
Mini Review

海産少毛類繊毛虫の細胞分裂周期と増殖能

太田 尚志

石巻専修大学理工学部

〒986-8580 石巻市南境新水戸1番地

Diel periodicity of cell division and growth rates of marine oligotrich ciliates

Takashi OTA

Department of Biological Engineering, Ishinomaki Senshu University, 1 Minamisakai, Ishinomaki, 986-8580, Japan

SUMMARY

Oligotrich ciliates are recognized to be a conspicuous component of microzooplanktonic assemblages in marine habitats. It has become obvious that perform multiple functions in the marine ecosystems such as a primary consumer of pico- and nano-sized producers, a significant nutrient regenerator and important food sources of metazoan zooplankton. To evaluate their functional role in the ecosystems, accurate estimates of growth and reproduction of organisms is indispensable. Cell cycle method including frequency of dividing cells (FDC) method is possibly one of the best too to estimate the growth rate of the ciliates *in situ*. This method have been successfully applied for several types of planktonic organisms, however, not attempted for oligotrichs because information of diel division pattern of the natural populations had not been available yet. Therefore, an attempt to obtain such basic data was made in this study. As a result, diel division patterns were successfully defined for several natural populations of oligotrichs in the oceanic waters and finally growth rate of the natural populations were determined.

1 はじめに

微小動物プランクトンとは、20-200 μm のサイズで定義される原生動物を主体とした動物プランクト

ン群集の総称で、本稿でとりあげる少毛類繊毛虫はその中でも量的に最も卓越した生物群集の一つである。微小動物プランクトンは、多くの動物プランクトンには小さすぎて利用することのできないピコサイズ (2 μm 以下) ・ナノサイズ (2-20 μm) のプランクトンを摂食し、その物質・エネルギーを甲殻類動物プランクトンなどの上位栄養段階に転送する役割を果たす (Fig. 1)。一方では、動物プランクトンに比べて潜在的代謝活性 (呼吸・増殖・摂餌・排泄など) が高いことから、栄養塩再生産者および溶存有

FAX: +81-225-22-7746

TEL: +81-225-22-7716

E-mail: otakashi@isenhu-u.ac.jp

Received: 16 Feb 2006.

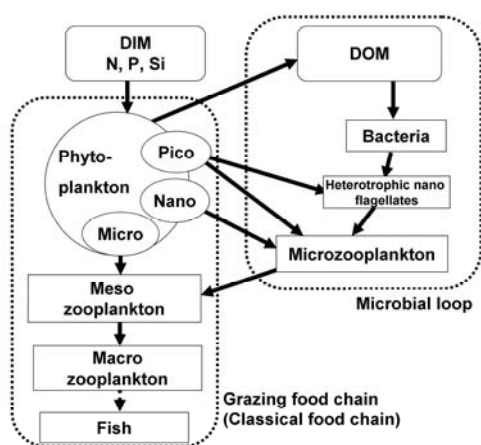


Fig. 1. Schematic diagram illustrating grazing food chain and microbial loop. DIM and DOM mean dissolved inorganic materials and dissolved organic materials, respectively.

機物の供給者として海洋表層系の物質循環の加速に大きく寄与するとも言われている。これらの生態学的機能の大きさを定量的に評価するためには、生物量と代謝速度、とりわけ増殖速度の測定が不可欠となる。しかしながら、これまで用いられてきた増殖速度測定法は現場の実態を把握するという意味において信頼性に欠けるといふ欠点があった。本稿では、従来法、ならびにそれに代わる方法として考案された細胞周期法および FDC 法を紹介し、同法を用いることで初めて実測に成功した現場の少毛類繊毛虫の増殖速度について論じていく。

2 繊毛虫の増殖速度測定法について

2-1 従来法

少毛類繊毛虫の増殖速度を見積もるにはこれまで様々な方法が用いられてきた。それらには 1) 増殖速度と体サイズおよび環境水温の関係を重回帰して導き出したモデル式による推定、2) 現場環境を擬似的に再現した条件下で自然群集を培養する方法、そして、3) 細胞分裂頻度と増殖速度の関係を利用して見積もる方法などが挙げられる。その中で 1) の増殖モデル式を用いる方法は最も簡便な方法であろう。繊毛虫の増殖速度が体サイズの増加に伴い遅くなることや環境水温の上昇とともに速くなることは経験的によく知られた事実である。この関係に基

づいて繊毛虫プランクトンの潜在的増殖速度を見積もるための関係式がこれまでにいくつか提案されてきた（例えば Montagnes et al., 1988; Müller and Geller, 1993; Nielsen and Kiørboe, 1994）。それらの式は室内実験の好適条件下で得られたデータをもとに導き出された式のために、見積もられた値は、外部因子に制限されない状態で果たされる潜在的な最大増殖速度とみなされる。逆の見方をすれば、餌料不足のような制限状況下にある繊毛虫群集についてこの式を適用した場合には、実態とはおよそかけ離れた過大な評価を招く恐れがある。2) の擬似現場培養方法は、現場で採取した海水試料を容器に封入し、現場に近い環境下で一定時間培養し、その海水中に含まれるプランクトン密度の変化量から増殖速度を見積もる方法である（擬似現場培養法）。しかしながら、容器培養では増殖に負の影響を与えるさまざまな因子を完全に排除することはほとんど不可能であり、この方法により見積もられた増殖速度は多かれ少なかれ過小評価されることになる。Venrick et al. (1977) は、培養期間内に生じる餌の枯渇、老廃物の蓄積、過度の光照射、スペースの制約、容器材用からの有害物質の溶出などがストレスとなり得ることを指摘した。また、自然海水を培養する場合には捕食者を完全に取り除くことはできないため、その摂食圧により見かけ上、増殖速度が低く見積もられることもあり得る。これを防ぐために繊毛虫よりも目合いの大きいプランクトンネットで予め培養海水を濾過するケースが多いが、そのろ過作業自体が少なからず脆弱な繊毛虫に物理的ショックを与えたり、細胞破壊を招くことも指摘されている (Gifford, 1985)。さらに、汚染の少ない外洋域では、作業過程で混入する微量金属 (Fe や Cu) がプランクトンの代謝に及ぼす影響が小さくないために、そのような現場で培養実験を行う際にはクリーン技術に細心の注意を払う必要があるとされている。以上の 2 つの従来方法では必ずしも現場の実態に即した増殖速度が得られるとは限らず、データの解釈には十分な注意を要する。そこで、それらにかわって実際の増殖速度を知る方法として提唱されたのが以下に述べる FDC 法および細胞周期法による増殖速度の推定である。

2-2 FDC 法 (Frequency of dividing cells method)

この方法は、少なくとも容器培養を必要としない点において、自然群集の増殖活性(状態)を知ることができる優れた方法のひとつと考えられている。真核生物の細胞周期は G_1, S, G_2, M 期の 4 つの連続したステージからなる (Fig. 2)。細胞周期の中で、一度進入したら次の G_1 期に入るまで進行が止まることな

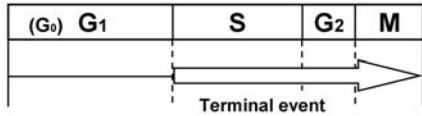


Fig. 2. Four sequential phases of cell cycle. Terminal event (thick arrow) can be defined as period between any point of the cell cycle and the end of cytokinesis (Mitchinson, 1971).

い細胞周期区間、すなわち S 期に進行してから細胞分裂が完了するまでの期間 (S 期、G₂ 期、M 期) をターミナルイベント (Mitchison, 1971) と呼ぶが、FDC 法では、このターミナルイベントに入った細胞は必ず細胞分裂を果すことを前提としている。McDuff and Chisholm (1982) はこの仮定のもとに、増殖速度 (μ) とターミナルイベント期にある細胞 (以後、ターミナル期細胞とする) の関係を以下の式で表した。

$$\mu = \frac{1}{n Td} \sum_{i=1}^n \ln[1 + f_x(t_i)] \quad (1)$$

ここで μ は日平均増殖速度 (d^{-1})、 $f_x(t_i)$ は i 番目のサンプリング時 (t_i) におけるターミナル期細胞の頻度、 Td はターミナル期に要する時間、そして、 n は 24 時間 に実施したサンプリング回数である。この式は、ターミナル期に要する時間 (Td) とターミナル期細胞の頻度がわかれば、理論的には増殖速度を知ることが可能であることを示している。この方法は、ターミナル期細胞の頻度が日周期的に変化する生物、すなわち、同調分裂している生物群集にも対応できることから、藍藻や渦鞭毛藻などの単細胞藻類に適用されてきた (Campbel and Carpenter, 1986; Weiler and Eppley, 1979; Yamaguchi, M., 1992)。

2-3 細胞周期法

FDC 法を適用する場合には Td が既知かでなければならなかったが、Carpenter and Chang (1988) は、個体群が同調分裂している場合、ターミナルイベント期間内の 2 つ以上のステージ (例えば S 期、G₂+M 期) を区別して頻度を計測することができれば、その経時変化曲線からそれぞれのステージに要する時間の合計を算出できることを以下の式で説明した。

$$T_S + T_{G_2M} = 2(t_2 - t_1) \quad (2)$$

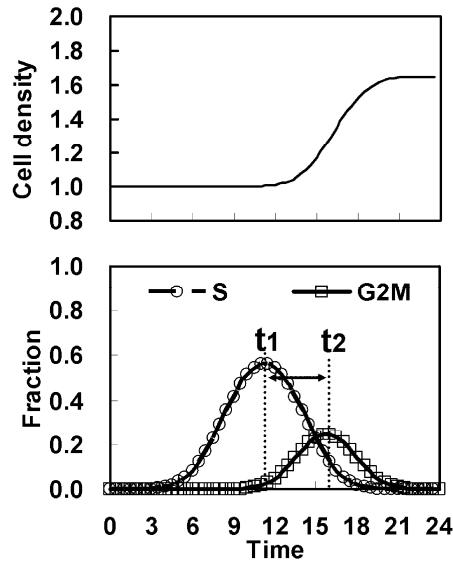


Fig. 3. Growth curve (top) and change of corresponding frequency of S and G₂M phases (bottom) under assumptions that growth rate (μ) = 0.5d⁻¹, S = 6 h and G₂M = 2 h.

$$\mu = \frac{1}{n(T_S + T_{G_2M})} \sum_{i=1}^n (ts)_i \ln[1 + f_S(t_i) + f_{G_2M}(t_i)] \quad (3)$$

ここで t_1 、 t_2 は S 期、G₂+M 期細胞の出現頻度が最大となる時間、 T_S 、 T_{G_2M} はそれぞれ S 期、G₂+M 期に要する時間、 n はサンプリング回数、 $f_S(t_i)$ 、 $f_{G_2M}(t_i)$ はそれぞれ i 番目のサンプリング時における S 期、G₂+M 期細胞の頻度、そして $(ts)_i$ はサンプリングの間隔時間である。式(2)より、S 期、G₂+M 期の合計時間は、それぞれの細胞頻度の経時変化から得られる曲線のピークの時間差を 2 倍して求められる (Fig. 3)。また、G₁、S、G₂+D 期に要する時間は以下の式により計算できる。

$$T_S = 2(t_2 - t_1)\beta / (\beta + 1) \quad (4)$$

$$T_{G_2D} = 2(t_2 - t_1) / (\beta + 1) \quad (5)$$

$$T_{G_1} = GT - T_S - T_{G_2D} \quad (6)$$

$$\beta = \frac{\sum \ln[1 + f_S(t_i) + f_{G_2D}(t_i)]}{\sum \ln[1 + f_{G_2D}(t_i)]} - 1 \quad (7)$$

$$GT = \frac{\ln 2}{\mu} \cdot 24 \quad (8)$$

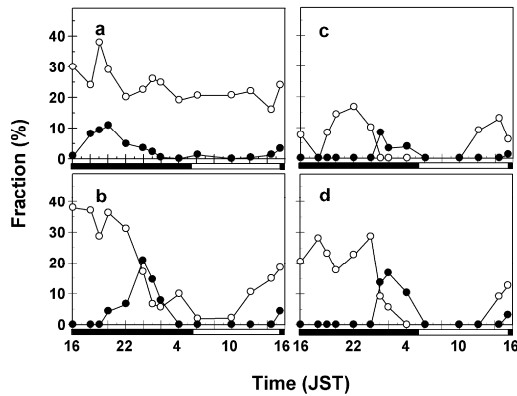


Fig. 4. Four examples of diel fraction patterns of S (open circle) and G₂D (close circle) observed in time-series experiment II at St. A. (a) *Strombidium* sp. 1; (b) *Strombidium wulffi*; (c) *Tontonia grandis*; (d) *Laboea strobila*. Heavy horizontal bar at bottom indicates dark period from sunset to sunrise.

この方法は、分裂に明瞭な日周期性を示す生物群集にのみ適用が可能となるが、現場サンプリングだけで自然群集の増殖速度を知ることができるという点で、FDC法よりも優れている。ただし、FDC法でも細胞周期法でも、通常は現場の海水を1～数時間間隔で24時間以上繰り返し採集し、かつ、様々な生物からなる群集の中から対象種の細胞を“ひろう”（種判別をする）作業があるので、従来法に比べて試料採集と試料分析に多大な労を要することになる。

3 少毛類自然群集の細胞分裂周期

FDC法および細胞周期法は、分裂に要する時間が既知の場合かもしくは対象とする群集が同調分裂をしている場合のみ適用が可能である。しかしながら、海洋少毛類繊毛虫については、これまでに培養に成功した種は限られ、あらかじめTdを見積もることが困難であること、また、細胞分裂周期に関する知見がほとんどないことから、少毛類繊毛虫に同法を適用することが試みられことはなかった。そこで筆者は、少毛類への細胞周期法およびFDC法の適用を目指して、西部北太平洋亜寒帯域のSt. A (45°N, 165°E) および亜熱帯域のSt. B (25°N, 165°E)において少毛類自然群集の分裂日周期を調査した。1～2時間毎24時間にわたり採取した表層海水2000 mlをブアン固定-プロタゴール染色処理を施した後、生物顕微鏡下での明視野観察により少毛類個々の細胞に

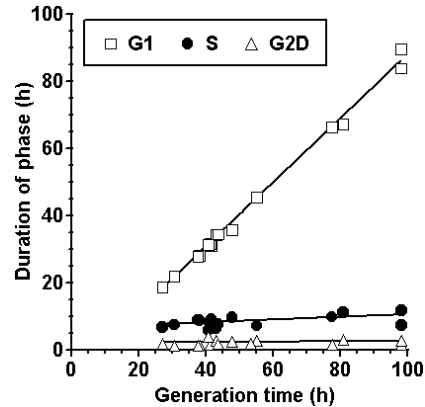


Fig. 5. Duration of Phases G₁ (open square), S (close circle) and G₂D (open triangle) phases as a function of the generation time for dominant oligotrichous ciliates in the western North Pacific. Solid lines are linear regressions of each data set.

ついて種同定および細胞周期ステージ (G₁、S、G₂+D期) の判別を行った。なお、繊毛虫は通常無性生殖で増加するため、細胞周期最終ステージはM期 (Mitosis) ではなく、サイトキネシスもしくは細胞分裂期 (cell division) となる。したがって、ここではM期のかわりに細胞周期最終ステージをD期と記すことにする。細胞周期ステージは、大核S期に出現するDNA複製帯 (replication band:RB) の有無、大核の形態、および娘細胞口器膜板の成長の程度に基づいて判別し、それらの出現頻度の経時変化解析により分裂周期を把握した。St. Aでは優占種2科5属12種、St. Bでは2科3属6種を対象として、分裂周期の観察を行った。その結果、亜寒帯の測点では、観察した16種のうち11種の少毛類が夜間に同調的に分裂していることが明らかとなった (Fig. 4)。それらはさらにI) 完全夜間同調型 (細胞分裂が夜間だけに限られる)、II) 夜間不完全同調型 (大多数は夜間に分裂するが日中にもわずかながら分裂が起こる) に分けることができた。およびIII) 非同調型 (分裂に同調性を示さない) の3パターンが認められた。興味深いことに、夜間同調型を示した種は混合栄養性種 (餌として取り込んだ植物プランクトンの葉緑体を消化せずに細胞と内に保持し、従属栄養過程と光合成の双方からエネルギーを獲得する) であり (Stoecker, 1991)、同調性が認められなかったのは従属栄養性種であった。しかしながら、今のところ夜間同調性と葉緑体の関連性はよくわかっていない。

Table 1. Specific growth rates of dominant oligotrichous ciliates in the subarctic and subtropical waters of the western North Pacific. *In situ* growth rates ($\mu_{in situ}$) were estimated by cell cycle method and maximum growth rates (μ_{max}) were predicted by the equation of Müller & Geller (1993). Ratios of $\mu_{in situ}$ to μ_{max} are also given.

Species	Growth rates (d^{-1})		$\mu_{in situ}/\mu_{max}$
	$\mu_{in situ}$	μ_{max}	
Subarctic Pacific [24-25 October]			
<i>Strombidium constrictum</i>	0.44	0.43	1.01
<i>Strombidium</i> sp. (cf. <i>constrictum</i>)	0.44	0.54	0.82
<i>Strombidium sulcatum</i>	0.30	0.68	0.44
<i>Strombidium wulffi</i>	0.40	0.47	0.84
<i>Tontonia gracillima</i>	0.54	0.48	1.13
<i>Tontonia grandis</i>	0.40	0.21	1.97
<i>Tontonia simplicidens</i>	0.40	0.56	0.73
<i>Tontonia</i> sp. (cf. <i>ovalis</i>)	0.21	0.45	0.47
<i>Laboea strobila</i>	0.30	0.34	0.90
<i>Leegaardiella sol</i>	0.45	0.44	1.03
<i>Pelagostrobilidium</i> sp.4	0.31	0.30	1.01
<i>Pelagostrobilidium</i> sp.5	0.53	0.24	2.21
Subarctic Pacific [28-29 October]			
<i>Strombidium sulcatum</i>	0.31	0.64	0.49
<i>Strombidium wulffi</i>	0.35	0.45	0.78
<i>Tontonia grandis</i>	0.17	0.19	0.88
<i>Laboea strobila</i>	0.21	0.31	0.65
Average	0.36	0.42	0.96
Subtropical Pacific [14-15 November]			
<i>Tontonia gracillima</i>	0.39	1.78	0.22
<i>Tontonia grandis</i>	0.38	1.57	0.24
<i>Tontonia</i> sp. 4 (cf. <i>cornuta</i>)	0.41	1.53	0.27
<i>Tontonia</i> sp. 5	0.61	1.78	0.34
<i>Parastrobilidium</i> sp. 1	0.17	1.98	0.09
<i>Rimostrombidium multinucleatum</i>	-	2.07	
Average	0.39	1.78	0.23

4 自然群集の増殖速度

4-1 細胞周期法による推定

分裂周期が明らかになった I) と II) のタイプの種については細胞周期法を適用して増殖速度 (μ) を計算した。一方、III) のタイプの場合は S 期と G₂D 期の頻度曲線に明瞭なピークが認められなかったため、S 期と G₂D 期に要する時間を推定することはできなかった。このため、それらの近縁種について筆者が室内実験で測定していた Td (G₂D に要する時間 = 1.1h) を用いることにした。結果を Table 1 に示す。亜寒帯測点における実験 1 (10 月 24-25 日実施) で観測した少毛類 12 種の増殖速度は 0.21-0.54 d^{-1} 、実験 2 (10 月 28-29 日実施) に観測した 4 種については 0.17-0.35 d^{-1} と見積もられた。また亜熱帯海域の測点で行った実験 3 (11 月 14-15 日) に観測した 6 種の増殖速度は 0.17-0.61 d^{-1} であった。亜寒帯海域と亜熱帯海域では環境水温に 16°C 以上の差があり

(亜寒帯測点では 10°C、亜熱帯では 26.4°C)、またクロロフィル濃度が 5 倍以上の差があるにも関わらず、両海域で見積もられた増殖速度はほぼ同範囲にあった (亜寒帯の平均 0.36 d^{-1} に対して亜熱帯では 0.39 d^{-1})。これら少毛類の世代時間(GT)は亜寒帯種で 30-98 時間、亜熱帯種で 27-98 時間と見積もられた。Fig.5 にそれぞれの種について世代時間と G₁,S,G₂D 期時間との関係を示した。データには異なる環境に棲息する様々な種の少毛類が含まれているにもかかわらず、G₁ 期の長さは世代時間にほぼ比例して増加し、一方で、S 期と G₂D 期は世代時間によらず比較的安定した値を示していた (亜寒帯種については T_S=7.2-9.8 h, T_{G₂D}=1.3-2.5 h 亜熱帯種については T_S=7.3-9.6 h, T_{G₂D}=1.5-2.9 h)。

4-2 細胞周期法による増殖速度と潜在的な最大増殖速度との比較

間接法として広く応用されている温度と細胞体積

依存の増殖モデル式を用いて潜在的な最大増殖速度 (μ_{\max}) を計算し μ と比較した。餌環境に制限のない場合には繊毛虫の増殖速度は体サイズの増大にともなって減少し (Fenchel, 1974; Finlay, 1977)、環境水温の上昇とともに増大する (Finlay, 1977)。したがって、 μ/μ_{\max} が 1.0 よりはるかに低ければ、何らかの要因によって自然群集の増殖能が抑制されていた可能性があるかと判断することができよう。なお、Montagnes (1996) は既存のモデル式を比較検討した結果、少毛類の増殖速度予測には Müller and Geller の式 $\ln \mu_{\max} = 1.52 \ln T - 0.27 \ln V - 1.44$ (ただし、T は環境水温、V は生体量) が最も適当であると結論している。それにしたがって本研究ではこの式を用いることにした。 μ (d^{-1}) の値は St. A では 0.16-0.54 (平均 0.39)、St. B では 0.25-0.58 (平均 0.36) とほぼ同程度の範囲にあったが、 μ/μ_{\max} は St. A (平均 0.96) より St. B (平均 0.23) のほうがはるかに低かった。このことから、St. A では繊毛虫の最大増殖能を発揮できる環境条件が揃っていたのに対して、St. B ではなんらかの制限因子による抑制が働いていたと推測される。要因としては、一つ目に St. B では餌不足状態にあったことが考えられる。一般論でいえば、貧栄養亜熱帯海域では亜寒帯海域に較べて一般的に生物量が桁小さい。本研究では植物プランクトンの指標としてクロロフィル *a* 量を測定しているが、St. B での値は St. A の 5 分の 1 以下であった。少毛類のすべてが餌料を植物プランクトンに依存しているわけではないが、食物連鎖の基点となる植物の現存量が低ければそれに依存して生きる生物の現存量も低くなることは容易に想像できる。また、亜寒帯海域に較べてより小型の植物プランクトンが優占する亜熱帯海域では繊毛虫に至るまでの栄養段階が亜寒帯に較べて多いことが予想される。この場合、植物の生産した有機物あるいはエネルギーは、食物連鎖を経て繊毛虫に至るまでに生物代謝によって無機化される割合が大きくなる。環境水温の高さはさらにこの無機化を加速させるだろう。そう考えれば、亜熱帯海域では亜寒帯海域と比較してクロロフィルの差以上に繊毛虫の餌料生物量が少なかったことは十分にあり得ることである。二つ目は、モデル式の限界である。Müller and Geller の式は、5-23°C の範囲内での室内実験データをもとに導きだされている。この式を環境水温が 26.4°C の亜熱帯域の種に外挿して適用すること自体に無理があるのかもしれない。残念なことに、今のところは 25°C 以上の高水温あるいは 5°C 以下の冷水温環境に適用できるモデル式は存在しない。いずれにせよ、少毛類繊毛虫が現場で果たしている実際の増殖速度を知るためには、従来法よりも本研究が紹介した細胞周期法が適

切であることが理解されよう。前述したとおり、この方法は解析にある程度の技術 (種同定) と労力 (検鏡作業) を要するため、今後は大量試料分析に向けて改善が望まれる。

- Campbell L, Carpenter EJ (1986) Diel patterns of cell division in marine *Synechococcus* spp. (*Cynechococcus*): use of the frequency of dividing cells technique to measure growth rate. *Mar Ecol Prog Ser* 32: 139-148
- Carpenter, E.J. and Chang, J. (1988) Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. I. Concept of the method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 43, 105-111.
- Fenchel, T. (1974) Intrinsic rate of natural increase: the relationship with body size. *Oecologia*, 14, 37-326.
- Finlay, B.J. (1977) The dependence of reproductive rate on cell size and temperature in freshwater ciliated protozoa. *Oecologia*, 30, 75-81.
- Gifford, D.J. (1985) Laboratory culture of marine planktonic oligotrichs (Ciliophora, Oligotrichida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 23, 257-267.
- McDuff, R.E. and Chisholm, S.W. (1982) The calculation of in situ growth rates of phytoplankton populations from fractions of cells undergoing mitosis: a clarification. *Limnol. Oceanogr.*, 27, 783-788.
- Mitchison, J.M. (1971) *The biology of cell cycle*. Cambridge University Press, London.
- Montagnes, D.J.S., Lynn, D.H., Roff, J.C. and Taylor, W.D. (1988) The annual cycle of heterotrophic planktonic ciliates in the waters surrounding the Isles of Shoals, Gulf of Maine: an assessment of their trophic role. *Mar. Biol.*, 99, 21-30.
- Montagnes, D.J.S. (1996) Growth responses of planktonic ciliates in the genera *Strobilidium* and *Strombidium*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 130, 241-254.
- Müller, H. and Geller, W. (1993) Maximum growth rates of aquatic ciliated protozoa: the dependence on body size and temperature reconsidered. *Arch. Hydrobiol.*, 126, 315-327.
- Nielsen, T.G. and Kjørboe, T. (1994) Regulation of zooplankton biomass and production in a temperate coastal zone. *Limnol. Oceanogr.*, 39, 508-519.
- Stoecker, D. K. (1991) Mixotrophy in marine planktonic ciliates: physiological and ecological aspects of plastid-retention by oligotrichs. *In: Protozoa and their role in marine processes*, Reid, P.C., Turley, C.M. and Burkill, P.H. (eds.). NATO ASI Series, Vol. G25.

- Springer-Verlag, Berlin, pp. 161-179.
- Venrick, E.R., Beers, J.R. and Heinbokel, J.F. (1977) Possible consequences of containing microplankton for physiological rate measurements. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 26, 55-76.
- Weiler, C.S and Eppley, R.W. (1979) Temporal pattern of division in the dinoflagellate genus *Ceratium* and its application to the determination of growth rate. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 39, 1-24.
- Yamaguchi, M., (1992) DNA synthesis and the cell cycle in the noxious re-tide dinoflagellate *Gymnodinium nagasakiense*. *Mar. Biol.*, 112, 191-198.