

ミドリゾウリムシにおける宿主—共生クロレラ間での
アミノ酸輸送に関する研究

加藤 豊¹, 木下 宗², 大村 現³, 洲崎 敏伸³, 今村 信孝^{2,4}

(¹立命館大学総合理工学研究機構, ²立命館大学理工学研究科, ³神戸大学大学院
理学研究科, ⁴立命館大学薬学部)

Amino acid transport between *Paramecium bursaria* and its symbiotic *Chlorella*

Yutaka KATO¹, Tsukasa KINOSHITA², Gen OMURA³, Toshinobu SUZAKI³ and Nobutaka IMA-
MURA^{2,4} (¹Research Organization of Science & Engineering, Ritsumeikan University, ²Graduate
School of Science and Engineering, Ritsumeikan University, ³Graduate School of Science, Kobe Uni-
versity, ⁴College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University)

SUMMARY

Our previous studies of the Japanese symbiotic *Chlorella* F36-ZK suggested that *Paramecium bursaria* supplies amino acids to its symbiont. To evaluate this, amino acid permeability of the perialgal vacuole (PV) membrane, which is a barrier between the host and its symbiotic *Chlorella*, was investigated. Because symbiotic algal amino acid transport was apparently stopped immediately by infection with a chlorovirus, this phenomenon was used to identify *Chlorella* enclosed within an intact PV membrane. Symbiotic *Chlorella* cells lacking, or with incomplete, PV membranes became infected with the chlorovirus and could not import any amino acids, while those with a complete PV membrane were protected from infection and could import amino acids. The experimental results revealed that at least Arg and Gln could

permeate the PV membrane. Furthermore, re-infection experiments using aposymbiotic *P. bursaria* cells and an Arg transport-deficient *Chlorella* mutant, which was obtained from canavanine-resistant strains, showed quite a low success rate of reconstruction of the symbiotic relationship. It is concluded that the host supplies Arg as a nitrogen carrier to its symbiont.

【目的】 日本産ミドリゾウリムシF36から共生クロレラF36-ZKを取得し¹, その生理的特徴について検討を行ってきた。F36-ZKは、自由生活型クロレラにはみられない発達したアミノ酸輸送系を有し², 本輸送系はCa²⁺や糖によって影響を受けるといった特徴がある^{3,4}。これらの結果から、宿主がアミノ酸を共生クロレラに供給しているのではないかと考えた。共生クロレラは、宿主細胞内で1細胞ずつ共生胞膜に包まれており、宿主-共生者間の物質のやりとりはすべてこの膜を通して行われる。共生胞膜に関する研究は電子顕微鏡を用いた手法が主流であったが⁵, 近年、大村らにより共生胞膜付きクロレラの単離法が開発され⁶, 生化学的な手法での切り口が開かれた。そこで、共生胞膜のアミノ酸透過性を調べるとともに、アミノ酸輸送変異株の再感染実験から供給されるアミノ酸について検討した。

【材料と方法】

クロロウイルスの単離

琵琶湖々水中のクロロウイルスを、Ettenらの方法⁷に準じて、軟寒天培地上のF36-ZKに感染、形成したプラークから単離した。寒天培地はC培地にSer (200 µg/ml) と glucose (5 g/L) を添加したものを使用した。

共生胞膜付きクロレラの単離とアミノ酸輸送測定

大村らの方法⁶に準じて、ミドリゾウリムシを破碎、遠心後、percoll密度勾配遠心分離 (50%, 90% percoll, 200 g 2 min, 400 g 8 min) して共生胞膜付きクロレラ画分を得た。この藻体懸濁液にクロロウイルスを添加し (>1000 pfu/*Chlorella* cell), 5分間インキュベート後, ¹⁴Cアミノ酸を用いて, 0.1 mM アミノ酸の15分間の取り込みを調べた。

F36-ZKアミノ酸輸送変異株の取得

変異株取得には、致死的な影響を与えるアミノ酸アナログの canavanine (Arg アナログ), もしくは azetidine-2-carboxylic acid (AZC, Pro アナログ) を用いて, F36-ZKのそれぞれの耐性株を単離した。次に, 耐性株の Arg, Ser, Pro, Ala の取り込みを測定し, 輸送変異株の選抜を行った。

再感染実験

ミドリゾウリムシF36株を暗条件下で培養後, cycloheximide (10 µg/ml), methyl viologen (10 µg/ml) を添加した赤エンドウマメ培地中で培養 (明条件下) し, 白ミドリゾウリムシを作製した。白ミドリゾウリムシとF36-ZK, もしくは変異株を混合し (ゾウリムシ: クロレラ=1:10⁴), 明条件 (40 µmol/m²/s, 24時間明) 下, 1日培養した後, クロレラを遠心で除去して上記光条件下で培養した。再感染から6日, および10日後に, ミドリゾウリムシを倒立顕微鏡および

蛍光顕微鏡を用いて観察した。ミドリゾウリムシ1個体中の共生クロレラがほぼ200 cells以上のものを, 共生関係が構築されたものと判断し, ミドリゾウリムシ200個体での構築の割合 (%) を示した。

【結果と考察】

クロロウイルス感染によるアミノ酸輸送の停止

大村らの方法で得られる共生胞膜付きクロレラ画分は, 膜を失った又は損傷を受けたクロレラとの混合物であり, 共生胞膜のアミノ酸透過性を調べるためには, 膜の状態による区別が必要であった。共生クロレラへクロロウイルスを感染させると, 溶藻までには数時間を要するが, 光合成は短時間 (10分以内) で停止することが知られており⁸, 同様にアミノ酸輸送も短時間で停止するか検討した。その結果, ウイルス添加 (44 pfu/*Chlorella* cell) 後5分以内で, アミノ酸輸送を90%以上停止できることがわかった。電子顕微鏡で観察したところ, 共生胞膜付きのクロレラにウイルスは感染しておらず, 膜がバリアーとなって感染を免れていると考えられた。これらのことから, 調製した共生胞膜付きクロレラ懸濁液中の, 共生胞膜に損傷を受けたクロレラのアミノ酸輸送を選択的に停止し, 共生胞膜のアミノ酸透過性を調べることが可能と考えた。

共生胞膜のアミノ酸透過性

酸性アミノ酸を除く18種のアミノ酸での検討の結果, 少なくともArgとGlnが共生胞膜を透過することがわかった。これらのアミノ酸は, 1分子あたりのN原子の数が多く, Nのキャリアーとして最適である。Reisser(1986)は, 宿主から共生クロレラへのN源としてNH₄⁺が主と考えたが, Glnも候補の一つとして挙げている⁹。

変異株取得と再感染実験

CanavanineとAZCへの耐性株を計19株単離し, 幾つかの変異株についてアミノ酸輸送を調べた結果, Arg以外のアミノ酸を殆ど取り込まない変異株 (ArgAZC 1) と, 他は取り込むがArgを取り込まない変異株 (SerCana 6) を得た。これらの変異株をArg, Gln, Ser, NH₄⁺を唯一のN源とする培地で培養した結果, それぞれ取り込み可能なアミノ酸の添加培地での増殖が良好で, NH₄⁺では, 野生株, 耐性株ともに増殖は低く, 差が見られなかった。共生関係の構築率を調べた結果, 感染から6日目の観察では, 野生株で74%, ArgAZC 1株で34%が共生関係を構築したが, SerCana 6株では2%であった。また10日目では, 野生株, ArgAZC 1株はそれぞれ98%, 71%と高い構築率だったが, SerCana 6株では20%に留まった。これらの株でNH₄⁺をN源とした増殖に違

いはなく、宿主中で NH_4^+ の供給も一部受けて共生関係の構築に寄与していると考え、供給される主たるN源はGlnや NH_4^+ ではなくArgと考えられる。

〔文献〕

- 1) Kamako, S., Hoshina, R., Ueno, S. and Imamura, N. (2005) *Eur. J. Protistol.*, 41, 193-202.
- 2) Kato, Y. and Imamura, N. (2009) *Symbiosis*, in press.
- 3) Kato, Y. and Imamura, N. (2008) *Plant Sci.*, 174, 88-96.
- 4) Kato, Y. and Imamura, N. (2008) *Plant Physiol. Biochem.*, 46, 911-917.
- 5) Meier, R., Lefort-Tran, M., Pouphe, M., Reisser, W. and Wiessner, W. (1984) *J. Cell Sci.*, 71, 121-140.
- 6) Omura, G., Hiraoka, S. and Suzuki, T. (2007) *Japanese J. Protozool.*, 40, 76-78.
- 7) <http://plantpath.unl.edu/facilities/Virology/isolate.html>
- 8) Seaton, G.G.R., Lee, K. and Rohozinski, J. (1995) *Plant Physiol.*, 108, 1431-1438.
- 9) Reisser, W. (1986) *Progress in Protistology Vol. 1*, Bioscience Press, Bristol, pp. 195-214.