

## 灰色藻 *Cyanophora paradoxa* のシアネレ増幅個体の出現と パターン分類に関する考察

Study on the Appearance and Typing of the Glaucophyceae  
*Cyanophora paradoxa* Holding Amplified Cyanelles

沖 田 理 絵      正 本 安 心      西 野 秀 昭

Rie OKITA

Yasumi MASAMOTO

Hideaki NISHINO

福岡教育大学・理科教育講座 (生物)

(平成21年9月30日受理)

### Abstract

*Cyanophora paradoxa* (*C.paradoxa*), a species of Glaucophyceae, is one of protists, which is thought to be equivalent to the ancestor of the present Chlorophytes (green plants). They have usually two chloroplast-like organelles a cell, called cyanelle, which resemble cyanobacterium holding the peptideglycan layer as the cell wall. The cells holding more number of cyanelle than normal one were observed in culture process of *C.paradoxa*. In this study, to elucidate the implication of the presence of the multiple cyanelle cells, observation was extensively performed in details for the classification of the cell pattern. *C.paradoxa* cells were cultured in the presence of terbinafine. As the result, the concentration dependency was not found in both the total population and the ratio of the multiple cyanelle cells. However, in longer culture under terbinafine, the appearance of the multiple cyanelle cells tended to be a little restraint. There were three patterns in the multiple cyanelle cells. In pattern 1, it is thought that division rate is thought to be different from the normal one. In pattern 2, it is thought that the cell itself does not divide but the cyanelle does so that the number of cyanelle could increase the number in a cell. In pattern 3, it is thought that the one of cyanelle only divides into small pieces. There are basically two cyanelles a *C.paradoxa* cell. However, there are more dozens of chloroplast a cell of higher plants. The *C.paradoxa* cells having a lot of cyanelle might be evolutionally positioned between Glaucophyceae-like ancestor cells and the higher plant. Besides, they might correspond to the way to natural selection in a process of evolution up to the multicellular higher plant.

### 要 約

灰色藻 *Cyanophora paradoxa* (*C.paradoxa*) は、現在の緑色植物の祖先型に相当すると言われている原生物である。その特徴は、ペプチドグリカン層を有するシアノバクテリア様の cyanelle (シアネレ) と呼ばれる葉緑体様の構造体を、基本的に細胞あたり2個持つことである。*C.paradoxa* の培養過程でシアネレを多数含む個体が観察されたことから、本研究では、そのことの再現性を含め、シアネレを多数含む個体 (シアネレ増幅個体) の存在意義を考察することを目的とした。出芽酵母に対する抗生物質である terbinafine 存在下での *C.paradoxa* の培養では、全体の個体数とシアネレ増幅個体の割合に terbinafine 濃度依存性は認められなかったが、シアネレ増幅個体の増殖には抑制傾向が見られた。また、個体の中でも2

個のシアネレの分裂速度が各々異なっていると考えられるパターン, 細胞分裂をせずにシアネレだけ分裂すると考えられるパターン, シアネレが少なくとも1つが小さな断片になっていると考えられるパターンと, 3つの様式へ分類された。灰色藻には細胞あたり基本的に2個のシアネレが存在するが, 高等な植物には細胞あたり数十~百個以上の葉緑体が存在する。本研究で観察されたシアネレを多数含む個体は, 進化的に灰色藻 *C.paradoxa* の祖先型生物と高等植物の間の位置に相当する可能性も考えられ, 多細胞高等植物への進化の過程を試行錯誤している道筋に相当する変異体なのかもしれない。

## 1. はじめに

地球上に存在する植物を動物と明確に区別しているものは, 葉緑体である。葉緑体は, シアノバクテリアと原始単細胞生物の共生により形成されたと言われている<sup>1)</sup>。その葉緑体の非常に原始的な形態を残していると考えられているのが, 灰色藻(カイショクソウ)とも呼ばれる *Cyanophora paradoxa* (*C.paradoxa*) である。その葉緑体様の構造は, cyanelle (シアネレ, または チアネル) とよばれ, 細胞内に2個存在し, シアノバクテリアの形態を非常によく保存している<sup>2)</sup>。シアネレの特徴として最も注目すべき点は, シアノバクテリアに類似したペプチドグリカン層の存在である<sup>3)</sup>。シアネレは葉緑体同様に独自のゲノムを持つが, その全体の大きさは, シアノバクテリアの遺伝子であるというよりも, 葉緑体に近い<sup>3)</sup>。そのため, シアネレは, 共生体としてのシアノバクテリアではなく, シアノバクテリア様の葉緑体と考えられている<sup>3)</sup>。

生物界の分類で現在有力な, 原核生物界・原生生物界・植物界・動物界・菌界の5つに分ける五界説によると, *C.paradoxa* は, 原生生物界に属する単細胞真核生物である<sup>4)</sup>。これは後に, プラシノ藻, 紅藻, 緑藻に分岐進化する位置に相当する。現在, 我々の身の回りで最も身近である「植物」は, 緑藻から分岐進化したとされる。

この *C.paradoxa* の培養過程で, 光学顕微鏡で *C.paradoxa* を観察する際, *C.paradoxa* 以外に小さな細胞が動いているのが観察された。この小さな細胞が酵母菌ではないかと考え, *C.paradoxa* の培養を純粋に行う目的で, 酵母菌のステロール生合成は阻害するが, ヒトなどの真核生物細胞では阻害しない terbinafine が, *C.paradoxa* の分裂増殖に影響がないか検討したところ, 1個体内にシアネレが多数ある個体が多く観察された。

そこで本研究では, terbinafine の存在によって *C.paradoxa* の細胞分裂・増殖に影響されることでシアネレを多数持つ個体, 即ちシアネレ増幅個体が出現するのか, 再現性や濃度依存性を含めて検討し, その出現理由に関して生物進化の観点から考察することを目的とした。

## 2. 方法

Terbinafine が *C.paradoxa* の細胞分裂に及ぼす影響を検討するため, terbinafine の各種濃度を表1のように調製する。

- ① アシストチューブに terbinafine を1 mg量りとり, 1 mlの滅菌蒸留水 (DW) を加え, よく混ぜて溶かす (1 mg/ml)。また, 別のアシストチューブに1 mg/ml terbinafine の100  $\mu$ l を入れ, 9,900  $\mu$ l の DW を加えてよく混合する (0.01 mg/ml terbinafine)。
- ② 100 ml 三角フラスコを洗剤でよく洗い, 洗剤が残らないように20~30回水洗いし, 蒸留水でよく濯いで乾燥する。
- ③ ②の三角フラスコにC medium<sup>6)</sup>を15 ml ずつ入れ, オートクレーブ(121°C, 20分)する。
- ④ ③が室温に冷えたら, フラスコに0.01 mg/ml terbinafine 水溶液10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 30  $\mu$ l, 40  $\mu$ l をそれぞれ加える。
- ⑤ *C.paradoxa* 培養中C medium を5 ml ずつ加え, ふたをして, 光合成ができるよう蛍光灯のもとで培養する。
- ⑥ フラスコ内の培養状態を, 目視と, 顕微鏡観察により, *C.paradoxa* の状態を確認する。

顕微鏡観察では, 細胞数を数えるため, 血球計算盤を使い, 1 ml あたりの個体数を数えた。ゾウムシの繊毛の緩速剤 (2%メチルセルロース) 5  $\mu$ l, *C.paradoxa* の培養液5  $\mu$ l をプレパラート上で混ぜて観察した。プレパラート上の4分の

1の範囲中にいる、シアネレの数が2個よりも多い個体数を数えた。各 terbinafine 濃度につき、3箇所測定した。

表1 Terbinafine の濃度調製

C medium <sup>6)</sup> (ml)	15	15	15	15	15
培養 <i>C.paradoxa</i> (ml)	5	5	5	5	5
Total (ml)	20	20	20	20	20
0.01 mg/ml terbinafine ( $\mu$ l)	0	10	20	30	40
Terbinafine 終濃度 (ng/ml)	0	5	10	15	20

### 3. 結果と考察

#### 3. 1 フラスコの目視

十分に緑色である *C.paradoxa* 培養中フラスコから5 ml ずつ分注し培養した。本研究では、17日間毎日観察を行った。

Terbinafine 濃度 0 ~ 20 ng/ml は5日目まで特にフラスコ上の色の変化は見られなかった。6日目から少しずつ0 ng/ml に黄緑色がかってきたが、5 ~ 20 ng/ml には特に変化はなかった。そこから日を経るに従って0 ~ 10 ng/ml の培養フラスコにも色がつき始め、10日目から15 ~ 20 ng/ml も少し、黄緑色がかってきた。13日目には、0 ng/ml は濃い黄緑、5 ~ 15 ng/ml は黄緑、20 ng/ml は薄い黄緑であった。16・17日目にはほぼ0 ~ 20 ng/ml は変わらず濃い緑になっていた。

#### 3. 2 顕微鏡での観察

画像は分かりやすいことを基準にしているため、画像の数は実際の個体数と比例しない (図1)。

これまでの実験では、0 ng/ml でもシアネレ増幅個体が観察されたら、何らかの物質の混在によって出現したものと判断してきたが、本研究では、分注する前のフラスコにわずかではあったが、シアネレ増幅個体が必ず観察された。シアネレ増幅個体の由来としては、terbinafine によって誘導されるのではなく、常に少量ながらも存在しているものであり、その数が terbinafine で増加する可能性を考え、そのまま観察を進めた。

しかし、terbinafine の濃度差による個体数の変化は、多い順に  $0 > 15 > 10 > 5 > 20$  (ng/ml) となった事から、特に濃度依存性は観察されなかった (図2, 図3)。また、シアネレ増幅個体の割合は培養に従って減少し、15日目で0.1%未満になったため、実験を終えた (図4)。シアネレ増幅個体の割合も特に濃度依存性は見られなかった (図4)。

シアネレ増幅個体の数は、変動幅はあるものの、図3で見ると減少傾向にあり、シアネレ増幅個体の割合が減っていった原因としては、正常個体数の増加が著しかったからだとも考えられる。

図3を見ると、0 ng/ml と20 ng/ml が平行に減少傾向にあり、20 ng/ml の方が絶対数が少ない。Terbinafine は個体において増殖の抑制に効くのではないかと考えられる。

#### 3. 3 シアネレ増幅個体の由来

目視観察では、2週間未満では terbinafine の存在によって *C.paradoxa* の培養に影響があるように見られたが、17日目には terbinafine の濃度に係らず、同様な分裂増殖が観察された。しかし、顕微鏡観察では、いずれの terbinafine 濃度でもシアネレを多数持つ個体が観察された (図1)。

観察中、シアネレ増幅個体を見つけるうち、シアネレ増幅個体には3つのパターンあると考えられた (図5)。これらのパターン1~3の成因を以下のように推測した。

通常同じ速度で細胞分裂すると、偶数個のシアネレしか見られないが、パターン1では、シアネレによって分裂速度が異なり、分裂したものとまだ分裂していないものが混ざっている状態で、奇数のシアネレを持つ細胞ができたのではないかと考えられる (仮説1)。

パターン2では、細胞分裂をせず、シアネレだけが次々と分裂していったのではないかと考えられる (仮説2)。

パターン3では、シアネレが不等分裂し、大きいシアネレと小さいシアネレに分かれたのではないかと考えられる。または、体積を増やさないまま分裂を続けていくシアネレがあったのかもしれない (仮説3)。

これらの仮説以外に、細胞融合も可能性として考えられるが、観察した中では他個体との細胞融合のような様子は見られなかった。仮説3 (細胞分裂をせず、シアネレだけ増殖) はパターン2の仕組みとして充分考えられる。

灰色藻という原生生物は、最も原始的な光合成生物と考えられている藻類である。*C.paradoxa*の葉緑体（シアネレ）はシアノバクテリアとよく似ていて、退化した形ではあるがペプチドグリカン層という細胞壁様の構造で覆われている。*C.paradoxa*のシアネレ分裂について調べてみるとシアノバクテリアや他の多くの細菌のように細胞壁が特殊化した隔壁が中央に形成されて分裂することが分かっている<sup>7)</sup>。一方で、高等植物では内側と外側に持つPDリング（色素体分裂リング）をシアネレは内側のPDリングだけ持ち分裂する<sup>7)</sup>。その分裂機構は高等植物の葉緑体と共通する特徴も持っている。したがって、シアネレの分裂はシアノバクテリアの細胞分裂と一般の葉緑体分裂の機構の中間的な性格を持っていると言える<sup>3)</sup>。

灰色藻は双子葉類・単子葉類・シダ・コケ植物などの祖先型に相当すると言われている。灰色藻は1細胞あたり普通2～4個のシアネレが存在するが、高等な植物には1細胞あたり数十個～百個以上の葉緑体が存在する。本研究で観察されたシアネレを多数含む個体は、シアネレと高等植物の葉緑体の間に位置し、灰色藻が進化の過程を試行錯誤している道筋にある可能性も考えられる。

#### 4. 参考文献

- 1) 正本安心：「植物系統進化における *Cyanophora paradoxa* の研究」, 2006年度福岡教育大学生物教室卒業論文
- 2) 中山剛：「バイオーバーシティ・シリーズ3 藻類の多様性と系統」岩槻邦夫・馬渡峻輔監修 千原光雄編集, 173, 2007
- 3) 前掲載書2) 175
- 4) 馬渡峻輔・堀内健雄による.: 「理科年表机上版」, 国立天文台, pp.807, 2004
- 5) 前掲載書2), 175
- 6) <http://mcc.nies.go.jp/02medium.html> 「培地リスト」
- 7) Iino, M and Hashimoto, H: Intermediate features of cyanelle division of *Cyanophora paradoxa* (glaucozystophyta) between cyanobacterial and plastid division, J. Phycol., 39, 567-569, 2003



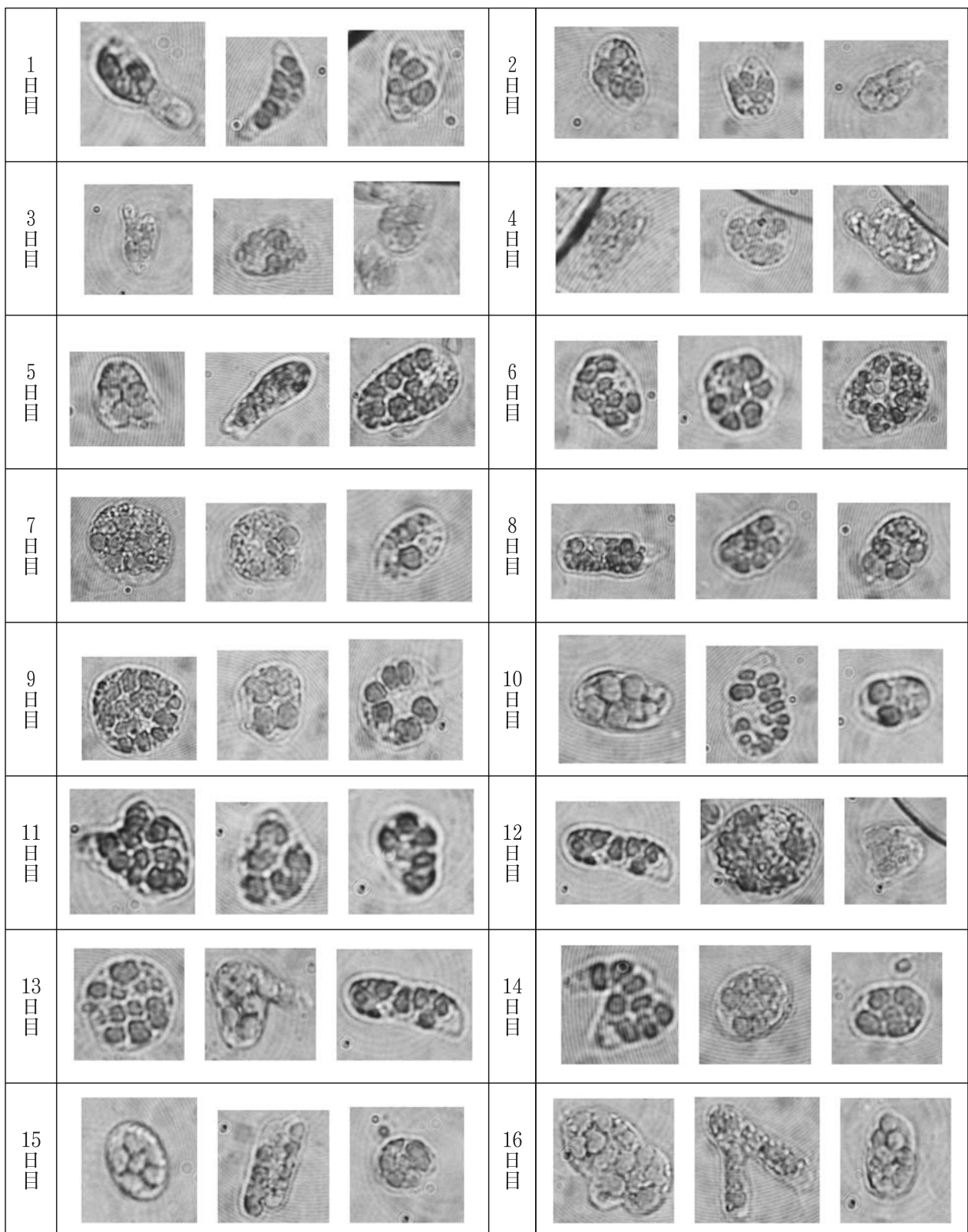


図1 *C.paradoxa* シアネレ増幅個体の顕微鏡観察

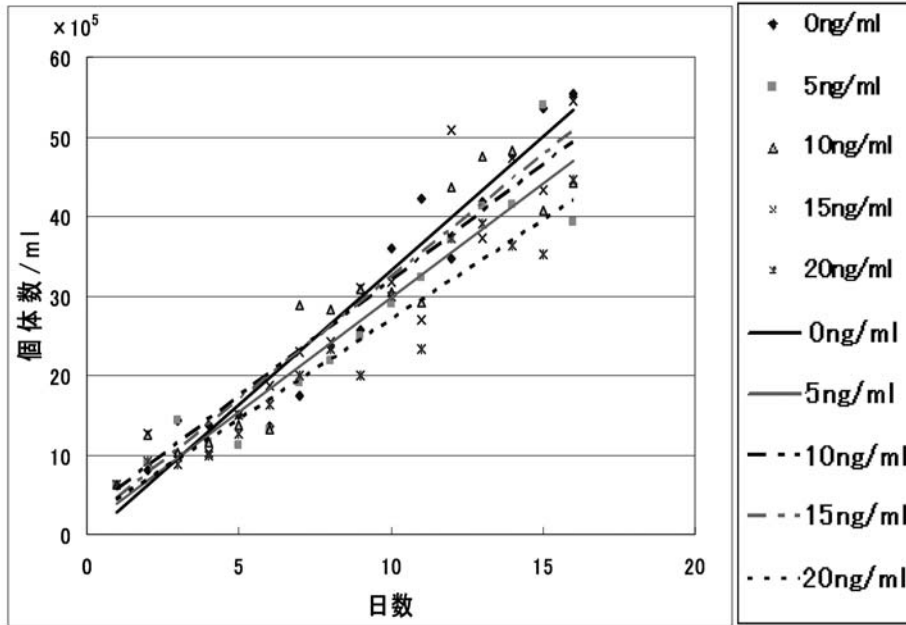


図2 Terbinafine 濃度と個体数/ml

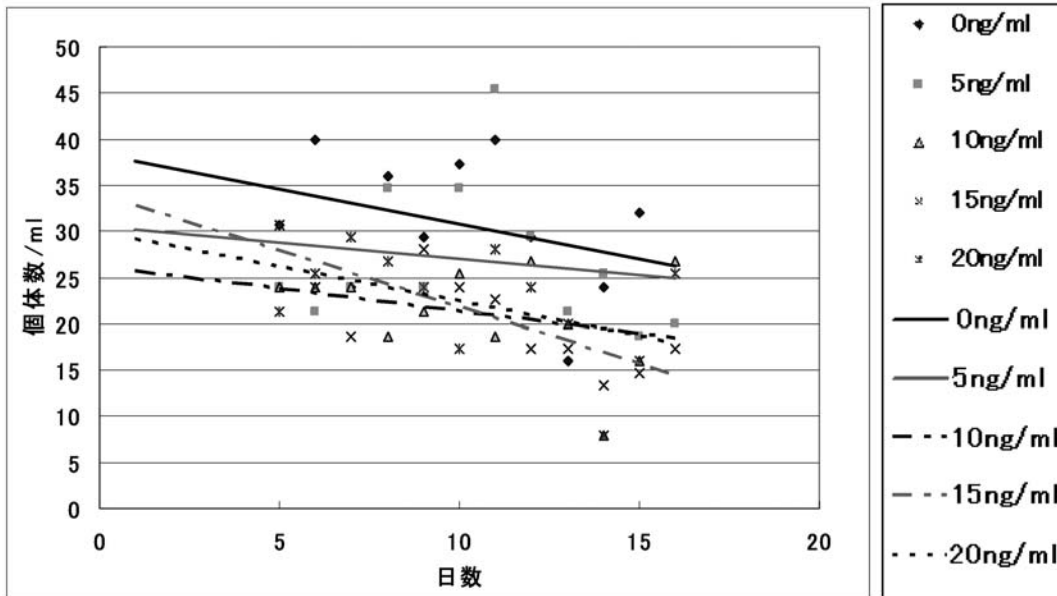


図3 1 ml あたりのシアネレ増幅個体数の推移

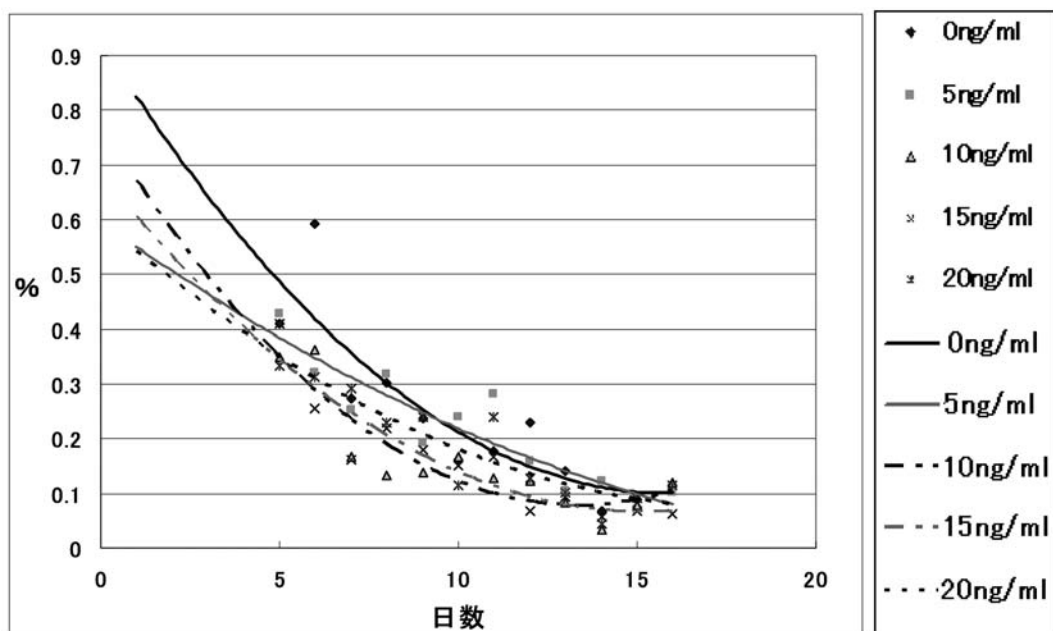


図4 全体の個体数に対するシアネレ増幅個体の割合

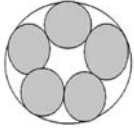
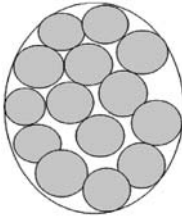
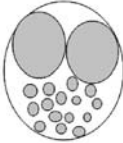

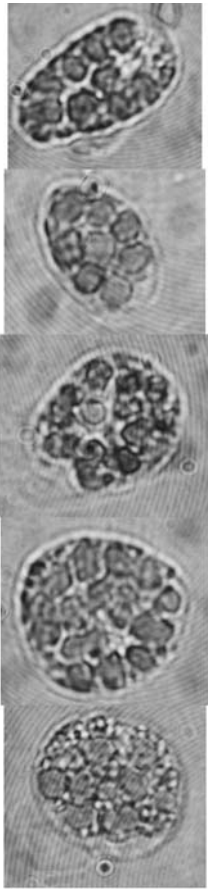

イメージ図	 <p>パターン 1</p>	 <p>パターン 2</p>	 <p>パターン 3</p>
特徴	シアネレの大きさと個体の大きさは正常な個体とさほど変わらないが、シアネレが1～数个多い。	個体の大きさが大きい。シアネレの大きさがやや小さく、シアネレの数が多し。	個体の大きさは正常とあまり変わらないが、2～3個の大きなシアネレと、小さいシアネレが多数ある。
画像			
成因の予想	シアネレによって分裂速度が異なる。	細胞分裂をせず、シアネレだけ分裂増殖し、細胞が大型化する。	シアネレの一部のみが断片化する。

図 5 シアネレ増幅個体のパターン分類