

新しい手法による *Spirogyra castanacea* (ホシミドロ科) の
接合の誘導

岩田和佳*・池谷仁里・石田一馬・園部誠司・新免輝男

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 (〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3丁目2番1号)

Kazuyoshi Iwata*, Hisato Ikegaya, Kazuma Ishida, Seiji Sonobe and Teruo Shimmen: New method of inducing conjugation of *Spirogyra castanacea* (Zygnemataceae). Jpn. J. Phycol. (Sôru) 68: 77-80 July 10, 2020

Condition inducing conjugation of *Spirogyra* was investigated. Conjugation of *Spirogyra castanacea* cells was induced in solution of high pH. In artificial pond water (APW) containing 5 mM Na₂SiO₃ (pH 10.4), a few cells were observed to be conjugated, while many cells shrunk (damaged or died). However, when cells were incubated in 0.1 M mannitol solution for 24 h and then in APW containing 5 mM Na₂SiO₃ (pH 10.4) with 0–0.15 mM mannitol, damage of cells dramatically decreased and 10–30% of cells were conjugated. Interestingly, the ratio of cells conjugated to parthenospore-like cells decreased as concentration of mannitol in APW increased. From these results, pH and osmotic stress are suggested to be key factors inducing conjugation in this *Spirogyra* species.

Key Index Words: conjugation, high pH, *Spirogyra*, turgor regulation

Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Harima Science Park City, Hyogo 678-1297, Japan

*Author for correspondence: k-iwata@arion.ocn.ne.jp

淡水藻であるアオミドロ属 (*Spirogyra*) 藻類は接合藻綱ホシミドロ科に属し、その接合過程は古くから興味深い生命現象として知られている。実験室レベルでの接合子形成の誘導は、様々な条件で試みられてきた。例えば、窒素欠乏 (Yamashita & Sasaki 1979, Simons *et al.* 1984), 光条件 (Yamashita & Sasaki 1979, Simons *et al.* 1984), C/N比 (Yamashita & Sasaki 1979), pH (Simons *et al.* 1984) である。しかし、再現性の低さから、接合子形成の研究はあまり進んでいなかった。

Ikegaya *et al.* (2012) は、*Spirogyra castanacea* G.C.Couch の藻体を寒天培地の上で培養することにより、接合子形成を誘導することに成功した。この実験系は約40%から50%と誘導率が高く、類似の方法も既に報告されていた (Allen 1958)。

著者らは、様々なストレス下で植物の成長阻害を緩和することが知られているケイ素 (Epstein 2009) の、*S. castanacea* に対する影響を調べた。ケイ素 (Na₂SiO₃) 濃度を増加させた時、少数の細胞が接合し、その後、高い pH の時に接合が誘導されている事実を見出した。本報では、その経過に加え、高 pH 溶液中で接合子形成を誘導する方法と、観察された現象について報告する。

S. castanacea を兵庫県相生市の小川で採取し (Inoue *et al.* 1999), Ikegaya *et al.* (2012) に従い培養した。即ち、蛍光灯を用い、明暗 16:8 時間のサイクルで、C 培地 (*Closterium* 用合成培地 Ichimura 1971) 中で維持した。

アオミドロの接合子形成誘導は、以下の2つの方法で行った。

方法1. C培地で培養した藻体を、人工池水 (0.1 mM KCl, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM NaCl, 1 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid-Na 緩衝液, pH 7.0) で3回ゆすぎ、24穴プレート (AGC テクノグラス) に入った 1mM, 2.5mM, 5 mM Na₂SiO₃ を含む人工池水 (pH 10.4) 中に移した。

方法2. C培地で培養した藻体を、0.1 M マンニトールを含む人工池水中で24時間静置し、人工池水で軽くゆすぎ、24穴プレートに入った 5 mM Na₂SiO₃ を含む人工池水 (pH 10.4) 中に移した。

アオミドロの接合は、乳状突起の形成から始まる。そこで、Ikegaya *et al.* (2012) と同様に、突起が観察された時点を接合の開始と判断した。突起を形成した細胞は、次の2タイプがあった。タイプIは接合管で2細胞が接合したもの (Fig. 1a), タイプIIは単独で突起を形成したもの (Fig. 1b) である。タイプIIは、接合藻の一種 *Zygnema* で報告された単為胞子 (Pouličková *et al.* 2007) に類似の楕円形の外見を有する場合があった。タイプIでは、接合管で接合した2つの細胞を、細胞数2としてカウントした (tube type)。タイプIIでは、突起を持っている細胞の数を、そのまま細胞数としてカウントした (single cell type)。

誘導後7日経過した細胞は、スライドグラスに載せ、顕微鏡 (Axioskop2, Zeiss, Tokyo, Japan) で観察した。Ikegaya *et al.* (2012) は、誘導後4日経過してから寒天上で観察した。

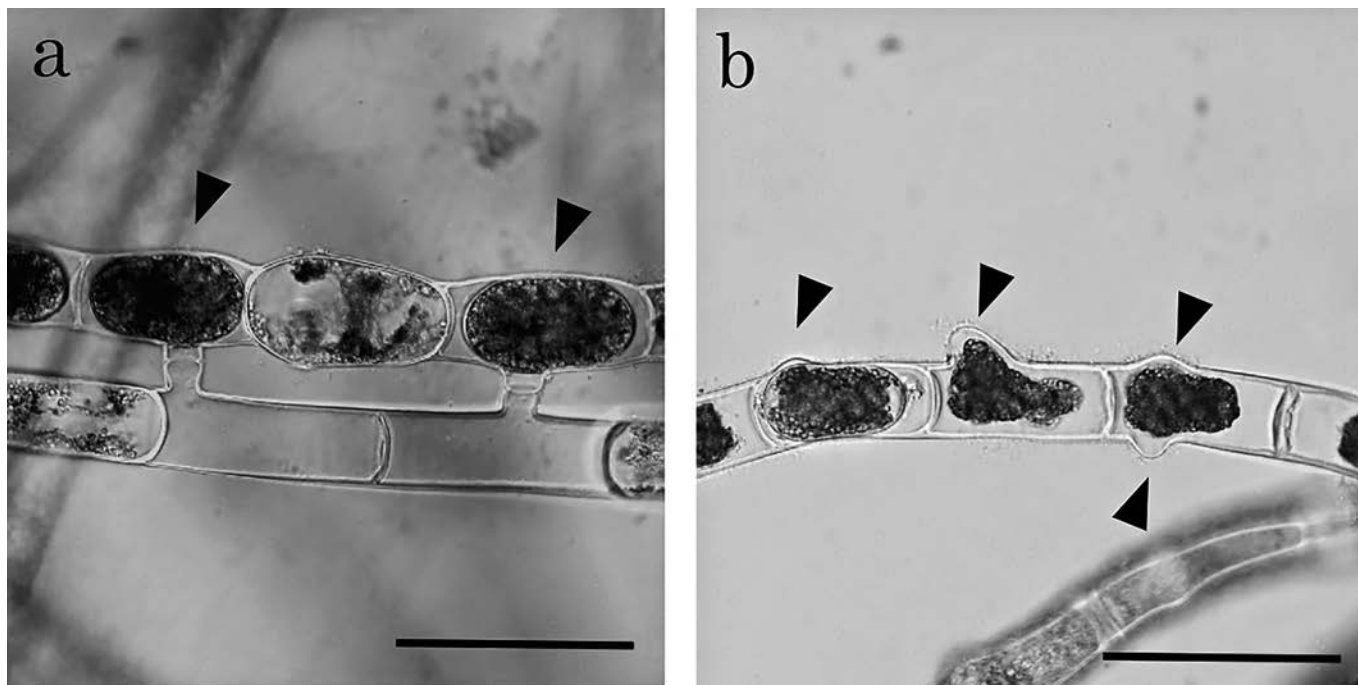


Fig. 1. Induction of conjugation of *Spirogyra castanacea* cell incubated in 5 mM Na_2SiO_3 with mannitol after turgor was regulated. a: Two cells forming conjugation tube and zygote (arrowheads). b: Single cells forming papilla (arrowheads). Bars = 100 μm .

しかし、溶液中での接合は同調率が低く、4日間は静置時間としては十分ではなかったため、7日後の細胞を観察した。細胞は、CCDカメラ (VB-7010, Keyence, Osaka, Japan) で撮影した。突起を持つ細胞は、タイプIとタイプIIを別々にカウントし、結果は全細胞数に対する、突起を持つ細胞数の比率で表した。

細胞の浸透圧は限界原形質分離法 (Iwata *et al.* 2001) で調べた。細胞を、様々な濃度のマンニトール溶液中で15分静置し、半数以上の細胞が原形質分離した最低のマンニトール濃度を細胞の浸透圧とした。

アオミドロ藻体を、1 mM または 2.5 mM Na_2SiO_3 を含む人工池水中で静置する (方法1) と、細胞に状態の変化は見られず、接合した細胞も見られなかった。その後、藻体を 5 mM Na_2SiO_3 を含む人工池水中で静置すると、接合した細胞が見られたが、多くの細胞にダメージが見られたり、あるいは死細胞であったりした (Fig. 2)。この時 5 mM Na_2SiO_3 は人工池水の持つ緩衝作用を打消し、溶液の pH は 10.4 に達した。Simons *et al.* (1984) は、アオミドロの多くの種で、pH 7–9 で接合した事実を報告している。著者らが知る限りでは、pH 10.4 という高い pH で、接合子形成が誘導された例は初めてである。従って、誘導に適した pH は種によって異なる可能性も考えられた。いずれにしても pH 10.4 という条件は細胞へのダメージが大きく、実験系としては不適であった。

次に、藻体を 0.1 M マンニトールを含む人工池水 (pH 7.0) 中で 24 時間静置し、5 mM Na_2SiO_3 と 0–0.15 M マンニトールを含む人工池水 (pH 10.4) 中に移したところ (方法2)、細胞のダメージが劇的に減り、約 10–30% の細胞が接合し、

また、タイプIとIIを合計すると 35–39% 程度になった (Fig. 3)。また、マンニトールの濃度が増加すると、タイプIの細胞が減少し、タイプIIの細胞が増加した (Fig. 3)。

今回用いたアオミドロ *S. castanacea* と同じく仮根を形成する *Spirogyra fluviatilis* では、マンニトールを用いて細胞に浸透ストレスを与えると、膨圧調節を行うことが報告されている (Iwata *et al.* 2001)。今回の *S. castanacea* も、0.1 M マンニトールを含む人工池水中で 24 時間静置すると、膨圧調節 (外液の浸透圧上昇により細胞の浸透圧が 0.41 M から 0.44 M に増加) が観察された。従って、膨圧調節に伴う代謝の変化が生じていると考えられる。このことが、今回観察された、浸透ストレスが付与した高 pH 溶液に対する抵抗性に関係している可能性がある。

Ikegaya *et al.* (2012) は、接合が寒天上で静置された時に生じることを報告している。寒天上の藻体は、周囲の水を失うことにより浸透ストレス下にあると考えられる。従って、浸透ストレスが *S. castanacea* の接合に重要な因子である可能性がある。

Ikegaya *et al.* (2012) は、アオミドロ *S. castanacea* の接合には光が必要なことを報告している。藻類を取り巻く水の pH は、光合成により上昇することが知られている (衛生環境研究所水質・赤土研究室 2006)。寒天上では、細胞周囲の水は大きく減少するため、水の pH は大きく上昇することが考えられる。従って、高 pH もこの種の接合に重要な因子である可能性がある。本報の溶液での誘導系と寒天上での誘導系は、細胞の置かれた環境で見ると、前者が溶液中、後者が乾燥状態であり表面的には正反対に見えるが、原理的には類

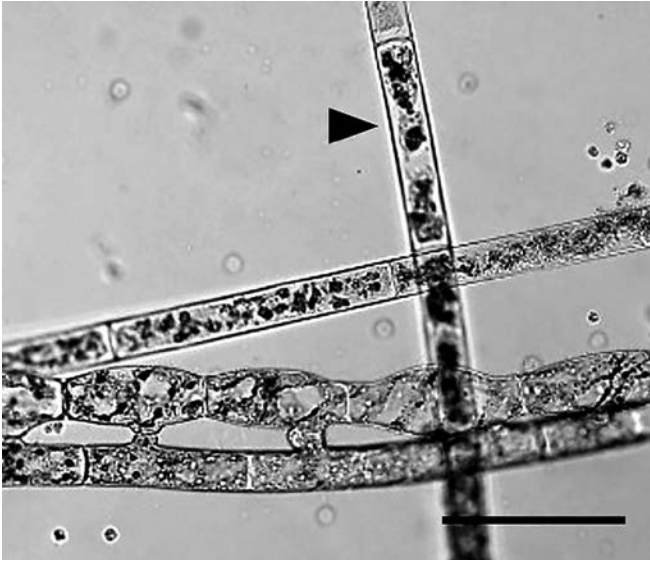


Fig. 2. Induction of conjugation of *Spirogyra castanacea* cell incubated in 5 mM Na_2SiO_3 . Damaged cell around conjugated cells is indicated by arrowhead. Bar = 100 μm .

似点があるのかもしれない。Takano *et al.* (2019) は、寒天上で誘導系を改良し、明期時間と光量を増加させ、13種の *Spirogyra* で接合子形成を誘導した。この条件は、光合成の活性化を介して pH が上昇している可能性がある。従って、この報告は、高 pH による接合子形成誘導の促進を示唆しているのかもしれない。

タイプ II は、単為胞子に類似の構造を形成している。こ

れらの細胞の中には、乳状突起が一度結合した後に分離した細胞が含まれる可能性があるが、明らかに乳状突起が2つ形成されている細胞もある (Fig. 1b)。これは、Ikegaya *et al.* (2012) で報告された現象に似ているが、寒天上で誘導される場合は、乳状突起が2つ形成された後、細胞質が単為胞子様の構造に変化しなかった。その理由については不明であるが、溶液中での誘導系に含まれている単為胞子様構造の誘導因子が寒天上で誘導系に含まれていない、あるいは寒天上で誘導系に含まれている阻害因子が溶液中での誘導系に含まれていない可能性が考えられる。例えば、溶液のみに含まれている Na_2SiO_3 などが候補に挙がる。

浸透ストレスが強いほど、単為胞子様構造を持つタイプ II の割合が増加する現象は、次のように考えると合理的であることが理解できる。即ち、ストレスが強い場合は、接合して接合子を形成するより、単独で単為胞子様構造を形成する方が、短時間で対応できるため、生存できる確率が増加するということである。

本論文で報告した、溶液中での誘導系は、大量に誘導することが可能で、阻害剤処理なども容易である。一方で、Ikegaya *et al.* (2012) による寒天上で誘導系は、接合像を一平面上で観察でき、形態学的研究に適している。溶液中では、藻体がねじれながら接合する機会が多く、観察に問題が生じる場合がある。従って、目的により実験系を選択することが、研究を進める上で重要であると考えられる。これらの実験系が、アオミドロ属藻類の接合現象の更なる理解につながることを期待される。

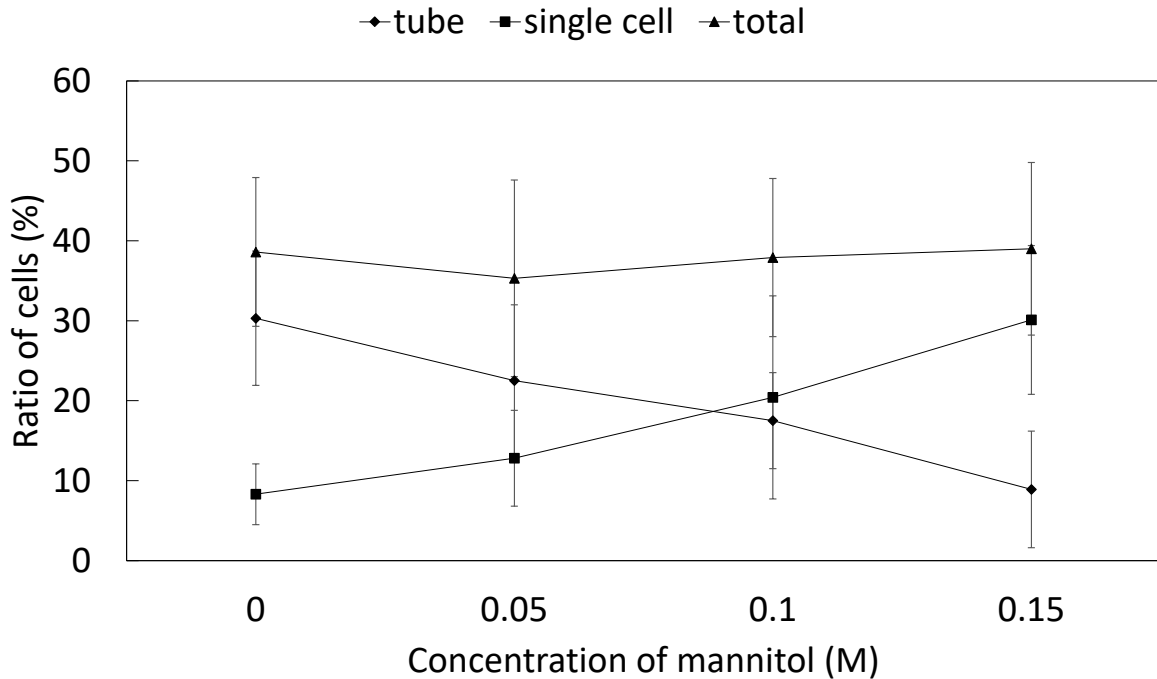


Fig. 3. Ratio of *Spirogyra castanacea* cells of tube type and single cell type to all cells. Cells were incubated in 5 mM Na_2SiO_3 with mannitol after turgor was regulated. Experiments were repeated five times and average values are shown with standard error.

引用文献

- Allen, M. A. 1958. The biology of a species complex in *Spirogyra*. Ph.D. thesis, Indiana University, Bloomington, Indiana, USA.
- 衛生環境研究所水質・赤土研究室 2006. 藻類と pH の関係について. 衛環研ニュース 第 12 号 p3.
- Epstein, E. 2009. Silicon: its manifold role in plants. *Ann. Appl. Biol.* 155: 155–160.
- Ichimura, T. 1971. Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. In: Nishizawa K. (ed), Proceedings of the 7th International Seaweed Symposium. pp 208–214. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Ikegaya, H., Nakase, T., Iwata, K., Tsuchida, H., Sonobe, S. & Shimmen, T. 2012. Studies on conjugation of *Spirogyra* using monoclonal culture. *J. Plant Res.* 125: 457–464.
- Inoue, N., Sonobe, S., Nagata, Y. & Shimmen, T. 1999. Secretion of lectin-binding material in rhizoid differentiation of *Spirogyra*. *Plant Cell Physiol.* 43: 479–483.
- Iwata, K., Tazawa, M. & Itoh, T. 2001. Turgor pressure regulation and the orientation of cortical microtubules in *Spirogyra* cells. *Plant Cell Physiol.* 42: 594–598.
- Pouličková, A., Žižka, Z., Hašler, P. & Benada, O. 2007. Zygnematalean zygospores: Morphological features and use in species identification. *Folia Microbiol.* 52: 135–145.
- Simons, J., Van Beem, A. P. & de Vries, P. J. R. 1984. Induction of conjugation and spore formation in species of *Spirogyra* (Chlorophyceae, Zygnematales) *Acta Bot. Neerl.* 33: 323–334.
- Takano, T., Higuchi, S., Ikegaya, H., Matsuzaki, R., Kawachi, M., Takahashi, F. & Nozaki, H. 2019. Identification of 13 *Spirogyra* species (Zygnemataceae) by traits of sexual reproduction induced under laboratory culture conditions. *Sci. Rep.* <https://www.nature.com/articles/s41598-019-43454-6>.
- Yamashita, T. & Sasaki, K. 1979. Conditions for the induction of the mating process and changes in contents of carbohydrates and nitrogen compounds during the mating process of *Spirogyra*. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. Bot.* 11: 279–287.

(Received Feb. 12, 2020; Accepted March 10, 2020)