ブレファリズマの脱シスト化

６年Ｂ組　山村梨絵
６年Ｃ組　梅﨑千里
指導教諭　櫻井　昭

１．要約

繊毛虫ブレファリズマなどの原生動物は環境が悪化すると外環境から身を守るためにシストと呼ばれる休眠状態になる。その仕組みを探るためにシスト化と脱シスト化の環境条件について調べた。

キーワード　　ブレファリズマ（*Blepharisma japonicam*）、シスト

２．研究の背景と目的

繊毛虫のブレファリズマは、水田などの水中に生息しており、乾燥に弱い。しかし、緩やかな周囲の環境の変化を感じて、乾燥に強い「シスト」という形態をとり、乾田でも生育し続けている。ブレファリズマの環境に対する形態変化の仕組みに興味を持ち、調べることにした。研究をするに当たり、奈良女子大学理学部生物科学科の春本晃江教授から、ブレファリズマの株（*B.Japonicum*）を分けていただいた。また、自ら水田より野生のブレファリズマを採取し、単離培養をすることにより、自然界のブレファリズマについても調べてみることにした。

ブレファリズマのシスト化では、細胞膜の表面に分泌された膜や壁が見られる用になり、一時的な休止状態になっていくことが分かっている（2009　西本）。では、ブレファリズマは何を感じ取ってシスト化するのであろうか。外液が及ぼすシスト化への影響と、温度、密度によるシスト化への影響を調べてみることにした。また、シストは環境条件が整うと、再び通常形態のブレファリズマに戻る。しかし、この環境も詳しく分かっていない。そこで、脱シストを誘導する環境についても調べてみることにした。

なお、本研究では一時的な休止状態になることを「シスト化」、休止状態からもとにもどることを「脱シスト化」と呼ぶことにする。

３．研究内容

＜研究Ｉ　シスト化と温度＞

通常ブレファリズマは、27℃で培養している。しかし、長期保存するときには、15℃に移す。すると、シスト形態の個体が見られるようになる。そこで、温度がシスト化に影響しているのではないかと考えた。

(1) 仮説

通常培養している 25℃よりも、低い温度（15℃）に置いておくと、シスト化が誘導される。

(2) 実験方法

● ブレファリズマの培養方法

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。

● 実験方法

① 奈良女子大学から頂いたブレファリズマの株(*B.Japonicum*)を培養する。

② ブレファリズマを 1cell ずつ、SMB（繊毛虫用生理的塩類溶液）に移す。

③ ②を 15℃と 25℃に設定したインキュベーターの中に、それぞれ静置する。

④ ③のブレファリズマを継続観察し、通常型（通常のブレファリズマの形態）、とシストの個体数変化をカウントする。

(3) 結果と考察

結果は、図１のようになった。15℃に静置しておいたブレファリズマの通常型の個体数は、増加しある地点で減少する。その通常型の個体数が減少する地点で、シストの数が増えることから、通常型の個体数が減った分シストになっていることが分かった。また、25℃に静置しておいたブレファリズマの通常型の個体数は、増加し続けてシストは見られなかった。以上より、15℃の方が 25℃よりもシスト化を誘導しやすい。ほぼ仮説どおりであった。

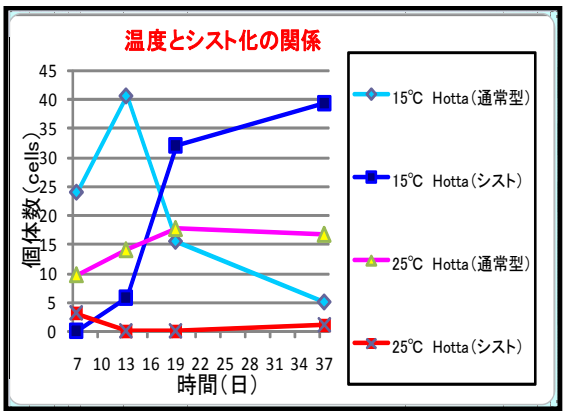

図１　温度とシスト化の関係

＜研究Ⅱ　シスト化と細胞密度＞

研究Ⅰにおいて、ブレファリズマを 1cell ずつ SMB へ移していくと、高密度で SMB へ移して培養するより、シスト化した個体が早く見られるようになった。そこで、細胞密度がシスト化に影響しているのではないかと考えた。

(1) 仮説

細胞密度が小さいと、シスト化され易い。

(2) 実験方法

① ブレファリズマの細胞密度を 5cells/ml、10cells/ml、100cells/ml に揃える。

② 温度を５℃、15℃、25℃に設定したインキュベーターの中に静置し全体におけるシストの割合をグラフ化する。

(1) 結果と考察

結果は、図２のようになった。５℃に静置しておいたブレファリズマは、どの細胞密度でも研究Ⅰの実験で、シスト化がみられ始めた７日目よりも早い、６日目までにシスト化が見られた。しかし、15℃、27℃に静置しておいたブレファリズマは、どの細胞密度でも、６日目までにシスト化が見られなかった。以上のことよりシスト化は、あまり細胞密度に依存せず、温度に依存することが分かった。

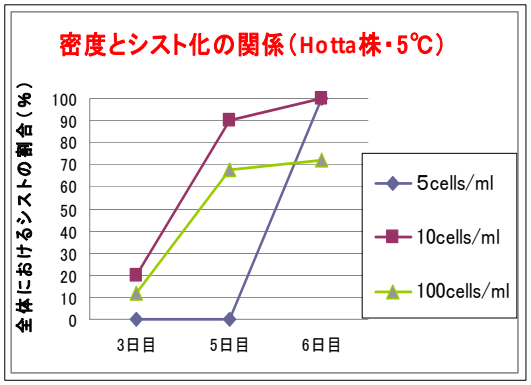

図２　密度とシスト化の関係(5℃)

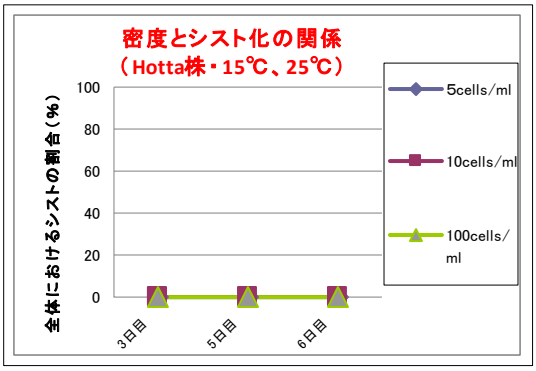

図３　密度とシスト化の関係(15℃、25℃)

＜研究Ⅲ　脱シスト化を誘導する環境＞

15℃で長期保存していたブレファリズマを、25 度のレタス培養液に植え継ぎすると、シストの状態のブレファリズマはいなくなる。このことから、低温、飢餓状態という環境を取り除くことが、脱シスト化につながると考えられる。そこで、脱シスト化にはレタス培養液の何が、ブレファリズマに作用するのか調べることにした。

(1) 仮説

レタス培養液にバクテリアを繁殖させた条件で、最もブレファリズマの脱シスト化が誘導される。

(2) 実験方法

① 奈良女子大学から頂いたブレファリズマの Hotta 株(*B.Japonicum*)と、自分たちで水田から採取し、単離培養に成功した株(*Blepharisma.sp*)をそれぞれ培養する。

② シスト化したブレファリズマを遠心機で収集する。

③ 温度 25℃、密度 5cells/ml にそろえる。

④ ③の外液のみ換えて、脱シスト化の個体数の変化を調べる。

外液は以下の条件にして観察した。

・SMB(SyntheticMediu for *Blepharisma*)

・レタス抽出液

・レタス抽出液＋バクテリア

・レタス抽出液＋バクテリア＋SolutionA

・稲抽出液＋バクテリア

・稲抽出液

・SMB＋シカの糞

※ SMB

NaCl(1.5mM),KCl(0.05mM),$CaCl_2$(0.4mM),$MgCl_2$(0.05mM),$MgSO_4$(0.05mM)

※SolutionA

NaCl,KCl,$CaCl_2$・$2H_20$,$MgCl_2$・$6H_2O$,$MgSO_4$・$7H_2O$

(3) 結果と考察

表１のような結果が得られた。レタス抽出液のみでは脱シストせず、バクテリアを含んだレタス抽出液と、稲抽出液では脱シストしていた。また、どの外液においても100%脱シストすることはなく、個体によって脱シストに要する時間は異なっていた。

Hotta株	
レタス抽出液	－
レタス抽出液＋バクテリア	＋＋
レタス抽出液＋SolutionA＋バクテリア	＋＋＋
イネ抽出液	－
イネ抽出液＋バクテリア	＋
SMB	－
SMB＋牛乳	－
SMB＋シカのフン	＋＋＋

表１　外液に対する脱シスト化

－：脱シスト化しない、＋：１cell 脱シスト化した、＋＋：過半数の個体が脱シスト化した、＋＋＋：全て脱シスト化した。

脱シスト後の個体数の変化では、図４のような結果が得られた。シカの糞＋バクテリアでは脱シスト後分裂せず、バクテリア入りのレタス培養液では分裂している。以上のことから、脱シスト化には動物性成分

と植物性成分の両方が必要であり、脱シスト化した後の細胞分裂には、餌（バクテリア）が必要ではないかと考えられる。

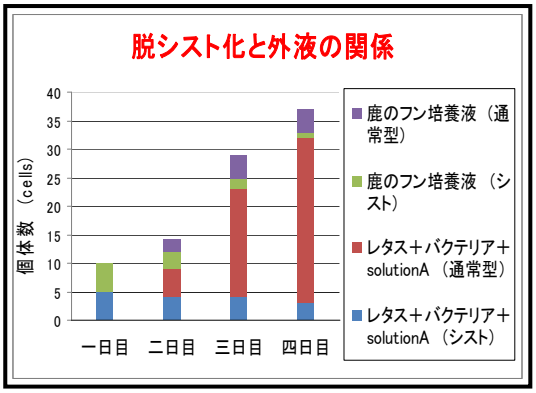

図４　脱シスト化と外液の関係

４．考察

以上の研究からシスト化には温度が影響していて、脱シスト化にはバクテリアが必要であることが分かった。ブレファリズマが生息する水田においてもバクテリアが存在するので、湿田においても温度が高温(25℃)に保たれていると脱シスト化できることが予想される。ブレファリズマは、水田という環境の変化(低温、乾燥など)の多い場所に生息するためにシストと呼ばれる休眠状態になることによって生き延びている。このことから、ブレファリズマは水田という環境に適していったため「種の保存」という点で水田は適していると考えられる。

５．まとめと今後の課題

現在報告されている繊毛虫コールポーダのシストはかなり小さく軽いため、風によって遠くへ運ばれることもあるが、これに対してブレファリズマのシストは乾田の稲株にしっかりと付着しているため、遠くへ飛ばされる可能性は非常に低い。そのためブレファリズマはその土地固有であると考えられるのではないか。つまり様々な地域の田から稲株を採取し、地域別にブレファリズマを調べることによって、ブレファリズマのシストの脱シスト化の条件についての地域差が見られるかもしれない。

６．参考文献

[1] 「繊毛虫コルポーダのシスト形成・脱シスト誘導因子」，高知大学
[2] ENCYSTMENT AND EXCYSTMENT
[3] CAPSULE SHEDDING

７．謝辞

奈良女子大学の春本晃江教授、神戸大学理学部の洲崎敏伸教授、そして本校の櫻井昭先生には助言、ご指導をいただきました。諸先生方、大変ありがとうございました。

・