

Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B, 12 (3), pp. 107-115, September 22, 1986

Planctonema lauterbornii SCHMIDLE における 糸状体制の形成

渡辺眞之¹・堀 輝三²・秋山 優³

Studies on the development of filament organization
in *Planctonema lauterbornii* SCHMIDLE

by

Masayuki WATANABE¹ · Terumitsu HORI² · Masaru AKIYAMA³

¹国立科学博物館植物研究部 Department of Botany, National Science Museum, Sakura-mura, Ibaraki-ken 305. ²筑波大学生物科学系 Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Sakura-mura, Ibaraki-ken 305. ³島根大学教育学部生物学教室 Department of Biology, Faculty of Education, Shimane University, Matsue 690.

Abstract The process of filament development in the planktonic alga *Planctonema lauterbornii* has been studied by light and electron microscopy. Following cell division, the two new (daughter) cells produce a new cell wall inside the mother cell wall, and the daughter cells then elongate causing disruption of the mother cell wall ends. As the daughter cells lengthen, they become separated from each other by the secretion of mucilaginous material in the space between them, and this continues until the ends which had previously been adjacent to each other become coincident with the rims of the open ends of the mother cell wall. Continued repetition of this process ultimately leads to the formation of long filaments consisting of alternating cells and mucilage-filled tubes or sheaths. The walls are covered externally by a thin layer of mucilaginous material which seems to contribute to the maintenance of filament organization.

Pigment analysis and the ultrastructural features of the chloroplast confirmed the green algal status of *P. lauterbornii*. It was shown that this species contains chlorophylls *a* and *b*, but not *c*, and possesses chloroplasts having a double membraned envelope, no chloroplast endoplasmic reticulum, lamellae composed of many fused thylakoids, starch grains present in the chloroplast matrix and pyrenoids of a type found in the green algae.

Planctonema lauterbornii SCHMIDLE は西ドイツの Mannheim の近くで LAUTERBORN 博士によって採集されたプランクトン試料中から SCHMIDLE (1903) によって発見され、不等毛類 (Heterokonten) の *Gloeotila* BORZI に近縁の新属新種として命名された。PASCHER (1925, 1939) はこの藻が不等毛類ではなく、緑藻類の *Stichococcus*, *Gloeotila*, *Dactylothece*, *Hormococcus*, *Dendronema*, *Pseudothrix* などと共に当時不明の点の多かったヒビミドロ目に所属するものとの考えをもちながらも、

命名者の考えを覆すほどの確かな証拠がなかったために、これらの属の再検討の必要性を指摘しただけでそのまま不等毛類の中においた。WILLE (1909) は *Planctonema* を含む上記の属のほとんどを *Stichococcus* に含めてしまった。その後 PRINTZ (1927) もこの藻を一時的に *Stichococcus* の異名とし、SKUJA (1956) はそれを *Binuclearia* と 2, 3 の *Ulothrix*, 特に *U. moniliformis* と近縁のものと考えた。このような経過をへた現在、数少ない例外 (HORTOBÁGYI, 1959) を除いて、*Planctonema* を *Gloeotila* と同様、緑藻ヒビミドロ科に所属する、*Binuclearia*, *Geminella* に近縁の藻と看做するのが一般的である (HINDÁK, 1962; BOURRELLY, 1966; STARMACH, 1972; 広瀬・山岸, 1977; Ettl, 1980)。

Planctonema は直径 2~3 μm , 長さ 4~9 μm の楕円体または両端の丸い円筒形の細胞によって形成される糸状の繊細な藻である。光学顕微鏡で形態の細部を観察するには藻体が小さく、加えて観察例が少ないことからこの藻についての形態学的知識は依然極めて不十分である。従って、それを緑藻の一員であると考えるのが正しいとしても、緑藻の中での分類学的位置に関して既に示されたいくつかの考えも仮説の域を出ないものである。過去に本種として報告されたものについて、BOURRELLY (1962) は粘質鞘とピレノイドの有無などによって 3 つの分類群を設けることを提案したが、芳賀 (1970) は我々の知識が不十分であるという理由でその考えに反対している。以上に述べた通り本種には形態学的、分類学的に未解決の問題が残されている。

我々は *Planctonema* の形態学的ならびに生態学的性質を調べるため、島根県の宍道湖と茨城県の霞が浦から藻を分離、培養した。ここでは原記載以来深く検討されることのなかった糸状体制の形成の様式について、主として光学顕微鏡による観察の結果と、葉緑体およびピレノイドの微細構造ならびにクロロフィルの定性の結果からこの藻が緑藻の一員であることを再確認できたことを合わせて報告する。

材料と方法

光学顕微鏡による観察には 1980 年 2 月、茨城県の霞が浦の湖心で採集、分離した培養株を C 培地 (ICHIMURA, 1971) で培養した試料を用いた。電子顕微鏡による観察には上記霞が浦産の試料と 1975 年 12 月、島根県の宍道湖で採集、分離した培養株を産地の水を使って調製された IAM collection 寒天培地 (田宮・渡辺, 1965) で培養した試料を用いた。

TEM 像観察用の試料作製は次のように行なった。宍道湖産株: 5% グルタルアルデヒド液 (0.1 M のリン酸緩衝液 pH 7.1 で稀釈) 中で 2 時間前固定した後、同緩衝液で 2 時間洗滌し (数回交換)、次いで 2% 四酸化オスミウム液で 6 時間、後固定した。通常のエタノール・シリーズで脱水の後、エポキシ樹脂に包埋した。切片に酢酸ウラン・鉛の二重染色を施した後観察した。霞が浦産株: 0.21 M の蔗糖を含む 4% グルタルアルデヒド液 (0.1 M カコジレート緩衝液 pH 7.1 で稀釈) 中で 3 時間前固定した後、順次蔗糖を減じながら同上緩衝液で洗い (2 時間)、2% 四酸化オスミウムで 14 時間、後固定した。脱水にかかる前に、酢酸ウランの飽和水溶液中で 6 分間ブロック染色した後、エタノール・シリーズで脱水し、Spurr 樹脂に包埋した。切片に鉛染色を施した後観察した。

SEM 像観察用試料については、培地を基礎とする 3% グルタルアルデヒド処理後、さらに培地によって水洗を行ない、2% 四酸化オスミウムによる二重固定を行なった。材料にはさらに水洗を行ない、エタノールによる脱水、酢酸イソアミルによる置換、臨界点乾燥を行ない、その後イオンスパッタリング法による白金の蒸着を施した。

クロロフィル組成の調査には霞が浦産の株を 20°C で培養して試料とし、メタノールで抽出後、アセトンを展開溶剤とするペーパークロマトグラフと分光光度計による 400~700 nm での吸収スペクト

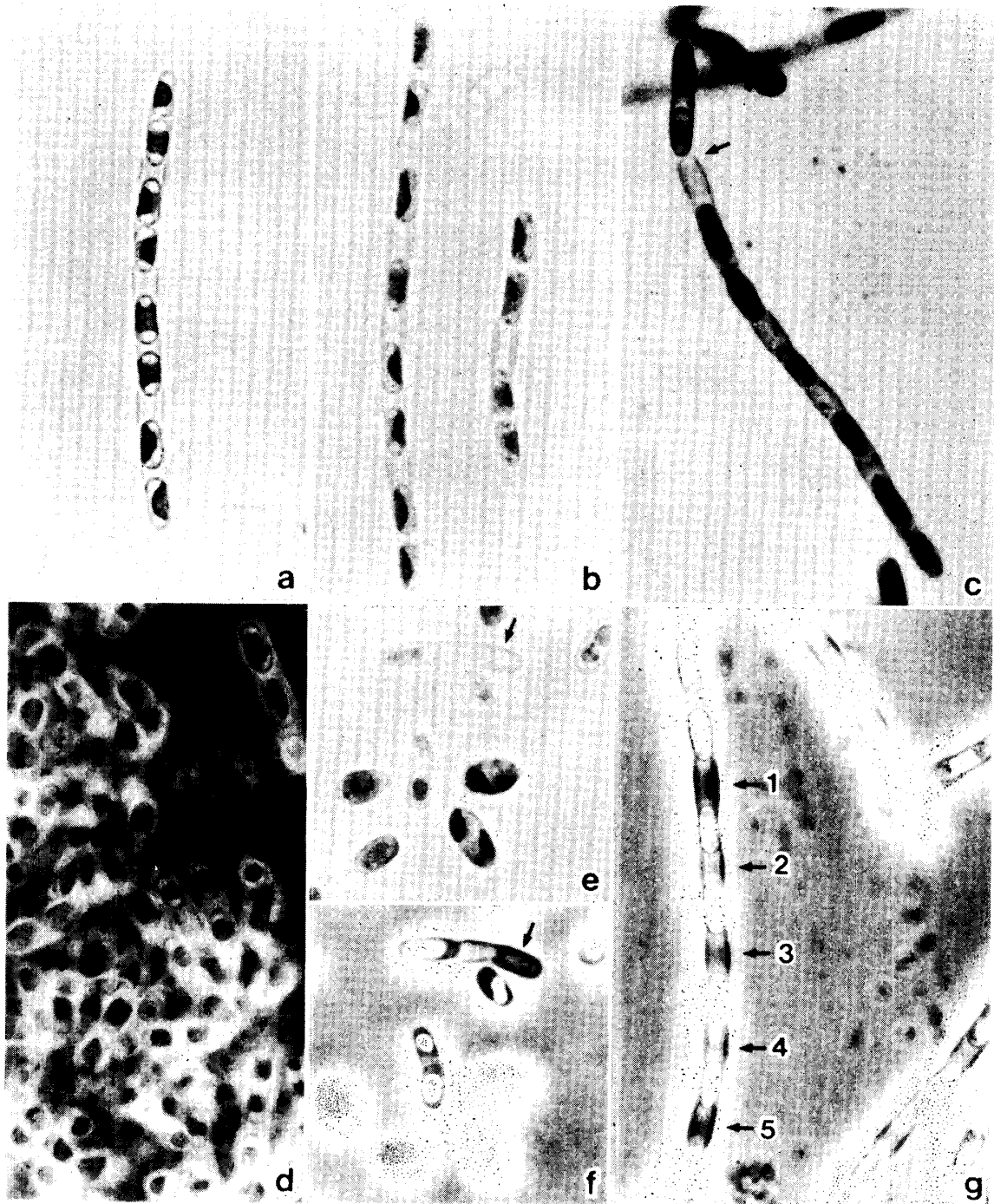
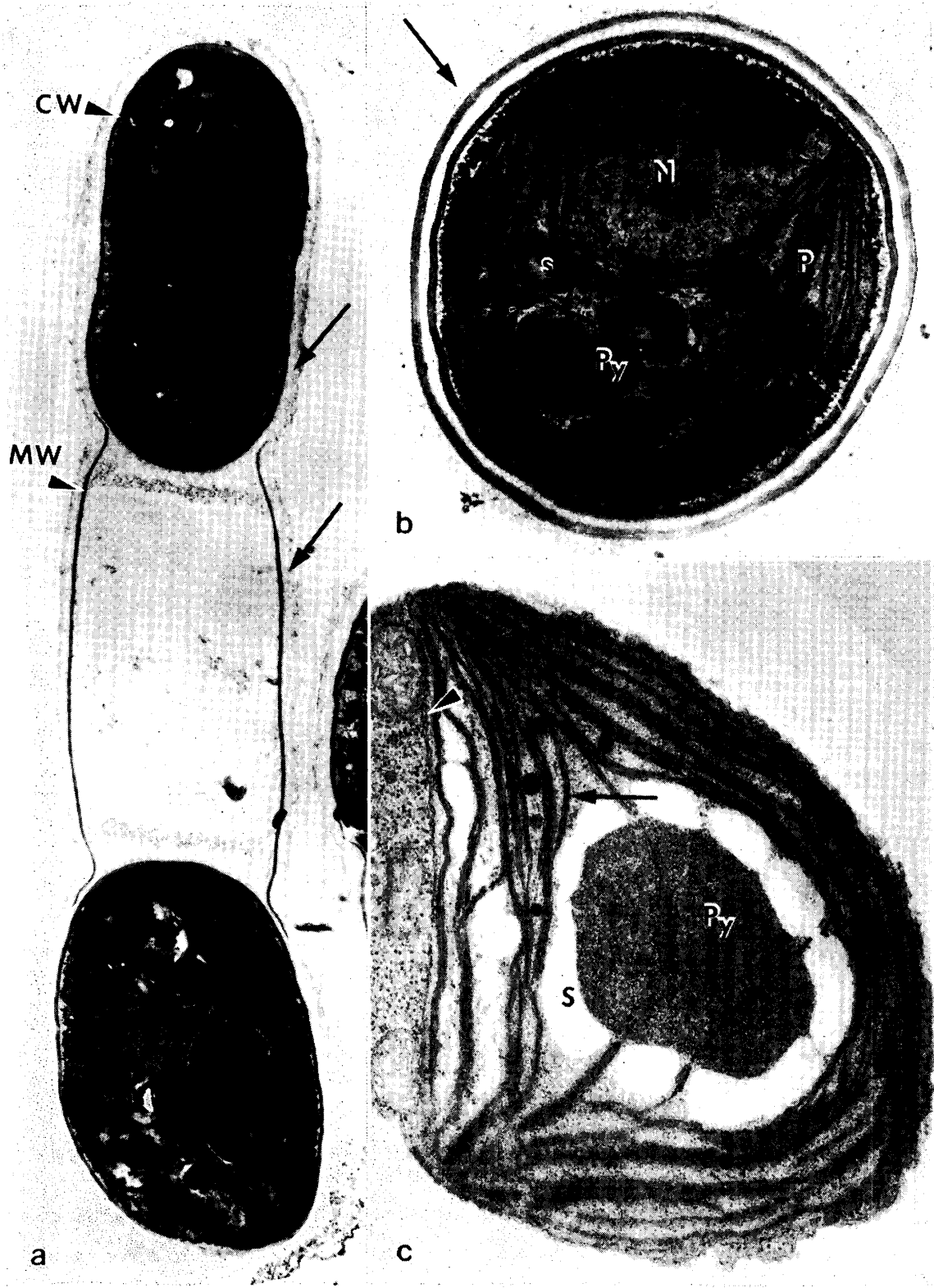


Fig. 1. LM micrographs of *Planctonema lauterbornii* SCHMIDLE. $\times 1,000$. a, b. Typical filament organization. c. A filament dyed with methylene blue. The open-ended sheath (arrow), does not contain the included granules detectable in other parts of the filament where the sheaths remain closed. d. Cells mounted in Indian ink showing the thin mucilaginous superficial layers. e. Cells cultured at 30°C . Some cells produce a new wall repeatedly, but with no cell division; eventually the older cell walls are shed. f. Phase contrast photograph of (e). The older walls show more contrast. g. Phase contrast photograph of filaments. The order of contrast among sheaths is: $1 \cong 5 \cong 3 > 4 = 2$.



ルの測定を行った。

結果と考察

糸状体制の形成

この藻の主要な形態的特徴は、無色透明の薄膜状の細長い鞘の内部に両端の丸い円筒形の細胞が規則的に配列することにある (Fig. 1a, b)。SCHMIDLE (1903) は本藻の増殖について、2 分裂後の細胞が恐らく粘液を分泌することによって鞘の内部を移動して互いに分離すると記している。しかしながら、この鞘がいつ、いかなる方法で伸長するかについては何も述べていない。

Fig. 1c はメチレンブルーで染色した藻体で、鞘が細胞間の空隙の部分で樽形に多少肥大していること、その空隙の部分に染色された顆粒が存在することがわかる。糸状体の切れた部分 (矢印) に注目すると、鞘の先端は細胞壁が H-piece を作ることで知られる不等毛類の *Tribonema* や緑藻類の *Microspora* の糸状体の切れ目のように見え、開口した鞘の空隙部は閉じたそれより光の透過度が高く、かつ顆粒が認められない。これらの観察は鞘の内部に充満していた液状の物質が開口部から漏れ出てしまったことを示している。Fig. 1g は位相差像で通常の顕微鏡では一様な細長い鞘に見えた構造が、光学的性質の異なるいくつかの部分によって構成されていることを示している。細胞の入っていない鞘の部分の濃度に段階的变化が認められる。Fig. 1e は 30°C で培養したもので、藻は糸状体を形成せず、単細胞ないし数細胞の状態が存在する。この図には細胞が分裂することなく、古い鞘の内側に新しい鞘を作っては古いその一端から抜け出した状態のものが見られる (Fig. 1e 矢印)。同じ試料を位相差装置によって観察すると、古い鞘はより濃く見える (Fig. 1f)。そこで再び Fig. 1g を見ると鞘は濃い部分 (1)、淡い部分 (2, 4)、それらの中間の部分 (3, 5) からなっていることがわかる。従って、これら細胞を介して連続する 5 つの鞘は、1→3, 5→2, 4 の順に新生されたものであると推定される。

以上の結果を総合すると、SCHMIDLE (1903) の原記載以来一続きの細長い鞘とされていたものは、実際細胞と細胞の間を橋のように連結する短い鞘であることが強く示唆される。また、その長さが細胞の長さにはほぼ等しいことから、これらの短い鞘は母細胞壁に由来すると考えるのが合理的であろう。そこで、このことを確かめるため本藻を電子顕微鏡で観察した。Fig. 2a から分るように、電子密度の高い細胞壁でつまれた 2 個の細胞の、他の細胞に面した側のそれぞれの末端が、同じ電子密度を示す 2 枚の壁構造に接している。細胞間の空隙部分の壁の厚さは細胞体をつつんでいる壁に比べて僅かに薄いが、両者が同一構造物であることは明らかである。空隙部分の古い細胞壁は独立した 2 枚の壁のように見えるが、両者が管状壁の側面であることは、横断像 (Fig. 2b) によっても明らかである。以上のことは、光顕観察から示唆される“短い鞘”が母細胞壁であることを明瞭に示している。細胞分

Fig. 2. TEM micrographs of *Planctonema lauterbornii* SCHMIDLE. a. A longitudinal section through two daughter cells which are interconnected by both the mother cell wall (MW) and a layer of mucilaginous material (arrows). CW, daughter cell wall. $\times 11,000$. b. A cross section of a cell (through the plane indicated by arrow in Fig. 4d) which is surrounded by the new (inner) and mother (outer) cell walls. Over the outer surface of the latter a layer of mucilaginous material (arrow) is seen. N, nucleus; P, chloroplast; Py, pyrenoid matrix; s, starch grain. $\times 22,000$. c. A chloroplast showing features typical of the green algae: a double-membrane envelope (arrowhead), switching of lamellae between thylakoids (arrow), a starch sheath (S) around the pyrenoid matrix (Py) which is traversed by two thylakoid-bands. No chloroplast endoplasmic reticulum is present. $\times 31,000$.

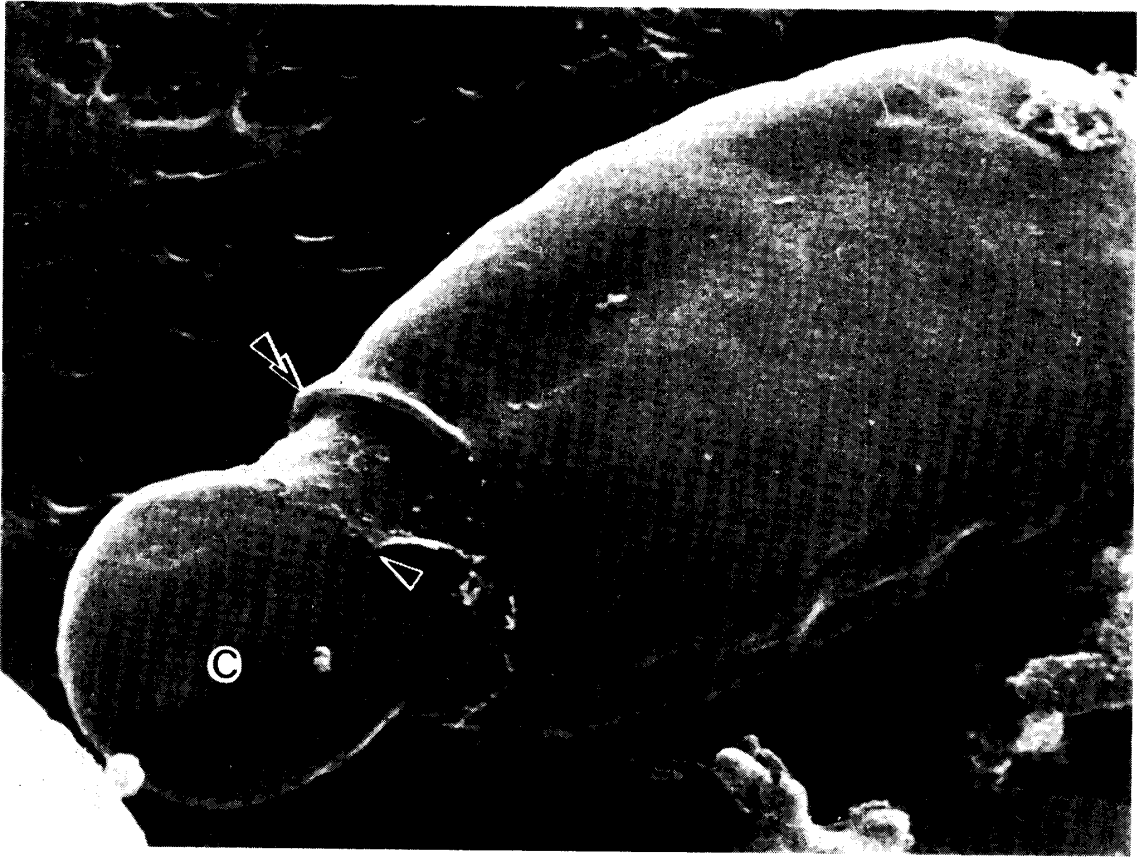


Fig. 3. SEM micrograph of *Planctonema lauterbornii* SCHMIDLE. A portion of a daughter cell (C) appears through the open mother cell wall (double-arrowhead). Both the proximal part of the daughter cell and the mother cell wall are covered with a layer of mucilaginous material (arrowhead). $\times 17,000$.

裂の完了後、2 個の娘細胞は生長しながら互いに反対方向に移動して母細胞壁を破る。しかし母細胞壁から完全に抜き出すことはなく、その末端にとどまり連鎖を形成する。

過去の報告には細胞とそれらを連結する鞘の外側に粘質鞘の存在を認める例 (SCHMIDLE, 1903; SCHRÖDER, 1917; BOURRELLY, 1962) とそれを認めない例 (SKUJA, 1956; 芳賀, 1970) が知られる。BOURRELLY (1962) は SCHMIDLE (1903) の藻を何故か粘質鞘を持たない例として挙げているが、SCHMIDLE 自身は図の説明において“糸状体は繊細なゼラチン質の鞘におおわれているように見える”と記述している。霞が浦産の株を墨汁でマウントし光学顕微鏡で観察してみたところ、かすかにではあるが粘質層が認められた (Fig. 1d)。これを電子顕微鏡で観てみると高い電子密度を示す細胞壁の外側に比較的均一な厚さ (約 180 nm) の細繊維性の物質からなる層が存在する (Fig. 2a)。この層が粘質鞘に相当すると思われる。本層は細胞体と細胞間の空隙部分の古い細胞壁との両方にまたがった連続した層として存在している (Fig. 2a, 3)。これによって空隙部分の古い細胞壁と細胞体とが撃ぎ止められ、糸状体制を維持することができる。従ってこの粘質鞘は *Planctonema* の糸状体制の保持には欠くことのできない構造で、BOURRELLY (1962) が提案したように、この粘質鞘の有無を種あるいはそれ以下の分類群の表徴として用いることはできない。しかしながら粘質鞘の厚さの違いが環境要因の違い

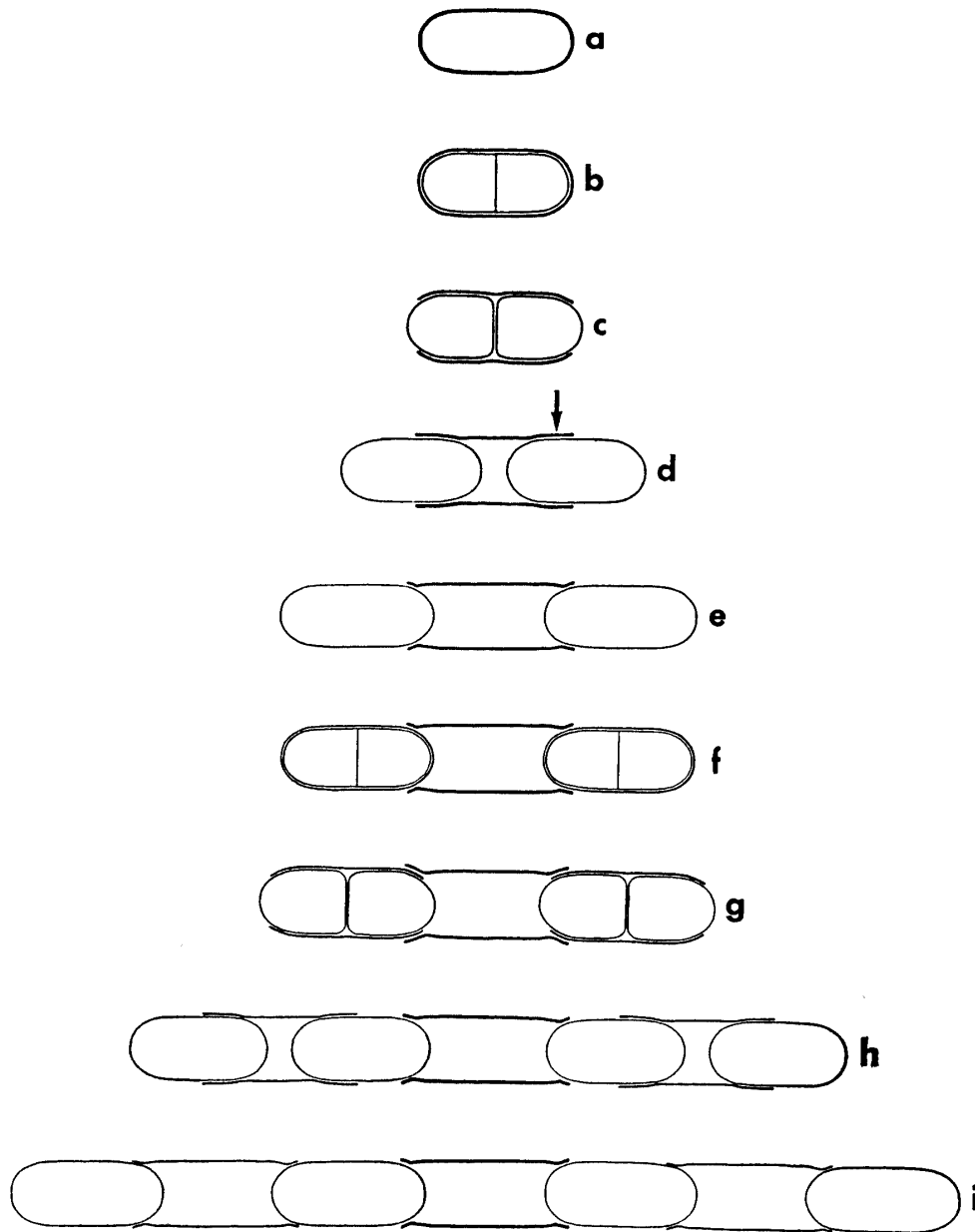


Fig. 4. Diagrammatic representation of the development of filament organization in *Planctonema lauterbornii* SCHMIDLE. a. An initial cell. b. Cell division and new wall formation. c. Elongation of daughter cells and disorganization of the ends of the mother cell wall. d. Elongation and separation of daughter cells. (arrow: see Fig. 2b). e. Completion of elongation and separation. The initial cell wall (a) has become a connecting sheath (or tube) between the daughter cells. f to i=a to e.

によってもたらされたものか、固定、染色などの人為的要因によって生じたものか、あるいはそれぞれの藻に固有の性質なのかなどの問題は今後明らかにされるべき課題である。

そこで Fig. 4 に示すような細胞の 2 分裂と新しい鞘のでき方を仮定すると上記の観察の結果を矛盾

なく一連の現象として説明できる。Fig. 4においてひとつの細胞から出発して *Planctonema* の糸状体制が形成される過程を説明すれば以下の通りである。1. 母細胞の内部に新しい細胞壁をもつ 2 つの娘細胞が形成される (b)。2. 娘細胞の伸長に伴って母細胞の両端が開口する (c)。3. 娘細胞はさらに伸長を続けると同時に先端から粘液を分泌することによって互いに離れ、母細胞壁に由来する鞘の先端に達するまで移動する (e)。この過程を繰り返すことによって長い糸状体が形成される (f~i)。ここに明らかにされた糸状体制形成の様式はこれまで知られるいかなるものとも異なるもので、*Binuclearia* などに見られる母細胞壁の側部が開裂するものを側部開裂型式 (lateral lysigenous type) と呼ぶなら、*Planctonema* のそれは両端部開裂形式 (terminal lysigenous type) と呼ぶことができる。

Planctonema を緑藻の一員と看做す 2, 3 の証拠

図 2c に本藻の葉緑体を示す。その微細構造的特徴をあげると、1. 二重膜性の葉緑体包膜の外側に葉緑体 ER が存在しない、2. チラコイドは 2~数層の、互いに密着した集合を示し、かつ一方から他方への移行が頻繁に見られる、3. 周縁チラコイド (girdle thylakoids) が存在しない、4. ピレノイド基質の周りにデンプン鞘が存在する、5. 2~3 のチラコイド束がピレノイド基質を貫通する、等である。これらはいずれも緑藻類の葉緑体に典型的な特徴である (DODGE, 1973; HORI, 1973)。

本藻のクロロフィル組成を調べるため、アセトンを展開溶剤とするペーパークロマトグラフを行なったところ、クロロフィル a (0.30) および b (0.20) に相当する Rf 値のスポットが出現した。原点にスポットが認められないのでクロロフィル c は存在しないと考える。また、クロロフィルの相対量を知るため、メタノール抽出液の吸収スペクトルを分光光度計で測定した。650 nm と 665 nm での吸光度 ($D_{650}=38$, $D_{665}=87$) から MACKINNEY (1941) の計算式によって計算したところクロロフィル a と b の相対量は 5.7 対 1 であった。これらの事実は葉緑体の微細構造的特徴とともに、本藻が緑藻類の一員であることを明白に示している。

以上、本研究の成果は *Planctonema* を緑藻類の一員と看做す考えに根拠を与えたが、緑藻内での分類学的位置については、*Planctonema* に見られる糸状体制形成の様式が他に類似の例を見ないものであるために、目下のところ比較検討が不可能である。この点に関しては、細胞分裂の様式の詳細や細胞壁物質の分析の結果が明らかになった段階であらためて検討する予定である。

謝 辞

走査型電子顕微鏡による観察にあたって、多くの便宜を与えられた鳥取大学医学部田中敬一教授ならびに多くの技術的御協力を賜った同医学部第二解剖学教室福留初子博士に感謝の意を表わす。また、クロロフィルの組成を確認するための実験は国立公害研究所客員研究員佐々 勤博士と国立科学博物館筑波実験植物園岩科 司博士の協力と指導を得て行なわれた、記して御礼申し上げる。英文の校閲をしていただいた Dr. J. C. GREEN, Marine Biological Association of the United Kingdom, Plymouth に感謝する。

引用文献

- BOURRELLY, P., 1962. Ulotrichales d'eau douce rares ou nouvelles. *Phykos*, 1: 29-35.
 ———, 1966. Les algues d'eau douce. Tome I. 511 pp., Boubée, Paris.
 DODGE, J. D., 1973. The fine structure of algal cells. 261 pp., Academic Press, London.
 Ettl, H., 1980. Grundriss der allgemeinen Algologie. 549 pp., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
 芳賀 卓, 1970. 北海道淡水産緑藻, ヒビミドロ科の 3 種について. 藻類 18: 131-136.

- HINDÁK, F., 1962. Beitrag zur Phylogense und Systematik der Ulothrichales. *Biologia* (Bratislava), **17**: 641-649.
- 廣瀬弘幸・山岸高旺(編), 1977. 日本淡水藻類図鑑. 933 pp. 内田老鶴圃新社, 東京.
- HORI, T., 1973. Comparative studies of pyrenoid ultrastructure in algae of the Monostroma-complex. *Jour. Phycol.*, **9**: 190-199.
- HORTOBÁGYI, T., 1959. Algák a Balatonból. *Annal. Biol. Tihany*, **26**: 329-342.
- ICHIMURA, T., 1971. Sexual cell division and conjugation-papilla formation of *Closterium strigosum*. Proc. VIIth Internatl. Seaweed Symp.: 208-214.
- MACKINNEY, G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Jour. Biol. Chem.*, **140**: 315-322.
- PASCHER, A., 1925. Heterokontae. In A. PASCHER (ed.) Die Süßwasser-Flora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz 11, 118 pp. Gustav Fischer, Jena.
- , 1939. Heterokonten. In L. RABENHORST (ed.) Kryptogamenflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz 11, 1092 pp. Leipzig.
- PRINTZ, H., 1964. Die Chaetophorales der Binnengewässer. *Hydrobiol.*, **24**: 1-376.
- SCHMIDLE, W., 1903. Bemerkungen zu einigen Süßwasser-algen. *Ber. dtsh. bot. Ges.*, **21**: 346-355.
- SCHRÖDER, B., 1917. Phytoplankton aus dem Schlawasee. *Ber. dtsh. bot. Ges.*, **35**: 681-695.
- SKUJA, H., 1956. Taxonomische und Biologische Studien über das Phytoplankton schwedischer Binnengewässer. *Nov. Act. Reg. Soc. Ups. Ser. 4*, **16**: 1-404.
- STARMACH, K., 1972. Flora Slodkowodna Polski Tom 10, Chlorophyta III. 750 pp., Polska Akademia Nauk.
- 田宮 博・渡辺 篤(編), 1965. 藻類実験法. 455 pp., 南江堂, 東京.
- WILLE, N., 1909. Conjugatae und Chlorophyceae. In ENGLER u. PRANTL, Natürl. Pflanzenfam., Nachträge zum I Th., 2 Abt. Lfg. 236-237, pp. 1-136, Leipzig.