
Review

日本産ミドリゾウリムシ細胞内共生藻について

保科 亮・鎌戸伸一郎・加藤 豊・今村信孝*

立命館大学理工学部 〒525-8577 滋賀県草津市野路東1-1-1

Studies on Endosymbiotic Algae in Green Paramecium from Japan

Ryo HOSHINA, Shin-ichiro KAMAKO, Yutaka KATO, and Nobutaka IMAMURA*

Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan

SUMMARY

Endosymbiotic algae of Japanese *Paramecium bursaria* were isolated and their axenicity was finally confirmed by DGGE method. Japanese symbiotic strains (F36-ZK and others) and American one, NC64A from ATCC, could use ammonia and organic nitrogen but not nitrate or nitrite as a sole nitrogen source. The measurement of nitrate (NR) reductase activity of NC64A and F36-ZK revealed the difference between these symbionts, i.e., weak NR activity was detected in NC64A cell extract but not in F36-ZK. Since Japanese symbionts preferred several amino acids for their growth, amino acid uptake were studied. F36-ZK was able to incorporate all amino acids through three amino acid transport systems, which considered to be driven by proton motive force. SSU rDNA analysis indicated four genetically discrete symbiotic algal groups depending on the strains of *P. bursaria*, of which three phylogenetically belonged to the Chlorellaceae, but one appeared at a different lineage in the Trebouxiophyceae. Species level analyses (ITS2 and other protein-coding genes) exposed

genetic dissimilarity and polyphyletic relations of the three chlorellacean symbionts, which suggests all four types were independently captured in the evolutionary history of *P. bursaria*. The host cell-free extract enhanced symbiotic algal carbon fixation about 3-fold, however, release of photosynthate hardly changed. On the other hand, the release of photosynthate was obviously increased with acidic condition. Thus, the host seems to regulate the photosynthesis and the release of photosynthate of the symbiont in perialgal vacuole via a specific compound and pH in the vacuole, respectively.

1. はじめに

ミドリゾウリムシはご存じのように細胞中に数百のクロレラ様藻類が共生している変わったゾウリムシである。この細胞内共生関係では宿主と共生藻が別個に培養できるため、19世紀の末から多くの研究者に様々な切り口からの研究材料として用いられてきた。

*Corresponding author

Tel: 077-566-1111 (代表) Fax: 077-561-2659

E-mail: imamura@se.ritsumei.ac.jp

(Received: 30 June 2006)

単離した共生藻や共生藻を失ったホワイトセルを用いた研究が行われた結果、ミドリゾウリムシの共生藻の数によって走光性が逆転するといった共生生物独特の面白い現象や、共生藻にのみ感染するウィルスが自然環境中に数多く存在するなどの驚くべき発見がなされた。この伝統ある研究生物であるミドリゾウリムシを研究対象にしたいと考えた切掛けは、水溜まりの中の小さな生物間で行われている弱肉強食の生存競争 (Imamura, 2005) だけではなく、平和に共存している生物間の相互作用を研究してみたいと考えたことである。究極の二者生物間の関係である細胞内共生での相互作用を化学的に探してみたい。走光性一つ取っても、共生藻の存在を示す何かの情報が宿主に受容されているのであろうし、第一、ミドリゾウリムシという一つの生物としての恒常性を保つにも、共生藻が勝手に分裂を続ければ宿主の体ははち切れてしまうので、なにがしかの制御機構があるに違いないなどと素人の考えを巡らし、特別な情報伝達物質があるのならその実体を化学的に明らかにしてみたいと考えたのである。その前提にはミドリゾウリムシは研究の歴史も古く、十分に宿主や共生藻についての研究が行われているので、単離や培養は我々素人集団でもどうにか出来るだろうという甘い見通しがあった。

ミドリゾウリムシの研究は歴史が古いがゆえに、検証された真実と不明瞭な部分を残したままの過去の推量との境目がばやけつつあるように思われる。例えば、暗条件に置くとホワイトセルが作れるとされてきたが、共生藻を完全に失ったホワイトセルを蛍光顕微鏡で厳密に検証したと報告されたのは、1995年になってからのことである (Hosoya et al., 1995)。ここでは、ミドリゾウリムシ共生藻についてのこれまでの研究を少し整理すると共に、分譲頂いたミドリゾウリムシが幸運にも日本産であったため、本来の検討に入る前に行った研究；日本産共生藻無菌株の単離と確立、日本産共生藻の生理学的特徴とアミノ酸輸送系についての検討、クロレラ様共生藻についての分子系統、そして当初の目的である宿主と共生藻との相互作用について、現在までに分かってきたことを記したい。

2. 日本産ミドリゾウリムシからの共生藻の単離・無菌化

産地を全く意識せずに共生藻についてのこれまでの知見を記述すると、特異なウィルス感染性、マルトース高生産性と光合成生産物の高い放出率、また、ホワイトセルに認識されることなど、自由生活型のクロレラとは異なる性状を持つ事が多くの研究者によって報告されている (Reisser, 1988)。ここに挙げた諸性状はそれぞれに不思議な性状で、例えばマルトー

ス高生産性を取り上げてみても、通常、二糖のマルトースは貯蔵物質の高分子のデンプンから切り出されて生成するもので、共生藻で考えられているような直接的な生合成経路 (Ziesenis et al., 1981) の存在自体、真実ならば極めて珍しいものである。共生藻の研究の殆どで欧米産が用いられており、欧州産では *Pbi* などの株が、また、米国産では *NC64A* という株がよく使われてきた。共生藻にのみ感染するウィルスが自然界に広く分布していること自体が驚くべき事実であるが、*Pbi* で単離されたウィルスが *NC64A* には感染せず、ウィルス感受性が欧州産と米国産では異なる事が指摘され (Reisser et al., 1991)、後述するようにミドリゾウリムシ共生藻が地球全体では共通のものではないと考えられるようになってきた。

さて、日本産共生藻については、欧米産と比べれば殆ど記述がなかった。我々の研究室で日本産ミドリゾウリムシからの共生藻無菌株の取得を目指して実験を始めた当初には、欧州産の共生藻が藻類一般に用いられる硝酸を窒素源とする寒天培地上で無菌化可能とされている (Reisser, 1984) のに対し、日本産ではバクテリアと共存するときのみ分離できるとの報告 (Nishihara et al., 1998) があっただけである。また、その分類については細胞壁構成糖の組成から、*Chlorella kessleri* ではないかとされていた (Takeda, 1995)。

共生藻の単離：取りあえず硝酸を窒素源とする寒天培地上で、日本産の共生藻の分離を試みることにした。日本産のミドリゾウリムシ(株名:F36、OK1、Sol3)培養液から細胞をろ紙上に濃縮し、宿主細胞を遠心破碎した。破碎液を遠心洗浄して、混在しているバクテリアの一部を除去した後、硝酸塩を唯一の窒素源とする藻類用の C 寒天培地に共生藻が懸濁した液を塗布した。25℃、明 16 時間暗 8 時間の条件で 1 ヶ月間静置培養したところ、直径 1 mm 以上の緑色コロニーが生育したが、顕微鏡を覗いてみると、これらのコロニーの全てにバクテリアが混在していた。やはり、バクテリアと共存する時だけ生育できるのであろうか？バクテリアと分離された藻の細胞はどうなったのであろうかと考え、塗布後 1 週間で肉眼では見えないコロニーを顕微鏡下で探して観察して見たところ、バクテリアが共存して水に濡れているように見えるコロニー(wet colony)と、1 つ 1 つの藻の細胞の輪郭がはっきりと観察でき乾いて見えるコロニー(dry colony、直径 50-80 μm)が観察された。それぞれのコロニーに印を付け、更に 1 ヶ月培養を継続すると、wet colony は直径 1 mm 以上までに生育したが、dry colony は成長していなかった。Dry colony を新たな C 培地に画線しても生育できず、C 培地では生育できないと考えた。そこ

で、共生藻や緑藻で用いられた種々栄養強化培地を検討したところ、ミドリゾウリムシ共生藻の単離に使用されたことのある MBBM 培地 (Van Etten et al., 1988) で、dry colony が増殖し、無菌と考えられる共生藻を取得できた。この培地には有機窒素源としてペプトン、炭素源としてスクロースが添加されていたが、無菌株の生育に必要なのはペプトンであることを確認した (Kamako et al., 2005)。

無菌化の確認：宿主と共生藻の相互作用を検討するには、共生藻が無菌であることは実験の必須条件となる。そこで、念には念を入れた無菌であることの証明 (あることを証明するのは容易だが、ないことを証明するのは、本来、不可能である) を行うことにした。まず、得られた無菌株をペプトン添加 C 液体培地で培養し、培養液を種々の蛋白質や糖を添加した無菌チェック用 C 寒天培地に塗布して、30℃で一晩培養したが、バクテリアのコロニーは出現しなかった。また、培養液を DAPI 染色して培養液中の全細胞を染色して蛍光顕微鏡で観察した。DAPI 染色で染色された細胞は全て共生藻であり、バクテリアは確認できなかった。さらに、全バクテリア種を確認できるとされ、環境中の微生物の解析に用いられている DGGE-PCR 法 (Ishii et al., 2000) を行った。すなわち、培養液の遠心沈殿物から全 DNA を抽出し、バクテリアの 16S rDNA に特異的なプライマーを用いて、16S rDNA を増幅して解析を行い、バクテリアが存在するか否かを評価した。DGGE-PCR 法では、無菌株培養液の DNA 抽出物から 16S rDNA フラグメントが検出された。しかし、現れたフラグメント DNA を抽出してシーケンスしたところ、*Chlorella vulgaris* Beijerinck の葉緑体の 16S rDNA と高い相同性 (98.7%) を示したことから、葉緑体の 16S rDNA 由来のものと考えられた。以上のことから、得られた共生藻を無菌と判断した (Kamako et al., 2005)。我々が無菌株を取得できたと喜び、その生理的特徴について検討を行っていた頃、日本産共生藻無菌株は硝酸アンモニウムを窒素源として無菌化が可能だが、数ヶ月しか維持できないとの論文 (Nakahara et al., 2003) が発表されていた。論文としてまとめる段になって、無菌化については先を越されていたことを知り落胆したが、同時に我々が得ていた日本産共生藻の生理的特徴が論文と共通することから、特殊な株を拾った訳ではないという安堵を感じた。

3. 共生藻の生理的特徴

共生藻無菌株の窒素化合物利用性：欧州産共生藻は共生時には硝酸還元酵素 (NR) を持たないが、単離された共生藻は無機塩培地上で硝酸によって NR が誘導

されて、硝酸塩を利用して生育できるようになるという報告がある (Albers et al., 1982)。また、欧州産共生藻の殆どが硝酸や亜硝酸を利用できるようなのである。日本産の共生藻の無菌株を確立したところ、硝酸塩のみの C 培地では得られた 3 株の共生藻 (F36-ZK、Sol3-ZK、OK-1-ZK 株) 全てで 7 日後に細胞数の減少が認められ、一方、ペプトンを加えた培地では顕著な増殖が確認された。そこで、まず共生藻 F36-ZK 株の窒素化合物の利用性について、自由生活型 *C. kessreli*、*C. vulgaris* と米国产ミドリゾウリムシ共生藻 NC64A とともに検討した。NC64A は文献 (Reisser and Widowski, 1992) には 2 株記載されており、一方は不明ではあるが、他方は硝酸利用できる事になっていた。前述のように欧州産も窒素利用可能なので、欧米産共生藻との違いが明確に出来る事を期待して窒素化合物の利用性を検討した。用いた窒素化合物は窒素含量として同量の硝酸、亜硝酸、アンモニウムの各イオンと、ペプトン、カザミノ酸である。タンパク質の酵素分解物であるペプトンはオリゴペプチドを含むが、カザミノ酸は酸加水分解物でアミノ酸にまで完全に加水分解されている。その結果を Fig.1 に示した。自由生活型と共生藻では明らかに窒素利用性が異なり、自由生活型クロレラは無機窒素の硝酸、亜硝酸、アンモニアをほぼ同様に利用でき、さらに *C. kessreli* ではペプトンやカザミノ酸も同様に利用可能であるが、*C. vulgaris* ではペプトンは殆ど利用できなかった。一方、共生藻では予想外に NC64A も硝酸や亜硝酸は利用できず、また、両者ともにアンモニアやカザミノ酸に比べればペプトンでの生育は劣るものであった。これら結果から、共生藻はアンモニアとアミノ酸が利用でき、オリゴペプチドは利用できないと考えられた。F36-ZK 株の単離の際にペプトンで育ったのは、用いた量が多かったので、率は低いが含まれるアミノ酸を利用して増殖できたものと考えられる。

次に、アミノ酸の利用性を明らかにするため、アミノ酸を唯一の窒素源として増殖測定を行った結果、F36-ZK 株は L-Arg、L-Asn、L-Gln、L-Ser、L-Ala と Gly が利用可能であった (Kato et al., 2006)。ここで特筆しておかなければならないのは、L-Glu が生育に利用できなかったことである。L-Gln と L-Glu は、アンモニアが有機物として同化される最初の化合物で、窒素代謝では極めて重要な位置を占めている。当然、L-Glu も生育に利用可能だと予想していたが、あっさりとは予想は覆されてしまった。

Albers ら (Albers et al., 1982; Albers and Wiessner, 1985) は共生藻に利用できないアミノ酸があることやその他の実験結果から、欧州産ミドリゾウリムシ共生藻関係についての宿主—共生藻間の窒素化合物のやり取りについて考察している。ミドリゾウリムシは硝酸

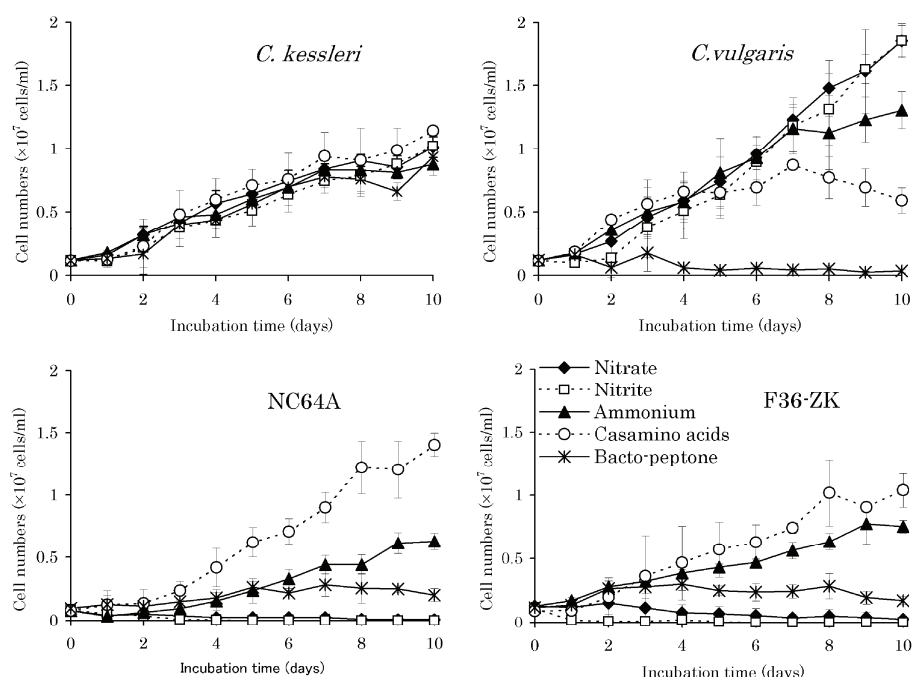


Fig.1 Utilization of nitrogen compounds for the growth of free-living *Chlorella* strains and symbionts. Concentrations of additive nitrogen: 2.3 mM

を取り込まないこと、単離直後の共生藻は硝酸還元酵素活性が無いことから、ミドリゾウリムシ体内は硝酸がない環境と考え、また、原生動物の一般的な排泄物であるアンモニアは、ホワイセルでは排出が確認されるが、ミドリゾウリムシでは逆に取り込みがあることから、アンモニアを宿主が共生藻に供給していると考えしている。同時に、共生藻のアンモニア同化酵素の活性が、単離した直後と **L-Gln** を窒素源として与えて培養した場合で同じ値を示すことから、**L-Gln** も供給され化合物の候補として挙げている。欧州産での考察は、そのまま日本産の宿主と共生藻との関係でも当てはまるようで、アンモニアと幾つかのアミノ酸が宿主からの窒素供給物質の候補としてあげられたことになる。ちなみに、F36-ZK 株に Gly や **L-Arg** といった利用できるアミノ酸のジペプチドを与えても生育できないことから、ジペプチドは取り込めないであろう。

日本産共生藻の窒素同化関連酵素の活性：日本産共生藻は硝酸を利用できないことから、硝酸からアンモニアへと還元する2つの酵素、硝酸還元酵素 (NR) と亜硝酸還元酵素 (NiR) の一方、あるいは両方が欠けて

いると考えられた。これを確認するためにまず NR について検討を行った結果、F36-ZK には NR の活性が認められなかった (Kamako et al., 2005)。NC64A では、極めて弱いものの NR 活性が硝酸で明らかに誘導され、硝酸で生育できるかどうかは別にして NR を発現した。ATCC から購入した NC64A 株は、有機窒素源を含む培地で保存することが推奨されており、有機窒素源を速やかに利用できる株が選択されているのかも知れない。一方、NiR 活性は、F36-ZK では比較実験に用いた自由生活型クロレラ同様に硝酸によって強く誘導されたが、NC64A では NiR 活性も極めて弱いものであった。ホウレンソウの変異株を用いた実験では、NR 構造遺伝子の変異株では F36-ZK と同様に NR 活性は無いが強い NiR 活性が、また、制御遺伝子の変異株では NC64A と同様に弱い NR と NiR 活性を観察している (Ogawa et al., 1994)。従って、F36-ZK の NR 遺伝子で変異が起こったと考えられ、日本産共生藻が欧米産よりもより細胞内共生に慣れ親しんだ結果、硝酸を還元する能力を失ったものとも考えることが出来る。

さて、前述の様に F36-ZK はアンモニア同化系で重要な鍵物質 **L-Glu** を生育に利用出来なかった。そこ

で、アンモニア同化系酵素のグルタミン合成酵素 (GS)、グルタミン酸合成酵素 (GOGAT)、グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の活性を調べた結果、NC64A は自由生活型クロレラと同様の酵素活性を示したが、F36-ZK ではなぜか GS 活性が検出できず、GOGAT は対照生物よりも強く、一方、GDH は弱いものであった (Kato et al., 2006)。アンモニアを利用できて L-Glu を利用できないのはなぜかという疑問から始めた検討であったが、GS 活性が無いという当惑する結果を得て、再現性を含めて現在も検討を続けている。米国産 NC64A と比べて、F36-ZK ではアンモニア同化も変わってしまったのか、結論を明確に出して行きたいと考えている。

4. 共生藻アミノ酸輸送系の解析へ

共生藻のアミノ酸の利用と輸送については、米国産の共生藻 2 株、NC64A, 3N813A で McAuley の報告がある (McAuley, 1986, 1989)。NC64A は L-Arg, L-Gln を生育に利用できるが、実験を行ったその他のアミノ酸 L-Pro, L-Ser, L-Ala, Gly, L-Lys, L-Glu は利用できず、また、取り込みは L-Arg で観察され、L-Lys で極めて微量の取り込みが認められている。一方、3N813A では、上記アミノ酸のうち L-Lys と L-Glu のみが利用できず、取り込みでは L-Lys は NC64A 同様に極めて微量で、L-Glu を除き実験に用いた他のアミノ酸 6 種の取り込みが確認された。これらの結果は、アミノ酸の取り込みと利用がほぼ一致しているということを示しているのみならず、L-Glu は取り込まれ難く利用できない事を示唆している。アミノ酸 20 種のうち 6 種を利用できる日本産共生藻 F36-ZK では、何種のアミノ酸が取り込めるか検討したところ、L-Asp の取り込みが少ないものの全てのアミノ酸の取り込みが認められた。L-Glu の取り込みも取り立てて弱いわけではなかった。同時に自由生活型クロレラの *C. vulgaris* でも測定を行った所、L-Arg のみ取り込まれ、他の 19 種のアミノ酸では取り込みが認められなかった (Kato and Imamura, submitted)。

F36-ZK 株がアミノ酸の取り込み系を発達させていることを明らかにするため、次にアミノ酸輸送系についての検討を行った。これまでに、前述の McAuley によって米国産共生藻について部分的な検討が行われており、NC64A では L-Arg と L-Lys の輸送を行う arginine/lysine system の存在が、また、3N813A では arginine/lysine system に加え、その他のアミノ酸を輸送する general system が報告されている。また、多くの緑藻類はアミノ酸を利用できるものの、その輸送系は余り発達していないとされている (Shehawy and Kleiner, 2001; Kirk and Kirk, 1978; Cho and Komor, 1985)。

F36-ZK の輸送系と各アミノ酸の輸送：F36-ZK が取り込める 20 種すべてのアミノ酸について、各々のアミノ酸の輸送系の数を予測するために、キネティクス解析を行った。その結果、L-Lys と L-Ala は K_m 値が 2 つ、その他のアミノ酸は 1 つであった。すなわち、L-Lys と L-Ala は少なくとも 2 つの輸送系での輸送が、またその他のアミノ酸は 1 つの輸送系での輸送が示唆された。一方、標識されていないアミノ酸を輸送系の競合阻害剤として添加し、各アミノ酸標識体の取り込み速度の変化を測定する、いわゆる競合実験から、各アミノ酸の輸送系の帰属を行った。結果を Table 1 に示す。L-Arg はキネティクス解析から K_m 値が他のアミノ酸に比べ小さい。すなわち、親和性が高いため、輸送が競合するときにはその影響が顕著に現れる。L-Arg を添加して輸送が阻害されたのが L-Arg、L-Lys だったので、これら塩基性アミノ酸は同一の輸送系での輸送と考えられ、この輸送系を basic amino acid transport system と命名した。また、L-Lys は前述のように 2 つの輸送系での輸送が予測され、2 つ目の輸送系としては、競合実験で阻害がみられた L-His や多くのアミノ酸を輸送する系が考えられた。競合実験を繰り返した結果、L-Arg 以外の 19 種のアミノ酸の輸送を媒介する general amino acid transport system の存在が示唆された。また L-Ala もキネティクス解析から 2 つの輸送系での輸送が予測されており、L-Ala に特有な輸送系が考えられた。これらの結果、F36-ZK は少なくとも 3 つの発達したアミノ酸輸送系を有していることが明らかとなった (Kato and Imamura, submitted)。また、これらの輸送系は全て能動輸送であり、多くの生物のアミノ酸輸送 (Cho and Komor, 1983; Young et al., 2003; Hsu et al., 1993; Bush et al., 1993) と同様にプロトンとの共輸送であることが強く示唆された。

アミノ酸輸送の pH 依存性：F36-ZK は少なくとも 3 つの輸送系を有しており、各輸送系の性質を調べるため、既知の方法 (Sauer, 1984) を用いて、いくつかのアミノ酸で取り込みの pH 依存性を調べた (Fig. 2)。L-Arg は 5-6.5 というやや広い至適 pH を示した。米国産共生藻 3N813A でも L-Arg の pH 依存性が報告されており (McAuley, 1989)、それによると L-Arg は pH 3.5-7.0 にかけて pH の上昇と共に取り込みが上昇するということである。F36-ZK 株では、general amino acid transport system で輸送される L-Ser, L-Ala, L-Gln はいずれも pH 5 で最も高い輸送速度を示した。同じ general amino acid transport system で輸送されるが酸性アミノ酸である L-Asp, L-Glu は、非常に特徴的な pH 依存性を示し、pH 6 を閾値として酸性側では取り込みが確認できるが、アルカリ性側ではその取り込みは非常に低い。これらの結果から、至適 pH はその等電点

Table 1. Effect of unlabeled amino acid on amino acid uptake

Target A.A.		Uptake of tracers (%control)																
Competitive A.A.	Arg 1	Arg 2	Lys 1	Lys 2	Lys 3	His	Asp ^a	Glu	Asn	Gln 1	Gln 2	Ser 1	Ser 2	Ala 1	Ala 2	Ala 3	Pro	Val
Arg	15	4	40	24	32	76	95	88	74	86	84	83	96	84	84	81	79	75
Lys	92	105	54	22	35	81	96	74	87	100	99	107	111	104	98	87	83	99
His	80	97	85	65	84	55	86	60	55	80	64	99	71	93	63	29	65	75
Asp	106	112	107	99	96	99	89	117	94	101	121	119	121	106	112	-	112	106
Glu	132	122	108	103	102	77	20	69	78	84	71	123	101	107	91	-	80	90
Asn	102	108	102	101	92	76	51	74	53	83	77	105	90	109	75	35	75	100
Gln	120	112	108	88	88	51	65	60	66	60	56	94	66	84	70	12	58	68
Ser	91	90	49	71	81	30	20	59	20	41	24	70	31	64	24	9	31	33
Thr	97	102	65	87	89	19	14	61	19	27	15	58	17	45	15	9	21	30
Tyr ^a	90	102	48	69	85	12	20	11	26	15	13	20	15	14	13	-	17	11
Ala	91	94	40	66	84	14	9	18	57	23	66	48	13	35	13	4	12	13
Val	97	105	69	90	90	19	15	17	61	26	15	52	21	54	15	14	25	16
Leu	97	97	32	55	69	8	14	10	28	17	9	33	12	34	9	-	17	8
Ile	93	93	60	90	104	12	16	10	31	20	8	39	12	37	13	15	16	12
Pro	90	93	67	86	89	23	10	26	23	31	28	55	20	59	17	8	24	24
Phe	84	85	35	64	72	7	14	7	19	15	9	30	10	30	9	-	16	9
Met	111	95	42	70	87	7	10	5	21	9	5	24	6	17	6	8	13	4
Trp	71	89	24	59	70	8	10	10	15	12	6	22	6	19	7	-	15	6
Gly	99	89	65	84	84	33	14	37	22	41	26	61	28	61	23	13	34	36
Cys	108	94	49	85	84	12	10	15	27	20	11	45	15	40	12	7	16	26

Conc. of tracers (mM) 0.026 0.014 0.026 0.026 0.12 0.036 0.012 0.012 0.012 0.012 0.009 0.006 0.006 0.025 0.027 0.027 0.027 4.670 0.026 0.025

Conc. of competitors (mM) 0.1 0.5 0.1 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.1 0.5 0.1 0.5 0.5 20 1 1

^a In the case of L-Asp, the pH of the experimental buffer was 5.0.

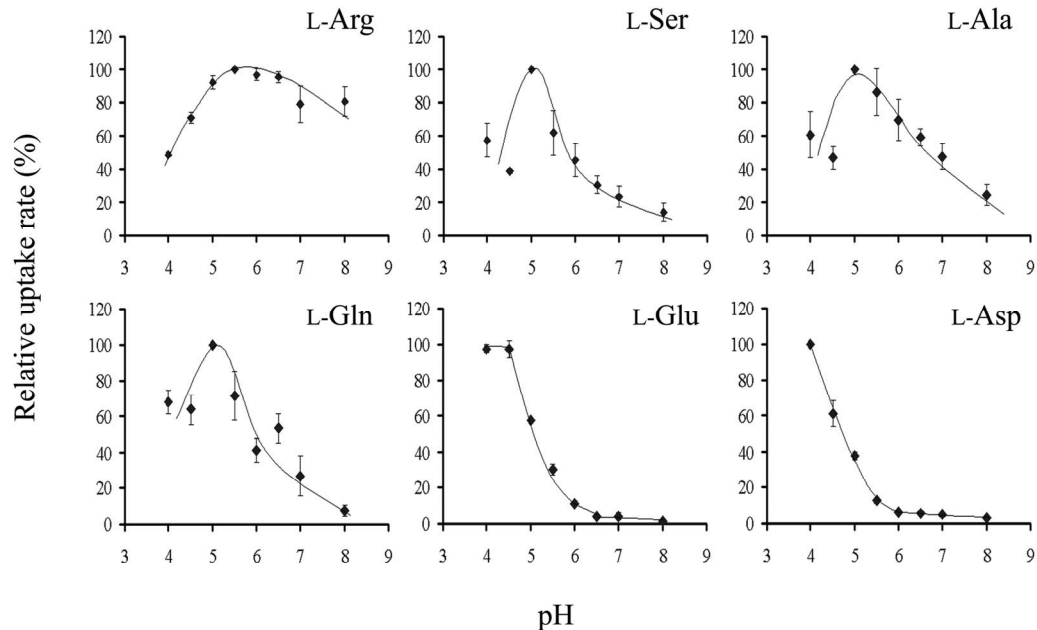


Fig.2 Relative amino acid uptakes of F36-ZK at several pH. Amino acid uptakes were measured using cells in 25 mM sodium citrate buffer at pH 4.0 to 5.0 and in 25 mM sodium phosphate buffer at pH 5.0 to 8.0. Each point is the mean of three experiments. Bars represent means $\pm$ S. D. of three replicates.

(pI)に近いが、酸性側であるため、やや正に帯電した状態での輸送が最適であると考えられる。酸性アミノ酸の L-Asp、L-Glu の pI はそれぞれ 2.8, 3.2 であり、今回の測定した pH 範囲外であるため正に帯電した状態が最適かどうかはわからないが、pI に近づくにつれて輸送速度は上昇している (Kato and Imamura, submitted)。pH6 を境とした急激な酸性アミノ酸の輸送速度の変化は、極めて重要な示唆を与えた。L-Glu 利用性の検討に用いた培地 pH が 7 近辺であったことを考え合わせると、取り込まれるが利用できない謎はこの辺りにその答えがあるのかも知れない。興味深いことに、共生藻が最もマルトースを放出する pH は 4-5 であり (Mascatine et al., 1967)、宿主の共生胞内の pH の調整により、マルトースの放出とともに酸性アミノ酸の取り込みを調整している可能性も考えられる。

5. 共生藻はクロレラか？

そもそもクロレラとは？：ミドリゾウリムシに細胞内共生する緑色の藻類の分類に関してはこれまで様々な見地から研究され、クロレラ *Chlorella*、もしくはそれに類似する藻類(例: Douglas and Huss, 1986; Reisser et al., 1988)とされてきた。クロレラは生理学的

研究にも頻繁に用いられるかわら、健康食品としても広く認知され、誰もがその名を知る藻類のひとつであるが、分類学的には非常に問題の多い一群である。*Chlorella* は 1890 年、*C. vulgaris* をタイプ種(type strain: SAG 211-11b)として、M. W. Beyerinck により記載されている。*Chlorella* は球状で鞭毛を持たず、細胞内には最小のオルガネラセットと思われる 1 核・1 葉緑体・1 ミトコンドリアのほか、いくつかのペロキシソームや小胞がみられるが、他に顕著な形態的特徴がない。このような緑色の球状藻は、湖沼、海、土壌などから次々に見つかり、100 種以上の *Chlorella* 属藻類が記載されるに至ったが、さまざまな系統に散乱する多系統群であることが徐々に明らかとなり (Friedl, 1997)、現在ではこうした単純な球状形態＝クロレラ型が生存競争の中で有利に働くと考えられるようになってきている (Potter et al., 1997)。

90 年代後半、遅れていた緑色藻の分子データが蓄積され、分子系統的立場から *Chlorella* の整理が行われるようになる。Huss et al. (1999) は SSU rDNA による解析からタイプ種を含むクレードを真の *Chlorella* (トレボウクシア藻綱) とし、*C. vulgaris*、*C. lobophora*、*C. sorokiniana*、*C. kessleri* (現 *Parachlorella kessleri*) の 4 種に限定した。Krienitz et al. (2004) はこのクレードに分

Table 2. Strains of *P. bursaria* and symbiotic algae analyzed in this study.

<i>P. bursaria</i>			共生藻	
Strain	Collection site	Genotype	Strain	Group
OK1	Aichi, Japan	I	OK1-Zk	i ("American")
So13	Nagano, Japan	I	So13-Zk	i ("American")
F36	(cross breed)	I	F36-Zk	i ("American")
KM2	Shimane, Japan	I	KM2-Zk	i ("American")
Dd1	Ibaraki, Japan	I	Dd1-Zk	i ("American")
Bnd1	Hiroshima, Japan	I	Bnd1-Zk	i ("American")
Cs2	Shanghai, China	I		i ("American")
MRBG1	Melbourne, Australia	I		i ("American")
	New York, USA		ATCC 50258	i ("American")
	Ohio, USA		ATCC 30562	i ("American")
	USA		SAG 211-6	i ("American")
PB-SW1	Schwarzwald, FRG	II		ii ("European")
CCAP 1660/11	Cambridge, UK	II		ii ("European")
CCAP 1660/12	Cambridge, UK	IV		ii ("European")
CCAP 1660/10	?	III		iii (<i>C. vulgaris</i>)
CCAP 1660/13	Cambridge, UK	IV		iv

ATCC: American Type Culture Collection, USA

SAG: Culture Collection of Algae at Göttingen University, FRG

CCAP: Culture Collection of Algae and Protozoa, UK

類学的な階級を与えクロレラ科としたが、同時にクロレラ型以外の藻類が多数入り混じることが明らかとなっている。クロレラ型藻類は、DNA 配列のほか微細構造や生理化学的な相違により識別可能とされるが、最も同定の難しい藻類ともいわれている(Krienitz et al., 2004)。現在 SSU rDNA において系統的にクロレラ科に入らない「もとクロレラ」は、属の変更処理がなされていない限り '*Chlorella*' と記すのが通例となっている。

日本産共生藻のリボゾーマル DNA 解析：こうしたクロレラ DNA 解析をバックボーンに、ようやくミドリゾウリムシ共生藻の分子系統解析についても着手できる状況が整ってきた。まず、日本産ミドリゾウリムシ 6 株(OK1, So13, F36, KM2, Dd1, Bnd1)から単離・培養に成功した共生藻 6 株についてリボゾーマルオペロン 5' half 領域を決定した。SSU rDNA はイントロンの挿入が 3 箇所にもみられる特殊なものであったが、exon 領域を比較するとそれらが上記のクロレラ科に入ることが示された。用いたミドリゾウリムシの採集域は狭いものではなかったが(Table 2)、決定した全領域で株間に多様性はみられなかった(Hoshina et al., 2004)。

ミドリゾウリムシからの共生藻 DNA 増幅：ミドリゾウリムシに限らず、共生生物は培養条件に非常に敏感であり、単離・培養自体が難しい場合が多い。地衣類

における遺伝子解析では宿主-共生藻混合の鋳型 DNA をもとに specific プライマーを用いた rDNA の PCR 増幅系が発展しており(例: Kroken and Taylor, 2000; Romeike et al., 2002)、試行錯誤の上ミドリゾウリムシに使用できる緑色藻 specific プライマー群を設計、直接内部共生藻をターゲットとした増幅系を確立した(Hoshina et al., 2005)。ミドリゾウリムシ内の藻類構成を考察することも、この増幅系の狙いのひとつである。実はミドリゾウリムシ内部の共生藻がクローンなのかどうか、現在もはっきりしていない。日本産共生藻 6 株からは同一の DNA 配列が得られたわけだが、株の確立過程で受ける淘汰圧により、ミドリゾウリムシ細胞内フロラのうち特定の entity だけが生き残った可能性も否定できない。事実 Nakahara et al. (2004)はクロレラ型藻類より明らかに小さい藻類(彼女らは *Choricystis minor* と同定している)がクロレラ型藻類と共存して維持されるミドリゾウリムシ株を報告している。しかし、この系により増幅された PCR 産物(rDNA)からは、現在のところすべての株で単一のきれいな DNA 波形が得られている。このことから共生藻のクローン化はかなり進んでいると言ってよさそうだが、それでも PCR 増幅物は鋳型 DNA の含有割合に確実に依存するため、マイノリティーとして共生している藻類がいたとしても検出されていない可能性は大に残っている。

世界の共生藻：このようにして得られた共生藻リボ

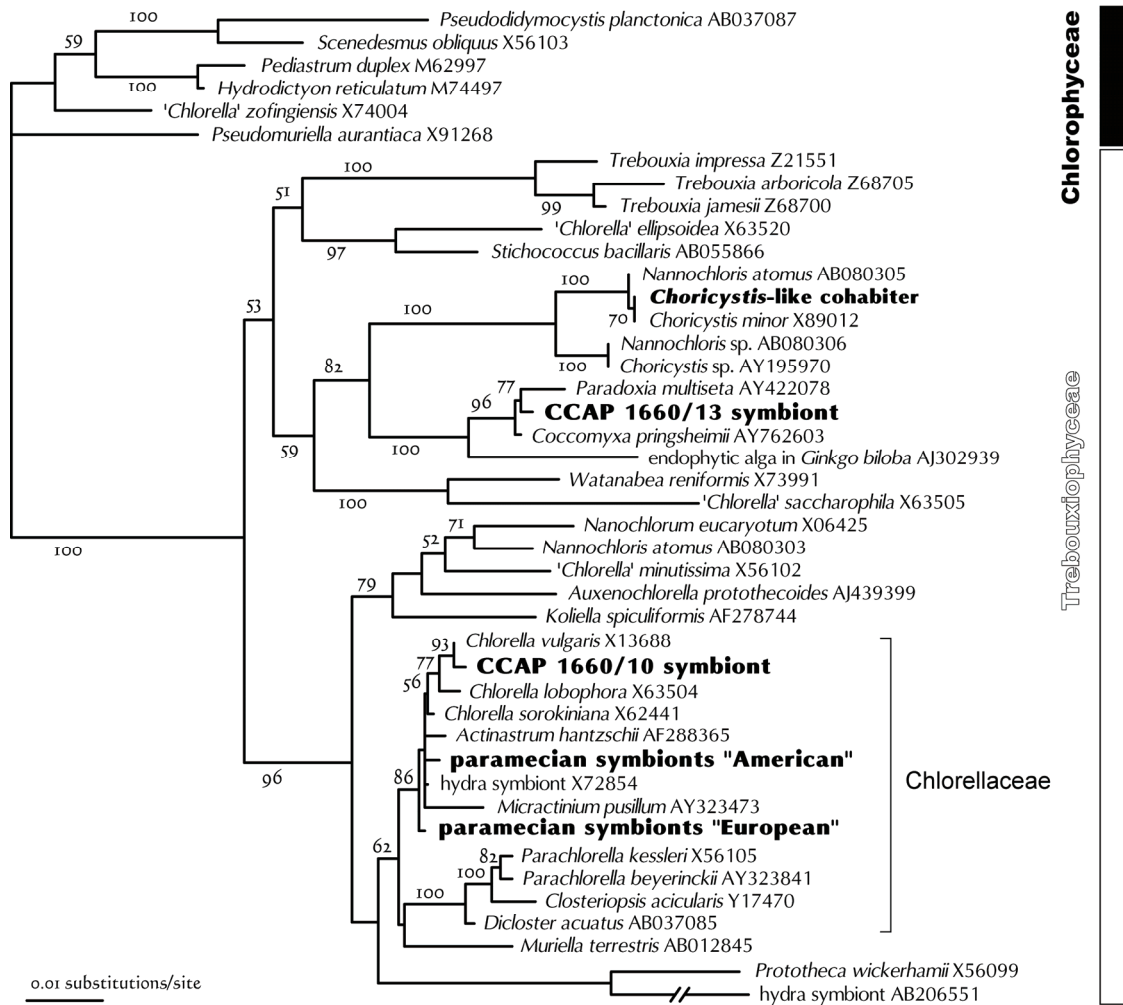


Fig.3 Maximum likelihood tree (GTR+I+G model) constructed from an analysis of SSU rRNA gene sequences. Parametric symbionts are in boldface. Numbers at each node represent bootstrap probabilities (100 replicates). Only values above 50% are shown.

ゾーマルオペロンの 5' half のシークエンスからは、明らかな特徴を持った遺伝的 4 グループが認識される (Table 2)。Group i: SSU rDNA 中にイントロンを 3 つ含むグループで、イントロンやスパーサー領域を含めても上述の日本産ミドリゾウリムシ共生藻と同一、もしくは数塩基の相違がみられるのみで、日本産のほかにも ATCC 50258 (NC64A)、ATCC 30562 (Syngen 2-3)、SAG 211-6、豪 MRBG1、中 Cs2 が含まれる。Group ii: SSU rDNA 中にイントロンを 1 つ含むグループで以下の 3 者で同一、英 CCAP 1660/11、1660/12 および独 PB-SW1。Group iii: 産地不明 CCAP 1660/10 でイントロン

なし。Group iv: 英 CCAP 1660/13 でイントロンはないが Group iii とは配列が大きく異なる。これまで行われてきた生理化学的研究からは、共生藻には性質の異なる 2 種類があり、それぞれの共生藻が納まっていたミドリゾウリムシの採集地にちなんで “American” (“southern”)、 “European” (“northern”) と称されている (Douglas and Huss, 1986; Reisser et al., 1988; Kessler and Huss, 1990; Linz et al., 1999; Kvitko et al., 2001)。これらの研究と重複する株や地理的分布を参照すると、Group i が “American”、Group ii が “European” に該当する (Hoshina et al., 2005)。SSU rDNA

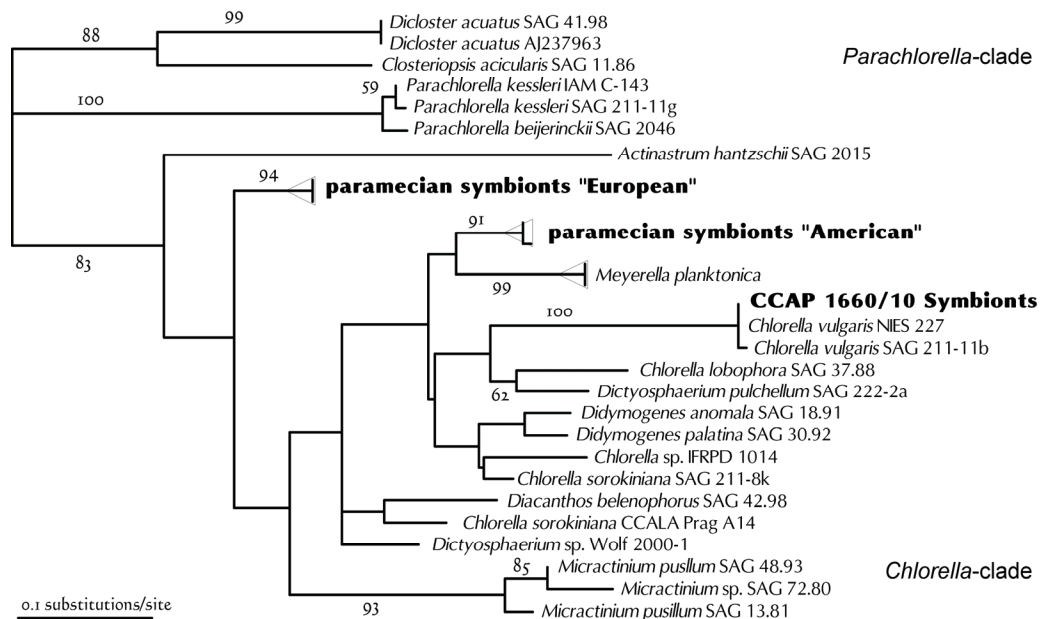


Fig.4 Maximum likelihood tree (GTR+I+G model) of ITS2 sequences of the Chlorellaceae. The tree was rooted with the members of Parachlorella-clade. Symbiotic algae are in boldface. Numbers at each node represent bootstrap probabilities (100 replicates). Only values above 50% are shown.

(exon)に基づく共生藻の系統樹を構築すると、“American”、“European”および Group iii = CCAP 1660/10 は系統的にクロレラ科に含まれるが、Group iv = CCAP 1660/13 はトレボウクシア藻綱内の異なる位置に出現し、地衣類やバイオフィームからみつかる *Coccomyxa*、イチョウのプロトプラストから発見された寄生的藻類 (Trémouillaux-Guiller et al., 2002) などとともにクレードを形成する。またこのクレードは Nakahara et al. (2004) の示した同居性藻類を含む *Choricystis-Nannochloris* クレードと姉妹関係にある (Fig. 3)。我々が使うカタカナの「クロレラ」が指す範疇は不明だが、ミドリゾウリムシの共生藻が全て *Chlorella* とは言い切れないようだ。

クロレラ科内における共生藻と既知種との関係：クロレラ科内部では、ITS2 を用いた解析が進められている (Krienitz et al., 2004; Hoshina et al., 2004, 2005)。ITS2 は特定の二次構造をとることで 5.8S、LSU rRNA 末端の成熟を補助する。ゆえに ITS2 は単なるスペーサーではなくひとつの遺伝子として捉えられ、植物の系統や種分化に関する研究では近年最も頻繁に用いられる領域となっている (Hershkovitz et al., 1999)。ITS2 系統樹では 3 グループの共生藻は *Chlorella*-クレード内

の異なる位置に出現し、各グループ間の遺伝的距離は 0.2 以上となった (Fig. 4)。

近年、種分化の程度をみる上で ITS2 二次構造上における相補的置換の有無が取り上げられている。Coleman (2000) によれば、ITS2 の相違が直接種分化に作用しているわけではないものの、二者間で CBC (Fig. 5) がみられる場合は両者の間で (正常な子孫形成を度外視しても) 接合自体が起こらないとしている (比較領域はヘリックス II、III に限定)。CBC がみられないことが単一種を示すわけではないが、CBC がみられる場合、それは別個の生物学的種ということになる。CBC と種の境界に関してはさまざまな生物群 (例: 巻貝: Coleman and Vacquier, 2002; 昆虫: Young and Coleman, 2004; 珪藻: Behnke et al., 2004; 繊毛虫: Coleman, 2005) で実証され、現在のところ反例もなく、有性生殖を行わない本藻群における種の境界を探る上ではきわめて有用なアプローチとなろう。共生藻研究の主体であった“American”や“European”は、その生理化学的研究のなかで *C. vulgaris* や *C. sorokiniana* と同定されてきた (例: Douglas and Huss, 1986; Reisser et al., 1988) が、“American”とどの藻類を比較しても CBC と hemi-CBC (CBC に次ぐ不和合性を示す, Fig. 5) がみつかると。“European”でも同様に他種との間には CBC の壁が

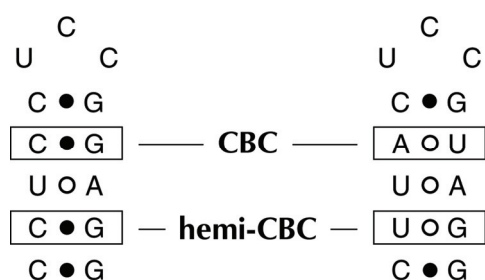


Fig. 5 Examples of compensatory base changes. CBC is a phenomenon when a base of a pair changed the opposite side base compensatively changes to conserve that pairing in a double strand helix. Changing on only one side of a pair preserving the pairing is called hemi-CBC.

ある。こうした観点から、“American”も“European”も既知の *Chlorella* 属藻類および ITS2 配列が公開されている他の種に当てはめることはできない。一方 CCAP 1660/10 の共生藻は、*C. vulgaris* にきわめて近い。Müller et al. (2005) は各国保存機関の *C. vulgaris* について遺伝的に検証し、*C. vulgaris* の ITS 領域には 6 種類のわずかな多様性がみられることを報告している。CCAP 1660/10 から得られた共生藻の配列は上記バリエーションのひとつと完全に一致しており、従って、遺伝的には *C. vulgaris* に他ならない。

繰り返される共生藻獲得：ミドリゾウリムシ同様、クロレラ型藻類を共生させる生物にグリーンヒドラがある。Huss et al. (1993, 1994) は、ヒドラの共生藻 4 株の SSU rDNA を用いた系統解析を行い、3 株(HvT, Ssh, Esh)は塩基配列にわずかな違いがあるものの互いに近縁で、残りひとつの株(Jsh)だけは系統樹上で異なる位置に出現することから、ヒドラは進化上少なくとも 2 度独立して共生藻を獲得したと結論付けている。前述の Group iv = CCAP 1660/13 共生藻は、他の 3 グループの共生藻とは SSU rDNA レベルでも明らかに系統が異なること(Fig. 3)から、ミドリゾウリムシ共生藻でも同様のことがいえる。さらに ITS2 (Fig. 4)、*rbcL*、*psaA* (保科未公開データ)からの系統樹では、*Chlorella*-クレードに含まれる 3 グループ(“American”, “European”, CCAP 1660/10)も単系統ではない。現在までに解析された共生藻株の中では、数の上で“American”と“European”が圧倒的に多く、CCAP 1660/10 や 1660/13 は例外的な株かも知れないが、遺伝的に識別した 4 グループの共生藻は、それぞれ独立して共生藻としての地位を確立—すなわち、ミドリゾウ

リムシは、その進化上繰り返し新たな共生や共生藻の総入れ替えをおこなってきたことになる。

宿主の遺伝的多様性と共生藻の関係：緑色藻 specific プライマーによる共生藻 rDNA の増幅と同様、宿主 rDNA の増幅も可能となっている。現在までに 13 株のミドリゾウリムシ SSU rDNA シークエンスを決定し、4 つの Genotype (I-IV)を認識しているが、シンジェンとの関連性はよくわかっていない。Genotype 間における多様性は、Genotype I-II 間で最大となり 23 塩基置換 + 4 挿入/欠失がみられ、Genotype III と IV は比較的近い (2 塩基置換のみ)関係にあるようだ。進化的分岐順は確定できていないが、宿主の Genotype と共生藻のグルーピングを表にしてみると、検体が少ないために不明瞭ではあるが、奇妙な相関がみえてきた (Table 2)。数の多い Genotype I の宿主は全て“American”タイプの共生藻を有しており、一方、Genotype II の宿主は“European”タイプの共生藻を持っていた (Hoshina et al., 2005)。また、唯一の Genotype III (CCAP 1660/10)は *C. vulgaris* を、Genotype IV では“European”と Group iv を持っていた。生理化学的に識別されてきた“American”、“European”タイプの共生藻だが、宿主ミドリゾウリムシの遺伝子型とも関係がありそうだ。

Ribosomal DNA 中にみられるイントロン：SSU rDNA 中に 3 つもイントロン挿入があった“American”タイプの共生藻は、LSU rDNA にも豊富な 5 つのイントロン挿入がみられる。また“European”タイプでは、株やゲノム内でも相違があるようだが、LSU rDNA 3'付近に 1-3 つのイントロン挿入がみられる (保科未公開データ)。

“American”タイプの共生藻では、SSU rDNA 中に存在したものも考慮して、5'末端からイントロン 1~8 (1~3 は SSU rDNA 中)と呼んでいる。これらは全て Group-I イントロンで、4 つずつそれぞれ subgroup E (イントロン 1、5、6、7)と C1 (イントロン 2、3、4、8)に帰属される。イントロンの挿入位置は、SSU rDNA で 2 つのものが、また LSU rDNA で 1 つのものが既知のポジションであったが、他の 4 つの挿入位置は新規のものとなるようだ。Group-I イントロンは、親(細胞)から子(細胞)へと受け継がれる遺伝的伝播のほか、感染機構は不明な部分もあるが、遺伝とは関係なく種を超えて伝播する水平伝播が知られている。本研究で発見されたイントロンの起源は不明だが、4 つの subgroup E のイントロンは互いの類似度が非常に高いことから、ゲノム内にいったん入り込んだイントロンが、コピー&トランスファーされて数を増やした可能性が示唆される。

生存競争で自己複製のスピードがものを言うバク

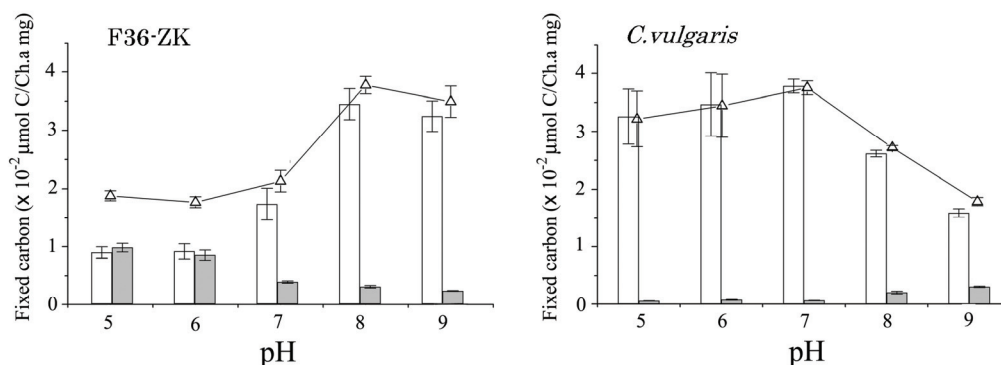


Fig.6 pH dependence of carbon fixation of F36-ZK and *C. vulgaris*. The pH was adjusted using 50 mM sodium phosphate buffer. The white bar shows intracellular carbon fixation, the shaded bar shows released photosynthate and the line chart shows gross carbon fixation. Bars represent means $\pm$ S. D. of three replicates.

テリアのゲノムには、一般にイントロンがみられない。複製のスピードが宿主に制御される共生藻の特殊な環境が、このような多数のイントロン挿入を可能にしているとはいえないだろうか。イントロンの多さが歴史的に長い期間ミドリゾウリムシ体内で飼われていることを示すのであれば、“American”や“European”に ITS2 レベルで近縁種がみつからない理由付けともなるのだが。

6. 宿主と共生藻との相互作用

当初の研究目的である宿主と共生藻との相互作用を化学的に探るという課題は、まだ初歩的な段階を抜けきっていない。ミドリゾウリムシの宿主と共生藻での物質のやり取りについては、これまでに共生藻から光合成産物のマルトースが宿主へ放出されていることが報告されているが、その他の物質については詳細は不明である。共生関係では必ず内部に生活するものへの栄養供給が行われているはずであり、物質の授受も状況に合わせて適切に行われているはずである。海洋生物ではサンゴやシャコガイ、イソギンチャクなど多くの生物で藻類が共生している。シャコガイでの共生関係でも、共生藻から宿主へ光合成産物が移動していると考えられており、この共生関係では宿主の組織破砕液により共生藻の光合成産物の放出量が大きく増加することが報告されている (Masuda et al., 1994)。また、サンゴでも、宿主の破砕液中の低分子の因子が、共生藻のグリセロールの代謝と放出を調製しているとの報告がある (Grant et al., 1998)。ミ

ドリゾウリムシにおいても、同様の共生関係が存在していると考えられるが、検討した例はない。そこで、細胞内共生関係での相互作用について知見を得る目的で、宿主無細胞抽出液の共生藻光合成活性への影響を自由生活型の *C. vulgaris* と比較しながら検討することにした。

共生藻および自由生活型クロレラ光合成への pH の影響と放出される光合成産物：ミドリゾウリムシ体内で共生藻の 1 つ 1 つの細胞は共生胞と呼ばれる膜で覆われており、共生胞内は酸性であるとの報告 (Schüßler and Schnept, 1992) があるので、まずは、F36-ZK 株と *C. vulgaris* との炭酸同化能の pH 依存性を検討してみた。リン酸バッファーで各藻体懸濁液を pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 に調製し、放射性標識した CO_2 の固定を測定した。その結果は Fig.6 に示すように、対照的なものであった。*C. vulgaris* の炭酸同化は pH 7 を境にしてアルカリ側で低下したが、F36-ZK では酸性側よりもアルカリ側での炭酸同化は約 2 倍であった。また、*C. vulgaris* が藻体外への光合成産物の放出は殆どなかったのに対して、F36-ZK は酸性側では全同化量の約半分を藻体外に放出していた (Kamako and Imamura, 2006)。共生胞内の pH が約 5 といわれており、F36-ZK は宿主に都合よく飼育慣らされた性質をもっていた。

F36-ZK が酸性で放出する物質を明らかにするため、対数増殖期にある F36-ZK 培養液の pH を 4～5 に調製し、培養液をイオン交換樹脂で処理して中性物質のみを得た。これをシリカゲル薄層クロマトグラ

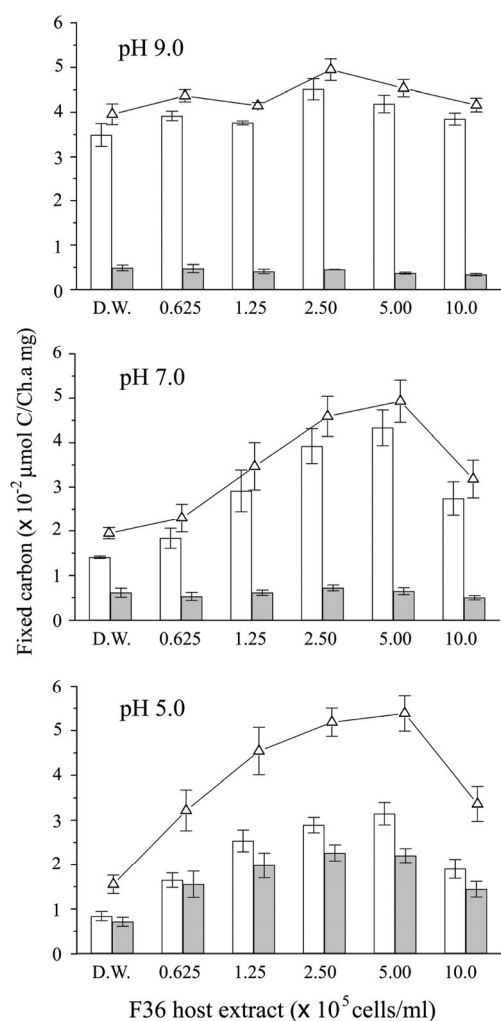


Fig. 7 pH dependence of the effect of the cell-free extract on carbon fixation of F36-ZK. The white bar shows intracellular carbon fixation, the shaded bar shows released photosynthate and the line chart shows gross carbon fixation. Bars represent means $\pm$ S. D. of three replicates.

フィーで分析した結果、F36-ZK が放出する主要な光合成生産物は、欧米産共生藻 (Brown and Nielsen, 1974) 同様にマルトースであることを確認した。しかしながら、TLC 上には UV 吸収をもつ中性物質のスポットも認められ、糖類ではない物質も藻体外へ放出していることが明らかである。

宿主抽出液の共生藻および自由生活型クロレラへの影響：対数増殖期にある共生藻 (株名・F36-ZK, OK 1-ZK, Sol13-ZK) および自由生活型クロレラ (*C. vulgaris*, *C. kessleri*) の炭酸同化への宿主抽出液の影響を調べた。宿主抽出液は、ミドリゾウリムシ F36 株培養液から細胞をろ紙上に濃縮し、宿主細胞を蒸留水で洗浄した後、メンブランフィルターで吸引ろ過することで宿主細胞を破碎し、ミドリゾウリムシ無細胞抽出液を得た。共生藻 F36-ZK の光合成活性は、宿主抽出液の濃度に依存して最大 3 倍程度上昇した。しかし、光合成生産物の放出量に関しては、宿主抽出液の影響が見られなかった。光合成活性を上昇させる既知の因子としては、光強度と CO₂ 濃度が知られているが、一般的な実験条件下においてその他の要因で光合成活性が上昇することはなく、極めて稀な現象と思われた。今回の実験系では光条件は一定なので無視できるが、宿主抽出液中の炭酸により光合成活性が上昇している可能性が考えられた。そこで、宿主抽出液中の炭酸を除去して F36-ZK への影響を検討したが、やはり光合成活性は上昇した。したがって、宿主抽出液中には炭酸とは異なる光合成活性を上昇させる因子が存在することが明らかになった。また、抽出液によって、共生藻、自由生活型クロレラに関わらず、宿主抽出液の濃度に依存して光合成活性が 3 倍上昇した。このことから、抽出液の光合成活性を上昇させる宿主因子には、特別な種特異性はないと考えられた。

また、宿主抽出液の効果への pH の影響を検討するために、pH5.0、7.0、9.0 の宿主抽出液の F36-ZK の光合成活性への影響を測定した。その結果を Fig. 7 に示した。横軸は宿主抽出液の濃度を示すもので、1ml 当たり宿主細胞何セル分の抽出物が溶けているかを示しているが、おおよそ 5×10^5 cells/ml の濃度がミドリゾウリムシ体内の濃度に相当する。蒸留水 (DW) と比較して、pH5 と 7 では宿主抽出物濃度の上昇とともに炭酸同化量がおおよそ 3 倍まで増加したが、pH9 ではほぼ一定であった。また、pH5 では光合成生産物は、宿主抽出液の濃度に関わらず常に 45%程度が放出された (Kamako and Imamura, 2006)。うがった見方をすると、共生藻は共生胞という独房の中で、宿主の光合成上昇因子で鞭打たれせつせと炭酸同化を行い、共生胞内の酸性条件でせっかく作り出した光合成生産物の半分を宿主に差し出していることになる。

宿主抽出液中の共生藻の炭酸同化を上昇させる因子は何か？：海洋生物での検討では、光合成生産物の放出を促進する宿主因子は低分子である。ミドリゾウリムシの場合はどうか検討するために、メンブランフィルターで分子量分画 (MW<5,000) した。その結果、やはり低分子物質であり、前述のように共生胞に包まれ

ている以上、この膜を透過しなければならず、低分子であることは至極当然のようにも思える。また、この物質は熱や pH の変化に対しても安定な物質であるが、通常のアミノ酸ではないことだけは確認済みである。現在、この物質の化学的解明を目指して検討を続けているが、どの様な物質が出てくるかは今後のお楽しみとしたい。

7. おわりに

ミドリゾウリムシの宿主と共生藻の関係を化学的に探ってみようということでスタートした研究が、いつの間にか日本産ミドリゾウリムシ共生藻の特徴や生理、分子系統の話へと広がってしまった。日本産共生藻は NR 活性の欠如、アミノ酸輸送系の発達などから考えると、米国产 NC64A よりもさらにミドリゾウリムシの細胞内の生活に慣れ親しんでいるようだ。クロレラウィルスの感受性からも日本産共生藻が "American" タイプ、また琵琶湖にいるウィルスも "American" タイプであることを確認しており、ミドリゾウリムシ宿主・共生藻・クロレラウィルスという3点セットが、太平洋の遠い対岸と同系と考えると何とも不思議な気がするのは私だけであろうか。また、分子系統から世界には多様な共生藻が居ることが分かってくると、このミドリゾウリムシという生物の細胞内共生関係も、決して地球上全てで均質ではないと思われる。では、ミドリゾウリムシ流の細胞内共生の極意とはなにか？ 沢山の謎を 0.5mm ほどの体の中に詰め込んだミドリゾウリムシだが、宿主と共生藻との関係を覗いてみると、共生藻は光合成活性や光合成生産物の放出を宿主に制御されていると考えられ、すでに宿主のエネルギー獲得器官となりつつあるのではないとも思われる。当初、思い描いていた二者生物が営む平和な細胞内共生関係のイメージは崩れ、むしろ囚われの身となった共生藻が強制労働させられているかのように思えてきた。

今後、宿主抽出液中の炭酸固定を亢進する物質の解明は勿論、共生藻の窒素代謝系の解明とともに宿主との窒素化合物のやり取りも検討して行きたいと考えているが、研究上大きな問題は共生胞膜の存在であろう。最近、宿主-共生藻間相互作用の厳密な検討を可能とする『無菌のミドリゾウリムシ』の研究 (Omura et al., 2004) や、再感染時の共生胞の生成についての新たな検証 (Kodama and Fujishima, 2005) が行われ、この膜の物質透過性や共生胞内の環境を検討できる状況が出来上がりつつあるように思える。我々の興味を中心である宿主と共生藻間の物質のやり取りも、一つの画期的なアイデアが出れば、その化学的な解明に展望が開けるような予感を感じている。

謝辞

研究の発端となったミドリゾウリムシを分与頂いた石巻専修大学の柳 明 先生に深謝いたします。

参考文献

- Albers, D., Reisser, W. and Wiessner, W. (1982) Studies on the nitrogen supply of endosymbiotic chlorellae in green *Paramecium bursaria*. *Plant Sci. Lett.*, 25, 85-90.
- Albers, D. and Wiessner, W. (1985) Nitrogen nutrition of endosymbiotic *Chlorella spec.* *Endocyt. C. Res.*, 55-64.
- Behnke, A., Friedl, T., Chepurinov, V. A. and Mann, D. G. (2004) Reproductive compatibility and rDNA sequences analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). *J. Phycol.*, 40, 193-208.
- Brown, J. A. and Nielsen, P. J. (1974) Transfer of photosynthetically produced carbohydrate from endosymbiotic *Chlorella* to *Paramecium bursaria*. *J. Protozool.*, 21, 569-570.
- Bush, D. R. (1993) Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44, 513-542.
- Cho, B.H. and Komor, E. (1985) The amino acid transport systems of the autotrophically grown green alga *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta*, 821, 384-392.
- Cho, B.H. and Komor, E. (1983) Mechanism of proline uptake by *Chlorella vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta*, 735, 361-366.
- Coleman, A. W. (2000) The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist*, 151, 1-9.
- Coleman, A. W. (2003) ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet.*, 19: 370-375.
- Coleman, A. W. (2005) *Paramecium aurelia* revisited. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 52, 68-77.
- Coleman, A. W. and Vacquie, V. D. (2002) Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: A test case for abalone (*Haliotis*). *J. Mol. Evol.*, 54, 246-257.
- Douglas, A. E. and Huss, V. A. R. (1986) On the characteristics and taxonomic position of symbiotic *Chlorella*. *Arch. Microbiol.*, 145, 80-84.
- Friedl, T. (1997) The evolution of the green algae. *Plant Syst. Evol. Suppl.*, 11, 87-101.
- Grant, A. J., Rémond, M. and Hinde, R. (1998) Low mo-

- lecular-weight factor from *Plesiastrea versipora* (scleractinia) that modifies release and glycerol metabolism of isolated symbiotic algae. *Mar. Biol.*, 130, 553-557.
- Hershkovitz, M. A., Zimmer, E. A. and Hahn, W. J. (1999) Ribosomal DNA and angiosperm systematics. In: *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Hollingsworth, P., Bateman, R. and Gornall, R. (eds.). Taylor & Francis, New York, pp. 268-326.
- Hoshina, R., Kamako, S.-i. and Imamura, N. (2004) Phylogenetic position of endosymbiotic green algae in *Paramecium bursaria* Ehrenberg from Japan. *Plant Biology*, 6, 447-453.
- Hoshina, R., Kato, Y., Kamako, S.-i. and Imamura, N. (2005) Genetic evidence of "American" and "European" type symbiotic algae of *Paramecium bursaria* Ehrenberg. *Plant Biology*, 7, 526-532.
- Hsu, L., Chiou, T., Chen, L. and Bush, D. R. (1993) Cloning a plant amino acid transporter by functional complementation of a yeast amino acid transport mutant. *Proc. Am. Nat. Acad. Sci.*, 90, 7441-7445.
- Huss, V. A. R., Holweg, C., Seidel, B., Reich, V., Rahat, M. and Kessler, E. (1993/94) There is an ecological basis for host/symbiont specificity in *Chlorella/Hydra* symbioses. *Endocyt. Cell Res.*, 10, 35-46.
- Huss, V. A. R., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., Wenzeler, P. and Kessler, E. (1999) Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta) *J. Phycol.*, 35, 587-598.
- 今村信孝 (2005) 水溜まりの化学戦争 アオコを殺すバクテリアの化学兵器, バイオサイエンスとインダストリー, 63, 30-31.
- Ishii, K., Nakagawa, T. and Fukui, M. (2000) Application of the denaturing gradient gel electrophoresis approach to microbial ecology (Japanese). *Microbes Environ.* 15, 59-73.
- Kamako, S.-i., Hoshina, R., Ueno, S. and Imamura, N. (2005) Establishment of axenic endosymbiotic strains of Japanese *Paramecium bursaria* and the utilization of carbohydrate and nitrogen compounds by the isolated algae. *Eur. J. Protistol.*, 41, 193-202.
- Kamako, S.-i. and Imamura, N. (2006) Effect of Japanese *Paramecium bursaria* extract on photosynthetic carbon fixation of symbiotic algae. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 5, 136-141.
- Kato, Y., Ueno S. and Imamura, N. (2006) Studies on the nitrogen utilization of endosymbiotic algae isolated from Japanese *Paramecium bursaria*, *Plant Science*, 170, 481-486.
- Kato, Y. and Imamura, N. (2006) Amino acid transport systems of Japanese *Paramecium* symbiont. submitted.
- Kessler, E. and Huss, V. A. R. (1990) Biochemical taxonomy of symbiotic *Chlorella* strains from *Paramecium* and *Acanthocystis*. *Bot. Acta*, 103, 140-142.
- Kirk, D. L. and Kirk, M. M. (1978) Carrier-mediated Uptake of Arginine and Urea by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 61, 556-560.
- Kodama Y. and Fujishima, M. (2005) Symbiotic *Chlorella* sp. of the ciliate *Paramecium bursaria* do not prevent acidification and lysosomal fusion of host digestive vacuoles during infection. *Protoplasma*, 225, 191-203.
- Krienitz, L., Hegewald, E., Hepperle, D., Huss, V. A. R., Rohr, T. and Wolf, M. (2004) Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia*, 43, 529-542.
- Kroken, S. and Taylor, J. W. (2000) Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *Bryologist*, 103, 645-660.
- Kvitko, K. V., Migunova, A. V., Karellov, D. V. and Prokosheva, M. Ju. (2001) Molecular taxonomy of virus-sensitive *Chlorella* sp. – symbionts of *Paramecium bursaria*. *Protistology*, 2, 96-104.
- Mascatine, L., Karakashian, S. J. and Karakashian, M. W. (1967) Soluble extracellular products of algae symbiotic with a ciliate, a sponge and a mutant hydra. *Comparative Biochem. Physiol.*, 20, 1-12.
- Masuda, K., Miyachi, S., Maruyama, T. (1994) Sensitivity of zooxanthellae and non-symbiotic microalgae to stimulation of photosynthate excretion by giant clam tissue homogenate. *Mar. Biol.*, 118, 687-693.
- McAuley P. J. (1986) Uptake of amino-acids by cultured and freshly isolated symbiotic *Chlorella*. *New Phytologist*, 104, 415-428.
- McAuley P. J. (1989) The effect of arginine on rates of internalization of other amino acids by symbiotic *Chlorella* cells. *New Phytologist*, 112, 553-559.
- Müller, J., Friedl, T., Hepperle, D. and Lorenz, M. (2005) Distinction between multiple isolates of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) and testing for conspecificity using amplified fragment length polymorphism and ITS rDNA sequences. *J. Phycol.*, 41, 1236-1247.
- Nishihara, N., Horiike, S., Takahashi, T., Kosaka, T.,

- Shigenaka, Y. and Hosoya, H. (1998) Cloning and characterization of endosymbiotic algae isolated from *Paramecium bursaria*. *Protoplasma*, 203, 91-99.
- Nakahara, M., Handa, S., Nakano, T. and Deguchi, H. (2003) Culture and pyrenoid structure of a symbiotic *Chlorella* isolated from *Paramecium bursaria*. *Symbiosis*, 34, 203-214.
- Nakahara, M., Handa, S., Watanabe, S. and Deguchi, H. (2004) *Choricystis minor* as a new symbiont of simultaneous two-species association with *Paramecium bursaria* and implications for its phylogeny. *Symbiosis*, 36, 127-151.
- Niess, D., Reisser, W. and Wiessner, W. (1981) The role of endosymbiotic algae in photoaccumulation of green *Paramecium bursaria*. *Planta*, 156, 268-271.
- Ogawa, K., Shiraishi, N., Mii, M., Ida, S., Komamine, A. and Nakagawa, H. (1994) Isolation and characterization of nitrate reductase - deficient mutants of cultured spinach cells: Biochemical, immunological and mRNA analysis. *J. Plant Physiol.* 143, 279-285.
- Omura, G., Ishida, M., Arikawa, M., Mostafa Kamal Khan, S. M., Suetomo, Y., Kakuta, S., Yoshimura, C. and Suzuki, 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.
- Potter, D., Lajeunesse, T. C., Saunders, G. W. and Anderson, R. A. (1997) Convergent evolution masks extensive biodiversity among marine coccoid picoplankton. *Biodivers. Conserv.*, 6, 99 - 107.
- Reisser, W. (1984) The taxonomy of green algae endosymbiotic in ciliates and a sponge. *Br. Phycol. J.*, 19, 309-318.
- Reisser, W. (1988) Signals in the *Paramecium bursaria* - *Chlorella* sp. - association. In: *Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis* (Eds., Scannerini, S., Smith, D., Bonfante-Fasolo, P. and Gianinazzi-Pearson, V.), Springer-Verlag, Berlin, 281-296.
- Reisser, W., Vietze, S. and Widowski, M. (1988) Taxonomic studies on endocytobiotic chlorophycean algae isolated from different American and European strains of *Paramecium bursaria*. *Symbiosis*, 6, 253-270.
- Reisser, W., Burbank, D. E., Meints, R. H., Becker, B. and Van Etten, J. L. (1991) Viruses distinguish symbiotic *Chlorella* spp. of *Paramecium bursaria*. *Endocytobiosis Cell Res.*, 7, 245-251.
- Reisser, W. and Widowski, M. (1992) Taxonomy of eukaryotic algae endosymbiotic in freshwater associations. In: *Algae and symbioses* (Ed., Reisser, W.), Biopress, Bristol, 21-41.
- Romeike, J., Friedl, T., Helms, G. and Ott, S. (2002) Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (Lichenized Ascomycetes) along a transect of the Antarctic peninsula. *Mol. Biol. Evol.*, 19, 1209-1217.
- Sauer, N. (1984) A general amino-acid permease is inducible in *Chlorella vulgaris*. *Planta*, 161, 425-431.
- Schüßler, A. and Schnepf, E. (1992) Photosynthesis-dependent acidification of perialgal vacuoles in the *Paramecium bursaria/Chlorella* symbiosis: visualization by monensin. *Protoplasma*, 166, 218-222.
- Shehawy, R.M. and Kleiner, D. (2001) Nitrogen limitation In: *Algal Adaptation to Environmental Stresses - Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms* (Eds., Rai, L. C. and Gaur, J. P.), Springer-Verlag, Berlin, 45-64.
- Takeda, H. (1995) Cell wall composition and taxonomy of symbiotic *Chlorella* from *Paramecium* and *Acanthocystis*. *Phytochemistry* 40, 457-459.
- Trémouillaux-Guiller, J., Rohr, T., Rohr, R. and Huss, V. A. R. (2002) Discovery of an endophytic alga in *Ginkgo biloba*. *Am. J. Bot.*, 89, 727-733.
- Van Etten, J. L., Meints, R. H., Kuczmarski, D. and Meints, R. H. (1983) Virus infection for culturable *Chlorella*-like algae and development of a plaque assay. *Science*, 219, 994-996.
- Young, I. and Coleman, A. W. (2004) The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 30, 236-242.
- Young, K., Seale, R. B., Olsson, K., Aislabie, J. and Cook, G. M. (2003) Amino acid transport by *Sphingomonas* sp. strain Ant 17 isolated from oil-contaminated Antarctic soil. *Polar Biol.*, 26, 560-566.
- Ziesenisz, E., Reisser, W. and Wiessner, W. (1981) Evidence of de novo synthesis of maltose excreted by the endosymbiotic *Chlorella* from *Paramecium bursaria*. *Planta*, 153, 481-485.