

「細胞内共生説」のモデル材料ミドリゾウリムシ

島根大学生物資源科学部生物科学科准教授 児玉 有紀

1. ミドリゾウリムシとは

高校の生物の授業でリン・マーギュリス博士の提唱した「細胞内共生説」を初めて知った日のことは今でも鮮明に覚えている。「私達の細胞内に存在しているミトコンドリアや、植物細胞内に存在している葉緑体は、今から10～20億年前に細菌が初代真核細胞に共生して誕生した」と聞いて、にわかには信じがたいと思った。その理由は、元々は被食者であった細菌が、捕食者である初代真核細胞に取り込まれて、消化を免れてそのまま細胞内に居続け、やがて共生が成立するというイメージが全く湧かなかったためである。しかし、著者はその4年後に、細胞内共生を人為的に誘導することが可能な細胞内共生説のモデル生物に出会い、その生物を使った研究生活は今年で11年目を迎えた。

その生物とはミドリゾウリムシ(*Paramecium bursaria*)というゾウリムシである(図1A)。ミドリゾウリムシは河川や池などの淡水中に生息し、比較的簡単に採集することが可能である。ミドリゾウリムシの細胞質内には約700個のクロレラが共生しており、各クロレラは宿主のリソソームが融合しないperialgal vacuole(PV)膜に包まれ、宿主の分裂時には娘細胞に分配される。共生クロレラを持つ原生生物はミドリゾウリムシの他にもアメーバ、ラッパムシ、ツリガネムシなど多数報告されている。原生

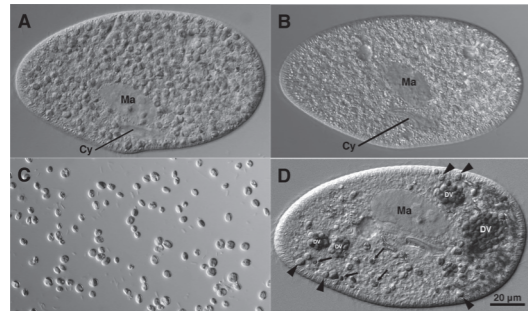


図1 A:クロレラが細胞内に共生しているミドリゾウリムシ。B:クロレラを除去したミドリゾウリムシ。C:ミドリゾウリムシから単離した共生クロレラ。D:Bのクロレラ除去細胞に、Cの単離共生クロレラを混合してから3時間後の細胞。矢尻は消化を免れて再共生に成功したクロレラを示している。Ma:大核, Cy:細胞口, DV:食胞膜(Kodama and Fujishima, 2012¹⁾から引用)

生物情報サーバの細胞内共生の項目には、クロレラを持つ原生生物の美しい写真が多数掲載されている(<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Subjects/Endosymbiosis.html>)。また、ヒドラやカイメン等の多細胞生物でもクロレラとの細胞内共生が報告されている²⁾。

クロレラは宿主に酸素やマルトースなどの光合成産物を与える。一方で、宿主はクロレラにCO₂やNH₃などを与える²⁾³⁾。ミドリゾウリムシとクロレラは相利共生の関係であるが、両者はまだ単独での増殖が可能である。ミドリゾウリムシを恒暗条件下で培養したり、タンパク質合成阻害剤や光合成阻害剤で処理すると簡単にクロレラを除去することができる(図1B)。このクロレラ除去細胞とミドリゾウリムシから単離した共生クロレラ(図1C)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経由して数時間後には容易に細胞内共生を再開する(図1D)。ミドリゾウリムシは培養が容易である点や、細胞が透明であるため再共生過程の観察が可能である点や、マイクロインジェクションも可能なサイズである点などから細胞内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²⁾³⁾。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食胞に取り込まれるため観察が困難で、クロレラの再共生過程の詳細は長年不明瞭なままであった。

2. クロレラの再共生過程

著者ら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を経時的に追跡する最適条件を確立した⁴⁾。図2はクロレラの再共生過程を観察するためのパルスラベルとチェイスの方法の模式図である。方法の詳細は以下のとおりである。
(1) クロレラを除去したミドリゾウリムシを細胞密度が1mLあたり5000細胞になるように調整する。
(2) (1)にミドリゾウリムシから単離した共生クロレラを5×10⁷個加える。

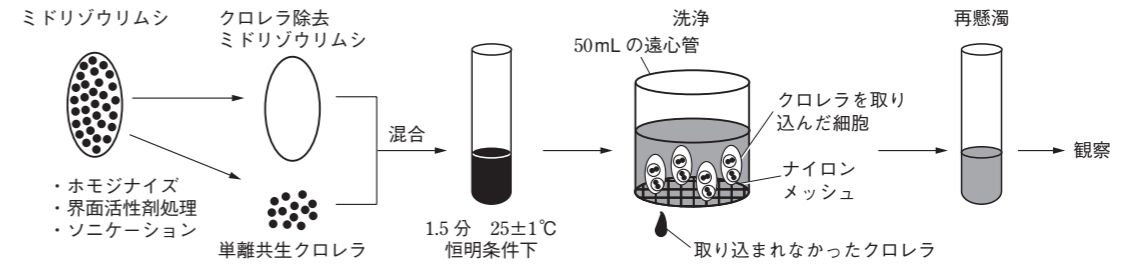


図2 クロレラの再共生過程を観察するためのパルスラベルとチェイスの方法。

- (3) 1.5分後、直ちに15μmの編み目を持つナイロンメッシュに(2)を移し、さらにゾウリムシの生理食塩水であるドリル洗浄液を注ぐことで、クロレラ除去ミドリゾウリムシに取り込まれなかったクロレラを完全に洗い流す。ミドリゾウリムシの体長は120μmであるのに対して、クロレラの直径は2-4μmであるため、このメッシュで洗浄するとクロレラはメッシュの下に流れ落ち、クロレラを取り込んだ細胞はメッシュの上に残る。
(4) メッシュ上の細胞を回収して試験管に移した後、取り込まれたクロレラの様子を顕微鏡を用いて観察する。

この方法を用いて、最終的に細胞内共生を成立させるクロレラがどの食胞から細胞質中出现するのかとそのタイミングを明らかにした⁴⁾。その結果、クロレラが辿る再共生過程には次に述べる4つの重要な現象が存在することが明らかになった。図3にクロレラの再共生過程の全容と、再共生成立に必須な4つの現象の模式図を示した。なお、以下の研究成果の詳細は、Kodama and Fujishima(2010)、Fujishima and Kodama(2012)の総説にまとめた⁵⁾⁶⁾。

第1は、一部のクロレラが宿主食胞内で一時的にリソソーム消化酵素耐性になる現象である。クロレラが一時的にリソソーム消化酵素耐性になる現象は、クロレラの細胞周期、宿主食胞内での位置、クロレラの種や株、

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。一部のクロレラが一次的にリソソーム消化酵素耐性を獲得する理由はまだ明らかになっていない。

第2は、クロレラが食胞膜の出芽で細胞質中に遊離する現象である。食胞からの遊離は、消化を免れたクロレラだけでなく、消化されたクロレラでも可能である。この遊離は、煮沸したクロレラや酵母菌、ミドリゾウリムシに共生不能なクロレラでも可能であるが、最終的には消化または排出される。一方、直径が0.81μmのラテックスビーズ、宿主の餌の細菌、墨汁は遊離が不可能であった。この食胞膜からの遊離にはダイナミンが関与していることが明らかになっている。

第3は、クロレラを包む食胞膜がリソソーム融合を阻止するPV膜に分化する現象である。リソソーム

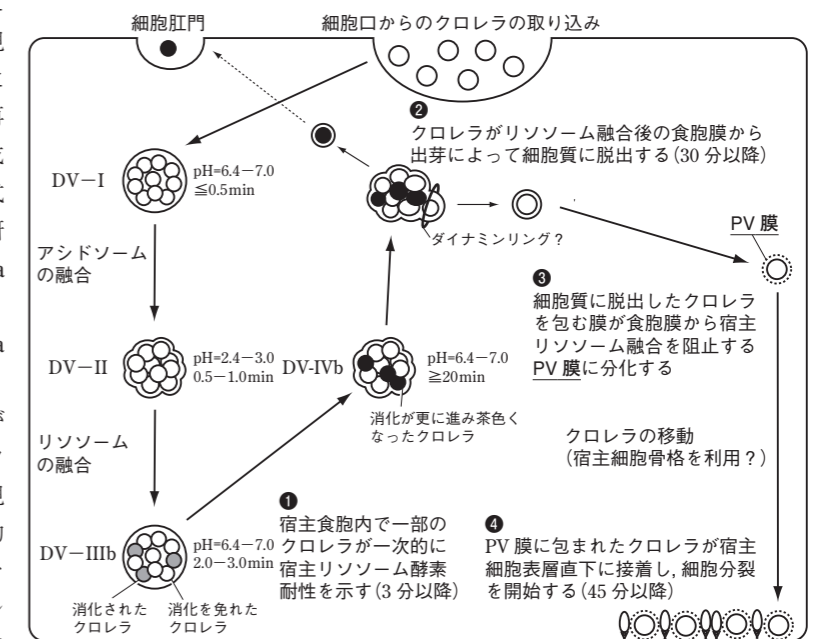


図3 クロレラの再共生過程の全容と、再共生成立に必須な4つのプロセスの模式図(Kodama and Fujishima, 2010⁵⁾を改変)。

ム融合後の食胞内と、クロレラと混合後 30 分以降の出芽部分の食胞膜とクロレラの細胞壁の間には、リソソームの指標酵素である酸性フォスファターゼ (AcPase) の活性が検出された。混合後 45-60 分には、細胞質に遊離した緑色のクロレラが宿主の細胞表層直下に接着する現象が観察される。これらのクロレラは宿主の原形質流動によって移動することはない。この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、食胞膜からクロレラが遊離して、宿主の細胞表層直下に接着する間に起きることが明らかになった。

第 4 に、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である。ミドリゾウリムシの共生クロレラや共生可能な自由生活クロレラ (*C. variabilis*, *C. sorokiniana*, *Parachlorella kessleri* の 3 種) は食胞からの遊離後に宿主の細胞表層直下に接着する能力を持っている。一方で、共生不能なクロレラ (*C. ellipsoidea*, *C. saccharophila*, *C. fusca* var. *vacuolata*, *C. zofingiensis*, *C. protothecoides*) は、食胞内で消化を免れ、宿主細胞質中への遊離はできるが、細胞表層直下に接着はできず、最終的に細胞肛門から排出されることが明らかになった。これらの結果は、宿主細胞表層直下への接着が細胞内共生成立の最終段階として必須な現象であることを示唆している。さらに、クロレラの共生能の有無は、糖分解酵素や蛍光色素で標識したレクチンを用いた実験結果から、細胞壁の糖組成とは無関係であることが示唆された。

3. クロレラを包む PV 膜の性質

共生クロレラを包んでいる PV 膜は共生胞の一種である。PV 膜は宿主の食胞膜由来であることは明らかであるが、両者の性質は大きく異なる。1. 食胞膜には 1 つ以上のクロレラが包まれているが、PV 膜にはクロレラが 1 つだけ包まれている。2. 食胞膜の直径は食胞内のクロレラの数によって変化する (2.1-12.9 μm) が、PV 膜の直径はクロレラの細胞分裂時以外はほとんど変化しない (2.5-4.5 μm)。3. 食胞膜には宿主の原形質流動に伴う移動が見られるが、PV 膜には見られず、宿主細胞表層直下に定着している。4. 食胞膜には分化に伴う膜構造の変化が見られるが、PV 膜には見られない。5. 食胞膜

には宿主のリソソームが融合するため AcPase 活性が検出されるが、PV 膜にはリソソームが融合しないため検出されない²⁾。なぜ PV 膜がリソソーム融合を阻止できるのか、どのように PV 膜を通じて宿主と共生クロレラ間での物質交換がなされているかは未だに明らかになっていない。PV 膜の性質に関しては多くの点が不明瞭なままである。

著者らは、ミドリゾウリムシを恒明条件下でタンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミドで処理すると、24 時間以内に PV 膜が同調して膨潤し (著者らはこの現象を *synchronous PV-swelling*, 略して *SPVS* と呼んでいる)、*SPVS* の誘導後には 8 割以上のクロレラが消化されることを明らかにした⁷⁾。シクロヘキシミドで処理してから 48 時間以上経過すると再び PV 膜は収縮する。その後、共生クロレラの数徐々に減少し、シクロヘキシミド処理後 7 日では観察した全ての細胞からクロレラが消失した。シクロヘキシミドは 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ではクロレラのタンパク質合成のみを阻害し、宿主のタンパク質合成は阻害しないため、ミドリゾウリムシから共生クロレラを除去する方法として用いられてきた。しかし、どのようにクロレラが除去されるかについては調べられていなかった。シクロヘキシミドによる *SPVS* は、恒暗条件下や光合成阻害剤の *DCMU* 存在下では誘導されない。さらにその後のクロレラの消化も誘導されない。これらの結果は、光合成活性存在下で同時に合成されるクロレラのタンパク質が、共生クロレラを包む PV 膜への宿主リソソーム融合阻止能力と深く関わっている可能性を示唆している。*Reisser* (1992)²⁾ はクロレラ細胞壁と PV 膜が密着していることが物質の流動性を低下させ、結果としてリソソーム融合を阻止している可能性を示唆しているが、イオノフォアのモネンシンでは *SPVS* は誘導されるがクロレラの消化は誘導されなかったことから⁸⁾、PV 膜とクロレラ細胞壁間の距離のみがリソソーム融合阻止能力の原因ではないことが明らかになった。恒明条件下で *SPVS* が誘導される理由や、*SPVS* 誘導後の PV 膜とクロレラ細胞壁の間を満たしている物質については不明であるが、これまで情報が希薄だった PV 膜の性質について新たな見解が得られた。今後は、光合成活性存在下で同時に合成されるクロレラのタンパク質を検出し、その機能を解明したいと考えている。

4. ミドリゾウリムシの入手方法

昨年度から、ミドリゾウリムシを含む *Paramecium* 属は「ゾウリムシリソースの収集・保存・提供」の課題で、第 3 期ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) に採択された。NBRP ゾウリムシは、国際標準となる高品質のゾウリムシリソースを整備するとともに、国内外のユーザーの希望に応じた株を提供することを目的としている。プロジェクトの代表機関は山口大学であり、NBRP ゾウリムシのホームページ (http://www.shigen.nig.ac.jp/paramecium/distribution_deposition.html) には、提供可能な株の情報や、ミドリゾウリムシやクロレラを除去したミドリゾウリムシの提供依頼の方法が掲載されている。

5. 今後の研究

著者らの研究グループは、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、細胞内共生の成立に必要な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。現在は、クロレラと共生しているミドリゾウリムシとクロレラを除去したミドリゾウリムシの遺伝子発現の差異やタンパク質の差異を、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析を用いて調べている。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ポラの細胞内共生においては、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が明らかになっている⁶⁾。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、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至るところに存在しているので、ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生成立機構の解明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も役立つことが期待される。

モデル生物として確立された生物だけではなく、

参考文献

- 1) Kodama, Y. and Fujishima, M. (2012) Characteristics of the digestive vacuole membrane of the alga-bearing ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist* 163:658-670
- 2) Reisser, W. (1992) Endosymbiotic associations of algae with freshwater protozoa and invertebrates. In: Reisser, W. (Ed.) *Algae and symbioses: plants, animals, fungi, viruses, interactions explored*, vol.1.1. Biopress, Bristol, pp 1-19
- 3) Karakashian, S. J. (1975) Symbiosis in *Paramecium bursaria*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 29:145-173
- 4) Kodama, Y. and Fujishima, M. (2005) Symbiotic *Chlorella* sp. of the ciliate *Paramecium* do not prevent acidification and lysosomal fusion of the host digestive vacuoles during infection. *Protoplasma* 225:191-203
- 5) Kodama, Y. and Fujishima, M. (2010) Secondary Symbiosis between *Paramecium* and *Chlorella* Cells. In: Jeon, K.W. (Ed.) *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol. 279, Elsevier Inc., San Diego, Burlington, London, Amsterdam, pp 33-77
- 6) Fujishima, M. and Kodama, Y. (2012) Endosymbionts in *Paramecium*. *Eur. J. of Protistol.* 48:124-137
- 7) Kodama, Y. and Fujishima, M. (2008) Cycloheximide induces synchronous swelling of perialgal vacuoles enclosing symbiotic *Chlorella vulgaris* in the ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist* 159:483-494
- 8) Schüßler A. and Schnepf, E. (1992) Photosynthesis-dependent acidification of perialgal vacuoles in the *Paramecium bursaria/Chlorella* symbiosis: visualization by monensin. *Protoplasma* 166:218-222