

イーストを感染させたミドリゾウリムシの透過型電子顕微鏡観察

ソン チホン, 洲崎 敏伸 (神戸大・院理・生物)

Transmission electron microscopic observations of *Chlorella*-free
Paramecium bursaria infected with yeast cells

Chihong SONG and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

Aposymbiotic (*Chlorella*-free) *Paramecium bursaria* was infected with yeast cells (*Pichia capsulata* and *Rhodotorula rubra*) for establishing artificial systems of intracellular symbiosis. Yeast-bearing *Chlorella*-free *P. bursaria* was observed with a transmission electron microscope using freeze-substitution techniques and comparing the results with conventional chemical fixation. Both *P. capsulata* and *R. rubra* were found to be enclosed within the perisymbiont vacuole (PV) membranes in the host cells, and a large amount of microfibrillar materials were observed to be connecting the fungal cell wall and the inner surface of the PV membrane. The distance between the fungal cell wall and the PV membrane was 100–300 nm for *R. rubra* and 100–200 nm for *P. capsulata*, irrespective of the fixation method used, although the cell wall of the symbiotic *Chlorella* was closely apposed to the PV membrane with a distance of only 20–50 nm.

【目的】ミドリゾウリムシの細胞内には数百個のクロレラが共生している。この共生クロレラは、いくつかの方法で取り除くことができる。そのようにして人工的に作製した白いミドリゾウリムシに対して、もともとそのミドリゾウリムシが保持していた共生クロレラだけでなく、様々な酵母や細菌が感染できることが報告されている¹⁾。クロレラとは異なる性質をもっている酵母が、ミドリゾウリムシの細胞内でどのように共生状態を確立させていくのかを形態的に観察し、それを共生クロレラの場合と比較した。

【方法】ドイツ産のミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* PB-SW1 株は *Chlorogonium capillatum* を餌として用いた無菌二者培養法²⁾で培養した。イースト *Pichia capsulate* (DSM 70269) と *Rhodotorula rubra* (Tü8093) は YM 培地 (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% D-glucose, 2% agar) で無菌培養したものを使用した。PB-SW1 株を 10 µg/ml のシクロヘキシミドを含む 0.01% Knop 溶液下で白化した後、*P. capsulate* と *R. rubra* をそれぞれ与えて感染させ、0.01% Knop 無菌液体培地で *C. capillatum* を餌として 3 ヶ月以上培養した。ミドリゾウリムシと

2種のイースト、およびこのイーストが感染した白化ミドリゾウリムシは、グルタルアルデヒドと四酸化オスミウムによる化学固定、あるいは、オスミウム・アセトンによる凍結置換固定を行い、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。

[結果と考察] 自由生活状態の *R. rubra* と *P. capsulate* はグルカン繊維構造の厚い細胞壁を形成していた。ミドリゾウリムシの細胞に定着した *R. rubra* と *P. capsulate* は、Peri-symbiont vacuole (PV) 膜を持っていたが、PV 膜と細胞壁の間には酵母の表面のグルカン繊維構造が散らばって伸びているような毛羽立ち状の繊維構造によって連結されていることがわかった。凍結置換固定による透過型電子顕微鏡観察結果、共生クロレラが約 20-50 nm の間隔で PV 膜にきわめて近接していることに対して、*R. rubra* は約 100-300 nm の間隔で、*P. capsulate* は約 100-200 nm の間隔で PV 膜とかなり離れていることがわかった。自由生活性の酵母では、細胞壁にグルカン繊維構造がキチンと混雑されて比較的堅く存在してい

るが、ミドリゾウリムシの食胞の内部ではアシドゾームによる酸性化の影響か、散らばって長く伸び、最後に PV 膜と結合する構造になっていると考えられる。このような連結構造の存在が、クロレラやイーストなどの共生体がミドリゾウリムシの細胞内に定着するための重要な機能を担っている可能性がある。しかし、イーストの細胞壁の外表面にはクロレラよりも生い茂った繊維構造が存在しているのにもかかわらず、自然界では酵母が感染したミドリゾウリムシは発見できない。また、酵母の種により感染の可否が決定されている。つまり、繊維構造以外に感染の可否を決定する物質があると考えられるし、クロレラは他の生き物の感染を阻止する何らかの仕組みを持っていると考えられる。

[文献]

- 1) Gortz, H. D. (1982) J. Cell Sci., 58, 445-453.
- 2) Omura, G., Ishida, M., Arikawa, M., Khan, S.M.M.K., Suetomo, Y., Kakuta, S., Yoshimura, C. and Suzaki, T. (2004) Jpn. J. Protozool., 37, 139-150.