

氏 名(本籍)	えん 遠	どう 藤	ゆう 裕	こ 子
学位の種類	博 士 ( 農 学 )			
学位記番号	農 博 第 8 2 7 号			
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科環境修復生物学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	繊毛虫プランクトン <i>Strombidium conicum</i> の chloroplast 取り込み観察法と encystment 誘導に関する研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	谷 口	旭
	(副 査)	教 授	羽 柴	輝 良
		教 授	菅 原	和 夫

## 論文内容要旨

【はじめに】 海洋表層生態系内で通常の動物プランクトンネットでは採集できない、200 $\mu\text{m}$ 以下の微小動物プランクトンが多く、海洋の物質循環においても重要な役割を担っていること、およびその中では繊毛虫プランクトンが卓越していることが明らかにされたのは、1960-70年代であった。1980年代になってからは、それまで従属栄養性と考えられてきた繊毛虫プランクトンの中に、餌として摂食した植物プランクトンからクロロプラストだけを消化せずに細胞内に保持して光合成せしめ、その産物からもエネルギーを獲得するものもあることが明らかになった。そのような混合栄養性繊毛虫プランクトンの代謝生理を明らかにすることは、海洋生態系の構造と機能を解明するために重要な知見であり、それらに関する研究が行われてきた。

一方、餌である藻類細胞を消化する過程でクロロプラストだけを残して利用するという生態は、植物の起源を探る上で大きな鍵となるため、繊毛虫プランクトンのクロロプラスト取り込みは進化学的観点から注目されるに至った。クロロプラスト保持機構に関する研究は主に透過型電子顕微鏡 (TEM) による細胞形態学的手法によって行われたが、クロロプラスト取り込み過程の研究は、クロロプラストを保持していない栄養細胞を自然群集から入手することが極めて困難であるため、進展しなかった。

女川湾では混合栄養性の繊毛虫プランクトン *Strombidium conicum* が優占し、海底泥中にはそのシストが、大量に存在すること、およびがそのシストを excyst させる培養法が Kim (1995)、Kim & Taniguchi (1995, 1997) によって明らかにされた。従って、シストを十分量入手できれば、excyst した直後のクロロプラストを持たない初生栄養細胞を入手することができる。そのような初生栄養細胞に餌料となる植物プランクトンを与えることにより、摂食、消化およびクロロプラスト取り込みの過程を観察することができると考えられた。そのためには随時必要量のシストを入手することが重要であるが、本種のシストを人為的に産生させることは試みられたことがない。

本研究では、まず *Strombidium conicum* のクロロプラスト保持状態を観察するための TEM 試料作成方法の確立をめざした。次いで、シストを随時入手するために *Strombidium conicum* の encystment 誘導実験を行った。その過程で、女川湾における自然群集の encystment 誘導要因が明らかになったので、併せて報告する。

### 1. *Strombidium conicum* のクロロプラスト保持状態の観察法

【目的】 クロロプラストの取り込み過程を明らかにするには、シストから excyst した直後の初生細胞に餌料植物プランクトンを摂食させ、摂食、消化、クロロプラスト取り

込みの時系列を TEM で追跡する必要がある。しかし、本種の細胞は脆弱で、良好な TEM 試料を作成する方法は確立されていない。そのため、本研究ではまずその方法の確立をめざした。限られた数の細胞から良質な TEM 試料を作成すること、特に細胞膜が十分に発達していないと思われる excystment 直後の初生細胞を高い確率で固定し、TEM 試料を作成することを課題とした。

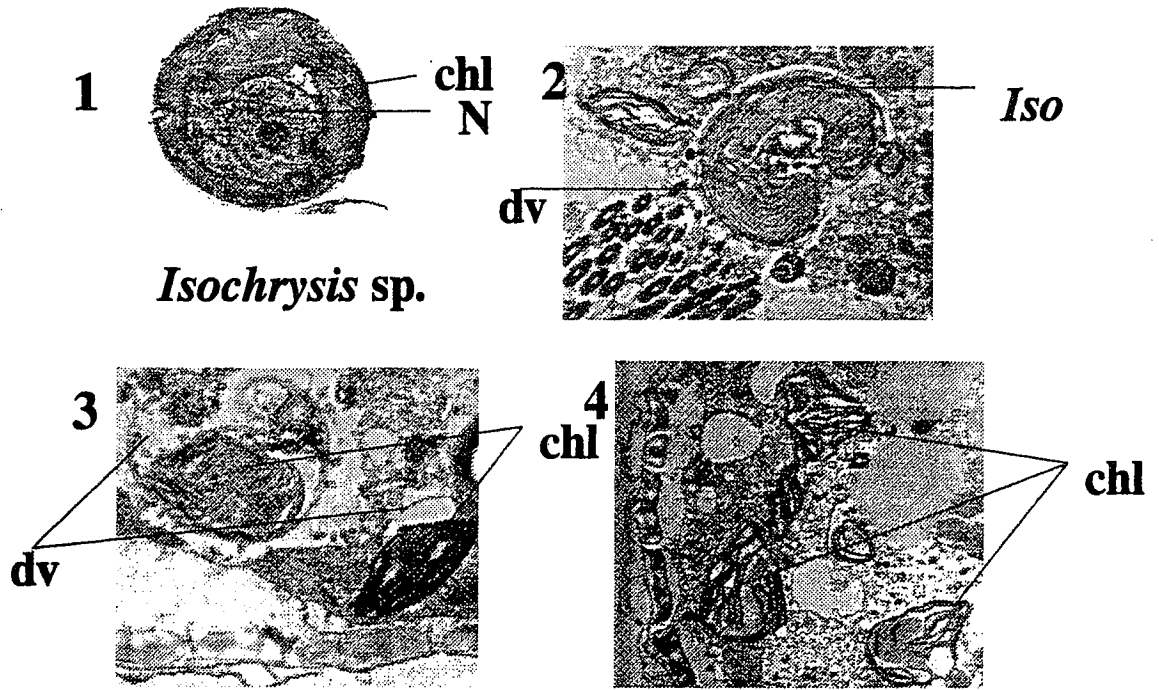
【材料と方法】 実験に供した *Strombidium conicum* は、女川湾から採集した海底泥からソートし培養したものである。これから excyst した栄養細胞に餌として *Isochrysis* sp. を与えて飼育した。その結果増殖した栄養細胞から TEM 試料を作るには、既存の方法によれば、前固定、濃縮、後固定、脱水、包埋、切片作成、電子染色という手順が必要であるといわれている。本研究ではまずこの方法に従い、前固定を 0.1 M カコジル酸バッファで調整した 2% グルタルアルデヒドで、試料濃縮を 500 rpm で 10 分間、後固定を 0.1 M カコジル酸バッファで調整した 1% オスミウム酸で行い、エチルアルコールで脱水した後に、試料に包埋剤を浸透させるため、プロピレンオキサイドに浸漬してから、エポック 812 または クエトール 812 に包埋した (作成法 1)。しかし、この方法ではクロロプラストの微細構造まで観察することは困難であったので、本村泰三が植物観察に用いている方法にならって次のような改良を施した。

前固定は、本村博士の助言に従ってまず 0.5% グルタルアルデヒドで固定を行った後、2-3% グルタルアルデヒドで再固定した。試料濃縮には、細胞の破損を抑えるために手回し遠心機を用いた。後固定は、前法と同様 1% オスミウム酸で行った。試料に塩分が残っていると超薄切片の表面が滑らかでなく観察の障害になるため、脱水の前に塩抜きを行った。脱水は、エチルアルコールのかわりにアセトンで、また包埋剤はスパーで行った。

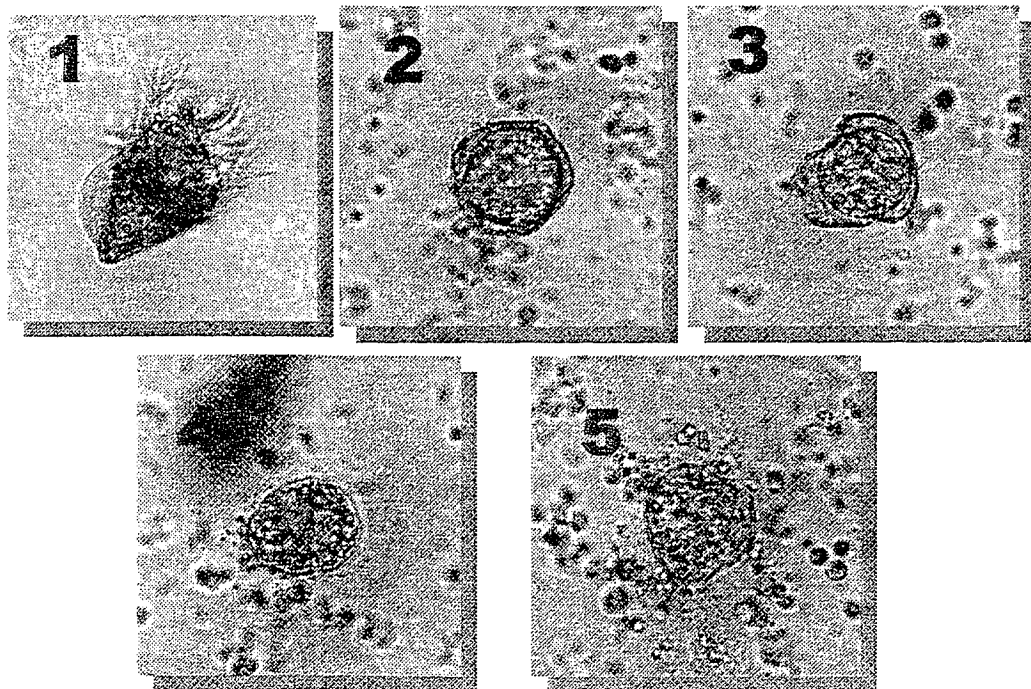
*S. conicum* は excystment 直後に摂食を開始しなければ死ぬこと、そして、植物プランクトンを給餌しクロロプラストを取り込むことを避けるため、バクテリアを与えてクロロプラストを持たない栄養細胞を作を試みた。

改良法の前固定でも破損する細胞がみられたので、グルタルアルデヒド濃度を 0.5、1、2、3、4、5% の 6 段階とし、破損の程度を調べた。

【結果と考察】 改良法で得られた TEM 画像 (Fig. 1) は 作成法 1 で得られた画像に比べて細胞の微細構造の保存に勝っていた。摂食される前と摂食された後の *Isochrysis* sp. のクロロプラストのラメラ構造やピレノイドが良く保存され、前後の関連を解析するには十分な水準が達成されたといえる。すなわち、この水準ならば、繊毛虫細胞内に



**Fig. 1.** TEM of chloroplasts (chl) and nucleus (N) of *Isochrysis* sp. (Iso) (1), just ingested cells of *Isochrysis* sp. (2), some chloroplasts and some digestive vacuoles (dv) in *Strombidium conicum* protoplasm (3,4).



**Fig. 2.** Vegetative cell with a swelling on side (1), cysts under shell formation (2,3,4) and dead or empty cyst (5) of *Strombidium conicum* observed in the Experiment 1.

取り込まれているクロロプラストの由来植物プランクトン分類群を同定することが可能である。

Excystment 直後にバクテリアを与えたときに得られた、24 個体の *S. conicum* のすべては、クロロプラストを保持せずに 24 時間以上生存した。その後も、分裂増殖はしなかったが 1 週間以上生存した個体もみられた。

前固定時のグルタルアルデヒド濃度と栄養細胞の破損程度を検討した結果、0.5-1% の低濃度よりも 4-5% という高濃度の方が、破損が抑えられ、成績が良いことがわかった。

【結論】 以上の結果から、excystment 時にバクテリアを与えて飼育した栄養細胞を使って植物プランクトンの摂食、消化、クロロプラスト取り込み過程の時系列を観察することができること、また、その際には、前固定を 4% グルタルアルデヒドで行い、以下改良法に従えば良好な TEM 試料にもとづいた結果が得られるものと考えられる。

## 2. *Strombidium conicum* にみられる encystment の生物学的意義

【目的】 *Strombidium conicum* の excystment および encystment を自由にコントロールすることができれば、クロロプラストの取り込み過程観察のために十分な数の、クロロプラストを持たない初生栄養細胞を入手することができる。このうち excystment についての知見はすでに報告されているが、encystment コントロールについての知見は全くない。一般に原生生物のシストの役割は不適な環境に耐えるためといわれ、一方では原生生物は個体群の若返りのために接合することが必要ともいわれ、接合後にシストを形成する種も報告されている。本研究では、*S. conicum* の encystment を随時誘導して十分量のシストを入手する方法の確立のために、本種の encystment が環境悪化と接合の必要性とのいずれによって誘発されるのかを調べた。

### 2-1. 外的環境と encystment の関係 (室内実験)

【材料と方法】 供試栄養細胞は、女川湾の海底泥中からソートして、F/2-Si 培地で excyst させ、*Isochrysis* sp. を与えて増殖させたものである。この単一クローンを用いて、異なる温度、餌および光環境下における細胞群の動態を調査した。また、同時に excyst させた 4 つのクローンについて、15 °C における excystment から 6 日後までの growth rate および 1 つのクローンについては、excystment から数えて 28 日後の 10, 15, 20, 22, 25 °C における growth rate を測定した。

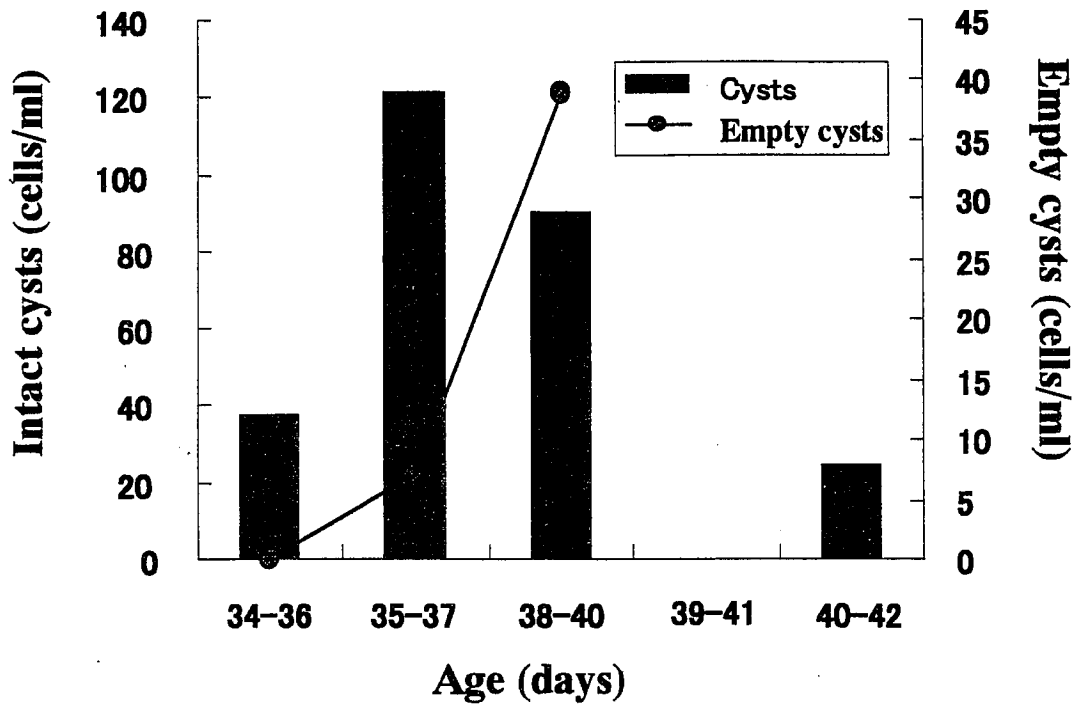
【結果と考察】 飼育群は多くの場合定常期に達してからも長く維持されたが、単一クローンでは、いずれの条件下でも encystment は起こらなかった。Excystment 後 28 日経過してから測定した growth rate は、10、15、20、22、25 °C において、それぞれ -0.49、0.42、1.28、0.35、-2.10  $\mu$ /day であった。すなわち、10 °C と 25 °C は *S. conicum* にとって不適水温であった。それにも拘わらず encystment が起こらなかったことは、不適水温環境だけでは、encystment が誘導されないことを示している。また、適水温 15 °C および 20 °C であっても、飢餓あるいは暗条件下では 2-3 日後にほとんど死滅し、飢餓条件および暗条件も極めて厳しい不適環境であることが分かった。このときにもまた encystment は起こらなかった。以上のことから、クローン飼育では、水温、餌濃度、光環境といった外的環境要因の悪化では、encystment は誘発されないといえる。

## 2-2. 齢と encystment の関係 (室内実験)

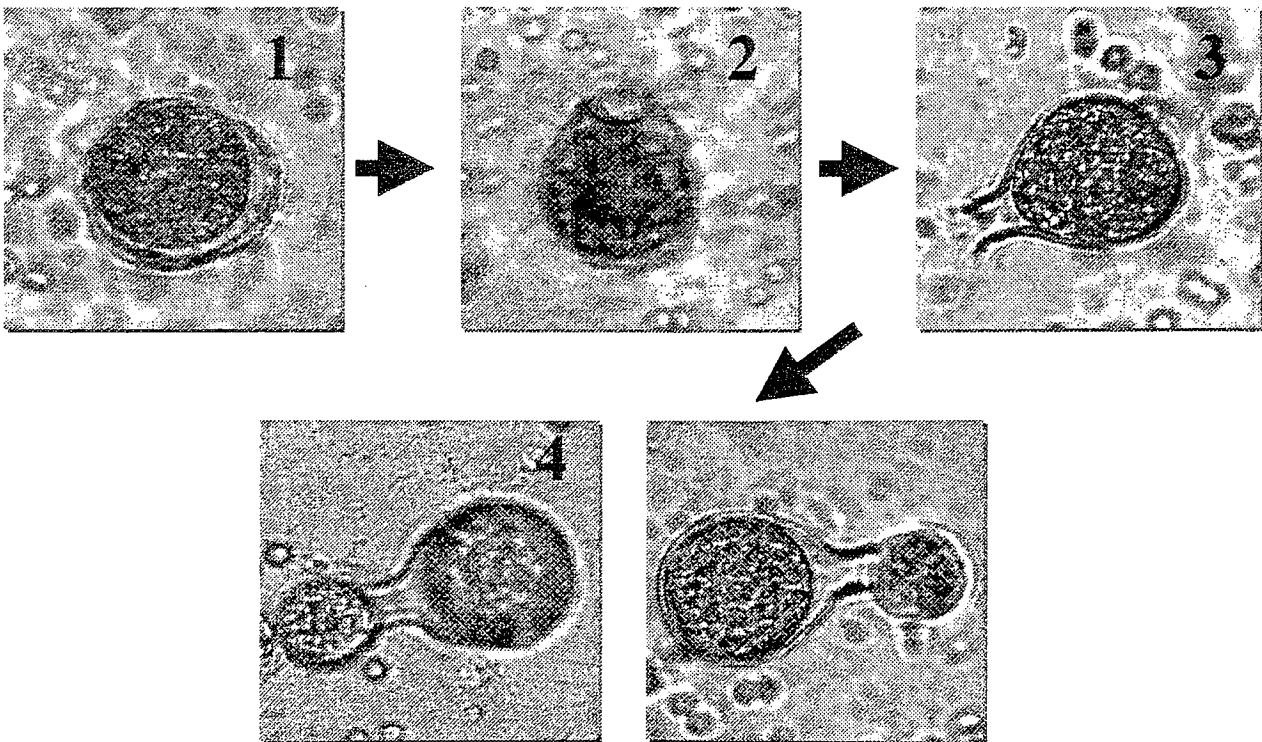
【材料と方法】 異なるシストから excyst した 5 つのクローン栄養細胞群から各 1 個体をソートして同一セル中に入れ、混合クローン飼育群を作った。飼育条件は前述の実験と同じにした。飼育期間中毎日 1 回、接合と encystment の有無のチェックを行った (実験 1)。その後同様の実験を 2 回行った (実験 2,3)。

【結果と考察】 実験 1, 2, 3 では excystment から数えて 32-36 日後に encystment が起こった (Fig. 2,3,4)。このことは、encystment には複数のクローンの混在が必要であることを示している。実際に実験 1 では接合ペアが確認され、その他にも側面にコブ状突起を持っている単独栄養細胞もみられた (Fig. 2)。後者は実験 2 でもみられた。このことは、encystment の前には接合が起こること示唆している。これらの飼育群の growth rate から、encystment が起こるまでの間に約 12-15 回の分裂があったと計算された。接合は、二分分裂増殖を重ね、個体群が成熟あるいは老化したときに起こるといわれているので、*S. conicum* は 12-19 回の分裂で成熟あるいは老化に達したものと考えられる。すなわち、*S. conicum* の encystment には、複数のクローンの混在および個体群の加齢が必要であるといえる。なお、実験 3 では、新に形成されたシストが 2-3 日後に cyclosis していることが確認された。このことは、本種のシストは、形成後短期間に excyst する能力を備えていることを示している。

以上の成果を利用すれば、実験室内において encyst させ、得られたシストを excyst させることで初生栄養細胞を随時入手することが可能になる。この方法により、初生栄養細胞によるクロロプラストの取り込みの過程あるいは保持の機構に関する観察が可能になると期待できる。



**Fig. 3.** Numbers of encystment and empty cyst of *Strombidium conicum* observed during the Experiment 2 under the condition at 15°C with 14L/10D light cycle.



**Fig. 4.** Process of encystment of *Strombidium conicum* observed in the Experiment 3, 1: Secretion of shell-material, 2: formation of the shell, 3: completion of the shell, 4: excretion of food vacuole contents and chloroplasts.

### 3. *Strombidium conicum* 自然群集の encystment

【材料と方法】 女川湾における本種の encystment 期に相当する 2003 年 9 月から 11 月にかけて、海洋観測、採水、sediment trap 採集を毎週行った。また、周年変化をみるために 2003 年 9 月から 2004 年 9 月にわたって毎月 1 回同様の観測採集を行った。

【結果と考察】 9 月から 11 月のシスト形成期には、水温、クロロフィル *a* 濃度および *S. conicum* 栄養細胞密度のいずれもが高かった。このことは、次世代の発生源を大量に確保するための適応だといわれてきた。私はそれに次のことを付け加えたい。それは、栄養細胞のピーク時には個体群の若返りが必要になり、その結果接合と encystment が繰り返されること、そして個体群のピーク時であれば異なったクローンの栄養細胞どうしの遭遇率が高くなるので有利であるということである。その後冬季には、現場水温は低下して 1 月から 4 月まで全層の水温は 10 °C 以下になるが、本研究において 10 °C 以下では *S. conicum* はほとんど成長しないか死亡することが明らかになった。過去の研究によれば、底層水温が低下するに従って excystment 率が低くなる遅延型シスト群集へと変化するとされている。したがって、初冬に形成されるシストは直ちに excyst することがなく、結果的に越冬の機能を有することになると考えられる。以上要約すると、*S. conicum* のシスト形成は個体群の若返りの過程の 1 つであり、形成されたシストは環境が悪化すれば耐久性を発揮することができるといえる。



## 論文審査結果要旨

繊毛虫プランクトンの中に、餌として摂食した植物プランクトンのクロロプラストを細胞内に保持して光合成せしめる混合栄養者があり、海洋生態学および植物進化学の分野で興味を引いている。クロロプラスト獲得保持機構の研究は透過型電子顕微鏡 (TEM) による細胞形態学的手法で行われるが、クロロプラスト未保持細胞の入手が困難なため、その取込過程の研究は進展していない。そのため本研究は、卓越する無殻繊毛虫プランクトン *Strombidium conicum* を材料とし、TEM 観察試料作成方法の確立およびクロロプラスト未保持細胞入手のためのシスト形成誘導法の解明を目的とした。

この分野では、脆弱な細胞の破壊損失を招かない固定法と、細胞内に取込まれたクロロプラストの微細構造観察に適した TEM 観察試料作成法が必要である。本研究は、原生動物細胞の観察法に無殻植物プランクトン細胞観察法を組合せて試行錯誤しつつ、確率の高い固定法と TEM 試料作成法を開発した。これにより、初生細胞によるクロロプラスト取込み過程の研究が進展すると期待される。

クロロプラスト取込み過程の研究にはクロロプラスト未保持細胞が必要であるが、それは自然群集中にはほとんど存在しない。そこで、*S. conicum* 飼育群でシスト形成を誘導し、シストから初生細胞を入手することをめざした。一般に原生生物のシストは耐久細胞であり、環境ストレスで形成が誘導されるといわれている。しかし本研究は、本種のシスト形成は、餌、水温、光の致死レベルに達するまでのストレスによっても誘導されないこと、複数クローンの混合群では加齢によって接合が起こり、その結果シストが形成されることを見出した。さらに、新シストが 2-3 日後には excyst することを確認した。これらのことは、本種のシストが本来耐久休眠シストではなく、個体群若返りの一過程であることを示している。この発見は、原生動物のシストの機能に関する新知見であるとともに、実験室内で随時シスト形成を誘導し、得られたシストから初生栄養細胞を入手することを可能にするものであり、将来の研究に資するところが大きいと評価できる。

さらに、女川湾において 2003 年 9 月から一年間、毎月 1 回、うち *S. conicum* のシスト形成盛期に相当する 9 月から 11 月には毎週 1 回の頻度で現場観測を行い、シスト形成期には環境条件が好適であり、本種の栄養細胞群密度も高いことを再確認し、シスト形成が耐久性獲得よりも個体群若返りと深く関係し、それがこの期間に複数回繰返されることを論じた。この期間後半から水温が低下するが、それが形成されたシストの excystment を阻害遅延させるので、結果的に耐久越冬が可能になるという著者の推論は、過去の知見と本研究の発見とを矛盾なく説明する論理であると評価することができる。

以上のように、本研究は卓越する繊毛虫プランクトンの生物学に新知見を加え、かつ、将来の研究に資するところが大きいものであり、審査委員一同は博士（農学）の学位を授与するにふさわしいと判定した。