

理化学研究所 ニュース

Mar.—1977

No. 44

酵母菌の性ホルモンの化学

1 *Saccharomyces cerevisiae* の 性的凝集能誘導因子

酵母菌というと、すぐにアルコール飲料を思い出す人が少なくないだろう。酵母菌はそれほどまでに、私たちの生活になじみの深い存在である。しかし、酵母菌に性の区別があるということは、意外と知られていないのではないだろうか。

ビールをつくったり、パンを焼いたりするときに使われる *Saccharomyces cerevisiae* とよばれる酵母菌には、性が分化していない homothallic (同株) の系統のもの、性の分化した heterothallic (異株) の系統のものがある。どちらの系統でも、ふつうは、2組の遺伝子セットを持つ二倍体 (diploid) の細胞として分裂、増殖をつづけていく。ところが、栄養の欠乏など、生育に不利な条件下におかれると、胞子を形成する。胞子は遺伝子セットを1組しかもたない半数体 (haploid) であって、胞子の形成は、とりもなおさず減数分裂の過程とみなされる。Homothallic な酵母菌では、生育の条件がととのえば、2個の同質の胞子が無差別に接合し、ふたたび二倍体の細胞として増殖していく。ところが、heterothallic な系統のものでは、オスとメスに相当する a および α 型の接合型がある。どちらがオスで、どちらがメスであるかはきめられていないが、a 型細胞と α 型細胞

胞を別々にしておけば、それらは半数体細胞として分裂、増殖をつづけていく。しかし、a 型細胞と α 型細胞とを混合すると、両者は接合し、ふたたび二倍体としての世代をはじめる (図1)。

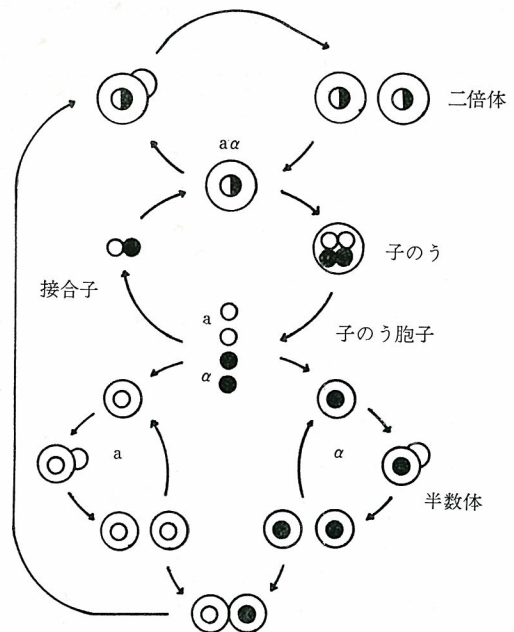


図1 Heterothallic な *Saccharomyces cerevisiae* の生活史

ところで、a 型細胞と α 型細胞とを混ぜ合わせるとき、最初に認められる顕著な現象は、両型細胞の凝集反応である。そのさい、a 型細胞と α 型

細胞とは1:1の割合で集まるのではなく、つぎつぎと無差別に集合して大きな塊りとなる。ついで、異型の細胞が1個ずつ接合し、さらに細胞質の融合から核の融合へと進んでく(図2)。

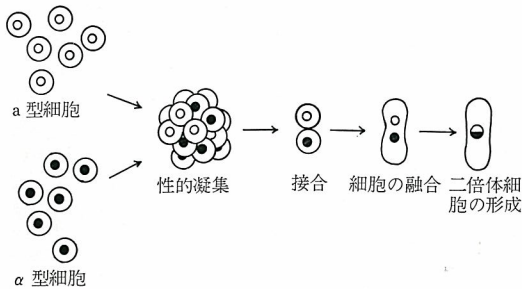


図2 Heterothallic な *Saccharomyces cerevisiae* の接合過程

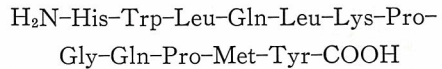
1972年、大阪市立大学理学部の坂井・柳島両氏は、この性的凝集反応の過程について重要な事実を発見した。すなわち、a型細胞には、α型細胞と混ぜたとき、すぐに凝集反応を起こす菌株と、混合後数十分たってから凝集する菌株とがあることを確認するとともに、前者を constitutive (構成的)な菌株、後者を inducible (誘導的)な菌株と名づけた。そして、inducible なa型細胞の菌株においては、α型細胞が分泌するある種のホルモン様物質(α substance-I)によって性的凝集能が誘導されると推論した。私たち農薬合成第3研究室の研究者は、この発表にひじょうな興味を覚え、柳島氏らに協力して、この性ホルモンの単離に取り組むことになった。それは、細胞の相互認識ないしは分子認識の機構について、なにがしかの化学的知見を提示しうる可能性を意識したからである。

桜井はまず、α substance-I の生物検定法をつぎのように設定した。被検試料の溶液と inducible なa型細胞とを混合して2時間振とうしたのち、そこへα型細胞の懸濁液を加えて、20分間振とうする。試料にα substance-I が含まれていれば、両型細胞の凝集が、肉眼ではっきり認められる。

いざ、活性因子の精製、単離にとりかかってみると、私たちは、そのむずかしさに圧倒される感じであった。しかし最終的には“T22”とよばれるα型細胞の培養液300 l から、およそ10段階の

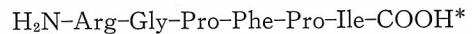
精製行程を経て、活性ペプチド2.1mgを純粋な形で得ることができた。このホルモンの活性はまことに顕著で、0.4ng/ml というきわめて低い濃度においても、a型細胞に明らかな性的凝集能を誘起した。

桜井はさっそく、α substance-I のアミノ酸組成をしらべ、さらに Edman-dansyl 法と臭化シアニン分解法とを併用して、アミノ酸の結合順序をつぎのように決定した。



なお、これらの実験の過程で、α型細胞に属する“H15”とよばれる菌株も、培養液中にα substance-I をつくっていることを知ったので、それについて精製を進め、1.2mgのペプチド性活性物質を得ることができた。しかし、それは“T22”株から単離した物質と明かに別なものなので、α substance-I_B と名づけ、先に得られたものをα substance-I_A とよぶことにした。I_Bの活性はI_Aのそれよりやや劣ったが、それでも2ng/ml という低濃度で、a型細胞に性的凝集能を誘起させた。

I_Bのアミノ酸組成とN末端アミノ酸(アルギニン)は常法によって決定したが、構造解析に用いる試料の量が少ないので、坂田はマスマスペクトロメトリーによってアミノ酸配列をつぎのように決定した。



2 *Rhodosporidium toruloides* の接合管形成誘導因子

酵母菌にはいろいろな種類があり、そのなかに *Rhodosporidium toruloides* とよばれるものがある。1967年、(財)発酵研究所の伴野氏は、この酵母菌が有性生殖を行っていることを明らかにし、二つの接合型をA型およびa型と名づけた。1975年、東京大学応用微生物研究所の福井助教授らは、A型細胞とa型細胞の接合過程について興味

* His ヒスチジン, Trp トリプトファン, Leu ロイシン, Gln グルタミン, Lys リシン, Pro プロリン, Gly グリシン, Met メチオニン, Tyr チロシン, Arg アルギニン, Phe フェニルアラニン, Ile イソロイシン

ある発表を行った。まずA型細胞がある種の性ホルモン(A factor)を分泌する。a型細胞はそれに感応して接合管を形成するとどうじに、別種のホルモン(a factor)を分泌する。A型細胞はそれを受取って接合管を形成する。ついでA型細胞とa型細胞は、たがいに接合管を伸ばして結びつき、最終的に接合管を通じて核の融合が行われる(図3)。私たちは、福井氏らに協力して、これらの性的因子の単離と構造解析を行うことになったが、その手はじめとして、この菌の接合現象の“引き金”役を果たしているA factorの精製、単離を試みることにした。

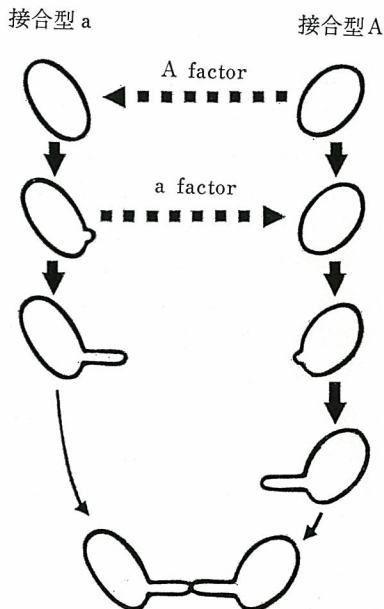


図3 *Rhodosporidium toruloides* の接合過程

A factorの単離に先立ち、神谷はつぎのような生物検定法を組立てた。すなわち、a型細胞を含む寒天フィルムをつくり、その小片を被検試料の溶液に数時間浸したのち、顕微鏡で観察する。試料のなかにA factorが含まれていれば、寒天中のa型細胞に明らかな接合管形成が認められる。

酵母エキスとショ糖から成る培地中でA型細胞をタンク培養し、得られる培養液300 lを減圧濃縮したのち、ブタノール抽出した。この抽出液を濃縮して得られる活性粗粉末を、9段階の精製にかけて、ついに1.2mgの活性因子を純粹に単離

することに成功した。このホルモンは、20ng/mlの濃度まで、a型細胞の接合管形成を誘導する。

このようにして得られたA factorはペプチドとしての性質を示す。それはきわめて不安定で、室温でも容易に変質して、活性を失う。したがって、この物質は、メタノール溶液にして、 -20°C 以下に保存しておかなければならない。

神谷は、A factorを塩酸で加水分解したのち、加水分解物をアミノ酸アナライザーにかけ、この物質が、つぎに示すアミノ酸を等モルずつ含んでいることを明かにした。

アスパラギン酸、トレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、イソロイシン、チロシン、アルギニン

A factorの紫外線吸収スペクトルは、トリプトファンとチロシンとの1:1混合物のそれと完全に一致する。さらにその吸収強度から、A factorは上述の10種のアミノ酸各1モルから成るデカペプチドであることが確かめられた。そのN末端がチロシンであることは、dansyl法によってきめられたが、他のアミノ酸の結合順序は最終的に決定されていない。試料の量が余りにも少なく、しかもそれがいちじるしく不安定であることが、実験を進める上で大きな障害となっている。A factorが、たくさんの極性アミノ酸を含みながら脂溶性に富むこと、アルギニンを含みながら塩基性が弱いことなど、ふつうのペプチドの物理化学的性質と矛盾する点が少なくない。これらの問題は、その特異な生理活性と関連づけて、こんご解明されるべきことがらであって、当面、全力をあげて構造解析を進めつつある。

*Saccharomyces cerevisiae*や*Rhodosporidium toruloides*の性現象の化学的解明が、より高等な生物における性現象の一般的な理解につながっていくかどうか、現在の段階ではまだ何んともいえない。しかし私たちは、これらの研究を通じて、どのように微量な生理活性物質でも、必ずそれらを単離し、構造を解析し得る確信をいただき、またそれを支える実験的な手法を確立することができたと考えている。

農薬合成第3研究室
主任研究員 田村三郎

開発テーマ この欄には、当所で行っている基礎研究から育った応用的研究の成果を紹介します。これら新技術の芽が、広く産業界に活用されていくことを期待しています。この欄に対するお問い合わせは、開発調査室へお寄せください。

電導度測定装置と交流ポーラログラフ装置

—高精度・迅速測定のための新方式—

はじめに

今回は、当所の無機化学研究室で開発した、高精度で迅速な測定を目的とした電導度測定装置やポーラログラフ装置について紹介します。無機化学研究室では、電解質溶液の電導度や活量係数、拡散定数の精密測定をもとに、電解質の溶存状態の研究を進める一方、電解質や有機化合物の電極反応の解析やその制御法についての研究を行っています。これらの研究を通して、電解質溶液の電導度の温度依存性を精密かつ迅速に測定する装置や、極低濃度の重金属の検出や定量に役立つ交流ポーラログラフ装置などが開発されて来ました。以下にこのような特定の研究目的から一般的な測定装置へと、今後の応用面が期待されるいくつかの測定装置および測定法について説明します。

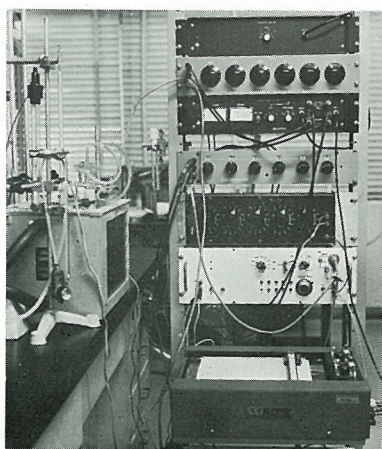


図1 電導度—温度依存性測定装置

1 電導度測定装置

電導度—温度依存性測定装置

電解質溶液の重要な物性の一つとしてその電気伝導度（電導度）があげられます。電導度の測定結果からは、溶液中での電解質のイオンの価数や電離度、イオンの大きさ、イオン同士やイオンと溶媒との相互作用などについての多くの知見を得ることが出来ます。また、電導度の測定から直接溶液中の電解質の濃度を推定したり、濃度変化を電導度でモニターすること、及び電導度滴定として精密な化学分析の手法にも用いられています。電導度測定はこのように広く利用されているにもかかわらず、電解質溶液の電導度を測ることを目的にして設計された測定器は意外に少ないのが現状です。

従来の電導度の測定には交流インピーダンスブリッジを用いて特定の温度にセットした恒温槽中に電導度セルを浸して測定する方法がとられています。しかし、ブリッジを子細にゼロ調したり、多くの測定温度で精密に恒温槽をセットすることは容易でなく、このため電導度の温度依存性に関するデータは質・量ともに充分には得られていません。このような測定上の難点を解決したのが本測定方法で、まず電導度は、セル・コンダクタンスと基準抵抗のコンダクタンスの差を演算増幅器を用いた交流リニア・ブリッジによって検出し、これを位相敏感検波してX-YレコーダーのY軸に供します。一方、セル内の温度はサーミスタ感温素子によって約1/1000°Cの感度で検出してレコ

ーダーのX軸として記録します。この方法では、溶液の温度はセル外部の温度を目的の温度付近でゆるやかに変化させればよく、溶液の温度を目的の値に正確に設定する必要がなく、測定は迅速に行われます。また種々の試料の各温度における電導度を比較するのに適したデータが得られます。

また、この装置は測定温度のレンジを広げることによって、広い温度範囲の電導度—温度特性を直視することも出来、試料の温度特異性の発見などに役立っています。

交流4電極法

溶液の電導度を測るため通常は、例えば図2左に示すような一對の白金黒付白金電極を封入した2電極用の電導度セルが用いられています。これに対し、交流4電極法では電極溶液界面の分極の問題が除去されるため白金黒付白金電極を用いる必要はなく、例えば図2右に示すような単純なガラス製セルを用いることができます。測定上重要なセル定数はこのセルの形状で決まり、電極の挿入位置やその材質に影響されにくく、このためセルの製作や洗浄、乾燥、保守が極めて容易です。また試料溶液と電極との接触が少なく、電極によって触媒反応を起こす系や、コロイド系や生体物質などの電極との接触によって影響を受け易い物質を測定できる利点があります。

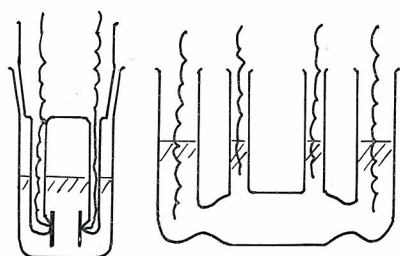


図2 従来の電導度測定用2電極セル(左)と交流4電極法のためのセル(右)

このような4電極セルでの測定のために、4電極用ポテンショスタット装置やガルバノスタット装置を試作しましたが、いずれの装置でも良い測定結果が得られています。

2 ポーラログラフ装置 位相弁別交流ポーラログラフ

交流ポーラログラフとは、電極に微小の交流電圧を重畳した直流電圧を加え、その時起る電極反応に伴って流れる交流電流と直流加電圧との関係を調べる方法をいいます。従来までの交流ポーラログラフが、この交流電流の大きさのみを測定していたのに対し、位相弁別交流ポーラログラフでは交流加電圧と同相成分の交流電流（コンダクタンス成分）と90°移相した成分（サセプタンス成分）とを分離して測定しています。電解系の交流的な特性を解析するためにはこのような両成分の測定が必要で、従来はブリッジなどによる煩雑な測定を必要としていました。

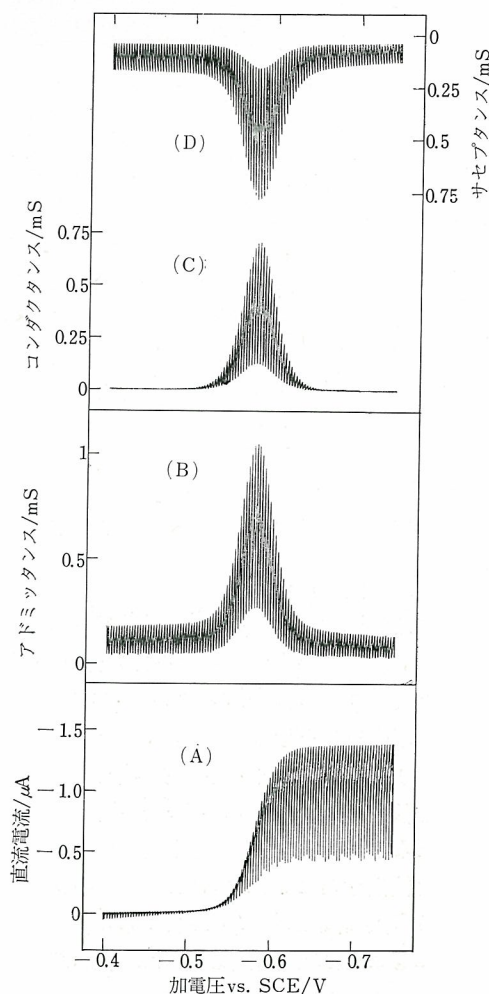


図3 1M KNO₃中のCd(I)のポーラログラム

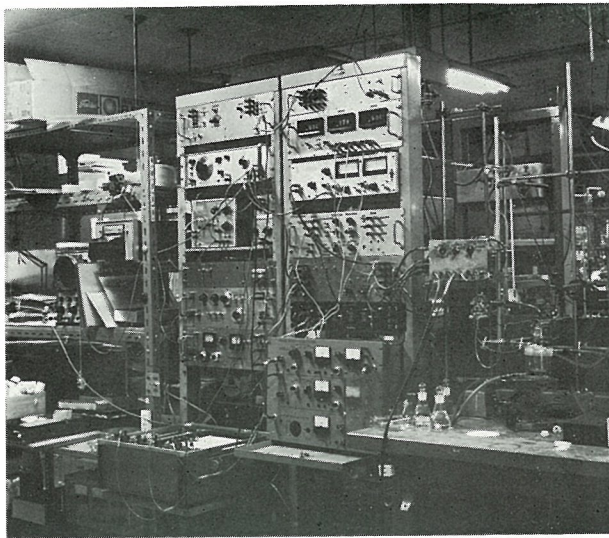


図4 種々の測定条件に対応して、各種ポーラログラフの開発に活躍する総合ポーラログラフ装置

図3は2ミリモル(約200ppm)のカドミウムイオンの電解還元に伴うポーラログラフ波です。下から直流(A)および交流(B)ポーラログラム、位相弁別交流ポーラログラフ法によるコンダクタンス成分(C)およびサセプタンス成分(D)を示しています。(C)においては(B)や(D)に見られるベース電流(ピーク以外の部分の容量性の電流)がほとんど現われていず、このコンダクタンス成分によるポーラログラムはピークの高さを用いる定量分析においては大変高い感度を得ることができます。この方法を用いた好条件下の分析ではカドミウムや鉛イオンの 5×10^{-8} モル(数ppb)の極低濃度の定量までが可能となっています。これは従来方法よりも約2けた高い分析感度となっています。

矩形波ポーラログラフ

この方法は先の交流ポーラログラフが微小信号として正弦波を用いたのに対し、微小矩形波電圧を加えたものです。矩形波電圧の後半部に相当する電流を検出することによって、矩形波の初期に見られる多大な残余電流(電気二重層の充電電流)を除去することができます。このため分析方法としては、先のコンダクタンス成分による交流ポーラログラフと同様に高い分析感度を得ることが

できます。この方法を更に改良して、矩形波波形の任意の時間および任意の時間幅で電流をサンプリングする方法を取り入れ、分析装置としてのみならず、電極反応の解析などに役立つような装置が完成しました。特に矩形波の $\frac{1}{4}$ 周期の位置での電流は電極反応速度の測定に便利な情報として利用されます。

おわりに

以上に電気化学の研究から発展改良された測定装置について述べましたが、これらはいずれも従来からの方法に最近のエレクトロニクスによる高性能で廉価な手法を取り入れたものです。これらの改良によって単なる分析機器や多大な労力と時間を必要とした精密測定法を迅速で高精度な測定方法に発展させることができました。さらにこれらの測定法では、いわゆる“素性の知れた測定量”すなわち物理的意味の明確な測定量が得られるように考慮されています。このような測定技術は、より複雑な系での分析や解析が要求されつつある今後の科学技術の進歩の一助になるものと期待されます。

発明・考案リスト

昭和51年11月～12月に公開になったもの

公開番号	出願番号	発明・考案の名称
51-125355	50-40728	抗菌性及び抗腫瘍性関連物質の製造法
51-125736	49-138998	農園芸用殺菌剤（共願）
51-125750	49-106891	//
51-125978	50-32804	抗血栓性人造器官材料
51-130065	50-53716	アルカリ性セルロース廃液の浄化方法
51-133483	50-56545	光利用の培養装置
51-135579	50-59833	圧力検出装置
51-136601	50-83234	有機ニトロ化合物の水素添加法
51-141776	50-66273	金属含有スラッジの不溶化と再資源化処理法
51-144785	50-67974	α -ガラクトシダーゼの製造法
51-146882	50-70387	消泡装置付投込型比色計
51-146889	50-70388	有機化合物の酸素定量法
51-151389	50-74820	微生物によるスクワレン酸化物の製造法（共願）
51-84485	50-1779	温度測定回路（実用新案）
51-100134	50-18948	デジタルコンパス（実用新案）
51-151683	50-71707	金属定量用試料の灰化装置（実用新案）

技術相談

当所は、戦前の(財)理化学研究所以来の長い伝統をついで、物理、化学、工学、農学の幅広い分野において基礎から応用にあたる高水準の試験研究を行っておりますので、その成果とポテンシャルを広く社会に役立てることに心がけております。

当所のご利用にご関心のある方のために、技術相談に応じます。無料ですので、お気軽にご利用ください。

■ 技術相談の内容

当所の普及業務の利用

特許権等の実施許諾

受託研究（受託試験を含む）

委託研究生

受託分析

サイクロトロンイオンビーム照射

各種研究報告書の頒布

図書館の利用

■ 一般的技術相談

技術開発，研究遂行上の諸問題

科学技術に関する一般的情報

■ その他当所利用の相談

講演会，セミナー等についての協力等

■ 技術相談の窓口

技術相談は、開発調査室へお問い合わせください。

■ 技術相談の取り計らい

1. 当初の普及業務の利用が適当である場合
担当部局にご紹介いたします。
2. 一般的技術相談に該当する場合
技術相談の内容により、必要に応じ、当所の専門家または当所以外の専門試験研究機関にご紹介いたします。



曼陀羅華

以前庭の隅に、ヨウシュチョウセンアサガオ（洋種朝鮮朝顔）の種を播いてみたことがあった。夏の頃、茄子をやや粗大にしたような枝葉の中に、大ぶりの朝顔といった感じで、うす紫色の花が咲いた。秋風が吹くと、刺を密生したくるみ大の実が生り、不快な臭気を発するうちに、やがて真っ黒な種子がもりもり中から溢れ出して来た。これを見届けてから、焼捨ててしまったことを覚えている。熱帯アメリカ原産のこのナス科植物、*Datura tatura* L. は、たまたま空地の草むらの中に見掛けることがあるが、元来薬草として、明治初年我が国に移植されたものが野生化したという。喘息の薬として有用なことは今も変わらないが、とにかく葉であれ種子であれ、猛毒を持っていて油断がならない。紀ノ国紀ノ川のほとり、有吉佐和子の“華岡青洲の妻”が、雨に濡れながら袂に摘んだ白い曼陀羅華の花は、この近縁のチョウセンアサガオであった。漢の名外科医華陀の用いた幻の麻酔薬「麻沸散」の再現に没頭していた青洲は、この曼陀羅華に草烏頭を混じ、さらに白芷、当帰、川芎、天南星を合した。実験を重ねるうち、毒性の為に狂い死にした犬猫の数は何十にも及んだが、試行錯誤の末に、麻酔薬「通仙散」は完成、後は人体実験を残すのみという段階に入って青洲はためらった。その時先を争って自らの人体実験を名乗って出たのが、彼の老母と若い妻であっ

た。傍目には美しいこの争いも、実は姑と嫁の命を賭した激越な戦いであった。母が、次いで妻が麻酔薬を飲んで実験は了ったが、遂に妻の視力は戻らなかった。しかし、まさにそのことによって妻は姑に勝った。やがて江戸時代も末の文化2年（1805年）青洲は世界最初の全身麻酔による乳岩の手術に成功した。米国におけるエーテル麻酔、英国でのクロロホルム麻酔の利用に先立つこと、ざっと40年である。“曼陀羅華”とは梵語で“天上に咲く花”であるという。その幻覚作用が飲む者を天上の楽園へと誘うからであろうか。この草の汁を嗅飲し、おのが未来図をそこに見て、成人の儀式を祝う風習は、米国西南部、中南米の諸部族の間に見出されるそうである。ともあれ一つの植物の薬理効果が解明される迄の長い試行錯誤の過程には、悲劇も喜劇もあったであろう。米国におけるこの草の俗名Jimson (James town) Weedの由来はこうである。独立宣言から遡ること百年、反インディアン運動の旗頭ベーコン等の反乱勢力は、英国植民地ヴァージニアの首都James townを40日に亘って占拠していた。奪回に向かった植民地政府軍はこの町に進撃して野営した。当番兵が料理して出した路傍の野草が何とこの *Datura* で、気の狂った兵士達が正気に戻るのに11日かかったという。畏多くも英国王の名を冠したこの町は、以来“きちがいなすび”の通り名となって、米国建国の歴史の中に長く記憶されることとなった次第である。

有機合成化学研究室
研究員 大澤 富彦

◆理研シンポジウムのお知らせ

◇テーマ 次世代の科学技術用計算

とき 3月25日(金) 10:00~17:00

ところ 理化学研究所第二会議室

主催 情報科学研究室

◇テーマ 放電応用装置と気体エレクトロニクス

とき 3月31日(木) 10:30~18:45

ところ 理化学研究所第二会議室

主催 プラズマ物理研究室

共催 文部省総合研究班、放電研究グループ

理化学研究所ニュース No. 44, Mar. 1977

編集発行・理化学研究所
編集責任者・宮崎友喜雄

埼玉県和光市広沢2番1号
〒351 (0484)-62-1111(代表)