

感染型の核内共生細菌ホロスポラは宿主に選択的食胞形成を誘導する

中村 欽光, 藤島 政博 (山口大・院理工・環境共生系)

Infectious form of endosymbiotic bacterium *Holospora* induces selective digestive vacuole formation in the host *Paramecium*

Yoshimitsu NAKAMURA and Masahiro FUJISHIMA

(Dep. of Env. Sci. and Eng., Grad. Sch. of Sci. and Eng., Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

When cells of *Paramecium caudatum* are mixed with an infectious form of *Holospora obtusa*, the bacteria usually infect the host macronucleus through the digestive vacuoles within 30 min. Within 6 hours after mixing, the paramecia infected with *H. obtusa* exhibit selective digestive vacuole formation. That is, paramecia cease to ingest the infectious form of *H. obtusa* in the digestive vacuoles, whereas they continue to ingest the reproductive and boiled infectious forms of *H. obtusa*, as well as *Klebsiella pneumoniae* as food bacteria. The infected paramecia seem to acquire an ability to distinguish infectivity of *H. obtusa* and to avoid ingesting the infectious form into digestive vacuoles. To attempt to identify the components of the infectious form of *H. obtusa* involved in this behavior, the infectious forms were mixed with paramecia in the presence of rifampicin and chloramphenicol. Furthermore, the bacteria were pretreated with proteinase K, lipase PN, lyticase and  $\beta$ -galactosidase, and then mixed with paramecia. None of these treatments inhibited the induction of selective ingestion.

〔目的〕 我々は、*Paramecium caudatum* (P.C)が大核内共生細菌*Holospora obtusa* (H.O)の感染後、少なくとも6時間で、H.O感染型を取り込む食胞形成能を選択的に低下させることを明らかにした(3)。しかし、

ホロスポラの感染過程で、宿主食胞内、細胞質、核内、核内での増殖の、どの段階がこの現象の引き金かは特定されておらず、またその分子も同定されていない。そこで我々は宿主の食胞形成を変化させる

ホロスボラ分子を特定するため、ドリル緩衝液中の菌体上清、宿主とホロスボラ混合後の培養上清、Rifampicin, Chloramphenicol, Proteinase K, Lipase PN, Lyticase,  $\beta$ -galactosidaseで処理後のH.O感染型と宿主を混合し、宿主のH.Oに対する食胞形成の変化を調べた。

【材料と方法】 *P. caudatum* Rb-1s58a2株 (syngen 4, 接合型E) と *H. obtusa* F1株を用いた。H.O感染型 ( $1 \times 10^7$  cells/ml, 以下この濃度で使用)を次の条件で処理後P.Cと混合し、15分、6時間後のH.Oを取り込んだ平均食胞数を調べた。①Rifampicin (20と200  $\mu$ g/ml), Chloramphenicol (50と500  $\mu$ g/ml)で25°C, 30分処理し同濃度の抗生物質存在下でP.C ( $2 \times 10^3$  cells/ml, 以下この濃度で使用)と混合した。②Proteinase K (3 mg/ml), Lipase PN (3 mg/ml), Lyticase (1.5 mg/ml),  $\beta$ -galactosidase (220  $\mu$ g/ml)で25°C, 24時間処理し、10mM Na-Kリン酸バッファーで洗浄後、P.Cと混合した。

さらに感染型H.Oをドリル緩衝液200  $\mu$ lで4°C, 24時間処理し、遠心後の上清にP.Cを400 cells加えた。H.O感染型とP.Cを混合後15分の培養上清に新たにP.Cを加えた。それぞれの溶液と混合6時間後、H.Oを加え15分後のH.Oを取り込む平均食胞数を調べた。H.O感染型は観察を容易にするためあらかじめDAPI染色し、染色後も感染能力があることを確認した。観察前に細胞を0.15%グルタルアルデヒドで固定し、ノマルスキー、蛍光顕微鏡で観察した。

【結果と考察】 P.Cは感染型H.Oに対して特異的に食胞形成能を低下させ、ボイルした感染型、増殖型ではこのような変化は見られない。このことはP.Cは感

染型H.Oを認識する能力を持ち、P.CのH.O認識はH.Oの感染性と関連した物質であることを示唆している(3)。そこで、Rifampicin, ChloramphenicolでH.OのRNAとタンパク質合成をそれぞれ阻害し宿主への影響を上記の方法で調べた。これらの抗生物質存在下でH.Oを混合し15分、6時間後、それぞれのH.Oを取り込む宿主の平均食胞数は12, 2~3個であった。したがって感染後新たに合成されるタンパク質は影響しないことから、P.CのH.O認識に関わるH.O分子は、感染型H.Oにすでに備わっている分子であることが示唆された。

次にH.OとP.Cを混合後の培養上清または、H.O-ドリル緩衝液上清を用いて外液中に存在する分子の影響を調べた。それぞれの上清添加6時間後のP.Cに、H.Oに対する特異的な食胞形成能の低下は見られなかった。また、Proteinase K, Lipase PN, Lyticase,  $\beta$ -galactosidaseで処理したH.OとP.Cを混合し15分、6時間後に、それぞれのH.Oを取り込む宿主の平均食胞数を調べた結果、阻害効果はなく6時間後には低下した。したがってこれらの酵素の基質となる糖鎖や膜タンパク質、脂質はP.Cによって認識されるH.O分子ではないと考えられる。今後、H.O細胞外膜のLPSの影響の検討を行う予定である。

#### 【文献】

- 1) Görtz, H-D. (1983) Intern. Review of Cytol. 14, 145-176.
- 2) Heckmann, K. (1977) Proc. Int. Congr. Protozool. 5<sup>th</sup>, New York. 160-164.
- 3) Nakamura Y. and Fujishima M. (2005) Jpn. J. Protozool. 39(1), 91-92.