

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 3 日現在

機関番号：16401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870023

研究課題名（和文）ミドリゾウリムシと共生クロレラの細胞内共生成立過程に関与する分子の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecules related to establishment of endosymbiosis between ciliate *Paramecium bursaria* and *Chlorella* spp.

研究代表者

児玉 有紀 (KODAMA YUKI)

高知大学・教育研究部自然科学系・助教

研究者番号：80582478

研究成果の概要（和文）：繊毛虫ミドリゾウリムシの細胞内には約 700 個のクロレラが共生している。本研究課題は、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を目的として行った。研究期間中には、共生クロレラが宿主の食胞内で一時的に消化を免れる仕組み、共生クロレラが食胞膜内から細胞質中へ脱出する仕組み、共生クロレラの宿主細胞表層直下への接着の仕組みに関するデータを得た。

研究成果の概要（英文）：*Paramecium bursaria* cells harbor about 700 of symbiotic *Chlorella* spp. in their cytoplasm. The purpose of this research project was clarification of the mechanism of the algal reinfection process to the alga-free *P. bursaria*. In this research period, we have gotten some data about the mechanism of the algal resistance to the host lysosomal enzymes in the digestive vacuole, of the algal escape from the host digestive vacuole to the cytoplasm, and of the algal localization beneath the host cell cortex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：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、二次共生、ミドリゾウリムシ、クロレラ

## 1. 研究開始当初の背景

ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) はゾウリムシ属の中では唯一、クロレラを共生させる能力を持っている。各クロレラは Perialgal vacuole (PV) 膜と呼ばれる共生胞に包まれている。PV膜には宿主のリソソームが融合しない。ミドリゾウリムシとクロレラ

は相利共生であるが、両者はまだそれぞれが単独で増殖する能力を維持しているため、クロレラの除去実験や再共生実験が可能である。これは、両者の関係が動物細胞と藻類の細胞内共生による新たな真核細胞誕生の初期段階にあることを示している。ミドリゾウリムシとクロレラは、培養や再共生の容易さ等から、

細胞内共生成立の初期プロセスを分子レベルで解明するのに適した材料であると考えられてきた。しかし、クロレラの再共生過程の観察の報告はMeier and Wiessnerのみであり、彼らの報告においても詳細な過程は明らかにされていない。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を与えると、短時間で多数のクロレラが取り込まれるため、その後のクロレラの運命の追跡が困難であったためであると考えられる。そこで、まず我々はクロレラ除去細胞に共生クロレラをパルス的に与えチェイスする最適条件を確立した (Kodama and Fujishima, 2005)。このパルスラベルとチェイスの方法を用いて、クロレラが細胞内共生を成立させる過程の全容を明らかにすることができた。さらに、クロレラの再共生成立のために必須な4つのプロセスの存在を明らかにすることができた (Kodama and Fujishima, 2010)。プロセス1: 同一食胞内の一部のクロレラが宿主リソソーム消化酵素耐性を獲得する。プロセス2: 食胞膜の出芽によってクロレラが宿主細胞質中に脱出する。プロセス3: 食胞膜から宿主リソソーム融合を阻止するPV膜に分化する。プロセス4: PV膜に包まれたクロレラが宿主細胞表層直下に接着し、細胞分裂を開始する。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞内共生による真核細胞の進化のルーツを探るこれまでの研究とは異なり、細胞内共生成立のために必須なプロセスに関与する重要分子を明らかにすることを目的としている

## 3. 研究の方法

### (1) プロセス 1 に関して

生きたクロレラのみが消化酵素耐性を示すので (Kodama et al., 2007)、クロレラのタ

ンパク質合成を阻害した時の、リソソーム消化酵素耐性への影響を調べる。

### (2) プロセス 2 に関して

クロレラの脱出はアクチン及び微小管重合阻害剤では阻害できない (Kodama, 未発表)。ダイナミンは小胞のくびり切りに働くタンパク質である。ダイナミン阻害剤で脱出が阻害できるかどうかと、脱出中のクロレラを包む食胞膜の透過型電子顕微鏡観察でダイナミンの関与を調べる。

### (3) プロセス 3 に関して

PV膜への分化は、クロレラの食胞膜からの脱出後15分以内で起こる (Kodama and Fujishima, 2009a)。PV膜に対するモノクローナル抗体を作成し、抗原の消長時期を間接蛍光抗体法で調べ、抗原の部分アミノ酸配列から抗原の機能を予測する。さらに、他の共生体を包む膜 (シンビオソーム) にも共通の抗原が存在するかを間接蛍光抗体法とイムノロットで調べる。

### (4) プロセス 4 に関して

クロレラの接着に与える宿主細胞骨格系阻害剤の影響を調べる。透過型電子顕微鏡で、クロレラを表層直下へ接着させる微細構造の有無を観察する。

## 4. 研究成果

上記の4つのプロセスに関して、以下を明らかにした。

### (1) プロセス 1 に関して

食胞に取り込まれた一部のクロレラのみが消化酵素耐性を示す要因を明らかにするために、恒暗条件下で培養したクロレラをクロレラ除去細胞に与えたところ、クロレラの大

部分は食胞内での消化酵素耐性を失うことが明らかになった。この結果は、クロレラが消化を免れるためには、再共生前のクロレラの光合成が必要である可能性を示唆している。

## (2) プロセス 2 に関して

食胞膜の出芽は、クロレラと宿主を混合して 30 分後に生じ、墨汁や餌のバクテリアや直径の小さなラテックスビーズは遊離しないが、直径の大きなラテックスビーズや酵母菌は遊離できることから、食胞内容物の直径に依存することが明らかになった。さらに、食胞膜の出芽にはダイナミンが関与していることが明らかになった (Kodama and Fujishima, in press)。

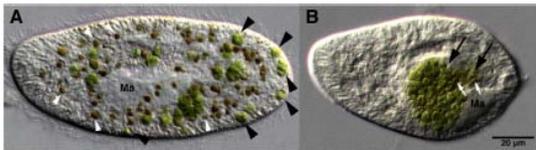


図 1 ダイナミン阻害剤の影響

A: コントロール。B: ダイナミン阻害剤で処理した細胞。ダイナミン阻害剤存在下では、クロレラの食胞膜からの出芽が大きく阻害される。黒矢尻: 食胞膜から出芽した緑色のクロレラ。白矢尻: 食胞膜から出芽した消化されたクロレラ。Kodama and Fujishima, in press から引用。

## (3) プロセス 3 と 4 に関して

PV 膜特異的モノクローナル抗体は作成できなかったが、ミドリゾウリムシの表層直下に存在している PV 膜以外の全ての構造 (トリコシスト、基底小体、ミトコンドリア) に対するモノクローナル抗体が得られた。これらの抗体を使って以下の実験を行った。

①光学顕微鏡観察によると、共生クロレラはトリコシストの間に挟まるようにして存在しているため、トリコシストを包む膜と PV 膜が融合することで、共生クロレラの細胞表

層直下への接着が維持されている可能性が示唆された。そこで抗トリコシストモノクローナル抗体を使い、共生クロレラとトリコシストの位置関係を調べた結果、共生クロレラの表層直下への接着にはトリコシストは必要ではなく、むしろ共生クロレラが接着している部分のトリコシストが除去されることが明らかになった (Kodama and Fujishima, 2011)。

②共生クロレラ、トリコシスト、基底小体、ミトコンドリアはいずれもミドリゾウリムシの表層直下に存在している。これらの正確な位置関係を各種モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法で調べている。

## 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 5 件)

- ① Kodama Y. and Fujishima M. Characteristics of the digestive vacuole membrane of the alga-bearing ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist*, 査読有, 2012, 印刷中 (doi:10.1016/j.protis.2011.10.004)
- ② Fujishima M. and Kodama Y. Endosymbionts in *Paramecium*. *Europ. J. Protistol.*, 査読有, 48, 2012, 124-137.
- ③ Kodama, Y. and 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, 2011, 325-337.
- ④ Kodama, Y., Inouye, I., and Fujishima, M. Symbiotic *Chlorella vulgaris* of the Ciliate *Paramecium bursaria* plays an important role in

maintaining perialgal vacuole membrane functions. Protist, 査読有, 162, 2011, 288-303.

- ⑤ Kodama, Y. and Fujishima, M. Four important cytological events needed to establish endosymbiosis of symbiotic *Chlorella* sp. to the alga-free *Paramecium bursaria*. Jpn. J. Protozool., 査読有, 44(1), 2011, 1-20.

〔学会発表〕(計 13 件)

- ① 児玉 有紀, 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大会, 2011 年 11 月 10 日, 奈良女子大学 (奈良県)
- ② Kodama Y., Four important cytological processes needed to establish endosymbiosis of symbiotic *Chlorella* sp. to the alga-free *Paramecium bursaria*. 1st Asian Congress of Protistology 8th Asian Conference on Ciliate Biology, 2011 年 10 月 6 日, 済州大学校 (韓国)
- ③ 児玉 有紀, 繊毛虫ミドリゾウリムシと共生クロレラとの細胞内共生成立機構の解明, 日本動物学会 第 82 回 旭川大会, 2011 年 9 月 21 日, 大雪クリスタルホール (北海道)
- ④ Kodama Y., Control mechanisms of establishment of the endosymbiosis between *Paramecium bursaria* and symbiotic *Chlorella* sp. 6<sup>th</sup> European Congress of Protistology, 2011 年 7 月 28 日, ベルリン自由大学 (ドイツ)
- ⑤ 児玉 有紀, ミドリゾウリムシへの再共生過程で食胞内のクロレラがリソソーム消化酵素耐性を示す要因について, 生物系三学会中国四国支部大会, 2011 年 5 月 15 日, 香川大学 (香川県)
- ⑥ Kodama Y., Infection process of symbiotic algae to the alga-free *P. bursaria*. 6th Asian Pacific Organization for Cell Biology Congress, Manila, Phillipines, 2011 年 2 月 26 日, エドサ シャングリ・ラ マニラ (マニラ、フィリピン)

- ⑦ Kodama Y., Infection Process of Symbiotic *Chlorella* sp. to the alga-free *P. bursaria*. Invited Memorial Symposium for the 26th International Prize for Biology "Biology of Symbiosis" -Celebrating Dr. Nancy A. Moran-, 2010 年 1 月 8 日 筑波国際会議場 (茨城県)

- ⑧ 児玉 有紀, 生物多様性の原動力の二次共生成立機構の解明, 第 14 回 建設・環境マネジメント講演会, 2010 年 1 月 1 2 日, 山口大学 (山口県)

- ⑨ 児玉 有紀, ミドリゾウリムシと共生クロレラとの細胞内共生成立機構の研究 第 43 回 日本原生動物学会大会公開シンポジウム「生物の共生機構を考える」, 2010 年 1 月 7 日, 茨城大学 (茨城県)

〔図書〕(計 2 件)

- ① Kodama Y. and Fujishima M., Formatex, Formatex Research Center Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2010 年, 95-102.
- ② Kodama, Y., Research Center for Environmental Safety (RCES), Yamaguchi University, Proceedings of Infrastructure and Environmental Management Symposium in Yamaguchi, 2010, 1-39.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

児玉 有紀 (KODAMA YUKI)  
高知大学・教育研究部自然科学系・助教  
研究者番号: 80582478

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし