ブレファリズマのシスト形態

６年Ｃ組　西本　舞
指導教諭　櫻井　昭

１．要約

ブレファリズマは、水田に多く生息している単細胞の繊毛虫である。この生物は、環境が悪化するとシストと呼ばれる休眠状態に変化する。しかし、ブレファリズマのシストについては詳しい研究が成されていなかったため、シストの形態を追及しようと試みた。そして光学顕微鏡・電子顕微鏡などを用いた観察から、シスト形態の一部を明らかにした。また、観察結果をもとに、“シスト化”の過程について、一つの仮説を立てた。

キーワード　　シスト、乾燥、水田、endcyst、ectocyst、コムシスト

２．研究の背景と目的

通常型ブレファリズマとシストでは外形が大きく異なる上に、「シストは乾燥に強い」ことで知られている。実際にシストを乾燥させてみると、シストの表面に細胞壁が形成されているように観察された。乾燥に耐えるために、シストには特殊な膜が形成されているのではないかと考えた。そこで、まずはシストの外形から観察を始め、シストの乾燥に対する耐性と、膜構造の関係を探ることにした。

２－１．　基本事項

(1) ブレファリズマ

赤色色素をもつ単細胞生物で、繊毛虫の一種である。野生では水田や沼地に生息し、環境の悪化によってシストを形成する。その証拠に乾燥した田んぼの稲株には、シストが付着していることが多い。

本校では、500～1000ml フラスコ内で、バクテリアを餌に培養している。

(2) シスト

「原生動物やごく下等な動物がからだの表面に厚い膜をつくり、一時的な休止状態に入ったもの」の総称をシストという。まわりの環境変化に影響されて、シスト化・脱シスト化が誘導されると言われている。

繊毛虫の一種である「コルポーダ」のシストについては研究が進んでいるが、ブレファリズマのシストについては研究報告が少ない。

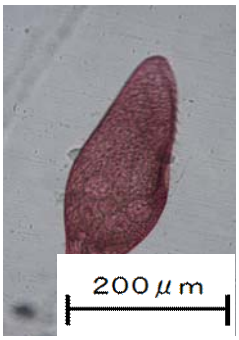

図１　通常型ブレファリズマ

３．研究内容

＜研究Ｉ　細胞外形の変化＞

シスト化における外形の変化を明らかにすべく、光学顕微鏡で観察を行った。

（1）観察方法

① ディプレッションスライド 6well に、それぞれ 1ml の SMB を入れる。

② ①の 6well それぞれに、通常型ブレファリズマを 1cell ずついれ、乾燥しないよう小箱に入れたのち、インキュベーター（15℃）内で保存する。

③ １日おきに、光学顕微鏡で細胞外形を観察する.

（2）観察結果・考察

シスト化の過程は、外形の違いから大きく３つに分類できた。

.・１段階目（図２）

外形から「しずく形」と命名した。細胞質が凝縮を始め、口部は消失していた。繊毛は存在し、回転・前後運動が観察された。

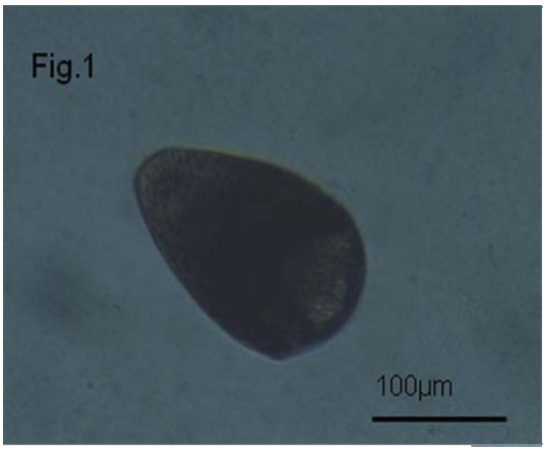

図２　シスト化　１段階目

・２段階目（図３）

細胞質がさらに凝縮して外形が球状に近づいた。繊毛は存在するが、回転運動のみ観察された。

・３段階目（図４）

繊毛が消失して運動は停止した。そして新たな膜が観察された。外側の膜を ectocyst、内側の膜を endcyst と呼ぶ。膜の間の空間は時間とともに広がるが、ある地点で止まった。結果、はっきりと２重の膜に分かれて見えた。

図３　シスト化　２段階目

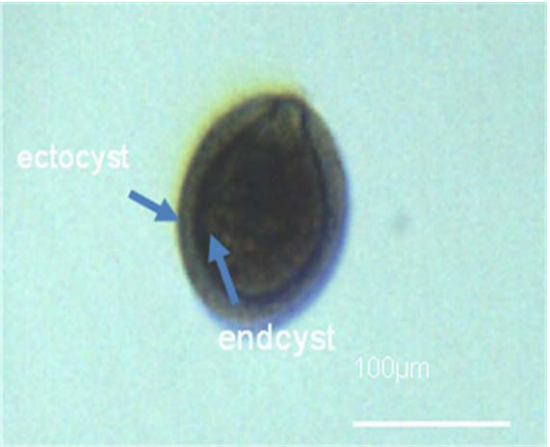

図４　シスト化　３段階目

＜観察Ⅱ　シストの大核・小核の形＞

観察Ⅰにおいて、外形に大きな変化が生じたことから、遺伝子レベルで変化が起きているのではないかと考え、以下の観察を行った.

（1）仮説

シストの大核には凝縮が生じ、シスト固有の遺伝子が活性化されている。

（2）観察方法

通常型ブレファリズマとシストの固定・染色は、以下の手順で、それぞれ容器を分けて行った。

●細胞の固定

① 細胞を遠心機で集める

② 細胞を固定させるプレパラートをアルコール消毒する

③ マイクロピペット（200μl）を 35μl に設定し、①の細胞を顕微鏡で見ながら確実に吸い取る

④ ②のプレパラートの中央にのせる

⑤ カルノア液を１、２滴落とす

⑥ 乾燥させる

※カルノア液で固定後、1 ヶ月以内に DAPI 染色を行う。

●脱色

（ブレファリズマの赤色色素があると、DAPI 染色時に観察しにくいため）

① 70%エタノールを容器にいれる

② 固定した細胞がついたプレパラートを容器内に並べる

③ プレパラート全体が浸るまで①を注ぎ通常型ブレは 1overnight、シストは 3 overnight おく。

●DAPI 染色

① エタノールから取り出したプレレパラートを約 10 分間乾燥させる

② 顕微鏡で細胞のある場所を確認した後、プレパラート 1 枚につき約 10μl の DAPI をかける

③ ②の上からカバーグラスをかけ、その縁にマニキュアを塗って密封する

④ アルミホイルをかける

※完成したプレパラートを、蛍光顕微鏡で観察する。

（３）結果

シストの大核は折りたたまれた状態で観察された（図５，６）。小核に変化は見られなかった。

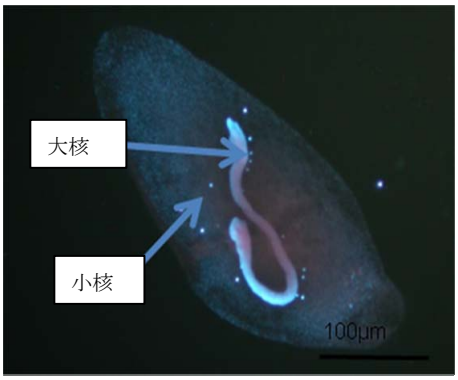

図５　通常型ブレファリズマの大核と小核

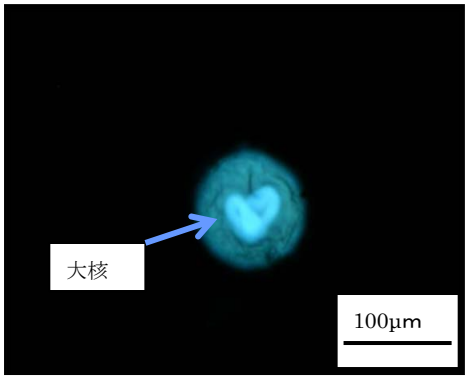

図６　シスト化したブレファリズマの大核

（４）考察

シスト化の過程で著しい細胞質の凝縮がおこるため、大核もそれに従って折りたたまれたと考えられる。しかし、平面図では核サイズを詳しく検証できないため、核の凝縮が生じているかどうかの確認はできなかった。

＜観察Ⅲ　細胞小器官＞

膜構造を調べるため電子顕微鏡でさらに詳しい観察を行った。

（１）観察方法

●細胞固定

① 集めた試料をガラスチューブにいれ、水位を 500μl に合わせる

② サンプルをドラフトに持っていき、グルタルアルデヒド固定液を 500μl 加える

③ ときどき混ぜながら、30 分放置する

④　先を細くしたプラスチックピペットで上清を吸い取る
⑤　リンス液を 500μl 加え、混ぜる
⑥　細胞が沈殿した後、上清を吸い取る
⑦　オスミウム固定液を 500μl 加える
⑧　時々混ぜながら、30 分放置する
⑨　細胞が沈殿した後、上清を吸い取る
⑩　蒸留水を 500μl 加えて混ぜる
⑪　細胞が沈澱した後、上清を吸い取る
（ここまでドラフト内で行う）

●脱水・包埋

①　チューブに 50%エタノールを 1000μl 程度加える
②　時々混ぜながら、20 分間放置する
③　先を細くしたプラスチックピペットで回収する
④　70%, 90%, 95%, 99%, 100%エタノールについても、①～③と同様に置換を繰り返す。

※SEM（走査型）試料は 90%エタノールの段階でストップし、冷蔵庫に保存する
※TEM（透過型）試料は 100%エタノールの置換を２回繰り返す
（以下 TEM 試料について）

⑤　試料をエッペンチューブに移し、100%エタノールを 500μl える
⑥　サンプルをドラフトに持っていき Sppur 樹脂を加え全量を 1000μl にする
⑦　軽く混ぜた後、冷蔵庫で 1overnight おく
⑧　遠心機にかける
⑨　ドラフト内で、上清を半量吸い取る
⑩　新しい Spurr 樹脂を加えて全量 1000μl とする
⑪　15 分置きにボルテックスで攪拌しながら１時間放置する
⑫　⑧～⑪の作業をもう一度繰り返す
⑬　遠心機にかける
⑭　ドラフト内で上清を全量吸い取る
⑮　新しい Spurr 樹脂を２、３滴加える
⑯　ビームカプセルに細胞懸濁液を移す
⑰　遠心機にかけて、カプセルの底に平均的に液を沈ませる
⑱　ドラフト内で、カプセルの９分目まで Spurr 樹脂を加える
⑲　重合オーブンに入れ、70℃で８時間重合する

●観察

・SEM 試料

①　99%, 100%（２回）エタノールでの置換を、前述の通りに行う
②　amyl acetate を 1ml 加える
③　軽く攪拌し、５分間放置する
④　上清を半量捨てる
⑤　新しい amyl acetate を２倍量加える
⑥　軽く攪拌し、20 分間放置する
⑦　上清を全量捨てる
⑧　新しい amyl acetate を 1ml 加える
⑨　軽く攪拌し、20 分間放置する
⑩　上清を全量捨てる
⑪　⑧～⑩を２回繰り返す
⑫　試料を臨界点乾燥器にかける
⑬　試料をイオンスタッパーコーティング処理する
⑭　走査型電子顕微鏡に試料をセットし観察する

・SEM 試料

①　重合後の試料をカプセルから取り出す
②　特殊カッターでスライスし、超薄切片をつくる
③　②を 3%ウラン水溶液とクエン酸鉛染

色液で染色する

④　試料を透過型電子顕微鏡にセットし観察する

（２）観察結果

試料には、通常型ブレファリズマとシストの混合液を用いたが、結果は別に記す。

[通常型ブレファリズマ]

・SEM

表面はなだらかで、無数の小さな穴があるように見えた(図７)。

・TEM

細胞の表面から、フィラメント状の物質（＝コムシスト）が分泌されていた(図８)。

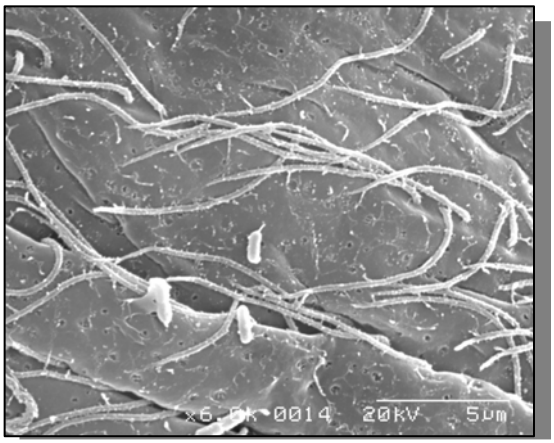

図７　通常型ブレファリズマの細胞表面（SEM）

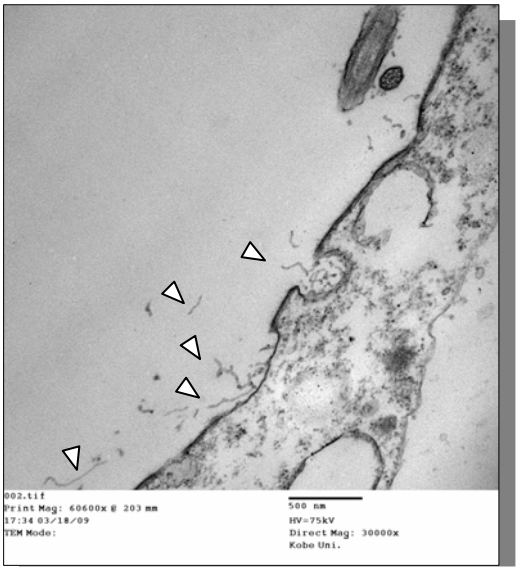

図８　通常型ブレファリズマの細胞表面（TEM）

[シスト]

・SEM

膜の表面が網目状の構造をしているように観察された。繊毛はなく、バクテリアが多く付着していた(図９)。

・TEM

２層の膜(ectcyst, endcyst)に分かれて見えた(図 10)。細胞の内部から分泌物が放出されている(図 11)。

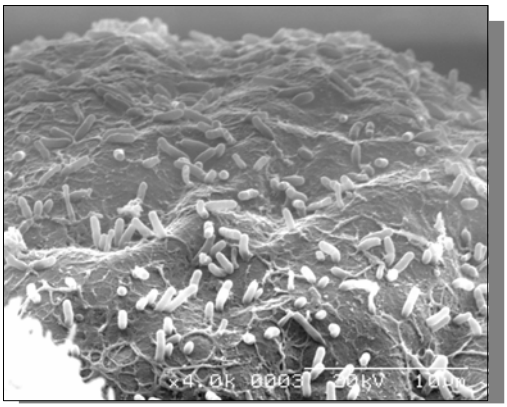

図９　シストの細胞表面（SEM）

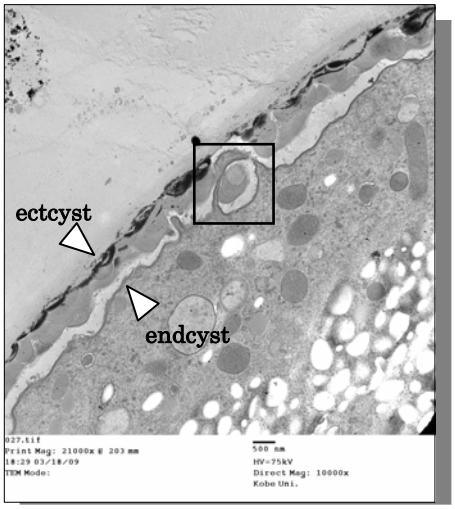

図 10　シストの細胞表面（TEM）

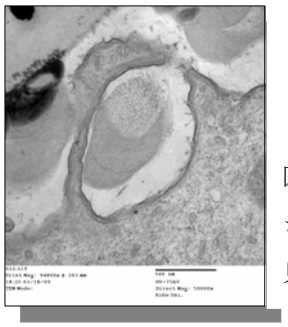

図 11
シストの細胞表面に見られる分泌胞

（３）考察

観察した細胞の中には、実際にシスト化した細胞も多数見られたことから、観察した通常型ブレファリズマはシスト化の準備段階にあった可能性が比較的高いと言える。こう考えると、コムシストはシスト形成に深く関係する物質であると考えられる。

シスト表面にはバクテリアが付着していたことから、シストの膜には粘性があると考えられる。

また、外形観察で観察されたシストの新しい膜は、細胞内部からの分泌物によって徐々に形成されたものと推測される。

４．まとめ

ブレファリズマはシスト化に時間がかかるため、リアルタイムでの観察はできなかった。よって立証はできないが、観察結果よりシスト化の過程につい以下の①～⑤の仮説をたてた。

①環境の悪化を感知する

②通常型ブレファリズマの細胞質が凝縮を始め、細胞表面から粘性のあるコムシストが放出される

② 外形が球状に変化し、コムシストが繊毛や細胞膜に絡まる

③ 繊毛の動きが妨げられ、次第に運動は停止に向かう

④ 繊毛が消失する（基部はそのまま残る）

⑤細胞内部からシストの膜の構成物質が分泌され、endcyst と ectocyst の２層にはっきりと分かれた状態になる

はっきりと分かったことは、「ブレファリズマのシストは２重膜構造をもつ」ことである。ブレファリズマが主に生息する田んぼは、季節によって水の有無が決まっている。シストが特殊な膜構造を持つことで、長期間の乾燥を乗り切り、子孫繁栄に繋がったのではないか。

また、今回観察した *japonicum* 以外の種や生息地域の異なるブレファリズマのシスト形態を比較すると、違いがみられる可能性もある。

５．参考文献

[1]「ENCYSTMENT AND EXCYSTMENT」

[2]「ENCYSTMENT-SPESIFIC *m*RNA IS ACCUMULATE CYSTS OF THE CILIATE」

６．謝辞

貴重な時間を割いて協力して下さった奈良女子大学大学院 春本晃江教授、神戸大学理学部 州崎敏伸教授には深く感謝申し上げます。また、今回の観察を進めるにあたって、櫻井先生に多大なご指導を賜りました。誠にありがとうございました。