

メナジオンの酸化還元を指標とする酵母細胞の活性度の電気化学的測定

近藤正夫・木下美紀*・伊藤真由子*・安藤俊之 (* 梶山女学園大学)

醸造分野においては、酵母など使用する微生物の生理状態が、製品の品質を大きく左右する。従って、微生物の生理状態を把握し、発酵を最適に制御することが望まれる。これまでに、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、迅速さや簡便さの点で必ずしも充分ではない。

一方、高齢化社会を迎え老化現象への関心が高まっており、食品分野でも食品の老化制御機能が注目を集めている¹⁾。生体の老化は細胞レベルにも反映されるので、細胞の活性度は老化の指標として有効と考えられ、いろいろな方法が呈示されている²⁾。しかし、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、生体を実験対象とすることが望ましいが、微生物細胞や培養動物細胞をモデルにした研究からも、参考となる普遍的な知見を得ることができる。従って、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期待されている。

以上の観点から、筆者らは清酒発酵に利用される真核微生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデルに、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について報告した³⁾。ところで、化学発光法は感度の点で優れているものの、検出器の普及が進んでいないのが現状である。そこでより汎用性の高い電気化学的方法で活性度を計測する方法について検討した。

実験方法

1. 酵母の培養と細胞の計数

酵母は、清酒製造用の *Saccharomyces cerevisiae* FIA を使用した。酵母の培養及び細胞の計数は既報の方法³⁾ に依った。また、生菌率はメチレンブルー染色法⁴⁾ に依った。

2. 酵母細胞の活性度の測定

2. 1 細胞の活性度測定の方法

図1 は、細胞の活性度を電気化学的に測定する原理を示している。嫌気性の生物を除き多くの生物は、酸素存在下で還元性の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として、細胞内で ATP を生成する酸化的リン酸化に関する NADH や、NADPH などの細胞内還元物質や、酸化還元酵素の活性を指標とすることができる。

そこで、適当なメディエーター (仲介) 物質を介して、細胞との反応で生成したメディエーターの還元型を、電極で酸化する際に生じる酸化電流を測定し、その大小から細胞の活性度を評価しようとするのが、本報で取り上げる方法の原理である。メディエーターとしては、広範な生物において電子伝達に関与しているビタミン K の類縁体であり、各種脱水素酵素の電子受容体としても機能するメナジオン (ビタミン K₃) を用いた。

一方、細胞の生化学反応や酵素反応は、被酸化基質存在下で、フェリシアン化カリウムなどの人工メディエーターの電極反応を利用して解析できる。近藤徹弥らは酢酸菌の基質酸化活性⁵⁾ やグルコン酸センサー⁶⁾ について報告している。また、メディエーターのベンゾキノンのみを用いて、細胞の活性度を評価する装置^{7, 8)} も市販されている。

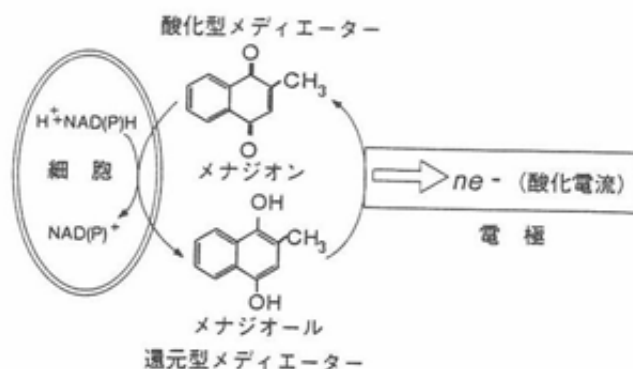


図1 細胞の活性度測定の方法

上述の他の報告とは異なり、本報では、試験時の細胞の酸化還元状態、つまり基質添加によらないで活性度を評価することを目的とした。すなわち、天然の電子伝達系の類縁体であり、基質及びメディエーターの両方の役割を兼ね備えたメナジオンのみを用いて試験を行った。

2. 2 酸化電流測定システム

図2は、酸化電流を測定するシステムの構成を示している。北斗電工(株)製ポテンシostat HAB-151とピーエーエス(株)製ボルタメトリー用セルVC-2を用いて、3電極方式により酸化電流を測定した。作用電極にはグラッシーカーボン電極、比較電極には銀・塩化銀電極、対極には白金カウンター電極を用いた。

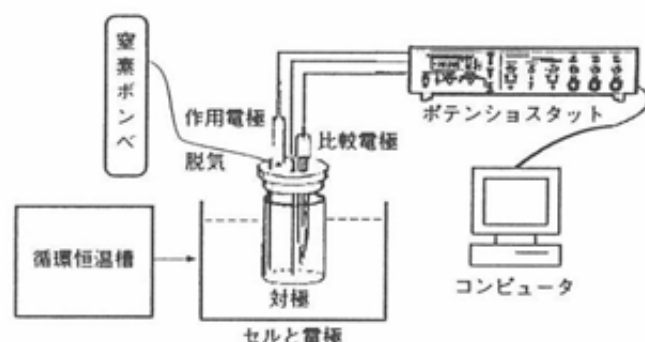


図2 酸化電流測定システム

2. 3 メナジオールの調製

メナジオンの150mMエチルアルコール溶液を原液とし、それに10分間空素通気による脱気を行った後、0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液で希釈して10mMのメナジオン溶液を15ml調製した。次に空素脱気下で0.1Mのハイドロサルファイトナトリウム溶液を1ml加えて、メナジオンが完全にメナジオールに還元した溶液を、10mMメナジオール溶液とした。

2. 4 酸化電流の測定

電極セルに0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液9mlを入れて10分間空素脱気した後、各種細胞濃度の酵母細胞懸濁液5mlを加え、10mMメナジオン溶液1mlを添加後、スターラーを用いて250rpmで撹拌しながら、電位を-110mVに設定し酸化電流を測定した。

3 酵母細胞の活性度測定

3. 1 酵母の保存試験

酵母細胞を、0.1M、pH7.0のリン酸ナトリウム緩衝液に懸濁し 3×10^8 cells/mlに調整した。そ

の細胞懸濁液を、4℃静置、-59℃凍結、30℃静置、または30℃、100rpm振盪の各条件で20時間保存した。20時間後酸化電流を測定し、それぞれの環境条件における活性度を比較した。

3. 2 栄養成分添加による試験

3×10^8 cells/mlに調整した酵母細胞懸濁液を、30℃、20時間100rpmで振盪後、遠心分離(8000rpm、10分、4℃)した菌体を、蒸留水で2回洗浄した。その後、蒸留水、2%グルコース溶液、PGY培地にそれぞれ懸濁した液を、4時間、100rpmで振盪した。さらに、細胞懸濁液を遠心分離で2回洗浄し、再度 3×10^8 cells/mlに調整した後、酸化電流を測定した。

3. 3 各種阻害剤添加による試験

アジ化ナトリウム、とうがらし抽出物(アサマ化成株製)及び銀抗菌剤(品川燃料株製)は、蒸留水でそれぞれ1.0Mと15%に、ジシクロヘキシルカルボジイミド(以下DCCDと略す)はエチルアルコールで1.0Mに調製した。それらを酵母細胞懸濁液に接触反応させた後、酸化電流を測定した。

実験結果及び考察

1. メナジオールの電極反応

1. 1 メナジオールの電流-電位曲線

メナジオンの還元型であるメナジオールは、適当な電位で酸化を受ける。図3は、メナジオンをハイドロサルファイトナトリウムで還元して調製したメナジオールの10mM溶液を10分間空素脱気した後、電位を走査しながら、それぞれの電位にお

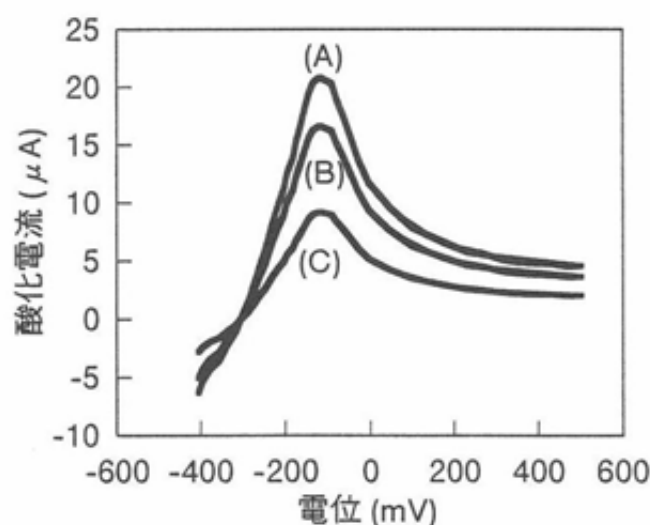


図3 メナジオールの電流-電位曲線

(A)500mV/sec (B)100mV/sec (C)酵母+メナジオン

ける酸化電流を測定した結果である。初期電位を-400mVとして、正の方向へ500mV/secと100mV/secの速度で電位を変化させると、いずれの場合も、-110mV付近に、電極上でのメナジオールの酸化による安定したピーク電流が得られた。このピーク電流は、500mV/secで走査させた方が100mV/secより大きな値を示した。

さらに、メナジオンと酵母細胞を反応させて酸化電流を測定すると、メナジオールの場合と同様に-110mV付近にピークが見られた。このことから、酵母細胞とメナジオンによってメナジオールが生成されることが示唆された。

1. 2 メナジオール濃度と酸化電流の関係

図3の結果より、以下の実験では、電位を-110mVに固定して酸化電流を測定した。図4は、メナジオールの濃度と酸化電流との関係を示している。濃度と電流値の間には、正の相関関係が得られた。従って、細胞とメナジオンの反応による酸化電流値より、メナジオールが何モル生成したかを算出することができる。

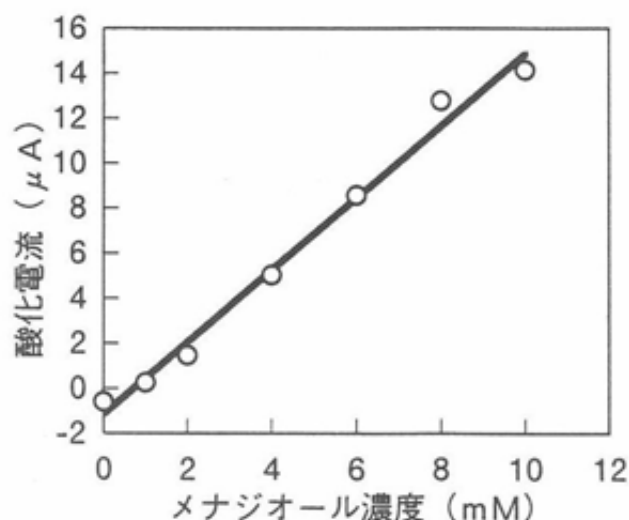


図4 メナジオール濃度と酸化電流の関係

2. メディエーターの影響

図5は、 3×10^8 cells/mlの培養パン酵母細胞（生細胞）または15分間煮沸処理した細胞（死細胞）を、メディエーターである15mMのメナジオン、ベンゾキノン、ジクロロインドフェノール（DCIP）、フェリシアン化カリウムとそれぞれ1分間接触させた場合に生成する酸化電流を示している。

生細胞の場合の酸化電流は、メナジオンが1.66 μAと最も大きく、ついでベンゾキノンは0.73 μA、DCIP、フェリシアン化カリウムは0.5 μA以下であ

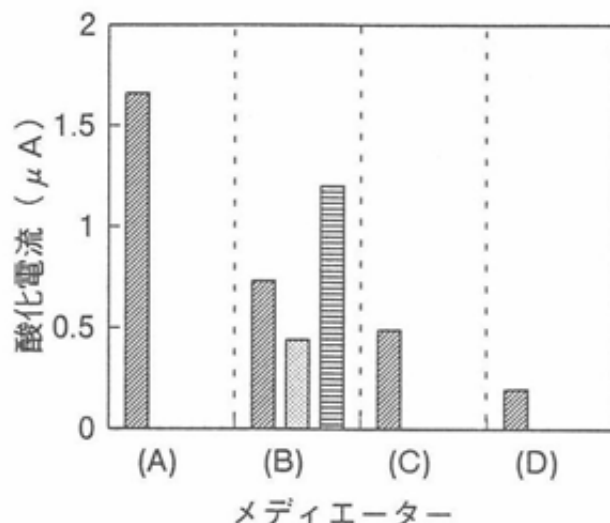


図5 メディエーターの種類と酸化電流の関係

(A)メナジオン (B)p-ベンゾキノン

(C)フェリシアン化カリウム (D)DCIP

■ 無処理細胞 ■ 煮沸細胞 □ 細胞なし

った。死細胞の場合には、メナジオン、DCIP、フェリシアン化カリウムでは酸化電流が流れなかった。一方、ベンゾキノンは、死細胞、細胞無しの場合でも酸化電流が観察され、パン酵母に対して、反応に特異性が見られなかった。従って、試験した4化合物のうち、メディエーターとしてはメナジオンが最も適していると考えられる。

この理由としては、フェリシアン化カリウムは水溶性のため、細胞膜との親和性が低く、細胞の表層のみでしか反応できず、逆にベンゾキノンは、脂溶性のため細胞膜との親和性は高いものの、酸化力が強すぎ、細胞構成成分とも反応してしまうためと考えられる。さらに、ベンゾキノンのみの場合においても酸化電流が観察された理由として、市販ベンゾキノン中に微量に含まれる還元型のヒドロキノンによるものと考えられる。

これに対しメナジオンの場合には、脂溶性のため細胞膜との親和性があり、しかも酸化力が穏やかなため、細胞膜酵素を介した生化学反応によって細胞内還元物質によって還元される。そして生成されるメナジオールは細胞外へ戻され、その結果細胞内の酸化還元状態を伝えることができるものと考えられる。

3. 酵母細胞による酸化電流の生成

3. 1 酸化電流の時間経過

図6は、 10^8 cells/mlの乾燥パン酵母細胞、及び培養酵母細胞と10mMのメナジオンを接触反応させた場合の、酸化電流の時間経過を示している。

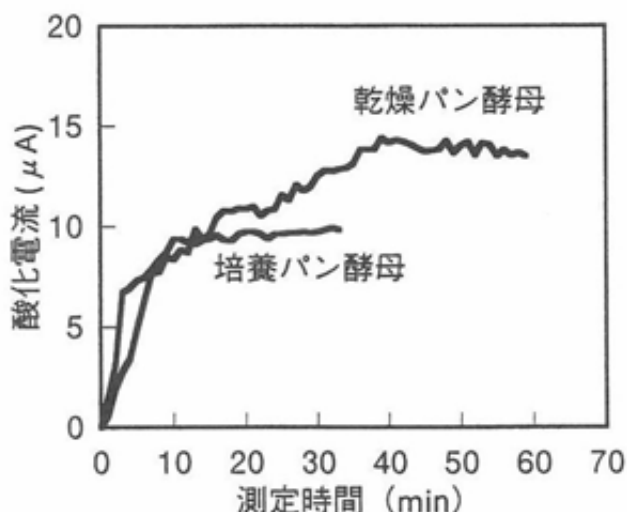


図6 パン酵母による酸化電流の時間経過

培養パン酵母では20分間、市販乾燥パン酵母では40分間にわたり酸化電流は上昇した。

3. 2 酸化電流による活性度測定

図7 は、細胞とメナジオンを接触反応させてから測定開始までの時間をいろいろ変えた場合の、 10^7 cells/ml から 10^8 cells/ml の細胞濃度と酸化電流との関係を示している。1分後に測定すれば、細胞濃度と酸化電流との間に、ほぼ直線となる関係が認められた。このことから、接触反応 1分後の酸化電流を測定すれば、その値から細胞とメナジオンの反応によって生成する酸化電流、すなわち活性度の傾向を迅速に把握することができる

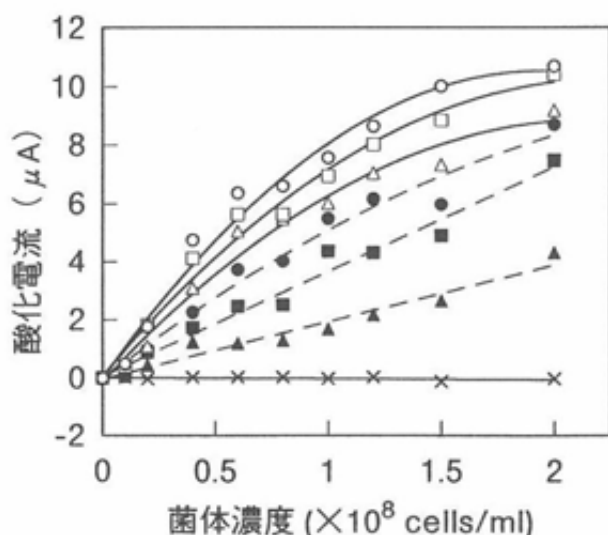


図7 各接触反応時間後における菌体濃度と酸化電流の関係

× 0分 ■ 1分 △ 2分 ○ 3分
▲ 0.5分 ● 1.5分 □ 2.5分

考えられる。よって以下の実験では、接触反応 1分後の酸化電流の測定値によって活性度を評価することにした。

3. 3 酵母細胞濃度と酸化電流の関係

図8は、酵母細胞濃度と酸化電流の関係を示している。死細胞では酸化電流は観察されなかった。一方、生細胞では、 10^4 cells/ml 以下では酸化電流は流れなかったが、 10^6 cells/ml 以降、細胞濃度の増加に伴い酸化電流は増加し 3.16×10^8 cells/ml では $11.4 \mu A$ となった。このように 10^6 cells/ml 以上では生細胞濃度と酸化電流には正の相関関係があることが分かった。これを利用することにより、細胞当たりの活性度が既知であれば、逆に細胞濃度を算出することができる。

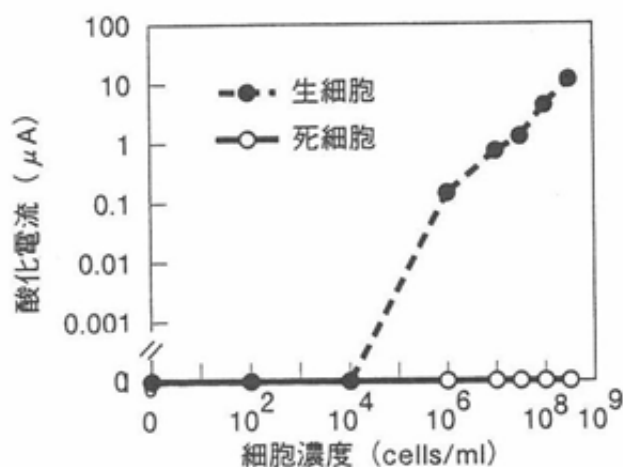


図8 細胞濃度と酸化電流の関係

4. 酵母細胞の活性度への各種因子の影響

4. 1 活性度に及ぼす保存条件の影響

酸化電流で評価する細胞の活性度は、環境要因の変化によって大きな影響を受けることが予想さ

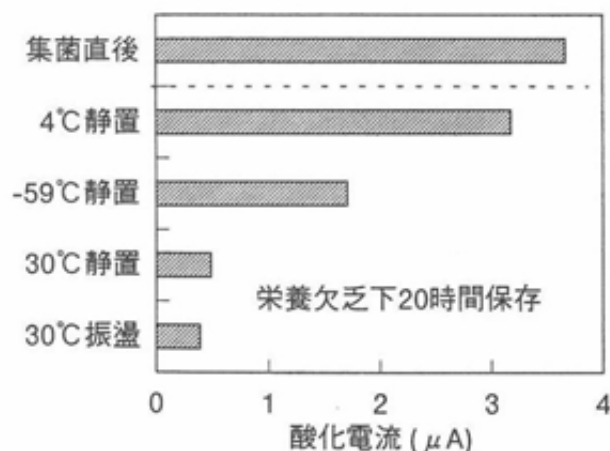


図9 活性度に及ぼす保存条件の影響

れる。図9は0.1M、pH7.0のリン酸ナトリウム緩衝液中の酵母細胞を、各種条件下で20時間保存した場合の活性度を比較した結果である。4℃静置では活性度が若干減少するのみであった。しかし、-59℃の凍結、30℃の静置、30℃の振盪保存の順に、活性度は大きく低下した。このように、細胞の活性度は、温度などの環境条件によって大きく影響を受けることが判明した。

4.2 活性度に及ぼす栄養状態の影響

図10は、16時間培養後のパン酵母を洗浄し、リン酸ナトリウム緩衝溶液中に懸濁した酵母を、30℃で20時間振盪、すなわち栄養欠乏下に置いた場合の、菌体濃度と酸化電流を測定した結果である。菌体濃度は変化しないにもかかわらず、振盪時間欠乏下では、細胞の活性度が低下することが確認された。

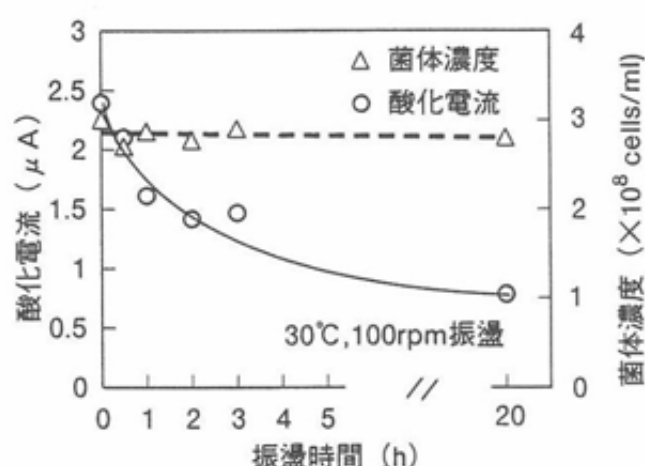


図10 栄養欠乏下における活性度の変化

ところで、栄養欠乏下で低下した細胞の活性度は、栄養状態を改善することにより回復すること

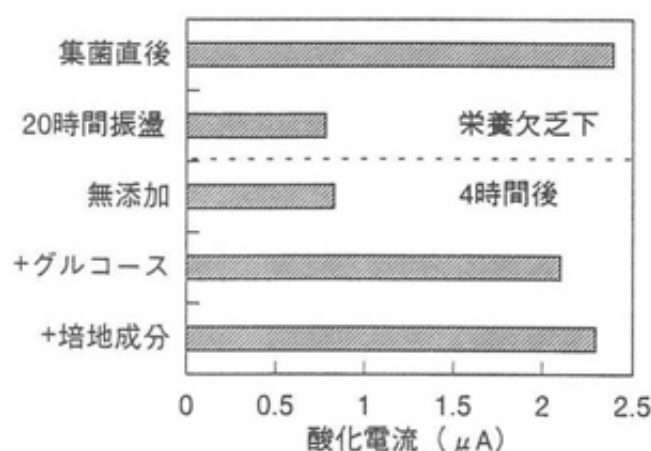


図11 栄養成分添加による活性度の復帰

が予想される。図11は、30℃で20時間振盪され、栄養欠乏条件下に置かれ活性度が低下した細胞に、2%のグルコースやPGY培地を添加した場合の活性度の変化を示している。栄養状態を回復させることによって、活性度は通常のレベルにまで復帰した。

4.3 市販パン酵母の活性度の比較

図12は、市販の乾燥パン酵母3種類と培養して得られたパン酵母細胞について、それらの酸化電流とメチレンブルー染色による生菌率を比較した結果である。酸化電流値と生菌率では、酸化電流値が大きければ、生菌率も高いという傾向がみられた。また、細胞数は同じであっても酸化電流値に差が見られ、種類によって活性度の違いが存在した。なお、乾燥酵母の活性度は、培養酵母の40%以下であった。

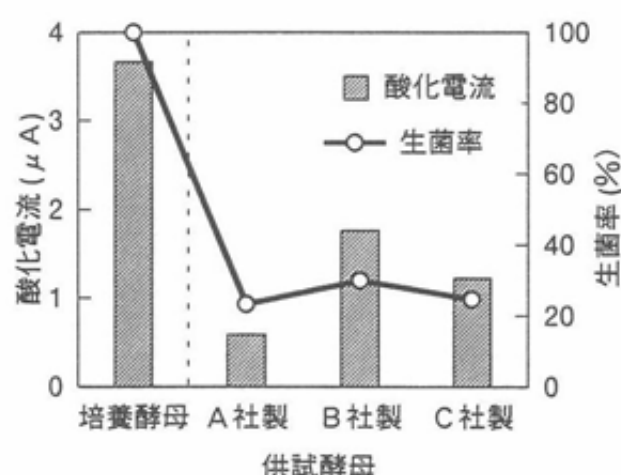


図12 各種パン酵母の活性度の比較

4.4 各種阻害剤の細胞への影響

図13は、酵母細胞とメナジオンとの反応液に、電子伝達系阻害剤であるアジ化ナトリウム、ATPase阻害剤であるジシクロヘキシルカルボジイミド⁹⁾、抗菌剤として利用されている銀抗菌剤、及びとうがらし抽出物を添加した場合の酸化電流を比較したものである。

接触直後は酸化電流そのものも小さいが、銀抗菌剤では、無添加に比べすぐに酸化電流が低下した。さらに、15分間接触させると、アジ化ナトリウムの場合は低下しなかったが、DCCD、とうがらし抽出物、そして銀抗菌剤では格段に酸化電流が低下した。すなわち、細胞阻害剤として知られている物質のうち、アジ化ナトリウムは酸化電流で評価する活性度には影響しないのに対し、DCCD、

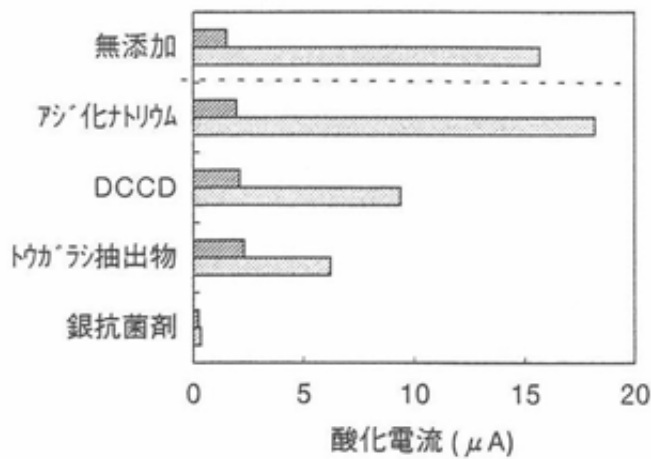


図13 活性度に及ぼす各種阻害剤の影響

■ 接触直後 □ 接触15分後

とうがらし抽出物、銀抗菌剤は顕著な阻害効果を示し、特に銀抗菌剤は速効性であった。このように、酸化電流による活性度によって、細胞への阻害剤の影響を区別することができた。

以上の例が示すように、細胞とメナジオンとの反応で生成するメナジオールの酸化電流によって評価する活性度は、微生物に対する環境因子の影響や、化学物質の生体への影響評価などいろいろな目的に活用することができる。その他、発酵工程における微生物管理や、廃水処理における活性汚泥管理など、高濃度の微生物の生理状態を定性的に把握する必要がある局面で利用価値がある。また、動植物細胞の活性度を測定する場合にも、応用可能であると考えられる。

要約

酵母細胞の活性度を電気化学的に測定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を接触させると、生成したメナジオールによる酸化電流が観察された。
- 2) 酸化電流は細胞濃度に対応し、細胞の生理状態を反映しているので、細胞の活性度の指標として利用できる。
- 3) 活性度は細胞の置かれた保存条件や栄養状態によって変動した。
- 4) 市販パン酵母の活性度に差異が認められた。
- 5) 阻害剤との接触による活性度の変化が観察され、抗菌剤等のスクリーニングに活用できることが判明した。

- 1) 中村良・川岸舜朗・渡辺乾二・大澤俊彦：食品機能化学，p. 229，三共出版（1990）
- 2) 横田享ほか編：老化の科学－21世紀への老化研究をめざして－，p. 243，東京化学同人（1994）
- 3) 近藤正夫・浅田文子・近藤徹弥・天野武雄：愛知食品工技年報，37，33（1996）
- 4) 坂井拓夫：食物・栄養科学シリーズ15，微生物学，p. 53，培風館（1987）
- 5) T. Kondo and T. Ikeda: Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 664（1999）
- 6) 近藤徹弥・榊原信彦：愛知食品工技年報，39，47（1998）
- 7) C. Rossetti, I. Gilli, A. Teruzzi and P. A. Martino: Life Chemistry Reports, 10, 209（1994）
- 8) C. Rossetti, I. Gilli, A. Teruzzi and P. A. Martino: Life Chemistry Reports, 11, 3732（1994）
- 9) 佐見学：発酵協会誌，90，538（1995）