

繊毛虫 *Spirostomum ambiguum* の再生過程における
形態修復について

(Morphological reconstruction during cell regeneration
in the ciliate *Spirostomum ambiguum*)

島根大学大学院自然科学研究科

島田真帆

目次

第1章 序論.....	2
1-1. 生物の再生に関する研究.....	2
1-2. 細胞レベルの再生研究.....	5
1-3. スピロスタマムの再生.....	7
1-4. 本研究の目的.....	9
第2章 材料と方法.....	10
2-1. 培養方法.....	10
2-2. 切断方法.....	10
2-3. 切断した断片の光学顕微鏡観察.....	11
2-4. 走査型電子顕微鏡による切断面の形態観察.....	13
2-5. 透過型電子顕微鏡による観察.....	14
第3章 結果.....	17
3-1. 切断した断片の光学顕微鏡観察.....	17
3-2. 走査型電子顕微鏡による切断面の観察.....	19
3-3. 透過型電子顕微鏡による観察.....	20
第4章 考察.....	22
4-1. <i>S. ambiguum</i> は切断されても生存・再生し, 増殖する.....	22
4-2. 切断されても収縮胞形成に関する前後軸は維持される.....	23
4-3. 細胞口の形成.....	23
4-4. 大核を必要としない形態修復.....	24
4-5. 切断面の膜修復.....	25
4-6. 本研究のまとめ.....	27
4-7. 今後の展望.....	28
謝辞.....	29
参考文献.....	30
図表.....	35
付録.....	64

第1章 序論

1-1. 生物の再生に関する研究

1-1-1. 多細胞生物における再生と単細胞生物における再生

生物は、進化の過程で複雑な身体構造を獲得し、多様な環境での生活を可能にしてきた。進化の過程で獲得した能力の一つに「再生能力」がある。生物の再生現象は多細胞生物において広く知られているが、単細胞生物でも再生能力をもつものがある (Tang and Marshall, 2017)。多細胞生物において、生物が損傷した場合の多くは、損傷した部分の細胞が脱落し、新しい細胞が損傷した組織や器官を再形成することで再生する。一方、単細胞生物においては、損傷した細胞そのものが修復され、再生する。つまり、多細胞生物における再生は「組織レベル・器官レベルの再生」であるのに対し、単細胞生物における再生は「細胞レベルの再生」であると言える。

多細胞生物における再生現象については、扁形動物に属するプラナリア (Molina and Cebria, 2021) を始め、棘皮動物に属するヒトデ (Khadra et al., 2017) や、脊索動物の両生類に属するイモリ (Casco-Robles et al., 2021) やメキシコサンショウウオ (Abedini et al., 2024)、脊索動物の爬虫類に属するトカゲ (Alibardi, 2021)、脊索動物の哺乳類に属するシカ (Qin et al., 2023) など、幅広い種において研究が行われてきた。これらの生物については近年も積極的に研究が行われており、再生過程に関わる遺伝子などに関しても明らかになっている。しかしそのほとんどが「組織レベル・器官レベルの再生」を対象とした研究である。

一方単細胞生物においては、繊毛虫類や有孔虫類などの一部の原生生物が再生能力をもつことが知られている。しかし、近年は繊毛虫類の一種である *Stentor* を除いて、ほとんど研究が行われておらず、多細胞生物の再生研究に比べるとはるかに少ないのが現状である (Tartar, 1960; Marshall, 2021)。単細胞生物における再生メカニズムを明らかにすることで、多細胞生物における再生現象について細胞レベルでの理解を深めるとともに、単細胞生物から多細胞生物まで広くみられる再生現象の進化についても解明できる可能性がある。

また、現代の医療において、ヒトなどの多細胞動物が組織や器官を損傷した場合、移植などの損傷した部分を新しいものに置き換える治療法が主に行われている。しかし、移植には拒否反応や大がかりな手術による患者への負担、移植可能な臓器の提供を待つ間での病状悪化や死亡など、多くの問題点が残っている。拒否反応については、自己由来の iPS 細胞による治療法で大幅に改善すると思われ、実用化が急速に進められている。しかし、実用化されても患者からの体細胞採取、iPS 細胞の培養、移植などと治療に時間がかかるという問題点は残る。単細胞生物を用いた再生研究によって、損傷した細胞そのものが修復するメカニズムを明らかにすることで、多細胞動物においても損傷した細胞そのものを修復する、負担の少ない治療法の開発へと応用できる可能性がある。

1-1-2. 生物の再生における極性制御機構

生物が正常に再生するためには、様々な制御が必要であり、前後軸の決定もその一つである。多細胞生物においては、発生生物学の分野において極性の制御について多くの研究が行われている。再生現象における極性の制御に関しても様々な生物を対象に研究が進んでいる。

再生能力をもつ生物として最もよく知られているプラナリアにおいては、前後軸の決定に Wnt/ β -カテニンシグナル経路が重要であることが分かっている (Petersen and Reddien, 2008)。Wnt/ β -カテニンシグナルはプラナリアに限らず、両生類や魚類など様々な多細胞生物において再生過程や発生過程で重要な機能をもつ分子シグナルである (Stoick-copper et al., 2007; Yokoyama et al., 2007)。プラナリアの再生過程においては Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化は尾部の形成を誘導する働きをもつ。その制御システムや極性決定メカニズムについては分子レベルの研究がかなり進んでおり、Wnt/ β -カテニンシグナルの制御に Hedgehog シグナルが関与していることが示されている (Yazawa et al., 2009)。その後、プラナリアの損傷部で活性化される ERK シグナルが頭部の形成を誘導する働きをもち、Wnt/ β -カテニンシグナルが ERK シグナルを抑制することによって尾部の形成を誘導していることが示された (Umesono et al., 2013)。また、哺乳類の神経細胞においては細胞単位での極性決定についての研究が行われており、神経の極性決定は細胞内のシステムだけではなく、細胞外からのシグナルも関わっ

ていることが示されている(Yoshimura et al., 2006). つまり, 神経細胞の極性決定は細胞単体の独立したシステムではなく, 周辺の細胞などの影響を受けていることが示唆された. このように, 多細胞生物を用いた極性決定メカニズムに関する研究は, これまで多く行われてきたものの, そのほとんどが組織レベル・器官レベルの極性決定メカニズムについての研究である.

細胞レベルの極性決定メカニズムについては, *Paramecium* において繊毛列などの構造の極性が細胞皮質に依存すること(Beisson and Sonneborn, 1965)が示されている. また, *Stentor* においては, キナーゼ補助因子である Mob1 が前後軸の形成に関与すること(Slabodnick et al., 2014)などが示唆されているが, 細胞レベルでの極性の決定や制御機構についての研究は少ない.

本研究で対象とした *Spirostomum ambiguum* は細胞の後端部に巨大で明瞭な収縮胞をもち, 細胞の前後の識別が極めて容易である. この特徴は, 体表の模様対比などで極性を判断する *Stentor* 等と比較しても, 切断後の断片における極性を瞬時かつ定量的に判断できるという点において優位である. 本種は細胞レベルでの前後軸決定メカニズムの研究モデルとして極めて適しているが, 細胞の極性に特化した解析はこれまでほとんど行われていない.

1-1-3. 核による再生現象の制御

生物のさまざまな現象は, 主に核がもつゲノム情報によって制御されており, 細胞レベルの再生に関する研究においては, 度々核の重要性について示されてきた. Balamuth (1940) は様々な原生生物の再生現象についての総説において, いずれの生物も核を含む細胞断片のみが再生したと示した. *Stentor* では複数の研究において細胞口の再生には核が必要であることが示されており(Tartar, 1961; James, 1967), *Spirostomum* では核を含まない断片が2時間以内に死滅したことが示されている(Padmavathi, 1956). これらの先行研究により, 再生における核の必要性が強く示唆されている.

1-2. 細胞レベルの再生研究

1-2-1. 再生能力をもつ単細胞生物

「細胞レベルの再生」についての研究は、主に単細胞生物である原生生物を対象に行われてきた。Balamuth (1940)は、原生生物の中でも鞭毛虫類 (Mastigophora), 肉質虫類 (Sarcodina), 繊毛虫類 (Ciliophora), 放散虫類 (Radiolaria) など様々な分類の生物が再生能力をもつことを示している。中でも、運動器官 (繊毛) や摂食器官 (細胞口や膜板帯) が高度に分化している繊毛虫類は、再生研究に適していると考えられ、古くから「細胞レベルの再生」の材料として扱われてきた。

1-2-2. 繊毛虫の再生研究

繊毛虫類は、核分裂の様式の違いから2つの亜門に分けられ、さらに11の綱に分けられる (Gao et al., 2016)。Postciliodesmatophora 亜門は、*Loxodes* などが含まれる原始大核綱 Karyorelictea と、*Blepharisma*・*Stentor*・*Spirostomum* などが含まれる異毛綱 Heterotrichea に分けられる。Intramacronucleata 亜門は、旋毛綱 Spirotrichea, 被甲綱 Armophorea, *Dileptus anser* などが含まれるリトストマ綱 Litostomatea, 層状咽頭綱 Phyllopharyngea, *Bursaria truncatella* などが含まれるコルポダ綱 Colpodea, 梁口綱 Nassophorea, 前口綱 Prostomatea, プラギオピラ綱 Plagiopylea, *Frontonia leucas*・*Paramecium* などが含まれる貧膜口綱 Oligohymenophorea に分けられる (表 1)。

繊毛虫類の中では、異毛綱の *Blepharisma*, *Stentor*, *Spirostomum* や、リトストマ綱の *Dileptus anser*, コルポダ綱の *Bursaria truncatella*, 貧膜口綱の *Frontonia leucas*, *Paramecium* などを対象とした研究の報告がある。*Paramecium* については、系統によって再生能力が異なることや、切断する部分によって断片の生存率が異なることが示されている (Peebles, 1912)。Balamuth (1940)は細胞断片の体積と再生能力の関係に注目した研究を行い、*Dileptus anser* においては切断後の断片の体積が元の細胞体積の 1/30 を下回ると再生できなくなり、*Bursaria truncatella*・*Frontonia leucas* においても一定の相対体積を下回ると再生できないことを示した。

繊毛虫類の中でも異毛綱に属する種は特に再生能力が高く、また細胞が大きく顕微手術が容易なことなどから、「細胞レベルの再生」の研究のモデル生物として注目されている。異毛綱に属する *Blepharisma*, *Spirostomum*, *Stentor* は 19 世紀頃から再生現象についての研究が行われており、*Stentor* の再生現象についてはアメリカの研究グループを中心に近年も積極的に研究が行われている。

Blepharisma においては、顕微手術による細胞切断実験や融合実験の報告が複数あり (Giese, 1973; Kumazawa, 1979), Giese and McCaw (1963) は、切断後の温度操作によって *Blepharisma* の再生速度が 13 - 30°C で加速し、10°C を下回ると停止することを示した。

Stentor においては、顕微手術による細胞切断実験や融合実験 (Gruber, 1885; Tartar, 1961) だけでなく、再生過程に関わる遺伝子 (Sodd et al., 2022) などについても報告されている。Gruber (1885) は *S. coeruleus* を用いて、前後軸に対して垂直に 2 分割・3 分割に切断しても再生することや、細胞を十字に 4 分割に切断しても再生することを示した。Morgan (1901) は *S. coeruleus* の再生において様々な大きさの断片からの再生現象についての研究を行った。特に細胞口の大きさに着目した観察の結果、前後軸に対して垂直に切断した場合、前方断片は元の細胞口を保持するため断片の長さに対して大きすぎる口をもち、後方断片は新しい細胞口を形成するが断片の長さに対して小さすぎる口をもつことを示した。これらのアンバランスな細胞口は時間経過とともに縮小または成長し、正常なバランスに戻ることも示されている。Tartar (1954) は *S. coeruleus* を用いて細胞移植実験を行い、同種での細胞融合実験だけでなく、*S. polymorphus* を用いた異種細胞融合実験も行われた。同種でも異種でも容易に融合可能であることが示され、同種融合では複数の細胞口が形成されることが多く、融合後も個体としての性質を維持していたと示されている。一方、異種融合では体表の繊毛列などはうまく融合し調和がとれるが、器官形成や核の挙動は対立し不調和になると示した。Tartar は 20 世紀後半に *S. coeruleus* を用いて多くの再生に関する研究を行っており、再生現象と核の関係について、細胞後端の固着器(ホールドファスト)の再生には核が必要でないことや、細胞口の再生には核が必要であることを示した (Tartar, 1961)。また、断片に含まれる核の個数と細胞の機能に着目した研究も行い、細胞内の核が少なくなると細胞の機能が低下するが、核の個数が過剰になっても細胞機能が向上するわけではないことも示した (Tartar, 1963)。 *Stentor* の再生については細胞口に着目した報告が多くあり、James (1967) は RNA 合成阻害剤であるアク

チノマイシン D とタンパク質合成阻害剤であるプロマイシンを用いた薬剤阻害実験の結果、細胞口の再生には切断後の新規 RNA 合成とタンパク質合成が必要である可能性を示した。また、スクロース処理によって膜板帯の繊毛を除去し、再生過程を電子顕微鏡で観察した結果、再生された膜板帯が通常の細胞と同じ構造をもつことも示された (Paulin and Bussey, 1971)。また、真核生物に広く保存され、細胞分裂や形態形成、極性の制御、アポトーシスなどに関与しているキナーゼ補助因子である Mob1 に着目した研究が行われ、Mob1 が *Stentor* の形態形成や前後軸の形成に関与することが示唆された (Slabodnick et al., 2014)。この研究過程で *S. coeruleus* において Feeding RNAi の手法が確立され、*Stentor* の再生メカニズムについて分子レベルでの研究発展が期待された。その後実際に分子レベルでの研究がいくつか行われ、Sood et al. (2022) は *S. coeruleus* の再生過程において、時間経過によって発現する遺伝子が異なることを示した。さらに、再生過程の初期に発現する遺伝子は翻訳不要で発現することや、再生過程の後期に発現する遺伝子は初期に発現する遺伝子の産物に依存して発現するカスケード型の遺伝子発現であることを示した。また、再生過程の初期に発現する Pumilio (RNA 結合タンパク質) と E2F 転写因子に着目し、Pumilio が細胞口の大きさの制御に必須であることや、E2F 転写因子が再生の完了に必要なことを示した。さらにプラナリアの再生過程に発現する遺伝子とは相関関係がないことも示された。

1-3. スピロストマムの再生

1-3-1. *Spirostomum ambiguum* とは

本研究で対象とした *Spirostomum ambiguum* は、原生生物繊毛虫類異毛綱に属し、細胞長が 1 mm を超えることもある大型の単細胞生物である。淡水環境に生息し、細胞表面を覆う繊毛の運動によってらせん状に回転しながら遊泳する。細胞外からの物理的な刺激や化学的な刺激に対して、ねじれながら急速に縮む。細胞の前方から 2/3 - 3/4 の位置には細胞口があり、細胞の前端から細胞口にかけて膜板帯をもつ。膜板帯には繊毛が密集しており、繊毛運動で水流を起こすことでバクテリアなどを細胞口付近に集めて捕食する。細胞内部の後端部には

収縮胞をもち、細胞前端から収縮胞まで集水管が細く伸びている。集水管で細胞内の余分な水分を集め、収縮胞から細胞外に排出することで浸透圧調節を行っている。細胞内には「大核」と「小核」という機能が異なる 2 種類の核をもつ。大核はゲノムの一部のコピーであり、恒常的に発現するものや細胞分裂時に発現する遺伝子情報などが含まれている。小核は全ゲノムをもち、有性生殖である接合を行うときに用いられる。大核は細胞の前方から後方にかけて数十個の粒が数珠状に連なって存在しており、小核は大核の付近に複数個存在している。

1-3-2. *Spirostomum ambiguum* の再生研究

Spirostomum の再生についてもいくつか報告がある。Sokoloff (1924)は *S. ambiguum* において、再生可能な切断後の断片の限界体積は元の細胞体積の $1/63 - 1/69$ であることを示した。Day (1930)は *Spirostomum* の収縮胞に着目した研究の中で、大核を含まない細胞断片においても収縮胞が形成されたことを報告した。Seyd (1936)は *S. ambiguum* を用いて顕微手術を行い、切断面は 24 時間以内に丸まり正常な形態に近づくものがほとんどであると示した。また、完全な切断だけでなく切れ込みを入れる実験も行い、前後軸に垂直の切れ込みだけでなく前後軸に平行の切れ込み実験も行った。その結果、細胞の融合や吸収、分離などが観察された。前後軸に垂直に 2 つに切断すると前方断片の後端部に新しい収縮胞が形成されるが、後方断片の前端部には収縮胞は形成されないことも報告した。また、Padmavathi (1956)は *S. ambiguum* の分裂と核の挙動についての研究の中で、大核を含まない細胞断片は 2 時間後に死滅したと記述している。

1-4. 本研究の目的

前述したとおり, *Spirostomum ambiguum* は再生能力をもつ単細胞生物であり, 細胞が大きく切断が容易である. また, 細胞の後端部に収縮胞をもつことで細胞の前後の識別が極めて容易である. これらの点から「細胞レベルの再生」についての研究対象に適していると考えられる. しかしこれまでの研究報告は同じ繊毛虫類異毛綱に属する *Stentor* よりもはるかに少なく, 断片的である. そこで本研究では, スピロstromamの再生能力をより詳細に明らかにすることを目指した. 特に, 切断後の断片の増殖能力の有無や, 大核を含まない細胞断片の再生に注目し, 光学顕微鏡を用いた観察を行った.

単細胞生物における再生は, まず損傷した部分の膜が閉じて形態が戻る「修復」がおこり, そして繊毛列や細胞口などの構造や分裂機能などが戻る「再生」が起こる (Morgan, 1901). 単細胞生物が正常に再生・増殖するためには, まず細胞膜の修復が起こることが必須であると考え, 走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた観察から再生過程における膜の修復メカニズムを明らかにすることを目指した.

第2章 材料と方法

2-1. 培養方法

本研究では、広島県の極楽寺付近にある池(北緯 34°38'77.3", 東経 132°31'720")から採取し、研究室内で継代培養されてきた *Spirostomum ambiguum* を使用した。直径 9 cm のシャーレに 0.01 % Knop 氏液(組成は表 2)と熱処理をした麦粒 2-3 粒を入れる方法、もしくは直径 5 cm のシャーレにミネラルウォーター(Volvic®)と玄米粒を入れる方法で、20-25°Cで培養した。本研究の培養環境下において *S. ambiguum* は、麦粒または玄米粒の周辺に増えるバクテリアをエサとして捕食する。植え継ぎの際には、まず、新しいシャーレに新しい 0.01 % Knop 氏液またはミネラルウォーターと新しい熱処理をした麦粒または玄米粒を入れた。そこに古いシャーレから先細パスツールピペットを用いて細胞を移し、ピンセットで麦粒または玄米粒を 1 粒移した。古いシャーレには麦粒または玄米粒を補充した。植え継ぎは 1 週間~2 週間に 1 回を目安に行った。

2-2. 切断方法

先行研究においては、細胞の切断方法として、メス(Morgan, 1901)や極細ガラス針(Day, 1930; Tartar, 1954), 銅針(Padmavathi, 1956)などが用いられてきた。一方で、細胞を突いたり移動させたりする道具としては、つまようじの先にまつ毛をつけたものが用いられる。本研究を行うにあたって、予備実験として極細ガラス針とまつ毛を切断の道具として比較した。その結果どちらも再生過程において差がなかったため、本研究では操作性が容易なまつ毛を切断の道具として採用した。

自まつ毛またはつけまつげ(ポリエステル製, DAISO アイラッシュ(ベーシック, ブラック軸, 接着剤付, A10), Lot No. 1505CB, LAN コード:4549892096563)をつまようじの先端に接着して使用した(図 1A)。細胞を先細パスツールピペットでホールスライドガラスにのせ、実体顕微鏡下で押し切るように切断した(図 1B - D)。切断後にまつ毛を素早く引き上げると、まつ毛に

ついてきた細胞断片の切断面が水滴表面に触れて細胞内容物が流出し死滅してしまうことが多いため、切断後数秒間はまつ毛を水滴内で維持した。

2-3. 切断した断片の光学顕微鏡観察

2-3-1. 2つに切断した断片の増殖観察と倍加時間の計算方法

細胞を2つに切断し、各断片を直径5 cmのシャーレに1断片ずつ入れ、培養した。培養液として Volvic® を使用し、玄米粒を1粒加えて20-25°Cで最長で25日間培養した。切断から1, 3, 6, 9, 16, 25日後に各シャーレ内の細胞数を計測した。切断から25日後に細胞数が多くなったものは、細胞懸濁液と同量の酢酸アルコール(酢酸:エタノール=1:6)を加えて固定し、実体顕微鏡で写真を撮影して細胞数を計測した。対照として、切断していない細胞においても同様の方法で1細胞からの培養を行い、1細胞培養の開始から1, 3, 6, 9, 16, 25日後の細胞数を計測した。

対数増殖期(切断から9日後から25日後までの16日間)において、前方断片および後方断片、切断されていない細胞について、倍加時間を算出した。計算式は以下のとおりである。ここで、 $N(9)$ および $N(25)$ はそれぞれ、切断から9日後と25日後における細胞数を示す。

$$t = \frac{16 \times \log 2}{\log N_{(25)} - \log N_{(9)}}$$

2-3-2. 新しい収縮胞形成にかかる時間の計測

切断の瞬間から前方断片の後端に新しい収縮胞が形成されるまでの時間を計測した。新しい収縮胞の形成にかかる時間の計測は2人で行った。1人が細胞の切断と観察を行い、もう1人がストップウォッチの操作を行った。細胞を切断したタイミングと前方断片の後端に新しい収縮胞が形成されたタイミングで合図し、ストップウォッチで時間を計測した。

2-3-3. 3 つに切断した断片の観察

細胞を3つに切断した後、中央断片の前後に注意しながら実体顕微鏡を覗き続け、中央断片における収縮胞形成について観察した。各断片を別々に直径 3 cm のシャーレに入れ、培養した。培養液として 0.01 % Knop 氏液を使用し、煮沸した麦粒を 1 粒加えて 20-25 °C で 20 日間培養した。培養期間中は 2-3 日に 1 回以上は細胞数を計測した。

2-3-4. 小断片の観察

細胞の前端から切り出した、大核を含まないと思われる小断片を直径 3 cm のシャーレまたは 96 穴プレートで培養した。培養液として 0.01 % Knop 氏液またはミネラルウォーターを使用し、麦粒や玄米粒は加えずに 20 - 25 °C で培養した。切断から 1 日後または 2 日後に細胞の形態と遊泳性を光学顕微鏡で観察し、切断から 2 日後に細長い形態になっていたものに対しては、墨汁を用いた食胞形成の観察を行った。墨汁は市販のものを 10 分の 1 に希釈し、培養液に対しておよそ 100 分の 1 になるように添加した。観察後、酢酸オルセイン染色または微分干渉顕微鏡観察 (Nikon ECLIPSE 80i) によって大核の有無を確認した。

2-3-5. 光学顕微鏡観察像の撮影

光学顕微鏡による観察像は顕微鏡用デジタルカメラ (WRAYMER WRAYCAM-NOA2000) を用いて撮影した。

2-4. 走査型電子顕微鏡による切断面の形態観察

2-4-1. 水凍結乾燥法

Postciliodesmatophora 亜門に属する繊毛虫 (*Loxodes* などの原始大核綱 Karyorelictea や, *Blepharisma*・*Stentor*・*Spirostomum* などの異毛綱 Heterotricia) は, グルタルアルデヒド (GA) やパラホルムアルデヒド (PFA) を用いる従来の化学固定法では細胞の形態が十分に固定されないことが知られており (Seah, 2022), 化学固定液を使用しないサンプルの固定方法が模索されてきた (Foissner, 2014). 水凍結乾燥法は, 細胞懸濁液を瞬時に凍結し, 凍結したサンプルを真空乾燥させることで化学的な固定を伴わずにサンプルを固定する方法である (Ishida et al., 2022). 化学固定液による処理を行わないため, 試料作製時のアーティファクトがかなり少ない試料作製方法である. 本研究では, 走査型電子顕微鏡用の試料作製方法として水凍結乾燥法を採用した (付録 1).

アルミニウム製の試料台に直径 12 mm の導電性両面テープ (カーボン製, 日新 EM 株式会社) でスペーサーを張り付けた. スペーサーは厚さ 0.5 mm のシリコンシート (アズワン株式会社) から 10 mm と 7 mm の穴あけポンチ (株式会社スリーエッチ) を使用して切り出した. シリコンリングの内側に, 先細パストゥールピペットで細胞懸濁液 (サンプル + DW) をのせ, 水面がシリコンリングの高さと同じ高さになるように液量を調整した. ディープフリーザーで -80 °C に冷却した銅ブロックを試料台の真上から約 1 分間押しあて, サンプルを急速凍結した. 凍結したサンプルを t-ブチル乾燥機を用いて真空乾燥し, オスミウムコーターでオスミウムをコーティングした.

2-4-2. 走査型電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡 (日立, S-4800) を用いて観察した. 切断していない細胞の両端と, 切断後 30 秒, 切断後 40 -50 分, 切断後 3 時間, 切断後 24 時間の切断面の観察を行った. 加速電圧は 5 kV で行った.

2-5. 透過型電子顕微鏡による観察

2-5-1. GA-OsO₄ 二重固定法

前固定液 (GA 固定液) と後固定液 (OsO₄ 固定液), リンス液を作製した (表 3). コーティングガラス管もしくはセラムチューブに細胞懸濁液を入れ, 等量の前固定液を加えて軽く振って混ぜた. 前固定液を加えてから 30 秒後に, 細胞懸濁液 + 前固定液の全量と等量の後固定液を加え, 軽く振って混ぜた. 時々振りながら 30 分間おいて細胞を固定した. 上澄みを捨ててリンス液を加え, 軽く振って混ぜた. 時々振りながら 15 分間おいて細胞を洗浄した. 上澄みを捨てて DW を加え, 軽く振って混ぜた. 5 分後, もう一度上澄みを捨てて DW を加え, 軽く振って混ぜた. 5 分後, 上澄みを捨てて, アルコールシリーズによる脱水を行った. 脱水過程はセラムチューブ内で行った. アルコールシリーズは 50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 98 %, 100 % のアルコールを使用し, 各濃度 15 分間ずつおいた. 15 分間はローテーターを使用して混和し続けた. 100 % アルコールは 3 回行った.

2-5-2. 加圧凍結置換法

2-4-1. で記述した通り, 一部の繊毛虫は化学固定法では細胞の形態が十分に固定されない. 本研究では凍結したサンプルを化学固定液に浸す凍結置換法によって試料作製を行った. サンプルを凍結してから化学固定液に浸すことで固定液が浸透する過程で起こる変形を抑えることができる. 凍結は加圧凍結装置 Leica EM ICE を用いた加圧凍結を行った. 高圧 (加圧) 状態で凍結することで, 凍結時の氷晶形成を抑えることができる. 専用の金属製のキャリア (直径 3 mm, 高さ 300 μ m) に細胞懸濁液をのせ, もう一つのキャリアを同じ向きで被せた. プラスチック製のホルダーでキャリアを挟んで機械内に取り込ませ, およそ 2,000 bar の高圧 (加圧) 状態で凍結した. サンプルは凍結後, プラスチックホルダーごと自動的に機械内の液体窒素タンクに送られる. 液体窒素のタンクを取り出し, 液体窒素で満たした別容器内でプラスチックホルダーからキャリアを取り出した. キャリアを 2 % オスミウムアセトンが入ったセラムチューブに入れ, -80 $^{\circ}$ C 以下で 48 時間以上おいて凍結置換を行った (ディープフリーザーもしくは凍結置換装置 CRYO POTER CS-80C). 凍結置換装置で自動的に, もしくは手動 (家庭用

冷凍庫-20 °Cで1時間以上, 家庭用冷蔵庫 4 °Cで30分以上, 室温で30分以上)で室温に引き上げた後, アセトンで洗浄した.

2-5-3. 樹脂包埋

化学固定法(GA-OsO₄ 二重固定法)もしくは加圧凍結置換法によって固定したサンプルを用いた. アルコールシリーズによる脱水またはアセトン洗浄を終えたサンプル液が入ったセラムチューブに, サンプル液と等量の Spurr 樹脂(Polysciences, Inc., 表 4)を加えて, ローテーターで30分間混和し続けた. 30分後, 小型遠心機で遠心して上澄みを半量捨て, 等量の Spurr 樹脂を加えて, ローテーターで30分間混和し続けた. 30分後, 小型遠心機で遠心して上澄みを捨て, Spurr 樹脂を加えてローテーターで30分間混和し続けた. 30分後, 再度小型遠心機で遠心して上澄みを捨て, Spurr 樹脂を加えてローテーターで30分間混和し続けた. 30分後, 1細胞ずつシリコン型に並べる, もしくは複数細胞をビームカプセルに入れて遠心してカプセルの先端に集めた状態にした. あらかじめ70 °Cに温めた恒温器で8時間加熱し, 硬化した.

2-5-4. 切片の作製

硬化したサンプルをカミソリやマイクローム(Leica EM UC7, ガラスナイフを使用)で成型した. 1細胞ずつ平板包埋したサンプルはビームカプセルで硬化した樹脂を削って土台を作り, 土台に接着したうえで成型した. 接着には2液性の接着剤を用いた. 成型した樹脂ブロックから, マイクロームを用いてガラスナイフで厚さ90 nmの超薄切片を切り出した. 切り出した切片を, ネオプレン W で処理した銅製のグリッド(Polysciences, Inc., 2 × 1 mm)に貼ったフォルムバーの支持膜の上にのせた. 切片をのせたグリッドをEMステイナーで15分間染色し, よく洗浄した. さらにクエン酸鉛で5分間染色し, よく洗浄した.

2-5-5. 透過型電子顕微鏡観察

透過型電子顕微鏡(日立, H-7100)を用いて観察した. 切断していない個体, 切断 30 秒後 (GA-OsO₄ 二重固定法), 切断 5 分後 (GA-OsO₄ 二重固定法, 加圧凍結置換法), 切断 20 分後 (GA-OsO₄ 二重固定法), 切断 30 分後 (GA-OsO₄ 二重固定法) 切断 40 分後 (GA-OsO₄ 二重固定法, 加圧凍結置換法), 切断 50 分後 (GA-OsO₄ 二重固定法) 切断 3 時間後 (加圧凍結置換法) のサンプルについて, 観察を行った. 加速電圧は 75 kV で行った.

第3章 結果

3-1. 切断した断片の光学顕微鏡観察

3-1-1. 2つに切断した細胞の再生

2つに切断された細胞断片は、前方・後方のどちらの断片も切断後も遊泳を継続した。断片をつつくと収縮する様子もみられた。切断後の両断片の形態変化を時間経過とともに図2に示した。切断直後の前方断片(図2B)には収縮胞がみられなかった。その後前方断片の後端部に新しい収縮胞が形成された(図2C)。前方断片において切断から新しい収縮胞が形成されるまでの時間を計測したところ、 88 ± 33 秒(平均±標準偏差)で必ず断片の後端部に新しい収縮胞が形成された($n = 22$, ここで「 n 」は切断後に新しい収縮胞が形成するまでの時間を計測した細胞数を示す)。前方断片において切断後に新しく形成された収縮胞が収縮し、正常に機能していることも確認した。後方断片においては、切断部分である断片の前端部に収縮胞が形成されることはなく、切断前から細胞内に存在した収縮胞が正常に機能し続けた(図2E)。両断片ともに切断直後は切断面が直線的であったが(図2B および図2Eの矢頭部分)、切断から1日後には正常な細胞と同様に切断面が丸みを帯びていた(図2D および図2Fの矢頭部分)。

2つに切断した各断片の増殖観察の結果を図3に示した。14細胞を切断し、それぞれ1断片ずつ培養した。前方断片においては、切断から6日後には14断片中13断片が生存していたが、増殖していた断片はなかった。切断から9日後には14断片中3断片が増殖し、切断から25日後には14断片中4断片が増殖していた。25日後の細胞数は、最も多いもので199細胞であった。後方断片においては、切断から6日後には14断片が全て生存していたが、増殖していた断片はなかった。切断から9日後には14断片中2断片が増殖し、切断から25日後には14断片中5断片が増殖していた。25日後の細胞数は、最も多いもので660細胞であった。また、同一細胞由来の前方断片・後方断片の両方が通常細胞と同様に増殖したものが1例確認された(図3A および Bの赤丸)。切断していない個体では10細胞について1細胞からの培養を行った。培養開始から1日後、10細胞中1細胞が増殖していた。培養開始から

9 日後には 10 細胞全てが生存し、10 細胞中 2 細胞が増殖していた。切断から 25 日後には 10 細胞中 4 細胞が増殖していた。25 日後の細胞数は、最も多いもので 481 細胞であった。対数増殖期における倍加時間(平均±標準偏差)は、前方断片では 2.4 ± 0.086 日、後方断片では 2.7 ± 0.98 日、通常細胞では 2.0 ± 0.078 日であった。そのうち最も増殖したものの倍加時間は、前方断片では 2.4 日、後方断片では 1.9 日、通常細胞では 2.0 日であった。なお、本データの一部は既報(Shimada et al., 2024)であるが、同論文中の通常細胞の倍加時間の記載「2.9 日」は誤記であり、正しくは本論文に記載の「2.0 日」である。

3-1-2. 3 つに切断した細胞の再生

3 つに切断された細胞断片は、前方・中央・後方のいずれの断片も切断後も遊泳を続けた。断片をつつくと収縮する様子もみられた。細胞を 3 つに切断した場合の断片の形態変化を図 4 に示した。切断直後の前方断片および中央断片においては収縮胞がみられなかった。その後数分以内に前方断片(図 4A)および中央断片(図 4B)において断片の後端部で新しい収縮胞が形成された。3 つに切断する実験は複数回行ったが、前方断片および中央断片において新しく形成される収縮胞は必ず断片の後端部に形成され、どの断片においても断片の前端部に新しい収縮胞が形成されることはなかった。

4 つの細胞を 3 つに切断し、各断片を別々に培養した。前方断片においては 4 断片中 1 断片、中央断片においては 4 断片中 1 断片、後方断片においては 4 断片中 2 断片のみで増殖が確認された。また、同一細胞由来の前方・中央・後方のいずれの断片も増殖したものが 1 例観察された。

3-1-3. 小断片の再生

37 細胞の前端から大核を含まないよう小さい断片を切り出した。切断から 1 日後、37 断片中 27 断片が生存していた。切断から 2 日後には 37 断片中 12 断片(32%)が生存し、そのうち 7 断片(58%)は切断から 2 日後に細長い通常の細胞に似た形態を示した(表 5)。酢酸オルセイン染色または微分干渉顕微鏡による観察の結果、細長い形態を示さなかった小断片に

については、全ての断片において大核がみられなかった。一方で、2 日後に細長い形態を示した7つの小断片については、断片内に大核を含むものが5断片、大核を含まないものが2断片であった。2 日後に細長い形態を示したものについて、大核を含まない小断片の形態変化の例と、大核を含む小断片の形態変化の例をそれぞれ図 5, 図 6 に示した。大核を含まない小断片においても、図 2 や図 4 で示した大きな断片と同様に、切断後数分以内に新しい収縮胞を形成することが観察された(図 5A)。切断から2 日後に細長い形態を示した細胞は、大核の有無に関わらず、通常細胞と同様に機能する収縮胞をもち、遊泳していた(図 5B, 図 6)。切断から2 日後に丸い形態のままだった細胞においても繊毛の運動は確認されたが、通常細胞と同様に遊泳するものはほとんどなかった。切断から2 日後に細長い形態を示した小断片のうち、食胞の形成が確認されたのは7断片中2断片であった(図 6B)。食胞を形成した2つの小断片はいずれも断片内に大核を含んでいた。これらの細胞は大核の有無を確認する過程でほとんどが死滅したため、長期的な観察は行わなかった。

3-2. 走査型電子顕微鏡による切断面の観察

損傷した細胞が修復し再生するためには、まず細胞膜の修復が必要となる。そこで、電子顕微鏡を用いて再生過程の膜修復の様子を観察した。試料作製には一般的な化学固定法よりもアーティファクトの少ない水凍結乾燥法を用いた。切断後の切断面の走査型電子顕微鏡による観察像を図 7-14 に示した。切断直後(5分以内)、前方・後方どちらの断片においても、繊毛の無い膜(図 7-13 中の矢印)が切断面を覆い始めていた(図 7, 8)。いくつかの細胞においては繊毛の無い膜は切断面を完全に覆ってはおらず、部分的に細胞の内部が露出していた(図 7B'および図 8A', 8D'のアスタリスク)。膜が破れている部分には、直径 1.5 - 7.7 μm の球状の粒や直径 14 μm の球状の粒がみられた。切断部分は切断時に押しつぶされたまま膜が融合したような直線状、または切断方向が分かるような楕円形に近い形をしており、その長径は細胞の幅とほぼ同じで短径の2倍以上を示した。切断から40 - 50分後には、切断面がほぼ完全に繊毛の無い膜で覆われていたが(図 9, 10)、前方断片の切断面においてわずかに膜が破れている部分がみられた(図 9A'のアスタリスク)。膜が破れている部分の大きさは

0.8 – 4.9 μm であった. いくつかの細胞においては, 切断面の繊毛の無い膜の部分に体表の繊毛列から離れた繊毛がみられた(図 9A', 9B'の白矢頭). 切断面は楕円形に近い形や円形をしており, その長径は細胞の幅より短いものがほとんどであった. 切断から 3 時間後においても切断面に繊毛の無い膜がみられた(図 11, 12). いくつかの細胞においては, 切断面の繊毛の無い膜の部分に体表の繊毛列から離れた繊毛がみられた(図 11B'の白矢頭). 切断面は楕円形に近い形をしており, その長径は細胞の幅のおよそ半分かそれ未満であった. 切断から 24 時間後には, 個体によっては繊毛の無い膜の部分が残っていたものもあったが(図 13B), ほとんどは切断面が繊毛で覆われ, 損傷部の修復がほとんど完了していた(図 13, 14). 繊毛の無い膜が残っていた切断面は円形に近い形をしており, その直径は細胞の幅のおよそ 1/7 であった.

3-3. 透過型電子顕微鏡による観察

試料作製は GA-OsO₄ による化学固定法および加圧凍結置換法によって行った. 図 15 に化学固定法および加圧凍結置換法によって作製したサンプルの TEM 像を示した(図 15A, 15D は化学固定法, 図 15B, 15C, 15E は加圧凍結置換法によって作製). 化学固定法によって作製したサンプルにおいては, 細胞全体が均一に固定され, 細胞内部には多数の空胞がみられた(図 15A). 加圧凍結置換法によって作製したサンプルにおいては, 細胞内に固定が良好な部分(図 15B のアスタリスク)と不良な部分が見られた. また, 細胞が割れているものもみられた(図 15C). 細胞の表面に近い部分には大きな空胞はみられず, 繊毛列や繊毛の様子は化学固定法および加圧凍結置換法のどちらのサンプルにおいても固定の状態は良好であった. 図 16 には化学固定法および加圧凍結置換法によって作製したサンプルのミトコンドリア(図 16A, 16B)および大核(図 16C, 16D)の TEM 像を示した. 化学固定法によって作製したサンプルにおいては, ミトコンドリア(図 16A の黒矢頭)および大核(図 16C の黒矢頭)のどちらも均一に固定されていた. 加圧凍結置換法によって作製したサンプルのミトコンドリアにおいては, 固定が良好なもの(図 16B の黒矢頭)と不良なもの(図 16B の白矢頭)が見られた. 大核においても固定状態にはばらつきがみられ, 細胞の表面に近い部分は固定が良好な一方で

(図 16D の黒矢頭), 細胞の内部側は固定が不良であった(図 16D の白矢頭).

通常の繊毛列部分の観察像を図 17 に, 切断後の切断面付近の観察像を図 18 - 20 に示した. 図 17 - 20 のサンプルは加圧凍結置換法によって作製した. 通常の繊毛がある部分においては, 繊毛列の間にミトコンドリアがみられ, 大小さまざまな空胞がみられた(図 17). 細胞膜の表面には毛羽立ち状の構造がみられた(図 17 の黒矢頭). 切断直後(5 分以内)には, 切断部分周辺の細胞膜が破れて断片化し(図 18 の矢印), 切断部分から細胞内容物が流出していた. 切断から 40 分後には, 切断面が細胞膜で覆われていた(図 19). 切断面を覆う細胞膜には繊毛や繊毛列の内側にみられる構造が観察されなかった. 切断面を覆う細部小膜の表面には毛羽立ち状の構造がみられた(図 19A' の黒矢頭). 切断部分の内側には, ミトコンドリアなどの細胞小器官や通常の細胞内にみられる大きな空胞などがみられず, 150 - 1500 nm の小胞が密集していた(図 19A' の白矢頭). 小胞の膜の内側には毛羽立ち状の構造は見られなかった. 切断から 3 時間後にも切断部分の内側に小胞がみられた(図 20A' の白矢頭). 小胞が集まるエリアは切断から 40 分後よりも狭くなっていた. 切断から 3 時間後のサンプルにおいても, 切断から 40 分後と同様に, 切断面を覆う細胞膜の表面には毛羽立ち状の構造がみられ(図 20A' の黒矢頭), 切断部分の内側に集まる小胞の膜の内側には毛羽立ち状の構造は見られなかった(図 20A' の白矢頭). 切断後に切断面を覆う細胞膜表面の毛羽立ち状の構造や, 切断部分の内側に小胞が集まる様子は化学固定法によって作製したサンプルにおいても観察された(図 22). 切断から 30 秒後, 5 分後, 20 分後, 30 分後, 40 分後の断片においても化学固定法によって作製したサンプルの観察を行ったが, 脱水および置換過程の乾燥や染色時のコンタミネーションなどの原因により, 良好なサンプルは得られなかった. 一部サンプルの TEM 像を図 23 に示した.

第4章 考察

4-1. *S. ambiguum* は切断されても生存・再生し, 増殖する

S. ambiguum は2つに切断されても両断片ともが泳ぎ続け, 再生した(図2). これは Sokoloff (1924) や Seyd (1936) の結果と良く一致した. また, これまでの研究では再生した細胞の生存期間や増殖については言及されていなかったが, 本研究により, 切断されて再生した断片も約1か月は生存し, 増殖も可能であることが明らかとなった. 本研究の増殖実験において期間中に最も増殖した断片および細胞の倍加時間は, 前方断片では2.4日, 後方断片では1.9日であり, 通常細胞の2.0日との間に顕著な差は見られず, 切断後も通常の細胞と同程度に増殖できる機能を維持していることが示された. また, 2つまたは3つに切断された同じ細胞由来の各断片においてもそれぞれが再生後に増殖したことも観察され, *S. ambiguum* の高い再生能力が改めて示された. これまでの細胞レベルの再生研究において, 再生現象における核の重要性が示唆されてきた. *S. ambiguum* は細胞の前端から後端にかけて数十個の大核をもつため, 2つや3つに切断されても各断片に十分な量の大核が含まれることが再生能力の高さに繋がっているのではないかと考えられる.

今回の増殖実験においては, 細胞の増殖が始まるまでに約1週間の遅れが生じた. これは, 培養開始時に培養液中に餌となるバクテリアが少なかったことが要因であると考えられる. この過程で一部の細胞は死滅したが, 切断された細胞と切断されていない細胞の両方で約47%の細胞が生存した. 切断された細胞と切断されていない細胞の生存率には大きな差はなく, 培養開始時の餌が少なかったことは切断が増殖に与える影響について議論するうえでは大きな問題点ではないと考える. また, 本研究の培養方法は, 麦粒などの周囲に増えるバクテリアをエサとして用いており, その種類や量は必ずしも安定しているとはいえない. そのため, 通常の培養条件下においてもシャーレごとに増殖状況に相違が生じることが多々ある. 特に, 今回の増殖実験で後方断片の標準偏差(0.98)が大きい要因として, エサ環境や, 切断後の回復から最初の分裂を開始するまでの時間に大きな個体差が生じたことなどが考えられる. こうした不安定要因を解消し, 再現性の高い安定的な培養系を確立するため, 現在, 所属研究室で

はエサバクテリアの種類の特定期や適切な給餌量に関する検討が進められている。

4-2. 切断されても収縮胞形成に関する前後軸は維持される

細胞を2つに切断すると、切断されて収縮胞を失った前方断片において、切断から数分以内に新しい収縮胞が必ず断片の後端部に形成された。また、後方断片においては元の収縮胞が機能し続け、断片の前端部に新しい収縮胞が形成されることはなかった。この結果は Seyd (1936) の報告と一致した。また、細胞の前端部も後端部も持たない断片においても、収縮胞は必ず断片の後端部に形成され、収縮胞形成に関わる前後軸が切断後も維持されていることが示唆された。細胞の極性は細胞内の mRNA やタンパク質などの局在や濃度勾配 (Slabodnick et al., 2014; Tang and Marshall, 2017)、細胞皮質の構造 (Beisson and Sonneborn, 1965) といった様々なものに依存している。*S. ambiguum* の収縮胞は細胞内の前端から後端の収縮胞まで伸びている集水管の後方に水が集められることで形成される (Day, 1930)。収縮胞形成に関わる前後軸は集水管の構造そのものに依存し、切断されても集水管の機能が維持されることで断片の後端部に収縮胞が形成される可能性が考えられる。

4-3. 細胞口の形成

S. ambiguum は細胞の前方から 2/3-3/4 の位置に細胞口をもち、細胞の前端から細胞口にかけて膜板帯をもつ。細胞を前後軸に対して垂直方向に細胞を半分に切断すると、前方断片は細胞口を失い、後方断片には元の細胞口が残る。細胞口が機能しているかを調べるために、培養液中に墨汁を添加し、墨汁粒子を含む食胞の形成を観察する方法がよく用いられる。この方法を用いて、前方断片と後方断片の食胞観察を行った所属研究室の先行研究がある (又野, 2024 卒論)。この研究では市販の墨汁を 10 倍に希釈した後透析処理を行い、培養液中に 1,000 倍~2,000 倍希釈になるように添加された。その結果、前方断片においては最も速いもので切断から 16 時間後に食胞が観察され、後方断片においてはほとんどが切断から 30 分以内に食胞が観察された。この研究により、切断によって細胞口を失った前方断片は切断

から 16 時間以内に細胞口を新しく形成し、捕食機能を回復していることが示唆されている。また、後方断片は切断後も元の細胞口の機能を維持していることも明らかになった。

本研究では、細胞の前端から切り出した小断片において、食胞が観察され(図 6B'の白矢頭)、細胞口の再形成・捕食機能の回復が確認された。食胞を形成した2つの小断片はどちらも断片内に大核を有しており(図 6B'のアスタリスク)、大核を含まない小断片においては食胞の形成はみられなかった。この結果は、少なくとも捕食機能の回復には大核が必要であることが示唆される。これは *S.ambiguum* と同じ繊毛虫類異毛綱に属する *Stentor* において、細胞口の再生には大核が必要である(Tartar, 1961)という先行研究の内容と一致する。

4-4. 大核を必要としない形態修復

細胞の前端から切り出した大核を含まない小断片においても、切断から数分以内に収縮胞が形成された。これは、Day (1930) の結果を再確認するものとなった。また、本研究の結果では、大核を含まない断片は切断から 2 日後にも生存し、通常の細胞に似た細長い形態をもち活発に遊泳する様子を確認した。これは収縮胞の形成だけでなく、細胞の基本的な形態や運動機能の維持において大核が必須ではないことを示している。一方で Padmavathi (1956)は、大核を含まない小片は 2 時間以内に死滅したと示しており、これは本研究の結果と異なる。*S.ambiguum* は分裂時に大核の形状が大きく変化する。通常は細胞内に数珠状に連なっている大核の粒は、分裂初期には細胞中央付近に凝集し、1 つの塊となる(Padmavathi, 1956)。先行研究は *S.ambiguum* の分裂と核の関係についての研究に付随して行われた実験であり、分裂初期の大核が細胞中央に集まった細胞を対象に行われた。一方で、本研究では大核が数珠状に連なって存在している状態の細胞を対象に行った。通常時の細胞と分裂初期の細胞内に発現している遺伝子は異なると考えられるため、用いた細胞の周期の違いが大核を含まない断片の生存期間の違いにつながったと考えている。

前述したとおり、細胞口の修復は大核を有する断片でのみ観察された。これは細胞口の修復には断片内に核が存在すること、つまり転写が起こることが必要である可能性を示唆しており、これまで *Stentor* などを対象に行われてきた先行研究の内容と一致する。一方で、収縮胞

の形成や細胞の基本的な構造や運動機能の維持には大核が必要ではないことが示唆された。すなわち、本種の修復には、大核を必要としない構造依存の修復と、大核を必要とする遺伝子依存の修復があることが示された。

4-5. 切断面の膜修復

SEM による観察の結果、*S. ambiguum* は切断後に損傷部分を急速に繊毛の無い膜で覆うことで細胞内容物の流出を極力防いでいることが明らかになった(図 7 および図 8)。再生能力をもたない *Paramecium multimicronucleatum* の切断面を SEM で観察すると、本種とは対照的に切断面が閉じることなく、細胞内容物が流出して死へと至る(図 24)。つまり、損傷部分を急速に覆って細胞内容物の流出を防ぐことが、細胞が再生するための重要な点の一つであると考えられる。しかし、*S. ambiguum* の切断面において細胞内部が露出している部分がみられる(図 7B' および図 8A', 8D' のアスタリスク)。これは試料作成時のアーティファクトである可能性があり、繊毛の無い膜が構造的に脆弱である可能性を示唆している。一方で、光学顕微鏡レベルでの観察において、少量の細胞内容物の流出が確認された断片も遊泳を続け、その後再生することを確認している。つまり、この細胞内部の露出によって多少の細胞内容物の流出が起きても、断片の生存に大きな影響はないと考えられる。損傷部分を覆う繊毛の無い膜の部分は次第に繊毛に覆われて狭くなり、切断から 24 時間前後で修復を完了する。図 13B の前方断片は切断から 24 時間後でも繊毛の無い膜の部分がみられるが、これは断片ごとの再生速度の違いであると考えている。*Stentor* においては、断片内の核の数が再生速度に関係することが分かっており、核の数が少ないと再生速度が遅くなることが示されている(Tartar, 1963)。このことから、図 13B の断片内に含まれる大核の数が少なかった可能性が考えられる。

S. ambiguum を TEM で観察すると、細胞内に大小さまざまな空胞がよくみられる。小さな空胞は細胞全体で観察されるが、通常の細胞では図 19 や図 20 のように密集している部分はみられない。切断後に切断面を覆う繊毛の無い膜の由来については、2 つの可能性が考えられる。1 つ目は、損傷部分の周辺の細胞膜が伸展し損傷部分を覆う可能性である。繊毛は細胞膜直下で隣接する繊毛と結びつき、細胞骨格構造として比較的動きにくい構造をしている(石田・島野, 2025)。流動性の高い脂質で構成される細胞膜のみが動くことで損傷部分が覆われ

ている可能性が考えられる。2 つ目は、細胞内部の小胞膜が融合して損傷部分を覆う可能性である。切断後に細胞内の小胞が損傷部分付近で細胞の内側から細胞表面の膜に融合し、損傷部分周辺の膜の面積を増やすことで損傷部分を覆っている可能性が考えられる。この場合は、小胞膜の内側が細胞表面となる。TEMの観察像において膜の構造に着目すると、通常の繊毛列部分の細胞膜の表面には、毛羽立ち状の構造がみられた(図 17 の黒矢頭)。そして、切断部分を覆う繊毛の無い膜の表面にも、通常の繊毛がある部分の細胞膜と同様に、毛羽立ち状の構造がみられた(図 19A'の黒矢頭および図 20A'の黒矢頭)。一方で、切断後に損傷部分の内側に集まる小胞の膜の内側には、毛羽立ち状の構造がみられなかった(図 19A'の白矢頭および図 20A'の白矢頭)。また、切断後の断片において、繊毛列の構造の部分では細胞内の小胞が細胞表面の膜に融合する様子は観察されたが(図 21)、損傷部分では小胞が融合する様子は観察されなかった。これらの結果から、切断後に切断面を覆う繊毛のない膜は、主に損傷部分の周辺の細胞膜が伸展して形成されている可能性が高いと考えている。また、SEMの観察像において、損傷部分の繊毛の無い膜の表面に、繊毛列から離れた繊毛がみられた例がいくつかあった(図 9A', B'および図 11B'の白矢頭)。前述したとおり、通常は繊毛は細胞膜直下で隣接する繊毛と強く結びついており、新しい繊毛が形成される際もすでにある繊毛のすぐ隣に新しい基底小体が形成され、そこから繊毛が伸びるため、スピロストマムにおいては繊毛列から離れた位置に単独の繊毛がみられることはほとんどない。図 9A', B'および図 11B'でみられた繊毛列から離れた繊毛は、切断によって隣接する繊毛との結びつきが弱くなり、損傷部分周辺の細胞膜が動いた際に流された可能性が考えられ、繊毛の無い膜が損傷部分周辺の細胞膜が伸展することで形成されているという仮説の根拠の一部となりうる。

本研究では透過型電子顕微鏡の試料作製を、加圧凍結置換法および化学固定法によって行った。2-4-1 で記述したように、本研究で対象とした *S. ambiguum* などの一部の繊毛虫は、化学固定液を用いた処理によって細胞の収縮などの変形が起こる。そこで、細胞を凍結させてから固定液に浸して処理する凍結置換法も併せて採用した。凍結方法は冷却した金属に圧着するメタルコンタクト法や冷却液体(窒素やプロパンなど)に浸す浸漬法などがあるが、凍結時の氷晶形成によるアーティファクトが大きい。今回は氷晶形成を抑えるために高圧状態で凍結し、メタルコンタクト法および浸漬法(プロパン)による凍結置換法や化学固定法(GA-OsO4 二重固定法)で作製した試料の様子との比較を行った。加圧凍結によって作製したサンプルにおいて、細胞全体が良好に凍結されているものはほとんどなかったものの、細胞の表

面付近の構造などは凍結が良好な部分もみられた(図 15). ミトコンドリアの凍結状態にはばらつきがあるものの, 凍結が良好なものにおいては繊毛虫のミトコンドリアの特徴である管状のクリステがみられた(図 16B). メタルコンタクト法および浸漬法によって作製したサンプルについては細胞全体において凍結はあまり良好ではないものの, ごく一部分においては良好に凍結することもあった(付録 2). 凍結の良好な部分は, 加圧凍結によって作製したサンプルの方が細胞の深部まで及んでいることが多かった. 化学固定法によって作製したサンプルの固定状態と比較すると, 細胞全体の固定状態がより良いのは化学固定法であるが, 化学固定液による処理での変形が懸念点である. 加圧凍結置換法は, 細胞深部の微細構造を観察するには課題の残る手法である. しかし, 細胞表層の構造を保持する能力は非常に優れている. したがって, 本研究が対象とした切断部分の修復過程を高解像度で捉える目的においては, 本手法は極めて有効な手段であったと言える.

4-6. 本研究のまとめ

本研究では, 繊毛虫 *Spirostomum ambiguum* を用いた「細胞レベルの再生」についての研究を行った. *S. ambiguum* は切断されても生存し, 正常に再生・増殖する. 切断によって収縮胞を失った断片においては, 切断から数分後に断片の後端部に新しい収縮胞が形成される. 収縮胞の形成は大核を含まない小断片においても確認され, 大核を有さずとも少なくとも 2 日間は生存し, 活発に遊泳する細長い形態を示した. これらの結果から, 収縮胞の形成や運動機能の維持には大核が必要ないことが示唆された. 切断によって細胞口を失った断片においては, 断片内に大核が含まれる場合は修復がみられた. この結果から, 細胞口の修復には大核が必要であることが示唆された. 切断面は切断直後に繊毛の無い膜で覆われ, 細胞内容物の流出を防いでいることが明らかになった. 繊毛の無い膜の面積は時間経過とともに狭くなり, 切断から約 24 時間で繊毛に覆われ, 切断面の修復が完了する. 繊毛の無い膜は損傷部分の周辺の細胞膜が伸展し形成されている可能性が示唆された.

S. ambiguum はその細胞の大きさによる顕微手術の容易さや収縮胞をもつことによる前後の識別の容易さなどから, 「細胞レベルの再生」, 特に細胞レベルの形態修復や極性決定に関する研究モデル生物に適していると考えられる. しかしながら, *S. ambiguum* の再生現象に

ついでの研究は 20 世紀半ばから途絶えており、それまでの研究報告も断片的なものであった。本研究から、切断された各断片が正常に増殖できることや、大核を必要としない形態修復や機能の維持があることなどが明らかになり、*S. ambiguum* の再生能力の高さが改めて示された。

4-7. 今後の展望

本研究によって示唆された収縮胞形成に関わる前後軸の存在や、大核を必要としない形態修復などのメカニズムについては、細胞内に広く分布する微小管などの構造に対する阻害実験などを行うことで解明できるのではないかと考えている。また、切断後の膜修復については、より細かい時間軸での観察を行うとともに、切断前の細胞膜表面や繊毛を識別するなどして繊毛の無い膜の由来やその後損傷部分を覆う繊毛の由来について明らかになるのではないかと考えている。

S. ambiguum と同じ繊毛虫類異毛綱に属する *Stentor coeruleus* においては、再生現象についての研究が近年も積極的に行われており、分子レベルでの研究手法が確立されつつある。一方で *S. ambiguum* においては、再生研究に限らず分子レベルでの研究報告はまだ少ない。しかし過去に取得したシングルセルによるトランスクリプトーム解析データがあるため、今後は *Stentor* での研究を参考にして *S. ambiguum* においても再生過程での遺伝子発現などについての研究を行うことで、細胞の再生に関わる遺伝子の特定につながると考えられる。

細胞レベルの再生メカニズムが明らかになることで、ヒトにおける再生医療など、多細胞生物における細胞単位での修復技術に応用されることを期待している。

謝辞

本研究は, JST SPRING JPMJSP2155 および, JSPS 科研費 JP24KJ1708, JP22H04926 の助成を受けたものです. これらの助成に, 深く感謝いたします.

本研究を行うにあたって, 多くの方々にご指導およびご支援を賜りました. ここに深く感謝いたします.

まず, 主指導教員である島根大学大学院 石田秀樹准教授には, 日々の研究活動すべてにおいて多大なるご指導・ご支援をいただきました. また, 共同研究者である早川昌志氏, 神戸大学大学院 洲崎敏伸教授にも多くのご指導・ご支援をいただきました. 北海道大学大学院 早川卓志助教授にはトランスクリプトーム解析に関する技術指導を賜りました. 国立研究開発法人理化学研究所 豊岡公德上級技師, 同研究所 佐藤繭子技師, 同研究所 後藤友美氏には加圧凍結装置の技術補助を賜りました. さらに, これまでの研究過程で協力・助言をいただいた所属研究室のみなさま, そしていつも応援してくれていた家族にも心から感謝いたします.

参考文献

- Abedini, A.A., Hosseini, F., Laurencin, C.T., 2024. Regeneration Engineering of a Lim: From Amputation to Regeneration. *Regen. Eng. Transl. Med.* 10,461-479.
<https://doi.org/10.1007/s40883-023-00323-z>.
- Alibardi, L., 2021. Introduction to the Study on Regeneration in Lizards as an Amniote Model of Organ Regeneration. *J. Dev. Biol.* 9(4),51. <https://doi.org/10.3390/jdb9040051>.
- Balamuth, W., 1940. Regeneration in protozoa: a problem of morphogenesis. *Quart. Rev. Biol.* 15, 290-337. <https://doi.org/10.1086/394611>.
- Beisson, J., Sonneborn, T.M., 1965. Cytoplasmic inheritance of the organization of the cell cortex in *Paramecium aurelia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 53:275-282.
<https://doi.org/10.1073/pnas.53.2.275>.
- Casco-Robles, M.M., Yasuda, K., Yahata, K., Maruo, F., Chiba, C., 2021. Reviewing the Effects of Skin Manipulations on Adult Newt Limb Regeneration: Implications for Subcutaneous Origin of Axial Pattern Formation. *Biomedicines* 9(10), 1426.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9101426>.
- Day, H.C., 1930. Studies on the contractile vacuole in *Spirostomum* and *Paramecium*. *Physiol. Zool.* 3, 56-71. <https://doi.org/10.1086/physzool.3.1.30151085>.
- Foissner, W., 2014. An update of ‘basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliate protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 271-292.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.057893-0>.
- Gao, F., Warren, A., Zhang, Q., Gong, J., Miao, M., Sun, P., Xu, D., Huang, J., Yi, Z., Song, W., 2016. The All-Data-Based Evolutionary Hypothesis of Ciliated Protists with a Revised Classification of the Phylum Ciliophora (Eukaryota, Alveolata). *SCIENTIFIC REPORTS.* 6: 24874. <https://doi.org/10.1038/srep24874>.

- Giese, A.C., 1973. *Blepharisma*. The biology of a light-sensitive protozoan. Stanford University Press, Stanford, CA. <https://doi.org/10.1126/science.180.4093.1355.b>.
- Giese, A.C., McCaw, B., 1963. Regeneration rate of *Blepharisma* with special reference to the effect of temperature. *J. Protozool.* 10, 173-182 <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1963.tb01658.x>.
- Grüber, A., 1885. Über künstliche Teilung bei Infusorien. II. *Biol. Zentralbl.* 5, 137–141.
- Ishida, H., Matsumoto, C., Shimada, M., Suzaki, T., 2022. SEM observation of non-fixed and water freeze-dried *Spirostomum ambiguum*. *Eur. J. Protistol.* 85, e125896 <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2022.125896>.
- James, E.A., 1967. Regeneration and division in *Stentor coeruleus*: the effects of microinjected and externally applied actinomycin D and puromycin. *Dev. Biol.* 16, 577–593. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(67\)90065-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(67)90065-6).
- Khadra, Y.B., Sugni, M., Ferrario, C., Bonasoro, F., Coelho, A.V., Martinez, P., Carnevali, M.D.C., 2017. An integrated view of asteroid regeneration: tissues, cells and molecules. *Cell Tissue Res* 370, 13-28. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2589-9>.
- Kumazawa, H., 1979. Homopolar grafting in *Blepharisma japonicum*. *J. Exp. Zool.* 207, 1–15. <https://doi.org/10.1002/jez.1402070102>.
- Marshall, W.F., 2021. Regeneration in *Stentor coeruleus*. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, e753625 <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.753625>
- Molina, M.D., Cebria, F., 2021. Decoding Stem Cells: An Overview on Planarian Stem Cell Heterogeneity and Lineage Progression. *Biomolecules* 11(10), 1532. <https://doi.org/10.3390/biom11101532>.
- Morgan, T.H., 1901. Regeneration of proportionate structures in *Stentor*. *Biol. Bull.* 2, 311–328. <https://doi.org/10.2307/1535709>.

- Padmavathi, P.B., 1956. "Fission zone" in *Spirostomum ambiguum*. *Experientia* 12, 382–383.
<https://doi.org/10.1007/BF02157280>.
- Paulin, J.J. Bussey, J., 1971. Oral Regeneration in the Ciliate *Stentor coeruleus*: A Scanning and Transmission Electron Optical Study. *J. Protozool.* 18(2), 201-215.
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1971.tb03308.x>
- Peebles, F., 1912. Regeneration and Regulation in *Paramecium caudatum*. *Biol. Bull.* 23, 154-170. <https://doi.org/10.1126/science.180.4093.1355.b>.
- Petersen, C.P., Reddien, P.W., 2008. Smed1- β catenin-1 is Required for Anteroposterior Blastema Polarity in Planarian Regeneration. *Science.* 319, 327-330.
<https://doi.org/10.1126/science.1149943>.
- Qin, T., Zhang, G., Zheng, Y., Li, S., Yuan, Y., Li, Q., Hu, M., Si, H., Wei, G., Gao, X., Cui, X., Xia, B., Ren, J., Wang, K., Ba, H., Liu, Z., Heller, R., Li, Z., Wang, W., Huang, J., Li, C., Qiu, Q., 2023. A population of stem cells with strong regenerative potential discovered in deer antlers. *Science* 379, 840-847.
<https://doi.org/10.1126/science.add0488>.
- Seah, B.K.B., Emmerich, C., Singh, A., Swart, E.C., 2022. Improved methods for bulk cultivation and fixation of *Loxodes* ciliates for fluorescence microscopy. *Protist* 173, e125905. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2022.125905>.
- Seyd, E.L., 1935. Studies on the regulation of *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. *Arch. Protistenkd.* 86, 454–470.
- Slabodnick, M.M., Ruby, J.G., Dunn, J.G., Feldman, J.L., DeRisi, J.L., Marshall, W.F., 2014. The kinase regulator Mob1 acts as a patterning protein for *Stentor* morphogenesis. *PLoS Biol.* 12, e1001861. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001861>.
- Sokoloff, B., 1924. Das Regenerationsproblem bei Protozoen. *Arch. Protistenkd.* 47, 143–252.

- Sood, P., Lin, A., Yan, C., McGillivray, R., Diaz, U., Makushok, T., Nadkarni, A.V., Tang, S.K.Y., Marshall, W.F., 2022. Modular, cascade-like transcriptional program of regeneration in *Stentor*. *eLife* 11, e80778. <https://doi.org/10.7554/eLife.80778>.
- Stoick-cooper, C.L., Weidinger, G., Riehle, K.J., Hubbert, C., Major, M.B., Fausto, N., Moon, R.T., 2007. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Dev.* 134, 479-489. <https://doi.org/10.1242/dev.001123>.
- Tang, S.K.Y., Marshall, W.F., 2017. Self-repairing cells: how single cells heal membrane ruptures and restore lost structures. *Science* 356, 1022–1025. <https://doi.org/10.1126/science.aam6496>.
- Tartar, V., 1954. Reactions of *Stentor coeruleus* to homoplastic grafting. *J. Exp. Zool.* 127, 511–575. <https://doi.org/10.1002/jez.1401270306>.
- Tartar, V., 1961. *The Biology of Stentor*. Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-01654-4>.
- Tartar, V., 1963. Extreme Alteration of the Nucleocytoplasmic Ratio in *Stentor coeruleus*. *J. Protozool.* 10(4), 445-461. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1963.tb01704.x>.
- Umesono, Y., Tasaki, J., Nishimura, Y., Hroudá, M., Kawaguchi, E., Yazawa, S., Nishimura, O., Hosoda, K., Inoue, T., Agata, K., 2013. The molecular logic for planarian regeneration along the anterior-posterior axis. *Nature*. 500, 73-76. <https://doi.org/10.1038/nature12359>.
- Yazawa, S., Umesono, Y., Hayashi, T., Tarui, H., Agata, K., 2009. Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 106:22329-22334. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907464106>.
- Yokoyama, H., Ogino, H., Stoick-Cooper, C.L., Grainger, R.M., Moon, R.T., 2007. Wnt/ β -catenin signaling has an essential role in the initiation of limb regeneration. *Dev. Biol.* 306, 170-178. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.014>.

Yoshimura, T., Arimura, N., Kaibuchi, K., 2006. Signaling Networks in Neuronal Polarization. *J.*

Neurosci. 26(42), 10626-10630. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3824-06.2006>.

石田正樹, 島野智之 繊毛虫類の形態用語と高次分類体系 2025年 原生物 第8巻
第1号

又野菜月 切断後のスピロスタムの口部装置再生時間に関する研究 2024年卒業論文

図表

表 1: 繊毛虫の分類

繊毛虫類は、核分裂の様式の違いにもとづいて大きく2つの亜門に分けられ、さらに11の綱に分けられる。

Postciliodesmatophora	Karyorelictea	原始大核綱
ポストキリオデスマトフォラ亜門	Heterotrichea	異毛綱
Intramacronucleata	Spirotrichea	旋毛綱
イントラマクロヌクレータ亜門	Armophorea	被甲綱
	Litostomatea	リトストマ綱
	Phyllopharyngea	層状咽頭綱
	Colpodea	コルポダ綱
	Nassophorea	梁口綱
	Prostomatea	前口綱
	Plagiopylea	ブラギオピラ綱
	Oligohymenophorea	貧膜口綱

表 2: 1 % Knop 氏液の組成.

1 % Knop 氏液をストックし, DW で 100 倍に希釈して使用した.

24 mM	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
14 mM	KNO_3
6 mM	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
10 mM	KH_2PO_4

表 3: 前固定液 (GA 固定液), 後固定液 (OsO₄ 固定液), リンス液の組成.

前固定液・後固定液は 2 倍濃度で作製し, サンプル液と 1:1 で混ぜて使用した.

〈前固定液 (GA 固定液)〉

		2倍濃度	最終濃度
1 M	HEPES	100 mM	50 mM
25%	glutaraldehyde	6%	3%
1 mM	MgSO ₄	40 μM	20 μM
100 mM	sucrose	4 mM	2 mM
	DW		

〈後固定液 (OsO₄ 固定液)〉

		2倍濃度	最終濃度
1 M	HEPES	100 mM	50 mM
4%	OsO ₄	1%	0.50%
1 mM	MgSO ₄	40 μM	20 μM
100 mM	sucrose	4 mM	2 mM
	DW		

〈リンス液〉

		最終濃度
1 M	HEPES	50 mM
1 mM	MgSO ₄	20 μM
100 mM	sucrose	2 mM
	DW	

表 4: Spurr 樹脂の組成.

ERL-4221 (3,4-Epoxy cyclohexanecarboxylate), D.E.R. (Dow epoxy resins), Grade 736, Nonenyl Succinic Anhydride (NSA), Dimethylaminoethanol (DMAE)を以下の分量で混和した.

ERL-4221	5 g
D.E.R. 736	3 g
NSA	13 g
DMAE	0.2 g

表 5:細胞の前端から切り出した小断片の観察結果

切断から 2 日後に生存していた 12 細胞における 2 日後の細胞の形態・細胞の縦横比・断片内の大核の有無・食胞形成の有無の観察結果. ここでは, 細胞の前後軸方向の長さが細胞の幅の 3 倍以上である細胞を細長い形態とした. ND は観察を行っていないことを示す.

2日後の細胞の形	縦横比	大核	食胞形成
細長い	3.5	×	ND
丸い	ND	×	ND
丸い	1.1	ND	ND
細長い	6.6	○	○
細長い	7.4	○	○
細長い	4.4	○	×
細長い	5.0	○	×
細長い	5.6	○	×
細長い	3.1	×	×
丸い	1.1	×	ND
丸い	ND	ND	ND
丸い	ND	ND	ND

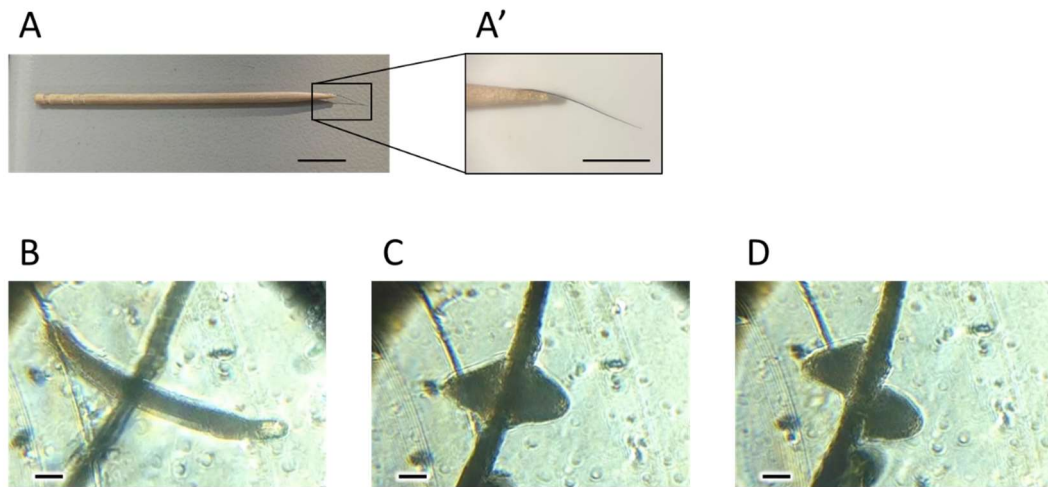


図 1: 切断方法

A は切断に使用した道具. つまようじの先に自まつ毛またはつけまつげを接着して使用した. B - D は切断の様子を顕微鏡の接眼レンズ越しに撮影したもの. この撮影は生物顕微鏡下で行ったが, 実験中の切断は実体顕微鏡下で行った. スケールバーは 1 cm (A), 5 mm (A'), 100 μm (B - D)を示す.

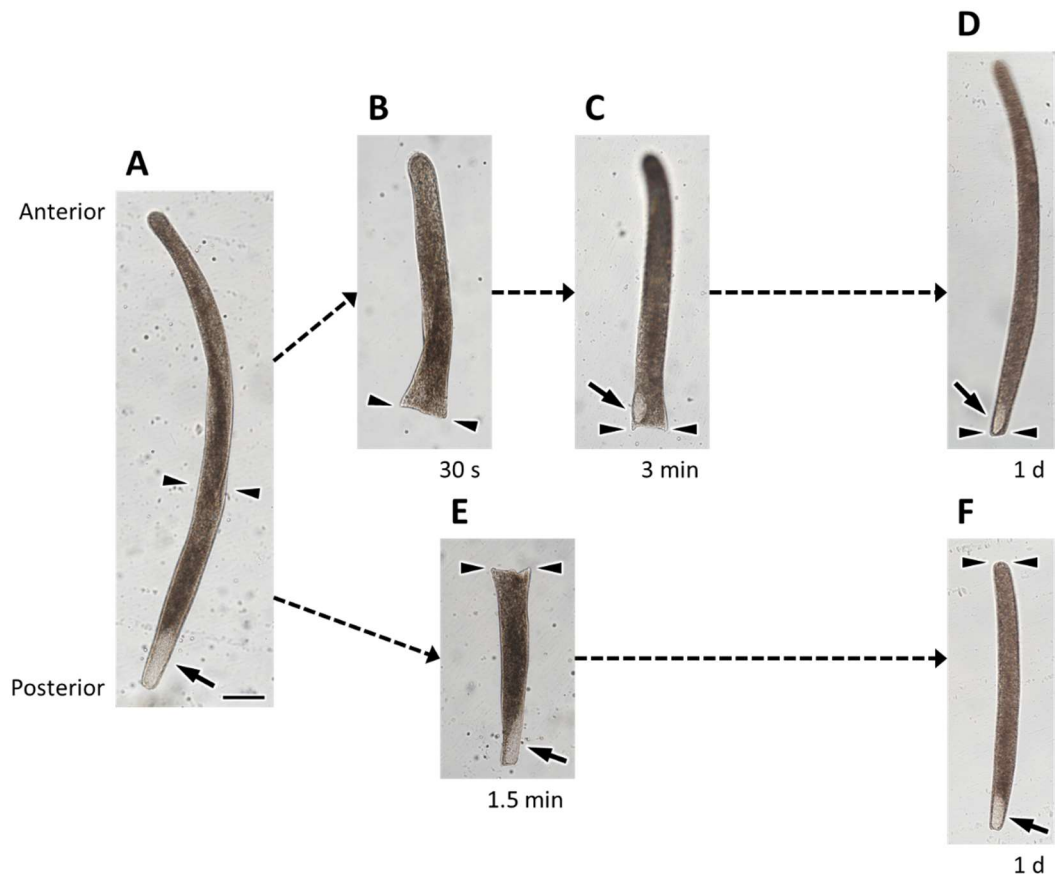


図 2:2 つに切断した各断片の形態変化.

A は切断前の細胞, B は切断から 30 秒後の前方断片, C は切断から 3 分後の前方断片, D は切断から 1 日後の前方断片, E は切断から 1 分 30 秒後の後方断片, F は切断から 1 日後の後方断片の形態を示す. 矢頭は切断部分を示し, 矢印は収縮胞を示す. スケールバーは 100 μm を示す.

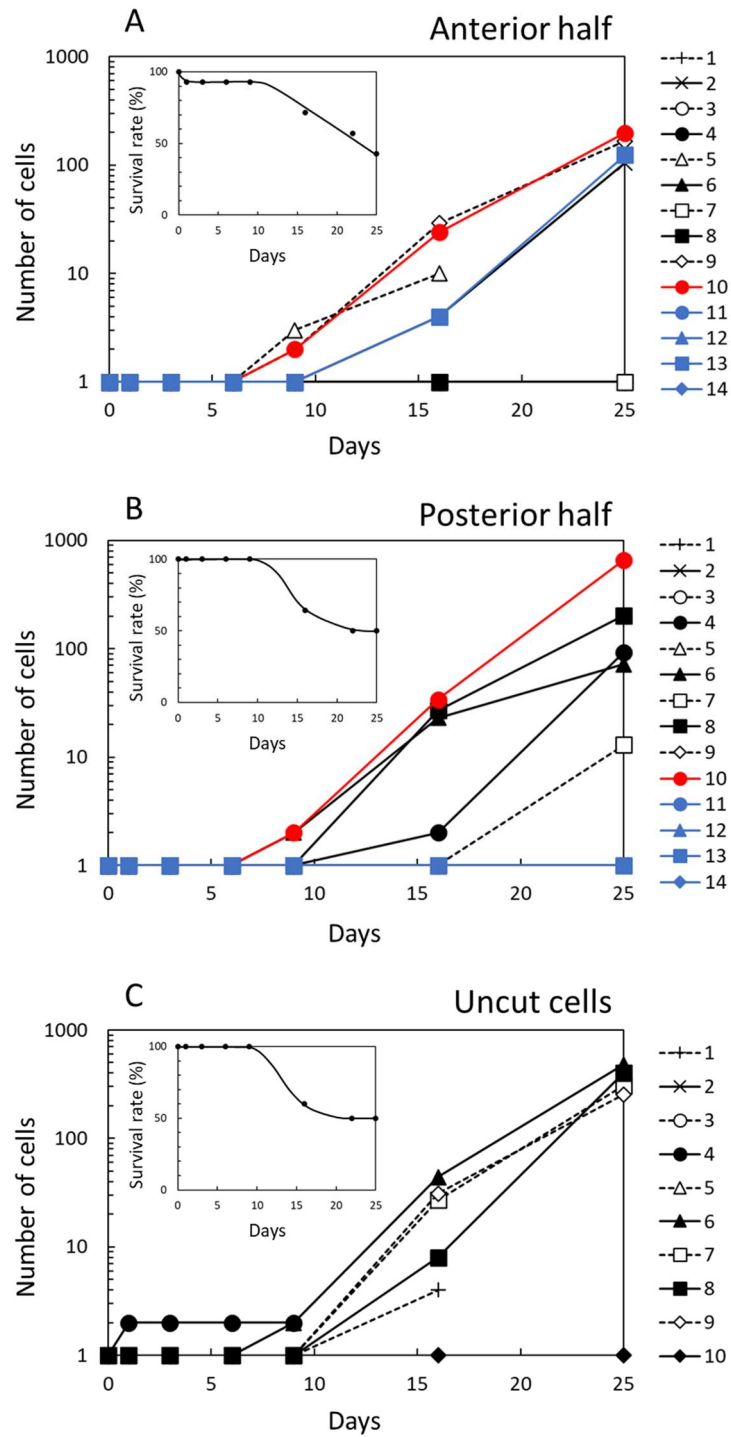


図 3:2 つに切断した各断片および切断していない細胞の増殖の様子。

A は前方断片, B は後方断片, C は切断していない細胞の増殖曲線を示す. 各グラフ中, 左上のグラフは, 増殖観察期間中の生存率を示す. A および B において, 同じマーカーは同一細胞由来の前方断片・後方断片を示す.

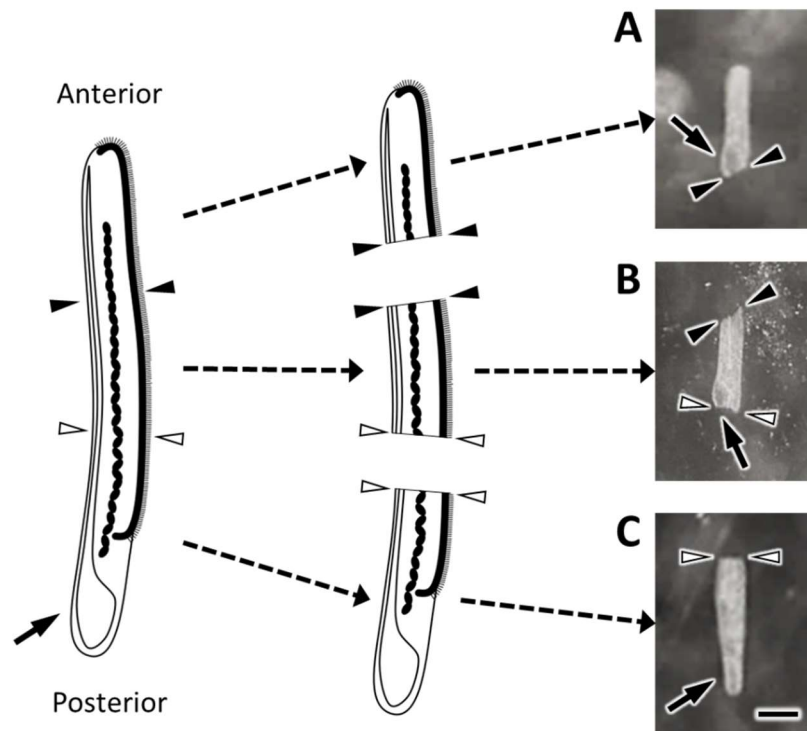


図 4:3 つに切断した各断片の図.

A は切断から数分後の前方断片, B は切断から数分後の中央断片, C は切断から数分後の後方断片を示す. 矢頭は切断部分, 矢印は収縮胞を示す. スケールバーは 100 μm を示す.

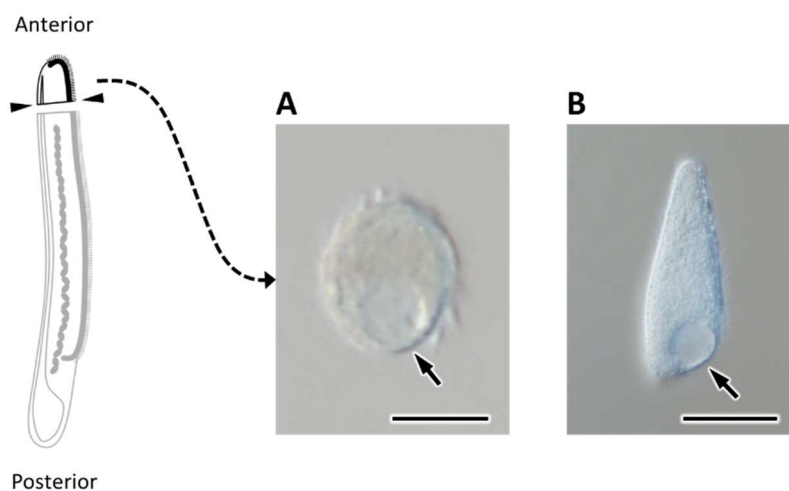


図 5: 細胞の前端から切り出した大核を含まない小断片の形態変化(微分干渉顕微鏡像).

A は切断から数分後の小断片, B は切断から 2 日後の小断片を示す. 矢頭は切断部分, 矢印は収縮胞を示す. スケールバーは 50 μm を示す.

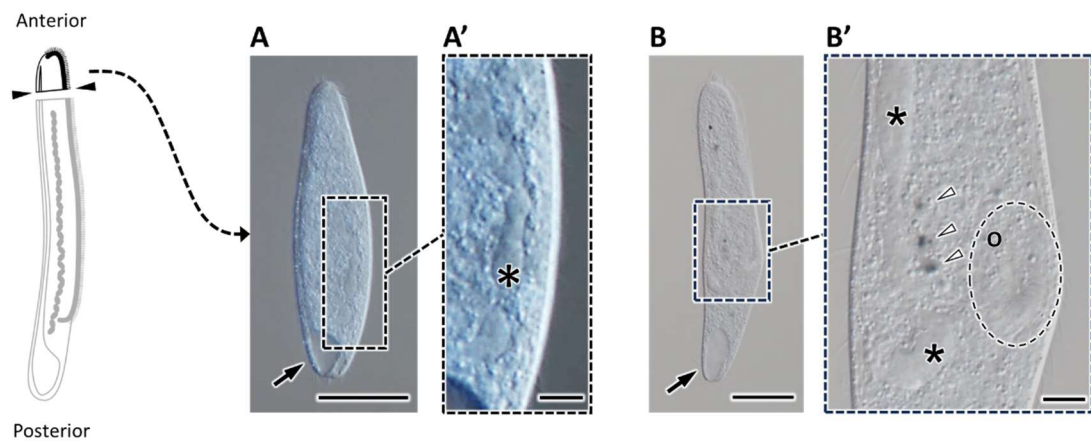


図 6: 細胞の前端から切り出した大核を含む小断片の微分干渉顕微鏡像.

A, B は切断から 2 日後の小断片を示す. 黒矢頭は切断部分, 矢印は収縮胞を示す. A の四角枠部分の拡大図を A' に, B の四角枠部分の拡大図を B' に示す. 拡大図中のアスタリスクは大核, 白矢頭は墨汁の粒を含む食胞, O は細胞口を示す. スケールバーは 50 μm (A, B), 10 μm (A', B') を示す.

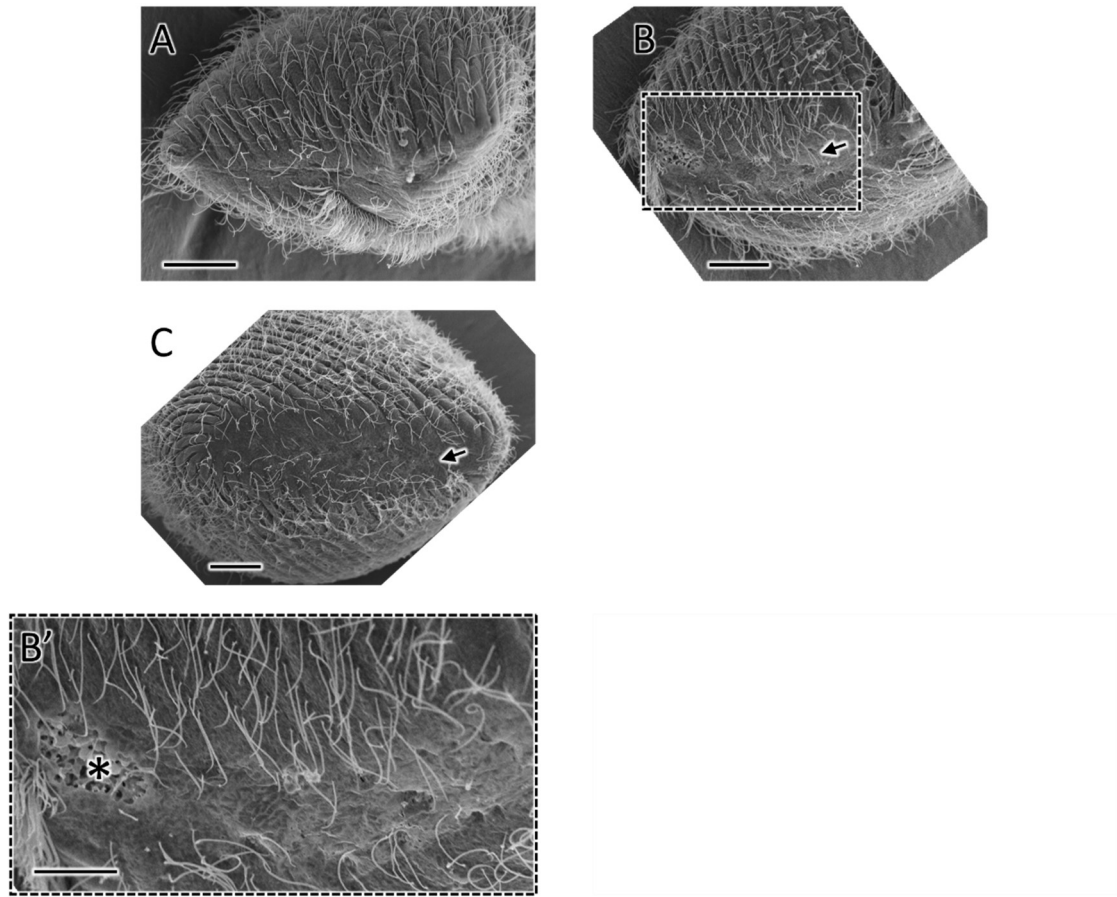


図 7: 切断直後の切断面の走査型電子顕微鏡像 (前方断片).

A は図 8A と, C は図 8B と, それぞれ同一細胞に由来する. B の四角枠部分の拡大図を B' に示す. 矢印は繊毛の無い膜の部分, アスタリスクは細胞内容物が露出している部分を示す. スケールバーは $20\ \mu\text{m}$ (A-C), $10\ \mu\text{m}$ (B') を示す.

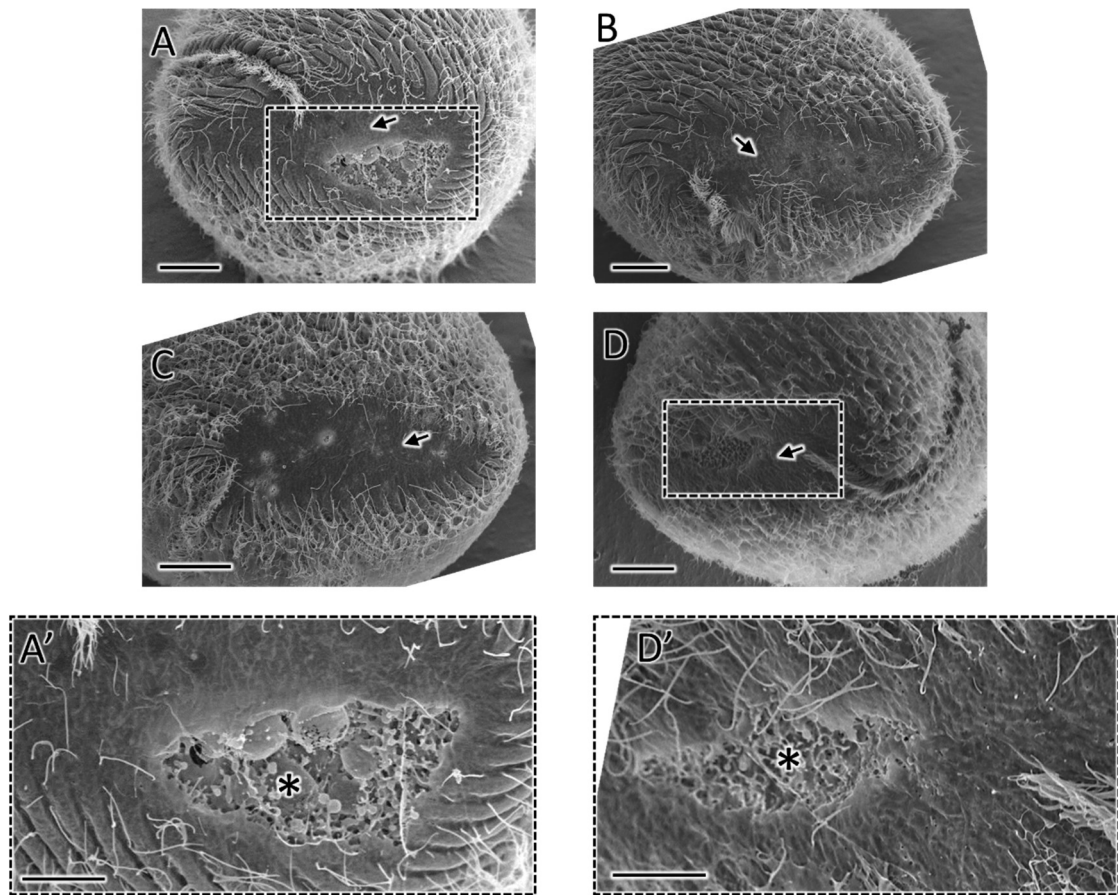


図 8: 切断直後の切断面の走査型電子顕微鏡像(後方断片).

A は図 7A と, B は図 7C と, それぞれ同一細胞に由来する. A の四角枠部分の拡大図を A' に, D の四角枠部分の拡大図を D' に示す. 矢印は繊毛の無い膜の部分, アスタリスクは細胞内容物が露出している部分を示す. スケールバーは 20 μm (A-D), 10 μm (A', D') を示す.

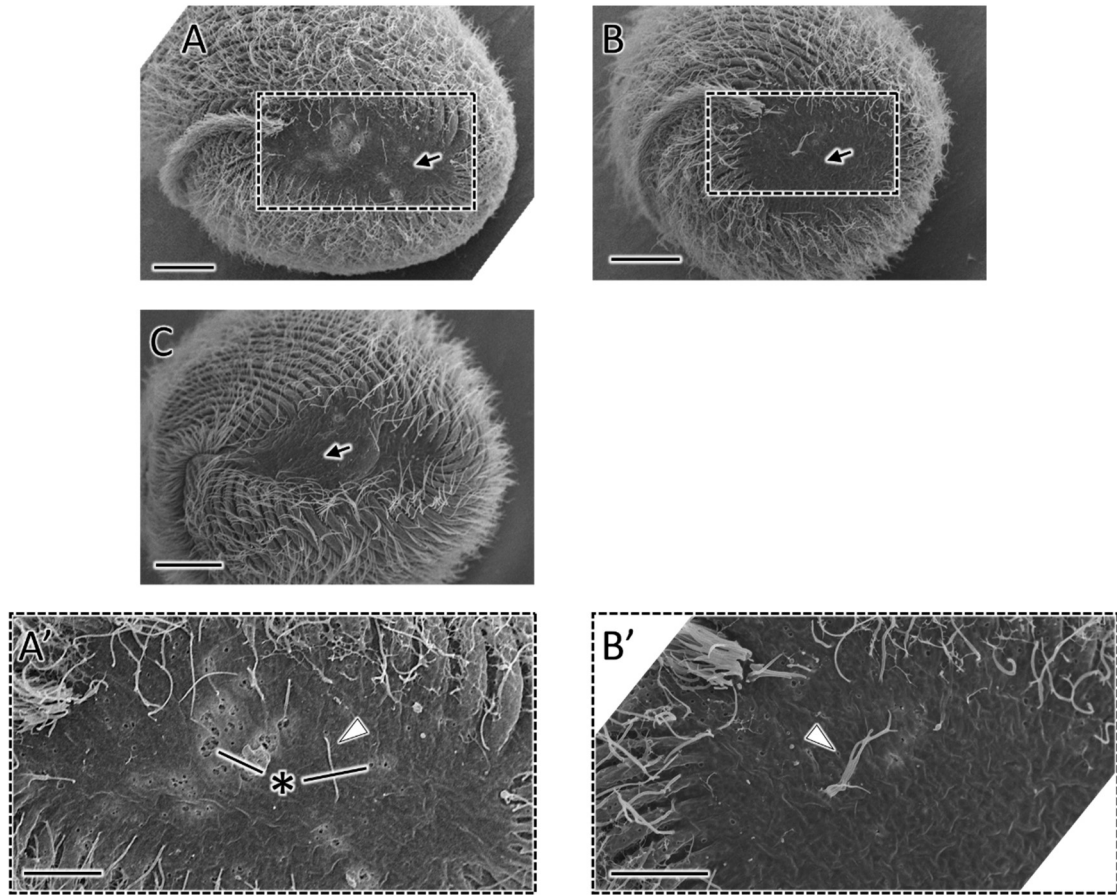


図 9: 切断から 40 分後の切断面の走査型電子顕微鏡像 (前方断片)。

A の四角枠部分の拡大図を A' に示す. 矢印は繊毛の無い膜の部分, アスタリスクは細胞内容物が露出している部分を示す. 白矢頭は繊毛の無い膜の部分にある繊毛を示す. スケールバーは 20 μm (A-C), 10 μm (A') を示す.

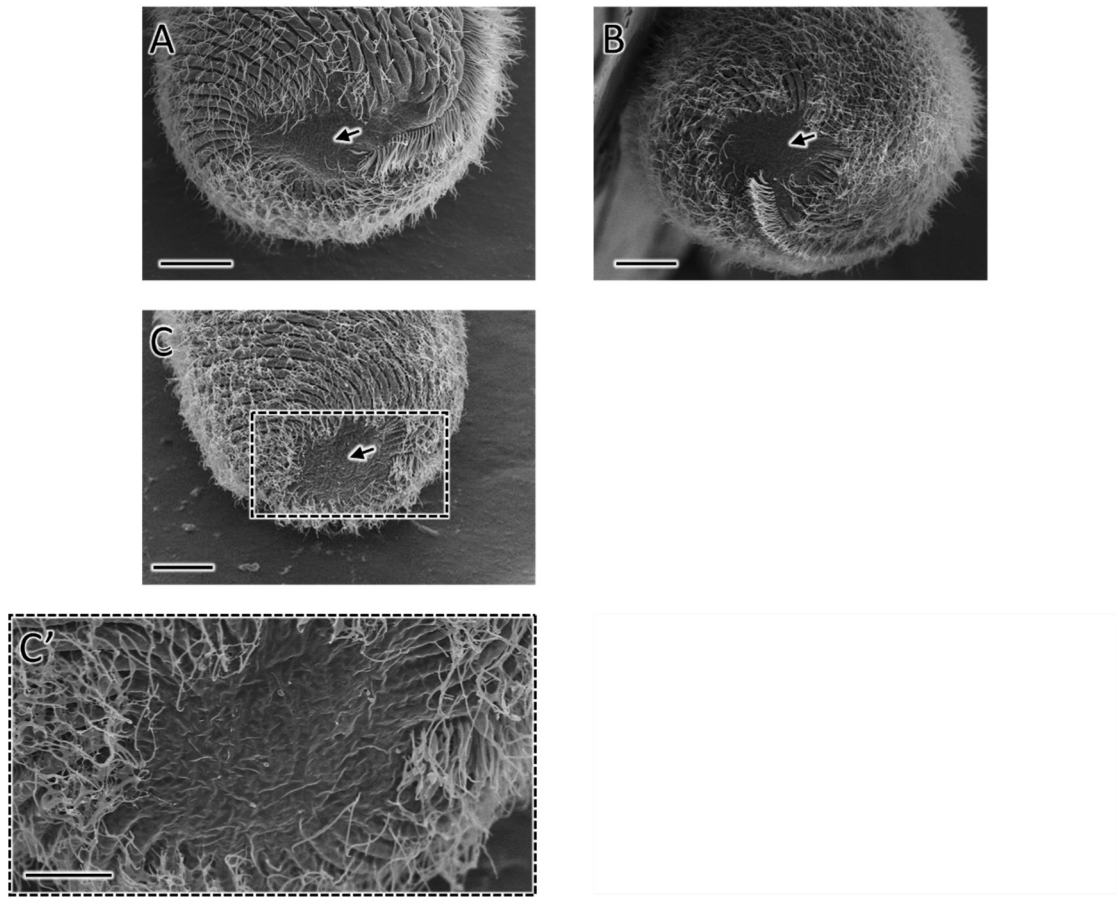


図 10: 切断から 40 分後の切断面の走査型電子顕微鏡像 (後方断片).

C の四角枠部分の拡大図を C' に示す. 矢印は繊毛の無い膜の部分を示す. スケールバーは $20\ \mu\text{m}$ (A-C), $10\ \mu\text{m}$ (C') を示す.

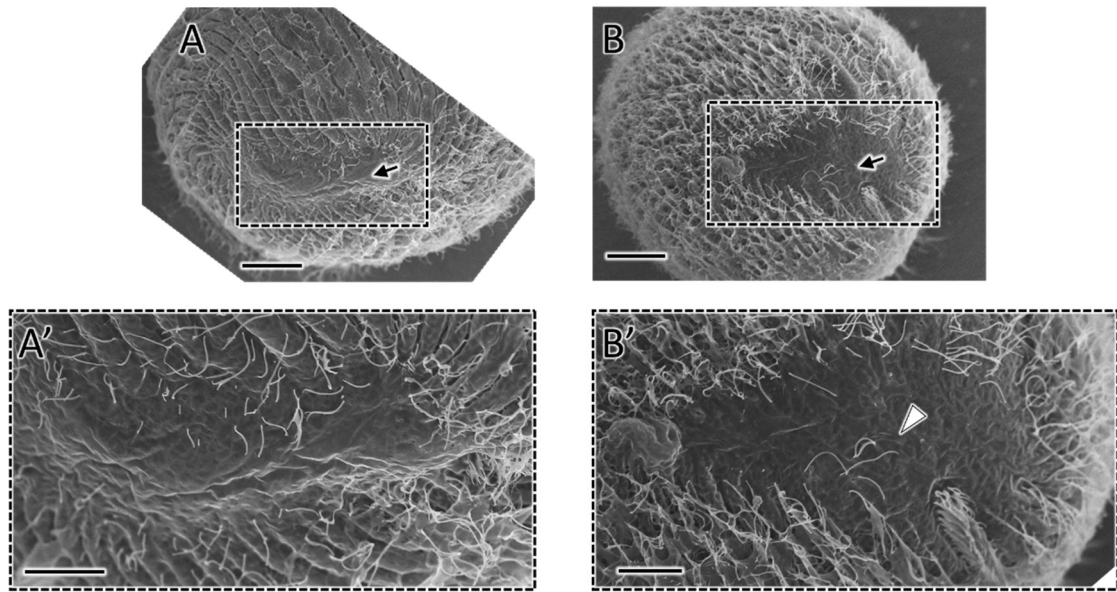


図 11:切断から 3 時間後の切断面の走査型電子顕微鏡像(前方断片).

A および B はどちらも図 12 の A および B とそれぞれ同一細胞に由来する. A の四角枠部分の拡大図を A' に, B の四角枠部分の拡大図を B' に示す. 矢印は繊毛の無い膜の部分, 白矢頭は繊毛の無い膜の部分にある繊毛を示す. スケールバーは $20\ \mu\text{m}$ (A, B), $10\ \mu\text{m}$ (A', B')を示す.

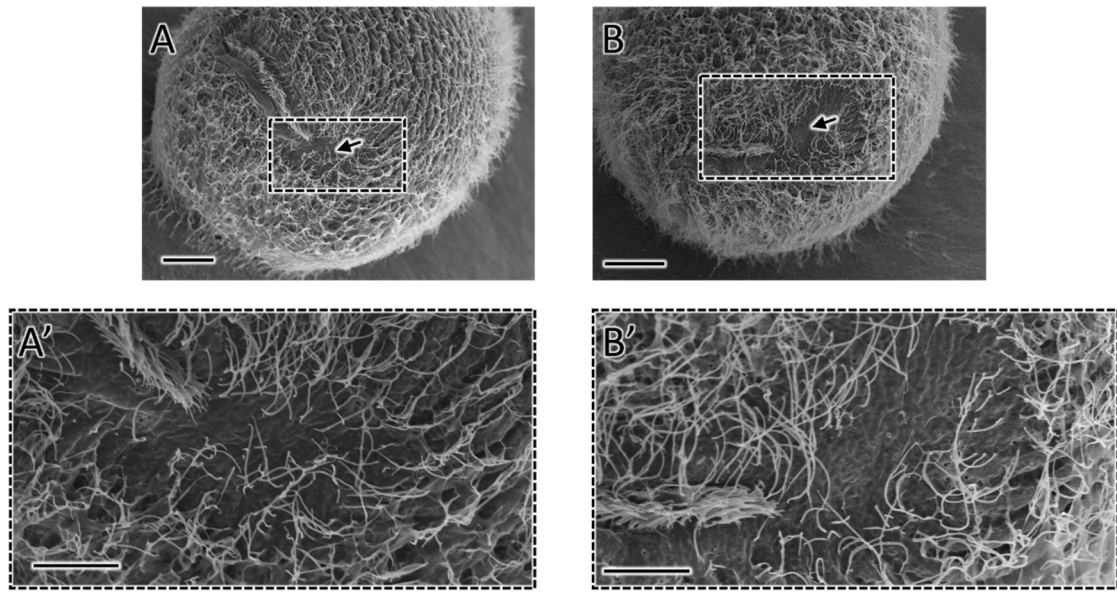


図 12: 切断から 3 時間後の切断面の走査型電子顕微鏡像(後方断片)。

A および B はどちらも図 11 の A および B とそれぞれ同一細胞に由来する. A の四角枠部分の拡大図を A' に, B の四角枠部分の拡大図を B' に示す. 矢印は繊毛の無い膜の部分を示す. スケールバーは $20\ \mu\text{m}$ (A, B), $10\ \mu\text{m}$ (A', B') を示す.

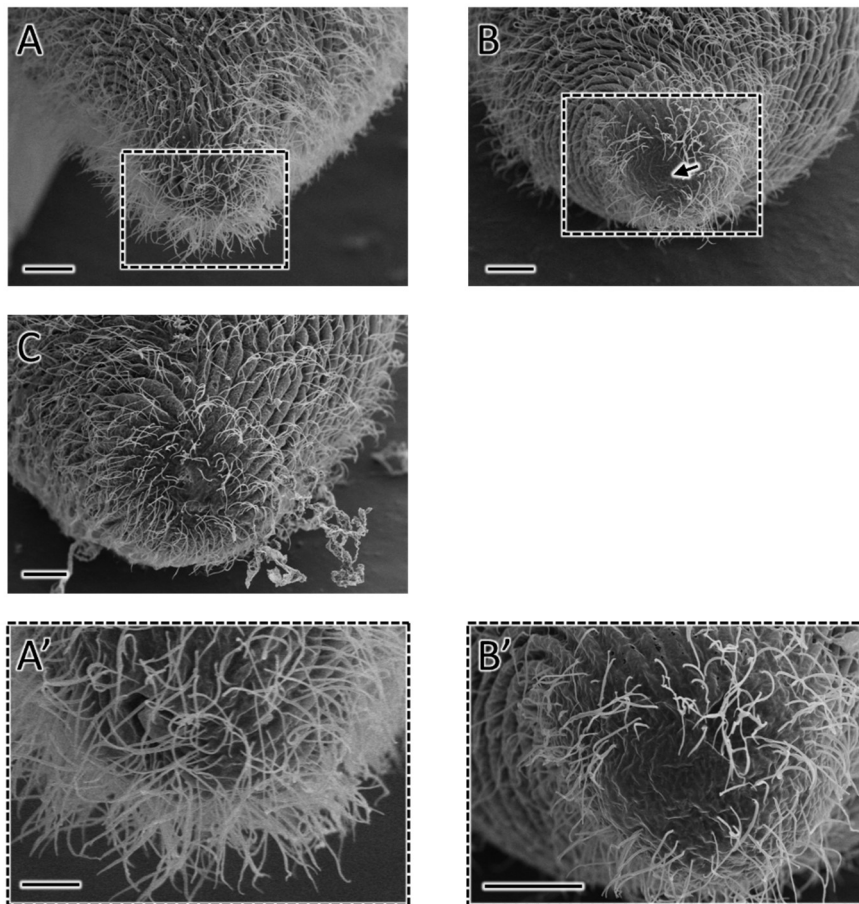


図 13: 切断から 24 時間後の切断面の走査型電子顕微鏡像 (前方断片).

A は図 14B と同一細胞に由来する. A の四角枠部分の拡大図を A' に, B の四角枠部分の拡大図を B' に示す. 矢印は繊毛の無い膜の部分を示す. スケールバーは 20 μm (A-C), 10 μm (A', B') を示す.

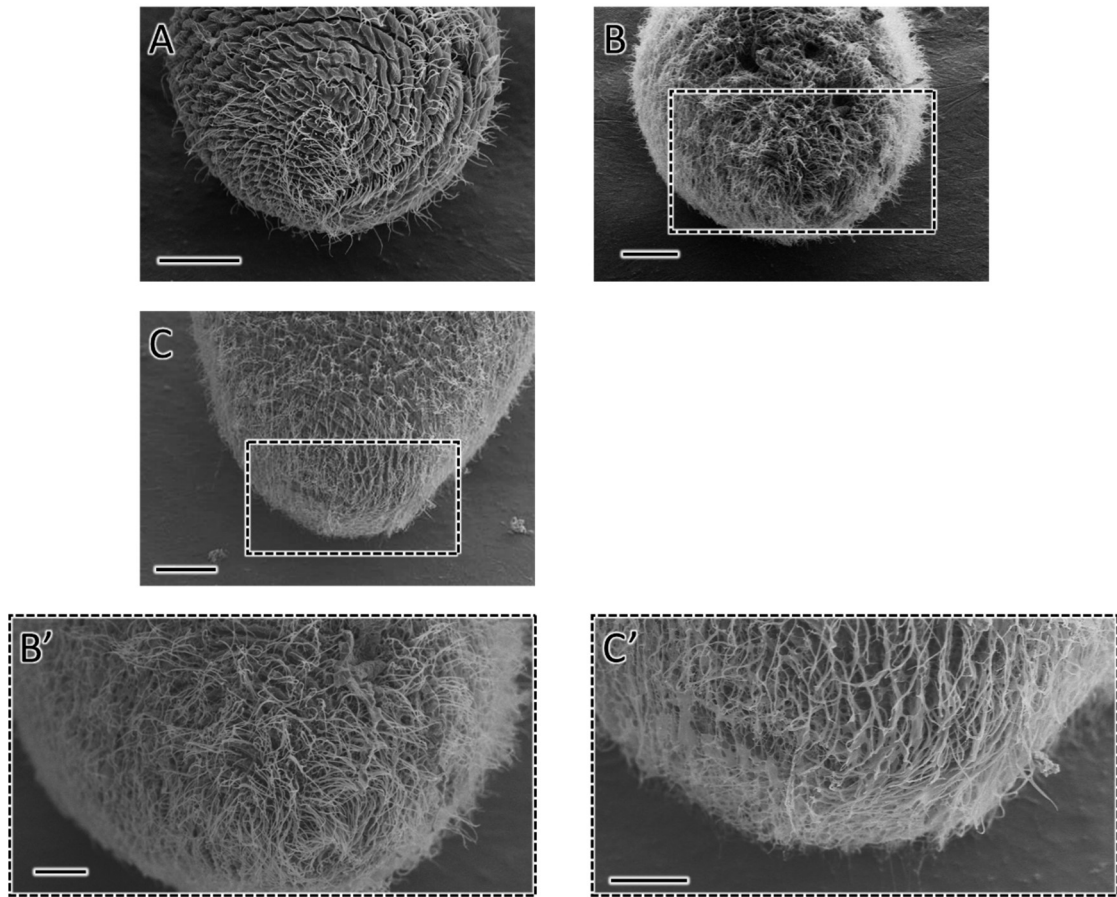


図 14: 切断から 24 時間後の切断面の走査型電子顕微鏡像(後方断片).

B は図 13A と同一細胞に由来する. B の四角枠部分の拡大図を B' に, C の四角枠部分の拡大図を C' に示す. スケールバーは $20\ \mu\text{m}$ (A-C), $10\ \mu\text{m}$ (B'-C') を示す.

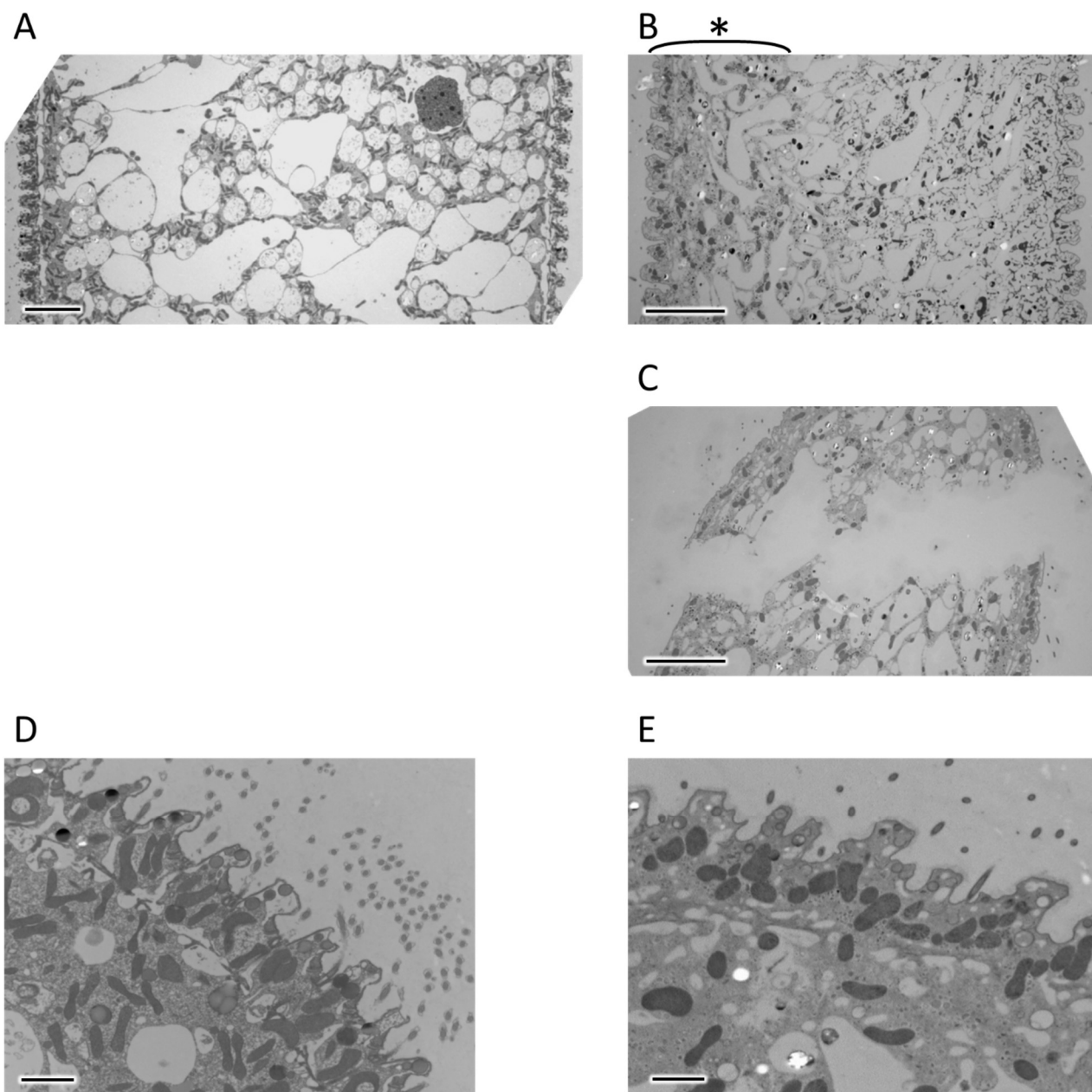


図 15: 化学固定法および加圧凍結置換法によって作製したサンプルの透過型電子顕微鏡像.

A, D は化学固定法, B, C, E は加圧凍結置換法によって作製した. アスタリスクは凍結が良好な部分を示す. スケールバーは 10 μm (A, B, C), 2 μm (D, E) を示す.

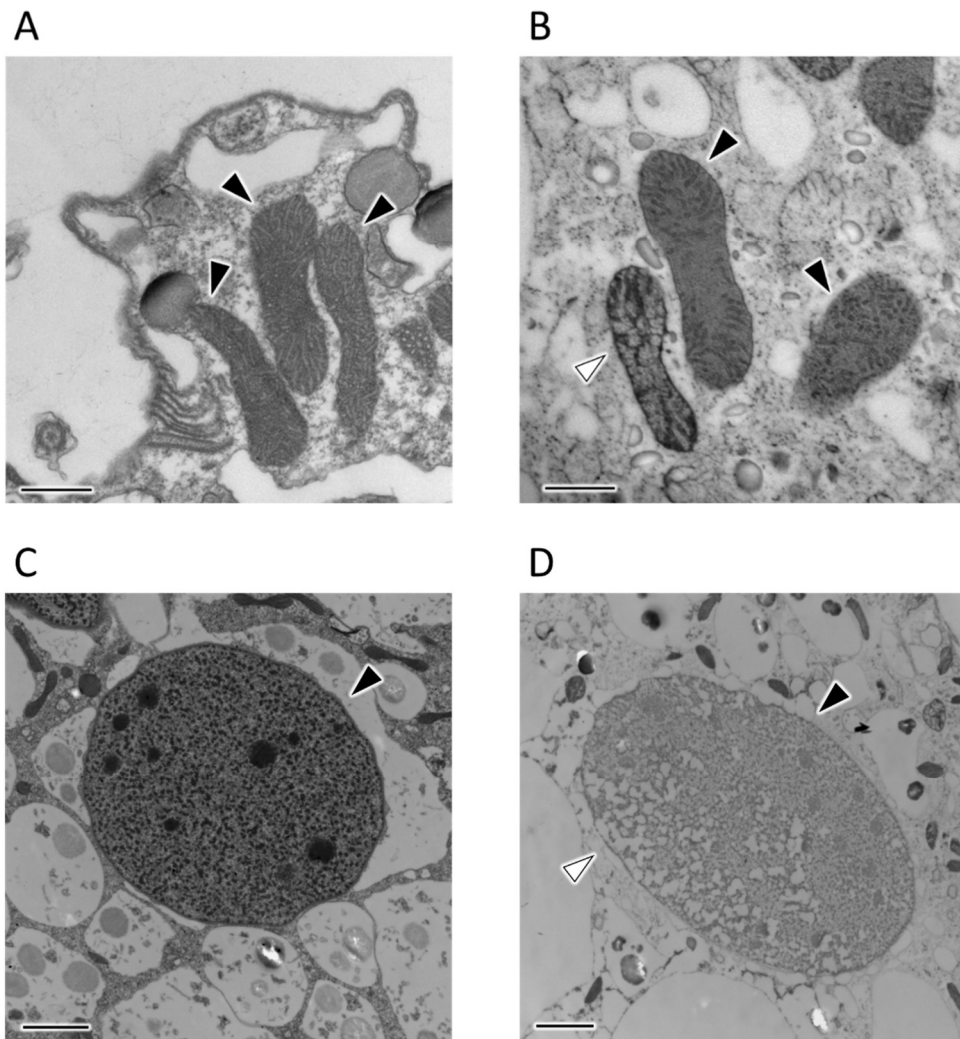


図 16: 化学固定法および加圧凍結置換法によって作製したサンプルにおけるミトコンドリアおよび大核の透過型電子顕微鏡像.

A, C は化学固定法, B, D は加圧凍結置換法によって作製した. 黒矢頭は固定の状態が良好な部分, 白矢頭は固定の状態が不良な部分を示す. スケールバーは 500 nm (A, B), 2 μm (C, D)を示す.

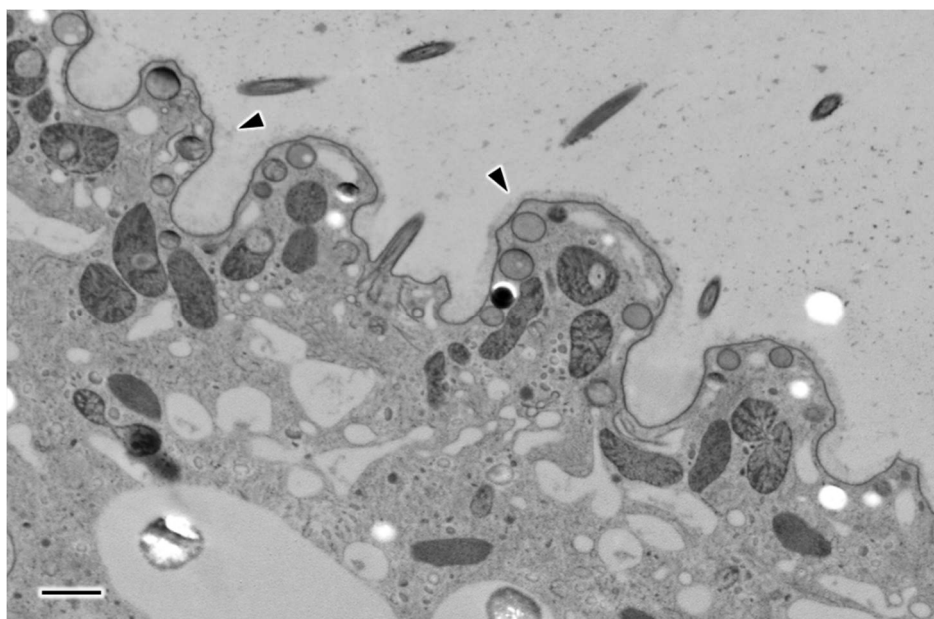


図 17: 絨毛列部分の透過型電子顕微鏡像.

加圧凍結置換法によって作製した. 矢頭は細胞膜を示す. スケールバーは 1 μm を示す.

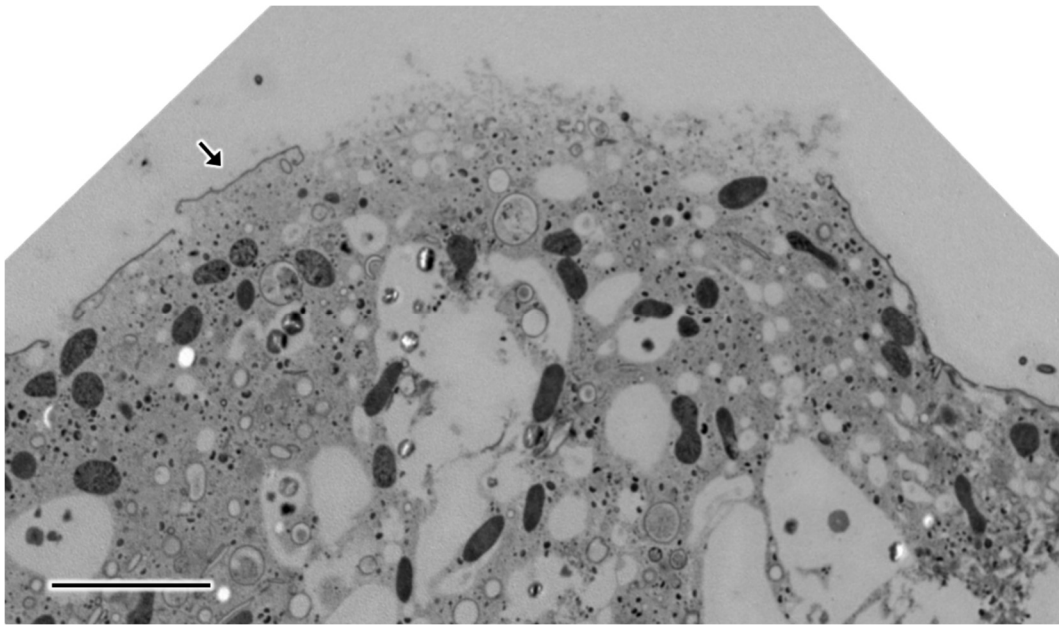


図 18:切断から 5 分後の切断面の透過型電子顕微鏡像.

加圧凍結置換法によって作製した後方断片の画像を示す. 矢印は断片化した細胞膜を示す. スケールバーは 5 μm を示す.

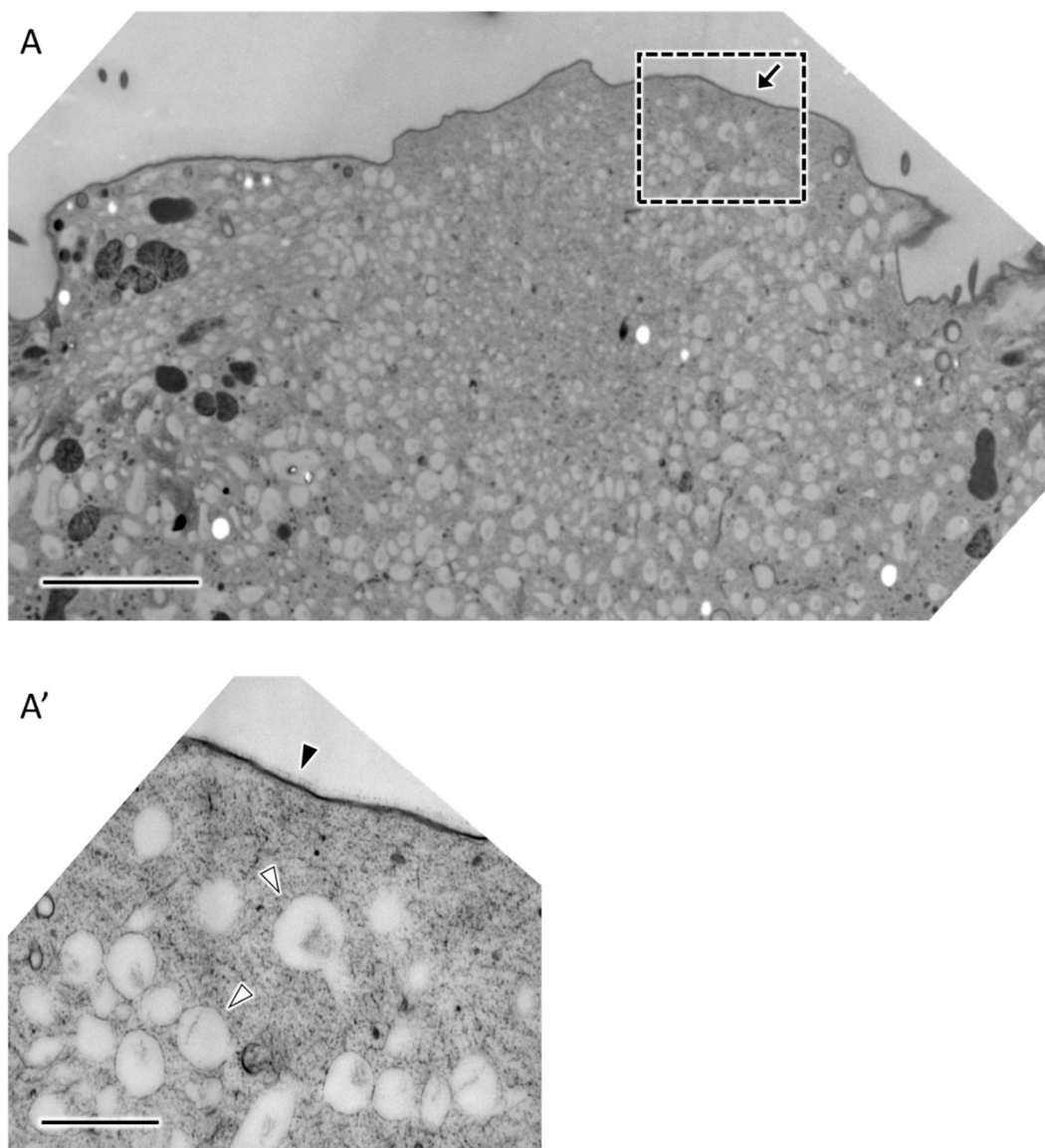


図 19: 切断から 40 分後の切断面の透過型電子顕微鏡像.

加圧凍結置換法によって作製した後方断片の画像を示す. A の四角枠部分の拡大図を A' に示す. 矢印および黒矢頭は切断部分の細胞膜, 白矢頭は切断後に切断部分に集まった細胞内の小胞を示す. スケールバーは 5 μm (A), 500 nm (A') を示す.

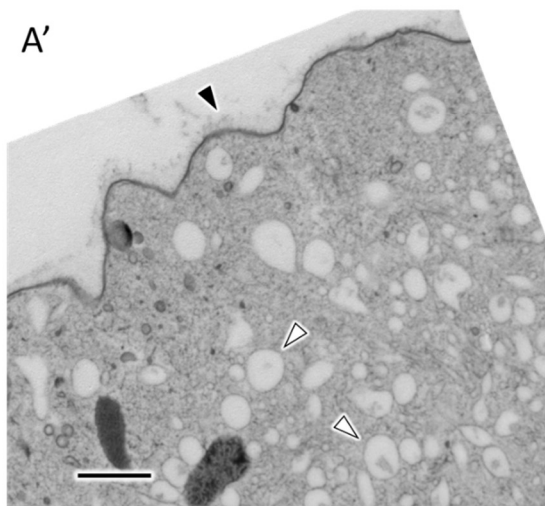
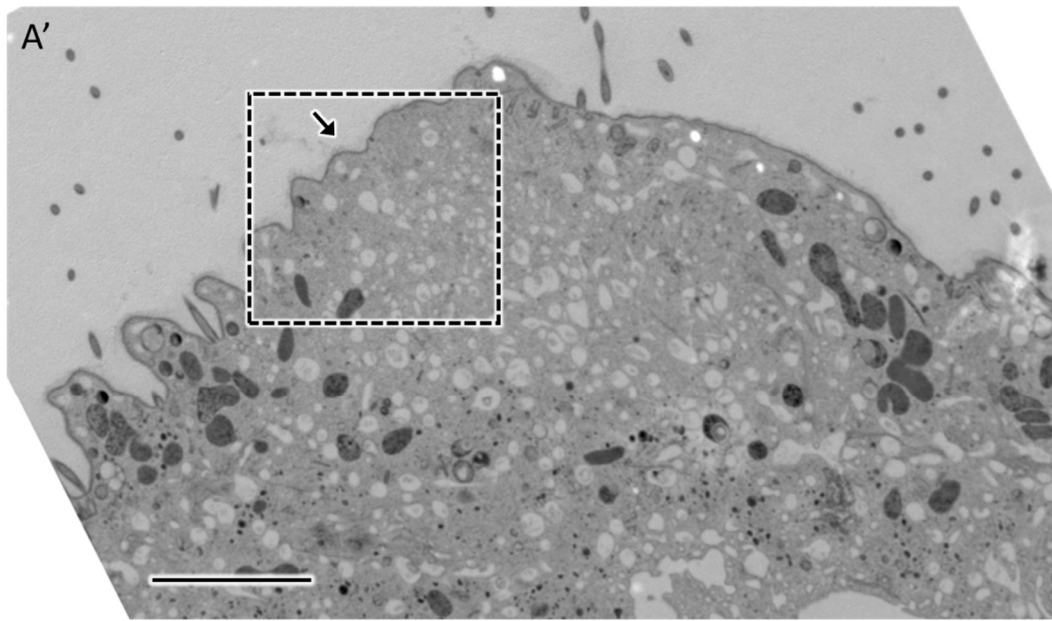


図 20: 切断から 3 時間後の切断面の透過型電子顕微鏡像.

加圧凍結置換法によって作製した後方断片の画像を示す. A の四角枠部分の拡大図を A' に示す. 矢印および黒矢頭は切断部分の細胞膜, 白矢頭は切断後に切断部分に集まった細胞内の小胞を示す. スケールバーは $5\ \mu\text{m}$ (A), $1\ \mu\text{m}$ (A') を示す.

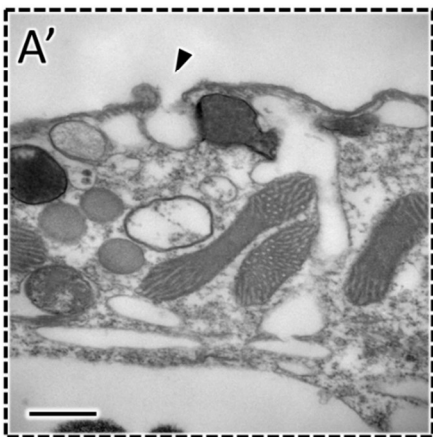
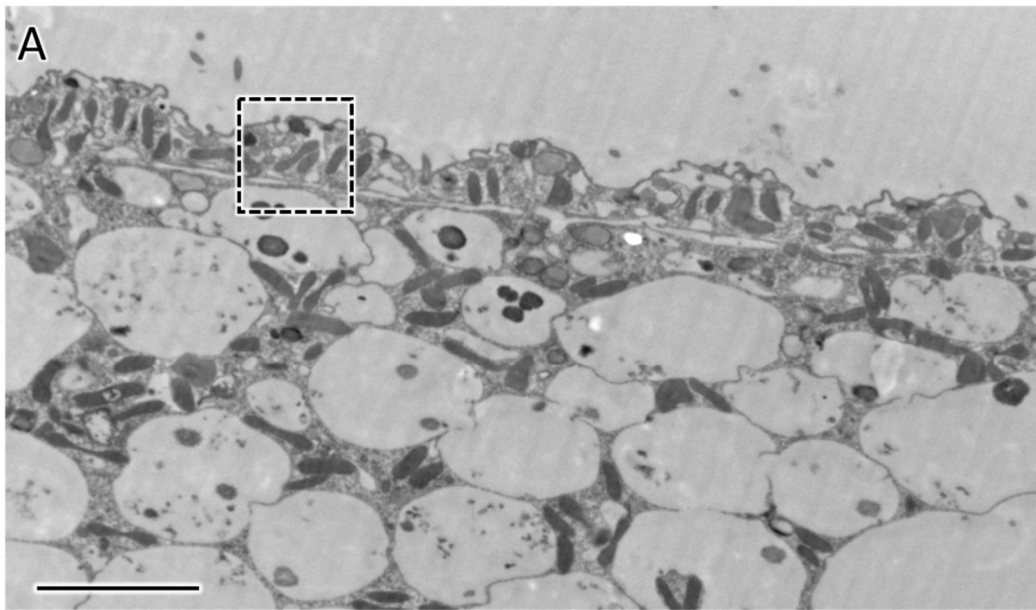


図 21: 切断から 20 分後の切断面の透過型電子顕微鏡像.

化学固定法によって作製した後方断片の画像を示す. A の四角枠部分の拡大図を A' に示す. 黒矢頭は細胞内の小胞が細胞表面の膜に融合している部分を示す. スケールバーは 5 μm (A), 500 nm (A') を示す.

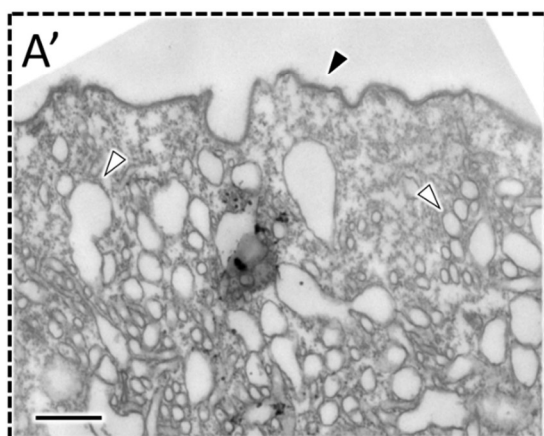
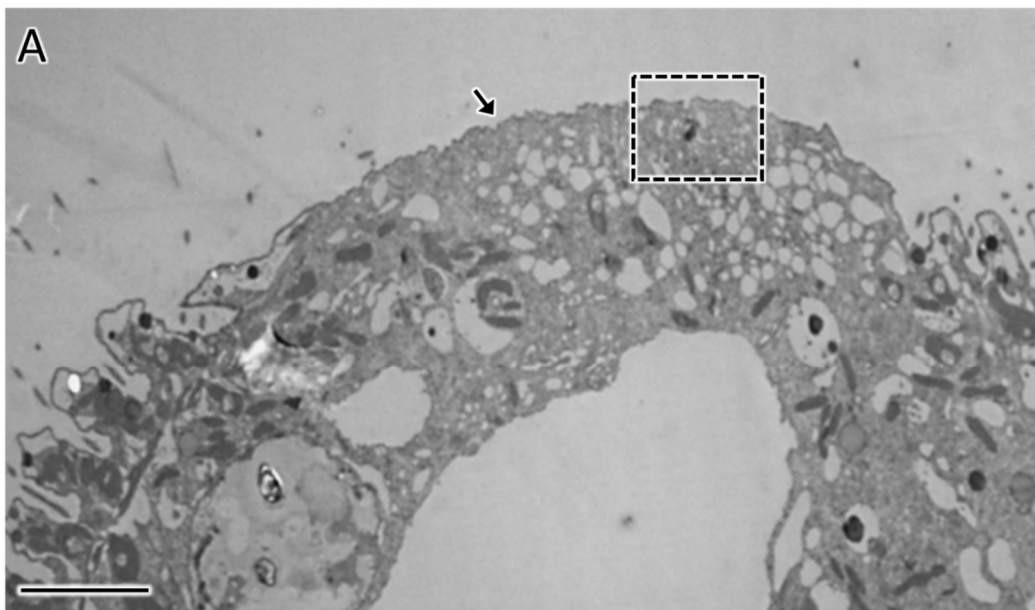


図 22:切断から 50 分後の切断面の透過型電子顕微鏡像.

化学固定法によって作製した前方断片の画像を示す. A の四角枠部分の拡大図を A' に示す. 矢印および黒矢頭は切断部分の細胞膜, 白矢頭は切断後に切断部分に集まった細胞内の小胞を示す. スケールバーは 5 μm (A), 500 nm (A') を示す.

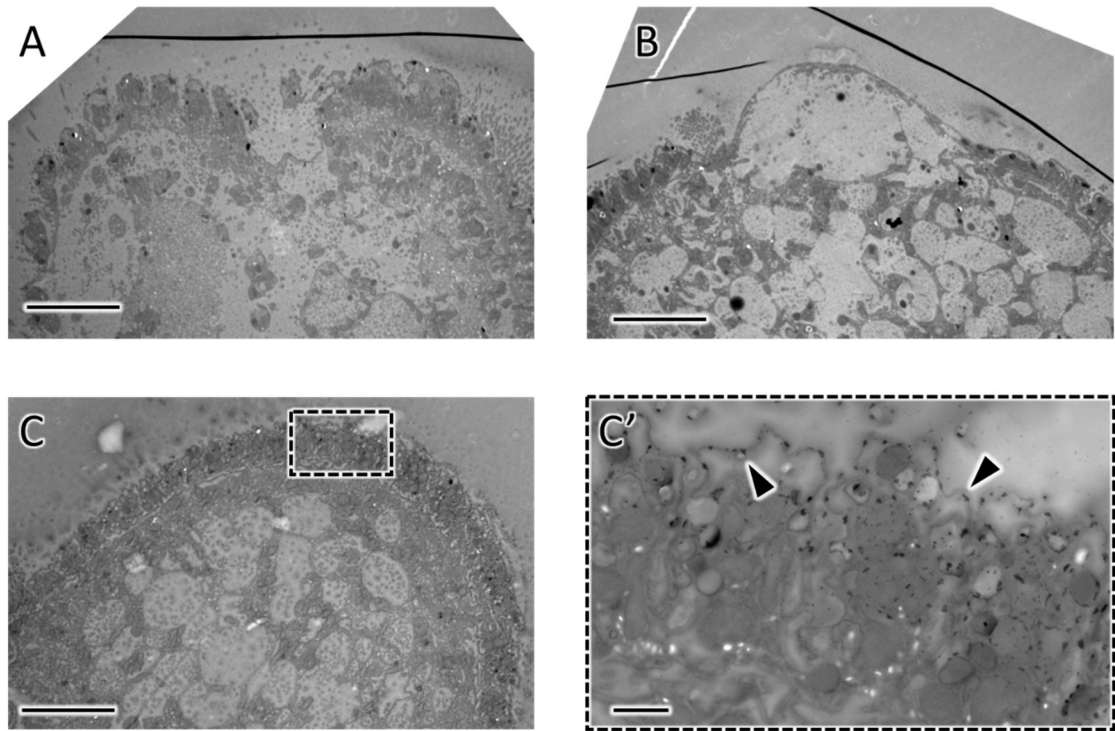


図 23: 化学固定法によって作製したサンプルの透過型電子顕微鏡像.

A は切断から 5 分後, B は切断から 40 分後の切断面の画像を示す. C は切断から 30 分後の切断面を含まない部分の画像を示す. いずれも化学固定法によって作製したが, 試料作製過程での乾燥や染色過程でのコンタミネーションによって良好な画像を得られなかった. C の四角枠部分の拡大図を C' に示す. 矢頭は染色過程のコンタミネーションによる汚染を示す. スケールバーは $10\ \mu\text{m}$ (A-C), $1\ \mu\text{m}$ (C') を示す.

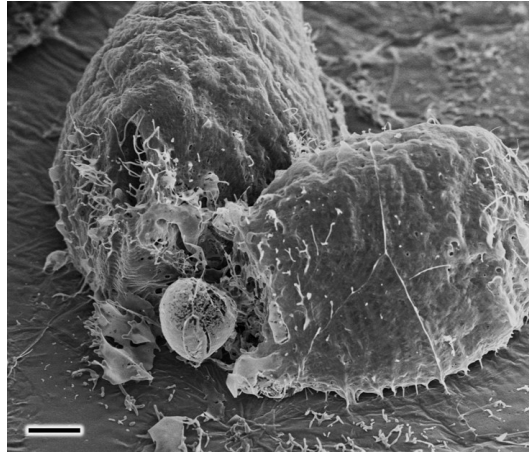
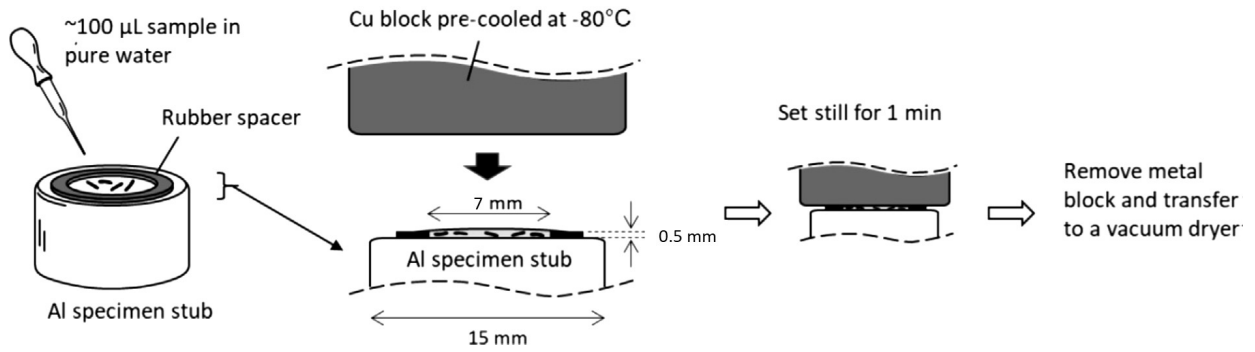


図 24: 切断された *P. multimicronucleatum* の走査型電子顕微鏡像

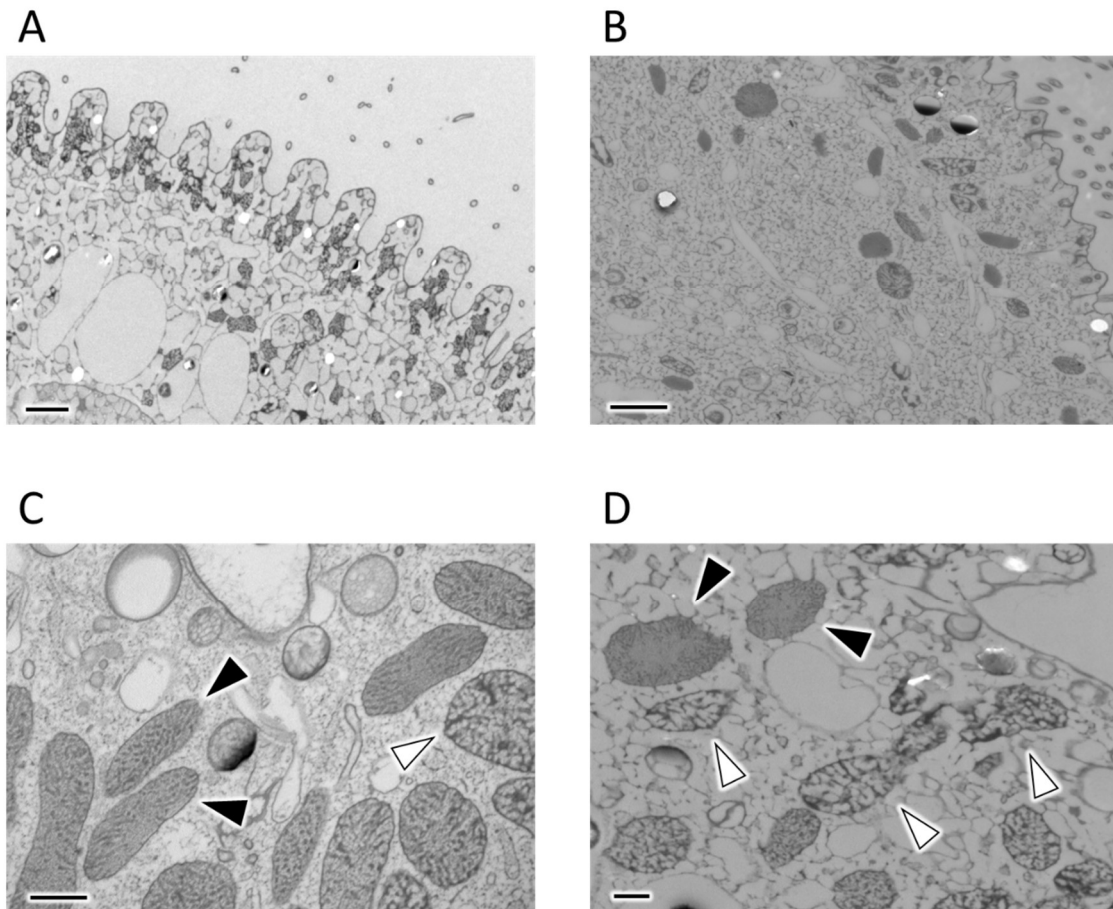
P. multimicronucleatum の切断面. 損傷部分が覆われることなく, 細胞内容物が流出している. スケールバーは 10 μm .

付録



付録 1: 水凍結乾燥法の凍結方法概要図

Ishida et al. *Europ. J. Protistol.* 2022 より引用. 本研究では, スペーサーのサイズは外径 10 mm, 内径 7 mm で行った.



付録 2:メタルコンタクト法および浸漬法(プロパン)による凍結置換法で作製したサンプルの透過型電子顕微鏡像

A および C はメタルコンタクト法, B および D は浸漬法によって凍結したサンプルの TEM 像を示す. 黒矢頭は固定の状態が良好なミトコンドリア, 白矢頭は固定の状態が不良なミトコンドリアを示す. スケールバーは $2\ \mu\text{m}$ (A, B), $500\ \text{nm}$ (C, D)を示す.