

ミドリゾウリムシ由来の共生藻炭酸固定上昇因子の単離・同定

加藤 豊, 今村 信孝 (立命大・理工・化生工)

Identification and modification of the symbiotic algal carbon fixation-enhancing factor in *Paramecium bursaria*Yutaka KATO and Nobutaka IMAMURA
(Department of Bioscience and Biotechnology, Ritsumeikan Univ.)

SUMMARY

We previously reported that an extract of the Japanese *Paramecium bursaria* enhanced carbon fixation in symbiotic algae. In our studies to identify the enhancing factor, we found that the enhancing activity remained even when the organic compounds in the *Paramecium* extract were completely removed by burning. We then measured the concentration of major inorganic cations (K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+}) in the extract and prepared an artificial cation mixture (Artificial Host Factor; AHF) according to the results. We found that AHF enhanced algal carbon fixation in the same way as the *Paramecium* extract, and that modification of the cation concentrations caused higher carbon fixation. To reveal the mechanism of the enhancement of carbon fixation, we studied the reaction to light, which provides energy for carbon fixation. We found that oxygen evolution by symbiotic *Chlorella* F36-ZK decreased in a sodium phosphate buffer without AHF, while oxygen evolution by free-living *Chlorella* was stable in the same buffer. When AHF was added, the decrease in oxygen produced by symbiotic algae did not occur and the algal oxygen evolution rate remained unchanged. The sensitivity of symbiotic *Chlorella* F36-ZK to an external cation concentration suggests that the symbiont cannot regulate its own cation balance in the cell. The ability to regulate cation balance may have been lost through the endosymbiosis, because the *Paramecium* host provided a suitable cation balance to the symbiotic *Chlorella*.

【目的】我々は日本産ミドリゾウリムシ F36 からその細胞内共生クロレラ F36-ZK を取得し¹、宿主-共生クロレラ間での物質のやりとりの解明を目的に実験を行ってきた^{2,3,4}。ミドリゾウリムシを破碎して得られる抽出液（以下、体液と記す）をクロレラに添加すると、クロレラの炭酸固定が上昇し、体液中には炭酸固定を上昇させる因子（宿主因子）の存在が示唆されていた⁴。今回、この宿主因子の単離・同定を検討した。

【方法】ミドリゾウリムシ体液抽出のため、赤エンドウマメ培地で培養したミドリゾウリムシを蒸留水で洗浄し、蒸留水に再懸濁した。懸濁液を GF/C、メンブランフィルターで順にろ過して宿主細胞を破碎し、濾液を宿主体液とした。実験には、細胞換算濃度で 2.5×10^5 *Paramecium* cells ml⁻¹ になるように蒸留水で調整した体液を用いた。

炭酸固定測定には、¹⁴C 標識体を用いた。50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7)に懸濁した共生クロレ

ラ F36-ZK もしくは自由生活型 *C. vulgaris* に体液と ¹⁴C 炭酸水素ナトリウムを添加し、25°C、120 μmol m⁻² s⁻¹ の条件下で 30 分間インキュベートした。遠心ろ過にて藻体と外液をろ別し、細胞内放射線量から炭酸固定量を算出した。

酸素発生速度は、酸素電極を用いて測定した。50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7)に懸濁した藻体の暗条件下 10 分間の酸素消費量と、明条件下 (120 μmol m⁻² s⁻¹) 3 分間の酸素発生量から、正味の酸素発生速度を算出した。

【結果と考察】宿主因子は、水溶性の低分子であることが示唆されていた⁴ため、体液中の脂質をクロロホルム/メタノール抽出（クロロホルム：メタノール：水 = 1:2:0.8）により除去し、その水・メタノール画分を限外ろ過（Millipore, Ultrafree-MC）した。得られた低分子画分（MW<5,000）に体液と同等の炭酸上昇活性を確認した。精製を進めるため、宿主因子の熱安定性を検討した。体液をオートクレープ処

理 (121°C、2 時間) したが、炭酸固定上昇活性は完全に保持されており、無機物の関与を推測した。次に、体液中の有機物を完全燃焼 (700°C、1 時間) させたところ、残渣の灰分 (無機物画分) が体液と同等の活性を有していたことから、宿主因子は無機物であると考えた。

生体内で多くを占める K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} に着目し、体液中のカチオン濃度をイオン選択電極やキレート滴定を用いて測定した結果、それぞれ 1.32 mM, 0.67 mM, 0.38 mM 含まれることがわかった。カチオンの炭酸固定への影響を検討した結果、それぞれのカチオン単独では炭酸固定上昇活性を引き起こさず、 K^+ と 2 価カチオンとの組み合わせで、飛躍的に炭酸固定が上昇した。3 種のイオンすべてを混合した場合に、体液と同等の上昇活性を示したことから、宿主因子は 3 種のカチオン混合物であると考えられる。

この 3 種のカチオン混合物を人工宿主因子 (**Artificial Host Factor: AHF**) として以降の実験に用いた。

カチオン濃度を変動させ、炭酸固定への影響を検討した。その結果、2 種カチオンの同時添加でも炭酸固定量は大幅に増加したが、3 種カチオンを添加した時に最大約 6 倍まで固定量が上昇した。ミドリゾウリムシ体液中のカチオン濃度は炭酸固定上昇に至適な濃度であった。共生クロレラをもたないゾウリムシ (*P. caudatum* TA2) から、ミドリゾウリムシと同様に体液を抽出し、各カチオン濃度を測定した結果、 K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} がそれぞれ 0.2 mM, 0.43 mM, 0.03 mM 含まれていることがわかり、炭酸固定上昇

に重要な K^+ , Mg^{2+} 濃度がミドリゾウリムシ体液に比べ、極端に低いことがわかった。

AHF の作用機作を調べるため、炭酸固定反応のエネルギーを供給する明反応に着目して検討を行った。緩衝液で洗浄・懸濁した共生クロレラ F36-ZK の酸素発生速度は経時的に低下した。一方、自由生活型クロレラの酸素発生速度は、緩衝液でこのような経時的な変動はみられなかった。共生クロレラの酸素発生速度は、体液や AHF 添加で緩衝液中での経時的な低下を免れ、安定的に持続した。

以上の結果から、共生クロレラの光合成は特に外部イオン濃度の変化に敏感であることがわかった。外部の環境変化からは隔離された細胞内共生という環境で生活していたことを考えると、このような性質は退化ともとれる現象ではないだろうか。

[謝辞] *P. caudatum* を分与していただいた山口大学の藤島政博教授に深くお礼申し上げます。

[文献]

- 1) S. Kamako, R. Hoshina, S. Ueno, N. Imamura, (2005) *European Journal of Protistology* **41**, 193-202.
- 2) Y. Kato, S. Ueno and N. Imamura, (2006), *Plant Science* **170** 481-486
- 3) Y. Kato and N. Imamura, (2007), *Plant Science* in press
- 4) S. Kamako and N. Imamura (2006), *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**(2) 136-141