

単細胞性紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における細胞外 pH 低下機構の解明

引地 楓音（筑波大学生物学類）

指導教員：蓑田 歩（筑波大学生命環境系）

【背景・目的】

単細胞性紅藻イデユコゴメ綱(Cyanidiophyceae)は、主に高温強酸性(56℃以下、pH5.0以下)の硫酸性温泉に生息している。温泉のような水圏では、溶解する物質の影響などにより環境中のpH変化が起こり得るが、イデユコゴメ綱は中性～アルカリ性の培地のpHを低下させることが先行研究により報告されている[1, 2]。また、同研究により、イデユコゴメ綱は至適培養pHであるpH2.5以外のpH4.0～7.0でも増殖が可能であることが報告されている。しかし、現在までにイデユコゴメ綱における細胞外pH低下と増殖の関連性、そして細胞外pH低下機構の詳細やその意義はわかっていない。

当研究室の先行研究により、イデユコゴメ綱に属する *Galdieria sulphuraria* と *Cyanidioschyzon merolae* をそれぞれpH2.5とpH6.0の培地で培養したところ、どちらも培養液のpHが低下したが、*G. sulphuraria* の増殖はpHによって変わらなかったのに対して、*C. merolae* の増殖はpH6.0の培地ではpH2.5の培地と比較して顕著に遅れた。この結果より、*C. merolae* はイデユコゴメ綱における細胞外pH低下と増殖の関連性を調べるのに適した実験材料であると考えられた。そこで、本研究では、全ゲノム配列が決定しており、破碎が容易であるため生化学的解析や分子生物学的解析にも適した *C. merolae* を用いて、イデユコゴメ綱における細胞外pH低下機構の解明を目的とした。

【材料・方法】

1. 培養

C. merolae の細胞を初期濁度 $OD_{750} = 0.05$ になるように調整し、初期培地pH0.5～8.0に調整した2×Allen's培地で12日間、40℃、光強度 $90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、試験管にて通気培養した。pH6.0については、0 mM または 10 mM MES を含む培地で同様に培養した。

2. イオンクロマトグラフィー

pH2.5とpH6.0にて12日間培養した *C. merolae* の培養後上清を遠心分離により回収した。この培養後上清とコントロールとして実験に用いた培地(pH2.5、pH6.0)をそれぞれ分析した。

【結果・考察】

1. 細胞外pH低下と増殖の関連性

最初に、*C. merolae* を12日間培養した結果、*C. merolae* はpH2.5の培地と比較してpH4.0、pH5.0の培地では増殖は変わらず、pH0.5、pH6.0の培地では増殖が遅れ、pH8.0の培地では増殖できなかった。12日後の培養液のpHは、培養開始時のpHがpH0.5～2.5の培地では培養液のpHが大きく変わらなかったのに対し、培養開始時のpHがpH4.0～8.0の培地では培養液のpHが低下した。特に、*C. merolae* が増殖できたpH4.0～6.0の培地では12日後には

pH2.0付近まで培養液のpHが低下したが、*C. merolae* が増殖できなかったpH8.0の培地では培養液のpHはpH4.0付近だった。また、10 mM MESを含むpH6.0の培地では12日間で培養液のpHは低下せず、*C. merolae* は増殖できなかった。次に、pH6.0における *C. merolae* の増殖速度と培養液のpH低下速度を比較すると、培養液のpH3.0～4.0付近で増殖速度が上昇した。

これらの結果から、*C. merolae* はpH3.0～4.0付近に増殖が促進される閾値をもち、最初に細胞外pHを低下させてから効率よく増殖することがわかった。

2. 細胞外pH低下を引き起こす原因

C. merolae における細胞外pH低下の原因を探るために、イオンクロマトグラフィー分析により培養前後の細胞外の陰イオンと有機酸の分析を行った。その結果、pH6.0では培養後に培養液のpHがpH2.0付近まで低下していたが、培養前と比べて SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 、 Cl^- が減少していた。また、培養前と比べて NO_3^- が増加していたが、その増加量は僅かであった。これらの結果から、細胞外pH低下の原因は陰イオンの増加によるものではなかった。さらに、培養後に有機酸と考えられるピークが検出されたが、少量であり、有機酸も細胞外pH低下の原因ではないと考えられた。

今後、有機酸についてはメタボローム解析を行う予定であるが、これらの結果から、*C. merolae* における細胞外pH低下を引き起こす主な原因は、細胞外への陰イオンや有機酸の排出ではなく、細胞外への H^+ の排出である可能性が高いと考えられる。

3. 短期間の実験系の構築

細胞外pH低下機構を詳細に解析するために、*C. merolae* の細胞を初期濁度 $OD_{750} = 0.30, 0.45, 0.60$ に調整して培養を行い、新たに短期間の実験系の構築を試みた。しかし、これらの初期濁度では1日後には *C. merolae* が試験管に張り付き、測定ができないという問題が生じた。そこで、培養液組成について検討を行ったところ、*C. merolae* の試験管への張り付きは解消された。この方法で4日間 *C. merolae* を培養したところ、初期濁度 $OD_{750} = 0.45, 0.60$ では1日で培養液のpHがpH6.0からpH4.0付近まで低下しており、短期間の実験系の構築に成功した。

今後、この短期間の実験系を用いて、トランスクリプトーム解析などを行い、イデユコゴメ綱における細胞外pH低下機構のさらなる解明を目指す。

【参考文献】

- [1] Oesterhelt, C et al. 2007. The Plant Journal. 51. 500-511
- [2] Hirooka, S et al. 2020. Scientific Reports. 10. 13794