

紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis* Ueda) の
生活環を通した細胞微細構造比較、
および生殖細胞形成と発生に関する研究

学位論文内容の要旨

紅色植物門、原始紅藻亜綱ウシケノリ目に属するスサビノリ (*Porphyra yezoensis* Ueda) は海苔養殖現場において代表的な種であり、育種を目的とした研究が古くからなされてきた。現在でも栄養実験などの生理学的な研究や分子生物学的な研究が盛んに行われている。一方、本種の細胞生物学的な分野における研究例は他の紅藻に比べて報告が少なく、核分裂などの基本的な現象も報告されていないのが現状である。本種の基礎生物学的な知見が欠如している状況は、応用研究を進める上でいくつかの具体的な生物学的知見に基づいた研究戦略の立案を困難にしている。したがって、本研究はスサビノリ你的生活環を通して起こる諸現象を細胞微細構造レベルで観察することを目的とし、得られた結果は本種に関わる基礎生物学の分野の充実だけでなく、海藻を用いた応用研究の礎とすることを目標とした。以下では本研究において行った研究結果 (第 2 章殻胞子嚢形成に関する培養実験および色落ちの形態学的観察、第 3 章配偶体の栄養細胞と有性生殖細胞における微細構造観察、第 4 章胞子体の栄養細胞における基本構造および殻胞子嚢における細胞質分裂過程、第 5 章細胞壁に関する組織化学) についてまとめた。

第 2 章では殻胞子嚢の形成条件について温度条件 (5~25℃)、栄養塩濃度条件 (標準栄養強化培地として PES 培地を使用、通常海水 100 ml につき 2 ml の PES 原液を添加) に関する培養実験を行った。その結果、実験開始 25 日目頃から殻胞子嚢形成が観察され、50 日目には 15℃、1/4 PES (0.5 ml/100 ml) で最も高密度で殻胞子嚢が形成されたことから、本条件を最適とした。培地交換することで 1 週間後に殻胞子の放出が観察できた。以上より、アマノリ属植物の胞子形成において重要な要因と報告されている水温、光周期に加え

て、培地中の栄養塩濃度も重要であることが明らかとなった。また、配偶体ならびに孢子体を貧栄養条件下で培養することにより藻体の色落ちを誘導し、細胞微細構造を調べた。その結果、どちらにおいても葉緑体で最も大きな変化が観察され、ピレノイドは縮小し、チラコイド膜の不規則な融合、圧着が随所で起こった。このような構造の変化はクリプト藻や単細胞性紅藻で観察されていることから、貧栄養状態において細胞が受けたダメージの一つであると考えられた。

第3、4章では配偶体ならびに孢子体の細胞微細構造の特徴を記載した後に、配偶体では核分裂、孢子体では細胞質分裂、ピットプラグ形成、そして減数分裂について観察を行った。生活環を通した単孢子、果孢子、殻孢子の形成過程は、液胞の縮小やデンプン粒の増加などで共通した現象であった。配偶体の造精子細胞では形成初期から繊維物質が充満した小胞が分裂極付近に形成され徐々に大型化していった。また、葉緑体が縮小し、デンプン粒が消失した。さらに、それに伴う核分裂では紅藻の分裂極に存在する特徴的な構造、NAO (nuclear associated organelle) を構成するリングが終期に複製する様子が観察されたことから、NAO が細胞周期を通して半保存的な構造であることが示唆された。さらに、スサビノリ配偶体における核分裂は前中期から中期にかけて紡錘体極で観察される微細構造によって分類されている PG (polar gap)、PF (polar fenestration) タイプの両方の特徴を有していることが明らかとなった。以上の結果は、原始紅藻亜網と真正紅藻亜網の間というウシケノリ目の系統的な位置を示唆する分子系統学的な報告を支持するものであった。本研究では配偶体の核分裂期の微細構造について考察を行ったが、今後は孢子体においても核分裂期の微細構造を確認することで生活環を通した特徴付けが可能になると考えている。

孢子体では栄養細胞ならびに殻孢子嚢の微細構造を詳細に記載した他に、細胞質分裂とピットプラグ形成の過程を観察した。細胞質分裂は細胞膜が細胞の内側に向かって陥入することで進行した。その後、細胞質分裂の途中にできた開口部にピットプラグが形成された。ピットプラグの縁まで及んでいた細胞膜はキャップ層に沿ってループ状に伸長し、最終的にチューブ状の膜とともにほぼ全体を覆った。ウシケノリにおいても同様の構造が観察されたことから、スサビノリで示唆された細胞膜の伸長様式はウシケノリ目に共通した構造であると考えられた。ダルスならびにマキイトグサでは細胞膜から二叉分岐したキャップ膜の存在が急速凍結置換法を用いて明らかとなった。また、孢子体の細胞では2種

類の特徴的な膜構造である数珠状小胞とロマソームが観察された。数珠状小胞は細胞膜が細胞壁側に突出することで形成され、細胞質分裂時に頻繁に観察された。また、それらが隔壁に蓄積したことから、細胞壁形成への関与が示唆された。一方、ロマソームは隔壁形成箇所ではほとんど観察されなかったが、成熟した殻孢子嚢、貧栄養処理した孢子体において発達していたことから、細胞の生存、維持に関わる機能を有していると考えられた。

次にスサビノリ生活環を通して染色体数の計測を行い、配偶体では3本、果孢子嚢、孢子体栄養細胞、殻孢子嚢では6本の染色体が観察された。殻孢子嚢の成熟過程で染色体数が6本から3本に半減し、殻孢子発芽体では染色体数が3本であったこと、そして成熟した殻孢子嚢において第一減数分裂前期に特徴的な構造が観察されたことから、スサビノリ生活環における減数分裂は殻孢子嚢の成熟過程において起こることが示唆された。しかし、殻孢子の大きさが均一でなかったことなどから、殻孢子の発芽時における減数分裂を否定することはできず、今後はシナプトネマ構造の出現時期の特定をする必要がある。

第5章では配偶体、孢子体において細胞壁の成分と微細構造が大きく異なることを踏まえて、8種の多糖染色剤、レクチン7種を用いた組織化学的実験を行った。その結果、配偶体では内部細胞壁に中性多糖ならびに硫酸多糖が他の多糖に比べて多く含まれていることが明らかとなった。レクチン標識ならびに多糖染色剤による結果から、孢子体は配偶体よりも硫酸多糖を多く含むことが示唆された。また、単孢子、果孢子発芽体においてカルコフロールホワイト、コンゴーレッドによる染色濃度検定を行った結果、(1→4)- β -グルカンなどのセルロース性の細胞壁成分に量的な差があることが示唆された。さらに、レクチンの標識パターンおよび透過型電子顕微鏡による観察結果からは、単孢子ならびに果孢子が着生直後に形成する細胞壁は組織学的、微細構造学的にも同質であることが示された。しかし、果孢子の発芽管に形成される細胞壁は孢子部分とは大きく異なっており、果孢子発芽体は2種の全く異なる細胞壁をひとつの細胞内で分泌するという特徴的な発生過程を経ることが明らかになった。

以上のように、本研究では生活環を通して観察される諸現象について形態学的な種々の手法を用いて観察を行い、新しい結果を明確に示した。今後は本研究で得られた基礎的なデータをもとに、細胞壁や葉緑体に関する生理学的な研究を進め、細胞形態学、生理学、そして分子生物学的結果を統合した新たな展開を試みたい。また、世代間における細胞壁の組成の違いについて行った組織化学的な実験手法、また海苔藻体の色落ち状態に

おける細胞微細構造の変化については水産科学ならびに育種の現場において応用できるような研究を進めていきたい。

学位論文審査の要旨

主査	教授	嵯峨直恆
副査	教授	本村泰三
副査	教授	都木靖彰
副査	准教授	長里千香子
副査	准教授	三上浩司

学位論文題名

紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis* Ueda) の 生活環を通した細胞微細構造比較、 および生殖細胞形成と発生に関する研究

海産紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis* Ueda) は海苔養殖現場において代表的な種であり、育種を目的とした研究だけでなく、生理学、分子生物学的な観点から広く研究が行われている。一方、細胞生物学の分野では核分裂などの基本的な現象も報告されていないのが現状である。本研究はスサビノリ的生活環を通して起こる諸現象を主に電子顕微鏡を用いた細胞微細構造レベルで観察することを目的として研究を進めている。

本論文は6つの章より構成され、第1章では全体における緒言を示し、第2章において殻胞子嚢の形成条件に関する培養実験、ならびに貧栄養処理することで色落ちさせた配偶体、胞子体の微細構造の変化について調べた。第3章では配偶体の基本的な微細構造の他に、造精子形成に伴う核分裂について詳細に観察した。第4章では胞子体の微細構造を記載し、殻胞子嚢形成における細胞質分裂の過程を詳細に観察した。また、染色体の計測、核分裂像を観察して減数分裂の生活環における位置について考察した。第5章では第3、4章の結果を踏まえて、多糖染色剤、レクチンを用いて細胞壁の組織化学的実験を行った。第6章では本研究の総括を行い、スサビノリを用いた将来の細胞学と水産科学への応用に向けた課題と展望について述べた。以下では第2~5章の詳細について記す。

第2章では殻胞子の形成条件について温度条件 (5~25℃)、栄養塩濃度条件に関する培養実験を行った。その結果、実験開始から50日目には15℃、1/4 PES培地で最も高密度で殻胞子嚢が形成された。培地交換することで1週間後に殻胞子の放出が見られた。また、貧栄養処理を施した配偶体ならびに胞子体では葉緑体の構造が最も大きく変化していた。ピレノイドは縮小し、チラ

コイド膜の不規則な融合、圧着が随所で観察され、細胞質中のデンプン粒は増加していた。

第3章において観察した配偶体の造精子細胞では形成初期から繊維物質が充満した小胞が分裂極付近に形成され、葉緑体の縮小、デンプン粒の消失が観察された。核分裂では紅藻の分裂極に特徴的な構造である NAO (nuclear associated organelle) を構成するリングが終期に複製する様子が観察されたことから、NAO が細胞周期を通して半保存的な構造であることが示唆された。

第4章では細胞質分裂ならびにピットプラグの形成過程を観察した。細胞質分裂は細胞膜が内側に向かって陥入することで進行し、その過程においてピットプラグが形成された。その後、ピットプラグはループ状に伸長した細胞膜とチューブ状の膜によってほぼ全体が覆われた。ウシケノリにおいても同様の構造が観察され、スサビノリで示唆された細胞膜の伸長様式はウシケノリ目に共通した構造であると考えられた。ダルスとマキイトグサでは細胞膜から二叉分岐したキャップ膜の存在が急速凍結置換法を用いて明らかとなった。次にスサビノリ生活環を通して染色体数の計測を行い、配偶体では3本、果孢子嚢、孢子体栄養細胞、殻孢子嚢では6本の染色体が観察された。殻孢子嚢の成熟過程で染色体数が6本から3本に半減し、殻孢子発芽体では染色体数が3本であったこと、成熟した殻孢子嚢において第一減数分裂前期に特徴的な構造が観察されたことから、スサビノリ生活環における減数分裂は殻孢子嚢の成熟過程であることが示唆された。

第5章では8種の多糖染色剤ならびに7種のレクチンを用いて配偶体、孢子体の細胞壁の違いを組織化学的に捉えた。配偶体の内部細胞壁には他の多糖よりも中性多糖ならびに硫酸多糖が多く、外部細胞壁には種々の多糖が含まれていた。一方、孢子体では硫酸多糖が豊富で、セルロース性の細胞壁成分が配偶体よりも多く含まれていることが明らかにされた。本研究で行った網羅的かつ詳細な形態学的観察の報告は、水産科学の分野では非常に少なく、今後の応用研究の基礎的な知見となりうる。また、細胞壁の組織化学的な実験手法の確立により育種の現場への応用が期待される。

主論文は平成20年1月21日13時から14時まで第二研究棟特別講義室において、審査員および関連教員16名および一般聴講22名出席のもと発表された。一般聴講においては、造精子細胞に形成される繊維物質を含んだ小胞の内容物が精子外被の粘質多糖の成分になる経緯について、造果器細胞に見られる受精突起の位置、そして殻孢子嚢から殻孢子が放出される時にはどのようにしてピットプラグから離れるのかについて質疑・応答がなされた。また、審査員および関連教員においては、受精突起に付着した精子が核分裂が完了した際にいくつかの精子核が造果器細胞内に進入するのか、細胞質分裂の特徴は他の紅藻と比べて系統的に関連性があるのか等について質疑・応答がなされた。また、本研究は今後進められる様々な研究の基礎的な知見として十分な価値があり、そして造精子細胞の内部細胞壁で見られた変化について組織化学的な研究を進めることで水産科学に応用できるなどのコメントがなされた。これらの研究で得られた結果は本種の基礎生物学の分野の充実だけでなく、今後の海藻を用いた応用研究の発展に資するところ大と判断し、博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。