

エゾヤハズの四分孢子発生機構の解析 VI

四分孢子発生におよぼすサイトカラシンBの影響

大森長朗・植木洋子

山陽学園短期大学 (703 岡山市平井 1-14-1)

OHMORI, T. and UEKI, Y. 1980. An analysis of tetraspore development in *Dictyopteris divaricata* VI. Effects of cytochalasin B on tetraspore development. Jap. J. Phycol. 28: 177-181.

Tetraspores of *Dictyopteris divaricata* were cultured in seawater solutions of cytochalasin B at various concentrations. Cytochalasin B at 100 mg/l or more inhibited rhizoid formation. In this concentration of cytochalasin B, tetraspores developed into multicellular spherical germlings lacking rhizoids. After the spores developed into 2-4 celled germlings, rhizoidal protuberances began to appear. These protuberances were greater in number as compared with the controls.

Under continuous unilateral illumination, tetraspores were cultured in seawater solution of cytochalasin B at 100 mg/l. The first segmentation wall of the germlings was formed at random and had no relation to the direction of the light. Rhizoids arising afterwards were formed away from the light source. In cytochalasin B seawater solution, therefore, a definite relation was not seen between the direction of the first segmentation wall and that of the rhizoid.

Key Index Words: cytochalasin B; *Dictyopteris divaricata*; morphogenesis; *Phaeophyta*; photopolarization; rhizoid formation; tetraspore development.

Takeo Ohmori and Yoko Ueki, Sanyo Gakuen Junior College, Hirai, Okayama, 703 Japan.

サイトカラシンBは $C_{29}H_{37}NO_5$ の化学式をもつ一種の抗生物質で、細胞内のマイクロフィラメントの存在様式に影響をおよぼすと考えられている物質である。サイトカラシンBは、原形質流動を可逆的に抑制し、動物細胞では細胞質の分裂を阻害するなど数多くの効果が知られている。海藻に対するサイトカラシンBの効果は、ヒバマタ目に属する *Fucus* (QUATRANO 1973), および *Pelvetia* (NELSON and JAFFE 1973, 安部 1978) の受精卵について調べられているに過ぎない。本研究では、アミジグサ目に属するエゾヤハズ *Dictyopteris divaricata* の四分孢子をサイトカラシンBを含む海水で培養したところ、いくらかの効果がみられたので、その結果を報告する。

材料と方法

本研究では、1978年6月4日と翌1979年6月11日に、岡山県玉野市渋川で採集したエゾヤハズの四分孢子体を用いて実験を行なった。採集後、藻体を一晚暗所に放置し、翌日濾過海水を満した大型シャーレに浸して四分孢子を放出させた。2時間以内に放出された四分孢子を遠沈して集め、実験に用いた。

まず、四分孢子の発生に影響するサイトカラシンBの有効濃度を決定するため、10, 50, 100, 120, 150, 200 mg/lのサイトカラシンBを含む海水溶液を作り、小型シャーレ(径6 cm)を用いて培養した。光は自然光で、培養温度は17.5°Cであった。サイトカラシンBは水に不溶なので、その10 mgを0.5 mlのdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し、これに純水9.5 mlを加

えて貯蔵液とした。この貯蔵液を濾過海水で必要な濃度に稀釈して培養液とした。

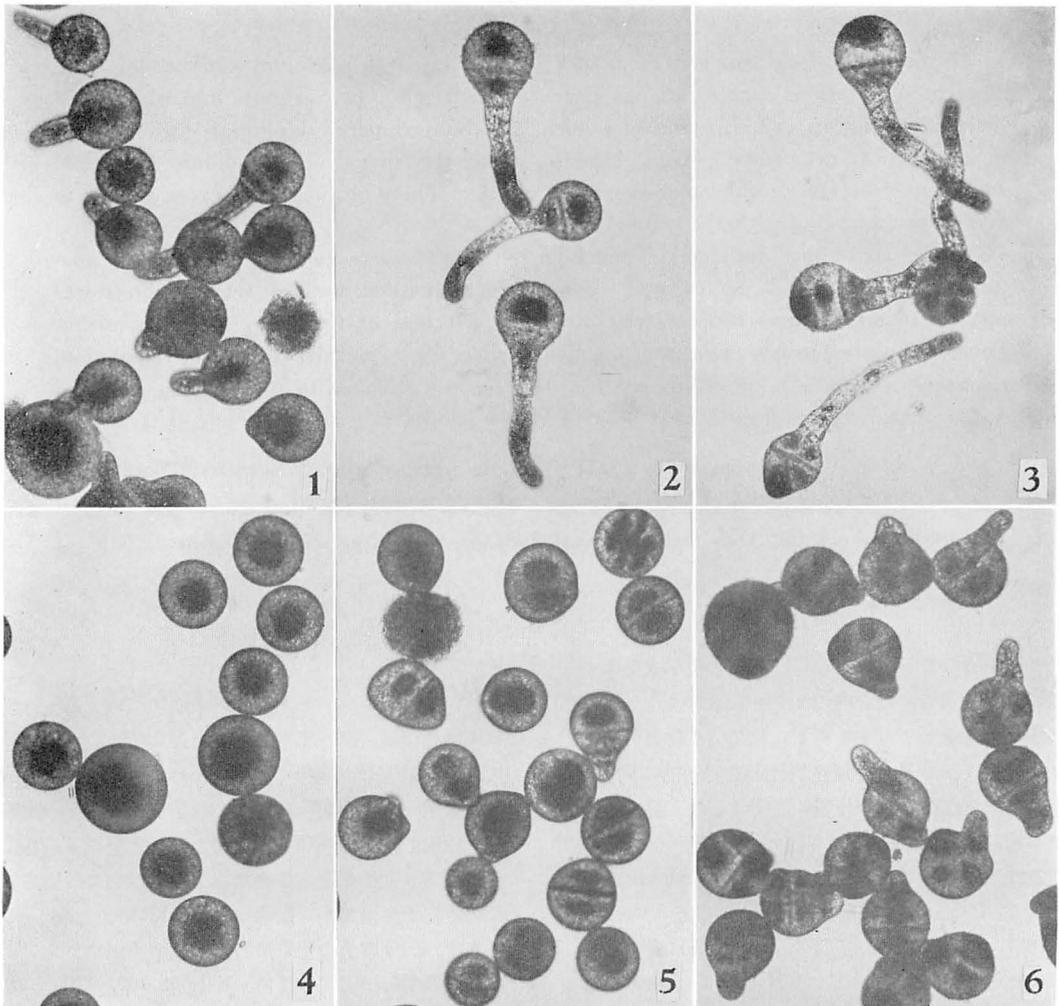
さらに、光による仮根の定位 (photopolarization) にサイトカラシンBがどのような影響を与えるのかを調べるため、100 mg/l サイトカラシンBを含む海水溶液中で培養した四分胞子に光を一側から6~72時間照射し、照射後は暗培養に切り替えて、培養5日後に仮根の伸出方向を観察した。一方照射の実験に用いたシャーレは、一方を開けて黒紙で包み、他の方向からは光が入らないようにした。光源には15 Wの白色蛍光灯を用いて1000 luxの光を与え、室温(23.0±

0.5°C)で実験を行なった。

結 果

1. 四分胞子の発芽におよぼすサイトカラシンBの影響

エゾヤハズの四分胞子を濾過海水で培養すると、培養14~19時間後に胞子の一端にふくらみを生じ仮根突起を形成する (Fig. 1)。培養22~36時間後に、仮根突起が伸長する方向とは直交して、第一分割壁が胞子の中央よりやや仮根よりの位置に形成される (Fig. 2)。培養2日後の胞子の発芽率は93.9%、培養4日後の発



Figs. 1-6. Stages in the development of tetraspores in *Dictyopterus divaricata*. ($\times 100$)

1. 24 hr in seawater. 2. 48 hr in seawater. 3. 72 hr in seawater. 4. 24 hr in cytochalasin B at 100 mg/l. 5. 48 hr in cytochalasin B at 100 mg/l. 6. 72 hr in cytochalasin B at 100 mg/l.

芽率は 98.6% であった。dimethyl sulfoxide (DMSO) が胞子発芽およびその後の発生におよぼす影響を調べるために、150 mg/l サイトカラシン B 溶液中に含まれている DMSO と同濃度の DMSO 海水溶液中で四分胞子を培養した。その結果、培養 2 日後の発芽率は 67.0% と低かったが、おくれで発芽するものが多く、培養 4 日後の発芽率は 87.4% と正常のものに近い値を示すようになった。

サイトカラシン B 溶液中で培養した場合は、その濃度が 50 mg/l 以下の場合には濾過海水中での発芽率と変わらず、その影響は見られなかった。100 mg/l の濃度では、培養 24 時間を経過しても、仮根突起を生じたものは全く見られず (Fig. 4)、培養 2 日後の発芽率は 50.4% と低かった。しかし培養 3 日後には 94.1% と正常に近い発芽率に回復した。120 mg/l 以上の濃度では、濃度が高くなるにしたがって発芽率は低くなり、150 mg/l の濃度では培養 2 日後の発芽率は 49.6%、4 日後の発芽率は 69.1% であった。

2. 発生におよぼすサイトカラシン B の影響

海水中で四分胞子が発芽する時には、最初に仮根突起を形成し、その後胞子の核が分裂して、2 核の間に第一分割壁が形成される。100 mg/l サイトカラシン B 海水溶液で培養すると、四分胞子は培養 36 時間ぐらい経過した頃に、仮根突起を生じることなく胞子の核は分裂して、胞子の中央部に第一分割壁が形成される (Fig. 5)。続いて第一分割壁に直交して第二分割壁

が入り、胞子は 4 細胞となる。胞子が 2~4 細胞に分裂した後 (培養 36~60 時間後) に、初めて仮根突起が生じてくる (Fig. 6)。培養 2 日後には、このような仮根のない多細胞の発芽体が 79.1% も生じた (Table 1)。サイトカラシン B の濃度が高くなるにしたがって、異常な発芽体の数が増加すると共に、仮根突起の形成もおくれてくる。培養 4 日後では、100 mg/l の濃度で仮根をもたない発芽体は 26.7% と培養 2 日後に比べ著しく減少した。200 mg/l の濃度では、培養 4 日後になっても 78.7% のものがまだ仮根突起を形成していなかった (Table 1)。胞子が 2~4 細胞に分割された後に仮根突起を生じる場合、第一分割壁が走る方向と仮根の伸出部位との間には決まった関係は見られない。第一分割壁に直交した位置に仮根突起を生じる場合もある。この場合、仮根の生長は著しく阻害されていた。サイトカラシン B の濃度が 50 mg/l 以下の場合には、正常に発生しその影響はみられない。

濾過海水中で培養すると、ほとんどの四分胞子は 1 本の仮根を形成し、2 本の仮根を生じたものは 1.3% に過ぎない。サイトカラシン B 海水溶液で培養した場合には、仮根の数が増加する傾向がみられる。100 mg/l の濃度では、10.5% のものが 2 本の仮根を形成し、0.5% のものが 3 本の仮根を形成していた (Table 2, Fig. 7)。2 本の仮根を生じる場合、それぞれの仮根が反対の方向に伸出することもあれば、同一方向に

Table 1. Percentage of multicellular germlings without rhizoid in cultures with various concentrations of cytochalasin B

	Seawater	DMSO	Cytochalasin B concentration mg/l					
			10	50	100	120	150	200
2 Days	17.3	8.3	7.7	7.5	79.1	77.0	86.7	88.9
3 Days	9.8	9.9	4.4	6.4	32.5	65.8	77.6	86.2
4 Days	0.9	7.2	3.5	5.1	26.7	42.1	63.9	78.7
7 Days	0.9	4.7	3.8	1.8	13.4	16.0	29.8	36.3

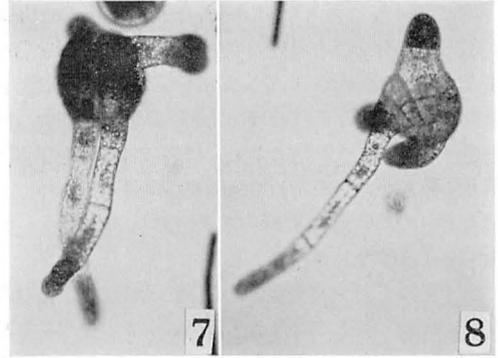
Table 2. Percentage of germlings with several rhizoids in cultures with various concentrations of cytochalasin B for 7 days

Number of rhizoids	Seawater	Cytochalasin B concentration mg/l					
		10	50	100	120	150	200
1	98.7	96.9	94.9	89.0	88.6	88.0	83.5
2	1.3	4.6	4.6	10.5	9.5	9.1	16.5
3	0	0.5	0.5	0.5	1.8	2.9	0

2本の仮根を生じる場合もあった。さらに、サイトカラシンBは直立苗の数も増加させる。濾過海水で7日間培養したものでは、1本の直立苗をもつものが93.0%、2本のが2.2%であった。100 mg/l サイトカラシンBでは、1本の直立苗をもつものが79.0%と減少し、2本もつものが8.9%、3本のが0.8%と増加した (Table 3)。

3. Photopolarization におよぼす影響

100 mg/l サイトカラシンB 海水溶液で四分胞子を培養し、これに一方から白色蛍光灯で1000 luxの光を照射した。その結果、胞子は仮根突起を生ずることなく第一分割壁を形成するが、その第一分割壁が走る方向は、入ってくる光の方向とは関係がなく、全く任意の方向に形成された (Table 4)。分割壁形成後、おくれで仮根突起は生じてくる。この仮根突起の伸出方向は光によって影響され、大多数の発芽体が入っ



Figs. 7-8. Germlings of *Dictyopteris divaricata* in cultures with cytochalasin B at 100 mg/l for 7 days. (×100)

7. A germling with three rhizoids and an erect shoot. 8. A germling with a rhizoid, an erect shoot and two protuberances.

Table 3. Percentage of germlings with several erect shoots in cultures with various concentrations of cytochalasin B for 7 days

Number of erect shoots	Seawater	Cytochalasin B concentration mg/l					
		10	50	100	120	150	200
0	4.8	5.3	3.3	11.3	6.6	22.5	29.7
1	93.0	88.9	85.8	79.0	84.7	66.9	60.1
2	2.2	4.9	10.2	8.9	6.6	8.5	8.0
3	0	0.8	0.8	0.8	2.1	1.4	2.2

Table 4. The direction of the first segmentation wall of apolar germlings to the light in cultures with cytochalasin B at 100 mg/l for 3 days

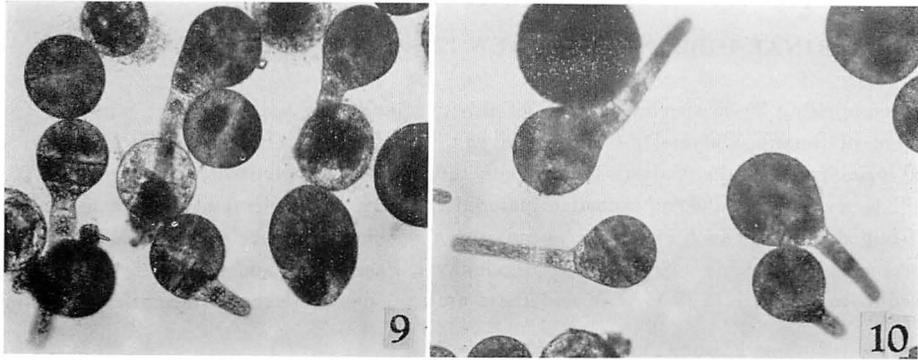
	Direction of the wall to light		Total
	Parallel	Vertical	
Number	63	52	115
%	54.8	45.2	100

てくる光の方向とは反対の側に仮根突起を形成した (Table 5, Fig. 9)。培養開始後から12時間連続一方照射したものでは53.5%、18時間照射したものでは75.5%、24時間照射したものでは85.1%の発芽体が反光源側に仮根を形成した (Table 5)。濾過海水中で培養した場合は、培養開始後9~12時間の間の一方照射が仮根定位に対して最も有効であった (大森・植木1979)。今回の実験では、光が仮根の伸出方向を決定する時間帯が海水中の場合よりもおくられている。これは

サイトカラシンBの影響により、胞子発生の経過が全体としておくられていることに起因していると思われる。第一分割壁は任意の方向に形成されるが、仮根突起が反光源側に形成されるので、第一分割壁に平行に仮根を伸出する発芽体もあれば、分割壁に直交する位置に仮根突起を生じる発芽体もあって、その発芽体の形態はさまざまとなるのである。

考 察

エゾヤハズ四分胞子をサイトカラシンB海水溶液で培養すると、その濃度が50 mg/l以下の場合には影響が見られなかった。100 mg/l以上の濃度では、その濃度が高くなるにしたがって発芽率は低下し、発生におくれが生じた。高濃度のサイトカラシンBは細胞分裂には影響を与えないが、仮根の形成を著しく阻害する。100 mg/l サイトカラシンB海水溶液中では四分胞子は仮根突起を生じることなく細胞分裂を行なって多細胞体となる。胞子が2~4細胞に分割された後に、ようやく仮根突起が生じてくる。生じる仮根の数



Figs. 9-10. Germlings of *Dictyopteris divaricata* in cultures with cytochalasin B at 100 mg/l for 96 hr. ($\times 100$)

9. Germlings under the continuous unilateral illumination. The light from the upper part of the figure. 10. Germlings in the dark.

Table 5. Percentage of orientation of the rhizoidal outgrowth under the unilateral illumination in cultures with cytochalasin B at 100 mg/l. The light source was in the south

Illumination time	South	North	East	West
0- 6 hr L	6.7	60.0	20.0	13.3
0-12 hr L	4.7	53.5	25.6	16.3
0-18 hr L	4.1	75.5	10.2	10.2
0-24 hr L	0	85.1	8.5	6.4
0-36 hr L	0	78.6	16.7	4.8
0-48 hr L	0	84.8	9.1	6.1
0-60 hr L	0	78.6	14.3	7.1
0-72 hr L	0	77.4	12.9	9.7

は1本とは限らないで、増加する傾向がみられる。これは、サイトカラシンBの存在のもとでは、孢子が多細胞になった後に仮根形成が始まるので、分割されたそれぞれの細胞が仮根突起を形成しようとするためと考えられる。

QUATRANO (1973) は *Fucus distichus* の受精卵を 10 mg/l サイトカラシンB で培養すると、エゾヤハズの発芽体でみられたのと同じような多細胞体になり、仮根をもたない胚が生ずることを報告している。NELSON and JAFFE (1973) は *Pelvetia fastigiata* の受精卵で、1~5 mg/l のサイトカラシンB が仮根突起の形成を抑制することを示し、これは仮根形成部位の生長が妨げられるためであると考えている。

QUATRANO (1973) は *Fucus distichus* の受精卵で、50~100 mg/l サイトカラシンB が光による極性

軸の固定をおくらすことを述べている。NELSON and JAFFE (1973) は *Pelvetia fastigiata* の受精卵で 30~100 mg/l のサイトカラシンB が、安部 (1978) はエゾイシゲ *Pelvetia wrightii* の受精卵で 40 mg/l のサイトカラシンB が photopolarization を抑制することを報じている。エゾヤハズでは、100 mg/l という高濃度のサイトカラシンB 海水溶液でも photopolarization を抑制することではなく、分割壁形成後に、入ってくる光の方向とは反対側に仮根を形成した。

エゾヤハズの四分孢子を濾過海水で培養すると、反光源側に仮根を伸出する。その後、仮根の伸出方向とは直交して第一分割壁が形成される。すなわち、第一分割壁の形成方向は仮根の伸出方向によって決定されている。しかし、サイトカラシンB の溶液中では第一分割壁の形成方向は at random であって、秩序はなく、その後に出してくる仮根の形成部位は光に影響されて、第一分割壁が影響を与えている様子はみられなかった。

引用文献

- 安部 守 1978. エゾイシゲ卵の極性発現について。日本植物学会第 43 回大会研究発表記録 p. 74.
- NELSON, D. R. and JAFFE, L. F. 1973. Cells without cytoplasmic movements respond to cytochalasin. *Develop. Biol.* 30: 206-208.
- 大森長朗・植木洋子 1979. エゾヤハズの四分孢子発生機構の解析 V. 一方照射による仮根の定位。藻類 27: 99-102.
- QUATRANO, R. S. 1973. Separation of processes associated with differentiation of two-celled *Fucus* embryos. *Develop. Biol.* 30: 209-213.