

[J. Ferment. Technol., Vol. 54, No. 1 p. 11~15, 1976]

フェニルプロパノールおよび関連化合物による清酒酵母 の呼吸欠損変異株の誘発

小嶋 操・加藤木好雄・波多江敬三

福岡大学薬学部

Induction of a Respiration-deficient Mutant of *Saccharomyces saké* by Phenyl Propanols and Related Compounds

Misao Kojima, Yoshio Katohgi and Keizo Hatae

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University
Nanakuma, Nishi-ku, Fukuoka

Induction of a respiration-deficient mutant of *Saccharomyces saké* strain Kyokai no. 7 by four kinds of phenyl propanols and six related compounds was studied. Benzyl alcohol showed higher minimum inhibitory concentration (MIC) than phenol, and the more higher the carbon number of side chain, the lower the MIC was. Induction of petite colonie mutants was detected by overlaying triphenyltetrazolium chloride on the agar plate. When a compound was added directly to the medium, frequency of petite colonies was higher than when an ethanolic solution of the same compound was added. Maximum induction frequencies, 79.7% and 20.9%, were obtained by direct addition and as alcoholic solution of α -phenethyl alcohol, respectively. The other compounds also showed induction effects to some degree.

Petite colonie mutants thus obtained were confirmed to be respiration-deficient mutants as they showed no growth on sodium lactate agar, no oxygen uptake, and did not have cytochrome a and b.

緒 言

酵母の呼吸欠損変異株は Ephrussi らの報告¹⁾以来、とくに、*Saccharomyces* 属酵母について多くの遺伝学的解析や生化学的研究がなされている。^{2~4)} 呼吸欠損酵母は遺伝学的に、2群に分類されている。その1つは、染色体上の遺伝子に変異をもつ核性の呼吸欠損変異株であり、他は細胞質の遺伝因子(ρ -または ρ ho)の欠損による細胞質性のものである。これらの変異株は、寒天培地上で、正常株に比べて小さい集落を形成することから、“petite colonie”(小集落)変異株とよばれている。^{1,5)}

細胞質性の呼吸欠損変異株は、種々の変異誘起物

質²⁾によって誘発されるが、とくに、エビゾームを除去するアクリジン系色素(acriflavine および euflavine)により高率に誘発される。^{6,7)} 福井らは、 α -フェネチルアルコールの清酒酵母に対する効果について検討し、 α -フェネチルアルコール添加、好気培養酵母は呼吸能を全く欠き、そのチトクローム吸収パターンが呼吸欠損菌(ρ^-)のそれと類似していること⁸⁾などより、 α -フェネチルアルコールに呼吸欠損菌誘発作用があり、これが呼吸欠損変異誘発物質⁹⁾であることを示した。Lester¹⁰⁾はフェネチルアルコールおよび関連化合物(フェノール、ベンジルアルコール、3-フェニル-1-プロパノールなど)の *Neurospora crassa* に対する増殖阻害効果を検討し、芳香環と水酸基との間の鎖の長さに

より、この効果が異なることを示唆した。そこで、著者らはフェニルアルコールより炭素数が1個多いフェニルプロパノール4種および関連化合物6種、計10種を用いて、清酒酵母に対する増殖阻害効果を比較検討した。さらに、これらの化合物による呼吸欠損変異株の誘発および誘発率と構造との関係について検討を加え、芳香環の側鎖の α 位に水酸基のある化合物が誘発率の高いことを見出したので報告する。

実験方法

菌株 *Saccharomyces saké* Kyokai no. 7 (協会7号), 日本醸造協会より譲渡をうけ使用した。

フェニルプロパノールおよび関連化合物 供試化合物10種を Table 1 にまとめて示した。No. 1～No. 8 (いずれも東京化成), No. 9 および 10 (ICN-K and K Lab., Inc., USA) を用いた。

前培養 2%ブドウ糖含有の Ogur 液体培地¹¹⁾ を滅菌 T 字管(径 1.5 cm, 長さ 15 cm)に 10 ml とり、常

法により高圧蒸気滅菌後、保存斜面より 1 白金耳接種し、呼吸欠損変異株の自然発生頻度の最低¹²⁾ の 30°C で、18～24時間、モノー式振盪培養機で振盪培養した。

本培養および最小発育阻止濃度 (MIC) の測定 予め滅菌した T 字管中の、2%ブドウ糖含有の Ogur 液体培地に供試化合物をマイクロシリンジで直接、または、供試化合物の 70% エタノール溶液を無菌的に添加し、前培養液より、 10^5 cells/ml になるように接種し、30°C で振盪培養した。

MIC は24および48時間以上振盪培養後の菌発育の有無を肉眼的に観察し、容量%であらわし、石炭酸係数も求めた。

平板培養および TTC (塩化トリフェニルテトラゾリウム) 染色 24時間培養の本培養菌液を 2%ブドウ糖含有の Ogur 寒天平板培地上に、約 200 個の集落が生えるように稀釈塗抹し、30°C で48時間静置培養した。培養後、永井の TTC 寒天重層法⁷⁾ を応用し、集落上に TTC 上層培地⁷⁾ を重層し、30°C, 3 時間放

Table 1. Phenyl propanols and related compounds.

Sample No.	Name	Formula
1	1-Phenyl-1-propanol	$\text{C}_6\text{H}_5-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
2	1-Phenyl-2-propanol	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_3$
3	2-Phenyl-2-propanol	$\text{C}_6\text{H}_5-\underset{\text{OH}}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{CH}_3$
4	3-Phenyl-1-propanol	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_3}$
5	Phenol	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{OH}$
6	Benzyl alcohol	$\text{C}_6\text{H}_5-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}$
7	α -Phenethyl alcohol	$\text{C}_6\text{H}_5-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_3$
8	β -Phenethyl alcohol	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}$
9	1-Phenyl-2-butanol	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
10	Phenyl <i>tert</i> -butanol	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{CH}_3$

置後, TTC 還元性のない, 白くて小さい集落 (小集落) を呼吸欠損変異株とみなし, 全集落に対する誘発率を求めた。

乳酸ナトリウム培地上での発育の有無 TTC 寒天重層法で検出された変異株が, 呼吸欠損変異株であることを確認するために, この変異株が利用し得ない, 非発酵性炭素源, 乳酸ナトリウム, 1% をブドウ糖のかわりに添加した Ogur 寒天平板に塗布し, 生育の有無をしらべた。

呼吸能 (Q_{O_2}) の測定 Yanaco の Oxygen meter, PO-100A 型を用い, 次の条件で行なった。集菌した菌体を, 生理的食塩水で, 10% に県濁し, この 0.1 ml を 2% ブドウ糖含有 M/10 リン酸緩衝液, 2 ml に加え, 30°C で測定し, nm moles O_2 /min/10 mg wet wt. of cells として求めた。

チトクローム吸収パターンの測定 20% 菌県濁液に少量のヒドロサルファイトナトリウムを加えて還元型にしたのち, Shibata のオパールガラス法¹³⁾により, 日立124型自記分光光度計を用いて測定した。

実験結果および考察

最小発育阻止濃度 (MIC) および石炭酸係数 供試化合物, 10種の協会7号に対する MIC および石炭酸係数を Table 2 にまとめた。数回の実験において, MIC は安定しており, 測定誤差はほとんど認められなかった。供試化合物を直接添加およびエタノール溶

液として添加の場合, 48時間以上振盪培養後の MIC は, 化合物 No. 10 で 0.10% の差が認められたにすぎず, 他は同じ値か, 0.05% の差であった。

MIC および石炭酸係数より判定すれば, フェノールによる発育阻止は, CH_2 基 (ベンジルアルコール) の妨害により減じたことになる。しかし, 側鎖の炭素数が増すにしたがって阻止能は増し, 直接添加の場合, 石炭酸係数は No. 1 が 1.0, No. 4 および 9 は 1.3 を示した。また, エタノール溶液添加の場合, No. 4 が 1.0, No. 10 は 1.3 を示した。

これらの結果は Lester の実験¹⁰⁾を裏づけたことになる。フェニルプロパノール異性体 (化合物 No. 1~4) の MIC は, 総体的に No. 2=No. 3>No. 1>No. 4 となり, MIC と構造との相関関係がうかがわれる。

TTC 染色 呼吸欠損変異株の誘発率は, 供試化合物の MIC に比較的近い値で最高⁹⁾になるため, 前実験の MIC 測定結果より, Table 3 に示すような濃度段階とし, 供試化合物を直接添加した場合および 70% エタノール溶液として, エタノールの最終濃度が 0.7% になるように添加した場合の小集落生成の誘発率を数回の実験の平均値として Table 3 にまとめて示した。直接添加の場合, 最高誘発率は, 化合物 No. 1 が 48.8%, No. 2, 15.0%, No. 3, 20.0%, No. 4, 11.4%, No. 5, 4.3%, No. 6, 20.9%, No. 7, 79.7%, No. 8, 3.4%, No. 9, 8.4% および No. 10, 2.8% を示した。福井ら⁹⁾は本実験と誘発条件は異なるが, 培地に 0.15%

Table 2. Minimum inhibitory concentration and phenol coefficient of experimental compounds.

Compound No.	Series	MIC		Phenol coefficient	Series	MIC		Phenol coefficient
		Culture period				Culture period		
		24 hr	48 hr			24 hr	48 hr	
1	A	0.10	0.20	1.0	B	0.20	0.20	0.8
2		0.25	0.25	0.8		0.30	0.30	0.5
3		0.25	0.25	0.8		0.30	0.30	0.5
4		0.15	0.15	1.3		0.15	0.15	1.0
5		0.15	0.20	1.0		0.15	0.15	1.0
6		0.40	0.50	0.4		0.50	0.50	0.5
7		0.30	0.35	0.6		0.30	0.35	0.4
8		0.30	0.35	0.6		0.30	0.35	0.4
9		0.10	0.15	1.3		0.20	0.20	0.8
10		0.20	0.25	0.8		0.15	0.15	1.3

Minimum inhibitory concentration (MIC) was expressed as volume %. Compounds of series A were added directly into culture medium by microsyringe and those of series B were added as ethanolic solution.

Table 3. Frequency of petite colonie mutants appearing on an agar plate.

Compound	Series A		Series B	
	Final concentration (volume %)	Induction frequency (%)	Final concentration (volume %)	Induction frequency (%)
None	—	0.8	—	0.8
Ethanol	0.70	1.1	0.70	1.1
No. 1	0.01	2.6	0.01	2.3
	0.05	48.8	0.05	3.5
	0.10	23.2	0.10	2.5
No. 2	0.05	6.0	0.01	0.2
	0.10	15.0	0.05	0.4
	0.15	4.0	0.10	0.9
No. 3	0.05	10.0	0.01	0.7
	0.10	20.0	0.05	0.9
	0.15	15.0	0.10	1.8
No. 4	0.01	1.9	0.01	0.5
	0.05	11.4	0.05	0.7
	0.10	3.5	0.10	0.4
No. 5	0.01	3.3	0.01	5.8
	0.05	4.3	0.05	4.0
	0.10	2.0	0.10	4.1
No. 6	0.10	5.5	0.10	10.4
	0.20	11.8	0.20	8.3
	0.30	20.9	0.30	4.8
No. 7	0.10	44.2	0.10	6.9
	0.15	59.8	0.15	20.9
	0.20	79.7	0.20	18.8
	0.25	49.2	0.10	1.9
No. 8	0.10	3.4	0.15	1.8
	0.15	2.1	0.20	1.1
	0.20	0.7		
No. 9	0.001	1.8	0.001	3.8
	0.01	2.9	0.01	3.4
	0.05	8.4	0.10	3.0
No. 10	0.01	2.0	0.01	3.8
	0.05	2.8	0.10	3.1
	0.10	1.2	0.20	2.6

の α -フェニルアルコールの添加で、60.9%の誘発率を得ており、本実験では同濃度で、59.8%となり、非常に近似した値であった。しかし、0.20%の添加では、彼らは49.2%と減じた値を示したが、本実験では、供試化合物中、最高値の79.7%を示し、0.25%の添加で49.2%と減じた。これは培地、培養条件などの違いによる差であろう。7号酵母の呼吸欠損変異株の自然誘発率は、大で、約1%⁹⁾といわれ、本実験では0.8%であった。10種の供試化合物はいずれも自然発生率より高い誘発率を示していることより、呼吸欠損変異株誘発剤として作用しているものと思われる。エタノール溶液添加の場合、No. 1よりそれぞれ、3.5%、0.9%、1.8%、0.7%、5.8%、10.4%、20.9%、1.9%、3.8%および3.8%の最高誘発率となり、いずれも直接添加の場合より低い値を示した。とくに、フェニルブ

ロパノール類の場合、誘発率は低下した。0.7%エタノール添加の場合、誘発率の平均値は1.1%となり、無添加の自然誘発率より常にわずかに高い値を示したから、エタノールも弱い誘発剤とみなされる。しかし、エタノールと供試化合物とが共存する場合、相殺効果が示されたことになる。この点については、現在検討中である。

誘発率と供試化合物の構造との関係については、直接添加の場合、芳香環の側鎖の α 位に水酸基がついている化合物 (No. 1, No. 3, No. 6 および No. 7 の4種) はいずれも、誘発率が高く、20%以上であった。 β 位に水酸基がついている化合物 (No. 2, No. 8, No. 9 および No. 10 の4種) および γ 位の No. 4 は低かった。したがって、誘発率と MIC との間には、規則性はないように思われる。なお、フェニルブプロパノール類の

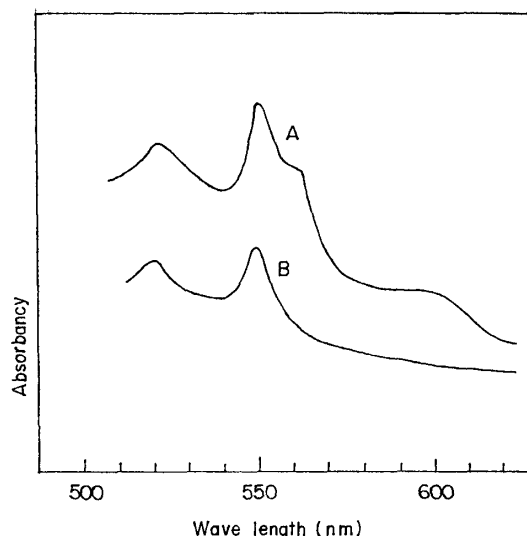


Fig. 1. Visible region absorption spectra of the reduced form of cytochromes of parent and respiration-deficient mutant of *Saccharomyces sake* Kyokai no. 7.

The respiration-deficient mutant induced by 1-phenyl-1-propanol and the parent strain were suspended in Sørensen's phosphate buffer (pH 7.0) to a final concentration of 20%. Absorbance was measured by Shibata's opal glass transmission method.¹³⁾ Sodium hydrosulphite was used as the reducing agent of cytochromes in cells. Curve A is for parent strain, and curve B for respiration-deficient mutant.

誘発率は No. 1>No. 3>No. 2>No. 4 の順になった。

乳酸ナトリウム培地上での発育の有無, Q_{O_2} およびチトクローム吸収パターン 平板培養により生成した, 大小の集落をそれぞれ白金耳でかきとり, 2% ブドウ糖含有の Ogur 寒天斜面に接種, 30°C で培養した菌を保存し, 次の実験を行なった。

これらの菌を非発酵性の乳酸ナトリウム培地上に画線すれば, 大集落よりのものは生育したが, 小集落よりのものはいずれも生育しなかった。また, 大集落(野生株)の Q_{O_2} は平均 61.0 nm moles O_2 /min/10 mg wet wt. of cells を示したが, 小集落よりの菌はいずれも 0 に近い値を示し, 呼吸欠損変異株の特徴を示した。チトクローム吸収パターン例は Fig. 1 のごとく, 大集落(野生株)よりの菌は典型的なチトクローム a (600 nm), b (563 nm) および c (550 nm) を有していたが, 10種の供試化合物添加により得られた小集落はいずれも, チトクローム a および b を欠き, c のみを有していた。以上の実験結果より, TTC 寒天重層法により生成した小集落は呼吸欠損変異株と同定した。

要 約

フェニルプロパノール 4 種および関連化合物 6 種による, 清酒酵母(協会 7 号)の呼吸欠損変異株の誘発実験を行なった。

まず, 供試化合物の最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。置換基に CH_2 を有するベンジルアルコールはフェノールの MIC より高い値であったが, 置換基の炭数素が増すにしたがい, MIC は低くなり, 3-フェニル-1-プロパノール, 1-フェニル-2-ブタノールおよびフェニル-*tert*-ブタノールはフェノールとほぼ同じ MIC を示した。次に, TTC 寒天重層法により, 小集落生成をたしかめた。供試化合物を直接培地に添加した場合, α -フェネチルアルコール添加酵母が最高の 79.7%, ついで, 1-フェニル-1-プロパノールが 48.8% の小集落生成率を示すなど, 供試化合物すべてに小集落生成が認められた。供試化合物をエタノール溶液として添加した場合, 生成率は低くなった。得られた小集落について, 乳酸ナトリウム培地上での発育の有無, 呼吸能 (Q_{O_2}) およびチトクローム吸収パターンをしらべ, これらは呼吸欠損変異株と同定された。

本研究の一部は日本薬学会九州支部, 第87回例会(昭49.5 於福岡大学)において発表した。本研究を進めるにあたり, 終始有益なご討論をいただいた, 静岡薬科大学講師, 森田 全博士に深謝する。

文 献

- 1) Ephrussi, B., Hottinguer, H., Chimenes, A. M.: *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, **76**, 351 (1949).
- 2) Nagai, S., Yanagishima, N., Nagai, H.: *Bacteriol. Rev.*, **25**, 404 (1961).
- 3) 長尾, 杉村: 化学と生物, **4**, 527 (1966).
- 4) 三宅: 蛋白質核酸酵素, **13**, 1053 (1968).
- 5) Slonimski, P. P.: *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, **76**, 510 (1949).
- 6) Ephrussi B.: "Nucleo-cytoplasmic relations in microorganisms", Claredon Press (1953).
- 7) Nagai, S.: *Science*, **130**, 1188 (1959).
- 8) 山城, 西原, 谷, 福井: 醸工, **49**, 16 (1971).
- 9) 山城, 谷, 福井: 醸工, **49**, 313 (1971).
- 10) Lester, G.: *J. Bacteriol.*, **90**, 29 (1965).
- 11) Ogur, M., John, R. S.: *J. Bacteriol.*, **72**, 500 (1956).
- 12) Ogur, M., Ogur, S., John, R. S.: *Genetics*, **45**, 189 (1960).
- 13) Shibata, K., Benson, A. A., Calbin, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **15**, 461 (1954).

(昭50.11. 4受付)