細胞サイズの変化の過程

6年A組 中澤 春香 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により、細胞が巨大化することが知られている。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」と呼ぶことにする。

この形態変化の基礎研究においてジャイアントブレファリズマは比率を変えずそのまま巨大化し、大核は二股になっていることがわかっている (2007 東野)。また、餌がない状態にジャイアントブレファリズマを分注すると何らかの過程を経て細胞サイズを小さくすることが観察されている。しかし、それらの形態変化のメカニズムはいまだ明らかにされていない。

そこで、本研究ではジャイアントブレファリズマがどのような細胞なのかを知るため、ジャイアントブレファリズマがどのようにして細胞サイズを小さくするのか、その過程を調べることにした。その結果、ジャイアントブレファリズマは細胞分裂をし、比率を変えずに元の細胞サイズに戻るという傾向がみられた。このことから、ジャイアントブレファリズマは細胞分裂することで細胞サイズを小さくしていることがわかった。

キーワード ブレファリズマ(Blepharisma japonicum)、大核、細胞周期

2. 研究の背景と目的

繊毛虫ブレファリズマは、特定の環境下 (飢餓状態)におかれると共食いすること により、そのまま細胞サイズを巨大化させ る(以下、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)。また、 普通サイズのブレファリズマ(以下、通常 型ブレファリズマとよぶ)に比べ、大核が 二股になり、約2.8倍の大きさになる(2007 東野)。このことから、分裂直前で分裂できなくなった個体が、ジャイアントブレファリズマではないかと考えられる。しかし、 細胞と大核のどちらが先に巨大化しているのかは明らかになっていない。また、生理 的塩類溶液にジャイアントブレファリズマを分注すると、何らかの過程を経て細胞サイズを小さくすることが観察されている。 けれども、どのような過程を経て細胞サイズを小さくさせるのか、明らかになっしていない。そこで、細胞サイズを小さくしている過程を明らかにすることによって、ジャイアントブレファリズマが一体どのではないかと考えた。ジャイアントブレファリズマが再び細胞サイズを小さくする過程をいかと考えた。ジャイアントブレファリズマが再び細胞サイズを小さくする過程を、細胞形態の変化に注目して追うことにした。また、巨大化が細胞サイズの変化を引き起こしているのかどうか、細胞サイズの小型 化と核サイズの変化の関係を調べるために、 細胞サイズと大核の形状の変化を観察した。 本研究の目的は次の通りである。

- ジャイアントブレファリズマの細胞サイズの縮小過程を明らかにする。
- ・ジャイアントブレファリズマの大核が、 細胞サイズを縮小させる過程でどのよう な変化を見せるかを明らかにする。

3. 研究内容

研究I

I-1 仮説

ジャイアントブレファリズマは、そのまま縮むのではなく細胞分裂により細胞サイズを縮小している。

I-2 研究方法

①培養方法

実験材料: Blepharisma japonicum

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した(25°C、10 日間、500ml から 4000ml まで植えついで増やした)。

②観察方法:カウント法とサイズ測定

まずコントロールとして、1000µl ずつ3 回培養液ごと細胞をサンプリングし、光学顕微鏡を用いてデジタルカメラで細胞を撮影した。その後、パソコン画面上で長径・短径・面積のサイズを測定した(測定には画像処理ソフト Scion Image を使用した)。また、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)25枚、計75ホールに500µl ずつ SMB(ブレファリズマの生理的塩類溶液)を分注し

た。そこにジャイアントブレファリズマを1Cell ずつ入れ、25 $^{\circ}$ で保存した。

16 時間後、分注しておいた細胞の個体数に変化があるかカウントし、それぞれ同様に光学顕微鏡を用い、デジタルカメラで細胞を撮影した。その後パソコン画面上で長径・短径・面積のサイズを測定した。以後、同様の操作を 24 時間後まで1時間おきに繰り返した。

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

以下の各グラフの表記はホール内の個体 数の違いである。

1Cell:ホール内の個体が 1Cell 2Cell:ホール内の個体が 2Cell 3Cell:ホール内の個体が 3Cell

4Cell:ホール内の個体が 4Cell

Deth:ホール内の個体が死んでいたもの



図1 細胞個体数の変化

1 ホール内の細胞の個体数の変化の結果である。図 1 は、ブレファリズマ 16 時間後から 17 時間後にかけて 1Cell(ジャイアントブレファリズマ)のホールが急激に減り、2Cell のホールが増えている。また、24 時間後には 4cell のホールが観察される。

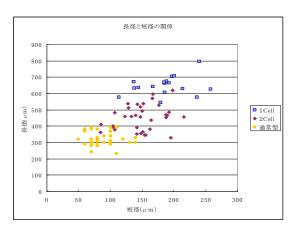


図2 長径と短径の関係

図2は、サンプリングしたブレファリズマの長径と短径の関係である。長径が約300μm 付近のブレファリズマが通常型のブレファリズマ(通常型)であり、長径が約600μm 付近のブレファリズマがジャイアントブレファリズマ(1Cell)である。そのおよそ中間に分布している個体は1ホール内に2個体みられたときのブレファリズマのサイズである(2Cell)。

1Cell (ジャイアントブレファリズマ)、 2Cell、通常型のそれぞれの長径と短径の比 が一直線上に並んでいる。

I-4 考察

結果より、生理的塩類溶液に分注した1ホール中のジャイアントブレファリズマが2Cellになり、細胞サイズを縮小させていたことから、ジャイアントブレファリズマは分裂することによって細胞サイズを縮小していると考えられる。また、図1の細胞個体数の変化より、生理的塩類溶液に入れてから、およそ12~17時間で分裂が行われると考えられる。

また、図2より、分裂した細胞と、ジャイアントブレファリズマの長径と短径の比がほぼ等しいことから、形態を変えること

なく(長径のみ長くなるなどの部分的な変化はなく)分裂によって細胞サイズを縮小させていると考えられる。ジャイアントブレファリズマは分裂するとき、細胞サイズを小さくしただけの形になり、分裂した個体はジャイアントブレファリズマの細胞サイズまで戻らない。

長径と短径のサイズ変化においては、図2より、一度細胞分裂したジャイアントブレファリズマは、分裂前と通常型ブレファリズマの細胞との中間程度の細胞サイズになっているため、ジャイアントブレファリズマは2度の細胞分裂によって通常型ブレファリズマのサイズに戻るのではないかと推測できる。

研究Ⅱ

II-1 仮説

ジャイアントブレファリズマの巨大化し た大核は、細胞サイズの縮小と同様に通常 型ブレファリズマの大核の形態にもどる。

Ⅱ-2 研究方法

研究Iと同様に細胞を培養・観察する。

大核の面積測定

ブレファリズマをカルノア液(酢酸:エタノール=1:6)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した。

Ⅱ-3 結果

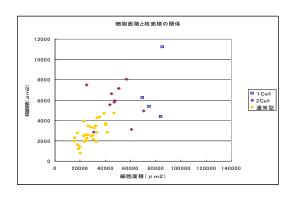


図3 大核と面積の関係

図3は、サンプリングしたブレファリズマの大核、細胞面積の関係を示している。 図2同様、1Cell(ジャイアントブレファリズマ)、2Cell、通常型それぞれの、大核と細胞面積の比が一直線上に並んでいる。

Ⅱ-4 考察

図3の、ジャイアントブレファリズマ (1 Cell) と、ジャイアントブレファリズマが一回細胞分裂した細胞 (2Cell) と、通常サイズのブレファリズマの、大核と細胞面積の比が一直線上に並んでいることから、ジャイアントブレファリズマは、大核と細胞の面積の比を変えることなく細胞サイズを巨大化させ、又、分裂していると考えられる。

しかし、研究Ⅱにおいては細胞固定がうまくいかず、大核のサンプル数が非常に少なくなったため、大核の形状を観察できる満足なデータを得ることが出来なかった。

4. 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 リズマが細胞サイズを縮小させる過程は細 胞分裂によるものだという仮説が実証され た。よってジャイアントブレファリズマは 細胞分裂する能力を持っているとわかった。 今回の実験よりジャイアントブレファリズ マが細胞サイズを小さくするメカニズムの 特徴に、「長径と短径の比を変えないこと」、 および「二回の細胞分裂により通常型の大 きさに戻ること」があると考察できた。

また、ジャイアントブレファリズマは生理的塩類溶液内(餌のない環境)で分裂することができた。では何がジャイアントブレファリズマの大きな細胞サイズを保たせているのだろうか。基礎研究より、分裂直前で分裂できなくなった個体がジャイアントブレファリズマではないかと考えられる(2007 東野)。このことから何らかの物質が細胞分裂を止めているのではないかと考察できる。細胞は、細胞周期のM期に分裂するため、直前のG2期チェックポイント(図5参照)が関わっているのではないだろうか。このG2期チェックポイントを通過出来なかった場合は細胞分裂できない状態に切り替わる。

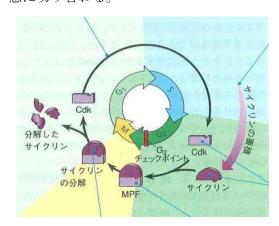


図5 細胞周期の調節にかかわる分子機構

このとき、G2 期チェックポイントに至る までに共食いされたブレファリズマ、また は同様な大きさの餌が細胞分裂を阻害して いる可能性が考えられる。今、細胞分裂に 必要とされるのではないかと研究されている分子が、G2期のジャイアントブレファリズマにおいて、その分子が分裂に十分な量生成されているかどうかを調べることにより、ジャイアントブレファリズマの出来方を明らかにすることができるかもしれない。

また、二股になった大核の形状の変化は、 鮮明な写真を撮ることが出来ず、分裂過程 の大核変化を観察できなかった。大核の観 察において、今後は固定するサンプル数を 増やすことと、細胞を破裂させることなく 固定する工夫が必要である。

次回の実験では、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の工夫を加えジャイアントブレファリズマの形態変化を調べていきたい。

5. 参考文献

- [1]「繊毛中における接合誘導機構の解析」, 春本 晃江
- [2]「キャンベル生物学」, Neil A.Campbell, Jane B.Reece

6. 謝辞

ブレファリズマの株を分けていただき、 培養方法をはじめいろいろとアドバイスを いただきました、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、指 導してくださった櫻井 昭先生、本当にあ りがとうございます。