研究ノート

Euglena gracilis z における無機 イオンの要求性と蓄積

越智宏倫*, 重岡 成**, 飯塚義富**
渡辺文雄***, 中野長久****

北岡正三郎****

* 日本老化制御研究所

** 近畿大学農学部

*** 羽衣学園短期大学家政科

**** 大阪府立大学農学部

Requirement and Accumulation of Inorganic Ions in *Euglena gracilis* z

Hiroto OCHI,* Shigeru SHIGEOKA,**
Yoshitomi IIZUKA,** Fumio WATANABE,**
Yoshihisa NAKANO****
and Shozaburo KITAOKA****

* Japan Geriatric Research Institute,
Fukuroi, Shizuoka 437-01

** Department of Food and Nutrition,
Kinki University, Nara 631

*** Laboratory of Nutrition and Food Science,
Hagoromo-gakuen Junior College, Sakai,
Osaka 592

**** Department of Agricultural Chemistry,
University of Osaka Prefecture,
Sakai, Osaka 591

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (J. Jpn. Soc.
Nutr. Food Sci.) 43, 54~57 (1990)

To elucidate the requirement of inorganic ions in *Euglena gracilis* z, the organism was grown in medium depleted of each of the following metal ions: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} . *Euglena* cell growth was depressed by depletion of Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , or Fe^{3+} , but not by that of Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , or Ni^{2+} , indicating that *Euglena* has an absolute requirement for at least Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , and Fe^{3+} for growth. *Euglena* was grown in medium supplemented with a large amount of each metal ion (10 or 100 times that in original Koren-Hutner medium) to study ion uptake and accumulation. *Euglena* cell growth was significantly depressed by ad-

dition of 100-fold excess Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , or Ca^{2+} . However, Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , and Fe^{3+} were taken up by the cells and accumulated at levels 130, 30, 16, 11, and 3 times higher than those in cells grown in the standard medium, respectively.

Key Words *Euglena*, inorganic ion, metal ion.
(Received July 19, 1989)

生物、とくにヒトを含めた高等動物において正常な発育や生物学的機能を営む上で、数種の無機イオンの摂取が必須であることはよく知られている¹⁾。これら無機イオンの欠乏により機能障害を引き起こす。また、ある種の無機イオンは潜在的欠乏状態であることも少なくない²⁾。しかし、それら無機イオンの詳細な生理的役割はいまだ不明の点が多い。

単細胞真核生物である *Euglena* においても同様に無機イオンとして Mg^{2+} , PO_4^{4-} , SO_4^{2-} , Cl^- , K^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} が培地中から供給される³⁾ が、それら無機イオンの要求性およびその生理機能についての知見は非常に少ない。そこで無機イオンの生理機能の解明を目的として、まずはじめに *Euglena* における無機イオンの要求性および細胞内蓄積について検討した。

実験材料および方法

1. 生物および培養法

本実験には野性株である *Euglena gracilis* z を用いた。*Euglena* の培養は Koren-Hutner 培地 (KH 培地)³⁾ を基本培地として用い、その中の無機イオン量のみを種変化させた培地で 27°C, 2,000 lux で 6 日間振とう培養した。無機イオンとして $MgCO_3$, $CaCO_3$, $FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4$, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ が通常の KH 培地にはそれぞれ 600, 120, 50, 18, 25, 0.5, 0.5 mg/l 培地含有されている。この KH 培地から各無機イオンを単独で除いたものをその無機イオン欠乏培地とした。一方、KH 培地に各無機イオンをその 10 倍量添加したものを無機イオン 10 倍過剰培地、100 倍量添加したものを 100 倍過剰培地として本実験に用いた。

各無機イオン欠乏細胞の調製は通常の KH 培地で 5 日間前培養した *Euglena* 細胞 1.0 ml (約 20×10^6 cells/ml) を各無機イオン欠乏培地 50 ml に無菌的に接種し、6 日間培養した。この細胞をさらに 2 回各無機イオン欠乏培地 (50 ml) で 6 日間培養した細胞を各無機イオン欠乏細胞とした。

* 〒437-01 静岡県袋井市春岡

** 〒631 奈良市中町 3327-204

*** 〒592 堺市浜寺南町 1-89-1

**** 〒591 堺市百舌鳥梅町 4-804

各無機イオン過剰細胞の調製は通常の KH 培地で 5 日間前培養した *Euglena* 細胞 1.0 ml を各無機イオン過剰培地 (50 ml) に無菌的に接種し、6 日間培養した。この細胞をさらにもう一回各無機イオン過剰培地で 6 日間培養した細胞を各無機イオン過剰細胞とした。

本実験に用いた器具等の洗浄からすべてにおいて再蒸留水を使用し、他の無機イオンの混入を最小限におさえた。

2. 細胞内金属元素含有量の測定

各 *Euglena* 培養液 (5~10 ml) を $3,000 \times g$ 15 分間の遠心分離により細胞を集め、再蒸留水で 2 回洗浄後、減圧乾燥した。その細胞 10 mg (乾燥重量) を衛生試験法⁴⁾に準じ、硝酸・硫酸系により湿式灰化した。このように調製した試料を用いてアセチレン炎原子吸光法により各金属元素を定量した。また、原子吸光分析計は日本ジャレル・アッシュ株式会社 AA-1, MK-11 を用いて行った。

3. 試 薬

Zn, Mg, Fe, Mn, Ca, Cu, Ni および Co 測定用標準液はすべて和光純薬工業製原子吸光分析標準液を用いた。その他、湿式灰化処理などに用いた硝酸、硫酸はすべて和光純薬工業製精密分析用を用いた。

結果および考察

1. 無機イオン欠乏と過剰添加の生育に及ぼす影響

各無機イオン欠乏培地で培養した細胞については Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} 欠乏のものに、正常のものと比べて細胞数の減少が認められた (Fig. 1)。各無機イオン欠乏細胞の定常期 (生育 5 日目) の細胞数は Zn^{2+} 欠乏で 4.67×10^6 cells/ml, Mg^{2+} 欠乏で 1.40×10^6 cells/ml, Fe^{3+} 欠乏で 13.0×10^6 cells/ml, Mn^{2+} 欠乏では 14.0×10^6 cells/ml であった。その他の無機イオン欠乏細胞の細胞数 (Ca^{2+} 欠乏, 21.5×10^6 cells/ml; Ca^{2+} 欠乏, 20.7×10^6 cells/ml; Ni^{2+} 欠乏, 19.6×10^6 cells/ml; Co^{2+} 欠乏, 22.0×10^6 cells/ml) は正常細胞 (約 20×10^6 cells/ml) と同程度の生育を示し、無機イオン欠乏による細胞数の著しい変化は認められなかった。また細胞数の減少した各無機イオン欠乏細胞にそれぞれの欠乏無機イオンを添加したところ、添加後 10 日間でいずれの欠乏細胞も正常細胞と同様の細胞数になった。このことは Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} の欠乏が *Euglena* の細胞増殖を抑制することを示し、*Euglena* の生育には少なくともこれらの無機イオンが必須であることを示唆している。

各無機イオン 10 倍過剰培地で培養した細胞については Ni^{2+} , Co^{2+} で著しく細胞数が減少し、それぞれ 9×10^3 cells/ml, 1.7×10^4 cells/ml であったが、それ以外の

Fig. 1. Growth of *Euglena* cells in each of metal ion-depleted medium.

a, normal (control); b, Fe^{3+} ; c, Mn^{2+} ; d, Zn^{2+} ; e, Mg^{2+} . Five days after each of metal ion was added to the respective metal ion-depleted medium. Each dotted line show the growth after the addition of the respective metal ion.

ものは正常細胞と同様の細胞数 (20×10^6 cells/ml) であった。また 100 倍過剰培地の場合は Ni^{2+} , Co^{2+} 以外に Mg^{2+} , Ca^{2+} でも細胞数は減少し、それぞれ 3×10^3 cells/ml, 7×10^3 cells/ml, 3×10^3 cells/ml, 1×10^6 cells/ml であった。それ以外の無機イオンは正常細胞と同様の細胞数を示した。この結果は *Euglena* が Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} 以外の高濃度の無機イオンに対して耐性をもつことを示唆している。

2. 無機イオン欠乏と過剰添加の細胞内金属元素含有量

各無機イオン欠乏細胞の細胞内金属元素含有量を測定した結果、 Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} 欠乏細胞ではこれらの無機イオンは細胞内には検出されなかった。また、 Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} 欠乏細胞では正常細胞に比べるとこれらの無機イオンは著しく減少 (Zn^{2+} , $12 \text{ ng}/10^6$ cells; Mg^{2+} , $80 \text{ ng}/10^6$ cells; Fe^{3+} , $30 \text{ ng}/10^6$ cells) していた (Table 1)。細胞内 Cu^{2+} , Ni^{2+} および Ca^{2+} 含量の著しい欠乏にもかかわらず *Euglena* の生育はまったく影響をうけなかった。多くの生物において Cu^{2+} と Ca^{2+} は非常に重要な役割を演じていることが知られている⁵⁾。*Euglena* がこれらの金属イオンが検出できないほどに不足しても正常な生育を示すことは他の金属イオンが代替えるのか、検出限界以下の量 (Cu , $< 0.5 \text{ ng}/10^6$ cells; Ni , $< 1.0 \text{ ng}/10^6$ cells; Ca , $< 0.5 \text{ ng}/10^6$ cells) できわめて効率的に機能しているのか、これらの無機イオンの生理的役割に非常に興味もたれる。一方、著しい細胞増殖の減少をきたした Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} および Fe^{3+} 欠乏細胞に各欠乏無機イオンを添加すると、これら無機イオンを活発に取り込み、上述したように

Table 1. Contents of some metal ions in *Euglena* cells grown under various conditions.

	Normal cells	Deficient cells	(μg/10 ⁶ cells)	
			Supplemented cells	
			10-fold excess	100-fold excess
Zn	0.795	0.012	1.51	2.23
Mg	0.165	0.080	0.70	0.58
Fe	0.153	0.030	0.23	0.67
Mn	0.024	<0.0005	0.23	0.95
Ca	0.046	<0.0005	0.07	0.12
Cu	0.004	<0.0003	0.04	0.59
Ni	0.006	<0.001	—	—

Bar mean not tested.

Euglena は急激な細胞増殖を行い添加 10 日目には正常細胞と同様にまで生育し、しかもその時の各無機イオン添加細胞内含量は正常細胞のそれと同様のレベルまで取り込み蓄積した。

各無機イオン過剰細胞内金属含有量を測定した (Fig. 2)。10 倍過剰細胞では Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 過剰細胞は正常細胞の約 10 倍量 (Mn^{2+} , 0.24 μg/10⁶ cells; Cu^{2+} , 0.04 μg/10⁶ cells) の含有量を示したが、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 過剰細胞ではそれぞれ正常細胞の 4.2 (0.7 μg/10⁶ cells), 1.9 (1.51 μg/10⁶ cells), 1.5 (0.25 μg/10⁶ cells), 1.5 (0.07 μg/10⁶ cells) 倍量の各無機イオンを含んでいた。100 倍過剰細胞では Cu^{2+} 過剰細胞は正常細胞の約 130 倍 (0.59 μg/10⁶ cells) もの Cu^{2+} を含んでいた。 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 過剰細胞では正常細胞のそれぞれ 30 (0.95 μg/10⁶ cells), 16 (2.23 μg/10⁶ cells), 11 (0.12 μg/10⁶ cells), 3 (0.67 μg/10⁶ cells) 倍であった。

また Ni^{2+} および Co^{2+} 過剰細胞は細胞数が非常に少なく各無機イオン含量は測定できなかった。以上の結果から *Euglena* には生育をまったく阻害することなく Cu^{2+} および Mn^{2+} を細胞内に活発に取り込み蓄積する能力のあることを示している。また細胞内に取り込まれた Zn^{2+} はセファデックス G-15 のゲルろ過によりタンパク質と結合して存在していることが明らかとなった (重岡 成, 未発表データ)。

Euglena gracilis には Metallothioneine (Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 結合タンパク質) の存在が報告されており⁶⁷⁾、おそらく上述した Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 等の細胞内過剰蓄積はこのタンパク質の関与によるものと思われる。

Euglena は各種ビタミンを生合成または取込みにより高濃度に蓄積し⁸⁾、またカゼインに匹敵する良質のタン

Fig. 2. Effect of the addition of large amount of metal ion on *Euglena* growth.

(A) 10-fold excess, (B) 100-fold excess. a, normal (control); b, Fe^{3+} ; c, Mn^{2+} ; d, Ca^{2+} ; e, Zn^{2+} ; f, Cu^{2+} ; g, Mg^{2+} ; h, Co^{2+} ; i, Ni^{2+} .

パク質を含んでいる⁹⁾。さらに上述したように *Euglena* は無機イオン (とくに Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+}) を細胞内に取り込み蓄積する。したがって *Euglena* の培地組成および培養条件等を組み合わせることにより、ビタミンや無機質を多量に含む細胞を調製することができ、*Euglena* 細胞自体が機能性食品として利用できる可能性が示唆された。

要 約

Euglena における無機イオンの生理機能の解明を目的としてまず *Euglena* の無機イオンの要求性と細胞内蓄積について検討した。

1) *Euglena* の無機イオンの要求性を調べるために各無機イオン欠乏培地で *Euglena* を培養しその生育に及ぼす影響を調べた。その結果、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} および Mn^{2+} の欠乏が *Euglena* の生育を著しく抑制したことから、少なくともこれらの無機イオンが生育に必須であることが明らかとなった。

2) *Euglena* の無機イオンの細胞内蓄積を検討するために各無機イオン過剰培地 (10 倍および 100 倍過剰) にて *Euglena* を培養しその細胞内無機イオン量を測定し、その細胞内蓄積について検討した。その結果、*Euglena* は Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 過剰により著しく生育が抑制されたが、それ以外のもの (Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+}) に対して耐性をもっていた。各無機イオン 10 倍過剰細胞において Mn^{2+} と Cu^{2+} は正常細胞の約 10 倍量を含んでおり、その他のイオンにおいても 1.5~6.5 倍の蓄積量を示した。また 100 倍過剰細胞では Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} においてそれぞれ正常細胞の約 130, 30, 16, 11, 3 倍の蓄積量を示した。この結果から *Euglena* が生育を全く阻害されることなく Cu^{2+} および

Mn²⁺ を細胞内に活発に取り込み蓄積する能力のあることが明らかとなった。

文 献

- 1) Underwood, E.J. : Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 1 (1977), Academic Press (New York)
- 2) Flodin, N.W. : Vitamin/Trace Mineral/Protein Interaction s, 156 (1979), Eden Press (West-mount)
- 3) Koren, L.E. and Hutner, S.H. : *J. Protozool.*, **14** (Suppl.) 17 (1967)
- 4) 日本薬学会 : 衛生試験法注解, 290 (1980), 金原出版 (東京)
- 5) Underwood, E.J. : Trace Element in Human and Animal Nutrition, 56-108 (1977), Academic Press (New York)
- 6) Gingrich, D.J., Weber, D.N., Shaw, C.F., Garvery, J.S. and Petering, D.V. : *Environ. Health Perspect.*, **65**, 77 (1986)
- 7) Gingrich, D.J., Petering, D.H. and Shaw, C.F. : *Mar. Environ. Res.*, **14**, 89 (1984)
- 8) 越智宏倫, 渡辺文雄, 重岡 成, 中野長久, 北岡正三郎 : 栄食誌, **41**, 496 (1988)
- 9) 細谷圭助, 北岡正三郎 : 農化, **51**, 483 (1977)

(1989 年 7 月 19 日受理)