

# ブレファリズマの膜形成反応についての研究

5年B組 井上 なずな  
指導教諭 櫻井 昭

## 1. 要約

昨年から引き続き、ブレファリズマの膜形成についての研究を行った。前研究においてはブレファリズマに膜形成を誘導する薬品を発見した。今回はその追実験と、新たに他の薬品を使用し膜形成が誘導される時の条件を探る実験を行った。今回はその過程と成果について報告する。

キーワード マルチプレート、遠心分離機、ニュートラルレッド、サフラニン、食紅、メチルグリーンピロニン

## 2. 研究の背景と目的

ブレファリズマは、ストレス付加条件下で膜状のものを形成することが知られている。これまでの研究で、ブレファリズマにニュートラルレッドを加えると膜形成が生じることを確認した。ニュートラルレッドで確認できたのは粘液状の膜だったが、それとは別にカプセル状の膜をブレファリズマが形成する現象も観察されている。そこで、今回はニュートラルレッドを使った追実験を行うことで、粘液状の膜形成はカプセル状の膜形成と同じ現象なのかを確かめる。さらに、なぜニュートラルレッドが膜形成を引き起こすのか、他の薬品を使って実験を行い、その共通点について考察する。上記2つを本研究の目的とし、新たな薬品として、サフラニンと食紅を使用することとした。ニュートラルレッドと似た特性(赤くて細胞を固定しない)を持つものならば膜形成を引き起こすのではないかと考えたためである。生物の実験でよく使用される、

赤い染色液の酢酸オルセインは細胞を固定してしまうため除外した。

## 3. 研究内容

### <実験の準備>

実験条件を常に同じにするために、実験に用いるブレファリズマの密度を揃えた。ブレファリズマの培養液を質量が同じになるように2本、ないし4本の遠沈管にわけ、1000 rpm で5分間遠心分離機にかける。その後フィルターに通して、溶液中に浮遊するゴミを取り除く。これを濃縮ブレファリズマ(密度は200 $\mu$ l中127匹)と呼ぶことにする。マルチプレートに濃縮ブレファリズマ500 $\mu$ lをいれ、実験に使用した。

### <実験 I > 赤色色素に対するブレファリズマの膜形成実験

ニュートラルレッドが膜形成反応を引き起こすか追実験を行い、またニュートラルレッドに似た性質を持つ薬品を使い、その

物質に対する反応を見る。各薬品の濃度は前回の研究で使用した、0.1%のニュートラルレッドを基準とした。

#### ①ニュートラルレッド

これまでに膜形成を引き起こすことがわかっているニュートラルレッドの確認実験を行った。準備した濃縮ブレファリズマに0.1%ニュートラルレッドを20 $\mu$ l加えたものを顕微鏡で観察した。その結果、膜形成が確認できた(図1)。それに加え、自身が作った膜から抜け出そうともがいているブレファリズマを観察できた(図2)。また、すでに本体がぬけでた後と思われる抜け殻の膜も発見した(図3)。抜け殻には上部にやぶれた後があり、やはりブレファリズマは膜を作った後に自分で膜を破って外に抜け出していると思われる。

#### ②サフラニン

濃縮ブレファリズマに0.5%サフラニン溶液を20 $\mu$ l加えたところ、サフラニンが濃すぎて観察することができなかった。そこで10 $\mu$ lに変更したところ観察することができ、ブレファリズマは細胞壁が破れ中身が流出したようになり、すべて死んでしまった(図4)。

#### ③食紅

食紅0.01gに対して水を100 $\mu$ l加え、溶液を作った。この食紅溶液20 $\mu$ lを、濃縮ブレファリズマに加えて顕微鏡で観察した。食紅は大きめの赤い粒子のようにみえた。ブレファリズマは食紅の粒子のなかで特に問題なく活動していた(図5)。

#### ④まとめ

サフラニンに関してはほとんどの個体が死んでしまい、食紅はブレファリズマになんの影響も与えていそうにないという結果を得た。ここから、細胞膜を通り抜けることが可能な物質がブレファリズマの膜形成に影響を与えるのではないかという仮説を立てた。メチルグリーンピロニンという染色液は細胞内部にあるRNAとDNAを染色するため、この条件に見合うのではと考え、これを使って実験を行うことにした。

#### <実験Ⅱ>核(酸)染色液に対するブレファリズマの膜形成実験

核染色液であるメチルグリーンピロニンが膜形成反応を引き起こすかどうか確かめるための実験を行った。結果、ニュートラルレッドで確認したものと類似の膜形成反応が見られた。また、膜を抜け出して泳いでいく個体を確認し動画に収めることができた(図6および図7)。この実験でメチルグリーンピロニンが膜形成を引き起こすことが確認できた。

#### 4. 考察

今回の実験では以下のことがわかった。  
①食紅は膜形成を引き起こさない、②ニュートラルレッドとメチルグリーンピロニンはブレファリズマの膜形成を引き起こす。さらに、ニュートラルレッドとメチルグリーンピロニンの共通点として、核(DNA)を染色する染色液であることが挙げられる。  
ブレファリズマが膜を形成する条件として、高密度の粒子が細胞外にあることなく、それらの粒子が細胞内に入り込もうとすることが必要である。では、どのような

性質をもつ物質が細胞に入り込むことができるのだろうか。私は、(i)小さい粒子である、(ii)脂質と親和性がある、という性質を考えた。これは、実験 I の結果から立てた仮説とも一致している。ブレファリズマは、核を染色する染色液の粒子を体内に入れないように、膜に吸着させてその場から抜け出すという方法で身を守っているのではないだろうか。このことに加えて、食紅が膜形成を引き起こさなかったという結果から、ブレファリズマが膜形成反応を起こすのは、細胞膜を通り抜けられるほどの小さな粒子の物質か、細胞膜の主成分である脂質と親和性がある物質だと推測できる。

しかし、この仮説には疑問も残る。今回の実験ではサフラニンが膜形成を引き起こさなかった。サフラニンもニュートラルレッドやメチルグリーンピロニンと同様に核を染色する染色液であるのに、なぜこのような結果になったのだろうか。

## 5. 今後の課題

今後の課題として、サフラニンで膜形成が起こらなかった理由を突き止めたいと思う。ここで、濃度が濃すぎたということが推測できる。実験ではニュートラルレッドは濃度 0.1%のものを、サフラニンは 0.5%のものをニュートラルレッドのちょうど半量使用した。観察中もサフラニンは他の薬品と比べて濃いように感じ、ブレファリズマもすぐに死んでしまっていた。また、サフラニンはアミノ基をもつため塩基性である(図 8 参照)。塩基性の物質は細胞に害をなすため、サフラニンは膜形成を引き起こした他の薬品よりも毒性が強いということも考えられる。次は、より濃度の低いもので

試すなどし、その結果を考察していきたい。また、物質を膜に吸着させてその場から抜け出すという仮説が正しいかどうか確かめたい。そのために、赤以外の色の薬品を使用して実験を重ねる。赤い薬品を加えても、膜についている赤色が薬品に由来するものなのか、ブレファリズマが持っている赤色素のブレファリズミンなのかはわからないからだ。さらに、膜形成を誘導する物質の条件が、小さい粒子であることなのか、脂質と親和性を持つことなのかを突き止めたい。この2つの条件に見合う物質について、それぞれ実験を行っていく。これらを明確にできれば、膜形成の仕組みが解明されると考える。

## 6. 参考

<http://www.sigmaaldrich.com/japan/product-catalog-jp.html>

## 7. 謝辞

この研究に関して櫻井先生に多くのご指導をいただきました。深く感謝します。

## 8. 画像

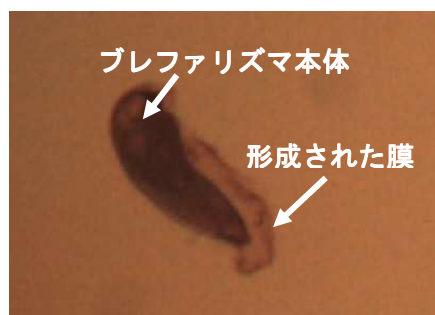


図1 ニュートラルレッド(膜形成)

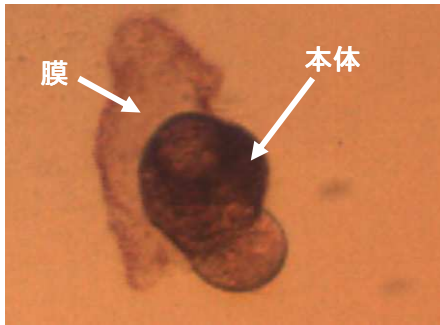


図2 ニュートラルレッド  
(抜け出そうとしている。)

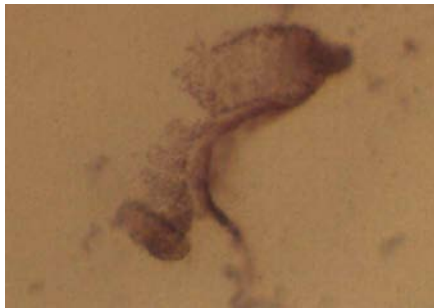


図3 ニュートラルレッド(抜け殻)

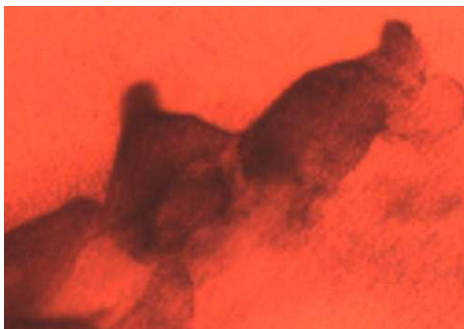


図4 サフラニン(死亡)



図5 食紅

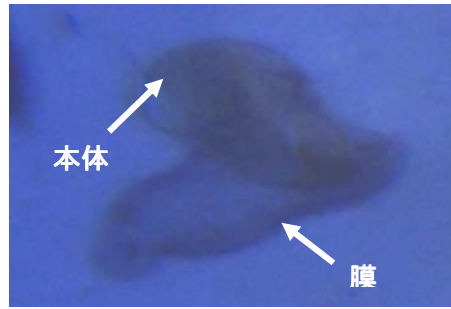


図6 メチルグリーンピロニン



図7 チルグリーンピロニン(抜け殻)

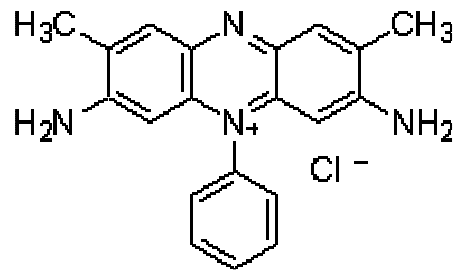


図8 サフラニン