

## ハプト藻 *Chrysochromulina parkeae* の培養株確立と微細構造

塚越 智夏 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

### 【背景と目的】

一部のシアノバクテリアは光合成だけでなく窒素固定を行い、地球上の窒素循環に大きな役割を果たしている。ソテツやアカウキクサなどの陸上植物と共生し、窒素固定産物を宿主に供給する役割をもつものもある。このような窒素を介した共生関係は、藻類でも知られている。ロパロディア科の一部の珪藻は細胞内に窒素固定シアノバクテリアを共生させており、その内部共生体は楕円体 (spheroid body) と呼ばれる。ハプト藻 *Chrysochromulina parkeae* も窒素固定内部共生体をもつと考えられており、その内部共生体ゲノムは、珪藻の楕円体と同様に窒素固定に必要な遺伝子をもつ一方、光合成や主要な代謝系に関する遺伝子を多く失っている。また、この内部共生体は窒素固定シアノバクテリア UCYN-A の一群に含まれることが示唆されている。UCYN-A は海洋に広く分布し、海洋の窒素固定に大きく貢献しているとして近年注目を集めている生物である。さらに、UCYN-A2 とハプト藻との共生関係が示唆されているが、培養株がないためにこれらの関係については構造的にも機能的にも詳細な研究が行われていない。そこで本研究では、まず *C. parkeae* の培養株を確立し、その微細構造を明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

鳥取県泊港と高知県池ノ浦港を中心に表層海水を 15 回採水した。採取した海水を 8.0 μm フィルターで濾過濃縮したのち、粗培養と単離を行った。培養には ESM, f/2, IMK の 3 種類の培地を使用し、明期 12 時間、暗期 12 時間、18°C の環境で培養した。

外部形態の観察には、光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた。種同定に必要な鱗片の微細構造を観察するために、細胞をホールマウント染色し、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。内部構造の観察には、樹脂包埋した試料から超薄切片を作成し、TEM で観察した。また、DNA の局在を調べるために、DAPI を用いた蛍光顕微鏡観察を行った。

培養株より抽出した DNA を用いて、PCR 法により増幅した 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、最尤法で分子系統樹を作成した。また、先行研究により解読された *C. aff. parkeae* 内部共生体ゲノムのデータから設計した 16S rRNA 遺伝子とニトロゲナーゼサブユニット遺伝子 *nifH* の特異的プライマーを用い、増幅した培養株の DNA から目的遺伝子の増幅を試みた。

### 【結果と考察】

海水サンプルから ESM 培地で 2 つの培養株確立に成功した (KC1-P2 と TT5-P1)。微細構造観察の結果、4 種類の鱗片を確認し、それらの形態的特徴に基づきこれら 2 株を *C. parkeae* と同定した。さらに、SEM 観察により 4 種類の鱗片の配置様式を新たに明らかにした。

光学顕微鏡観察により KC1-P2 の細胞後部に 1 つの球状の構造が確認できた (図 1 矢印)。DAPI を用いた蛍光顕微鏡観察では、

この構造が DNA をもつことが示された。したがってこの球状の構造は独自のゲノムをもつ内部共生体であると考えられる。

本研究で得られた 2 つの培養株の 18S rRNA 遺伝子の配列は、*C. parkeae* strain Kawachi と非常に高い相同性を示し、UCYN-A2 の宿主と推定される環境配列と同じクレードに含まれた。よって、UCYN-A2 の宿主は *C. parkeae* に近縁な生物であることが示唆された。

しかしながら、継代培養につれて内部共生体が観察できなくなり (図 2)、超薄切片観察でも細胞内に原核生物様の構造は発見できなかった。加えて、内部共生体の 16S rRNA 遺伝子と *nifH* の検出もできなかった。よって、KC1-P2 は培養の途中で内部共生体を失ったと考えられる。これは、窒素豊富な培地で培養し続けたために、窒素固定が不要になったからかもしれない。

細胞縦断面の TEM 写真を図 3 に示す。細胞周縁に 2 個の葉緑体があり、管状クリステのミトコンドリアを持つことが確認できた。細胞前方にはゴルジ体があり、鱗片を含むゴルジ小胞も観察された (図 3 矢印)。他の鱗片を有するハプト藻と同様に、ゴルジ体で鱗片を生産し細胞表面に放出していると考えられる。細胞後方に内部共生体の痕跡は見られず、複数の小胞が見られた。

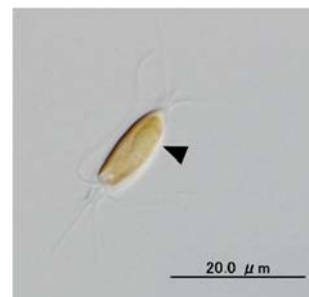


図 1. KC1-P2 (矢印:共生体)

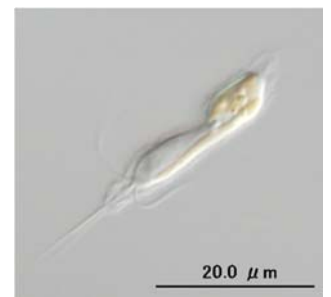


図 2. KC1-P2 (共生体なし)

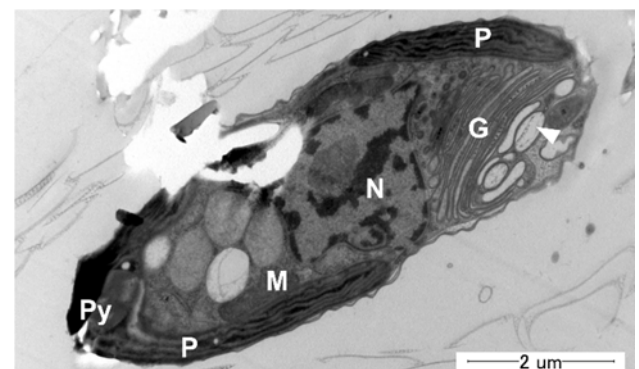


図 3. KC1-P2 の縦断面 G:ゴルジ体、M:ミトコンドリア、N:核、P:葉緑体、Py:ピレノイド、矢印:ゴルジ小胞内の鱗片

### 【研究のまとめと今後の展望】

今回、*C. parkeae* の新たな培養株の確立に成功した。さらに、SEM と TEM 観察により *C. parkeae* の微細構造に関する新たな知見が得られた。今後は、内部共生体を保持した状態での培養株の維持を目標とし、内部共生体を持つ細胞と持たない細胞の比較を行っていききたい。