

## 単細胞動物ミドリゾウリムシと緑藻クロレラとの細胞内共生の成立機構

児玉有紀<sup>a, b</sup>, 藤島政博<sup>a\*</sup><sup>a</sup> 山口大学大学院理工学研究科, <sup>b</sup> 日本学術振興会特別研究員(DC2)

キーワード: ミドリゾウリムシ, クロレラ, 細胞内共生, 二次共生, 感染

## 1. はじめに

ミトコンドリアや葉緑体を生み出した細胞内共生は現在でも繰り返して行われ, 進化の原動力となっている. その中でも特に原生動物と藻類との細胞内共生(二次共生)は, 動物細胞の植物化を誘導し, 植物の多様性の推進力となっている. しかし, その成立機構についてはほとんど明らかにされていない.

繊毛虫類のミドリゾウリムシ(*Paramecium bursaria*)は, 体長約120 $\mu$ mの単細胞動物である. ミドリゾウリムシは淡水の河川や湖沼に生息し, 細胞質内に約700個の緑藻のクロレラを共生させているため緑色に見える(図1A). 共生クロレラは1細胞ずつが宿主のリソソームが融合しないPerialgal vacuole(PV)膜に包まれ, PV膜の中で細胞分裂して増殖し, 宿主の分裂時には, 娘細胞に安定して分配される.

ミドリゾウリムシの他にも共生クロレラを持つ原生動物は多数報告されており(原生生物情報サーバのURLを参照), ヒドラやカイメン等の多細胞生物でも共生クロレラが存在が知られている<sup>1)</sup>.

共生クロレラはミドリゾウリムシに光合成産物(酸素, マルトースなどの糖類)を与える<sup>2,3)</sup>. 一方, ミドリゾウリムシは共生クロレラにCO<sub>2</sub>やNH<sub>3</sub>, 光合成活性上昇因子などを与える<sup>4~7)</sup>. 細胞内共生することによってミドリゾウリムシは飢餓や密閉条件下でも長期間生存可能であるだけでなく(児玉と藤島, 未発表), 酵母菌やバクテリアの感染から保護されることが知られている<sup>8)</sup>. 共生クロレラのメリットとしては, クロレラウイルスによる細胞破壊からの保護<sup>9)</sup>や, 捕食者からの保護などが知られている. このように, ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生は相利共生の関係であるが, 両者はまだ単独でも増殖できる能力を維持している. ミ

ドリゾウリムシを恒暗条件下で培養したり, シクロヘキシミドや光合成阻害剤で処理するとクロレラを除去することができる(図1C)<sup>10~12)</sup>. このクロレラ除去細胞に, ミドリゾウリムシから単離した共生クロレラ(図1B)を混合すると, 細胞口から取り込まれたクロレラの一部が食胞を經由して細胞質に出現し容易に細胞内共生を再開する(図1D)<sup>13)</sup>. ミドリゾウリムシは培養が容易で細胞内共生不能な突然変異体も得られており<sup>14)</sup>, さらに細胞が透明であるため共生成立過程の観察が容易のうえ, マイクロインジェクションも可能な大きさの細胞である等から二次共生成立機構解明のモデル材料になると考えられてきた. しかし, クロレラ除去細胞と共生クロレラを混合すると, 短時間で多数のクロレラが一気に食胞内に取り込まれるため, その後の観察が困難で, クロレラの共生成立過程の詳細は不明瞭なままであった. 我々はクロレラ除去細胞に一定数のクロレラを1.5分間だけパルス的に与え, その後チェイスして食胞内に取り込まれたクロレラの運命を計時的に追跡可能な最適条件を確立し, この方法を用いてミドリゾウリムシとクロレラとの共生成立過程の全容を明らかにした<sup>15~17)</sup>.

## 2. ミドリゾウリムシの食胞の分化

*Paramecium* 属の食胞形成に関する詳細な研究はハワイ大学のFokらによって*P. multimicronucleatum*で行われて

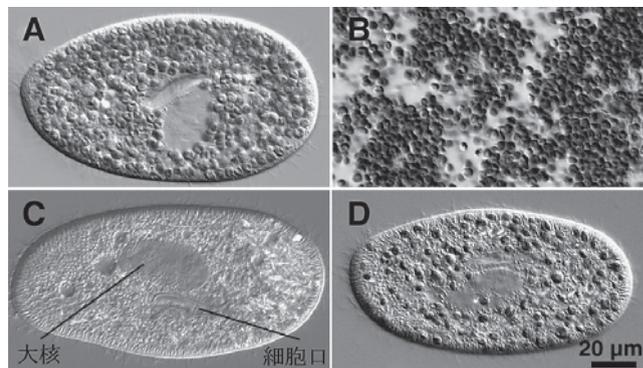


図1 ミドリゾウリムシとクロレラの再感染. A, ミドリゾウリムシ. B, 単離した共生クロレラ. C, クロレラを除去した白いミドリゾウリムシ. D, 白いミドリゾウリムシにクロレラを再感染させた細胞.

Yuuki Kodama and Masahiro Fujishima: Mechanism of establishment of endosymbiosis between the ciliate *Paramecium bursaria* and the symbiotic alga *Chlorella* species

<sup>a</sup> 〒753-8512 山口県山口市吉田1677-1

TEL/FAX: 083-933-5712

\* E-mail: fujishim@yamaguchi-u.ac.jp

2008年1月9日受付

いる<sup>18)</sup>。しかし、パルスラベルとチェイスを行い、ミドリゾウリムシの食胞の分化過程を観察すると、*P. multimicronucleatum* とはかなり異なることが明らかになった。図2に示すように食胞の形態の特徴を基にミドリゾウリムシの食胞の分化過程を8時期 (DV-I, DV-II, DV-IIIa, DV-IIIb, DV-IIIc, DV-IVa, DV-IVb, and DV-IVc) に分類し、各時期の出現時間を明らかにした。

クロレラ除去細胞と単離した共生クロレラを混合すると、クロレラは宿主細胞口から取り込まれて最初の食胞のDV-Iに包まれる。球形のDV-Iの食胞膜は光学顕微鏡で容易に観察できる。DV-Iはクロレラと混合してから0.5分以内に観察される。0.5-1.0分後には食胞膜が収縮し、光学顕微鏡では観察困難なDV-IIに分化する。2.0-3.0分後には食胞膜が膨潤して再び顕微鏡で確認可能なDV-IIIに分化する。DV-IIIはその食胞内の全てのクロレラが緑色のDV-IIIa, 黄色く退色した消化途中のクロレラと緑色のクロレラとが共存するDV-IIIb, 食胞内の全てのクロレラが黄色を示すDV-IIIcの3つのサブステージに分けられる。そして、20分以降では食胞膜が再び収縮したDV-IVに分化する。DV-IVもDV-IIIと同様に、食胞内の全てのクロレラが緑色のDV-IVa, 消化がさらに進み直径が小さく茶色くなったクロレラと緑色のクロレラとが共存するDV-IVb, 食胞内の全てのクロレラが茶色を示すDV-IVcの3つのサブステージに分けられる。pH指示薬で細胞壁を標識した酵母菌を食胞に取り込ませ、その酵母菌の色の変化で食胞内pHを測定した結果、食胞の酸性化はDV-IIで起こり、この時期にアシドソームが食胞に融合することが分かった。Gomori染色<sup>19)</sup>で酸性フォスファターゼ (AcPase) 活性の有無を調べると、クロレラの消化が観察されたDV-III以降でAcPase活性が検出されることから、DV-IIIでリソソームが融合することが分かった<sup>15)</sup> (児玉と藤島, 未発表)。

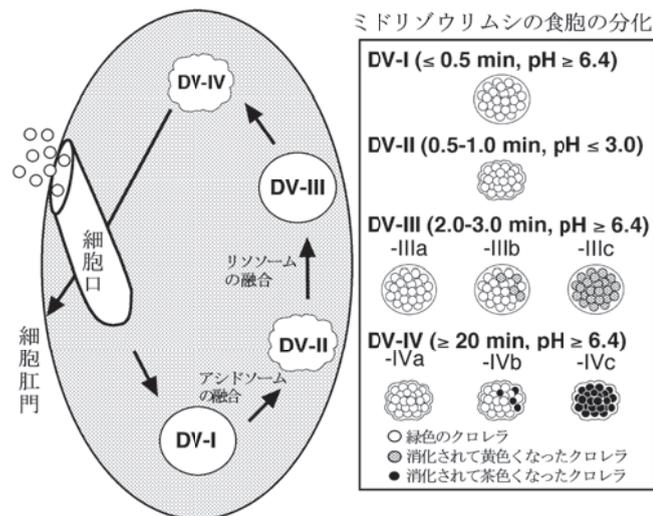


図2 ミドリゾウリムシの食胞の分化。本文参照。Kodama and Fujishima (2005) に基づき作成。

### 3. クロレラの感染過程

次に、細胞内共生を成立させるクロレラが食胞から脱出して宿主細胞質に出現する時期を明らかにした。DV-IIIbとDV-IVbは、同一食胞内に一次的にリソソーム耐性を獲得して消化を免れた緑色のクロレラと消化途中の黄色又は茶色のクロレラを共存させている (図3)。

クロレラが一次的にリソソーム耐性を獲得する現象は、クロレラの細胞周期、宿主食胞内の位置、クロレラの種類、クロレラと宿主のタンパク質合成活性の有無とは無関係であった<sup>17)</sup>。そのため、一部のクロレラだけが一次的にリソソーム耐性を獲得する理由はまだ明らかではない。

クロレラと混合後30-60分では、DV-IVbの食胞膜の出芽によってほぼ全てのクロレラが徐々に1個ずつ食胞膜に包まれて宿主細胞質に脱出する現象が観察される (図3A 黒矢尻)。この食胞膜の出芽現象は、煮沸して殺したクロレラや酵母菌、さらにはDV-IVbの中で消化が始まったクロレラでも生じるが、これらは食胞から脱出後に例外無く消化または宿主細胞肛門から排出される。一方、直径0.81μmのラテックスピーズ、宿主の餌のバクテリア (*Klebsiella pneumoniae*)、墨汁では食胞膜の出芽による脱出は生じなかった<sup>15)</sup>。また、食胞からのクロレラの脱出は、宿主とクロレラの両方のタンパク質合成を阻害しても行われた (児玉と藤島, 未発表)。

共生成立過程におけるクロレラの挙動とその出現時期、クロレラを包む小胞内のAcPase活性の有無を表1に示した。

クロレラと混合してから3分後のDV-III以降の食胞内にはAcPase活性が検出された。混合後30分以降に生じる出芽部分の食胞膜とクロレラの細胞壁との間にはAcPase活性が検出された。混合後45-60分では、食胞から細胞質に脱出した緑色のクロレラが宿主の細胞表層直下に接着して安定化する現象が観察された。このような接着したクロレラは宿主の原形質流動によって細胞質内を移動することはなく、ク

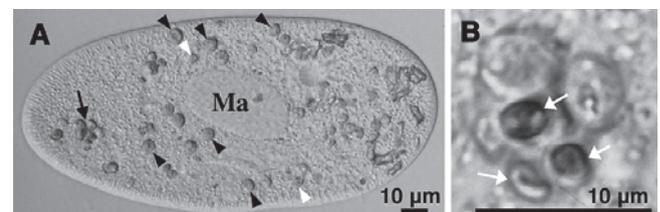


図3 細胞内共生を成立させるクロレラはDV-IVbの食胞膜の出芽で宿主細胞質に脱出する。A, クロレラ除去細胞とクロレラとを混合後3時間の細胞。食胞膜の出芽で食胞から細胞質に脱出した緑色のクロレラ (黒矢尻)。食胞内で消化されたクロレラ (白矢尻) も同様に細胞質に脱出できる。B, Aの黒矢印の食胞 (ステージDV-IVb) の拡大写真。DV-IVbでは消化を免れたクロレラと消化されたクロレラ (白矢印) が同一食胞内に共存している。Ma, 大核。Kodama et al. (2007) を一部改変。食胞分化の分類は、図2およびKodama and Fujishima (2005) を参照。

表1 感染過程におけるクロレラの挙動と AcPase 活性の有無

クロレラの挙動	出現時期	AcPase 活性
食胞内	3分～	+
食胞から出芽中のクロレラ	30分～	+
細胞表層に移動中のクロレラ	30分～	?
細胞表層に接着したクロレラ	45分～	-

クロレラを包む膜の内側には AcPase 活性は検出されなかった。つまり、食胞膜から PV 膜への分化は、DV-IVb からの脱出直後から宿主の細胞表層直下に接着するまでの 15-30 分間に行われることが明らかになった (児玉と藤島, 未発表)。なお、細胞表層に接着したクロレラは混合後 48 時間で分裂を開始する。

一方、ミドリゾウリムシに細胞内共生することが可能な 3 種類の自由生活クロレラ (*C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *Parachlorella kessleri*) は、宿主食胞に取り込まれると、その一部が食胞膜の出芽で細胞質に脱出し、さらに宿主の細胞表層直下に接着できるが、細胞内共生能力を持たない他種のクロレラ (*C. ellipsoidea*, *C. saccharophila*, *C. fusca* var. *vacuolata*, *C. zofingiensis*, *C. protothecoides*) の場合は、食胞から細胞質への脱出まではできるが、宿主の細胞表層直下に接着することはできず、最終的には宿主細胞肛門から排出された<sup>16)</sup> (図4)。

これらの結果は、宿主細胞表層直下への接着が二次共生の成立の最終段階として必須な現象であることを示している。一方、細胞内共生可能なクロレラ種とそれが不能な種は細胞壁の糖組成で決定されると考えられていた<sup>20)</sup>。しかし、糖分解酵素や蛍光標識レクチンを用いた我々の実験結果によって、クロレラの細胞内共生能力は細胞壁の糖組成とは無関係であり、食胞からの脱出後に宿主細胞表層直下に接着する能

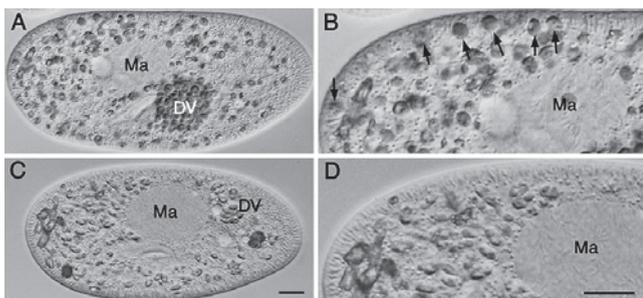


図4 宿主食胞から脱出したクロレラによる宿主細胞膜直下への定着。細胞内共生は宿主食胞から脱出したクロレラが宿主細胞膜直下に定着して成立する。A, ミドリゾウリムシに単離した共生クロレラを与えてから3時間後の細胞。B, Aの左上部の拡大図。宿主の細胞表層直下にクロレラが定着している (矢印)。C, ミドリゾウリムシに共生できない自由生活クロレラ (*C. saccharophila*) を与えてから3時間後の細胞。D, Cの左上部の拡大図。この種のクロレラは宿主表層直下に定着できず消失し、細胞内共生を成立させることができない。スケール, 10µm。Ma, 大核。DV, 食胞。

力の有無で決定されることが明らかになった<sup>16)</sup>。さらに、共生可能であると報告されていた種においても共生可能な株と不可能な株が存在することが分かった (表2)。

#### 4. 細胞内共生の成立のために必須な4つの現象

我々の研究結果は、クロレラの細胞内共生成立に必須な4つの現象の存在を明らかにした: (1) 一部のクロレラが宿主食胞内で一時的にリソソーム酵素耐性になる現象, (2) クロレラが食胞膜の出芽で細胞質に脱出する現象, (3) クロレラを包む食胞膜がリソソーム融合を阻止するPV膜に分化する現象, (4) PV膜に包まれたクロレラが宿主細胞表層直下に接着する現象。

#### 5. クロレラの宿主リソソーム攻撃からのエスケープ機構

細胞内共生生物が宿主細胞内に侵入して安定して維持されるためには、第一に宿主細胞のリソソーム酵素の攻撃を回避しなければならない。これには、*Listeria* 属と *Holospira* 属細菌のように食胞膜を貫通して細胞質に脱出してリソソーム酵素の攻撃を回避する例、*Salmonella* 属細菌・結核菌・*Legionella* 属細菌・*Brucella* 属細菌のように食胞とリソソームとの融合を阻止する例が知られている<sup>21,22)</sup>。当初、クロレラは宿主食胞にリソソームが融合する前に食胞から脱出すると考えられていたが<sup>23)</sup>、我々はそうではないということを示すことができた。最終的に細胞内共生に成功するクロレラは、アミドソームとリソソームが融合した食胞内で一次的にリソソーム酵素耐性を獲得し、次に食胞膜の出芽で食胞膜に包まれて細胞質に脱出し、さらにクロレラを包む食胞膜をリソ

表2 クロレラ除去細胞 (OS1w 株) に対する各種自由生活クロレラと共生クロレラの感染能と3種の蛍光標識レクチンに対する結合性

種	株	感染能	レクチン		
			WGA	GS-II	Con A
<i>C. vulgaris</i>	C-27	-	-	-	-
<i>C. sorokiniana</i>	C-212	+	+	-	-
	C-43	-	+	-	-
<i>Parachlorella kessleri</i>	C-531	+	-	-	-
	C-208	-	-	-	-
<i>C. ellipsoidea</i>	C-87	-	-	-	+
<i>C. saccharophila</i>	C-169	-	-	-	+
<i>C. fusca</i> var. <i>vacuolata</i>	C-104	-	-	-	+
<i>C. zofingiensis</i>	C-111	-	-	-	+
<i>C. protothecoides</i>	C-150	-	-	-	+
共生 <i>C. vulgaris</i>	1N	+	-	-	-

Alexa Fluor 488 で標識した3種のレクチン (WGA, GS-II, Con A) でクロレラを処理し、レクチンの細胞壁結合性を蛍光顕微鏡で観察した。+, 全てのクロレラに蛍光が観察された場合。-, 全てのクロレラに蛍光が観察されなかった場合。1N 株以外は自由生活株。Kodama and Fujishima (2007) から抜粋。

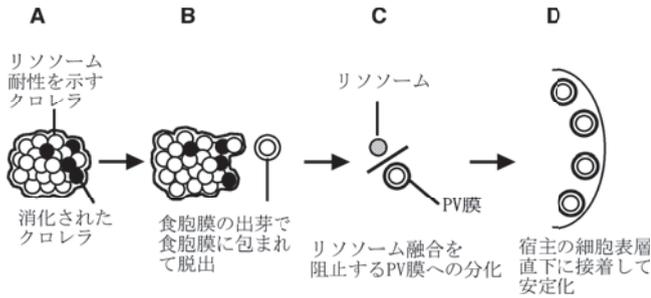


図5 クロレラの感染過程. 細胞内共生に成功するクロレラは、食胞内で宿主リソソーム攻撃に耐え、その後食胞から細胞質に脱出し、宿主の細胞表面直下に定着して安定化して48時間後には細胞分裂で増殖する。A, 消化を免れたクロレラ（白丸）と消化されたクロレラ（黒丸）を同一食胞内に持つDV-IVb. この食胞内にはAcPase活性が存在する。B, DV-IVb膜の出芽で食胞膜に包まれたクロレラが細胞質に脱出。C, 食胞から脱出後すぐに食胞膜がPV膜（太線）に分化しリソソームの融合が阻止される。D, 消化を免れたクロレラはPVに包まれて宿主細胞膜直下に接着して安定化する。Kodama and Fujishima (2005, 2007) に基づき作図。

ソーム融合阻止能力を有するPV膜に分化させて宿主細胞表面に接着して増殖を開始することが明らかになった<sup>15)</sup> (図5)。共生クロレラによる3段階の宿主リソソーム攻撃からのエスケープ機構（一次的なリソソーム酵素耐性能の獲得、食胞からの脱出、PV膜の分化）は、これまでに報告されたとの寄生性や共生性生物とも異なる新規で複雑なエスケープ機構である。

## 6. 今後の展開

我々の研究は、これまでの細胞内共生に関する多くの研究とは異なり、真核細胞の進化のルーツを探るのではなく、二次共生の成立に必要とされる諸現象の分子機構を明らかにすることを目的としている。この研究が進めば、任意の細胞の組み合わせで細胞内共生を人為的に誘導して有用な細胞をつくり出す技術の開発が期待される。たとえば、動物細胞に光合成能力を獲得させる技術開発が可能になるであろう。また、ゾウリムシとその核内共生細菌ホロスボラの細胞内共生の研究は、共生によって宿主細胞が各種のストレス耐性を獲得し、生息域を拡大できることを明らかにした<sup>24,25)</sup>。細胞内共生の人為的誘導技術の開発は、究極の省エネ対策としての食料不足の解決や、二酸化炭素濃度の減少と酸素濃度の増加、さらに生存に不適な各種ストレス環境下でも生育できる生物の作成等に貢献できることが期待される。動物と藻類との細胞内共生は地球環境のいたるところに存在するので、ミ

ドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生成立機構の研究で得られた成果は、藻類を細胞内共生生物とする他の様々な共生系と生態系の維持及び修復に役立つことが期待される。

## 7. 謝辞

本研究は、児玉への日本学術振興会特別研究員奨励費と、藤島への科学研究費補助金基盤研究(B)海外(No. 17405020)の支援で行われた。

## 文献

- 1) Reisser, W.: in Reisser, W. (Ed.), *Algae and Symbioses*, Biopress Limited, Bristol England, 1992, p. 1-19
- 2) Brown, J. and Nielsen, P.J.: *J. Protozool.*, 21, 569-570 (1974)
- 3) Pado, R.: *Acta Soc. Bot. Pol.*, 36, 97-108 (1967)
- 4) Reisser, W.: in Corliss, J.O. and Patterson, D.J. (Eds.), *Progress in Protistology*, Biopress, Bristol, 1986, p. 195-214
- 5) Albers, D., Reisser, W. and Wiessner, W.: *Plant Sci. Lett.*, 25, 85-90 (1982)
- 6) Albers, D. and Wiessner, W.: *Endocyt. Cell Res.*, 55-64 (1985)
- 7) Kamako, S.-i. and Imamura, N.: *J. Euk. Microbiol.*, 5, 136-141 (2006)
- 8) Görtz, H.-D.: *J. Cell Sci.*, 58, 445-453 (1982)
- 9) Reisser, W., Vietze, S. and Widowski, M.: *Symbiosis*, 6, 253-270 (1988)
- 10) Karakashian, S.J.: *Physiol. Zool.*, 36, 52-68 (1963)
- 11) Reisser, W.: *Arch. Microbiol.*, 107, 357-360 (1976)
- 12) Weis, D.S.: *J. Protozool.*, 31, 13A (1984)
- 13) Karakashian, M.W.: *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 29, 145-173 (1975)
- 14) Tonooka, Y. and Watanabe, T.: *Europ. J. Protistol.*, 38, 55-58 (2002)
- 15) Kodama, Y. and Fujishima, M.: *Protoplasma*, 225, 191-203 (2005)
- 16) Kodama, Y. and Fujishima, M.: *Protoplasma*, 231, 55-63 (2007)
- 17) Kodama, Y., Nakahara, M. and Fujishima, M.: *Protoplasma*, 230, 61-67 (2007)
- 18) Fok, A.K. and Allen, R.D.: in Görtz, H.-D. (ed), *Paramecium*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1988, p. 301-324
- 19) Gomori, G.: *Microscopic Histochemistry. Principles and Practice*. University of Chicago Press, Chicago, 1952
- 20) Takeda, H., Sekiguchi, T., Nunokawa, S. and Usuki, I.: *Europ. J. Protistol.*, 34, 133-137 (1998)
- 21) Iwatani, K., Dohra, H., Lang, B.F., Burger, G., Hori, M. and Fujishima, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337, 1198-1205 (2005)
- 22) 山本友子, 高屋明子: *蛋白質 核酸 酵素*, 51, 118-124 (2006)
- 23) Meier, R. and Wiessner, W.: *J. Cell Sci.*, 93, 571-579 (1989)
- 24) Hori, M. and Fujishima, M.: *J. Euk. Microbiol.*, 50, 293-298 (2003)
- 25) Fujishima, M., Kawai, M. and Yamamoto, R.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 243, 101-105 (2005)