

令和 2 年

厚岸湖・別寒辺牛湿原学術研究奨励補助金

調査研究報告書

厚岸湖及び別寒辺牛湿原における珪藻浮遊現象の解明

東京理科大学 理学研究科

井出 祐貴

目次

1. 序論	4
1-1. はじめに	4
1-2. 珪藻	4
1-3. 採取	4
1-4. 一細胞観察	4
1-5. 横倒し顕微鏡	5
1-6. 温度制御ステージ	5
1-7. 軌跡解析	5
1-7. 珪藻浮遊現象の温度依存性	5
1-8. 研究目的	5
2. 実験方法及び装置	5
2-1. 使用した珪藻	5
2-2. 培養	6
2-3. 植え継ぎ	6
2-4. ガラスチャンバーの作製	6
2-5. 温度制御ステージの作製	6
2-6. 横倒し顕微鏡	7
2-7. 観察資料の作製	8
2-8. 動画撮影・変換	8
2-9. 解析	8
2-10. 細胞の速さや移動距離の算出	8
3. 実験結果と考察	10
3-1. 珪藻の顕微鏡画像	10
3-2. 自作ガラスチャンバー作製	10
3-3. 温度制御ステージの作製	11
3-4. サーモグラフィーカメラを使用した温度制御装置とガラスセルの熱画像測定	13
3-5. 観察試料の顕微鏡画（17分後）と珪藻細胞の軌跡（17分間）	14
3-6. 細胞の位置座標から速さ、移動距離への変換	15
3-7. 観察時間（0.03s 間隔）と細胞の積算距離	16

4. 結論	17
4-1. 採取珪藻.....	17
4-2. 自作ガラスチャンバー	17
4-3. 温度制御ステージ	17
4-4. 珪藻の浮遊の速さ	17
5. 今後の展開.....	17
6. 参考文献	19
7. 謝辞	19

1. 序論

1-1. はじめに

水中を生きる珪藻は海水・淡水・湿地に見られる単細胞生物で、地球上の酸素の約 20%を生産している主要な一次生産者の 1 つである(Bowler et al., 2010)。鞭毛などの運動器官を持たない浮遊性珪藻は対流などによって光の届く水中上方へ浮遊し細胞分裂を行うことから、珪藻の浮遊と温度の関係を調べることは光合成メカニズムを知る上で重要である。珪藻の光合成には強い光は必要ないが、適切な光強度が必要である(Feijao et al., 2018)。また、珪藻の光合成の重要な要因の一つに比重が挙げられる。重鉱物成分のない遠洋の生物の密度は $102\text{-}105\text{ g ml}^{-1}$ とされるが、珪藻はシリカの被殻を細胞壁として持つため、最大 1.3 g ml^{-1} の密度を持つ可能性があると報告されている(Moore and Villareal, 1996, Winfried Lampert, 2007)。それは水より少し高いので、珪藻は静かな水に沈み、僅かな波があるときに浮くことができる。これらの要因は、光合成効率のための最適な浮遊条件となる。

珪藻を個別に観察することは困難であるため、これまでのほとんどの研究では、自然条件下で珪藻の集団行動を調べてきた(Abelmann et al., 2015, Asper and Smith, 2003, Matsumoto et al., 2014)。観察方法の 1 つは、粒子画像測定法 (PIV) である。ただし、この方法は単一の個体ではなく細胞群の分析が可能である(Xiao et al., 2012)。珪藻の個々の細胞観察に関する研究はこれまでない。当研究室では珪藻の浮遊を観察するために倒立顕微鏡を 90 度傾けて、地表面に対して垂直な顕微鏡を開発した(Shoumura et al., 2020)。この顕微鏡は浮遊現象を観察することを目的としているため、温度制御機能はついていない。近年、地球温暖化の影響で水温が上昇していることはよく知られている。これまでの研究では、垂直な試料ステージにヒーターを取り付け、珪藻浮遊の温度依存性を評価した(Ide et al., 2020)。

1-2. 珪藻

珪藻は植物プランクトンの一種で、世界中のあらゆる水域に生息している、光合成生物である。単体や集団で水中に存在する。また珪藻の細胞壁に当たる部分が被殻でこれは無色透明の珪酸質でできている。

1-3. 採取

珪藻はあらゆる水域に存在している。本研究では特殊なネットを用いて浮遊性珪藻を採取した。採取した海水中には種の異なる珪藻やそれ以外の微生物も存在するが、本研究では実際の水中環境をチャンバー内で再現するために、単離しない珪藻で観察を行った。

1-4. 一細胞観察

珪藻には、自らが出す粘液を推進力に変え、固体表面上を運動する滑走性珪藻と、能動的な運動をしない浮遊性珪藻がある。運動する珪藻を解析する上で問題となるのは、観察対象にしている細胞が顕微鏡の観察視野から外れてしまうことである。この問題を解決したのが樹脂を使用して作製したマイクロチャンバーである。鋳型であるシリコン基板にマイクロパターンを印字し、そこに樹脂を流し込み、固め、500 ミクロン程度の透明な容器を作製し、このマイクロチャンバーで細胞を閉じ込めることで、一

細胞観察を可能にした。本研究においても浮遊性珪藻が奥行き方向に浮遊し、観察視野から外れてしまうことを防ぐために、浮遊性珪藻の観察に適した方法で一細胞観察を行った。

1-5. 横倒し顕微鏡

珪藻には鞭毛などの運動機構を持たない浮遊性のものもある。浮遊性珪藻をシャーレに入れて倒立顕微鏡で観察すると、細胞の様子が確認できた。しかし、この観察方法では珪藻は上下方向にも浮遊するため、細胞が対物レンズの焦点からすぐに外れてしまう。そこで、本研究では、地表面に対して 90 度傾けて、地表面に対して垂直な顕微鏡を使用した。この顕微鏡によって、水族館でガラス越しに水槽を覗くのと同一ように細胞を観察することができる。

1-6. 温度制御ステージ

珪藻の浮遊と温度の関係を調べるにあたり、自作の温度制御ステージを作製した。このステージによって細胞を封入するためのチャンバーを冷やしたり温めたりすることができる。この温度制御ステージによって採取時の水温に合わせた観察を可能にする。

1-7. 軌跡解析

80 年代頃は、ビデオカメラで撮影した動画を映写機で方眼紙上に映し出し、細胞部分をプロットし、時間変位から移動距離や速さを求めていた。現代では珪藻細胞の顕微鏡画像をビデオカメラで撮影し、動画を分割し、静止画から追跡したい細胞 PC ソフトウェア上で指定し、その細胞の幾何重心の座標から移動距離や速さを求められるようになった。

1-8. 珪藻浮遊現象の温度依存性

これまでの私の研究では、横倒し顕微鏡の試料ステージにヒーターを取り付け、浮遊性珪藻である *Cyclotella meneghiniana* の浮遊現象を観察した。その結果、細胞は懸濁液の温度を上げると、細胞の浮遊の速さが大きくなることが確認された。

1-9. 研究目的

以前の私の研究で、細胞の浮遊現象と懸濁液の温度に関係があることが示唆されており、本研究では珪藻の浮遊現象と温度の關係に着目し、細胞懸濁液を横倒し顕微鏡で観察するためのチャンバーに入れ、自作の温度制御ステージを使用して、細胞の浮遊現象と温度の關係について調べた。

2. 実験方法及び装置

2-1. 使用した珪藻

本研究では採取時の水中を再現するために単離しない珪藻で実験を行った。採取場所は北海道厚岸郡厚岸町厚岸湖 (43°03'21.7"N 144°50'58.3"E)である。

2-2. 培養

シャーレに海水培地と淡水用培地の混合比 1:1 で入れ (10ml), 細胞懸濁液 800 μ l 入れ, 1 週間毎に植え継ぎを行った。

2-3. 植え継ぎ

採取した珪藻をダイゴ人工海水 SP (395-01343, Nihon Pharmaceutical, Tokyo, Japan) 中の Guillard's (f/2) marine water enrichment solution (G9903-500ML, Sigma-Aldrich, MO, USA) 培地と Bold Modified Basal Freshwater Nutrient Solution 液体培地 (BBM 培地, B5282-500ML, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) で継代培養し, 植え継ぎから 2 週間経過したものを観察に使用した (培養温度 18 °C)。

2-4. ガラスチャンバーの作製

本研究では横倒し顕微鏡で観察するために, 専用の容器を作製した。図 1 はチャンバーの作製方法を示している。スライドガラスをガラスカッターで半分に切り, 重ね合わせ, エポキシ系接着剤で固定した。サイズは厚み方向の内寸は 2mm である。

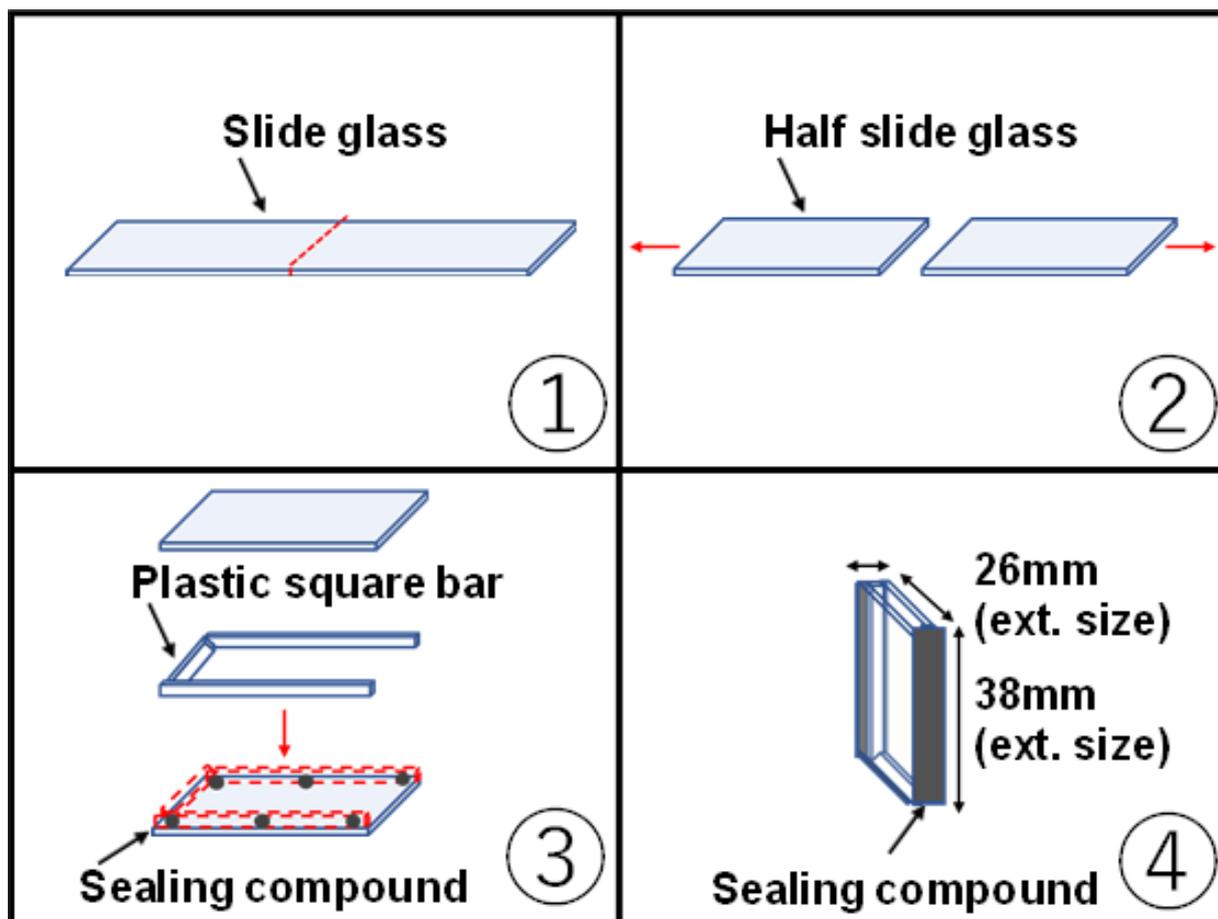


図 1 自作ガラスチャンバーの作製方法

2-5. 温度制御ステージの作製

図2は温度制御ステージの概略図である。試料の温度制御を行うために、横倒し顕微鏡の試料台に装着できる温度制御機能付きステージを作製した。厚さ1mmのアルミ板を縦93mm横110mmに切り出し、ペルチェ素子を固定するための穴(M3)をあけた。家庭用電源である交流100Vを直流12Vに変換し、サーモスタット、ペルチェ素子と水冷ポンプに電源を供給した。本研究ではチャンバー内に自然界を再現するために、チャンバーの底面だけを制御している。また温度計はチャンバーの底面に設置した。また、熱源とチャンバーの温度勾配を確かめるためにサーモグラフィカメラ(FSV-1200-L16, Apiste)で行った。測定の温度は採取時の水温10°Cに合わせて行った。

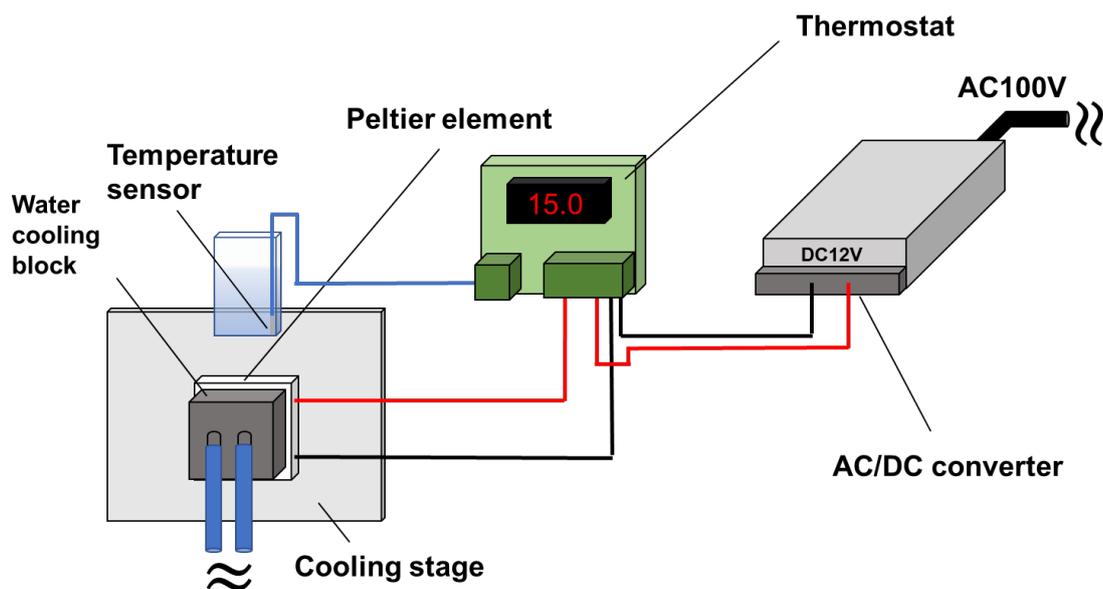


図2 温度制御ステージの概略図

2-6. 横倒し顕微鏡

図3に横倒し顕微鏡を模式図で示した。この顕微鏡(CKX-53, OLYMPUS)は地表面に対して垂直な試料ステージを持っている。この顕微鏡を用いることで重力方向の観察が可能である。

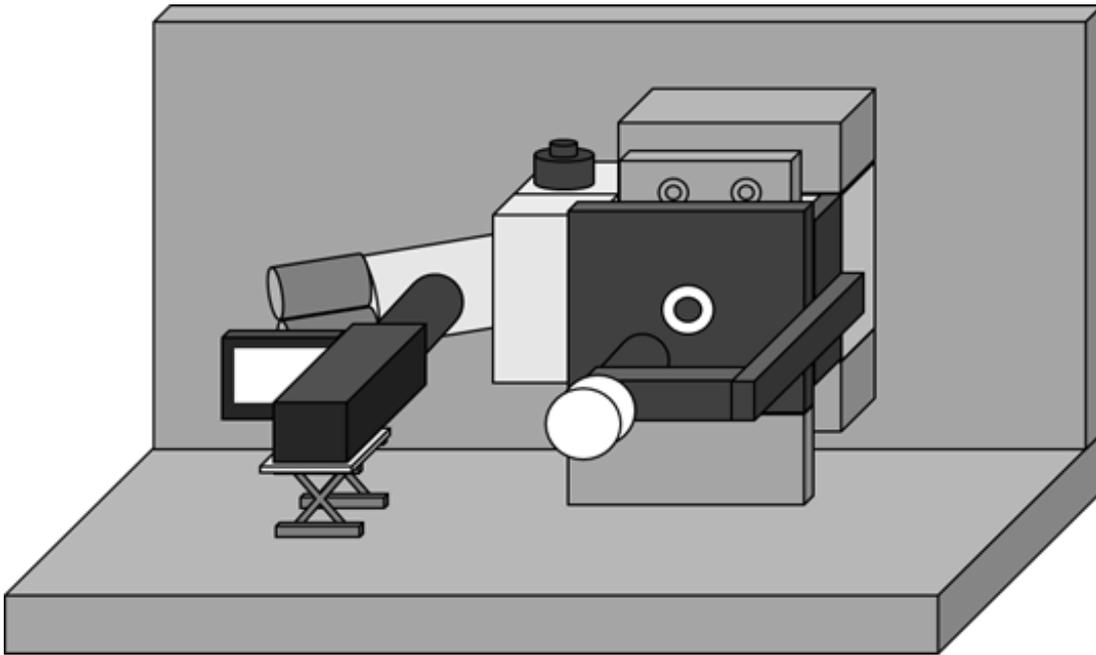


図 3 横倒し顕微鏡の模式図

2-7. 観察試料の作製

細胞懸濁液 1 ml を自作のガラスチャンバー (厚み方向の内寸 2 mm) に入れ, 地表面に対して垂直な試料ステージに取り付けた (照度: 約 6, 000 lx)。観察はチャンバーの内側・底面の温度が 5 °C, 室温, 35 °C になるように行った。

2-8. 動画撮影・動画変換

顕微鏡のカメラアダプターに接続したビデオカメラ (HDR-CX590, SONY) を使用した。記録は 720P 30FPS で行った。ビデオカメラで撮影した MPEG 形式の動画を解析ソフトに適した WMV 形式に Adobe Media Encoder で変換した。

2-9. 解析

解析には軌跡解析ソフトウェア (MoveTR/2D, Library) を用いた。このソフトウェアデジタル化されたカラー画像の RGB を認識して, 全て白くなった部分を抽出し, 細胞の幾何学的重心の座標から細胞を自動追跡する。このソフトウェアを使用して細胞の位置座標の時間変位を算出する。

2-10. 細胞の位置座標から速さや移動距離を算出

本研究では細胞の位置座標の時間変位のみを実験の生データとして使用した。速さや移動距離はこのデータを元に別途計算した。計算方法は図 4 のように 2 点間を計算している。解析ソフトの都合上, 原点は左上となっている。

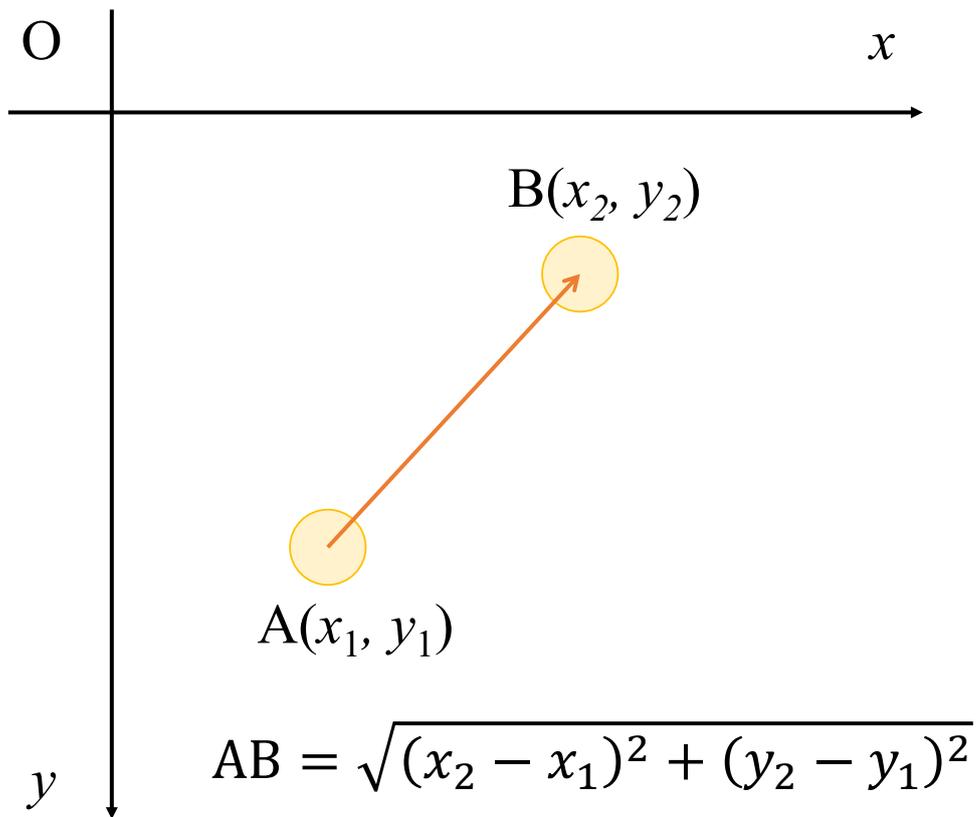


図 4 浮遊距離の計算方法

3. 実験結果と考察

3-1. 珪藻の顕微鏡画像

図5は横倒し顕微鏡で観察した顕微鏡画像である。赤丸で囲っている細胞に注目するとガラス質の被殻に覆われており、中心に核が確認できる。これは珪藻である。



図5 厚岸湖で採取した細胞の横倒し顕微鏡画像

珪藻の長軸の長さは $50\ \mu\text{m}$ で短軸の長さは $5\ \mu\text{m}$ であった。形はで羽状であった。自ら動かないことを顕微鏡観察で確認した。

3-2. 自作ガラスチャンバーの作製

図5は作製したガラスチャンバーである。大きさは横 26mm 縦 38mm 厚み方向の内寸は 2mm であった。これまでは、シャーレに細胞懸濁液を入れて、横倒し顕微鏡で観察していた。シャーレでも観察することができるが、シャーレに厚みがあるため、顕微鏡の視野から外れやすかった。本研究では自作ガラスチャンバーを作製することによって観察視野内で奥行方向に細胞が消失することを100個体中10個体以下にすることができた。したがって、横倒し顕微鏡のチャンバーとして有効であることが確認できた。一方で、珪藻の大きさと比べると、薄く作製できたとは言い難い。薄く作りすぎると、注入した液体が排出できないなどの問題も生じるため、今後は培地の粘弾性なども考慮しつつ、改良につなげていきたい。

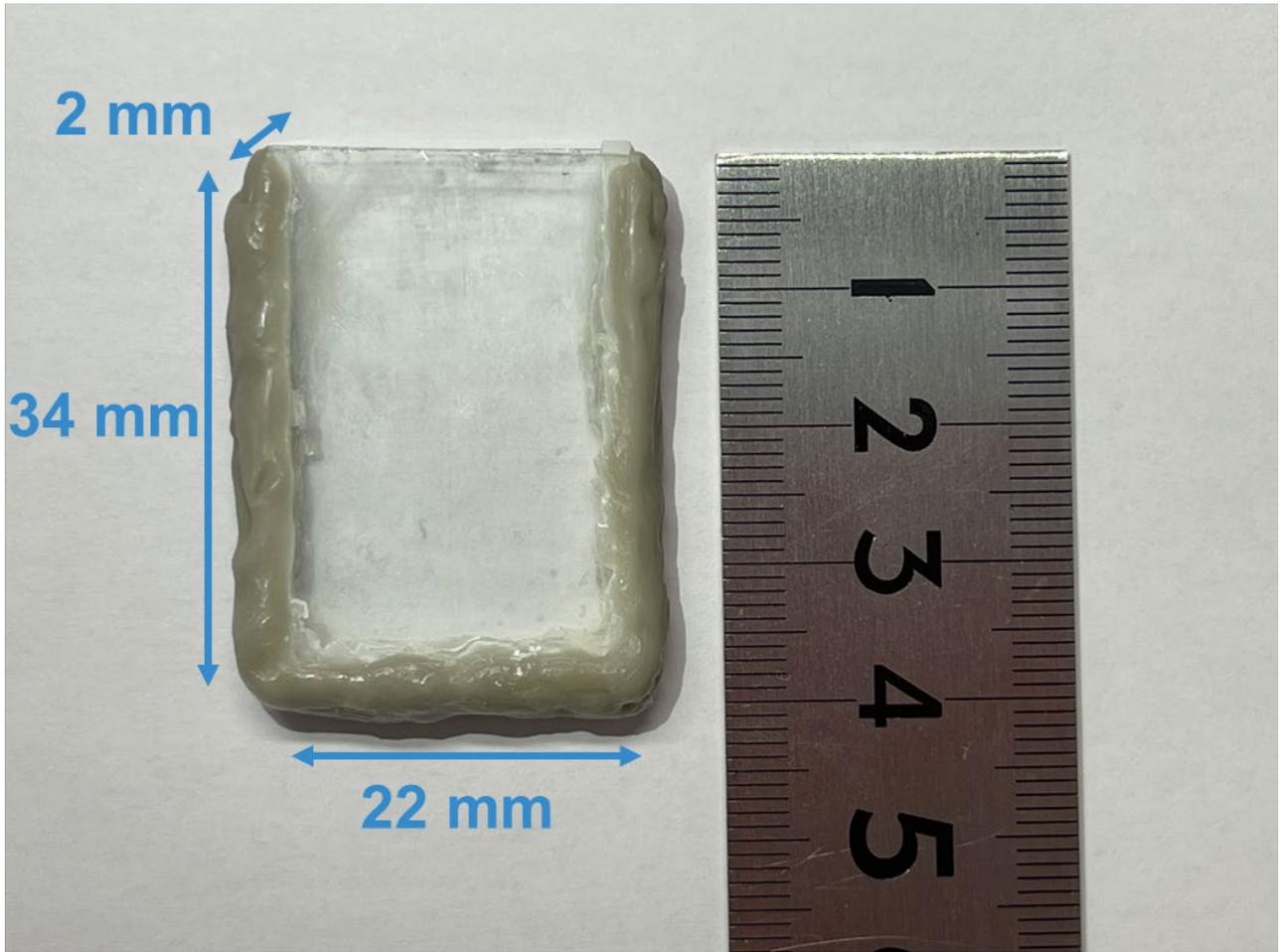


図 6 自作ガラスチャンバーの作製結果

3-3. 温度制御ステージの作製結果

図6に実際に横倒し顕微鏡に取り付けた様子を示した。アルミ板に冷却装置を取り付けた。温度勾配をつけるためにガラスセルセルの下部だけを冷却・加熱するようにしている。

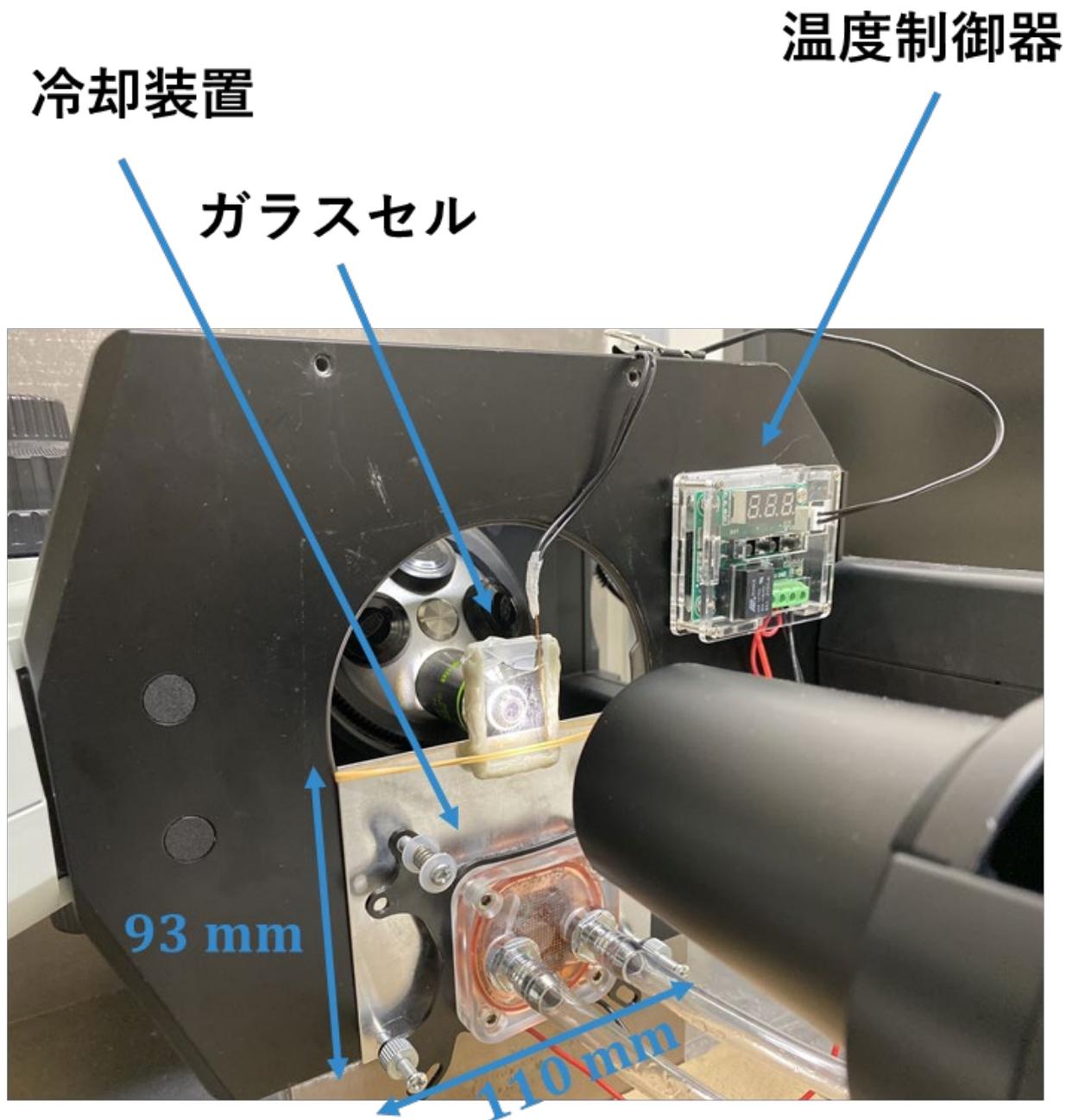


図7 横倒し顕微鏡に取り付けた温度制御ステージ

3-4. サーモグラフィーカメラを使用した温度制御装置とガラスセルの熱画像測定

図7はアルミ板とサーモグラフィーカメラの熱画像測定結果である。ガラスチャンバーを青い線で囲っている。チャンバー内底面の温度が15.8°Cのときの温度勾配を示しており、熱源から離れると温度が高くなっていることが分かった。本研究ではチャンバー内で自然界を再現したいという目論見があり、

チャンバーの底面のみ熱が伝わるように温度制御ステージを作製した。結果からもチャンバー内に温度勾配が発生したことを確認できた。顕微鏡ステージ用の温度制御ステージは市販されているが、このようなタイプのステージは存在しないため、他にない温度制御可能なステージであると言える。ペルチェ素子は正極、負極を逆転することで物体を冷やしたり、温めたりすることができる。冷温機能を持っていることもこの装置の強みである。また、市販品と異なり、低予算で作製可能である。一方で、冷却の際は、ペルチェ素子の構造上、排熱が必要なため、現状では CPU の水冷装置を素子の排熱に利用しているが、今後は、よりコストを抑えられる空冷化を目指したい。

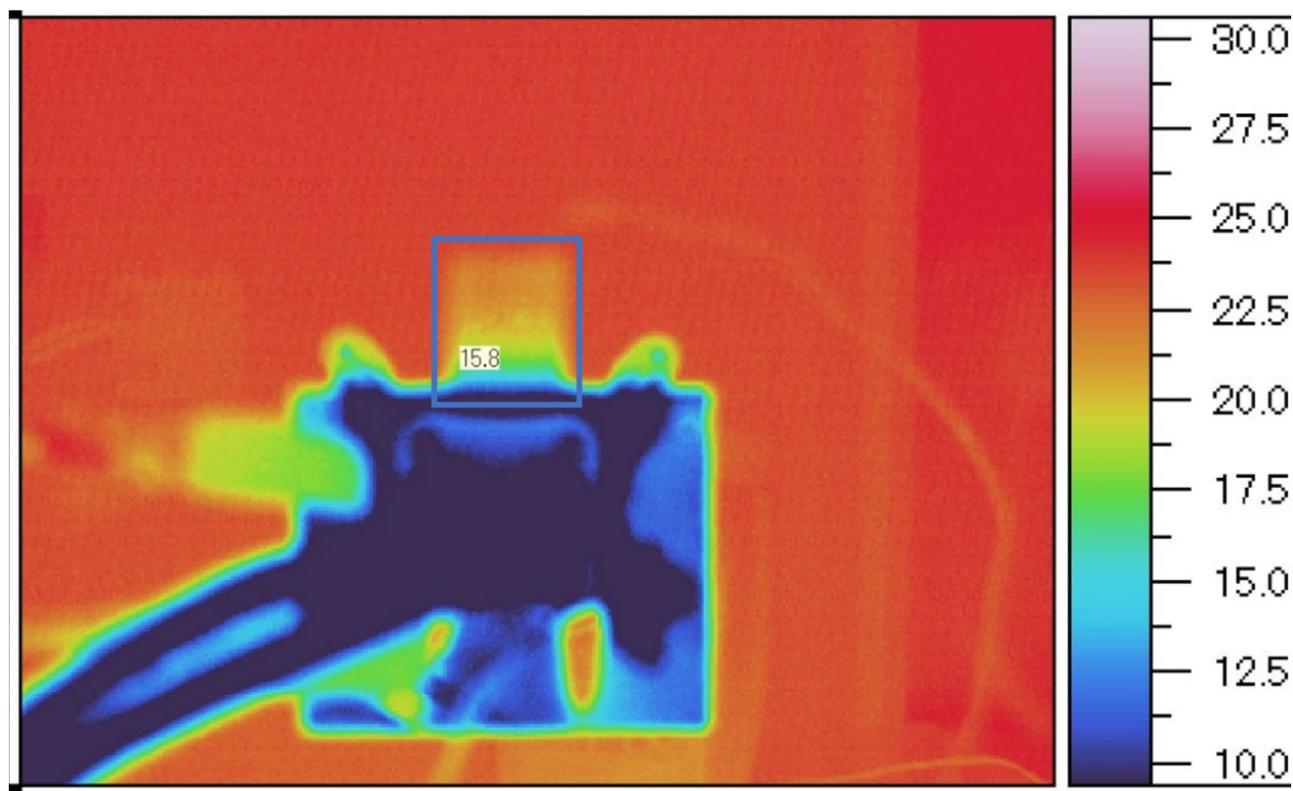


図 8 温度制御ステージとガラスチャンバーの熱画像測定

3-5. 観察試料の顕微鏡画（17分後）と珪藻細胞の軌跡（17分間）

図9は、観察開始から17分後の細胞の顕微鏡画像に17分間に細胞が浮遊した軌跡を上書きしたものである。細胞を解析した結果、チャンバー内の温度が10°Cでは様々な方向に浮遊することが確認された。



図9 (実験1) 観察試料の顕微鏡画（約17分後）と珪藻細胞の軌跡（約17分間）

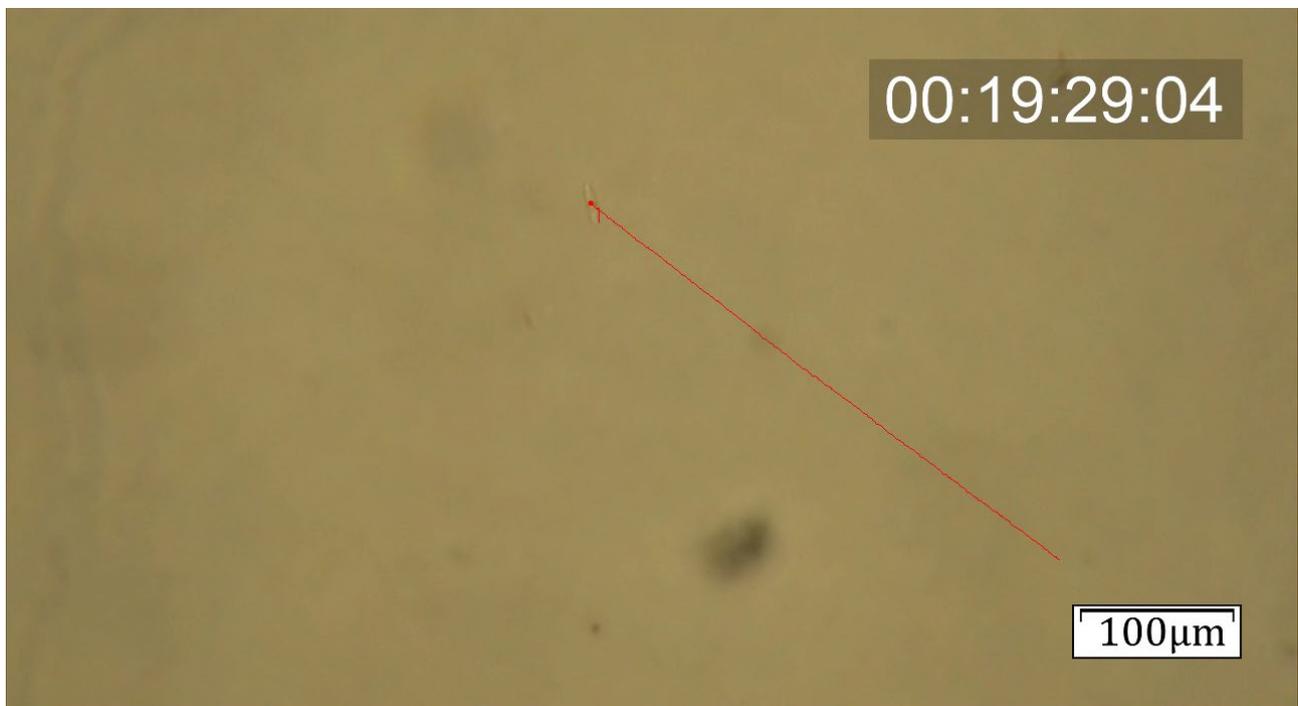


図10 (実験2) 観察試料の顕微鏡画（約19分後）と珪藻細胞の軌跡（約19分間）

3-6. 細胞の位置座標から速さ、移動距離への変換

図 9,10 は細胞の座標データから速さや移動距離を算出した一例である。本研究では解析対象の細胞が膨大であったため、予め座標データを入力するとグラフ化まで可能なエクセルシートを作成した。解析ソフトウェアにも細胞の速度などを自動算出する機能があるが、本研究では、正確さのために細胞の位置座標と時間変位のデータのみを使用した。解析専用のシートを利用することで、作業を効率化することができた。

時間(s)	座標X	座標Y	速度X	速度Y	速度	加速度X	加速度Y	加速度	距離	積算移動距離	終点	392
0	438.42	348.42									速度XAVE	-19.20
0.03	438.42	347.37	0	-35	35	0	-1166.67	1166.667	1.05	1.05	速度YAVE	-25.63
0.07	436.84	346.84	-39.5	-13.25	41.66308	-987.5	543.75	1127.307	1.666523	2.716523327	速度AVE	41.34
0.1	436.84	345.79	0	-35	35	1316.667	-725	1503.076	1.05	3.766523327	加速度XAVE	-18.46
0.13	435.26	345.26	-52.6667	-17.6667	55.55078	-1755.56	577.7778	1848.189	1.666523	5.433046654	加速度YAVE	-19.65
0.17	436.32	343.68	26.5	-39.5	47.56574	1979.167	-545.833	2053.055	1.90263	7.335676413	加速度AVE	1409.70
0.2	435.79	342.63	-17.6667	-35	39.20601	-1472.22	150	1479.844	1.17618	8.511856672	移動距離AVE	1.35
0.23	434.74	342.11	-35	-17.3333	39.05694	-577.778	588.8889	824.9953	1.171708	9.683564826	移動距離SUM	527.9365
0.27	434.21	341.05	-13.25	-26.5	29.6279	543.75	-229.167	590.069	1.185116	10.86868085		
0.3	433.16	340.53	-35	-17.3333	39.05694	-725	305.5556	786.7587	1.171708	12.04038901		
0.33	433.16	339.47	0	-35.3333	35.33333	1166.667	-600	1311.911	1.06	13.10038901		
0.37	431.58	338.95	-39.5	-13	41.58425	-987.5	558.3333	1134.413	1.66337	14.76375908		
0.4	431.58	337.89	0	-35.3333	35.33333	1316.667	-744.444	1512.55	1.06	15.82375908		
0.43	432.11	336.32	17.66667	-52.3333	55.23485	588.8889	-566.667	817.2522	1.657046	17.48080465		
0.47	430	336.32	-52.75	0	52.75	-1760.42	1308.333	2193.354	2.11	19.59080465		
0.5	431.05	334.74	35	-52.6667	63.23589	2925	-1755.56	3411.393	1.897077	21.48788134		
0.53	429.47	334.21	-52.6667	-17.6667	55.55078	-2922.22	1166.667	3146.505	1.666523	23.15440467		

図 11 細胞の位置座標から速さ，移動距離への変換の一例

3-7. 観察時間 (0.03s 間隔) と細胞の積算距離

図 10 は室温での細胞の積算距離の時間変位をグラフに示す。

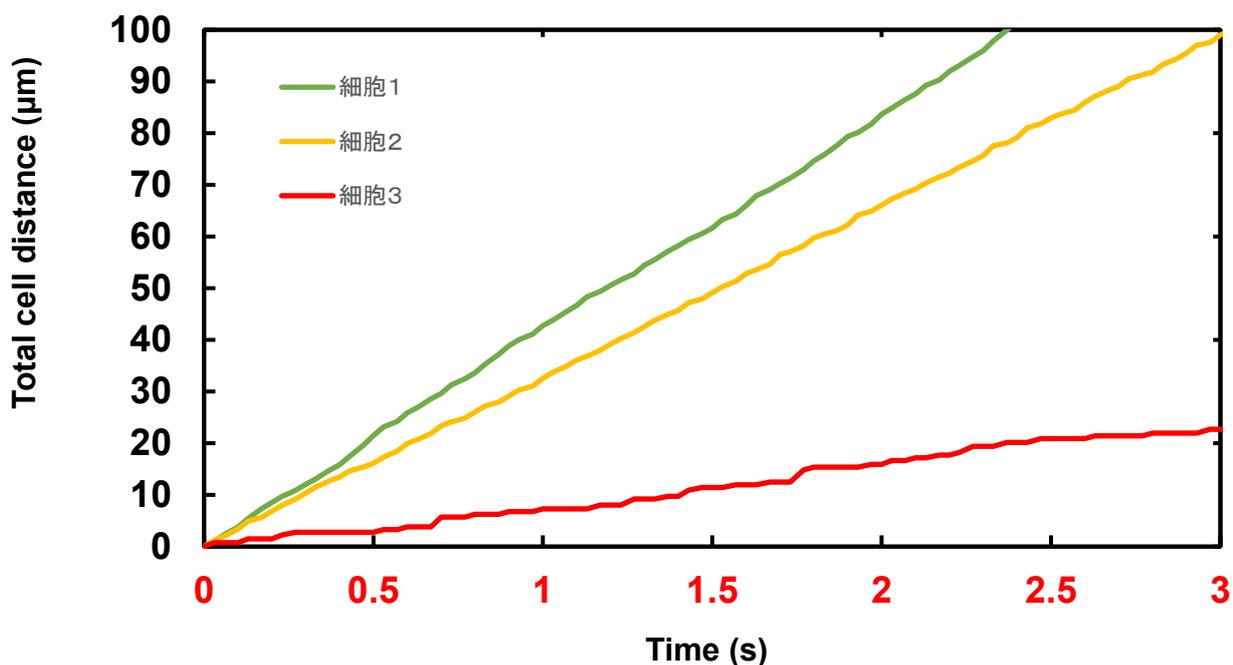


図 12 チャンバー内の温度が 10°Cでの細胞の移動距離の時間変位

細胞はチャンバー内の温度勾配によって生じた流体によって浮遊していることを確認した。細胞の浮遊の速さは細胞 1 で $41.3 \pm 0.61 \mu\text{m/s}$ 、細胞 2 で $33.0 \pm 0.65 \mu\text{m/s}$ 、細胞 3 で $11.4 \pm 0.39 \mu\text{m/s}$ となった。平均値は $28.6 \pm 7.29 \mu\text{m/s}$ となっており、3 つの細胞の浮遊の速さはどれも同じで誤差の範囲内であると考えられる。

採取した細胞を採取時の温度 10°Cで観察し、解析した結果、細胞はチャンバー内で沈降せずに、容器内を様々な方向に浮遊することを確認した。理由の一つとして、観察用チャンバー内の温度差によって流体が移動し、循環が生じ、懸濁液中に溶存している細胞の浮遊に影響が生じたことが考えられる。

4. 結論

4-1. 採取珪藻

観察結果から、被殻や細胞核が確認され、観察物を珪藻と断定した。

4-2. 自作ガラスチャンバー

自作ガラスチャンバーを使用することで珪藻の浮遊を連続した時間で観察することができた。本チャンバーは横倒し顕微鏡での長時間観察に有効である。

4-2. 温度制御ステージ

本研究ではチャンバー内の底面の温度を制御した状態で顕微鏡観察することができた。自然界を再現するために容器内に温度勾配をつけることにも成功した。熱画像測定からも冷却精度や性能も問題ないと結論づけた。

4-3. 珪藻の浮遊の速さ

細胞の浮遊の速さの平均値は $28.6 \pm 7.29 \mu\text{m/s}$ となっており、3つの細胞の浮遊の速さはどれも同じで誤差の範囲内であると考えられる。

本研究により、珪藻細胞の浮遊現象に対する温度の影響が顕微鏡直接観察により可視化された。

5. 今後の展開

本研究では、横倒し顕微鏡を用いた珪藻の一細胞観察に適した装置の作製から観察、解析までを一連して行った。これにより浮遊現象に対する温度の影響が顕微鏡直接観察により可視化を行うことができた。今後は、珪藻の形状や比重などを考慮して、珪藻浮遊現象の定量化を行っていきたい。

6. 参考文献

- Abelmann, A., Gersonde, R., Knorr, G., Zhang, X., Chaplign, B., Maier, E., Esper, O., Friedrichsen, H., Lohmann, G., Meyer, H., Tiedemann, R., 2015. The seasonal sea-ice zone in the glacial Southern Ocean as a carbon sink. *Nat. Commun.* 6, 12.
- Asper, V.L., Smith, W.O., 2003. Abundance, distribution and sinking rates of aggregates in the Ross Sea, Antarctica. *Deep-Sea Res. Part I-Oceanogr. Res. Pap.* 50, 131-150.
- Bowler, C., Vardi, A., Allen, A.E., 2010. Oceanographic and Biogeochemical Insights from Diatom Genomes. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 2, 333-365.
- Feijao, E., Gameiro, C., Franzitta, M., Duarte, B., Cacador, I., Cabrita, M.T., Matos, A.R., 2018. Heat wave impacts on the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*: Searching for photochemical and fatty acid biomarkers of thermal stress. *Ecol. Indic.* 95, 1026-1037.
- Ide, Y., Matsukawa, Y., Miyashiro, D., Mayama, S., Julius, M.L., Umemura, K., 2020. Unique observation method of temperature dependence of diatom floating by direct microscope. *J. Microbiol. Methods.* 172, 4.
- Matsumoto, M., Mayama, S., Nemoto, M., Fukuda, Y., Muto, M., Yoshino, T., Matsunaga, T., Tanaka, T., 2014. Morphological and molecular phylogenetic analysis of the high triglyceride-producing marine diatom, *Fistulifera solaris* sp nov (Bacillariophyceae). *Phycol. Res.* 62, 257-268.
- Moore, J.K., Villareal, T.A., 1996. Size-ascent rate relationships in positively buoyant marine diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 41, 1514-1520.
- Shoumura, S., Hamano, R., Hanada, Y., Mayama, S., Umemura, K., 2020. Single cell analysis of sinking diatoms studied using a homemade 'tumbled' optical microscope system. *J. Microbiol. Methods.* 168.
- Winfried Lampert, U.S., 2007. *Limnology The Ecology of Lakes and Streams*. Oxford University Press. Second Edition, 47.
- Xiao, F., Li, X.Y., Lam, K.M., Wang, D.S., 2012. Investigation of the hydrodynamic behavior of diatom aggregates using particle image velocimetry. *J. Environ. Sci.* 24, 1157-1164.

7. 謝辞

本研究は、厚岸湖・別寒辺牛湿原学術研究奨励補助金（代表：井出祐貴）の助成を受けたものである。