

高濃度アルミニウム存在下における単細胞性紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の増殖と細胞サイズの変化

上田 修也 (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

地球の地殻中に最も豊富に存在するアルミニウムは、中性環境ではケイ酸塩などの形態で土壌などに固定されるが、土壌や水の pH が低下するとアルミニウム(Al)イオンとして溶出し、数 mM の Al は多くの生物の成長を阻害する。

単細胞性紅藻イデユコゴメ綱 *Cyanidium caldarium* は、実験室内において 200 mM Al 存在下でも増殖することが報告されている(Yoshimura et al. 1999)。イデユコゴメ綱は、世界各地の温泉や火山地帯などの高温・強酸性条件 (56°C以下、pH 5 以下) に適応した極限環境生物の一種である。イデユコゴメ綱が生息する高温・強酸性条件では、金属は非常に水に溶けやすいため、高濃度の金属に対する耐性は生存のために重要であると考えられる。Al 耐性については、細胞内でポリリン酸が Al をキレートしていることが知られている (Nagasawa et al. 2002) が、その全容は明らかではない。

そこで、本研究ではイデユコゴメ綱に属する *Galdieria sulphuraria* および *Cyanidioschyzon merolae* を用いて、イデユコゴメ綱における高濃度 Al 耐性のメカニズムを明らかにすることを目的に研究を行った。*G. sulphuraria* と *C. merolae* は全ゲノム配列が決定されており、相同組換えによる形質転換が可能な優れた実験材料である。また、*C. merolae* は細胞壁を持たず、光独立栄養でのみ増殖するのに対して、*G. sulphuraria* は固い細胞壁を持ち、従属栄養で増殖でき、生理学的、形態学的特徴が異なる。

Materials and Methods

培養: 50 ml フラスコに 10 ml の *G. sulphuraria*, *C. merolae* をそれぞれ、初期濁度 $OD_{750} = 0.05$ となるように 2×Allen's medium (pH 2.5) で調整し、40 °C で振動培養した。*G. sulphuraria* は従属栄養 (暗条件, 25mM グルコース添加) もしくは、連続光(70 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$)を照射して、光独立栄養で、Al 濃度を 0-700 mM で段階的に変えて培養した。Al は硫酸塩として添加した。同様に *C. merolae* は Al 濃度が 0, 30, 100, 200, 300 mM となるよう Al を添加し、光独立栄養で培養した。光学顕微鏡 (OLYMPUS BX53) により細胞を観察した。

Al 濃度の測定: 培養液および、培養液を遠心分離により上清画分と細胞画分に分けたものを灰化处理し、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES)により Al 濃度を決定した。

Results and Discussion

Al の濃度を段階的に変えて *G. sulphuraria* を培養したところ、従属栄養、光独立栄養ともに 700 mM では増殖せず、500 mM では増殖したが、増殖が低下した。全ての Al 濃度で、従属栄養のほうが独立栄養よりも高い Al 耐性を示した。*C. merolae* は、30, 100, 200 mM Al 存在下では、通常培養条件 (0 mM Al 添加) よりも高

い増殖速度を示した。一方、300 mM Al 存在下では増殖しなかった。

ここまでの結果から、*G. sulphuraria* のもつ固い細胞壁が Al 耐性に寄与している可能性はあるが、イデユコゴメ綱における高濃度の Al 耐性には、細胞の代謝が重要であると考えられた。そこで、これ以降、細胞内の元素局在の解析や生化学的解析に優れた *C. merolae* を研究材料として、イデユコゴメ綱における高濃度 Al 耐性機構の詳細なメカニズムを調べることにした。

C. merolae について顕微鏡観察を行ったところ、全ての Al 濃度で、通常培養に比べて細胞サイズの縮小が観察された。Al 添加後 6, 14 日目の *C. merolae* 培養液、及び培養液を遠心分離して得た上清画分と細胞画分の Al 濃度を、ICP-AES により決定した。その結果、両方のサンプリング日で、全ての Al 濃度で、細胞画分の Al 量は通常培養と変わらず、添加した Al は主に培地上清に含まれていた。このことから、*C. merolae* は、Al の取り込みを抑制、あるいは排出を促進する機構を有しており、それが Al 耐性に主に寄与していると考えられる。

本研究では、*C. merolae* と *G. sulphuraria* も *Cyanidium* と同様に高濃度 Al 耐性をもち、*C. merolae* では、高濃度 Al 存在下で細胞サイズが縮小するが、200 mM 以下の Al が存在するときには増殖が促進されることをみいだした。さらに、高濃度 Al 存在下でも細胞画分の Al 濃度が上昇しなかったことから、先行研究とは異なる Al 耐性機構があることが示唆された。今後、本研究成果を手がかりに、イデユコゴメ綱における高濃度 Al 耐性の解明を目指す。

References

- Nagasaka et al. 2002 *Planta*, 215: 399-404.
Yoshimura et al. 1999 *Soil Sci. Plant Nutr.*, 45:721-724.