

9 6 2 5 原生動物ユーグレナの塩適応

助成研究者：宮武 和孝(大阪府立大学 農学部)
 共同研究者：中野 長久(大阪府立大学 農学部)
 竹中 重雄(羽衣学園短期大学 家政学科)
 田村 良行(羽衣学園短期大学 家政学科)
 渡辺 文雄(高知女子大学 家政学部)
 榎本 俊樹(石川県立農業短期大学 食品科学科)

地球温暖化を防ぐ有力な方法として、大気中の二酸化炭素(CO₂)を植物等の光合成能により固定することが挙げられている。しかしながら高等植物を生育させるには広大な面積の耕作可能な土地が必要となることから、現状ではその実現は困難であると考えられる。また最大のCO₂排出源である火力発電所等の工場排気中には20%前後のCO₂が含まれる。このCO₂濃度においては植物の生育が困難であることから、それらの排気からの直接的CO₂の固定を植物で行うことは困難である。そこで高CO₂耐性を持ち、高い光合成能を有する微生物により、直接的に工場排気からのCO₂の固定を行うのがより現実的な方法である。我々は原生動物であり、葉緑体を持つことから植物部門の藻類にも分類されるユニークな生物、*Euglena gracilis* (以下ユーグレナ)が本目的の達成には最適の生物であると考えている。ユーグレナは工場排気に含まれる20%程度のCO₂濃度で最大の生育がみられること、またそのユーグレナ細胞がバイオマスし源として有望であることが挙げられる。しかしユーグレナは淡水に生育する生物であるため、多くの火力発電所や工場等が設置されている臨海地帯での有効利用を高めることを目的として、ユーグレナに耐塩性機構が備わっているかを検討した結果、我々はユーグレナが塩を含む浸透圧環境下に置かれたときに、 β -1,3-グルカンよりなる貯蔵多糖パラミロンを急速に分解し、適合溶質としてトレハロースを合成・蓄積することを見出し報告した。本年度はユーグレナのトレハロース合成調節機構についての検討を行った。

ユーグレナのトレハロース代謝はトレハロースフォスホリラーゼによることから、本酵素の活性調節機構の存在について検討を行った結果、糖代謝の調節因子である細胞内 Fru-2,6-P₂ レベルがトレハロースフォスホリラーゼの活性調節因子として機能することを示唆する結果を得た。また Fru-2,6-P₂ の代謝を行う酵素 Fru-6-P 2-kinase/Fru-2,6-P₂ phosphatase の存在を示す結果を得た。さらに合成酵素活性は塩ストレス後、一時的に低下することを見出した。

一方、塩ストレス時にプロテインキナーゼ阻害剤を添加した場合にはトレハロース合成が抑制されたことから、塩ストレスから適合溶質の合成へといった情報伝達経路にプロテインキナーゼが存在することが示唆された。さらに Fru-2,6-P₂ レベルとその合成酵素活性を測定した結果、どちらも阻害剤存在下においてその変化が抑制されたことから、プロテインキナーゼによる活性調節を受けると考えられる。

9 6 2 5 原生動物ユーグレナの塩適応

助成研究者：宮武 和孝 (大阪府立大学 農学部)
 共同研究者：中野 長久 (大阪府立大学 農学部)
 竹中 重雄 (羽衣学園短期大学 家政学科)
 田村 良行 (羽衣学園短期大学 家政学科)
 渡辺 文雄 (高知女子大学 家政学部)
 榎本 俊樹 (石川県立農業短期大学 食品科学科)

1. 研究目的

地球温暖化を防ぐ有力な方法として、大気中の二酸化炭素 (CO₂) を植物等の光合成能により固定することが挙げられている。しかしながら高等植物を生育させるには広大な面積の耕作可能な土地が必要となることから、現状ではその実現は困難であると考えられる。また最大の CO₂ 排出源である火力発電所等の工場排気中には 20% 前後の CO₂ が含まれる。この CO₂ 濃度においては植物の生育が困難であることから、それらの排気からの直接的 CO₂ の固定を植物で行うことは困難である。そこで高 CO₂ 耐性を持ち、高い光合成能を有する微生物により、直接的に工場排気からの CO₂ の固定を行うのがより現実的な方法である。我々は原生動物であり、葉緑体を持つことから植物部門の藻類にも分類されるユニークな生物、*Euglena gracilis* (以下ユーグレナ) が本目的の達成には最適の生物であると考えている。ユーグレナは工場排気に含まれる 20% 程度の CO₂ 濃度で最大の生育がみられること、またその際のユーグレナ細胞あたりの CO₂ 固定能が最大限にまで増加することを見出した (1)。またこれまでに CO₂ を固定することにより得られた細胞が稚魚飼育のための資料として利用可能であることを報告してきた (2)。ユーグレナは淡水に生育する生物であるため、多くの火力発電所や工場等が設置されている臨海地帯での有効利用を高めることを目的として、ユーグレナに耐塩性機構が備わっているかを検討した結果、我々はユーグレナが塩を含む浸透圧環境下に置かれたときに、 β -1,3-グルカンよりなる貯蔵多糖パラミロンを急速に分解し、適合溶質としてトレハロースを合成・蓄積することを見出し報告した (3)。トレハロースはカビ、酵母においても適合溶質として細胞内に蓄積されることが知られている。酵母等においてはトレハロース合成はトレハロース-6-リン酸シンターゼ、トレハロース-6-リン酸フォスファターゼが存在し、その分解にはトレハラーゼが機能することが知られている (4) が、ユーグレナにおいてはそれら酵素は存在せず、トレハロースの合成および分解をグルコースとグルコース-1-リン酸を基質とするトレハロースフォスホリラーゼが行う (5) と報告されている (Fig. 1) ことから、酵母とは異なる合成調節系の存在が考えられる。またユーグレナのトレハロースフォスホリラーゼは高等動物の糖代謝調節因子である Fructose-2,6-bisphosphat (Fru-2,6-P₂) により活性が阻害される (6) ことを見出ししている。本年度はトレハロース合成制御の分子機構について検討を行い、高度耐塩性を有した

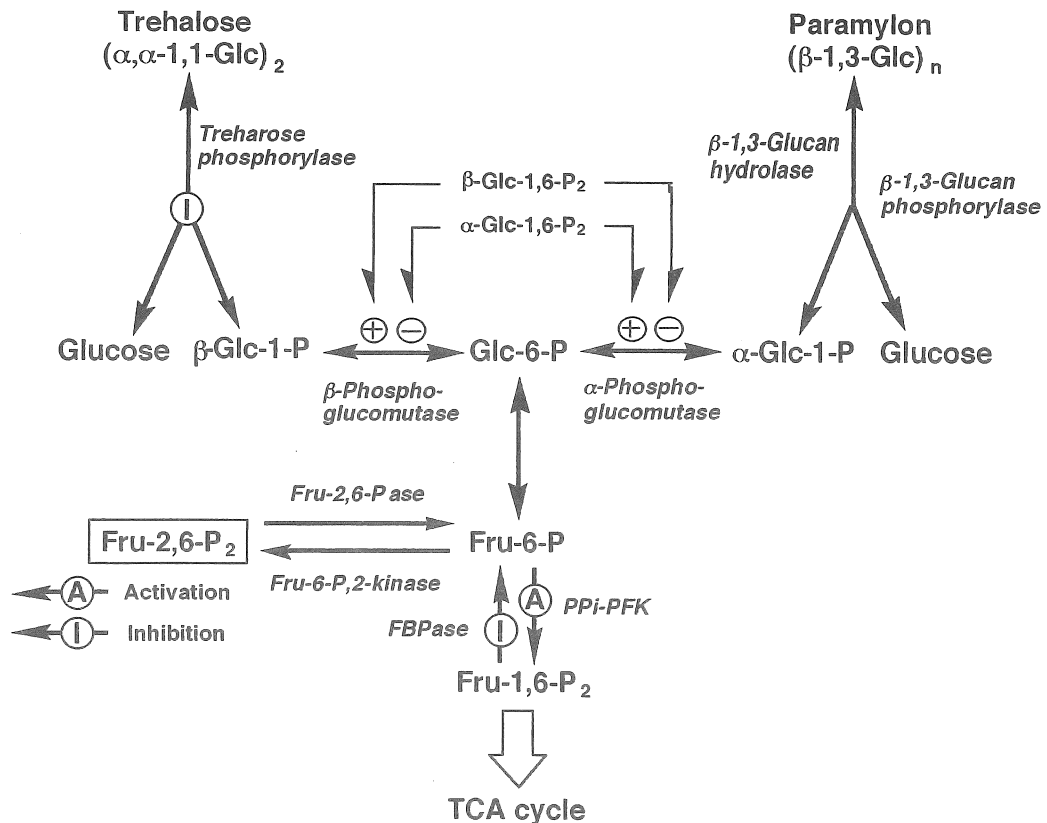


Fig. 1 Trehalose metabolism in *E. gracilis*.

ユーグレナを分子育種するための基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 研究方法

2-1. 研究材料と培養方法

淡水に生育する野性株 *Euglena gracilis* Z株を用いた。培養は Koren-Hutner 培地 (7) を用いて、25℃、2,000 lux の光照射条件下、培養を行った。また生育は血球計測盤により細胞数を測定することにより求めた。

2-2. パラミロンの定量

β -1,3-グルカンにより構成される貯蔵多糖パラミロン含量以下の方法に従って定量した。ユーグレナ細胞懸濁液をアセトン処理し、遠心後、沈殿を採集した。その沈殿物を 1%SDS 溶液に懸濁し、沸騰水中で 15 分間加熱した後、遠心を行い、その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 (8) を用いて、グルコースを標準として定量した。

2-3. 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。抽出液をエバポレーターにより乾固し、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°Cで45分間反応させ、TMS誘導体を作成し、ガスクロマトグラフィーによる分析を行った。カラムは10 mm x 8 m、充填材はSE-30を使用し、水素炎イオン化検出器により検出した。

2-4. Fru-2,6-P₂定量

培養液を遠心分離し、ユーグレナ細胞を採集する。その細胞を80%アセトン (pH 8.0) で抽出し、その抽出液に100 mgの活性炭を添加し、水中に30分以上放置した後に、遠心分離により沈殿物を除去した。得られた上清をエバポレーターで乾固した後に、300 μ lの50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、試料とした。Fru-2,6-P₂の定量は、Van Shaftingenの方法(9)に従いPPi-PFKの活性化率により算出した。

2-5. タンパク質定量法

タンパク質の定量は牛血清アルブミンを標準として、Bradfordの方法(10)により行った。

2-6. 試薬

プロテインキナーゼ阻害剤は協和メディックおよびSigma社のものを用いた、その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. トレハロースフォスホリラーゼの精製

ユーグレナ細胞抽出液よりトレハロースフォスホリラーゼの分離精製を試みた結果、Table 1に示すような方法によりトレハロースフォスホリラーゼを単一にまで精製した。ゲルろ過より分子量400 kd、SDSゲル電気泳動より分子量100 kdであったことから、単一サブユニットよりなる四量体であると結論した。

Table 1. Summary of purification of trehalose phosphorylase from *E. gracilis*.

	Total protein (mg)	Specific activity (nmol/min/mg)	Total activity (nmol/min)	Yield (%)	Purification fold
Extract	2960	91.84	271839	100	1.00
PEG 10 % Ppt	936	213.68	200000	73.5	2.33
DEAE Sepharose	131	1066.95	139770	51.4	11.62
Sepharose CL-6B	135	1292.96	175751	64.6	14.08
GigaPite	44.5	2298.85	102298	37.6	25.03
Q Sepharose	12.1	5095.79	61913	22.7	55.49
Toyopearl FW-55	2.78	19579.23	54430	20.0	213.19

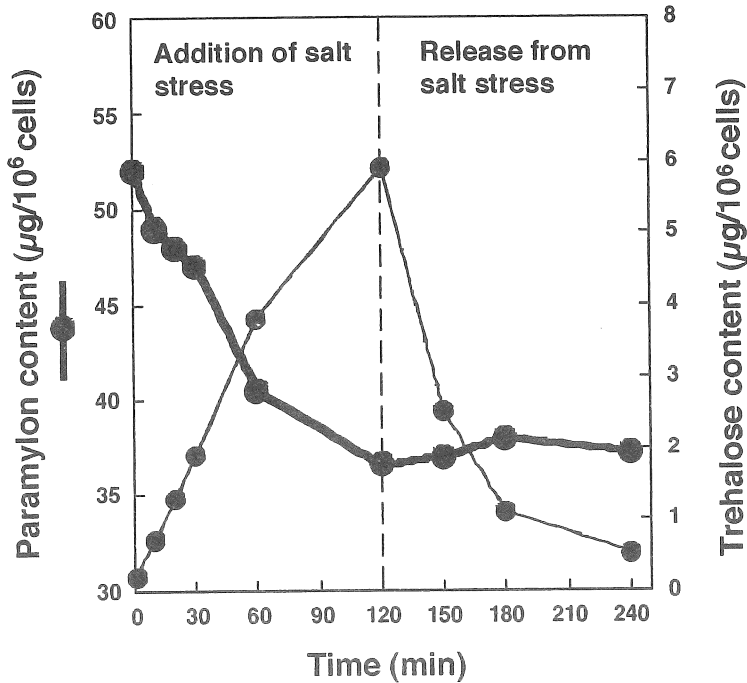


Fig. 2 Change of paramylon and trehalose content in *E. gracilis*.

3-2. 塩ストレス負荷および解除後の Fru-2,6-P₂ 含量の変動

トレハロースフォスホリラーゼが Fru-2,6-P₂ による拮抗阻害を受けることを *in vitro* の実験より見い出し、塩ストレス付加時および解除時の Fru-2,6-P₂ の細胞内含量変化を検討した。終濃度 250 mM となるように塩ストレスを負荷したとき、細胞内トレハロース含量は Fig. 2 に示すように変化した。10分から30分の間に Fru-2,6-P₂ は完全に分解され、測定できないレベルにまで低下したが、60分後には塩ストレス負荷前のレベルにまで回復した。またその後、ユーグレナを遠心分離後、塩を含まない緩衝液中に移したところ、Fru-2,6-P₂ レベルは5分から10分の間で検出できないレベルにまで低下し、30分後には定常レベルにまで回復した (Fig.3)。

3-3. Fru-6-P 2-kinase/Fru-2,6-P₂ phosphatase の存在とその活性変化

塩ストレス負荷後の Fru-6-P 2-kinase/Fru-2,6-P₂ phosphatase の合成方向と分解方向の各々の活性変化を測定したところ、塩ストレス負荷後、合成方向の反応である Fru-6-P 2-kinase 活性が低下し、トレハロースの合成がほぼ終了すると同時に元のレベルにまで回復した。一方、分解側の活性である Fru-2,6-P₂ phosphatase 活性はほとんど変化が見られなかった (Fig. 4)。

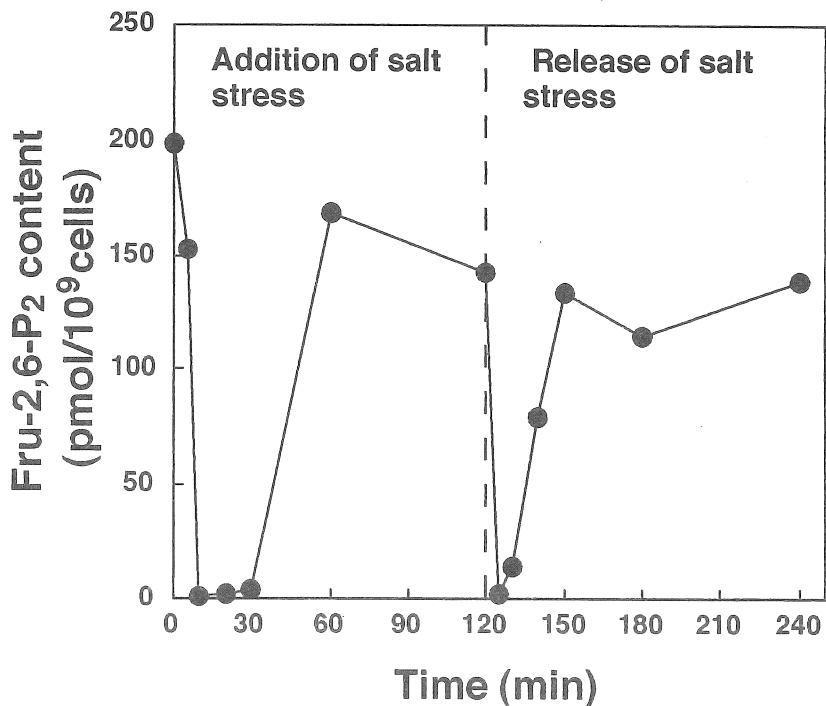


Fig. 3 Change of Fru-2,6-P₂ content in *E. gracilis*.

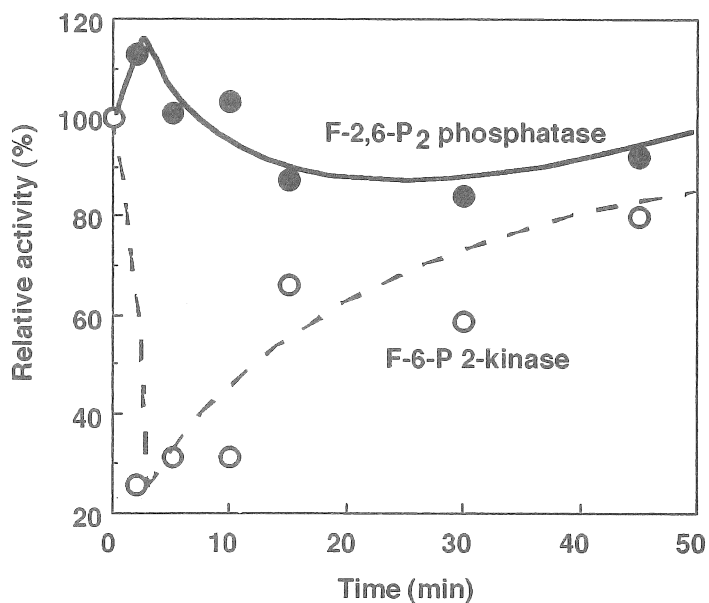


Fig. 4 Change of Fru-6-P 2-kinase/Fru-2,6-P₂ phosphatase activity under the salt stress.

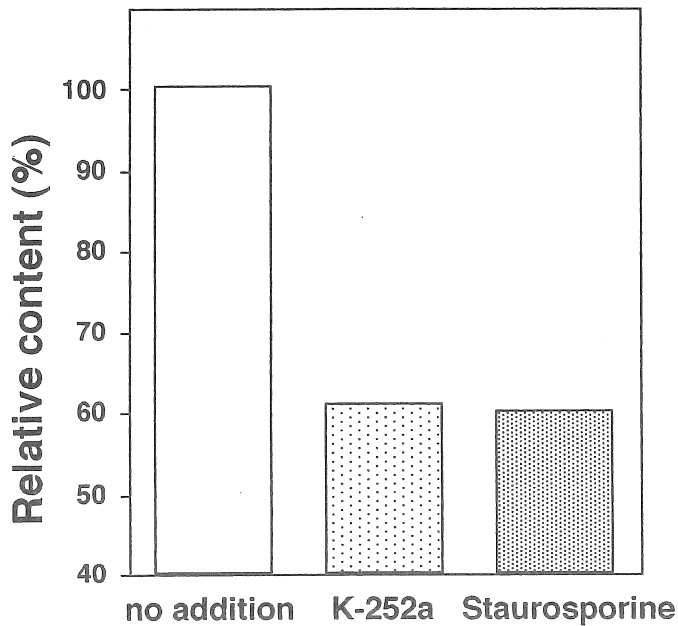


Fig. 5 Effect of protein kinase inhibitor on trehalose accumulation in *E. gracilis*.

3-4. プロテインキナーゼ阻害剤の影響

プロテインキナーゼ阻害剤によるトレハロース合成および Fru-2,6-P₂ 含量への影響について検討を行った。プロテインキナーゼ阻害剤であるスタウロスポリンまたは K-252a のトレハロース合成への影響を検討したところ 10 μM 存在時に各々約 50% 程度のトレハロース合成の阻害が見られた (Fig. 5)。

一方、スタウロスポリン存在時に細胞内 Fru-2,6-P₂ レベルの低下は 50% 程度にまで抑えられた (Fig. 6)。この結果は先に示した酵素活性の変動と連動するものであると考えられることから、さらに Fru-6-P 2-kinase/Fru-2,6-P₂ phosphatase のそれぞれの活性比を測定した結果、スタウロスポリン存在下では分解方向の Fru-2,6-P₂ phosphatase 活性に変化は見られなかったが、合成方向の Fru-6-P 2-kinase 活性は低下は抑制されていた (Fig. 7)。

4. 考察

淡水に生息する原生動物ユーグレナは外部の浸透圧変化に適応して、細胞内にトレハロースを合成・蓄積する。このトレハロースの合成はトレハロースフォスフォリラーゼにより触媒されている。今年度はこのトレハロースフォスフォリラーゼの活性調節機構を明らかにすること目的に研究を行った。トレハロースフォスフォリラーゼは糖代謝の調節因子として知られる Fru-2,6-P₂ により拮抗阻害を受けることを報

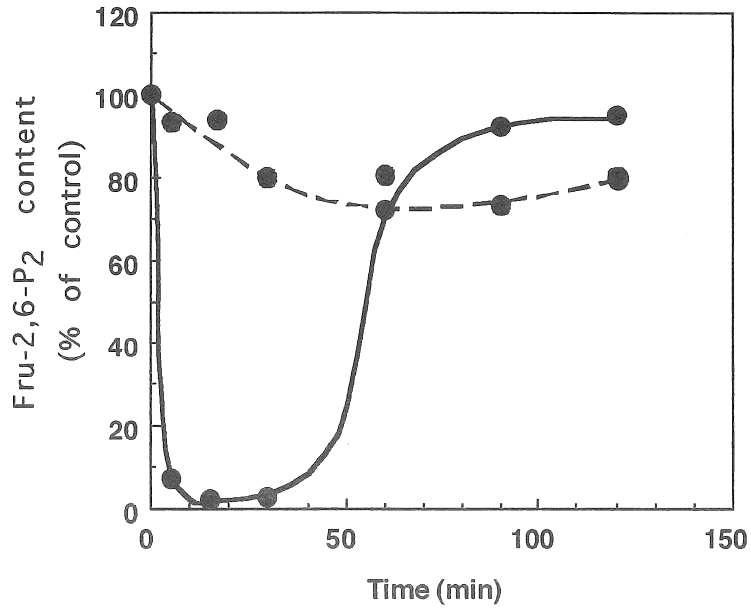


Fig. 6 Effect of staurosporine on Fru-2,6-P₂ content in *E. gracilis*.

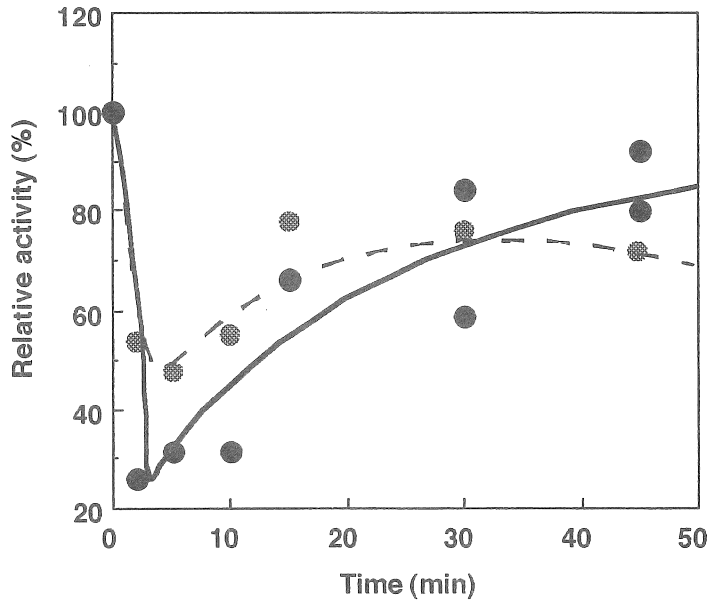


Fig. 7 Effect of staurosporine on Fru-6-P 2-kinase in *E. gracilis*.

告していたが、今回 *in vivo* で細胞内 Fru-2,6-P₂ レベルが変動するという結果を得たことから、トレハロースフォスホリラーゼの活性を調節しているのは細胞内に存在する Fru-2,6-P₂ であることを示唆する結果を得た。また我々はトレハロースフォスホリラーゼの分離精製方法を確立しており、現在のその活性調節機構をより詳細に解

明するべく、分子的レベルでの解析を進めている。

高等動物において Fru-2,6-P₂ の合成と分解は Fru-6-P 2-kinase/Fru-2,6-P₂ phosphatase と呼ばれる単一の酵素が触媒することが知られている (11)。ユーグレナにおいて Fru-2,6-P₂ の代謝を行う酵素についての検討を行うことを目的として、Fru-2,6-P₂ 代謝酵素の精製を試みところ、試みた各種カラムクロマトグラフィーにおいて合成と分解の活性比がほぼ一定であったことから、ユーグレナの Fru-2,6-P₂ 代謝に関与しているのは高等動物と同様の Fru-6-P 2-kinase/Fru-2,6-P₂ phosphatase であると考えられる。また Fru-2,6-P₂ レベルの変動はその代謝酵素である Fru-6-P 2-kinase/Fru-2,6-P₂ phosphatase の Fru-6-P 2-kinase 活性の低下によることも明らかになった。

プロテインキナーゼ阻害剤を作用させたところ、トレハロース合成が抑えられる結果が得られたことから、塩ストレスからトレハロース合成への間にプロテインキナーゼが関与することが示唆された。このことは Donariella のような耐塩性藻類においても、浸透圧変化にともなう適合溶質の合成制御にプロテインキナーゼが関与する (12) ことから、同様の浸透圧センサーからの情報伝達系を持つことが考えられる。

同様に調節因子であると考えられる Fru-2,6-P₂ レベルへのプロテインキナーゼの関与を検討したところ、塩ストレス負荷後の一時的な低下がプロテインキナーゼ阻害剤存在下において、抑えられたことから、Fru-2,6-P₂ が調節因子として機能していることが強く示唆される。また高等動物では Fru-6-P 2-kinase/Fru-2,6-P₂ phosphatase の活性比がリン酸化により調節されることが知られている (13) が、ユーグレナにおいてもプロテインキナーゼ阻害剤存在下においては Fru-6-P 2-kinase の活性低下が抑制されることから、Fru-6-P 2-kinase/Fru-2,6-P₂ phosphatase が塩ストレスからプロテインキナーゼを介した情報伝達系の基質であることが考えられる。

5. 今後の課題

ユーグレナのトレハロース合成・蓄積は糖代謝調節因子として機能している Fru-2,6-P₂ による可能性を強く示唆する結果を得ているが、その分子的メカニズムについては依然、不明な点が多くある。そこで現在、精製トレハロースフォスホリラーゼから抗体の作成、N末端アミノ酸配列および内部アミノ酸配列の決定を行っているが、それらをプローブとして使用し、トレハロースフォスホリラーゼの全構造の決定を急ぎ、その活性調節に関与するアミノ酸を同定する必要がある。この部分のアミノ酸を改編した組み替え体のユーグレナへの導入により、高度のトレハロース蓄積能を有した変異体を得ることが可能になると考えられる。また Fru-2,6-P₂ の含量を調節する情報伝達系を明らかにすることからも同様の結果を得ることができるものと期待される。これらの耐塩性ユーグレナの作出により、重要環境問題の一つである生物学的手法による CO₂ の固定とそのバイオマスの利用という解決手段を提示するものである。

6. 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. Takenaka, S., Kondo, T., Nazeri, S., Tamura, Y., Tokunaga, M., Tsuyama, S., Miyatake, Y. & Nakano, Y. submitted.
4. Winkler, K., Kienle, I., Burgert, M., Wagner, J.-C. & Holzer, H. (1991) *FEBS Lett.*, **291**, 335-358.
5. Belocopetow, E. and Marechal, L. R. (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, **198**, 151-154
6. Miyatake, S., Kuramoto, Y. and Kitaoka, S. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 906-911.
7. Koren, L. E. & Hutner, S. H. (1967) *J. Protozool.*, **14**, Suppl. 17.
8. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956) *Anal. Chem.*, **28**, 350.
9. Van Schaftingen, E. & Hers, H. G. (1972) *FEBS Lett.*, **164**, 195-200.
10. Bradford, M. M. (1978) *Anal. Biochem.*, **72**, 278-284.
11. El-Maghrabi, M. A., Claus, T. H., Pilkis, J., Pilkis, S. J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 315-319.
12. Yuasa, T. & Muto, S. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 175-182.
13. Furuya, E., Yokoyama, M. & Uyeda, K. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 264-270.

Adaptation mechanism to salt stress in a protozoan, *Euglena gracilis*.

Kazutaka Miyatake¹, Yoshihisa Nakano¹, Shigeo Takenaka²,
Yoshiyuki Tamura², Fumio Watanabe³ and Toshiki Enomoto⁴

¹Department of Applied Biological Chemistry, Osaka Prefecture University,

²Laboratory of Nutrition and Food Science, Haboromo-gakuen College,

³Department of Food and Nutrition, Kochi Women's University, ⁴Department of Food Science, Ishikawa Junior College of Agriculture.

Due to the increased use of fossil fuels caused by rapid industrialization and population growth, the concentration of carbon dioxide (CO₂) in the atmosphere is increasing. This gas is called green house gas and has a green house effect. It has been estimated that the global temperature will rise by 2-3°C due to the green house effect of the CO₂ if the its concentration raises from the presence to 600 ppm. To resolve the problem, the biological fixation of CO₂ can satisfy food demand and mitigate global warming simultaneously will be caused in the next century. We propose the biological fixation of CO₂ via photosynthesis with a microalgal system using a protozoan, *Euglena gracilis* which can adapt upto 40 % pCO₂ and is available for food production as feed for fishes and some animals. Recently we investigated that it can adapt to salt conditions upto 250 mM NaCl and that trehalose is formed from paramylon, which is a storage sugar of β-1,3-glucan, in it. Here we report the mechanism of trehalose accumulation under the salt stress.

Trehalose phosphorylase, is trehalose metabolizing enzyme in *E.gracilis*, was purified from the organism and examined its regulation of activity. Fructose-2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂) acting as a regulator on sugar metabolism in mammalian and in *E. gracilis* inhibited its activity with the competitive manner. Further its concentration in the cell decreased during trehalose synthesis was active and recovered to the initial level when trehalose synthesis and accumulation finished. Fru-6-P 2-kinase, catalyzes Fru-2,6-P₂ formation, activity was also under the salt stress. These results indicate that trehalose formation and accumulation is regulated by Fru-2,6-P₂.

Trehalose accumulation was inhibited in the presence of protein kinase inhibitor, K-252a and staurosporine. The decrease of Fru-2,6-P₂ concentration in the cell caused by the inactivation of Fru-6-P 2-kinase activity was also inhibited. These suggested that protein phosphorylation is involved in the signal transduction of trehalose synthesis.