

9229 なぜ *Dunaliella* sp. は南極の高塩水湖で生きられるか

助成研究者: 綿貫 知彦(神奈川県衛生研究所 生活環境部)

共同研究者: 松下 和弘(埼玉医科大学)

: 加藤 賢三(国立予防衛生研究所)

1. はじめに

南極の高塩水湖で分離・培養された *Dunaliella* sp. は他の地域における *Dunaliella* 属と同様にユニークな浸透圧調節を有していて、さらに南極の冬季における低温や太陽が出ないという気象条件から耐凍性や遮光性があることが考えられたので、主としてNMR(核磁気共鳴分光法)で検討した。その結果、*Dunaliella* sp. の主要な代謝産物である glycerol を指標とすることにより塩・耐凍性や遮光ストレスの程度を測定できると結論された。ここでは<sup>1</sup>H-NMRでは塩ストレスによっておこる glycerol の増減をリアルタイムに測定した。また耐凍および遮光ストレスでは<sup>1</sup>H- および<sup>13</sup>C-NMR で測定し、一部の実験ではSodium Bicarbonate<sup>13</sup>C の取り込み実験を行い興味ある結果をえた。

2. 方法

○塩ストレスと希釈ストレスを<sup>1</sup>H-NMRで見る: 塩ストレスでは6%NaClから12%NaClへ、希釈ストレスは3%から1.5%NaClへそれぞれストレスを与え試料450 μl とTSP 50 μl を内部基準物質として試料管にいれ、JEOL, JMN-EX400スペクトメーターを使用した。

○低温ストレスを<sup>1</sup>H-NMRで見る: 3%NaCl培地で培養した細胞を10<sup>9</sup> cells/lに調整し-20℃に保存し、比較のため *D. primolecta* も実験に供した。

○遮光ストレスを<sup>13</sup>C-NMRで見る: Sodium Bicarbonate<sup>13</sup>C を取り込ませた細胞で遮光ストレスを与え<sup>13</sup>C-NMRで測定した。

3. 結果と結論

塩ストレスをリアルタイムに測定することが出来たが、glycerolは5分後、一時的に減少するが5から60分間に急増し、150分後には塩ストレス前の約1.4倍になった。また希釈ストレスでは10分から30分間にglycerol量は急激に減少し、150分後にはストレス前の約40%に減少することがわかった。低温ストレスではglycerolの分解によって生じた脂質に由来すると考えられるメチレン基やメチル基などが顕著に見られたが *D. primolecta* と著しく異なる特徴である。<sup>13</sup>Cでラベルされた細胞に遮光ストレスを与え<sup>13</sup>C-NMRで測定した結果ではトレハロースのシグナルが観察できたのが特徴的であった。各種ストレスにglycerolが深く関与し、各種代謝産物の追跡が容易であるので広くストレス応答の実験に用いる事が可能である。



## 9229 なぜDunaliella sp.は南極の高塩水湖で生きられるか

助成研究者:綿貫 知彦(神奈川県衛生研究所 生活環境部)

共同研究者:松下 和弘(埼玉医科大学)

:加藤 賢三(国立予防衛生研究所)

### 1. はじめに

Dunaliella属は細胞壁がなく、うすい弾力性に富んだ細胞膜に包まれている。細胞中に大量のglycerolを含有し、ユニークな浸透圧調節と共に有名である。南極産Dunaliellaは他の地域におけるDunaliellaと異なり、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に加えて耐凍性および遮光性を持つことが考えられるなど生態学上の興味もある、また環境ストレス応答の実験材料としても有望である。我々によって南極の高塩水湖から初めて分離・培養されたDunaliella sp.を実験材料として用いた。

前年度の研究では南極産Dunaliellaも他の地域におけるDunaliella属と同様な性質があることがわかった。さらに比較に用いたD. primolectaよりもglycerolの含有量が大きいことも示した。

細胞を生きたままの状態では化学的情報が得られるNMR(核磁気共鳴分光法)で塩ストレスおよび希釈ストレスによる影響をglycerol量の変動で見ると、3から6%NaClの塩ストレスではglycerol量は1.40倍に増加し、3から1.5%への希釈ストレスでは3%時の約40%に減少した。南極産DunaliellaはD. primolectaに比してストレス応答は柔軟性が見られる傾向であった。

<sup>1</sup>H-NMRでの測定では今までglycerol以外のシグナルは得られなかったが、betaine, choline, lactateなどの他に-CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>などlipidに由来すると考えられるシグナルも見ることが出来た。この系を用いて塩ストレスと希釈ストレスにおけるglycerolの合成・分解との関係を生きたまままで実験できる系を確立した。

第2年目では塩ストレスと希釈ストレスの結果をリアル・タイムで見ることができた。また、耐凍性と遮光性における実験を<sup>1</sup>H-および<sup>13</sup>C-NMRで測定し、Sodium Bicarbonate-<sup>13</sup>Cの取り込み実験を実施し、興味ある結果が得られた。

### 2. どうして実験に主としてNMRを用いたか

NMR(核磁気共鳴分光法)を用いての生体計測は細胞や臓器、あるいは生物個体といった生体を生きたまままで測定し、その生命過程の動態を分子レベルでとらえられるからである。

図-1に純正品のglycerolと生きたままの南極産Dunaliellaの<sup>13</sup>C-NMRのシグナルを示し

た。*Dunaliella*を生きたままの状態での $^{13}\text{C}$ -NMRで測定し、その代謝産物がglycerolであることを初めて示したのはNortonら(1982)であったが、いずれもNortonらのシグナルと比して、より明瞭な2本のシグナルが得られた。ここで見られる2本のシグナルはglycerolにおけるケミカルシフトの強度比が純正品のglycerolと全く同じである。したがって、この系は生きたままでglycerolの動態を見る系として有用である。

図-2に純正品のglycerolと生きたままの南極産*Dunaliella*の $^1\text{H}$ -NMRのシグナルを示した内部基準物質TSP(Tetramethylsilane)がそれぞれ入れてある。ここで得られたglycerolのシグナルは純正品glycerolのケミカルシフトと良く一致している。この事から $^1\text{H}$ -NMRで南極産*Dunaliella*のglycerol量およびその状態をリアルタイムで見る事が可能であることが良く示している。

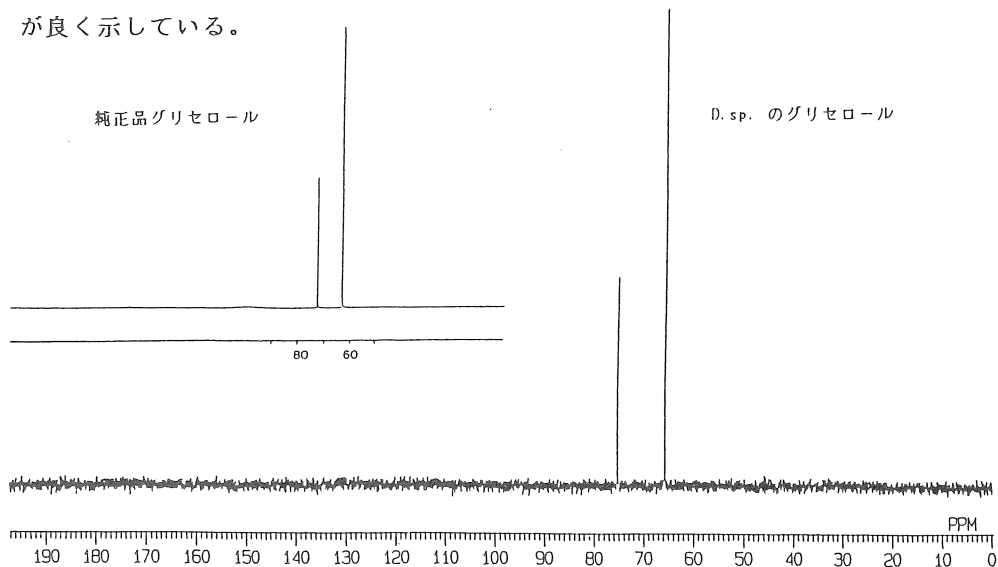


Fig1 ケミカルシフト ( P P M )

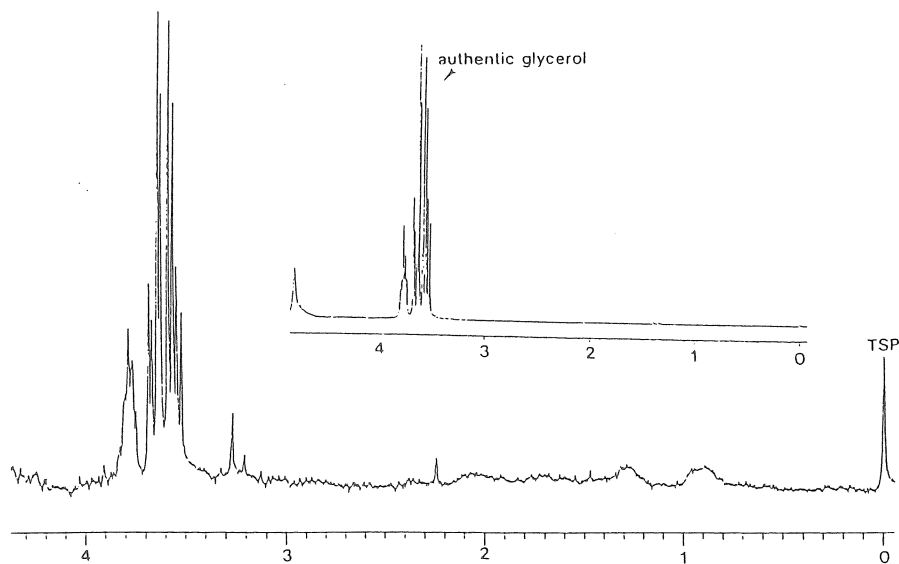


Fig2 ケミカルシフト ( P P M )

### 3. 実験方法

#### 3-1. 藻類の培養

Jonhson et al. の合成培地でpH 8.0, 8,000 Lux. 連続照射, 培養温度20°Cでmilipore filter (0.45  $\mu$ m) で滅菌通気で培養し, 対数増殖期の細胞を実験に供した。

#### 3-2. $^1\text{H}$ - および $^{13}\text{C}$ -NMR による測定法

$^1\text{H}$ -NMR: 試量450  $\mu$ l とTSP(Tetramethylsilane)50  $\mu$ l を内部基準物質として 5mmの試量管に入れ, JEOL, JMN-EX400スペクトロメーターを使用した。

$^{13}\text{C}$ -NMR: 周波数(100 MHz), パルス幅(5.8  $\mu$ sec, 45), パルス間隔(2 sec), データポイント(32K), 積算回数(256) の条件で測定した。

#### 3-3. 塩ストレスの影響を $^1\text{H}$ -NMRで見る。

6%NaClで培養した対数増殖期の細胞を $10^9$  cells/l に調整し12% NaCl培地に移し塩ストレスを与え5, 30, 60 および150 分後にそれぞれ測定した。

#### 3-4. 希釈ストレスの影響を $^1\text{H}$ -NMRで見る。

3%NaClで培養した対数増殖期の細胞を $10^9$  cells/l に調整し1.5%NaCl培地に移し希釈ストレスを与え10, 30, 60, 120および150 分後にそれぞれ測定した。

#### 3-5. 低温ストレスの影響を $^1\text{H}$ -NMRで見る。

南極産*Dunaliella* sp. と比較のため*D. primolecta*を用いて -20°Cに10, 20, 30および40日保存した細胞を解凍し, それぞれについて測定した。

#### 3-5. 遮光ストレスを $^{13}\text{C}$ -NMR で見る。

対数増殖期の南極産*Dunaliella* sp. の培養瓶を黒布で包み, 2, 5, 9 日間遮光し, 遮光ストレスの影響を  $^{13}\text{C}$ -NMR で測定した。

### 4. 結果

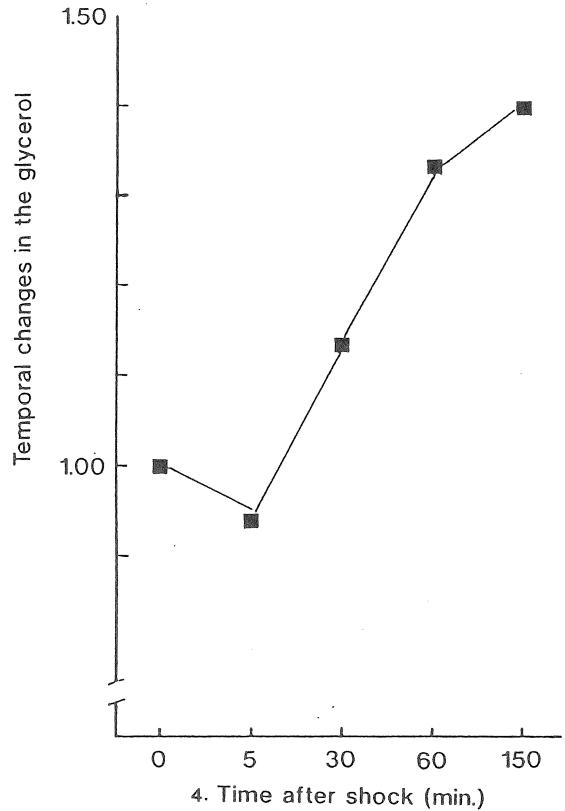
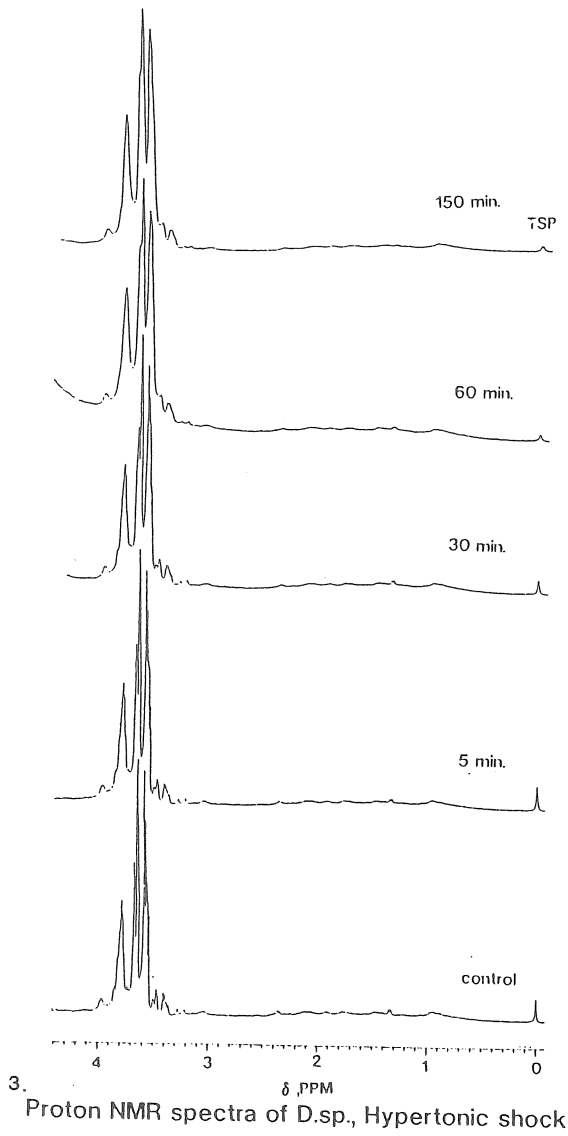
#### 4-1. 塩ストレスによるglycerolの変動。

6%NaClで培養した対数増殖期の細胞を $10^9$  cells/mlに調整し12% NaCl培地に移し塩ストレスを与え5, 30, 60 および150 分後に  $^1\text{H}$ -NMRでそれぞれ測定した結果をFig. 3 に示した。このようにリアルタイムにglycerolの変動を知ることができた。またこの結果をTSP を基準として, 塩ストレス前のglycerol量を1としてFig. 4 にglycerolの変動を示した。

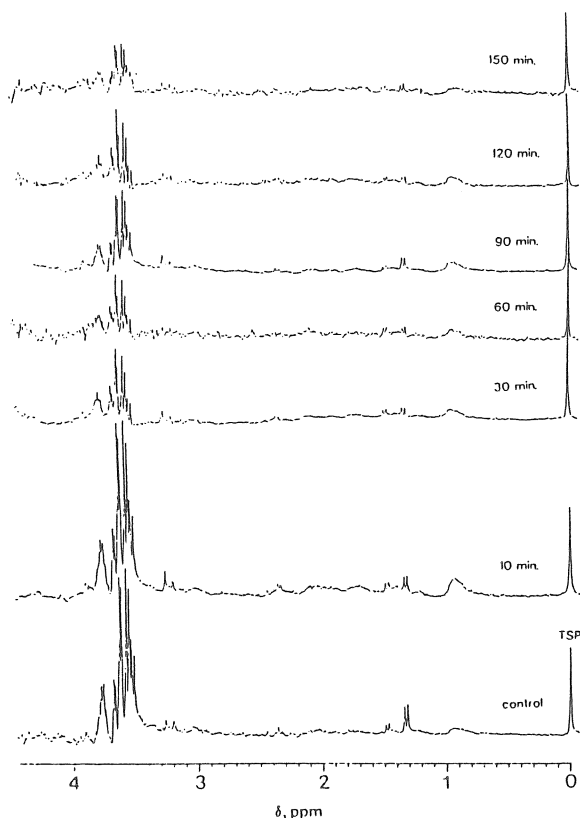
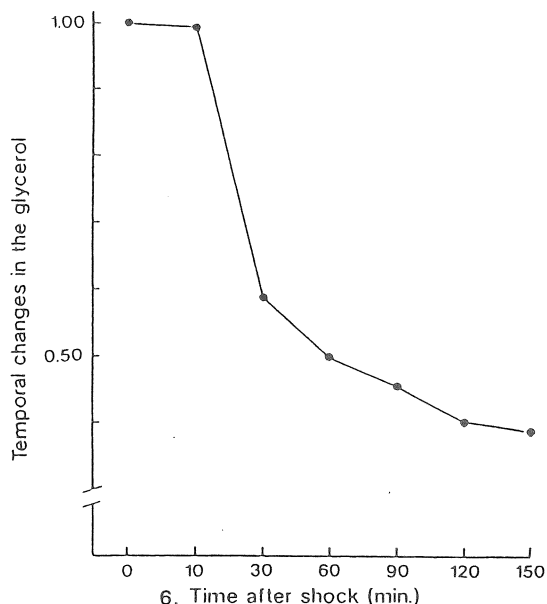
その結果, 塩ストレス後 5分では一時的にglycerolは減少するが 5分から60分に急増し150 分後にはストレス前の約1.4 倍になることがわかった。glycerol量の変動をリアルタイムに示すことができた。

#### 4-2. 希釈ストレスによるglycerolの変動。

1.5%NaClで培養した対数増殖期の細胞を $10^9$  cells/mlに調整し1.5%NaCl培地に移し希釈ストレスを与え10, 30, 60, 90, 120 および150 分後に  $^1\text{H}$ -NMRでそれぞれ測定した結果をFig. 5 に示した。Fig. 5 に示すように, ほぼ時間の経過とともにglycerol量は減少し, そのシグナルの様子も変化する様子がリアルタイムに観測できた。



glycerolの変動の様子を4-1と同様にストレス前のglycerol量を1としてFig.6に示した。Fig.6に示すようにglycerol量は10分から30分間に急速に減少し、150分後にはストレス前の約40%になることがわかった。

5. Proton NMR spectra of *D.sp.* Diluent shock

6. Time after shock (min.)

#### 4-3. 低温ストレスを<sup>1</sup>H-NMRで見る。

Fig. 7 に南極産 *Dunaliella* と Fig. 8 に *D. primolecata* を  $-20^{\circ}\text{C}$  で 10, 20, 30 および 40 日間保存し、それぞれを <sup>1</sup>H-NMR で測定した結果を示した。Fig. 7 に示すように南極産 *Dunaliella* は 40 日間保存においても glycerol は低温ストレス前に比して約 10% 存在し、解凍すると生きかえることができる。また <sup>1</sup>H-NMR のシグナルの特徴は glycerol の分解によって生じた脂質に由来すると考えられる  $-\text{CH}_2$  (メチレン基),  $-\text{CH}_3$  (メチル基) などが顕著に見られることにある。これは南極産 *Dunaliella* における低温ストレス応答に対して興味ある知見である。

これに比して、南極産ではない *D. primolecata* は Fig. 8 に示すように 10 日間で glycerol 量はストレス前の約 10% までに減少した。この事は南極産 *Dunaliella* と比して著しく異なる現象であり、南極産 *Dunaliella* が glycerol 含有量が *D. primolecata* に比して多いことと関連して興味深い知見である。また、glycerol の分解によってアセトン (ACE), 酢酸 (ACT), エタノール (EtOH) などを生じるのは、低温ストレスによって *D. primolecata* が著しいダメージを受けたことを示すと考えられる。

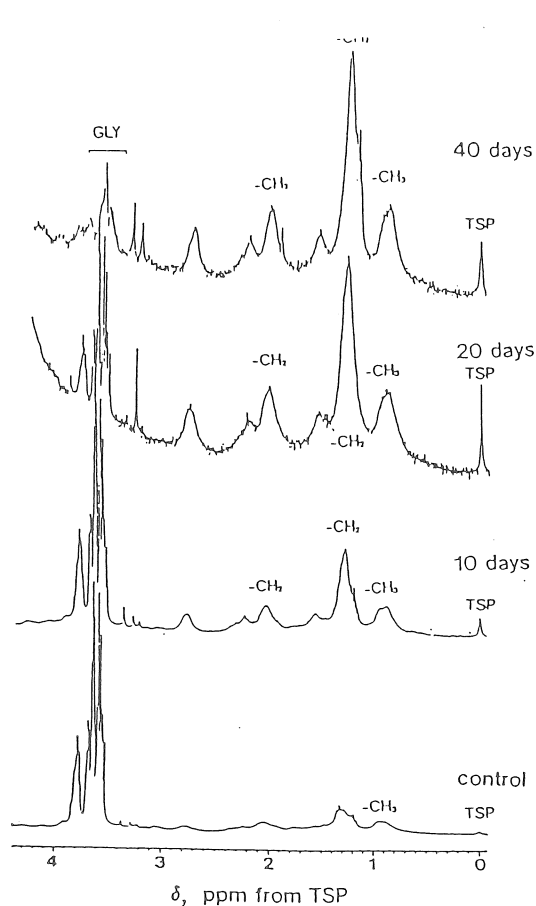


Fig.7.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of *D.sp.* under the low temperature stresses

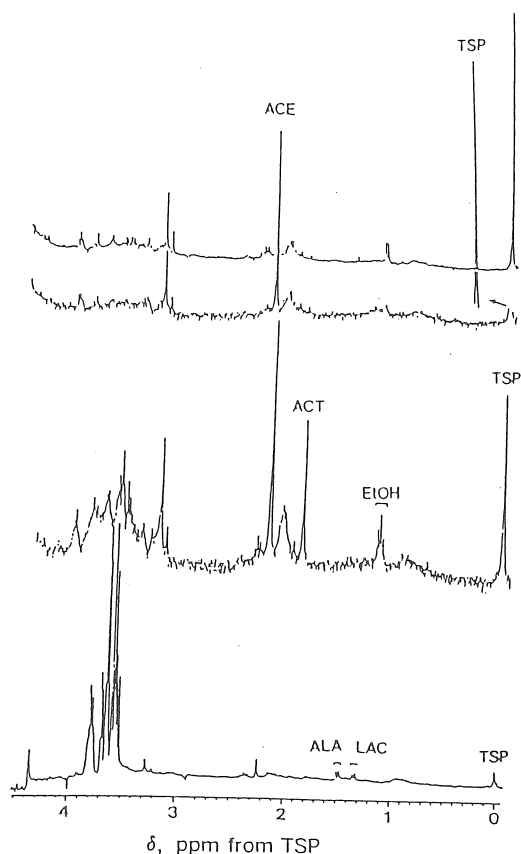


Fig.8.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of *D.primolecta* under the low temperature stresses

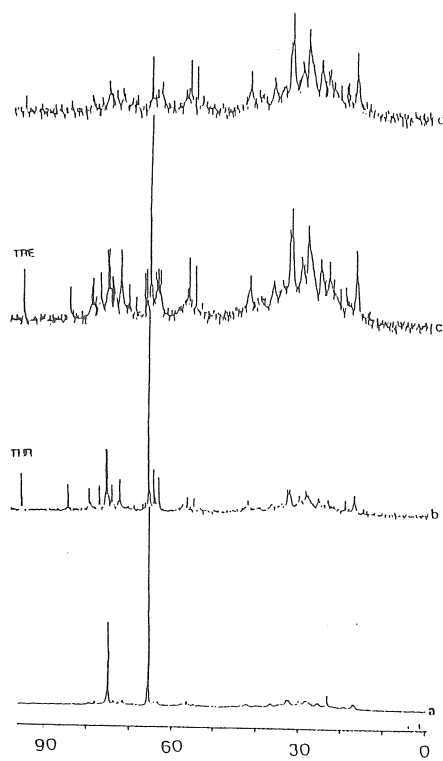
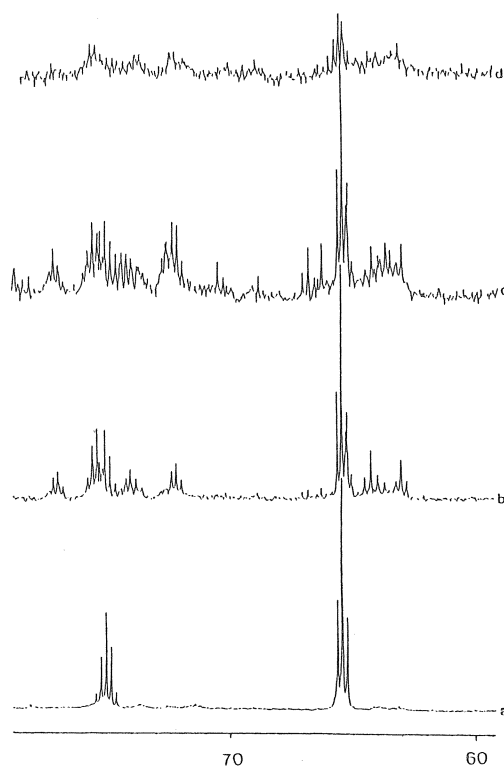
#### 4-4. 遮光ストレスを $^1\text{H}$ -および $^{13}\text{C}$ -NMRで見る。

遮光ストレスの影響を知るために細胞を入れた培養瓶を黒布で覆い3, 6, および9日間遮光し $^1\text{H}$ - (Fig. 9) および $^{13}\text{C}$ -NMR (Fig. 10, 11)で測定した結果を示した。 $^{13}\text{C}$ -NMRでの測定ではsodium bicarbonate- $^{13}\text{C}$ でラベルした細胞を用いた。

$^1\text{H}$ -NMRでの測定では3日目にglycerolのシグナルは変化を示し始め6日目には大きく変化し, glycerolは分解され質的にも変化していることを示した。9日目では運動する細胞検算されなかった。

$^{13}\text{C}$ -NMR (Fig. 10)に見られるようにラベルしていないglycerol (Fig. 1)の2本のglycerolシグナルはsodium bicarbonate- $^{13}\text{C}$ によってラベルされ, 細胞内に取り込まれglycerolが合成され, そのglycerolが遮光ストレスによって分解されていく様子が見られる。また, $^{13}\text{C}$ ラベルされ, $^{13}\text{C}$ -NMRで測定した遮光ストレスの特徴のひとつとしてFig. 11の95 ppm付近にトレハロース (TRE)が見られることである。



Fig.9  $^{13}\text{C}$ -NMR ケミカルシフト (P.P.M.)Fig.10  $^{13}\text{C}$ -NMR ケミカルシフト (P.P.M.)

## 5. 考察

南極産 *Dunaliella* は比較実験のため用いた *D. primolecia* に比して細胞内に含まれる glycerol 量が多く、耐凍性や遮光性が高いことを各種の実験で示した。このことは南極産 *Dunaliella* が南極の高塩水湖で生きられ大きな理由のひとつであるが、各種ストレスに対して外界のストレスに柔軟に対応できるのは素早い浸透圧調節が基本になっているようである。

南極産 *Dunaliella* は硬い細胞壁を持たず、弾力性に富んだ薄い細胞膜で包まれているという特徴がある。そのユニークな浸透圧調整機能は osmometer としても大いに注目される。これらの特徴は例えば南極産 *Dunaliella* を蒸留水で希釈してハイスピードビデオで観察すると約80秒で鞭毛のある前部から破裂し核などの細胞器官が飛び出すまで0.012秒と素早く反応するところにも表れている。

また、南極産 *Dunaliella* の代謝産物を指標として、生きたままの状態でも各種のストレスに対する応答を測定できるので実験動物の代替になる可能性を秘めており、細胞膜の役割を考える上でも興味深い実験材料である。

## 6. 今後の課題

南極産 *Dunaliella* は外界の各種のストレスに柔軟に対応できることを実験によって確認したが、それらストレス応答の引きがねとなる機構について研究することは細胞の生理・生化学の発展に寄与できるデータを提供できるはずである。

また、塩類や強酸に耐えられるので、遺伝子操作などにより不毛地帯でも生育できる作物の栽培も可能となろう。

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):  $^{13}\text{C}$ - and  $^1\text{H}$ -NMR studies of osmoregulation in Dunaliella. Biochimica et Biophysica Acta. 846:313-323.
- Gimmler, 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.

How *Dunaliella* sp. can survive the high salt lake of Antarctica ?

Tomohiko Watanuki (Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories)

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

Kenzo Kato (Department of Viruses 2, National Institute of Health)

#### Summary

The genus *Dunaliella* do not have a rigid cell wall. The cell is enclosed by a thin elastic plasma membrane and therefore can respond rapidly to changes in osmotic stress by changing its cell volume. The response of the cell to changes in the extracellular osmotic stress occurs in two distinct steps. In the first step the cells rapidly shrink or swell under hypertonic or dilute stress. The second step of adaptation is slower than the first step and involves metabolic adjustment, by synthesis or elimination of glycerol in hypertonic or dilute stress. The Antarctic *Dunaliella* sp. had a large amount of glycerol content than *D. primolecta*. The alga is one of the ecological peculiarities of the Antarctic high salt lake. 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. We herein report the result obtained by the use of  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR to characterize the intracellular glycerol metabolism in living *Dunaliella* sp. during adaptations to such stresses as salt, cryo and light-shielding.

In vivo  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR demonstrated that signal observed was assigned to be glycerol. The glycerol has been known as one of marker substance for osmoregulators in an adaptation experiment to salt stress.

In hypertonic salt stress shifting from 6% to 12% sodium chloride content, intracellular glycerol content increased, whereas in the hypotonic stress shifting from 3% to 1.5% sodium chloride intracellular glycerol decreased. In those stress experiments, in vivo  $^1\text{H}$ -NMR detected choline, alanine, lactate other than glycerol in *Dunaliella* sp..  $^{13}\text{C}$ -NMR demonstrated that glucose can be stored as glycogen. When *Dunaliella* sp. labeled with enriched  $^{13}\text{C}$ -labeled glucose was exposed to salt stress, changes such as degradation of glycogen were demonstrated. The results strongly suggest that biochemical change in cell membrane of *Dunaliella* sp. was occurred. Thus, in vivo NMR combined with stable isotope is extremely useful in a measurement for real time change in such metabolites as glycerol. And this approach is applicable not only to salt stress but also to cryostress or light-shielding stress.