

## 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 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32634

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770059

研究課題名（和文）

母細胞壁の開裂と脱ぎ捨てるの有無から解くトレボキシア藻の細胞連結と偽柔組織化

研究課題名（英文）

Analysis of the cleavage and dissociation of the mother cell wall on the filament and colony formation in Trebouxiphyceae

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）：

本研究は、トレボキシア藻の分裂様式の変化が細胞同士の連結を生み出し、単細胞藻が糸状体化していく過程を明らかにすることを目的とした。二分裂型のスチココッカスは、糸状体をしばしば形成する株と全く形成しない株が存在する。糸状体形成の要因を明らかにするために、母細胞壁開裂の有無と分裂面の細胞壁成分の差異に着目した。糸状体形成株と非形成株はどちらも母細胞壁の開裂が観察された。一方、糸状体形成株では、細胞質分裂後の分裂面にマンノース特異的 ConA の蛍光が観察された。細胞質分裂面のマンノース局在の有無が糸状体形成に影響を及ぼしている可能性が示唆された。マンノシダーゼとセルラーゼで処理すると、糸状体は断片化し、プロトプラスト化する様子が観察された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined whether the filament formation was caused by the evolution of the mode of cell division in Trebouxiphyceae. Binary fission type genus, *Stichococcus* includes filamentous species and non-filamentous species. We focused on the cleavage of the mother cell wall and the cell wall component of the plane of division to clarify the process of the emergence of filamentous species. The cleavage of the mother cell wall occurred in both filamentous and non-filamentous species. On the other hand, the newly formed cell wall at the plane of division displayed a stronger signal of ConA than other area in the cell in filamentous species. However, we observed no signal in non-filamentous species. These results suggest that the mannose specific localization may be influence the formation of the filament. After the treatment of mannosidase and cellulase, filaments fragmented into short filaments and resulted in protoplast formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
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：トレボキシア藻、内生孢子形成、細胞壁、電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞化のはじまりは、細胞分裂後の娘細胞同士がつながったままになることである。緑藻植物の一綱であるトレボキシア藻綱には単細胞、糸状体、細胞塊、偽柔組織、葉状体などの多細胞化への様々な発達段階の種が揃っている。多くの単細胞種は内生孢子形成で分裂増殖する。筆者はこれまでに、トレボキシア藻の単細胞種の内生孢子形成には細胞質分裂前に娘細胞壁が合成される初期合成型と細胞質分裂後に合成される後期合成型の2タイプがあることを明らかにした (Yamamoto et al. 2004, 2005)。一回、もしくは数回の細胞質分裂の後、母細胞壁は裂け、娘細胞が内生孢子として放出される。このような様式で生じる娘細胞は単細胞でしか存在しえない。一方、トレボキシア藻綱には、糸状体や葉状体を形成する種も存在する。このことは、内生孢子形成から他の様式への変化が生じた可能性を示唆する。

トレボキシア藻綱のクロレラクレードには、内生孢子形成するクロレラやパラクロレラの他に、二分型型のナノクロリスや、出芽型のマルバニアが存在する。これまでに系統解析から、二分型型や出芽型は内生孢子形成から二次的に発達した可能性を示した (Yamamoto et al. 2001, 2003, 2007)。ナノクロリスの二分型とマルバニアの出芽では、内生孢子形成型と同様に母細胞壁の開裂が起こるため、本質的には内生孢子形成と同じである。しかしながら、母細胞壁は娘細胞に付着して残存する (Yamamoto et al. 2007)。一方、カワノリクレードには、ナノクロリスと同様に二分型型をするスチココッカスがある。*Stichococcus bacillaris* はナノクロリスと同様に、桿状の単細胞種である。しかし、しばしば分枝のない単列の糸状体を形成する点が異なる。また、細胞サイズやゲノムサイズがナノクロリスよりも大きい (Yamamoto et al. 2011)。

## 2. 研究の目的

二分型型のスチココッカスが糸状体を形成する要因には2つの可能性がある。1つ目は、母細胞壁が開裂しない可能性である。細胞分裂後、母細胞壁が開裂しないままであれば、内側でさらに細胞分裂が繰り返され、最初の母細胞壁の内側にはいくつもの細胞が詰まっている状態になるだろう。もちろん、母細胞壁はやがて祖母細胞壁、曾祖母細胞壁と呼ぶにふさわしい世代となり、分裂を繰り返すたびに、若い世代の細胞壁が重層されて

いくことになるだろう。2つ目は、母細胞壁は開裂するものの、若い娘細胞同士が分裂面に新生された細胞壁を介して接着している、という可能性である。この場合、常に単細胞状態にある種と比較すると、分裂面の細胞壁成分に違いがある可能性がある。

そこで、糸状体の形成要因を明らかにすることを目的とし、糸状体形成型における糸状体形成のタイミングを確認したうえで、糸状体形成型と非形成型における母細胞壁の開裂の有無を透過型電子顕微鏡と走査型電子顕微鏡を用いて調べた。さらに分裂面の細胞壁成分を比較するため、レクチン染色を施した細胞の蛍光顕微鏡観察を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞数と糸状体数の変化

糸状体形成株と非形成株について、植え継ぎ後2週間の細胞数と糸状体数をカウントし、糸状体形成率を求めた。

### (2) 母細胞壁開裂の電子顕微鏡観察

糸状体形成株と非形成株の間で、細胞質分裂と細胞質分裂後の母細胞壁の開裂の過程に差異がないかどうかを調べるために、透過型電子顕微鏡と走査型電子顕微鏡で比較観察した。透過型電子顕微鏡観察用試料の細胞固定には加圧凍結固定法を用い、凍結置換し、樹脂包埋後、超薄切片を観察した。走査型電子顕微鏡観察用試料は加圧凍結固定後に凍結置換し、臨界点乾燥とオスミウムコートを施し、超高分解能電界放出型走査型電子顕微鏡で観察した。

### (3) 細胞分裂面に特異的な細胞壁成分の蛍光顕微鏡観察

母細胞壁開裂後の分裂面での娘細胞同士の解離の遅れが糸状体形成に関与している可能性がある。糸状体形成株と非形成株の分裂面の細胞壁成分の差異を調べるために、蛍光レクチン染色と Fluostain I 染色、細胞壁成分分解酵素処理を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 糸状体形成のタイミング

糸状体形成株の場合、糸状体を形成するのは対数増殖期であり、この間、糸状体は日増しに伸長する様子が観察された。しかし、定常期にさしかかると散開し、単細胞状態に戻った。一方、非形成株では、対数増殖期にも定常期にも糸状体は観察されなかった。

糸状体形成株において、糸状体の形成が対

数増殖期に促進されるものの、定常期には娘細胞がみな単細胞状態に帰するということは、対数増殖期特異的に積極的な細胞連結のしくみが存在する、というよりもむしろ、娘細胞は、本来単細胞状態になる予定であるが、解離に時間がかかってしまい、糸状体が形成されている可能性が高いと考えた。すなわち、細胞分裂が活発な対数増殖期においては、分裂後の解離に時間を要している間に次の細胞分裂が、さらにその次の細胞分裂が始まり、終わってしまうのだろう。それでは、解離の遅れの直接の原因は、母細胞壁の開裂の遅れか、あるいは細胞分裂後の娘細胞同士の解離の遅れかを明らかにするために、次に糸状体形成株と非形成株の母細胞壁開裂の有無を調べた。

#### (2) 母細胞壁開裂の有無

糸状体形成株と非形成株はどちらも母細胞壁の開裂は起こるものの、脱ぎ捨てられず、娘細胞壁の表面上に母細胞壁が残存する様子が透過型電子顕微鏡下で観察された。したがって、スチココッカスの二分裂もナノクロリスと同様に本質的には内生孢子形成と同じであると考えられる。走査型電子顕微鏡観察では、分裂面に前回の分裂時の母細胞壁、すなわち現在は祖母細胞壁であるものの分裂痕が観察された。糸状体形成株の細胞が4つ連なっている状態でも、それぞれの分裂面で分裂痕が観察されたことから、娘細胞が連なることに、母細胞壁の開裂の有無は関与しないと考えられる。

#### (3) 細胞分裂面に特異的な細胞壁成分

染色を試みたグルカン特異的蛍光色素 Fluostain I と 16 種の蛍光レクチン (ConA、PSA、PNA、LCA、WGA、Jacalin、UEA、GSL I、GSL II、ECL、PHAE、PHAL、VVA、LEL、STL、DSL) のうち、特異的な蛍光が観察されたのは、Fluostain I と ConA のみだった。糸状体形成株は分裂予定面に Fluostain I の蛍光が、細胞質分裂後の分裂面にはマンノース特異的レクチン ConA の蛍光が観察された。一方、非形成株では Fluostain I の蛍光は糸状体形成株同様に観察されたが、ConA の特異的蛍光は観察されなかった。そこで、糸状体形成株にマンノシダーゼ処理とセルラーゼ処理を行ったところ、単独の処理ではマンノシダーゼ処理において ConA の特異的蛍光が消失しただけで、いずれも糸状体に変化はなかった。しかし、マンノシダーゼとセルラーゼで同時に処理すると、ConA と Fluostain I の蛍光が消失し、糸状体の断片化と細胞のプロトプラスト化が観察された。

トレボキシア藻綱では、①母細胞壁の脱ぎ捨てが起らない、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らないなどのステップを経ることで、糸状体や細胞塊、葉状体への体制の変化が起ったと考えられる。(1)~(3)の研究成果から、スチココカスは、①と②の段階にあることが明らかとなった。今後は、細胞塊や葉状体を形成する種についても母細胞壁の開裂の有無と細胞分裂面に特異的な細胞壁成分を明らかにすることで、トレボキシア藻綱の多細胞化への道筋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 6 件)

- ① T. Yamazaki, S. Owari, S. Ota, N. Sumiya, M. Yamamoto, K. Watanabe, T. Nagumo, S. Miyamura, S. Kawano, Localization and evolution of septins in algae, *The Plant Journal*, 査読有, 印刷中, 2013
- ② 山本真紀, 化学固定と凍結固定によるトレボキシア藻 *Chlorella vulgaris* の電子顕微鏡観察, 専修自然科学紀要, 査読無, 第 44 号, 2013, 53-57
- ③ 山本真紀, 加圧凍結固定法を用いた藻類細胞の電子顕微鏡観察, 専修大学自然科学研究所報, 査読無, No. 93, 2013, 8-11
- ④ 山本真紀, さすらう藻類, 専修大学自然科学研究所報, 査読無, No. 93, 2013, 2-7
- ⑤ N. Sumiya, T. Yamazaki, S. Owari, M. Yamamoto, K. Watanabe, S. Kawano, Chloroplast division and differentially regulated expression of FtsZ1 and FtsZ2 in the synchronous culture of *Nannochloris bacillaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), 査読有, 77(1), 2012, 59-66
- ⑥ M. Yamamoto, S. Handa, S. Kawano, DNA content of *Stichococcus bacillaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) nuclei determined with laser scanning cytometry. *Cytologia*, 査読有, 76(2), 2011, 157-161

[学会発表] (計 7 件)

- ① 半田信司、大村嘉人、山本真紀、坪田博美、中原(坪田)美保、陸生および水生の微細緑藻 *Stichococcus bacillaris* (トレボウクシア藻綱) の系統分類学的解析、日本植物学会第 76 回大会、2012 年 9 月 16 日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス
- ② 山本真紀、半田信司、河野重行、二分裂型緑藻 *Stichococcus bacillaris* の糸状体形成と分裂面のマンノース局在、日本藻類学会第 36 回大会、2012 年 7 月 15 日、北海道大学学術交流会館

- ③M. Yamamoto, S. Handa, S. Miyamura, T. Nagumo, S. Kawano, The filament and colony formation caused by deficiency of cleavage and dissociation of the mother cell wall in Trebouxiophyceae, The 6th Asian Pacific Phycological Forum, 2011年10月10日, Yoesu, Korea
- ④山本真紀、半田信司、宮村新一、南雲保、河野重行、トレボキシア藻の娘細胞連結による糸状化と細胞塊形成、日本植物学会第75回大会、2011年9月19日、東京大学駒場キャンパス
- ⑤半田信司、大村嘉人、坪田博美、山本真紀、中原-坪田美保、多様な環境から単離したトレボキシア藻綱スチココックス属 (*Stichococcus*) 数種の形態と系統、日本藻類学会第35回大会、2011年3月27日、富山大学
- ⑥杉本貢一、山本真紀、八木裕、登里淳、嶋田敬三、都筑幹夫、佐藤典裕、スルフォキノボシルジアシルグリセロール合成系遺伝子のゲノムワイドな検索、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月20日、東北大学
- ⑦山本真紀、半田信司、宮村新一、南雲保、河野重行、母細胞壁の開裂と脱離の有無から見たトレボキシア藻の娘細胞連結、日本植物学会第74回大会、2010年9月11日、中部大学

## 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