

Fe 欠乏により引き起こされる微細藻類の細胞内元素組成の変化

—細胞内元素ホメオスタシス解析へのアプローチ—

松澤敏広¹⁾、世良耕一郎²⁾、二ツ川章二³⁾、白岩善博¹⁾

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ンセンター
020-0173 岩手郡滝沢村留ヶ森 348-58

³⁾ 日本アイソトープ協会アイソトープ部
113-8941 文京区本駒込 2-28-45

1 序

光合成生物が Fe 欠乏条件に晒されるとその生育や細胞の生理状態が変化し、様々な応答を示すことが知られている。その例としては、多くの生物で見られるクロロシスやシアノバクテリアにおける集光性タンパク質の集合体であるフィコビリソームの減少等があり¹⁻⁴⁾、これは Fe が電子伝達系を構成するチトクロームの機能原子であることに深く関わることに起因すると考えられる。さらに、Fe 欠乏に対する細胞の応答として、Fe³⁺を還元して Fe²⁺を生成するフェリックスレダクターゼの活性を強く発現させて不足した Fe²⁺を補おうとする反応が生じることも知られている。その他、Fe はミトコンドリアにおける呼吸鎖においてもチトクロームタンパク質の機能分子として重要な役割を果たしており、その欠乏の影響は単に光合成反応にのみ限定されるものではない。このように Fe 欠乏に対する光合成生物の応答は多様であり、かつ複雑である。

細胞には Fe に加え多くの金属元素が含まれており、それらが補酵素や酵素の活性中心に配位して機能している。酵素発生に関わる光化学系 II の Mn クラスターや CO₂ 濃縮機構に関わるカルボニックアンヒドラーゼの反応中心の Zn などがその例である。これまで光合成生物を用いての個々の元素の欠乏実験はなされてきたが、特定の元素を欠乏状態にした場合の他の元素、特に金属元素を中心とする触媒機能性元素の動向についての解析例は少ない。本研究においては、光合成電子伝達系および呼吸鎖において中心的役割を果たしている Fe を欠乏状態にした場合、その影響が単に Fe 含量の低下にのみ起因するものとして現れるのか、他の元素含量も変化して、その結果、何らかの特別な影響がもたらされるものかについて定量的解析を行い、細胞における元素バランス、すなわち元素のホメオスタシス維持機能の存在を明らかにし、その解析をしたものである。このような研究を遂行するためにはより多くの微量元素を網羅的にかつ高感度で測定することが不可欠である。Bio-Particle Induced X-ray Emission (Bio-PIXE) 法は正にその目的を達成するために適した解析技術であり、その点で本研究は Bio-PIXE 法の導入をもってはじめて可能になった研究と位置付けることができる。

研究材料として光合成モデル生物である単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を用いた。*C. reinhardtii* は核、ミトコンドリア、葉緑体の遺伝子操作が可能であり、多くの変異株が既に作製されている⁶⁾。ま

た Expressed Sequence Tag (EST) 解析も既に行われており、遺伝子レベルの解析が可能となっている。したがって、このような生物を用いて研究を行うことは、Fe 欠乏に対する光合成生物の応答を単に元素含量の変化の解析に止らせることなく、さらに詳細に解析することを可能にし、光合成生物における元素ホメオスタシス機構を知るためのひとつのモデルとなるものと期待される。

本研究では *C. reinhardtii* 137c 株 (野生株) を用いて、Fe 欠乏条件下における細胞内の元素含量について多元素同時分析法による網羅的かつ経時的な解析を行った。その方法として Bio-PIXE 法を用いて多元素分析を行い、元素含量を網羅的に解析したので報告する。

2 材料および方法

2.1 材料

本研究で用いた単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 137c は神戸大学の坪由宏教授から新潟大学の武田宏教授を経て譲り受けた。本藻は TAP⁷⁾ 培地を含む寒天斜面上で 16 時間明期、8 時間暗期の明暗周期を与え、温度 20°C で保存培養した。生理実験に用いるため、細胞を得るための通常培養は 500 mL 容扁平培養瓶を用いて、流速 200 mL · min⁻¹ で通常大気を通気し、光強度を 150 μmol photon · m⁻² · sec⁻¹、温度を 25 °C、連続光照射条件下で 30 mM MOPS を添加した HS 培地 (HSM)⁸⁾ を用いて行った。細胞を斜面寒天培地から 100 mL 容三角フラスコ中の 50 mL HSM に接種し、4 日間培養した。

2.2 Fe 欠乏実験における培養

通常培養から Fe 欠乏条件に移行させる培養は以下のようにして行った。500 mL の HSM 中でクラミドモナス細胞を通気培養し、細胞懸濁液を 250 mL ずつに 2 分し、各々を 10 分間遠心 (3000 rpm、25 °C) し、細胞を回収した。それぞれの細胞を 5 mL の FeSO₄ · 7H₂O (18 μM) を非添加の Fe 欠乏 HSM (HSM-Fe) に懸濁し、細胞のみを遠心回収する作業を 2 回繰り返し、前培養から持ち込んだ Fe を十分に除去した。初期濁度 (OD₇₅₀) が 0.1 程度になるようにそれぞれ 1.5 L の HSM (Control) および HSM-Fe (-Fe) に再懸濁して扁平培養瓶中で通気培養し、経時的に細胞を回収した。尚、回収直前の細胞と各々の培地へ懸濁した直後 (本操作には 12 分を要した) の細胞をそれぞれ 0 時間細胞および 0.2 時間細胞とした。

2.3 細胞増殖およびクロロフィル濃度の測定

2.3.1 細胞懸濁液の濁度

分光光度計 (UV-2200、島津製作所) を用い波長 750 nm の濁度 (OD₇₅₀) を測定することで細胞密度、すなわち細胞の増殖の変化を調べた。

2.3.2 クロロフィル濃度

クロロフィル濃度は常法に従い、分光光度計を用いて決定した⁹⁾。細胞懸濁液を 2 mL 採取し、微量遠心機 (MX-160、トミー精工) で 13000 rpm、5 分間遠心を行った。1.8 mL 上清を除去し、得られた沈殿を超音波破碎 (Bransonic B1200、ヤマト) し、1.8 mL メタノールを加えた。その後ヒートブロック中で 50 °C、暗中で 5 分間静置することでクロロフィル抽出を行い、13000 rpm で 5 分間遠心し、上清を得た。上清の OD₇₅₀、OD₆₆₅、および OD₆₅₀ を分光光度計で測定し、クロロフィル濃度 (μg · mL⁻¹) を、計算式 $25.5 \times (OD_{650} - OD_{750}) + 4 \times (OD_{665} - OD_{750})$ から求めた。

2.4 元素分析

2.4.1 試料調製

種々の条件で培養した後、細胞懸濁液 (液量 (mL) = 5 / OD₇₅₀) を採取し、50 mL 容サンプルチューブ中に、Tween 20 を終濃度 0.1 % となるように添加した。スイングローターにて 10 分間遠心 (3000 rpm、

25 °C) 分離を行い、細胞を回収した。更に細胞を脱イオン水 (5 ml) に再懸濁し、遠心分離した。この脱イオン水による洗浄作業を再度繰り返し、培地成分を除去した。全ての元素分析操作のために用いたガラス器具は、あらかじめ前処理として全て硝酸による酸洗浄を行った。

2.4.2 Bio-PIXE 法

小幡らの方法¹⁰⁾に従い、以下の方法で行った。細胞画分をガラス棚内部で1日静置し、乾燥した細胞に68 µLの濃硝酸と2 µLのIn標準液(1000 ppm、和光純薬)を滴下し、1時間溶解させた後、硝酸灰化用テフロン製容器へと移した。電子レンジによる加熱(200 W、2 min)を2回行った。室温に放置して1時間放熱させた後、スイングローター遠心機にてテフロン容器を3000 rpm (4500×g (maximum))で1分間遠心した。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、室温で一晩乾燥させたものを測定試料とした。小型サイクロトロンから陽子ビーム(6 mm φ)を試料に照射し、発生した特性X線を2台のSi (Li) 半導体検出器により同時に測定した。Bio-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(NMCC)にて行った。

3 結果

C. reinhardtii をFe欠乏条件(HSM-Fe培養)で培養し、経時的に細胞増殖、クロロフィル濃度および元素含量を解析し、Fe十分条件下(HSM培養)で培養した細胞と比較した。いずれの条件とも200時間までは差異なく細胞増殖およびクロロフィル濃度が増加した。その後HSM-Fe培養ではクロロフィル合成能の低下が見られ、それに伴って細胞増殖も264時間以降停止した(Figure 1)。Bio-PIXE法により元素含量を測定したところ、Fe欠乏条件下でFe含量は培養開始時より継続的に減少し、384時間でFe十分条件下の10%まで減少した(Table 1)。Fe欠乏条件下の細胞におけるFe以外の元素含量をFe十分条件下での元素含量と比較したところ、264時間でP、Mg、Ca、Zn、K、は75%まで減少し、Sは時間と共に減少速度が大きくなる傾向を示し、最終的に50%まで減少した。一方、CuはFe欠乏後直ちに減少する傾向を示し50%にまでその含量を低下させた。最もFe欠乏の影響を受けたのはMn含量であり、150時間までにFe十分条件下の含量と比べて2%にまで減少した(Table 1)。これらの元素でFe欠乏条件下において培養開始時よりその含量が顕著に減少したのはMn、FeおよびCuの順であった。細胞の増殖が完全に止まった264時間において、Fe欠乏条件下におけるこれら3種の元素含量をFe十分条件の含量と比較したところ、FeおよびCuでそれぞれ20%および50%であったのに対し、Mn含量は2%にまで減少した。本結果よりFe欠乏条件下で最も影響を受ける元素がMnであり、Fe欠乏条件下では細胞内のMn含量が速やかに減少することが明らかになった。

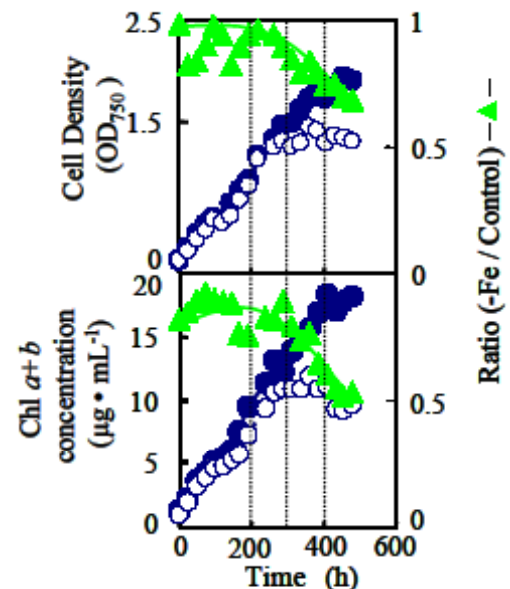


Figure 1. Fe欠乏条件下での細胞の密度及びクロロフィル濃度の経時変化。●, HSM培養条件(Control); ○, HSM-Fe培養条件(-Fe); ▲, -Fe/Control比

4 考察

Bio-PIXE法を用いた元素分析によって網羅的な元素組成の変化を経時的に解析した結果、Fe欠乏条件下においてMn含量の減少が著しく起こることが明らかになった(Table 1)。一方、⁵⁴Mnを用いてパル

スーチェイス実験を行うことで、細胞内の Mn の挙動と培地中への Mn の放出を検証した。通常培養で ⁵⁴Mn を取り込ませた細胞を Fe 十分条件 (HSM) および Fe 欠乏条件 (HSM-Fe) で 4 日間培養したところ、細胞増殖に差異は見られなかったが、Fe 十分条件下と比べて Fe 欠乏条件下では細胞体積あたりの Mn 含量が約 25% まで減少し、培地中への Mn 放出量が約 2 倍増加した (未発表)。これらの結果を総合して、緑藻 *C. reinhardtii* は Fe 欠乏条件下で速やかに Fe 含量を低下させると同時に細胞内の Mn を細胞外へと放出することを示唆する。Fe と Mn は葉緑体に多く局在し、光合成における光化学系 II を構成する主要な元素であることが知られている。また、クロレラは Mn 欠乏でクロロシスは起こさないものの、光合成の阻害を起こすことが明らかとなっている¹¹⁾。本研究の結果から、Fe 欠乏によって引き起こされる光合成の阻害は、Fe および Mn 含量の減少による相乗的影響が大きく、Fe 欠乏条件が Mn 欠乏を誘導し、それによって光合成および生育に影響を与える可能性が考えられる。Fe が細胞内で不足した場合、光合成器官では Fe-S クラスターを含むフェレドキシンや Fe を含むシトクロム等の数が制限されることが予想される。フェレドキシンやシトクロムが不足すると光合成活性が低下し、還元物質の生産や ATP 合成量の低下を招くほか、光化学系 II から I への電子伝達の阻害が生じ、光化学系 II より電子を受容して生産されたプラストヒドロキノンが飽和し、いわゆる光阻害がもたらされることになると考えられる。そのため、光化学系 II における水分解反応に関わる Mn を放出し、光化学系 II の活性を低下させ、電子伝達系をその根元でブロックして光阻害を軽減することで細胞を保護している可能性が考えられる。今後は Fe 欠乏で減少する Fe 結合タンパク質や Mn タンパク質の同定と定量的解析や、Fe 欠乏回復時に誘導されるタンパク質の同定、さらには Mn の放出メカニズムに関連するメカニズムを解析していくことにより、これらの制御機構を明らかにできるものと期待される。

Table 1 Bio-PIXE分析によるFe欠乏条件下でのクラミドモナス細胞内元素含量の経時変化。

元素種	培養条件	細胞内元素含量 [$\mu\text{g} \cdot (\text{g dry weight})^{-1}$]					
		0 h	0.2 h	48 h	96 h	168 h	264 h
Fe	+Fe	487	473	228	158	241	343
	-Fe	487 (100) ^a	184 (39)	115 (50)	76 (48)	64 (27)	64 (19)
Mn	+Fe	611	406	454	474	662	793
	-Fe	611 (100)	291 (72)	68 (15)	24 (5)	16 (2)	19 (2)
Cu	+Fe	49	30	43	34	56	31
	-Fe	49 (100)	25 (82)	31 (74)	51 (150)	31 (55)	24 (49)
Zn	+Fe	125	75	78	60	79	87
	-Fe	125 (100)	53 (72)	74 (96)	79 (131)	77 (98)	81 (92)
Mg	+Fe	1585	2098	2027	1456	1970	1835
	-Fe	1585 (100)	1997 (95)	2504 (124)	1736 (119)	1848 (94)	2034 (111)
K	+Fe	4950	3877	4095	2687	3544	3731
	-Fe	4950 (100)	3161 (81)	3772 (92)	2483 (92)	2588 (73)	2758 (74)
Ca	+Fe	7070	4785	6211	4037	3840	3400
	-Fe	7070 (100)	3849 (80)	5794 (93)	4340 (108)	2766 (72)	2529 (74)
S	+Fe	7877	7102	5036	2919	3542	6853
	-Fe	7877 (100)	5834 (82)	4612 (92)	2987 (102)	2561 (72)	3647 (53)
P	+Fe	22256	18550	22243	16166	16810	17477
	-Fe	22256 (100)	16207 (87)	22609 (101)	16718 (103)	12726 (76)	14786 (85)

^a()内は、-Fe/+Fe の比を%で示す。

謝辞

本研究は、日本アイソトープ協会仁品記念サイクロトロンセンター (NMCC) および筑波大学研究基盤センターアイソトープ部門の共同利用研究として実施された。関係各位に深謝する。

参考文献

- 1) Spiller, S. and Terry, N. (1980) Limiting factors in photosynthesis.II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. *Plant Physiol.*, 65, 121-125.
- 2) Terry, N. (1980) Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity in vivo. *Plant Physiol.*, 65, 114-120.
- 3) Straus, N. A. (1994) *Iron Deprivation: Physiology and Gene Regulation*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- 4) Guikema, J. A. and Straus, N.A. (1983) Influence of iron deprivation on the membrane composition of *Anacystis nidulans*. *Plant Physiol.*, 74, 90-95.
- 5) Eckhardt and Buckhout, (1998) Iron assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* involves ferric reduction and is similar to strategy I higher plants. *J Exp Bot.* 49, 1219-1226.
- 6) 下河原浩介 (1999) “緑の酵母”クラミドモナス. *科学*. 69, 125-133. 岩波書店.
- 7) Gorman, D.S. and Levine, R. P (1965) Cytochrome f and plastocyanin : their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 54, 1665-1669.
- 8) N. Sueoka (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 46, 83-91.
- 9) 西澤一俊, 千原光雄 編 (1979) 藻類研究法, 共立出版.
- 10) 小幡年弘, 世良耕一郎, 二ツ川章二, 白岩善博. (2001) 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. *NMCC 共同利用研究成果報文集*. 9, 137-143.
- 11) マルク・ヤーコヴィレッチ・シュコーリニク 著, 藤原彰夫 監修, 原田竹治 訳. (1982) 植物の生命と微量元素 社団法人 農山漁村文化協会 146-159.