

ブレファリズマの巨大化メカニズムの解明に向けて

6年C組 東野 友哉
4年B組 中澤 春香
4年B組 永井 伸明
指導教諭 櫻井 昭

1. 要約

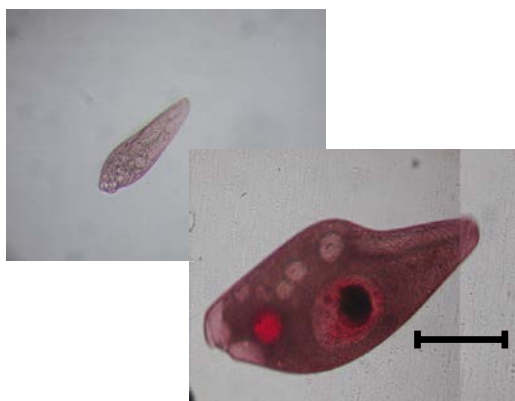
繊毛虫ブレファリズマは、飢餓状態になると共食いすることが知られている。この現象が起きる際の形態変化の基礎研究を行なった結果、共食いをすると、細胞サイズと大核が巨大化することが示唆された。しかし、細胞が巨大化するしくみはまだ明らかにされていない。そこで、本研究では、餌のサイズとブレファリズマの細胞サイズの変化との関連性を調べるために、ブレファリズマに大きさの異なる4種類の餌を与えて培養し、細胞サイズの変化を、日を追って観察した。その結果、ブレファリズマは大きい餌を食べると細胞サイズが大きくなるという傾向が見られた。

キーワード ブレファリズマ、共食い、大核、DAPI染色、銀染色

2. 緒言

ブレファリズマは特定の環境下（飢餓状態）に置かれると、共食いをし、巨大化するという性質を持っている。本研究では巨大化したブレファリズマを「ジャイアントブレファリズマ」とよぶことにする。右の図は通常サイズのブレファリズマ（左）とジャイアントブレファリズマ（右）である。バーは200 μm 。（写真右下）

これだけ大きな変化を示すジャイアントブレファリズマだが、1980年のレナルツらの報告以降詳しい研究はなされていない。そこで、本研究では、ジャイアントブレファリズマが形成される過程を詳しく観察することにした。また、ジャイアントブレファリズマのでき方も共食いに注目して観察することにした。



3. 研究目的

- ・ジャイアントブレファリズマは、どのような細胞なのか調べる。
- ・細胞の巨大化がどのように起こるのかも調べる。

4. 研究内容

研究 I

I - (1) 仮説

ジャイアントブレファリズマの形態は、細胞サイズに対して口径サイズが肥大化する。

I - (2) 研究方法

①培養方法

実験材料：*Blepharisma japonicum*
R1072株、R48株

培養液：滅菌したレタスの絞り汁に、バクテリア(*Enterobacter aerogenes*)を増殖させたレタス培養液をエサとして用い、インキュベーターで培養する(25 $^{\circ}\text{C}$ 、2日間)。

②観察方法

カウント法とサイズ測定

毎日1000 μl ずつ3回サンプリングし、実体顕微鏡下で個体数のカウントを行う。また、光学顕微鏡を用い、デジタルカメラで細胞を撮影する。その後、パソコン画面上で長径と短径、そして口径のサイズを測定する。

大核の面積測定

ブレファリズマをカルノア液で固定し、DAPI染色を行い、蛍光顕微鏡を用いデジタルカメラで細胞を撮影する。その後、画像処理ソフト(Scion Image)で大核の面積を測定する。

繊毛列と膜板帯の測定

ブレファリズマを銀染色し、光学顕微鏡を用いデジタルカメラで細胞を撮影し、Scion Imageで繊毛列の幅と膜板帯の幅を測定する。(膜板帯とは、ブレファリズマの口の周りにある特殊化された繊毛であり、繊毛列とは、ブレファリズマの細胞表面に列を成すように並んだ繊毛である。)

観察時には、他の菌が混ざらないよう、熱殺菌、消毒など、無菌操作を心掛けた。

I - (3) 結果

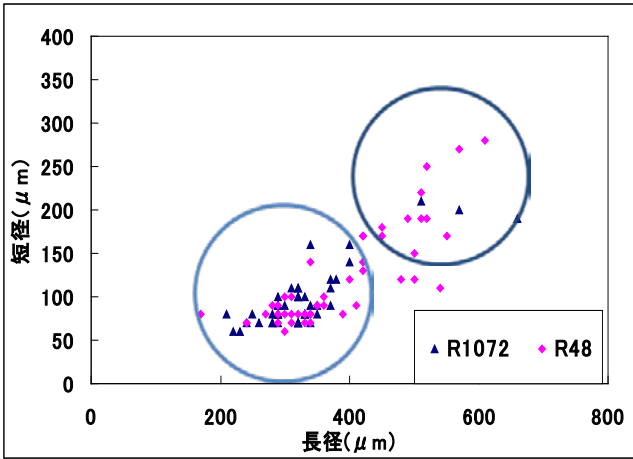


図1 長径と短径の関係

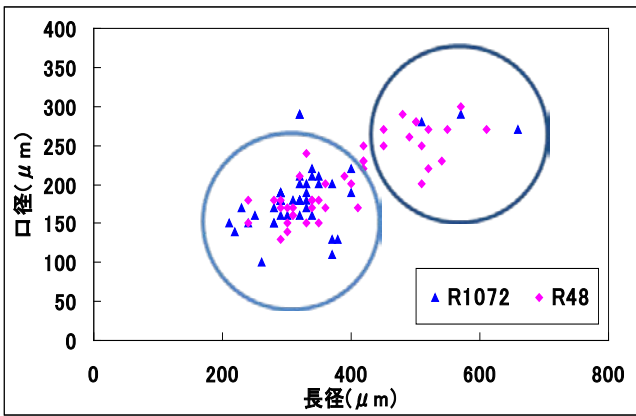


図2 長径と口径の関係

図1と図2は、サンプリングしたブレファリズマの長径、短径、口径の結果である。長径が約300 μm 付近のブレファリズマが通常型ブレファリズマであり、長径が約600 μm 付近のブレファリズマがジャイアントブレファリズマである。図1のグラフより、ジャイアントブレファリズマの長径に対する短径の比は、通常型ブレファリズマの長径と短径の比に等しいことが分かった。また、ジャイアントブレファリズマの長径と口径の比と、通常型ブレファリズマの長径と口径の比に等しいことが分かった。

図3は、大核面積の測定結果である。通常型ブレファリズマの大核に比べ、ジャイアントブレファリズマの大核は2.8倍もの大きさになっていることが分かった。また、図4のように1本の長い大核が途中で枝分かれして大核面積を大きくしているようであった。

銀染色を行った結果、図5のようにブレファリズマの繊毛の基部が染色された。そして、繊毛列の幅では、通常型ブレファリズマに比べ、ジャイアントブレファリズマのほうが大きくなっていた。しかし、膜板帯の幅は、通常型ブレファリズマとジャイアントブレファリズマでは違いがなかった(図6参照)。

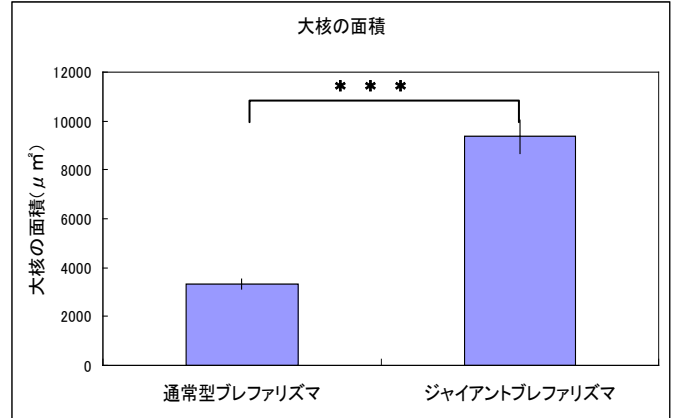
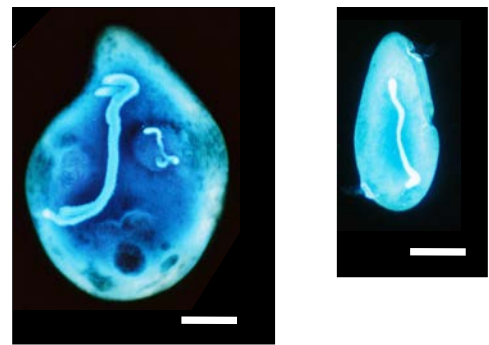


図3 大核面積の比較



(バーは100 μm)

図4 ジャイアントブレファリズマ(左)と通常型ブレファリズマ(右)の蛍光顕微鏡写真

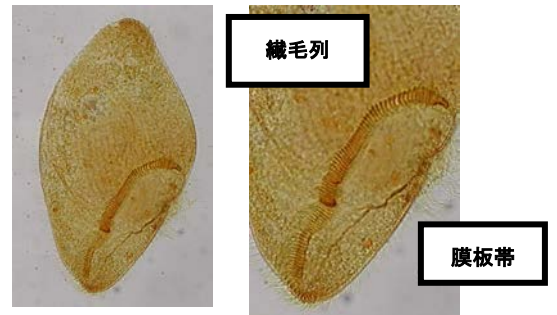


図5 銀染色によって染色されたブレファリズマ(左)と口部の拡大(右)

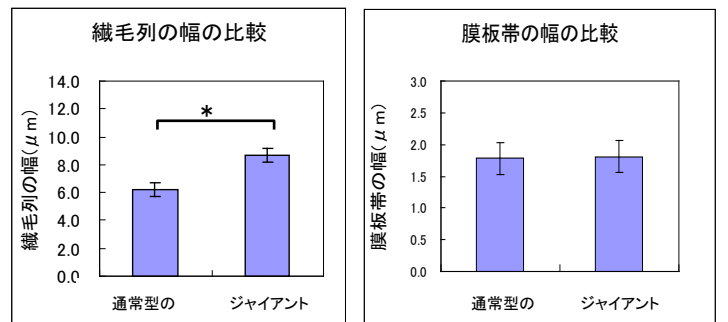


図6 繊毛列の幅の比較(左)と膜板の幅の比較(右)

ここで図1と図2を、ブレファリズマの株の違いに注目して検証してみた。すると、R1072株よりもR48株のほうがもとの細胞サイズにばらつきがあり、ジャイアントブレファリズマの発生個体数も多くなっている。これは、「共食い」をしやすい株のほうがジャイアントブレファリズマになりやすいのではないかと考えられる。そこで、餌のサイズによって細胞サイズが左右されるのか調べることにした。

研究Ⅱ

Ⅱ-① 仮説

餌のサイズが大きくなるとブレファリズマの細胞サイズも大きくなる。

Ⅱ-② 研究方法

① 培養方法

実験材料：*Blepharisma japonicum* R48株

餌の種類：

餌の名前 (学名)	細胞サイズ
小型のブレファリズマ (<i>Blepharisma</i> sp:A)	200 μm
ゾウリムシ (<i>Paramecium</i> sp:B)	100 μm
小型の繊毛虫 (<i>Sathophilus</i> sp:C)	40 μm
バクテリア (<i>Enterobacter aerogenes</i> :D)	1 μm

培養方法：4種類の餌を定常期になるまで培養し、1ml まで入る穴が3つ開いた厚いスライドガラス(ディプレッションスライドガラス)に600 μl ずつ分注する。その中に10匹のブレファリズマを入れて、ブレファリズマの個体数変化と細胞サイズ変化を測定する。このとき、コントロールとしてSMB(ブレファリズマの生理食塩水、以下E)を600 μl 加えたものを用意する。

② 観察方法 (カウント法とサイズ測定法)

一日ごとにディプレッションスライド一枚(3サンプル)の細胞数を実体顕微鏡でカウントする。また、サイズ測定は実験Ⅰと同様に行った。

Ⅱ-③ 実験結果

4種類の餌を与えたそれぞれのブレファリズマは、図7と図8のような培養日数に対する個体数変化と細胞サイズ変化を示した。個体数変化においては、ゾウリムシ以外は培養日数に対して、個体数は順調に増えていった(図7)。また、培養3日目までは、大きい餌を食べたものほど細胞サイズが大きくなっ

ていた。しかし4日目以降では、細胞サイズは小さくなったが、コントロールよりは大きい状態を保っていた。ただし、ゾウリムシ(B)では細胞サイズに大きな変化は見られなかった(図8)。

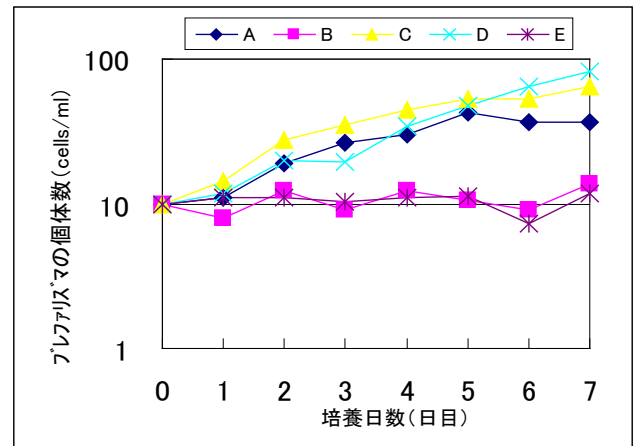


図7 個体数の変化

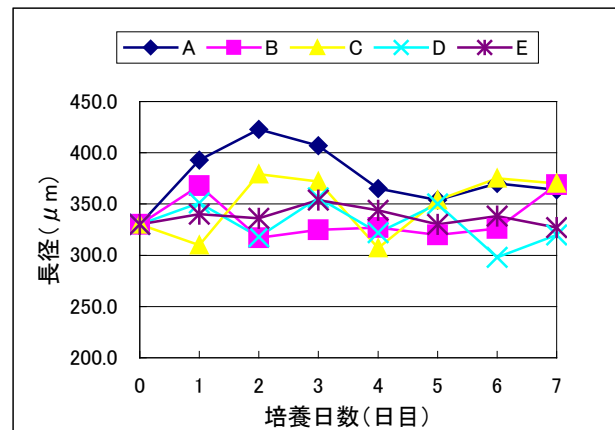


図8 細胞サイズの変化

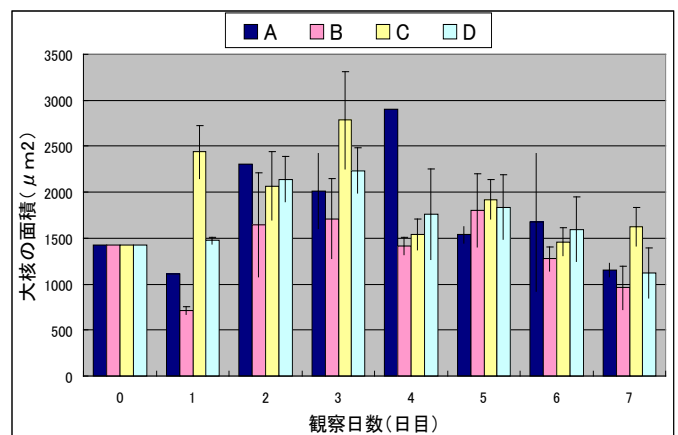


図9 大核の面積の変化

次に、与えた餌の違いによりブレファリズマの大核の面積は図9のような変化を示した。小型のブレファリズマ(A)はバクテリアに比べて、2日目から

大核の面積が大きくなっていた。また、小型の繊毛虫 (C) はバクテリア (D) に比べて、1日目からほぼ大核の面積が大きくなっていた。しかし、小型ブレファリズマは5日目に、小型繊毛虫は4日目に、ほぼもとの大核の面積に戻ってしまった。一方で、ゾウリムシ (B) を餌にしたブレファリズマの大核の面積は、バクテリア (D) に比べて大きくなっておらず、返って小さくなっていた。

5. 考察

通常型ブレファリズマとジャイアントブレファリズマの大核の面積の比較から、ジャイアントブレファリズマの大核は通常型のそれに比べて巨大化させていると考えられる。また、長径と短径、長径と口径の比が、通常型ブレファリズマとジャイアントブレファリズマでほぼ等しかったことから、ジャイアントブレファリズマは、体の一部が局所的に大きくなっているのではなく、全体的に大きくなっていると考えられる。そして、繊毛列の幅は大きくなっているのに、膜板帯の幅はほぼ変わらなかったことから、ジャイアントブレファリズマの繊毛列の数は、通常型のそれに比べて増えていない。しかし、口径が大きくなっているにも関わらず、膜板帯の幅が大きくなっていないことから、膜板帯の数が増えていると考えられる。

最も細胞サイズの小さいバクテリアを餌としていたブレファリズマと、小型繊毛虫、小型ブレファリズマを餌として食べたブレファリズマの細胞サイズの比較から、大きい餌を食べると細胞サイズもおおきくなると考えられる。そして、それらのブレファリズマは、細胞サイズが大きくなってからも個体数を増やしていることから、細胞サイズを大きく保ったまま分裂・増殖をしていると考えられる。さらに、それらのブレファリズマの細胞サイズが大きくなったとき、大核の面積も大きくなっていることから、細胞の巨大化には大核の巨大化が関係していると考えられる。そして、細胞の増殖が弱まり、細胞サイズが小さくなっていく(元のサイズに戻る)ところに、大核の面積がもとの大きさに戻ってきたことから、大きな餌が得られなくなると大核の面積が減少し、細胞サイズも減少すると考えられる。しかし、どちらが先に生じるのか、どのようにもとの細胞サイズに戻るのか今回の実験だけでは分からない。最後に、ゾウリムシで培養したブレファリズマの細胞数はほとんど増えず、細胞サイズと大核の面積ともに、巨大化するような変化が見られなかった。また、捕食されるはずのゾウリムシの個体数は、培養日数が多くなっても、減少しているようには感じられなかった(正確なカウントは行っていない)。これらのことから、ゾウリムシはブレファリズマの餌にならな

ったために、細胞サイズが大きくならず、それに伴い大核の面積も大きくならなかったと考えられる。つまりブレファリズマの細胞サイズには餌が大きく影響していると考えられる。

6. まとめと今後の課題

今回の実験より、ジャイアントブレファリズマのできる過程は次のように予想できる。まず、最初に、餌を捕食したブレファリズマは分裂するための準備に入る。そして、大核を倍化させ、新しい口の原基を、既存の口の下部に形成する。分裂準備の整ったブレファリズマはこの後分裂をしてもとのサイズに戻るはずである。しかし、何らかの理由で分裂できずに、口の原基が、もともとあった口と合体してしまう。その結果、大核が倍加させた、細胞サイズの大きい細胞となり、口を形成する膜板帯の数も増えてしまうのではないか。

この仮説を検証するため、大核の巨大化がどの時点で生じるものなのか、その巨大化が分裂する細胞の大核の倍化と同じ過程を経ているのかを調べる必要がある。また、今回の実験では、細胞サイズがもとのサイズに戻ると、大核の面積ももとのサイズに戻るといふ結果を得たが、先にどちらが減少するのかも明らかにできなかった。よって、今後はこの大核の面積と細胞サイズの関係について、より観察間隔を細かくするなど工夫を加え、調べていきたい。

7. 参考文献・サイト

- [1]「ブレファリズマの接合」、春本晃江・杉浦真由美、原生動物学会誌、第36巻(2003)
- [2] http://protist.i.hosei.ac.jp/Protist_menu.html 「原生生物情報サーバー」
- [3] <http://mail2.nara-edu.ac.jp/~masaki/> 「Call Biology Lab.」

8. 謝辞

ブレファリズマの株を分けていただき、培養方法をはじめ色々と助言を戴きました、奈良女子大学理学部生物科学科細胞情報学分野 春本晃江教授、ありがとうございます。また、ご指導いただきました、櫻井昭先生、矢野幸洋先生ありがとうございました。