

発表番号 27

海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の好塩性に関与する新規遺伝子の単離と新規塩応答機構の解明

助成研究者：松田祐介（関西学院大学理工学部生命科学科）

田中祐二（関西学院大学理工学部生命科学科）

海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* に好塩機構が存在するのかを明らかにすることを目的に塩条件を様々に改変したときの生育及び光合成活性を生理学的に解析した。

P. tricornutum の細胞を Na^+ 及び Cl^- の濃度がそれぞれ 0.5 M (Na^+) と 0.6 M (Cl^-) になるように調整した人工海水 F2ASW-0.5 M NaCl にて培養し、この細胞を塩濃度や浸透圧を改変した人工海水に移して 2 週間恒常光下 20 °C で培養した。元の生育条件である F2ASW-0.5 M NaCl を基準にすると高塩条件 F2ASW-1.0 M NaCl 及び低塩条件 F2ASW-0.1 M NaCl では生育の低下が見られたが、細胞は $[\text{NaCl}]$ が 0.1 M から 1.0 M の範囲では比較的良好に生育した。0.1 M の $[\text{NaCl}]$ を含む人工海水に 0.45 M Na_2SO_4 を添加することで低 $[\text{Cl}^-]$ 高 $[\text{Na}^+]$ にした場合は、F2ASW-0.5 M NaCl で培養したときに匹敵する生育を示した。これに対して F2ASW-0.1 M NaCl + 0.9 M Choline-Cl で培養すると細胞の生育は著しく阻害され、F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M LiCl 培地や F2ASW-0.1 M NaCl + 1.0 M Sorbitol 培地でも生育は著しく阻害された。これらの結果から Na^+ は珪藻に対して浸透圧ストレス、陽イオンストレス、 Cl^- イオンストレスによる生育阻害効果を軽減する効果をもつことが示唆された。さらに F2ASW-0.5 M NaCl にて培養した細胞を上記の条件に移したときの光合成活性を測定したところ、低 $[\text{Cl}^-]$ 高 $[\text{Na}^+]$ 条件でのみ有意な光合成活性の増大が見られた。同様の結果は 1,4-*p*-benzoquinone 存在下でも確認することができた。このことから、 Na^+ は珪藻に対して PSII の活性を増大させる効果があることが示された。以上のことから珪藻 *P. tricornutum* には好塩性の生理機構が存在することが示された。この好塩性の分子機構を明らかにすることを目的にイオン特異的蛍光プローブを用いて細胞内の Na^+ と Cl^- の局在を調べた。珪藻の葉緑体は 2 次共生生物特有の葉緑体構造である 4 重膜構造からなる。F2ASW-0.5 M NaCl で培養した細胞で調べた結果、 Na^+ と Cl^- は共に外側 2 膜と内側 2 膜の間にある（1 次共生細胞の細胞質にあたる）葉緑体周辺区画に局在していることが示唆された。さらに主用な Na^+ 排出機構である Na^+/H^+ アンチポーター及び Na^+/K^+ -ATPase に対する特異的な阻害剤 EIPA 及び ouabain は、どちらも Na^+ の細胞内への取り込みを阻害し、且つ Cl^- の細胞内への蓄積及び葉緑体周辺区画への局在にも影響を与えた。これらの結果は、 Na^+ 及び Cl^- の葉緑体周辺区画への蓄積に Na^+/H^+ アンチポーターだけでなく動物特異的な遺伝子産物である Na^+/K^+ -ATPase が関与することを強く示唆している。

25

助成番号 0425

海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の好塩性に関する新規遺伝子の単離と
新規塩応答機構の解明

松田祐介 (関西学院大学理工学部生命科学科)

田中祐二 (関西学院大学理工学部生命科学科)

研究目的

本研究では、海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の塩応答機構に関する遺伝子をクローニングし、その機能を調べることで、珪藻の好塩性の分子機構を明らかにしていくことを最終目的としている。塩応答機構については、藍藻から高等植物にいたる多くの光合成生物で古くから研究がなされてきた。それらの知見から、多くの光合成生物にとって Na^+ は成長を阻害する有害且つ不要な元素として作用すると考えられている¹⁾。一方、海洋性珪藻 *P. tricornutum* においては、予備的実験の結果から Na^+ は細胞の生育に害を与えず、むしろ生育促進及び光合成の活性化に寄与していることが示唆されている。珪藻は海洋において最も繁栄している藻類であり、海洋に於ける一次生産量の約半分を占めるといわれている²⁾。この繁栄の理由の一つとして、上にあげたような好塩性機構が関与している可能性は非常に高いと思われる。本報告では、海洋性珪藻の塩応答性に対して詳細な生理学的解析を行うことで珪藻の様々な生理に比較的高濃度の至適 $[\text{Na}^+]$ 域が存在するか否かを明らかにし、細胞内に於ける栄養塩の局在と各種イオン輸送体阻害剤を用いた実験により局在に関する輸送システムの概略を調査した。

研究方法

珪藻 *P. tricornutum* の培養

実験材料には珪藻 *P. tricornutum* UTEX640 (The Culture Collection of Algae at the University of Texas)³⁾ を用いた。細胞の継代には人工海水 F2ASW⁴⁾ の Na^+ 及び Cl^- の濃度をそれぞれ 0.5 M (Na^+) と 0.6 M (Cl^-) になるように調整した F2ASW-0.5 M NaCl を培地として用いた。100 ml 三角フラスコに培地 25 ml を入れ、そこに細胞を継代し、20°C、光 (60-100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) 照射下で静置培養した。 Na^+ が生育に与える影響を調べる際には、人工海水 F2ASW-0.5 M NaCl にて生育させた細胞を塩濃度や浸透圧を改変した人工海水に初期濁度が $\text{OD}_{760} = 0.005$ となるように継代し、光照射下で 14 日間静置培養した。用いた改変人工海水はいずれも F2ASW をベースとした培地で、以下の表の通りである。

培地名	注 釈
F2ASW-0.1 M NaCl	F2ASW の Na ⁺ 及び Cl ⁻ の濃度をそれぞれ 0.1 M (Na ⁺) と 0.2 M (Cl ⁻) になるように調整したもの
F2ASW-1.0 M NaCl	F2ASW の Na ⁺ 及び Cl ⁻ の濃度をそれぞれ 1.0 M (Na ⁺) と 1.1 M (Cl ⁻) になるように調整したもの
F2ASW-0.1 M NaCl + 0.45 M Na ₂ SO ₄	F2ASW-0.1 M NaCl に 0.45 M Na ₂ SO ₄ を添加したもの
F2ASW-0.1 M NaCl + TrisSO ₄	F2ASW-0.1 M NaCl に 0.45 M H ₂ SO ₄ を添加し、Tris にて pH 調整したもの
F2ASW-0.1 M NaCl + 0.9 M Cholin-Cl	F2ASW-0.1 M NaCl に 0.9 M Cholin-Cl を添加したもの
F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M LiCl	F2ASW-0.1 M NaCl に 0.2 M LiCl を添加したもの
F2ASW-0.1 M NaCl + 1.0 M Sorbitol	F2ASW-0.1 M NaCl に 1.0 M Sorbitol を添加したもの

光合成活性の測定

細胞を遠心分離機によって収穫した後、測定用の塩濃度を改変した培地にて2回洗浄した。この細胞を同じ培地にて懸濁しクロロフィル a の濃度が約 6.5 µg/ml になるようにしたものを測定試料とした。酸素発生速度の測定にはクラークタイプ酸素電極を用いて単位クロロフィル量における単位時間あたりの酸素発生量を測定した。PSII の活性測定は 2 mM 1,4-p-benzoquinone を添加したときの酸素発生速度を指標とした。

細胞内 Na⁺ および Cl⁻ の局在

細胞内 Na⁺ の局在解析には、細胞内のNa⁺ イオンに対する蛍光プローブである Sodium Green tetraacetate /cell permeant type (Molecular Probes) を、細胞内Cl⁻ の局在解析には、Cl⁻ イオンに対する蛍光プローブである 6-methoxy-N-ethylquinolinium chloride (MEQ) (Molecular Probes) を細胞浸透用に調製したものをを用いた。Sodium Green は 50 µg/ml、MEQ は1 mg/ml になるように添加し30分暗所で反応させた後、細胞を共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 META, version 3.0 (Carl Zeiss) の lambda mode にて350 nm – 640 nmの範囲で蛍光画像データを集積した。得られたデータからは、各蛍光プローブ及びクロロフィル由来の蛍光スペクトルを指標にそれぞれの蛍光を選別した。

イオン輸送体阻害剤の影響

イオン輸送体阻害剤は、Sodium Green と MEQ を添加するときに同時に添加した。用いたイオン輸送体阻害剤は以下の通りである。1 mM EIPA: 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride、360 µM ouabain、60 µM TTX: Tetrodotoxin、0.5 mM DIDS: 4,4'-Diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid disodium、30 µM IAA-94: [(6,7-

dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-2-methyl-1-oxo-1H-inden-5-yl)-oxy] acetic acid 94

研究結果

Na⁺ が珪藻の生育に与える影響

海洋の平均塩濃度である 0.5 M NaCl を含む人工海水 F2ASW-0.5 M NaCl で培養した細胞を塩濃度や浸透圧等を改変した人工海水に移し 10 日間培養したところ、その生育に大きな差が見られた (Fig. 1)。元の生育条件である F2ASW-0.5 M NaCl を基準にすると (Fig. 1 上段中央) 高塩条件 F2ASW-1.0 M NaCl (Fig. 1 上段右) 及び低塩条件 F2ASW-0.1 M NaCl (Fig. 1 上段左) では生育の低下が見られたが、どちらの条件でも細胞の増殖が確認できた。低 [Cl⁻] 高 [Na⁺] 条件である F2ASW-0.1 M NaCl + 0.45 M Na₂SO₄ で培養すると、F2ASW-0.5 M NaCl で培養したときに匹敵する生育を示した (Fig. 1 中段左)。これに対し、低 [Cl⁻] 低 [Na⁺] 条件かつ F2ASW-0.1 M NaCl + 0.45 M Na₂SO₄ と同濃度の [SO₄²⁻] を含む F2ASW-0.1 M NaCl + TrisSO₄ 培地や高 [Cl⁻] 低 [Na⁺] 条件である F2ASW-0.1 M NaCl + 0.9 M Choline-Cl で培養すると細胞の生育は著しく阻害された (Fig. 1 中段中、中段右)。さらに、陽イオン Li⁺ を加えた F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M LiCl 培地や高浸透圧条件である F2ASW-0.1 M NaCl + 1.0 M Sorbitol 培地でも生育は著しく阻害された (Fig. 1 下段)。

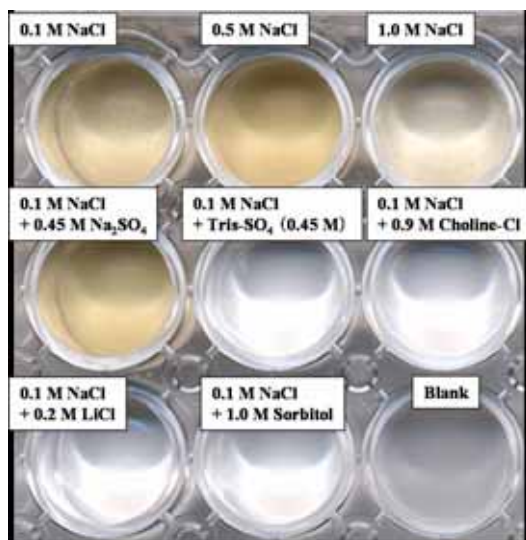


Figure 1. Effects of sodium chloride on the growth of diatom. Cells grown in F2ASW-0.5 M NaCl ([Na⁺]: 0.5 M, [Cl⁻]: 0.6 M) were transferred into modified F2ASW and were grown for 14 days under illumination at 20°C. The concentrations of NaCl and additional chemicals in modified F2ASW are indicated in boxes.

Na⁺ が光合成活性に与える影響

海洋の平均塩濃度である 0.5 M NaCl を含む人工海水 F2ASW-0.5 M NaCl で培養した細胞を Fig. 2 図中に示した条件に移しその光合成活性を測定したところ、低 [Cl⁻] 高 [Na⁺] 条件である F2ASW-0.1 M NaCl + 0.45 M Na₂SO₄ のときにのみ有意な光合成活性の増大が見られた。同様の結果は 2 mM 1,4-*p*-benzoquinone 存在下でも確認することができた。

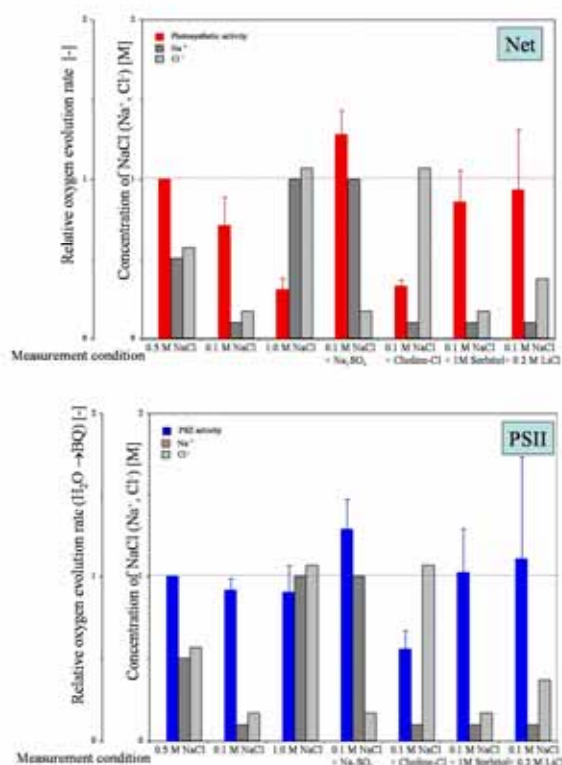


Figure 2. Effects of sodium chloride on photosynthetic activity. Cells grown in F2ASW-0.5 M NaCl were transferred to modified F2ASW and photosynthetic O₂ evolution was measured with a Clark-type oxygen electrode at 20°C in the absence (Net) or presence (PSII) of 2 mM 1,4-*p*-benzoquinone. The concentrations of NaCl and additional chemical in modified F2ASW were indicated in figure. The photosynthetic activities at F2ASW-0.5 M NaCl were also determined as a non-treated standard.

Na⁺ による陽イオンストレス耐性の増大

海洋の平均塩濃度である 0.5 M NaCl を含む人工海水 F2ASW-0.5 M NaCl で培養した細胞を F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M KCl 又は F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M LiCl に移し 10 日間培養すると、その生育は著しく阻害される (Fig. 3 左 K3, 右 L3)。これらの培地に 0.2 M 又は 0.45 M Na₂SO₄ を添加することによって培地中の [Na⁺] を増大させたところ、どちらの場合も Na₂SO₄ の添加量に応じて生育阻害効果が軽減された (Fig. 3 左 K1-K2, 右 L1-L2)。Na⁺ 及び Cl⁻ の細胞内局在

F2ASW-0.5 M NaCl で培養した細胞に細胞内の Na⁺ 及び Cl⁻ イオン特異的蛍光プローブである sodium green 及び MEQ を取り込ませた。これを共焦点蛍光顕微鏡 LSM 510 META, version 3.0 (Carl Zeiss) の lambda mode にて撮影し、各蛍光プローブ及び

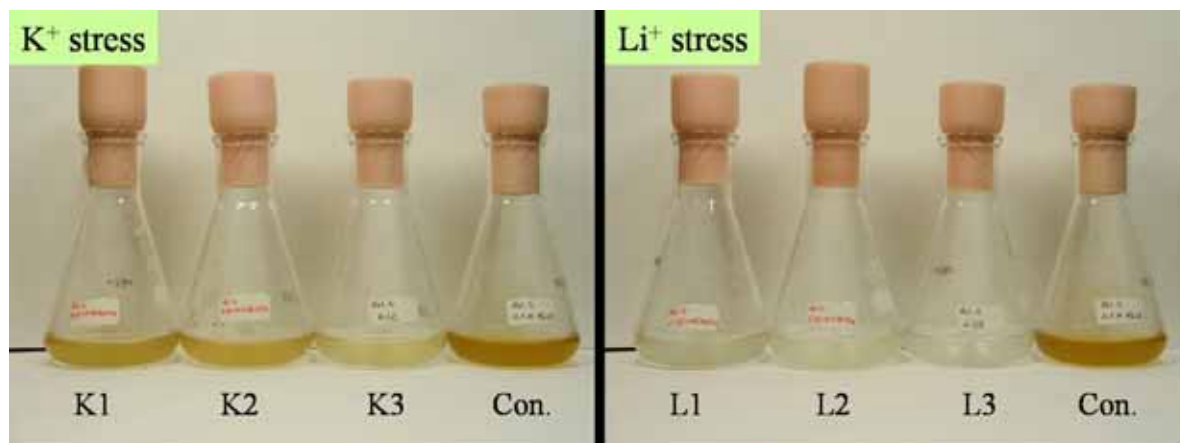


Figure 3. Effects of Na^+ on K^+ -stress or Li^+ -stress of diatom. Cells grown in F2ASW-0.5 M NaCl were transferred into modified F2ASW and were grown for 10 days under illumination at 20°C. Con.: F2ASW-0.1 M NaCl, K1: F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M KCl + 0.45 M Na_2SO_4 ($[\text{Na}^+]$: 1.0 M, $[\text{K}^+]$: 0.2 M), K2: F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M KCl + 0.2 M Na_2SO_4 ($[\text{Na}^+]$: 0.5 M, $[\text{K}^+]$: 0.2 M), K3: F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M KCl ($[\text{Na}^+]$: 0.1 M, $[\text{K}^+]$: 0.2 M), L1: F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M LiCl + 0.45 M Na_2SO_4 ($[\text{Na}^+]$: 1.0 M, $[\text{Li}^+]$: 0.2 M), L2: F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M LiCl + 0.2 M Na_2SO_4 ($[\text{Na}^+]$: 0.5 M, $[\text{Li}^+]$: 0.2 M), L3: F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M LiCl ($[\text{Na}^+]$: 0.1 M, $[\text{Li}^+]$: 0.2 M).

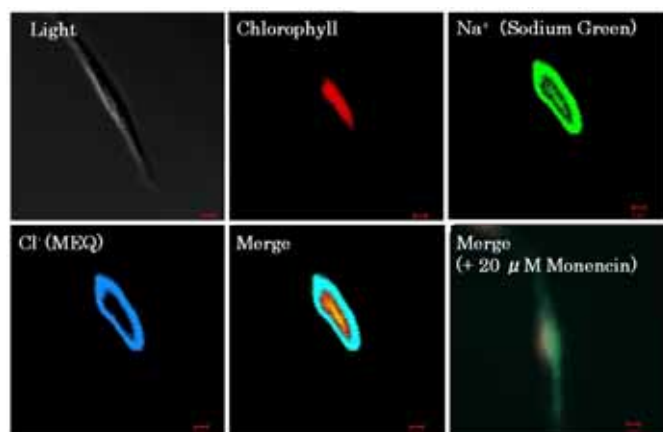


Figure 4. Localization of Na^+ and Cl^- in cells grown in F2ASW-0.5 M NaCl. Cells grown in F2ASW-0.5 M NaCl were treated with sodium green and MEQ for 30 min in the dark in the presence or absence of Monencin. All images were taken with laser-scanning confocal microscope under conditions described in the text. Scale bars, 2 μm . Light: Light image, Chlorophyll: chlorophyll

autofluorescence without Monencin, Na^+ : fluorescence of sodium green without Monencin, Cl^- : fluorescence of MEQ without Monencin, Merge: merged images of all fluorescence image without Monencin, Merge (+20 μM Monencin): merged images of all fluorescence image with 20 μM Monencin.

クロロフィル由来の蛍光スペクトル特性を指標にそれぞれの蛍光を選別したところ、各蛍光プローブ由来の特性蛍光は細胞内ではクロロフィル由来の赤色蛍光 (Fig. 4 上段中央) を取り囲むように存在し (Fig. 4 上段右、下段左) さらにこれら蛍光プローブ由来と思わ

れる蛍光は同じ場所に局在していた (Fig. 4 下段中央)。さらに蛍光プローブ由来と思われる蛍光の局在は、 Na^+ チャンネルのイオノホアである Monencin ($20 \mu\text{M}$) の添加で共に細胞全体に拡散した。

Na^+ 輸送体阻害剤の影響

F2ASW-0.5 M NaCl で培養した細胞に sodium green 及び MEQ を反応させるときに 1 mM EIPA 又は $360 \mu\text{M}$ ouabain を添加して、これらの細胞を Fig. 4 の実験同様に共焦点蛍光顕微鏡にて撮影し、各蛍光プローブ及びクロロフィル由来の蛍光スペクトルを指標にそれぞれの蛍光を選別した。EIPA 存在下では sodium green 由来の蛍光は細胞全体に拡散し、その強度は著しく減少した (Fig. 5 中段中央)。MEQ 由来の蛍光は葉緑体に多く局在しているものの、sodium green 由来の蛍光と同様に細胞全体に拡散していた。MEQ 由来の蛍光の蛍光強度は sodium green 由来の蛍光ほどは減少しなかった (Fig. 5 中段右)。ouabain 存在下では sodium green 由来の蛍光はほとんど観察することができなかった (Fig. 5 下段中央)。MEQ 由来の蛍光は EIPA 存在下のときと同様に葉緑体に多く局在しているものの、細胞全体に拡散していた。MEQ 由来の蛍光の蛍光強度は EIPA 存在下のときよりも減少していた (Fig. 5 下段右)。

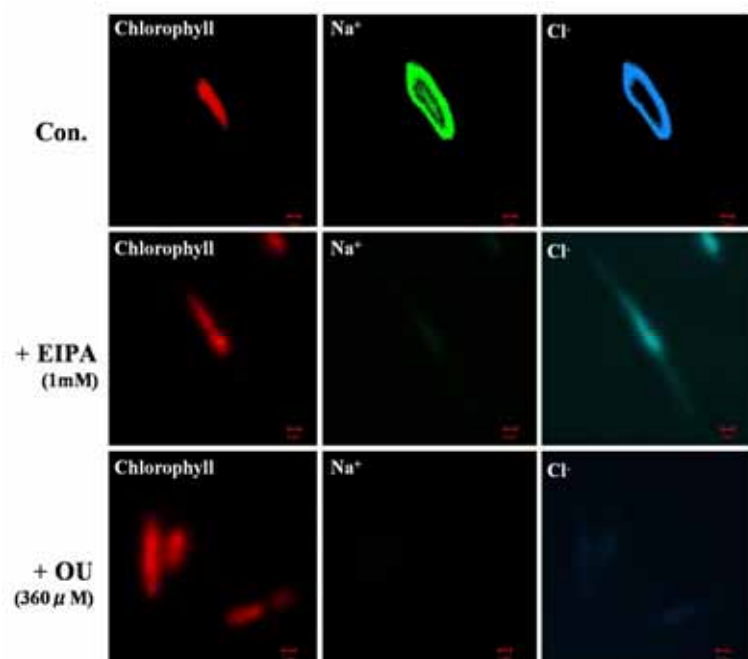


Figure 5. Effects of EIPA and ouabain on localization of Na^+ and Cl^- in cells grown in F2ASW-0.5 M NaCl. Cells grown in F2ASW-0.5 M NaCl were treated with sodium green and MEQ for 30 min in darkness in the presence or absence of 1 mM EIPA or $360 \mu\text{M}$ ouabain. All of images were taken with a laser-scanning confocal microscope under conditions described in the text. Scale bars, $2 \mu\text{m}$. Light: Light image,

Chlorophyll: chlorophyll autofluorescence, Na^+ : fluorescence of sodium green, Cl^- : fluorescence of MEQ.

Na^+ チャンネル、 Cl^- チャンネル、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送体阻害剤の影響

F2ASW-0.5 M NaCl で培養した細胞に sodium green 及び MEQ を反応させるときに 60

μM TTX、0.5 mM DIDS, または 30 μM IAA-94 を添加して、これらの細胞を Fig. 4 の実験同様に共焦点蛍光顕微鏡にて撮影し、各蛍光プローブ及びクロロフィル由来の蛍光スペクトルを指標にそれぞれの蛍光を選別した。TTX 存在下では sodium green 由来の蛍光は葉緑体周辺に局在するが、その強度は減少した (Fig. 6 中段左 2)。MEQ 由来の蛍光は、sodium green 由来の蛍光と同様に葉緑体周辺に局在し、その強度も減少した (Fig. 6 下段左 2)。DIDS 存在下では TTX 存在下のときと同様に両蛍光とも葉緑体周辺に局在し、その強度は減少した (Fig. 6 中段右 2、下段右 2)。IAA-94 存在下では sodium green 由来の蛍光は ouabain 存在下のときと同様にほとんど観察されなかった (Fig. 6 中段右)。MEQ 由来の蛍光もまた、ouabain 存在下のときと同様に葉緑体に多く局在しているものの細胞全体に拡散しており、蛍光強度も減少していた (Fig. 6 下段右)。

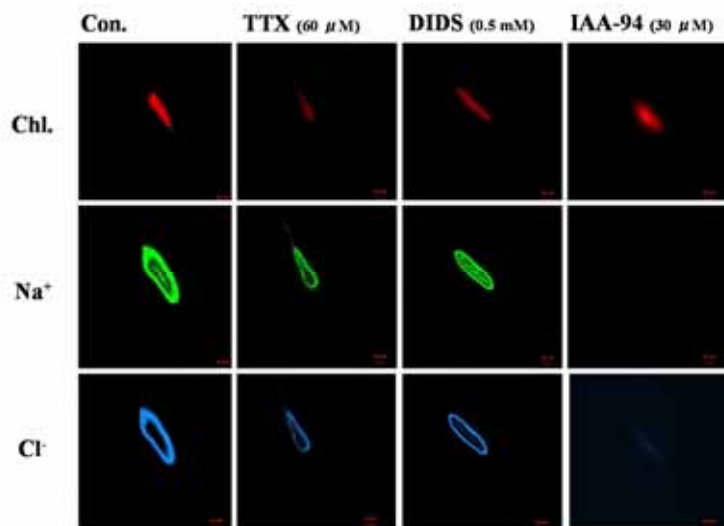


Figure 6. Effects of TTX, DIDS and IAA-94 on localization of Na^+ and Cl^- in cells grown in F2ASW-0.5 M NaCl. Cells grown in F2ASW-0.5 M NaCl were treated with sodium green and MEQ for 30 min in the dark in the presence or absence of 60 μM TTX, 0.5 mM DIDS or 30 μM IAA-94. All images were taken with a laser-scanning confocal

microscope under conditions described in the text. Scale bars, 2 μm . Light: Light image, Chlorophyll: chlorophyll autofluorescence, Na^+ : fluorescence of sodium green, Cl^- : fluorescence of MEQ.

考察

Na^+ による生育及び光合成活性の増大効果

ラン藻、緑藻、そして高等植物において塩応答性は古くから研究されており、その結果一部の C4 植物を除き光合成など光合成生物の生理活性に対して Na^+ は負の影響を与えるものと考えられており、 Cl^- は Na^+ のカウンターイオンと考えられてきた。その分子機構は高 $[\text{Na}^+]$ によって生じる 1)陽イオンストレス、2)浸透圧ストレス、3)細胞内 Na^+/K^+ 比の変動による栄養塩取り込み機構への影響などが報告されている。Fig. 1 の結果から海洋性珪藻 *P.tricornutum* は海洋の平均塩濃度である 0.5 M NaCl を中心にその倍の NaCl 濃度まで生育することが可能であることが分かる。しかしながら、高 $[\text{Cl}^-]$ 低 $[\text{Na}^+]$ 条件

(F2ASW-0.1 M NaCl + 0.9 M Choline-Cl) や陽イオン Li^+ ストレス (F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M LiCl)、高浸透圧ストレス (F2ASW-0.1 M NaCl + 1.0 M Sorbitol) ではその生育は著しく阻害された。これらの結果に対し、低 $[\text{Cl}^-]$ 高 $[\text{Na}^+]$ 条件 (F2ASW-0.1 M NaCl + 0.45 M Na_2SO_4) で培養したときの細胞は F2ASW-0.5 M NaCl で培養したときに匹敵する生育を示したことから、*P.tricornutum* にとって $[\text{Na}^+]$ の増大はその生育に対して正の影響を与えることが示唆された。 Na_2SO_4 の添加は $[\text{Na}^+]$ の増大だけでなく $[\text{SO}_4^{2-}]$ の増加も同時に引き起こすが、同濃度の $[\text{SO}_4^{2-}]$ を含む F2ASW-0.1 M NaCl + TrisSO_4 培地では生育が著しく阻害されることから、 Na_2SO_4 の添加による生育の促進効果は $[\text{Na}^+]$ の増大によるものと考えられる。

光合成器官、とりわけ PSII はその複雑な構造や、光合成反応中常に光及び酸化ストレスに晒されることから多くのストレスに対して感受性が高い器官であり、塩ストレスに対しても多くの報告がされている。しかしながら、Fig. 2 の結果は Fig. 1 の結果同様に $[\text{Na}^+]$ の増大が *P. tricornutum* の生理活性に対して正の影響を与え、 $[\text{Cl}^-]$ は負の影響を与えることを示唆している。Fig. 1 の結果では生育を著しく阻害した F2ASW-0.1 M NaCl + 0.2 M LiCl 条件や F2ASW-0.1 M NaCl + 1.0 M Sorbitol 条件で、その光合成活性はそれほど大きな被害を受けていないことから、陽イオンストレスや浸透圧ストレスは短時間では光合成活性に強い影響を与えないことが示唆される。これらの結果に対して塩濃度を改変した条件ではその光合成活性が影響を受けやすいことから、 $[\text{Na}^+]$ 及び $[\text{Cl}^-]$ はイオン特異的に短時間で光合成活性に強い影響を与える要因であることが示唆された。 $[\text{Na}^+]$ の増大による光合成活性の増大は 2 mM 1,4-p-benzoquinone 存在下でも確認することができたことから、 $[\text{Na}^+]$ は、PSII 活性を促進する効果があり、これによって Net の光合成活性を促進しているものと考えられる。

一般に Na^+ は細胞に対して陽イオンストレスを与えるものであるが、Fig. 1 と Fig. 2 の結果から *P. tricornutum* の細胞は Na^+ を要求する性質があることが示唆された。そこで、陽イオンストレス存在下での Na^+ の影響について調べたのが Fig. 3 である。いくつかの光合成生物では細胞内の $[\text{Na}^+]$ が増大すると、それに伴って細胞内の $[\text{K}^+]$ が増大することが知られている。これは栄養塩の取り込みのためには細胞質内を常に $[\text{Na}^+] < [\text{K}^+]$ に保つ必要があるためと考えられている。このことから、 Na^+ によるイオンストレスに対しての $[\text{K}^+]$ の増大はストレス軽減効果が期待されるが、この場合逆に過剰な K^+ によるイオンストレスに対して $[\text{Na}^+]$ の増大は、陽イオンストレスを増大させるのみであると考えられる。しかしながら *P. tricornutum* の細胞の場合、Fig. 3 に示すように過剰な K^+ によるイオンストレスに対して $[\text{Na}^+]$ を増大させることでそのストレス効果が軽減した。光合成生物の主要な Na^+ 排出機構は Na^+/H^+ アンチポーターである。この Na^+ 排出機構は Na^+ だけでなく同じ陽イオンである Li^+ も排出することが可能であるが、その排出能力は Na^+ のときと比較してかなり劣ることから、LiCl による陽イオンストレスは浸透圧ストレスを

伴わない陽イオンストレスの影響をみるうえで多くの光合成生物で汎用されている。つまり、一般的には K^+ のときと同様に Li^+ によるイオンストレスに対して $[Na^+]$ の増大は、陽イオンストレスを増大させるのみであると考えられる。しかしながら、 K^+ のストレスのときほどではないが、 Li^+ による陽イオンストレスに対して $[Na^+]$ の増大させることで *P. tricornutum* のストレス効果は軽減した。これらの結果から *P. tricornutum* においては環境中の $[Na^+]$ の増大は陽イオンストレスを与えず、むしろ他のイオンによる陽イオンストレスを軽減する効果をもたらすことが示唆された。

Na⁺及び Cl⁻ の局在

光合成生物は細胞質内の $[Na^+]$ を低く保つために、 Na^+ を細胞外に排出するか液胞に溜め込むことが知られている。Cl⁻ イオンについても同様に、PSII の活性中心が Cl⁻ イオンを要求するため一部は葉緑体のチラコイドルーメンまで輸送されるが、その多くは Na^+ のカウンターイオンとして液胞に局在する。これに対し珪藻 *P. tricornutum* は、 Na^+ と Cl⁻ のそれぞれが葉緑体を取り囲むように局在していることが示唆された (Fig. 4)。珪藻の葉緑体は2次共生生物特有の葉緑体構造である4重膜構造からなる。外側2膜はER膜で最外膜は核膜と融合している。内側2膜は葉緑体胞膜である。そして(1次共生細胞の細胞質にあたる)ER膜と葉緑体胞膜の間には葉緑体周辺区画と呼ばれる区画が存在する。チラコイドを取り囲む区画としては、1)ER膜間、2)葉緑体周辺区画、3)葉緑体胞膜間、4)葉緑体ストロマの4つが考えられるが、1)の場合 Na^+ と Cl⁻ はそれぞれ核も取り囲むように存在することになると考えられるので、可能性は低いと思われる。3)4)に関しては、1次共生生物で Na^+ や Cl⁻ を葉緑体胞膜間や葉緑体ストロマに蓄積する報告例がないことから、やはり可能性は低いと思われる。以上のことから2次共生生物である珪藻 *P. tricornutum* は、 Na^+ 及び Cl⁻ を2次共生生物特異的な区画である葉緑体周辺区画に蓄積しているものと考えられる。

イオン輸送体阻害剤の影響

前述したように光合成生物の主要な Na^+ 排出機構は Na^+/H^+ アンチポーターである。これに対し動物の主要な Na^+ 排出機構は Na^+/K^+ -ATPase である。そこでこれらに対する特異的な阻害剤 EIPA 及び ouabain の影響を調べたのが Fig. 5 である。この結果、どちらの阻害剤も Na^+ の蓄積を阻害し、且つ Cl⁻ の蓄積及び局在にも影響を与えた。これらの結果は、 Na^+ の蓄積に Na^+/H^+ アンチポーター及び Na^+/K^+ -ATPase が関与することを強く示唆している。 Na^+/H^+ アンチポーターについては一部の藻類や動物細胞で逆向きに配位して Na^+ の取り込みに用いられることが報告されている。しかしながら、 Na^+/K^+ -ATPase については動物では広く保存されているものの Na^+ の取り込みに用いられる例は無く、光合成生物においては一部の藻類でホモログが見つかっているのみで ouabain 感受性のものは未だ報告されていない。珪藻は2次共生時の最終核起源生物が動物と近縁であり、その結果動物と植物の両方の遺伝子を兼ね備えていると考えられている。本研究の結果から、塩の輸送機構

に関して珪藻は動植物特有のイオン輸送体を用いて新たな応答機構を構築しているように思われる。Na⁺ 輸送体の阻害剤が Cl⁻ の局在にも影響を与えることから、この珪藻特異的な塩輸送機構においては Na⁺ と Cl⁻ は互いに干渉しあうものと考えられる。このことは Na⁺ チャンネル阻害剤 TTX や Cl⁻ チャンネル阻害剤 DIDS 及び IAA-94 それぞれが Na⁺ と Cl⁻ の双方の局在や蓄積に影響を与えていることから支持される (Fig. 6)。

2 種類の Cl⁻ チャンネル阻害剤 DIDS と IAA-94 は Na⁺ と Cl⁻ の蓄積量及び、その局在においても異なる結果を示した。IAA-94 が強い Cl⁻ チャンネル阻害剤であるのに対し、DIDS は弱い Cl⁻ チャンネル阻害剤であると同時に Na⁺/HCO₃⁻ 共輸送体の阻害剤でもある。このことから、珪藻 *P. tricornutum* は Na⁺/HCO₃⁻ 共輸送体を有している可能性も高いと思われる。Na⁺/HCO₃⁻ 共輸送体もまた Na⁺/K⁺-ATPase 同様動物特異的な遺伝子の一つであり、光合成生物では未だにその存在が報告されていない。

今後の課題

本研究結果から珪藻 *P. tricornutum* が好 Na⁺ 性の性質を示す特殊な塩応答性を有することが示され、その分子機構には2次共生生物特有の複雑な葉緑体構造と植物のイオン輸送機構だけでなく動物特異的なイオン輸送体が関与していることが強く示唆された。今後は分子レベルで至適 [Na⁺] 域から低塩環境への順化過程を調べることにより、珪藻特有の好塩性機構を解明する。その方法としてイオン輸送体を中心にした PCR クローニング法と半網羅的な解析として cDNA-AFLP 法を用いた低塩ストレス誘導性遺伝子のクローニングを計画している。また、光合成器官自身の好塩性能について調べるために、無障チラコイド膜の単離方法の確立、それを用いた生化学的な Na⁺ 依存性の解析を行うことを計画している。

文献等

- 1) Hayashi H, Murata N (1998) In K Sato, N Murata, eds, *Stress Responses of Photosynthetic Organisms: Molecular Mechanisms and Molecular Regulation*. Elsevier, Amsterdam,
- 2) Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448
- 3) <http://www.bio.utexas.edu/research/utex/>
- 4) Anderson, R. A. *et al.* (2005) In Anderson, R. A. ed. *Algal culturing techniques* Elsevier academic press, London,

Isolation of salt responsive genes and characterization of salt responsive mechanism
in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*

Yusuke Matsuda and Yuji Tanaka

Department of Bioscience, School of Science and Engineering, Kwansei-Gakuin University,

Summary

Physiological and biochemical responses of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* to various salt concentrations were investigated. Cells of the marine diatom *P. tricornutum* grown in f/2 enriched artificial seawater (F2ASW) containing 0.5 M NaCl were transferred to manipulated [NaCl] and cultured at 20 °C for 2 weeks under continuous illumination. Cells were grown well under 0.1 M to 1.0 M NaCl. A partial deprivation of Cl⁻ by replacement of NaCl with Na₂SO₄ under constant [Na⁺] of 1.0 M also exhibited little inhibitory effect on growth whereas the addition of 0.2 M LiCl, 0.2 M KCl, 1.0 M Sorbitol, or 0.9 M Cholinechloride to the F2ASW containing 0.1 M NaCl drastically inhibited the growth. These probable inhibitory effects with Cl⁻, osmotic and cationic stresses were reduced by the addition of Na₂SO₄ in a concentration dependent manner. Under above-described stressed conditions, activities of the linear electron transport and PSII were measured with oxygen evolution rate respectively with and without added 2 mM 1,4-*p*-benzoquinon. All these activities were stimulated upon the addition of 0.45 M Na₂SO₄ to the modified F2ASW containing 0.1 M NaCl, whereas these were inhibited upon the addition of 0.9 M cholinechloride. The addition of 0.2 M LiCl, 0.2 M KCl, or 1.0 M sorbitol exhibited little effect on photosystem. These observations suggest a possible occurrence of novel halophilic systems in marine photoautotrophs.

Furthermore, Na⁺ and Cl⁻ fluxes were monitored under several ambient [NaCl] using ion specific fluorescence indicators. At salt concentration below the average of seawater (0.5 M), both ions accumulated in periplastidal compartment, an intermembrane space of four-layered chloroplast envelope of secondary endocytobionts. 360 μM ouabain and 100 μM EIPA, inhibitors respectably for Na⁺/K⁺ ATPase and Na⁺/H⁺ antiporter, completely abolished Na⁺ influx and dissipated periplastidal Cl⁻ accumulation at 0.5 M NaCl. These observations indicate that the periplastidal compartment might play a crucial role during acclimation of cells to broad range [NaCl], and that these ion fluxes are driven by Na⁺/K⁺ ATPase and/or Na⁺/H⁺ antiporter.