
Mini Review

浮游性コレオトリカ目繊毛虫 *Strombidium conicum* の chloroplast 取り込み観察法と encystment 誘導に関する研究

遠藤裕子*, 谷口 旭

東北大学大学院農学研究科水圏生態学分野
〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

Method of chloroplast sequestration and induction of encystment in the planktonic ciliate *Strombidium conicum*

Yuko ENDO* and Akira TANIGUCHI

Aquatic Ecology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University,
Sendai, 981-8555, Japan

SUMMARY

Planktonic ciliates are generally known to be strictly heterotrophic, but many marine Strombidiidea including *Laboea strobila*, and some *Tontonia* and *Strombidium* contain functional chloroplasts and perform photosynthesis. These mixotrophic planktonic ciliates isolate chloroplasts from their diet algae. Such behavior of the isolation and sequestration of a cell organ of different creature is interesting not only from ecological but also from evolutionary point of view. The purpose of this study is to get enough number of virgin vegetative cells of a planktonic ciliate without chloroplasts to follow the processes of the isolation/sequestration of chloroplasts after supplying diet algae. One of the most dominant planktonic ciliates, *Strombidium conicum*, in Onagawa Bay, Japan sequesters the functional chloroplasts from ingested phytoplankton. Kim and Taniguchi (1995, 1997) isolated the cysts of this species from sediment samples collected in the bay and successfully identified outenal conditions induce excystment in laboratory. Then, it is theoretically possible to obtain enough number of the newly excysted virgin cells in laboratory if the encystment can also be artificially induced. We put some stresses on a clonal *Strombidium conicum* population but encystment could not be induced. However, during continual cultures of mixed clones numerous encystments occurred along with a few conjugations after 15-17 times of binary fissions. This suggests that aging and conjugation are necessary for the encystment in this species.

*Corresponding author

Tel: +81-22-717-8733, Fax: +81-22-717-8734

e-mail: uko@bios.tohoku.ac.jp

Received: 30 Jan 2006.

はじめに

海洋表層生態系内には通常使用される目合 200 μm の動物プランクトンネットでは採集できない微小動物プランクトンが多く、海洋の物質循環過程で重要な役割を担っていること、およびその中では浮遊性の繊毛虫が卓越していることが明らかになったのは、1960-70 年代であった (Johannes, 1964; Beers and Stewart, 1969, 1971, 1980; Beers et al., 1975; Taniguchi, 1984; 谷口, 1989; Stoecker and Capuzzo, 1990)。1980 年代には、それまで従属栄養性と考えられてきた繊毛虫プランクトンの中に、餌として摂食した植物プランクトンからクロロプラストだけを消化せずに細胞内に取り込んで光合成せしめ、その産物からもエネルギーを獲得する種がかなり多いことが明らかになった。そのような混合栄養性種の現存量と代謝活性に関する知見は海洋生態系の構造と機能の解明に必須であるため、数多く研究されてきた (Laval-Peuto et al., 1986; Stoecker et al., 1987; Jonsson, 1987)。

一方、餌である藻類細胞からクロロプラストだけを取り込んで機能させるという生態は、植物の進化の観点からも注目されるようになった。機能的なクロロプラストの保持に関する研究は主に透過型電子顕微鏡 (TEM) による細胞形態学的手法によって行われたが (Stoecker et al., 1987, 1988/1989)、その取り込み過程に関する研究は、実験に供すべきクロロプラスト未保持の細胞が自然にはほとんど存在しないため、進展しなかった。

1990 年代後半、宮城県女川湾には混合栄養性の繊毛虫プランクトン *Strombidium conicum* が優占し、海底泥中にはそのシストが大量に存在することが明らかになり、そのシストを excyst させる培養法も確立された (Kim, 1995; Kim & Taniguchi, 1995, 1997)。従って、シストを十分量入手できれば、excystment 直後のクロロプラスト未保持の初生栄養細胞も十分量入手することができる。その初生栄養細胞に餌料植物プランクトンを与えることにより、摂食、消化およびクロロプラスト取り込みの諸過程を観察することができるはずである。そのためには随時必要量のシストを入手しなければならないが、シストを人為的に産生させることは繊毛虫プランクトンでは試みられたことがない。そこで、本研究では、まず *Strombidium conicum* 細胞内のクロロプラストを観察するための TEM 試料作成法の確立をめざし、次いでシストを随時入手するための encystment 誘導実験を行った。その過程で、女川湾における自然群集の encystment 誘導要因が推測できたので、併せて報告する。

1. 細胞内クロロプラスト観察用 TEM 試料作成法

【目的】 クロロプラストの取り込み過程を明らかにするには、シストから excyst した直後でクロロプラスト未保持の初生細胞に餌料植物プランクトンを与え、摂食、消化、クロロプラスト取り込みの時系列を TEM で追跡する必要がある。しかし、*Strombidium conicum* の栄養細胞は脆弱であるため、良好な TEM 試料を作成するための方法が必要である。特に初生細胞では細胞膜の発達が不十分であり、入手できる細胞数も限られるため、固定から超薄切片作成までを高い確率で行わなければならない。そのため、本研究では、主に初生細胞の TEM 試料作成法の確立を目指した。

【材料と方法】 実験に供した *Strombidium conicum* 栄養細胞は、女川湾奥の海底堆積泥からソートしたシストを F/2-Si 培地で培養して excyst した初生細胞を、*Isochrysis* sp. を餌として増殖させたものである。これを、Stoecker et al. (1988/1989) の方法を参考に、前固定、濃縮、後固定、脱水、包埋、切片作成、電子染色という手順で TEM 試料作成を試みた。すなわち、前固定を 0.1 M カコジル酸バッファで調整した 2% グルタルアルデヒドで、試料濃縮を 500 rpm で 10 分間の遠心で、後固定を 0.1 M カコジル酸バッファで調整した 1% オスミウム酸でそれぞれ行い、エチルアルコールで脱水した後に、試料に包埋剤を浸透させるためにプロピレンオキサイドに浸漬してから、エポック 812 または クエトール 812 に包埋した (作成法 1)。しかし、この方法ではクロロプラストの微細構造まで観察することは困難であった。そこで、本村泰三先生のご指導の下で、単細胞藻類に用いる方法にならって次のように改変した。すなわち、まず 0.5% グルタルアルデヒドで前固定をした後、2-3% グルタルアルデヒドで再固定した。試料濃縮は細胞の破損を抑えるために手回し遠心機で行った。また、塩分が残っていると超薄切片が乱れて観察の障害になるため、脱水の前に塩抜きを行った。脱水は、エチルアルコールのかわりにアセトンで、また包埋剤はスパーで行った。しかし、この前固定法でも細胞の破損がみられたので、グルタルアルデヒド濃度を 0.5、1、2、3、4、5% の 6 段階とし、破損の程度を調べた。

なお、*S. conicum* は excystment 直後に摂食を開始しなければ死ぬこと、しかし、給餌する植物プランクトンからクロロプラストを取り込むことを避けるため、バクテリアを与えて栄養増殖させることも試みた。

【結果と考察】 改良法で得られた TEM 画像 (Fig. 1) は、作成法 1 で得られた画像に比べて細胞の微細

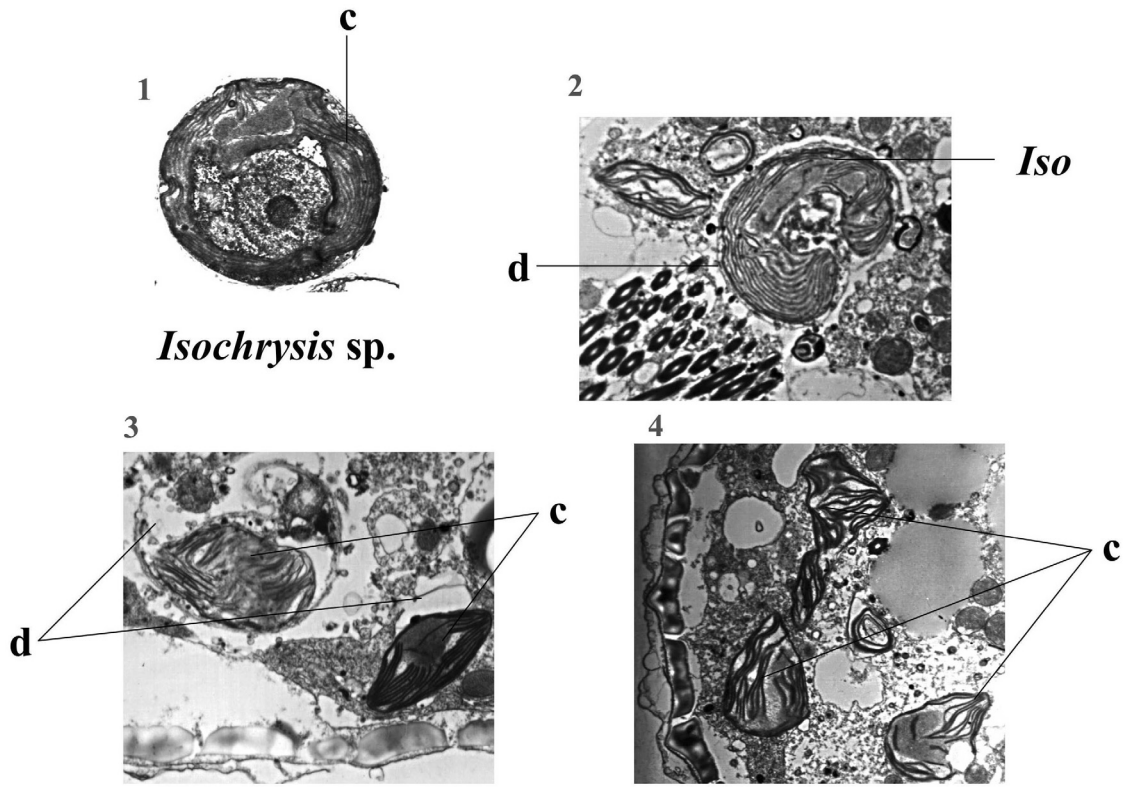


Fig. 1. TEM photograph of a vegetative cell of *Strombidium conicum*. (1) *Isochrysis* sp. cell with chloroplasts (chl) and nucleus (N), (2) *Isochrysis* sp. cell (Iso) just ingested in digestive vacuole (dv) of *Strombidium conicum*, (3) chloroplasts (chl) in digestive vacuoles (dv) and (4) in protoplasm.

構造の保存に勝っていた。摂食前後の *Isochrysis* sp. のクロロプラストのラメラ構造やピレノイドが *S. conicum* 細胞内でも良く保存されており、前後の関連を解析するには十分な水準が達成されたといえる。すなわち、この改良法によれば、繊毛虫細胞内に取り込まれているクロロプラストの由来植物分類群を同定することが可能である。前固定時のグルタルアルデヒド濃度と栄養細胞の破損程度を検討した結果は、0.5-1%の低濃度よりも 4-5%という高濃度の方で成績が良いことを示した。

バクテリアを餌料として与えたとき、Excystment 直後の栄養細胞は分裂増殖しなかった。しかし、供試した 24 個体の細胞のすべてがクロロプラスト非保持のまま 24 時間以上生存し、1 週間以上生存した個体もみられた。

以上の結果から、バクテリアを与えて初生栄養細胞を集積蓄養してから植物プランクトンを給餌すれ

ば、その摂食、消化、クロロプラスト取り込み過程の時系列を改良法によって観察することができると期待される。

2. *Strombidium conicum* にみられる encystment の生物学的意義

【目的】 *Strombidium conicum* の excystment および encystment を自由にコントロールすることができれば、クロロプラスト取り込み過程観察のために十分な数の初生栄養細胞を入手することができる。このうち excystment についての知見はすでに得られている (Kim, 1995; Kim & Taniguchi, 1995, 1997) が、encystment コントロールについての知見は全くない。一般に原生生物のシストの役割は耐休性にあるといわれ、一方で原生生物は個体群の若返りのため

Table 1. Culture conditions of the experiments to estimate growth rate (μ /day) in Clone N1 of *Strombidium conicum* of different ages at different temperatures. Growth rate was obtained from growth curves, of which R2 was calculated.

Age (days)	Temperature ($^{\circ}$ C)	Initial concentration (cells/ml)		Growth rate (μ /day)	R ²	n
		<i>S. conicum</i>	<i>Isochrysis</i> sp.			
5-6	15	1	1.0×10^5	0.73	0.99	4
28	10	20	1.0×10^5	-0.49	0.95	3
28	15	20	1.0×10^5	0.42	1.00	3
28	20	20	1.0×10^5	1.28	0.95	3
28	22	20	1.0×10^5	0.35	0.76	3
28	25	20	1.0×10^5	-2.10	-	3

に接合することが必要だともいわれており、接合後にシストを形成する種も報告されている。本研究では、*S. conicum* の encystment を随時誘導して十分量のシストを入手する方法の確立のために、本種の encystment が環境悪化と接合の必要性とのいずれによって誘発されるのかを調べた。このとき、シストから栄養細胞を得るという本研究の基本的な技法は、単一クローンまたは混合群別の実験を行う上で極めて有利であった。

【材料と方法】 まず、シストを個別に培養して得られたクローンを単独に用いて、異なる温度、餌および光環境下における細胞群の動態を観察し、環境ストレスと個体群密度（または年齢）の影響をみた。この過程で、本種の適水温である 15° C における excystment から 6 日後までの増殖速度を 4 つのクローンについて測定し、また、1 つのクローンについては、excystment から数えて 28 日後の増殖速度を 10, 15, 20, 22, 25° C で測定した。

次いで、5 つのクローン栄養細胞群から各 1 個体をソートして同一容器内に接種し、混合クローン飼育群を作った上で、前述の実験同様に、環境ストレスと個体群密度または年齢の影響をみた。この実験は 3 回繰り返した（実験 1-3）。

【結果と考察】 飼育群は多くの場合定常期に達してからも長く維持されたが、単一クローンでは個体群密度が最大約 1000cells/ml に達しても encystment は起こらなかった。Excystment から数えて 28 日後から測定した増殖速度は、10, 15, 20, 22, 25° C において、それぞれ -0.49, 0.42, 1.28, 0.35, -2.10 μ /day であった (Table 1)。すなわち、 10° C と 25° C は明らかに不適水温であったにも拘わらず encystment は起こらず、不適水温環境だけでは encystment が誘導されないことがわかった。また、適水温 15° C および

20° C であっても、飢餓あるいは暗条件下では 2-3 日後にほとんど死滅し、飢餓および暗条件も極めて厳しい不適環境であることが分かった。しかし、このときにもまた encystment は起こらず、単一クローンでは、外的環境要因の悪化によって encystment が誘発されることはないかと推察される。

5 つのクローンを混合した飼育群では、excystment から数えて 32-36 日後に encystment が起こった。このことは、encystment には複数のクローンの混在が必要であることを示している。このときに、実験 1 では接合ペアも確認され、encystment と接合が同時期に起こること示唆していた。これらの飼育群の growth rate から、encystment が起こるまでの間に約 15-17 回の分裂があったと計算された。この接合が二分増殖を重ねて個体群が成熟あるいは老化したために起こったとすると、*S. conicum* 個体群はわずか 15-17 回の分裂で成熟に達したものと考えることができる。

この実験で観察された興味深い現象は、新に形成されたシストが 2-3 日のうちに cyclosis を開始し、まもなく excyst したことである。このことは、本種のシストが形成後短時間で excyst する能力を備えていることを示しており、必ずしも耐久休眠のために形成されるものではないことを意味している。

以上二つのシリーズの実験で得られた成果を発展応用すれば、実験室内において随時飼育群にシストを形成させて初生栄養細胞を入手することが可能になる。それに植物プランクトンを給餌して、本研究で改良した方法にしたがって TEM 試料を作成すれば、クロロプラストの取り込みの過程あるいは保持の機構に関する観察が可能になると期待できる。

引用文献

- Beers, J. R. and G. L. Stewart, 1969. Micro-zooplankton and its abundance relative to the larger zooplankton and other seston components. *Mar. Biol.*, 4: 182-189.
- Beers, J. R. and G. L. Stewart, 1971. Micro-zooplankton in the plankton communities of the upper waters of the eastern tropical Pacific. *Deep-Sea Res.*, 18: 861-883.
- Beers, J. R. and G. L. Stewart, 1980. Microplankton population structure in Southern California nearshore water in late spring. *Mar. Biol.*, 60: 209-226.
- Johannes, R. E., 1964. Phosphorus excretion as related to body size in marine animals: the significance of nano-zooplankton in nutrient regeneration. *Science*, 146: 923-924.
- Kim, Y.-O. and A. Taniguchi, 1995. Excystment of the oligotrich ciliate *Strombidium conicum*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 9: 149-156.
- Kim, Y.-O. and A. Taniguchi, 1997. Seasonal variation of excystment pattern of the planktonic oligotrich ciliate *Strombidium conicum*. *Mar. Biol.*, 128: 207-212.
- Stoecker, D. K., A. E. Michaels and L. H. Davis, 1987. Large proportion of marine planktonic ciliates found to contain functional chloroplasts. *Nature, Lond.*, 326: 790-792.
- Stoecker, D. K., M. W. Silver, A. E. Michaels and L. H. Davis, 1988/1989. Enslavement of algal chloroplasts by four *Strombidium* spp. (Ciliophora, Oligotrichida). *Mar. Microb. Food Webs*, 3: 79-100.
- Stoecker, D. K. and J. M. Capuzzo, 1990. Predation on protozoa: its importance to zooplankton. *J. Plankton Res.*, 12: 891-908.
- Taniguchi, A., 1984. Microplankton biomass in the arctic and subarctic Pacific Ocean in summer. *Mem. Nat. Inst. Polar Res.*, 32: 63-76.
- 谷口 旭, 1989. 微小動物プランクトンの存在, 27-48 pp. “生物海洋学-低次食段階論”, 西澤 敏 (編), 恒星社厚生閣, 東京.