

## シクロヘキシミドは共生クロレラを包む PV 膜の膨張と クロレラの消化を誘導する

児玉 有紀<sup>1,2</sup>, 藤島 政博<sup>3</sup>

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

### Cycloheximide induces swelling of the perialgal vacuole membrane enclosing symbiotic *Chlorella vulgaris* and digestion of the algae in the ciliate *Paramecium bursaria*

Yuuki KODAMA<sup>1,2</sup> and Masahiro FUJISHIMA<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Dept. Natural Sci. and Symbiosis, Grad. School of Sci. and Engineering, Yamaguchi Univ. <sup>2</sup>Res. Fellow of JSPS DC2, <sup>3</sup>Dept. Env. Sci. and Engineering, Grad. School of Sci. and Engineering, Yamaguchi Univ.)

#### SUMMARY

Cycloheximide inhibits protein synthesis in symbiotic *Chlorella* of the ciliate *Paramecium bursaria*, but hardly inhibits the host's protein synthesis. Treatment of the algae-bearing *Paramecium* cells with cycloheximide induces synchronous swelling of all perialgal vacuoles containing the symbiotic algae. The volume of the vacuoles increases about 25 times after 24 hours of treatment. The vacuoles then become condensed and can be stained by Gomori's staining; eventually, the algae in the vacuoles are digested. This phenomenon can only be induced under a fluorescent light and does not occur under a constant dark condition. On the other hand, even with the fluorescent light, this phenomenon cannot be induced if the paramecia are treated with cycloheximide in the presence of the photosynthesis inhibitor 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. These results indicate that the algal proteins synthesized during algal photosynthesis play some important role in preventing the expansion of the perialgal vacuole and to maintain an ability of the perialgal vacuole membrane to protect from the host's lysosomal fusion to the membrane.

**[目的]** 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おり、それらは 1 つずつ宿主のライソソームが融合しないペリアルガルバキュオール (PV) 膜に包まれている。PV 膜がライソソーム融合を阻止する仕組みについてはこれまで全く明らかになっていない。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、それぞれ単独でも増殖できる能力を維持している。これまでにタンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミドがクロレラのタンパク質合成を優先的に阻害する性質を用いて、ミドリゾウリムシから共生クロレラを除去する方法が報告されている<sup>(1)</sup>。クロレラが除去される原因としては次の 2 つの可能性が考えられる。1) シクロヘキシミド存在下で宿主のみの細胞分裂による共生クロレラ数の希釈。2) PV 膜への宿主ライソソーム融合による共生クロレラの消化。後者が原因であるならば、この現象は PV 膜の宿主ライソソーム融合阻止能力の仕組みを解明する優れ

たモデルとなることが期待される。そこで、ミドリゾウリムシをシクロヘキシミドで処理し、クロレラが除去される過程を径時的に観察した。

#### [材料と方法]

##### シクロヘキシミド処理

5,000 cells/ml に調整した *P. bursaria* (OS1g1N 株) にシクロヘキシミド (Wako) を最終濃度が 10 µg/ml になるように加え、その後 25 ± 1°C、恒明条件下 (LL) または恒暗条件下 (DD) でインキュベートし、細胞内の共生クロレラに起こる変化を光学顕微鏡下で観察した。また、3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) (Wako) を最終濃度が 10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> M になるように細胞浮遊液に加え、光合成阻害剤が与える影響を調べた。

##### 共生クロレラ数のカウント

シクロヘキシミド処理前、処理後 (1、3、6 日後) の細胞浮遊液に等量の 8% (w/v) パラホルムアルデヒド

を加えることによって固定した細胞をその後数分間 DW に浸した。その細胞を 1 匹ずつマイクロピペットで吸い取りスライドガラスに乗せた後カバーガラスをかけ、ペーパーで水分を吸い取りながらゆっくりと細胞を潰し、流れ出した緑色の共生クロレラ数を光学顕微鏡下でカウントした。

#### 【結果】

##### LL でのシクロヘキシミド処理

通常の PV 膜は共生クロレラの細胞壁に密着しているため (PV 膜と細胞壁間の距離は  $0.05 \mu\text{m}$ )<sup>(2)</sup>、光学顕微鏡下で PV 膜を観察することはできない。しかしシクロヘキシミド処理してから 1 日後、ミドリゾウリムシ内の PV 膜が同調して膨張し、光学顕微鏡下で容易に PV 膜を観察することができた。この時の PV 膜とクロレラ細胞壁間の距離は  $1.26 \pm 0.52 \mu\text{m}$  (mean  $\pm$  S.D, n=50) であった。PV 膜の膨張に引き続き多数の共生クロレラが消化される現象が観察された。この時の 1 細胞あたりの共生クロレラ数は処理前のコントロールの細胞 (約 700 個) と比較して約 1/6 に減少していた。2 日後、PV 膜は再び収縮し、光学顕微鏡下での観察は不可能になり、細胞内のクロレラ数はさらに減少していた。その後時間経過に伴って 1 細胞あたりの共生クロレラ数は減少し、7 日後には観察した全ての細胞内の共生クロレラが除去された。

##### DD、光合成阻害剤を添加した時のシクロヘキシミド処理

これまでに Schüßler and Schnepf (1992) はイオノフォアのアモニウムが PV 膜の膨張を誘導し、さらに DD や光合成阻害剤を添加した場合にはこの現象は誘導されないことを報告している。そこで同様にシクロヘキシミド処理による PV 膜の膨張と消化に対する光と光合成阻害剤の影響を調べたところ、DD または  $10^{-7}$  M 以上の DCMU 存在下で PV 膜の膨張と共生クロレラの消化が完全に阻害された。さらに 1 細胞あたりのクロレラ数はコントロールと比較して統計

学的に有為な差を示さなかった。

【考察】 今回の観察によってシクロヘキシミドによる PV 膜の膨張と共生クロレラの消化の誘導が初めて明らかになった。さらにその現象は Schüßler 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 DD や光合成阻害剤存在下では誘導されないことが明らかになった。この結果は、光合成活性存在下で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 膜への宿主ライ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、結果としてライ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 PV 膜の膨張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はライソソーム融合阻止能力の理由ではないことが明らかになった。さらに我々は組織化学的な方法を用いて、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ライソソームが融合し、DD や光合成阻害剤存在下では PV 膜にライソソームは融合しないことを確認した。今後は PV 膜と細胞壁間を満たしている物質や、シクロヘキシミド処理による PV 膜のライソソーム融合阻止能力の消失の仕組みを明らかにしていきたい。

#### 【文献】

- 1) Weis D.S. (1984) J. Protozool. 31: 14A.
- 2) Reisser W. (1986). Progr. in Protistol. 1: 195-214.
- 3) Schüßler, A., and Schnepf, E. (1992) Protoplasma 166: 218-222.
- 4) Reisser, W. (1992) Endosymbiotic associations of algae with freshwater protozoa and invertebrates. In: Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored, Reisser, W. (Eds.), Vol.1.1, Biopress Limited, Bristol England : 1-19.