

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450483

研究課題名(和文) アルミニウム毒性と膜脂質 ゲノム情報に基づく lipidomics解析

研究課題名(英文) Aluminum toxicity and membrane lipid

研究代表者

砂入 道夫 (SUNAIRI, Michio)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80196906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルミニウムイオン(Al)は酸性土壌での植物の生育を阻害する主たる要因である。しかし、その毒性機構については、酸化ストレスあるいは膜脂質流動性攪乱や、メタルイオン恒常性攪乱などが提唱されているが、その詳細は明らかではない。

本研究では、高濃度Al耐性微生物である*Acidocella aluminidurans*および*Rhodotorula taiwanensis*の脂質組成の解析を進め、Al感受性や耐性と脂質組成の関連について検討を加えた。また、モデル生物である出芽酵母からAl耐性変異株を確実に選択し、欠損によりAl耐性を示した脂質関連遺伝子群とAl毒性やAl耐性との関係に検討を加えた。

研究成果の概要(英文)：Aluminum ion (Al) severely inhibits plant growth in acid soils. Although it has been proposed that the mechanisms of Al toxicity might be related to oxidative stresses, turbulences in functions of membrane lipids, or disturbances in metal ion homeostasis, it is still need to be clarified.

In this study, we analyzed the lipid compositions of highly Al-tolerant bacterium, *Acidocella aluminidurans*, and yeast, *Rhodotorula taiwanensis*, and examined the relationships between their Al-tolerance and lipid compositions. In addition, Al-sensitive mutants were selected from a collection of deletion mutants (4826 strains) of *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and their mechanisms of Al-sensitivities, especially the lipid-related genes, were studied.

研究分野：環境農学

キーワード：環境適応 アルミニウム耐性 アルミニウム毒性

1. 研究開始当初の背景

世界の陸地のおよそ70%が耕作に適さないとされる問題土壌であり、その約30%が酸性土壌と言われているが、人口増加に伴う食糧問題の解決のためには、酸性土壌での効率的な作物生産が望まれている。酸性土壌環境では、低pH以外に、各種金属類の可溶化による金属過剰、土壌中のリンが金属塩として不溶化するなど、複合的な環境ストレスにより植物の生育が阻害される。特に可溶化したアルミニウムイオンは作物植物に対して強い毒性を持ち、マイクロモラーレベルの濃度で、根の伸長阻害などにより、作物植物の生育阻害を起こすことが知られている。アルミニウム毒性の分子メカニズムは、植物の生育阻害だけではなくヒトの難病との関連も疑われているため、精力的に研究され、物膜脂質流動性の攪乱や、金属イオンの恒常性の攪乱あるいは酸化ストレスが関与することなどが指摘されているが、その詳細はいまだ明らかになっていない。

われわれは、これまでに強酸性土壌に適応した植物を植物・微生物共生系として捉え、タイ、ベトナム、中国などで多くの共生菌を単離してきた。単離した各種共生菌のゲノム配列を決定し、その情報を基に遺伝子破壊変異株コレクションを作成し、各共生系の酸性土壌適応機構の解明を目指して解析を行ってきた。その研究を通じて、アルミニウム耐性に関して、以下のことを明らかにしてきた。

(1) 強酸性土壌適応植物・微生物共生系から単離した高濃度アルミニウム耐性菌 *Pullulanibacillus* sp. CA42 株をイネに接種するとアルミニウム含有水耕液でのイネの生育向上が認められた。CA42 株が生産する細胞外ホモ多糖にアルミニウム結合能があることを示し、その糖鎖構造を決定し、ゲノム上の生合成遺伝子を解析した。構造的には新規多糖ではなかったが、これまでアルミニウム結合性やアルミニウム耐性への関与は報告されておらず、新しいアルミニウム耐性機構として注目される結果であった。

(2) 酸性の茶畑から高濃度アルミニウム耐性酵母 *Rhodotorula taiwanensis* RS1 株を単離し、アルミニウム存在下に肥厚化した細胞壁にアルミニウムが蓄積する事を示した (Wang *et al.*, 2013a)。また、同菌のミトコンドリアゲノム配列を決定し (Zhao *et al.*, 2013)、プロテオミクス解析を行った結果、100 mM アルミニウム存在下で転写、翻訳、DNA 修復、ゴルジ体機能やグルコース代謝に関連するタンパク質が減少することに対して、リンゴ酸脱水素酵素が増加することを明らかにした。同条件下で、細胞内のリンゴ酸脱水素酵素活性が上昇し、細胞内のクエン酸含有量が増えていることから、細胞内でアルミニウムをキレートしてアルミニウム耐性を付与していることが示唆された (Wang *et al.*, 2013b)。

(3) 高濃度アルミニウム耐性菌 *Acidocella* spp. が、これまでアルミニウム耐性への関与が報告されていない、アルミニウム結合性の低分子グルコース誘導体を細胞外に分泌している事を明らかにした。

(4) 強酸性土壌適応植物・微生物共生系から単離した高濃度アルミニウム耐性菌 *Acidocella aluminidurans* AL46 株 (Kimoto *et al.*, 2010) のゲノム配列を決定し、網羅的な遺伝子破壊株のセットを作成、アルミニウム感受性変異株を多数単離した。アミノ酸合成遺伝子破壊によるアルミニウム結合性のアミノ酸誘導体蓄積など、その多くは既報のアルミニウム耐性機構であった。

(5) 強酸性土壌適応植物・微生物共生体から単離した窒素固定菌の多くが単独ではアルミニウム感受性であるが (Aizawa *et al.*, 2010, 2011)、高濃度アルミニウム耐性菌と混合培養すると高濃度アルミニウム存在下でも窒素固定を示した。

(6) これら多くの高濃度アルミニウム耐性微生物に多様な方法で検討を加えたが、アルミニウム耐性に関与する因子として検出されたのは、主として、アルミニウム結合性のキレーターや多糖、細胞壁の完全性、細胞内外でのアルミニウム局在性に関連する遺伝子群であり、活性酸素種消去系などの酸化ストレス関連遺伝子群はほとんど検出されなかった。

(7) 一方、これら高濃度アルミニウム耐性微生物は、培養時のアルミニウムの有無により、その脂質組成に大きな差異が認められた。生物種によりその差異は異なるが、アルミニウム存在下では、総脂質量の増加、複合脂質の増加、不飽和脂肪酸の減少などが認められていた。

これまでの研究から、高濃度アルミニウム耐性と膜脂質の組成の間に関連が認められたことから、これら高濃度アルミニウム耐性微生物やモデル生物などのゲノム情報に基づき作成した各種変異株について、アルミニウム感受性を調べ、変化が認められた欠損株について、脂質を解析することで、アルミニウム毒性および耐性と膜脂質組成の間の関係を明らかにすることが出来ると期待された。

アルミニウム毒性および耐性と膜脂質組成と間の関係を明らかにすることは、これまで主として植物を材料として行われてきた。それに比べて、高濃度アルミニウム耐性微生物は、生育可能なアルミニウム濃度域が広いことから色々な培養条件を設定でき、脂質組成も大きな差異を示すことなどの特長があり、モデル生物である出芽酵母と併せて、すでにゲノム配列を決定していること、さらにゲノム情報に基づき網羅的遺伝子破壊コレクションを作成済みであること、複数の変異を持つ変異株を作成できること、大量の試料を短期間に調製可能なことなどから、これまで困難であったアルミニウム毒性やアル

ミニウム耐性に関与する膜脂質、例えば、アルミニウム輸送にかかわる膜脂質などを明らかにする端緒となることが期待された。

本研究で用いる高濃度アルミニウム耐性微生物は、アルミニウムによる膜脂質の組成変化が大きい一方で、含まれる膜脂質に特殊なものは検出されておらず、またゲノム、特に膜脂質代謝に関連する遺伝子群は、大腸菌あるいは出芽酵母などのモデル生物と共通点が多い。すなわち、これらモデル生物の知見や実験系を用いて解析可能であり、研究の迅速な進展が期待できる。

このような研究の進展により、アルミニウム毒性の分子メカニズムにかかわる膜脂質、例えば、アルミニウム毒性の標的となる膜脂質や、アルミニウム輸送にかかわる膜脂質、あるいはアルミニウム耐性に関与する膜脂質などを明らかにすることができれば、アルミニウム耐性作物植物の育種の手がかりとなることが期待される。

2. 研究の目的

酸性土壌での効率的な作物生産を目指し、アルミニウム毒性や耐性の分子メカニズムの解明を試みている。その結果、われわれは、上記のように、酸性土壌に適應した植物・微生物共生系の研究から高濃度アルミニウム耐性と膜脂質組成の間に関連があることを見出した。

本研究は、ゲノム配列を決定した高濃度アルミニウム耐性微生物 *Acidocella aluminidurans* AL46 株や *Rhodotorula taiwanensis* RS1 株などについて脂質を網羅的に解析し、アルミニウム感受性や耐性と脂質組成の関連について、ゲノム情報に基づき検討を進めるとともに、モデル生物である出芽酵母を併せて用いることにより、例えばゲノムワイドスクリーニングから単離されるアルミニウム感受性に变化を生じた脂質関連遺伝子群の遺伝子欠損変異株を組み合わせて解析に用い、アルミニウム毒性および耐性と膜脂質の関係、あるいは脂質と深く関係する遺伝子群の生理機能との関係を、検討を推し進めることにより明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

アルミニウム毒性、耐性と膜脂質組成（流動性）関連を明らかにするために、酸性土壌に適應した植物・微生物共生系から単離した高濃度アルミニウム耐性微生物 *Acidocella aluminidurans* AL46 株よりトランスポゾン変異法で作成した遺伝子破壊株コレクションと、モデル生物である出芽酵母の BY4741 株由来のノックアウトコレクション（4826 株）を Research Genetics より購入し用いた。コレクションよりアルミニウム感受性が確実に变化した変異株を液体培養法で単離し

た。より簡便な寒天平板培養法や high-throughput 法も併せて検討した。検定には Dunnett 法を用いた。選抜したアルミニウム感受性に変異が認められた遺伝子欠損株については、遺伝子の欠損部位の確認を行った後に、機能グループ解析などの *in silico* 解析を行った。高濃度アルミニウム酵母 *Rhodotorula taiwanensis* RS1 株などと併せて、脂質解析、細胞内アルミニウム蓄積量測定、生理機能解析などを行った。

4. 研究成果

モデル生物である出芽酵母 BY4741 株由来のノックアウト・コレクション（4826 株）からアルミニウム感受性が变化した変異株を単離したが、簡便な寒天平板培養法や短時間でアルミニウム存在下での生育を測定できるプレートリーダーを用いた high-throughput 法などに比べ、液体培地で 4 日間培養し、その間の生育状況を詳細に観察することで、確実にアルミニウム感受性に变化を生じた変異株を単離することができた。その中には、high-throughput 法を用いた類似の研究では報告されていない遺伝子の欠損株も多く含まれていた。単離された変異株の細胞内アルミニウム蓄積量を ICP 発光分析装置で測定したが、親株と有意な差は認められなかった。このことから、今回選抜されたアルミニウム感受性に变化を生じた遺伝子欠損株の中から、アルミニウム輸送に何らかの影響が生じたことによりアルミニウム感受性に变化を生じた遺伝子欠損変異株の候補を見つけ出すことはできなかったと考えられた。

これらアルミニウム感受性に变化を生じた変異株の欠損遺伝子群を細胞機能グループ解析した結果、エンドサイトーシスやトリカルボン酸回路、グルタミン酸合成、イソクエン酸代謝などの細胞機能クラスにかかわる遺伝子がアルミニウム毒性や耐性と関連して有意に多く単離されていることが示された。

また、単離されたアルミニウム感受性変異株には、*in silico* による細胞機能グループ解析では検出されなかったが、スフィンゴ脂質やリン脂質の生合成や組成および局在性に影響を与える遺伝子を欠損しているものが多く含まれていることを明らかにし、その解析を進めた。その中には、スフィンゴ脂質やリン脂質の細胞内局在性や、細胞膜や内膜系を構成する脂質二分子膜の外側の脂質層と内側の脂質層への局在性に影響を与える遺伝子群も含まれていた。これらの遺伝子の欠損によるアルミニウム耐性のメカニズムを解明するためには、脂質の網羅的解析ではなく、個々の脂質分子の細胞内あるいは細胞膜内やオルガネラ膜内での分布や動きを調べることが必要となる。特定の脂質分子を検出するための分子プローブがすでに開発さ

れ、細胞分裂時の機能解析などで大きな成果を挙げている。しかしながら、生きている細胞内部の各種脂質分子を検出し、その動きや分布を解析することは、未だ技術的には大きな困難を伴っている。そのための効率的な検出技術を開発することができれば、アルミニウム毒性あるいは耐性にかかわるこれら遺伝子群の分子メカニズムの解明が飛躍的に進むことが期待される。今後はこれらの技術にも検討を加えてゆく必要がある。

一方、高濃度アルミニウム耐性微生物を用いた研究においては、高濃度アルミニウム耐性細菌 *Acidocella aluminidurans* AL46 株の遺伝子破壊コレクションからは、すでにアミノ酸合成遺伝子の破壊によりアルミニウム結合性のアミノ酸誘導体が蓄積しアルミニウム感受性に变化した株を単離していたが、アルミニウム感受性に变化した脂質関連遺伝子の欠損株を単離することはできなかった。

同株や高濃度アルミニウム耐性酵母 *Rhodotorula taiwanensis* RS1 株などの脂質組成の検討を進めた結果、すでに明らかにしていたアルミニウム存在下での総脂質量の増加、複合脂質の増加、不飽和脂肪酸の減少などに加え、アルミニウム感受性とリン脂質量と水酸化脂肪酸量が関連する可能性を認め、これら脂質とアルミニウム感受性の関連についてゲノム情報を基に解析を進めた。真核生物に比べ細菌では、特定の脂質分子の動きや分布を検出することは、その細胞の小ささゆえに技術的に未だに困難である。また、細胞膜などの脂質二分子膜の内部に存在すると考えられる水酸化脂肪酸残基の挙動や分布を詳細に調べる技術も必要となる。これら脂質分子の(細菌)細胞における動きや分布を調べる技術についても併せて検討を加えてゆきたい。

われわれは顕著な細胞保護効果が認められる細胞外糖脂質についても検討を重ねてきた。本研究では、その解析のモデル系として、脂肪酸を付加した高分子を作成し、その性質に検討を加えた。アニオン高分子に低い割合で疎水性基を導入することで、アニオン高分子に多様な保護効果機能を付与することができることを示した。これら脂質を付加したアニオン高分子のアルミニウムに対する保護効果についても検討を加えてゆきたい。

以上、本研究では、モデル生物である出芽酵母と酸性土壌に適応した植物・微生物共生系から単離した高濃度アルミニウム耐性菌 *Acidocella aluminidurans* AL46 株および *Rhodotorula taiwanensis* RS1 株などを用いて、アルミニウム毒性あるいは耐性と脂質の関連について、脂質の網羅的解析とゲノム情報に基づいた解析を行い、アルミニウム毒性あるいは耐性とリン脂質量と水酸化脂肪酸量間の関連、あるいはスフィンゴ脂質やリン脂質の細胞内や膜内部での局在性との関連

の可能性を認めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Urai M, Aizawa T, Nakajima M, and Sunairi M. "An Anionic Polymer Incorporating Low Amounts of Hydrophobic Residues Is a Multifunctional Surfactant. Part 1: Emulsifying, Thickening, Moisture-absorption and Moisture-retention Abilities of a Fatty Acid-Containing Anionic Polysaccharide." *Advances in Chemical Engineering and Science*. 査読有, Vol. 5, 2015, pp. 173-180, DOI: 10.4236/aces.2015.52019

Urai M, Aizawa T, Nakajima M, and Sunairi M. "An Anionic Polymer Incorporating Low Amounts of Hydrophobic Residues Is a Multifunctional Surfactant. Part 2: Emulsification, Moisture Absorption, and Moisture Retention of Alkyl Esterified Poly- γ -Glutamic Acid." *Advances in Chemical Engineering and Science*. 査読有, Vol. 5, 2015, pp. 181-191, DOI: 10.4236/aces.2015.52020

[学会発表](計 3件)

Aizawa T, Shiina A, Zhao XQ, Sunairi M. "Characterization and lipidomic analyses of highly aluminum tolerant microorganisms." *The International Society for Microbial Ecology 16th International Symposium on Microbial Ecology (ISME 16)*, 2016/08/23, Montreal (Canada).

Shiina A, Aizawa T, Zhao XQ, Sunairi M. "Which cellular components or processes are relevant with aluminum toxicity?" *The International Society for Microbial Ecology 16th International Symposium on Microbial Ecology (ISME 16)*, 2016/08/23, Montreal (Canada).

Aizawa-Urai T, Zhao XQ, Sato J, Ohara N, Shiina A, Sunairi M. "Aluminum toxicity and tolerance in microorganisms." *Federation of European Microbiological Societies 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015)*, 2015/06/09, Maastricht (Netherlands)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂入 道夫 (SUNAIRI, Michio)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：80196906

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

相澤 朋子 (AIZAWA, Tomoko)
日本大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：60398849

(4) 研究協力者

大原 菜月 (OOHARA, Natsuki)

椎名 綾乃 (SHIINA, Ayano)