

9323 好酸性耐塩性緑藻の生理学的研究Ⅱ-その成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)

共同研究者:富永 裕之(武蔵丘短期大学)

研究報告要旨

生物体が有害な重金属に曝されたとき、生物体をとる防御手段として化学反応を使って重金属を無害化することが知られている。その代表的なものが銅、水銀、カドミウム、亜鉛、銀などによって体内での合成が誘導され、それらを結合するメタロチオネインである。メタロチオネインはシステインに富むタンパク質で、その類似物質も含め広く生物界に発見されており、それらはクラスⅠ～Ⅲに分類されている。植物体内で誘導合成されるものは $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{Gly}$ の構造を持つペプチドで、フィトケラチンとも呼ばれクラスⅢのメタロチオネインである。

緑藻 *Chlamydomonas* sp. は、南オーストラリア州内陸部の酸性(pH 3.3)の塩湖の湖水より分離したもので、好酸性かつ耐塩性の藻類である。酸性塩湖では湖水の低pHのため、周辺の土壌から溶出した高濃度の金属イオンを含む。従ってその中に生育する藻類は予想どおり水銀、カドミウム(Cd)など数種類の金属に対して高い耐性を示した。

そこで本研究は、好酸性、耐塩性緑藻 *Chlamydomonas* sp. を用いてその生長特性及び金属耐性の機構を明らかにすることを目的とした。

まず、Glycine-H₂SO₄緩衝液とPhthalate-H₂SO₄緩衝液を用いて生長に対するpHの影響を見たところ、至適pHは3.5付近にみられた。

Cd存在下で培養した細胞にはかなりの量のCdが可溶画分に取り込まれており、メタロチオネイン様物質の存在が示唆された。そこで1993年度はその物質の精製を試みることにした。Cd処理細胞の蒸留水抽出液のゲル濾過クロマトグラムはCdを含む画分が分子量の大きいものと小さいものの2つあることを示した。陰イオン交換クロマトグラフィーで精製するため、1M NaCl抽出液及び蒸留水抽出液のCd分布を調べたところ前者は可溶画分のCdが減少していた。蒸留水抽出液は塩濃度を上げて生じた沈澱を除いた後、両方とも希釈してDEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーにかけたところ、蒸留水抽出液の方が分離がよかったが、いずれも分子量の高い画分の量が減少していた。分子量の大小2画分ともまだ部分精製の段階であるが、酵母、芥子、トマトで報告されているHMW及びLMW PC-Cd複合体に相当するかも知れない。

9323 好酸性耐塩性緑藻の生理学的研究Ⅱ-その成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)

共同研究者: 富永 裕之(武蔵丘短期大学)

1. 研究目的

生物体が有害な重金属に曝されたとき、生物体のとる防御手段として1)細胞壁などに結合させて細胞の中に入れない、2)重金属を影響の大きくない部位に移動させる、3)化学反応を使って重金属を無害化するなどが知られている。3)の無害化の例として、銅、水銀、カドミウム、亜鉛、銀などが細胞に侵入することによって体内での合成が誘導され、それらを結合するメタロチオネインがある。メタロチオネインはシステインに富むタンパク質で哺乳動物の臓器中に見つけられたが、その後類似物質が広く生物界に発見されクラスⅠ～Ⅲに分類された。植物体内で誘導合成されるものはクラスⅢに分類されフィトケラチンとも呼ばれる。フィトケラチンは $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{Gly}$ の構造を持つペプチドで、その研究は動物のメタロチオネイン程進んでいないが現在盛んに行われている。

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。この *Chlamydomonas* sp. は、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ったことから好酸性かつ耐塩性の藻類である。

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、実際亜鉛、水銀、カドミウム(Cd)など数種類の金属に対して高い耐性を示した。

そこで本研究は、好酸性で耐塩性の緑藻 *Chlamydomonas* sp. を用いてその生長特性及び金属耐性の機構を明らかにすることを目的とした。

まず最適生長条件を知るために、昨年度に引続き生長に対するpHの影響を2種類の緩衝液を用いて調べた。

金属耐性については昨年度、1)20 μM Cd存在下で培養した細胞の可溶性画分には沈澱画分より多くのCdが取り込まれており、2)培地中のCd濃度を上げると単位タンパク質当りのCd量は顆粒画分では変化しないが、可溶画分では増加することから、メタロチオネイン様物質の存在が示唆された。そこで1993年度はその物質の精製を試みることにした。

2. 研究方法

2. 1 培養方法

培地は、生長に対する pH の影響を見るときは Johnson らの培地¹⁾に glycine、glycyl-glycine または potassium biphthalate を最終濃度 0.05 M になるように加え、pH は H_2SO_4 で調製し、NaCl 濃度 15% (2.57 M) とした。培養は 100ml の三角フラスコに培地を 20ml 入れ 20°C 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 5×10^6 cells/ml) のものを約 10% 植え継いだ。

金属結合ポリペプチドの精製用の大量培養には *Duanliella acidophila* 用の培地 (DAM) を改良したのを用い、NaCl 濃度 15% (2.57 M)、pH 3.5 で行った。20 μM カドミウムを含んだ培地を大型シャーレに置いて培養し、収穫 2 日前にカドミウム濃度を 100 μM にした。

照明は植物育成用ランプを用い下部または側部で $166 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (15,000 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²⁾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/Unesco³⁾に従い測定

グリセロール量: Ben-Amotz の方法⁴⁾

生長に対する pH の影響を見るときは、細胞を遠心で除いた後培地の pH も測定した。

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 メタロチオネイン様物質の精製

収穫した細胞を 15% NaCl で洗浄後、蒸留水または 1 M NaCl に懸濁して超音波破碎した (Branson type 250) 後、遠心 ($22,000 \times g$ 20 min) 上清及び沈澱懸濁液の蛋白量、SH 基量を測定し、またそれら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)。SH 基の定量は Ellman の方法で行った⁵⁾

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及び DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーで行った。各フラクションの OD_{280} 、 OD_{254} 、SH 基、カドミウム量などを測定した。

DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー用の試料は 1 M NaCl で抽出の上清、または蒸留水で抽出の上清に 1 M になるよう NaCl を加え 1 夜放置後遠心で沈澱を除いたもの、それぞれを蒸留水で 0.05 M まで塩濃度を下げて用いた。溶出は NaCl の 0.05-0.8 M 濃度勾配で行った。

HPLC は島津 LC6A、カラムは Zorbax ODS C₁₈ (DuPont, 4.6 mm \times 25 cm) を用いて行い、

溶媒は0.05% 磷酸-20% アセトニトリルの0.05% 磷酸溶液を、20分で100:0から20:80へ変化させて溶出した (流量1 ml/min)。検出は OD_{220} で行った。

アミノ酸分析は日立 835型高速アミノ酸分析計で行った。

3. 結果

3. 1 生長特性

生長に対する pH の影響を、Johnson らの培地 (15% NaCl) に3種の 0.05 M 緩衝液 Glycine- H_2SO_4 (pH 2.5-3.75)、Glycylglycine- H_2SO_4 (pH 2.7-4.0) または Phthalate- H_2SO_4 (pH 3.75-5.5) を加えて調べた。その結果を Fig. 1 に示した。生長は1日当りの比増殖速度 (μ) で表し、この条件では 0.1/day から 0.2/day の値を示した (Fig. 1 A)。また、7日目の細胞数を Fig. 1 B に示した。これら3種の有機物の添加は0.05 M の濃度では無添加の培地に比べ生長速度、細胞数、タンパク質量、色素量などに促進効果は見られなかった。ただ、非解離型のフタル酸は生長を阻害するらしい。培養後期には培地の pH が大きく変化したものも見られた。この結果から生長の至適 pH は 3.5 付近と考えられる。

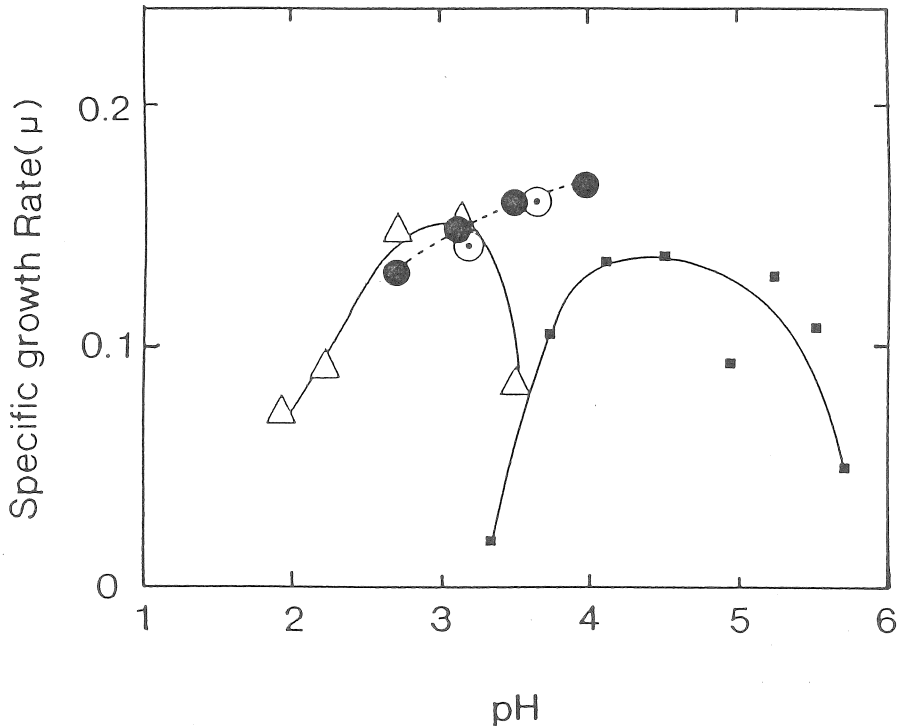


Fig. 1A. Effect of pH on the growth of *Chlamydomonas* sp.

Growth is expressed here in the specific growth rate (natural units per day) in the Johnson's media containing 0.05 M glycine- H_2SO_4 (Δ), 0.05 M glycylglycine- H_2SO_4 (\bullet), 0.05 M phthalate- H_2SO_4 (\blacksquare) buffer or none (\odot).

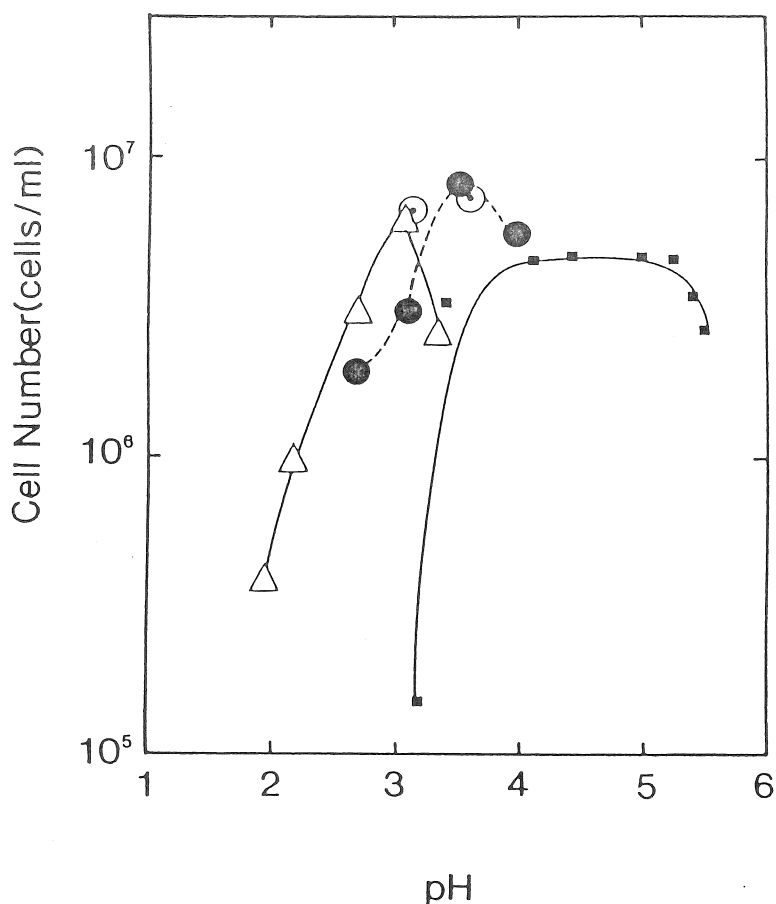


Fig. 1B. Effect of pH on the growth of Chlamydomonas sp. Growth is expressed here in cell number at 7th day. Conditions are as specified in the legend to Fig. 1A.

3. 2 メタロチオネイン様物質の精製

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ラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせで行うが、昨年は陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出を常法の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。そこで1 M NaClによる抽出を行い、高塩分濃度によって沈澱する成分をあらかじめ除いたものと蒸留水による抽出と比較した (Table 1)。

Table 1. Extraction of cadmium-containing complex from *Chlamydomonas* sp. grown in 100 μ M CdSO₄. The cells were harvested by centrifugation for 5 min at 3000 \times g, washed twice with 15 % NaCl and suspended in distilled water or 1 M NaCl. The suspension was sonicated and centrifuged for 20 min at 22,000 \times g.

Extract with	Cd/protein (mg/g)			Cd/SH (mg/mole)	
	cell	supt	ppt	supt	ppt
DW	0.23	0.72	0.11	11.9	1.4
1 M NaCl	0.20	0.51	0.16	2.0	1.2

可溶画分のCd量はタンパク質当り、SH基当り共に顆粒画分の2-8倍にのぼり細胞内にCdが取り込まれていたが、NaCl溶液による抽出では可溶画分のCd量が低かった。

次に蒸留水抽出液に1MになるようにNaClを加え1夜放置後、沈澱を除いた。これと、NaCl抽出液ともにNaCl濃度が0.05Mになるように希釈しDEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーにかけた。溶出は0.05-0.8M NaClの濃度勾配で行ったところ、蒸留水抽出液の方が分離がよかった (Fig. 2)。

Fig. 2のCdを含む画分を凍結乾燥し、Sephadex G-50ゲル濾過クロマトグラフィーを2回行った。1回目のクロマトグラムをFig. 3に示す。NaCl濃度を高める処理を行った試料のクロマトグラムは塩処理無しでゲル濾過を行った場合 (Fig. 4A)に比べ、分子量の大きいフラクション (HMW) が非常に低くなっていた。この画分は塩分濃度を上下させることによって沈澱または他のタンパク質と共沈したと考えられる。2回目のクロマトグラフで得られたCdを含む画分 (分子量の小さい画分、LMW) を逆相HPLCで分析した。2つのピークが得られ、それぞれについてアミノ酸分析を行った。どちらもアミノ酸組成が似ており、グルタミン酸とグリシンの含有率が高いもののシステイン含量が非常に低かった。試料の濃度が低かったので再度分析が必要であるが、重金属との結合にシステインが重要な働きをしているのでこれらがフィトケラチンでない可能性も考えられる。

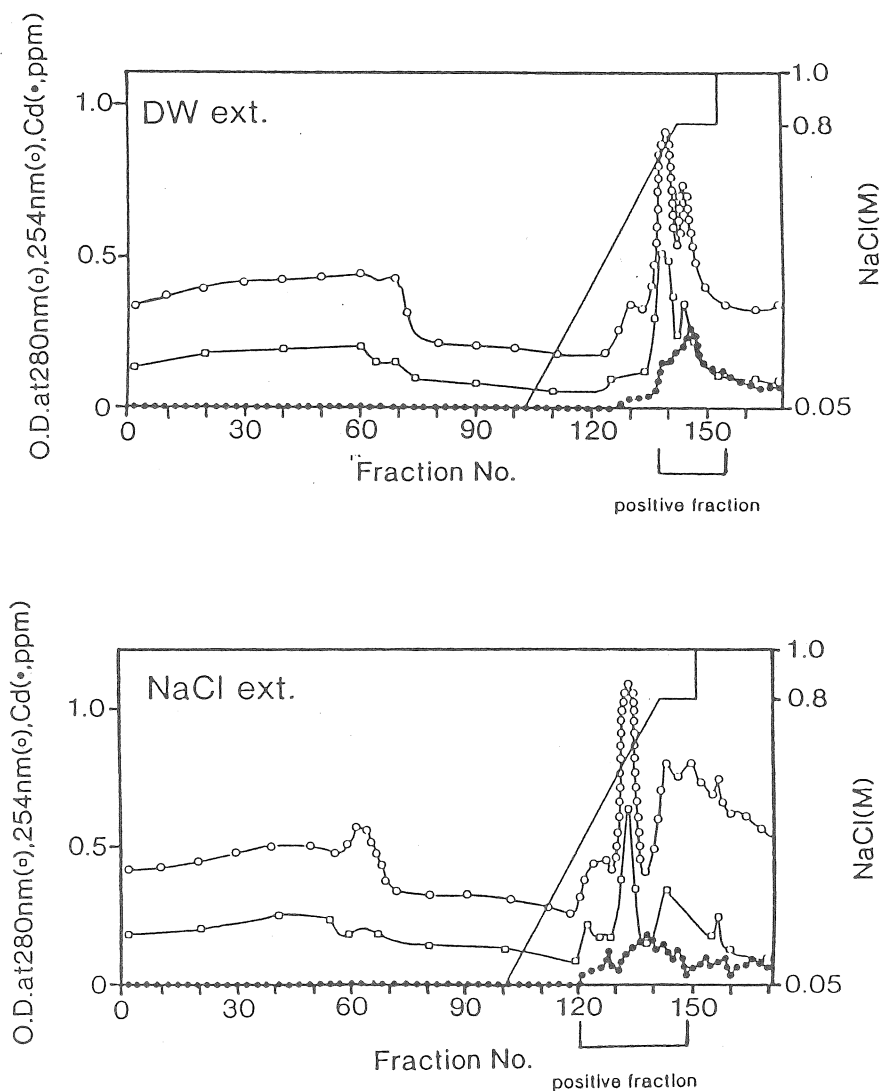


Fig. 2. DEAE chromatography of extracts with distilled water and 1.0 M NaCl.

A 2.7x17.5 cm column containing DEAE Sephadex A-25 was equilibrated with 0.05 M phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 M NaCl and 10 mM mercaptoethanol. The elution was performed with a gradient over 0.05-0.8 M and then with 1.0 M NaCl. Flow rate, 65 ml/h; 3.5 ml fractions collected.

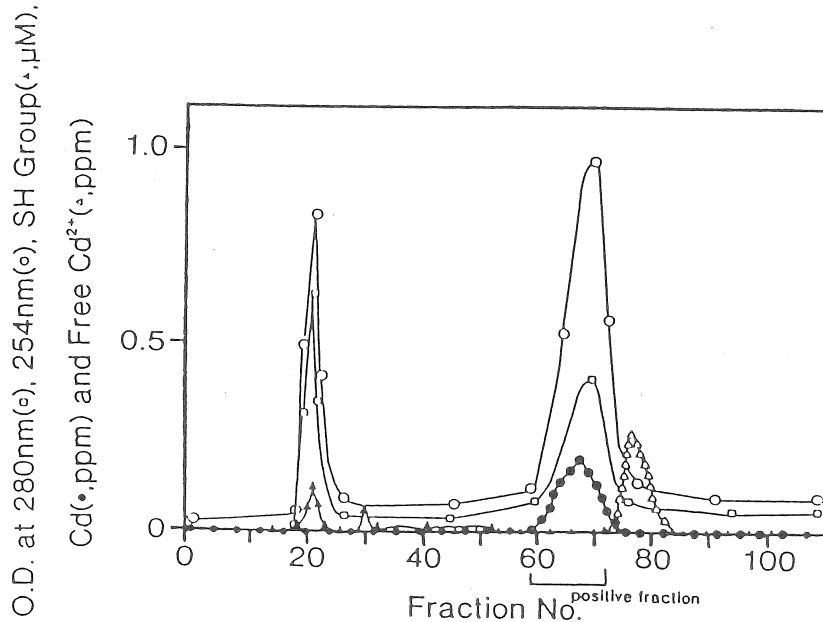


Fig. 3. Fractionation on Sephadex G-50 of Cd-containing material from DEAE-Sephadex A-25. A 2.7x65 cm column was equilibrated 10 mM ammonium acetate buffer (pH 7.0). Rate, 33 ml/h; 3.8 ml fractions collected.

Chlamydomonas sp. の蒸留水抽出液のゲル濾過クロマトグラムはCdを含む画分が分子量の大きいものと小さいものの2つあることを示した (Fig. 4A)。次に4Aの分子量の高い画分を集め、再度Sephadex G-50 ゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。結果を Fig. 4Bに示す。得られた画分を塩処理しDEAE-Sephadex A-25にカラムクロマトグラフィーによる精製を試みたがCdが遊離してしまい、耐塩性の*Chlamydomonas* sp. のフィトケラチンの精製にはイオン交換クロマトグラフは有効でないことが分かった。ゲル濾過で得られた画分の逆相HPLCでは十数本のピークが得られ、それらの内のいくつかはアミノ酸分析の結果フィトケラチンの可能性が高いがさらに精製の必要がある。

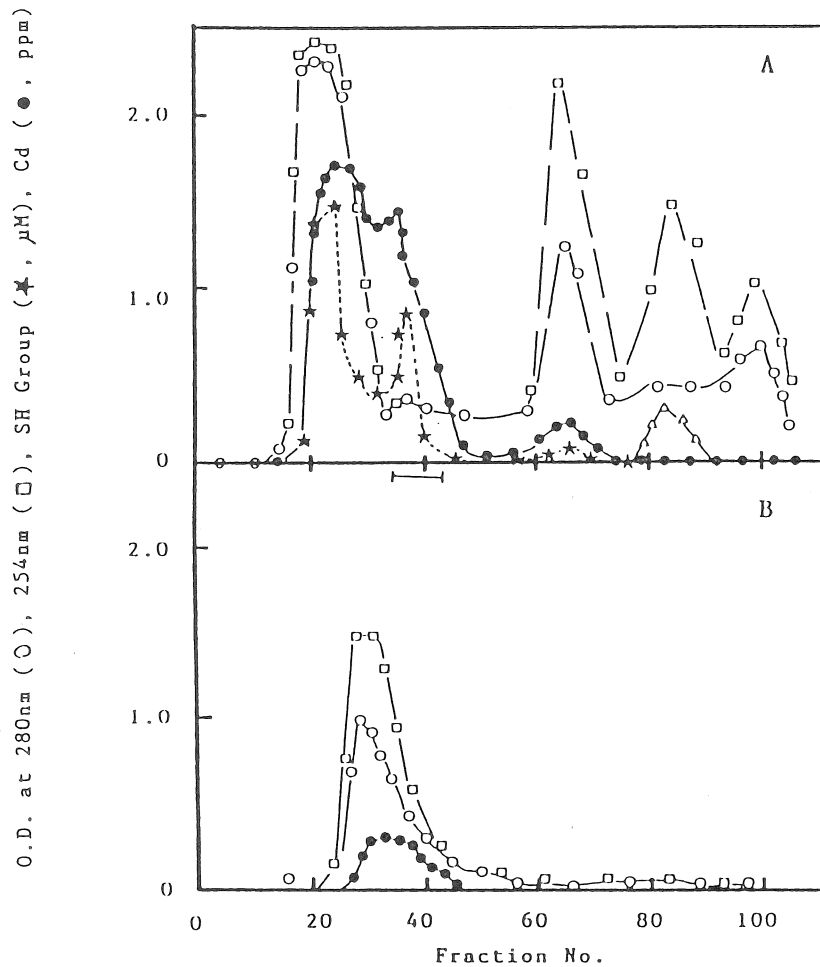


Fig. 4. Fractionation on Sephadex G-50 of cell-free extract with DW, A; and larger-molecular-mass material from Sephadex G-50 (A), B. Conditions are as specified in the legend to Fig. 3.

4. 考察及び今後の課題

Chlamydomonas sp. の生長の pH 依存性について調べ、この条件では至適 pH は 3.5 付近であったが、依然として以下の検討すべき問題が残されている。

- 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。今後、コハク酸、MES buffer で調べる予定。
- 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。

金属耐性に関しては、細胞破碎液の沈澱画分にもCdが含まれていたため、耐塩性高等植物⁶⁾で報告されている細胞壁に金属を結合させて細胞内に入れられないという機能も持っていると考えられる。しかし、タンパク質当りでかなりの量が上清画分に得られたため金属結合ペプチドいわゆるフィトケラチンもCd存在下で生育した細胞に含まれると考え精製を試みたが部分精製にとどまった。*Chlamydomonas* sp. の蒸留水抽出液のゲル濾過クロマトグラムはCdを含む画分が分子量の大きいものと小さいものの2つあることを示した。

2種類のフィトケラチン-金属複合体の存在はCdに曝した酵母において見つけられた⁷⁾。第一は大部分フィトケラチンとCdからなり、見かけの分子量は3-4 kDa (LMW PC-Cd複合体)で、第二は見かけの分子量は6-9 kDa、フィトケラチン、Cdの他に硫化物を含む(HMW PC-Cd-S⁻²複合体)である。フィトケラチン(γ Glu-Cys)_nGlyにおいてnの数は2から11と報告されているので、分子量の小さい画分をまず精製した。この画分のHPLCから得られた成分は両方ともシステイン含量が低くグルタミン酸とグリシンを多く含んでいた。耐塩性藻類はグルタミン酸のような酸性アミノ酸を多く含むといわれており、またシステインは重金属との結合に重要なため精製が十分でなく混在物質の可能性が考えられる。

酵母⁷⁾以外にも、芥子⁸⁾、トマト⁸⁾などにおいてHMW PC-Cd複合体の存在が報告されている。*Chlamydomonas* sp. のカドミウムを含む分子量の大きい画分がこれに相当するのかも知れない。逆相HPLCの結果フィトケラチンが含まれていること明らかになったがさらに精製が必要である。塩抽出、塩処理の結果からCdを含む画分が沈澱する恐れがあることが分かったので、まずゲル濾過である程度他のタンパク質を除いた後陰イオン交換クロマトグラフィーで精製を試みたがCdが遊離してしまってその方法は使えないことが分かった。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。

5. 文献

- 1) Johnson, M. J., Johnson, E. J., MacElroy, R. D., Speer, H. L. and Bruff, B. S. (1968) *J. Bacteriol.* 95, 1461-1468
- 2) Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976) *Anal. Biochem.* 70, 241
- 3) Scor/Unesco (1966) In: *Monographs on oceanographic methodology I.* Unesco Publication center, N. Y., 69pp.
- 4) Ben-Amotz, A. (1975) *J. Phycol.* 11, 50-54
- 5) Ellman, G. L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77
- 6) Jackson, P. J., Anderson, W. L., DeWitt, J. G., Ke, H. D., Kuske, C. R., Moncrief, R. M. and Rayson, G. D. (1993) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29P, 220-226
- 7) Murasugi, A., Wada, C. and Hayashi, Y. (1983) *J. Biochem.*, 93, 661-664
- 8) Plocke, D. J. and Kagi, J. H. R. (1992) *Eur. J. Biochem.*, 207, 201-205

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

Noriko TOMINAGA¹ and Hiroyuki TOMINAGA²

¹Institute of Environmental Science for
Human Life, Ochanomizu University

²Musashigaoka College

Summary

The effect of pH on the growth of an acidophilic and salt tolerant green alga, Chlamydomonas sp. isolated from acidic saline lake in South Australia, was studied. The specific growth rates (μ) ranged from 0.1 to 0.2 per day at $166 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the synthetic media containing 15% NaCl and 0.05 M buffer. Buffers were glycine- H_2SO_4 , glycyglycine- H_2SO_4 , and phthalate- H_2SO_4 . The highest value of μ was obtained around pH 3.5.

Chlamydomonas sp. has tolerance to certain heavy metals. An extract from cells induced by $100 \mu\text{M}$ CdSO_4 was assayed by gel filtration to investigate mechanisms of metal tolerance. Chlamydomonas sp. produced two Cd-containing peaks that might correspond to the HMW (high molecular weight) and LMW phytochelatin-Cd complexes recently observed in extracts from yeast, wild mustard and tomato. We examined the purification and characterization of two peaks. HMW fraction was lost by NaCl treatment for application to anion exchanging chromatography.