

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22370082

研究課題名(和文)ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生成立機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of establishment of endosymbiosis between *Chlorella* and *Paramecium bursaria*

研究代表者

藤島 政博 (FUJISHIMA, MASAHIRO)

山口大学・理工学研究科・教授

研究者番号：40127783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：ミドリゾウリムシの共生クロレラはペリアルガル(PV)膜と呼ばれる宿主の食胞(DV)膜由来の膜に包まれて宿主リソソーム融合の阻害と宿主細胞表層直下に接着している。細胞内共生の再誘導は宿主DVを經由して行われ、この研究で次のことを明らかにした。(1)クロレラは宿主と混合前の光合成活動に依存してDV内のリソソーム酵素耐性を得る、(2)DV膜の出芽はダイナソアで阻害される、(3)出芽したクロレラを包む膜は出芽後15分以内にPV膜に分化する、(4)PV膜は宿主細胞表層直下のミトコンドリアの外膜と接着する、(5)DV膜とPV膜それぞれに特異的なモノクローナル抗体が得られる。

研究成果の概要(英文)：Paramecium bursaria harbors several hundred symbiotic Chlorella cells. Each alga is enclosed in a peri-algal vacuole (PV) membrane derived from the host digestive vacuole (DV) membrane, which protects the alga from the host lysosomal fusion, and can attach to the host cell cortex. The reinfection of this endosymbiosis occurs through the host phagocytosis. In the present study, we found that (1) algae acquire resistance to the host lysosomal enzymes in the DVs depending on photosynthetic activity before mixing with the hosts, (2) separation of the undigested algae in the DVs by budding of the DV membrane is inhibited by dynasore, (3) The DV membrane enclosing the undigested single green Chlorella cell differentiates into the PV membrane within 15 min after the budding, (4) the PV membrane attaches the host mitochondrial outer membranes localizing beneath the host cell cortex, (5) DV and PV membrane specific monoclonal antibodies could be developed.

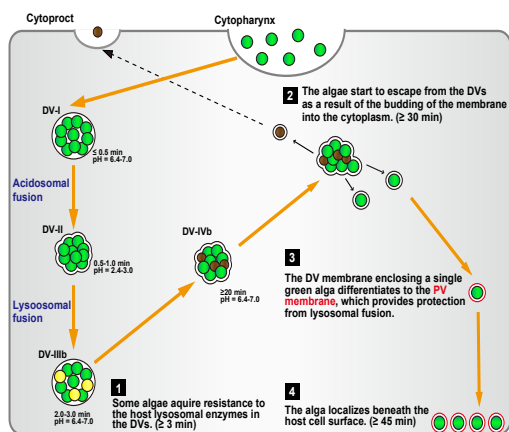
研究分野：進化生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：細胞内共生 ミドリゾウリムシ 共生クロレラ PV膜 二次共生

1. 研究開始当初の背景

(1) ミドリゾウリムシはゾウリムシ属の中で藻類のクロレラを細胞内共生させる能力を持つ2種のうちの1種で、これから単離した共生クロレラを、予めクロレラを除去しておいた白いミドリゾウリムシと混合すると、クロレラは宿主の細胞口から食胞を経由して宿主リソソームが融合しない Perialgal Vacuole 膜(PV 膜)に包まれて細胞質に脱出し、宿主細胞表層直下に定着して24時間後には分裂を開始して細胞内共生を成立させる。(2)我々は予め共生クロレラを除去したミドリゾウリムシにクローン化した一定数の共生クロレラ(*Chlorella variabilis*)を1.5分だけパルス的に与え、チェースして食胞内に取り込まれたクロレラの経時的追跡を可能にする最適条件を確立した(Kodama and Fujishima, *Protoplasma* 225, 191-203, 2005)。この方法を用いて、ミドリゾウリムシの食胞の形態的分化、食胞内 pH の変化に基づく食胞膜へのアシドソームの融合時期、酸性フォスファターゼ活性の出現に基づく食胞膜へのリソソームの融合時期、食胞の出芽によるクロレラの細胞質への脱出開始時期、食胞から脱出したクロレラを包む食胞膜のPV 膜の分化時期が明らかになった。また、PV 膜の機能維持には光合成存在下で行われるクロレラのタンパク質合成が必要であることが明らかになった。これらの結果から、クロレラの感染ルートの全容が初めて姿を現した(Kodama, Fujishima, *Int Rev Cell Mol Biol*, 276, 33-77, 2010)。(3)ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生(二次共生)の成立に必須な4つのチェックポイントの存在が明らかになった。この研究では、この4つのチェックポイントの調節機構を明らかにする(下図参照)。



2. 研究の目的

(1) チェックポイント1。同一食胞内の一部のクロレラが宿主リソソーム酵素耐性を獲得する仕組みを明らかにする  
 (2) チェックポイント2。食胞膜(DV 膜)の出芽によるクロレラの脱出の仕組みを明らかにする。  
 (3) チェックポイント3。食胞膜からPV 膜へ

の分化時期を明らかにする。

(4) チェックポイント4。DV 膜とPV 膜の違いを明らかにする。  
 (5) チェックポイント5。PV 膜に包まれたクロレラの宿主細胞表層直下への接着の仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) について: 共生クロレラの事前の光合成活性とチェックポイント1で消化を免れる能力との関係を解明する。  
 (2) について: DV 膜の出芽にダイナミンが関与する可能性を阻害剤のダイノソアを使用して解明する。  
 (3) について: ミドリゾウリムシからDV とPV 膜付きのクロレラをそれぞれ単離し、マウスに感作し、DV 膜とPV 膜のそれぞれに特異的なモノクローナル抗体を作成し、間接蛍光抗体法でPV 膜の分化時期を解明する。  
 (4) について: DV 膜とPV 膜に特異的な抗原の機能を解明する。  
 (5) について: PV 膜付きクロレラを単離してPV 膜に宿主細胞構造の何が接着しているかを解明する。また、クロレラを維持した宿主と維持していない宿主の遺伝子発現の変化をトランスクリプトーム解析する。

4. 研究成果

(1) チェックポイント1で宿主のDV 内でクロレラが消化を免れるためには、宿主と混合する前のクロレラの光合成活性の有無と関連があることを明らかにした(論文投稿中)。  
 (2) DV 膜の出芽がダイノソアで完全に阻害されることを明らかにした(Kodama, Fujishima, *Protist*, 163, 658-670, 2012)。  
 (3) DV 膜特異的モノクローナル抗体2種とPV 膜特異的抗体1種の作成に成功した。この抗体を使った間接蛍光抗体法でDV 膜抗原の消失時期とPV 膜抗原の出現時期を明らかにできた(論文投稿準備中)。  
 (4) DV 膜抗原はSDS-PAGEのイムノブロットで検出できたが、PV 膜抗原は検出できなかった。現在、抗原の検出条件を検討中である。  
 (5) PV 膜に宿主ミトコンドリアの接着を確認した(論文投稿準備中)。また、宿主の共生クロレラを同調して脱着する実験系を開発した(Kodama, Fujishima, *Protist* 164, 660-672, 2013)。この系を用いて、PV 膜と宿主の接着要因をさらに解析中である。

さらに、クロレラを維持した宿主と維持していない宿主の遺伝子発現の変化をトランスクリプトーム解析し、共生株で発現量が有為に高まる遺伝子群を検出した(Kodama et al. *BMC Genomics*, 2014, 15:183)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Yuuki Kodama, Haruo Suzuki, Hideo Dohra, Manabu Sugii, Tatsuya Kitazume, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Masahiro Fujishima. Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts. BMC Genomics, 査読有, 2014, 15:183.  
Doi:10.1186/1471-2164-15-183
- ② Kodama Y., Fujishima M. Synchronous induction of detachment and reattachment of symbiotic *Chlorella* spp. from the cell cortex of the host *Paramecium bursaria*. Protist, 査読有, 164 (5), 660-672, 2013.  
Doi:10.1016/j.protis.2013.07.001
- ③ Fujishima M., Kodama Y. Endosymbionts in *Paramecium*. European Journal of Protistology, 査読有, 48, 124-137, 2012.  
Doi:10.1016/j.ejop.2011.10.002
- ④ Kodama Y., Fujishima M. Cell division and density of symbiotic *Chlorella variabilis* of the ciliate *Paramecium bursaria* is controlled by the host's nutritional conditions during early infection process. Environmental Microbiology, 査読有, 14(10), 2800-2811, 2012.  
Doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02793.x
- ⑤ Kodama Y., Fujishima M. Characteristics of the digestive vacuole membrane of the alga-bearing ciliate *Paramecium bursaria*. Protist, 査読有, 163, 658-670, 2012.  
Doi:10.1016/j.protis.2011.10.004
- ⑥ Kodama Y., Fujishima M. Endosymbiosis of *Chlorella* species to the ciliate *Paramecium bursaria* alters the distribution of the host's trichocysts beneath the host cell cortex. Protoplasma, 査読有, 248 (2): 325-337, 2011.  
Doi: 10.1007/s00709-0175-z
- ⑦ Kodama Y., Inouye I., Fujishima M. Symbiotic *Chlorella vulgaris* of the ciliate *Paramecium bursaria* plays an important role in keeping of the functions of perialgal vacuole membrane. Protist, 査読有, 162, 288-303, 2011.  
Doi:10.1016/j.protis.2010.06.005
- ⑧ Kodama Y., Fujishima M. Four important cytological events needed to establish endosymbiosis of symbiotic *Chlorella* sp. to the alga-free *Paramecium bursaria*. Japan Journal of Protozoology, 査読有, 44 (1), 1-20, 2011.  
<http://protozoology.jp/>
- ① 児玉有紀, 藤島政博. 織毛虫ミドリゾウリムシと緑藻クロレラの細胞内共生. 日本生態学会第61回全国大会, 2014年3月18日、広島国際会議場(広島市).
- ② 児玉有紀, 藤島政博. ミドリゾウリムシの細胞表面直下に存在する共生クロレラの離脱と再接着の同調誘導. 第84回日本動物学会, 2013年9月28日、岡山大学(岡山市).
- ③ Yuuki Kodama, Masahiro Fujishima, Synchronous induction of detachment and reattachment of symbiotic *Chlorella* spp. from the cell cortex of the host *Paramecium bursaria*, International Congress of Protistology XIV, 2nd August, 2013, The Westin Bayshore - Vancouver, Vancouver (Canada).
- ④ 三戸紗央里, 藤島政博. 共生クロレラの有無によるミドリゾウリムシの食胞形成能と口部装置の形態の変化. 中国四国地区生物系三学会合同大会, 2013年5月12日、徳島大学三島キャンパス(徳島市).
- ⑤ 児玉有紀, 藤島政博. ミドリゾウリムシの共生クロレラの接着領域の局在性について. 日本動物学会中四国支部大会, 2012年5月13日、島根大学松江キャンパス(松江市).
- ⑥ 児玉有紀, 藤島政博. 恒暗条件下で培養したミドリゾウリムシの共生クロレラは宿主食胞内での消化酵素耐性を失う. 第44回日本原生動物学会. 2011年11月12日、奈良女子大学(奈良市).
- ⑦ Kodama Y., Fujishima M. Four important cytological processes needed to establish endosymbiosis of symbiotic *Chlorella* sp. to the alga-free *Paramecium bursaria*. 1<sup>st</sup> Asian Congress of Protistology and 8<sup>th</sup> Asian Ciliate Conference of Ciliate Biology, 6<sup>th</sup> Oct, 2012, Jeju Univ., Jeju (Korea).
- ⑧ Fujishima M. Endosymbiosis in *Paramecium*. Plenary lecture. VI European Congress of Protistology, July 29, 2011, Free-University of Berlin, Berlin (Germany).
- ⑨ Kodama Y., Fujishima M. Infection process of symbiotic algae to the alga-free *Paramecium bursaria*. 6th Asian Pacific Organization for Cell Biology Congress, Feb. 26, 2011, Manila (Philippines).
- ⑩ Fujishima M. *Paramecium* in action. 6th Asian Pacific Organization for Cell Biology Congress, Feb 26, 2011, Manila (Philippines).
- ⑪ 児玉有紀, 藤島政博. 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. 第43回日本原生動物学会議. 2010年11月6日、茨城大学理学部(三

戸市)。

- ⑫ 児玉有紀、藤島政博. 食胞膜の出芽と切り離しによってミドリゾウリムシの食胞から共生クロレラを包む小胞が宿主細胞質中に有利する仕組み. 平成22年度生物系三学会中国四国支部山口大会 2010年5月16日. 山口大学理学部(山口市).

[図書] (計 5件)

- ① Fujishima M., Kodama Y. Insights into the *Paramecium-Holospira* and *Paramecium-Chlorella* symbioses. In, *Cilia/flagella and ciliates/flagellates*, (Eds) Hausmann K., Radek R., Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart, pp. 203-227, 2014.  
ISBN 978-3-510-65287-7
- ② Schweikert M., Fujishima M., Görtz H.-D. Symbiotic associations between ciliates and prokaryotes. In, *The Prokaryotes, 4th Edition*, (Eds) Rosenberg E., DeLong E. F., Thompson F., Lory S., Stackebrand E., Quinones D., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 427-463, 2013,  
Doi: 10.1007/978-3-642-30194-0\_18
- ③ Kodama Y., Fujishima M. Chapter 2. Secondary symbiosis between *Paramecium* and *Chlorella* cells. In, "International Review of Cell and Molecular Biology", (Ed) Jeon K. W., Vol. 279, pp. 33-77, Elsevier Inc. San Diego, Burlington, London, Amsterdam: Academic Press, 2010.  
ISBN: 978-0-12-381011-3
- ④ Kodama Y., Fujishima M. Induction of secondary symbiosis between the ciliate *Paramecium* and the green alga *Chlorella*. In, "Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology", (Ed) Antonio Mendez Vilas, Vol. 1, pp. 95-102, Formatex Research Center, 2010.  
ISBN: 978-84-614-6194-3
- ⑤ Kodama Y., Fujishima M. Elucidation of establishment of secondary endosymbiosis as a driving force for biodiversity. Proceedings of Infrastructure & Environmental Management Symposium in Yamaguchi 2010 (4), pp. 1-39, 2010.  
ISBN:4-9901161-9-4 C3069

[その他]

ホームページ等

[https://accafe.jp/fujishima\\_lab](https://accafe.jp/fujishima_lab)

<http://nbrpcms.nig.ac.jp/paramecium/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤島 政博 (FUJISHIMA, Masahiro)  
山口大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：40127783

### (3) 連携研究者

児玉 有紀 (KODAMA, Yuuki)  
島根大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号：80582478