

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007~2008
 課題番号： 19770049
 研究課題名 (和文) 不等分裂における細胞質分裂面決定機構に関する研究
 研究課題名 (英文) Study on decision of cytokinetic plane during an asymmetrical cell division
 研究代表者
 長里 千香子 (NAGASATO CHIKAKO)
 北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授
 研究者番号：00374710

研究成果の概要：不等分裂を行う褐藻類の受精卵の最初の細胞質分裂がどのように進行していくか、アクチンはどのような働きをもっているのかについて微細構造レベルで明らかにするために、急速凍結置換法という固定法を用いて透過型電子顕微鏡で詳細に観察を行った。その結果、アクチンは細胞質分裂面に供給される平板小嚢と呼ばれる構造の形成に関与していることが明らかになった一方、細胞質分裂面の決定には直接関与していないことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	0	2,700,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	240,000	3,740,000

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：植物形態

1. 研究開始当初の背景

褐藻類は複雑な多細胞体制を持つ系統群である。多細胞生物の形態形成にとって不等分裂は、細胞の多様性を生み出すスタートとなり、特に、受精卵の第一分裂で不等分裂が行われる場合は、その後の多細胞体の組織パターンへの分化が、最初の分裂で生じる二つの娘細胞に託されるため非常に重要なステップといえる。このような不等分裂機構の解析のためのモデルとして、褐藻ヒバマタ目ヒバマタ属の受精卵がよく用いられてきた。しかしながら、不等分裂の際の2つの娘細胞を仕切る細胞質分裂面がどのように決定されるのか、細胞骨格との関連性、特にアクチンの

機能が明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

ヒバマタをはじめ多くの褐藻類では、細胞質分裂予定域にプレート状にアクチンフィラメント (AP; actin plate) が配向することが報告されている。この AP こそが発生過程で生じた極性を反映して二つの異なるアイデンティティを持つ娘細胞を形成するように細胞質分裂を制御していると考えられてきた。

本研究では、ヒバマタ属の受精卵を用いて、不等分裂において細胞質分裂面はどのように決定されるのか、新しい隔壁形成はどのよ

うに行われるのかについて、最もその関与が示唆される AP の働きについて着目し、研究を行った。

3. 研究の方法

急速凍結置換法を用いて不等分裂を行う褐藻類の受精卵の細胞質分裂過程について観察を行った。抗アクチン抗体を用いて間接蛍光顕微鏡、免疫電子顕微鏡法でアクチンの局在と隔膜形成の進行との関連を調べた。また、アクチン重合阻害剤であるLatrunculin B (LB)を細胞質分裂直前の細胞に投与し、不等分裂への影響を電子顕微鏡、およびタイムラプス撮影装置にて経時的に観察を行った。

4. 研究成果

褐藻類ヒバマタ、エゾイシゲでは、受精を人工的に誘導することができ、かつ発生が同調的に進行することから、細胞質分裂の時間が特定しやすい。これらの受精卵の最初の分裂は、形態も性質も異なる娘細胞を生み出す不等分裂であり、ヒバマタ、エゾイシゲではそれぞれ受精後20, 18時間で行われる。本研究では、まず細胞質分裂の様子が微細構造レベルで詳細にされてこなかったヒバマタ、エゾイシゲについて急速凍結置換法による固定を施し、細胞質分裂時の微細構造観察を行った。

その結果、①核分裂終了後の娘核の間に粗面小胞体 (rER) が発達、②細胞質分裂に関与する平板小囊 (FC; flat cisternae) と呼ばれる構造はrER由来である、③隔膜形成は細胞質分裂面の数か所で開始される、④細胞壁沈着は隔膜形成完了後に起こる、ことが明らかになった (図1)。

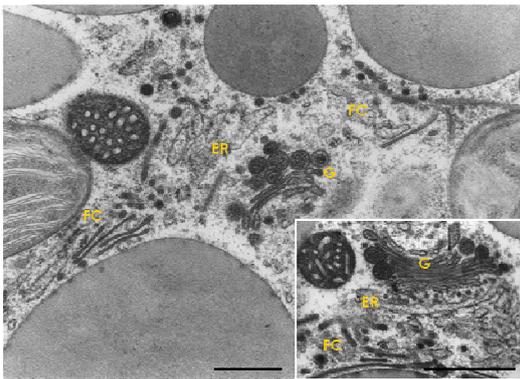


図1.細胞質分裂予定域
平板小囊 (FC) は小胞体 (ER) 近傍に出現。スケールバーは 500nm。

また、ローダミン-ファロイジン、もしくは抗アクチン抗体による蛍光顕微鏡の観察で示されていた、細胞質分裂面に形成されるプレート状アクチン構造について免疫電子顕微鏡法を用いて調べた。その結果、確かに分裂予定域にアクチン分子の存在を確認することができた (図2)。しかしながら、微細構

造レベルでアクチンフィラメント自体を観察することはできなかった。

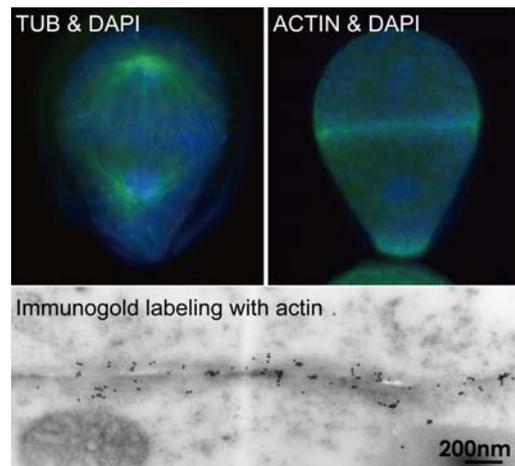


図2.細胞質分裂面のプレート状アクチン構造
間接蛍光顕微鏡 (上) で見るとアクチンは微小管が交差する部位に形成されていることがわかる。免疫電子顕微鏡 (下) による観察。

次にアクチン重合阻害剤であるLBを細胞質分裂直前の受精卵に投与すると核分裂を阻害しないが、平板小囊形成を阻害することにより細胞質分裂の進行を妨げることを電子顕微鏡で明確に示すことができた。平板小囊形成は、褐藻類の細胞質分裂における初期のステップであるが、アクチンの細胞質分裂における働きは、①隔膜形成に不可欠な平板小囊の形成のほか、②平板小囊の細胞質分裂面への配置、③隔膜融合の促進、④発達途中の隔膜からのエンドサイトーシスによる膜の回収にも関与している可能性が電子顕微鏡による観察から示唆された (図3)。

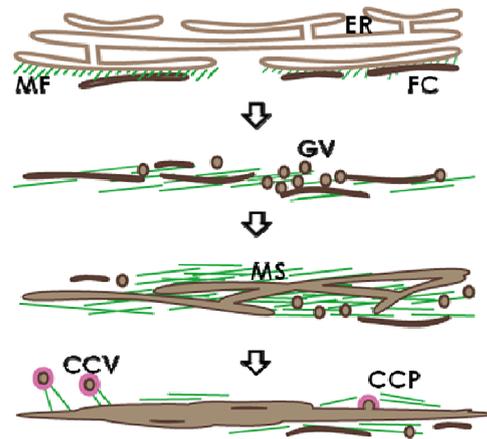


図3.細胞質分裂におけるアクチンの働き
FCの形成 (上), FCとゴルジ体由来小胞 (GV) の細胞質分裂面への配置 (中上), 膜融合への関与 (中下), エンドサイトーシスによる膜成分の回収 (下)。

一方、ゴルジ体からの小胞分泌を阻害する brefeldin A (BFA) の投与では①平板小囊の分裂面への集積は観察されたが、②隔膜形成は完了せず、著しい遅延が起こっている、③未完成の隔膜からエンドサイトーシスによ

る膜の回収が頻繁に行われていることが明らかになった。BFA 存在下の細胞は、細胞質分裂が未完のまま次の細胞周期が開始されることとなり、AP は細胞周期の進行に伴って一旦消失することが明らかになった。しかしながら、2 回目の核分裂終了後、4 核となった娘核の間に再び、AP が出現する様子が観察された。新たに AP が形成される領域は、1 回目の核分裂後出現した AP の位置とは関係なく、4 核の娘核間で交差する微小管の部位に相当していた。本研究結果から、細胞質分裂面決定には、細胞質分裂面に形成される AP ではなく、中心体から発達する微小管が重要であり、細胞質分裂が完了しなかった場合、AP の形成領域は、細胞周期の進行とともに解消されることが明らかとなった (図 4)。

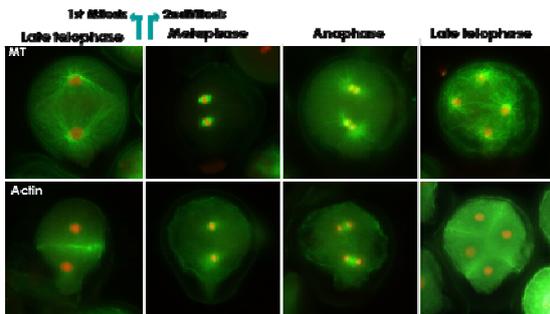


図 4. BFA 投与によるプレート状アクチン構造の挙動

本研究結果より、褐藻類の細胞質分裂における隔膜形成過程は、陸上植物の細胞板形成に類似している点を多く見出すことができた。しかしながら、陸上植物の細胞板形成における主な膜の供給源がゴルジ体由来小胞であるのに対して、褐藻類の細胞質分裂の隔膜形成には平板小囊と称する特異的な膜構造と、ゴルジ体由来小胞が関与している。また、これら 2 種の膜構造は、起源も機能も異なることも明らかになった。褐藻類は、コンブやワカメを含む生物群で、ほとんどが海産の多細胞生物である。海洋における重要な一次生産者である褐藻類は複雑な多細胞体制に進化した 5 つの真核細胞系統群の一つに数えられ、他の 4 つの系統群、動物、緑色植物 (陸上植物・緑藻類を含む)、菌類、紅藻類とともに多細胞化への進化の観点からも注目すべき生物群である。これまで、多細胞体制をとる真核生物の細胞質分裂に関する研究は、動物と陸上植物に代表され、細胞質分裂に関わるいくつかのタンパク質も同定されている。それらの結果は、動物と陸上植物の細胞質分裂装置は大きく異なるが、膜輸送や膜融合に関連するタンパク質に関しては共通性が存在していることを示している。今後、褐藻類の細胞質分裂機構が詳細になるにつれて、多細胞生物間での共通点がより明確になるものと期待される。

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 7 件)

1. C. Katsaros, T. Motomura, C. Nagasato and B. Galatis. (2009) Diaphragm development in cytokinetic vegetative cells of brown algae. *Botanica Marina* 52:150-161. 査読あり
2. T. Motomura and C. Nagasato. (2009) Functional and non-functional spindle formation affecting mitosis and cytokinesis in *Fucus distichus* zygotes: the role of the centrosome. *Botanica Marina* 52:140-149. 査読あり
3. C. Ueki, C. Nagasato, T. Motomura and N. Saga. (2009) Ultrastructure of mitosis and cytokinesis during spermatogenesis in *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 52:129-139. 査読あり
4. C. Nagasato and T. Motomura. (2009) Effect of latrunculin B and brefeldin A on cytokinesis in the brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, phaeophyceae). *Journal of Phycology* 45:404-412. 査読あり
5. C. Ueki, C. Nagasato, T. Motomura and N. Saga. (2008) Reexamination of the pit plugs and the characteristic membranous structures in *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Phycologia* 47: 5-11. 査読あり
6. T. Yamagishi, T. Motomura, C. Nagasato, A. Kato and H. Kawai. (2007) A tubular mastigoneme-related protein, *OCMI*, isolated from the flagellum of a chromophyte alga, *Ochromonas danica*. *Journal of Phycology* 43: 519-527. 査読あり
7. A. Tanaka, C. Nagasato, S. Uwai, T. Motomura and H. Kawai. (2007) Re-examination of ultrastructures of the stellate chloroplast organization in brown algae: Structure and development of pyrenoids. *Phycological Research* 55:203-213. 査読あり

[学会発表] (計 25 件)

1. 長里 千香子・井上 晶・尾島 孝男・奥田 一雄・本村 泰三. 褐藻類の細胞質分裂時における隔膜発達と細胞壁沈着過程. 日本藻類学会第 33 回大会, 2009 年 3 月 27 日, 琉球大学, 沖縄.
2. 山岸 隆博・本村 泰三・長里 千香子・川井 浩史. 黄金色藻オクロモナスにおける管状マスチゴネマ関連遺伝子 *Ocm* ファミ

- リーについて. 日本藻類学会第 33 回大会, 2009 年 3 月 27 日, 琉球大学, 沖縄.
3. 木村 圭・上井 進也・長里 千香子・本村 泰三. 褐藻ワカメの受精時におけるミトコンドリア, 葉緑体の母性遺伝機構の解析. 日本藻類学会第 33 回大会, 2009 年 3 月 27 日, 琉球大学, 沖縄.
 4. 寺内 真・加藤 敦之・長里 千香子・本村 泰三. 黄金色藻オクロモナスにおける遺伝子導入系に向けての EST 解析と基礎実験. 日本藻類学会第 33 回大会, 2009 年 3 月 27 日, 琉球大学, 沖縄.
 5. C. Nagasato and T. Motomura. The function of actin on cytokinesis in brown algae, *Fucus distichus* and *Silvetia babingtonii*. The Vth Asian Pacific Phycological Forum, November 14, 2008, Victoria University of Wellington, Wellington, New Zealand.
 6. T. Sato, C. Nagasato, T. Motomura T and Y. Hara. Ultrastructure of nuclear and nucleomorph divisions and analysis on the cell cycle in *Pyrenomonas helgolandii* (Cryptophyta). The Vth Asian Pacific Phycological Forum, November 13, 2008, Victoria University of Wellington, Wellington, New Zealand.
 7. A. Kushibiki, A. Yokoyama, C. Nagasato, T. Motomura and Y. Hara. Phylogenetic and evolutionary significance of cell division in the Rhodophyceae, The Vth Asian Pacific Phycological Forum, November 13, 2008, Victoria University of Wellington, Wellington, New Zealand.
 8. T. A. Klochkova, J. B. Shim, J. W. Han, G. H. Kim, C. Nagasato and T. Motomura. Sex-related proteins in a marine brown alga, *Scytosiphon lomentaria*, using proteomics and differential gene expression. The Vth Asian Pacific Phycological Forum, November 13, 2008, Victoria University of Wellington, Wellington, New Zealand.
 9. 長里 千香子・本村 泰三. 褐藻類の細胞質分裂に出現するプレート様アクチン構造の挙動, 日本植物学会第 72 回大会, 2008 年 9 月 25 日-27 日, 高知大学, 高知市.
 10. 木村 圭・長里 千香子・本村 泰三. 褐藻類における異なる有性生殖様式間でのミトコンドリア細胞質遺伝機構の比較, 日本植物学会第 72 回大会, 2008 年 9 月 25 日-27 日, 高知大学, 高知市
 11. 佐藤 友則・長里 千香子・原 慶明・本村 泰三. クリプト藻 *Pyrenomonas helgolandii* におけるヌクレオモルフ分裂及びその分裂周期の解析, 日本植物学会第 72 回大会, 2008 年 9 月 25 日-27 日, 高知大学, 高知市
 12. C. Nagasato and T. Motomura. Two membrane systems involved in cytokinesis of brown algae. Ectocarpus 2008, June 06-08, 2008, SAMS Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, UK.
 13. K. Kimura, C. Nagasato and T. Motomura. Cytoplasmic inheritance of mitochondria in brown algae. Ectocarpus 2008, June 06-08, 2008, SAMS Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, UK.
 14. 長里 千香子・本村 泰三. 褐藻類の細胞質分裂時に現れる平板小囊の形成と機能, 日本藻類学会第 32 回大会, 2008 年 3 月 23 日, 東京海洋大学, 東京.
 15. 佐藤 友則・長里 千香子・本村 泰三・原 慶明. クリプト藻 *Pyrenomonas helgolandii* における核分裂およびヌクレオモルフ分裂の形態学的観察, 日本藻類学会第 32 回大会, 2008 年 3 月 23 日, 東京海洋大学, 東京.
 16. 木村 圭・小亀 一弘・長里 千香子・本村 泰三. 褐藻類の受精時における雄性配偶子由来ミトコンドリア DNA の消失時期の比較, 日本藻類学会第 32 回大会, 2008 年 3 月 23 日, 東京海洋大学, 東京.
 17. 大田 修平・長里 千香子・本村 泰三・石田 健一郎. クロララクニオン植物 *Lotharella amoebiformis* の細胞周期を通しての微小管の動態, 日本藻類学会第 32 回大会, 2008 年 3 月 23 日, 東京海洋大学, 東京.
 18. 長里 千香子. 褐藻ヒバマタ, エゾイシゲ受精卵の初期発生における小胞体の挙動, 第 10 回植物オルガネラワークショップ 2008 年 3 月 19 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌市.
 19. C. Nagasato. Centriole inheritance and behavior during fertilization in brown algae. International workshop on Oocyte Maturation and the Cell Cycle, March 6th, 2008, Kyodo Garden Hotel, Kyoto, Japan.
 20. 長里 千香子. 褐藻植物における生殖細胞の初期発生, 第 52 回日本植物学会北海

道支部大会, 2007年9月21日, 北海道大学, 札幌市.

21. 石川 美恵・高橋 文雄・野崎 久義・長里 千香子・本村 泰三・片岡 博尚. ストラメノパイル生物群における青色光受容体の分布, 日本植物学会第71回大会, 2007年9月7 - 9日, 東京理科大学, 野田市.
22. C. Ueki, C. Nagasato, T. Motomura, and N. Saga. Ultrastructure of cell division and spermatogenesis in *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). Fourth European Phycological Congress, July 23 - 27, 2007, Oviedo, Spain.
23. T. Motomura and C. Nagasato. Fertilization and zygote development in brown algae. Fourth European Phycological Congress, July 23 - 27, 2007, Oviedo, Spain.
24. C. Nagasato and T. Motomura. Cytokinesis in brown algae. Fourth European Phycological Congress, July 23 - 27, 2007, Oviedo, Spain.
25. T. Yamagishi, T. Motomura, C. Nagasato and H. Kawai. Identification of the proteins composing the tripartite tubular mastigoneme in a chromophyte alga, *Ochromonas danica*. Fourth European Phycological Congress, July 23 - 27, 2007, Oviedo, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長里 千香子 (NAGASATO CHIKAKO)
北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授
研究者番号: 00374710