

ミドリゾウリムシの過酸化水素耐性に対する共生クロレラの影響

小林 啓, 三輪 五十二
(茨城大・院理工)Effects of the symbiosis chlorella on the hydrogen peroxide tolerance in
*Paramecium bursaria*Kei KOBAYASHI and Isoji MIWA
(Grad. Sch. Sci. Engn., Ibaraki Univ.)

SUMMARY

Cells of *Paramecium bursaria* contain several hundred symbiotic *Chlorella* in the cytoplasm. *Chlorella*-free white cells are obtainable easily from natural green cells by rapid growth in constant darkness (DD). White cells can also be restored quickly to green ones by the infection of *Chlorella* isolated from green cells. In this study, to confirm the role of symbiotic *Chlorella* in enhancing tolerance to hydrogen peroxide using *Chlorella*-free and *Chlorella*-containing cells. More than 70% of white cells died within 12 hr in 100 μ M hydrogen peroxide. Most green cells lived in the darkness after hydrogen peroxide treatment, although they showed as low a survival rate as the white ones in constant light (LL) did. Furthermore, the degree of tolerance to hydrogen peroxide in white cells became as high as that of the green cells after maltose added. When the survival rate of white cells was measured in hydrogen peroxide after infection with *Chlorella*, many cells died for one day after re-infection even though cells contained many *Chlorella*. However, the survival rate increased to high as same as the green cells five days after re-infection. We clarified that symbiotic *Chlorella* of *P. bursaria* enhanced the tolerance to hydrogen peroxide in host cells.

【目的】 ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は体内に数百個の緑藻クロレラを共生させており緑色をしている。水界生態系の多くの生物において、細胞外、及び細胞内での酸化ストレスが、生理的な負担となることがわかっている。光合成細菌と共生している生物は自身の呼吸に加えて、共生藻の呼吸、および昼間の光合成によって、体内における酸素濃度が劇的に変化する。そのため、光合成を行う生物は酸化ストレスを軽減させる効率的なメカニズムを持っている。しかし、酸化ストレスの主な原因である活性酸素は、光状態によって反応性が変化する物質であり、光が当たることによって反応性の大きい物質に変化していく。そのため、いくら酸化ストレスを軽減するシステムを持っていようとも、酸化ストレスが多すぎた場合、これを処理する能力には限界があると考えられる。

今回、*P. bursaria* の緑色細胞、白色細胞に活性酸素の一種である過酸化水素を与え、一定時間後の生存率を調べた。光条件やそれに伴う光合成によって生じる物質、細胞内のクロレラ数、それぞれが *P. bursaria* の過酸化水素耐性にどのような影響を与えているのかを検証した。

【方法】 定常期、明期の細胞を使用した。最終的な過酸化水素濃度が 100 μ M になるように調節し、混合した時間を 0 時間後として、12 時間後の生存率を測

定した。混合後、恒明 (LL) 条件に置いた場合と恒暗 (DD) 条件に置いた場合の測定を行った。光合成産物の影響を確かめるため、マルトースを与えてから1時間後、ミドリゾウリムシを洗浄し同様の実験を行った。

緑色細胞から抽出したクロレラを白色細胞に再感染させ、時間経過による細胞内のクロレラ数の変化と過酸化水素耐性を計測した。過酸化水素処理後は全て DD 条件下に置いた。また、緑色細胞を 2 週間 DD 条件下で培養し、時間経過による細胞内のクロレラ数の変化と過酸化水素耐性を計測した。過酸化水素処理後は全て DD 条件下に置いた。

【結果】 過酸化水素処理後、LL 条件に置いた緑色細胞、白色細胞、DD 条件に置いた白色細胞は 10-30% の生存率を示したのに対し、DD 条件に置いた緑色細胞だけは 90% 前後の高い生存率を示した。マルトースを与えて実験を行ったところ、DD 条件に置いた緑色細胞以外で生存率の上昇が見られた。

再感染実験において、感染直後が最もクロレラを取り込んでいたが、生存率は白色細胞と同程度の値を示した。5 日目から生存率が大幅に上昇し、通常の緑色細胞と同等の値を示すようになった。

DD 培養実験では 3 日目まで細胞内のクロレラ数は 300 前後を維持、生存率も通常の緑色細胞と変わらなかった。しかし、4 日目にクロレラ数が 100 個

体近く減り生存率も半減, 7 日目にはクロレラ数は 100 以下となり, 白色細胞の生存率とほぼ同程度の値を示した. その後は少しずつクロレラ数が減少していったものの完全に 0 になることはなく, 生存率は一定して白色細胞と同じ値を示した.

[考察] LL 条件下では過酸化水素がより活性の高い活性酸素に変化しやすい. そのため, 緑色, 白色細胞ともに, DD 条件下のときよりも生存率が低くなったと考えられる. 過酸化水素とともにカタラーゼを与えて実験すると, 全ての条件下の細胞が 90% 前後の生存率を示した. カタラーゼは過酸化水素の分解酵素であるため生存率が上昇するのは当然だが, 大きな生存率の上昇は, 光による過酸化水素の変化が生存率に与える影響が大きいことを示している. しかし, 光合成産物のマルトースが過酸化水素に対する耐性を上昇させるという結果も出ている. クロレラの光合成が, ミドリゾウリムシの酸化ストレス軽減に繋がっていることも確かなことである. DD 条件に置いた緑色細胞だけが高い生存率を示したのは, 活性の高い活性酸素が発生しづらい条件であり, 明期に生産されたマルトースが体内に残っており, 生存率の上昇の手助けをしていたためと考えられる.

再感染直後, 細胞内のクロレラ数が最大であった

にもかかわらず生存率が低いままだったのは, 共生関係を確立していないクロレラがどれだけ細胞内においても, 生存率には影響がないことを示している. 再感染 5 日目に生存率が急激に上昇したのは, 共生関係が確立するのが 5 日目からであると考えられる. また, DD 培養 4 日目に大きく生存率が低下したのは, DD 培養を続けたためにミドリゾウリムシとクロレラの共生状態が不安定になったためと考えられる. これらの結果を総合して考えると, 共生関係を確立したクロレラの存在が生存率に影響を与えていることがわかる.

近年の研究結果によれば, 過酸化水素の耐性に関して, 緑色細胞と白色細胞でほとんど変化がない, または, 緑色細胞の方が日常的に多くの酸化ストレスにさらされており, 白色細胞の方が耐性が高いと報告されている^{1,2)}. しかし, 今回の実験結果では, クロレラの影響によって, 緑色細胞の方が耐性が高いということが示されている. 今回の結果は, ミドリゾウリムシにおけるクロレラ役割を議論するための材料になるだろう.

[文献]

- 1) Kawano et al. (2004) Z. Naturforsch. C, 59, 538-542.
- 2) Hortnagl and Sommaruga (2007) Photochem. Photobiol. Sci., 6, 842-847.