

322 蛍光試料 PI (Propidium Iodide) を用いた細胞膜損傷の解析

○西田 博, 田中友樹, 池内智彦, 永田進一 (神戸商船大)

【目的】生菌数と細胞濁度の間には, 一般的にほぼ比例関係があることが知られている. しかし, 当研究室で単離した *Brevibacterium* sp. JCM 6894 株をエタノールに暴露した時の生菌数と細胞濁度の変化を測定したところ, 両者の間に比例関係は認められなかった. そこで本研究では, 細胞膜損傷のある細胞を蛍光染色することにより, 細胞膜損傷を定量し, 濁度変化, 並びに生菌数変化と細胞膜損傷との相関の有無について検討した. 【方法及び結果】グラム陰性菌とグラム陽性菌のそれぞれの代表として *Escherichia coli* K-12 株と *Brevibacterium* sp. JCM 6894 株を使用した. 培養した菌体を洗浄後, 0% ~ 15% のエタノール溶液中に暴露し, 時間毎に採取した試料の細胞濁度, 細胞膜損傷, 並びに生菌数の各項目を計測した. 細胞膜損傷は採取した試料にヨウ化プロビジウム (PI) 溶液を加えて 10 分間室温で静置後, 菌体を洗浄することによって PI 溶液を除去した後, 励起波長 495nm で蛍光強度 (蛍光波長 600nm) を測定した. その結果, 両菌において, 細胞膜損傷を暴露時間で積分した値と濁度変化との間に相関が認められたが, 生菌数との相関は確認できなかった. したがって, 細胞濁度の減少速度は, その時の細胞膜損傷を有する細胞量と相関があることが示唆された.

Analyses on the membrane injury of microorganisms using fluorescence dye, Propidium Iodide

○ Hiroshi Nishida, Yuuki Tanaka, Tomohiko Ikeuchi, Shinichi Nagata (Kobe Univ. Mercantile Marine)

Key words *Brevibacterium* sp. JCM 6894, *Escherichia coli*, PI Propidium Iodide, 蛍光, 膜損傷, 濁度

324 淡水性微細藻類 *Chlamydomonas reinhardtii* におけるアブジジン酸による環境ストレス耐性の誘導 ―その二―

○吉田賢司, 五十嵐映子, 若月映子, 平田収正, 宮本和久 (阪大・薬・環境)

【目的】地球規模の環境汚染や食糧問題対策のために, 種々の環境ストレス負荷条件下で生育することのできるストレス耐性植物を作出することが必要である. 我々は, 環境浄化や食糧増産に応用できるストレス耐性植物を作出することを最終的な目標に, 微細藻類のストレス応答反応について解析を行っている. 前回は, 植物におけるストレス応答ホルモンとして知られるアブジジン酸 (ABA) による淡水性緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* における酸化ストレス緩和効果について報告した. 今回は種々の環境ストレスに対する緩和効果について報告する. 【方法及び結果】ABA を培地に添加して, 浸透圧, 塩, 重金属の三種の環境ストレス条件下で培養した結果, ABA 添加群はストレスによる増殖阻害を緩和していた. しかし, 24 時間の ABA 処理細胞に対して上記の三種のストレスを短時間負荷しても, 直接的な緩和効果は見られなかった. さらに, どの環境ストレス条件下においても細胞内でストレス負荷無しの時と比較して光照射条件下で有意に活性酸素種の生成量が増加しており, 酸化ストレスを受けていた. また, ABA 処理細胞においてはこれらのストレスに起因する活性酸素の生成は低く抑えられていたことから, ABA は三種の環境ストレスそのものを緩和する細胞内応答を引き起こすのではなく, これらのストレスによって二次的に引き起こされた酸化ストレスのみを緩和している可能性が示唆された.

Induction of tolerance to environmental stresses in the fresh water microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, by abscisic acid

○ Kenji Yoshida, Eiko Igarashi, Eiko Wakatsuki, Kazumasa Hirata, Kazuhisa Miyamoto (Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)

Key words *Chlamydomonas reinhardtii*, abscisic acid, oxidative stress

323 海産性緑藻 *Dunaliella tertiolecta* における Zn^{2+} 及び Cd^{2+} による phytochelatin 合成調節機構の解析

○辻直城¹, 岩部 修¹, 田河真理子¹, 平田収正¹, 宮坂 均², 高木昌宏³, 宮本和久¹ (¹ 阪大院・薬・環境, ² 関西電力・総研, ³ 北陸先端院・材料)

【目的】Phytochelatin (PC) は, 重金属存在下, GSH を基質として誘導的に合成されるペプチドであり, 植物や藻類において重金属無毒化を担う. PC 合成は一般に Cd^{2+} によって最も強く誘導されるが, 我々は, *D. tertiolecta* において Zn^{2+} が最も強い誘導能を持つことを見出した. そこで, この特性をストレス耐性植物作出へ応用することを目的に, PC 合成調節機構について研究を行ってきた. 今回は, Zn^{2+} と Cd^{2+} の PC および GSH の合成に関わる酵素の活性に対する影響について比較検討した. 【方法及び結果】200 μ M Zn^{2+} および 400 μ M Cd^{2+} で処理した細胞から得た粗酵素分画の PC synthase および GSH 合成系の *O*-acetylserine (thiol) lyase, γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS), glutathione synthetase (GS) の活性を測定した. PC synthase は, Zn^{2+} によって, Cd^{2+} よりもやや弱い, 植物の場合よりも有意に強く活性化された. 一方, Zn^{2+} 処理により γ -ECS および GS の活性が Cd^{2+} 処理の場合よりも高くなった. これらの結果から, 本株における Zn^{2+} の強い PC 合成誘導能は, PC synthase の植物よりも強い活性化と, γ -ECS および GS の活性上昇による GSH 供給量の増大に起因することが示唆された. また, 細胞内 ROS を DCFH-DA を用いて FACS で解析したところ, Zn^{2+} 処理で ROS 発生が認められたが, Cd^{2+} では認められなかった. したがって Zn^{2+} による GSH 合成促進は, ROS 発生を介した γ -ECS および GS の活性上昇によるものであると考えられる.

Biosynthetic regulation of phytochelatin synthesis by Zn^{2+} and Cd^{2+} in marine alga, *Dunaliella tertiolecta*

○ Naoki Tsuji¹, Osamu Iwabe¹, Mariko Tagawa¹, Kazumasa Hirata¹, Hitoshi Miyasaka², Masahiro Takagi³, Kazuhisa Miyamoto¹ (¹ Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., ² KEP Co., Inc., ³ Sch. Materials Sci., JAIST)

Key words *Dunaliella tertiolecta*, phytochelatin, zinc, cadmium, phytochelatin synthase, GSH synthesis

325 メタノールラジカルガスによる殺菌機構の解析

○川村幸嗣¹, 董 党紅¹, 佐藤薫子¹, 佐野庸治², 民谷栄一², 二本鋭雄³ (¹ バイオメディア, ² 北陸先端大, ³ AIST. HSS セ)

はじめに メタノールから触媒反応により発生するメタノールラジカル (MR) ガスを利用した殺菌システムは, EOG 以上の強い殺菌力を持ち, 残留性・腐食性も無いことが確認され, 既に実用化されている. 本システムの殺菌効果はラジカルによると考えられているが, その殺菌機構には不明点が多い. そこで本実験では MR ガスの殺菌作用点が遺伝子・細胞膜・タンパク質の部位にあると予想し, MR ガス曝露によりそれぞれがどのような変化を示すか検証し, その結果から MR ガス滅菌システムの殺菌機構を明らかにしようとした.

実験 酵母に MR ガスを曝露させた. 曝露後の酵母から DNA を抽出し, 電気泳道をおこなった. また酵母に細胞二重染色を行ない, 細胞膜透過性について確認した. さらにタンパク質を MR ガスに曝露させ, SDS-PAGE および等電点電気泳動を行なった.

結果 対照酵母の DNA 電気泳道像では塩基対のバンドが確認できたが, MR ガス滅菌後の酵母では確認できなかった. これは酵母の DNA 鎖が MR ガスによって切断され, バンドを形成できる程の大きさの DNA 鎖が消失したとと考えられた. また MR ガス曝露酵母の細胞二重染色像では対照酵母とは異なる蛍光が見られ, 細胞膜透過性は MR ガス曝露により変化したこと, から, MR ガスにより細胞膜が損傷されたことが明らかとなった. さらに MR ガス曝露はタンパク質を分解・酸化・架橋することも電気泳動像から明らかとなった. この様に, MR ガスは DNA を分解し, 細胞膜を傷害して, さらにタンパク質を変性させることが確認できた. これはヒドロキシラジカルで考えられている細胞への障害機構と同様であり, MR ガスにおいても類似した作用によって殺菌効果を引き起こしていることが推察された.

Sterilization Mechanism of Methanol Radical Gas Sterilization System

○ Koji Kawamura¹, Masako To¹, Kaoruko Satoh¹, Tsuneji Sano², Eiichi Tamiya², Etsuo Niki³ (¹ Bio Media Co., Ltd., ² Japan Adv. Inst. Sci. Technol., ³ HSS-RC, AIST)

Key words 殺菌機構, ラジカル, タンパク質, 核酸, 細胞膜, 微生物