

光波長によって変化するミドリゾウリムシの増殖速度

学校法人静岡理工科大学静岡北高等学校
科学部 3 年 千野 可菜美 他 3 名

1 動機

ミドリゾウリムシは、細胞内に共生藻を持つ単細胞の原生動物である。藻類と共生するサンゴは、共生藻を失うと白化し、その後死んでしまう。ミドリゾウリムシは、サンゴと同様に白化するが、白化後も生存し、また、再共生する場合もあることが知られている。静岡北高等学校科学部では、ミドリゾウリムシの白化を明らかにしようと 2018 年度より研究を始めた。2018 年度では、光の強さによって行動に変化が見られるかを調べ、3,500 lx 付近では正の光走性が、8,600 lx 以上では負の光走性がみられ光の強さによって正の光走性から負の光走性へ行動が変化することが確認できた。昨年度の研究では、白色光をあてた時の明暗条件、恒明条件、恒暗条件におけるミドリゾウリムシの白化の状態を調べ、恒暗条件で白化が起こるといわれていたが、恒明条件においてもクロレラ量の減少がみられることがわかった。今年度は光の波長が、ミドリゾウリムシの持つクロレラ量にどのような影響を与えるかを知りたいと考え、この研究を始めた。葉緑体内の色素は、波長 400～500nm の紫、青色光、650～670nm の赤色光付近の光を吸収することが分かっている。そのため、私たちは紫、青、黄、赤の波長の光と白色光をミドリゾウリムシにあてて培養し、ミドリゾウリムシ内のクロレラ量を計測、波長により保持するクロレラ量に変化するか比較を行った。

2 方法

(1) ミドリゾウリムシの株と培養方法

使用した株は、HA 1 g と KM 2 g の 2 株とした。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、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、約 1,800 lx の環境で培養したものを用いた。餌はコーンスープ味の液体カロリーメイト（大塚製薬株式会社）を精製水で 1000 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。

(2) 培養箱の作成

白色光は、段ボールで箱を作成しその中で培養した。ワイヤーシェルフで棚を作成し、黄、紫は遮光シート、赤、青は黒いビニールシートを外からの光を遮断した。LED 電球を各培養箱に一つ設置した。照度、Ft-cd(カンデラ)と光量子の数値を高くするため、培養箱の裏にはアルミホイルを貼った。また、青色光の数値が低かったため、14cm の台を設置した。

(3) 光の照射設定

LED ライトを一個使用し、白(380～780nm)、紫(380～430nm)、青(460～500nm)、黄(570～590nm)、赤(610～780nm) の 5 通りを作成した。

LED ライトを用い実験を行うときと同じ条件（実験を行った培養箱内で測定。光源からの距離約 30 cm、青色光のみ 15 cm）で各光の測定を行った。それぞれの光を照度計で測定した。照度と Ft-cd(カンデラ)、光量子計で測定した光量子量は以下の通りであった。

照度；白(951lux)、紫(135lux)、青(30.4lux)、赤(89.4lux)、黄(333lux)

Ft-cd(カンデラ)；白(150.0cd)、紫(23.01cd)、青(12.0cd)、黄(62.8cd)、赤(24.32cd)。

光量子量；白($6 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)、紫($8 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)、青($4 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)

黄($5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)、赤($3 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)。

光の照射時間の設定；明暗条件で行い、光の照射時間を 12 時間に設定した。

(4) 培養

培養瓶に培養液 20m l、ミドリゾウリムシ 500cell (細胞) 入れた、培養瓶を 20 本用意し、一つの波長について株 (HA 1 g と KM 2 g) ごとに 5 色の光の下で (Fig 1) 一つの光に対して培養瓶 2 本ずつ使用し培養した (Fig 2)。培養は、箱内の温度約 25℃で行った。



Fig 1. 実験に使用した培養箱



Fig 2. 培養箱内の培養瓶

(5) 実験 1 光波長によるクロレラに色素量の割合

ア 方法

培養期間を 1 週間とし、培養液は 3 日に一度 5 m l ずつ与えた。1 サンプルにつき 10 μ l を 3 回取りプレパラートを作成した。最終日にミドリゾウリムシの細胞に対するクロレラの割合を調べた。クロレラの色素量の割合は、顕微鏡で写真を取り、その後画像解析ソフト “imagej” でクロレラの量を測定した。

(6) 実験 2・3 光波長による増殖とクロレラの色素量の割合

ア 方法

培養期間を 4 週間とし、培養液は培養瓶中の液体が透明になってきたら与えた。1 サンプルにつき 50 μ l を 3 回取りプレパラートを作成した。最終日にミドリゾウリムシの細胞数と、細胞に対するクロレラの割合を調べた。1 週間ごとに、ミドリゾウリムシの細胞数と細胞に対するクロレラの色素量の割合を調べた。クロレラの割合は、顕微鏡で写真を取り、その後画像解析ソフト “imagej” でクロレラの量を測定した。

(7) 実験 4 光波長による光走性

ア 方法

シャーレの半分に線を引き、ミドリゾウリムシ 80cell、培養液 900 μ l 入れた。LED 電球一つを 9.2cm の台に固定させ、双眼実体顕微鏡の右側に設置した。シャーレから LED 電球の距離 5 cm とした (Fig 3)。他の光を遮断するために実験室に暗幕をかけた。実験 1、2、3 と同様の白、紫、青、黄、赤の光をそれぞれ照度計で測定した照度と、光量子計で測定した光量子数は以下の通りであった。

Fig 3. 実験 4 顕微鏡下のシャーレと電球

照度 ; 白 (5201lux)、紫 (751lux)、青 (23.401lux)、赤 (2271lux)、黄 (5461lux)

光量子量 ; 白 (220 μ mol/m²/s)、紫 (64 μ mol/m²/s)

青 (34 μ mol/m²/s)、黄 (29 μ mol/m²/s)、赤 (20 μ mol/m²/s)。

シャーレの右方向から一定の強さで 20 分間光を当て続け 5 分おきに左右それぞれの個体数を数えた。



Fig 3. 実験 4 顕微鏡下のシャーレと電球

3 結果

(1) 実験1

5色の光下での培養では、どちらの株においても色素の変化は見られなかった。すべての細胞で色素の細胞に対する割合が50%から80%の間であった(Fig4)。

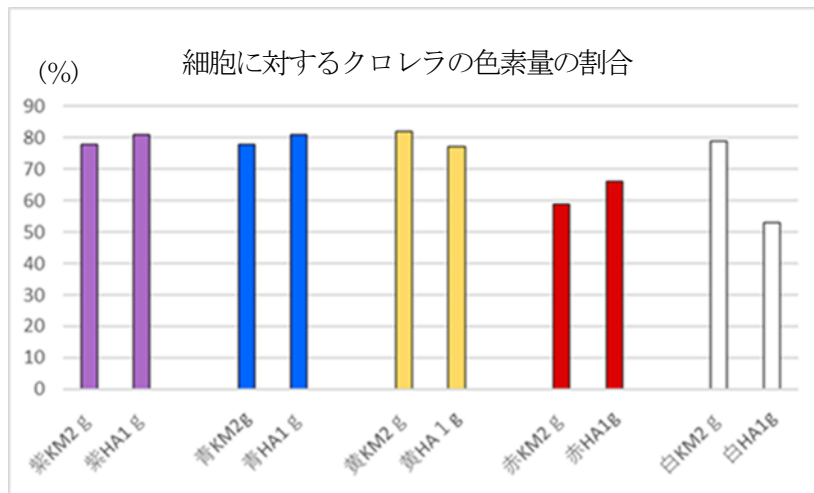


Fig4. 実験1 ミドリゾウリムシ内のクロレラの持つ色素の割合

(2) 実験2・3

ア 細胞数

細胞数では、HA1g株では青色光において最も細胞数が多くなり、白色光と紫色光が次に多く、黄色光と赤色光ではあまり増加していなかった (Fig5, 6, 7, 8)。KM2g株でも最も細胞数が増加したのは白色光下で培養したものであったが、白色光、紫色光と青色光において細胞数が増加し、黄色光と赤色光では細胞数はあまり増加しないという傾向はおなじであった。実験2のKM2gの青色光下で行った実験は、コンタミネーションがおこり、死亡数が非常に多かった。このため、3週間目から4週間目にかけて細胞数が減少している (Fig5)。

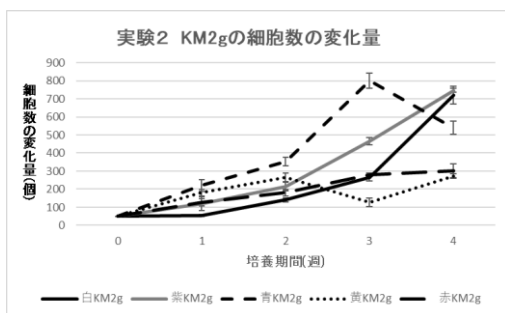


Fig5. 実験2 KM2gの細胞数の変化量

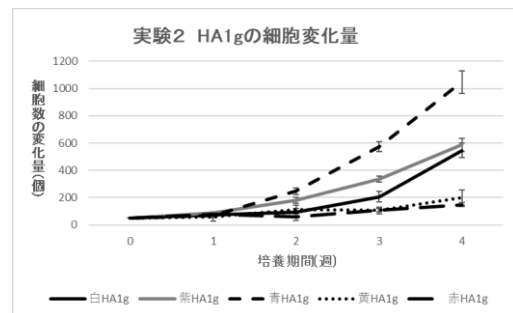


Fig6. 実験2 HA1gの細胞数の変化量

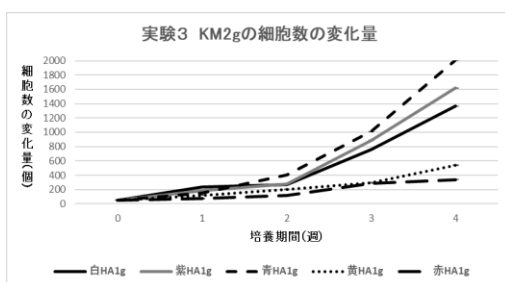


Fig7. 実験3 KM2gの細胞数の変化量

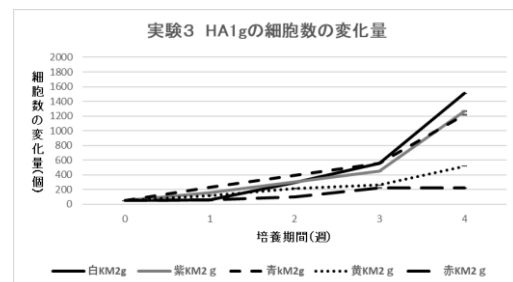


Fig8. 実験3 HA1gの細胞数の変化量

イ クロレラの色素量の割合

細胞内のクロレラの持つ色素の割合は、HA 1g と KM 2g のどちらの株でも週ごとの増減はあるが、どの波長の光でも大きな変化が見られなかった (Fig 9, 10, 11, 12)。細かく週ごとの変化を見ていくとどちらの株でも赤色光でクロレラの持つ色素の割合が大きい傾向が見られた。しかし、グラフを全体的にみると、紫色光、青色光、白色光は赤色光と黄色光に比べやや細胞内の色素量が少なくなっているものがあつた。

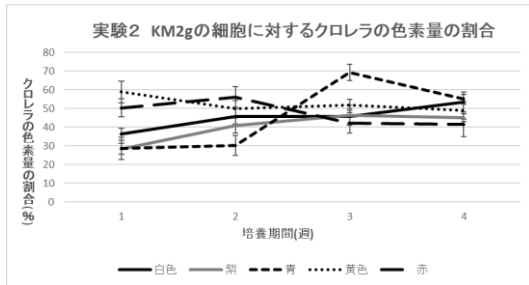


Fig 9. 実験 2 KM 2 g の持つ色素の割合

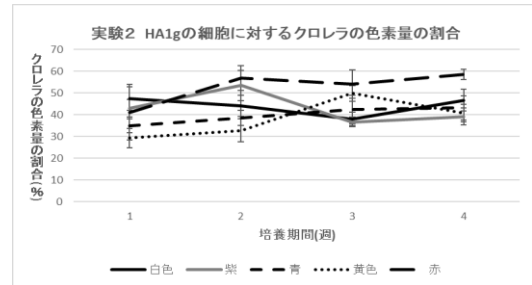


Fig10. 実験 2 HA 1 g の持つ色素の割合

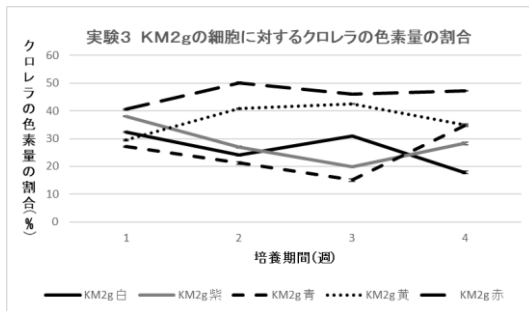


Fig11. 実験 3 KM 2 g の持つ色素の割合

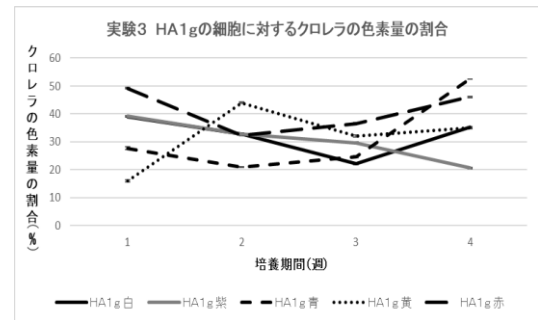


Fig12. 実験 3 HA 1 g の持つ色素の割合

ウ 実験 4

光走性の実験では、白色光と紫色光、青色光において光に向かっていく個体が多く見られた。黄色光に対しては正の方向と負の方向に向かう細胞数の割合に変化がみられなかった。赤色光では、光から逃げる個体が多くみられた。

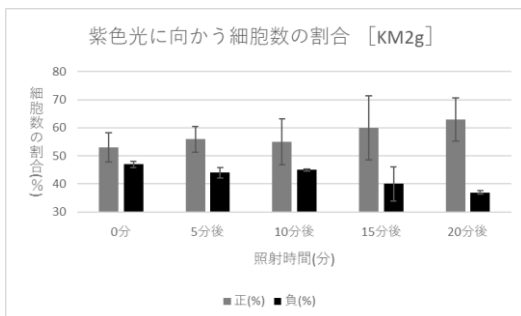


Fig13. 実験 4 KM 2 g 紫色光に向かう細胞数の割合

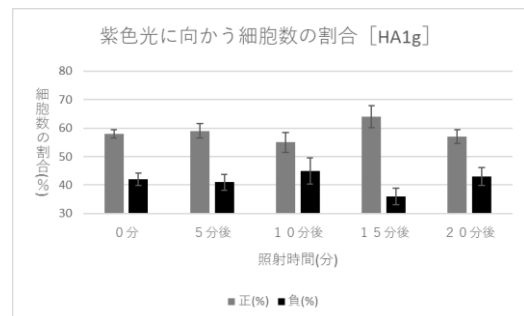


Fig14. 実験 4 HA 1 g 紫色光に向かう細胞数の割合

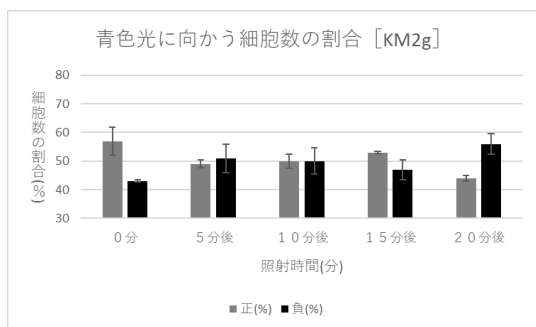


Fig15. 実験4 KM2g 青色光に向かう細胞数の割合

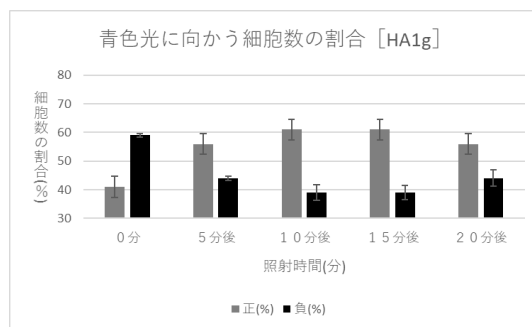


Fig16. 実験4 HA1g 青色光に向かう細胞数の割合

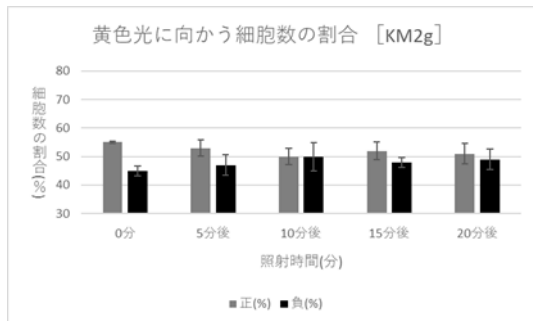


Fig17. 実験4 KM2g 黄色光に向かう細胞数の割合

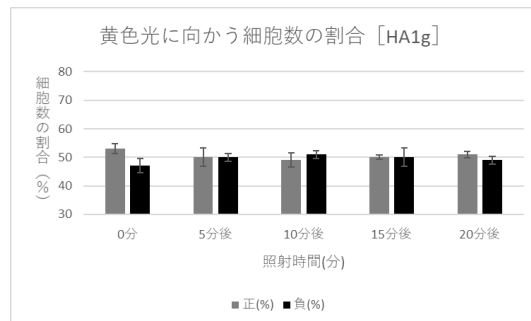


Fig18. 実験4 HA1g 黄色光に向かう細胞数の割合

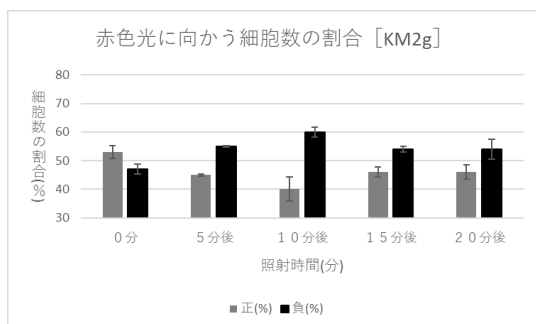


Fig19. 実験4 KM2g 赤色光に向かう細胞数の割合

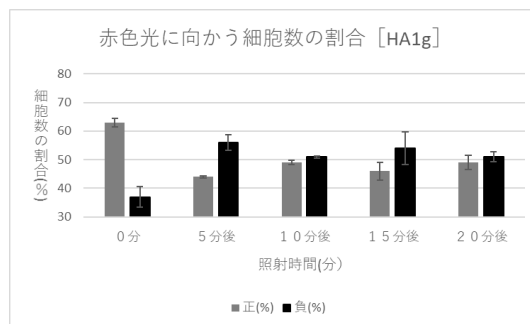


Fig20. 実験4 HA1g 赤色光に向かう細胞数の割合

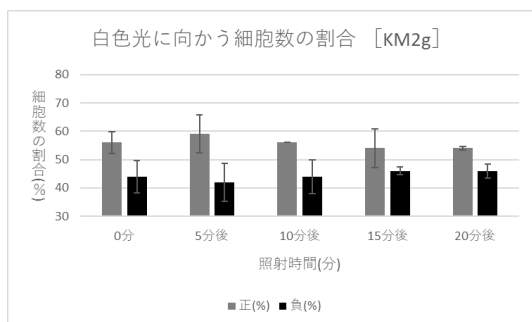


Fig21. 実験4 KM2g 白色光に向かう細胞数の割合

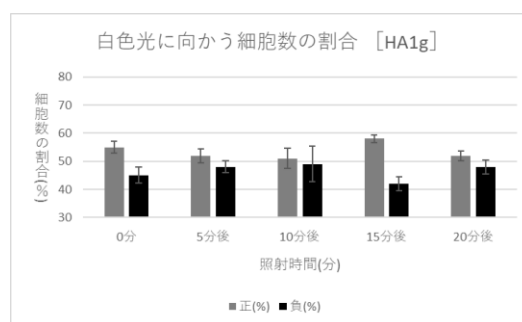


Fig22. 実験4 HA1g 白色光に向かう細胞数の割合

4 考察

今回の研究では、細胞内のクロレラの量は光の色(波長)によってほとんど変化がないことが分かった。また、細胞数は全ての実験で白色光、紫色光、青色光において黄色光、赤色光よりも増加していた。このことから培養瓶内全体での「ミドリゾウリムシの持つクロレラの色素量」が白色光、紫色光、青色光下で培養した場合に増加量が多いことが考えられた。このことから、クロレラは、白色光、紫色光、青色光下において十分に増殖を行うだけの有機物を光合成によって得られていたと考えられる。また、KM2g株とHA1g株の細胞数の変化は波長によりクロレラの色素量の増加する割合が異なる可能性もあると考えられる。そして、赤色光は黄色光と同様にKM2g株とHA1g株どちらの細胞数も増加していなかったため、培養瓶内全体でのクロレラの色素量は青色光などと比較して少なく、増殖するために必要な有機物が青色光等よりも少なかった可能性が考えられる。

葉緑体内の光合成色素の吸収量は、青色光と赤色光付近では吸収量が高く、黄色光付近では吸収量が低いことがわかっている。本研究ではKM2g株とHA1g株どちらの場合も、赤色光は黄色光と同様に細胞数が増加していなかったため、培養瓶内全体でのクロレラの色素量は青色光などと比較して少なく、光合成にあまり利用されていない可能性が出てきた。走光性の実験では、白色光と紫色光、青色光に対しては、正の光走性があると考えられる。黄色光や赤色光に対しては光走性があるとは言えなかった。このことから、赤色光に対しては光走性がない可能性がある。このことから、ミドリゾウリムシの細胞内にあるクロレラの持つ色素は、植物内の葉緑体の持つ色素の利用する波長の光と異なる可能性が出てきた。

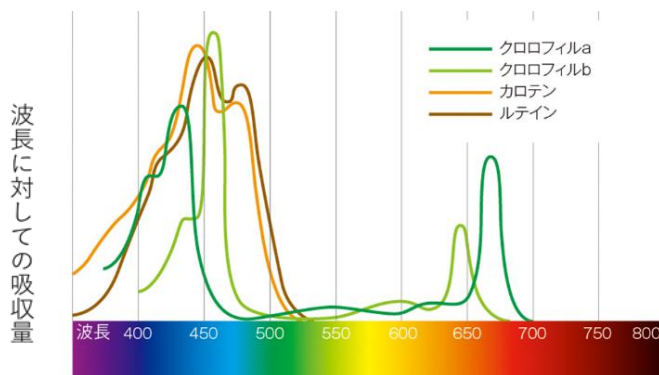


Fig23. 葉緑体内の色素の吸収スペクトル
(GRSSY AQUA 光「波長」のことを考えてみる)

5 結論

本研究より、赤色光は黄色光と同様に青色光、紫色光に比べ光合成にあまり利用されていない可能性があることがわかった。また、ミドリゾウリムシにいろいろな波長の光刺激を与え、応答を調べると、膜電位に変化を示している光波長は、青色光と赤色光付近にあることが分かっている(中岡 1991)。赤色光に対し何らかの応答があると考えられるが、今後の研究で、ミドリゾウリムシの白化現象に視点を置くだけでなく、ミドリゾウリムシの細胞内で光合成色素に変化が起こっているのか等、クロレラにも視点を置いて研究をしていきたい。

6 謝辞

ゾウリムシ株 HA1g、KM2g は、国立研究開発法人医療研究開発機構(AMED)のNBRPの支援によって、山口大学の共生生物学研究室から提供されました。深く感謝申し上げます。また、研究にお力添えしていただいた塚越亮允さん、科学部生物班の塚越汐里先生に深く感謝申し上げます。

7 参考文献

- 中岡保夫（1991年）「原生動物の光受容と応答」
植物・微生物の光反応 ―変異種などを用いた新しい解析法の開発―
<http://hdl.handle.net/10097/49096> (2020. 12)
- GRSSY AQUA 光「波長」のことを考えてみる <https://grassyaqua.com> (2002. 12)
- 児玉有紀（2017）細胞内共生成立の分子機構と細胞内共生の進化的意義の解明
26840119 研究成果報告書 (nii.ac.jp)
- 児玉有紀（2008）ミドリゾウリムシと共生クロレラの細胞内共生成立機構
Jpn. J. Protozool. 41(1) 15-19 (2008) (jst.go.jp)
- 児玉有紀（2016）「細胞内共生説」のモデル材料ミドリゾウリムシ 33-3 総説_2.indd (jst.go.jp)
- 児玉有紀 藤島政博（2014）繊毛虫ミドリゾウリムシと緑藻クロレラの細胞内共生
(<https://www.esj.ne.jp/meeting/abst/61/E2-12.html>) (2020. 12)
- 早川昌志 洲崎敏伸（2016）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
33-3 総説_2.indd (jst.go.jp)