

長波長紫外光による酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 細胞膜機能の損傷

荒見真一郎・秦 恵・板谷安佐子・山下智子
蜂谷欽司^{a)}・鑛山宗利^{a)}・多田幹郎

(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Received July 1, 1993

Damage of Membrane Functions in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Near-UV Irradiation

Shin-ichiro ARAMI, Megumi HADA, Asako ITADANI, Satoko YAMASHITA,
Kinji HACHIYA^{a)}, Munetoshi KANAYAMA^{a)} and Mikiro TADA
(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)

When the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was exposed to near-UV radiation, survival of yeast cells decreased with increasing fluence. In order to examine mechanism for the appearance of this biological photo-response, the fluence-response curves for disruption of the permeability barrier of the cell membrane and damage to the active transport system by near-UV irradiation were measured.

The survival of yeast cells decreased to approximately 50% with near-UV fluence of 10 J/ml. The same fluence caused the disruption of the permeability barrier in the cell membrane and resulted in non-selective leakage of potassium and sodium ion and permeation of normally impermeable substance into yeast cells.

Near-UV fluence of 5 J/ml, at which there was little effect on the survival of yeast cells, resulted in significant decrease in velocity of amino acids uptake and selective leakage of potassium ion. It was deduced from these results that ion-pump and/or ion-channel systems and active transport systems were sensitive to slight changes in membrane structure caused by photochemical reaction. In addition, on the basis of kinetics, it was suggested that decrease in velocity of amino acids uptake were not due to damage to receptors on the membrane surface but damage to the transport system after reception of amino acids.

緒 言

光と生物の関係において、光はエネルギー源としてあるいは環境情報の伝達因子として、生物の生命の維持と正常な成育に対して重要な役割を果たしている反面、有害因子としての作用も併せ持っている。

光が細胞の増殖を阻害する現象は“細胞の不活性化”と称され、古くから知られている有害因子としての光が関与する光生物現象である。この光生物現象の発現機構についての研究は、主に紫外光による DNA 損傷の観点から行われ、ピリミジンの二量体形成を主とする“直接作用による DNA 損傷^{1,2)}”及び“光増感作用による DNA 損傷³⁾”が見いだされ、その化学機構

a) 岡山大学 R I 共同利用津島施設 (Radioisotope Laboratory of Okayama University)

についての知見が多く報告された。そして、DNA 損傷が細胞の光不活性化の主要因であると考えられていた²⁾。これに対して、R.M. Tyrrell ら⁴⁾は長波長紫外光 (UV-A) ではピリミジン二量体の形成など DNA 損傷が非常に起こり難いことから、長波長紫外光による細胞の不活性化は細胞膜構成成分の光化学変化に由来する可能性があることを指摘した。この指摘を受けて、照射の細胞膜機能への影響についての研究が活発に行われ、炭素源としての糖やアミノ酸及びイオンの輸送など細胞の成育や増殖及び正常な細胞活動に重要な役割を果たしている細胞膜機能が損傷を受けていることを示す多くの現象が報告された⁵⁻¹¹⁾。しかし、これらの研究の大部分は原核細胞である細菌について行われたもので、真核微生物での研究は極めて少ない。原核細胞と真核細胞の細胞膜は、構成成分や機能において異なり、長波長紫外光による細胞膜機能への影響も異なることが予想される。伊藤ら^{12,13)}は、真核微生物で真菌類に属している酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の変異株を用いて、DNA 損傷が生じる光量よりも少ない量の長波長紫外光照射によって増殖の阻害が起ることを認め、巧妙な手法でそれが細胞膜の透過障壁能の損傷に起因する可能性を示した。本研究では、伊藤らの研究を基にして、酵母 *S. cerevisiae* に長波長紫外光を照射して、能動輸送能への影響をアミノ酸の取り込み速度を指標として調べ、透過障壁能への影響について細胞内電解質の漏出および細胞膜非透過性物質の拡散的浸入を指標として調べた。

材料及び方法

1. 供試菌株と培養条件

本研究に用いた *Saccharomyces cerevisiae* IS66-4C α は、岡山大学薬学部の小野文一郎助教授より譲り受け、培養には YPD 培地 [1% yeast extract, 2% bactopecton, 2% glucose (1.5% agarose)] を用い、27°C で暗所で好氣的に連続培養した。そして、対数増殖期中期、後期及び定常期の菌体を実験に供した。

2. 照射光源及び照射方法

光照射は菌体を OD₆₀₀ = 0.5 [0.6mg dry cell wt/ml] になるように脱塩蒸留水に懸濁し、この菌体懸濁液を四面光学石英セル (10×10×45mm) に入れ、氷冷しながら行った¹⁴⁾。照射光源には放射波長域 300~400nm で最大放射波長光 360nm を持つ BLB 蛍光灯 (National FL20S-BLB) を用いた。なお、照射光強度は 14W/m² であり、1時間照射すると懸濁液への入射光量は 5J/ml となる。

3. 増殖阻害の検定

光照射した菌体の増殖阻害 (光不活性化) の測定はコロニーカウント法によって検定した。YPD 寒天培地プレートに被験菌体が50個体程度になるように光照射した菌体懸濁液を寒天プレートに添布し、27°C で48時間の培養後、プレートに生じたコロニー数を計測して生存率を求めた。

4. アミノ酸取り込み速度の測定

アミノ酸取り込み速度の測定は Brandriss らの方法¹⁵⁾に準じて行った。被照射菌体懸濁液 1ml を分取し、3,000×g の遠心分離により得た細胞を 0.9ml の窒素源を除いた完全合成培地 (N-フリーSD培地) に懸濁し、これに放射能濃度を 100kBq/ml に調製した各種アミノ酸の 2.5mM 溶液を 0.1ml 加えた (比放射能: 400Bq/nmol)。そして、30°C で30分間インキュベートした後、10mM 氷冷アミノ酸溶液を 2ml 加えることにより取り込み反応を停止させた。その後、反応液をメンブレンフィルター (Millipore 0.8 μ m) で濾過し、10mM アミノ酸溶液で菌体を 2回洗浄した。この濾集・洗浄した菌体を液体シンチレーションカウンターに供して放射能を測定し、その値からアミノ酸の取り込み量を算出した。

5. 細胞内電解質漏出の測定

光照射による細胞膜機能損傷の指標の一つとした細胞内電解質の漏出は、一定時間光照射した細胞懸濁液 50ml を 3,000×g で遠心分離して菌体を除いた細胞外液の比電気伝導度の変化を測定 (TOA CM20E) することによって追跡した。また、 Na^+ と K^+ の漏出量は、この細胞外液を希釈して原子吸光分析 (HITACHI 180-30) に供することによって求めた。

6. 細胞膜非透過性物質侵入の測定

細胞膜に大きな損傷が生じると、本来細胞内部には侵入しない物質が拡散的に侵入することが考えられる。*p*-nitrophenylphosphate (PNPP) は健全な細胞に浸透しないが、細胞膜の透過障壁能に損傷が起こって細胞内に侵入すると、細胞内の phosphatase によって加水分解され *p*-nitrophenol (PNP) が生成される⁹⁾。このことを利用して光照射による細胞膜の透過障壁能の変化を調べた。被照射菌体懸濁液 10ml を 3,000×g で遠心分離し、得られた菌体を 3.6ml の 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.5) に懸濁して、これに終濃度が 1 mM になるように 0.4ml の PNPP を加えた後、30℃ で 1 時間インキュベートした。その後、反応液に 1 M の炭酸ナトリウムを 1.0ml 加えて反応を停止させ、遠心分離で細胞を除去した後、加水分解生成物 PNP を 400nm の吸光度測定 (SHIMADZU spectronic 20) により定量した。

結果及び考察

1. 増殖に及ぼす長波長紫外光照射の影響

培養開始後10時間 (対数増殖前期)、20時間 (対数増殖後期) 及び定常期に達した40時間目に集めた酵母菌体に長波長紫外光を照射して、増殖に及ぼす影響をコロニー形成を計測する方法によって調べた。照射した全菌体のうちコロニー形成能を有している菌体の割合を生存率とし、照射光量と生存率との関係を光量一効果曲線として表した (Fig. 1)。光量一効果曲線はいずれも閾値を持ったシグモイド曲線を示し、生存率は光量に依存して低下した。光に対する感応は培養時間の延長に伴って低下し、生存率を50%にまで低下させる光量は対数増殖前期の菌体では 5.9J/ml であるが、中期および定常期の菌体ではそれぞれ 8.1, 10.8J/ml であった。

伊藤らは⁹⁾、長波長紫外光による DNA 損傷は、遠紫外光のそれと比較して、非常に低い頻度でしか生じないことを認め、長波長紫外光による細胞の不活性化は細胞膜損傷に起因すると提唱した。本研究に用いた光源は伊藤らが使用したものと同一の UV-A 光源であり、酵母の増殖阻害を DNA 損傷で説明することはできない。それゆえ、伊藤らの提唱した細胞膜損傷の観点に立って以下の実験を行った。

2. 透過障壁能への影響

細胞膜の重要な機能である透過障壁能に及ぼす影響を細胞内電解質の漏出と非透過性物質の細胞内への侵入を指標として調べた。

培養開始後20時間及び40時間目に集めた菌体

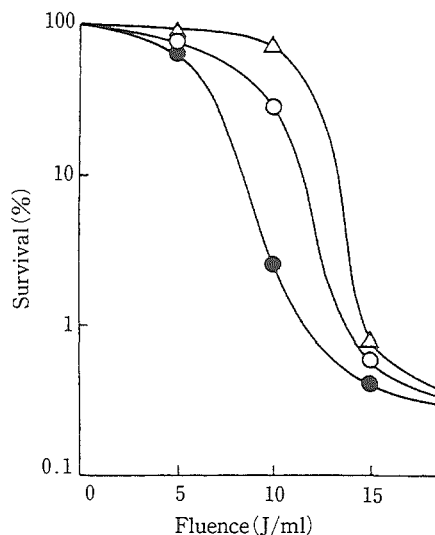


Fig. 1 Effects of near-UV irradiation on growth of yeast cells. Cells were suspended in distilled water and exposed to near-UV. (●): exponential mesophase cells cultured for 10 hr in liquid YPD medium, (○): exponential anaphase cells cultured for 20 hr, (△): stationary phase cells cultured for 40 hr.

を脱塩蒸留水に懸濁して照射し、細胞外液の比電気伝導度を調べた結果を Fig. 2 に示した。定常期の菌体においては光量に依存した緩やかな増加を示したが、対数増殖期の菌体では、10 J/ml の入射光量までは顕著な比電気伝導度の増加は認められず、それ以上の光量で急激に増加した。このような急激な比電気伝導度の増大は、細胞膜に大きな変化が生じたことを予想させる。さらに、対数増殖期の菌体で行った実験の細胞外液中のカリウムとナトリウムイオン濃度を測定し、その結果を Fig. 3 に示した。カリウムイオンについては、照射の開始と共に漏出が始まり、10 J/ml までは光量に依存して直線的に増加し、それ以上の光量になると急激な増加傾向を示した。一方、ナトリウムイオンについては、10 J/ml までの光量では漏出は全く認められず、それ以上の光量で急激な増加が認められた。両イオンが 10 J/ml 以上の光量で急激に漏出したことは、比電気伝導度の増大を反映するもので、この光量以上の照射によって細胞膜の構造に大きな変化が生じて透過障壁能が劣化するものと考えられる。また、10 J/ml 以下の光量でカリウムイオンのみが選択的に漏出したことは、カリウムポンプやカリウムチャンネルの機構が特異的に損傷を受けていることを予測させると共に、低い光量の照射でも細胞膜の機能に何らかの影響が生じることを予想させた。

非透過性物質の細胞内への拡散的浸入についての実験は、伊藤らの方法に準じて PNPP を用いて行った (Fig. 4)。本実験においても、Fig. 2 に示すように、培養時間によって感応に差があり、対数増殖期の菌体のほうが感受性が高い。しかし、その光量-効果曲線のパターンは類似している。即ち、10 J/ml 以下の光量では顕著ではないが、それ以上の光量において PNP の生成が急激に増大した。この PNP の生成は、本来非透過性である PNPP が細胞内に浸入して、そこでホスファターゼ的作用によって生成した PNP が細胞外に漏出したことを意味する。なお、ホスファターゼが細胞外に漏出していないことを、細胞外液に PNPP を加えても PNP が生成されないことから確認した。これらの結果は、細胞膜内で長波長紫外光照射による構成成分の

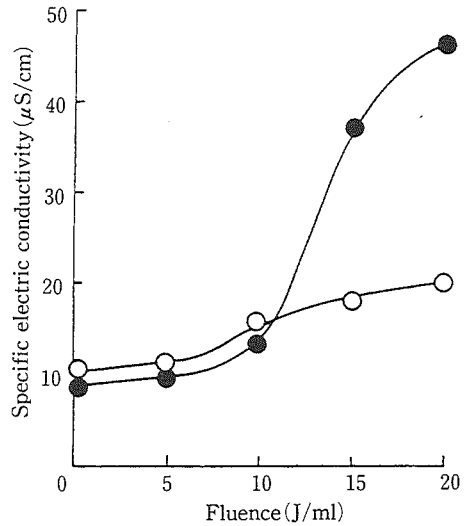


Fig. 2 Effects of near-UV irradiation on leakage of intracellular electrolytes from yeast cell. Cells were removed from the suspension immediately after irradiation by centrifugation, and the specific electric conductivity of the medium was measured. (●): exponential anaphase cells, (○): stationary phase cells.

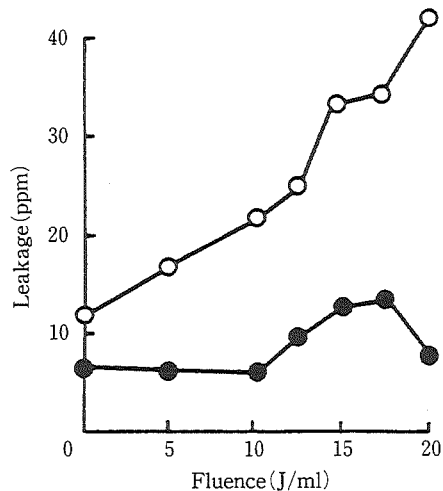


Fig. 3 Dependence on near-UV fluence for leakage of potassium ion and sodium ion. The same sample solution as that used for experiment in Fig. 2 was subjected to measure. (○): potassium ion, (●): sodium ion.

光化学変化が進行し、細胞膜の構造に大きな変化が起こり、酵素分子は通さないがPNPPのような低分子は通す小孔が生じたことを暗示している。

3. 能動輸送能に及ぼす影響

生命維持に必須の細胞膜機能である能動輸送能に及ぼす長波長紫外光の影響を、アミノ酸の取り込み速度の変化を指標として調べた。本実験には、培養開始後20時間目に集めた菌体を使用し、8種のアミノ酸（ロイシン、フェニールアラニン、トリプトファン、チロシン、プロリン、セリン、ヒスチジン、アスパラギン酸）について検討した。

個々のアミノ酸について調べた結果、いずれのアミノ酸についても低い光量で取り込み速度の急激な低下が起こり、5J/mlの光量で未照射の20%にまで低下し、10J/mlの照射によってアミノ酸の取り込みはほぼ完全に阻害された。この取り込み速度低下の光量-効果曲線はアミノ酸の種類によって異なるが、それらは典型的な3つのパターンに大別されることが示された(Fig. 5)。

ヒスチジン、ロイシン及びセリンの光量-効果曲線は明確な閾値を有するシグモイド曲線を描き、フェニールアラニンとアスパラギン酸のそれは閾値を持たないシグモイド曲線を描いた。それに対して、トリプトファン、チロシン及びプロリンの4種の取り込み速度は指数関数曲線を描いて急激に低下した。このように、アミノ酸取り込み速度への影響は、すべてのアミノ酸に対して一様に同じ程度に現れるのではなく、アミノ酸の種類によって異なって現れる。例えば、トリプトファンのような双曲線型の光量-効果曲線を有する場合、ヒスチジンの取り込みが影響を受けないより低い光量でアミノ酸の取

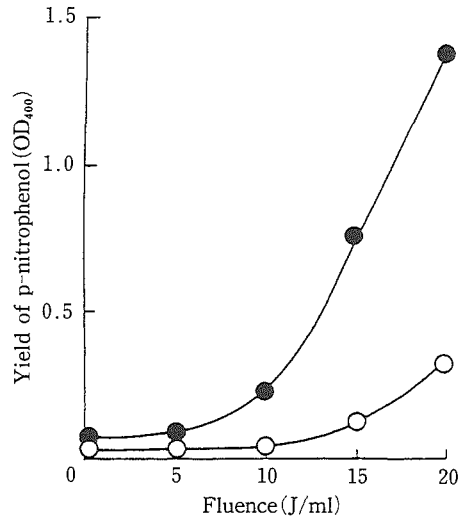


Fig. 4 Effect of near-UV irradiation on permeation into cell of normally impermeable substrate *p*-nitrophenyl phosphate. The *p*-nitrophenyl phosphate permeated into cells was hydrolyzed to *p*-nitrophenol by intracellular phosphatase. The *p*-nitrophenol leaking out of the cells was measured spectrophotometrically at 400 nm. (●): exponential anaphase cells, (○): stationary phase cells.

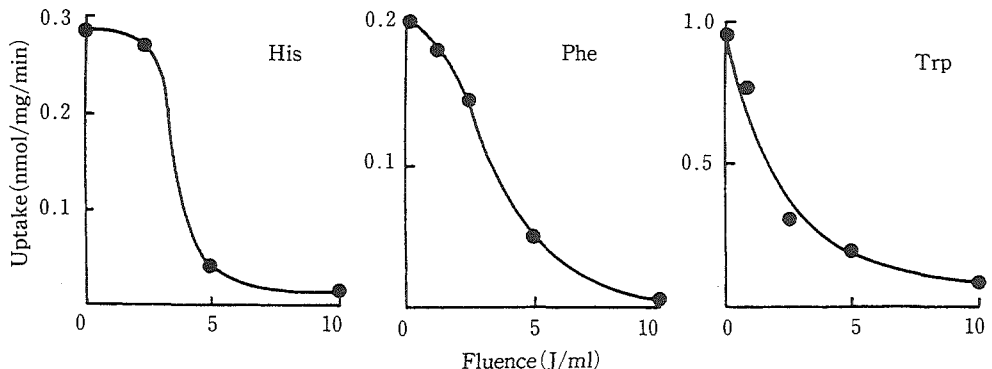


Fig. 5 Different pattern fluence-response curve for decrease in the rate of amino acids uptake caused by near-UV irradiation. In this experiment exponential anaphase cells were used.

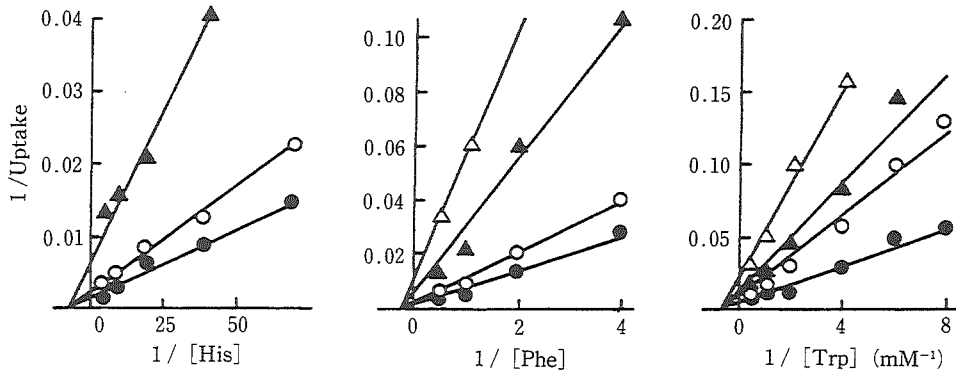


Fig. 6 Lineweaver-Burk plots, the rate of amino acids uptake into cells exposed to near-UV of different fluences is plotted against the concentration of amino acids. The exponential anaphase cells were exposed to near-UV fluence of 0 (●), 2.5 (○), 5.0 (▲) and 7.5 J/ml (△).

り込みが阻害されることが理解される。このことは、酵母が個々のアミノ酸に対して独自の能動輸送系を持っていることに起因すると考えられる。次いで、長波長紫外光によるアミノ酸能動輸送能の低下機構についての知見を得るために、光量-効果曲線の異なる3種のアミノ酸について、Lineweaver-Burk plotsを作成して、その取り込み速度低下の動力学的解析を試みた。その結果、Fig. 6に示したように、何れについても照射によって取り込み速度は著しく低下するにもかかわらず、Km値は変化しないことから、アミノ酸の受容部位に対する親和性は変化しないことが示された。このことは、長波長紫外光によって細胞膜表面のアミノ酸レセプターは影響を受けず、細胞膜内での輸送機構に損傷が生じるために取り込み速度の低下が起こったことを示している。

以上の実験結果から、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対する長波長紫外光照射による影響の発現について次のような推察を行うことが可能である。

酵母に長波長紫外光が照射されると、細胞膜内で光化学反応が進行し、膜構成成分に変化が生じる。照射光量が少ない場合には細胞膜構成成分の変化は少ないが、細胞膜の高次構造の微妙な変化によって制御される機能、例えばアミノ酸の能動輸送やカリウムイオンの排出などはこの段階で影響を受ける。しかし、この程度の変化は比較的速やかに回復されるために、コロニー測定法による増殖阻害としては現れて来ない。さらに照射光量が高くなり10J/mlに近づくと、光化学反応による細胞膜構成成分の変化も速やかな回復が困難となる程に激しくなり、細胞膜の高次構造に損傷が生じる。この高次構造の損傷は細胞膜の透過障壁能の破壊をもたらす、結果的に増殖を著しく阻害する。

摘 要

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に長波長紫外光を照射すると、酵母の生存率は光量に依存して急激に低下した。この現象の発現機構についての知見を得るために、細胞膜機能として非常に重要な透過障壁能と能動輸送能の長波長紫外照射による損傷について、光量-効果曲線を作成して調べた。

酵母に10J/mlの長波長紫外光を照射すると生存率は50%に低下する。この照射光量は、細胞膜の透過障壁能の破壊を引き起こし、細胞内のカリウムイオンおよびナトリウムイオンの非選択的漏出と細胞膜非透過性物質の細胞内への侵入をもたらした。

5J/ml以下の光量は酵母の生存率にほとんど影響を与えないが、アミノ酸の取り込み速度

の著しい低下とポンプあるいはチャンネル機構の損傷を予想させるカリウムイオンの選択的漏出をもたらした。また、動力学的解析結果から、アミノ酸の取り込み速度低下の要因は、細胞膜表面に存在するレセプターの損傷によるものではなく、受容以降の輸送系の損傷によることが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、菌株の譲渡のみならず有益な助言を頂いた本学薬学部小野文一郎助教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) Boyce, R.P. and P. Howard-Flanders : Release of ultraviolet light induced thymine dimers from DNA in *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **51**(2), 293—300 (1964)
- 2) Grossman, L. and E. Rodgers : Evidence for the presence of cytosine photohydrates in UV-irradiated nucleic acids. Biochem. Biophys. Res. Commun., **33**(6), 975—983 (1968)
- 3) 伊藤 敦 : 光による核酸障害. 遺伝, **45**(10), 44—48 (1991)
- 4) Tyrrell, R.M. : Induction of pyrimidine dimers in bacterial DNA by 365 nm radiation. Photochem. Photobiol., **17**, 69—73 (1973)
- 5) Ito, T. and K. Kobayashi : *In vivo* evidence for the photodynamic membrane damage as a determining step of the inactivation of yeast cells sensitized by toluidine blue. Photochem. Photobiol., **26**, 581—587 (1977)
- 6) Moss, S.H. and K.C. Smith : Membrane damage can be a significant factor in the inactivation of *Escherichia coli* by near-ultraviolet radiation. Photochem. Photobiol., **33**, 203—210 (1981)
- 7) Tuveson, R.W. and M.E. March : Photodynamic and sunlight inactivation of *Escherichia coli* strains differing in near-UV sensitivity and recombination proficiency. Photochem. Photobiol., **31**(3), 287—289 (1980)
- 8) Wagner, G., G. Geissler, R. Linhardt, A. Mollow and A. Vonhof : Light-dependent ion transport processes and photosensory transition in *Halobacterium*. Dev. Plant. Biol., **4**, 641—644 (1980)
- 9) Ito, A. and T. Ito : Possible involvement of membrane damage in the inactivation by broad-band near-UV radiation in *Saccharomyces cerevisiae* cells. Photochem. Photobiol., **37**, 395—401 (1983)
- 10) Siegel, S.M. and C. Corn : Thermal nad ionic factors in the ultraviolet photolysis of plant cell membranes. Physiol. Plant., **31**, 267—270 (1974)
- 11) Robb, F.T., J. Hauman and M.J. Peak : Similar spectra for the inactivation by monochromatic light of two distinct leucine transport systems in *E. coli*. Photochem. Photobiol., **27**, 465—469 (1978)
- 12) Ascenzi, J.M. and J. Jagger : Ultraviolet action spectrum (238—405nm) for inhibition of glycine uptake in *E. coli*. Photochem. Photobiol., **30**, 661—666 (1979)
- 13) Sharma, R.C. and J. Jagger : Ultraviolet (254—405nm) action spectrum and kinetics of alanine uptake in *Escherichia coli* B/R. Photochem. Photobiol., **33**, 173—177 (1981)
- 14) Tada, M. and M. Shiroishi : Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* II. Aspects of photoregulative reaction. Plant Cell Physiol., **23**(3), 549—556 (1982)
- 15) Lasko, P.F. and M.C. Brandriss : Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol., **148**, 241—247 (1981)