

祖先的繊毛虫原始大核類 *Loxodes* の培養法の検討吉野 亜紀<sup>1</sup>, 遠藤 浩<sup>2</sup>(<sup>1</sup>金沢大・院自然・生物科学, <sup>2</sup>金沢大・院自然・生命科学)Improved culture method of ancestral ciliates *Loxodes* spp. isolated in JapanAki YOSHINO<sup>1</sup> and Hiroshi ENDOH<sup>2</sup>(<sup>1</sup>Div. Biol. Sci., <sup>2</sup>Div. Life Sci., Grad. Sch. Nat. Sci. and Technol., Kanazawa Univ.)

## SUMMARY

Along with heterotrichs, karyorelictids are the most ancestral ciliates that diverged from the main line of most other ciliates. Karyorelictids are characterized by non-dividing macronuclei, which have likely derived from a common ancestor. Further studies of the non-dividing macronucleus are important for solving the origin and subsequent evolution of ciliates. However, no sexual process has been described fully in the literature, and analysis at the molecular level has been undertaken only rarely, probably because of the absence of a refined culturing method. Herein, we describe an improved culture method for *Loxodes* spp., which are the only karyorelictids living in fresh water, and also show phylogenetic analyses of the species isolated in Japan, based mainly on SSU rRNA.

**【目的】** 原始大核類は繊毛虫のなかで異毛綱と共に早い段階で分岐した最も祖先的な繊毛虫だと考えられている。そのため形態や核変化に祖先的な形質を留めている。最も大きな特徴は大核がいかなる分裂も行わないことである。原始大核類の非分裂大核は細胞周期ごとに小核から新たに再形成されているのである。一般的に大核の分化は繊毛虫類の有性生殖過程である接合や自家受精のときにみられ、無性的に新たな大核の再形成が起きるのは珍しい。

これらは大核の起源を考える上で重要な特徴であり、繊毛虫の最も祖先的な形質の一つと考えられている。これまで以下のようなシナリオが考えられている<sup>1)</sup>。繊毛虫の祖先は多核の細胞であったと推測されている。ある時、核に多数のトランスポゾンが侵入した。DNA の正常発現を保つためトランスポゾンの切り出しが起こった。更にトランスポゾンが再びゲノム内に侵入するのを防ぐためトランスポゾン、DNA 断片末端にテロメアが付加された。これにより染色体が分断され複製起点、動原体を失ってしまった。したがってこのような染色体を持つ核はDNA の複製が困難となり分裂能力を失ったと考えられる。これが現在の大核の前身である。トランスポゾンの切り出しを行わず、分裂能力を維持した核もあった。これが後の小核である。その後繊毛虫祖先種は原始大核類と異毛類の共通祖先と、その他大多数の繊毛虫（ここではコア繊毛虫類と呼ぶ）へと分岐した。その後、異毛類とコア繊毛虫類はそれぞれ独立に大核無糸分裂能力を獲得したが、原始大核類は繊毛虫祖先種と同じ非分裂大核を現在も保持していると考えられている<sup>2)</sup>。

このような変わった特徴をもち、且つ繊毛虫の進化や起源を探る上で重要な位置にあるにも関わらず原始大核類に関する研究はあまり行われていない。そこで

本研究では第一段階として原始大核類の中で唯一淡水に生息する *Loxodes* 属の簡易的な培養法を検討し、あわせて今回単離した株とこれまで記載された種との関係を分子系統学的に調べた。

**【方法】****系統分析**

野外からサンプルを採集し、*Loxodes* を単離した。大核、小核を共に2個ずつ細胞（細胞長 100-230 μm）と、大核小核をそれぞれ5-13個ずつ細胞（同 280-400 μm）の2種が確認された。それぞれ単離培養後、10細胞からDNAを抽出し、PCRによりrDNA遺伝子（約1,600 bp）を増幅後、クローニング、シーケンシングを行った。得られた配列を元に最尤法により系統樹を作成した。

**培養方法**

培養容器の候補として小型シャーレ・15 ml 試験管・1.5 ml マイクロチューブを用いた。

溶液は池の水・ミネラルウォーターを用い、栄養素として青汁・ヤサイジュース・クロロニウムを加えた。さらに固形物として砂・泥・砂利・由来の異なる腐葉土などを加えた。これら4つの要素を組み合わせ細胞の増減を観察し、最適な培養条件を検討した。

**【結果と考察】****系統解析**

BLAST の相同検索では *Loxodes* 属に属する原始大核類がヒットした。さらに、この塩基配列のうち1,311 bp を用いて  $\gamma$  補正した最尤系統樹を作成し、系統関係を解析した。作成した系統樹では、核数の異なる2種の株とも、系統的に *L. magnus* (大核 8-31, 小核 5-32) か、*L. striatus* (大核 2, 小核 2) なのかは確定できなかった。

た。今回単離した株が原始大核類 *Loxodes* の一種であることは確かだが、既存種であるのか、あるいは新種であるのかについてはまだはっきりしない。

#### 培養方法

シャーレ・小型試験管では他の要素をどのような組み合わせにしても細胞は増加しなかった。

そこで容器をマイクロチューブに絞り他要素の組み合わせを検討した。

「マイクロチューブ + 池の水 + 野菜ジュース + 池中の泥」では細胞は増加したものの動きが鈍く状態がよくなかった。

「マイクロチューブ + ミネラルウォーター + クロロゴニウム + 池の泥」とすると細胞の状態はよくなったが増加速度が落ちた。

「マイクロチューブ + ミネラルウォーター + クロロゴニウム + 腐葉土」とすると細胞の状態、増加速度共によい状態のものが得られた。

容器としてマイクロチューブという、容量が小さく且つ機密性に富んでいる容器を好むことから *Loxodes*

は微嫌気的環境を好むと考えられる。更に腐葉土を加えると細胞が増加したことから、腐葉土が細胞の増殖に必要であることがわかった。現在腐葉土の成分に着目し、主成分であるフミン酸（塩）を腐葉土のかわりに添加し培養を試みている。

本研究において *Loxodes* の大量培養が可能となった。今後はこの細胞を用い大核、小核の単離を行い、大小核の違い(とりわけ DNA の再配列)の解析を分子レベルで進めていこうと考えている。このことにより、大核が分裂能力を失った原因を明らかにすることや、大核の分化の引き金と想定されているトランスポゾンの侵入説を裏付ける証拠が得られるかもしれない。

#### 【文献】

- 1) Endoh (2009) Jpn. J. Protozool., 43, 79-80.
- 2) Raikov (1982) *The Protozoan Nucleus: Morphology and Evolution*. Springer-Verlag, Wien, New York, pp.232-264.