

基礎科学研究報告

生態系における
ミカヅキモとクリプトモナスの増殖動態の解析

滋賀医科大学 医学部

堀田 兼蔵

生態系におけるミカヅキモとクリプトモナスの増殖動態の解析

堀田 兼蔵

(滋賀医科大学 医学部医学科)

《要旨》

本研究では、培地中の窒素濃度を 1/10 濃度に減少させた場合のミカヅキモとクリプトモナスの各々の藻の増殖動態を解析した。クリプトモナスは、接種後約一週間は指数関数的に増殖したが、14 日後には定常期に入り 21 日以後は減少する傾向を示した。一方、ミカヅキモは、接種後約一週間指数関数的に増殖した後、一旦増殖を停止し、その後数日の内に再び増殖を開始して 42 日後においてさえ増殖を続けた。このことは、クリプトモナスが、増殖に際しては培地中の窒素源のみしか利用できないのに対して、ミカヅキモは、最初は培地中の窒素源を利用して増殖するが、この窒素源が枯渇すると、細胞内に蓄積された窒素源や細胞内構造を構成しているタンパク質を分解して得られた窒素源を増殖に利用できる代謝経路を備えていることを示唆した。また、この結果は、培地中の窒素濃度は、クリプトモナスの増殖時の最大細胞密度を決定する直接的な要因になるが、ミカヅキモの増殖時の最大細胞密度を決定する直接的な要因にはならないことを示した。

本研究では、さらに、生態系の一つのモデルとして、ミカヅキモとクリプトモナスを共棲させた場合の各々の藻の増殖動態の解析を行った。各々の藻を単独培養した場合には、増殖時の最大細胞密度はいずれの藻の場合にも約 6×10^4 cells/ml に達したが、クリプトモナスの方がミカヅキモに比べて増殖速度が大きく（クリプトモナスの世代交代時間は 1.02 日、ミカヅキモの世代交代時間は 1.27 日）、早く最大細胞密度に達した。それに対して混合培養した場合には、接種後 14 日後まではクリプトモナスの方が増殖速度が速いために優占種であったが、その後クリプトモナスは減少傾向を示し、ミカヅキモは増殖を続けてミカヅキモが優占種となった。このことから、ミカヅキモは、おそらく窒素以外の栄養源についても、培地中の栄養源が枯渇すると、細胞内に蓄積された栄養源や細胞内構造を分解して得られた栄養源を利用して増殖・生存に利用できる代謝経路を備えているが、クリプトモナスはこのような代謝経路を持たないことが示唆された。

《目的》

ミカヅキモは単細胞の緑藻で、貧栄養から中栄養の淡水中に棲息する。また、クリプトモナスは単細胞のクリプト藻で、鞭毛により運動し、富栄養水中において突発的に増殖することで赤潮の一因となる。これら二つの藻は、実験室内で単離株をC培地中に接種し、適当な条件下で培養すると、二分裂による栄養増殖を行う。

本研究では、

- ・これら二つの藻の棲息する水質の差に注目し、水質評価指標の一つである窒素濃度（特にC培地より低濃度にした場合）と、各々の藻の増殖との関係
- ・生態系の一つのモデルとして、これら二つの藻を共棲させた場合の各々の藻の増殖動態という二点を明らかにすることを目的として実験を行った。

《材料および方法》

本研究では、ヒメミカヅキモ (*Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex) (車軸藻綱、緑色植物門) 及び クリプトモナス (*Cryptomonas*) 属の一種 (クリプト藻綱、クリプト植物門) を用いた。(以下、それぞれミカヅキモ、クリプトモナスと呼ぶ 図1参照)

培地としては、C培地 (Ichimura 1971 : 組成は表1参照) 及び C培地の窒素濃度を1/10濃度に減少させた培地 (以下、N1/10培地と呼ぶ : 組成は表2参照) を調整し、それぞれの培地に以下のような細胞密度で ミカヅキモ か クリプトモナス あるいはその両方の藻をイーザープラスコ内の10mLの培地中に無菌的に接種した。

- 1 ミカヅキモ 200cell/mL (単独培養)
- 2 クリプトモナス 200cell/mL (単独培養)
- 3 ミカヅキモ 100cell/mL + クリプトモナス 100cell/mL (混合培養)

①～③のそれぞれにつき2個ずつサンプルを作成し、これらのサンプルを

温度24°C, 16:8時間/日の明暗周期, 光照度2000 lx(55 μ mol photon/m²·s)

という条件下で6週間 無菌的に培養し、7日ごとに細胞密度を測定した。

測定にはフックスローゼンタル計数板を用い、無菌的に行った。なお、クリプトモナスは運動しているが、基本的には定常円を描く運動であるので、固定せずに生きたまま観察して、細胞密度の測定を行った。

①～③のそれぞれにつき、2サンプルの計測値の平均値を結果に用いた。



図1. ミカヅキモとクリプトモナスのC培地における共棲像

(ミカヅキモは直径10~20 μ m,長さ約100 μ mの単細胞緑藻、クリプトモナスは直径約20 μ mの単細胞クリプト藻)

<図1,6,7,8撮影:中西宏貴氏>

表1 C培地組成

Ca(NO) ₂ · 4H ₂ O	150mg/L
KNO ₃	100mg/L
β-グリセロリン酸 Na	50mg/L
Mg ₂ SO ₄ · 4H ₂ O	40mg/L
Vitamin B ₁₂	1×10 ⁻⁷ mg/L
Biotin	1×10 ⁻⁷ mg/L
Thiamine HCl	1×10 ⁻⁵ mg/L
Tris 緩衝剤	500mg/L
Na ₂ EDTA	1.5×10 ⁻¹ mg/L
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.9×10 ⁻² mg/L
MnCl ₂ · 4H ₂ O	8.2×10 ⁻³ mg/L
ZnCl ₂	1×10 ⁻³ mg/L
CoCl ₂ · 4H ₂ O	4×10 ⁻⁴ mg/L
Na ₂ MoO ₄	8×10 ⁻⁴ mg/L
(medium pH 7.5)	

表2 N1/10培地組成

Ca(NO) ₂ · 4H ₂ O	15mg/L
KNO ₃	10mg/L
CaCl ₂	63.5mg/L
KCl	67.1mg/L
β-グリセロリン酸 Na	50mg/L
Mg ₂ SO ₄ · 4H ₂ O	40mg/L
Vitamin B ₁₂	1×10 ⁻⁷ mg/L
Biotin	1×10 ⁻⁷ mg/L
Thiamine HCl	1×10 ⁻⁵ mg/L
Tris 緩衝剤	500mg/L
Na ₂ EDTA	1.5×10 ⁻¹ mg/L
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.9×10 ⁻² mg/L
MnCl ₂ · 4H ₂ O	8.2×10 ⁻³ mg/L
ZnCl ₂	1×10 ⁻³ mg/L
CoCl ₂ · 4H ₂ O	4×10 ⁻⁴ mg/L
Na ₂ MoO ₄	8×10 ⁻⁴ mg/L
(medium pH 7.5)	

《結果》

各実験の結果により、ミカヅキモとクリプトモナスの増殖について、以下の図2～図5のグラフを得た。

図2.ミカヅキモ(Closte)とクリプトモナス(Crypto)を
C培地で単独培養した場合の増殖曲線
(縦軸:細胞密度($\log_{10}(\text{cell/ml})$),横軸:接種後日数(Day)の片対数グラフ:以下同様)

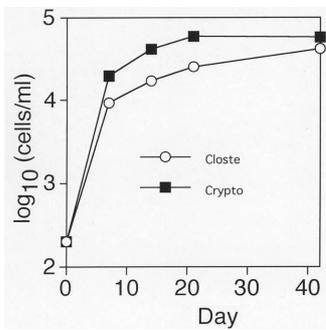
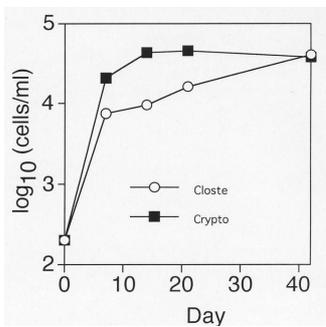


図3.ミカヅキモ(Closte)とクリプトモナス(Crypto)を
N1/10培地で単独培養した場合の増殖曲線



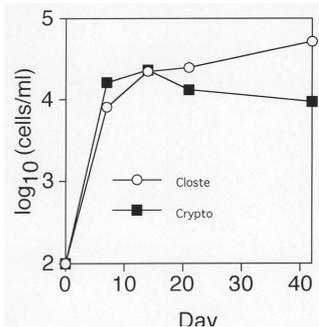
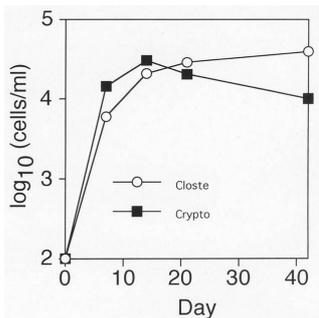


図4.ミカヅキモ(Closte)とクリプトモナス(Crypto)をC培地で混合培養した場合の増殖曲線

図5.ミカヅキモ(Closte)とクリプトモナス(Crypto)をN1/10培地で混合培養した場合の増殖曲線



これらのグラフより、以下のことが示された。

1、C培地において単独培養した場合（図2）

ミカヅキモもクリプトモナスも一週間程度は指数関数的に増殖した。この期間においては、ミカヅキモの世代交代時間は1.27日、クリプトモナスの世代交代時間は1.02日であった。クリプトモナスは21日後に定常期（増加も減少もしない状態）に入った。ミカヅキモは高見(2003)、添田(2004)らの実験によれば、約50日後に定常期に入った。

2、N1/10培地において単独培養した場合（図3）

C培地の場合と同様に、ミカヅキモもクリプトモナスも一週間程度は指数関数的に増殖した。この期間においては、ミカヅキモの世代交代時間は1.35日、クリプトモナスの世代交代時間は1.05日であり、C培地の場合と比べて大きな差は見られなかった。クリプトモナスは14日後に定常期に入り、21日後からは減少に転じた。ミカヅキモは7~14日の間に一旦増殖を停止し、その後数日の内に再び増殖を開始して42日後においてさえ増殖を続けた。

3、C培地において混合培養した場合（図4）

接種後 14 日後まではクリプトモナスの方が増殖速度が速いためクリプトモナスが優占種であったが、その後クリプトモナスは減少傾向を示し、ミカヅキモは増殖を続けてミカヅキモが優占種となった。

4、N1/10 培地において混合培養した場合（図 5）

C 培地において混合培養した場合と比べ、クリプトモナスが優占している期間が 3 日間ほど長い、その他は C 培地の場合と比べて大きな差は見られなかった。

また、以下のことが観察された。

1、培養開始後、日数が経過するにつれ、細胞質が不完全な形になったり、完全に抜けてしまった（いわゆるゴースト）ミカヅキモが増加した。（図 6 から図 8 参照）このようなタイプのもは C 培地よりも N1/10 培地で、また単独培養よりも混合培養で多くみられた。



図 6 正常なもの



図 7 細胞質が異常なもの



図 8 ゴースト化したもの

2、C 培地、N1/10 培地ともに、混合培養したクリプトモナスは単独培養したものよりも、運動が鈍くなったり、突発的に不規則な運動を行うものが増加した。この傾向は、接種後 7 日後においてさえ顕著に観察された。

《考察》

1、培地中の窒素濃度と藻の増殖との関係

図 3 で、N1/10 培地において 21 日目以降クリプトモナスが減少に転じたのに対し、ミカヅキモは 7～14 日の間に一旦増殖を停止し、その後再び増殖を開始して 42 日後においてさえ増殖を続けた。ということは、クリプトモナスが一つの代謝経路しか用いていないのに対し、ミカヅキモが 7 日目までの増殖と、10 日目以降の増殖において、異なる代謝経路を用いていることを示唆している。すなわち、クリプトモナスは増殖に際して、培地中の窒素源のみしか利用できず、このため、培地中の窒素濃度は、クリプトモナスの増殖時の最大細胞密度を決定する直接的な要因となると考えられる。これに対し、ミカヅキモは、最初は培地中の窒素源を利用して増殖するが、この窒素源が枯渇すると、細胞内に蓄積された窒素源や細胞内構造を構成しているタンパク質を分解して得られた窒素源を増殖に利用できるため、培地中の窒素濃度は、ミカヅキモの増殖時の最大細胞密度を決定する直接的な要因にはならないと考えられる。接種後、日数が経過するにつれて細胞質の形態が異常なミカヅキモが

増加したことは、ミカヅキモが細胞内構造を構成しているタンパク質を分解して得られた窒素源を増殖に利用できるという見解を支持している。

2、共棲下での藻の増殖動態

図4と図5で、C培地でもN1/10培地でも増殖型に大きな差が見られなかったことより、ミカヅキモは、おそらく窒素以外の栄養源（例えばリン、硫黄やビタミン類などのどれか、あるいは複数のもの）についても、培地中の栄養源が枯渇すると、細胞内に蓄積された栄養源や細胞内構造を分解して得られた栄養源を利用して増殖・生存に利用できる代謝経路を備えているが、クリプトモナスはこのような代謝経路を持たないと考えられる。

また、共棲下におかれたクリプトモナスが、単独培養下に比べ、運動機能の低下や、普段見られない動きを早い時期から示したことは、ミカヅキモがクリプトモナスの運動を阻害するような物質を分泌している可能性があることを示唆している。この点に関しては、さらなる検討が必要とされるだろう。

《結論》

1、培地中の窒素濃度は、クリプトモナスの増殖時の最大細胞密度を決定する直接的な要因になるが、ミカヅキモの増殖時の最大細胞密度を決定する直接的な要因にはならない。

2、ミカヅキモとクリプトモナスが共棲するような生態系では、ミカヅキモが優占種となる。これは、ミカヅキモが細胞内に蓄積された物質や細胞内構造を分解して得られた物質を栄養源として増殖・生存に利用できる代謝経路を備えていることに起因する。

《謝辞》

滋賀医科大学生命科学講座 生物学教室の佐藤浩教授並びに今泉眞知子助手は、本研究を進める上での様々な困難について、その解決のための多くの的確な助言と支援を下された。この場を借りて、心からの謝意を表したい。

同講座化学教室の木村隆英教授、物理学教室の小林隆幸准教授、福村和子講師は、中間報告会及び研究発表会において、率直で大変有益な意見を示して下さい。基礎生物学教室の小原明人准教授、並びに実験実習支援センター機器部門からも様々な支援をいただいた。また、過去の基礎科学研究報告は本研究を進め、またこの報告をまとめるにあたって大変参考になった。水質や生態系における藻類の生活については、灘中学校・灘高等学校の宮田幸一良教諭、不二葦泰暁教諭、及び校友の野口真央氏、同校生物研究部の諸氏からも多くの助言をいただいた。併せてこれらの方々にも謝意を表したい。

本研究をすすめ、またこの報告をまとめるにあたり、市立川西病院の川本博司医師, 梶尾圭介医師, 善本哲郎医師及び仲川千津子看護科長, 吉村美知代看護師をはじめ、多くの医療スタッフの支援をいただいた。また、立命館大学文学部の磯貝健一講師、フルート奏者の奥田良子さんからも精神的支援をいただいた。これらの方々に感謝の意を捧げるとともに、様々な協力をしてくれた家族にも感謝したい。

《参考文献》

- ・ 菊池俊英 現代生物学演習 (培風館 1975) 1~6
- ・ 西沢一俊, 千原光雄 藻類研究法 (共立出版 1979) 223~240, 274~305
- ・ 濱田仁 接合藻の生物学 (コウヨウ社 1991) 63~67

- ・ 高見柚賀子 基礎科学研究報告 (滋賀医科大学 2003) 6~11
- ・ 添田郁美 基礎科学研究報告 (滋賀医科大学 2005) 28~32
- ・ 村田舞 基礎科学研究報告 (滋賀医科大学 2006) 1~7
- ・ 鷹見将規 基礎科学研究報告 (滋賀医科大学 2006) 9~13
- ・ 中西宏貴 基礎科学研究報告 (滋賀医科大学 2006) 15~21