

学位論文題名

The life cycle of *Derbesia* (Chlorophyta):
the alternation of nuclear phase and behaviors of
nuclei and organelles in sporogenesis and gametogenesis

(緑藻ツユノイトの生活環：核相交代と遊走子
及び配偶子形成における核と細胞小器官の挙動)

学位論文内容の要旨

海産多核緑藻ツユノイト属については、近年二つの異なる生活環が報告されており、正しい生活環は何かが問われてきた。特に新しく報告された生活環は、緑藻の中でも非常に珍しい生活環であり多くの藻類研究者達を驚かせたが細胞学的に十分に検討されてはいない。本研究は、論争の対象となっているツユノイト属の生活環を再検討し正しい生活環を明らかにするだけでなく、藻類の中でも特異な形態を示す多核多鞭毛のステファノコント遊走子の形成過程及び異型配偶子形成過程における核と細胞小器官の挙動を細胞生物学的に明らかにすることを目的としている。

ツユノイト属の生活環に関して Neumann(1969)がホソツユノイトを用いて観察した結果、雌雄配偶子の受精直後に核融合が起こり二倍体の胞子体が形成され、遊走子形成過程で減数分裂が起こることを aceto-carmin 染色による染色体の観察により報告した。しかし、Schnetter グループ(1981, 1985, 1986)が主に顕微定量測光装置を用いてツユノイト属の生活環を通して核相の変化を調べた結果、ツユノイトの胞子体の核内 DNA 量が配偶体の核内 DNA 量と同じであることを観察し、胞子体は一倍体の異核共存体であると報告した。そして遊走子形成過程の早い段階で DNA 量が二倍になった直後に半減することから、遊走子形成過程の早い段階で核融合が起こり、直ちに減数分裂が起こると報告した。また彼ら(1984)は雌性配偶子の核を acridine orange で生体染色し雌雄配偶子を受精させ、さらに核を Hoechst33258 で2重生体染色し、受精過程には核融合が伴わないと報告した。近年殆どの藻類学教科書では Schnetter グループの異核共存の生活環をツユノイト属の正しい生活環として引用している。

本研究では、まず顕微定量測光によりツユノイト属の生活環を通して核相の変化を調べた。正確な実験結果を得るため、雄性配偶子の核内 DNA 量をコントロールとして生活環の各ステージでの相対的 DNA 量を計測したり、核以外の細胞壁や他の細胞質を除くなど実験方法において Schnetter らとは異なる工夫を行った。その結果、胞子体の相対的 DNA 量は配偶体の二倍であることを確認した。そして遊走子形成過程の早い段階の遊走子嚢では核融合によるものと考えられる DNA 量の増加は観察できないことを確認した。このことからツユノイト属の胞子体は異核共存体ではないことを明らかにした。細胞学的証拠として受精過程での核融合を電子顕微鏡により観察し、受精後 5 分の接合子で核融合が起こることを確認した。本研究の結果から Schnetter グループが生活環を通して核相の変化を調べるために用いたツユノイトの多くは単為発生した一倍体の胞子体株である可能性を示唆

した。単為発生株でないものについては、彼らの受精実験で核融合が起こらなかった理由の一つに *acridine orange* による毒性の可能性が強いと推察した。以上の結果からツユノイト属の生活環は Neumann(1969, 1974)により報告された結果がツユノイト属の正しい生活環であることを明らかにした。最近出版された藻類学教科書では本研究の結果がツユノイト属の正しい生活環として記述されている。

ステファノコント遊走子は藻類の中でもイワヅタ目とサヤミドロ目の一部の属で報告されているだけである。サヤミドロ目ではサヤミドロの単核多鞭毛のステファノコント遊走子形成の微細構造が報告されているが、イワヅタ目のステファノコント遊走子形成過程の微細構造の研究はなされていない。本研究では多核多鞭毛のステファノコント遊走子形成過程を明らかにするため、イワヅタ目のツユノイトケバを用い遊走子囊における減数分裂とその後の核の挙動とステファノコントの鞭毛形成過程を調べた。ツユノイト属では遊走子形成過程の初期段階で減数分裂が起こり、その結果形成された四つの核の中で一つの核が生き残り、残りの三つの核は退化することが光学顕微鏡を用いて報告されている。本研究では生存核と退化核の二つのタイプの核の分化過程を電子顕微鏡観察により明らかにした。分化の初期段階で生存核の近傍には中心子が新に現れ、まもなく基底小体と成る。しかし退化核には中心子が現れず、分裂溝に放出され膜構造に囲まれ退化していく。鞭毛形成過程では未熟の基底小体が独特な形態を取り、成熟と共に形態が変わること及び鞭毛装置の三つのバントが分化する過程を明らかにした。

さらに、本研究では異型配偶を行う雌雄異株のツユノイトケバの配偶子形成過程を調べた。雄性配偶体と雌性配偶体の栄養個体には外形及び細胞小器官の微細構造に違いは認められない。しかし、形成される雄性配偶子と雌性配偶子には、細胞の大きさの違いだけでなく細胞小器官の微細構造にも顕著な違いが観察された。雌性配偶子形成過程では配偶子形成完了まで、細胞小器官の大きさに変化が認められるものの、顕著な微細構造の変化は認められなかった。しかし、雄性配偶子形成過程の早い段階では、小型の配偶子に顕著な細胞小器官の形態変化が観察され、核が凝縮し明瞭な核小体も観察されなくなる。葉緑体は分裂による小型化と共にチラコイド膜の減少などにより退化が始まる。そして DNA を特異的に染色する染色試薬を用いて調べた結果、雄性配偶子形成過程の早い段階で特異的に細胞小器官の DNA が消失することが明らかになった。雌性配偶子形成過程では配偶子形成完了まで細胞小器官 DNA が観察された。以上の結果は免疫電子顕微鏡法による観察でも確認された。異型配偶を行う別属の海産多核緑藻ハネモでも細胞小器官 DNA の消失及び細胞小器官の形態変化が小型配偶子の配偶子形成過程で起こることが報告されている。同型配偶を行う緑藻(クラミドモナス、カサノリ、キッコウグサ)でも細胞小器官 DNA の母性遺伝が報告されているが、このような同型配偶では交配型プラスと交配型マイナスの配偶子間で細胞小器官の形態の違いはなく、両配偶子に細胞小器官 DNA が存在するが、受精過程で交配型プラスの葉緑体 DNA の母性遺伝が起こる。本研究ではツユノイトケバの異型配偶子形成過程における細胞小器官 DNA の挙動及び細胞小器官の形態変化を明らかにした。そして同型配偶を行う緑藻と異型配偶を行う緑藻の間で細胞小器官 DNA の消失が起こる時期と細胞小器官の形態変化が起こる時期に明瞭な違いがあることを明らかにした。

本論文では上記のように、海産多核緑藻ツユノイト属の正しい生活環及び多核多鞭毛のステファノコント遊走子形成過程の微細構造を明らかにした。この結果は緑藻類の多種多様な生活環と体制の中でツユノイト属の生活環と形態形成が如何に特色があるかを理解する上で重要な観察結果を提供するものである。さらに同型配偶と異型配偶の緑藻類間で細胞小器官 DNA の消失時期と細胞小器官の形態変化が起こる時期に明らかな違いがあることを初めて明確に指摘した。このことは同型配偶から異型配偶への進化を考える上で、細胞小器官 DNA の母性遺伝が異型配偶の進化と密接な関係がある可能性を示唆するものである。

学位論文審査の要旨

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

学 位 論 文 題 名

The life cycle of *Derbesia* (Chlorophyta):
the alternation of nuclear phase and behaviors of
nuclei and organelles in sporogenesis and gametogenesis

(緑藻ツユノイトの生活環：核相交代と遊走子
及び配偶子形成における核と細胞小器官の挙動)

多核海産緑藻ツユノイト属は、分岐糸状の複相の孢子体世代と囊状の単相の配偶体世代(古くウミノタマ属と呼ばれる別属の緑藻として記載されていた)が異型世代交代をする生物である(Neumann 1969, 1974)。近年ドイツのSchnetterら(1984, 1986, 1990, 2000など)によって、この緑藻の孢子体の子嚢菌類や担子菌類などで知られている異核共存の単相体であるとの説が発表され注目を浴び、欧米の教科書などにも藻類では非常に珍し生活環として紹介されている。しかし、この説の根拠となる顕微測光のデータ及び受精後の配偶子核の挙動についての報告には問題があり、論争の余地を残していた。

本研究は、ツユノイト属の生活環を再検討するためにその生活環の各ステージについて光学・蛍光・電子顕微鏡及び免疫電子顕微鏡などを用いた詳細な研究を行った。顕微測光によりツユノイト属の生活環を通して核相の変化を調べるに当たり、雄性配偶子の核内DNA量をコントロールとして生活環の各ステージの相対的DNA量を計測したり、核以外の細胞壁や他の細胞質を除くなど、Schnetterらとは異なる実験方法を用いて正確な実験結果を得るための努力を行った。その結果、孢子体の相対的DNA量は配偶体の二倍であることを確認した。また、Schnetterらが遊走子形成過程の早い段階の遊走子嚢内で核融合によるDNA量の増加が起こると主張しているが、このような事実は全くなく孢子体の核は最初から複相であることを確認した。

受精直後の接合子内で配偶子核が融合することなく各々が体細胞分裂するとするSchnetterらの見解に対しては、受精後5分の接合子で核融合が起っていることを蛍光

顕微鏡及び電子顕微鏡により確認した。本研究の結果から Schmetter らが生活環を通して核相の変化を調べるために用いたツユノイトの多くは単為発生した単相の胞子体株である可能性を示唆した。単為発生株でないものについては、彼らの受精実験で核融合が起こらなかった理由の一つに acridine orange による毒性の可能性が強いと推察した。以上の結果からツユノイト属の生活環は Neumann(1969, 1974)の報告した生活環が正しいことを明らかにした。

また、藻類の中でもイワツタ目とサヤミドロ目の一部の属に限られて報告されている多鞭毛のステファノコント遊走子の形成過程を明らかにするため、イワツタ目のツユノイトケバの遊走子嚢における減数分裂とその後の核の挙動とステファノコントの鞭毛形成の過程を調べた。ツユノイト属では遊走子形成過程の初期段階で減数分裂が起こり、その結果形成された四つの核の中で一つの核が生き残り、残りの三つの核は退化することが光学顕微鏡を用いて報告されているが、本研究では生存核と退化核の二つのタイプの核の分化過程を電子顕微鏡により観察した。分化の初期段階で生存核の近傍には中心子が新に現れ、まもなく基底小体と成る。しかし退化核には中心子が現れず、分裂溝に放出され膜構造に囲まれ退化していく。鞭毛形成過程では未熟の基底小体が独特な形態を取り、成熟と共に形態が変わること及び鞭毛装置の三つのバントが分化する過程を明らかにした。

本研究ではまた、同調的配偶子形成を行う雌雄異株のツユノイトケバを用い、異型配偶子の形成過程における細胞小器官の形態変化及び細胞小器官 DNA の挙動を明らかにした。雌性配偶子形成過程では配偶子形成完了まで細胞小器官の大きさに変化が認められるものの顕著な微細構造の変化は認められなかったのに対して、雄性配偶子形成過程では早い段階で顕著な細胞小器官の形態変化が観察され、核は凝縮し明瞭な核小体も観察されなくなることや、葉緑体が分裂による小型化と共にチラコイド膜の減少などにより退化する事、及び雄性配偶子形成過程の早い段階で特異的に細胞小器官の DNA が消失することを明らかにした。そして同型配偶を行う緑藻と異型配偶を行う緑藻の間で細胞小器官 DNA の消失が起こる時期と細胞小器官の形態変化が起こる時期に明瞭な違いがあることなどを明らかにした。

以上のように海産緑藻ツユノイト属の生活環の核相交代を明らかにしただけでなく、多核細胞における減数分裂・体細胞分裂を伴う遊走子形成、雌雄配偶子の差異及び受精・発生、異型配偶子の形成過程における核及びオルガネラの形態変化とその DNA の挙動を明らかにした。国際的学術誌に3編の論文として既に公表、他にも2編の論文を投稿しており、この分野の研究発展に大きく貢献している。特に、最近その特異性から欧米の教科書などにも採用された誤った解釈に基づく論文の公表者達の強い反論にも打ち勝って、正しい本属の生活環を世に再認識させた意義は大きい。よって、本論文は北海道大学博士(理学)の学位申請論文に値するものと認める。