

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06176

研究課題名(和文) コンブ微小世代のシードバンクとしての能力と実海域における生残性の把握

研究課題名(英文) Survival capability of kelp microscopic early life stage as seed bank

研究代表者

水田 浩之 (Mizuta, Hiroyuki)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：00250499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マコンブ微小世代(配偶体)の多くは連続暗期下で3カ月間生存できるが、その後は葉緑体機能の低下と共に活性酸素が生じ、生存率の低下を招いた。また弱光の照射は高生残率を長く維持することから、光照射が配偶体の生残に不可欠であることが分かった。さらに、巨視的世代(孢子体)の生殖器官(子嚢斑)では活性酸素発生のもとケイ素を細胞外に取り込みポリフェノールと架橋を形成する防御機能に富んでいることが示唆された。このことは、子嚢斑はウニの摂食により消化され難く、それを摂餌したウニの消化管内の糞や放出した糞を培養するとコンブ配偶体や幼孢子体が多数出現したことから、孢子体の配偶体の生残性への貢献の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コンブ類は、巨視的世代と微視的世代との間で世代交代を行い、両世代の量や質は次世代の生物量を大きく左右する。特に微視的世代は、そのサイズの小ささから藻場における生存性について不明な点が多い。その為、シードバンクとしての微視的世代の生存性やそれを支える生理機構の解明、また巨視的世代と微視的世代の相互関係や藻食動物との関連性を具体的に把握することは、沿岸域における藻場を形成・維持に有用な知見を提供することになる。加えて、コンブ微視的世代のストレス抵抗性や生存能力の把握は、養殖の際の種苗生産や種苗保存にも大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Microscopic generation of Makombu (male and female gametophytes) can mostly survive for 3 months under continuous dark, and after then the survival rate gradually decreased with declining of the functions in chloroplast and with production of radical oxygen species. On the other hand, dim light condition contributed to extend the maintenance of high survival rate for long times. Moreover, oxidative burst-induced extracellular silicon deposition mechanism is suggested to be active in the reproductive organ (sorus) of the macroscopic generation (sporophyte) for the successful reproduction. Actually, the sorus tissues were considerably resistant to feeding by sea urchins, because the gametophyte and juvenile sporophytes appeared in the feces of sea urchins fed the sorus tissues. These observations suggest the contribution of parent generation to microscopic stage in Makombu.

研究分野：水産植物学

キーワード：コンブ 世代交代 ストレス防御 生存能力 シードバンク

1. 研究開始当初の背景

コンブ類の巨視的世代(孢子体)は大きな藻場を形成し、沿岸域における動植物の生育場の提供や栄養塩類保持等の様々な機能を果たしている。しかし、これらの機能は藻場の減少や消失によって著しく低下し、社会的にも大きな問題となっている。コンブ類は、巨視的世代と微視的世代(配偶体)との間で世代交代を行い、両世代の量や質は次世代の生物量を大きく左右する。特に微視的世代は、そのサイズの小ささから実海域における生残性やそれを支える生理機構などはほとんどわかっていない現状がある。

2. 研究の目的

シードバンクとしてのコンブ配偶体のストレス抵抗性や生存能力を明らかにし、その生物量と環境との相互関係を把握した上で自然回復力の評価や母藻投入・移植による新規加入量を決める必要がある。そこで、本研究ではコンブ配偶体の生残特性を把握し、特に光環境との相互関係を明らかにすると共に、孢子体世代と配偶体世代との相互関係の解明を目指し、藻場の保全や造成に有用な基礎的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 光制限が微小世代の生残性に及ぼす影響

シードバンクとしての微小世代の生存能力を把握するためには、特に大きな影響を及ぼすと考えられる光制限下での生残性を明らかにする必要がある。そこでマコンブ配偶体を連続暗期条件下で培養し、クロロフィル蛍光パラメーターを測定すると共に、シードバンクとして存在し得る期間を調べた。成熟孢子体の生殖器官(子嚢斑)から生殖細胞(遊走子)を放出させ、角型シャーレ内に敷き詰めたスライドガラスに着生、発生させた配偶体を水温 10°C、赤色光照射下(5-10 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 12hr 明暗周期)で成熟を抑制して培養した。次いで連続暗期条件下で培養するため、配偶体が着生しているスライドガラスをシャーレに入れ、アルミホイルで遮光し水温 5°C で培養した。その後 1、2、3、6、9、12、16 カ月後にシャーレを取り出し、配偶体を生物顕微鏡下で観察すると共に、ニュートラルレッド染色で生死判定し生存率を算出した。連続暗期下で培養した配偶体は、パルス変調クロロフィル蛍光測定装置(Opti-Sciences 社, OS1p)を用いたクロロフィル蛍光パラメーター(F_v/F_m , $Y(II)$, $rETR$, NPQ)の測定に供した。また 2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート(DCFH₂-DA)染色により活性酸素種(ROS)の生成を蛍光顕微鏡下で観察した。加えて、連続暗期培養後の配偶体を、正常な生長や成熟が認められる培養条件である 10°C、白色光(5-10 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 12hr 暗期: 12hr 明期)下で 1 カ月間培養し、光制限からの回復状況を確認した。さらにマコンブ配偶体及び芽胞体(発生して間もない顕微鏡レベルの小さな孢子体)計 127-176 個体が付着した種苗糸 1-2cm を 5°C、長日(16hr 明期: 8hr 暗期) 6 光量条件(連続暗期, 0.1, 0.24, 0.61, 1.06, 91.8 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)のもと 12 穴マイクロプレート 10ml 中で 4 カ月間培地の交換を行うこと無しに連続培養し、その生残率を調べた。

3-2. 配偶体新規加入量とその生残性に及ぼす成熟孢子体の影響

子嚢斑のケイ素含有量が他の部位に比べ高いこと(Mizuta et al., 2012)から、配偶体のケイ素含有量を測定すると共に、孢子体におけるケイ素の取り込み機構とその意義を調べた。孢子体片を 2mM 過酸化水素で処理し、ケイ素の取り込みを培地中のケイ酸塩濃度の減少から見積もった。また、ケイ素の局在を調べるためローダミン 123(R123)を添加した培地中でケイ酸態ケイ素を取り込ませ蛍光顕微鏡下で観察すると共に、メタノール抽出及びアルカリ抽出を経て得られた可溶性フロロタンニン画分、細胞壁結合フロロタンニン画分中の R123 濃度を蛍光光度計により測定した。さらに細胞外ヨードペルオキシダーゼ(IPO)活性を検出する為、培地中に最終濃度 12.5 μM となるようフェノールレッドを添加し、21 時間培養前後の吸収スペクトルの変化をモニターした。

次に、ウニによる子嚢斑組織の摂食が微小世代の新規加入に及ぼす影響について調べた。実験開始前に 2 週間絶食させたエゾバフンウニとキタムラサキウニに、餌として子嚢斑を形成している孢子体片 1g を与えた。その後ウニから排泄された糞を回収し、その内容物を顕微鏡観察すると共に、糞を 10°C、50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (中日)条件下で培養した。また、餌として与えた子嚢斑の影響を排除する為、ウニの消化管内にて形成された糞も回収・培養し、配偶体及び孢子体発生の有無を観察した。

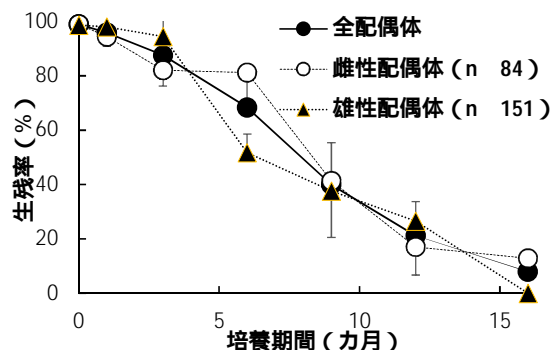


図1 低温(4°C)連続暗期下で培養したマコンブ配偶体の生残率の推移。データは平均値±標準偏差で示す。

4. 研究成果

4-1. 光制限が微小世代の生残性に及ぼす影響

(1) 連続暗期下での生残性

5°C、連続暗期下で配偶体を3か月培養したところ、雌性及び雄性配偶体の生残率は共に80%以上の高い値を維持していた(図1)。この間、葉緑体は細胞全体に分布しており、雌雄間に差は認められなかった。同条件で6か月間培養すると、細胞数の増加傾向が認められたものの、雌雄配偶体の平均生残率は68.4%に低下し、9か月目には40.0%まで低下した。その後時間が経過するほど生残率は低下した。6か月培養した配偶体の中には、葉緑体が細胞壁に沿って局在する細胞を持つものが観察され始めた。生残率の低下に伴い、雌雄配偶体共に葉緑体の縮小と局在および液胞の肥大化が顕著になった。9か月以上培養した配偶体において、それ以前に認められなかった葉緑体での強いROSの生成が認められた(図2)。また、1-6か月間連続暗期下で培養した配偶体のクロロフィル蛍光パラメーター F_v/F_m 値とNPQ値は、培養前とほぼ変わらなかったが、9か月培養した配偶体の F_v/F_m 値は培養開始時の約70%に、NPQ値は約50%に低下した(図3)。その後、両値は培養期間が長くなるにつれて徐々に低下した。同条件下で1-3か月培養した配偶体のY(II)値とrETR値はほとんど変化しなかったが、6か月培養すると低下し始め、12および16か月間培養したものはいずれも検出限界以下となった。連続暗期下で培養した配偶体の F_v/F_m 値とNPQ値は生残率との間に正の相関が認められたことから、配偶体の生残性を評価する指標としてクロロフィル蛍光パラメーター、特に F_v/F_m 値またはNPQ値が有用であることが分かった。また、連続暗期条件下で培養した雌性および雄性配偶体の中には、12か月間生残するものも存在していた。12か月間生存した雌雄配偶体をその後1か月間正常な成長が進行する光・栄養塩環境下で培養すると、正常に成長し、成熟・受精を経て孢子体が出現した。

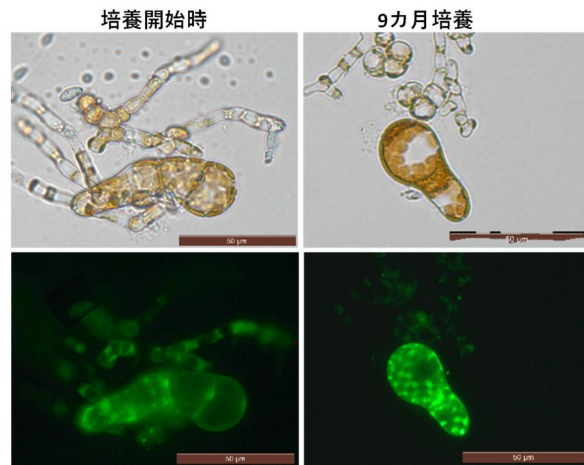


図2 低温(4°C)連続暗期下で9か月培養したマコンブ配偶体の明視野像(上段)と蛍光像(下段)。緑色蛍光:活性酸素種。スケールバー:50 μm

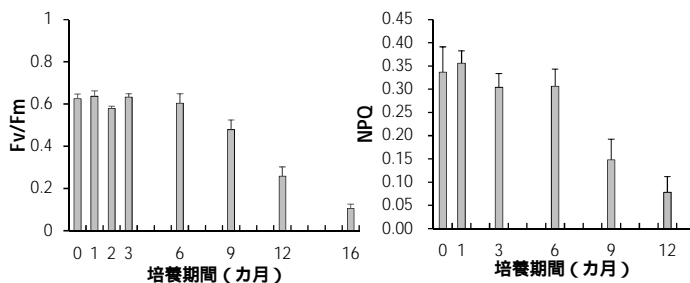


図3 低温(4°C)連続暗期下で培養したマコンブ配偶体のクロロフィル蛍光パラメーター(F_v/F_m 及びNPQ)の推移。データは平均値+標準偏差(n=4-6)で示す。

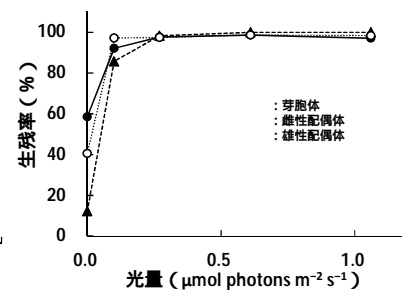


図4 異なる光量下で4か月培養したマコンブ芽胞体及び雌雄配偶体の平均生残率

(2) 低光量照射が微小世代の生残性に及ぼす影響

4か月の連続暗期培養では40~60%の雌雄配偶体が生残したものの、芽胞体の生残率は著しく低かった(約10%)。このことから、雌雄配偶体が芽胞体に比べ連続暗期に対する耐性が高いことが分かった(図4)。長日かつ高光量条件下で培養した雌雄配偶体は成熟し、その後受精を経て孢子体が出現したものの、その後栄養制限を受けて死滅した。一方、 $0.24 \sim 1.06 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光量条件下で培養した雌雄配偶体は95%以上の高い生残率を示した。この光量は、ジャイアントケルブ(*Macrocystis pyrifera*)雌性配偶体が10°Cで、年1回の換水を行った培養で少なくとも5年間生存したと報告している光量($5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)(Barrento et al., 2016)より1オーダー低い値であった。連続暗期下で培養した芽胞体は、脱色が進み、やがて全ての個体が死滅した。高光量($91.8 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)下で培養した芽胞体も脱色し死滅した。このことは、成長に十分な光量がある場合には、培地中の栄養分を吸収し尽くし、栄養制限を受けて脱色死滅したことを示している。一方、低光量($0 \sim 0.15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)での低い芽胞体生存率は、その生存にもある程度の光照射が必要であることを示している。以上のことから、配偶体の長期間にわたる生存には、 $0.27 \sim 1.06 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の極めて低い光量条件が好ましいと考えられた。一方、芽胞体は成長を抑えて長期生残する可能性があるが、光量の増加は即成長を導くことや、配偶体に比べ相対的な栄養要求性が高いため栄養塩の枯渇による枯死が起る可能性があることから、芽胞体が微視的サイズのまま生残するためには、上述した低光量条件と適度な栄養塩の供給が必要であると結論された。

4-2 配偶体新規加入量と生残に及ぼす成熟孢子体の影響

(1) 孢子体の細胞外ケイ酸態ケイ素取り込み機構

子嚢斑から遊走子を放出させた海水を濾過したものと、通常の濾過海水中でそれぞれ配偶体を培養したところ、前者の海水中で微生物の増殖が抑えられていた。このことは、子嚢斑組織から抗菌物質が放出されていることを示唆するものである。また、孢子体片を過酸化水素で処理し酸化ストレスを与えると、培地中のケイ酸態ケイ素濃度が減少し、孢子体が酸化ストレス下でケイ素を吸収することが明らかになった。このケイ酸態ケイ素の取り込みは、ヨードベルオキシダーゼ (IPO) 阻害剤である臭化カリウムにより阻害され、IPO が取り込みに深く関与していることが示された。さらに、取り込まれた R123 の蛍光は細胞外のアポプラスト領域において検出され、可溶性フロロタンニン画分と細胞壁結合フロロタンニン画分に配分されていた。このことは、細胞外に取り込まれたケイ素がフロロタンニンと架橋構造を構成し、組織の強化に寄与していることを示唆するものである。これらのことを踏まえ、孢子体にはオキシダティブバーストが起こるとフロロタンニンの存在下で IPO の作用を受けてケイ酸態ケイ素を細胞外に取り込み、細胞表面を強固にすることで様々なストレスに対する防御する仕組みを備えていることが提唱された (図5)。この機構は、他の部位に比べケイ素を高含有する子嚢斑で顕著に働き、子嚢斑内の遊走子保護機能を有していることを示唆するものである。加えて、細胞外の IPO の存在は、オキシダティブバーストで生成した ROS を用い、ヨウ化物を反応性次亜ヨウ素酸や分子状ヨウ素に酸化し、海水中への放出を引き起こしていると考えられ、それらの抗菌作用が、遊走子が着底し配偶体に分化するまでの間、生物ストレスからの保護に貢献していると考えられた。さらに、配偶体でも $0.14 \pm 0.00\% \text{DW}^{-1}$ ($n = 4$) のケイ素含有量を示したことから、配偶体でも類似のケイ酸態ケイ素取り込み機構が存在し、生残性に貢献していることが予想された。

(2) 被食に対する子嚢斑組織の抵抗性

エゾバフンウニに子嚢斑を有する孢子体ディスクを摂食させた後に排泄された糞中には子嚢斑組織が含まれ、生殖細胞である遊走子を作る遊走子嚢とそれを保護する側糸の構造がそのまま残っていた。消化管から回収した糞を培養したところ、配偶体だけでなく孢子体の発生する様子が観察された (図6)。放出された遊離遊走子由来の雌性配偶体では 1, 2 細胞で成熟するのに対し、ウニの糞からは多細胞の配偶体が多数観察された。これらの現象は、エゾバフンウニ

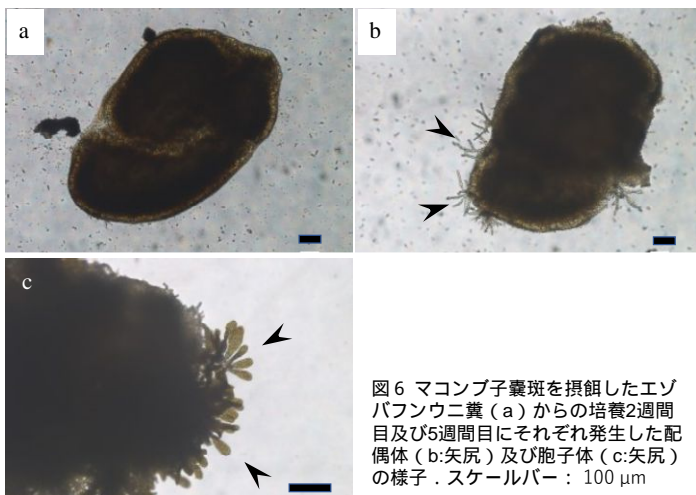


図6 マコンプ子嚢斑を摂餌したエゾバフンウニ糞 (a) からの培養2週間目及び5週間目にそれぞれ発生した配偶体 (b: 矢尻) 及び孢子体 (c: 矢尻) の様子。スケールバー: 100 μm

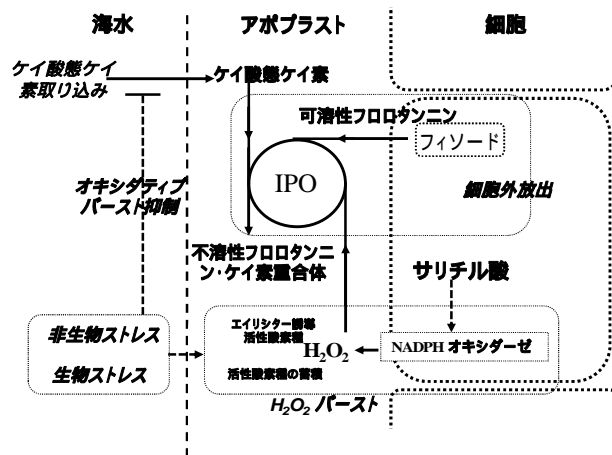


図5 コンブ孢子体のオキシダティブバースト依存性細胞外ケイ素取り込み機構

だけでなくキタムラサキウニでも高頻度で観察された。多細胞配偶体の出現は、より多くの孢子体を生産させることを可能とするだけでなく、時間的な遅延も生じさせ、多様な孢子体再生産パターンの存在が予想された。以上のことから、子嚢斑はウニなどの植食性動物の摂餌に対する抵抗性を持ち、微小世代の新規加入量を維持する仕組みを有していると結論された。また、植食性動物の摂餌に対する高い抵抗性を支える主要な機構の1つに、図5で示したオキシダティブバーストで誘導される細胞外ケイ素取り込み機構があると考察された。

(引用文献)

- Barrento, S., C. Camus, I. Sousa-Pinto and A. H. Buschmann (2016) Germplasm banking of the giant kelp: Our biological insurance in a changing environment. *Algal Res.*, **13**, 134-140.
- Mizuta H. and Yasui H. (2012) Protective function of silicon deposition in *Saccharina japonica* sporophytes (Phaeophyceae). *J. Appl. Phycol.*, **24**:1177-1182.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizuta Hiroyuki, Uji Toshiki, Yasui Hajime	4. 巻 58
2. 論文標題 Extracellular silicate uptake and deposition induced by oxidative burst in <i>Saccharina japonica</i> sporophytes (Phaeophyceae)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 102369 ~ 102369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.algal.2021.102369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uji Toshiki, Mizuta Hiroyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 The role of plant hormones on the reproductive success of red and brown algae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 01-08
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.1019334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------