

ミドリゾウリムシの白化と光条件

学校法人静岡理工科大学静岡北高等学校
科学部 2年 望月さくら 小松龍遊雅

1 研究目的

ミドリゾウリムシは体内に共生藻を持ち、共生藻を薬剤等で処理を行うと、共生藻を失い白化することが知られている。しかし、同じように共生藻を持つサンゴは共生藻である褐虫藻を失うと白化した後死亡する。私達はその違いに興味を持ち、多くの論文を調べたが、ミドリゾウリムシが自然状態において白化する条件は明らかになっていないことが分かった。そのためミドリゾウリムシの白化と共生が起こる条件を調べる研究を始めた。

人為的なミドリゾウリムシの白化は、体内のクロレラがパラコートなどの除草剤によって枯死したり、クロレラが光合成阻害剤の影響を受けたり、暗闇でミドリゾウリムシを培養したときなど、クロレラが光合成をすることができない環境にいるときに起こることが知られている。これらのことから、光合成を行わないクロレラの保持はミドリゾウリムシにとって不利益であるために白化が起こることが予想される。私達は、その白化が起こる不利益にミドリゾウリムシの飢餓状態と明暗条件が関係すると考え、給餌量と光条件を変化させることでミドリゾウリムシが持つクロレラにどのような変化が生じるのかを調べた。

2 実験方法

ミドリゾウリムシは実験Ⅰでは HA1g 株と KM2g 株を、実験Ⅱと実験Ⅲでは KM2g 株のみを使用した。両株とも、National Bio-Resource Project (NBRP) に登録されている山口大学から提供を受けた。ミドリゾウリムシは 25 ± 1 °C、約 1,800 lx の環境で培養したものをを用いた。餌はコーンスープ味の液体カロリーメイトを精製水で 1,000 倍に希釈し、約 121 °C で約 20 分間オートクレーブにかけたものを使用した。培養液をミドリゾウリムシに与える時には、2ml ずつ与えた。培養瓶は AS ONE の細胞培養フラスコを用いた。

(1) 実験Ⅰ

HA1g 株、KM2g 株を 2,000 cells/15 ml に細胞密度を調整した。給餌は 2 日に一度、濃度を変えた培養液を 2 ml ずつ与えた。培養液の濃度は何も与えていないもの、1,000 倍、1,500 倍、3,000 倍で希釈した培養液を与えたものの 4 通り作成した。また、明暗条件の 2 通りを作成し、1 株当たり 8 種類の条件で実験を行った。培養温度は全サンプル 25 ± 1 °C で培養し、恒明条件は 2,450 \pm 150 lx 下で、恒暗条件は暗室で 14 日間培養を行った。観察は双眼実体顕微鏡を用いて毎日培養瓶のまま観察した。

(2) 実験Ⅱ

KM2g 株を 5,000 cells/15 ml に細胞密度を調整した。給餌は 3 日に一度、等濃度の培養液を 5 ml 加えた。恒明条件の照度は約 1,800 lx とし、恒暗条件は暗室で培養した。観察は給餌の約 24 時間後に行い、顕微鏡を用いてミドリゾウリムシをカメラで撮影した。ミドリゾウリムシの中にあるクロレラの量の測定には画像解析ソフト “imagej” を使用した。

(3) 実験Ⅲ

KM2g 株を 5,000 cells/15 ml に細胞密度を調整した。給餌は 3 日に一度、等濃度の培養液を 5 ml 加えた。恒明条件の照度は約 1,800 lx とし、光の照射時間を 24 時間と 10 時間に設定した。観察は給餌の約 24 時間後に行い、顕微鏡を用いてミドリゾウリムシをカメラで撮影した。ミドリゾウリムシの中にあるクロレラの量の測定には画像解析ソフト “imagej” を使用した。

3 結果

(1) 実験Ⅰ

ミドリゾウリムシの顕微鏡観察においては、恒暗条件では、白化個体が見られたのは2日目、3日目、9日目、10日目、13日目に通常の濃度の餌を与えられていた KM2g、3日目に通常の濃度の餌を与えられていた HA1g の計6回観察された。また、1日目から餌を与えていない KM2g、4日目に濃度三分の一の餌を与えられていた KM2g、5日目に濃度三分の二の餌を与えられていた KM2g の培養瓶内を観察した時、生存している個体が観察されなかった。恒明条件では、11日目に三分の二の濃度の餌を与えられていた KM2g の白化個体が見られた。また、すべての培養瓶内で実験終了まで生存個体が確認された。

最終日のミドリゾウリムシの個体数測定では、HA1g 株の方が実験終了まで多くの個体が残っていた。また、恒暗条件よりも恒明条件の方が残った個体数が多かった。

(2) 実験Ⅱ

ミドリゾウリムシの顕微鏡観察では、恒暗条件ではミドリゾウリムシの中にあるクロレラの量が減少していた。明条件での培養実験では、クロレラの量が若干減少しているものも見られたが、逆にクロレラの量が若干増加しているものも見られた。また、最終日のミドリゾウリムシの中にいたクロレラの量は暗条件の方が少なかった。顕微鏡観察においては白化個体を確認することはできなかった。クロレラの量の測定では、暗条件での培養実験では日を追ってミドリゾウリムシの中にあるクロレラの量が減少していた。平均のグラフでは、全体的にミドリゾウリムシの細胞内にあるクロレラの量が減っていた。3日目に観察したクロレラの量と14日目に観察したクロレラの量を比べると、どれも3日目よりも14日目の方がクロレラの量が少なくなっていた。明条件での培養実験では、クロレラの量の増減が激しかったが、観察3日目と比べて観察14日目の方が減少していた。

(3) 実験Ⅲ

ミドリゾウリムシの顕微鏡観察では、恒明条件での培養実験においては、ミドリゾウリムシの細胞内のクロレラの量が若干減少していた。明暗条件での培養実験では、あまり変化が見られなかった。また、最終日のミドリゾウリムシの中にいたクロレラの量は恒明条件の方が若干少なかった。顕微鏡観察において白化個体を確認することはできなかった。クロレラの量の測定では、恒明条件での培養実験においては、実験Ⅱに比べて変化が小さかったが、ミドリゾウリムシの細胞内のクロレラの量は日を追って減少した。明暗条件での培養実験では、ミドリゾウリムシの細胞内のクロレラの量は若干減少したが、観察最終日のクロレラの量は恒明条件よりも多かった。また、どちらの培養実験でも観察初日と観察最終日のクロレラ保持量に有意差は見られなかった。

4 考察

(1) 実験Ⅰ

暗条件下で、通常の濃度の餌を与えられていたミドリゾウリムシが白化し、飢餓状態のミドリゾウリムシは白化せずに死んでしまったため、飢餓状態で白化が起こるということに疑問が出てきた。また、暗条件下で多くの白化が観察され、明条件下ではほとんど白化が観察できなかったことから光の量が白化条件に関わっているのではないかと考えた。

(2) 実験Ⅱ

刺胞動物のサンゴも褐虫藻と共生関係を持つが、褐虫藻が何らかの原因で弱った際はその褐虫藻を消化する機構を持っている。本実験では、約 1,800 lx の恒明条件においてミドリゾウリムシ細胞の中からクロレラが減少したという結果が得られた。サンゴと同様の機構をミドリゾウリムシも持ってい

るとすると、照明を24時間当て続けたことによりミドリゾウリムシの許容範囲を超えた光合成による活性酸素種など有害物質の生成によって弱ったクロレラを、宿主細胞であるミドリゾウリムシ自身が、障害を受けることを避けるために排除したことが原因である可能性があると考えた。

恒暗条件におけるクロレラ保持量減少の理由としては、ミドリゾウリムシは餌を与える事によって定期的に栄養分を補給できるのに対し、クロレラは光合成を行えず飢餓状態になったと考えられる。そのため、ミドリゾウリムシの分裂する速度に対し、クロレラの分裂する速度が遅くなるため、一細胞当たりのクロレラ保持量が減少したと考えられる。また、ミドリゾウリムシ細胞内の共生藻はPV膜に包まれており、このPV膜に包まれている共生藻は消化されず、ミドリゾウリムシの体内に留まっている。しかし、共生藻のタンパク質合成を阻害すると共生クロレラが消化されることが知られている。これらのことから、PV膜の維持にはミドリゾウリムシとクロレラ両方の働きかけが重要であり、クロレラ側からの維持には何らかの光合成産物等が必要であるため、ミドリゾウリムシの栄養状態が良好であってもクロレラが消化されたのではないかと考えた。

(3) 実験Ⅲ

恒明条件では、ミドリゾウリムシの細胞内のクロレラの量は減少した。観察初日と観察最終日のクロレラ保持量に有意差は見られなかったが、実験Ⅱでも観察3日目と観察14日目を比較するとミドリゾウリムシの細胞内のクロレラの量が減少していることから、恒明条件でクロレラの量は減少する傾向があると考えられる。暗条件より恒明条件での培養の方がミドリゾウリムシの細胞内のクロレラの減少量が少ないことから、恒明条件での培養を長期間行うことで白化したミドリゾウリムシを作ることができる可能性がある。

明暗条件では、ミドリゾウリムシの細胞内のクロレラの量は減少した。しかし、恒暗条件と恒明条件のクロレラの減少量と比べると、明暗条件の減少量は少ないと言える。また、観察初日と観察最終日のクロレラ保持量に有意差は無かった。これらのことから、明暗条件での培養においては、クロレラを消化する理由がないため、ミドリゾウリムシの細胞内のクロレラの量があまり減少しなかったと考えられる。

5 今後の展望

実験Ⅲでは、恒暗条件だけでなく、恒明条件での白化の可能性が示唆された。恒明条件と明暗条件の比較実験ではどちらも有意差が見られなかったが、恒明条件にクロレラ保持量の減少傾向が見られる可能性があるため、今後別の実験を行い、明らかにしたい。また、実験Ⅱと実験Ⅲにおいては、餌を与えてから約24時間後の観察が徹底できていかなかった。正確な計測が行えていなかった可能性があるため、改善する必要がある。このような課題点の解決と共に、さらに詳しい白化条件の解明に向けてこれからも研究を続けていきたい。

6 参考文献

- 1) 細川浩史 原生生物ミドリゾウリムシの謎にせまる (2013)
- 2) 児玉有紀、藤島政博 単細胞生物ミドリゾウリムシと緑藻クロレラとの細胞内共生成立機構 (2008)
- 3) 早川昌志、洲崎敏伸 ミドリゾウリムシにおける細胞内共生研究の現状と課題 (2016)
- 4) 静岡県立清水東高等学校自然科学部生物班 ミドリゾウリムシと共生藻の共生関係の解明 (2007)
- 5) 水産庁ホームページ サンゴ礁の働きと現状 (2019/4/29)
- 6) Lisa Fujise 他 サンゴの白化につながる共生藻の排出メカニズムを解明 (2019/10/5)

7 図表

Figure 1 : 実験Ⅰ 暗条件下でのミドリゾウリムシの生存の有無

光無し	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	最終日の個体数
HA1g 餌無し	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	0
HA1g 餌普通	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○		○	○	191
HA1g 餌2/3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	245
HA1g 餌1/3	○	○	○	○	—	○	○	○	○	○		○	○	272
KM2g 餌無し	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	0
KM2g 餌普通	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○		○	○	28
KM2g 餌2/3	○	○	—	○	—	—	—	—	—	—		—	—	0
KM2g 餌1/3	○	—	○	—	—	—	—	—	—	—		—	—	0

○クロレラを持つ個体 ● 白化個体 — 生存個体なし

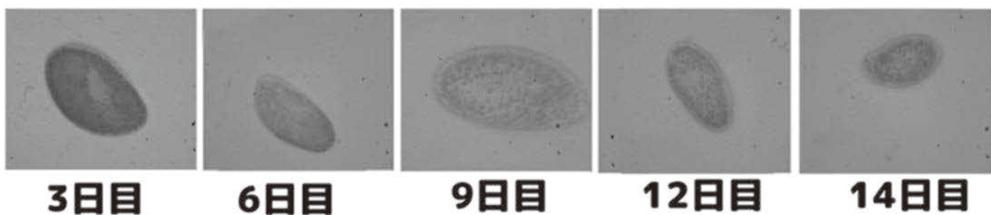
Figure 2 : 実験 I 明条件下でのミドリゾウリムシの生存の有無

光有り	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	最終日の個体数
HA1g 餌無し	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	41
HA1g 餌普通	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	267
HA1g 餌2/3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	144
HA1g 餌1/3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	153
KM2g 餌無し	—	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	○	○	3
KM2g 餌普通	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	97
KM2g 餌2/3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	128
KM2g 餌1/3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	68

○クロレラを持つ個体 ● 白化個体 — 生存個体なし

Figure 3 : 実験 II 恒暗、恒明条件下でのミドリゾウリムシ

暗期



明期

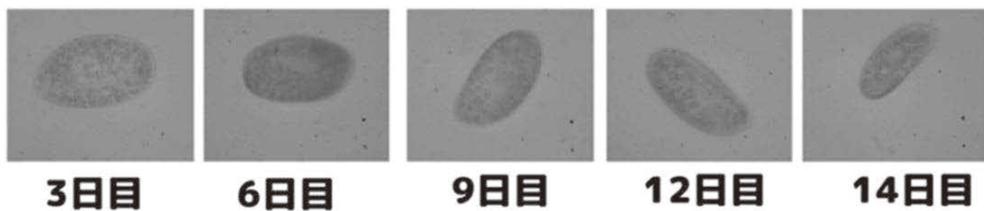


Figure 4 : 実験 II ミドリゾウリムシ内のクロレラ量の変化の平均 (縦軸の単位はピクセル)

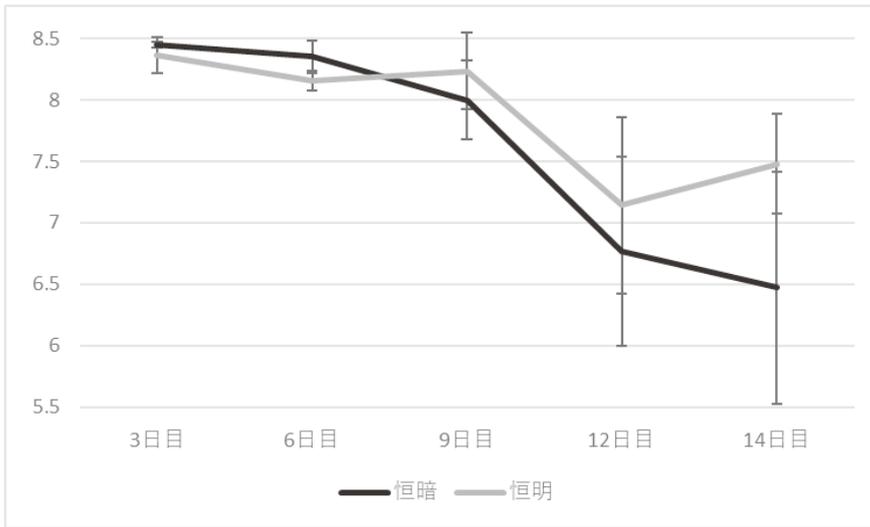


Figure 5: 実験Ⅲ ミドリゾウリムシ内のクロレラ量の変化の平均 (縦軸の単位はピクセル)

