ブレファリズマの膜形成

４年Ａ組　飯島　麻穂
４年Ｃ組　井上　なずな
指導教諭　櫻井　昭

１．要約

繊毛虫ブレファリズマを飢餓状態にし、光学顕微鏡で撮影を続けていたところ、膜から細胞が抜け出るような現象が確認された。この現象がなぜ生じたのか、それが撮影された環境条件に着目して調べることにした。今回設定した実験条件は高温(37.5℃)、低温(約5℃)、化学薬品(ニュートラルレッド)の３つとした。実験の結果、ニュートラルレッドを用いた実験で細胞から膜がはがれるような現象を確認することが出来た。膜の形成は何らかの刺激から身を守るために出来るのではないかと考えられる。しかし、今回の実験で見られた現象は初めに興味を持った現象とは少し違う。今後も研究を深める必要があると思われる。

キーワード　ブレファリズマ、ニュートラルレッド、細胞膜

２．研究背景と目的

サイエンス研究会生物班では歴代、ジャイアントブレファリズマやシストといったブレファリズマ(図１)の形態変化について研究してきた。今回私たちは、先輩方の研究途中で得られた１枚の写真(図２)に興味を持ち、本研究を開始した。繊毛虫ブレファリズマは、その膜表面に様々な分泌物を蓄えていることが知られている。今回見られた脱皮のような現象も、この膜構造が影響しているのではないかと考え、過去の実験を参考に実験方法を考えていくことにした。先輩方の研究途中で得られた写真には通常見られない膜のようなもの(以下単に「膜」とする)が存在している。この膜が何故発生したのか、どんな成分で構成されているのかを解明することを、本研究の最終目標とする。

３．研究内容

ジャイアントブレファリズマやシストの形態変化には飢餓状態という共通の環境条件がある。しかし、飢餓状態では細胞からの膜の分離は見られなかった。そこで、脱皮のように見える現象が撮影された条件を先輩に伺ったところ、ブレファリズマには強力な光が当てられており、水が非常に少なく蒸発寸前、という過度のストレス状況下だったそうである。では、どのストレスが膜を形成する直接的な原因になったのかを調べようと思い、仮説を立てた。

ブレファリズマに強力な光が当てられていたということから温度の高い状況ならストレス状態になるのではないか。また、逆もストレス状態になるのではないか、と考え高温と低温という条件の実験を行った。

３－１．温度条件における膜の形成の有無

（１）仮説

培養温度よりも高温、保管温度よりも低温の環境下に置かれるとブレファリズマは細胞外に膜を形成する。

（２）実験方法

a) ブレファリズマの培養方法

バクテリア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。

b）細胞の準備

・培養したブレファリズマを質量が同じになるように２本、ないし４本の遠沈管に分け、同じ重さの遠沈管を対称に遠心分離器にセットし、５分間遠心分離する。（1000rpm）

・分離が終わったら、遠沈管の底に集められたブレファリズマを別の容器に移す（以下これを「濃縮ブレファリズマ」と呼ぶ）。

c) 対照実験

①高温

遠心分離器にかけたときの上澄み液を湯煎で温める。この上澄み液300μl と、濃縮ブレファリズマ200μl をマルチプレートに入れ、顕微鏡で観察する。このときの全体の温度は 37.5℃だった。

②低温

用意しておいた濃縮ブレファリズマを、約－20℃の冷凍庫で 10 分間冷やし、500μl をマルチプレートに移して、顕微鏡で観察する。

（３）実験結果

①高温(図３)

ブレファリズマの動きが活発になるだけで、膜の形成は確認できなかった。

②低温(図４)

色素が抜け、動きが通常より遅くなっただけで、膜の形成は確認できなかった。

２つの実験から、温度変化によるストレスではブレファリズマは膜を形成しないことが分かった。そこで私たちは、文献調査をしたところ、「Caupsule Shedding (膜分離様現象)」という文献を発見し、この膜分離が、先輩が確認したものと同様なのではないかと考えた。文献で使用した薬品の中から、入手可能な薬品を選び、以下の追実験を行うことにした。

３－２．薬品添加における膜形成の有無

（１）仮説

文献で見た膜分離は先輩方が発見した現象と同様のものである。

（２）実験方法

ブレファリズマ 500μl に対し、ニュートラルレッド 20μl をマイクロピペットでマルチプレートに入れ、顕微鏡で観察する。

（３）実験結果

赤っぽい色の膜を形成しているブレファリズマを確認した。また、形成した膜から脱皮するように抜け出る様子も観察できた(図５)。

４．考察

ニュートラルレッドの実験のみで膜の形成が見られたことから、膜の形成はなんらかの物理的刺激から身を守るためにできるのではないか、と考える。

次に、ブレファリズマのニュートラルレッドのある成分と反応したのではないかとも考えられる。高温・低温の実験と決定的に違うのは薬品を使用した点だからである。そして膜形成は、低温状態でブレファリズマの色素が抜ける反応とは違うメカニズムなのではないかと考えられる。低温状態の実験では、細胞膜のすぐ内側にある色素胞からブレファリズミンという色素が抜ける反応が観察された。そのことから、低温というストレスが細胞膜に何らかの影響を与えたと考えられる。しかし、低温では、膜の形成は確認されなかった。よって、色素が抜けるのとは違うメカニズムなのではないかと考えた。

そして最後に、当初の興味を持った写真と、今回得られた実験結果の膜は違う現象なのではないかと考えられる。当初の写真で見られたものは、細胞膜のような膜から細胞が抜け出しているように見える。それに対し、今回の実験で得られたものは、細胞内部から何らかの物質が分泌され、膜を形成しているように見えるのである。ここから、私たちが立てた仮説は２つである。

仮説１：細胞膜がニュートラルレッドと反応したのではないか。

ブレファリズマには多くの膜が存在していて、そのうちの数枚までにニュートラルレッドが浸透しはがれたのではないかと考えた(図６)。

仮説２：実験で得られた膜は、ブレファリズマの細胞内にある物質が出たものではないか。

低温の実験で見られた色素が抜けるという現象は、ブレファリズマがもともと持っている色素胞というものがあるからだ。このように、外から刺激を受けることで細胞内の何らかの物質が分泌されたと考えた(図７)。

５．今後の展望

まず、ニュートラルレッドが細胞のどこまで到達するのかを調べようと思う。上記に挙げたように、ニュートラルレッドが細胞表面でとどまるのであれば、形成された膜はニュートラルレッドが細胞表面の物質と反応し、細胞膜が剥がれ落ちたものと考えられ、ニュートラルレッドが細胞内まで到達するのであれば、細胞内でニュートラルレッドと何らかの物質が反応し、それが細胞外に分泌されたと考えられる。

そして今回ニュートラルレッドという薬品で反応が見られたが、ブレファリズマの生息地である池や沼に、薬品そのものがあるとは考えられない。そこで、薬品を使わず、自然界に近い状況下で実験することで、膜の形成が自然界でも起こりうることなのか(物理的刺激によって生じるものなのか)ということを調べたい。

ニュートラルレッドの成分調査を行い、ブレファリズマの生息地である池や沼と共通する成分があるかどうかも調べていきたい。また、共通する成分が多い場合はニュ

ートラルレッド以外の薬品でも実験を行い、
絞り込んでいこうと思う。

６．参考文献

[1]『Caupsule Shedding(膜分離様現象)』,
Chapter Seven

７．謝辞

今回の研究を行うにあたり、櫻井先生には多くのご指導を受けました。また、生物班の先輩である中澤春香先輩にも情報提供をしていただき、より深い研究につなぐことができました。この場で深く感謝致します。

【図表一覧】

図１　通常のブレファリズマ

図２　先輩方の得た写真

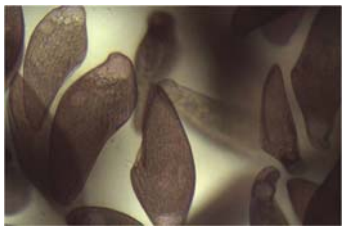

図３　高温実験の結果

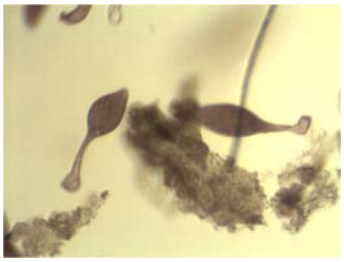

図４　低温実験の結果

図５　ニュートラルレッドの結果

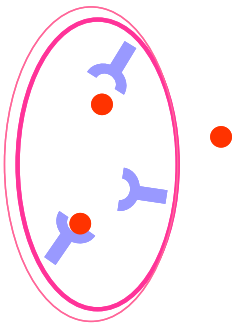

図６　仮説１

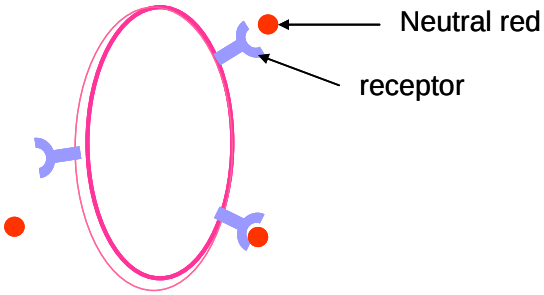

図７　仮説２