

ラン藻体内のメタロチオネイン誘導に対する環境因子の効果

Environmental Effects on the Induction of Cyanobacterial Metallothionein under Heavy Metal Stress

高 寺 喜久雄*・外 山 恭 央**・渡 辺 正*
Kikuo TAKATERA, Yasuo TOYAMA and Tadashi WATANABE

1. は じ め に

近年、工業の進歩に伴って地表における重金属の濃度は増加しつつある¹⁾。かつての重金属放出源は鉱山の採鉱場や工場排水に限られていたが、最近では生活排水から環境中への放出、酸性雨による土壌成分からの溶出²⁾も無視できなくなっている。重金属汚染は緩慢に進行するため気づきにくく、いったん生じるとその影響が長年月に及んで残留し、われわれの社会生活をも脅かしかねない。

重金属ストレスが過度に加わると生物は死滅しときに生態系が変わるほどの影響も出るが、致死量に至らないまでのストレスに対しては生体防御機能が働き、重金属を解毒することが知られている。重金属の解毒に重要な働きをしている物質がメタロチオネイン (MT) と呼ばれるタンパクである³⁾。MT はシステインを多く含み、銅・亜鉛・カドミウムなどの重金属イオンに高い親和性を示し、分子量は比較的小さい。MT は下等生物から高等生物まで広範囲に存在し、重金属ストレス下で体内に誘導されて、重金属の輸送⁴⁾・貯蔵⁵⁾・解毒⁶⁾に本質的な役割を演じると考えられている。

MT に関するこれまでの研究の多くは、個々の重金属がどのようにまたどれほどの量の MT を誘導するか注目したものである。しかし、酸性雨、温暖化、オゾン層の破壊などの深刻な環境破壊が進みつつある今日、重金属ストレスが生体に及ぼす影響は、重金属と生体との観点のみからではなく、その生体がおかれている環境あるいは将来予測される環境変化との複合的な観点から捕える必要がある。とくに河川や湖沼の生物は周りの環境から影響を直接に受けるため、この種の研究は重要である。

そこで本研究では、生体中における MT 誘導に環境因子がどのような影響を及ぼすかについて検討した。検

討した環境因子は光、温度、水素イオン濃度 (pH) である。生体試料にはラン藻を用いた。ラン藻は水系の生物の食物連鎖における一次食物として重要な位置を占めるほか、光独立栄養原核生物として光合成を行い、高等植物に類する光合成器官を保持しているため、分子レベルでの MT 誘導過程を測定する理想的な系となる。MT の分離・定量方法としては高速液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析法 (HPLC-ICP/MS) を用いた^{7)~10)}。

2. 実 験

図 1 に装置の概略を示す。高速液体クロマトグラフ (HPLC) (日本分光製 880-PU) の溶出口を誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP/MS) (セイコー電子製 SPQ6100) の試料導入口に直結し、ICP/MS を HPLC の元素検出器として用いた。HPLC にはゲル濾過カラムの Asahipak GFA-30F (300mm×7.5mm i.d.) を、溶離液は 0.2M (NH₄)₂SO₄ および 1 mM EDTA を含むトリス緩衝液 (pH7.5) を用いた。流速は 0.8 ml/min、温度は 23°C、1 回のサンプル注入量は 20μl である。スイッチングバルブの切り替えで、HPLC またはフローインジェクション分析 (FI) モードに設定できる。分析は HPLC でを行い、すべての成分が溶出した時点で FI に切り替えて既知濃度の金属標準液を注入し、それぞれのピーク面積から MT 中の金属含量を算出した。ラン藻 (*Synechococcus* strain, *Anacystis nidulans* R-2) は、重金属を含まない培養液中で培養し、対数成長期の終了した時点 (培養開始から約 3 週間後) で、重金属 (Cd²⁺ (10μM), Zn²⁺ (1μM)) を加え、それぞれの培養環境

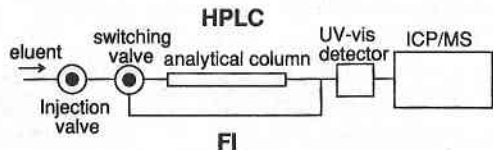


図 1 HPLC-ICP/MS 装置構成。

*東京大学生産技術研究所 第 4 部

**埼玉工業大学 環境工学科

研究速報

において一定時間経過後、収穫破碎し、HPLC-ICP/MSによりMT中のCdを定量した。Cdは質量数114で検出を行った。ラン藻からMT含有画分の分離は既報に従った⁸⁾。

3. 結果と考察

3.1 光の影響

重金属添加後、蛍光灯下(約1000 lx)で培養したラン藻体内のMT含有画分が時間とともにどう変わるかをHPLC-ICP/MS法で測定した。典型的なクロマトグラムを

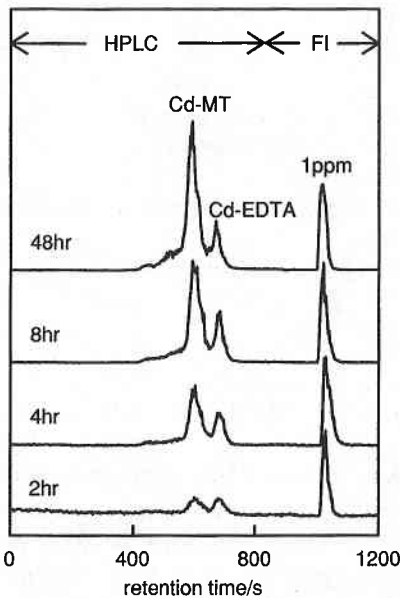


図2 Cd添加後の経過時間に対する、ラン藻細胞超音波ホモジェネート可溶性画分のHPLC-ICP/MSクロマトグラムの変化。(蛍光灯下で培養)

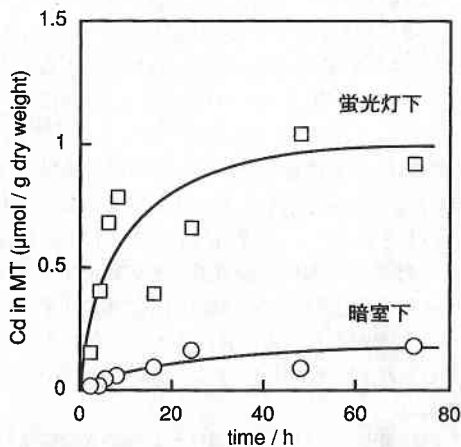


図3 ラン藻のMT誘導に及ぼす光の影響。

ラムを図2に示す。Cd-MTは580sに検出された。660sの小さなショルダーピークは遊離Cd²⁺が溶解液に含まれるEDTAと結合してCd-EDTA錯体の形で溶出したものである。同様な測定を暗室下についても行い、その経時変化を図3にプロットしてある。暗室下では蛍光灯下に比べMTの誘導量が約1/5に減少した。一般に植物は光(光合成)あるいは酸素(呼吸)によってエネルギーを獲得しタンパクの生合成を行っているが、この測定結果より、ラン藻のMT誘導に関する主な代謝過程が光合成に由来するものであると示唆される。

ラン藻は、通常、培養液よりも格段に高い濃度のイオンを体内に含有し、また膜電位は外部溶液に対して負に荷電している。-60mVから-200mV程度のこの電位差を維持するためにエネルギーが消費され、その結果として大部分のカチオンは、通常、化学的な濃度勾配には逆らっていながら電気化学的勾配に従って細胞へ受動的にとりこまれている。暗室下においてこの膜電位は照射下に比べ約20mVだけ正側にシフトし、そのため電気化学的勾配が減少することが知られている¹¹⁾。これによりラン藻体内へのCdの取り込みが抑制され、MTの誘導量が減少した可能性もある。

3.2 温度の影響

ラン藻が成長する上で、温度は重要な働きをする。高温や低温のストレスに対しラン藻は成長あるいはタンパクの合成パターンを変化させて、これらの変化に適応しようとする¹²⁾。図4は重金属を添加した後、照射下、培養温度5, 23, 35°CにおいてMTの誘導量の経時変化をプロットしたものである。用いたラン藻(A. nidulans R-2)の場合、23°C前後の温度がMT誘導効果をもっとも高く、それよりも低温または高温にさらされる

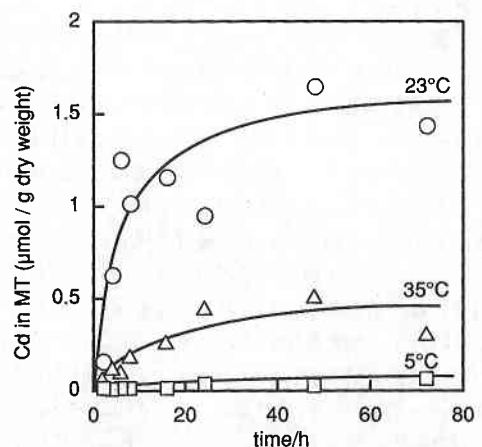


図4 ラン藻のMT誘導に及ぼす温度の影響。

研究速報
とMT誘導が抑えられることがわかる。特に低温においてその影響は顕著である。

一般に温度に対する植物の生理活動変化は、温度上昇が生化学過程に対して2つの相互に拮抗する仕方の影響を及ぼすために生じる¹³⁾。すなわちまず第一に、細胞の温度が上昇すると、反応性分子の運動速度が増大し、分子間の衝突頻度が増加して反応速度が速くなる。一方、細胞内における反応はすべて酵素によって触媒されており、酵素が基質と正しく反応するためには酵素の3次元構造が保持されていることが必要である。温度が上昇すると、分子の運動性の増大によって酵素の3次元構造が壊れやすくなり、酵素の活性とその反応速度が低下する。これら2つの作用が拮抗して、ラン藻体内のMT誘導過程では23°C前後の温度が至適となったと考えられる。A. nidulans R-2の成長には25~30°Cの温度が最適とされており¹⁴⁾、成長至適温度とMT誘導至適温度とはほぼ一致することから、ラン藻MTは、高温あるいは低温ストレスによって誘導量が増すいわゆる熱ショックタンパク(heat-shock protein)に属さないことが明らかとなった。

3.3 pHの影響

ラン藻培養液のpHを変化させて、重金属添加後ラン藻体内MTの誘導を測定した(図5)。約2時間でMT誘導が認められ、pH9および7では、16時間後ほぼ定常状態に達した。一方pH5では24時間以降においてMT量が次第に減少した。そこで、重金属添加24時間後において細胞分画を行いラン藻体内におけるCd分布(細胞壁および細胞質)を各pHの培養液について測定した(表1)。pH9とpH7とではほとんど差が認められなかったが、pH5でCdの取り込み量は、細胞壁・細胞質ともに約1/4と顕著に減少した。

ラン藻の生育には、光合成による生体物質の合成が必要である。このためには、生体物質の主要な元素、炭素、窒素、リンを環境から取り込み、生体物質へ同化しなければならない。もっとも多量に必要なものが炭酸固定による炭素の同化である。自然界でラン藻は、大気中の炭酸ガスと平衡状態にある淡水か、炭酸緩衝液ともいえる海水中で光合成を行っている。後者の場合は炭酸の供給に問題はないが、今回実験に用いたラン藻のように前者の場合には、培養液pHが酸性であると炭酸の供給がうまく行われず、生育を阻害すると考えられる。本実験においてもこのような理由から、pH5では光合成からのエネルギーの供給が円滑に進まず、Cdの取り込み量が減少したものと推定される。

淡水性のラン藻は、季節・気象変動などを通じてさま

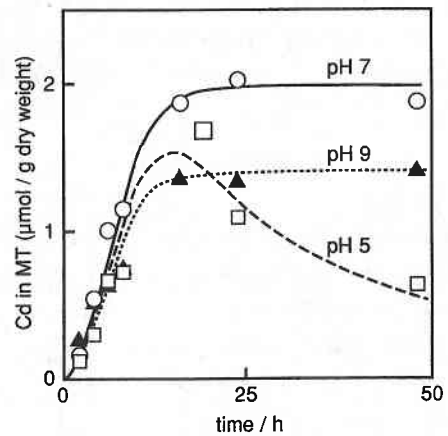


図5 ラン藻のMT誘導に及ぼすpHの影響。
(pHは2N硫酸で調整)

表1 Cd添加24時間後のラン藻体内Cd分布の培養液pHによる違い
(単位: µmol/g dry weight, ±標準偏差 (n=3))

pH	細胞壁	細胞質
5	0.14 ± 0.04	0.99 ± 0.46
7	0.66 ± 0.04	3.9 ± 0.9
9	0.67 ± 0.04	4.1 ± 0.1

ざまな環境にさらされるため、細胞内部のpHを一定に保つメカニズム(pH-stat mechanism)が機能している。A. nidulans R-2の場合、培養液のpHが5から10の間で変動しても細胞内部のpHは7.2から7.6の間に保たれる¹¹⁾。酸性環境下においては、細胞内部への水素イオンの侵入が増えるため、ラン藻は水素イオンを活発に排出して細胞内部のpHを一定に維持しようとする。水素イオンの細胞外への排出には、光合成あるいは呼吸作用によって得られるエネルギーを必要とする。しかしながら、pH5の環境下に長時間さらされると、このエネルギーの供給が十分追いつかず、ラン藻は細胞内部のpHを一定に保つことができなくなる。図5においてpH5で24時間以降MT誘導量が減少したのは、細胞内部のpH変動により、MT合成に関与する酵素の働きが失われたためと考えられる。またpH7で最もMT誘導量が多くなったが、これは培養液のpHが細胞内部のpH(7.4前後)付近であるとき、細胞内外で水素イオンの移送のバランスがとれ、光合成によって得られるエネルギーを有効にMT合成に向けることができたためと推定される。

以上の結果から、MTの誘導はラン藻の光合成活動と密接に連動しており、環境の変化に敏感であることが明

らかとなった。このことは同レベルの重金属ストレスであっても、周囲の環境によって生体の受ける影響が大きく異なることを意味する。生体を取り巻く環境がめまぐるしく変化しつつある今日、重金属などの環境汚染物質が生体に及ぼす影響は、生体がおかれている環境との関連でとらえることが今後ますます重要になると予想される。
(1993年4月22日受理)

参 考 文 献

- 1) J. O. Nriagu, J. M. Pacyna, *Nature [London]* 333, 134 (1988).
- 2) "ACID RAIN", B. J. Mason, Clarendon Press, Oxford, 1992
- 3) (a) "Metallothionein", ed. J. H. R. Kägi and M. Nordberg, Birkhäuser Verlag, Basel, 1979; (b) "Metallothionein II", ed. J. H. R. Kägi, and Y. Kojima, Birkhäuser Verlag, Basel, 1987.
- 4) E. C. Foulkes, "Biological Roles of Metallothionein", ed. E. C. Foulkes, Elsevier North Holland, New York, pp. 131-140 (1982).
- 5) M. Webb, *Biochem. Pharmacol.*, 21, 2751 (1972).
- 6) M. P. Richards and R. J. Cousins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64, 1215 (1975).
- 7) K. Takatera and T. Watanabe, *Anal. Sci.* 7, 695 (1991).
- 8) K. Takatera and T. Watanabe, *Anal. Sci.* 8, 469 (1992).
- 9) K. Takatera, T. Watanabe, *Anal. Sci.* 9, 19 (1993).
- 10) 高寺喜久雄, 渡辺 正, *生産研究*, 44, 10, 463-468 (1992)
- 11) R. J. Ritchie, *J. Plant Physiol.* 137, 409 (1991).
- 12) G. Borbely, G. Suranyi, "Methods in Enzymology", ed. L. Packer and A. N. Glazer, Vol. 167: Cyanobacteria, p. 662, Academic Press, San Diego, 1987.
- 13) "Environmental Physiology of Plants", A. H. Fitter and R. K. M. Hay, Academic Press, 1981
- 14) T. Abe, M. Tsuzuki, Y. Kadokami, S. Miyachi, *Plant Cell Physiol.* 29, 1353 (1988).