

*Paramecium bursaria*の集光性における共生クロレラの役割に関する研究九十九 慎吾<sup>1</sup>, 中川 弥生<sup>1</sup>, 中岡 保夫<sup>2</sup>, 石田 正樹<sup>1</sup>( <sup>1</sup>奈良教育大学理科教育講座, <sup>2</sup>大阪大学基礎工学部システム科学科生物工学コース)Studies on the Role of Endosymbiotic *Chlorella* for Photoaccumulation  
in *Paramecium bursaria*Shingo TSUKUMO<sup>1</sup>, Yayoi NAKAGAWA<sup>1</sup>, Yasuo NAKAOKA<sup>2</sup> and Masaki ISHIDA<sup>1</sup>( <sup>1</sup>School of Science Education, Nara University of Education, <sup>2</sup>Department of Biophysical Engineering, Faculty of Engineering Science, Osaka University)

## SUMMARY

*Paramecium bursaria* cells contain several hundred endosymbiotic *Chlorella* in perialgal vacuoles. The *Chlorella*-containing *P. bursaria* stock, BND-1G, is photosensitive and accumulates in areas of appropriate light intensity (photoaccumulation), while a *Chlorella*-free *P. bursaria* stock, BND-1W, which had been artificially obtained from BND-1G by prolonged culture in darkness, does not show photoaccumulation, although the cells are photosensitive. In the current study, photoaccumulation rates were compared in two batches of cells having different numbers of endosymbiotic *Chlorella*. A higher photoaccumulation rate was observed in the batch with more *Chlorella*. The resting membrane potentials of BND-1G and BND-1W were measured using microelectrodes, and compared. The measured resting potential of BND-1W was approximately 5–8 mV negative to that of BND-1G. The resting membrane potential of the *Chlorella*-free BND-1W could be elevated to almost the level of BND-1G by the addition of maltose to the external medium, and photoaccumulation also occurred. Elevation of the resting potential and photoaccumulation were also induced in BND-1W by the addition of either the membrane-permeable cyclic nucleotide analog, 8-bromo-adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, or the cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor, theophylline. Based on these data, we discuss the role of endosymbiotic *Chlorella* in photoaccumulation of *P. bursaria*.

**【目的】** 細胞内に共生クロレラを持つ *P. bursaria* は、光強度の変化に反応し、適度な光強度の場所では、遊泳速度を減少させそこに集まる性質（集光性）を示す。Mitarai and Nakaoka (2005)<sup>3</sup>の報告によれば、*P. bursaria* の光に対する反応は、細胞膜の膜電位変化と密接な関係があり、脱分極を引き起こす Ca<sup>2+</sup> チャンネル、過分極を引き起こす K<sup>+</sup> チャンネルが関係することが示されており、光照射により細胞内のcAMP濃度が高い状態に維持された結果、これらのチャンネルが開き続けることが示されている。一方、共生クロレラを人為的に排除し継代培養したBND-1W株は、光感受性を持つにもかかわらず集光性は示さない。従って *P. bursaria* の集光性と共生クロレラの間には、密接な関係が考えられている。本研究では、クロレラを持つBND-1G株とクロレラを持たないBND-1W株を用いて、細胞内のクロレラ密度と集光性の関係を調べ。さらには、クロレラが合成するとして知られるマルトース<sup>1,2,4,5</sup>やcAMP濃度を変化させる薬品処理の影響を調べることで、集光性における共生クロレラの役割を解明することを目的とした。

**【材料と方法】** 本研究では、クロレラを共生させている株であるBND-1G株、および、BND-1G株を暗所で

継続して培養することによりクロレラを人為的に排除した株であるBND-1W株を使用した。稲わら浸出液と0.028%のハイポネクス (Hyponex Co) を含む同浸出液2種類の培養液を準備し、それぞれに餌として *Klebsiella pneumoniae* を用いた。明・暗それぞれ12時間の周期下において培養した。実験に際しては、細胞を予め標準実験溶液 (2 mM KCl, 0.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Tris-HCl, pH 7.2) 中に1日順応させた。theophylline (Wako pure chemicals) および8-bromo-adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-cAMP, Sigma) は、標準実験溶液に溶解して使用した。顕微鏡(IMT-2, OLYMPUS)搭載の光源とサンプルの間に560 nmの干渉フィルター及び赤外線フィルタをセットし、光源絞りにより、直径2.5 mmの光スポットを作った。この時の光強度は、1.32 mW/cm<sup>2</sup>である。集光性の観察においては、光スポットに集まった細胞の密度を集光密度として、次の式により算出した: **集光密度 = 一定時間の光照射後の細胞密度/光照射直後の細胞密度**。細胞内電位記録においては、標準実験溶液に6.5%エタノールを加えた溶液により脱繊毛した細胞を使用し、測定は標準実験溶液中で行った。遊泳速度は、ビデオ撮影により4秒間の遊泳軌跡の距離を測定することにより計算した。

**【結果と考察】** BND-1G, BND-1W に加え, BND-1G をハイボネクスを添加した培養液で培養し, クロレラを量的に増加させた細胞BND-1G(H)を使用し, 細胞内クロレラの含量による集光性の差を検討した。細胞が含有するクロレラの数測定においては, トーマ氏血球計算盤の上に載せた単一の細胞を破裂させることで, 細胞内のクロレラを全て計測した。BND-1G(H)は, 通常培養液で飼育したBND-1G株の約1.8倍のクロレラ数を持つという結果が得られた。集光性の観察においては, BND-1Wが集光性を示さないのに対して, BND-1Gでは集光性を示し, BND-1G(H)の方が2倍以上の高い集光密度を示した。この事は, クロレラの含有量の違いが集光性に影響する可能性を示唆していた。クロレラは, 自身の合成産物であるマルトースを宿主細胞に与えていることが知られている<sup>1,2)</sup>。そこで, BND-1Wの外液中にマルトースを添加し, その影響を検証した。

興味深いことには, マルトース投与後, 本来集光性が観察されないBND-1Wにおいて集光性が観察された。測定された静止膜電位は  $-21.8 \pm 1.5$  mVであり, マルトースを投与しないコントロール ( $-28.0 \pm 2.3$  mV) より高い値を示した。さらに, 遊泳速度においては,  $74.3 \pm 27.1$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ とコントロール ( $425.7 \pm 69.3$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) に比較して低い値を示した。一方, クロレラが合成するその他の糖および合成しない糖においても同様に実験を行ったところ, 集光性は観察されず, 静止膜電位にも変化は見られなかった。遊泳速度においても, 無処理のBND-1Wとほとんど変わらないという結果が得られた。したがって, マルトース投与は, 静止膜電位に変化を与えた結果, 遊泳速度に変化がおこり, BND-1Wの集光性を回復

させた可能性が考えられた。

theophyllineや8-Br-cAMPは共に, 細胞外液に投与することにより細胞内cAMPの濃度を上昇させる事が期待される薬品である。そこで, これら細胞内cAMP濃度を変化させる薬品処理によってBND-1Wにおいて集光性が観察されるか否かを検証した。結果として, これらの処理により集光性は観察され, 静止膜電位は, theophyllineで  $-20.8 \pm 1.6$  mV, 8-Br-cAMPで  $-20.4 \pm 1.14$  mV まで上昇, 遊泳速度は, それぞれ  $68.6 \pm 33.9$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ および  $77.5 \pm 57.5$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ へと減少する結果が得られた。Mitarai and Nakaoka (2005)<sup>3)</sup>は, BND-1G株において, 酵素免疫測定法によりcAMP濃度を測定し, 照射後の細胞内cAMP濃度が増加することを報告し, 細胞内cAMP濃度の増加 $\rightarrow$ Ca<sup>2+</sup>チャンネルの開口 $\rightarrow$ 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加 $\rightarrow$ 繊毛打の変化 $\rightarrow$ 遊泳速度の減少 $\rightarrow$ 集光性が達成されるという仮説を示している。本研究の結果は, これを支持するものであり, クロレラを持たないBND-1Wにおいても, 同様の仮説が成り立つものと考えられる。

#### 【文献】

- 1) Brechignac, F. and Wolf, L. (1994) Adv. Space Res., 14:79-88.
- 2) Brown, A.J. and Nielsen, A.J. (1974) J. Protozool., 21:569-570.
- 3) Mitarai, A. and Nakakoka, Y. (2005) Photochemistry and Photobiology, 81,1424-1429.
- 4) Tanaka, M. and Miwa, I. (2000) Zoological Science, 2000 17, 735-742.
- 5) Weis, D.S. (1979) J. Protozool., 26, 117-119.