

日本産ミドリゾウリムシ共生藻によるマルトース生合成経路の検討

木下 宗¹, 今村 信孝² (¹立命館大学工学研究科, ²立命館大学薬学部)Study on the biosynthetic pathway of maltose produced by symbiotic *Chorella* from Japanese *Paramecium bursaria*.Tsukasa KINOSHITA¹ and Nobutaka IMAMURA^{1,2} (¹Graduate School of Science and Engineering, Ritsumeikan Univ., ²College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan Univ.)

SUMMARY

The endosymbiotic *Chorella* cells in *Paramecium bursaria* provide photosynthate in the form of maltose to the host. The pathways for maltose production by the symbiont was thought to be dependent on light conditions; i.e., a normal degradation pathway from starch in the dark, and an unusual direct synthesis from two molecules of α -glucose-1-phosphate catalyzed by maltose synthase in the light. To clarify the production pathway in light, enzymatic activity in cell-free extracts of the Japanese symbiont F36-ZK were studied. From the results of experiments using the corresponding substrates, activity of β -amylase and maltose phosphorylase was detected. The latter has been found in prokaryote cells and catalyzes a reversible conversion of maltose to glucose and β -glucose-1-phosphate. However, no maltose synthase activity was detectable in the cell-free extract. Furthermore, a crude β -amylase inhibitor prepared from *Daphne* leaves decreased the ratio of maltose to total photosynthate released by the symbiont. These results clearly indicate that the maltose is mainly produced by β -amylase from starch, and not by maltose synthase, in the light.

【目的】 淡水原生動物であるミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は細胞内に数百個のクロレラを共生させている。我々は、日本産ミドリゾウリムシ F36 の細胞内共生藻 F36-ZK の無菌株の確立を行い¹⁾、宿主-共生者間の物質輸送に関する研究を行ってきた。細胞内共生クロレラは、光合成生産物の一部をマルトースとして放出することが知られており²⁾、pH 4-5 付近の酸性条件では炭酸固定量の 30-40% に相当する光合成産物を³⁾宿主に供給していると考えられている。生体内でのマルトース生成には以下の 3 つの経路が知られている。(1) 通常の β -アミラーゼによ

るデンプンの分解でマルトースを生成する経路³⁾、(2) ホウレンソウで報告のある特異なマルトース合成酵素により α -グルコース-1-リン酸 2 分子から合成される経路⁴⁾、(3) 原核生物で知られ、可逆的に反応を触媒するマルトースホスホリラーゼにより β -グルコース-1-リン酸とグルコースから生成する経路⁵⁾ である。ミドリゾウリムシ共生藻では、暗条件下では(1)の β -アミラーゼによる生産、明条件下では(2)のマルトース合成酵素による生産が示唆されている⁴⁾。しかし、その詳細は不明だったので、特に明条件下でのマルトース生合成経路の解明を目的に、共生藻の

無細胞抽出液を粗酵素液として用いてマルトース生成経路について検討した。

[方法] 共生藻F36-ZKの藻体外放出物の殆どがマルトースであること、また、藻体内にはマルトースが含まれていないことを、放射線ラベルを用いた炭酸固定実験とHPLC分析によって確認した。共生藻F36-ZKを定常期まで培養し、50 mM リン酸緩衝液(pH 5.5もしくはpH 7.0)で洗浄した後、それぞれの緩衝液に懸濁し、明条件(30 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)で30分間静置した。この時、共生藻F36-ZKの光合成に影響を与えるカチオン濃度は、1.32 mM K^+ 、0.67 mM Ca^{2+} 、0.38 mM Mg^{2+} とした。次に1 mM PMSF(セリンプロテアーゼ)、5 mM DTT(還元剤)を加えた50 mM リン酸緩衝液(pH 5.5もしくはpH 7.0)に再懸濁し、超音波破碎機で藻体を破碎後、遠心分離(10,000 g, 10 分間)して上清の無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液中の緩衝液を交換するため、限外ろ過膜(30 kDa)付きカップを用いて遠心濃縮・洗浄を行い、それぞれ50 mM リン酸緩衝液(pH 5.5もしくはpH 7.0)に交換した。次に想定した三つの経路のそれぞれの基質である可溶性デンプン、 α -グルコース-1-リン酸、およびマルトースホスホリラーゼ活性測定用⁹⁾のサリチルアルコールとマルトースを粗酵素液にそれぞれ加え、酵素反応を行った。 β -アミラーゼ、マルトース合成酵素により生成するマルトースは、PMP(1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン)で誘導体化した後にHPLCで定量し、また、マルトースホスホリラーゼについては、生成したサリチルアルコールグルコピノサイドを定量して、それぞれの酵素活性を測定した。次に藻体を用い、 β -アミラーゼ阻害剤の光合成産物放出への影響を検討した。 β -アミラーゼ阻害剤は市販されておらず、報告に従って月桂樹葉から粗 β -アミラーゼ阻害剤を調製した。この粗 β -アミラーゼ阻害剤は、市販のマルトースホスホリラーゼは阻害せず、また、 β -アミラーゼ活性を阻害することを確認した。 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ を含む50 mM MES緩衝液(pH 5)に懸濁した藻体に、粗 β -アミラーゼ阻害剤を加えて明条件下24時間静置した後、藻体内外の光合成産物量を放射活

性から測定した。

[結果と考察] 藻体無細胞抽出液を用いた酵素活性測定で、pH 7の明条件下に置いた藻体では、可溶性デンプンからの β -アミラーゼによるマルトース生産が確認された。測定結果から、 β -アミラーゼは酸性側では不安定と考えられた。一方、 α -グルコース-1-リン酸からのマルトース合成酵素によるマルトース生産は検出されず、また、マルトースホスホリラーゼによるサリチルアルコールグルコピノサイドの生産が確認でき、真核生物では余り例のない本酵素を、共生藻が有していることが示唆された。しかしながら、マルトースホスホリラーゼは可逆的に反応を触媒することから、マルトース生産へ寄与するか、単にマルトースの分解反応を触媒しているかは不明である。次に、月桂樹の粗 β -アミラーゼ阻害剤を共生藻に加え、藻体内外の光合成産物量への影響を検討した所、阻害剤の添加により両者ともに減少した。これは粗 β -アミラーゼ阻害剤中に、光合成を阻害する物質が含まれたため、総光合成産物量が低下したと考えられた。そこで、粗 β -アミラーゼ阻害剤添加時の総光合成産物量への藻体外放出量と藻体内の量の割合を求めたところ、粗阻害剤の濃度に依存して藻体外への放出量の割合が減少した。この結果と、藻体内にマルトースは存在せず、また、藻体外放出物の殆どがマルトースであることから、明条件下でもマルトース生産には β -アミラーゼが大きく寄与していると考えられ、推定されてきたマルトース合成酵素による経路は否定された。

[文献]

- 1) S. Kamako, R. Hoshina, S. Ueno, N. Imamura (2005) *Eur. J. Protistol.*, 41, 193-202.
- 2) L. Muscatine, S.J. Karakashian, M. Karakashian (1967) *Comp. Biochem. Physiol.*, 20, 1-12.
- 3) N. Schilling (1982) *Planta* 154, 87-93.
- 4) W. Reisser (1981) *Planta* 153, 481-485.
- 5) K. Kino (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 6, 1598-1600.