
Review

単細胞動物ミドリゾウリムシと緑藻クロレラとの細胞内共生成立機構

児玉有紀^{1,2†}・藤島政博^{1,*}

¹山口大学大学院理工学研究科, ²日本学術振興会特別研究員 (PD)

¹〒753-8512 山口県山口市吉田1677-1

Mechanism of establishment of endosymbiosis between the ciliate *Paramecium bursaria* and the symbiotic alga *Chlorella* species

Yuuki KODAMA^{1,2†} and Masahiro FUJISHIMA^{1,*}

¹Graduate School of Science and Engineering, Yamaguchi University, Yoshida 1677-1, Yamaguchi 753-8512, Japan

²Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) Research Fellow

1. はじめに

ミトコンドリアや葉緑体を生み出した細胞内共生は現在でも繰り返して行われ、進化の原動力となっている。その中でも特に原生動物と藻類との細胞内共生(二次共生)は、動物細胞の植物化を誘導し、植物の多様性の推進力となっている。しかし、その成立機構についてはほとんど明らかにされていない。

太陽虫、ラップムシ、ツリガネムシ、ミドリゾウリムシやマヨレラなどのように共生クロレラを持つ原生動物は多数報告されている。ミドリゾウリムシ(*Paramecium bursaria*, Fig. 1A)と共生クロレラの細胞内共生は古くから研究が続けられてき

た。ミドリゾウリムシの細胞質内には約700個のクロレラが共生している(Kodama and Fujishima, 2008)。共生クロレラは1細胞ずつが食胞膜由来のPerialgal vacuole (PV) 膜 (Fig. 2) に包まれ、その中で細胞分裂して増殖し、宿主の細胞分裂時には、娘細胞に安定して分配される。PV膜には宿主のリソソームが融合しない (PV膜の性質の詳細については本総説の「5. PV膜の性質」を参照)。共生クロレラは宿主のミドリゾウリムシから窒素源や二酸化炭素を供給される (Albers and Wiessner, 1985; Albers et al., 1982; Reisser, 1976, 1980)、共生クロレラの炭素固定は宿主内で促進される (Kamako and Imamura, 2006)。さらに宿主内ではクロレラウイルスの感染から保護される (Kawakami and Kawakami, 1978; Reisser et al., 1988; Van Etten et al., 1982; Yamada et al., 2006)。一方ミドリゾウリムシは、光さえ当てておけば、飢餓やガス交換ができない密閉容器内でも長期間生存可能であり (児玉と藤島、未発表)、酵母菌やバクテリアの感染から保護される (Görtz, 1982)。さらに、共生クロレラからマルトースや酸素などの光合成産物を供給される (Brown and Nielsen, 1974; Muscatine et al., 1967; Reisser, 1976, 1980, 1986)。共生クロレラを持つミドリゾウリムシの分裂速度は、持たないミドリゾウリムシより速く (Görtz, 1982; Karakashian, 1963, 1975)、共生クロレラは宿主を紫外線から保護する働きがあることが

*Corresponding author

Tel & Fax: +81-83-933-5712

E-mail: fujishim@yamaguchi-u.ac.jp

Received: 19 September 2008

Note: [†]現在の所属先: 〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1 筑波大学大学院 生命環境科学研究科

[†]Present address: Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba 305-8572, Japan

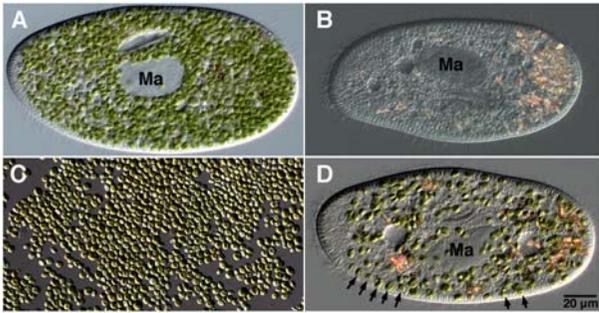


Fig. 1 Photomicrographs of algae-bearing *P. bursaria* strain OS1g1N (A), algae-free *P. bursaria* strain Yad1w (B), *Chlorella vulgaris* isolated from OS1g1N cells (C), strain Yad1w cells during the early infection process (4 h after mixing with isolated algae) (D). Ma, Macronucleus. Arrow, single green *Chlorella* (SGC) which could establish endosymbiosis.

報告されている (Hörtnagl and Sommaruga, 2007)。共生クロレラの光合成産物は宿主の概日リズムの発現に深く関わっており (Miwa et al., 1996; Tanaka and Miwa, 1996, 2000)、宿主と共生クロレラの細胞分裂のタイミングは互いに同調している (Kadono et al., 2004; Takahashi et al., 2007)。このように、ミドリゾウリムシとクロレラは相利共生の関係で、双方の増殖速度の調節機構をも備えているが、両者はまだ単独でも増殖できる能力を維持している。ミドリゾウリムシを恒暗条件下で培養したり (Karakashian, 1963)、タンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミド (Kodama and Fujishima, 2008; Kodama et al., 2007; Weis, 1984)、光合成阻害剤 (Reisser, 1976)、除草剤 (Hosoya et al., 1995) で処理すると容易にクロレラを除去することができる (Fig. 1B)。クロレラ除去細胞は、共生クロレラを保持した状態と比較すると分裂速度はやや低下するが (Görtz, 1982)、増殖能力は維持している。クロレラ除去細胞を、ミドリゾウリムシのホモジネートから単離した共生クロレラ (Fig. 1C) と混合すると、細胞口から食胞に取り込まれたクロレラの大部分は宿主によって消化されて細胞肛門から排出されるが、一部のクロレラは消化を免れて細胞内共生を再開する (Fig. 1D) (Karakashian, 1975; Siegel and Karakashian, 1959)。ミドリゾウリムシでは、クロレラとの細胞内共生が不安定な自然突然変異体が得られている (Tonooka and Watanabe, 2002, 2007)。さらに、細胞が透明であるため共生成立過程の観察が容易で、マイクロインジェクションも可能な大きさの細胞である。これらの特徴は、二次共生成立機構解明のモデル材料として、ミドリゾウリムシと共生クロレラが適切であると考えられる根拠となっていた。しかし、クロレラ除去細胞と共生クロレラを混合すると、短時間で多数のクロレラが一気に食胞内に取り込まれるため、その後のクロレラの

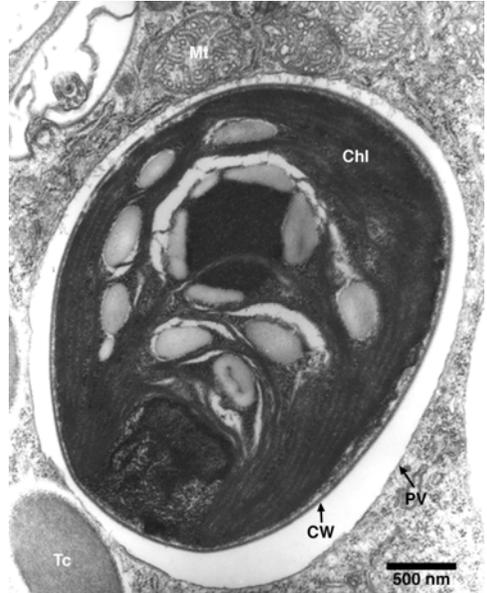


Fig. 2 Transmission electron micrograph of symbiotic algae near the host cell surface. Chl, symbiotic *C. vulgaris*. CW, cell wall. PV, perialgal vacuole membrane. Mt, mitochondrion. Tc, trichocyst. (Kodama and Inouye, unpub. data)

運命の観察は困難を極め、共生成立過程の詳細は Siegel and Karakashian (1959) による再共生実験以来の50年もの間不明瞭なままであった。我々は、クロレラ除去細胞に一定数のクロレラを1.5分間だけパルス的に与え、その後チェイスして食胞内に取り込まれたクロレラの運命を計時的に追跡することが可能な最適条件を確立し、この方法を用いてミドリゾウリムシとクロレラとの共生成立過程の全容を明らかにした (Kodama and Fujishima, 2005, 2007, 2008, 2009, 印刷中; Kodama et al., 2007)。

2. ミドリゾウリムシの食胞の分化

Paramecium 属の食胞の分化の研究はハワイ大学の Fok らによって *P. multimicronucleatum* で詳細に行われた (Fok and Allen, 1988)。*P. multimicronucleatum* の食胞の分化は次の4段階に分類されている。新生の球形の食胞DV-Iに、食胞形成後4-8分にアシドソームが融合して、食胞内のpHを中性付近から3まで下げ、同時に、DV-I膜とアシドソーム膜の膜置換が起こり、収縮したDV-IIと呼ばれる食胞になる。食胞形成後8-20分に、リソソームがDV-IIに融合し、pHが再び6まで上昇した球形のDV-IIIに分化して食胞内容物は消化される。その後、食胞形成後20分以降には、リソソームの指標酵素の酸性フォスファターゼ (AcPase) 活性の無いDV-IVに分化する。DV-IVは、細胞肛門と

融合し、食胞内の未消化物を細胞外に放出する。

ミドリゾウリムシの食胞の分化に関する報告はこれまで無く、食胞の分化過程は*P. multimicronucleatum*と同様であると予測されていた (Meier and Wiessner, 1989)。しかし、パルスラベルとチェイスを行い、ミドリゾウリムシの食胞の分化過程を観察する

と、*P. multimicronucleatum*とはかなり異なることが明らかになった (Kodama and Fujishima, 2005)。Fig. 3に示すように食胞の形態の特徴と食胞内のクロレラの消化の有無を基にミドリゾウリムシの食胞の分化過程を8時期 (DV-I, DV-II, DV-IIIa, DV-IIIb, DV-IIIc, DV-IVa, DV-IVb, and DV-IVc) に分類し、各時期の出現時間を明らかにした。クロレラ除去細胞と単離した共生クロレラを混合すると、クロレラは細胞口から取り込まれてDV-Iに包まれる。球形のDV-Iの食胞膜は光学顕微鏡で容易に観察できる。DV-Iはクロレラと混合してから0.5分以内に観察される。0.5–1.0分後には食胞膜が収縮するため、光学顕微鏡では食胞膜が観察困難なDV-IIに分化する。2.0–3.0分後には食胞膜が膨潤して、再び光学顕微鏡で観察可能なDV-IIIに分化する。DV-IIIはその食胞内の全てのクロレラが緑色のDV-IIIa、黄色く退色した消化途中のクロレラと緑色のクロレラとが共存するDV-IIIb、食胞内の全てのクロレラが黄色のDV-IIIcの3つのサブステージに分けられる。そして、20分以降には食胞膜が再び収縮したDV-IVに分化する。DV-IVもDV-IIIと同様に、食胞内の全てのクロレラが緑色のDV-IVa、消化がさらに進み直径が小さく茶色くなったクロレラと緑色のクロレラとが共存するDV-IVb、食胞内の全てのクロレラが茶色のDV-IVcの3つのサブステージに分けられる。プロモフェノールブルー、ブロムクレゾールグリーン、コンゴレッドのpH指示薬で細胞壁を標識した酵母菌をクロレラ除去細胞に与え、食胞内に取り込まれた酵母菌の色の変化で食胞内のpHを測定した結果、*P. multimicronucleatum*と同様に、DV-IIの時期にアシドソームが食胞に融合して、食胞内のpHは2.4–3.0に低下し、DV-IIIでは食胞内のpHは6.4–7.0に上昇することが分かった (Kodama and Fujishima, 2005)。Gomoriの染色 (Gomori, 1952) で食胞内のAcPase活性の有無を調べると、クロレラの消化が観察されるDV-III以降でAcPase活性が検出されることから、DV-IIIでリソソームの融合が起こることが分かった (Kodama and Fujishima, 2009)。

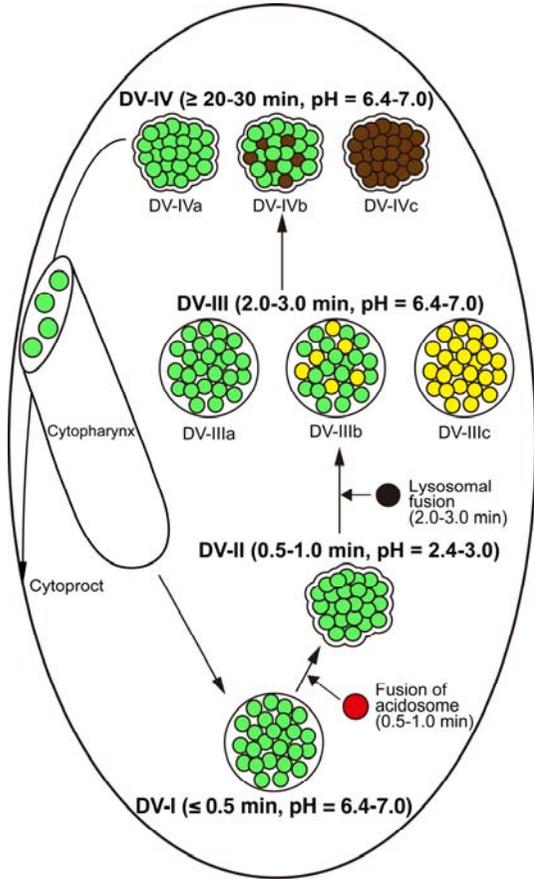


Fig. 3 Schematic representation of DV differentiation of *P. bursaria*. When isolated living *Chlorella* sp. and algae-free paramecia were mixed, one or several algae were ingested by the host cytopharynx into a DV-I. pH inside DV-I is 6.4–7.0. Acidified and condensed DV-II appeared at 0.5–1.0 min after mixing. pH inside DV-II is 2.4–3.0. Fusion of lysosomes occurred at 2.0–3.0 min, leading to swollen DV-IIIa to DV-IIIc. The color of the algae faded by digestion in DV-IIIb and DV-IIIc. pH inside DV-III is 6.4–7.0. Condensed DV-IVa to DV-IVc appeared at 20–30 min. pH inside DV-IV is 6.4–7.0. The color of the algae becomes brown by digestion in DV-IVb and DV-IVc. Green circle means intact algae. Yellow circle means digested yellow algae. Brown circle means digested brown algae. See color figure in on-line publication.

3. クロレラの再共生過程

次に、食胞内に取り込まれたクロレラの運命を追跡し、細胞内共生を成立させるクロレラが出現する食胞とそのタイミングを明らかにした。

ミドリゾウリムシに共生しているクロレラは1つずつがPV膜に包まれて、宿主細胞質に維持されている (Fig. 2)。そこで、単独で存在する緑色のクロレラが、どの食胞から、いつ出現するかを明らかにするため、クロレラ除去細胞5,000 cells/mlと、ミドリゾウリムシから単離した共生クロレラを1:10⁴で混合し、25°C、恒明条件下で1.5分のパルスラベルを行った。その後、15 μmナイロンメッシュで濾過して、DryI液で細胞を洗浄して外液のクロレラを除去し、チェイスし、0.05, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 9, 24, 48, 72時間後に4% (w/v) パラホルムアルデヒドで固定して、共生初

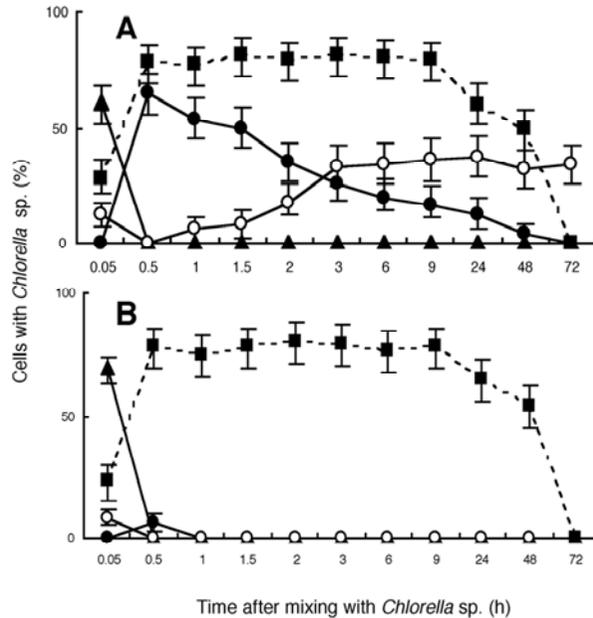


Fig. 4 Fates of living and boiled *Chlorella* sp. during the infection process. Isolated living (A) or boiled (B) *Chlorella* sp. and algae-free paramecia were mixed, washed, chased, and fixed at 0.05, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 9, 24, 48, and 72 h after mixing. The percentages of cells with SGC, single digested *Chlorella* (SDC), DV-IIIa, DV-IIIb, DV-IVa, and DV-IVb were determined. Note that all SGCs that appeared before 0.5 h after mixing were digested by 0.5 h. ▲, cells with DV-IIIa or DV-IIIb; ●, DV-IVa or DV-IVb; ○, SGC; ■, SDC. For each fixing time interval, 100 to 300 cells were observed. Bar, 90% confidence limit. (From Kodama and Fujishima, 2005.)

期過程で見られる1個で緑色のクロレラ (以後single green *Chlorella*, SGCと表す)、1個で消化途中のクロレラ (以後single digested *Chlorella*, SDCと表す)、DV-IIIaまたはDV-IIIb、DV-IVaまたはDV-IVbを持つ細胞の割合を調べた (Fig. 4A)。Fig. 4の横軸はクロレラと混合後の時間、縦軸は各食胞またはSGC、SDCを持つ細胞の割合を示している。DV-IIIaまたはDV-IIIbと、DV-IVaまたはDV-IVbを持つ細胞の割合は時間経過に伴って減少し、食胞内のクロレラは消化されるためSDCを持つ細胞の割合が増加する。クロレラと混合してから0.05時間後の12%のSGCは、最初から1つだけ食胞内に取り込まれたクロレラを示している。このようなSGCは0.5時間以内に全て消化されるため、0.5時間後のSGCを持つ細胞の割合は、0%になる。しかし0.5時間以降は、SGCを持つ細胞の割合が時間経過に伴って増加し、72時間後には34%に達した。0.5時間以降に出現したSGCは、宿主によって消化されることなく、24時間後には細胞分裂によって宿主細胞内で増殖を開始し、細胞内共生を成立させた。これらの結果は、最終的に細胞内共生を行うクロレラは最初から少数存在していたSGCではなく、30分以降に緑色のクロレラを含むDV-IVaまたはDV-IVbから出現したことを示している (Kodama and Fu-

jishima, 2005)。

10分間煮沸して殺した共生クロレラを使って、1.5分のパルスラベルとチェイスを行いクロレラの運命を追跡した (Fig. 4B)。その結果、煮沸したクロレラでも生きたクロレラと同様に、SGCを持つ細胞と、DV-IIIaを持つ細胞の割合は、0.5時間後には0%になるが、生きたクロレラを与えた時とは異なり、その後SGCが出現することはなかった。また、DV-IVaを持つ細胞の割合も、1時間後には0%になり、72時間後には全てのクロレラが消化または排出された。煮沸したクロレラを与えた時は、生きたクロレラを与えた時とは異なり、消化されたクロレラと、消化を免れた緑色のクロレラとが共存するDV-IIIbやDV-IVbは出現しないことが分かった。パラホルムアルデヒドなどで固定した共生クロレラでも100%の消化が誘導された。これらの結果から、DV-III以降で一部のクロレラが消化を免れる現象は、生きたクロレラを与えた時のみで見られる現象であることが明らかとなった。生きたクロレラのみが持つAcPase活性に対する抵抗性が何で決まるのかはまだ明らかにされていない (Kodama and Fujishima, 2005; Kodama et al., 2007)。

最終的に細胞内共生を行うクロレラは、DV-IVaとDV-IVbのどちらの食胞から出現するのだろうか?

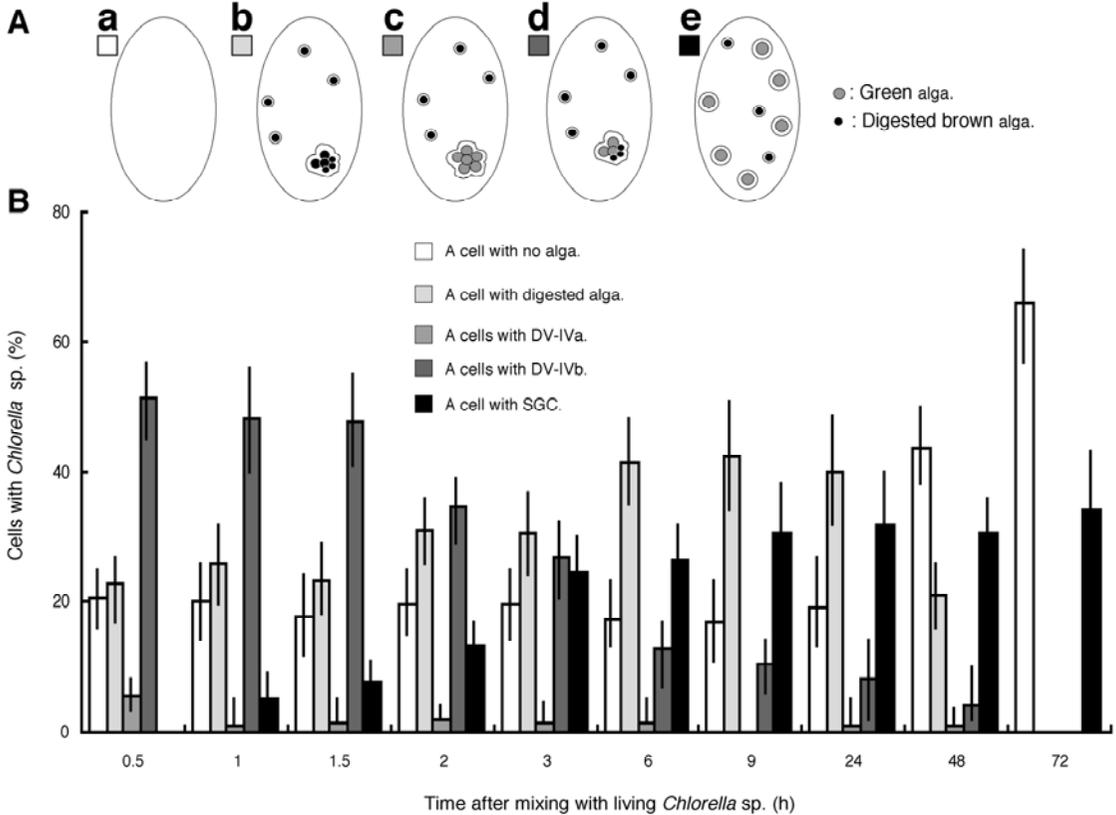


Fig. 5 Source of SGCs that can establish endosymbiosis. *Chlorella* sp.-free cells were mixed with isolated algae, washed, chased, and fixed at 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 9, 24, 48, and 72 h after mixing. (A) Cells fixed at 0.5 h after mixing were classified into five types according to the stages of their DVs: (a) a cell with no algae, (b) a cell with digested algae, (c) a cell with DV-IVa, (d) a cell with DV-IVb, (e) a cell with SGC. When a cell had several types of DVs, i.e., types b–e are seen together, the cell was classified in the order b < c < d < e. For example, when a cell has DVs with SDC and SGC, the cell was classified as type e. (B) Summary of DV types found during the infection process. At each fixing time interval, 100 to 230 cells were observed. Bar, 95% confidence limit. (From Kodama and Fujishima, 2005.)

クロレラによる 1.5 分のパルスラベル後、0.5 時間以降に観察すると、Fig. 5Aa-e に示す 5 種類の細胞（クロレラを持たない細胞、a; 消化途中のクロレラのみを持つ細胞、b; DV-IVa を持つ細胞、c ; DV-IVb を持つ細胞、d; SGC を持つ細胞、e）が見られる。Fig. 5B の横軸はクロレラと混合後の時間を示しており、縦軸は観察した細胞内におけるそれぞれの細胞の割合を示している。同一細胞内に複数のタイプのクロレラを持つ場合は、より後者(e>d>c>b>a) を持つ細胞としてカウントした。クロレラと混合後 0.5 時間では 0% であった SGC を持つ細胞の割合は時間経過に伴って増加し、それとは対照的に、0.5 時間後では約 50% であった DV-IVb を持つ細胞の割合が減少した。72 時間後には、クロレラを持たない細胞もしくは SGC を持つ細胞の二者のみとなった。混合後、24 時間以降の SGC は細胞分裂に

よって増殖を開始するので、細胞内共生に成功したと考えることができる。一方、この時宿主は、72 時間後までほとんど細胞分裂を行わなかった。72 時間後の SGC を持つ細胞の割合の約 35% という値は、常に 1% 以下しか存在しない DV-IVa からの出現のみでは補うことができない。従って、最終的に細胞内共生を行うクロレラの大部分は、消化されたクロレラと消化を免れたクロレラが共存する DV-IVb から出現したことが明らかになった (Kodama and Fujishima, 2005)。

Fig. 6 はクロレラの感染過程における DV-I (Figs. 6A and B)、DV-II (Figs. 6C and D)、DV-IIIb (Figs. 6E and F)、DV-IVb (Figs. 6G and H) と、食胞から脱出中のクロレラ (Figs. 6I and J)、宿主細胞表層に接着したクロレラ (Figs. 6K and L) の光学顕微鏡像 (Figs. 6A, C, E, G, I, and K) と、その時の Gomori 染色像 (Figs. 6B, D, F,

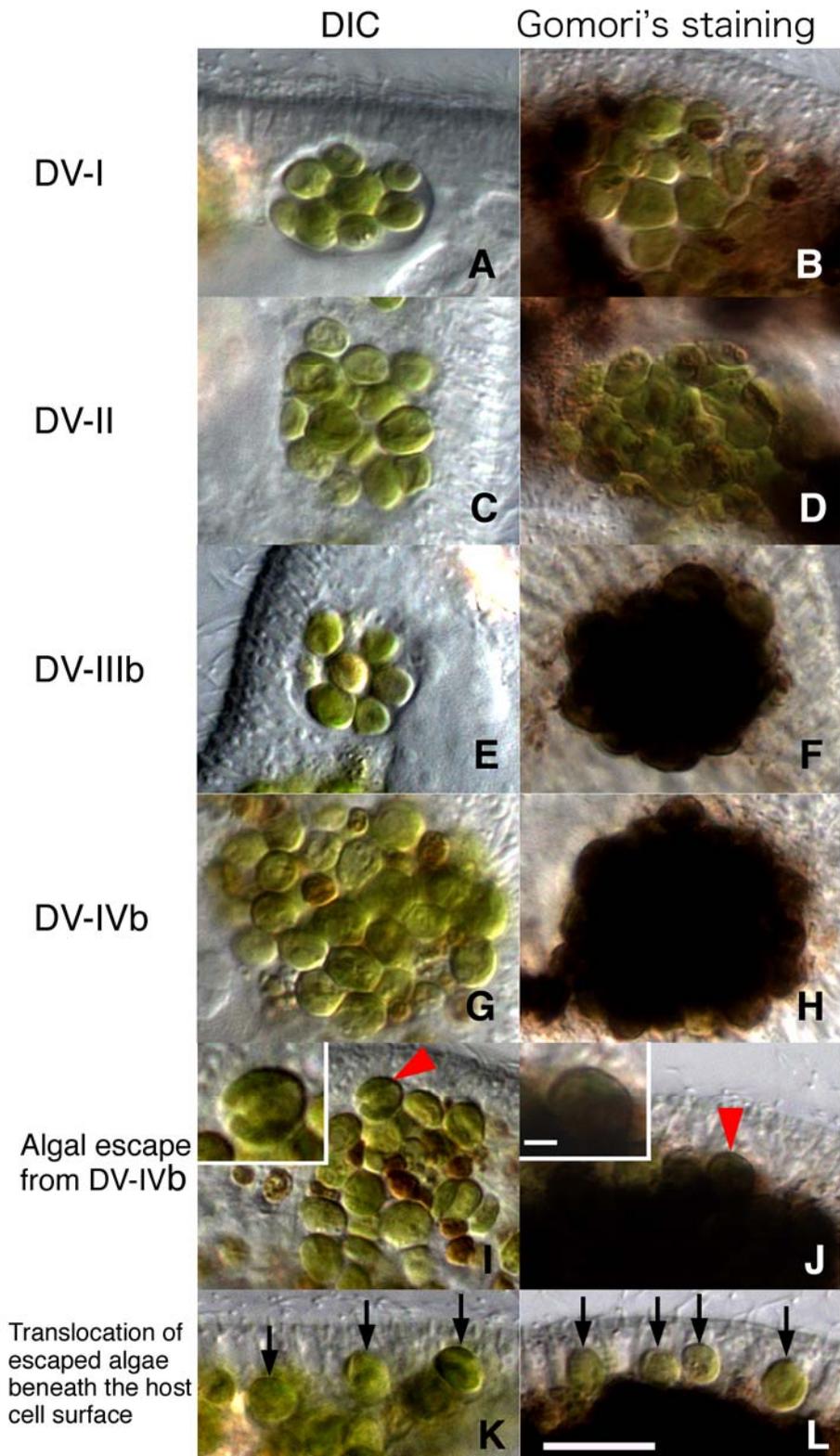


Fig. 6 Differential-interference-contrast (DIC) micrographs of infection process of symbiotic *C. vulgaris* cells to algae-free *P. bursaria* cells. *Chlorella*-free paramecia were mixed with isolated algae and fixed at 0.5 min (A and B), 1 min (C and D), 10 min (E and F), 30 min (G and H), and 3 h (I-L) after mixing. Cells non-treated with Gomori's solution; A, C, E, G, I, K. Cells treated with Gomori's solution; B, D, F, H, J, L. Experiments were repeated more than 10 times and the results were reproducible. DV-I; A and B. DV-II; C and D. DV-IIIb; E and F. DV-IVb; G and H. I and J; an alga is just escaping by budding of the DV-IVb membrane (a red arrowhead). Insets of I and J; enlarged photomicrographs of the escaping alga. K and L; algae attached just beneath the host cell surface (black arrows). Note that DV-I (B) and DV-II (D) are AcPase-negative, and DV-IIIb (F) and DV-IVb (H and J) are AcPase-positive. SGCs that escaped from the host DVs and translocated just beneath the host cell surface are AcPase-negative (L, black arrows). Bars, 10 μ m (L) and 2 μ m (inset in J). Updated from Kodama and Fujishima 2009. See color figure in on-line publication.

H, J, and L) である。クロレラを取り込んだDV-I (Fig. 6A) は、0.5-1分以内にアシドソームが融合したDV-II に分化する (Fig. 6C)。DV-I と DV-II の食胞内には AcPase 活性は検出されない (Figs. 6B and D)。DV-III 以降の食胞内には AcPase 活性が観察される (Figs. 6F, H, J, and L)。AcPase 活性を示す DV-IIIb (Fig. 6F) や、DV-IVb (Fig. 6H) 内で一部のクロレラが食胞内で一次的にリソソーム耐性を獲得する理由を明らかにするために、クロレラ除去細胞に、クローン化した共生クロレラ (*C. vulgaris*, strain 1N) やタンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミドで処理したクロレラを与えたところ、それでも DV-IVb は出現した。宿主から単離した共生クロレラに、PV 膜が付着していた可能性があるため、ミドリゾウリムシの細胞膜を溶かす濃度の界面活性剤で処理したクロレラを与えたところ、それでも DV-IVb は出現した。さらに、消化を免れるクロレラと消化されるクロレラには、その細胞周期や宿主食胞内での位置の違いは見られなかった (Kodama et al., 2007)。クロレラ除去細胞と単離した共生クロレラを混合し、3 時間後に固定して、クロレラを取り込んだ食胞の直径と、食胞内のクロレラの消化との関係を調べた結果、直径が大きい食胞、つまり多数のクロレラを取り込んだ食胞は、直径の小さな食胞と比較して、消化される数が少ないことが分かった (Kodama et al., 2007)。この結果から、直径の大きな食胞には宿主リソソームが融合しない、もしくは、融合しても食胞内にリソソーム酵素が充満していない可能性を考え、Gomori 染色で直径の大きな食胞を観察したが、AcPase 活性は食胞全体に検出され、この可能性は排除された (Kodama and Fujishima, 2009)。一部のクロレラだけが一次的にリソソーム耐性を獲得する理由はまだ明らかではない。

クロレラと混合後 30 分以降では、DV-IVb から食胞膜の出芽によってほぼ全てのクロレラが徐々に 1 個ずつ食胞膜に包まれて宿主細胞質に脱出する現象が観察される (Fig. 6I, 矢じり)。食胞から脱出中のクロレラの周りには、AcPase 活性が検出された (Fig. 6J, 矢じり)。食胞膜の出芽現象は、煮沸して殺したクロレラや酵母菌、さらには DV-IVb 内で消化されたクロレラでも生じるが、これらは食胞から脱出後に例外無く消化または宿主細胞肛門から排出される。生きている共生クロレラでなくても、食胞から脱出でき

ることが分かった。一方、直径 0.81 μ m のラテックスビーズ、宿主の餌のバクテリア (*Klebsiella pneumoniae*)、墨汁では食胞膜の出芽による脱出は生じなかった (Kodama and Fujishima, 2005)。また、食胞からのクロレラの脱出は、宿主とクロレラの両方のタンパク質合成を阻害しても行われた (児玉と藤島, 未発表)。

クロレラと混合後 45 分以降には、食胞から細胞質に脱出した SGC が宿主の細胞表層直下に接着して安定化する現象が観察される (Fig. 6K, 矢印)。このような SGC は宿主の原形質流動によって細胞質内を移動することはない。この SGC を包む膜の内側には AcPase 活性は検出されなかった (Fig. 6L, 矢印)。従って、PV 膜の分化は、DV-IVb 膜の出芽による食胞脱出の直後から宿主の細胞表層直下に接着するまでの約 15 分間に行われることが明らかになった (Kodama and Fujishima, 2009)。

Fig. 7B はクロレラと混合してから 3 分後と 30 分後の食胞を観察し、観察した全ての食胞に占める Fig. 7A-a のような AcPase 活性陰性の食胞 (白い棒グラフ)、Fig. 7A-b のような食胞の淵のみが AcPase 活性陽性の食胞 (灰色の棒グラフ)、Fig. 7A-c の左の食胞のような AcPase 活性陽性の食胞 (黒い棒グラフ) の割合を示したグラフである。クロレラと混合後 3 分では、AcPase 活性陽性の食胞は約 10% 存在する。その後、時間経過に伴ってこの割合は増加し、30 分後には観察したほぼ全ての食胞が AcPase 活性陽性であった。この時、クロレラと混合してから 72 時間後に細胞を観察してクロレラの再共生率を調べると約 85% であった。再共生率とは、観察した全ての細胞に占める宿主細胞表層に接着した SGC を持つ細胞の割合である。この値は、クロレラと混合してから 30 分後の AcPase 活性陰性の食胞の約 4% の食胞からの出現のみでは補うことが出来ない。つまり、細胞内共生を成立させるクロレラは AcPase 活性陽性の食胞から出現したことを示している。これらの結果は、「細胞内共生を成立させるほぼ全てのクロレラは、アシドソームとリソソーム融合後の DV-IVb から出現する」という結果 (Kodama and Fujishima, 2005) を、組織化学的方法でも、支持するものとなった (Kodama and Fujishima, 2009)。

細胞内共生生物が宿主細胞内に侵入して安定して

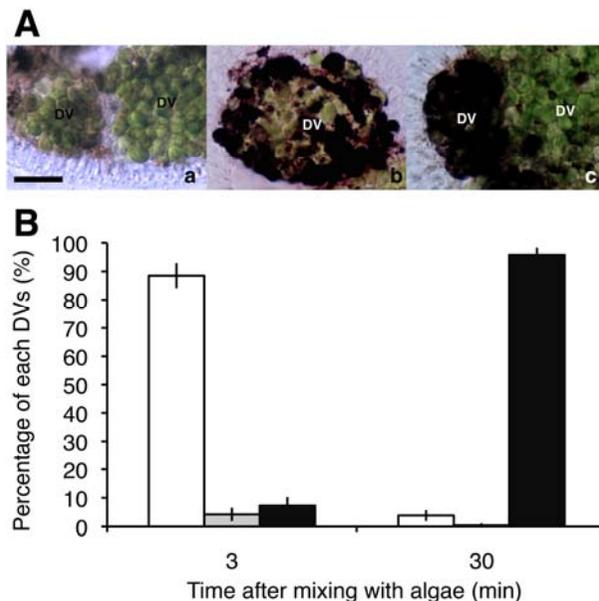


Fig. 7. A, Three kinds of DVs classified according to the localization of their AcPase-activity. AcPase-negative DV (a); DV with partially AcPase-positive area near DV membrane (b); entirely AcPase-positive black DV (left DV in c). Bar, 10 μ m. B, Timing of appearance of Gomori's staining-positive DVs. White bars mean AcPase-negative DV. Gray bars mean DV with partially AcPase-positive area near DV membrane. Black bars mean entirely AcPase-positive black DV. Algae-free *P. bursaria* strain, Yad1w cells, were mixed with symbiotic *C. vulgaris* strain, 1N cells, for 1.5 min at 5,000 paramecia/ml and 5×10^7 algae/ml, washed, chased and fixed at 3 and 30 min after mixing. The cells were stained by Gomori's staining to detect AcPase activity in DVs ingesting the algae. Results obtained from three separate experiments were summarized as mean \pm SD. For each time point, 472–512 DVs from 233–236 paramecia were observed. At 3 min, only 6.3% of the DVs were entirely AcPase-positive. On the other hand, at 30 min, ratios of such DVs were increased to 95.6%. Thus, it shows that the majority of the DVs become AcPase-positive until 30 min. Updated Kodama and Fujishima, 2009. See color figure in on-line publication.

維持されるためには、第一に宿主細胞のリソソーム酵素の攻撃を回避しなければならない。これには、*Listeria*属と*Holospora*属細菌のように食胞膜を貫通して細胞質に脱出してリソソーム酵素の攻撃を回避する例、*Salmonella*属細菌・結核菌・*Legionella*属細菌・*Brucella*属細菌のように食胞とリソソームとの融合を阻止する例が知られている (Iwatani et al., 2005; 山本と高谷, 2006)。過去の研究では、最終的に細胞内共生に成功するクロレラは、食胞にリソソームが融合する前にDV-IIから細胞質に脱出すると考えられていた (Meier and Wiessner, 1989)が、我々の結果はそれが間違いであることを示した。最終的に細胞内共生に成功するクロレラは、アシドソームとリソソームが融合した食胞内で一次的にリソソーム酵素耐性能を獲得し、次に食胞膜の出芽で食胞膜に包まれて細胞質に脱出し、この膜がリソソーム融合阻止能力を有するPV膜に分化して、宿主細胞表層に接着して増殖を開始することが明らかになった (Kodama and Fujishima, 2005, 2009, 印刷中)。共生クロレラによる3段階の宿主リソソーム攻撃からのエスケープ機構 (一次的なリソソーム酵素耐性能の獲得、食胞から

の脱出、PV膜への分化) は、これまでに報告されたいの寄生性や共生性生物とも異なる新規で複雑なエスケープ機構である (Fig. 8)。

4. クロレラ除去細胞に取り込まれた共生可能なクロレラ種と共生不可能なクロレラ種の運命

ミドリゾウリムシと共生可能なクロレラと共生不可能なクロレラを宿主食胞に取り込ませた時の運命の違いを調べるため、9種15株の自由生活クロレラ (*C. vulgaris* strain C-27, *C. sorokiniana* strains C-212 and C-43, *Parachlorella kessleri* strains C-208 and C-531, *C. ellipsoidea* strains C-87 and C-542, *C. saccharophila* strains C-183 and C-169, *C. fusca* var. *vacuolata* strains C-104 and C-28, *C. zofingiensis* strain C-111, *C. protothecoidea* strains C-150 and C-206, カイメンの共生藻である *Chlorella* sp., strain C-201) をクロレラ除去細胞に一定条件でパルス的に与え、食胞内に取り込まれたクロレラの運命を追跡した。その結果、ミドリゾウリムシに共生可能な自由生活クロレラの *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *P. kessleri* は、宿主食胞に取り込まれる

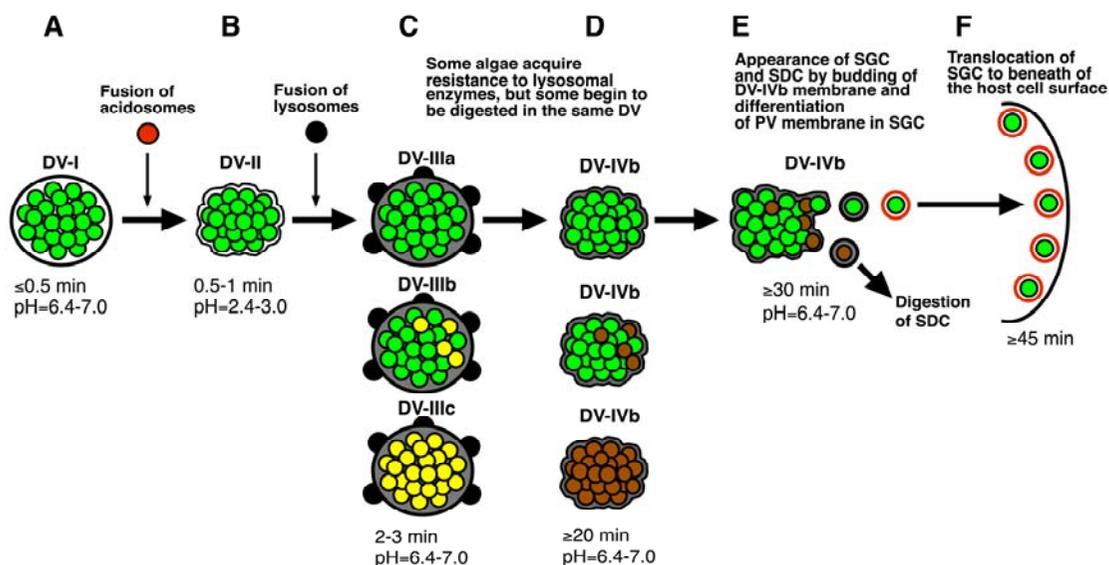


Fig. 8 Schematic representation of timing of PV membrane differentiation from DV membrane in early infection process of symbiotic *C. vulgaris* to algae-free *P. bursaria* cells. (A) Spherical DV-I vacuole containing green algae. (B) Differentiation of condensed DV-II vacuole by fusion of acidosomes and acidification. (C) Differentiation of swollen DV-III vacuole by fusion of primary lysosomes. AcPase-activity positive area by Gomori's staining are shown by a gray area in the DV. In the DV-III vacuole, some of the algae exhibit resistance to the lysosomal enzymes and can maintain green color and original morphology. Remaining algae are partially digested and show yellow colors in the same DV. Internal pH of the DV-III vacuole increased. DV-III is further classified into three substages: DV-IIIa contains green algae only; DV-IIIb contains both discolored by partial digestion and green algae; and DV-IIIc contains exclusively discolored algae. (D) Differentiation of condensed DV-IV vacuole. DV-IV is classified into three substages: DV-IVa contains green algae only; DV-IVb contains both green and digested brown algae; DV-IVc contains digested brown algae only. (E) Appearance of a SGC and a SDC through DV-IVb vacuole membrane budding. This phenomenon occurs notwithstanding the fact that alga is intact or partially digested. Note that alga in the buds were still covered by a gray thin layer by Gomori's staining. (F) Translocation of the SGCs just beneath the host cell surface, anchor there at about 10 μm interval and initiation of algal cell division to establish endosymbiosis. Note that algae attached beneath the cell surface has no AcPase activity, suggesting that the vacuole membrane wrapping the algae differentiate to PV membrane (red circle) immediately after budding from the DV membrane. Afterward, the distance between each alga is shorter. SGCs of infection-incapable and SDCs of infection-capable *Chlorella* species cannot translocate beneath the host cell surface and eventually failed to establish endosymbiosis. Green circle means intact algae. Yellow circle means digested yellow algae. Brown circle means digested brown algae. Updated from Kodama and Fujishima, 2009. See color figure in on-line publication.

と、その一部が食胞膜の出芽で細胞質に脱出し、さらに宿主の細胞表層直下に接着できた (Fig. 9A、矢印)。一方、共生不可能な他種のクロレラ (*C. ellipsoidea*, *C. saccharophila*, *C. fusca* var. *vacuolata*, *C. zofingiensis*, *C. protothecoides*) の場合は、食胞から細胞質への脱出まではできるが、共生可能なクロレラのように宿主の細胞表層直下に接着することができず、最終的には宿主細胞肛門から排出された (Fig. 9B) (Kodama and Fujishima, 2007)。これらの結果は、宿主細胞表層直下への接着が二次共生の成立の可否を決定する最終段階として必須な現象であることを示している。さらに、共生可能であると報告されている *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *P. kessleri* の3種のクロ

レラであればどの株でも共生できるわけではなく、同じ種でも共生能力は株に依存することが分かった (Table 1)。Takedaらは我々が用いたクロレラ除去株 (*P. bursaria*, strains OS1w and Yad1w) とは異なる株 (*P. bursaria*, strain T316w) を用い、この株には感染可能な3種のクロレラの全ての株が共生したと報告している (Takeda et al., 1998)。これらの結果は、クロレラ株だけの問題ではなく、宿主株とクロレラ株の組み合わせも影響する可能性を示唆している。

一方、過去の研究では、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ではグルコサミン型であり、共生不可能な種ではグルコースとマン

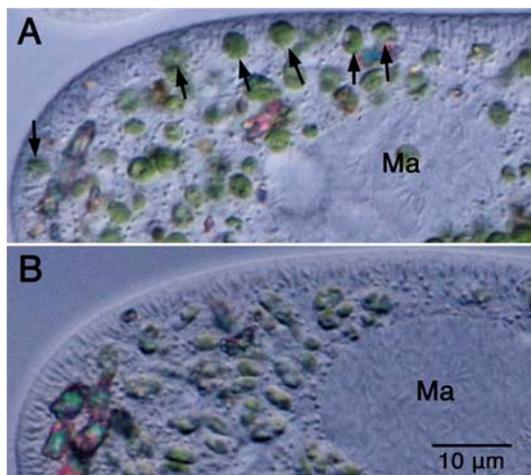


Fig. 9. Photomicrographs of *P. bursaria* OS1w cells pulse-labeled with symbiotic *Chlorella* sp. cells isolated from *P. bursaria* OS1g cells (A) and with *C. saccharophila* strain C-169 cells (B). Paramecia were observed 3 h after mixing. Note that the symbiotic *Chlorella* sp. cells are localized close to the host cell surface (arrows), whereas *C. saccharophila* C-169 cells are not. Ma, Macronucleus. From Kodama and Fujishima, 2007. See color figure in on-line publication.

ノース型であると報告されていた (Takeda et al., 1988)。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未処理のクロレラの細胞壁に対する Alexa flour 488 で標識した3種のレクチン (Con A; マンノースと結合、GS-IIとWGA; Nアセチルグルコサミンと結合) の結合性を調べ、rigid wallの糖組成とミドリゾウリムシとの共生能の有無との相関を調べた。その結果、アルカリ溶液処理の有無に関わらず、クロレラのレクチン結合性とミドリゾウリムシとの共生能の有無には相関は見られなかった (Table 1)。

山田 (1994) は、クロレラウイルスのクロレラへの感染能と、クロレラの共生能の関係について考察している。クロレラウイルスは、日本各地の淡水湖沼河川に頻繁に存在しているウイルスで、ミドリゾウリムシやヒドラなどと細胞内共生を営んでいたクロレラにしか感染しない。ウイルスの宿主となるクロレラは細胞表面に特徴があり (クロレラウイルスによって認識されるレセプターの存在や酵素による分解性)、これがミドリゾウリムシやヒドラとの共生関係の樹立にも重要な因子となると考察している。クロレラのみドリゾウリムシへの共生能の有無が、クロレラウイルスの感染能の有無とも関係があるのかどうかは大変興味深い。

一方、過去の研究では、クロレラの細胞壁をCon Aでマスクすると、再生率が低下するという報告が

されていた (Nishihara et al., 1996; Reisser et al., 1982; Weis, 1980)。今回、我々が調べたクロレラのうち、Con A結合能とクロレラ除去細胞への再生能を持つ株は無かったが、*C. sorokiniana*, strain C-212にはWGAが結合し、クロレラ除去細胞に再生することができた (Table 1)。そこで、WGAでC-212株の細胞壁をマスクした後、クロレラ除去細胞と混合し、再生率への影響を調べたところ、コントロールの未処理のクロレラと比較して再生率に有意差は見られなかった。これらの結果は、クロレラの細胞内共生能力は細胞壁の糖組成とは無関係であり、食胞から脱出後に宿主細胞表面直下に接着する能力の有無で決定されることを強く示している (Kodama and Fujishima, 2007)。洲崎らはクロレラ除去細胞に3種の酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*, *Yarrowia lipolytica*) を与え、食胞に取り込まれた酵母菌がその後、宿主細胞表面に定着するか、宿主細胞内で分裂増殖できるか、宿主細胞質に維持されるか、細胞内共生を成立させるかを調べた。その結果、*R. rubra*と*Y. lipolytica*は宿主の細胞表面に定着して増殖し、再び共生クロレラが与えられるまでは、安定した細胞内共生を確立させた。一方*S. cerevisiae*は細胞表面には定着せず、1週間から10日後に自然に消失したと報告している (Suzaki et al., 2003)。これらの結果は、クロレラ以外にも宿主細胞表面に接着する能力があれば、ミドリゾウリムシに共生可能であることを示している。

5. PV膜の性質

共生クロレラを包むPV膜は宿主の食胞膜由来であるが、両者の性質は大きく異なる。1. 食胞膜には1つ以上のクロレラが包まれているが、PV膜にはクロレラが1つだけ包まれている。2. 食胞膜の直径は食胞内のクロレラの数によって変化する (2.1-12.9 μm) が、PV膜の直径はクロレラの細胞分裂時以外はほとんど変化しない (2.5-4.5 μm)。3. 食胞膜には宿主の原形質流動に伴う移動が見られるが、PV膜には見られない。4. 食胞膜には分化に伴う膜構造の変化が見られるが、PV膜には見られない。5. 食胞膜には宿主のリソソームが融合するためAcPase活性が検出されるが、PV膜にはリソソームが融合しないためAcPase活性が検出されない (Reisser, 1992)。なぜPV膜がリソソーム融合を阻止できるか、どのようにPV膜を通じて宿主と共生クロレラ間の物質交換がなされているかは未だに明らかになっていない。PV膜の性質に関しては多くの点が不明瞭なままである。

我々は、ミドリゾウリムシを恒明条件下でタンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミドで処理すると、24時間以内にPV膜が同調して膨潤し (我々はこの現象をsynchronous PV-swelling, 略してSPVSと呼んでいる)、SPVSが誘導されると8割以上のクロレラが消化されることを明らかにした (Fig. 10B, Kodama and Fujishima, 2008)。シクロヘキシミド処理後48時間た

Table. 1 Lectin-binding activity of the NaOH-treated and untreated cell walls of *Chlorella* species and their infectivity for algae-free *P. bursaria*

Species	Strain (alternative name)	Infectivity		Lectin labeling of: ^a					
				Non-treated cells			NaOH-treated cells		
		T316w	OS1w	WGA	GS-II	Con A	WGA	GS-II	Con A
<i>C. vulgaris</i>	C-27 ^b		-	-	-	-	+	+	+
<i>C. sorokiniana</i>	C-212								
	(211-8k) ^c	+	+	+	-	-	±	+	±
<i>Parachlorella kessleri</i> (formerly called as <i>C. kessleri</i>)	C-43 ^b		-	+	-	-	+	+	+
	C-208								
	(211-11g) ^c	+	-	-	-	-	-	±	-
<i>C. ellipsoidea</i>	C-531								
	(211-11h) ^c	+	+	-	-	-	-	±	-
	C-87								
<i>C. saccharophila</i>	(211-1a) ^c	-	-	-	-	+	-	+	+
	C-542								
	(211-1a) ^c	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>C. fusca</i> var. <i>vacuolata</i>	C-183 ^b		-	-	+	+	-	+	+
	C-169 ^b		-	-	-	+	-	-	+
<i>C. zofingiensis</i>	C-104								
	(211-8b) ^b		-	-	-	+	-	-	+
	C-28 ^b		-	-	-	+	-	-	-
<i>C. protothecoides</i>	C-111								
	(211-14) ^b		-	-	-	+	-	-	+
Symbiotic <i>Chlorella</i> sp.	C-150								
	(211-11a) ^b		-	-	-	+	-	-	+
	C-206 ^b		-	-	-	+	-	-	+
Symbiotic <i>Chlorella</i> sp.	C-201 ^b		-	-	-	+	-	+	+
	OS1g ^b		+	-	-	-	+	+	+
	Dd1g ^b		+	-	-	-	+	+	+
	KM2g ^b		+	-	-	-	+	+	+
	Bwk-16								
	(C ⁺) ^b		+	±	-	±	+	+	+
	IN ^b		+	-	-	-	+	+	+

^a Algal cells were labeled with Alexa Fluor 488-conjugated Con A, WGA or GS-II. +, 100% of cells with FITC fluorescence; ±, less than 100 %; -, 0%. For each experiment, more than 100 algal cells were observed.

^b Strain used only in this study.

^c Strain used in this study and by Takeda et al. (1998).

Updated from Kodama and Fujishima, 2007.

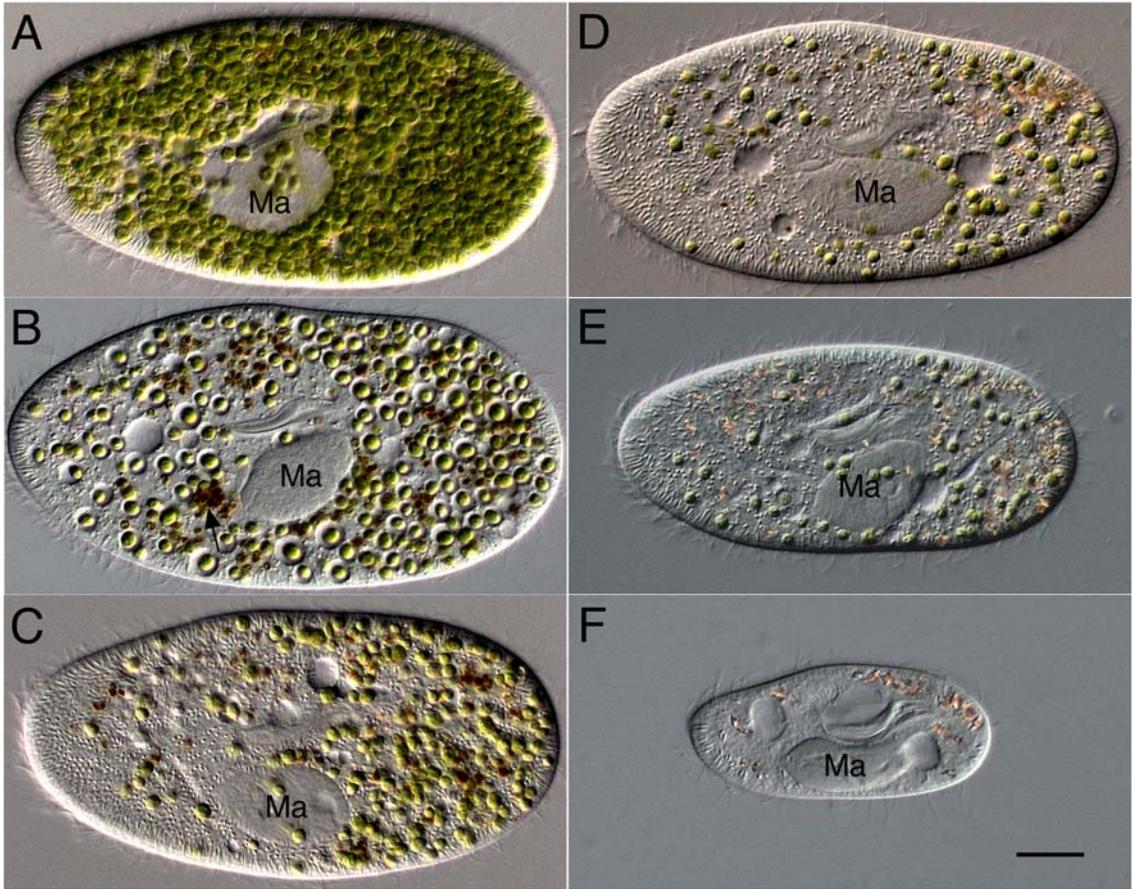


Fig. 10. Photomicrographs of algae-bearing OS1g1N cells suspended in fresh culture medium containing 10 $\mu\text{g/ml}$ of cycloheximide at 5×10^3 paramecia/ml at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ under the LL condition: (A) before treatment; (B) 1 day after mixing with cycloheximide. All PVs containing green algae swelled synchronously. Furthermore, digested algae appeared in the cytoplasm (arrow). (C) 2 days after mixing with cycloheximide, the green algae were numerically reduced. (D) 3 days after mixing. (E) 5 days after mixing. (F) 7 days after mixing. All algal cells disappeared from the host cytoplasm. The paramécie cells became small. Ma, macronucleus. Bar = 10 μm . From Kodama and Fujishima, 2008. See color figure in on-line publication.

つと再びPV膜は収縮する (Fig. 10C)。その後、共生クロレラの数徐々に減少し (Figs. 10D and E)、シクロヘキシミド処理後7日では観察した全ての細胞からクロレラが消失した (Fig. 10F)。シクロヘキシミドは1-100 $\mu\text{g/ml}$ ではクロレラのタンパク質合成のみを阻害し、宿主のタンパク質合成は阻害しない (Ayala and Weis, 1987) ことから、ミトゾウリムシから共生クロレラを除去する方法として用いられてきた (Weis, 1984)。しかし、どのようにクロレラが除去されるかについては調べられていなかった。シクロヘキシミドによるSPVSIは、Schübler and Schnepf (1992)が報告したモネンシンによるPV膜膨張の現象と同様に、恒暗条件下や光合成阻害剤のDCMU存在下では誘導されない。さらにクロレラの除去も誘導されな

い (Fig. 11) (Kodama and Fujishima, 2008)。この結果は、光合成活性存在下で同時に合成されるクロレラのタンパク質が、共生クロレラを包むPV膜への宿主リソソーム融合阻止能力と深く関わっている可能性を示唆している。Reisser (1992)はクロレラ細胞壁とPV膜が密着していることが物質の流動性を低下させ、結果としてリソソーム融合を阻止している可能性を示唆しているが、モネンシンではシクロヘキシミドで誘導されたようなSPVSIに引き続く消化の誘導は起きなかったことから、PV膜とクロレラ細胞壁間の距離がリソソーム融合阻止能力の原因ではないことが明らかになった。さらに我々はGomori染色を用いて、恒明条件下でのシクロヘキシミド処理によって消化されたクロレラには宿主のリソソームが融合

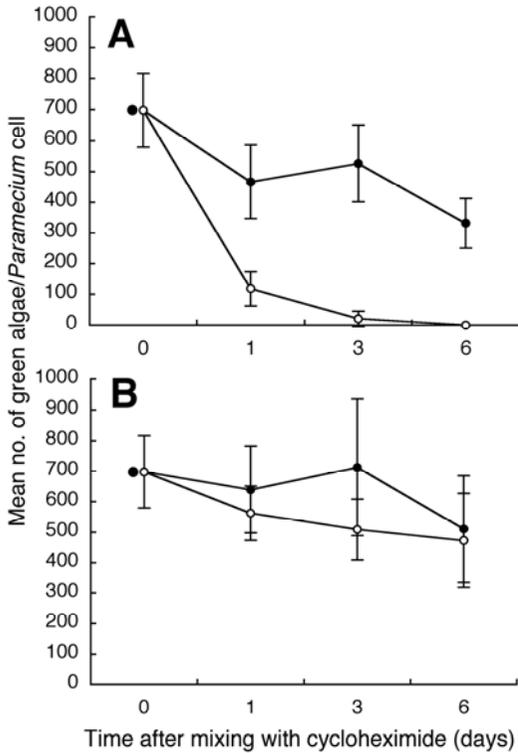


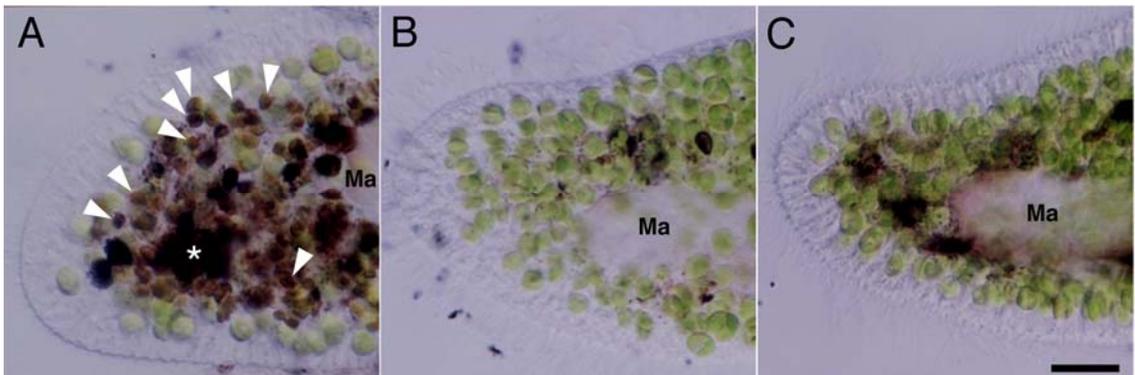
Fig. 11. Effects of cycloheximide on the mean number of green algae per host cell under LL and DD conditions. *Paramecium* cells were suspended in culture media with (open circle) or without (closed circle) 10 $\mu\text{g/ml}$ of cycloheximide at 5×10^3 cells/ml at 25 ± 1 $^\circ\text{C}$, under an LL (A) and a DD (B) conditions. The vertical bars represent standard errors of the mean quantities of green algal cells per host cell. At each time, 20-30 *Paramecium* cells were observed. The vertical bars, respectively, represent standard errors of the mean for three samples. Updated from Kodama and Fujishima, 2008.

し、恒暗条件下や光合成阻害剤のDCMU存在下でのシクロヘキシミド処理ではPV膜にリソソームは融合しないことを確認した (Fig. 12) (Kodama and Fujishima, 2008)。恒明条件下におけるシクロヘキシミドによるSPVSと消化の誘導について、Fig. 13のような仮説を立てた (Kodama and Fujishima, 2008)。恒明条件下のみでSPVSが誘導される理由や、PV膜とクロレラ細胞壁の間を満たしている物質については不明であるが、これまで情報が希薄だったPV膜の性質について新たな見解が得られた。今後は、光合成活性存在下で同時に合成されるクロレラのタンパク質の検出と機能を解明したいと考えている。

6. まとめと今後の展開

我々の研究は、これまでの細胞内共生に関する多くの研究とは異なり真核細胞の進化のルーツを探るのではなく、二次共生の成立に必要とされる諸現象の分子機構を明らかにすることを目的としている。この研究が進めば、任意の細胞の組み合わせで細胞内共生を人為的に誘導して有用な細胞をつくり出す

Fig. 12. AcPase activity around the symbiotic algae of *Paramecium bursaria* cells, strain OS1g, treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide for 24 h at 5×10^3 cells/ml at 25 ± 1 $^\circ\text{C}$, under the LL condition (A), DD condition (B), and LL condition in the presence of 10^{-7} M of DCMU. Only under the LL condition, many symbiotic algae were digested (some are labeled by white arrowheads) and showed AcPase activity around them. In contrast, under the DD condition (B) or the LL condition in the presence of DCMU (C), algal digestion and AcPase activity in the PVs were not induced. AcPase activities appearing in B and C are those in DVs containing food bacteria. An asterisk denotes DV containing many digested algae; Ma, macronucleus. Bar, 10 μm . From Kodama and Fujishima, 2008. See color figure in on-line publication.



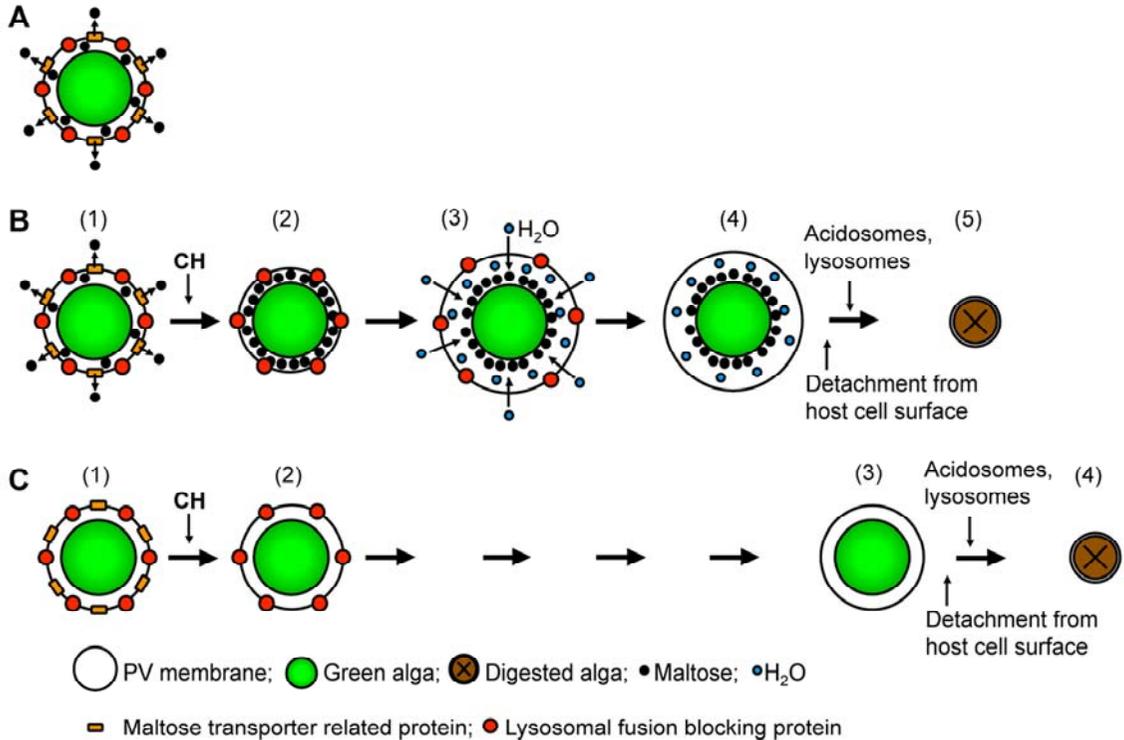


Fig. 13. Schematic drawing illustrating some hypotheses related to the induction of SPVS and digestion of symbiotic alga after treatment of alga-bearing *Paramecium bursaria* cells with 10 mg/ml cycloheximide under LL or DD conditions. As molecules responsible for functions of the PV membrane, two proteins that are synthesized by the algae, excreted outside the algae and localized on the PV membrane, are postulated. One is a hypothetical maltose transporter-related protein (squares on PV membrane) (Willenbrink, 1987), which is synthesized by the alga during photosynthesis and transports maltose from inside the PV membrane to the outside. Loss of this protein in the LL condition induces accumulation of photosynthesized carbohydrates, mainly maltose. Another one is a hypothetical lysosomal fusion blocking protein (circles on PV membrane) that is synthesized by the algae and which has abilities to block lysosomal fusion to the PV membrane and also to attach to unknown structures immediately beneath the host surface, so that loss of this protein induces detachment of the PV from the host cell surface and induces fusion with the host lysosomes. The maltose transporter-related protein disappears rapidly from the PV membrane when the algal protein synthesis is inhibited by cycloheximide. On the other hand, the lysosomal fusion blocking protein has a longer turnover time than that of the former; for this reason, this protein remains for some time on the PV membrane when the algal protein synthesis is inhibited by cycloheximide. Under the LL condition (A), the symbiotic alga synthesizes mainly maltose by photosynthesis in the host cell (Muscatine et al., 1967) and excretes it into a lumen between the cell wall of the algae and the PV membrane. The maltose is then transferred outside of the PV membrane through the maltose transporter-related protein on the PV membrane. The maltose transporter-related proteins disappear from the PV membrane (B-2) when the algal protein synthesis is inhibited by treatment with cycloheximide under the LL condition (B). Ayala and Weis (1987) reported that, by treatment with 100 mg/ml cycloheximide, the rate of carbohydrate secretion by symbiotic algae under LL showed no significant difference between the treated and untreated groups. Consequently, the concentration of the carbohydrates including maltose increases inside the PV membrane, and outside water flows into the PV and induces the SPVS (B-3). Later, the lysosomal fusion blocking protein disappears from the swollen PV membrane (B-4). Therefore, the vacuole containing an alga detaches from the host surface; then the host acidosomes fuse to the swollen vacuole and the vacuole contracts by membrane replacement between the acidosomal membrane and the swollen vacuole (Fok and Allen, 1988; Kodama and Fujishima, 2005). Thereafter, lysosomal fusion occurs to the contracted vacuole and the alga is digested (B-5). As shown in Fig. 10C, the PVs that are able to avoid the lysosomal fusion in the presence of cycloheximide recontracted PV. Such vacuoles might be produced by evasion of lysosomal fusion after acidosomal fusion. Under the DD condition (C-1), cycloheximide treatment induces loss of the maltose transporter-related protein from the PV membrane (C-2), but no morphological change is induced. Later, the lysosomal fusion blocking protein disappears from the PV membrane (C-3). The vacuole detaches from the host cell surface and fuses with acidosomes and lysosomes; then the algae are digested (C-4). Under the DD condition, the fate of the PV is the same as that of C, irrespective of the presence or the absence of cycloheximide. CH, cycloheximide. From Kodama and Fujishima, 2008. See color figure in on-line publication.

技術の開発が期待される。たとえば、動物細胞に光合成能力を獲得させる技術開発が可能になるであろう。また、ゾウリムシとその核内共生細菌ホロスポラの細胞内共生の研究は、共生によって宿主細胞が各種のストレス耐性を獲得し、生息域を拡大できることを明らかにした (Fujishima et al., 2005; Hori and Fujishima, 2003)。細胞内共生の人為的誘導技術の開発は、究極の省エネ対策としての食料不足の解決や、二酸化炭素濃度の減少と酸素濃度の増加、さらに生存に不適な各種ストレス環境下でも生育できる生物の作成等に貢献できることが期待される。動物と藻類との細胞内共生は地球環境のいたるところに存在するので、ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生成立機構の研究で得られた成果は、藻類を細胞内共生生物とする他の様々な共生系と生態系の維持及び修復に役立つことが期待される。

7. 謝辞

本研究は、児玉への日本学術振興会特別研究員奨励費と、藤島への科学研究費補助金基盤研究(B)海外(No. 17405020)の支援で行われた。

引用文献

- Albers, D. and Wiessner, W. (1985) Nitrogen nutrition of endosymbiotic *Chlorella* spec. *Endocyt. C. Res.*, 1, 55-64.
- Albers, D., Reisser, W. and Wiessner, W. (1982) Studies on the nitrogen supply of endosymbiotic chlorellae in green *Paramecia bursaria*. *Plant Sci. Lett.*, 25, 85-90.
- Ayala, A. and Weis, D.S. (1987) The effect of puromycin and cycloheximide on the infection of algae-free *Paramecium bursaria* by symbiotic *Chlorella*. *J. Protozool.*, 34, 377-381.
- Brown, J.A. and Nielsen, P.J. (1974) Transfer of photosynthetically produced carbohydrate from endosymbiotic *Chlorella* to *Paramecium bursaria*. *J. Protozool.*, 21, 569-570.
- Fok, A.K. and Allen, R.D. (1988) The lysosome system. In: Görtz H-D (ed) *Paramecium*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp 301-324.
- Fujishima, M., Kawai, M. and Yamamoto, R. (2005) *Paramecium caudatum* acquires a heat-shock resistance in ciliary movement by infection of endonuclear symbiotic bacterium *Holospira obtusa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 243, 101-105.
- Gomori, G. (1952) *Microscopic Histochemistry. Principles and Practice*. University of Chicago Press, Chicago
- Görtz, H-D. (1982) Infection of *Paramecium bursaria* with bacteria and yeasts. *J. Cell Sci.*, 58, 445-453.
- Hori, M. and Fujishima, M. (2003) The endosymbiotic bacterium *Holospira obtusa* enhances heat-shock gene expression in the host. *Paramecium caudatum*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 50, 293-298.
- Hörtnagl, P.H. and Sommaruga, R. (2007) Oxidative and UV-induced photooxidative stress in symbiotic and aposymbiotic strains of the ciliate *Paramecium bursaria*. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6, 842-847.
- Hosoya, H., Kimura, K., Matsuda, S., Kitamura, M., Takahashi, T. and Kosaka, T. (1995) Symbiotic algae-free strains of the green paramecium *Paramecium bursaria* produced by herbicide paraquat. *Zool. Sci.*, 12, 807-810.
- Iwatani, K., Dohra, H., Lang, B.F., Burger, G., Hori, M. and Fujishima, M. (2005) Translocation of an 89-kDa periplasmic protein is associated with *Holospira* infection. *BBRC*, 337, 1198-1205.
- Kadono, T., Kawano, T., Hosoya, H. and Kosaka, T. (2004) Flow cytometric studies of the host-regulated cell cycle in algae symbiotic with green paramecium. *Protoplasma*, 223, 133-141.
- Kamako, S-i. and Imamura, N. (2006) Effect of Japanese *Paramecium bursaria* extract on photosynthetic carbon fixation of symbiotic algae. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 5, 136-141.
- Karakashian, M.W. (1975) Symbiosis in *Paramecium bursaria*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 29, 145-173.
- Karakashian, S.J. (1963) Growth of *Paramecium bursaria* as influenced by the presence of algal symbionts. *Physiol. Zool.*, 36, 52-68.
- Kawakami, H. and Kawakami, N. (1978) Behavior of a virus in a symbiotic system, *Paramecium bursaria-zoochlorella*. *J. Protozool.*, 25, 217-225.
- Kodama, Y. and Fujishima, M. (2005) Symbiotic *Chlorella* sp. of the ciliate *Paramecium* do not prevent acidification and lysosomal fusion of the host digestive vacuoles during infection. *Protoplasma*, 225, 191-203.
- Kodama, Y. and Fujishima, M. (2007) Infectivity of *Chlorella* species for the ciliate *Paramecium bursaria* is not based on sugar residues of their cell wall components, but on their ability to localize beneath the host cell membrane after escaping from the host digestive vacuole in the early infection process. *Protoplasma*, 231, 55-63.
- Kodama, Y. and Fujishima, M. (2008) Cycloheximide induces synchronous swelling of perialgal vacuoles enclosing symbiotic *Chlorella vulgaris* and digestion of the algae in the ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist*, 159, 483-494.
- Kodama, Y. and Fujishima, M. (2009) Timing of perialgal vacuole membrane differentiation from digestive vacuole membrane in infection of symbiotic algae *Chlorella vulgaris* of the ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist*, 160, 65-74.
- Kodama, Y. and Fujishima, M. (in press) Localization of perialgal vacuoles beneath the host cell surface is not a prerequisite phenomenon for protection from the host's lysosomal fusion in the ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist*, doi:10.1016/j.protis.2008.11.003.
- Kodama, Y., Nakahara, M. and Fujishima, M. (2007) Symbiotic alga *Chlorella vulgaris* of ciliate *Paramecium bursaria* shows temporary resistance to host lysosomal enzymes during the early infection process. *Protoplasma*, 230, 61-67.

- Meier, R. and Wiessner, W. (1989) Infection of algae-free *Paramecium bursaria* with symbiotic *Chlorella* sp. Isolated from green paramecia. II. A timed study. *J. Cell Sci.*, 93, 571-579.
- Miwa, I., Fujimori, N. and Tanaka, M. (1996) Effects of symbiotic *Chlorella* on the period length and the phase shift of circadian rhythms in *Paramecium bursaria*. *Europ. J. Protistol.*, 32 (Suppl 1), 102-107.
- Muscantine, L., Karakashian, S.J. and Karakashian, M.W. (1967) Soluble extracellular products of algae symbiotic with a ciliate, a sponge and a mutant *Hydra*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 20, 1-12.
- Nishihara, N., Takahashi, T., Kosaka, T. and Hosoya, H. (1996) Characterization of endosymbiotic algae in *Paramecium bursaria*. *Jpn. J. Protozool.*, 29, 35 (in Japanese).
- Pado, R. (1967) Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. II. Photosynthesis. *Acta. Soc. Bot. Pol.*, 36, 97-108.
- Reisser, W. (1976) Die stoffwechselfysiologischen Beziehungen zwischen *Paramecium bursaria* Ehrbg. und *Chlorella* spec. in der *Paramecium bursaria*-symbiose. I. Der Stickstoff- und der Kohlenstoff-Stoffwechsel. *Arch. Microbiol.*, 107, 357-360.
- Reisser, W. (1980) The metabolic interactions between *Paramecium bursaria* Ehrbg. and *Chlorella* spec. in the *Paramecium bursaria*-symbiosis III. The influence of different CO₂-concentrations and of glucose on the photosynthetic and respiratory capacity of the symbiotic unit. *Arch. Microbiol.*, 125, 291-293.
- Reisser, W. (1986) Endosymbiotic associations of freshwater protozoa and algae. In: *Progress in Protistology*. Vol. 1. Corliss, J. O. and Patterson, D. J. (Eds.), Biopress Bristol. pp. 195-214.
- Reisser, W. (1992) Endosymbiotic associations of algae with freshwater protozoa and invertebrates. In: *Algae and symbioses*. Reisser, W. (Ed.) Biopress Bristol. pp. 1-19.
- Reisser, W., Klein, T. and Becker, B. (1988) Studies on phycoviruses I. On the ecology of viruses attacking *Chlorella* exsymbiotic from an European strain of *Paramecium bursaria*. *Arch. Hydrobiol.*, 111, 575-583.
- Reisser, W., Radunz, A. and Wiessner, W. (1982) Participation of algal surface structures in the cell recognition process during infection of aposymbiotic *Paramecium bursaria* with symbiotic *Chlorella*. *Cytobios*, 33, 39-50.
- Schüßler, A. and Schnepf, E. (1992) Photosynthesis dependent acidification of perialgal vacuoles in the *Paramecium bursaria/Chlorella* symbiosis: visualization by monensin. *Protoplasma*, 166, 218-222.
- Siegel, R. and Karakashian, S. (1959) Dissociation and restoration of endocellular symbiosis in *Paramecium bursaria*. *Anat. Rec.* 134, 639.
- Suzaki, T., Omura, G. and Görtz, H-D. (2003) Infection of symbiont-free *Paramecium bursaria* with yeasts. *Jpn. J. Protozool.*, 36, 17-18 (in Japanese).
- Takahashi, T., Shirai, Y., Kosaka, T. and Hosoya, H. (2007) Arrest of cytoplasmic streaming induces algal proliferation in green paramecia. *PLoS ONE* 2(12): e1352. doi:10.1371/journal.pone.0001352
- Takeda, H., Sekiguchi, T., Nunokawa, S. and Usuki, I. (1998) Species-specificity of *Chlorella* for establishment of symbiotic association with *Paramecium bursaria* – Does infectivity depend upon sugar components of the cell wall? *Eur. J. Protistol.*, 34, 133-137.
- Tanaka, M. and Miwa, I. (1996) Significance of photosynthetic products of symbiotic *Chlorella* to establish the endosymbiosis and to express the mating reactivity rhythm in *Paramecium bursaria*. *Zool. Sci.*, 13, 685-692.
- Tanaka, M. and Miwa, I. (2000) Correlation of photosynthetic products of symbiotic *Chlorella* with the mating reactivity rhythms in a mutant strain of *Paramecium bursaria*. *Zool. Sci.*, 17, 735-742.
- Tonooka, Y. and Watanabe, T. (2002) A natural strain of *Paramecium bursaria* lacking symbiotic algae. *Eur. J. Protistol.* 38, 55-58.
- Tonooka, Y. and Watanabe, T. (2007) Genetics of the relationship between the ciliate *Paramecium bursaria* and its symbiotic algae. *Inv. Biol.* 126, 287-294.
- Van, Etten, J.L., Meints, R.H., Kuczarski, D., Burbank, D.E. and Lee, K. (1982) Viruses of symbiotic *Chlorella*-like algae isolated from *Paramecium bursaria* and *Hydra viridis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3867-3871.
- Weis, D.S. (1980) Hypothesis: Free maltose and algal cell surface sugars are signals in the infection of *Paramecium bursaria* by algae. In: *Endosymbiosis and cell biology*, vol I. Schwemmler, W. and Schenk, E.A. (Eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 105-112.
- Weis, D.S. (1984) The effect of accumulation time of separate cultivation on the frequency of infection of aposymbiotic ciliates by symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. *J. Protozool.* 31, 14A.
- Willenbrink, J. (1987) Die pflanzliche Vakuole als Speicher. *Naturwissenschaften*, 74, 22-29.
- 山田隆 (1994) ウイルスによるクロレラの殺滅. 水産学シリーズ99 赤潮と微生物-環境にやさしい微生物農薬をもとめて. pp. 97-109.
- Yamada, T., Onimatsu, H. and Van, Etten, J.L. (2006) *Chlorella* viruses. *Adv. Virus Res.* 66, 293-336.
- 山本友子, 高屋明子 (2006) 感染症における細胞貪食の役割; 細菌がマクロファージによる貪食と殺菌を回避するしくみ, 蛋白質 核酸 酵素, 51, 118-124.