

セレン欠乏により誘導される円石藻細胞の元素含量の変動

小幡年弘¹⁾, 世良耕一郎²⁾, ニツ川章二³⁾, 白岩善博^{1), 4)}

¹⁾ 筑波大学大学院生命環境科学研究科
305-8572 つくば市天王台 1-1-1

²⁾ 岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173 岩手郡滝沢村字留ヶ森 348-58

³⁾ 日本アイソトープ協会滝沢研究所
020-0173 岩手郡滝沢村字留ヶ森 348-58

⁴⁾ 筑波大学生物科学系
305-8572 つくば市天王台 1-1-1

1 はじめに

円石藻はハプト植物門に属する海洋性植物プランクトンの一種であり、細胞表面にココリス（円石）と呼ばれる炭酸カルシウムを主成分とする特殊な構造体を持っている（図1）。全世界の海洋に大量に生育しており、巨大なブルーム（渦鞭毛藻による赤潮（red tide）に対して白潮（white tide）と呼ばれる）を起こす生物としても知られている。その円石形成および光合成により固定される炭素は莫大な量に達し、円石形成成分だけでも珊瑚礁や貝類の固定する炭素量に匹敵すると言われている。円石藻が固定した炭素化合物の一部は微生物による分解や溶解を免れて沈降し、その結果、海洋表面から海底へと炭素が輸送される。そのため、円石藻は生物ポンプとして機能する重要な生物と考えられており、その増殖速度の変動は、地球規模での炭素循環に多大な影響を与えるものと考えられている^{1), 2)}。我々は、円石藻が生育の必須微量元素としてセレンを要求することを既に見出し^{3), 4)}、そのことから、細胞内のセレン含量が円石藻増殖の制限要因となっているものと推測した。セレンは従来有毒元素としての研究知見が多く、特に光合成生物ではその有用性や必須性に関する研究は僅少であった⁵⁾。そこで、本研究ではPIXEによる円石藻細胞内のセレンの定量を行い、円石藻細胞におけるセレン濃縮の有無や、その含有量を明らかにすることを主目的とした。また、多元素を同時に分析できるPIXEの利点を生かし、セレン欠乏過程において引き起こされるセレン以外の元素の含量変化を網羅的に解析することも目的とした。それらの結果に基づき、セレンと生理的に密接な相互作用を示す元素やセレン含有化合物の探索と同定を行うことにより、円石藻細胞内におけるセレンの新規生理機能の解明を目指している。

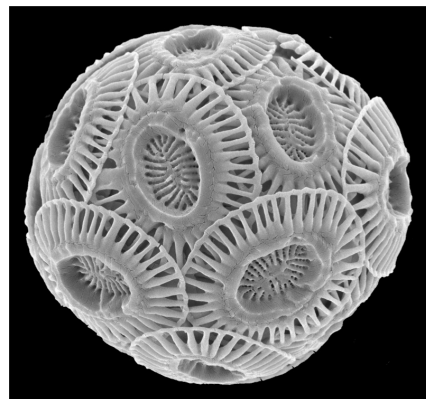


図1 円石藻 *Emiliania huxleyi* の走査型電子顕微鏡像

2 材料および方法

2.1 材料

円石藻 *Emiliana huxleyi* (Lohmann) Hay & Mohler は、1990年11月に海洋バイオテクノロジー研究所（東京）の蒼玄丸による採集航海において南太平洋で採集・単離された株を用いた。*E. huxleyi* 株の保存培養には、富化栄養塩としてESM添加培地および終濃度 10 nMの亜セレン酸ナトリウムを補強した天然海水培地を用いた^{3), 4)}。100 mL容三角フラスコ中に50 mLの培地を入れ、温度を20 °Cおよび光強度を20~30 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ に保ち、16時間明期/8時間暗期の明暗サイクル下で静置培養法により保存培養を行った。

2.2 培養条件

実験培養には人工海水 Marine Art SF-1（千寿製薬，大阪）に土壌抽出液を除いたESM添加培地（MA-ESM）を用い⁴⁾、扁平培養瓶中で通気培養を行った。通気流速、光強度および温度は、各々100 mL/min、70~110 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ および20 °Cとした。

2.3 細胞増殖の測定

）細胞懸濁液濁度

細胞懸濁液の濁度は、UV-2200分光光度計（島津）を用い、波長750 nmの吸光度（OD₇₅₀）を測定することにより決定した。

）細胞密度

細胞数は検鏡プレート（UR-157，高さ0.07 mm，積水メディカル）に細胞懸濁液を載せ、20倍の対物レンズで観察を行い、顕微鏡モニター（MC-31，スカラ社）の1視野中に含まれる細胞数を計測し、あらかじめ作製した以下の換算式から細胞数を計算した。

$$\text{細胞数 (個/mL)} = \text{観察細胞数} \times 4.762 \times 10^5$$

）細胞直径

検鏡プレートを用い、40倍の対物レンズで観察を行い、顕微鏡モニター（MC-31，スカラ社）で細胞を観察した画像を印刷し、細胞直径を定規で計測した。計測値をあらかじめ作製した以下の換算式に当てはめることにより細胞直径を計算した。

$$\text{細胞直径 (}\mu\text{m)} = \text{計測値} \times 1.89 \times 10^{-3}$$

2.4 PIXE分析

細胞懸濁液をOD₇₅₀ × 液量 (mL) = 20となるように採取し、50 mL容サンプルチューブ（No.352098，FALCON社）に入れ、1/2000容の20% Tween 20を添加した。シングローター遠心機 [R=60 (minimum), 107 (intermediate), 155 mm (maximum), TOMY社] を用いて、3,000 rpm [4,500 × g (maximum)] で10分間遠心分離し、細胞を回収した。更に、0.01% Tween 20を含む3% NaCl溶液（50 mL）に細胞を再懸濁し、再度遠心分離することにより、残存した培地成分を除去した。細胞画分（ペレット）を真空デシケーター中に2~3日間放置して完全に乾燥した後、150 μL の濃硝酸（精密分析用，和光純薬），と4 μL のIn標準液（1 mg/mL，原子吸光分析用，和光純薬）を滴下し、1時間放置することで細胞を溶解した。得られた細胞溶解液の全量を硝酸灰化用テフロン製容器に移し、電子レンジによる加熱（200 W，2分間）を2回行った。室温に一時間放置して冷却した後、シングローター遠心機を用いてテフロン容器を数秒間遠心した。得られた試料溶液のうち5 μL を4 μm 厚のポリプロピレン製バックリングフィルム上に滴下し、室温で一晩乾燥したものを測定試料とした⁶⁾。一方、硝酸湿式灰化処理を適用しない場合、培養から得た細胞ペレットに150 μL の蒸留水を添加し、そこに4 μL のIn標準液を加えて十分攪拌したものを試料とした。それを5 μL 取り、上と同様にバックリングフィルム上に試料を載せ、測定試料を作製した。

PIXE分析は日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンターにて行った。測定試料に小型サイクロトロンからの陽子ビーム(6 mm)を真空チャンバー内で試料に照射し、これにより発生した特性X線を低エネルギー用と高エネルギー用の2台のSi(Li)半導体検出器により同時に測定して、スペクトルを得た。高エネルギー用検出器には、X線吸収体として500 μm Mylarフィルムが装着された。プロトンの加速エネルギーは2.9 MeVで、スペクトルを収得した際のビーム電流値は30~60 nA、照射電荷量は20~60 μCであった。データの解析はPIXE専用スペクトル解析プログラム“SAPIX”を用いて行った⁷⁾。

3 結果および考察

3.1 円石藻 *E. huxleyi* 細胞の元素組成のPIXE分析

ストックカルチャーから継代した *E. huxleyi* を10 nMの亜セレン酸を含むMA-ESMで培養し、直線増殖期終期で培養を停止し、細胞内に含まれる元素量をPIXEで測定した(表1)。解析は人工培地の構成成分として添加されている元素についてのみ行った。硝酸灰化処理を行わなかった場合、前項に示したように、遠心により回収した細胞ペレットをMilli-Q水に懸濁し、内部標準を添加後、一定量をバックフィルムに滴下し、乾燥させ、PIXE測定用試料とした。しかし、回収した円石藻細胞のペレットは非常に粘性が高く、均一な試料が調製し難かったことに加え、軽元素からの連続X線バックグラウンドが増大し、Al, Mg, Fe, Sr, I, SeおよびMoでは十分な測定精度が得られず、正確な定量を行うことができなかった。更にWおよびCoに関しては全く検出不能であった(data not shown)。一方、硝酸湿式灰化処理を行った場合、Mg, Sr, FeおよびSeでは測定精度が向上し、Coは高精度で検出可能になったが、逆にIは全く検出されなくな

表1 人工海水MA-ESM培地中の元素組成と *E. huxleyi* 細胞の元素組成との比較

| Element | Medium (μg/mL) A | Cell (μg/mL cell) | Concentration factor (B/A) |
|---------|---------------------|-------------------|-------------------------------|
| | | Means ± SD B | |
| Mg | 1200 | 247 ± 51.3 | 0.206 |
| S | 835 | 1580 ± 179 | 1.89 |
| Ca | 382 | 1320 ± 85.5 | 3.46 |
| K | 362 | 1490 ± 101 | 4.12 |
| Br | 60.4 | 5.58 ± 0.700 | 0.0925 |
| Sr | 7.19 | 6.37 ± 0.691 | 0.886 |
| P | 0.889 | 1370 ± 106 | 1540 |
| I | 0.0535 | N.D. | - |
| Mn | 0.0414 | 18.6 ± 1.44 | 449 |
| Fe | 0.0354 | 133 ± 29.4 | 3770 |
| Mo | 0.0109 | 0.365 ± 0.447 | 33.5 |
| Al | 0.000894 | 30.2 ± 15.1 | 33800 |
| Se | 0.000790 | 0.605 ± 0.264 | 766 |
| W | 0.000111 | N.D. | - |
| Co | 0.000093 | 3.95 ± 1.09 | 43400 |

N. D., Not detected

った。硝酸湿式灰化法では、ハロゲン等の揮発性元素が飛散するため、揮発性元素を直目元素とする場合は、前処理に硝酸非処理を併用する必要がある。MA-ESM培地の元素組成とPIXEで測定した *E. huxleyi* の細胞内元素含量を比較すると、円石藻は微量元素として培地に添加されている Co, Al, Fe, Se, Mn および Mo の順にそれらの元素を高濃度に濃縮した(表1)。細胞内にセレンが均一に存在すると仮定し、実測した細胞直径から細胞体積を算出し、細胞内のセレン濃度を計算すると 7.66 μM となった。これは培地中セレン濃度の 766 倍にあたる。セレンの放射性同位元素である ^{75}Se を用いてセレン濃縮活性の解析を行った場合、セレン枯渇処理した細胞を用いて、3.2 nM $^{75}\text{SeO}_3^{2-}$ を培地中に加え、 ^{75}Se の取り込みが見かけ上停止した段階で細胞を収穫し、その放射活性を測定した。その結果、セレンの細胞内濃度は 7.7 μM であり、その濃縮率は約 3,000 倍であったとの結果が得られている⁵⁾。 ^{75}Se トレーサー実験の場合、一般に ^{75}Se 添加以前に蓄積していた Se-化合物への ^{75}Se の置換が完全である保証はなく、また、 ^{75}Se 添加前に細胞内のセレン化合物を完全に枯渇させることは困難であることや、細胞内で生合成されたセレン化合物中の ^{75}Se の比活性の正確な算出が困難であるため、細胞内濃縮率の測定には PIXE 法による定量がより正確であると考えられる。しかし、文献⁵⁾ で示した実験においては、より完全なセレン枯渇処理細胞を用いたため比放射活性の希釈が行われなかったことと、用いたセレンの比放射活性値が正確であったことから、円石藻細胞のセレン濃度は、本研究における PIXE による分析値とほぼ一致したものと考えられる。したがって、定常状態における円石藻 *E. huxleyi* の細胞内セレン濃度は 7.7 μM であることがより確実に示された。

Co の濃縮率が高い値を示した原因は、円石藻が Co を補欠因子とするシアノコバラミン(ビタミン B₁₂) を濃縮することによるものと考えられる⁸⁾。そのほか Fe および Mo の濃縮に関しては、それぞれ鉄イオウタンパク質(フェレドキシン)、ヘムタンパク質(ペルオキシダーゼ、カタラーゼ等)およびモリブデン含有タンパク質(硝酸還元酵素など)の補欠因子となっている等、光合成や N 固定に不可欠であるため、存在量が必要であることを反映するものと推測される^{9)・10)・11)}。また、一般に海洋性の微細藻類は Al を濃縮することが知られており、本研究においても円石藻で Al の高い濃縮率が得られた。ただし、微細藻類における Al の生理機能はまだ明らかにはなっていない¹²⁾。P に関しては、P が核酸等の生体高分子、ATP 等の中間代謝産物の主要な構成成分として存在量が多く、その濃縮率も高いものと考えられる。濃縮率の値は培地組成中の各々の元素の濃度と細胞内の蓄積量に依存する。人工海水を培養液として用いた場合、濃縮率のみから元素の有用性を論ずることはできない。しかし、天然海水を用いた培養実験やある海域で採集された植物プランクトンの元素含量とその海域の天然海水の元素組成との比較は、そこに生息する植物プランクトンの増殖を制御する無機栄養塩を特定するための方法として有効であろう。

表に記載された円石藻における細胞内濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL cell}$) の高い順に元素を並べると、S (1580), K (1490), P (1370), Ca (1320), Mg (247), Fe (133), Al (30.2), Mn (18.6), Sr (6.37), Br (5.58), Co (3.95), Se (0.605) および Mo (0.365) となる。これらは本円石藻細胞による要求度の高い順であり、光合成生物(植物)において必要度の高い S, K, P, Mg および Fe に加えて、ココリス形成に不可欠な Ca の細胞内濃度が非常に高いことが円石藻細胞の特徴となっていることが示された。

3.2 円石藻細胞の元素含量に与えるセレン欠乏の影響

1 nM (通常培地中の 1/10 の濃度) の亜セレン酸を含む MA-ESM で円石藻の前培養を行い、直線増殖期後期で細胞を遠心分離 [1,600 rpm (最大 800 \times g), 10 分, 20 μg] により回収し、部分的養分欠乏細胞を得た。それをセレン欠乏培地に再懸濁し、その細胞懸濁液を二分した。一方をそのまま(セレン欠乏条件)、もう一方には終濃度 10 nM の亜セレン酸を添加(セレン添加条件)し、培養を行った(図 2 A)。培養開始後 24 時間以降では、セレン欠乏条件下での増殖がセレン添加条件下におけるそれよりも低下したことから、その増殖低下はセレン欠乏に起因するものと考えられる(図 2 A)。各測定点における細胞の元素含量を PIXE 法により定量した結果、セレン添加条件下で培養した細胞のセレン含量が培養開始後 24 時間目で急激に増加し、その後一定値 (ca. 60 $\text{pg}/10^6\text{cells}$) を保ったのに対し、セレン欠乏条件下では細胞内セレン含量は増加せず、セレン欠乏条件下の約 5 分の 1 程度の低い値を維持した(図 2 B)。これらの結果は、セレン欠乏条件下では

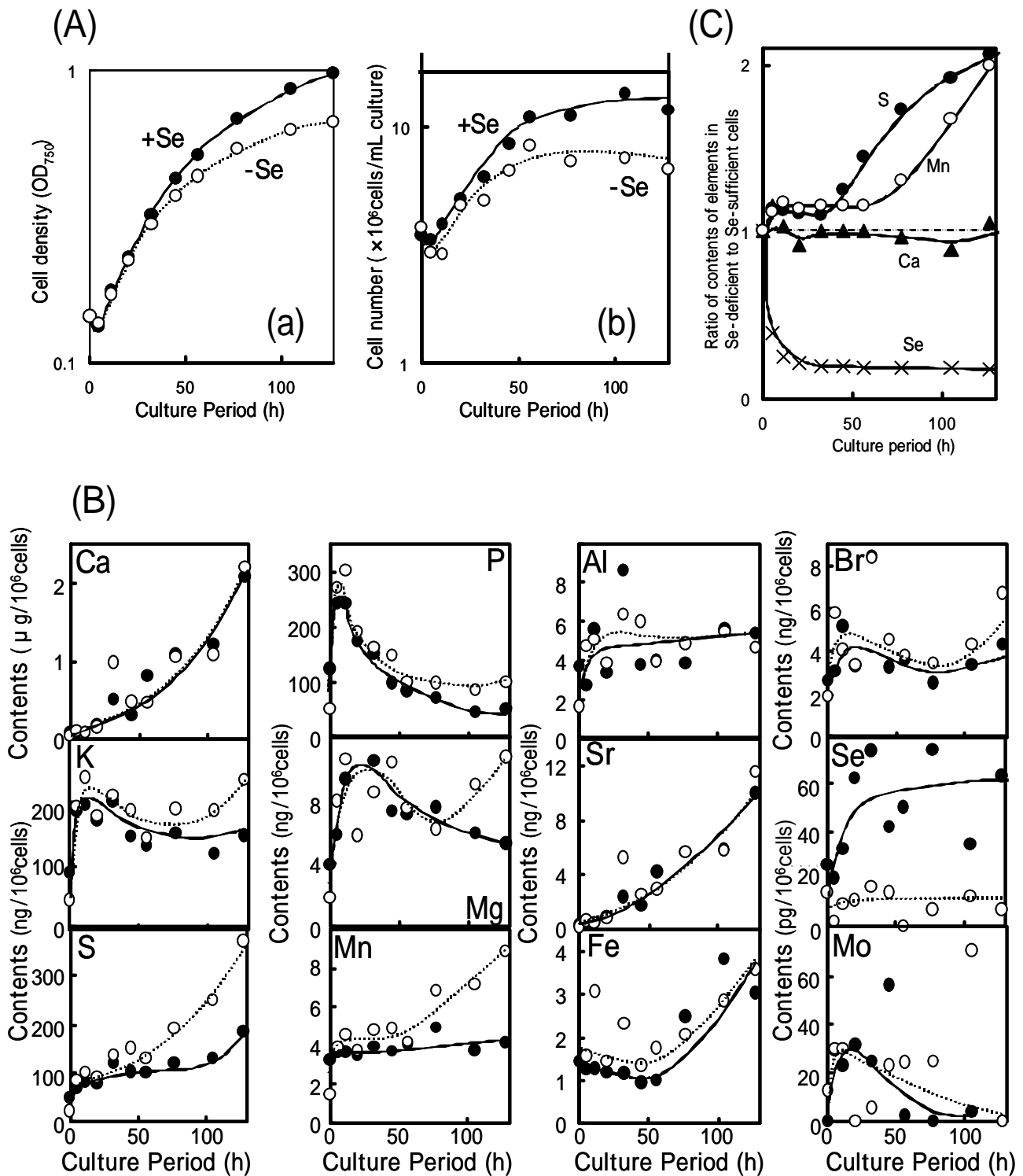


図2 セレン欠乏条件下での培養過程における細胞内元素含量の経時変化

(A), 10 nM 亜セレン酸添加条件 (+Se, (●)) およびセレン非添加条件 (-Se, (○)) での培養過程における細胞懸濁液の濁度 (a) および細胞密度 (b) 変化に基づく増殖曲線。(B), 細胞中元素含量の経時変化。(C), +Se 細胞に対する -Se 細胞の元素含量の比

細胞内セレン含量が大きく低下することを明らかに示すと共に、細胞増殖が停止してもなお、その濃度は低いものの、細胞内セレン含量がある一定のレベルを保ち続けることを示している。我々は既に、円石藻細胞に特有のセレン含有タンパク質（分子量 28.9 および 25.4 kDa）を見出し¹³⁾、それらのタンパク質がセレン欠乏条件下で Se を遊離するか、もしくはセレン含有タンパク質の量的減少により細胞増殖が抑制されるものと推測される。現在、セレン添加および欠乏条件においてそれらのタンパク質の挙動を解析することにより、円石藻細胞におけるセレンの生理的役割の解明を行っているところである。

一方、セレン以外の元素の挙動について解析したところ、その挙動は三種のパターンに区別できた。セレン欠乏による影響を受けなかった元素は Ca, K, Mg, Al, Sr, Fe, Br および Mo であり、セレン欠乏により細胞内含量が増加したものは、その程度に差はあるが、S, P および Mn であった。その中で、特に S と Mn の増加が著しく見られた。そして、セレン欠乏により細胞内含量が低下したものはセレンのみであった（図 2 B, C）。円石藻は細胞内石灰化機構を有し、CaCO₃ 結晶からなるココリスを形成する。したがって、Ca の含量は他の元素と比べ著しく大きく、その細胞内への取り込みは細胞増殖が進行するに従ってより大きく増大したが、セレン欠乏によっては影響されなかった（図 2 B）。この結果は、細胞増殖期後期に移行するに従って Ca の取り込みと CaCO₃ 結晶の形成が増大するが、ココリス形成とセレンとの関連性は低いことを示唆している。含量は少ないものの、細胞増殖の進行に伴って増大した元素には Sr および Fe があり、いずれも Ca と同様にセレン欠乏の影響を受けなかった。Sr は Ca の同族元素であり、環境要因にある程度影響されるものの、Ca のアナログとして細胞内に取り込まれ、利用されることが知られており、本結果もそれを支持する。バッチ培養においては細胞増殖の進行に伴い、種々の養分欠乏や細胞による光の遮断が生じ、増殖速度が低下することが一般的に知られている。図 2 の結果は、直線増殖期以降急激な P 欠乏が生じていることを明らかに示しており、増殖の低下（図 2 A）の原因の一つとして、少なくとも P 欠乏の可能性を示唆している。Mo もまた、その細胞内含量が少ないものの、P と同様の挙動を示したが、測定誤差が大きかったため、詳細な議論のためには更に詳細な分析を必要とする。ただし、Mo は N の同化系に不可欠な Mo-タンパク質である硝酸還元酵素（NR）の co-factor となっており、細胞内 Mo 含量の低下は N 欠乏に伴う NR の減少に起因する可能性も考えられる。S や P に関しては、他の光合成生物において、高濃度セレン条件におけるその取り込み量の減少^{14)・15)}、セレン添加による補完効果^{16)・17)}等が報告されていることから、セレンと何らかの相互作用を持つ可能性は高い。Mn は光合成光化学反応で水の分解を触媒する重要なタンパク質結合元素であることから、セレン欠乏が光化学系の機能の増大を引き起こした可能性が考えられる。その他、Mn はカタラーゼやスーパーオキシドジスムターゼ等、活性酸素消去系の酵素の活性因子になっていることから、セレン欠乏による抗酸化酵素系の活性低下を補完するために Mn の取り込み量が増加したことも考えられる¹⁸⁾。

謝辞

本研究は（社）日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター、岩手医科大学サイクロトロンセンターおよび筑波大学アイソトープセンターにおける共同利用研究として実施されました。また、本研究は財団法人日本科学協会より笹川科学研究助成（助成対象者；小幡年弘，研究番号 12-384M（平成 12 年度）13-381MK（平成 13 年度））を受けました。関係各位に深く感謝します。

参考文献

- 1) 白岩善博（2000）円石藻における光合成と石灰化. *月刊海洋*. 32: 412-417
- 2) 白岩善博（2001）光合成生物による石灰化と地球 CO₂ 環境. *日本結晶成長学会誌*. 28: 53-60

- 3) Danbara, A. and Shiraiwa, Y. (1999) The requirement of selenium for the growth of marine coccolithophorids, *Emiliana huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica* and *Helladosphaera* sp. (Prymnesiophyceae). *Plant Cell Physiol.* 40: 762-766
- 4) 檀原明子, 白岩善博 (1999) 円石藻 *Emiliana huxleyi* のセレン要求性と生育培地の選択. *日本海水学会誌.* 53: 476-484
- 5) 岩本浩二, 白岩善博 (2001) 海洋生物における微量元素セレンの生理機能. *バイオサイエンスとインダストリー.* 59: 22-25
- 6) ニツ川章二. (2000) Bio-PIXE その理論と応用 第2章 生物試料定量分析のための試料調製 (1) 生体試料のための電子レンジを用いた硝酸湿式灰化法. *RADIOISOTOPES.* 49: 447-450
- 7) Sera, K., Yanagisawa, T., Tsunoda, H., Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Saitoh, Y., Suzuki, S. and Orihara, H. (1992) Bio-PIXE at Takizawa Facility (Bio-PIXE with a Baby Cyclotron). *Int. J. PIXE* 2: 325-330
- 8) Miyamoto, E., Watanabe, F., Ebara, S., Takenaka, S., Takenaka, H., Yamaguchi, Y., Tanaka, N., Inui, H. and Nakano, Y. (2001) Characterization of a vitamin B12 compound from unicellular coccolithophorid alga (*Pleurochrysis carterae*). *J. Agricul. Food Chem.* 49: 3486-3489
- 9) 上山憲一, 中村晃 (1995) 鉄硫黄タンパク質とそのモデル錯体. 季刊化学総説 No. 24 生物無機化学の新展開. p. 44-60. 学会出版センター
- 10) 渡辺芳人, 石森浩一郎, 森島績 (1995) ヘム酵素の機能発現と構造因子. 季刊化学総説 No.24 生物無機化学の新展開. p.61-86. 学会出版センター
- 11) 西野武士 (1995) モリブデン含有酵素の構造と機能. 季刊化学総説 No.24 生物無機化学の新展開. p. 148-154. 学会出版センター
- 12) Sacan, MT. and Balciöđlu, IA (2001) Bioaccumulation of aluminium in *Dunaliella tertiolecta* in natural seawater: aluminum-metal (Cu, Pb, Se) interactions and influence of pH. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66: 214-221
- 13) 小幡年弘, 岩本浩二, 白岩善博, 中島栄一, 河合賢司, 進藤英世 (2000) ラジオルミノグラフィ (RLG, 放射線測定ルミネッセンス輝尽性発光技術) 17. イメージングプレート (IP) によるダブルラベル試料の分析. *RADIOISOTOPES.* 49: 623-636
- 14) Moede, A., Greene, R. W. and Spencer, D. F. (1980) Effects of selenium on the growth and phosphorus uptake of *Scenedesmus dimorphus* and *Anabaena cylindrica*. *Emv. Exp. Bot.* 20: 207-212
- 15) Wheeler, A. E., Zingaro, R. A. and Irgolic, K. (1982) The effect of selenate, selenite, and sulfate on the growth of six unicellular marine algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 57: 181-194
- 16) Eriksson, C. and Pedrós-Alió, C. (1990) Selenium as a nutrient for freshwater bacterioplankton and its interactions with phosphorus. *Can. J. Microbiol.* 36: 475-483
- 17) Williams, M. J., Ogale, R. S., Knight, A. W. and Burau, R. G. (1994) Effects of sulfate on selenate uptake and toxicity in the green alga *Selenostrum capricornutum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 449-453
- 18) 成田吉徳 (1995) 含マンガンタンパク質 (モデル系). 季刊化学総説 No.24 生物無機化学の新展開. p. 133-146. 学会出版センター