

ミドリゾウリムシへのイースト *Pichia capsulata* の細胞内共生

ソン チホン<sup>1</sup>, 松元 里樹<sup>2</sup>, 西垣 貴美子<sup>2</sup>, 矢頭 卓児<sup>2</sup>, 島田 晴美<sup>1</sup>, 大村 現<sup>1</sup>, 洲崎 敏伸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大・院理・生物, <sup>2</sup>兵庫県立神戸高校)

Symbiosis of the yeast *Pichia capsulata* in *Paramecium bursaria*

SONG Chihong<sup>1</sup>, Rina MATSUMOTO<sup>2</sup>, Kimiko NISHIGAKI<sup>2</sup>, Takuji YATO<sup>2</sup>, Harumi SHIMADA<sup>1</sup>,  
Gen OMURA<sup>1</sup> and Toshinobu SUZAKI<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kobe Univ., <sup>2</sup>Hyogo Pref. Kobe High Sch.)

## SUMMARY

*Chlorella*-free *Paramecium bursaria* can be infected with various species of yeasts and bacteria, which are usually eventually ejected from the host cell when it is re-infected with the original symbiotic *Chlorella*. We have recently found that the yeast *Pichia capsulata* DSMZ 70269 is able to infect *Chlorella*-bearing *P. bursaria*, resulting in a stable double symbiosis. It can also infect *Chlorella*-free *P. bursaria*, but unlike other yeast species, it was not excluded on further introduction of the original symbiotic *Chlorella*. When infected with this yeast, *Chlorella*-free *P. bursaria* was able to withstand higher temperature, more ultraviolet irradiation, and stronger physical compression, showing that the symbiosis with *P. capsulata* is beneficial to the host *P. bursaria*.

[目的] ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は、細胞内に数百個のクロレラを共生させている原生動物である。宿主のミドリゾウリムシと共生クロレラを単離し、それぞれ独立に培養できる<sup>1)</sup>ことから、真核細胞同士の細胞内共生の機構を探るためのモデル生物として、多くの実験が行われてきた。その中に、クロレラを除去した白いミドリゾウリムシに、クロレラ以外の緑藻やイースト等の微生物が細胞定着するという報告がある<sup>2,3)</sup>。クロレラがミドリゾウリムシへ与える影響については多々報告されているが、クロレラ以外の微生物のミドリゾウリムシへの細胞内定着や、その影響について研究は進められて

いない。そこで、本研究ではクロレラに限定せず細胞内共生生物に注目し、その細胞内定着過程や宿主に及ぼす影響について実験を行った。

[方法] *Paramecium bursaria* PB-SW1株は *Chlorogonium euchlorum* を餌として無菌二者培養<sup>4)</sup>しているものを用いた (以後、GPBと表記)。GPBを5 µg/mlの除草剤パラコート (1, 1-dimethyl-4, 4-bipyridinium dichloride, Sigma) を含む0.01% Knop溶液下で白化した<sup>5)</sup>後、*C. euchlorum* を餌として培養した (以後、WPBと表記)。イースト *Pichia capsulata* (DSM 70269) はYM培地 (0.3% yeast extract, 0.3% malt ex-

tract, 0.5% peptone, 1% D-glucose, 2% agar) で無菌培養したものを使用した。0.01% Knop溶液で懸濁したイーストをWPBに与えて共生させた後、*C. euchlorum*を餌として与えて培養した(以後、PPBと表記)。*Paramecium caudatum*は*C. euchlorum*を用いて培養した(以後、PCと表記)。

細胞内共生生物が宿主に与える影響: 無菌培養のGPBとWPBの2種は、0.01% Knopで洗ったものを、他のゾウリムシと同じようにシャーレで培養しておいたものを使用した。GPB, WPB, PPB, PCの4種で次の二つの実験をおこなった。1) 高温耐性実験: 20  $\mu$ lの細胞懸濁液を20°Cから45°Cの範囲にしておいた500  $\mu$ lの0.01% Knop溶液に移した。150秒後、室温(20°C)の0.01% Knop溶液を500  $\mu$ l加えた後、生存率を計算した。2) UV耐性実験: まず、照射直後の影響について、次のように調べた。60ウェルプレートの各ウェルにつき細胞を10個体ずつ入れ、10~100 mJ/cm<sup>2</sup>のUV線量をそれぞれ照射した。UV照射直後の細胞の様子と1時間インキュベートした後の様子をそれぞれ実体顕微鏡下で観察した。さらに、長期的な影響について、次のように調べた。6連のホールスライドに250  $\mu$ lの細胞懸濁液を入れ、10, 20 mJ/cm<sup>2</sup>のUV線量を細胞に照射した。UV照射後、細胞を10 mlの0.01% Knop溶液入りのシャーレに移し、餌として*C. euchlorum*を与えた。餌はその後も1日1回与えた。1日1回シャーレから1 mlずつホールスライドにとり、細胞数を数えた。

クロレラとイーストの二重定着実験: シャーレ培養したWPBにイースト*Pichia capsulata*とクロレラを与えてから2日後、4日後、6日後の細胞を蛍光顕微鏡で観察して、クロレラとイーストの細胞内定着の様子をみた。

[結果] 高温耐性、UV耐性の2点において、クロレラとイーストのどちらにおいても、宿主に細胞内定着することで高温耐性、UV耐性共に高められることが、今回の実験でわかった。今まで細胞内定着することが知られていたイーストには、宿主の分裂異常をひき起こすことが報告されているものがある<sup>6)</sup>。しかし、今回使用したイーストでは、分裂異常などの宿主にとって有害な影響は見られず、むしろ細胞内定着することで宿主ミドリゾウリムシの高温耐性とUV耐性を高めることがわかった。

WPBにクロレラとイーストを同時に与えた細胞内定着実験で、二重に細胞内定着した細胞が観察されたが、細胞内に定着していたイーストは徐々に減少し、クロレラが増殖していく様子が観察された。このことから、クロレラとイーストでは、細胞内の定着においてクロレラが優位であることがわかった。しかし、イーストは完全には消失せず、最終的にクロレラとイーストとがミドリゾウリムシの細胞内に安定的に二重共生することがわかった。さらに、GPBにイーストを与えたところ、イーストはミドリゾウリムシの細胞内に定着し、上と同様に安定な二

重共生細胞ができた。

[考察] ミドリゾウリムシ(GPB)はクロレラを細胞内にもつことで、高温耐性能力をもつことが報告されている<sup>7)</sup>。同時に、クロレラの光合成により、マルトースやグルコース、フルクトース、酸素などの光合成産物の存在下で高温耐性能力をもつということも報告されている<sup>8)9)</sup>。今回の実験でWPBよりPPBのほうが、より高温条件下で生存することが示された。イーストは光合成能を持たないので、GPBでのクロレラによる機構とは別の機構が働いているのではないかと推察される。UV耐性に関しては、GPBではクロレラが紫外線を吸収<sup>10)</sup>し、それによって宿主のUV耐性を高めているという可能性と、正の走光性が生じる<sup>11)</sup>結果、UV耐性機構を持つに至ったという可能性が示されている。イーストにおいては、共生体が単に機械的にUVを遮蔽しているとは考えにくいので、*Pichia capsulata*が何らかの紫外線吸収物質を合成し、宿主のUV耐性に関与しているという可能性が高い。

クロレラとイーストを二重定着した場合、クロレラの数とイーストの数は逆相関の関係となった。クロレラもイーストも細胞の表層に定着しているが、定着可能な場所には限りがある。つまり、クロレラとイーストとの間で存在場所の獲得競争が起こり、その結果、増殖の速いクロレラがイーストを次第に排除していったのだと考えられる。しかし、イーストは結果的に完全には排除されず、一定の細胞数のイーストが常にミドリゾウリムシの体表面に残り、安定な二重共生細胞ができあがった。*Pichia capsulata*はクロレラに比較してかなり細胞サイズが小さいので、隣り合うクロレラの隙間に入り込んだイーストはそれ以上排除されないという仕組みで、安定した共生関係が成立したのかも知れない。どのような機構により、イーストとクロレラの二重共生が成立していくのかということは、細胞内共生を考えるうえでも興味深い点であり、さらなる研究が望まれる。

#### [文献]

- 1) Siegel, R. W. (1960) *Exp. Cell Res.*, 19: 239-252.
- 2) Bomford, R. (1965) *J. Protozool.*, 12: 221-224.
- 3) Görtz, H. D. (1982) *J. Cell Sci.*, 58: 445-453.
- 4) Omura, G., Ishida, M., Arikawa, M., Khan, S. M. M. K., Suetomo, Y., Kakuta, S., Yoshimura, C. and Suzuki, T. (2004) *Jpn. J. Protozool.*, 37: 139-150
- 5) Hosoya, H., Kimura, K., Matsuda, S., Kitamura, M., Takahashi, T. and Kosaka, T. (1995) *Zool. Sci.*, 12: 807-810.
- 6) Omura, G., Suzuki, T. and Gortz, H. D. (2005) In "12th International Congress of Protozoology, Guangzhou, China."
- 7) Iwatsuki, K., Nishidoi, M. and Suehiro, K. (1998) *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.*

- iol., 121: 405-409.
- 8) Hori, M. and Fujishima, M. (2003) *J. Eukaryot. Microbiol.*, 50: 293-298.
- 9) Fujishima, M., Kawai, M. and Yamamoto, R. (2005) *FEMS Microbiol. Lett.*, 243:101-105.
- 10) Xiong, F., Kopecky, J. and Nedbal, L. (1999) *Aquat. Bot.*, 63: 37-49.
- 11) Iwatsuki, K. and Naitoh, Y. (1981) *Proc. Jpn. Acad.*, 57: 318-323.