

シオグサ目多核緑藻における隔壁形成と細胞骨格

II. フサバロニアのレンズ状細胞形成

関田 諭子¹・牛嶋 秀貴²・岡田 元一²・細木 佳奈³・奥田 一雄^{1*}

¹高知大学総合科学系黒潮圏科学部門 (〒 780-8520 高知市曙町二丁目 5-1)

²高知大学理学部生物学科 (〒 780-8520 高知市曙町二丁目 5-1)

³高知大学大学院理学研究科 (〒 780-8520 高知市曙町二丁目 5-1)

Satoko Sekida¹, Hideki Ushijima², Gen-ichi Okada², Kana Hosogi³ and Kazuo Okuda^{1*}: Septum formation and cytoskeleton in cladophoralean coenocytic green algae. II. Lenticular cell formation of *Valonia fastigiata*. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 71: 143–155, November 10, 2023

In this study, we used light and electron microscopy to investigate the formation of lenticular cells, microtubule behavior, and septum development in the coenocytic green alga *Valonia fastigiata*. Lenticular cell formation was a two-step process. The first step involved protoplasmic aggregation in a circular area, with centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern appearing along the peripheries. In the second step, the plasma membrane invaginated, and a septum was formed. The centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern split into two parts, creating a circumferential narrow band without microtubules. The plasma membrane then furrowed at the narrow band, and brush-like microtubules emerged at the leading edges of the plasma membrane during septum development. Cells treated with a microtubule-disrupting drug during the first step had a destroyed circular ray pattern and diffused protoplasmic aggregation, while cells treated early in the second step stopped septum formation and had no brush-like microtubules. The septum grew centripetally, with amorphous materials deposited first and then cellulose microfibrils synthesized to thicken it. It has been noted that the brush-like microtubules present in this species may be a component of unique cytokinetic apparatuses, similar to those previously discovered in *Chaetomorpha moniligera*.

Key Index Words: actin filaments, cellulose, cytokinesis, electron microscopy, indirect immunofluorescence microscopy, lenticular cell formation, microtubules, multinucleate green algae, septum formation, *Valonia fastigiata*

¹Kuroshio Science Unit, Multidisciplinary Science Cluster, Kochi University, 2-5-1 Akebono-cho, Kochi 780-8520, Japan

²Department of Biology, Faculty of Science, Kochi University, 2-5-1 Akebono-cho, Kochi 780-8520, Japan

³Graduate School of Science, Kochi University, 2-5-1 Akebono-cho, Kochi 780-8520, Japan

* Author for correspondence: okuda@kochi-u.ac.jp

緒言

バロニア属の種はシオグサ目に属する多核緑藻で、本邦を含む世界中の熱帯から亜熱帯域の海岸に生育・分布する (吉田 1998, Eggert *et al.* 2003)。藻体は、大きさが数 mm を越える単独もしくは複数の巨大な細胞からなる (Shihira-Ishikawa 1987)。細胞は球形から卵形または棍棒状を呈し、その容積のほとんどを中心液胞が占める。細胞壁のすぐ内側に分布する原形質の薄い層の中に何千個以上の核と葉緑体が含まれる。原形質膜のすぐ内側に表層微小管が平行に配列する。バロニア属の一部の種では、2 本鞭毛の配偶子を放出する雌雄異株の配偶体と 4 本鞭毛の遊走子を放出する胞子体からなる同形の世代が交代する生活史が知られている (堀 1994)。巨大な細胞を有するという特徴を活かし、バロニア属の種はイオンポテンシャルや膨圧に関する生理学的な実験材料に用いられ

ている (Asai & Kishimoto 1975)。

シオグサ目多核緑藻の主要な細胞質分裂は、隔壁形成による二分裂と、隔壁形成によらない分割細胞分裂の 2 つの様式が知られている (Leliaert *et al.* 2007)。さらに、隔壁形成による細胞質分裂には 2 つのタイプがある。その 1 つは、前報でタマジユズモ (*Chaetomorpha moniligera* Kjellman 1897) において報告したように (関田・奥田 2022)、円柱形の細胞がその細胞を横断する隔壁によってほぼ等分裂するタイプである。隔壁形成による細胞質分裂の 2 つ目のタイプは、バロニア科の種において見られるレンズ状細胞形成である。この場合、卵形の細胞の原形質の一部を切り出すように隔壁が発達することで、母細胞表面からレンズ状の小さな細胞が局所的に分裂する (Okuda *et al.* 1997)。細胞質分裂のこれら両方のタイプにおいて、隔壁は母細胞の細胞壁の内側から液胞方向

ヘカメラの絞りが閉じるように求心的に発達する。

筆者らは、タマジユズモの隔壁形成において、液胞側へ陥入する原形質膜の最先端に夥しい数の刷毛状の短い微小管が出現することを第1報で明らかにした(関田・奥田 2022)。また、この刷毛状の微小管はフラグモプラストでもファイコプラストでもなく、タマジユズモの隔壁形成に関与する独特の細胞質分裂装置の一部であることを示唆した。本研究は、シオグサ目多核緑藻の隔壁形成と細胞骨格についての第2報として、バロニア科に属するフサバロニア (*Valonia fastigiata* Harvey ex J. Agardh 1887) (熊田ら 2009) のレンズ状細胞形成について報告する。レンズ状細胞が形成されるときに細胞表面観の変化に基づき、レンズ状細胞形成をいくつかの段階に分け、原形質の局所的集積、隔壁形成の進み方、微小管の配置と挙動、隔壁の構造と成分、および微小管破壊剤の効果について明らかにした。

材料と方法

フサバロニアは 2009 年 6 月 8 日に高知県大月町西泊の海岸で採集した。4 本鞭毛をもつ遊走子から発生した株を用いた。藻体は栄養強化海水(ダイゴ IMK 培地, 日本製薬株式会社, 東京)で培養した。培地粉体 25.2 g を 200 mL の蒸留水に溶解後に濾過滅菌し、これを IMK 原液とした。オートクレーブで滅菌した海水 500 mL に対して IMK 原液を 1 mL の割合で加え、培養液として用いた。藻体は約 200 mL の培養液を含む腰高シャーレの中で、温度 22°C、白色蛍光灯による 14 h の明期 ($16 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) と 10 h の暗期からなる明暗周期の条件で培養した。

フサバロニアのレンズ状細胞形成の過程を観察・記録するため、デジタルカメラ (Coolpix P6000, 株式会社ニコン, 東京, 日本) を装着した実体顕微鏡 (SZX7, オリンパス光学工業株式会社, 東京, 日本) を使用した。インターバル撮影は 2 min または 5 min おきに行った。

微小管とアクチンフィラメントおよび核を観察するための間接蛍光抗体法は基本的に第1報(関田・奥田 2022) で記載した方法と同様であった。ただし、固定液に含まれる固定剤の最終濃度は、4% パラホルムアルデヒドと 1% グルタルアルデヒドであった。蛍光像は落射蛍光顕微鏡 (BX51, オリンパス光学工業株式会社) で観察した。また、微小管破壊剤アミプロフォスメチル (APM) のレンズ状細胞形成に及ぼす効果を明らかにする実験においても、関田・奥田 (2022) に記載された方法に従った。

レンズ状細胞を形成している細胞を固定して樹脂包埋し、光学顕微鏡および電子顕微鏡で観察するための切片を作製した。細胞を 0.5% グルタルアルデヒド (GA) と 0.5% 四酸化オスミウム (OsO_4)、0.1 M カコジル酸ナトリウム (CB) (pH 7.4) を含む 70% 海水 (SW) で 15 min 固定した。0.1 M CB を含む 70% SW で洗浄後、1% GA と 1% タンニン酸、0.1 M CB を含む 70% SW で 1 h 再固定した。0.1 M CB を含む 70% SW で洗浄後、1% OsO_4 と 0.1 M CB を含む 65% SW で 8 h 後

固定した。定法に従ってエチルアルコールで脱水し、Spurr の樹脂 (Spurr 1969) または LR ホワイトレジン (応研商事, 東京) に包埋した。Spurr の樹脂に包埋した試料は光学顕微鏡観察および通常の電子顕微鏡観察に用いられた。LR ホワイトレジンに包埋した試料は、後述するように、セルロースを標識するための実験に用いられた。ウルトラミクロトーム (Ultracut UCT, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用い、光学顕微鏡観察のために厚さ 1–2 μm の切片を作製した。切片は 1% トルイジンブルー O または 0.25 mg/mL のカルコフルオールホワイト M2R (Fluorescent Brightener 28, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で染色した。カルコフルオールホワイト M2R はセルロースを蛍光染色することが知られている (Maeda & Ishida 1967)。

電子顕微鏡観察のために、厚さ 50–100 nm の切片を作製した。これらの切片の一部は 1% 酢酸ウラニル水溶液とクエン酸鉛による二重染色を行った後に電子顕微鏡 (JEM-1400, 日本電子株式会社, 東京, 日本) で観察した。他の切片は、隔壁にセルロースが含まれるかどうかを調べるために用いた。Chanzy *et al.* (1984) は、セルラーゼの一種 (cellobiohydrolase-I = CBHI) を結合させたコロイド金 (CBHI-conjugated gold) はセルロースを標識することを報告している。この方法を応用し、電子顕微鏡下で金粒子が付着・分布している部位にセルロースが存在することを示すことができる (Okuda *et al.* 1993)。Chanzy *et al.* (1984) に従い、粒子径 20 nm のコロイド金 (Sigma-Aldrich) を用いて CBHI-conjugated gold 溶液を作製した。CBHI は Novo Industri (Bagsvaerd, Denmark) から寄贈されたものを使用した。切片を CBHI-conjugated gold 溶液で 1 h 処理し、PBS で洗浄後、1% 酢酸ウラニル水溶液で染色して電子顕微鏡観察した。

レンズ状細胞形成の進行に伴って発達する隔壁の表面観を、光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した。隔壁の表面を観察するためには隔壁の表面に付着する原形質を除去する必要がある。しかし、発達中の隔壁は脆弱なので、そのような隔壁を無傷で分離するために隔壁の周囲の原形質を物理的に取り除くことは困難であった。そのため、本研究では、隔壁から原形質を取り除くために、化学的な方法を用いた。レンズ状細胞を形成している細胞を、市販の塩素系漂白剤 (ハイター, 花王, 東京) の原液 (6% 次亜塩素酸ナトリウムを含む) に直接浸漬して処理し、原形質を溶解した。浸漬後約 10 分で、処理した細胞を海水中に移し、レンズ状細胞とその周辺部を残すように、その他の細胞部分を、カミソリを使って切除した。分離した発達中の隔壁を含むレンズ状細胞とその周辺部の試料を蒸留水で洗浄し、一部は倒立顕微鏡 (CKX41, オリンパス光学工業株式会社) の位相差モードで観察した。その他は、電子顕微鏡観察のためのレプリカ試料作製に用いられた。

電子顕微鏡観察のためのレプリカ試料は、Okuda & Mizuta (1985) に従い、基本的に真空蒸着型 1 段レプリカ法 (日本電子顕微鏡学会関東支部, 1975) によって作製した。以下にその概略を記載する。上記で示したように、レプリカの元にな

る細胞壁試料はハイターで原形質を除去した後、海水と蒸留水で洗浄し、隔壁を含むレンズ状細胞と周辺細胞壁部分として分離されてきたものである。このような試料を、その細胞壁の内側表面（母細胞の液胞側から見た細胞壁の表面）を上向きにし、水中でアセチルセルロースフィルム（応研商事、東京）に載せて密着させ、水中から取り出した。アセチルセルロースフィルムに密着した細胞壁試料は自然乾燥後、真空蒸着器（JEE4B, 日本電子株式会社）内に移され、真空度 2×10^{-4} Pa の条件で、白金によるシャドーウィングと炭素蒸着を行った。シャドーウィングと炭素蒸着を施した試料は 70% 硫酸水溶液に浮かべて 60°C で 3 日間処理することで、細胞壁とアセチルセルロースフィルムを溶解した。レプリカは蒸留水で 3 回洗浄後、グリッドに載せて電子顕微鏡で観察した。

結果

1. 原形質の局所的な集積とレンズ状細胞の形成

レンズ状細胞が形成される時、細胞全体にわたって均一に分布していた原形質は、その一部が移動することで、局所的に集積した。集積してきた原形質は、多数の核と葉緑体を含み、それら全体を、新たに形成される隔壁が周りの原形質から分割することで、母細胞からレンズ状細胞が分裂した。これらの一連の過程の細胞表面観の変化を実体顕微鏡で観察し (Fig. 1), 併せて動画を作成した (Movie S1, S2)。また、レンズ状細胞を形成している細胞の断面の切片を作製した (Fig. 2)。

レンズ状細胞形成の最初の段階は、細胞の不特定な場所に原形質が集まり始めたことだった (Fig. 1A)。原形質は半径 0.5–0.6 mm の円形の領域に集合し、葉緑体の分布密度が増加した結果、原形質が集合する円形領域は濃い緑色を呈し、その周辺部分と区別された (Fig. 1B)。原形質は円形領域のどくに周縁部に集積した (Fig. 1C の矢印)。その後、原形質集積周縁部の外周に濃緑色の細い環が観察された (Fig. 1D とその挿入図の矢印)。表面観におけるこの濃緑色の細い環の出現は、原形質集積周縁部の端を起点として、母細胞の細胞壁の内側表面から隔壁が形成され始めたことを示す形態的指標であった (Fig. 2A1–3)。

隔壁形成の開始後、細胞の表面観では、原形質集積部の形と色の変化で隔壁の発達を知る事ができた。原形質集積部は濃い緑色で、指輪の形を呈した (Fig. 1E)。隔壁形成の進行に伴い、原形質集積部は内側へ拡大し (Fig. 1F), 指輪の穴の直径がカメラの絞りが閉じるように求心方向へ徐々に小さくなった (Fig. 1E–G)。

形成される実際の隔壁の三次元的な配置や構造は平面観では明らかにできないので、隔壁形成を細胞断面観で観察した。上記で述べたように、Fig. 2A1 の段階 (Fig. 1D) で、原形質集積周縁部の端から隔壁形成が開始した (Fig. 2A2 と Fig. 2A3 の矢印)。Fig. 2B1 の段階 (Fig. 1E) では、隔壁は原形質集積周縁部の原形質を包み込むように母細胞壁の内側から液胞側の斜め方向へ発達し始めた (Fig. 2B2 と Fig. 2B3 の矢印)。Fig. 2C1 の段階 (Fig. 1F) では、伸長・発達している隔壁 (Fig.

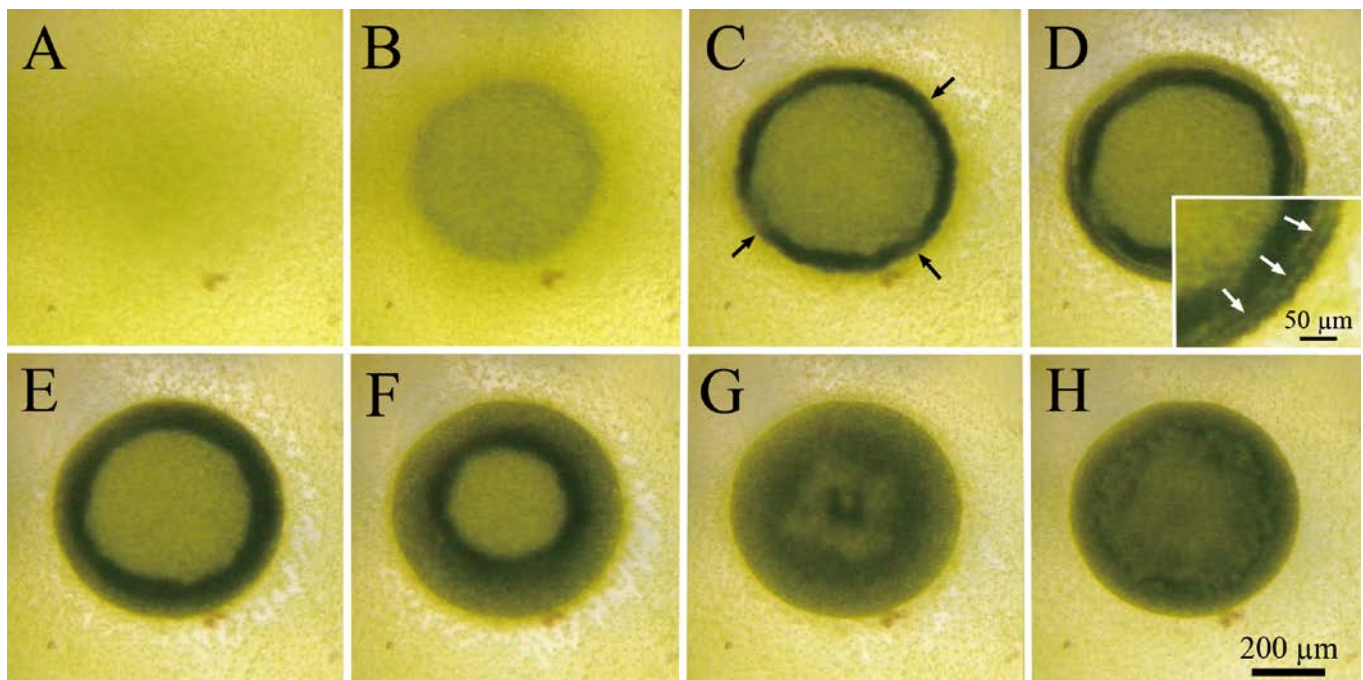


Fig. 1. A series of observations of cell surfaces depicting the process of lenticular cell formation in *Valonia fastigiata*. The images labeled as A through H were taken at different times: 0, 6, 10, 11, 13, 16, 19, and 22 h after the beginning of a dark period, respectively. Arrows in C point towards the peripheries of protoplasmic aggregation. The arrows in the insert of D indicate the initiation of septum formation, which is depicted by a dark green ring appearing outside the peripheries of protoplasmic aggregation.

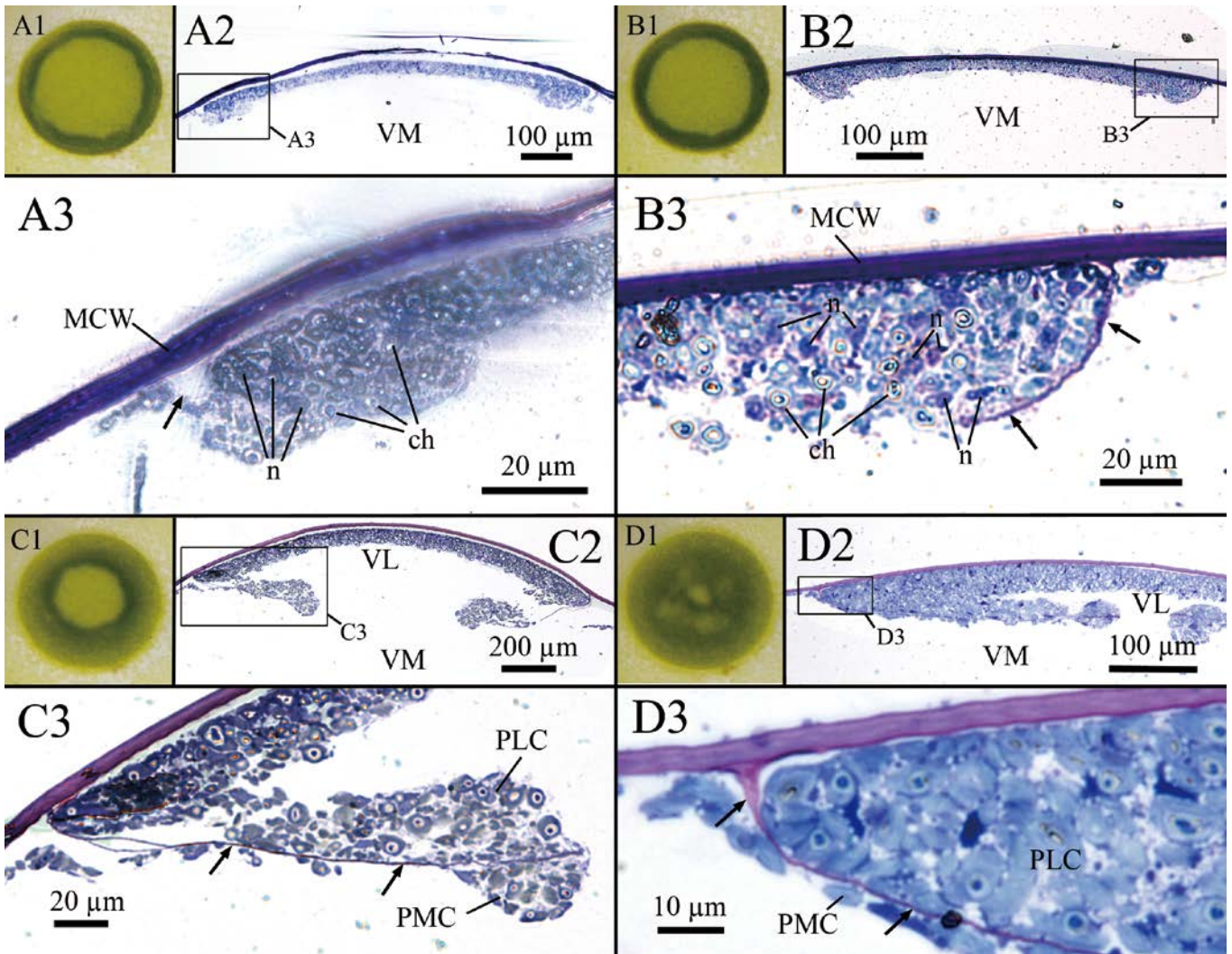


Fig. 2. Septum formation in *Valonia fastigiata* showing the surface views (A1, B1, C1, D1) and the cross-sectional views (A2–3, B2–3, C2–3, D2–3). A1–3, centripetal ingrowth of a septum (arrow in A3) beginning from the inside of the mother cell wall (MCW) at the outside of the peripheries of protoplasmic aggregation. B1–3, an early-developing septum (arrows in B3) that covers the protoplasm-rich portions. C1–3, a developing septum at the middle stage that looks like a holed coin (C1). Centripetal ingrowth of the septum (arrows in C3) proceeds toward the vacuole between the mother and the lenticular cells. Protoplasm at the side of a lenticular cell (PLC) is distributed much more than protoplasm at the side of a mother cell (PMC). D1–3, an almost complete septum, where the center pore is to be closed (D1). D3 shows that PLC was closely packed on the septum (arrows), while PMC extended sparsely on the opposite side. VM, vacuole of mother cell; VL, vacuole of lenticular cell; n, nucleus; ch, chloroplast.

2C2 と Fig. 2C3 の矢印) の上下に原形質が回り込んだ。Fig. 2C3 は、隔壁の上部(レンズ状細胞側)表面に分布する原形質(PLC)と隔壁の下部(母細胞側)表面に分布する原形質(PMC)を示す。隔壁はさらに求心的に伸長・発達し(Fig. 2D2 と Fig. 2D3 の矢印)、最後に中心の穴を塞ぐことでレンズ状細胞が形成された。このように、レンズ状細胞形成は連続する2つの段階からなっていた。すなわち、第1段階は円形領域への局所的な原形質の移動と集積であり、それに続き、第2段階は原形質集積周縁部の端から始まる求心方向への隔壁形成であった。

隔壁形成中に将来のレンズ状細胞には、すでに液胞が存在した(Fig. 2C2 と Fig. 2D2 の VL)。Fig. 2C3 および Fig. 2D3

で示すように、PLCは、PMCよりも多く分布し、また、原形質が移動し、局所的に集積してくるレンズ状細胞形成の第1段階では、平行配列する表層微小管とは異なる微小管が出現した。Fig. 3Aは、原形質が集まり始めた円形の原形質集合領域周辺において、3つのタイプの微小管が分布する部位とそれぞれの配列様式を模式的に示す。Fig. 3Aの模式図

2. 原形質の局所的な集積に伴う細胞骨格の変化

原形質が移動し、局所的に集積してくるレンズ状細胞形成の第1段階では、平行配列する表層微小管とは異なる微小管が出現した。Fig. 3Aは、原形質が集まり始めた円形の原形質集合領域周辺において、3つのタイプの微小管が分布する部位とそれぞれの配列様式を模式的に示す。Fig. 3Aの模式図

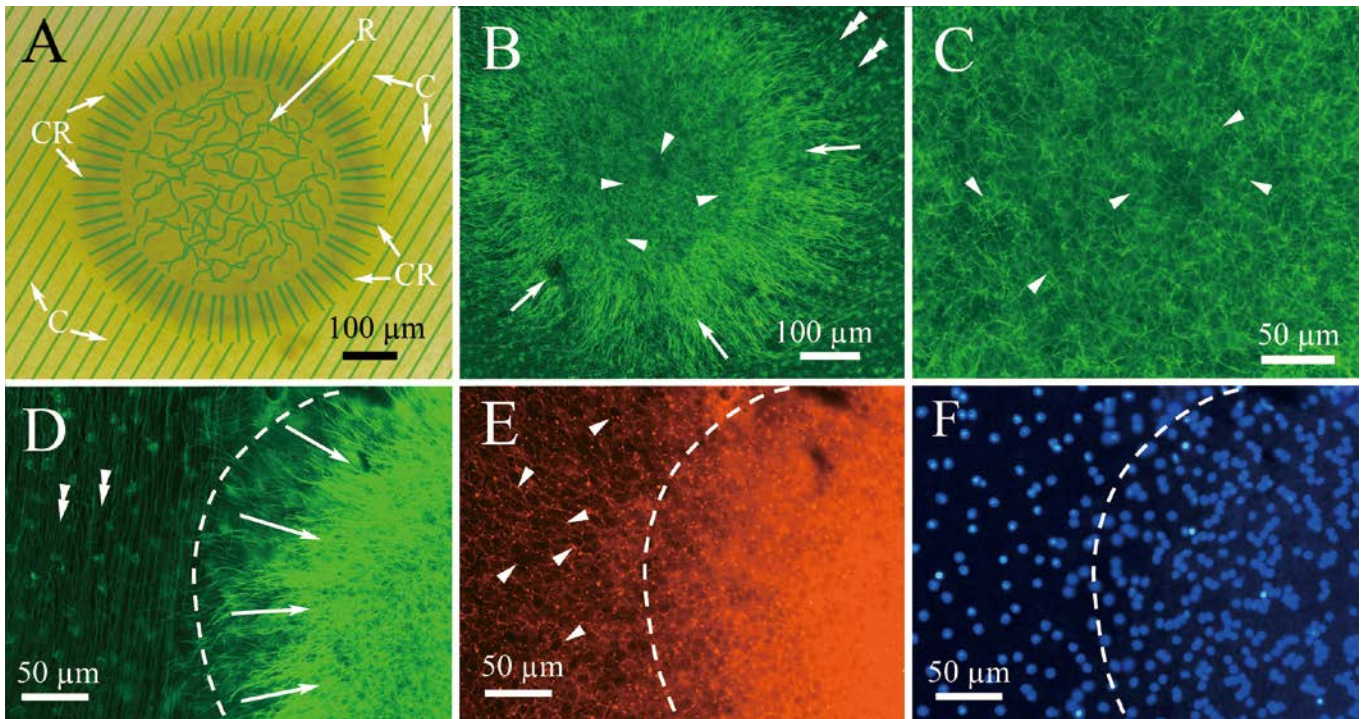


Fig. 3. Observation of microtubules, actin filaments, and nuclei during lenticular cell formation in *Valonia fastigiata*. A, a diagram of three distinct microtubules distributed inside and outside of protoplasmic aggregation, the portion of a dark green disk. Random microtubules (R) and centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern (CR) appeared in the central area and peripheries of the protoplasmic aggregation, respectively. Cortical microtubules (C) were arranged parallel around the outside of the protoplasmic aggregation. B, immunofluorescence of microtubules that are situated as indicated in A. This image displays various types of microtubules, including randomly arranged ones (indicated by arrowheads), centripetal microtubules arranged in a circular pattern (indicated by arrows), and cortical microtubules (indicated by double arrowheads). C, random microtubules (arrowheads) distributed in the central area of B. Immunofluorescence images of microtubules (D) and actin filaments (E) and nuclei stained with DAPI (F). The same area was photographed in D–F. Broken lines show the outer boundary of the protoplasmic aggregation that stands at the right side of each photo. D, centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern (arrows), and cortical microtubules parallel (double arrowheads). E, actin filaments showing reticulated arrangement (arrowheads). F, nuclei more densely distributed inside the protoplasmic aggregation than the outside.

は Fig. 1B と同じ段階を示している。この写真上に微小管を緑色の線で描画した。円形のプロプラズム集積領域の周縁とそのすぐ外側の範囲において、求心方向へ配列する微小管が多数出現した (Fig. 3A の CR; Fig. 3B の矢印)。これらの微小管は長さ 100–200 μm であったが、原形質集積領域の中央部 (直径 300–400 μm) には分布しなかった。本研究では、この微小管を周縁求心微小管 (centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern = CR) とよぶことにする。原形質集積領域の中央部では、周縁求心微小管とは異なり、ランダムに配列する短い微小管が多数存在した (Fig. 3A の R; Fig. 3B, C の矢頭)。原形質集積領域の周縁部外側よりもさらに外側に分布する原形質では、平行に配向する表層微小管 (Fig. 3A の C; Fig. 3B の二重矢頭) が存在した。Fig. 3D–F では、原形質集積領域周辺の同一部位を撮影し、微小管とアクチンフィラメント、核の分布を比較した。原形質集積領域はそれぞれの図の右側に位置し、白色の破線はその原形質集積領域の外側境界を示している。周縁求心微小管は原形質集積領域の中心方向へ配列し (Fig. 3D の矢印)、原形質集積領域の外側には平

行配列する表層微小管が分布した (Fig. 3D の二重矢頭)。一方、アクチンフィラメントは、原形質集積領域の内側周囲からその外側の原形質を通じて網状に分布した (Fig. 3E の矢頭)。核は、原形質集積領域の外側の原形質部分でほぼ均等に分布したが、原形質集積領域の内側では、核分裂が起こり、複数の核のいくつかが数珠つなぎとなり、核の分布密度が高くなった (Fig. 3F)。さらに原形質の集積が進むと、原形質集積領域の周縁部が濃緑色を呈し始め、その部分の原形質層が厚くなった (Fig. 1C)。この段階以降、それまでの原形質集積領域を原形質集積部とよぶことにする。このとき、周縁求心微小管の長さは 60–80 μm となった。

3. 隔壁形成に伴う細胞骨格の変化

隔壁形成が始まる前 (Fig. 4A1–3) と後 (Fig. 4D1–3) の段階において、円形のプロプラズム集積部の表面観と断面を模式的に表す。Fig. 4D1–3 で示す段階は、隔壁形成初期を示す Fig. 2A1–3 と対応している。Fig. 4A1 と Fig. 4D1 の下図は、原形質集積周縁部の断面で、原形質が液胞側へ畝のように盛り上

がった状態を示す。それら Fig. 4A1 と Fig. 4D1 の下図の四角部分を拡大したのがそれぞれ Fig. 4A2,3 と Fig. 4D2,3 である。

Fig. 4A2,3 では、原形質集積周縁部とその外側および内側の領域において、原形質膜上で観察される微小管の区別とそ

れらの分布範囲を両側矢印で示す。Fig. 4A2 の2つの微小管 (CR と R) と両側矢印は Fig. 4B に適用され、Fig. 4A3 の3つの微小管 (CR1, CR2 および R) と両側矢印は Fig. 4C に適用される。

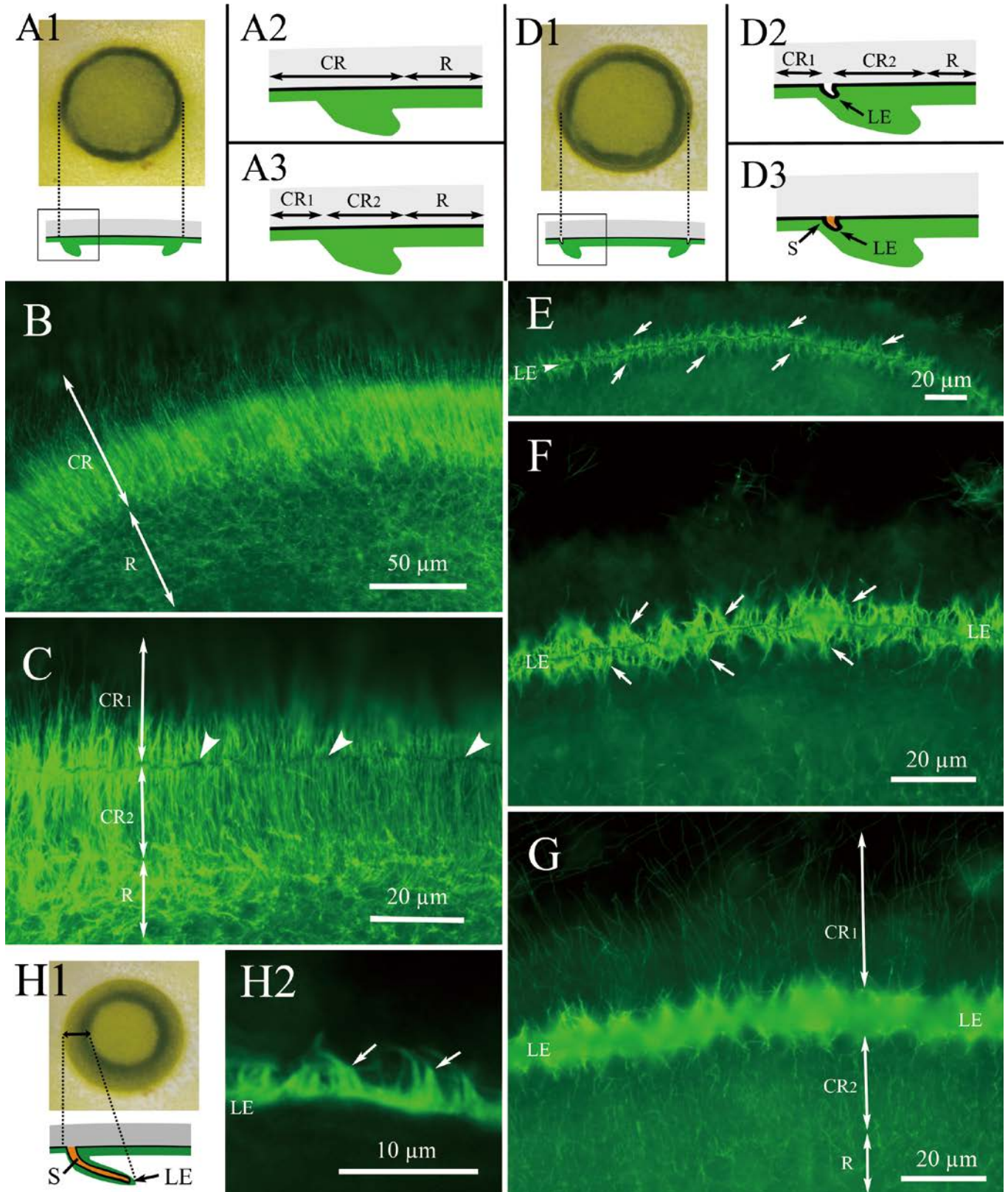


Fig. 4A1 で示す段階 (Fig. 1C) までは、原形質集積周縁部とその外側部分にわたって周縁求心微小管 (CR) が配列し、内側部分にはランダムな微小管 (R) が分布した (Fig. 4A2 と Fig. 4B)。しかし、隔壁形成が始まる直前になると (Fig. 4A3 と Fig. 4C)、周縁求心微小管 (CR) が原形質集積周縁部の端 (円周) に沿って分断し、外側 (CR1) と内側 (CR2) の微小管に二分した。その結果、CR1 と CR2 の間に微小管の存在しない幅の狭い帯状の原形質膜部分 (帯状原形質膜部分とよぶ) が出現した (Fig. 4C の矢頭)。この帯状原形質膜部分は原形質集積周縁部全体を取り囲むように一周したので、実際、その帯状原形質膜部分は円周の形であった。CR2 の内側にはランダム配列する微小管 (R) が存在した。後述するように、この帯状原形質膜部分は隔壁形成のために液胞側へ陥入した。

Fig. 4D1 (= Fig. 1D) と Fig. 4D2 は、前述した帯状原形質膜部分が液胞側へ陥入し始めた直後の段階の模式図である。Fig. 4D3 は、原形質膜の陥入に引き続いて隔壁 (S) の形成が始まった段階の模式図である。Fig. 4D2, 3 では、陥入していく原形質膜の最先端を LE で示す。Fig. 4D2 は Fig. 4E-G に適用され、Fig. 4D2 の3つの微小管 (CR1, CR2 および R) とそれらの分布範囲を示す両側矢印は Fig. 4G に適用される。

周縁求心微小管が二分して残った CR1 と CR2 (Fig. 4A3) の間の帯状原形質膜部分 (Fig. 4C の矢頭) が液胞側へ陥入し始めたとき、陥入する原形質膜の最先端 (LE) には、短く、夥しい数の刷毛状の微小管が観察された (Fig. 4E, F)。刷毛状の微小管は LE の上部と下部から互いに反対方向へ発出し、LE に沿って横に2列になって並んだ (Fig. 4F の矢印)。Fig. 4G は Fig. 4F と同じ場所を撮影したものであるが、原形質膜の陥入直後においては、焦点を LE よりも浅くすると、CR1, CR2 および R (Fig. 4D2) の微小管が残存していた (Fig. 4G)。しかし、原形質の陥入が進み、隔壁 (Fig. 4D3 の S) が形成され始めると、CR1 と CR2 は消失した。

Fig. 4H1 で示すように、隔壁が求心的に発達している段階 (Fig. 1F) では、隔壁 (S) の形成部位に対応し、陥入している原形質膜の最先端 (LE) に刷毛状の微小管が分布した (Fig.

4H2)。隔壁が発達・伸長するこのような段階になると、隔壁の母細胞側とレンズ状細胞側の両方の原形質膜が連続し、かつ、隔壁形成部に対応する LE 全体を含む原形質試料を作製することが困難であった。この場合、隔壁の母細胞側またはレンズ状細胞側のどちらか一方の原形質膜だけを含む試料を作製した。そのため、隔壁形成が進んだ段階の試料では、LE の上部または下部から発出する一列に並ぶ刷毛状の微小管が観察された (Fig. 4H2 の矢印)。

4. 陥入する原形質膜最先端部に分布する微小管と小胞

間接蛍光抗体法で観察した刷毛状微小管の分布と配列パターンを直接観察し、隔壁を構成する物質の供給に関わる小胞等が存在するかどうかを明らかにする目的で、隔壁形成中の段階 (Fig. 1E, F) において、液胞側へ陥入する原形質膜の最先端に分布する原形質と隔壁を超薄切片法により電子顕微鏡で観察した。Fig. 5A1 の模式図で示すように、陥入する最先端部の原形質膜とその付近の原形質を、隔壁の平面に対して接線方向に切った (隔壁の平面とほぼ平行にかすめるように削いだ) 断面を Fig. 5A2, 3 で示す。Fig. 5A2 の矢印は陥入する原形質膜を示し、その原形質膜で囲まれた部分 (破線 CF) は分裂溝 (cleavage furrow) の一部である。Fig. 5A2 では、分裂溝 (CF) を挟んで右上方にレンズ状細胞側の原形質 (PLC) が位置し、左下方に母細胞側の原形質 (PMC) が位置する (Fig. 2C3; Fig. 2D3)。Fig. 5A2 の四角部分を拡大したのが Fig. 5A3 である。隔壁平面に接する原形質には、多数の微小管 (Fig. 5A3 の矢頭) と小胞 (v) が分布したが、微小管と小胞との直接の付着や結合は観察されなかった。Fig. 5B1 の模式図で示すように、陥入する原形質膜と隔壁の最先端を、隔壁に対してほぼ垂直方向に切ったときの断面が Fig. 5B2, 3 である。Fig. 5B2 の矢印は陥入する原形質膜を示し、LE はその最先端部位である。その原形質膜で囲まれた部分は分裂溝 (破線 CF) であり、発達中の隔壁の断面が観察された。Fig. 5B2 では、分裂溝 (CF) を挟んで右側にレンズ状細胞側の原形質 (PLC) が位置し、左側に母細胞側の原形質 (PMC) が

Fig. 4. Changes in microtubule arrangement pattern in *Valonia fastigiata*. A1, the surface view (upper side) and cross-section (lower side) of a protoplasmic aggregation at the stage indicated by Fig. 1C. A2 and A3 are enlargements of a square in A1 and show the locations and ranges of the distinct microtubules, CR, CR1, CR2 and R. CR and R refer to centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern and random microtubules, respectively. CR divides into CR1 and CR2. A2 and A3 relate to B and C, respectively. B, CR and R were located around the peripheries and central area of a protoplasmic aggregation, respectively, as indicated in Fig. 3A-C. C shows that CR split into two parts, CR1 and CR2, to create a circular, narrow band of the plasma membrane without microtubules (indicated with arrowheads) just before the invagination of the plasma membrane. D1, the surface view (upper side) and cross-section (lower side) of a protoplasmic aggregation at the stage indicated by Fig. 1D. D2 and D3 are enlargements of a square in D1 and have the leading edges of the plasma membrane (LE). D2 shows the different microtubules, including CR1, CR2, and R, just after the beginning of the invagination of the plasma membrane. D2 pertains to E-G. D3, the formation of a septum (S). E and F demonstrate the appearance of brush-like microtubules (indicated with arrows) along the LE right after the circular, narrow band of the plasma membrane has invaginated to create a cleavage furrow. Brush-like microtubules refer to many short microtubules that originate from the narrow transverse band LE towards two opposite directions (indicated with arrows). G shows that CR1, CR2, and R remain, but CR1 and CR2 vanish soon after the formation of the septum (D3). Although F and G utilize the same specimen, G's focus is slightly behind that of F. H1, the surface view (upper side) and cross-section (lower side) of a protoplasmic aggregation at the stage indicated by Fig. 1F. H1 indicates the leading edges of the plasma membrane (LE) and the septum (S) that is growing deeply into a vacuole. In this stage, preparing specimens with protoplasm on both sides of the septum was challenging. H2 shows that brush-like microtubules (arrows) originate from LE and extend to either of two directions.

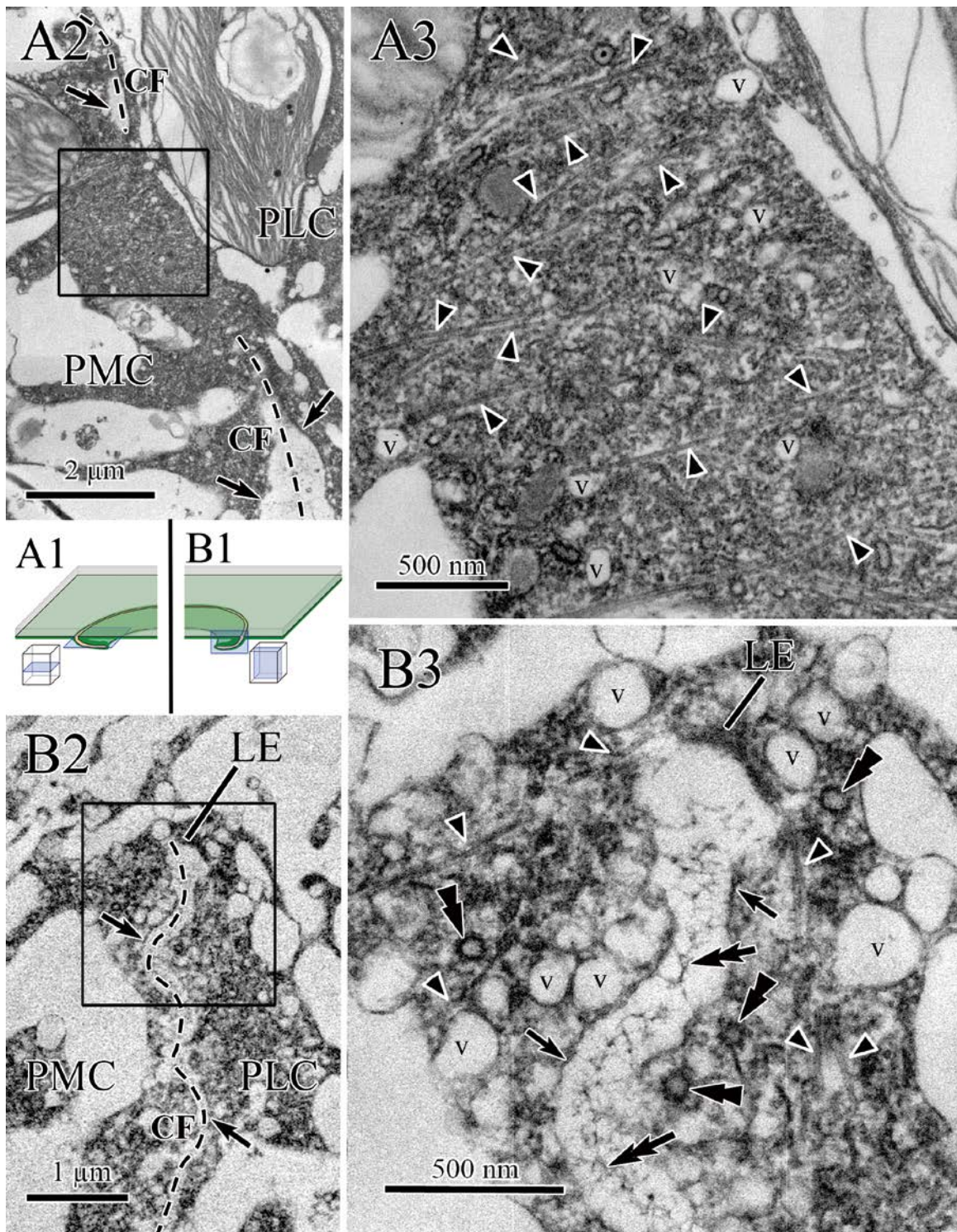


Fig. 5. Electron micrographs showing microtubules and vesicles in the protoplasm adjacent to a cleavage furrow in *Valonia fastigiata*. A1, a diagram showing the technique for making tangential sections to septum surfaces for A2–3. A2, a cleavage furrow (CF and broken lines) surrounded by the plasma membrane (arrows) near the leading edges of the plasma membrane. The protoplasm of the mother cell (PMC) and the protoplasm of the lenticular cell (PLC) are on the left and right of CF, respectively. A3 is the enlargement of a square in A2 and shows many microtubules (arrowheads) and small translucent vesicles (v) distributed in the protoplasm on the plasma membrane near the leading edges. B1 illustrates how to create cross-sections of a cleavage furrow. B2, a cleavage furrow (CF and broken lines) surrounded by the plasma membrane (arrows) near the leading edges of the plasma membrane (LE). The protoplasm of the mother cell (PMC) and the protoplasm of the lenticular cell (PLC) are on the left and right of CF, respectively. B3 is the enlargement of a square in B2 and provides a closer view of the microtubules (arrowheads), translucent vesicles (v), and coated vesicles (double arrowheads) distributed in the protoplasm on a cleavage furrow near the leading edges. Additionally, fibrous material (double arrows) is present in the cleavage furrow or an incipient septum.

位置する。Fig. 5B2の四角部分を拡大したのがFig. 5B3である。Fig. 5B3では、陥入する原形質膜（小矢印）の左右両側（PLC側とPMC側）に大小多数の低電子密度の小胞（v）および微小管（矢頭）が分布した。また、周辺に被覆小胞（Fig. 5B3の二重矢頭）が観察された。隔壁断面には、染色性の繊維物質（Fig. 5B3の二重矢印）が観察された。小胞同士または小胞と原形質膜との融合は明確には確認できなかった。

5. 隔壁の成分と構造

隔壁の構造および隔壁にセルロースが沈着する時期を光学顕微鏡と電子顕微鏡で調べた。Fig. 6A-Dは、隔壁形成中（Fig. 2C2, 3の段階）の細胞断面であり、同一試料（ブロック）からの連続切片の一部を示す。Fig. 6Aは、カルコフルオールホワイトM2Rで染色された切片の紫外線による蛍光像と、同一切片の位相差像をマージした写真である。Fig. 6Aでは、隔壁形成が始まった基端部位（矢印）と隔壁が形成されている先端部位（二重矢印）を示す。また、矢頭[B]が形成直後の部位、矢頭[C]がそれ以前に形成された部位、矢頭[D]が最初に形成された部位であることを示す。Fig. 6Aにおいて、母細胞

壁（MCW）と、すでに形成された隔壁の一部（矢頭[C]から矢頭[D]を経由して矢印までの範囲）にセルロースの存在を示す青白い蛍光が観察された。二重矢印から矢頭[B]を経由して矢頭[C]までの若い隔壁の範囲には、蛍光はほとんど観察されなかった。

Fig. 6Aで矢頭[B],[C],[D]によって示した隔壁のそれぞれの部位を電子顕微鏡で観察した。電子顕微鏡下でセルロースの有無を検出するために、切片はCBHIを結合したコロイド金溶液で処理した。隔壁が形成され始めた部位（Fig. 6B）では、隔壁の厚さ（Fig. 6Bの両側矢印）は200 nm未満で薄く、金粒子は観察されなかった。Fig. 6Bよりも以前に隔壁が形成された部位の隔壁（Fig. 6Cの両側矢印）は、300–400 nmと厚くなり、セルロースの存在を示す金粒子（矢印）がいくつか観察された。最初に隔壁形成が始まった末端部位に近い部位の隔壁（Fig. 6Dの両側矢印）は、厚さ500 nmを越え、多数の金粒子（Fig. 6Dの矢印）で標識された。

初期に沈着する非セルロース性の物質の微細構造や沈着様式と、その後沈着してくるセルロースの形態や配列様式を明らかにするため、発達中の隔壁の表面構造を光学顕微鏡お

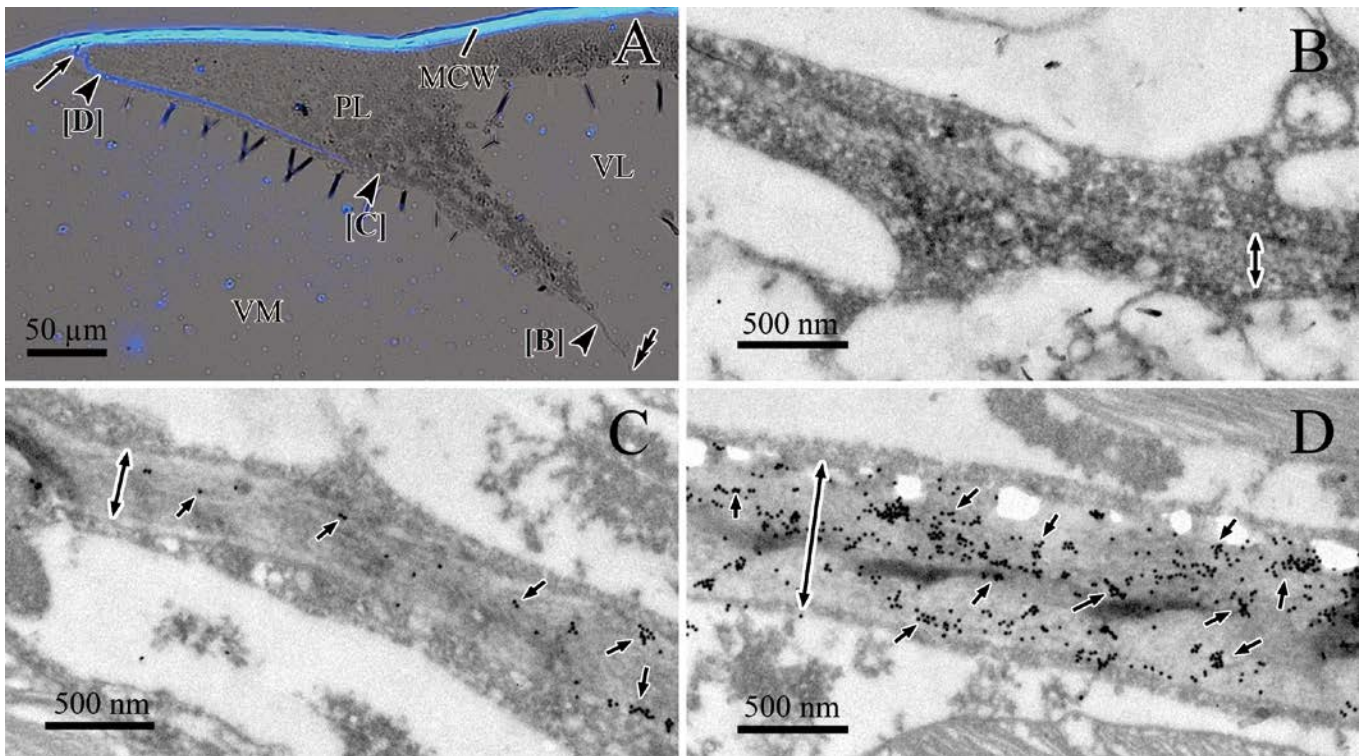


Fig. 6. Increase in thickness and cellulose content during septum formation in *Valonia fastigiata*. A, light micrograph showing a merged image of two different photos in the same section that was stained with Calcofluor White M2R. One photo was taken under a phase contrast microscope, while the other was taken under a fluorescence microscope by UV excitation. Blue-white fluorescence indicates the presence of cellulose in mother cell wall (MCW) and the part of septum between the arrowheads [C] and [D]. Septum formation started from the proximal end (arrow) and proceeded toward the distal end (double arrows). The thickness of the septum is shown by the double arrows in the electron micrographs B, C, and D, which were taken at the positions of arrowheads [B], [C], and [D] indicated in A, respectively. CBHI-conjugated gold solution was applied to the sections of B–D to detect cellulose. B shows no gold particle in the septum at the position [B]. C, the septum at the position [C] labeled by several CBHI gold particles (arrows). D, the septum thickening at the position [D] labeled by much more gold particles (arrows). VM, vacuole of mother cell; PL, protoplasm of lenticular cell; VL, vacuole of lenticular cell.

よびレプリカ法によって電子顕微鏡で観察した。隔壁表面の原形質を溶解するため、形成中のレンズ状細胞を含む母細胞をハイターで処理し、細胞壁試料を作製した。

Fig. 7A はレンズ状細胞とその周囲の母細胞の一部を含む細胞壁試料を示す。その細胞壁試料の断面の立体模式図と観察方向を示したのが Fig. 7B である。Fig. 7B では、レンズ状細胞を母細胞の液胞側（矢印）から見ており、母細胞の細胞壁（MCW）の内側が底面となり、その上に発達中の隔壁が覆い

被さるように配置されている。母細胞の液胞側の隔壁表面（Fig. 7B の ss）と形成中の隔壁の先端（Fig. 7B の es）は、それぞれ Fig. 7A の ss と es に対応する。また、レンズ状細胞頂部にあたる細胞壁の内側表面（Fig. 7A と Fig. 7B の*）は母細胞の細胞壁内側表面となる。

形成中の隔壁を含む細胞壁試料の表面構造をレプリカ法により電子顕微鏡で観察した（Fig. 7C-F）。Fig. 7A で ss 上に示した C-F は、電子顕微鏡で観察した 4 つの部位である。隔壁は求心的に（Fig. 7A の矢印）形成されたので、時間的には F, E, D, C の順に形成され、C がもっとも新しく形成された隔壁先端部位となり、逆に F がもっとも以前に形成された隔壁基端部位となった。

Fig. 7C は形成中の隔壁の最先端部（矢印）を示す。*の領域は母細胞壁内側表面に沈着するセルロースマイクロフィブリル（CMF）の層である。矢印を境にして左下側の領域には、隔壁形成のために最初に沈着した不定形の基質物質（#）が観察された。基質物質が沈着したため、その奥側に存在する母細胞壁内側表面の CMF 層は見えなかった。Fig. 7D は形成中の隔壁の最先端からおよそ 50 μm 基端側の部位における隔壁の表面構造を示す。全体に沈着する不定形の基質物質（Fig. 7D の #）の他に、細いランダムに配向する CMF の沈着が認められた（Fig. 7D の矢印）。形成中の隔壁の最先端から基端側へおよそ 100 μm 離れた部位（Fig. 7E）では、不定形の基質物質（#）の沈着がなおも確認された。CMF（Fig. 7E の矢印）は Fig. 7D で示したものよりも比較的太く、また、ほぼ一定の

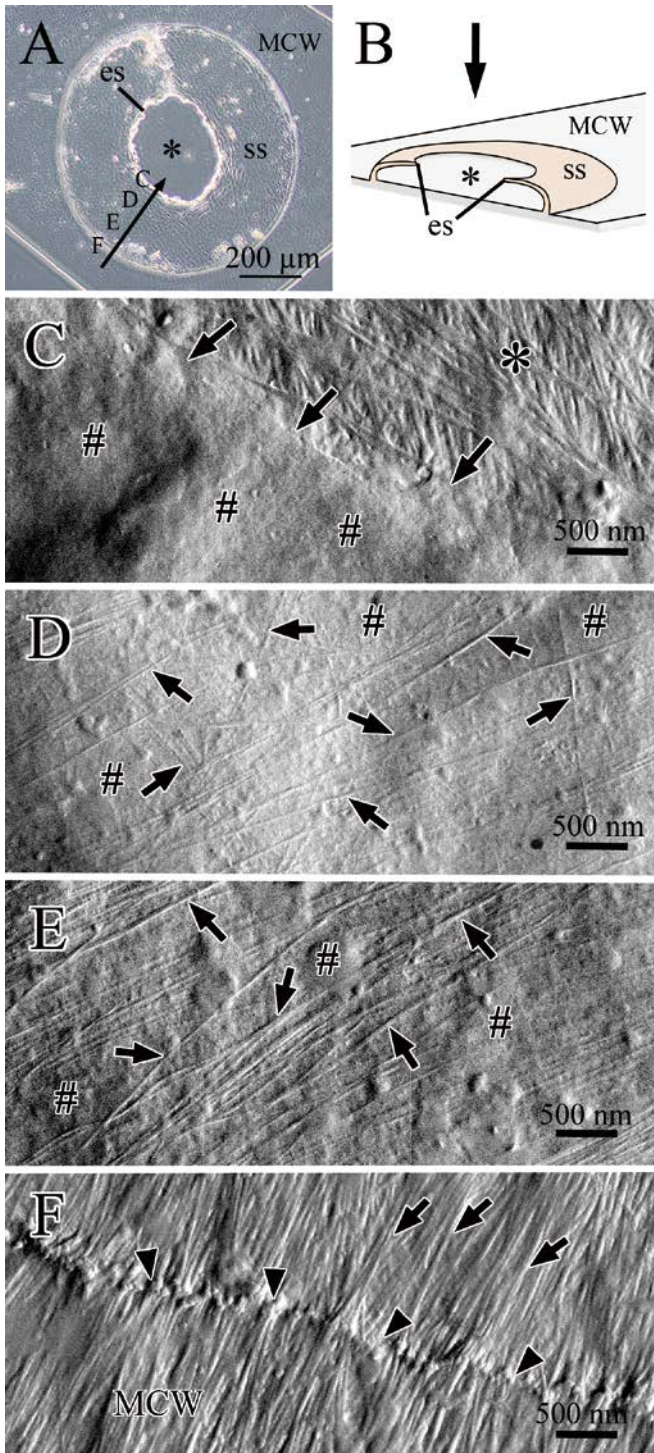


Fig. 7. Cell wall materials and structures deposited during septum formation in *Valonia fastigiata*. A, cell wall specimen that includes the growing septum (ss and es) of a lenticular cell and a part of the mother cell wall (MCW) outside of the lenticular cell. The cell wall specimen was made by the treatment of a mother cell developing a lenticular cell with a chlorine-based bleaching agent to remove protoplasm. Septum formation started from the proximal end (F) and proceeded in order of E, D, and C (arrow) toward the distal end (es). B, a diagram showing how the cell wall specimen in A was observed. Surfaces (ss) and edges (es) of the growing septum were viewed from the inside of a mother cell (arrow). Asterisks in A and B show the inner surfaces of the MCW. C, D, E, and F are electron micrographs showing replicas of the surface structures of the growing septum at the positions of C, D, E, and F indicated in A, respectively. C, the leading edges of the growing septum (arrows), where amorphous materials (#) began to be deposited exclusively on the left bottom side. The asterisk shows the inner surface of the mother cell wall the same as that in each of A and B. D is situated 50 μm proximally from C to the opposite direction of an arrow in A. D, the appearance of thin microfibrils (arrows) oriented in various directions that were embedded in amorphous materials (#). E is situated 50 μm proximally from D. E, the deposition of thicker microfibrils (arrows) and a small number of amorphous materials (#). F is situated 80 μm proximally from E and shows the proximal end of the growing septum (arrowheads). Microfibrils of the septum (arrows) were closely packed without amorphous materials and as thick as those of the MCW.

方向へ配向し、本数も多かった。Fig. 7F は隔壁の基端部(矢頭)を示し、形成中の隔壁最先端からおよそ 180 μm 離れている。基端部位の隔壁の表面には、一定の方向に配列する太い CMF (Fig. 7F の矢印) が高密度で沈着し、基質物質はほとんど観察されなかった。基端部よりも左下側の部分は母細胞壁の内側表面 (Fig. 7F の MCW) であり、隔壁基端部位と同様の太さの CMF が高密度で沈着していた。

6. 微小管破壊剤 APM の効果

APM 無処理の細胞では、前述したように、レンズ状細胞形成の第 1 段階で原形質集合領域の周縁と中央部にそれぞれ周縁求心微小管とランダム配列する微小管が出現し (Fig. 3B)、原形質集合領域の外側には平行配列する表層微小管が分布した (Fig. 3D)。そこで、レンズ状細胞形成の第 1 段階 (Fig. 1B) に APM で 2 h 処理した細胞を固定し、APM のこれらの微小管に対する影響を調べた。その結果、原形質集合領域には微小管は観察されなかった (Fig. 8A の破線の左側)。しかし、原形質集合領域の外側周囲には平行配列する表層微小管が存在していた (Fig. 8A の破線の右側の二重矢頭)。一方で、レンズ状細胞形成の第 2 段階に入ると、これも前述したように、APM 無処理の細胞においては、原形質膜が液胞側へ陥入し、隔壁形成が始まった。このとき、陥入している原形質膜の最先端に刷毛状の微小管が出現した (Fig. 4E, F)。そこで、レンズ状細胞形成の第 2 段階の初期 (Fig. 1D) に、APM で 2 h 処理した細胞を固定し、刷毛状の微小管の有無を調べた。その結果、液胞側へ陥入している原形質膜の最先端 (Fig. 8B の矢

印) には微小管は観察されなかった。原形質集積部の外側領域では、表層微小管 (Fig. 8B の二重矢頭) が残存していた。

このように、レンズ状細胞形成の第 1 段階における APM による処理は周縁求心微小管とランダム配列する微小管を破壊し、第 2 段階での APM 処理は刷毛状微小管を破壊した。そこで、周縁求心微小管とランダム配列する微小管、または刷毛状微小管のレンズ状細胞形成におけるはたらきを調べるため、APM で処理した細胞を実体顕微鏡下で継続的にインターバル撮影した。その結果、原形質が集合してくるレンズ状細胞形成の第 1 段階の細胞を APM で処理したとき、一旦集合していた原形質は拡散し、APM 処理後 6 時間でほぼ元の均一な分布に戻った (Movie S3)。それに対して、隔壁が形成されるレンズ状細胞形成の第 2 段階の前半の細胞を APM で処理したとき、2 時間以内に原形質の集積は停止し、それ以後の隔壁形成は阻害された (Movie S4)。しかし、第 2 段階の後半に APM で処理した細胞では、原形質の集積は継続し、結果的に隔壁は形成された (Movie S5)。

考察

筆者らは前報と本報の 2 つの相互に関連する研究論文を通し、シオグサ目多核緑藻の隔壁形成と細胞骨格を明らかにしてきた。シオグサ目多核緑藻においては、隔壁形成による細胞質分裂は 2 つのタイプがある。1 つは細胞を横断する隔壁によって円柱形の細胞がほぼ等分裂するタイプである。その例として前報ではシオグサ科のタマジユズモを用いた (関田・奥田 2022)。2 つ目は母細胞の不特定な部位に集積してきた

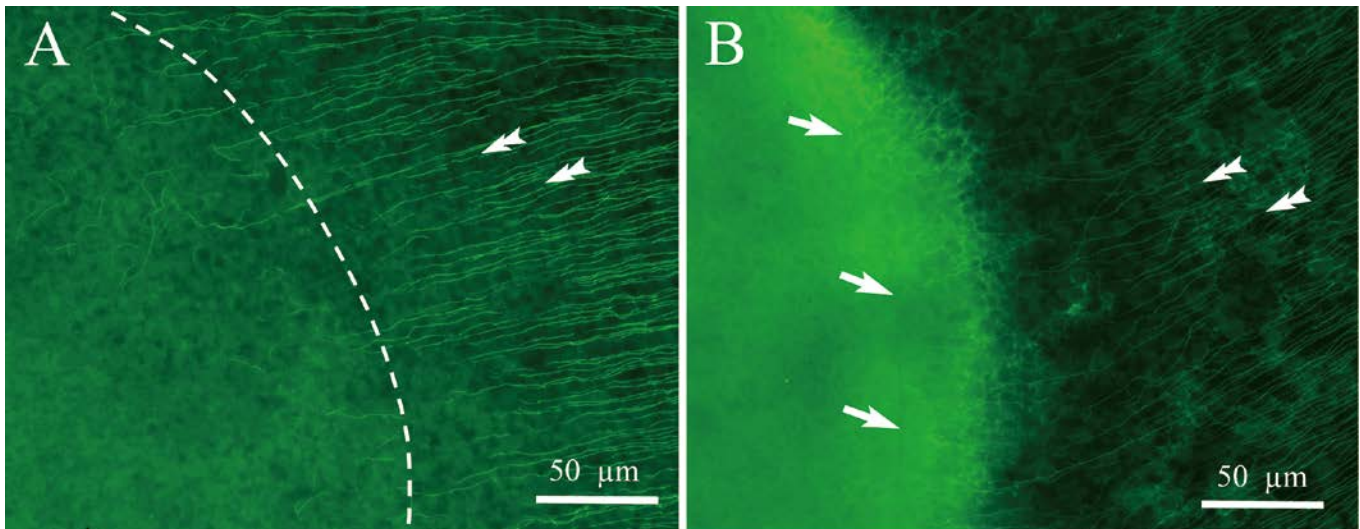


Fig. 8. Effect of APM on microtubules specific to each step of lenticular cell formation in *Valonia fastigiata*. A, immunofluorescence of microtubules in a cell fixed 2 h after treatment with APM at the first step (Fig. 1B). Broken lines show the outer boundary of the protoplasmic aggregation that stands at the left side of the photo. No microtubule was found within the protoplasmic aggregation, whereas cortical microtubules (double arrowheads) remained partially outside of the protoplasmic aggregation. Compare this photo with Fig. 3B. B, immunofluorescence of microtubules in a cell fixed 2 h after treatment with APM at the beginning of the second step (Fig. 1D). Protoplasmic aggregation is situated at the left side of the photo. The leading edges of the plasma membrane were seen as a faint stria (arrows). No microtubule was found on the leading edges of the plasma membrane. Cortical microtubules (double arrowheads) survived partially in the outer area of the protoplasmic aggregation. Compare this photo with Fig. 4E, F.

原形質を隔壁によって母細胞から切り出し、小さなレンズ状の細胞を形成するタイプである (Okuda *et al.* 1997)。その例として本報ではバロニア科のフサバロニアを用いた。本報で明らかとなったフサバロニアのレンズ状細胞形成の一連の過程を示すため、細胞の表面観と断面観の変化に対応した微小管の挙動を模式的にまとめた (Fig. S1)。参考のため、タマジユズモの隔壁形成と微小管の挙動についても模式的にまとめた (Fig. S2)。まず、タマジユズモとフサバロニアの2種の隔壁形成の過程と細胞骨格の挙動をそれぞれ比較して考察する。

タマジユズモはレンズ状細胞を形成しないので、その隔壁形成には、フサバロニアの場合と異なり、原形質が集積するという段階がない。タマジユズモの未分裂細胞における表層微小管は細胞の側面と平行 (細胞の縦方向) に配列する (関田・奥田 2022)。この表層微小管は、隔壁形成に先立ち、細胞を横断する全周に沿って上下に分断する。表層微小管が分断した帯状部分の原形質膜は、隔壁形成のために細胞の液胞側へ陥入し始める。

それに対してフサバロニアでは、母細胞の原形質はレンズ状細胞の形成のために円形の領域に集積するという段階があった。その円形領域の中心部にはランダムな微小管が分布したのに対し、周縁部では求心方向へ配向する微小管 (周縁求心微小管 = centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern) が新たに出現した (Fig. 3A-D)。ここで注目されるのは、隔壁形成の直前に周縁求心微小管は、原形質が集積する周縁に沿って分断し (Fig. 4B-C)、それに引き続き、その分断部の原形質膜が隔壁形成のために陥入したことである。微小管の分断に引き続いて原形質膜が陥入したことは、タマジユズモの隔壁形成が開始した時の状況と一致する。

原形質膜の陥入のために、タマジユズモでは既存の表層微小管が分断するのに対し、フサバロニアは、既存の表層微小管ではなく、新規に周縁求心微小管を構築し、それを分断した。両種においては、微小管の分断が原形質膜の陥入開始の条件となる。このように、タマジユズモとフサバロニアの隔壁形成においては、いつどこでどのように原形質膜が陥入するかを決めるしくみが存在すると推量され、そのしくみの一部は表層微小管の分断または周縁求心微小管の構築と分断を含むと考えられる。それらの微小管が分断することで初めてその部位から原形質膜が陥入し、隔壁形成が始まる。

本研究は、フサバロニアの隔壁形成のために陥入する原形質膜の最先端に刷毛状の微小管が存在することを明らかにした。フサバロニアの刷毛状の微小管 (Fig. 4E, F, H2) は、タマジユズモの刷毛状の微小管と同様の分布と配列様式を示した。刷毛状の微小管は、フサバロニアとタマジユズモともに、隔壁形成が始まったときに出現し、隔壁が完成したときに消失した。また、両種の隔壁は母細胞の細胞壁の内側から始まって液胞方向へ求心的に発達した。さらに両種ともに、隔壁形成開始後すぐに微小管破壊剤 APM で細胞を処理することで、隔壁の形成が阻害された。これらのことは、フサバロニアとタマジユズモの隔壁形成には、刷毛状微小管を含む同様の

細胞質分裂装置が関与することを強く示唆する (関田・奥田 2022)。

種子植物においては、ゴルジ体由来の多数の小胞が隔膜形成体 (フラグモプラスト) に集合し、互いに融合して細胞板が形成される (Verma 2001, 馳澤ら 2015)。細胞板は遠心的に拡大し、母細胞壁の内側に接することで隔壁が完成する。細胞板には、ゴルジ小胞が供給する細胞壁多糖類として、最初にカロースとキシログルカンが蓄積し、隔壁と母細胞壁との接続後にセルロースとペクチン類が沈着する。一方、アオサ藻綱シオグサ目に属する種においては、細胞質分裂装置としてフラグモプラストまたはファイコプラストの存在は報告されていない (堀 1983)。しかし上述したように、フサバロニアとタマジユズモでは、隔壁形成に関与すると考えられる特有の刷毛状微小管が出現する。フサバロニアを用いた本研究では、隔壁形成のために陥入する原形質膜または隔壁の最先端部に接する原形質内には、刷毛状微小管に相当する微小管と低電子密度の小胞が多数存在することを明らかにした (Fig. 5A2, A3, B2, B3)。アオサ藻綱では、カモジシオグサ (*Cladophora glomerata* (Linnaeus) Kützinger 1843) (McDonald & Pickett-Heaps 1976) とモツレグサ属 (*Acrosiphonia*) の種 (Hudson & Waaland 1974, Aruga *et al.* 1996) においても、隔壁が形成される部位に近接して微小管と小胞が分布し、両者の関連性が指摘されている。

多核緑藻は細胞壁を構成する主要な多糖類成分によって概ね3つのグループに分けられる (Painter 1983)。1つはセルロース性の細胞壁をもつグループで、ここにシオグサ目多核緑藻が含まれる。2つ目は非セルロース性多糖類の細胞壁をもつ多核緑藻で、そのうちマンナンを主成分とするグループとキシランを主成分とするグループに分かれる。セルロース性の細胞壁をもつ多核緑藻では、例えばハリガネユズモ (*Chaetomorpha melagonium* (F. Weber et D. Mohr) Kützinger 1845) の場合、セルロース含量は41%で、セルロース以外の多糖類は主にアラビノース残基やガラクトース残基、グルコース残基から構成される (Cronshaw *et al.* 1958)。

フサバロニアとタマジユズモでは、隔壁は母細胞壁の内側表面から液胞方向へカメラの絞りが閉じるように発達する。そのとき、閉じていく絞りの先端部が形成直後の隔壁となる。そのような若い隔壁がその後どのように発達・変化するかは明らかにされていなかった。本研究はフサバロニアの発達中の隔壁の厚さと成分、表面構造を、隔壁の部位と対応させて明らかにした。隔壁の厚さは、形成直後の隔壁の先端部がもっとも薄く、それよりも以前に形成された基端側部位へ行くに従って厚くなった (Fig. 6B-D)。また、隔壁が厚くなるに従い、セルロースの含有量は増加した (Fig. 6A-D)。これらの事実は隔壁形成開始後も引き続いて隔壁物質の供給または合成が継続していることを意味する。

隔壁の表面構造では、形成直後の隔壁は不定形の基質物質のみからなることから (Fig. 7C)、当該部位の原形質に分布している刷毛状微小管が、このような最初に沈着する非セルロー

ス性の基質物質の供給に関係している可能性があるが、そのことを示す証拠はない。隔壁のさらに基端側の部位に行くに従い、基質物質に混ざって沈着するセルロースマイクロフィブリル (CMF) の太さと数が増加した (Fig. 7D, E)。CMF は原形質膜に結合するセルロース合成酵素複合体によって原形質膜で直接合成される (奥田 1999) ので、フサバロニアにおいてのこれらの部位から始まる隔壁へのセルロースの供給は小胞のエクソサイトシスによるものではない。バロニア科のマガタマモ (*Boergesenia forbesii* (Harvey) Feldmann 1938) では、細胞の切断によって誘導したプロトプラストは新たに細胞壁を形成して球形の細胞へと再生する (Mizuta *et al.* 1985)。このとき、フサバロニアの隔壁形成と同様に、最初に非セルロース性の基質物質が沈着し、それに続いて CMF が沈着する。種子植物の細胞板形成においても、非セルロース性多糖類を取り込んだ後でセルロースが沈着する (Verma 2001, 馳澤ら 2015)。このように、新たな細胞壁が形成される場合、おそらく CMF 合成の足場または土台となるため、最初に非セルロース性多糖類が沈着するというしくみがあると推察される。

謝辞

研究材料のフサバロニアを採集いただいた高知大学総合研究センター海洋生物研究教育施設の田中幸記博士に感謝申し上げる。

引用文献

- Aruga, H., Motomura, T. & Ichimura, T. 1996. Immunofluorescence study of mitosis and cytokinesis in *Acrosiphonia duriuscula* (Acrosiphoniales, Chlorophyta). *Phycol. Res.* 44: 203–213.
- Asai, K. & Kishimoto, U. 1975. Effects of sodium, potassium and chloride ions on the membrane potential of *Valonia aegagropila*. *Plant Cell Physiol.* 16: 93–100.
- Chanzy, H., Henrissat, B. & Vuong, R. 1984. Colloidal gold labeling of 1,4- β -glucan cellobiohydrolase adsorbed cellulose substrates. *FEBS Lett.* 172: 193–197.
- Cronshaw, J., Myers, A. & Preston, R. D. 1958. A chemical and physical investigation of the cell walls of some marine algae. *Biochim. Biophys. Acta* 27: 89–103.
- Eggert, A., Burger, E. M. & Breeman, A. M. 2003. Ecotypic differentiation in thermal traits in the tropical to warm-temperate green macrophyte *Valonia utricularis*. *Bot. Mar.* 46: 69–81.
- 馳澤盛一郎・湖城恵・秋田佳恵・松垣匠 2015. 細胞板形成における細胞骨格機能のイメージング解析. *植物の生長調節* 50: 50–56.
- 堀輝三 1983. 細胞構造にみる緑藻類の系統と進化. *遺伝* 37: 16–23.
- 堀輝三 1994. 藻類の生活史集成. 第 1 巻. 緑色藻類. 内田老鶴圃, 東京.
- Hudson, P. R. & Waaland, J. R. 1974. Ultrastructure of mitosis and cytokinesis in the multinucleate green alga *Acrosiphonia*. *J. Cell Biol.* 62: 274–294.
- 熊田美里・渡辺剛・大葉英雄 2009. 沖縄県宮古列島の海藻植生. *みどりいし* 20: 24–33.
- Leliaert, F., De Clerck, O., Verbruggen, H., Boedeker, C. & Coppejans, E. 2007. Molecular phylogeny of the Siphonocladales (Chlorophyta: Cladophorophyceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 44: 1237–1256.
- Maeda, H. & Ishida, N. 1967. Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *J. Biochem.* 62: 276–278.

- McDonald, K. L. & Pickett-Heaps, J. D. 1976. Ultrastructure and differentiation in *Cladophora glomerata*. I. Cell division. *Amer. J. Bot.* 63: 592–601.
- Mizuta, S., Sawada, K. & Okuda, K. 1985. Cell wall regeneration of new spherical cells developed from the protoplasm of a coenocytic green alga, *Boergesenia forbesii*. *Jpn. J. Phycol.* 33: 32–44.
- 日本電子顕微鏡学会関東支部 1975. 電子顕微鏡生物試料作製法. 丸善, 東京.
- 奥田一雄 1999. 藻類のセルロース合成. *電子顕微鏡* 34: 81–86.
- Okuda, K., Li, L., Kudlicka, K., Kuga, S. & Brown, R. M. Jr. 1993. β -glucan synthesis in the cotton fiber. I. Identification of β -1,4- and β -1,3-glucan synthesized in vitro. *Plant Physiol.* 101: 1131–1142.
- Okuda, K. & Mizuta, S. 1985. Analysis of cellulose microfibril arrangement patterns in the cell wall of new spherical cells regenerated from *Boodlea coacta* (Chlorophyceae). *Jpn. J. Phycol.* 33: 301–311.
- Okuda, K., Ueno, S. & Mine, I. 1997. Cytomorphogenesis in coenocytic green algae. IV. The construction of cortical microtubules during lenticular cell formation in *Valonia utricularis*. *Mem. Fac. Sci. Kochi Univ. Ser. D (Biol.)* 18: 17–25.
- Painter, T. J. 1983. Algal polysaccharides. In: Aspinall, G. O. (ed.) *The polysaccharides*, Vol. 2, pp. 195–285. Academic Press, New York.
- 関田諭子・奥田一雄 2022. シオグサ目多核緑藻における隔壁形成と細胞骨格 I. タマジユズモの隔壁形成. *藻類* 70: 167–176.
- Shihira-Ishikawa, I. 1987. Cytoskeleton in cell morphogenesis of the coenocytic green alga *Valonia ventricosa* I. Two microtubule systems and their roles in positioning of chloroplasts and nuclei. *Jpn. J. Phycol.* 35: 251–258.
- Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31–43.
- Verma, D. P. S. 2001. Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 751–784.
- 吉田忠生 1998. 新日本海藻誌. 内田老鶴圃, 東京.

補足資料

- 日本藻類学会の Web サイト (http://sourui.org/publications/sorui/list/71_03.html) で本論文と同時に公開される。
- Movie S1. A video showing lenticular cell formation in *Valonia fastigiata* (ver. 1).
- Movie S2. A video showing lenticular cell formation in *Valonia fastigiata* (ver. 2).
- Movie S3. A video showing that APM caused protoplasmic aggregation to diffuse.
- Movie S4. A video showing that APM stopped protoplasmic aggregation.
- Movie S5. A video showing that protoplasmic aggregation continued even after APM treatment.
- Fig. S1. Schematic representation that shows behaviors of protoplasm and microtubules during lenticular cell formation in *Valonia fastigiata*.
- Fig. S2. Schematic representation of changes in the occurrence and arrangement of microtubules during septum formation in *Chaetomorpha moniligera*.

(2023 年 4 月 17 日受付, 2023 年 9 月 4 日受理)
通信担当編集委員: 芹澤 (松山) 和世