
 報文

学生実験テキストシリーズ(1)

ユープロテスの細胞周期

洲崎敏伸^{1,*}・有川幹彦²¹神戸大学理学部生物学科 〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1²高知大学医学部循環制御学教室 〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮

はじめに

ユープロテスは、ゾウリムシやミドリムシなどと比較すると、学生にとってはあまり馴染みのない原生動物である。しかし、池水から簡単に採集できることや培養が容易であること、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、学生実験の材料としては扱いやすい生物である。本稿では、ユープロテスの大核が示す細胞周期特異的な形態変化に着目し、簡単な核染色を行うことのみで細胞周期の各ステージを判別し、細胞周期に関する理解を深めることを目的とした学生実験を紹介する。

実習の目的

この実験は、特別な技法を必要としない簡単なものなので、顕微鏡の使用法を説明する際に、それに付随させる入門的な実験としても利用できるだろう。対象となる学年は大学 1-2 年次がふさわしいが、高等学校の生物学の実験としても利用できそうである。生きた細胞を観察する際には、対物レンズの絞りをなるべく小さく設定し、コントラストを高める必要がある。しかし反対に、染色した細胞を観察する場合には、絞りを比較的大きく広げて色を強調するほうが効果的である。この実験で、用途に応じた対物絞りの使用法を理解させることもできる。

準備

この実験の準備として最も重要なことは、材料のユープロテスをきちんと培養しておくことである。ユープロテスは簡単に培養できるが、餌が少なく増殖が抑制された状態の細胞を用いた場合には、当然のことながら S 期や M 期の細胞を観察することが困難となる。逆に、餌が豊富な状態で、1つの培養容器内で細胞が増え過ぎても良くない。過密からくる酸欠により細胞は容易く死んでしまうので、培養容器数を増やすなどの工夫が必要である。

(1) ユープロテスの入手方法

この実験で用いているのは、アメリカ産の *Euplotes aediculatus* (図 1) であるが、ユープロテスであれば種は何でもよい。*Euplotes aediculatus* と、餌として用いる *Chlorogonium elongatum* は、神戸大学洲崎研究室 (E-mail: suzaki@kobe-u.ac.jp) あるいは山

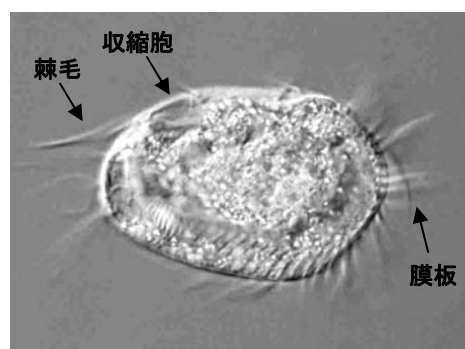


図1 ユープロテス *Euplotes aediculatus* の光学顕微鏡写真。右が細胞前端部。

*Corresponding author

Phone/Fax: +81-78-803-5722

E-mail: suzaki@kobe-u.ac.jp

(Received: 24 Dec, 2005)

表 1 20倍濃度のクロロゴニウム培養液の組成

Na-acetate trihydrate	10 g
Polypeptone	10 g
Tryptone	20 g
Yeast extract	20 g
CaCl ₂	0.1 g

蒸留水を加えて全量を500 mlにする

口県由宇町立マイクロ生物館 (micro@shiokezouen.net) にメールで依頼すれば郵送してもらえる。ユープロテスは日本各地の池や沼にも普通に見られる繊毛虫なので、水底の落ち葉などを水と共に採集し、シャーレで観察すると容易に確認することができるだろう。

Euplotes aediculatus は、長さが 110-165 μm の、比較的大型のユープロテスであり、数字の「3」やアルファベットの「C」の字に似た形の太核と、一個の小核を持つことが特徴の種である。

(2) クロロゴニウムを用いたユープロテスの培養法

推奨される培養法は、別途に無菌培養したクロロゴニウム *Chlorogonium elongatum* を餌として定期的な与える方法である。クロロゴニウムはユープロテスのみならず、太陽虫、ゾウリムシ、アメーバ、ラッパムシ、ツリガネムシなど、多くの捕食性原生動物の優れた餌として利用できる単細胞性の緑色鞭毛虫（緑藻）である。まず、クロロゴニウムの培養法について説明する。培地は、表 1 に示すストック液を作成し、それを蒸留水で 20 倍に希釈して使用液とする。ストック液は 50 ml 程度のポリ瓶あるいはチューブに小分けして、冷凍庫で保存する。解凍・再冷凍を繰り返しても問題はない。作成した培地は三角フラスコに入れ、オートクレーブ滅菌する。クロロゴニウムが増殖するには、適度な照明の下で 20-25°C で約 1 週間かかるが、細胞を維持する目的のみであれば 2-3 週間に一度の植え継ぎを行えばよい。照明はあったほうがよいが、クロロゴニウムの増殖に必須ではない。照明を受けたクロロゴニウムは、光合成を行って緑色となるので、ユープロテスに餌として与えた際に捕食された様子が視覚的に確認できる。増えたクロロゴニウムは無菌状態から下ろし、遠心管に移して 1,000 rpm 程度で 5 分間の遠心により集める。上澄みを一部捨て、ミネラルウォーター（軟水が好ましく、Volvic などが適している）を残液と同量加える。細胞を懸濁させ、再度遠心

し、またミネラルウォーターを加えるという操作をさらに二回ほど繰り返し、細胞を洗浄する。最後に適量のミネラルウォーターに懸濁させた後に、三角フラスコに入れて室温で保存する。このようにして調製したクロロゴニウムは、1 週間から 10 日間は餌として使用できる。

通常、ユープロテスの培養にはシャーレを使用する。三角フラスコなどでも構わない。培養には 20-25°C が好ましいが、特に恒温のインキュベータを用いる必要はない。培地としては Volvic などのミネラルウォーターを用い、上記の方法で調製したクロロゴニウムを適当な間隔で与える。餌を与える頻度と量はユープロテスの量に依存するが、多量に増やしたい時にはシャーレの中の餌の量を確認しながら毎日一回補充する。ユープロテスは主にシャーレの底面で生息しているが、餌のクロロゴニウムは水中のいたるところで泳いでいる。したがって、ユープロテスはたまたま底面に降りてきたクロロゴニウムを捕食することになる。餌が十分に補給されている場合、25°C の培養条件では分裂サイクルは約 20 時間である。

ユープロテスは、シャーレに米粒や麦粒を入れて培養することもできる。詳しくは参考文献を参照されたい。

(3) 酢酸オルセイン染色液

ここでは 10 ml の酢酸オルセイン染色液を作成する場合について述べる。まず、4.5 ml の酢酸を適当なサイズの容器に入れ、湯煎して温める。次に 0.1 g の酢酸オルセイン（粉末）を量り取り、湯煎した酢酸に加えて良く攪拌する。酢酸オルセインは溶けきれず、幾分か残る。さらに、5.5 ml の蒸留水を加えて攪拌し、最後に 0.45 μm ポアサイズのフィルターを通して、溶け残った酢酸オルセインを除去する。作製した染色液は別の容器に移して室温で保存する。筆者の経験では、この状態で数年間は使用可能であり、染色液内に沈殿物が生じた場合でもろ過して使用できる。液状の酢酸オルセインが市販されているので、それを利用してもよい。

(4) 細胞の準備

ここでは、2 種類の実験用に、2 つのシャーレで細胞を準備する。「実験 1」では、細胞の形態を観察するので、細胞数はそれほど多くは必要ではない。しかし、細胞内にクロロゴニウムを含む食胞がたくさんあると観察が難しいので、1-2 日間ほど餌を与えずに絶食させ、飢餓状態にある細胞を準備する（図 2a の左図）。「実験 2」では、多数の細胞の核の様子を調べなければならない。しかも、細胞が盛んに

＜実習テキスト＞

原生生物ユープロテス核の細胞周期における形態変化**目的**

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G1期、DNAの合成を行うS期、細胞分裂の準備段階であるG2期、そして細胞分裂を行うM期である。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）が細胞周期の中でもっとも目立つのは、M期が視覚的に捉えることができるためである。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、また、細胞質分裂は細胞形態を見ると明らかである。

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期を観察することができる。つまり、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観察することができる。本実験では、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。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。

材料

ユープロテス *Euplotes aediculatus*、ワセリン入り注射器、マイクロピペット（200 μ l用）、先を細くしたガラスピペット、麻醉液（1 mM 塩化ニッケル水溶液）、染色液（酢酸オルセイン水溶液）、ホールスライド、スライドグラス、カバーグラス、柄付き針

実験1 ユープロテスの外部形態の観察

1. スライドグラス上にワセリンで土手を作る。
2. 培養液とともに材料を20 μ l取り、ホールスライドに移す。
3. 等量（20 μ l）の麻醉液を加えて良く攪拌した後、2～3分間放置する。
4. ホールスライドから材料をスライドグラス上に移す。
5. カバーグラスをかけて顕微鏡で観察し、細胞の形態をスケッチする。

実験2 ユープロテスの核の観察

1. スライドグラス上にワセリンで土手を作る。
2. ガラスピペットを用いて、少量の培養液とともにできるだけ多くの材料を取り、ホールスライドに移す。
3. 等量以上（約30 μ l）の染色液を加えて良く攪拌した後、2～3分間放置する。
4. ホールスライドから材料をスライドグラス上に移す。
5. カバーグラスをかけて顕微鏡で観察し、細胞および核の形態をスケッチする。
6. 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。

課題

1. ユープロテスの各部の名称をスケッチに記入し、その構造や機能についてまとめよ。
2. ユープロテスの細胞周期における各ステージの特徴をそれぞれまとめ、高等動物との違いを比較検討せよ。

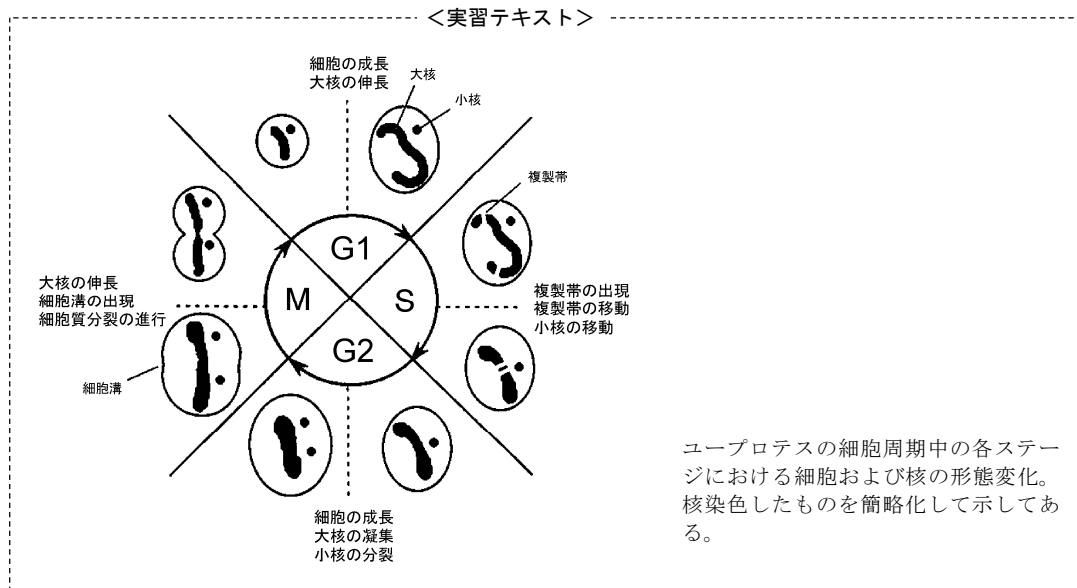


図2 細胞の準備。「実験1」用には5 cmシャーレに絶食させた細胞を入れ (aの左図)、「実験2」用には9 cmシャーレに十分に餌を与えた細胞を多めに入れておく (aの右図)。実験に用いる直前に「実験2」用のシャーレをゆっくり回すと、細胞がシャーレの中央に集まる (b) ので、そこから先細のガラスピペット (cの下図) で10-20 μ l 程度の細胞懸濁液をホールスライド (cの上図) に取り分ける。

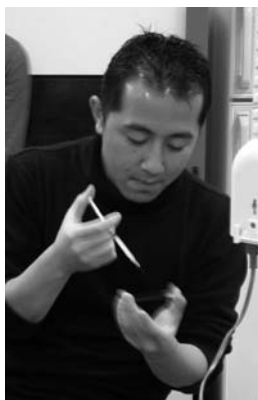


図3 スライドグラス上にワセリンで土手を作る。

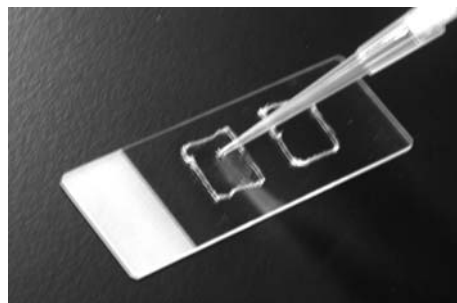


図4 ワセリンの土手の中に細胞を入れる。

分裂・増殖を行っている状態でなければ M 期や S 期の細胞を観察することができないので、あらかじめ多量の餌を与え続けた細胞を多めに準備しておく (図 2a の右図)。酸欠や水質低下などの培養条件の悪化を防ぐため、複数のシャーレで培養し実験の直前に混ぜて準備するほうが良い。

(5) その他の準備

観察には、ワセリンでスライドガラスに土手を作り、その中に細胞を入れてカバーガラスで封入する。これは、細胞が押し潰されないようにすることと、溶液の乾燥を防ぐことが目的である。ワセリン (白色ワセリン) は、あらかじめ小型の容器に入れておき、湯煎により溶かす。これを、1 ml の注射筒に吸引し、針先を短く切除した注射針を装着して使用する。必ずしも針先を切除する必要はないが、針先が長いと扱い難いし、注射針は予め斜めにカットされているので、そのまま使うとワセリンが斜めに出てきて使いにくい。ワセリンの入った注射器で、スライドガラスにカバーガラスよりも一回り小さな正方形を書く。今回の実験では 2 つのサンプルを観察するので、一枚のスライドガラスに 2 つの四角形を書いておく (図 3)。実験に際しては、マイクロピペットを用いて、作成した細胞懸濁液 20-50 μl をワセリンの土手の内部に入れ (図 4)、カバーガラスをかけて検鏡する。ワセリンの土手が決壊し、サンプルが土手の外に流れ出たとしても、カバーガラスをかけて検鏡する分には何の支障もない。しかし、時間とともに乾燥してしまうので、土手枠外にある細胞を長時間観察するのは無理である。

実験 1 では、細胞を動かないようにする目的で、ニッケル麻酔を行う。塩化ニッケル溶液は、1 mM の濃度で Volvic などのミネラルウォーターに溶解したものを予め作成しておき、細胞懸濁液と 1 : 1 で混合する (最終濃度 500 μM)。ニッケルイオンには繊毛内部の分子モーターであるダイニンの活性を抑制する作用があり、そのために繊毛運動が阻害される。ニッケル麻酔処理した細胞は、繊毛の動きがゆっくりとなる、あるいは停止するため、細胞の微細構造をじっくりと観察することができる。しかし、時間が経ち過ぎると細胞が膨れて変形したり、あるいは破裂したりするので注意が必要である。

実験の実際について

(1) ユープロテスの外部形態の観察

この実験では、教卓上にユープロテスの入ったシャーレと塩化ニッケル水溶液を準備する。学生は各自 20 μl の細胞懸濁液と等量のニッケル麻酔液を取

り、ホールスライドの中でゆっくりと混合し、それをスライドガラス上に作ったワセリンの土手の中に入れて、カバーガラスをかける。

ユープロテスは、細胞の下面に棘毛 (きょくもう) と呼ばれる足のような運動器官を有し、これを動かして水底を歩き回っている。棘毛は、数本~十数本の繊毛が束になったものである。また、細胞の前端部には膜板 (まくばん) とよばれる板状の突起がたくさん生えており、これを動かして水流を発生させ、食物を口部へと誘導している。この膜板も繊毛で構成されている。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す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、老廃物の排出を行う細胞小器官である。

(2) ユープロテスの核の観察

この実験では、なるべくたくさんの細胞をプレパラートにする必要があるので、実験指導者が先細のガラスピペット (図 2c 下図、詳しい作成方法および操作方法は参考文献を参照のこと) を用いて学生のホールスライドに細胞を取り分ける。細胞が入ったシャーレを円を描くようにゆっくりと回転させると、細胞は次第に中央部に集積する。そこを狙ってガラスピペットで吸い取り、なるべく少量の溶液とともに学生の持っているホールスライドに細胞を取り分ける。だいたい 100-200 個程度の細胞を、10 μl 程度の懸濁液として取ることができる。学生はそこに 30 μl の染色液を加え、マイクロピペットを用いてゆっくりと出し入れすることにより混合する。次に、同じマイクロピペットを使い、スライドガラス上に作ったワセリンの土手の中に移し、カバーガラスで封入して検鏡する。

細胞が細胞周期のどのステージに属するかは、核の形状、細胞の形状、複製帯の有無の 3 点で判断する。以下に各ステージの主な特徴を記す。

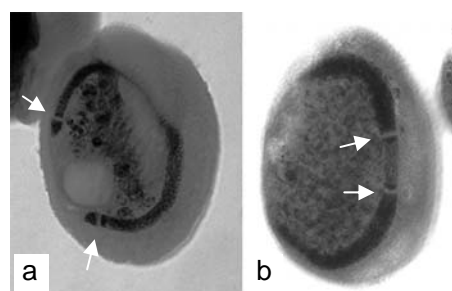


図5 S期の細胞。aはS期初期の細胞で、複製帯は大核の両端に位置している。bはS期終期の細胞で、複製帯が中央部に移行していることがわかる。矢印は複製帯を示す。

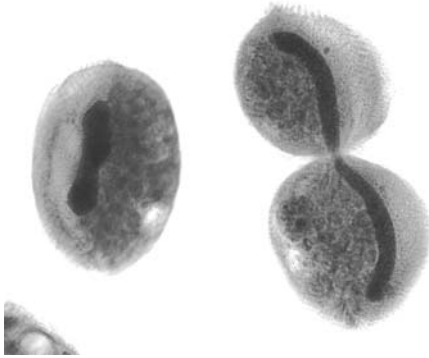


図6 G2期(左図)とM期(右図)の細胞。

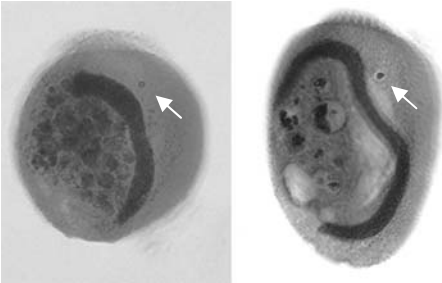


図7 G1期の細胞。細胞分裂直後の細胞の大核は短い(左図)。典型的なG1期の細胞は「3」あるいは「C」の字型の大核を持つ(右図)。矢印は小核を示す。

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できる(図5)。複製帯はDNA複製の場である。S期の最初に一对の複製帯が大核の両端に出現し、次第に大核の中央に向かって移動していく。最後は、中央部で合体して消失する。

G2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、太く短い棒状の形になる(図6左図)。G2期の後期には、小核が分裂する(この状態の細胞は、M期に含めてもよい)。細胞分裂に備えて細胞が大きくなる。

M期：細胞が中央部でくびれ、ピーナッツ状になる(図6右図)。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。

G1期：分裂直後の細胞は小さく、大核も短い(図7左図)。細胞が成長するとともに大核も伸長する。核はふたたび長いひも状になり、「3」あるいは「C」の字型になる(図7右図)。

(3) 各ステージの細胞の割合の算出

この実験の最後に、各自のプレパラートで観察される細胞をそれぞれのステージに分類し、それらの出現頻度を算出してみる。ひとりひとりが行ってもよいが、信頼度の高いデータを得るために、クラス全員のデータを集計してみても面白い。表2と図8は、最近、神戸大学理学部生物学科の2年次生を対象に行った実験で得られた結果である。26人の学生

表2 細胞周期の各ステージの出現頻度

細胞周期のステージ	G1	S	G2	M
観察された細胞数	1868	1117	406	151
割合(%)	53	32	11	4

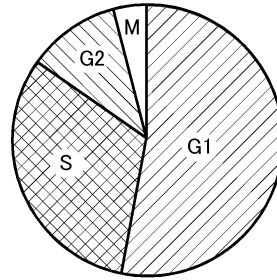


図8 表2のデータから作成したユープロテスの細胞周期。26人のクラス全員のデータを集計して作成したもの。

が全部で3542個の細胞をカウントした。

実験における注意点

細胞周期のステージを判断する場合に、もし複製帯を見逃すとその細胞はG1期にカウントされてしまい、最終データの正確性に欠けてしまう。また、G1初期の細胞とG2初期の細胞は核の形態が類似している(これは細胞の大きさで区別する。G2期の細胞は比較的大型である。)ので間違っ判断される場合がある。複製帯や小核は、高倍率で観察するよう指導する。実験前に、細胞周期の進行にともなう核変化の様子や各ステージの特徴を、模式図等を用いて説明しておくことで学生も容易に判断できる。最も難しいのは小核の確認であろう。実際、細胞内顆粒を間違っ小核と判断する例が多い。正しい小核を教えてやると、こんなに小さいの?と驚く声が良く聞かれる。小核の位置も、細胞周期のステージを判断する際に重要な指標となり得るので、正しく確認してもらいたい。複製帯や小核を確認することができない学生には遠慮なく手を挙げさせ、実験指導者が顕微鏡を直接覗いて指導してあげることが大事である。本稿に、実習テキストの一例を含めた。読者らが実際に学生実習を行う際の参考にしていただきたい。

おわりに

ユープロテスを用いた細胞周期の観察は、高校の生物学の実験としても利用されている。原生動物学

雑誌に「教材としての原生動物」をシリーズで連載されている香川県立丸亀高校の丸岡禎は、ユープロテスを野外から採集し、実験室で培養する詳細な方法を含め、本実験法に関する細かい記述を報じている(丸岡、1982, 1992)。また、鳴門教育大学の佐藤勝幸は、成長曲線と細胞周期の関係について示すとともに、接合と細胞周期との関連性についても論じている(佐藤、1992)。本実験を実施する際には、これらの報告も参考になるだろう。

参考文献

- 重中義信 監修 (1988) 原生動物の観察と実験法。
共立出版
- 丸岡 禎 (1992) 原生動物を使った細胞周期の観察
じっきょう理科資料 No.32, 7-9.
- 丸岡 禎 (1982) 核の複製を観察する 香川県高等学校
教育研究会理化部会生地部会会誌, 18: 12-26.
- 佐藤勝幸 (1992) 細胞周期の教材としての繊毛虫ユー
プロテス 生物教育, 32: 213-218.