

## 論文内容の要旨

応用生命化学専攻

平成11年度博士課程進学

氏名 長坂 征治

指導教官 森 敏

### 論文題目 *Cyanidium caldarium* の金属代謝

Al は土壌の約 7%を占めており、最も多量に存在する金属元素である。pH が中性に近い土壌中では、Al は主として不溶性の  $\text{Al}_2\text{SiO}_5$  として存在し、植物にとって無毒である。しかし、土壌 pH の低下に伴い Al は、様々なイオン形態となり溶出する。特に pH が 4.5 以下になるような強酸性土壌では、Al の大部分が  $\text{Al}^{3+}$  の型で存在している。 $\text{Al}^{3+}$  は、植物の生育を著しく阻害するため、酸性土壌における作物生産の抑制因子の一つと考えられている。強酸性土壌は、世界の耕作可能面積の約 30%を占めるため、このような不良土壌でも生育可能な Al 耐性植物の開発は、人口増加に伴う食糧不足を回避する有望な方策と考えられる。現在までに、Al 誘導性遺伝子、あるいは、Al 耐性機構に関連する遺伝子を導入した形質転換植物が幾つか開発されている。しかしながら、強酸性土壌で正常に生育する植物の創製には至っていない。

*Cyanidium caldarium* は、好熱・好酸性の単細胞紅藻で世界各地の酸性温泉あるいは、火山の噴気孔に分布している。この紅藻は、核、ミトコンドリア、葉緑体を一つずつ持つことから、最も原始的な真核生物の一つであると考えられている。そのため、生物の進化過程のモデルとして、あるいは、細胞分裂の機構に関する研究の対象と

して用いられてきたが、それ以外の生理学的な研究についての報告は少ない。*C. caldarium* の生息するような酸性温泉水には、多くの金属イオンが溶解しており、この紅藻が、金属に対して高い耐性能を持つことが予想された。しかしながら、これまでに、*C. caldarium* の金属耐性の機構について生理学的な研究はなされていない。本研究は、*C. caldarium* の金属耐性機構を明らかにし、Alをはじめとした金属に耐性の植物創製に寄与しようとするものである。

### 1. *C. caldarium* の金属耐性

*C. caldarium* の金属に対する耐性能の評価を、50°Cの培養温度で行った。この紅藻は、多くの金属に対して高い耐性を示し、対照区に対する生育速度は、1 mM の  $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  の存在下で、それぞれ、67, 81, 103, 103, 80%であった。Al に対しては特に高い耐性を示し、100 mM, 200 mM という高濃度の  $Al^{3+}$  存在下での生育は、対照区に対して 83, 58%の生育速度であった。更に、金属存在下で培養した細胞の金属含有量を測定した。Zn, Mn は、細胞内の濃度が特に高く、細胞乾重量あたり、それぞれ、0.23%, 0.16%であった。これとは対照的に、Al, Cu, Ni の細胞内濃度は非常に低く抑えられており、特に Al に関しては、湿重量あたりの細胞内 Al 濃度 (3.1 ppm) が、培地 (100 mM = 2700 ppm) と比較して約 1000 分の 1 に維持されていた。更に、培養温度 30°C では、50°C の場合と比較して、より高い Al 耐性を示した。この時、30°C で培養した細胞内の Al 濃度は、50°C で培養した細胞の約 10 分の 1 と、低く抑えられていた。これらのことから、細胞内の Al 濃度を低くすることで耐性を獲得していると考えられる。このことから、*C. caldarium* には、細胞内へ Al を取り込まない、あるいは、排出するなど、細胞内 Al 濃度を低く維持するための機構が存在していると考えられる。

*C. caldarium* が、特に Al に対して高い耐性を持つことから、細胞内の Al 濃度の変化に注目して、幾つかの実験を行った。Fe 濃度を一定に保ち Al 濃度を変化させた培地では、Al 濃度と共に、細胞内の Al 濃度は上昇するが、細胞内 Fe 濃度は逆に減少していた。また、培地中の Al 濃度を一定に保ち、Fe 濃度を上げた場合、細胞内 Al 濃度は減少していた。このことから、*C. caldarium* の細胞内に存在している Al は、Fe の吸収あるいは、蓄積機構に関連していることが示唆された。一方、100 mM  $AlCl_3$  存在

下で、1 時間の CCCP(脱共役剤)処理を行うと、CCCP 処理濃度と共に、細胞内 Al 濃度が上昇した。このことから、共役によって得られるエネルギーを利用して、細胞内の Al を排出している、あるいは、培養液中の Al を取り込まないようにしていることが示唆された。

## 2. *C. caldarium* の細胞内顆粒

*C. caldarium* 細胞を走査型電子顕微鏡(TEM)で観察すると、核の近傍に直径 100 ~200 nm の高い電子密度を持つ顆粒(以下、EDB: electron-dense body)の存在が認められた。また、EDB の電子線回折からは、明確な結晶構造は認められず、金属がアモルファス状に存在しているものと推定された。TEM-EDX での元素分析の結果、EDB には、多量の P, O, Fe が含まれており、また、微量ながら、K, Ca, Mg なども含まれていた。P, Fe の、細胞内でのマッピングの結果、両元素の EDB への局在が示された。EDB は、生育段階に関わらず、ほとんどの細胞で観察され、また、EDB の構成元素の割合はほぼ一定で、P と Fe の比率(P/Fe)は、1.3~2.0 の範囲内にあった。一方、Al 処理した細胞の EDB でも、構成元素の大部分は P, O, Fe であったが、それに加えて Al の存在が認められた。細胞内 Al のマッピング分析の結果、Al 処理細胞内での EDB への Al の集積が示された。すなわち、*C. caldarium* は、EDB に Al を捕捉することで無毒化していると考えられた。

EDB の構成元素の多くが P, O, Fe であること、また、EDB の電子顕微鏡写真から、EDB が一様の物質ではなく、さらに小さい粒子の集合体として構成されていることから、EDB が、*C. caldarium* のフェリチンである可能性が考えられた。トウモロコシのフェリチンに対する抗体を用いた、*C. caldarium* タンパク質のウエスタンブロットティングでは、フェリチンタンパク質の存在が確認された。しかしながら、同じ抗体を用いたイムノゴールドアッセイでは、金粒子は EDB 上へ局在せず、主として葉緑体全体に分散しており、フェリチンである可能性は低いと考えられた。

EDB の Fe の存在形態を明らかにするために、ESR による分析を行った。未破碎細胞の ESR スペクトルには、g 値 4.15 に検出される、細胞内のタンパク質などに含まれる高スピン状態の Fe のシグナルの他に、未同定の非常に強い等方性のシグナルが g 値 2.00 に観察された。また、細胞破碎液の分画の結果、この等方性シグナルのみが

観察される画分を取得した。この画分に、100 mM の EDTA を加え、室温に 2 時間放置した後、再度 ESR で測定すると、等方性のシグナルが減少し、EDTA-Fe<sup>3+</sup>のシグナルが増加していた。従って、等方性のシグナルはクラスター状の Fe<sup>3+</sup>に起因するシグナルであることが示された。C. caldarium 細胞内の Fe の多くが EDB に局在していることから、このシグナルが EDB に集積しているアモルファス状の Fe<sup>3+</sup>のものであると考えられた。更に、この Fe<sup>3+</sup>のシグナルは培地中の Fe 濃度を如実に反映していた。すなわち、アモルファス状の Fe<sup>3+</sup>のシグナルは、Fe 濃度が通常の 10 分の 1 の培地で生育した細胞では、ほとんど消滅し、逆に Fe 濃度が通常の 10 倍の培地で生育した細胞では明確な増加が認められた。このことから、EDB が、C. caldarium 内で、Fe の蓄積機構として働いていることが示唆された。一方、EDB が P, O, Fe を多く含むことから、ポリリン酸-Fe<sup>3+</sup>、リン酸-Fe<sup>3+</sup>、フェリチン-Fe<sup>3+</sup>の ESR スペクトルと EDB の等方性シグナルとの比較を行ったところ、ポリリン酸-Fe<sup>3+</sup>のシグナルと非常に類似しており、EDB が、ポリリン酸-Fe<sup>3+</sup>を主成分として構成されているものと結論された。

以上の結果から、C. caldarium の Al 耐性機構について以下のような知見が得られた。

- 1) C. caldarium は、細胞内の Al 濃度を低く維持することで、高い耐性を示し。そのためには、共役によるエネルギーに依存した細胞内 Al を排出する機構が関与している可能性がある。
- 2) EDB は、ポリリン酸顆粒であり、通常の条件下では Fe の蓄積機構として機能しているが、Al 条件下では細胞内の Al と結合することで、これを無毒化している。

本研究では、Al 耐性植物の創製にはいたらなかった。しかしながら、ポリリン酸が Fe の貯蔵物質として働いていること、そして、Al 耐性にも貢献していることを明らかにした。現在までに、多くの生物でポリリン酸が、Ca, Mg などの 2 価のカチオンの貯蔵機構として機能していることが報告されているが、Fe の貯蔵機構、そして、Al 耐性機構としての働きについて明確に示されたのは、本研究がはじめてである。今後、高等植物において、ポリリン酸の合成能を強化することで Al 耐性が向上されることが期待される。