

(山崎賞)

4 ミドリゾウリムシと共生藻の共生関係の解明

静岡県立清水東高等学校自然科学部生物班

1 はじめに

ミドリゾウリムシは、ゾウリムシの一種とクロレラに近い緑藻類(これを共生藻と呼ぶ)が、共生しているものである。共生のきっかけは、ゾウリムシの捕食と考えられている。わたしたちは、ミドリゾウリムシの共生藻の取り出しと再捕食に取り組んできた。これには、想像した以上の困難がつきまとった。その主な理由は、以下の2点である。

① かなり大量の試料を必要とするが、高校の設備では無菌状態での培養が難しい。

② 技術の習熟を必要とする過程が多く、慣れないと1回の実験に相当の時間を要する。

この度、ようやく共生藻の取り出しに成功し、再捕食したと思われる結果が得られたので、とりあえず速報という形で報告する。

2 研究の目的

本研究は、一昨年(2006年度)の本校理数科課題研究を引き継いだものである。2006年の研究では、薬剤により共生藻を減らしたミドリゾウリムシ(これをホワイトと呼ぶ)において、共生藻が宿主の尾部に偏ったまま分裂する様子を観察した。このことから、両者の共生関係はまだ弱いと推測し、その結果を日本進化学会の高校生ポスターセッションに発表した。この発表を見た専門家より、『共生藻は宿主の細胞膜に均等に分配されており、両者の共生関係は強い』との指摘を受けた。そこで、2007年度の課題研究でこの現象を観察しようとした。しかしながら、薬剤処理したホワイトは、残った共生藻もダメージを受けて緑色が退色しており、宿主の細胞膜に張り付いている様子はよくわからなかった。

今年度研究を引き継いだ私たちは、共生藻を宿主から取り出し、取り出した共生藻をホワイトに再捕食させ、両者が共生関係に至る様子を観察することを目的として、本研究に取り組んだ。

3 実験方法

(1) ゾウリムシの培養法

ミドリゾウリムシの培養は、以下のように行っている。

飼育株	静岡大学より分けていただいた、株名無し(以後N株)とSKS4-6株(以後S株)
培養器	100ml、200ml フラスコ、及びコーヒの空き瓶
培養液	MDS (Modified Dryl's solution) + 餌のレタスジュース
培養条件	蛍光灯付き低温恒温器にて25℃に管理

(2) ホワイトの作成法

共生藻を減らしたホワイトの作成は、以下のように行っている。

① パラコートを最終濃度5~10mg/Lとなるように、培養液に加える。

② 2~3日後に観察し、共生藻が残っていたら、1~5mg/Lのパラコートを加える。

③ ②をもう一度くり返す。

通常1週間程度でホワイトが作成できる。この手法は、先輩から受け継がれたものである。今

年度は、最終濃度を計算してパラコートを与えるように改善した。これにより、ほぼ安定してホワイトが作成できるようになった。しかし、ホワイトになってしまうと個体数は増加せず、維持するのがやっとなのである。従って、再捕食させるにはパラ処理の日を計算することが重要である。

*パラコートによる共生藻除去法は広島大学が特許件を有する。

(3) ミドリゾウリムシの共生藻取り出し法

共生藻取り出しは、基本的には以下の手順に従って行った。なお、この方法は、山口大学の藤島先生に教えていただいた方法を、本校でできるように一部変更したものである。

- ① ミドリゾウリムシ培養液を2枚重ねのキムワイプを通してカスを取り除く。
- ② 手動遠心機を10~15回転させ、パスツールピペットを用いて沈殿したミドリゾウリムシを回収し、MDS (0.1mM PMSF*を含む) に懸濁して、同条件の遠心で2回洗浄する。
- ③ 沈殿したミドリゾウリムシを1 mL の MDS に懸濁し、氷上でホモジナイザーによりホモジナイズし、すぐに5 mL の MDS (同) を加える。
- ④ 粉碎液を孔サイズ 15 μ m のナイロンメッシュでろ過する。
- ⑤ ろ液を卓上小型遠心機で (最高回転数 6200rpm : 4,500 \times g) 2分間遠心して共生藻を沈殿させ、マイクロチューブ内の MDS (同) をとりかえて洗浄する。これを2回繰り返す。
- ⑥ 適当な細胞密度になるように MDS で希釈し、血球計算板等で細胞密度を数える。

*PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride ; プロテアーゼインヒビター)

(4) ホワイトの濃縮法

- ① ホワイト培養液を2枚重ねのキムワイプを通してカスを取り除く。
- ② 手動遠心機を25~30回転させ、パスツールピペットを用いて沈殿したホワイトを回収し、冷やした MDS に懸濁して、同条件の遠心で2回洗浄する。

*ホワイトは、共生藻がいなくて沈殿しにくいので、氷で冷やしながら濃縮を行う。

4 これまでの実験結果

(1) 夏休み(8月)

昨年度実験に使用したミドリゾウリムシがフラスコ1本だけ生き残っていた。これを増殖させて、実験に使用した。このときは、生き残った株名がわからないことと(仮に06株とした)、ナイロンメッシュが届いていなかったことから、再捕食は考えず、とりあえず共生藻の取り出しだけをやってみた。従って、上述の取り出し方法のうち、④と⑥は行っていない。

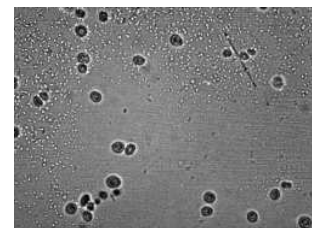


図1 取り出した共生藻

8/14と8/17に、どちらも約50mLの06株を使って実験を行った。

このうち、8/14はごくわずかしき共生藻が確認できなかったが、8/17にはかなりの共生藻が確認され、写真に撮ることができた。また、生きたままのゾウリムシも観察されたほか、バクテリアらしきものも見ることもできた。

なお、このときはまだ恒温器の中に入れていなかったため、猛暑のために、ほとんどのミドリゾウリムシが8月中旬に死んでしまった。

(2) 9月~11月

この間は、なかなかミドリゾウリムシを思うように増殖できず、苦勞した。それでも、10/18、10/27、11/6の3回取り出しに挑戦したが、どれもうまくいかなかった。

なお、この間は、手動遠心機を2分間まわして沈殿を集めていた。また、遠心後は、沈殿物を回収するのではなく、上澄み液を捨てていた。

ア 1回目 (10/18)

取り出し法の⑤まで行った結果、マイクロチューブの先にわずかに緑色の沈殿がみられた。顕微鏡観察でも、共生藻はほとんど見つからず、壊れたカスのようなものが多く見られた。

イ 2回目 (10/27)

前回の反省から、ホモジナイズの時間を短くして、30秒間、1分間、2分間の3種類の時間で実施し、共生藻が取り出されているか観察した。ナイロンメッシュを使わなかったため、どの条件でも生きたミドリゾウリムシが見られたが、共生藻はあまり見つからなかった。

ウ 3回目 (11/6)

前回の結果から、ホモジナイズの時間を長くして、3分間、4分間、5分間の3種類の時間で実施し、共生藻が取り出されているか観察した。ナイロンメッシュでろ過しなかったが、どの条件でも生きたままのミドリゾウリムシは見つからず、共生藻が少数ながら確認された。このため、ホモジナイズの時間は3~4分程度が適当と推測された。

ところが、この実験中に手動遠心機が壊れてしまった。できるだけたくさんミドリゾウリムシを集めようとして頑張るあまり、余分な力を入れすぎてしまったらしい。また、ミドリゾウリムシも減ってしまい、しばらく実験できない状態になってしまった。

(3) 11月

8月の予備実験の段階では、少なくとも共生藻の取り出しはできる見通しであったのに、その後なぜ共生藻が大量に取り出せないのかが、最大の課題であった。

その原因を探るため、培養しているミドリゾウリムシを顕微鏡でよく観察してみた。その結果、肉眼では緑色に見えるフラスコ内の個体でも、全体的に共生藻が少なくなっていることがわかった。ほとんど、ホワイトに近い個体も数多く見られた。

新しい手動遠心機が来てからは、遠心機の回し方を再確認し、遠心機を回した後、緑色の沈殿ができていないかを調べた。その結果、私たちが「個体数が多い」と判断したフラスコであれば、緑色の沈殿がはっきりできることがわかった。ただし、緑色の沈殿がはっきり見える場合も、上述の通り半数近くがホワイトになってしまっていた。

以上のことから、何らかの要因で共生藻が減ってしまい、そのためミドリゾウリムシが、なかなか増殖しないのだと考えられた。共生藻が大量に取り出せないのも同じ原因と考えられた。そこで、静大よりミドリゾウリムシを新たに分けてもらって増殖させ、今まで培養してきたものはホワイトにして、実験に使用することにした。また、共生藻の減少を防ぐため、蛍光灯の数を増やし光量を増やして培養することにした。なお、取り出し実験を、静大で一度やらせていただくことにした。

(4) 12月

ア 静大での共生藻の取り出し

12/18に静大で、道羅先生に指導していただきながら、共生藻の取り出しと再捕食を行った。実験に使ったのは、N株のミドリ 300mL と、ホワイト 250mL、それに静大で培養していただいたS株のミドリ 200mL である。ホワイトは個体密度が低いので、あらかじめナイロンメッシュで5倍に濃縮して持参した。

その結果、S株からは、 9.56×10^7 個/mL の共生藻抽出液 1.2mL、N株からは 3.68×10^7 個/mL の共生藻抽出液 0.4mL を得ることができた。また、ホワイトは 2.4×10^3 匹/mL に濃縮した培

養液約 1mL を得た。ホワイトを 2 つにわけ、S 株と N 株をそれぞれホワイト 1 匹に対して 100 個体の共生藻になるように調節して、S 株を 1.25 μ L, N 株を 3.25 μ L 与えた。

約 30 分後に顕微鏡で観察したが、再捕食している様子は見られなかった。翌日道羅先生に観察して頂いて、再捕食しているようだったら、また静大に観察に行く予定であったが、結局再捕食はしていなかった。

再捕食しなかった原因は、まずホワイトの量が少なかったことが第一だと思われた。そしてホワイトを濃縮していく過程から、氷で冷やしたままであったため、ホワイトの元気がなくなり、捕食できなかったことも考えられた。その他、与えた共生藻の不足も疑われた。

イ 再捕食の実験 1 回目 (12/19 ~ 12/21)

静大での実験で、共生藻は余っていたので、これを使って学校で再捕食の実験をした。このときは、N 株のホワイト約 150mL を使い、与えた共生藻も N 株を食べさせた。

12/19 に、まず、ナイロンメッシュで培養液をろ過し、そのまま MDS をメッシュの上からかけて洗浄し、遠心機による洗浄を 1 回に減らした。最終的には前回と同様約 1 mL の濃縮液ができた。これを 2 つにわけ、1 つにはその日のうちに共生藻を与え、もう一つには翌日の 12/20 に与えた。

12/21 にプレパラートを各試料 4 枚ずつ作成して顕微鏡観察を行ったが、ゾウリムシ自体が見つからなかった。そこで、共生藻をホワイト 1 匹に対して 2,000 個になるように多量の共生藻を与えて 1 時間後に再び観察した。その結果、再捕食したらしい 3 個体のホワイトが見つかった。共生藻の数は、20 ~ 80 個ぐらいであった。しかし、残念ながら、顕微鏡の調子が悪く、写真に残すことができなかった。

ウ 再捕食の実験 2 回目 (12/25 ~ 1/7)

S 株のホワイトがたくさん得られたので、その約 280mL をつかってもう一度再捕食の実験をした。

12/25 に、ホワイトを濃縮した。最初の量が多く、密度も高く見えたので、ナイロンメッシュでの洗浄を 2 回くり返した。遠心機による濃縮によって、約 1.6mL の濃縮液を得た。これに MDS を約 1mL 加え、2.6mL とした。遠心による濃縮が終了した後は、すぐに常温に戻した。この濃縮液を、5 本の遠沈管に約 0.5mL ずつ分配して、No1~No5 とした。個体数密度を調べたところ、約 4.5×10^3 匹/mL であった。そのうち、No1 には 1 匹あたり 100 個、No2 には同じく 1000 個の S 株の共生藻を与え、30 分後に顕微鏡で観察した。その結果、どちらも再捕食しているようであった。

表 1 共生藻の由来株と与えた数

	共生藻の由来株	共生藻数/1 個体	与えた日
No.1	S 株	100	12月25日
No.2	S 株	1000	12月25日
No.3	N 株	100	12月26日
No.4	S 株	20	12月26日
No.5	S 株	100	12月26日



図 2

実験に使用したホワイト (S 株)



図 3

12/25 再捕食 30 分後の No1

12/26 には、No3 の遠沈管に N 株からの共生藻を 1 匹あたり 100 個、No4 には S 株の共生藻を 1 匹あたり 20 個、No5 には S 株の共生藻を 1 匹あたり 100 個、それぞれ与えた。約 30 分後と、約 3 時間後に顕微鏡で観察したところ、いずれも再捕食が確認された。また前の日に再捕食させた、No1 と No2 も共生藻が観察された。

12/27 もう一度顕微鏡で再捕食を確認した。

12/28 残しておいた No5 を肉眼で観察し、写真撮影。

正月休のため、培養温度を 18℃ に設定した。

1/4 同じく No5 を肉眼と顕微鏡で観察した。まだ、600 匹/mL とかなりの個体数が生きていて、そのまま再共生してくれそうだった。

1/7 始業式には、残念ながら全滅していた。

エ 考察

一連の実験では、与える共生藻数、ホワイトを MDS で洗浄してからの時間、共生藻がどちらの株に由来するか、などの条件が、再捕食とどのような関係があるかについては、わからなかった。とにかく、再捕食するときにはどんな条件でもして、しないときは全くしなかった。現段階では、状態の良いホワイトが多数得ることができれば、再捕食は比較的簡単にできるらしいと想像している。

4 まとめ

これまでの実験から、どうやら再捕食に成功したようであるが、再共生にまで至っていない。また、再捕食した個体の蛍光顕微鏡やレーザー共焦点顕微鏡での観察が実現していないので、共生藻が細胞膜に張り付いているのかどうかまだわからない。

今後は、本校で共生藻の取り出しを実現すること、再捕食した個体を静大の顕微鏡で観察させていただくこと、再捕食した個体を長期間培養することを目標として、実験に取り組んでいきたい。

また、ホワイト作成はほぼ安定してできるようになったので、ホワイトとミドリゾウリムシにおける光走性の比較など、高校生でも手軽にできる実験をしてみたいと考えている。

5 謝辞

本研究は山崎研究助成金の助成を受けて行った。

また、本研究に当たって以下の方々のご指導や貴重なご助言を頂いた。ここに深く感謝する。

- ・ 静岡大学遺伝子実験施設 道羅 英夫先生
- ・ 広島大学理学部 細谷 浩史先生
- ・ 山口大学理学部 藤島 政博先生
- ・ 筑波大学生物科学系 井上 勲 先生



図 4

12/26 再捕食30分後のNo3

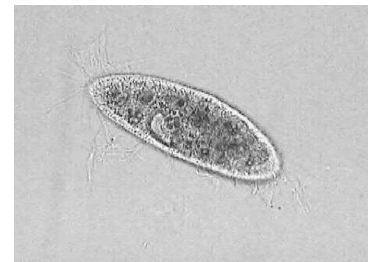


図 5

12/26 同No4

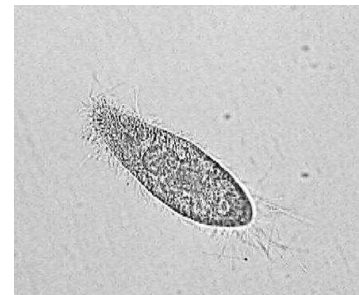


図 6

12/26 再捕食1日後のNo2



図 7

12/26 再捕食4時間後のNo5

