

## *Chlorella vulgaris* と *C. sorokiniana* はミドリゾウリムシの細胞内に共存できない

西嶋 綾子<sup>1</sup>, 藤島 政博<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>山口大・院理工・自然情報科学, <sup>2</sup>山口大・院理工・環境共生系)

## *Chlorella vulgaris* and *C. sorokiniana* cannot be maintained in *Paramecium bursaria* cell

Ayako NISHIJIMA<sup>1</sup> and Masahiro FUJISHIMA<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dep. of Physics, Biol. and Informatics, Grad. Sch. of Sci. and Engineering, <sup>2</sup>Dep. of Environmental Sci. and Engineering, Grad. Sch. of Sci. and Engineering, Yamaguchi Univ.)

### SUMMARY

The ciliated protozoan *Paramecium bursaria* contains several hundred unicellular algae which belong to the genus *Chlorella*. Three *Chlorella* species are known to be able to infect to *P. bursaria*: *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* and *C. kessleri*. However, these species are so morphologically similar, it is difficult to tell whether they can co-exist in the same host cell. In this study, we used a monoclonal antibody specific for symbiotic *Chlorella* of *P. bursaria* to distinguish them, and observed fates of ingested *Chlorella* cells in two cases: aposymbiotic *P. bursaria* cells were fed simultaneously with symbiotic *C. vulgaris* and free-living *C. sorokiniana* cells, or the *C. vulgaris* cells were added to *P. bursaria* cells after establishment of endosymbiosis with *C. sorokiniana* cells. In both cases, the two *Chlorella* species successfully localized just beneath the cell membrane in the same *P. bursaria* cell for at least one week. In the former case, however, only *C. vulgaris* cells were eventually retained in the host cells. In the latter case, *P. bursaria* cells bearing *C. vulgaris* exclusively increased one week after the mixing with *C. vulgaris* cells. These results suggest that co-existence of two *Chlorella* species in the same host cell is a temporary phenomenon and only *C. vulgaris* cells are retained in the long term.

**【目的】** ミドリゾウリムシ *P. bursaria* はその細胞内に数百細胞の共生藻を維持している。これらの共生藻は形態学的にクロレラ *Chlorella* に類似しており、DNA 解析からも、1細胞のミドリゾウリムシ細胞内に共生している藻類は *C. vulgaris* で、クローンであることが示唆されている<sup>1)</sup>。一方で、同一の *P. bursaria* 細胞質に同時に複数種の共生体が存在することも報告されている<sup>2)</sup>。また、*P. bursaria* に感染可能なクロレラは *C. vulgaris* 以外に、2種知られているが<sup>3)</sup>、しかし、*P. caudatum* と核内共生細菌 *Holospora* との共生の例をはじめ、いくつかの細胞内共生では同一宿主細胞内に同属の2種以上の細胞内共生体は安定して共存できないという現象が知られている<sup>4)</sup>。我々

の作成したモノクローナル抗体 mAb CW1は、*P. bursaria* の共生クロレラ (*C. vulgaris* 株1N) の細胞壁を認識するが、自由生活をしているクロレラ (*C. sorokiniana* 株 C-212) や、*P. bursaria* へ感染後数ヶ月以内の *C. sorokiniana* 株 C-212の細胞壁は認識しない。この特徴を利用すれば、これまで困難であった *P. bursaria* 細胞内の2種のクロレラの識別が可能になる。我々は mAb CW1抗体を用い、2種のクロレラが宿主 *P. bursaria* 細胞内に共存できるかどうか、また、先住者のクロレラが既に *P. bursaria* 細胞内にある時に他種のクロレラの追加感染が可能であるかどうかを調べた。

【材料と方法】 自由生活をしているクロレラ (*C. sorokiniana* 株 C-212)とミドリゾウリムシ *P. bursaria* から単離したクロレラ (*C. vulgaris* 株 1N)を混合し、共生藻を持たないアポシンビオティック細胞に一定条件で与え、1.5分間のパルスラベル後に直径 15  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュで洗浄し、外液に残ったクロレラを除去した。その後、細胞を数時間毎にマイクロカバーガラス上で風乾後固定し、モノクローナル抗体 mAb CW1 を 1 次抗体に用いた間接蛍光抗体法で、細胞内共生に成功してゾウリムシの細胞表層直下に定着したクロレラの種類を確認した<sup>5,6</sup>。また、共生藻を持たないアポシンビオティック細胞に予め *C. sorokiniana* を共生させておき、ミドリゾウリムシから単離した *C. vulgaris* を 1.5 分間だけ与えた場合についても、その後同様の方法でクロレラの運命を追跡した。

【結果と考察】 上記のいずれの感染実験でも、2種のクロレラが *P. bursaria* の同一細胞表層に接着して共存できることが確認された。アポシンビオティックな *P. bursaria* に、2種のクロレラを同時に与えた場合、クロレラを与えてから 3 時間後には、これら2種のクロレラの両方を細胞表層直下に定着させた *P. bursaria* 細胞が観察された。しかし、このタイプの細胞は感染実験後 1 1 日目までは存在が確認された

が、17日目には消失し、最終的には *C. vulgaris* のみを維持した *P. bursaria* のみになった。

一方、予め *C. sorokiniana* を感染させた *P. bursaria* に *C. vulgaris* を与えた場合も、2種のクロレラが同時に *P. bursaria* 細胞表層直下に接着した細胞の割合が徐々に増加したが、1週間後には *C. vulgaris* のみを細胞表層に持つ *P. bursaria* が出現した。これらの結果は、同一宿主細胞内での2種のクロレラの共存は感染初期の一時的なものであり、2種間には宿主に安定して維持される能力に強弱があり、今回用いたクロレラ種では、最終的には *C. vulgaris* のみが維持されるようになると考えられる。

#### 【文献】

- 1) Hoshina, R., Kamako, S.I., Imamura, N. (2005) Jpn. J. Protozool. 38, 84-85.
- 2) Nakahara, M., Handa, S., Watanabe, S., Deguchi, H. (2004) Symbiosis, 36, 127-151.
- 3) Takeda, H., Sekiguchi, T., Nunokawa, S., Usuki, I. (1998) Europ. J. Protistol. 34, 133-137.
- 4) Fujishima, M. (1997) Jpn. J. Protozool. 30(1), 1-13.
- 5) Kodama, Y., Fujishima, M. (2005) Protoplasma, 225, 191-203.
- 6) Kodama, Y., Fujishima, M. (2007) Protoplasma, in press.