

大型海藻類細胞生物学事始@菅島臨海実験所

○白江-倉林 麻貴

生物・生体技術支援室 生物機能解析・実験実習技術グループ

概要

名古屋大学大学院理学研究科附属臨海実験所（菅島臨海）において、海藻を生物学実験対象とするための基礎研究をおこなった。まず菅島臨海周辺の花藻を網羅的に採取し、分類した。次にこれらの海藻を切断してその応答を観察した。さらに一部の海藻については蛍光色素で核と細胞壁を染色し、共焦点顕微鏡で切断応答のタイムラプスイメージングをおこなった。以上の結果を論文にまとめ、発表した^[1]。また研究室内で長期維持が可能だった5種類の花藻について継代培養を試みており、3種で世代を回すことに成功した。現在これらの海藻をモデル海藻として確立するため、無菌・滅菌培養を試みている。その概要を記載する。

1 背景

名古屋大学大学院理学研究科附属臨海実験所（菅島臨海）は1939年に元は医学部から設立されており、半世紀以上の歴史がある。菅島臨海は2020年に改組して現在5つの研究チームがあり、筆者はこのうち海藻細胞生物学チームに所属している。（もう1人の技術職員である福岡技師は、海洋調査チームとして海水温、塩濃度や海藻のモニタリング調査、海産動物の採集などを行っている。）筆者は、五島剛太所長から海藻に関する実験系の開発を依頼された。しかし、開所以来、菅島臨海で海藻を用いた研究が行われた例は無く、所長を含め教員・技官ともに海藻を扱うのは初めてのことだった。そこでまず、初動の2年で菅島臨海周辺に生息する海藻の調査と海藻培養系の確立を行い、一方で細胞生物学的アプローチを試みることにした。



図.1 菅島臨海外観

2 採集と同定

2020年と2021年、3月の干潮時を中心に、実験所周辺の採集調査を行った。海藻は、実験所の西側、東側の磯の他に浮棧橋や、ポンプで引き入れた海水を溜めてある屋外水槽で見られた。海藻は外見で茶色い褐藻、赤い紅藻、緑の緑藻に分けられ、基部・葉状部・生殖器官の形態、分枝の様子から手触りまで様々な外観的特徴でおおよその種や属に分けることができた。しかし外見だけでは分からない種も多く、そのような場合には18S rDNAや*rbcl*遺伝子の塩基配列解析を行った。結果的に、今日までに菅島臨海付近で68種の花藻が採取できた。



図.2 採取された海藻の一部

3 切断応答実験

次に、採取した海藻を切断して応答の様子を観察する実験を行った。古い論文では1974年に、カザシグサという紅藻を用いて海藻切断後の再生が報告されている^[2]。この実験では、藻体の後方を切断すると切断面から細胞が伸長し仮根が生じた。一方で先端に近い部分を切除すると、その切断面には芽体が生じることが報告された。このような海藻の切断応答について、最新の分子生物学的手法を用いて研究した論文はない。そこで筆者らは採取した海藻のうち66種について同様の切断実験を行った。



図.3 海藻の切断応答 ([1]より改変)

今回の実験系では、褐藻では切断応答は23種中2種のみで観察され、一方紅藻や緑藻では芽体や仮根形成が多く見られた。さらに、一部の緑藻では非常に素早く、1日で胞子を作って飛び出し抜け殻になるといった反応(胞子化)も見られた。

4 ライブイメージング

次に切断応答における細胞の様子を観察するため、ライブイメージングを試みた。顕微鏡で細胞を観察するために、polydimethylsiloxane (PDMS) 装置を作製した。元々五島所長がヒメツリガネゴケというコケの細胞観察に用いていた装置であり^[3]、部分的に15µmほど凹ませたシリコン型を薄いガラス板に貼り付け、ガラスとシリコンの15µmの隙間に海藻を注入して観察することができる。今回4種の藻体をPDMS装置に挿入して切断応答を観察することに成功した。本稿ではそのうちダジアとミルについて結果を記載する。

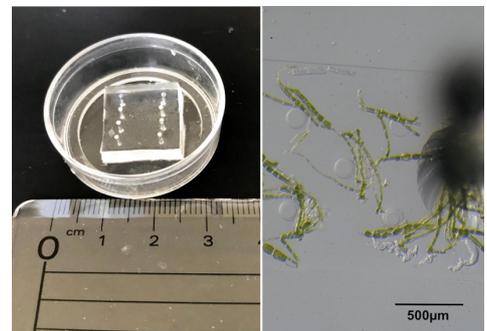


図.3 PDMS装置^[1]

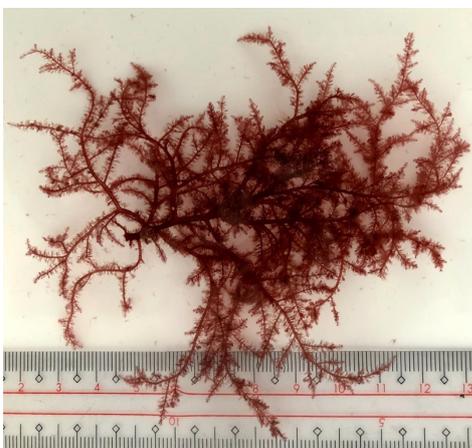


図.4 ダジア (Dasya sp., 左) とミル (Codium fragile, 右) ^[1]

4.1 ダジア (*Dasya* sp.) の切断応答

紅藻ダジアは多核体であり、一つの細胞が多くの核を持つ。この茎や葉を切断すると数日で芽や根が伸長した。さらに葉を切断してヘキスト 33342 という蛍光色素で細胞壁と核を染め、PDMS 装置に注入して、共焦点顕微鏡でタイムラプス観察をした。切断面の細胞は死に、その隣接細胞が伸長し、この細胞内の数個の核が同調して分裂し、核分裂と同時に隔壁が生じ、細胞が分裂する様子を観察する事ができた。

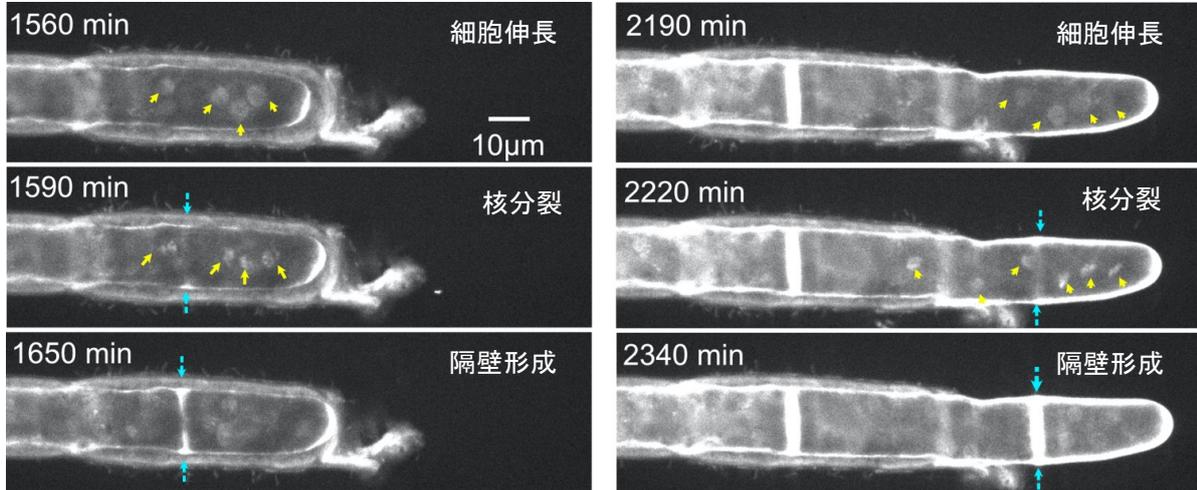


図.5 ダジア (*Dasya* sp.) の切断面応答 (禍根形成) のタイムラプス^[1]

4.2 ミル (*Codium fragile*) の切断応答

緑藻ミルは多核嚢状体という体制をとり、細胞を分けるような隔壁が見当たらないことから、一つの個体が一つの細胞であると見なされている。一つ一つの枝をほぐしてみると、小嚢と髄糸と呼ばれる組織からなる。ほぐした藻体をシャーレで維持して3週間ほど経つと、小嚢は退縮して髄糸(糸状の藻体)だけが伸びるようになる。この状態で半永久的に培養が可能である。この藻体を切断すると、どこを切っても芽体が生じた。そこでこの芽体形成をヘキスト 33342 で染めて、タイムラプスで観察した。

まず、切断面は速やかに閉じる事が分かった。細胞内では常に原形質流動が起こっていた。切断後しばらく経つと、切断面から少し離れた側部に隆起が生じた。原形質流動は継続しているがその中で隆起に核が集中し始め、さらに隆起が伸長して核や色素体流れ込んだ。ダジアとは異なり、芽体形成時、形成場所付近での核分裂は観察されなかった。

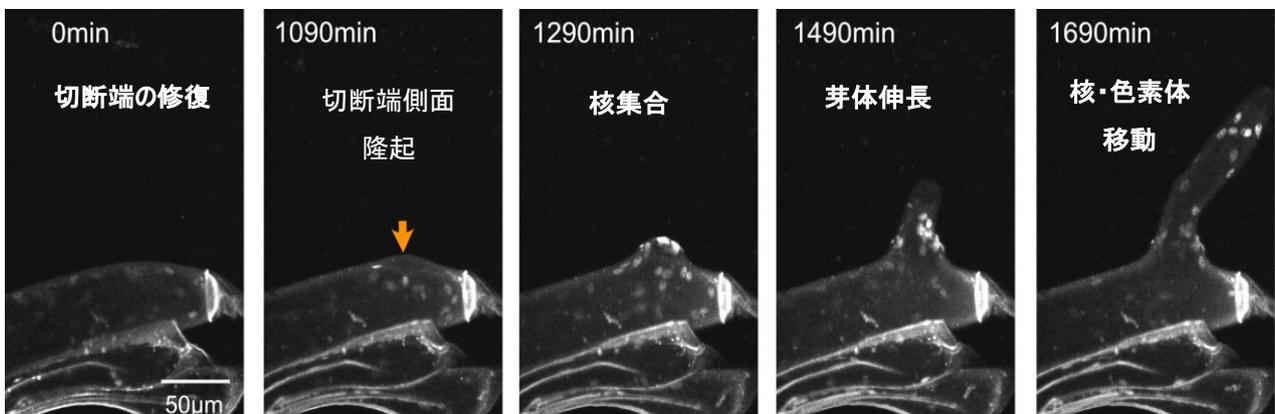


図.6 ミル (*Codium fragile*) の切断面応答 (禍根形成) のタイムラプス^[1]

この他にシオグサ (*Cladophora* sp.)、コラコネマ (*Colaconema* sp.) のタイムラプスイメージングに成功したが、切断応答時の核分裂や隔壁形成のタイミングなどは種ごとに異なり、共通の傾向は見当たらなかった。

以上の海藻採集から細胞イメージングまでの結果を論文にまとめ、科学雑誌 PLOS ONE に発表した^[1]。

5 継代培養

研究室内で効率的に培養し、世代交代を管理することは実験生物において必須である。そこで次に、室内で海藻の世代を回すことを試みた。海藻はシャーレで静置や振盪を試み、また丸型フラスコでの通気培養も試みた。日照・日長、温度の条件を検討した。(現在実験所は 15°C、20°C、22-25°Cでの培養が可能な環境にある。) その結果、ハネモ (*Bryopsis* sp.)、ダジア、コラコネマの3種で世代を回すことに成功した。

本稿では一例としてダジアを挙げる。ダジアは磯の潮下帯や屋外水槽で採取できた。採取した藻体は孢子体(核相 2n)と配偶体(核相 n)だが、外観は非常に似通っており、区別がつかない。しかしそれぞれが四分孢子囊と果孢子囊という、形状の異なる生殖器官を持つことから見分ける事ができた。筆者が見る限りダジアは雌雄同体で、一配偶体は精子囊と果孢子囊両方を持ち、自家受精が可能であった。従ってこの配偶体を水槽内で維持すれば自然に受精して果孢子囊に果孢子が生じ、果孢子囊からこぼれ落ちてくる果孢子を採取できる。果孢子を培養すると孢子体として成長し、22-25°C下1カ月ほどで成熟し、四分孢子囊を持った。そこから四分孢子が採取でき、これを育てると成長してやはり1ヶ月ほどで配偶体として成熟することが分かった。現在、さらに短い期間で世代交代ができないか条件を検討している。

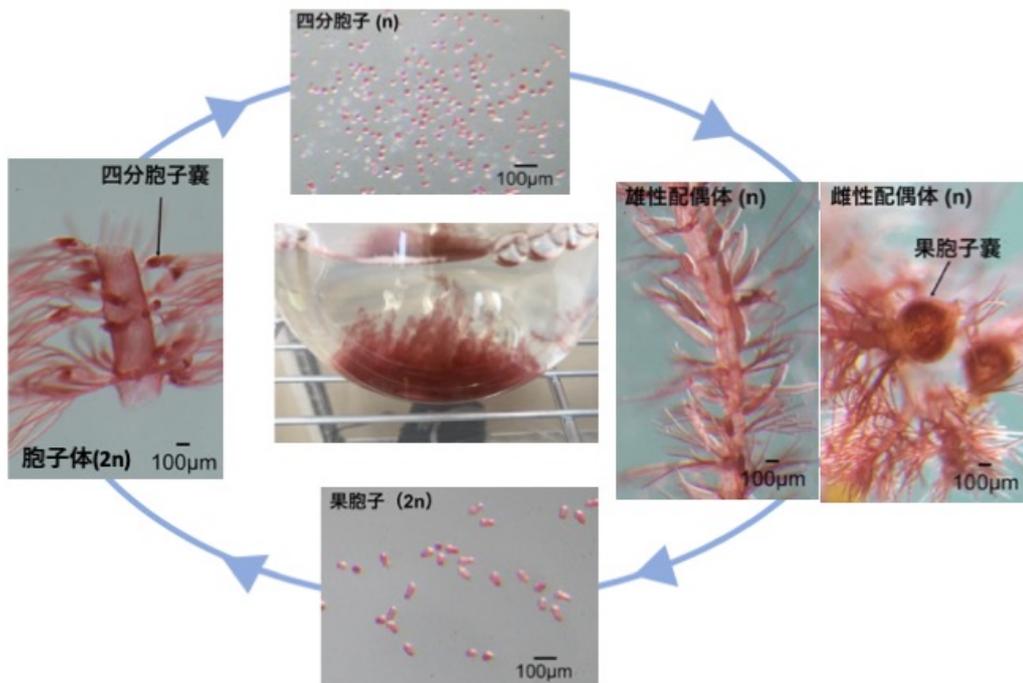


図.7 ダジア (*Dasya* sp.) の生活環

6 無菌培養

6.1 抗生物質添加実験

海藻には多くのバクテリアが共生していることが知られている。モデル生物を確立するためには、これらのバクテリアを除去または極限まで減らす滅菌・減菌を行う必要がある。そこで海藻自体の成長に影響を与えずにバクテリアを殺すことのできる抗生物質を見つけるため、薬剤添加実験を行った。各海藻の断片に抗生物質を希釈して加え、生育状況を確認した。さらに9日間抗生物質で培養した後の海藻断片を洗浄後バクテリア用培養液 (YPD) で培養し、バクテリア増殖の有無を確認した。

その結果、例えばダジアではアンピシリンやカナマイシンによって藻体の成長を止めずにバクテリアを抑えることができた。

ダジア	抗生物質 (原液濃度)	テトラサイクリン (10mg/ml)	アンピシリン (50mg/ml)	カナマイシン (20mg/ml)	ストレプトマイシン (100mg/ml)	PPM 原液	カルベニシリン (10mg/ml)	Cefotaxime (200mg/ml)	クロラムフェニコール (20mg/ml)
9 day	1/100	x (dead)	++ (growth)	+	x (dead)	x (dead)	++ (growth)	+	x (dead, fungi)
	1/1000	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	+	x (dead)	++ (growth)	+	x (dead, fungi)
	1/10000	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	+	x (dead)

ミル	抗生物質 (原液濃度)	テトラサイクリン (10mg/ml)	アンピシリン (50mg/ml)	カナマイシン (20mg/ml)	ストレプトマイシン (100mg/ml)	PPM 原液	カルベニシリン (10mg/ml)	Cefotaxime (200mg/ml)	クロラムフェニコール (20mg/ml)
9 day	1/100	x (dead)	+	+	+	x (dead)	++ (fungi)	++ (growth, fungi)	x (dead, fungi)
	1/1000	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	++ (fungi)	++ (fungi)	++ (fungi)	++ (growth, fungi)	++ (growth, fungi)
	1/10000	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	++ (fungi)	++ (growth)	++ (fungi)	++ (growth, fungi)	++ (growth, fungi)

ハネモ	抗生物質 (原液濃度)	テトラサイクリン (10mg/ml)	アンピシリン (50mg/ml)	カナマイシン (20mg/ml)	ストレプトマイシン (100mg/ml)	PPM 原液	カルベニシリン (10mg/ml)	Cefotaxime (200mg/ml)	クロラムフェニコール (20mg/ml)
9 day	1/100	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	x (dead)	++ (growth)	++ (growth, fungi)	x (dead)
	1/1000	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	x (dead)	++ (growth)	++ (growth, fungi)	+
	1/10000	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth)	++ (growth, fungi)	++ (growth)

+, ++: 9/15-24までの生育状況。



ハネモは6日後、ミル・ダジアは7日後に薬体を含む培養海水10μlをYPD培地に添加し、バクテリアの生え具合を観察。

図.7 抗生物質添加実験

次にダジアに関してカナマイシンを添加しつつ世代を回した藻体について、16S rDNA メタゲノム解析を行った。その結果、ダジアには約 500 種のバクテリアが生息しており、その量はカナマイシン処理により減らす事ができる一方、カナマイシン処理により優勢となる種もあった。従って、いくつかの抗生物質を併せて用いることで効果的にバクテリアを減らせる可能性が示唆された。

6.2 ハネモ (*Bryopsis* sp.) の原形質吸い出し実験

緑藻ハネモはミルと同様、多核嚢状体という体制を持っている。さらにハネモは、細胞質である原形質からも自然に再生する、大変再生能力の高い海藻として知られている。通常の再生実験では、原形質を得るために細胞壁を含めた藻体を切り刻んでいるため細胞壁のバクテリアを大量に含んでしまい、無菌化が難しい状況にある。そこで現在、インジェクターを用いてハネモの藻体から原形質を取り出して再生させる方法で、細胞壁由来のバクテリアを取り除く試みを行っている。切断面からインジェクション針を差し入れて原形質を吸い取り、海水中に放置すると数時間で丸いプロトプラストが形成され、3日から1週間ほどで出芽が起こる。この原形質を抗生物質入りの栄養海水中で維持すると、プロトプラストは形成されるが再生が進行しない。しかし1週間ほど抗生物質入り栄養海水中に維持したプロトプラストを、抗生物質を抜いた栄養海水に入れて培養すると、芽が伸長する。6試行試みた中で、その後芽が伸長するが性成熟しない(ハネが育たない)藻体が2サンプルあり、一部のバクテリアが性成熟に関与する可能性がある。ハネモについては現在、抗生物質により減菌化した藻体について 16S rDNA メタゲノム解析を行う一方で、全ゲノム解析を試みている。

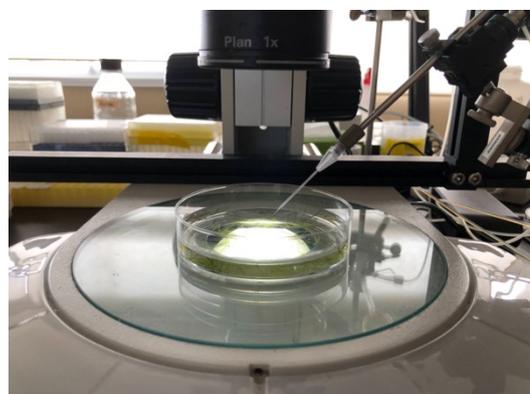


図.8 ハネモ (上) とインジェクター (下)

7 展望

海藻分子細胞生物学を推し進めるための目下第一の目標は、ハネモやダジアの全ゲノム配列解明である。ゲノムが明らかになれば、変異体作製やゲノム編集技術を適用することでさらに遺伝子機能解析や分子イメージングが視野に入る。現在、その為の予備実験をおこなっている。また、固定サンプルの免疫染色法などの研鑽を行っている。ハネモは原形質からの藻体再生メカニズムやバクテリアとの共生系、ダジアは多核体が細胞伸長・分裂を行う際の核同調性のモデルとして研究を継続する予定である。

8 謝辞

本稿の業務は五島剛太所長から依頼を受けて行った。海藻培養をゼロから立ち上げるにあたっては、鳥羽市水産研究所の岩尾豊紀博士、三重大学の倉島彰教授に助言をいただいた。海藻分類に関しては神戸大学の鈴木雅大特命助教、福山大学の山岸幸正准教授にご指導いただいた。深い場所での海藻採集や大量培養については、所内の福岡雅史技師にお願いした。また、ダジアとハネモの RNA-seq を名古屋大学遺伝子実験施設の野元美佳助教に行っていた。さらに科研費事業の先進ゲノム支援に解析対象として採択されており、国立遺伝学研究所の豊田敦特任教授、東京工業大学の伊藤武彦教授にハネモの全ゲノム解析を依頼している。本研究は科研費奨励研究「多細胞性海藻における再生現象のイメージング」(21H04162)、および理学部技術開発・研鑽経費「新規モデル海藻の培養・研究技術開発」から助成を受けた。この場を借りて心から謝意を表す。

参考文献

- [1] Shirae-Kurabayashi M, Edzuka T, Suzuki M, Goshima G (2022) Cell tip growth underlies injury response of marine macroalgae. PLoS ONE 17(3): e0264827.
- [2] Waaland SD, Cleland RE. Cell repair through cell fusion in the red alga *Griffithsia pacifica*. Protoplasma. 1974;79(1):185–96. Epub 1974/01/01. pmid:4844713.
- [3] Leong SY, Yamada M, Yanagisawa N, Goshima G. SPIRAL2 Stabilises Endoplasmic Microtubule Minus Ends in the Moss *Physcomitrella patens*. Cell Struct Funct. 2018;43(1):53–60. Epub 2018/02/16. pmid:29445053

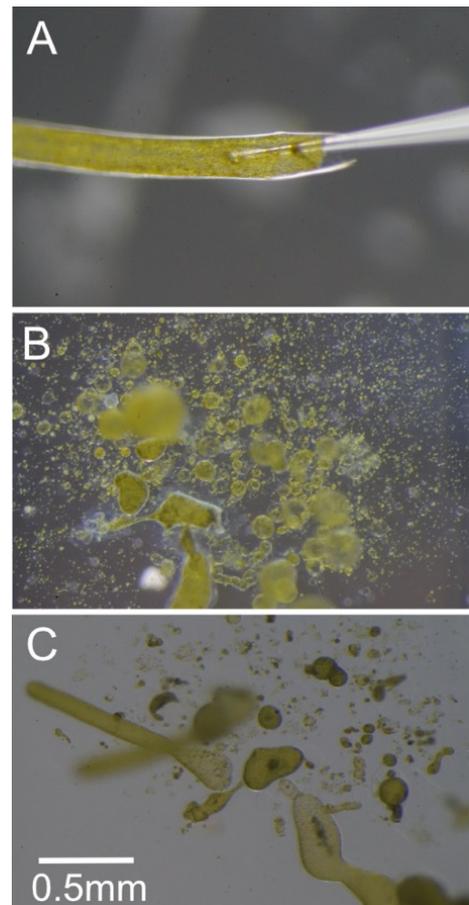


図.9 ハネモ原形質吸い出し実験

A ハネモ原形質の吸い出し. B 原形質を海水中に静置し1日経ったもの. C 吸い出し後1週間. 棒状の藻体が形成されている.