

千葉県産の緑藻ボルボックスの1種の形態と分類

野崎久義^{1*}・佐野郷美²・手塚幸夫³・大藪健⁴¹ 東京大学大学院理学系研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)² 東邦大学理学部教職課程 (〒274-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1)³ 房総野生生物研究所 (〒298-0004 千葉県いすみ市大原 7952)⁴ 夷隅郡市自然を守る会 (〒299-4501 千葉県いすみ市岬町椎木 426-5)Hisayoshi Nozaki^{1*}, Satomi Sano², Yukio Tezuka³ and Ken Ooyabu⁴: Morphology and taxonomy of a species of *Volvox* (Chlorophyceae) from Chiba Prefecture, Japan Jpn. J. Phycol. (Sôru) 68: 153-156, November 10, 2020

A species of *Volvox* (Chlorophyceae) was studied by using clonal cultures newly established from a paddy field soil collected in Isumi, Chiba Prefecture, Japan. Thick cytoplasmic bridges between somatic cells in asexual spheroids of this species indicated that the species belongs to *Volvox* sect. *Volvox*. Monoicous sexual spheroid characteristics and zygote spine morphology of this alga were similar to those of two Japanese species of this section, *V. ferrisii* and *V. kirkiorum*. On the other hand, the zygote number in a sexual spheroid and number of daughter spheroids in a parental spheroid were different between the present alga and the latter two species previously reported. However, the ITS sequence of nuclear rDNA unambiguously resolved that the *Volvox* species from Chiba Prefecture belongs to *V. ferrisii*. This is the first taxonomic identification at species level on the genus *Volvox* originating from Chiba Prefecture, Japan.

Key Index Words: asexual spheroid, molecular phylogeny, monoicous species, morphology, sexual spheroid, taxonomy, *Volvox*, *Volvox ferrisii*, *Volvox* sect. *Volvox*

¹ Graduate School of Science, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo, Tokyo 113-0033, Japan² Faculty of Science, Toho University, Miyama 2-2-1, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan³ Boso Wildlife Research Association, Ohara 7952, Isumi, Chiba 298-0004, Japan⁴ Isumigunsi Nature Preserve Association, MisakichouShiigi 426-5, Isumi, Chiba 299-4501, Japan

*Author for correspondence: nozaki@bs.s.u-tokyo.ac.jp

緒言

「ボルボックス」は一般の人にはなじみが薄いようで、よく「コロボックスの研究ですか」と言われる。ボルボックス *Volvox* は虫眼鏡でみると小さな緑色の妖精のような魅力的な生物であり、湖や水田等の淡水域に実在する群体性とも言われている多細胞球体の緑藻類の1属であり、分類学的にはリンネが1758年に属として設立している(野崎2000)。東京大学の一般公開やオープンラボではボルボックスは女子高生に人気があり、「自分で培養したい。種を調べたい。」という問い合わせがある。日本各地からこれまでに8種と、形態的に特異であるが *Volvox ferrisii* Isaka, Matsuzaki & Nozaki に非常に近縁な *Volvox* sp. Sagami が報告されている(野崎1991, Isaka *et al.* 2012, Nozaki *et al.* 2015, 2016, Kimbara *et al.* 2019)。千葉県からは君津市亀山湖の未同定種が報告されているが(よしさん2007)、ボルボックスの種レベルでの報告は千葉県からはこれまでないようである(野崎1998)。

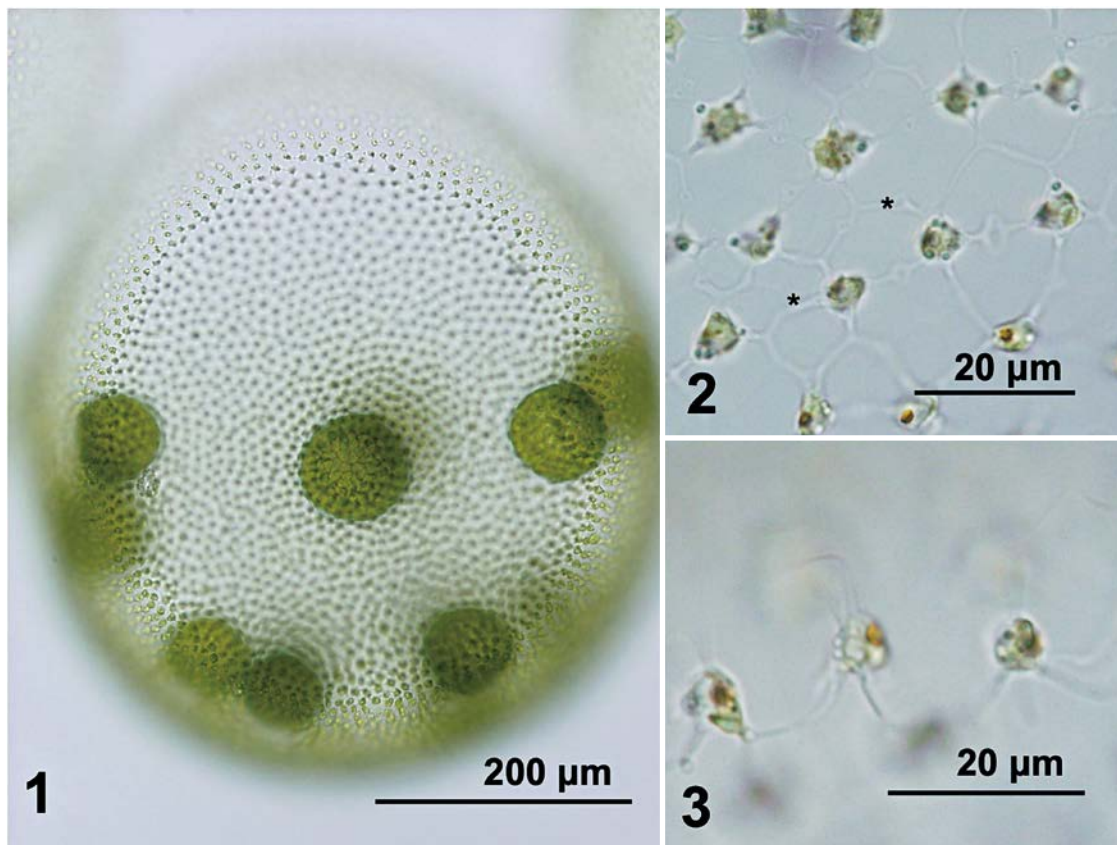
今回千葉県いすみ市からボルボックスを採取し、培養条件下で無性群体と有性群体を観察し、分子系統解析と照らし合わせて種同定を実施したのでその結果を報告する。

材料と方法

2018年10月13日、千葉県いすみ市新田の著者の

一人手塚が耕作する無農薬無肥料の水田(35°15'46"N, 140°22'30"E)から表土を採取した。乾燥後、約0.5gをシャーレ(90mm x 20mm)に入れ、蒸留水約20mLを加えて25°C明暗条件下(80–130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 14:10h)で培養した結果、10日後にボルボックスの遊泳球体が発生した。これをピペット洗浄法で分離し、AF-6培地(加藤1982)で培養株3株(2018-1031-VVx1 ~ VVx3)を確立した。そのうちの1株(2018-1031-VVx2)を形態観察と塩基配列決定に用いた。ボルボックスの性誘導は有機物を多く含む培地で培養する必要があるため、培養した親球体から遊泳する直前の娘球体をピペットで放出させて再分離してバクテリアを排除し(Isaka *et al.* 2012), VTAC培地(Kawachi *et al.* 2013)を用いて上記明暗条件下で培養した。2018-1031-VVx2株は国立環境研究所微生物系統保存施設(Kawachi *et al.* 2013)に寄託し、NIES-4465として公開した。光学顕微鏡観察にはBX60 microscope (Olympus, Tokyo, Japan)を用いた。観察にはビニールテープ法(野崎1999)を使用し、運動を止めて写真撮影した。球体の細胞数は表面積($S = 4\pi R^2$)に相当するので、球体の正中断面周囲の細胞数($L = 2\pi R$)を計数して概算($S = L^2/\pi$)した(Nozaki 1988)。

分子系統解析には核rDNA ITS領域(ITS-1, 5.8S rDNA and ITS-2)を用いた。方法はKimbara *et al.* (2019)に準じて、細胞破碎液をDNAサンプルとし、Coleman *et al.*



Figs 1–3. Asexual spheroids of *Volvox ferrisii* from Chiba, Japan. 1. Semi-optical section of spheroid. 2. Surface view of somatic cells interconnected with one another by thick cytoplasmic bridges (asterisks). 3. Side view of anterior somatic cells. Note that the cells are ellipsoidal or ovoid.

(1994) のプライマー, KOD One PCR Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan) で PCR 増幅した DNA フラグメントをダイレクトシーケンスで配列決定した。決定した配列は既知の種 *V. ferrisii* のものと完全一致したので, 同配列を用いてボルボックス節 [*Volvox* sect. *Volvox* (= section “*Euvolvox*”, Smith 1944)] で最も多くの種数を解析した Nozaki *et al.* (2020) の系統解析結果をそのまま系統樹に使用した。

結果

無性球体は卵形で 5,800–9,600 細胞から構成されていて, 発達中の次世代の胚または娘球体を 4–17 個持っていた (Fig. 1)。成熟したものは径 370–680 μm であった。非生殖細胞は鞭毛を 2 本ずつ持ち, 鞭毛よりも太い細胞質連絡で連結し, 球体表面から見ると星形からアメーバ状の形状であった (Fig. 2)。娘球体が反転する時期の親球体の前方の非生殖細胞は, やや縦長で楕円形から卵形であった (Fig. 3)。

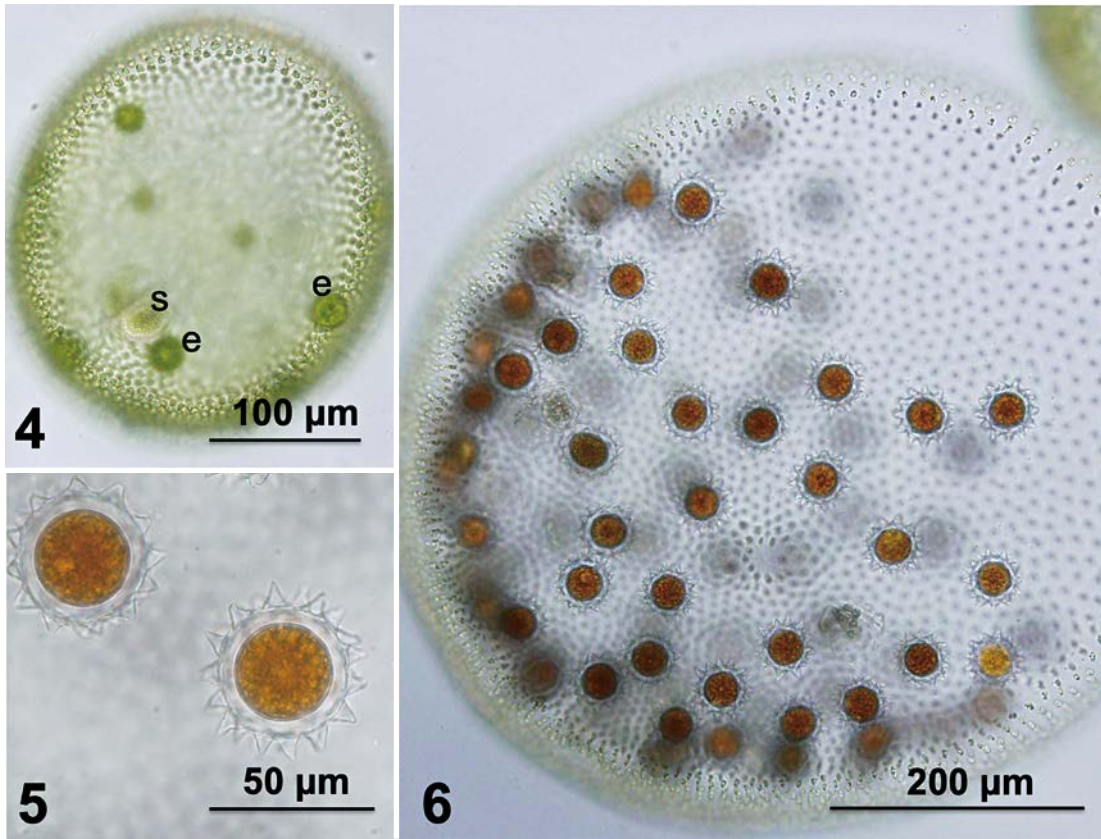
培養株からバクテリアを除去し, 酢酸ナトリウムを含む VTAC 培地で培養すると有性球体が誘導された。有性球体は複数の卵と 2–4 個の精子束を同時に持つ雌雄同体であった (Fig. 4)。未成熟の有性球体では卵は同時に分化しないが, 成熟した球体では 46–95 個の同じように成熟した卵, または受精卵が認められた (Figs 5, 6)。成熟した受精卵は赤褐

色で厚い細胞壁を持ち, 細胞壁は鋭い棘で覆われていた。受精卵の棘を除いた直径は 33–38 μm であった。棘は先が尖り, 径 7–10 μm の長さであった (Fig. 5)。

千葉県産 2018-1031-VVx2 株の ITS 配列 (585 塩基対, DDBJ アクセッション番号 LC575050) は, 埼玉県産の池, 神奈川県と茨城県の水田から分離培養された 4 株の雌雄同体種 *V. ferrisii* の配列 (AB663330, AB663333, AB663336, AB663339; Isaka *et al.* 2012) と 100% 一致した。ボルボックス節全体の系統樹では, 日本産の雌雄同体の 2 種 1 モルフォタイプ (*V. ferrisii*, *V. kirkiorum* Nozaki, Kawai-Toyooka & Isaka, *Volvox* sp. Sagami) が雌雄異体種 *V. rousseletii* G.S.West と単系統群を構成し, これらがタイプ種 *V. globator* Linnaeus とは系統的に異なることが明らかであった (Fig. 7)。

考察

光学顕微鏡で観察した結果, 千葉県産株は球体の表面を覆う細胞同士が太い細胞質連絡で連結する特徴をもつボルボックス節に含まれることが明らかになった。本節の種レベルの同定は無性球体の形態だけでは不可能である (Isaka *et al.* 2012, Nozaki *et al.* 2020)。このために有性生殖の誘導と核 rDNA ITS 配列決定を実施した。



Figs 4–6. Sexual spheroids of *Volvox ferrisii* from Chiba, Japan. 4. Immature sexual spheroid showing sperm packet (s) and eggs (e). 5. Part of mature sexual spheroid showing zygotes with spiny walls. 6. Sexual spheroid with many matured zygotes.

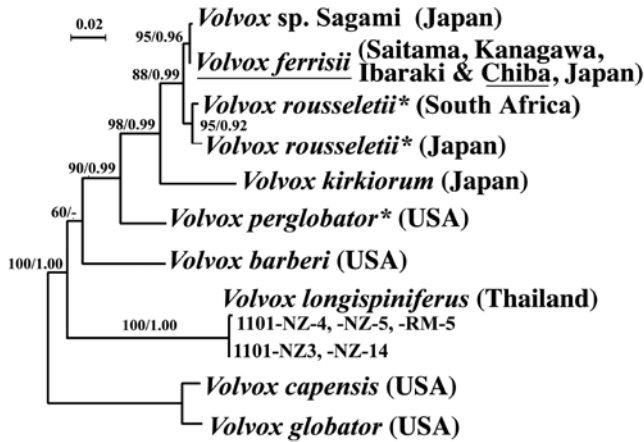


Fig. 7. Phylogenetic position of *Volvox ferrisii* from Chiba, Japan within *Volvox* sect. *Volvox*. Asterisks indicate dioicous species. Other species are monoicous. The phylogenetic analyses were carried out previously (Nozaki *et al.* 2020) based on maximum likelihood (ML) method of the internal transcribed spacer (ITS) regions of nuclear rDNA (ITS-1, 5.8S rDNA and ITS-2). Branch lengths are proportional to the evolutionary distances that are indicated by the scale bar. Numbers in left and right sides at branches represent bootstrap values (50% or more) based on 1,000 replications of ML and posterior probabilities (0.90 or more) by Bayesian inference, respectively.

千葉県産株の受精卵の数 (46–95 個) および受精卵の棘の形態 (径 7–10 μm で先が尖る) は、ボルボックス節の雌雄同体種で日本産の *V. ferrisii* および *V. kirkiorum* と最も良く一致した (Nozaki *et al.* 2020; Table 1)。受精卵の数は本節で種レベルの分類に重要とされていたが (Isaka *et al.* 2012)、千葉県産株は両種の間隔的な値を示した (Table 1)。一方、*V. kirkiorum* で観察されたような小さな有性球体 (Isaka *et al.* 2012) は千葉県産株からは確認されなかった。また、千葉県産株は、無性球体の次世代の球体の数が 10 以上になる点で *V. ferrisii* および *V. kirkiorum* と異なった (Table 1)。従って、千葉県産株は形態的には新種の可能性もあると考えられた。

一方、千葉県産株の ITS 配列は *V. ferrisii* のものと完全に一致した。*V. ferrisii* の ITS 配列には、Isaka *et al.* (2012) が形態観察して新種として報告した関東地方産の 4 株が含まれる。群体性緑藻ボルボックス目では ITS 配列の進化速度が高いので、種またはそれ以下の系統解析に用いられ、ボルボックス節の種によっては ITS 配列の種内多型が認められる (Nozaki *et al.* 2020)。従って、今回の千葉県産のボルボックス節は *V. ferrisii* に同定すべきと結論され、観察された形態は *V. ferrisii* の種内変異と解釈される。また、分子情報は本節の種レベルの分類には不可欠であることが今回再認識さ

Table 1. Comparison of four morphological types of *Volvox* sect. *Volvox* from Japan.

	<i>Volvox</i> sp. from Chiba Pref.	<i>V. kirkiorum</i>	<i>V. ferrisii</i>	<i>Volvox</i> sp. Sagami
Size of asexual spheroid (μm)	370–680	400–790 × 430–930	630–1,000 × 650–1,000	up to 590
Number of cells in asexual spheroid	5,800–9,600	3,000–6,000	5,000–8,000	2,000–10,000 (usually 2,000–5,000)
Number of gonidia in asexual spheroid	4–17	2–8 (usually 4–6)	2–8 (usually 3–5)	4–8
Size of sexual colony (μm)	400–650	430–440 × 510–540	600–800 × 650–900	up to 500
Number of cells in sexual spheroid	5,200–7,600	1,000–6,000	5,000–13,000	4,000–8,000
Number of zygotes (eggs) in sexual spheroid	46–95	20–80 (usually 30–50)	70–250 (usually 100–150)	5–25 (usually 10–20)
Number of sperm packets in sexual spheroid	2–4	4–8	3–5	1–5
Shape of anterior somatic cells	ellipsoidal to ovoid	pear-shaped to ovoid	ellipsoidal to ovoid	elongate- ovoid or elongate-ellipsoidal
Diameter of zygotes without spines (μm)	33–38	32–38	35–40	37–48
Shape of spines of zygote	straight with acute apices	straight with acute apices	straight with acute apices	straight with acute apices
Length of spines of zygotes (μm)	7–10	5.5–8	6–8.5	up to 3
Distribution	paddy field, Chiba	paddy field, Gifu	paddy fields, Kanagawa and Ibaraki, ana a pond, Saitama, Japan	large lakes, Kanagawa, and a pond, Shiga
References	the present study	Isaka <i>et al.</i> (2012)	Isaka <i>et al.</i> (2012)	Nozaki <i>et al.</i> (2016)

れた。

V. ferrisii は関東地方の水田に主に生育し、非常に近縁であるが有性球体の形態が大きく異なる *Volvox* sp. Sagami (Table 1) が関東地方の大型湖沼に分布するので、両者は生態的種分化の初期であると考えられている (Nozaki *et al.* 2016)。しかし、今回の千葉県産の *V. ferrisii* は水田の泥から分離したという以外は生態的な情報がなく、その水田も特に際だった環境特性があるとは思われない。また、千葉県産株には ITS 配列以外の分子情報はない。従って、千葉県産の *V. ferrisii* の形態的特徴のもつ生態的・進化生物学的意義は今後の研究で明らかになることが期待される。

謝辞

これまで長い間千葉県のボルボックスに関して現地情報を提供して下さった千葉県立中央博物館分館 海の博物館の菊地則雄博士に厚く御礼申しあげる。

引用文献

- Coleman, A. W., Suarez, A. & Goff, L. J. 1994. Molecular delineation of species and syngens in volvocacean green algae (Chlorophyta). *J. Phycol.* 30: 80–90.
- Isaka, N., Kawai-Toyooka, H., Matsuzaki, R., Nakada, T. & Nozaki, H. 2012. Description of two new monoecious species of *Volvox* sect. *Volvox* (Volvocaceae, Chlorophyceae), based on comparative morphology and molecular phylogeny of cultured material. *J. Phycol.* 48: 759–767.
- 加藤季夫 1982. *Colacium vesiculosum* Ehrb. の培養と形態. 藻類 30: 63–67.
- Kawachi, M., Ishimoto, M., Mori, F., Yumoto, K., Sato, M. & Noël, M.-H. 2013. MCC-NIES List of Strains, 9th Edition, Microbial Culture Collection at National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan.

Kimbara, R., Isaka, N., Matsuzaki, R., Kawai-Toyooka, H., Kawachi, M. & Nozaki, H. 2019. Morphological and molecular identification of the dioicous “African species *Volvox roussetii* (Chlorophyceae) in the water column of a Japanese lake based on field-collected and cultured materials. *PLoS ONE* 14: e0221632.

Nozaki, H. 1988. Morphology, sexual reproduction and taxonomy of *Volvox carteri* f. *kawasakii* f. nov. (Chlorophyta) from Japan. *Phycologia* 27: 209–220.

野崎久義 1998. オオヒゲマワリ目 Volvocales. 千葉県史料研究財団 (編) 千葉県自然誌, 本編 4: 千葉県の植物 1- 細菌類・菌類・地衣類・藻類・コケ類 - (県史シリーズ 43). pp. 399–402. 千葉県.

野崎久義 1991. Order Volvocida France, 1894 ボルボックス目. 水野・高橋 (編) 日本淡水動物プランクトン検索図説, pp. 463–485. 東海大学出版会.

野崎久義 1999. 真核微細藻類の同定. 杉山純多・渡辺信・大和田純一・黒岩常祥・高橋秀夫・徳田元 (編) 新版微生物学実験法, pp. 228–231. 講談社サイエンティフィック.

野崎久義 2000. ボルボックスとそのなかま. 小さな緑の粒に隠された秘密. 国立科学博物館. 36 pp.

Nozaki, H., Matsuzaki, R., Yamamoto, K., Kawachi, M. & Takahashi, F. 2015. Delineating a New heterothallic species of *Volvox* (Volvocaceae, Chlorophyceae) using new strains of “*Volvox africanus*”. *PLoS ONE* 10: e0142632.

Nozaki, H., Ueki, N., Isaka, N. *et al.* 2016. A new morphological type of *Volvox* from Japanese large lakes and recent divergence of this type and *V. ferrisii* in two different freshwater habitats. *PLoS ONE* 11: e0167148.

Nozaki, H., Mahakham, W., Heman, W., Matsuzaki, R. & Kawachi, M. 2020. A new preferentially outcrossing monoicous species of *Volvox* sect. *Volvox* (Chlorophyta) from Thailand. *PLoS ONE* 15: e0235622.

Smith, G. M. 1944. A comparative study of the species of *Volvox*. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 63: 265–310.

よしさん 2007. 亀山湖 (角柳) のボルボックス. <http://lake-champ.com/hoge/js-news06-20070526-04.htm>

(Received Aug. 12, 2020; Accepted Sep. 11, 2020)