

学位論文題名

Studies on cell division and cytoskeleton
in a marine multinucleate green alga,
Acrosiphonia duriuscula (Ruprecht) Collins

(海産多核緑藻モツレグサにおける細胞分裂と細胞骨格の研究)

学位論文内容の要旨

細胞周期の進行に伴う細胞内小器官の挙動と細胞骨格系の変化は、これまでは動植物の単核細胞について研究されて来た。細胞分裂時の核分裂装置の形成のみならず、細胞質分裂面の決定、娘核や葉緑体の分配、隔壁形成などにおける細胞骨格系の非常にダイナミックな変化が報告されている。しかし、ほとんどは単核細胞を研究対象としており、多核細胞に関する研究は非常に少ない。紅藻や緑藻などの藻類では多核細胞の種類も知られているが、細胞分裂に伴う細胞内小器官と細胞骨格の挙動に関しては、これまでほとんど研究されていない。本論文では海産緑藻モツレグサを用いて、多核細胞の細胞質分裂に伴う核と葉緑体の挙動と単核細胞で研究されてきた細胞周期の進行に伴う微小管およびアクチン繊維などの細胞骨格の挙動との関連を研究考察した。

海産緑藻モツレグサの配偶体は、一つの細胞内に数百の核を持つ多核細胞よりなる分枝糸状体である。葉緑体は多数のピレノイドを含む一枚の網目袋状構造を呈し、細胞中心部の巨大液胞を包み込むように細胞膜の内側に配置する。細胞膜と葉緑体の間隙を多数の核と細胞質が満たしている。栄養生長では先端細胞のみが伸長・分裂し、先端寄りに著しく偏った位置で隔壁を形成する。この不等細胞質分裂において、それまで細胞表層に均等に分散していた多数の核が、隔壁形成の予定位置に集合し“核リング”を形成する。同時にこの部分で葉緑体の部分的な褶曲が起こる。この特徴的な核や葉緑体の挙動は、微小管やアクチン繊維などの細胞骨格系が大きく関与していると考えられる。しかし、多核細胞では核分裂と細胞質分裂が必ずしも連携していないことから、単核細胞の細胞周期で知られている結果とは異なる細胞骨格の挙動を観察することが可能であると考えた。

最初に、モツレグサの先端細胞の伸長と分裂の過程における核と葉緑体の挙動の観察を行った。細胞表層に均等に分散していた数百の核の約60%が細胞質分裂の予定位置に集合し核リングを形成し、各々が同調的に核分裂した。その後細胞質分裂が起こるが、ほとんどの娘核は新たに形成される先端細胞側に分配され、先端細胞の伸長生長に伴い細胞質表層に再び均等に配置された。核リング形成と娘核の再配置に伴って、移動方向に尖った部分に向けた涙滴状の核の形態変化が観察された。核分裂は、まず核リング部分の多数の核の同調分裂から始まり、続いてリング形成に関与しない核リングのすぐ近傍の核、さらに遠くの核へと時間を経て同調的核分

裂の波が伝播することが明らかとなった。細胞内に一様に展開していた葉緑体は、細胞分裂直前に核リングのすぐ内側でその一部分を褶曲させるが、細胞質分裂後の新たな先端細胞の伸長に伴ってその褶曲部分を伸展させ、再び細胞全表層に展開した。

次に、上記の核と葉緑体の挙動と細胞周期の進行との対応を調べるため、モツレグサの先端細胞における各々の核の G1 期、S 期、G2 期、M 期の時間を蛍光顕微測光法による相対 DNA 量と BrdU の取り込み実験から推定した。その結果、モツレグサは G2 期が細胞周期の半分以上を占める G2 植物であり、S 期は核分裂後に娘核が細胞内に再配置される途中から開始されることが明らかとなった。

モツレグサの細胞分裂の進行に伴う細胞骨格の研究は、抗チューブリン抗体を用いた微小管とローダミン標識ファロイジン等を用いたアクチン繊維の観察、中心子の挙動は Aruga *et al.*(1997)による簡易観察法により行った。間期の表層微小管は先端細胞の先端から放射状に伸び、細胞の長軸方向に平行に配列していた。また表層アクチン繊維は網目状で細胞質表層に一様に分布し、その配列は全体として細胞長軸に平行であった。表層微小管の配列は、細胞質分裂開始直前に分裂の開始位置で、その向きを徐々に細胞長軸に対して垂直に変化させ、分裂期に入るまでに 11 ~ 13 本の微小管の束からなる顕著な“微小管バンド”を形成した。この微小管バンドの形成は、核リング形成と同調的であった。表層アクチン繊維も上記と同じ位置で密度を増し、徐々に細胞長軸に対して垂直な複数のアクチン繊維束を形成し、その蛍光域は葉緑体の褶曲部分とほぼ一致した。核分裂前期には各々の核膜周囲に“かご状のアクチン繊維の束”が観察され、次いで微小管とアクチン繊維を含む紡錘体が形成された。核が紡錘体を形成している核リングの部分では表層微小管、アクチン繊維束は消失するが微小管バンドは存在し続け、核分裂終了後の求心的な隔壁形成による細胞質分裂では、隔壁溝の突端部に微小管バンドが観察された。娘核の再配置に伴い、消えていた表層微小管が最初は無秩序な方向性を示しながら現れ、徐々に細胞長軸と平行に再配列した。一方、表層アクチン繊維は、葉緑体の褶曲部分が伸展し再び展開しつつある部分に多く分布した。中心子は細胞周期を通して核周辺に存在し、分裂核の両極および核が移動する際の運動方向の先端に位置することが明らかとなった。

微小管、アクチン繊維の阻害剤であるコルヒチン、サイトカラシン D を用いた実験結果などを総合して、多核緑藻モツレグサの細胞分裂に伴う核や葉緑体の挙動に関する細胞骨格の変化と役割について、以下のことを明らかにした。細胞分裂に伴う核の移動には微小管とアクチン繊維の両者が関与し、その運動方向には中心子が位置する。細胞質分裂開始部分で葉緑体が褶曲する運動にはアクチン繊維のみが関与するのに対し、細胞分裂後の葉緑体の褶曲部分の伸展と展開には微小管とアクチン繊維の両方が関与する。後者では、葉緑体の伸展・展開が細胞分裂後の先端細胞の伸長生長に付随して行われるからであると考えられる。また、モツレグサの細胞分裂で観察される顕著な微小管のバンドは、分裂期以前の表層微小管と密接な関係を示しながら細胞質分裂の開始予定位置に形成され、細胞質分裂時には分裂装置として機能していると考えられる。このような微小管バンドは、核リングを分裂面に維持する役割をも持っていると考えられるが、それ自身の維持にはアクチン繊維の存在が必要であることも明らかとなった。以上のように、多核糸状緑藻のモツレグサの細胞分裂環を研究することによって、細胞内での核の移動と配置、同調的核分裂の波、細胞質および葉緑体の分割、隔壁形成、これらと呼応する微小管とアクチ

ン繊維などの細胞骨格の挙動などのように、単核細胞の研究では得られないような多様で示唆に富む重要な関係を解析し、細胞骨格の役割解明に大きく貢献した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 市 村 輝 宜
副 査 助 教 授 本 村 泰 三
副 査 助 教 授 堀 口 健 雄

学 位 論 文 題 名

Studies on cell division and cytoskeleton in a marine multinucleate green alga, *Acrosiphonia duriuscula* (Ruprecht) Collins

(海産多核緑藻モツレグサにおける細胞分裂と細胞骨格の研究)

近年、細胞周期に関する分子細胞生物学的研究が盛んに行われている。しかし、ほとんどは動植物や酵母などの単核細胞生物を研究対象としており、紅藻や緑藻などの海藻類の多核細胞生物に関する研究は非常に少ない。

本論文は、海産緑藻モツレグサを用いて、多核細胞の細胞分裂に伴う核と葉緑体の挙動に関する微小管およびアクチン繊維などの細胞骨格の役割を研究考察することを目的として行われた。この目的を達成するために高度の細胞生物学的技術を駆使して、細胞分裂に先行する葉緑体の褶曲と核の集合、核分裂装置の形成、細胞分裂面の決定、隔壁形成、娘核の分配と葉緑体の伸展などにおける非常にダイナミックで特色ある細胞骨格系の挙動を明らかにした。その概要を下記に示す。

モツレグサの配偶体は、1細胞に数百の核を含む多核細胞よりなる分枝糸状体である。葉緑体は多数のピレノイドを含む一枚の網目袋状構造を呈し、細胞中心部の巨大液胞を包み込むように細胞膜の内側に配置する。細胞膜と葉緑体の間隙を多数の核と細胞質が満たしている。栄養生長では先端細胞のみが伸長・分裂し、先端寄りに著しく偏った位置で隔壁を形成する。この不等細胞分裂において、それまで細胞表層に均等に分散していた多数の核が、隔壁形成の予定位置に集合し“核リング”を形成する。同時にこの部分で葉緑体の部分的な褶曲が起こる。この核や葉緑体の挙動は、微小管やアクチン繊維などの細胞骨格系が大きく関与している。

モツレグサの先端細胞の伸長と分裂の過程における核と葉緑体の挙動は下記のとおりである。細胞表層に均等に分散していた数百の核の約60%が細胞分裂の予定位置に集合し核リングを形成し、各々が同調的に核分裂する。その後細胞分裂が起こるが、ほとんどの娘核は新たに形成される先端細胞側に分配され、先端細胞の伸長生長に伴い細胞表層に再び均等に配置される。核リング形成と娘核の再配置に伴って、移動方向に尖った部分に向けた涙滴状の核の形態変化が認められる。核分裂は、まず核リング部分の多数の核の同調分裂から始まり、続いてリング形成に関与しない核リング近傍の核、さらに遠くの核へと時間を経て“核分裂の波”が伝播す

る。細胞内に一様に展開していた葉緑体は、細胞分裂直前に核リングのすぐ内側でその一部分を褶曲させるが、細胞分裂後の新たな先端細胞の伸長に伴ってその褶曲部分を伸展させ、再び細胞全表層に展開する。

核と葉緑体の挙動と細胞周期の進行との対応を調べるため、モツレグサの先端細胞内の各々の核の G1 期、S 期、G2 期、M 期の所要時間を蛍光顕微測光法による相対 DNA 量と BrdU の取り込み実験から推定し、モツレグサは G2 期が細胞周期の半分以上を占める G2 植物であり、S 期は核分裂後に娘核が細胞内に再配置される途中から開始されることを明らかにしている。

細胞分裂の進行に伴う細胞骨格の挙動は、抗チューブリン抗体を用いた微小管の観察とローダミン標識ファロイジン等を用いたアクチン繊維の観察、中心子の挙動は抗セントリン抗体を用いた Aruga *et al.*(1997)による簡易観察法により行われている。間期の表層微小管は先端細胞の先端から放射状に伸び、細胞の長軸方向に平行に配列している。表層アクチン繊維は網目状で細胞質表層に一様に分布し、その配列は全体として細胞長軸に平行である。表層微小管の配列は、細胞分裂開始直前に予定分裂位置で、向きを徐々に細胞長軸に対して直角に変化させ、分裂期に入るまでに 11~13 本の微小管の束からなる顕著な“微小管バンド”を形成する。この微小管バンドの形成は、核リング形成と同調的である。表層アクチン繊維も上記と同じ位置で密度を増し、徐々に細胞長軸に対して直角に並ぶ複数のアクチン繊維束を形成し、その蛍光域は葉緑体の褶曲部分とほぼ一致する。核分裂前期には核膜周囲に“かご状のアクチン繊維の束”が観察され、次いで微小管とアクチン繊維を含む紡錘体が形成される。核が紡錘体を形成している核リングの部分では表層微小管とアクチン繊維束は消失するが微小管バンドは存在し続け、核分裂終了後の求心的な隔壁形成による細胞質分裂では、隔壁溝の突端部に微小管バンドが観察される。娘核の再配置に伴い、消えていた表層微小管が最初は無秩序な方向性を示しながら現れ、徐々に細胞長軸と平行に再配列する。一方、表層アクチン繊維は、葉緑体の褶曲部分が伸展し再び展開しつつある部分に多く分布する。中心子は細胞周期を通して核周辺に存在し、分裂核の両極および核が移動する際の運動方向の先端に位置する。

また、微小管とアクチン繊維の阻害剤（コルヒチンとサイトカラシン D）を用いた実験から以下のことを明らかにした。細胞分裂に伴う核の移動には微小管とアクチン繊維の両者が関与し、その運動方向には中心子が位置する。細胞分裂開始部分で葉緑体が褶曲する運動にはアクチン繊維のみが関与するのに対し、細胞分裂後の葉緑体の褶曲部分の伸展と展開には微小管とアクチン繊維の両方が関与する。モツレグサの細胞分裂で観察される顕著な微小管のバンドは、分裂期以前の表層微小管と密接な関係を示しながら細胞分裂の開始予定位置に形成され、細胞分裂時には分裂装置として機能していると考えられる。このような微小管バンドは、核リングを分裂面に維持する役割をも持っていると考えられるが、それ自身の維持にはアクチン繊維の存在が必要であることも明らかとなった。

以上のように、著者は、多核細胞における核の移動と再配置、核分裂の波、細胞質および葉緑体の分割、隔壁形成、これらと呼応する微小管とアクチン繊維などの細胞骨格の挙動などのように、単核細胞生物では見られないような非常に特色ある重要な関係を明らかにし、細胞分裂と細胞骨格の研究に新しい分野を開拓し大きな貢献をした。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。