

静岡県浜松市三ヶ日町尾奈で採集された糸状藻 アオミドロ属（接合藻綱）の接合を誘引する要因の解析

野 崎 健太郎*

Study on factors inducing conjugation of a filamentous green alga *Spirogyra* sp.
(Zygnematophyceae) collecting from Ona, Mikkabi, Hamamatsu, Shizuoka, Japan

Kentaro NOZAKI

要 旨

2014年4月11日および4月18日に静岡県浜松市三ヶ日町尾奈の水田横の水路で採集された糸状藻アオミドロ（接合藻綱）を用いて、有性生殖の一形態である接合を誘引する要因を検討した。本研究では、接合を誘引する要因として、これまで有力な要因として調べられてきた窒素飢餓に代表される水質の変化に焦点をあてた。そこでアオミドロを培養する溶液として、採集地の水、24時間汲み置いた実験室の水道水（名古屋市水道局、木曾川が水源）、蒸留水の3種類を用意した。すなわち、採集地の水に比べて、窒素が少ない蒸留水を用いた実験区で最も接合が誘引されると予測した。水質の指標とした電気伝導度は、採集地の水で26 mS/m、水道水で5~6 mS/m、蒸留水で0.8 mS/mであった。pHは7であった。11日に採集した試料では、培養開始68.5時間後には採集地の水87%、水道水72%、蒸留水80%が接合し、実験区で大きな違いは見られなかった。18日に採集した試料では、培養開始73時間後には、90%以上の接合を示し、地点間、実験区間で意味のある違いは観察されなかった。実験結果から、本研究で用いたアオミドロの接合には水質の変化が要因となっている可能性は低いと考えられた。興味深い結果は、11日の試料では接合しなかった地点のアオミドロが、18日の試料では、87~97%の細胞に接合が生じたことである。アオミドロにおける生物季節の存在が示唆された。

キーワード：アオミドロ属、有性生殖、接合、接合胞子、窒素飢餓、生物季節

Key words : Genus *Spirogyra*, sexual reproduction, conjugation, zygospore, nitrogen depletion, phenology

研究の背景と目的

接合藻綱（Zygnematophyceae）として扱われるアオミドロ属（Genus *Spirogyra*）は、細

* 教育学部 子ども発達学科

胞が糸状に連結した髪の毛状の群体を形成する多細胞生物であり、近年では広義の車軸藻（シャジクモ）綱（Charophyceae）に含まれるとされている（千原，1999；井上，2006）。アオミドロの群体は、肉眼ではアオサ藻綱（Ulvophyceae）のカワシオグサ属（Genus *Cladophora*）に類似しているが、分枝せず（unbranched）、細胞表面にぬめりがある点で形態が異なる。細胞を顕微鏡で観察すると葉緑体が細胞壁に沿って、らせん状に回転し（spirally coiled chloroplast）、光合成色素としてクロロフィル a を多く含むため鮮やかな緑色を呈している（山岸，1999）。

アオミドロは、異なる群体を形成する細胞が接合（conjugation）し、どちらか一方に細胞質が流れ込み接合胞子（zygospore）を形成する有性生殖を行う。このため、アオミドロは、同形配偶子による有性生殖の教材として一般的である（野崎，2014）。しかしながら、接合を誘引する要因については確定しておらず、窒素飢餓（窒素欠乏）が有力な要因の1つとされている（Yamashita and Sasaki, 1979; Ikegaya *et al.*, 2012; Nozaki, 2013）。筆者は、接合を誘引する要因の探索については、未だ情報が不足しており、今後も研究の蓄積が必要と考えている。

本研究では、分類学・地理学的研究のために、2014年3月26日に静岡県浜松市で採集されたアオミドロが、実験室で接合し接合胞子を形成したため（Nozaki，投稿中）、同じ場所で採集したアオミドロを用いて接合を誘引する要因を検討する実験を行った。なお、本研究の遂行にあたり、科学研究費補助金基盤研究C（研究課題番号：24501114，研究代表者：野崎健太郎）を用いた。

方 法

アオミドロの採集

実験試料の採集は、静岡県浜松市三ヶ日町尾奈の水田横の水路で行った（北緯34度46分48秒，東経137度32分23秒）。水田は天竜浜名湖鉄道の線路わきで、みかん畑として開墾されている丘陵地に接している。採集地には、鉄分に富むと思われる赤みを帯びた湧水が丘陵地から流入している。アオミドロは水路全体に繁茂していたが、特に群落形成が明瞭であった場所から試料を採集した（図1a~c）。最も下流の採集地を地点1、丘陵地からの湧水が流入している場所を地点2、そして湧水の流入点より上流で地点1からおよそ7m上流の場所を地点3とした。

アオミドロの群落は20~30cmの糸状体が集合して形成されており、根元の部分は、他の生き物、有機物の残渣、砂泥が着生・混入しているため、なるべく群落上部の5~10cmの部分から実験試料を採集した。採集したアオミドロは100mLのポリびんに入れ、10℃以下の冷暗状態に保ち2時間以内に実験室へ移送した。採集は2014年4月11日と4月18日に行った。採集地では、日本陸水学会東海支部会編集（2014）の手順に従い、環境要素として水温（棒温度計）、電気伝導度（東亜電工，CM-21P）、pH（共立理化，パケットテストWAK-pH）の測定を行った。実験に用いる採集地の水は1Lのポリびんに採取し、アオミドロと同じく冷暗状態に保ちながら実験室へ運んだ。



図 1a~c 静岡県浜松市三ヶ日町尾奈のアオミドロの採集地点（2014年4月18日）。

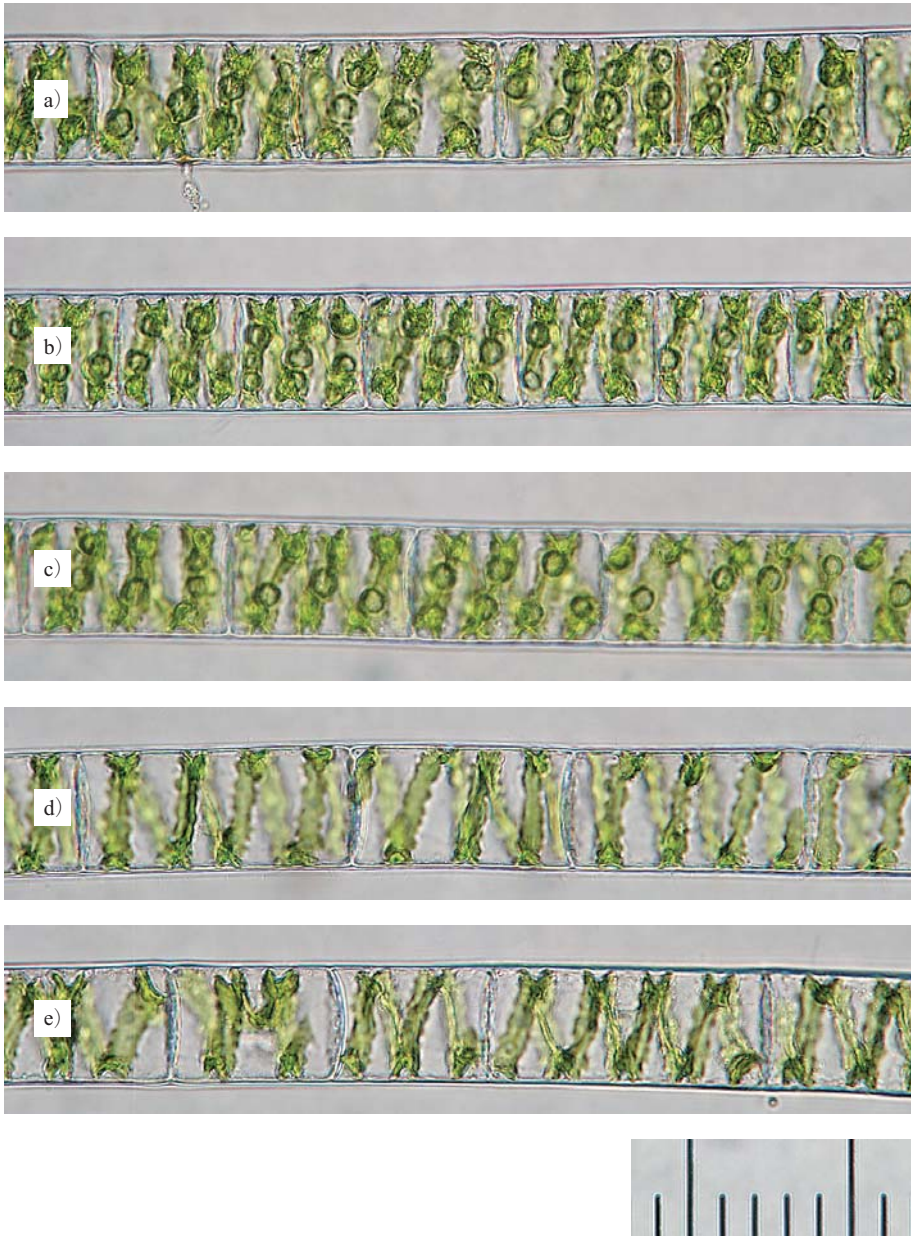


図2a~e 実験に用いたアオミドロ (600倍)。
a) 地点1 (4月11日), b) 地点2 (4月11日), c) 地点3 (4月11日), d) 地点1 (4月18日), e) 地点3 (4月18日)。対物マイクロメーターの1目盛りは10 μm を示す。

試料の調整

アオミドロは、白いバットに水ごと移し、混入している他の生物やごみ等の異物をピンセットで取り除いた。続いて蒸留水を満たしたガラスシャーレで良く洗浄した。そして、実験までは、ガラス繊維ろ紙（ADVANTEC, GF-75, 直径47mm）でろ過した調査地点の水で満たしたビーカーに入れておいた。試料としたアオミドロを図2a～eに示した。地点間、調査日で外部形態の大きな違いは見られず、同じ種類であると判断した。細胞の直径は40～50 μ mで、細胞の連結部の隔膜は平板状（plane end cell wall）、葉緑体は1本（single chloroplast）であった。本試料の外部形態は、福井県敦賀市中池見湿地で2012年3月12日に採取され、接合過程と接合胞子の形態から *Spirogyra variformis* TRANSEAU と同定されたアオミドロ（Nozaki, 2013）に酷似していた。

今回の実験では、接合を誘引する要因として、これまで有力な要因として調べられてきた窒素飢餓に代表される水質の変化に焦点をあてる。そこでアオミドロを培養する溶液として、ろ過した採集地の水、24時間汲み置いた実験室の水道水（名古屋市水道局、木曾川が水源）、蒸留水（YAMATO, WG203で製造）の3種類を用意した。すなわち、採集地の水に比べて、窒素が少ない蒸留水を用いた実験区で最も接合が誘引されると予測した。水質の指標とした電気伝導度は、採集地の水で26 mS/m、水道水で5～6 mS/m、蒸留水で0.8 mS/mであった。pHは7であった。

実験1の構成

4月11日に地点1～3から採集したアオミドロを用いて、4月11日17時～4月14日13時30分に行った。採集地の水、水道水、蒸留水で満たしたシャーレを各3枚、合計9枚用意した。各地点のアオミドロを、異なる溶液で満たした3枚のシャーレに移し、人工気象器（SANYO, GROWTH CHAMBER, MLR-351H）内で20 $^{\circ}$ C、明暗各12時間で培養した。光条件は最大の強さに設定した。

4月12日16時（23時間後）と4月14日13時30分（68.5時間後）に接合の状態を観察した。シャーレからアオミドロ群落の一部を採取し、スライドガラス上に広げ光学顕微鏡（OLYMPUS, BX-51）を用い200倍で接合の有無を確認した。その後、無作為に10視野を選び、通常の細胞と接合している細胞に分けて計数を行った。

実験2の構成

4月18日に地点1および地点3から採集したアオミドロを用いて、4月18日18時～4月21日19時に行った。実験2では、水道水を外し、採集地の水を2種類設定した。1つは、実験1と同じく、ガラス繊維ろ紙でろ過したもの、もう1つは、ろ過後、60～70 $^{\circ}$ Cで20分間熱殺菌したものを用意した。これは、微生物の影響を除去するために行った。以下、実験1と同様の手順で培養を行い、4月21日19時に接合の有無を確認し計数を行った。

地点1および3のアオミドロの質的な違いを知るために、単位重量あたりのクロロフィルa含有量を測定した。アオミドロは群体を長さ1cm程度に切断し、蒸留水に懸濁させた。懸濁水に含まれたアオミドロは、ガラス繊維ろ紙（ADVANTEC, GF-75, 直径47mm）上に捕集した。1試料について6枚をろ過し、3枚は重量、残りの3枚はクロロフィルaの分析に用いた。地点1と3以外に、隣接する水田に繁茂していたアオミドロも比較

対象として分析した。

分析手順は、日本陸水学会東海支部会編集（2014）に従った。重量は、まずろ紙を乾燥器（AS ONE, S. P. MODULE）で72時間処理し、重量変化が無くなったことを確認して乾燥重量を測定した。続いて電気炉（SHIROTA, Super 300S）に入れ、550℃で3時間熱し、110℃で12時間放冷した後、再び乾燥重量を測定した。加熱後に減少した重量を有機物、すなわちアオミドロの乾燥重量と見なした。クロロフィル a は、ろ紙を90%アセトン10mLで抽出した後、分光光度計（HITACHI, U-1500）で吸光度を測り、Lorenzen法で算出した。

表1 実験1の計数結果。

	4月12日			4月14日		
	通常 (細胞の状態：細胞数)	接合	合計	通常	接合	合計
地点1						
採集地の水	1812	146	1958	444	3105	3549
水道水（汲み置き）	1665	776	2441	1071	2772	3843
蒸留水	2097	1260	3357	752	2922	3674
地点2						
採集地の水	1668	0	1668	計数せず		
水道水（汲み置き）	3274	2	3276			
蒸留水	1855	2	1857			
地点3						
採集地の水	2121	0	2121	計数せず		
水道水（汲み置き）	1866	0	1866			
蒸留水	2032	0	2032			

結果と考察

実験1

接合の有無を計数した結果を表1に示した。地点1で採集されたアオミドロは接合を生じたが、地点2および3のアオミドロは、ほとんど接合せず、第2回目（4月14日）の計数は行わなかった。また、採集地の水で培養した地点2および3のアオミドロは、4月14日には、糸状の群体がばらばらになっていた（図3）。

図4は、地点1のアオミドロの結果を示している。培養開始23時間後（4月11日）では、採集地の水で培養したアオミドロの接合が7%と低かったが、68.5時間後（4月14日）には、採集地の水87%、水道水72%、蒸留水80%が接合し、実験区で大きな違いは見られなかった。

実験2

表2に計数結果を示した。実験1と異なり、地点3で採集されたアオミドロにも接合が生じた。図5で実験区を比較すると、全ての実験区は培養開始73時間後には、いずれも

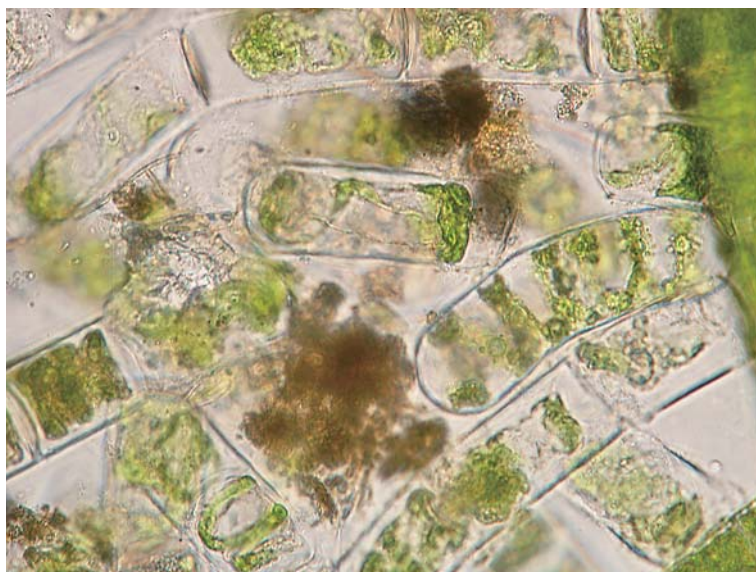


図3 調査地の水で培養した地点2のアオミドロ。培養開始68.5時間後。

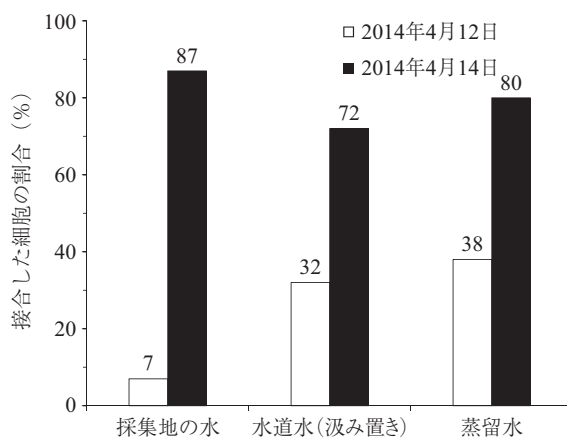


図4 地点1で採集したアオミドロの接合実験の結果（実験1）。

表2 実験2の計数結果。

	地点1			地点3		
	通常	接合	合計	通常	接合	合計
	(細胞の状態：細胞数)			(細胞の状態：細胞数)		
採集地の水	144	3684	3828	149	4286	4435
採集地の水（加熱）	327	3675	4002	255	3491	3746
蒸留水	242	3557	3799	663	4321	4984

90%以上の接合を示し、地点間、実験区間で意味のある違いは観察されなかった。

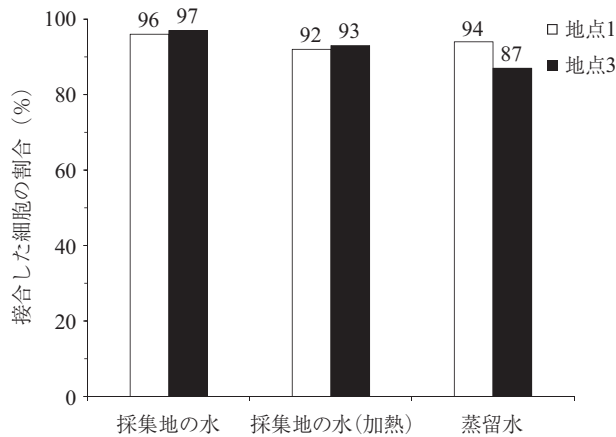


図5 地点1および3で採集したアオミドロの接合実験の結果（実験2）。

表3は、実験試料としたアオミドロの単位乾燥重量あたりのクロロフィルa含有量を示している。それぞれ地点1は 4.5 ± 1.0 mg/g、地点3は 2.2 ± 0.3 mg/g、水田は 3.9 ± 0.4 mg/gとなり、地点3のクロロフィルa含有量が低かったが、接合実験の結果からは、クロロフィルa含有量が接合に影響を及ぼしているとは考えられなかった。

表3 アオミドロの単位有機物量あたりのクロロフィルa含有量（2014年4月18日採集の試料）

	クロロフィルa μg/L	有機物 g/L	含有量 mg/g	平均値 mg/g	標準偏差
地点1	1164	0.22	5.29	4.45	0.94
	929	0.27	3.44		
	1111	0.24	4.63		
地点3	489	0.20	2.44	2.15	0.28
	462	0.22	2.10		
	398	0.21	1.89		
水田	422	0.10	4.22	3.85	0.42
	374	0.11	3.40		
	392	0.10	3.92		

採集地のアオミドロの接合を誘引する要因

実験1および2の結果から、本研究で用いたアオミドロの接合には水質の変化が要因となっている可能性は低いと考察できる。アオミドロは、採集地の水、水道水、蒸留水のいずれでも接合を生じた。むしろ興味深い結果は、実験1では接合を生じなかった地点3のアオミドロが実験2では、87~97%の細胞に接合が生じたことである。この結果からは、地点3のアオミドロは4月11日には、細胞が接合する状態になっておらず、1週間後の4月18日には、その状態に達していたことが示唆される。

静岡県浜松市三ヶ日町尾奈で採集された糸状藻アオミドロ属（接合藻綱）の接合を誘引する要因の解析

1週間の間で明確に変化した環境要素は水温である。地点1は、最も下流に位置する採集地点で、水温14℃の湧水が直上に流入するため、地点3よりも水温が高い。4月11日の地点1の水温は13℃であったが、地点3は12℃であった。その後、4月18日には、地点1および地点3の水温は、14℃に達した。Nozaki (2013) は、本研究で用いたアオミドロと同種と思われる *Spirogyra variformis* TRANSEAU の接合を誘引する要因として水温の上昇を推測している。

山岸 (1999) は、実証的な研究の不足を認めた上で、藻類の生活史にも陸上の植物と同様に、発生、成長、生殖等が季節と対応している可能性を述べている。すなわち、生物季節 (phenology) の存在である。生物季節に大きな影響を及ぼす環境要素は、光と温度である。今後は、これまで接合を誘引する主な要因と思われてきた窒素飢餓に加え、陸上の植物の生活史解析と同様に、光と温度の季節変化に着目する必要があると考えられる。なお、本採集地で地点1の水温が20℃に達した5月23日まで観測を継続したが、水温が17℃になった4月25日には、本研究で用いた葉緑体が1本のアオミドロは衰退し、複数の葉緑体を持ったアオミドロに優占種が交代した。この観測結果からもアオミドロにおける生物季節の存在が示唆される。

文 献

- 千原光雄 (1999) 藻類の多様性と系統. 裳華房.
- Ikegaya, H., T. Nakase, K. Iwata, H. Tsuchida, S. Sonobe and T. Shimmen (2012) Studies on conjugation of *Spirogyra* using monoclonal culture. *Journal of Plant Research*, **125**: 457-464.
- 井上勲 (2006) 藻類30億年の自然史藻類からみる生物進化・地球・環境. 東海大学出版会.
- 日本陸水学会東海支部会編集 (2014) 身近な水の環境科学 (実習・測定編), 朝倉書店, 東京.
- Nozaki, K. (2013) Formation process of conjugation and zygospores of a filamentous green alga, *Spirogyra* species collected from a lowland marsh, Naka-ikemi, Tsuruga, Fukui, Japan. *Limnology in Tokai Region of Japan*, **60**: 35-39.
- 野崎健太郎 (2014) 生物学教育における有性生殖の教材としての糸状藻アオミドロ属 (車軸藻綱) の有用性. 椋山女学園大学教育学部紀要, **7**: 295-299.
- 山岸高旺 (1999) 淡水藻類入門淡水藻類の形質・種類・観察と研究. 内田老鶴圃.
- Yamashita, T. and K. Sasaki (1979) Conditions for the induction of the mating process and changes in contents of carbohydrates and nitrogen compounds during the mating process of *Spirogyra*. *Journal of Faculty of Science, Hokkaido University, Series V (Botany)*, **11**: 279-287.