

■原 著■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

神奈川県下で採集された原生動物ミドリゾウリムシの 培養系の確立に関する研究

氷見英子^{1,2} 橋 友理香^{3,4} 小谷 享⁴ 細谷浩史^{4,5}

Studies on Establishment of Culture System of Green Paramecium,
Paramecium bursaria, Isolated in Kanagawa Prefecture

Eiko Himi^{1,2}, Yurika Hashi^{3,4}, Susumu Kotani⁴ and Hiroshi Hosoya^{4,5}

¹ Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Kurashiki City, Okayama 700-8536, Japan

² Present Address: School of Agriculture, Kibi Tokyo International University, Minamiawaji City, Hyogo 656-0400, Japan

³ Yamano College of Aesthetics, Hachioji City, Tokyo 192-0396, Japan

⁴ Department of Biological Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁵ To whom correspondence should be addressed. E-mail: ft160257sv@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: A green paramecium, *Paramecium bursaria*, having several hundred symbiotic algae in its cytoplasm, is widely distributed in freshwater habitats of the world. The symbiotic relationship between *P. bursaria* and symbiotic algae is an excellent model for studying symbiosis between eukaryotic cells. Algae-free *P. bursaria* lines have been produced to clarify the symbiotic relationship between *P. bursaria* and symbiotic algae. In addition, multiple strains of symbiotic algae have been isolated from *P. bursaria*. It has also been revealed that these cloned algae could proliferate in algae-free *P. bursaria* leading to green *P. bursaria*. However, it is still unknown whether algae are the only symbiont with *P. bursaria*. In this study, bacterial flora analysis of the *P. bursaria* medium was performed to investigate the relationship between *P. bursaria* and bacteria. Moreover, a strain of *P. bursaria*, which can be cultured without bacteria as food, was established. The results obtained will be discussed in this report.

Keywords: green paramecium, bacteria, culture medium, symbiosis, protistology

序論

代表的な原生生物の一種である繊毛虫ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は、体内に緑藻クロレラに類似の共生藻が数百個共生している。大きさは 100 μm 程度であり、肉眼でも緑色に見える点で他の原生生物と容易に区別できる。

ミドリゾウリムシは、世界各地に普遍的に生息している。野外では共生藻が体内に共生していない「白いミドリゾウリムシ」が生息している、という報告もある¹⁾。良く知られているゾウリムシとミドリゾウリムシは、共生藻の有無を除けば互いに類似の形態を持ち、同じ繊毛虫に分類されている。しかし、両者を交配させる事、さらにはゾウリムシに共生藻を共生させる事なども不可能である。

なぜ(ゾウリムシではなく)ミドリゾウリムシ体内に共生藻が共生できるのだろうか。

共生藻とミドリゾウリムシ両者の共生メカニズムを明らかにするために、白いミドリゾウリムシを研究室内で人工的に作成する方法が複数報告されている²⁾。また、ミドリゾウリムシから単離された共生藻クローン株も複数確立されている³⁾。これらの単離共生藻株は、前出の白いミドリゾウリムシに補食させると、補食された一部の共生藻がミドリゾウリムシ体内に移動し、結果的に「緑色の」ミドリゾウリムシを再生/復元させる事も可能である^{4,5)}。単離共生藻株は、藻類培養の培地中で、ミドリゾウリムシに共生していない状態で長期間培養が可能である。

残念な事に、これらの単離共生藻株をゾウリムシに補食させても共生藻は食胞からゾウリムシ体内に移動せず、上述の様に「緑色のゾウリムシ」を創製する事は不可能である。共生藻に対するミドリゾウリムシとゾウリムシのこのような反応の差は、どのような理由で生ずるのだろうか。この理由を明らかにする事が、「共生藻のミドリゾウリムシへの共生メカニズムの解明」に直結する事は間違いない。このために、まだ未解明のミドリゾウリムシゲノムの解析は急務である。

共生藻に関しては、分子生物学的な解析が進んでいる。一方、ミドリゾウリムシ体内の共生藻の種類を始め、世界各地に生息するミドリゾウリムシ体内の共生藻の状況が同一か否か、など、細胞生物学的な解析に関しては多くの事項が未解明のままである。

ゾウリムシは、まわりのバクテリアやカビ、さらには（自由生活性の）藻類などを補食して生存が可能である。一方ミドリゾウリムシは、太陽光の利用できる日中は、体内の共生藻が産生する光合成産物を利用して生存が可能である。また、日中でもバクテリアやカビなどを補食している可能性は高い。さらに、太陽光が利用できない環境（夜間など）では、ゾウリムシと同様ミドリゾウリムシは確実にバクテリアやカビ、さらには藻類などを補食しているものと推測されている。

共生藻をミドリゾウリムシに補食させると、一部の共生藻は消化を免れミドリゾウリムシ体内で共生を開始することは既に述べた。消化を免れ、共生を開始できるものは共生藻だけであろうか。ミドリゾウリムシに補食されたバクテリアやその他の微生物の行く末は？ 実際、藻類が共生できないのにも関わらず、核内にバクテリアが共生（論文では“infection”とも表記）しているゾウリムシの仲間が存在する、という報文がある⁶⁾。ミドリゾウリムシにおいても、体内でバクテリアと酵母菌（のinfection）を確認したという報文が存在する⁷⁾。

ゾウリムシやミドリゾウリムシを培養する際には、通常、様々な種類のバクテリアをエサとして投与している。バクテリアや酵母菌の共生を報告したこれらの報文^{6,7)}でも、培養に際しバクテリアがエサとして投与されている。この場合、投与されたバクテリアが補食後体内に取り込まれ、「共生」に至らぬ手前の状況でゾウリムシやミドリゾウリムシの体内で観察されている可能性は無いのだろうか。本来なら、「無菌」の状態のゾウリムシやミドリゾウリムシを準備し、エサとしてバクテリアの投与は行わないですむ培養条件が必須である。そのもとで、あらためてバクテリアを加えその行方を追う必要がある。本研

究では、ミドリゾウリムシの培養条件の確立を目的として、エサの投与を行わず長期に渡り維持可能なミドリゾウリムシ株の確立を行った。

材料と方法

ミドリゾウリムシ

湘南ひらつかキャンパス内各所の湿地や池でミドリゾウリムシの探索を行い、得られたミドリゾウリムシについて、複数のクローン化株が既に確立されている⁸⁾。具体的には、ミドリゾウリムシ一個体を培養池水から単離し、洗浄後レタス培地中で増殖させ、クローン化ミドリゾウリムシ株を作製した。これらのミドリゾウリムシ株を本研究で使用した。

エサを投与しないミドリゾウリムシの培養

ミドリゾウリムシの培養では、レタス培地を使用した。レタス培地の作製は以下の通りである。レタスの葉を洗浄後、沸騰水中で1-2分茹でたのち、濾紙上に広げ乾熱滅菌器で乾燥させた。乾燥したレタス葉1gに対して2Lの割合でイオン交換水（DW）を加え、100℃で5分間抽出を行った。その後、抽出液の冷却を待ってろ過を行いレタス葉を取り除いた。得られたレタス培地を広口メジューム瓶に分注してオートクレーブ（120℃、20分）を行い、室温で保存した。クローン化ミドリゾウリムシはレタス培地中で外部からバクテリアなどのエサを与えず、インキュベーター（BiOTRON, 日本医科機械製作所）内で23℃、光照射下（12時間明、12時間暗）長期間培養を行った。

結果

ミドリゾウリムシの継代

ミドリゾウリムシを一匹単離しクローン化する作業は2017年までに実施されている⁸⁾。得られた複数のクローン化株について、2017年以後現在に至る迄、培養時にバクテリアなどのエサを外部から投与する事は行っていない。具体的には、6穴プレートの各ウェルに3mLのレタス培地を投入、それぞれのウェルに1匹ずつ、培地中で保存されているクローン化ミドリゾウリムシを投与後、培養を開始し増殖の様子を観察した（2017年）。ミドリゾウリムシは、投入前に、保存されている200mLコルベン中から取り出されレタス培地を用いて洗浄を行った。培養開始後二週間で20-30細胞/ウェル程度（密度では7-10細胞/mL程度）に増殖した株を選別し、洗浄は行わず同様な作業をさらに一度繰り返した。培養開始後三週間で100-200細胞/ウェル程度（密度では30-70細胞/mL程度）に増殖した株を100mLの

培養系（200 mL コルベン）に投入、増殖を観察した。培養開始後 40–60 日程度で 1000–1400 細胞/mL の密度に増殖し、その状態（増殖の定常期）でインキュベーター内で長期間（1 年程度）保存した。この間、エサのバクテリアは投与していない。同様な作業は 2018 年も実施、さらに 2019 年も既に実施済みである。

ミドリゾウリムシの培養に、通常バクテリアなどのエサを用いることは既に述べた。実際、本研究グループでも、野外からミドリゾウリムシを単離した後しばらくは、レタス培地にエサを投入して培養を行っていた（2017 年以前）。本研究グループを含む、各所で実施されているこのような培養法では、研究者毎に加えるエサ（各種バクテリア以外に、ミドリゾウリムシ以外の小型の原生生物などを与えて培養している研究グループもある）の種類が異なり、ミドリゾウリムシ培養条件の均一化（均一化とは、どの研究グループでも全く同様のミドリゾウリムシ培養条件を用いて実験を行う、の意味）がはかれないという難点がある。共生藻に関しても、例えば日本国内、あるいは海外で採集されるミドリゾウリムシについて、どの個体でも同じ種類の共生藻が共生しているのか、さらには一個体内部の共生藻（400 個程度）が同種か否かなど、基本的な事項について不明である事はすでに述べた。共生藻に関する均一化の問題を解決するため、共生藻除去した白いミドリゾウリムシを作製し²⁾、そこにクローン化した共生藻を再共生させ「内部の共生藻の種類が全部均一のミドリゾウリムシ」を作製、「モデルミドリゾウリムシ」を作製する試みも魅力的である^{4,5)}。しかし、培養中にミドリゾウリムシから共生藻が出入りしているという観察もあり、いくら均一の共生藻を共生させた新規ミドリゾウリムシであっても、長期間の培養中「共生藻の質」を常に保証することは難しい。ミドリゾウリムシおよび共生藻に関わるこのような「実験材料としての質の保証」、言い換えると「ミドリゾウリムシを実験材料としてモデル化する」事に関して容易に想定される問題を解決する作業は急務である。

培地中のバクテリア

ミドリゾウリムシを野外から単離した直後は、ミドリゾウリムシは体内にエサとして複数のバクテリアやその他の微生物（酵母菌や原生生物）を取り込んでいるはずである。これらの微生物は、ミドリゾウリムシを一匹単離し、無菌のレタス培地で洗浄を繰り返しても除去されない事は明白である。それだけでなく、除去されなかったバクテリアや微生物が培

地中で増殖し、培養液中でこれらが検出されるはずである。本研究では、野外から単離直後のミドリゾウリムシの培養液について、エサ投与下で培養開始後一定の期間ごとに採取し、バクテリア培養用の寒天培地（BTB 寒天培地、ニッスイ）に塗布後、形成されたバクテリアコロニーの同定を 16SrDNA の配列を明らかにすることにより実施した。この実験により、培養開始直後（投与されたエサのバクテリアが優位）からどのような種類のバクテリアが培地中で増殖していくか、経時的な観察を行った。その結果、培養開始後 2 日では、投与されたバクテリア（理研 JCM14683）が優位であったが、5 日目から他種のバクテリアが増殖し始めて、12 日では JCM14683 は検出されず、Proteobacteria に属する *Variovorax* や、Bacteroidetes に属する *Chryseobacterium* などのバクテリアが優位に増殖していた。これらのバクテリアは、エサ投与を実施した複数のミドリゾウリムシ培養系で同様に検出されており、ミドリゾウリムシの培養環境下での常在菌である可能性が高いものと考えられた。

討論

本研究で使用されたミドリゾウリムシは無菌化されておらず、正確な意味でのクローン（純粋な単細胞由来の細胞集団）ではない。ゾウリムシやミドリゾウリムシを無菌化したと言う報文も過去にあるが、無菌化ゾウリムシでは、その後体内にバクテリアが共生している事が明らかにされた。バクテリアの共生がゾウリムシやミドリゾウリムシの生存には必要である可能性が高い。

本研究により、長期間外部からバクテリアを投与せずレタス培地中で維持できるミドリゾウリムシ株が確立された。外部からのエサの投与が無い状態で、当該株がこれからどれくらいの期間維持できるか、今後も継続的な確認作業が必須である。今回は、バクテリア投与開始後短期間での培養液中におけるバクテリア組成の変化を確認した。今後、長期間バクテリア投与をせず維持されたミドリゾウリムシ培養液中においても、バクテリアの組成がどのように変化しているか、網羅的に解析する必要がある。

謝辞

本研究は 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成金（RIIS201808）を受けて行った。本研究の遂行には、神奈川大学の日野晶也教授（理学部）、北島正治氏（理学部）、井上和仁教授（理学部）を始め、卒論生各位（小貫まどか、島村拓伸、中澤隼、根岸一樹、諸橋礼大）の協力を得た。ここに感謝の意を表する。

文献

- 1) Tonooka Y and Watanabe T (2002) A natural strain of *Paramecium bursaria* lacking symbiotic algae. *Europ. J. Protistol.* **38**: 55-58
- 2) Hosoya H, Kimura K, Matsuda S, Kitaura M, Takahashi T and Kosaka T (1995) Symbiotic algae-free strain of the green paramecium *Paramecium bursaria* produced by herbicide paraquat. *Zool. Sci.* **12**: 807-810
- 3) Nishihara N, Horiike S, Takahashi T, Kosaka T, Shigenaka Y and Hosoya H (1998) Cloning and characterization of symbiotic algae from the green paramecium *Paramecium bursaria*. *Protoplasma* **203**: 91-99
- 4) 細谷浩史 (2000) 太陽エネルギーで生きる動物. *科学* **70**: 636-641.
- 5) 細谷浩史 (2013) 原生動物ミドリゾウリムシの謎にせまる. *じっぎょう理科資料* **73**: 1-6.
- 6) Preer LB (1969) Alpha, an infectious macronuclear symbiont of *Paramecium aurelia*. *J. Protozool.* **16**: 570-578.
- 7) Gortz HD (1982) Infections of *Paramecium bursaria* with bacteria and yeasts. *J. Cell Science.* **58**: 445-453
- 8) Hosoya H, Hamao K, Kato K, Dohra H and Kotani S (2017) Studies of green paramecium, *Paramecium bursaria*, isolated in Kanagawa Prefecture. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **28**: 79-83