

長波長紫外光照射による酵母 *Rhodotorula minuta* 細胞膜エルゴステロールの分解

中馬 誠^{a)}・荒見真一郎^{b)}・秦 恵^{c)}・中川 一郎^{d)}
村田 芳行^{a)}・多田 幹郎
(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Photodecomposition of Ergosterol by Near-UV irradiation
in the Plasma Membrane of the Yeast *Rhodotorula minuta*

Makoto Nakauma^{a)}, Shin-ichiro Arami^{b)}, Megumi Hada^{c)},
Ichiro Nakagawa^{d)}, Yoshiyuki Murata^{a)} and Mikiro Tada
(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)

In search for primary photochemical reaction related to photoinduced carotenogenesis and photoinactivation in yeast *Rhodotorula minuta*, the influence of near-UV radiation (300-400 nm) on ergosterol in the plasma membrane of the yeast was studied.

Irradiation by near-UV of intact cells and the plasma membrane preparation from the yeast caused changes in their absorption spectra. For the plasma membrane, difference spectra measured after irradiation of near-UV suggested the decomposition of ergosterol and the suggestion was proved by HPLC analysis. Experiments in model systems revealed that ergosterol itself was the photoreceptor in the photochemical reaction, and that there was not any other photoreceptor or photosensitizer which was related to photochemical reaction of ergosterol decomposition in the plasma membrane.

Key words : *Rhodotorula minuta*, near-UV, ergosterol, absorbance change

緒 言

光と生物の関係において、光はエネルギー源あるいは環境情報の伝達因子として生命の維持と正常な生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。

赤色酵母 *Rhodotorula minuta* におけるカロテノイド生合成は光によって誘導され、その誘導合成の速度と生成量は光の強度によって制御される¹⁾。このカロテノイド生合成の光制御が光化学反応過程、酵素合成過程、カロテノイド合成過程の3過程から成っていることが明らかにされているが^{2,3,4)}、光化学反応過程についての物質レベルでの知見は極めて少ない。多田ら⁵⁾は、本酵母におけるカロテノイド光誘導

合成の作用スペクトルを調べ、この光生物現象に関わる光受容体は400 nm より短波長域の光を吸収し、280 nm 近辺に極大吸収波長をもつ物質であることを推察したが、その物質の特定には至っていない。秦らは *R. minuta* 菌体に UV-B (280~320 nm) 光を

Received October 1, 1997

- a) 岡山大学大学院自然科学研究科
(Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University)
b) 現 農林水産省食品総合研究所
(National Food-Research Institute)
c) 現 神戸大学理学部
(Faculty of Science, Kobe University)
d) 現 九州農政局
(Kyushu Regional Agricultural Administration Office)

照射した時、菌体の吸収スペクトルに微細な変化が生じることを見だし、その変化が細胞膜エルゴステロールの分解に起因することを示し、エルゴステロールの光吸収波長域が作用スペクトルの範囲にあることを根拠に、この光化学反応がカロテノイド光誘導合成に関わる可能性を述べた⁶⁾。

一方、荒見らは長波長紫外光 (UV-A光) が酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の増殖遅延をもたらし、より高い光強度では細胞内電解質の漏出を引き起こすことを見だし、それらの現象が細胞膜エルゴステロールの光分解に起因することを明らかにした^{7,8,9)}。また、秦らは *R. minuta* 菌体に UV-B 光を照射した時に生じる細胞内カリウムイオンの選択的排出にエルゴステロールの光分解が関わっていることを推察している¹⁰⁾。

本研究は、細胞膜エルゴステロールの光化学分解とカロテノイドの誘導合成あるいは細胞膜の機能損傷との関係についての知見を得る目的で、UV-B に比べてより長波長域の光 (UV-A光) を用いて同様な実験を行った。

材料と方法

1. 供試菌株と培養条件

大阪発酵研究所より1978年に譲り受け、その後当研究室で継代培養されている酵母 *Rhodotorula minuta* (Saito) Harrison var. *texensis* (IFO 1102) を用い、培養にはアスパラギン培地¹⁾を使用した。あらかじめ、種菌培養寒天斜面の菌体を100ml容三角フラスコに入れた15mlの培地に懸濁して、26°Cで48時間、暗所で振とう前培養し、その全量を500ml容坂口フラスコに入れた150mlの培地に加えて26°Cで48時間暗所で振とう培養し、この培養で得られた菌体を実験に供した。

2. 細胞膜画分の調製方法

暗所培養した *R. minuta* を遠心操作 (1500×g, 10 min) で集菌し、脱塩水で2回洗浄した後、25 mM EDTA を含む30 mM リン酸カリ緩衝液 (pH; 7.0) で洗浄して菌体表層の2価カチオンを除去した菌体を、10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH; 7.50, 25 mM ソルビトールを含む) に懸濁し、冷却しながらフレンチプレス (1.5 t/cm²) で破碎した。菌体破碎後、2300×g (10 min) の遠心操作によって得られた上清を、続いて15000×g (60 min) の遠心操作に供し

た。次いで、得た沈澱物を不連続ショ糖密度勾配 [10, 20, 30, 40% ショ糖 (3:3:3:2/v:v:v:v), 100,000×g (90 min)] に供し、ショ糖20%の画分を細胞膜画分とした。

3. リポソームの調製方法

上記の *R. minuta* 細胞膜画分から Allen-Good の法に従って総脂質を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供してクロロフォルム (中性脂質)、アセトン (糖脂質)、メタノール (リン脂質) 溶出画分に分画した。エルゴステロールを含むリポソームを調製する場合は3画分を混合し、含まないリポソームの場合はアセトン、メタノール画分を混合して用いた。リポソームの調製は静置水和法に従って行った。脂質を少量のエーテルに溶かして200ml容三角フラスコに入れ、窒素ガスを噴射してエーテルを蒸発させながら三角フラスコの底面に脂質の薄膜を形成させ、ここに脱塩蒸留水を静かに注ぎ込んだ後、24時間室温で静置して巨大リポソームを得た。

4. 照射光源及び照射光量

長波長紫外光の照射光源には、BLB 蛍光灯 (National FL20S BL-B) を4本並べたものを使用した。この光源の照射光強度は $1.4 \times 10^{-3} \text{ J/sec} \cdot \text{cm}^2$ であり365 nm を中心とした UV-A 領域 (320~400 nm) の長波長紫外光を放射する。なお、光量はアクチノメトリーによって求めた。その原理は、光照射によって、 $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ の反応を起こし、生成された Fe^{2+} をフェナントロリン比色法によって定量することに基づいている。光量は次のようにして求めた。生成された Fe^{2+} を a (mol/ml)、光の主波長におけるエネルギー量を B (erg/einstein)、照射時間を t (min)、量子収率を C (mol/einstein) とすれば、照射光強度 I (erg/ml·min) および照射光量 E (erg/m) は、それぞれ、 $I = a \cdot B / C \cdot t$ 、 $E = I \cdot t$ で表される。

5. 照射方法

菌体に直接照射する場合は340 nm における吸光度が0.15になるように、細胞膜調製品への照射の場合は、その濃度が5 mg-protein/mlになるように滅菌水に懸濁させ、その懸濁液を四面石英セル (1.0×1.0×4.5 cm) に入れ、そのセルを石英製照射容器の中央に固定して、マグネットスターラーで常時攪拌しながら光照射した。また、試料の低温保持のためにポンプで氷水を循環させながら照射を行った。この方

法でセル中の溶液に照射される光強度は、 1.0×10^{-2} W/mlであった。なお、リポソームへの照射についても同様に行った。

6. 吸収スペクトル及び差スペクトルの測定

光照射した試料は自記分光光度計(島津二波長/ダブルビーム自記分光光度計 UV-3000)を使用して、一定時間毎に、220~340 nmの波長域における吸収スペクトルを測定した。また試料に生じた微妙な吸収スペクトルの変化を明確にするために、光照射前の試料と光照射後の試料の吸収スペクトルの変化を差スペクトルを測定することによって求めた。

7. エルゴステロールの HPLC による定量

細胞膜画分中のエルゴステロールの定量は、HPLC 分析によって行った。それらの方法を次に示す。

- a) HPLC 分析供与試料の調製：5 mg-protein に相当する細胞膜調製品に90%-エタノールを5 ml加えて10分間沸騰湯浴中で還流した後、エタノール2.5 mlと水2.5 mlを加えて10 mlとした。次に、メンブレンフィルター(TM-4, 0.2 μ m)で濾過して不溶物を除き、その濾液5 mlをSEP PACK C-18カートリッジにゆっくりと通してカートリッジにエルゴステロールを吸着させる。次いで、イソプロピルアルコールでエルゴステロールを溶出させ、溶出液を5 mlに定容して HPLC 供試液とした。
- b) HPLC 条件：カラムには、Inertsil ODS (5 μ m, 4.6 \times 150mm)を使用し、エタノール：メタノール：水(10：86：4)の混合溶液を溶出溶媒として用いた。流速は1.5 ml/minとし、検出は280 nmの吸光度によった。
- c) 定量方法：HPLC に出現したピークの同定は、エルゴステロール標品との保持時間の比較により決定し、定量はあらかじめ求めた標準線に基づいて行った。

結果及び考察

1. 長波長紫外光照射(UV-A光)によって細胞および細胞膜に生じる吸収スペクトル変化

暗所成育菌体に UV-A 光を低温下で3時間照射して生じた吸収スペクトル変化とこのスペクトル変化を差スペクトルで経時的に追跡した結果を Fig. 1 に示した。

照射時間の延長に伴って260 nm 付近の吸収の低下が生じ235 nm 付近の吸収の増加が起こる。そして、

両方の波長域での吸収の増加と減少は同時に起こるのではなく、低波長域での吸収増加は減少に比べてかなり遅れて起こるように思われる。このような現象は UV-B 光照射の場合にも認められており、照射によって細胞壁画分および細胞質画分にも吸収スペクトル変化が生じるが、その変化の程度は少なく、細胞膜で生じる変化が大きく寄与していることが明らかにされている。そこで、*R. minuta* の細胞膜調製品を使用して同様な照射実験を試みた。

Fig. 2 は2時間の照射によって生じる吸収スペクトルの変化とその間の経時変化を差スペクトルで追跡した結果である。未照射試料の吸収スペクトルに見られる250~300 nm にかけての弱い吸収が照射によって減少し、代わりに250 nm 以下の低波長域での吸収が増大した。そして、差スペクトルからも250~300 nm の吸収の減少に伴って230 nm を中心とする波長域で吸収の増加が起こっていることが認められる。この250~300 nm での吸収低下を詳細に調べると、変化したスペクトルに265, 272, 282, 295 nm ピークが存在することが認められる。また、235 nm での吸収増加量と282 nm での吸収の減少量は、共に照射光量に比例してほぼ直線的に増大した(Fig. 3)。また、吸収の増加と減少は255 nm に等吸光度点を持って進行し、UV-A 光照射した場合に起こる物質の化学変化(減少と増加)は化学量論的に進行していることが予測された。

真菌類の細胞膜構成脂質中にはエルゴステロールが含まれている。このエルゴステロールは紫外光照射によってプレカルシフェロールに容易に変換されることが知られている。それ故、UV-A 光照射によって生じた265, 272, 282, 295 nm での吸収低下は、細胞膜中のエルゴステロールが光化学反応を受けて分解したことを強く予想させる。

2. 細胞膜エルゴステロールの光分解

細胞膜調製品に UV-A 光を照射して細胞膜のエルゴステロール含有量の経時変化を調べた(Fig. 4)。調製した細胞膜画分のエルゴステロール含有量は16 μ g/mg-protein であるが、光照射時間の延長に伴って、エルゴステロール含有量は指数関数曲線を描いて著しく減少し、180分の光照射によって細胞膜画分に含まれる総量の65%のエルゴステロールが分解され、含有量は5 μ g/mg-protein になった。また、Fig. 5の結果から、282 nm での吸光度の減少量とエルゴス

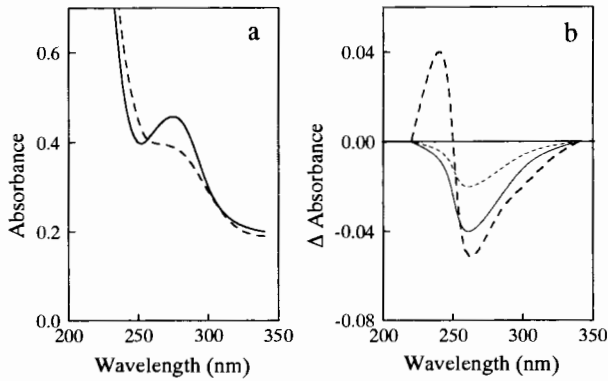


Fig. 1 Effects of near-UV irradiation on absorption spectrum of intact cells of *R.minuta* : (a) absorption spectra before (—) and after (---) irradiation for 180 min ; (b) the difference spectra after irradiation for 60 min (.....) , 120 min (—) and 180 min (---).

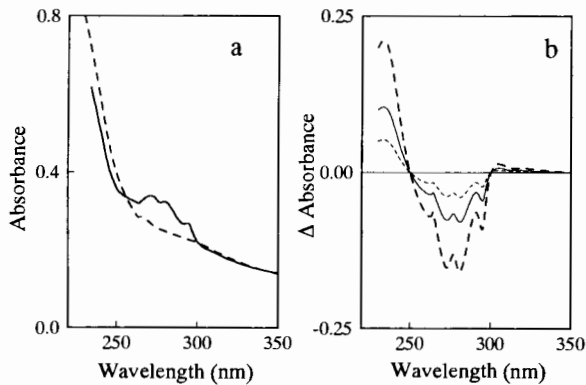


Fig. 2 Effects of near-UV irradiation on absorption spectrum of membrane preparation from *R.minuta* cells (a) absorption spectra before (—) and after (.....) irradiation for 120 min ; (b) the difference spectra after irradiation for 30 min (.....) , 60 min (—) and 120 min (---).

テロール含有量の減少量との間には直線的な比例関係があることが示され、このことから、UV-A 光を照射によって生じる250~300 nm の波長域での吸収度の減少はエルゴステロール含有量の減少を直接反映していることを示し、282 nm の吸光度の減少量からエルゴステロール含有量の減少量を求めることが可能であることを示している。

3. モデル系におけるエルゴステロールの光化学反応

細胞膜エルゴステロールが UV-A 光 (300~400

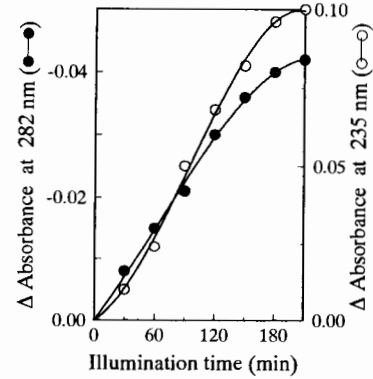


Fig. 3 Time course of absorbance changes of membrane preparation from *R.minuta* cells during irradiation by near-UV : ●, decrease in absorbance at 282 nm. ○, increase in absorbance at 235 nm.

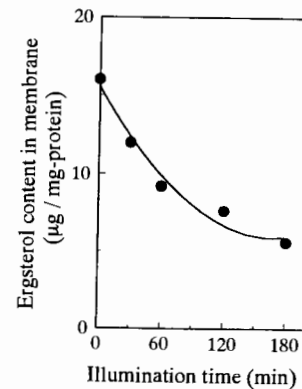


Fig. 4 Time course of decrease in ergosterol content of membrane preparation from *R.minuta* cells during irradiation by near-UV.

nm) の照射によって分解されることを認めたが、この光化学反応の光受容体が何であるかについての知見を得るために、言い換えると、細胞膜エルゴステロールの光分解に特別な光受容体あるいは光増感物質が介在しているか否かを確かめるために、モデル系におけるエルゴステロールの UV-A 光照射による分解を調べた。

照射に先立って、モデル系での吸収スペクトルを比較すると、Fig. 6 に示したように、エタノール中のエルゴステロールの吸収波長域は概ね300 nm 以下の領域にあるのに対して、0.2%-SDS 溶液では僅かに長波長側にシフトしてスペクトルの形も変化する。すなわち、吸収極大波長での相互の強度比が異なると共に、エタノール中では吸収がゼロに等しい

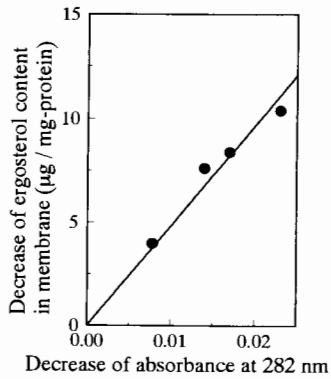


Fig. 5 Relationship between the decrease in absorbance at 282 nm and the decrease in ergosterol content of membrane preparation from *R.minuta* cells.

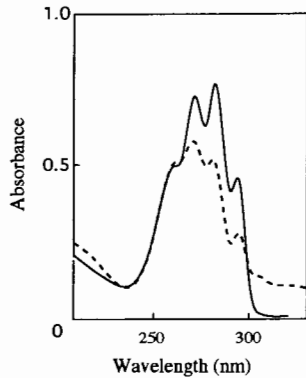


Fig. 6 Absorption spectra of ergosterol : dissolved in ethanol (—), solubilized in 0.2 %-SDS solution (-----).

300 nm 以上の波長域に弱いながら吸収が認められるようになる (データは示さないが、リポソームにおいても SDS-溶液中と同様なスペクトルが観察された)。この結果は、エルゴステロールの吸収スペクトルは自由溶液中に存在する場合と、SDS-ミセルやリポソーム中のように、一定の配向をもって存在する場合とでは異なり、本実験に使用した光源の放射波長域光の吸収率は後者のほうが高くなることを示している。

このような予測に立って、エルゴステロールのエタノール溶液、0.2%-SDS 溶液および *R.minuta* から調製した総脂質を用いて作成したリポソームに UV-A 光を照射して、エルゴステロールの光分解を差スペクトルの変化で追跡した。それらの結果は Fig. 7 に示したように、予測通りにエタノール溶液中では変化が少ないのに対して、SDS-ミセルや水に分散したリポソームにおいては比較的容易にエルゴステロールの分解が生じている。

これらの結果は、UV-A 光によるエルゴステロールの光化学分解には特別の光受容体や光増感物質の介在は必要とせず、この光化学反応の基質であるエルゴステロール自身が光エネルギーを直接吸収していること、エルゴステロールは一定の配向を保っている時に、より多くの UV-A 光を吸収することができ、それによって比較的容易に分解されることを示している。そして、酵母細胞膜中のエルゴステロールは一定の配向をもって存在するため、特別の光受容体や光増感物質の介在なしで、UV-A 光によって比較的容易に分解されると考えられる。

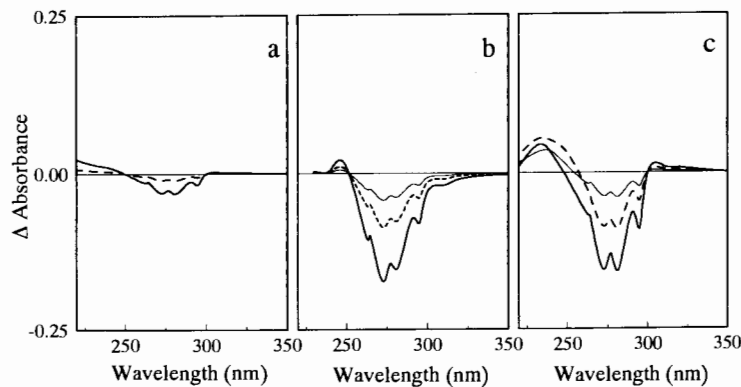


Fig. 7 Photochemical decomposition of ergosterol by near-UV radiation : ergosterol was dissolved in ethanol (a), solubilized in 0.2 %-SDS solution (b), buried in liposome prepared with lipids extracted from membrane preparation of *R.minuta* cells (c). Difference spectra were measured after irradiation for 30 min (—), 60 min (-----) and 120 min (— · —).

長波長紫外光が細胞の増殖を遅延・阻害する現象は広く知られており、長波長紫外光の作用点は細胞膜であると推測されていた。荒見らは、酵母 *S. cerevisiae* の UV-A 光による増殖の遅延・阻害がエルゴステロールの分解によってもたらされる細胞膜機能の低下によることを示した^{8,9)}。本研究において、酵母 *R. minuta* の細胞膜エルゴステロールも UV-A 光照射によって比較的容易に分解されることを明らかにした。しかし、UV-A 光の連続照明下での培養実験において、*S. cerevisiae* に比べて *R. minuta* は光耐性が極めて高いことを認め、*R. minuta* には光分解によって減少したエルゴステロールを素早く供給する機構が存在し、その機構は本酵母が有しているカロテノイド生合成の光誘導と緊密な関係があると考えている。

要 約

酵母 *Rhodotorula minuta* におけるカロテノイドの光誘導合成および細胞膜の機能損傷に関わる初期光化学反応についての知見を得る目的で、長波長紫外光 (UV-A 光) による細胞膜エルゴステロールの分解を調べ、次の結果を得た。

酵母菌体および菌体から調製した細胞膜調製品に長波長紫外光を照射すると吸収スペクトルに微細な変化が生じることを認めた。細胞膜調製品に生じた吸収スペクトルの変化は細胞膜エルゴステロールが光化学分解を受けることを予想させ、この予想は HPLC 分析によって確かめられた。また、モデル系での実験によって、細胞膜中のエルゴステロールの光化学反応には特別な光受容体あるいは光増感剤は介在しておらず、エルゴステロール自身が光受容体であり反応基質となっていることが明らかになった。

謝 辞

この研究は平成6年度から8年度までの3年間に亘る岡山大学学内特別研究「特殊環境生物の機能開発と生物生産への応用」を分担して行ったものである。

文 献

1) Tada, M. and M. Shiroishi : Mechanism of Photoregulated Carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* I. Photocontrol of Carotenoid Production. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 541-547 (1982)

- 2) Tada, M. and M. Shiroishi : Mechanism of Photoregulated Carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* II. Aspects of Photoregulative Reaction. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 549-556 (1982)
- 3) Tada, M. and M. Shiroishi : Mechanism of Photoregulated Carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* III. Effect of Certain Nucleic Acid and Protein Inhibitors on Photoinduction of Carotenoid Biosynthesis. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 567-573 (1982)
- 4) Tada, M. and M. Shiroishi : Mechanism of Photoregulated Carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* V. Photoinduction of 3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl Coenzyme A Reductase. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 615-621 (1982)
- 5) Tada, M., K. Watanabe and Y. Tada : Mechanism of Photoregulated Carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* VII. Action Spectrum for Photoinduced Carotenogenesis. *Plant Cell Physiol.*, **31**, 241-246 (1990)
- 6) Hada, M., M. Tada and T. Hashimoto : UV B Induced Absorbance Change in the Yeast *Rhodotorula minuta*. *J. Photochem. photobiol. B : Biol.*, **17**, 127-134 (1993)
- 7) 荒見真一郎・秦 恵・板谷安佐子・山下智子・蜂谷欽司・鎌山宗利・多田幹郎 : 岡山大学農学部学術報告, **82**, 1-7 (1993)
- 8) Arami, S., M. Hada and M. Tada : Near-UV-induced Absorbance Change in the Plasma Membrane of Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**, 1665-1671 (1997)
- 9) Arami, S., M. Hada and M. Tada : Reduction of ATPase Activity Accompanied by Photodecomposition of ergosterol by Near-UV Irradiation in Plasma Membrane Prepared from Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**, 2465-2471 (1997)
- 10) Hada, M., M. Tada and T. Hashimoto : UVB-induced Efflux of Potassium from Yeast *Rhodotorula minuta* Cells. *J. Photochem. photobiol. B : Biol.*, **21** 77-80 (1993)