

ミドリゾウリムシ共生藻の糖類応答性に関する研究

加藤 豊, 今村 信孝 (立命大・理工・化生工)

Sugar sensing of symbiotic *Chlorella* isolated from Japanese *Paramecium bursaria*

Yutaka KATO and Nobutaka IMAMURA

(Department of Bioscience and Biotechnology, Ritsumeikan Univ.)

SUMMARY

We studied the effect of glucose on amino acid transport of symbiont F36-ZK from Japanese *Paramecium bursaria* F36. The algal Ser uptake was increased in the presence of glucose. Uptakes of Ala and Gln, but not Arg, were also accelerated by the sugar. These responsive amino acids are transported via a general amino acid transport system, indicat-

ing an association of the transporter and the response. In kinetic analysis of Ser uptake, a 2-fold  $V_{max}$  value was measured in the presence of glucose, suggesting that the amount of transporter was increased. However, cells in which protein synthesis was inhibited by cycloheximide also showed the response to glucose. The response became stronger as external pH was increased from 5.5 to 8.0, and preincubation with glucose for more than 10 min was needed for the maximum effect. As a low concentration of glucose also accelerated Ser uptake, and glucose uptake was not detectable, these results indicated that the response to glucose occurred via a signaling pathway. We also examined the effect of glucose-related compounds. Glucose dimers, disaccharides, accelerated Ser uptake in the same way as glucose. Assays using monosaccharides revealed that stereochemistry at carbon 2, and hydroxyl groups at carbons 3 and 6 are important for the response.

**【目的】** 我々は日本産ミドリゾウリムシ F36から共生藻の無菌株 F36-ZK を取得し<sup>1</sup>, 共生藻 F36-ZK は藻類の一般的な窒素源である硝酸を利用できず, アミノ酸を好み, 発達した3つのアミノ酸輸送系(basic amino acid transport system, general amino acid transport system, Ala transport system)を有していることを明らかにした<sup>2</sup>. ミドリゾウリムシ共生藻は共生体内では共生胞膜に包まれ, 藻体外へと糖類を放出し宿主へと糖類を供給していることから, 糖類が存在している状態で生活していると考えられる。共生藻の特異的な性質から共生体内でアミノ酸が重要な役割を担っていると考えており, 糖類がアミノ酸の輸送に対して与える影響を検討した。

**【方法】** アミノ酸輸送の測定には, <sup>14</sup>C 標識体を用いた。27 mM グルコースで30分間処理した藻体に<sup>14</sup>Cアミノ酸を添加し, 経時的に藻体をろ過, 洗浄し, 藻体内の放射活性から取り込み量を算出した。糖類の取り込み測定もアミノ酸の輸送測定と同様に<sup>14</sup>C 標識体を用いて行った。

**【結果と考察】** 共生藻 F36-ZK に Ser とグルコースを同時に添加すると, 添加1分後の早い段階から Ser の取り込みが促進された。グルコースによる Ser 輸送の促進はあらかじめ藻体をグルコースで10分処理することにより, 2-2.5倍の効果をみせた。また, 外液の pH を5.5からアルカリ側にするに従って促進効果が大きくなった。この pH 依存性は Ser 輸送の pH 依存性とは全く逆の傾向を示したことから, グルコースは Ser の輸送が困難な状態を打破するものと考えられる。グルコース濃度を希釈して低濃度での促進

効果を調べた結果, 27 mM ~27  $\mu$ M までは同等の促進効果を示し, その濃度を境として促進効果は急激に減少した。27 mM での促進効果を100%とした時の半分の効果を示す濃度( $EC_{50}$ )は3  $\mu$ M であった。さらに興味深いことに, 促進効果を示すグルコース自体は細胞内には取り込まれていなかった。以上の結果は, グルコースが共生藻に対しシグナルとして働いていることを示唆している。

グルコース応答によって Ser だけではなく Ala や Gln も同様にその輸送が促進されたが, Arg の輸送にはほとんど影響がなかった。影響されるアミノ酸は共に3つの輸送系の内 general amino acid transport system (GATS)で輸送されることから, グルコース応答と GATS との関連性が示唆された。そこで GATS への影響を検討するため, Ser 輸送のキネティクス解析を行った結果, グルコースは GATS 輸送体の基質結合部位には影響を示さず, 最大輸送速度のみが上昇していた。輸送タンパク質量が増加した場合にもこのような現象が得られ, 実際, 自由生活型の *Chlorella kessleri* では, グルコースによりアミノ酸輸送体の生合成が誘導されるとの報告があり<sup>3</sup>, 今回の共生藻でも同様の誘導がかかっている可能性があった。そこで, タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシイミドを作用させてタンパク質合成を阻害した共生藻を用いて, グルコース応答の効果を検討した。藻体に15  $\mu$ M シクロヘキシイミドを添加し30分以上インキュベートすると, 54%以上のタンパク質合成を阻害した。同条件下でもグルコース応答性がみられたことから, この応答には新たなタンパク質合成は関与していない。

共生藻が放出する糖類は主にマルトースであり,

その他の糖類での効果も興味深い。共生藻のグルコースアナログに対する応答性を調べた結果、L体のグルコースと6位がカルボン酸になったグルクロン酸には応答しなかった。共生藻はグルコース二量体に対してはグルコースとほぼ同等の応答を示したが、スクロースやラクトースなどグルコース以外の糖を含む2糖類に対しては著しくその応答が低下した。グルコースとほぼ同等の影響を与えたアナログを用い低濃度での作用を検討した結果、2位の立体配置と、3, 6位の水酸基が特にこのシグナリングには重要であるがわかった。

## [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., (2006), *Plant Science* **170** 481-486
3. Cho B. H., Sauer N., Komor E., Tanner W., (1981) *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78** (6), 3591-3594