

## ミカツキモ (*Closterium acerosum*) の増殖と接合条件

朝倉正海

神奈川県立横須賀大津高等学校

### Conditions of Reproduction and Growth for *Closterium acerosum*

Masami ASAKURA

KANAGAWA PREFECTURAL YOKOSUKAOTSU HIGH SCHOOL

#### はじめに

ミカツキモは接合藻綱, チリモ目に属する単細胞性の緑藻植物であり, 二分裂により増殖し, 接合と呼ばれる有性生殖をすることが知られている。水溜まり, 水田, 池, 湖沼などに広く生息し, 70~90種ほどの形態種が知られている。水底の泥の表面, 水草, 糸状藻を採取することにより, それらの中から容易に数種のミカツキモを単離することができる。これらのうち *Closterium ehrenbergii* は 0.5mm を超えるものもあるなど, 大型できれいな三日月形をしており, 顕微鏡観察の試料など教材としてよく利用されており, その接合の教材化についてもすでに報告した<sup>1)</sup>。ここでは, 自然から単離した針状のミカツキモ *Closterium acerosum* について培養条件と接合条件の検討を行なった。この種は同一のクローン内で接合が行われるホモタリック (自家接合型) であるため, ヘテロタリック (他家接合型) の種のように + と - の 2 クローンを別々に継代する必要がないなど系統の維持も容易である。また, 接合の過程が光に依存することが報告されており<sup>4)6)</sup>, 栄養培地で増殖中のものを接合培地に移すことなく, 明暗周期を変えることでも接合を誘起できる。

#### 材料と方法

材料の *Closterium acerosum* は 1991 年 6 月に神奈川県海老名市新田の水田より採集, 分離した。泥の表面を 10ml ピペットで採水した試料から双眼実体

顕微鏡下で, 滅菌したマイクロピペットを用い, 毛管現象により吸入し, 新しい滅菌水中に移すことを 10 回繰り返して洗浄した後, オートクレーブで滅菌した二相培地 (soil-water bi-phasic medium) または C 培地<sup>3)</sup> でクローン培養 (clonal culture) した。このように分離した 8 クローンのうちスターの時計皿法<sup>5)</sup> で有性生殖を誘起した結果, ホモタリックであることが確認された系統を用いた。培養器としてはネジロ試験管 (30ml), 三角フラスコ (100ml, 200ml, 300ml) などを用い, 12 時間明期/12 時間暗期 (12L-12D) の明暗周期, 20℃, 3000lux の条件下で培養し, 20~30 日ごとに新しい培地に継代を行なった。

培養条件については, 特に培地について検討を行ない, 合成培地として C 培地, 簡易培地として二相培地, ハイポネックスの培地で増殖の比較をした。C 培地の組成は第 1 表に示した。二相培地は約 3g の風乾土に米粒大の石灰石 1 粒を入れ, くみ置きの水道水を加えた。ハイポネックス (N6.5・P6・

第 1 表 培地の組成

	C 培地	Ch-N 培地
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	15mg	—
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	—	10mg
KNO <sub>3</sub>	10mg	—
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	8mg
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4mg	4mg
β-グリセロリン酸ナトリウム	5mg	5mg
ビタミンB <sub>1</sub>	1μg	1μg
ビタミンB <sub>12</sub>	0.01μg	0.01μg
ピオチン	0.01μg	0.01μg
Tris buffer	50mg	—
HEPES	—	30mg
PV Metals※	0.3ml	0.3ml
DW	99.7ml	99.7ml
(pH)	7.5	7.5

※ Na<sub>2</sub>EDTA: 1500mg, FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O: 194mg, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O: 82mg, ZnCl<sub>2</sub>: 10mg, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O: 4mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>: 8mg, DW: 1000ml

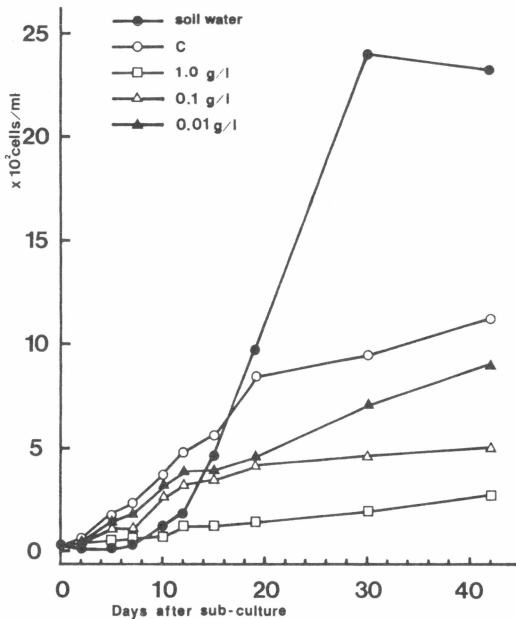
K19) の培地は蒸留水で1.0 g/l, 0.1 g/l, 0.01 g/l の濃度にし, 初期のpHを7.5とした. 培養液はそれぞれ30mlネジ口試験管に20mlとし, 約500個体を接種し, 12L-12D, 20℃, 3000luxで培養した. 個体数はピペットでゆるく攪拌した後, 培養液を0.5mlとり, その中の全数を双眼実体顕微鏡下で計測した.

この種は栄養培地 (C培地や二相培地) で室内培養中にしばしば接合子の形成が観察されることから, 接合誘起の条件について, 培地および明暗周期の影響を検討した. 接合の誘起は培養開始後21日目のミカヅキモ約500個体を, 新しいC培地あるいはCh-N培地 (第1表) 5 mlを入れた6 cmシャーレに移し, 20℃, 3000lux, 明暗周期は24L-0D, 16L-8D, 14L-10D, 12L-12Dの4条件で培養し, 7日後および14日後に, 双眼実体顕微鏡下で接合子, 原形質吐出を起こした異常な接合子, 栄養細胞の数を計測した.

結果と考察

1. 培養条件について

培地と増殖の関係 (第1図) は, 二相培地が最もよく増殖し, 10日ほどのゆっくりとした増殖のち対数増殖期に入り, 約30日で $2.4 \times 10^3$  細胞/mlとな



第1図 培地と種類と増殖

り定常期となる. C培地, 0.01 g/l ハイポネックス培地は二相培地での増殖には及ばないが初期の増殖は大変よい. ハイポネックス培地についてはミドリムシ (*Euglena gracilis*) では1.0 g/l (0.1%) がよいとされているが, ミカヅキモではさらに低濃度がよく, *Closterium ehrenbergii* の場合0.1 g/l であった<sup>1)</sup>が, この*Closterium acerosum*では, それよりもさらに低濃度の0.01 g/l がよい. また, C培地はつねに安定した増殖が得られることがわかった. 二相培地は簡便な培地であるが, 用いる土壌によって結果が大きく異なるので, つねにより結果を得るためには土壌選びが重要となる. ここで用いた土壌は, 神奈川県三浦市の休耕田から採取したものを風乾後, ふるいにかけ微細粒を除いたものである.

2. 接合について

(1) 接合の過程は, 12L-12D, 20℃, 3000luxで栄養増殖中のものを明期の始めに接合培地 (Ch-N培地) に移し, 16L-8D, 20℃, 3000luxの条件下におくと, 第1回目の細胞分裂 (First cell division: 16~24時間後), 第2回目の細胞分裂 (Second cell division: 40~48時間後), 細胞の集合 (Cell aggregation: 48~64時間後), 接合管形成 (Pappilla formation: 64~72時間後), 接合子の形成 (Zygospor formation: 72時間後~) のように進行する (第2図).

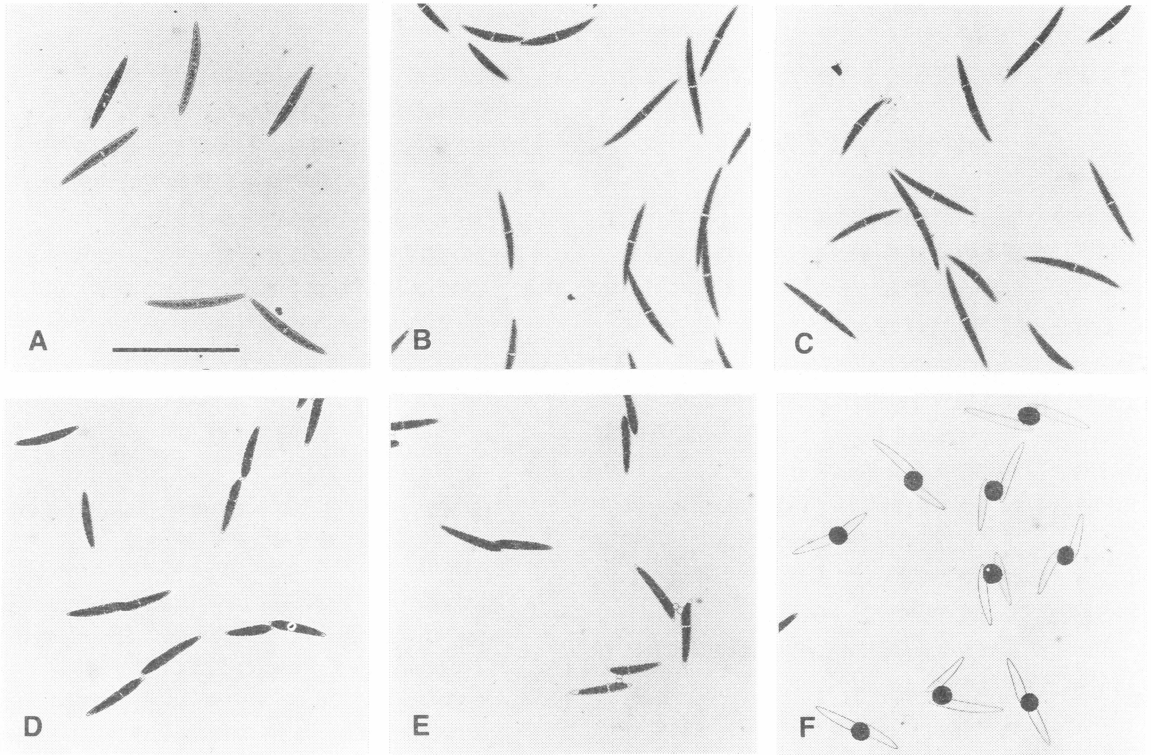
この種はホモタリックなので, 接合の過程で, ヘテロタリックの*Closterium ehrenbergii*にみられるような第1回目の細胞分裂後の+型細胞と-型細胞のペア形成は行なわれないが, 第2回目の細胞分裂後, 生じた細胞の間で接合管が伸び, 接合子が形成

第2表 明暗周期・培地と接合子形成率

明暗周期 培養日数 培地	24L-0D	16L-8D	14L-10D	12L-12D
	C培地	7日 44.1 (9.6)	69.8 (2.1)	1.4 (0.7)
	14日 40.1 (16.2)	51.7 (0.5)	0.9 (0)	0 (0)
	21日 67.4 (34.7)	63.4 (1.9)	0.7 (0)	0 (0)
Ch-N	7日 64.0 (15.7)	86.6 (8.2)	58.2 (0)	35.6 (0)
	14日 82.1 (23.9)	98.8 (17.4)	96.1 (1.4)	81.3 (2.5)

※ 接合子形成率 (%) =  $\frac{\text{接合子数}}{\text{接合子数 (正常, 異常) + 栄養細胞数}} \times 100$

※ ( ) の数字は原形質吐出などを起こした異常な接合子の割合である.



第2図 接合の過程 A. 栄養細胞 B. 第1分裂  
C. 成長 D. 第2分裂 E. 接合管の形成  
F. 接合子の形成 (図中の—は0.5mm)

される。Hamada<sup>2)</sup>は*Closterium ehrenbergii*を用いて、配偶子（接合を行なう2細胞）形成時には核DAN量の倍加が見られず、分裂により核DAN量が半減することを報告している。したがって、この細胞分裂は体細胞分裂とは異なることが予想され、染色体レベルでの検証が必要と思われる。

(2) 接合の条件について、一般的に接合など有性生殖の過程は窒素源の欠乏下での炭水化物の蓄積により誘起されるといわれている。すなわち、第2表に見られるように接合培地として窒素源を含まないCh-N培地を用いると、どの明暗周期でも2週間後には80%以上の高い接合率を示すとともに、14L-10D, 12L-12Dの明暗周期の7日目、14日目の接合率を比較すると日数の経過とともに接合率が上昇していることから、光合成による炭水化物の蓄積が必要であることが示唆される。さらにこの種は窒素源を含む栄養培地中で明暗周期のとり方によって接合が誘起されることがわかる。すなわち、C培地

では12L-12Dの明暗周期で接合子の形成は起こらないが、2週間後に14L-10Dでは約1%、16L-8Dでは約52%、24L-0Dでは約40%の接合子が形成された。これらのことから*Closterium acerosum*の接合には、窒素源の欠乏と炭水化物の蓄積によって引き起こされる何らかの生理的な変化が必要であるだけでなく、明暗周期そのものが関わっているとも考えられる。

また、24L-0Dでは接合過程に入ったものの正常な接合子が形成されないで原形質吐出を起こしたものが約25~35%に達した。これはミカヅキモの細胞分裂が暗期に集中して行なわれることから、細胞周期と正常な接合過程の進行とが深い関係にあるものと考えられる。

接合の初期過程において、ペアの形成、接合管の形成、プロトプラストの放出が行なわれるが、ヘテロタリックの*Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complexでは+型細胞の性フェロモンが、

光の存在下で一型細胞のプロトプラストの放出を引き起こす<sup>4)</sup>。ホモトリックの種では、この過程にどのようなしくみが存在するのか今後の課題である。

### 教材化についての考察

ミカヅキモは、単細胞生物の中では大型で、大変美しく、培養も容易であるなど、教材として優れた特質をもっている。従来、ミカヅキモの接合が生殖の教材として用いられることは少なかったが、*Closterium acerosum*は*Closterium ehrenbergii*よりさらに簡単に接合を誘起できることがわかった。*Closterium acerosum*を教材として用いる場合の利点は次のように考えられる。

(1)教材としてよく利用されているボルボックス、ゾウリムシなどと同様に培養が容易であり、培養環境に対する許容度が高い。二相培地で1年以上も室内に放置しても生き続けている。

(2)ホモトリックなので有性生殖の過程の観察にも1系統だけ継代培養しておけばよい。

(3)有性生殖の観察には接合培地を用いるとよいが、栄養培地で増殖中のものでも16L-8Dの明暗周期下においても接合を誘起することができる。

(4)(3)の条件におけば3日後には接合子が形成され、その過程を観察することが可能である。

(5)雄と雌の存在という固定観念にとらわれず生物の雌雄性や有性生殖の意義を考える材料となる。

### 摘 要

針状のミカヅキモ*Closterium acerosum*の培養および接合条件について検討した。培地については二相培地で最もよく増殖し、約30日で $2.4 \times 10^3$ 細胞/mlとなった。合成培地であるC培地では増殖率は低いが安定した結果を得ることができた。

接合の過程を明らかにするとともに、C培地では14L-10Dの明暗周期下で接合は起こらず、16L-8Dでは接合が誘起されることがわかった。また、Ch-N培地では容易に接合することがわかった。

### 引用文献

- 1) 朝倉正海. 1992. ミカヅキモの教材化に関する基礎的研究. 神奈川県立教育センター研究集録. 11: 153-156.
- 2) HAMADA, J. 1987. Diploidy in DNA content in vegetative cells of *Closterium ehrenbergii* (Chlorophyta). J. Phycol. 23: 541-546.
- 3) ICHIMURA, T. 1971. Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. Proc. 7th Intern. Seaweed Symposium 8: 208-214.
- 4) 関本弘之・藤伊 正. 1993. ミカヅキモの有性生殖にかかわる細胞間情報交換. 遺伝. 47(1): 43-48.
- 5) STARR, R. C. 1964. The culture collection of algae at Indiana University. Amer. J. Bot., 51(9): 1013-1044.
- 6) UENO, T and SASAKI, K. 1978. Light dependency of the mating process in *Closterium acerosum*. Plant & Cell Physiol. 19: 245-252.