

## ミドリゾウリムシのクロレラ再感染過程における共生成立時期

木下 浩幸, 大森 智志, 野崎 学, 三輪 五十二 (茨城大・理・生物科学)

Timing of establishing symbiosis during the re-infection of *Chlorella* sp. in *Paramecium bursaria*Hiroyuki KINOSHITA, Satoshi OOMORI, Manabu NOZAKI and Isoji MIWA  
(Department of Biology, Faculty of Science, Ibaraki University)

## SUMMARY

White cells of *P. bursaria* can be quickly restored to green by re-infecting them with *Chlorella* isolated from green cells. Six hours after re-infection, host cells contain about 450 *Chlorella* per cell. After washing, the number of *Chlorella* decrease to about 100 per cell, 1 day after re-infection. They then increase gradually for 3 to 7 days. The survival rate of re-infected cells exposed to  $H_2O_2$  was assayed at the same time as *Chlorella* proliferation was monitored. Their survival rate increased gradually to the level of the original green cells 3 to 4 days after re-infection. When white cells entrained to a LD 12:12 h cycle were re-infected with *Chlorella* isolated from green cells entrained to a reverse-phase LD cycle, they retained the same mating reactivity rhythm as the original white cells during the first 2 days, but began to shift to the phase of the *Chlorella* 3 days after re-infection, when kept in continuous light. A similar shift was observed 4 days after re-infection, when white cells entrained to a LD cycle at 25°C were re-infected with *Chlorella* isolated from green cells entrained to a different temperature cycle. The time for establishment of symbiosis was demonstrated to be 3–4 days after re-infection.

**[目的]** ミドリゾウリムシを暗闇で培養するとクロレラを持たない白色細胞を作ることが出来る。白色細胞にクロレラを再感染させると、最初に多数取り込まれるが、途中で洗うと1日後には細胞あたり100個程度になる。その後、クロレラは次第に増え、1週間後には400個程度に達する。どの段階で共生が成立してクロレラの機能が発現される時期を確定するため、過酸化水素耐性が発現される時期と、逆位相のクロレラを感染させた時、接合活性リズムの位相が変化する時期について調べる。

**[材料と方法]** 再感染は $2 \times 10^7$ 個の単離クロレラを $2 \times 10^3$ 細胞のゾウリムシに混ぜて行った。過酸化水素耐性は60細胞をマイクロプレートに単離し150  $\mu$ Mの $H_2O_2$ を与え、12時間後に生存している細胞数を数えて生存率とした。接合活性リズムは集団から60細胞

を3時間ごとに単離し、テスター細胞を加え接合活性を現わしている細胞を数えて接合活性率とし、それを3~4日間続けた。明暗サイクルは明期(L)と暗期(D)をLD 12:12 hで与えた。照度は0.5  $mW/cm^2$ である。温度サイクルは高温(W, 25°C)と低温(C, 15°C)をWC 12:12 hで与えた。

**[結果]** ミドリゾウリムシの白色細胞に緑色細胞から単離したクロレラを、ゾウリムシ一匹当たり1万個の濃度で再感染させると、6時間後には500個程度取り込まれる。洗って周りのクロレラを取り除くと1日後には細胞当たり約100個となり、その後徐々に増えて1週間後には約400個に達する。

ミドリゾウリムシの緑色細胞と白色細胞は過酸化水素水( $H_2O_2$ )に対する耐性が異なり、150  $\mu$ M  $H_2O_2$ の12時間後の生存率は約78%と約33%である。クロレ

ラを再感染させた白色細胞のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性を1日毎に調べると、最初はクロレラが多数存在しているにもかかわらず白色細胞タイプの生存率を示していた。しかし、3~4日にかけて緑色細胞タイプに変わっていった。

白色細胞に、明暗サイクルの逆位相で培養した緑色細胞から単離したクロレラを感染させ集光性リズムを測定すると、最初の2日間は白色細胞本来の位相を現していたが、3日目から逆位相の緑色細胞の位相を現すようになることは前に報告した<sup>1)</sup>。これと同じ現象が接合活性リズムにおいても見られた。この現象は同位相のクロレラを感染させた場合や恒明条件下でも光合成阻害剤(DCMU)を処理したときには見られなかった。

ミドリゾウリムシは温度サイクル(WC 12:12 h)に同調して、接合活性を高温期に現わし、低温期に消失させることがわかった。そこで、明暗サイクルで培養した白色細胞に、恒明条件下で温度サイクルに同調させて培養した逆位相の緑色細胞から単離したクロレラを感染させ、接合活性リズムを測定した。この場合は、最初の3日間は白色細胞本来の位相を現していたが、4日目から逆位相を現すようになった。これらの結果から再感染したクロレラの共生が成立するのは3~4日後であることがわかった。

**[考察]** ミドリゾウリムシの白色細胞に共生クロレラを感染させると、ゾウリムシ1匹当たりクロレラ3000個以上の場合、どんな濃度で与えても途中で洗

うと一日後の細胞内のクロレラ数は100個程度になる。その後、次第に増え約1週間後に最大に達する。3000個以下だと増えなくて、共生が成立しない場合が多い。共生を成立させるためには一定量のクロレラ数が必要である。薬剤耐性やリズム発現は感染後3~4日後から機能を発現してくる。1日目はクロレラが多数存在していても白色細胞の性質を現すことはまだ共生が成立していないことになる。感染後3~4日後から緑色細胞の性質を現すことは、そのころに共生が成立したことになる。

明暗サイクルで同調したクロレラを感染した場合と、温度サイクルで同調したクロレラを感染させた場合では、白色細胞の位相変位を起こす時期が1日異なっている。クロレラの時計は明暗サイクルに同調することはわかっているが、温度サイクルに同調するかどうかは不明である。温度サイクルに同調したゾウリムシの時計の情報がクロレラの時計に伝わるのに1日かかるのかもしれない。または、クロレラに対する明暗サイクルと温度サイクルの同調の強さが異なり、感染後ゾウリムシの時計に影響を与えるのが1日異なったのかもしれない。今後はクロレラの時計が温度サイクルに同調するかどうか、もし同調したら、明暗サイクルによる同調との間に強弱の差があるかどうか調べる必要がある。

#### **[文献]**

- 1) Miwa I, Fujimori N, Tanaka M (1996) *Europ. J. Protozool.* 32, Suppl. I:102-107.