



# 細胞内共生を行うクロレラの共生に関わる構造的・分子的特徴の研究

樋口, 里樹

---

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Date of Publication)

2021-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7448号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007448>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博 士 論 文

細胞内共生を行うクロレラの  
共生に関わる構造的・分子的特徴の研究

平成 30 年 12 月  
神戸大学大学院理学研究科

樋口 里樹

## 目次

要旨	2
第1章 序論	5
第2章 自由生活クロレラと共生生活クロレラの比較	
1 材料と方法	10
2 結果	22
3 考察	34
第3章 クロレラ NC64A 株と共生能欠損変異株#48 株の比較	
1 材料と方法	37
2 結果	39
3 考察	54
第4章 全体考察	57
謝辞	63
引用文献	64

## 要旨

クロレラ (*Chlorella variabilis*) は単細胞の緑藻で、ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) の細胞質内で細胞内共生を行う。ミドリゾウリムシと共生クロレラの共生関係は絶対的なものではなく、両者は互いに単独で培養することが可能である。恒暗条件での培養や除草剤を用いることで、ミドリゾウリムシから細胞内の共生クロレラを除去することができる。共生クロレラも、宿主のミドリゾウリムシを破砕し細胞内から取り出した後、栄養培地上で単独培養することが可能である。さらに、単独培養を行っているミドリゾウリムシと共生クロレラを同環境中に置くと、クロレラがミドリゾウリムシに捕食され、やがてミドリゾウリムシの細胞内に定着する。この共生関係は、細胞内共生の極めて初期の段階と考えられており、細胞内共生のメカニズムの解明のモデルとして適している。本研究では、クロレラがリソソームによる消化から逃れ安定した共生をする際の細胞壁の役割を解明すること、トランスクリプトーム解析を用いた発現変動遺伝子の解析により共生に関与する分子を見つけること、クロレラのマルトース放出能と細胞内共生との関連性を調べることを目的とした。

第 1 章では、現在までの細胞内共生に関する知見と、それに基づいた本研究の目的と意義を述べた。

第 2 章では、単独培養下のクロレラと共生状態のクロレラについての比較研究を行った。ここで、「自由生活クロレラ」はミドリゾウリムシ Pb-Kb1 株から取り出されクローン化された後にセリン添加液体 C 培地で 1 か月以上培養されたクロレラ Kb1 株のことを指す。また、「共生生活クロレラ」というのは、実験の直前に超音波破砕されたミドリゾウリムシ Pb-Kb1 株の細胞から得られたクロレラ Kb1 株を指す。クロレラ Kb1 株の rDNA の ITS2 配列を読んだ結果、Kb1 株は *Chlorella variabilis* と同定された。細胞直径を測定した結果、対数期の自由生活クロレラは  $3.8 \pm 0.51 \mu\text{m}$ 、定常期の自由生活クロレラは  $5.0 \pm 0.56 \mu\text{m}$ 、定常期のミドリゾウリムシから取り出した共生生活クロレラは  $4.9 \pm 0.49 \mu\text{m}$  であった。共生生活クロレラの細胞直径は対数期の自由生活クロレラと比較して有意に大きく、定常期の自由生活クロレラとは有意差がなかった。クロレラ細胞壁の厚さの比較のために、凍結置換固定により透過型電子顕微鏡で観察を行った。その結果、自由生活クロレラの細胞壁の厚さは  $14.2 \pm 3.0 \text{ nm}$  で、共生生活クロレラでは  $8.1 \pm 2.0 \text{ nm}$  であり、共生生活クロレラの細胞壁は有意に薄くなっていることがわかった。自由生活クロレラと共生生活クロレラの両方で細胞壁表層に繊維状の毛羽立った構造が見られた。細胞壁の糖組成の比較のために、細胞壁を Calcofluor・WGA-FITC・LFA-FITC の 3 種の試薬で染色

した。Calcofluor は  $\beta$ -D-glucopyranose 多糖類に反応する蛍光色素で、セルロース・N-アセチルグルコサミン・シアル酸・グリコサミノグリカンなどを染色する。WGA は N-アセチルグルコサミンやシアル酸に結合する。LFA はシアル酸に特異的に反応するレクチンである。Calcofluor は自由生活クロレラの細胞壁をよく染色したが、共生生活クロレラの細胞壁では蛍光強度が約 50%に低下していた。このことから共生によってクロレラの細胞壁上の糖に変化が生じていることが示唆された。セルラーゼ処理により、Calcofluor の染色性には変化がなかったため、セルロースは Calcofluor の染色性の低下の原因ではないことがわかった。WGA と LFA は、共生状態によらず同様な染色性を示したので、N-アセチルグルコサミンとシアル酸は細胞内共生の結果生じるクロレラ細胞壁の Calcofluor に対する染色性の低下の原因ではないことが示唆された。以上のことから、クロレラ細胞壁上に存在するグリコサミノグリカンが Calcofluor 染色性の変化の原因であることが示唆された。マルトースの放出量を測定するため、マルトース量が正確に測定できる実験系を確立した。これにより、クロレラ Kb1 株の放出糖はマルトース特異的で、グルコースは含まれていないということがわかった。自由生活クロレラと共生生活クロレラではマルトースの放出量に差はなく、どちらも低 pH 条件でマルトース放出量が増加した。

第 3 章では、共生を行うクロレラとその変異株で共生能を持たないクロレラとの比較研究を行った。重イオンビームを用いてクロレラ NC64A 株 (*Chlorella variabilis*) から作出した変異株#48 株が、ミドリゾウリムシ Pb-Kb1 株に共生できないことを見出した。NC64A と#48 の細胞数の経時変化を測定し増殖曲線を作成したところ、NC64A の定常期の細胞密度は約  $3 \times 10^7$  cells/mL で、#48 の細胞密度は約  $2 \times 10^7$  cells/mL であり、NC64A の方が定常期での細胞密度が高かった。細胞の直径を測定した結果、NC64A は  $4.8 \pm 0.47$   $\mu\text{m}$ 、#48 は  $4.8 \pm 0.33$   $\mu\text{m}$  であり、NC64A と#48 の細胞直径に有意な差はなく、細胞サイズが共生成立を決定する要因ではないことが示された。NC64A と#48 を凍結置換法で固定し、透過型電子顕微鏡で観察し細胞壁の厚さを測定したところ、NC64A の細胞壁の厚さは  $29 \pm 5.7$  nm、#48 は  $19 \pm 3.9$  nm であり、NC64A の方が有意に細胞壁が厚いことがわかった。また、クロレラ Kb1 の細胞壁表層に見られた毛羽立ち構造は NC64A と#48 には見られなかった。NC64A と#48 の Calcofluor 染色による蛍光強度を測定したところ、#48 での蛍光強度は NC64A に比べて有意に低下していた。WGA と LFA は、共生状態によらず同様な染色性を示したので、N-アセチルグルコサミンとシアル酸は細胞内共生の結果生じるクロレラ細胞壁の Calcofluor に対する染色性の低下の原因ではなく、Calcofluor の染色性の変化の原因はグリコサミノグリカンの量の変化であることが示唆された。

NC64A と#48 のマルトースの放出量を測定した結果、マルトースの放出量に差はなく、どちらも低 pH 条件でのマルトース放出量の増加が認められた。このことから、マルトースの放出能は細胞内共生成立を決定する要素ではないことが示唆された。NC64A と#48 の遺伝子発現量を算出し、2 群間での差次的発現解析を行い、発現変動遺伝子を探索した。#48 で発現量が低下していたいくつかの遺伝子には、他の細胞内共生系において共生現象への関与が示唆されているタンパクがヒットした。#48 で発現量が大きく低下していた遺伝子について自由生活クロレラ Kb1 と共生生活クロレラ Kb1 での発現量比較を行った結果、共生生活クロレラ Kb1 で遺伝子発現が大きく低下していた配列「DN2524\_c3\_g4」を見出した。「DN2524\_c3\_g4」は serine/threonine protein kinase の一種である mitogen-activated protein kinase (MAPK) 遺伝子と相同性が高かった。この遺伝子は、マメ科植物 *Lupinus albus* では根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. の感染時に発現が上昇することや、MAPK の発現を阻害剤で処理すると根粒の形成が抑制されることが報告されており、クロレラがミドリゾウリムシに共生する際にも重要な遺伝子である可能性が示唆された。

第 4 章では全体考察として、本研究で示された自由生活クロレラと共生生活クロレラ、NC64A と#48 における細胞壁の形態や組成の変化を踏まえて、クロレラがリソソームによる消化から逃れ安定した共生をする際の細胞壁の役割について推察した。また、serine/threonine protein kinase と細胞内共生との関連性や、質量分析によるクロレラ細胞表面タンパク質の解析などについて考察した。

## 第1章 序論

### ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生

原生動物ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) の細胞内には数百個のクロレラ (*Chlorella* 属などの単細胞緑藻類) が共生している (Omura et al., 2004)。宿主のミドリゾウリムシはクロレラに窒素源 (Albers and Wiessner, 1985) や CO<sub>2</sub> (Reisser, 1980) を供給し、クロレラはミドリゾウリムシの細胞内に共生することでクロレラウイルスの感染を回避している (Kawakami and Kawakami, 1978)。一方、クロレラは光合成産物であるマルトースをミドリゾウリムシに供給している (Ziesenisz et al, 1981)。さらにミドリゾウリムシはクロレラを共生させることによって、高温耐性や UV 耐性が高まることが報告されている (Iwatsuki et al., 1998; Summerer et al., 2009)。このように、ミドリゾウリムシとクロレラはお互いに有益な共生関係を保っていると考えられている。

ミドリゾウリムシとクロレラの共生関係は絶対的なものではなく、共生しているクロレラを人為的に取り除くことができる (Reisser, 1976)。共生クロレラを除去した白化ミドリゾウリムシは通常のみドリゾウリムシと同様に成長、増殖する一方で、ミドリゾウリムシから取り出された共生クロレラも単独で培養が可能である。さらに、白化ミドリゾウリムシと単離されたクロレラを同環境下に置くと、白化ミドリゾウリムシがクロレラを捕食し、捕食されたクロレラがミドリゾウリムシの細胞内に定着、増殖し再共生が起こる (Ziesenisz et al., 1981)。このことから、ミドリゾウリムシとクロレラは二次共生の初期段階にあると考えられており、細胞内共生のメカニズムを解明するためのモデルとして適している。しかし、現在にいたるまで様々な研究が行われてきたにもかかわらず、細胞内共生の確立と維持に関わる分子的基盤はほとんど明らかになっていない。また、クロレラ側からの細胞内共生に関わる研究は宿主のみドリゾウリムシに比べてほとんど行われていない。

ミドリゾウリムシに共生を行うクロレラは一部の種に限られおり、*Chlorella* 属の中においても共生する種と共生しない種がある。これまで共生性のクロレラと非共生性のクロレラの比較はいくつかの研究がなされているが (Reisser, 1984; Muscatine et al., 1967)、共生を行うのに必要な因子の特定には至っていない。また、クロレラの細胞の機能や形態が宿主のみドリゾウリムシによって影響を受けているかどうかについては、ほとんど調べられていない。これに関する数少ない報告として、ミドリゾウリムシの細胞から抽出した成分がクロレラの炭素固定活性を亢進させることと、ミドリゾウリムシ

の細胞内ではクロレラの光合成が活性化しているということが示されている (Kamako and Imamura, 2006)。そこで、共生に伴いクロレラに生じる変化を調べることで、共生の過程で起きる現象や宿主とクロレラ間の相互作用を知る手掛かりになるのではないかと考え、ミドリゾウリムシ細胞内に共生しているクロレラと単独培養されているクロレラとの比較研究を行った。また、ミドリゾウリムシに共生可能なクロレラ *Chlorella variabilis* NC64A 株に重イオンビーム処理をして変異株を作出し、その中からミドリゾウリムシへの共生能を持たない株が得られた。クロレラ NC64A 株と共生能欠損変異株の比較により、共生の可否を決定する因子の探索を行った。研究を進めるにあたっては、クロレラ細胞壁の糖、細胞表層のタンパク質、クロレラの放出するマルトースの3点に着目した。

### リソソームによる消化の回避と細胞壁の関連性

細胞壁はクロレラの細胞を取り囲み、細胞の保護と形態の維持にはたらく。ミドリゾウリムシの細胞内のクロレラは周囲を保護されているようにも見えるため細胞壁の必要性が低くなると考えられるかもしれないが、実際はそうとは言い切れない。ミドリゾウリムシの細胞内に安定して共生するためには、クロレラは宿主細胞のリソソームの攻撃を逃れ細胞内消化を免れる必要がある (Dolan, 1992)。クロレラの細胞壁は最外層でリソソームの攻撃に対抗している可能性がある。宿主に細胞内共生しているクロレラは、宿主由来の *peri-algal vacuole membrane* (PV 膜) という膜に包まれていて (Karakashian et al., 1968; Meier et al., 1984)、クロレラの細胞壁は宿主の PV 膜と近接した状態にある。クロレラがミドリゾウリムシの細胞内に定着するまでの過程を追って観察した過去の文献によると、クロレラはミドリゾウリムシに捕食され食胞に取り込まれる。その後、ほとんどのクロレラはリソソームにより消化されるが、一部のクロレラは個々に膜をまとったまま原形質流動から逃れ、ミドリゾウリムシの細胞質内へと脱出する

(Meier and Wiessner, 1989)。その後、ミドリゾウリムシの細胞膜直下に移動し、定着する (Karakashian et al., 1968)。このときに形成される膜が PV 膜である。従って、PV 膜は宿主の食胞由来であると考えられている。しかし、食胞がリソソームと融合し内容物を消化するのに対して、PV 膜にはリソソームは融合せず、クロレラは消化を免れている (Karakashian et al., 1981)。ミドリゾウリムシとクロレラの共生において PV 膜に



リソソームが結合しない理由は明らかになっておらず、リソソームの回避に細胞壁の糖がはたらいっている可能性があると考えた。

細胞内に取り込まれた共生生物や病原体が、細胞表層の糖鎖によって宿主の細胞による消化作用を受けないでいる事例はいくつか知られている。例えば、大腸菌 *E. coli* がヒトの脳に感染する際には上皮細胞の内部を通過するが、その際にリソソームによる攻撃を回避している (Luzio et al., 2007)。この際に重要な構造が、大腸菌の細胞表面に存在する「K1 カプセル」という構造で、これは  $\alpha$ -2,8-linked polysialic acid からなる細胞外殻である (Kim et al., 2003)。大腸菌は原生動物の一種であるアカンソアメーバ *Acanthamoeba* にも感染し、細胞内に維持されるが、この際にも K1 カプセルによりリソソームの攻撃を回避している。K1 カプセルを作らない変異株はアカンソアメーバの細胞内で維持されない (Jung et al., 2007)。これらの研究により、大腸菌表面のポリシアル酸構造が、一枚の細胞膜を隔てて宿主の細胞内に何らかの作用を示し、リソソームを寄せ付けない働きをしていると考えられている。さらに、レジオネラ菌が、動物細胞に感染する際には、ファゴソーム内部にリポ多糖類 (LPS) でできた小胞を放出し、それがリソソームと食胞との融合を阻害しているという報告もある (Fernandez-Moreira et al., 2006)。また、イソギンチャクに共生する共生藻の細胞壁の糖タンパクがイソギンチャクとの共生の確立に重要であるとの報告 (Lin et al., 2000) や、サンゴ虫への渦鞭毛虫の細胞表面の糖鎖が重要な役割を果たしているとの報告もある (Wood-Charlson, 2006)。

クロレラの細胞壁の糖組成を調べるために、本研究では糖結合性の試薬を用いた実験を行った。カルコフロア Calcofluor は糖の一種である  $\beta$ -D-glucopyranose 多糖類を特異的に染色する蛍光色素であり (Chen et al., 2007)、クロレラの細胞壁はカルコフロアでよく染色される。カルコフロアは  $\beta$ -D-glucopyranose 多糖類の代表的な多糖類であるセルロースをよく染色する (Bezares et al., 2008)。しかし共生を行うクロレラの中にはセルロースを持たない種も存在する (Kapaun, and Reisser, 1995)。また、カルコフロアはキチンやシアル酸とも強く結合することが知られている (Albani et al., 2000)。一方、WGA は GlcNAc の  $\beta$ -1,4 結合重合体に結合するレクチンで、菌類の細胞壁に存在するキチンやシアル酸にも結合するとされる (Rodrigues et al., 2008)。WGA とカルコフロアの染色部位は必ずしも一致せず、WGA がシアル酸を染色しない場合もあるようで (Rodrigues et al., 2008)、カルコフロアがクロレラの細胞表層の何を染色しているのかは不確かであった。クロレラの細胞壁はキチンに類似している (Kapaun, and Reisser, 1995) との報告があることと、シアル酸を含む糖ペプチドがクロレラに存在すること (Correll, 1964)、グリコサミノグリ

カンハカルコフロアで染色され、かつクロレラ細胞壁に存在すること (Kapaun, and Reisser, 1995) から、カルコフロアに結合している物質はキチンかシアル酸あるいはグリコサミノグリカンであると考えられる。ミドリゾウリムシに共生していたクロレラを細胞外で単独で培養したものについては、カルコフロア染色で染まるということは、過去にも報告がある (Reisser, 1984)。しかし、共生状態のクロレラがカルコフロアによって染色されるかどうかは現在まで調べられていなかった。

また、クロレラの細胞壁の形態が細胞内共生に伴ってどのように変化するかについても、これまでに調べられていなかった。ミドリゾウリムシに共生するクロレラは約 20 nm の厚さの細胞壁を持つが、非共生性の種のクロレラの中には 100 nm にも達する厚さの細胞壁を持つものもあることが報告されており (Reisser, 1984)、細胞壁の厚さは細胞内共生の可否に関わっている可能性がある。非共生性のクロレラ *Chlorella vulgaris* では、独立栄養条件においても、炭素源としてグルコースを加えた培地で従属栄養的に生育させた場合でも、細胞壁の厚さは一定であることが報告されていて (Martinez et al., 1991)、栄養条件の変化で細胞壁の厚さが変わることはない。細胞壁が細胞内共生時のリソソーム回避などの役割を担うとすると形態にも変化が起きているかもしれない。

以上のことを踏まえて、クロレラの細胞壁の形態構造や組成の解析を行った。構造変化の解析では透過型電子顕微鏡による細胞壁の観察と比較を行い、組成変化の解析では糖結合性の蛍光試薬を用いて細胞壁の組成と量を比較した。

### クロレラ細胞表層タンパク質と細胞内共生の関連性

クロレラの細胞表層には細胞膜の膜タンパク質や細胞壁の糖タンパク質といった形で多くのタンパク質が存在している。細胞内共生や病原体の感染や寄生に侵入者の細胞表層タンパク質が重要な役割を果たす例はいくつか知られている (de Koning-Ward et al., 2009; Lin et al., 2000)。またミドリゾウリムシのミトコンドリアが、PV 膜を介してクロレラ細胞壁と頻繁に密接な関係を形成することが報告されており (Song et al., 2017)、クロレラ細胞壁上のタンパク質が PV 膜やミトコンドリアとの接着に関係している可能性も示唆されている。

トランスクリプトーム解析が共生性のクロレラ (Arriola et al., 2017) やミドリゾウリムシ (Kodama et al., 2014) について報告されているが、細胞内共生に関連する遺伝子の同定には至っていない。また、単独培養状態のクロレラと共生状態のクロレラについて

の発現量比較や、共生性のクロレラとその変異株の発現量比較についての研究はなされていない。そこで、クロレラのトランスクリプトーム比較解析を行った。

### クロレラのマルトース放出と細胞内共生の関連性

宿主から取り出された共生藻が糖を放出する現象については様々な研究が行われており (Mews and Smith, 1982; Dorling et al., 1997; Summerer et al., 2007)、酸性条件下で共生藻の糖放出量が増加することが複数の共生藻で確認されている (Kessler et al., 1991; Brechignac and Schiller, 1992)。共生藻を持つヒドラの PV 膜内部は pH が 5 付近とされており (Douglas and Smith, 1984)、ミドリゾウリムシについても PV 膜内部の pH は酸性であると報告されている (Mews, 1980; Rees, 1989; Song and Suzaki, 2013)。共生藻の放出する糖はマルトース、グルコース、グルコース-6-リン酸で、複数の共生藻では 3 つの糖の中でもマルトースを特に多く放出すると報告されている (Kessler et al., 1991)。マルトースの合成や輸送の経路については不明確であるが、クロレラのマルトース合成は光化学系 I の電子伝達系が関与している可能性や (Shibata et al., 2016)、マルトースの輸送体は細胞外への一方向の能動輸送である可能性が示唆されている (Arriola et al., 2017)。共生性の緑藻は非共生性の藻類より多くの炭素を放出するという報告 (Muscatine et al., 1967) や、原生生物の *Acanthocystis* の共生藻やヒドラの共生藻もマルトースの放出を行う (Kessler et al., 1991; Matzke et al., 1990) ことから、共生藻類と宿主の関係においてマルトースの放出は重要な役割を担っていると考えられる。ミドリゾウリムシに共生状態のクロレラでマルトース放出量が高まる可能性や、マルトースの放出量によって共生の可否が決定される可能性を考え、クロレラの放出する糖の定量実験を行った。

### 本研究の目的

以上のように、クロレラ側に着目することで細胞内共生に関わる新たな発見があると考え、クロレラがリソソームによる消化から逃れ安定した共生をする際の細胞壁の役割を解明すること、トランスクリプトーム解析により共生を関与する分子を見つけること、クロレラのマルトース放出能と細胞内共生との関連性を調べることを目標に研究を行った。

## 第2章 自由生活クロレラと共生生活クロレラの比較

### 1 材料と方法

#### 1-1 細胞と培養

本研究で用いたミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は、神戸大学の圃場で採集し、無菌・クローン化した Pb-Kb1 株である。白化ミドリゾウリムシは、ミドリゾウリムシ Pb-Kb1 を、1 µg/mL のパラコート (methyl viologen: SIGMA, M-2254) 存在下で培養し、共生藻を除去したものである (Tanaka et al., 2002)。ミドリゾウリムシと白化ミドリゾウリムシは、改変クロロゴニウム培地 (酢酸ナトリウム 1 g/L, yeast extract 5 g/L in Volvic) でクロロゴニウム *Chlorogonium capillatum* (NIES-3374) を餌とし、明暗サイクル 12 時間/12 時間、25°C の条件下で無菌二者培養した (Omura et al., 2004)。

ミドリゾウリムシ Pb-Kb1 の細胞内に共生しているクロレラは、ミドリゾウリムシに超音波発生機 (Handy Sonic, UR-20P) で超音波を強度 2 目盛、25 °C で 1 分間処理し、ミドリゾウリムシの細胞を破砕することで取り出された。得られたクロレラは L-serine (0.2 g/L) を添加した 1.5%寒天 C 培地で培養され、コロニーをピックアップすることでクローン化され、Kb1 株と名付けられた。共同研究者の長浜バイオ大学保科亮博士の協力を得て、Kb1 の rDNA の ITS2 配列を読んだところ、Kb1 は *Chlorella variabilis* であることがわかった (図 1)。以下の実験ではクロレラの培養にセリン添加 C 培地を用いた (表 1、表 2)。

#### 1-2 自由生活クロレラと共生生活クロレラ

本研究で用いる「自由生活クロレラ」という用語は、クローン化された後にセリン添加液体 C 培地で 1 か月以上培養されたクロレラ Kb1 のことを指す。また、「共生生活クロレラ」というのは、実験の直前に超音波破砕されたミドリゾウリムシ Pb-Kb1 の細胞から得られたクロレラ Kb1 を指す。この時使用したミドリゾウリムシは、白化ミドリゾウリムシにクローン化したクロレラ Kb1 を混合して捕食・再共生させ、1 年以上細胞内共生を維持したまま培養したものである。図 2 に、「自由生活クロレラ」と「共生生活クロレラ」の作製方法を図示した。

#### 1-3 光学顕微鏡観察

光学顕微鏡観察には、ECLIPSE Ni-U 微分干渉顕微鏡 (Nikon) を用いた。またミドリゾ

ウリムシ Pb-Kb1 の 1 細胞内に共生しているクロレラ Kb1 の個体数を以下の方法で推定した。ミドリゾウリムシの定常期の細胞懸濁液を用意し、その細胞密度を測定した後、ミドリゾウリムシの細胞を超音波で破碎した。その後、破碎液内のクロレラの細胞密度を測定し、ミドリゾウリムシ 1 細胞あたりに存在していたクロレラの個体数を算出した。

#### 1-4 増殖曲線と細胞の直径

自由生活クロレラに白色 LED ライト (1,000 lx) を照射し、明暗周期 12 時間/12 時間、25°C、振とう条件でセリン添加 C 培地で培養し、細胞数の経時的変化を測定した。決まった時間に培養液を 10  $\mu$ L ずつ 3 回採取し、血球計算盤でクロレラの細胞数を測定し増殖曲線を作成した。

自由生活クロレラの対数期 (培養 8 日目) と定常期 (培養 20 日目) の細胞と定常期 (培養 14 日目) のミドリゾウリムシから取り出した共生生活クロレラの細胞の直径を光学顕微鏡 (Nikon, ECLIPSE Ni-U) 下で観察し比較した。平均値の差の検定には Welch の t 検定を用いた。

#### 1-5 透過型電子顕微鏡観察と細胞壁の厚さ

電子顕微鏡観察のための固定法は、化学固定法と凍結置換固定法の二つに大別できる。ミドリゾウリムシに共生するクロレラの観察には、よりアーティファクトの少ない凍結置換固定法が適していると考えられる (Song and Suzaki, 2013; Song et al., 2017) ので、本研究では、凍結置換固定法を用いて自由生活クロレラと共生生活クロレラの観察と、微細形態の比較を行った。

##### 1-5-1 凍結置換固定法

細胞の急速凍結は、急速凍結装置 (VFZ-1, Japan Vacuum Device, Ltd., Japan) を用いて、液体窒素 (-196°C) であらかじめ冷却した金属ブロックに細胞懸濁液を圧着して凍結する金属圧着法で行った。凍結した細胞は、冷却した固定液 (1% OsO<sub>4</sub> アセトン溶液) に移し、deep freezer (-80°C) 中で三昼夜間、時々混和しながら置換した。その後、冷凍庫 (-20°C) に 1 時間、冷蔵庫 (4°C) に 0.5 時間おいてから室温に戻した。凍結置換した細胞はチューブに集め、卓上遠心機 (DISKBOY) でペレットができるまで遠心し上清を捨て 100%アセトンを加えた。それを卓上遠心機で遠心し上清を捨てて 100%アセトンを加える過程をさらに 2 回繰り返して完全に脱水した。脱水が終わったサンプルを、遠心

し上清の半量を捨て、同量の Spurr 樹脂 (Polysciences, Inc., Warrington, PA)を加えた後に、30 分間ローテーションを行った。それを遠心分離機 (Eppendorf, Centrifuge 5702 R) で 4,400 rpm 20°Cで 5 分間遠心し、上清を半分取り除き、新しい Spurr 樹脂を加えた。サンプルを 30 分間ローテーションし、4,400 rpm 20°Cで 5 分間遠心し、樹脂を捨てて新しい樹脂を加える作業を 2 回行い、完全に樹脂へと置換した。樹脂に入った試料はビームカプセルに入れ、遠心により細胞をカプセルの下部に集積させた後、あらかじめ加温しておいた重合用オープン中で、70°C、8 時間重合した。このように作製した細胞のブロックを、ガラスナイフやダイヤモンドナイフを取り付けたウルトラマイクロトームを用いて超薄切片にし、neoprene W で処理した銅製のグリッドメッシュにホルムバールの支持膜を貼った上に載せた。超薄切片を載せたグリッドは EM ステイナー (日新 EM) で 15 分間染色した。その後、よく洗浄した後、クエン酸鉛溶液 (Reynolds, 1963) で 5 分間染色し、洗浄・風乾した。染色されたグリッドは、透過型電子顕微鏡 (Hitachi, H-7100) で観察を行った。

#### 1-5-2 クロレラ細胞壁の厚さの測定

透過型電子顕微鏡による観察でみられた自由生活クロレラと共生生活クロレラの細胞を各々 20 個ずつ選び、細胞壁の厚さを測定した。平均値の差の検定には Welch の t 検定を用いた。

#### 1-6 クロレラ細胞壁の糖鎖の染色

ミドリゾウリムシの細胞内共生に伴うクロレラ細胞壁の化学組成の変化を調べるために自由生活クロレラと共生生活クロレラを蛍光染色し、染色の強さを比較した。染色されたクロレラを共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FV1000-D) で観察し、得られた画像から蛍光強度を算出し比較解析を行った。

##### 1-6-1 クロレラの濃縮と洗浄

自由生活クロレラの濃縮と洗浄は次のように行った。クロレラを 2 週間培養した C 培地 40 mL をプラスチックチューブに入れ、4,400 rpm、20°Cで 5 分間遠心し上清を捨て同量の蒸留水を加えた。さらに遠心分離機で 4,400 rpm、20°Cで 5 分間遠心し上清を捨てる工程を 3 回行った。最終的に 5 mL になるように蒸留水を加え、自由生活クロレラの細胞懸濁液を得た。この洗浄作業により、培地を除去した。

共生生活クロレラの濃縮と洗浄は次のように行った。ミドリゾウリムシの培養液 200 mL をプラスチックチューブに入れ 4,400 rpm、20°C で 5 分間遠心し 20 mL に濃縮した。得られたミドリゾウリムシの細胞懸濁液に超音波発生機の強度 2 目盛 25°C で 1 分間超音波をかけてミドリゾウリムシの細胞を破碎した。それを遠心分離機で 4,400 rpm、20°C で 5 分間遠心し上清を捨てる工程を 3 回行った。最後に 5 mL になるように蒸留水を加え、共生生活クロレラの細胞懸濁液を得た。

#### 1-6-2 蛍光染色

クロレラは Calcofluor white M2R (Fluorescent Brightener, SIGMA)、FITC Labeled Lectin WGA (EY Laboratories, Inc.) と FITC Labeled Lectin LFA (EY Laboratories, Inc) の 3 種の試薬で染色した(表 3)。濃縮と洗浄をされた自由生活クロレラと共生生活クロレラを、遠心分離機(KUBOTA, 3500)で 5,000 rpm、20°C で 5 分間遠心し上清を捨てた後、Calcofluor 水溶液 (0.5 g/L) を 1 mL 加え、20°C で 5 分間染色した。WGA と LFA による染色では、クロレラのペレットに WGA あるいは LFA の水溶液 (100 mg/L) を加え、20°C で 10 分間染色した。染色後のクロレラは、5,000 rpm、20°C で 5 分間遠心し、上清を捨て蒸留水を上清と同量加える操作を 3 回繰り返すことで染色液を除いた。染色後のクロレラは蒸留水 100  $\mu$ L 中に懸濁し、等量の退色防止剤 Aqua Poly/Mount (Polysciences Inc) とともにプレパラートにした。カバーガラスの 4 辺をマニキュアで固め、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

細胞壁中のセルロース量を推定するために、cellulase (SIGMA) を用いた実験も行った。自由生活クロレラと共生生活クロレラを 1 mL プラスチックチューブに入れ、cellulase を濃度が 10 g/L、20 g/L、50 g/L になるように加え、20°C で 24 時間振とうした。その後、4,400 rpm、20°C で 5 分間遠心し上清を捨てる操作を 3 回行った。この洗浄作業により、培地を除去した。次いで、Calcofluor 水溶液 (0.5 g/L) を 1 mL 加え、クロレラを 5 分間 20°C で染色した。その後の手順は Calcofluor 染色時と同様である。

#### 1-6-3 共焦点レーザー顕微鏡観察

Calcofluor と WGA と LFA の蛍光と、クロロフィルの自家蛍光を、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FV1000-D) で観察した。蛍光染色を施したクロレラのプレパラートを共焦点レーザー顕微鏡にセットし、明視野で観察しクロレラ同士が重なっていない部分に視野を合わせた。その後、励起光を当て、蛍光の画像を撮影した。Calcofluor は励起光 405

nm で 425-475 nm の範囲の蛍光、FITC-WGA と FITC-LFA は励起光 473 nm で 485-585 nm の範囲の蛍光、クロロフィルの自家蛍光は励起光 405 nm で 630-730 nm の範囲の蛍光を観察した。クロロフィルの自家蛍光をクロレラの生存の基準とした (図 3)。自由生活クロレラと共生生活クロレラを観察するときは同じ設定を用いた。

#### 1-6-4 蛍光強度の測定

共焦点レーザー顕微鏡で撮影した蛍光の画像は、画像解析ソフト Image J を用いて、蛍光強度の定量的解析を行った。まず、クロロフィルの自家蛍光を観察し、自家蛍光を発している生きたクロレラ細胞を選んだ。次に Calcofluor (または WGA、LFA) の蛍光画像を Image J で読み出し、クロレラ細胞を楕円図形で選択し、そこに含まれるピクセルあたりの平均輝度を算出し、蛍光強度 (任意単位) とした。平均値の差の検定には Welch の t 検定を用いた。

#### 1-7 マルトース放出量の測定

Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) はサンプル中の標的分子に特異的な蛍光色素を検出ベースとして DNA、RNA、タンパク質の量やその品質を正確に測定するために設計されたベンチトップ型フルオロメーターである。Qubit は Amplex® グルコースアッセイキットを用いると溶液中のグルコース濃度を測定することができ、本研究ではその機能を用いてクロレラが放出するマルトースの量を測定した。

##### 1-7-1 グルコース濃度の測定法

Qubit によるグルコース濃度測定原理は、次の通りである。まず D-グルコースがグルコースオキシダーゼによって酸化され D-グルコノラクトンと過酸化水素が生成される。生成された過酸化水素は HRP (Horseradish peroxidase) を触媒として、特異性の高い蛍光プローブ (Amplex® Red reagent) と 1:1 で結合し、レゾルフィン (励起/蛍光波長= 570/585 nm) を生成する。レゾルフィンの蛍光強度を測ることによってグルコース濃度を算出する。

Qubit によるグルコース濃度の測定手順は、まず検量線を作成するためのスタンダードサンプルを用意する。スタンダードサンプルはグルコースが 0  $\mu$ M の溶液 (1×Reaction Buffer) と 120  $\mu$ M のグルコース溶液である。測定するサンプルとスタンダードサンプルを 100  $\mu$ L ずつ 0.5 mL チューブに入れ、各チューブに 100  $\mu$ L の Working Solution (表 4)



を加えて反応を開始させる。一定時間後に Stop Reagent を加えて反応を停止させ、Qubit で溶液中のグルコース濃度を測定する。

### 1-7-2 マルトース濃度の測定法

グルコース濃度の測定法は前述のような方法であるが、マルトースを事前に $\alpha$ -グルコシダーゼ (Wako) (以下、マルターゼ) で分解することによってマルトースの濃度を測定することも可能である (志賀、卒論)。マルターゼの濃度、反応時間、温度は志賀の卒業論文を参考にした。

Qubit でのマルトース濃度測定の精度を調べるために、グルコース溶液とマルトース溶液のさまざまな濃度で蛍光強度を測定した。マルトースはマルターゼで加水分解され 2 分子のグルコースになるため、濃度はグルコースの半分にして用いた。サンプルを 100  $\mu$ L ずつ 0.5 mL チューブに入れ、マルターゼ溶液 (4 U/mL) を 10  $\mu$ L 混合し、2 時間 25°C で静置した後に Amplex® グルコースアッセイキットと Qubit を用いて蛍光強度を測定した。

### 1-7-3 クロレラが放出するマルトース量の測定

自由生活クロレラと共生生活クロレラをそれぞれ 1.5 mL チューブに入れ遠心分離機 (KUBOTA, 3500) で 15,000 rpm、3 分間遠心し、上清を捨て同量の蒸留水を加えた。さらに 15,000 rpm、3 分間遠心し上清を捨てる洗浄操作を 2 回行った。クロレラの細胞密度を血球計算盤で測定し、新しいセリン添加 C 培地 (pH 7.5, 4.0) 中で細胞密度が 5,000,000 cell/mL になるように調整した。クロレラに白色 LED ライト (1,000 lx) を照射し 25°C で振とうしながら 3 時間マルトースを放出させた。その後、チューブを 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を取り出しマルトース濃度測定サンプルとした。測定サンプルとスタンダードサンプル (0  $\mu$ M、60  $\mu$ M マルトース溶液) を 100  $\mu$ L ずつ 0.5 mL チューブに入れ、マルターゼ溶液 (4 U/mL) を 10  $\mu$ L 混合し、2 時間 25°C で静置しマルトースを分解させた。その後は「2-7-1 グルコース濃度の測定法」に基づいて測定した。溶液中のグルコース濃度からクロレラが放出したマルトースの量を算出し、自由生活クロレラと共生生活クロレラで培地の pH ごとに比較した。

クロレラ Kb1 がグルコースではなくマルトースを放出することを確認するために、自由生活クロレラをセリン添加 C 培地 (pH 4.0) で 3 時間培養した溶液にマルターゼ処理を行った場合と行わなかった場合とで「2-7-1 グルコース濃度の測定法」に基づいた測定

を行い蛍光強度を比較した。

#### 1-8 トランスクリプトーム解析

次世代シーケンサーIllumina HiSeq X を用いて、9 種類のサンプルについて *de novo* トランスクリプトーム解析を行った (表 6)。

クロレラのサンプルの調製は、細胞を 5 倍量の RNAlator (qiagen) で懸濁し、懸濁液と 0.1 mm ガラスビーズを 1:1 で混合し Bead Smash 12 (WakenBTech) で 5,000 rpm で 60 秒のホモジナイズを 10 回行い細胞を破碎し、RNeasy Kit (qiagen) を用いて RNA を抽出した。

*De novo* トランスクリプトーム解析は主に Trinity (Haas et al., 2013) のパッケージで行った。まず次世代シーケンサーで得られたリードに FastQC (ver. 0.11.5) によるクオリティチェックと AfterQC (ver. 0.9.3) によるトリミングを行いクリーニングした。次に Trinity (ver. 2.5.1) による *de novo* アセンブリーを行い、リファレンス配列を作成する。作成されたリファレンス配列にリードの塩基配列をマッピングし、kallisto (ver. 0.43.1) で発現量を推定した。さらにサンプル群同士で比較する為に DESeq2 (Love et al., 2014) により正規化し多群間比較で差次的発現を解析し、発現変動遺伝子を検出し、MA plot により特徴的なものを可視化した。

表1 クロレラの培養に用いたセリン添加 C 培地 (Kato and Imamura, 2008)

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.15 g
KNO <sub>3</sub>	0.10 g
β-Na <sub>2</sub> グリセロリン酸	0.05 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.04 g
Vitamin solution	1 mL
PIV metals	3 mL
Tris-HCl	0.5 g
L-Serine	0.2 g
Distilled water	1 L

表2 PIV metals (Provasoli and Pintner, 1959)

Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	100 mg
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	19.6 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3.6 mg
ZnCl <sub>2</sub>	1.04 mg
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.4 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25 mg
Distilled water	100 mL

表3 クロレラ細胞壁の染色に用いた試薬

Calcofluor は、セルロース、キチン、シアル酸、およびグリコサミノグリカンを含む  $\beta$ -D-グルコピラノース多糖類 (Chen et al., 2007) と反応する蛍光色素である (Bezares et al., 2008; Albani et al., 2000; Kapaun et al., 1995)。WGA は、N-アセチルグルコサミン、キチン、およびシアル酸に結合するレクチンである (Rodrigues et al., 2008)。LFA は、シアル酸と特異的に反応するレクチンである (Fischer and Brossmer, 1995)。

	Calcofluor White	FITC-WGA	FITC-LFA
クロレラ細胞壁上の標的分子	シアル酸	シアル酸	シアル酸
	キチン	キチン	
	セルロース		
	グリコサミノグリカン		
励起/蛍光波長 (nm)	405/525–545	473/485–585	473/485–585

表4 グルコース濃度測定のための Working Solution の組成

Qubit 用の Amplex® グルコースアッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

Amplex® Red reagent stock solution	10 $\mu$ L
HRP stock solution	20 $\mu$ L
glucose oxidase stock solution	20 $\mu$ L
1x Reaction buffer	950 $\mu$ L

表5 SDS-PAGE 用泳動ゲルの組成

	running gel	stacking gel
30% Acrylamide	4 mL	600 $\mu$ L
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 mL	334 $\mu$ L
10% SDS	100 $\mu$ L	40 $\mu$ L
10% APS	100 $\mu$ L	40 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L	4 $\mu$ L
DDW	3.3 mL	3.0 mL

表6 トランスクリプトーム解析に用いたサンプル

トランスクリプトーム解析には、ミドリゾウリムシ Pb-Kb1、白化ミドリゾウリムシ Pb-Kb1、共生生活クロレラ Kb1、自由生活クロレラ Kb1、自由生活状態のクロレラ NC64A、クロレラ#48 を用いた。ミドリゾウリムシ Pb-Kb1, 白化ミドリゾウリムシ Pb-Kb1, 共生生活クロレラ Kb1 は増殖状態が対数期の後半（培養4日目）と定常期の序盤（培養8日目）でそれぞれサンプルを作製した。すべてのサンプルは2つずつ作製し次世代シーケンサーにかけた。

生物種(株)	増殖状態	サンプル番号
ミドリゾウリムシ(Pb-Kb1)	対数期	4C, 4D
	定常期	4A, 4B
白化ミドリゾウリムシ(Pb-Kb1)	対数期	4E, 4F
	定常期	4G, 4H
共生生活クロレラ(Kb1)	対数期	2I, 2J
	定常期	2G, 2H
自由生活クロレラ(Kb1)	定常期	2E, 2F
自由生活クロレラ(NC64A)	定常期	2A, 2B
自由生活クロレラ(#48)	定常期	2C, 2D

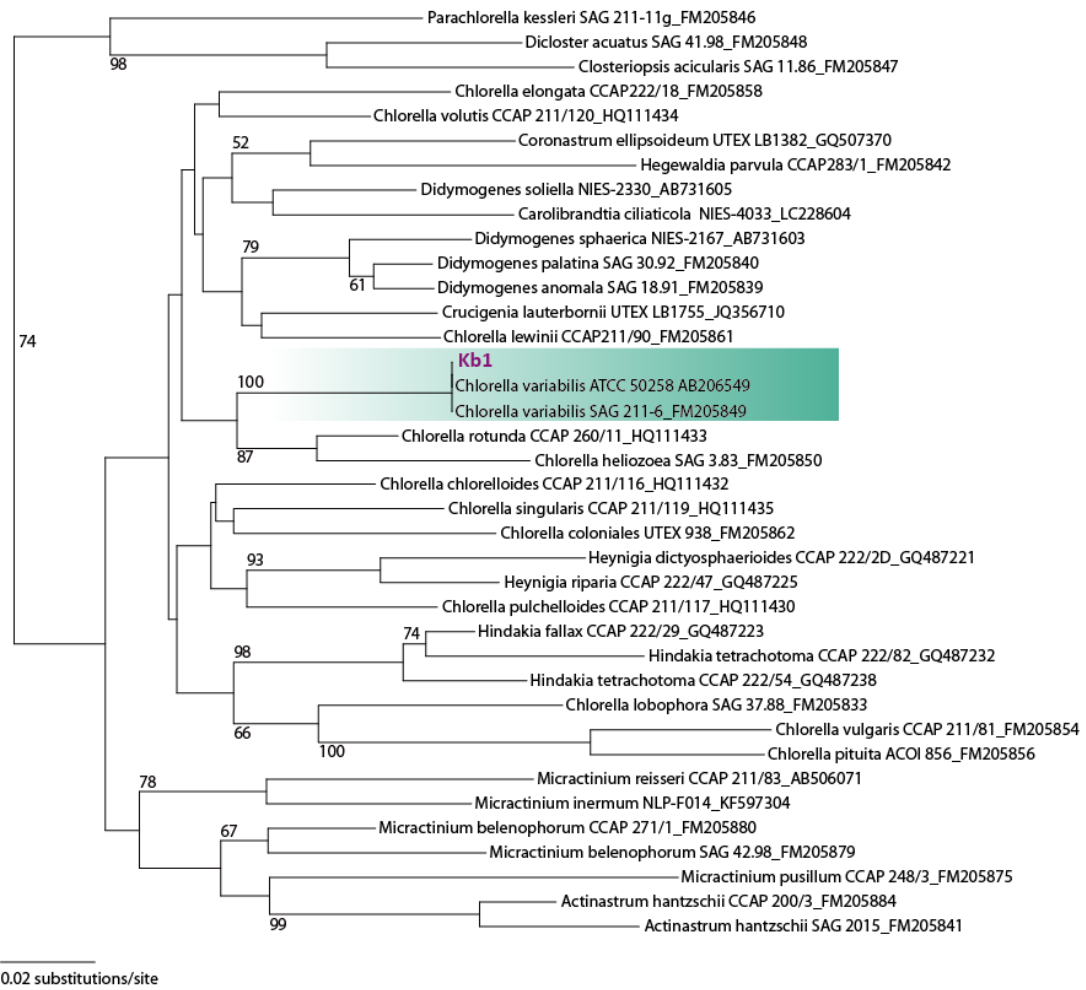


図1 クロレラ Kb1 株と近縁の緑藻類の系統関係(ITS2 領域の近隣結合法による系統樹)

系統樹は ClustalX2 (Larkin et al. 2007) プログラムを用いてギャップがない位置を除外するオプションで構築した。アライメントは Heeg and Wolf (2015) に基づいて行った。各ノードの数字は、NJ 分析のブートストラップ確率を表し、50%を超える値のみ表示した。Kb1 株の ITS2 領域は *C. variabilis* SAG 211-6 株や *C. variabilis* ATCC 50258 (NC64A 株) のいくつかの配列と同一であり、他の種とは独立したクレードを形成したことから、Kb1 株は *C. variabilis* と同定された。また、Kb1 株の rDNA 配列に含まれていた L200 の位置のグループ I イントロンは *C. variabilis* からのみ見出されている (Hoshina and Imamura, 2009)。

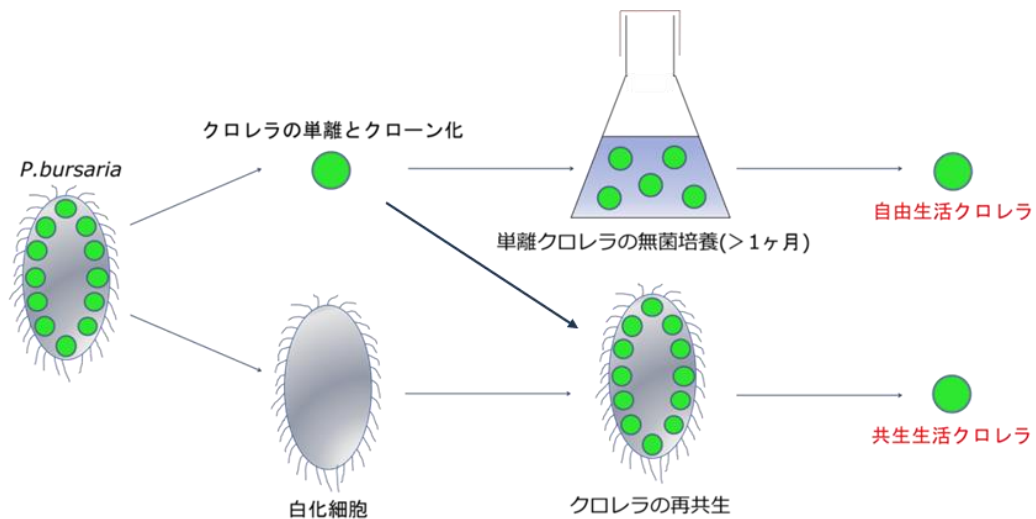


図2 自由生活クロレラと共生生活クロレラの作製方法

自由生活クロレラはミドリゾウリムシ *Pb-Kb1* 株から単離とクローン化された後にセリン添加液体C培地で1か月以上培養されたクロレラ *Kb1* 株のことを指す。共生生活クロレラは、実験の直前に超音波破碎されたミドリゾウリムシ *Pb-Kb1* 株の細胞から得られたクロレラ *Kb1* 株を指す。

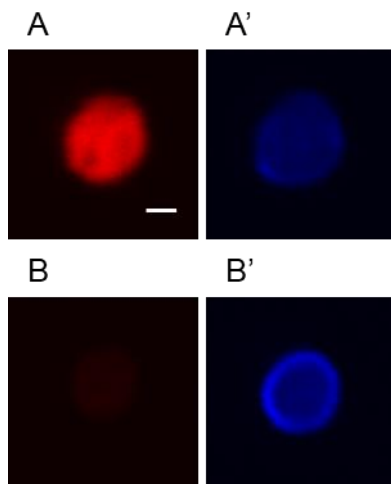


図3 共焦点レーザー顕微鏡で観察したクロレラ *Kb1* の蛍光像

クロレラ *Kb1* に Calcofluor 染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で Calcofluor 蛍光とクロロフィルの自家蛍光を観察した。(A)はクロレラ *Kb1* 生細胞のクロロフィル自家蛍光像、(A')は(A)の細胞の Calcofluor 蛍光像、(B)はクロレラ *Kb1* 死細胞のクロロフィル自家蛍光像、(B')は(B)の細胞の Calcofluor 蛍光像である。倍率は全て同じでスケールバーは  $2\ \mu\text{m}$  を示す。

## 2 結果

### 2-1 細胞の観察

光学顕微鏡でミドリゾウリムシとクロレラを観察し、写真を撮影した (図 4)。

ミドリゾウリムシの定常期の細胞懸濁液の細胞密度は平均  $1,160 \text{ cells/mL}$  であった。細胞懸濁液内のミドリゾウリムシを超音波で完全に破壊し、得られたクロレラの細胞懸濁液の細胞密度を測定すると平均  $509,300 \text{ cells/mL}$  となった。この結果から、ミドリゾウリムシ Pb-Kb1 は 1 細胞あたり約 439 細胞の共生クロレラを有していることがわかった。

### 2-2 増殖曲線と細胞の直径

自由生活クロレラの細胞数の経時変化を測定し増殖曲線を作成した (図 5)。定常期の細胞密度は約  $2.5 \times 10^7 \text{ cells/mL}$  で、定常期になるまでの期間は 10 日程度であった。

自由生活クロレラ対数期の細胞直径は  $3.8 \pm 0.51 \mu\text{m}$  ( $n = 60$ )、自由生活クロレラの定常期の細胞直径は  $5.0 \pm 0.56 \mu\text{m}$  ( $n = 72$ )、定常期のミドリゾウリムシから取り出した共生生活クロレラの細胞直径は  $4.9 \pm 0.49 \mu\text{m}$  ( $n = 54$ ) であった (図 6)。共生生活クロレラの細胞直径は対数期の自由生活クロレラと有意に差があり、定常期の自由生活クロレラとは有意差がなかったことから、定常期のミドリゾウリムシ細胞内のクロレラの細胞分裂は頻繁でないことが推測された。

### 2-3 透過型電子顕微鏡観察

#### 2-3-1 共生に伴う細胞壁の厚さの変化

自由生活クロレラと共生生活クロレラを凍結置換固定法で処理し、透過型電子顕微鏡で観察した。凍結固定を行った試料は細胞の収縮はほとんど起きていなかったが、凍結時に氷結晶ができて試料の細胞が壊れている部分があった。氷結晶ができておらず、クロレラの細胞壁と細胞膜が明確に判別できる自由生活クロレラと共生生活クロレラをそれぞれ 21 個体選択し、細胞壁の厚さを測定した。細胞壁の表面は毛羽立ったような構造をしていたため (図 7-B,C)、その毛羽立ちの根本の部分から細胞壁の厚さを測定した。測定の結果、自由生活クロレラの細胞壁の厚さは  $14.2 \pm 3.0 \text{ nm}$  で、共生生活クロレラは  $8.1 \pm 2.0 \text{ nm}$  で自由生活クロレラの半分ほどの厚さであった。Welch の t 検定により、自由生活クロレラと共生生活クロレラには有意に差があり、自由生活クロレラの方が細胞壁の厚いことがわかった (図 7-A)。



### 2-3-2 クロレラ細胞壁表面の毛羽立ち構造

自由生活クロレラと共生生活クロレラの両方で細胞壁の表面は毛羽立った構造が見られた。化学固定法で観察した際は、この毛羽立った構造は共生生活クロレラにのみ観察されていた。しかしながら、凍結置換固定法での観察の結果、自由生活と共生生活の両方のクロレラに毛羽立ち構造が見られた。凍結置換固定法の方がアーティファクトが少ないと考えられるため、毛羽立ち構造は共生に関係なくクロレラ細胞壁上に常に存在している可能性が高い。毛羽立ち構造はクロレラ細胞壁の外側だけでなく内側にも観察された（図 8）。毛羽立ち構造は長さが均一で約 15 nm であり、ミドリゾウリムシに細胞内共生している状態のクロレラでは、この毛羽立ち構造がミドリゾウリムシの PV 膜と近接しており、連結しているようにも見えた（図 9）。

## 2-4 共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光強度の解析

### 2-4-1 共生に伴う Calcofluor の染色性の変化

自由生活クロレラ 47 個体、共生生活クロレラ 27 個体の蛍光強度を測定した。その結果、自由生活クロレラの細胞壁は強い蛍光を示し、共生生活クロレラの細胞壁では蛍光強度が有意に低下した（図 10）。この結果から、自由生活クロレラの細胞壁には共生生活クロレラの細胞壁よりも多くの  $\beta$ -D-グルコピラノース多糖類が存在していることがわかった。

### 2-4-2 共生に伴う LFA の染色性の変化

自由生活クロレラ 33 個体と共生生活クロレラ 28 個体の FITC-LFA の蛍光の観察と蛍光強度の測定を行った。自由生活クロレラと共生生活クロレラの細胞壁の蛍光強度に差は見られなかった（図 11-A）。

### 2-4-3 共生に伴う WGA の染色性の変化

自由生活クロレラ 39 個体と共生生活クロレラ 22 個体の FITC-WGA の蛍光の観察と蛍光強度の測定を行った。自由生活クロレラと共生生活クロレラの細胞壁の間に蛍光強度の差は見られなかった（図 11-B）。

### 2-4-4 細胞壁のセルロースへの Calcofluor の染色性の変化

自由生活クロレラを、セルラーゼをいれた培地で 24 時間振とう培養しセルロースを分

解した後、Calcofluor 染色と共焦点レーザー顕微鏡観察を行い、蛍光強度を測定した（図 11-C）。0%はセルラーゼを含まないセリン添加 C 培地で 24 時間の振とう培養した後の Calcofluor の蛍光強度で、1%、2%、5%はセルラーゼ濃度が各値のセリン添加 C 培地での処理後の Calcofluor の蛍光強度であるが、それぞれに有意な差はなかった。このことからセルロースは Calcofluor によって染色される主要な糖成分ではないことがわかった。

## 2-5 マルトース放出量

### 2-5-1 グルコース溶液とマルトース溶液の蛍光強度の比較

Qubit でのマルトース濃度測定の精度を調べるために、グルコース溶液とマルトース溶液のそれぞれで濃度を変えて蛍光強度を測定した（図 12）。グルコース溶液の蛍光強度を測定した場合と、マルターゼで処理したマルトース溶液の蛍光強度を測定した場合で得られる数値や傾向に大きな差は見られず、この方法でマルトース濃度の測定が可能であることがわかった。

### 2-5-2 自由生活クロレラと共生生活クロレラのマルトース放出量

自由生活クロレラと共生生活クロレラをセリン添加 C 培地に入れ、3 時間後の培地中のマルトース濃度を培地の pH 毎に測定し、クロレラ 1 細胞が 1 時間あたりに放出するマルトースの分子数を算出した（図 13）。細胞密度 5,000,000 cells/mL、白色 LED ライト（1,000 lx）を照射、25°C、振とうの条件下でクロレラ 1 細胞が 1 時間あたりに放出するマルトースの分子数は、自由生活クロレラでは pH 7.5 で  $2.9 \pm 0.11 \times 10^5$  個、pH 4.0 で  $51 \pm 3.0 \times 10^5$  個、共生生活クロレラでは pH 7.5 で  $2.6 \pm 0.26 \times 10^5$  個、pH 4.0 で  $47 \pm 2.6 \times 10^5$  個となった。自由生活クロレラと共生生活クロレラで放出するマルトースの量に有意な差はなく、どちらも培地の pH が下がるとマルトース放出量が増加することがわかった。

自由生活クロレラを 3 時間培養した後のセリン添加 C 培地（pH 4.0）についてマルターゼ処理有りの場合と無しの場合で検出された蛍光強度を比較した（図 14）。マルターゼ処理有りの場合は無しの場合に比べて蛍光強度が有意に高く、マルターゼ処理無しの場合はコントロールのセリン添加 C 培地と蛍光強度の差がなかった。このことからクロレラが放出する糖はグルコースではなくマルトースであることが確かめられた。

## 2-6 トランスクリプトーム解析

RNA-seq で得られたリードデータからクロレラ Kb1 とミドリゾウリムシ Pb-Kb1 のコンティグ配列を作成し、これを質量分析の参照配列として使用した。自由生活クロレラと共生生活クロレラの遺伝子の発現量解析は共同研究者の長浜バイオ大学の小倉淳准教授の研究室から報告予定である。



図 4 ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* Pb-Kb1 株 (A) と単離されたクロレラ *Chlorella variabilis* Kb1 株 (B) の微分干渉光学顕微鏡像

ミドリゾウリムシは 1 細胞あたり 400-500 個の共生クロレラを有していた。スケールバーは (A) が 10  $\mu\text{m}$ 、(B) が 2  $\mu\text{m}$  を示す。

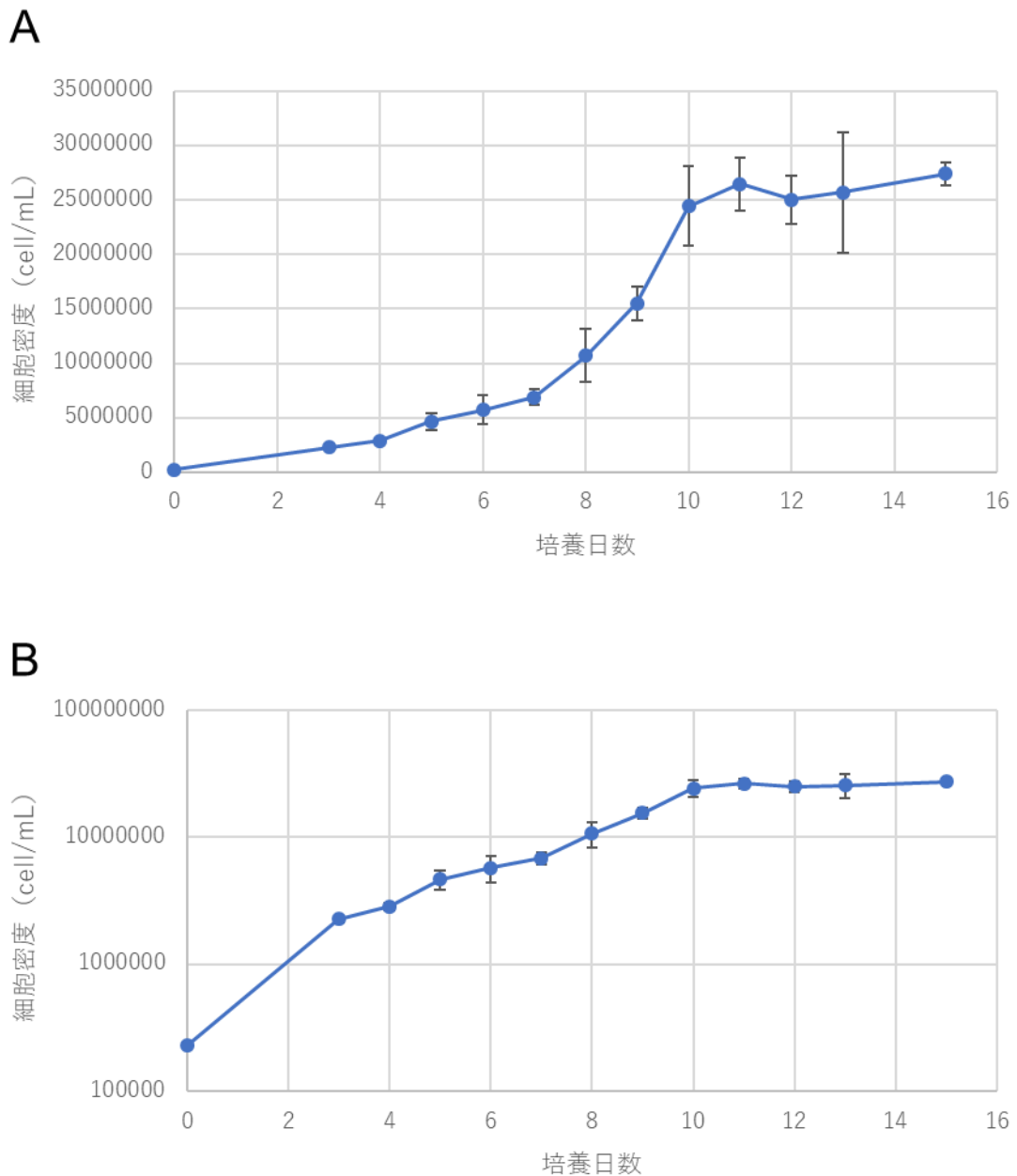


図5 自由生活クロレラ Kbl の増殖曲線

自由生活クロレラに白色 LED ライト (1,000lx) を照射し、恒明、25°C 振とうの条件でセリン添加 C 培地で培養し、細胞数の経時変化を測定し増殖曲線を作成した。(A) は増殖曲線の線形グラフで、(B) は縦軸の細胞密度を対数表示にした半対数グラフである。決まった時間に培養液を 10  $\mu$ L ずつ 3 回採取し、血球計算盤でクロレラの細胞数を測定し増殖曲線を作成した。定常期になるまでにかかる期間は 10 日程度だった。

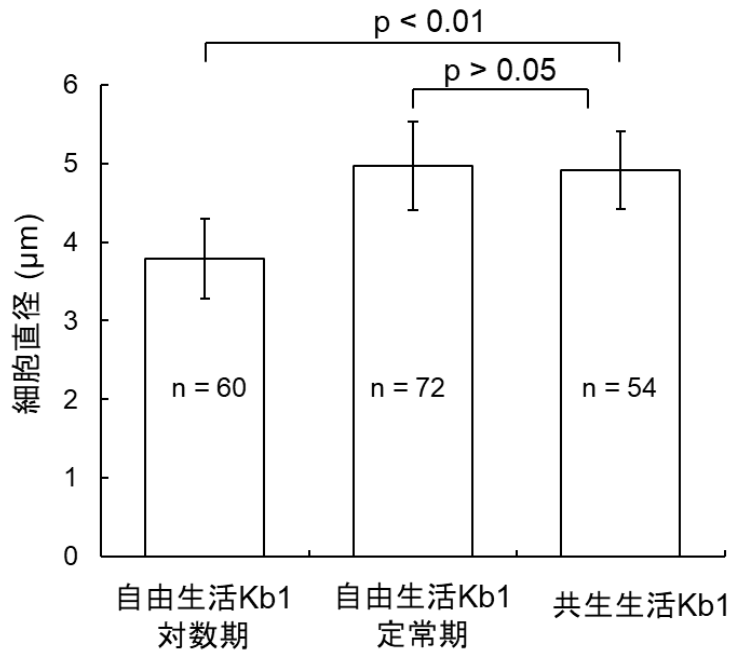


図6 自由生活クロレラ Kb1 と共生生活クロレラ Kb1 の細胞直径

自由生活クロレラの対数期と定常期の細胞と共生生活クロレラの細胞の直径を測定した。共生生活クロレラの細胞直径は対数期の自由生活クロレラと有意に差があり、定常期の自由生活クロレラとは有意差がなかった。誤差範囲は±標準偏差とし、平均値の差の検定には Welch の t 検定を用い、有意差を示した。

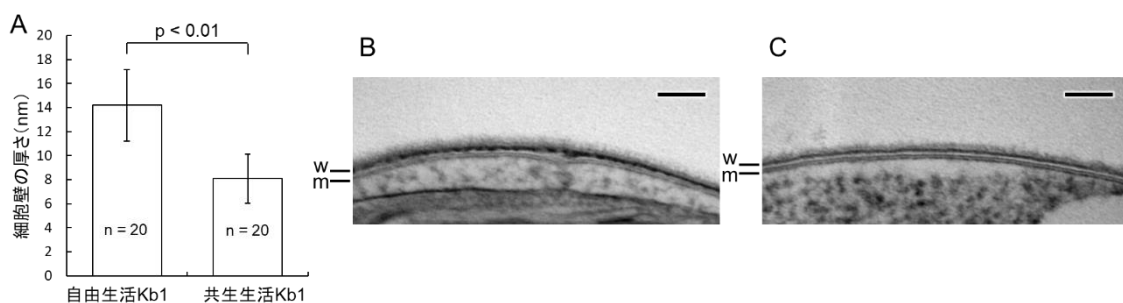


図7 自由生活クロレラ Kb1 と共生生活クロレラ Kb1 の細胞壁の厚さと微細構造の比較

自由生活クロレラの細胞壁の厚さは共生生活クロレラの約2倍であった (A)。誤差範囲は±標準偏差とし、平均値の差の検定には Welch の t 検定を用い、有意差 ( $p < 0.01$ ) を示した。(B) は自由生活クロレラの細胞壁断面の透過型顕微鏡写真で、(C) は共生生活クロレラの細胞壁断面の透過型顕微鏡写真である。w は細胞壁、m は細胞膜を指し示している。自由生活クロレラ (B) と共生生活クロレラ (C) の細胞壁表面は微細な繊維の層で覆われていた。スケールバーは (B) (C) とも 100 nm を示す。

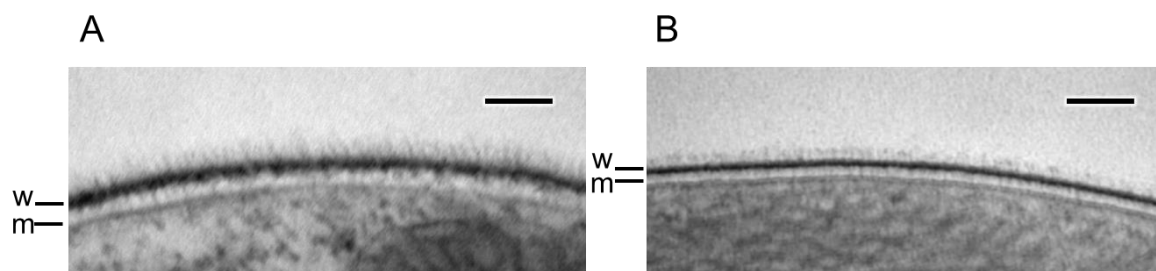


図8 クロレラ K1 細胞壁上の毛羽立ち構造は細胞壁内側にも見られた

細胞壁と細胞膜の間に隙間が空いている細胞を観察すると、自由生活クロレラ (A) と共生生活クロレラ (B) で共に細胞壁の内側にも毛羽立ちが見られた。w は細胞壁、m は細胞膜を指し示している。スケールバーは (B) (C) とも 100 nm を示す。

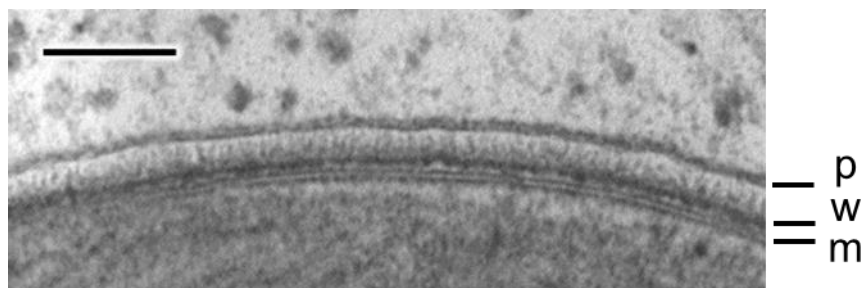


図9 ミドリゾウリムシ Pb-K1 の細胞内に共生しているクロレラ K1 の細胞壁表面の構造

ミドリゾウリムシに凍結置換固定を施し、細胞内共生しているクロレラを観察すると、細胞壁表面の毛羽立ち構造はミドリゾウリムシの PV 膜と近接していた。p は PV 膜、w は細胞壁、m は細胞膜を指し示している。スケールバーは 100 nm を示す。

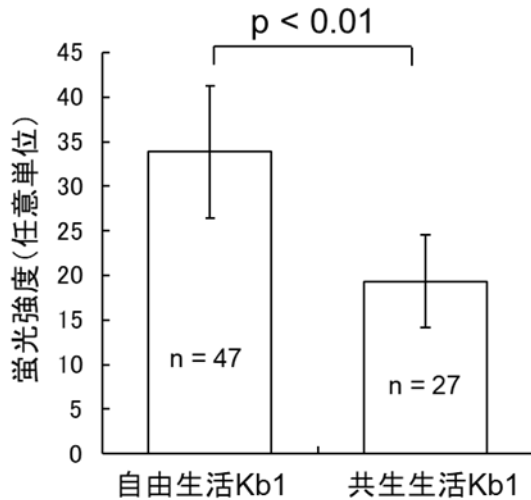


図 10 自由生活クロレラ Kb1 と共生生活クロレラ Kb1 への Calcofluor 染色の蛍光強度の比較

自由生活クロレラと共生生活クロレラに Calcofluor 染色を行い、任意単位で表される蛍光強度を比較した。共生生活クロレラの蛍光強度は自由生活クロレラに比べて有意に減少していた。誤差範囲は±標準偏差とし、平均値の差の検定には Welch の t 検定を用い、有意差 ( $p < 0.01$ ) を示した。

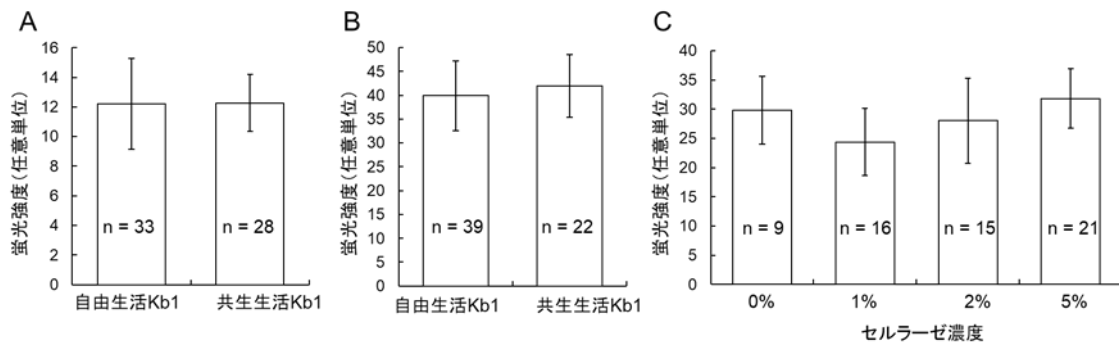


図 11 自由生活クロレラ Kb1 と共生生活クロレラ Kb1 への FITC-LFA (A) または FITC-WGA (B) 染色時の蛍光強度の比較と Calcofluor 染色に様々な濃度のセルラーゼによる前処理を併用したとき (C) の蛍光強度の変化

FITC-LFA (A) と FITC-WGA (B) 染色による蛍光強度は、どちらも自由生活クロレラと共生生活クロレラとで差は見られなかった。セルラーゼ処理の有無やセルラーゼの濃度による Calcofluor の染色性の変化はみられなかった (C)。誤差範囲は±標準偏差とし、平均値の差の検定には Welch の t 検定を用いた。



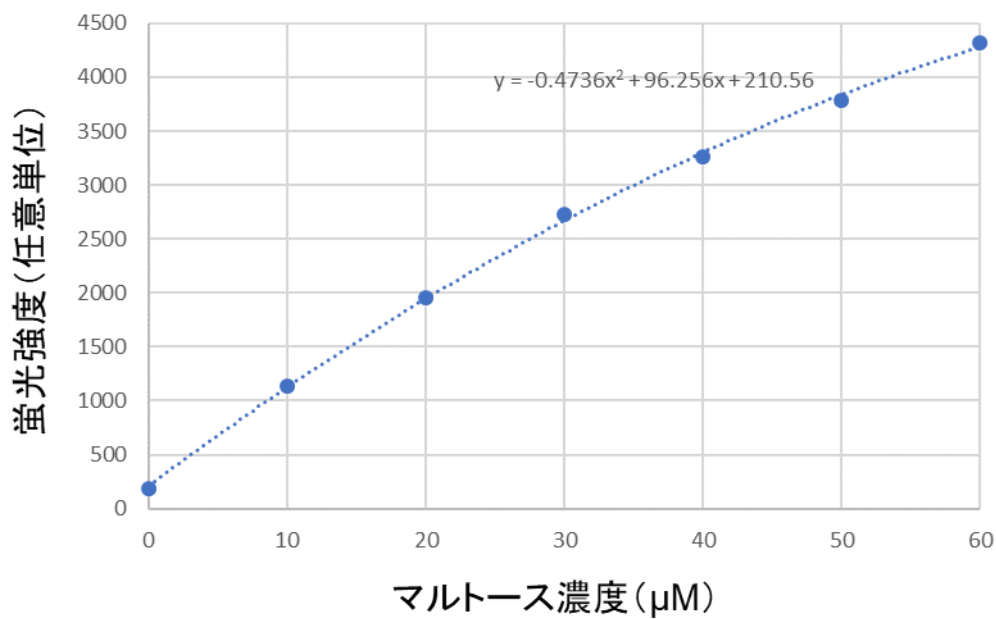
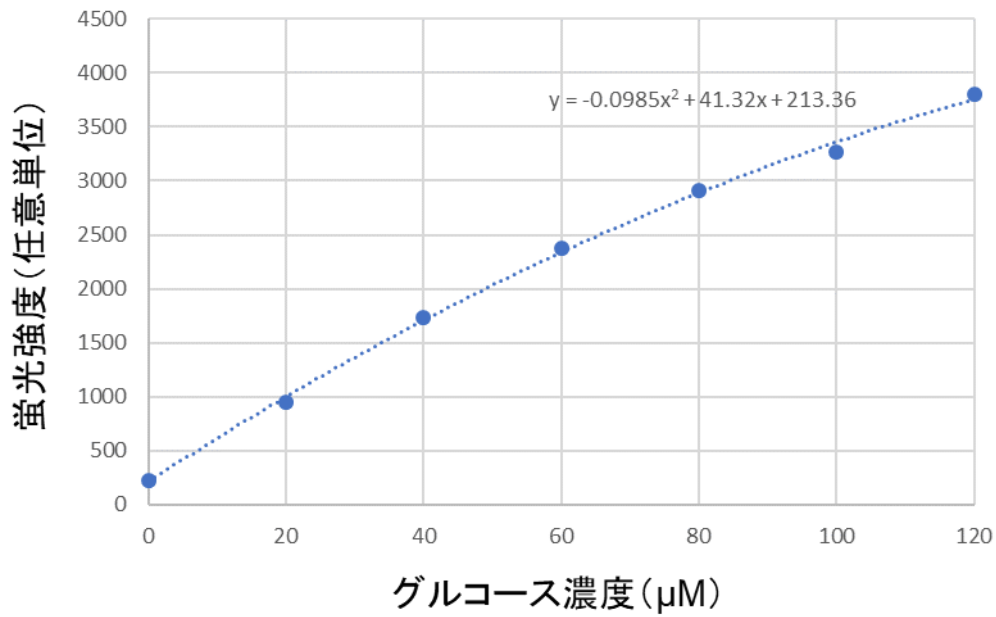


図 12 グルコース濃度とマルトース濃度の検量線

Qubit のグルコース測定機能でグルコースとマルトースの濃度ごとの蛍光強度を測定した。マルトースはマルターゼで加水分解され 2 分子のグルコースになるため、濃度はグルコースの半分にして用いた。マルターゼで分解したマルトースでもグルコースの蛍光強度を測定した場合と同様の結果が得られたため、マルトース濃度の測定もこの方法で可能であると確認された。グラフ中の数式は近似曲線を表している。

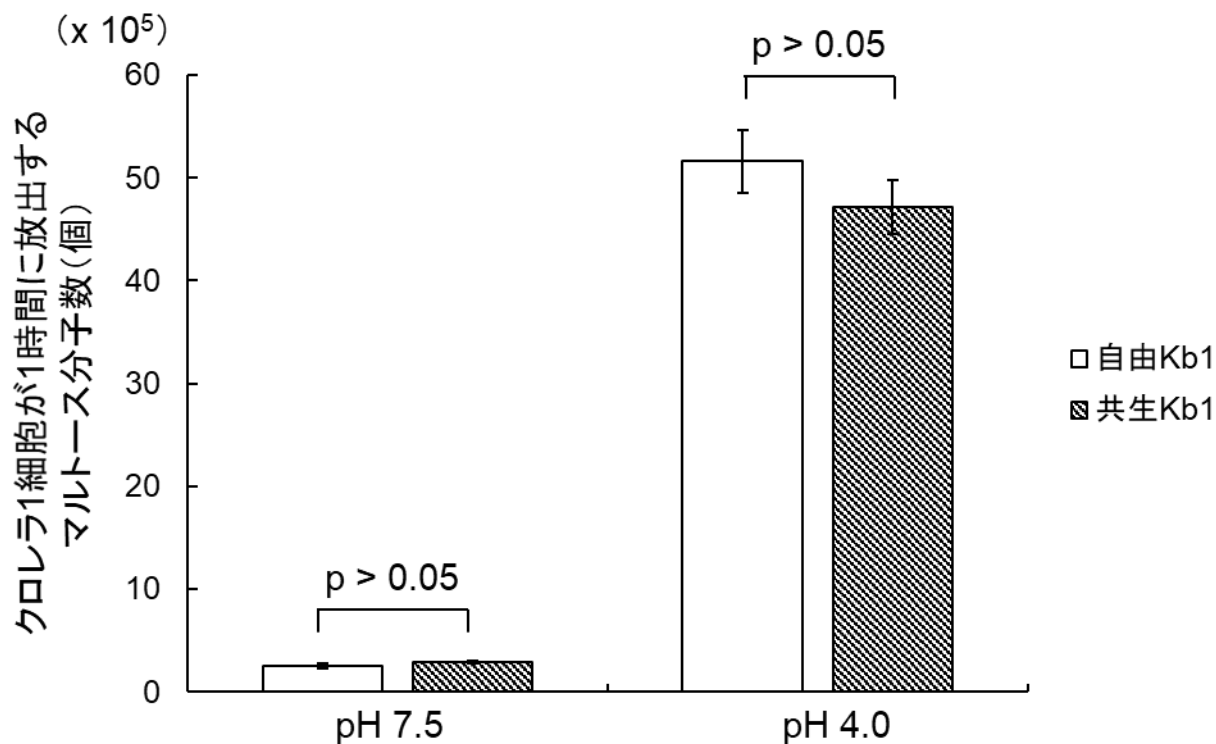


図 13 自由生活クロレラ Kb1 と共生生活クロレラ Kb1 の 1 細胞が 1 時間に放出したマルトース分子数

自由生活クロレラと共生生活クロレラについてセリン添加 C 培地中で 1 細胞が 1 時間に放出したマルトースの分子数を示した。細胞密度は 5,000,000 cells/mL、マルトースを放出させる時間は 3 時間に揃えた。自由生活クロレラと共生生活クロレラで放出したマルトースの分子数に差はなく、培地中の pH を下げるとマルトースの放出量が有意に増加した。誤差範囲は±標準偏差とし、平均値の差の検定には Welch の t 検定を用いた。

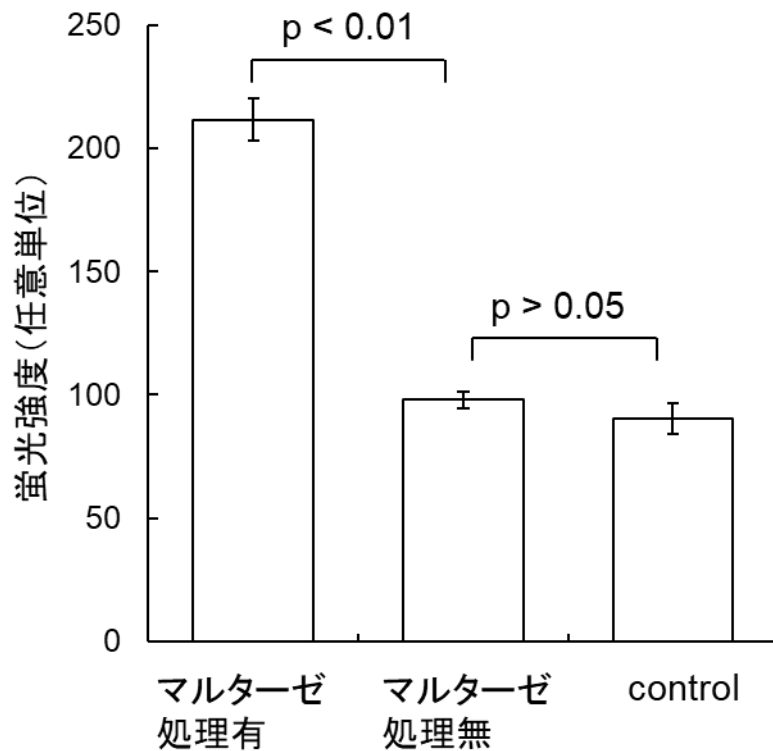


図 14 自由生活クロレラ Kb1 の放出糖へのマルターゼ処理の有無による蛍光強度の変化

自由生活クロレラの細胞密度を 5,000,000 cells/mL にし 3 時間培養した後のセリン添加 C 培地 (pH 4.0) についてマルターゼ処理有りの場合と無しの場合で Qubit のグルコース測定機能で検出される蛍光強度を比較した。コントロールにはクロレラを混合しなかったセリン添加 C 培地 (pH 4.0) を使用した。マルターゼ処理有りの場合は無しの場合に比べて蛍光強度が有意に高く、マルターゼ処理無しの場合はコントロールのセリン添加 C 培地と蛍光強度の差がなかった。誤差範囲は土標準偏差とし、平均値の差の検定には Welch の t 検定を用いた。

### 3 考察

#### ミドリゾウリムシ細胞内のクロレラの細胞分裂速度

共生を行う生物の中には宿主の細胞が共生体の細胞増殖を制御する機構をもつと考えられているものもある。ヒドラの共生藻は、宿主のヒドラ細胞から何らかの調節作用を受け、ヒドラの分裂と同調した細胞分裂を行うことが知られている (McAuley, 1982)。一方、ミドリゾウリムシについては、宿主と共生するクロレラは細胞分裂のタイミングが同調しているという報告もあるが (Kadono et al., 2004; Takahashi et al., 2007)、ミドリゾウリムシの細胞内で増えすぎたクロレラが消化されたり細胞肛門から排出されることでミドリゾウリムシ細胞内での数が制御されているとするものもあり (Omura et al., 2004)、宿主細胞内のクロレラの細胞分裂の調節機構は明らかになっていない。自由生活クロレラと共生生活クロレラの細胞直径比較から、定常期のミドリゾウリムシの細胞内のクロレラは定常期の自由生活クロレラのサイズに近く、対数期のように頻繁には細胞分裂していないことが示唆された。本研究で行った細胞壁の厚さの測定や細胞壁の糖の蛍光染色実験では、定常期のミドリゾウリムシから取り出した共生生活クロレラと定常期の自由生活クロレラを比較しており、そこでみられた差は細胞分裂の頻度の違いによるものではないということが言えるだろう。定常期のミドリゾウリムシ細胞内のクロレラが頻繁に細胞分裂をしないことがミドリゾウリムシによる調節を受けた結果なのか、ミドリゾウリムシの細胞内でのクロレラの細胞密度が高まり栄養条件が悪くなった結果なのかは判断できない。

#### 細胞内共生に伴うクロレラ細胞壁の形態の変化の重要性

自由生活クロレラと共生生活クロレラの電子顕微鏡観察によりクロレラの細胞壁は共生状態において薄くなることが明らかになった。*C. vulgaris* では培養条件が変化しても細胞壁の厚さは一定であることが報告されている (Martínez et al. 1991)。著者の知見ではクロレラの細胞壁の厚さが環境によって変化するという報告はなく、今回見出された共生に伴う細胞壁の厚さの減少は、ミドリゾウリムシとクロレラとの間の共生相互作用に起因する可能性がある。またクロレラ Kb1 の細胞壁表面には繊維状の毛羽立ち構造が観察された。クロレラの細胞壁に存在するポリアニオン成分が、PV 膜のリソソームによる攻撃から防いでいる可能性を示唆する研究があり (Karakashian and Rudzinska, 1981)、毛羽

立ち構造がポリアニオン性の糖鎖でミドリゾウリムシに捕食されたクロレラ入りの PV 膜にリソソームが結合することを阻害している可能性が考えられる。この毛羽立ち構造はミドリゾウリムシの PV 膜と近接していた。ミドリゾウリムシのミトコンドリアが、PV 膜を介してクロレラ細胞壁と頻繁に密接な関係を形成することが報告されている (Song et al., 2017)。これらの所見は、共生関係の形成および維持におけるクロレラ細胞壁と PV 膜との間の相互作用の重要性を示唆している。

### 細胞壁のグリコサミノグリカンが細胞内共生に関与する可能性

自由生活クロレラと共生生活クロレラの細胞壁を 3 種類の糖結合性の試薬を用いて染色しその蛍光強度を比較した結果、Calcofluor では自由生活クロレラで蛍光強度が有意に高く、FITC-LFA と FITC-WGA では差はみられなかった。このことからクロレラの細胞壁では Calcofluor で染色される  $\beta$ -D-グルコピラノース多糖類が共生に伴い減少しており、その変化は LFA が反応するシアル酸や WGA が反応するキチンによるものではないことが示唆された。共生性のクロレラの中には、藻類では珍しく細胞壁にセルロースを持たない種がある (Kapaun, and Reisser, 1995)。クロレラ Kb1 に対してセルラーゼ処理後に Calcofluor 染色を行っても未処理の場合と同様の蛍光強度が測定されたことから、クロレラ Kb1 の細胞壁にもセルロースが存在しない可能性が示された。以上のことから消去法的に、グリコサミノグリカンが Calcofluor 染色性の変化の原因と考えられる物質として残った。

グリコサミノグリカンは硫酸基が付加された二糖の繰り返し構造からなる多糖類である。グリコサミノグリカンは負に荷電したポリアニオン性多糖鎖であるため、PV 膜へのリソソーム攻撃を防止する助けになっている可能性がある (Karakashian and Rudzinska, 1981)。また、細胞壁の糖組成が共生性のクロレラと非共生性のクロレラで異なり、共生性のクロレラ種はグリコサミノグリカンの成分糖の 1 つであるグルコサミンが豊富であるとする報告がある (Takeda et al., 1998)。これらの報告や本研究の結果より、細胞壁を構成するグリコサミノグリカンがミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生を促進する上で重要であることが示唆されている。

### Qubit によるクロレラの糖放出量測定の有用性と共生時のマルトース放出能

糖の定量法には、フェノール-硫酸法や Somogyi-Nelson 法などの吸光度測定による方法や高速液体クロマトグラフィーによる方法があるが、溶液中のグルコースやマルトースに限定すると本研究で用いた Qubit による測定法は非常に簡便で正確性もあり、クロレラの放出糖量の検出には有用な手法であることがわかった。本章でのマルトースの放出量測定実験では、マルトース量が正確に測定できる実験系が確立されたことと、クロレラ Kbl の放出糖はマルトース特異的でグルコースは含まれていないということが示された。低 pH 環境でのマルトース放出量の増加は他の共生藻の性質とも一致しており、酸性とされているミドリゾウリムシの PV 膜内部でより多くマルトースを放出できる系が共生関係の歴史の中で選択されてきた結果なのかもしれない。マルトースの放出量は自由生活クロレラと共生生活クロレラで差はなかったが、共生生活クロレラはミドリゾウリムシから取り出した細胞なので、実際のミドリゾウリムシ細胞内でのクロレラのマルトース放出量は違っている可能性もある。ミドリゾウリムシの PV 膜内部の環境は詳しく分かっておらず、共生したままでマルトース放出量を測定できるような実験系の改良が望まれる。

## 第3章 クロレラ NC64A 株と共生能欠損変異株#48 株の比較

### 1 材料と方法

#### 1-1 細胞と培養

3章ではクロレラ NC64A 株 (*Chlorella variabilis* ATCC 50258) とその変異株#48 株を用いて研究を行った。NC64A は ATCC コレクションから譲り受けた、ミドリゾウリムシに共生可能なアメリカ産クロレラで、共生性のクロレラで唯一全ゲノムが解析されている (Blanc et al., 2010)。NC64A から作出されたミドリゾウリムシへの細胞内共生ができない変異株#48 と NC64A との比較解析から共生成立に関わる因子の探求を行った。

#### 1-2 重イオンビームによる変異株の作出

NC64A の変異株作出の変異原には重イオンビームを利用した。重イオンビームは、変異原としてよく用いられるエックス線やガンマ線よりも高い線エネルギー付与 (Linear Energy Transfer, LET) をもつ。エックス線やガンマ線が散逸的に低いエネルギーを与えるのに対して、重イオンビームは局所的に高いエネルギーを与えることができ、生物効果が大きい。このような特徴から、これまで様々な作物の突然変異育種に用いられ、従来得られなかった変異体や特異な変異体が多数得られている。重イオンビームによる突然変異の誘起は主に植物の品種改良に用いられるが、クロレラの変異株の作出についても有効であると考え使用した。

#### 1-3 重イオンビームによる共生能を失ったクロレラ変異株の作出

NC64A の変異株の作出には、共同研究者の国立研究開発法人国際農林水産業研究センター 藍川晋平博士の協力を得て、日本原子力研究開発機構のイオン照射施設 TIARA (現在は国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構所属) にあるイオン加速器 AVF サイクロトロンを用い、深度制御種子照射装置で行った。NC64A を直径 6 cm のシャーレにまき、そこに吸収線量 150 Gy、照射エネルギー 220 MeV の  $^{12}\text{C}^{5+}$  イオン (LET 121.8 keV/ $\mu\text{m}$ ) を照射した。照射後に 120 株の継代培養可能な株を取得した。得られたクロレラ株をそれぞれ白化ミドリゾウリムシと混合し、細胞内共生が成立するかどうかをみたところ、共生能を欠損した変異株が 3 株見つかったが、そのうち継代可能だったのは 1 株であった。それを NC64A-#48 株 (略して#48 株) とし、以下の実験に用いた。NC64A と#48 の培養にはセリン添加 C 培地を用いた。

#### 1-4 NC64A と#48 のミドリゾウリムシに対する共生能

白ミドリゾウリムシとクロレラ（NC64A あるいは#48）をセリン添加 C 培地を入れたシャーレ中で混合し、1 週間以上培養し、光学顕微鏡（Nikon, ECLIPSE Ni-U）で白化ミドリゾウリムシにクロレラが共生しているかどうかを観察した。

#### 1-5 増殖曲線と細胞の直径

「2 章-1-4 増殖曲線と細胞の直径」の方法と同様の手順で NC64A と#48 の増殖曲線の作成と細胞直径の測定を行った。細胞直径の測定には培養日数が 13 日のクロレラ細胞を使用した。

#### 1-6 透過型電子顕微鏡観察と細胞壁の厚さ

「2 章-1-5 透過型電子顕微鏡観察と細胞壁の厚さ」の方法と同様の手順で実験を行った。クロレラは培養日数が 20 日の細胞を使用した。

#### 1-7 クロレラ細胞壁の糖鎖の染色

「2 章-1-6 クロレラ細胞壁の糖鎖の染色」の方法と同様の手順で実験を行った。クロレラは培養日数が 27 日の細胞を使用した。セルラーゼの前処理を行う実験は実施しなかった。

#### 1-8 マルトース放出量測定

「2 章-1-7-3 クロレラが放出するマルトース量の測定」の方法と同様の手順で実験を行った。クロレラは培養日数が 7 日の細胞を使用した。

#### 1-9 トランスクリプトーム解析

「2 章-1-8 トランスクリプトーム解析」の方法と同様の手順で実験を行った。



## 2 結果

### 2-1 NC64A と#48 のミドリゾウリムシに対する共生能

Volvic 中で白化ミドリゾウリムシ Pb-Kb1 株とクロレラ (NC64A あるいは#48) を混合し培養した結果、1 週間程度で NC64A は共生したが、#48 は共生しなかった (図 15)。その後観察を続けたところ、培養 40 日目でも NC64A は共生を維持したが、#48 は共生をしないままであった。#48 は白化ミドリゾウリムシの細胞内にエンドサイトーシスで取り込まれるが定着することなく白化ミドリゾウリムシの細胞外へ排出された (図 16)。

### 2-2 増殖曲線と細胞の直径

NC64A と#48 の細胞数の経時変化を測定し増殖曲線を作成した (図 17)。NC64A の定常期の細胞密度は約  $3 \times 10^7$  cells/mL で#48 の細胞密度は約  $2 \times 10^7$  cells/mL となり NC64A の方が最終的に得られる細胞密度が高かった。定常期になるまでの時間はどちらも 7 日程度であった。

細胞の直径を測ったところ NC64A は  $4.8 \pm 0.47 \mu\text{m}$  ( $n = 100$ ) で、#48 は  $4.8 \pm 0.33 \mu\text{m}$  ( $n = 108$ ) であった (図 18)。NC64A と#48 の細胞直径に有意な差はなかった。

### 2-3 透過型電子顕微鏡観察

#### 2-3-1 細胞壁の厚さ

NC64A と#48 を凍結置換固定法で固定し、透過型電子顕微鏡で観察した (図 19)。NC64A と#48 を比較したところ、ミトコンドリア、葉緑体、ピレノイドといった細胞小器官や核の微細形態には違いは見られなかった。クロレラの細胞壁の詳細な観察を行い、クロレラの細胞壁と細胞膜が明確に判別できる細胞を NC64A と#48 でそれぞれ 40 個体選択し、細胞壁の厚さを測定した (図 20)。その結果、NC64A の細胞壁の厚さは  $29 \pm 5.7 \text{ nm}$  で、#48 は  $19 \pm 3.9 \text{ nm}$  であった。Welch の t 検定により、NC64A と#48 には有意に差があり、NC64A の方が細胞壁の厚いことがわかった。クロレラ Kb1 の細胞壁表層に見られた毛羽立ち構造は NC64A と#48 には見られなかった。

### 2-4 共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光強度の解析

#### 2-4-1 Calcofluor の染色性

NC64A と#48 の Calcofluor 染色による蛍光強度を測定した。#48 ( $n = 40$ ) の蛍光強度は NC64A ( $n = 50$ ) のものに比べて有意に低下していた (図 21)。この結果から、#48 で

は NC64A と比較して、 $\beta$ -D-グルコピラノース多糖類の量が減少していることが示唆された。

#### 2-4-2 FITC-LFA の染色性

NC64A と #48 の FITC-LFA 染色の蛍光強度の測定を行った。その結果、NC64A (n=31) と #48 (n=31) の細胞壁の蛍光強度に有意な差は見られなかった (図 22)。これにより、Calcofluor 染色での蛍光強度の差は、シアル酸の量の変化によるものではないことが示唆された。

#### 2-4-3 FITC-WGA の染色性

NC64A と #48 の FITC-WGA 染色の蛍光強度の測定を行った。NC64A (n=111) と #48 (n=62) の間に蛍光強度の有意な差は見られなかった (図 23)。これは、Calcofluor 染色での蛍光強度の差は N-アセチルグルコサミンの量の違いに起因するものではないことを示唆している。

### 2-5 マルトースの放出量

#### 2-5-1 クロレラ培養液中のマルトース濃度の経時変化

セリン添加 C 培地で培養している NC64A と #48 の培養液中のマルトース濃度を 20 日間定時に測定した (図 24-A)。培養は白色 LED ライト (1,000 lx) を照射し、明暗サイクル 12 時間、25°C、振とうの条件で行った。培地中のマルトース濃度は培養日数が経つにつれて上昇していったが、定常期になると増えなくなった。定常期における培地中のマルトース濃度をクロレラの細胞密度で割り、1 細胞あたりのマルトース濃度に換算すると、#48 の方がマルトースの放出量が高いという結果になった (図 24-B)。しかしながら、細胞密度を揃えてからマルトースを放出させると細胞密度が低いほど 1 細胞あたりのマルトース濃度は高くなるという結果になり、マルトース放出量は細胞密度の影響を受けることがわかった (図 25)。

#### 2-5-2 NC64A と #48 のマルトース放出量

NC64A と #48 をセリン添加 C 培地に入れ、3 時間後の培地中のマルトース濃度を培地の pH 毎に測定し、クロレラ 1 細胞が 1 時間あたりに放出するマルトースの分子数を算出した (図 26)。細胞密度 5,000,000 cells/mL、LED ライト (1,000 lx) を照射、25°C、振と

うの条件下でクロレラ 1 細胞が 1 時間あたりに放出するマルトースの分子数は、NC64A では pH 7.5 で  $4.4 \pm 0.34 \times 10^5$  個、pH 4.0 で  $16 \pm 0.18 \times 10^5$  個、#48 では pH 7.5 で  $3.5 \pm 0.94 \times 10^5$  個、pH 4.0 で  $17 \pm 0.49 \times 10^5$  個となった。NC64A と #48 のマルトース放出量に有意な差はなく、共に低 pH で増加した。

## 2-6 トランスクリプトーム解析

NC64A と #48 の遺伝子発現量を算出し、2 群間での差次的発現解析を行い、発現変動遺伝子を検出した (図 27)。FDR は多重検定における有意かどうかの判定の指標で、FDR の値が小さく NC64A と #48 で発現量に有意に差がある遺伝子について Blastx での機能解析を行った。#48 で発現量が低下していたいくつかの遺伝子には、共生現象への関与が示唆されているタンパクがヒットした。NC64A と #48 で発現量が有意に異なっていたいくつかの遺伝子について、Kb1 のトランスクリプトームデータで相同な遺伝子を探し、自由生活クロレラと共生生活クロレラでの発現量を比較した (図 28)。#48 で発現量が低下した遺伝子について FDR が小さい順に 10 個の Kb1 での発現量を見たが、自由生活クロレラと共生生活クロレラの発現量に有意に差があったのは「TRINITY\_DN2524\_c3\_g4」の 1 個のみで、他の 4 個の遺伝子は自由生活クロレラと共生生活クロレラで発現量に差はなかった。#48 で発現量が増加した遺伝子 7 個についても Kb1 の自由生活クロレラと共生生活クロレラで発現量に有意な差はなかった。

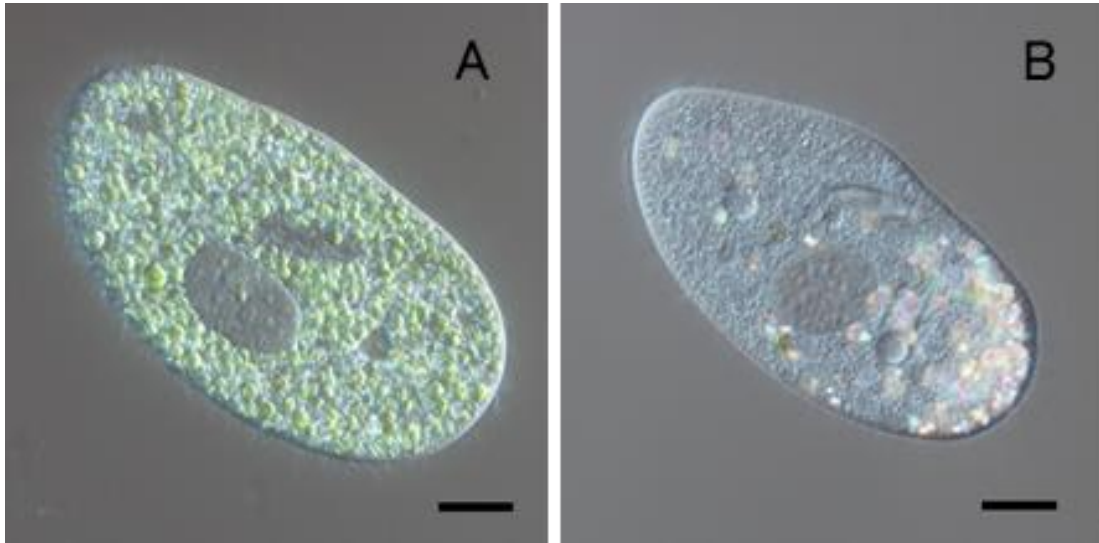


図 15 NC64A と混合した白化ミドリゾウリムシ (A) と#48 と混合した白化ミドリゾウリムシ (B) の光学顕微鏡写真

Volvic 中で白化ミドリゾウリムシとクロレラ (NC64A、#48) を混合し 8 日後に観察した。NC64A と混合した白化ミドリゾウリムシでは共生が成立した細胞がみられたが (A)、#48 と混合した白化ミドリゾウリムシでは共生は起きなかった (B)。スケールバーは (A) (B) とも 20  $\mu\text{m}$  を示す。



図 16 白化ミドリゾウリムシの細胞内に一時的に取り込まれた#48

#48 は白化ミドリゾウリムシに捕食されたが、白化ミドリゾウリムシの細胞膜直下に定着することはなく、やがて細胞外へ排出された。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示す。

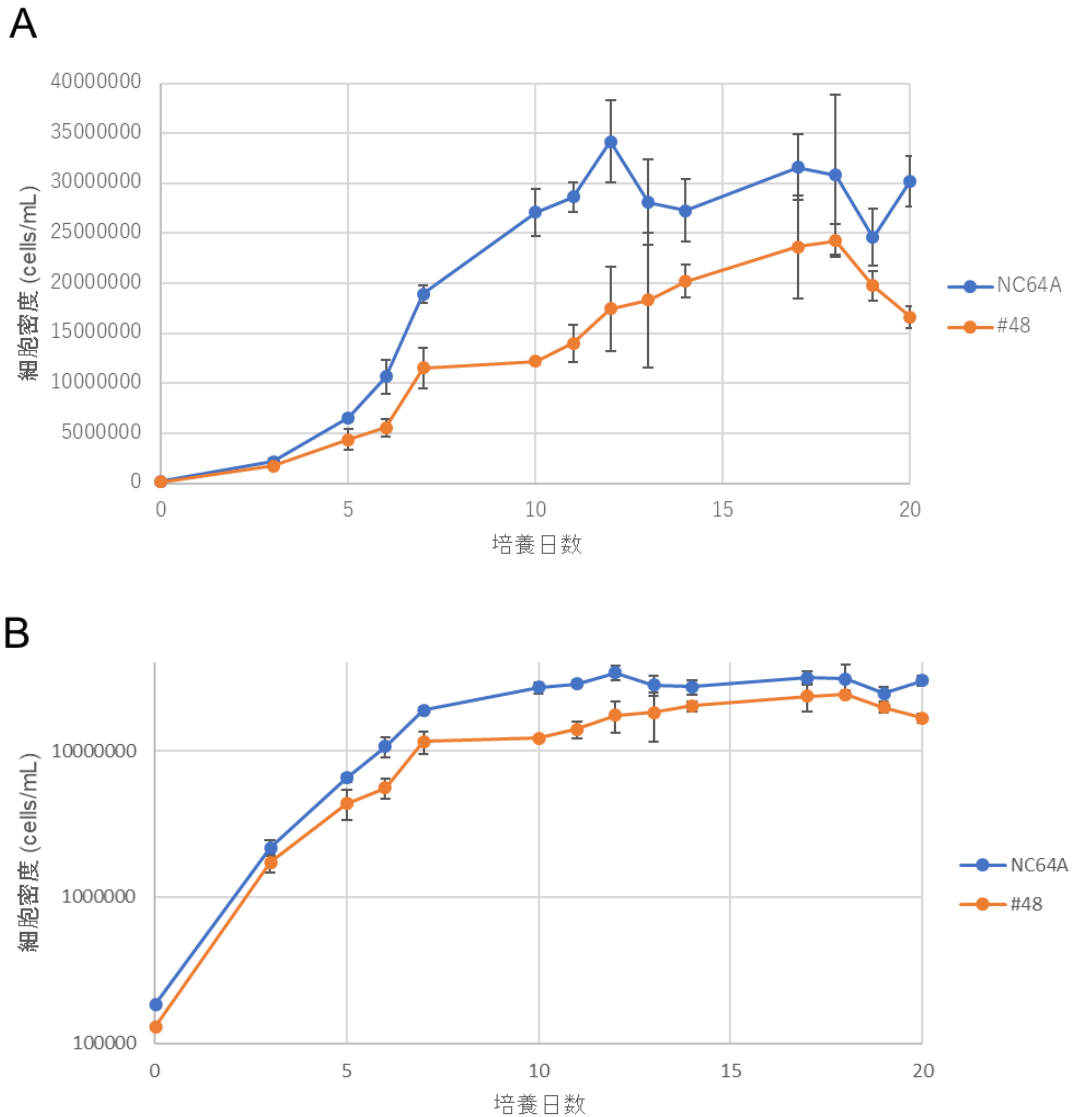


図 17 NC64A と#48 の増殖曲線

NC64A と#48 に LED ライト (1,000 lx) を照射し、恒明、25°C、振とうの条件でセリン添加 C 培地で培養し、細胞数の変化を測定した。(A) は増殖曲線の線形グラフで、(B) は縦軸の細胞密度を対数表示にした片対数グラフである。培養開始時の細胞密度は NC64A と#48 で等しくなるように調整した。決まった時間に培養液を 10  $\mu$ L ずつ 3 回採取し、血球計算盤でクロレラの細胞数を測定し増殖曲線を作成した。NC64A の方が定常期の細胞密度は大きく、定常期になるまでにかかる期間はどちらも 7 日程度だった。

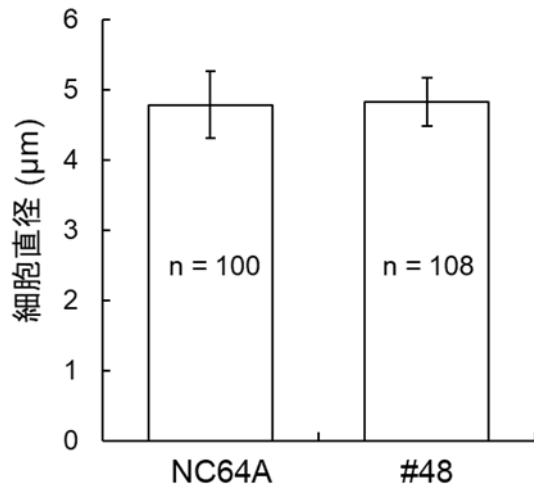


図 18 NC64A と#48 の細胞直径

培養日数 13 日の NC64A と#48 を光学顕微鏡で観察し、細胞直径を測定した。NC64A と#48 で細胞直径には有意な差はなかった ( $p>0.05$ )。誤差範囲は±標準偏差とし、平均値の差の検定には Welch の t 検定を用いた。

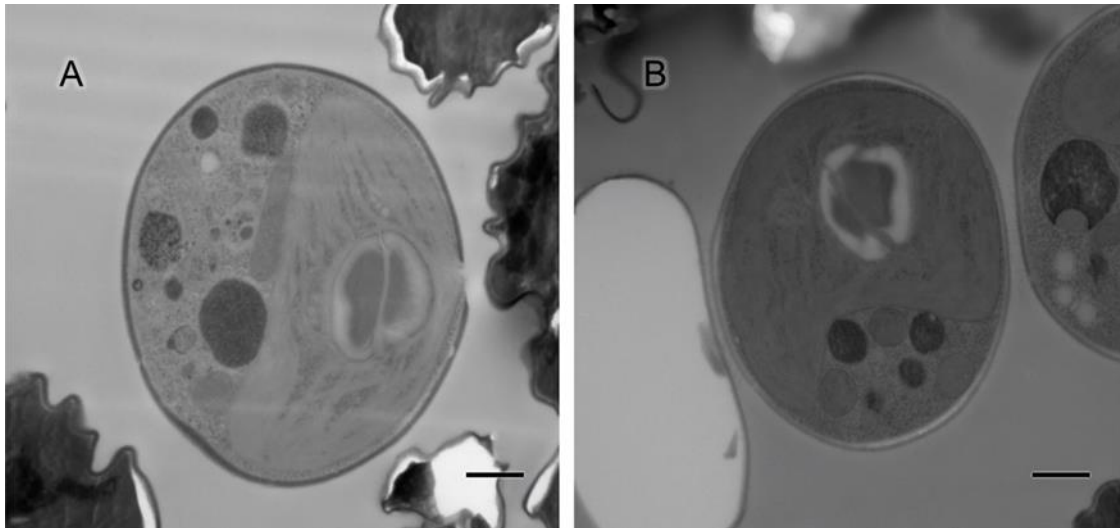


図 19 NC64A と#48 の透過型電子顕微鏡画像

同じ条件下で培養した自由生活状態の NC64A (A) と#48 (B) を透過型電子顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは (A) (B) とともに 500 nm を示す。

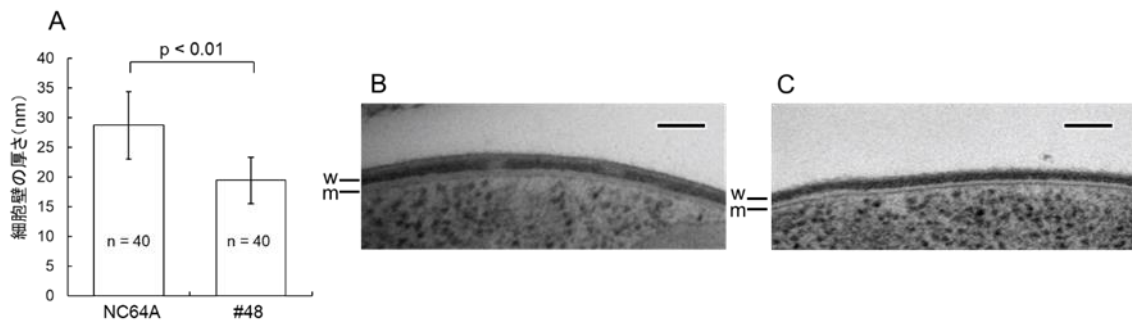


図 20 NC64A と#48 の細胞壁の厚さと微細構造の比較

透過型電子顕微鏡観察から細胞壁の厚さを測定したところ、NC64A (n=40) の細胞壁の厚さは#48 (n=40) より有意に大きかった (A)。誤差範囲は±標準偏差とし、平均値の差の検定には Welch の t 検定を用い、有意差 ( $p < 0.01$ ) を示した。NC64A (B) と#48 (C) の細胞壁の断面を透過型電子顕微鏡で観察した。w は細胞壁、m は細胞膜を指し示している。2 章の自由生活クロレラ Kb1 で見られた細胞壁表面の毛羽立ち構造は NC64 と#48 にはみられなかった。スケールバーは (B) (C) とともに 100 nm を示す。

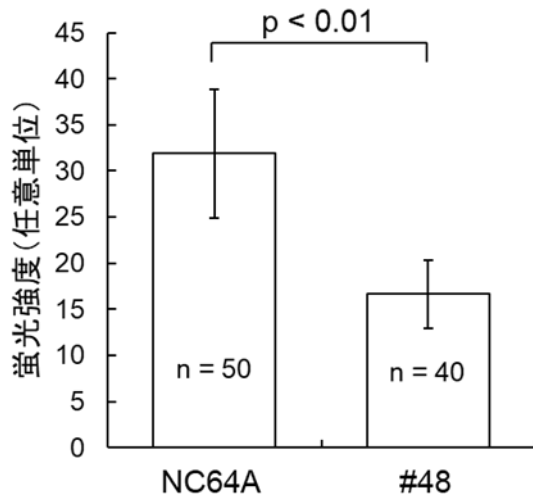


図 21 Calcofluor 染色の蛍光強度の比較

NC64A と#48 に Calcofluor 染色を行い、任意単位で表される蛍光強度を比較した。#48 (n = 40) の蛍光強度は NC64A (n = 50) に比べて有意に低かった。誤差範囲は土標準偏差とし、平均値の差の検定には Welch の t 検定を用い、有意差 ( $p < 0.01$ ) を示した。

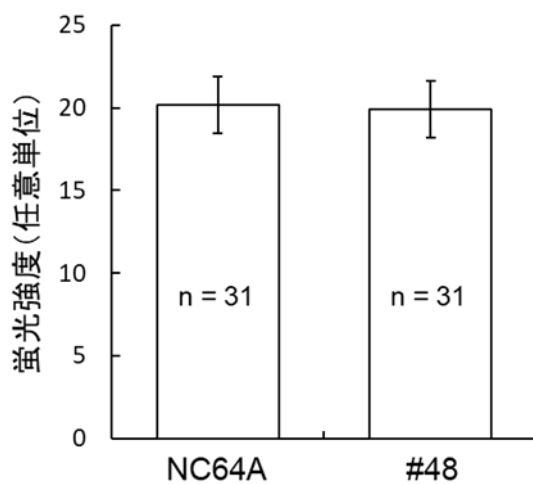


図 22 FITC-LFA 染色の蛍光強度の比較

NC64A と#48 に FITC-LFA 染色を行い、任意単位で表される蛍光強度を比較した。NC64A (n=31) と#48 (n=31) の蛍光強度に有意な差はなかった ( $p > 0.05$ )。誤差範囲は土標準偏差とし、平均値の差の検定には Welch の t 検定を用いた。



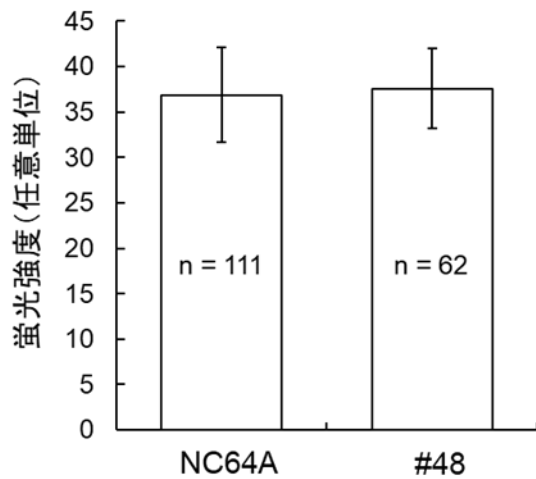


図 23 FITC-WGA 染色の蛍光強度の比較

NC64A と#48 に FITC-WGA 染色を行い、任意単位で表される蛍光強度を比較した。NC64A (n = 111) と#48 (n =62) の蛍光強度に有意な差はなかった ( $p>0.05$ )。誤差範囲は±標準偏差とし、平均値の差の検定には Welch の t 検定を用いた。

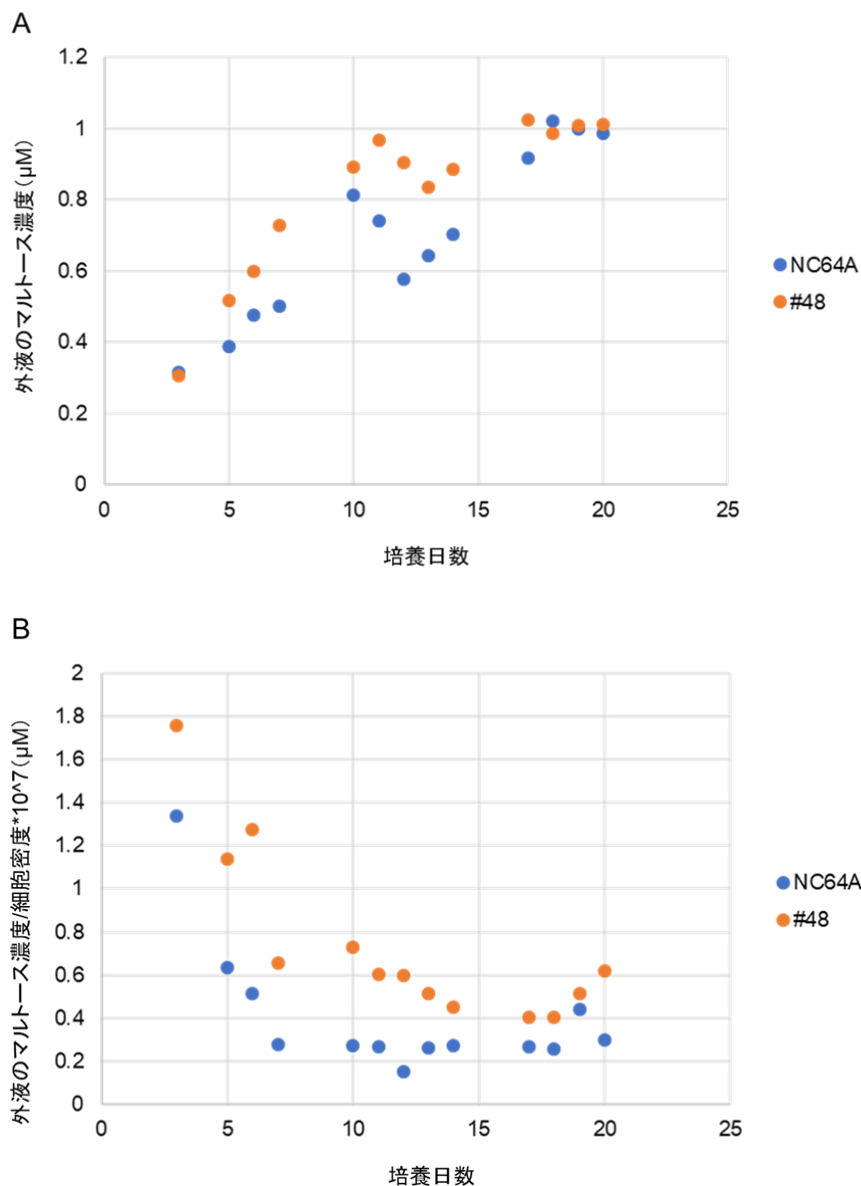


図 24 クロレラ培養液中のマルトース濃度の経時変化

NC64A と#48 の培養液（セリン添加 C 培地）を決まった時間に 10  $\mu$ L 採取し、マルトース濃度を測定し、外液のマルトース濃度のグラフ (A) とそれをクロレラの細胞密度で割ったグラフ (B) を作成した。NC64A と#48 はどちらも対数期に培養液中のマルトース濃度が増加するが、定常期付近で増加しなくなった。1 細胞あたりのマルトース濃度をみると、#48 の方が高いことがわかった。

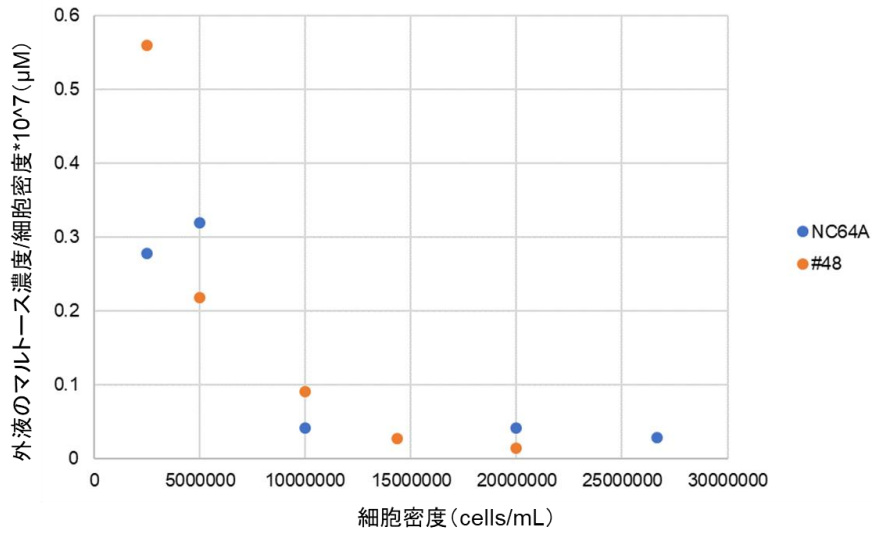


図 25 クロレラの細胞密度によるマルトース放出量の変化

NC64A と#48 がセリン添加 C 培地中で 1 細胞が 1 時間に放出したマルトースの量をマルトース放出時の細胞密度を変えて測定した。培養日数 14 日の NC64A と#48 を使用し、マルトースを放出させる時間は 3 時間に揃えた。NC64A と#48 はどちらも細胞密度が増加するとマルトースを放出する量が低下した。

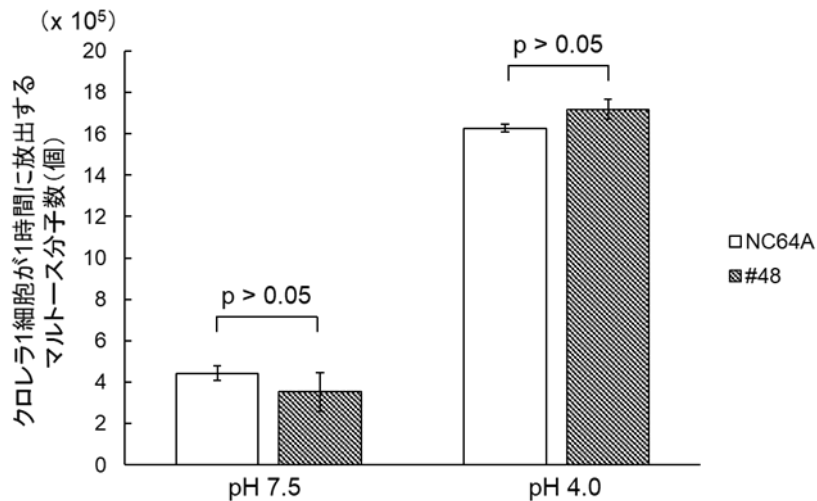


図 26 NC64A と#48 の 1 細胞あたりの 1 時間中のマルトース放出量

NC64A と#48 がセリン添加 C 培地中で 1 細胞が 1 時間に放出したマルトースの分子数を示した。培養日数 8 日の NC64A と#48 を使用し、細胞密度は 5,000,000 cells/mL、マルトースを放出させる時間は 3 時間に揃えた。NC64A と#48 で放出するマルトースの分子数に差はなく、培地中の pH を下げるとマルトースの放出量が有意に増加した。誤差範囲は土標準偏差とし、平均値の差の検定には Welch の t 検定を用いた。

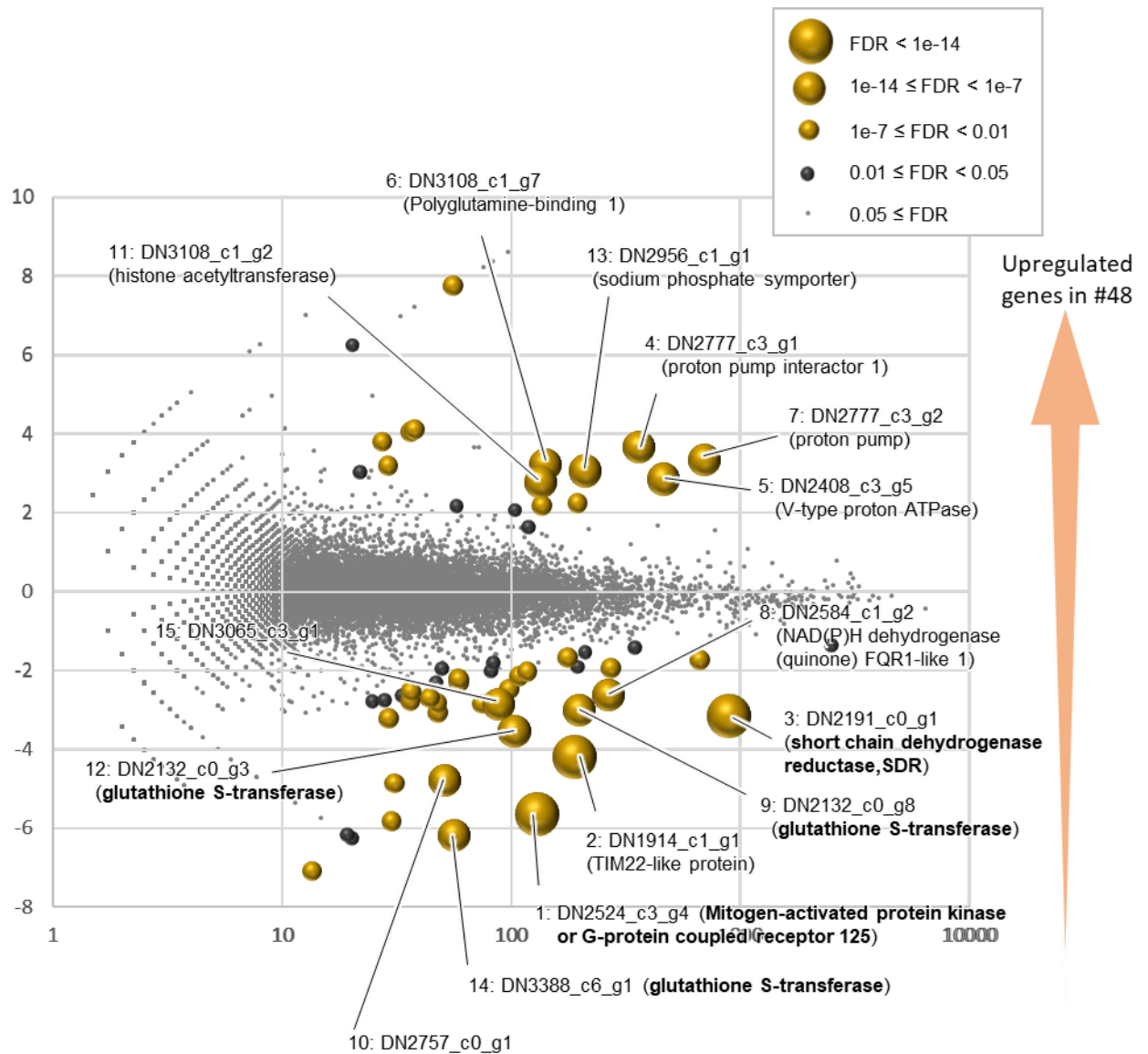


図 27 NC64A と#48 の差次的発現変動遺伝子の MA プロット

各点は遺伝子を表し、点のサイズは凡例のように FDR 値を示す。FDR が 0.05 以下の遺伝子は NC64A と#48 での発現量が有意に異なると判断した。横軸は  $\log_2$  変換された DESeq2 により正規化されたカウントデータの平均値で、縦軸は  $\log_2$  変換された DESeq2 により正規化されたカウントデータの比をとっている。DESeq2 により正規化されたカウントデータを遺伝子の発現量とした。NCBI BLAST の Blastx を用いて遺伝子の機能解析を行い、括弧内にトップヒットのタンパク質を示した。太字のタンパク質は共生に関与することが示唆されているタンパク質である。

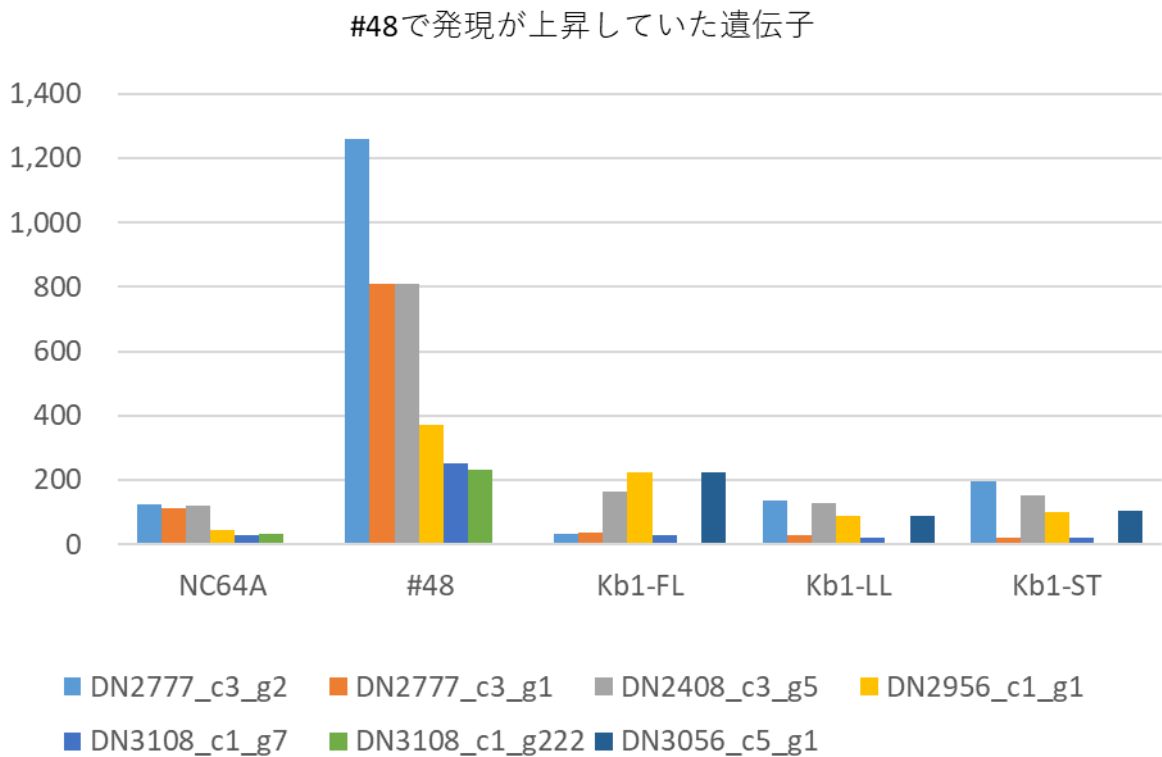
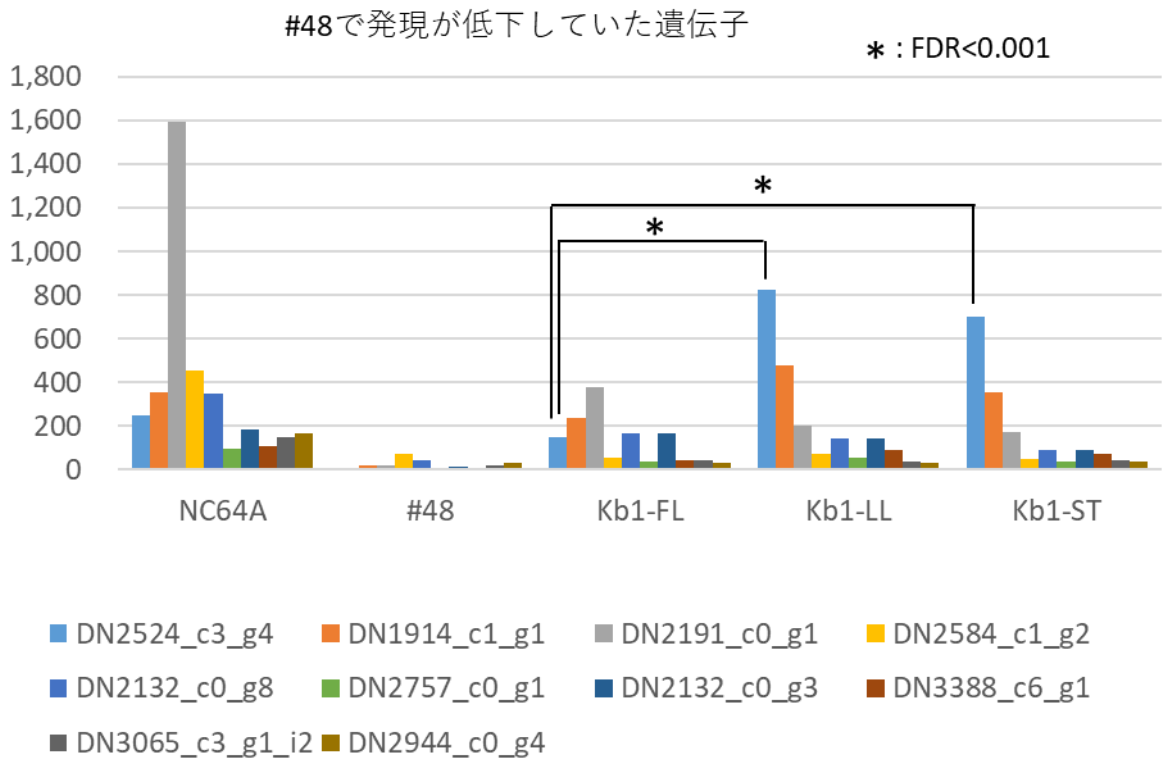


図 28 NC64A と#48 の差次的発現変動遺伝子の Kbt1 での発現量

NC64A と#48 で発現量が有意に異なっていたいくつかの遺伝子について、Kb1 のトランスクリプトームデータで相同な遺伝子を探し、自由生活クロレラと共生生活クロレラでの発現量を比較した。縦軸は  $\log_2$  変換された DESeq2 により正規化されたカウントデータで、これを遺伝子の発現量としている。Kb1-FL は自由生活クロレラ Kb1 で、Kb1-LL は対数期のミドリゾウリムシから取り出した共生生活クロレラ Kb1、Kb1-ST は定常期のミドリゾウリムシから取り出した Kb1 を示している。

### 3 考察

**#48 はリソソームによる消化の回避ができないか、宿主の細胞膜直下に留まることできない**

NC64A と#48 を白化ミドリゾウリムシ Pb-Kb1 の培地に混合し、再共生するかどうかを検証した実験では、NC64A は一部の細胞がミドリゾウリムシの細胞内に定着しそのまま保持され共生したが、#48 は捕食されミドリゾウリムシの細胞内に取り込まれるがミドリゾウリムシの細胞内に定着することはなかった。ミドリゾウリムシに取り込まれた#48 の辿る経過を見てみると、食胞とリソソームの結合により消化されるか食胞のエキソサイトーシスでミドリゾウリムシの細胞外に排出されるかのどちらかであった。共生性のクロレラは捕食された後にミドリゾウリムシの細胞膜直下に留まり増殖することで共生を確立するが、ミドリゾウリムシに取り込まれた#48 は宿主の細胞膜直下に留まることはなかった。このことから、#48 はミドリゾウリムシの細胞内でリソソームによる消化を逃れること、もしくはミドリゾウリムシの細胞膜直下に留まることができず細胞内共生が成立しないことが推測された。

#### 共生能欠損変異株#48 の細胞壁の変化

透過型電子顕微鏡観察の結果、#48 では NC64A に比べて細胞壁の厚さが減少していて、NC64A と#48 のどちらにも Kb1 で見られた毛羽立ち構造がみられなかった。毛羽立ち構造が細胞内共生において何らかの役割を担うとすると、共生性の NC64A はミドリゾウリムシの細胞内に共生しているときに毛羽立ち構造が現れるのかもしれない。NC64A の自由生活と共生生活の比較を行うことで変化がみられる可能性がある。

NC64A と#48 の細胞壁の糖の染色実験では、#48 で Calcofluor の染色性が低下し、FITC-LFA と FITC-WGA の蛍光強度には差はないという結果になった。NC64A と#48 は Kb1 と同種であることから細胞壁にセルロースが存在する可能性は低く、#48 での Calcofluor 染色性の低下はグリコサミノグリカンの減少によるものであることが示唆された。

#### クロレラの細胞サイズやマルトース放出能は共生を決定づける要素ではなかった

NC64A と#48 の細胞直径に差はなく、光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察した細胞の形状にも違いは見られなかった。従ってクロレラの細胞サイズはミドリゾウリムシとの細胞



内共生の可否を決定する要素ではないことがわかった。また、細胞サイズに違いはないにも関わらず、同じ条件下での培養で#48はNC64Aよりも定常期の細胞密度が低かったことから、#48の方がより多くのCO<sub>2</sub>や栄養素を要求する株である可能性が見出された。

NC64Aと#48が外液中へ放出するマルトース量に差はなく、どちらも低pH条件で放出量が増加するという結果であったことから、マルトースの放出能は細胞内共生を決定づける要素ではないことが示唆された。ただし、NC64Aと#48がpH 4.0で放出するマルトースの量はKb1に比べて3分の1程度しかなく、NC64Aは共生性のクロレラの中ではマルトース放出能が低い株なのかもしれない。そのことは細胞内共生の維持能力に影響を与えている可能性がある。

### ミドリゾウリムシへの共生維持能力の強弱

ミドリゾウリムシに共生できる生物は緑藻だけではない。赤色酵母の*Rhodotorula rubra*や*Pseudomonas*属の細菌もミドリゾウリムシに細胞内共生することがわかっている。しかしそれらがミドリゾウリムシに共生できるのはミドリゾウリムシの細胞内にクロレラがない場合に限られ、先に赤色酵母や細菌がミドリゾウリムシに共生していても、後からクロレラが入ってくることでミドリゾウリムシの細胞内から消えてしまう(Görtz, 1982)。また*Chlorella*属の中でも異なる2種の共生性のクロレラをミドリゾウリムシに与えると片方の種のみが共生を維持するという報告もあり(Nishijima and Fujishima, 2007)、ミドリゾウリムシの細胞内共生には共生する生物によって共生維持能力の強弱があるようだ。NC64AとKb1についても共生維持能力に差が見られる。NC64AはミドリゾウリムシPb-Kb1と共生を行うが、共生状態のミドリゾウリムシにエサを潤沢に与えると細胞内のNC64Aが抜け落ち白化ミドリゾウリムシになることがある。クロレラKb1がPb-Kb1に共生している状況ではこのようなことは起こらない。これはPb-Kb1がNC64Aのもともとの宿主でないことも一因であるかもしれないが、NC64AはKb1よりも共生の維持能力が弱いのもかもしれない。共生維持能力に強弱がある原因は明らかになっていないが、NC64Aのマルトース放出能が低いことや細胞壁表面の毛羽立ち構造が見られなかったことなどが影響している可能性も考えられる。

### トランスクリプトーム解析で検出された発現変動遺伝子と共生との関連性

トランスクリプトーム解析の結果、NC64A と#48 の間で有意に発現量が変化している遺伝子が検出され、その内、#48 で発現量が低下していた配列の中には共生との関連が示唆されているタンパク質に対応するものがいくつかあった。#48 で発現量が低下し、自由生活クロレラと共生生活クロレラの比較で共生に伴い発現量が上昇していた配列「TRINITY\_DN2524\_c3\_g4」は Mitogen-activated protein kinase (MAPK) に相同性があった。MAPK は Serine/Threonine protein kinase の一種で、マメ科植物 *Lupinus albus* では根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. の感染時に MAPK の発現が上昇するという報告があり、MAPK の発現を阻害剤で処理すると根粒の形成が抑制される (Fernandez-Pascual et al., 2006)。マメ科植物と根粒菌の共生では MAPK は宿主の植物側で発現しているが、ミドリゾウリムシとクロレラの共生ではクロレラ側での MAPK の発現量の上昇が共生成立において重要な役割を担っているのかもしれない。#48 で発現が低下していた「TRINITY\_DN2191\_c0\_g1」は short chain dehydrogenase reductase (SDR) と相同性があり、SDR はアルファアルファ根粒菌の共生において重要なタンパク質で、これをノックアウトすると根粒を形成できなくなる (Jacob et al., 2008)。「TRINITY\_DN2132\_c0\_g8」と相同性があった glutathione S-transferase は植物の根と真菌の菌糸との外菌根形成時に植物の組織中で発現が上昇するという報告がされている (Tagu et al., 2003)。以上のようにトランスクリプトーム解析から発現が変動する共生関連遺伝子がいくつか見出されてきたので、それらがミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生で実際に重要なのかを検証することが今後の課題である。クロレラの遺伝子のノックアウトは難しいが、マメ科植物に用いられた MAPK の発現阻害剤はクロレラにも有用かもしれない。

## 第4章 全体考察

### リソソームによる消化の回避と細胞壁の関連性

細胞内共生が成立する過程で糖が重要な役割を果たす例はいくつか報告されている。例えばレジオネラ菌は動物細胞に感染する際にファゴソーム内部にリポ多糖類でできた小胞を放出しリソソームと食胞の融合を阻害する (Fernandez-Moreira et al., 2006)。また、イソギンチャクの共生藻は、細胞壁の糖を酵素で分解されると共生ができなくなる (Lin et al. 2000)。これらの知見と、本研究で示された自由生活クロレラと共生生活クロレラ、NC64A と #48 における細胞壁の形態や組成の変化を踏まえて、細胞壁が細胞内共生の成立するにあたって担う役割について推察した (図 29)。自由生活状態のクロレラは厚い細胞壁を持っており、ミドリゾウリムシに取り込まれることで細胞壁に変化が起こる。構成する糖の遊離や糖鎖と PV 膜との結合が生じ、PV 膜とリソソームの融合が阻害され消化を逃れる。この過程に伴い細胞壁は消耗し厚さが減少する。この時に作用する糖がグリコサミノグリカンの可能性がある。#48 のような自由生活状態で十分な厚さの細胞壁を持たないクロレラはリソソームに対抗する糖が不足し消化から逃れられない。この仮説は非共生性のクロレラが共生性のクロレラより分厚い細胞壁を持つとする報告 (Reisser, 1984) と矛盾するようだが、共生性のクロレラにはセルロースが存在しない種がいること (Kapaun, and Reisser, 1995) や共生性のクロレラの細胞壁はグルコサミン型の糖が豊富である (Takeda et al., 1998) ことから、共生の成立には細胞壁の組成が重要で必要な種類の糖、例えばグリコサミノグリカンが十分ないと共生に至らないのかもしれない。

また、ミドリゾウリムシのミトコンドリアが PV 膜を介してクロレラ細胞壁と頻りに密接な関係を形成することから (Song et al., 2017)、細胞壁上の糖鎖は PV 膜を通過してミトコンドリアと接着することで細胞膜直下にとどまることができるのかもしれない。実際に、ミドリゾウリムシに共生状態のクロレラ Kb1 株でも細胞表層を電子顕微鏡で観察すると細胞壁の毛羽立ち構造と PV 膜は近接して見られた。

### 細胞壁の糖組成の解析の展望

本研究でグリコサミノグリカンが共生に伴い減少する可能性を示した。同様に共生能欠損変異株でもグリコサミノグリカンが減少することが示唆された。しかしこれらは消去法による結論であり、直接的なグリコサミノグリカンの検出が今後の課題である。クロ

マトグラフィーによる解析などが必要となるため、細胞壁の成分分析の技術を持つ研究者の協力を得て実施することが望まれる。また、酸性ムコ多糖類を染色するコロイド鉄染色を用いて電子顕微鏡試料を作製し観察を行うことで、グリコサミノグリカンの細胞壁上の局在を観察することが可能になるかもしれない。グリコサミノグリカンの検出が可能となれば非共生性のクロレラとの比較も実施したい。

### クロレラのマルトース放出量測定の展望

本研究ではクロレラのマルトース放出能と細胞内共生成立との関連性は示されなかった。しかし、NC64A は K<sub>b</sub>1 よりも酸性条件下でマルトース放出量が少なく、共生性のクロレラであっても株間でマルトース放出能に差があることがわかった。その差が白化ミドリゾウリムシ Pb-K<sub>b</sub>1 細胞内での共生維持能力に関与しているかもしれない。また、クロレラの細胞密度が高まると 1 細胞あたりのマルトースの放出量が減少したことから、外液中のマルトース濃度が高まることでマルトース放出速度が低下する可能性が示唆された。より詳細に外液のマルトース濃度とクロレラのマルトース放出速度の関係を検証することで、マルトースの細胞外への輸送様式は能動輸送か受動輸送かなど、その仕組みを明らかにできるかもしれない。また、今回確立されたマルトース測定法を用いて重イオンビームで得られた NC64A の変異株群や他の共生藻のマルトース放出能を調べ、放出能に違いがある株についてゲノムや遺伝子の発現量を比較することでマルトースの合成や輸送に関わる遺伝子を見出すことが期待できる。

### 重イオンビームによる変異株を用いた研究の展望

#48 のゲノムの変異箇所 の同定は共同研究者の長浜バイオ大学の小倉淳准教授の研究室で実施され、そちらから報告予定であるが、NC64A と #48 の間には数千箇所の単塩基置換や欠損、挿入による変異と数百箇所の構造多型があることがわかった。このことからゲノムのみから共生に関連する遺伝子を見つけ出すのは難しいと考えられる。生理学的変化の比較から共生に関連する遺伝子を探す場合も、より多くの共生能欠損変異株を比較する必要がある。クロレラ NC64A 株から 120 株の変異株を作出しその内 3 株が共生能を持たなかったことから、重イオンビームは共生能欠損変異株を作出するにあたって有用であった。#48 以外の共生能欠損変異株を含めいくつかの株は継代培養が難しく絶えて

しまったが、100株以上の変異株は現在も培養を継続している。ミドリゾウリムシに共生可能な変異株は本研究では用いなかったが、それらの株の中にも遺伝形質に違いがあるはずである。NC64Aよりもミドリゾウリムシへの共生維持能力が高い株存在する可能性もあり、#48以外の変異株の解析から新たな発見があるかもしれない。

### クロレラ細胞表層タンパク質の質量分析

クロレラの細胞表層のタンパク質を解析することを目的とした、自由生活クロレラと共生生活クロレラ、NC64Aと#48の質量分析と比較解析を行った。クロレラの細胞数が等しくなるように調整し、SDS-PAGE用サンプリングバッファーに懸濁し、すぐに10,000 rpmで1分間遠心し、回収した上清を95°Cで5分間加熱し、SDS-PAGEと銀染色後に質量分析を行った。解析はMascot Search (MS/MS Ion Search)を使用した。参照配列は、自由生活クロレラと共生生活クロレラではクロレラ Kblの*de novo* トランスクリプトームデータとミドリゾウリムシの*de novo* トランスクリプトームデータの二種類を用い、NC64Aと#48ではNC64Aの*de novo* トランスクリプトームデータと#48の*de novo* トランスクリプトームデータの二種類を用いた。得られた結果のMascotスコアをもとに細胞表層タンパク質を比較した。Mascotスコアとは質量データがペプチドにマッチする確率をもとに算出される値で、閾値以上でヒットした配列が有意であると判断できる。また、Mascotスコアは銀染色によるバンドの濃さと相関があり、サンプル中のタンパク質の量のある程度反映する (Kikuchi et al., 2004)。

自由生活クロレラと共生生活クロレラの質量分析では、自由生活クロレラで様々なタンパク質をコードするコンティグ群が検出され、共生生活クロレラでは主にチューブリンをコードするコンティグが検出された。共生生活クロレラでチューブリンが多く検出されたのはミドリゾウリムシを破碎した際の細胞の破片が混入したことが原因であると考えられるので、ミドリゾウリムシから共生生活クロレラを取り出した後にパーコールやフィルターによる分画を行うことでヒットする数は減ってくるだろう。またミドリゾウリムシの破碎に用いた超音波によってクロレラの細胞膜が損傷を受けている可能性があり、シリンジと注射針を通して圧力でミドリゾウリムシのみを破碎する方法などに変更すればクロレラ細胞膜の損傷は抑えられるだろう。自由生活クロレラのみでヒットしたコンティグは、細胞質局在のタンパク質や葉緑体の遺伝子をコードしたものが多く、上記の通り共生生活クロレラのタンパク質がサンプル調整中に損傷を受けたことで検出さ

れなかった可能性があるため、今回の結果から共生に伴い変化する細胞表層タンパク質を同定することは難しかった。

NC64A と#48 の質量分析でも Kb1 の時と同様に細胞質に局在するタンパク質が多く検出され、特に#48 では大量のミトコンドリア関連タンパク質が見られた。サンプル調整時にクロレラ細胞膜が壊れ、細胞質中のタンパク質が溶け込んだと推測される。さらに、#48 のみでヒットした配列が全体の半分以上を占めていたことから、#48 は NC64A よりも細胞膜が弱く細胞質中のタンパク質が流れ出しやすかったのかもしれない。NC64A と#48 の質量分析の結果とトランスクリプトーム解析の結果を照らし合わせてみたが、Mascot スコアと遺伝子の発現量において NC64A と#48 で差異がある配列は一致しなかった。

自由生活クロレラのみでヒットしたコンティグの中で Mascot スコアが最も高かった配列を含めたいくつかのコンティグは Serine/Threonine protein kinase と相同性があるポリペプチドをコードしていた。また、NC64A のみでヒットしたコンティグで Mascot スコアが最も高かった配列も Serine/Threonine protein kinase をコードしていた。それらの Serine/Threonine protein kinase をコードする配列について非共生性のクロレラである *Chlorella vulgaris* での類似配列検索を BLAST で行った結果、相同性がある配列が見つからないものがいくつかあった。共生をするクロレラに特異的な Serine/Threonine protein kinase が存在する可能性が示唆された。トランスクリプトーム解析で#48 と共生生活クロレラでの遺伝子発現量が低下していた、Serine/Threonine protein kinase をコードする「TRINITY\_DN2524\_c3\_g4」の配列と質量分析で Mascot スコアが高かった Serine/Threonine protein kinase に対応する配列の類似性を調べたが、両者の類似性は低く別の種類の Serine/Threonine protein kinase であると考えられた。

細胞表層のタンパク質を目的とした質量分析を行ったが、細胞質中のタンパク質が多く含まれていたことをはじめいくつかの問題点が見つかった。クロレラの細胞膜と細胞壁部分のみを分画するなどサンプルの調整法を改善する必要がある。しかしながらクロレラ細胞壁は非常に丈夫で、強力なビーズ式のホモジナイザーやフレンチプレスを用いて破碎をしなければならず、手だてを講じなければならない。

細胞内共生を行う際に細胞表層のタンパク質が重要な役割を担う例は他の共生や寄生を行う生物で知られていることから、実験方法を向上させクロレラの細胞表層タンパク質を調査することには大きな意義があると考えている。

## Serine/Threonine protein kinase と細胞内共生への関連性とトランスクリプトーム解析の展望

Serine/Threonine protein kinase の一種である mTOR の阻害剤 torin2 をミドリゾウリムシの培地に加えるとミドリゾウリムシの細胞内のクロレラが消化される（楨本、修論）。torin2 は抗マラリア剤としても利用され、マラリア原虫の赤血球への寄生を阻害する（Hanson et al., 2013）。このように Serine/Threonine protein kinase が細胞内共生や寄生において重要な役割を果たしている例がある。今回トランスクリプトーム解析で#48 と共生生活クロレラでの遺伝子発現量が低下していた「TRINITY\_DN2524\_c3\_g4」も Serine/Threonine protein kinase の一種である Mitogen-activated protein kinase (MAPK) と相同性があり、共生への関連が示唆されている。

トランスクリプトーム解析の結果は、今後さらにデータの解析を進めることや条件を変えたサンプルの解析を行うこと、質量分析や生理学的解析の結果と照らし合わせることで共生関連分子が同定されることが期待できる。

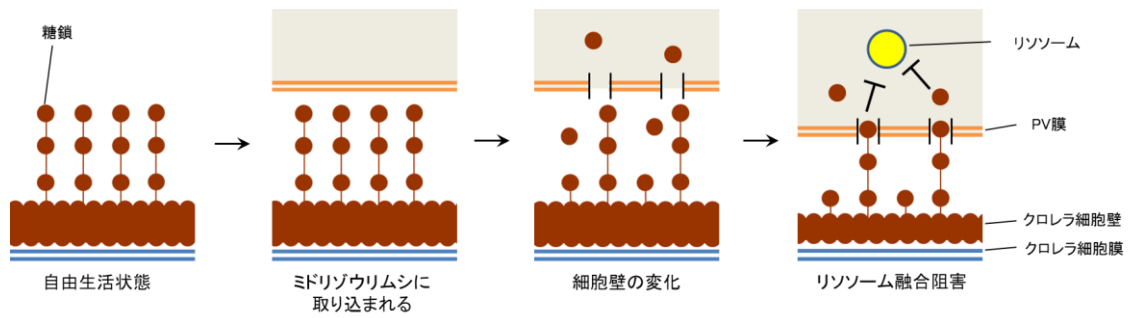


図 29 細胞壁の糖鎖による PV 膜へのリソソーム融合阻害作用

自由生活状態のクロレラは厚い細胞壁を持っており、ミドリゾウリムシに取り込まれることで細胞壁に変化が起こる。構成する糖の遊離や糖鎖と PV 膜との結合が生じ、PV 膜とリソソームの融合が阻害され消化を逃れる。この過程に伴い細胞壁は消耗し厚さが減少するのではないだろうか。



## 謝辞

本研究を行うにあたり、温かいご指導とご援助を賜りました洲崎敏伸准教授に心より感謝いたします。共同研究者の長浜バイオ大学の小倉淳准教授、保科亮博士、小倉研究室の嶺井隆平氏、国立研究開発法人国際農林水産業研究センター藍川晋平博士に深く御礼申し上げます。本研究を纏めるにあたり、多大なご助言を賜りました神戸大学理学研究科の前川昌平教授、尾崎まみこ教授、井上邦夫教授に深く感謝申し上げます。そして、研究全般にわたりご協力を賜りました洲崎研究室の皆様にも感謝いたします。最後に、いつも支えてくださった夫や両親、義両親とお腹の中の子どもに心よりお礼申し上げます。

## 引用文献

- Albani, J. R., Sillen, A., Plancke, Y. D., Coddeville, B., Engelborghs, Y. 2000. Interaction between carbohydrate residues of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (orosomuroid) and saturating concentrations of Calcofluor White. A fluorescence study. *Carbohydr. Res.* 327, 333–340.
- Albers, D., Wiessner, W. 1985. Nitrogen nutrition of endosymbiotic *Chlorella* spec. *Endocytobiol. Cell Res.* 2, 55–64.
- Arriola, M., B., Velmurugan, N., Zhang, Y., Plunkett, M., H., Hondzo, H., Barney, B., M. 2017. Genome sequences of *Chlorella sorokiniana* UTEX 1602 and *Micractinium conductrix* SAG 241.80: implications to maltose excretion by a green alga. *Plant J.* 93, 566–586.
- Bezares, J., Asaro, R. J., Hawley, M. 2008. Macromolecular structure of the organic framework of nacre in *Haliotis rufescens*: implications for growth and mechanical behavior. *J. Struct. Biol.* 163, 61–75.
- Blanc, G., Duncan, G., Agarkova, I., Borodovsky, M., Gurnon, J., Kuo, A., Lindquist, E., Lucas, S., Pangilinan, J., Polle, J., Salamov, A., Terry, A., Yamada, T., Dunigan, D. D., Grigoriev, I. V., Claverie, J. M., Van Etten, J. L. 2010. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *Plant Cell* 22, 2943–2955.
- Brechignac, F., Schiller, P. 1992. Pilot CELSS based on a maltose-excreting *Chlorella*: concept and overview on the technological developments. *Adv. Space Res.* 12, 33–36.
- Chen, M. Y., Lee, D. J., Tay, J. H. 2007. Distribution of extracellular polymeric substances in aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 1463–1469.
- Correll, D. L. 1964. Sialic acid-containing glycopeptide from *Chlorella*. *Science* 145, 588–589.
- de Koning-Ward, T. F., Gilson, P. R., Boddey, J. A., Rug, M., Smith, B. J., Papenfuss, A. T., Sanders, P. R., Lundie, R. J., Maier, A. G., Cowman, A. F., Crabb, B. S. 2009. A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature* 459, 945–949.
- Dolan, J. 1992. Mixotrophy in ciliates: a review of *Chlorella* symbiosis and chloroplast retention. *Mar. Microb. Food Webs* 6, 115–132.
- Dorling, M., McAuley, P. J., Hodge, H. 1997. Effect of pH on growth and carbon metabolism of maltose-releasing *Chlorella* (Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* 32, 19–24.
- Douglas, A., Smith, D. C. 1984. The green hydra symbiosis. 8. Mechanisms in symbiont regulation. *Proc. R. Soc. Ser. B Biol.* 221, 291–319.

- Fernandez-Moreira, E., Helbig, J. H., Swanson, M. S. 2006. Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infect. Immun.* 74, 3285–3295.
- Fernandez-Pascual, M., Lucas, M. M., de Felipe, M. R., Boscá, L., Hirt, H., Golvano, M. P. 2006. Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *J Exp Bot.* 57, 2735-2742.
- Fischer, E., Brossmer, R. 1995. Sialic acid-binding lectins: submolecular specificity and interaction with sialoglycoproteins and tumour cells. *Glycoconj. J.* 12, 707–713.
- Görtz, H. D. 1982. Infections of *Paramecium bursaria* with bacteria and yeasts. *J Cell Sci.* 58, 445-453.
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., LeDuc, R. D., Friedman, N., Regev, A. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nat Protoc.* 8, 1494-1512.
- Hanson, K. K., Ressurreição, A. S., Buchholz, K., Prudêncio, M., Herman-Ornelas, J. D., Rebelo, M., Beatty, W. L., Wirth, D. F., Hänscheid, T., Moreira, R., Marti, M., Mota, M. M. 2013. Torins are potent antimalarials that block replenishment of *Plasmodium* liver stage parasitophorous vacuole membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 2838-2847.
- Heeg, J. S., Wolf, M. 2015. ITS2 and 18S rDNA sequence-structure phylogeny of *Chlorella* and allies (Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellaceae). *Plant Gene* 4, 20–28.
- Hoshina, R., Imamura, N. 2009. Phylogenetically close group I introns with different positions among *Paramecium bursaria* photobionts imply a primitive stage of intron diversification. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1309–1319.
- Iwatsuki, K., Nishidoi, M., Suehiro, K. 1998. Symbiotic *Chlorella* enhances the thermal tolerance in *Paramecium bursaria*. *Comp. Biochem. Phys. A.* 121, 405–409.
- Jacob, A. I., Adham, S. A., Capstick, D. S., Clark, S. R., Spence, T., Charles, T. C. 2008. Mutational analysis of the *Sinorhizobium meliloti* short-chain dehydrogenase/reductase family reveals substantial contribution to symbiosis and catabolic diversity. *Mol Plant Microbe Interact.* 21, 979-987.
- Jung, S. Y., Matin, A., Kim, K. S., Khan, N. A. 2007. The capsule plays an important role in *Escherichia coli* K1 interactions with *Acanthamoeba*. *Int. J. Parasitol.* 37, 417-423.

- Kadono, T., Kawano, T., Hosoya, H., Kosaka, T. 2004. Flow cytometric studies of the host-regulated cell cycle in algae symbiotic with green paramecium. *Protoplasma*, 223, 133-141.
- Kamako, S., Imamura, N. 2006. Effect of Japanese *Paramecium bursaria* extract on photosynthetic carbon fixation of symbiotic algae. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53, 136-141.
- Kapaun, E., Reisser, W. 1995. A chitin-like glycan in the cell wall of a *Chlorella* sp. (Chlorococcales, Chlorophyceae). *Planta* 197, 577-582
- Karakashian, S. J., Karakashian, M. W., Rudzinska, M. A. 1968. Electron microscopic observations on the symbiosis of *Paramecium bursaria* and its intracellular algae. *J. Protozool.* 15, 113-128.
- Karakashian, S. J., Rudzinska, M. A. 1981. Inhibition of lysosomal fusion with symbiotic-containing vacuoles in *Paramecium bursaria*. *Exp. Cell Res.* 131, 387-393.
- Kato, Y., Imamura, N. 2008. Effect of calcium ion on uptake of amino acids by symbiotic *Chlorella* F36-ZK isolated from Japanese *Paramecium bursaria*. *Plant Sci* 174, 88-96.
- Kawakami, H., Kawakami, N. 1978. Behavior of a virus in a symbiotic system, *Paramecium bursaria* - zoochlorella. *J. Protozool.* 25, 217-225.
- Kessler, E., Kauer, G., Rahat, M. 1991. Excretion of sugars by *Chlorella* species capable and incapable of symbiosis with *Hydra viridis*. *Bot Acta* 104, 58-63.
- Kikuchi, M., Hatano, N., Yokota, S., Shimosawa, N., Imanaka, T., Taniguchi, H. 2004. Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease. *J Biol Chem.* 279, 421-428.
- Kim, K. J., Elliott, S. J., Di Cello, F., Stins, M. F., Kim, K. S. 2003. The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. *Cell. Microbiol.* 5, 245-252.
- Kodama, Y., Suzuki, H., Dohra, H., Sugii, M., Kitazume, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Fujishima, M. 2014. Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts. *BMC Genomics* 15, 183.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.

- Lin, K. L., Wang, J. T., Fang, L. S. 2000. Participation of glycoproteins on zooxanthellal cell walls in the establishment of a symbiotic relationship with the sea anemone, *Aiptasia pulchella*. *Zool. Stud.* 39, 172–178.
- Love, M. I., Huber, W., Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
- Luzio, J. P., Pryor, P. R., Bright, N. A. 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 622-632.
- Martínez, F., Ascaso, C., Orús, M. I. 1991. Morphometric and stereologic analysis of *Chlorella vulgaris* under heterotrophic growth conditions. *Ann. Bot-London* 67, 239–245.
- Matzke, B., Schwarzmeier, E., Loos, E. 1990. Maltose excretion by the symbiotic *Chlorella* of the heliozoan *Acanthocystis turfacea*. *Planta* 181, 593–598.
- McAuley, P. J. 1982. Temporal relationships of host cell and algal mitosis in the green hydra symbiosis. *J. Cell Sci.* 58, 423-431.
- Meier, R., Lefort-Tran, M., Pouphe, M., Reisser, W., Wiessner, W. 1984. Comparative freeze-fracture study of perialgal and digestive vacuoles in *Paramecium bursaria*. *J. Cell Sci.* 71, 121–140.
- Meier, R., 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.
- Mews, L. K. 1980. The green hydra symbiosis. III. The biotrophic transport of carbohydrate from alga to animal. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 209, 377-401.
- Mews, L. K., Smith, D. C. 1982. The green hydra symbiosis. VI. What is the role of maltose transfer from alga to animal? *Proc. R. Soc. Ser. B Biol.* 216, 397–413.
- Muscatine, L., Karakashian, S. J., Karakashian, M. W. 1967. Soluble extracellular products of algae symbiotic with a ciliate, a sponge and a mutant hydra. *Comp Biochem Physiol* 20, 1–12.
- Nishijima, A., Fujishima, M. 2007. *Chlorella vulgaris* and *C. sorokiniana* cannot be maintained in *Paramecium bursaria* cell. *Jpn. J. Protozool.* 40, 28-29
- Omura, G., Ishida, M., Arikawa, M., Khan, S. M. M. K., Suetomo, Y., Kakuta, S., Yoshimura, C., Suzaki, T. 2004. A bacteria-free monoxenic culture of *Paramecium bursaria*: its growth characteristics and the re-establishment of symbiosis with *Chlorella* in bacteria-free conditions. *Jpn. J. Protozool.* 37, 139–150.

- Provasoli, L., Pintner, I. J. 1959. Artificial media for fresh-water algal: problems and suggestions. In the Ecology of Algae. Spec. Pub. No. 2., Eds. by Tryon, C. A., Jr. and Hartmann, R.T., Pymatuning Laboratory of Field Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, p. 84-96.
- Rees, T. A. V. 1989. The green hydra symbiosis and ammonium. II. Ammonium assimilation and release by freshly isolated symbionts and cultured algae. Proc R Soc Lond Biol. 235, 365-382.
- Reisser, W. 1976. Die stoffwechselfysiologischen Beziehungen zwischen *Paramecium bursaria* Ehrbg. und *Chlorella* spec. in der *Paramecium bursaria*-Symbiose. I. Der Stickstoff- und der Kohlenstoff-Stoffwechsel. Arch. Microbiol. 107, 357-360.
- Reisser, W. 1980. The metabolic interactions between *Paramecium bursaria* Ehrbg. and *Chlorella* spec. in the *Paramecium bursaria*-symbiosis. III. The influence of different CO<sub>2</sub>-concentrations and of glucose on the photosynthetic and respiratory capacity of the symbiotic unit. Arch. Microbiol. 125, 291-293.
- Reisser, W. 1984. The taxonomy of green algae endosymbiotic in ciliates and a sponge. Br. Phycol. J. 19, 309-318.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-212.
- Rodrigues, M. L., Alvarez, M., Fonseca, F. L., Casadevall, A. 2008. Binding of the Wheat Germ Lectin to *Cryptococcus neoformans* suggests an association of chitinlike structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. Eukaryot. Cell 7, 602-609.
- Shibata, A., Takahashi, F., Kasahara, M., Imamura, N. 2016. Induction of Maltose Release by Light in the Endosymbiont *Chlorella variabilis* of *Paramecium bursaria*. Protist 167, 468-478.
- Song, C., Suzaki, T. 2013. Improved preservation of organelles in *Paramecium bursaria* by freeze-substitution with glutaraldehyde and osmium tetroxide. J. Electr. Microsc. Technol. Med. Biol. 27, 1-8.
- Song, C., Murata, K., Suzaki, T. 2017. Intracellular symbiosis of algae with possible involvement of mitochondrial dynamics. Sci. Rep. 7, 1221.
- Summerer, M., Sonntag, B., Sommaruga, R. 2007. An experimental test of the symbiosis specificity between the ciliate *Paramecium bursaria* and strains of the unicellular green alga *Chlorella*. Environ. Microbiol. 9, 2117-2122.

- Summerer, M., Sonntag, B., Hörtnagl P., Sommaruga, R. 2009. Symbiotic ciliates receive protection against UV damage from their algae: a test with *Paramecium bursaria* and *Chlorella*. *Protist* 160, 233–243.
- Tagu, D., Palin, B., Balestrini, R., Gelhaye, E., Lapeyrie, F., Jacquot, J. P., Sautière, P. E., Bonfante, P., Martin, F. 2003. Characterization of a symbiosis- and auxin-regulated glutathione-S-transferase from *Eucalyptus globulus* roots. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 611-618.
- Takahashi, T., Shirai, Y., Kosaka, T., Hosoya, H. 2007. Arrest of cytoplasmic streaming induces algal proliferation in green paramecia. *PLoS One.* 2, e1352
- Takeda, H., Sekiguchi, T., Nunokawa, S., Usuki, I. 1998. Species-specificity of *Chlorella* for establishment of symbiotic association with *Paramecium bursaria* – Does infectivity depend upon sugar components of the cell wall? *Eur. J. Protistol.* 34, 133–137.
- Tanaka, M., Murata, H. M., Kadono, T., Yamada, T., Kawano, T., Kosaka, T., Hosoya, H. 2002. Complete elimination of endosymbiotic algae from *Paramecium bursaria* and its confirmation by diagnostic PCR. *Acta Protozool.* 41, 255–261.
- Wood-Charlson, E. M., Hollingsworth, L. L., Krupp, D. A., Weis, V. M. 2006. Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis. *Cell Microbiol.* 8, 1985-1993
- Ziesenisz, E., Reisser, W., Wiessner, W. 1981. Evidence of de novo synthesis of maltose excreted by the endosymbiotic *Chlorella* from *Paramecium bursaria*. *Planta* 153, 481–485.