

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570090

研究課題名（和文） クロララクニオン藻で初めての細胞分裂様式の解明およびその多様性と進化に関する研究

研究課題名（英文） Ultrastructure, diversity and evolution of cell division in the chlorarachniophytes

研究代表者

石田 健一郎（ISHIDA KEN-ICHIRO）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：30282198

研究成果の概要（和文）：クロララクニオン藻の系統的に離れた3種について、細胞分裂様式をタイムラプスビデオ顕微鏡、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を用いて観察し、中心小体の有無及び数、紡錘体の形成、核膜の崩壊の程度など基本的な形質に多様性が存在することを明らかにした。本研究は、二次共生により葉緑体を獲得した生物群の1つであるクロララクニオン藻の細胞分裂に関するまとまった基礎的知見を初めて提供できた点で学術的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：Cell division manner of three chlorarachniophyte species that are phylogenetically distant each other was studied using a time-lapse video microscope, a fluorescent microscope and a transmission electron microscope. It has been revealed that a big diversity is present in the basic processes of cell division manner among species of chlorarachniophytes. This research contributes to providing a good amount of basic knowledge on the cell division manner of chlorarachniophytes, which evolved by a secondary endosymbiosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生物多様性・分類

キーワード：クロララクニオン藻、二次共生、細胞分裂、進化、藻類、原生生物

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂が形態・微細構造学的にどのように進行するかは、1980年代までに電子顕微鏡等を用いて様々な分類群で明らかにされてきた。これにより光合成真核生物の主要分類群のほとんどで細胞分裂過程が形態学的に明らかとなっている。特に緑色植物ではその多様性が詳細に研究され、緑色植物の分類と進化

の理解に大きく貢献した。また、近年では紅藻において細胞分裂の分子機構にまで理解が進んでいる。しかし、光合成真核生物の主要分類群の一つであるクロララクニオン藻は、その発見が1984年と比較的最近であることから細胞分裂に関する詳細な研究は全く行なわれたことがなく、光合成真核生物の中で形

態的なレベルですら細胞分裂に関する情報がほとんどない唯一のグループである。

クロララクニオン藻は、緑藻を細胞内に取り込み葉緑体を獲得した二次共生由来の生物群である。葉緑体には取り込まれた緑藻の核の痕跡（ヌクレオモルフ）が付随しており、共生による葉緑体の獲得過程、および葉緑体（光合成能）獲得に伴う生物の進化・多様化を研究する上で非常に興味深い生物群として知られている。これまでに研究代表者らの研究によって詳細な分子系統解析が行なわれ、群内の系統関係がほぼ明らかとなっている。また、研究代表者は、科学研究費補助金基盤研究C（平成18～20年度）において、二次共生による葉緑体獲得に伴うクロララクニオン藻の“植物”への適応進化を研究してきたが、その付随する成果として、断片的ではあるが細胞分裂の様式において、中心小体の有無、核膜の崩壊、紡錘体形成等に大きな多様性が存在することが示唆され、その多様さは、緑色植物で見られている多様性に匹敵する可能性があることが予想された。

2. 研究の目的

クロララクニオン藻の主要系統群全てについて、タイムラプスビデオ解析、間接蛍光抗体法、電子顕微鏡などにより、微小管の動態まで含めた詳細な観察を行ない、クロララクニオン藻の分裂様式の特徴を明確にするとともに、群内の細胞分裂様式の多様性を把握し、これまでに明らかとなっている細胞形態と生活様式の進化をベースとして、クロララクニオン藻における細胞分裂様式の進化を明らかにすることを目的とした。

本研究は、クロララクニオン藻の細胞分裂過程に関する世界初の詳細な形態・構造学的データを提供するものであると同時に、葉緑体の獲得を契機として起こったと考えられるクロララクニオン藻の形態や生活様式の進化と、細胞分裂様式の多様性との進化的関連性を明らかにすることで、クロララクニオン藻の進化に関するより深い理解を目指すものとして位置づけられる。

3. 研究の方法

クロララクニオン藻の主要系統群のうち3群の代表種（*Amorphochlora amoebiformis*, *Partenskyella grossopodia*, *Bigelowiella natans*）について、主に以下の3項目を実施した。1) タイムラプスビデオ観察法により、各種の細胞分裂がどのように進行するのか、一連の流れを観察した。2) 細胞分裂過程における α -チューブリンと γ -チューブリンの

挙動を、間接蛍光抗体法により観察した。3) 透過型電子顕微鏡により、細胞分裂過程を微細構造レベルで把握した。得られた情報から、クロララクニオン藻の細胞分裂様式の特徴と多様性を明確にするとともに、これまでに得られている系統進化学的知見と合わせて、細胞分裂様式の進化および細胞分裂様式とその他の形質（形態、生活様式）との進化的関連性を考察した。

4. 研究成果

(1) *A. amoebiformis* の細胞分裂過程

A. amoebiformis は裸のアメーバ状であり、タイムラプスビデオ観察により栄養分裂は通常の2分裂によることが観察された。間接蛍光抗体法により、細胞の間期には、内部に網目状の細胞骨格微小管が見られ、それらが仮足の根元で微小管の束を形成し、仮足内に伸びること、分裂期には細胞骨格微小管が消失し、核分裂中期および後期に、染色体あるいは娘核の周りに微小管の局在がみられること、細胞質分裂が終わると、細胞骨格微小管が再構築されることを観察した。電子顕微鏡観察の結果、*A. amoebiformis* の核分裂には、中心小体は存在しないこと、紡錘体形成における微小管の伸長に伴って核膜がトンネル状に貫入すること、前中期頃までは核膜の崩壊は見られず、中期と後期に断片的に崩壊することが明らかとなった。

(2) *P. glossopodia* の細胞分裂課程

P. glossopodia の細胞は浮遊性で、細胞サイズが2-4 μ mと小さい。細胞が小さいためタイムラプス撮影では十分な解像度が得られなかったため、蛍光抗体染色と透過型電子顕微鏡により観察を行った。観察の結果、本藻は分裂期には鞭毛を持たない球状細胞となり、核分裂に先立ち、葉緑体、ヌクレオモルフの分裂が起こること、間期に1個だった中心小体は、分裂期に入ると3個となることがわかった。また、この後に続く核分裂の様式は2通り（タイプ1、タイプ2）観察された。タイプ1は紡錘体極に中心小体が1つずつ現れる核膜開放型の核分裂であった。タイプ2は核の2か所から貫入ができ、変形したカップ状核の内部に中心小体が入り込んだ後に、その核形のままクロマチンの凝集と核膜崩壊が起こる核分裂であった。タイプ1では前期に中心小体が2個になるのに対し、タイプ2では中心小体が2個になる時期が細胞によって異なり、終期まで3個観察される細胞も存在した。核分裂時に中心小体が3個存在したのは、*P. glossopodia* が基底小体を1個しか持っておらず、娘細胞のために新しく2つの基底小体を複製しているためと考えられた。また、核分

裂タイプ2は今までに類似のものが観察された例のない核分裂である。核分裂が2通り観察された要因として、核相、細胞の大きさ、基底小体の消失時期による変異、有性生殖と無性生殖による可能性が考えられる。今後これらの可能性を検証していく必要がある。

(3) *B. natans*の細胞分裂課程

*B. natans*の観察は、同調培養の十分な効率を得るのに時間がかかり、未だ観察は継続中である。結局、36時間連続暗期後、明暗周期を再開し2回目の暗期に12.5%の分裂中細胞の同調率を得、これを用いて電子顕微鏡観察を行なった。その結果、核分裂前期に中心小体が4つ観察されること、核膜は中期～後期に断片化すること、中心小体を伴う紡錘体形成があることなどが明らかとなっている。

本研究により、クロララクニオン藻群内における核分裂様式には、中心小体の有無、紡錘体の形成様式、紡錘体そのものの構造、核膜崩壊の程度、など核分裂の基本的な特徴において大きな多様性が存在することが明らかとなった。また、*P. glossopodia*のタイプ2核分裂は、これまでいかなる生物でも観察されたことのない分裂様式であり、新奇の発見となった。

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9件)

- ① Ota S., Kudo A., Ishida K. *Gymnochlorella dimorpha* sp. nov., a new chlorarachniophyte that has a unique behaviour of daughter cells. *Phycologia* 50:317-326, 2011 (査読有) .
 - ② Ishida K., Yabuki A. and Ota S. *Amorphochlorella amoebiformis* gen. et comb. nov. (Chlorarachniophyceae). *Phycological Research* 59:52-53, 2011 (査読有) .
 - ③ Hirakawa Y. and Ishida K. Internal plastid-targeting signal found in a RubisCO small subunit protein of a chlorarachniophyte alga. *The Plant Journal* 64:402-410, 2010 (査読有) .
 - ④ Hirakawa Y. Gile G. H., Ota S., Keeling P. J. and Ishida K. Characterization of periplastidal compartment targeting signals in chlorarachniophytes. *Molecular Biology and Evolution* 27:1538-1545, 2010 (査読有) .
 - ⑤ Ota S., Silver T.D., Archibald J. M. and Ishida K. *Lotharella oceanica* sp. nov. – a new planktonic chlorarachniophyte studied by light and electron microscopy. *Phycologia* 48:315-323, 2009 (査読有) .
 - ⑥ Hirakawa Y., Nagamune K. and Ishida K. Protein targeting into secondary plastids of chlorarachniophytes. *Proceedings of National Academy of Science USA* 106:12820-12825, 2009 (査読有) .
- [学会発表] (計14件)
- ① Nomura M., Nakayama T. and Ishida K. How does *Paulinella chromatophora* (Euglyphida, Cercozoa) build a daughter's shell? Joint Meeting of the Phycological Society of America, International Society of Protistologists and Northwest Algal Symposium Memorial Symposium. The University of Washington, Seattle, Washington, USA, 12 - 16 July, 2011
 - ② Shiratori T., Yabuki A. and Ishida K. Taxonomic study on a new naked thaumatomonad (Phylum Cercozoa). Joint Meeting of the Phycological Society of America, International Society of Protistologists and Northwest Algal Symposium Memorial Symposium. The University of Washington, Seattle, Washington, USA, 12 - 16 July, 2011
 - ③ 藤田咲也、石田健一郎、クロララクニオン藻 *Bigelowiella natans* における細胞分裂過程の解明に向けた同調培養系の確立、日本藻類学会第35回大会、富山大学・富山、2011年3月27日
 - ④ 石田健一郎、二次共生における共生者核の運命、染色体学会第61回年会シンポジウム2「藻類ゲノムの最前線」、東邦大学習志野キャンパス・千葉、2010年11月5日
 - ⑤ 工藤 敦子、石田 健一郎、多核ステージを含むクロララクニオン藻 P314 株の生活環、日本植物学会第74回大会、中部大学、春日井・愛知、2010年9月11日
 - ⑥ 工藤 敦子、石田 健一郎、クロララクニオン藻P314株における巨大多核細胞の分裂過程の解明、日本藻類学会第34回大会、筑波大学、2010年3月20日
 - ⑦ Ishida K. Endosymbiotic Plastid Acquisitions in Photosynthetic Rhizarians. Radiolarian Biology based on Paleoceanography Workshop -RABOPAWOR-, Kyushu University, 13 November 2009.
 - ⑧ 遠藤寛子、大田修平、長里千香子、本村泰三、石田健一郎、クロララクニオン藻 *Partenskyella glossopodia* における細胞分裂過程の形態学的観察、日本植物学会第73回大会、山形大学小白川キャンパス、2009年9月18-20日
 - ⑨ Endo H., Ota S., Nagasato C., Motomura T. and Ishida K. Ultrastructural observation on the nuclear division of a

chlorarachniophyte alga, *Partenskyella
glossopodia*. 9th International Phycological
Congress, Tokyo, 2–8 August 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 健一郎 (ISHIDA KEN-ICHIRO)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：30282198