

3Da-7

クロレラ細胞の酸性コンパートメント（液胞）のpH、
構造、機能 - *in vivo* NMRによる解析

○ 朽津和幸、大浜多美子、都筑幹夫、宮地重遠
(東大・応微研)

植物細胞において液胞は、高分子物質の蓄積と分解、細胞質とのイオンや代謝産物の交換などを行い、細胞質の恒常性の維持機能を持つと考えられている。さらに高等植物の巨大な液胞は、体表面積を大きくして光合成能を上げるために、細胞内の大きな空間を充填する役割も果している。液胞の進化や、基本的な特徴の理解のためには、より単純な植物システムの液胞の研究も相補的に重要である。この意味で、独立、従属どちらの栄養形態でも生育でき、生理条件によって代謝パターンを大きく変化させることのできる単細胞藻類は、優れたモデル系になり得ると考えられる。しかし、単細胞藻類の液胞については、従来、電子顕微鏡レベルの形態学的な知見が得られていただけで、生理的な情報は全く得られていなかった。

単細胞緑藻 *Chlorella vulgaris* 11h 細胞の、 ^{31}P -*in vivo* NMRスペクトルを測定したところ、無機リン酸のシグナルが2つ観測され(図1 a)、それらは共に、細胞内のpHの異なる2つのコンパートメントに由来すると帰属された。細胞の過塩素酸抽出液におけるpH滴定曲線から、それらの区画のpHは、 7.1 ± 0.2 、 6.3 ± 0.2 であり、それぞれ細胞質、及び酸性コンパートメント(液胞)に対応するものと推定された。そこで、液胞に特異的に取り込まれる塩基性試薬(ニュートラルレッド、クロロキン)を用いて細胞化学的に液胞を検出したところ、その発達状況は、NMRの酸性シグナルの挙動とよく対応した。すなわち、定常増殖期の細胞ではNMRにより顕著な酸性シグナルが検出され、そのとき液胞は大きく融合してよく発達していた(図2)。一方、直線増殖期の若い細胞では、NMRの酸性シグナルは検出されず(図1 b)、塩基性試薬を蓄積するオルガネラも、極めて小さかった。また細胞をアンモニアで処理すると液胞はアルカリ化され、そのとき酸性シグナルは、細胞質のシグナルに重なった(図1 c)。これらの結果から、NMRの酸性シグナルは、液胞内に存在する無機リン酸に由来することが明らかとなった。また液胞は、細胞内で活発に運動していることが観察された。細胞外のpH変化に対してはpH 3-10の範囲で、細胞質や液胞のpHは安定に保たれた。一方、細胞を暗黒下で嫌気処理したところ、ブドウ糖を添加した際に、液胞のpHの低下が見られた。これは、乳酸発酵により過剰に細胞質に蓄積された有機酸が、液胞に蓄積された可能性を示唆する。

このように、*in vivo* NMR法と、細胞化学的な方法との組合せにより、さまざまな生理条件における液胞のpHや発達状況を容易に調べられることが示された。同様のオルガネラは、*Chlamydomonas*、*Euglena*、*Porphyridium* など単細胞藻類に一般的にみられた。このような単細胞性の光合成生物においても、液胞が細胞質中のpH、代謝産物の濃度などの恒常性の維持機能を担っていることが示唆された。

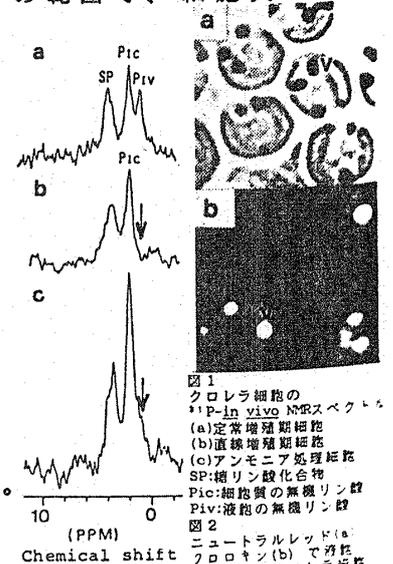


図1 クロレラ細胞の ^{31}P -*in vivo* NMRスペクトル。
(a)定常増殖期細胞
(b)直線増殖期細胞
(c)アンモニア処理細胞
SP:細胞質の無機リン酸
Piv:液胞の無機リン酸
図2 ニュートラルレッド(a)、クロロキン(b)で液胞を染色したクロレラ細胞。V:液胞