

ミドリムシが生成するパラミロン量と培地のメチルセルロース含有量の関係性の考察

石川県立金沢泉丘高等学校理数科2年

8班 小杉 空 高松 南帆 柄田 萌結 中井 彩花 森 響生 藪野 雅都

1. 研究動機

我々は、ミドリムシが生成するパラミロンと呼ばれる物質がどのような条件下で増加するのかということに焦点を当て研究を行いたいと考えている。パラミロンは多糖類の一種で、近年の株式会社ユーグレナと東京大学医学部附属病院の共同研究等で燃料や健康食品の原料としての利用可能性が確認されている粒状の物質である。より多くのパラミロンを得るミドリムシの培養条件を発見することができれば、多方面での応用が期待できる。

本研究では、ミドリムシが生成するパラミロンの量がミドリムシを培養する培地のメチルセルロースの含有量によってどのように変化するかを調査する。

2. 先行研究

ミドリムシはグルコースなどの糖を栄養源とし、従属栄養または独立栄養培養により増殖し、生成されるパラミロン量はミドリムシのpHやCO₂濃度等の培養条件に依存する²⁾。

パラミロンなどの多糖類はエネルギー貯蔵物質として利用されていて、ミドリムシの鞭毛運動を抑制するべく、ミドリムシを高粘度培地で培養する実験を行った結果、メチルセルロースを用いた培地で培養したものは通常の培地で培養したものと比べて非常に多いパラミロンを生成する。また高粘度培地でミドリムシを培養すると細胞分裂が抑制され世代時間が増加する¹⁾。

高粘度培地に従属栄養生物であるミドリムシの養分になりうる糖が用いられており、パラミロンの生成量の増加が物理的な運動の抑制によるものであるとはいきれない。また運動が抑制され、かつ細胞分裂を抑制しないような粘度はわかっていない。

3. 本研究で明らかにしたいこと

先行研究にあるメチルセルロースの培地で培養したミドリムシがパラミロンを多く生成するのは、培地に粘性があり物理的にミドリムシの運動を阻害するためであり、メチルセルロース特有の性質により鞭毛が分解されるなどの化学反応が起こるためではないということ。

ミドリムシのパラミロン生成量が最も多くなるときに加えたメチルセルロースの量。

4. 実験計画

(準備する物品や使用施設・場所)

準備する物品: ミドリムシ、市販のミネラルウォーター、液肥(ハイポネックス)、米粒、蛍光灯 PPF51.6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、メチルセルロース、アラビアガム、顕微鏡、カメラ、分光光度計、吸光光度計、遠心分離機、100%アセトン、1%SDS溶液、0.5N NaOH、フェノール硫酸溶液、グルコース

メチルセルロース…強い粘性をもつ増粘剤で、多糖類の一種。

アラビアガム…弱い粘性をもつ多糖類の一種。

場所: 生物実験室

(培養方法)

市販のミネラルウォーターに液肥を1000倍希釈になるように加え、培地の水溶液は400mlに固定し、米粒を1個入れ、25°C 4000lux(蛍光灯 PPF51.6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)、12L12Dで培養する。ミネラルウォーターを用いるのは微量元素の確保のためである。培地のpHは5.0に固定する。

本研究では単にこの作業を「培養する」と表すこととする。

(パラミロンの定量方法)

(1)ミドリムシの個体数を測定する。

ミドリムシの個体数と分光光度計を用いて計測した ABS は比例関係にあるため³⁾、ABSを計量線の式に代入することでミドリムシの個体密度を求める。

(2)パラミロンをミドリムシから抽出する。

- ①培養された培養液を遠心分離(3000×g、5min、2℃)し、培地を捨て細胞を蒸留水で洗浄する。
- ②遠心分離(3000×g、10min、4℃)をさらに2回繰り返し、蒸留水を捨てる
- ③細胞に100%アセトンを加えて遠心分離(3000×g、10min、4℃)し、色素を除去し、なくなるまで繰り返す。
- ④その残渣に1%SDS溶液を加えて煮沸後、遠心分離(3000×g、5min、4℃)を3回繰り返す。
- ⑤沈殿をパラミロン画分として、それを0.5N NaOHに溶解する。
- ⑥フェノール硫酸溶液に溶かし、480nmの吸光光度計を用いて定量する。標準物質にはグルコースを用いる。

(1)、(2)よりミドリムシ1個体あたりのパラミロンの質量を求める。

本研究では単にこの作業を「パラミロンを抽出する」、この作業によって得られたミドリムシ1個体あたりのパラミロンの質量を「パラミロン量」と表すこととする。

1つの観察、2つの実験を行う。

観察(1)ミドリムシの鞭毛運動がメチルセルロース以外の増粘剤を含む培地においても抑制されることを観察する。

(観察手順)

- ①ミドリムシを何も添加しない培地(培地a)、メチルセルロースを添加した培地(培地b)、アラビアガムを添加した培地(培地c)で7日間培養する。
- ②7日後、それぞれの培地の一部をシャーレに移し光学顕微鏡(倍率150倍)でミドリムシを観察し、録画する。
- ③録画した映像を動画解析ソフト「Tracker」で解析し、無作為に抽出したミドリムシ1個体の1分あたりの運動速度を求める作業を10回行う。

観察(1)に引き続き、実験(2)を行う。

実験(2)ミドリムシがメチルセルロース、アラビアガムを栄養源としないことを確認する。

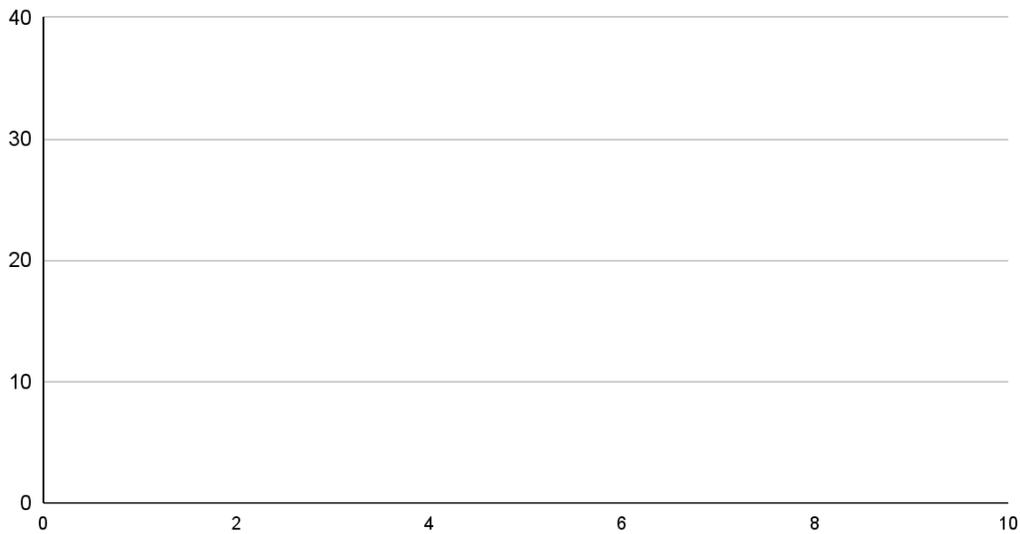
(実験手順)

- ①培地a～cで培養したミドリムシからパラミロンを抽出する。
- ②パラミロン量を棒グラフで表す。

実験(3)増粘剤の量を変化させたときパラミロン量がどのように変化するかを確認する

- ①メチルセルロース濃度を1.0g/100mlごとに変化させて2.0～10g/100mlである培地を用意し、7日間培養する。
- ②パラミロンを抽出する。

増粘剤の量とパラミロン量の関係



5. 仮説

観察(1)メチルセルロースは増粘剤でありミドリムシの鞭毛運動を物理的に阻害する一方で、アラビアガムの粘性は弱いために培地a、cよりも培地bのほうがミドリムシの運動速度は遅くなる。

それぞれの培地とミドリムシの運動速度の平均値について表1を作成する。

ミドリムシの鞭毛運動がメチルセルロースの増粘剤としての性質により抑制される。

培地の濃度 (g/100ml)	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
ミドリムシの 運動速度 (μ m/s)									

実験(2)

培地a～cについてその性質をまとめると

a.粘性なし、多糖類を含まない b.粘性あり、多糖類を含む c.粘性なし、多糖類を含む
となる。

ミドリムシは多糖類を栄養源としないため、培地aとcのパラミロン量を比べると差が見られない。

また、ミドリムシが鞭毛運動を抑制されるため、培地cよりもbのパラミロン量のほうが多くなる。

このことから、ミドリムシは多糖類を栄養源とせず、培地の粘性が大きくなることで鞭毛運動が抑制されるためにパラミロン量が増える。

実験(3)

増粘剤を加える量が一定の値に達するまで増粘剤を加える量を増やすとパラミロン量は比例の関係で増えていくが、その値を超えるとパラミロン量は減少に転じる。

増粘剤の働きによりミドリムシの細胞分裂が抑制され、個体数の増加率が下がることで一個体が生成するパラミロン量は増加するが、全体としてのパラミロン量は減少に転じる。

6. 参考文献

1) 美留町竜輝、國府田宏輔.

”メチルセルロースを用いた運動抑制によるパラミロン高含有ユーグレナの培養条件確立”.

茨城県水戸第一高等学校生物同好会.2019-03-29.

https://student.ne.jp/wp-content/uploads/2019/03/student-bio_1_3.pdf(参照 2024-06-12).8

2) 松本隆二、乾博、宮武和孝、中野長久、村上克介.

”光質とCO₂濃度が光合成培養におけるユーグレナのたんぱく質、パラミロン、脂肪酸量へ及ぼす影響”.

Eco-Engineering.2007-06-18.

https://www.istage.jst.go.jp/article/seitaikogaku/19/4/19_4_223/_pdf/-char/ja(参照 2024-06-15).

3) 海野李、中山侑香、川上修吾、砂山星也、若林勇太.

”ミドリムシの増殖と光合成 一効率よい増殖方法、光合成とpHの関係—”.

石川県立金沢泉丘高等学校3年.2018

<https://cms1.ishikawa-c.ed.jp/izumih/wysiwyg/file/download/30/663>(参照 2024-06-15).