

紅藻ウミゾウメンに内生する藍藻の生理学的研究 II. *Calothrix parasitica* とウミゾウメンとの間の ^{14}C の移動

鈴木 三喜

静岡県立伊東高等学校 (414 静岡県伊東市岡入の道 1229-3)

SUZUKI, M. 1985. Physiological investigations of blue-green algae endophytic in the red alga *Nemalion vermiculare* II. Transfer of ^{14}C between *Calothrix parasitica* and *N. vermiculare*. Jap. J. Phycol. 34: 31-36.

The effect of light conditions on the transfer of photoassimilated ^{14}C from *Nemalion vermiculare* SUR. via culture medium to *Calothrix parasitica* (CHAUV.) THUR. and vice versa were investigated. The transfer of ^{14}C between *N. vermiculare* and *C. parasitica* increased as the light intensity increased in the range of 1.25 to 6.25 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. The radioactivity of ^{14}C incorporated into *C. parasitica* was depressed at a light intensity of 9.33 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, and was accelerated when illuminated by red light rather than by white or blue light. The radioautographic experiment demonstrated that the radiocarbon derived from *C. parasitica* which was inserted into the tissue of *N. vermiculare* was translocated to the cortical cells of the host plant and accumulated especially in the sporulating tissue.

Key Index Words: *Calothrix*; *endophyte*; *Nemalion*; *radioautography*; *translocation*.

Mitsuyoshi Suzuki, Itoh High School, Okairinomichi, Itoh-shi, Shizuoka, 414 Japan.

海藻と着生藻との間の物質の移動を ^{14}C を用いて調べた研究はこれまで幾つか知られている (EVANS *et al.* 1973, HARLIN and CRAIGIE 1975, TURNER and EVANS 1978, GOFF 1979)。しかし、海藻に内生する藍藻類では宿主との共生関係が推測されている (UMEZAKI 1961, ROSENBERG and PAERL 1981) にも拘らず、両者間の物質の移動について確認した例はない。そこで著者は、紅藻ウミゾウメン *Nemalion vermiculare* SUR. とその内生藍藻 *Calothrix parasitica* (CHAUV.) THUR. との間の代謝産物の移動を ^{14}C を用いたトレーサー実験により確認し、同時にそれに与える光の量 (強度) と質 (波長) の影響を調べた。また、*C. parasitica* が放出した代謝産物をウミゾウメンが組織のどの部位に主として蓄積するかをラジオオートグラフィーにより確かめたので、その結果を報告するとともに共生関係において同藍藻が果たしている役割についても考察を試みた。

材料と方法

1983年7月から9月にわたり北海道南部太平洋岸の

南茅部町白尻よりウミゾウメンの成熟個体を計3回採集し、その都度、実体顕微鏡下で解剖針を用いて内生している *C. parasitica* を分離し、ピペット洗浄を繰り返してから、 20°C , 1.25 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 1日12時間照明により、ESP培地 (PROVASOLI 1966) で2週間予備培養を行なった後、実験に供した (Fig. 1)。青色光および赤色光のもとでの実験は、それぞれ 510 nm 付近及び 580 nm より長波長の光が透過する市販のカラーセロファン (Fig. 2) をシャーレにかぶせて行なった。培養に際し、光源にはすべて白色蛍光灯を用いた。

ウミゾウメンから *C. parasitica* への光合成産物の移動を調べるため、実験開始直前に白尻より新たにウミゾウメン (体長約 7 cm) を採集し、滅菌ろか海水による洗浄と軟寒天中を引きずりまわす操作を行ない、藻体表面の付着物を除去してから、滅菌ろか海水を用いて 20°C , 暗黒中で一晩予備培養した。次に ESP 培地 100 ml に $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (60 mCi/mmol) を添加して 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$ の濃度とし、それを 300 ml 容の三角フラスコに入れ、その中でウミゾウメンを1個体ずつ培地を更新しながら 20°C , 6.25 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ または暗黒中で6時間培養して ^{14}C を取りこませ、次に滅菌海水洗

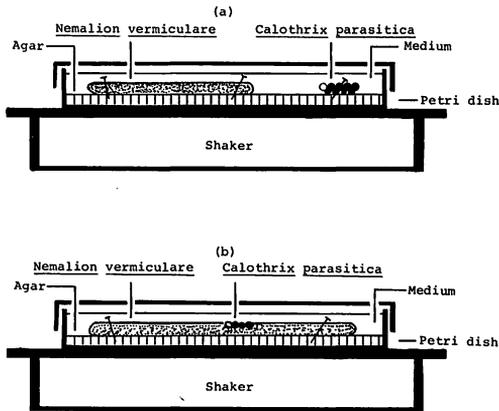


Fig. 1. Schematic illustrations of culture apparatus for a ^{14}C transfer between *Calothrix parasitica* and *Nematium vermiculare* (a), and for autoradiography of the tissue of *N. vermiculare* (b).

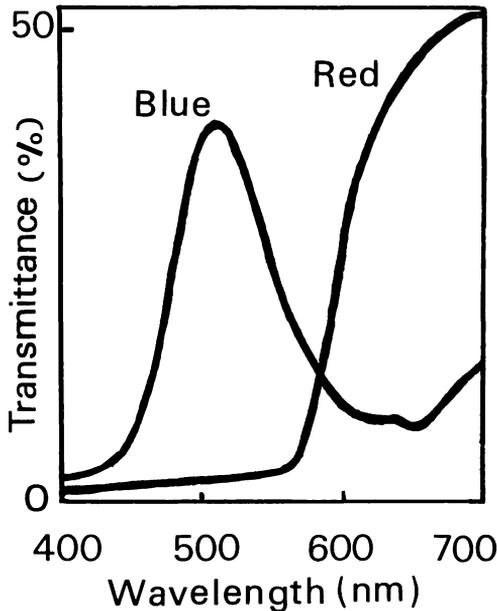


Fig. 2. Transmission spectra of colored cellophanes used for the experiment of ^{14}C transfer between *Calothrix parasitica* and *Nematium vermiculare*.

浄と軟寒天により藻体表面に付着している ^{14}C を除去し、先に2週間予備培養した *C. parasitica* (乾燥重量約 50 mg) とともに、寒天プレート上に滅菌ろか海水を満した小型シャーレ (直径 9 cm) にそれぞれ1個体ずつ入れ、虫ピンで固定して3日間振とう培養した (Fig. 1a)。なお、小型シャーレ内での両者の間隔は

5 cm とした。光強度の影響を調べる実験では光源と小型シャーレの距離を変えることにより 1.25 から $9.33 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ まで5段階の光強度の白色光を用い、また光の波長の影響を調べる実験では、 $1.20 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の青色光と $1.28 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の赤色光を用いて行ない、いずれも連続照射とした。培養終了時、培地に 6 N 塩酸を添加して、*C. parasitica* とウミゾウメンを小型シャーレより取り出し、前述と同様の方法で丁寧に洗浄してから各藻体を白熱電灯下で乾燥させた。藻体及び培地の放射線量は、シンチレーションカウンタ Aquasol-2 (New England Nuclear) を用いて、Aloka 601 液体シンチレーションスペクトロフォトメーターにより測定した。

C. parasitica からウミゾウメンへの物質移動の実験は、予備培養後の *C. parasitica* に前述のウミゾウメンの場合と同様の方法により ^{14}C を取り込ませ、実験直前に採集し洗浄と予備培養をしたウミゾウメンとともに前述の実験と同様に Fig. 1a の装置に取り付けて行なった。ただし、実験に際し光強度は 0.55 から $6.25 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ まで5段階とした。

なお、藻体表面に付着している ^{14}C が滅菌ろか海水と軟寒天プレートによる洗浄方法で完全に除去されることを確認するため、ホルマリン海水で固定したウミゾウメンと *C. parasitica* を用いて上述の ^{14}C を取り込ませる操作を行ない、小型シャーレ中で3日間培養液に浸漬した。培養液浸漬の直前と直後に各藻体中の放射能を測定したところ、検出された放射能はウミゾウメン、*C. parasitica* とも1検体当たり 5.3 dpm 以下と極めて微量であり、無視できる範囲であった。また、暗黒中における ^{14}C の移動量は外からの光を遮断するためアルミホイルをかぶせた小型シャーレで培養したものについて測定した。全ての実験は1条件につき3組の小型シャーレを用意して行ない、それを2回ないし3回反復した。

内生している *C. parasitica* から宿主ウミゾウメンに移動した ^{14}C の蓄積部位をラジオオートグラフィにより調べるため、まずウミゾウメン (体長約 10 cm) を実験直前に白尻より採集し洗浄と予備培養を行なったのち、ほぼ中央にカミソリで間隙をつくり、 $3.00 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の白色光を用いて前述の方法により ^{14}C を *C. parasitica* (乾燥重量約 50 μg) に取り込ませ、これを慎重に挿入した。次に、寒天プレート上に滅菌ろか海水を満した小型シャーレにウミゾウメンを虫ピンで固定し (Fig. 1b)、 $3.00 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、1日12時間照射のもとで3日間振とうしながら培養した。培養終

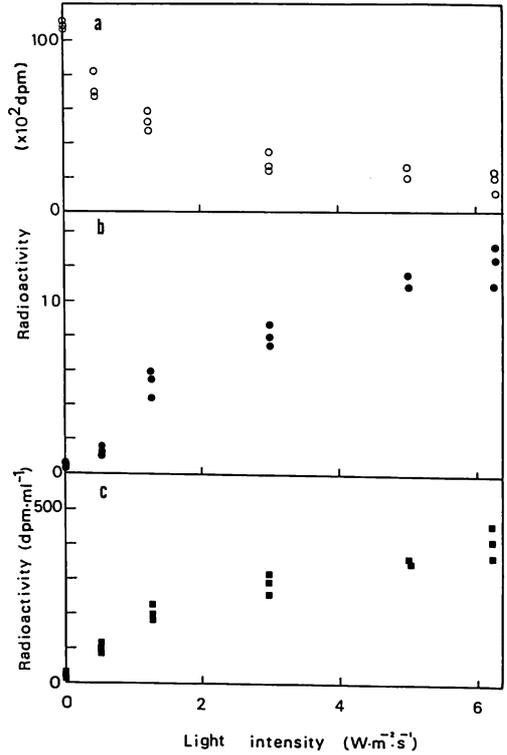
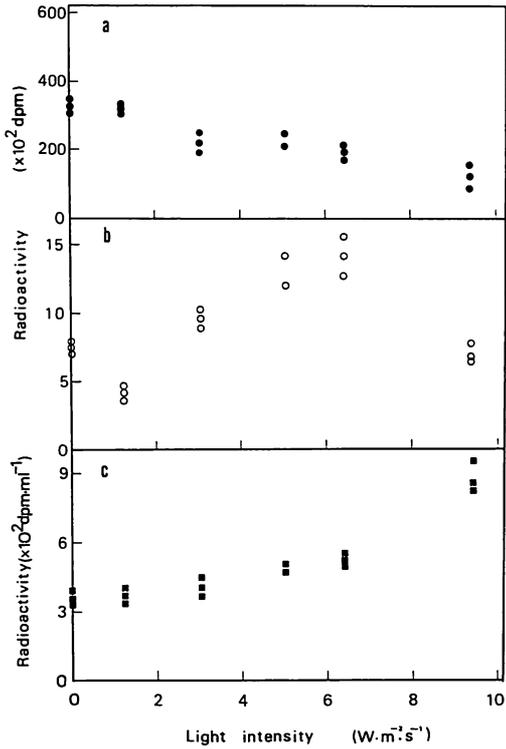


Fig. 3. Effect of light intensity on the transfer of photoassimilated ¹⁴C from *Nemaion vermiculare* via culture medium to *Calothrix parasitica*. Incubation was carried out at 20°C under continuous illumination for 3 days. Each symbol represents the mean value of radioactivity of 3 experiments. The average radioactivity of *N. vermiculare* was 4.44×10^4 dpm at the start of incubation. a, *N. vermiculare*; b, *C. parasitica*; c, culture medium.

Fig. 4. Effect of light intensity on the transfer of photoassimilated ¹⁴C from *Calothrix parasitica* via culture medium to *Nemaion vermiculare*. Incubation was carried out at 20°C under continuous illumination for 3 days. Each symbol represents the mean value of radioactivity of 3 experiments. The average radioactivity of *C. parasitica* was 1.26×10^4 dpm at the start of incubation. a, *C. parasitica*; b, *N. vermiculare*; c, culture medium.

Table 1. Effect of light quality on the transfer of photoassimilated ¹⁴C from *Nemaion vermiculare* via culture medium to *Calothrix parasitica*. Incubation was carried out at 20°C for 3 days under continuous illumination of white ($1.25 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$), red ($1.28 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) or blue light ($1.20 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). The radioactivity (mean \pm SD) after 3-day incubation is shown. The average radioactivity of *N. vermiculare* was 3.05×10^4 dpm at the start of incubation.

Illumination	Radioactivity		
	<i>Nemaion vermiculare</i> (dpm)	Culture medium (dpm/ml)	<i>Calothrix parasitica</i> (dpm)
White	20803 \pm 440	336 \pm 16	291 \pm 24
Red	12297 \pm 524	1015 \pm 24	504 \pm 133
Blue	17794 \pm 1776	830 \pm 19	207 \pm 55

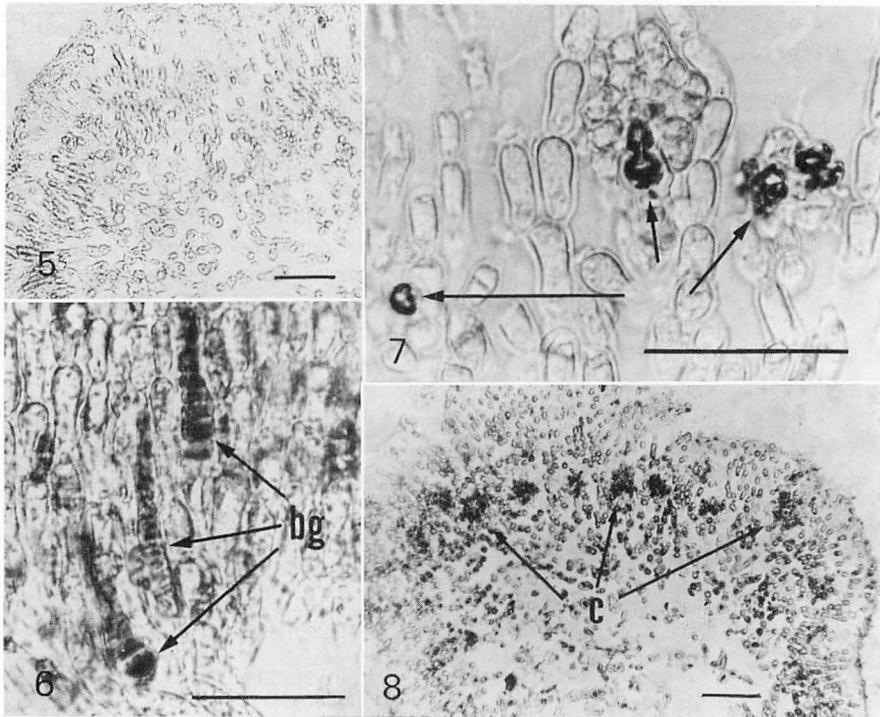
了後、津屋・重松 (1979) の記述に従いウミゾウメンのパラフィン切片を作成し、ディップ法でさくらNH-M2 乳剤を切片にかぶせ、3ヶ月露出させた。なお、比較のため *C. parasitica* を挿入する直前と直後のウミゾウメンの組織切片についても同様な処理を行なって調べた。

結 果

ウミゾウメンから *C. parasitica* に移動した ^{14}C 量は Fig. 3b にみられる様に、光強度が増すに従って多くなり、 $6.25 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ で1検体当たり平均 1,411 dpm に達し最大値を示したが、 $9.33 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ では 635 dpm となり著しく減少した。また、暗黒中において *C. parasitica* に移動した ^{14}C 量は1検体当たり平均 747 dpm であり、この値は $1.25 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の光を照射した時のそれよりも高かった。一方、ウミゾウメンは培養開始時には1個体当たり平均 44,419 dpm

の ^{14}C 量 (光合成と無関係に暗固定した量はそのうちの 2.17%) を含有していたが、3日後には暗黒中及び $1.25 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ では 30,000 dpm 前後となり、以下、照射光の強さが増すとともに残存量は減少した (Fig. 3a)。これに対して、培地中の ^{14}C 量は光強度の上昇に従って多くなり、その程度は特に $6.25 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ から $9.33 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の間で顕著であった (Fig. 3c)。ウミゾウメンから *C. parasitica* への ^{14}C の移動量に与える光の波長の影響を調べた実験の結果を Table 1 に示す。赤色光下と青色光下での ^{14}C の移動量は、前者の方が後者に比べて約 2.4 倍の値を示した。

C. parasitica からウミゾウメンに移動した ^{14}C 量は Fig. 4b にみられる様に、光強度が増加するに従って多くなった。また、暗黒中においてウミゾウメンに移動した ^{14}C 量は1個体当たり平均 55 dpm であり、この値は $0.55 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の光を照射した時の約 1/2 であった。一方、*C. parasitica* の ^{14}C 量は培養開始時には1検体当たり平均 12,638 dpm (光合成と無関係



Figs. 5-8. Autoradiographs of ^{14}C in the transverse section of *Nematium vermiculare*. The accumulation of ^{14}C derived from labelled *Calothrix parasitica* which was inserted into the *Nematium* tissue is shown as silver grain deposit (C) after 3-day translocation. Scale bars = 50 μm . Fig. 5. Control *Nematium* tissue showing no radioactivity. Fig. 6. ^{14}C -labelled *C. parasitica* (bg) shortly after inoculation into *Nematium* tissue. Fig. 7. Carposporophytes (arrows) in an early developmental stage. Fig. 8. Mature cystocarps (c).

に暗固定した量はそのうち 3.65%) のであったが、3 日後には高い光強度のもとで培養した藻体ほど ^{14}C の残存量は少なく、特に 0 から $3.00 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ までは急激に減少した (Fig. 4a)。これに対して、培地中の ^{14}C 量は光強度の上昇に従って増加した (Fig. 4c)。

ウミゾウメンに挿入された内生状態の *C. parasitica* 由来の ^{14}C を宿主が蓄積した部位をラジオオートグラフィにより調べた結果を Figs. 5-8 に示す。Fig. 5 は対照として藍藻を挿入しないウミゾウメンの組織に乳剤をかぶせたときのラジオオートグラフである。 ^{14}C の所在は銀粒子が黒変するので容易に識別できる。*C. parasitica* を挿入した直後は、その藍藻のみが判然としていたが (Fig. 6)、3 日後には主にウミゾウメンの皮層部に顕著な銀粒子が観察され、とくに受精直後の果胞子体や嚢果に高密度の銀粒子がみられた (Figs. 7, 8)。

考 察

この実験結果から、*C. parasitica* とウミゾウメンとの間では相互に ^{14}C が移動し、その量は光環境に強く影響されることが明らかとなった。ウミゾウメンから *C. parasitica* に移動した ^{14}C 量は光強度の上昇に伴って増加し、 $6.25 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ で最大となり、培地中の ^{14}C 量も同じ傾向を示した。しかし、 $9.33 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ では培地中の ^{14}C 量は更に増加したのに対して、*C. parasitica* への移動量は激減した。 $6.25 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ は同藍藻の光合成の光飽和点であり、 $9.33 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ では強光阻害が起こること (鈴木, 未発表) から、ウミゾウメン由来の炭素化合物の摂取にも同藍藻の光合成系が何らかの関与をしているものと考えられる。また $1.25 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の光を照射した時に *C. parasitica* に移動した ^{14}C 量は暗黒中のものより少なかったが、これは同藍藻が摂取したウミゾウメン由来の ^{14}C を再度培地中に排出するのを光が促進したためと考えられる。このことは、藍藻類を含めた数種の微細藻で光の照射が代謝産物の細胞外への排出を促進する効果を持つこと (FOGG *et al.* 1965, NALEWAJKO 1966, BROWN and GEEN 1974) や、Fig. 4a に示す如く、同藍藻が $1.25 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の光のもとで多量の ^{14}C を培地中に排出するため残量が暗黒中でのその約 1/2 となったという事実によっても推察出来る。なお、この点については更に詳細な実験が必要である。一方、*C. parasitica* からウミゾウメンに移動した ^{14}C 量は暗黒中で最も少なかった。これは暗黒中では光照射時

に比べて *C. parasitica* が放出する光合成産物の絶対量は少なく、ウミゾウメンの摂取も促進されなかったためであろう。また、ウミゾウメンから *C. parasitica* への ^{14}C の移動量は青色光下よりも赤色光下の方が多かったが、これは *C. parasitica* の主要な光エネルギー獲得色素であるフィコビリソ蛋白の顕著な吸収帯が 570 nm よりも長波長側にあること (鈴木・正置 1985) と本実験に用いた赤色光がこの波長域と殆んど同じであることに関係があるかもしれない。さらに、光の質 (波長) が藻類の炭素代謝や代謝産物の細胞外への排出を制御することが報告されているので (BROWN and GEEN 1974)、赤色光下よりも白色光下の方が移動量が少なかったのは白色光の青色域が *C. parasitica* の炭素化合物の摂取を抑制しているか、ウミゾウメンからの放出量の違いが影響している可能性も考えられる。このように内生藍藻 *C. parasitica* は弱光に対して敏感に反応し、赤色光のもとではウミゾウメン由来の光合成産物の摂取が活発になったことは、炭素源の確保という面でウミゾウメン内の制限された光環境と同藍藻が適応している事を示唆するものであろう。

一方、ウミゾウメンが内生状態の *C. parasitica* から取り込んだ ^{14}C は、受精直後の果胞子体や嚢果に高濃度に蓄積されたが、一般に形成過程の嚢果では果胞子放出前には代謝産物の移動や蓄積が盛んに行なわれること (CHAMBERLAIN and EVANS 1973, TURNER and EVANS 1978) から、ウミゾウメンの果胞子形成の際に *C. parasitica* 由来の物質が利用されているものと考えられる。

終わりに本研究の御指導と御校閲を賜った北海道大学水産学部 正置富太郎教授と辻野勇教授に深謝する。

引用文献

- BROWN, T. J. and GEEN, G. H. 1974. The effect of light quality on the carbon metabolism and extracellular release of *Chlamydomonas reinhardtii* DANGEARD. J. Phycol. 10: 213-220.
- CHAMBERLAIN, A. H. L. and EVANS, L. V. 1973. Aspects of spore production in the red alga *Ceramium*. Protoplasma 76: 139-159.
- EVANS, L. V., CALLOW, J. A. and CALLOW, M. E. 1973. Structural and physiological studies on the parasitic alga *Holmsella*. New Phytol. 72: 393-402.
- FOGG, G. E., NALEWAJKO, C. and WATT, W. D. 1965. Extracellular products of phytoplankton photosynthesis. Proc. Roy. Soc. London, B

- 162: 517-534.
- GOFF, L. J. 1979. The biology of *Harveyella mirabilis* (Cryptonemiales, Rhodophyceae). VI. Translocation of photoassimilated ^{14}C . J. Phycol. 15: 82-87.
- HARLIN, M. M. and CRAIGIE, J. S. 1975. The distribution of photosynthate in *Ascophyllum nodosum* as it relates to epiphytic *Polysiphonia lanosa*. J. Phycol. 11: 109-113.
- NALEWAJKO, C. 1966. Photosynthesis and excretion in various planktonic algae. Limnol. Oceanogr. 11: 1-10.
- PROVASOLI, L. 1966. Media and prospects for the cultivation of marine algae. p. 63-75. In A. WATANABE and A. HATTORI [ed.] Cultures and Collections of Algae. (Proc. U.S.-Japan Conf. Hakone, Sept. 1966). Jap. Soc. Plant Physiol.
- ROSENBERG, G. and PAERL, H. W. 1981. Nitrogen fixation by blue-green algae associated with the siphonous green seaweed *Codium decorticum*: Effects on ammonium uptake. Mar. Biol. 61: 151-158.
- 鈴木三喜・正置富太郎 1985. 紅藻ウミゾウメンに内生する藍藻の生理学的研究 I. 光合成色素に与える光の波長の影響. 藻類 33: 239-244.
- TURNER, C. H. C. and EVANS, L. V. 1978. Translocation of photoassimilated ^{14}C in the red alga *Polysiphonia lanosa*. Br. phycol. J. 13: 51-55.
- 津谷 旭・重松昭世 1979. ミクロオートラジオグラフィ. p. 72-129. 水平敏知(編) オートラジオグラフィ. 医歯薬出版. 東京.
- UMEZAKI, I. 1961. The marine blue-green algae of Japan. Mem. Coll. Agr., Kyoto Univ. 83: 1-149.

新 刊 紹 介

「ガラモ場—ホンダワラ類の生物学」海洋科学175号, 66pp. 1985, 「海中林—コンブ科植物の生物学」海洋科学186号, 61pp. 1985, 海洋出版 K. K. (各1,500円)

海洋学関係の専門雑誌「海洋科学」にガラモ場と海中林に関する総説がまとめられた。この雑誌は、海洋・水産学分野では知られているが、一般的な雑誌ではないので、ここに内容を紹介したい。

いわゆる藻場造成は、最近各地で試みられており、その基礎的な知識を提供するためにこれらの総説が企画された。「ガラモ場」では、吉田、寺脇、小河、梅崎、奥田、月館、飯倉、今野、大野らによって、ホンダワラ類の分類、形態、生理、生態、造成技術、藻場内の環境などについて書かれている。「海中林」では、右田、川島、金子、秋山、谷口、林田、喜田、新崎、大野らによって、コンブ類、アラメ・カジメ類の分類、交雑、生態、増養殖、造林技術などについて書かれている。各総説は6~7頁にわたり、一般読者向けにわかりやすくまとめられているが、執筆者がそれぞれの分野の第一線の研究者であるので、自分のデータとともに、多くの報文を紹介している。読者はこの2冊によってホンダワラ類、コンブ科植物に関する研究の最近の動向も知ることができるであろう。

海藻の応用科学の分野では、増養殖、造林技術に関する研究は、世界的視野からみても日本が一步先んじているが、基礎的な研究に欠けるところがある。これらの総説をもとに、さらに藻場・海中林に関する研究が発展することを期待する。

(高知大・海洋生物センター 大野正夫)