原 著

ビ タ ミ ン B₁ 要求大腸菌変異株における紫外線障害の
光修復作用についてPhotoreactivation in Vitamin B₁-requiring *Escherichia coli*

国立栄養研究所 (The National Institute of Nutrition)

山 崎 陽 代 (Haruyo Yamazaki) 鈴 江 緑 衣 郎 (Ryokuero Suzue)

真 田 宏 夫 (Hiroo Sanada) 中 嶋 洋 子 (Yoko Nakashima)

河 田 正 治 (Shoji Kawada)

It has been known that ultraviolet (UV) irradiation causes mutation and death in many organisms, and that UV-inactivated organisms can be photoreactivated.

The present paper describes the photoreactivation in vitamin B₁-requiring mutants of *E. coli* B. Three kinds of mutants, which require respectively pyrimidine, thiazole and VB₁, were isolated. The cells of wild strain and three mutants were irradiated with UV light of 255 m μ at the rate of 0.194 mW/cm². After irradiation the cells were immediately exposed to photoreactivating (PR) light of 320—420 m μ for 15 to 60 minutes.

The survival curves of Th⁻, B₁⁻ mutants were similar to that of the wild strain, but Pm⁻ mutant was extremely sensitive to UV irradiation.

When cells were irradiated by UV light at a dose of 40×0.194 mW/cm², the wild strain was almost completely reactivated by exposure to PR light for 15 minutes, and Th⁻, B₁⁻ mutants were reactivated in 60 minutes. However, in Pm⁻ mutant, the phenomenon of photoreactivation was not observed.

After irradiation of UV light at a dose of 80×0.194 mW/cm², only the wild strain was reactivated by exposure to PR light for 60 minutes. On the other hand, none of three mutants could be reactivated.

The present results indicated that in the wild strain and VB₁-requiring mutants of *E. coli* B, UV-induced damage was repaired by exposure to PR light, although the photoreactivating ability of mutants was lower than that of the wild strain. It was concluded that the photoreactivating activity differs by the kind of mutants and the degree of UV damage.

紫外線照射が生物に及ぼす影響については、種々の研究がなされているが、生物にとって最も重要な作用として、ビタミンD生合成に関与することが古くから知られている。しかし一方、紫外線には多くの害作用があり、過剰照射の場合には皮膚炎や皮膚癌を発生させたり、微生物においては、変異や致死を誘発させることなどが知られている¹⁾。

このような紫外線の害作用は、紫外線が細胞に影響を及ぼして DNA に変化を起こすために生じるものであ

ることがわかっている。そして細胞における紫外線障害は、ある波長の光線を照射することによって修復されることが、1949年、Kelner によって発見され²⁾、この光修復現象は、生物の生命現象や遺伝、発癌、放射線障害などの研究とも関係が深く、興味深い問題として認識されてきた。最近、この修復作用を有する光線は $320\text{m}\mu\sim 420\text{m}\mu$ の波長域の近紫外線であることが報告されている³⁾。

今回著者らは、ビタミン B₁ 要求大腸菌変異株における紫外線障害の光修復作用について研究し、ビタミン B₁ 生合成の各酵素系に及ぼす紫外線照射の影響と光修復作用について研究したので報告する。

実験方法

(1) 使用菌株

E. coli B (ATCC 11303) と本菌より分離した次の3種のビタミン B₁ 要求変異株、すなわち、ピリミジン (Pm) 要求株、チアゾール (Th) 要求株、ビタミン B₁ (B₁) 要求株を使用した。

(2) 変異株の分離法

E. coli B に紫外線照射後、ペニシリンスクリーニングを利用した変異株の分離法⁴⁾ を用いて3種のビタミン B₁ 要求変異株を分離した。

(3) 使用培地

1. 最小培地：Gray and Tatum 培地⁵⁾ を使用した。
2. 保存用培地：*E. coli* B 野生株は普通寒天培地（日水製薬）の斜面に、またビタミン B₁ 要求変異株は、ビタミン B₁ 塩酸塩を 10^{-5}M 添加した最小培地の斜面にうえ、 37°C 、24時間培養した後冷暗所に保存した。
3. 液体完全培地：最小培地に酵母エキスを 0.5% 添加して使用した。

(4) 紫外線照射と光修復処理

各菌株を保存培地に24時間培養後、約2白金耳をかきとり、滅菌生理食塩水で遠心洗浄後、生理食塩水に大抵 10^8 個/ml の菌濃度になるように懸濁し、菌液約 10ml をシャーレに入れ、 $255\text{m}\mu$ 、 $0.194\text{mW}/\text{cm}^2$ の紫外線（東芝殺菌灯 GT-1511NA）を10秒、20秒、40秒、80秒間照射し、各時間ごとに0.1ml を液体完全培地に接種した。

光修復処理としては、紫外線照射直後に $320\text{m}\mu\sim 420\text{m}\mu$ の光線（東芝 FE 2300）を照射し、0.1ml を液体完全培地に接種した。 37°C 、20時間培養し、生菌数を測定することにより、紫外線照射による致死率と、光修復処理による光修復率を算出した。

実験結果

(1) 致死率

紫外線照射による致死率では、Th 要求株と B₁ 要求株は野生株と同じような傾向を示し、10秒の紫外線照射ではほとんど影響がなく、40秒ではほぼ完全に不活性化した。しかし Pm 要求株だけは10秒で非常に低い生存率を示し、紫外線に対して特に感受性が強いという現象がみられた (Fig. 1)。

(2) 光修復率

紫外線照射後、 $320\text{m}\mu\sim 420\text{m}\mu$ の光線照射を行ない、紫外線障害の光修復率を調べた結果、 $40\times 0.194\text{mW}/\text{cm}^2$ の紫外線量によって障害を受けた場合、野生株は15分の光線照射で100%に近い修復率を示し、Th 要求株、B₁ 要求株では60分の光線照射で40~60%の修復率を示した。しかし Pm 要求株には修復が認められなか

った (Fig. 2)。

$80 \times 0.194 \text{ mW/cm}^2$ の紫外線量によって障害を受けた場合には、野生株だけが60分の光線照射で修復が認められたが、ビタミン B₁ 要求変異株においてはいずれにも修復が認められなかった (Fig. 3)。

考 察

紫外線照射が細胞に作用して突然変異や致死を誘発させることはよく知られている。これらの紫外線障害は修復光線を照射することによって修復される。紫外線障害の原因のうち重要なものは、細胞内 DNA にできるピリミジン体のダイマーであり、このピリミジン体のダイマーは、光線によって活性化される酵素によって monomerize され、紫外線障害から修復されることが報告されている⁶⁾⁷⁾。

Fig. 2. Photoreactivation (UV-dose $40 \times 0.194 \text{ mW/cm}^2$)

著者らが行なった実験結果から、ビタミン B₁ 要求大腸菌変異株においても紫外線障害の光修復現象が認められた。また変異株の光修復能は野生株に比べて低いことや、変異株の種類や紫外線の障害によって光修復率に差があることなどを認めた。これらのことから、紫外線に対する感受性は修復能と関連があることが推定される。

Pm 要求株は紫外線に対して特に感受性が強く、光修復能もほとんど認められなかった。これは核酸のピリミジン体がプリン体よりも約10倍も紫外線に対して高感受性である⁸⁾ ことから考えて、Pm 要求株の紫外線に対する高感受性と何らかの関係があるのではないかと考えられ、興味深い現象である。

ビタミン B₁ の生合成は、主に大腸菌の変異株を用いて研究され、ピリミジン部とチアゾール部がそれぞれ合成され、それらからビタミン B₁ が合成されることが知られている。ビタミン B₁ 生合成の各酵素系に対する紫外線の作用が異なることは、ビタミン B₁ 生合成の研究上重要なことであると思われる。

Fig. 1. Effect of UV-irradiation on *E. coli*

Fig. 3. Photoreactivation (UV-dose $80 \times 0.194 \text{ mW/cm}^2$)

要 約

ビタミン B₁ 要求大腸菌変異株を用いて、紫外線照射直後の致死率と、紫外線照射後、320m μ ~420m μ の光線を照射することによって修復される光修復率とを調べ、紫外線障害の光修復作用を研究した。その結果、次のことを認めた。

- (1) ビタミン B₁ 要求大腸菌変異株においては、紫外線障害の光修復能力は、野生株に比べて低い。
- (2) 光修復率は変異株の種類、紫外線照射による障害の程度によって異なり、Pm 要求株にはほとんど光修復現象がみられなかった。

本研究は三島海雲記念財団の学術研究奨励金の御援助に負うことが多い。深甚な謝意を表する。

また、ビタミン B₁ 要求変異株分離に関する山口大学医学部微生物学教室吉井善作助教授の御協力を深く感謝する。

文 献

- 1) F. Urbach : The biologic effects of ultraviolet radiation, p. 25 Pergamon Press, (1969).
- 2) A. Kelner : *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.)*, **35**, 73 (1949).
- 3) J. Jagger and R. S. Stafford : *Biophys. J.*, **5**, 75 (1965).
- 4) B. D. Davis : *Experimentia*, **6**, 41 (1950).
- 5) 友田宜孝, 坂口謹一郎, 山田正一, 朝井勇宣 : 微生物工学講座 2 微生物実験法, p. 118 共立出版, (1962).
- 6) R. B. Setlow and W. L. Carrier : *J. Mol. Biol.*, **17**, 237 (1966).
- 7) J. S. Cook : *Photochem. Photobiol.*, **6**, 97 (1967).
- 8) J. Jagger (武部 啓訳) : 紫外線光生物学, p. 114 共立出版, (1969).

(受付: 昭和45年2月1日)