

伊豆沼の底泥から発生したヒカリモ(黄金色藻綱)

横山亜紀子^{1*}・横山 潤²

¹山形大学大学院理工学研究科 〒990-8560 山形市小白川町 1-4-12 TEL 023-628-4772
e-mail akiko@sbiol.kj.yamagata-u.ac.jp

²山形大学理学部生物学科 〒990-8560 山形市小白川町 1-4-12

* 責任著者

キーワード: 伊豆沼 黄金色藻 ヒカリモ 18SrRNA 遺伝子

2008 年 12 月 27 日受付 2009 年 1 月 31 日受理

要旨 伊豆沼の砂泥サンプルを実験室内で静置したところヒカリモが発生した. 光学顕微鏡による形態観察の結果, 黄金色藻特有の色調をもった浮遊相細胞と, 長短2本の鞭毛をもつ遊泳細胞を確認した. 遊泳細胞を単離培養し, 詳細な形態観察を行なった結果, 本藻は葉緑体に半埋没するピレノイドをもっていた. これらの形態的特徴は *Chromophyton vischeri* (= *Ochromonas vischeri*) と一致した. 単離培養株から 18SrRNA 遺伝子の塩基配列を決定し, 既報配列と比較したところ, *C. cf. rosanoffii* CCMP2751 株と 99.9% の相同性を持つことがわかった. 自然状態での発生ではないものの, 伊豆沼は現在報告されているヒカリモの発生地の中では最北限となる.

はじめに

ヒカリモは不等毛植物門黄金色藻綱に属する単細胞性の光合成生物で, 遊泳性のステージ(遊泳相)と, 疎水性の外被をもって水面から立ち上がる不動性の細胞となるステージ(浮遊相)の 2 つの生活型をしめす. 後者のステージで密集して発生すると, 水面で光を反射する膜のようになり金色に見えることから, この和名がある. 本邦における発生地は福島県, 茨城県(池上・井上 2003), 千葉県(三好 1915), 長野県(日比野 1915, 大田 1947), 兵庫県(大石ほか 1991), 岡山県, 熊本県(西村 1948)など広い範囲に知られているが, 発生地そのものの数が少なく, 定期的な発生地では天然記念物などに指定されている場所もある(国指定: 千葉県富津市竹岡, 市指定: 茨城県水戸市備前町).

我々は, 伊豆沼での水生植物の調査の際に採取した底泥を静置していたところ, そのうちの 2 サンプルからヒカリモの発生を確認した(図 1). そこで本藻の培養株を確立し, 細胞の形態観察と, 18SrRNA 遺伝子の塩基配列データの既知配列との比較を行なったので, 本論文ではその結果を報告する.

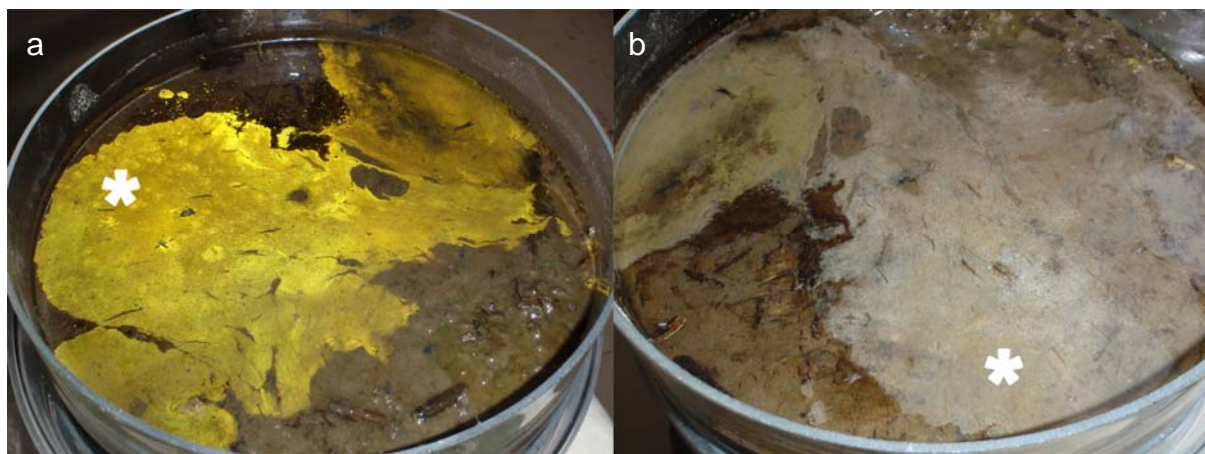


図 1. 伊豆沼の底泥より発生したヒカリモ. 水面に膜状に広がるヒカリモの同一地点を*で示す. a. 太陽光に反射して黄金色に光って見えるヒカリモ, b. 同一シャーレだが, 撮影角度を変えると水面反射が観察されず, 灰色みがかった油膜のようにみえる.

方法

伊豆沼の底泥は, 2008 年 6 月 19 日に, 伊豆沼北部(38° 43′ 08″ N, 141° 5′ 28″ E)の湖底からエクマンバージ採泥器(離合社, 採泥面積 225 cm²)で採取した. これを実験室に持ち帰り, 大型シャーレに広げ, 乾燥しないようにふたをして静置した. およそ 1 ヶ月後に水面に発生したヒカリモの浮遊相をカバーガラスに付着させて採集し, 水を加えて光学顕微鏡で形態観察したところ, 多数の遊泳細胞を得た. これらの遊泳細胞を, ガラスキャピラリーを用いたSingle-cell isolation法で単離し, AF-6 培地を用いて 15°C, 明暗 12 時間周期で培養し, 単藻培養株を樹立した. 細胞観察にはノマルスキー式微分干渉顕微鏡Axioscope2 (Carl Zeiss社)を用いた. また, 培養株の遊泳細胞の観察には, 4%四酸化オスミウムによる蒸気固定(約 30 秒)を用いた.

培養細胞は遠心により回収し, 改変 CTAB 法(Hasebe & Iwatsuki 1990)を用いてヒカリモの全 DNA を抽出した. この DNA を用いて, PCR 法で 18SrRNA 遺伝子を増幅した. 用いたプライマーは SR1, SR5, SR4, SR8, SR12(Nakayama et al. 1996)および SR9(Naw & Hara 2002)で, それぞれ SR1 と SR5, SR4 と SR9, および SR8 と SR12 の組み合わせで増幅を行なった. 増幅条件は以下の通りとした. 94°C で 15 分変成した後, 変成 94°C 30 秒, アニーリング 50°C 30 秒, 増幅 72°C 2 分を 30 サイクルおこない, その後 72°C で 12 分増幅を行なった. ただし, SR4 と SR9 のプライマー対では, アニーリングを 53°C とした. 増幅産物はイソプロパノール沈殿法で精製し, Big Dye Terminator ver 1.1 と Prism 310 ジェネティックアナライザ(Applied Biosystems 社)を用いてサイクルシーケンス法で塩基配列を決定した. 得られた配列は BLAST 検索により既知配列と比較した.

結果と考察

砂泥サンプルをいれて約 1 ヶ月静置し, ヒカリモが発生したシャーレでは, 光の入射方向から観察する

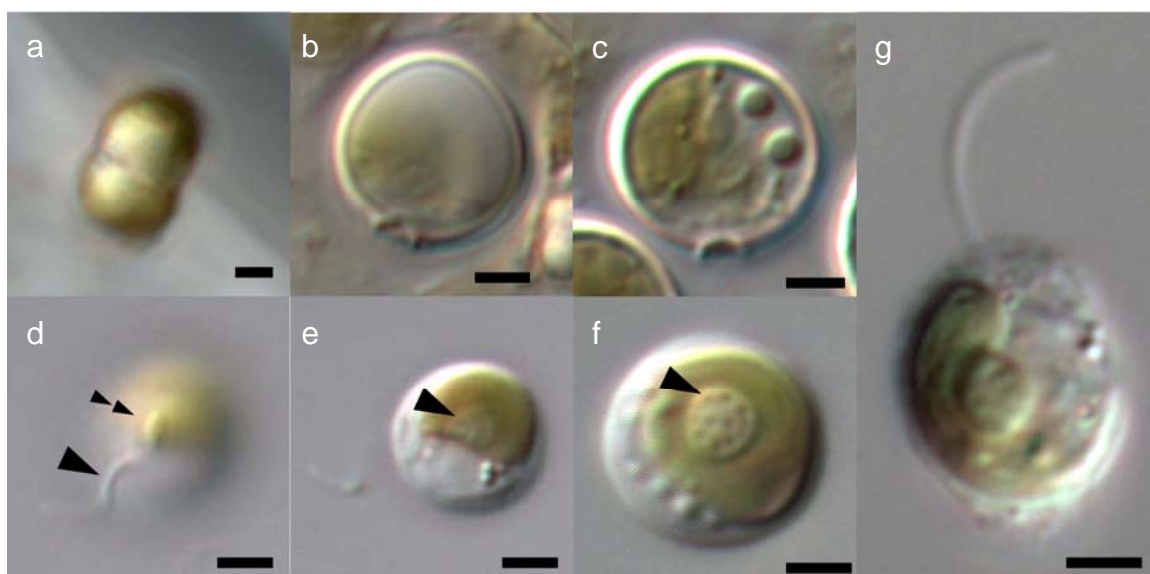


図 2. 伊豆沼産ヒカリモのノマルスキー式微分干渉像。スケールバーは 2 μm 。a. カバーガラスとスライドガラスの隙間にできた空隙に浮かぶ浮遊相の細胞, b-c. 水槽より採集した直後の浮遊相にみられたシスト, b. シストの表面観, c. シスト内部には油滴様の小胞が観察される, d-g. ヒカリモ培養株の遊泳細胞, d. 遊泳細胞の前端部から生える長鞭毛(矢印)と短鞭毛(二重矢印), e. 球形の遊泳細胞. 葉緑体の中央に半埋没してピレノイド(矢印)が存在, f. ピレノイド内部には複数の管状構造物が確認された(矢印), g. オスミウムで蒸気固定した遊泳細胞の側面観. 長鞭毛は, 細胞の前方方向に長く伸びる。

と, 水面が黄金色に光って見えるが(図 1 a), 角度をかえると水表面に油膜が張っているだけのように見える(図 1 b). 水槽より採集した直後には, 浮遊相と遊泳相とが観察されたが, AF-6 液体培地による培養株では, 遊泳細胞のみが観察できた。

浮遊相の細胞は球形で, しばしば複数細胞より成る集塊を形成していた(図 2 a). また, 基部に短い柄を持つシストも観察された(図 2 b, c). 培養株の遊泳細胞は, 長径約 6~10 μm , 短径約 5~6 μm の球形または卵形(図 2 d-g)で, 細胞前端に長短2本の鞭毛が存在した(図 2 d). 細胞内部には, 顕著なピレノイドをもつカップ状の葉緑体, 核, 小胞などが観察された. ピレノイドは, 葉緑体のほぼ中央部の細胞中心側に半埋没する形で偏在していた(図 2 e, g). これらの形態的特徴, 特にピレノイド構造は, ヒカリモの一種 *Chromophyton vischeri* (Bourrel.) Couté(=*Ochromonas vischeri* Bourrel.) (Couté, 1983)と一致する。

水面で黄金色に光る黄金藻には *C. rosanoffii* Woronin という種も存在するが, この種はピレノイドが葉緑体に埋没するように存在する(Couté 1983). 本研究では透過型電子顕微鏡による微細構造観察は行っていないが, ピレノイド内部に貫入する構造物が観察される(図 2 f, g)点も, *C. vischeri* のピレノイド構造(Couté 1983)と一致する. なお, 茨城県水戸市産のヒカリモも微細構造上の特徴から *C. vischeri* と同定されている(池上・井上 2003)。

培養株から抽出した DNA を用いて, 今回得られたヒカリモの 18SrRNA 遺伝子の塩基配列を決定し, 得られた 1776 塩基の配列を既知のヒカリモ類の配列と比較した. 決定した配列は, DDBJ/EMBL/GenBank 国際 DNA データベースに AB474963 のアクセッション番号で登録済みであ

る。その結果、今回決定した配列は、東京近郊産の *C. cf. rosanoffii* (CCMP2751, CCMP2753: Andersen 2007) の CCMP2751 株と 99.9%, CCMP2753 株と 99.6% という高い相同性を示した。なお 2008 年 12 月現在、*C. vischerii* の名前で登録されている塩基配列はない。

ただし、既報の *C. cf. rosanoffii* の東京近郊産株は、登録配列の元となっている株の同定自体が未確定な状態であり、本藻が *C. vischeri* と同定される可能性も残っており、これらの株の形態的特徴の再検討が必要である。なお、*C. rosanoffii* は、北米産の CCMP260 株 (Andersen et al. 1999) の配列も登録されているが、本株は後に不動の細胞が水面より下で膜状に広がることが確認されており、現在では *Kremstochrysis* sp. (Andersen 2007) または *Kremastochrysopsis* sp. (CCMP, <https://ccmp.bigelow.org/home>) とされる別種であり、塩基配列の類似性も低かった (92.1%)。

今回伊豆沼の底泥から発生を確認したヒカリモが、自然状態でどのような場所で生育しているのかは、現時点では不明である。既報の天然のヒカリモ発生地は、いずれの場所も水深が浅く、洞窟内など水面が波や風の影響で大きく攪乱されることがない環境である。伊豆沼のように大きな開放水面を持つ池沼は、これらの条件にあわないため、本藻が生育していても、ヒカリモとして顕在化すること (湖面が光って見える現象を確認すること) は困難であると考えられる。しかし、沼周辺の水路などには、上記の条件に合致する場所も散見され (進東健太郎氏 私信)、このような場所の精査から、伊豆沼周辺でのヒカリモの野外での発生状況が明らかになると期待される。

ヒカリモの種の同定あるいは分布などにはまだ様々な問題が残されているが、これまでのヒカリモの北限産地は茨城県日立市と報告されている (私設ホームページや掲示板等では福島県相馬市松川浦でも発生地が確認されている、2008 年 12 月現在) ことから、今回見いだされたヒカリモは、自然状態での発生ではないものの、国内でこれまでに最も北で発見されたものと考えられる。ただし、伊豆沼での発見例が示唆するように、様々な環境条件がそろって初めてヒカリモ群生地として認識されるため、実際には発見が難しいだけで、ヒカリモ自体はかなり広範囲に普遍的に生育している生物であるかもしれない。

謝辞

宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団の嶋田哲郎博士、進東健太郎氏、藤本泰文博士、山形大学理学部の山本峰大氏には採集の際にお世話になりました事を、記して感謝いたします。また、本研究の一部は宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団より平成 20 年度沈水・抽水植物復元基礎調査及び自然再生全体案作成補助業務の補助を受けていることを記して謝意を表します。

引用文献

- Andersen, R. A., Van der Peer, Y., Potter, D., Sexton, J. P., Kawachi, M. & La Jeunesse, T. 1999. Phylogenetic analysis of the SSU rRNA from members of the Chrysophyceae. *Protist* 150: 71-84.
- Andersen, R. A. 2007. Molecular systematics of the Chrysophyceae and Synurophyceae. In:

- Brodie, J. & Lewis, J. (eds.), Unravelling the algae, the past, present, and future of algal systematics. pp. 285-313. CRC Press, Boca Raton.
- Couté, A. 1983. Ultrastructure de *Chromophyton rosanoffii* Woronin emend. Couté et Chr. vischeri (Bourrel.) nov. comb. (Chrysophyceae, Ochromonadales, Ochromonadaceae). Protistologica 19: 393-416.
- Hasebe, M. & Iwatsuki, K. 1990. *Adiantum capillus-veneris* Chloroplast DNA clone bank as useful heterologous probes in the systematics of the leptoporangiate ferns. Am. Fern J. 80: 20-25.
- 日比野信一. 1915. 信州下虎岩ニ於テ発見セラレタル光藻ニ就イテ. 植物学雑誌 29: 125-149.
- 池上陽子・井上 勲. 2003. ヒカリモ(黄金色藻綱)における浮遊細胞の微細構造と分類学的研究. つくば生物ジャーナル 2: 38.
- 三好学. 1915. 日本ニ於ケル光藻ノ発見ニ就イテ. 植物学雑誌. 29: 123-125.
- Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H. & Inouye, I. 1996. The phylogenetic relationship between the Chlamydomonadales and Chlorococcales inferred from 18SrDNA sequence data. Phycol. Res. 44: 47-55.
- Naw, M. W. D. & Hara, Y. 2002. Morphology and molecular phylogeny of *Prasiola* sp. (Prasiolales, Chlorophyta) from Myanmar. Phycol. Res. 50: 175-182.
- 西村謙一. 1948. ヒカリモ発生と培養. 採集と飼育 10: 219-220.
- 大石英明・矢野洋・伊藤裕之・中原正展. 1991. 兵庫県内の池に発生したヒカリモ(黄金藻)の観察. 藻類 39: 37-42.
- 大田繁則. 1947. ヒカリゴケとヒカリモの新産地. 採集と飼育 9: 148-149, 155.

Chromophyton vischeri (Chrysophyceae) occurring from mud samples
of Lake Izunuma

Akiko Yokoyama^{1*} & Jun Yokoyama²

¹Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University
Kojirakawa 1-4-12, Yamagata 990-8560, Japan

TEL +81-23-628-4772 e-mail akiko@sbiol.kj.yamagata-u.ac.jp

²Department of Biology, Faculty of Science, Yamagata University

* Corresponding author

Abstract The bloom of “Hikarimo” was recorded from mud samples collected from Lake Izunuma. Morphological features observed under light microscope showed the Chrysophycean algae having golden colored floating and motile cells. The motile cells had long and short flagella at the tip of the cell, and a single cup-shaped chloroplast with a semi-embedded pyrenoid. These morphological features were consistent with those of *Chromophyton vischeri* (= *Ochromonas vischeri*). We determined the nucleotide sequence of the 18SrRNA gene from isolates, and compared it with known sequences. The obtained sequence showed 99.9% similarity to *C. cf. rosanoffii* CCMP2751. Although we have not observed a bloom of “Hikarimo” in the field yet, Lake Izunuma might be a northern limit of distribution of *C. vischeri* in Japan.

Keywords: *Chromophyton vischeri*, Chrysophyceae, Lake Izunuma, 18SrRNA gene

Received: December 27, 2008 / Accepted: January 31, 2009