

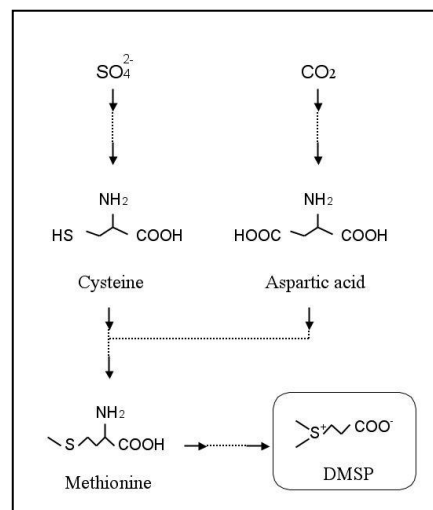
発表番号 27 (0314)

藻類の塩ストレス応答と馴化に關与する適合溶質の生合成

助成研究者:加藤美砂子(お茶の水女子大学大学院人間文化研究科)

生物が塩濃度の高い環境で生育するときには、細胞内の浸透圧を外液の浸透圧に合わせて調整する必要がある。そのために細胞内に蓄積される物質を適合溶質という。適合溶質は細胞内に高度に蓄積しても代謝系の酵素活性を阻害することはなく、高塩濃度下での細胞の機能を正常に保つことができる。本研究では潮間帯に生息する緑藻であり、広範囲の塩濃度に適応して生息することができるヒラアオノリ (*Enteromorpha compressa*) を用いて、高塩濃度下での適合溶質の生合成の誘導機構を明らかにすることを目的とした。ヒラアオノリの水溶性抽出物を $^1\text{H-NMR}$ 分析したところ、主要な構成成分は DMSP (Dimethylsulfoniopropionate) であった。その他、低分子の糖と推定されるシグナルも検出することができた。この DMSP 量は培地中の塩濃度の上昇に伴い増加し、ヒラアオノリでは DMSP を適合溶質として浸透圧調節を行っていることが示唆された。

DMSP の前駆体はメチオニンであることが知られている。DMSP 合成経路の概略は $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{メチオニン} \rightarrow \text{DMSP}$ と表すことができる。通常の培地から高塩濃度の培地へ移したヒラアオノリに、 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ を与えて DMSP 合成能の変化を調べた。 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ を投与したヒラアオノリから過塩素酸を用いて水溶性物質を抽出し、得られた画分を 2 次元薄層クロマトグラフィーで分離後、イメージアナライザーで解析した。その結果、高塩濃度環境へ一定時間馴化させた藻体における、 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ からの DMSP 合成能は馴化 9 時間までは著しく上昇し、その後もコントロールよりも高い合成能を保持していた。一方、 ^{14}C -メチル]メチオニンからの DMSP 合成能は、馴化させた時間に関わらずほぼ一定であった。以上の結果から、高塩濃度へ馴化する際にはスキームの前半部 ($^{35}\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{メチオニン}$) が活性化して DMSP 量が増加することが示された。このことから、DMSP 生合成はメチオニン供給量により調節されている可能性が考えられる。



DMSP 合成経路の概略

15

助成番号 0314

藻類の塩ストレス応答と馴化に関する適合溶質の生合成

加藤 美砂子

お茶の水女子大学大学院人間文化研究科

研究目的

生物が塩濃度の高い環境で生育するときには、細胞内の浸透圧を外液の浸透圧に合わせて調整する必要がある。そのために細胞内に蓄積される物質を適合溶質という。適合溶質は細胞内に高度に蓄積しても代謝系の酵素活性を阻害することはなく、高塩濃度下での細胞の機能を正常に保つことができる。グリシンベタインのような四級アンモニウム化合物、マニトール、ピニトールのような糖アルコール、プロリンのようなアミノ酸などが植物の適合溶質として機能することが知られている。[1]

本研究では潮間帯に生息する緑藻であり、広範囲の塩濃度に適応して生息することができるヒラアオノリ(*Enteromorpha compressa*)を用いて、高塩濃度下での適合溶質の生合成の誘導機構を明らかにすることを目的とした。

研究方法

1 材料

ヒラアオノリ(*Enteromorpha compressa*)は、90%人工海水をベースにしたPES培地[2]で、21、14時間明期、10時間暗期の条件で1の平底フラスコを用いて通気培養を行った。通常の培地に含まれるNaCl濃度は0.36 Mである。

成熟した藻体を新鮮な培地に移し、2日後に配偶子を放出させた。走光性を利用して先の曲がったパスツールピペットで配偶子を集め、それを3週間培養して得た直径1cm程度のウニ状の藻体を実験に用いた。

2 方法

2.1 NMR解析用試料の調製

乳鉢と乳棒を用いて藻体を50%メタノール中で破碎した。5,000xgで20分間の遠心分離を行い、残渣を70%メタノールで再抽出した。これを再度、遠心分離し、得られた上清を合わせてナス型フラスコに移した。ロータリーエバポレーターを用いて減圧乾固させた後に、重水に再溶解させた。これを凍結乾燥した後に、重水を加え再び凍結乾燥して重水置換を行った。1,500xg,5分間の遠心分離によって不溶成分を除き試料とした。

2.2 NMR 測定

¹H-NMR スペクトルは Varian Inova 500MHz を用い、30 °C で測定した。

2.3 放射性標識化合物を用いたトレーサー実験

[¹⁴C-methyl]methionine(55mCi/mmol)、L-[³⁵S]cysteine (1075Ci/mmol)は ARC より、Sodium[³⁵S]sulphate (>100mCi/mmol)はアマシャムバイオサイエンスより購入した。

センターウエルつきフラスコの主室に5 個体(約80mg 相当)の藻体と培地3ml を入れた。¹⁴C-標識化合物を用いた場合は、ウエル中に20%水酸化カリウムをしみこませた濾紙を入れた。 [¹⁴C-methyl]methionine は1 μCi、L-[³⁵S]cysteine は2 μCi、Sodium[³⁵S]sulphate は10 μCi をそれぞれ加えて反応を開始し、室温(20-25 °C)で照射下に置いた。

反応終了後に藻体を取り出して水で洗い、6% 過塩素酸で抽出した。遠心分離して残渣を除き、上清を水酸化カリウム溶液で中和した。中和の際に生じた過塩素酸カリウムを遠心分離によって除き、得られた上清を凍結乾燥した。凍結乾燥後の試料を少量の50% メタノールに溶解し、二次元薄層クロマトグラフィーで分析した。

薄層クロマトグラフィーは、セルロース薄層プレート(Merck、10×10cm)を用い、一次展開(n-ブタノール/酢酸/水 = 4/1/1 (v/v/v))および二次展開(フェノール/水 = 7/3 (v/v)) を行った。展開後、FLA-2000(FUJIFILM)でオートラジオグラフィーを行い、薄層プレート上の各スポットの放射活性の分布を解析した。

研究結果

1 ヒラアオノリの適合溶質の同定

ヒラアオノリの生育に対する塩濃度の影響を調べるために、塩濃度の異なる培地で藻体を培養した。ヒラアオノリに含まれる適合溶質を同定するために水溶性抽出物の¹H-NMR 分析を行った。Fig.1 にスペクトルを示す。水溶性抽出物中の主要な化合物として DMSP (dimethylsulfoniopropionate)を同定した。藻体を高塩濃度の培地に移した直後は、DMSP の他に低分子の糖と推定されるシグナルも検出された。

DMSP が適合溶質として機能しているかどうかを調べるために、藻体を異なった塩濃度の培地に移して馴化させた。38 日後に藻体の DMSP 量を定量したところ、培地中の塩濃度の上昇に伴い、DMSP も増加していた。(Fig.2) 通常の2倍の塩濃度で培養したところ、DMSP 量は約3倍に増加し、生育阻害もみられないことから、以下の実験で用いる高塩濃度培地には通常の2倍の塩濃度を使用した。

2 高塩濃度への馴化と DMSP 生合成能の関係

DMSP 生合成能に対する高塩濃度馴化の影響を調べるために、藻体を高塩濃度条件下に移してから 2-24 時間後の DMSP 生合成能を sodium [^{35}S] sulphate を用いて測定した。その結果、DMSP 生合成能は、高塩濃度条件下に移してから 2-9 時間の間に増加し、その後、やや減少した。しかし、通常培地の藻体と比較すると常に高い生合成能を示した。(Fig. 3) 中間産物である ^{35}S -メチオニンを検出することはできなかった。

前駆体であるメチオニンからの DMSP 生合成を調べるために、高塩濃度条件下に移してから 2-24 時間後の藻体に [^{14}C -methyl]methionine を与えた。馴化した時間にかかわらず、DMSP 生合成能はほぼ一定に保たれていた。また、通常の培地中の藻体の DMSP 生合成能との有意な差は認められなかった。(Fig. 4)

次に藻体を高塩濃度に移すと同時に L- [^{35}S]cysteine を 1 時間与え、標識された [^{35}S]-水溶性化合物を分析した。藻体から検出できた主要な化合物は [^{35}S]-システイン、 [^{35}S]-メチオニン、 [^{35}S]-DMSP であった。1 時間後に合成された DMSP はコントロールの 3 倍であり、メチオニンは 2 倍であった。(Table 1)

考察

ヒラアオノリは潮間帯に生育することが知られている。ヒラアオノリは、実験室内で培養することができる。配偶子から発生させることによって、常に同じ条件で培養した個体を実験に使うことが可能となる。そのため、適合溶質の生合成を調べるためのモデル植物として選択した。生育が可能な塩濃度範囲もきわめて広く、外界の塩濃度に対応して細胞内での適合溶質のターンオーバーが活発に行われているのではないかと予測した。

細胞の中で適合溶質として機能する物質は、植物種によってさまざまである。水溶性化合物を ^1H -NMR 分析した結果、この画分に存在する主要な化合物は DMSP であることがわかった。そして、外界の塩濃度に対応して DMSP 量は増加することから、DMSP は細胞内で適合溶質として機能すると考えられる。藻体を高塩濃度条件下に移した直後は、DMSP 以外の低分子の糖と思われる物質の存在も確認されたが、馴化時間が長くなると水溶性画分に存在する物質の主要成分は DMSP となった。DMSP は多くのハプト藻の適合溶質として知られているが、ハプト藻以外の緑藻や高等植物の適合溶質であることが示されている。[1,3,4]

DMSP は S 原子を含む化合物であり、合成経路の概略は SO_4^{2-} → メチオニン → DMSP である。合成経路の模式図を Fig.5 に示す。メチオニンから DMSP までの経路は、藻類と高等植物では異なることが報告されているが、いずれの場合もメチオニンを前駆体として DMSP が合成されることは共通である。[5] 高塩濃度下で DMSP 量が増加することを確認することができたが、このときの DMSP 生合成能をモニターするために、 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ から合成された [^{35}S]-DMSP を定量した。(Fig. 3) この結果により、高塩濃度に移すと早い時期に DMSP 生合成能は上昇することが示された。この上昇が、 SO_4^{2-} からメチオニンまでの合成系の活性化

によるものか、あるいはメチオニンから DMSP までの合成系の活性化によるものかを確認するために [^{14}C -methyl]methionine から DMSP への合成能を調べたが、DMSP 合成能は塩濃度にかかわらずほぼ一定に保たれていた。したがって、合成経路の前半部、 SO_4^{2-} メチオニンの部分が高塩濃度条件下で活性化されると推定できる。 [^{35}S]-cysteine の投与実験の結果も、この仮説を支持している。高塩濃度条件下における DMSP 生合成能の誘導は、メチオニン供給量によって調節されている可能性を示唆した。

高等植物のメチオニン代謝は複雑なフィードバック制御が行われていることが知られている。メチオニン生合成の鍵酵素は、システインと α -ホスホホモセリンからシスタチオンを合成するシスタチオン- β -シクターゼである。しかし、藻類でのメチオニン代謝の詳細を調べた報告は少ない。今後は、高塩濃度条件下でシスタチオン- β -シクターゼの発現がどのように変化するかを遺伝子レベルで解析することを考えている。

参考文献

- [1] Rai, L.C. and Gaur J.P. eds. Algal adaptation to environmental stresses. 2001 Springer-Verlag Berlin Heiderberg
- [2] 西澤一俊、千原光雄 編 藻類研究法 1979 共立出版
- [3] Trossat, C., Rathinasabapathi, B., Weretilnyk, E.A., Shen, T-L., Huang, Z-H., Gage, D.A. and Hanson, A.D. Salinity promotes accumulation of 3-dimethylsulfonylpropionate and its precursor S-methylmethionine in chloroplasts. Plant Physiol. 116:165-171.
- [4] Summers, P.S., Nolte, K.D., Cooper, A.J.L., Borgeas, H., Leustek, T., Rhodes, D. and Hanson, A.D. (1998) Identification and stereospecificity of the first three enzymes of 3-dimethylsulfonylpropionate biosynthesis in a chlorophyte alga. Plant Physiol. 116:369-378.
- [5] Gage, D.A., Rhodes, D., Nolte, K.D., Hicks, W.A., Leustek, T., Cooper, A.J.L. and Hanson, A.D. (1997) A new route for synthesis of dimethylsulphonylpropionate in marine algae. Nature 387:891-897.

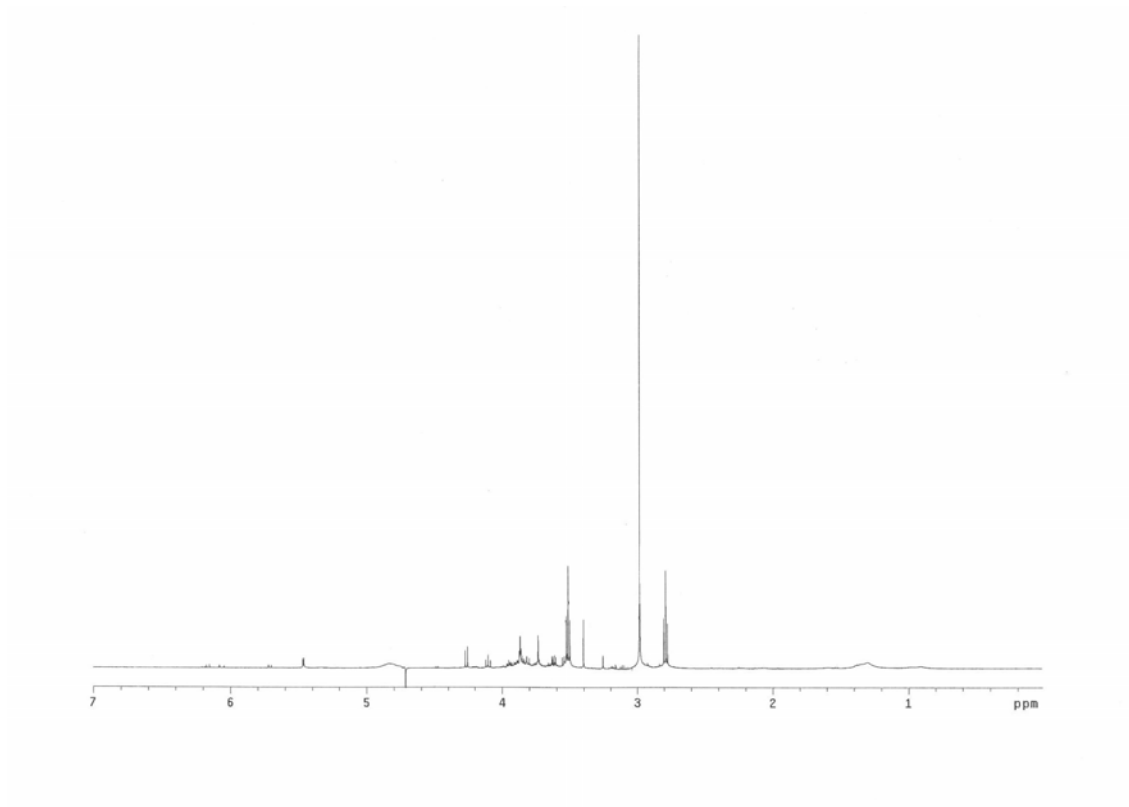


Fig.1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum for DMSP in *E.compressa*.

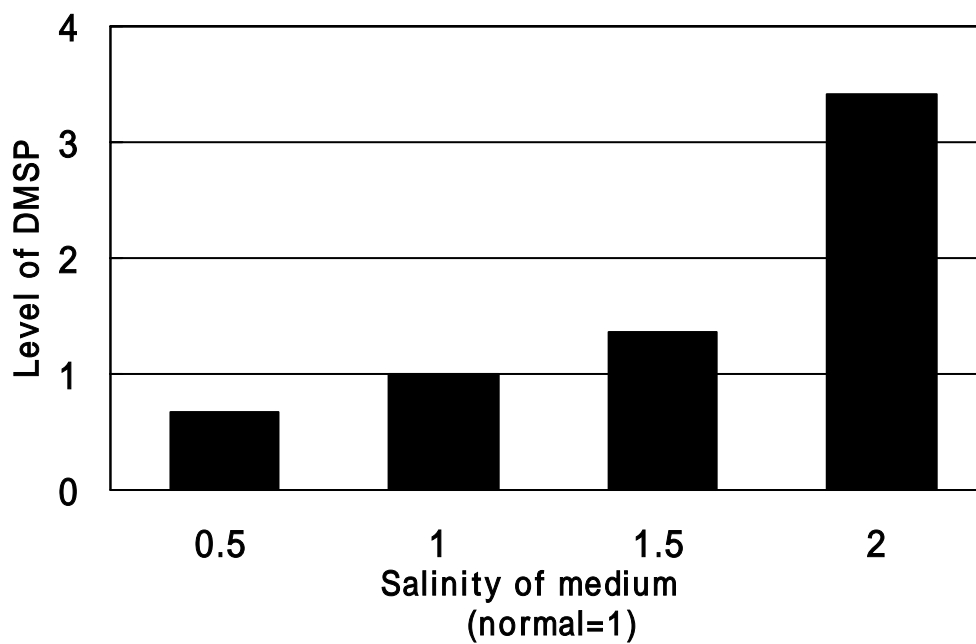


Fig.2 Effect of salt acclimation on DMSP level. Level of DMSP was expressed as the relative value with the cells in the normal condition.

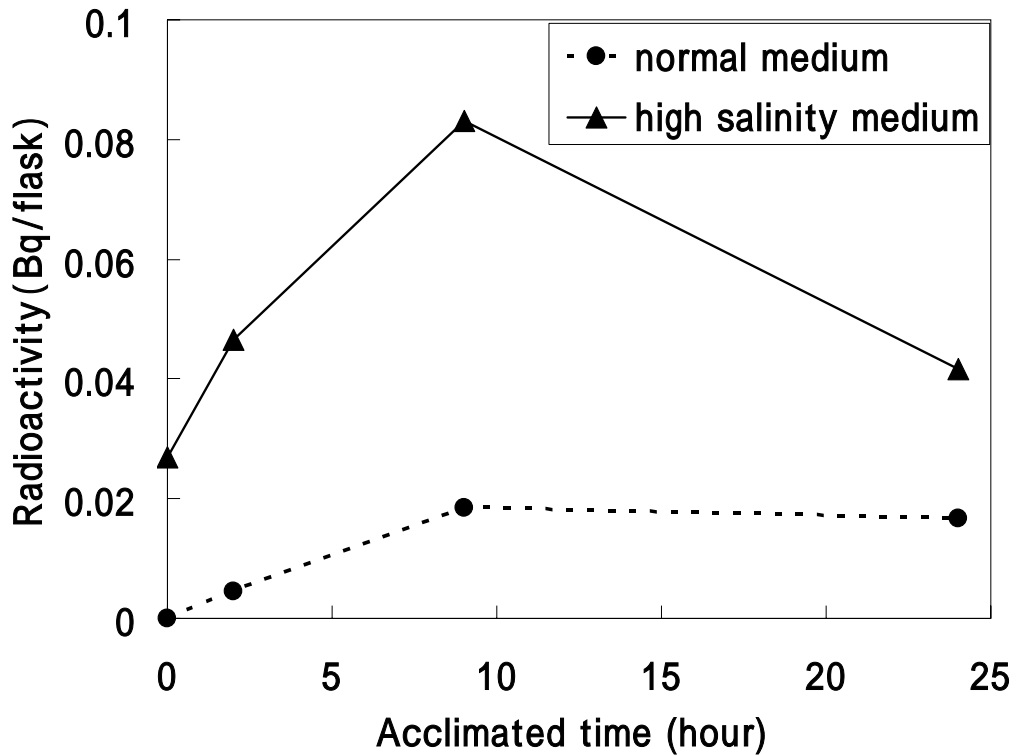


Fig.3 Conversion of $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ to DMSP in salt-acclimated algae.

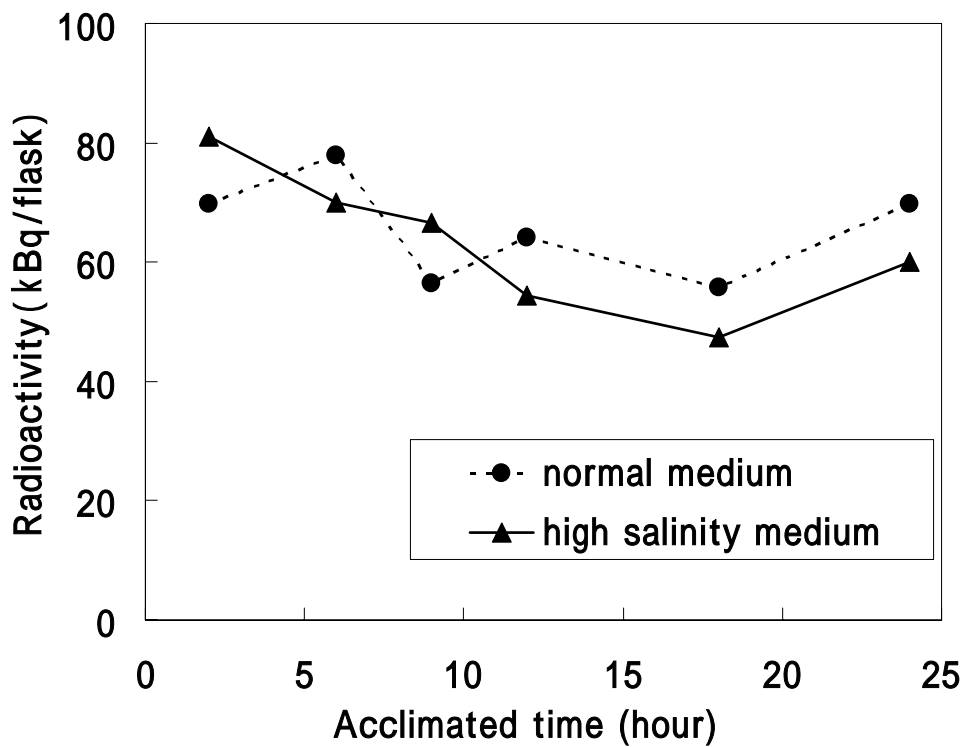


Fig.4 Conversion of [methyl- ^{14}C]methionine to DMSP in salt-acclimated algae.

Table.1 Metabolism of [³⁵S]cysteine by *E.compressa*. Incorporation of radioactivity is expressed as kBq · 100mg⁻¹fresh weight · hour⁻¹

Salinity of medium	Normal	High-salt
Total uptake	16.97	13.91
Cysteine	12.78	8.68
Methionine	0.68	1.46
DMSP	0.37	1.29

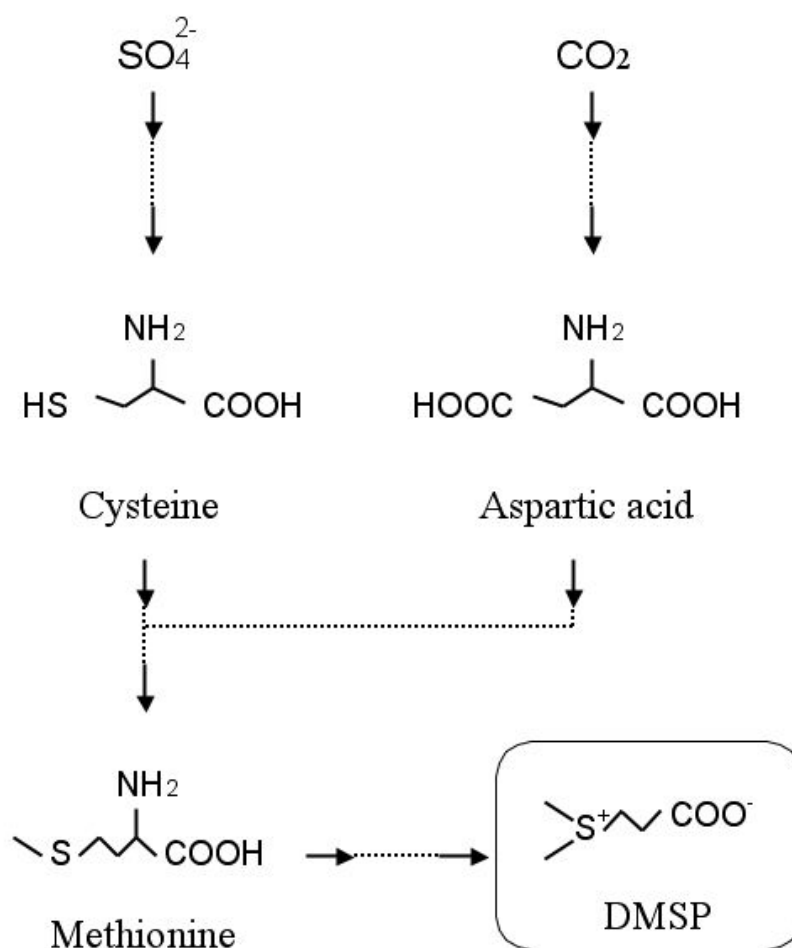


Fig.5 Biosynthetic pathway of DMSP in plants.

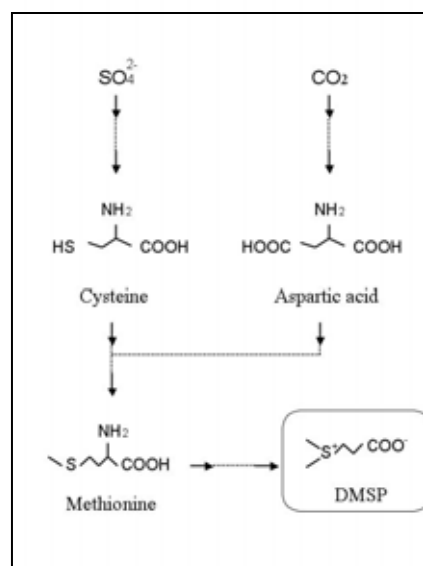
Biosynthesis of compatible solutes involved in salt acclimation of algae

Misako Kato

Graduate School of Humanities and Sciences, Ochanomizu University

Almost all cells are able to live within a certain range of enhanced salt concentrations due to the accumulation of compatible solutes. Compatible solutes, which are low-molecular weight, highly hydrophilic organic compounds, can be accumulated in high concentrations without interfering with the cellular metabolism. In the present study, the author investigated the induction of the biosynthesis in compatible solutes during salt acclimation using *Enteromorpha compressa* (Chlorophyceae) which adapted to the external salt concentrations with the dynamic change. Organic solutes were examined by $^1\text{H-NMR}$ spectra and major organic solute was identified as DMSP (Dimethylsulfoniopropionate). A close correlation was found between the intracellular level of DMSP and salinity, suggesting that DMSP had osmoregulatory function in *E. compressa*.

The outline of the biosynthetic pathway in DMSP was as follows; SO_4^{2-} methionine DMSP. Feeding experiments with $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ demonstrated that DMSP biosynthetic activity was induced by the high salt concentration. The activity increased sharply and reached maximal activity after 9 hours-acclimation. On the other hand, the biosynthetic activity from [methyl- ^{14}C]methionine to DMSP remained constant in spite of acclimation period. The obtained results suggested the activation of the former part in the pathway (SO_4^{2-} methionine) was involved in the increase of DMSP during high-salt acclimation. The biosynthesis of DMSP might be regulated by the supply of methionine *in vivo*.



Pathways for biosynthesis of DMSP