

多細胞藻類における一次細胞間連絡の形成

Formation of Primary Intercellular Connections in Multicellular Algae

長里千香子^{a*}, 寺内 真^b, 本村 泰三^a

Chikako Nagasato, Makoto Terauchi and Taizo Motomura

^a北海道大学北方生物圏フィールド科学センター^b神戸大学先端融合研究環

要旨 褐藻類はコンブやワカメなどを含むグループであり、沿岸域において最も大型化する光合成生物である。全ての種が多細胞体制をとり、単列糸状、多列糸状、細胞や組織の分化が見られる複雑な多細胞体をとるものがある。隣接細胞間には原形質連絡と呼ばれる10–20 nmの小さな細胞質トンネル、細胞間連絡が存在している。同じく原形質連絡を有する陸上植物では、細胞質分裂時に形成されることが知られている。褐藻類では細胞質分裂および原形質連絡の出現時期が不明だったことから、電子線トモグラフィー解析を含めた微細構造観察を行った。その結果、中心体から伸びる微細管が交差する領域が細胞質分裂面となり、その予定域にゴルジ小胞と平板小囊と呼んでいる扁平な膜構造が出現し、それらが融合することで隔壁が細胞膜内部より遠心的に発達し、親細胞壁に到達することが示された。また、原形質連絡は細胞質分裂時に形成されることが確認された。

キーワード：褐藻類、原形質連絡、細胞質分裂、細胞分化、多細胞

1. はじめに

真核生物の世界において、コケ、シダ、種子植物以外の酸素発生型光合成生物である藻類は、オピストコンタおよびアメーボゾア以外のすべてのドメインで見られる¹⁾。わずかに数 μm の単細胞から50 mを超えるジャイアントケルプまで存在し、生育環境も淡水、汽水、海水の他、雪上、砂中と多様である。その中でも肉眼で確認でき、海水に生育するものを海藻と呼ぶ。海藻は体色の違いから緑藻類、褐藻類、紅藻類に大別される。緑藻の中には、巨視的な単細胞体制をとる種がいくつかみられるものの、緑藻類、褐藻類、紅藻類は、動物・菌類・陸上植物と同様に真核生物の中でも多細胞体制を獲得した数少ないグループである。陸上植物や菌類、海藻類で多細胞体制を有する生物は、個々の細胞は固い細胞壁によって物理的に隔離される一方、隣接細胞の直接的な物質のやりとりを可能にする細胞間連絡構造を発達させている。それらの構造は、グループによって異なっている。今回は海藻類の中でも、特に複雑な多細胞体制をとる褐藻類の細胞質分裂と細胞間連絡構造である原形質連絡の形成（一次原形質連絡）について紹介したい。

2. 褐藻という生き物

コンブやワカメを想像すると分かりやすいのだが、褐色を帯びた海藻類の間である褐藻類は、海岸でもすぐに目につくほどの大きさで、全てが多細胞体制をとる。同じく海藻としてひとまとめにされる緑藻類（アオサ・イワツタ等）や紅藻類（ササビノリ・テングサ等）とは辿ってきた進化の道筋が違い、これらが陸上植物とともにアーケプラスチダ系統群を形成するのに対して、褐藻類はストラメノパイルという異なる系統群に属し、この系統群の中で独自に多細胞体制を獲得した。多くの海藻類の生活史には世代交代とよばれるイベントが存在する。褐藻類では無性生殖細胞を形成する孢子体と有性生殖細胞を形成する配偶体という核相の異なる二つの独立した世代交代が見られる。コンブを例にすると、私たちがよく知る“コンブ”という生物体は孢子体であり、遊泳性をもった無性生殖細胞（遊走子）を形成する過程で減数分裂を行い、その遊走子が岩などに定着し配偶体へ発生していく（図1A）。配偶体は単列の糸状体であり、肉眼では確認することができず、また形態によって分類することもできないほどである（図1B）。雌雄配偶体から形成される卵と精子の受精を経て（図1C, D）、再び表皮・皮層・髄層に分化する複雑な多細胞である孢子体世代となる（図1E, F）。つまり、大きな“コンブ”の体のもとには1細胞である接合子であり、その後の細胞分裂、組織分化を遂げて形成されていたものである。

海藻類は陸上の植物が持たない特有の細胞壁多糖類を持っており、潮間帯に生育するこれら生物の乾燥耐性や柔軟性、

^a 〒051-0013 北海道室蘭市舟見町1-133-31

TEL: 0143-22-2846; FAX: 0143-22-4135

* E-mail: nagasato@fsc.hokudai.ac.jp

2016年8月9日受付、2016年9月29日受理

藻体の物理的強度を与えている。コンブ類に触れた時、手にネバネバした感触が残るが、これはアルギン酸と硫酸多糖類（フコイダンなど）という細胞壁多糖類によってもたらされている。アルギン酸は褐藻類の細胞壁成分の中で最も割合が高いと言われており、褐藻類の他、細菌類、紅藻類の一部で見られる多糖類である。β-D-マンヌロン酸（M）とそのC5エピマーであるα-L-グルロン酸（G）の2種類のウロン酸から構成され、MブロックとGブロック、もしくはMとGがランダムに結合したMGブロックとして細胞壁に存在している。一方、褐藻類から抽出される硫酸多糖類は、硫酸化L-フコースを主要な構成糖とし、他の単糖類が10%以下であるものをさす。褐藻類の細胞壁中には陸上の植物と同様に

セルロースも含まれているが、その含有量は非常に低い。褐藻類は細胞分裂をしながら隣接細胞間の接着を維持するため、これらの細胞壁成分の分泌・合成を行っている。

褐藻類の中には大きく分けて3つの体制が見られる。細胞が一行に並んだ構造をしている単列糸状、細胞分裂の方向が短軸方向のみではなく、長軸方向にも行われるため、何列かの細胞で構成されている多列糸状、そして、皮層と髓層といった組織分化のみられる複雑な多細胞である。特に、コンブ目の孢子体の体は、褐藻類の中でもっとも組織分化がみられるものであると言え、外側から表皮、皮層、髓層という3つの細胞層からなる。そして髓層部分には陸上植物の師管のような構造であるトランペット形細胞糸がみられ、物質の長距離輸送を可能にしている。

すべての褐藻類の隔壁内には原形質連絡という直径10–20 nmの小さな細胞質トンネルが存在する。この構造は、隣接細胞の細胞膜が直接連結しており、細胞間での物質のやりとりを可能にしている（図1G）。褐藻類の体制の違いによる原形質連絡の分布について電子顕微鏡で調べたところ、単列・多列糸状の体制を持つ褐藻類では原形質連絡は隔壁内に散在していること（図1H）、複雑な多細胞体制をとる褐藻類では原形質連絡が一箇所に集合して存在する隔孔域（pit field；図1I）として存在していることが明らかになった²⁾。例えば、コンブを例にすると、孢子体は3層に分化しているため隔孔域が見られ、配偶体は単列糸状であることから散在して原形質連絡が存在しているというように生活環のステージで体制が変わると、それらの存在様式も異なるということである。

原形質連絡は、細胞質分裂時に出現するものを一次原形質連絡、細胞質分裂とは関係なく隔壁に出現するものを二次原形質連絡と呼んでいる。一次原形質連絡の形成について紹介するにあたり、最初に褐藻類の細胞質分裂から触れる。

3. 褐藻類の分裂の仕組み

褐藻類の細胞には一組の中心子（centriole）を中心として微小管を発達させる中心体（centrosome）が存在している（図2A-C）。微細構造観察と中心子に局在しその複製にも関係するセントリン（20 kDa）とチューブリンに対する抗体を用いた間接蛍光抗体の結果から、細胞周期を通して主な微小管形成の中心は中心体が担っていること、そして、紡錘体微小管は核分裂前に複製した中心体が核の両極へ移動して形成していることが明らかになっていた。一方で核分裂終了後の娘核を物理的に分断する細胞質分裂の仕方は長いこと不明であった。細胞質分裂の様子を観察するためには電子顕微鏡観察において膜構造の保存が不可欠であるが、褐藻類では化学固定による電子顕微鏡試料作製において注意を払わなければいけない点がある。具体的には、①褐藻類はフィソードと呼ばれる単膜で覆われた構造が細胞内に多く見られ、これがフェノールを含んでおり通常の固定では細胞質内に漏出し他の細胞小器官の構造へダメージを与えてしまう（図2Aの中のP; physode）、②細胞壁に多量に含まれるアルギン酸が化

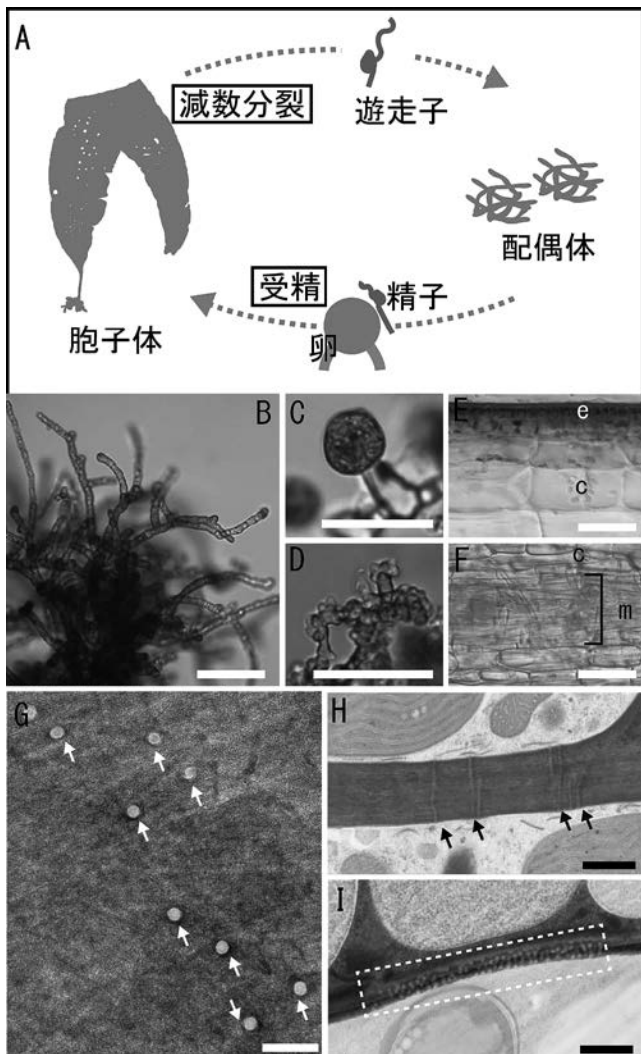


図1 褐藻類の生活環と特徴。(A) コンブの生活環。コンブは巨視的な孢子体と微視的な配偶体の世代交代を行う。遊走子(無性生殖細胞)は減数分裂を経て形成され、配偶体から卵と精子が放出し、受精後再び孢子体となる。(B) 微視的な配偶体。(C) 造卵器。(D) 造精子器。(E, F) 孢子体の断面像。表皮(e)、皮層(c)、髓層(m)。(I) 原形質連絡横断面。矢印は原形質連絡。(H) *Halopteris congesta* (多列糸状体制)の隔壁。(I) *Fucus distichus* (複雑な多細胞体制)の隔壁。囲みは隔孔域。スケールバー100 μm (B), 50 μm (C-F), 200 nm (G), 500 nm (H, I)。

学固定の過程で水溶液中に溶出してしまうため、原形質分離が生ずることがあげられ、化学固定では良好な電子顕微鏡像が得られなかった。それを改善するためにカフェインやカルシウム(アルギン酸は二価イオンにより架橋されゲル化する)を前固定のバッファーの中に添加するなどの工夫がなされた³⁾。化学固定による褐藻類の細胞質分裂に関する研究は1970年代から1980年代にかけて報告され、娘細胞を分断する隔膜の拡張方向が細胞の内側から進行するか、もしくは外

側から進行するかが議論された。動物と同様に細胞膜のくびれこみによって求心的に細胞質分裂が進行するとして報告されたのはシオミドロ目 *Pylaiella littoralis*⁴⁾、クロガシラ目 *Sphacelaria tribuloides*⁵⁾、ムチモ目 *Cutleria cylindrica*⁶⁾、ヒバマタ目 *Fucus vesiculosus*⁷⁾ であり、陸上植物と同様に細胞内部より新しい隔壁が遠心的に形成されると報告されたのはヒバマタ目 *Ascophyllum nodosum*⁸⁾ のみだった。その後、アクチンフィラメントが細胞質分裂直前に細胞質分裂面に局在す

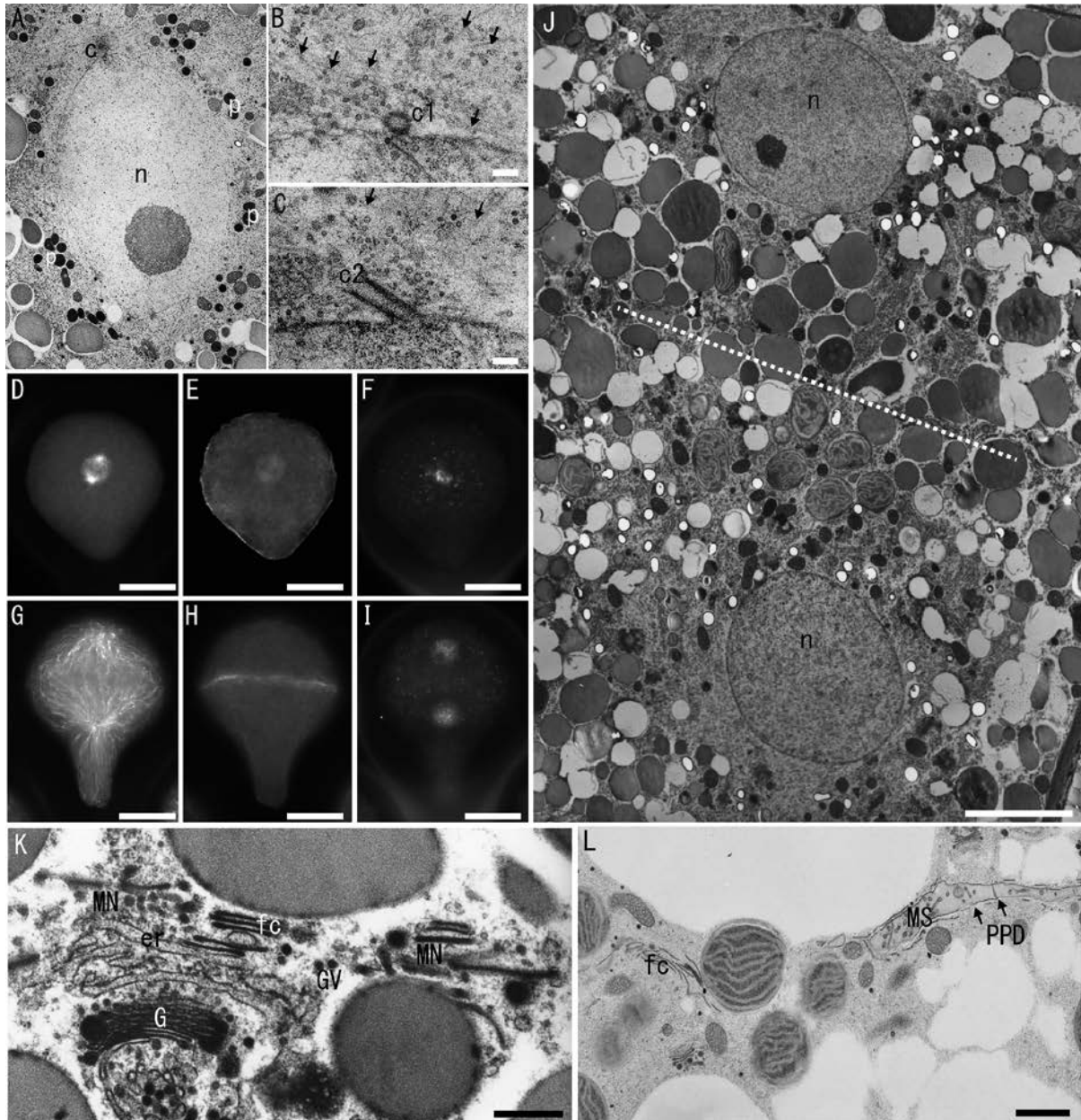


図2 褐藻類の細胞分裂。(A-C) ヒバマタ *Fucus distichus* の核分裂直前の細胞。(A) 複製後、核の両極へ移動している中心子(c)。核(n)、フィソード(p)。(B, C) 中心子。c1とc2で一組。周辺に微小管(矢印)が発達。(D-I) エゾイシゲ *Silvetia babingtonii* の接合子における最初の分裂。(D-F) 核分裂中期。(G-I) 細胞質分裂直前。(D, G) 微小管, (E, H) アクチン, (F, I) DNA。(J) ヒバマタ核分裂直後の細胞。破線は細胞質分裂予定域。核(n)。(K) 細胞質分裂面に集積してくる平板小囊(fc)とゴルジ小胞(GV)。それらの融合により形成される membranous sac; MN。小胞体(er), ゴルジ体(G)。(L) *Halopteris congesta* の頂端細胞の分裂。膜の融合が進み membranous sac; MSが形成されている。プレ原形質連絡(PPD)。スケールバー 2 μ m (A), 200 nm (B, C), 20 μ m (D-I), 5 μ m (J), 500 nm (K), 1 μ m (L)。

ることが明らかになったことから (図 2D-I), このアクチンフィラメントが動物での収縮環のような働きをしていると考えられ, 多くの電子顕微鏡観察にならぬ, 細胞質分裂は細胞内部への膜のくびれ込みによって生じていると考えられていた。しかし, それを納得させるだけの良好な電子顕微鏡像は得られていなかった。

著者らは, 液化プロパンを使用した急速凍結置換法を用いて褐藻類の細胞質分裂の様子を再検証した。浸漬法により細胞を瞬時に凍結し, オスミウムアセトンで置換した結果, これまでにない良好な電子顕微鏡像を得ることができた。調べた褐藻類はクロガシラ目 *Halopteris congesta*, *Sphacelaria rigidula*⁹⁾, カヤモノリ目 *Scytosiphon lomentaira*¹⁰⁾, アミジグサ目 *Dictyota dichotoma*¹¹⁾, ヒバマタ目 *Silvetia babingtonii*^{12,13)}, *Fucus distichus* であり, *Sphacelaria rigidula* 以外は細胞質分裂面に集積してきたゴルジ小胞と平板小囊と名付けた扁平な小胞の融合によって細胞内部より隔膜が形成されていく様子が観察された (図 2J)。平板小囊は直径が約 500 nm, 厚さが約 20 nm の扁平な膜構造で, 細胞質分裂予定域の他, 細胞膜直下に細胞膜に対して平行に存在する構造である。核分裂後に娘核周辺とその間に発達する小胞体周辺に形成されているのが観察されており (図 2K), 電子線トモグラフィによる詳細な解析の結果, 小胞体起源を示唆する電子顕微鏡像が得られている¹²⁾。これらの膜構造は細胞質分裂予定域に集積した後, 平板小囊の周辺にゴルジ小胞が次々に融合し, 膜のネットワークの出現 (MN; membranous network; 図 2K) を経て, 袋状の膜構造 (MS; membranous sac; 図 2L) が形成される。MS は細胞質分裂面に幾つか形成され, それぞれが拡張と融合, そして拡大を遂げ, 新しい隔膜として親細胞膜に到達することで細胞質分裂が完了する。こうして細胞質分裂時にみられる一連の膜構造の変化が固定方法を変えることで, 詳細に捉えることができた。*Sphacelaria rigidula* は細胞質分裂面に相当する細胞膜が内部にくびれ込んでいく様子が観察されたが, くびれ込みの進行に必要な膜の供給はゴルジ小胞と平板小囊が担っていることが示された。

4. 褐藻類と陸上植物の細胞質分裂の比較

褐藻類の細胞には中心体が存在し, 中心体による紡錘体極形成が行われること自体は, 動物細胞の核分裂のように進行していくが, その後の細胞質分裂における膜融合過程は陸上植物と類似している部分が見られた。ここでは, 褐藻類の細胞質分裂の詳細について, 陸上植物の細胞質分裂との比較をしながら説明していきたい。両者の細胞質分裂の重要なポイントは, ①細胞質分裂面の決定のタイミングと関連する構造, ②細胞質分裂の進行に伴う膜構造変化, ③細胞壁多糖類の沈着に特徴があることである。

4.1 細胞質分裂面の決定のタイミングと関連する構造

陸上植物では G2 期終わりに細胞膜直下に出現する分裂準備帯 (preprophase band) が細胞質分裂面の決定を担っている。この構造を構築している主な成分は微小管であり, 前中期に

は消失する。この一過的に出現していた構造の領域は細胞に記憶され, 核分裂終了後に娘核間に隔壁形成体 (phragmoplast) により形成される細胞板位置に関係している。

褐藻類では細胞質分裂面は核分裂終了後の中心体の位置により決定されている^{14,15)}。中心体から伸びる微小管が交差する領域にアクチンがパッチ状に出現し, 最終的に分裂面全体に拡がりプレート状になるが, 細胞質分裂が完了して間もなく消失するといった挙動を示す¹⁶⁾。しかしながら, 褐藻類では電子顕微鏡下でアクチンフィラメントの構造を観察することが未だにできていない。

4.2 細胞質分裂の進行に伴う膜構造変化

陸上植物の細胞質分裂は加圧凍結置換法の導入により小胞の融合にはじまる膜構造の変化が明らかになった¹⁷⁾。隔壁形成体の赤道面に集積したゴルジ小胞からチューブ状の構造が伸び, 他のゴルジ小胞と融合することで膜のネットワーク構造が形成される。ネットワークは範囲を拡大するとともに, 形成途中の細胞板中央部は網目が徐々に消失し, シート状の構造に変化していく様子が報告されている。

褐藻類ではゴルジ小胞は陸上植物と同様に微小管によって細胞質分裂面に輸送される様子が観察されている¹⁰⁾。中心体付近にのみゴルジ体が存在するカヤモノリを用いて観察することにより, ゴルジ小胞は中心体から細胞質分裂予定域に伸びる微小管によって輸送されていることが明らかになった。褐藻類はそれに加えて平板小囊が不可欠である。ゴルジ小胞の形成を阻害する brefeldin A で細胞を処理しても細胞質分裂面に平板小囊が蓄積していることから, これらの小胞は起源が異なることが明らかになり, 前述の通り, 電子線トモグラフィによる小胞体起源である可能性を強く示唆する結果となった¹⁸⁾。一方, 細胞質分裂面に出現するアクチンプレートの働きを調べるために重合阻害剤である latrunculin B で細胞を処理すると, 娘核の位置が定まらないこと, 中心体から娘核間へ発達する微小管が交差しないこと, 平板小囊の形成がみられないことが明らかとなった¹³⁾。従来の透過型電子顕微鏡による観察と電子線トモグラフィ解析により, 平板小囊の端にゴルジ小胞が融合し, 膜のネットワークを構築することが明らかになった。このネットワークは細胞質分裂面の数カ所で同時的に起こり, そこで陸上植物と同様に網目からシート状の構造 (MS) へ変化していった。

両者の間には新しい隔壁を形成するための膜の供給源が異なるが, 小胞融合から膜構造の変化には類似点が見られた。

4.3 細胞壁多糖類の沈着

陸上植物において細胞板の主成分はカロースとキシログルカンであり, キシログルカンはゴルジ小胞によって分裂面に輸送され, カロースは細胞板で合成される^{16,19)}。そして細胞板の成熟にとともに, セルロースの密度は増加していくことが報告されている。

一方, 褐藻類に含まれる細胞壁成分は, セルロース, アルギン酸, フコイダンであるが, 免疫電子顕微鏡でアルギン酸とフコイダンの局在を調べたところ, フコイダンはゴルジ体

で合成されゴルジ小胞を介して分裂予定域に輸送されること、アルギン酸はある程度膜融合が進んだMSの段階から存在が確認されはじめることが明らかになった。一方、セルラーゼ—金粒子プローブの結果は、完成した隔壁においてもセルロースがほとんど検出されないことを示した。隔膜が完全に親細胞壁に到達すると、電子密度の高い繊維状の細胞壁成分の沈着が内部にみられる。

5. 一次原形質連絡の形成

ここで陸上植物と褐藻類の細胞質分裂に関わるもう一つの共通点である原形質連絡の形成について触れたい。陸上植物では、細胞板形成の小胞融合の過程で見られるネットワークに小胞体がトラップされ、細胞板の成熟後も小胞体をトラップした部分で穴が開いたままであり、それが原形質連絡になることが知られている²⁰⁾。陸上植物の原形質連絡は直径が50 nmの隔壁を貫通する構造で隣接する細胞は原形質連絡でつながっている。その中をデスモ小管と呼ばれる小胞体と連結する構造が見られる。

褐藻類の原形質連絡にはデスモ小管が見られない。褐藻類でも原形質連絡が細胞質分裂時に形成されることがムチモで報告されていたが、化学固定により作製された電子顕微鏡試料では、細胞質分裂の様子も不明確だったため、それ以降の報告に続かなかった。多列糸状体制を有し、頂端で分裂を行う*Halopteris congesta*や、表層と髄層からなり頂端部分が分裂組織となるアミジグサについて観察を行ったところ、一次原形質連絡の形成の様子が詳細に観察された¹¹⁾。急速凍結置換法、加圧凍結置換、電子線トモグラフィ法により、細胞質分裂時に見られる膜構造であるMSの膜の内部が内側へ貫入し、それがMSの反対側の膜を貫通し原形質連絡として細胞質分裂後も残ることが示された。これをプレ原形質連絡(PPD; pre-plasmodesmata; 図2L内のPPD)と呼んでいる。デスモ小管を持たない褐藻類の原形質連絡では、それを持つ陸上植物の原形質連絡と形成方法が異なっているということが明確に示された。

6. おわりに

褐藻類と陸上植物で見られる細胞質分裂時の膜融合の変化

は、これらの生物群が新たな隔壁を形成する上で細胞壁多糖類の分泌や合成の仕方と密接に関係しているのではないかと予測している。さらには、原形質連絡構造の類似は、細胞質分裂の類似点に起因しているのではないかと予測される。今後、膜構造の変化に伴う多糖類合成酵素の局在や、原形質連絡周辺の多糖類構造について調べることで、真核生物の別のグループでありながら、構造の類似点が生じている原因について新たな視点が加えられるのではないかと考える。

文 献

- 1) Burki, F.: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 6, a016147 (2014)
- 2) Terauchi, M., Nagasato, C. and Motomura, T.: *J. Plant Res.*, 128, 7–15 (2015)
- 3) Clayton, M.N. and Beakes G.W.: *J. Phycol.*, 19, 4–16 (1983)
- 4) Markey, D.R. and Wilce, R.T.: *Protoplasma*, 85, 219–241 (1975)
- 5) Katsaros, C., Galatis, B. and Mitrakos, K.: *J. Phycol.*, 19, 16–30 (1983)
- 6) La Claire, J.W.II: *Biol. Cell*, 40, 139–142 (1981)
- 7) Brawley, S.H., Quatrano, R.S. and Wetherbee, R.: *J. Cell Sci.*, 24, 275–294 (1977)
- 8) Rawlence, D.J.: *Phycologia*, 12, 17–28 (1973)
- 9) Katsaros, C., Motomura, T., Nagasato, C. and Galatis, B.: *Bot. Mar.*, 52, 150–161 (2009)
- 10) Nagasato, C. and Motomura, T.: *Protoplasma*, 219, 140–149 (2002)
- 11) Terauchi, M., Nagasato, C., Kajimura, N., Mineyuki, Y., Okuda, K., Katsaros, C. and Motomura, T.: *Planta*, 236, 1013–1026 (2012)
- 12) Nagasato, C., Inoue, A., Mizuno, M., Kanazawa, K., Ojima, T., Okuda, K. and Motomura, T.: *Planta*, 232, 287–298 (2010)
- 13) Nagasato, C., Kajimura, N., Terauchi, M., Mineyuki, Y. and Motomura, T.: *Protoplasma*, 251, 1347–1357 (2014)
- 14) Nagasato, C. and Motomura, T.: *J. Cell Sci.*, 115, 2541–2548 (2002)
- 15) Bisgrove, S.R., Henderson, D.C. and Kropf, D.L.: *Plant Cell*, 15, 854–862 (2003)
- 16) Bisgrove, S.R. and Kropf, D.L.: *Protoplasma*, 223, 163–173 (2004)
- 17) Samuels, A.L., Giddings, T.H. and Staehelin, L.A.: *J. Cell Biol.*, 130, 1345–1357 (1995)
- 18) Nagasato, C. and Motomura, T.: *J. Phycol.*, 45, 404–412 (2009)
- 19) Kakimoto, S. and Shibaoka, H.: *Plant Cell Physiol.*, 33, 353–361 (1992)
- 20) Hepler, P.K.: *Protoplasma*, 111, 121–123 (1982)