

ミドリムシの化学走性の観察

石川県立金沢泉丘高等学校理数科

岩崎 ななみ 松村 京香 石田 航輝 扇 弘樹 川合 温大

要旨

私たちは、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) が化学走性を示す物質とそのときの走性の強度を調べるために、寒天を使った実験装置を用いて数種類の化学物質について調査した (寒天法)。その結果、グルコースやエタノールに対する化学走性が観察されたが、より明確な結果を得るためにポリジメチルシロキサン (PDMS) を加工したマイクロ流路¹⁾を使い、顕微鏡下でさらに化学走性を観察した (マイクロ流路法)。その結果、二酸化炭素に対し正の走性が、アンモニアや 1.0%エタノールに対し負の走性が観察された。

1. 研究背景・目的

ミドリムシのもつ化学走性についての研究は光走性に比べて少なく、詳細が判明していない。そこで私たちは、ミドリムシが化学走性を示す物質と、そのときの走性の強度を調べることにした。

材料となるミドリムシは、2年前に(株)島津理化より購入した *Euglena gracilis* を植え継いできたものだが、植え継ぎ直後の低密度時、有機物として入れた米粒にミドリムシがたくさんついている状態が観察され、ミドリムシには化学走性があると考えた。

そこで、生命に必要な糖やアミノ酸の化学走性から調べることにした。

2. 仮説

私たちは、ミドリムシは二酸化炭素、グルコース、グルタミン酸に関して正の化学走性を持つと仮説を立てた。二酸化炭素に関しては、ミドリムシは葉緑体を持ち、光合成をするため必要と考えた。また、グルコースは呼吸基質としてエネルギー源になるため、グルタミン酸はタンパク質合成の材料として必要であり、これらに対しては、正の化学走性を持つと考えた。逆に、ミドリムシにとって害になる物質には負の

走性を示すと考えた。また先行研究²⁾のエタノールは高濃度(5%)で負の走性を示すという事実を本研究と比較し、実験の正当性を確保するためにエタノールを用いた。

3. ミドリムシの培養方法

市販のミネラルウォーター(SUNTORY 奥大山の天然水)に液肥(ハイポネックス)を 1000 倍希釈になるように加え、さらに 400ml 当たり米粒を 1 個入れ、25°C4000lux(蛍光灯 PPF51.6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)、12L12D で培養した。ミネラルウォーターを用いたのは微量元素の確保のためである。

4. 実験 1

4-1 方法

実験対象の化学物質を含んだ寒天を作成し、シャーレの中央部に置き、その後ミドリムシ培養液を流し込む。培養液中に寒天からの化学物質を拡散させて濃度勾配をつくり、ミドリムシの走性を調べる。

走性を調べる方法として、①タイムラプスを用いた撮影と、②吸光度法を使ってミドリムシの密度測定を行った。密度の測定はミドリムシ培養液を流して 1 時間後、2 つの仕切りを設置

し、シャーレを区切り（図1）、各区域のミドリムシ培養液を採取し、590nmの吸光度³⁾を測定した。

この実験では、グルコース、グルタミン酸、エタノール、炭酸水素ナトリウムについて調べた。

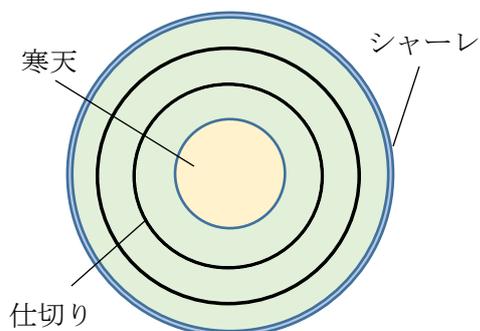


図1 実験装置

なおこれらの実験では、光の影響を避けるため、暗室にて蛍光スタンドに赤セロファンを巻き、赤色光のもとで撮影ならびに実験を行った。赤色光を用いたのはミドリムシが赤い光に対し光走性を示さない⁴⁾からである。

4-2 結果と考察

①タイムラプスでの撮影を行った結果、ミドリムシが寒天の周りに一度集まり、その後やや離れる様子が観察された。この行動については、ミドリムシが一度走性を示した後に、寒天から溶出した濃度勾配がなくなった結果、集まったミドリムシが再び分散したことが理由と考えられる。

②吸光度法によるミドリムシの密度の測定では、すべての化学物質においてミドリムシはシャーレの壁面に集まる負の走性が観察された。これは、ミドリムシがシャーレの端でうまく方向転換を行うことができず、とどまってしまったことが原因だと考えられる。

同じ実験装置を用いた観察でも18時間かけてのミドリムシの位置の変化には共通性が見られなかった。このことは、実験の再現性の低さを示しており、とりわけミドリ

ムシが壁面に集まり、方向転換ができない状況を改善する必要が出てきた。

5. 実験2

5-1 方法

実験1では正確な結果が得られなかったため、実験装置を図2のように改良した。

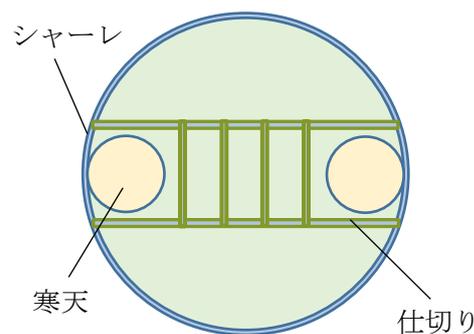


図2 実験装置

寒天を2つ、シャーレの中に設置し、1時間後その間のミドリムシの密度（分布）を測ることで、ミドリムシが端に寄ってしまうという特性が測定に影響されないようにした。

この実験では、炭酸水素ナトリウム、エタノール、グルコースについて調べた。

5-2 結果と考察

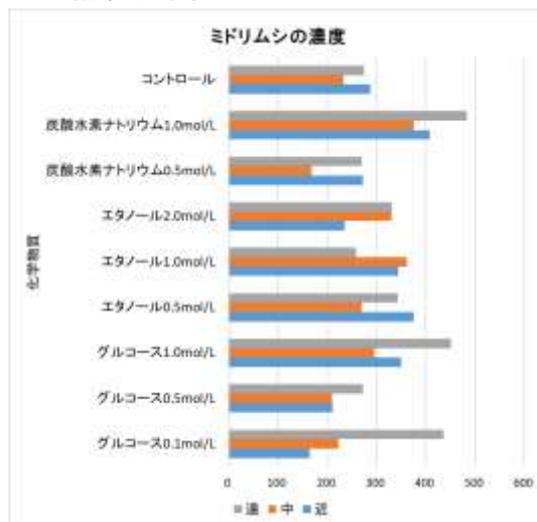


図3 各化学物質に対するミドリムシの分布

結果は図3の通りである。実験2ではコントロール（左右ともに化学物質の入らない寒天を

設置した場合) に対して、ミドリムシは均一な分布を示したので、各化学物質に対する結果は有効と考えられる。

この実験では、1.0mol/L のエタノールに対しては正の走性を示し、2.0mol/L のエタノールや 0.1mol/L のグルコースに対しては負の走性を示す傾向が見られた。

これらの結果は仮説とは異なるものとなった。さらに、各物質の濃度の違いにおける結果についても解決しにくいものとなった。

寒天法による化学走性の解析には寒天濃度の違いと、化学物質の寒天からの溶出速度の関係など曖昧さを排除できなかった。

6. 実験3

6-1 方法

実験3では、さらに正確なミドリムシの化学走性の検出を行うため、化学走性の研究において新しい手法である、PDMS 製のマイクロ流路⁵⁾を用いて実験を行った。PDMS とはポリジメチルシロキサンというシリコンの1種で、多孔質であるため低分子の物質を透過させることが可能である。

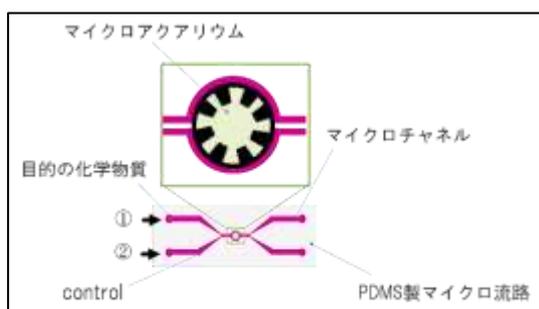


図4 マイクロ流路のイメージ図

図4のようにマイクロチャネルを通し、その内部にミドリムシが自由に動くことのできるマイクロアクアリウムと呼ばれる空間を作る。片方のマイクロチャネルに目的の化学物質の水溶液(または気体)を、もう片方に比較対象として純水(または空気)を流した。そして、マイクロアクアリウム内にはミドリムシを入

れることでミドリムシの化学走性の検出を試みた。なお、マイクロアクアリウムに入れる試料ミドリムシは、以下の方法で培養液より採取し、観察した。

- ① 培養液を 40g10 分間遠心分離にかける。
- ② 上澄みを捨て、純水を加える。
- ③ 再び 40g10 分間で遠心分離をする。
- ④ 沈殿したミドリムシを回収する
- ⑤ マイクロピペットを用いて、適量を図4のマイクロアクアリウム内に流し込む。
- ⑥ スライドガラスを⑤の状態のマイクロ流路にかぶせる。
- ⑦ 顕微鏡の光源に赤色のフィルムをかぶせ、赤色光で観察を行う。

②で純水を用いたのは、培養液中に含まれる物質の影響を受けないようにするためである。また、赤色光下で観察を行ったのは、ミドリムシが光の影響を受けないようにするためである。

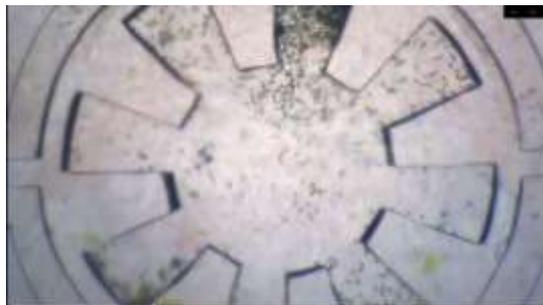
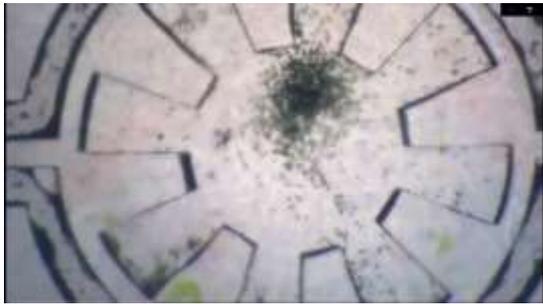
6-2 結果と考察

エタノール(1.0mol/L)に関しては負の走性を示したため先行研究と一致した。グルタミン酸ナトリウム(0.1mol/L)に関しては反応を見せなかった。アンモニア(気体)には忌避反応を、二酸化炭素(気体)には誘引反応を示す様子が観察された。また、アンモニアの実験を行った後のミドリムシはほぼ全てが死滅していた。二酸化炭素については、尾笹先生らの実験でミドリムシは 15%以上の濃度の二酸化炭素に対して負の走性を示すことが確認されている。この結果は本研究の結果とは異なるものであるため、研究方法の改善を検討している。グルコースに関しても実験を行ったが、断定できない結果のため省く。

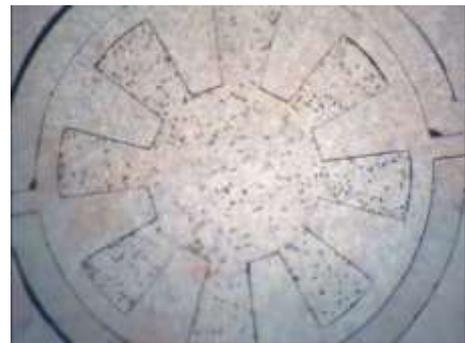
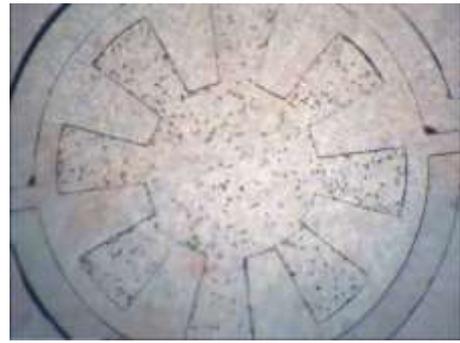
下の写真は実際の実験結果を示すマイクロアクアリウムの画像である。中の黒い粒はミドリムシである。画像の下側のチャネルからは目的の化学物質の水溶液(または気体)、上側のチャ

ネルからは対照として純水(または空気)が流れている。

エタノール(0.1mol/L)



グルタミン酸ナトリウム(0.1mol/L)



アンモニア(気体)(100%)



これらの結果から、グルコースやグルタミン酸ナトリウムはエタノールや二酸化炭素に比べ分子量が大きいため、マイクロアクアリウムへの拡散が遅くなり、その間に水側のマイクロチャンネルから水がマイクロアクアリウムに入り、濃度勾配が十分にできていなかった可能性が考えられる。

7. 結論

ミドリムシの葉緑体は三重膜であり、元々は従属栄養性の単細胞生物に単細胞の緑藻類が共生したことで進化したものと考えられている。

そのもともとの従属栄養性から、グルコースやグルタミン酸に対し正の走性があると仮説を立て、実験を行った。より正確な結果を得るため、何度か改良を加えた結果、現在は PDMS 法にたどりついている。

我々は化学走性に影響を与える要因となる培養液中の米粒や液肥についてその影響を抑えるため、測定前に蒸留水へミドリムシを移し

実験を行っているが、十分に健全な状態をまだ維持できていない。

8. 今後の課題

①これまではミドリムシの培養液の条件を変えることで従属栄養化を考えていたが、暗所に置きながらも健全な状態を保ち、従属栄養化させる培養法を確立する。

②マイクロ流路を用いて定量化すること。この定量化に関しては、実験の様子を撮影した動画を時間ごとに区切り、ミドリムシの数を数えることを予定している。また、実験中はマイクロ流路に調べたい物質を流し続ける必要があると考えている。さらに、実験後に調べたい物質と反応を示さない物質（水や空気）を入れ替えて同じ反応がみられるかといった、結果の正確性を確かめる実験を行う必要があると考えている。

9. 謝辞

今回の研究を進めていくにあたり、ご指導いただいた、理化学研究所の尾笹一成先生、北陸先端科学技術大学院大学の小田和司先生、高村禅先生、石川県立金沢泉丘高等学校の先生方に、心より感謝いたします。ご協力ありがとうございました。

10. 参考文献

1) 尾笹 一成、前田 瑞夫(2014)「ミドリムシの化学走性を利用した細胞毒性モニターチップ 理化学研究所」第75回応用物理学会学術講演会、札幌

2) Kazunari Ozasa Jeessoo Lee Simon Song Mizuo Maeda (2014)

“Toxicity Sensing by Using Chemotactic Reaction of Microbial Cells Confined In Microfluidic Chip”

3) 海野 李、中山 侑香、川上 修吾、砂山 星也、若林 勇太 (2019)「ミドリムシ

の増殖と光合成 - 効率よい増殖方法、光合成と pH の関係 -」石川県立金沢泉丘高校理数科平成31年3月 AI 課題研究論文集

4) 伊関 峰生 (2007)「ミドリムシにおける光センシングの分子機構」

jpn. j. Protozool. Vol. 40, No. 2

5) 尾笹 一成、原 正彦、前田 瑞夫(2013)「マイクロ流路の拡散濃度勾配によるミドリムシの CO₂化学走性」ユウグレナ研究会第29回研究集会、筑波