

9829 原生動物における塩ストレス情報伝達機構に関する研究

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)
 乾 博 (大阪府立大学 農学部)
 上田 光宏 (大阪府立大学 農学部)
 渡辺 文雄 (高知女子大学 生活科学部)
 榎本 俊樹 (石川県立農業短期大学 食品学科)
 竹中 重雄 (羽衣学園短期大学 人間生活学科)

Euglena gracilis Z (ユーグレナ) は淡水に生息する原生動物である。ユーグレナは塩ストレスにさらされると細胞内の貯蔵多糖パラミロンを適合溶質トレハロースに変換・蓄積し、適応する。トレハロース代謝の制御因子は糖代謝調節因子として知られるフルクトース-2,6-ビスリン酸 (F-2,6-P₂) であることを見出した。そこで我々はユーグレナの塩ストレス情報伝達経路を明らかにすることを目的に検討を行った。

ユーグレナを種々のプロテインキナーゼインヒビターで処理し、塩ストレスを付加した結果、スタウロスポリン存在下でトレハロース蓄積が阻害された。またチロシンリン酸化阻害剤である 2,5-Mec、ハービマイシンで処理した場合にも同様の結果が得られた。それら以外の特異的プロテインキナーゼインヒビターではトレハロースの蓄積阻害は見られなかった。さらに同一条件下で F-2,6-P₂ 含有量に対するプロテインキナーゼインヒビターの影響を検討したところ、未処理のユーグレナ細胞ではトレハロース合成に代謝を傾けるために F-2,6-P₂ 含有量が急激に低下したが、スタウロスポリン存在下では F-2,6-P₂ の減少が抑制された。2,5-Mec、ハービマイシン処理においても同様の傾向が見られた。そこで F-2,6-P₂ の代謝酵素である F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase 活性への影響を検討した結果、プロテインキナーゼ非存在下では F-6-P 2-kinase 活性が急激に低下したが、スタウロスポリン、2,5-Mec、ハービマイシン処理を行ったユーグレナ細胞では F-6-P 2-kinase 活性の減少は抑制されていた。さらには F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase 精製標品に対してサイクリック AMP 依存プロテインキナーゼカタリティックサブユニットを作用させた場合に、F-6-P 2-kinase 活性の急激な現象が見られた。以上の結果から F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase の活性の調節にはセリン/スレオニンプロテインキナーゼが関与することを明らかにした。

一方、チロシンリン酸化タンパク質の関与が示唆されたことから、塩ストレス付加後、ユーグレナ抽出液を経時的に調整し、抗フォスフォチロシン抗体を用いたイムノプロットによりチロシンリン酸化タンパク質の検出を試みた。その結果、数種類のチロシンリン酸化タンパク質の存在を見出した。現在、これらチロシンリン酸化タンパク質の同定を試みている。

9829 原生動物における塩ストレス情報伝達機構に関する研究

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)
 乾 博 (大阪府立大学 農学部)
 上田 光宏 (大阪府立大学 農学部)
 渡辺 文雄 (高知女子大学 生活科学部)
 榎本 俊樹 (石川県立農業短期大学 食品学科)
 竹中 重雄 (羽衣学園短期大学 人間生活学科)

1. 研究目的

二酸化炭素 (CO₂) を主要な原因とする温室効果による地球環境の悪化がいわれる中、その生物による再固定が注目されている。しかしながら工場排気には20%を超える高濃度のCO₂が含まれるため高等植物による直接的な固定は困難である。そこで我々は地球上のCO₂がはるかに高かった時代に派生した淡水域に生息する原生動物 *Euglena gracilis* (ユーグレナ) に着目し、高CO₂存在下における炭酸固定能力を検討した結果、ユーグレナには高CO₂に対する耐性があり、むしろそのような条件下において高い光合成能を示すことを見い出した¹⁾。さらにユーグレナは植物細胞とは異なり、細胞壁ではなく、ペリクルと呼ばれる細胞膜構造を持つことから動物の飼料として利用するのに十分な消化性を持ち、またそのタンパク質栄養価もカゼインに匹敵する良好なものであることから魚類や動物の飼料としての利用が期待されている²⁾。

ユーグレナを利用したCO₂の再固定の効率化には高CO₂排出工業立地であり、大規模培養設備の設置可能な沿海域でのユーグレナの生産が不可欠である。すなわち対塩性のユーグレナの育種が必要である。これまでに我々はユーグレナが塩環境に移されると、外環境の塩濃度に応じて適合溶質トレハロースを合成・蓄積することを見い出した³⁾。トレハロースの代謝経路は酵母や植物とは異なり、トレハロースフォスホリラーゼにより触媒されることを明らかにした。さらにこの代謝経路は高等動物の糖代謝調節因子であるフルクトース-2,6-ビスリン酸により行われることを報告した。しかしながらユーグレナがどのような方法で外環境の塩を感知し、トレハロースの合成・蓄積を調節しているのか、それらに関与する細胞内情報伝達経路はどのようなものであるのかは不明である。そこで対塩性ユーグレナの分子育種を目的に、ユーグレナの塩ストレス情報伝達機構について検討を行うことにした。

2. 研究方法

2-1. 生物と培養方法

Euglena garacilis Z株は 25°C、2000 lux の光照射下でビタミン B₁ とビタミン B₁₂ を含む Koren-Hutner 培地⁴⁾ に接種し、振とう培養した。

2-2. パラミロン含有量測定法

ユーグレナの貯蔵多糖であるパラミロン (β 1,3-グルカン) はフェノール・硫酸法⁵⁾ により行った。ユーグレナ培養液を採取し、3,000 x g、5 分間遠心分離をし、ユーグレナ細胞を分離した。ユーグレナ細胞にアセトンを加えた後、同様に遠心分離し、不溶性画分を得た。その不溶性画分に 1% ラウリル酸硫酸ナトリウム溶液を加え、沸騰浴水中で 10 分間処理し、同様に遠心分離しパラミロン画分を得た。パラミロンは少量の 0.5 N NaOH に溶解し、試料とした。

2-3. トレハロース測定法

ユーグレナ細胞を遠心分離で採取し、0.1% スクロースを含む 80% エタノールで抽出した。抽出液は完全に乾固した後、トリメチルシリル化剤による処理を行いガスクロマトグラフィーに供した。カラムには SE-30 を用い、検出は FID によった。

2-4. フルクトース-2,6-ビスリン酸測定法

Enomoto らの方法⁶⁾ に従って行った。ユーグレナ細胞を 80% アセトン (pH 8.0) で抽出し、100 mg の活性炭を添加し、30 分後、遠心分離 (2,000 x g、5 分) で沈殿物を除去した。上清は完全に乾固した後、少量のトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、試料とした。フルクトース-2,6-ビスリン酸 (F-2,6-P₂) はポテトピロリン酸依存フォスフォフルクトキナーゼ (PPi-PFK) の活性化率から求めることとした。試料を PPi-PFK の反応系に加え、ピロリン酸を添加し、反応を開始し、得られた PPi-PFK の初速度から算出した。

2-5. フルクトース-6-リン酸 2キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスリン酸フォスファターゼ測定法

フルクトース-6-リン酸 2キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスリン酸フォスファターゼ (F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase) Enomoto らの方法⁶⁾ に従って行った。ユーグレナ細胞を蒸留水で洗浄後、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、超音波破碎を行った。ユーグレナ破碎液を 100,000 x g、5 分間遠心し、得られた上清を試料とした。F-6-P 2-kinase 活性は酵素反応生成物である F-2,6-P₂ を前述の方法で測定することにより行った。また F-2,6-P₂ phosphatase 活性は基質である F-2,6-P₂ の減少を同様に前述の方法により測定した。

2-6. F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase 精製法

Koren-Hutner 培地で定常期まで培養したユーグレナを遠心分離により採取し、蒸留水で洗浄後、さらに 3 回 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) を用いて洗浄を行った。再度ユーグレナを少量の同緩衝液に懸濁後、超音波で破碎した。細胞残差を遠心分離により取り除き、ユーグレナ抽出液とした。このユーグレナ抽出液に終濃度 5% となるようにポリエチエングリコール 6000 を添加し、F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase を沈殿とし

て得た。得た沈殿を同緩衝液で懸濁し、同緩衝液で平衡化した DEAE セファロースカラムに供した。同カラムを洗浄後、0-0.5M の NaCl の直線的濃度勾配により溶出した。またゲルろ過は高速液体クロマトグラフィーで行った。使用したカラムはトヨパール HW-55 である。

2-7. 2次元電気泳動法

ユーグレナ細胞を採取し、2 M 尿素、1 % NP-40 を含む緩衝液で懸濁後、ユーグレナ細胞を超音波破碎した。得られた抽出液は 20,000 x g 10 分の遠心分離を行い細胞残差を取り除いた上清を細胞抽出液とした。この細胞抽出液をファルマシアイモビラインドライストリップに供し、規定の方法により等電点電気泳動を行った。等電点電気泳動終了後、ストリップを 2 mM DTT を含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。

2-8. N末端アミノ酸配列決定法

試料を前述の 2次元電気泳動により分離した後、1 % SDS を含む 10 mM CAPS-NaOH (pH 11) の系で試料を PVDF 膜に転写し、コマシーブリリアントブルー (CBB) で染色した。また同時に抗フォスフォチロシン抗体によるイムノブロットを行いチロシンリン酸化タンパク質の検出を行った。検出には Pierce Super Signal Kit を用いた。前述のイムノブロットに相当するスポットを転写膜から切り出し、CBB を完全に除去した後、N末端アミノ酸シークエンサー (Applied Biosystems Model 4910) に供した。

2-9. タンパク質定量

ユーグレナ抽出液のタンパク質含有量は Bio-Rad Protein Assay Kit または Pierce Micoro Protein Assay Kit を用いて定量した。標準タンパク質は牛血清アルブミンを用いた。

2-10. 試薬

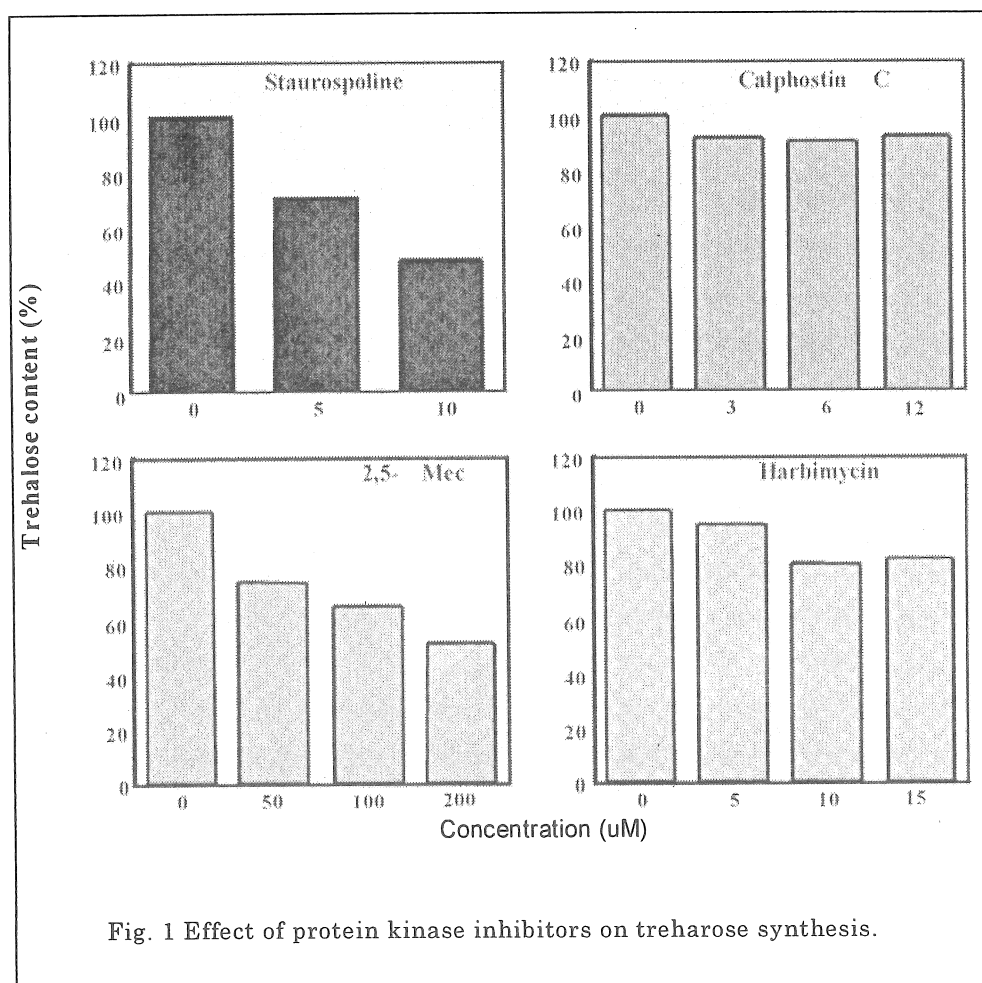
特に記載のない限り、市販の特級試薬を利用した。

3. 結果

3-1. プロテインキナーゼインヒビターの効果

3-1-1. トレハロース合成・蓄積への影響

定常期に達したユーグレナに特異性の低いスタウロスポリン、プロテインキナーゼ C の特異的阻害剤カルフォスチン C、チロシンキナーゼ阻害剤の 2,5-Mec、ハービマイシンを種々の濃度で添加し、30 分間の処理を行った後、塩ストレスを付加し、60 分後の細胞奈トレハロース含有量をガスクロマトグラフィーで測定した (Fig.1)。その結果、スタウロスポリンによる阻害が見られることから、塩ストレス下のトレハロース合成への情報伝達にプロテインキナーゼ関与している。同様にチロシンキナーゼインヒビターである 2,5-Mec、ハービマイシンがトレハロースの合成蓄積を阻害した。しかしプロテインキナーゼ



Cに対する阻害剤がほとんど影響を示していないことから、プロテインキナーゼCが関与していないことが示された。

3-1-2. F-2,6-P₂含有量への影響

糖代謝調節因子である F-2,6-P₂はトレハロース合成調節因子としても機能していることから、プロテインキナーゼ阻害剤存在下での F-2,6-P₂含有量を検討した (Fig.2) その結果、阻害剤を添加しない場合にはトレハロースの合成を急速に進めるため、塩ストレス付加後 15分で細胞内 F-2,6-P₂含有量は急速に低下した。一方、スタウロスポリン存在下ではトレハロース合成が阻害されていたのと同程度に F-2,6-P₂の減少が抑制されていた。さらに 2,5-Mec、ハービマイシン存在下でも F-2,6-P₂の減少は抑制されていた。

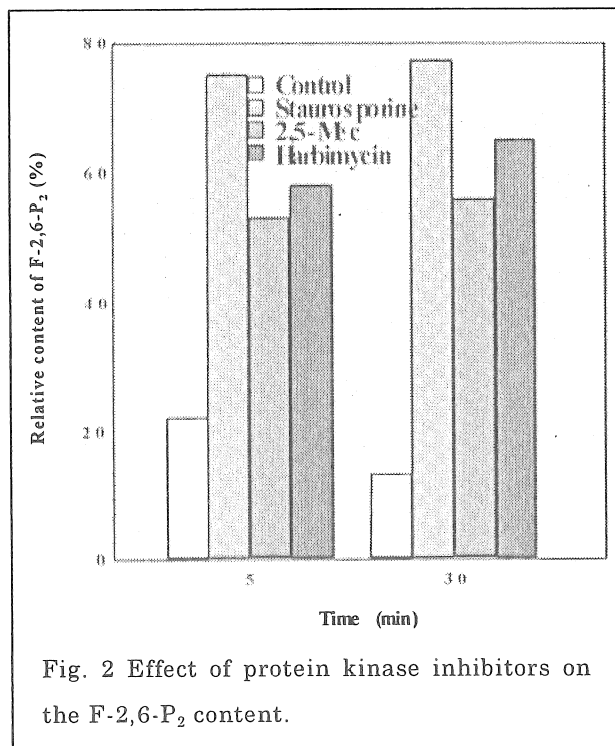


Fig. 2 Effect of protein kinase inhibitors on the F-2,6-P₂ content.

3-1-3. F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase 活性への影響

F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase は糖代謝調節因子である F-2,6-P₂ の合成・分解を触媒する酵素であり、その活性は厳格に調節されていると考えられる。そこで種々のプロテインキナーゼインヒビターの F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase に対する影響を検討した (Fig.3)。プロテインキナーゼプロテインキナーゼ非存在下では F-6-P 2-kinase 活性が低下し、分解酵素活性が上昇した。対してスタウロスポリン存在下では F-6-P 2-kinase

活性の低下が抑えられた。同様にチロシンキナーゼインヒビターである 2,5-Mec、ハービマイシン存在下においても同様に F-6-P 2-kinase 活性の減少は抑制される傾向にあった。しかし検討したプロテインキナーゼ阻害剤はどれも F-2,6-P₂ phosphatase 活性に影響を与えなかった。

3-2. F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase 分離精製とその活性調節メカニズムについて

3-2-1. F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase の分離精製

実験方法に記載した方法により F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase の分離精製を試みた。精製過程を通じて F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase の両活性は常に同時に溶出され、

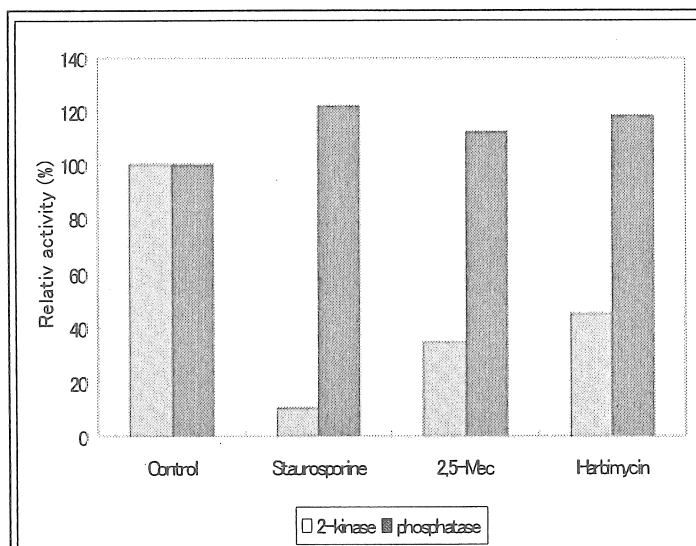


Fig. 3 Effect of protein kinase inhibitors on F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase activity.

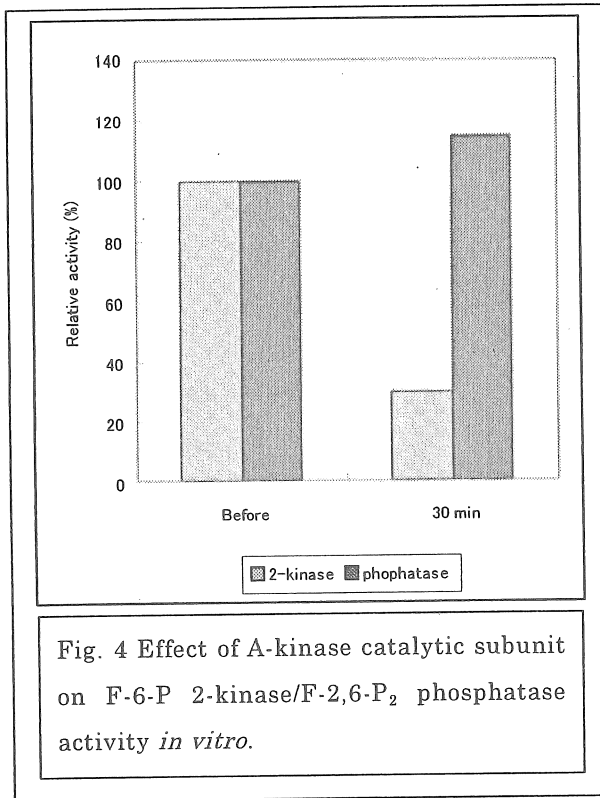


Fig. 4 Effect of A-kinase catalytic subunit on F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase activity *in vitro*.

ゲルろ過法により抽出液に対して60倍以上の酵素活性を示す精製標品を得た。以下の実験ではこの精製標品を実験材料として用いた。

3-2-2. F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase の活性調節機構

F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase に 1 mM ATP 存在下サイクリック AMP 依存プロテインキナーゼカタリティックサブユニットを作用させ酵素活性に与える影響を検討した(Fig.4)。30分の処理後、F-6-P 2-kinase 活性は処理前の 25%まで低下したが、F-2,6-P₂ phosphatase 活性は処理前後でほとんど差が見られなかった。

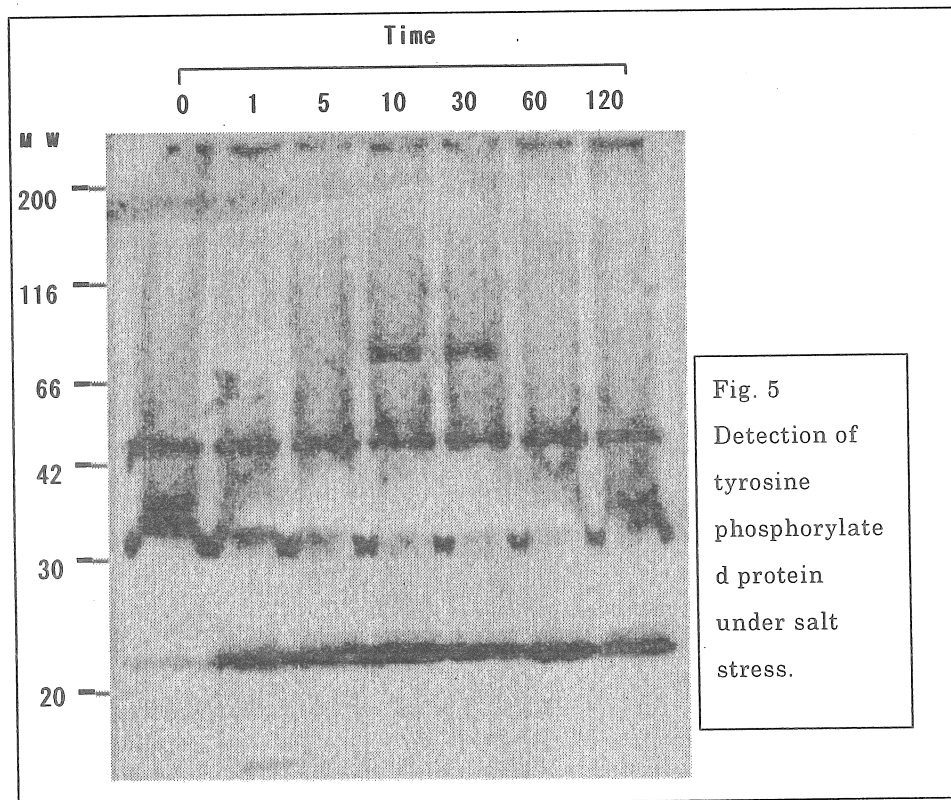
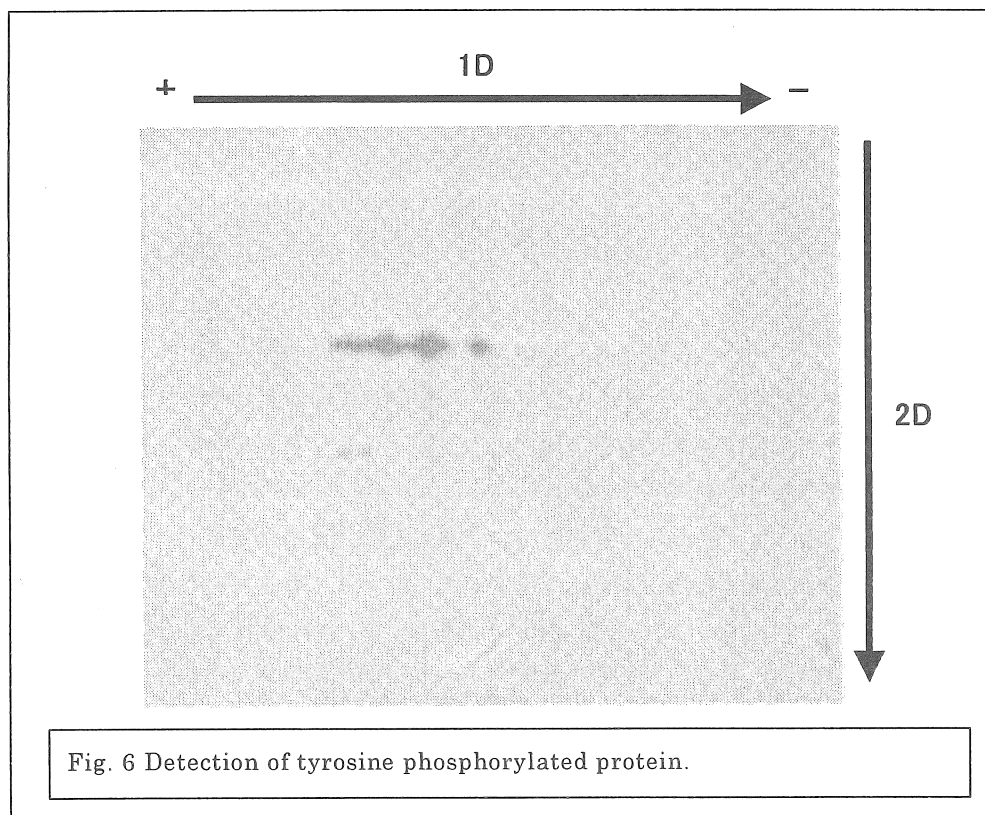


Fig. 5 Detection of tyrosine phosphorylated protein under salt stress.



3-3.チロシンリン酸化タンパク質の分離とその構造に関する検討

3-3-1.チロシンリン酸化タンパク質の検出

塩ストレス下のユーグレナ細胞を経時的に採取し、市販の抗フォスフォチロシン抗体による検出を試みた (Fig.5)。70 kD、45 kD、22 kD に抗体と反応するタンパク質を検出した。また 2,5-Mec による処理を行ったユーグレナ細胞ではこれらのバンドは検出されなかった。またこれらの出現と消失は塩ストレス後の時間経過により変化した。

3-3-2.チロシンリン酸化タンパク質の分離と N 末端アミノ酸配列

チロシンリン酸化タンパク質の分離と N 末端アミノ酸配列を同定することを目的に、2次元電気泳動による分離を試み、得られたスポットから N 末端アミノ酸配列を検討した。2次元電気泳動により分離し、前述の抗フォスフォチロシン抗体による検出を行った結果、Fig.6 に示す結果を得た。免疫ブロットの結果に相当する 60kD の分子量を示すスポットのひとつから P-N-S-V-Q の N 末端配列を得た。

4.考察

ユーグレナのトレハロース代謝経路は合成と分解を単一の酵素トレハロースフォスホラーゼにより行うものである。この酵素活性の調節には F-2,6-P₂ が調節因子として機能することを見出し⁷⁾、その制御機構と細胞内情報伝達経路に関する検討を行った。

塩ストレス環境でのユーグレナのトレハロース合成はプロテインキナーゼ存在下で抑制された。この結果は塩ストレスによるトレハロース合成への情報伝達にプロテインキナーゼが関与することを示唆するものである。またチロシンリン酸化阻害剤である 2,5-Mec とハービマイシンが抑制効果を持ったことは情報伝達経路にチロシンリン酸化が関与することを示唆するものである。さらにプロテインキナーゼ C 阻害剤であるカルフォスチン C がトレハロース合成を抑制しなかったことから、プロテインキナーゼ C は関与しないと思われる。

ユーグレナのトレハロース合成では F-2,6-P₂ が重要な機能を果たしていることから、その変動に対するプロテインキナーゼインヒビターの影響を検討した結果、スタウロスポリンがもっとも強い F-2,6-P₂ 減少抑制効果を示した。加えてチロシンリン酸化阻害剤も同様にその減少を抑制する傾向にあった。加えて F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase の活性比に対するプロテインキナーゼの影響を調べた結果からもスタウロスポリンの F-6-P 2-kinase 活性減少抑制効果がもっとも強く見られ、チロシンリン酸化阻害剤の場合には同様の傾向が見られるにとどまった。これらの結果は F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase の直接的な活性の調節に関与しているのはチロシンリン酸化酵素ではないことを示唆するものである。そこで精製した F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase に対するサイクリック AMP 依存プロテインキナーゼの影響を検討した結果、セリン/スレオニンプロテインキナーゼを作用させることにより前述のプロテインキナーゼ阻害剤を用いた F-6-P 2-kinase 活性が減少した結果と同一であった。高等動物の F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase もセリン/スレオニンキナーゼによるリン酸化を受け、F-6-P 2-kinase 活性が低下すること⁸⁾が報告されており、ユーグレナの同酵素もその分子量と性質から動物のそれに類似したものであることが考えられる。

ユーグレナの塩ストレスに誘導されるトレハロース合成がチロシンリン酸化阻害剤により抑制されることから、ユーグレナにおけるチロシンリン酸化タンパク質の存在を検討した。塩ストレス付加後、経時的にチロシンリン酸化タンパク質の出現と消失が観察された。この結果はユーグレナが塩ストレス下において複数のチロシンリン酸化タンパク質を利用していることを示すものであり、酵母や動物細胞において報告されている HOG 経路類似の細胞内情報伝達経路を利用していることが考えられる。

5. 今後の課題

ユーグレナの塩ストレス下での細胞内情報伝達経路にリン酸化反応が関与し、F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase に対してはセリン/スレオニンキナーゼが関与することを示した。しかしながら F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase タンパク質の構造が不明であり、リン酸化部位と活性調節の分子的立証がまだ終わっていない。今後、F-6-P 2-kinase/F-2,6-P₂ phosphatase の 1 次構造の決定が望まれる。またチロシンリン酸化を介した細胞内

情報伝達経路の存在を見出した。ユーグレナにおいてチロシンリン酸化タンパク質の存在とその機能に関する報告はこれまでになく、今回が最初の報告であると思われる。今回の研究で得たチロシンリン酸化タンパク質の N 末端アミノ酸配列はデータベースでの検索結果からは相同なものがなく、今後その構造を含めた詳細な機能の検討が必要である。またこれらの成果を踏まえてユーグレナの分子育種を進める予定である。

6.参考文献

- 1) Nakano et al. (1995) *CELSS Journal*, 7, 15-18.
- 2) Nakano et al. (1997) *CELSS Journal*, 9, 7-12.
- 3) Takenaka et al. (1997) *J. Euk. Microbiol.*, 44, 609-613
- 4) Koren et al. (1967) *J. Protozool.*, 14, Suppl. 17.
- 5) Dubois et al. (1956) *Anal. Chem.*, 28, 350.
- 6) Enomoto et al. (1989) *Comp. Biochem. Physiol.*, 92B, 477-480.
- 7) Miyatake et al. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 906-911.
- 8) Furuya et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79, 325-329.

Signal transduction in a protozoa, *Euglena gracilis*, under salt stress.

Kazutaka Miyatake¹, Yoshihisa Nakano¹, Hiroshi Inui¹, Mitsuhiro Ueda¹,
Fumio Watanabe², Toshiki Enomoto³, Shigeo Takenaka⁴

¹Department of Applied Biological Chemistry, Osaka Prefecture University,

²Department of Life Science, Kochi Women's University, ³Department of Food Science,
Ishikawa Agricultural College, ⁴Laboratory of Nutrition and Food Science, Haboromogakuen college.

Euglena gracilis Z is a protozoa, living in fresh water. When *Euglena* are transferred to stressed conditions, for example, salt or heat stress, *Euglena* synthesize and accumulate trehalose as a compatible solute to adapt environmental changes. Although the regulation of this phenomenon is not well known, we have reported that fructose-2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂), which is known as a regulator of sugar to metabolism in mammals, is a key regulator in trehalose synthesis under salt stress in this organism. Here, we report that the signal transduction involved in the trehalose synthesis of *Euglena* under salt stress.

E. gracilis treated with protein kinase inhibitors, staurosporine, calphostin C, 2,5-Mec and harbimycin, were transferred to a medium containing salt and then the trehalose content in the cell was measured. Trehalose accumulation was markedly inhibited in the cells treated with staurosporine, 2,5-Mec and harbimycin. The Fru-2,6-P₂ content in the cells not treated with them in the salt stressed conditions decreased rapidly, while the content of Fru-2,6-P₂ in the cells treated with the protein kinase inhibitors decreased gradually. Furthermore, decrease of F-6-P 2-kinase activity under the salt stress was moderated in the cells treated with the protein kinase inhibitors. We also found that cyclic AMP dependent protein kinase catalytic subunit suppressed F-6-P 2-kinase activity *in vitro*. These results showed that the protein kinase cascade is involved in the signal transduction regarding the trehalose accumulation of *E. gracilis* under salt stress and that phosphorylation of serine/threonine residue regulate the F-6-P 2-kinase activity directly.

We detected tyrosine phosphorylated peptide by immunoblot technique with an anti-phosphotyrosine antibody. Several peptides were found in the extract of *E. gracilis* under salt stress and the N-terminal amino acid sequence of one of the protein was determined.