

単細胞の緑藻 *Micrasterias thomasiana* var. *notata* の接合子形成について

今泉真知子・土井田幸郎

滋賀医科大学生物学教室

緑藻植物界の接合藻目にツツミ藻 (desmids) とよばれる藻類がある。これらの藻類は、無性分裂による増殖を行なう他に“接合子形成” (zygote formation) とよばれる有性生殖を行なうことが、自然界において観察されている。しかしながら、これらの藻類を人工培地中で培養した場合には、有性生殖の誘発がなかなか起こらないことから、接合子形成を誘発する環境条件を見つけることが、1950年以降のツツミ藻研究の一つの課題とされてきた。近年、placoderm desmids である *Closterium* 属に関する詳細な研究 [1-3] が進められ、この属の接合子形成を誘発する重要な要因が明らかにされた。我々は、これらの研究成果をふまえて、placoderm desmid である *Micrasterias thomasiana* var. *notata* の homothallic 株の接合子形成を誘発する培地およびいくつかの環境要因について研究をおこなった。本報文では、これらの結果について述べ、さらに、この藻の接合子形成の過程を観察した結果をまとめた。

1. 接合子形成を誘発する培地および環境要因について

placoderm desmid である *Cosmarium* 属や *Closterium* 属の接合子形成を誘発する一つの方法が、Starr [4-6] によって開発された。この方法は、heterothallic 株では接合可能な双方の strain を、homothallic 株では単一の strain を、時計皿内の培地中に混ぜあわせて植え、この時計皿を、底に 5% NaHCO₃ 水を浸すことによって大気中の CO₂ 濃度を増加させたペトリ皿内に置いて、光照射下に培養するというものであった。Starr [4] は、この方法が接合子形成の誘発に有効なことから、光と CO₂ と培地 (culture medium) の組成が、接合子形成誘発の重要な要因であることを指摘した。しかしながら、ここで用いられた培地は、Pringsheim's soil-water であり、その組成は明らかにされていない。しかし、Starr の時計皿法は、その後も、*Pleurotaenium* 属 [7] や *Micrasterias* 属 [8-10] などの placoderm desmids の接合子形成の誘発に有効であることが報告されている。それに対して、Biebel [11,12] は、*Netrium* 属や *Cylindrocystis* 属、*Mesotaenium* 属および *Spirotaenium* 属などの saccoderm desmids の接合子形成を誘発する条件について検討をおこなった。彼は、*Netrium* 属と *Cylindrocystis* 属を完全な合成培地中に培養することに成功した。そして、これらの細胞が、このような合成培地中から窒素源を除いた培地に植えかえられた場合に、接合子形成が誘発されることを報告した。近年、*Closterium* 属に関する研究が進められ、培地における窒素欠乏 (nitrogen depletion) が、*Closterium* 属の接合子形成の誘発にとって最も重要な要因であることが明らかにされた [1-3]。このような有性生殖の誘発における窒素欠乏の重要性は、*Chlamydomonas* [13] や *Chlorococcum* [14]、*Spirogyra* [15] などの他の淡水緑藻においてもまた報告されており、窒素欠乏が sexuality を誘発するメカニズムについて研究が進められている [13-16]。

我々は、*M. thomasiana* var. *notata* の homothallic 株の接合子形成が、*Closterium* 属や *Netrium*

属, *Cylindrocystis* 属と同様に、培地における窒素欠乏によって誘発されるかどうかについて検討をおこなった。材料である *M. thomasiana* var. *notata* の homothallic 株は、滋賀県下の田んぼで採集されて単離された後、stock culture medium (1%の寒天末を含んだ modified Waris medium [16]) を底に敷き、その上に等量の modified Waris medium を注いだ培地) 中で20°C, 1,500 lux の蛍光灯による光照射(一日に16:8時間の明暗周期でおこなう)下に培養された。実験の方法は、増殖期にある栄養細胞を、5 mlの培地を浸したマイクロシャーレ内に50個まき、上述と同じ温度および光の条件下で培養し、接種後、シャーレ内に形成されてくる接合子の数 (N_v) および栄養細胞の数 (N_z) を実顕微鏡下で数えるという方法をとった。接合子形成の誘発の割合および細胞の分裂増殖の程度を、それぞれ、接合子形成率(the frequency of zygote formation(%))と全細胞数(the total cell number)で表わすこととし、それらの値を、次の数式から算出した。

$$\text{接合子形成率 (\%)} = 2 \times 100 \times N_z / (2 \times N_z + N_v)$$

$$\text{全細胞数} = 2 \times N_z + N_v$$

ある実験においては、Starrの時計皿法にならって、大気中のCO₂濃度を増加させることにより培地中のCO₂濃度を増加させた。大気中のCO₂濃度を増加させるには、細胞と培地を入れたマイクロシャーレを、容積比で密閉容器の1/10になるような量の5% NaHCO₃水を含む小容器とともに密閉容器内に置いた。この条件下では、大気中のCO₂濃度は、約5%に増加させられた。Fig. 1およびTable 1に示されたように、*M. thomasiana* var. *notata*の接合子形成は、細胞を、modified Waris mediumから窒素源だけを除去した培地(N⁻ medium) [16]に植えかえることによって誘発された。大気中のCO₂濃度を増加させることによりN⁻ medium中のCO₂濃度を増加させた場合(high CO₂-N⁻ medium)、接合子形成の誘発は、さらに速められた(Fig. 1, Table 1)。しかしながら、細胞を、CO₂濃度を増加させたmodified Waris medium (high CO₂-modified Waris medium)中に植えた場合には、接合子形成は誘発されなかった(Fig. 1, Table 1)。細胞の分裂増殖の程度を知る指標として測定された全細胞数を比較するとき、CO₂濃度が増加された場合のそれぞれの培地における全細胞数は、CO₂濃度が増加されなかった場合のそれらにおける全細胞数より多かった(Table 1)。これらの事実は、CO₂は、一般的な代謝を高めることによって接合子形成の誘発を速めるが、接合子形成を誘発する直接的な要因ではないこと、そして、接合子形成を誘発する最も重要な要因は、窒素欠乏であることを示唆している。

M. thomasiana var. *notata*の接合子形成を効率良く誘発する温度および光の条件が、high CO₂-N⁻ mediumを用いて検討された。細胞が、温度20°Cで、1,500 luxの光照射(一日に、16:8時間の明暗周期)下に培養された場合、接合子形成の誘発は、接種後5日目におこり、14日目の接合子形成率は、90%を超えた(Fig. 1)。照射条件を同じにして温度を25°Cまたは28°Cに上げた場合には、接合子形成の誘発は、20°Cの場合とほぼ同様なやり方でおこったが、誘発の開始が、わずかに(せいぜい1日くらい)速められた。温度を15°Cに下げたときには、誘発の開始は、3-4日遅らせられたが、接種後14日以内に、80%の高率で接合子が形成された。温度がさらに10°Cまで下げられたときには、接合子形成の誘発は、接種後20日目ですえおこらず、全細胞数として測定された細胞の増殖も著しく減少させられた。次に、温度を20°Cに、一日の明暗周期を16:8時間に固定して、光の強さ(照度)を変化させた。細胞が、1,500 lux または3,000 luxの照度で照射された場合、接合子形成の誘発は、接種後5日目におこり、14日後には、接合子形成率は90%を越えた。それに対して、照度が10,000 luxに高められたときには、誘発の開始は遅らされなかったが、14日目における接合子形成率は、1,500 lux または3,000 luxの場合より約30%減少させられた。照度が500 luxにされた場合、誘発の開始は遅ら

せられ、接合子形成率は、14日後にせいぜい50%であった。最後に、温度を20°C、照度を1,500 lux に固定して、一日の明暗周期すなわち照射時間/日を変化させた。一日の照射時間が2時間の場合には、接種後30日目でさえ、接合子形成の誘発も細胞の増殖もおこらなかった。接合子形成および細胞の増殖が接種後14日以内におこるためには、一日に4時間以上の照射が必要とされた。そして、4時間以上/日の照射が行なわれた場合には、照射時間が長くなるにつれて、接合子形成の誘発が速められた。誘発にとって最適の照射時間は、12-16時間/日であり、24時間/日の照射は、14日目の接合子形成率を70%に減少させた。以上えられた結果をまとめると、*M. thomasiana* var. *notata* の接合子形成を最も効率よく誘発する条件は、温度が20-28°C、照度が1,500-3,000 lux、一日の照射時間が12-16時間であった。これらの条件は、この細胞の分裂増殖に最適な条件と一致している。また、温度を上げたり光の照射量を増加させた場合に、接合子形成の誘発が速められたのに対して、温度を下げたり、照射量を減少させた場合には、誘発が抑えられ、同時に、細胞の分裂増殖が減少させられた事実は、温度および光は、細胞の一般的な代謝を高めたりエネルギーを供給したりすることによって、接合子形成の誘発を速めるが、誘発を引き起こす直接的な要因ではないことを示唆していると考えられる。

2. 接合子形成の過程について

接合子形成の過程を観察するためには、細胞を、少し大きめのシャーレ内の high CO₂-N⁻ medium 中にまき、温度28°C、1,500 lux (16時間照射/日)の光照射下に培養した。接種後、シャーレ内に形成されてくる対合細胞 (paired cells) を一対ピペットでとりだしてマイクロシャーレ内の N⁻ medium 中に移し、26-28°C、自然光の照射下に置いて、その後おこってくる接合子形成の過程を倒立顕微鏡下で観察した。Fig. 2B-L に示された写真は、選ばれた一対の細胞を time-lapse 法で撮影したものである。*M. thomasiana* var. *notata* の homothallic 株における接合子形成は、親細胞の分裂によって生じた娘細胞 (配偶子) 同志が、互いに接近して、双方の isthmus を並置させながら向き合う (pairing) ところから開始される (Fig. 2B)。対になった娘細胞は、それらが分泌した粘液物質に取りまかれている。pairing 形成直後の配偶子 (conjugants) は、きわめて接近した位置に並んでいるが、時間の経過にともない、双方の isthmus 付近から放出される粘液物質が配偶子間の空間に蓄積されるにしたがって、両配偶子間の間隔が広げられ、それらは、やがて35-40μm に達する。両配偶子間の距離がこのような長さになった後、しばらくの間、双方の配偶子にはなんの変化も観察されない。数時間後、双方の配偶子の isthmus 付近に papilla とよばれる半球状の小さな突起が形成される (Fig. 2C)。このような突起は、isthmus が細胞の長軸方向に伸長して広げられ、その部分から向かい合った配偶子に向けて、両配偶子の原形質が突出することによって形成される。形成された直後の papilla には、ペクチン質の細胞壁物質がためられていることが Kies の電顕を用いた観察 [17] によって明らかにされている。papilla の形成は、双方の配偶子でほぼ同時におこる場合もあるが、多少の時間的なずれが観察されることが多かった。形成後、papilla は3-4時間の間、なんの変化もみせずにとどまっているが、突如として膨らみだして大きくなり、双方の表面の先端部分において接するようになる (Fig. 2D)。双方の papilla が出会うのは、膨らみだしてから約90秒後である。大きくなりだした papilla は、両配偶子から移動させられた多くの小胞を含んでいるが (Fig. 2D)、双方の接触が起こった後も、配偶子から papilla へ向けて、原形質や葉緑体が急速に移動するのが観察された (Fig. 2E)。これらの移動にともない、双方の papilla の体積は増え (Fig. 2E-F)、接触した部分の細胞壁が溶かされ始めた (Fig. 2G)。融合した papilla へ向けて、両配偶子からの原形質の移動が続くが、接触後30分後には、これらの移動は完了し、両配偶子の原形質は、融合 papilla の中で完全に混ざり合う (protoplast fusion)

(Fig. 2H). その後、融合 papilla は急速に収縮して体積を減少させ、1-2時間の内に完全な球形になった (spherical zygote とよばれる) (Fig. 2I). papilla 形成後 8-9 時間の後に、球形の接合子には、刺が形成され始める (spine formation) (Fig. 2J). 刺形成の開始直前、球形接合子は、形を多角形に変化させるが、多角形の角から刺が形成されるのが観察された (Fig. 2J). 刺は、出始めてから 2-3 時間くらいの内に伸長して、先端部分で二叉に分枝した (Fig. 2K-L). 伸長しつつある刺は、光学顕微鏡下で観察されたとき、透明で薄く光るようにみえる (Fig. 2K) のに対して、最大の長さに達した後の刺は、透明で強く光るようにみえる (Fig. 2L). Kies の電顕を用いた観察 [18] によれば、刺は、exospore とよばれる接合子の最も外側に形成される厚い細胞壁の一部分であって、伸長しつつある刺には、matrix 物質が多くみられるが、完成後の刺には、多くの cellulose の microfibril の束が交差して組み込まれていることが明らかにされている。刺の数や形、あるいは、刺の分布のしかたは、ツヅミ藻の種を分類する重要な指標とされている [19]. 接合子の exospore の内側には、その後 2-3 日以内に、厚くて表面の滑らかな茶色の mesospore とよばれる細胞壁が形成される [10]. mesospore の形成は、それまで緑色をしていた接合子が、黒く変化することによっても認められた。成熟した接合子には、3 枚の細胞壁が認められているが、最も内側の透明の endospore が最後に形成されてくる [10, 19]. 空になった両配偶子は、静かにおいておけば、接合子形成の完了後も長く、接合子に隣接してくっついているが、ピペットなどでゆすぶれば、比較的簡単に離れてしまう。刺を除いた成熟接合子の直径は、84-100 μm であり、刺の長さは 26-36 μm であった。

参考文献

1. J. Hamada, Bot. Mag. Tokyo, 91, 173-180 (1978).
2. T. Hogetsu and M. Yokoyama, Plant & Cell Physiol., 20, 811-817 (1979).
3. T. Ueno and K. Sasaki, Plant & Cell Physiol., 19, 245-252 (1978).
4. R. C. Starr, Bull. Torrey Bot. Club, 82, 261-265 (1955).
5. R. C. Starr, Archiv Protistenk., 104, 155-164 (1959).
6. R. C. Starr, Am. J. Bot., 47, 67-86 (1960).
7. H. U. Ling and P. A. Tyler, Br. phycol. J., 7, 65-79 (1972).
8. S. I. Blackburn and P. A. Tyler, Br. phycol. J., 15, 83-93 (1980).
9. S. I. Blackburn and P. A. Tyler, Br. phycol. J., 16, 217-229 (1981).
10. L. Kies, Flora, Abt. B, Bd., 157, 301-313 (1968).
11. P. Biebel, Am. J. Bot., 51, 697-704 (1964).
12. P. Biebel, Beih. Nova Hedwigia., 42, 39-57 (1973).
13. R. Sager and S. Granick, J. Gen. physiol., 37, 729-742 (1954).
14. J. C. O'Kelley, J. Phycol., 19, 57-64 (1983).
15. J. Simons, A. P. V. Beem and P. J. R. Devries, Acta Bot. Neerl., 33, 323-334 (1984).
16. M. Imaizumi and Y. Doida, Plant Sci., 71, 21-28 (1990).
17. L. Kies, Beih. Nova Hedwigia, 42, 139-154 (1973).
18. L. Kies, Protoplasma, 70, 21-47 (1970).
19. A. J. Brook, in The biology of desmids, Botanical Monographs, Vol. 16, pp. 144, Blackwell scientific publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, and Melbourne, (1981).

Table 1 Effect of nitrogen depletion on zygote formation

Medium	Frequency of zygote formation (%) ^a	Total cell number ^a
Modified Waris medium (control 1)	0 (0) [0]	303 ± 45.0 (562 ± 116.2) [955 ± 48.8]
N ⁻ medium (control 2)	52.9 ± 11.9 ^b (92.1 ± 3.1 ^b)	116 ± 21.0 (152 ± 12.0)
High CO ₂ -modified Waris medium (control 3)	0 [0]	834 ± 212.4 [3155 ± 423.8]
High CO ₂ -N ⁻ medium	94.7 ± 3.0 ^{c,d}	207 ± 21.6

Determinations of zygote frequency and total cell number were made 14 days after inoculation except values in parentheses and brackets. Values in parentheses were determined after 27 days and values in brackets were after 50 days.

^aValues represent the mean ± S.D. of triplicates or quadruplicates. To compare treatment means with a control mean, statistical analysis was performed using Student's t-test, and the significance is presented in the form of P-values.

^bP < 0.001 vs. control 1.

^cP < 0.01 vs. control 2.

^dP < 0.001 vs. control 3.

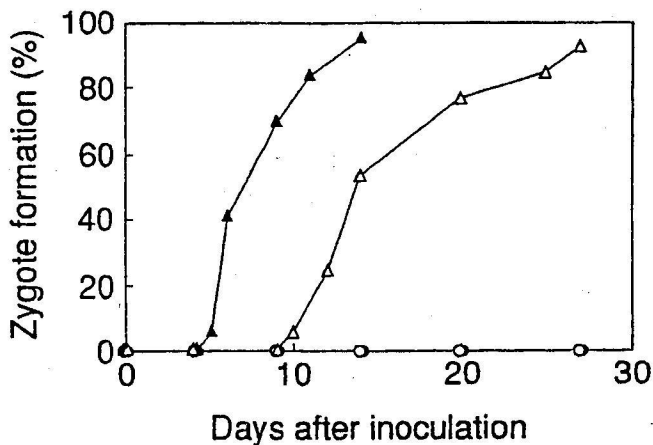


Fig.1

Legends to figures

Fig. 1. Effect of nitrogen depletion on zygote formation in *Microsterias thomasiana* var. *notata*. Cells were inoculated into the following mediums. —▲—, N⁻ medium ; —○—, modified Waris medium ; —▲—, high CO₂-N⁻ medium ; —●—, high CO₂-modified Waris medium.

Fig. 2. Zygote formation in *M. thomasiana* var. *notata*. ×180. Photographs were taken with an inverse microscope (Diaphot-TMD, Nikon, Tokyo). B—L. Time-lapse photomicrographs of the process of zygote formation.

- A. A vegetative cell in front view.
- B. Early stage in gametic pairing. Conjugants are in side view, having been forced apart by refractive mucilage secreted between them. 5:27 p.m.
- C. Papilla formation. Protrusion of protoplast is evident at isthmus of each conjugant. 9:27 p.m.
- D. Papillas enlarge and come in contact. 11:26 p.m.
- E. Protoplasts move out of cell walls toward a common center. 11:27.5 p.m.
- F. Protoplasts are closely appressed, but actual fusion has not begun. 11:28.5 p.m.
- G. Fusion of the protoplasts begins. Protoplasts continue to move out of walls toward the common center. 11:29.5 p.m.
- H. Fusion is complete. 11:54 p.m.
- I. Spherical zygote. 1:53 a.m.
- J. Spines are evident as small outgrowth of membrane. 3:31 a.m.
- K. Spines increase in length. 4:10 a.m.
- L. Zygote with mature spines. 6:14 a.m.

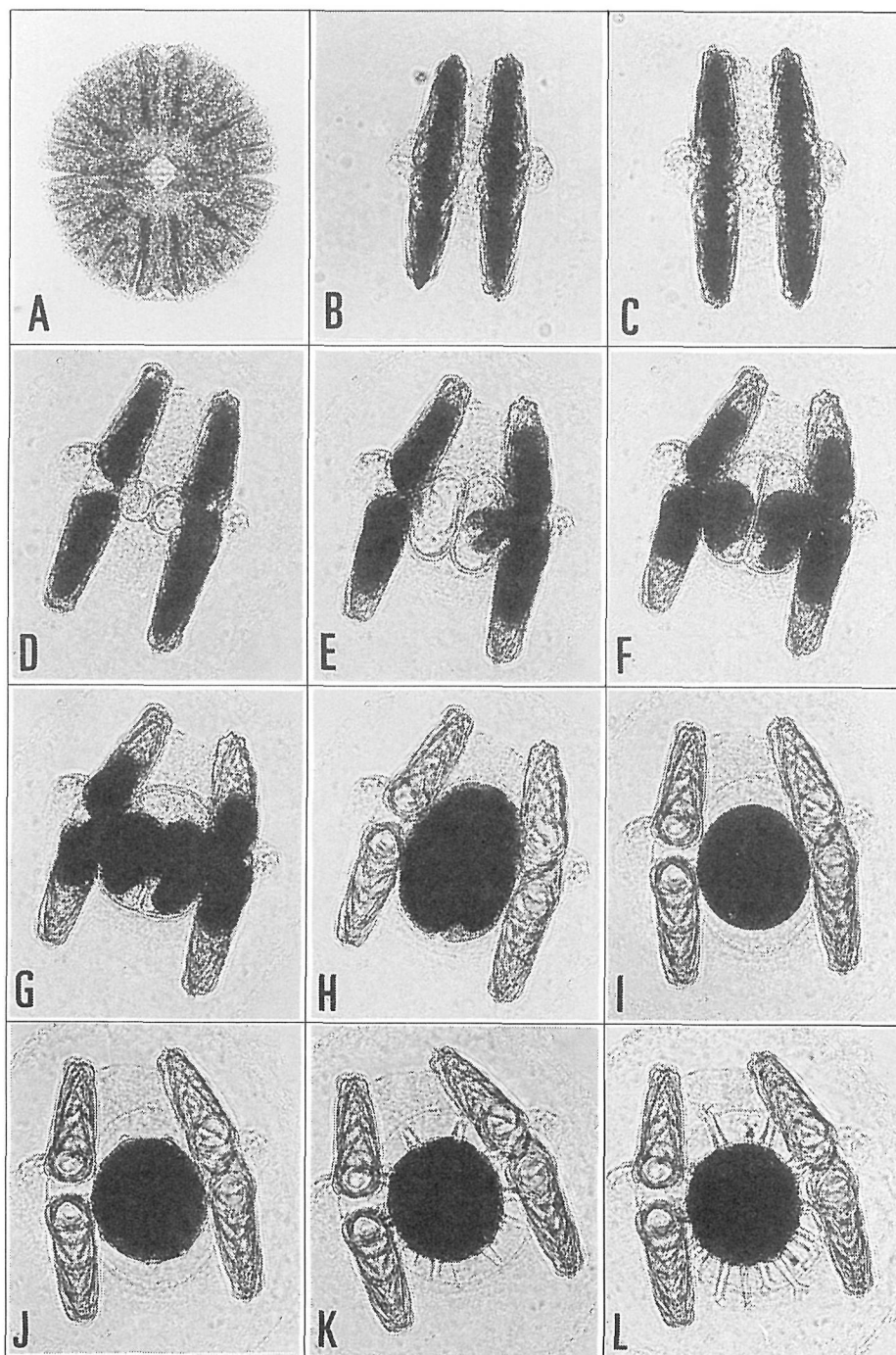


Fig.2