

〈第 29 回 山崎賞〉

13 ミドリゾウリムシと共生藻の関係

静岡県立静岡農業高等学校生物部研究班

3 年 海野弘幸 他 6 名

1 研究の目的

私たちは、先輩たちから受け継いだ緑色をしたミドリゾウリムシ（通称ミドリ）や共生藻のいない白いミドリゾウリムシ（通称ホホワイト）を培養しており、これらの微生物を用いた研究を計画した。この両方保持して高校は全国的にみても珍しいと思われる。当初の目的は、ミドリから共生藻を取り出し、これをホホワイトに与えて再共生に至らせることであった。その取り組み中に、ミドリの細胞口付近に激しい回転流が発生し、共生藻が細胞内に取り込まれる瞬間を目撃し、動画の撮影にも成功した。同様のことをホホワイトで観察できれば、取り込んだ共生藻が特定できる。そこで、ホホワイトが共生藻を捕食する瞬間を動画に撮影することを第一の目的として研究に取り組んだ。

2 研究計画と実験方法

研究を行った項目は、「ミドリから取り出した共生藻の光合成活性等について」、「ホホワイトの再共生の試み」、「回転流とそれによる捕食の観察」、の 3 つである。

以下に、各項目に共通するミドリゾウリムシの濃縮方法と共生藻の取り出し方法について、再共生を例に示す。

- ①ホホワイトの培養液をナイロンメッシュ（経 $15\mu\text{m}$ ）を用いて密度 500cell/ml になるまで濃縮・洗浄する。
- ②ミドリを手動遠心分離器で密度 500cell/ml になるまで濃縮・洗浄する。
- ③ホモジナイザーを用いて氷上で粉碎する。
- ④粉碎液を同じナイロンメッシュでろ過し、ろ液を卓上遠心分離器で遠心し共生藻を回収する。
- ④これを①で用意したホホワイトに与えて経過を観察する。

3 実験結果と考察

(1) 共生藻の光合成

ア 宿主であるミドリとの比較

(ア) この実験では、本校のミドリから取り出した共生藻を用いた。ミドリの濃縮手順を間違え、ホモジナイズする前に卓上遠心機を使用してしまった。回転流と捕食を観察したのは、卓上遠心機で濃縮した濃縮液の状態を、顕微鏡で確認していたときだった。

濃縮したミドリから得られた共生藻の抽出液約 1 mL を、BTB を加えたときに変色がわかるように 3 倍 ($3.3\times 10^4\text{ cell/mL}$) に希釈した。また、濃縮したミドリが 4 mL 残ったので、これを比較の実験に使用した。実験の手順は以下の通りである。

- ① 各溶液に適量の BTB 溶液を加え、息を吹き込み黄色にする。
- ② それぞれを 2 本の試験管に等分し、1 本は暗条件とするためアルミ箔で覆う。
- ③ 人工気象機に入れ、温度 25°C 、 $20\text{W}\times 16$ 本の蛍光灯連続照射の条件に置く。
- ④ インターバル機能付きのデジタルカメラを設置し、15 分間隔で自動撮影する。

⑤ 光合成により BTB 溶液の色が変化したら、明暗条件を入れ替える。

(イ) 実験結果と考察

共生藻、ミドリのどちらも沈みながら光合成による BTB の変色が進行していった。変色に要した時間はおおよそ 3 時間であり、ここで明暗条件を入れ替え、翌日まで一日間実験を継続した。その結果、暗条件にあった共生藻の方は明条件にしても全く変色しなかった。これは、共生藻を取り出す初めての試みであり、手順を間違えたりしてのもので、取り出された共生藻の状態がよくなかったのではないかと考えられる。仮に光合成活性が維持されていたとしても、共生藻は泳ぐための手段がないので、沈んだままであったであろうと思われるが、ミドリの方は沈んでいた個体がおおよそ 12 時間後には再び泳ぎだし光合成をし、1 日後には溶液の全面が青色に変色していた。泳ぐ手段を持たない共生藻にとっては、泳いでくれるミドリゾウリムシと共生した方が、光合成をしやすと考えられ、その生存に有利であるといえるだろう。

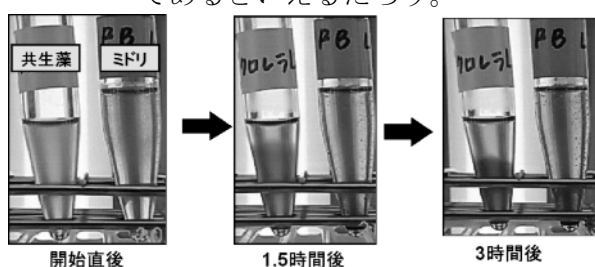


図1 共生藻とミドリの光合成による変色1

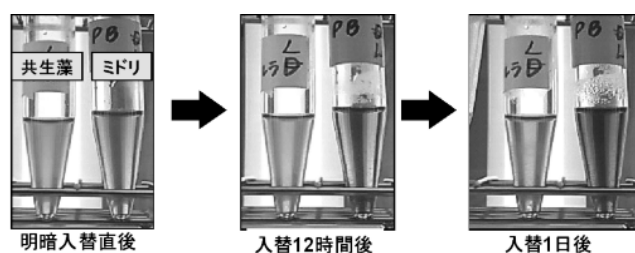


図2 共生藻とミドリの光合成による変色2(明暗入替後)

イ 光合成阻害剤の影響

(ア) 実験方法

本校が保持しているホワイとは、ミドリに光合成阻害剤を与えて共生藻を除去したものである。この阻害剤はメチルピオロゲンという物質で、かつてはパラコートという名で除草剤として売られていた。このパラコートによる阻害の影響を確かめてみた。実験に使用したのは、後述する広島大学での実験で余った共生藻である。

- ① 共生藻懸濁液を卓上小型遠心機で遠心 (9000 回転/分、90 秒) する。
- ② 上澄み液を MW と取り替え攪拌し、再び遠心する。(2 回繰り返す)
- ③ 最終濃度 $2.0 \times 10^5 \text{ cell/mL}$ の懸濁液 4 mL に BTB を加え息を吹き込む。
- ④ 2 本の試験管に分け 1 本にはパラコート (P) を最終濃度 1.0 mg/mL となるよう加える。
- ⑤ インターバル機能付きのデジタルカメラを設置し、15 分間隔で自動撮影する

(イ) 実験結果と考察

共生藻は沈みながら青色に変色していった。パラコート処理区は 1 時間経過するまで無処理区と同様に青色に変色し、その後緑色に戻ったことから、パラコートの影響が出るのは 1 時間後であるといえる。この時間は、本校生物部が 2010 年にミドリ本体で行った実験と同じ結果であった。

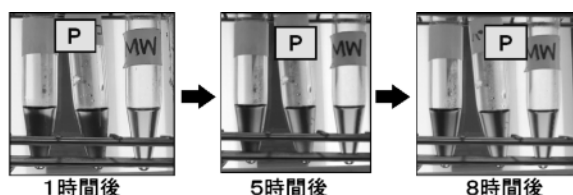


図3 共生藻の光合成に対する阻害剤の影響

また、無処理区では 8 時間後には溶液全面が青色に変色したことから、共生藻が沈殿していても、時間がたつとその光合成により、BTB 溶液全体が青色に変色することがわかった。これらの結果から、共生藻の光合成活性は、宿主の体内にいる場合と、単独でいる場合で特に大きな差はないものと推定される。

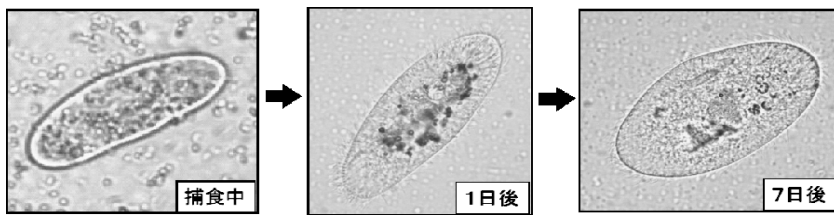


図4 再捕食したホワイトにおける共生藻の消失

トが共生藻を捕食してできた食胞が観察された。翌日も確実に食胞は存在したが、1週間後には完全に消失していた。消化されたか、はき出されたに違いない。その原因はよくわからないが、共生藻の取り出し方に問題があるのかもしれない。数は多く取り出せても、やはり何らかのダメージを共生藻に与えている可能性が高い。

(2) 再共生

実験方法は上述したとおりである。共生藻の取り出しは比較的うまくいったように感じ、推定濃度 1.0×10^6 cell/mL とかなり高濃度の共生藻が得られた。両者を混合したときには、ホワイ

(3) ミドリゾウリムシが引き起こす回転流と、それによる捕食の観察

ア ミドリでの偶然による観察

前述したとおり、ミドリ濃縮液の観察中に、ミドリによって周囲に回転流が引き起こされ、共生藻が細胞口から吸い込まれる様子を目撃し、動画に撮影した。このときは、卓上小型遠心機を濃縮段階で使用してしまったため、その衝撃で一部のミドリがつぶれ、共生藻が混在

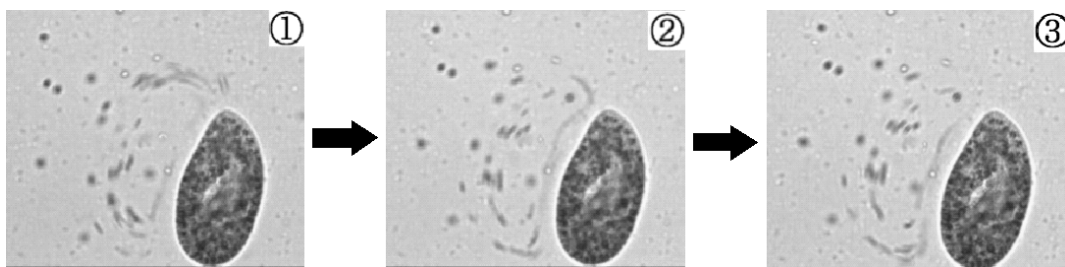


図5 ミドリ周辺の回転流により回転する共生藻

する溶液となっていたと考えられる。図5に示したように、細胞の中央付近に細胞口があり、その斜め前方方向から水が

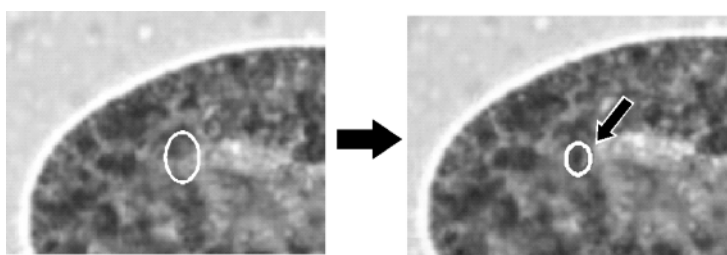


図6 ミドリ周辺の回転流により取り込まれた共生藻

吸い込まれ、そこに向かうように一方方向の激しい回転流が生じていた。

観察しているうちに、共生藻が回転流によって細胞口付近から吸い込まれるところを、何度か目撃した。図6の丸印で示した共生藻が取り込まれた。この瞬間も動画に収めることができた。なお、原形質流動もはっきりと見て取れた。

イ 本校でのホワイトによる捕食の観察その1

この動画を広島大学理学部に送ったところ、大変貴重な映像であることがわかった。また、ホワイトで観察されれば、より確実に捕食が確認できるとのアドバイスを頂き、その実験に何回かとりくんだ。また、広島大学で観察してみてはというご提案を頂き、夏休みに訪問することにした。

(ア) 取り出した共生藻の捕食

上述した再共生の実験と同時に行った結果、動画の撮影はできなかったが、細胞口周辺

の回転流を3名の部員が目撃した。これにより回転流はゾウリムシ自身が引き起こすことが確認された。

(イ) ポスターカラーの捕食

広島大学を訪問する前に、練習としてポスターカラーを用いて回転流を観察することにした。このときは、特に回転流は観察されず、繊毛を使って這いずり回り、移動した跡がスジとなって残っていた。また、ポスターカラーを取り込んだ食胞が観察された。

ウ 広島大学でのホワイトによる共生藻の捕食の観察

(ア) 実験方法

広島大学が確立した、ミドリの動きを止め原形質流動を観察する手法を用いて、スライドグラス上に共生藻を加え、回転流による捕食の観察を試みた。共生藻は寒天培地で単離培養したものを使用した。実験の手順は以下の通りである。

- ① ホワイト濃縮液 (500cell/mL) と共生藻 (4.0×10^4 cell/mL) を、6 μ L ずつスライドグラスにとる
- ② 余分な水をろ紙で吸い取る
- ③ カバーガラスの周囲をマニキュアで封じ乾燥を防ぐ
- ④ 家庭用ビデオレコーダーを装着した顕微鏡で観察しながら撮影

(イ) 実験結果と考察

2日間、のべ5時間以上観察したが、私たちが目撃したような激しい回転流は観察されなかった。しかし、細胞口内にも繊毛があつて激しく波打つとともに、細胞口自体も激しく振動するのが観察された。動画を解析してみると、1秒間に4回のペースで開閉していることがわかった。どうやらこのときは、細胞口が上を向いた状態でカバーガラスにへば

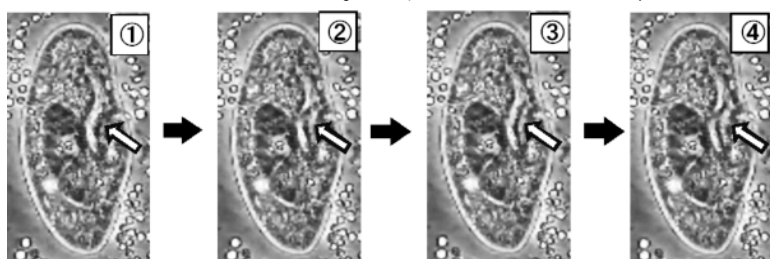


図7 細胞口の開閉の連続写真

りついていたようである。あまりにも狭い隙間に閉じ込めたため体の回転ができず、細胞口が横を向けなかったのではないかと想像される。このことから回転流は、細胞口の開閉と細胞口内の繊毛運動によって引き起こされる可能性が考えられる。

エ 本校でのホワイトによる共生藻の捕食の観察その2

(ア) 実験方法

広島大学での経験と余った共生藻を生かし、本校のホワイトで再び実験を行った。細胞が回転しやすいように濃縮液と共生藻の体積を前回より増やし8 μ L ずつとして、ろ紙で吸い取る量も最小限にした。

(イ) 実験結果と考察

同じことを2回実施し、いずれも捕食の瞬間の撮影は叶わなかったが、回転流は何度も確認され、動画の撮影にも成功した。このときは収縮胞が開閉する様子も、はっきりとわかった。回転流の径や規模はミドリで観察されたものに比べてかなり小さく、水の厚みがまだ不足している可能性がある。また、1個体について3回の捕食を目撃し、その個体の捕食直後の静止画の撮影にも成功



図8 共生藻を捕食したホワイト

した。共生藻の一つ一つがはっきりとわかり、いかにも新鮮な感じがした。

4 回転流に関する総合的考察

一連の研究結果から、ミドリゾウリムシの周辺にみられる回転流は、ミドリゾウリムシ自身が引き起こしていると考えて間違いないようだ。またそれは、細胞口の開閉と細胞口付近の繊毛運動によって生じると考えている。その根拠は以下の通りである。

- ① この回転流は、細胞口付近で生じ、回転方向は一定である。
- ② この回転流は、移動のための繊毛運動では生じない。
- ③ 細胞口が高速で開閉し、細胞口内の繊毛が激しく波打つ。
- ④ この回転流は、体軸が回転できないほど狭い空間では生じない。

5 研究のまとめ

今年度、ミドリゾウリムシを用いたいくつかの研究によって、以下のような成果を上げた。

- ① ミドリにおいて、捕食の瞬間という、過去に例のない貴重な動画の撮影に成功した。
- ② ミドリゾウリムシを生きた状態で静止させ、原形質流動や収縮胞の動きを撮影する手法を確立した。
- ③ ミドリゾウリムシは、細胞口のはたらきによって回転流を起こして周囲の水を吸い込み、捕食している可能性を示した。
- ④ 取り出した共生藻の光合成活性は、宿主の体内にあるときと変わらないことを確認した。
- ⑤ 共生藻にとって、泳いでくれるミドリゾウリムシと共生した方が光合成に有利なことを確認した。
- ⑥ ホワイトの再共生には至っていないが、再捕食させることに成功した。

6 今後の課題

今後の課題は、以下の通りである。

- ① ホワイトで共生藻の捕食の瞬間を撮影する。
必ずしも捕食するものは共生藻でなくてもよいが、捕食が明確に確認できる大きさや色などで、共生藻に勝るものは今のところ見つかっていない。
- ② 収縮胞や原形質流動と浸透圧の関係を調べるなど、習得した観察法を応用する。
水溶液の浸透圧が高いほど、収縮胞の収縮が速くなることが教科書に載っている。薬品を全く使用しなくてよいので、正確に測定できるのではないか。
- ③ 再共生に再挑戦する。
再捕食しても、再共生に至らない原因が不明であるが、後輩にはぜひまた挑戦してほしい。

7 謝辞

最後に、本研究を進めるにあたり、広島大学大学院理学研究科細谷浩史教授をはじめ、院生の方々に実験方法を指導していただいた。また、以下の方々にも大変お世話になった。特に水質研究班のみなさんがいなければ、この研究は成り立たなかった。ここに深くお礼申し上げる次第である。

本校職員 乗松朋代、高辻倫江、久富恵世（敬称略）

本校生物部水質研究班のみなさん

8 参考文献

本校生物部. 山崎賞発表論文「いろいろな光合成生物の光合成と呼吸」, 2011

清水東高校. ミドリゾウリムシの共生関係の解明, 遺伝別冊 No.20, 2007

内藤 豊. 単細胞動物の行動, 東京大学出版会, 1990

H.S.Jennings. The Behavior of the lower organisms, BiblioLife,LLC