

9119 なぜ *Dunaliella* sp. は南極の高塩水湖で生きられるか

綿貫 知彦(神奈川県衛生研究所)

1.はじめに 南極大陸の昭和基地付近にある高塩水湖の船底池より分離・培養した等長の2本の鞭毛をもつ単細胞藻類(緑藻類) *Dunaliella* sp.を材料にして塩、低温および遮光ストレスがこの藻類にどのような影響を与えるかを主として核磁気共鳴分光法(^1H および ^{13}C -NMR)を用いて「なぜ*Dunaliella* sp.は南極の高塩水湖で生きられるか」に関して検討を加えた。その結果、主要な浸透圧調整物質であるGlycerolを指標とすることにより各種ストレスの影響を容易に診断することが出来た事とGlycerol自身の代謝・動態が本研究の鍵であることもわかった。

2.材料と方法 Watanuki et al.(1987)によって南極昭和基地付近の湖塩水湖である船底池より分離された*Dunaliella* sp.および比較のため*D. primolecta*(UTEX LB 1600)を用い3%NaCl,pH 8.0のJohnson et al.(1968)の培地に植えついだ。塩ストレスは3%NaClから1.5%Hypotonic および6%NaClのHyoertonic shockを与えた。低温ストレスは対数増殖期の細胞を-20℃のフリーザに保存し、10,20,30日後に、遮光ストレスは対数増殖期の培養瓶を黒色の布で覆い、培養3,6 および12日目に実験に供した。

3.結果

a: ^{13}C -NMRによるGlycerolの測定: ^{13}C -NMRで*Dunaliella*を生きたままで測定したところGlycerolのみのシグナルが得られたことから、主要な代謝産物はGlycerolであり各種ストレスの指標となることがわかった。

b: ^1H および ^{13}C -NMRによる塩ストレスの影響:3%NaClから6%NaClへのHypertonic shock 2時間後では3%NaCl時のGlycerol量に比して南極産では140%,*D. primolecta*では132%となった。また3%から1.5%NaClのHypotonic shockでは南極産では3%時32%,*D. primolecta*では22%になった。以上の結果からHypertonic shockではGlycerolの合成,Hypotonic shockではGlycerolの分解で浸透圧調整が行われていると考えられた。

^1H -NMRでは今までに得られなかったAlanine,Betanine,Choline,Lactateなどのシグナルも分離することが可能となる浸透圧調節とGlycerol合成・分解との関係を細胞が生きたままで実験できる系を確立した。

c:低温および遮光ストレス:細胞中のGlycerol含有量は*D. primolecta*よりも南極産の方が高く、低温および遮光ストレスに対して南極産の方が*D. primolecta*の方が強かった。また3,6 および 9%NaCl *Dunaliella*をそれぞれ培養した結果、塩濃度の高い培地で培養した方が各種のストレスに強いことがわかった。

4.考察と要約:塩、低温および遮光ストレスいずれの場合にも細胞中のGlycerolが深く関係していることがわかった。このことは*Dunaliella*が南極の高塩水湖で生きられることと深く関係していることを示唆していると考えられた。

9119 なぜ *Dunaliella* sp. は南極の高塩水湖で生きられるか

綿貫 知彦 (神奈川県衛生研究所)

1. はじめに

*Dunaliella*属は単細胞の緑藻類で細胞中に大量のGlycerolが含まれていることが報告(Craige & McLachlan, 1964) されてからこの属は注目されてきた。培地のNaCl濃度が0.1 Mから飽和NaClまで増殖することが出来る。一般に、真核生物の藻類はイオンの蓄積やcompatible solutesの合成または分解によって浸透圧調節ができる。後者のmechanismは特に、*Dunaliella*を用いて行われ、glycerol cycleにおけるsynthesised and metabolisedで数多くの研究されすでに、Wegman(1986)のReviewがある。

この属の浸透圧調節には2つの段階がある、細胞外の浸透圧が増加もしくは減少した場合、まず細胞容積を増減させて、ある程度の浸透圧を保つた後に細胞内のglycerolなどの浸透圧調節物質を増減させて細胞容積を元に戻すものが良く知られている(e.g. Ben-Amotz & Avron, 1973; Borowitzka & Brown, 1974)。

このように*Dunaliella*属は藻類の中でも特異であることから、数多くの報告がされているが我々によって初めて南極の高塩湖から分離、培養された*Dunaliella* sp. (Watanuki et al., 1987)は生息していた湖が高塩水湖であること、南極の冬季は低温かつ太陽が出ないという気象条件からユニークな浸透圧調節と共に遮光および耐凍性があることが推察できるなど、他の*Dunaliella*属と異なる生態上の興味を有している。

本稿では南極産*Dunaliella*の遮光および耐凍性の実験を実施する上で必要な基礎的性質である浸透圧調節について培地のNaCl濃度によって浸透圧調節物質がどのように変化するかを主として¹H-および¹³C-NMRを用いて検討した。南極産*Dunaliella*との比較のため実験の一部では*D. primolecta*を用いた。

2. 実験

2-1. 藻類の培養方法

南極産*Dunaliella* sp.はWatanuki et al. (1987)によって南極昭和基地付近の高塩水湖・船底池から分離培養した株と対照として用いた *D. primolecta* (UTEX LB 1600) はDr. Y. Yamaguchi (Germantown Industrial Research Ins., Chugoku) より分与された。培養方法はJohnson et al. (1968)の合成培地を用い、pHは8.0、照度8000 Lux. 光周期12L:12Dで1000 mlの培養瓶でmillipore filter (0.2 μ)を用いて滅菌通気した。

2-2. Glycerol 量の測定

各濃度で培養した細胞を遠心(3000 rpm)で集めた細胞に水(5 ml)を加え超音波洗浄機で5分間処理した後、90℃で10分間放置、これを遠心分離後、0.45 μのフィルターで濾

過し、ガスクロマトグラフィー (島津, カラム WCP-0V101-M50) で分析した。

2-3. 細胞容積の変化

3% NaClで培地で培養した南極産 *D. sp.* と *D. primolecta* を6 or 9% Hypertonicまたは1.5 or 0.9% Hypotonic shock を与えた時に生じる細胞容積の変化をコールターカウンターで測定した。

2-4. NMR (核磁気共鳴分光法) による代謝産物の測定

対数増殖期の南極産 *D. sp.* を20°C, 3000 rpm, 12分間遠心し, TSP(3-Trimethylsilyl propane sulphonic acid) を重水でと化したもの50 μ l と沈沙を同一培地450 μ l を再封入してsample450 μ l を直径5mmのsample管を用いて¹H-NMRは270 MHz, 33K data pointで繰り返し7 sec, 積算63回, ¹³C-NMRは67.7MHz, data point 3.3 K, Flip angle 45 パルス幅4.0 で繰り返し2.0 sec., 積算26000回で行った。3% NaCl添加培地中で増殖した南極産*D. sp.* を3等分し, 3%は遠心, 集藻し, 残りはそれぞれ6, および1.5% NaCl培地に移し, 2時間培養後, 3000 rpmで遠心しそれぞれを細胞数 10^9 cells/ml に調整した。それらの試料とし¹H および¹³C-NMR で測定した。

2-5. ¹³C-glucose の取り込み実験

対数増殖期前の南極産*D. sp.* を黒布で2日間遮光した後, ¹³C-U-glucose を培地に150mg/l になるように添加し光照射を行った。その後対数増殖期まで4日間培養した後, 遠心により採藻した。Hypertonic or Hypotonic shock は2-3 および2-4 と同様, 2時間行なった後時間培養後, 3000 rpmで遠心しそれぞれを試料とし¹³C-NMR でグリセロールを中心とした浸透圧調整物質の変化を観測した。

3. 結果

3-1. 培地のNaCl濃度とGlycerolの関連

3, 6 および9% NaCl培地で培養した*Dunaliella*の細胞内Glycerol量をガスクロマトグラフで測定した。Fig. 1. に示されるように3%で増殖した南極産*D. sp.* 細胞中のglycerol量は*D. primolecta*に比していずれも高く, たとえば3%NaClでは南極産 *D. sp.* は18.0mg/g-cells, *D. primolecta*で11.2mg/g-cellsで南極産 *D. sp.* の方が*D. primolecta*より約1.6倍多く6および9%では約1.2倍の含有量であった。

*D. salina*を用いた(Ben-Amotz, 1982; Avoron, 1986)の報告でもNaCl濃度の上昇に伴いGlycerol量もほぼ直線的に増加したことが報告され, この属における特徴を示している。

3-2. 細胞容積の変化

3%NaCl培地で培養した対数増殖期における6 および9%のHypertonic shockとしての*Dunaliella*をHypotonic shockの, 1.5 および0.9% NaCl のを与えて細胞容積の変化をコールターカウンターで測定 (Fig. 2) した。6%NaClのHypertonicおよび1.5%のHypotonic shock 後, 10分後は細胞容積は殆ど変化しないが, 9%のHypertonicおよび0.9%NaClのHypotonic shock では10分後の測定において, 3% NaCl で約120 μ m³ のものが0.9%NaClのHypotonic shock で約170 μ m³ と約1.36倍増加し, 9%のHypertonic shockでは3%時の

約67% になった。Hypotonic shock 約120 分では約145 μm^3 となり3%時より増加した。Hypotonic shock の120 分後では復帰出来なかったのは多くの細胞は死亡したことによる。

*D. primolecta*では南極産*Dunaliella*と同様に6 または1.5% の Hypertonic もしくは Hypotonic shockは細胞の容積は殆ど変化しないが、9% の10分後のHypotonic shock では134.6 μm^3 約1.3 倍の増加となった。9%の Hypertonic shock では3%時の約57.7% になり、南極産*Dunaliella*と同じように120 分後のHypertonic shockでは3%時の容積には復帰できなかった。

3-3. ^1H and ^{13}C -NMR よる南極産 *Dunaliella* における浸透圧調整物質の測定

南極産 *Dunaliella* の細胞を 10^9 cell/ml を採藻し試料管に入れ ^{13}C -NMR で測定した結果を Fig.3に示した。主要な代謝産物はGlycerolで、そのシグナルはグリセロールの標準物質のシグナルと良く一致した。したがって南極産 *Dunaliella* の主要な代謝産物はGlycerolであるが示された。

南極産*Dunaliella* をHypertonicまたはHypotonic shock を与えた時どのように変化するかを ^1H -NMRを用いて測定(Fig.3)した。 ^1H -NMRの結果から3 から6%NaClへと2時間のHypertonic shockに暴露された南極産*Dunaliella*はGlycerolを増加させるとともに3%の時のメインピークは3.68ppm から3.49ppm へと変化した。このことから南極産*Dunaliella*の細胞内Glycerolの質的变化を反映しているものと思われる。また3 から1.5%NaClへとHypotonic shock を与えた場合でGlycerolは3%と比して細分化されたシグナルがえられ、Glycerolの減少とともにGlycerolの構造的変化をも示すと考えられた。浸透圧ストレスがGlycerol量を基準物質のTSP 量に換算すると、3%NaClで306.5mM/sample450 μm が1.5%のHypotonic shock では 97.3mM/sampleで3%の約32% と激減し、6%のHypertonic shock では 430mM/sample で3%の約1.4 倍に増加した。

Degani et al. (1985)の ^1H -NMR の測定では Glycerol 以外のシグナルは得られていないが、我々の ^1H -NMR による測定ではGlycerol以外にCholine, Betaine, Lactate, の他-CH, -C H_2 , -CH $_3$ などのLipid のシグナルも得られた。

3-4. 南極産 *Dunaliella* における ^{13}C -U-glucose の取り込み

南極産 *Dunaliella* における ^{13}C -U-glucose の取り込み実験の結果をFig.5 に示した。Glucose は100 ppm の位置にみらるから、Glycogenとなり、ストックされ ^1H -NMR と同様にGlycerolの変化とともにCholine の変化が著しかった。

4. Discussion

細胞壁のない*Dunaliella*では高浸透圧にさらされた場合、素早く一部の水分を細胞外に出し、細胞はshrinkして浸透圧をある程度のレベルまで高め、Glycerolなどの浸透圧調節物質をを細胞内で合成し、浸透圧を維持し細胞容積を元に復帰させる。低浸透圧に暴露されると一時的に細胞容積を減少させ、さらに細胞内のglycerolなどの浸透圧調節物質を増減させて細胞容積を元に戻し、浸透圧を維持する(Ben-Amotz and Avron, 1973; Borowiczka and Bron, 1974; Gimmler et al., 1977; Gimmler and Moller, 1981; Kessly and Brown, 198

1; Ben-Avron, et al., 1982) ことが知られている。

南極産 *Dunaliella* の Glycerol 量は 3, 6 および 9% NaCl 培地中で *D. primolecta* よりもいずれも高く、ほぼ直線的に増加し、*Dunaliella* 属の特徴を示した。*Dunaliella* の cell を 3% から 6 または 9% の Hypertonic shock および 1.5 または 0.9% の Hypotonic shock を与えた場合の cell の shrink or swell の程度は南極産 *D. sp.* の方が大きく、南極塩湖産 *Dunaliella* の方が細胞膜の柔軟性を示すことであれば耐凍性などと関連して大変興味深い。

Hypertonic または Hypotonic shock を与え 2 時間後の Glycerol 量の変化を測定したところ、Hypertonic shock では 3% 時の約 1.4 倍、Hypotonic shock では 3% 時の約 37% であった。Hypertonic shock では Glycerol の合成による増加、Glycerol は通常培地中には漏れない matrix 構造があるが Hypotonic shock では Glycerol の分解および浸透圧の低下もしくは温度の上昇によって水素結合の切断による Glycerol は細胞外の露出 (Wegmann et al., 1980) があるとされるが南極産 *Dunaliella* も同様な作用であったと考えられた。

細胞を生きたままの状態では化学的情報が得られる NMR (核磁気共鳴法) のうち $^1\text{H-NMR}$ では従来、測定されなかった (Degani et al., 1985) が今回、Betaine, Choline などのシグナルが得られたので、浸透圧の変化と Glycerol 合成との関係を生きたままでも実験できる系を確立出来た。同時に細菌類では浸透圧調整に加えて酵素活性の保護作用のある Betaine や Choline (Csonka, 1989) などについても Glycerol と同じように $^1\text{H-NMR}$ を用いて各種ストレス、例えば温度・光・各種化学物質によるストレスの実験材料としても優れていると考えられる。また *Dunaliella* の細胞中にはカロチンを大量に含むことからイスラエルやオーストラリアなどでは野外のプールで大量培養され産業となっている (Ben-Amotz & Avron, 1983) 5. まとめ

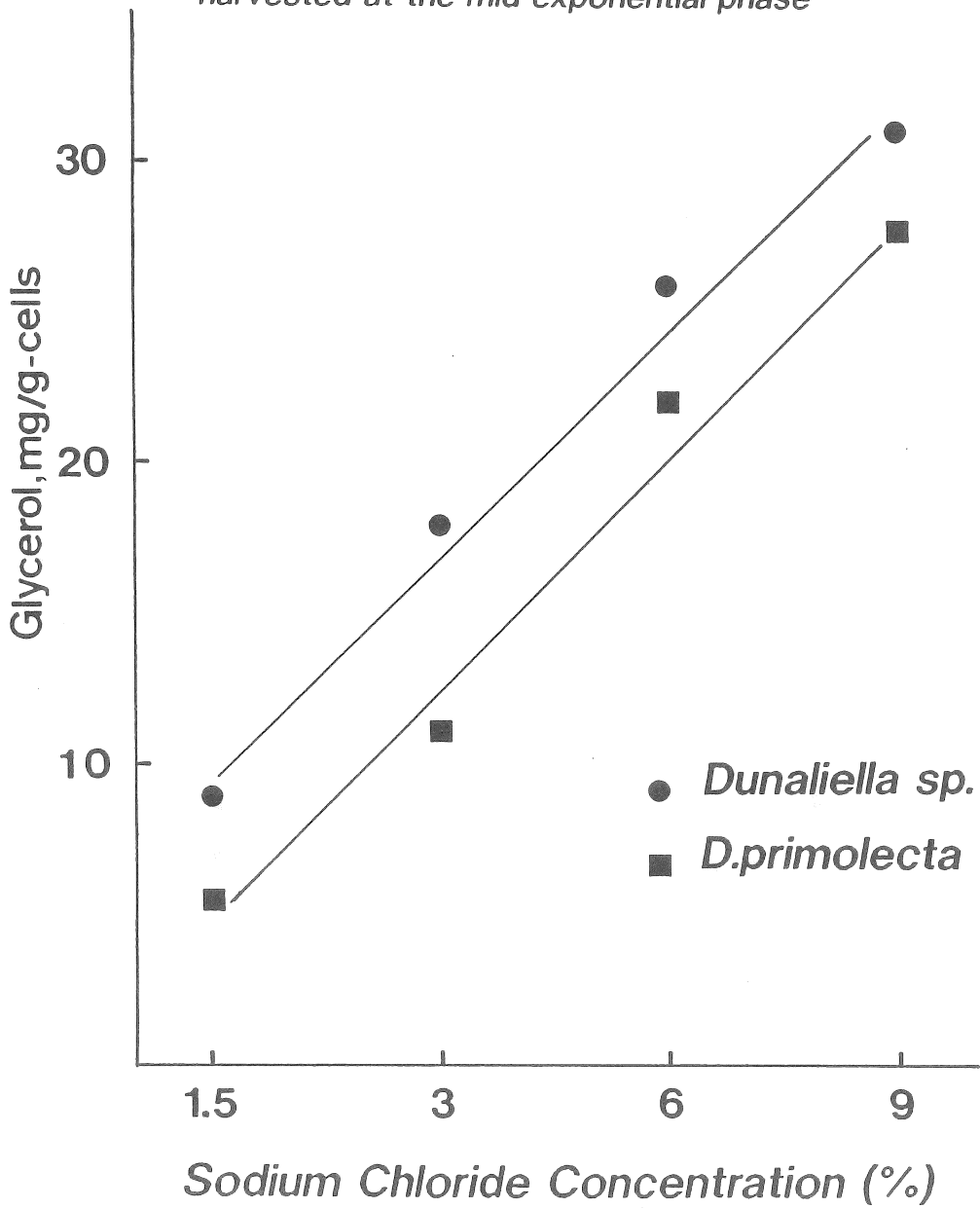
南極産 *Dunaliella* と *D. primolecta* (UTEX LB 1600) を用いて培地中の NaCl 濃度を変化させることによる細胞中の Glycerol 量とその他の代謝産物を主に ^1H および $^{13}\text{C-NMR}$ で検討した結果、次のようであった。

- 培地の NaCl 濃度を 1.5, 3, 6 および 9% で培養した *Dunaliella* 細胞内の Glycerol 量はいずれの濃度でも南極産の方が *D. primolecta* より多く、他の地域における *Dunaliella* と同様な生化学的性質を有していた。さらに培地の NaCl 濃度の変化によって細胞容積を一時的に変化されることもコールターカウンターによって確認された。
- NMR によって南極産 *Dunaliella* の主要な代謝産物は Glycerol であることが示された。
- 3% NaCl 培地での細胞を 1.5% NaCl へと Hypertonic shock または 6% NaCl へと Hypotonic shock を与え ^1H および $^{13}\text{C-NMR}$ で観測したところ Glycerol 量は Hypertonic shock で 3% NaCl 培地における細胞容積の 130-140% で Hypotonic shock では細胞容量の減少は多く 20-30% であった。後者の結果は細胞内での Glycerol の分解とともに Glycerol のある部分が細胞外に漏れたことによると考えられた。
- 今まで *Dunaliella* の $^1\text{H-NMR}$ では観測されていなかった Betaine, Choline および Lactate の他に $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}$, $-\text{CH}$, など Lipid に由来するシグナルが観測できた。この系を用いて浸透圧ストレスと Glycerol 合成・分解との関係を生きたままでも実験出来る系を確立出来た。

Fig.1

Content of glycerol in *D.sp.* and *D.primolecta*

harvested at the mid exponential phase



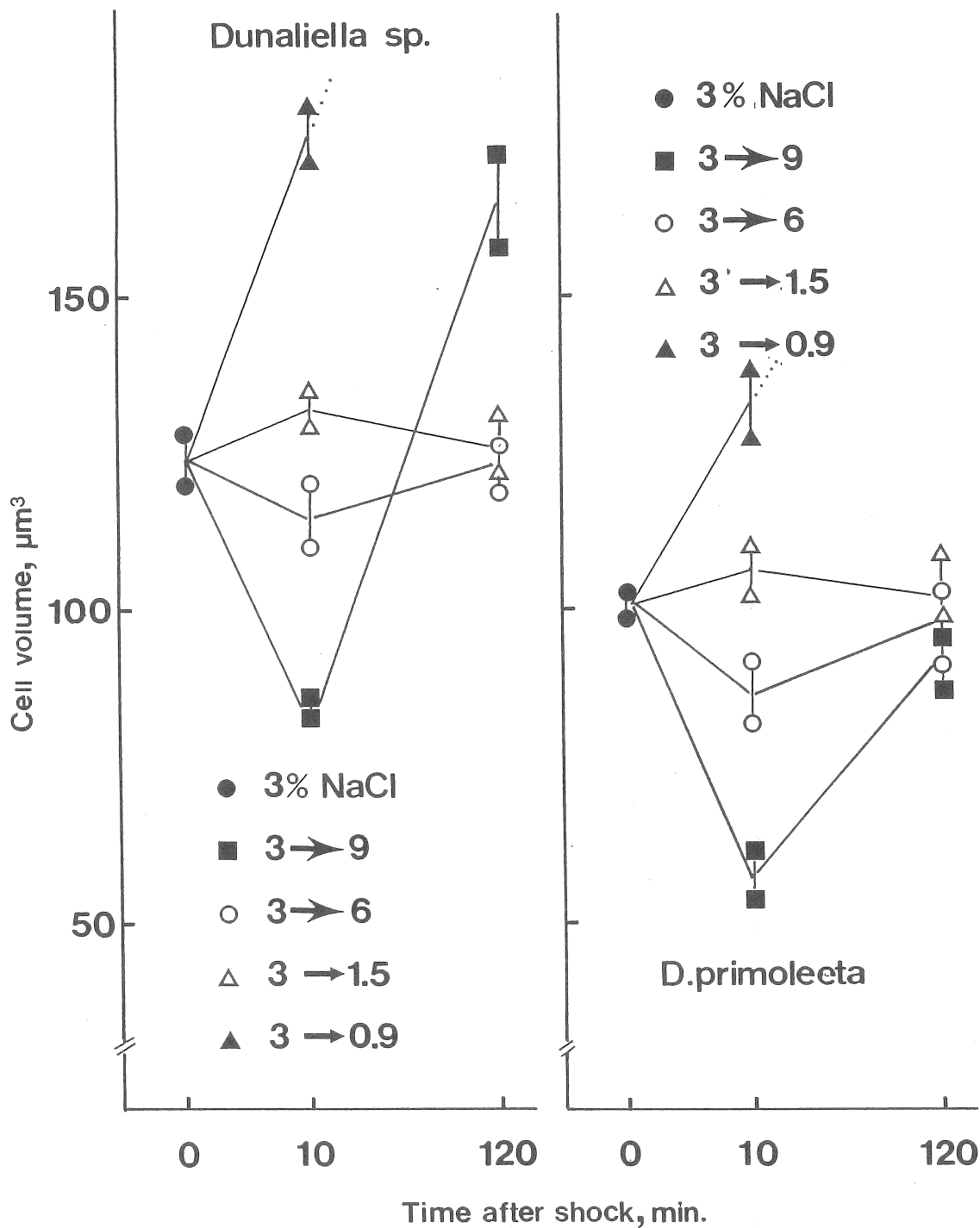


Fig.2 Temporal changes cell volume

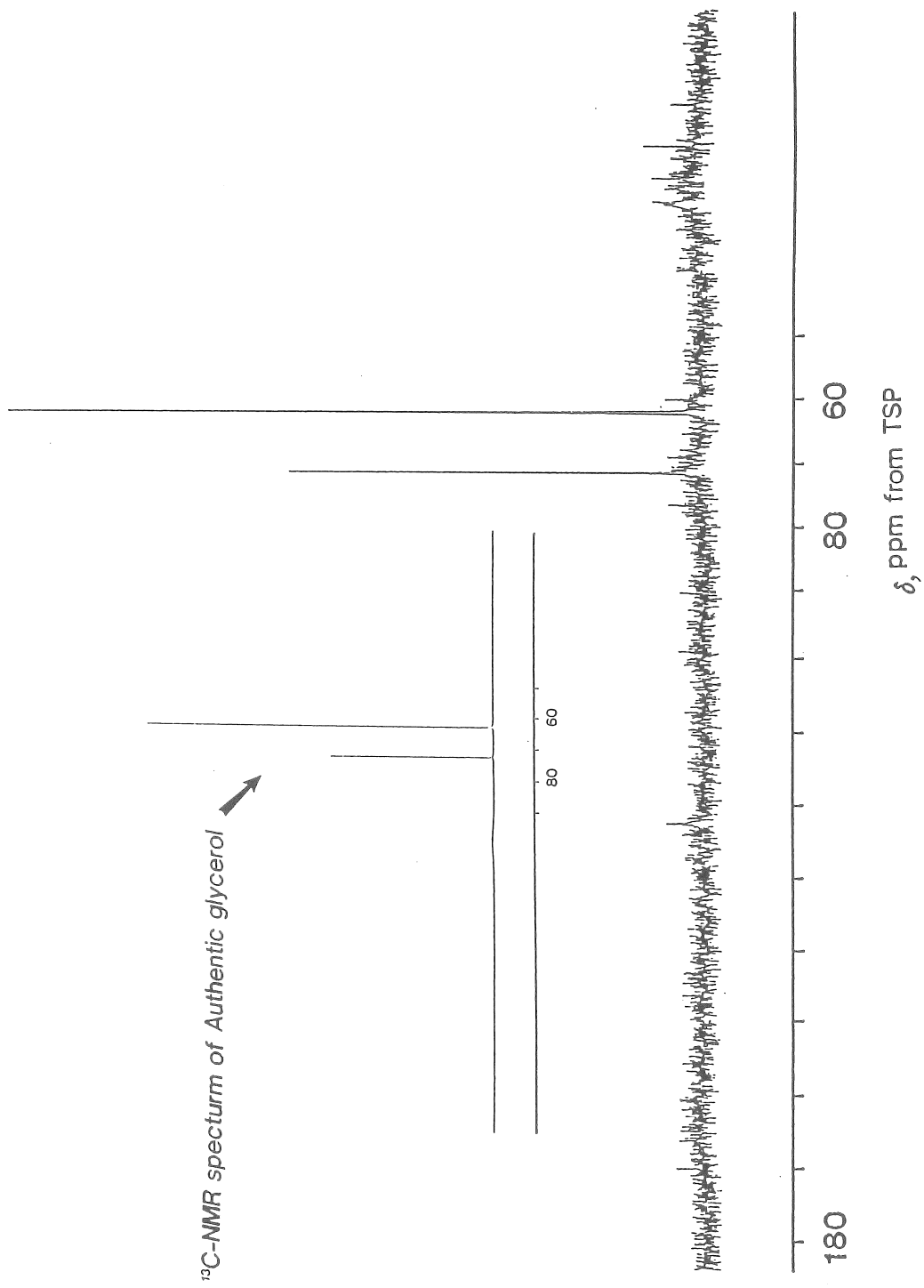
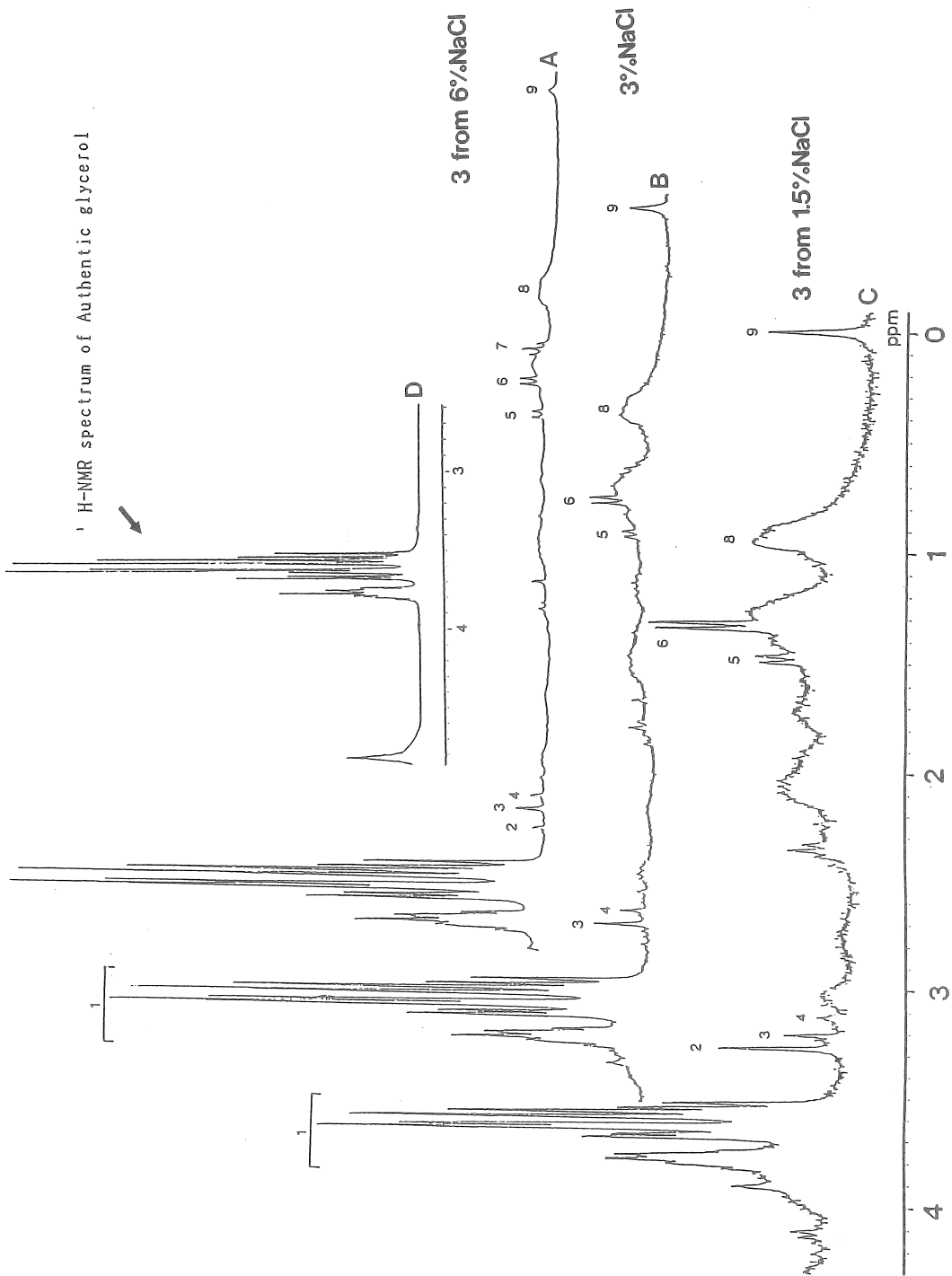
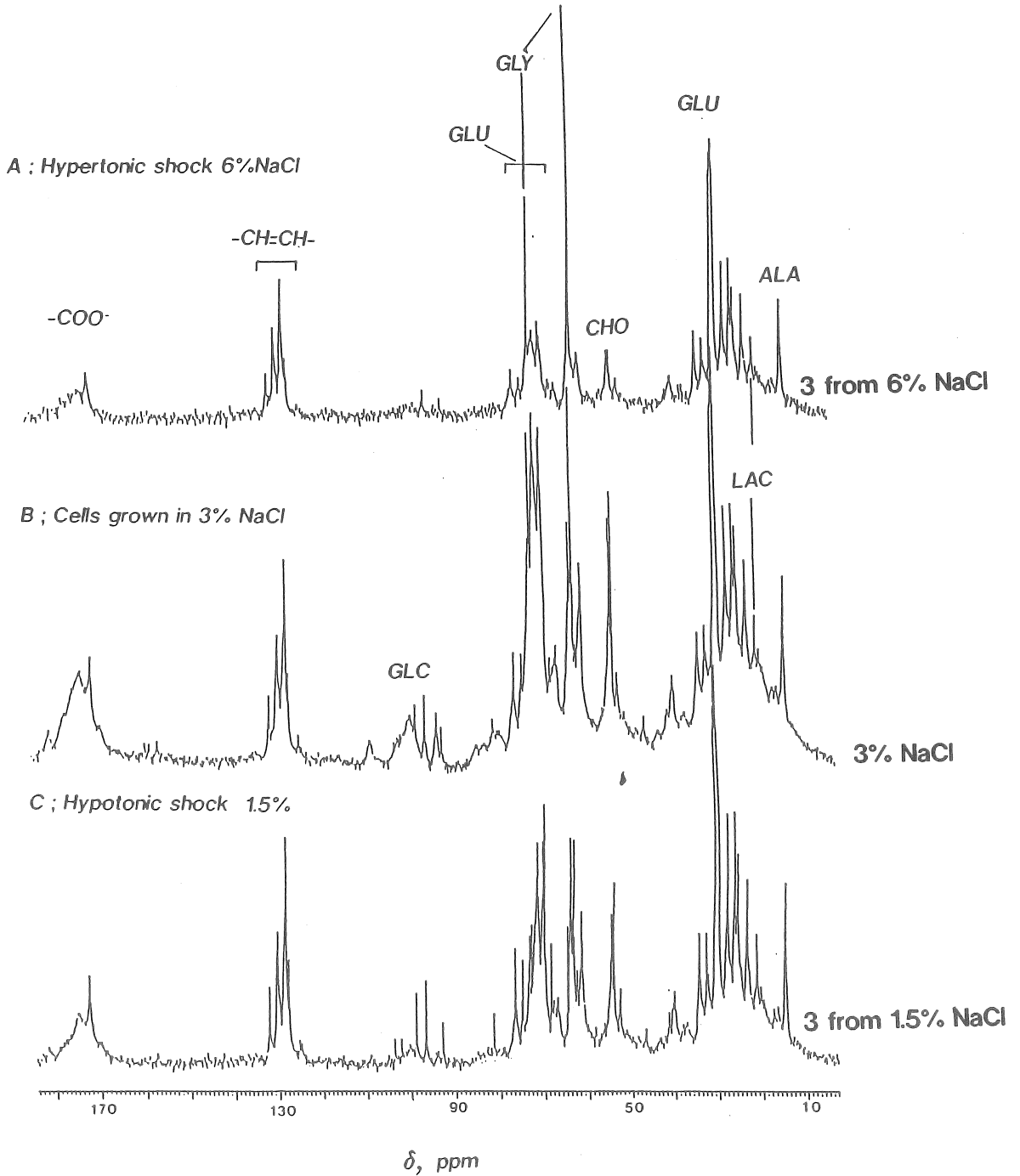


Fig.3 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of *D.sp.*



δ , ppm from TSP

Fig. 4 Temporal changes in the intracellular content of metabolites



¹³C-NMR spectra of *Dunaliella* sp.

Table-1

NaCl (%)	<u>Dunaliella</u> sp.		<u>D. primolecta</u>	
	(a)	(b)	(a)	(b)
3	1.00	1.00	1.00	1.00
1.5	0.32	0.49	0.22	0.42
6	1.40	1.39	1.32	1.70

References

- Ben-Amotz, A. and M. Avron (1973): The Role of Glycerol in the Osmotic Regulation of the Halophilic Alga Dunaliella parva. *Plant Physiol.*, 51:875-878.
- Ben-Amotz, A., I. Sussman and Avron (1982): Glycerol production by Dunaliella. *Experientia* 38, 49-52.
- Ben-Amotz, A. and M. Avron (1983): Accumulation of Metabolites by Halotolerant Algae and Its Industrial Potential. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37:95-119.
- Borowitzka, L. J., and Brown, A. D. (1974): The salt relation of marine and halophilic species of the unicellular green alga, Dunaliella. The role of glycerol as a compatible solute, *Arch. Microbiol.* 96, 37-52.
- Borowitzka, L. J., D. S., Kessly and A. D., Brown (1977): The salt relations of Dunaliella, Further observation on glycerol production and its regulation. *Arch. Microbiol.* 113, 131-138.
- Craigie, J. S. and McLachlan, J. (1964): Glycerol as a photosynthetic product in Dunaliella parva. *Plant Physiol.* 51, 875-878.
- Csonka, L. N. (1989): Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53, 1, 53, 121-147.
- Degani, H., I. Sussmann, G. A. Peschek and Avron, M. (1985): ^{13}C - and ^2H -NMR studies of osmoregulation in Dunaliella. *Biochimica et Biophysica Acta.* 846:313-323.
- Gimble, H and Lotter, G. (1982): The intracellular distribution of the glycerol cycle in the unicellular alga Dunaliella parva. *Z. Naturforsch.* 37c, 1115-1123.
- Johnson, M., E. J., Johnson, R., MacElroy, H., L. Speer and Bruff H. (1968): Effects of salt on the Halophilic alga Dunaliella viridis. *J. of Bacteriol.* 95, 4, 1461-1468.
- Watanuki, T., Ohno, M., and Nakamura, S. (1987): Growth characteristics of Dunaliella sp., unicellular green alga isolated from a salt lake along the coastal region of Lutzow-Holm bay, antarctica. *Rep. Usa mar. biol. Inst., Kochi Univ.* 9, 139-147.
- Wegmann, K., Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1980): Effect of temperature on glycerol retention in the halotolerant algae Dunaliella and Asteromonas. *Plant Physiol.* 66, 1196-1197.

Tomohiko Watanuki (Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories)

Kazuhiro Matsusita (Department of Medical Zoology, Saitama Medical School)

Kenzo Kato (Department of Enteroviruses, National Institute of Health)

Summary

We isolated Dunaliella sp. from a high salt lake Funazoko along the coastal region of Lutzow Holm Bay, Antarctica, and have characterized partially its biological properties. The Dunaliella sp. has many interesting characters in ecology and biochemistry as well because it was found to be halotolerant, cryotolerant and light-shield tolerant. Cells of the genus Dunaliella do not possess a rigid cell wall, which are enclosed by a thin elastic plasma membrane and therefore respond rapidly to changes in osmotic pressure by adjusting its cell volume. The alga osmoregulates by varying its intracellular concentration of glycerol in response to the extracellular osmotic pressure.

We herein report the result obtained by the use of $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ to characterize the intracellular glycerol metabolism in living Dunaliella sp. during adaptations to various stresses.