

サイエンス・プラザ

原生動物ミドリゾウリムシの謎にせまる

広島大学大学院理学研究科生物科学専攻
細胞生物学研究室教授 細谷 浩史

ミドリゾウリムシは日本全国の池や沼、河川に生息しているため、採集が容易で、小中高さらには大学で実施される生物実習の材料としてはもってこいの生き物である。しかし、野外での生態を始め、増殖のメカニズム、緑色の原因である「共生藻」の共生メカニズム、野外に生息する白いミドリゾウリムシの誕生の秘密、さらにはゲノム構造など殆どが未解明のままであり、ミドリゾウリムシについての本格的な研究は、実はようやく始まったばかりである^{参考文献1)}。本稿では、教材として使用する際の長所と短所を意識しながら、未知の生き物ミドリゾウリムシを語ってみようと思う。

1. はじめに

日本全国の池や沼、河川には、代表的な原生動物の一種である繊毛虫ゾウリムシにそっくりの「ミドリゾウリムシ」が生息している。ミドリゾウリムシは、大きさが人間の髪の毛の太さと同じくらい（100-120 μm 程度）で、日本以外の各国、例えばドイツやアメリカなどにも生息している。体内にはクロレラに類似した共生藻がびっしりと詰まっており、緑色なのでひと目でゾウリムシと

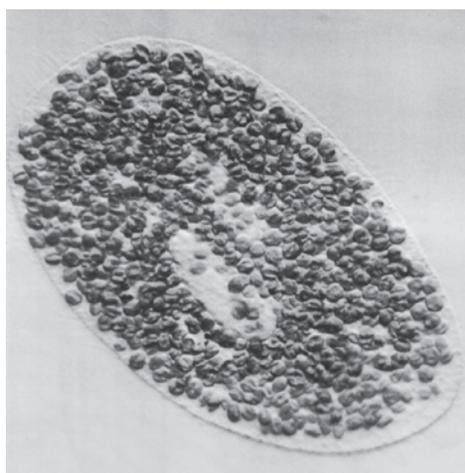


図1 ミドリゾウリムシ

大きさは100-120 μm 程度。体の周りに繊毛が生えているので繊毛虫に分類される。体内に数百個の、クロレラに類似の共生藻が共生しているのが特徴である。

(Hosoya et al. (1995), Zoological Science, 12:807-810, Fig.3 より転載)

区別できる。体内の共生藻は大体どのミドリゾウリムシでも数百個程度である（図1）。

2. ミドリゾウリムシとミドリムシ

ミドリゾウリムシは、よく「ミドリムシ」と間

◆ も く じ ◆

サイエンス・プラザ

原生動物ミドリゾウリムシの謎にせまる…… 1

トピックス

生命の惑星は銀河系に充満している？…… 7

高校生へ私が選んだ1冊の本

凍った地球

スノーボールアースと生命進化の物語…… 12

違われる。ミドリムシは粉状にされクッキーに入れられたり、また航空機のジェット燃料の材料として見直されたりして、マスコミに時々とりあげられている。ミドリムシは、体内に直接葉緑体が存在している点でまさに「植物（または藻類）*」である。しかし、鞭毛が生えており動く事ができるので、そのために繊毛を用いて自由自在に遊泳するミドリゾウリムシと混同されるのかもしれない。ミドリゾウリムシでは、体内の共生藻の「中」に葉緑体が局在しており、葉緑体は直接ミドリゾウリムシに含まれている訳ではないので、植物細胞（または藻類）の定義には当てはまらない。れっきとした「動物細胞」である。見方を変え、動物細胞なのに体内に葉緑体が含まれている事になり、誠に不思議な生き物であると言える（図2）。共生藻にしてみれば、自分では動く事ができないが、ミドリゾウリムシに共生できるようになったおかげで様々なところに行けるようになったというメリット(?)がある。

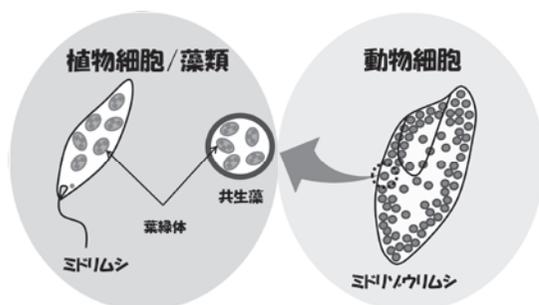


図2 ミドリムシとミドリゾウリムシの比較

中央は、ミドリゾウリムシ（右）の体内の共生藻を拡大したもの。共生藻体内には直接葉緑体が存在している。その左はミドリムシ。共生藻と同じく、ミドリゾウリムシ体内には直接葉緑体が存在する。ミドリゾウリムシには、共生藻を介して間接的に葉緑体が存在している事がわかる。共生藻の大きさは数 μm 程度、ミドリムシは60 μm 程度である。

*分類学上は、藻類は原生生物に含まれ、植物とは区別されている。

3. 共生藻を除去した白いミドリゾウリムシの作製

野外には、ミドリゾウリムシの他に、共生藻が共生していない「白いミドリゾウリムシ」も存在するという報告がある。我々は、まず始めに人工的に白いミドリゾウリムシを作製できないかと考

えた。過去の論文を検索したところ、暗闇でミドリゾウリムシを飼いつける方法（暗闇法）や、DCMUと呼ばれる光合成阻害剤を作用させると白いミドリゾウリムシが作製できる方法（DCMU法）などが海外での実例として報告されていた。両者とも理屈は合理的である。特に「暗闇法」に関しては、日常の我々の経験、例えば暗がりに植物の鉢植えを置きっぱなしにすると枯れてしまう事から、共生藻でもさもありませんと納得できる。我々は成功を疑わず、先達を書いた論文の追試に取り掛かった。暗闇での培養開始5日目にミドリゾウリムシを取り出して観察すると、顕微鏡を用いるまでもなく、ミドリゾウリムシは白っぽくなり共生藻数の減少が見て取れた。10日目に観察すると、共生藻はミドリゾウリムシ体内で50個程度に減っていた。元は数百個程度だった訳だから「激減」と言える。迷わず暗闇培養を続け、15日目に3回目、20日目に4回目の共生藻の観察を行った。予想外な事に15日以後は共生藻は減少せず、結局「ゼロ」にはならなかった。「DCMU法」も試したが白いミドリゾウリムシは作製できなかった。

我々は暗闇法とDCMU法を諦め、新たな方法で、確実に、誰でもミドリゾウリムシを白くできる方法がないか検討を始めた。様々な方法を試みた結果、現在までに、雑草除去に用いるパラコートと呼ばれる物質を極めて薄く希釈した液（パラコート法）^{参考文献2)}と、もうひとつは、トンネル工事等に用いるアクリルアミドをこれまた極めて薄く希釈した液（アクリルアミド法）それぞれでミドリゾウリムシを培養すると、いずれの場合でも共生藻がミドリゾウリムシ体内から取り除かれる事が明らかになった。

さて、ここで「共生藻がミドリゾウリムシから除去された」という事をきちんと証明するにはどうしたらよいか、という点について考えてみる。先達の論文は、光学顕微鏡（ふつうの実体顕微鏡と思われる）でミドリゾウリムシ体内の共生藻を観察できなくなった場合を「共生藻除去」と定義していた。しかし、この方法ではほんのわずかの

共生藻がミドリゾウリムシ体内に潜んでいても気付かず「共生藻は完全に除去された」と思ってしまう場合もあるだろう。という事で、もう少しきちんとした方法で「共生藻除去」を証明したいと考えた。我々は共生藻内に存在する葉緑体に含まれるクロロフィル（葉緑素）が紫外線に当たると赤い自家蛍光を発するという事実に注目し、共生藻が除去されたと考えられる白いミドリゾウリムシを蛍光顕微鏡で観察した。ここで共生藻の赤い自家蛍光が観察されなければ「共生藻除去」がよりきちんとして示された事になる。上記のパラコート法等ではその定義に従って「共生藻が除去された」とみなしている。

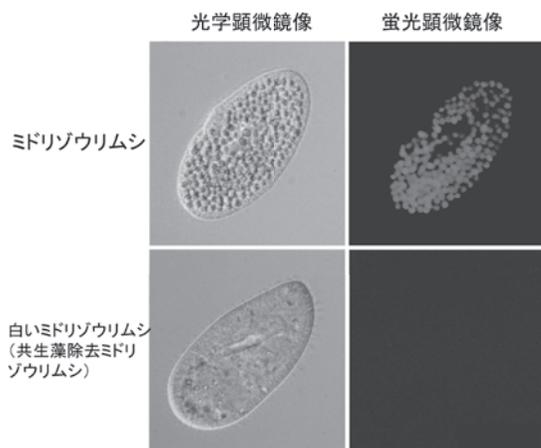


図3 ミドリゾウリムシと白いミドリゾウリムシ

(上段) ミドリゾウリムシ (左) を蛍光顕微鏡で観察すると、共生藻内の葉緑体に含まれるクロロフィルが紫外線によって自家蛍光を発し赤く (ここでは灰色に) 見える (右)。

(下段) パラコートを用いて作製された白いミドリゾウリムシ (左) では、蛍光顕微鏡を用いても赤い (灰色の) 共生藻は観察されない (右) (参考文献 2)。

ところが、よく考えると、パラコート処理により葉緑素がなくなっただけで葉緑体特有の遺伝子がそのまま残っている場合もあるだろう。だから、葉緑素の自家蛍光がなくなっただけでは「共生藻が除去された」と胸を張って言えない事に気がついた。そこで、植物細胞に極めて多く含まれる RubisCO と呼ばれるタンパク質の遺伝子に注目し、この遺伝子がミドリゾウリムシ体内からなくなったら共生藻除去が完了したと「より」強く言えるのでは、と考えた。幸いな事にパラコ

ート法で作製した白いミドリゾウリムシからは RubisCO の遺伝子は検出されなかった。

ところが (また、ところが、である)、RubisCO 以外の植物特有の遺伝子もある訳であるし、RubisCO の有無だけで共生藻の有無を確実に論ずる事ができる訳でもない。現在ミドリゾウリムシのゲノム解析は行われていないが、将来「白いミドリゾウリムシのゲノム」が明らかになれば、その中に植物由来の遺伝子がないかどうかを調べる事ができるので、その時代の到来を待っているところである。

ところが (またまた、ところが、である)、他の共生生物では共生体の遺伝子がホストに乗り移ってしまっている場合があるので、どこまで調べたら「共生藻がない」と言えるのだろうか大いに悩む所である。

4. 共生藻のクローン化

ミドリゾウリムシ体内に数百個程度の共生藻が常に存在している事は既に述べた。ミドリゾウリムシの状況がどうであれ、なぜいつも共生藻が数百個程度で一定か、という事実にも興味があるが、何はともあれ、この数百個が皆同じ共生藻であるかどうかまだわかっていないのが現状である。ミドリゾウリムシは日本全国のみならず、世界のいたるところに生息しているが、例えばドイツのミドリゾウリムシ体内の数百個の共生藻と、アメリカのそれが全く同じであるかどうかかわからない。同じミドリゾウリムシであっても、両国で体内の共生藻の種類・組み合わせが異なれば、両国のミドリゾウリムシ研究者が同じ研究結果を出せない場合もあるだろう。日本国内でも同様である。例えば、岩手のミドリゾウリムシに広島のみドリゾウリムシと同じ種類の共生藻が共生している保証はない。ミドリゾウリムシ体内の共生藻を岩手と広島で、いや、全世界で同じものにしておかなければ研究者は再現性の良い研究を実施できないだろう。そのために、共生藻をミドリゾウリムシ体外に取り出し、たった一個の共生藻を増殖させてきた純粋な共生藻の集団「クローン化共生藻」

を作製できる方法を確立させる事にした。これらのクローン化共生藻を「白いミドリゾウリムシ」に再共生させ、「少なくとも」中身が全く同じミドリゾウリムシを全世界の研究者が共有できれば、ミドリゾウリムシ研究が飛躍的に進展するのではないかと考えた次第である。

幸いな事に、共生藻はミドリゾウリムシから取り出されても生存可能であるという事は先達の研究で分かっていた。これらのミドリゾウリムシから取り出したままの共生藻を培養し、その中から一個だけ共生藻を取り出してその共生藻を培養した。このような方法で純粋なクローン化共生藻を作製する事にした。実際には、プラスチックシャーレ内で寒天を固化し、その上に、ミドリゾウリムシをつぶした共生藻を含む細胞破碎液を白金耳を用いて塗りつけた。シャーレを37度の恒温装置にセットし家路についた。翌朝が待ち遠しかった事ははっきり記憶に残っている。翌朝研究室に到着し恒温装置の扉をあけて中のシャーレを一目見て驚いた。寒天表面が、赤や黒、黄色のふかふかの物体で覆われている。白いどろっとした、何かわからないコロニーも寒天培地上に散見される。高等動物培養細胞も別の部屋で培養しているので、これらがカビだったら実験室中大変な事になる。でもどう見てもカビに違いなく、この事が契機となり、高等動物培養細胞用のプレハブの無菌ルームを隣の実験室内に新築する事になった。ところで、ミドリゾウリムシはそもそも野外から採集されてきたものであり、しかもかれらは太陽エネルギーが利用できないときは周りの細菌やカビを食べていると考えられるので、カビや細菌はある意味生えて当然、かれらと無縁でミドリゾウリムシ（野外生物）研究はできないと今更ながら思いなおした。

無菌ルーム作製でこの難局を乗り切りつつ、共生藻クローン化の実験を再開した。細菌やカビには不適だが植物細胞の培養に適した貧栄養培地を用いて寒天を固め直し、光を照射した状態で恒温装置内での培養を再開した。様々な試行錯誤の末、カビや細菌の増殖は抑えられ、小

さな緑色の斑点が寒天培地上に形成される培養条件を見出した。斑点の出現には約一カ月かかる。滅菌した楊枝の先でその斑点、すなわち共生藻のコロニーをつつき培地に溶解させ、再び寒天培地に塗布し一カ月待つ、という作業を繰り返し、ついに共生藻をクローン化する事に成功した。

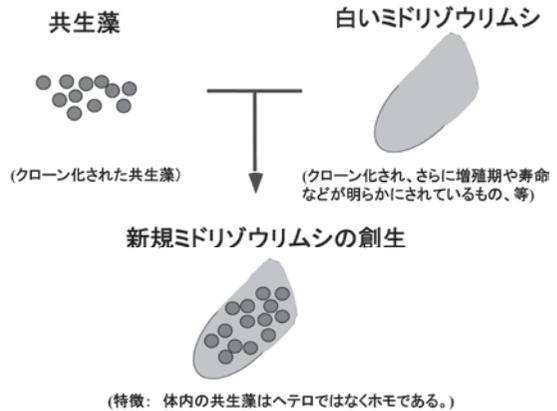


図4 新規ミドリゾウリムシの創生

ミドリゾウリムシから取り出しクローン化した共生藻を、白いミドリゾウリムシに再共生させると、体内の共生藻が全部同じ種類の「新規ミドリゾウリムシ」を新たに作り出す事ができる。

5. 謎(1)：共生藻のミドリゾウリムシへの共生能力

現在までに我々は、4で示した方法でいくつもの共生藻をクローン化した。クローン化共生藻を白いミドリゾウリムシにエサとして与え、複数の「再共生ミドリゾウリムシ」を創生する事にも成功した。興味深い事に、もともとミドリゾウリムシ体内にいたはずの共生藻であっても、中には白いミドリゾウリムシに「再共生」できない株もある事に気付いた。共生藻は、形態的には自由生活性のクロレラにそっくりである。我々はクロレラの保存株を多数所持している東京大学分子細胞生物学研究所（当時）に依頼して多数のクロレラ株を入手した。これらのクロレラは今までミドリゾウリムシに出会った事はないはずだが、ひょっとしたら白いミドリゾウリムシに共生するのではないかと考え再共生実験を試みた。その結果、殆どのクロレラは再共生できないが、少数のクロレラは白いミドリゾウリムシに再共生できるという、

これまた興味深い事実を明らかにする事ができた。元は共生できていたクローン化共生藻がなぜ共生能を失ってしまったのか、また、ミドリゾウリムシとは無縁に生きてきたはずの自由生活性クロレラに、少数でもミドリゾウリムシに共生できる株が存在する理由は何なのか、これらの二つの疑問はまだ解明できていない。

6. 謎(2)：共生藻がゾウリムシに共生できない理由

ゾウリムシはミドリゾウリムシと同じ繊毛虫に分類される原生動物である。高等学校や中学校の生徒達には、ミドリゾウリムシよりはるかに身近な生き物である。このゾウリムシもやはりバクテリアやカビを主食としており、周りに共生藻がいると共生藻も捕食する。捕食された共生藻はしばらくゾウリムシの食胞にとどまっているがやがて消化され、決してゾウリムシ体内に共生する事はないと考えられている。なぜ共生藻はゾウリムシに共生できず、ミドリゾウリムシだけに共生できるのだろうか。光合成反応の過程では活性酸素が発生する。活性酸素は有害であり、植物細胞などではSODと呼ばれる物質を生産し活性酸素の無毒化に対処させている。しかし、動物細胞にはSODはない。それではミドリゾウリムシは、体内の共生藻が光合成を行う際発生した活性酸素をどのようにして処理しているのだろうか？ひょっとしたら、ミドリゾウリムシは他のゾウリムシに比べて活性酸素に対する耐性が高いからこそ共生藻を許容できたのではないかと考えて、傷口に塗るオキシドールの主成分である H_2O_2 をミドリゾウリムシやゾウリムシに作用させ、 H_2O_2 に対する耐性を調べてみた。その結果、ミドリゾウリムシは、各種ゾウリムシに比べて活性酸素に対する耐性が高い事が明らかになった。ミドリゾウリムシの活性酸素に対する耐性は、たとえ白いミドリゾウリムシであっても、共生藻を再共生させたミドリゾウリムシであっても、いずれも同じで高く、活性酸素に対する高耐性は共生藻の有無に無関係のミドリゾウリムシ固有の性質である事が明らか

になった。過去の進化の過程で、何らかの理由によってミドリゾウリムシは活性酸素に対する耐性を有するようになり、そのため共生藻を体内に常時維持できるようになったものと我々は考えている。

7. 謎(3)：ミドリゾウリムシの夜間の過ごし方

ミドリゾウリムシは太陽光を利用できない夜間は どうやって空腹をみたくしているのだろうか。その答えとして、「夜間はミドリゾウリムシは体内に蓄積した糖類を切り崩して消費している」か、「周りのカビやバクテリアを捕食する事で栄養を補給している」という二つの可能性を我々は準備している。しかし、ミドリゾウリムシのバクテリア消費量を、昼と夜できちんと比較した論文を筆者は知らない。またバクテリアがない状態で、夜間の体内糖類の蓄積量減少をきちんと定量した論文も筆者は知らない。今後の研究の進展が待たれるところである。

8. 謎(4)：ミドリゾウリムシ体内に含まれる高濃度の遊離糖の存在

今から40年以上前に、ミドリゾウリムシ体内にマルトースなどの遊離糖が含まれている事が明らかにされた。この事を報告したいくつかの論文の一つは、薄層クロマトグラフィーという伝統的なテクニックで遊離糖の存在を指摘している。その論文の図はたった一つで、しかも生データではなくマルトースの泳動「バンド」を作図の細長黒四角で整然と示しただけのものという何ともおおらかな論文だった。共生藻は光合成を行うから、マルトース等はミドリゾウリムシ体内にあっても不思議ではない。生データを美しい作図で代用する事が許されない現代に話を戻すが、糖の存在を何とか確かめたいと思い、我々の近代的？手法を用いた分析で遊離糖の存在を確かめ、その濃度は相当高い事も併せて明らかにした。これらの遊離糖がエネルギー源なら、ミドリゾウリムシは光に当たるだけでエサをとらなくても長期間生存できるはずである。遊離糖が共生藻からミドリゾウリ

ムシへの御礼?かどうかはともかくとして、将来もしこれらの遊離糖を取り出す事ができれば、人類食糧と競合しない原材料を用いた糖生産が可能となり、人類も多大な恩恵を受ける事になるだろう。

9. 謎(5)：共生藻のミドリゾウリムシ体内での流動

ミドリゾウリムシ自体は大体一日に一回程度分裂する事がわかっている。その場合、ミドリゾウリムシ体内の共生藻数が一定のままだと、ミドリゾウリムシの増殖に伴って共生藻数は半減していき、最終的にはゼロになってしまうだろう。しかし、ミドリゾウリムシ体内の共生藻数は、どのミドリゾウリムシでも数百個程度である事はすでに述べた。そのためには、共生藻は、ミドリゾウリムシの分裂と同調して分裂し、その数を増加させなくてはならない。我々は、ミドリゾウリムシの分裂前後におけるミドリゾウリムシ体内の共生藻数を丹念に数え、共生藻はミドリゾウリムシの分裂「直前」に二倍に増殖する事を明らかにした。ミドリゾウリムシの分裂「直後」に共生藻数が半減してしまい、すぐ共生藻が一回分裂して元通りの共生藻数に追いつくメカニズムでも良い訳だが、事実はそうではない。その理由は謎である。ともかく、ミドリゾウリムシの増殖に同調して共生藻が増殖し、ミドリゾウリムシ体内の共生藻数を一定に保っている事実は確認できた。さて、次はミドリゾウリムシと共生藻の分裂が同調している理由である。その理由もまだ謎のままであるが、理由を考える上でヒントとなる一つの興味深い現象が見つかっている。共生藻は間期(=分裂していない時期)のミドリゾウリムシ体内で一斉に一方向に流動している。その様子は、校庭の400mトラックを一斉に同じ方向にランニングする生徒の集団の様である。ところが、ミドリゾウリムシが二つに分裂しようとしている時共生藻の流動は停止し、ひょうたん型のミドリゾウリムシ体内の各所で共生藻はランニングをやめてもじもじしながらその場にとどまる様になる。この現象を纏めると、「間期のミドリゾウリムシでは、共生藻は流

動しているので分裂できないが、ミドリゾウリムシが分裂期に入ると流動は停止するので共生藻は分裂、しかも一回だけ分裂可能になる」という事になる参考文献3)。「流動が共生藻の細胞分裂を制御する」という仮説を証明するために、我々は現在様々な検討を行っているところである。

10. 最後に

身近に、どこにでもいるミドリゾウリムシは、このように多くの事柄が謎に包まれたままの不思議な生き物である。ミドリゾウリムシは、池や沼で周りがエサのバクテリアやカビだらけの状態ですら普通に生活している訳だから、体内に共生藻以外にも多くの生き物が棲みついている可能性が高い。ミドリゾウリムシを用いて、例えば岩手と広島で互いに異なる実験結果を生徒が出したとしても、それは生徒の技量や先生の指導のせいではなく、ミドリゾウリムシに住みつく共生生物が異なるせいかもしれない。顕微鏡でミドリゾウリムシ体内を観察する場合、共生藻の他に何か生き物らしいものを見つけたら是非ムービーを撮っておきたい。ミドリゾウリムシを暗闇に置いて長時間観察し、自分の地域のミドリゾウリムシを用いて共生藻数がどう変化するか測定してみるのも面白い。本稿で記述した以外の方法で白いミドリゾウリムシの作製に成功したという報告も実際存在する。パラコートやアクリルアミドなどを用いない、より簡単な、再現性のある(=ここが肝心)白いミドリゾウリムシ作製法の発見に是非チャレンジしていただきたい。ミドリゾウリムシの実験で不思議な事が起こったら、いつでも先生方からの相談をお受けさせていただいております。

参考文献

- 1) 細谷浩史 (2000) 太陽エネルギーで生きる動物. 科学 vol.70, No.8, p636-641, 岩波書店
- 2) Hiroshi Hosoya, *et al.*, (1995) Zoological Science, vol.12, p807-810
- 3) Toshiyuki Takahashi, *et al.*, (2007) PLoS ONE, Issue 12, e1352