

研究紹介

長波長紫外光によって酵母 *Rhodotorula minuta* 細胞膜に生じる エルゴステロールの 光化学反応生成物

中馬 誠^{a)}・入山 卓也
村田 芳行^{a)}・多田 幹郎
(生物資源化学講座)

Photochemical Products from Ergosterol
in the Plasma Membrane of the
Yeast *Rhodotorula minuta* cells illuminated
by Near-UV

Makoto Nakauma^{a)}, Takuya Iriyama,
Yoshiyuki Murata^{a)} and Mikiro Tada
(Department of Bioresources Chemistry)

When the plasma membrane of the yeast *Rhodotorula minuta* cells was exposed to near-UV at 0°C, three new compounds were formed photochemically with decrease in ergosterol content. When 0.4% SDS solution containing ergosterol was illuminated with near-UV, the same three compounds as in the membrane were formed. As a result of instruments analysis, one of these photochemical products was identified as previtamin D₂ and another two compounds were characterized chemically that they had the structure of ergosta-4, 7, 22-trien-3-on. In addition, these photochemical products did not affect the growth and carotenogenesis of the yeast *Rhodotorula minuta*.

Key words : *Rhodotorula minuta*, near-UV, ergosterol, photochemical products

緒言

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400nmより短波長域の光を吸収し、280nm近辺に極大吸収波長をもつ物質であることを推察した。さらに秦ら⁶⁾は、菌体にUV-A(300~400nm)光を照射した時、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光分解に起因することを推察した。そして筆者等⁷⁾は、細胞膜エルゴステロールの分解の作用スペクトルが、カロテノイド誘導の作用スペクトルと近似していることを見出し、それを根拠として、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。さらに、SDS-ミセル系におけるエルゴステロールのUV-A光照射による分解機構から、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、また反応基質となっていることを明らかにした⁷⁾。そこで本研究において、この光化学反応によって生成される物質すなわちエルゴステロールの光反応生成物を単離・同定し、その生成物が菌体の増殖ならびにカロテノイド生合成におよぼす効果を調べた。

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

Received October 1, 1999

a) 岡山大学大学院自然科学研究科
(Graduate School of Natural Science and Technology,
Okayama University)

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℃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℃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, 10min) で集菌し、脱塩水で2回洗浄した後、25mM-EDTA を含む30mM-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、10mM-トリス塩酸緩衝液 (pH; 7.50, 25mM-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 (10min) の遠心操作によって得られた上清を、続いて15000×g (60min) の遠心操作に供した。次いで、得た沈澱物を不連続蔗糖密度勾配[10, 20, 30, 40% ショ糖 (3:3:3:2/v:v:v:v), 100,000×g (90min)] に供し、ショ糖20%の画分を細胞膜画分とした。

3. 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 1.4×10^{-3} J/sec·cm² であり365nm を中心とした UV-A 領域 (320~400nm) の長波長紫外光を放射する。なお、光量は既報で述べたフェナントロリン比色法に基づくアクチノメトリーによって求めた⁷⁾。

4. 照射方法

細胞膜調製品への照射の場合は、その濃度が5mg-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 (1.0×1.0×4.5cm) 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。

細胞膜のモデルとしての SDS ミセル中でのエルゴステロールの光反応生成物の検出には、0.4% SDS-水溶液に50mg/lになるようにエルゴステロールを可溶化させた溶液を用い、上記と同様の条件で照射を行った。

5. 光分解生成物の抽出および単離・精製

CHCl₃:CH₃OH=2:1に一昼夜浸析して細胞膜から脂溶性成分を抽出しこれを分析供試画分とした。

一方、照射されたエルゴステロール0.4% SDS 可溶化液は、イオン交換カラム (Dowex 1×2, 30×170mm) に供した。この操作で SDS がイオン交換樹脂に吸着され、その SDS に脂溶性物質が疎水的に吸着される。次いでカラムにエタノールを流下させて SDS に疎水的に吸着されている脂溶性物質を溶出した。さらに、この溶出液の溶媒を留去して得られる残渣を水とエーテルで分配し、エーテル層を集め無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を留去して得られた脂溶性物質を分離操作の出発画分とした。この画分を1回目のシリカゲルカラムクロマトグラフィ (C.C.-1:ワコーゲル C-100, 30×170mm) に供し、Fig. 2に示した溶媒を用いて溶出し、この溶出液を200mlづつ集めこれらを F-1, F-2, …… F-6とした。その後、目的物質が含まれている画分 (F-4) をさらに2回目のシリカゲルカラム (C.C.-2:ワコーゲル C-100, 10×210mm) に供し、これを20mlづつに分画した。そして、主要な脂溶性成分を分画、濃縮乾固後適当な溶媒中で再結晶操作を行うことにより単離・精製した。

6. エルゴステロール光反応生成物の構造解析

単離した反応生成物の構造は、UV スペクトル、¹H-NMR スペクトル、マススペクトルに基いて解析した。なお、UV スペクトルの測定には Simadzu UV-3000、¹H-NMR スペクトルの測定には Seiko SPQ-8000A、マススペクトルの測定には Valian UNITY INOVA 300を用いた。

結果及び考察

1. 細胞膜エルゴステロールの光化学反応生成物

長波長紫外光照射された細胞膜から抽出した脂溶性成分を非照射の細胞膜から抽出したものと共に TLC (Kieselgel 60 F254, ベンゼン:エーテル:メタノール=14:5:1) に供した結果、Fig. 1に示すように長波長紫外光を照射した細胞膜から抽出した脂溶性成分の中には非照射のものとは別にエルゴステロールより極性の低いスポットがひとつ、極性の高いスポットが2つ見いだされた。また、これは細胞膜のモデルとして用いたエルゴステロール SDS

可溶化液に長波長紫外光を照射した試料から抽出された脂溶性成分に含まれるスポットと一致している。

この結果は、膜中のエルゴステロールの長波長紫外光による光分解機構が SDS 可溶化液中のエルゴステロールのそれとほぼ同じであり、この新しく現れた3つのスポットがエルゴステロールの分解に起因することを示している。したがって、Fig. 1 に示した A, B, C の三成分が細胞膜エルゴステロールの主要な光反応生成物であると思われる。また、物質 A, B, C に相当するスポットに Liebermann-Burchard 試薬を噴霧した結果、物質 B, C に青緑色呈色反応があり、これらはステロイド骨格を有していることを示した。さらに、ジニトロフェニルヒドラジン試薬とフェリシアン化カリウム液によって呈色させると B, C は青色を示した。このことより物質 B, C はステロイド母核を有し、ケト基を持つことが分かった。なお物質 A はどちらの試薬にも反応しなかった。

2. エルゴステロールの光分解生成物の精製と単離

長波長紫外光を照射した SDS-可溶化エルゴステロールから抽出された総脂質から目的の物質を精製・単離する手順を Fig. 2 に示す。

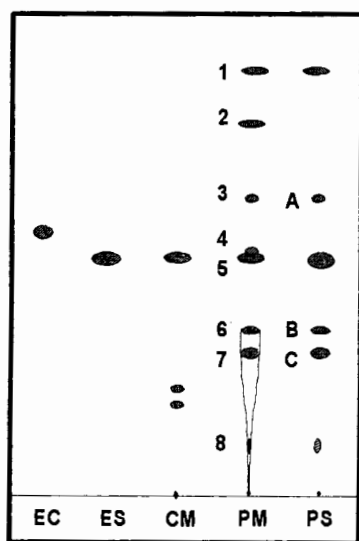


Fig. 1 TLC pattern of photochemical products and authentic samples. CM and PM were prepared from membrane of cells grown under darkness and illuminated with near-UV, respectively. PS was fractionated from 0.4%-SDS solution containing ergosterol after illumination of near-UV. ES and EC are ergosterol and ergocalciferol, respectively.

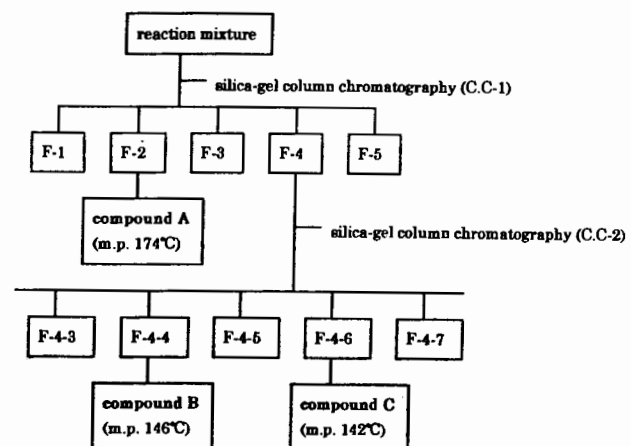
光反応生成物の混合溶液を1回目のカラムクロマトグラフィー (C.C.-1) に供した結果、Fig. 1 の A に相当する物質をほとんど純品として含む画分 (F-2) と B, C に相当する2成分が共存している画分 (F-4) を分取することができた。さらに、B, C が共存しているこの F-4 を、2回目のカラムクロマトグラフィー (C.C.-2) に供した結果、B に相当する物質と C に相当する物質がそれぞれほぼ純品として含まれる画分を分画することができた。

次に、光化学反応に於ける主要生成物として単離の対象とした物質 B, C をほとんど純品として含む画分 (F-4-4, F-4-6) をヘキサンに溶解させ、少量の活性炭で処理することによって微量の不純物を取り除いた後、pore size 0.7 μ m のメンブランフィルター (Cellulose Nitrate: ADVANTEC TOYO) によって濾過し、少量のヘキサンと酢酸エチルエステルの混合溶媒に溶かし、再結晶を繰返すことによってこれらを精製した。物質 B, C は、その結果、物質 A を淡黄色針状結晶 (m.p. 174 $^{\circ}$ C) として、物質 B を無色鱗片状結晶 (m.p. 146 $^{\circ}$ C)、また、物質 C を無色針状結晶 (m.p. 142 $^{\circ}$ C) として得た。

3. エルゴステロール光分解物の構造解析

1) 吸収スペクトル

得られた物質の UV 吸収スペクトルを Shimadzu



elute solution

C.C-1 n-hexane : acetone : methanol

185 14 1 500ml

160 20 20 500ml

C.C-2 n-hexane : acetone

90 10 100ml

80 20 100ml

Fig. 2 Method for isolation of photochemical products by using silica-gel column chromatography.

UV-3000により測定した結果を Fig. 3に示す。物質Aは260nmが極大吸収波長であった。物質Bは275nmにおいて極大吸収を示し、270nmと285nmにショルダーを持っていた。また物質Cは270, 275, 285nmのそれぞれに極大吸収を有していた (λ_{\max} は275nm)。

2) MS スペクトル

Table 1に、それぞれの物質のMSスペクトルの主な分子イオンピークを、比較として用いたエルゴステロールおよびエルゴカルシフェロールの結果と共に示した。物質Aの分子量はエルゴステロールと同じ396であり、物質B, Cは共に410の分子量であることがわかった。410の分子量をもつ物質B, Cは

エルゴステロールの分子量396より分子量が14多く、OH基の付加と3位の水酸基の酸化が予想される。また、個々の最大のピークを100%ととして、それぞれのピークの相対強度で示したマスフラグメンテーションパターンから、物質Aはステロイド環が開環している previtamin D₂に、物質B, Cはエルゴステロールによく似ていることが分かる。さらに、エルゴステロールのサイドチェーンを表す125のイオンピークはいずれにも存在している。

3) ¹H-NMR スペクトル

Fig. 4に3種の化合物A, B, CのNMRスペクトルを示している。

標品エルゴステロールとエルゴカルシフェロール

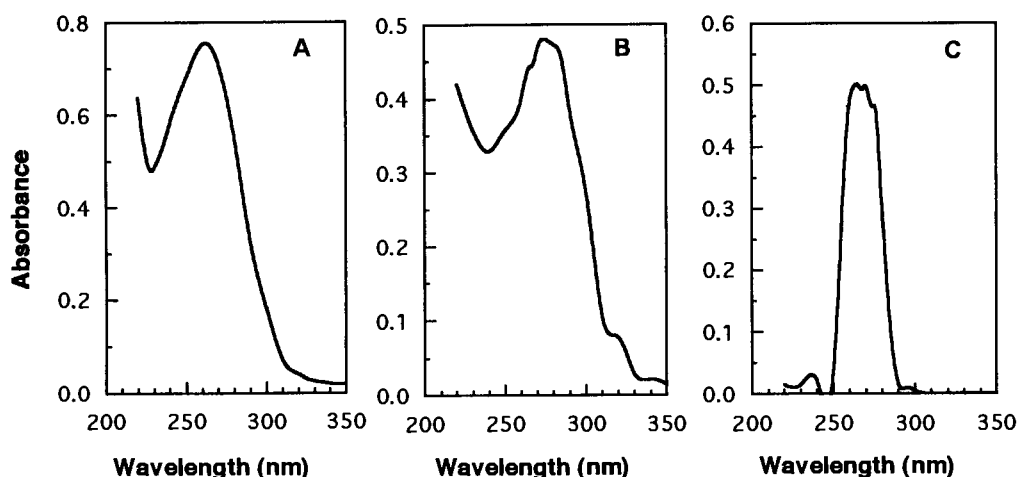


Fig. 3 UV absorption spectra of compound A, B and C.

Table 1 Mass spectra of compound A, B and C

	-18	-33	-59	-125	-143	-197	-260
compound A							
M.W. 396	378 (5%)	363 (16%)	337 (12%)	271 (21%)	253 (29%)	199 (0%)	136 (100%)
compound B							
M.W. 410	392 (79%)	377 (100%)	351 (23%)	285 (62%)	267 (76%)	213 (48%)	150 (0%)
compound C							
M.W. 410	392 (80%)	377 (100%)	351 (23%)	285 (30%)	267 (42%)	213 (35%)	150 (0%)
ergosterol							
M.W. 396	378 (54%)	363 (100%)	337 (36%)	271 (30%)	253 (95%)	199 (30%)	136 (0%)
previtamin D ₂							
M.W. 396	378 (8%)	363 (10%)	337 (15%)	271 (20%)	253 (30%)	199 (0%)	136 (100%)

との比較の結果、物質Aは previtamin D₂ に一致している。また、物質BとCはそのスペクトルからエルゴステロールあるいはそれに近似した構造をしていることが示唆された。物質Aに見られる、1.80~2.85 ppm にかけてのシグナルは、エルゴステロールの1.70~2.40 ppm に相当するもので、全体的に低磁場にシフトしており、ステロイドのB環の開裂を示している。また、エルゴステロールにおいて0.60 ppm 付近に見られる OH 基によるスペクトルが物質BとCには見られず、これは、エルゴステロールの3β位のOH基が無くなっていることを示している。

マススペクトルから付加したことが示唆された OH 基の位置は ¹H-NMR からは区別できなかったため、これらの正確な構造は特定できなかった。

4) 構造式の推定

TLC での挙動、吸収スペクトル、マススペクトルなどの結果も併せて、単離した3成分の構造をFig. 5に示すように推定した。物質Aはプレカルシフェロールであることがほぼ確定的である。BとCはエルゴステロールの3位が酸化されケトン基になったものにOH基が付加したものであることが推定されたがOH基がどこに付加しているかまでは特定できなかった。(Fig. 5)

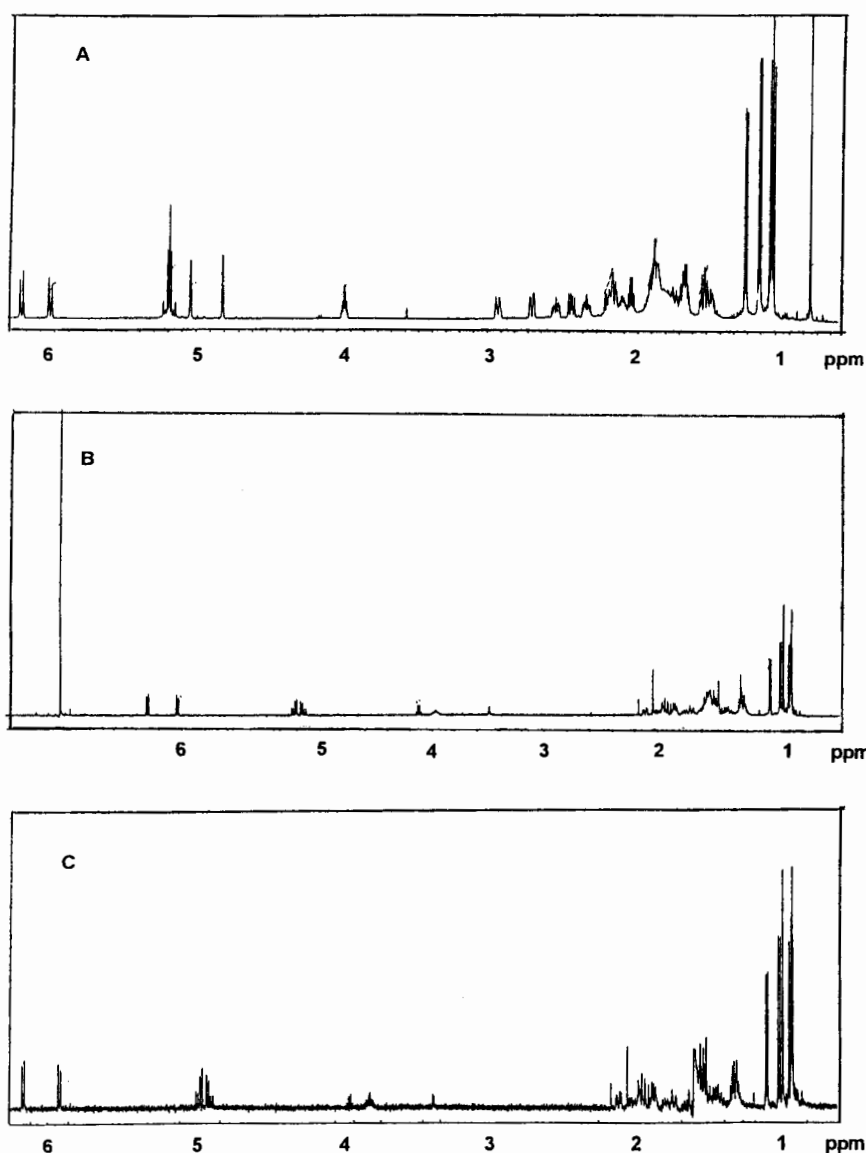


Fig. 4 ¹H-NMR spectra of compound A, B and C.

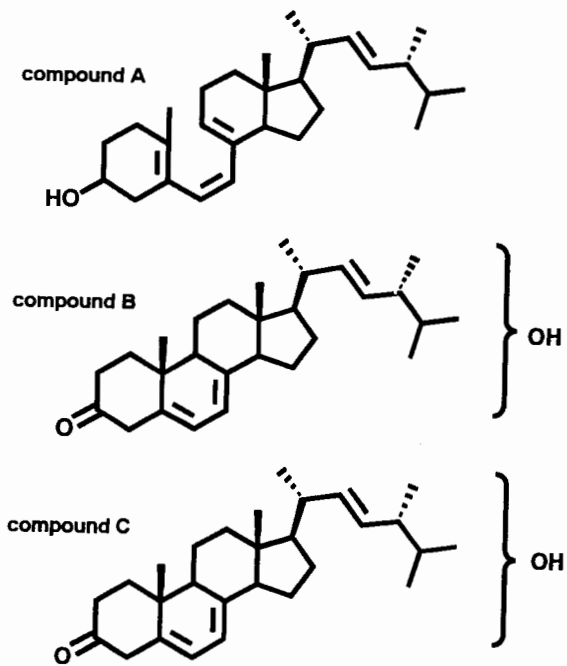


Fig. 5 Chemical structures of compound A, B and C.

5) エルゴステロールの光分解

Fig. 6 は、自由溶液中のエルゴステロールの280nmの光(UV-B)による分解である。エルゴステロールは今回使用した光より波長の短いUV-Bによって速やかに previtamin D₂ へと変換され、また更なる照射により副生成物として tachysterol, lumisterolなどを生成することが知られている。なお、生体内ではよく知られている previtamin D₂ から vitamin D₂ への反応は熱を加えることによっておこる反応であり(酵素等触媒がない場合は80℃以上)、光照射のみでは起こりえない反応である⁸⁾。本研究において previtamin D₂ が比較的多量に生成されたにもかかわらず tachysterol, lumisterol が生成されなかった理由はこれらの光化学反応が可逆的であり、今回使用した比較的長波長の光源においては反応の平衡が previtamin D₂ の側に大きく傾いているためと思われる。また、vitamin D₂ 生成されなかったのは、光照射を低温で行ったためであろう。

4. エルゴステロール光化学反応生成物の *R. minuta* に及ぼす影響

エルゴステロールは、*R. minuta* のカロテノイド合成の光誘導機構の初発段階である光化学反応の光受容体でありまた最初の光化学反応基質である⁷⁾。

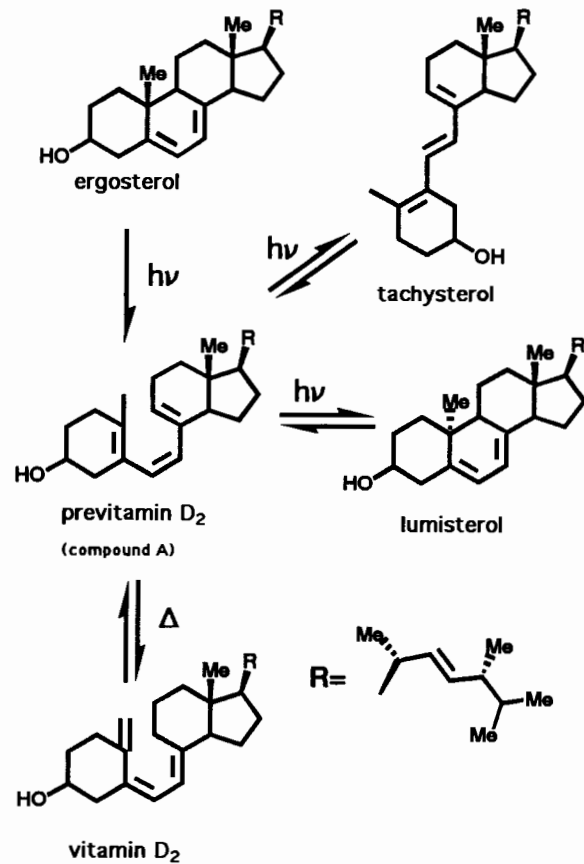


Fig. 6 Reaction scheme of the photoisomerization of ergosterol and its photoisomers.

従って、長波長紫外光によって生成した、エルゴステロールの光化学反応生成物はカロテノイド合成の光誘導に何らかの影響を与えているものと思われる。そこで、エルゴステロール光化学反応生成物の *R. minuta* に及ぼす影響について、菌体の増殖とカロテノイド合成の点から検討を行った。結果、物質B及びCは菌体の増殖を若干阻害したが、物質Aは菌体の増殖に目立った変化を与えなかった。一方、単離されたどの物質も菌体のカロテノイド生産量に影響を与えなかった。さらに単離し得なかった他の光反応生成物を培地に加えても菌体のカロテノイド含有量にほとんど影響を与えなかった。これらの事実より、エルゴステロールの光化学反応生成物は菌体のカロテノイド含有量にほとんど影響を与えないことが分かった。すなわち、エルゴステロールの長波長紫外光による光分解物自体は *R. minuta* のカロテノイド合成の光誘導の誘導因子として機能しないことが示唆された。

要 約

赤色酵母 *R. minuta* 細胞膜に長波長紫外光を照射した時に生じるエルゴステロール由来の光化学反応生成物の単離・精製およびその同定を行った。結果、3種類の物質が単離・精製され、そのうちの1つは previtamin D₂ であることが同定され、残りの2つについては ergosta-4, 7, 22-trien-3-on の何れかの炭素に OH 基が付いたものであることが分かった。単離した成分を培地に加え、菌体の増殖とカロテノイド生合成に対する影響を調べた結果、これらの物質はそのどちらにも影響を及ぼさなかった。

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*. Aspects of Photoregulative Reaction. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 549-556 (1982)
- 3) Tada, M. and M. Shiroishi : Mechanism of Photoregulated Carotenogenesis in *Rhodotorula minuta*. 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*. 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*. 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) 中馬 誠・荒見真一郎・秦 恵・中川一郎・村田芳行・多田幹郎 : 岡山大学農学部学術報告, **87**, 85-90 (1998)
- 8) M. Braun and K.L. Kompa : Improved photosynthesis of previtamin D₂ by wavelength of 280-300nm. *J. Photochem. Photobiol.*, **61**, 15-26 (1991)