

平成 27 年度 修士論文

GFP 標識酵母を用いた
ミドリゾウリムシの食作用の測定

Measurements of Phagocytic Activities of
Paramecium bursaria Using GFP-labeled Yeast

弘前大学大学院 教育学研究科 教科教育専攻 理科教育専修

13GP211 三浦貴士

指導教員 岩井草介

目次

| | |
|--|----|
| 1 序論 | 3 |
| 2 材料と方法..... | 6 |
| 2.1 ミドリゾウリムシの培養..... | 6 |
| 2.2 白化株の作成 | 7 |
| 2.3 GFP 標識酵母の取り込みの観察と測定 | 7 |
| 2.4 GFP 標識酵母の消化の測定 | 8 |
| 2.5 GFP 標識酵母の細胞外への排出の観察 | 9 |
| 2.6 酵母の細胞口への運搬の観察 | 9 |
| 3 結果 | 11 |
| 3.1 酵母を餌とした場合のミドリゾウリムシの増殖曲線..... | 11 |
| 3.2 GFP 標識酵母の取り込み及び排出の観察 | 12 |
| 3.3 ミドリゾウリムシの餌取り込み活性(1)共生藻の有無による違い | 15 |
| 3.4 ミドリゾウリムシの餌取り込み活性(2)増殖時期による違い | 17 |
| 3.5 ミドリゾウリムシの消化活性 | 19 |
| 3.6 ゾウリムシの食作用..... | 21 |
| 4 考察 | 23 |
| 4.1 GFP 標識酵母を用いた繊毛虫の食作用の測定 | 23 |
| 4.2 ミドリゾウリムシの細胞内共生と食作用..... | 24 |
| 参考文献..... | 26 |
| 謝辞 | |

1 序論

単細胞の原生生物であるミドリゾウリムシ(*Paramecium bursaria*)は繊毛虫ゾウリムシ類の類縁種であるが、大きな特徴として細胞内に約 500~700 個のクロレラ様藻類が共生（二次共生）している。宿主の細胞内では、共生藻は 1 細胞ずつ食胞膜由来の共生胞膜に包まれており、その中で細胞分裂して増殖する (1)。通常の光条件では、宿主の細胞内で比較的安定に維持されている (2)。宿主のミドリゾウリムシが食作用で得た窒素源などを共生藻に供給する一方で、共生藻はマルトースや酸素などの光合成産物を宿主に供給していることから、両者は相利共生の関係にあると考えられている (1)。共生系全体としては、共生藻による光合成と宿主による食作用の 2 種類の異なるエネルギー（栄養）獲得機構を持っていることから、ミドリゾウリムシは独立栄養と従属栄養の両方を兼ね備えた“混合栄養生物”ということになる (3,4)。宿主と共生藻はそれぞれ単独でも培養でき、宿主と共生藻を組み合わせることによって共生の再構成も可能なことなどから、ミドリゾウリムシは古くから二次共生の研究によく用いられてきた。

食作用とは、細胞が細菌や異物、餌などを外部環境から細胞内に取り込み、分解する活動である。エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた物体は膜からなる食胞に包まれ、これにさまざまな分解酵素を含むリソソームが融合することによって分解される。ミドリゾウリムシの食作用については、酵母や共生藻を餌として用いる研究によって、以下のように進行することが分かっている (1)。まずエンドサイトーシスによって細胞口から取り込まれた餌は、0.5 分以内に食胞に包まれ、アシドソームが食胞に融合して食胞内の pH は 2.4-3.0 まで低下する。その後リソソームの融合が起こり、pH は 6.4-7.0 まで上昇して餌は消化される。消化されなかったものは細胞肛門から排出される。以上のように、食作用は取り込みから分解に至る過程でさまざまなタンパク質が機能するため、それを行うには少なくない量の細胞内の資源（栄養分）を要すると考えられる。

一般に、光合成と食作用の両方を行う混合栄養生物にとっては、生存や増殖の効率を高めるために限りある細胞内の資源（栄養分、特にタンパク質）を光

合成と食作用のどちらにどれだけ振り分けるのが有利か、という大きな問題がある (3)。しかしながら、そのような混合栄養生物における細胞内資源の最適な分配戦略については、まだ分かっていないことが多い。その中でも特に、藻類が細胞内に共生している生物においてその細胞内共生が宿主の食作用に与える影響についてはほとんど分かっていない。そこで本研究では、それらについて知見を得るために、クロレラ様藻類が細胞内に共生しているミドリゾウリムシの食作用を定量的に調べることにした。

繊毛虫の食作用の測定においては従来、上記のような酵母や共生藻のほか、細菌や蛍光ビーズなどが餌として用いられてきた (5,6)。しかしこれらの方法は、餌の細胞内への取り込みを測定することはできるものの、餌が分解されないかもしくは分解が観察しにくいために取り込まれた餌の消化を調べることは難しい。最近、繊毛虫の 1 種であるテトラヒメナの食作用測定において、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 GFP を発現している大腸菌が餌として用いられた (7)。GFP には pH が低くなると蛍光が減少するという性質があるため (8)、大腸菌が食胞内で消化されてその細胞壁と膜が失われると、GFP は pH の低い食胞内に拡散してその蛍光は大きく減少する。そのため、蛍光顕微鏡などを用いることによって餌の消化を検出することができる。ただし大腸菌は、長さが約 2-4 μm の細長い桿菌であるため顕微鏡による観察が容易ではなく、また目的の繊毛虫にとって必ずしもよい餌ではない可能性もある。

そこで本研究では、ミドリゾウリムシの食作用を定量的に測定するために、GFP を過剰発現している出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いた (以降これを GFP 標識酵母と呼ぶ)。出芽酵母の細胞は直径約 5 μm の楕円形であり、大腸菌と比べて顕微鏡観察が容易である。GFP 標識酵母は、過去に赤痢アメーバの食作用の測定に用いられた例があるが (9)、繊毛虫の食作用の測定には用いられたことはない。本研究ではこの GFP 標識酵母を用いることによって、取り込んだ餌と共生藻の区別および餌を取り込んだ後の消化と排出の区別が可能になり、ミドリゾウリムシの食作用を定量的に測定することができた。測定によって、ミドリゾウリムシの食作用について以下のような新たな結果が得られた。

- 1) 共生藻の存在は、ミドリゾウリムシ細胞内における消化活性には影響しない。
- 2) 餌の取り込み活性は白化株の方が野生株より高かったことから、共生藻の存在は餌の取り込み活性を低下させる。
- 3) 同じ野生株でも、定常期に入ると対数増殖期よりも取り込み活性が低下する。これは、定常期に入ると餌を取り込むためのタンパク質の発現が抑制されるためである。

これらの結果について、混合栄養生物における細胞内資源の最適な分配戦略の観点から考察する。

2 材料と方法

2.1 ミドリゾウリムシの培養

本研究のミドリゾウリムシの実験は、当研究室によって 2010 年に青森県弘前市内の池より採集された HA1 株を野生株として用いた。

ミドリゾウリムシの培養は以下のように行った。まず 50 ml の三角フラスコに、市販のミネラルウォーターや河川などのイオン組成を参考に当研究室で作成した“人工池水”（0.3 mM NaCl, 0.1 mM MgSO₄, 0.1 mM KCl, 0.5 mM CaCl₂；以下 AW と呼ぶ）を 19 ml 入れ、シリコセン（信越ポリマー；T-24）で栓をして高圧蒸気滅菌してから、室温まで冷ました。餌として、YPD 培地で 1 晩培養した出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株の培養液 1 ml を毎分 3000 回転で 5 分間遠心し上清を吸い取ってから、AW 1 ml で懸濁してすべてフラスコに入れた。さらに抗生物質アンピシリンを最終濃度が 500 µg/ml となるように加えてから、ミドリゾウリムシの前培養液を 500 µl 加えた。フラスコは 24°C の恒温培養機（サンヨー；MIR-152）に静置し、植物育成用蛍光灯 FL20SS・BRN/18（東芝）によって約 1000 lux の光を 12:12 時間の明暗サイクルで照射した。ときどきフラスコをゆすって、底に沈んだ酵母を舞い上がらせた。後述する HA1w3 株は共生藻から光合成産物を得られないので、全滅しないように 2 週間以内に植え継いだ。

HA1 株と HA1w3 株について、上記のように培養を開始してから 1 週間以上後に、培養液の一部を標準寒天培地（グルコース 1 g/L, Bacto Tryptone 5 g/L, Yeast Extract 2.5 g/L, Bacto Agar 15 g/L）に塗布し、30°C で静置した。2 晩以上培養しても餌とした酵母以外の微生物が増殖しなかったことから、両培養株は無菌的であると判断した。

ミドリゾウリムシの細胞濃度の測定は以下のように行った。まず培養液を 100 µl 採取し、細胞の運動を停止させるために最終濃度が 1 mM となるように NiCl₂ を加えてから当研究室作製のアクリル製の容器に入れ、倒立顕微鏡（ニコン；TMS-F）で細胞数を計測した。

2.2 白化株の作成

白化（非共生）株は、文献（10）に従い以下のようにタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドを用いて作成した。まず試験管に 0.5% 青汁 /0.005% YeastExtract を 1.8 ml 入れ、*Klebsiella* を加えた 0.5% 青汁（同仁堂；大麦若葉 100% 青汁） /0.005% YeastExtract で培養した HA1 株の培養液 200 μ l を加え、ここにシクロヘキシミドを最終濃度が 10 μ g/ml となるように加えた。試験管は 24°C で静置し、約 1000 lux の光を 12:12 時間の明暗サイクルで照射した。7 日後、ミドリゾウリムシ細胞内の共生藻が完全に除去されたことを顕微鏡観察で確認した後、クローニングを行った。クローニングは、実体顕微鏡下でミドリゾウリムシを 1 匹採取し、アンピシリンを含む AW 1ml で 8 回洗浄してからミニシャーレで培養した。ミニシャーレで十分に増殖したら、三角フラスコに移してさらに培養した。得られた白化株を HA1w (white) 3 と命名し、以降の実験に用いた。

2.3 GFP 標識酵母の取り込みの観察と測定

GFP 標識酵母は、以下のように調整した。まず、多コピーのプラスミドおよび TEF1 プロモーターの制御によって GFP を過剰発現している出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* pTOW-pTEF1::GFP/BY4741 株（岡山大学守屋博士より供与）を SC-Ura 培地（グルコース 20 g/L, Yeast nitrogen base without amino acids 6.7 g/L, -Uracil drop out mix 0.77 g/L）で 4 晩振とう培養した。その培養液 1 ml を毎分 3000 回転で 5 分間遠心し、上清を吸い取ってから、150 μ l の AW で懸濁して、GFP 標識酵母懸濁液とした。

ミドリゾウリムシについては、適当な増殖時期の培養液 5 ml を穴径 11 μ m のナイロンネットフィルター（Millipore）に通してから、AW 1 ml で 5 回洗浄することによって、培養液中に残っている酵母を除去した。ピペットで回収したミドリゾウリムシは、24°C で光を照射しながら 3 時間静置することによって細胞内に残っている培養液由来の酵母を消化させた。

この 3 時間静置したミドリゾウリムシの細胞懸濁液を、GFP 標識酵母懸濁液とそれぞれの細胞濃度が $1-2 \times 10^3$ cells/ml と 5×10^7 cells/ml になるように混合することによって、ミドリゾウリムシに GFP 標識酵母を取り込ませた。この時

刻を 0 として、5 分, 10 分, 15 分, 20 分, 25 分, 30 分後に細胞内の GFP 標識酵母を計数した。

GFP 標識酵母の計数は、以下のように蛍光顕微鏡を用いて行った。まず、上記の混合液から各時刻に 50 μ l 採取し、6%ホルマリンを等量加えて細胞を固定した。固定したミドリゾウリムシ細胞を、40 倍の UPlanSApo 対物レンズ（オリンパス）を用いて正立落射蛍光顕微鏡 BX51（オリンパス）によって観察した。蛍光観察の光源としては、高圧水銀ランプを用いた。GFP の蛍光を観察するために、U-FGFP フィルターセット（オリンパス）を用いて試料を青色光で励起して緑色の蛍光を検出した。一方、クロロフィルに由来する共生藻の自家蛍光を観察するために、U-MWIG3 フィルターセット（オリンパス）を用いて試料を緑色光で励起し、赤色の蛍光を検出した。細胞内に存在する GFP 標識酵母の計数は、各時刻につき 10 細胞以上について行った。

2.4 GFP 標識酵母の消化の測定

前節と同様に細胞内の酵母を消化させたミドリゾウリムシ細胞懸濁液を、GFP 標識酵母懸濁液とそれぞれの細胞濃度が $1-2 \times 10^3$ cells/ml と 5×10^7 cells/ml になるように混合して 5 分間静置することによって、ミドリゾウリムシに GFP 標識酵母を取り込ませた。この混合液を孔径 11 μ m のナイロンネットフィルターに通し、取り込まれなかった酵母を除去した。ミドリゾウリムシはピペットで回収し、24°Cで光を照射しながら静置した。酵母を除去した時刻を 0 として、10 分, 30 分, 1 時間, 1.5 時間, 2 時間, 2.5 時間, 3 時間後に細胞内に残存している GFP 標識酵母を計数または撮影した。

GFP 標識酵母の計数と撮影は、以下のように蛍光顕微鏡を用いて行った。細胞内に取り込まれた酵母については、上記の混合液から各時間に 7 μ l 採取してスライドガラスに滴下し、カバーガラスをかぶせてほぼ動きが停止した細胞のものを計数した。細胞外にある酵母については、まず直径約 5 mm の穴をあけたシリコンゴムをスライドガラスに張り付けた。混合液をピペティングによってよく攪拌してから 20 μ l 採取し、6%ホルマリンを等量加えて細胞を固定してから、シリコンゴム内に入れた。液中の全てのミドリゾウリムシと細胞外にある酵母の細胞数を計数した。シリコンゴム内の液は厚みがあるので、ピント

を頻繁に変えながら計数を行った。これらの試料は、前節と同じ条件、同じ対物レンズと蛍光顕微鏡を用いて観察した。蛍光像はモノクロ CCD カメラ WAT-120N+ (Watec) で撮影し、USB 接続の A/D 変換器 USB VideoLink 2.0 (Zarbeco) と付属のソフトウェアを用いてパソコンに取り込んだ。取り込んだ画像は、オープンソースの画像処理ソフトウェア ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)および当研究室作成のプラグイン (未公開) によってコントラスト増強・着色・合成を行った。

2.5 GFP 標識酵母の細胞外への排出の観察

ミドリゾウリムシを生きている状態で長時間観察するために、ミドリゾウリムシをコーンスターチと混合し、デンプン粒の間に閉じ込めることによって、運動を制限した。実際には、前節のように GFP 標識酵母を取り込ませたミドリゾウリムシを回収してから 1 時間後にミドリゾウリムシを含む液 10 μ l と 80% コーンスターチ (細川製麺) 溶液 20 μ l を混合し、混合液をスライドガラスに 5 μ l 滴下した。その後すぐに、あらかじめ四隅に真空用グリース (東レ・ダウコーニング; FS50) を塗っておいたカバーガラスをすばやくかぶせた。さらに、キムワイプをカバーガラスにかぶせ、コーンスターチがスライドガラス上に一様に拡散するように上から指で押した。溶液が蒸発するのを防ぐために、カバーガラスの周囲をシリコンオイルで封入した。試料の観察と撮影は、前節と同様に蛍光顕微鏡と CCD カメラを用いて行った。ただし、対物レンズは 20 倍のもの、光源は高圧水銀ランプの光を ND フィルターによって 1.5% に減光して用い、カメラはゲインを最大として 2 フレームずつ積算して撮影した。

2.6 酵母の細胞口への運搬の観察

CongoRed 染色酵母は、次のように調製した。まず、YPD 培地で 1 晩振とう培養した出芽酵母 BY4741 株の培養液 200 μ l を毎分 3000 回転で 5 分間遠心し上清を吸い取ってから、AW 100 μ l で懸濁した。この懸濁液を 0.05% CongoRed 500 μ l と混合し、100°C に 1 時間置いた。その後、遠心と AW 500 μ l による洗浄を 3 度繰り返してから、最後にもう一度遠心して AW 100 μ l で懸濁した。この CongoRed 染色酵母を対数増殖期または定常期のミドリゾウリムシ

と混合してからスライドガラスに 7 μ l 滴下し、光学顕微鏡で観察した。

3 結果

3.1 酵母を餌とした場合のミドリゾウリムシの増殖曲線

まず酵母がそもそもミドリゾウリムシの餌として適しているかを確認するために、出芽酵母を餌としてミドリゾウリムシを培養し、その増殖を調べた。図 1 に、細胞内に共生藻を持つ野生株および人工的に共生藻を除去した白化（非共生）株の増殖曲線を示す。ゾウリムシ類の培養でよく用いられる、細菌の *Klebsiella* を加えたレタス浸出液を用いてミドリゾウリムシを培養した場合は、培養開始から 1 週間で約 1500 cells/ml まで増殖することが知られている(11)。一方、酵母を餌とした場合は、培養開始から 1 週間で約 2000 cells/ml まで増殖したことから、酵母はミドリゾウリムシの餌として適していることが明らかになった。また以前の研究と同様に(11, 12)、酵母を餌とした場合も、野生株が餌を消費し尽くして定常期に入ってから長期間生存し続けるのに対して、白化株は餌を消費し尽くしてしばらくすると急速に死滅した。

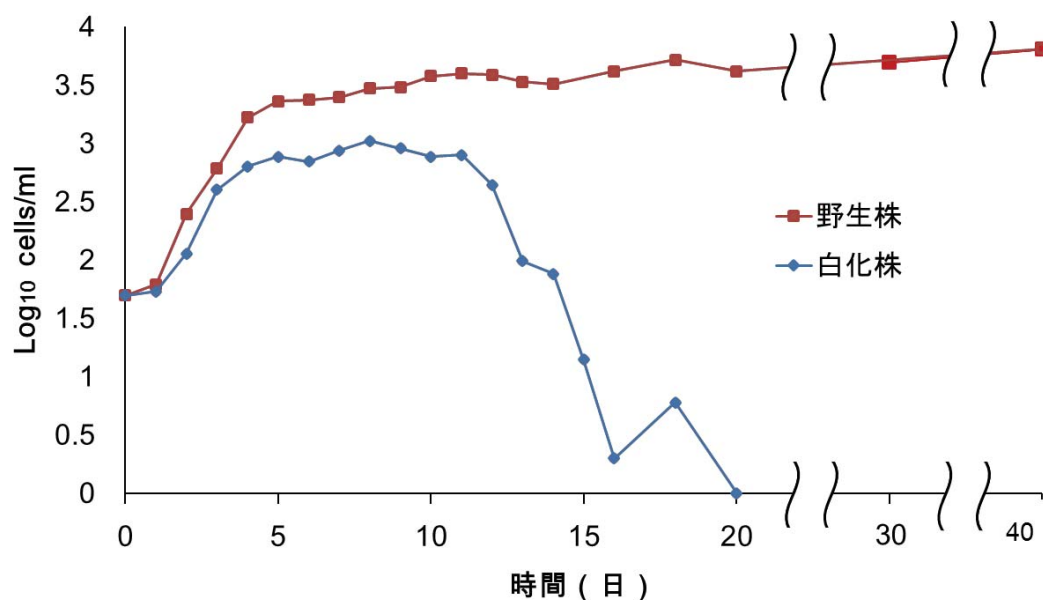


図 1. 酵母を餌とした場合のミドリゾウリムシの増殖曲線。野生株は HA1 株、白化株は HA1 w3 株を用いた。

3.2 GFP 標識酵母の取り込み及び排出の観察

次に、細胞内に取り込まれた GFP 標識酵母と共生藻を区別できるかどうか調べるために、ミドリゾウリムシの野生株細胞に GFP 標識酵母を取り込ませ、細胞外の酵母を除去してから一定時間経過後に蛍光顕微鏡で細胞内の共生藻と GFP 標識酵母を観察した。2 種類のフィルターセットを用いることによって、クロロフィルに由来する共生藻の赤色の自家蛍光と GFP の緑色の蛍光をそれぞれ別々に検出することができた (図 2)。酵母は 1 個または複数個ずつ食胞に取り込まれており、共生藻が存在している共生胞と位置が重なることはなかった。常に細胞質全体に一定数存在していた共生藻とは異なり、外部の酵母を除くと細胞内に残存している酵母の数は、時間とともに減少した。以上より、GFP 標識酵母と蛍光顕微鏡を用いることによって、共生藻と細胞内に取り込まれた酵母を区別できることが分かった。

白化株についても同様に、GFP 標識酵母を取り込ませて観察したところ、共生藻のない白化株も、野生株と同様に酵母を細胞内に取り込むことが分かった (図 3)。なお白化株の細胞内にも赤色の蛍光を出す物体が観察されることがあったが (矢尻)、通常の光条件で白化株の培養を続けてもクロレラ様の藻類が増殖することはなかったことから、共生藻ではなく赤色の自家蛍光を出す何らかの細胞内構造物と考えられる。

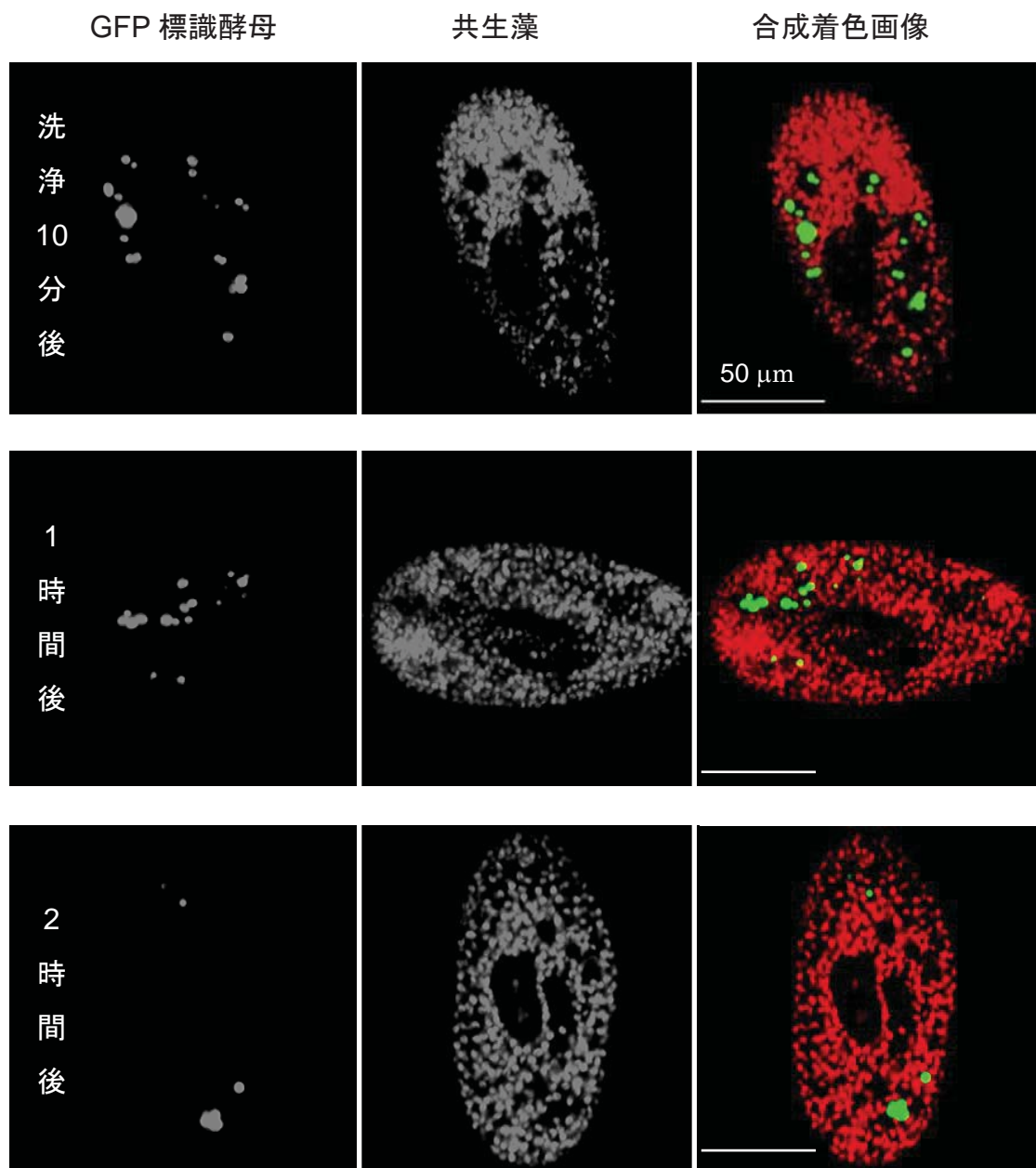


図 2. 野生株（培養 7 日目）の食作用の観察。GFP 標識酵母、共生藻の蛍光像、および両者の合成着色画像（GFP 標識酵母は緑色に、共生藻は赤色に着色した）を示した。スケールは 50 μm 。

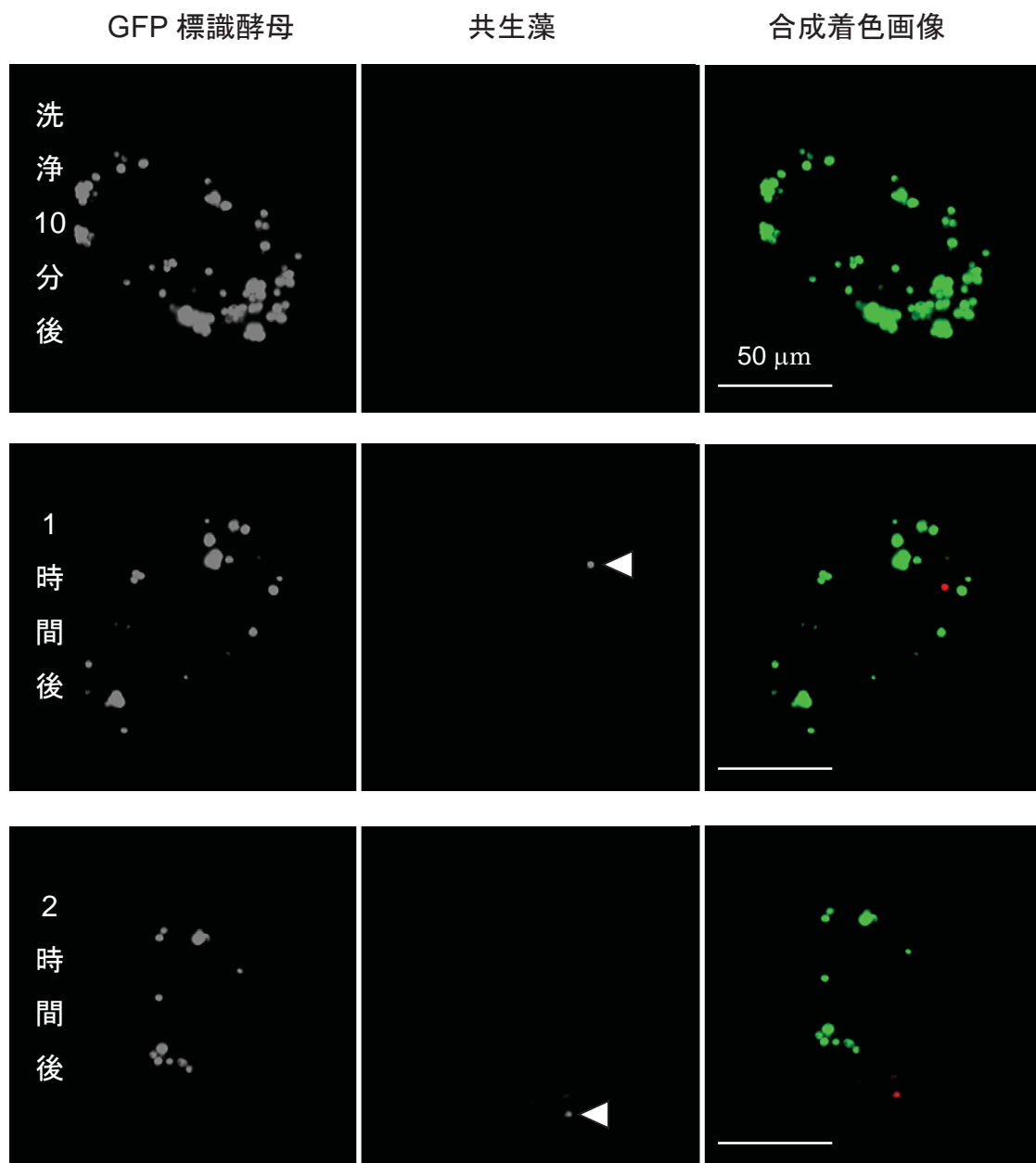


図 3. 白化株（培養 7 日目）の食作用の観察。GFP 標識酵母、共生藻の蛍光像、および両者の合成着色画像（GFP 標識酵母を緑色に着色した）。スケールは 50 μm 。白化株に共生藻は見られない。

この GFP 標識酵母を取り込んだミドリゾウリムシ細胞を採取し、生きている状態で約 100 分間観察し続けたところ、たまたまミドリゾウリムシが酵母を細胞外へ排出するところを観察することができた。図 4 に酵母を排出する瞬間の連続写真を示す。図のように、排出された GFP 標識酵母はしばらく観察するこ

とが可能であり、蛍光が消失する様子はなかったことから、未消化の GFP 標識酵母が細胞外に排出されても蛍光顕微鏡によって検出可能であることが分かった。

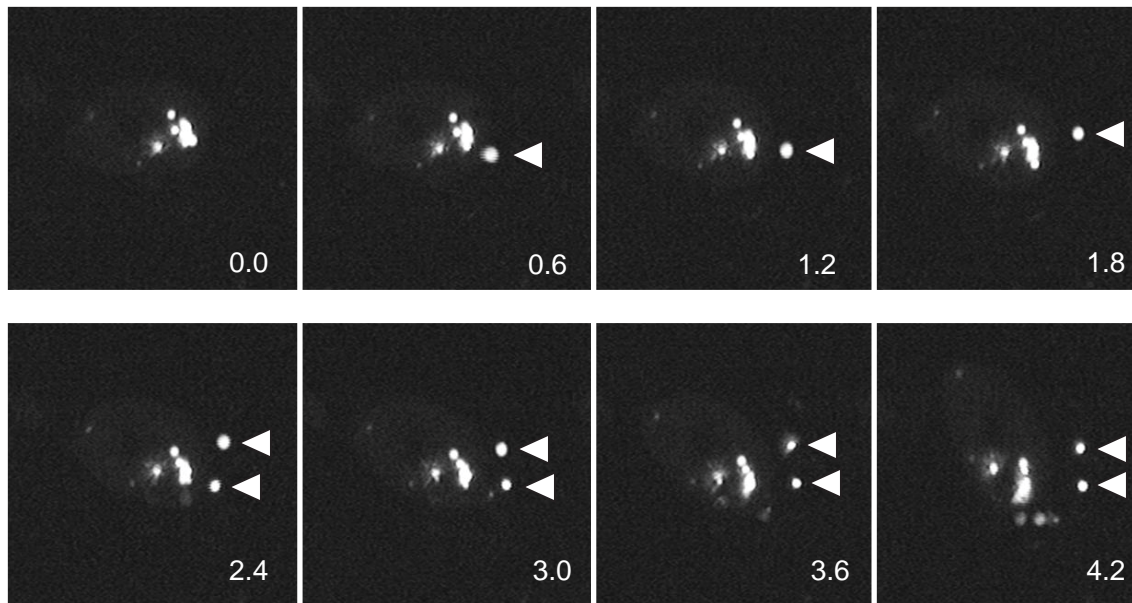


図 4. 野生株の細胞が GFP 標識酵母を排出する瞬間の連続写真。数字は時間（秒）。矢尻は細胞外に排出された GFP 標識酵母を示す。

3.3 ミドリゾウリムシの餌取り込み活性 (1) 共生藻の有無による違い

ミドリゾウリムシの食作用における餌の取り込みを定量的に調べるために、ミドリゾウリムシに GFP 標識酵母を取り込ませてから一定時間ごとに細胞を固定し、取り込まれた酵母の数を計測した（図 5）。図にはそれぞれの条件において、最も取り込んだ量が多かった時のデータを示した。野生株と白化株のどちらも、細胞内に取り込まれる酵母の数は時間とともに増加し、10-20 分程度で飽和した。取り込み開始から 20 分後に野生株と白化株が取り込んだ酵母の数を比較したところ、白化株の方が野生株より取り込む酵母の量が有意に多かった（Mann-Whitney 検定, $P < 0.01$ ）。この結果から、餌の取り込み活性は白化株の方が野生株よりも高く、共生藻の存在はミドリゾウリムシの餌取り込み活性を低下させることが分かった。なお、白化株の方が野生株よりも餌の取り込み量が多いことは、蛍光ビーズを用いた研究で既に報告されている（6）。

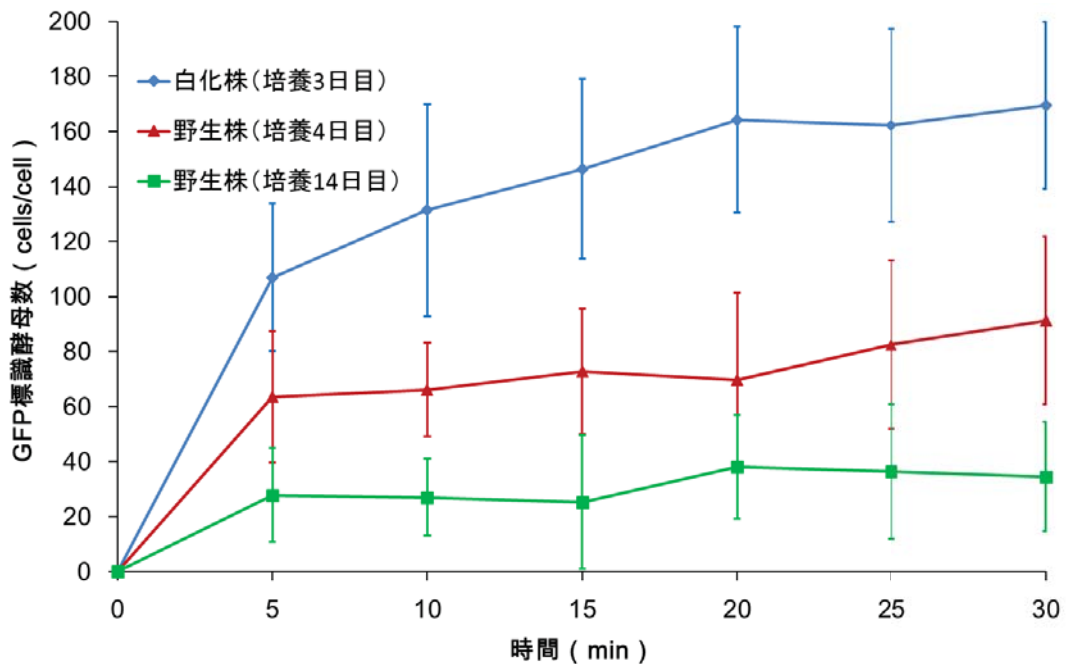


図 5. 野生株と白化株による GFP 標識酵母の取り込み。時間は、取り込みを開始してから経過した時間を表す。細胞内の GFP 標識酵母の数をそれぞれ 10 個体以上について測定し、平均と標準偏差（棒）を示した。

白化株が野生株よりも多く酵母を取り込んだ理由として、共生藻が存在しない白化株の方が単に細胞内の空いている空間が広いため多くの酵母を取り込むことができるという可能性がある。そこで、共生藻の数を減らしたミドリゾウリムシを用いて、細胞内の共生藻の数と取り込む酵母の数の相関を調べた（図 6）。恒暗条件で 4 日間培養することによって共生藻を減少させた野生株の細胞（1 細胞あたりの平均共生藻数：62.8）に GFP 標識酵母を取り込ませ、20 分後に細胞内の共生藻数と取り込まれた酵母の数の両方を計数した。その結果、ミドリゾウリムシ細胞内の共生藻数と取り込む酵母の数には弱い正の相関はあったものの（相関係数：+0.38）、特に負の相関はなかったことから、細胞内の共生藻が少なければ多くの酵母を取り込むわけではないということが分かった。

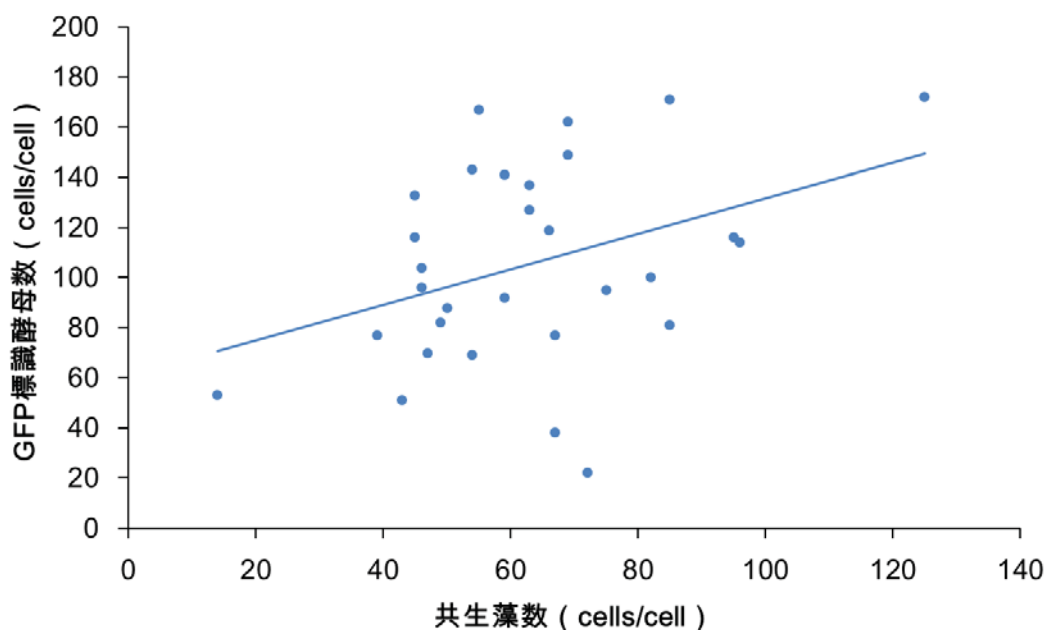


図 6. 細胞内の共生藻数と取り込んだ GFP 標識酵母の数の関係。細胞は野生株を恒暗条件で 4 日間培養したものを用いた。30 細胞についての結果を示す。

3.4 ミドリゾウリムシの餌取り込み活性 (2) 増殖時期による違い

次に、増殖時期によって餌の取り込みに違いがあるかどうかを調べるために、対数増殖期および餌の酵母が枯渇して定常期に入った野生株の細胞について、酵母の取り込みを比較した (図 5)。その結果、定常期 (培養 14 日目) の細胞は、対数増殖期 (培養 4 日目) の細胞と比較して有意に取り込む酵母の数が少ないことが分かった (Mann-Whitney 検定, $P < 0.025$)。ミドリゾウリムシが定常期に入ると餌の取り込み活性が低くなる原因を探るために、定常期の細胞に酵母を与えて増殖を再開させてから取り込む酵母の数を調べた (図 7)。その結果、定常期の細胞に餌の酵母を与えると、2 日で取り込み活性が対数増殖期の細胞と同程度に戻ることが分かった。一方で、酵母を与える際に同時にミドリゾウリムシのタンパク質の合成を阻害する Puromycin (13) も加えると、取り込み活性は定常期の細胞と変わらないままだった (図 7)。以上の結果から、ミドリゾウリムシは周囲に餌があって増殖を開始すると、餌を取り込むのに必要なタンパク質を多く発現するようになると考えられる。定常期に入ると取り込み活性が低くなるのは、そのようなタンパク質の発現が抑制されるためであろう。

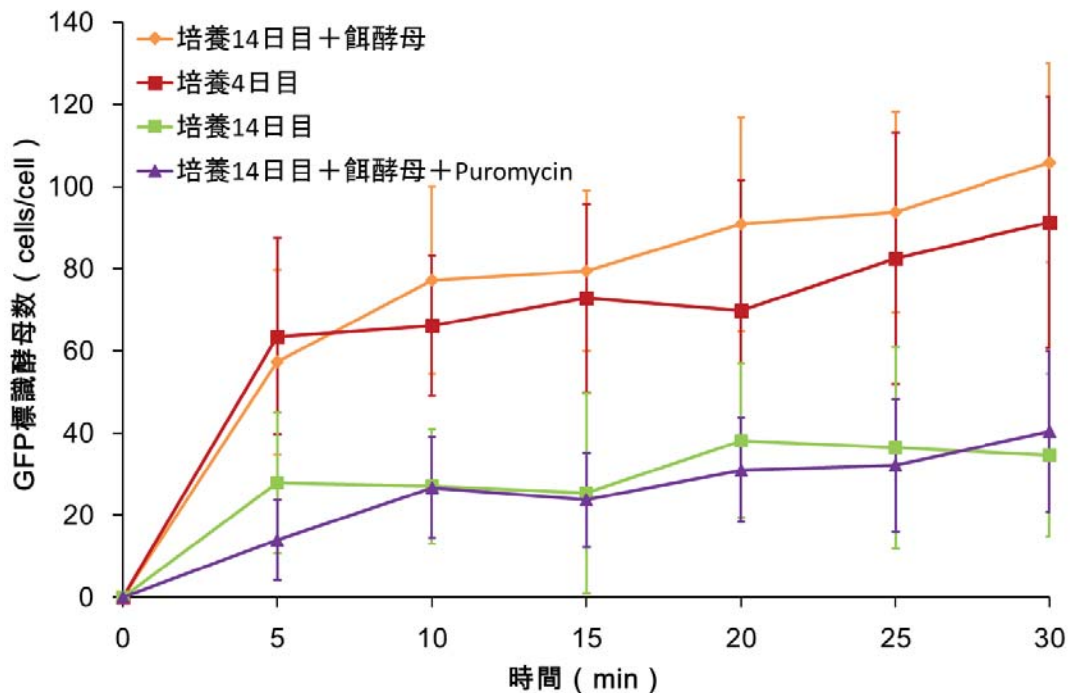


図 7. 野生株の対数増殖期と定常期における GFP 標識酵母の取り込み。時間は、取り込みを開始してから経過した時間を表す。細胞内の GFP 標識酵母の数をそれぞれ 10 個体以上について測定し、平均と標準偏差 (棒) を示した。

ミドリゾウリムシにおける餌の取り込みは、細胞外にある餌を繊毛運動によって細胞口へ運搬する段階と、エンドサイトーシスによって細胞口から食胞に取り込む段階の 2 つに分けられる。定常期におけるミドリゾウリムシの餌の取り込みにおいてどちらの段階が抑制されているかを調べるために、ミドリゾウリムシの野生株に CongoRed で染色した酵母を与え、その細胞口への運搬を光学顕微鏡で観察した (図 8)。その結果、定常期においても、繊毛運動による細胞口への餌の運搬は対数増殖期と同様に正常に行われていた。このことから、定常期において発現が抑制されるタンパク質は、細胞口への運搬ではなくエンドサイトーシスに関与するものである可能性が高い。

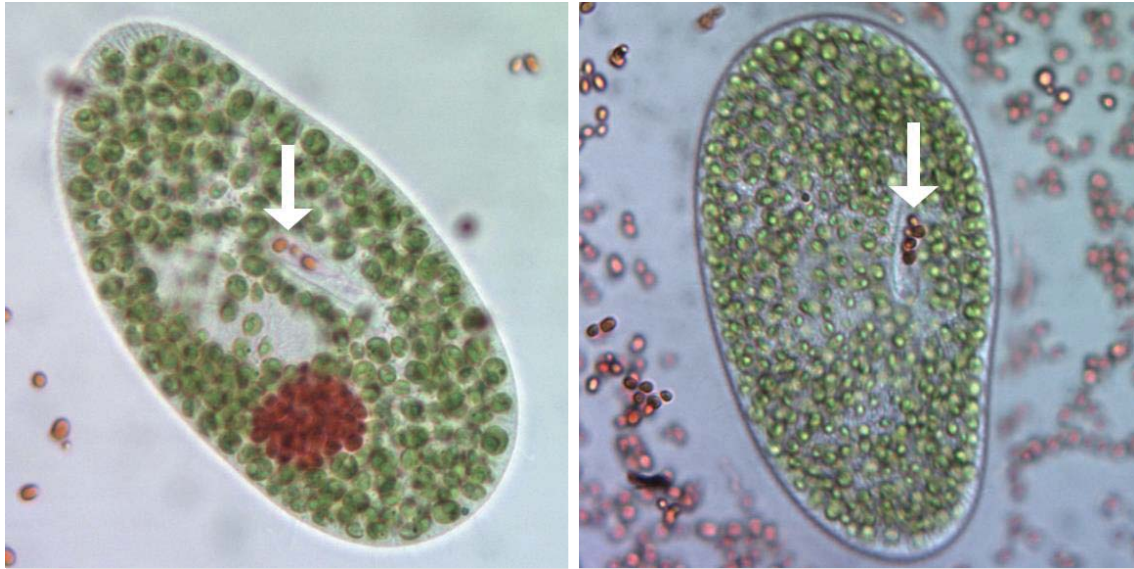


図 8. 野生株細胞の細胞口に吸い込まれる CongoRed 染色酵母の観察（矢印）。左側が対数増殖期（培養 4 日目）の細胞、右側が定常期（培養 14 日目）の細胞。

3.5 ミドリゾウリムシの消化活性

ミドリゾウリムシの食作用における取り込んだ餌の消化を定量的に調べるために、ミドリゾウリムシに GFP 標識酵母を取り込ませ、細胞外の酵母を除去してから一定時間経過後に細胞内に残存している酵母の数を計測した。細胞外に排出された分を見積もるために、同時に細胞外に存在している酵母の数も計測した。測定の実例として、培養開始から 4 日目の野生株に GFP 標識酵母を取り込ませた場合を図 9 に示す。細胞内に残存している酵母は時間とともに減少し、3 時間でほとんどなくなった。それに対して、細胞外に存在する酵母の数は、ミドリゾウリムシ細胞外の酵母を除いてから 10 分と 2 時間でほとんど変わらず、ミドリゾウリムシ 1 細胞あたりおよそ 1 個のままだった。ミドリゾウリムシが取り込んだ酵母を消化せずに排出したとすれば、細胞内で減少した分細胞外の酵母の数は増加するはずなので、細胞内の酵母数が減少したのはほとんどが消化によるものと言える。なお、ミドリゾウリムシが取り込んだ餌を全て消化するのにかかる時間は、増殖時期によらずおよそ 3 時間だった（データは示さず）。

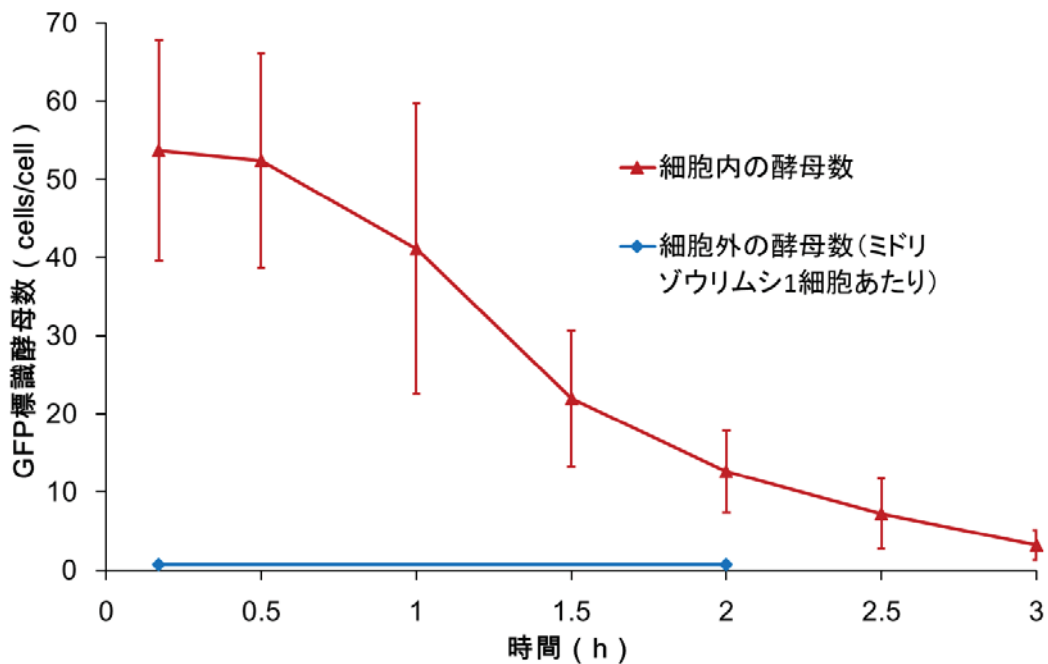


図 9. 野生株（培養 4 日目）における GFP 標識酵母の消化。時間は、酵母を除いてから経過した時間を表す。細胞内に残存している GFP 標識酵母の数をそれぞれ 10 細胞以上について測定し、平均と標準偏差（棒）を赤で示した。細胞外に存在する GFP 標識酵母の数（ミドリゾウリムシ 1 細胞あたり）は青で示した。

野生株と白化株の消化活性を比較するために、GFP 標識酵母を用いて両者における消化を調べた（図 10）。ただし 3.3 節で述べた通り、野生株と白化株では最初に取り込む酵母の数が異なるため、細胞内に残存する酵母の数をそのまま比較することはできない。そこで、消化の全体が 1 段階の反応であると仮定し、残存する GFP 標識酵母の数を指数関数で近似してその一次速度定数を求めた。その結果、消化の見かけの一次速度定数は、野生株が $0.74 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ 、白化株が $0.61 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ となり、ほとんど変わらなかった。以上より、餌の消化活性は野生株と白化株でほとんど変わらず、共生藻の存在はミドリゾウリムシの消化活性には影響しないことが示唆された。

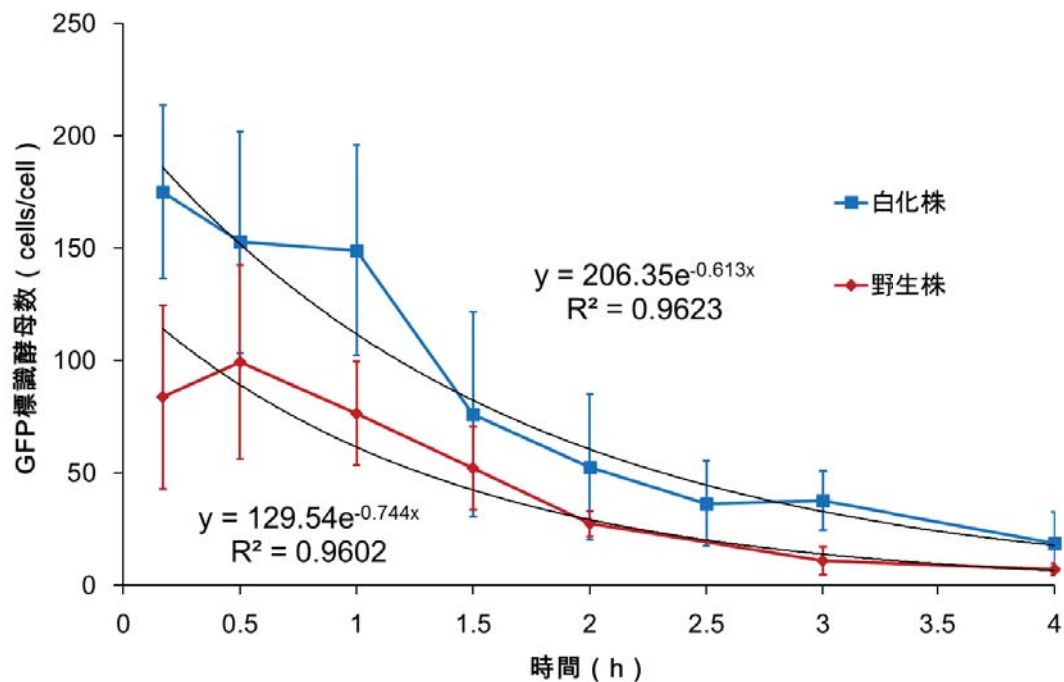


図 10. 野生株と白化株における GFP 標識酵母の消化。時間は、酵母を除いてから経過した時間を表す。細胞内に残存している GFP 標識酵母の数をそれぞれ 10 細胞以上について測定し、平均と標準偏差（棒）を示した。曲線は指数関数による近似。

3.6 ゾウリムシの食作用

ミドリゾウリムシと同属であるが共生藻をもたないゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) についても、GFP 標識酵母を用いて食作用を調べた (図 11)。ゾウリムシの細胞のサイズはミドリゾウリムシよりも大きいにも関わらず、1 細胞あたり取り込む酵母の数はミドリゾウリムシよりも少なかった。また細胞ごとの差も大きかった。そこで、酵母を餌としてゾウリムシを培養し、増殖を調べた (図 12)。 *Klebsiella* を加えたレタス浸出液でゾウリムシを培養した場合は、約 1500 cells/ml まで増殖し、その後 2 週間以上生存し続けたのに対し、酵母を餌として培養した場合増殖は遅く、9 日目で全滅に至った。以上の結果から、ゾウリムシは酵母をあまり摂取・利用できないと考えられる。

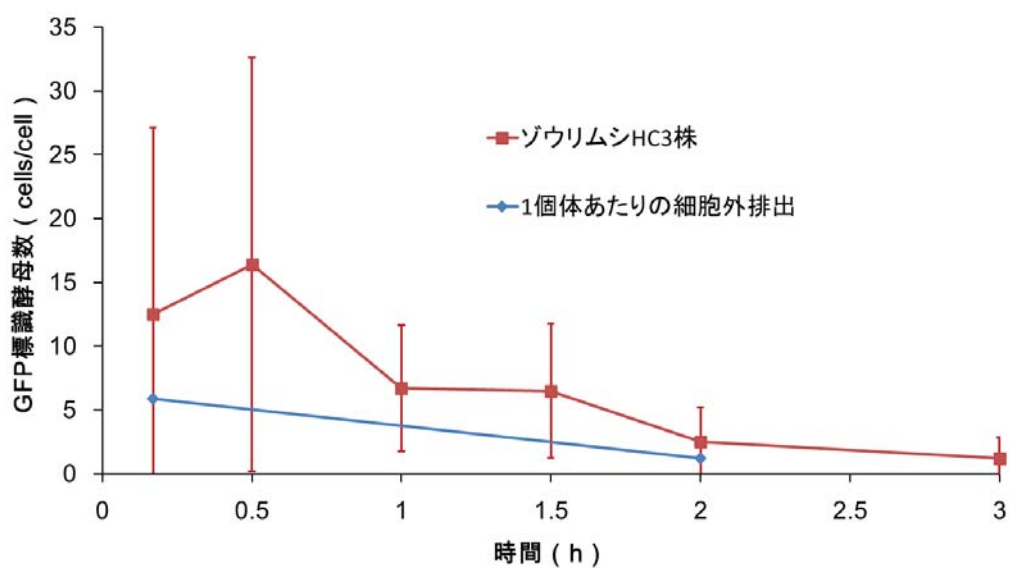


図 11. ゾウリムシ HC3 株における GFP 標識酵母の消化。時間は、酵母を除いてから経過した時間を表す。細胞内に残存している GFP 標識酵母の数をそれぞれ 10 細胞以上について測定し、平均と標準偏差（棒）を赤で示した。細胞外に存在する GFP 標識酵母の数（ミドリゾウリムシ 1 細胞あたり）は青で示した。HC3 株は、2012 年に当研究室によって弘前市だんぶり池より採集された。

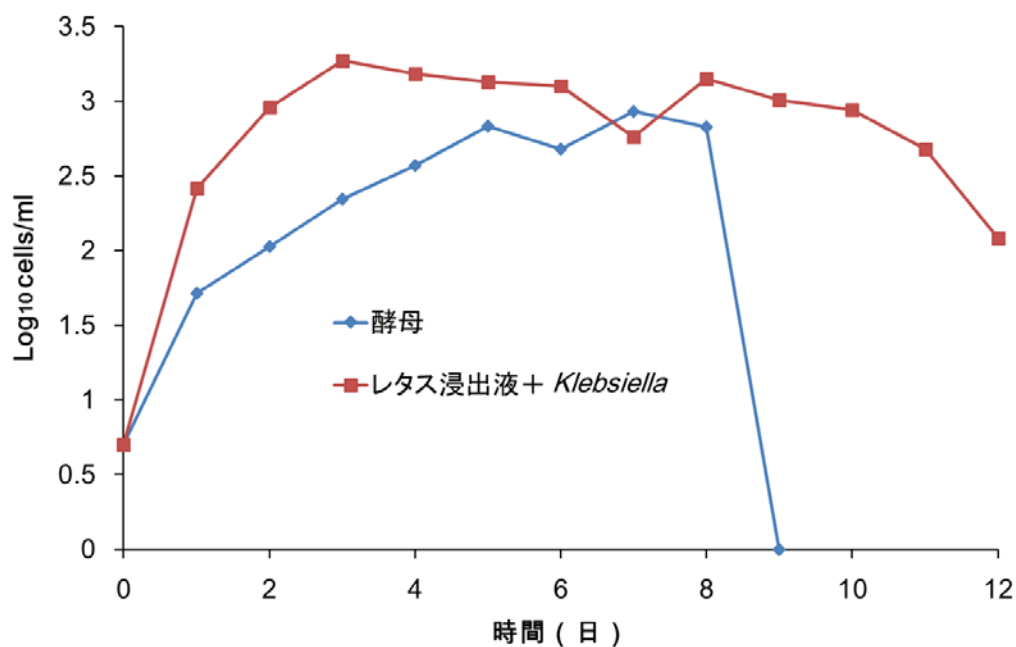


図 12. *Klebsiella* を加えたレタス浸出液または出芽酵母を餌として培養した場合のゾウリムシ HC3 株の増殖曲線。

4 考察

4.1 GFP 標識酵母を用いた繊毛虫の食作用の測定

GFP 標識酵母を用いてミドリゾウリムシの食作用を定量的に測定するためには、酵母がミドリゾウリムシの餌として適していることが望ましい。そこでミドリゾウリムシに餌として出芽酵母を与えて培養したところ、既存の餌と遜色ない増殖を示したことから、酵母はミドリゾウリムシの餌として適していることが分かった。一方でゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) に酵母を与えて培養しても増殖が遅く、死滅に至るのも早かったことから、ゾウリムシは酵母をあまり摂取・利用できないと考えられる。このようにゾウリムシとミドリゾウリムシで酵母に対する食性が異なるという結果は、ゾウリムシが細菌食者であるのに対して、共生藻をもつミドリゾウリムシが藻食者であることを表しているのかもしれない。出芽酵母は緑藻類のクロレラと同じく真核生物であり、細胞の大きさなども比較的近いと、藻食者にとってはよい餌になるのかもしれない。

細胞内に共生生物をもつ生物の食作用を観察する場合は、取り込んだ餌と共生生物をどのようにして区別するかが問題となる。本研究では、緑色蛍光タンパク質 GFP を過剰発現している酵母が強い緑色の蛍光を出すのに対して、共生藻は光合成色素のクロロフィルに由来する赤色の自家蛍光を出すことを利用して、蛍光顕微鏡と 2 種類のフィルターセットを用いることによって、両者をそれぞれ別々の蛍光像として検出することができた。このように、GFP 標識酵母および蛍光顕微鏡を用いることによって、共生藻と食作用によって細胞内に取り込まれた餌を区別することが可能になった。

食作用を定量的に調べるためには、取り込んだ餌の消化と排出が区別できることも重要である。GFP を細胞内に過剰発現している酵母は、細胞が活着している限り蛍光を出し、消化によって細胞壁と膜が失われると蛍光が大きく減少することが予想されるため、GFP 標識酵母を用いることによって消化の検出が可能になることが期待される。まずミドリゾウリムシから未消化の酵母が細胞外に排出される様子を観察したところ、排出された GFP 標識酵母は排出後も顕微鏡によって検出することが十分に可能であることが分かった。一方 GFP 標識酵

母をミドリゾウリムシに取り込ませてから外の酵母を除くと、細胞内に残存している酵母の数は時間が経つにつれて減少したのに対し、細胞外に存在する酵母の数は、ほとんど変化せず細胞内の酵母よりもずっと少ないままだった。ミドリゾウリムシが酵母を消化せずに排出しているとすれば、細胞外に存在する酵母の数は増加するはずなので、細胞内に残存している酵母が減少したのはほとんどが消化によると結論できる。よって、**GFP** 標識酵母を用いることによって、取り込んだ酵母の消化と排出を区別することが可能になったと言える。以上の結果をまとめると、少なくとも一部の繊毛虫については、**GFP** 標識酵母は、食作用を定量的に測定するのに有用であると結論される。

4.2 ミドリゾウリムシの細胞内共生と食作用

GFP 標識酵母を用いて、ミドリゾウリムシの食作用を定量的に測定した。食作用は、餌の細胞内への取り込みと取り込んだ餌の消化の2つの過程からなる。まず取り込んだ酵母の消化については、野生株と白化株でほとんど変わらなかった。この結果から、細胞内に共生藻を持つミドリゾウリムシにおいて、共生藻が分解されるのを防ぐために、細胞全体の消化活性が抑制されることは特にないことが分かった。ミドリゾウリムシにおいては、共生藻は共生胞に包まれており餌などを分解する食胞とは完全に分離されているため(1)、共生藻の存在が食胞の消化活性に影響することはないと考えられる。

一方、取り込む酵母の数については、白化株の方が野生株よりも多かった。このことから、共生藻の存在はミドリゾウリムシの餌取り込み活性を低下させることが分かった。ミドリゾウリムシが酵母を取り込む際に細胞内の共生藻数と取り込む酵母の数に相関があるか調べたところ、弱い正の相関はあるものの、特に負の相関はなかったことから、細胞内の共生藻が少なければ多くの酵母を取り込むわけではない。よって、白化株の方が餌の取り込み活性が高いのは、単に共生藻が存在しないため餌を取り込む空間が多いからというわけではないと言える。弱い正の相関は、ミドリゾウリムシの細胞が大きいほど、取り込む酵母の数と共生藻の両方が多くなることによるものかもしれない。以上より、共生藻の存在によってミドリゾウリムシの餌取り込み活性が低下するのは、単に空間的な問題ではなく、宿主の生理的性質によると考えられる。

野生株の場合、増殖における時期によっても取り込む酵母の数に差がみられ、定常期に入って時間が経つほど減少した。なおゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) においても、定常期に入ると餌の取り込みが減少することが分かっている (14)。この定常期の細胞に酵母を与えると、2 日で取り込み活性が対数増殖期と同程度に戻った。しかし、酵母を与えると同時にタンパク質合成阻害剤も加えると取り込み活性は戻らなかったことから、ミドリゾウリムシは周囲に餌があって増殖を開始すると餌を取り込むのに必要なタンパク質を多く発現し、定常期ではそのようなタンパク質の発現が抑制されていると考えられる。定常期においても繊毛運動による細胞口への餌の運搬は正常に行われていたもので、定常期において発現が抑制されるタンパク質は、餌の細胞口への運搬でなくエンドサイトーシスに関与するものと考えられる。

以上のようにミドリゾウリムシの餌の取り込み活性がさまざまな状況に応じて変化することは、混合栄養生物であるミドリゾウリムシが、生存や増殖の効率を高めるために限りある細胞内の資源（タンパク質）を共生藻の増殖や光合成と自身の食作用のどちらに振り分けるのが有利かという、資源の最適な分配戦略によって説明することができる。野生株の方が白化株よりも餌の取り込み活性が低かったのは、共生藻がいる野生株の場合、資源をある程度共生藻の増殖や光合成に割かなければならないため、食作用への振り分けがその分減ると考えられる。同じ野生株でも定常期に入ると取り込み活性が低下するのは、餌が全く枯渇している状況では、餌の取り込みに資源を割くのは無駄になる可能性が高いためと考えられる。そのような状況でも、多数の共生藻を維持していれば、共生藻の供給する光合成産物によって増殖は出来ないまでも生命活動、特に遊泳運動を維持することができ、餌のある環境に行き着く可能性がある。よって、定常期では食作用よりも共生藻の維持や光合成に資源を振り分ける方が有利になると考えられる。本研究によって、混合栄養生物、特に細胞内に藻類を共生させているミドリゾウリムシが、状況に応じて自身の食作用と共生藻への資源の分配を変えており、それによって餌の取り込み活性を変化させている可能性が示唆された。

参考文献

1. 児玉有紀、藤島政博(2008) 単細胞動物ミドリゾウリムシと緑藻クロレラとの細胞内共生成立機構 原生動物学雑誌 41(2):117-132.
2. 田村琢郎 (2013) ミドリゾウリムシの細胞内における共生藻の増殖の解析 平成 25 年度卒業研究論文
3. Esteban, G. F., Fenchel, T., and Finlay, B. J. (2010) Mixotrophy in Ciliates. *Protist* 161: 621-641.
4. Bronmark, C., Hansson, L.A. 占部城太郎監訳 (2007) 湖と池の生物学—生物の適応から群集理論・保全まで (共立出版株式会社)
5. 丸岡禎(2004) 教材としての原生動物(2)—ゾウリムシ I 原生動物学雑誌 37(1):19-30.
6. Berk, S.G., Parks, L.H., and Ting, R.S. (1991) Photoadaptation alters the ingestion rates of *Paramecium bursaria*, a mixotrophic ciliate. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2312-2316.
7. Ghafari, P., St-Denis, C. H., Power, M. E., Jin, X., Tsou, V., Mandal, H. S., Bols, N. C., and Tang, X. (2008) Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated protozoa. *Nature Nanotechnology* 3: 347-351.
8. 宮脇敦史(2000) GFP とバイオイメーjing グ 蛍光タンパク質の発現と検出の基本から生体機能の可視化まで (羊土社)
9. Mitra, B.N., Yasuda, T., Kobayashi, S., Saito-Nakano, Y. and Nozaki, T. (2005) Differences in morphology of Phagosomes and kinetics of acidification and degradation in phagosomes between the pathogenic *Entamoeba histolytica* and the non-pathogenic *Entamoeba dispar*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 62: 84-99.
10. Kodama, Y., Fujishima, M. (2008) Cycloheximide induces synchronous swelling of perialgal vacuoles enclosing symbiotic *Chlorella vulgaris* and digestion of the algae in the ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist* 159(3) :

483-494.

11. Omura, G., Ishida, M., Arikawa, M., Khan, S.M.M.K., Suetomo, Y., Kakuta, S., Yoshimura, C. and Suzaki, T. (2004) A bacteria-free monoxenic culture of *Paramecium bursaria*: its growth characteristics and the re-establishment of symbiosis with *Chlorella* in bacteria-free conditions. *Jpn J. Protozool* 37: 119-130.
12. Karakashian, S. J. (1963) Growth of *paramecium bursaria* as influenced by the presence of algal symbionts. *Physiological Zoology* 36(1): 52-68.
13. Ayala, A., Weis, D.S. (1987) The effect of Puromycin and Cycloheximide on the infection of algae-free *Paramecium bursaria* by symbiotic Chlorellae. *J. Protozool* 34(4): 377-381.
14. Fok, A.K., Allen, R.D., Kaneshiro, E.S. (1981) Axenic *Paramecium caudatum*. III. Biochemical and physiological changes with culture age. *European Journal of Cell Biology* 25: 193-201.
15. 保科亮、鎌戸伸一郎、加藤豊、今村信孝(2006) 日本産ミドリゾウリムシ細胞内共生藻について 原生動物学雑誌 39(2):173-188.
16. 井上勲(2011) 藻類 30 億年の自然史 第二版 藻類からみる生物進化・地球・環境 (東海大学出版会)

謝辞

本研究を行うにあたり、指導教員である岩井草介准教授（弘前大学教育学部）には研究全般における懇切なる御指導を賜りましたことを深く御礼申し上げます。守屋央朗准教授（岡山大学異分野融合先端研究コア）には、本研究に必要な不可欠である GFP 発現出芽酵母 pTOW-pTEF1::GFP/BY4741 株を提供いただきました。藤島政博教授（山口大学大学院理工学研究科）には、本研究室へディプレッションスライドを提供いただいただけでなく、本研究全般に関して励ましの言葉をいただきました。皆々様方に、改めて御礼申し上げます。最後に、経済的に苦勞をかけながらも大学への進学を許してくれた両親に感謝して、締め括りとさせていただきます。

平成 28 年 1 月 24 日

弘前大学大学院 教育学研究科
教科教育専攻 理科教育専修 生物学分野

13GP211 三浦 貴士