

報告年月日	2005年 2月 17日
報告者氏名	矢島 祐輝
職種 (○で囲む)	研究員 ORA
所属 (RAのみ)	連合農学研究科 生物資源科学専攻 (帯広畜産大学配属 16年度入学)
担当 (指導) 教員氏名	大西 正男
申請研究テーマ (50字以内)	真菌セレブロシドの構造特性と寒冷応答
採用によって得られた 成果 具体的に記すこと。 (今年度の申請をふまえて、何が解決され、何が問題として残ったか、予想していなかった結果など) 各項目の長さを適宜調整し、全体で2ページに収まるように記すこと。 図表を入れても構わない。	<p>研究背景</p> <p>植物や真菌の細胞膜と液胞膜を構築する主要な脂質成分であるグルコシルセラミド (セレブロシド) は、膜を強固に維持する上で重要であるとともに、情報伝達系に係わる機能性脂質と考えられている。一方、低温環境下では、セレブロシドの物理的特性は生体膜の流動性の維持あるいは安定化の面ではマイナスに作用すると推測されている。セレブロシドは構成スフィンゴイド塩基や脂肪酸の組成の違いによって様々な分子種が存在し、その構造上の違いによって、相転移温度や膜流動性の保持能の違いが報告されている。中でも、酵母が持つ特有の9-メチル塩基含有型セレブロシドは植物型セレブロシド同様に膜流動性保持能が高く、9-位にメチル基を持つ意義に興味深い。実際、低温耐性植物や一部の酵母では、生育温度の変化に対応してセレブロシドが量的および質的に変化することが明らかになっているが、その生理的な意義や寒冷応答機構については未詳の点が多い。申請者は、実験モデル系として <i>Kluyveromyces lactis</i> などの乳酵母を用い、生物の寒冷下での生存戦略、とくに低温傷害を回避する上でセレブロシドがどのように関わり合うのかを、分子生物学的、生化学的な手法で究明しようとしている。</p> <p>目的</p> <p>低温ストレスに対する <i>K. lactis</i> のセレブロシド含有量や構造上の変化の意味を検討するために、セレブロシドの熱特性や酵母などによく見られる9-メチル塩基含有型セレブロシドの9-メチル塩基の意義について追求する。また、UV照射によりセレブロシド高蓄積変異株の取得を目指し、セレブロシドが低温ストレスに対して負に作用するか否か検討する。</p> <p>研究方法</p> <p>各種セレブロシドの分子種の違いによる熱特性の差異を調べるために、DSC (示差走査熱量分析) を行った。</p> <p>9-メチル塩基含有型セレブロシド量の差異が成長速度に影響するかどうか調査するために、培養開始時から定常期まで、6時間ごとのOD₍₆₆₀₎を吸光度計によって測定した。平均成長速度は増殖期初期から定常期までのODと時間から算出した。</p> <p>セレブロシド高蓄積変異株のスクリーニングは変異源としてUVを用いた。UVを照射後、YPDプレートに塗布した。37°Cで培養して生育したコロニーを125μM PDMPプレートに植菌して30°Cで培養して、生育した菌株を変異株とした。</p>

成果と考察

今回、植物のモデルケースとして *K. lactis* を用いてセレブロシドの寒冷応答に対する、構造的、量的な役割について検討するために実験を行った。

① DSC (示差走査熱量分析) による各種セレブロシドの熱特性の比較解析

9-メチル塩基含有型セレブロシドのキノコセレブロシドはウシ脳セレブロシドよりもはるかに低い温度でピークが確認され 8-*cis* 不飽和型のセレブロシドを持つ植物セレブロシドもすべてウシ脳セレブロシドよりも低い温度でピークが確認された。このことから、植物、真菌両セレブロシドともウシ脳セレブロシドよりも膜流動性の保持能が高いことが示唆されたが、分子種組成の違いによりピークの範囲に差が確認されたことも興味深い。特に9-メチル塩基含有型セレブロシドが比熱特性が植物型セレブロシドよりも高いことが示唆された。

② *K. lactis* 6 菌株中のセレブロシド含量および9-メチル基含有量の差異と低温耐性能の関連

次に、セレブロシドの構造、特に9-メチル塩基に着目して実験を行った。これまで、当研究室は *K. lactis* 間の9-メチル塩基含有型セレブロシド量の比較や、低温培養時の膜脂質組成の変動について報告している。この中で、菌株間にセレブロシド含量に差異が見られ低温培養時には9-メチル塩基含有型セレブロシドの割合は増加したものの、その量は減少するという興味深い結果が得られていることから、低温培養条件時と9-メチル塩基含有型セレブロシド量との関係について調査した。使用6菌株とも低温培養時には比増殖速度は低下したが、予想に反して25°Cと15°C増殖速度比の割合と9-メチル塩基含有型セレブロシド割合に相関は認められなかった (Fig 1)。

これらのことから、菌株間に9-メチル塩基含有割合に差が見られたが、これまでの実験において比増殖速度比と9-メチル塩基含有型セレブロシドの割合には関連が確認されなかった。

③ UV 照射でのセレブロシド高蓄積変異株の取得

膜脂質中のセレブロシド含量が高いと低温ストレスに対する膜流動性の保持にマイナス作用すると考えられるが、実際にセレブロシド高蓄積変異株を取得して成長速度や分子種の検討を目的としてスクリーニングを開始した。これまでに130菌株ほど変異株を取得してセレブロシド含量をTLCで確認してきたが、これまでのところ含量が顕著に増加した株は得られていない。今後もスクリーニング方法を検討しながら継続する予定である。

Fig 1

