

ワカメ成熟葉体の電子顕微鏡的観察
—特に表層、皮層細胞および粘液腺の微細構造について¹⁾—

奥田 弘 枝

広島女学院大学 (730 広島市東区牛田東4丁目13-1)

OKUDA, H. 1980. Electron microscopic observations on a brown alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales), with special reference to the fine structure of the epidermal and cortical layer cells and the mucilage gland. Jap. J. Phycol. 28: 255-263.

As a basic study of the morphology of the *Undaria pinnatifida*, electron microscopic observations of the frond were carried out. The fresh materials were obtained from Onomichi in Hiroshima Prefecture and fixed by double fixation of glutaraldehyde and osmic acid. After dehydration and Epon embedding, the ultrathin sections were stained by uranyl and lead acetates. The findings were as follows: (1) Several chloroplasts were seen in an epidermal and a cortical layer cells. A lamellae band of the chloroplast does not differentiate into grana and stroma lamellae and is formed by three thylakoids. (2) Some thylakoids of the chloroplast were connecting each other. (3) Mitochondria are mostly seen at the end portion of thylakoid. (4) About the mucilage gland the fine structure of the sticky contents, the membrane structure and different stages of the development were observed.

Key Index Words: Carotenoid; chloroplast; electron microscope; fine structure; mucilage gland; Phaeophyta; thylakoid; *Undaria pinnatifida*.

Hiroe Okuda, Hiroshima Jogakuin College, Ushita, Higashi-ku, Hiroshima, 730 Japan.

筆者はこれまでに、ワカメ葉状部の化学成分の分布状態や消長等について光顕レベルで検討してきた(奥田ら1977)。本報ではワカメの基本的構造を究める基礎的研究の一環として、組織の微細解剖学的所見を得ることを目的とし、成熟した葉状部における表層、皮層細胞および粘液腺について電顕的観察を行なった。

材料と方法

観察に用いた試料は、1978年4月、瀬戸内海尾道市の海岸で採取したワカメの健全な葉状部である。葉体長は約80cmで、成実葉をつけた十分に成熟した藻体である。採取後、藻体を0.1M カコジル酸緩衝液(pH 7.4)で軽く洗い、附着物を除去した後、葉状部の中央部(葉体長の1/2くらいの部位で、羽状裂片と中肋の中間部分)から一片約5mmの小四角片を切り出し試料に用いた。試料は0.1M カコジル酸緩衝液(pH 7.4)で

稀釈した2% グルタルアルデヒドで前固定した後1% オスミウム酸で後固定を行った。用いた試料は海水中に生育していることから浸透圧の変化が細胞の形態に与える影響を考慮して、まず10%~40%のカコジル酸緩衝アルコールで脱水し、ついで50%~60%のアルコール系列で順次脱水の後、エポン包埋し、LKBウルトラミクロトームで500~600Åの超薄切片を作製し、酢酸ウラニル液で約20分間、酢酸鉛液で10分間染色を施し、HS-7型あるいはJEM 100-B型透過型電子顕微鏡で観察した。

結 果

葉状部組織の構造は一般に外側より表層、皮層および髓層の順に配列している(Fig. 1)。本報では表層、皮層の細胞および粘液腺について述べ、髓層については次の機会に報告する。

1) ワカメに関する研究(第2報)

1. 表層細胞について

表層は1~2, 3層の細胞から形成されている (Fig. 1)。Fig. 2 に示す一層目の細胞は三角形を呈しているが、一般に多角~不定形な場合が多く、大きさも2~3層目の細胞より小さい。最外層の細胞の細胞壁は波状形になっていることが多く、波状形の厚い部分は約1.0 μm 、薄い部分は0.2 μm ある。2~3層目の細胞は長径5~6 μm 、短径4~5 μm の円柱状をした細胞が密に隣接して配列し、その細胞壁の厚さは約0.2 μm である。細胞内は葉緑体、その他の小器官でみだされているが、細胞質の構造が他の組織層に比較して非常に緻密なため葉緑体や、核その他の小器官の形状の判別がかなり困難な場合が多い (Fig. 2)。表層の細胞壁は微小繊維からなる。

2. 皮層細胞について

皮層組織は2~3層の細胞で形成されており、細胞の大きさは平均長径20 μm 、短径12 μm 前後であり、表層の細胞に比較して数倍の大きさである。細胞壁は約0.6~0.8 μm と厚く、微小繊維からなる網目構造が観察される (Fig. 3)。外皮層の細胞のほぼ中央部に中等度の電子密度を有する核が存在している。その他、細胞質には葉緑体、ゴルジ体、ミトコンドリア、液胞等が認められる (Fig. 3)。核は二重膜によって包まれており、核質は微小な顆粒物質からなる。核内にはやや電子密度の高い球状の核小体が1個見られる場合が多い。二重の核膜の外膜が伸びて葉緑体を包みこむ、いわゆるクロロプラスト ER (BOUCK 1965) も観察される (Fig. 4, 矢印 CE)。葉緑体は一個の細胞に通常5~6個存在し、長径3~4 μm 、短径1.5 μm 前後で、その形態は紡錘形である。これらの葉緑体は皮層細胞の細胞壁に沿って伸展拡張している。ミトコンドリアは普通1個の細胞に数個以上存在し、その大きさはほぼ長径0.5 μm 、短径0.3~0.4 μm 程で楕円形を呈し、内外二つの膜からなっている。これらのミトコンドリアは葉緑体の両端に近接して見られる場合が多く、内膜突起は短く小管状構造を呈する。また、ゴルジ体集団と見られる構造も核やクロロプラストに近接している場合が多い (Fig. 5)。葉緑体を強拡大で観察すると (Fig. 6)、葉緑体全体が二重の葉緑体包膜で包まれ、その内部は平行に走る6枚の膜が単位となつて一つのバンドを形成していて、バンドの幅は約0.04 μm である。それが多数存在する。バンド内の各チラコイドは約0.08 μm の間隔で互いにはほぼ平行に走り、各バンドは葉緑体の長軸にはほぼ沿って並んでいる。1個の葉緑体に10~15枚のバンドが認められるが、あ

る部位では隣接するバンド間での1~2枚のチラコイドの移行が見られる (Fig. 6, *印)。ストロマには、やや電子密度の高い顆粒が点在している (Fig. 6)。ピレノイドに関しては、今回の試料では定型的なものを見出す事は出来なかった。内皮層の細胞ではチラコイドの膜構造が不鮮明な像や、葉緑体自体の縮小が見られ、ミトコンドリアやゴルジ体等の細胞小器官が減少し、液胞が細胞内の大部分を占めるようになる (Fig. 7)。

3. 粘液腺について

粘液腺は表層、皮層、髄層にかけて存在し、表層、皮層の細胞に比較してはるかに大きい。厚さ約0.1 μm の細胞壁で包まれた、ほぼ球状に近い細胞で頂部は表層の表面上に開口している。

電顕観察用に固定し、エポン包埋した試料を、厚さ5 μm の連続切片に作製し、トルイジン青染色後、まず光学顕微鏡で粘液腺を観察した。なお、トルイジン青染色では染色度の濃淡によって粘質物の充満度の違いが判別出来、内部の膜状物質も好染される (奥田ら 1979)。内部に袋状の膜状物質を有する粘液腺や、粘質物を有する粘液腺の連続切片のすべてにおいて、それぞれ膜状物質または、粘質物が観察されるのみである。透明な粘液腺はすべて透明な状態のままであった。以上の観察から得られた結果による粘液腺内部の膜状物質や粘質物のあり方の差異は試料を切片にする段階での切断面の違いではなく、個々の粘液腺の粘質物の分泌、蓄積に関係することが判明した。また、小さい粘液腺は連続切片5枚で一方の末端から他方の末端に達し、大きいものでは連続切片が17枚にわたるものもあり、平均すると10枚前後である。従つて、粘液腺の直径はだいたい50 μm 前後が多いといえる。

電顕により粘液腺の微細構造を観察すると、今回の試料である成熟粘液腺の細胞内には、表層や皮層細胞内に見られた葉緑体や核等の小器官は確認されなかった。しかし、不明瞭ではあるがゴルジ体像と考えられるものと、粘質物の分泌、蓄積の様々な様態を示すと考えられる構造が観察される (Figs. 8~13)。

ある粘液腺の細胞質周辺部では粘質物はまばらな状態で観察され、中央部では密度が高い。しかし、均質な密度ではなく、電子密度を異にする粘質物が球状をなして袋状の小胞様構造単位で見られ、より高濃度な粘質物が部分的に黒い塊状に観察される (Fig. 8)。別の粘液腺では細胞壁近くの薄い膜状物質の一部は非連続的であり、一部は連続している。細胞内部の状態を拡大してみると (Fig. 9)、粘質物は電子密度中等度な

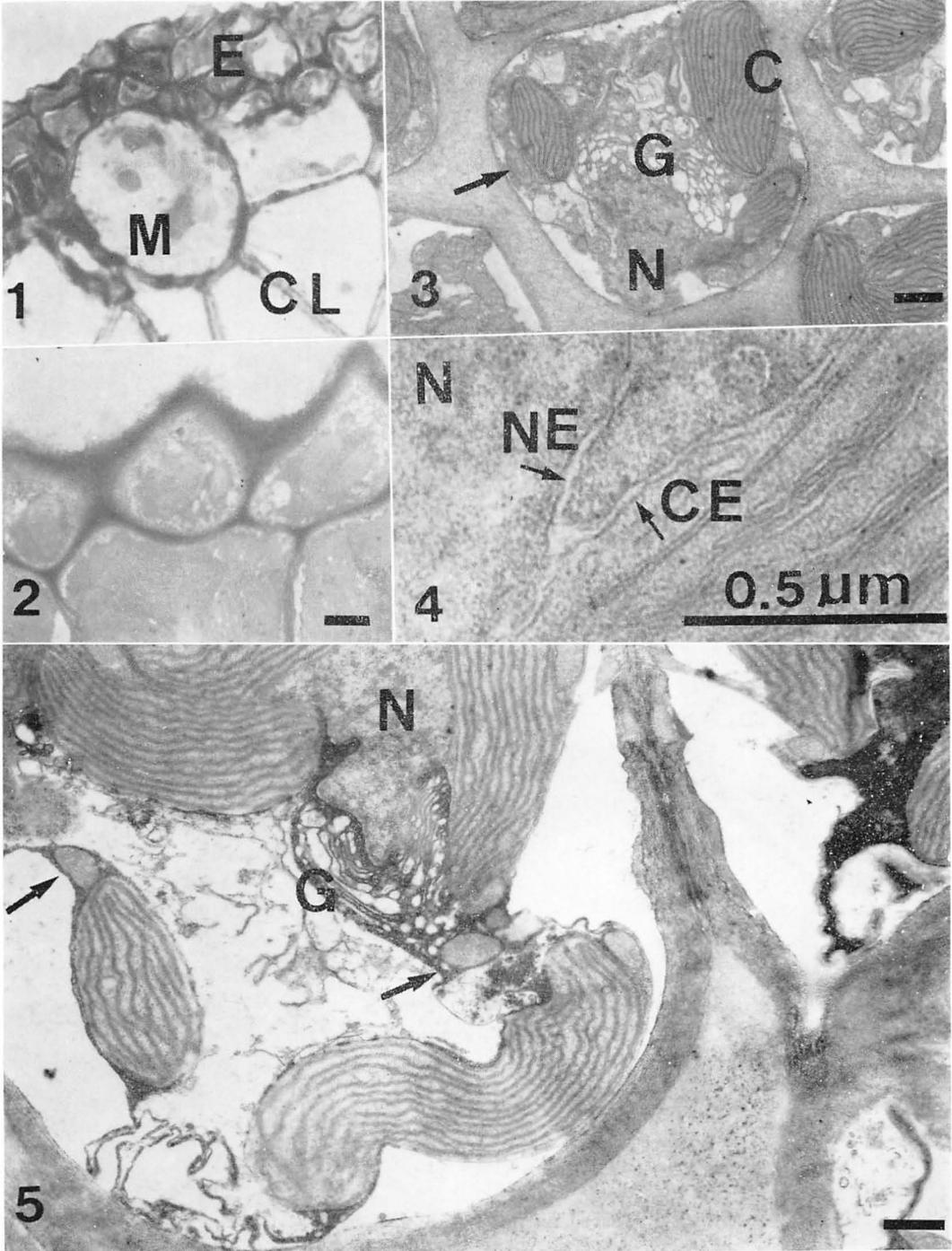


Fig. 1. Light micrograph of epidermal (E), cortical (CL) layer cells and mucilage gland (M). $\times 500$. Fig. 2. Electron micrograph of epidermal layer cells. Fig. 3. Epidermal cells near the cortical layer. Nucleus (N), mitochondria (\dagger), some chloroplasts (C) and Golgi body (G) are noticed. Fig. 4. Chloroplast ER (CE), connecting with nuclear envelope (NE). N: Nucleus. Fig. 5. In the cytoplasm of cortical cell, mitochondria mainly seen at the end portion of the chloroplast (\dagger). Golgi body (G) near the nucleus (N). (Scales in Fig. 2, 3, 5. $1 \mu\text{m}$.)

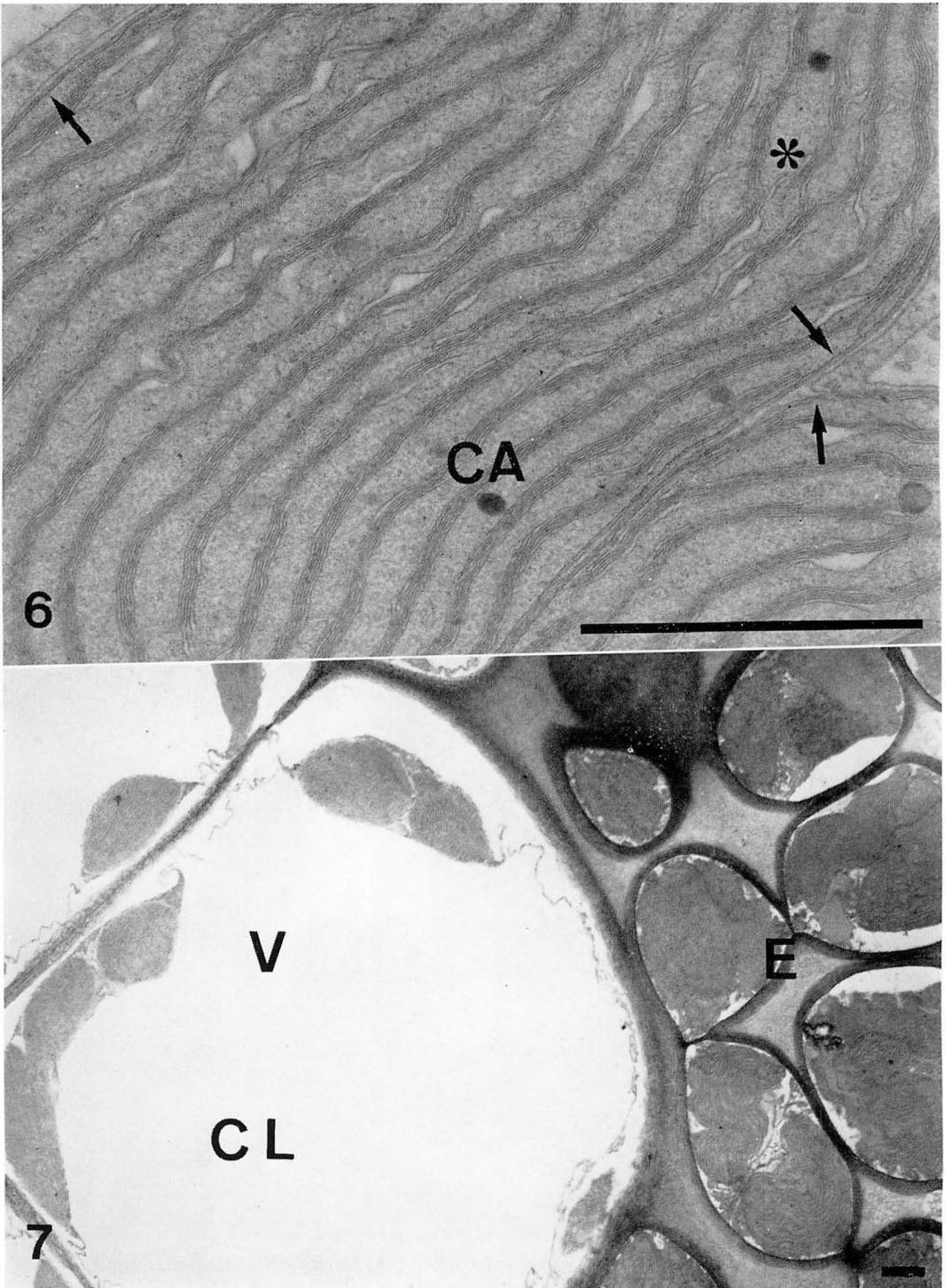
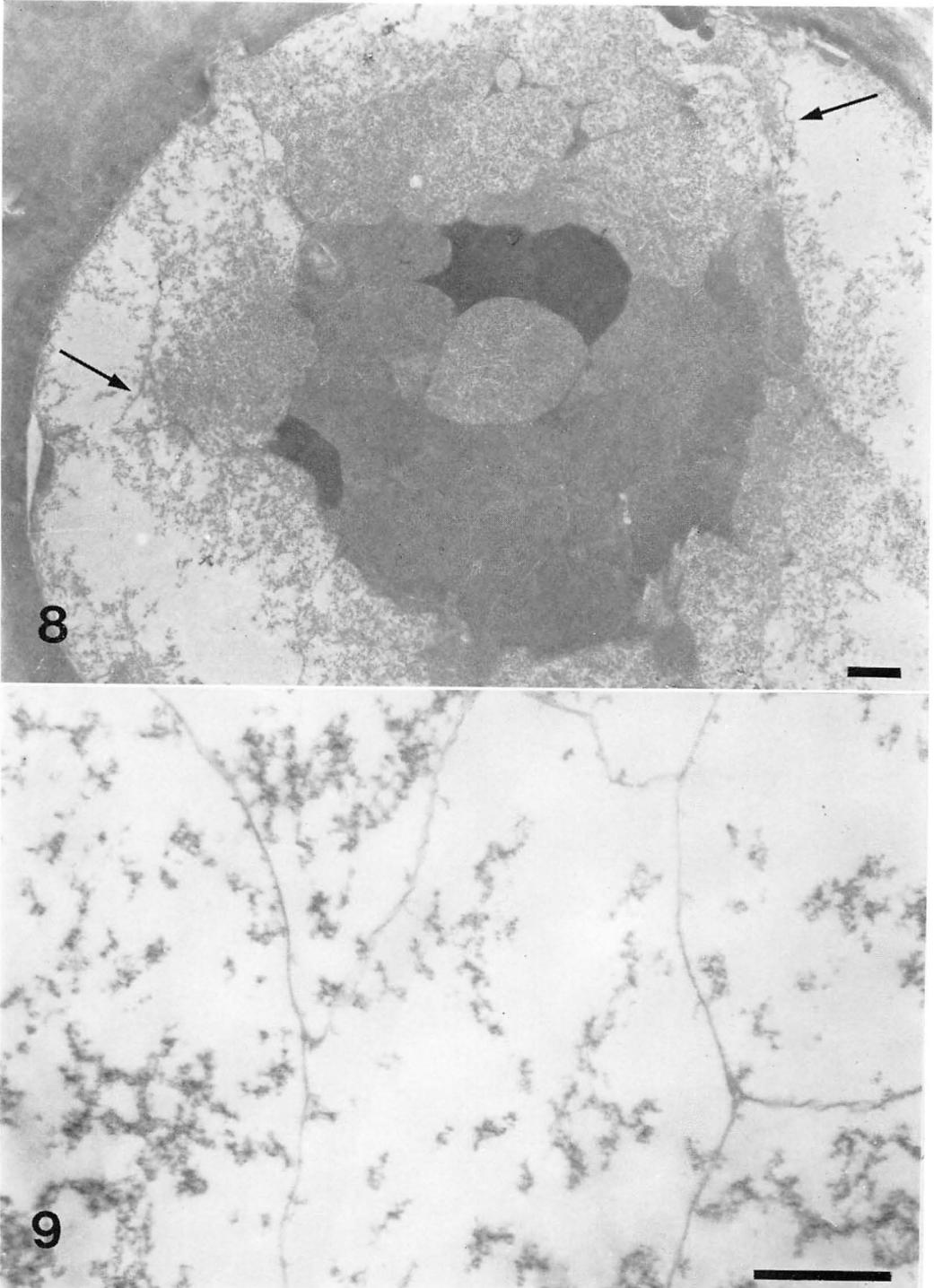


Fig. 6. The chloroplasts surrounded by the double layer membranes (chloroplast membrane †). A lamellar band formed by three thylakoids and some thylakoids are connecting each other in some portion (*). Carotenoids (CA) are also noticed. Fig. 7. In the dilatated cortical layer cells (CL), vacuole (V) occupies greater part of the cytoplasm. E: epidermal layer. (Scale $1\ \mu\text{m}$.)



Figs. 8-9. Electron micrographs of the mucilage gland. 8. Various dense materials surrounded by membrane system at the center of this gland. Uncontinuous membrane (\uparrow) observed peripheral area of the gland. 9. In this gland amorphous materials seen in the membrane system. (Scale $1\ \mu\text{m}$.)

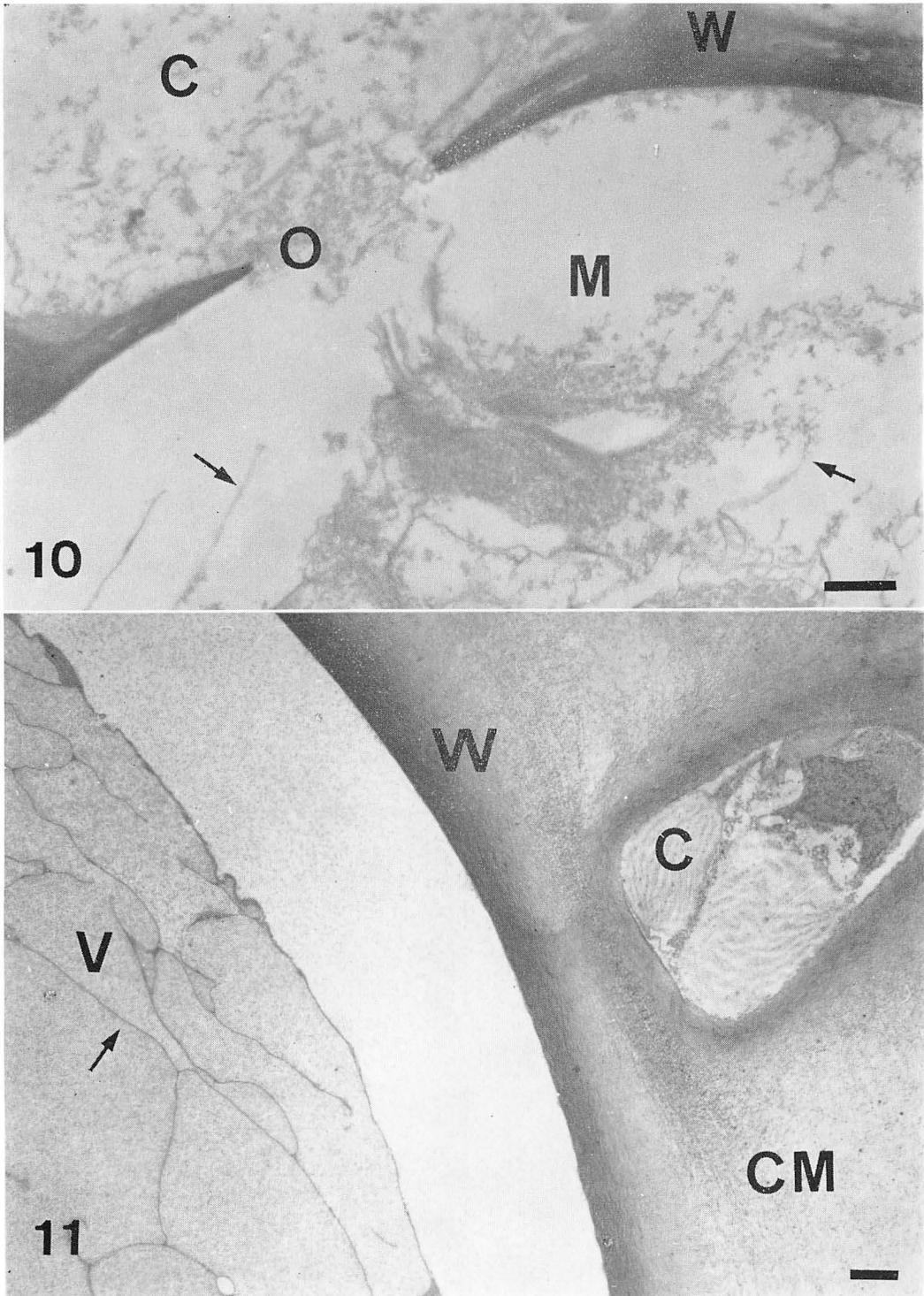


Fig. 10. The mucilage gland (M) connected with neighboring cell (C) through opening (O) of the cell wall (W). Uncontinuous membrane (↑) are observed. 11. This mucilage gland consist of small sac like structure (V), and no dense materials are observed. C: Cut surface of other cell. CM: cell matrix. (Scale $1\mu\text{m}$.)

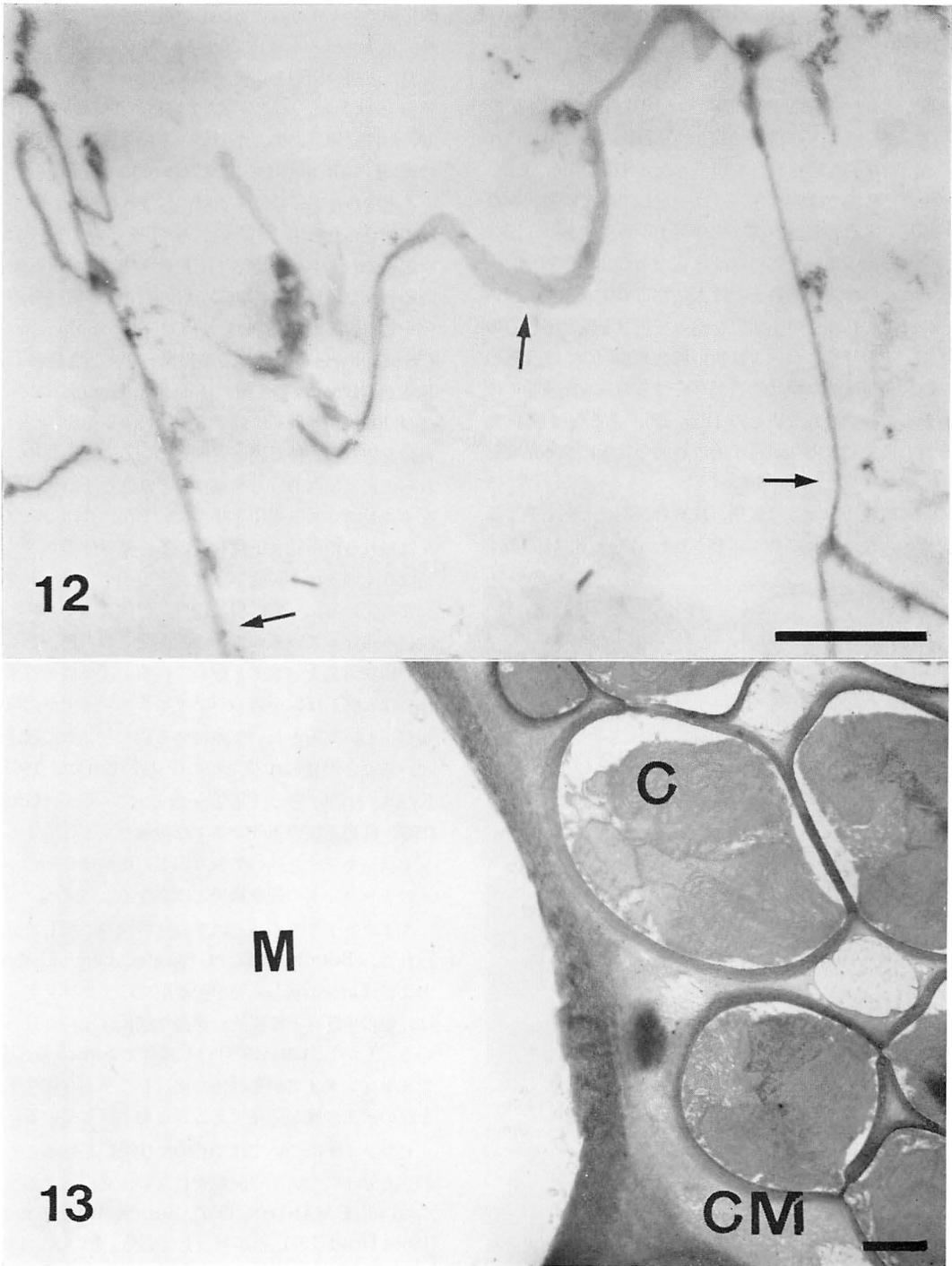


Fig. 12. Some part of membrane system of the mucilage gland. Arrows show continuous part of the membrane. 13. Some mucilage gland (M) show empty contents with out any membrane nor materials. C: Cut surface of other cell. CM: cell matrix. (Scale 1 μ m.)

無定形の物質であり、連続した薄い膜状物質で区切られている。この粘液腺では Fig. 8 に見られた高密度で黒い塊状になった粘質物は観察されなかった。粘液腺と、これに隣接する細胞とは約 $0.3 \mu\text{m}$ の細胞壁の開口部を通して連絡しており、粘質物の移動が見られる。断片的な膜状物質も観察される (Fig. 10)。また、他の粘液腺では大きさ、形は一定していない袋状物質が互いに密着し、内部はやや電子不透明である。図は一部分を示すが全体はほぼ球状である (Fig. 11)。

これらの膜状物質または、粘物質の生成過程については現在粘液腺の生活史を追って観察を続けているので、その詳細については次の機会に譲りたい。その他、非連続的な膜状物質が存在するのみで粘質物のほとんど観察されないもの (Fig. 12)、あるいは膜状物質も消失し、内部が電子的に透明な状態にある粘液腺も観察された (Fig. 13)。

粘液腺の細胞壁は表層、皮層の細胞壁と同じ微小繊維からなる網目構造が観察された (Figs. 8, 11, 13)。

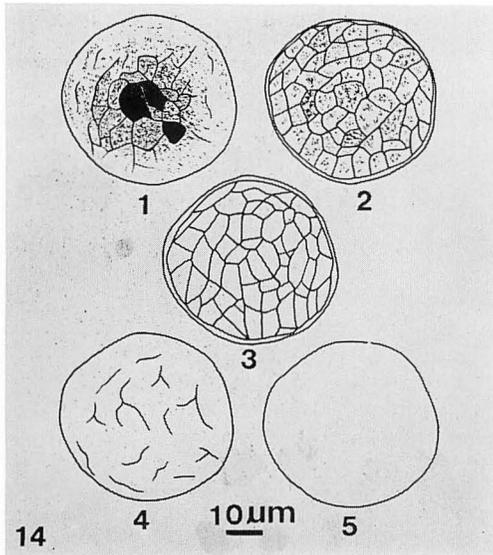


Fig. 14. Schematic drawing of the mucilage gland showing different stages of the development.

考 察

表層の1層目の細胞は一般に多角～不定形な場合が多く、直接海水に触れる外壁は肥厚して波状形をしている。2～3層目の細胞質の構造は他の組織に比較して最も緻密である。表層、皮層、粘液腺の細胞壁は微小繊維からなる網目構造が観察される。その主成分はサフラン液、ライトグリーン液に好染すること、

酸化銅アンモニアによる反応が陽性であること等により、セルロースと考えられる (奥田ら 1977)。皮層の細胞は表層の細胞と比較すると数倍の大きさであり、葉緑体は表層、皮層ともに1細胞に普通5～6個存在し、形は紡錘形の場合が多い。その大きさは高等植物の葉緑体 (ROBARDS 1970, GEOFFREY 1970) とほとんど変わらない。核は二重膜に包まれており、核小体は1個見られる場合が多い。核外膜が伸びて葉緑体を包みこむクロロプラスト ER を形成している像も認められた。GIBBS (1962) は核の外膜と葉緑体の外側を包む膜との連続性を初めて Chrysophyceae や Cryptophyceae に属する藻類について記載した。BOUCK (1965) は褐藻類の Fucales, Laminariales および Ectocarpales に属する植物の膜構造を調べ、葉緑体を包む膜が核外膜と連続していることを認め、これらの褐藻類における葉緑体をとり囲む小胞体の膜系をクロロプラスト ER と呼んでいるが、今回の観察結果はこれらの所見と一致している。葉緑体のラメラ構造は6本のラメラが観察され、三重のチラコイドでなりたっている。一般に褐藻類の葉緑体ではラメラが数段積み重なっているためその断面像として見られる数層の層状構造をバンドと称しているが、ワカメの葉緑体ではしばしば、一方のバンドのチラコイドが比較的規則正しい間隔をおいて隣接する別のバンドに連絡していることが見られる。この所見は BOUCK (1965), EVANS (1966) らの所見と一致しているが、GIBBS (1962) は褐藻類のチラコイドは接触せず平行に走るバンド構造を示すと述べており、この所見は今回のワカメのチラコイドの観察結果とは異なると言える。

ミトコンドリアの多くは葉緑体の両端に接して認められた。BOUCK (1965) は Fucales, Laminariales, および Ectocarpales 等の褐藻類ではミトコンドリアは、他の小器官と位置的に密接な関係はないと言っている。しかし、CHI (1977) は褐藻類の Sphacelariales でミトコンドリアが葉緑体に接近して多く存在するのを認め、光合成が活発であることを示唆している。

ピレノイドについては SIMON (1954) が始めてその形態と分布についての記載を行ない、その電顕的所見については MANTON (1957), BOUCK (1965), EVANS (1966), HORI (1971) らが報告している。EVANS (1966) は褐藻類におけるピレノイドの分布には系統発生的な意義があり、分化の進んだものには認め難いことを指摘している。HORI (1971) は本邦における多くの褐藻類のピレノイドの有無を調べて、同形配偶子および異形配偶子による生殖を行なうものはピレノイドを有し、

卵受精を行なうものはピレノイドを有しないと述べ、ワカメについては rudimentary pyrenoid の存在を示した。

内皮層の細胞では細胞小器官の変形や退化が見られ、液胞が細胞内の大部分を占めている。これは細胞の老熟現象を示していると考えられる。

これまでのワカメの表層、皮層細胞の観察により、褐藻類に見られる特徴のいくつかを今回の試料においても認めることが出来た。すなわち、核の近くに存在するゴルジ体集団、核外膜が伸びて葉緑体を包みこむクロロプラスト ER の形成、6本のラメラからなる三重のチラコイドが1枚のバンドを形成し、バンドの側方への移行、ピレノイドの退化の可能性、葉緑体とミトコンドリアの密接な関係等である。

成熟した粘液腺の大きさは小さいもので直径25 μm 、大きいものでは直径85 μm にもなる。平均して直径50 μm 前後で表層、皮層の細胞に比較してはるかに大きい。内部には葉緑体や核等の小器官は確認されなかった。先に述べた通り粘液腺の内部構造に種々な状況が観察された。これをまとめると次のようになる。

(1) 粘液腺内部に粘質物が充満しており、中央部の粘質物の密度が高い。しかし、一定した密度ではなく、電子密度を異にする粘質物が袋状の小胞様構造単位で見られ、より高濃度な粘質物が部分的に黒い塊状に観察される。細胞壁に近い膜状物質は断片的である (Fig. 8, Fig. 14-1)。

(2) 粘液腺内部が膜状物質で区切られ、中に中等度な電子密度を有する不定形な粘質物が粗に存在している (Fig. 9, Fig. 14-2)。

(3) 薄い袋状の膜状物質が密着して集合し、全体がほぼ球状を呈していて、内部はほぼ透明である (Fig. 11, Fig. 14-3)。

(4) 非連続的な膜状物質が観察され、断片的な膜が存在するのみで粘質物はほとんど見られない (Fig. 12, Fig. 14-4)。

(5) 膜状物質、および粘質物も消失し、内部が電子的に透明な状態にあるもの (Fig. 13, Fig. 14-5) 等である。

また、粘液腺と粘液腺に隣接する細胞は細胞壁の約0.3 μm の開口部を通して粘質物の移動が見られる像も認められた。

これら粘液腺の内部構造の差異は、粘質物の分泌、蓄積、排出等の様々な過程段階を示すものと考えられる。しかし、ワカメの粘液腺の形態形成、およびどの様なサイクルで粘質物の分泌、排出等が行なわれてい

るのか不明な点が残されている。これまでに得られた結果を基盤として、現在ワカメの生活史を追って粘液腺の発達段階の観察を続けている。

終りに、御指導を頂いた筑紫女学園短大、川上いつゑ教授、本稿の御校閲を賜った九州大学、塚原博教授、奥田武男助教授、および研究に対して多大の便宜をはかって頂いた広大原医研、岡本直正教授、佐藤幸男助教授に深く感謝申し上げる。

引用文献

- BOUCK, B. 1965. Fine structure and organelles associations in brown algae. *J. Cell. Biol.* **26**: 523-537.
- CHI, B. G. 1977. Fine structure of vegetative cells of *Sphacelaria tribuloides* MENEGH. with special reference to some unusual proliferations of the plasmalemma. *Phycologia* **16**: 139-151.
- EVANS, L. V. 1966. Distribution of pyrenoids among some brown algae. *J. Cell. Sci.* **1**: 449-454.
- GEOFFREY, H. B. 1970. Division of labor in cells. Academic Press, Inc. New York.
- GIBBS, S. P. 1962 a. Nuclear envelope chloroplast relationships in algae. *J. Cell. Biol.* **14**: 433-444.
- GIBBS, S. P. 1962 b. The ultrastructure of the pyrenoids of algae exclusive of the green algae. *J. Ultrastruct. Res.* **7**: 247-261.
- HORI, T. 1971. Survey of pyrenoid distribution in brown algae. *Bot. Mag. Tokyo* **84**: 231-242.
- MANTON, I. 1957. Observations with the electron microscope on the internal structure of the zoospore of a brown alga. *J. Exp. Bot.* **8**: 294-303.
- 奥田弘枝・請川琴子 1977. ワカメに関する研究 (第1報). ワカメの一般組織と β -carotene について. 広島女学院大学論集 **27**: 131-144
- 奥田弘枝・請川琴子 1979. ワカメの粘液腺について. 主として連続切片法による所見. 広島女学院大学論集 **29**: 179-189.
- ROBARDS, A. W. 1970. Electron microscopy and plant ultrastructure. p. 110-115, 183-193. McGraw-Hill. England.
- SIMON, M. F. 1954. Recherches sur les pyrenoides des Phéophycées *Revue Cytol. Biol. Vég.* **15**: 73-105.