

## メナジオンが関与するルミノール発光による酵母細胞の活性度の計測

近藤正夫・浅田文子<sup>\*</sup>・近藤徹弥・天野武雄

食品は、栄養的機能、嗜好的機能、生体調節機能という3つの機能を有している。このうち第3の生体調節機能については、抗酸化性を中心として活発な研究がなされてきた<sup>1)</sup>。特に近年、来たるべき高齢化社会に向け食品の老化制御機能が注目を集めている。

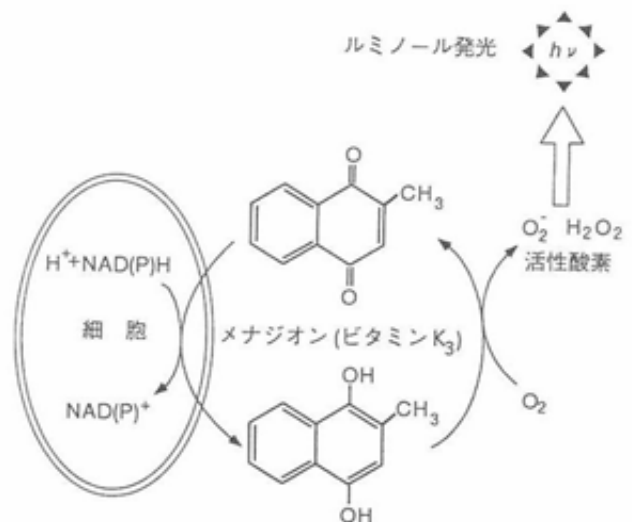
ところで、食品の老化制御機能を明らかにするためには、前提として生体細胞の老化現象を把握することが不可欠である。それぞれの立場で、老化現象が測定され解析されてはいるものの、汎用的に利用できる迅速、かつ、簡便な計測法がないのが現状である。このような計測法の開発には、当然ヒト細胞を実験対象とするのが望ましい。しかしながら、培養動物細胞や微生物細胞をモデルにした研究からも、貴重な知見を得ることができる<sup>2)</sup>。そしてそれらを基礎として、老化現象を迅速、かつ、簡便に計測する方法の実現が要望されている。

一方、醸造分野においては、発酵を最適に制御するため、発酵微生物の生理状態を把握することが必要となっている。これまでにも、生理状態を表すものとして各種の指標が提示されているが、それらの妥当性や普遍性を立証することが課題となっている。

以上の理由から本報では、清酒発酵に利用される代表的な真核微生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデルに、感度の点で有利な、メナジオンが関与するルミノール発光を利用して細胞の活性度を計測する方法<sup>3, 4)</sup> について検討した。

第1図は活性度計測の原理を示している。好気性生物は、酸素存在下で還元性物質を酸素で酸化することによってエネルギーを得ている。従って、好気条件下での細胞の活性度には、酸化的リン酸化によるATPの生成に関連するNADHやNADPHなど還元性物質の細胞内での量比や、酸化還元酵素の活性が関係する。すなわち、細胞の酸化還元状態(レドックス)や酸化還元反応の効率の良否を、細胞の活性度として利用することができる。

細胞の酸化還元反応の効率は、適当なメディエーター



第1図 酵母細胞の活性度計測の原理

(媒体) を介して測定可能である。例えば、メディエーターとして血液凝固因子として知られているメナジオン(ビタミンK<sub>3</sub>)<sup>5)</sup>を用いると、酸化還元反応の過程で活性酸素が発生する<sup>6, 7)</sup>。スーパーオキシドや過酸化水素といった活性酸素は、微量でもルミノール発光など化学発光法によって検出が可能である<sup>8)</sup>。従って、細胞とメナジオンを反応させ、生成する活性酸素を化学発光法で検出することにより、細胞の活性度を計測することができる。

## 実験方法

## 1. 酵母の培養

酵母としては清酒製造用の *Saccharomyces cerevisiae* FIA を使用した。酵母は30℃で16時間培養したものを前培養液とした。ついで前培養液10mlを90mlの培地中に懸濁し、さらに30℃で所定の時間培養したものを実験に使用した。

培養方法は静置培養または振盪培養で行い、振盪培養は200rpmで振盪した。酵母の細胞数は、血球盤(ト

\* 椋山女学園大学生生活科学部

ーマ製)、またはコールターカウンター(コールター・エレクトロニクス社製ZM型)で計数した。

## 2. ルミノール発光による活性酸素の測定

### 2.1 過酸化水素の測定

試料0.1ml, 500  $\mu$ Mルミノール溶液0.2ml, 1 mM フェリシアン化カリウム溶液0.1ml, 200mM トリス緩衝液(pH9.5) 0.6mlを混合攪拌した後, 30°Cで30秒間測定を行い, その間の各時間における発光強度(counts/sec)の積算値を発光量(counts/30sec)とした。そして, 得られた発光量を過酸化水素濃度の指標とした。

ルミノールは和光純薬工業の生化学用高純度試薬を用い, 発光量の測定にはルミフォトメータ(ラボサイエンス(株)製TD-4000)を使用した。

### 2.2 スーパーオキシドの測定

試料, 0.5mMメナジオン溶液, 34mMルミノール溶液, 1 mM塩化第二鉄溶液, 5 mM EDTA溶液のそれぞれ0.1mlずつと200mM トリス緩衝液(pH9.5) 0.5mlを混合攪拌し, 初発1秒間を除き, 30°Cで5秒間測定を行い, その間の各時間における発光強度(counts/sec)の積算値を発光量(counts/5 sec)とした。そして, 得られた発光量をスーパーオキシド濃度の指標とした。

## 3. 酵母細胞の活性度の測定

酵母細胞によるメナジオンの酸化還元に伴い生成する過酸化水素やスーパーオキシドをルミノール発光で検出し, その発光量を酵母細胞の活性度とした。培養液は組成成分が光を吸収することによってルミノール発光を妨害するので, 酵母細胞は3000rpm, 5分間の遠心分離と, 0.85%の食塩水または蒸留水による洗浄を3回繰り返したものを実験に使用した。

細胞当たりの活性度としては, スーパーオキシドの生成量に対応するルミノール発光量を測定し, それを細胞濃度で除した値を用いた。

## 4. 酵母のATP含量の測定

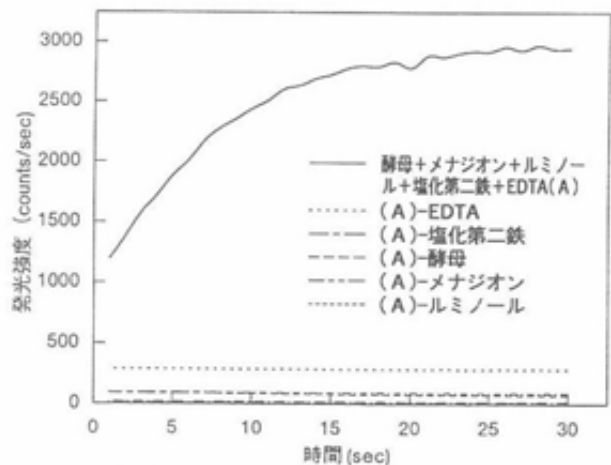
ルシフェリンルシフェラーゼ法によった。ルシフェラーゼとATP標準試薬はペーリンガー社のATP測定キットを用い, 発光量の測定には, ルミフォトメータTD-4000を使用した。

## 実験結果及び考察

### 1. メナジオンの酸化還元に伴うルミノール発光

#### 1.1 ルミノール発光に必要な因子

第2図は, 酵母細胞とメナジオン, ルミノール, 及び発光に影響を与えられとされる塩化第二鉄とEDTAを混合した時の, 30秒間の発光強度の経過を示している。発光は混合直後から直ちに現れ30秒でほぼ平衡に達した。混合溶液からルミノールやメナジオンを除くと発光は見られず, 酵母細胞を除くとわずかな発光が見られるのみであった。酵母細胞を除いた場合, わずかな発光が見られた理由としては, メナジオンの酸化還元過程で自動酸化によって活性酸素が生成したためと考えられる<sup>9)</sup>。



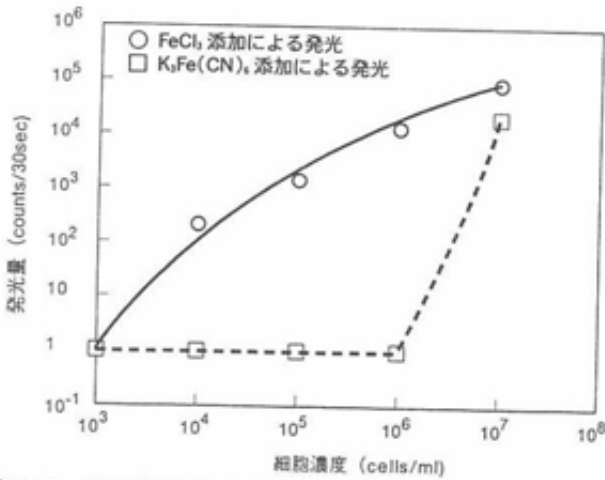
第2図 酵母細胞とメナジオンによるルミノール発光の時間経過

塩化第二鉄やEDTAを除いた場合は, 発光量が全混合液のそれぞれ3%と10%程度に低下した。このことから, 塩化第二鉄やEDTAは発光を増強する効果を持っていると考えられる。

#### 1.2 酵母細胞濃度とルミノール発光との関係

ルミノール発光は, スーパーオキシドや過酸化水素といった各種活性酸素によって引き起こされることが知られており, 塩化第二鉄を添加した場合のルミノール発光はスーパーオキシドの測定<sup>3)</sup>に, フェリシアン化カリウムを添加した場合のルミノール発光は過酸化水素の測定<sup>10)</sup>に用いられている。

第3図は, 酵母細胞濃度を変化させた時の, 細胞濃度とルミノール発光量との関係を示している。塩化第二鉄を添加した場合は,  $10^3$ cells/mlから $10^7$ cells/mlへと細胞濃度の増加に伴い発光量が増加した。一方, フェリシアン化カリウムを添加した場合は, 細胞濃度が $10^6$ cells/ml以下ではほとんど発光は見られず,  $10^7$ cells/mlで明白な発光が検出された。このように, 酵母細胞とメナジオンの生化学反応の結果, 添加物に



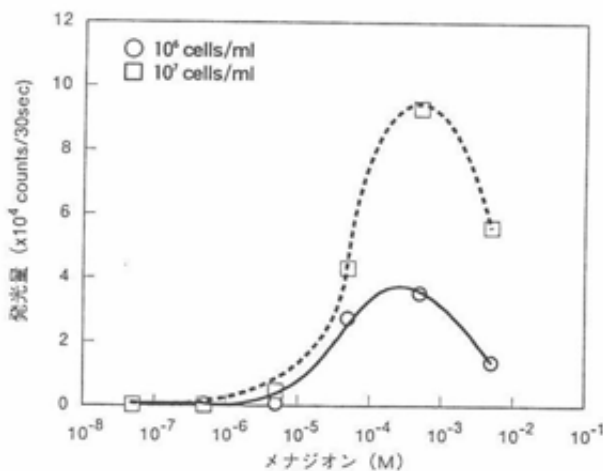
第3図 酵母細胞とメナジオンによるルミノール発光量の関係

よってパターンの異なるルミノール発光が観察された。フェリシアン化カリウムを添加した場合、細胞濃度が低い領域でルミノール発光が観察されなかった理由として、ルミノール発光を引き起こす過酸化水素が、酵母細胞のカタラーゼによって分解されるためではないかと推測された。そこで酵母細胞のカタラーゼ活性を測定したところ、顕著な活性が認められた。従って、細胞の活性度としてメナジオン存在下での過酸化水素生成量を指標とする方法<sup>1)</sup>は、今回実験に使用した系では不相当であると考えられる。

## 2. ルミノール発光の原因物質

### 2.1 ウミホテルルシフェリンによる発光

メナジオン存在下、酵母濃度に依存するルミノール発光の原因物質が何かを確定することを試みた。第4



第4図 酵母細胞とメナジオンによるウミホテルルシフェリン発光

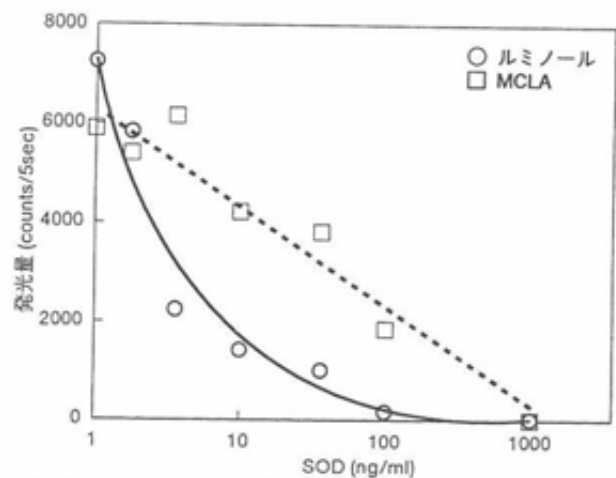
図は、ルミノールのかわりにスーパーオキシドの特異的な検出发光試薬であるウミホテルルシフェリン類縁体MCLA (2-メチル-6-[*p*-メトキシフェノール]-3,7-ジヒドロイミダゾ [1,2-*a*]ピラジン-3-オン)<sup>11)</sup>を用い、酵母細胞とメナジオンの生化学反応による発光量を調べた結果である。酵母濃度が10<sup>7</sup>cells/mlの方が10<sup>6</sup>cells/mlより大きな発光が観察された。この発光にはメナジオンが必須であり、その至適濃度は5 × 10<sup>-4</sup>Mであった。

メナジオン濃度が10<sup>-3</sup>M以上で発光量が低下するのは、メナジオン自身が光を吸収するためであった(予備実験の結果より)。MCLAで発光が認められたことから、酵母細胞とメナジオンの生化学反応の過程で、スーパーオキシドが生成することが示唆された。

### 2.2 スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)による発光の阻害効果

スーパーオキシドを不均化して消去する作用を持つSODは、スーパーオキシドの存在を立証する方法としてしばしば利用される。第5図は、SOD濃度に伴うルミノール発光とウミホテルルシフェリン発光の変化を示している。SOD濃度の対数の増加に伴いルミノール発光は双曲線的に、またウミホテルルシフェリン発光はほぼ直線的に減少した。

前節のウミホテルルシフェリン発光や、SODによる発光の阻害の結果より、酵母細胞によるメナジオンの酸化還元に伴うルミノール発光には、スーパーオキシドが関与するものと考えられる。なお、ルミノール発光とウミホテルルシフェリン発光に対するSODの阻害の様相が異なる理由としては、ウミホテルルシフェリ

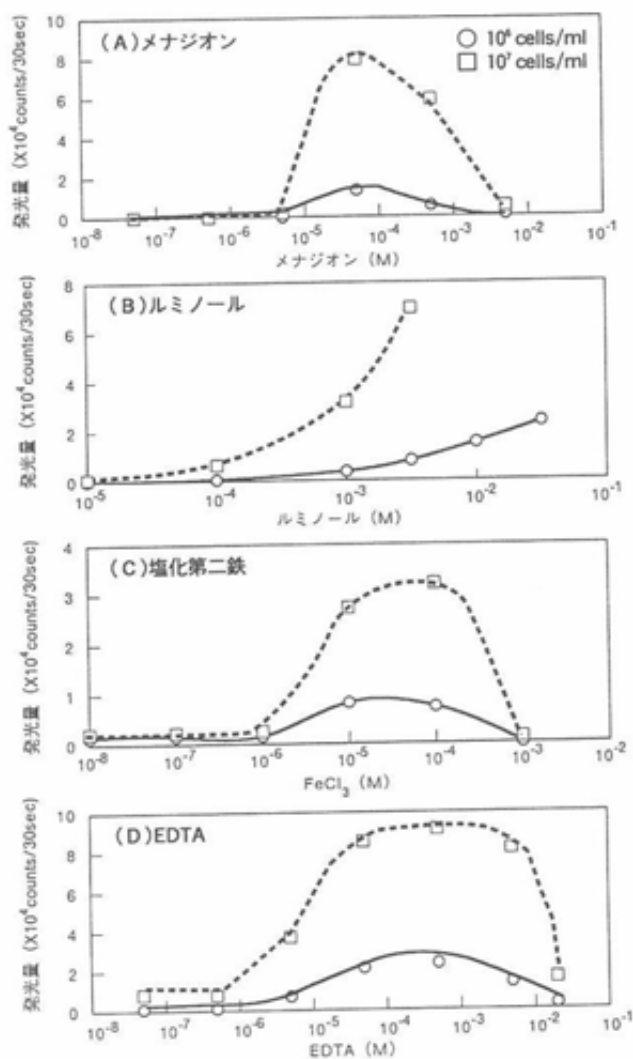


第5図 ルミノール発光とウミホテルルシフェリン発光に及ぼすSODの影響

ン発光が、一重項酵素によっても引き起こされることによるものと考えられる<sup>12)</sup>。

### 3. ルミノール発光の測定条件の検討

酵母細胞とメナジオンの反応から生成するスーパーオキシドによるルミノール発光の測定条件を検討した。発光にはメナジオン、ルミノール、塩化第二鉄、EDTAが関係する。そこで、それぞれの至適濃度を求めたのが第6図である。



第6図 添加成分濃度とルミノール発光量との関係

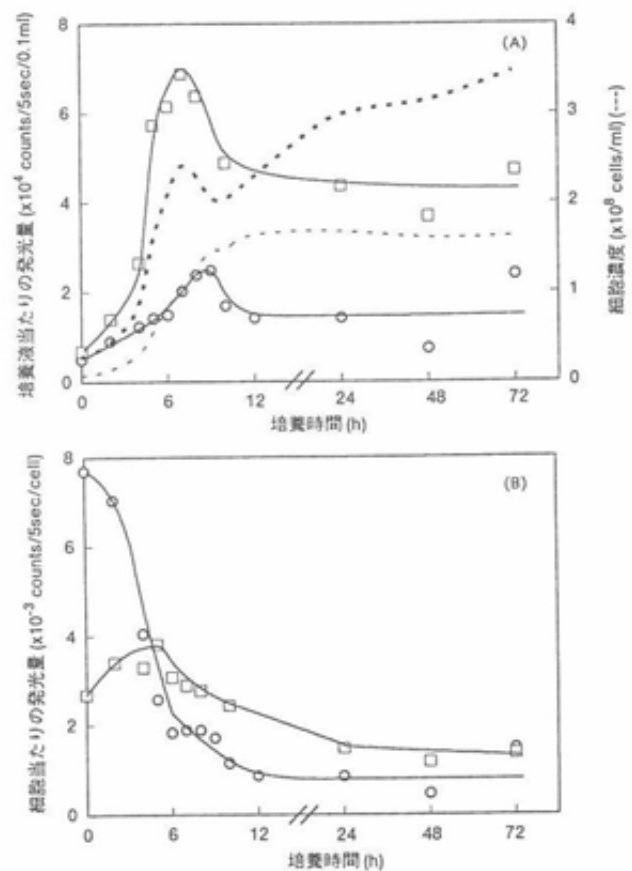
メナジオン、塩化第二鉄、EDTAについては、第6図の(A)、(C)、(D)のように、それぞれ0.5mM、0.1mM、0.5mM付近に至適濃度が得られたので、以下の実験ではそれらの濃度を採用した。また、第6図(B)に示すように、ルミノールについては濃度の増加とともに発光量が単調に増加したので、検出範囲を考慮して以下の実験では34mMを採用した。

### 4. 増殖過程における活性度の変化

#### 4.1 ルミノール発光量の変化

酵母細胞の活性度は、培養条件や細胞齢や環境条件によって種々変化することが予想される。そこでまず、増殖過程における活性度の変化を調べた。第7図は、静置培養と振盪培養によって得られた細胞の、ルミノール発光に基づく活性度を対比した結果である。培養液当たりの活性度は、静置培養と振盪培養のいずれの場合も、増殖による細胞数の増加に伴い増加した(第7図(A))。

細胞当たりの活性度は、振盪培養では対数増殖期に



第7図 増殖過程に伴う活性度の変化

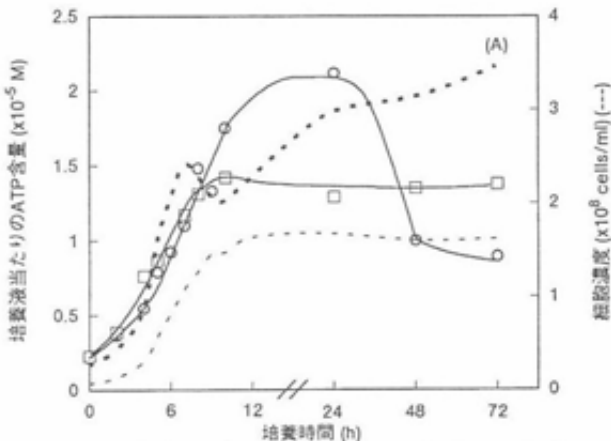
発光量: ○ 静置培養 □ 振盪培養  
細胞濃度: - - - 静置培養 - - - 振盪培養

最高となり、その後徐々に減少し定常期にはほぼ平衡に達した。これに対し静置培養では、培養開始時に細胞当たりの活性度は著しく高いにもかかわらず、誘導期から対数増殖期にかけて大きく減少し、定常期には振盪培養のレベルを若干下回った(第7図-(B))。

振盪培養での活性度の変化は予想されるものであったが、静置培養の挙動は予想しがたい結果となった。この理由としては、本培養開始時点の細胞が、それまで16時間静置で前培養された、嫌気条件により近い状態で生育された細胞であるのに対し、本培養では静置とはいえ数時間おきのサンプリングの過程で好気条件にさらされ、その結果、実質的には振盪培養に類似した生育環境となり、振盪培養の細胞のレベル以下まで活性度が低下したのではないかと考えられる。このように、培養条件の微妙な差異が、結果に影響を与えることが示唆された。なお、振盪培養と静置培養での細胞当たりの活性度の大小については、今回のデータのみからは説明が困難であり、今後の課題である。

#### 4.2 ATP含量の変化

第8図は、ルミノール発光量による活性度と比較するため、増殖過程におけるATP含量の変化を示したものである。培養液当たりのATP含量は、活性度と同様に、静置培養と振盪培養のいずれの場合も、増殖による細胞数の増加に伴い増加した(第8図-(A))。細胞



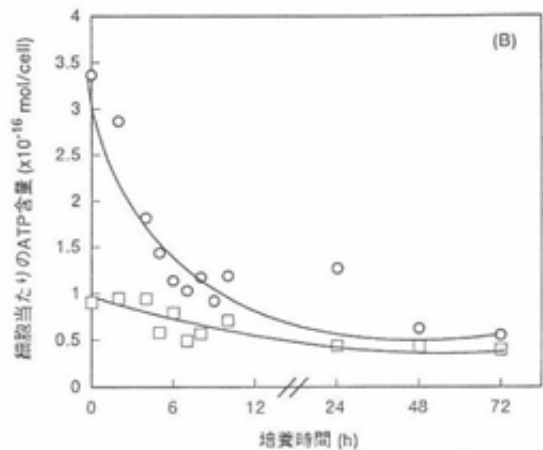
第8図-(A) 増殖過程に伴うATP含量の変化

ATP含量: ○ 静置培養 □ 振盪培養  
細胞濃度: --- 静置培養 - - - 振盪培養

当たりのATP含量は、培養開始後数時間は静置培養の細胞の方が高いものの、その後は静置培養と振盪培養でほぼ同レベルであった。変動幅は活性度ほど大きくなかった(第8図-(B))。

#### 5. 環境変化に伴う活性度の変化

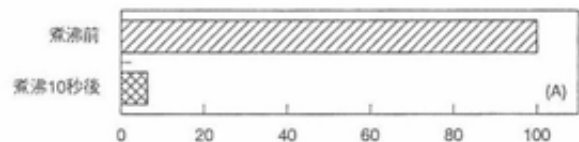
第9図は、環境をいろいろ変化させた場合の酵母細



第8図-(B) 増殖過程に伴うATP含量の変化

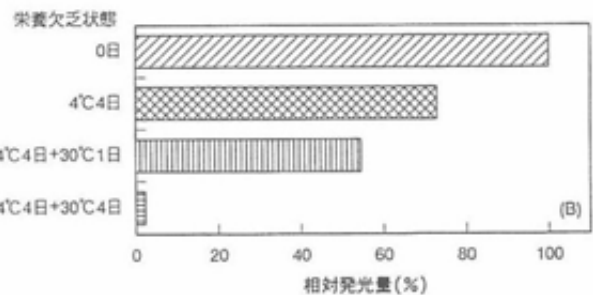
ATP含量: ○ 静置培養 □ 振盪培養  
細胞濃度: --- 静置培養 - - - 振盪培養

胞の活性度を示している。細胞を沸騰水に投入すると、10秒で活性度は6.4%に低下した(第9図-(A))。



第9図-(A) 環境条件に伴う酵母細胞の活性度の比較

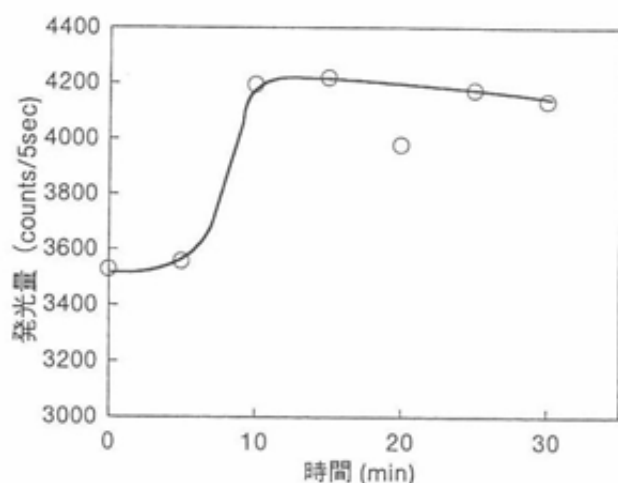
洗浄後の細胞を生理食塩水に懸濁し、栄養欠乏状態とした後、記載の温度で図に示す日数静置した場合の活性度の変化を示したのが第9図-(B)である。日数



第9図-(B) 環境条件に伴う酵母細胞の活性度の比較

の経過に伴い活性度は低下し、4℃で4日間の後さらに30℃で4日間栄養欠乏状態を継続した場合、活性度は実験開始時の2.2%まで減少した。

次に4日間30℃で静置した後、蒸留水の中で栄養欠乏状態において活性度を低下させた酵母細胞に、再びエネルギー源としてグルコースを与えた時の活性度の変化を示したのが第10図である。10分間活性度は上昇し、その後は、実験誤差によると思われる20分後の値を除き一定となった。これはグルコースの添加によ



第10図 グルコース添加による活性度の上昇

て細胞内のNADHやNADPHが増加し、それにより活性度が復元したものと考えられる。

今回報告した酵母細胞の活性度計測の原理には、スーパーオキシドが関係している。スーパーオキシドは、発がん、炎症、老化など多くの生命現象に関わっていることが明らかとなっている。一方、検出法として利用した化学発光は、もっとも検出感度が高い分析法のひとつでありセンサー化が可能な方法である。今後スーパーオキシドと化学発光をリンクさせた方式は、老化現象をはじめとする生命現象の解析に有益な示唆を与えるものと考えられ、そのセンサー化は、研究の進展に大いに寄与するものと期待される。

### 要 約

酵母細胞の活性度を迅速かつ簡便に計測する方法について検討し、以下の結論が得られた。

- 1) 酵母細胞とメナジオンの反応により、細胞濃度に依存するルミノール発光が観察された。
- 2) SODやウミホタルルシフェリンに対する挙動から、

ルミノール発光にはスーパーオキシドが関与すると考えられた。

- 3) 細胞当たりの活性度は、静置培養では増殖過程に伴い双曲線的に減少し、振盪培養では、対数増殖期に最高であった。
- 4) ATP含量は、活性度と類似した傾向を示したが、増殖に伴う変動幅は活性度ほど大きくなかった。
- 5) 活性度は細胞が置かれた環境条件によって大きく変動した。

### 文 献

- 1) 中村 良, 川岸舜朗, 渡辺乾二, 大沢俊彦: 食品機能化学, p53, 三共出版 (1990)
- 2) Egilmez, N. K., Chen, J. B., Jazwinski, S. M.: J. Gerontol., **45**, 9-17 (1990)
- 3) Yamashoji, S., Ikeda, T., Yamashoji, K.: Biochim. Biophys. Acta, **1059**, 99-105 (1991)
- 4) Nishimoto, F., Yamashoji, S.: J. Ferment. Bioeng., **77**, 107-108 (1994)
- 5) 日本ビタミン学会編: ビタミン学 [1] 脂溶性ビタミン, p237, 東京化学同人 (1980)
- 6) 中野 稔, 浅田浩二, 大柳善彦: 活性酸素, p150, 共立出版 (1988)
- 7) McCord, J. M., Fridovich, I.: J. Biol. Chem., **245**, 1374-1377 (1970)
- 8) 浅田浩二, 中野 稔, 柿沼カツ子編: 活性酸素測定マニュアル, p180, 講談社 (1992)
- 9) 浅田浩二: 生化学, **48**, 226-257 (1976)
- 10) Tabata, M., Fukunaga, C., Oyabu, M., Murachi, T.: J. Appl. Biochem., **6**, 251-258 (1984)
- 11) Sakurai, T., Sugioka, K., Nakano, M.: Biochim. Biophys. Acta, **1043**, 27-33 (1990)
- 12) 今井一洋編: 生物発光と化学発光—基礎と実験—, p61, 廣川書店 (1989)