

岡崎恵視\*・高田真美\*\*・宮田昌彦\*：石灰緑藻ウチワサボテングサの炭酸カルシウム沈着部位と結晶型について  
(藻類の炭酸カルシウム沈着の研究 II)

Megumi OKAZAKI\*, Mami TAKADA\*\* and Masahiko MIYATA\*:  
Site and nature of calcium carbonate deposits in a calcareous  
green alga *Halimeda discoidea*. (Studies on the calcium  
carbonate deposition of algae-II)

石灰藻には現在のところ、少くとも 680 種<sup>1)</sup> が知られている。筆者らは前報<sup>2)</sup> において、これら石灰藻の種類によって異ったいくつかの石灰化機構が存在する可能性を指摘したが、その後も石灰化機構の重要な一面と思われるカルシウムと炭酸イオンの濃縮のしくみや、石灰化部位での有機基質の有無および、その石灰化への寄与の仕方などについて何らかの手がかりを得る目的で藻類の  $\text{CaCO}_3$  沈着部位とその結晶型についての研究を続けてきた。今回は乾燥重量の 10% が  $\text{CaCO}_3$  からなり、石灰化の程度がさほど顕著でない石灰緑藻ウチワサボテングサ *Halimeda discoidea* について報告したい。

### 材料と方法

ウチワサボテングサ *Halimeda discoidea* Decaisne は伊豆半島爪木崎にて 1975、1976 年の 6、7 月に採集した。この材料を用いて光学顕微鏡の構造と透過型・走査型電子顕微鏡で形態の微細構造の観察を行った。また  $\text{CaCO}_3$  結晶型は制限視野電子線回折法、X 線回折法で決定した。

光学および透過型電子顕微鏡の観察のためには、採集直後の藻体をまずグルタルアルデヒドとオスミック酸で二重固定し、常法に従ってアルコールシリーズで脱水したのちエポキシに包埋した。ただし  $\text{CaCO}_3$  の溶解を防ぐ目的で、固定液は pH 7.4 に調整し、脱水に用いたアルコールはすべて沈降性  $\text{CaCO}_3$  で飽和して使用した。また、光学顕微鏡観察にはエポキシ包埋試料を比較的厚い切片にし、トルイジンブルーで染色した。

走査型電子顕微鏡観察試料にはアセトンシリーズで脱水した藻体を風乾したものをを用いた。この場合もアセトンは上述のようにして  $\text{CaCO}_3$  で飽和したものをを用いた。

\* 東京学芸大学生物学教室 (184 東京都小金井市貫井北町 4-1-1)

Department of Biology, Tokyo Gakugei University, Koganei, Tokyo, 184 Japan.

\*\* 私立暁友学園女子高等学校 (156 東京都世田谷区宮坂 1-5-30)

Ôyu-Gakuen Girls' High School, Setagaya, Tokyo, 156 Japan.

Bull. Jap. Soc. Phycol. 25: 189-194. 1977.

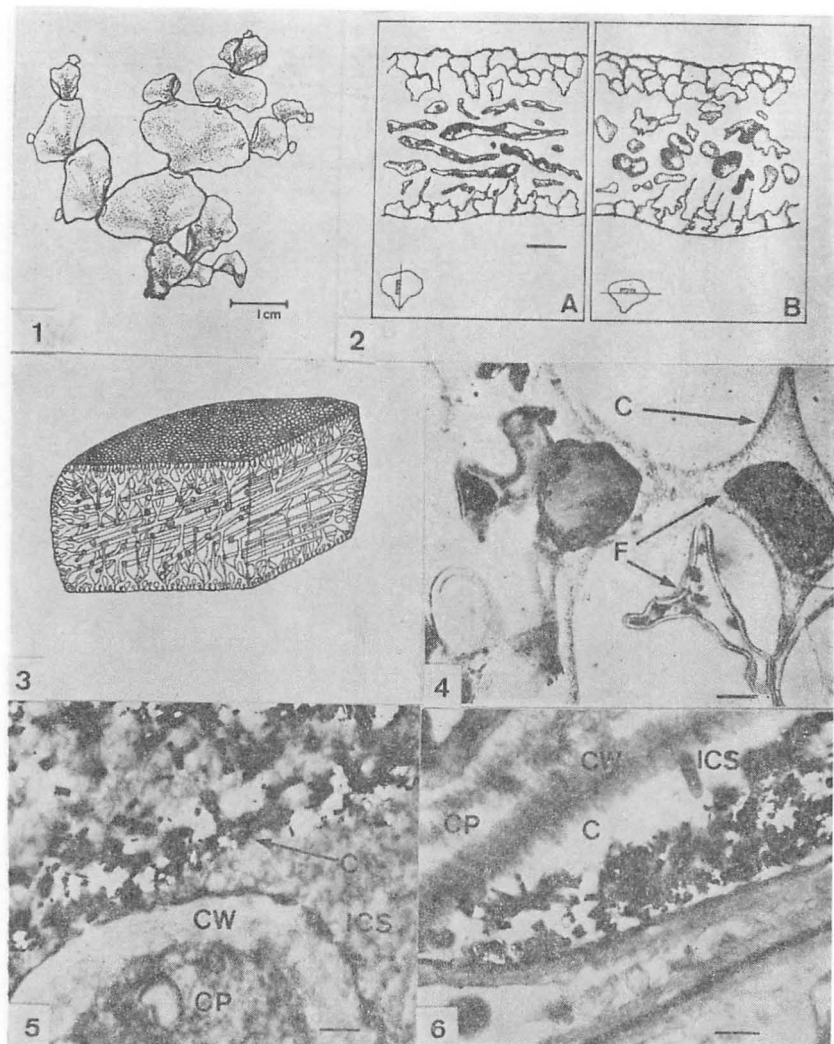
溶解を防いだ。検鏡に先だって乾燥藻体を炭素と金で二重蒸着をほどこした。使用した電子顕微鏡は、日本電子製で透過型が JEM-7 型、走査型が JESM-U3 型である。

X線回折のための試料は採集直後の藻体を蒸留水で簡単に水洗した後風乾したものを粉末化して調整した。制限視野電子線回折は、透過型電顕用超薄切片についておこなった。また前述のアセトン脱水乾燥藻体を 1mm 角程に切り取り、そのまま銅メッシュ上にドータイトで貼り付け、藻体表面に付着している結晶についても電子線回折を行った。

## 結 果

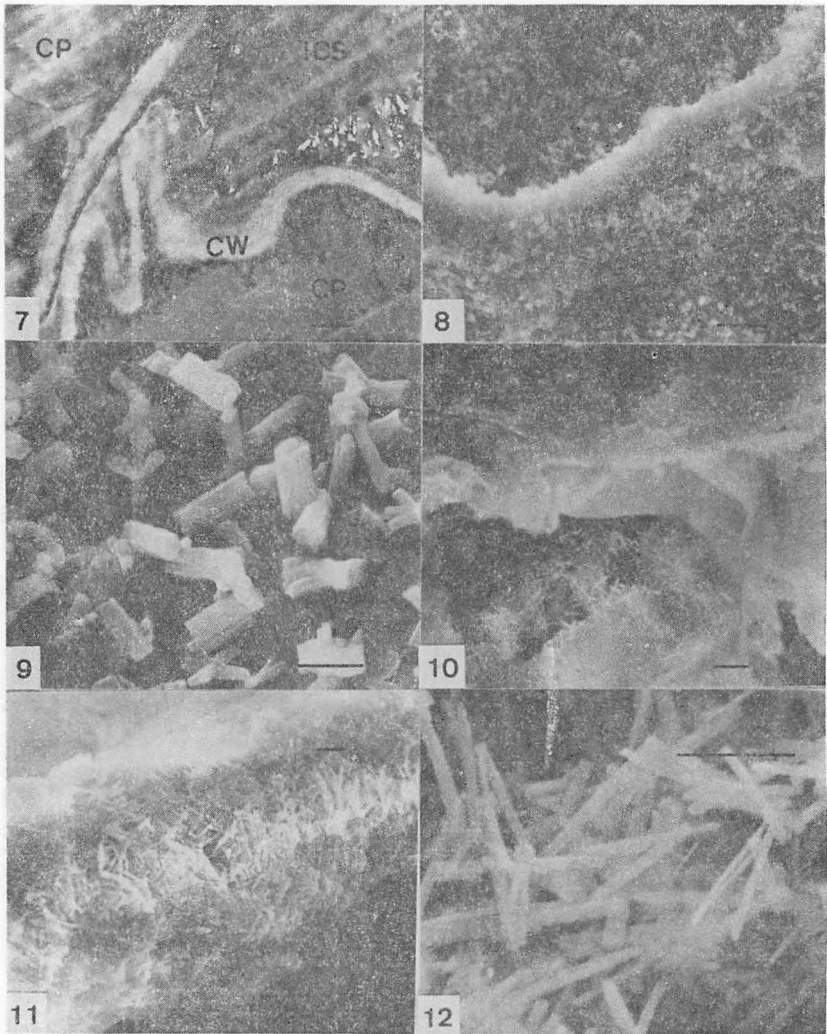
ウチワサボテングサは扇形の節間部が節を介して連なり、その葉状体はウチワサボテンのような形をしている (Fig. 1)。この節間部の縦断・横断切片を光顕で観察し、スケッチしたのが Fig. 2 である。また Fig. 3 はこれらをもとにして作製した節間部の立体構造を模式的に示したものである。この図からわかるように、藻体は一連の管状糸 (Filament) から構成されており、管状糸は分枝しながら藻体表面でふくらみ胞嚢に終わっている。この胞嚢は互に密着しあっているため藻体内部には、外界の海水とは直接連絡のないと思われる細胞間隙を形成している。Fig. 4 は藻体内部の拡大像であるが、Cで示した暗色の部分は  $\text{CaCO}_3$  の結晶の集合したものである。この部分は生藻体では、管状糸の壁の表面に密着していたものであるが、切片作製の過程で、内容物が流出し、壁が収縮したために、はがれて残ったものと思われる。このことから石灰化部位は細胞壁の外側であることが推察されるが、この部位を透過型電子顕微鏡でさらに詳細に検討したのが、Figs. 5—7 である。ここに示した電顕像は、前述の Fig. 4 に相当する部分を観察したものである。Figs. 5, 6 に示されているように、電子密度の非常に高い棒状物質が細胞壁に接した部分に散在している。後で述べるようにこれは  $\text{CaCO}_3$  の結晶であることが判った。これら電顕像においても管状糸の収縮のため結晶部位は一部細胞壁より分離しているのが見られる。また細胞壁の内側には全くこのような結晶像は見られない。Fig. 7 は、切片を酢酸鉛で染色したものであるが、染色処理 (おそらくは水洗中) で結晶は完全に溶解し去り、脱灰像がはっきりと観察される。しかし、細胞質内にはそのような脱灰像は全く見られなかった。すなわちサボテングサの石灰化部位の一つは葉状体内部の細胞表面すなわち間隙内であることがはっきりした。

Fig. 8 は葉状体表面の走査電顕像であるが、一部の胞嚢表面に、結晶が沈着しているのが観察された。この結晶は、巾  $0.4\mu\text{m}$ 、長さが  $1\mu\text{m}$  程度の桿状結晶であった (Fig. 9)。Fig. 10 は葉状体表面と内部との境の部分を示しているが、この胞嚢間隙には、よく発達した針状結晶がみられる。また Fig. 11 に見られるように、葉状体中心部を走る管状糸の表面にも針状結晶が付着しており前述の透過電顕像 (Figs. 5, 6, 7) とよく一致した。またこの細胞間隙に沈着している針状結晶は、巾  $0.1\mu\text{m}$  で長さが  $2\mu\text{m}$  程のものであった (Fig. 12)。



Figs. 1-6. *Halimeda discoidea* Dec.

1. Portion of thallus of *Halimeda discoidea*. 2. Longitudinal (A) and cross (B) sections of a mature segment of the thallus ( $\times 60$ ). The parts where sections were made are shown diagrammatically in the lower left corner of each figure. Scale= $100\mu\text{m}$ . 3. A schematic sketch showing three dimensional structure of the thallus. Note well developed intercellular space. 4. Light micrograph of cross section of a mature segment ( $\times 1,200$ ). C:  $\text{CaCO}_3$  deposits, F: shrunk medullary filaments. Scale= $4\mu\text{m}$ . 5. Cross section of an inner filament (unstained) ( $\times 4,950$ ). C:  $\text{CaCO}_3$  crystals, CW: cell wall, ICS: intercellular space, CP: cytoplasm. Scale= $1\mu\text{m}$ . 6. Longitudinal section of an inner filament (unstained) ( $\times 2,850$ ). For other explanations see Fig. 5. Scale= $2\mu\text{m}$ .



Figs. 7—12. *Halimeda discoidea* Dec.

7. Cross section of an inner filament (stained by lead acetate) ( $\times 2,250$ ).  $\text{CaCO}_3$  crystals were removed during the staining process. For other explanation see Fig. 5. Scale= $2\mu\text{m}$ . 8. Outer surface view of a segment observed with SEM ( $\times 1,500$ ). Small crystals were deposited on the collapsed utricle. Scale= $4\mu\text{m}$ . 9. High magnification of rod-shaped crystals in Fig. 8 ( $\times 9,000$ ). Scale= $1\mu\text{m}$ . 10. Needle-shaped crystals deposited in intercellular space ( $\times 4,500$ ). Rod-shaped crystals as shown in Fig. 8 were also observed on the outer surface of the utricles. Scale= $1\mu\text{m}$ . 11. Needle-shaped crystals deposited on the outer surface of a medullary filament ( $\times 4,500$ ). Scale= $1\mu\text{m}$ . 12. High magnification of needle-shaped crystals in Fig. 10 ( $\times 15,000$ ). Scale= $1\mu\text{m}$ .

次には藻体の細胞間隙や表面で観察された結晶の成分と結晶型が何であるかが問題である。この点に関して、超薄切片内に存在する結晶を制限視野電子線回折法で検討した結果、藻体内部の針状結晶はアラレ石型の  $\text{CaCO}_3$  結晶であることが判明した。また藻体表面付着の桿状結晶については、銅メッシュに藻体の小片を表面を上にはりつけ、同様の方法を用いて検討したが、同じくアラレ石型の結晶であった。また藻体乾燥粉末を、X線回折法で分析した結果、藻体に含まれている結晶はすべてアラレ石型のものであり、方解石の存在は検出できなかった。

## 考 察

サボテングサ属の石灰化部位に関する研究は Wilbur ら (1969)<sup>3)</sup> および Borowitzka ら (1974<sup>4)</sup>, 1977<sup>5)</sup> の研究があり、いずれも藻体内の細胞間隙に石灰化がみられることを指摘している。今回のウチワサボテングサで得た観察結果は彼等の結果とよく一致した。ただ葉状体表面にも藻体内部の結晶とは形態の異なった桿状結晶が沈着するといった新たな結果が得られた。また以前から石灰緑藻の  $\text{CaCO}_3$  結晶はアラレ石型であることが報告されているが、今回の著者等の結果もこの事実を裏づけた。一方、Borowitzka ら (1976)<sup>6)</sup> は *Halimeda tuna* などではアラレ石型が80%で、残り20%は方解石型であったと報告しているが、今回は方解石型は検出されなかった。

藻類の石灰化の機構に関しては、古くから光合成との関係が重要視されてきた。つまり光合成では  $\text{HCO}_3^-$  から  $\text{CO}_2$  が抜き取られ固定される結果、 $\text{OH}^-$  が増加する。これによって起こる pH の上昇は  $\text{HCO}_3^-$  を解離させて  $\text{CO}_3^{2-}$  の増加を促す。結局、 $2\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_3^{2-}$  なる反応によって形成された  $\text{CO}_3^{2-}$  が、石灰化に寄与するとする仮説である。サボテングサ属を材料として、この点に関するより詳細な研究を精力的に行ってきたのは Borowitzka ら (1976<sup>6)</sup>, 1977<sup>5)</sup> である。しかし、残念なことに、彼等は藻体表面での石灰化については未だ立ち入っていない。

藻体表面では、すでに述べたように細胞間隙における結晶型とは異なり、桿状結晶が形成される。このような藻体表面での桿状結晶はすでにオキナウチワ (宮田他, 1977)<sup>2)</sup> においても見られている。藻体表面は、細胞間隙とは異った条件の下に置かれていることは確かであり、上述の結晶形の違いを考え合わせるとき、石灰化機構の面にも何らかの差違が存在するものと考えられる。

最後に走査電顕写真の撮影に援助いただいた日本歯科大学の大島海一氏に深くお礼申し上げる。

## Summary

In the present paper the calcification sites and the properties of calcium carbonate crystals of *Halimeda discoidea* were described.

The ultrastructures of thin sections and surfaces of the thalli were studied by transmission and scanning electron microscopy. Needle-shaped crystals of calcium carbonate were deposited abundantly in the intercellular space within the thallus. However, calcium carbonate crystals could be detected neither in the cell wall nor in the cytoplasm. The needle-shaped crystals were about  $0.1\mu\text{m}$  wide and up to  $2.0\mu\text{m}$  long. Rod-shaped crystals were also observed partially on the outer surface of the thallus. These crystals were about  $0.4\mu\text{m}$  wide and up to  $1.0\mu\text{m}$  long.

The properties of needle- and rod-shaped crystals mentioned above were identified to be aragonite by selected-area electron diffraction. X-ray diffraction patterns of the algal powder examined agreed with that of aragonite.

#### 引用文献

- 1) WRAY, J. L. (1977) *Calcareous algae*. Elsevier Sci. Pub. Comp. Amsterdam, Oxford, New York: 22-23.
- 2) 宮田昌彦, 岡崎恵視, 古谷庫造 (1977) 石灰褐藻オキナウチワの炭酸カルシウム沈着部位と結晶型について (藻類の炭酸カルシウム沈着の研究 I) 藻類 25: 1-6.
- 3) WILBUR, K. M., L. H. COLINVAUX and N. WATABE (1969) Electron microscope study of calcification in the alga *Halimeda* (order Siphonales). *Phycologia* 8: 27-35.
- 4) BOROWITZKA, M. A., A. W. D. LARKUM and C. E. NOCKLODS (1974) A scanning electron microscope study of the structure and organization of the calcium carbonate deposits of algae. *Phycologia* 13: 195-203.
- 5) BOROWITZKA, M. A. and A. W. D. LARKUM (1977) Calcification in the green alga *Halimeda*. I. An ultrastructure study of thallus development. *J. Phycol.* 13: 6-16.
- 6) ————— (1976) Calcification in the green alga *Halimeda*. II. The exchange of  $\text{Ca}^{2+}$  and the occurrence of age gradients in calcification and photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 27: 864-878.
- 7) ————— (1976) Calcification in the green alga *Halimeda*. III. The sources of inorganic carbon for photosynthesis and calcification and a model of the mechanism of calcification. *J. Exp. Bot.* 27: 879-893.