

9624 好酸性・耐塩性緑藻における植物ホルモンの動態

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：古賀 恭子(お茶の水女子大学 生活環境研究センター)

植物ホルモンの作用についての研究は高等植物において非常に詳細に行われ、膨大なデータが得られているが、その作用機作の分子的基础はまだ不明な点が多い。

我々は耐塩性単細胞緑藻 *Dunaliella* sp. において植物ホルモンアブシジン酸 (ABA) の存在を GCMS など で確認し、内生 ABA 量の生長段階における変化、塩分濃度や栄養塩制限の ABA レベルに及ぼす影響などを明らかにした。そこで本研究は、耐塩性と好酸性を併せ持つためより多くのストレスを与えやすい *Chlamydomonas* sp. を主な実験材料とし単細胞緑藻における ABA レベルの変化及びその機能を知ることを目的とした。

ABA は高速液体クロマトグラフを用いて測定した。まず、*Dunaliella* sp. において、硫酸塩制限によっても対数増殖期初期に ABA 量の増減が見られ、その最高値は生長が抑えられるほど高くなることを示した。次に定常期の細胞、つまり ABA 含量が低くなった細胞でも浸透圧ショックを与えると一時的に (3 時間後) ABA 含量が増加し、その量はショックが大きいほど高くなった。

好酸性・耐塩性緑藻の *Chlamydomonas* sp. において、硝酸塩、リン酸塩、硫酸塩を制限して生長、内生 ABA レベルに対する影響を見たところ、*Dunaliella* sp. と同様に、生長初期に ABA レベルのピークが見られ、その値は生長に不利な条件ほど高くなることが明らかになった。また、増殖が同程度に押さえられる濃度では栄養塩の種類に関わらず ABA レベルはほぼ等しくなった。

以上の結果から、単細胞藻類においても ABA の動向は高等植物の場合と似ており、ABA の作用は、生長の不利な条件で増加して生長を抑えるように、またストレス時に増加してストレス環境に適応させる働きをしているのではないかと推測される。

Dunaliella sp. と *Chlamydomonas* sp. でほぼ同じ傾向が得られたが、硝酸塩制限において差が見られた。*Dunaliella* sp. では硝酸塩制限によって大量のカロテノイドが蓄積されるが、生長がリン酸塩制限や硫酸塩制限と同程度に生長が抑えられるていても、ABA 量が非常に高くなった。この場合、今のところ何も証明されていないが ABA の一部はカロテノイドの大量合成を誘導すると考えると興味深い。

今後の課題として、ABA がカロテノイドの合成と関係あるか、高等植物内で ABA と拮抗する作用をするとされているホルモンは単細胞藻類の中に存在するか、などについて調べ、単細胞藻類における植物ホルモンの作用を明らかにしたい。

9624 好酸性・耐塩性緑藻における植物ホルモンの動態

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：古賀 恭子(お茶の水女子大学 生活環境研究センター)

1. 研究の目的

植物ホルモンの作用についての研究は高等植物において非常に詳細に行われ、膨大なデータが得られている。しかし、1つのホルモンについてもいろいろな働きが示され、かつ濃度や組織による作用の差があり、その上、他のホルモンとの相互作用なども複雑に絡んでいる。そのため植物ホルモンの作用機作の分子的基礎はまだ不明な点が多い。

一方、分化のみられない単細胞藻類において植物ホルモンのアブシジン酸(ABA)が1986年初めて検出され¹⁾、以後藻類全般に低濃度ながらもABAは存在するであろうとされている。そこで生ずる疑問は、1)分化していない単細胞緑藻において植物ホルモンはどのような働きをしているのか、2)ABA以外の植物ホルモンも単細胞藻類に存在するかの2点である。

我々は耐塩性単細胞緑藻*Dunaliella* sp.においてABAの存在をGCMSなどで確認し、以下の結果を得た。1)内生ABA量は生長段階で変化し、対数増殖期初期に著しい増加を示してピークに達した後急激に減少し、定常期に入ってからほぼ一定の値を保つ。2)培地中のNaCl濃度を変えて培養すると、ABAのピーク値は増殖最適濃度の15%の時最低で、それより高い場合も低い場合も高くなる。3)硝酸塩またはリン酸塩を制限すると、基本培地の場合ABA含量は最低で、増殖が抑えられるほどピーク値が高くなる。つまり生長初期のABA量に応じて生長が抑えられているのではないかと考えられる。また細胞の最終収量がほぼ同じになるような制限で比較すると、硝酸塩制限でカロテノイド量が基本培地の4~5倍、ABA量が4倍になるのに対し、リン酸塩制限ではカロテノイド量は基本培地と変わらず、ABA量はほぼ2倍であった²⁾。

そこで本研究は、*Dunaliella* sp.に比べ細胞壁を持つため遠心、濾過時の取り扱いが容易で、耐塩性と好酸性を併せ持つためより多くのストレスを与えやすい*Chlamydomonas* sp.を主な実験材料とし*Dunaliella* sp.の結果と比較し、単細胞緑藻におけるABAレベルの変化及びその機能を知ることが目的とした。

2. 研究方法

2.1. 培養方法

南オーストラリア州の酸性塩湖より単離精製した*Chlamydomonas* sp.は増殖の最適pHが3.5~4.5、最適NaCl濃度が10~15%の好酸性・耐塩性緑藻である。*Dunaliella* sp.は同

じく南オーストラリア州の塩湖より単離したもので、塩分濃度10~15%、中性でよく増殖する好中性・耐塩性緑藻であるが、窒素源不足など培養条件により大量のカロテノイドを合成する特徴を持つ。

Chlamydomonas sp. は *Dunaliella acidophila* 用培地 (DAM、pH 3.5) に、*Dunaliella* sp. は Johnsonらの培地³⁾ (pH 7.4) に、それぞれNaClを15% (2.57 M) 加えたものを基本培地とし、100 ml の三角フラスコに培地を20ml入れて20°Cで静置培養した。

栄養塩を制限するときは、同じ培地で三回以上植え継いだものを使用し、対数増殖期後期のものを 5×10^4 (*Dunaliella* sp.) または 5×10^5 (*Chlamydomonas* sp.) となるよう植え継いだ。照明は植物育成用ランプを用い、 $166 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、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。

蛋白質量：Lowry-folin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/Unesco⁴⁾に従い測定。

2.3 ABA測定法

明期の中間点の細胞を遠心で集め、抽出はNormanらの方法⁵⁾を改良して行い、定量には高速液体クロマトグラフィーを用いた²⁾。ABAの標準物質は(±)-*cis, trans*-abscisic acid (Sigma)を用い、回収率は89%であった。

3. 結果及び考察

3.1 *Dunaliella* sp. での結果

これまでの研究で生長に不利な条件の時ABAレベルが上昇すると推測されたので、硫酸塩を制限した場合の生長 (Fig. 1 A) と内生ABA含量の変化 (Fig. 1 B) を見た。硫酸塩を制限することによって不足するMgはMgCl₂を加えて補った。その結果、制限によって生長は抑えられ、生長過程におけるABA含量変化のパターンは同じで、生長が抑えられるほどABA含量のピーク値は高くなった。ただ、硫酸塩制限では大量のカロテノイド合成は誘導されず、細胞数の最終収量がほぼ同程度になるように制限した場合リン酸塩制限のABA量とほぼ等しい値が得られた。

次に、基本培地で6日間培養した細胞を様々な塩分濃度の培地に移して浸透圧ショックを与え、内生ABA量の時間的変化を見た (Fig. 2 A)。移して3時間後に、浸透圧差が大きい3%、26%でABAが顕著に増加し、6時間後には下がりその後は大きな変動はなかった。Fig. 2 Bに3時間後の各細胞のABA含量を示す。培養6日目にはABAレベルは既にピークを過ぎて低くなっているが、そのような細胞でも浸透圧ショックを与えると短時間のうちにABAを合成することが示された。浸透圧ショックを与えた *Dunaliella*

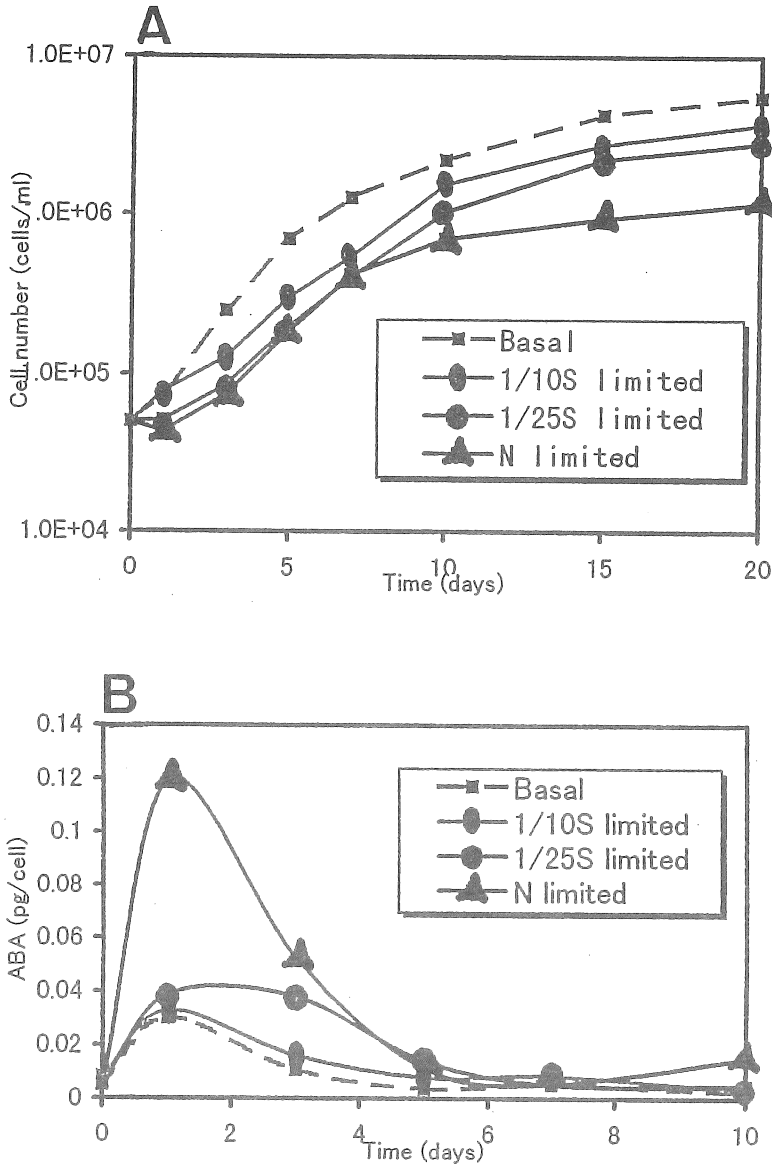


Fig. 1. The effects of nutrient deficiency on the growth (A) and endogenous levels of ABA (B) in *Dunalliella* sp. Concentrations of nutrients were: (■), 10 mM KNO_3 and 2mM $MgSO_4$ (basal); (▲), 0.4 mM KNO_3 (N-limited); (●), 80 μ M $MgSO_4$ (1/25S); (●), 0.2 mM $MgSO_4$ (1/10S). Each point represents the average of triplicate experiments with two flasks each.

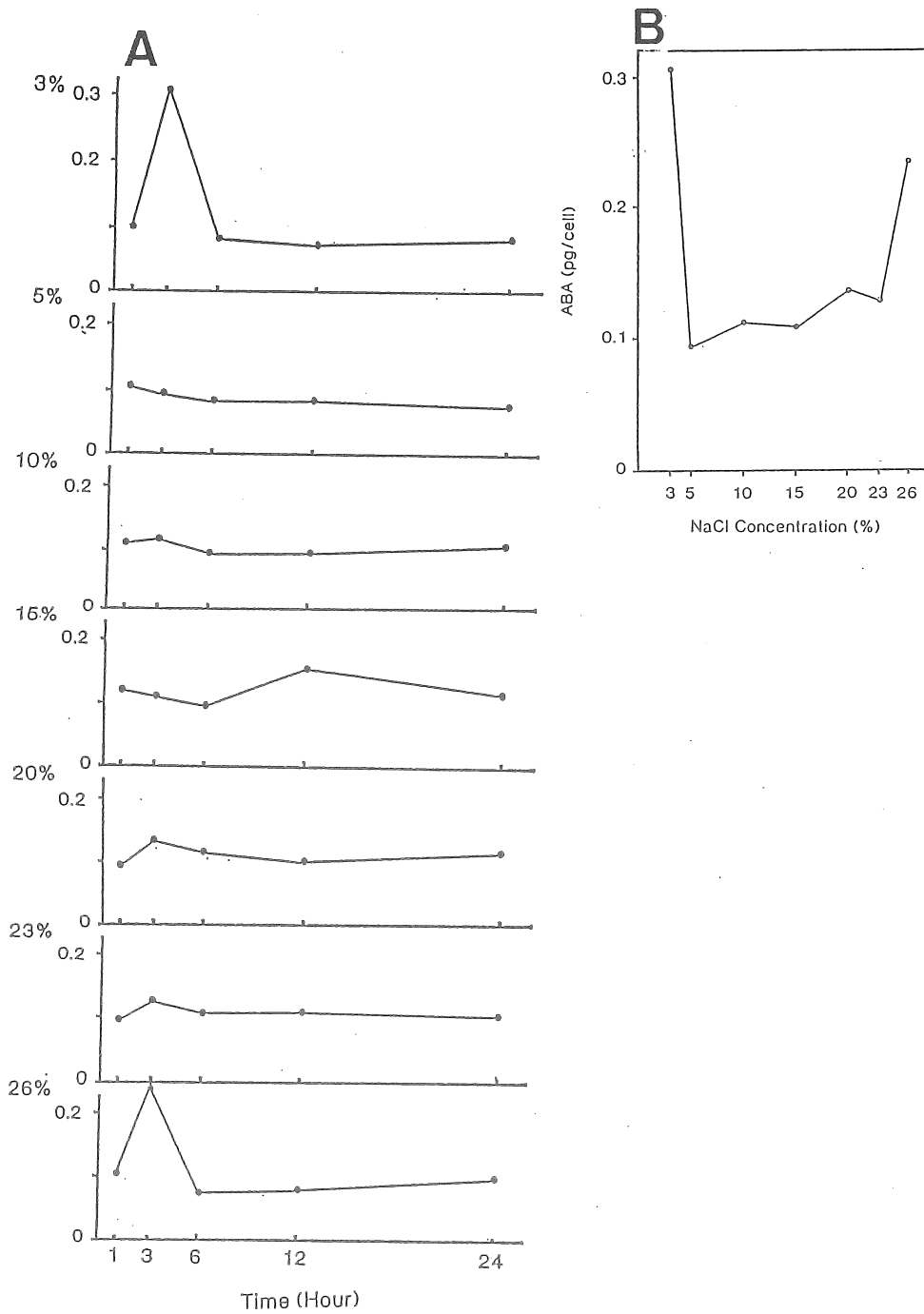


Fig. 2A. Time course of endogeneous level of ABA following exposure of *Dunaliella* sp. to salinity stress. Cells were transferred at zero time from the medium containing 15% NaCl to those of 3, 5, 10, 15, 20, 23, and 26% NaCl. Measurements were made 6 days after inoculation of culture. 2B: Endogeneous level of ABA at 3 hour after osmotic shock.

*parva*では3時間以内に⁶⁾、また低張条件から高張条件に移した塩生殖物のマツナでは約6時間後に⁷⁾ABA含量のピークが見られることが報告されている。

3.2 *Chlamydomonas* sp. の場合

Chlamydomonas sp. を用いて同様な実験を行った。硝酸塩制限の結果をFig. 3に、リン酸塩制限の結果をFig. 4に、硫酸塩制限の結果をFig. 5に示す。*Chlamydomonas* sp. においてもABAレベルは*Dunaliella* sp. と同様な変化を示し、またピーク時の値は生長に不利な場合ほど高くなった。

これらの結果をまとめたのがFig. 6である。Fig. 6 A Bから明らかなように、栄養塩ストレス条件下で、制限する栄養塩の種類にかかわらず、生長に不都合な条件でABA含量が増えるという、NaCl濃度ストレス同様の結果が得られた。

しかし、*Chlamydomonas* sp. においては*Dunaliella* sp. (Fig. 1 B)で見られるような硝酸塩制限のみABA含量が高くなるということにはなかった。*Dunaliella* sp. では硝酸塩制限によりリン酸塩制限や硫酸塩制限の場合の4~5倍以上のカロテノイド合成が誘導される (Fig. 6 C) が、*Chlamydomonas* sp. ではそのような現象は見られなかった (Fig. 6 D)。

図ではABA量を細胞当たりの量で表しているが、2種の藻類は細胞の大きさが異なり、*Dunaliella* sp. は $12 \times 18 \mu$ で、*Chlamydomonas* sp. ($5 \times 7 \mu$)より体積では10倍以上大きい。基本培地で培養した両者とも単位蛋白あたりのクロロフィルa量は20~30 mg/gとほぼ等しいので、クロロフィル量当たりで比較すると、*Dunaliella* sp. の基本培地でのピーク時のABA量は*Chlamydomonas* sp. に比べて約10倍、カロテノイド量は3倍高い。つまり、*Dunaliella* sp. はもともとカロテノイドもABAも多く含んでいるといえる。

高等植物におけるABAの生合成経路はまだ明らかでないが、カロテノイド合成の前駆体として知られるファルネシルピロリン酸を経由して直接合成される経路、あるいはメバロン酸から合成されたカロテノイドの分解による経路の2つが提示されている。Cowanらは*Dunaliella* sp. と近縁の*Dunaliella bardawil*を高塩分ストレスにさらしたとき、カロテノイドの蓄積には2つの段階があるといっている。すなわちストレス後速やか(1日以内に)にABAが合成されるがカロテノイドは低い値を保つ。合成されたABAが細胞外に排出されて低い値を保つ間、カロテノイドの蓄積が始まる。つまりABA合成の増加→ABAとその代謝産物のファゼイン酸は細胞外に排出→カロテノイドの合成の誘導と推測している⁸⁾。

硝酸塩制限で増加したABAの一部はカロテノイド合成が高まった結果の副産物であるとも考えられるが、カロテノイドが大量に蓄積されるのは培養8日以降であるし、ABAが増加するのは1~2日頃であることからその可能性は低い。我々の結果では培地中にはABAは痕跡量しか検出できなかつたし、*Dunaliella* sp. で高いカロテノイド合成を誘導

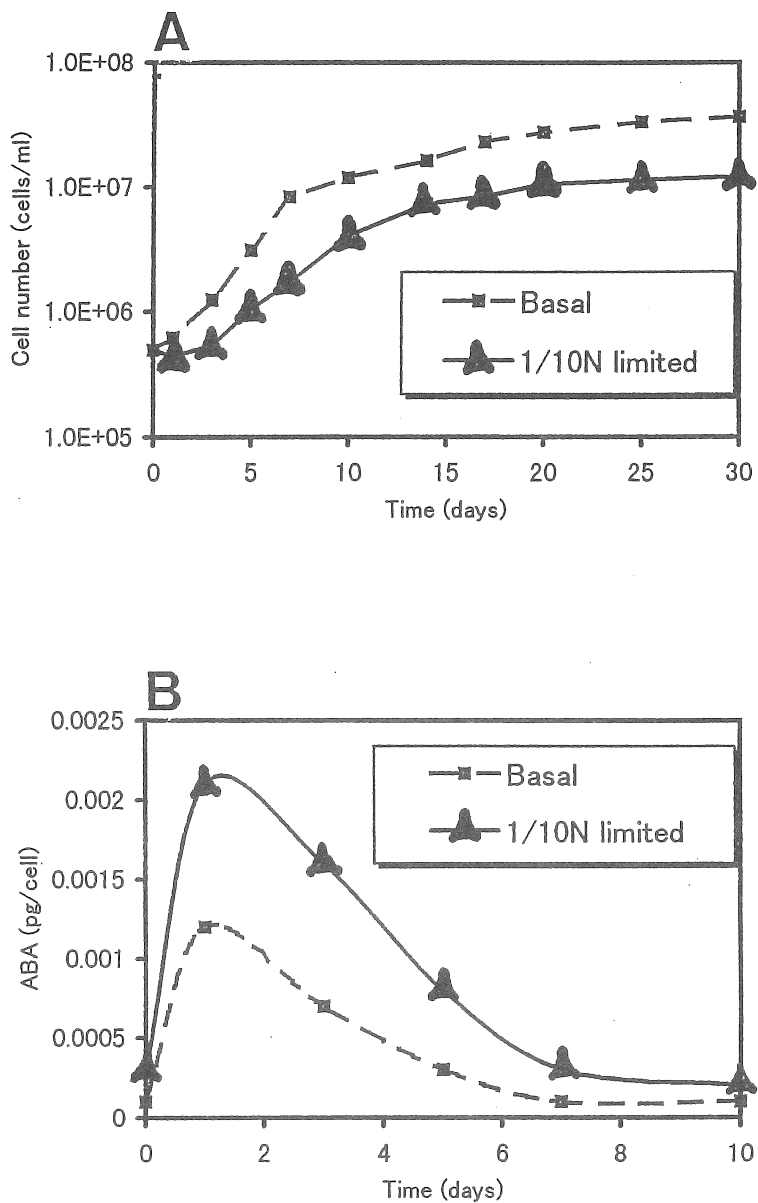


Fig. 3. The effect of nitrate deficiency on growth (A) and endogenous level of ABA (B) of *Chlamydomonas* sp. Concentrations of nitrate were 3 mM (■) and 0.3 mM (▲)

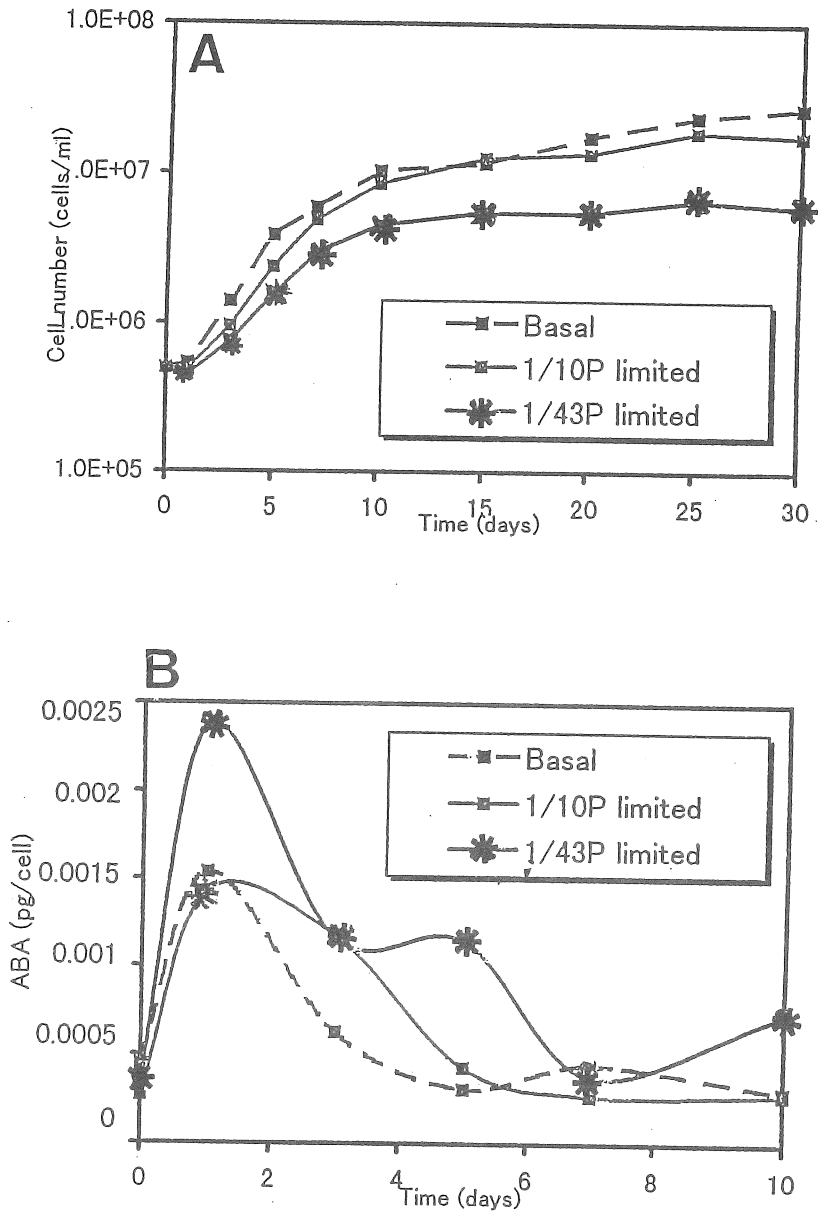


Fig. 4. Growth (A) and ABA content (B) of *Chlamydomonas* sp. under different phosphate concentrations. Concentrations of KH_2PO_4 were: (-■-), 0.55 mM (basal); (-▣-), 55 μM ; (*), 13 μM

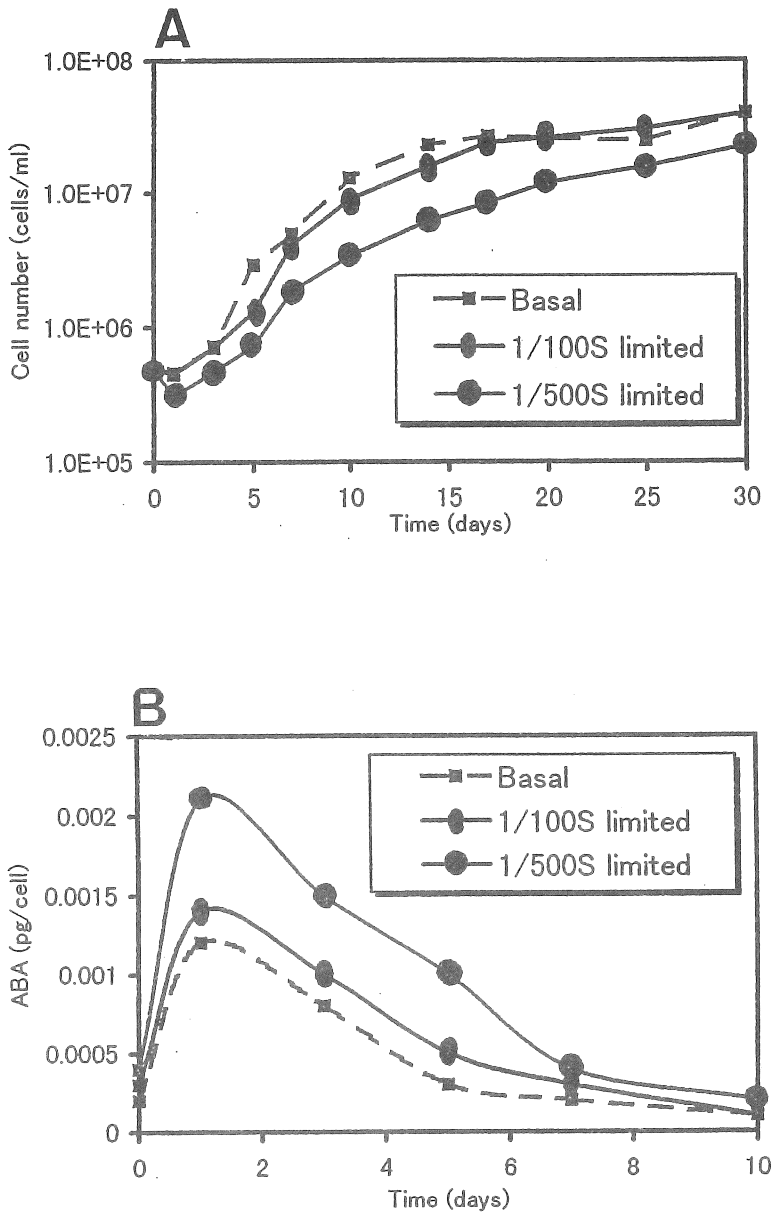


Fig. 5. Effects of sulfate deficiency on growth (A) and endogenous level of ABA (B) of *Chlamydomonas* sp.. $MgSO_4$ concentrations were: (■), 0.1 M; (●), 1 mM (1/100S); (●), 0.2 mM.

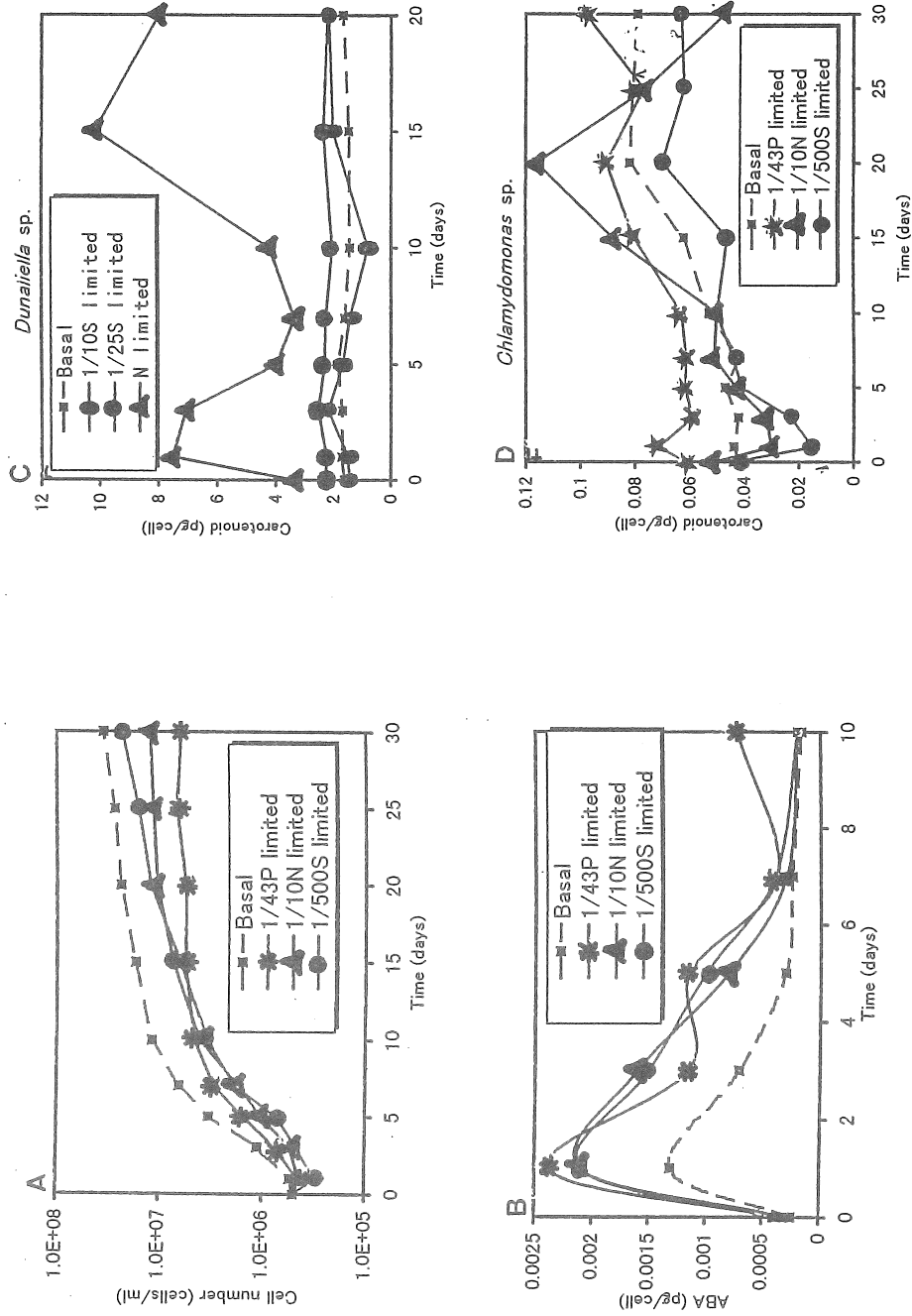


Fig.6 Effects of nutrient deficiency on growth (A) and endogenous ABA level (B) of *Chlamydomonas* sp. Conditions are as specified in the legend to Fig. 3, 4 and 5. Carotenoid contents during growth of *Dunaliella* sp. (C) and *Chlamydomonas* sp. (D) under nutrient deficiency. Conditions are specified in the legend to Fig. 1, 3, 4, and 5.

する他の条件で確かめなくてはならないが、硝酸塩制限における高いABAの一部がカロテノイドの合成を誘導するのなら*Dunaliella* sp.においてABAもカロテノイド量も多いことを説明できる。この可能性については今後さらに検討が必要であろう。

4. 今後の課題

以上の結果から、単細胞藻類においてもABAの動向は高等植物の場合と似ており、ABAの作用は、生長の不利な条件で増加して生長を抑えるように、またストレス時に増加してストレス環境に適応させる働きをしているのではないかと推測される。しかし、本研究では藻類の生長量やABA量の測定など基礎的データにとどまり、ABAの生理作用を直接明らかにするには至っていない。藻類においても、高等植物と同様に、ABAに拮抗する様々な生理作用物質が存在すると思われ、その1つの可能性として植物ホルモンのオーキシンの検出を試みたが、現在までのところ成功していない。様々な環境で生育する植物の適応を解明するために、未分化の単細胞の藻類はよい実験モデルとなると思われる。今後の課題としては、

- 1) 外部から植物ホルモンを与えて、生長その他に及ぼす影響を見る。この場合、耐塩性の藻類は外部からの物質を取り込みにくいようなので、好酸性で淡水性の*Chlamydomonas acidophila*を用いて調べる。
- 2) 抽出精製条件や、生物検定を含む抽出条件を検討して生長促進ホルモンの検索を行う。
- 3) ストレス (特にカロテノイドを増加させる) 条件によるABA含量の変化を詳しく調べる。

5. 文献

- 1) Tietz, A. and Kasprick, (1986) *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 181: 269-274
- 2) Tominaga, N., Takahata, M. and Tominaga, H. (1993) *Hydrobiologia*, 267: 163-168
- 3) Johnson, M. K., Johnson, E. J., MacElroy, R. D., Speer, H. L. and Bruff, B. S. (1968) *J. Bact.*, 95: 1461-1468
- 4) Scor/Unesco (1966) In: Monographs on oceanographic methodology 1. Unesco Publication center, N. Y., 69 pp.
- 5) Norman, S. M., Poling, S. M. and Maier, V. P. (1988) *J. agric. Food Chem.*, 36: 225-231
- 6) Hirsch, R., Hartung, W. and Gimmler, H. (1989) *Botanica Acta*, 102: 326-334
- 7) LaRosa, P. C., Hand, A. K., Hasegawa, P. M. and Bressan, R. A. (1987) *Plant Physiol.*, 126: 23-32
- 8) Cowan, A. K. and Rose, P. D. (1991) *Plant Physiol.*, 97: 798-803

Effects of nutrient limitation and salt osmotic shock on the ABA level in halotolerant and acidophilic-halotolerant green algae

Noriko Tominaga and Yukiko Koga

Institute of Environmental Science for Human Life, Ochanomizu University

Summary

Abscisic acid (ABA) is a hormone which has a number of roles during the life cycle of a plant. The variation of cellular ABA, protein and pigment content during the growth of a halotolerant green alga, *Dunaliella* sp. and a acidophilic-halotolerant green alga, *Chlamydomonas* sp. was investigated under nutrient limitation or osmotic stress.

Experimental results can be summarized as follow: in both *Dunaliella* sp. and *Chlamydomonas* sp., (1) ABA content was changed with the growth stage of culture: A rapid increase in ABA content was observed in the logarithmic phase. After this, the content rapidly decreased to low values. (2) The ABA content also increased with decreasing nitrate, phosphate or sulfate concentration of the medium. Nitrate deficiency caused the accumulation of large amounts of carotenoid in *Dunaliella* sp. but not in *Chlamydomonas* sp. (3) In *Dunaliella* sp., both hyperosmotic and hypoosmotic shocks caused, within 3 h, an increase in the internal ABA cytoplasmic concentrations, and after 6 h the content decreased to the original value.

The accumulation of ABA under stress suggests a similar hormonal function of ABA in higher plants. The present study suggests that the accumulation of ABA in halotolerant algae may inhibit growth, but more detailed investigations are needed.