

ミドリゾウリムシの細胞内共生クロレラは共生することで細胞壁が変化する

西垣 貴美子¹, 松元 里樹¹, 矢頭 卓児¹, 洲崎 敏伸²
(¹兵庫県立神戸高校, ²神戸大・院理・生物)

Changes in cell wall properties of symbiotic *Chlorella* during symbiosis
in *Paramecium bursaria*

Kimoko NISHIGAKI¹, Rina MATSUMOTO¹, Takuji YATO¹ and Toshinobu SUZAKI²
(¹Hyogo Pref. Kobe High Sch., ²Dept. Biol., Grad. Sch., Sci., Kobe Univ)

SUMMARY

Morphological and chemical properties of the cell wall of the symbiotic *Chlorella* strain PB-SW1C1 were examined in either free-living cells or those re-infected into apo-symbiotic host cells of *Paramecium bursaria* PB-SW1. The cell wall of free-living *Chlorella* stained with Calcofluor white M2R, which is a fluorescent dye that stains β -D-glucopyranose polysaccharides. Cell walls of symbiotic *Chlorella* that had just been isolated by mechanically disrupting both the *P. bursaria* plasma membrane and the perialgal membrane with a microneedle, did not stain with Calcofluor. Thickness of the cell wall was the same whether the *Chlorella* was free-living or symbiotic, and was about 20 nm. The outer surface of the cell wall of the symbiotic *Chlorella* had a fluffy appearance, while that of the free-living *Chlorella* was smooth. These results indicate that the cell wall of *Chlorella* changes in both structure and chemical properties with the establishment of the *Chlorella-Paramecium* symbiosis.

[目的] 細胞壁の主要な機能は細胞を外界から防御し、構造的に補強することである。とするならば、ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* の細胞内に共生しているクロレラには、細胞壁はもはや必要がないかもしれない。さらに、共生しているクロレラは、ホストのミドリゾウリムシの細胞質との間で、

さまざまな分子をやりとりしていることがわかっている^{1,2)}。このような機能には、クロレラの細胞壁は妨げになっているかもしれない。一方で、クロレラの最外層を構成する細胞壁は、細胞内共生の初期段階でのクロレラ包膜 (PV膜) へのリソソームの融合を阻止したり、ミドリゾウリムシの細胞表層にクロ

レラが定着したりする上で重要な役割を担っている可能性も考えられる。そこで、共生クロレラの細胞壁に着目し、その性質を、ホストから単離して培養している状態（単離状態）とミドリゾウリムシに共生している状態（共生状態）とで比較した。

【方法】 ドイツ産のミドリゾウリムシ *Paramecium bur-saria* PB-SW1株に共生しているクロレラPB-SW1C1株を単離・クローン化し、C培地に peptone (1 g/l) と glucose (5 g/l) を添加した培地³⁾で培養した。ミドリゾウリムシPB-SW1株と、それから共生クロレラを取り除いた白化PB-SW1株は、*Chlorogonium capillatum* を餌として用いた無菌二者培養法⁴⁾で培養した。クロレラの細胞壁はグルコピラノース多糖類を認識するカルコフロア Calcofluor white M2R 水溶液 (0.05%) で10分間室温で染色し、その後 Volvic で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。撮影した蛍光顕微鏡画像は、画像解析ソフト Scion Image を用いて、一定の領域の画像輝度を積算することで、蛍光強度の定量的解析を行った。ミドリゾウリムシとクロレラは、常法に従いグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムの二重固定を行い、Spurr樹脂に包埋した後、超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡観察を行った。

【結果】 単離状態のクロレラの細胞壁はカルコフロアで強く染色されたが、ミドリゾウリムシに共生しているクロレラを細胞外に取り出した直後の状態では、染色性が約1/3に低下していた。ミドリゾウリムシから取り出したクロレラは、ミドリゾウリムシの細胞内でクロレラを包んでいたPV膜を全く保持していなかった。つまり、PV膜が残っていたためにクロレラの細胞壁がカルコフロアによって染まらなかったのではなく、共生状態にあるクロレラの細胞壁の成分が、単離状態とは異なっていることが示された。クロレラの細胞壁の厚さは、単離状態と共生状態とで違いはなく、いずれの場合も約20 nmであった。しかし、共生状態では細胞壁の外部に顕著な毛羽立ち構造が認められた。すなわち、共生クロレラ細胞壁表面の構造的性質も、細胞内共生に伴い変化していることがわかった。

【考察】 ミドリゾウリムシに共生していたクロレラを細胞外で培養したものについては、その細胞壁がカルコフロア染色で染まるということは、過去にも報告がある⁵⁾。しかし、共生状態のクロレラがカルコフロアによって染色されるかどうかはこれまで調べられていなかった。今回の観察から、クロレラの細胞壁を構成するカルコフロアに結合する成分が、細胞内共生に伴い減少している可能性が示唆されたが、カルコフロアがクロレラ細胞壁のどのような成分を認識しているかはよくわからない。カルコフロアは糖の一種であるβ-D-グルコピラノース多糖類 (β-D-glucopyranose polysaccharides) を特異的に染色する蛍光色素である⁶⁾。主としてβ-1,4-Nアセチルグルコサ

ミン (GlcNAc) に対して結合する。たとえば、より具体的には、GlcNAc-β-1,4-GlcNAc結合を認識することにより、キチン chitin などと結合する⁷⁾。β-1,4結合型のグルコピラノースの代表はセルロースであり、カルコフロアはセルロースもよく染色する⁸⁾。一方、レクチンの一種であるWGAはGlcNAcのβ-1,4結合重合体に結合するとされ、生体内では菌類の細胞壁に存在するキチンなどに結合する⁹⁾とされるが、WGAとカルコフロアの染色部位は必ずしも一致しない⁹⁾。いずれにしても、カルコフロアがクロレラの細胞表面の何を染色しているのかは不確かであるが、細胞内共生に伴いカルコフロアの染色性が低下するという今回の観察結果は、カルコフロアの結合する物質が細胞内共生の確立あるいは維持に何らかの役割を果たしている可能性を示している。

培養条件にあるミドリゾウリムシに共生していたクロレラは、類似した自由生活種のクロレラ同様に、約20 nmの厚さの細胞壁を持つことが報告されている⁹⁾。一方で、自由生活性のクロレラの中には100 nmにも達する厚さの細胞壁を持つものもある⁵⁾ので、もしかしたら細胞壁の厚さと細胞内共生の可否には関係性があるのかも知れないと考えた。少なくとも、細胞壁の厚さが細胞内共生に伴ってどのように変化するかは、これまでに調べられていなかった。ただ、自由生活性のクロレラ *Chlorella vulgaris* では、独立栄養条件においても、炭素源としてグルコースを加えた培地で生育させた場合でも、細胞壁の厚さは一定であることが報告されていた¹⁰⁾。今回の電顕観察から、細胞内共生に伴い、細胞壁の厚さが変化することはないということがわかった。しかし、細胞壁の外表面構造には顕著な毛羽立ち構造が認められた。この構造は、クロレラの細胞壁とPV膜との連絡構造かも知れないし、あるいは共生状態の細胞壁は、その構造が不安定になっていることを示唆しているのかも知れない。いずれにしても、今回、1) 細胞壁へのカルコフロアの結合性が、共生後に低下した、2) 共生したクロレラの細胞壁に構造的な変化が見られた、ということがわかった。これらの結果は、クロレラの細胞壁の化学組成と構造がミドリゾウリムシへの感染に伴い変化したことを示した初めての報告となる。

【文献】

- 1) Albers, D. and Wiessner, W. (1985) Endocyt. Cell Res., 1, 55-64.
- 2) Ziesenisz, E., Reisser, W. and Wiessner, W. (1981) Planta, 153, 481-485.
- 3) Kamako, S., Hoshina, R., Ueno, S. and Imamura, N. (2005) Eur. J. Protistol., 41, 193-202.
- 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, 119-130.
- 5) Reisser, W. (1984) Br. Phycol. J., 19, 309-318.
- 6) Chen, M. Y., Lee, D. J. and Tay, J. H. (2007) Appl. Mi-

- crobiol. Biotechnol., 73, 1463-1469.
- 7) Pringle, J.R. (1991) *Methods Enzymol.*, 194, 732-735.
- 8) Bezares, J., Asaro, R. J. and Hawley, M. (2008) *J. Struct. Biol.*, 163, 61-75.
- 9) Rodrigues, M. L., Alvarez, M., Fonseca, F. L. and Casadevall, A. (2008) *Eukaryotic Cell*, 7, 602-609.
- 10) Martinez, F., Ascaso, C. and Orus, M. I. (1991) *Ann. Bot.*, 67, 239-245.