

*Paramecium bursaria*からのPV膜付き共生クロレラの単離と  
透過型電子顕微鏡観察

大村 現<sup>1</sup>, 平岡 三和<sup>2</sup>, 洲崎 敏伸<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>神戸大・環境管理センター, <sup>2</sup>神戸大・理・生物)

Isolation and transmission electron microscopy of symbiotic *Chlorella*  
with PV membrane from *Paramecium bursaria*

Gen OMURA<sup>1</sup>, Sawa HIRAOKA<sup>2</sup>, Toshinobu SUZAKI<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Center for Environmental Management, Kobe University,  
<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University)

## SUMMARY

By Percoll density gradient centrifugation, symbiotic *Chlorella* cells were isolated from *Paramecium bursaria* with their surrounding peri-algal vacuole (PV) membranes. Integrity of PV and purity of *Chlorella* cells with PV membrane were monitored by transmission electron microscopy after *Chlorella* cells were isolated using different homogenization media. The best result, in which >80% of the isolated *Chlorella* cells retained the PV membrane without notable contamination with other cytoplasmic components, was achieved when isolation was performed with 200 mM sucrose, 1 mM EDTA-KOH and 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5). Addition of  $K^+$  was favorable in yielding higher amounts of *Chlorella* with PV membrane, but shrinkage of *Chlorella* cytoplasm was inevitably observed. Inclusion of  $Mg^{2+}$  in the isolation medium was effective in preserving nuclei of paramecium cells, but adhesion of cytoplasmic debris to PV membrane became pronounced. It was also found that the PV membrane was extremely vulnerable to even low levels of mechanical stress such as pelleting down onto the bottom of a glass centrifugation tube. Therefore, *Chlorella* cells were settled on a cushion of 80% Percoll. Isolation of PV membrane-bearing *Chlorella* cells will allow analysis of membrane proteins of the PV membrane and of metabolic activities of *Chlorella* with PV membrane *in vitro*.

**【目的】** ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* が持つ共生クロレラを細胞内で包んでいる peri-algal vacuole (PV) 膜の単離を行うために、まず PV 膜で包まれた状態の共生クロレラの単離法を確立することを目的とした。

**【方法】** クロロゴニウムを利用した無菌二者培養法 (1) で大量培養した細胞を Potter-Elvehjem 型ホモジナイザー内で手でペッスルを上下させて破碎した。破碎物から大核や細胞膜を遠心除去した後、80% Percoll 液に重層して遠心することでクロレラを 80% Percoll の上に集めて回収した。この作業により大半のミトコンドリアなどは除去できた。最後に、回収したクロレラを 80% + 45% などの Percoll 液に上層して遠心することで、80% Percoll の上に形成された層からクロレラを回収した。この作業により混入していたゾウリムシの小核や細胞質塊が除去されて、高純度のクロレラを集めることができた。回収したクロレラをグルタルアルデヒド・オスミウム同時二重固定法により固定して透過型電子顕微鏡で観察を行い、PV 膜の保存状態と細胞質成分の混入や PV 膜への付着の程度の評価を行った。

**【結果】** さまざまな組成の破碎液に細胞を懸濁して破碎を行ったが、その中でもっとも良好な結果を示したのは 200 mM sucrose と 1 mM EDTA-KOH, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5) から成る破碎液だった。この

破碎液中で破碎して Percoll 遠心分離を行って単離したクロレラは、透過型電子顕微鏡下で観察したところその 80% 以上が完全な PV 膜に包まれており、またゾウリムシのミトコンドリアなどの混入や PV 膜への付着は非常に少なかった。さまざまな濃度の Sucrose に加えて  $K^+$  を 50-100 mM 加えた場合、PV 膜の保存率は高まったが、Percoll 遠心の際のクロレラの見かけ上の密度が変わり、また電顕下ではクロレラの細胞質が萎縮して細胞壁から分離しているのが観察された。破碎の際はゾウリムシの大核の破壊を最小限に抑えるようにペッスルの動きを調節したが、それ以上に激しい力で破碎を行うと破碎にかかる時間は短縮できたが大核が破壊され、細胞質成分の凝集と PV 膜への付着が見られた。また破碎液に 1-5 mM の  $MgSO_4$  (と EDTA の代わりに 1 mM EGTA) を含めた場合、大核はほとんど破壊されなくなったように見えたが、細胞質成分の大規模な凝集と PV 膜への付着が見られた。固定していない PV 膜は脆弱でガラス遠心管の底にクロレラを沈殿させると PV 膜は完全に失われたので、クロレラを遠心沈降させる際には 80% Percoll 液のクッションをチューブ底に置く必要があることも分かった。

**【考察】** PV 膜付きのクロレラの単離にあたって解決すべき大きな問題となったのは、PV 膜の保存に有効な破碎液組成の決定と、破碎後に起こるゾウリムシ細胞質成分の凝集と PV 膜への付着の防止であった。

破碎液の組成はさまざまなものを試したが、結局一番単純なものに落ち着いた。Sucroseの一部をK<sup>+</sup>などの一価陽イオンで置き換えてもPV膜の保存に効果があったが、クロレラ細胞自体へのダメージがあるように見えた。今後、PV膜の膜タンパク質構成をSDS-PAGEなどで解析するのであれば特に問題はないと思われるが、PV膜がついた状態のクロレラの代謝の解析や、インピーダンス測定には適さないと思われる。破碎の際に破壊された核から流出したDNAは細胞質成分同士の凝集を引き起こすと言われている(2)。Ca<sup>2+</sup>やMg<sup>2+</sup>などの二価陽イオンを破碎液に含めると核膜の安定化に効果があるが、同時に細胞質成分同士の凝集を引き起こすこともある(3)。流出した

DNAがPV膜への細胞質成分の付着を引き起こしていると考えてMg<sup>2+</sup>を破碎液に含めたが、逆に凝集と付着が強くなってしまった。Mg<sup>2+</sup>の使用はあきらめて、ある程度の大核の破壊とそれによる凝集・付着は受け入れなければならないのかも知れない。

#### [文献]

- 1) Omura, G., Ishida, M., Arikawa, M., Mostafa, Kamal, Khan, S. M., Suetomo, Y., Kakuta, S., Yoshimura, C. and Suzaki, T. (2004) *Jpn. J. Protozool.*, 39: 139-150
- 2) Huber, L. A., Pfaller, K. and Vietor, I. (2003) *Circ. Res.*, 92: 962-968
- 3) Tata, J. R. (1974) *Methods in Enzymology*, 31: 253-262