

# 金属イオンがゾウリムシの遊泳行動に及ぼす影響

久留戸涼子, 小野静香<sup>1)</sup>, 明石真弥

The effects of metal ions on the swimming behavior of  
*Paramecium caudatum*

KURUTO Ryoko, ONO Shizuka<sup>1)</sup>, AKASHI Maya

2020年11月6日受理

## 抄 録

ゾウリムシ *Paramecium caudatum* は、生息環境によって繊毛運動が影響を受け、遊泳行動が変化することが知られている。本研究では、水中の金属イオンによって繊毛運動が変化することで、どのような遊泳行動をするのか、光学顕微鏡観察により遊泳速度や運動軌跡を解析した。Ni<sup>2+</sup> では、本実験では 0.3 mM 以下では停止しなかったが、Ni<sup>2+</sup> 濃度が高いほどゾウリムシが停止する時間も早くなる傾向にあり、濃度依存的に Ni<sup>2+</sup> がゾウリムシの繊毛運動を阻害していた。Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> では、遊泳速度が最大になる濃度は異なっていたが、低濃度側で遊泳速度が大きくなり、液内の外周を遊泳し続ける円運動となることがわかった。また、濃度が高まり、遊泳速度が小さくなると、Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup> では回転運動が、Na<sup>+</sup> では前後運動が見られ、金属イオンによって異なることがわかった。従って、いくつかの遊泳パターンがあることがわかり、ゾウリムシの遊泳運動が水質汚染を調べる 1 つの指標となる可能性が考えられた。

キーワード：ゾウリムシ、繊毛運動、遊泳行動、金属イオン、遊泳速度

## 1. 研究の背景

ゾウリムシ *Paramecium caudatum* は、繊毛虫門貧膜口綱ゾウリムシ目ゾウリムシ科ゾウリムシ属に属する原生生物で、1 個の細胞からなる単細胞生物である (Fig. 1)。小中学校の理科の授業でも、光学顕微鏡で観察を行ったりする、身近な生物である。水が淀



Fig. 1 ゾウリムシ *Paramecium caudatum*

<sup>1)</sup> 掛川市立桜木小学校

んだ有機質の多い場所を好み、常に廃水が滞留し食物滓などがヘドロ状に堆積し、かつ日当たりが良い場所である下水溝にも、ミドリムシやユレモ、アオコに混じって生息している。池や沼などの環境中の底、水草や石の表面など、「壁面付近に集積する」という定性的な性質が報告され、この集積行動には生存戦略上大きな2つのメリットがあるとされる(1)。1つは、豊富な栄養分で、水草や石、生活環境の底には餌となる栄養分が堆積しており、壁面付近に留まって遊泳することでより効率よく栄養を摂取できる。もう1つは、安定した環境で、固液界面付近では流れによる影響が少ないため、より安定した環境と考えられる。

ゾウリムシは、細胞1個で生きられる構造と機能を持ち、複雑な器官をもっている。収縮胞と呼ばれる浸透圧を調節する装置や、細胞口、食胞、細胞肛門といった栄養摂取に関連した細胞内器官があり、細胞膜直下には、トリコシスト(毛胞)と呼ばれる長楕円体の袋がある。トリコシストには特殊なタンパク質が含まれていて、機械的、あるいは化学的な刺激を受けると細胞外へ飛び出し、同時に伸長して槍状構造に変化するとされる。そして、多数の繊毛と呼ばれる細かい毛が、細胞表面全体を覆うようにして生えている。繊毛は、ヒトの気管にもあり、外界からの異物を吐き出す防御の役割を果たし、真核生物に広く見られる細胞器官である(2)。ゾウリムシの多くは、楕円体に近い形をし、繊毛をバタ足のように使って楕円体の長軸方向に遊泳するとされる(1)。普段は水中を自由に泳ぎまわっているが、前方の障害物にぶつくとバックし、後方からの刺激に対しては普段の倍以上の速さで泳いで逃げていく。こうした遊泳行動反応は、繊毛の打つ頻度や方向が変化することによって生じ、細胞が刺激を受けた際に生じる膜電位変化と、それによって生じる繊毛内のセカンドメッセンジャーの濃度変化により調節されているとされる(3)。

ゾウリムシの繊毛運動は、生息環境の温度、pH、化学組成、照度などの変化に応じて変わることが報告されている。その中で、金属イオンが影響を及ぼすことも知られている(4)。Ni<sup>2+</sup>については、ゾウリムシの繊毛運動を阻害することが知られ、Ni<sup>2+</sup>は、繊毛の向きに影響を与えることなく、繊毛打の周波数と振幅を徐々に減少させる(5)。Larsenらは、Ni<sup>2+</sup>は、繊毛を構成する微小管と結合する14Sダイニンに直接作用することによって、可逆的な麻痺を誘発すると報告している(6)。Ni<sup>2+</sup>による繊毛運動の阻害は、低濃度時には運動を制御する機構に起こり、高濃度では、すべり曲がり機構に起こっている可能性が考えられている。また、Ca<sup>2+</sup>については、細胞内を界面活性剤で処理した細胞モデル(トリトンモデル)を用いた実験において、その影響が明らかにされている(7,8)。細胞前端部が刺激を受けると脱分極が起こり、膜電位依存性のCa<sup>2+</sup>チャンネルが開き、細胞外からCa<sup>2+</sup>が細胞内に流入して細胞内Ca<sup>2+</sup>が上昇する(3)。そして、繊毛内Ca<sup>2+</sup>濃度が10<sup>-6</sup>M程度上昇すると、繊毛打方向が逆転し、後退運動を示す。一方、細胞後端部が刺激を受けると過分極が起こり、K<sup>+</sup>チャンネルを介したカチオンの流出に伴ってアデニル酸が活性化され、繊毛内のcAMP濃度が上昇する(9)。これによって繊毛打頻度が上昇し、ゾウリムシは通常の倍以上の速さで泳ぐとされる(3)。K<sup>+</sup>またはBa<sup>2+</sup>のCa<sup>2+</sup>に対する相対濃度を増

した時も、繊毛逆転反応を示すとされる。また、 $\text{Ni}^{2+}$  処理により停止したゾウリムシは  $\text{Ca}^{2+}$  で回復することが知られ、これは、 $\text{Ca}^{2+}$  が繊毛運動を活性化させるためと考えられている (4, 6)。そこで、これらの金属イオンによって、実際のゾウリムシの遊泳行動がどのようなようになるのかを、顕微鏡観察し、解析することにした。

## 2. 研究の目的

ゾウリムシは、細胞表面全体を覆っている繊毛の動きによって、遊泳行動が決められている。本研究では、金属イオンに着目し、金属イオンによって繊毛運動が変化することで、どのような遊泳行動をするのかを調べることにした。光学顕微鏡像を録画し、動画解析をし、停止時間、遊泳速度、遊泳軌跡などを調べ、基礎的なデータを得ることにした。金属イオンとしては、繊毛運動を停止させるとされる  $\text{Ni}^{2+}$ 、それを回復させるとされる  $\text{Ca}^{2+}$  をはじめ、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  といった、一価、二価の陽イオンの様々な濃度について調べることにした。

また、ゾウリムシは単細胞生物であり、物質の影響は個体レベルである。遊泳運動のパターンを調べることで、ゾウリムシの遊泳行動が水質汚染など環境汚染の毒性評価の1つの指標となり得るかも考察することにした。

## 3. 方法

### 3-1. ゾウリムシの培養

200 mL ビーカーで30分ほど藁を煮て、良い色合いになった所で火を消し、培養液を作製した (10)。実験に用いるゾウリムシ *Paramecium caudatum* の状態を一定にするため、実験を行う1週間前に、その都度5 mLの培養液にゾウリムシを移植した。作製した培養液は冷蔵庫で保管した。

### 3-2. 光学顕微鏡による遊泳観察 (4)

#### 3-2-1. $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 影響下での遊泳観察

- (1) 3-1. で培養中のゾウリムシの一部をチューブに取り攪拌し、ゾウリムシ懸濁液とした。このうち  $4\mu\text{L}$  をホールスライドガラスに取った。この際、ゾウリムシの数が10匹前後となるように調整した。
- (2) ここに  $0.1 \sim 1.2 \text{ mM}$  の  $\text{NiCl}_2$  水溶液  $4\mu\text{L}$  を加え、懸濁した (最終濃度  $0.05 \sim 0.6 \text{ mM}$ )。
- (3) CCD カメラ (ELMO) を取り付けた光学顕微鏡 (接眼レンズ10倍×対物レンズ2倍) (OLYMPUS BH-2) で、12分間録画し、ゾウリムシの遊泳を観察した。
- (4) 同様に、 $1 \sim 200 \text{ mM}$  の  $\text{CaCl}_2$  水溶液 (最終濃度  $0.5 \sim 100 \text{ mM}$ )  
 $0.04 \sim 200 \text{ mM}$  の  $\text{MgCl}_2$  水溶液 (最終濃度  $0.02 \sim 100 \text{ mM}$ )  
 $0.4 \sim 500 \text{ mM}$  の  $\text{NaCl}$  水溶液 (最終濃度  $0.2 \sim 250 \text{ mM}$ )  
 $0.4 \sim 200 \text{ mM}$  の  $\text{KCl}$  水溶液 (最終濃度  $0.2 \sim 100 \text{ mM}$ ) で行った。

### 3-2-2. $\text{Ni}^{2+}$ と $\text{Ca}^{2+}$ 影響下での遊泳観察

- (1) 3-2-1. (1)と同様にゾウリムシを取り、ゾウリムシの数を10匹前後となるように調整した。
- (2) ここに1.0、1.2 mMの $\text{NiCl}_2$ 水溶液4 $\mu\text{L}$ を加え、懸濁し(最終濃度0.5、0.6 mM)、全てのゾウリムシが停止するのを観察した。対照実験として蒸留水4 $\mu\text{L}$ でも行った。
- (3) ここに100～523.8 mMの $\text{CaCl}_2$ 水溶液3 $\mu\text{L}$ を加え、懸濁した(最終濃度27.3～145.3 mM)。
- (4) 3-2-1. (3)と同様に、光学顕微鏡で18分間録画し、ゾウリムシの遊泳を観察した。

### 3-3. 動画の解析

#### 3-3-1. $\text{Ni}^{2+}$ 影響下での動画の解析

- (1) 動画を再生しながら、各個体の停止時間を記録した。
- (2) 各濃度のゾウリムシの停止時間の平均並びに標準偏差を算出した。

#### 3-3-2. $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 影響下での動画の解析

- (1) モニターにOHPフィルムを貼った。
- (2) 動画をスロー再生しながら、各個体の10秒間の遊泳の軌跡をペンでなぞった。 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ では反応するまでに時間がかかったため、加えてから60～70秒を解析した。 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ では反応するまでに時間がかからなかったため、加えてから30～40秒を解析した。
- (3) マップメーター(株式会社小泉測機製作所)で軌跡の長さを測り、各濃度のゾウリムシの遊泳速度の平均並びに標準偏差を算出した。

## 4. 結果

### 4-1. $\text{Ni}^{2+}$ の影響

繰り返し実験を行ったが、本実験で用いたゾウリムシでは、0.20、0.25、0.30 mMの $\text{NiCl}_2$ 濃度では、12分間の観察で、停止する個体は見られなかった(Table 1)。0.35～0.60 mMの $\text{NiCl}_2$ 濃度では、全ての個体が停止し、 $\text{NiCl}_2$ 濃度が高いほど、ゾウリムシが停止する時間も早くなる傾向にあった(Fig. 2)。従って、 $\text{NiCl}_2$ 濃度に依存してゾウリムシが停止し、 $\text{Ni}^{2+}$ がゾウリムシの繊毛運動に対して阻害作用を示すことが確認できた。

Table 1 NiCl<sub>2</sub> 濃度 (0.20 ~ 0.60 mM) とゾウリムシの停止時間

NiCl <sub>2</sub> 最終濃度 (mM)	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60
ゾウリムシの数 (匹)	6	6	6	5	4	4	5	4	4
停止時間	停止する個体は見られなかった。			5 匹 停止。 1'26" 8'40" 8'45" 9'20" 9'40"	4 匹 停止。 3'31" 5'29" 5'45" 6'31"	4 匹 停止。 4'53" 5'25" 5'25" 6'40"	5 匹 停止。 3'44" 4'13" 5'16" 6'06" 8'16"	4 匹 停止。 2'53" 3'19" 4'45" 5'23"	4 匹 停止。 3'38" 4'18" 4'20" 5'08"
平均停止時間				7'34" (454")	5'19" (319")	5'36" (336")	5'31" (331")	4'05" (245")	4'21" (261")
標準偏差				185"	66"	39"	96"	61"	32"

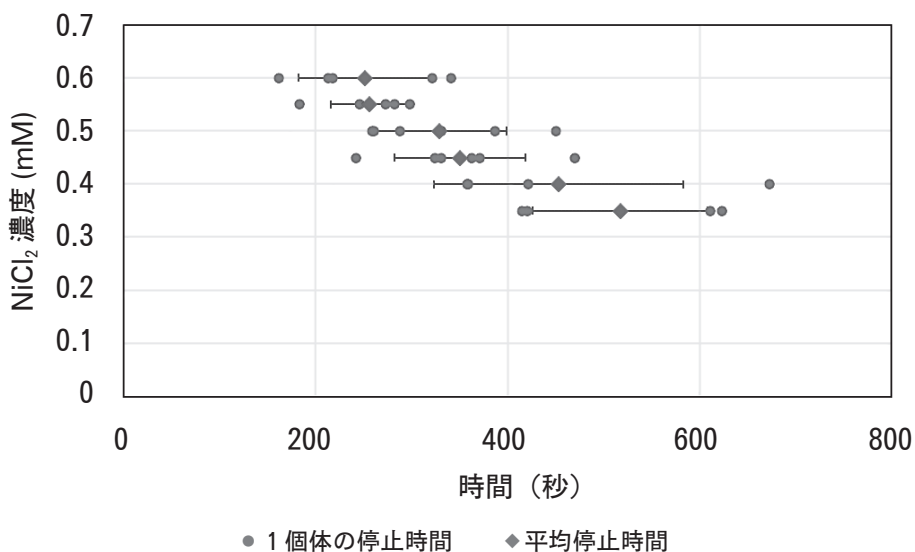


Fig. 2 NiCl<sub>2</sub> 濃度 (0.20 ~ 0.60 mM) による停止時間の変化

#### 4-2. Ni<sup>2+</sup> と Ca<sup>2+</sup> の影響

Ni<sup>2+</sup> 処理により停止したゾウリムシは、Ca<sup>2+</sup> で回復することが知られている。またその際、Ni<sup>2+</sup> の処理を長時間 (5 分以上) 行うと、繊毛運動の回復率が低下することが確認されている (4)。そこで、4-1. の Table 1 でほとんどの個体が 5 分以内で停止した、0.5 または 0.6 mM の NiCl<sub>2</sub> 濃度で実験を行った。

まず、Table 2 の①の対照実験の蒸留水と 145.3 mM の  $\text{CaCl}_2$  濃度では、 $\text{CaCl}_2$  を加えた直後に全ての個体が停止し、18 分後には死亡していた。②と③の 0.6 mM の  $\text{NiCl}_2$  濃度と 145.3、81.8 mM の  $\text{CaCl}_2$  濃度では、全ての個体の遊泳が回復せず、18 分後には死亡していた。④の 0.6 mM の  $\text{NiCl}_2$  濃度と 27.3 mM の  $\text{CaCl}_2$  濃度では、 $\text{CaCl}_2$  を加えた直後に 2 匹の遊泳が少し回復したが、しばらくすると停止した。⑤の 0.5 mM の  $\text{NiCl}_2$  濃度と 27.3 mM の  $\text{CaCl}_2$  濃度では、 $\text{CaCl}_2$  を加えた直後に半数の遊泳が少し回復したが、約 3 分後には、全ての個体が再び停止した。

81.8 ~ 145.3 mM の高濃度では、ゾウリムシの遊泳は回復せず、27.3 mM の低濃度であれば遊泳は回復した。そのため、ゾウリムシの遊泳が回復する  $\text{Ca}^{2+}$  には適切な影響濃度範囲があり、高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  では、ゾウリムシに毒性を示していた。また、低濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  では、回復した個体も見られたが、最後には再び停止してしまい、 $\text{Ca}^{2+}$  の遊泳回復の効果は一時的であった。

Table 2  $\text{NiCl}_2$  処理停止時の  $\text{CaCl}_2$  影響下での観察

	①	②	③	④	⑤
ゾウリムシの数(匹)	9	7	7	6	17
$\text{NiCl}_2$ 濃度 (mM)	0	0.6	0.6	0.6	0.5
$\text{CaCl}_2$ 添加時間(分後)	5'	5'	3'	3'20"	4'
$\text{CaCl}_2$ 濃度 (mM)	145.3	145.3	81.8	27.3	27.3
結果	$\text{CaCl}_2$ 添加後、全ての個体が停止し、死亡していた。	$\text{NiCl}_2$ 添加後、全ての個体が停止した。 $\text{CaCl}_2$ 添加後は回復せず、死亡していた。	$\text{NiCl}_2$ 添加後、3分で全ての個体が停止したため、 $\text{CaCl}_2$ を添加した。回復せず、死亡していた。	$\text{NiCl}_2$ 添加後、3分20秒で全ての個体が停止したため、 $\text{CaCl}_2$ を添加した。添加直後、2匹が動き出したが、すぐに停止した。	$\text{NiCl}_2$ 添加後、4分でほぼ全ての個体が停止したため、 $\text{CaCl}_2$ を添加した。添加直後、半数が動き出したが、3分ほど経つと全ての個体が停止した。

#### 4-3. $\text{Ca}^{2+}$ の影響

4-2. を踏まえて、 $\text{Ca}^{2+}$  の遊泳行動への影響を調べた。 $\text{CaCl}_2$  濃度が 0.5 ~ 20 mM と高まると、遊泳速度が大きくなる傾向が見られた (Table 3, Fig. 3)。しかし、遊泳速度が大きくなるのは一時的であり、徐々に遊泳速度が小さくなる個体や 12 分



後には停止している個体も見られた。また、100 mM の  $\text{CaCl}_2$  濃度では、加えた直後に停止する個体が現れ、約 1 分半で全ての個体が停止した。さらに、約 12 分後には、細胞内容物が飛び出したようにつぶれて死亡していた。従って、100 mM の高濃度では、ゾウリムシに毒性を示していた。

また、遊泳の様子にも、各濃度で違いが見られた。ゾウリムシは通常、繊毛の打つ頻度や方向を変化させながら自由に泳いでいる (Fig. 4A)。0.5 mM と 2 mM の  $\text{CaCl}_2$  濃度では、通常の遊泳とほとんど変化が見られなかった (Fig. 4B, C)。一方、5 mM の  $\text{CaCl}_2$  濃度では、方向転換がほとんどなく、円状の直進運動をしていた (Fig. 4D)。これは、直進運動をすると、液内の外周を遊泳し続けるため、遊泳の軌跡が円状となるためと考えられた。以下、この直進運動のことを円運動と呼ぶことにした。10 mM と 20 mM の  $\text{CaCl}_2$  濃度でも、方向転換が全くなく、円運動が見られた (Fig. 4E, F)。従って、5 ~ 20 mM の低濃度では、遊泳速度が大きくなり、それに伴い円運動が活発になった。ゾウリムシは、繊毛内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が  $10^{-6}$  M 程度上昇すると、繊毛打方向が逆転し、後退運動を示すことが知られている (3)。そのため、5、10、20 mM の  $\text{CaCl}_2$  濃度では、後退運動をしていたと考えられた。後退運動をすることによって、遊泳速度が大きくなると考えられた。

Table 3  $\text{CaCl}_2$  濃度 (0 ~ 20 mM) とゾウリムシの遊泳速度

遊泳速度 (mm/s)		$\text{CaCl}_2$ 濃度 (mM)					
		0	0.5	2	5	10	20
ゾウリムシ ナンバ ー	1	0.79	0.83	0.78	1.98	2.35	2.63
	2	0.56	1.08	0.94	1.69	2.21	2.69
	3	0.71	0.79	0.59	1.48	1.83	2.61
	4	0.80	0.87	0.94	1.65	1.68	2.56
	5	0.68	0.80	0.61	1.33	1.82	2.52
	6	0.76	0.69	0.99	1.46	2.38	2.64
	7	0.67	0.93	0.91	1.01	1.50	2.75
	8	0.68	0.81	0.60	1.67	2.27	2.82
	9	0.66	0.74	0.71	2.13	2.37	
	10			1.01		2.60	
	11			1.36		1.13	
	12			0.35		2.23	
	13			0.79		2.19	
	14			0.64		2.19	
	15			0.82		2.13	
	16			0.71		2.10	
平均		0.70	0.84	0.80	1.60	2.06	2.65
標準偏差		0.07	0.11	0.22	0.32	0.37	0.09

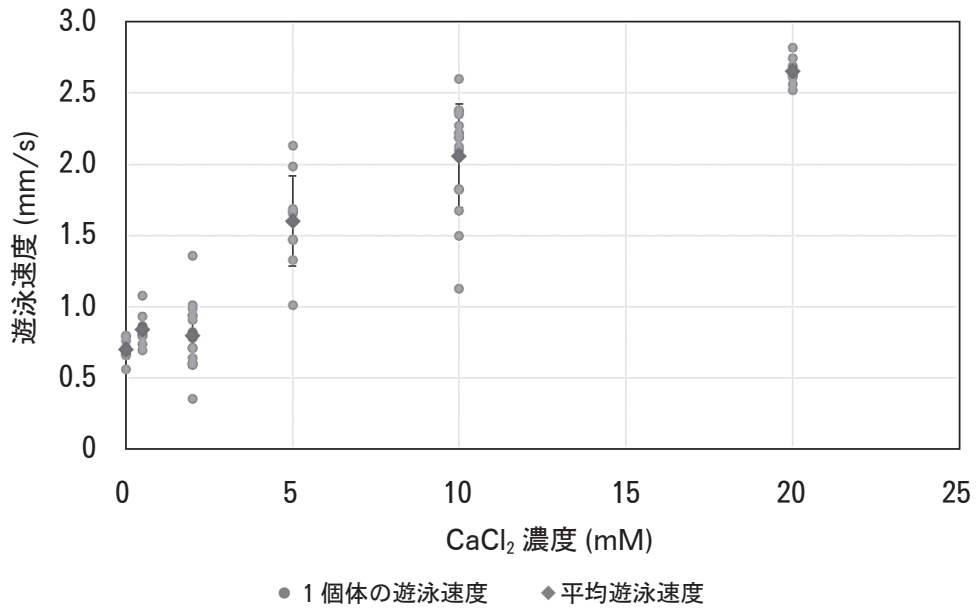


Fig. 3 CaCl<sub>2</sub> 濃度 (0 ~ 20 mM) によるゾウリムシの遊泳速度の変化



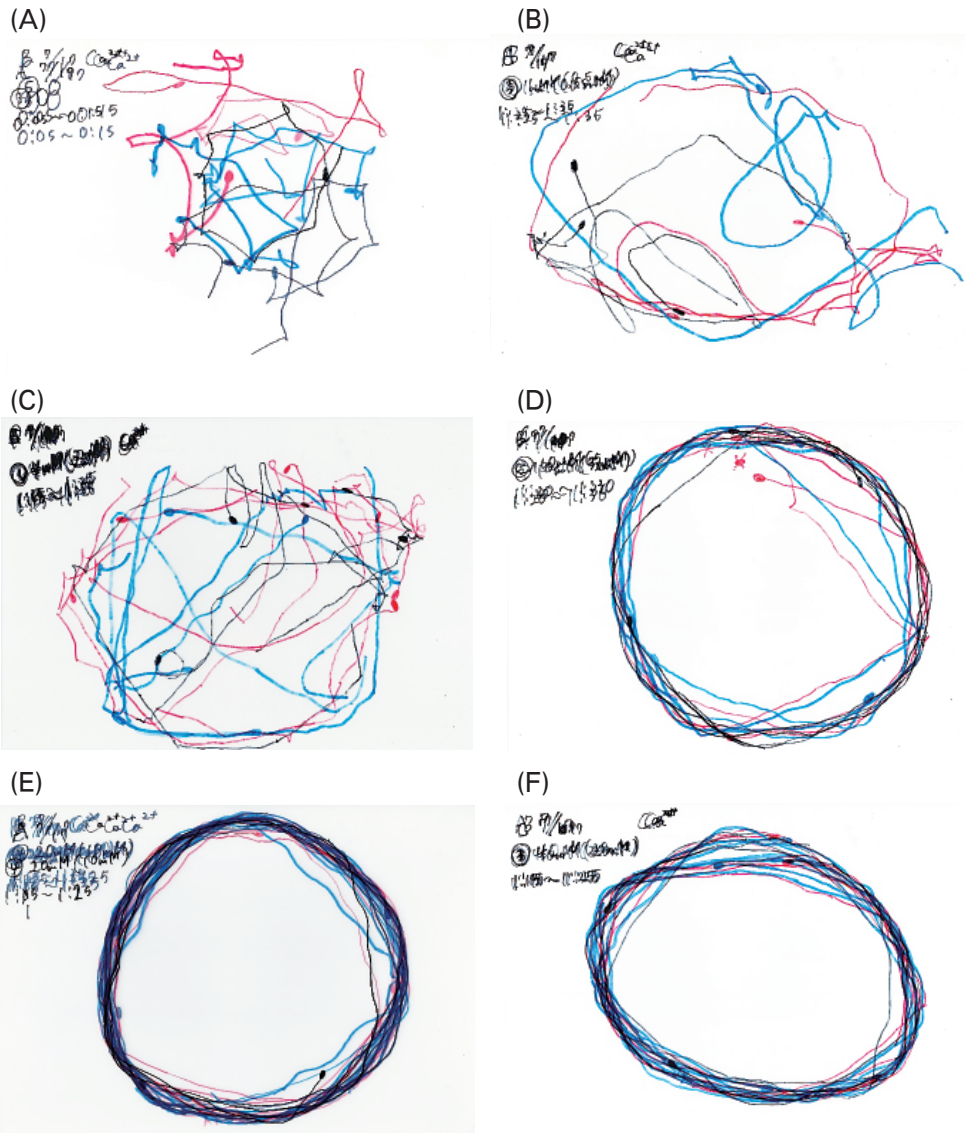


Fig. 4  $\text{CaCl}_2$  (0 ~ 20 mM) 下での遊泳の軌跡  
 (A : control B : 0.5 mM C : 2 mM D : 5 mM E : 10 mM F : 20 mM  $\text{CaCl}_2$ )

#### 4-4. $\text{Mg}^{2+}$ の影響

$\text{Mg}^{2+}$  については、 $\text{MgCl}_2$  濃度が 0.02 ~ 0.5 mM と高まると、遊泳速度が大きくなる傾向が見られた (Table 4, Fig. 5)。しかし、さらに 2、5、10 mM と高めていくと、遊泳速度が小さくなり、通常の遊泳速度に戻っていく傾向が見られた (Table 4, 5, Fig. 5, 6)。また、25 mM の  $\text{MgCl}_2$  濃度では、通常の遊泳速度よりも小さくなった。50、100 mM の  $\text{MgCl}_2$  濃度では、停止する個体が見られたため、遊泳の軌跡の記録

と遊泳速度を測定することができなかった。50 mM の  $MgCl_2$  濃度では、遊泳速度が小さくなり、約 6 分で全ての個体が停止し、約 12 分後には死亡していた。 $Ca^{2+}$  の場合とは異なり、そのままの形で死亡していた。100 mM の  $MgCl_2$  濃度では、加えてから約 30 秒で全ての個体が停止し、約 12 分後には死亡していた。従って、50 ~ 100 mM の高濃度では、ゾウリムシに毒性を示していた。 $Mg^{2+}$  は  $Ca^{2+}$  に比べ、より低濃度でゾウリムシの遊泳に影響を及ぼすが、少し濃度が高まると通常の遊泳速度よりも小さくなった。

また、遊泳の様子にも、各濃度で違いが見られた。0.02 mM の  $MgCl_2$  濃度では、通常の遊泳に近いが、0.05 mM の  $MgCl_2$  濃度では、円運動をする個体も見られた (Fig. 7B, C)。0.2、0.5、0.625 mM の  $MgCl_2$  濃度では、半数以上の個体が円運動をしていた (Fig. 7D, E, Fig. 8B)。2 mM の  $MgCl_2$  濃度では、方向転換をする個体が見られ、通常の遊泳に近づいた (Fig. 7F)。5、10、25 mM の  $MgCl_2$  濃度では、その場で回転する個体が見られた (Fig. 7G, Fig. 8C, D)。従って、0.02 ~ 0.625 mM の低濃度では、遊泳速度が大きくなり、それに伴い円運動が活発になった。また、5 ~ 25 mM の高濃度では、遊泳速度が小さくなり、それに伴いその場での回転運動が活発になった。 $Mg^{2+}$  は  $Ca^{2+}$  に比べて、遊泳速度を高める濃度が低く、後退運動も小さいが、 $Ca^{2+}$  に似た作用をしていた。

Table 4  $MgCl_2$  濃度 (0 ~ 5 mM) とゾウリムシの遊泳速度

遊泳速度 (mm/s)		$MgCl_2$ 濃度 (mM)						
		0	0.02	0.05	0.2	0.5	2	5
ゾウリムシ ナンバ ー	1	0.93	0.71	1.08	1.04	1.04	0.87	0.76
	2	0.82	0.84	0.81	1.38	1.34	1.06	0.90
	3	0.86	0.88	1.13	1.02	1.10	1.05	0.81
	4	0.85	0.56	1.17	0.69	1.14	1.12	0.91
	5	0.85	0.86	0.81	1.10	1.13	1.00	0.88
	6	0.79	0.89	0.76	0.77	1.18	0.85	0.93
	7	0.88	1.14	0.91	1.10	1.01	0.76	0.84
	8	0.80			1.47		1.07	0.83
	9	0.84					0.81	0.88
	10						1.05	
平均		0.85	0.84	0.95	1.07	1.13	0.97	0.86
標準偏差		0.04	0.16	0.16	0.25	0.10	0.12	0.05

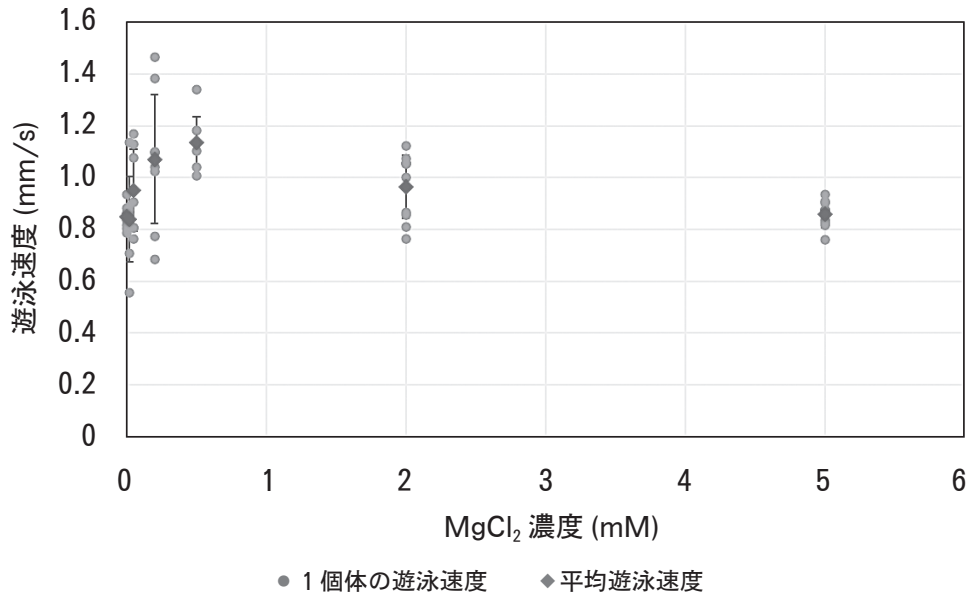


Fig. 5 MgCl<sub>2</sub> 濃度 (0 ~ 5 mM) によるゾウリムシの遊泳速度の変化

Table 5 MgCl<sub>2</sub> 濃度 (0 ~ 25 mM) とゾウリムシの遊泳速度

遊泳速度 (mm/s)		MgCl <sub>2</sub> 濃度 (mM)			
		0	0.625	10	25
ゾウリムシ ナンバ ー	1	0.76	1.12	0.83	0.63
	2	0.83	1.48	0.71	0.48
	3	0.71	1.22	1.04	0.61
	4	0.84	1.25	0.88	0.66
	5	0.96	1.32	0.86	0.58
	6	0.70	1.02	0.68	0.60
	7		1.10	0.73	
	8		0.94	0.84	
平均		0.80	1.18	0.82	0.59
標準偏差		0.09	0.16	0.11	0.06

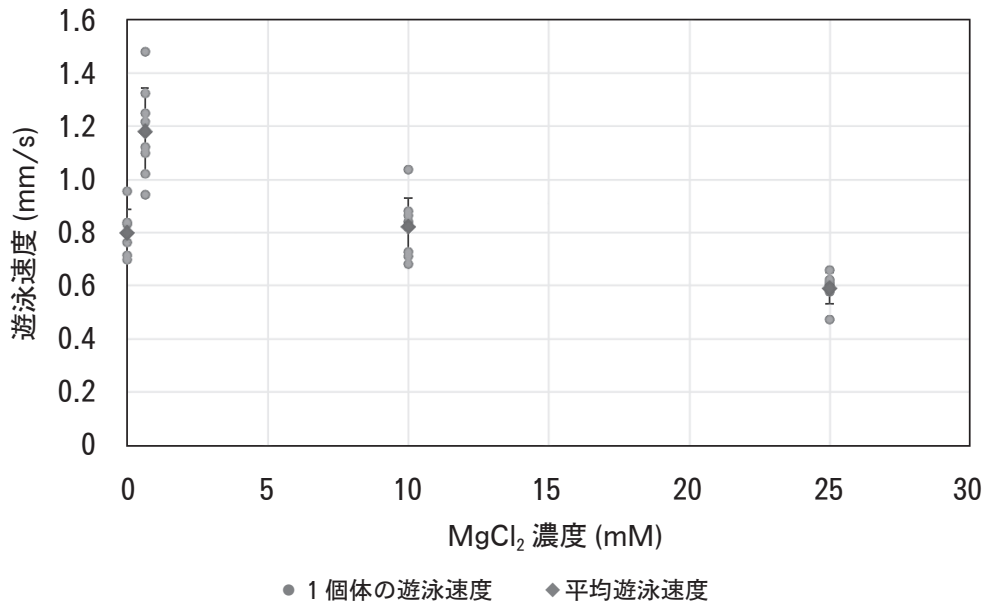


Fig. 6 MgCl<sub>2</sub> 濃度 (0 ~ 25 mM) によるゾウリムシの遊泳速度の変化

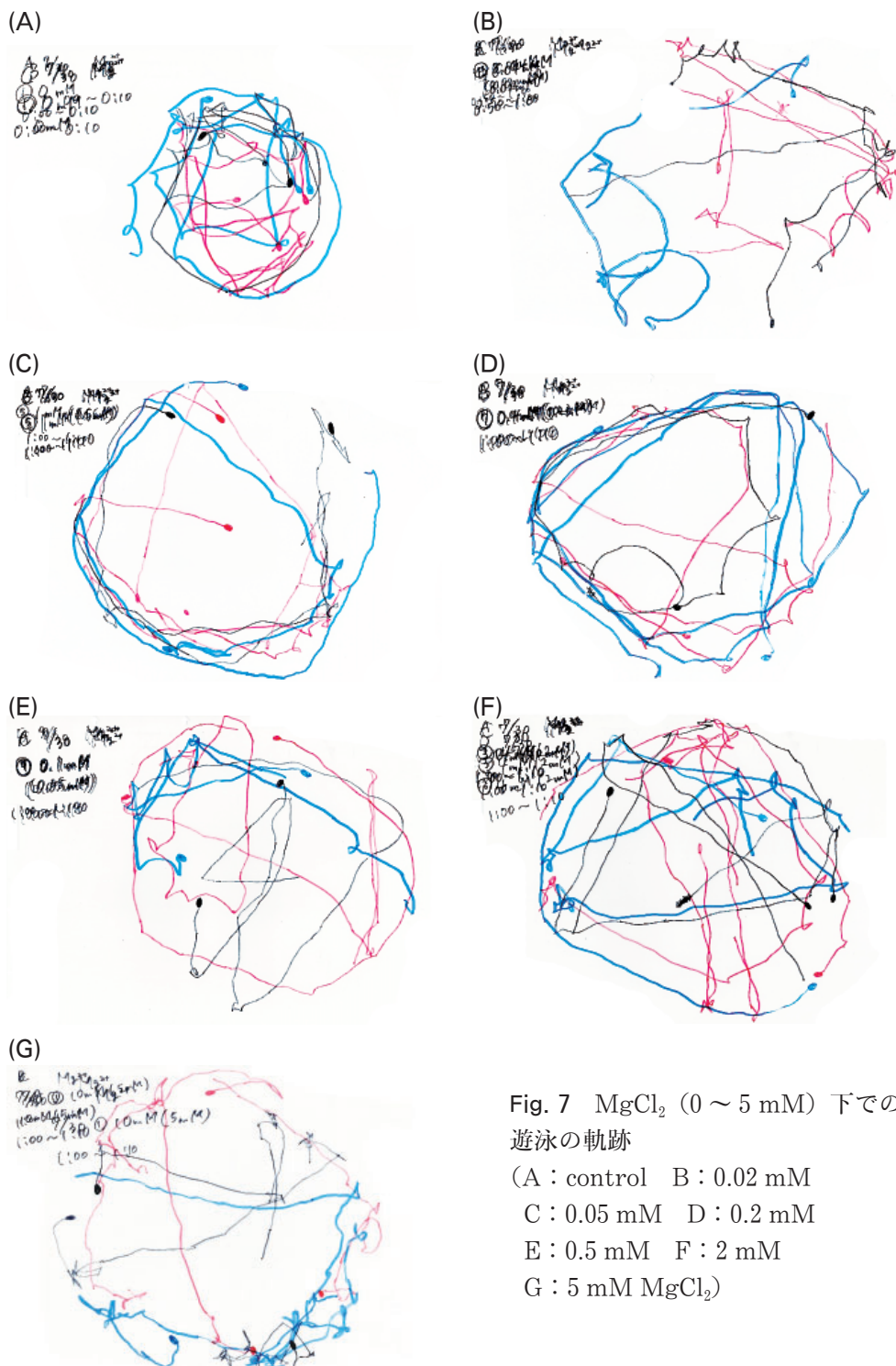


Fig. 7  $\text{MgCl}_2$  (0 ~ 5 mM) 下での遊泳の軌跡

(A : control B : 0.02 mM  
C : 0.05 mM D : 0.2 mM  
E : 0.5 mM F : 2 mM  
G : 5 mM  $\text{MgCl}_2$ )

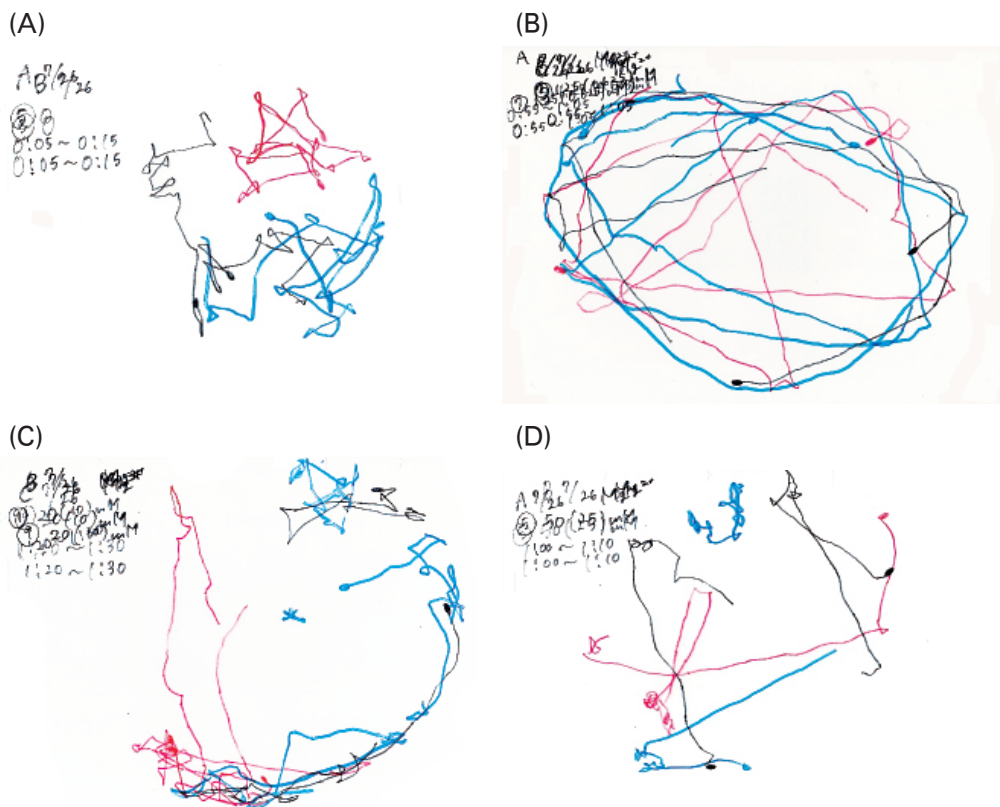


Fig. 8  $\text{MgCl}_2$  (0 ~ 25 mM) 下での遊泳の軌跡  
(A : control B : 0.625 mM C : 10 mM D : 25 mM  $\text{MgCl}_2$ )

#### 4-5. $\text{Na}^+$ の影響

$\text{Na}^+$  については、 $\text{NaCl}$  の濃度が 0.2、0.5 mM と高まると、遊泳速度が大きくなる傾向が見られた (Table 6, Fig. 9)。しかし、2 mM の  $\text{NaCl}$  濃度では、遊泳速度は小さくなった。また、5、10、25 mM の  $\text{NaCl}$  濃度では、緩やかに小さくなる傾向が見られた (Table 7, Fig. 10)。50、100、250 mM の  $\text{NaCl}$  濃度では、その場で前後運動をしていたため、遊泳の軌跡の記録と遊泳速度の測定ができなかった。50 mM の  $\text{NaCl}$  濃度では、次第に遊泳速度が小さくなったが、12 分後にはおよそ通常の遊泳速度まで回復していた。100 mM の  $\text{NaCl}$  濃度では、次第に遊泳速度が小さくなり、12 分後には停止しそうなほど遊泳速度が小さくなった。250 mM の  $\text{NaCl}$  濃度では、加えてから約 6 分後に全ての個体が停止し、死亡していた。従って、0.2 ~ 0.5 mM の低濃度では、遊泳速度が大きくなり、さらに濃度を高めた 5 ~ 25 mM の濃度では、緩やかに遊泳速度が小さくなった。また、50 ~ 250 mM の高濃度では、遊泳速度が小さくなり、ゾウリムシに毒性を示していた。

また、遊泳の様子にも、各濃度で違いが見られた。0.2 mM の  $\text{NaCl}$  濃度では、通

常の遊泳に近いが、0.5 mM の NaCl 濃度では、円運動をしていた (Fig. 11A - C)。2、5、10、25 mM の NaCl 濃度では、通常の遊泳に近づいた (Fig. 11D, F - H)。50 mM の NaCl 濃度では、その場で前後運動をする様子が見られたが、次第に収まっていった。100 mM の NaCl 濃度では、50 mM の NaCl 濃度の時より激しくその場で前後運動をし、次第に収まっていった。従って、0.2 ~ 0.5 mM の低濃度では、遊泳速度が大きくなり、円運動が活発になった。また、50 ~ 100 mM の高濃度では、遊泳速度が小さくなり、それに伴い前後運動が活発になった。

Table 6 NaCl 濃度 (0 ~ 2 mM) とゾウリムシの遊泳速度

遊泳速度 (mm/s)		NaCl 濃度 (mM)			
		0	0.2	0.5	2
ゾウリムシ シナンバー	1	0.83	0.74	0.96	0.72
	2	0.73	0.81	0.76	0.81
	3	0.79	0.77	1.21	0.75
	4	0.81	0.98	1.02	0.64
	5	0.74	0.80	0.75	0.64
	6	0.78	0.73		0.80
	7				0.78
	8				0.71
平均		0.78	0.81	0.94	0.73
標準偏差		0.03	0.09	0.17	0.06

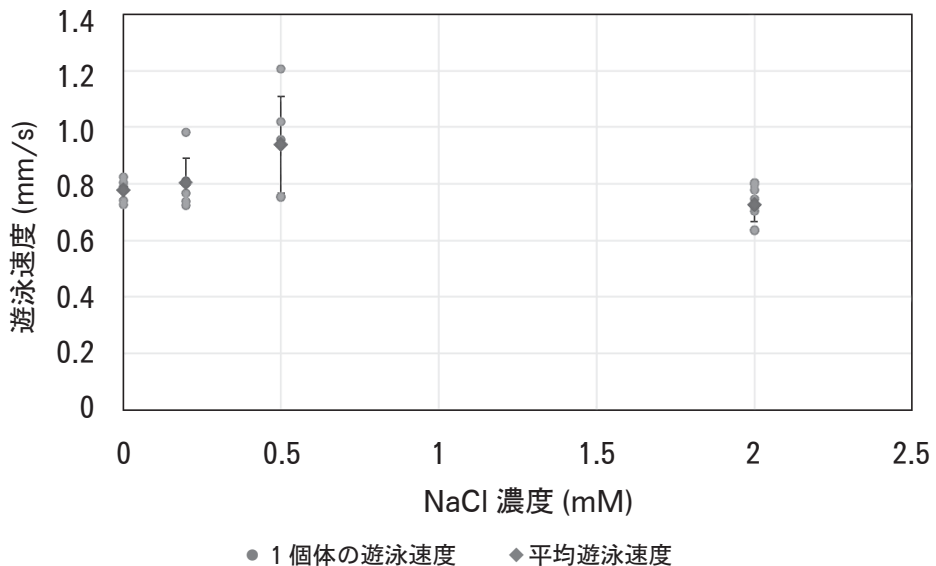


Fig. 9 NaCl 濃度 (0 ~ 2 mM) によるゾウリムシの遊泳速度の変化



Table 7 NaCl 濃度 (0 ~ 25 mM) とゾウリムシの遊泳速度

遊泳速度 (mm/s)		NaCl 濃度 (mM)			
		0	5	10	25
ゾウリムシ ナンバ	1	0.90	0.84	0.78	0.60
	2	0.97	1.04	0.86	0.96
	3	0.90	0.85	0.89	0.74
	4	0.85	0.77	0.62	0.98
	5	1.05	0.89	0.95	0.98
	6	0.87	0.86	0.86	0.76
	7				0.76
平均		0.93	0.88	0.83	0.83
標準偏差		0.07	0.08	0.10	0.15

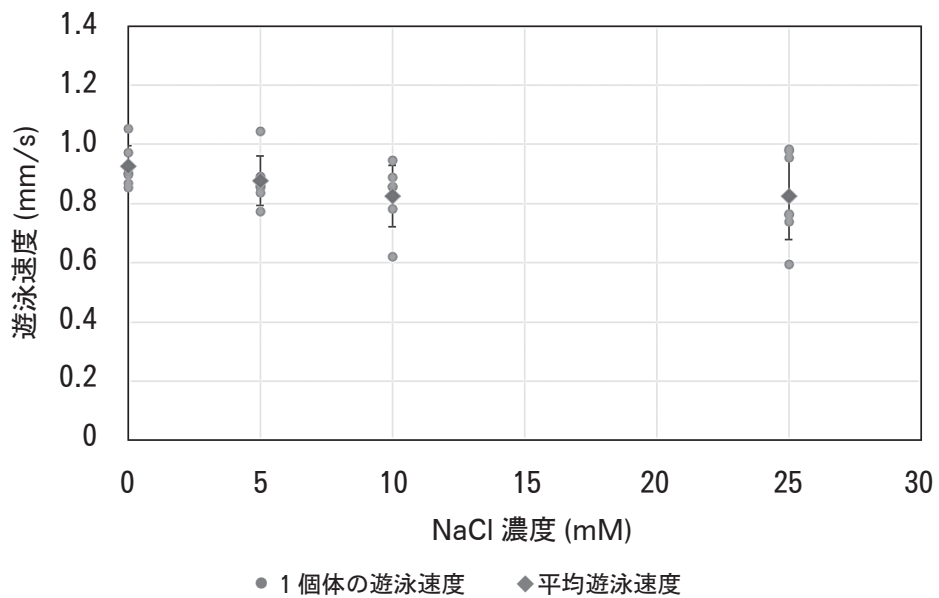


Fig. 10 NaCl 濃度 (0 ~ 25 mM) によるゾウリムシの遊泳速度の変化

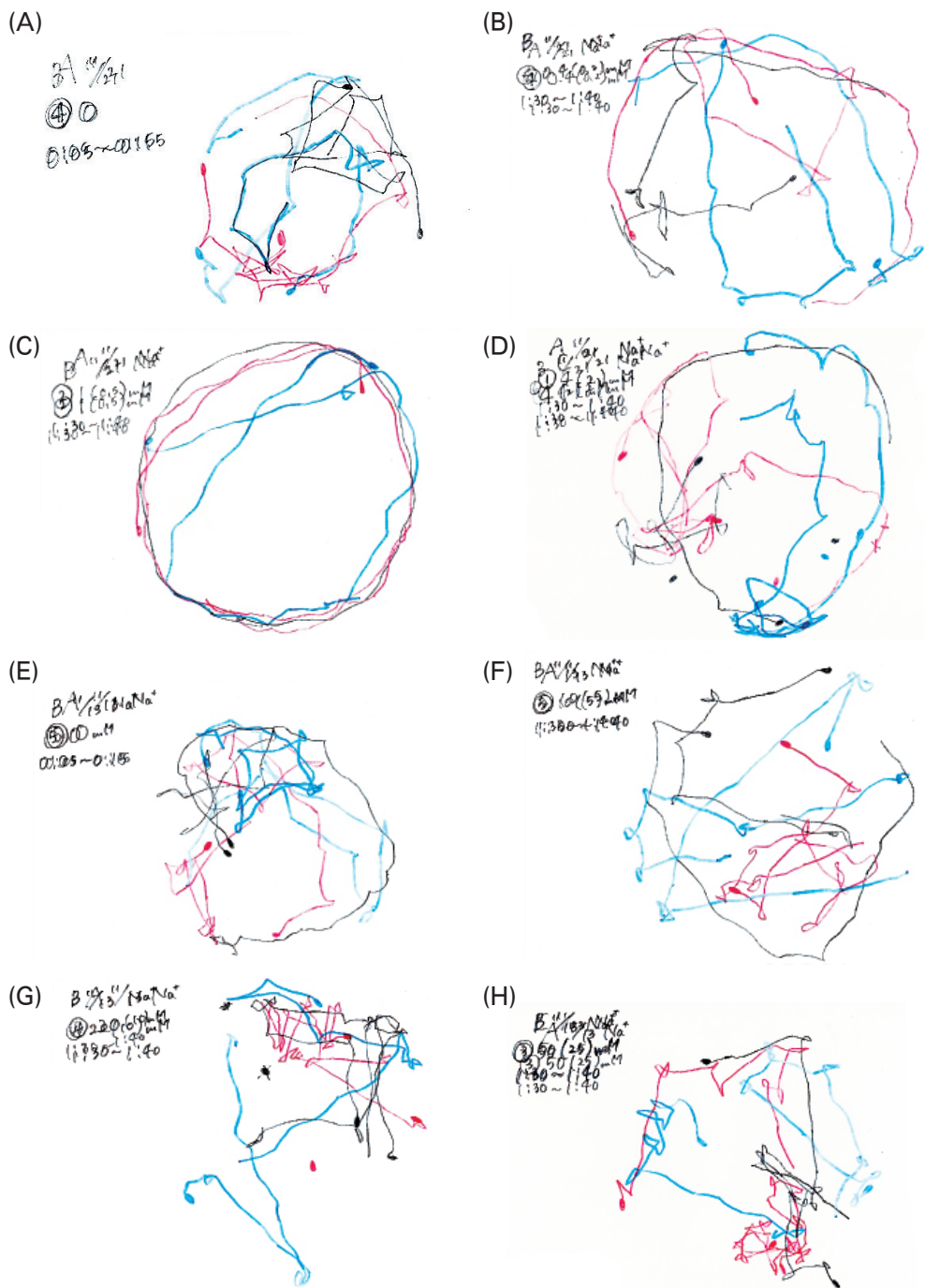


Fig. 11 NaCl (0 ~ 25 mM) 下での遊泳の軌跡  
 (A, E : control B : 0.2 mM C : 0.5 mM D : 2 mM F : 5 mM  
 G : 10 mM H : 25 mM NaCl)

#### 4-6. K<sup>+</sup> の影響

K<sup>+</sup> については、KCl 濃度が 0.2、0.5 mM と高まると、遊泳速度が大きくなる傾向が見られた (Table 8, Fig. 12)。しかし、さらに 2、10 mM と高めていくと、通常の遊泳速度よりも小さくなった。また、25、50 mM の KCl 濃度では、回転運動を多くする個体が見られたため、遊泳速度を測定することが困難であった。そのため、遊泳の軌跡の記録のみとした (Fig. 13F, G)。50 mM の KCl 濃度では、約 11 分後に 1 匹が停止した。100 mM の KCl 濃度では、徐々に遊泳速度が小さくなり、約 7 分後に全ての個体が停止した。従って、0.2、0.5 mM の低濃度では遊泳速度が大きくなり、50、100 mM の高濃度では、ゾウリムシに毒性を示していた。それは、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> と比べると弱い、Na<sup>+</sup> より強い毒性を示していた。

また、遊泳の様子にも、各濃度で違いが見られた。0.2 mM の KCl 濃度では、通常の遊泳に近いが、0.5 mM の KCl 濃度では、半数以上の個体が円運動をしていた (Fig. 13A - C)。2 mM の KCl 濃度では、通常の遊泳に近づいた (Fig. 13D)。10 mM の KCl 濃度では回転運動をしながら遊泳する個体が見られ、25、50 mM の KCl 濃度では、その場での回転運動のみで遊泳は見られなかった (Fig. 13E - G)。従って、0.5 mM の低濃度では、遊泳速度が大きくなり、それに伴い Mg<sup>2+</sup> と同様の反応の強さで円運動が活発になった。また、10 ~ 50 mM の高濃度では、遊泳速度が小さくなり、それに伴いその場での回転運動が活発になった。K<sup>+</sup> は同様な回転運動を見せた Mg<sup>2+</sup> と比べて、同じ濃度において、より活発に回転運動を行っていた。

Table 8 KCl 濃度 (0 ~ 10 mM) とゾウリムシの遊泳速度

遊泳速度 (mm/s)		KCl 濃度 (mM)				
		0	0.2	0.5	2	10
ゾウリムシ ナンバー	1	0.86	0.93	1.46	0.88	0.74
	2	0.75	0.86	1.17	0.81	0.71
	3	0.81	0.81	1.14	0.67	0.62
	4	0.89	0.91	1.57	0.81	0.74
	5	0.80	0.86	1.10	0.73	0.81
	6	0.67	0.97	1.13	0.61	0.64
	7					0.70
平均		0.80	0.89	1.26	0.75	0.71
標準偏差		0.07	0.05	0.18	0.09	0.06

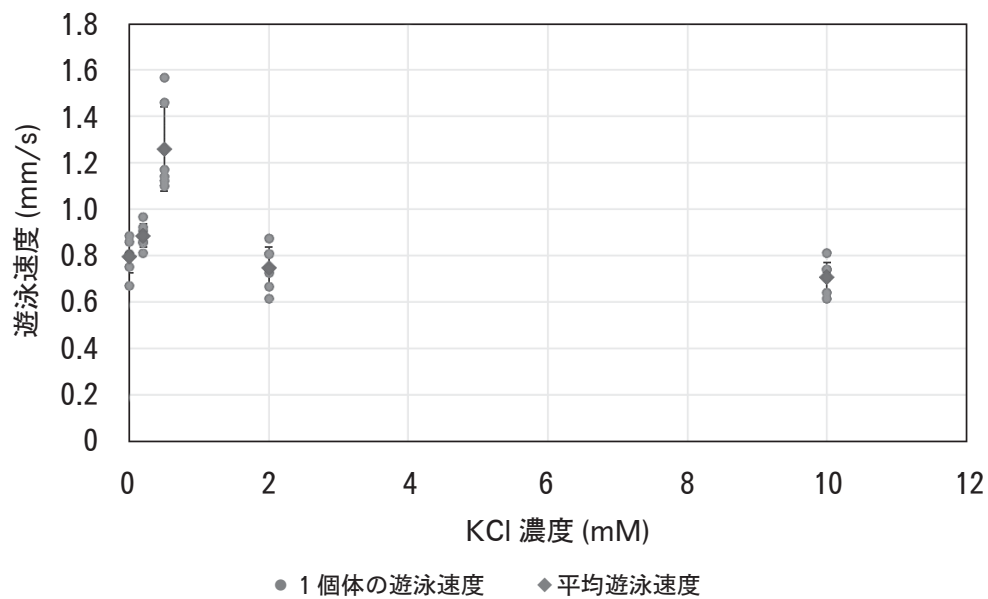


Fig. 12 KCl 濃度 (0 ~ 10 mM) によるゾウリムシの遊泳速度の変化

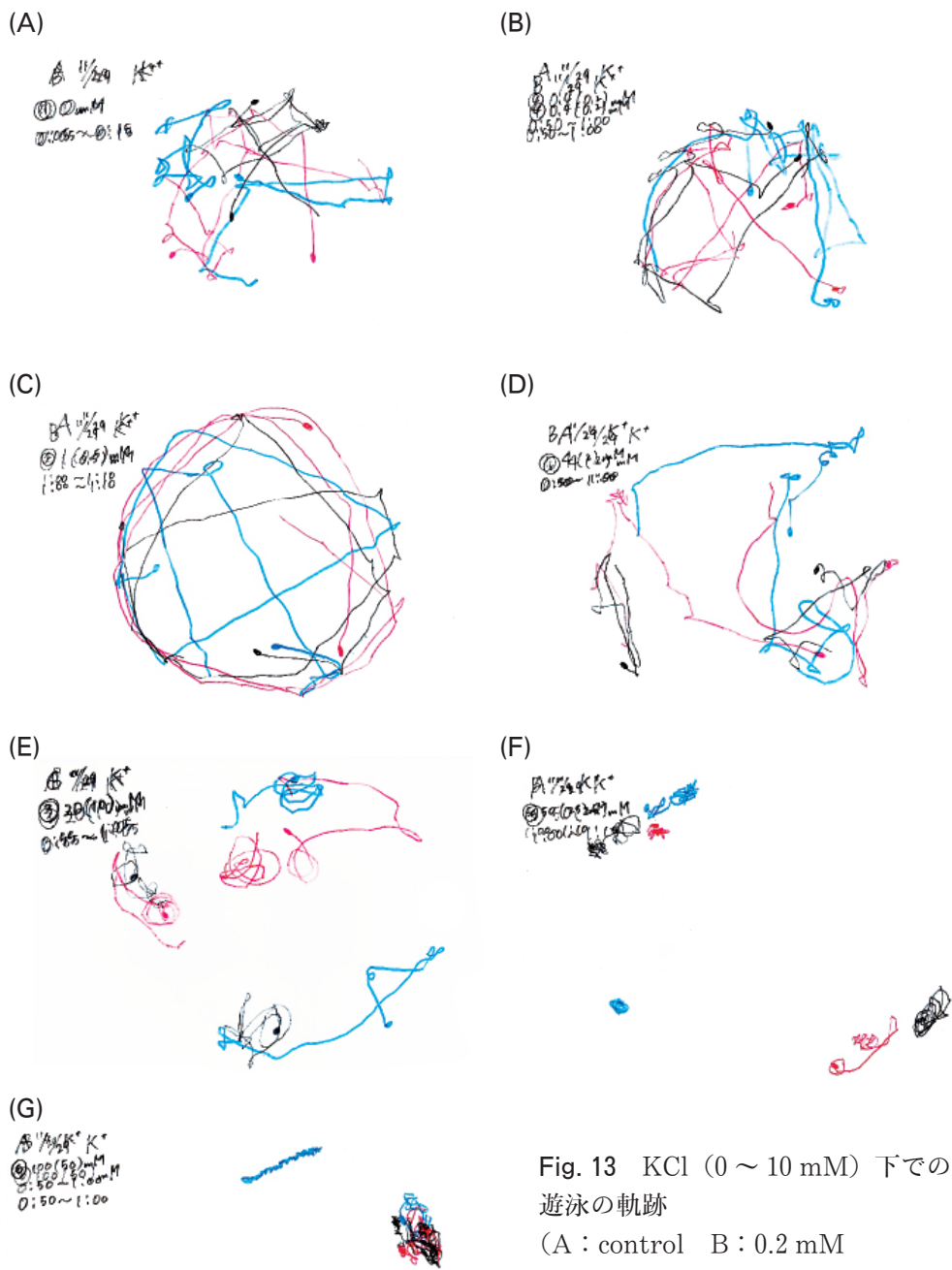


Fig. 13 KCl (0 ~ 10 mM) 下での遊泳の軌跡

(A : control B : 0.2 mM  
C : 0.5 mM D : 2 mM  
E : 10 mM F : 25 mM  
G : 50 mM KCl)

## 5. 考察

ゾウリムシは、通常は繊毛の打つ頻度や方向を変化させながら自由に泳いでいるが、生息する水環境によって、その繊毛運動が影響を受け、遊泳行動が変化することが知られている (3, 4)。本研究では、金属イオンに着目し、金属イオンによって繊毛運動が変化することで、どのような遊泳行動をするのかを、光学顕微鏡像を録画し、遊泳速度や運動軌跡を動画解析して調べた。

$\text{Ni}^{2+}$  については、0.1 mM の  $\text{NiCl}_2$  で停止したと報告されている (4, 6)。本実験では、 $\text{NiCl}_2$  濃度が 0.3 mM 以下では停止しなかったが、これは、当実験室で維持されているゾウリムシの  $\text{Ni}^{2+}$  に対する感受性の違いによる可能性も考えられた (Table 1)。一方、 $\text{NiCl}_2$  濃度が高いほど、ゾウリムシが停止する時間も早くなる傾向にあり、濃度に依存して  $\text{Ni}^{2+}$  がゾウリムシの繊毛運動を阻害していた (Fig. 2)。この作用は、 $\text{Ni}^{2+}$  が 14S ダイニンに直接作用することによって、可逆的な麻痺を誘発するためと報告されている (6)。Takenaka らは、 $\text{Ni}^{2+}$  によって誘導される *PcGST1* 遺伝子と *NCH16* 遺伝子があること、 $\text{Ni}^{2+}$  による遺伝子発現レベルの変化があることを示している (11)。また、 $\text{Ni}^{2+}$  処理により停止したゾウリムシは  $\text{Ca}^{2+}$  で回復することが知られている (4, 6)。実際に、 $\text{Ni}^{2+}$  処理により停止したゾウリムシに  $\text{Ca}^{2+}$  を加える実験を行ったが、ゾウリムシの遊泳が回復する  $\text{Ca}^{2+}$  には適切な濃度範囲があり、高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  では、ゾウリムシに毒性を示していた (Table 2)。また、回復した個体も見られたが、再び停止してしまっただけから、 $\text{Ca}^{2+}$  の遊泳回復の効果は一時的であると考えられた。

$\text{Ca}^{2+}$  自体については、5 ~ 20 mM の低濃度では、遊泳速度が大きくなり、それに伴い円運動が活発になり、後退運動をしていた (Table 3, Fig. 3, 4)。Sarvestani らは、ゾウリムシが  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存的な行動をするため、 $\text{Ca}^{2+}$  により泳ぎを効率的に制御できると報告している (12)。 $\text{Mg}^{2+}$  では、 $\text{Ca}^{2+}$  より低濃度の 0.5、0.625 mM でゾウリムシの遊泳速度が高まり、円運動もしていた (Table 4, 5, Fig. 5 - 7)。これは、 $\text{Ca}^{2+}$  に比べて濃度は低い、 $\text{Ca}^{2+}$  と同様の作用を示していると考えられた。しかし、25 mM と少し濃度が高まると通常の遊泳速度よりも小さくなり、回転運動が見られた (Fig. 8D)。 $\text{Na}^+$  では、0.2 ~ 0.5 mM の低濃度では、遊泳速度が大きくなり、円運動が活発になった (Table 6, Fig. 9)。また、50 ~ 100 mM の高濃度では、遊泳速度が小さくなり、それに伴い前後運動が活発になった。Oami らは、ゾウリムシが  $\text{Na}^+$  に対して少なくとも 2 種類の膜電位応答を示すことを報告している (13)。 $\text{K}^+$  では、0.5 mM の低濃度では、遊泳速度が大きくなり、それに伴い  $\text{Mg}^{2+}$  と同程度の反応の強さで円運動が活発になった (Table 8, Fig. 12)。また、10 ~ 50 mM の濃度では、遊泳速度が小さくなり、その場での回転運動が活発になった (Fig. 13E - G)。これは、同様な回転運動を見せた  $\text{Mg}^{2+}$  と比べて、同じ濃度において、より活発な回転運動であった。また、100 mM といったより高濃度では、何れの金属イオンでも停止や死亡が認められ、毒性を示していた。従って、ゾウリムシは、金属イオンにより、遊泳速度が最大になる濃度は異なっていたが、低濃度側で遊泳速度が大きくなり、液内の外

周を遊泳し続ける円運動となることがわかった。また、遊泳速度が小さくなることに伴って、 $Mg^{2+}$ 、 $K^+$  では回転運動が見られ、 $Na^+$  では前後運動が見られ、金属イオンによって違いがあることがわかった。従って、本実験より、いくつかの遊泳運動パターンが確認できた。

環境汚染物質の生物への影響は、様々な方法で調べられている。それと同時に、生物の形態や行動を指標として、環境汚染の状態を調査することも行われている。ゾウリムシは単細胞生物であり、物質の影響を1個体のレベルで受けることになる。ゾウリムシに対する影響は、ヒトを初めとする多細胞生物に対する、より複雑な影響とは異なる点も多い。一方、繊毛の構造は、すべての真核生物に共通するとされており、ゾウリムシの繊毛運動への影響を調べることは、他の生物に対する影響に通じる点もあると考えられた。従って、ゾウリムシの遊泳行動の観察は、環境汚染物質の影響評価の1つのツールとして用いることができるのではないかと考えた。荒木らは、ゾウリムシが酸性雨を想定した状態で、その場での回転運動をすることも観察し、ゾウリムシが水質汚濁モニターになるのではないかと報告している(14)。ゾウリムシの遊泳運動についてパターン化し、水質調査を行う採集水にゾウリムシを入れて、その遊泳運動を観察することで、水質汚染を調べる1つの指標として利用することができると考えられた。また、代表的な環境汚染の有機フッ素化合物である PFOS perfluorooctane sulfonate により、ゾウリムシの遊泳に影響が見られたという報告もあった(15)。一方、いくつかの繊毛虫類について、重金属に対する耐性を調べた結果では、ゾウリムシが必ずしも感受性が高いわけではなかったと報告されている(16)。今回、金属イオンがゾウリムシの遊泳行動にどのような影響を与えるか、動画解析を行い、様々な遊泳様式をとることを確認した。今後、様々な環境汚染物質に曝露し、その遊泳への影響、毒性評価をパターン化していきたい。

最近、大村らは、ゾウリムシより単純な形のテトラヒメナの遊泳運動について、固液境界面(壁面)でのシンプルな数理モデルで分類することができることを報告し、これはゾウリムシでも同様であることを確認した(1, 17, 18)。Jana らも、限られた空間内でのゾウリムシの遊泳を、詳細に解析している(19)。また、Mayne らは、水環境がナノ粒子で汚染されている際に、ゾウリムシに取り込ませることで浄化することができることを示し、ゾウリムシが水質浄化に寄与できると報告している(20)。ゾウリムシについては、今後さらに研究され、有用な単細胞生物として利用されることを期待したい。

## 参考文献

1. 大村拓也:実験と流体数値計算からアプローチする遊泳微生物の行動. 分子シミュレーション学会誌“アンサンプル”, 21, 67-71, 2019.
2. Yano J, Valentine MS, Van Houten JL. : Novel Insights into the Development and Function of Cilia Using the Advantages of the *Paramecium*



- Cell and Its Many Cilia. *Cells*, 4, 297-314, 2015.
3. 久富理、堀学：ゾウリムシを用いた研究から明らかになった繊毛のエネルギー供給と運動調節機構. *原生動物学雑誌*, 47, 13-27, 2014.
  4. Takahashi T, Ito A, Hasegawa Y. : A New Physiological Experiment for Non-Science Major Students : Arrest and Recovery of Ciliary Motility on Protozoa *Paramecium* Using Metal Ions. *The Hiyoshi review of the natural science*, 46, 43-55, 2009.
  5. Naitoh Y. : Reversal response elicited in nonbeating cilia of *Paramecium* by membrane depolarization. *Science*, 154, 660-662, 1966.
  6. Larsen J, Satir P. : Analysis of Ni<sup>2+</sup>-induced arrest of *Paramecium* axonemes. *J. Cell Sci.*, 99, 33-40, 1991.
  7. Naitoh Y, Kaneko H. : Reactivated Triton-extracted models of *Paramecium*: Modification of ciliary movement by calcium ions. *Science*, 176, 523-524, 1972.
  8. Nakaoka Y, Ooi H. : Regulation of ciliary reversal in Triton-extracted *Paramecium* by calcium and cyclic adenosine monophosphate. *J. Cell Sci.*, 77, 185-195, 1985.
  9. Schultz JE, Klumpp S, Benz R, Schürhoff-Goeters WJ, Schmid A. : Regulation of adenylyl cyclase from *Paramecium* by an intrinsic potassium conductance. *Science*, 255, 600-603, 1992.
  10. 針山孝彦ら編：研究者が教える動物飼育 第1巻 ゾウリムシ, ヒドラ, 貝, エビなど. 共立出版, 2015.
  11. Takenaka Y, Haga N, Inoue I, Nakano T, Ikeda M, Katayama S, Awata T. : Identification of two nickel ion-induced genes, *NCI16* and *PcGST1*, in *Paramecium caudatum*. *Eukaryot. Cell*, 13, 1181-1190, 2014.
  12. Sarvestani AN, Shamloo A, Ahmadian MT. : Simulation of *Paramecium* Chemotaxis Exposed to Calcium Gradients. *Cell Biochem. Biophys.*, 74, 241-252, 2016.
  13. Oami K, Takahashi M. : Membrane potential responses of *Paramecium caudatum* to external Na<sup>+</sup>. *Zoolog. Sci.*, 21, 1091-1097, 2004.
  14. 荒木勉、後藤繁、佐藤達也、近森憲助：ゾウリムシの遊泳と細胞蛍光を指標とした水質汚濁モニターの試み. *関西支部講演会講演論文集*, 77, 15-11-15-12, 2002.
  15. Kawamoto K, Nishikawa Y, Oami K, Jin Y, Sato I, Saito N, Tsuda S. : Effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on swimming behavior and membrane potential of *paramecium caudatum*. *J. Toxicol. Sci.*, 33, 155-161, 2008.
  16. Vilas-Boas JA, Cardoso SJ, Senra MVX, Rico A, Dias RJP. : Ciliates as model organisms for the ecotoxicological risk assessment of heavy metals: A meta-analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 199, 110669, 2020.

17. Ohmura T, Nishigami Y, Taniguchi A, Nonaka S, Manabe J, Ishikawa T, Ichikawa M. : Simple mechanosense and response of cilia motion reveal the intrinsic habits of ciliates. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 115, 3231-3236, 2018.
18. Nishigami Y, Ohmura T, Taniguchi A, Nonaka S, Manabe J, Ishikawa T, Ichikawa M. : Influence of cellular shape on sliding behavior of ciliates. Commun. Integr. Biol., 11, e1506666, 2018.
19. Jana S, Eddins A, Spoon C, Jung S. : Somersault of *Paramecium* in extremely confined environments. Sci. Rep., 5, 13148, 2015.
20. Mayne R, Morgan J, Whiting JGH, Phillips N, Adamatzky A. : On measuring nanoparticle toxicity and clearance with *Paramecium caudatum*. Sci. Rep., 9, 8957, 2019.