

9525 原生動物ユーグレナの耐塩性機構に関する研究

助成研究者：中野 長久（大阪府立大学 農学部）

共同研究者：宮武 和孝（大阪府立大学）

渡辺 文雄（高知女子大学）

竹中 重雄（羽衣学園短期大学）

地球温暖化を防ぐ有力な方法として、空気中の二酸化炭素（CO²）を植物の光合成能により固定することが挙げられている。しかし高等植物を生育させるには広大な土地が必要であることから、その実現は困難であると考えられる。そこで光合成能を有する微生物を利用してCO²の固定を行うことがより現実的な方法である。そこで高い炭酸固定能を示し、様々な環境に適応する能力を持ち、さらにCO²固定後の利用価値の高い光合成微生物の分子育種が期待されている。

我々は淡水環境に生育する原生動物である *Euglena gracilis* Z（以下、ユーグレナ）が最適の生物であると考えている。本生物は高等植物が生育不能となる高濃度のCO²を含む工場排気中においても生育可能であり、その高CO²条件下において良好な生育を示す。またこれまでにその細胞を稚魚飼育のための飼料として利用可能であることを報告してきた。よって本生物を塩環境下において生育可能とすることが出来れば、地球環境の保全のみならず新たな産業の育成が可能であると考えられる。そこで本生物の耐塩性機構について検討を行った。

ユーグレナの生育は100 mM NaClの存在下で阻害が見られたが、ユーグレナは250 mM NaClまで生育することが可能であった。この塩ストレス下でユーグレナの細胞形態が約30分で球形へと変化し、細胞体積も外部の塩濃度に比例して減少した。この形態の変化と細胞体積の減少は塩環境への適応に関係すると考えられる。

塩ストレス下でのユーグレナの貯蔵多糖、パラミロン含量を検討した結果、パラミロンは塩ストレス負荷後、急激に減少することを見い出した。パラミロンから生成される物質を同定するために、¹⁴C-グルコースによるパラミロンの標識を行い生成物を検討した結果、二糖類であるトレハロースが生成され、蓄積されることを見い出した。またトレハロースの蓄積量は外部の塩濃度に比例することから、トレハロースは適合溶質として機能することが示唆された。

以上の結果より、ユーグレナはトレハロースを適合溶質とする耐塩性機構をもつことを明らかとした。

9525 原生動物ユーグレナの耐塩性機構に関する研究

助成研究者：中野 長久 (大阪府立大学 農学部)

共同研究者：宮武 和孝 (大阪府立大学)

渡辺 文雄 (高知女子大学)

竹中 重雄 (羽衣学園短期大学)

1. 研究目的

地球温暖化を防ぐ有力な方法として、空気中の二酸化炭素 (CO_2) を植物の光合成能によりより固定することが挙げられている。しかし高等植物を生育させるには広大な土地が必要であることから、その実現は困難であると考えられる。そこで光合成能を有する微生物を利用して CO_2 の固定を行うことがより現実的な方法である。そこで高い炭酸固定能を示し、様々な環境に適応する能力を持ち、さらに CO_2 固定後の利用価値の高い光合成微生物の分子育種が期待されている。

我々は淡水環境に生育する原生動物である *Euglena gracilis* Z (以下、ユーグレナ) が最適の生物であると考えている。本生物は高等植物が生育不能となる高濃度の CO_2 を含む工場排気中においても生育可能であり、その高 CO_2 条件下において良好な生育を示す (1)。またその細胞を稚魚飼育のための飼料として利用可能であることを報告してきた (2)。よって本生物を塩環境下において生育可能とすることが出来れば、地球環境の保全のみならず新たな産業の育成が可能であると考えられる。そこで本生物の耐塩性機構について検討を行った。

2. 研究方法

2-1. 研究材料と培養方法

Euglena gracilis Z株を用いた。培養には、Kore-Hutner (KH) 培地 (3) を用いた。26℃、2,000 luxの光照射下で、振盪培養した。

2-2. 細胞数測定及び体積測定法

ユーグレナの生育は血球計測盤により細胞数を測定した。また細胞体積は毛細管に注入し、遠心後の体積を測定することにより求めた。

2-3. 走査電子顕微鏡による観察

細胞懸濁液に5%となるようにグルタルアルデヒドを添加し、4℃で一晩固定を行った後、15 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄後、凍結乾燥した。その細胞を白金による蒸着後、走査電子顕微鏡による観察を行った。倍率は2,000倍、加速電

圧は20 kVとした。

2-4. パラミロン定量

ユーグレナ細胞懸濁液をアセトン処理し、遠心後、沈殿を採取した。その沈殿をさらにSDS溶液に懸濁し、100℃、15分間加熱後、遠心し、沈殿を採集する操作を3回繰り返した。この沈殿をパラミロンとし、フェノール・硫酸法により定量した。標準としてグルコース溶液を用いた。

2-5. ^{14}C -グルコースによるパラミロンの標識と細胞成分の分画

KH培地により4日間培養したユーグレナを採取し、蒸留水で洗浄後、5 mM $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -グルコース（1 mCi/mmol）を含む15 mM リン酸緩衝液（pH 6.8）に懸濁し、25℃で、7時間振盪培養した。

上記の培養液を採取し、ユーグレナ細胞を遠心分離後、クロロホルム・メタノール・水（10:20:8）により抽出し、残渣を再度抽出処理し、得られた抽出液にクロロホルムと蒸留水を加え、再度抽出を行い、クロロホルム層を脂質画分とした。水層は水酸化カリウムで中和後、Dowex 50カラム（ H^+ form, 1 x 5 cm）に供した。カラムから1 N アンモニアで溶出される画分をアミノ酸画分とした。非吸着画分をDowex 1カラム（ HCOO^- form, 1 x 5 cm）に供した。1 N 塩酸で溶出される画分を有機酸画分とし、非吸着画分を可溶性糖画分とした。また脂質抽出処理により得られた残渣は乾固した後、0.54 N 過塩素酸に懸濁した。これを10,000 x g、10分の遠心後、酸可溶性画分は脂質抽出時の水層と同じ方法でアミノ酸、有機酸、可溶性糖に分画した。酸不溶性画分は1% SDS溶液に懸濁した後、100℃、15分間加熱した。1,000 x g、3分間の遠心後、上清をタンパク質画分、沈殿をパラミロン画分とした。各画分中に含まれる放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

2-6. 薄層クロマトグラフィー（TLC）による可溶性糖の同定

可溶性糖画分をシリカゲル 60に供し、プロパノール・水（85:15）で展開、風乾後、原点から5 mm間隔にシリカゲルを削り採り、放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。ラフィノース、トレハロース、マンニトール、スクロース、グルコース、ソルボース、グリセロースを標準とし、試料と同様の方法で展開、風乾後、0.5% KMnO_4 を含む1 N NaOHをプレートに噴霧し、150℃、15分間加熱し、スポットを検出した。

2-7. 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による可溶性糖の同定

可溶性糖画分を流速 1 ml/minのアセトニトリル・水（75:25）により平衡化

したコスモシールバックドカラム5NH2 (4.6 x 250 mm) に供し、溶出液を0.5分毎に分取し、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。グリセロール、フルクトース、グルコース、スクロース、トレハロースを標準として用い、試料と同様の方法で溶出し、RI検出器により溶出位置を求めた。

2-8. カスクロマトグラフィー (GC) によるトレハロースの定量

ユーグレナ細胞より80%エタノールによりトレハロースを抽出し、同時に内部標準として100 μ gのスクロースを添加した。1,000 x g、3分間の遠心分離後、得られた上清をエボポレーターで乾固し、トリメチルシリル (TMS) 化試薬 (無水ピリジン-ヘキサメチルジシラザン-トリメチルクロロシラン=1.25:0.25:0.125) を加え、75 $^{\circ}$ Cで45分間インキュベートした。この試料をGCに供した。カラムは10 mm x 8 m、充填剤はSE-30、糖のTMS誘導体は水素炎イオン化検出器 (FID) で行った。

2-9. 試薬

[U- 14 C]グルコースはNew England Nuclear社から購入した。他の試薬は全て市販の特級試薬を用いた。

3. 研究結果

3-1. 生育に対するNaClの影響

KH培地に終濃度0、50、100、150、200 mMとなるようNaClを添加し、ユー

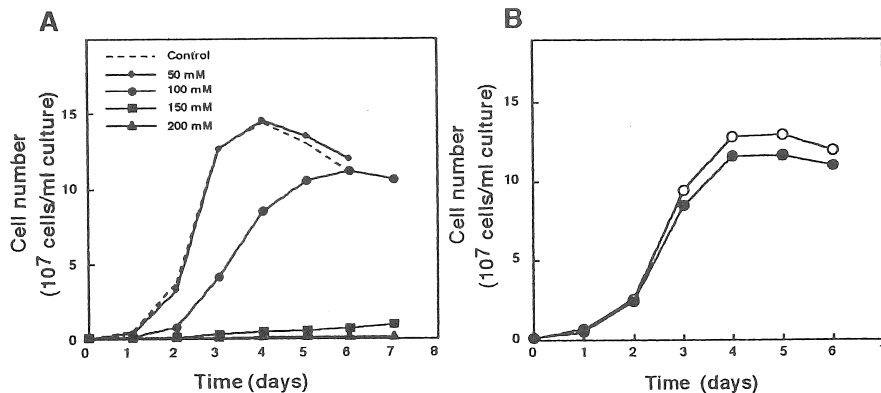


Fig. 1 Effect of NaCl on proliferation of *E. gracilis*.
(A): Effect of NaCl on growth, (B): Effect of NaCl treatment on cell survival.

グレナの生育に対する塩濃度の影響について検討した (Fig. 1-A)。50 mMの塩濃度は生育になんらの影響も及ぼさなかったが、100 mMでは生育速度と細胞数ともに低下した。150、200 mMでは生育を完全に抑制した。そこで生育阻害の見られる濃度の細胞の生存の有無について検討した (Fig. 1-B)。200 mMのNaClで6日間処理した細胞を塩を含まない培養液中に移した結果、未処理の細胞と同一の生育を示した。

3-2. 塩ストレス負荷後の細胞の形態変化

塩ストレス負荷で引き起こされる細胞の形態変化を走査電子顕微鏡を用いて、観察した (Fig. 2)。200 mM NaCl (以下、塩ストレスとする) 負荷により、5分後には、通常の紡錘形 (Fig. 2-A) から、細長い棒状 (Fig. 2-B) に変化し、30分後には球形 (Fig. 2-C) となり活動を停止した。ユーグレナは塩ストレスが解除されるまで球形を保った。

3-3. 塩ストレス負荷後の細胞体積の変化

50、100、200 mMの塩ストレスの細胞体積に対する影響について検討した (Fig. 3)。50 mMではほとんど体積に影響はなかったが、100 mMでは塩ストレス負荷後、10分後に後に約20%の減少を示した。同様に200 mMでも約50%の減少が見られた。30分以降に体積の増加が

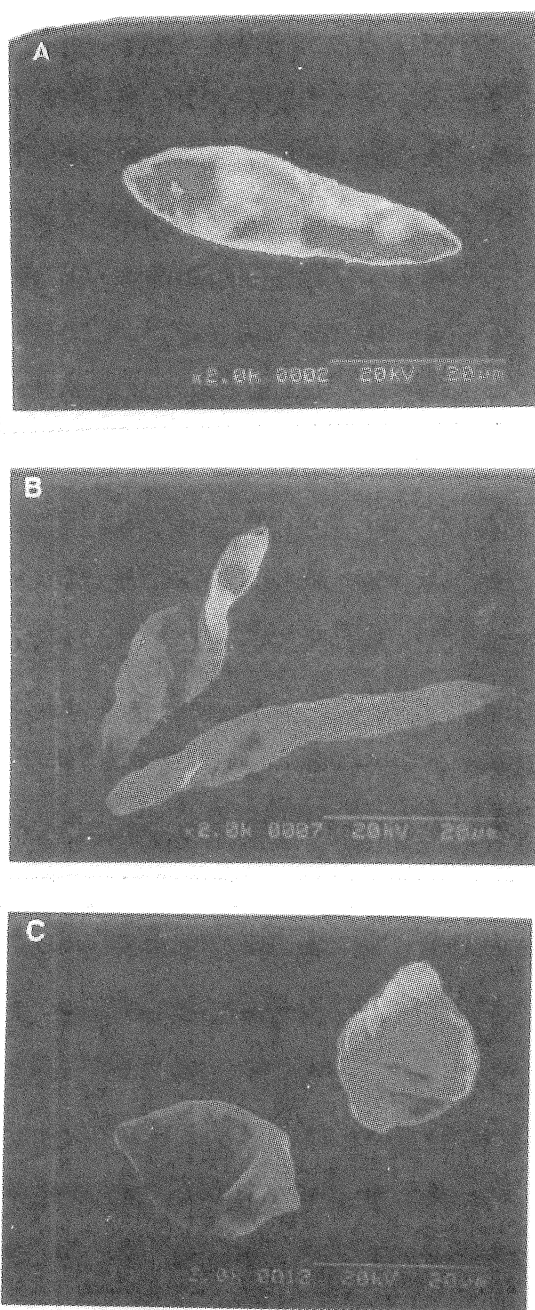


Fig. 2 Change of cell shape under the salt stress.
(A): Before, (B): 5 min, (C): 30 min.

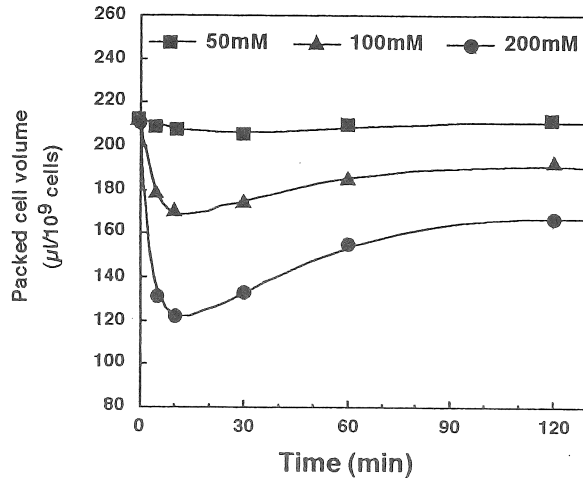


Fig. 3 Change of packed cell volume under the salt stress.

始まり、最終的に100 mMでは90%、200 mMでは80%まで回復し、その後一定を保った。

3-4. 塩ストレス負荷後のパラミロン含量の変動

β -1,3-グルカンよりなる貯蔵多糖パラミロンの耐塩性への関与を検討するため、200 mM塩ストレス負荷後のパラミロン含量を測定した (Fig. 4)。パラミロン含量は塩ストレス負荷直後から減少を始め、2時間で約30%が分解された。

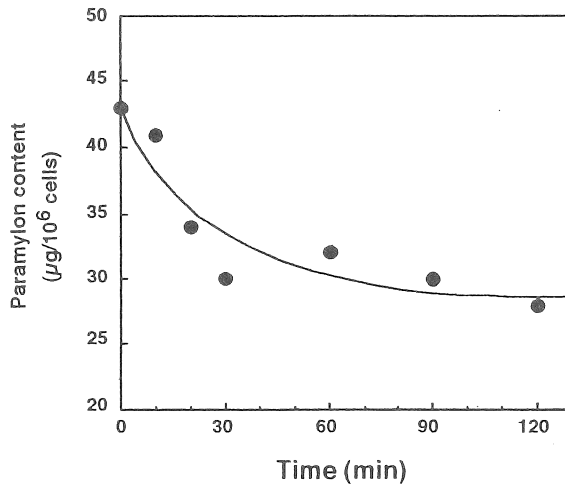


Fig. 4 Change of paramylon content under the salt stress.

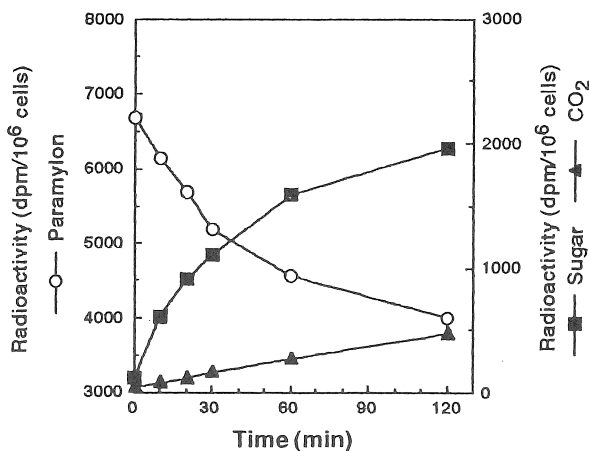


Fig. 5 Migration of radioactivity from ¹⁴C-paramylon.

3-5. パラミロンからの生成物の検討

パラミロン分解に伴う生成物を同定するために、[U-¹⁴C]グルコースを用いたラベルチェイス実験を行った。放射性パラミロンを蓄積したユーグレナに塩ストレスを負荷後、細胞成分を分画し、それぞれの放射活性を測定した (Fig.5)。パラミロン画分の放射活性は塩ストレス負荷後、2時間で約40%減少した。一方、可溶性糖画分はそれと対照的な増加を示した。またCO₂画分もわずかに増加した。アミノ酸、有機酸、脂質、タンパク質画分では変動はほとんど見られなかった。

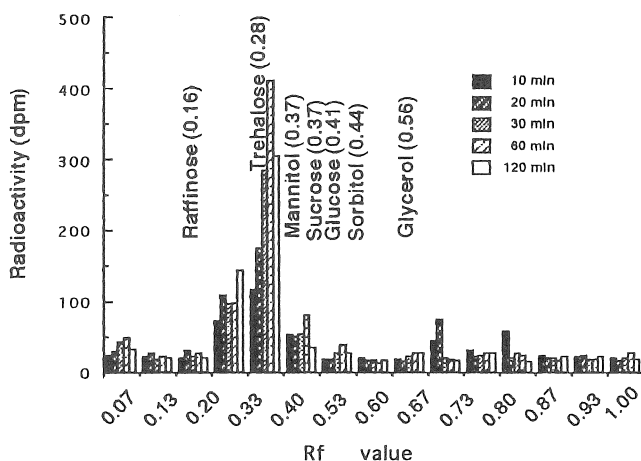


Fig. 6 TLC analysis of sugar formed under the salt stress.

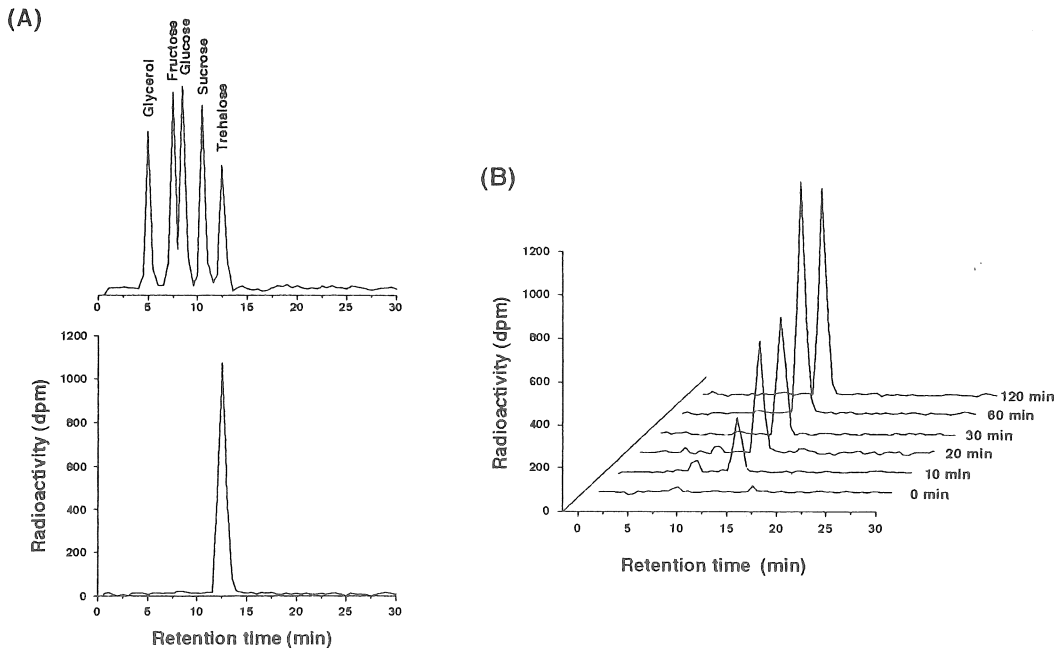


Fig. 7 HPLC analysis of sugar formed under the salt stress. (A) Elution profile of sugars. (B) Change of trehalose content under the salt stress.

3-6. TLC、HPLCによる生成糖の同定

^{14}C -パラミロンから精製した可溶性糖の同定を行った。可溶性糖両分をTLCに供し、展開後のシリカゲルを分取し、その放射活性を測定した結果、 R_f 0.2から0.3の間に検出された (Fig. 6)。トレハロースの R_f 値が0.28であることから、生成した可溶性糖をトレハロースであると推定した。さらにHPLCに供し、溶出される放射活性の保持時間を測定した結果、保持時間12.5分に溶出された (Fig. 7)。トレハロースの R_f 値が0.28、保持時間も一致したことから、生成した可溶性糖をトレハロースであると同定した。

3-7. トレハロース合成に対する塩濃度の影響

0、50、100、150、200 mM NaClの塩ストレス負荷後のトレハロース生成量をGCにより定量した (Fig. 8)。それぞれの塩ストレス負荷後にトレハロース合成が始まり、50 mMでは負荷後30分で合成が停止し、100、150 mMでは1時間、200 mMでは2時間後に停止した (Fig. 8-A)。また負荷した塩濃度に比例して、トレハロースの合成が起こることが明らかとなった (Fig. 8-B)。

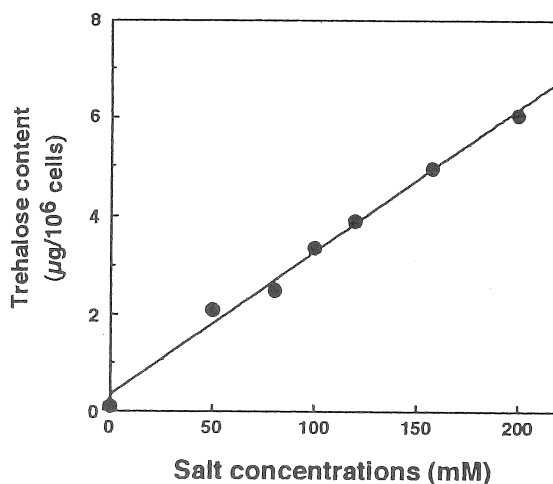


Fig. 8 Relation between trehalose content in the cell and NaCl concentration in the medium.

4. 考察

ユーグレナの耐塩性について、その生育から検討した結果、100 mMの塩存在下において生育の阻害が見られるようになり、200 mMの塩存在下では生存することが可能であったが、その環境下では生育することが出来なかった。またその塩環境下における形態変化を走査電子顕微鏡により観察した結果、塩ストレス負荷直後、脱水反応による細胞形態の伸長が見られ、その後球形へと形状を変化させ、塩ストレスに適応していることが示された。この結果は塩環境下に移された直後に急激な細胞体積の変化とその後の適応による細胞体積の回復が関与していることが考えられる。

ユーグレナは嫌気状態への適応機構として、 β -1,3-グルカンよりなるパラミロンをワックスエステルへと代謝し、その環境への適応する(4)。そこで塩ストレス環境下にユーグレナを置いた時のパラミロンの含量を検討した結果、急激な減少が認められた。これまでに知られている微生物の耐塩性機構は、細胞内に適合溶質と呼ばれる物質を蓄積することである。緑藻の*Dunaliella tertiolecta*はグリセロール(5)を*Platymonas subcordiformis*はマンニトールを蓄積する(6)ことが知られている。この結果はユーグレナが耐塩性機構として、何らかの適合溶質をパラミロンより合成し、細胞内に蓄積することを示唆するものであった。

そこで¹⁴Cグルコースにより標識されたパラミロンを細胞内に蓄積したユーグレナを塩ストレス環境下に移し、パラミロンからの代謝産物について検討した。その結果、可溶性糖にのみ放射活性の移動が見られ、その他の細胞成分の放射活性値

はほとんど変動しなかった。TLC及びHPLCによりパラミロンより生成した糖の同定を試みた結果、トレハロースであった。さらにトレハロースの蓄積量と塩濃度の関係を検討したところ、その合成は培地中の塩濃度に比例したことから、塩ストレスに対する適合溶質として機能していることが示された。

以上の結果はユーグレナが適合溶質としてトレハロースを細胞内に蓄積する能力を保持し、淡水に生息する原生動物であるが、耐塩性機構を保持していることを示すものである。

5. 今後の課題

ユーグレナは産業的利用価値の高い原生動物であり、さらにCO²に対する耐性及び光合成能から地球環境保全のための有用微生物としての利用が期待されている。今回の研究結果より、ユーグレナにはトレハロースを適合溶質として細胞内に蓄積する能力を持つことが明らかとなった。今後さらにユーグレナの環境耐性を高めるために耐塩性機構を向上させることが望まれる。そのためにはユーグレナのトレハロース代謝系を検討し、分子育種の基礎的知見を得ることが必要である。

参考文献

- (1) Hamasaki, K., Okuno, H., Takenaka, S., Miyatake, K. & Nakano, Y. (1996) *Plant. Cell Physiol.*, 137, Suppl. 41.
- (2) 林 雅弘、戸田享次、米司 隆、佐藤 修、北岡正三郎 (1993) 日水誌、59、1051-1058.
- (3) Koren, L. E. & Hutner, S. H. (1967) *J. Protozool.*, 14, Suppl. 17.
- (4) Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y. & Kitaoka, S. (1982) *FEBS Lett.*, 150, 89-93.
- (5) Avron, M. (1986) *Trends Biochem. Sci.*, 11, 5-6.
- (6) Craigie, J. S., McLachlin, J., Majak, W., Ackman, R. G. & Tocher, C. S. (1966) *Can. J. Bot.*, 44, 1247-1254.

Salt-tolerant mechanism of a protozoan, *Euglena gracilis* Z

Yoshihisa Nakano, Kazutaka Miyatake, Fumio Watanabe⁽¹⁾
and Shigeo Takenaka⁽²⁾

Department of Applied Biological Science, Osaka Prefecture University

⁽¹⁾Department of Food and Nutrition, Kochi Women's University

⁽²⁾Laboratory of Nutrition and Food Science, Hagoromo Gakuen Junior College

Summary

Elevation of the CO₂ level in the atmosphere is a major problem for the earth and therefore many meteorologists are worrying about changes in earth climate. To reduce the level of CO₂, we proposed the biological fixation of CO₂ via photosynthesis and established the microalgal system using the protozoan, *Euglena gracilis* Z. In our experiments, this organism proliferated in high CO₂ concentrations such as in exhausted gas from a electric power station in which higher plants or other algae could not survive. In addition, the *E. gracilis* contained very rich nutrients such as protein, unsaturated fatty acids and vitamins. However, there is little information available on the salt-tolerance of *E. gracilis*. This study is an attempt to elucidate the salt-tolerant mechanism of *E. gracilis* and to establish an application for the breeding of salt-tolerant plants or microalgae by using molecular biological techniques.

Proliferation of *E. gracilis* was inhibited at 100 mM NaCl concentration, but the cells could survive up to 250 mM NaCl. Under these conditions, *E. gracilis* changed its cell shape from tear drop to globular within 30 min and the packed-cell volume also decreased. These changes may be due to adaptation to salt stress.

We found that trehalose, a disaccharide, was formed rapidly from paramylon, a reserve polysaccharide of this organism due to the salt conditions. ¹⁴C labelled paramylon converted stoichiometrically to the trehalose, suggesting *E. gracilis* forms trehalose as a compatible solute. The amount of trehalose changed in response to changes in external salt concentrations.

From these results, we concluded *E. gracilis* has a salt-tolerant mechanism which produces trehalose as a compatible solute.