

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 2年 川嶋ひかる 他3名

1 動機

ミドリゾウリムシは白化した後も生存し、再共生する場合が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光走性と白化現象に興味を持ち 2018 年度より研究を始めた。

2018 年度では、光走性に焦点を当て、光の強さによって行動に変化が見られるかを調べ、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。2019 年度では、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た。その結果、恒明条件においてもクロレラの減少がみられることがわかった。2020 年度から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、研究を行ってきた。葉緑体内の色素は、紫色光(400~500nm)、青色光、赤色光付近(650~670nm)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。そして、ミドリゾウリムシとクロレラが行っている光合成に注目し、クロレラのみで生息する単体クロレラとミドリゾウリムシ内にいたクロレラの光合成色素の吸収スペクトルの違いを明らかにすることを目的として研究を始めた。

2 方法

＜紫色光、青色光、黄色光、赤色光、白色光下でのミドリゾウリムシの培養実験＞

(1)実験1 異なる光波長下での培養による共生クロレラの色素量の変化を調べる方法

培養期間を1週間とし、培養液を3日に一度5mlずつ与えた。1サンプルにつき10μlを3回取りプレパラートを作成した。最終日に画像解析ソフト“imagej”を用いて、ミドリゾウリムシの細胞に対するクロレラの割合をクロレラの量を測定した。

(2)実験2・3 異なる光波長下での培養によるミドリゾウリムシの増殖と共生クロレラの色素量の割合を調べる方法

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50μlを3回取りプレパラートを作成し、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色素量の割合を調べた。クロレラの割合は、顕微鏡写真を画像解析ソフト“imagej”でクロレラの量を測定した。

＜5色の光照射下での走性について＞

(3)実験4 異なる光波長下での光走性を調べる方法

シャーレの半分に線を引き、ミドリゾウリムシ80cellと培養液900μl入れ、シャーレの右方向から一定の強さで20分間5つの光を当て続け、5分おきに正の方向に向かうミドリゾウリムシの細胞数と負の方向に向かうミドリゾウリムシの個体数を測定した。

＜クロレラの吸収スペクトルについて＞

(4)実験5 単体クロレラの光合成色素の吸収スペクトルを調べる実験

錠剤状のクロレラをすり潰し、抽出溶媒のエタノールと混ぜ合わせて溶かし、揮発させた。そして脱脂綿をカラムクロマトグラフ管の先端に詰め、その上から海砂、展開溶媒(ヘキサン：酢酸エチル＝

1 : 3)とシリカゲルを混ぜたものの順で入れた。色素サンプルと展開溶媒を加え、溶かしたものを上から流し込み、色素を分離させ、分光光度計にかけて吸収スペクトルを測定した。

(5)実験6 共生クロレラの光合成色素の吸収スペクトルを調べる実験

ミドリゾウリムシが死ぬと細胞膜が破れ、共生クロレラが細胞外へとでてきて、培養瓶の底にたまる。そのため、培養瓶の底に落ちたクロレラを使い、実験を行った。パスツールピペットに脱脂綿を詰め、その上から海砂、シリカゲル、海砂の順に加えた。HA1 g 株の培養瓶の底部から共生していたクロレラを含む培養液をとり、上から流し込んだ後、エタノールを流し込み、抽出した色素の吸収スペクトルを分光光度計で測定した。

<ミドリゾウリムシの吸収スペクトルを調べる実験>

(6)実験7 ミドリゾウリムシ (生体) の吸収スペクトルを測定する方法

HA1 g 株、KM2 g 株のミドリゾウリムシを集め、分光光度計にかけて吸収スペクトルを測定した。

(7)実験8 白化したミドリゾウリムシ (生体) の光合成色素の吸収スペクトルを測定する方法

HA1 w 株 (HA1 g 株の白化株) のミドリゾウリムシを集め、分光光度計にかけて吸収スペクトルを測定した。

<白化したミドリゾウリムシにおける5色の光照射下での走性について>

(8)実験9 白化したミドリゾウリムシの走光性を調べる方法

シャーレに100細胞のミドリゾウリムシを入れ、5つの波長(白、赤、青、黄、紫)を10分間当てた後、15分間5分ごとに光と反対方向に向かうミドリゾウリムシの個体数を数えた。

3 結果

<5色の光照射下での培養について>

(1)実験1 異なる光波長下での培養による共生クロレラの色素量に変化を調べる実験

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(Fig. 1)。

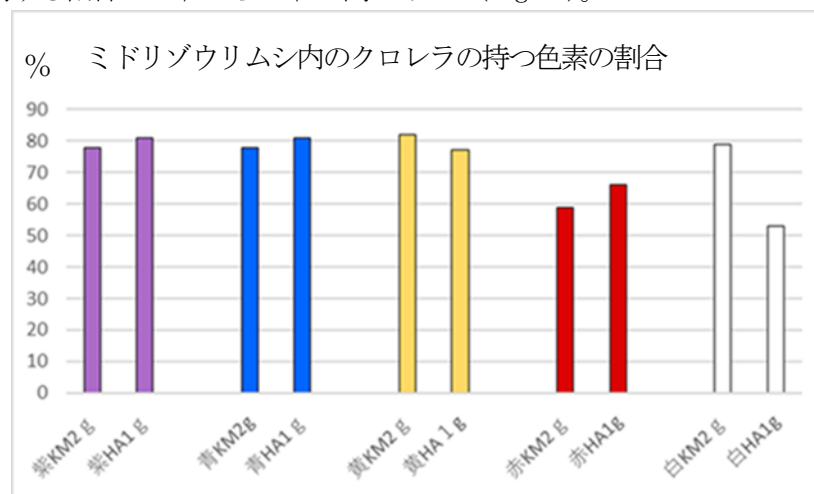


Fig. 1 実験1 ミドリゾウリムシ内のクロレラの持つ色素の割合

(2)実験2・3 異なる光波長下での培養によるミドリゾウリムシの増殖と共生クロレラの色素量の割合を調べる実験

ア 細胞数

細胞数では、HA1 g 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 (Fig 1, 2, 3)。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 (Fig. 1)。

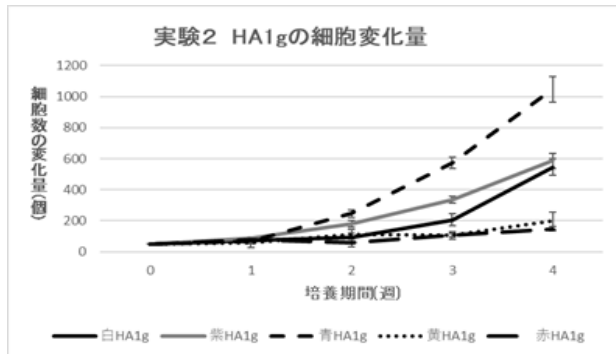


Fig. 2 実験2 HA1gの細胞数の変化量

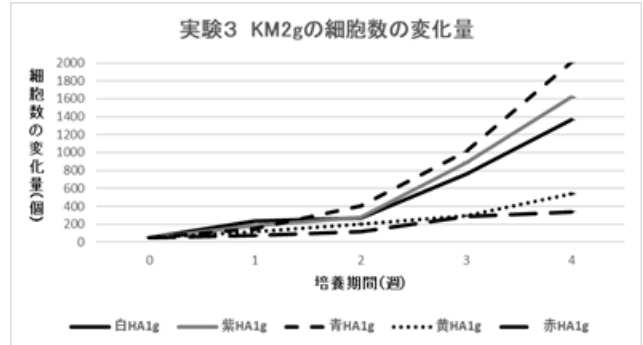


Fig. 3 実験2 KM2gの細胞数の変化量

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、HA1gとKM2g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 4, 5)。細かく週ごとの変化を見ていくと、どちらの株にと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。

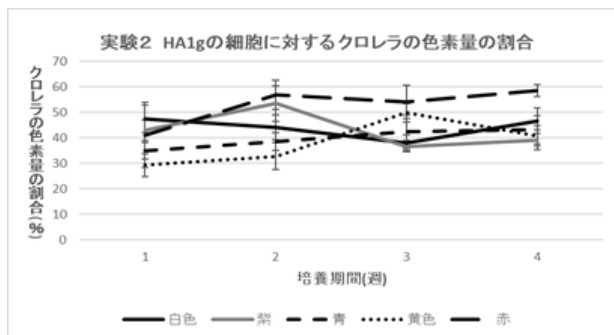


Fig. 4 実験3 HA1gの持つ色素の割合

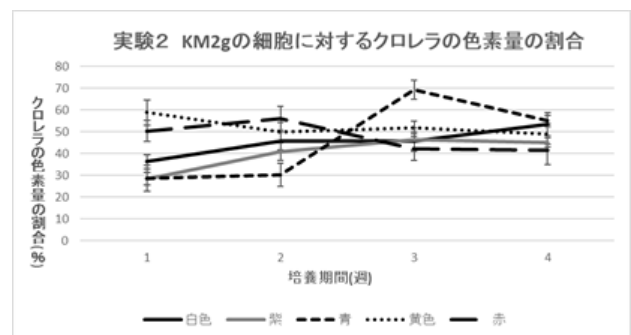


Fig. 5 実験3 KM2gの持つ色素の割合

(3) 実験4

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。また、黄色光に対して、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。

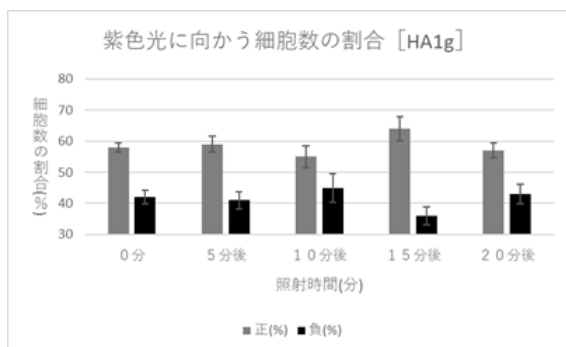


Fig. 6 実験4 HA1g 紫色光に向かう細胞数の割合

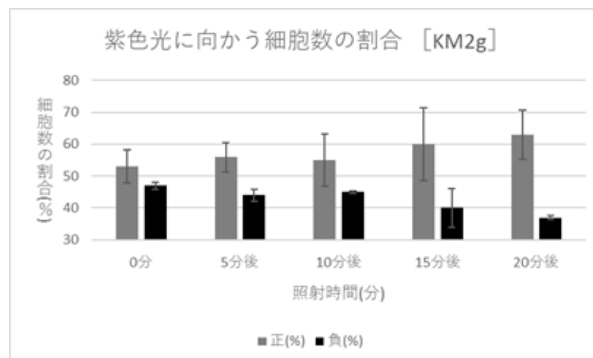


Fig. 7 実験4 KM2g 紫色光に向かう細胞数の割合

(4)実験5

単体クロレラの光合成色素は、青色光、紫色光と同様に赤色光も吸収していた。

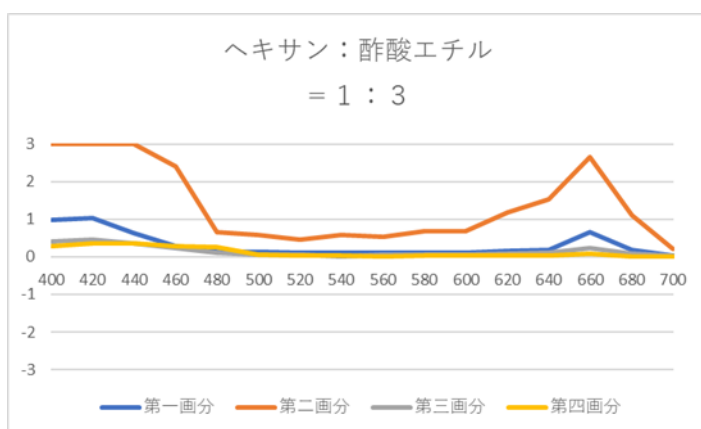


Fig. 8 実験5 単体クロレラの光合成色素の吸収スペクトル

(5)実験6

ミドリゾウリムシ内にいたクロレラの光合成色素は、青色光、紫色光と同様に赤色光も吸収していた。

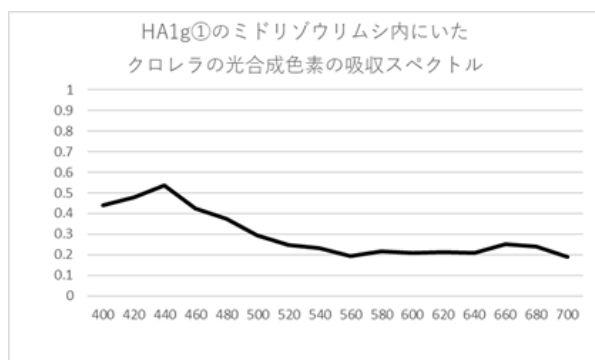


Fig. 9 実験6 HA1g株①のミドリゾウリムシ内にいたクロレラの光合成色素の吸収スペクトル

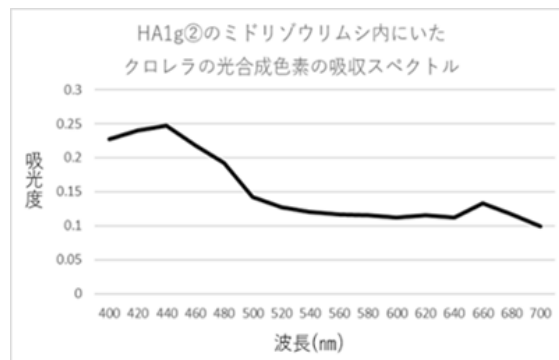


Fig. 10 実験6 HA1g株②のミドリゾウリムシ内にいたクロレラの光合成色素の吸収スペクトル

(6)実験7

ミドリゾウリムシ自体は紫色光、青色光を吸収していたが、赤色光においてはほとんど吸収して

いなかった。

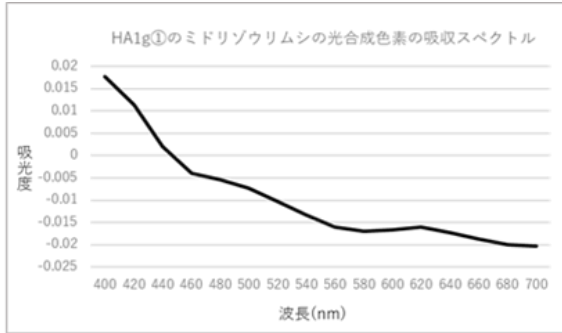


Fig. 11 実験7 HA1 g株①のミドリゾウリムシの
光合成色素の吸収スペクトル

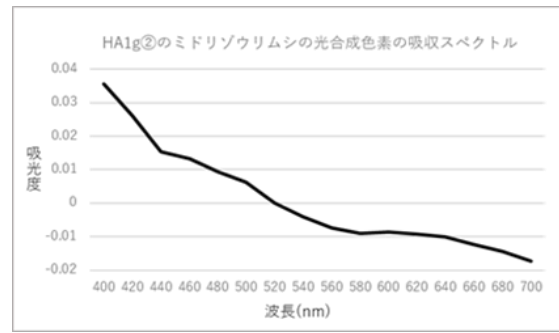


Fig. 12 実験7 HA1 g株②のミドリゾウリムシの
光合成色素の吸収スペクトル

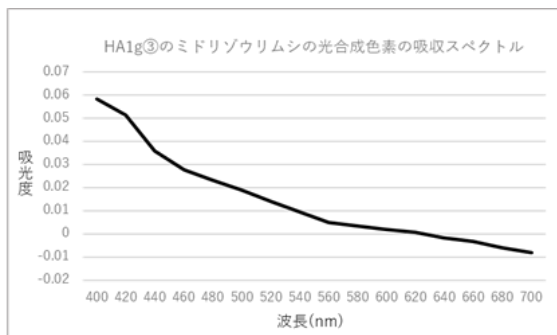


Fig. 13 実験7 HA1 g株③のミドリゾウリムシの
光合成色素の吸収スペクトル

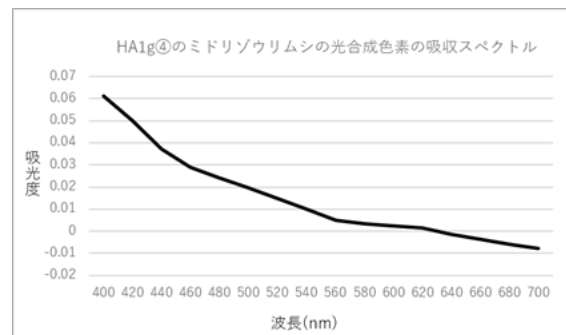


Fig. 14 実験7 HA1 g株④のミドリゾウリムシの
光合成色素の吸収スペクトル

(7) 実験8

白化個体のミドリゾウリムシは紫色光、青色光は吸収していたが、赤色光は吸収していなかった。

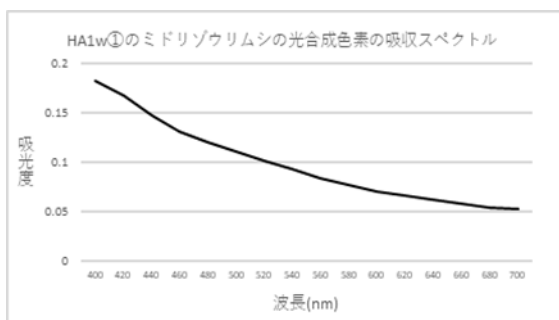


Fig. 15 実験8 HA1w株①のミドリゾウリムシの
光合成色素の吸収スペクトル

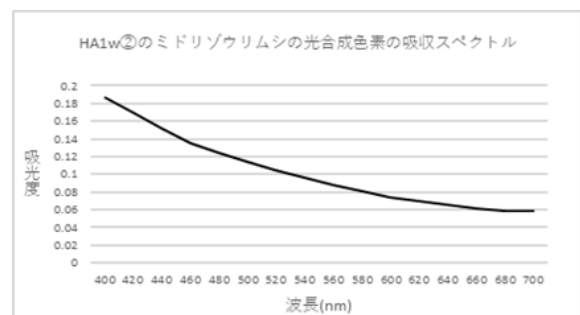


Fig. 16 実験8 HA1w株②のミドリゾウリムシ
光合成色素の吸収スペクトル

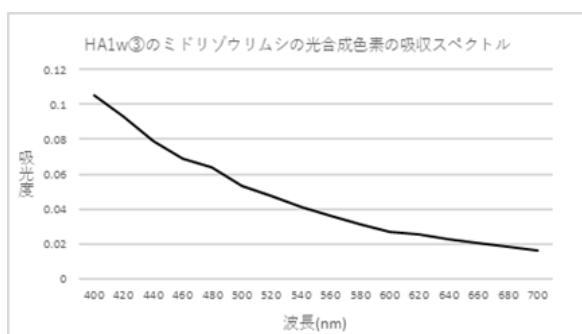


Fig. 17 実験8 HA1w株③のミドリゾウリムシの光合成色素の吸収スペクトル

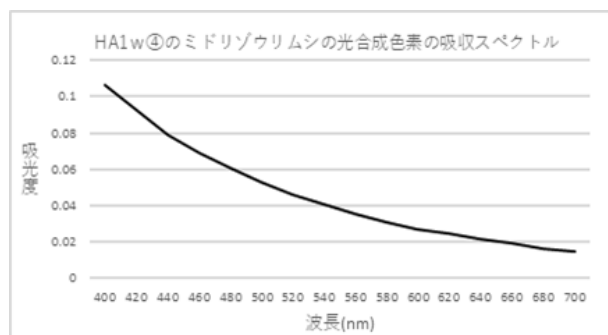


Fig. 18 実験8 HA1w株④のミドリゾウリムシの光合成色素の吸収スペクトル

(8)実験9

白化したミドリゾウリムシは赤色光において負の走光性が見られた。

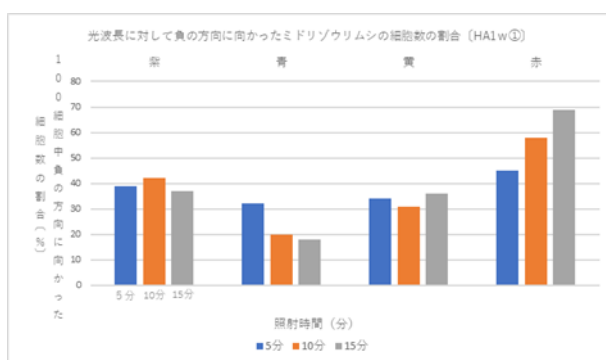


Fig. 19 実験9 光波長に対して負の方向に向かったミドリゾウリムシの細胞数の割合 (HA1w①)

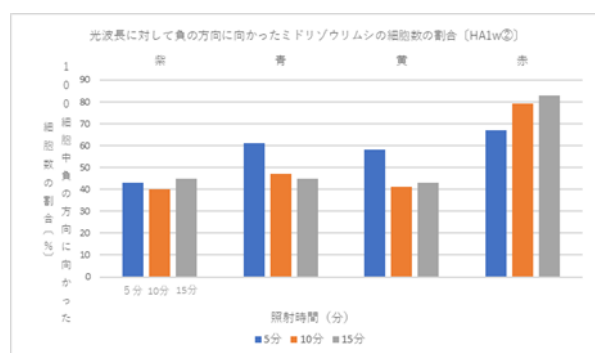


Fig. 20 実験9 光波長に対して負の方向に向かったミドリゾウリムシの細胞数の割合 (HA1w②)

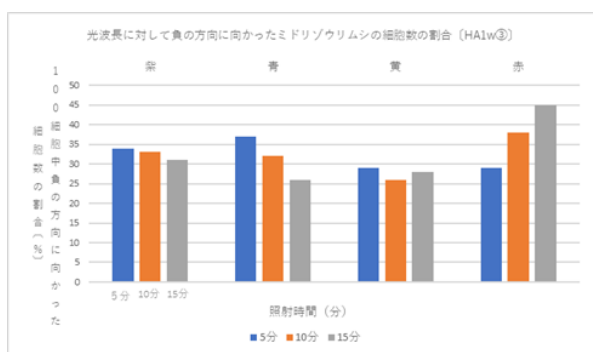


Fig. 21 実験9 光波長に対して負の方向に向かったミドリゾウリムシの細胞数の割合 (HA1w⑤)

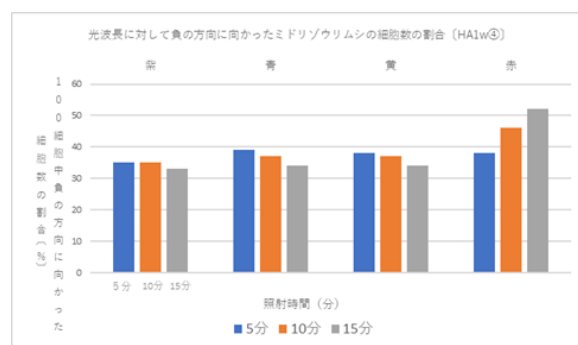


Fig. 22 実験9 光波長に対して負の方向に向かったミドリゾウリムシの細胞数の割合 (HA1w⑥)

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、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、KM 2g 株と HA 1g 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 KM 2g 株と HA 1g 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考えられるため、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。また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く、ミドリゾウリムシの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、赤色光よりも増加することがわかった。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。これらのことから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。今回の研究では、ミドリゾウリムシ内にいたクロレラは単体クロレラと同様に、紫色光、青色光、赤色光を吸収していることがわかった。しかし、ミドリゾウリムシ自体は紫色光、青色光を吸収しているが、赤色光を吸収していないことがわかった。そして、2020年度の研究では白色光、紫色光、青色光において細胞数が増加し、黄色光と赤色光で細胞数があまり増加しないことがわかった。また、葉緑体内の光合成色素の吸収スペクトルでは、紫色光、青色光と赤色光付近では吸収量が高いことがわかっている。これらのことから、ミドリゾウリムシが赤色を細胞内部に取り込まない可能性、ミドリゾウリムシがクロレラを取り込んでいる場合にミドリゾウリムシがクロレラに何か作用する可能性、ミドリゾウリムシ内にクロレラが取り込まれているとクロレラが変化する可能性が出てきた。

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はなく、ミドリゾウリムシの細胞内で光合成色素に変化が起きているのか等、クロレラにも視点を置いて研究をしていきたい。本研究から、ミドリゾウリムシ内のクロレラと単体クロレラが吸収する光に変化はないが、ミドリゾウリムシが赤色を吸収していない可能性が出てきた。今後の研究では、単体クロレラとミドリゾウリムシ内のクロレラの光合成色素の吸収スペクトルについての実験を繰り返し行っていきたい。

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://grassyaqu.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)
- ・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)
- ・教育用 Education シリーズ「カラムクロマトグラフィー実験キットー光合成色素分離ー」
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/01342.html> (2021/7/14)
- ・クロレラ [https://balancebody.jp/2018/11/03/chlorella/\(2021/8/5\)](https://balancebody.jp/2018/11/03/chlorella/(2021/8/5))