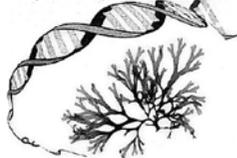


藻類学最前線



接合藻類アオミドロの温故知新

池谷仁里

地球表面の約70%を占める水圏を覗いてみれば、多種多様な藻類がカレードスコープのように精妙で華やかな世界をつくっている。藻類はその形態もさることながら、様々な生活環をもつ。湖沼・河川などの淡水域で、滑らかな肌触りの糸状緑藻を探してみると、アオミドロ (*Spirogyra*) を見つけることができる。アオミドロはジグネマ科スピロギラ属に分類され、円筒形の細胞内にリボン状の葉緑体をもった無分枝の糸状体をしている。また、これまでに386種のアオミドロが報告されており (Kadlubowska 1984)、その多くの種は浮遊性で、水田、湖沼などで藻塊を形成しているが、仮根を形成して流水中で石などの基質に付着して生息している種もいる。国内においては、山岸高旺博士 (日本大学 名誉教授) によって、スピロギラ属の分類がおこなわれてきた (山岸 1977, 2007)。一方では、アオミドロは単純な細胞体制をしているため、古くから形態形成や光合成などの生理学的な研究材料として広く用いられており、著者もアオミドロがつくる仮根の形態制御機構について研究をおこなっていた (Ikegaya *et al.* 2008)。

近年では、次世代シーケンサーの普及による大規模で多種多様なシーケンス情報に基づく分子系統解析や、フィールド調査に基づくファイコレメディエーション (藻類による環境修復) の研究でアオミドロが再び注目されつつある。そこで、本稿ではこれらの研究報告を中心に、著者が取り組んでいる研究と併せて接合藻類アオミドロを紹介したい。

アオミドロによるファイコレメディエーション

アオミドロは水田や湖沼など日当たりの良い淡水域に生息している。日本の淡水域では、数種から20種程度のアオミドロをみることができ、アオミドロの発生期の平均気温は20°C前後であり、弱酸性から弱アルカリ性の範囲で種によって好適なpH値が異なっている (Simons & Been 1990, Hainz *et al.* 2009)。フィールド研究から、アオミドロはpH 5以下の環境下では発生せず、塩害田ではその発生が抑制されることがわかった (山岸・橋爪 1974, Simons & Been 1990)。また、アオミドロは接合とよばれる有性生殖をおこなうが、種によって最盛期が異なっており、オランダにおける野外調査から、*Spirogyra gracilis* は4月から5月にかけて、*S. subcrassa* は7月から9月にかけて接合し、弱アルカリ性の環境下よりも硬水中で多くの接合胞子が観察されている (Simons & Been 1990)。アオミドロは貧栄養な淡水域だけでなく、有機物を多く含む富栄養な環境下に適応し、リン、窒素源だけでなく、環境汚染の原因となる重金属も集積する

ことから、ファイコレメディエーションへの活用もすすめられている (Lee & Chang 2011, Tang *et al.* 2014, Jaiswar *et al.* 2015)。重金属の集積能力に関する研究によると、重金属は細胞壁表層に分布しており、非セルロース多糖類やタンパク質に結合していることが示唆されている (Lee & Chang 2011)。

アオミドロをバイオマス資源として用いた研究を調べたところ、アオミドロを鶏のビタミンB12欠乏飼料に混ぜ、発育促進効果を確認した農業試験報告があった (高橋ら 1957)。アオミドロをはじめ藻類は、ビタミンB12を多く保有していることが知られている。Croft *et al.* (2005) は、ビタミンB12は藻類にとってタンパク質の合成や成長に必要であるため、合成能をもつものは自力で、欠いているものは細菌との密接な関係を築き上げ、ビタミンを得ているのではないかと述べている。著者は緑藻の培養で広く用いられている *Closterium medium* で10株のアオミドロを培養しているが、種によるビタミンB12合成能はわからないため、培地には必ずビタミンB12を入れている。

アオミドロの分子系統解析

従来、陸上植物と同じストレプト植物に属する車軸藻綱の中で、コレオケーテ属やシャジクモ目が陸上植物に最も近縁であると考えられてきた (Karol *et al.* 2001, Becker & Marin 2009)。Karol *et al.* (2001) は4遺伝子と3個のゲノムデータを用いて系統推定をおこなったが、近年では、次世代シーケンサーを活用して、160個の核ゲノムに基づく分子系統解析 (Timme *et al.* 2012) や424遺伝子における個別の遺伝子系統樹からもっとも確率の高いトポロジーをもつ種系統樹を選択するコアレッセンス解析 (Wichett *et al.* 2014)、259個のトランスクリプトームデータと10個のゲノムデータに基づく分子系統解析 (Delauxa *et al.* 2015) がおこなわれている。その結果、ジグネマ科の接合藻類が陸上植物の姉妹群であることが高い確率で支持された。さらに、Timme *et al.* (2012) は、シャジクモ目やコレオケーテ目から分岐した後、接合藻類は、卵生殖や鞭毛装置などを二次的に欠失し、アオミドロのような分枝しない多細胞体制をもつ仲間が出現してきたのではないかと述べている。

アオミドロの有性生殖 (接合) の諸性質

アオミドロの細胞は見かけ上ほとんど同じであるが、雌雄に分かれて接合をおこなう。ジグネマ科の接合胞子は種による特異性がみられるため、アオミドロの種同定は主に接合様

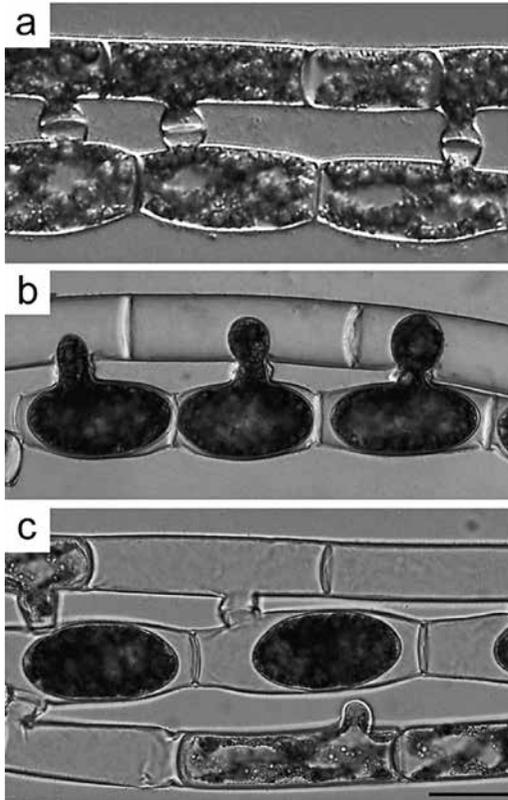


図1. アオミドロ (*Spirogyra castanacea*) の接合。 a: 接合管連結, b: 雄性配偶子の移動, c: 接合子形成。bar = 50 μ m。 *Spirogyra castanacea* の場合, 接合を誘導すると, 接合管は通常ペア形成した細胞間で位置を合わせて伸長し, 連結する (図1a)。接合管連結後, 雌性配偶子嚢の膨張がみられ, 接合管連結部の細胞壁が分解されると同時に雄のプロトプラストの移動が始まる (図1b)。そして, 雄のプロトプラストはおよそ5時間で雌性配偶子嚢に移動し, 接合胞子が形成される (図1c)。

式や成熟した接合胞子の微細構造をもとにおこなわれてきた (Kadlubowska 1984)。しかし, カルチャーコレクションの保存株や野外から採集した株は必ずしも接合が誘導されるとは限らず (Nozaki 2008), Hoshaw *et al.* (1985) の報告以来, 再現性が高く, 培養条件をコントロールして自由に接合させる接合誘導法は見出されていなかった。著者はアオミドロの接合胞子が水田の中干しの時期に多いことに気づき, 新免輝男博士 (兵庫県立大学大学院, 名誉教授) や富永義人博士 (平安女学院短大, 名誉教授) らの協力を得ながら, アオミドロを寒天上で処理する接合誘導法を開発した (Ikegaya *et al.* 2012)。この方法では, Artificial Pond Water (APW) を用いて作成した寒天培地上でアオミドロを培養することにより, 接合を誘導する。従来, アオミドロの接合誘導においては, 窒素の欠乏がトリガーになると考えられてきた。しかし, Ikegaya *et al.* (2012) の接合誘導法では, 寒天培地に含まれる APW に 1 mM の KNO_3 を添加したり, 寒天培地作成に APW ではなく窒素を多く含む *Closterium medium* を使用したりしても, アオミドロの接合が誘導されることが

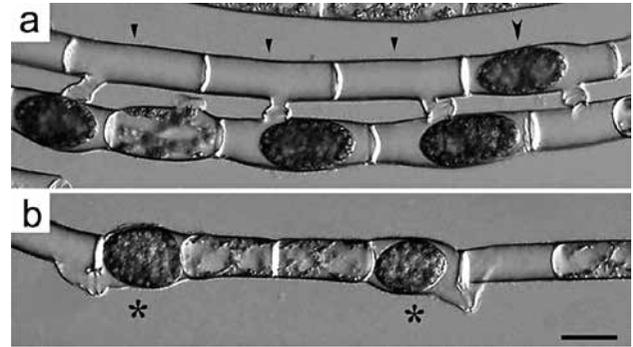


図2. 雌雄性決定に伴う接合子形成。a: ペアの藻体内で形成された接合子, 矢先: 雄性配偶子, 矢尻: 雌性配偶子。b: 1本の藻体内に形成された接合子, アスタリスク: 接合子, bar = 50 μ m。クローン培養したアオミドロをそのまま接合誘導条件に移したところ, 二本の藻体間で複数のペアが形成されたが, 原形質の移動方向は異なっている場合や (図2a), 藻体の細胞群体内にも接合胞子が形成されたことから (図2b), アオミドロの雌雄の性は遺伝的に決定されておらず, 接合する細胞間, 及び隣接する細胞群体の相互作用によって誘導される性分化であることが示唆された。Ikegaya *et al.* (2012) より, 一部転載した。

報告されている。このことから, 寒天培地上で培養すること自体がトリガーになっていると考えられる。この系は10年以上継代培養法によって維持されてきた *S. castanacea* においても, 高頻度に接合を誘導することができ, *S. fulvialtilse* や *Spirogyra hopeiensis* など付着性の種の接合誘導に効果的であることがわかった。しかし, 浮遊性である *S. ellipsospora* などの誘導には適しておらず, 凡庸的な接合誘導法の開発は緊急の課題になっている。ここからは, *S. castanacea* の接合に焦点をしばり, その生理学的な現象や性フェロモンの探索に関する研究について述べることにする。

S. castanacea の場合, 1) ペア形成した細胞が細胞分裂後, 先に接合管を形成した細胞が雌性配偶子嚢になる。2) 雌性配偶子嚢から伸長した接合管の先端が雄性配偶子嚢に到達すると, 接着部分から接合管が誘起され, 接合管が連結する。そして, 3) 雄性配偶子はおおよそ5時間をかけて雌性配偶子と合体し, 接合胞子が形成される (図1)。これまでの研究から, *S. castanacea* の接合は有性分裂 (Tsuchikane *et al.* 2003) に相当する細胞分裂をおこない, 雌雄同株の群体間における雌雄性分化をともなった有性生殖であることが分かってきた (図2, Ikegaya *et al.* 2012)。

アオミドロは接合胞子の形成にともなって, 大量の淡黄色の油滴を合成・蓄積する (Fowke & Pickett-Heaps 1971, Laurin-Lemay *et al.* 2012) アオミドロの配偶子は葉緑体内に同化デンプンを貯蔵することにより, 栄養細胞に比べて膨圧が低いことが報告されている (Lloyd 1926)。同化デンプンによって葉緑体やピレノイドが肥大化する時期に, 配偶子内で大量の油滴が観察されることから, 油滴は配偶子の膨圧

調節の副産物かもしれないが、詳細は不明である。また、藻類は光合成により固定した炭酸ガスを液状炭化水素や油脂に変換することが知られており (Huang *et al.* 2013), アオミドロの接合過程で蓄積される油滴も同様の分子機構がはたらいっていることが示唆された。そこで, *S. castanacea* の接合管形成時に蓄積された油滴について GC/MS 解析をおこなったところ, 主な脂肪酸はパルミチン酸 (C16:0) が 26.5%, リノール酸 (C18:2) 11%, リノレン酸 (C18:3) 21.3% であった。

アオミドロにおける接合の全過程の引き金は, どのような反応であり, どのようなメカニズムがはたらいっているのだろうか。これまでに藻類の有性生殖に関わる複数の性フェロモンが報告されており (Frenkel *et al.* 2014), アオミドロの接合においても, 古くから性フェロモン様物質の存在が示唆されていた (Grote 1977)。*S. castanacea* は窒素源の有無に関わらず, 寒天上でのみ接合が誘導される。そこで, 著者は接合誘導に使用した寒天を再利用して接合誘導に対する影響を調べた結果, 接合誘導に使用した寒天を用いると, 通常の寒天に比べて接合が促進されることが分かった。さらに, 接合誘導後, 回収した寒天抽出物によってアオミドロを処理すると, 今まで寒天培地上でしか誘導できなかったアオミドロの接合を初めて人工培地中で接合誘導することに成功した。以上の結果から, 著者はアオミドロの接合が誘導された寒天には接合誘導物質が存在していると判断し, 現在, 接合誘導に関わる物質の特定を進めている。

今後の展開

膨大で多種多様なシーケンス情報をもたらす次世代シーケンサーだけでなく, バイオインフォマティクスも更に進められ, ゲノム情報が少ないアオミドロにおいても, モデル生物のようにトランスクリプトーム, プロテオーム解析などが当然のようにおこなわれるようになることが期待される。また, 多様な藻類の全ゲノム配列を容易に取得できるようになれば, 従来の化石情報や形態データに基づく系統解析の確固たる裏づけになることは明確で, 藻類における系統発生の研究は飛躍的に進むだろう。しかし, 広く水田や湖沼で生息している接合藻類アオミドロを理解するためには, オミックス研究ばかりではなく, フィールド調査から得られる情報や室内における生理学的, 生化学的研究から得られる知見がより一層求められるようになるのではないだろうか。今後のアオミドロに関する研究はオミックス研究とバランスのとれた複合的な研究スタイルの構築をすすめなければならぬと考えている。

引用文献

- Becker, B. & Marin, B. 2009. Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Ann. Bot.* 103: 999–1004.
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., & Smith, A. G. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 438: 90–93.
- Delauxa, P. M. et al. 2015. Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 13390–13395.
- Frenkel, J., Vyverman, W. & Pohnert, G. 2014. Pheromone signaling during sexual reproduction in algae. *Plant J.* 79: 632–644.
- Fowke, L. C. & Pickett-Heaps, J. D. 1971. Conjugation in *Spirogyra*. *J. Phycol.* 7: 285–294.
- Grote, M. 1977. Untersuchungen zum Kopulationsablauf bei der Grünalge *Spirogyra majuscula*. *Protoplasma* 91:71–82.
- Hainz, R., Wober, C. & Schagerl, M. 2009. The relationship between *Spirogyra* (Zygnematophyceae, Streptophyta) filament type groups and environmental conditions in Central Europe. *Aquatic Botany* 91: 173–180.
- 山岸高旺 (1977) 緑藻綱 ホシミドロ目. 日本淡水藻類図鑑. 廣瀬弘幸・山岸高旺 (編著) 内田老鶴圃, 東京. pp. 416–461
- Hoshaw, R. W., Wang, J. C., McCourt, R. M. & Hull, H. M. 1985. Ploidal changes in clonal culture of *Spirogyra communis* and implication for species definition. *Amer. J. Bot.* 72: 1005–1011
- Huang, N. L., Huang, M. D., Chen, T. L. & Huang, A. H. 2013. Oleosin of subcellular lipid droplets evolved in green algae. *Plant. Physiol.* 16: 1862–1874.
- 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.
- Ikegaya, H., Sonobe, S. & Shimmen, T. 2008. Rhizoid differentiation of *Spirogyra* is regulated by substratum. *J. Plant Res.* 121: 571–579.
- Jaiswar, S., Kazi, M. A. & Mehta, S. 2015. Bioaccumulation of heavy metals by freshwater algal species of Bhavnagar, Gujarat, India. *J. Environ Biol.* 36: 1361–1366.
- Kadlubowska, J. Z. 1984. Conjugatophyceae I-Zygnemales. In: Ettl, H., Gerloff, H., Heynig, H. & Mollenhauer, D. (eds.) Süßwasserflora von Mitteleuropa, Chlorophyta VIII. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Karol, K. G., McCourt, R. M., Cimino, M. T. & Delwiche, C. F. 2001. The closest living relatives of land plants. *Science* 294: 2351–2353.
- Laurin-Lemay, S., Brinkmann, H. & Philippe, H. 2012. Origin of land plants revisited in the light of sequence contamination and missing data. *Current Biology* 22: 593–594.
- Lee, Y. C. & Chang, S. P. 2011. The biosorption of heavy metals from aqueous solution by *Spirogyra* and *Cladophora* filamentous macroalgae. *Bioresour. Technology* 102: 5297–5304.
- Lloyd, F. E. 1926. Studies on *Spirogyra*. *Trans. Roy. Soc. Can.* 5: 75–110.
- Nozaki, H. 2008. A new male-specific gene “OTOKOGI” in *Pleodorina starrii* (Volvocaceae, Chlorophyta) unveils the origin of male and female. *Biologia* 63: 772–777.
- Simons, J. & Van Beem, A. P. 1990. *Spirogyra* species and accompanying algae from dune waters in The Netherlands. *Acta Bot. Neerl.* 36: 13–31.
- 高橋重作・柳沢昊永・横川昭夫 1957. 2, 3 のビタミン B12 資源について (第 3 報). 栄養と食糧 9: 306–309.
- Tang, W., Cui, J., Shan, B., Wang, C. & Zhang, W. 2014. Heavy Metal Accumulation by Periphyton Is Related to Eutrophication in the Hai River Basin, Northern China. *PLoS ONE* 9: e86458.
- Timme, R. E., Bachvaroff, T. R. & Delwiche, C. F. 2012. Broad phylogenomic sampling and the sister lineage of land plants. *PLoS ONE* 7: e29696.
- Tsuchikane, Y., Fukumoto, R., Akatsuka, S., Fujii, T. & Sekimoto, H. 2003. Sex pheromones that induce sexual cell division in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Charophyta). *J. Phycol.* 39: 303–309.
- Wickett, N. J. et al. 2014. Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E4859–E4868.
- 山岸淳・橋爪厚 1974. 水田の緑藻類の生態と防除に関する 2, 3 の知見. 雑草研究 18: 39–43.
- 山岸高旺 2007. 淡水藻類-淡水産藻類属総覧. 内田老鶴圃, 東京,