殆ど完全に阻害をした(Figure 9)。 CO_2 排出も全く同様な阻害型を示した(Figure 10)。

Saccharomyces carlsbergensis 葡萄糖添加呼吸に対して $5 \times 10^{-4} \text{M}$ モノヨード醋酸は強い阻害を示した(Figure 11)。また CO_2 の排出には $5 \times 10^{-4} \text{M}$ で殆ど完全に阻害をした(Figure 12)。

Mycoderma cerevisiae 葡萄糖添加呼吸に対して $5 \times 10^{-4} \text{M}$ モノヨード醋酸は非常に強い阻害効果を持ち、 10^{-3}M で完全に阻害をした。また endogenous 呼吸も完全に阻害をした(Figure 13)。 CO_2 排出に対して $5 \times 10^{-4} \text{M}$ で強い阻害を認めた(Figure 14)。

Torula candida 10^{-3}M モノヨード醋酸を与えた結果では、酸素の吸収、 CO_2 の排出ともに非常に強い阻害を与えた(Figure 15, 16)。

弗化ソーダによる阻害

前記8種類の酵母のうち、モノヨード醋酸の阻害が最も少い *Rhodotorula glutinis* と、極めて多い *Saccharomyces cerevisiae* の酸素吸収に対する弗化ソーダの阻害をしらべた。それによると

Rhodotorula glutinis 葡萄糖添加呼吸は $10^{-2}M$ 弗化ソーダによって極めてわずかしか阻害されなかった。 $2 \times 10^{-2}M$ 弗化ソーダでもかなりの活性を残した (Figure 17)。

Saccharomyces cerevisiae 葡萄糖添加呼吸は $10^{-2}M$ 弗化ソーダでは極めてわずかしか阻害されなかったが、 $2 \times 10^{-2}M$ 弗化ソーダでは 30 分後に完全に阻害された (Figure 18)。

論 議

モノヨード醋酸の酵素阻害機作は酵素の蛋白部分の SH 基に作用するということはすでに明らかにになっているが⁶⁾ 葡萄糖の解糖及び好氣的分解に関する酵素では特に 3-phosphoglyceraldhyde dehydrogenase と alcohol dehydrogenase⁷⁾, pyruvic carboxylase⁹⁾, succinic dehydrogenase⁸⁾ などに対して強い阻害作用を現すことが知られている。また弗化ソーダは enolase の作用を特異的に阻害することが知られている。従って EMP 径路或は TCA cycle を経て葡萄糖を分解するときの活性度は、ある適当な濃度のモノヨード醋酸及び弗化ソーダで著しく阻害される。いま各種の酵母の持つ原形質膜のモノヨード醋酸及び弗化ソーダに対する透過性が大きな差がないものとする、これらの阻害物による酸素呼吸能ならびに炭酸排出能の阻害度を比べることにより、それぞれの酵母の持つ葡萄糖分解型式の比較を考慮することができる。

(Table 1)。一般に酵母は、葡萄糖を分解する径路として、EMP 径路から alcohol 発酵または TCA cycle を経て分解する方法と、pentose cycle を利用して直接酸化する方法と、2つの径路を利用しているが、酵母の種類によって2つの径路に対する依存度が異なる。いまモノヨード醋酸及び弗化ソーダによる阻害率を、実験した8種類の酵母について比べてみると、その阻害率が高いものほど EMP 径路を高度に利用しているものと考えられる。

モノヨード醋酸による阻害は、8種類の酵母中 *Rhodotorula glutinis* が最も少く、次いで *Candida utilis*, *Schizosaccharomyces pombe* の順になった。*Saccharomyces cerevisiae* 以下5種類は阻害率が非常に大きかった。またこれらの阻害率は大体において RQ の大きいものにおいて強く影響を及ぼしているが、やはり EMP 径路の酵素をモノヨード醋酸が阻害するからであろう。*Mycoderma cerevisiae* と *Torula candida* とは共に RQ は小さくて、*Rhodotorula glutinis* と *Candida utilis* の RQ に似た値を持つ。しかし一方モノヨード醋酸による阻害率は最も高く *Saccharomyces* 属より以上であった。*Mycoderma cerevisiae* と *Torula candida* の呼吸は、おそらく EMP—TCA の径路に依存するものが多いのであろう。

モノヨード醋酸による阻害型式によって前記8種類の酵母をわけると、阻害率の小さい *Rhodotorula glutinis*, *Candida utilis*, 阻害率の大きい *Saccharomyces* 属、その中間型の *Schizosaccharomyces pombe*, RQ が小さくて阻害率の大きい *Mycoderma cerevisiae*, *Torula candida* の4グループに大別できる。

弗化ソーダによる阻害は、モノヨード醋酸と比べて高濃度を要した。 $10^{-2}M$ では殆ど影響がなく、 $2 \times 10^{-2}M$ では強い阻害が現れた。得られた結果はモノヨード醋酸によるものと全く同じ傾向であった。pentose cycle を高度に利用していると思われる *Rhodotorula glutinis* には阻害度が比較的少なく、EMP 径路に強く依存していると考えられる *Saccharomyces cerevisiae* で

は $2 \times 10^{-2}M$ により酸素の吸収は全く停止した。

結 論

1. 8種類の酵母について酸素吸収、炭酸排出に対するモノイオド醋酸と弗化ソーダの影響をしらべた。
2. モノイオド醋酸に対する感受性は、酵母の種類によって異なり、RQ が小さく、殆ど alcohol 発酵をしない *Rhodotorula glutinis* は最も弱く、次いで *Candida utilis*, *Schizosaccharomyces pombe* が少かった。alcohol 発酵能の強い *Saccharomyces* 属は大きな阻害を受けた。TCA cycle による呼吸に大きく依存しているものと考えられる *Mycoderma cerevisiae* と *Torula candida* とは最も強い阻害を受けた。
3. 弗化ソーダによる呼吸阻害は、モノイオド醋酸と比べると高濃度を要した。*Rhodotorula glutinis* に対しては阻害が比較的少なく、*Saccharomyces cerevisiae* は著しく阻害された。
4. モノイオド醋酸及び弗化ソーダによる酸素吸収能、炭酸排出能に阻害が少ない酵母ほど葡萄糖の直接酸化に対する依存度が大きいものと考えられる。

謝 辞

終にのぞみ平素御指導をたまわり、種々の御教示をいただいた北海道大学教授宇佐美正一郎先生に深く感謝の意を表する。

Résumé

1. The effects of monoiodoacetic acid and sodium fluoride on oxygen uptake and carbon dioxide output of eight kinds of yeasts were observed.
2. The sensibility to monoiodoacetic acid varies yeast by yeast, and *Rhodotorula glutinis*, which has less RQ value and produces scarcely any ethyl alcohol, was most stable against monoiodoacetic acid. *Candida utilis* and *Schizosaccharomyces pombe* were sensible to monoiodoacetic acid, but their sensitivity was relatively small. Respiration and fermentation of *Saccharomyces* group which produces actively ethyl alcohol were significantly inhibited. The respiration of *Mycoderma cerevisiae* and *Torula candida* was inhibited most extremely.
3. It required higher concentration of sodium fluoride to inhibit the respiration of yeasts compared with the case of respiratory inhibition by monoiodoacetic acid. The respiratory inhibition by sodium fluoride was relatively small on *Rhodotorula glutinis*. But the respiration of *Saccharomyces cerevisiae* was greatly inhibited.
4. It is conceivable that the yeast received less inhibition on oxygen uptake and carbon dioxide output activity by monoiodoacetic acid and sodium fluoride, the more it depends upon direct oxidation of glucose.

文 献

1. Lodder, J., and Kreger-van Rij, N. J. W., "The Yeasts" (North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1952).
2. Kudriavzev, V. I., "The Systematics of Yeasts" (Academy of Science of the U. S. S. R., Moscow, 1954).
3. Lodder, J., Slooff, W. C., and Kreger-van Rij, N. J. W., "The Classification of Yeasts" in Cook, A. H., "The Chemistry and Biology of Yeasts" (Academic Press, New York, 1958).
4. Wickerham, L. J., Carbon assimilation test for the classification of yeasts. *Jour. Bact.* **56**, 363~371 (1948).
5. Barnett, J. A., Comparative studies of yeasts. *Nature* **186**, 449~451 (1960).
6. Runnström, J. and Alm, F., Über die Gärungshemmung durch Monojodacetat bei Trockenhefe. *Naturwissenschaften* **25**, 74 (1937).
7. Adler, E., Hans v. Euler and Günther, G., Dehydrasen und Jodessigsäure. *Skand. Arch. Physiol.* **80**, 1~15 (1938).
8. Auhel, E. and Szulmajester, J., Contribution à l'étude de la respiration de *Escherichia coli*. II. Action des inhibiteurs sur les deshydrogénase et les phosphatases de *Esch. coli*. *Biochem. et Biophys. Acta* **5**, 255~267 (1950).
9. Stoppani, A. O. M., Actis, A. S., Deferrari, J. O. and Gouzález., Essential role of thiol groups in carboxylase. *Nature* **170**, 842~843 (1952).
10. Massart, L. and C. van Noortgaete, The influence of sodium fluoride and monoiodoacetate on the respiration of baker's yeast. *Naturwissenschaften* **26**, 67~72 (1944).
11. Reiner, J. M., Effect of enzyme inhibitors on transformation of enzymes in the living cell. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **63**, 81~84 (1946).
12. Sakaguchi, K. and Baba, S., The acid fermentation of *Aspergillus niger*. *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **18**, 619~624 (1942).