

令和3年度 学生による地域フィールドワーク研究助成事業
研究成果報告書

- ・機関・学部・学科： 富山大学理学部生物学科
- ・所属ゼミ： 山崎研究室
- ・指導教員： 山崎裕治 准教授
- ・代表学生： 綿谷みなも
- ・参加学生： 岡田幸笑
- ・協力学生： 金子 寛(調査等をサポートした学生)

【研究題目】 立山マリモの保全のための生育環境調査

1. 課題解決策の要約

富山県立山町に生育するタテヤママリモ(立山マリモ)を保全するための基礎研究として、形態的特徴および遺伝的特徴に基づく種同定方法の確立を行なった。また自然下におけるタテヤママリモの生育状況調査を行ない、過去の生育状況との比較を行った。以上の結果、タテヤママリモ保全において種判別方法の確立など、不可欠な情報が収集されると同時に、本種の生育域の縮小の可能性が明らかになった。本研究の成果を活用し、今後も継続的な調査の必要性が示された。

2. 調査研究の目的

近年、種の絶滅は地球規模で進行しており、保全が必要な種が増加している。このような状況に対して、多くの生物を対象とした対策が講じられているが、その大半が象徴種や指標種など、人間生活や生態系全体の持続性に資する生物を対象としている。例えば、メダカは身近な生物の象徴であり、ツキノワグマは生態系の指標生物として、保全の分野においても注目を集めている。その一方で、身近な存在であり、時にはその地域を象徴する生物でありながら、認識される機会が乏しい生物も少なくない。その一例としてタテヤママリモ *Aegagropilopsis moeravica* (Dvořák)が挙げられる。

タテヤママリモ(図1)は緑藻植物門アオサ藻綱シオグサ目アオミソウ科タテヤママリモ属に分類され、1980年代に富山県中新川郡立山町の民家ではじめて確認された淡水性藻類である(立山マリモ生育状況調査実行委員会,1995)。その外見的特徴や生育状況から、扁平な楕円形を呈して水中を浮遊する「浮遊糸状体」と用水路の底面や壁面に着生する「着生糸状体」に分けられている。タテヤママリモの分類は未だに混乱しており、発見された当初は、マリモ *Aegagropila linnaei* (Kütz)とみなされており、立山町で発見されたことから「立山マリモ」と呼称された。

その後、いくつかの遺伝子分析が行われ、核DNAの18SrRNA領域の塩基配列に基づく分子系統解析によって、マリモとは遺伝的特徴が大きく異なり、別の種であることが指摘された(Hanyuda et al. 2002)。しかし、タテヤママリモの形態的特徴、特にマリモや他のシオグサ類との形態的差異は、必ずしも明らかにされていない。

富山県立山町におけるタテヤママリモの生育状況については、1992年から1994年に立山町教育委員会が主体となり、調査が実施された(立山マリモ生育状況調査実行委員会,1995)。その結果、同町野口地区の複数の民家の池や周辺の用水路において本種の生育が確認された。またその生育には、湧き水などの冷水が不可欠であることも明らかにされた。しかしそれ以降、体系的な生育地調査は実施されておらず、現在のタテヤママリモの生育状況は把握されていない。そのため、現在においてタテヤママリモの生育域の状況が変化している

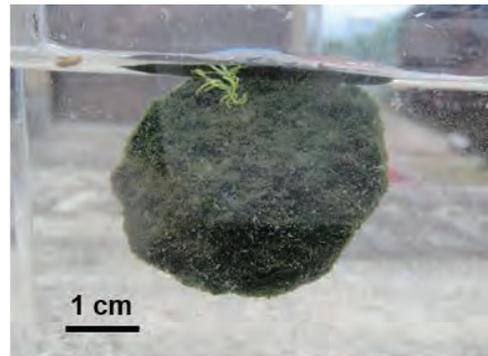


図1. タテヤママリモ(浮遊糸状体)

可能性が考えられ、実態把握とそれに即した保全策の構築が必要である。

そこで本研究では、立山町を象徴する貴重な地域資源であるタテヤママリモについて、遺伝子と形態に注目した分類方法の構築と、それらに基づく生育地調査を行い、本種の現状を把握し、今後の保全に資する情報の収集と蓄積を行うことを目的とした。

3. 調査研究の内容

3-1. フィールド調査

フィールド調査地点を、立山マリモ生育状況調査報告書（立山マリモ生育状況調査実行委員会,1995）に基づき、富山県立山町野口地区を中心に、常願寺川水系右岸側の用水路に設定した。

まず、2021年5月24日に、立山町教育委員会の許可および協力を受け、同町野口地区の人家に設置されたタテヤママリモの保護実験水槽（図2）に生育しているタテヤママリモ5藻体（糸状体の塊）を提供いただいた。提供いただいた藻体については、藻体ごとに300mlの広口T型瓶に飼育水と共にいれ、冷蔵状態で大学研究室に持ち帰った。研究室においては、本種の生育に適した水温とされる14度に設定したインキュベーター内で、藻体ごとに個別に飼育瓶に入れ、生育に必要な成分を補うアドバンスソイル水草用（アズワン社）を付加して飼育した。また、光合成をさせるために、日中はインキュベーターから飼育瓶ごと出し、直射日光の当たらない窓辺に静置した。その結果、藻体から気泡が発生し、それにより得た浮力によって飼育瓶内で浮上する様子が確認された。

上述した調査地点におけるフィールド調査を、2021年5月から11月にかけて実施した（図3）。主に道路わきの用水路を中心に、目視観察を行い、用水路壁面や底面に藻類の付着を確認した場合は、徒手あるいはピンセット等を用いて藻類を採取した。採取した藻体は300mlの広口T型瓶に採集地点の水ごと保存し、冷蔵状態で大学研究室に持ち帰った。フィールド調査においては、調査地点における緯度経度および水温について記録を行った。緯度経度はGPSMAP® 62SCJを用いて測定した。水温は防水デジタル温度計ASF-250T（アズワン社）を用いて測定した。

3-2. 形態観察

フィールド調査で採取し、研究室に持ち帰った藻体について、その一部を摘出して、NIKON 検査用顕微鏡ECLIPSE E400および生物顕微鏡PANTHERAシリーズを用いて顕微鏡観察を行った。藻体の種同定は、日本淡水藻図鑑（廣瀬・山岸, 1977）に基づいて行った。

これまでの報告において、タテヤママリモは、対生もしくは互生に分岐する枝を有する糸状体がいくつも絡み合うことで塊を形成していることが知られている（立山マリモ生育状況調査実行委員,1995）。さらにその詳細として、枝は縦列した筒状あるいは棍棒状の細胞から成り、細胞中には網目状の葉緑体およびピレノイドが存在している。そこで本研究では、タテヤママリモの形態的特徴、特にマリモとの形態的差異を明らかにするために、枝の状態の詳細および細胞比に注目した。

枝の状態および細胞比については、HOZAN USB cam software2を用いて藻体の顕微鏡画像を作成し、立山町の保護実験水槽から入手したタテヤママリモについて一次枝（藻体の主軸から分岐した枝を指す）および二次枝（藻体の一次枝から分岐した枝を指す）における先端細胞（枝において最も端に位置する細胞を指す）および栄養細胞（先端細胞以外の細胞を指す）を記録した。特に先端細胞および栄養細胞について、それぞれの



図2. タテヤママリモ保護実験水槽における調査の様子。

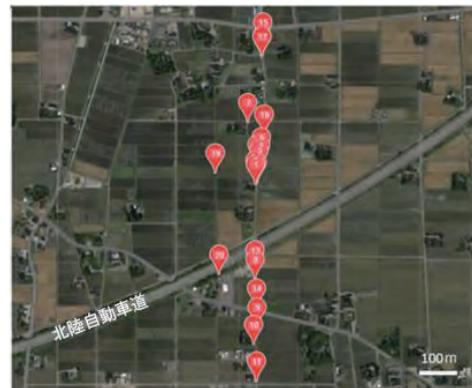


図3. 立山町野口地区における調査地点。（地図画像はGoogleマップより）

直径(D)および細胞長(L)を測定し、細胞比(L/D 比)を算出した。タテヤママリモの先端細胞については、一次枝については9検体(藻体の一部)から23細胞を、二次枝については5検体から5細胞を、それぞれ計測した。また、タテヤママリモの栄養細胞については、一次枝については8検体から21細胞を、二次枝については5検体から7細胞を、それぞれ計測した。

また、2021年11月のフィールド調査において採取され、後述する形態観察および遺伝子分析においてタテヤママリモと判断された藻体についても一次枝および二次枝における先端細胞および栄養細胞の直径(L)および細胞長(D)を測定し、細胞比(L/D 比)を算出した。この藻体の先端細胞は一次枝については1検体から3細胞を、二次枝については1検体から1細胞を、それぞれ計測した。また、栄養細胞は一次枝については1検体から9細胞を、二次枝については1検体から7細胞を、それぞれ計測した。

さらに、タテヤママリモと比較するために、北海道の土産物店で購入したマリモについても同様に観察した。その際、マリモの先端細胞については、一次枝については2検体から2細胞を、二次枝については3検体から5細胞を、それぞれ計測した。また、マリモの栄養細胞については、一次枝については4検体から21細胞を、二次枝については1検体から5細胞を、それぞれ計測した。

3-3. 遺伝子分析

立山町の保護実験水槽から入手したタテヤママリモおよびフィールド調査において採取した藻体について、遺伝子分析を実施した。

藻類においては、遺伝子分析の実施事例が乏しく、また細胞を覆う細胞壁や藻体内における多糖類の多さが要因となって、遺伝子分析の困難さが指摘されていた。そこで本研究では、分析方法の確立を目指した。

遺伝子実験試料としては、上記の藻体の一部を摘出し、100%エタノールに固定・保存したものをを用いた。遺伝子抽出方法として、Template Prepper for DNA(ニッポンジーン社)、Gentra Puregene(キアゲン社)、そしてDNeasy Plant Mini Kit(キアゲン社)の3種類のキットを用い、いずれも正規の操作手順に従って実験を行った。

遺伝子増幅においては、核DNAの18SrRNA領域を対象として、Hanyuda et al. (2002)で報告されている方法に従って実施した。増幅が確認されたサンプルについて、BigDye terminate v3.1を用いて、ダイターミネター反応を行い、Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザー(サーモフィッシャー社)を用いて、塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列について、アメリカ国立工学情報センターのデータベース(NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)において相同性検索を行った。また、MEGAプログラムを用いて、近隣結合法に基づく分子系統樹を作成した。この際、NCBIに登録されている近縁種を解析に加えた。

4. 調査研究の成果

4-1. フィールド調査と形態分類

フィールド調査では18地点から藻体を合計20検体採取した。

2021年5月の調査では、用水路の壁面を中心とした10地点から10検体を採取した。これらの藻体の長さは2~5cmであった。顕微鏡観察の結果、タテヤママリモと判断される藻体は確認できず、シオグサ属、ヒビミドロ属、サヤミドロ属、そしてスギゴケ属の緑藻類が確認された。

2021年8月の調査では、5地点から5つの藻体を採取した。これらの藻体の長さは2~6cmであった。顕微鏡観察の結果、タテヤママリモと判断される藻体は確認できず、シオグサ属、サヤミドロ属、アオミドロ属、そしてフシナシミドロ属の緑藻類が確認された。調査地の水温は、14.6℃~24.8℃であった。

2021年11月の調査では、3地点から5つの藻体を採取した。これらの藻体の長さは1~2cmであった。顕微鏡観察の結果、タテヤママリモと判断される藻体が地点1において確認された(図4)。他地点ではシオグサ属の緑藻類が確認された。調査地の水温は、12.4℃~17.7℃であった。



図4.タテヤママリモ確認地点。

4-2. タテヤママリモの細胞形態

タテヤママリモの一次枝において先端細胞および栄養細胞の平均値は、長さが510.4 μm および297.5 μm 、直径が46.1 μm および45.5 μm 、細胞比が12.6および7.5であった。また、二次枝において先端細胞および栄養細胞の平均値は、長さが460.4 μm および287.6 μm 、直径が45.8 μm および48.7 μm 、細胞比が12.1および6.2であった(図5、表1)。

また、2021年11月に地点1で採取され、後述する遺伝子分析においてタテヤママリモと判断された藻体における一次枝についての先端細胞および栄養細胞の平均値は、長さが187.3 μm および201.2 μm 、直径が23.7 μm および31.6 μm 、細胞比が9.1および6.6であった。また、二次枝において先端細胞および栄養細胞の平均値は、長さが152.0 μm および123.9 μm 、直径が13.0 μm および22.9 μm 、細胞比が11.7および5.5であった(表1)。

一方、マリモの一次枝において先端細胞および栄養細胞の平均値は、長さが414.0 μm および292.3 μm 、直径が93.5 μm および71.7 μm 、細胞比が4.4および4.4であった。また、二次枝において先端細胞および栄養細胞の平均値は、長さが179.6 μm および287.0 μm 、直径が57.0 μm および77.0 μm 、細胞比が3.4および4.1であった(表1)。

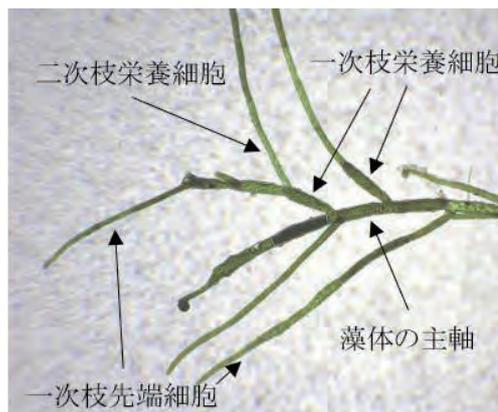


図5. タテヤママリモの顕微鏡像

表1. タテヤママリモおよびマリモにおける先端細胞および栄養細胞の形態的特徴。

	先端細胞		
	長さ(μm):平均(最小-最大)	直径(μm):平均(最小-最大)	細胞比:平均(最小-最大)
一次枝			
タテヤママリモ	510.4 (130 - 1308)	46.1 (27 - 68)	12.6 (2.8 - 33.4)
地点1の藻体	187.3 (126 - 229)	23.7 (16 - 38)	9.1 (5.4 - 14.3)
マリモ	414.0 (216 - 612)	93.5 (76 - 111)	4.4 (2.8 - 5.5)
二次枝			
タテヤママリモ	460.4 (306 - 824)	45.8 (27 - 58)	12.1 (5.6 - 30.5)
地点1の藻体	152.0 (152 - 152)	13.0 (13 - 13)	11.7 (11.7 - 11.7)
マリモ	179.6 (54 - 329)	57.0 (33 - 112)	3.4 (1.6 - 6.3)
	栄養細胞		
	長さ(μm):平均(最小-最大)	直径(μm):平均(最小-最大)	細胞比:平均(最小-最大)
一次枝			
タテヤママリモ	297.5 (68 - 680)	45.5 (27 - 77)	7.5 (1.0 - 21.3)
地点1の藻体	201.2 (126 - 331)	31.6 (20 - 41)	6.6 (3.1 - 16.6)
マリモ	292.3 (178 - 538)	71.7 (45 - 120)	4.4 (1.7 - 10.4)
二次枝			
タテヤママリモ	287.6 (173 - 422)	48.7 (37 - 74)	6.2 (3.4 - 9.1)
地点1の藻体	123.9 (87 - 160)	22.9 (19 - 27)	5.5 (3.2 - 7.6)
マリモ	287.0 (239 - 381)	77.0 (38 - 103)	4.1 (2.6 - 6.4)

4-3. 遺伝子分析

3種類の抽出キットを用いた遺伝子抽出およびPCR増幅の結果、Template Prepper for DNA および Genra Puregene を用いた実験では、明瞭な遺伝子増幅産物が得られなかった。これに対して、DNeasy Plant Mini Kit では、明瞭な増幅産物が確認されたことから、この方法を用いて塩基配列の決定を行った。

各遺伝子実験用藻体について、塩基配列を決定し、NCBI における相同性検索を行った結果、タテヤママリモとマリモから得られた結果は、いずれも当該種として NCBI 上に登録されている配列と一致した。一方、フィールド調査において得られた藻体においては、2021年11月に地点1で採取された藻体は、タテヤママリモと同じ塩基配列を示した。そして、これ以外の藻体については、シオグサ属のカワシオグサ *Cladophora glomerata* Kützinger であった。

近隣結合法に基づく分子系統樹を作成した結果、タテヤママリモは、マリモや他の緑藻類とは異なる系統的配置を示し、マリモとアオミソウ藻類が形成したクレードと単系統を形成した(図6)。また、同所的に確認されたカワシオグサとは遺伝的特徴が大きく異なった。

5. 調査研究に基づく提言

本研究の結果、形態的特徴および遺伝的特徴に基づくタテヤママリモの種同定法が確立された。まず形態的特徴においては、タテヤママリモおよびマリモ間の一次枝および二次枝における先端細胞の直径は少なくとも10 μm、タテヤママリモの方が短いことが示された。また、タテヤママリモおよびマリモ間の一次枝の先端細胞の直径は最小値および最大値が重複していなかった。さらに、タテヤママリモの細胞比が、マリモのそれと比べて高い値を示す傾向が認められた。以上のことから、タテヤママリモについて、細胞レベルの形態観察に基づく分類が可能となった。また、遺伝子分析においては、タテヤママリモの塩基配列は、マリモや他の藻類と明確に異なり、遺伝子分析に基づく分類が可能となった。そして、これら研究成果を活用することで、タテヤママリモの正確な種同定が可能となり、生育状況調査の際にこれら手法を用いることが有益であると判断される。

また、フィールド調査および種同定の結果、タテヤママリモの特徴を有する藻体が2021年11月の地点1から1検体確認された。しかし本研究では、立山マリモ生育状況調査報告書(立山マリモ生育状況調査実行委員会,1995)において本種の生育が確認されている地点を含む地域からは、上記以外にタテヤママリモの特徴を有する藻体は確認できなかった。この要因として以下の2点が可能性として示唆される。

1つ目として、水温の上昇による本種の生育適地の減少、および他の藻類の生育域が拡大した可能性が挙げられる。タテヤママリモが生育する人家の池および保護実験水槽の水温は、湧水の流入があり、平均15°C前後と安定しており、夏場の気温が上昇する時でも水温は18°Cである(立山マリモ生育状況調査実行委員会,1995)。しかし、2021年8月のフィールド調査における調査地点の水温の平均値は22.8°Cであり、タテヤママリモが生育する人家の池や保護実験水槽と比べて約5°C水温が高かった。加えて、他の緑藻類や藍藻類の中には、高水温や直射日光を好む種類があり、これらの繁茂がタテヤママリモの生育を阻害している可能性が指摘されている(立山マリモ生育状況調査実行委員会,1995)。これらのことから、現在の用水路においては、本種の生育に適さない高水温状態あるいは他の藻類との生育地の競合が生じている可能性が考えられる。

2つ目として、用水路の改修整備が影響していることが考えられる。藻類において用水路は生育場として活用されている。このうちタテヤママリモが生育している水路は、かつては野面石積と呼ばれる丸みを帯びた栗石を積み重ねることで作られていた(立山マリモ生育状況調査実行委員会,1995)。栗石も藻類における生育場として活用されており、人為的に栗石を入れた用水路ではカワニナ類 *Semisulcospira* sp. および藍藻類や珪藻類が栗石に付着した(森ほか,2005)。また、用水路の底質も重要な要素を占めており、原形自然水路型および整備土水路型、整備コンクリート水路型における比較では整備コンクリート水路型の用水路において最も出現した大型水生動物の種類が少ないことが示されている(楡井,1997)。しかし現在における用水路は野面石

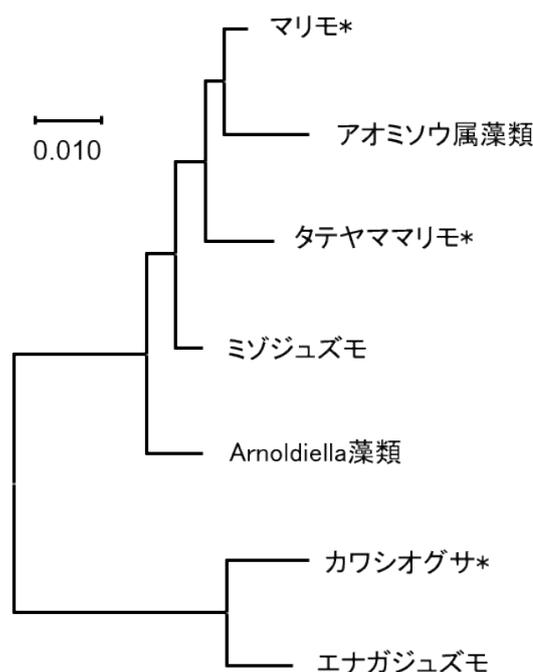


図6. 核DNAの18SrDNAのITS領域の塩基配列に基づくシオグサ類の分子系統樹。
*本研究で分析した検体。

積ではなくコンクリートを用いた滑らかな用水路となっている。従って、改修工事が行われた用水路の方には藻類が付着できず、タテヤママリモの生育が困難である可能性が示唆される。

以上のことから、タテヤママリモの保全やそのための現地調査においては、水温、用水路の構造、そして共存生物の状況など、多角的な視点に基づく実態把握が必要であると考えられる。

6. 課題解決策の自己評価

本研究の結果、1995年の調査から27年が経過しているが、自然下でのタテヤママリモの生育が確認された。しかし、確認されたのは1地点のみであったため、今後は従来よりも広範囲な調査の実施に加えて、タテヤママリモにおける最適な底質および水流についても調査を行う必要がある。また、その際に不可欠な種同定方法について、本研究において形態および遺伝子の双方の手法が確立できたことは、今後のタテヤママリモの保全において重要な知見の提供になったと判断される。以上のように、当初目的としたタテヤママリモの現状評価とそのための方針の確立という点では、大きな成果が得られたものと考えられる。

その一方で、新型コロナウイルス感染症の影響で、必ずしも十分な現地調査の実施や試料採取ができなかったことは否めない。今後の継続調査や分析検体数の増加が期待される。

今回得られた成果を、地元の立山町や富山県内外に広くアピールしていくことで、タテヤママリモの保全の機運を高めるとともに、タテヤママリモを通して、地域の価値の再認識と、地域の魅力の発信の一助になると考えられる。

参考文献

- Hanyuda T, Wakana I, Miyaji K, Watano Y, Ueda K (2002) Phylogenetic relationships within Cladophorales (Ulvophyceae, Chlorophyta) inferred from 18S rRNA gene sequences, with special reference to *Aegagropila linnei*. *Journal of Phycology*, 38: 564-571.
- 廣瀬弘幸・山岸高旺(1977)日本淡水藻類図鑑. 内田老鶴圃新社, 993頁.
- 森淳・水谷正一・松澤真一(2005)生態系保全水路の建設に向けた底質の予備実験. 農業土木学会論文集, 240: 141-142.
- 楡井秀夫・中村俊彦(1997)日本の農村生態系の保全と復元 VII:水田用水路の大型水生動物と圃場整備, 国際景観生態学会日本支部会報, 3: 70-71.
- 立山マリモ生育状況調査実行委員会(1995)立山マリモ生育状況調査報告書. 立山町教育委員会, 60頁.