

博士論文

ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* における

細胞内共生維持機構の解析

殿岡裕樹

平成十三年

目次

序論	1
第一章 野外から採集された白色ミドリゾウリムシ株の形態学的解析	4
序論	5
材料と方法	6
結果	9
考察	13
第二章 野外から採集された白色ミドリゾウリムシ株の遺伝学的解析	18
序論	19
材料と方法	20
結果	21
考察	25
第三章 ミドリゾウリムシにおける共生藻増殖の制御機構の解析	28
序論	29
材料と方法	30
結果	33
考察	37
総合考察	44
謝辞	46
要旨	47
参考文献	49

序 論

ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は細胞内に多数のクロレラ属に属する緑藻類 (*Chlorella* spp.) を持つ単細胞の繊毛虫である。藻類はゾウリムシ由来の膜に包まれて存在し、通常はその消化過程から免れることによって安定して存在出来ると考えられている (Karakashian and Karakashian 1973, Karakashian and Rudzinska 1981, Meier et al. 1984)。これは餌となるバクテリアなどが同一細胞質内で消化されることと対照的である。ミドリゾウリムシと藻類の間には、藻類からの光合成産物 maltose の放出とそのミドリゾウリムシによる利用、ミドリゾウリムシから藻類への窒素源の供給、ミドリゾウリムシによる藻類の分裂制御といった相利的な相互作用が存在すると考えられている (Karakashian 1963, Muscatine and Lenhoff 1963, Weis 1969, Brown and Nielsen 1974, Weis 1974, 1977, Reisser 1980, 1981, Reisser et al. 1983, Tanaka and Miwa 1996, Wang and Douglas 1999)。両者の関係は細胞分裂や有性生殖を経ても維持される永続的なものであり、細胞内共生 (endosymbiosis) と呼ばれている (Siegel 1960, Karakashian 1975)。ミドリゾウリムシにおける細胞内共生関係の模式図を Fig. 1a に示す。この関係においては慣習的に、生活場所を提供しているミドリゾウリムシを宿主 (host)、細胞内の緑藻類を共生藻 (symbiotic algae) と呼ぶ。

藻類との共生関係はミドリゾウリムシに限らず、繊毛虫綱に属する生物群内でいくつかの属にまたがって見られる現象である。また原生生物以外でも、ヒドラやサンゴなどの刺胞動物や他の無脊椎動物で藻類との共生関係が見られる。主に共生藻となるのは、淡水域では緑藻類の *Chlorella* spp.、海水域では渦鞭毛藻類の *Symbiodinium* spp.と違いはあるが、藻類-無脊椎動物間での共生関係における宿主-共生藻間の相互関係として、McAuley (1994) は次の 4 点をあげている。(1) 共生藻は光合成産物を細胞外に放出し、宿主がそれを炭素源

として利用する。(2) 共生藻は宿主の排出した無機窒素（アンモニア）をアミノ酸へと同化して利用する。(3) 共生藻の細胞分裂は宿主によって制御されており、共生藻とそれを含む宿主細胞の分裂はほぼ同調して起こる。(4) 共生藻は宿主細胞質内に、宿主由来の膜に包まれて存在している。

このような安定な関係を持っている一方で、ミドリゾウリムシでは、宿主と共生藻双方の生存にとってお互いの存在は必須ではないことがわかっている。ミドリゾウリムシを暗所で培養すると、共生藻と宿主の増殖のバランスが崩れてミドリゾウリムシ 1 細胞あたりの共生藻数が徐々に減少し、やがては共生藻を持たない細胞が現れる (Siegel 1960)。また、ミドリゾウリムシの細胞を除草剤である Paraquat で処理したり、X 線処理する事によっても、同様に共生藻を持たない細胞が得られる (Wichterman 1948, Hosoya et al. 1995)。一方、宿主の細胞から取り出した共生藻も、適当な栄養分を調製した培地上で培養可能である (Weis 1978, 1979, Weis and Ayala 1979, Takeda et al. 1998)。ここでは便宜上、共生藻を持つミドリゾウリムシの細胞を緑色細胞 (green)、持たないものを白色細胞 (white) と呼ぶ。

白色ミドリゾウリムシ細胞では、緑色細胞から直接単離した共生藻や単離後培養した共生藻を外液に懸濁させて経口的にあたえると、共生関係が回復することが知られている。これを共生の再確立 (re-establishment) 或いは共生藻の感染 (infection) と呼ぶ (Weis and Ayara 1979, Reisser 1980, Ayara and Weis 1987, Meier and Wiessner 1988, 1989)。この過程の観察から、共生藻はまず細胞口から食胞に取り込まれる。通常の消化過程で食胞は acidsome と呼ばれる小胞の融合で酸性化され、続いて消化酵素を含むリソソームが融合して内容物が消化される。白色細胞に取り込まれた単離共生藻も、多くはこの一連の過程を経て消化される。しかし、取り込まれた共生藻の一部はリソソーム融合前に食胞から出芽方式で新たな小胞へと単離される。この共生藻を含む新たな小胞は perialgal vacuoles (PV) と呼ばれ、細胞内での消化から免れる。

こうして共生藻は宿主細胞内で分裂・増殖が可能となり、やがて細胞内共生が確立すると考えられている (Meier and Wiessner 1988, 1989)。共生関係の再確立過程を Fig. 1b に模式的に示した。

細胞内共生関係が成立し安定化する過程では、宿主による共生藻の認識、消化過程からの離脱と共生藻の細胞内環境への順化、宿主細胞内での共生藻の分裂とその制御等様々な段階が考えられている (Rahat and Reich 1984)。現在までの研究で、宿主による共生藻の認識に細胞表面の物質が関与していること、共生藻の放出する光合成産物が共生の成立に一定の役割を果たしていることなどが報告されている (Karakashian and Karakashian 1973, Weis 1978, 1980, Meints and Pardy 1980, Takeda 1995, Takeda et al. 1998)。しかし、宿主が共生藻を認識する機構や、細胞内で共生藻を維持する具体的な機能については不明のままである。

1997 年に山形県寒河江市において、野外から細胞内に共生藻を持たないミドリゾウリムシの細胞 (strain Ysa2) が採集された。ミドリゾウリムシと共生藻の関係が安定で永続的であることから (Siegel 1960)、この細胞では共生関係を維持する機能に異常が生じ、結果として共生藻を失った白色細胞になった可能性があると考えられた。この細胞を用いて感染実験を行ったところ、共生藻を感染させることはできるが共生関係を安定して維持できない細胞であることが示された (Tonooka and Watanabe 2002)。この結果はまた、共生藻の維持にゾウリムシ側の働きが存在することも併せて示した。これらの結果を第一章で述べる。次いで、Ysa2 細胞が持つ形質の遺伝学的解析を行った。これを第二章で述べる。第三章では、ミドリゾウリムシによる共生藻の維持機構を明らかにするために、宿主内での共生藻の増殖に着目し、共生初期細胞系 (白色細胞に共生藻を感染させた状態の細胞) を作成した。この細胞系を用い、どのような因子が共生藻の分裂増殖を規定しているのかを探索した。これらを総合して、ミドリゾウリムシによる共生藻の維持機構を議論した。

第一章

野外から採集された白色ミドリゾウリムシ株の形態学的解析

序 論

ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* とその内部共生藻との関係は、安定で永続的なものであることが知られている (Siegel 1960)。人為的な操作により共生藻を持たないゾウリムシも単離された共生藻も単独で培養可能であるが、自然条件下で共生藻を持たないミドリゾウリムシはこれまで報告されてこなかった。1997 年に山形県寒河江市において、宮城教育大学の荒木多賀子さんにより共生藻を持たないミドリゾウリムシの白色細胞 (strain Ysa2) が自然条件下で採集された。これらの細胞はミドリゾウリムシと接合中の状態で発見され、更にそれを含んでいた水サンプルからは緑色細胞と他の白色のミドリゾウリムシ様細胞も発見、単離された (Fig. 2)。一般に共生関係が安定であることから、自然発生した白色細胞である Ysa2 は共生藻を維持する機能に何らかの変異が生じ、その結果共生藻を失ったのではないかと考えられた。

多くの過程から成る複雑な細胞の機能を解析する際、例えば突然変異体のような、その過程のある部分に機能の変異を持った材料を用いることで、個々の段階を明らかにするといった手法が有効な場合がある。ミドリゾウリムシは、共生藻を持たない株を作成できることが示すように、細胞内共生の成立・維持機構をこのような手法によって解析するための材料と成り得る。共生関係への依存度が高い場合、その機能の変化は即細胞の死につながるが、ミドリゾウリムシでは共生藻に対する依存度が比較的低いため、このような機能変化、そしてその解析が可能であると考えられる。しかし、ミドリゾウリムシの共生関係において、変異株を得てそれを解析するといった研究は、現在までなされていない。

本研究では、まず、この野外から採集された白色のミドリゾウリムシ株が共生を成立させ維持できるかどうかを、感染実験により調べた。またその過程の形態学的な観察を行った。

材料と方法

株

実験に用いたミドリゾウリムシの株は以下の通りである。Ysa2 株は野外から得られた白色細胞であり、山形県寒河江市で採集された。感染実験の対照として Sj2w 株, Kz1w 株を用いたが、これらの株は緑色細胞を暗所で培養することによって共生藻を除いた白色細胞である。こうして得られた白色細胞に単離共生藻を与えると、白色細胞はそれを細胞内に取り込み、共生関係を回復することが予備実験により確認されている。感染実験用の共生藻としては Gr3 株, KM2 株および T316 株から単離したものをを用いた。Ysa2 は宮城教育大学の荒木多賀子さんから、Sj2w, Kz1w, T316 および KM2 は茨城大学の三輪五十二教授からそれぞれ頂いた。Gr3 は野外から採集した株同士を掛け合わせて得られた子孫である。

細胞培養法

ミドリゾウリムシの培養は、ゾウリムシ用生理的塩類溶液である Dryl's solution (Dryl 1959) の改変、K-DS (2.0 mM クエン酸ナトリウム, 1.4 mM リン酸水素 2 ナトリウム, 0.69 mM リン酸 1 カリウム, 1.5 mM 塩化カルシウム) にレタスジュースを加え、餌としてバクテリア *Klebsiella pneumoniae* を植えた Hiwatashi's lettuce juice medium を用いた (Hiwatashi 1968, Yanagi 1992)。培養はまた 24°C、12 時間の明/暗周期で行い、光源には 18w の蛍光灯 (光強度 $17.6 \mu\text{einstein m}^{-2}\text{s}^{-1}$) を用いた。試験管に 4 ml の予め培養したゾウリムシを入れ、1 日毎に 2, 4, 4, 6, 6, 2 ml の培養液を加えた。最後の 2 ml を加えた翌日に細胞は定常期に入り、接合活性を示す。この試験管から 4 ml

を次の試験管に移して培養することで、クローンを継代した。

共生藻の単離

共生藻の単離法は、共生藻を持つ淡水産刺胞動物 *Hydra viridis* (green hydra) における McAuley の SDS-法 (McAuley 1987) をミドリゾウリムシ用に改変して行った。

培養した緑色細胞を手回し遠心機で集めた後、1.5ml チューブに移し、0.1%SDS で処理してゾウリムシの細胞を破碎した。6000rpm, 2min 遠心して上清を除き、0.05% SDS in K-DS に 5 分間懸濁させた。この操作により、共生藻以外の不純物を除いた。6000rpm, 2min で遠心の後上清を除き、K-DS で 3 回共生藻を洗い SDS を取り除いた。最終的に 1ml K-DS に共生藻を懸濁させ、感染実験に用いた。なお、この SDS 処理を含む一連の操作によっても、共生藻は感染能力を保持していることが予備実験により確認された。

感染実験

単離した共生藻と白色細胞を用い、新たに共生関係を確立させる感染実験を行った。方法は以下の通りである。実験は 24℃、恒明条件の恒温器中で行った。

白色細胞を手回し遠心機で集め、細胞密度を測定した。これらの細胞と単離した共生藻を用い、1.5ml チューブに 1000 個体の白色細胞と 2×10^6 細胞の共生藻を含む感染実験処理液 1ml を調製した。このチューブを 24℃の恒温器に移し、5 時間放置した。この間にゾウリムシは共生藻を食胞内に取り込んだ。次いで、ゾウリムシの細胞を K-DS で 3 回洗い、細胞外の共生藻を除いた。細胞を 1ml 培養液に懸濁し試験管に移した。共生藻を取り込ませる時間、共生藻の密度とゾウリムシ細胞密度の割合などは、Weis and Ayala (1979) の論文を参考にした。

共生藻を取り込ませた細胞に 1 日 1-2 ml の餌を加え、培養を継続した。通常、取り込まれた共生藻の内あるものはゾウリムシ細胞内で次第に増殖し、最終的に白色細胞は緑色細胞となった。感染細胞集団から数日おきに 20-50 細胞を抽出し、細胞内の共生藻の有無を蛍光顕微鏡で観察した。生きている共生藻は光学顕微鏡下で鮮緑色の小粒として観察され、紫外線照射により強い赤色の自家蛍光を発するので、死んだ共生藻（褐色、薄橙色の自家蛍光）や食胞（無色、薄橙色～白色の自家蛍光）と区別できる。これに基づいて、共生藻の保持率（Retention rate）や細胞内共生藻数の経時変化を測定した。感染実験にあたっては、単離した共生藻を Ysa2 と対照の白色細胞（人為的に緑色細胞から得られたもの）に同時に与え、その後の経過を合わせて追跡した。

感染細胞の単離培養（daily isolation culture）

感染実験において、外来の共生藻を取り込んだミドリゾウリムシの細胞や細胞内の共生藻の存在状態がどのように変化するかを確かめるために、Sonneborn（1950）の方法に従って共生藻を取り込んだ集団中からゾウリムシ細胞を単離し、デプレッション・スライドグラス上で培養した。1 日ごとに新しい培養液に細胞を移しつつ、細胞の状態を顕微鏡にて観察した。

蛍光染色

共生藻処理後の Ysa2 の細胞を詳細に観察するために、アクリジンオレンジ（AO）を用いた細胞の生体染色を行った。細胞培養液 10 ml をプラスチック遠心管に取り、AO を終濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調製した。2 分間放置し、その後 K-DS で 2 回細胞を洗った後、K-DS に懸濁し 10 分間放置した。この間に AO は細胞内に取り込まれた。スライドグラス上に細胞を取り、蛍光顕微鏡下で紫外光、または紫色光による AO の自家蛍光を観察した。AO は弱塩基性であり、pH が酸性の細胞小器官に特異的に取り込まれるため細胞内 pH の指

示薬として利用される。ゾウリムシの細胞では、酸性化された食胞、トリコシストと呼ばれる分泌小胞などの染色に用いられている (Allen and Fok 1983, Busch and Satir 1989)。

透過型電子顕微鏡による観察

感染実験の際、Ysa2 で見られた凝集塊を持つ細胞を 1.25%グルタルアルデヒド (0.5 M リン酸緩衝液, pH 7.2 中) で 1 時間固定後、同じ緩衝液で洗浄し、1%オスミウム酸 (0.5 M リン酸緩衝液, pH 7.2 中) で 1 時間、後固定した。緩衝液で洗浄した後、アルコールで脱水し、Spurr (1969) の低粘性樹脂 (TAAB 社, Spurr kit) に包埋した。超薄切片を 2%酢酸ウラニル水溶液とクエン酸鉛で二重染色した後 (Reynolds 1963)、日立電子顕微鏡 (H8100, 加速電圧 75kV) で観察した。

結 果

Ysa2 の形態

実験に先立って、Ysa2 が真にミドリゾウリムシの細胞であるかどうかを検証した。細胞の外形はミドリゾウリムシ様であり (Fig. 2)、核染色によりこの細胞はミドリゾウリムシ同様 1 大核 1 小核を持つことが明らかとなった (Fig. 3)。また Ysa2 は、syngen (種内群) 1 の接合型 I, II, IV の細胞と交配反応を示し、III の細胞とは交配反応を起こさなかった。これらの結果から、Ysa2 細胞は syngen1 に属し接合型 III を持つミドリゾウリムシの細胞であると示唆された。更なる検証は、遺伝学的解析の過程で行った。

感染実験

緑色細胞から単離した共生藻を与えた直後、Ysa2 と対照の白色細胞（人為的に緑色細胞から得られたもの）はともに多数の共生藻を細胞内に持っており、この時点で明確に識別可能な差異は見られなかった (Fig. 4a, b)。しかし共生藻を与えて 2-3 日後から、感染 Ysa2 細胞集団の中に凝集塊を持つものが現れた (Fig. 4c, d)。凝集塊の数や大きさは細胞によって大きな幅があり、1 つの凝集塊中に含まれる共生藻数も同様に幅があった (Fig. 4e-h)。巨大な凝集塊を持つ細胞を単離し、daily isolation culture によってその運命を追跡したところ、細胞の変形や分裂異常がしばしば生じ、多くの場合に細胞死が引き起こされることが確かめられた。また、感染 Ysa2 細胞では共生藻が細胞の後半部に偏在する傾向も見られた。凝集塊を持つ細胞の分裂時には共生藻の不均等な分配がしばしば観察され、最も極端な場合には共生藻を持つ細胞から全く持たない白色細胞が生じた (Fig. 5)。凝集塊を持つ細胞の daily isolation culture を行った結果、これらの細胞は細胞分裂で凝集塊を持つ細胞、共生藻は持つが凝集塊は持たない細胞、共生藻を持たない白色細胞を生じた。このような現象はミドリゾウリムシとミドリゾウリムシ由来の共生藻を用いた感染実験では過去に報告がなく、Ysa2 に特有の性質である事が示された。

一方、Ysa2 を用いた感染実験では、全細胞中に占める共生藻を保持している細胞の割合 (Retention rate) は Gr3 由来の共生藻を用いた時に対照の白色細胞よりも大幅に減少した。40 日後における共生藻の保持率は、対照の白色細胞で約 90%、Ysa2 では約 45% だった。ミドリゾウリムシの感染実験では、用いた共生藻の由来によって感染後の保持率が変動することが報告されている (Siegel 1960, Weis 1978, 1979)。Ysa2 で観察された凝集塊の形成と保持率の低下が、由来を異にする共生藻でも同様に起こるかどうかなを確認するために、異なる場所で採集された緑色細胞由来の共生藻を用いて同様の再感染実験を行った。T316 由来の共生藻を用いた感染実験の結果、Ysa2 と Sj2w の間で保持率に差が見られなかった (保持率は約 70%)。しかし、この場合において

も、Ysa2 では感染数日後から凝集塊の形成が観察された。また、Sik1-2 由来の共生藻を用いた場合にも、Ysa2 の共生藻保持率は低下せず、凝集塊は形成された。

いずれの感染実験でも、保持率の低下はあるものの共生藻は Ysa2 の細胞内に長期間（40 日以上）存続し、維持された。これらの再感染実験の結果から、Ysa2 の持つ最も顕著な形質は、感染時における共生藻凝集塊の形成であることが示された。(Tonooka and Watanabe 2002)。

凝集塊の形態学的観察

透過型電子顕微鏡の観察により、ミドリゾウリムシの緑色細胞においては、個々の共生藻が perialgal vacuole (PV) と呼ばれる宿主由来の小胞に包まれて存在していることが明らかになっている (Karakashian et al. 1968, Meier et al. 1984)。Ysa2 に共生藻を再感染させたときに現れる共生藻凝集塊が、単に PV が集合したものか、それとも PV の膜が融合しているのかが詳細に観察された。Ysa2 の共生藻凝集塊を透過型電子顕微鏡で観察した結果、これらの共生藻を包んでいる膜が少なくともその一部で融合しているのが観察された (Fig. 6)。融合の度合は凝集塊間で大きく異なり、PV 膜の一部が融合しているもの、PV 膜同士が完全に融合して一つの巨大な小胞が形成されているものが観察された。(Fig. 6) また、共生藻凝集塊中では、共生藻細胞壁の断片も観察された (Fig. 6d)。

ミドリゾウリムシの細胞内では、バクテリアなどの餌は消化される一方で、通常共生藻はその消化過程から免れている。凝集塊中に共生藻細胞壁の断片がみられることから、共生藻が凝集塊中で消化されている可能性が考えられた。ゾウリムシの細胞では、細胞口から切り出された食胞に acidsome と呼ばれる小胞が融合して、食胞が酸性化されることが知られている (Allen and Fok 1983)。一方で、ミドリゾウリムシ同様細胞内に共生藻を持つ green hydra の

細胞では、共生藻を含む小胞は酸性化されていないと報告されている (Rands et al. 1992)。そこで、細胞内の酸性化部位の指示薬として知られている蛍光色素アクリジンオレンジ (AO) を用いて、緑色細胞と凝集塊を持つ細胞の染色を行った。その結果、緑色細胞では、食胞と思われるいくつかの小胞が AO による染色性を示したが PV は染められず、ミドリゾウリムシでも green hydra と同様に PV は酸性化されていないことが示された (Fig. 7)。一方、Ysa2 の共生藻凝集塊は、細胞外の栄養分や餌が少ない定常期 (stationary phase) においては AO により染色されなかった (Fig. 8)。これは共生藻凝集塊が PV と同様酸性化されていないことを示している。反対に細胞外に餌となる細菌が豊富な条件下 (log phase)、すなわち食胞の形成が活発に起こっていると考えられる条件では、PV や共生藻凝集塊にも AO による染色性が見られた (Fig. 8)。

細胞の飢餓処理

AO による染色性が細胞外の栄養条件によって異なっていたことから、凝集塊の形成が食胞の形成や細胞内消化と関連して起こっている可能性が考えられた。そこで、凝集塊を持つ Ysa2 の細胞に餌となる細菌を与えない飢餓処理を行い、形成された凝集塊の動向を追跡した。この実験には T316 由来の共生藻を感染させ、共生藻処理後 10 日以上経過した Ysa2 細胞を用いた。飢餓処理を行う前には、これらの細胞のうち約 8 割が共生藻を保持しており、共生藻を保持している細胞のうちの約半数が凝集塊を形成していた (Fig. 9, 0 day)。これらの細胞を含む培養液を試験管 2 本に 4ml ずつ植え継ぎ、片方には毎日 2ml の培養液を加え (fed)、もう片方には K-DS を 2ml ずつ加えることで飢餓処理 (starved) とした。共生藻処理後の Ysa2 の細胞を、(1) 共生藻を持たない白色の細胞 (white)、(2) 共生藻を保持し凝集塊を形成している細胞 (cluster)、(3) 共生藻を保持するが凝集塊を生じていない細胞 (dispersion)、

の3種類に分類し、飢餓処理をかけたものとかけないものでその後の細胞の割合を調べた。その結果、飢餓処理をかけた細胞では凝集塊を持つものの割合が時間の経過とともに減少した (Fig. 9)。飢餓処理後 10 日まででは、対照と飢餓処理とで共生藻保持率に差は見られなかった。この結果は、凝集塊を持つ細胞の割合の減少が、共生藻を保持するが凝集塊を持たない細胞の割合の増加と連動して起っている事を示している。

考察

感染実験

ミドリゾウリムシの緑色細胞から単離された共生藻と Ysa2 株を用いた感染実験で、共通にかつ最も顕著にみられた現象は、細胞質内における共生藻凝集塊の形成であった。共生藻を取り込んだ直後の細胞の観察では、対照に用いた白色細胞と明瞭な差異は見られず、Ysa2 の細胞においても感染初期の部分には異常がないことが考えられた。

共生藻凝集塊の形成については、二通りの形成過程が考えられる。第一は、PV に単離された共生藻がその後分裂するが、分裂した共生藻が再び新たな PV に単離されず、それを繰り返すことによって多数の共生藻を含む小胞が形成された場合。第二は、単離された PV 同士が融合し、凝集塊が形成された場合である。共生藻処理後 1-2 日という短い時間で、多数の共生藻を含む凝集塊が形成されていること、部分的に融合した PV が電子顕微鏡観察で見られたことから、第二の説明の妥当性がまず考えられた。

再感染実験を行うに際しては、用いる共生藻によって感染率が変わることが知られている (Siegel 1960, Weis 1978, 1979)。細胞内共生が確立する条件のうちの少なくない部分が、共生藻の側にあることも議論されている

(Karakashian and Karakashian 1973, Weis 1978, Meints and Pardy 1980)。Gr3 から単離された共生藻で見られた共生藻保持率の低下が T316 由来の共生藻で見られなかったことは、それぞれの共生藻が持つ共生の再確立に寄与する性質が異なっていた、という可能性がある。T316 由来の共生藻を用いた再感染実験においては、凝集塊を持つ細胞でも凝集塊に含まれない単独の共生藻が多く観察されたため、Gr3 由来の共生藻で見られたような共生藻凝集塊の不均等な分配による白色細胞に出現が起こりにくく、共生藻保持率も低下しなかったことが考えられる。

共生藻凝集塊

透過型電子顕微鏡での観察から、共生藻凝集塊では PV の膜同士が融合しているのが観察された。また、凝集塊中では共生藻の細胞壁の断片が観察された。これらの事から、まず、凝集塊中で共生藻が消化されているのではないかと考えられたが、AO による染色では凝集塊は食胞の様に酸性化されておらず、むしろ PV に近い性質を持つことが示された。凝集塊を持つ細胞の daily isolation culture によっても凝集塊中に含まれる共生藻が消化されて凝集塊が消失するといった現象は観察されなかった。細胞壁の断片は、再感染過程で食胞に取り込まれた共生藻が消化される際に観察されるが、共生藻の分裂時にも同様に観察される (Karakashian et al.1968, Meier and Wiessner 1989)。これは、共生藻の分裂様式が 4 分孢子 (tetraspore) 形成型であり、娘細胞は常に親細胞の細胞壁を壊して生じるためである。緑色細胞では、4 分孢子は速やかに個々の PV に単離され残った細胞壁は細胞内消化か細胞肛門からの排出によって除去されるが、凝集塊中ではこれが起こらずに細胞壁が残った可能性がある。この点から、上述した凝集塊形成過程の第一の可能性、すなわち凝集塊中で共生藻が分裂を繰り返しその数を増すという可能性も妥当であると考えられた。特に細胞死を引き起こす様な巨大な凝集塊においては、緑色細胞に含まれる数 (平

均 350) よりもはるかに多くの共生藻 (最大 1000 以上) が確認されており、ある凝集塊中では共生藻の過剰な増殖が起こっていることを示唆している。これらのことから、感染 Ysa2 細胞における凝集塊の形成は、単離された PV 同士の融合とその中での共生藻の分裂という二つの側面があると考えられた。

共生藻凝集塊やその中の共生藻は消化されずに存続するが、凝集塊の形成と細胞内消化が関連している可能性が考えられる。AO の染色性は細胞外の栄養条件の違いによって変化し、また、飢餓処理によって凝集塊を持つ細胞の割合が減少した。この時共生藻を持つ細胞の割合は変わっていない事から、凝集塊を持つ細胞の減少は持たない細胞の増加を伴っており、凝集塊を持つ状態と持たない状態が同一の細胞中で可逆的に変化する事が考えられた。各凝集塊で膜融合の度合が異なっていたという電子顕微鏡の観察結果も、この可逆性を支持すると考えられる。

PV と食胞は、Fig. 1 に示す様に由来を同じくしているにもかかわらず前者は消化過程を免れ、後者はリソソームの融合により内容物が消化される。この違いは両者の膜の構成成分の違いによると考えられているが、具体的に何が異なっているかは現在のところ明らかではない。いずれにせよ、PV 膜は食胞膜から由来し、細胞内共生の成立過程のどこかでその性質、または膜の構成成分を変化させていると考えられている (Karakashian and Karalashian 1973, Karakashian and Rudzinska 1981)。これまでの研究で得られた結果と、今回得られた結果の対比から考察される Ysa2 の凝集塊に関わる形質は以下のようなものである。Ysa2 では、共生藻を認識しそれを PV に単離する作用は働いている。この点は緑色細胞や人為的に得られた白色細胞と Ysa2 との間に差はない。その一方で、Ysa2 は PV の膜か PV を維持する機構のどこかに変異を生じていて、細胞内で一度単離された PV が融合する。AO 染色や凝集塊を持つ細胞の飢餓処理の実験結果から、消化過程において食胞に付加される何らかのシグナルが Ysa2 においては PV にも付加され、その影響で PV 同士が融合する

という可能性が考えられる。緑色細胞においては阻害されているこれらのシグナルの付加が、Ysa2 では起こっているとするものである。感染 Ysa2 細胞において、通常の培養条件下では PV 融合と PV への共生藻の単離の機構が同時に働いており、PV の形成と凝集塊の形成がいわば競合しあう形で継続していると考えられる。凝集塊を持つ細胞の daily isolation culture の結果もこの考えを支持する。餌が不足し飢餓状態になると、消化過程に伴って起こっていた PV の融合が停止する一方、PV の形成作用は続行するため、結果的に共生藻凝集塊が消失したと考えられる。共生藻凝集塊の形成と消失は細胞内消化過程を介してつながっている可逆的なものであることが示唆された。

野外から採集された白色細胞の形質

ミドリゾウリムシと共生藻との関係は安定で相互的かつ永続的であり、自然条件下で常に共生藻を持った状態であるとこれまで考えられてきた (Siegel 1960)。従って、共生藻を持たないミドリゾウリムシ細胞が野外から採集されたことはこの考えに当てはまらないものであり、自然条件下において共生藻を維持できなくなったためにこのような細胞が生じたのだと想定された。単離共生藻を用いた感染実験で、Ysa2 は長期間にわたって共生藻を維持することができたが、その一方で共生藻凝集塊の形成や不等分配、それに伴う白色細胞の形成という、「共生関係を安定に維持できない」という性質も示した。

ミドリゾウリムシを用いた感染実験において、藻類の凝集塊が形成される現象は過去に Pringsheim (1928) や Karakashian (1963) によって報告されている。また共生藻を持つ green hydra においても、同様の報告がある (Rahat and Reich 1984)。これらの研究によると、ある種の free-living algae (*Sticochocus*, *Hormidium*, *Chlorella*) や緑色下毛類 (ミドリゾウリムシとは別分類群に属し共生藻を持つ繊毛虫) 由来の共生藻を白色細胞に感染させた場合、取り込まれた藻類がゾウリムシ細胞内で凝集塊を形成する。Karakashian

(1963) は報告の中で、新たに形成された共生を“infection with unusual characteristics”と呼び、凝集塊を持った細胞の増殖が緑色細胞と白色細胞の中間の値を示すことから、この共生関係が完全な共生と非共生の間の“intermediate”な状態であるとしている。そして、ミドリゾウリムシとある種の“external algae”との間に見られたこの現象を、host-symbiont 間の特異性で説明しているが、それ以上の検証はなされていない。今回 Ysa2 で観察された現象は彼らの記載に合致するが、決定的に異なるのは用いた共生藻がミドリゾウリムシ由来の共生藻という点である。凝集塊は Ysa2 を用いた全ての感染実験（共生藻は異なる緑色細胞から単離された）で形成されたため、凝集塊の形成は Pringsheim (1928) や Karakashian (1963) の場合のように藻類の側ではなく、Ysa2 の細胞自身にその原因があると考えられた。すなわち、本来なら共生のパートナーであるべき相手と Ysa2 は安定な共生関係を維持できない、ということを示している。凝集塊形成という、ある種の外来藻類に対する反応を共生藻に対して行うことから、共生藻を認識する機構に変異が生じた可能性が考えられる。また感染初期の凝集塊中で、宿主の細胞死を引き起こすような共生藻の過剰な増殖が起きていた事実から、共生藻の増殖を制御する機能に変異が生じた可能性も示唆された。一方で、Ysa2 は他のミドリゾウリムシの細胞と同様培養が可能であり、食胞の形成や自身の細胞分裂そのものには異常が見られなかった。この事実から、Ysa2 に生じた異常は「共生の維持」に限定された変異であることが示された。

第二章

野外から採集された白色ミドリゾウリムシ細胞の遺伝学的解析

序論

第一章において、野外から細胞内に共生藻を持たないミドリゾウリムシの株 (strain Ysa2) が採集されたこと、及びこの株を用いた感染実験の結果を報告した。実験の結果、Ysa2 は細胞内に長期間 (40 日以上) 共生藻を維持できるが、その間に緑色細胞では決して見られない共生藻の凝集塊を形成すること、凝集塊を持った細胞では分裂時に共生藻の不均一な分配が生じ、最も極端な場合には共生藻を持つ母細胞から持たない娘細胞が生じることが明らかとなった (Tonooka and Watanabe 2002)。これらの結果は、Ysa2 が共生藻を維持する機能に何らかの変異を持つ事を示した。また、Ysa2 での凝集塊形成が全ての感染実験 (共生藻は由来の異なる様々な緑色細胞から単離された) で観察された事実からも、共生藻ではなく Ysa2 の細胞自身に凝集塊形成や共生藻の不等分配を引き起こす原因があると考えられた。

一般に、ある細胞に生じた機能の変異はそれを制御する遺伝子に変異が生じた結果であることが多い。また、このようにして生じた変異 (突然変異) を材料として用い、ある生物や細胞が持つ機能を明らかにする方法は有効である。実験材料としてのミドリゾウリムシとその細胞内共生の問題は、共生の成立過程や宿主による共生藻の認識に焦点を当てた研究が多く、これまでは共生の成立条件や共生成立の形態学的側面が明らかにされてきた。しかし遺伝学的には、ミドリゾウリムシにとっての性別である接合型の遺伝様式が明らかになっているのみである (Siegel and Larison 1960)。また、藻類を共生者とする共生関係 (Alga-invertebrate symbiosis と称される) に限れば、細胞内共生の成立や維持に対する遺伝学的な研究は進んでいない。

野外から採集された白色株 Ysa2 は、共生関係の維持に変異を持つと考えられた。もしこの形質が遺伝子支配であるならば、これまで扱われて来なかった遺伝学的視点からの共生関係の解析が可能になる。そこで、Ysa2 が示した形

質が、ある遺伝子座に生じた突然変異によるものかどうかを明らかにするために、Ysa2 と他のミドリゾウリムシ株をかけ合わせ、更にここで生じた F1 細胞同士をかけ合わせ F2 細胞を得る遺伝学的な解析を行った。

材料と方法

株、細胞培養法、感染実験

遺伝学的解析に用いた株は以下の通りである。Ysa2（接合型 III）は野外から採取された白色細胞であり、山形県寒河江市で得られた。かけ合わせの相手としては緑色細胞である T316（接合型 IV），KM2（接合型 I）を用いた。Ysa2 は宮城教育大学の荒木多賀子さんから、T316 は茨城大学の三輪五十二教授からそれぞれ頂いたものである。かけ合わせで生じた白色細胞については、単離共生藻を与える感染実験を行い共生関係を確立できるかどうか確かめた。感染実験の方法は第一章で述べたものに従った。

Ysa2 の遺伝学的解析

第一章で明らかになった、Ysa2 の持つ形質が遺伝的に支配されているかどうかを検証するために、Ysa2 を他の株と交配させて F1 を得、更に F1 同士をかけ合わせるといふ遺伝学的解析を行った。方法は以下の通りである。

定常期に入った Ysa2 の細胞を、かけ合わせる相手の細胞とデプレッション・スライドグラス上で混合し、24℃、5-10 時間置いた。この間に形成された接合対を 1 対ずつ K-DS に移し、二日後接合過程を終了し離れた接合完了体細胞を培養液の入った 96 穴マルチプレートに単離した。細胞数が増えたところで試験管に移し、定常期に入った後、接合活性を持った別の細胞（tester）と混合して接合活性の有無をテストした。有性生殖が成功した場合、増殖した細胞

は接合活性を持たない未成熟状態となり交配反応を示さない。しかし、ゾウリムシにおいては、接合完了体の中にも新大核が分化せずに旧大核が再生し分裂、増殖する場合がある。この現象は大核再生 (macronuclear regeneration: MR) と呼ばれ、こうして増殖した細胞は有性生殖が成功した細胞 (new macronuclear reproduction: NR) と異なり接合活性を示す。これらの細胞は親細胞の表現型を示すため、遺伝的解析をする上で排除する必要がある。有性生殖が成功した細胞としなかった細胞が外部からは判別できないために、ゾウリムシの遺伝学的解析ではこのようなテスト (MR test) が必要となる。未成熟な期間は接合後約 50 分裂、試験管培養では約 1-3 ヶ月間で、接合活性が表れるまで試験管での培養を続けた。F2 については共生関係に関する形質に注目したため、必ずしも全ての子孫細胞を接合活性が表れるまで培養したわけではない。Siegel and Larison (1960) によって明らかにされた、ミドリゾウリムシにおける性の遺伝様式は次の通りである。ミドリゾウリムシ (syngen1) の性 (接合型) には 2 つの遺伝子座が関与しており、その組み合わせにより 4 種類の性が存在する。接合型はメンデル式に遺伝し、優性の法則、分離の法則、独立の法則に従う。ある接合型を持つ細胞は、他の 3 つの接合型の細胞と交配反応を起こし、生殖が可能である。各接合型の遺伝子型は、次のように記載されている。接合型 I; 遺伝子型[A-B-]、接合型 II; [aaB-]、接合型 III; [aabb]、接合型 IV; [A-bb]。

結果

雑種第一代 (F1)

第一章で述べた Ysa2 の示す共生藻の維持に関する特性が遺伝的なものであるかどうかを明らかにするため、他のミドリゾウリムシとかけ合わせて遺伝学

的解析を行った。緑色細胞である T316 (接合型 IV, 遺伝子型 AAbb), KM2 (I, AaBb) を Ysa2 (III, aabb) と接合させ、接合を完了した細胞を単離培養してその表す形質を追跡した。緑色細胞と白色細胞の接合による有性生殖では、減数分裂によって生じた半数体核が一回分裂し、そのうち一個のみが交換される。一方で細胞質中の共生藻は交換されない。よって通常このかけ合わせでは理論上遺伝子組成を同じくする緑色細胞と白色細胞が生じる (Siegel 1960, Siegel and Larison 1960)。T316 と Ysa2 のかけ合わせでは、生じた全ての F1 子孫が接合型 IV (Aabb) を示した。単離した細胞のうち試験管培養まで生き残ったものが 9.6%、MR test を経て有性生殖が成功したと認められたものがその 39% (全体の 3.8%) であった (Table 1)。緑色 F1 細胞では共生藻の凝集塊形成や白色細胞の生成は観察されなかった。この点において、全ての緑色 F1 細胞は正常な緑色細胞であるといえる。白色 F1 細胞については外部から単離共生藻を与える感染実験を行い、感染能力の有無を確認した。その結果、全ての白色 F1 細胞で共生関係が正常に確立した。共生藻の凝集塊形成等 Ysa2 で見られた現象は、緑色 F1 細胞同様全く観察されなかった (Table 1)。Ysa2 と KM2 の組み合わせでは、単離した接合完了体のうち 15% が生き残り、その中の 87% (全体の 13%) が有性生殖を成功させた細胞であった。この組み合わせでは、子孫に全ての接合型 (4 種類) が分離した。T316×Ysa2 の F1 細胞同様、緑色細胞は正常であり白色細胞は外部から単離共生藻を取り込む事により正常な共生関係を形成した (Table 1)。これらの結果から、Ysa2 の示す形質が白色 F1 細胞の細胞質に引き継がれるものではないこと、及び少なくとも優性の遺伝子によって支配されているものではないことが示された。

F1 の子孫 (B1, F2)

緑色細胞とのかけ合わせで得られた F1 が Ysa2 の形質を表さなかったため、F1 細胞を用いた更なる遺伝学的解析を行った。上述の通り Ysa2 と T316 と

の子孫は全て同じ接合型 (IV) を示したため、F1 同士のかけ合わせに用いることができなかった。そこで、親細胞である Ysa2 との戻し交雑 (backcross) を行った。一方 Ysa2 と KM2 との子孫は 4 種類全ての接合型を示したので、F1 細胞同士のかけ合わせによる解析は Ysa2×KM2 の F1 を用いて行った。

緑色 F1 細胞と Ysa2 の戻し交雑、緑色 F1 細胞同士のかけ合わせの両方で、9 割以上の子孫は正常な緑色細胞であった。そしてこの段階で、F1 が稔性を持ち正常な子孫を生じたことから、Ysa2 が「共生藻を持たないミドリゾウリムシの株」であると改めて確認された。

緑色 F1 細胞 (Ysa2×T316) と Ysa2 による戻し交雑の結果を、Table 2 に示す。この組み合わせでの子孫の生存率は F1 よりも更に低く、有性生殖に成功した子孫細胞の割合は全体の 1.8%にすぎなかった。F1 の結果とは異なり、B1 細胞 (戻し交雑第一代) の一部には培養過程で白色細胞を生じるものがあった (Table 2)。これらの株では緑色細胞と白色細胞とが長期間混在した。次に、Ysa2×KM2 の緑色 F1 細胞同士をかけた結果を Table 3 に示す。このかけ合わせでは、有性生殖に成功した子孫細胞の割合は全体の 7.7%であり、戻し交雑よりは生存率が高かった。この組み合わせでも、多くの F2 は正常な緑色細胞であったが一部に白色細胞を生じるクローンが現れた。人為的な圧力 (薬剤処理や暗所での培養) を加えない限り、通常の培養条件下で緑色細胞が白色細胞を生じるという現象は報告されていない。そこでまず、白色細胞の生成が培養条件や F1 細胞自身に起因するものかどうかを確認するため、かけ合わせに用いた緑色 F1 細胞の単離培養を行った。20 日間以上の培養期間を通じて、緑色 F1 の単離培養 (96×2) では白色細胞は生成されなかった。このことから、白色細胞の生成はかけ合わせによる遺伝的変化に起因すると考えられた。そこで、緑色・白色細胞の混在する F2 株から白色細胞のみを単離培養し、単離した共生藻を与える感染実験を行った。白色細胞を生じた緑色細胞の形態学的観察のために、白色・緑色細胞が混在するクローンも並行して維持

培養した。

F2 で生じた白色細胞を用いた感染実験の結果を、Fig. 10 に示す。用いた共生藻は Gr3 株から単離されたものであり、白色 F1 細胞を用いた感染実験の結果も併せて示した。全体的な傾向として、白色 F2 は人為的に作成した白色細胞や白色 F1 に比べ共生藻の保持率が低くなった。保持率の低下は感染後数日以内に起こった。この中には一度保持率が低下した後緩やかに上昇するものが見られたが、反対に取り込んだ全ての共生藻を培養の過程で失う株 (9-3w 株) も存在した。共生藻を保持しないというこれまでにない現象が見られたため、この株に注目して更に感染実験を行った。様々な緑色細胞から共生藻を単離し、それを与える感染実験を行った結果、9-3w 株は Gr3, T316, KM2 由来のどの共生藻を取り込んでも共生関係を確立しなかった。この時に共生藻の消失が早い段階で起こることから、感染実験の初期における共生藻の動態を対照の細胞と比較して追跡した (Fig. 11)。光学顕微鏡、蛍光顕微鏡による細胞の観察から、9-3w 細胞内に取り込まれた共生藻は数時間以内に死亡し消化されていることが明らかとなった。一方、9-3w 細胞は共生藻の PV への単離を対照の細胞と同様に行っている事が示された (Fig. 12a, b, Fig. 4a)。すなわち、感染直後の時点で、9-3w 細胞内には単独の状態の「生きた」共生藻が多数存在する。しかし数時間後、これらの共生藻は 9-3w 細胞内で死亡してその数を減じ、やがては完全に消化された (Fig. 12c, d)。

白色細胞を生じた緑色 F2 細胞における、細胞内の共生藻の状態を Fig. 13 に示す。白色細胞を生じた F2 株のうち、ある細胞では共生藻の不均一な分布や凝集塊の形成が起こっていた (Fig. 13a, b)。細胞内共生藻数も細胞によって差があり、数十個から数百個まで幅があった。また、別の F2 細胞では共生藻が死亡し褐色に変色しているのが観察された (Fig. 13c, d)。通常の緑色細胞では、宿主細胞内での共生藻の死亡は観察されず、この現象も Ysa2 の F2 細胞特有の現象であると考えられる。更に、共生藻を持つ 9-3 株の細胞分裂時

においては、共生藻の不均等分配による白色細胞の形成が確認された (Fig. 14)。共生藻を感染させた Ysa2 細胞 (Fig. 5) で見られたのと同様の現象が、F1 を経た F2 細胞で観察された。

考 察

雑種第一代 (F1)

Ysa2 と他のミドリゾウリムシ細胞との間に生じた F1 細胞は、Ysa2 が感染実験で示した特徴を全く表さなかった。緑色細胞と白色細胞のかけ合わせでは、殆どの場合生殖核だけが交換され共生藻の移動は起こらない (Siegel 1960)。このため理論上は遺伝的に同一の緑色細胞と白色細胞が生じるが、ゾウリムシは単細胞生物であるため子孫細胞は基本的に親細胞の細胞質を受け継ぐことになる。緑色 F1 細胞で共生藻の凝集塊が形成されず、白色 F1 細胞に共生藻を感染させると正常な共生関係を確立した事実から、Ysa2 の持つ共生藻維持に関する異常は遺伝的に優性な形質でないこと、Ysa2 の細胞質に生じたものではないことの二点が併せて示された。

F1 の子孫 (B1, F2)

Ysa2 が持つ形質が F1 で表れなかったため、F1 細胞を用いた遺伝学的解析を行った。その結果、緑色細胞に由来する子孫の一部に、白色細胞を生じる株が出現した。緑色 F1 細胞の単離培養 (20 日間以上) では白色細胞が生じることはなく、通常の培養条件下で緑色細胞から白色細胞が生じるという現象も報告されていない。このことから、F2 で出現した白色細胞は F1 では表れなかった Ysa2 の持つ形質が表れたものと考えられる。

白色細胞を生じた F2 とそこから単離された白色細胞の特徴は以下の通りで

ある。(1) これらの F2 細胞は摂食や分裂増殖に関しては異常が見られない。

(2) 外部から緑色細胞由来の共生藻を与えると、それを個々の PV へと単離する。(3) 単離された共生藻の大部分は、取り込まれてから数時間以内に死亡し宿主によって消化される。(4) 白色細胞を出したもとの株では共生藻は維持されるが、凝集塊の形成、分裂時における共生藻の不均等分配によって白色細胞が生じる。

これらの事実から、Ysa2 は細胞内共生の維持に関する自然突然変異であると結論された。現在までのところ、緑色 F1 同士のかげ合わせによる正常な緑色 F2 と白色細胞を生じる F2 の分離比はおよそ 10 : 1 である。この数字は一遺伝子突然変異、二遺伝子突然変異の中間の値である。複数遺伝子が連鎖している可能性もあり、現時点でいくつの遺伝子に変異が生じているかは明らかではないが、少なくとも Ysa2 には劣性の突然変異が生じている事が明らかとなった。共生関係が安定である事から、Ysa2 の祖先細胞は緑色細胞であったと考えられる。ある時点で遺伝子に突然変異が生じ、その結果細胞内で安定して共生藻を維持できなくなり、その後の世代のどこかで共生藻を失い白色細胞になったのだと考えられる。

まとめと今後の展望

細胞内での共生藻の維持は、様々な働きが複合的に関わり合った機構である。具体的な共生維持機構の全体像が明らかではないため、今回得られた突然変異体はその機能のどこに変異を生じ、結果として「白色細胞を生じる」という形質を示すようになったのかは不明である。しかし、Ysa2 や白色 F2 細胞の示した特徴を総合して、次のように推測することが可能である。この変異体は、共生藻を長期間にわたって維持するという機能は保持している。しかし、安定な関係を維持するために必要な細胞内への共生藻の分散や共生藻の増殖制御が正常に機能せず、場合によって細胞分裂の際に白色細胞を生じる。これと連動し

て、一度共生藻を失った細胞は共生関係を回復しにくいという性質も併せ持つ。Ysa2 の感染実験において、共生藻の過剰な増殖やそれに伴った宿主の細胞死といった現象は、感染初期の数日間に集中して起こった。感染から 40 日以上経過した細胞集団の観察では、細胞死を引き起こすような巨大な凝集塊を持つものは殆ど見られない。感染初期には共生藻の増殖が通常より活発になるが（第三章参照）、この時点での共生藻を制御する働きが Ysa2 では異常になっている可能性も考えられる。いずれにせよ、「共生関係を安定して維持できない」という Ysa2 の形質は、自然条件下において共生藻を持たない白色細胞が存続して来たことの説明ともなる。つまり、何らかの機会に白色細胞が共生藻を取り込む機会を得ても（死亡した緑色細胞に接するなどして）、そこから安定した共生関係を構築できないために、共生藻を持たない細胞が常に生じて来たのだと考えられる。

ミドリゾウリムシにおける共生の研究では、宿主と共生藻の特異性という観点から、主に共生藻の側に焦点を当てた研究が行われてきた。Free-living のクロレラのある株がミドリゾウリムシに共生可能であること、人為的に共生藻を除いた白色細胞に他の生物（細菌や酵母）が感染することなどから、宿主による認識には共生藻側の因子（表面構造など）が重要であると議論され、様々な共生者と宿主の組み合わせが試されてきている（Karakashian 1975, Karakashian and Karakashian 1964, Bomford 1965, Goertz 1982, Rahat 1985, Rahat and Reich 1984, 1985）。共生の維持機構に変異を持つ Ysa2 の存在は、共生の研究に新たな視点からの解析を行うための有用な材料となりうる。今後はこの突然変異体を用い、differential display などの手法で原因遺伝子を特定して、ミドリゾウリムシにおける共生藻の維持機構を明らかにしていくことが望まれる。

第三章

ミドリゾウリムシにおける共生藻増殖の制御機構の解析

序 論

細胞内共生は、宿主細胞中に共生者が存在し、双方に実質的な利益があり、安定で永続的な関係であると定義されている (Siegel 1960, Karakashian 1963)。共生関係の維持においては、宿主による共生者の増殖制御がその永続化には必要であると考えられている (Weis 1969, McAuley 1981, 1994, Reisser et al. 1983, Bossert and Dunn 1986)。藻類-無脊椎動物間の共生においては一般的に、共生藻の方が潜在的増殖能力が高い (McAuley 1994)。宿主が何らかの方法で共生藻の増殖を抑制し、更に宿主の分裂に共生藻の分裂が同調することによって、宿主内共生者の細胞数が一定に保たれていると考えられている (Dunn 1987, McAuley 1982, McAuley and Darrah 1990)。宿主による共生藻の増殖制御は主に海産無脊椎動物や green hydra などで行われており、これまでに次のことが明らかになっている。(1) 宿主細胞中の共生藻は光合成により炭素源は得られるが、窒素源が不足した状態である。このために、共生藻は分裂が抑制されている (Rees 1990)。(2) 宿主が餌を食べると、老廃物であるアンモニアが生成され、共生藻がそれをアミノ酸へと同化する。この結果共生藻の分裂が可能となる (McAuley 1990)。(3) これらの制御とは別に、繊毛虫類に属す *Euplotes daidaleos* (下毛類) や *Stentor polymorphus* (ラッパムシ) などにおける共生では、定常的に共生藻が消化され一方では共生藻が増殖することにより共生者の数が維持されるという、“digestive regulation”という現象が報告されている (Reisser et al. 1983)。

慢性的に貧栄養状態である熱帯浅海域の共生においては、窒素源の欠乏で共生藻の増殖制御が説明できる。造礁サンゴのいくつかの種では、外部からの窒素源の添加により共生藻が増加することを支持する報告がある (Hoegh-Guldberg and Smith 1989, Muscatine et al. 1989, Stambler et al. 1991)。しかし、前述の green hydra で共生藻の分裂が宿主の細胞分裂に同調している

という現象は、窒素源の欠乏で共生藻の分裂が抑制されているというだけでは説明できない。McAuley (1985a, b) は更に一步踏み込んで、green hydra では宿主による共生藻の分裂制御に成長因子 (growth factor) が存在することを議論しているが、その実体は未だ明らかでない。ミドリゾウリムシにおいても、共生藻の増殖制御が行われていることは以前から言及されている (Weis 1969)。形態学的な観察から、少なくともその制御が“digestive regulation”ではないことがこれまでに明らかになっている (Karakashian and Rudzinska 1981, Reisser et al. 1983)。

第一章、第二章において、共生藻の維持に関するミドリゾウリムシの自然突然変異体が単離されたことを報告した。これは、ミドリゾウリムシの正常な細胞には共生藻を維持する機構が存在することも併せて示している。しかし、今までのところ、共生関係の制御や維持に関する具体的な機構は明らかになっていない。そこで、ミドリゾウリムシによる共生関係の維持がなされているのかどうか、もしあるならばその実体はどのようなものであるのかを明らかにするために、宿主による共生藻の増殖制御に注目して実験を行い、その結果を解析した。実験にあたっては、ミドリゾウリムシの「共生関係の再確立」という系を利用し、感染初期の細胞系を作成して、その後の共生藻の分裂・増殖を様々な条件下で追跡した。そして、細胞内共生藻の維持に関するミドリゾウリムシの役割を議論した。

材料と方法

株、細胞の培養および感染実験

実験にはミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* (syngen1) の緑色、白色細胞を用いた。緑色細胞としては Gr3 株を、白色細胞としては Sj2w 株を用いた。

白色細胞は野外採集の緑色株から、暗所での培養により共生藻を除いた株である。Sj2w は茨城大学の三輪五十二教授から頂いたものであり、Gr3 は野外から採集した株同士をかけ合わせて得られた子孫である。ゾウリムシの培養法および感染実験は、第一章で述べたものと同じである。

共生藻の分裂に対する環境条件の影響

宿主ミドリゾウリムシによる共生藻の増殖制御を検証するために、外部環境が共生藻の増殖に与える影響を調べた。宿主に対しては栄養（餌）条件、共生藻に対しては光条件に着目し、それぞれの条件を変化させることによって共生藻の分裂がどのように影響を受けるかを解析した。

実験に先立ち、白色細胞と単離共生藻を用いて共生成立初期の細胞を作成した。前述の方法で白色細胞に共生藻を感染させた後、2 日間 K-DS に入れて細胞を飢餓状態にした。この間にゾウリムシの細胞内では、取り込まれたものの共生を確立しなかった共生藻は消化され、確立したものだけが残る。これらの細胞を（光・餌）（光・飢餓）（暗・餌）（暗・飢餓）の 4 つの培養条件に分割して培養した。環境条件の設定は以下の通りである。光条件については、24℃ に設定した光源のある恒温器（光）と無い恒温器（暗）で細胞を培養した。栄養条件については、通常の培養に用いられるバクテリア入り培養液（餌）と培養液の代わりに同量の K-DS（飢餓）をそれぞれ加えて富栄養状態、貧栄養状態を作成した。これらを組み合わせて、上記の 4 つの培養条件を作成した。

共生藻の増殖の指標を、長期間・短期間のそれぞれについて設定した。長期間の指標としてはミドリゾウリムシ細胞内共生藻数の平均値とその推移を、短期間の指標としては細胞内の全共生藻数に対する分裂中の共生藻の割合（分裂指数、Division index）を用いた。長期間では 1 日毎、短期間では各条件においてから 24 時間まで数時間毎に細胞を採取し、細胞内の共生藻数、分裂指数等を測定した。

窒素源の添加

上記実験の（光・飢餓）条件において窒素源を添加し、（光・餌）条件との比較を行った。窒素源としては硝酸アンモニウム（ NH_4NO_3 ）を用い、濃度は $100\ \mu\text{M}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ とした。窒素源の濃度は green hydra で用いられたものを参考にした（McAuley 1990）。

1.5ml チューブにゾウリムシ約 1000 細胞を含む 1ml の処理液を調製し、 24°C 、恒明条件下の恒温器中に置いた。餌も窒素源も加えなかったもの（negative control）、窒素源を加えたもの、バクテリアを含む culture medium を加えたもの（光・餌条件；positive control）の三者について、短期間の共生藻分裂指数を測定した。また、ゾウリムシが食胞経由で細胞内に物質を取り込むことから、栄養分のないポスターカラーを同時に添加し、ゾウリムシに食胞を形成させながら窒素源を与える実験も行った。ポスターカラーを加えるとゾウリムシはそれを取り込んで食胞を形成するが、消化吸収はされずに一定時間の後排出されるゾウリムシを含む培養液にポスターカラーを加えても、細胞の生存には影響がないことが予備実験により確かめられている。対照としてポスターカラーのみを与えて分裂指数を計測する実験も行った。

炭素源の添加

窒素源の影響に加えて、共生藻の分裂への炭素源の影響を見るために、（光・飢餓）条件において硝酸アンモニウムとともに濃度 $10\ \text{mM}$ の酢酸ナトリウム（ CH_3COONa ）を加え、共生藻の分裂に与える影響を調べた。用いた酢酸ナトリウム濃度は green hydra の研究で用いられたものを参考にした（McAuley et al. 1996）。（光・飢餓）条件に酢酸ナトリウムのみを与える実験も合わせて行った。

タンパク質合成阻害剤の影響

ゾウリムシの摂餌後 10-12 時間における共生藻の分裂誘導が、新規のタンパク質合成を必要とするかどうかを明らかにするために、タンパク質合成阻害剤である cycloheximide(cyc)と puromycin(puro)を上記実験系に用いた。窒素源添加の実験と同様の処理液に終濃度 100 µg/ml の cyc、500 µg/ml の puro をそれぞれ餌と同時に (0h)、餌を与えてから 2, 4, 6, 8 時間後に添加し、10 時間後の分裂指数を対照 (no inhibitor) と比較した。各薬剤による処理濃度は Ayala and Weis (1987) の研究を参考にした。

結 果

長期間の影響

感染初期のミドリゾウリムシをそれぞれ 4 つの条件におき、ゾウリムシ 1 細胞当たり共生藻数の平均値の推移を計測した (Fig. 15)。光のある条件下で比較したところ、(光・餌) では共生藻数が増加し 10 日後には 1 細胞当たり 300 まで達したのに対し、(光・飢餓) では緩やかな増加しか見られなかった。光のない条件においても、(暗・餌) では共生藻数が増加し (暗・飢餓) では増加しないという傾向が見られたが、(暗・餌) での増加は 5 日程で頭打ちになりその後は変化しなかった。

上記実験において、餌のある条件でゾウリムシ細胞は分裂増殖し飢餓条件では殆ど増殖しない。この点を考慮して、細胞当たり共生藻数を培養液中に含まれる全共生藻数 (population size) に換算し、その推移を Fig. 16 に示した。共生藻の population size は、光の有無にかかわらず飢餓条件ではほぼ同様の推移を示したが、(暗・餌) 条件では飢餓条件よりも高い増加を示した。この場合でも、(光・餌) 条件に比べ (暗・餌) 条件の増加は早い段階で頭打ちに

なるという傾向が見られた。

(光・飢餓) 条件では植物細胞の成長・増殖に必要な光があるにもかかわらず共生藻は増殖せず、反対に(暗・餌) 条件では光合成に必要な光なしで共生藻が増殖した。そこで、個々の共生藻の細胞成長に着目し、ゾウリムシ細胞内に存在する共生藻の平均サイズを実験前と各条件下で 5 日間培養したものとで計測・比較した (Table 4)。サイズの指標としては共生藻の体積を用い、共生藻を完全な球体と仮定して直径から算出した。その結果、5 日後における共生藻サイズは(光・飢餓) が最も大きく(暗・餌) が最も小さかった。実験前との比較では、(光・餌) 条件のものが統計的に有意な差を示さなかったのに対し他の 3 条件のものは有意差を示した。長期間の実験の結果から、ミドリゾウリムシ細胞内においては、ゾウリムシが餌を摂取している条件で共生藻が増殖し、飢餓条件では増殖しないことが明らかになった。(暗・餌) 条件でも共生藻が増殖したことから、共生藻の増殖には、光条件よりも宿主ゾウリムシの栄養条件の方が重要であることが示された。

短期間の影響

宿主ゾウリムシの栄養条件の変化が共生藻の増殖に与える影響を明らかにするために、短期間での分裂指数 (全共生藻数に対する分裂中のものの割合; Division index) を餌・飢餓それぞれの条件下で計測した (Fig. 17a)。細胞内共生藻数の平均値も合わせて示した。この実験により、飢餓条件では共生藻の分裂が期間を通して殆ど見られないのに対し、餌を与えた条件では 10 時間以後に明瞭な分裂の誘導が見られた。分裂指数は 10 時間から 18 時間までが最も高く、その後低下した。それに合わせて 18 時間以降に細胞内共生藻数も増加した。ゾウリムシ側に着目すると、餌を与える前に分裂中の共生藻を持っているものは全体の 10% に満たないのに対し、10 時間後にはほぼ 100% のゾウリムシが細胞内に分裂中の共生藻を細胞中に持っていた (Fig. 17b)。反対にミ

ドリゾウリムシ細胞自身は、この期間内に殆ど細胞分裂を起こさなかった。この結果は、共生藻を持つ刺胞動物 *Hydra viridis* (green hydra) において共生藻の分裂と共生藻を含む宿主細胞の細胞質分裂が同調しているという報告とは異なる (McAuley 1982)。細胞質の分裂では同調が見られなかったため核の分裂に注目して同様の観察を行ったところ、餌を与えてから 18 時間後にゾウリムシの核分裂の極大が見られた (Fig. 17c)。極大の位相がずれてはいるが、共生藻の分裂と宿主の核分裂（またはそれに至る DNA 合成）は関連して起こっているという可能性が示唆された。

材料と方法の項で述べたように、ゾウリムシの培養液はレタスジュースを含む塩類溶液にバクテリアを植えたものである。共生藻の分裂誘導が、宿主が栄養分を得た結果であるか培養液中に含まれる何らかの因子の影響であるかを確かめるために、ホルマリン固定したバクテリア (10^4 - 10^6 cells/ml まで細胞密度を変えた) を K-DS に懸濁したものとバクテリアを含まないレタスジュース培養液をそれぞれ与える実験を行った。その結果、12 時間後においてはレタスジュースと密度の低いバクテリアでは共生藻の分裂誘導が見られなかったのに対して、 10^5 , 10^6 cells/ml のバクテリアでは 12 時間後に明瞭な共生藻の分裂誘導が見られた (Fig. 12)。この結果から、共生藻の分裂誘導がレタスジュース中の因子が引き起こしたのでは無く、バクテリアそのものを栄養分とした結果である事が示唆された。レタスジュースについては、21-24 時間後にバクテリアを与えた時よりも低い分裂誘導の極大が見られた。

窒素源添加の影響

藻類と無脊椎動物との細胞内共生関係においては、窒素源の欠乏によって共生藻の細胞分裂が抑制されているという報告がある (McAuley 1994)。共生藻の分裂誘導が、餌の消化によるアンモニア排出の影響かどうかを明らかにするために、(光・飢餓) 条件の細胞にアンモニアを添加し 12 時間後における共

生藻の分裂を計測した (Fig. 19)。その結果、アンモニアを添加しても共生藻の分裂は誘導されなかった。ポスターカラーをともに与え食胞を形成させた場合でも、分裂の誘導は見られなかった。更に、過剰のアンモニアの添加 (10 mM) も分裂を誘導せず (12 時間後の分裂指数 0.0123)、外部からの無機窒素源の添加はミドリゾウリムシにおける共生藻の分裂を誘導しない事が示された。

炭素源添加の影響

ミドリゾウリムシ細胞内の共生藻は、光合成産物の maltose を細胞外に放出している事が知られている (Brown and Nielsen 1974)。このため、宿主細胞内の共生藻は窒素源だけでなく炭素源も不足し、それが細胞の分裂を抑制していると指摘されている (Rees 1990, McAuley et al. 1996)。そこで、窒素源添加の実験において C3 化合物である酢酸ナトリウムを同時に添加し、共生藻の分裂を計測した (Fig. 21)。アンモニアの添加に比べて、酢酸ナトリウムの添加では 24 時間まで緩やかな分裂指数の上昇が見られたが、これは酢酸ナトリウムのみでの添加でも観察された。いずれの場合も、餌を与えた時に見られる分裂の誘導よりも低い値を示した。

タンパク質合成阻害剤の影響

感染初期ミドリゾウリムシの細胞では、ゾウリムシに餌を与えると共生藻の分裂が誘導された。しかし green hydra や海産無脊椎動物とは異なり、無機窒素源であるアンモニアの添加も補助的炭素源の添加も共生藻の分裂を餌を与えた時ほどは誘導しなかった。したがってミドリゾウリムシでは、これまで考えられてきたよりも積極的に、宿主が共生藻の分裂を制御していることが考えられた。そこで、一連の feeding-division induction にゾウリムシ、共生藻それぞれの新規タンパク質の合成が必要かどうかを確かめるために、タンパク質合成阻害剤の cycloheximide (cyc) と puromycin (puro) を用い共生藻の分裂に与

える影響を解析した。Ayala and Weis (1987) によって、cyc は共生藻の $^3\text{H-Leu}$ の取り込みを阻害するがゾウリムシによる取り込みは阻害しない事、反対に puro はゾウリムシの $^3\text{H-Leu}$ 取り込みを阻害するが共生藻による取り込みは阻害しない事が明らかにされている。それぞれの薬品を餌と同時、餌を与えて後 2 時間毎に 8 時間まで添加し、添加時間への依存性も同時に調べた。その結果、cyc の添加は餌を与えてから 6 時間後までは高い阻害効果 (80%以上) を示し、その効果は 8 時間後の添加では 30%まで低下した (Table 5)。一方 puro は、餌と同時に与えた時には高い阻害効果 (80%以上) を示したが、2, 4 時間後に投与したのではその効果は半減し、6 時間後には 20%程度まで低下した (Table 6)。各薬剤の相対的な阻害効果とその推移を Fig. 22 に示した。宿主、共生藻それぞれに特異的に作用するとされるタンパク質合成阻害剤は、共生藻の分裂誘導に対して異なる阻害効果を示した。

考 察

長期間の影響

感染初期のミドリゾウリムシは、異なる光や餌の条件下で異なる共生藻の増殖を示した。光・餌ともに十分な条件ではゾウリムシも共生藻もともによく増殖した。ゾウリムシが飢餓条件に置かれると、光の有無にかかわらず共生藻の増殖は低下した。この結果は、共生藻の増殖には共生藻自身に対する光条件よりもゾウリムシの栄養条件の方が支配的な役割を持つ事を示唆した。この推測はまた、暗黒条件下でもゾウリムシの餌があれば共生藻は増殖する事からも支持される。Population size の増大も (光・餌) 条件が最大で、(暗・餌) 条件がそれに続き、ゾウリムシの餌が無い条件では光の有無にかかわらず低かった。共生藻サイズの測定結果から、暗条件下での共生藻の増殖は細胞の成長を伴っ

ておらず、反対に（光・飢餓）条件下では、分裂を伴わない細胞の肥大成長が起こることが明らかになった。ゾウリムシが餌のある条件におかれると共生藻の分裂増殖が誘導され、飢餓条件では誘導されない事が示された。感染初期ミドリゾウリムシの系では、細胞当たり共生藻数が数 10 で通常の緑色細胞に比べて遙かに少なく、細胞質が共生藻によって「飽和した状態」ではない。にもかかわらず（光・飢餓）条件で共生藻が分裂しなかったのは、ゾウリムシによる分裂抑制の結果であると考えられる。（光・飢餓）条件下で細胞内の共生藻数が漸増しているという結果から、この抑制は共生藻が全く分裂できないような阻害的効果ではないことが示唆される。この事は、green hydra において宿主の飢餓処理が緩やかな共生藻の DNA 量増加を伴うという報告とも一致する（McAuley 1986b）。反対に、（暗・餌）条件下での共生藻の増殖が初期の段階では（光・餌）条件と同様の推移を示すこと、共生藻の増加に伴ってそのサイズが小さくなること、（光・餌）条件とは異なり共生藻の増殖が頭打ちを示すことから、この条件下の共生藻は分裂できる限界まで分裂し、その後は細胞内で維持されるということが考えられた。実験結果を総合して、宿主ゾウリムシによって共生藻の増殖が促進・抑制の両方向に制御されているという事が明らかになった。ミドリゾウリムシ細胞は、自身の餌条件に応じて共生藻の分裂を制御することで、安定な共生関係を維持しているのだと推測された。

短期間の分裂誘導

長期間の影響の実験から、ミドリゾウリムシの栄養条件が共生藻の増殖に反映される事が明らかとなった。一方、短期間での分裂指数の推移を計測した結果、ミドリゾウリムシが餌を取り込むという刺激が、10 時間後における共生藻の分裂誘導へとつながった。バクテリアを含まないレタスジュース培養液を与えた場合には、12 時間後ではなく 24 時間後に共生藻の分裂誘導が見られた。レタスジュースにもある程度の栄養分があり、共生藻の分裂が遅れて誘導され

たことが示唆される。12 時間までにミドリゾウリムシの細胞分裂や核分裂は起こっておらず、共生藻の分裂が宿主の細胞分裂そのものに同調しているのではないことが明らかとなった。これは green hydra において共生藻の分裂が宿主細胞の分裂と同調するという McAuley (1985a) の報告とは異なっており、ミドリゾウリムシでは green hydra とは異なった制御機構が働いていることを示している。一方、ゾウリムシの核分裂は餌を与えてから 18 時間後に極大を示しており、宿主 DNA の合成や G2 期におけるシグナルの放出などが、共生藻の分裂誘導と関連している可能性がある。この系における細胞周期間の関連性や相互作用は、今後の研究課題である。感染初期の細胞は緑色細胞に比べ共生藻の増殖が早く、いわば「共生藻の増殖」が強調された系である。共生藻の分裂指数は、餌を与えてから 10 時間後に 0.1 (全体の 10%) 程度にまで達しており、green hydra に比べてもかなり高い同調的な分裂誘導が見られた (McAuley 1985a, b)。これはまた、ミドリゾウリムシの感染初期細胞という系が、共生藻の分裂制御を研究する上で有用な材料であるという事を示している。

窒素源添加の影響

共生藻は細胞外からアンモニア (NH_4^+) を取り込み、グルタミン酸合成酵素-グルタミン合成酵素の働きにより無機窒素をアミノ酸へと同化して利用していると考えられている。(McAuley 1987, 1990, Rees 1990, McAuley et al. 1996)。基本的に独立栄養である植物細胞では、無機窒素源 (アンモニアなど) と炭素源 (二酸化炭素) があれば生存と増殖が可能であると考えられ、利用できる窒素源と炭素源のバランスがこれら植物細胞の成長と増殖を規定していると考えられている。一般に、藻類と無脊椎動物間の細胞内共生においては、共生藻は常に窒素源が不足した環境下におかれており、窒素源の有無が共生藻の成長を規定している (N-limited) と考えられている (Hoegh-Guldberg and

Smith 1989, McAuley 1994)。ミドリゾウリムシの共生でも窒素源が共生藻の増殖を制御しているかどうかを検証した結果、外部からのアンモニア添加は共生藻の分裂を誘導せず、これまで他の系で考えられてきたモデルではミドリゾウリムシの共生藻制御を説明できない事が明らかになった。無機窒素源の添加が共生藻の分裂を誘導しなかったことから、ミドリゾウリムシ内の共生藻の分裂はいわゆる単純な“N-limited”ではなく、未知の別要因が制御しているのだと考えられる。

炭素源添加の影響

ミドリゾウリムシ細胞内の共生藻は、細胞外に光合成産物由来の maltose を多量に放出している (Brown and Nielsen 1974, Weis 1979)。共生藻が光合成産物を細胞外に放出するという性質は藻類-無脊椎動物の共生では共通に見られるものであるが (McAuley 1994)、maltose 放出により宿主細胞中の共生藻では窒素源だけでなく炭素源も不足していると指摘されている (Rees 1990, McAuley et al. 1996)。すなわち、無機窒素を有機物へと変換するには炭素骨格が必要であり、maltose の放出は無機窒素の固定に必要な炭素源の不足につながるというものである。Green hydra の共生藻は酢酸ナトリウムの添加でアンモニアの取り込みが増大するが (McAuley et al. 1996)、ミドリゾウリムシでは炭素源の添加も共生藻の分裂を誘導しなかった。12 時間後の分裂指数は飢餓処理、硝酸アンモニウム添加、硝酸アンモニウム+酢酸ナトリウムの添加という三つの処理をくらべると、いずれの処理も餌を与えたときよりも低い値を示した。炭素源の添加は緩やかな分裂指数の上昇をもたらしたが、これは窒素源無しでも見られた。アンモニアのような無機窒素とは異なり、炭素源（この場合酢酸イオン）は宿主も直接利用できる物質であると考えられる。レタスジュースを与えた時と同様、添加された炭素源が宿主によって利用され、その結果共生藻の分裂が誘導された可能性が考えられる。これらの事実から、ミド

リゾウリムシにおける共生藻の分裂制御は、共生藻にとっての炭素源や窒素源が不足していることに起因する「消極的な抑制」ではなく、宿主がより積極的に共生藻の増殖を制御しているという積極的なものである可能性が示唆された。

タンパク質合成阻害剤の影響

窒素源・炭素源の外部からの添加は、これまで報告されているような共生藻の分裂を誘導しなかった。そこでミドリゾウリムシでは、宿主が更に積極的に共生藻の増殖を制御している事が考えられた。餌を与える事で誘導される共生藻の分裂が新規タンパク質の合成を必要とするかどうか明らかにするために、2種類のタンパク質合成阻害剤 (cyc, puro) を感染初期ミドリゾウリムシに作用させた。Ayala and Weis (1987) によって上記阻害剤の特異的な効果 (cyc=algae, puro=paramecia) が明らかにされている。この特異性を利用して、共生藻の分裂に対するそれぞれの阻害剤の効果を解析した。Cyc の結果から、共生藻の分裂には共生藻自身のタンパク質合成が必要であり、その合成はゾウリムシに餌を与えて6時間後にはまだ完了しておらず8時間後付近で完了する事が考えられた。一方、puro の阻害効果とその時間経過は cyc とは異なり、高い阻害効果は餌と同時に与えた時にしか見られなかった。餌を与えて6時間後に注目すると、共生藻の分裂に必要な共生藻自身のタンパク質合成は完了していないがゾウリムシ側のタンパク質合成は完了に近い。この結果から、共生藻の分裂にはまず宿主のタンパク質合成が必要で、それが完了した後に共生藻のタンパク質合成が起こり、10時間後に共生藻の細胞質分裂が起こる事が示唆された。ここでどの様なタンパク質合成が共生藻の分裂に必要なかは現在のところ明らかではないが、共生藻側では細胞分裂に必要な細胞内繊維系の再構築や分裂装置の形成が考えられる。共生藻の分裂に自身のタンパク質合成が必要なのは本実験の結果からも明らかであるが、この分裂にゾウリムシ側のタンパク質合成が必要である事が今回新たに明らかとなった。ゾウリムシ側で合

成されるタンパク質には、McAuley (1985a, b) が指摘したような共生藻の分裂因子やシグナル物質が考えられる。阻害剤の作用の時間的な変化から推測される制御の流れは次の通りである。ゾウリムシが餌を消化して自身の維持や分裂に必要なタンパク質が合成される一方、共生藻の分裂に必要なまたはそれを促す物質が合成される (Fig. 22)。それを受けて、共生藻が分裂に必要なタンパク質合成を行い細胞分裂を行う。今後は、具体的にどのようなタンパク質が合成され、どのような相互作用（もし存在するならば）を経て最終的な共生藻の分裂が誘導されるのかを明らかにしていくことが必要である。

ミドリゾウリムシによる共生藻の増殖制御

細胞内共生関係において、宿主による共生藻の増殖制御、安定な共生関係を維持する上で欠くことのできない機能であると考えられている (Karakashian 1969, Weis 1969, 1977, Karakashian 1975, McAuley 1981, 1982, 1985a, b, 1986a, b, 1994, Reisser et al. 1983, 1985, Bossert and Dunn 1986, Dunn 1987, McAuley and Darrah 1990, McAuley et al. 1996)。自然条件下での環境変動を考慮に入れると、宿主は共生藻の増殖に対し促進と抑制の制御をする必要がある。熱帯浅海域のような慢性的貧栄養環境下では、共生藻の増殖抑制の必要性は低いと考えられ、そのためにこれらの共生では外部からの栄養源添加が共生藻の増加につながる (Hoegh-Guldberg and Smith 1989, Muscatine et al. 1989, Stambler et al. 1991, McAuley 1994)。一方ミドリゾウリムシでは、環境の栄養条件は大きく変動する事が考えられる。大きく分けて共生藻は独立栄養でありミドリゾウリムシは従属栄養であるため、ある環境の栄養条件は宿主共生藻それぞれにとって必ずしも一致しない。無機栄養分が少なくてもバクテリアなどの微生物が多ければゾウリムシにとっては「富栄養」であり、反対に無機栄養分に富み微生物が少ない環境はゾウリムシには「貧栄養」となる。外部からの窒素源の添加や補助的な有機物の添加が共生

藻の分裂を誘導しなかった事実から、ミドリゾウリムシにとっての「貧栄養」条件では共生藻の分裂が抑制されていると考えられる。(光・飢餓)条件下においても共生藻の増殖を抑制していることの意義は、宿主にとって共生者を統御下に置くことの方が制御を離れて増殖しそれによって得られる利益よりも優先することを示唆している。この点において宿主細胞内の共生藻の増殖は単純な“N-limited”ではなく、ゾウリムシ側の栄養条件が規定していると結論される。

宿主側の「富栄養」条件は、共生藻の増殖促進につながる (McAuley 1985a, Bossert and Dunn 1986, Dunn 1987)。ここでも促進の効果は、宿主の代謝による老廃物の生成と共生藻によるその利用という受動的な促進効果と、宿主が共生藻の分裂に必要な物質やシグナルを与えるという能動的な促進効果が考えられる (Karakashian 1975, McAuley 1994)。(暗・餌)条件下での長期間の培養の結果から、ゾウリムシにとっての栄養分がある条件では共生藻の分裂はその細胞成長に優先する事が明らかになった。これはこの系における能動的な促進効果の存在を示している。また同条件下で共生藻の population size が増大した事から、光合成を行えない共生藻に対して、ゾウリムシから少なくとも細胞の分裂と維持に必要な物質が与えられていることが示唆された。ゾウリムシの細胞が持つ機能として、餌が十分に得られる条件下では、ゾウリムシは共生藻の分裂に必要な物質を合成し、それを受けて共生藻は自身の分裂に必要なタンパク質合成を行い分裂すると推察される。今回明らかになったのは「宿主の摂食」という刺激が「両者のタンパク質合成」を経て「共生藻の細胞分裂」を引き起こすという宿主-共生藻間の制御機構の一端である。今後は両者の細胞周期間の関わり合いや分子生物学的手法を用いた宿主-共生藻間相互作用の実体の解明が必要となるだろう。

総合考察

ミドリゾウリムシとその共生藻は、自然界において安定な共生関係を結んでいる。共生関係が永続するためには、適当な数の共生藻が細胞内に保持されている必要がある。少なすぎれば細胞分裂を経るうちに共生関係が失われる可能性があり、多すぎれば細胞死の原因となる。多くの藻類-無脊椎動物間共生と同様、ミドリゾウリムシでも共生藻の増殖を宿主が制御し、それによって安定な共生関係を維持しているのだと考えられてきたが、その実体は不明であった。本研究では感染初期の細胞と野外由来の白色細胞をモデルとして用い、共生関係の維持機構の解析を試みた。

宿主による共生藻の制御には、大きく分けて質的な制御 (Qualitative control) と量的な制御 (Quantitative control) の二つが考えられる。質的な制御には、共生藻を他と識別し、PV という特殊な小胞に単離して消化過程から守る機能、PV に入った共生藻を宿主細胞質内に均等に分配する機能などが考えられる。一方、量的な制御には、細胞内の共生藻数に応じて増殖を促進抑制する機能等が挙げられる。初期感染系細胞を例にとると、宿主細胞は取り込んだ共生藻を PV へと単離し (質的制御)、その数を増すために分裂を促進し (量的制御)、分裂した共生藻は新たな PV へと単離されて細胞質内に分配される (質的制御)。質的制御と量的制御がこの様に細胞内で関わり合いながら、共生関係は維持されていると考えられる。本研究で明らかになった共生関係の維持機構を、これまで明らかにされたもの、議論されているものと合わせて Fig. 23 に示した。

本研究の結果から、少なくとも一つの遺伝子座が安定な共生関係の維持に関与していることがまず明らかになった。Fig. 23 に示すように、感染初期 Ysa2 で見られた異常は、質的・量的制御の複数の部分に関与している可能性がある。これが複数遺伝子に生じた変異によるものか、それとも一つの統御的遺伝子の

変異によるものかを明らかにすることは、今後の課題である。また第二章の結果から、細胞内の共生藻の増殖は宿主の栄養条件に規定されることが示された。共生藻の増殖制御は促進・抑制の両方向に働いており、特に餌を取り込んだことによる共生藻の分裂促進効果は、窒素源や炭素源の不足に由来する受動的な促進ではなく、宿主側の新規タンパク質合成を必要とする能動的なものである。ここで、感染初期のように共生藻数が少ない場合と緑色細胞のように細胞質が「飽和した」状態とでは共生藻の分裂速度・頻度が異なるが、これが限られた成長因子を分け合った結果であるのか、それとも宿主が細胞内の共生藻数を把握してそれに応じた分裂誘導を行っているかは現在のところ不明である。飢餓条件における共生藻の増殖抑制についても宿主側の作用の実体は不明であり、今後明らかにしていく必要がある。いずれにせよ、Ysa2 での結果と同様、第三章の結果も共生藻の制御に宿主細胞の働きが必要であることを示した。ミドリゾウリムシにおける共生藻の制御は、宿主が積極的に関与する強い制御機構であると結論された。

細胞内共生の維持機構は、様々な反応が重なり合った複合的な機能であると考えられる (Fig. 23)。本研究で明らかになった制御機構の一端が、それぞれどのような関連を持っているかは現在のところ不明である。しかし、これまで焦点が当てられなかった遺伝学的な解析の可能性を示したこと、餌の取り込みという「刺激の受容」が「共生藻の分裂誘導」へとつながる反応系を明らかにしたことは、共生関係の解析を進める上での新たな端緒であると考えられる。今回明らかとなった結果を基礎として、今後は更に詳細な共生関係維持機構の解明が望まれる。

謝辞

本研究を行うに当たり、東北大学の渡辺彊教授からは実験方法から結果の解析まで実に様々なご助言、ご指導を頂いた。ここに深くお礼の言葉を述べたい。宮城教育大学の荒木多賀子さん、見上一幸教授からは、実験に用いた Ysa2 株を頂いた。この様な貴重な材料を快く提供して下さいましたお二方に、感謝の言葉を述べたい。また、茨城大学の三輪五十二教授からは、人為的に得られたミドリゾウリムシの白色株をはじめ多くの株を頂き、東北大学の川崎智之さんには電子顕微鏡観察において多大なご協力を頂いた。こちらもあらためてお礼を申し上げる次第である。

要旨

ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は細胞内に多数の共生藻を持ち、両者の関係は細胞分裂や有性生殖を経ても保たれる安定で永続的なものである。1997年に野外から共生藻を持たない白色のミドリゾウリムシ細胞 (Ysa2) が採集された。共生関係が安定であることから、この細胞は共生藻を維持する機能に変異が生じ、結果として白色細胞になったのではないかと考えられた。この可能性を検証するために外部から単離共生藻を与える感染実験を行ったところ、Ysa2 は共生藻を細胞内に保持できるが、共生関係を安定して維持することができず、細胞内での凝集塊の形成や分裂時の不均等分配などにより共生藻を持った細胞から白色細胞が生じるという形質を示した。Ysa2 細胞はまた、感染時における共生藻の過剰な増殖等、共生関係の維持に関する特徴を示した。Ysa2 が示したこれらの形質が、遺伝子に支配されたものかどうかを明らかにするために、他のミドリゾウリムシ細胞とかけ合わせて子孫を得る遺伝学的な解析を行った。その結果、緑色細胞と Ysa2 とのかけ合わせで生じた緑色 F1 細胞では、感染 Ysa2 細胞で観察された凝集塊などは観察されず全て正常な緑色細胞であった。また白色 F1 細胞を用いて感染実験を行ったところ、全ての子孫細胞が正常に共生関係を確立した。Ysa2 が表した形質が F1 では表れなかったため、F1 同士をかけ合わせて F2 を得、その表す形質を追跡した。緑色 F1 細胞同士のかけ合わせの結果、多くの F2 細胞は F1 と同様正常な緑色細胞であった。しかし緑色 F2 細胞の一部には、培養の過程で白色細胞を生じる株が存在した。ここで生じた白色 F2 細胞を単離培養して感染実験を行ったところ、人為的に緑色細胞から得られた白色細胞や白色 F1 細胞に比べ共生藻を保持する能力が低いという傾向を示した。中でも全く共生関係を確立しない株 (9-3w 株) について更に詳しく感染過程を追跡したところ、細胞内に取り込まれた共生藻が短時間のうちに死亡し消化されていることが明らかになった。白色細胞

を生じた緑色 F2 細胞では、長期間にわたって共生藻は維持されていたが、共生藻の凝集塊形成や細胞質内での不均等な分散が観察された。またこれらの細胞の分裂時には、共生藻の不均等な分配による白色細胞の生成が起こることが示された。白色細胞を生じた F2 細胞で見られたこれらの現象は、Ysa2 細胞が示した形質と共通のものであった。実験結果を総合して、Ysa2 細胞は共生藻の維持機構に異常を持つ自然突然変異であると結論された。

共生関係を安定に維持するためには、宿主による共生藻の増殖制御が必要であるとこれまでに議論されてきている。共生関係の維持機能に変異を持つ Ysa2 の存在も、この考えを支持している。しかしミドリゾウリムシの細胞内共生においては、どのように共生藻の増殖制御が成されているかこれまで明らかにされていなかった。そこで、宿主内での共生藻の増殖に着目し、感染初期のミドリゾウリムシの細胞を用いる事によって、どのような因子が共生藻の増殖に影響を与えるかを解析した。その結果、光の有無にかかわらずゾウリムシが飢餓条件に置かれると共生藻の増殖は低く、反対にゾウリムシに餌を与えると光が無くても共生藻は増殖することが明らかになった。短期間での動態の観察から、飢餓状態に置かれたゾウリムシに餌を与えてから 10 時間後に細胞内で共生藻の分裂が誘導されていることが明らかになった。この分裂誘導は窒素源や炭素源の不足に由来する受動的なものではなく、ゾウリムシ側のタンパク質合成を必要とする能動的なものであることが示唆された。タンパク質の合成という宿主細胞の働きが必要であるというこれらの実験結果から、ミドリゾウリムシにおける共生関係の維持は宿主が共生藻の分裂を積極的に制御する強い制御機構であると結論された。

参考文献

Allen R. D. and Fok A. K, 1983: Nonlysosomal vesicles (acidsomes) are involved in phagosome acidification in *Paramecium*. J. Cell Biol. 97, 566-570

Ayala A. and Weis D. S. 1987: The effect of puromycin and cycloheximide on the infection of algae-free *Paramecium bursaria* by symbiotic *Chlorellae*. J. Protozool. 34(4), 377-381

Bomford R. 1965: Infection of alga-free *Paramecium bursaria* with strains of *Chlorella*, *Scenedesmus* and a yeast. J. Protozool. 12, 221-224

Bossert P. and Dunn K. W. 1986: Regulation of intracellular algae by various strains of the symbiotic *Hydra Viridissima*. J. Cell Sci. 85, 187-195

Brown J. A. and Nielsen P. J. 1974: Transfer of photosynthetically produced carbohydrate from endosymbiotic chlorellae to *Paramecium bursaria*. J. Protozool. 21(4), 569-570

Busch G. R. and Satir B. H. 1989: The secretory vesicle in living *Paramecium* is acidic. J. Cell Sci. 92, 197-203

Dryl S. 1959: Antigenic transformation in *Paramecium aurelia* after homologous antiserum treatment during autogamy and conjugation. J. Protozool. 6 (suppl.), 25

Dunn K. 1987: Growth of endosymbiotic algae in the green hydra, *Hydra viridissima*. J. Cell Sci. 88, 571-578

Goertz H.-D. 1982: Infections of *Paramecium bursaria* with bacteria and yeasts. J. Cell Sci. 58, 445-453

Hiwatashi K. 1968 Determination and inheritance of mating type in *Paramecium caudatum*. Genetics 58, 373-386

Hoegh-Guldberg O. and Smith G. J. 1989: Influence of the population density of zooxanthellae and supply of ammonium on the biomass and metabolic characteristics of the reef corals *Seriatopora hystrix* and *Stylophora pistillata*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 57, 173-186

Hosoya H., Kimura K. Matsuda S., Kitaura M., Takahashi T. and Kosaka T. 1995: Symbiotic algae-free strains of the green paramecium *Paramecium bursaria* produced by herbicide paraquat. Zool. Sci. 12(6), 807-810

Karakashian M. W. 1975: Symbiosis in *Paramecium bursaria*. Symp. Soc. Exptl. Biol. 29, 145-173

Karakashian M. W. and Karakashian S. J. 1964: The inheritance of susceptibility to free-living algal infection in aposymbiotic *Paramecium bursaria*. J. Protozool. 11(suppl.), 19

Karakashian M. W. and Karakashian S. J. 1973: Intracellular digestion and symbiosis in *Paramecium bursaria*. Exp. Cell Res. 81, 111-119

Karakashian S. J. 1963: Growth of *Paramecium bursaria* as influenced by the presence of algal symbionts. Physiol. Zool. 36, 52-68

Karakashian S. J., Karakashian M. W. and Rudzinska M. A. 1968: Electron microscopic observations on the symbiosis of *Paramecium bursaria* and its intracellular algae. J. Protozool. 15(1), 113-128

Karakashian S. J. and Rudzinska, M. A. 1981: Inhibition of lysosomal fusion with symbiont-containing vacuoles in *Paramecium bursaria*. Exp. Cell Res. 131, 387-393

McAuley P. J. 1981: Control of cell division of the intracellular *Chlorella* symbionts in green hydra. J. Cell Sci. 47, 197-206

McAuley P. J. 1982: Temporal relationships of host cell and algal mitosis in the green hydra symbiosis. J. Cell Sci. 58, 423-431

McAuley P. J. 1985a: The cell cycle of symbiotic *Chlorella*. I. The relationship between host feeding and algal cell growth and division. J. Cell Sci. 77, 225-239

McAuley P. J. 1985b: The cell cycle of symbiotic *Chlorella*. II. The effect of continuous darkness. J. Cell. Sci. 77, 241-253

McAuley P. J. 1986a: The cell cycle of symbiotic *Chlorella*. III. Numbers of algae in green hydra digestive cells are regulated at digestive cell division. J. Cell. Sci. 85, 63-71

McAuley P. J. 1986b: The cell cycle of symbiotic *Chlorella*. IV. DNA content of algae slowly increases during host starvation of green hydra. J. Cell. Sci. 85, 73-84

McAuley P. J. 1987: Quantitative estimation of movement of an amino acid from host to *Chlorella* symbionts in green hydra. Biol. Bull. 173, 504-512

McAuley P. J. 1990: Uptake of ammonium by green hydra. Proc. R. Soc. Lond. B 242, 45-50

McAuley P. J. 1994: Interactions between hosts and symbionts in algal invertebrate intracellular symbioses. Bot. J. Scotl. 47(1), 97-112

McAuley P. J. and Darrah P. R. 1990: Regulation of numbers of symbiotic *Chlorella* by density-dependent division. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 329, 55-63

McAuley P. J., Darling M. and Hodge H. 1996: Effect of maltose release on uptake and assimilation of ammonium by symbiotic *Chlorella* (chlorophyta). J. Phycol. 32, 839-846

Meier R., Lefort-Tran M., Pouphe M., Reisser W. and Wiessner W. 1984: Comparative freeze-fracture study of perialgal vacuoles in *Paramecium bursaria*. J. Cell Sci. 71, 121-140

Meier R. and Wiessner W. 1988: Infection of algae-free *Paramecium bursaria* with symbiotic *Chlorella* sp. isolated from green paramecia. I. Effect of the incubation period. Europ. J. Protistol. 24, 69-74

Meier R. and Wiessner W. 1989: Infection of algae-free *Paramecium bursaria* with symbiotic *Chlorella* sp. isolated from green paramecia. II. A timed study. J. Cell Sci. 93, 571-579

Meints R. H. and Pardy R. L. 1980: Quantitative demonstration of cell surface involvement in a plant-animal symbiosis: lectin inhibition of reassociation. J. Cell Sci. 43, 239-251

Muscatine L. and Lenhoff H. M. 1963: Symbiosis: on the role of algae symbiotic with hydra. Science 142, 956-958

Muscatine L., Falkowski P. G., Dubinsky Z., Cook P. A. and McCloskey L. R. 1989: The effect of external nutrient resources on the population dynamics of zooxanthellae in a reef coral. Proc. R. Soc. Lond. B 236, 311-324

Pringsheim E. G. 1928: Physiologische Untersuchungen an *Paramecium*

bursaria. Ein Beitrag zur Symbioseforschung (German). Arch. Protist. 64, 289-418

Rahat M. 1985: Competition between *Chlorella* in chimeric infections of *Hydra viridis*: the evolution of a stable symbiosis. J. Cell Sci. 77, 87-92

Rahat M. and Reich V. 1984: Intracellular infection of aposymbiotic *Hydra viridis* by a foreign free-living *Chlorella* sp.: initiation of a stable symbiosis. J Cell Sci. 65, 265-277

Rahat M. and Reich V. 1985: Correlations between characteristics of some free-living *Chlorella* sp. and their ability to form stable symbioses with *Hydra viridis*. J. Cell Sci. 74, 257-266

Rands M. L., Douglas A. E., Loughman B. C. and Hawes C. R. 1992: The pH of the perisymbiont space in the green hydra-*Chlorella* symbiosis. An immunocytochemical investigation. Protoplasma 170, 90-93

Rees T. A. V. 1990: The green hydra symbiosis and ammonium IV. Methylammonium uptake by freshly isolated symbionts and cultured algae; evidence for low-ammonium concentration in the perialgal space. Proc. R. Soc. Lond. B 242, 255-259

Reisser W. 1980: The metabolic interactions between *Paramecium bursaria* Ehrbg. and *Chlorella* spec. in the *Paramecium bursaria*-symbiosis. III. The influence of different CO₂-concentrations and of glucose on the

photosynthetic and respiratory capacity of the symbiotic unit. Arch. Microbiol. 125, 291-293

Reisser W. 1981: Host-symbiont interaction in *Paramecium bursaria*: physiological and morphological features and their evolutionary significance. Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd. 94, 557-563

Reisser W., Meier R. and Kurmeier B. 1983: The regulation of the endosymbiotic algal population size in ciliate-algae associations. An ecological model. Endocytobiology. vol. II, Walter de Gruyter & Co., Berlin/New York. 533-543

Reynolds E. S. 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-211

Siegel R. W. 1960: Hereditary endosymbiosis in *Paramecium bursaria*. Exp. Cell Res. 19, 239-252

Siegel R. and Larison L. 1960: The genic control of mating type in *Paramecium bursaria*. Proc. Nat. Acad. Sci. 46, 344-349

Sonneborn T. M. 1950: Methods in the general biology and genetics of *Paramecium bursaria*. J. Exp. Zool. 113(1), 87-148

Spurr A. R. 1969: A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26, 31-43

Stambler N., Popper N., Dubinsky Z. and Stimson J. 1991: Effects of nutrient enrichment and water motion on the coral *Pocillopora damicornis*. Pacific Science 45, 299-307

Takeda H. 1995: Cell wall composition and taxonomy of symbiotic *Chlorella* from *Paramecium* and *Acanthocystis*. Phytochemistry 40(2), 457-459

Takeda H., Sekiguchi T. Nunosawa S. and Usuki I. 1998: Species-specificity of *Chlorella* for establishment of symbiotic association with *Paramecium bursaria*- Does infectivity depend upon sugar components of cell wall? Europ. J. Protistol. 34, 133-137

Tanaka M. and Miwa I. 1996: Significance of photosynthetic products of symbiotic *Chlorella* to establish the endosymbiosis and to express the mating reactivity rhythm in *Paramecium bursaria*. Zool. Sci. 13, 685-692

Tonooka Y. and Watanabe T. 2002: Natural strain of *Paramecium bursaria* lacking symbiotic algae. Europ. J. Protistol. in press

Wang J. T. and Douglas A. E. 1999: Essential amino acid synthesis and nitrogen recycling in an alga-invertebrate symbiosis. Marine Biology 135, 219-222

Weis D. S. 1969: Regulation of host and symbiont population size in

Paramecium bursaria. Experimentia 25(6), 664-666

Weis. D. S. 1974: Sparing effect of light on bacterial consumption of *Paramecium bursaria*. Trans. Amer. Micros. Soc. 93(1), 135-140

Weis D. S. 1977: Synchronous development of symbiotic chlorellae within *Paramecium bursaria*. Trans. Amer. Micros. Soc. 96(1), 82-86

Weis D. S. 1978: Correlation of infectivity and concanavalin A agglutinability of algae exsymbiotic from *Paramecium bursaria*. J. Protozool. 25(3), 366-370

Weis D. S. 1979: Correlation of sugar release and concanavalin A agglutinability with infectivity of symbiotic algae from *Paramecium bursaria* for aposymbiotic *P. bursaria*. J. Protozool. 26(1), 117-119

Weis D. S. 1980: Hypothesis: free maltose and algal cell surface sugars are signals in the infection of *Paramecium bursaria* by algae. In "Endocytobiology: endosymbiosis and cell biology" Vol. I. Walter de Gruyter&Co. Berlin/New York. 105-112

Weis D. S. and Ayala A. 1979: Effect of exposure period and algal concentration on the frequency of infection of aposymbiotic ciliate by symbiotic algae from *Paramecium bursaria*. J. Protozool. 26(2), 245-248

Wichterman R. 1948: The biological effects of X-rays on mating types and

conjugation of *Paramecium bursaria*. Biol. Bull. 94, 113-127

Yanagi A. 1992: Behavior and DNA synthesis of the nuclei produced after meiosis in *Paramecium caudatum*. Europ. J. Protistol. 28, 37-42

Table 1 F1 progenies of Ysa2.

	No. of clones	survivors	NR progenies*	green F1	white F1**	normal	cluster	white+***
Ysa2*T316								
#1	96	4	4	4	0	4	0	0
#2	96	2	0	0	0	0	0	0
#3	96	5	5	0	5	5	0	0
#4	96	9	0	0	0	0	0	0
#5	96	26	9	5	4	9	0	0
total	480	46	18	9	9	18	0	0
Ysa2*KM2								
#1	96	30	29	16	13	29	0	0
#2	96	4	4	3	1	4	0	0
#3	96	8	3	3	0	3	0	0
total	288	42	36	22	14	36	0	0
F1 total	768	88	54	31	23	54	0	0

*New macronuclear reproduction. New macronucleus was yielded successfully after conjugation and progenies showed immaturity at MR test (see text).

**All white F1 re-establish normal symbioses when they ingest symbiotic algae isolated from green paramecia.

***Green progenies that produce aposymbiotic cells.

Table 2 B1 progenies of Ysa2.

	No. of clones	survivors	NR progenies	green B1.	white B1	normal	cluster	white+
(Ysa2*T316)1-4*Ysa2								
#1	96	6	0	0	0	0	0	0
#2	96	3	0	0	0	0	0	0
#3	96	3	0	0	0	0	0	0
#4	96	3	2	0	2	2	0	0
#5	96	8	7	7	0	6	0	1
#6	96	4	0	0	0	0	0	0
#7	96	0	0	0	0	0	0	0
#8	96	5	0	0	0	0	0	0
#9	96	9	0	0	0	0	0	0
#10	96	2	2	2	0	0	0	2
#11	96	6	5	5	0	5	0	0
#12	96	8	6	4	2	5	0	1
#13	96	9	0	0	0	0	0	0
total	1248	66	22	18	4	18	0	4

Table 3 F2 progenies of Ysa2 - cross of green F1.

	No. of clones	survivors	NR progenies	green F2	white F2	normal	cluster	white+
(Ysa2*KM2)1-4*1-11								
#1	96	9	9	9	0	9	0	0
#2	96	9	9	9	0	9	0	0
#3	96	12	5	5	0	4	0	1
#4	96	12	12	12	0	11	0	1
#5	96	4	2	2	0	2	0	0
#6	96	20	12	12	0	10	0	2
#7	96	9	8	8	0	8	0	0
#8	96	2	1	1	0	1	0	0
#9	96	12	10	10	0	7	0	3
#10	96	20	6	6	0	6	0	0
#11	96	6	2	2	0	2	0	0
#12	96	5	4	4	0	3	0	1
#13	96	9	9	9	0	9	0	0
#14	96	16	15	15	0	13	1	1
total	1344	145	104	104	0	94	1	9

Table 4 Diameter and cell volume of algae (means \pm 1SEM, n=25) in paramecia under different culture conditions.

	condition	diameter (μm)	volume (μm^3)
0 day		9.30 \pm 0.54	502 \pm 84.6
5 days	light, fed	9.20 \pm 0.40	465 \pm 71.4
	light, starved	11.0 \pm 0.53*	826 \pm 136*
	dark, fed	6.40 \pm 0.28*	156 \pm 20.2*
	dark, starved	6.72 \pm 0.28*	177 \pm 20.5*

*:significantly different from 0 day (t test, P<0.01)

Table 5 Effect of cycloheximide (cyc: 100 µg/ml) on algal division 10 hours after feeding of paramecia.

	Addition time*	10h-Division index**	% of control
Control (no cyc)	-	0.117 ± 0.0055	100
Addition of cyc after feeding	0 hour***	0.00338 ± 0.00338	2.89
	2h	0.00229 ± 0.00229	1.96
	4h	0	0
	6h	0.0177 ± 0.00235	15.1
	8h	0.0779 ± 0.0083	66.6

*Addition time of reagent hours after feeding

**Mean division indices ± 1 SEM (n=3).

***cyc and culture medium were added to paramecia at the same time.

Table 6 Effect of puromycin (puro: 500 µg/ml) on algal division 10 hours after feeding of paramecia.

	Addition time	10h-division index*	% of control
Control (no puro)	-	0.0883 ± 0.00829	100
Addition of puro after feeding	0 hour	0.0156 ± 0.00202	17.7
	2h	0.0473 ± 0.0272	53.6
	4h	0.0460 ± 0.0228	52.1
	6h	0.0726 ± 0.0121	82.2
	8h	0.0679 ± 0.0157	76.9

*Mean division indices ± 1 SEM (n=3).

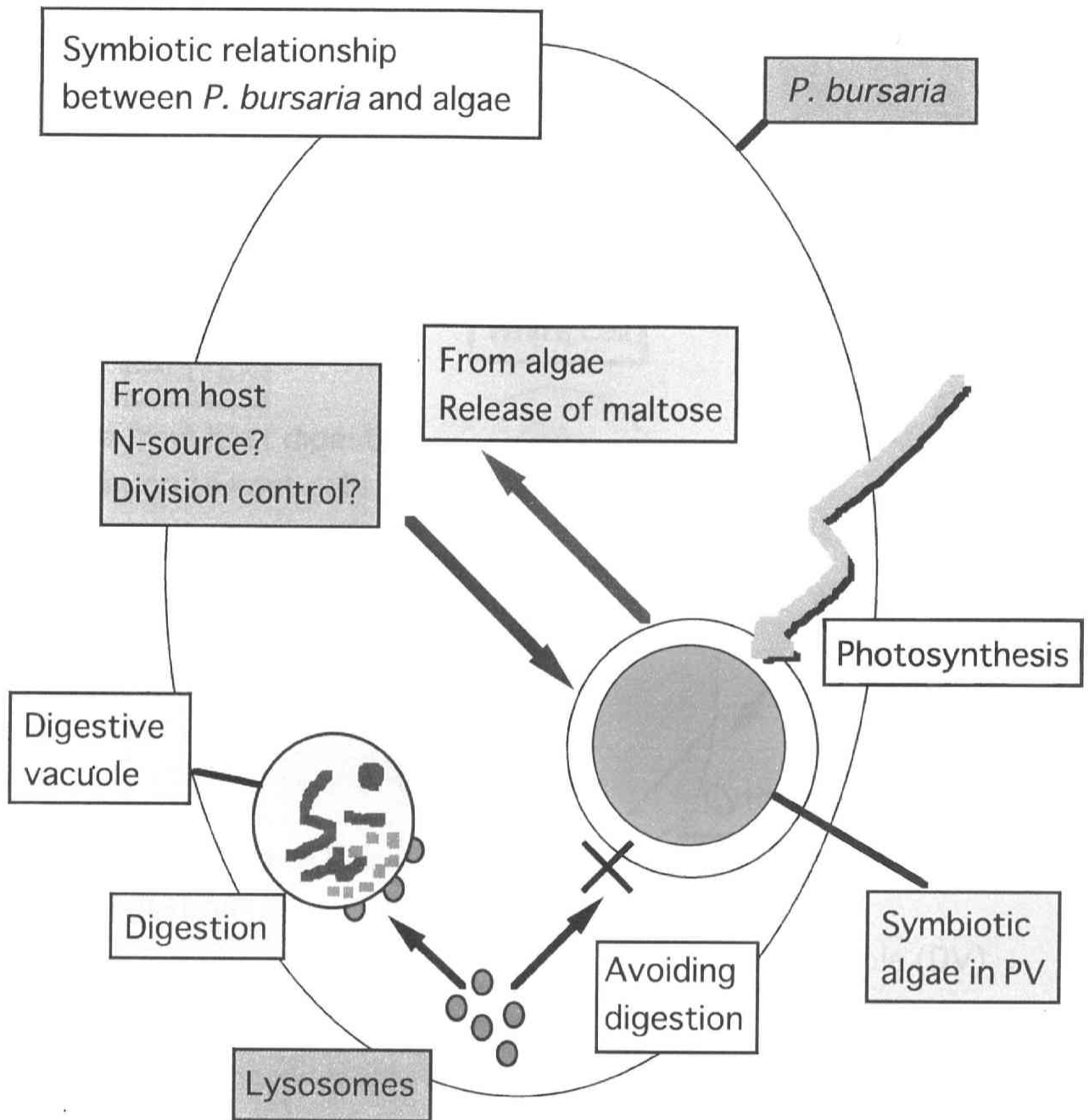


Fig. 1 a Symbiotic relationship between *Paramecium bursaria* and its symbiotic algae. Each algae is enclosed by perialgal vacuole (PV) in host cell. Algae in PV avoid lysosomal fusion and host digestion, while materials in digestive vacuole (DV) are digested by fusion of lysosomes. Algae release photosynthetically produced maltose to host paramecia. It is discussed that N-source is given to algae and algal population is controlled by host paramecia, which substances are still unknown.

Re-establishment of symbiotic relationship (Infection process)

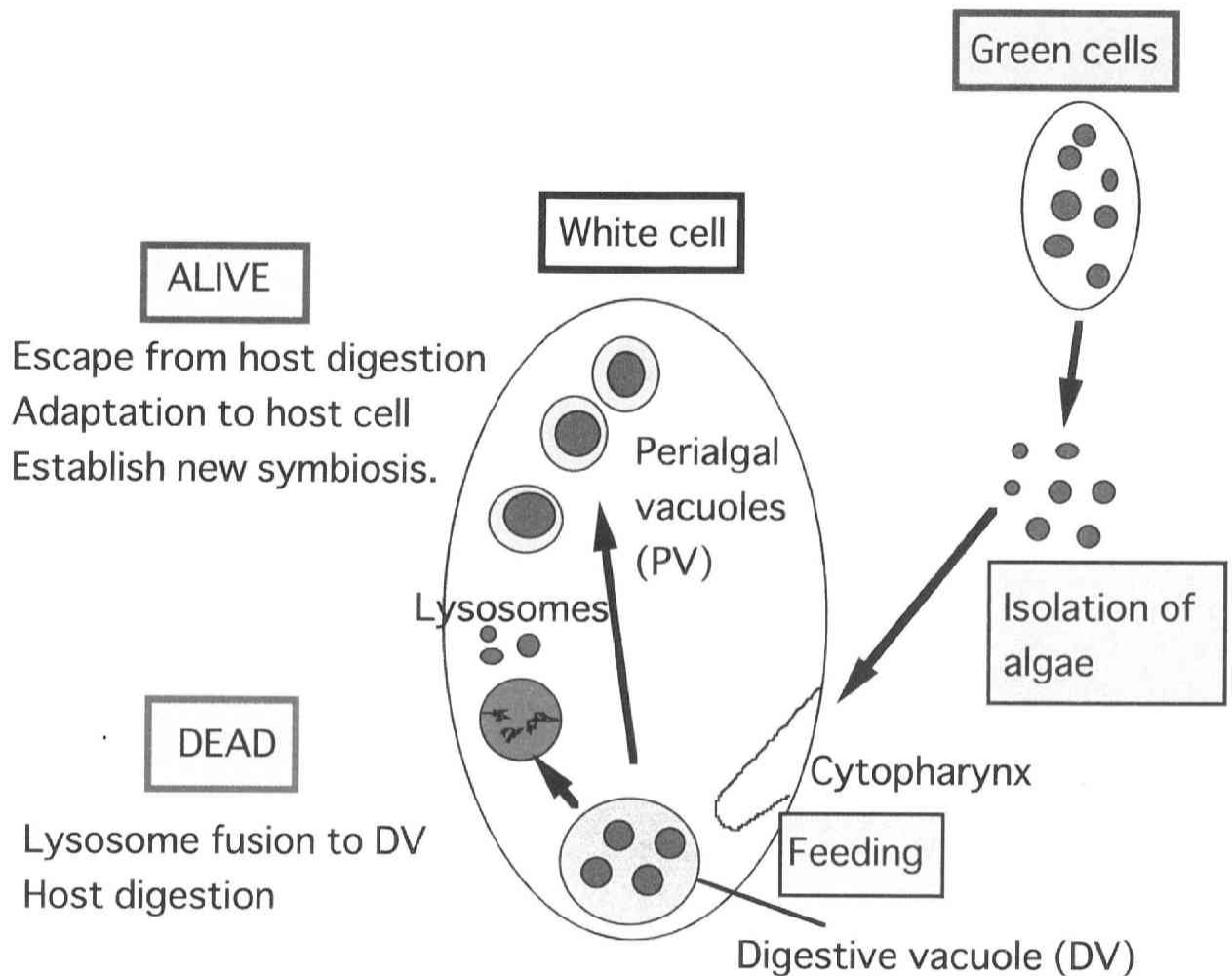


Fig. 1b Re-establishment of symbiotic relationship of *P. bursaria*. When potential symbiotic algae are ingested into digestive vacuole (DV) of paramecia, many of them are digested by normal digestion process. However, some algae isolated into new vacuoles (PV) escape from digestion process. Algae in PV are never digested by host, increase in number, and then the new symbiotic relationship are re-established.

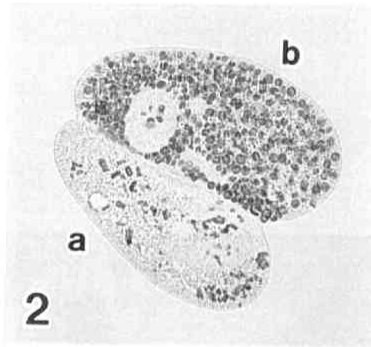


Fig. 2 Strain Ysa2 (a), a natural aposymbiotic cell of *Paramecium bursaria*. It mates with a normal green cell (strain Gr3, b). Magnification: x200.

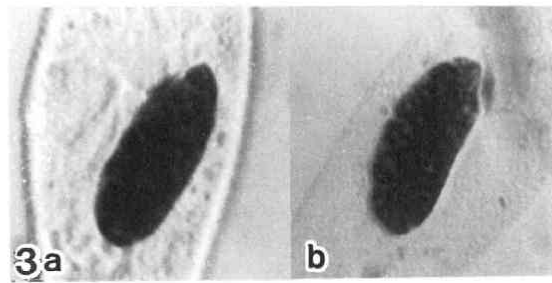


Fig. 3 Nuclear staining of an artificially obtained aposymbiotic cell of *P. bursaria* (a, Sj2w) and a natural aposymbiotic cell (b, Ysa2). One macronucleus and one spindle-shaped micronucleus are seen in both. Magnification: x320

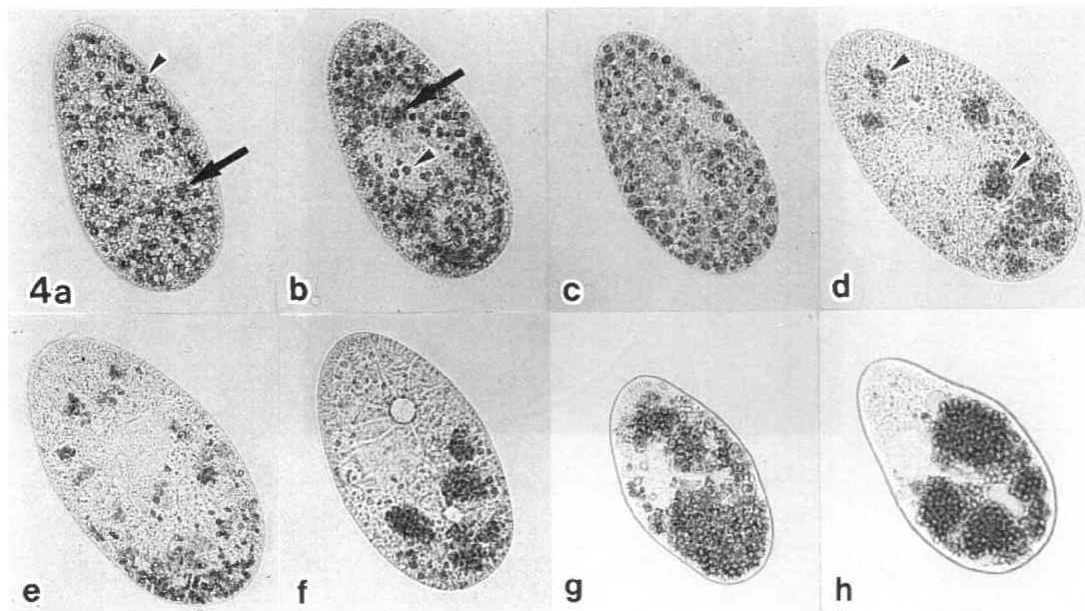


Fig. 4 Microscopic observations of infected Sj2w and Ysa2. (a, b) Cells just after exposure to algae. There is little difference between Sj2w (a) and Ysa2 (b). Single algae probably isolated into perialgal vacuoles (arrowheads) and algae in DV (arrows) are seen in both. (c, d) Micrographs of paramecia four days after infection. Algae in Sj2w are dispersed in the cytoplasm (c), while there are clusters of algae in infected Ysa2 (d, arrowheads). (e-h) Various kinds of clusters in infected Ysa2. The number of clusters and algae contained in a cluster differ from cell to cell. Each figure shows small-sized (e), middle-sized (f), and large-sized clusters (h). Unequal distribution of algal cluster occurred in a cell with large clusters (h). Magnification: x200.

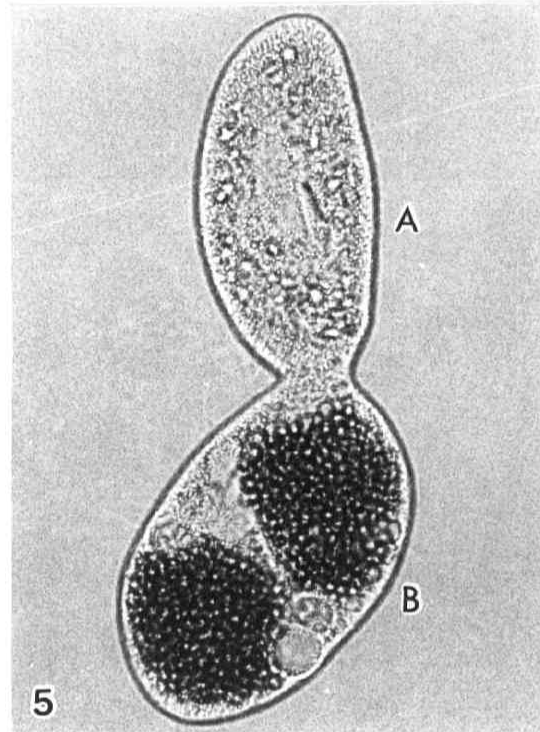


Fig. 5 Unequal distribution of symbiotic algae at the time point of cell division in infected Ysa2. The cell division would produce a cell that retains whole clusters (posterior, B) and a white cell that has no algae (anterior, A). Magnification: x340.

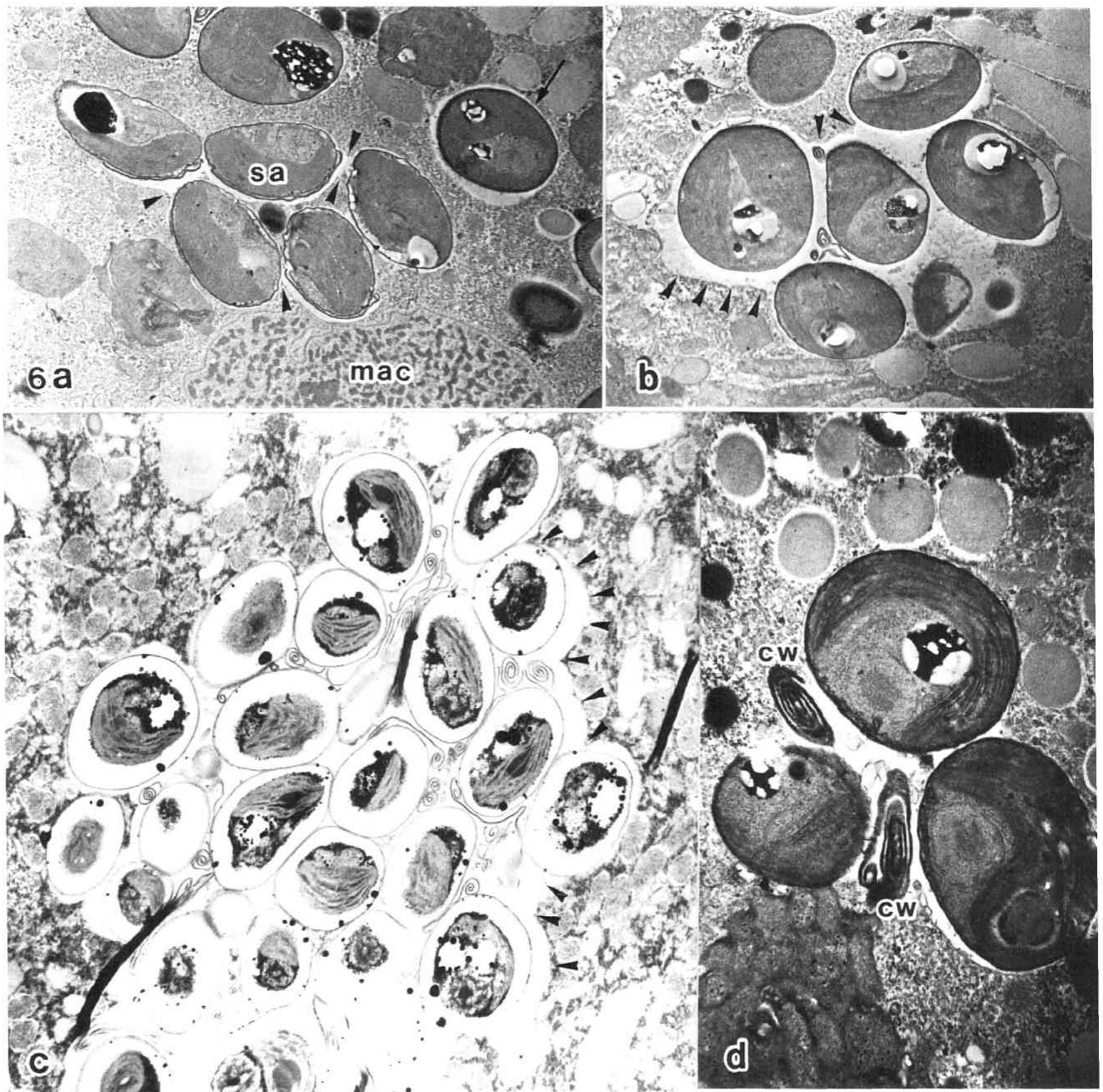


Fig. 6 Electron micrographs of clusters of algae in infected Ysa2 cells. (a) Some perialgal vacuoles (PV) are partially fused. The membranes of these PV are partially continuous (arrowheads). One PV which membrane does not fuse with other PV is seen (arrow). (b) A cluster containing six or seven algae with continuous membrane. (c) A large cluster. Many algae are involved in the cluster. The membrane of the cluster is continuous. (d) Fragments of algal cell wall in a cluster (cw). sa: symbiotic algae, mac: macronucleus of host. Magnification: a x6800, b x6300, c x7300, d x12200.

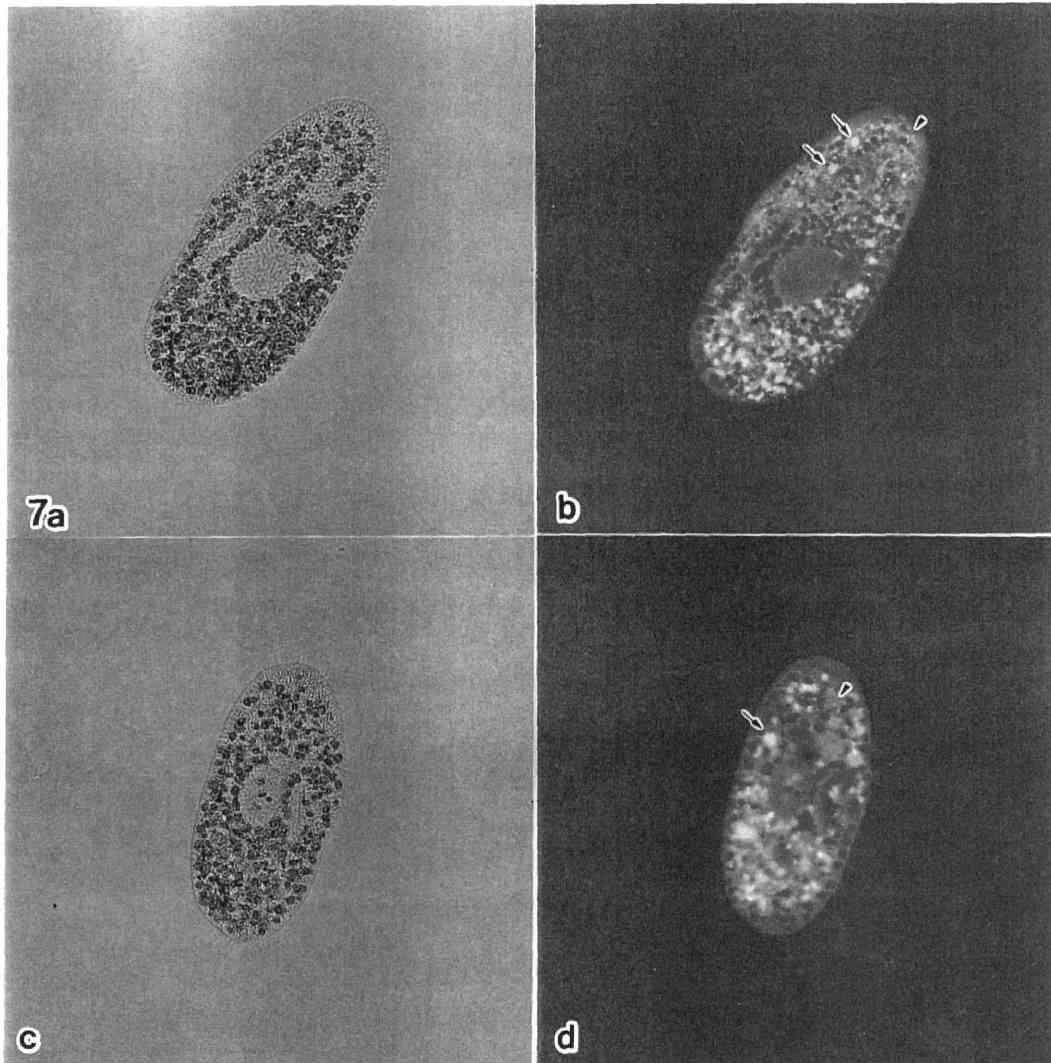


Fig. 7 Acridine orange (AO) stain of normal green paramecia (Gr3). (a): Bright-field, stationary phase. (b): Fluorescence, stationary phase. (c): Bright-field, log phase. (d): Fluorescence, log phase. Digestive vacuoles (arrows) and some smaller vesicles or granules (arrowheads) are stained by AO, but perialgal vacuoles are not stained in both phases. Magnification: x200

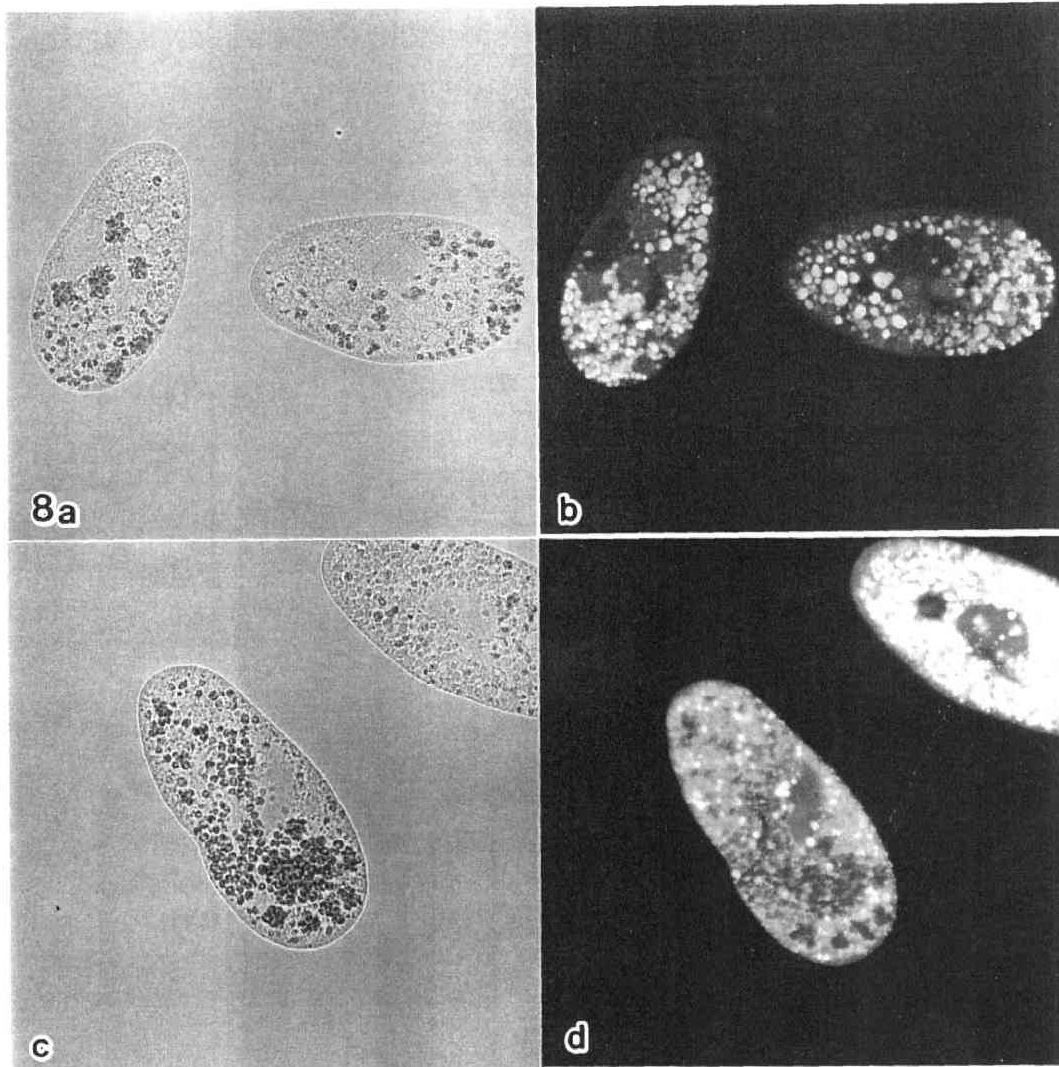


Fig. 8 AO stain of infected Ysa2 with Gr3 algae. (a, b): stationary phase. (c, d): Log phase. Clusters are not stained by AO in stationary phase. There are many vacuoles stained by AO and perialgal vacuoles are slightly stained in log phase. Magnification: x200

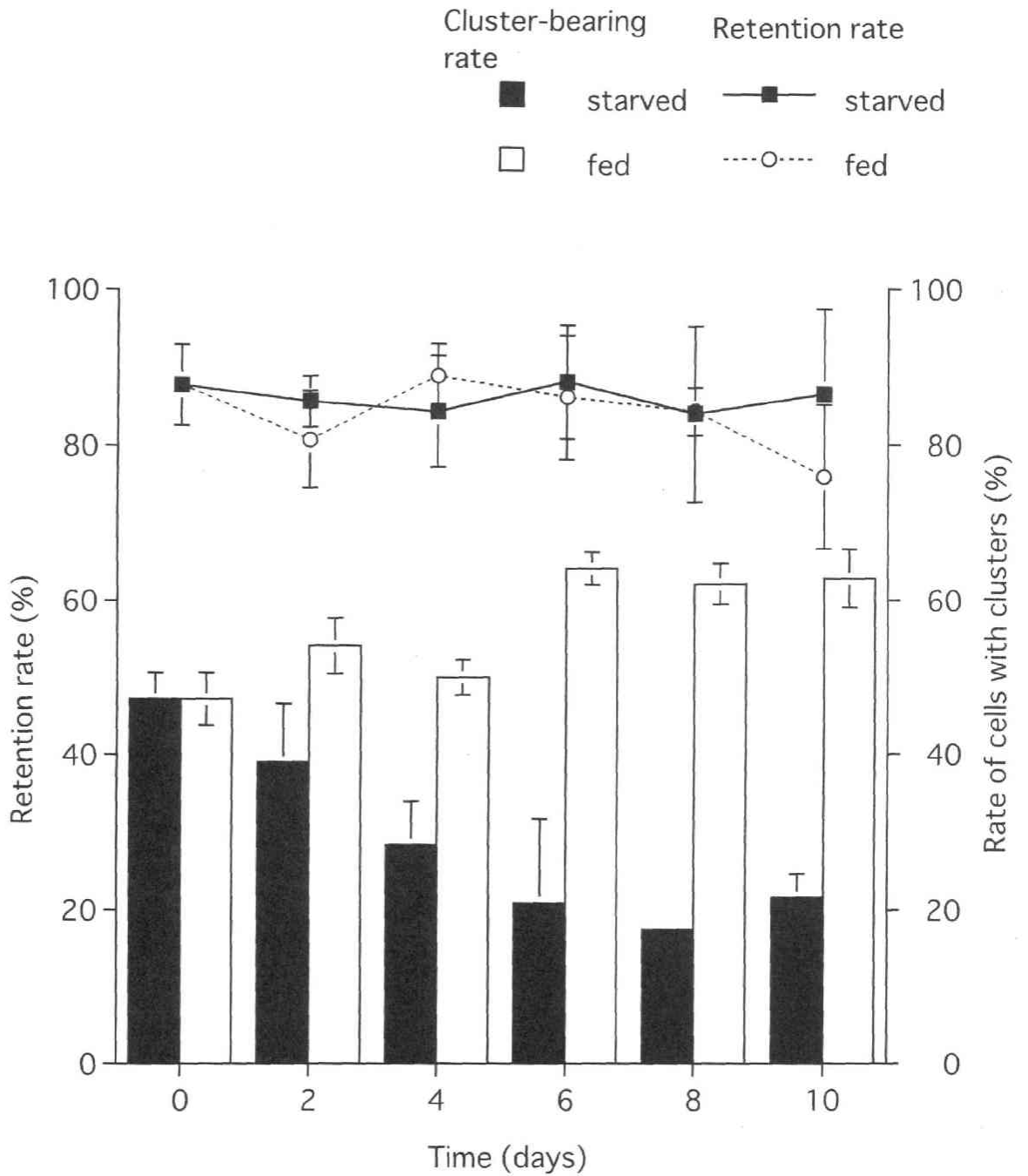


Fig. 9 Temporal changes of retention rate and rate of cells that have cluster during starvation. Lines(left): Retention rate. Filled square; starved, open circle; fed. Columns(right): Rate of cluster-bearing cells in cells retaining algae. Black columns; starved, white columns; fed. Rate of cluster-bearing cells decreased during starvation while retention rates show no significant difference. Error bars show standard error of mean (for all graphs).

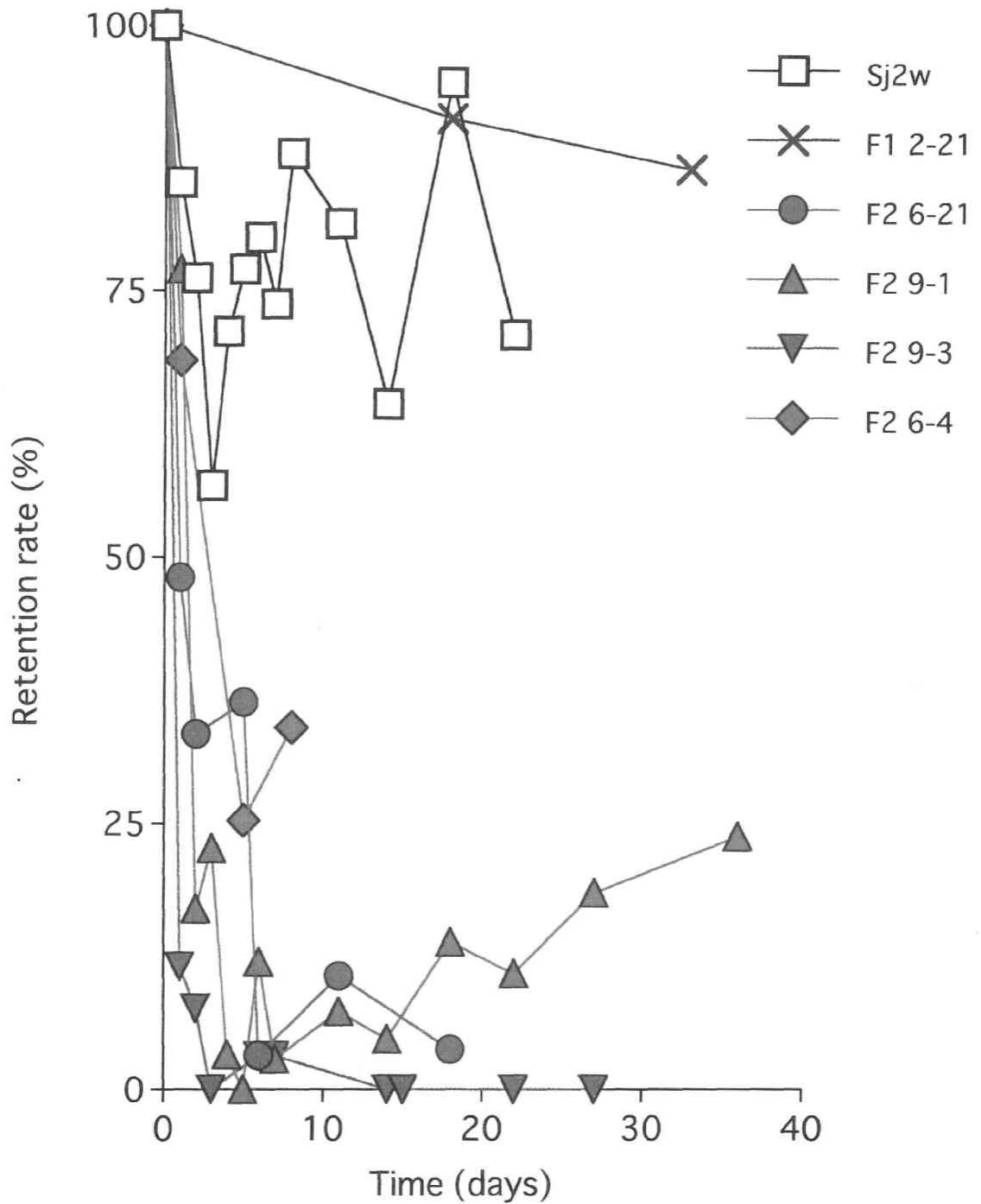


Fig. 10 Infection of white F1 and F2 progenies of Ysa2. Sj2w was used for control (empty square). Retention rates of white F2 progenies (red symbols) decreased during culture, while white F1 progeny (blue) showed high retention rates. Algae used in infection were delivered from Gr3.

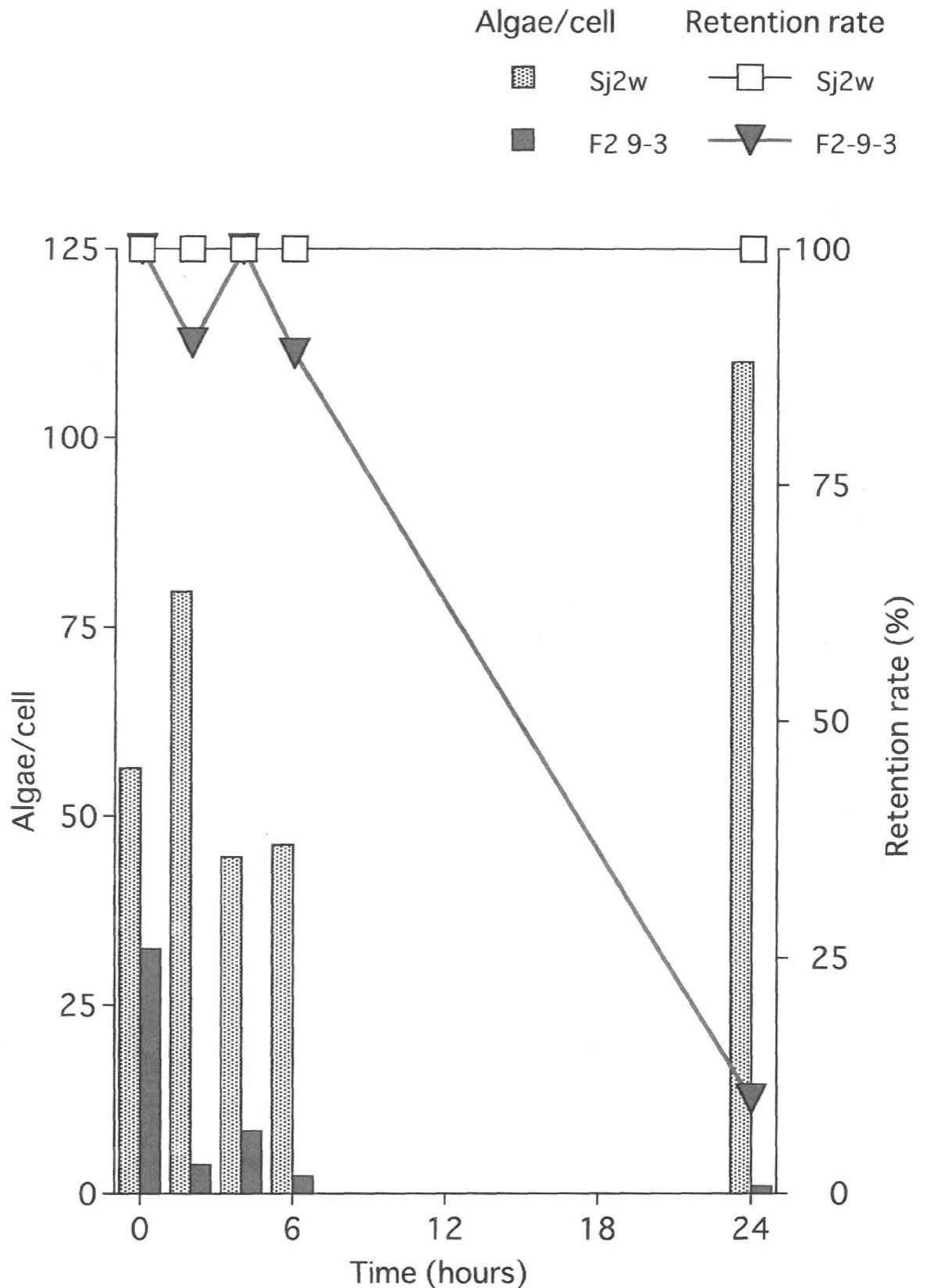


Fig. 11 Infection of Gr3-derived algae to F2 9-3w (in short time). Both retention rate and living algae per paramecium were reduced after infection compared with Sj2w. 24 hours after exposure, retention rate of Ysa2 was 10% (100% in Sj2w) and mean number of algae per paramecium was 1.0 (110 in Sj2w).

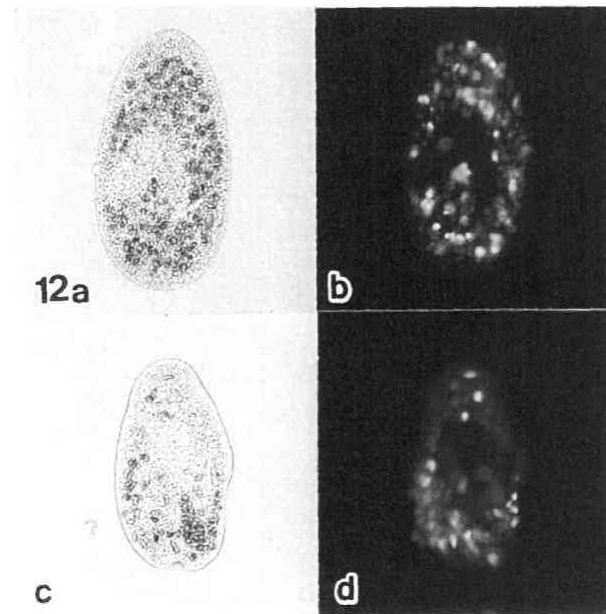


Fig. 12 Micrographs of infected F2 9-3w. (a, b) A cell just after exposure to algae. Many algae are seen in that cell (a) and living algae show self-fluorescence (bright red) under UV irradiation (b). (c, d) Infected F2 9-3w 12h after exposure. Number of algae decreased (c) and there is only one living alga in that cell (d). Magnification: x230.

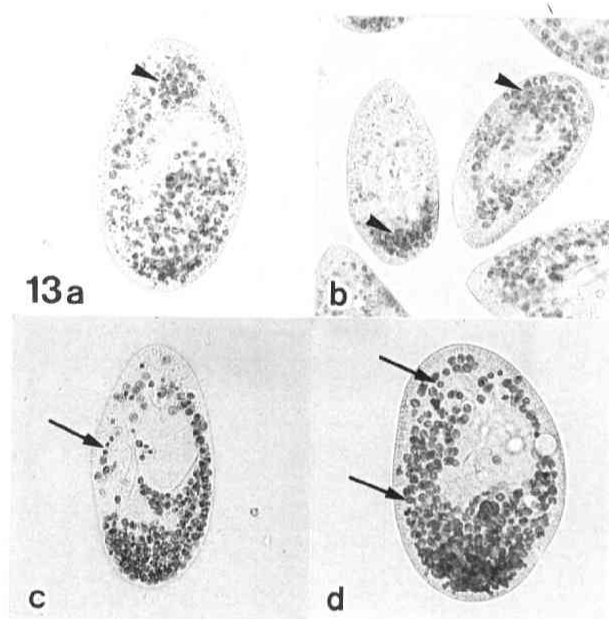


Fig. 13 Micrographs of green F2 cells that are in the process of producing white cells during culture. In F2 9-3 cells, clusters of algae (arrowheads) and unequal dispersion of algae (b) are seen. In other green F2 cells, brown-colored dead algae (arrows) are observed in cytoplasm (c: F2 14-11, d: F2 14-16). Magnification: x200.

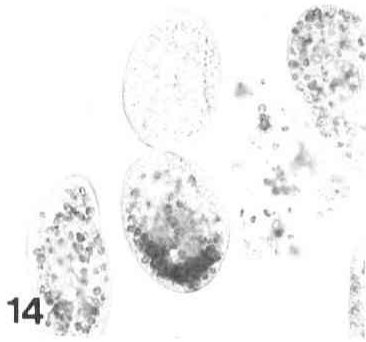


Fig. 14 Production of a white cell by unequal distribution of algae at the time point of cell division of F2 9-3. Magnification: x200.

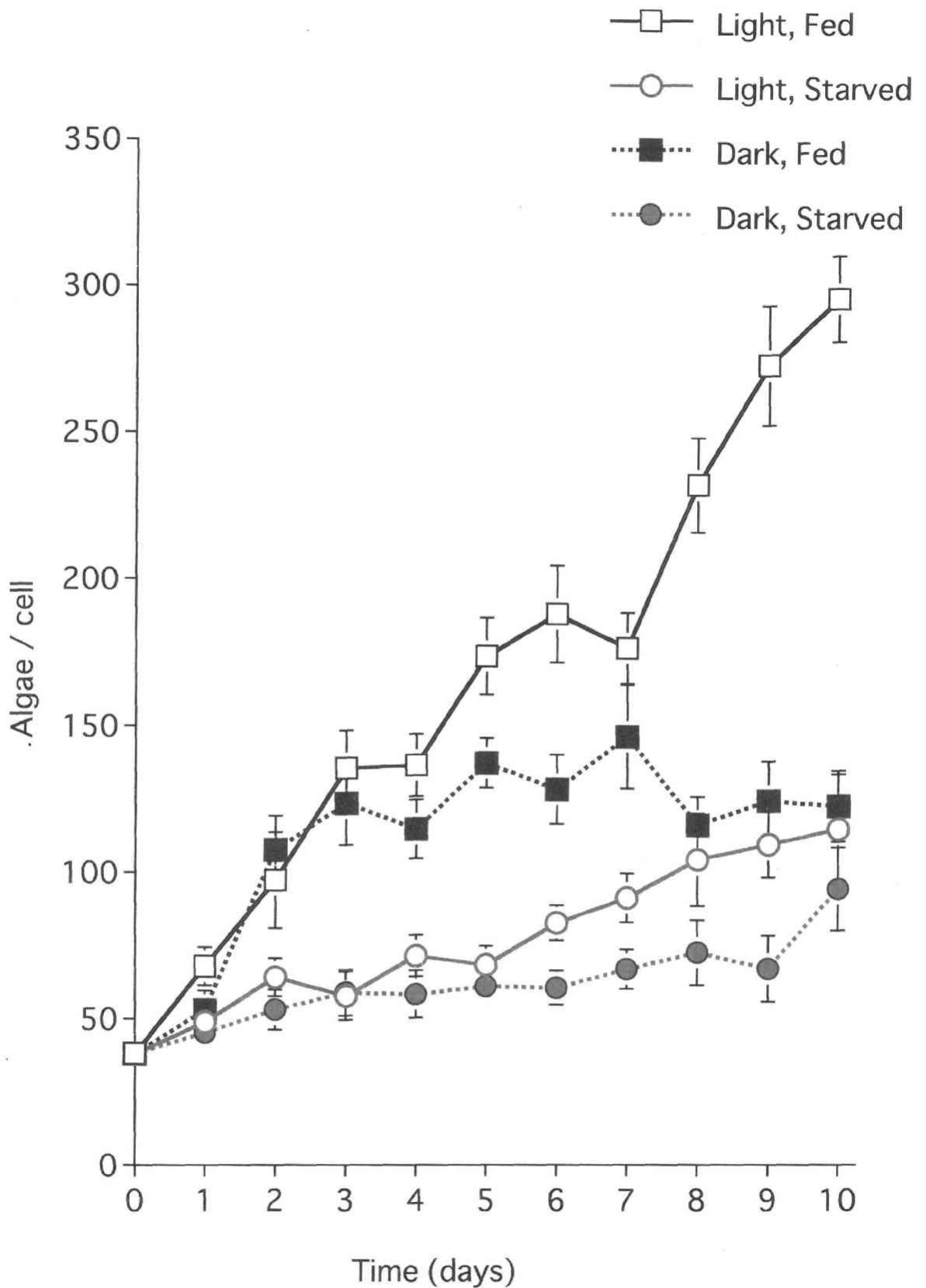


Fig. 15 Temporal change of the mean number of algae per paramecium (infected Sj2w with Gr3 algae) under the different culture conditions. Error bars show standard error of mean (1SEM, n=3)

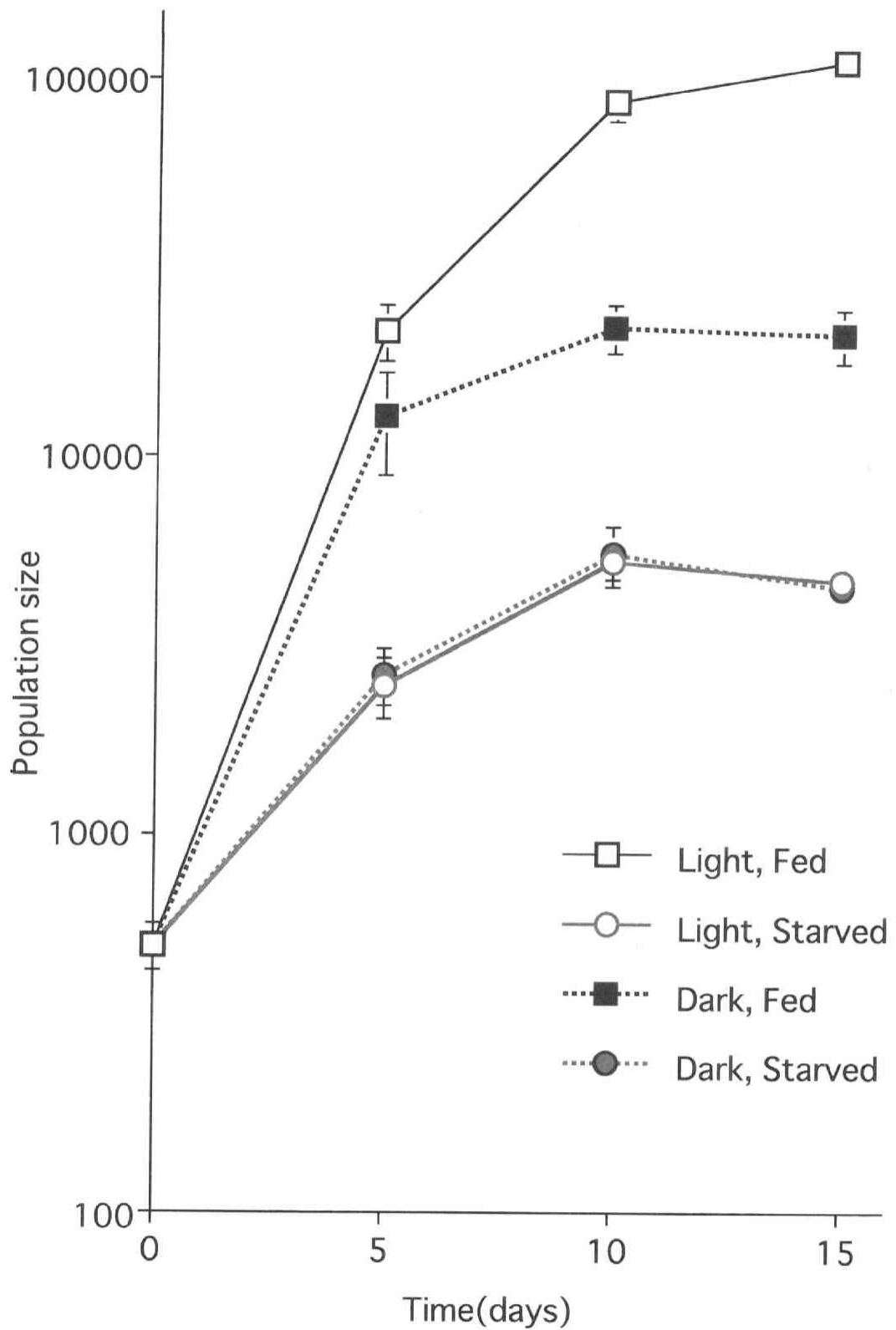


Fig. 16 Temporal change of the algal population size in paramecia under the different culture conditions. Population size is the product of algal number per paramecium and total cells of paramecia in culture medium.

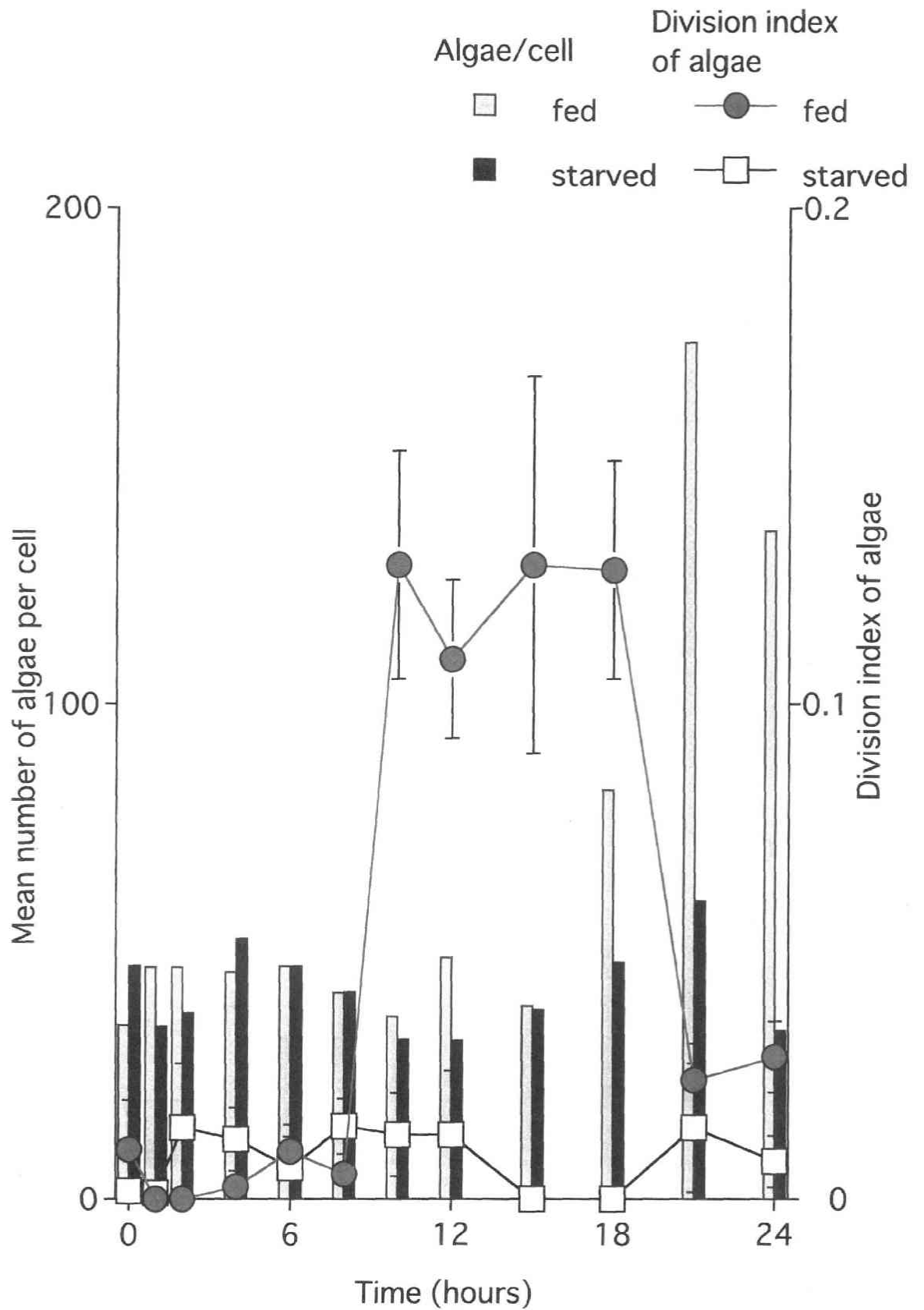


Fig. 17a Induction of algal cell division in infected paramacia. In fed paramacia, division index of algae (dividing algae/total algae) increased 10 hours after feeding, followed by increasing in the number of algae (18h after feeding).

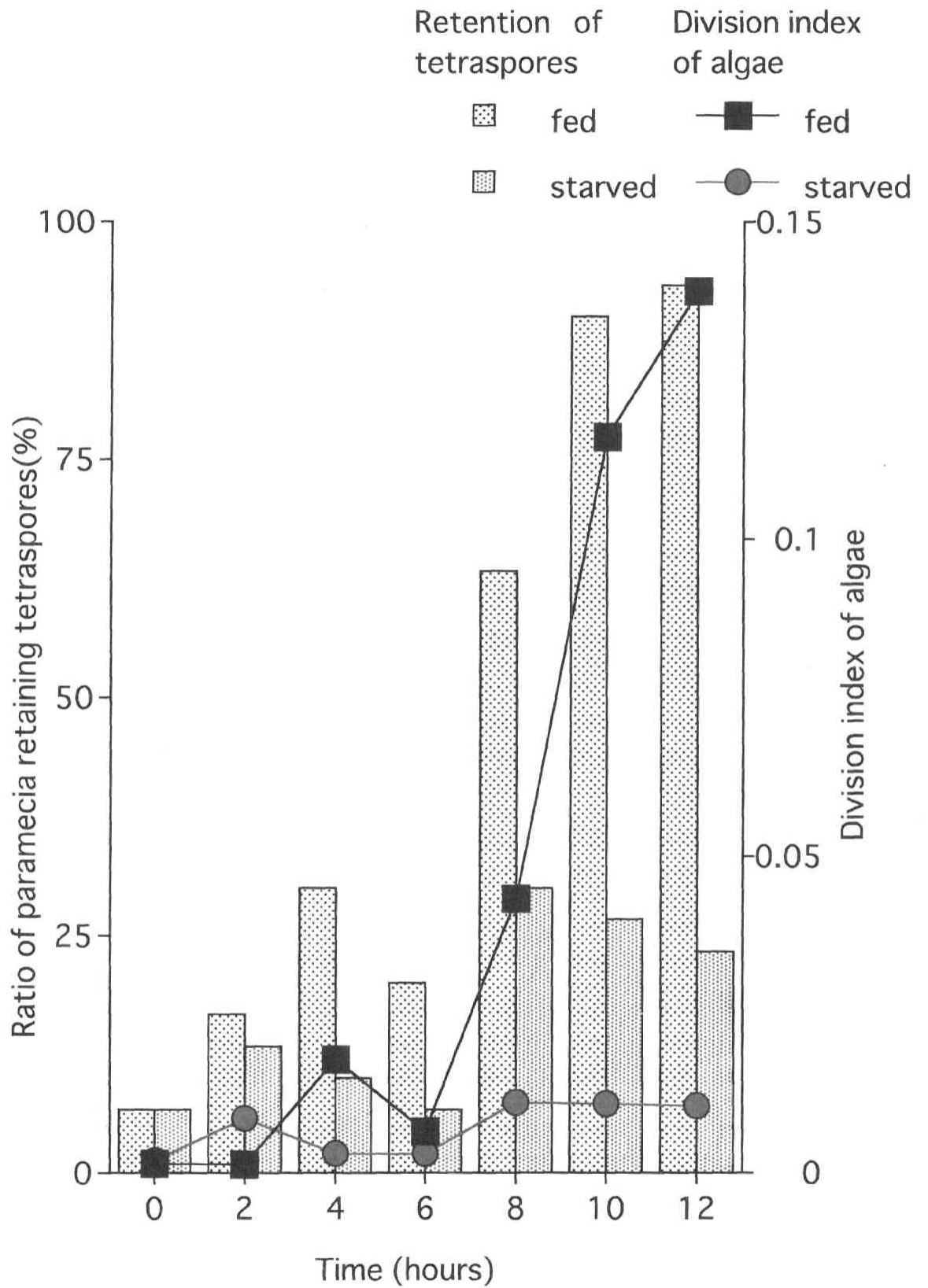


Fig.17b Ratio of paramacia that retained tetraspores (dividing algae, columns) after feeding. In feeding conditions, most of paramacia retained tetraspores 12 hours after feeding, when the induction of algal cell division occurred.

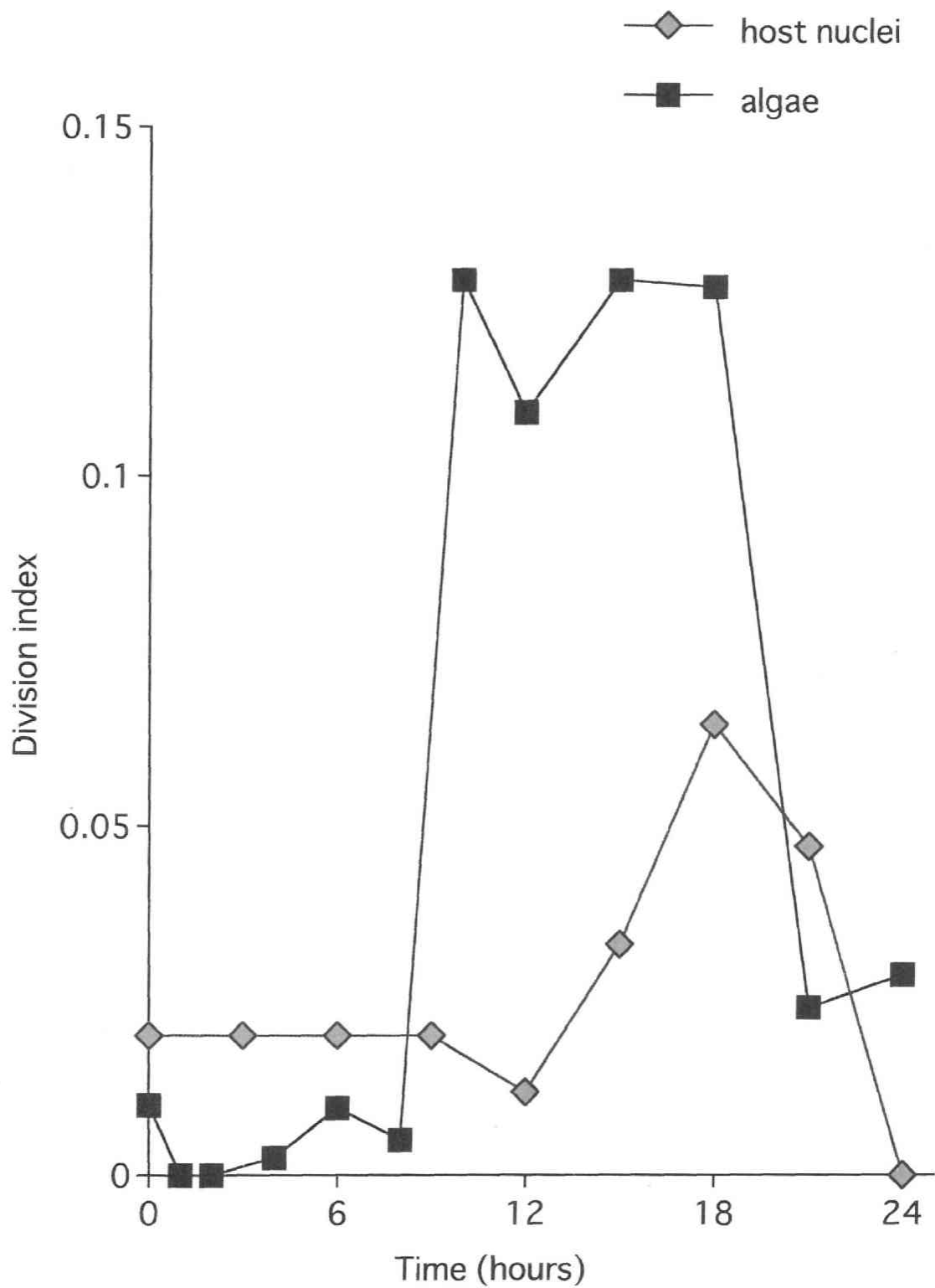


Fig. 17c Division indices of host nuclei (paramecia with dividing nuclei/total paramecia) and symbiotic algae after feeding. Nuclear division of host showed the maximal value 18 hours after feeding.

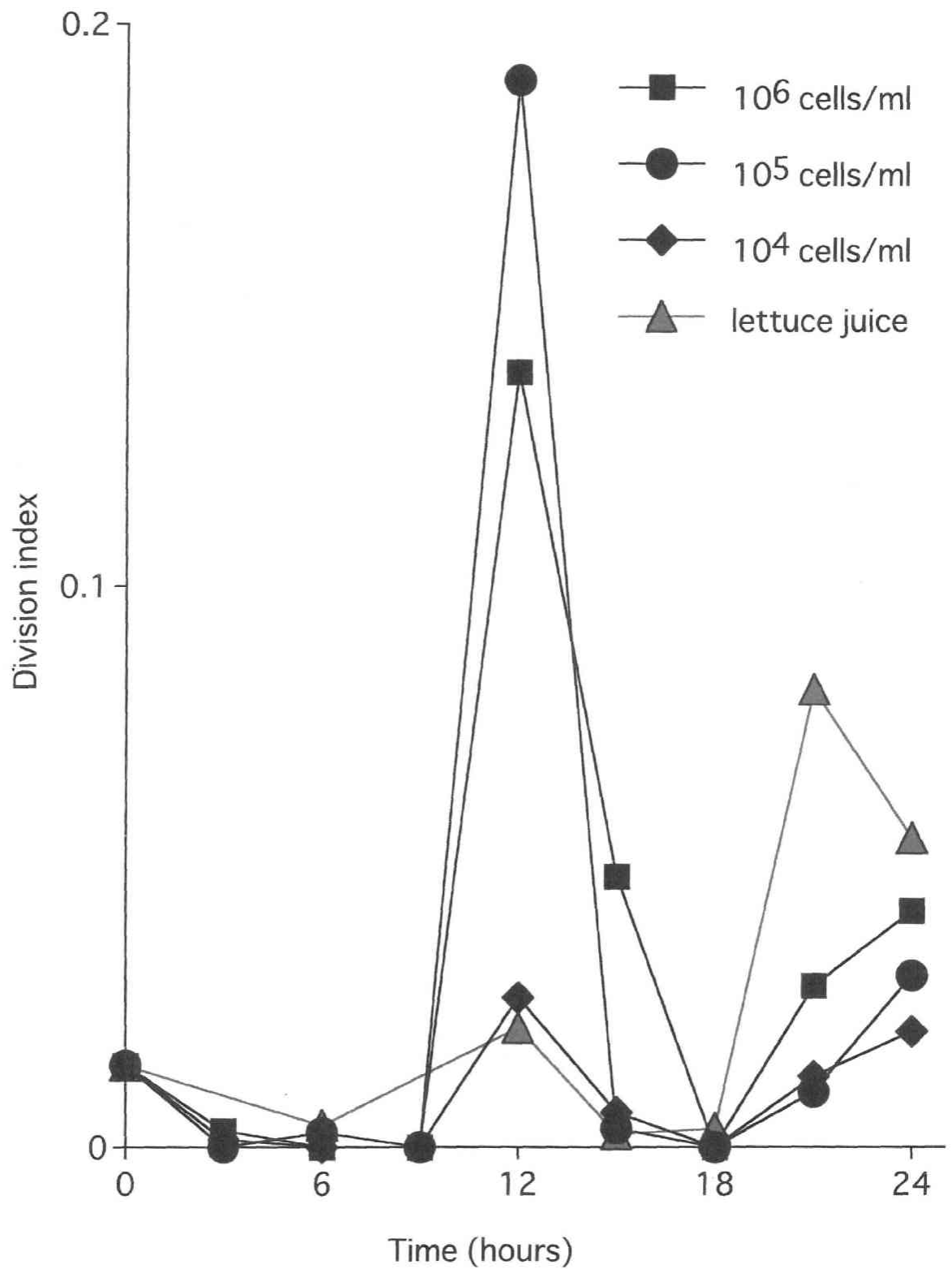


Fig. 18 Induction of algal cell division by feeding formalin-fixed bacteria and lettuce juice medium. Algae in paramecia divided 12 hours after feeding, which induction was high in high densities of bacteria. Division of algae in lettuce juice-fed paramecia showed maximum value 21h after feeding.

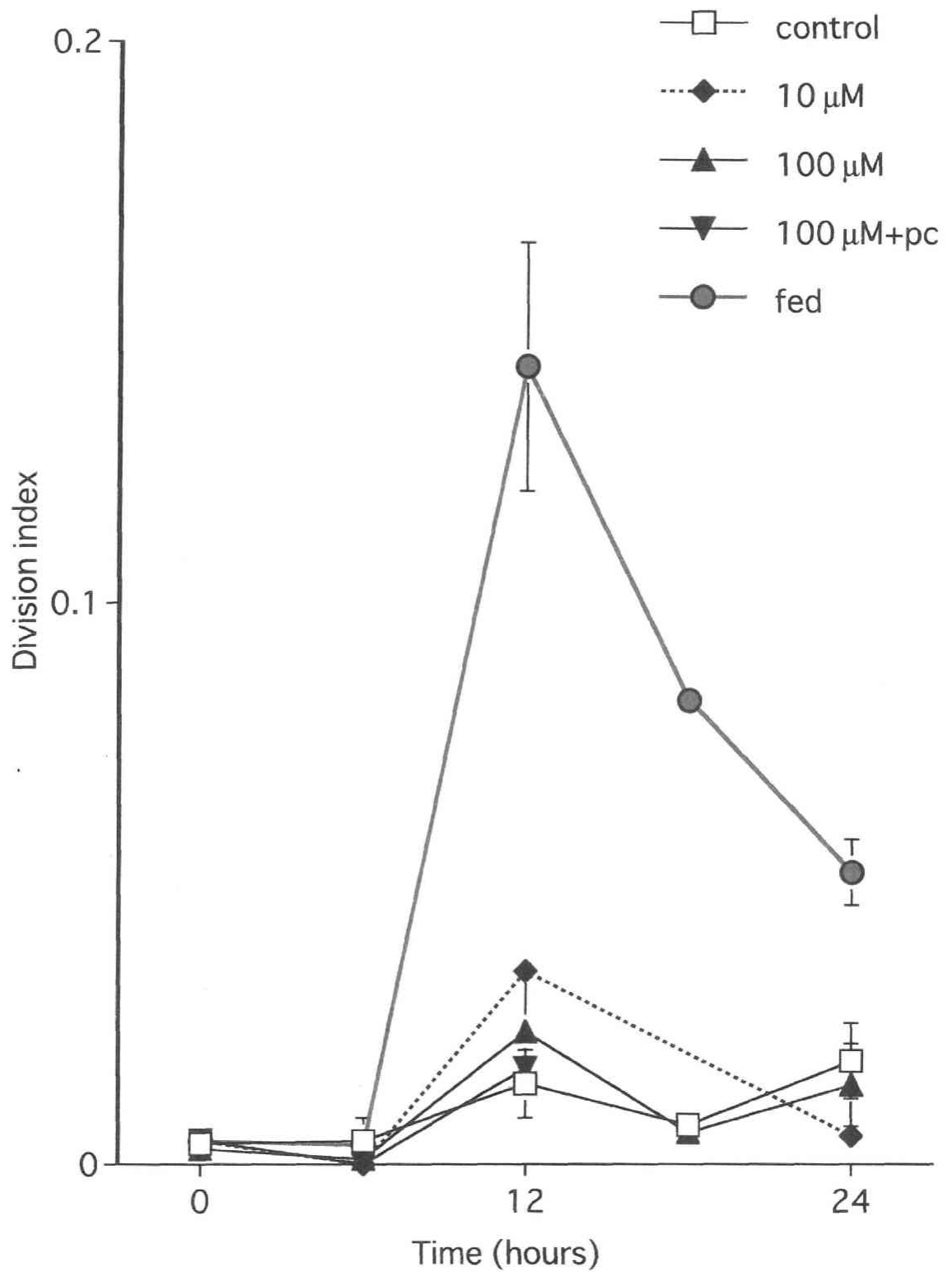


Fig. 19 Effect of ammonium nitrate on division of algae in starved paramecia. No significant difference was observed by ammonium addition compared with control (starved). Abbreviations: control; no addition of ammonium, 10 μM , 100 μM ; addition of ammonium nitrate of each concentration, 100 $\mu\text{M}+\text{pc}$; 100 μM ammonium nitrate and poster color were added, feed; bacterized culture medium.

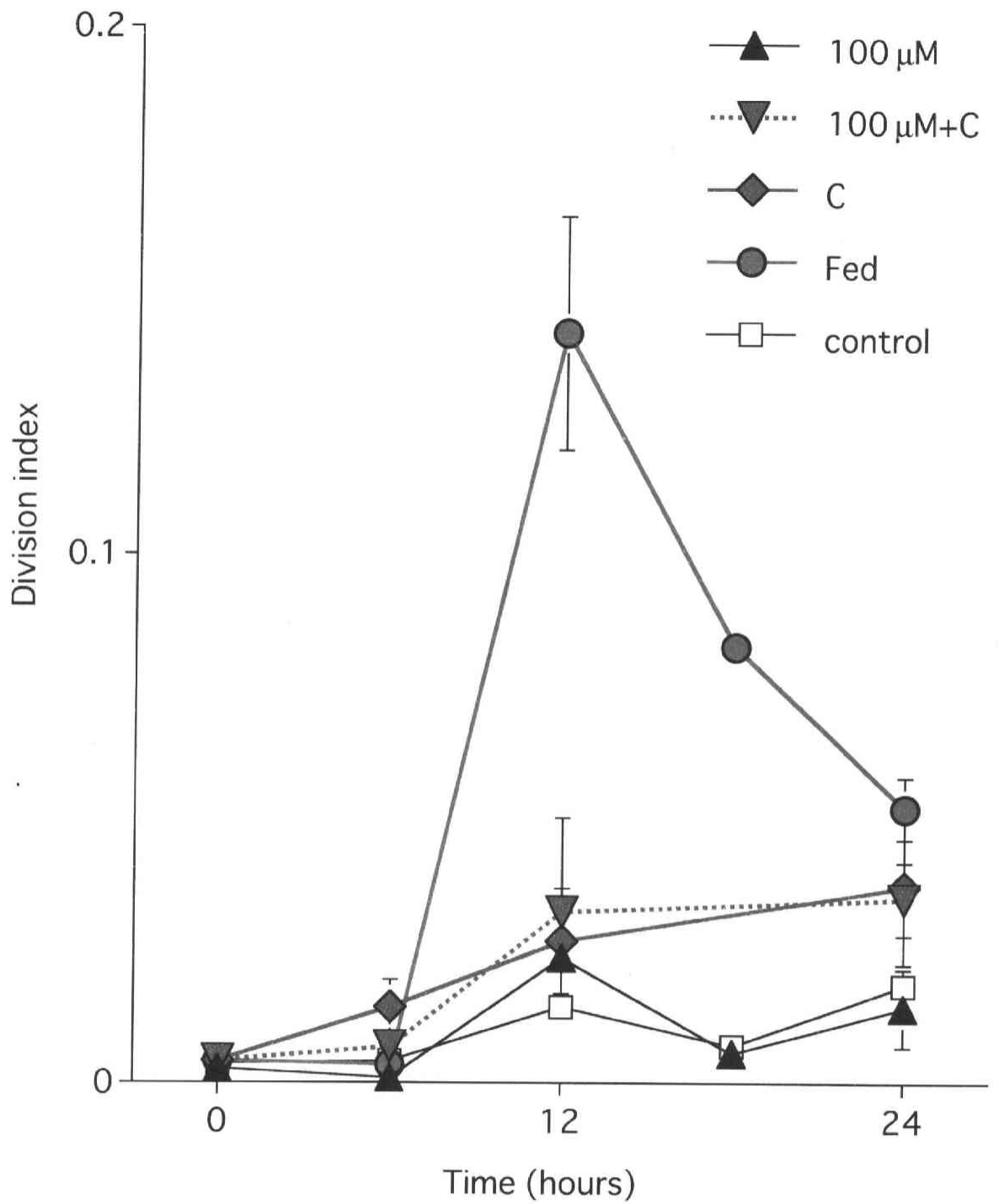


Fig. 20 Effect of sodium acetate on division of algae in starved paramecia. Division indices of paramecia with acetate were slightly increased after addition. Abbreviations: 100 μM; 100 μM ammonium nitrate, 100 μM + C; 100 μM ammonium nitrate and 10 mM sodium acetate, C; 10 mM sodium acetate, Fed; bacterized culture medium, control; no addition of N, C sources.

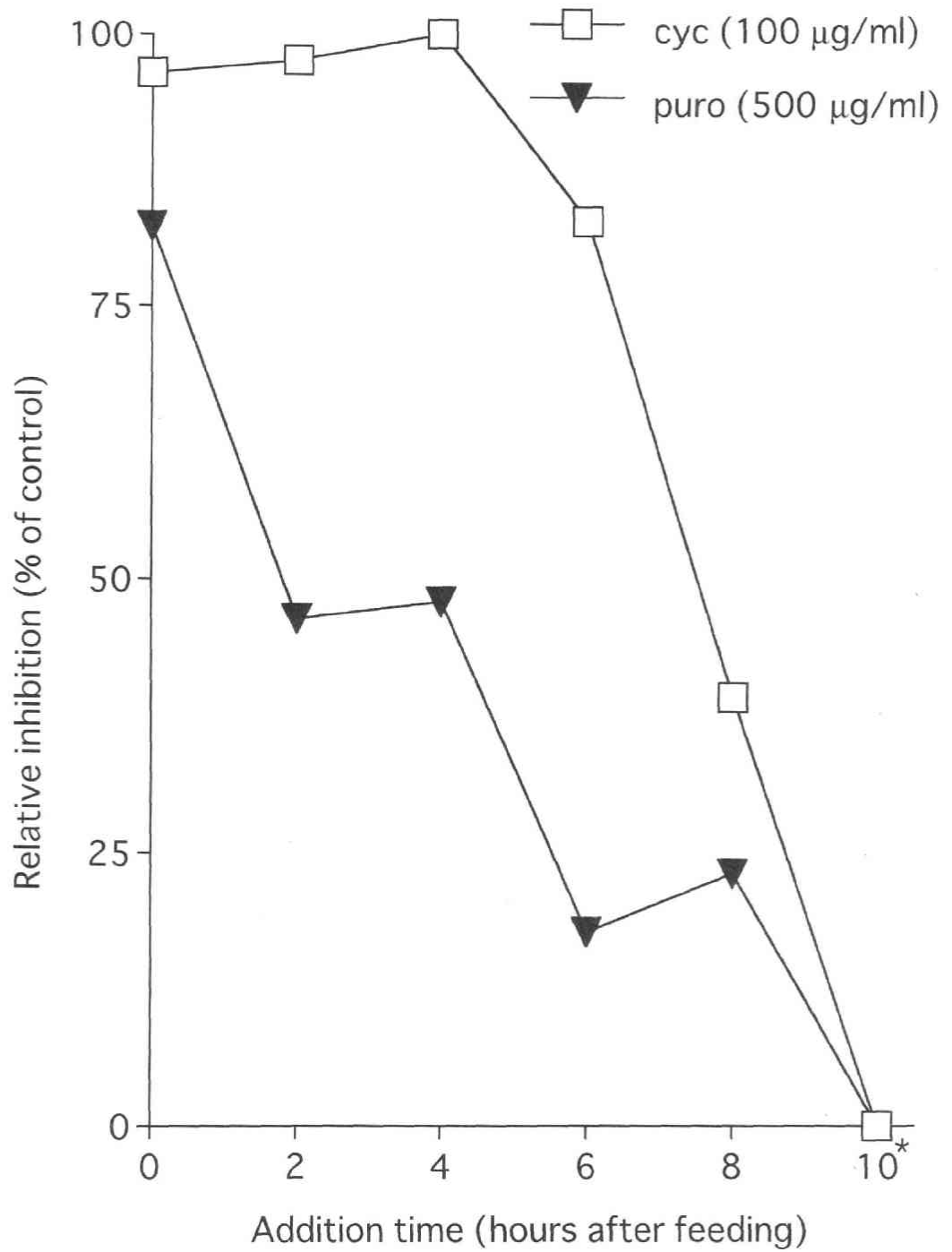


Fig. 21 Effect of cycloheximide (cyc) and puromycin (puro) on 10-hour algal division in fed paramecia. Vertical axis shows relative inhibition of algal division (% of control) and horizontal axis shows the addition time of reagents (hours after feeding). Asterisk (*) shows control (no addition of reagents).

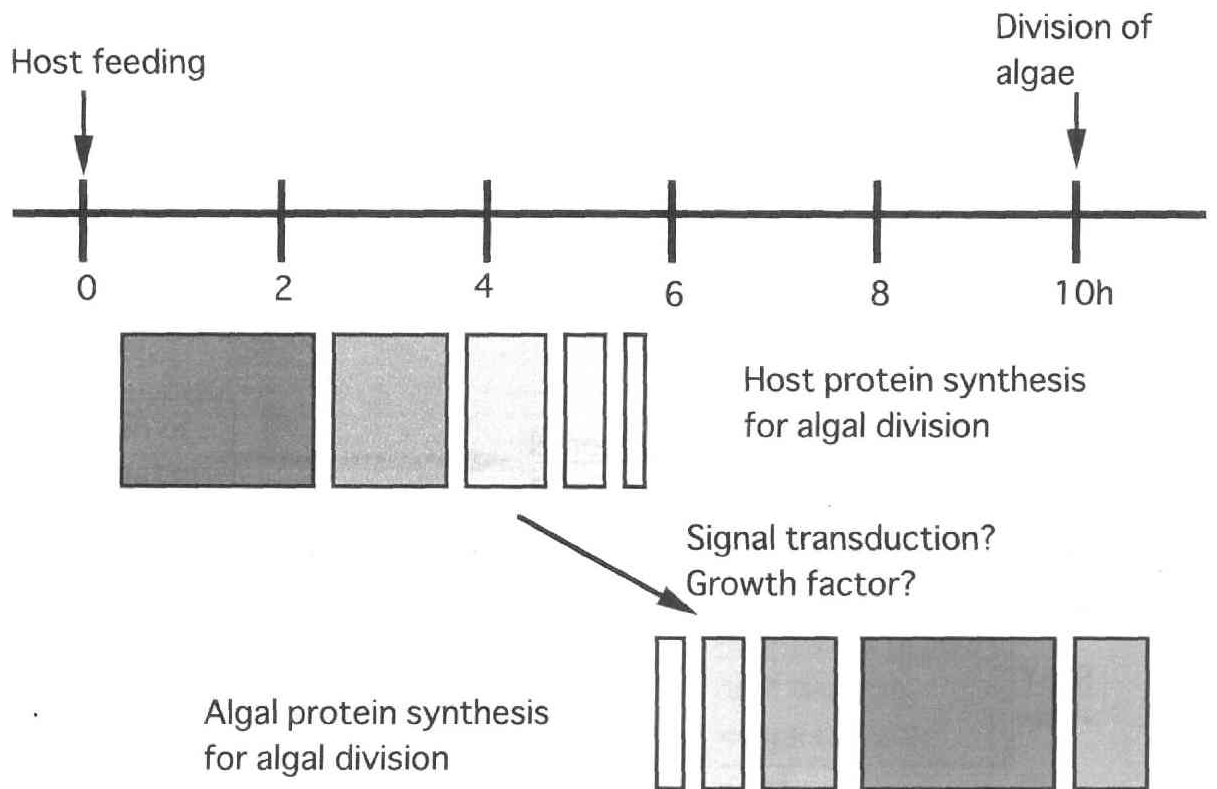


Fig. 22 Putative time course of protein synthesis for algal division 10 hours after feeding of paramecia. Algal protein synthesis is needed for their division (inhibited by cyc). In addition, host protein synthesis (not secretion of ammonia) is also needed for algal division (inhibited by puro). Growth factor is a candidate synthesized for algal division.

Maintenance of symbiotic algae in green paramecia
 - an early infection model.

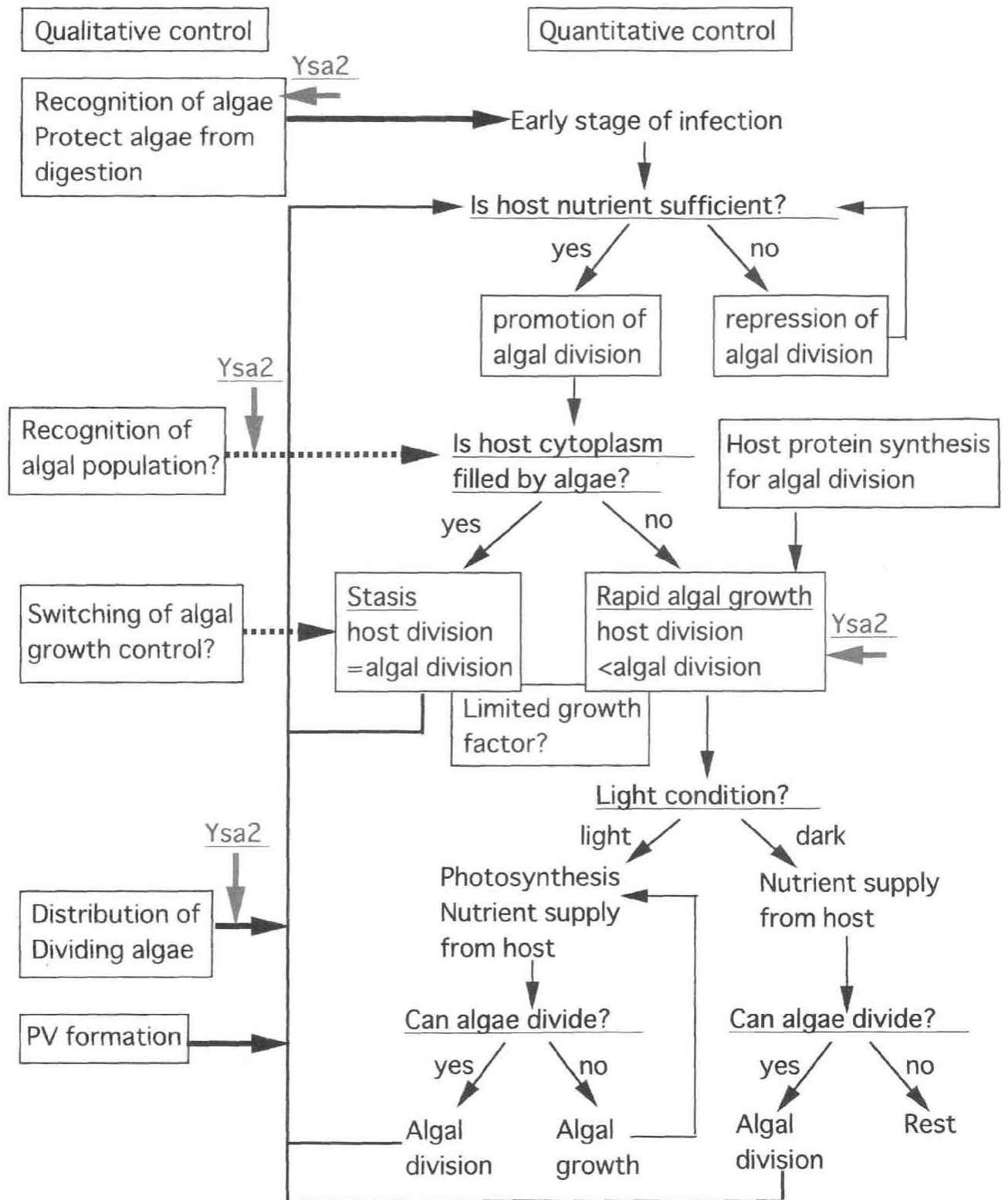


Fig. 23 Maintenance of symbiotic algae in *Paramecium bursaria*, an early infection model. Light-yellow boxes show qualitative control and light-blue boxes show quantitative control (see text). Red arrows are putative mutation which occurred in Ysa2 cells. Controls with question marks are functions under the discussion.