

ボルボックスの研究

ゴニジアの早期摘出による生育への影響

Effects of early removal of gonidia in Volvox on its growth

天羽 奈津子 堀家 茉那美
AMOU Natsuko HORIKE Manami

1. 要旨, 概要

高校の生物実験室でボルボックスが培養されており、そこで初めてボルボックスの実物を見た。研究室以外では安定して培養すること自体難しいと言われるボルボックスが培養されていたことに加え、ボルボックスがクルクルと回っている様子がとても面白いと感じたことがきっかけで、ボルボックスの研究を始めた。

ボルボックスは池などに生息する緑藻類で、2本の鞭毛を持つ非生殖細胞とゴニジアと呼ばれる生殖細胞からなる細胞群体である。この論文では、非生殖細胞を親、親がたくさん集まったものを親ボル、生殖細胞（ゴニジア）を子ボルと呼ぶことにする（図1）。

ボルボックスに関する先行研究を調べていると、子ボルは親ボルの中で十分に成長すると、親ボルの体細胞を特異的に分解する酵素を分泌し、親ボルを破って外界に出ることを知った。子ボルが自ら一番良い状態の時を判断して外界に出てきているのだとすればすごいことだと思った。同時に、このように自然と出てくる前に、人工的に取り出されても子ボルは生きられるのかという疑問が生まれた。

そこで子ボルがまだ小さい段階で、顕微鏡で見ながら針で親ボルに穴を開け、子ボルを取り出し培地に入れて観察した。取り出すタイミングは、ボルボックスのライフサイクルにおける成長期（比較的早い段階）と孵化準備期（成熟した段階）で分けて実験した。結果は、孵化準備期に取り出したボルボックスは全ての個体が増殖し、成長期に取り出したものは成長に時間はかかったが約8割の個体が増殖できた。

上記の実験で使用したボルボックスは地元の池で採取したもので、調べてみると *Volvox. rousseletii*（親同士を結ぶ原形質連絡が太いもの）ではないかと推定できた。先行研究にて、この種類のボルボックスは親と子ボルも原形質連絡を通じてつながっており、成長に必要な物質を親ボルから子ボルへ供給しているのではないかと示されていた。そこで、原形質連絡による親子のつながりがない種類のボルボックスを使って同じ実験をすれば、生存率が上がるのではと考え、そのような種類を取り寄せ、同様の実験を行った。結果は、予想に反して全滅した。

これには様々な理由が考えられるが、いずれにせよ子ボルがどのようにして栄養を得ているのかについて、今後詳しく調べる必要がある。

興味本位からスタートしたこの研究だが、現在ボルボックスは、再生医療の分野で研究に用いられている。ボルボックスには光を受容する眼点があり、特定の遺伝子を目の神経節細胞に注入することで失明からの視覚の再生をする人工網膜と遺伝子治療の実用化に向けた研究が進んでいる。子ボルが栄養を得る方法を解明できれば、効率的な増殖という点で研究に貢献できるかもしれない。

2. 問題提起, 研究目的

初めにボルボックスについて簡単に紹介したい。

○ボルボックスとは（参考文献I）（図1）

- ・池などに生息する緑藻類である。
- ・2本の鞭毛をもつ非生殖細胞（親）とゴニジアと呼ばれる生殖細胞（子ボル）からなる細胞群体である。
- ・光合成を行い、光の方向に向かって泳ぐ。
- ・光や温度等の状態が良いと無性生殖を行い、光や温度等の状態が悪いと有性生殖を行う。
- ・多細胞生物の誕生、生殖細胞の分化、形態形成などのモデル生物として様々な研究に利用されている。

先行研究より、子ボルは親ボルの中で十分に成長すると、親ボルの体細胞を特異的に分解する酵素を分泌し、親ボル破って外界に出ることが分かった（参考文献Ⅲ）。このように自然と出てくる前に、人工的に取り出されても子ボルは生きられるのか疑問に思い調べたが、成長途中で無理矢理取り出す実験は先行研究にもなかったため、行うことにした。

研究目的は、*Volvox.rousseletii*（親同士を結ぶ原形質連絡が太いもの）の子ボルを人工的に取り出した場合、その後の生育にどのように影響するのかを調べることである。

3. 研究方法

実験1：ボルボックスを1個体ずつ自然な状態で培養

<目的>

研究を行う上で各個体の観察をやすくするために、1個体で生育する必要があったが、1個体では生育することができないという情報があった。そこで、実験2を行う前に、そもそもボルボックスは1個体だけでも生きられるのかを調べることを目的としてこの実験を行った。また、実験2で人工的に取り出した場合と増殖の仕方を比較するため、増え方を観察することも目的とした。

<仮説>

ボルボックスは1個体でも生きることができるのではないかと。

<準備物>

香川県立高松西高等学校前の池で採取した *V.rousseletii*（親同士を結ぶ原形質連絡が太いもの）、小粒の赤玉土、炭酸カルシウム、ハイポネックス（肥料）、アルミニウムはく、人工気象器、オートクレーブ（滅菌できる機械）、培養用の試験管 20本

<培地の作り方>

参考文献Ⅱをもとに材料の比を決定した。ただし土と水の比は予備実験を行い、最もよく増殖した比を採用した。

- ① 赤玉土を洗い、材料を測る。
 - ・赤玉土→試験管の底から約3cm
 - ・水→20ml
 - ・炭酸カルシウム→0.07g
- ② 炭酸カルシウム、赤玉土、水を順に試験管に入れる。
- ③ アルミニウムはくで試験管に蓋をして、オートクレーブをかける。
- ④ ハイポネックス 0.01ml を試験管に入れる。

<方法>

V.rousseletii（親同士を結ぶ原形質連絡が太いもの）の親ボル 20個体を選び、1個体ずつ培地に入れ、人工気象器（21℃）で培養し個体数を目視で数え、観察する。

実験2：子ボルを人工的に取り出して培養

<仮説>

初めに、子ボルが人工的に取り出されても生きられるかどうかは子ボルを取り出す時期で決まると考えた。ボルボックスのライフサイクルは4段階に分けられる（図2）。

- ① 成長期（子ボル反転前）

- ② 反転期
- ③ 孵化準備期（子ボル反転後）
- ④ 孵化期

ここで反転について説明する。子ボルの鞭毛は初め内側を向いているが、親ボルから出る直前に細胞の表と裏がひっくり返る「反転」をする（参考文献Ⅲ）（図3）。

そこで、子ボルは親ボルの外では反転できないと考え、反転前に人工的に取り出された場合は生きることができないのではないかと仮説を立てた。

<準備物>

V.rousseletii（親同士を結ぶ原形質連絡が太いもの）、小粒の赤玉土、炭酸カルシウム、ハイポネックス（肥料）、アルミニウムはく、人工気象器、オートクレーブ（滅菌できる機械）、培養用の試験官 40 本

<方法>

(1) *V.rousseletii*（親同士を結ぶ原形質連絡が太いもの）を各期間ごとに 20 個体ずつ分ける。図 4 で示したように、子ボルが小さくて親にくっついているものを成長期、子ボルが大きくて親から離れているものを孵化準備期と判断した。

A 群：成長期（子ボル反転前）

B 群：孵化準備期（子ボル反転後）

- (2) 1 個体ずつホールスライドガラスに取り、双眼実体顕微鏡で見ながら針で親ボルに穴を開けて子ボルを取り出す（図 5）。
- (3) 取り出した子ボルを 1 個体ずつ培地に入れ、人工気象器（21℃）で培養し、個体数を目視で数え、観察する（図 6）。

実験 3：原形質連絡が細いボルボックスと、原形質連絡をもたないボルボックスを用いて実験 1、実験 2 と同様の実験を行う。

<仮説>

実験 3 の仮説を述べる前に、原形質連絡による分類とその役割について説明する。

- ・ボルボックスは、親同士が原形質連絡を持つかどうかで分類されている。
- ・原形質連絡がないもの、細いもの、太いものがある（図 7）。
- ・親ボル内の原形質連絡には親同士を結ぶもの、親と子ボルを結ぶものがある（図 7）。

・親同士を結ぶ原形質連絡の意義は何か、3 つの仮説が立てられた（参考文献Ⅳ）。

① 親ボルの走光性に関与しているのではないかと。

→原形質連絡を持たないものも走光性を示すので否定された。

② 親同士の固定を行っているのではないかと。

→原形質連絡がなくても、親同士がバラバラになることはないので否定された。

③親ボルから子ボルへ物質を供給しているのではないかと。

→*V.rousseletii*（親同士を結ぶ原形質連絡が太いもの）の親は、子ボルが大きくなるにつれて小さくなっていき、それは、親ボルから子ボルへ物質を供給しているからだと考えられた（図 8）。そこで、子ボルの成長を促すために親同士が繋がったのではないかと考えられ、この仮説が現在最も有力だとされている。しかし、原形質連絡を流れる物質を直接調べることは困難であるため証拠はない。様々な細胞質の成分を標識し、その後の分布を観察できる方法が開発されることでこの仮説を直接検証することが可能になるのではないかとされている。

これらのことを参考に、実験 3 の仮説を立てた。

- ・親同士を結ぶ原形質連絡がない子ボルは、もともと親から独立しているため、親から栄養を貰っているとは考えにくく、人工的に取り出されても生きられるのではないかと。
- ・親同士を結ぶ原形質連絡が細い子ボルは、それが太い子ボルより栄養を貰える量が少ないと考えられるため、生存率が下がるのではないかと。

<準備物>

国立環境研究所より取り寄せた *V.aureus* (親同士を結ぶ原形質連絡が細いもの)、*V.carteri* (親同士を結ぶ原形質連絡がないもの)、小粒の赤玉土、炭酸カルシウム、ハイポネックス (肥料)、アルミニウムはく、人工気象器、オートクレーブ (滅菌できる機械)、培養用の試験管 30 本

<実験 1 の方法>

- (1) *V.aureus* (親同士を結ぶ原形質連絡が細いもの)、*V.carteri* (親同士を結ぶ原形質連絡がないもの) を、自分たちで作った培地で 1 ヶ月程度培養し、安定して育つようにする。
- (2) それぞれ、親ボル 5 個体を 1 個体ずつ培地に入れ、人工気象器 (21℃) で培養し個体数を目視で数え、観察する。

<実験 2 の方法>

- (1) *V.aureus* (親同士を結ぶ原形質連絡が細いもの)、*V.carteri* (親同士を結ぶ原形質連絡がないもの) を各期間ごとに 5 個体ずつ分ける。
A 群：成長期 (子ボル反転前)
B 群：孵化準備期 (子ボル反転後)
- (2) 1 個体ずつホールスライドガラスに取り、双眼実体顕微鏡で見ながら針で親ボルに穴を開けて子ボルを取り出す。
- (3) 取り出した子ボルを 1 個体ずつ培地に入れ、人工気象器 (21℃) で培養し、個体数を目視で数え、観察する。

※実験 3 で個体数が 5 個体ずつと少ないのは、原形質連絡が細いボルボックスと原形質連絡がないボルボックスの実験をそれぞれ 20 個体ずつ同時に行おうとした際、人工気象器に入りきらなかったためである。

4. 結果

実験 1：ボルボックスを 1 個体ずつ自然な状態で培養

<結果>

20 個体中 20 個体が増殖した。増殖の様子をグラフ 1 に示す。グラフは、縦軸が試験管一本中のボルボックスの個体数、横軸が試験管にボルボックスを入れた日を初日とした経過日数を表している。左側のグラフの 4 日目までに注目したグラフが右側のグラフである。グラフの日付が連続していない部分があるのは、学校に入れない期間がありデータを取ることが出来なかったためである。

実験 2：子ボルを人工的に取り出して培養

<結果>

A 群 (成長期すなわち反転前に取り出したもの) は 20 個体中 6 個体が死に、14 個体が増殖した。しかし増殖した 14 個体は、摘出後の 4 日間はほとんど増えず (グラフ 2 右側)、その後は他のものと同様に増殖した。(グラフ 2 左側)。B 群 (孵化準備期すなわち反転後に取り出したもの) は、20 個体中 20 個体が増殖した。また、実験 1 (自然な状態で培養したもの) と同様に増殖した (グラフ 3 右側)。グラフの日付が連続していない部分があるのは、学校に入れない期間がありデータを取ることが出来なかったためである。

実験 3：原形質連絡が細いボルボックスと、原形質連絡をもたないボルボックスを用いて実験 1、実験 2 と同様の実験を行う。

<結果>

V.aureus (親同士を結ぶ原形質連絡が細いもの) の結果を以下に示す。実験 1 (自然な状態で培養したもの) では、20 個体中 20 個体が増殖した。実験 2 (子ボルを人工的に取り出して実験) では、A 群は 5 個体中 3 個体が増殖し、B 群は 5 個体中 5 個体が増殖した。親同士を結ぶ原形質連絡が太いものと同様の結果である。

V.carteri (親同士を結ぶ原形質連絡がないもの) の結果を以下に示す。実験 1 (自然な状態で培養したもの) では、20 個体中 20 個体が増殖した。しかし実験 2 (子ボルを人工的に取り出して実験) では、A 群と B 群ともに 5 個体全て全滅した。

5. 考察

実験 1：ボルボックスを 1 個体ずつ自然な状態で培養

実験 2：子ボルを人工的に取り出して培養

<考察>

実験 2 の結果は仮説に反し、子ボルは反転前に摘出されても生きられた。このことについて詳しく調べると、子ボルの周りには細胞全体を覆う膜が存在し、膜が正常に膨らまない突然変異体は反転できないと分かった (参考文献 V) (図 9)。したがって、その膜が親ボルの外でも正常に機能したため、反転できたのではと考えている。

また、反転前に摘出された場合、生存率が下がり増殖に時間がかかった。これについては、原形質連絡を通じて親ボルから子ボルへ物質を供給しているのではないかという先行研究より、A 群は B 群より原形質連絡を通じて親ボルから物質を貰っている時間が短かったため、その分成長が遅れたのではと考えている。

実験 3：原形質連絡が細い種と原形質連絡を持たない種を用いて、実験 1 や実験 2 と同様の実験を行う。

<考察>

V.aureus (親同士を結ぶ原形質連絡が細いもの) では、実験 1 や実験 2 (親同士を結ぶ原形質連絡が太いもの) と同様の結果が得られた。このことから、生存率に原形質連絡の太さは関係しないと考えられる。

V.carteri (親同士を結ぶ原形質連絡がないもの) では、予想に反して、人工的に取り出したものは取り出した期間に関係なく、全滅した。ボルボックスは、原形質連絡を持たないものから原形質連絡を持つものが派生したことが先行研究より分かっている。原形質連絡を持つようになったボルボックスは、子ボルが原形質連絡を通じて生育するために必要な物質を直接親からもらえるようになり、何らかの理由により、成長途中で親ボルの外へ出されても、生きていけるようになったのではないかと考えた。また、*V.carteri* はビタミンがあると増殖しやすいことから、培地が合っていなかった可能性も考えられる。他に、*V.carteri* の親ボルの内側は栄養が高濃度になっており、成長途中で子ボルが親ボルの外へ出されることで外では効率的に栄養を吸収することができなかつたため全滅した可能性も考えられる。

6. 結論 (課題)

V.rousseletii (親同士を結ぶ原形質連絡が太いもの) と *V.aureus* (親同士を結ぶ原形質連絡が細いもの) の子ボルは原形質連絡を通じて親ボルから物質を貰っているため、早期に取り出すと成長は遅れるが親ボルの外でも反転し、約 8 割の個体が生きられる。

課題、反省

- ・双眼実体顕微鏡で見ながら針で親ボルに穴を開けて子ボルを取り出す時、素早く作業を行わなければボルボックスが弱ってしまい、動かなくなってしまう時があるので、常にボルボックスにとって良い環境下で子ボルを取り出す実験を行う必要がある。
- ・実験 3 の培地が *V.carteri* (親同士を結ぶ原形質連絡がないもの) に合っていない可能性があるため、*V.carteri* の培地にビタミンを加え、再度実験する必要がある。
- ・*V.carteri* の子ボルの周りを満たしている物質を詳しく調べる実験を行ったり、光の条件や培地内の栄養濃度を変化させるなどして追加実験を行えば、子ボルがどのように栄養を得ているのか調べることができ、実験 3 の考察を深めることができる。

7. 参考文献

・参考文献I

「ボルボックスとそのなかま 小さな緑の粒に隠された秘密 解説と分類」
著書：野崎久義 出版社：国立科学博物館

・参考文献II

「生命科学教育教材としての水田の微生物（II）～ボルボックスの簡単な培養方法の検討～」
宮崎教育大学附属理科教育研究施設 見上一幸・阿部倫子

・参考文献III

「Research—研究を通して—ボルボックスで見る多細胞生物の形づくり」
米国セントルイス Washington 大学 西井一郎
https://www.brh.co.jp/publication/journal/039/research_11.html

・参考文献IV

「Cytoplasmic Bridges in Volvox and Its Relatives Madame Curie Bioscience Database」
Harold J.Hoops ; Ichiro Nishii ; David L Kirk
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6424/>

・参考文献V

「Controlled Enlargement of the Glycoprotein Vesicles Surrounding a Volvox Embryo Requires the InvB Nucleotide-Sugar Transporter and Is Required for Normal Morphogenesis」
AMER SOC PLANT BIOLOGISTS Noriko Ueki ; Ichiro Nishii

8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院理学系研究科 兼 国立環境研究所 野崎 久義先生、株式会社リバネス 滝野 翔大様、徳島大学 博士課程 学生 城 裕己様、高松第一高等学校 教諭 本田 一恵先生をはじめ多くの先生方にご指導ご鞭撻を賜りました。ありがとうございました。

9. 図表, 画像

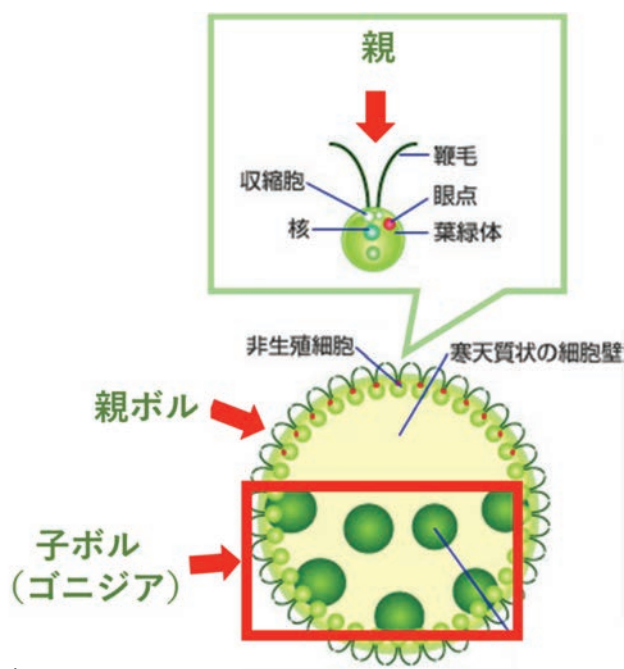


図1 ボルボックス

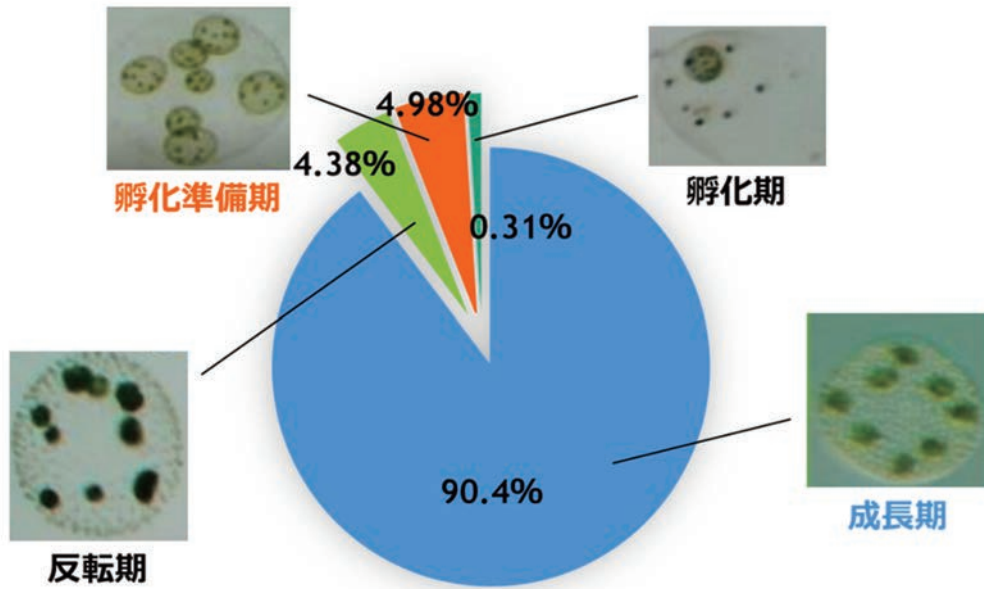


図2 ボルボックスのライフサイクル

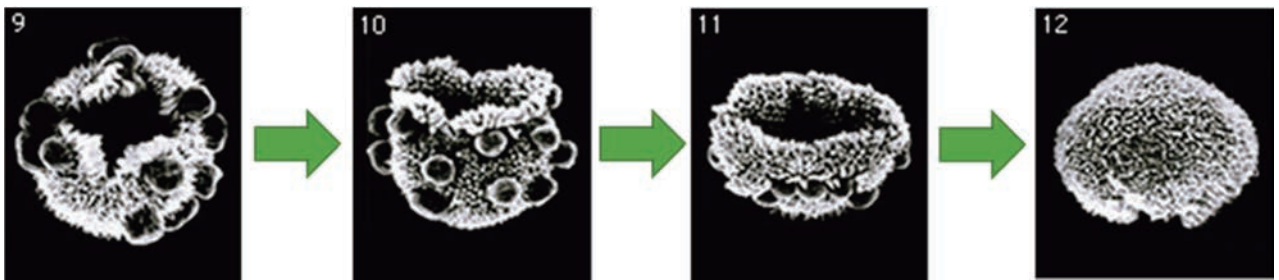


図3 反転の様子

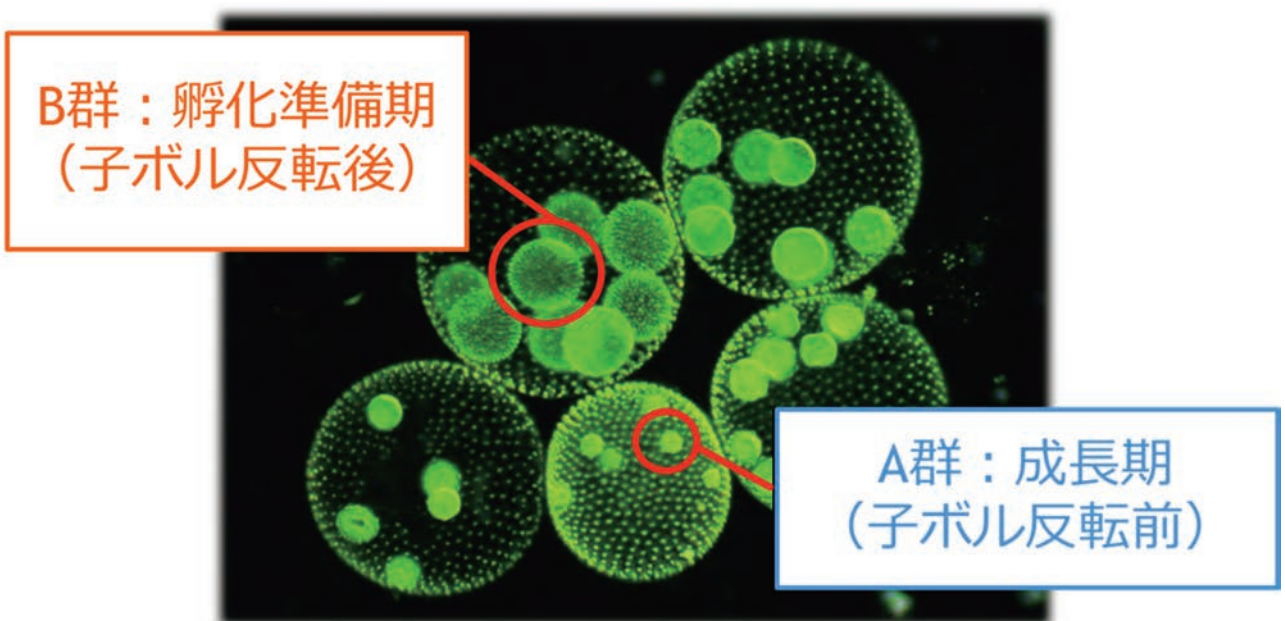


図4 ライフサイクルの判断基準

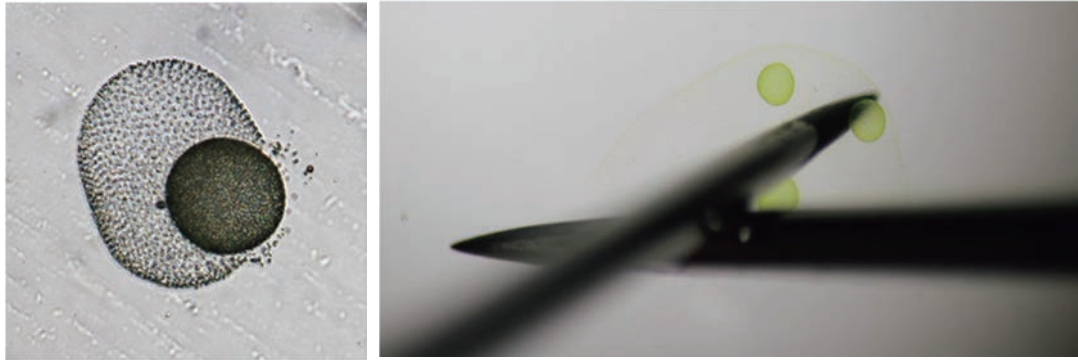


図5 針で取り出している最中の写真

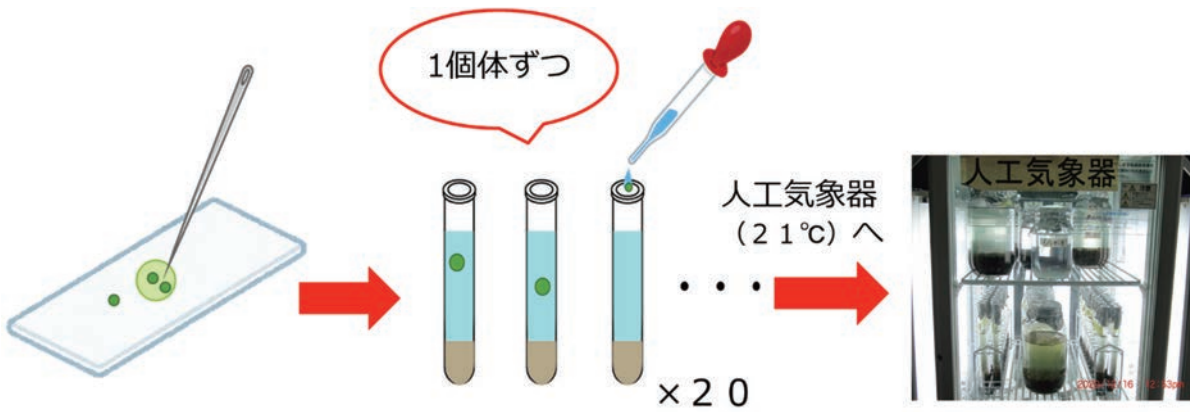


図6 実験方法

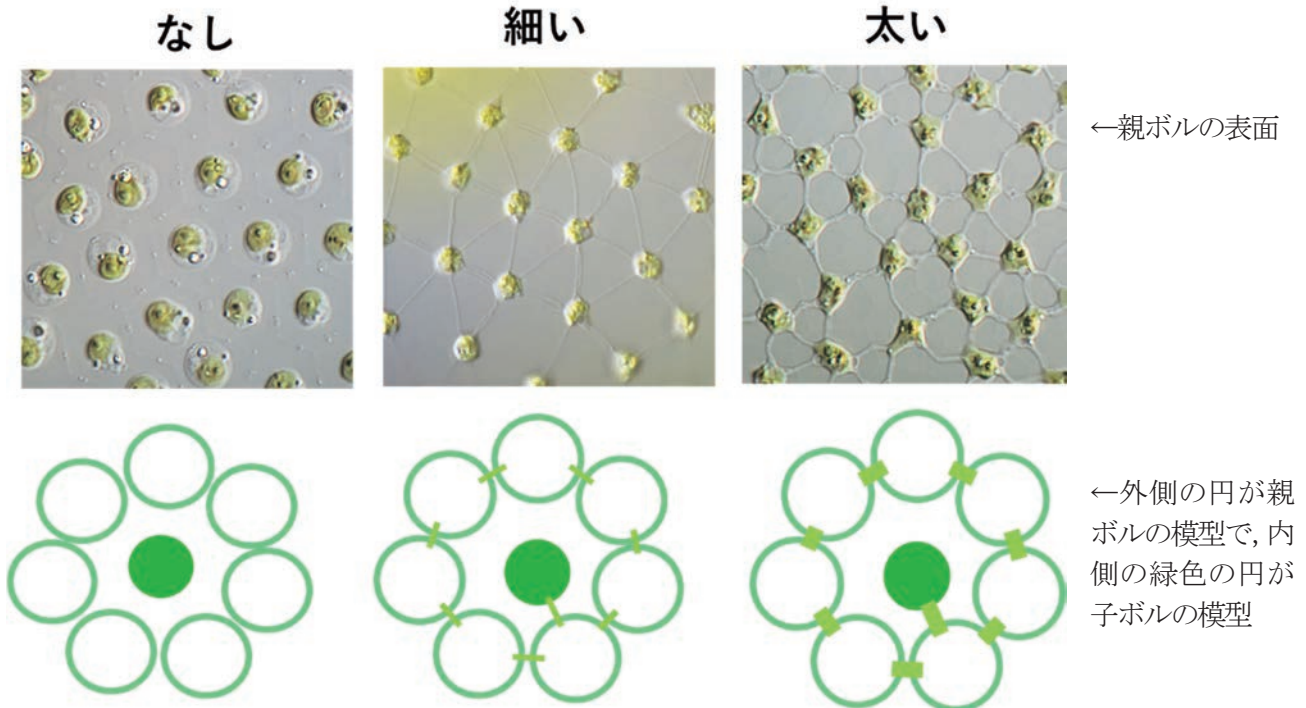


図7 ボロボックスの種類 (原形質連絡に注目)

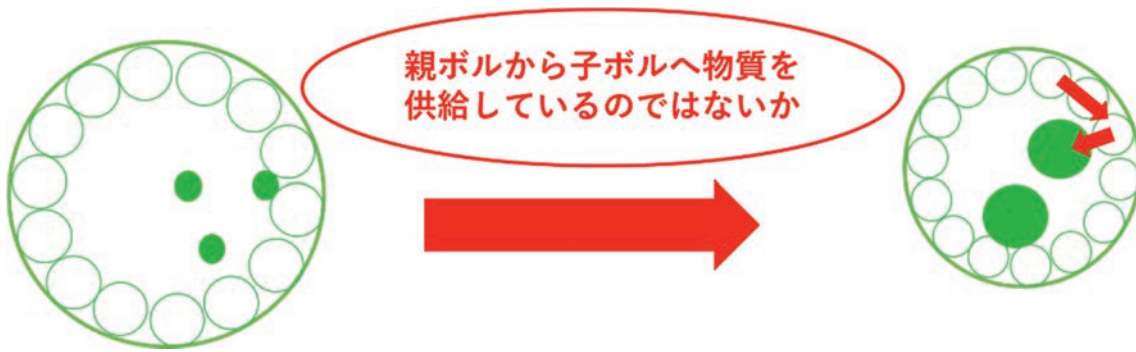


図8 子ボルが大きくなるにつれて親が小さくなっていく図

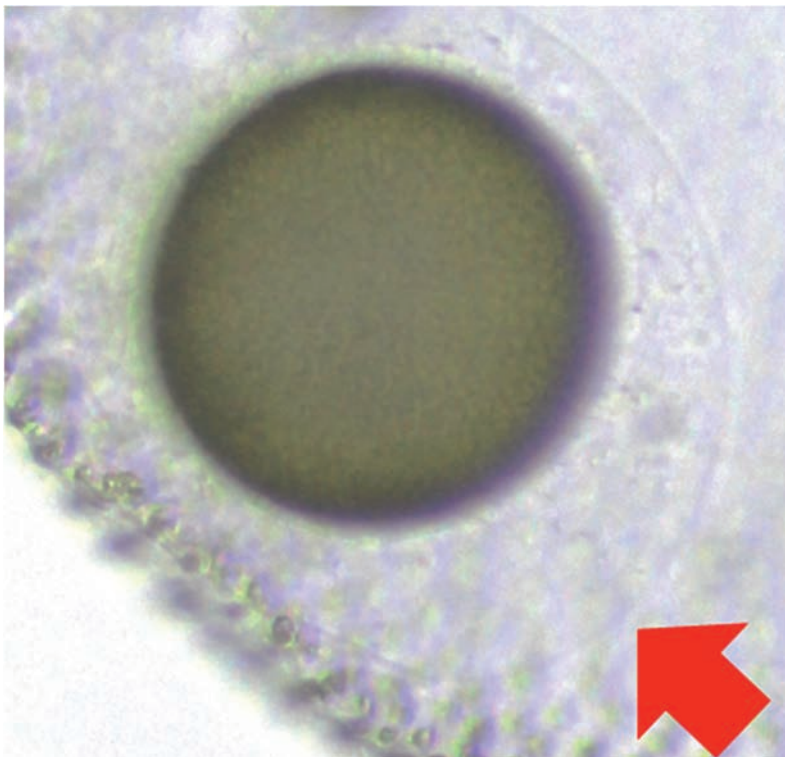
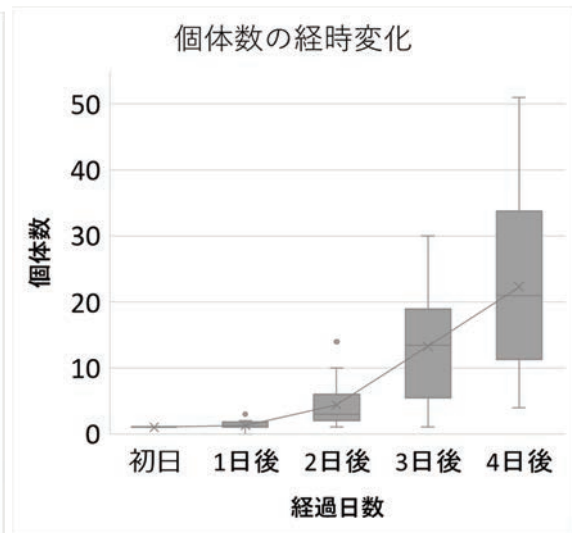
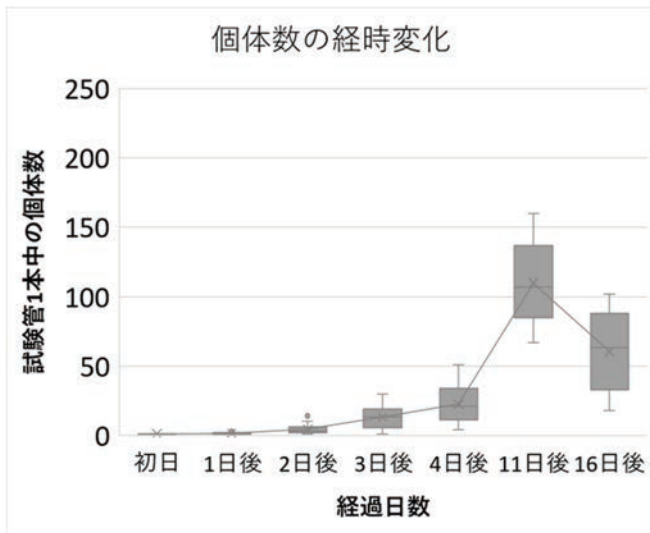
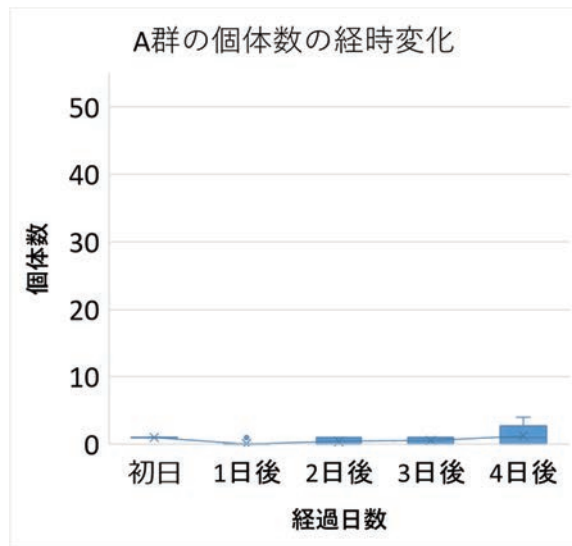
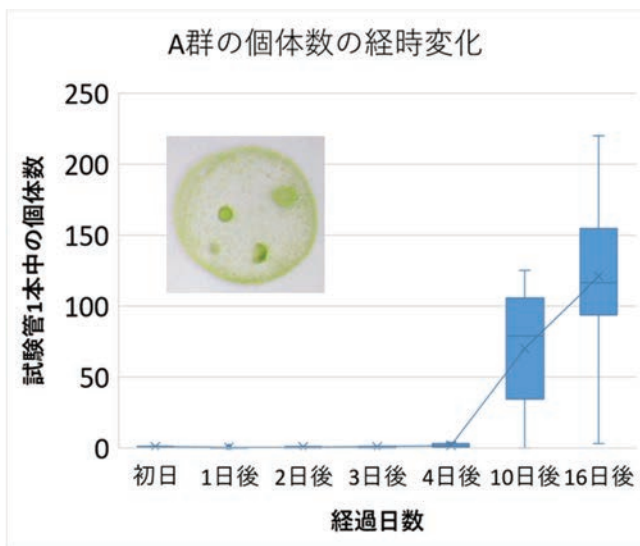


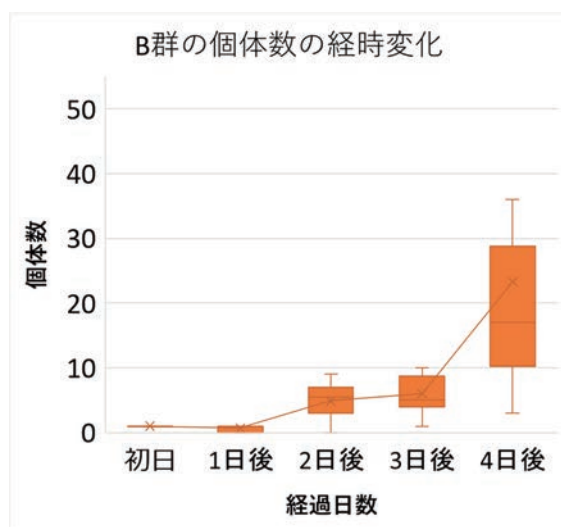
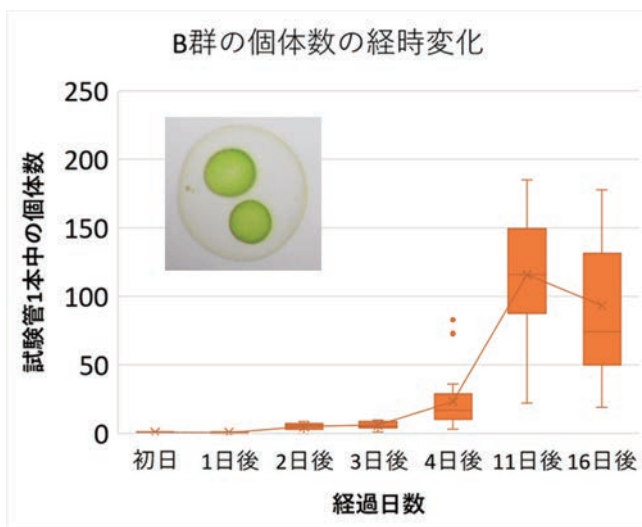
図9 子ボルの周りの細胞全体を覆う膜



グラフ1 自然な状態で培養



グラフ2 子ボルを人工的に取り出して培養 (A群 反転前に取り出したもの)



グラフ3 子ボルを人工的に取り出して培養 (B群 反転後に取り出したもの)