

単細胞性紅藻 *Galdieria sulphuraria* における高濃度の鉄耐性機構の解明

福田 幸広 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 蓑田 歩 (筑波大学 生命環境系)

Introduction

Cyanidiophyceae は、世界各地の温泉地などの高温・強酸性条件 (至適培養条件: pH 2, 42°C) に適応した極限環境生物の一種である。*Galdieria sulphuraria* は Cyanidiophyceae の中で最も環境耐性能力が高く、自然界でも生息する環境の 90% 以上のバイオマスを占める優占種である (Schönknecht *et al.* 2013)。

Cyanidiophyceae が生息する高温・強酸性条件は、金属が非常に溶けやすく、火山地帯や鉱山地帯付近の河川など、数百 mM を超える鉄が含まれる環境での生息が報告されている (Baker *et al.* 2004)。実験室内においては、200 mM Al 存在下での増殖が報告されており (Yoshimura *et al.* 1999)、中性域に生息する多くの生物よりも数百から千倍ほど高い金属耐性を示す。

全ゲノム配列の解析から、古細菌やバクテリアからの遺伝子の水平転移が極限環境への適応を促進したと言われている (Schönknecht *et al.* 2013) が、水平転移により獲得された多くの遺伝子が機能未知であり、*G. sulphuraria* が過酷な環境を制するメカニズムはほとんどわかっていない。金属耐性機構についても、広く生物に保存されるポリリン酸の関与が報告されている (Nagasaka *et al.* 2003) が、強酸性条件では金属の化学形態や吸着・吸収速度が中性領域とは全く異なることから、既知のメカニズムに加えて、新たな金属耐性機構の存在が予想される。

そこで私は、*G. sulphuraria* を研究材料として、生物にとって必須元素であると同時に、高濃度では毒性を示す鉄に着目し、その耐性機構を明らかにすることを目的として、研究を行った。本研究は *G. sulphuraria* の高濃度鉄耐性機構を生理・生化学的手法により研究することで、生物がどのように極限環境に適応するのかについて理解を深めることを目指す。

Materials and Methods

- (1) 培養: *G. sulphuraria* を 25 mM グルコースを含む培地で 8 日間培養し、OD₇₅₀ = 0.2 に希釈後、0, 0.3, 3, 30, 100, 300 mM になるように鉄を添加して培養を行った。鉄は全て硫酸塩として添加した。
- (2) 培養液上清の鉄濃度の測定: 培養液を遠心後、フィルター濾過して得られた上清について、フェナントロリン吸光光度法を用いて鉄の濃度を決定した。
- (3) 各種レクチン-FITC で染色後、顕微鏡観察を行った。
- (4) 遺伝子発現解析: 100 mM の鉄を添加してから 0, 1, 3, 6, 24, 48 時間後にサンプリングを行い、RNA を精製した。精製した RNA を mRNA-seq 解析に用いるとともに、鉄の代謝に関連することが予想される 7 個の遺伝子について RT-qPCR を行い、各遺伝子の発現量を比較した。

Results and Discussions

G. sulphuraria に添加する鉄の濃度を段階的に変えて培養したところ、100 mM までは増殖速度と最終 OD に変化は見られなかったが、300 mM では増殖が阻害された。3 mM 鉄添加条件では、鉄添加 1 日後から 2 日後の間に培養液中の鉄の濃度が 0.3 ± 0.1 mM まで急激に低下した。このとき、細胞表層にレクチンで染色される新たな構造が形成された。同様の構造は、100 mM 鉄添加条件では、1 日後にすでに形成されていたが、培養液中の鉄の濃度は 98 ± 3 mM であった。

これらの結果から、3 mM 鉄添加条件では、細胞が培地中の鉄を吸収し、細胞外の鉄濃度を減らすことで通常培養と同様に増殖するメカニズムが存在するのに対して、100 mM 鉄添加条件では、細胞が鉄を吸収するメカニズムに加えて、細胞外に大量の鉄が存在しても、通常培養と同様の増殖を可能にするメカニズムが存在することが予想された。

そこで、現在、100 mM 鉄添加後 0, 1, 3, 6, 24, 48 時間後に RNA のサンプリングを行い、mRNA-seq 解析を行っている。同様の RNA について、鉄の代謝に関連することが予想される 7 種の遺伝子について RT-qPCR を行ったところ、予備的なデータであるが、バクテリアからの水平転移によって獲得したと考えられるフェリチン様タンパク質の発現レベルの上昇が見られた。また、細胞内の活性酸素 (ROS) 除去系の酵素の発現レベルが変化しない、もしくは低下する一方、鉄添加後、細胞外分泌性の Class III ペルオキシダーゼの発現レベルが大きく上昇した。これらの結果は、細胞内に新規の鉄耐性機構があることを示唆すると同時に、細胞内外の ROS 除去システムの使い分けや ROS を利用した細胞を堅牢化する仕組みの存在が高濃度の鉄耐性に寄与していることを示唆する。

今後、mRNA-seq による遺伝子発現レベルの解析を進めるとともに、細胞内外の鉄の化学形態や分布について、 μ XAS を用いたイメージング分析や、細胞内外のキレーターや酵素活性などの生化学的な分析を進めることで、*G. sulphuraria* における高濃度の鉄耐性機構を明らかにしたい。

References

1. Schönknecht *et al.*, *Science* **339**, 1207–1210 (2013).
2. Baker *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6264–6271 (2004).
3. Yoshimura *et al.*, *Soil Sci. Plant Nutr.* **45**, 721–724 (1999).
4. Nagasaka *et al.*, *BioMetals* **16**, 465–470 (2003).