

# ミドリゾウリムシと光の関係性についての研究

小磯 太楊 沖本 彩希 黒井 直登 田中 柚妃 渡邊 啓仁  
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年

ミドリゾウリムシ(*Paramecium bursaria*)の細胞質内には約700個のクロレラ(*Chlorella*)が共生しており、細胞内共生説の研究材料として使用されている。しかし、ミドリゾウリムシについてはまだ解明されていないことが多々あるため、本研究では光とミドリゾウリムシの生存との関係性を明らかにすることを目的として、照度とミドリゾウリムシの生存個体数の関係を調べた。研究の結果、ミドリゾウリムシはクロレラから得られる光合成産物のみでも長期間の生存が可能であり、さらに照度が大きくなるにつれて増加率も大きくなることがわかった。

## 1. はじめに

ミドリゾウリムシ(*Paramecium bursaria*)の細胞質内には700個のクロレラ(*Chlorella*)が共生しており、細胞内共生説の研究材料として近年注目されている。ミドリゾウリムシとクロレラの共生においては光の条件が重要であり、恒暗下ではミドリゾウリムシが個体内で共生しているクロレラを体外に放出し白化(個体そのものが白くなる)状態になることが確認されている(図2)。しかしミドリゾウリムシの生態についてはまだ明らかになっていないことは多い。本研究では今後の科学研究において重要な研究材料となるであろうミドリゾウリムシについて、クロレラの共生と光との関係性に着目して研究を進めた。



図1 ミドリゾウリムシ



図2 白化状態

## 2. 目的と仮説

### 2.1. 目的

ミドリゾウリムシとクロレラの共生は相利共生である。ミドリゾウリムシはクロレラの光合成によって生成された光合成産物を得ており、クロレラはミドリゾウリムシによってクロレラウイルスによる細胞破壊から保護されている。これによってミドリゾウリムシはエサがない環境でも栄養を得ることが可能である。しかし光が当たらないところではクロレラの光合成が停止するため、ミドリゾウリムシにとっての共生利益がなくなり相利共生の関係が崩れてしまう。そのため、ミドリゾウリムシは先述したようにクロレラを体外に放出して白化状態になる。白化状態になったミドリゾウリムシは、自ら摂取できる

エサがない場合栄養を得ることができずに生存が不可能となる。先行研究では白化状態については述べられているが、ミドリゾウリムシがクロレラから得られる光合成産物のみで生存することができるかどうかは述べられていない。本研究では光の要素のうちの照度に着目し、ミドリゾウリムシの個体数の増減と照度の関係を推定することを目的とする。当初は光の条件として照度、波長の2つの要素を用いようと考えていたが、研究期間の都合上今回は照度に絞って研究した。

### 2.2. 仮説

本研究では、ミドリゾウリムシはクロレラの光合成産物のみで生存できることを第1の仮説とした。また、光量が多いほどクロレラの光合成が盛んに行われるようになるため、ミドリゾウリムシの生存率は高くなると考えられる。さらに、ミドリゾウリムシは池や沼などに生息しているため、水の汚れの影響などでミドリゾウリムシに届く光の照度は小さくなると思われる。以上の理由から、ミドリゾウリムシの生存個体数は照度の大きさと正の相関関係を持つが、クロレラの光合成においては比較的小さい照度にこれ以上の光を当てても光合成を行わない点である光飽和点があるということを第2の仮説とした。

## 3. 準備

### 3.1. 培養方法

温度 20℃一定のインキュベーター内で、クロロゴニウム(*Chlorogonium*)をエサ、ミネラルウォーターを培地として十分な光量下においてシャーレ内でミドリゾウリムシを培養した。またエサとなるクロロゴニウムは酵母エキス 4g、酢酸ナトリウム 1gを脱イオン水 1000mlで希釈したものを培地として同じくインキュベーター内で培養した。

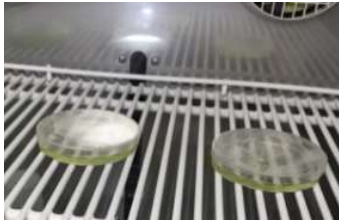


図 3 ミドリゾウリムシの培養

### 3.2. ミドリゾウリムシの培地との分離方法

培養しているシャーレにはエサが入っているため、ミドリゾウリムシを実験で使用する際にはエサのある状態からエサのない状態にする必要がある。遠心分離によってエサとミドリゾウリムシを分離したが、回転速度 (rpm) が大きすぎるとミドリゾウリムシ自体が潰れてしまうため、手回し遠心機を使用し回転速度を調節した。また、クロロゴニウムの分離は遠心分離機 (図 4) で 1500rpm、3min の遠心を行って培地成分と分離し、ミドリゾウリムシにエサとして与えた。



図 4 遠心分離機

## 4. 実験 I

### 4.1. 目的

光とエサの有無によるミドリゾウリムシの個体数の増減を調べる。

### 4.2. 方法

はじめにミドリゾウリムシの個体数の増減が光の有無によって変化するのかを調べた。ミドリゾウリムシを分離したものと純水をセルの中に入れ、それぞれの条件下で数日間経過したのちそのセルから 0.3ml 取り出しその中にある全てのミドリゾウリムシの個体数を位相差顕微鏡 (図 6) で調べた。条件は光ありの場合は特定の光源 (測定値: 照度 530 lx、光度 48 fc、光合成量子束密度 9.3 ppfd) を用い、光なしの場合はセルをアルミホイルで完全に覆って 0 lx、0 fc、0 ppfd とした。また、エサありの場合はクロロゴニウム抽出液 0.4 ml をセルに加えた。



図 5 観察画像の例



図 6 位相差顕微鏡

表 1 実験 I の条件

	光	エサ
①530 lx エサなし	有	無
②0 lx エサあり	無	有
③0 lx エサなし	無	無

### 4.3. 結果

実験室を利用できる曜日の都合上、経過を観察する日の間隔が異なっている。そのため、表ではデータが取れなかったところを「-」と表記している。これは実験 I だけでなく実験 II でも同様である。

個体数の変化と照度との関係を比較するために、観察開始時点 (0日目) の個体数を 1 としたときの増加の割合を増加率と定義した。

表 2 実験 I の個体数の経過日数と照度との関係

記号と照度 \ 経過日数 (日)	0	3	4	7	10	11	13
①530 lx エサなし	12	16	-	39	24	-	34
②0 lx エサあり	132	-	317	348	-	587	-
③0 lx エサなし	57	-	26	24	-	19	-

表 3 実験 I の増加率の経過日数と照度との関係

記号と照度 \ 経過日数 (日)	0	3	4	7	10	11	13
①530 lx エサなし	1.00	1.33	-	3.25	2.00	-	2.83
②0 lx エサあり	1.00	-	2.40	2.64	-	4.45	-
③0 lx エサなし	1.00	-	0.46	0.42	-	0.33	-

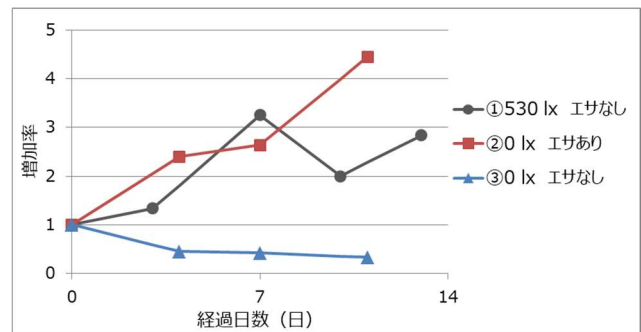


図 7 実験 I の増加率の経過日数と照度との関係

図 7 から分かるように、①530 lx エサなしと②0 lx エサありでは個体数は増加傾向にあった。一方で、

③0 lx エサなしは、①530 lx エサなしと比較すると増減の傾きが全く異なり、減少傾向が見られた。

#### 4.4. 実験 I に対する考察

結果より、エサがない場合530 lxの光があるときは増加率が1より大きくなり0 lxのときは1より小さくなったことから、530 lxの光があればクロレラによって光合成が十分に行われ、エサがある場合ほどではないもののその光合成産物のみでミドリゾウリムシは生存し、なおかつ増殖できることが示され、第1の仮説が裏付けられた。また、0 lxのときはミドリゾウリムシは白化し、エサがないためにそのまま死んで分解されたと考えられる。セル内には純水とミドリゾウリムシしか入れておらず、炭素や窒素は加えていないことから、クロレラは他のミドリゾウリムシを栄養として光合成をしている可能性がある。

### 5. 実験 II

#### 5.1. 目的

実験 I よりミドリゾウリムシは530 lxで生存可能であることがわかった。このことより実験 II では照度を変化させることによりミドリゾウリムシの生存個体数の推移に変動があるかを調べ、光飽和点を決定することを目的とした。

#### 5.2. 方法

実験 I と同様の方法で、照度を変えて実験を行った。エサは入れておらず、純水のみを使用している。照度を変化させるためダンボールとライトスタンドを使用して図 8,9 のような実験系を作成した。ダンボールで仕切られた空間にミドリゾウリムシの入ったセルを置き、真ん中の仕切りにボールペンを使用しダンボールに直径約 3.5 mm の穴を開けた。その穴の上をライトスタンドで覆い、穴を通して光が届く仕組みにすることによってセルに届く光の量を調節した。各穴の個数と照度の対応は表 4 に示した。

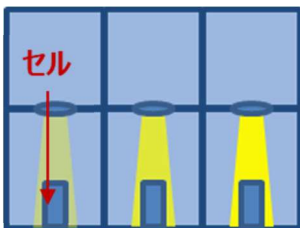


図 8 実験装置の模式図



図 9 実際の装置

表 4 穴の個数と照度の対応表

	穴の個数(個)	照度(lx)
A 0.1 lx	1	0.1
B 1.3 lx	3	1.3
C 3.3 lx	5	3.3
D 12.9 lx	10	12.9
E 16.6 lx	15	16.6

作成した実験系ではダンボールで仕切られた3つの空間があるため、同時に3条件で実験を行うことができる。本研究では、1回目はABC、2回目はBCD、3回目はCDEの組み合わせで実験を行なった。同時に行なった3つのセルは初期状態(ミドリゾウリムシの個体数や濃度)がほぼ等しいと考えられる。1回の実験にかかる時間が長いため、実験期間の制約でA, Eは1回、B, Dは2回、Cは3回と試行回数が少ないが、複数回試行した条件に関しては増加率を平均により求め、初期状態による違いはあまり生じないと仮定して照度による増加率を各条件で比較した。

#### 5.3. 結果

表 5 実験 II 1 回目の個体数の経過日数と照度との関係

記号と照度	経過日数(日)			
	0	3	7	10
A 0.1 lx	78	97	89	119
B1 1.3 lx	108	116	136	206
C1 3.3 lx	107	122	152	199

表 6 実験 II 2 回目の個体数の経過日数と照度との関係

記号と照度	経過日数(日)			
	0	3	7	10
B2 1.3 lx	24	22	42	44
C2 3.3 lx	28	39	45	49
D1 12.9 lx	38	47	56	81

表 7 実験 II 3 回目の個体数の経過日数と照度との関係

記号と照度	経過日数(日)			
	0	3	7	10
C3 3.3 lx	73	112	118	187
D2 12.9 lx	105	171	193	273
E 16.6 lx	108	198	234	285

表 8 実験Ⅱの増加率の平均と経過日数と照度の関係

経過日数(日) 記号と照度	0	4	7	8	11
A 0.1 lx	1.00	1.24	1.14	-	1.53
B 1.3 lx	1.00	1.00	1.50	-	1.87
C 3.3 lx	1.00	1.36	1.54	1.60	2.06
D 12.9 lx	1.00	1.43	1.63	1.74	2.37
E 16.6 lx	1.00	1.83	-	2.17	2.64

実験Ⅰの①530 lx エサなしは照度以外は実験Ⅱと同条件であるから、図 10では実験Ⅱの結果に比較対象として①530 lxのグラフを重ねた。

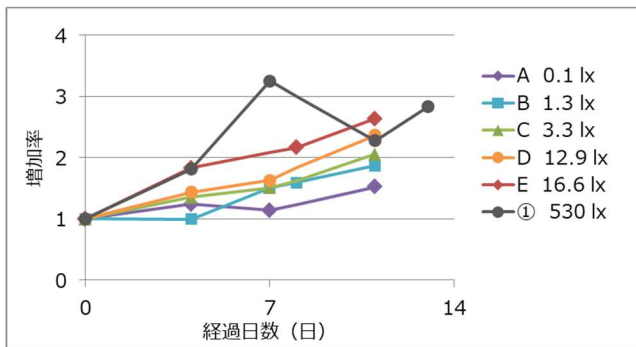


図 10 実験Ⅱの増加率の平均と経過日数と照度の関係

照度が大きくなるにつれて増加率は大きくなった。また、A0.1 lxでも個体数は増加した。約4 lxの差があるD12.9 lxとE16.6 lxを比較すると増加率に有意な差があった。一方、約500 lxの差があるE16.6 lxと①530 lxを比較すると有意な差はなかった。

#### 5.4. 実験Ⅰと実験Ⅱの総合考察

実験Ⅰより、ミドリゾウリムシはクロレラから得られる光合成産物のみで生存できることがわかった。また、実験Ⅰの0 lxでは増加率が1より小さくなったのに対し、実験Ⅱでは0.1 lxで増加率が1を超え、さらに0.1 lxから16.6 lxに照度が大きくなるにつれて増加率が大小関係が逆転することなく大きくなったことから、0.1 lx以上において照度とミドリゾウリムシの生存個体数との間に正の相関関係があることが分かった。また、12.9 lxと16.6 lxとの増加率の差と16.6 lxと530 lxの増加率の差の比較から、クロレラの光合成における光飽和点は16.6 lx近傍であると推定される。以上から、第2の仮説として挙げた、比較的小さい照度に光飽和点があることが示唆された。

## 6. 今後の展望

光合成産物の量は照度だけでなく波長にも影響される。特定の光源を用いて照度のみに着目した本研究での結果を基に光の波長と照度の2つの値を変化させ研究を進展させていきたい。また、ミドリゾウリムシは共生状態を解除しクロレラを体外に放出して白化する基準を自らが感じる光の照度によって決めているのか、あるいはクロレラの光合成による光合成産物の量によって決めているのかを調べることも研究課題として挙げられる。

ミドリゾウリムシは共生生物のモデルとして科学研究に重宝されており、今後ミドリゾウリムシの性質、共生の条件などを解明することによって細胞内共生説についての新たな発見があるのではないかと期待を膨らませている。

## 7. 謝辞

本研究においてミドリゾウリムシを分譲してくださり、実験の方法について多大な助言をいただいた、神戸大学大学院理学研究科生物学専攻、洲崎敏伸准教授、私たちの研究に親身になって協力していただいたサイエンスアドバイザーの皆さん、本校の先生方に深く感謝の意を申し上げます。

#### [参考文献・参考URL]

- [1]早川昌志 洲崎敏伸, ミドリゾウリムシにおける細胞内共生研究の現状と課題, 比較生理生化学33巻3号, p. 108-115(2016)  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/hikakusei-riseika/33/3/33\\_108/\\_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/hikakusei-riseika/33/3/33_108/_pdf/-char/ja)
- [2] 児玉有紀 藤島政博, 単細胞ミドリゾウリムシと緑藻クロレラとの細胞内共生の成立機構, 原生動物学雑誌, 41巻2号, p. 117-132(2008)  
[http://microscopy.or.jp/jsm/wp-content/uploads/publication/kenbikyoe/43\\_1/pdf/43-1-60.pdf](http://microscopy.or.jp/jsm/wp-content/uploads/publication/kenbikyoe/43_1/pdf/43-1-60.pdf)
- [3]光合成事典(Web版), 日本光合成学会編, 2015年4月公開  
<https://photosyn.jp/pwiki/index.php>
- [4]神戸大学大学院理学研究科生物学専攻 洲崎研究室のホームページ  
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-suzaki/index.html>
- [5]慶応義塾大学 自然科学研究教育センターのホームページ  
<https://www.sci.keio.ac.jp/eduproject/practice/biology/detail.php?eid=00004>