

Blepharisma (albino), *Climacostomum*, *Dileptus* の光増感性色素による
photodynamic killing

寺嶋 昌代¹, 春本 晃江² (¹東海女子短期大学, ²奈良女大・理・生物科学)

Photodynamic killing of *Blepharisma* (albino), *Climacostomum* and *Dileptus* by treatment with photosensitizer pigments

Masayo Noda TERAZIMA¹ and Terue HARUMOTO²

(¹Tokai Women's Jr. Col., ²Biol. Sci., Nara Women's Univ.)

SUMMARY

Blepharisma japonicum produces a red pigment, blepharismine. Blepharismine is highly toxic to various ciliates in the dark. It is known that blepharismine has a defense function against predatory protists. Blepharismine is a photodynamic pigment. Even a dilute solution of blepharismine photosensitizes colorless cells. *Blepharisma* and *Climacostomum* are highly resistant to the toxicity of blepharismine in the dark. Are they also resistant to the toxicity of blepharismine in the light? We examined the photodynamic killing of *Blepharisma* (albino), *Climacostomum* and *Dileptus* by treatment with the photosensitizer pigments blepharismine, eosin, erythrosin, rose bengal and methylene blue. *Blepharisma* (albino) and *Climacostomum* were killed by the phototoxicity of blepharismine. *Climacostomum* was most resistant among the three ciliates to the phototoxicity of the acidic photosensitizer pigments and most sensitive to the phototoxicity of the basic photosensitizer pigment. *Blepharisma* (albino) was not resistant to the phototoxicity of any photosensitizer pigments tested in this work. These findings suggest that the mechanism of toxicity of blepharismine in the dark is different from that of its phototoxicity. The fact that *Blepharisma* is resistant to the toxicity of blepharismine in the dark but is sensitive to the phototoxicity of blepharismine suggests that *Blepharisma* developed the photophobic response to escape from harmful light.

[目的] *Blepharisma japonicum* のもつ色素ブレファリズミンは毒性と光毒性をもち¹⁾、捕食性原生動物の捕食に対する防御機能があることがわかっている²⁾。*Blepharisma* や *Climacostomum* はブレファリズミンの暗条件下での毒性に耐性である³⁾。それでは、*Blepharisma* や *Climacostomum* はブレファリズミンの光毒性に対してはどうであろうか。一般に光照射によって励起された色素分子から励起エネルギーが移動することを光増感作用 (photosensitization) といい、酸素存在下でそれによって細胞成分が光酸化を起こし、損傷がおこることを光力学作用 (photodynamic action) といい、それによって細胞が死ぬことを光力学死 (photodynamic killing) という。*Blepharisma* は他の光増感性色素の光毒性にも耐性なのか。エオシン、エリスロシン、

ローズベンガル、メチレンブルーなどの光増感性色素を *Blepharisma*(albino), *Climacostomum*, *Dileptus* に作用させ、photodynamic killing の様子を比較した。

[材料と方法] <細胞> *Blepharisma japonicum* (R1072株、A538株) および *Climacostomum virens* (W株)、*Dileptus margaritifer* (D3-I株) を用いた。*Blepharisma* の光毒性に対する強さを調べるためには色素量の少ないアルビノ株の *Blepharisma* (A538) を用いた。実験を始める前に、SMB- (ブレファリズマのための塩類溶液) 中で30分間光照射しても死なないものを用いた。<細胞外液、CFF> *Blepharisma* を SMB- 中に浮遊させておくと、*Blepharisma* は色素顆粒を放出し、細胞外液は赤色を呈する。さらに濃い色素を含む細胞外液を得る場合

は、*Blepharisma* を SMB-中に浮遊させたものと、0°Cに冷却した SMB-を等量混合し、多量の色素顆粒を放出させることにより得た。これらを遠心分離機にかけ、細胞を取り除いた液を細胞外液 (cell-free fluid, CFF) と呼ぶ。この CFF は色素プレファリズミンを含み、その濃度は580nm の吸光度によって表す。< photodynamic killing > 光増感性色素であるエオシン (東京化成) 10^{-4} M、エリスロシン (東京化成) 10^{-5} M、ローズベンガル (東京化成) 10^{-5} M (以上、酸性色素)、メチレンブルー (東京化成) (塩基性色素) 10^{-5} M の SMB-溶液 200 μ l 中に細胞を10細胞とり、1200 W/m²の強い可視光を照射して実顕微鏡下で観察した。

[結果と考察] *Blepharisma* (albino), *Climacostomum* の *Blepharisma* の細胞外液中での photodynamic killing プレファリズミンの暗条件下の毒性に大変強い *Blepharisma* と *Climacostomum* は、プレファリズミンの光毒性に対してはどうであろうか。野生型の *Blepharisma* は細胞内に多量のプレファリズミンを有しているため、光照射した場合、内在するプレファリズミンの光毒性によって photodynamic killing する。外在性のプレファリズミンの光毒性に対する耐性をみるためには、*Blepharisma* のアルビノ株を用いた。アルビノ株もプレファリズミンの暗条件下での毒性には耐性である。*Blepharisma* のアルビノ株を *Blepharisma* (red, 野生株) の CFF 溶液(580 nm の吸光度: 0.66)の中で光照射し、死んでいく様子を観察した。CFF 中では光照射によって、細胞後部の収縮胞の周辺に小さな泡状の膨らみがいくつも生じ、最後はそれが破裂して死ぬものも現れた。*Climacostomum* は濃い CFF(580 nm の吸光度:0.78)の中でも暗条件下でなら損傷はない。しかし CFF 中で光照射すると、プレファリズミンの光毒性によって photodynamic killing した。以上のことから、プレファリズミンの暗条件下の毒性には耐性の *Blepharisma* と *Climacostomum* も、プレファリズミンの光照射下での光毒性によっては損傷を受けるといことがわかった。色々な色素の光増感作用による photodynamic killing 繊毛虫の光増感性色素の暗条件下での毒性に対する耐性についてはすでに報告した⁴⁾、暗条件下での毒性に強い原生動物は光毒性に

も強いのかを調べた。エオシン 10^{-4} M、エリスロシン 10^{-5} M、ローズベンガル 10^{-5} M、メチレンブルー 10^{-5} M 中における *Climacostomum*, *Blepharisma* (albino), *Dileptus* の photodynamic killing の様子を観察した。これらの濃度では暗条件下では細胞に損傷はない。しかし、強い可視光を照射 (1200 W/m²) すると、photodynamic killing が起こった。エオシン、エリスロシン、ローズベンガルという酸性色素中では *Climacostomum* が一番 photodynamic killing するのが遅かった。エオシン中では、photodynamic killing の速度は *Blepharisma* (albino) > *Dileptus* > *Climacostomum* であった。*Blepharisma* (albino)は暗条件下では *Dileptus* よりエオシン中で耐性であるが、光照射下では光毒性に弱いことを意味している。エリスロシン中では *Blepharisma* (albino)、*Dileptus* はほぼ同じ速度で photodynamic killing した。ローズベンガル中では *Dileptus* が一番早く photodynamic killing した。塩基性色素メチレンブルー中では *Climacostomum* が一番 photodynamic killing の速度が速かった。これは、暗条件下でも、*Dileptus* がローズベンガルに一番弱く、*Climacostomum* がメチレンブルーに一番弱いことと関連があるようである。以上から、光増感性色素中での photodynamic killing の様子は、暗条件下の毒性に対する感受性と関係があり、一般に暗条件下で感受性のものは photodynamic killing する時、短時間で死ぬ。また、一部、必ずしも暗条件下での毒性に対する感受性と photodynamic killing の速度の関係が一致していない場合もあり、これは、細胞損傷の機構が異なることを反映していると思われる。*Blepharisma* (albino)は光増感性色素プレファリズミンの暗条件下での毒性に強いが、光増感性色素をもっているからといって、他の光増感性色素の光毒性に必ずしも耐性があるわけではないことがわかった。このことは、プレファリズミンの暗条件下での毒性と光毒性は作用機構が異なることと、*Blepharisma* はプレファリズミンの暗条件下での毒性に対する耐性を獲得しているが、光毒性に対する耐性を獲得しておらず、光を回避するために、photophobic response を発達させたことを示唆する。

[文献]

- 1) Terazima, N. M., Iio, H. and Harumoto, T. (1999)

- Photochem. Photobiol. 69, 47-54.
- 2) Harumoto, T., Miyake, A., Ishikawa, N., Sugibayashi, R., Zenfuku, K. and Iio, H. (1998) *Europ. J. Protistol.* 34, 458-470.
- 3) Terazima, N. and Harumoto, T. (2004) *Zool. Sci.* 21, 823-828.
- 4) 寺嶋昌代、春本晃江 原生動物学雑誌 (2002) 第35巻第1号, p46.