

共生による光走性への影響 Ver. 2

学校法人静岡理工科大学静岡北高等学校
科学部 2年 新井真優 寺川実那

1 研究背景・これまでの実験

科学部の活動で大学生や研究者の方からお話を聞く機会が多くある。そのなかでミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) という鮮やかな緑色をしたゾウリムシを知り、私達はこの植物のように見えるがゾウリムシとして自由に水の中を泳ぎ、植物性の生物を体の中に取り込み、共生している不思議な現象について非常に興味を持ち、共生について詳しく調べることにした。

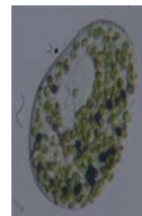


図1

ミドリゾウリムシの緑色は細胞内に共生するクロレラという単細胞の緑藻に由来し、クロレラに関しては体内で分解せず保持している。この共生関係によりクロレラからの光合成産物がミドリゾウリムシに供給されるが、興味深いことに、ミドリゾウリムシが極度の飢餓状態に陥るなどミドリゾウリムシに共生の利益がなくなった場合、共生しているクロレラをエサとして摂取することがある（これを白化という）。

私達は細胞内のクロレラとの共生によってミドリゾウリムシの行動に変化があるのか、ということに特に興味をもち、共生によってクロレラから体内に酸素の供給があり、ミドリゾウリムシの行動に関して影響が大きいと予想される光合成（光）という面から、ミドリゾウリムシの光走性に注目して研究を始めた。

【これまでの研究：共生による光走性への影響～ミドリゾウリムシ・白化ミドリゾウリムシ～】

ミドリゾウリムシの光走性は、照度 (lux) でミドリゾウリムシ、白化させたミドリゾウリムシのそれぞれの行動の変化を比較することで、共生による光走性への影響を調べた。その結果、ミドリゾウリムシは共生の有無とは関係なく、照度 46001x 以下では正の光走性、86001x 以上では負の光走性を示した。66001x では有意な差が見られなかったため、66001x 付近で光走性の正負が変化する可能性が高いと考えた。また、照度によらずミドリゾウリムシの方が、光走性が正負ともにより顕著に見られた。これより、ミドリゾウリムシはクロレラと共生することによってより強い正の光走性を示すが、86001x のより強い光の下では白化ゾウリムシより強い負の光走性を示すと考えた。

2 目的

これまでの研究の結果から考えられたことを仮説とし、前回同様、共生によってミドリゾウリムシの光走性にどのような影響があるのかを明らかにすることを目的とする。

本研究では、ミドリゾウリムシ、白化ミドリゾウリムシの光走性に加えて、ゾウリムシについても同様に実験をおこない、共生による影響とともに種による違いについても調べることにする。

3 実験

i 試料 本研究では、クロレラと共生しているミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) をノーマル、白化したミドリゾウリムシを白化ゾウリムシと呼ぶ。本研究には、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) のナショナルバイオリソースプロジェクトを介して国立大学法人山口大学から提供を受けたミドリゾウリムシの Yad1g1N (ノーマル: 参考文献)、白化したミドリゾウリムシの Ha1w (白化ゾウリムシ: 参考文献)、ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の dKNZ1207x1209-3 を使用した。

これらのノーマル・白化のミドリゾウリムシ、ゾウリムシはカロリーメイト 1ml を 500ml の水に薄めたものを培養液とし、室温は約 24℃ に保った状態で 24 時間照明下に置き培養した。照明には蛍光灯を使用し、光の強さは培養フラスコの上部が 25001x になるように保った。

ii 方法

これまでの研究では、ミドリゾウリムシを培養している細胞培養フラスコを顕微鏡下に置き、顕微鏡の右からLEDライトで光をあて、その行動を観察していたが、全個体の行動を追えないという課題があったため、本研究ではプレパラートを作成し観察をした。観察は、下記の①～③の方法で行った。

- ① 全体の個体数を数える。
- ② 一方向から一定の明るさの光を5分間当て続ける。

光源はLEDライトを使用し、照度は以下の8パターンで調べる。

90lx 1300lx 2250lx 3500lx 4600lx 6600lx 8600lx 11700lx

なお、照度はライトからの距離で変え、照度計で計測した値である。

また、90lxは、光源となっているLEDは光をつけないで電源を切っており、室内灯も切った状態で、窓から入ってくる屋外からの光のみの値である。

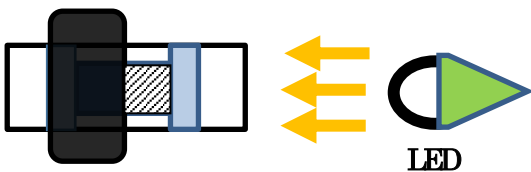


図2 実験装置（真上から見た図）

双眼実体顕微鏡のステージにプレパラートを置き、非光源側の半分を黒ビニールテープで覆った。

- ③ 1分毎に光源側半分の範囲（上図斜線部）を、顕微鏡を通して撮影する。撮影枚数は基準となる0分を含め、1～5分目の計6枚である。
- ④ 撮影した写真（光源側）にうつる個体数を数える。はじめに写真に写る個体数のばらつきを考慮し、結果は全体の個体数に対する割合で示す。

（例）

図3

77 個体



全体 152 個体

光源側 $77/152 \times 100 \div 50.7\%$

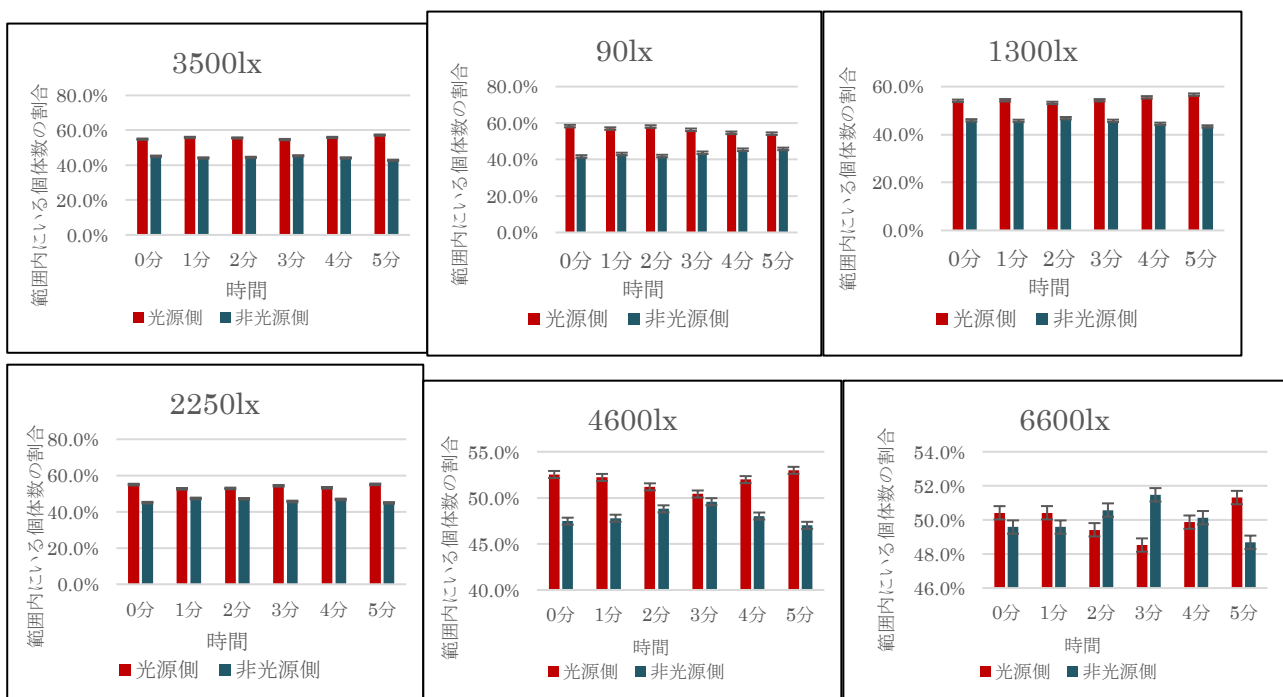
非光源側 $75/152 \times 100 \div 49.3\%$

- ④ 結果についてT検定を行う

4 結果

① ノーマル

図4 照度と時間経過による範囲内の個体数（割合）の変化



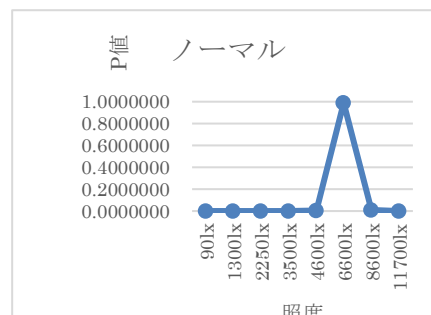
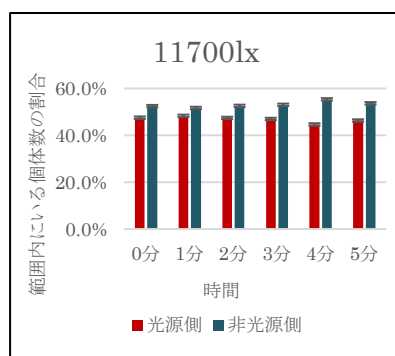
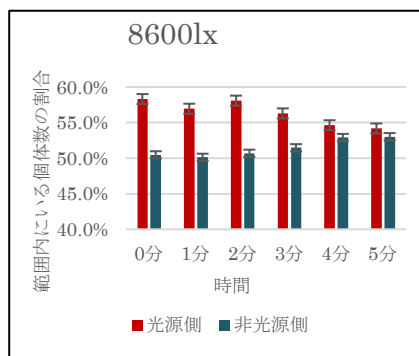


図5 T検定（左右の検定）の結果

図4のグラフから

- ・90lx～3500lx 時間の経過に伴い、光源側の個体の割合が増えた
- ・4600lx 時間の経過に伴い、光源側の個体の割合が増えているわけではないが、全体に対して光源側の個体の割合の方が常に大きかった
- ・6600lx 光源側、非光源側のどちらの方向に対しても傾向は見られなかった
- ・8600lx～11700lx 時間の経過に伴い、非光源側の個体の割合が増えた

図5のT検定の結果から 有意差はない[6600lx]、有意差がある[90lx 1300lx 2250lx 3500lx 4600lx 8600lx 11700lx]に分けられた。これより、6600lxでは、ミドリゾウリムシの泳ぐ方向には規則性がなかった。そして、ミドリゾウリムシは90lx～4600lxでは光の方向に対して泳いでおり、8600lx～11700lxでは光が差す方向と反対の方向に泳いでいた。

②白化ゾウリムシ

図6 照度と時間経過による範囲内の個体数（割合）の変化

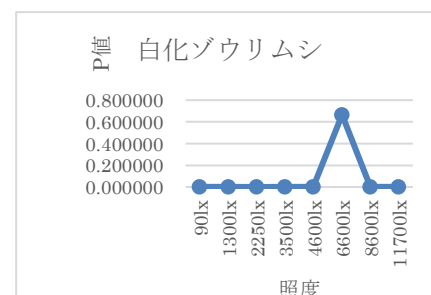
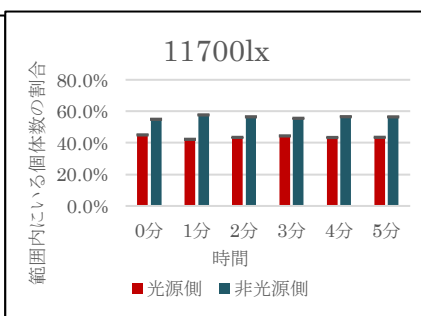
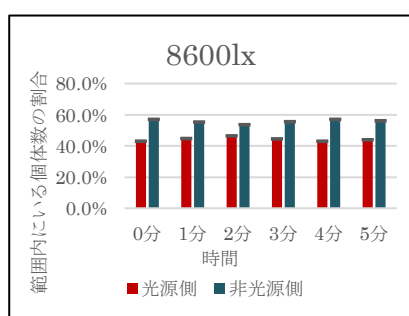
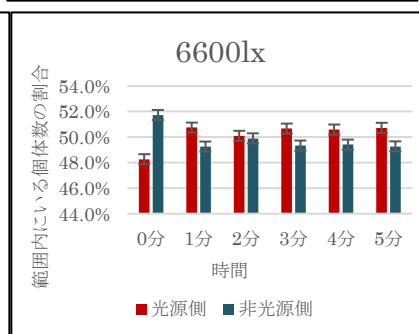
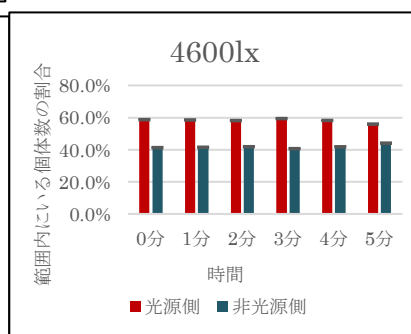
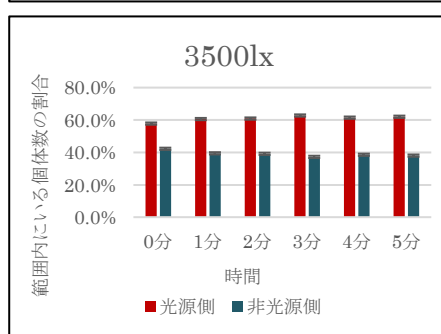
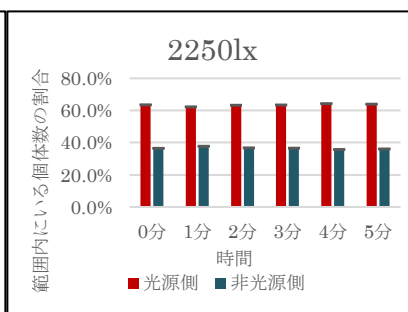
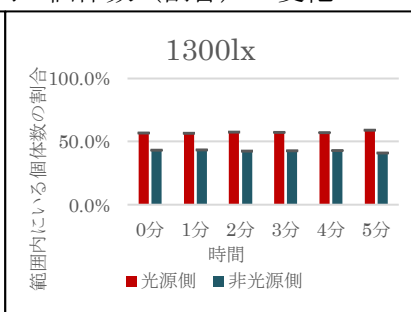
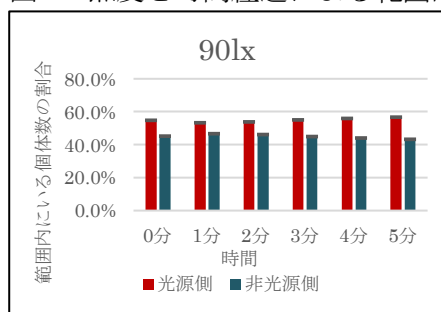


図7 T検定（左右の検定）の結果

図6のグラフから、・90lx～4600lx 時間の経過に伴い、光源側の個体の割合が増えた

- ・ 6600lx 光源側、非光源側のどちらの方向に対しても傾向は見られなかった
- ・ 8600lx 時間の経過に伴い、非光源側の個体の割合が増えているわけではないが、全体に対して非光源側の個体の割合の方が常に大きかった
- ・ 11700lx 時間の経過に伴い、非光源側の個体の割合が増えた

図7のT検定の結果から、・有意差はない[6600lx] 有意差がある[90lx 1300lx 2250lx 3500lx 4600lx 8600lx 11700lx]これより、6600lxでは、ミドリゾウリムシの泳ぐ方向には規則性がなかった。そしてノーマルと同様に、ミドリゾウリムシは90lx~4600lxでは光の方向に対して泳いでおり、8600lx~11700lxでは光が差す方向と反対の方向に泳いでいた。

③ゾウリムシ

図8 照度と時間経過による範囲内の個体数（割合）の変化

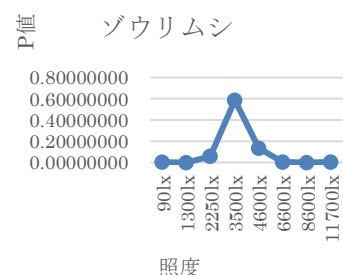
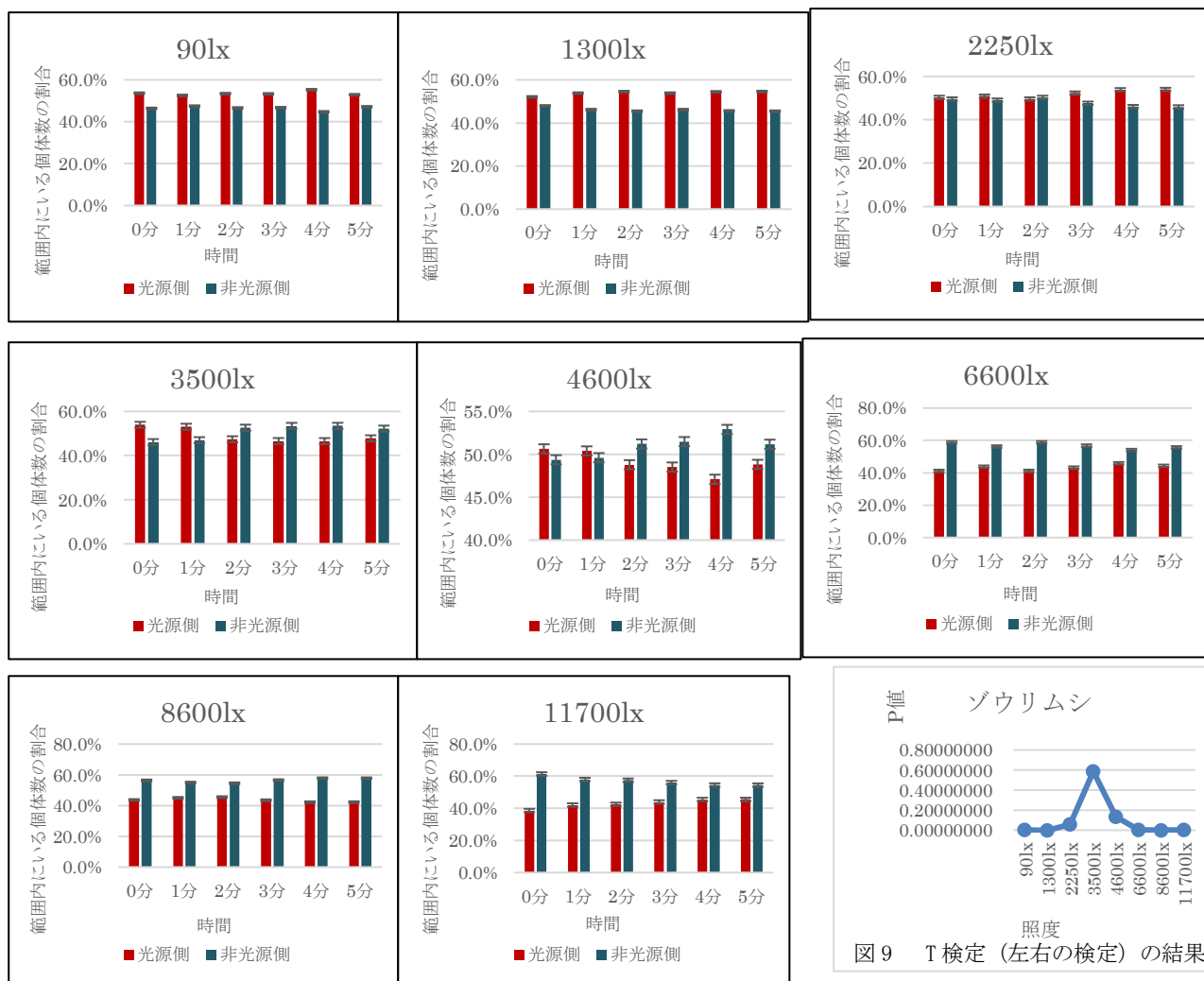


図9 T検定（左右の検定）の結果

図8のグラフから

- ・ 90lx~2250lx 時間の経過に伴い、光源側の個体の割合が増えた
- ・ 3500lx~4600lx 光源側、非光源側のどちらの方向に対しても傾向は見られなかった
- ・ 6600lx~8600lx 時間の経過に伴い、非光源側の個体の割合が増えた
- ・ 11700lx 時間の経過に伴い、非光源側の個体の割合が増えているわけではないが、全体に対して非光源側の個体の割合の方が常に大きかった

図9のT検定の結果から、有意差はない[3500lx 4600lx] 有意傾向である[2250lx] 有意差がある[90lx 1300lx 6600lx 8600lx 11700lx]これより、3500lx~4600lxでは、ゾウリムシの泳ぐ方向には規則性がなかった。ゾウリムシは90lx~2250lxでは光の方向に対して泳いでおり、6600lx~11700lxでは光が差す方向と反対の方向に泳いでいた。

5 考察

ノーマル・白化ゾウリムシ・ゾウリムシの結果を比較すると、図 10 のグラフから 66001x の光を照射したとき、ノーマル、白化ゾウリムシともに行動は規則的でないので、クロレラの有無を問わず 66001x 付近でミドリゾウリムシの光走性の正負が変化すると考えられ、特に共生しているミドリゾウリムシの方が、その変化点が顕著に見られると考えられる。クロレラをもつミドリゾウリムシは強い光・弱い光を敏感に区別している可能性があるだろう。また 35001x~46001x の光を照射したとき、ゾウリムシの行動が規則的でないので、35001x~46001x 付近でゾウリムシの光走性の正負が変化すると考えられる。これより、光走性の正負の変化点は、共生の影響というよりは、種による違いであるのではないかと推測する。したがって、ミドリゾウリムシは白化し、クロレラを所持していなくても、ゾウリムシと同様の光走性は示すわけではないといえるのではないかな。前回の実験の結果をふまえ、ミドリゾウリムシは、照度 46001x 以下では正の光走性、86001x 以上では負の光走性を示すことは検証することができたが、共生による光走性の強さの違いは前回ほど見られなかった。今回の実験ではプレパラートを作成し、全個体を追うことができたので、これまでの実験よりも光走性の変化点をはっきりと見ることもできたと思われる。共生によって光走性の正負の切り替えがはっきりしている可能性はあるだろう。

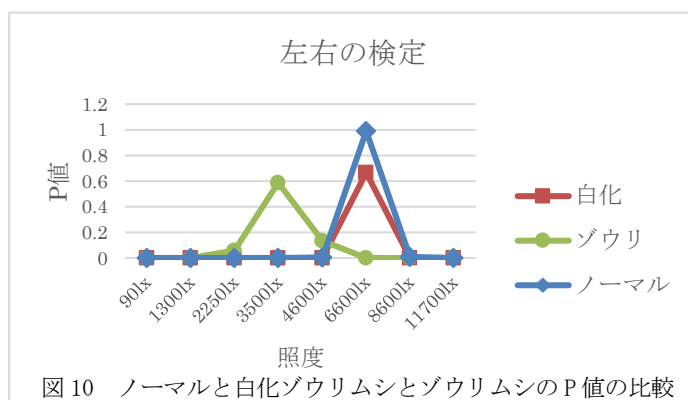


図 10 ノーマルと白化ゾウリムシとゾウリムシの P 値の比較

6 今後の課題

今回の研究から、クロレラからの光合成産物の供給がミドリゾウリムシの生命活動にどれくらいの割合で関わっているのかを知ることが、共生による影響があまり見られない理由を追求するのに重要となると考えた。また、白化したゾウリムシ・ゾウリムシの行動を変化させる光以外の要因を探ることで、クロレラとの共生がミドリゾウリムシの光走性を左右させているかを調べる必要があるだろう。

7 謝辞

本論文の作成にあたり、終始適切な助言を賜り、また丁寧に指導して下さった静岡大学准教授道羅英夫さんに感謝いたします。また、島根大学大学院生の塚越亮充さんには、調査のあり方や考察の方法など、細部にわたるご指導をいただきました。山口大学の藤島政博教授にはミドリゾウリムシ、白化ミドリゾウリムシ、ゾウリムシを提供していただきました。ここに感謝いたします。

8 参考文献

- ・九十九 慎吾・中川 弥生・中岡 保夫・石田 正樹 (2009 年)
「*Paramecium bursaria* の集光性における共生クロレラの役割に関する研究」
(奈良教育大学理科教育講座、大阪大学基礎工学部システム科学科生物工学コース)
- ・KOHJI MATSUOKA and YASUO NAKAOKA (Accepted 3 February 1988)
「PHOTORECEPTOR POTENTIAL CAUSING PHOTOTAXIS OF *PARAMECIUM BURSARIA*」
(Department of Biophysical Engineering, Faculty of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka, Japan 560)
- ・Iwai T, Fujiwara K, Tamura T. Maintenance of algal endosymbionts in *Paramecium bursaria*: a simple model based on population dynamics. *Environ. Microbiol.* 18, 2435–2445, 2016.
- ・Yuuki Kodama, Haruo Suzuki, Hideo Dohra, Manabu Sugii, Tatsuya Kitazume, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Masahiro Fujishima. Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts. *BMC Genomics*, 2014, 15:183.