

# 原生生物ユープロテス (ミズヒラタムシ) の細胞周期

山口県岩国市立ミクロ生物館

この実験の詳細内容は、ミクロ生物館のホームページにも掲載されています。  
(<http://shiohaze-kouen.net/micro/>)

## 目次：

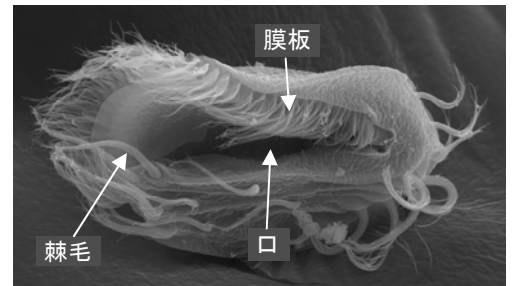
ユープロテスについて	1
ユープロテスの細胞周期	1
実験キットの内容	2
実験1: ユープロテスの外部形態 の観察	2
実験2: 細胞周期に伴う核の変化	3
配布プリントの例	4
解説1: 繊毛虫の核分裂に ついて	5
解説2: プレパラートの作り 方	5
解説3: ユープロテスの採 集・培養法	6

## ユープロテス (ミズヒラタムシ) について

ユープロテスはゾウリムシに近縁の原生生物(繊毛虫下毛類)で、淡水に生息する単細胞の生物である。水中に生息し、扁平な形状をしているので、和名をミズヒラタムシという。このキットで用いるユープロテスは学名をユープロテス・エディキュラータス(*Euplotes aediculatus*)という。ユープロテスは、普通のゾウリムシやミドリムシなどと比較すると、あまり馴染みのない原生生物である。しかし、池の水から簡単に採集できることや、培養が容易であること、また、表皮が頑強であるために手荒く扱っても細胞が変形しにくいことなどから、生物実験の材料として適している。

ユープロテス・エディキュラータスは、長さが110-165 μm の、比較的大型の繊毛虫であり、数字の「3」やアルファベットの「C」の字に似た形の大核と、一個の小核を持つことが特徴である。大核は栄養核ともよばれ、多細胞生物の体細胞の核に相当する機能を持つ核である。一方小核は、生殖系列の細胞の核に相当し、生殖核ともよばれる。通常の細胞分裂の際には、大核は無糸分裂を、小核は有糸分裂をおこなうことが知られている。

細胞の表面には、棘毛(きょくもう)とよばれる十数本の繊毛が束になった足のような突起があり、これを動かして水の底を歩くように泳いでいる。また、口の周りには膜板(まくばん)という名前の繊毛の列があり、これを動かして口へと食物を誘導している。ユープロテスは、クロコグニウムのような小型の鞭毛藻類を好んで食べる。これらの運動器官に加えて、周期的に膨張と収縮を繰り返している収縮胞も観察できる。収縮胞は、細胞の浸透圧調整を行うとともに、老廃物の排出も行っ



ユープロテスの走査電子顕微鏡写真。

## この実験の特長：

- 生きた原生生物を使用している。
- 細胞周期の各ステージを、簡単な染色で見分けることができる。
- 繊毛虫の基本的な細胞構造(繊毛・細胞口・核・収縮胞)が観察できる。
- 1クラス(40人)の実験に対応。

## ユープロテスの細胞周期

一般に、細胞周期は次の4つに分けられる。DNA合成の準備段階であるG<sub>1</sub>期、DNAの合成を行うS期、細胞分裂の準備段階であるG<sub>2</sub>期、そして細胞分裂を行うM期である。動物の細胞では、M期、すなわち核の分裂(有糸分裂)と細胞の分裂(細胞質分裂)がおきる時期が、細胞周期の中でもっとも目立つ。これは、M期が視覚的に捉えることができる時期だからである。つまり、有糸分裂時には核膜が分散し、核の内容物が凝縮して染色体が観察される。また、細胞質分裂は細胞形態を見ると明らかである。しかし、他の時期(G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>期)は、細胞や核の形が類似しているため、簡単には見分けることができない。

今回の実験材料であるユープロテスを含め、原生生

物繊毛虫下毛類では、S期大核に複製帯と呼ばれる構造が出現するため、他の多くの動植物細胞では視覚的に捉えられないS期を簡単に判別することができる。また、G<sub>1</sub>期とG<sub>2</sub>期の大核の形も違っている。つまり、ユープロテスでは、核の形態、細胞の形態、複製帯の有無によって、細胞周期の全ステージを判別することができる。

本実験の目的は、ユープロテスの核を染色し、その形態から細胞周期のどの時期に位置するかを観察することである。また、各ステージに位置する核の出現頻度から、ユープロテスの細胞周期における各ステージの割合を算出することもできる。

ホームページもご覧ください。  
example.microsoft.comhttp://shiokaze-kouen.net/micro/

## 岩国市立マイクロ生物館

〒740-1431

山口県岩国市由宇町有家浦

電話 0827(62)0160

FAX 0827(62)0156

Email: micro@shiokaze-kouen.net



見えない不思議がみえてくる。



マイクロ生物とは、肉眼ではよく見ることができないほど小さな生き物のことです。何気なく生活している私たちの周りには多くのマイクロ生物が存在しています。マイクロの世界を顕微鏡でのぞいてみると、マイクロの生物を通して『生命の不思議さ』、『自然環境のバランスの大切さ』などが見えてきます。

マイクロ生物館は、マイクロの世界のさまざまな生き物を中心に紹介する世界初の博物館です。あなたもぜひ、マイクロの世界の生き物たちと友達になって下さい。

## 実験キットの内容

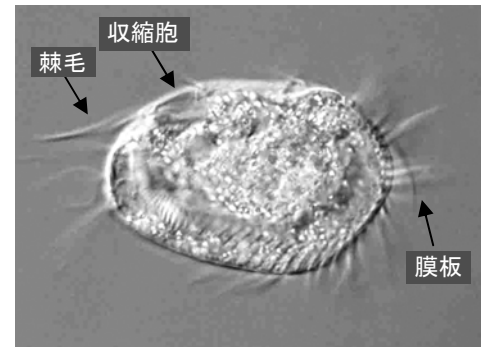
本キットには以下のものが入っています。

- 1) ユープロテスの浮遊液 1本(10 ml)
- 2) 餌のクロロゴニウム浮遊液 3本(10 ml x 3)
- 3) プラスチックシャーレ 1個
- 4) ワセリン入りピペット 5本
- 5) ピペット 3本
- 6) チップ (10  $\mu$ l の印付き)\* 2個
- 7) 麻酔液(1 mM 塩化ニッケル水溶液) 1本
- 8) 染色液(25%エタノール、38%酢酸、0.7%オルセイン溶液) 1本

各自で準備していただくもの

- 1) スライドグラス
- 2) カバーグラス
- 3) 柄付き針(つまようじでも可)
- 4) スケッチ用紙
- 5) 鉛筆
- 6) 顕微鏡

\* 10  $\mu$ lを測り取ることできるマイクロピペットがある場合には不要です。ない場合には、このチップをキットに入っているプラスチックピペットに装着してお使い下さい。



ユープロテスの光学顕微鏡写真。右が細胞前端部。

## 実験の準備

- 1) 実験の3~7日前にキットが届くように注文する。
- 2) キットが届いたら、ユープロテスの浮遊液をプラスチックシャーレに移す。
- 3) シャーレを20~25度の場所に置く。
- 4) クロロゴニウム浮遊液を1本シャーレに加える。
- 5) 残りのクロロゴニウム浮遊液も、20~25度の場所に置く。
- 6) 実験の2日前に、クロロゴニウム浮遊液をさらに1本シャーレに加える。
- 7) 実験の前日に、最後のクロロゴニウム浮遊液をシャーレに加える。

## 実験1: ユープロテスの外部形態の観察

時間に余裕がある場合は、以下の方法で長時間の観察が可能です。

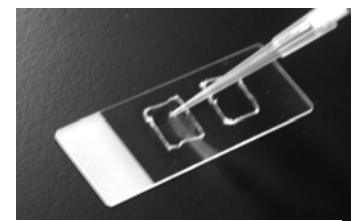
- 1) スライドグラス上にワセリンで土手を作る。
- 2) ユープロテスを一滴(10-20  $\mu$ lくらい)、スライドグラスのワセリン土手の内部に落とす。
- 3) 等量の麻酔液を加え、柄付き針で混ぜた後、カバーグラスをかける。
- 4) 時間とともに(5分くらいで)、徐々に繊毛運動がゆるやかになり、細胞は運動を停止する。顕微鏡で観察し、細胞の形態をスケッチする。

時間のない場合には、麻酔なしで以下の手順で観察すると、いいでしょう。

- 1) ユープロテスを一滴(10  $\mu$ lくらい)、スライドグラスの中央に落とし、カバーグラスをかける。
- 2) 次第に乾燥し、ユープロテスの動きが制約されてくる。最後には完全に押しつぶされて細胞は破裂して死んでしまうので、それまでの間で観察する。



シャーレをゆっくり回転させると、ユープロテスをシャーレの中央に簡単に集めることができる。下に黒い紙を敷くとわかりやすい。



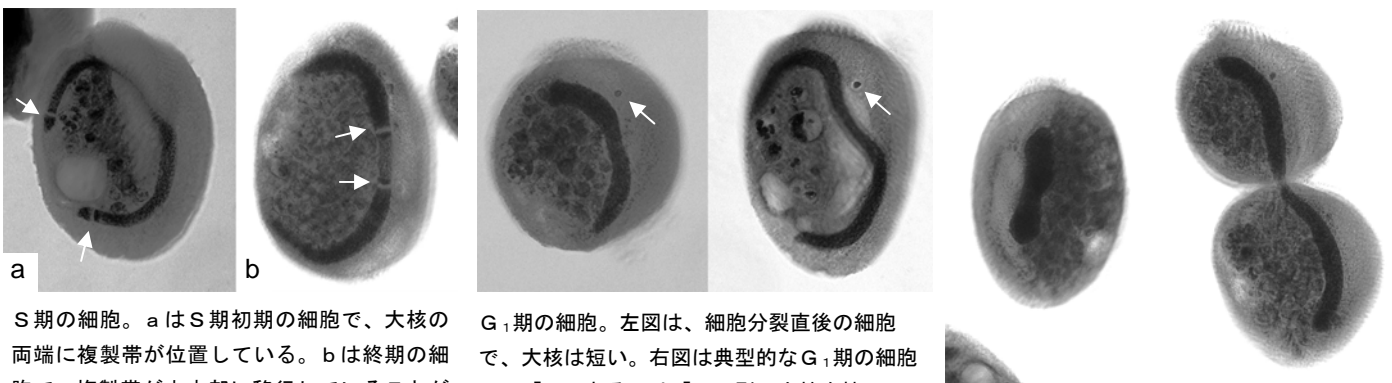
ワセリンでスライドグラス上に土手を作る。ワセリンはハンドクリームの主成分なので、皮膚に付いても安全です。

## 実験2：細胞周期に伴う核の変化

- 1) ピペットを用いて、ユープロテスを10  $\mu$ l スライドグラス上に取る。
- 2) 10  $\mu$ l の染色液をピペットで取り、ユープロテスに加える。
- 3) 柄付き針で軽く混ぜた後、カバーグラスをかける。
- 4) 細胞および核の形態をスケッチする。複製帯は顕微鏡の絞りを絞るとわかりやすい。
- 5) 各ステージにおける個体数を数え、細胞周期における各ステージの時間的割合を算出し、グラフ化する。

### ユープロテスの培養は簡単です

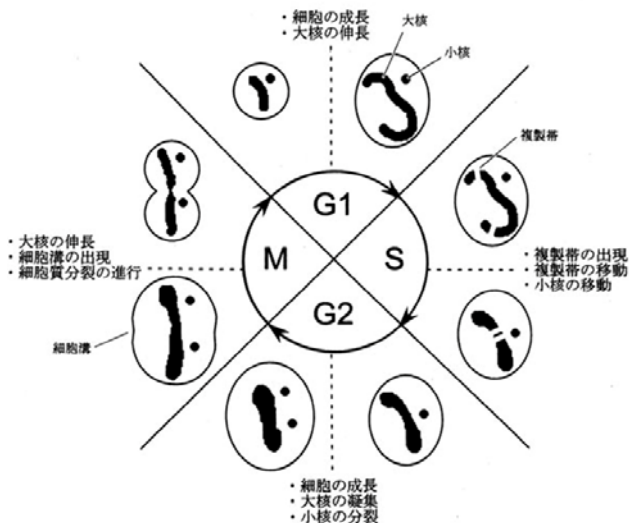
- ユープロテスの培養液は、市販のミネラルウォーターです。
- まず、餌のクロロゴニウムを少し残しておき、液体のハイポネックス®をミネラルウォーターで1,000倍に希釈した液で培養します。適当な容器に入れ、直射日光のあたらない窓際に置いておくと、増えてきます。
- ユープロテスはフラスコかシャーレに入れて室温で培養してください。1～2週間に一度、上のように育てた餌を遠心機で洗い、外液をミネラルウォーターで置き換えたもの(p6参照)を適量与えます。



S期の細胞。aはS期初期の細胞で、大核の両端に複製帯が位置している。bは終期の細胞で、複製帯が中央部に移行していることがわかる。(複製帯は、染色の条件によって他の部分よりも濃く染まる場合がある)

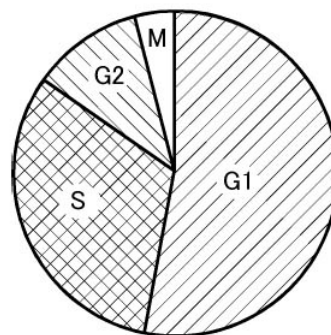
G<sub>1</sub>期の細胞。左図は、細胞分裂直後の細胞で、大核は短い。右図は典型的なG<sub>1</sub>期の細胞で、「3」あるいは「C」型の大核を持つ。矢印は小核を示す。

G<sub>2</sub>期(左図)とM期(右図)の細胞。



ユープロテスの細胞周期中の各ステージにおける細胞および核の形態変化。核染色したものを簡略化して示してある。

細胞周期のステージ	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>	M
観察された細胞数	1868	1117	406	151
割合 (%)	53	32	11	4



表のデータから作成したユープロテスの細胞周期の例。16人のクラス全員のデータを集計して作成したもの。

S期：このステージの細胞は、核のどこかに「複製帯」を有することで判別ができる。複製帯はDNA複製の場であり、S期の最初に一对の複製帯が大核の両端に出現する。複製帯は次第に大核の中央に移動していき、中央部で合体し、消滅する。

G<sub>2</sub>期：大核は凝集し、元の半分以下の長さになる。また、それにつれて直径も増大し、太い棒状の形になる。G<sub>2</sub>期の後期には、小核が分裂する(この状態のステージは、M期に含めてもよい)。

M期：細胞体が中央部でくびれ、ピーナッツ状になる。それとともに大核が伸長し、最終的に二つの娘細胞へと分裂する。大核の核膜は消失しない。

G<sub>1</sub>期：核はふたたび長いひも状になり、あるいは「C」の字型になる。細胞が成長するとともに大核は伸長する。

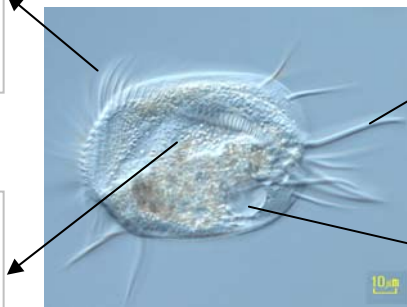
プリントの例(コピーしてお使い下さい)

## ユープロテス核の細胞周期における形態変化

氏名: \_\_\_\_\_

### 実験1 ユープロテスの外部形態の観察

名称:  
役割:



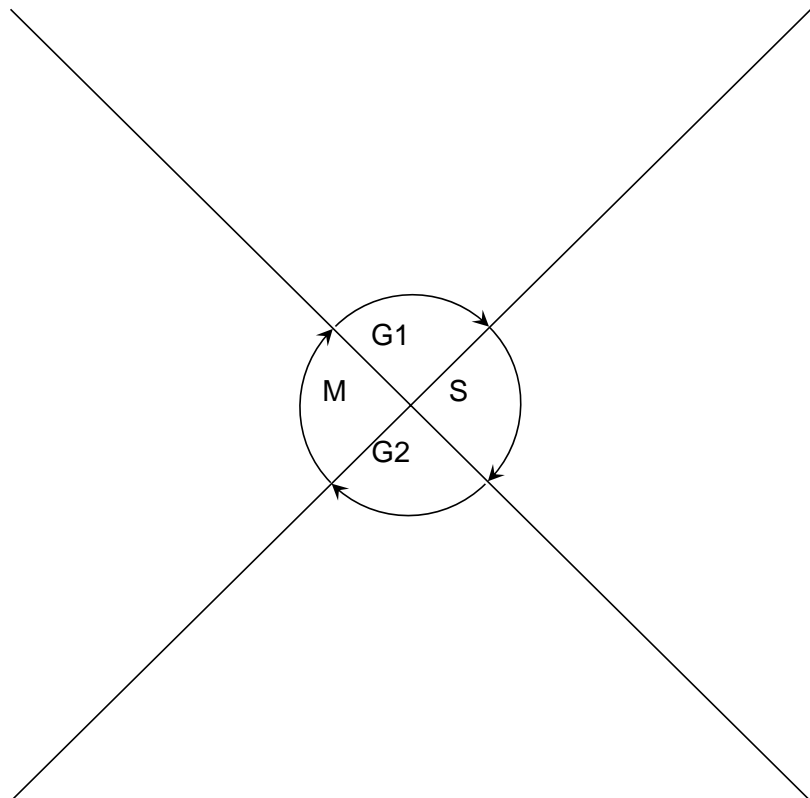
名称:  
役割:

名称:  
役割:

名称:  
役割:

### 実験2 ユープロテスの核の観察

細胞周期の各ステージにある細胞を観察し、スケッチしましょう。  
各ステージにある細胞の形態や核の形の特徴を書きましょう。



## 解説1： 繊毛虫の核分裂について



S期の細胞。複製帯が濃く赤色に染色されている。

### 繊毛虫とノーベル賞

繊毛虫の大核内には、多数のミニ染色体が存在している。これらが作られる際には、その末端に「テロメア」という特殊なDNA配列が付加されている。テロメアは、真核生物の染色体の末端に普遍的に存在し、染色体の末端を保護する構造である。テロメアは、人間の老化とがんの発生に深くかかわっていると考えられている。繊毛虫はテロメアの研究をする上でよいモデル生物である。たとえば繊毛虫の一種のテトラヒメナなどでは、細胞あたり4万個以上のテロメアがあるからである。テロメアの塩基配列は、エリザベス・H・ブラックバーンらにより、テトラヒメナを用いた研究で1978年に初めて明らかにされた。ブラックバーンらは、これらの研究により2009年のノーベル賞を受賞した。

繊毛虫に共通する特徴の一つは、大核と小核を持つことである。大核は小核ゲノムの一部が倍数化したものであり、繊毛虫が生きていく上で必要な遺伝情報しか持っていない。大核は多くの場合、有性生殖の過程で小核から新たに作られる。一方小核は、有性生殖時以外は働かない。

一般に、真核生物の核分裂は有糸分裂mitosisによるとされている。有糸分裂とは、染色体が均等に配分される分裂様式で、染色体や紡錘体などの繊維状構造が形成をとまう。繊毛虫の大核は、染色体の凝集を伴わないので、一部の例外を除いて、「無糸分裂amitosis」により分裂するとされている。ただ、ここで言う無糸分裂という用語は、有糸分裂に対する用語として、「染色体の不均衡な分配を生じる核分裂」という意味であり、微小管や分裂装置が形成されずに分裂するという意味ではない。実際、分裂中のユープロテスの大核の内部では多数の微小管が形成されており、微小管の働きで核は伸長し、両極へと配置される。この際、遺伝子は「ほぼ」均等に分配される。大核の内部には、約1000倍に増幅された小型の染色体(ナノ染色体という)が多数含まれている。それぞれのナノ染色体は、ふつう単一の遺伝子を含んでいる。このように大核の中には多数コピーの染色体が含まれるので、厳密に均等に染色体が分配されなくても不都合はまったく生じない。以上に述べたように、繊毛虫の大核の分裂は真核生物の核分裂の一般的な様式と大きく異なっているというわけではなく、その意味で核分裂を「有糸分裂」と「無糸分裂」に分けることに大きな意味はない。実際のところ、繊毛虫の大核の分裂に対して有糸分裂mitosisという用語が用いられることもあり、「無糸分裂」という用語は最近ばかり使われることのない専門用語となっている。

大核は核膜を保持したまま二つに分裂する。一方、小核は有糸分裂mitosisにより分裂するが、核膜は保持

されたままである。小核の分裂の場合は、分裂装置が核の内部に形成され、多細胞の動物や植物の核分裂と同じような過程を経て染色体がきちんと均等に分配される様式の核分裂である。

繊毛虫の有性生殖は、異なる型の細胞が一部を融合させる、「接合conjugation」によっておこなわれる。接合の際、小核は減数分裂を行い、形成された単相の小核が交換される。接合に引き続いて大核が新生する過程は、小核の内部に蓄積されたトランスポゾン様遺伝子などの『利己的遺伝子』を含むゲノムの多くの部分を取り除き、細胞の通常の機能に必要な遺伝子だけを大核の遺伝子として残すためのプロセスであると理解されている。ユープロテスを含むグループの繊毛虫では、小核のゲノムDNAの約90%が取り除かれ、残りの10%のDNAから大核のゲノムが作られている。

ユープロテスの細胞周期において、大核と小核のDNA複製の時期は一致していない。この実験では大核に複製帯が見られる時期をS期としたが、これは厳密な意味では正しくない。小核のDNA複製を無視しているからである。大核の複製帯の出現時期は、大核におけるDNA複製の時期を示している。小核のDNA複製の時期は細胞の分裂期にほぼ一致しているが、本実験の手法では確認できない。さらに、大核と小核の分裂時期も異なっている。ユープロテスの場合には、小核の分裂は大核の分裂に先立って生じる。本実験では、大核が1個で小核が2個の時期をG2期に分類しているが、これは大核の分裂サイクルに着目した場合の分類であり、小核の分裂が始まっている時期はM期に算入するべきかも知れない。しかし、小核の挙動は本実験では確認できないので、小核の分裂期を正確にとらえることは困難である。従って、正確な意味においては、この実験は「大核の挙動に着目した細胞周期の観察」と言うべき実験である。

## 解説2： プレパラートの作り方

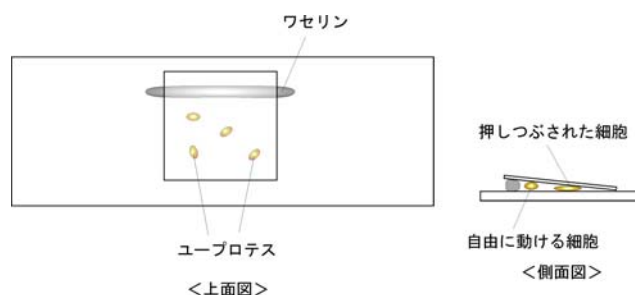
ユープロテス実験キットには、ワセリンの入ったプラスチック製ピペットが入っている。これは実験に必ずしも必要な道具ではない。たとえば、ホールスライドなどでも代用できる。あるいは、ビニールテープや両面テープで土手を作る方法もある。ワセリン法は、少人数での実験(クラブ活動など)の際には使い勝手がよいし、自由な厚さのプレパレートが作製可能なので、実験の規模に応じて活用していただきたい。ちなみに、いずれの方法も生きた細胞を観察するために用いる方法であり、染色した標本は、土手なしでカバーガラスをかけて、余分な液を除いてしっかり押しつぶされた状態にするほうがき

れいに観察できる。ワセリン法・ホールスライド法・テープ法の、それぞれの利点と欠点をまとめると、以下のようになる。

### 1)ワセリン法

利点: 土手の厚さを自由に調節できる。生きた細胞をスライドガラスとカバーガラスの間に挟んで動きを封じることができる、またつぶし過ぎないようにすることができる。時間がある場合、あるいはクラブ活動などに向く。(ワセリンはハンドクリームの主成分で、無害です。余分は手にすりこむとよい)

欠点: 生徒に作製させると時間がかかる。使用後のス



ワセリンを使ってさまざまな押しつぶし段階の観察をする方法。ごく少量のワセリンの土手をカバーガラスの一端のみに作ると、プレパラート中の水の厚さに傾斜をつけることができる。厚みのある部分では細胞は自由に泳ぐことができるが、薄い部分では押しつぶされる。プレパラートのどこかで、適当な強さで圧迫されて観察しやすい細胞を見つけることができる。

ライドグラスに付着しているワセリンは温湯や洗剤で流せるが、洗うのが面倒。

## 2) ホールスライド法

利点: 準備が不要なので、大人数に適している。

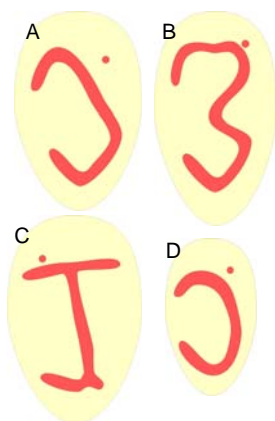
欠点: 生きた細胞を観察するには水の層が少し厚すぎる。ガラスの表面が湾曲しているのできれいに観察しにくい。

## 3) テープ法

利点: 準備を前もってしておけば、大人数に適する。

欠点: ホールスライドよりもきれいに観察できるが、土手の厚さは調節できない。両面テープを使うと密閉性の高いプレパラートができるが、実験後にはがすのが困難。

## 解説3: ユープロテスの採集・培養法



### ユープロテスの種の見分け方

A: *Euplotes aediculatus*: 本実験で用いたユープロテスである。大核は"C"字型で、平均的な大きさは $132 \times 84 \mu\text{m}$ 。小核は大核と離れた位置にある。

B: *Euplotes eurystomus*: 平均的な大きさは $138 \times 78 \mu\text{m}$ で、*E. aediculatus*とほぼ同じ。大核が"3"の字型で、小核は大核に近接している。

C: *Euplotes woodruffi*: 平均的な大きさは $140 \times 90 \mu\text{m}$ で、上の二種より少しだけ大きい。大核は"T"あるいは"J"の字型である。

D: *E. patella*: 平均的な大きさは $91 \times 52 \mu\text{m}$ で、上の三種よりかなり小さい。大核は*E. aediculatus*と類似した"C"の字型をしている。

ユープロテスは、日本に普通に見られる原生生物の一種である。本キットで用いるユープロテス・エディキュラータス(*Euplotes aediculatus*)は、熊本県の池から採集された系統である。池の水を、朽ちた枯葉などと一緒に採集し、シャーレに移して実体顕微鏡で観察すると、見つけることが可能である。シャーレに麦か米粒(9cmシャーレなら1~2粒)を入れておくと、それを栄養源として自然にバクテリアが増殖し、それを食べる原生生物が増えてくる。

ユープロテスは、本実験で用いるユープロテス・エディキュラータスの他にも、いくつかの種が存在する。これらの種は、左図のように核の形状で簡単に見分けることができる。

採集直後に何もいらないように見えても、15~25度くらいの温度で1~2週間放置しておくと、様々な原生生物が出現してくる。これらは、最初は数が少なくて見つけにくかったものに加えて、シスト(原生生物の休眠状態のもの)から出現したものもある。

シストとは、環境条件が悪化することにより形成される原生生物の形態で、これにより乾燥などにも耐えることが可能となる。乾燥状態のシストは風に乗って遠距離を移動するので、地球上の原生生物のかなりのものは

地域的な特殊性がなく、同じ種が世界中で観察される。原生生物のすべてがシストを作るわけではなく、シスト形成が報告されていない種も多い。

ユープロテスの採集方法と同じ方法で、ソウリムシ、アメーバ、ミドリムシなども採集することができる。これらの原生生物が単離できたら、シャーレにミネラルウォーター(たとえば「Volvic」や「六甲のおいしい水」などが原生生物の培養に適した硬度の水である)を入れ、麦か米粒を栄養源にして培養を続けることができる。

多量に増やしたい場合には、本実験で使用するクロロゴニウムを与える方法が適している。クロロゴニウムは、上記のミネラルウォーターに0.1%の濃度でハイポネックス(植物の培養液)を混ぜたもので単独に培養できる。ただし、0.1%ハイポネックスはユープロテスの増殖を阻害するので注意しなければならない(理由は不明)。従って、ハイポネックスで培養したクロロゴニウムを使用する場合には、遠心(1000 rpm程度の低速遠心で約5分)でクロロゴニウムを集めた後に、上記のミネラルウォーターで外液を置き換えてからユープロテスに与える必要がある。なお、クロロゴニウムはアメーバのよい餌として使えるが、口の小さいソウリムシには適していない。ミドリムシは、0.1%ハイポネックスで培養できる。