

感染初期過程でのクロレラのみドリゾウリムシに対する感染能は
食胞から脱出したクロレラが細胞表層に定着できるかどうか依存する

児玉 有紀^{1,2}, 藤島 政博³

(¹山口大・院理工・自然共生科学専攻, ²学振 DC2, ³山口大・院理工・環境共生)

Infectivity of *Chlorella* species for the ciliate *Paramecium bursaria* is based on their ability to localize beneath the host cell membrane after escaping from the host digestive vacuole in the early infection process

Yuuki KODAMA^{1,2} and Masahiro FUJISHIMA³

(¹Dept. Natural Sci. and Symbiosis, Grad. School of Sci. and Engineering, Yamaguchi Univ.

²Res. Fellow of JSPS DC2,

³Dept. Env. Sci. and Engineering, Grad. School of Sci. and Engineering, Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

Paramecium bursaria cells harbor several hundred symbiotic algae in their cytoplasm. Algae-free cells can be reinfected through their digestive vacuoles with algae isolated from algae-bearing cells or with cultivated *Chlorella* species. To determine the relationship between the infectivity of various *Chlorella* species and the nature of their cell wall components, algae-free *P. bursaria* cells were mixed with 15 strains of cultivated *Chlorella* and observed for the establishment of endosymbiosis. Only 2 free-living *Chlorella* strains were maintained in the host cells. Infection-incapable strains could escape from the host digestive vacuole but failed to localize beneath the host cell membrane and were eventually digested. Labeling of their cell walls with 3 lectins, with or without pre-treatment with 0.4 N NaOH, showed no relationship between their infectivity and stainability with these lectins. Our results indicate that the infectivity of *Chlorella* species for *P. bursaria* is not based on the sugar residues on their cell wall or the alkali-insoluble part of the cell wall components, but on their ability to localize just beneath the host cell membrane after escaping from the host digestive vacuole.

[目的] ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生は古くから知られている相利共生の例であるが、それぞれ単独でも生活できる能力を維持している。従ってミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生は、真核細胞が葉緑体を獲得しようとする過渡的段階にあると考えることができる。クロレラを除去したミドリゾウリムシに共生藻を再感染させることは容易であり、自由生活のクロレラも共生することが報告さ

れている^{1,2}。Takeda et al. (1998) は、クロレラの細胞壁をアルカリ溶液で処理して残る不溶性画分 (rigid wall) の糖組成が、共生可能なクロレラ種はグルコサミン型であり、不可能な種はグルコース&マンノース型であると報告している。さらに、ミドリゾウリムシの共生藻をレクチンの一種である Concanavalin A (Con A) で処理した時に、コントロールの未処理の場合と比較して再感染率が低下するこ

とから、クロレラの細胞壁の表面に存在する糖が共生藻の認識に必要であるとの報告がある^{4,6)}。そこで、アルカリ溶液処理を行った各種クロレラの細胞壁と処理しなかった細胞壁に対する蛍光標識レクチンの結合性を調べ、rigid wall の糖組成とミドリゾウリムシへの感染能に関連があるかどうかを調べた。

【材料と方法】再感染実験 クロレラを除去した *P. bursaria* (OS1w 株) 5,000 cells/ml と、宿主から単離した共生藻または15株の自由生活クロレラを1:10⁴の細胞密度で混合し、25±1°C、1500lux の恒明条件で1時間のパルスラベルを行った。その後、15µm ナイロンメッシュで濾過して、ドリルの液で細胞を洗浄して外液のクロレラを除去し、経時的に4% (w/v) パラホルムアルデヒドで固定して、細胞内の緑色のクロレラの数を調べた。15株の自由生活クロレラは東京大学分子生物学研究所から入手し、0.1%ハイボネックス (Hyponex, Japan) で培養した。

レクチン処理 10⁸cells/ml の単離共生藻または自由生活クロレラに Alexa fluor 488 で標識した3種のレクチン (WGA, GS-II, Con A) を最終濃度が50 µg/ml になるように加え、25±1°C、DD で2時間インキュベートした。その後 PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM NaHPO₄·12H₂O, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.2) で2回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。またクロレラの NaOH 処理は、10⁸cells/ml の単離共生藻または自由生活クロレラを0.4N NaOH 中で37°C、20 時間インキュベートすることによって行い、レクチン処理の前に DW で2回洗浄した。

【結果】再感染実験 15株の自由生活クロレラのうち *C. sorokiniana* C-212 株と *C. kessleri* C-531株のみが OS1w 株の細胞表層直下に定着し、細胞分裂によって増殖し細胞内共生を成立させた。一方、感染が成立しなかった13株は、宿主の食胞に取り込まれた後、共生藻のように食胞から脱出する⁷⁾ことはできたが、宿主の細胞表層直下に定着できず、4週間以内に全て排出された。また、5株のミドリゾウリムシから単離した共生藻は全て OS1w 株に維持された。

レクチン処理 Con A はマンノースと結合し、GS-

II と WGA は N アセチルグルコサミンに選択的に結合する。5株のミドリゾウリムシから単離した共生藻と15株の自由生活クロレラの細胞壁のレクチン結合性と、これらのクロレラの OS1w 株に対する感染能の有無の関係を調べた結果、これらには相関がないことが分かった。また Con A は調べた全ての共生藻と OS1w 株に感染能を示したクロレラには結合しなかった。クロレラの NaOH 処理によって、共生可能なクロレラには GS-II 及び WGA が結合し、不可能なクロレラには Con A が結合することが期待されたが、Takeda et al. (1998) の結果と異なり、そのような規則性は見られなかった。

【考察】 今回の結果から、ミドリゾウリムシに対するクロレラの感染能の有無は細胞壁表面もしくは rigid wall の糖組成で決定されるわけではないことが明らかになった。さらに WGA が結合し、OS1w 株に共生することのできる *C. sorokiniana* C-212株を WGA で処理し細胞表面をマスクしても、OS1w 株の細胞表層直下に定着し、細胞内共生を成立させることができた⁸⁾。従って、クロレラの感染能の有無は、細胞壁の糖組成ではなく、食胞から脱出したクロレラが宿主の細胞表層直下に定着できるかどうかによって決まっていることが明らかになった⁸⁾。今後は、何がミドリゾウリムシの細胞表層直下への定着能を決定しているのかを明らかにしたいと考えている。

【文献】

- 1) Karakashian S.J. and Karakashian M.W. (1965) Evolution 19: 368–37.
- 2) Bomford R. (1965) J. Protozool. 12: 221–224.
- 3) Takeda H. et al. (1998) Europ. J. Protitol. 34: 133–137.
- 4) Weis D.S. and Ayala A. (1980) J. Protozool. 26: 245–248.
- 5) Reisser, W et al. (1982) Cytobios 33: 39–50.
- 6) Nishihara N. et al. (1996) Jpn. J. Protozool. 29: 35.
- 7) Kodama Y. and Fujishima M. (2005) Protoplasma 225: 191–203.
- 8) Kodama Y. and Fujishima M. (2007) Protoplasma (in press).