

Spirogyra fluviatilis (ホシミドロ科) の膨圧調節岩田和佳^{1*}・岡崎芳次²・田沢仁³・新免輝男¹ 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)² 大阪医科大学生物学教室 (〒569-8686 大阪府高槻市大学町2番7号)³ 福井工業大学応用理化学科 (〒910-8505 福井県福井市学園町3丁目6番1号)Kazuyoshi Iwata^{1*}, Yoshiji Okazaki², Masashi Tazawa³ and Teruo Shimmen¹: Characterization of turgor regulation of *Spirogyra fluviatilis* (Zygnemataceae). Jpn. J. Phycol. (Sôrui) 68: 81-84 July 10, 2020

Turgor regulation of *Spirogyra fluviatilis* was investigated. Turgor regulation was completely inhibited by Gd³⁺ (stretch-activated (SA) channel blocker), which suggests that sensor of turgor might be SA channel. Turgor was also inhibited by dark condition, tetraethylammonium (K⁺ channel inhibitor), NPPB (Cl⁻ channel inhibitor), amiprophos-methyl (anti-microtubule reagent). It was shown that malate and NO₃⁻ increased significantly accompanying turgor regulation when solutes of *Spirogyra* cell were analyzed with ion chromatography. Detection of malate was characteristic of this phenomenon because malate was not detected in control cell. These results showed similarity between turgor regulation of *S. fluviatilis* and osmoregulation of guard cell of land plants. In addition, character of conjugation of *Spirogyra* was discussed from these results.

Key Index Words: Gd³⁺, malate, *Spirogyra*, turgor regulation

¹Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Harima Science Park City, Hyogo 678-1297, Japan²Department of Biology, Osaka Medical College, Takatsuki, Osaka 569-8686, Japan³Department of Applied Physics and Chemistry, Fukui University of Technology, Fukui, Fukui 910-8505, Japan

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

植物は、浸透ストレスに対し、膨圧を元に戻そうとする反応(膨圧調節)や浸透圧を元に戻そうとする反応(浸透圧調節)を行う。藻類では、膨圧調節は海藻(緑藻 *Valonia*, *Chaetomorpha* など)(Zimmermann 1978, Kirst 1990)や汽水域の藻類(シャジクモ植物 *Lamprothamnium*, 黄緑藻 *Vaucheria* など)(Okazaki 1996, Muralidhar *et al.* 2015)など、浸透圧調節は淡水産シャジクモ植物 *Chara* (Kamiya & Kuroda 1956, Bisson & Bartholomew 1984)で報告がある。

アオミドロの一種である *Spirogyra fluviatilis* Hilse (Fig. 1a)は、膨圧調節を行う淡水藻として最初に報告された(Iwata *et al.* 2001)。また、アオミドロは、系統的に最も陸上植物に近い藻類とされるホシミドロ目に含まれる(Delaux *et al.* 2015)。したがって、アオミドロの膨圧調節が、膨圧調節を行うことが知られている陸上植物(Shabara & Lew 2002)や、汽水域産を含む海藻(Zimmermann 1978, Kirst 1990, Okazaki 1996, Muralidhar *et al.* 2015)のいずれに近い性質を持つか、系統進化的視点から興味を持たれる。

Spirogyra castanacea G.C. Couch は、溶液中での接合子形成誘導において、前処理として膨圧調節を行わせると細胞のダメージが少なく、接合子形成が効率よく誘導されることが明らかになっている(岩田ら 2020)。したがって、接合子形成誘導の理解にはアオミドロ属藻類の膨圧調節の更なる理解が必要と考えられる。そこで本研究では、*S. fluviatilis* を

用い各種阻害剤を用いたり光条件を変えたりした生理学的解析と、イオンクロマトグラフィーによる浸透調節物質の解析を行い、膨圧調節の現象解析を行った。

S. fluviatilis は、京都府城陽市の池で採取し、C培地(*Closterium* 用培地, Ichimura 1971)で、23 °Cで継代培養したもので、以前の研究(Iwata 1995, Iwata & Itoh 1998, Iwata *et al.* 2001)で用いたものと同じ株である。明暗条件は 16 h light (蛍光灯) - 8 h dark, 光強度は 90 μmol m⁻² s⁻¹ とした。新しい培地に植継いしてから 2~7 日経過した細胞(増殖期)を実験に用いた。

膨圧調節の誘導には、人工池水(0.1 mM each of KCl, NaCl, CaCl₂, and 5 mM HEPES-Tris [pH7.5])を用いた。培地中の細胞を人工池水で軽くすすぎ、マンニトールを人工池水に溶解した溶液に移して膨圧調節を誘導した(Iwata *et al.* 2001)。マンニトール濃度は、人工池水中での細胞の浸透圧(限界原形質分離法で求める)の約 3/4 にあたる 0.40 M を採用した。

阻害剤は、SA-channel blocker として Gd³⁺, 微小管破壊剤として amiprophos-methyl (APM, DMSO に 5 mg mL⁻¹ になるように溶解して保存液とした), アクチンフィラメント破壊剤として サイトカラシン D (CD, DMSO に 10 mM になるように溶解して保存液とした), K-channel blocker として テトラエチルアンモニウム (TEA), Cl-channel blocker として 5-Nitro-2-(3'-phenylpropyl-amino)benzoic

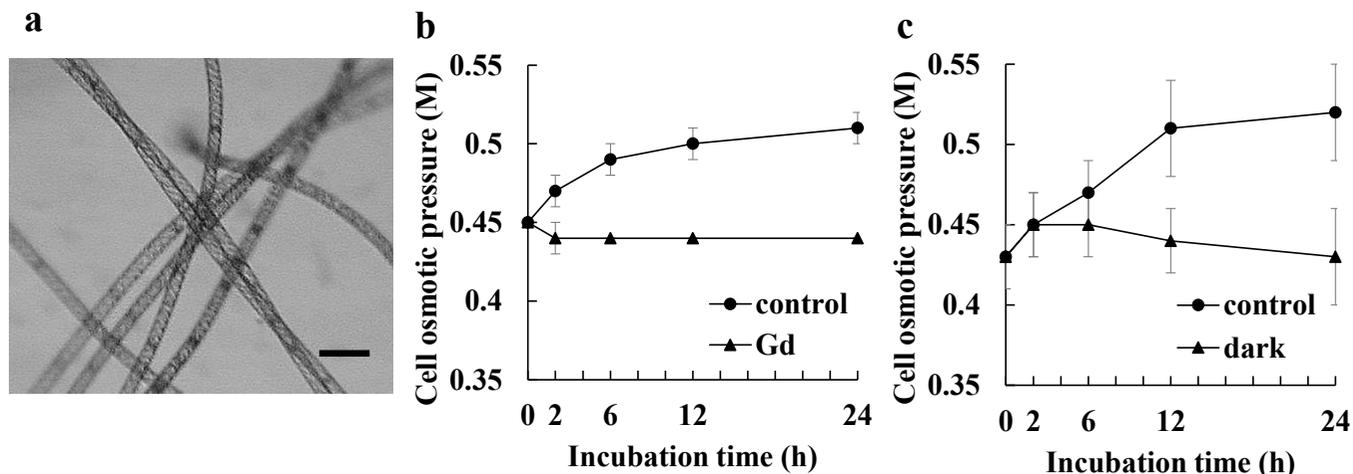


Fig. 1. Turgor regulation of *Spirogyra fluviatilis*. a. *Spirogyra fluviatilis* cells, bar=100 μm . b. Time course of effect of Gd^{3+} on turgor regulation. Turgor pressure value was shown as concentration of mannitol equal to limit plasmolysis concentration (cell osmotic pressure (M)). n=5. c. Time course of light effect on turgor regulation. Turgor pressure value was shown as concentration of mannitol equal to limit plasmolysis concentration (cell osmotic pressure (M)). n=5

acid (NPPB, DMSOに50 mMになるように溶解して保存液とした)を用いた。 Gd^{3+} は20 μM (対照は蒸留水), APMは3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (対照は0.06% DMSO), CDは10 μM (対照は0.1% DMSO), TEAは10 mM (対照は蒸留水), NPPBは10 μM (対照は0.02% DMSO)の濃度で、マンニトール溶液に加えた。阻害剤などの処理を含む膨圧調節は、6穴プレート(AGCテクノグラス)中で行った。光の遮断は、プレートをアルミホイルで包むことにより行った。細胞は、ピンセットでひとつまみ、各プレートに入れた。

細胞の浸透圧は限界原形質分離法で求めた。限界原形質分離法で求めた値と、オスモメーターで測定した値は、前者の値が約50 mM高いが、外液の浸透圧と膨圧調節の増減との関係は同様(即ち、外液の浸透圧が上昇すると膨圧が上昇してある値で安定する)であったため(Iwata *et al.* 2001)、今回は前者の手法を用いた。細胞は、様々な濃度のマンニトール溶液中で15 min静置した。そして、半分以上の細胞が原形質分離した最低の濃度を細胞の浸透圧とした。

浸透調節物質の分析はイオンクロマトグラフィーにより行った。マンニトール溶液中で24 h静置した細胞(対照は24 h人工池水処理)の周囲の水を濾紙(Whatman)で3回拭った。次に細胞を約20 mg エッペンドルフチューブに移し、 -20°C で1 h静置した。室温で融解後、細胞の重量の9倍の蒸留水を加え、限外濾過器 minicent-10(東ソー株式会社)で、1000 x gで10 min遠心した。得られた濾液を蒸留水で4倍希釈し、イオンクロマトグラフ HIC-6A(島津製作所)を用いてイオン種の分析を行った。

SA channel 阻害剤 Gd^{3+} は、膨圧調節を阻害した(Figs 1b, 2)。阻害は処理後2 h以内に見られ、細胞の浸透圧上昇を完全に阻害した(24 h処理後1%水準で有意差あり)。暗黒下では、処理後2 hまでは対照と変わらなかったが、そ

の後、阻害が見られた(24 h処理後1%水準で有意差あり)(Figs 1c, 2)。他の阻害剤では、K channel 阻害剤 TEA, Cl channel 阻害剤 NPPB, 微小管破壊剤 APMに阻害作用が見られたが(いずれも24 h処理後5%水準で有意差あり)、actin 破壊剤 CDは阻害作用が見られなかった(Fig. 2)。また、膨圧調節と並行して、硝酸イオンとリンゴ酸が対照に比べ有意に増加した(Fig. 3)。特に、リンゴ酸は対照では全く検出されず、この現象を特徴付けるものであった。

阻害剤実験の結果から、膨圧センサーとして SA channel が機能し、浸透調節物質として、 K^{+} , Cl^{-} が利用されている可能性が考えられた。また、細胞骨格としては微小管が関与していると考えられた。

膨圧調節が Gd^{3+} で阻害される現象は、*Vaucheria*の場合と同様である(Muralidhar *et al.* 2015)。しかし、浸透調節物質の測定結果では、膨圧調節による K^{+} と Cl^{-} の有意な増加は見られず、阻害剤実験の結果と一見矛盾するよう見える。ただ、例えば K^{+} と Cl^{-} の一時的な流入がトリガーになり、硝酸イオン、リンゴ酸が増加すると考えると矛盾はなく、今後の課題となろう。

細胞の浸透圧の測定値は、限界原形質分離法とイオン分析で大きく異なっていた。すでに述べたように、オスモメーターの測定値は限界原形質分離法より50 mM低く、今回の結果から、イオン分析は200 mM低い。オスモメーターとイオン分析における試料調製は、凍結した試料を融解するところまで共通であることから、試料成分そのものはほぼ同じであると考えられる。したがって、この差は測定されていない浸透調節物質によるものである可能性がある。例えば有機物として、藻類ではグリセロール(Ben-Amotz & Avron 1973)、バタイン(Blunden *et al.* 1992)、トレハロース、ショ糖(Bremauntz *et al.* 2011)が使われている。アオミドロも

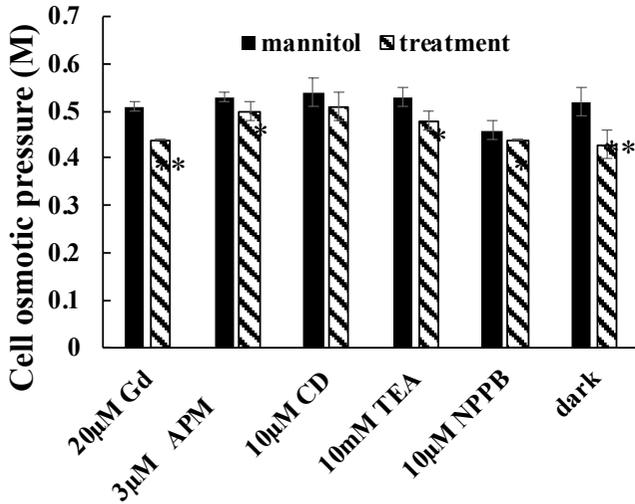


Fig. 2. Effect of inhibitors and light condition on turgor regulation of *Spirogyra fluviatilis*, after 24 h. Gd^{3+} (SA-channel blocker), amiprophosph-methyl (APM, anti-microtubule reagent), cytochalasin D (CD, anti-actin reagent), Tetraethylammonium (TEA, K-channel blocker) and NPPB (Cl-channel blocker) were used as inhibitors. Turgor pressure value was shown as concentration of mannitol equal to limit plasmolysis concentration (cell osmotic pressure (M)). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (t-test), $n = 5$.

こうした物質を利用しているのかもしれない。

リンゴ酸を浸透調節物質として利用していることは陸上植物との関係が推測される。光要求性の現象であることを含めると、いわゆる膨圧調節ではないが、気孔の開閉現象に類似する (Dittrich & Raschke 1977, Scheibe *et al.* 1990)。汽水域の藻類や海藻からは、浸透調節物質としてのリンゴ酸は、我々の知る限り見出されていないため、進化的に興味を持たれる。

気孔の開閉現象には、細胞骨格系として微小管とアクチンの両者が関与していることが報告されているが (Fukuda *et al.* 1998, Higaki *et al.* 2010)、今回の現象については微小管のみが関与する可能性が示された。Iwata *et al.* (2001) は、*S. fluviatilis* において表層微小管の配向変化と膨圧変化に対応関係があることを報告している。孔辺細胞における微小管構造変化と気孔開閉との関係と、何らかの共通点がある可能性があり、興味深い。更に、気孔開口時には、 K^+ と電荷のバランスを取るために、 Cl^- の流入やリンゴ酸の合成が起こることが知られている (Raschke & Schnabl 1978)。前述の、*S. fluviatilis* の K^+ 、 Cl^- の一時的な流入がリンゴ酸の増加のトリガーになる可能性との比較は、検討する価値があるように思われる。

岩田ら (2020) は、乾燥系 (Ikegaya *et al.* 2012) と溶液系の *S. castanacea* の接合子形成誘導過程が、現象的に類似している可能性を指摘した。類似点の一つとして浸透ストレス (乾燥系における乾燥と溶液系におけるマンニトール処理) がある。また、*S. fluviatilis* と *S. castanacea* とは、仮根を形

成する (Ikegaya *et al.* 2012)、膨圧調節能がある (岩田ら 2020)、乾燥ストレスで接合子形成誘導できる (Ikegaya *et al.* 2012) という点で類似した性質を持っている。したがって、溶液系の *S. fluviatilis* と、溶液系や乾燥系の *S. castanacea* が現象的に類似している可能性がある。溶液系と乾燥系の *S. castanacea* においても、阻害剤の影響やリンゴ酸の形成などを検討する必要があるかもしれない。今回明らかになった、SA channel による乾燥ストレスの受容の可能性、光要求性の現象である点、浸透制御にリンゴ酸を利用する点などが、溶液系と乾燥系の *S. castanacea* でも共通であれば、*S. castanacea* の接合子形成誘導過程の理解が深まることが期待される。

また、溶液系と乾燥系の浸透ストレスが対応しているとすると、本来、乾燥系、野外では例えば水を抜いた後の水田での乾燥ストレスへの適応が、実験室レベルの溶液系では膨圧調節という形で現れていた可能性がある。一般的な膨圧調節は、膨圧を一定に保つ現象であり、外液の浸透圧上昇分と同じだけ細胞内浸透圧の上昇が見られる (Zimmermann 1978, Kirst 1990, Okazaki 1996, Muralidhar *et al.* 2015)。しかし、*S. fluviatilis* の膨圧調節は外液の浸透圧上昇分の一部しか細胞内浸透圧の上昇が見られない (Iwata *et al.* 2001)。その生理的意味は不明であったが、本来、水中で行われる膨圧調節とは別の現象、即ち乾燥ストレスに対応する反応を、膨圧調節と捉えていたのかもしれない。その場合、今回の知見は、乾燥ストレスへの反応の解析につながる可能性があり、今後の進展が期待される。

本研究では、*S. fluviatilis* の膨圧調節の解析を行った。今回の結果が、単にアオミドロの研究に終わるのでなく、進化的視点を持った研究につながれば幸いである。

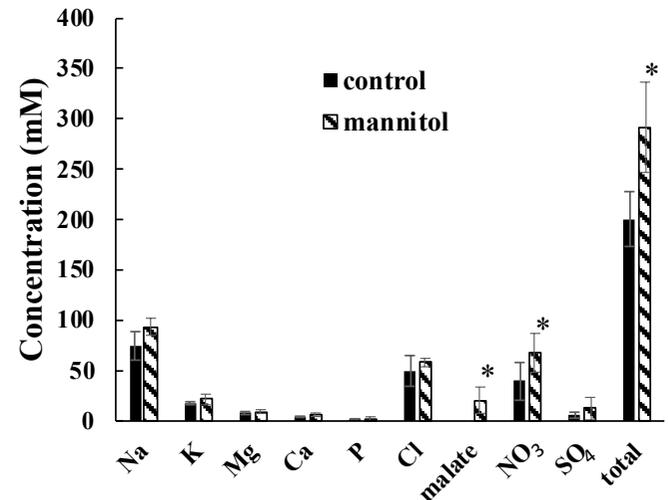


Fig. 3. Change of ionic concentration of *Spirogyra fluviatilis* cells accompanying turgor regulation. Cells were incubated in 0.40 M mannitol solution or artificial pond water (control) for 24 h. * $p < 0.05$ (t-test), $n = 4$.

引用文献

- Ben-Amotz, A. & Avron, M. 1973. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiol.* 51: 875–878.
- Bisson, M. A. & Bartholomew, D. 1984. Osmoregulation or turgor regulation in *Chara*? *Plant Physiol.* 74: 252–255.
- Bremauntz, P., Torres-Bustillos, L., Cañizares-Villanueva, R. O., Duran-Paramo, E. & Fernández-Linares, L. 2011. Trehalose and sucrose osmolytes accumulated by algae as potential raw material for bioethanol. *Nat. Resour.* 2: 173–179.
- Blunden, G., Smith, B. E., Irons, M. W., Yang, M., Roch, O. G. & Patel, A. V. 1992. Betaines and tertiary sulphonium compounds from 62 species of marine algae. *Biochem. Syst. Ecol.* 20: 373–388.
- Delaux, P., Guru, V., Radhakrishnan, G. V., Jayaraman, D., *et al.* 2015. Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 13390–13395.
- Dittrich, P. & Raschke, K. 1977. Malate metabolism in isolated epidermis of *Commelina communis* L. in relation to stomatal functioning. *Planta* 134: 77–81.
- Fukuda, M., Hasezawa, S., Asai, N., Nakajima, N. & Kondo, N. 1998. Dynamic organization of microtubules in guard cells of *Vicia faba* L. with diurnal cycle. *Plant Cell Physiol.* 39: 80–86.
- Higaki, T., Kutsuna, N., Sano, T., Kondo, N. & Hasezawa, S. 2010. Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J.* 61: 156–165.
- 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.
- Iwata, K. 1995. Regulation of the orientation of cortical microtubules in *Spirogyra* cells. *J. Plant Res.* 108: 531–534.
- 岩田和佳・池谷仁里・石田一馬・園部誠司・新免輝男 2020. 新しい手法による *Spirogyra castanacea* (ホシミドロ科) の接合の誘導. *藻類* 68: 77–80.
- Iwata, K. & Itoh, T. 1998. Effect of ions on the orientation of cortical microtubules in *Spirogyra* cells. *Plant Cell Physiol.* 42: 1099–1103.
- 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.
- Kamiya, K. & Kuroda, K. 1956. Artificial modification of the osmotic pressure of the plant cell. *Protoplasma* 46: 423–436.
- Kirst, G. O. 1990. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 21–53.
- Muralidhar, A., Shabala, L., Broady, P., Shabala, S. & Garrill, A. 2015. Mechanisms underlying turgor regulation in the estuarine alga *Vaucheria erythrospora* (Xanthophyceae) exposed to hyperosmotic shock. *Plant Cell Environ.* 38: 1514–1527.
- Okazaki, Y. 1996. Turgor regulation in a brackish water charophyte, *Lamprothamnium succinctum*. *J. Plant Res.* 109: 107–112.
- Raschke, K. & Schnabl, H. 1978. Availability of chloride affects the balance between potassium chloride and potassium malate in guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* 62: 84–87.
- Scheibe, R., Reckmann, U., Hedrich, R. & Raschke, K. 1990. Malate dehydrogenases in guard cells of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 93: 1358–1364.
- Shabara, S. N. & Lew, R. R. 2002. Turgor regulation in osmotically stressed *Arabidopsis* epidermal root cells. Direct support for the role of inorganic ion uptake as revealed by concurrent flux and cell turgor measurements. *Plant Physiol.* 129: 290–299.
- Zimmermann, U. 1978. Physics of turgor- and osmoregulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29: 121–148.

(Received Mar. 23, 2020; Accepted Apr. 28, 2020)