

ミドリゾウリムシ共生藻における特異なグルコースの影響

加藤 豊, 今村 信孝 (立命大・理工・化生工)

Novel effects of D-glucose on the physiology of a *Paramecium* symbiont

Yutaka KATO and Nobutaka IMAMURA

(Department of Bioscience and Biotechnology, Ritsumeikan Univ.)

SUMMARY

Glucose is a common nutrient, but sometimes it can work as an inducer or a signal. An endosymbiotic alga F36-ZK, isolated from Japanese *Paramecium bursaria* F36, grew faster in the presence of glucose, suggesting that glucose was a good nutrient. However, no glucose uptake was detectable in experiments using a radiotracer. On the other hand, it was found that glucose accelerated uptakes of several amino acids, such as L-Glu, L-Gln, L-Asp, L-Ser, L-Ala and L-Leu, approximately 2–5-fold in a mineral salt medium. A non-metabolizing glucose analogue, 3-OMG, also stimulated L-Ser uptake; this implies that glucose was not being used as an energy source. The effect was also observed in the presence of cycloheximide, indicating that the effect was not due to new synthesis of amino acid transporter. However, higher amino acid uptakes, but no stimulating effect of glucose were observed when Ca^{2+} and Mg^{2+} were absent, although amino acid uptake is generally increased in the presence of divalent cations in many organisms containing free-living *Chlorella*. These results suggest that divalent cations inhibit amino acid uptake, and glucose cancels the inhibiting effect of the cations. Glucose and divalent cations seems to have roles as regulators of the symbiont's amino acid uptake in *Paramecium* symbiosis.

[目的]ミドリゾウリムシ細胞内には、緑色藻類が細胞内共生しており、共生藻はグルコース2量体のマルトースを放出して、共生状態では糖存在下で生育していると考えられる。我々は、共生藻の単離が困難とされていた日本産ミドリゾウリムシ F36から、共生藻無菌株 F36-ZK の取得に成功した¹。これまでの研究結果から、共生藻 F36-ZK は、無機窒素源である硝酸を生育に利用できず、発達した3つのアミノ酸輸送系 (basic amino acid transport system; BATS, general amino acid transport system; GATS, Ala transport system) を有していることが明らかにしてきた^{2,3,4}。この共生藻の特異な窒素化合物利用性から、共生関係においてアミノ酸が重要な役割を担っていると考えており、今回、共生状態で存在するであろう糖のアミノ酸輸送への影響を検討し、ミドリゾウリムシ共生関係での糖の役割についての考察を試みた。

[材料と方法] *Paramecium bursaria* F36から単離した共生藻 F36-ZK と、free-living *Chlorella vulgaris* NIES-227を実験に用いた。実験に用いた藻体はすべて対数増殖期のものを用いた。糖類の増殖への影響の検討は、無機塩培地である C 培地に L-Arg もしくは L-Ser を窒素源として添加した培地に、数種の糖を添加して25°C、明：暗=16 h：8 hの条件下で培養した。24 h ごとにサンプリングし、自家蛍光で発色した細胞数を蛍光顕微鏡を用いて測定した。グルコースとアミノ酸の取り込みは、¹⁴C 標識体を用いて測定した。C 培地で遠心洗浄した藻体を、糖や無機イオンの影響を調べるべくそれぞれの実験条件に調製した溶液に懸濁して、¹⁴C アミノ酸を添加し、各時間における藻体をろ取後、液体シンチレーションカウンターを用いて藻体内放射線量を測定した。¹⁴C グルコースの取り込みについても同様にして行った。

[結果と考察] F36-ZK の増殖への糖類の影響を検討した結果、単糖であるグルコースとフルクトースの添加により顕著な増殖を確認した。またマルトース、スクロースなどの2糖やアラビノースでも生育促

進効果がみられた。しかしながら、増殖を促進する影響があるにもかかわらず、グルコースの取り込みは確認できなかった。一方、グルコースはアミノ酸取り込みへも影響を与えた。L-Arg, L-Asp, L-Glu, L-Gln, L-Ala, L-Ser そして L-Leu の取り込みへの影響を検討した結果、L-Arg 以外のアミノ酸は、その取り込みが2~5倍増加した (生育と同様 C 培地中での検討)。またグルコースのアナログである3-OMG でも同様の促進効果がみられたことから、グルコースがシグナルとしての役割を担っている可能性が考えられた。また、影響が確認されたアミノ酸は、すべて GATS で輸送され、グルコースとその輸送系との関連性が示唆された。このような影響は、シクロヘキシミド存在下でも同様に確認できたことから、新たな輸送タンパク質合成による影響ではない。また実験条件を C 培地からトリスバッファーへ変更したところ、アミノ酸の取り込みが増えてグルコースの影響が確認できなくなった。種々検討を行った結果、C 培地中の Ca²⁺と Mg²⁺がアミノ酸の取り込みを阻害し、グルコースの添加によってカチオン添加前と同レベルまでアミノ酸の取り込みが回復することが分かった。一般に Ca²⁺はアミノ酸取り込みを増強させるが、F36-ZK では逆の効果がみられた。

このような2価のカチオンとグルコースによるアミノ酸取り込みの調節現象は、free-living の *Chlorella vulgaris* では確認できず、ミドリゾウリムシ共生関係における宿主からの“調節因子”としての役割を担っているとも考えられる。

[文献]

1. S. Kamako, R. Hoshina, S. Ueno, N. Imamura, (2005) *European Journal of Protistology* 41, 193-202.
2. Yutaka K., Seiko U. and Nobutaka I., (2005) *Jpn. J. Protozool.* 38(1), 13-14
3. Yutaka K., Seiko U. and Nobutaka I., (2005), *Plant Science* in press.
4. Yutaka K. and Nobutaka I., (2005), 12th International Congress of Protozoology abstract Book, pp. 34.