

異なるサイズの微粒子を取り込んだミドリゾウリムシの食胞の観察

児玉 有紀¹, 藤島 政博²(¹高知大・理・生物科学, ²山口大・院理工・環境共生)Observation of digestive vacuoles in *Paramecium bursaria* ingesting different sized microspheresYuuki KODAMA¹ and Masahiro FUJISHIMA²(¹Inst. Biol. Sci., Kochi Univ., ²Dept. Env. Sci. Engn., Grad. Sch. Sci. Engn., Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

Ciliate *Paramecium bursaria* cells include about 700 symbiotic *Chlorella* spp. in their cytoplasm. Each alga is enclosed in a perialgal vacuole (PV) membrane, which provides protection from host's lysosomal fusion and an ability to localize beneath the host cell cortex. To establish endosymbiosis with alga-free *P. bursaria* cells, symbiotic alga must bud off and separate from digestive vacuole (DV) membrane into the cytoplasm after acidosomal and lysosomal fusion to the DVs. This budding was induced not only by intact algae but also by boiled or fixed algae. Both intact and boiled yeasts also budded from the DVs. However, this budding was not induced when food bacteria or India ink was ingested into the DVs. These results raise the possibility that *P. bursaria* can recognize the diameter of the DV content, and content with a similar size as algae can bud from the DVs into the cytoplasm. To examine the possibility, we mixed microspheres of various diameters with alga-free cells, and observed them with a light microscope. Budding from the DVs with 0.2 μm diameter microspheres was not observed. With 0.8 μm diameter microspheres, fragmentation of the DVs into small vacuoles was observed. With microspheres of which the diameter was greater than 3.0 μm , individual budding from the DVs was observed. These observations demonstrate that the budding pattern from a *P. bursaria* DV is dependent on the diameter of the content of the DVs.

【目的】 ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は, *Paramecium* 属の中では唯一クロレラを共生させる能力を持っている. ミドリゾウリムシとクロレラの共生は相利共生であるが, まだそれぞれが単独でも増殖できる能力を維持している. そのため, クロレラの除去

実験や再共生実験が可能である. 我々は, クロレラを除去した細胞にミドリゾウリムシから単離した共生クロレラを 1.5 分間だけパルス的に与え, 洗浄した後, クロレラ除去細胞の食胞内に取り込まれたクロレラの運命を追跡するパルスラベルチェイス法でクロ

レラの再共生過程の全容を明らかにした。その結果、ミドリゾウリムシへの再共生に成功するクロレラの大部分は、アシドソームとリソソーム融合後の食胞から食胞膜の出芽によってクロレラを包んだ小胞が食胞から切り離されることで生じることが明らかになった¹⁾。この現象は煮沸や固定液で殺したクロレラや酵母菌でも観察されるが、餌のバクテリアや墨汁では観察されない。これらの結果は、食胞膜の出芽と切り離しが食胞内容物の直径に依存して起きる可能性を示唆している。本研究では、様々な直径の微粒子をクロレラ除去細胞に与え、微粒子を包む食胞の膜の出芽と切り離しが行われるかどうかを観察した。

【材料と方法】クロレラを除去した *P. bursaria* (Yadlw株) 5,000 cells/ml と、直径が 0.2, 0.8, 3.0, 6.0 μm の微粒子 (Polysciences, Inc.) を一定の割合で混合し、25 \pm 1°C で 1.5 分間のパルスラベルを行った。その後、15 μm のナイロンメッシュで濾過して、ドリルの液で細胞を洗浄し、クロレラ除去細胞に取り込まれなかった微粒子を除去した。微粒子とクロレラ除去細胞を混合してから 3 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間、24 時間後に細胞を 8% (w/v) パラホルムアルデヒドで固定し、光学顕微鏡下で食胞の形態の変化を観察した。細胞肛門から排出された微粒子が再び取り込まれるのを防ぐために、各時間の固定後に細胞を上記の方法で洗浄した。

【結果】

直径 0.8 μm の微粒子を取り込んだ食胞の形態変化

1.5 分間のパルスラベル後、1 細胞あたり約 5 つの食胞が形成された。食胞数は、時間経過に伴って増加し、6 時間後には約 17 個になった。微粒子とクロレラ除去細胞を混合してから 3 分後と 30 分後の微粒子を取り込んだ食胞の直径を計測した結果、3 分後では大部分の食胞の直径が 5-10 μm であったが、30 分後では大部分の食胞の直径が 2-5 μm に縮小し、全体的に食胞膜の直径が小さくなることが分かった。

直径 3.0 μm または 6.0 μm の微粒子を取り込んだ食胞の形態変化

直径が 3.0 μm または 6.0 μm の微粒子と混合した時は 1.5 分間のパルスラベル後、1 細胞あたり約 3 つの食胞が形成された。クロレラ除去細胞と混合してから

6 時間後までは食胞数に大きな変化は観察されなかったが、時間経過に伴って、微粒子を 1 つだけ包んだ食胞の割合が増加することが分かった。食胞膜から細胞質中へ 1 つずつ遊離した微粒子は、クロレラ除去細胞と混合してから 30 分後には既に多数観察された。

直径 0.2 μm の微粒子を取り込んだ食胞の形態変化

1.5 分間のパルスラベル後、1 細胞あたり約 10 個の食胞が形成された。クロレラ除去細胞と混合してから 1 時間後以降は、1 細胞あたりの食胞数が減少し、24 時間後には全ての食胞が排出されていた。またこの間、食胞の形態には変化は観察されなかった。直径が 0.2 μm の微粒子を取り込んだ食胞の挙動は、クロレラ除去細胞に墨汁を与えた時と類似していた¹⁾。

【考察】今回の観察結果から、微粒子を包む食胞膜の出芽と切り離しの様式は、食胞内容物の直径に依存することが明らかになった。すなわち、直径が 0.2 μm の微粒子を取り込んだ食胞膜では出芽や切り離しは起こらないが、直径が 0.8 μm の微粒子を取り込んだ食胞膜では食胞膜の細分化が起こり、直径が 3.0 μm 以上の微粒子を取り込んだ食胞膜では、微粒子を 1 つだけ包む膜の出芽と切り離しが起こる。

ダイナミンは葉緑体やミトコンドリアが分裂する際に、膜をくびり切る働きをしている²⁾。ダイナミンは真核生物に広く存在し、*Paramecium* においても存在が報告されている^{3,4)}。ダイナミンの阻害剤は、クロレラの再共生過程においてクロレラを包んだ小胞の食胞膜からの出芽を阻害した (Kodama and Fujishima, 投稿準備中)。これらの結果から、食胞内容物の直径に依存した食胞膜からのくびり切りへのダイナミンの関与が示唆された。

【文献】

- 1) Kodama and Fujishima (2005) *Protoplasma*, 225, 191-203.
- 2) Miyagishima et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 15202-15207.
- 3) Surmacz et al. (2001) *Eur. J. Biochem.*, 268, 2-13.
- 4) Wijek and Wyroba (2002) *Cell Mol. Biol. Lett.*, 7, 1073-1080.