

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 7 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2013

課題番号：23603004

研究課題名(和文) 新しいバイオマスとしての原生動物ミドリゾウリムシの利用に関する研究

研究課題名(英文) Studies for sugars containing green paramecia *Paramecium bursaria* as new biomass

研究代表者

細谷 浩史 (Hosoya, Hiroshi)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90183102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な原生動物の一種である繊毛虫ミドリゾウリムシの体内には、数百のクロレラに類似の共生藻が共生している。これらの共生藻は太陽エネルギーを浴びて光合成を行なうため、ミドリゾウリムシは光合成により産生される遊離糖を生存に利用することができる。遊離糖は一部が共生藻の細胞外に放出され、ミドリゾウリムシの体内に蓄積すると考えられている。本研究では、遊離糖のミドリゾウリムシ体内における濃度や種類を解析する事を通じて、ミドリゾウリムシおよび共生藻の増殖における遊離糖の役割を解明し、将来新しい糖源として人類がミドリゾウリムシを利用できるかどうか明らかにするための基礎データを集積させる。

研究成果の概要(英文)：A green paramecium, *Paramecium bursaria*, has several hundred of symbiotic algae, which are morphologically similar to *Chlorella*. Interestingly, these symbiotic algae are retained during conjugation and transferred to both daughter cells during cell division. Previously, excretion of maltose and glucose has been reported to occur in the endosymbiotic algae from green paramecia. However, little information is available on this free-sugar excretion from the algae in the paramecium-algae association. Here, the influence of several factors on this process was investigated. Obtained data, such as the concentration of maltose or glucose in the paramecium, kinds of free sugars obtained in the paramecium, are also discussed for the possibility of future use of sugars in paramecium by human beings.

研究分野：細胞生物学、原生生物学

キーワード：ミドリゾウリムシ 共生藻 共生 細胞分裂 遊離糖

1. 研究開始当初の背景

代表的な原生動物の一種である繊毛虫ミドリゾウリムシの体内には、数百のクロレラに類似の共生藻が共生している。

これらの共生藻は、間期のミドリゾウリムシ体内では一方向に原形質流動を行っているが、ミドリゾウリムシが分裂期に入るとその流動は停止する。共生藻の流動が停止している間、すなわちミドリゾウリムシの分裂期に、共生藻は一度増殖しミドリゾウリムシ体内における数が倍加する。その後ミドリゾウリムシ自体が分裂する事で、ミドリゾウリムシ一個体あたりの共生藻数はもとに戻る。このようにして、どのミドリゾウリムシにおいても、体内に共生する共生藻の数は数百個適度に維持されている。なぜ、ミドリゾウリムシの分裂時に共生藻が分裂を開始するのか、その際共生藻が分裂し続けず、倍加程度にミドリゾウリムシ体内における共生藻数をとどめている理由は何か、などの疑問を含め、ミドリゾウリムシ体内における共生藻数制御のメカニズム解明は行なわれていない。

さらに、ミドリゾウリムシが太陽光を浴びると体内の共生藻は光合成を行い、光合成産物である遊離糖を藻類の体外、すなわちミドリゾウリムシ体内に放出する。この際、放出された遊離糖は一部が代謝され分解するが、その他はミドリゾウリムシの体内に蓄積されているものと考えられている。今までに、遊離糖の種類や全容の解明や遊離糖蓄積システムの解析を含め、ミドリゾウリムシ体内における共生藻数の制御機構における役割などの解析は行なわれていないのが現状である。

2. 研究の目的

申請者は、これらの事実をもとに、遊離糖が共生藻のミドリゾウリムシ体内における増殖を制御している可能性、また、藻類がミドリゾウリムシとは無関係に単独でも遊離

糖を産生する事が報告されているが、ミドリゾウリムシに共生した状態ではより高濃度の遊離糖を産生できるのではないかという可能性、さらには、現在サトウキビや甜菜などの植物性材料から主に精製されている遊離糖を動物細胞(ミドリゾウリムシ)から単離する事が将来可能になるのではないかと推察しその可能性を探る事、これらの点を明らかにする事が重要ではないかと考えた。そこで、遊離糖のミドリゾウリムシ体内における濃度や種類を解析する事、さらには様々な培養条件下でミドリゾウリムシを培養し、遊離糖濃度を最大にするにはどのような培養条件が最も適しているか等を検討し、将来人類が新規の糖源としてミドリゾウリムシを利用する事が可能になるかどうかを明らかにする事を第一の目的として本申請を行った。

3. 研究の方法

ミドリゾウリムシを様々な培養条件下(照射光の強度、照射時間、照射する光の波長など)で培養し、体内に含まれる遊離糖の濃度を明らかにする。また各種遊離糖存在下で単離共生藻を培養し、その増殖速度を明らかにする。さらに、ミドリゾウリムシ体内における共生藻密度を測定する。また、共生藻をミドリゾウリムシ体外に取り出した単離共生藻を培養した場合、共生藻増殖の最終段階で共生藻はどの様な密度にまで増殖を行えるのか、その密度はミドリゾウリムシ体内における共生藻密度と同程度かどうか、共生藻の密度により遊離糖の生産能力に差があるのかどうかについて明らかにする。共生藻がミドリゾウリムシ体内にいる状態で産生できる遊離糖の量、およびミドリゾウリムシ体内と同数の共生藻が単離された状態で産生する遊離糖の量をそれぞれ比較する。これらのデータを総合して、ミドリゾウリムシ体内に含まれる遊離糖の性質や量を明らかにし、将

来ミドリゾウリムシを新しい糖源として人類が利用できるかどうか検討を行うことのできる基礎データを得る。

4. 研究成果

(1) ミドリゾウリムシ体内に共生する共生藻を 20 株単離しクローン化した。これらのクローン化共生藻を、それぞれ共生藻除去ミドリゾウリムシに再共生させ再共生率を測定した。その結果、20 株中 2 株、もともと共生藻内で共生していたのにも関わらず、単離・クローン化後はその共生能力が低下している株があることが明らかになった。

(2) 20 株のクローン化共生藻全てについて寒天培地から単離後 pH7.0 で 4 日間液体培地中で培養し、細胞内に蓄積している糖量を測定した。また、同様な実験を pH5.0 の酸性条件下で培養を行い、共生藻の細胞内糖量を測定した。その結果、pH7.0, pH5.0 それぞれで高い細胞内糖量を示す複数の共生藻株があることが明らかになった。次に、細胞内糖量を測定した場合と同じ条件で共生藻を培養し、培地中に放出される糖量を株毎に測定した。その結果、それぞれの pH 条件下で糖放出能力の高い共生藻株が存在することが明らかになった。

(3) クローン化共生藻各株の再共生率と細胞内糖量および糖放出能力を比較したところ、細胞内蓄積糖量や放出能力が高くても再共生能力の低い株が存在し、両者の間には有意な相関がないことが明らかになった。

(4) ミドリゾウリムシ体内の遊離糖の量は、光照射条件下で各種培養条件を変化させると、照射光強度などに依存して 2-3 倍の範囲で増減する事が明らかになった。また、共生藻のいない共生藻除去ミドリゾウリムシ体内では、通常のみドリゾウリムシの体内に含まれる量の 1/7 程度に遊離糖量が減少する事が明らかになった。また、ミドリゾウリムシ体内に含まれる遊離糖としては、グルコースが最も濃度が高く、ついでフルクトースやマ

ルトースが検出される事が明らかになった。

(5) 遊離糖存在下で単離共生藻を培養した場合、共生藻の増殖速度に差が見られるが、共生藻の最終濃度に大きな変化は見られなかった。ミドリゾウリムシ体内に含まれる共生藻の密度は 10^8 個/ml 程度であること、一方、単離共生藻を培養した場合の最大密度は 10^8 個/ml を併せて明らかにした。その結果、前者は後者の 100 倍程度高密度であることが明らかになった。様々な密度で単離共生藻を培養した場合、密度が高くなるにつれて共生藻 1 個当たりが産生する遊離糖量が減少する傾向にあることが明らかになった。従って、ミドリゾウリムシ体内の共生藻密度が高い理由は、共生藻密度を上昇させる事によって糖生産効率を上げるいわゆる「密度効果」の為ではない事が示された。

(6) ミドリゾウリムシの培養を実験室内で行うと、通常 1000 個体/ml 程度の密度で定常期となる。深さ 1m、1ha の培養池を想定した場合、ミドリゾウリムシ体内に含まれる遊離糖をサトウキビ由来のかんしゃ糖生産量（農林水産省の報告データ、1ha・年間）と単純比較すると数パーセントに相当する事が明らかとなった。ミドリゾウリムシから効率良く遊離糖を単離する方法の確立が今後大事である事などが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 7 件)

(1) 安達由加、下村亜祐美、濱生こずえ、細谷浩史 ミドリゾウリムシの活性酸素および高温耐性に関する研究 第 46 回日本原生動物学会大会、2013 年 11 月 9 日、広島大学東広島キャン

パス

(2) 安達由加、下村亜祐美、濱生こずえ、細谷浩史 ミドリゾウリムシのストレス耐性に関する研究 第 84 回日本動物学会、2013 年 9 月 28 日、岡山大学

(3) 細谷 浩史、氏弘 一也、平木 英志、鉄川 公庸、山新 良彦、安達 由加、松原 康介、濱生 こずえ（広島大・院理・細胞生物）ミドリゾウリムシ体内に蓄積する遊離糖類 第 45 回日本原生動物学会大会、2012 年 11 月 25 日、姫路市（兵庫県立大学）

(4) 山新良彦、平木英志、鉄川公庸、安達由加、松原康介、濱生こずえ、細谷浩史 ミドリゾウリムシの増殖を制御するレタス培地中に存在する因子の解析 第 45 回日本原生動物学会大会、2012 年 11 月 24 日、姫路市（兵庫県立大学）

(5) 氏弘一也、平木栄志、鉄川公庸、山新良彦、濱生こずえ、細谷浩史 ミドリゾウリムシ（*Paramecium bursaria*）に蓄積する遊離糖の利用に関する研究 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜

(6)細谷浩史（シンポジウム講演）第84回日本生化学会大会 「共生藻を共生させている原生動物ミドリゾウリムシ体内の遊離糖に関する研究」

（2011年9月21日）（京都国際会館）

(7)細谷浩史（シンポジウム講演）日本生物物理学会第49回年会 「ミドリゾウリムシ共生藻が産生する遊離糖に関する研究」（2011年9月17日）（兵庫県立大学・姫路書写キャンパス）

〔図書〕（計1件）

(1)細谷浩史「原生動物ミドリゾウリムシ

の謎にせまる」じっきょう理科資料 73 巻
p1-6（2013）

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：糖の生産方法

発明者：細谷浩史・濱生こずえ・氏広一也

権利者：国立大学法人広島大学

種類：特許

番号：特開2013-165680

出願年月日：平成24年2月15日

公開日：平成25年8月29日

国内外の別：国内

取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細谷 浩史（HOSOYA Hiroshi）

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号：90183102

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし