

## 学 位 論 文 題 名

黄緑色藻類 *Tribonema bombycinum* のアキネート形成と耐凍性

## 学位論文内容の要旨

多くの淡水産藻類では、水質の変化や乾燥など生育環境下での種々のストレスに対して有性生殖による接合子や無性生殖によるアキネート（厚膜胞子）と呼ばれる耐久性細胞を形成する。配偶子の物理的な接近を必要とする接合子形成に対し栄養細胞が直接変化するアキネート形成は、より効率が良いと考えられる。また、これらの淡水産藻類の中には生活環の中で有性生殖をほとんど行わない種も多く、アキネートによる環境ストレスへの耐性は重要であると考えられる。アキネート形成を行う淡水産藻類は極地をはじめとする高緯度で寒冷な地域にも分布している種が多く、アキネートが低温や凍結に対して耐性を持ち、生存や繁殖に寄与していると考えられる。それらの藻類の中で黄緑色藻 *Tribonema bombycinum* は北海道を含む寒冷な地域に広く分布し、有性生殖は行わず、窒素欠乏下で耐乾燥性を持つアキネートを形成することが知られている。本研究では *T. bombycinum* を材料として栄養細胞からアキネート形成が誘導されるための環境条件を検討し、栄養細胞からアキネートに至る形態変化の過程を観察した。また、栄養細胞からアキネートに至る過程での細胞の耐凍性の変化を測定した。さらに凍結下での栄養細胞とアキネートの微細構造の変化を観察した。なお本研究には *T. bombycinum* の単藻培養株を用いた。培養には *Closterium* 用に開発された C 培地を用い、温度 18℃、明暗周期 16 : 8 時間で静置培養した。

比較的緩やかな栄養ストレスの効果を調べるために *T. bombycinum* を培地交換をせずに長期間静置培養を行った。その結果、徐々に形態が変化し、培養 45 日間で 90% 以上の細胞がアキネートに変化した。その際の培地中のイオン濃度を測定したところ、特に硝酸態窒素、有機リン酸態リン、硫酸態イオウの 3 種類の栄養塩が顕著に消耗していることがわかった。さらに 10% に希釈した培地もしくは主要な栄養塩（硝酸態窒素、有機リン酸態リン、硫酸態イオウ、マグネシウム）のいずれかを単独で除いた培地で 20 日間培養した場合アキネート形成が促進された。このことから培地中の栄養塩の欠乏がアキネート形成を促進することが示唆された。また、乾燥処理によってもアキネート形成は誘導された。短日条件もしくは低温処理ではアキネート形成は促進されなかった。また、アキネート形成に伴い細胞の長さの減少と分裂活性の低下が見られた。しかしアキネート形成後も乾燥重量はしばらく増加を続けた。

栄養細胞からアキネートに至る過程の微細構造の変化を電子顕微鏡で観察すると、*T. bombycinum* の栄養細胞は大型の液胞を細胞の中心部に持ち、細胞の側面に沿って葉緑体があり、細胞壁は薄かった。培養の経過に伴い細胞壁は徐々に厚くなり液胞は小型化して徐々に数が増加した。葉緑体は伸長・分裂し、数が増すとともに細胞の中心部にも張り出した。さらに細胞内に油滴が見られるようになった。典型的なアキネートでは細胞壁が栄養細胞の 2 倍以上に厚くなり、細胞内は多数の小胞化した液胞と油滴で充たされるようになった。葉緑体は栄養細胞と同様に側面に片寄る場合が多かった。このよ

うなアキネート形成過程での細胞構造の変化が明らかになった。

種々の培養条件の下で生育した藻体の緩速凍結（冷却速度  $2.4^{\circ}\text{C}\cdot\text{hr}^{-1}$ ）下での耐凍性（ $\text{LT}_{50}$ ）を電解質漏出法で測定した。培地交換なしで静置培養した場合、培養日数に従って耐凍性が顕著に上昇した。培養5日目の栄養細胞では $-3^{\circ}\text{C}$ であるのに対して培養45日目以降のアキネートでは $-30^{\circ}\text{C}$ を越す高い耐凍性を示した。また、希釈培地および硝酸態窒素、有機リン酸態リン、硫酸態イオウもしくはマグネシウムを単独で欠乏させた培地で生育し、アキネート形成の促進が見られた藻体でもそれぞれ耐凍性の上昇が見られた。短日条件もしくは低温処理の下で生育した藻体では耐凍性は上昇しなかった。この結果アキネート形成と耐凍性上昇の強い関わりが示唆された。

さらに緩速凍結下での栄養細胞とアキネートの微細構造の変化をフリーズ・フラクチャー電子顕微鏡法で観察した。栄養細胞を致死的な温度である $-15^{\circ}\text{C}$ まで緩速凍結すると、細胞外凍結により細胞は著しく変形収縮した。また、原形質膜ではタンパク質から成る膜内粒子が凝集して部分的に欠如したAP部位（Aparticulate domains）やフラクチャージャンプ（Fracture jump lesions）などの構造変化が多数見られた。さらに液胞膜では脂質二重層がシリンダー状の逆ミセル構造となるヘキサゴナル $\beta$ 相（Hexagonal  $\beta$  phase）も見られた。これらの特徴的な構造変化は高等植物では凍結傷害との関連が知られており、凍結により変形収縮した細胞内で膜同士が以上接近したことによると考えられている。この結果から藻類細胞の凍結傷害は高等植物と同様の機構による可能性が示された。一方、アキネートでは $-30^{\circ}\text{C}$ まで緩速凍結した場合に細胞外凍結しているにも関わらずアキネートの変形収縮の程度は比較的小さかった。また、膜構造にも大きな変化は見られず、アキネートの耐凍性の高さを裏づける結果となった。また、細胞内浸透濃度はアキネートの形成過程で上昇した。さらにアキネートでは $-20^{\circ}\text{C}$ 以下の緩速凍結下で70-80%生存しているが、緩速凍結後に藻体を液体窒素で急速凍結しても70%程度は生存していた。この結果、アキネートの含水量が低く、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下の緩速凍結下ではガラス化していることが示唆された。

*T. bombycinum* のアキネートは日長や低温では形成されず、栄養塩の欠乏や乾燥によって形成される。これは生息地での水質や水位の変化に対応してアキネートを形成して耐凍性および耐乾燥性を獲得するものと考えられる。本研究で用いた *T. bombycinum* を採取した池ではリン酸態リンは年間を通じて濃度は低く、夏季から冬季にかけて特に硝酸態窒素と硫酸態イオウの濃度低下が顕著であった。また、水位の大幅な低下が見られる場合もあった。 *T. bombycinum* はこのような環境条件の変化に応答してアキネートを形成し、耐凍性を高めていると考えられる。

*T. bombycinum* のアキネートがどのような機構で高い耐凍性を示すかにちては現時点では明言はできない。しかし厚い細胞壁、密に蓄積された油滴などアキネートの構造上の特性は他の藻類の耐久性細胞や高い耐凍性を示す木本植物の低温馴化した細胞に類似している点が見られ、アキネートの構造と耐凍性の因果関係を想起させる。たとえば、凍結下でのアキネートが著しい収縮や変形を免れていることから、厚くなった細胞壁や細胞内を充たした貯蔵物質などによって構造的に強化されていることも考えられる。また、細胞内の浸透濃度の上昇、含水量の低下によるガラス化も耐凍性上昇に寄与している可能性が示された。

今後、生化学的および分子生物学的解析を加えることにより、アキネートのような藻類の耐久性細胞における耐凍性機構について、さらに解明が進むものと期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 歩

副 査 教 授 市 村 輝 宜 (理学部)

副 査 助 教 授 藤 川 清 三

## 学 位 論 文 題 名

### 黄緑色藻類 *Tribonema bombycinum* のアキネート形成と耐凍性

多くの淡水産藻類では、水質の変化や乾燥など生育環境下での種々のストレスに対して、有性生殖による接合子や、無性生殖によるアキネート（厚膜孢子）と呼ばれる耐久性細胞を形成する。配偶子の物理的な接近を必要とする接合子形成に対し、栄養細胞が直接変化するアキネート形成は、より効率的に耐久性細胞を形成し得ると考えられる。また、これらの淡水産藻類の中には生活環の中で有性生殖をほとんど行わない種も多く、アキネートによる環境ストレスへの適応は重要である。アキネート形成を行う淡水産藻類は極地をはじめとする高緯度・寒冷地域に広く分布する種が多く、アキネートが低温や凍結に対して耐性を持ち、生存や繁殖に寄与していると考えられるがその詳細は不明である。これらの藻類の中で黄緑色藻 *Tribonema bombycinum* は北海道を含む寒冷な地域に広く分布し、窒素欠乏下で耐乾燥性を持つアキネートを形成することが知られている。本研究は *T. bombycinum* を材料として、栄養細胞からアキネート形成が誘導される種々の環境条件を検討するとともに、この過程における細胞の耐凍性の変化、形態変化、および凍結下での栄養細胞とアキネートの微細構造的挙動の違いを明らかにすることにより *T. bombycinum* の越冬機構を考察している。

比較的緩やかな栄養ストレスの効果を調べるために *T. bombycinum* を培地交換をせずに長期間静置培養を行うと徐々に形態が変化し、培養 45 日間で 90% 以上の細胞がアキネート化した。その際の培地中のイオン濃度を測定すると、特に硝酸態窒素、有機リン酸態リン、硫酸態イオウの 3 種類の栄養塩が顕著に消耗していた。さらに 10% に希釈した培地、もしくは主要な栄養塩（硝酸態窒素、有機リン酸態リン、硫酸態イオウ、マグネシウム）のいずれかを単独で欠いた培地での培養はアキネート形成を促進した。また、乾燥処理によってもアキネート形成は誘導されたが、短日条件もしくは低温処理ではアキネート形成は促進されなかった。

栄養細胞からアキネート形成に至る過程の微細構造の変化を電子顕微鏡で観察すると、*T. bombycinum* の栄養細胞は大型の液胞を細胞の中心部に持ち、細胞の側面に沿って葉緑体があり、細胞壁は薄かった。アキネート化に伴い、細

胞壁は徐々に厚くなり液胞は小型化して数が増加した。葉緑体は伸長・分裂し数が増すとともに細胞の中心部にも張り出した。さらに細胞内に油滴が見られるようになった。典型的なアキネートでは細胞壁が栄養細胞の2倍以上に厚くなり、細胞内は多数の小液胞と油滴で充たされていた。葉緑体は栄養細胞と同様に細胞側面に片寄る場合が多かった。アキネート化に伴う *T. bombycinum* の微細構造変化は、高い耐凍性を示す木本植物の細胞の低温順化過程に類似していることが明らかにされた。

種々の培養条件下で生育した *T. bombycinum* の緩速凍結（冷却速度  $2.4^{\circ}\text{C hr}^{-1}$ ）下での耐凍性（ $\text{LT}_{50}$ ）を電解質漏出法で測定した。培地交換なしで静置培養した場合、培養日数に従って耐凍性が顕著に上昇した。培養5日目の栄養細胞では  $\text{LT}_{50}$  は  $-3^{\circ}\text{C}$  であるのに対し、アキネート化に伴い耐凍性は徐々に増加し、培養45日目以降のアキネートでは  $\text{LT}_{50}$  は  $-30^{\circ}\text{C}$  を越した。また、希釈培地および硝酸態窒素、有機リン酸態リン、硫酸態イオウもしくはマグネシウムの単独欠乏培地で生育しアキネート形成の促進が見られた藻体でも、アキネート化の促進にともない耐凍性の上昇が見られた。一方、短日条件もしくは低温処理の下で生育した藻体では、アキネート化が促進されないとともに耐凍性は上昇しなかった。これらの結果はアキネート形成と耐凍性の上昇に強い関わりがあることを示している。

さらに緩速凍結下での微細構造の変化を、典型的な栄養細胞とアキネートについてフリーズ・フラクチャー電子顕微鏡法で観察した。栄養細胞を致死的な温度である  $-15^{\circ}\text{C}$  まで凍結すると、細胞外凍結により細胞は著しく変形収縮した。また、原形質膜にはタンパク質から成る膜内粒子が欠如した部位やフラクチャージャンプ傷害などの構造変化が発生した。この結果は *T. bombycinum* の凍結傷害の発生機構は高等植物と類似することを示す。一方、アキネートでは  $-30^{\circ}\text{C}$  まで緩速凍結しても、細胞の変形収縮の程度は小さかった。また、原形質膜構造にも凍結による大きな変化は見られず、アキネートの耐凍性の高さを裏づける結果となっている。

以上の結果は *T. bombycinum* は生息地での水質や水位の変化に対応してアキネートを形成して耐凍性および耐乾燥性を獲得する可能性を示している。本研究で用いた *T. bombycinum* を採取した池ではリン酸態リンは年間を通じて濃度は低く、夏季から冬季にかけて特に硝酸態窒素と硫酸態イオウの濃度低下が顕著であった。また、水位の大幅な低下が見られる場合もあった。*T. bombycinum* はこのような生育地の季節的な環境条件の変化に応答してアキネートを形成し耐凍性を高め、越冬している可能性が推定される。

これらの結果はこれまで明らかでなかった *T. bombycinum* のアキネート形成と凍結耐性の関係を明らかにするとともに *T. bombycinum* の環境ストレス適応機構の詳細を明らかにするものである。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また申請者が研究者として誠実かつ熱心であり、大学院過程における研鑽や取得単位数なども併せ、博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。