核磁気共鳴分光法で見た南極産藻類 *Dunaliella* の塩ストレス応答

神奈川県衛生研究所・¹⁾埼玉医科大学・²⁾国立予防衛生研究所
綿貫知彦・松下和弘¹⁾・加藤賢三²⁾

1. はじめに

南極昭和基地付近の露岩地帯にはいくつかの塩湖が点在する。その中で船底池は塩分濃度が海水の4~7倍ある海跡湖である。この湖に等長で2本の鞭毛を持つ長径10 μ mに満たない単細胞藻類 *Dunaliella* が夏季に水の華を形成する。

通常、緑藻類の *Dunaliella* 属は0.5~5.5Mまでの広いNaCl濃度範囲で増殖ができ、世界各地の汽水から高塩水湖まで分布している。この細胞は大量のglycerolを含み、細胞壁を持たないという特徴がある。このため希釈ストレスに曝されると細胞容積は増加する。塩ストレスに曝されると、直ちに細胞容積を減少する。しかし2~3時間後には前者ではglycerolを合成、後者ではglycerolを分解して元の体積に戻る。

Dunaliella は、このようなユニークなglycerolの合成・分解のメカニズムをもつことで有名である。また *D. acidiphila* という種類ではpH1.0の強酸性下でも増殖できる。いずれにしても薄い細胞膜で外界の強いストレスと応答している興味深い生物群である。南極産 *Dunaliella* 以外についてはすでに本属の総説がある¹⁾。

南極産 *Dunaliella* は、この属が一般に持っているglycerolの合成・分解のメカニズムの他に次のような生態上の興味がある。すなわち冬季の南極では太陽が出ないので、この気象条件下で生育できるためには遮光性と耐凍性があると推察できるからである。本稿では、Watanukiら²⁾によって南極の高塩水湖から初めて分離された *Dunaliella* sp. (以下、*D. sp.* と略)、および実験の一部ではGreat Salt Lake産の *D. primolecta* を用いて、細胞を生きたままの状態での化学的情報が得られるNMR(核磁気共鳴分光法)での結果を中心にして紹介したい²⁾⁻⁴⁾。

Response of Antarctic alga to salt stress, as measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy

Tomohiko WATANUKI, Kazuhiro MATSUSHITA¹⁾, Kenzo KATO²⁾

Department of Environmental Biology, Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories

¹⁾Medical Zoology, Saitama Medical School

²⁾Department of Enteroviruses, National Institute of Health

2. *D. sp.* の主要代謝産物は glycerol である。

D. salina を生きたままの状態では¹³C-NMRで測定し、主要な代謝産物が glycerol であることを示したのは Nortonら⁵⁾であった。生きたままの *D. sp.* と純正品の glycerol の¹³C-NMRシグナルを図1に示した。

いずれも Nortonらのシグナルに比して、より明瞭な2本のシグナルが得られた。ここで見られる2本のシグナルは、glycerolにおけるケミカルシフトの強度比が純正品 glycerol と全く同じである。したがってこの系は、生きたまま glycerol の動態を見る系として有用である。

3. *D. sp.* の glycerol 含有量は *D. primolecta* のそれよりも多い。

図2に、ガスクロマトグラフィーで測定した *D. sp.* と *D. primolecta* 細胞中の glycerol 量を示した。横軸に培地のNaCl量(%), 縦軸に細胞湿重量1g中の glycerol 量を示した。1.5, 3, 6および9% NaCl培地で培養した glycerol 量は、いずれのNaCl濃度でも *D. sp.* の方が高い値が得られた。この事は、*D. sp.* が南極の高塩水湖というきびしい環境に適応できた原因の一つであるとも考えられる。

4. ¹H-NMR から見た塩ストレスによる glycerol の変動

図3に *D. sp.* の¹H-NMRスペクトルを示した。内部基準物質TSP(1mM)がそれぞれの試料に入れている。ここで得られた glycerol のシグナル(A, B, C)は純正品 glycerol(D)と良く一致し、3% NaCl培地(B)から6% NaCl(A)への塩ストレスまたは、3% NaClから1.5% NaClへの希釈ストレス(C)による glycerol の増減も良く現れている。純正品 glycerol のケミカルシフトと *D. sp.* のそれが良く一致している。このことから、¹H-NMRで *D. sp.* の glycerol をリアルタイムで見る事が可能となり、生きたままの細胞に塩ストレスなどを与えた際の glycerol の分子運動が緩和時間(T₁, T₂)の値から解析が可能であると考えられる。

Deganiらの¹H-NMRによる測定では glycerol 以外は検出されていなかったが、我々の測定では glycerol のほかに、betaine, choline, lactateなどのシグナルも¹H-NMRで得られることがわかったので¹³C-NMRと同じように、この系は生きたまま glycerol と共に浸透圧調節に深く関係すると考えられている betaine や細胞膜の主要な構成成分である choline などの動態を見る系として有用である。培養温度や希釈ストレス等で細胞中の glycerol が漏れることが、いくつか報告さ

図1. 純正品のシグナルと南極産 *Dunaliella* sp. の ^{13}C -NMR グリセロールのシグナル 図2. 南極産 *Dunaliella* sp. (■) と *D. primolecta* (▲) の各塩濃度における glycerol 量
横軸: NaCl 濃度, 縦軸: 細胞 1 g (湿重量) の glycerol 量

れている。例えば, *D. teriolecta* で NaCl 濃度を 0.5 M から 0.25 M まで希釈した時, 細胞から培地中に glycerol が漏れることが報告されている⁷⁾が *D. sp.* では塩ストレス(a), 希釈ストレス(c)および 3 % NaCl

の各培地を, それぞれ20倍に濃縮して ^1H -NMR で測定した。いずれの条件でも glycerol の漏れは検出されなかったが, これが *D. sp.* の生理的特徴であるとする, 細胞膜の構造と機能という点で大変興味深い。

表1に塩ストレスによる glycerol 量の変動を知るために, *D. sp.* と *D. primolecta* を生きたままの状態では ^1H -NMR (基準物質 TSP) で測定した結果を載せた。いずれの場合も, 3 % NaCl 培地で培養した時の glycerol 量を1.00とした。表中の a は 3 から 6 % および 1.5 % NaCl へ, それぞれストレスを与え, 2 時間後の値。b は 1.5, 3 および 6 % NaCl 培地それぞれに別々に培養 (7 日) した時の glycerol の増減の割合を示した。*D. sp.* の 3 % から 6 % NaCl の塩ストレスと 6 % NaCl 培地での glycerol 量は, 3 % 時のそれぞれ 1.40, 1.39 と同様な値が得られたが, 3 % から 1.5 % NaCl の希釈ストレスでは a および b では両方に差が見られた。*D. primolecta* では *D. sp.* よりも glycerol の増減割合にそれぞれ差が見られ, 塩ストレスよりも希釈ストレスの方が影響が大きい。

5. *D. sp.* における ^{13}C -glucose の取り込み

D. sp. における ^{13}C -glucose の取り込み実験の結果を図4に示す。3 % NaCl 培地(B)で培養した *D. sp.* に ^{13}C -glucose 由来のシグナルが 100 ppm の位置に見られる。これは glucose が glycogen となって蓄積したものと考えられ, これを指標として, それぞれのスト

図3. 南極産 *Dunaliella* sp. の ^1H -NMRシグナル

A : 3 % から 6 % NaCl の 2 時間後における塩ストレス

B : 3 % NaCl 培地で培養 (コントロール)

C : 3 % から 1.5 % NaCl の 2 時間後における希釈ストレス

D : グリセロールの純正品

a : 3 % から 6 % NaCl の 2 時間後における塩ストレスの培養液

b : 3 % NaCl 培地で培養 (コントロール)

c : 3 % から 1.5 % NaCl の 2 時間後における希釈ストレスの培養液

ACE : acetone, ALA : alanine, BET : betaine, CHO : choline, GLY : glycerol, LAC : lactate, MEOH : methylalcohol, TSP : trimethylsilylpropionate.

表1 南極産 *Dunaliella* sp. と *D. primolecta* におけるストレスによる glycerol 量の変化. 3 % NaCl 培地の glycerol 量を 1.00, (a) : 3 から 6 % の塩ストレスまたは 3 から 1.5 % NaCl 培地への希釈ストレスを与えた場合, (b) : 1, 3, 3, および 6 % NaCl でそれぞれ別に培養した glycerol 量の増減率

Sodium Chloride (%)	Antarctic <i>Dunaliella</i>		<i>D. primolecta</i>	
	(a)	(b)	(a)	(b)
3	1.00	1.00	1.00	1.00
1.5	0.32	0.49	0.22	0.42
6	1.40	1.39	1.32	1.70

図4. 南極産 *Dunaliella* sp. に ^{13}C をラベルした場合の ^{13}C -NMR シグナル

A : 3 % から 6 % NaCl の塩ストレス, 2 時間後

B : 3 % NaCl

C : 3 % から 1.5 % NaCl の希釈ストレス, 2 時間後

ALA : alanine, CHO : choline, GLC : glycogen, GLU : glutamate, GLY : glycerol, LAC : lactate, $-\text{COO}^-$: carboxylate signals, $-\text{CH}=\text{CH}-$: signals due to unsaturated membranal carbons.

レス後の動態を見ることができる。

3 % NaCl 培地で培養した細胞を, 6 % の塩ストレス (B) および 1.5 % NaCl の希釈ストレス (C) を与えた時のシグナルから glycogen はエネルギー源として使用されていることがわかった. choline はそれぞれのストレスで有意な現象が見られ, 特に塩ストレスにおいて著しかった. choline は細胞膜の主な構成成分の一つであり, これらストレス調節に重要な役割をはたしている. このことはストレス応答における細胞膜の役割を考える上で興味ある知見である。

6. 終わりに

上述のように *Dunaliella* は硬い細胞壁を持たず, 弾力性に富んだ薄い細胞膜で包まれているという特徴がある. さらに, 外界のストレスに柔軟に対応できる, そのユニークな浸透圧調整機能は osmometer として大いに注目される. これらの特徴は, 例えば対数増殖

期の *D. sp.* を蒸留水で希釈してハイスピードビデオで観察すると、約80秒で鞭毛のある前部から破裂し、核などの細胞器官が飛び出すまで0.012秒⁸⁾と素早く反応するところにも表れている。*D. sp.* は極く薄い細胞膜で、極限に近い外界のストレスに対する調節機能を持っており、現在、塩ストレスばかりでなく強い耐凍性と共に遮光性のあることがわかってきた。

本種の代謝産物を指標として、生きたままの状態でも各種のストレスの影響を測定できるので、実験動物の代替になる可能性を秘めており、ストレス応答における細胞膜の役割を考える上で興味深い実験材料である。さらに、Avron ら¹⁾が述べているようにβカロチンを豊富に含むことから健康食品、医薬品、または食品の着色にも用い得る。また塩類や強酸に耐えられるので遺伝子操作で、不毛地帯でも生育できる作物の栽培も可能となろう。

仁科正実博士・堀栄太郎教授（埼玉医科大学）には

日頃からNMR研究に対して多大なご支援を頂き感謝いたします。

文 献

- 1) Avron, M., Ben-Amotz, A. (Eds.) (1992) *Dunaliella* CRC Press, Florida.
- 2) Watanuki, T., Nakamura, S., Ohno, M. (1987) *Rep. Usa Mar., Biol., Ins., Kochi Univ.*, 9, 130-147.
- 3) 綿貫知彦, 松下和弘, 加藤賢三 (1991) 体力・栄養免疫雑誌, 1, 1, 6-12.
- 3) Watanuki, T., Matsushita, K., Kato, K. (1993) *Bull., Soc., Sea Water Sci.*, 投稿中
- 5) Norton, R., Mackay, L., Borowitzka, J. (1982) *Biochem. J.* 202, 699-706.
- 6) Degani, H., Sussman, I., Peschek, G. A., Avron, M. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 690, 174-177.
- 7) Fujii, S., Hellebust, J. A. (1992) *Can. J. Bot.* 70, 1313-1318.
- 8) 上平恒 (1992) 科学朝日, 52, 9, 132-133.

S A N S A K U
さんさく
れ

タンパク質の結晶構造は溶液中の構造の

“スナップショット”?

膨大な数のT4リゾチームのミュータントのX線結晶解析を進めているオレゴン大学のB. W. Matthews らは、Met 6 を11eで置換したT4リゾチームの結晶は独立な分子を4個含んでおり、それらの立体構造が大きく異っていることを報告している(Faber & Matthews, *Nature*, 348, 263-266 (1990)). T4リゾチーム分子は2つのドメインから成り、くびれた部分によって蝶番のようにつながっている。野性型の構造と比較すると、4つの独立な分子の蝶番の角度は、それぞれ9.1°, 25.6°, 27.4°, 32.3°大きくなっている。酵素が阻害剤等を結合した場合やイムノグロブリンのような独立なドメインから構成されるタンパク質の立体構造の変化は知られていたが、一本のペプチド鎖から成る分子の立体構造の大きな変化をとらえたものとしては初めての例であり、コンホメーション変化の“スナップショット”であると報告している。

その後、同一結晶内ではないが部分的な二次構造転移を証明する報告がされている(Harata & Muraki, *J. Biol., Chem.*, 267, 1419-1421 (1992)). ヒトのα-ラクトアルブミンは同一条件下で2種類の結晶が生成する。X線結晶解析によると、その内の一つの結晶内では104~110番目のアミノ酸残基はα-ヘリックスを形成しているが、他の結晶ではその部分はループ構造である。これは、タンパク質の一部の二次構造が動的に変化していることを示した初めての例であり、二次構造変化の“スナップショット”といえる。

タンパク質結晶には多形が多く見られるが、通常X線結晶解析が行われるのはその内の一つである。もし、ある結晶内の構造が動的状態の“スナップショット”の一つにすぎないのであれば、得られた構造に対する化学的・生物学的考察等も注意深く行わなければならない。独立な分子が2個以上含まれるような結晶は解析上は敬遠されてきたが、分子の動的構造に関する情報を得るためには貴重である。種々の結晶から得られる“スナップショット”の組み合わせから動的状態にあるタンパク質分子の全体像が見えてくるのかもしれない。

(K. H.)