

ミドリゾウリムシとクロレラの感染過程に対する  
タンパク質合成阻害剤の影響について

児玉 有紀, 藤島 政博 (山口大・院理工・共生システム科学)

Effects of protein synthesis inhibitors on infection by symbiotic *Chlorella* in the host  
*Paramecium bursaria*

Yuuki KODAMA and Masahiro FUJISHIMA

(Div. of Natural Sci. and Symbiosis, Grad. Sch. of Sci. and Engineering, Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

*Chlorella*-free cells of *Paramecium bursaria* can be reinfected with algae isolated from *Chlorella*-bearing cells by ingesting them into the digestive vacuole (DV). In a previous study, we showed that an alga can successfully escape from the host's DV and establish endosymbiosis after acidosomes and lysosomes have fused with the vacuole. When boiled or fixed algae were added to algae-free paramecia, all algae were digested. Therefore, algal resistance to the lysosomal enzymes is a property of living algae. To examine the effects of protein synthesis inhibitors on infection by

symbiotic *Chlorella* of the host *P. bursaria*, isolated symbiotic algae were pretreated with cycloheximide, or algae-free hosts were pretreated with puromycin. The algae and the algae-free *P. bursaria* cells were then mixed, and the fate of the algae in the host DVs was observed. Infection of the host by *Chlorella* was not inhibited by host pretreatment with puromycin. However, algae treated with cycloheximide were not maintained in the host cytoplasm, although they could escape from the host's DV. These results suggest that algal protein synthesis plays an important role in establishing the *P. bursaria*-*Chlorella* endosymbiosis.

**[目的]** ミドリゾウリムシの食胞内に取り込まれた後に、細胞内共生に成功するクロレラは、アシドソームとライソソームが融合した食胞内で、一時的にライソソーム酵素耐性を獲得して、細胞質に脱出することができたものから生じる。しかし、同じ食胞内に共存する大部分のクロレラは食胞内で消化される。また、煮沸や固定液で殺したクロレラはライソソーム酵素による消化を免れることができない (Kodama and Fujishima, 2005)。タンパク質合成阻害剤のピュロマイシンはミドリゾウリムシのタンパク質合成を優先的に阻害し、シクロヘキシミドはクロレラのタンパク質合成を優先的に阻害することが報告されている (Ayala and Weis, 1987)。そこで、クロレラの感染過程における宿主とクロレラのタンパク質合成の必要性を調べるため、ピュロマイシンまたはシクロヘキシミド存在下で感染実験を行い、宿主食胞内に取り込まれたクロレラの運命を追跡した。

**[材料と方法]** シクロヘキシミドとピュロマイシンの最適濃度を調べるために、シンビオティック細胞 (OS1g 株) からクロレラを除去したアポシンビオティック細胞 (OS1w 株) 10細胞を各濃度 (シクロヘキシミドの場合 0, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  ; ピュロマイシンの場合 0, 10, 50, 75, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) の阻害剤を含む培養液200  $\mu\text{l}$  中でインキュベートし、24時間毎に3日間、ミドリゾウリムシの細胞数をカウントして細胞分裂の阻害が起こる濃度を調べた。クロレラの感染過程におけるシクロヘキシミドの影響を調べるため、単離クロレラを0, 20と100  $\mu\text{g/ml}$  のシクロヘキシミドを含むドリル氏液中で24時間、 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 、1500lux の恒明条件でインキュベートした。その後同じ濃度の抗生物質の存在下でアポシンビオティック細胞5,000 cells/ml と混合し (ゾウリムシ: クロレラ = 1:10<sup>4</sup>)、 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 、恒明条件で1.5分のパルスラベルを行った。

その後、15  $\mu\text{m}$  ナイロンメッシュで濾過してドリル氏液中で細胞を洗浄して外液のクロレラを除去し、チェイスし、経時的に4% (w/v) パラホルムアルデヒドで固定して1.5分間に食胞に取り込まれたクロレラの運命を追跡した。一方、ピュロマイシンの影響を調べるため、アポシンビオティック細胞を0と75  $\mu\text{g/ml}$  のピュロマイシンを含むドリル氏液中で1時間、 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 、1500lux の恒明条件でインキュベートし、その後同様の方法で感染実験を行った。

**[結果と考察]** 我々は、ミドリゾウリムシに細胞内共生するクロレラは、感染初期過程でライソソーム酵素耐性に一時的に変化し、その後、ライソソームが融合した食胞から細胞質に脱出し、次に宿主のライソソームが融合しない Perialgal Vacuole (PV) 膜に包まれて宿主細胞質内に維持されることを明らかにした。さらに、煮沸や固定によって殺したクロレラは、感染初期過程でライソソーム酵素耐性能を失い、全て消化される。よってクロレラが宿主の消化を免れるにはクロレラが生きていることが必要であると考えられた (Kodama and Fujishima, 2005)。そこで本研究では、宿主またはクロレラのタンパク質合成を阻害した時の感染過程に与える影響を調べた。<細胞分裂へのタンパク質合成阻害剤の影響> 10-100  $\mu\text{g/ml}$  のシクロヘキシミド存在下では、OS1w 細胞の細胞分裂は阻害されなかったが、75  $\mu\text{g/ml}$  以上のピュロマイシン存在下では抑制された。これまでにシクロヘキシミドによって共生藻が除去されることが報告されている (Weis, 1984)。OS1g 株でも同様に、10  $\mu\text{g/ml}$  のシクロヘキシミド存在下でミドリゾウリムシを培養すると、3-9日後にアポシンビオティック細胞が得られた。<感染過程へのタンパク質合成阻害剤> シクロヘキシミド(0, 20, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 存在下でも、クロレラは宿主食胞内で一時的にライ

ソソーム酵素耐性になり、食胞からの脱出は可能であったが、食胞から脱出したクロレラは細胞質には維持されず、宿主細胞内から消失した。一方、ピュロマイシンは宿主の分裂だけでなく、食胞形成率を低下させた。しかし、形成された食胞に取り込まれたクロレラはライソソーム酵素耐性になり、食胞から脱出し、その後宿主細胞質内に維持された。また、そのクロレラは細胞分裂によって増殖し、細胞内共生を成立させた。以上の結果は、宿主食胞内でのライソソーム酵素耐性の獲得と宿主食胞からの脱出には、宿主及びクロレラのタンパク質合成を必要

としないが、食胞から細胞質に脱出したクロレラの維持にクロレラのタンパク質合成が必要である可能性を示唆している。

#### 【文献】

- 1) Ayala, A and Weis, D.S. (1987) *J. Protozool.* 34(4): 377-381.
- 2) Kodama, Y. and Fujishima, M. (2005) *Protoplasma*, 225: 191-203.
- 3) Weis, D.S. (1984) *J. Protozool.*, 31: 13A.