

淡水海綿ヌマカイメンの緑色の芽球の 電子顕微鏡的観察

川崎医科大学 生物学教室

益田芳樹・佐藤国康・松本邦夫

(昭和58年9月19日受理)

Electron Microscopic Observations on Green Gemmules of
Freshwater Sponges, *Spongilla lacustris* (LINNAEUS)

Yoshiki MASUDA, Kuniyasu SATOH and Kunio MATSUMOTO

Department of Biology, Kawasaki Medical School

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Sept. 19, 1983)

概 要

著者らは電子顕微鏡を用いて淡水海綿の一種ヌマカイメンの緑色の芽球を観察した。芽球殻は薄く芽球内膜だけからなるものが多く、芽球口孔の表面にはいくつかの窪みがみられる。芽球内には多くの貯蔵細胞がつまっている。貯蔵細胞は多くの電子密度の高い大きな顆粒を含む。それらの大きな顆粒は形から球形の顆粒、だ円形の顆粒、凸レンズ状の顆粒（卵黄小板）の3つに分けられる。球形の顆粒は多くの脂肪小滴や粗面小胞体を含む。だ円形の顆粒には2型あり、いくつかの脂肪小滴や小さな粗面小胞体を含む型と、顆粒の中心部にグリコーゲン顆粒をその周辺にミトコンドリアや小さな粗面小胞体を含む型である。凸レンズ状の顆粒（卵黄小板）は、ほとんど脂肪小滴を含まない。球形の顆粒とだ円形の顆粒は未完成な卵黄小板の形であると考えられる。

以上の観察結果より、緑色の芽球は芽球形成の途中の段階で越冬に入っていることがわかった。

貯蔵細胞の空胞内には共生藻（クロレラ）が存在しているが分裂中のクロレラはみられず休眠中であると考えられる。いくつかのクロレラはだ円形の顆粒にとりこまれているが、クロレラの構造は貯蔵細胞の空胞内にみられるものとよく似ている。したがってこれらのクロレラはだ円形の顆粒内に消化されずに残っていると考えられる。

Abstract

With an electron microscope we observed the green gemmules of a freshwater sponge *Spongilla lacustris* (L.) collected from a pond near Lake Biwa in Shiga Prefecture (35° 11' S, 135° 08' E) on 30 December 1982.

The gemmular shells of most gemmules were thin and consisted of an inner gemmular membrane. Some hollows were seen on the micropyle. Many thesocytes were packed into the gemmular shell. The thesocytes contained many large inclusions with high density.

These inclusions were classified by their shape into three large groups, i. e., spherical

inclusions, ellipsoidal inclusions, and lenticular inclusions (vitelline platelets).

Spherical inclusions contained rough endoplasmic reticulum and many lipid droplets. Ellipsoidal inclusions were further classified into two types. One type contained some lipid droplets and fragments of rough endoplasmic reticulum. The other type contained a large amount of glycogen granules in the central portion and some mitochondria and fragments of rough endoplasmic reticulum in the peripheral portion. Lenticular inclusions (vitelline platelets) with a lower density region along the long axis contained few lipid droplets. It seems that both spherical and ellipsoidal inclusions are immature types of lenticular shaped inclusions (vitelline platelets).

As the result of these observations, although these green gemmules seem to be immature, they are hibernating.

Most symbiotic algae (zoochlorellae) are located inside individual vacuoles of the thesocytes. Although we could not observed the stages of cell division or pyrenoids in their chloroplasts, the structures of zoochlorellae have many points of likeness to those in green adult sponges. Some zoochlorellae were engulfed by ellipsoidal inclusions. Their ultrastructure closely resembled those located inside the vacuoles of thesocytes. Therefore, it seems that they are not digested in the ellipsoidal inclusions.

結 言

淡水海綿は有性生殖と無性生殖の二通りの生殖法を行う。無性生殖の一つとして芽球形成がある。多くの種類では芽球形成は冬が近づくと水温低下に伴ない海綿体内の原始細胞 (Archaeocyte) と栄養を貯えた栄養細胞 (Trophocyte) の集合体を形成することから始まる。次に原始細胞は栄養細胞を貪食し、貯蔵細胞 (Thesocyte) と呼ばれる細胞となる。芽球は多くの貯蔵細胞群が三層 (芽球外膜, 気泡層, 芽球内膜) からなる芽球殻に包まれた構造物である。芽球が形成されると、多くの種類では海綿体は死滅し、芽球のみが越冬する。春になり水温が上昇すると芽球内の貯蔵細胞は分裂後、芽球殻の一部 (芽球口孔) の殻を破り発芽し新しい海綿体を形成する。

以上の芽球の形成過程についての光学顕微鏡レベルでの研究は Leveaux (1939), Rasmont (1956) 向井 (1980) らにより報告されている。De Vos (1971) は電子顕微鏡を用いカワカイメンの芽球形成過程を観察し、栄養細胞を貪食した貯蔵細胞内に凸レンズ状の卵黄小板 (Vitelline platelet) が多数形成され、卵黄小板は好酸性の中層が2枚の好塩基性の外層によってはさまれ、中層の周縁部には脂質小滴を多く含むと報告している。ヌマカイメンの芽球については Pourbaix (1935) の組織化学的な研究があり、卵黄小板は多くの脂肪顆粒を含まないと報告している。著者らは固定操作および切片作製が比較的容易な芽球骨片の少ないしかも芽球殻の薄いヌマカイメンの緑色の芽球を材料とし電子顕微鏡により芽球内の貯蔵細胞や共生藻のクロレラを観察した。

材料および方法

この実験に用いたヌマカイメン *Spongilla lacustris* (L.) の芽球は1982年12月30日に滋賀県

神崎郡能登川町乙女浜の琵琶湖の内湖で採集した。

春から秋にかけてこの海綿は緑色を呈し石の表面や水草の表面を殻皮状におおい、そこから多くの細長い指状の突起を出している。指状の突起は枝わかれしたり、またお互いにくっつき幅広くなっているものもみられた(第1図)。採集時には親の海綿体は死に枝の一部はこわれさっていたが、芽球は裸出した骨格骨片の間にはさまって多く残っていた。突起部内の芽球の色は鮮やかな緑色であるが、基部の殻皮内の芽球は緑色が薄れ黄褐色であった。緑色の芽球を含む突起の一部(第2図)を低温保持(約10°C)しながら研究室に持ち帰り、冷蔵庫(約4°C)に保存した。

観察に先立ち、50日間保存した芽球の一部を20°Cの恒温槽に入れ発芽能力の有無を調べたところ、1週間以内に全芽球が発芽し緑色の小海綿体を形成した。観察に用いた芽球は冷水中(4°C)内で骨格骨片からはずし芽球殻の一部に安全カミソリで切れ目を入れたのち、直ちに固定液につけた。リン酸緩衝4%グルタルアルデヒド液とリン酸緩衝4%パラフォルムアルデヒド液の1:1の混合液で60分間室温で前固定した。その後、リン酸緩衝液で洗浄し、リン酸緩衝1%オスミウム酸で90分間の後固定を行なった。固定後、蒸留水で洗い、エタノール系列で脱水し、エポン樹脂に包埋した。

固定した一部の芽球はエタノール系列で脱水後臨界点乾燥を行ない、そのままあるいは芽球口孔の通る面で安全カミソリを使い2つに切断し、金パナジウムを蒸着後、日立走査型電子顕微鏡(HHS-2R)で観察した。

エポン樹脂に包埋した標本をPorter-Blum製超ミクロトームで厚さ約1 μ mの切片とし0.5%トルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡用観察に用い、電子顕微鏡用観察には同ミクロトームで超薄切片とし、酢酸ウラニールとクエン酸鉛で二重染色した後、日立透過型電子顕微鏡(HS-9)で観察した。

観 察 結 果

走査電子顕微鏡観察

芽球は球形またはだ円形で大きさはその径約300 μ mから約600 μ mと様々である。芽球骨片は芽球殻にそって接線方向に付着してみられるが数は少なく、観察されない芽球もある。芽球口孔(Micropyle)は各芽球に1~数個みられ、それらの各芽球口孔の大きさは異なる(第3図)。口孔管(Foraminal tube)はみられず、口孔(Foramen)はその円周に外に広がる膜状の襟(Peripheral collar)をもち、全体として皿状である(第5, 6図)。芽球口孔の表面にはいくつかの窪みがみられる(第5図)。

光学顕微鏡観察

芽球殻は薄く、芽球外膜(Outer gemmular membrane)、気胞層(Pneumatic layer)と芽球内膜(Inner gemmular membrane)の3層からできているものは少なくほとんどの芽球殻は芽球内膜のみであった。芽球殻内は多くの多角形をした貯蔵細胞(thesocyte)で満

たされている（第4図）。貯蔵細胞は明瞭な核小体をもつ2つの核をもち、細胞質には様々な形や大きさの顆粒がみられる。顆粒はトルイジンブルーによく染まった球状やだ円形の顆粒、凸レンズ状の顆粒（卵黄小板）、共生藻のクロレラや多くの脂肪小滴である。

電子顕微鏡観察

貯蔵細胞は核小体の明瞭な核をもち、細胞質には多くの脂肪小滴や電子密度の高い大きな球状、だ円形、凸レンズ状の顆粒（卵黄小板）がみられる。また、大きな顆粒や脂肪小滴の間に豊富なグリコーゲン顆粒を含んでいる。核の近くにゴルジ体がみられ、ミトコンドリアや粗面小胞体は細胞質全体に分散している。共生藻のクロレラは貯蔵細胞内の各空胞内に1個ずつみられ、分裂像を示すクロレラはみられない（第8図）。

球形の大きな顆粒：細胞質にみられるものと同じ大きさの脂肪小滴が顆粒内に多くみられ、そのうち一部の脂肪小滴は顆粒外へ突出している。また顆粒内には粗面小胞体をもつものもみられる（第9図a, b）。

だ円形の顆粒：顆粒は多重の膜で包まれる。顆粒はいくつかの脂肪小滴を含むものもみられるが、脂肪小滴の数は球形の顆粒内にみられる数より少なく、顆粒内で相接して集合している。顆粒内の周辺の電子密度の高い部分には小さな粗面小胞体が分散してみられる（第10図a）。脂肪小滴を含まないだ円形の顆粒は中央部にグリコーゲン顆粒を含み、その周辺部にいくつかのミトコンドリアや小さな粗面小胞体が見られる（第10図b）。

凸レンズ状の顆粒（卵黄小板）：顆粒は多重の膜に包まれる。ほとんどの顆粒は脂肪小滴を含まない。顆粒内の縦軸にそった部位はその周囲よりも電子密度は低い。小さな粗面小胞体が電子密度の高い部分にいくつかみられるが、ミトコンドリアの存在は不明瞭である（第11図）。

共生藻（Zoochlorellae）：クロレラの葉緑体は細胞内の片側に孤状に位置する。葉緑体のチラコイドは密に配列している。クロレラの細胞質には貯蔵細胞内にみられたものと似た脂肪小滴が1～2個みられる。その他、細胞質にはグリコーゲン顆粒や1～2個の電子密度の高い顆粒（Assimilation granule）がみられる（第12図）。

ほとんどのクロレラは貯蔵細胞の空胞内にみられるが、中にはだ円形の顆粒に包まれたものもみられる。それらのとりこまれたクロレラの構造は貯蔵細胞の空胞内にみられるものと同じ構造を示す（第13図）。

考 察

材料に使用したヌマカイメンは採集時、親の海綿体はすでに死に緑色の芽球だけが裸出した骨格骨片の間に残っていた。これらの芽球の芽球口孔と芽球殻を観察した結果、芽球殻は芽球内膜だけからできていたものがほとんどで芽球口孔の表面にはいくつかの窪みがみられた。益田ら（1982）はミマサカジカイメンの芽球殻の形成を走査電子顕微鏡で観察し、まず芽球内膜が形成されるが、その外側に気胞層が出来上がっていく時点では芽球口孔にいくつかの窪みがみられることを認めている。したがって今回使用したヌマカイメンの緑色の芽球の芽球殻は

芽球殻形成の途中の状態であると考えられる。

Pourbaix (1935) は組織化学的研究でヌマカイメンにおいては凸レンズ状の卵黄小板には脂肪顆粒が多く認められないと報告している。De Vos (1971) はカワカイメンについて電子顕微鏡観察した結果、卵黄小板の中層には初めグリコーゲン顆粒が蓄積しているが、小板が完成するにしたがって消滅すると報告している。今回のヌマカイメンの観察において凸レンズ状の顆粒である卵黄小板には脂肪小滴はほとんどみられなかったが、大きな球状の顆粒やだ円形の顆粒にはいくつかの脂肪小滴がみられた。また De Vos が報告している顆粒内におけるグリコーゲンの蓄積が卵黄小板の形成途上を示すものであれば、今回観察した中心部にグリコーゲン顆粒をもつだ円形の顆粒は卵黄小板の形成途中の段階であると考えられる。

以上から今回観察したヌマカイメンの緑色の芽球の構造は他の種類における芽球形成が完了していない状態と同じであると考えられる。しかし採集時、親の海綿体はすでに死に芽球だけが裸出した骨格骨片間に残っていたこと、また50日間冷蔵庫内に保存しても全芽球が発芽能力を示したことより、この緑色のヌマカイメンの芽球は芽球形成が未完成な状態においても越冬能力をもつものとする。

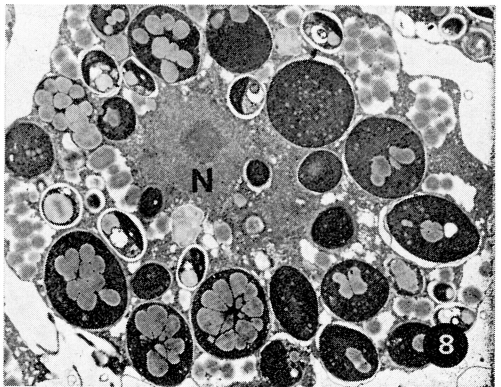
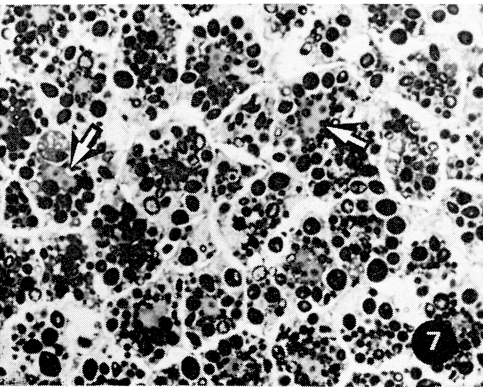
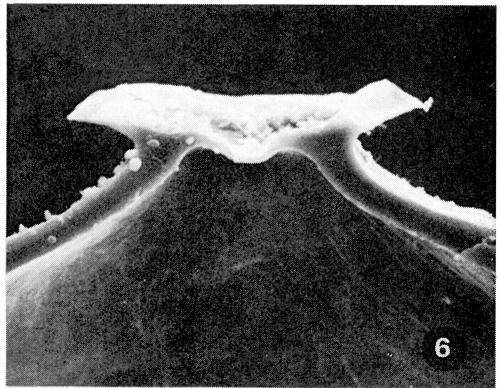
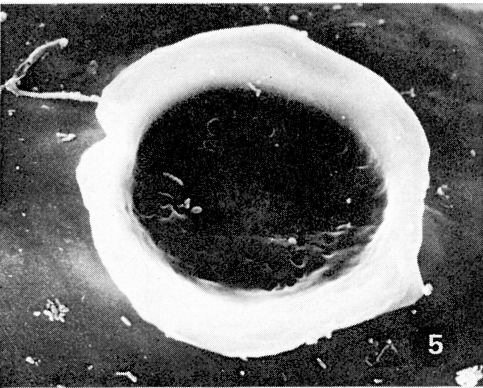
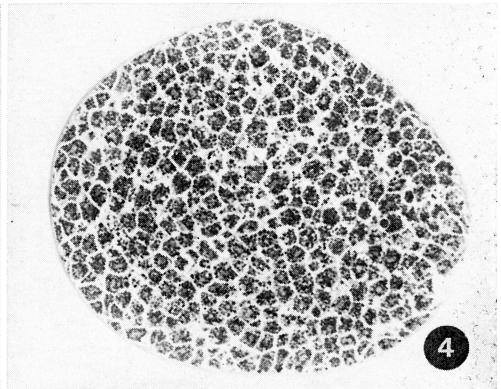
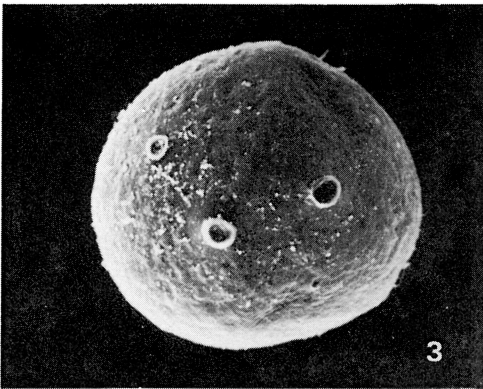
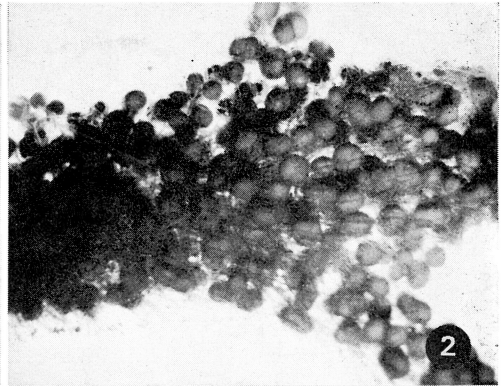
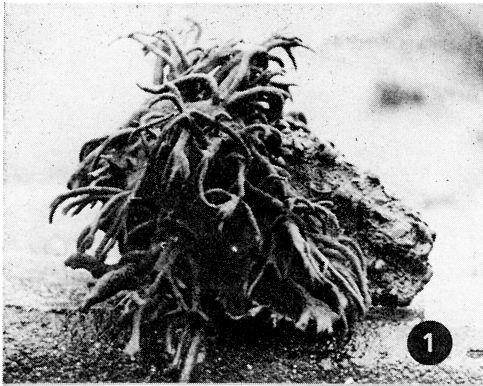
Williamson (1979) の緑色のヌマカイメンの共生藻の電子顕微鏡観察によれば、親の海綿体に共生するクロレラは葉緑体内に大きなピレノイドをもちチラコイドも密に配列している。クロレラの中には分裂像を示すものもみられる。一方、緑色の芽球の貯蔵細胞に共生するクロレラは分裂像を示さず、葉緑体内に大きなピレノイドもみられずチラコイドはやや粗に配列すると報告している。

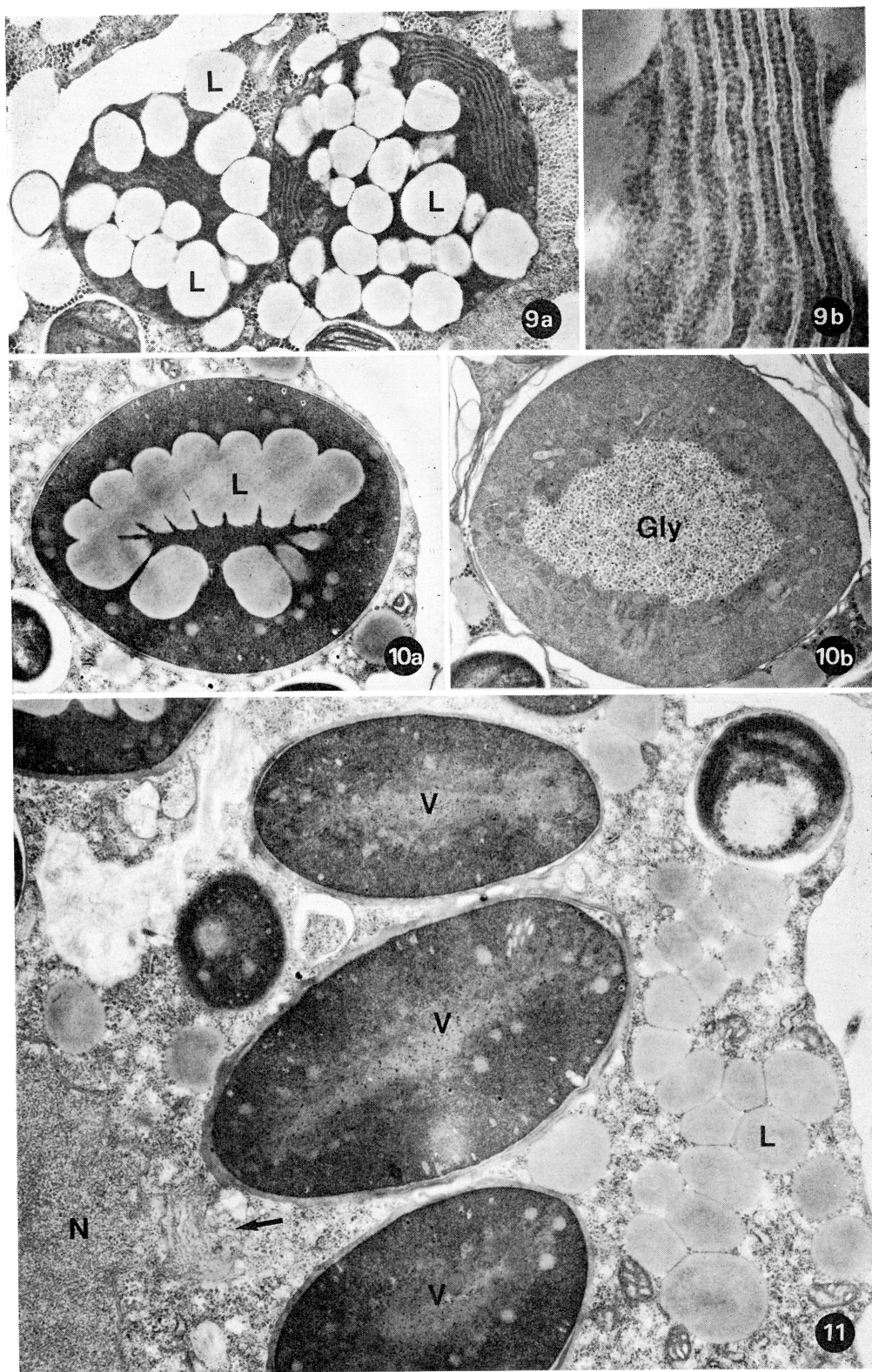
今回の観察でも貯蔵細胞内に共生するクロレラには分裂像やピレノイドも認められなかったが、葉緑体のチラコイドの配列は密で Williamson が観察した親の海綿体内のクロレラのチラコイドの配列に似ていた。また実験に用いた芽球の一部は発芽後、緑色の小海綿体を形成したことからクロレラは芽球内で休眠しているものとする。

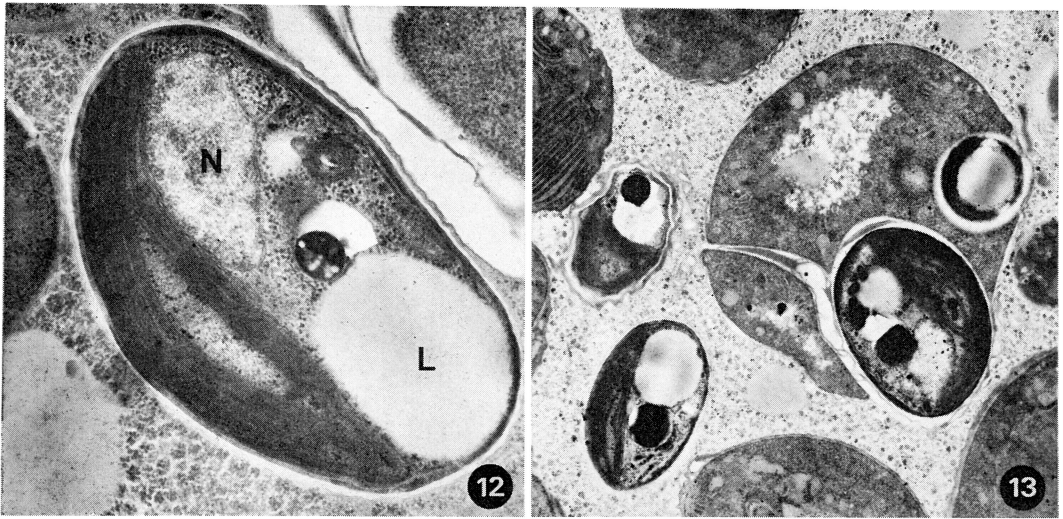
貯蔵細胞内の一部の芽球はだ円形の顆粒にとりこまれていたが、これらのクロレラには細胞壁も残っており消化されている像はみられず、貯蔵細胞の空胞内にみられる他のクロレラと同じ構造を示していた。このことはこれらのクロレラは取りこまれただ円形の顆粒内で消化されずに残っていると考えられる。

Explanation of Figures

- Fig. 1** Sponge body of *Spongilla lacustris* (L.) on 10 October 1982. The sponge body with vertical branches is green and is attached to a stone. $\times 0.2$
- Fig. 2** A part of one branch of *Spongilla lacustris* (L.) collected on 30 December 1982. Many green gemmules lie free in the interstices of the skeleton spicules. $\times 7$
- Fig. 3** Scanning electron micrograph of a green gemmule. Three micropyles are seen on the surface of the gemmule. $\times 78$
- Fig. 4** Photomicrograph of a gemmule in a toluidine blue section. Many polygonal cells are packed in the gemmular shell, which consists of inner gemmular membrane alone. $\times 120$
- Fig. 5** Scanning electron micrograph of a micropyle with peripheral collar. Some hollows are seen on the surface of the micropyle. $\times 780$
- Fig. 6** A profile of a micropyle cut vertically. $\times 780$
- Fig. 7** Thesocytes in a toluidine blue stained section. Many kinds of large granules are seen in the cytoplasm. The two arrows indicate binucleate thesocytes. $\times 600$
- Fig. 8** Electron micrograph of a thesocyte containing numerous lipid droplets, various kinds of large inclusions, and several zoochlorellae. N, nucleus. $\times 2,900$
- Fig. 9-12** Three types of inclusions : spherical inclusions, ellipsoidal inclusions, and lenticular inclusions (vitelline platelets).
- Fig. 9** Spherical inclusions.
- a Rough endoplasmic reticulum and numerous lipid droplets are seen in the large spherical inclusions. L, lipid droplet. $\times 13,000$
 - b Enlarged view of rough endoplasmic reticulum. $\times 53,000$
- Fig. 10** Two types of ellipsoidal inclusions.
- a Some lipid droplets are arranged in the central portion. L, lipid droplet. $\times 9,800$
 - b A large number of glycogen granules are seen in the central portion and some mitochondria and fragments of rough endoplasmic reticulum are seen in the peripheral portion. Gly, glycogen granule. $\times 9,800$
- Fig. 11** Lenticular inclusions (vitelline platelets). These inclusions show a light area in the longitudinal direction and contain no lipid droplets. L, lipid droplet ; N, nucleus ; V, vitelline platelet. $\times 13,000$
- Fig. 12** Intracellular zoochlorella located inside host vacuole. Note that the zoochlorella has a cell wall and closely arrayed thylakoid membranes in its chloroplasts. L, lipid droplet ; N, nucleus. $\times 29,000$
- Fig. 13** Zoochlorella engulfed by an ellipsoidal inclusion. The zoochlorella shows the same structure as that located inside the host vacuole. $\times 11,000$







引用文献

- 1) De Vos, L. (1971) Étude ultrastructurale de la gemmulogénese chez *Ephydatia fluviatilis*. I. Le vitellus-formation-teneur en ARN et glycogène. J. Microsc., **10**: 283-304.
- 2) Gilbert, J. J. and T. L. Simpson (1976) Gemmule polymorphism in the freshwater sponge *Spongilla lacustris*. Arch. Hydrobiol., **78** (2): 268-277.
- 3) 益田芳樹・佐藤国康・松本邦夫 (1982) 淡水海綿のジーカイメン及びミマサカジーカイメンの芽球殻の走査電子顕微鏡的観察, 川崎医学会誌一般教養編, (8): 75-84.
- 4) 向井秀夫 (1980) 多々良沼の淡水海綿についての二・三の知見 (芽球に関する総説を含む), 群馬大学教養部紀要自然科学編, **29**: 35-71.
- 5) Pourbaix, N. (1935) Formation histochimique des gemmules d'éponges. Ann. Soc. Roy. Zool. Belg., **66**: 33-37.
- 6) Rasmont, R. (1955) La gemmulation des Spongillidae (IV) Morphologie de la gemmulation chez *Ephydatia fluviatilis* et *Spongilla lacustris*. Ann. Soc. Roy. Zool. Belg., **86**: 340-387.
- 7) Ruthmann, A. (1965) The fine structure of RNA-storing archaeocytes from gemmules of freshwater sponges. Quart. J. Micr. Sci., **106**: 99-114.
- 8) Sasaki, N. (1939) Freshwater sponges obtained in south Saghalin. Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ., Ser. 4. **14**: 119-134.
- 9) Williamson, C. E. (1977) An ultrastructural investigation of algal symbiosis in white and green *Spongilla lacustris* (L.) (Porifera: Spongillidae). Trans. Amer. Microsc. Soc., **98** (1): 59-77.