

## 日本産ミドリゾウリムシ共生藻の共生環境の検討

木下 宗<sup>1</sup>, 今村 信孝<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>立命館大学・理工学研究科, <sup>2</sup>立命館大学・薬学部)The symbiotic environment of symbiotic *Chlorella* from Japanese  
*Paramecium bursaria*Tsukasa KINOSHITA<sup>1</sup> and Nobutaka IMAMURA<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Science and Engineering,  
Ritsumeikan Univ. <sup>2</sup>College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan Univ.)

## SUMMARY

The endosymbiotic *Chlorella* cells in *Paramecium bursaria* are reported to provide photosynthate as maltose to the host. In an acid condition, the cultured endosymbiotic *Chlorella* released maltose although its carbon dioxide fixation was decreased and the *Chlorella* were unable to grow. The inconsistency of conditions for the growth and the maltose release of cultured endosymbiotic *Chlorella* F36-ZK led to study the endosymbiotic milieu in *P. bursaria* F36. First, the pH change in F36-ZK cells were measured using fluorescence dye and the intracellular pH were varied depending on the external pH. To estimate the growth stage of endosymbionts in *P. bursaria* F36, the cell diameters of freshly isolated endosymbionts were measured and compared to those of various stage of cultured F36-ZK. The average cell diameter of freshly isolated endosymbionts was almost equal to that of cultured F36-ZK cells in middle stage of the stationary phase. The cell in this stage is larger than those in exponential growth phase or in the early stage of the stationary phase because cells store photosynthate, carbohydrate, and/or lipid. Consequently, the symbiotic milieu in *P. bursaria* F36 is apparently almost neutral and good for endosymbiont growth.

【目的】 淡水原生動物であるミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は細胞内に数百個のクロレラを共生させている。我々は日本産ミドリゾウリムシ F36 の細胞内に共生している共生藻 F36-ZK の無菌的単離に成功し<sup>1)</sup>、宿主-共生者間の物質輸送に関する研究を行ってきた。

共生藻は、光合成生産物の一部をマルトースとして放出することが知られている<sup>2)</sup>。宿主から単離された多くの共生藻は酸性側の pH 5 付近で、炭酸固定量の約 50% に相当する光合成産物を放出する<sup>2)</sup>。細胞内共生藻は、宿主中において perialgal vacuole (PV) 膜に包まれており、この膜を介して物質輸送がおこなっている。PV 膜内は酸性と報告されており<sup>3)</sup>、単

離培養された共生藻のマルトースの放出条件と一致することから、ミドリゾウリムシ内の共生藻は酸性条件下で宿主に光合成産物を供給していると考えられてきた<sup>4)</sup>。

しかしながら、無菌株として確立した共生藻 F36-ZK は、酸性条件下では炭酸固定量が低下し、増殖出来ない。F36-ZK は再感染可能であり、酸性では増殖できないことから、PV 膜内の酸性説に疑問を感じ、ミドリゾウリムシ内共生環境の検討をおこなった。

【方法】 酸性条件下における共生藻の炭酸固定量の経時的な測定をおこなった。共生藻 F36-ZK を定常期まで培養し、NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>を加えた 100 mM MES 緩衝

液 (pH 5) に懸濁し、明条件 ( $120 \mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )、 $25^\circ\text{C}$  に 10 時間静置した。2 時間毎に、ろ過洗浄を行い藻体内の炭酸固定量、および藻体外の光合成産物放出量を放射活性により測定した。この時、光合成に影響を与えるカチオン濃度は  $1.32 \text{ mM K}^+$ 、 $0.67 \text{ mM Ca}^{2+}$ 、 $0.38 \text{ mM Mg}^{2+}$  とした。

細胞内 pH 測定試薬 BCECF を用いた F36-ZK 内 pH の測定をおこなった。 $2.0 \times 10^8 \text{ cells/ml}$  に調整した F36-ZK に BCECF (最終  $10 \mu\text{M}$ ) を加え、1 時間室温で静置した後、蛍光強度 (Ex:440, 500 nm/Em:530 nm) を測定した。また、緩衝液 (pH 6-8) に懸濁した藻体に Nigericin (最終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$ ) を加え、蛍光強度を測定することによりキャリブレーションをおこなった。

ミドリゾウリムシ F36 内の共生藻の細胞径の測定をおこなった。プレパラート上で破碎したミドリゾウリムシ F36 より得られた共生藻の顕微鏡写真を撮影し、Image J 解析により細胞径を求めた。また、培養した F36-ZK の対数増殖期および定常期の細胞についても同様に細胞径を求め、ミドリゾウリムシ内の共生藻との細胞径の比較をおこなった。

ミドリゾウリムシ内の共生藻の細胞内 pH の測定をおこなった。まず、ミドリゾウリムシ F36 から共生藻を取り除いた白細胞 (white cell) に、BCECF により染色した F36-ZK を  $1:10^4$  の割合で加え、再感染させた。1 時間後に未感染の F36-ZK を除去し、再感染 24 時間後に、蛍光顕微鏡を用いて観察をおこなった。

**[結果と考察]** 酸性条件下で経時的に測定した F36-ZK の総炭酸固定量は、6 時間で一定値となり、光合成が停止した。また、6 時間経過後には藻体内の総炭酸固定量が減少し、藻体外液中の総光合成産物 (マルトース) 量が増加した。これまでに、月桂樹葉由来の  $\beta$ -アミラーゼの阻害剤の添加実験から、共生藻はデンプン経由でマルトースを生産することを示しており<sup>5)</sup>、6 時間以降の総光合成産物放出量の増加は、蓄積されていたデンプンの分解によるマルトースの放出と考えられる。また、酸性緩衝液 (pH 5) に懸濁した F36-ZK の細胞内 pH を BCECF を用いて測定した結果、pH 6.5 であった。通常の培地 (pH 7.5) 中における細胞内 pH は pH 7.3 であったので、外的要因により細胞内 pH が低下したことにな

る。アメリカ産ミドリゾウリムシ共生藻 NC64A においても同様に、酸性条件下において細胞 pH 低下が確認できた。緩衝液 (pH 3-9) に懸濁し 1 週間静置すると、pH 5 以下の酸性条件では褐色化したことから、酸性条件下では共生藻は細胞内の恒常性を保てず、細胞内が酸性となって増殖出来なくなると考えられた。次にミドリゾウリムシ F36 内の共生藻の細胞径を測定したところ、継代培養してきた F36-ZK の定常期中期の細胞の径と同等であった。この時期の細胞は、細胞内に光合成産物をデンプンあるいは油滴として蓄積する時期にあたり、ミドリゾウリムシ F36 内の共生藻も同様の栄養状態と考えられ、増殖に良好な共生環境であることが示唆された。ミドリゾウリムシの PV 膜内が常時酸性とは考えられないことから、BCECF で染色した F36-ZK を再感染させ、ミドリゾウリムシ内の共生藻の細胞内 pH を測定した。その結果、食胞からの脱出が観察された過半数の共生藻の細胞内 pH は、中性付近と考えられた。これらのことから、ミドリゾウリムシ内の共生藻の環境は常に酸性になっているわけではなく、共生藻にとって良好な増殖環境と考えられる。しかし、F36-ZK は中性条件ではマルトースをほとんど放出せず、宿主への光合成産物供給では不都合を生じる。一つの可能性として、ミドリゾウリムシへの再感染時に起こるアンドソーム融合による pH の一時的な低下が共生関係成立後も起こり、マルトースの放出を引き起こしているとも考えられる。また、増殖にも有利な良好な共生環境とすれば、なぜ、一定数で宿主内で増殖が止まるかも、今後の課題として残される。

#### [文献]

- 1) Kamako, S., Hoshina, R., Ueno, S. and Imamura, N. (2005) *Eur. J. Protistol.*, 41, 193-202.
- 2) Kamako, S. and Imamura, N. (2006) *J. Eukarot. Microbiol.*, 53, 136-141.
- 3) Schübler, A. and Schnept, E. (1992) *Protoplasma*, 166, 218-222.
- 4) Brown, J.A. and Nielsen, P.J. (1974) *J. Protozool.*, 21, 569-570.
- 5) 木下宗, 今村信孝, (2009) 日本原生動物学雑誌, 42, 26-27.