

## 9226 好酸性耐塩性緑藻の生理学的研究その生長特性と金属耐性について

助成研究者: 富永 典子(お茶の水女子大学 生活環境研究センター)

オーストラリアには塩湖(湖水の塩分濃度が海水より高い湖)が多く存在するが、その大部分は弱アルカリ性で酸性の塩湖は少ない。南オーストラリア州内陸部の酸性塩湖(pH 3.3)の湖水より緑藻 *Chlamydomonas* sp. をピペット洗浄法で単離無菌化した。

この酸性湖の塩分濃度は季節変動が激しいが、湖水を採取したときはNaClが析出していた。また、湖水の低pHのため、周辺の土壌から重金属がとけ込み、乾期で湖水が蒸発したため種類によっては海水の1000倍以上のものもあり、高濃度であった。この塩湖の微生物は塩分耐性及び金属耐性が高いと予想される。

そこで本研究は、このように塩分及び金属濃度が高く酸性の湖水から単離した藻株を実験材料として用い、その生長特性を明らかにすることと、重金属耐性を持つか調べ、その機構を明らかにすることを目的とした。

この藻株は、NaCl濃度0%では生長できず、飽和濃度でも生長できるが、15-20%の時最も速く生長した。しかも、NaCl濃度5%または15%で培養したとき、培養液中のグリセロール量は細胞数とほぼ同じ曲線を描いて増加した。また、細胞タンパク質当りのグリセロール量は培養期間を通じてほぼ一定で、5%と15%を比べると、15%の方が高いレベルを保っていた。以上のことからこの藻株は耐塩性で、細胞内のグリセロール量を加減して外界の浸透圧に対応している。

次に15%NaClでpHを変えて培養したところ、pH 1.5以下、pH 7以上では生長できず、pH 3-4付近で最もよく生長した。従ってこの藻株は好酸性である。グリシン、グルコース、コハク酸は生長を少し促進した。また、生長至適温度は25℃であった。

以上の結果から *Chlamydomonas* sp. は好酸性で耐塩性の藻株と結論づけられる。これまで、好酸性の藻類、耐塩性の藻類についての報告はあったが、両方の性質を合わせ持つ藻類の報告はこれまでにない。

次に重金属の生長に対する影響を見たところ、亜鉛、水銀、カドミウムなど数種類の金属に対して高い耐性を示した。カドミウム存在下で培養した細胞内にはかなりのカドミウムが取り込まれており、細胞抽出液をゲル濾過で分画したところ、低分子量でSH基とカドミウムを含む画分が得られ、高等植物や藻類で報告されているメタロチオネイン様金属結合ペプチドの存在が示唆された。



## 9226 好酸性耐塩性緑藻の生理学的研究その生長特性と金属耐性について

助成研究者: 富永 典子(お茶の水女子大学 生活環境研究センター)

## 1. 研究目的

本研究に用いた緑藻 *Chlamydomonas* sp.は、1983年に富永が南オーストラリア州内陸部の、酸性(pH 3.3)で塩化ナトリウムが析出した塩湖の湖水より分離したものである。

オーストラリアには塩湖が無数と言ってよいほど存在するが、その大部分は弱アルカリ性のもので酸性の塩湖は少なく、また世界的にも珍しい。なぜ塩湖の水が酸性になるのか、どの様にして酸性の塩湖ができたのかなどについてはまだ明らかにされていないのが現状である。

大部分の塩湖が弱アルカリ性であることから、塩湖に存在する藻類のほとんどは中性あるいは弱アルカリ性でよく生育する。しかし *Chlamydomonas* sp.は、これまでの研究で酸性(pH 2.5-6.5)及び塩化ナトリウムが高い条件 (5-25%)でよく生育し、塩化ナトリウムが飽和状態でも生育でき、アルカリ側では生育できなかつた。従ってこの藻類は好酸性、かつ耐塩性と考えられる。形態その他の性質から、酸性下でよく生育する *Chlamydomonas acidophila*に類縁のものと考えられるが、これまでに耐塩性の *C. acidophila*は報告されていない。耐塩性のみ、好酸性のみの性質を持つ藻類についての報告は以前からなされているが、好酸性かつ耐塩性の藻類については、生育の至適 pH 1.0 という好酸性の緑藻 *Dunaliella acidophila* が塩化ナトリウム 0.5 M (3%) まで生育できるという1報のみで本研究の藻類に比べ耐塩性は低い。

一方酸性塩湖では湖水の低pHのため、周辺の土壌から金属が湖水に溶出し金属イオン濃度が高い。従ってその中に生育する藻類は金属耐性が高いと予想され、予備的実験によれば実際 *Chlamydomonas* sp.は高い金属耐性を示した。

そこで本研究は、このように非常に珍しい好酸性、耐塩性緑藻 *Chlamydomonas* sp.を用いてその金属耐性の機構を明らかにすることを目的とした。究極的には金属耐性の機構を分子レベル、遺伝子レベルで明かにし、それと耐塩性の機構との関わりも明らかにしたいと考えているが、1992年度は、以下のことを目的とした。1)生長特性を詳しく調べ、最適生長条件を明らかにする。2)この藻類の各種金属に対する耐性を調べる。3)カドミウムに対する耐性を調べその耐性が金属を細胞表面に付着させて細胞内に入れないようにしているのか、それとも高等植物及び藻類に報告されているメタロチオネイン様金属結合ポリペプチドを合成するのかなどということ明らかにする。

## 2. 研究方法

### 2. 1 培養方法

*Chlamydomonas* sp. は1983年に南オーストラリア州内陸部の酸性塩湖の湖水を持ち帰り、集積培養後ピペット法(洗浄法)で単離無菌化した。

培地は初期は Johnsonらの培地(J. Bacteriol., 95: 1461-1468, 1968)を改良したものの、後に *Duanliella acidophila*用の培地(DAM)を改良したものを、通常はNaCl濃度15%(2.57 M)、pH 3.5とした。培養は 100mlの三角フラスコに培地を20ml入れ25℃で培養した。本培養と同じ培地を用いた前培養で対数増殖期後期(約  $5 \times 10^6$  cells/ml)のものを約10%植え継いだ。照明は植物育成用ランプを用い下部または側部で  $166 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (15000 lux)、明/暗12時間サイクルとした。

### 2. 2 生長測定方法

細胞数：ルゴール液で固定後、Thoma の血球計算盤で測定

タンパク質量：Lowry-folin 法改良法で牛血清アルブミンを標準物質として測定

色素量：90%アセトン抽出後 Scor/Unescoに従い測定

グリセロール量：Ben-Amotz の方法

顕微鏡はオリンパスBH、分光光度計は島津 UV-160Aを使用

### 2. 3 金属耐性測定

*Chlamydomonas* sp.の生長に及ぼす各種金属の影響は、各種金属を加えた培地 4mlに対数増殖期の細胞を 1ml加えて培養し17日目にタンパク質量を測定。

カドミウムイオンの影響を見る場合は、それぞれの濃度のカドミウムを含んだ培地で前培養しそれらを植え継いだ。

金属結合ポリペプチドの精製は、20  $\mu\text{M}$  カドミウムを含んだ培地を大型シャーレにいれて培養し、収穫2日前にカドミウム濃度を100  $\mu\text{M}$ にした。収穫した細胞を15%NaClで洗浄後、蒸留水に懸濁して超音波破碎した(Branson type250)。遠心(22000 $\times$ g)後上清及び沈澱懸濁液の一部を乾式灰化しカドミウム量を測定した(島津原子吸光/フレイム分光光度計AA-660)。

精製は上清を限外濾過または凍結乾燥で濃縮し、Sephadex G-50 カラムクロマトグラフィーにかけ、各フラクションの OD<sub>280</sub>、OD<sub>254</sub>、SH基、カドミウム量などを測定した。

## 3. 結果

### 3. 1 生長特性

15%NaClを含む Johnsonらの培地を用い種々のpHで培養したときの17日目のcell数を Fig. 1に示した。緩衝液を含まない培地は生長が進むにつれてpHの上昇がみられた。生

長の至適 pH は 3-4 付近であり、pH 2.5 あるいは pH 5 では生長は半減していた。pH 1.5 以下あるいは pH 7 以上では生育できず、この *Chlamydomonas* sp. が好酸性であることが明らかとなった。最適と思われる pH 3-4 付近で緩衝能の高い酢酸及びクエン酸緩衝液は生長を強く阻害した。

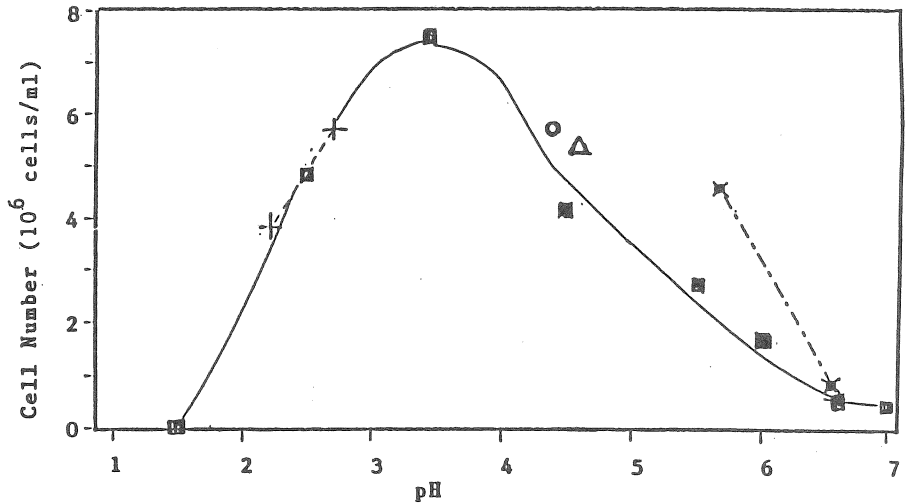


Fig. 1. Effect of pH on the growth of *Chlamydomonas* sp. Growth is expressed here in cell number at 17th day in the media containing no buffer (■), glycine-HCl (+), succinic acid-NaOH (○), phthalate-NaOH (△), and MES (\*).

生長に対する NaCl 濃度の影響を Fig. 2 に示した。10% 以下では細胞の凝集反応が起き、cell 数を正確に測定できないためタンパク質量で示した。これにより至適 NaCl 濃度は 15-20% であり、0% では生長できないが、飽和濃度でも速度は遅いが生長した。

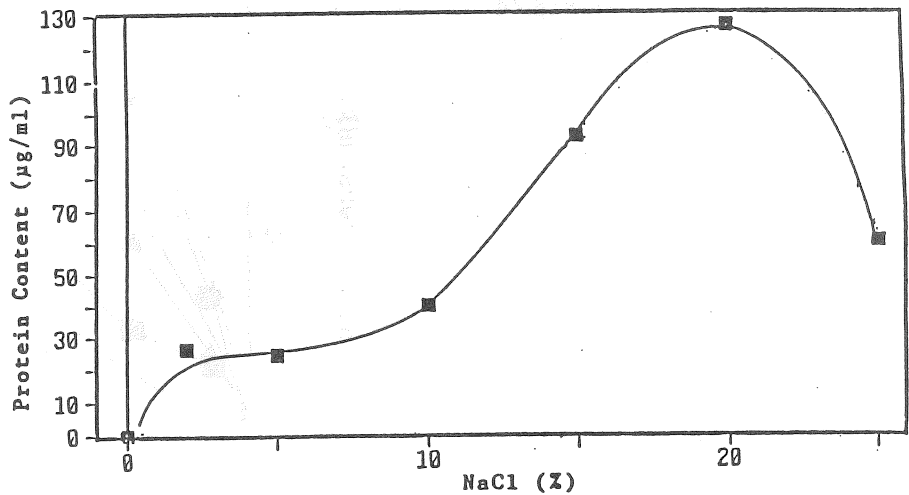


Fig. 2. Growth of *Chlamydomonas* sp. at various concentrations of NaCl. Growth is expressed here in protein content per ml.

*Dunaliella* の耐塩性の種は細胞内にグリセロールを蓄積して外界の塩分の浸透圧に対応

している。*Chlamydomonas* sp.も生育中に培養液 1ml 当りのグリセロール量は増加した。Fig. 3 A に 5%あるいは15%NaClでの生長を、Fig. 3 B に生長中のタンパク質当りのグリセロール量の変化を示す。タンパク質当りのグリセロール量は生長を通じてほぼ一定で、塩分濃度が高いときグリセロール量も高い。従って *Chlamydomonas* sp.も*Dunaliella*と同様に細胞内のグリセロール量を調節して塩分に対応していることが明らかとなった。

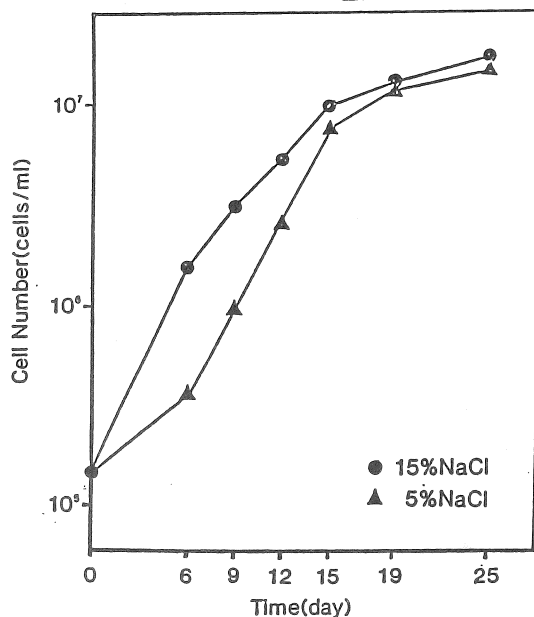


Fig. 3A Effect of NaCl conc. on cell number

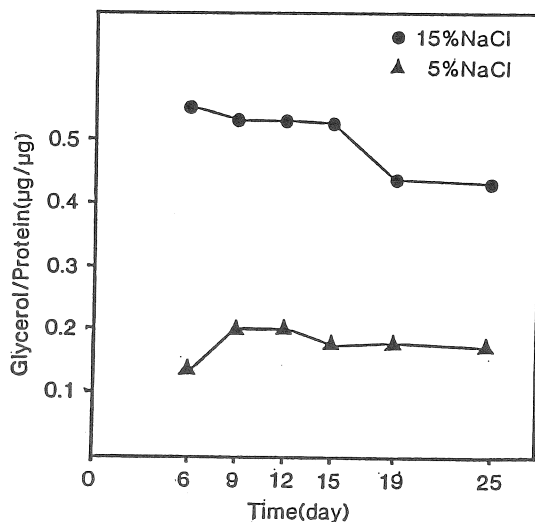


Fig. 3B Effect of NaCl conc. on glycerol contents (µg/µg)

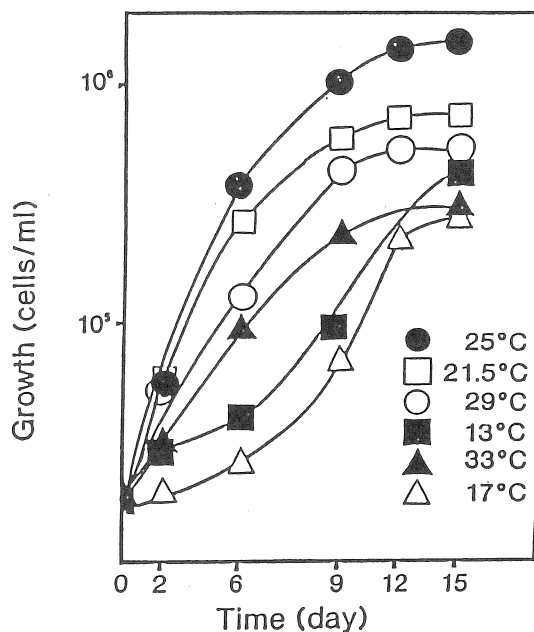


Fig. 4. Effect of temperature on the growth of *Chlamydomonas* sp.

生長に対する温度の影響を調べたところ最適温度は25°Cであった (Fig. 4)。この値は *Chlamydomonas* やその他の緑藻で報告されている値と大差無い。

次に Johnsonらの培地とDAMを比較したところDAMの方がよい結果が得られた (Fig. 5)。この差が何に由来するのかを現在検討中である。

Fig. 1でもわかるようにこの緑藻はグリシン、フタル酸などによって生長が促進されることが示唆された。そこでFig. 6に生長に対するグルコース、グリシン、コハク酸の影響をタンパク質量を指標として表した。これらはすべて生長を促進した。図には示していないがフタル酸はグリシンと同程度促進し、酢酸、クエン酸は阻害した。

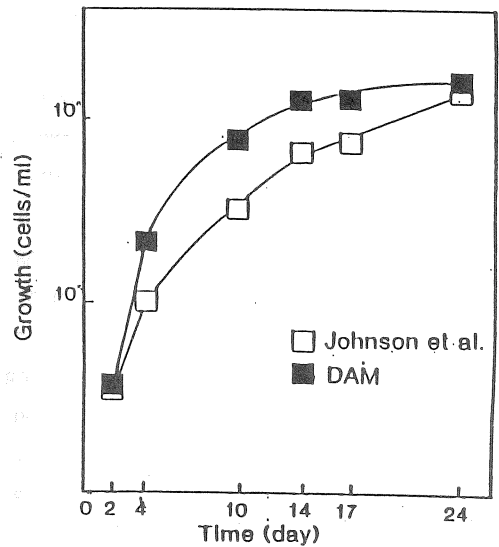


Fig. 5. Growth of *Chlamydomonas* sp. in a medium of Johnson (□) or DAM (■).

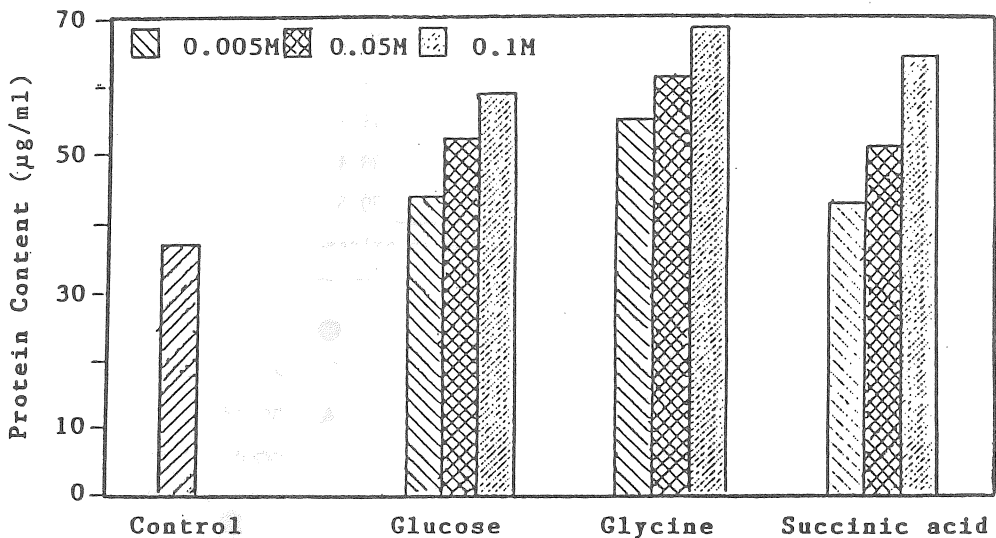


Fig. 6. Effects of glucose, glycine and succinic acid on the growth of *Chlamydomonas* sp. Growth is expressed here in protein content per ml of culture. Measurements were made 20 days after inoculation of the culture.

### 3. 2 金属耐性

生長に対する重金属の影響を Table 1 に示す。表中の他の微生物とは殆ど細菌に対する値であるから藻類としてはかなり高い耐性を持つといえる。特に亜鉛、水銀に対しては高い耐性を示した。

また、銅、カドミウムなどの金属にさらしたとき、高等植物などでメタロチオネイン様金属結合ポリペプチドが誘導合成されるといわれているが、*Chlamydomonas* sp.でも同様

Table 1. Effects of heavy metals on growth of *Chlamydomonas* sp.

Growth is expressed here in proteine content per ml of culture. measurements were made 17 days after inoculation of culture.

Element	Compound tested	Element conc. (mM)	Biomass (ug protein/ml)	Toxic level of other microorganism (mM)*
Mo	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.19	147.3	
		0.58	42.8	
Co	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.03	131.5	0.11
		0.17	42.8	
Cu	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.008	114.0	1.0
		0.20	33.3	
Fe	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.72	92.7	1.0
		1.08	33.3	
Ni	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.21	118.8	0.69
		0.42	41.2	
Zn	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.069	91.1	0.004
		1.56	64.9	
Cd	$\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$	0.026	68.1	0.45
Hg	$\text{HgCl}_2$	0.018	111.7	0.027
		0.092	63.4	
		0.18	36.4	
Control			70.5	

\*Ehrlich, H. L. (1978), In "Microbial life in extreme environment" (Ed. Kushner, D. J.) pp.381-408. Academic Press.

に合成されるかをみるため、まず、カドミウムの生長に対する影響を見た (Fig. 7)。100  $\mu\text{M}$  のカドミウムでは生長の阻害がみられたが、20  $\mu\text{M}$  ではコントロールと大差無い生長を示した。

20  $\mu\text{M}$  カドミウムで培養し、収穫2日前に終濃度100  $\mu\text{M}$  にした細胞破碎液の上清は沈澱のほぼ2倍量のカドミウムを含んでいた。

Sephadex G-50 カラムクロマトグラフィーの結果をFig. 8に示す。フラクションNo.46-49および84-90の画分が金属結合ペプチドと思われ、前者は後者の重合したものではないかと推測している。通常植物及び藻類の金属結合ペプチドの精製には陰イオンクロマトグ

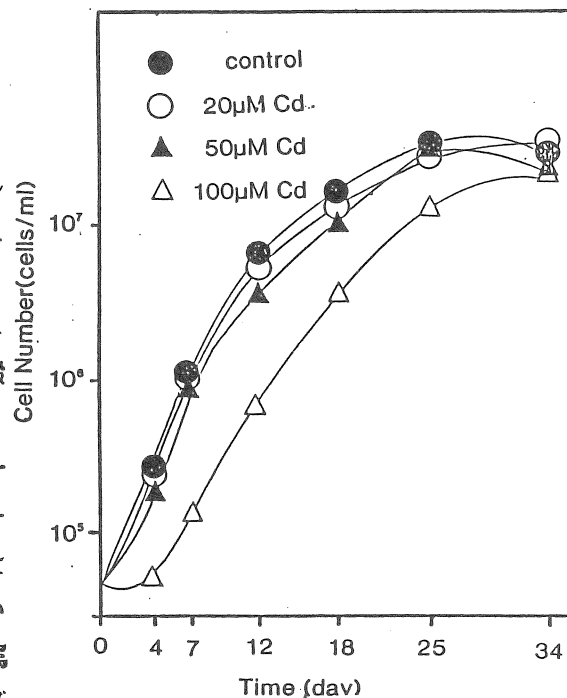


Fig. 7. Effect of Cd conc. on cell number



ラフィーを用いるが、溶出を常法のNaClの濃度勾配で行ったところカラムが詰まってしまっていて失敗した。この藻類は耐塩性なので細胞内の各種タンパク質のNaClに対する挙動が通常のものとは異なり、粗抽出液中のタンパク質が沈澱したことが原因と考えられる。

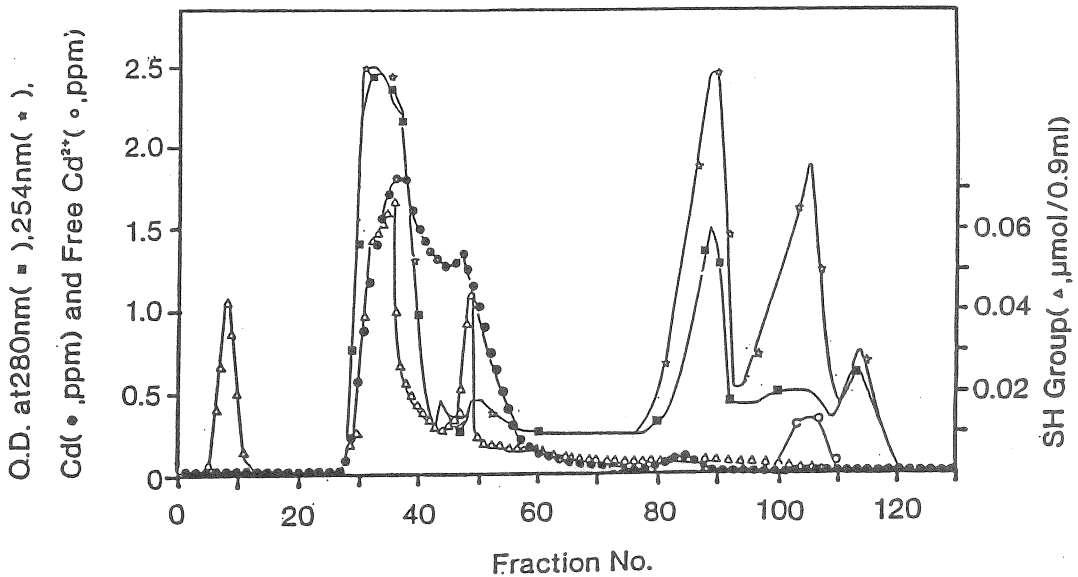


Fig. 8. Elution profile of chromatography on Sephadex G-50 of crude extract from Cd-exposed *Chlamydomonas* sp. The crude extract was derived from cells grown in the medium containing 20 μM CdSO<sub>4</sub> and exposed 100 μM Cd for 2 days.

#### 4. 考察及び今後の課題

オーストラリアの塩湖の大部分は、雨期には水をたたえ、乾期には湖水が蒸発してしまう ephemeral な塩湖である。そのため季節によって塩分その他の成分の濃度が著しく変化する。それに伴い、湖水の元々限られた生物相も変化する。植物プランクトンで塩分濃度の高い塩湖にみられるのは通常 *Dunaliella salina* であり、*Chlamydomonas* 属はもう少し塩分濃度の低いところでみられるが、この酸性塩湖から分離された藻株は以下の理由から *Chlamydomonas* と思われる。1)細胞壁を持っている。2)4遊走子または8遊走子の状態が観察される。

耐塩性の *Chlamydomonas* 属はこれまでに報告されているが、弱アルカリ性で生育し、この藻類よりは低い塩分濃度を好む。一方好酸性の植物プランクトンは、至適pH 1.5という *Dunaliella acidophila* をはじめ *Chlamydomonas acidophila*、*Cyanidium caldarium*、*Euglena mutabilis* などが報告されているが、耐塩性のものはない。従って生育至適pHが3-4で、至適塩分濃度が15-20%の *Chlamydomonas* sp. は非常に珍しいものといえよう。

生長至適pHに関しては問題が残されている。前述のように緩衝能が強いものは生長を阻害し、緩衝液を加えないものは培養中にpHが変化してしまう。pH 6.5付近では殆ど生長がみられないこと、生細胞による<sup>14</sup>C-NaHCO<sub>3</sub>取り込みの至適pHが5付近であることなどから

好酸性であることは確かである。

生長特性に関しては今後

- 1) 培地のpHを保ち、生長を阻害しない適当な緩衝液を捜す。
- 2) 塩分濃度を変えて生育至適pHが変化しないかを見る。
- 3) 窒素源の検討及び生長促進物質の検討をする。

酸性塩湖より湖水試料を採取した時は干上がる寸前で、塩分濃度は海水の10倍で、燐酸量が極端に少なく、海水に比べ金属イオン濃度が、Mn 310倍、Fe 60倍、Zn 240倍、Al 1300倍と高かった。実際Chlamydomonas sp. は種々の金属イオンがかなりの濃度で存在しても生育を示したが、このこと即ち金属耐性が非常に高いとは言いきれない。なぜなら、塩分濃度が高くしかも酸性の条件下では、培地中に加えた金属のすべてが有効なイオンの形で存在するかどうかは疑問であるからである。また一般に耐塩性の藻類は金属イオン耐性が高いという報告もあり、好酸性のこの藻類と、弱アルカリ性でよく生育する耐塩性の藻類及び好酸性で耐塩性でない藻類と金属耐性を比較する必要もあろう。

カドミウムがどのような形で培地中に存在するかは明かでないが、100  $\mu\text{M}$ ではかなりの生長阻害がみられたものの、20  $\mu\text{M}$ ではカドミウムを含まないものとほぼ同じ生長を示した。20  $\mu\text{M}$ カドミウムを含む培地で培養し対数増殖期に2日間100  $\mu\text{M}$ カドミウムに曝した細胞の膜画分にはかなりのカドミウムが含まれていた。しかし、細胞内には膜画分に比べタンパク質当りにして約2倍のカドミウムを取り込んでおり、100000 $\times$ g 上清にほとんどのカドミウムが得られたこと、上清のゲル濾過でSH基及びカドミウムを含む低分子量の画分が得られたことから、この藻類においても、高等植物や藻類で報告されている金属結合ペプチド(フィトケラチン)の存在が示唆された。即ち、細胞膜壁で重金属イオンをいれないようにする機構があるかも知れないが、一部は細胞内に取り込まれ金属結合ペプチドで無毒化されている可能性がある。

ペプチドの精製に関しては細胞破碎を高塩分下で行う即ち、高塩分で沈澱するものを予め除く、または熱変性を用いるなどの工夫が必要であろう。そして金属結合ペプチドの精製を進め、どんな条件でどのようなペプチドが誘導合成されるかを見る。

Physiological studies of acidophilic and salt tolerant green alga. Its growth characteristics and metal tolerance.

Noriko TOMINAGA  
Institute of Environmental Science  
for Human Life  
Ochanomizu University

#### Summary

An acidophilic and salt tolerant green alga, Chlamydomonas sp. was isolated from acidic saline lake in South Australia. An axenic and clonal culture was obtained by picking and washing single cells with a micropipet.

This strain grew best at concentrations of NaCl between 15 and 20%. There was no growth at 0% though it could grow even at saturated concentration. The intracellular content of glycerol of cells growing in 15% NaCl was constant during growth and higher than that of cells in 5% NaCl. These results suggests that the same mechanism involved in the osmotic regulation in salt tolerant Dunaliella is mediated in this strain.

In a synthetic medium containing 15% NaCl, the upper limit of growth was pH 7, lowest limit pH 1.5 and optimum at pH 3-4.

Chlamydomonas sp. demonstrated high tolerance to some heavy-metal such as zinc, mercury and cadmium. The cells were grown in the medium containing 20  $\mu\text{M}$  Cd and exposed to 100  $\mu\text{M}$  Cd for 2 days before harvesting. The crude cell-free extract contained two times higher Cd than particulate and was subjected to gel filtration chromatography. The elution profile displaced the UV-absorbing peak containing Cd as well as sulfhydryl groups. These results indicates the occurrence of Cd-binding peptide (phytocheratin) in the Cd-treated cells.