



Title	下毛目織毛虫 <i>Pleurotricha</i> sp. の栄養体と嚢子の耐凍性
Author(s)	松坂, 理夫; MATSUSAKA, Tadao
Citation	低温科学. 生物篇, 29, 113-119
Issue Date	1972-02-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17790
Type	departmental bulletin paper
File Information	29_p113-119.pdf



下毛目繊毛虫 *Pleurotricha* sp. の栄養体と嚢子の耐凍性*

松坂理夫

(低温科学研究所)

(昭和46年9月受理)

I. 緒言

原生動物を材料として凍結の問題を扱った報告はこれまでにかなりある。これらのほとんどは寄生性の材料を用いて株の保存を目的としたものである^{1,2)}。自由生活をする原生動物を扱った報告は少なく、なかでも栄養体が凍結融解後生存することの知られているのは DMSO の存在下で *Paramecium aurelia* と *Tetrahymena pyriformis* が液体窒素温度迄の緩慢凍結に耐えられるというものだけである^{3,4)}。一方原生動物の嚢子 (cyst) が低温・高温・乾燥等の悪条件に強い耐性を持っており、特に乾燥された嚢子では不利な温度に対する高い耐性があることが古くから知られている。最近 Bychenkova 等 ('69)⁵⁾ は繊毛虫の一種 *Colpoda maupasi* の栄養体が緩慢凍結にも耐えられないにもかかわらず、同一種の嚢子は緩慢凍結であれば液体窒素温度迄耐えうると報告している。彼等は乾燥されてない嚢子を用いており、ドライアイス又は液体窒素での急速凍結には耐えられないことを同じ報告で述べている。

このように同一種内で栄養体と嚢子の間に耐凍性に大きな差があることが知られている。一方嚢子形成は比較的短時間のうちに行なわれ、一旦嚢子が形成されると急激に耐凍性が高まる。この間の耐凍性の変動を研究するには多数の個体で同調的に嚢子を形成させることが望ましい。しかし同調的な嚢子形成のできる種は *Acanthamoeba* の一種⁶⁾ 以外には知られておらず、嚢子形成の機構も *Acanthamoeba* 以外ではほとんど調べられていない。更に嚢子形成に伴って不利な環境条件への耐性が増大する機構については全く知られていない。

著者は下毛目繊毛虫の一種 *Pleurotricha* sp. で多数の個体を一定条件下で嚢子を形成させる方法を見出し、この方法を利用して嚢子形成に伴う耐凍性の増大の機構を調べている。本報では栄養体と嚢子の耐凍性を比較し、更に耐凍性に関係すると思われる含水率を比較するためにそれぞれの等浸透濃度を調べたので報告する。

II. 材料と方法

本研究の庭で採集し、一個体から増殖 (clone culture) させた *Pleurotricha* sp. の栄養体及び嚢子を用いた。

この繊毛虫は乾燥レタス粉末の煮出汁中で増殖し、餌となるバクテリアが不足すると自発

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1171号

的に嚢子を形成する。しかしこのような場合には嚢子形成率が常に異なっており、全個体が嚢子形成するとは限らず、極端な場合には嚢子を形成する個体が全くなく全個体が死んでしまう場合もある。このため一度に得られる嚢子が少なく、脱包嚢 (excyst) 率で表わした生存率も一定しない。Jeffries (56)⁷⁾ は *P. lanceolata* を培養液から Osterhout 液に移すことによって 36 時間以内に 60% 以上の虫が嚢子を形成し、生存率も一定であると報告している。著者は彼の記載に従って径 9 cm のペトリ皿に餌動物として *Tetrahymena* を加えたレタス煮出汁を入れ、適当数の *Pleurotricha* を加えて 25°C で培養した。その後毎日観察して *Tetrahymena* が食べつくされ、*Pleurotricha* に大きな食胞が認められなくなった時期に虫を十倍の濃度の Osterhout 液に移し 25°C においた。この方法で Osterhout 液に移してから 24 時間以内に 90% 以上の個体が嚢子を形成する。このようにして得られた形成後 7~10 日目の嚢子を実験に用いた。尚嚢子を形成させる方法については更に検討を加え別の機会に詳しく報告する予定である。

凍結の方法は径 3 cm のプラスチック製のペトリ皿に繊毛虫を含んだレタス煮出汁を 1 ml 入れ凍結させた。栄養体の場合は氷を浮かせて -10°C の冷凍箱に入れ凍った状態で 10 分間放置し、嚢子は同様な方法で -20°C の冷凍箱に入れ 1 時間放置して凍らせた。他に嚢子については上記の方法で予備凍結した後液体窒素に投入し沸騰のおさまるまでおいたもの、直接液体窒素に投入し沸騰のおさまるまで凍らせたものの三種類の凍結方法を用いた。融解はどの凍結方法の場合も凍結している試料に室温の 0.5 M NaCl 溶液又はレタス煮出汁を 2 ml 加えて行なった。

融解後の生死の判定は栄養体は運動能力の有無で行なった。嚢子の場合は 0.5 M NaCl で融解したものは原形質分離の有無で判定し、レタス煮出汁で融解したものはその後 25°C に移し 24 時間以内に脱包嚢する個体、即ち栄養体になって包嚢を破って泳ぎ出す個体数を数えた。原形質分離で生死を判定した場合には原形質分離と原形質復帰を二度繰り返ささせ、脱包嚢を調べたものでは細胞分裂による誤差を生じないように、6, 12, 24 時間目に脱包嚢している個体を数え取り除いた。更に脱包嚢後も包嚢の外皮は長時間残っているため外皮の数を数えて脱包嚢した個体数を確めた。

栄養体と嚢子の含水率を比較するためにそれぞれの等浸透濃度を測定した。栄養体では種によって程度は違うが収縮胞に浸透圧の調節機能があり、その機能が完全な場合には等張溶液中で搏動が止まることが知られている⁸⁾。そこで種々の濃度の NaCl 及び蔗糖溶液中での収縮胞の搏動周期を測定して等浸透濃度を求めた。嚢子の場合は種々の濃度の NaCl 及び蔗糖溶液中での原形質分離を観察して等浸透濃度を測定した。

III. 結 果

1. 凍結融解後の栄養体及び嚢子の生存率

● 栄養体： 栄養体は -10°C の緩慢凍結にも全く耐えられなかった。融解後の個体を実体顕微鏡で観察すると融解直後には様々な程度に収縮変形しているが、次第にふくらみ数分後には自己分解を始めまもなく見えなくなった。凍結保護効果のあることが知られているグリセリンや DMSO, 蔗糖等を加えても 0.2 M 付近以上の濃度になると自己分解を起し凍結以前に死んで

しまった。0.2M 以下の濃度では凍結保護効果は全く認められなかった。NaCl 溶液で予備脱水を試みてもグリセリン溶液等の場合と同様濃度が高くなると自己分解を起し死んでしまった。

囊子： 実験に用いた形成後7~10日目の囊子は表Iに示したように、-20°C 1時間の凍結後室温のレタス煮出汁で融解すると25°Cでその後24時間以内に約80%が脱包囊し、-20°C 1時間の予備凍結後液体窒素に投入したのも約半数が脱包囊した。しかし直接液体窒素に投入したものでは融解後脱包囊した個体はなかった。脱包囊に要する時間も凍結融解のために対照群より短縮されたり長くなったりすることは見られず、いずれの場合でも6時間以内に脱包囊する個体はほとんどなく多くのものは12時間前後で脱包囊した。又脱包囊後12時間以内に分裂を完了して2個体になるものも対照群、実験群共になかった。凍結融解後脱包囊した個体でもその後培養を続けた場合は正常に増殖し、囊子も形成した。0.5M NaCl 溶液で融解し、原形質分離で生死を判定したのも脱包囊率とほぼ同じ結果が得られた(表II)。しかしこの場合は直接液体窒素で凍結させたものでも20%弱が原形質分離を示した。

第I表 凍結融解後の囊子の生存率 (脱包囊能力による判定)

凍結条件	使用した囊子の数	24時間以内の脱包囊数	24時間以内の脱包囊率(%)
対照	100	94	94
-20°C 1時間	134	104	77.6
-20°C 1時間 →液体窒素	122	55	45
液体窒素	120	0	0

試料1ml, 室温のレタス煮出汁2mlを加えて融解

第II表 凍結融解後の囊子の生存率 (原形質分離による判定)

凍結条件	使用した囊子の数	原形質分離した囊子の数	原形質分離率(%)
対照	49	49	100
-20°C 1時間	66	55	83
-20°C 1時間 →液体窒素	62	21	33
液体窒素	61	11	18

試料1ml, 室温の0.5M NaCl 溶液を2ml加えて融解

2. 栄養体及び囊子の浸透濃度

上記の実験から栄養体と囊子の間に大きな耐凍性の差があることがわかったので、耐凍性に影響があると思われる含水率をそれぞれの等浸透濃度を測定することによって比較した。

栄養体： 種々の濃度のNaCl及び蔗糖溶液中での収縮胞の搏動周期を測定した。培養液中及び0.0125MよりうすいNaCl溶液中ではこの纖毛虫の収縮胞は室温でほぼ20秒に1回の割合で搏動していた。溶液の濃度が増すと搏動周期が長くなり、0.025M NaCl 溶液中では搏動周期は180秒以上となり、全体の1/4~1/3の個体で細胞の尾部がいく分収縮した。更に濃度を上げて0.05M NaCl 溶液に入れると5分以上も搏動は見られず、全個体が収縮し液に入れてか

ら5分後頃には尾部付近でわずかであるが自己分解を起した。自己分解した部分は時間がたつと修復されたが細胞は収縮したままの状態であり、更に時間がたつと細胞内に数個の大きな液胞状のものが認められるようになった。蔗糖溶液の場合もそれと等張のNaCl溶液の場合とほとんど同じ結果を示した。ただし0.05M溶液中での搏動周期が約60秒とこの濃度と等張のNaCl溶液に於けるものよりかなり短かかった。又0.1M溶液中で細胞内に出現する液胞状のものがNaCl溶液中より顕著に認められた。以上の結果からこの実験で用いた *Pleurotricha* sp. の栄養体はNaClで0.025M、蔗糖で0.05M付近が等張と考えられる。

囊子： 栄養体の場合と同様に種々の濃度のNaCl及び蔗糖溶液を用いて、それぞれの溶液中での原形質分離の有無を調べた。この結果0.2M NaCl及び0.4M蔗糖溶液中では全部の囊子が原形質分離した。しかし0.15M NaCl溶液中では原形質分離を示す囊子はほとんどなかったし、原形質分離したものでもごく軽度のものであった。これに対して蔗糖溶液の場合は0.15M NaClと等張の0.3M溶液中でもほとんどの囊子がごく軽度ではあるが原形質分離した。これ以下の濃度ではNaCl溶液でも蔗糖溶液でも原形質分離した囊子はほとんどなかった。このことからこの実験に用いた囊子はNaClで0.15M、蔗糖で0.3M付近が等張であり、栄養体の約6倍もの浸透濃度を持っていることがわかった。

IV. 考 察

この実験に用いた *Pleurotricha* sp. の栄養体は細胞外凍結と思われる -10°C の緩慢凍結にも耐えられなかった。これに対して同一種の囊子は凍結条件さえ選ばば液体窒素温度までの凍結にも十分耐えられることがわかった。栄養体の場合は先に著者が報告したゾウリムシに於けるように⁹⁾、細胞内オルガネラが凍結によって損傷を受け、このことが凍死の一つの要因になっているのかも知れない。又この実験で用いた *Pleurotricha* の栄養体は0.1M NaCl溶液のような高張溶液に入れると脱水され収縮し、ごく短時間のうちに自己分解を起して死んでしまう。このことは凍結による溶液の濃縮の結果細胞が脱水されることも栄養体の凍死の要因の一つとして考える必要があるのではなからうか。

囊子の場合には、直接液体窒素に投入して急速凍結させた場合以外は脱包囊した。即ち -20°C 1時間の凍結後融解したものは約80%が脱包囊し、予備凍結後液体窒素に入れたものも融解後約半数が脱包囊した。凍結前に乾燥させた囊子もやはり液体窒素による凍結後1/3から半数が脱包囊した¹⁰⁾。急速凍結後脱包囊できなくなるのは細胞内氷晶の形成によって障害を受けたためと考えれば、予備凍結又は乾燥によって細胞内凍結を起しにくくすると *Pleurotricha* の囊子が液体窒素温度での凍結にも十分耐えられるようになることは説明される。

原形質分離法で生死の判定をした場合に、液体窒素による急速凍結後も20%弱ではあるが原形質分離した囊子があった。このことは囊子の場合にはこの実験で用いた程度の急速凍結には耐えられるものがあることを示しているようである。しかし脱包囊はできないので生きているとしても何らかの障害は受けているものと思われる。又囊子は死んでいてもこの時間にはまだ原形質膜に大きな害を受けていなかったため原形質分離をしたとも考えられるが、この点は更に研究する必要があるらう。

原生動物の収縮胞には、種によって程度は違いますが浸透圧の調節機能があると考えられており、等張溶液中ではその機能が完全であれば搏動を止めることが、また機能が不完全でもその周期が長くなることが知られている⁸⁾。この実験に用いた *Pleurotricha* sp. の栄養体は細胞がやや収縮する 0.025 M NaCl 溶液中でも収縮胞は搏動を続けていた。しかし搏動周期は培養液中の 20 秒に 1 回に対して 0.025 M NaCl 溶液中では 180 秒に 1 回と 10 倍近くも長くなっていた。このことからこの虫では細胞の収縮が始まり収縮胞の搏動周期が長くなった 0.025 M NaCl 付近の濃度が等張なのであろう。この値はこの実験で用いた方法を含む色々な方法で測られて現在迄に知られている数種類の淡水産の原生動物の栄養体のものと同じかごく近いもの¹¹⁾である。嚢子は *Pleurotricha* にごく近縁の *Stylonychia* で 0.175 M NaCl と等張であるという古い報告があり¹²⁾、この実験で得られた 0.15 M NaCl という値にごく近い。このことはこの実験に用いた *Pleurotricha* sp. では栄養体と嚢子の間に約 6 倍もの浸透濃度の差があることを示しており、従って嚢子形成の過程で浸透濃度に反映される溶質の量によほど大きな変動がない限り、嚢子の方が含水率もかなり低いと考えられる。嚢子形成の際に細胞内の物質質量に変動があることは十分考えられ、この点については後にふれるが、6 倍もの浸透濃度の差を細胞内の溶質量の変動だけで説明できるとは思われない。又同一条件下で固定染色した試料の切片像が光学顕微鏡でも電子顕微鏡でも常に嚢子の方が濃く染まる等¹³⁾、嚢子の方が含水率が低いことを意味するような事実が他にもある。このように栄養体に比べて嚢子はかなり含水率が低いと思われ、このことが嚢子の方が高い耐凍性を示すことの一つの要因になっていると思われる。しかし高張溶液での脱水が栄養体の耐凍性を高められないだけでなく、むしろ有害で細胞を死に至らせるという結果は、含水率の差だけで耐凍性の差を説明できないことを示している。

この実験で用いた嚢子は、酸素消費量が栄養体よりかなり低く¹⁴⁾ 休眠状態にあると思われる。このため生理的な条件が栄養体とは相当異なっているものと思われる。又嚢子形成の研究が進んでいる *Acanthamoeba* の一種では嚢子形成の際に核酸や蛋白質が減少し、一方では包嚢を作っている蛋白質やセルロースのように、新たに合成されるものもあることが知られている¹⁵⁾。この実験に用いた *Pleurotricha* でも嚢子形成の際に全体の形はもちろんミトコンドリアや大核にも大きな形態的变化があり¹³⁾、*Acanthamoeba* に於けるような物質的な変化が起こっていることが予測される。栄養体と嚢子の間に見られるこのような物質的、生理的な違い及び含水率の差が両者の耐凍性の差の要因となっているものと思われる。又昆虫や植物で耐凍性の高まりと平行したグリセリンや糖類等の増加があることが知られている^{16,17)} ように、この虫でも嚢子形成時に新しい物質が合成され、或いは既存の物質の分解産物が蓄積され、そのことによって嚢子の耐凍性が高められることがあるかも知れない。しかしこれらのことはいずれも想像の域を出ず、嚢子形成そのものの研究を進めることに嚢子形成に伴う耐凍性の変動を知る鍵があると思われる。

V. 摘 要

下毛目繊毛虫 *Pleurotricha* sp. の嚢子形成に伴う耐凍性の変動を調べるために栄養体と嚢子の耐凍性を比較した。この結果栄養体は -10°C の緩慢凍結にも耐えられないが、同じ種の

嚢子は -20°C 1時間の予備凍結をすれば液体窒素温度での凍結にも耐え約半数は脱包嚢できた。しかし直接液体窒素に投入し急速凍結させたものは脱包嚢できなかった。

栄養体と嚢子の浸透濃度を測定したところ栄養体は 0.025 M NaCl と、嚢子は 0.15 M NaCl とほぼ等張であることがわかった。このことから嚢子の方が栄養体より含水率が低いと考えられる。またこの実験に用いた嚢子は休眠状態にあり、酸素消費量も栄養体より低く細胞内の物質も性質、量共に栄養体とは異なっているものと思われる。このような含水率の違いを伴った生理的な条件の違いが、栄養体と嚢子の間の耐凍性の差に影響を及ぼしているのではなからうか。

文 献

- 1) Smith, A. U. 1961 Biological Effects of Freezing and Supercooling. Edward-Arnold Ltd. London, 116-137.
- 2) Diamond, L. S. 1964 Freeze-preservation of protozoa. *Cryobiology*, **1**, 95-102.
- 3) Hwang, S. W., Davis, E. E. and Alexander, M. T. 1964 Freezing and viability of *Tetrahymena pyriformis* in dimethylsulfoxide. *Science*, **144**, 64-65.
- 4) Wang, G. and Marquardt, W. C. 1966 Survival of *Tetrahymena pyriformis* and *Paramecium aurelia* following freezing. *J. Protozool.* **13**, 123-128.
- 5) Bychenkova, V. N., Lozina-Lozinskii, L. K. and Namatov, T. 1969 Microscopic observations of the processes of freezing and thawing in *Colpoda maupasii*. *Zool. Zh.*, **48**, 1772-1779. Abstract.
- 6) Neff, R. J., Ray, S. A., Benton, W. F. and Wilborn, M. 1964 Induction of synchronous encystment (differentiation) in *Acanthamoeba* sp. In *Methods in Cell Physiology*, Vol. 1. (Prescott, D. M. ed.) Academic Press, N.-Y. London, 55-83.
- 7) Jeffries, W. B. 1956 Studies on excystment in the hypotrichous ciliate *Pleurotricha lanceolata*. *J. Protozool.* **3**, 136-144.
- 8) Kitching, J. A. 1952 Contractile vacuoles. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **6**, 145-165.
- 9) 松坂理夫 1969 ゾウリムシの微細構造に及ぼす細胞外凍結の影響. 低温科学, 生物篇, **27**, 67-72.
- 10) 松坂理夫 1970 未発表.
- 11) Kitching, J. A. 1967 Contractile vacuoles, ionic regulation, and excretion. In *Research in Protozoology*, I. (Chen T. T. ed.) Pergamon Press, London, 307-336.
- 12) Ilowaisky, S. A. 1926 Material zum Studium der Cysten der Hypotrichen. *Arch. Protistenk.*, **54**, 92-136.
- 13) 松坂理夫 1971 未発表.
- 14) 松坂理夫 1971 未発表.
- 15) Neff, R. J. and Neff, R. H. 1969 The biochemistry of amoebic encystment. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **23**, 51-82.
- 16) 竹原一郎・朝比奈英三 1960 イラガ越冬前蛹のグリセリン. 低温科学, 生物篇, **18**, 51-56.
- 17) 吉田静夫・酒井 昭 1967 木本類の耐凍性増大過程 XII. ニセアカシアの幹の耐凍性と物質変動の関係. 低温科学, 生物篇, **25**, 29-44.

Summary

To investigate the mechanism of freezing resistance obtained by cyst formation, freezing resistance of the hypotrichous ciliate, *Pleurotricha* sp. was studied. The trophozoites of this ciliate were invariably killed even by slow freezing down to -10°C

and underwent autolysis shortly after thawing. The cysts excysted after deep freezing down to liquid nitrogen temperature when they were previously frozen to -20°C , however, no excystment was observed after direct immersion into liquid nitrogen.

It was estimated by the measurement of osmolarity that the isotonic concentrations of the trophozoites and the cysts were 0.025 M and 0.15 M in NaCl solutions, respectively. This suggests that the proportion of water may be lower in the cysts than in the trophozoites. The cysts used in the present study were in a dormant state and, therefore, might be different in their physiological conditions from the trophozoites. It was conjectured that such differences in physiological conditions including the proportion of water between the trophozoites and the cysts may give rise to the difference in their freezing resistance.