

学位論文題名

Ultraviolet irradiation and methyl viologen-induced cellular damage in *Euglena gracilis*; Coenzyme Q9 redox status as a marker of oxidative stress.

(*Euglena gracilis* における紫外線照射と methyl viologen 細胞障害および酸化ストレスマーカーとして Coenzyme Q9.)

学位論文内容の要旨

序章：地球環境概観と著者の研究動機

農薬、殺虫剤などの長期間に亘る過剰利用が、環境中に散逸し、野生動物の繁殖率の低下、奇形野生鳥類増加の原因として疑われている。大量の除草剤が水圏環境中に運ばれ、また産業廃棄物、殺虫剤などの農薬の残留が、水質汚染を起こしている。Fluorocarbon 化合物は人と自然の両方に、安全な化学物質であると最初は考えられていたが、オゾン層の破壊を招きオゾン・ホールを拡大を招き、生態系や個々の生物に紫外線暴露による危険を増す結果を招いている。OH ラジカルを生み出すことを通じて、紫外線Bが、また紫外線Aも一重項酸素を生成して生物の機能を傷つけ障害を起こす。OH ラジカルと一重項酸素など過剰の活性酸素に晒されると生体分子に重大な損害を与えることは、よく知られている。一旦オゾンホールが広がると、それは生態系のみならず、我々の健康にも障害を引き起こす危険性を孕んでいる。しかし、人間に対する障害が顕在化するはるかに前に、紫外線の障害は、植物・動物プランクトンのような小さい生き物に現われる。

プランクトンは、水圏の生態系において食物連鎖を構築し、水圏の生産性の主要な支えであり、プランクトンの生産性が低下すると海の生産性に影響する。水圏の生産性に及ぼすオゾンホールと紫外線障害との関係に関する研究の多くは紫外線暴露の影響だけに注目されているものが殆どである。

実際には、紫外線暴露と化学物質の暴露が同時に起きているので、著者は、紫外線と環境中に廃棄される化学物質が同時に生物に作用した場合、水圏の微小生物にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的に研究を行った。除草剤、methyl viologen (MV) は、世界的に農場やゴルフコースなどの雑草の除去に広く使われ

ている、非常に強力な除草剤である。MV の除草効果は植物組織を構成する細胞内で  $O_2^-$  が生成され、枯死させるが、時に養殖施設で魚の大量死を起こすことも知られている。

紫外線、MV いずれも活性酸素・フリーラジカルを生成し、生物機能に影響を及ぼすことを考慮すると、この両者が同時に生物、特に微小生物に作用する際の影響を調べ、障害発現の早期発見、障害防止などの対策を講じることは、極めて重要である。同時に、著者は、科学的な証拠を示すことを通して環境保護の重要性と、酸化的ストレスが生体に及ぼす影響の普遍性を明らかにすることが出来ると考えた。著者が、研究に用いた *Euglena gracilis* 細胞は、植物と動物プランクトン両方の特徴を示す 原生生物で環境の化学物質の効果についての多くの報告がなされており、研究の遂行に、光合成株 *E. gracilis* Z と、葉緑体欠損変異株 SMZ 株を用いた。著者は、先ず *E. gracilis* Z, SMZ 両株への UV と MV の単独ならびに重畳暴露が及ぼす影響を細胞学、細胞化学的手法を用いて調べ、暴露条件による細胞障害、ポリフェノール性抗酸化成分の細胞障害抑制効果を検討した。次に、細胞への酸化的ストレス障害の早期検出を目的に、ストレスバイオマーカーとしての可能性をユビキノン (Coenzyme Q) に求め、モデル生物に Coenzyme Q が存在するかどうかを調べ、Coenzyme Q9 の存在を確かめた。さらに酸化的ストレスマーカーとして評価しうる酸化的ストレス応答を CoQ9 が示すかどうかを酸素濃度条件、紫外線暴露条件を変えて比較検討した。その結果、CoQ9 が酸化的ストレスマーカーとして評価しうる鋭敏な応答を示すことを明らかにした。以下、各章の内容について概説する。第一章：紫外線並びに MV が *E. gracilis* 細胞への影響：実際の環境において紫外線と汚染化合物の影響を考え、著者は UV と MV 同時暴露の相乗効果が Z と SMZ 株に強い細胞障害を起こすのではないかとの仮説を立て UV 照射と MV との同時暴露の影響を調べた。第一章では、細胞成長と細胞現実性に対する UV と MV の暴露効果を *E. gracilis* Z と SMZ 株を用いて調べた。すなわち、細胞に連続 3 日間 UV 照射し、異なる暴露処理後に生死細胞数と細胞形態形態を比較し、UVA あるいは UVB の暴露が *E. gracilis* の形態的变化と細胞死を誘発することを明らかにした。UVA あるいは UVB の長期にわたる暴露並びに、単独あるいは UV と MV 同時暴露の *E. gracilis* 細胞に対する影響を生死細胞、奇形発生率などを指標に観察し、UVB 暴露が細胞に最も重篤な影響を与えることを明らかにした。UVB と比較して細胞形態学的並びに化学的ストレスに対しては

死細胞数の増加に対する UVA 照射の効果、MV 単独暴露ではそれほど重篤な影響を与えなかった。UV と MV の影響の相違を 植物プランクトンモデルで

ある Z 株と動物プランクトンモデル SMZ 株の間で相違があるかどうか調べた結果、酸化ストレスに対しては、植物型 Z 株の方が SMZ 株より高い抵抗性を示し、植物型細胞内部では、光合成に伴い常に活性酸素が生成し、細胞は、必然的にそれを消去する必要に迫られているからであると解釈した。ポリフェノール性抗酸化物質ルチン共存下での UV-B, MV 暴露は、TBARS を酸化的ストレス指標に比較したところ、明らかに抑制効果を示した。第二章では、生体膜構成主要リン脂質、phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) に対する UVB, MV の単独、重畳暴露効果を比較し、PE 組成の有意な減少を認めた。また、rutin によるある程度のリン脂質分解抑制作用も認められた。第三章では、鋭敏な oxidative ストレスモニターの検索を行った。UV, MV による活性酸素惹起細胞障害をいち早く察知する、あるいは適当な抗酸化性物質による防御態勢の構築は、生態系における障害を初期段階で防止するためにも極めて重要である。酸化ストレスを反映するバイオマーカーには、TBARS, 8-OH-dG などがあるが、微小生物をモデルとする場合、信頼性や分析操作の煩雑性などから必ずしも適当では無い。そこで、著者は、呼吸鎖のなかで重要な役割を演じている Coenzyme Q (CoQ) に注目した。*E. gracilis* は CoQ を含むとの報告があるが、酸化的ストレスマーカーとしては、全く注目されていない。本研究では SMZ を材料に、細胞の発育と CoQ 9 の酸化還元状態、CoQ 9 の含有量を好気培養と静止培養条件について比較検討した。酸素供給が制限される静止培養では、定常期で酸化型 CoQ 9 が増え、好氣的培養では酸化型 CoQ9 は定常期に入っても増加しなかった。この結果から、好気培養と静止培養により、CoQ9 の酸化還元状態は変化し、通気量（酸素供給）が少ない状態では酸化型含量が高まり、その上昇は、酸化的ストレスと関連するものと考えられた。CoQ 9 の還元型は、何によって影響されるのかを CoQ 還元酵素活性を指標に調べた結果、酸化型が高くなると Quinone reductase の活性が減少し、好気培養条件では、酸化型は上昇せず、酵素活性も静止培養細胞よりも有意に高い活性を示し、細胞への酸素供給量が減少したことに起因する細胞応答の結果として、酸化型 CoQ 9 が上昇したと解釈した。さらに UV-A の照射によって *E. gracilis* SMZ 株中の CoQ 9 含量は鋭敏かつ有意に変化し、Z 株に関しても同様な傾向な傾向が認められた。

本研究で著者が明らかにしたことは、UV と MV との重畳暴露が細胞に重大な酸化的障害を及ぼすこと、それがポリフェノール性抗酸化物質ルチンによってある程度抑制出来ること、さらにストレスバイオマーカーとして CoQ 9

の redox balance 評価が有効であることである。水産分野への貢献を考える時、水圏微小生物は、水産動物資源の下支え役を担っており、その微小生物が、紫外線、環境汚染物質など様々なストレスにさらされていることから、CoQ は鋭敏なストレスマーカーとしての利用が期待出来る。さらに CoQ は、強力な抗酸化物質であり、ストレス障害抑制物質としての研究も今後期待出来る。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 鐵 也

副 査 教 授 宮 下 和 夫

副 査 教 授 山 本 順 寛

(東京工科大学バイオニクス学部)

副 査 助 教 授 山 崎 浩 司

副 査 助 教 授 福 永 健 治 (関西大学工学部)

### 学 位 論 文 題 名

Ultraviolet irradiation and methyl viologen-induced cellular damage in *Euglena gracilis*; Coenzyme Q9 redox status as a marker of oxidative stress.

(*Euglena gracilis* における紫外線照射と methyl viologen 細胞障害および酸化ストレスマーカーとして Coenzyme Q9.)

農薬、殺虫剤などの長期間に亘る過剰利用が、環境中に散逸し、野生動物の繁殖率の低下、奇形野生鳥類増加の原因として疑われている。大量の除草剤が水圏環境中に運ばれ、また産業廃棄物、殺虫剤などの農薬の残留が、水質汚染を起こしている。人間に対する障害が顕在化するはるかに前に、紫外線の障害は、植物・動物プランクトンなど微小生物に現われる。プランクトンは、水圏の生態系において食物連鎖を構築し、水圏の生産性の主要な支えであり、プランクトンの生産性が低下すると海の生産性に影響する。水圏の生産性に及ぼすオゾンホールと紫外線障害との関係に関する研究の多くは紫外線暴露の影響だけに注目されているものが殆どである。実際には、紫外線暴露と化学物質の暴露が同時に起きているので、著者は、紫外線と環境中に廃棄される化学物質が同時に生物に作用した場合、水圏の微小生物にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的に研究を行った。除草剤、methyl viologen (MV) は、世界的に農場やゴルフコースなどの雑草の除去に広く使われている、非常に強力な除草剤である。MV の除草効果は植物組織を構成する細胞内で  $O_2^-$  が生成され、枯死させるが、時に養殖施設で魚の大量死を起こすことも知られている。

紫外線、MV いずれも活性酸素・フリーラジカルを生成し、生物機能に影響を及ぼすことを考慮すると、この両者が同時に生物、特に微小生物に作用する際の影響を調べ、障害発現の早期発見、障害防止などの対策を講じることは、極めて重要である。同時に、著者

は、科学的な証拠を示すことを通して環境保護の重要性と、酸化的ストレスが生体に及ぼす影響の普遍性を明らかにすることが出来ると考えた。著者が、研究に用いた *Euglena gracilis* 細胞は、植物と動物プランクトン両方の特徴を示す 原生生物で環境の化学物質の効果についての多くの報告がなされており、研究の遂行に、光合成株 *E. gracilis* Z と、Streptomycin 処理により葉緑体を欠損させた変異株 SMZ を用いた。著者は、先ず *E. gracilis* Z, SMZ 両株への UV と MV の単独ならびに重畳暴露が及ぼす影響を細胞化学的手法を用いて調べ、暴露条件による細胞障害、ポリフェノール性抗酸化成分の細胞障害抑制効果を検討した。次に、細胞への酸化的ストレス障害の早期検出を目的に、ストレスバイオマーカーとしての可能性をユビキノン (Coenzyme Q) に求め、モデル生物にも Coenzyme Q が存在するかどうかを調べ、Coenzyme Q9 (CoQ9) の存在を確かめた。さらに酸化的ストレスマーカーとして評価しうる酸化的ストレス応答を CoQ9 が示すかどうかを酸素濃度条件、紫外線暴露条件を変えて比較検討した。その結果、CoQ9 が酸化的ストレスマーカーとして評価しうる鋭敏な応答を示すことを明らかにした。著者は、呼吸鎖のなかで重要な役割を演じている Coenzyme Q (CoQ) に注目した。*E. gracilis* は CoQ を含むとの報告があるが、酸化的ストレスマーカーとしては、全く注目されていない。本論文では SMZ を材料に、細胞の発育と CoQ 9 の酸化還元状態、CoQ 9 の含有量を好気培養と静止培養条件について比較検討し、酸素供給が制限される静止培養では、定常期で酸化型 CoQ 9 (%CoQ) が増えたが、好氣的培養では酸化型 CoQ9 は定常期に入っても増加せず、この結果から、好気培養と静止培養により、CoQ9 の酸化還元状態は変化し、通気量 (酸素供給) が少ない状態では %CoQ 含量が高まり、その上昇は、酸化的ストレスと関連するものと考えた。CoQ 9 の還元型は、何によって影響されるのかを CoQ 還元酵素活性 (QR) を指標に調べた結果、%CoQ9 増加と QR 活性減少は連動し、好気培養条件では、%CoQ9 は上昇せず、QR 活性も静止培養細胞よりも有意に高い活性を示し、細胞への酸素供給量が減少したこと起因する細胞応答の結果として、%CoQ 9 が上昇したと解釈した。さらに UV-A の照射によって *E. gracilis* SMZ 株中の CoQ 9 含量は鋭敏かつ有意に変化し、Z 株に関しても同様な傾向が認められた。

本論文で著者が明らかにしたのは、(1) UV と MV との重畳暴露が細胞に重大な酸化的障害を及ぼすこと、(2) それが多環芳香族性抗酸化物質ルチンによってある程度抑制出来ること、(3) さらにストレスバイオマーカーとして CoQ 9 の redox balance 評価が有効であることである。水産分野への貢献を考える時、水圏微小生物は、水産動物資源の下支え役を担っており、その微小生物が、紫外線、環境汚染物質など様々なストレスにさらされていることから、CoQ は鋭敏なストレスマーカーとしての利用が期待出来、さらに CoQ は、強力な抗酸化物質であり、ストレス障害抑制物質としての研究も今後期待出来る。