

総説

バクテリアが拓くミドリゾウリムシ研究の新時代

細谷 浩史¹⁾・西原 直久³⁾

Hiroshi HOSOYA and Naohisa NISHIHARA

¹⁾ 神奈川大学化学生命学部 〒221-8686 横浜市神奈川区六角橋3-27-1²⁾ 放送大学東京文京学習センター 〒112-0012 東京都文京区大塚3-29-1³⁾ 江田島市教育委員会 大柿自然環境体験学習交流館 〒737-2214 広島県江田島市大柿町深江1073-1

要旨

繊毛虫ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は、単細胞性の原生生物の一種である。細胞内に数百個の共生藻が共生しており、以前から共生藻とミドリゾウリムシの共生機構を解明しようと多くの研究グループが実験を行ってきた。筆者らもその一つである。本稿では、ミドリゾウリムシを用いて行う研究で直面した実験上の問題点を整理し、今後のミドリゾウリムシ研究発展のためのヒントとしたい。併せて、ミドリゾウリムシの増殖に関わるバクテリアの存在に気づいたので、その事についても触れてみたい。

キーワード：共生、共生藻、*Paramecium bursaria*、レタス培地、無給餌株

はじめに

ミトコンドリアや葉緑体の祖先は、好気性細菌やシアノバクテリアと考えられている。これらが別の原核細胞に順次入り込み現在の真核細胞が形成されていった過程は「細胞内共生説」として高校の教科書でも詳しく紹介されている。そのプロセスは「原核細胞間、または原核・真核細胞間共生」と捉える事ができる。一方、ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* の場合、顕微鏡で容易に観察される細胞内の共生体は緑藻の一種（共生藻）であり、れっきとした真核細胞である。ミドリゾウリムシでの共生は、「真核細胞間共生」と解釈する事ができる。

ミトコンドリアや葉緑体は、すでに真核細胞内で細胞内小器官に変化してしまっている。そのため、植物細胞などからこれらを単離する事は容易であるが、単離した後の培養は非常に難しい。最近、葉緑体をハムスターの培養細胞に導入し「二日間」培養できた、という結果がまさに出たところである (Aoki et al., 2024)。一方、共生藻の場合は、ミドリゾウリムシから単離する事は容易で、かつ、単離共生藻を寒天培地上または培養液中で何年も長期間培養する方法も確立されている。さらに、ミドリゾウリムシから共生藻を「除去」する様々な方法が報告されており (Jennings, 1938; Karakashian, 1963; Pado, 1965; Weis, 1969), 共生藻除去ミドリゾウリムシ (algae-free *P. bursaria*: 白いミドリゾウリムシと一般に呼ばれている) に先ほどの単離共生藻を再共生させ、「緑色の」ミドリゾウリムシを再生させる事も容易である (Margulis and Bermudes,

1985; Fujishima, 2009)。これらの点から、ミトコンドリアや葉緑体の場合と大きく異なり、共生藻がミドリゾウリムシに共生したのは比較的最近なのでは、と筆者らは想像している。

ミドリゾウリムシは、日本を含む世界各地の池や沼に生息しており、野外からの採集も比較的簡単である。実験室内での培養も容易で、共生研究者だけでなく、中学校、高等学校の教育現場でも高い人気を誇る教材生物の一つである。

筆者 (HH) は元々「動物細胞の分裂制御機構の解明」を研究テーマとして、ウニ卵（正常細胞）や高等動物培養細胞 (HeLa 細胞などのガン細胞) を併用して様々な実験を行ってきた。1990年代、転勤先の広島大学でミドリゾウリムシの専門家に出会った。原生生物の研究は未経験だったが、初めての生き物について専門家の手解きを直接受けられる絶好のチャンスとなった。まずはミドリゾウリムシ細胞内の共生藻を数えてみた。すると、ミドリゾウリムシの細胞の大きさは様々なのに、共生藻の数はどの細胞でも 400 個前後とだいたい一定、共生藻が 10,000 個とか 100 個のミドリゾウリムシを見つけられない事に驚いた。ただし、東北地方では共生藻のいないミドリゾウリムシが天然にいる、という報告がある (Tonooka and Watanabe, 2002)。共生藻の細胞増殖を抑制している機構があるに違いないと直感し、ガン（細胞分裂）の研究にミドリゾウリムシが使えるのではないかと考えた。

筆者らは次いで、共生藻の単離や白いミドリゾウリムシの作成、さらには、多くの文献に記載がある「緑色の」ミドリゾウリムシの再生にもチャレンジした (Pringsheim, 1928; Siegel and Karakashian, 1959; Kodama and Fujishima, 2024)。単離共生藻は、寒天培地上にコロニーを形成させることで長期間保存が可能である。筆



Tel: 045-481-8686

E-mail: 2pmrlcelldivision@gmail.com

Received: 3 Mar 2025; Accepted: 29 May 2025.

表 1a. ミドリゾウリムシから単離した共生藻の再共生実験の結果.

共生藻の株	白いミドリゾウリムシの株						
	KSKw-103	NFw-1	EZw-25	MBw-1	BWKw-4	KNw-21	ASw-10
	共生藻単離後の経過年数						
	0	2	4		7		
SA-1 (OK-312)	+	+	+	-	+(1.8%)	+(13.6%)	+(1.8%)
SA-1a (OK-312)	-		-	-	-	-	-
SA-2 (HDK-124)	+	-	+	+	-	+(96%)	+(9.2%)
SA-3 (KSK-103)	+	+/-	+	-	-	-	-
SA-3a (KSK-103)	-	+	-	-	-	-	-
SA-4 (BS-4)	-		+	-	-	-	-
SA-4a (BS-4)	-	+	-	-	-	-	-
SA-4b (BS-4)	+	+	-	-	-	-	-
SA-5 (BS-6)	+						
SA-6 (H-5)	+						
SA-7 (IB-40)	+						
SA-7a (IB-40)	+						
SA-8 (K-5)	+	+	+	-	+(60%)	+(8%)	+(26.9%)
SA-8a (K-5)	-		-	-	-	-	-
SA-9 (OZ-3)	+	+	+	-	-	+(2.8%)	-
SA-10 (OZ-8)	+	+	+	+	-	-	+(14.9%)

横軸の KSKw-103 や NFw-1, EZw-25 などの表記は, 白いミドリゾウリムシ株の名称. 縦軸は, 広島で採取したミドリゾウリムシ株から共生藻を取り出し, クローン化した共生藻株の名称. () 内は, 共生藻を取り出したミドリゾウリムシ株の名称. 再共生実験を行うまでの経過年数は横軸に記載してある. +, -: 再共生の有無. () 内% は再共生率, 空欄: 実験未実施を表す.

表 1b. 自由生活性クロレラの共生実験の結果.

自由生活性クロレラの株	白いミドリゾウリムシの株						
	KSKw-103	NFw-1	EZw-25	MBw-1	BWKw-4	KNw-21	ASw-10
	クロレラクローン化後の経過年数						
	0	2	4		7		
<i>C. Ellipsoidae</i> C-87	-		+	-	-	-	-
<i>C. Ellipsoidae</i> C-87a					-	-	-
<i>C. Ellipsoidae</i> C-542	-		-	-	-	-	-
<i>C. fusca</i> var. <i>vocuolata</i> C-104	-		-	-	-	-	-
<i>C. fusca</i> var. <i>vocuolata</i> C-209	-		-	-	-	-	-
<i>C. kessleri</i> C-208	+		-	-	-	-	-
<i>C. kessleri</i> C-531	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. protothecoides</i> C-150	-		-	-	-	-	-
<i>C. protothecoides</i> var. C-206	-		-	-	-	-	-
<i>C. saccharophila</i> C-210	-		+	-	-	-	-
<i>C. saccharophila</i> C-211	-		+	-	-	-	-
<i>C. sorokiniana</i> C-43	-		-	-	-	-	-
<i>C. sorokiniana</i> C-212	+		-	-	-	-	-
<i>C. vulgaris</i> C-27	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. vulgaris</i> C-27a			+	-	-	-	-
<i>C. vulgaris</i> C-207	-		+	-	-	-	-
<i>C. zofinginesis</i> C-111	-		-	-	-	-	-

横軸の白いミドリゾウリムシ株表記については表 1a と同じ. 縦軸は, 東大応用微生物研究所 (当時) のクロレラコレクションから入手し, 新たにクローン化した自由生活性クロレラ株の名称 (ミドリゾウリムシから単離した共生藻ではない). 共生実験を行うまでの経過年数は横軸に記載してある. +, -: 共生の有無, 空欄: 実験未実施を表す.

者らは当時 (1990 年代後半), 共生藻を複数株単離し保存すると同時に (Nishihara et al., 1998), 各地のミドリゾウリムシを入手し, それぞれを「白く」させた. 次々できる白いミドリゾウリムシ株に保存中の単離共生藻を投与, ミドリゾウリムシの再生を目指したところ, 緑色のミドリゾウリムシは確かに再生した.ところが, 長期にわたって観察を続けていくと, 表 1a や表 1b に示すような複雑な現象が起きている事が判明した. まとめると:

(1) 元々ミドリゾウリムシから単離された共生藻 (各株の名称は SA) は, 多くは白いミドリゾウリムシに再共生できるが, 単離直後 (経過年数 0 年) であっても白いミドリゾウリムシに再共生できない共生藻が存在する. 表 1a の, 白いミドリゾウリムシ (KSKw-103 株) に共生できない SA-3a 株など.

(2) この共生藻 (SA-3a 株) であっても, KSKw-103 株とは別の白いミドリゾウリムシ (例えば NFW-1) には再共生できる場合がある.

(3) 単離共生藻は, SA-8 株の様に保存が長期 (最大 7 年) にわたっても再共生能力をある程度維持しているものがある一方, 単離後年数が経てば徐々に再共生能力が低下するものが多い (SA-3 や SA-4 など).

(4) 表 1a における事情は, 共生藻ではない自由生活性のクロレラの場合でも同様である (表 1b). などの様々な現象である.

図 1 は, 筆者 (HH) が普段講義や学会発表などで「ミドリゾウリムシと共生藻の共生」を説明する際に汎用している「導入用模式図」である (原図は Gerashchenko et al., 2000 を改変). しかし表 1 で判明した複雑な実験事実から, 「単離共生藻を白いミドリゾウリムシに混ぜればいつでも緑色のミドリゾウリムシが再生する」というシンプルな状況ではないな……という事実に徐々に気づき始めた. 同時に, 表 1 に示した様

な「再共生結果の再現性の低さ」, 言い換えれば「再共生結果の多様さ」がどのような理由から生ずるのか興味を持った. ここが, 本稿の出発点である.

ミドリゾウリムシについて

「はじめに」に記載した (1) ~ (4) の事象がなぜ発生するのか. その原因に関して, まず, ミドリゾウリムシ自体に注目して考えた点を列挙する.

(a) ミドリゾウリムシ自体が遺伝的に多様であるため, 同じ共生藻であっても再共生実験の結果に差が出る.

(b) ミドリゾウリムシが遺伝的に同一であっても, 餌や培地の種類など, ミドリゾウリムシの培養条件が多様であるため, 再共生実験の結果に差が出る.

(c) ミドリゾウリムシ細胞内の共生藻の種類が多様であるために, その影響を白いミドリゾウリムシが受け, 再共生実験の結果が多様になる.

(d) 白いミドリゾウリムシが増殖過程のどの段階 (対数増殖期や定常期など) にあるかによって再共生率が変化する.

(e) 共生藻の除去処理を行った白いミドリゾウリムシであっても, 実は共生藻が除去されずに残っており, その影響によって再共生実験の結果に差が出る.

(a) のミドリゾウリムシの遺伝的多様性の影響は古くから語られて来たが, 最近, 世界各地のミドリゾウリムシは, ヒストンなどの遺伝子配列を用いた分子系統解析により 5 つのグループ (R1 ~ R5) に分けられるという報文が出た (Spanner et al., 2022). 日本国内各地のミドリゾウリムシは, その一つのグループ (R3) に全て収まっている. 一方, R3 にはアメリカやチリ, オーストラリアやオーストリアが入っており, 分布が世界中に散らばっている. このため, ミドリゾウリムシの系統の分化は, 地理的隔離だけで単純に説明できる訳で

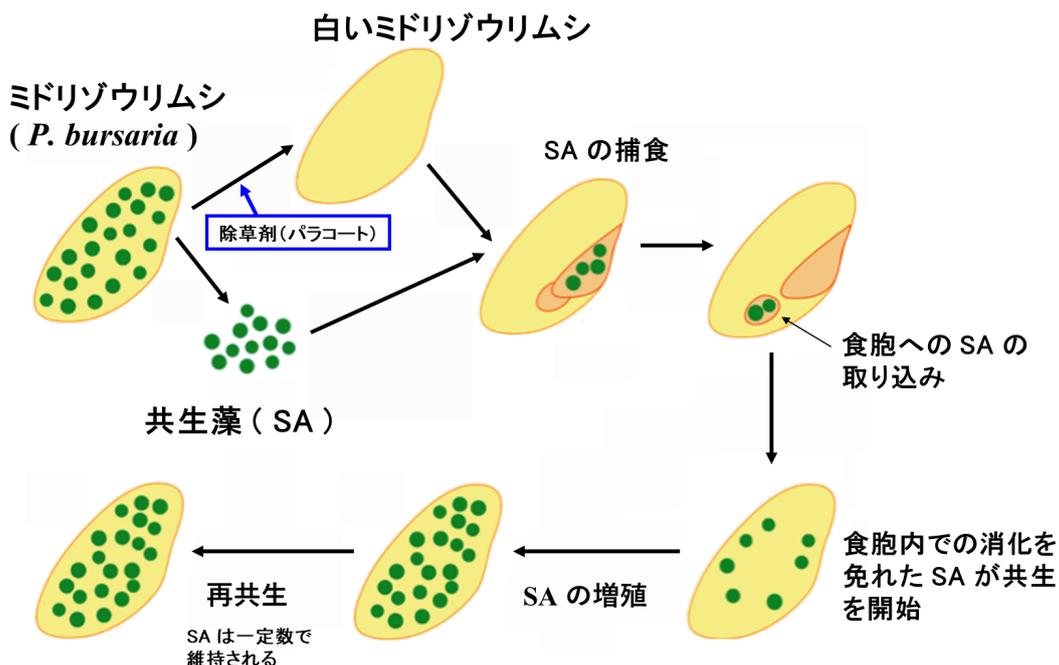


図 1. ミドリゾウリムシと共生藻の共生を説明する際に使用する「導入用模式図」.

はなさそうである。ただし、ミドリゾウリムシ全ゲノムの解析は完了していないので、とりあえず (a) についての結論は脇に置いておこう。

(b) に関しては、培養時に培地に外部から投与する「餌の多様さ」と、「培養液そのものの多様さ」を挙げることができる。表 2 に、ゾウリムシやミドリゾウリムシを培養する際の餌及び培地の種類をまとめた。餌としてはバクテリアや小型の繊毛虫をミドリゾウリムシに投与する研究者が多い (Sonneborn 1970; Berk et al. 1991; Omura et al. 2004)。一方、培養液としてはいわゆるレタス培地、レタス葉を煮沸後乾燥させて保存しておき、使用時には乾燥レタス葉を水に入れ煮沸して抽出した溶液を使用する研究者が多い (Barna and Weis 1973; Weis 1975)。その他に稲ワラの煮出し液やケール葉から作成した培地を使用するケースもある。レタス培地は、使用されるレタス葉の組成が産地ごとに多様で、抽出条件が異なれば、同じレタス培地と言っても組成も多様であると考えて良い。その都度異なる培養条件で培養されていれば、ミドリゾウリムシ自体が多様になり、その影響を白いミドリゾウリムシが受け、共生させる側の共生藻が同じでも、「再共生率」が異なってしまう可能性は十分あると思われる。培養条件の不統一は大事なポイントなので、後ほど「ミドリゾウリムシの培養条件について」の項でも再度取り上げる。

(c) に関しては、次項「共生藻について」で詳しく触れる。

(d) に関しては、筆者らは、増殖時期の異なるミドリゾウリムシから取りだした共生藻と、増殖時期の異なる白いミドリゾウリムシを組み合わせて再共生を行い、対数増殖期と定常期では再共生率が異なる事、対数増殖期同士での組み合わせが高い再共生率を示すという結果を既に得ている (Nishihara et al., 1996)。この事は、再共生には、共生藻または白いミドリゾウリムシ

の増殖時期が大きく影響する事を示唆している。一方、共生藻と (白い) ミドリゾウリムシそれぞれが若年か老年かでも、共生藻の再共生率が異なってくるだろう。実際は、共生藻とミドリゾウリムシの年齢を明らかにする事は難しいが、今後「再共生」の実験を行う際、(d) についての言及は必要になるだろう。

(e) の白いミドリゾウリムシであるが、作成方法については、ミドリゾウリムシを長期間暗黒条件下で培養したり、光合成阻害剤 (DCMU) を作用させたりするなど古くから多くの報告があり (Karakashian 1963; Weis 1969)、これらの論文では共生藻のないミドリゾウリムシができたこと明記されている。筆者は、広島のみドリゾウリムシを先行論文通り長期間暗黒においてみたが共生藻はゼロにならなかった (Hosoya et al., 1995)。その後、別の方法を試す事に専念し、パラコート (除草剤) やアクリルアミドを使用した、広島のみドリゾウリムシでも白くできる方法を新規に報告した (Hosoya et al., 1995; Takahashi et al., 2005)。

ところで、通常の光学顕微鏡による観察だけで共生藻の有無を判断する自信がなかったため、筆者らは、蛍光顕微鏡を用いて共生藻の葉緑素の自家蛍光 (赤色) を観察し、自家蛍光が観察されない場合を白、すなわち共生藻除去の根拠としていた (Hosoya et al., 1995; Nishihara et al., 1996, 1998)。しかしよく考えると、これは共生藻の葉緑素の消失を意味するものの、「共生藻」が無くなったとまでは断定できないのではないかと思いつき、パラコート処理でできた白いミドリゾウリムシでは Rubisco 遺伝子が消失している事までは明らかにできなかった (Tanaka et al., 2002)。しかし、「共生藻自体や藻内部のミトコンドリアの DNA の消失」まで証明できずに現在に至っている。従って、「白いミドリゾウリムシ」というのは、共生藻の葉緑素と Rubisco 遺伝子は消失しているが共生藻の DNA は残ったままの中途半端なミドリゾウリムシの可能性が大いにある。以上の理

表 2. ゾウリムシ・ミドリゾウリムシの培養条件。

1900 年以後に論文で報告されたゾウリムシ・ミドリゾウリムシの培養条件をまとめた。

論文 (年代順)	培養液に投与する栄養成分 (餌)	培養液
Calkins (1902b)	<i>Bacillus subtilis</i> (細菌)	干草煎じ液
Raffel (1930), Jennings (1939)	<i>Stichococcus bacillaris</i> (緑藻)	塩類培地, 干草煎じ液
Jennings (1939), Jennings (1944)	<i>Flavobacterium brunneum</i> (細菌)	塩類培地, 干草煎じ液, レタス葉煎じ液
Sonneborn and Dippel (1946), Wichterman (1949)	<i>Aerobacter aerogenes</i> (細菌)	レタス葉煎じ液
Wichterman (1949)	<i>Paramecium calkinsi</i> (繊毛虫)	レタス葉煎じ液
Weis (1969)	<i>Enterobacter (Aerobacter) aerogenes</i> (細菌)	レタス葉煎じ液
Barna and Weis (1973), Weis (1975), Reisser (1980), Berk et al. (1991)	<i>Enterobacter cloacae</i> (細菌)	レタス葉煎じ液
Fok and Allen (1979)	<i>Chlamydomonas</i> sp. (緑藻)	麦若葉煎じ液
Görtz et al. (1982), Sakaguchi and Suzaki (1999), Omura et al. (2004)	<i>Chlorogonium elongatum</i> (緑藻)	麦若葉煎じ液, 塩類培地
Nakaoka et al. (1987), Berk et al. (1991), Hosoya et al. (1995), Furukawa and Kawano (2012), Greczek-Stachura et al. (2021),	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (細菌)	干草煎じ液, EBIOS錠剤, レタス葉煎じ液
Zhang et al. (2022)	<i>Escherichia coli</i> TG1 (細菌)	塩類培地
Himi et al. (2023)	無し	レタス葉煎じ液

由から、「白いミドリゾウリムシを共生藻除去ミドリゾウリムシと単純に見做せないのでは？」と筆者らは現在考えている。

共生藻について

「はじめに」に記載した (1) ~ (4) の事象がなぜ発生するのか。その原因に関し、次に共生藻自体に注目して考えた点を列挙する。

(a) 共生藻の遺伝的多様性が、ミドリゾウリムシへの再共生実験の結果を変化させる可能性。

(b) 単離・クローン化後の共生藻の培養環境が多様な場合、そこから共生藻が影響を受け、再共生実験の結果を変化させる可能性。

(c) 共生藻の増殖過程における段階（対数増殖期や定常期など）や年齢により、再共生率が変化する可能性。

(a) に関しては、ミドリゾウリムシに共生する共生藻については、核 rRNA の ITS-2 領域を用いた解析が先駆的に行われ、殆どの共生藻は *Chlorella variabilis* と *Micractinium conductrix* の 2 種類である (Pröschold et al., 2011) 事が明らかにされている (*Chlorella vulgaris* という報告もある (Hoshina and Imamura 2008))。日本のミドリゾウリムシは全てグループ R3 に属することを既に述べたが、R3 に属するミドリゾウリムシの共生藻は全て *C. variabilis* であることが報告されている (Spanner et al., 2022)。因みにヨーロッパのミドリゾウリムシは主に R1 と R2 に属するが、一部が *C. variabilis*、残りの全ては *M. conductrix* を共生させている。これらの報告に従えば、我が国のミドリゾウリムシは全て *C. variabilis* を共生させている事になるので、(a) の可能性は低いのではないかと考えられる。

(b) に関して、ミドリゾウリムシから単離された共生藻は、コロニーのまま寒天培地上で保存する場合と、コロニーを藻類培地 (CA 培地など) に懸濁し液体中で保存する場合の 2 種類がある。筆者らは前者の方法で長期間単離共生藻を保存していた。その過程で、各共生藻のコロニーの周辺に白っぽい濁りが常に存在する事、その濁りは共生藻コロニーの種類によって色が異なる事などを確認していた。この濁りは光学顕微鏡で観察した限りでは正体は不明であったが、筆者らは細菌の可能性が高いと考えている。もし細菌なら、共生藻の種類によって増殖している細菌の種類が異なっている可能性がある。共生藻が常在菌を共生させていて、ミドリゾウリムシへの再共生能などが細菌により制御されているとすれば大変興味深い。共生藻のミドリゾウリムシへの再共生能が、寒天培地上で長期間保存されるうちに変化する事実 (表 1) を、共生藻に共生する細菌の変化で説明する事も可能になる。

(c) に関しては、「ミドリゾウリムシについて」の項 (d) で述べた事が共生藻についても言えるのではないだろうか。つまり、共生藻自体の年齢や、対数増殖期と増殖の定常期で共生藻のミドリゾウリムシへの再共生率に差が出る可能性は大いにあるだろう。再共生の実験にあたって本項 (c) についての言及は今後必要になるだろう。

ミドリゾウリムシの培養条件について

「はじめに」に記載した (1) ~ (4) の事象が発生するその理由について、本項ではミドリゾウリムシと共生藻両者の「培養条件」に注目して考えてみる。

ミドリゾウリムシの培養時には研究者ごとに様々な餌が与えられている。一般的には、バクテリアや小型の繊毛虫等様々な微生物が与えられることが多い事、培養液の種類も様々である事も「ミドリゾウリムシについて」の項で既に述べた。さらに、培養時の光照射時間や照射光の強度も報文ごとにまちまちであり、記載のない報文も多い。

そこで、まず筆者 (HH) は、投与される餌の多様性を解決するために、ミドリゾウリムシに外部から餌を投与せず、無菌の培地のみで培養が可能な株 (無給餌株) が作成できないか検討を行うこととした。

ミドリゾウリムシ無給餌株の確立

筆者 (HH) のもう一つの主要実験材料である高等動物の培養細胞では多くの場合、培養時には組成が明確な培地が用いられている。培養時に血清を添加する場合もあるが、無血清培養も実現されている。培養に微生物の投与不必要である。培地も細胞毎に統一されており、ミドリゾウリムシに比べ、研究者間の培養条件の統一の状況は遥かに進んでいる。

また、培養細胞は抗生物質存在下でも元元よく増殖し、多くの培養細胞では「無菌条件下」での培養が実現している。実際筆者 (HH) が使用している HeLa 細胞 (子宮頸癌組織から単離されたガン細胞) は、無菌室内で継代され、抗生物質を含む人工合成培地中でどんどん増殖している (Hamao et al., 2020)。このような例に倣い、筆者 (HH) はかつて、ミドリゾウリムシの無菌化を試みた事もあった。実際に、抗生物質投与でミドリゾウリムシ無菌株が作成できたという報告もあった (Omura et al., 2004)。しかし、ペニシリンやストレプトマイシン、ゲンタマイシンなどの抗生物質をミドリゾウリムシに投与した所、残念な事にミドリゾウリムシ自体が減少してしまった。抗生物質で餌のバクテリアが減少したからミドリゾウリムシも単純に減少したという可能性もあるが、ヒトの腸内細菌の様に、真核細胞であるミドリゾウリムシの生存に原核細胞が必要である可能性もあるのではないかと考え、どちらだろうとずっと悩んでいた。そこで、ミドリゾウリムシ自体を無菌化する努力はひとまず置き、せめても 外からバクテリア (餌) を投与せずに培養できるミドリゾウリムシ個体を得る事はできないかと考え、無給餌株の作成に専念する事にした。

2015 年 5 月に神奈川大学湘南ひらつかキャンパス構内の池からミドリゾウリムシを採取した (図 2)。採取後集団から 1 個体 (細胞) を取り出すクローニング作業を 2 回繰り返した。1 個体単離の都度無菌レタス培地で個体を洗浄し、個体外側のバクテリアをなるべく取り除く作業を行った。この個体 (KUNY-2 株) を大量培養で増殖させ餌条件で保存、一年後に培養液に餌を追加、さらに 3 ヶ月培養した状態で、培養液全体や洗浄後の 1 個体、及びその洗浄液のバクテリアの組成解析を行なった。翌年 (2017) 増殖した定常期の株から 3 回目のクローニングを実施、単離個体を洗浄

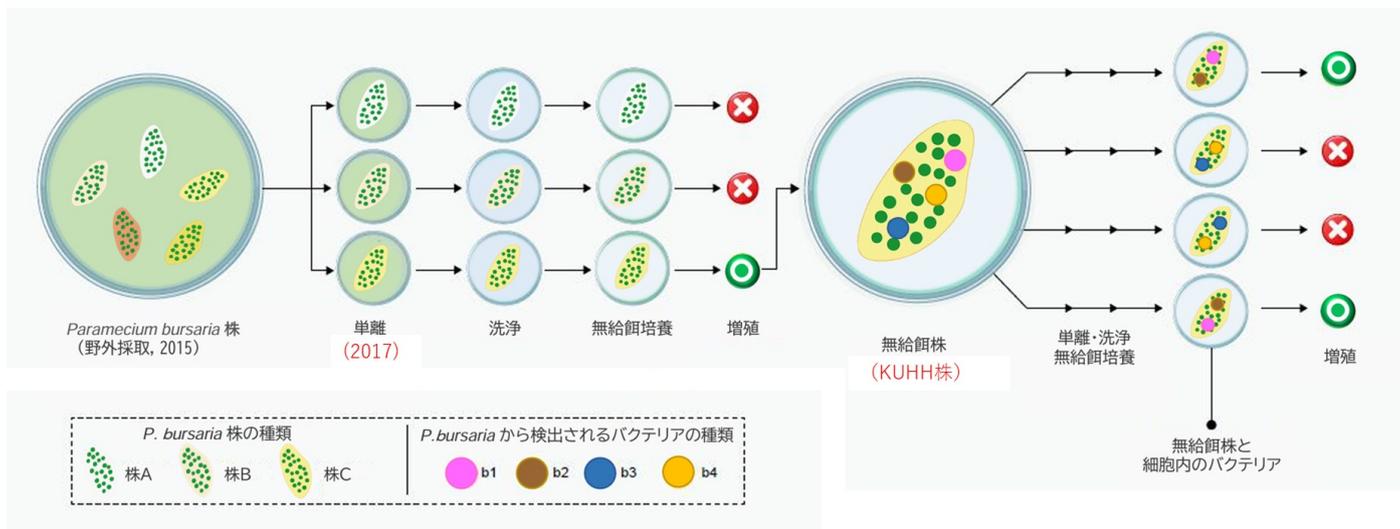


図 2. ミドリゾウリムシ無給餌株の作成過程、および、遺伝的背景が同一なミドリゾウリムシを「多様化」するバクテリアの役割. 野外のミドリゾウリムシから 1 細胞を単離し (2015), 餌を投与したレタス培地中で各株 (A, B, C など) の増殖状態を観察した. その中で増殖が盛んな株を選び出し, その株から 2 度目の単離を行った. 単離個体を有餌条件下で暫く培養後, 3 度目の単離を実施した (2017). この単離個体 (株 C とする) を無菌のレタス培地で洗浄後, 外部から一切餌を投与せず, 無菌のレタス培地だけを交換する条件下 (無給餌条件下) で現在まで長期間無給餌で継代を続けている (KUHH 株). 興味深い事に, 株 C が増殖した細胞集団は, 全個体の遺伝的背景が同じと推察されるが, そこから再度単離された個体をそれぞれ増殖させると, それぞれの増殖速度は大きく異なっていた (図中では, 解りやすさのため 4 株のミドリゾウリムシを例示). これらの各個体の培養液中のバクテリア組成の解析を行なったところ, 増殖の良い個体同士, 悪い個体同士で組成が類似しているものの, 互いの組成は大きく異なっている事が明らかとなった (Himi et al., 2023 を参照). ここでは, 解りやすさのため 4 種類のバクテリア (B1~B4) を例示したが, 実際にどのような種類のバクテリアがミドリゾウリムシの増殖を促進しているのか, これらのバクテリアが共生藻にも影響を及ぼしているのか, などの解析はこれからである.

後, 餌を投入せず無菌のレタス培地だけで培養を行う無給餌培養に移行した. 移行した株は複数作成し, その中から, 無給餌培養条件下であっても増殖の良い株を選び「無給餌株」とした (KUHH 株). 増殖後, さらにその中から 1 個体を単離, 洗浄後, 同様にレタス培地のみで培養する操作を現在まで適宜繰り返している. 現在, 無菌のレタス培地を交換するだけで, 外部からの餌投与なしでも安定して増殖するクローン株として維持されている (Hosoya et al, 2017; Himi et al., 2019; Matsushima et al., 2022; Himi et al., 2023).

II 無給餌株から明らかになった事

この「無給餌株」は, 1 個体単離を繰り返し, 単離したこの 1 個体からその都度増殖させているため, 株の個体集団に含まれる全個体の遺伝的背景は同一であると考えられる. しかし, 以下に記す顕著な特徴を示した (図 2). (a) 培養液に餌のバクテリアを添加しなくなしてから久しいが, 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を標的にして, 次世代シーケンスを用いた細菌叢解析を行ったところ, 常に培養液中から多種類のバクテリアが検出された.

(b) 無給餌株の各個体を 1 個体ずつ単離し増殖させると, どの個体も類似の増殖曲線を示すわけではなく, 増殖の良い個体から悪い個体まで様々な個体が観察された.

(c) ミドリゾウリムシの培養液を遠心し, ミドリゾウリムシ本体と, 培養液中のバクテリアに分け, それぞれについて 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を用いた細菌叢解析を行った. この結果に基づいてバクテリアの群集構造 (バクテリアの種類と群集に占める割合) の類似性解析を行ったところ, 両者の群集構造は極めて類似していた.

(d) 増殖速度が早く, 定常期の細胞密度が高い複数の無給餌株 (グループ A) と, 増殖速度が遅く, 定常期の細胞密度が低い複数の無給餌株 (グループ B) についてバクテリアの群集構造の類似性解析を行った. その結果, A の株同士, B の株同士では群集構造の類似性は高いが, A と B との間では低い事が明らかになった.

無給餌株中の各ミドリゾウリムシ個体には「内在的なバクテリア」が常在して, 細胞外にも随時脱出しており, 餌として投与されていた外在的バクテリアが無いので, 再びミドリゾウリムシに取り込まれて栄養の一部となっている可能性画あるだろう. 又, 内在するバクテリアはミドリゾウリムシの個体間で異なり, その種類によってミドリゾウリムシの増殖が活性化されたり抑制されたりしている可能性もあるのでは, と筆者らは考えている.

ちなみに, 無給餌株からは空中窒素固定能やトルエンなどを分解するバイオレメディエーション能を持つ

細菌が検出されている。これらの細菌のミドリゾウリムシにおける役割については現在不明であるが、ヒトの腸内細菌の様な役割を担っているのだとすればとても興味深い。

I と II の成果は、2021 年 11 月に日本 (神戸) で開催された ACOP での plenary lecture や *Frontiers in Microbiology* 誌 (Himi et al., 2023) 等でまとめて報告した。

III 新規ミドリゾウリムシ培養液の開発について

さて、研究者間で無給餌株の共有が実現できれば、ミドリゾウリムシの培養時に「外在的な餌」投与の必要がなくなり、培養時における「餌の不統一」の問題が一気に解決できる。しかし、もうひとつの課題、「多様な培地」の問題は解決できていない。実際、筆者 (HH) は現在でもレタス培地を使っている。一方、レタス培地を研究者間で共有しても、世界各地の研究者が作成するレタス培地の組成を共通のものにする事は事実上不可能である。となると、ミドリゾウリムシの培養に適した、レタス培地に代わる「誰でも作れる、組成が明確な人工培地」を新規に見出す事は今後の喫緊の課題となるであろう。

この培地と無給餌株を研究者間で共有できれば、研究者間におけるミドリゾウリムシ培養条件の統一に大きく近づくものと確信する。

まとめ

はじめに：共生藻とミドリゾウリムシの再共生実験について結果が不安定である事を示した。

ミドリゾウリムシについて：上記の原因を考えるにあたり、まずミドリゾウリムシ自体を分析、餌や培地の種類を始めとするミドリゾウリムシ培養条件の多様さ、さらには、再共生時に汎用される「白いミドリゾウリムシ」が、実は「共生藻除去 (algae-free)」ではない可能性にも言及した。

共生藻について：次に共生藻を分析、共生藻に共生？する細菌の存在に注目した。

ミドリゾウリムシの培養条件について：現在研究者間で統一されていないミドリゾウリムシの培養条件について議論した。統一に向けて、培養時に外在的な餌の投与を必要としないクローン化された「無給餌株」の確立と、将来レタス培地に代わる「組成が明確な人工培地」の確立が重要である事を指摘した。

以上の全項目を通じ、本稿で一番強調したい事は、「ミドリゾウリムシにおける細菌の役割」である。「ミドリゾウリムシの培養条件について」の項で、野外から単離したミドリゾウリムシのクローン化を繰り返し、無給餌株を単離できた事を記述した。図 2 に示したように、洗浄後のミドリゾウリムシを 1 個体から増殖させ、定常期の個体集団から 1 個体を再度単離、増殖後にこの作業をさらに繰り返していったので、得られた個体集団 (クローン) の遺伝的背景はどの個体も同一であると考えられる。それにも拘らず、各個体はそれぞれ多様な増殖速度を示した。もし、II の項目でも述べた様にミドリゾウリムシに共生する細菌がミドリゾウリムシの増殖を制御しているとしたら大変面白い。「共生藻について」の項では、共

生藻を細菌が制御している可能性にも触れた。ミドリゾウリムシに共生する細菌が、ホストだけでなく共生藻の制御にも一役買っている可能性がある。高等動物の培養細胞は、常時抗生物質の存在下で培養しているので、細胞内に細菌がない「無菌」が前提である。しかし、HeLa 細胞は、実際にヒト体内で細菌にまみれて？いるはずなので、細菌の影響を度外視した現在の HeLa 細胞研究が、逆にふと心配になった…。

今後、「白いミドリゾウリムシ」の取り扱いも課題であるが、当面は研究者間のミドリゾウリムシ株と培養条件を統一させ、実験結果の再現性向上を目指す事が喫緊の課題である。そのために、無給餌株 (クローン化済み) と「ミドリゾウリムシが元気に増殖し、組成が明確で誰でも作れる培地」(これから確立) をセットで準備、希望するミドリゾウリムシ研究者に配布できるシステム作りが重要である。研究者間で培養条件が統一され、無給餌株の共有がすすめば、ミドリゾウリムシが「真核細胞間共生」研究のモデル生物になる日も近づくと考えられる。

モデル生物といえば、クローンマウスを思い出した。クローンマウス同士の遺伝的背景は同一だが、各マウスには腸内細菌、あるいは付着する共生微生物などは居ないのだろうか？母マウスからの誕生時に、個体ごとに異なる細菌を受け継いでしまう可能性はないのだろうか？マウスの遺伝的背景は同じでも、腸内細菌によって個体の表現型が左右される事はないのだろうか、と次々疑問が湧いたところで、編集部から「繰り返しと寄り道はほどほどに」とメッセージが…。

謝辞

筆者 (HH) は、2021 年 11 月に日本原生物学会より学会賞を頂きました。学会賞に推薦して下さいました神戸大学・洲崎 敏伸 先生に深く感謝致します。また、本総説を執筆する機会を与えて下さいました、和文誌「原生物」北出 理 編集長、矢吹 彬憲 前編集長に深く感謝致します。本総説は、学会賞受賞内容を中心に、その前後のミドリゾウリムシ研究の成果を幅広く含め、執筆致しました。また筆者らは、ミドリゾウリムシの研究を推進するにあたり多くの助言や協力を賜りました。広島大学在職時の小阪 敏和 先生、高橋 忠夫 先生、堀 麻希 先生、河野 智謙 先生をはじめとする諸先生方、現職神奈川大学の井上 和仁 先生、小谷 享 先生、日野 晶也 先生をはじめとする諸先生方、職員の皆様、さらに研究室に所属していた氷見 英子 博士 (現・大妻女子大学)、田中 みほ 博士 (現・東京大学)、濱生 こずえ 博士 (現・広島大学)、高橋 利幸 博士 (現・都城工業高専)、松島 佑里 氏をはじめとする、博士研究員・大学院生・卒業研究生 (いずれも当時) の皆様に深く感謝致します。

引用文献

Aoki, R., Inui, Y., Okabe, Y., Sato, M., Takeda-Kamiya, N., Toyooka, K., Sawada, K., Mortita, H., Genot, B., Maruyama, S., Tomo, T., Sonoike, K. and Matsunaga, S. (2024) Incorporation of photosynthetically active algal chloroplasts in cultured mammalian cells towards

- photosynthesis in animals. Proc. Japan Acad. Ser. B, 100, 524–536. doi:10.2183/pjab.100.035
- Barna, I. and Weis, D. S. (1973). The utilization of bacteria as food for *Paramecium bursaria*. Trans. Am. Microsc. Soc., 92, 434–440. doi:10.2307/3225247
- Berk, S. G., Parks, L. H. and Ting, R. S. (1991). Photoadaptation alters the ingestion rate of *Paramecium bursaria*, a mixotrophic ciliate. Appl. Environ. Microbiol., 57, 2312–2316. doi:10.1128/aem.57.8.2312-2316.1991
- Calkins, G. N. (1902) Studies on the life-history of protozoa. III, The six hundred and twentieth generation of *Paramecium caudatum*. Biol. Bull., 3, 192–205.
- Fok, A. and Allen, R. D. (1979) Axenic *Paramecium caudatum*. I. Mass culture and structure. J. Protozool., 26, 463–470. doi:10.1111/j.1550-7408.1979.tb04654.x
- Fujishima, M. (2009) Endosymbionts in *Paramecium*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-92677-1
- Furukawa, S. and Kawano, T. (2012) Enhanced microsphere transport in capillary by conditioned cells of green *Paramecia* used as living micromachines controlled by electric stimuli. Sensors and Materials, 24, 375–386.
- Gerashchenko, B. I., Nishihara, N., Ohara, T., Tosuji, H., Kosaka, T. and Hosoya, H. (2000) Flow cytometry as a strategy to study the endosymbiosis of algae in *Paramecium bursaria*. Cytometry, 41(3), 209–215. doi:10.1002/1097-0320(20001101)41:3<209::AID-CYTO8>3.0.CO;2-U
- Greček-Stachura, M., Leśnicka, P. Z., Tarcz, S., Rautian, M. and Możdżeń, K. (2021) Genetic diversity of symbiotic green algae of *Paramecium bursaria* syngens originating from distant geographical locations. Plants, 10, 609. doi:10.3390/plants10030609
- Görtz H-D. (1982) Infections of *Paramecium bursaria* with bacteria and yeasts. J. Cell Sci., 58, 445–453. doi:10.1242/jcs.58.1.445
- Hamao, K., Ono, T., Matsushita, M. and Hosoya, H. (2020) ZIP kinase phosphorylated and activated by Rho kinase/ROCK contributes to cytokinesis in mammalian cultured cells. Exp. Cell Res., 386, 111707, doi:10.1016/j.yexcr.2019.111707
- Himi, E., Hashi, H., Kotani, S. and Hosoya, H. (2019) Studies on establishment of culture system of green paramecium, *Paramecium bursaria*, isolated in Kanagawa prefecture. Sci. J. Kanagawa Univ., 30, 85–88.
- Himi, E., Miyoshi-Akiyama, T., Matsushima, Y., Shiono, I., Aragane, S., Hirano, Y., Ikeda, G., Kitaura, Y., Kobayashi, K., Konno, D., Morohashi, A., Noguchi, Y., Ominato, Y., Shinbo, S., Suzuki, N., Takatsuka, K., Tashiro, H., Yamada, Y., Yamashita, K., Yoshino, N., Kitashima, M., Kotani, K., Inoue, K., Hino, A. and Hosoya, H. (2023) Establishment of an unfed strain of *Paramecium bursaria* and analysis of associated bacterial communities controlling its proliferation. Front. Microbiol., 14, 1036372, doi:10.3389/fmicb.2023.1036372
- Hoshina, R. and Imamura, N. (2007) Multiple origins of the symbioses in *Paramecium bursaria*. Protist, 159, 153–63. doi:10.1016/j.protis.2007.08.002
- Hosoya, H., Hamao, K., Kato, K., Dohra, H. and Kotani, S. (2017). Studies of green paramecium, *Paramecium bursaria*, isolated in Kanagawa prefecture. Sci. J. Kanagawa Univ., 28, 79–83.
- Hosoya, H., Kimura, K., Matsuda, S., Kitaura, M., Takahashi, T. and Kosaka, T. (1995) Symbiotic algae-free strains of the green paramecium *Paramecium bursaria* produced by herbicide paraquat. Zool. Sci., 12, 807–810. doi:10.2108/zsj.12.807
- Jennings, H. S. (1938) Sex reaction types and their interrelations in *Paramecium bursaria*: II. Clones collected from natural habitats. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 24 (3), 117–120. doi:10.1073/pnas.24.3.117
- Jennings, H. S. (1939) Genetics of *Paramecium bursaria*. I. Mating types and groups, their interrelations and distribution; mating behavior and self sterility. Genetics, 24, 202–233. doi:10.1093/genetics/24.2.202
- Jennings, H. S. (1944) *Paramecium bursaria*: Life history. I. Immaturity, maturity and age. Biol. Bull., 86, 131–145. doi:10.2307/1538335
- Karakashian, M. W. (1963) Growth of *Paramecium bursaria* as influenced by the presence of algal symbionts. Physiol. Zool., 36, 52–68.
- Kodama, Y. and Fujishima, M. (2024) Effects of the symbiotic *Chlorella variabilis* on the host ciliate *Paramecium bursaria* phenotypes. Microorganisms, 12, 2537. doi:10.3390/microorganisms12122537
- Margulis, L. and Bermudes, D. (1985). Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. Symbiosis, 1, 101–124.
- Matsushima, Y., Hirano, Y., Iwanaga, M., Komiya, M., Kondo, N., Ominato, Y., Suzuki, S., Yokoyama, M., Inoue, K. and Hosoya, H. (2022) Establishment of a method to culture a washed and cloned green *Paramecium* (*Paramecium bursaria*) Sci. J. Kanagawa Univ., 33: 1–4.
- Nakaoka, Y., Kinugawa, K. and Kurotani, T. (1987) Ca²⁺-dependent photoreceptor potential in *Paramecium bursaria*. J. Exp. Biol., 131, 107–115. doi:10.1242/jeb.131.1.107
- Nishihara, N., Horiike, S., Takahashi, T., Kosaka, T., Shigenaka, Y. and Hosoya, H. (1998) Cloning and characterization of symbiotic algae from the green paramecium *Paramecium bursaria*. Protoplasma, 203, 91–99. doi:10.1007/BF01280591
- Nishihara, N., Matsuda, S., Horiike, S., Takahashi, T., Kosaka, T., Shigenaka, Y. and Hosoya, H. (1996) Characterization of symbiotic algae-free strains of *Paramecium bursaria* produced by the herbicide paraquat. J. Protozool. Res., 6: 60–67.
- Omura, G., Ishida, M., Arikawa, M., Mostafa Kamal Khan, S. M., Suetomo, Y., Kakuta, S., Yoshimura, C. and Suzuki, T. (2004). A bacteria-free monoxenic culture of *Paramecium bursaria*: its growth characteristics and the re-establishment of symbiosis with *Chlorella* in bacteria-free conditions. Jpn. J. Protozool., 37, 139–150. doi:10.18980/jjprotozool.37.2_139
- Pado, R. (1965) Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. I. The influence of light on the growth of symbionts. Folia Biol., 13, 173–182.
- Pringsheim, E. G. (1928) Physiologische Untersuchungen an *Paramecium bursaria*: Ein Beitrag zur Symbioseforschung. Arch. Protistenkd., 64, 289–418.
- Pröschold, T., Darienko, T., Silva, P. C., Reisser, W. and Krienitz, L. (2011) The systematics of *Zoochlorella* revisited employing an integrative approach. Environ. Microbiol., 13(2), 350–364. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02333.x
- Raffel, D. (1930) The effect of conjugation within a clone of *Paramecium aurelia*. Biol. Bull., 58, 293–312.
- Reisser, W. (1980) The metabolic interactions between *Paramecium bursaria* Ehrbg. and *Chlorella spec.* in the *Paramecium bursaria*-symbiosis. Arch. Microbiol., 125, 291–293. doi:10.1007/BF00446890
- Sakaguchi, M. and Suzaki, T. (1999) Monoxenic culture of the heliozoon *Actinophrys sol.* Europ. J. Protistol., 35, 411–415. doi:10.1016/S0932-4739(99)80050-9

- Siegel, R. W. and Karakashian, S. J. (1959) Dissociation and restoration of endocellular symbiosis in *Paramecium bursaria*. *Anat. Rec.*, 134, 639.
- Sonneborn, T. M. and Dippel, R. V. (1946) Mating reactions and conjugation between varieties of *Paramecium aurelia* in relation to conceptions of mating type and variety. *Physiol. Zool.*, 19, 1–18. doi:10.1086/physzool.19.1.30151876
- Sonneborn, T. M. (1970). Methods in *Paramecium* research. In: *Methods in Cell Biology*. Prescott, D. M. (ed.). Academic Press, New York, pp. 241–339.
- Spanner, C., Darienko, T., Filker, S., Sonntag, B. and Pröschold, T. (2022) Morphological diversity and molecular phylogeny of five *Paramecium bursaria* (Alveolata, Ciliophora, Oligohymenophorea) syngens and the identification of their green algal endosymbionts. *Sci. Rep.*, 12, 18089. doi:10.1038/s41598-022-22284-z
- Takahashi, T., Yoshii, M., Kawano, T., Kosaka, T. and Hosoya, H. (2005) A new approach for the assessment of acrylamide toxicity using a green paramecium. *Toxicol. In Vitro.*, 19(1), 99–105. doi:10.1016/j.tiv.2004.06.012
- Tanaka, M., Murata-Hori, M., Kadono, T., Kawano, T., Yamada, T., Kosaka, T. and Hosoya, H. (2002) Complete elimination of endosymbiotic algae from *Paramecium bursaria* and its confirmation by diagnostic PCR. *Acta Protozool.*, 41, 255–261.
- Tonooka, Y. and Watanabe, T. (2002) A natural strain of *Paramecium bursaria* lacking symbiotic algae. *Europ. J. Protistol.*, 38, 55–58. doi:10.1078/0932-4739-00846
- Weis, D. S. (1969) Regulation of host and symbiont population size in *Paramecium bursaria*. *Experientia*, 25, 664–666. doi: 10.1007/BF01896584
- Weis, D. S. (1975) A medium for the axenic culture of chlorella-bearing *Paramecium bursaria* in the light. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 94, 109–117. doi: 10.2307/3225536
- Wichterman, R. (1949) The collection, cultivation, and sterilization of *Paramecium*. *Proc. Penna. Acad. Sci.*, 23, 151–180.
- Zhang, J., Changhong, L., Chen, X., Li, Y., Fei, C. and Chen, J. (2022) *Paramecium bursaria* as a potential tool for evaluation of microplastics toxicity. *Biology*, 11, 1852. doi:10.3390/biology11121852