

ホロスポラは宿主食胞膜を崩壊して細胞質に脱出する

藤島 政博^{1,2}, 森川 千穂²

(¹山口大・院理工・自然共生科学専攻, ²山口大・理・自然情報科学)

Holospora obtusa disrupts the host digestive vacuole membrane to appear
in the host cytoplasm

Masahiro FUJISHIMA¹ and Chiho MORIKAWA²

(¹Dept. Env. Sci. and Engineering, Grad. School of Sci. and Engineering, Yamaguchi Univ., and ²Dept. of Physics, Biol. and Informatics, Inst. of Fac. of Sci. Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

The gram-negative bacterium *Holospora* is an endonuclear symbiont of the ciliate *Paramecium*. Infectious forms of *H. obtusa* ingested in the host's DV-I digestive vacuole escape from there with the bacterial invasion tip leading, and the DV-I vacuole is acidified and becomes a condensed DV-II vacuole. Indirect immunofluorescence microscopy with acidosome membrane-specific mAb showed that this mAb labeled the DV-I and DV-II vacuoles, and that digestive vacuole

membrane pushed out by the invasion tip is disrupted before the bacteria escape from the vacuoles, indicating that the bacterium is not enclosed by the host's digestive vacuole membrane when it escapes from the digestive vacuole.

【目的】核内共生細菌ホロスボラは、宿主の細胞口から食胞に取り込まれると細胞質に脱出して標的核に侵入する。ドイツとロシアの研究グループは、電顕観察をもとに、ホロスボラが食胞膜に包まれて食胞から脱出し、次に、宿主ER由来の二重膜で包まれ、同時に食胞膜は退化し、この二重膜が核膜の2重膜と融合して宿主核内に侵入するモデルを提唱した (Görtz and Dieckmann, 1980; Podlipaev and Ossipov, 1979)。しかし、我々の実験結果から、*H. obtusa*が食胞から細胞質に脱出すると、アクチン結合モチーフを持つ*H. obtusa*のinvasion tip特異的 89-kDaタンパク質がinvasion tip表面に露出し、そこに宿主アクチンが集合して核への感染を助けることが明らかになった (Fujishima, in press)。さらに、ホロスボラの細胞外膜表面のリポ多糖と標的核膜との特異的結合が宿主の2種の核の識別手段であることが明らかになった。これらの実験結果は、ホロスボラが宿主食胞から宿主由来の膜に包まれずに標的核に侵入することを示している。本研究は、ホロスボラが細胞質に脱出する時に、食胞膜に包まれて出るとどうかを証明することを目的として行った。

【材料と方法】

培養と感染型*H. obtusa*の単離

*Paramecium caudatum*のRB-1 s518a2株と*Holospira obtusa*のF1株を用い、レタスジュース培養液で25°Cで培養した。感染型*H. obtusa*の単離は、Fujishima et al. (1990)の方法で宿主のホモジネートを70%パーコールで遠心して単離した。感染および間接蛍光抗体法に使用する感染型*H. obtusa*は10 mM Na,K-PBに懸濁して4°Cで保存した。また感染実験には単離してから1週間以内のものを用いた。

間接蛍光抗体法

P. caudatum (5×10^3 cells/ml)と*H. obtusa* (2×10^6 cells/ml)を混合後5分にボアサイズ15 μ lのナイロンメッシュとDrylの液で細胞を洗浄し、混合後10分、20分、30分に等量の8%パラホルムアルデハイドと混合して10分間固定し、PBSで洗浄、一次抗体で室温2時間処理、PBSTで洗浄、二次抗体 (Alexa Fluor R488ヤギ抗マウスIgG抗体) で室温1時間処理し、蛍光顕微鏡 (Axio Imager, Carl ZEISS, Germany) で観察した。1次抗体は、*P. caudatum*の液胞型プロトンポンプ特異的モノクローナル抗体 (E11B9H10)を用いた。

【結果】

抗原の局在性

モノクローナル抗体E11B9H10を使った間接蛍光抗体法では、2次抗体の蛍光は細胞咽頭周辺とDV-IとDV-IIにのみ観察され、この抗原がアンドソームに存在することが明らかにされた。細胞を低温条件 (0-4°C) で約10分間処理を行ってから固定した細胞

では、2次抗体の蛍光が痕跡程度になることから、抗原は液胞型プロトンポンプのサブユニットである可能性が強く示唆される。この抗体は、*P. caudatum*では、初めてのDV-I及びDV-IIの食胞膜特異的抗体である。1D-SDS-PAGEのイムノプロットでは抗原のバンドを検出できなかった。

食胞から細胞質に脱出する時の*H. obtusa*の観察

感染型*H. obtusa*が宿主食胞から脱出する際にはDV-IがDV-IIに分化する過程で、食胞の酸性化を必要条件として脱出する (Fujishima and Kawai, 1997)。その時に食胞膜に包まれて脱出するのか、食胞膜を破壊して脱出するのかを確認するため、DAPIで一晩生体染色した感染型*H. obtusa*と*P. caudatum*食胞膜特異的抗体を用いて間接蛍光抗体法により混合後10分と20分の宿主内感染型*H. obtusa*を観察した。食胞から脱出途中の*H. obtusa*を持つ食胞膜は、Invasion tipの先端側の食胞膜部分に蛍光が検出できないことが明らかになった。また、細胞質に脱出した単独の*H. obtusa*はこの抗体で染色されず、食胞膜で包まれていないことが明らかになった。

【考察】ゾウリムシの核内共生細菌ホロスボラは、宿主の細胞口から食胞に取り込まれると細胞質に脱出して標的核に侵入する。宿主のアンドソーム膜特異的モノクローナル抗体を使った間接蛍光抗体法は、感染型ホロスボラオプツサはその侵入先端で食胞膜を突出させて先端部分の膜を崩壊し、食胞膜に包まれずに細胞質に脱出することを明らかにした。電顕観察に基づくドイツやロシアの研究グループの観察結果と我々の実験結果の相違は、彼らが*H. obtusa*が食胞膜から脱出する際に細胞質側に突出させた食胞膜の横断面像を観察していたために、食胞膜で包まれて細胞質に脱出したように判断したことが原因ではないかと思われる。また、この時期の食胞膜突出部分の周囲には宿主の小胞やER様の膜が多数観察される。

【文献】

- Fujishima M. In, Endosymbionts in *Paramecium* (Ed. Fujishima M). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, in press.
- Fujishima M and Kawai M. In, Eukaryotism and Symbiosis (Eds. Achenk HEA et al.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 367-370, 1997.
- Fujishima M, Nagahara K, and Kojima Y. Zool Sci, 7, 849-860, 1990.
- Görtz HD and Dieckmann J. Protistologica., 4:591-603, 1980.
- Podlipaev SA and Ossipov DV. Acta Protozool, 8:465-480, 1979.