

平成 23 年 3 月 4 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770049

研究課題名（和文）細胞連結様式から解く二分裂型トレボキシア藻の糸状体化の過程

研究課題名（英文）Uniting of cells and filament formation of binary fission type species in Trebouxiophyceae

研究代表者

山本 真紀 (YAMAMOTO MAKI)

専修大学・商学部・准教授

研究者番号：80361616

研究成果の概要（和文）：緑色藻類トレボキシア藻の分裂様式に着目し、単細胞緑藻から糸状体への細胞連結がどのように生じたかの解明を目指した。蛍光顕微鏡と電子顕微鏡観察から *Stichococcus bacillaris* では内生孢子形成型と同様に母細胞壁の開裂が起こるが、娘細胞に密着したまま残存するために二分裂することが示された。さらに、対数増殖期に糸状体が形成されることから、娘細胞同士の解離が次のセルサイクルの進行よりも遅れることが糸状体形成の要因であることが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated uniting of cells and filament formation in binary fission type species in Trebouxiophyceae. We used LM, TEM and FE-SEM to explore mother cell wall exfoliation. The mother cell wall was cleaved but remained adhered to the daughter cell in *Stichococcus bacillaris*. We observed that cells of *S. bacillaris* united each other and formed long filaments in log phase. The parallel emergence of multicellular algal species may have begun from processes such as filament formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：細胞壁、藻類、トレボキシア藻、電子顕微鏡、内生孢子形成、*Stichococcus*

1. 研究開始当初の背景

トレボキシア藻は、陸上植物の直接の祖先である車軸藻と同じ緑色藻類に属するが、陸上植物化することはなかった、いわゆる進化

の袋小路に入り込んだグループといえる。トレボキシア藻の多くの種は内生孢子形成によって分裂増殖する。内生孢子形成とは、細胞壁の内側で細胞の中身である細胞質が分

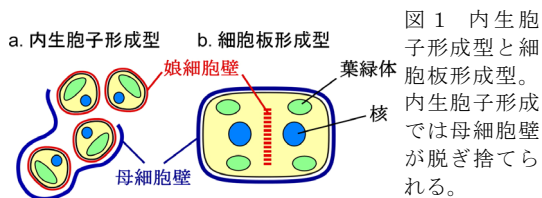


図1 内生孢子形成型と細胞板形成型。内生孢子形成では母細胞壁が脱ぎ捨てられる。

裂し、新しくできた娘細胞質が新規に合成された娘細胞壁に包まれる様式である。娘細胞が成熟すると、母細胞壁が開裂して娘細胞(孢子)が放出される。したがって、分裂のたびに前回の分裂時に合成した細胞壁を脱ぎ捨てることになる(図1a、2a-b)。一方、多細胞化した陸上植物の場合、細胞質は分裂面に形成される細胞板(娘細胞壁)によって仕切り分けられ、他の部分の細胞壁はそのまま保持されるので、分裂面に新しい細胞壁を形成するだけで足りる(図1b)。内生孢子形成のように母細胞壁の脱ぎ捨てるを繰り返している限り、多細胞化は起こり得ない。一方で、トレボキシア藻綱内には糸状体や葉状体を形成する種も存在する(Sherwood et al. 2007)。この背景には内生孢子形成型から別の分裂様式への転換があったものと考えられる。

これまで、トレボキシア藻綱内のクロレラグループには、二分裂型の *Nannochloris bacillaris* (図2c-d) や出芽型の *Marvania geminata* などの珍しい種が存在することに着目し、分裂様式の多様性とその出現経緯に焦点を絞って研究を進めてきた。その結果、トレボキシア藻綱内の分裂様式の祖先型は内生孢子形成であり、そこから二分裂や出芽が派生的に生じたこと(Yamamoto et al. 2001、2003)、トレボキシア藻綱内の種は、娘細胞壁合成が細胞質分裂前に始まる初期合成型と、細胞質分裂後に始まる後期合成型に分かれること(Yamamoto and Kawano 2004、Yamamoto et al. 2004、2005)、二分裂型・出芽型と内生孢子形成型の違いは、細胞質分裂時に母細胞壁が開裂するが、脱ぎ捨てられずに娘細胞壁にはりついている点だけであり、本質的には内生孢子形成の後期合成型と相同な分裂様式であること(Yamamoto et al. 2007)を明らかにした。

そこで、本研究では、祖先的な内生孢子形成型からの分裂様式の転換をきっかけに単細胞緑藻の細胞連結がどのように生じたかを解明することを目指した。

2. 研究の目的

トレボキシア藻の単細胞緑藻 *Stichococcus bacillaris* は、*Nannochloris*

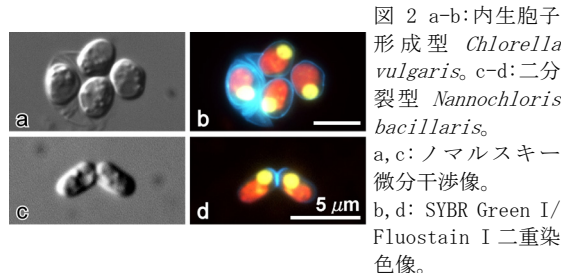


図2 a-b:内生孢子形成型 *Chlorella vulgaris*。c-d:二分裂型 *Nannochloris bacillaris*。a, c:ノマルスキー微分干渉像。b, d: SYBR Green I/Fluostain I 二重染色像。

*bacillaris*より細胞サイズが約1.5倍大きい、よく似た桿状の形態をしており、やはり二分裂する。しばしば細胞が横一直線に連結した糸状体を形成する点が *N. bacillaris* と異なる。二分裂型の種でこのような糸状体が形成されることから、内生孢子形成型からの脱却が細胞同士の連結を生み出していると推測される。そこで、内生孢子形成型から発達した二分裂型 *S. bacillaris* において、細胞同士はどのように連結しているかを解き明かすことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Stichococcus bacillaris* (Handa786x) のキャラクタライゼーション: *S. bacillaris* は光学顕微鏡下では *N. bacillaris* と極めてよく似た二分裂をする。核DNA含量の定量と18SrRNA 遺伝子に基づく分子系統解析を行い、*N. bacillaris* との系統関係を確認した。

①核DNA含量の定量: *S. bacillaris* の細胞核をDNA特異的蛍光色素PIで染色し、その蛍光強度をレーザースキャニングサイトメーター(LSC)で顕微測光した。コントロールにはhaploid (13.4Mb) とdiploid (26.8Mb) の *Saccharomyces cerevisiae* と *Ulva compressa* の配偶子(135Mb)を用いた。

②18SrRNA 遺伝子に基づく分子系統解析: *S. bacillaris* の18SrRNA 遺伝子断片を単離し、既知の緑色藻類83種93株の塩基配列を加え、ベイズ法を用いて分子系統樹を作成した。外群にはプラシノ藻の配列を用いた。

(2) *S. bacillaris* の母細胞壁開裂の有無と *N. bacillaris* との比較

①蛍光顕微鏡による母細胞壁脱ぎ捨てるの有無の観察: *S. bacillaris* の生細胞をDNA特異的蛍光色素SYBR Green Iと細胞壁特異的色素Fluostain Iで二重染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

②電子顕微鏡による母細胞壁開裂の有無の観察: *N. bacillaris* と同様に、*S. bacillaris* でも母細胞壁の開裂が起こるかどうかを透過型電子顕微鏡(TEM)と走査型電子顕微鏡(SEM)で比較観察した。TEM観察のための細胞固定には加圧凍結固定法を用い、凍結置換

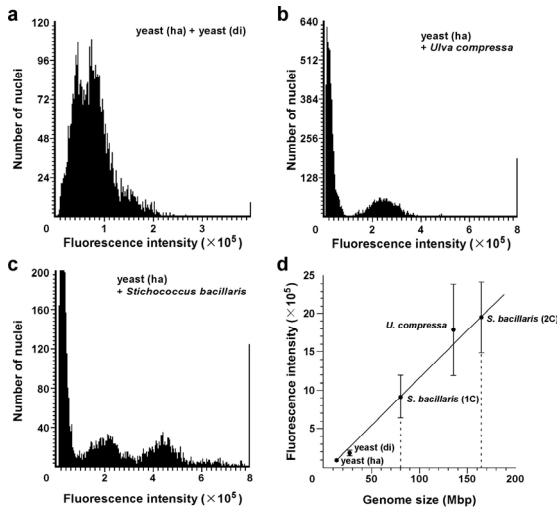


図3 LSCによる *S. bacillaris* の核 DNA 含量の測定
 a: *S. cerevisiae* YM4741 (haploid) と *S. cerevisiae* YM4743 (diploid)、b: *S. cerevisiae* YM4741 と *U. compressa*、c: *S. cerevisiae* YM4741 と *S. bacillaris* の相対的な蛍光強度の比較。d: a-c から得られる検量線 (論文番号①)。

した。SEM 観察用の試料は化学固定後に臨界点乾燥とオスミウムコートをし、超高分解能電界放射型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) で観察した。

(3) *S. bacillaris* の成長曲線と糸状体形成のタイミング

同じカルチャーでも日数が経つと糸状体の形成率が変化する様子が観察された。このことは、対数増殖期か、定常期かで細胞同士の連結しやすさに差があることを示唆している。そこで、植え継ぎ後の糸状体形成率の変化を経時的に観察した。

(4) *S. bacillaris* の細胞分裂時の細胞壁構造の変化: 細胞が連結するしくみを知る手がかりを得るために、*S. bacillaris* の細胞分裂時の細胞壁微細構造の変化を TEM で詳細に追跡した。

(5) 近縁種 *Diplosphaera chodatii* と *Prasiolopsis ramosa* の母細胞壁残存の有無: クロレラグループは *Chlorella* や *Nannochloris* などの単細胞性の種で占められる。一方、カワノリグループには、糸状体化する *S. bacillaris* の他に、細胞塊化する *D. chodatii* や柔組織様の *P. ramosa* が存在する。糸状体から細胞塊化、柔組織化を経て葉状体に発達する経緯を探るため、*D. chodatii* と *P. ramosa* の培養細胞を加圧凍結固定後、凍結置換し、TEM で観察した。

4. 研究成果

本研究の主な成果は以下の5点である。

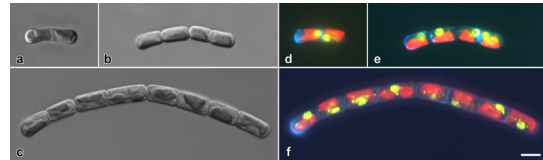


図4 *S. bacillaris* の母細胞壁脱ぎ捨ての有無の観察
S. bacillaris の分裂面に Fluostain I の強い蛍光が観察された。かつての分裂面の蛍光を残したまま分裂を繰り返して連なっていく様子が観察された。a-c: ノマルスキー微分干渉顕微鏡像、d-f: SYBR Green I /Fluostain I 二重染色像、バー=5 μ m (論文番号①)。

(1) *S. bacillaris* のキャラクタライゼーション

①DNA 含量の定量: レーザースキャニングサイトメーターを用いた蛍光顕微測光で *S. bacillaris* の核 DNA 含量を測定したところ、80Mb であり、*N. bacillaris* (20.3Mb) の約4倍であった (図3)。

②18SrRNA 遺伝子に基づく分子系統解析: *S. bacillaris* (Handa 786x) はトレボキシア藻綱のカワノリグループに属することが確認された。

①と②の解析から、光学顕微鏡下では極めてよく似た二分分裂をする *S. bacillaris* と *N. bacillaris* は同じトレボキシア藻綱に含まれるものの、別々のグループに属することが示された。

(2) *S. bacillaris* の母細胞壁開裂の有無と *N. bacillaris* との比較

①蛍光顕微鏡による母細胞壁脱ぎ捨ての有無の観察: *S. bacillaris* を SYBR Green I /Fluostain I で二重染色し、分裂中の細胞を観察したところ、細胞の周縁と分裂面で細胞壁の蛍光が観察された。単細胞状態でも糸状体でも脱ぎ捨てられる母細胞壁は一切観察されなかった (図4)。

②電子顕微鏡による母細胞壁開裂の有無の観察: *N. bacillaris* では、細胞質分裂時に細胞膜が分裂面に陥入した後に、細胞膜表面上に娘細胞壁が合成される (後期合成型)。分裂面で母細胞壁が開裂し、娘細胞同士が解離する。この時、開裂した母細胞壁は娘細胞壁に残存する様子が TEM で確認されている (Yamamoto et al. 2007)。そこで、FE-SEM で更に詳細に母細胞壁の残存を観察した。母細胞壁の細胞壁には更に前回の分裂時の祖母細胞壁の痕跡が観察されること、母細胞壁も開裂後に娘細胞から剥離せず、密着したままであることがわかった。また、成長期の細胞は分裂痕と反対の方向へ伸長することが示された。

S. bacillaris についても細胞分裂時の母

細胞壁の開裂と残存の有無を TEM と FE-SEM で観察したところ、*N. bacillaris* と同様に細胞表面には祖母細胞壁や母細胞壁が残存していることがわかった。母細胞壁と娘細胞壁は細胞周期を通じて常に密着し一体化していた。母細胞壁と娘細胞壁の空間的隔たりが失われると母細胞壁だけを脱ぎ捨てるのが難しくなるのだろう。二分型は、母細胞壁が残存するという表現型を得て、トレボキシア藻綱内の別のグループで収斂したと考えられる。

また、*S. bacillaris* は糸状体を形成している時でも、分裂面では母細胞壁の開裂が起こっていることが観察された。このことから、糸状体形成は母細胞壁開裂の有無とは関わりなく起こることが示唆された。

(3) *S. bacillaris* の成長曲線と糸状体形成のタイミング

S. bacillaris の糸状体形成の頻度を観察すると、培養後 5~7 日目の対数増殖期には数~数十個の細胞が連結し、徐々に長く伸びるが、9 日目以降の定常期には散開し、単細胞状態へと戻った。(2)と(3)の観察結果から、スチココカスの糸状体形成は娘細胞の解離の遅れに起因すると考えられる。

(4) *S. bacillaris* の細胞分裂時の細胞壁構造の変化

TEM で分裂中の *S. bacillaris* の分裂溝を観察すると、電子密度の高い細胞外分泌物が生じていた。また、分裂溝と母細胞壁との隙間、トライアングュラスペースも同様の物質で満たされていた。この分泌物が分解されると、母細胞壁開裂後に娘細胞同士が解離して単細胞状態になることが示唆された。この細胞外分泌物は内生胞子形成型の *C. vulgaris* や二分型の *N. bacillaris* では観察されないため、*S. bacillaris* の娘細胞解離に遅れが生じる要因となっている可能性がある。

(5) 近縁種 *D. chodatii* と *P. ramosa* の母細胞壁残存の有無：

D. chodatii は、内生胞子形成型であり、母細胞壁が開裂するが、母細胞壁、祖母細胞壁、曾祖母細胞壁が密着したまま層状に重なっていた。*P. ramosa* の母細胞壁は開裂しないまま分裂を繰り返した。

(1)~(5)の研究成果から、トレボキシア藻綱では、①母細胞壁の脱ぎ捨てが起こらない、②娘細胞同士の解離が起こらない、③母細胞壁の開裂が起こらないなどのステップを経ることで、糸状体や細胞塊への体制の変化が

起こった可能性が示唆された。トレボキシア藻綱の外へ目を転じると、緑藻には多くの種類があるが、プラシノ藻のある一群だけが車軸藻を経て陸上植物へと進化した。その背景には陸へ上がることのなかった多様な種が存在する。従来、車軸藻と陸上植物の分裂様式の比較から、多細胞化の道筋を明らかにしようとする研究が進められてきた。しかし、多細胞化は車軸藻以外の多くの種でも起こっている事象である。トレボキシア藻で起こった多細胞化過程の一端が明らかになったことで、多細胞化の普遍性と特殊性が明確になり、陸上植物への進化の分かれ道がどこにあったかを知る手掛かりにもなるものと期待される。

今後は、*S. bacillaris*、*D. chodatii*、*P. ramosa* の3種を実験材料に、①~③の事象が発生する経緯を明らかにすることを目標とする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①M. Yamamoto, S. Handa, S. Kawano, DNA content of *Stichococcus bacillaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) nuclei determined with laser scanning cytometry. *Cytologia*, 査読有、2011、印刷中

②山本真紀、多摩川流域に生息する微生物の観察と培養、専修自然科学紀要、査読無、第40号、2008、29-38

③山本真紀、河野重行、トレボキシア藻 *Marvania coccooides* の母細胞壁の残存と出芽、専修自然科学紀要、査読無、第40号、2008、23-28

[学会発表] (計6件)

①山本真紀、半田信司、宮村新一、南雲保、河野重行、二分型トレボキシア藻の細胞壁合成と娘細胞接着による糸状化、日本藻類学会第34回大会、2010年3月20日、筑波大学

②山本真紀、宮村新一、南雲保、河野重行、トレボキシア藻のなかで二分型増殖する種に共通する母細胞壁残存の様式、日本植物形態学会第21回大会、2009年9月17日、山形大学

③M. Yamamoto, S. Miyamura, T. Nagumo, S. Kawano, Binary fission and mother cell walls of *Nannochloris bacillaris* and *Stichococcus bacillaris* in

Trebouxiophyceae, The 9th International Phycological Congress 2009, 2009年8月6日、国立オリンピック記念青少年総合センター

④山本真紀、尾張智美、河野重行、トレ

ボキシア藻綱内で二分裂増殖する2種の母細胞壁の残存と細胞の糸状連結、日本藻類学会第33回大会、2009年3月28日、琉球大学

⑤尾張智美、山本真紀、南雲保、平田愛子、河野重行、トレボキシア藻綱の分裂様式を規定する母細胞壁の解離と残存、日本顕微鏡学会関東支部第33回講演会、2009年3月7日、工学院大学

⑥尾張智美、墨谷暢子、山本真紀、河野重行、トレボキシア藻綱の分裂様式：細胞伸長の方向を決める壁合成とセプチンホモログの局在、日本植物学会第72回大会、2008年9月25日、高知大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 真紀 (YAMAMOTO MAKI)

専修大学・商学部・准教授

研究者番号：80361616