

酸化ストレス物質により生じるゾウリムシの行動反応とその制御機構の研究

池内 花穂子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 大網 一則 (筑波大学 生命環境系)

導入

ゾウリムシは体表に無数に存在する繊毛の運動により水中を活発に遊泳する単細胞生物である。生物としては単純な体制だが、細胞表面にはイオン濃度や機械的刺激など外界の環境情報を受容する受容器を持つ。ゾウリムシはこれらの刺激に対して遊泳行動を変化させ、刺激に対して集合したり離散したりすることが知られている。様々な外的ストレスが考えられる自然界で生き抜く上で、ゾウリムシのこのような行動反応は重要である。

環境ストレスのなかでも、酸化ストレスによる影響は生物にとって無視できないものである。活性酸素は、酸素分子 O_2 が通常より反応性の高い状態になった化合物の総称で、強い酸化力をもつため細胞内では核酸、タンパク質、脂質、糖などを酸化変性させ、様々な細胞機能障害の原因となる。生体内ではミトコンドリアによるエネルギー生産過程で活性酸素の発生を免れることができないため、生物は活性酸素を処理する酵素による抗酸化反応機構を持つが、過剰な活性酸素が生じると、細胞の老化やがん化の原因になることが知られている。

私は、生体に障害を与えうる影響力を持つ酸化ストレス物質に対して、単純な体制のゾウリムシがどのような反応を示すのかに興味を持った。これまでに、酸化ストレス物質、過酸化水素 (H_2O_2) がゾウリムシに有害であること、更に、ゾウリムシは H_2O_2 溶液中で回避反応を示すことが明らかになっているが、その行動反応を制御するメカニズムは明らかでない。この実験では、 H_2O_2 がゾウリムシの行動にどのように作用するかをさらに詳しく調べ、また、 H_2O_2 が行動反応のどのプロセスに影響を与えているのかについて調べることを目的とした。

材料・方法

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は麦藁の抽出液を用いて培養した。培養したゾウリムシは標準溶液 (1 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM Tris-HCl ; pH7.4) で3回洗い、30分以上放置し順応させた後、実験に用いた。 H_2O_2 は標準溶液に溶いた。ゾウリムシの行動反応は実体顕微鏡で観察、もしくは暗視野照明下でビデオテープへ記録し、解析した。Triton モデルの作成は Nitoh と Kaneko (1972) の方法によった。

結果

はじめに、ゾウリムシを異なる濃度の H_2O_2 を含む溶液に入れ、行動反応と生存を調べた。ゾウリムシは 0.1 mM 以下の H_2O_2 溶液中では特別な行動反応を示さず、長時間生存可能であった。1 mM 以上の H_2O_2 溶液中に入れると、ゾウリムシは回避反応を含む行動反応を示した。しかし、これらの濃度では、時間とともにゾウリムシの形が通常の草履型から丸く変形し、最終的に運動を停止して死んだ。生存可能な時間は H_2O_2 の濃度が低い程長かった。

次に、 H_2O_2 に対するゾウリムシの行動反応を詳細に観察した。標準溶液から素早く H_2O_2 溶液に移したゾウリムシは、はじめ、

通常の遊泳速度より若干速い速度で前進遊泳を続けた。この前進遊泳は溶液に入れてから 1-2 分ほどで終了し、通常の前進遊泳速度に戻った。その後、ゾウリムシは後退遊泳とそれに伴う方向転換、前進遊泳を繰り返すようになり、ジグザグした遊泳軌跡を描いた。このジグザグ遊泳は暫くすると終わり、次に、ゾウリムシは通常時より遅い速度で前進遊泳した後、遊泳を停止し、死亡した。この様な一連の行動反応は 1 mM 以上の H_2O_2 溶液中で生じたが、 H_2O_2 濃度が高い程、ジグザグ遊泳を繰り返す時間が短く、また、方向転換の頻度も高かった。溶液に入れた直後に見られる前進遊泳の持続時間は H_2O_2 濃度によりあまり変化しなかった。

ゾウリムシを 10 mM H_2O_2 溶液に入れてから 5 秒~30 秒間おき、その後標準溶液に戻したときの行動反応を調べた。いずれの場合も、ゾウリムシは標準溶液に移したあとに回避反応を含んだジグザグ遊泳を行った。

H_2O_2 溶液中でみられるジグザグ遊泳を制御するメカニズムを調べる目的で、界面活性剤で細胞膜を除去処理したモデル細胞 (Triton モデル) に H_2O_2 を作用させ、その効果を調べる実験を行った。現在、Triton モデルの再活性化率が充分でないため、 H_2O_2 の繊毛運動系に及ぼす効果は明らかでないが、引き続き、検証を続ける所存である。

考察

今回の実験から、 H_2O_2 がゾウリムシに対して有毒であることが確認された。また、ゾウリムシの H_2O_2 による行動反応の流れがおおよそ連続した 4 つの段階に分けられることが明らかになった。はじめの素早い前進遊泳とそれに続くジグザグ遊泳は有毒な H_2O_2 を避ける行動反応であると考えられる。それに続くゆっくりした前進遊泳と細胞の変形は H_2O_2 の毒性に起因した細胞のダメージを反映していると考えられる。

ゾウリムシを H_2O_2 溶液に入れて初めに生じる素早い前進遊泳は、 H_2O_2 が細胞表面の受容器で受容されて生じると考えられる。これに対して特徴的なのが、回避反応を含むジグザグ遊泳であり、この反応はかなりのタイムラグを経て生じる。細胞表面の受容器を仲介した行動反応は速やかに生じると考えられることから、このタイムラグは H_2O_2 が細胞内に透過し、何らかの作用を及ぼしている可能性を示唆する。現在、予想される H_2O_2 の作用部位として、繊毛の動きを制御する運動系を想定して、Triton モデルを用いた実験を行っている。また、ゾウリムシの遊泳行動や回避反応は細胞膜の電気現象で制御されていることが知られており、 H_2O_2 が膜上のチャンネルに作用し膜電気現象に影響を及ぼしている可能性も考えられる。今後、Triton モデルの再活性化率を上昇させ H_2O_2 の運動系への影響を明らかにするとともに、微小電極を用いて膜電気系への影響の検証も進めていきたいと考えている。