

学 位 論 文 題 名

Morphological and cytochemical studies of
fertilization in a red alga, *Palmaria palmata* O. Kuntze

（紅藻ダルスの受精の形態学的・細胞化学的研究）

学位論文内容の要旨

< 緒 言 > 紅藻植物は雄性配偶体から水中に放出された不動精子が、雌性配偶体上に形成された造果器と融合することにより受精を行う。配偶子接着・融合をはじめとする様々な興味深い生命現象がこの過程で行われていることが今まで示唆されてきたが、多くの紅藻では成熟した造果器を一度に数多く観察することが難しいため、受精過程を詳しく追跡することは不可能であった。そこで本研究では、矮性の雌性配偶体が室内培養で短期間の内に造果器を形成し、大型の雄性配偶体から放出された精子と受精するという独特の生活史を示す紅藻ダルス科の植物に着目し、紅藻の受精過程の詳細な観察を試みた。

ダルス科の紅藻ダルス *Palmaria palmata* O. Kuntze の四分胞子を数日培養して得られる成熟雌性配偶体を、天然の雄性配偶体から得られた精子で媒精し、引き続き培養することにより紅藻の受精過程を経時的に観察することが可能となった。本論文はダルスの受精過程における配偶子の接着、精子の核分裂・細胞壁形成、配偶子の融合の過程の、光学・落射蛍光顕微鏡、および透過電子顕微鏡を用いた形態学的観察の結果と、その中で明らかになった精子と受精毛表面の構造が、配偶子接着に関与することを示した接着阻害実験の結果をまとめた。

< 結 果 > （配偶子表面の構造と接着）直径 $5\ \mu\text{m}$ ・球形の精子の細胞は約 $3\ \mu\text{m}$ の厚さの、墨の粒子を排除する透明な被膜で覆われている。ルテニウム・レッド固定－LR ホワイト樹脂包埋の電顕試料では、この被膜は網状・繊維状の構造を示した。この構造は精子が雄性配偶体から放出される以前に、精子細胞膜と精子嚢細胞壁の間に形

成される。受精しない限りその厚さを保っているこの精子の被膜は、脱水により可逆的に厚さを減ずるゲル状の構造である。

無固定の、または化学固定を施した精子の被膜は、種々のタンパク質分解酵素処理により酵素濃度と処理時間に応じて消失し、トリプシンによる被膜の消失は特異的阻害剤PMSFにより抑えられた。酵素処理により被膜を全く除いた精子細胞においても、細胞内の微細構造には処理前との違いは認められず、細胞生存検定法によりそれらの精子細胞の生存が確認された。

一方受精毛の細胞壁の表面は先端部も含めて一様に繊維状構造に覆われ、この表層構造は隣接グリコール基を透過電顕下で検出するPATAg検査で陽性の反応を示す。精子の被膜の表面は媒精直後に受精毛表層に接着する。短時間のタンパク質分解酵素処理により、精子の受精毛への接着は酵素濃度に応じて阻害される。また化学固定した雌性配偶体を過ヨウ素酸により酸化し、水素化ホウ素ナトリウムで還元すると、受精毛表層はPATAg-陽性反応を失い同時に精子との接着能力も著しく減ぜられる。媒精後5分以内に、精子の被膜が受精毛表層と接している部分だけが消失し、その結果精子の細胞膜は受精毛表層に接着し、受精過程は次の段階へ移行する。

(精子核分裂と細胞壁形成) 放出された精子の核は、その両極部分にポーラー・リング(紅藻で一般的な核分裂極の構造)により示される分裂極が形成されており、染色質は凝縮しているので分裂前期の状態にある。受精毛に接着した精子では前期で止まっていた核分裂がその後の段階に進行する。分裂前中期の核は媒精後15分に、中期は30分に、後期は45分に多く見られる。紅藻の核分裂時における極構造その他のオルガネラの機能や配偶子分化に関連して興味深い知見が、これまで知られていなかった紅藻の精子核分裂の微細構造において得られた。前中期に分裂極付近の核膜に間隙が形成される時期には、ポーラー・リングは消失している。核分裂後期から終期における2娘核の分離には、娘核の中間部分の核膜の消失とともに新しい核膜の形成される過程と、紅藻では知られていなかった他のオルガネラ(大きな小胞、ミトコンドリアなど)が娘核の中間部分の核膜を絞り込む様にして侵入する過程の2通りが観察された。

媒精後長く培養した電顕試料においてもまだ核分裂前期に留まっている精子は、受精毛との間に被膜を残しており細胞膜は受精毛表面に接着できないでいる。一方核分

裂前中期以降に進行した精子細胞膜は全て受精毛表面に接着していることが確かめられた。

配偶子接着後の核分裂に伴い精子は細胞壁を形成する。細胞壁物質は蛍光顕微鏡下ではカルコフルオールにより染色され、電顕下ではPATAg-陽性を示す。受精前の精子の細胞縁辺部付近にはPATAg-陽性の物質を含む小さな小胞があり、それらは管状構造で細胞膜と連絡しているが、受精時の細胞壁形成と同時にそれらの小胞の数が著しく減少する。このことはPATAg-陽性の小胞が、おそらく細胞膜管状構造とともに精子細胞壁形成に関与していると考えられ、同様の構造と現象が観察されるダルススの四分胞子の接着・発芽との類似性が示された。

(配偶子融合) 2核となった精子の細胞質は、受精毛の細胞壁に侵入し、その中で広がり、受精毛の細胞質と融合する。細胞質融合後、精子核分裂の娘核(雄核)は両方とも受精毛の細胞質に入る。侵入した雄核は、受精毛の先端へあるいは造果器側に向かって移動し、限られた内径の受精毛中では互いにすれ違って移動する雄核は見られない。人為的な媒精実験により受精毛は多数の精子と融合し、多くの雄核が受精毛中に侵入することができるが、ダルススのような特徴をもつ雌性生殖器官では、細胞質レベルの多精が核融合には必ずしも結び付かない。造果器内に侵入した雄核は束状に集まった微小管を伴っている。造果器内に入った雄核と、それと共存する造果器核にはポーラー・リングが見られなかった。このことは、他の生物の極構造が受精時に消失しないことと対照的である。2-3個の雄核が造果器内に侵入することが蛍光顕微鏡下では観察されたが、複数の雄核が造果器核と融合することは無い。

<結論>ダルススの受精においてタンパク質の精子被膜と隣接グリコール基を持つ受精毛の表層構造が細胞化学的に明らかにされ、形態学的にあるいは接着阻害実験から、それらは配偶子の特異的接着に機能することが示された。受精毛に接着した精子の被膜は、受精毛表層に接着している部位において短時間で消失する。その結果である精子細胞膜と受精毛細胞壁の直接の接着は、受精の次の段階である精子核分裂進行・細胞壁形成に必要な細胞外刺激であり、細胞密着から核分裂進行へのシグナル伝達機構が精子細胞内に存在することを強く示している。紅藻の受精過程は、このように様々な細胞学的現象の連続であることが本研究で明らかにされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 館 脇 正 和
副 査 教 授 吉 田 忠 生
副 査 教 授 谷 藤 茂 行
副 査 助 教 授 市 村 輝 宜

学 位 論 文 題 名

Morphological and cytochemical studies of fertilization in a red alga,

Palmaria palmata O. Kuntze

(紅藻ダルスの受精の形態学的・細胞化学的研究)

紅藻植物の有性生殖は、雌性配偶子である造果器の受精毛と雄性配偶子である不動精子との接着・融合から始まるが、成熟した造果器を大量に集めて観察することは極めて困難であり、そのため紅藻の受精過程の詳細な報告は今までにほとんどなされていなかった。しかし、紅藻類でもダルス科植物は、雌性配偶体が矮性で四分孢子培養3～5日で同調的に外生的造果器を形成して成熟し、大型雄性配偶体から放出される精子と受精するという独特の生活史を持つことが知られている。本研究は、このダルス科植物の特異な発生・生活史に注目して、同調的に成熟した造果器を大量に得ることにより、紅藻の受精過程を経時的に観察する実験系を確立して、雌雄両配偶子の微細構造及び細胞化学的実験から、紅藻の受精における配偶子の接着と融合の過程を初めて明らかにしたものである。

まず、両配偶子の形態的・化学的構造であるが、放出された不動精子は厚さ3 μ mの網目繊維状の微細構造を持つ透明なゲル状被膜を有し、タンパク質をその構成要素として持つことを、タンパク質分解酵素処理により実証している。一方、雌性配偶子

の受精毛については、透過電顕下でのPATAgテスト、過ヨウ素酸と水素化ホウ素ナトリウムによる酸化・還元処理によって、その細胞壁表面は隣接グリコール基を持つ繊維構造であることを示した。これらの表層構造が配偶子間の接着に機能していることを、精子と受精毛の接着を定量化した接着阻害実験により明らかにしている。

次に細胞学的研究として、精子核の挙動を造果器核との融合まで経時的に観察し、紅藻類の受精における数々の新しい知見を得ている。まず、放出後の精子核は分裂前期に留まっているが、受精毛表面に接着すると精子被膜が接着部分で消失し、精子細胞膜と受精毛細胞壁が密着して初めて核分裂が進行すること。つまり接着後15分で前中期に進み、30分後には中期、45分後に後期から終期とほぼ同調的に進行し、同時に精子は細胞壁を形成すること。また、従来知られていなかった紅藻の精子の核分裂の微細構造と他の細胞オルガネラの挙動などを明らかにしている。例えば、初め精子核の両極にポーラー・リングが存在するが、前中期以降このリングが消失することや、後期において2娘核が分離する時に中間部分を残して核膜を新生するタイプと小胞・ミトコンドリア等のオルガネラが中間部分を絞り込むように陥入する新しいタイプが存在することを明らかにした。受精毛の細胞壁は2核となった精子との接着部分で溶解し、細胞質は融合し2つの雄核とも受精毛内に侵入するが、雄核の移動はランダムに行われ、造果器核からの特別なシグナルや誘導はみられないこと、受精毛内に多数の雄核が侵入しても多精受精が起こらないこと、造果器核にはポーラー・リングがみられないことなどについても考察している。以上のように、タンパク質が一成分である精子被膜と隣接グリコール基をもつ受精毛の表層構造が細胞化学的に明らかにされ、これらの構造による配偶子の特異的な接着の後、精子被膜の部分的消失、精子細胞膜の受精毛への密着が、精子核分裂進行・細胞壁形成に必要なことから、一連の情報伝達機構が雄性配偶子に存在する事実を強く示唆する結果を得ている。

本研究は、単にダルス科植物の種における受精過程を明らかにしただけではなく、従来ほとんど研究されていなかった紅藻類の受精様式をモデル化して、受精における複雑なシグナル伝達についての一連の生命現象を解明する糸口を開拓したことに大きな意義が認められ、植物学・藻類学の生殖・発生の研究分野における貢献度も高い。よって審査員一同は、本論文の内容及び申請者の学力は共に博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認めた。