

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32634

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2020

課題番号：26440222

研究課題名(和文)糸状体化から始まるトレボキシア藻綱カワノリ目の多細胞化の過程を探る

研究課題名(英文)The process of filament formation and multicellularity in the order Prasiolales of Trebouxiophyceae

研究代表者

山本 真紀 (Yamamoto, Maki)

専修大学・商学部・教授

研究者番号：80361616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：トレボキシア藻綱カワノリ目内には単細胞の他に、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。本研究は、カワノリ目の単細胞から多細胞体への発達の過程を明らかにすることを目的とした。糸状体形成株 *Stichococcus bacillaris* Handa-786-x では分裂面のペクチン成分が娘細胞の乖離の遅らせることによって糸状体が形成されるが、糸状体形成株 *S. bacillaris* NIES-529 や偽柔組織形成株 *Prasiolopsis ramosa* では、ペクチン以外の要素が更に付加され、より高次の細胞連結のしくみが備わっている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑色藻類5綱のうち、ブラシノ藻綱の一群が車軸藻綱を経て陸上植物へと進化した。古くから車軸藻と陸上植物の分裂様式を比較し、多細胞化へ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、多細胞化自体は他の藻綱でも繰り返されたイベントである。トレボキシア藻綱の多細胞化の過程を明らかにすることは、多細胞化への道筋の各藻綱間での普遍性と特殊性が明確となり、陸上植物への進化の分岐点を明らかにできるという点で学術的意義がある。トレボキシア藻は淡水域や陸上の気生環境に幅広く生息し、健康食品やバイオ燃料としても利用されている藻類である。その分類系統や多様性を理解することには社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The order Prasiolales of the Trebouxiophyceae includes species in various stages of development to multicellularity, such as filamentous, package-like, pseudoparenchymatous, and thallus organisms, in addition to unicellular organisms. The purpose of this study was to elucidate the process of unicellular to multicellular development in the order Prasiolales. In the filamentous strain *Stichococcus bacillaris* Handa-786-x, the pectin component of the dividing plane delays the detachment of daughter cells, resulting in the formation of filament, whereas in the filamentous strain *S. bacillaris* NIES-529 and the pseudoparenchymatous strain *Prasiolopsis ramosa*, additional factors other than pectin were added, indicating that they may have a higher-order cell-cell connection mechanism.

研究分野：細胞生物学

キーワード：藻類 トレボキシア藻 細胞壁 糸状体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トレボキシア藻の多くは単細胞性で内生孢子を形成するが、その様式は(1)細胞壁の内側で新しい娘細胞壁が形成される、(2)一回もしくは数回の細胞質分裂が起こる、(3)娘細胞が成熟した後に、母細胞壁が開裂し、2つあるいはより多くの娘細胞が母細胞壁外へ放出され、母細胞壁は捨てられる、の3つの過程から成る。一方、トレボキシア藻綱カワノリ目に属する *Stichococcus* は糸状体を形成し、二分分裂で増殖する。研究代表者は、これまでの研究から、*Stichococcus bacillaris* Handa-786-x において、母細胞壁が分裂後も娘細胞壁上に残存するものの、分裂面で開裂することを示した。糸状体を形成中の細胞同士の接着面は分裂面の新生されたお互いの娘細胞壁と考えられる。分裂面の細胞壁の成分が、娘細胞同士の解離の遅れを引き起こし、糸状体形成に影響を及ぼしていることが予想された。

2. 研究の目的

不動性の単細胞藻類を主とするトレボキシア藻綱内で、カワノリ目だけは単細胞のほかに、糸状体、細胞塊、偽柔組織、葉状体という多細胞化への様々な発達段階の種が揃っており、藻類の体制進化の道のりを連続的にたどることができる。本研究では、カワノリ目を研究対象とし、具体的にどのような変化がきっかけとなって多細胞化が引き起こされるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Stichococcus* sp. Handa-1755-a 株、*Stichococcus bacillaris* Handa-786-x 株、*Stichococcus bacillaris* NIES-529 株の3株を培養し、細胞形態と糸状体形成の有無を比較した。糸状体形成株については、培養中の糸状体形成のタイミングを調べた。

(2) 3株のカワノリ目内での系統関係を明らかにするために、18SrRNA 遺伝子に基づく分子系統樹を作成した。

(3) 3株の分裂面の細胞壁成分を比較するため、グルカン特異的 Fluostain I と16種類のレクチンの蛍光染色を行った。

(4) 細胞壁成分が糸状体形成へ及ぼす影響を調べるため、マンノシダーゼ、マンノシダーゼ、セルラーゼ、ペクトリアーゼ、マセロザイムの酵素処理後の糸状体の変化を観察した。さらに153種類の細胞壁成分特異的抗体染色を試みた。

(5) *S. bacillaris* Handa-786-x で観察された事象のカワノリ目内における普遍性を調べるため、偽柔組織を形成する *Prasiolopsis ramosa* に対するペクトリアーゼ・マセロザイム処理と細胞壁成分特異的抗体染色を試みた。

4. 研究成果

(1) 3株とも形態は桿状だが、糸状体形成の有無に違いがみられた。1755-a 株は対数増殖期と定常期を通じて常に単細胞だが、529 株は常に糸状体と単細胞が混在していた。一方、786-x 株は対数増殖期初期には糸状体が伸長したが、対数増殖期後期には短くなりはじめ、定常期には単細胞に戻った。そこで、786-x 株について、短期間の植継ぎを繰り返して対数増殖の状態を保ったところ、百数十個もの細胞が連なる長い糸状体を形成した。786-x 株の糸状体は単に娘細胞の解離の遅れによって生じるが、529 株ではより高次の細胞連結のしくみが備わっている可能性がある。

(2) 3株を含めたカワノリ目の18SrRNA 遺伝子に基づく分子系統樹を作成したところ、1755-a 株と786-x 株は *Stichococcus* が主体となる別々のクレードに属することが示された。一方、529 株は葉状体の *Prasiola* に近縁なクレードに属した。

(3) 単細胞株と糸状体形成株の細胞壁成分の違いを調べるために、グルカン特異的蛍光色素 Fluostain I 及び16種類のレクチンで染色し、蛍光顕微鏡で観察した。単細胞の1755-a 株は、分裂面に Fluostain I の蛍光が観察されたが、レクチンの蛍光は観察されなかった。糸状体を形成する786-x 株と529 株の場合、Fluostain I の蛍光は分裂中と分裂した後の分裂面で強く観察され、レクチン ConA の蛍光が分裂後の細胞連結面で観察された。このため、Fluostain I と ConA の蛍光は互い違いに観察された。糸状体形成株のみに ConA の特異的蛍光が観察されたことから、単細胞株と糸状体形成株では、細胞壁成分に違いがあると考えられる。その違いが糸状体形成の有無に影響を及ぼしているかもしれない。

(4) 細胞壁成分が糸状体形成に及ぼす影響を調べるため、マンノシダーゼ、マンノシダーゼ、セルラーゼ、マセロザイム、ペクトリアーゼの5種の細胞壁分解酵素処理を試みた。786-x 株にマンノシダーゼ、マンノシダーゼ、セルラーゼでそれぞれ処理を施したのちに ConA 染色をしたところ、分裂面の特異的蛍光が消失した。しかしながら、糸状体が断片化する様子は観察されなかった。一方、マセロザイムとペクトリアーゼの二重処理をすると、786x 株では糸状体が断片化し、単細胞状態の割合が増加したが、N529 株では反応性が鈍かった。N529 株は、糸状体形成のタイミングにも違いがみられたことから、細胞連結にはペクチンに加えて、別の

要素が付加されている可能性がある。ホモガラクトン、ラムノガラクトン、ア
ラビノガラクトンタンパク質などの細胞壁成分に関連するモノクローナル抗体 153 種類を入手
し、蛍光抗体染色を行ったところ、786-x 株において、細胞末端と糸状体の細胞接着面に抗ア
ラビノガラクトンタンパク質抗体特異的蛍光が観察された。

(5) *Prasiolopsis ramosa* では、マセロザイム・ペクトリアーゼ処理後の形態に変化は見ら
れず、抗アラビノガラクトンタンパク質抗体特異的蛍光も観察されなかった。単細胞から糸状
体形成、偽柔組織形成への道筋は単一ではないと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maki Yamamoto, Shinji Handa, Masanobu Kawachi, Shinichi Miyamura, Tamotsu Nagumo, Aiko Hirata and Sigeyuki Kawano	4. 巻 81
2. 論文標題 Mother Cell Wall Cleavage during Filament Formation in <i>Stichococcus bacillaris</i> (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 35-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1508/cytologia.81.35	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本真紀、半田信司、河野重行
2. 発表標題 二分裂型トレボキシア藻にみられる糸状体形成の有無と分裂面の細胞壁
3. 学会等名 日本植物学会第79回大会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 山本真紀、半田信司、河野重行
2. 発表標題 二分裂型 <i>Stichococcus</i> 3株にみられる糸状体形成の有無とアラビノガラクトナンタンパク質局在
3. 学会等名 日本藻類学会第40回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山本真紀、半田信司、宮村新一、南雲保、河野重行
2. 発表標題 トレボキシア藻の内生孢子形成と娘細胞壁合成後の母細胞壁のふるまい
3. 学会等名 日本植物学会第78回大会
4. 発表年 2014年

1. 発表者名 山本真紀、半田信司、河野重行
2. 発表標題 二分裂型Stichococcus bacillarisが形成する糸状体の伸長と断片化
3. 学会等名 日本藻類学会第39回大会
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------