

多核緑藻キッコウグサの細胞同士を連結する付着細胞の誘導要因

奥田一雄^{1*}・関田諭子¹・高野友子²・的野はる奈³・郷裕絵³¹ 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 高知大学理学部自然環境科学科 (〒780-8520 高知市曙町二丁目 5-1)

Kazuo Okuda^{1*}, Satoko Sekida¹, Tomoko Kohno², Haruna Matono³ and Hiroe Goh³: Factors essential for inducing tenacula between neighboring cells in the marine coenocytic green alga *Dictyosphaeria cavernosa*. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 68: 125-133, November 10, 2020

Factors to induce the development of the small cells called tenacula that fasten neighboring daughter cells in the coenocytic green alga *Dictyosphaeria cavernosa* were examined. Daughter cells divided by segregative cell division increased in diameter, came in contact with each other and were united by producing tenacula between them. Daughter cells taken out of the mother cell produced tenacula when they were packed and cultured in a sack made of *Boergesenia* or *Valonia* cell wall. Daughter cells that produced tenacula decreased depending on increase in time after segregative cell division. Daughter cells produced tenacula by adhering to substrata with hydrophobic surfaces such as glass beads but not by adhering to hydrophilic substrata like agar blocks. Contact with living *Valonia* or *Boergesenia* cells made daughter cells produce tenacula. When daughter cells were kept floating on the surface of culture medium, they produced tenacula along the boundary between water and air. Daughter cells could recognize the interface between hydrophobic and hydrophilic properties for tenacula forming sites. Tenacula in *Dictyosphaeria* were divided from daughter cells by septa, therefore, equivalent to small lenticular cells in *Valonia*. This suggests that *Dictyosphaeria* has two distinct modes of cell division, segregative cell division and lenticular cell formation.

Key Index Words: daughter cells, *Dictyosphaeria cavernosa*, interface between aquatic and hydrophobic conditions, multicellularity, positional information, segregative cell division, tenacula.

¹Graduate School of Kuroshio Science, 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

³Department of Natural Environmental Sciences, Faculty of Science, Kochi University, 2-5-1 Akebono-cho, Kochi 780-8520, Japan

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

緒言

キッコウグサ (*Dictyosphaeria cavernosa* (Forsskål) *Børgesen*) はアオサ綱シオグサ目に属する海産の多核緑藻で、熱帯から温帯の潮間帯下部または潮下帯上部に生育する (吉田 1998, 田中・中村 2004, 神谷 2012)。キッコウグサは分割細胞分裂という特有の細胞分裂を行う (*Børgesen* 1912, 1913)。分割細胞分裂により、母細胞の原形質全体が数個以上のプロトプラストへ同時に分割・分離し、それらのプロトプラストのそれぞれが細胞壁を形成して娘細胞へと発達する (Enomoto & Okuda 1981, Enomoto *et al.* 1982)。形成初期の娘細胞は母細胞の細胞壁内壁に沿い、互いに離れて分布する。それらの娘細胞は速やかに体積を増加させて拡大成長し、互いに接し合い密着するようになる。その後、隣接する娘細胞の間に付着細胞 (tenaculum; *pl. tenacula*) を形成する (Enomoto & Okuda 1981)。付着細胞は隣り合う娘細胞から交互に形成され、その末端が指状に分岐した付着器 (hapteron; *pl. haptera*) によって反対側の娘細胞表面に強固に接着する (*Børgesen* 1912, 1913, Enomoto & Okuda 1981)。このように、付着細胞が細胞同士を連結することで、キッコウグサの藻体は、細胞がばらばらになることなく、多細胞体制を維持する。しかし、キッコウグサの付着

細胞がどのように形成されるのか、また、付着細胞の形成が誘導される要因については明らかにされていない。付着細胞形成の誘導要因を明らかにすることで、娘細胞が多細胞組織を構築するしくみを理解することにつながる。

キッコウグサでは、形成初期の娘細胞同士が接触して密着することで、それらの間に付着細胞が形成する。本研究では、まず、キッコウグサの娘細胞が付着細胞を形成する能力と細胞分裂後に経過した時間との関係を調べた。接触刺激が付着細胞を誘導する可能性が考えられるので、2つ目に、キッコウグサの娘細胞に種々の基質を接触させ、どのような基質が付着細胞の形成を誘導するかを明らかにした。付着細胞は細胞同士が密着する特定の部位で娘細胞から分裂して形成する。本研究では、キッコウグサの娘細胞を培地表面で浮かべて培養することにより、気中と水中との界面で小細胞の形成を誘導できることを明らかにし、その小細胞が付着細胞に相当することを検証した。そこで3つ目には、付着細胞が特定部位で分裂する機構を明らかにするため、この小細胞形成誘導の実験系を用い、小細胞形成における葉緑体と核の挙動および細胞分裂装置のひとつである微小管骨格の変化を明らかにした。併せて、小細胞形成に微小管の存在が必須であることを、微小管破壊剤アミプロフォスメチル (APM) を用い

て明らかにした。

材料と方法

キッコウグサは1982年7月に高知県夜須町手結海岸で採集した。本研究では、雄性配偶体から放出された配偶子の単為発生体株を用いた。分割細胞分裂後、キッコウグサの母細胞から単離した娘細胞を種々の基質と一緒に入れる袋を調製するため、以下のバロニアとマガタマモを用いた。両種はキッコウグサと同じシオグサ目に属し、数mmに及ぶ大きな細胞に発達するため、顕微解剖操作が容易であった。バロニア (*Valonia utricularis* (Roth) C. Agardh) は米国テキサス大学オースティン校のカルチャーコレクション (UTEX) から得たLB 2357株を用いた (Starr & Zeikus 1987)。マガタマモ (*Boergesenia forbesii* (Harvery) Feldmann) は1987年7月に鹿児島県奄美市笠利町のアママル岬で採集し、細胞内に形成した不動胞子から無性的に発生した藻体を用いた (榎本 1979)。これら3種それぞれの藻体は培養液として栄養強化海水 (Provasoli's enriched seawater = PES, 箱脇 1971) 約200 mL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時間の照明 ($16 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) と10時間の暗黒からなる明暗周期 (明期は午前8時から午後10時まで) の条件で培養した。

キッコウグサの分割細胞分裂を誘導するため、直径約3 mmの単細胞藻体を20–30個体ずつ新鮮培地に移した。移植後3–7日で細胞は分割細胞分裂した。Enomoto *et al.* (1982) によれば、分割細胞分裂は暗期中に始まり、次の明期の初めまでには終了する。分割細胞分裂した藻体は、その日の午前中の中に、分裂した日付を記録して6穴のプラスチック製マイクロプレート (IWAKI, AGC テクノグラス) の穴 (各穴に培養液5 mLを含む) に1個体ずつ移し入れた。このとき、分裂した娘細胞は互いに離れていた。いくつかの藻体は細胞を傷つけずに同じ培養条件で培養を続け、付着細胞の形成の様子を実体顕微鏡で毎日観察した。マイクロプレートへ移したその他の藻体はマイクロプレートの穴の中で、マイクロ剪刀または柄つき剃刀で母細胞の細胞壁を切り開いた (Fig. 1A, B)。ピンセットでつまんだ母細胞の細胞壁を水中で振ることで、娘細胞は母細胞の細胞壁の内側表面から遊離した。このように母細胞から取り出した娘細胞は互いに接しない状態で上記と同一条件で少なくとも2週間培養した。このように培養している間、個々の娘細胞は付着細胞を形成することはなかった。

母細胞から取り出したキッコウグサの娘細胞は、キッコウグサの娘細胞だけではなく、それ以外の基質と一緒にマガタマモまたはバロニアの細胞壁の袋の中に入れて培養した (Fig. 1A–G)。マガタマモの細胞壁の袋を調製するために、長さ5 mm以上のマガタマモの細胞を柄つき剃刀で上部と下部に切断した (Fig. 1C–E)。切断後3–6時間でマガタマモの原形質は多数の不動胞子に分割した (榎本 1979)。上部の細胞壁をピンセットでつまんで水中で振盪し、細胞内部に形

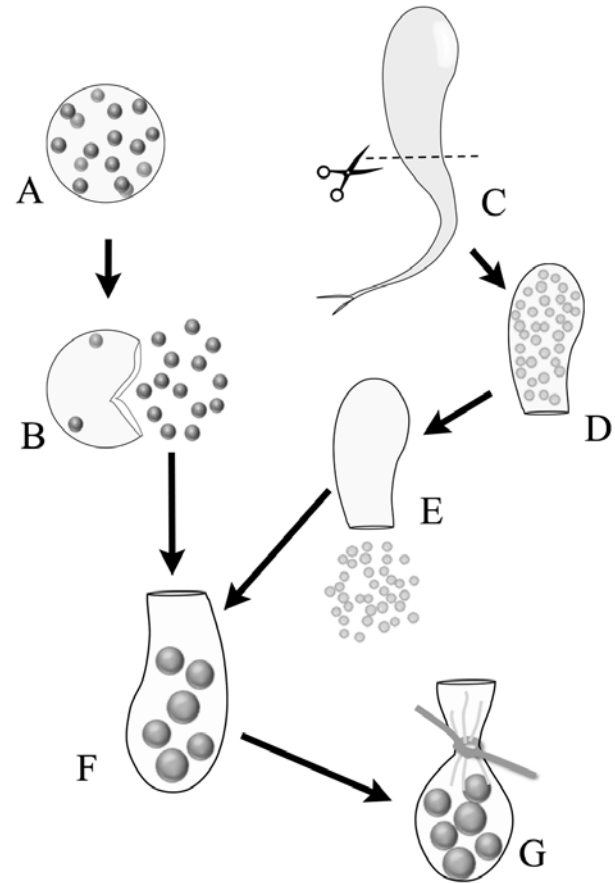


Fig. 1. Schematic representation of methods where the daughter cells of *Dictyosphaeria cavernosa* were packed and cultured in a sack made of the cell wall of *Boergesenia forbesii*. Young daughter cells of *D. cavernosa* after segregative cell division (A) were taken out of the mother cell (B). A cell of *B. forbesii* was cut into upper and lower portions (C). Aplanospores produced in the upper portion (D) were taken out of the portion to obtain a sack of the cell wall (E). The daughter cells of *D. cavernosa* were put into the sack of the cell wall of *B. forbesii* (F). An opening of the sack was closed by tied with a leader (G).

成した不動胞子と原形質などの細胞内容物全部を細胞壁からはずし去った。残った袋状のマガタマモの細胞壁を次の実験で使用した。培地中に遊離した不動胞子は別の実験で使用した。バロニアの袋状の細胞壁もマガタマモの場合と同様に調製した。

分割細胞分裂したその午前中に母細胞から取り出したキッコウグサの娘細胞は、その後、1–14日間、互いに接触させずに離して培養した。それぞれの日数で培養した娘細胞は、マガタマモの細胞壁の袋に3–5個ずつ入れ、袋の入口を1.5号 (直径約0.2 mm) のテグス (銀鱗, 東レ) で縛り、内部の娘細胞同士が接し合うようにした (Fig. 1F, G)。娘細胞を詰めたマガタマモの細胞壁の袋 (各日数の実験区それぞれ6つ) は、培養液を含む6穴のマイクロプレートの穴に移し、その後14日間、付着細胞の形成の有無と形成数を毎日実体顕微鏡で観察・写真撮影した。培養14日目には、マガタマモの細胞壁の袋の中から娘細胞を取り出し、娘細胞の接着面

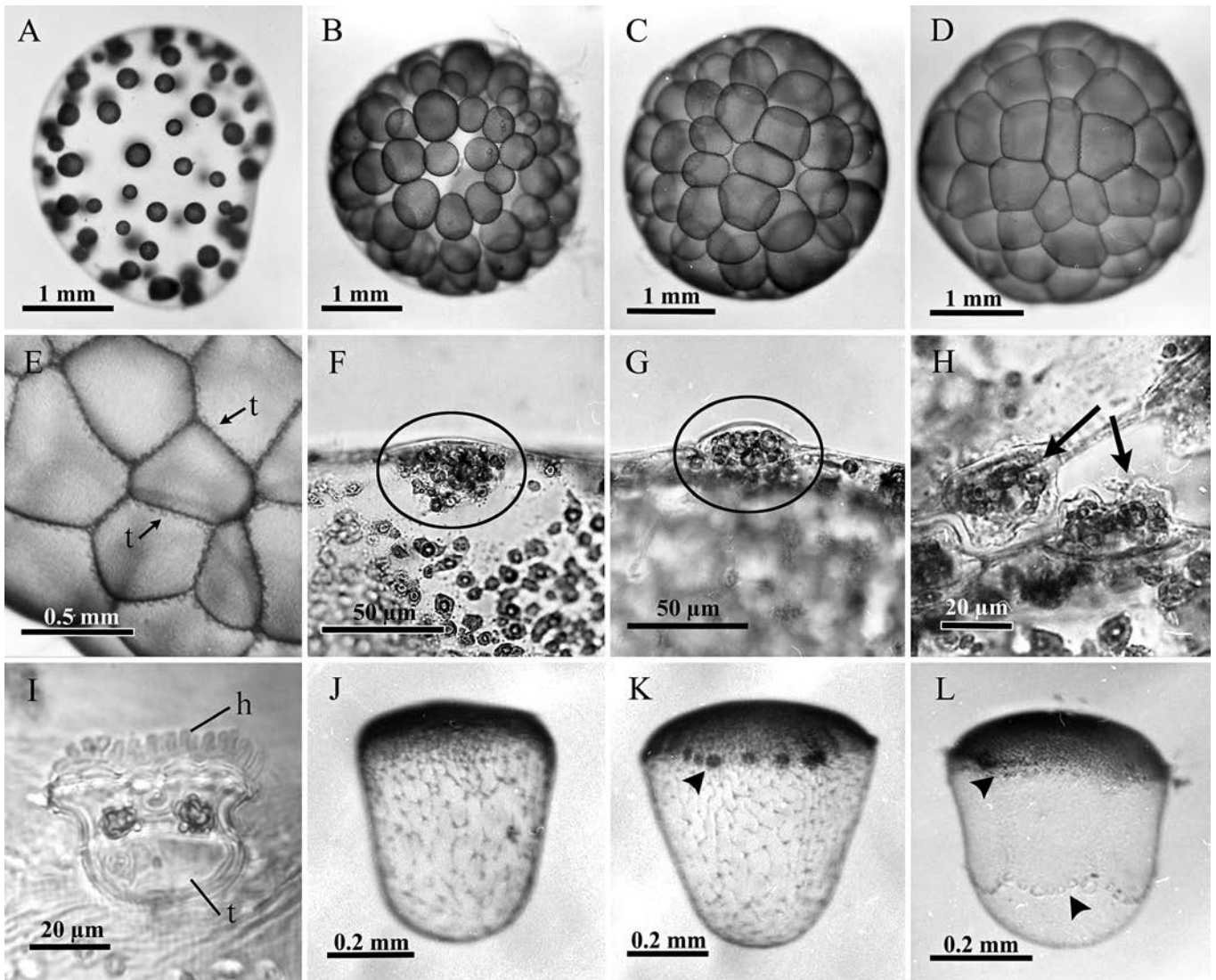


Fig. 2. Daughter cells of *Dictyosphaeria cavernosa* 2 h (A), 1 day (B), 2 days (C), 3 days (D) and 5 days (E) after segregative cell division. F, a part of chloroplasts accumulated (open circle). G, an incipient tenaculum with lenticular shape (open circle). H, intercellular tenacula alternatively fastening neighboring daughter cells together (arrows). I, a tenaculum with finger-like hapteron. Surface views of the lateral sides where daughter cells adhered to each other 2 days (J), 4 days (K) and 7 days (L) after segregative cell division. t, tenaculum; h, hapteron. Arrowheads, rows of tenacula.

に形成された付着細胞を撮影した。同様に、分割細胞分裂後 3, 4, 5 日のキッコウグサの娘細胞 3-5 個をバロニアの細胞壁の袋に入れて 6-9 日間培養した。

キッコウグサの娘細胞を、キッコウグサの娘細胞とは異なる種々の基質に接着させることで、付着細胞の形成が誘導されるかどうかを調べた。分割細胞分裂したその日に母細胞から取り出し、1-2 日培養した娘細胞を用いた。前述と同様の方法により、マガタマモの細胞壁の袋の中に 3-5 個の娘細胞と 3-5 個の基質を入れて互いに接し合うようにテグスで袋の口を縛り、14 日間培養し、娘細胞の表面における付着細胞の形成の有無を観察した。用いた基質は以下の 5 つの種別に分けた。

1. 疎水性表面をもつと考えられる基質：ガラスビーズ（直径 0.5 mm, アズワン）；ジルコニアボール（直径 0.5 mm, ニッ

カトー）；アルミナボール（直径 0.5 mm, アズワン）；ポリスチレン（直径 1.0 mm, 三協化成）；パラフィン（直径 1.0 mm, 米山薬品）。これらは滅菌海水で洗浄後に使用した。

2. 親水性表面をもつと考えられる基質：10% 寒天（寒天末（ナカライ）1 g を 10 mL の温湯で溶解後に凝固させ、1-2 mm 角に細断）；タピオカ（キャッサバ由来デンプンとして、乾燥タピオカ（エスビー食品）を温湯で茹で戻したもの、直径約 2 mm）；コンニャク（コンニャクイモ由来グルコマンナンとして、糸コンニャク（森澤食品）を 1-2 mm 角に細断）；ナタデココ（ココナツ水の酢酸菌による発酵産物であるセルロースとして、ナタデココ（フジッコ）を 1-2 mm 角に細断）。これらはそれぞれ少量を滅菌海水約 100 mL を含むビーカーに入れ、1 日振盪・洗浄した（途中、滅菌海水を 2 回交換）後に使用した。

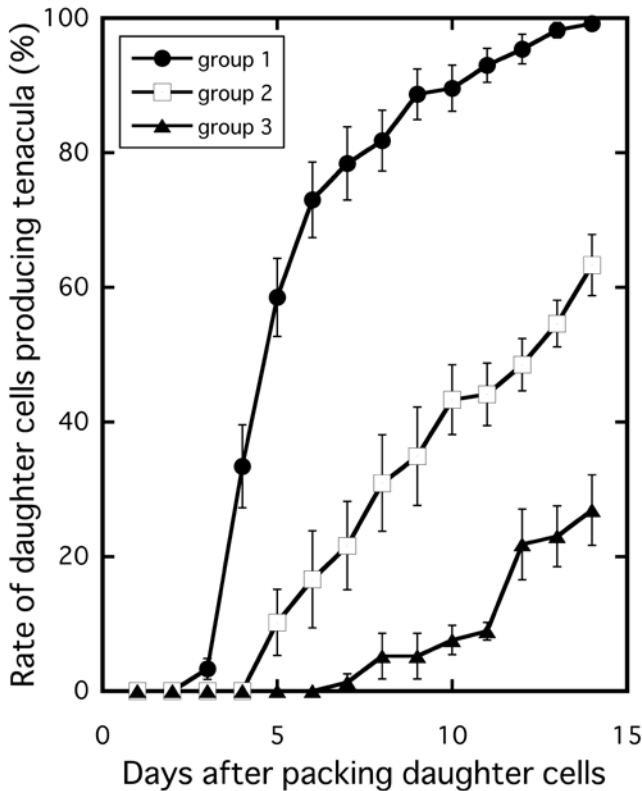


Fig. 3. Increase in the rates of *Dictyosphaeria cavernosa* daughter cells producing tenacula in three different groups. Daughter cells were cultured apart for 2–7 days (group 1, ●), 8–12 days (group 2, □) and 13–15 days (group 3, ▲) after segregative cell division before packing in *Boergesenia* cell wall sacks. Error bars, standard errors.

3. 疎水性表面をもつと考えられる基質をマガタマモの細胞壁で包んだもの：ガラスビーズ2個をそれぞれマガタマモの細胞壁で包んでテグスで口を閉じた。1つは、ガラスビーズの表面がマガタマモの細胞壁の内側に被われるようにした。もう1つは、マガタマモの細胞壁の袋の内側を外側へひっくり返し、ガラスビーズの表面が細胞壁の外側に被われるようにした。それぞれをキッコウグサの娘細胞とともに、もう1つの大きなマガタマモの細胞壁の袋の中に双方が接し合うように入れ、口を閉じた。

4. ホルマリン固定したキッコウグサの娘細胞：キッコウグサの娘細胞を、4%ホルムアルデヒドを含む滅菌海水で2分間固定し、その後、滅菌海水で10分おきに液を交換して10回洗浄した。このように固定処理したキッコウグサの娘細胞を、無処理の生きているキッコウグサの娘細胞とともにマガタマモの細胞壁の袋の中で培養した。

5. キッコウグサの娘細胞以外の細胞：マガタマモの細胞壁を調製する方法で記載したように、マガタマモの細胞の切断後に母細胞から取り出し、1日培養した直径約0.5 mmの不動胞子を用いた。同様に、バロニアの細胞を切断し、プロトプラストから形成した直径約1 mmの細胞を用いた。

キッコウグサの娘細胞を固体基質に触れさせず、付着細胞

の形成を試みた。分割細胞分裂したその日の午前中に母細胞から娘細胞を取り出した。分裂後1, 2, 3日でその娘細胞をピンセットで水面上に引き上げ、娘細胞の一部が気中に触れるように、細胞を浮かべて培養した。水中と気中の境界に沿って娘細胞の表面に付着細胞と同様の形態をもつ小細胞が形成した。この小細胞が形成する過程における娘細胞の葉緑体と核の挙動および微小管細胞骨格の変化を明らかにした。また、微小管破壊剤アミプロフォスメチル (APM) の小細胞形成に及ぼす効果を調べた。DAPIによる核染色と微小管細胞骨格の蛍光顕微鏡観察およびAPMの処方のための方法は、Okuda *et al.* (1997) に従った。

結果

1. 付着細胞の形成過程と形態

分割細胞分裂の終了直後の娘細胞は母細胞壁の内側に沿って分布し、互いに離れていた (Fig. 2A)。娘細胞は拡大成長し (Fig. 2B)、分割細胞分裂後2日で接し合うようになり (Fig. 2C)、分裂後3日で隣接する細胞同士で密着した (Fig. 2D)。分割細胞分裂後5–6日で、隣接する娘細胞の接着面の縁に付着細胞 (t) が形成した (Fig. 2E)。付着細胞が形成する部位では、娘細胞の原形質が局所的に集合した (Fig. 2F)。原形質が集合した部位の娘細胞の細胞壁が凸レンズ状に隆起し、隔壁によって娘細胞から分離して付着細胞になった (Fig. 2G)。付着細胞は向かい合う娘細胞から交互に形成され (Fig. 2H)、その末端は指状に分岐した付着器 (h) となり (Fig. 2I)、隣接する娘細胞の表面に固着した。接着し合った娘細胞をピンセットで分離すると、分割細胞分裂後2日では付着細胞は形成されていなかった (Fig. 2J) が、分割細胞分裂後4日で、娘細胞同士が接着している上側の側面に付着細胞の列が観察された (Fig. 2K)。分割細胞分裂後7日で、付着細胞の列は、娘細胞の下側の接着側面にも形成された (Fig. 2L)。

2. 娘細胞の付着細胞形成能力と分割細胞分裂後の経過時間との関係

分割細胞分裂後に母細胞から娘細胞を取り出し、互いに分離させたままで1–14日培養した。一定日数培養後、それらのキッコウグサの娘細胞をマガタマモまたはバロニアの細胞壁の袋に入れて14日間培養すると娘細胞は拡大成長して互いに接着し合った。分割細胞分裂後2日から15日までにマガタマモまたはバロニアの細胞壁の袋の中に入れて培養した娘細胞は付着細胞を形成した。しかし、付着細胞を形成した娘細胞の割合が増加するパターンは、分割細胞分裂後に娘細胞をマガタマモの細胞壁の袋に入れるまでに互いに分離して培養した日数によって3グループに分けられた (Fig. 3)。

グループ1は分割細胞分裂後2–7日の娘細胞で (Fig. 4A–C)、3つのグループの中でもっとも早期に付着細胞を形成し始め、14日間の実験終了までにほとんど全ての娘細胞が付着細胞を形成した (Fig. 3, ●)。分割細胞分裂後8–12日経過したグループ2の娘細胞は (Fig. 4D–F)、細胞壁の袋に入

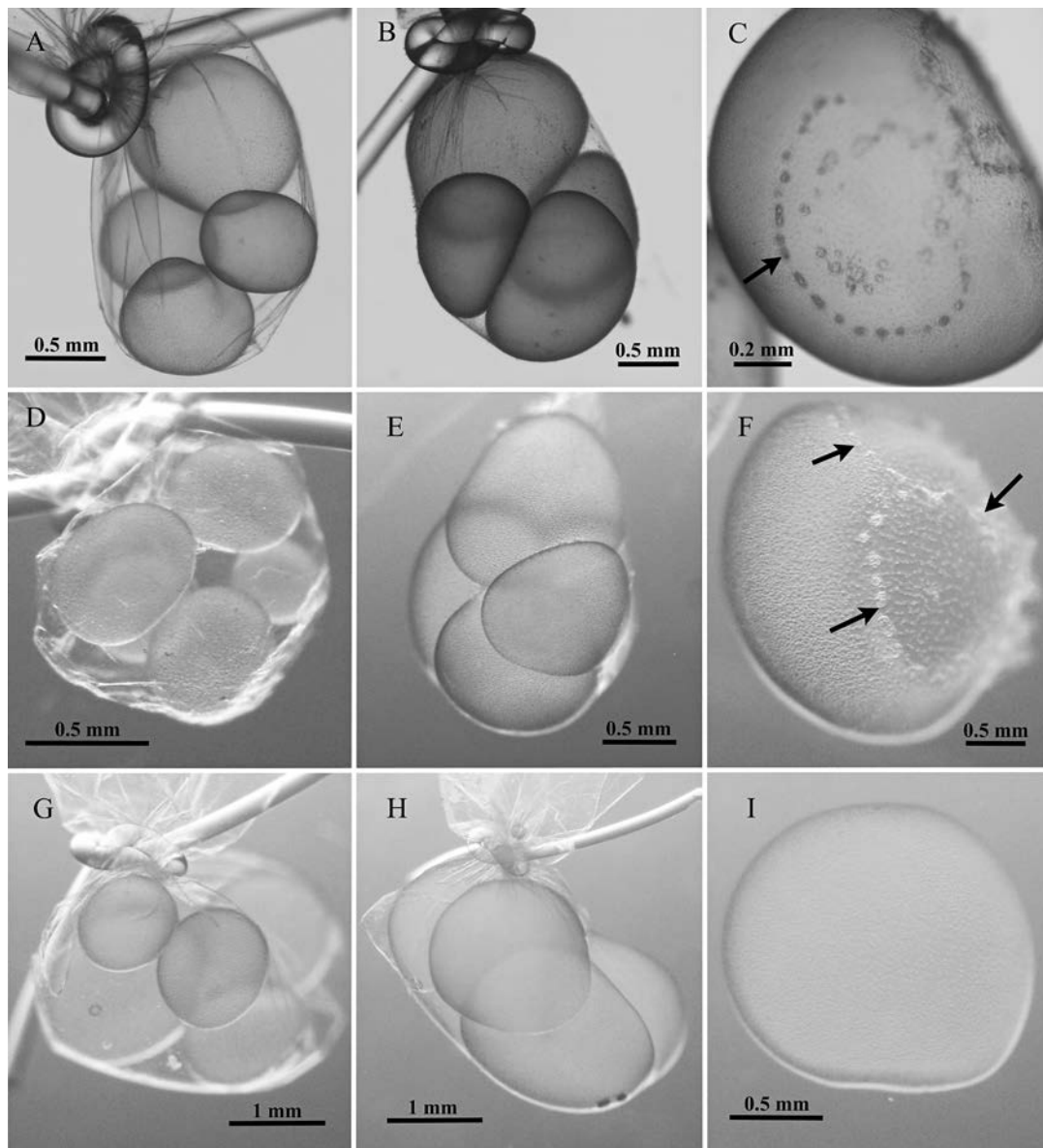


Fig. 4. Tenacula produced by appressing daughter cells of *Dictyosphaeria cavernosa* to each other in *Boergesenia* cell wall sacks. As a group 1, daughter cells 7 days after segregative cell division (A) were cultured for 14 days (B, C). Artificially splitting adhering daughter cells in B into the separate individuals shows tenacula that were produced between the daughter cells that adhered together (C). As a group 2, daughter cells 12 days after segregative cell division (D) were cultured for 14 days (E, F). Tenacula produced between daughter cells adhering to each other (F). As a group 3, daughter cells 15 days after segregative cell division (G) were cultured for 14 days (H, I). No tenaculum produced between adjacent daughter cells (I). Arrows, tenacula.

れた後5日で付着細胞を形成し始め、14日までに約6割の娘細胞が付着細胞を形成した (Fig. 3, □)。グループ3の娘細胞は分割細胞分裂後13–15日経過し (Fig. 4G–I)、付着細胞を形成し始めるまで少なくとも7日を要し、また、付着細胞を形成する娘細胞の割合がもっとも小さかった (Fig. 3, ▲)。

3. 付着細胞形成の誘導におけるキッコウグサの娘細胞以外の基質との接着の効果

キッコウグサの娘細胞とキッコウグサの娘細胞以外の基質を接着させてマガタマモの細胞壁の袋に入れ、キッコウグサの娘細胞に付着細胞が形成されるかどうかを調べた。キッコ

ウグサの娘細胞は、表面が疎水性と考えられるガラスビーズ (Fig. 5A, B)、ジルコニアボール (Fig. 5C, D)、ポリスチレン、アルミナ、パラフィンのそれぞれとの接着面の縁に沿って付着細胞を形成した。

マガタマモの細胞壁で包んだガラスビーズをキッコウグサの娘細胞とともにマガタマモの細胞壁の袋に入れて培養した (Fig. 5E)。キッコウグサの娘細胞は、ガラスビーズを包んだマガタマモの細胞壁外表面または細胞壁内表面との接着面に沿って付着細胞を形成した。

上記の種々の基質に対し、親水性基質と考えられる寒天 (Fig. 5F)、タピオカ (Fig. 5G)、糸コンニャク、ナタデココ

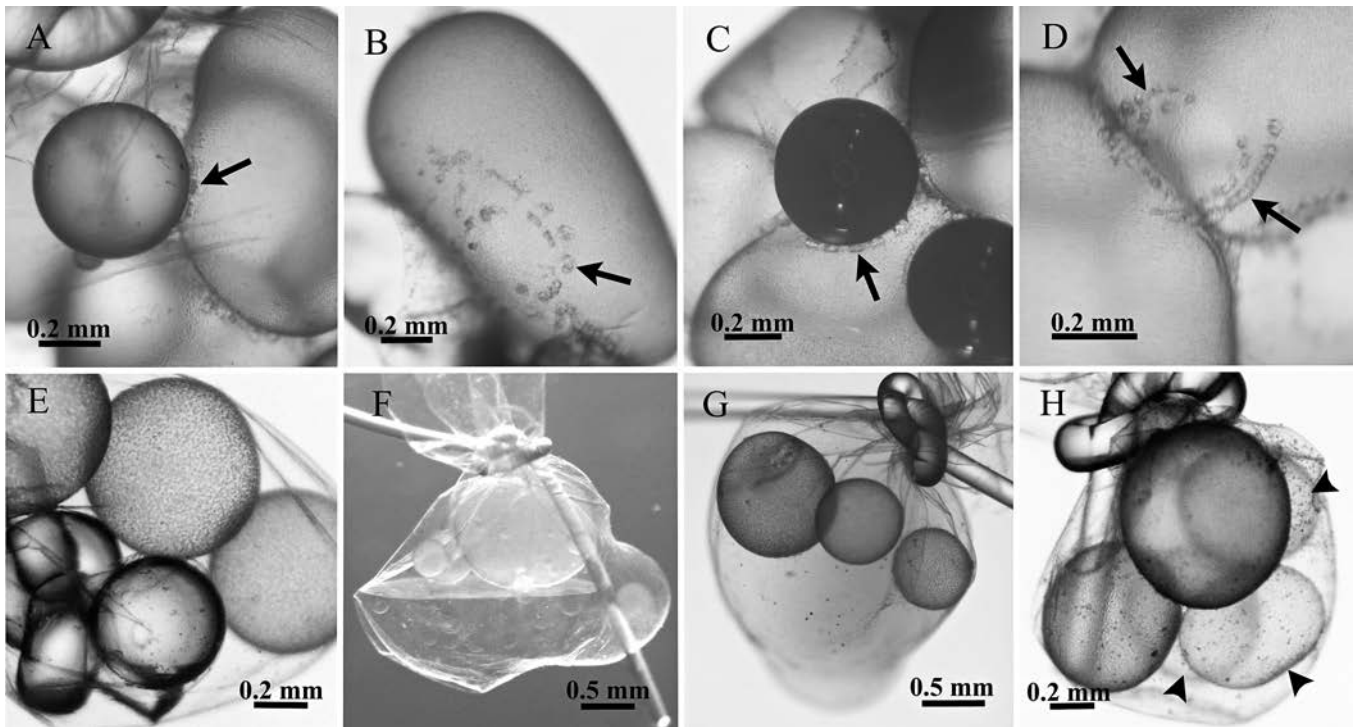


Fig. 5. Daughter cells of *Dictyosphaeria cavernosa* were put together with different substrata in *Boergesenia* cell wall sacks and cultured for 14 days. Daughter cells were brought into contact with hydrophobic surfaces of substrata such as glass beads (A) and zirconia balls (C) and produced tenacula along peripheries of the contact surfaces with glass beads (B) and zirconia balls (D) 15 days after beginning of culture. Tenacula produced between daughter cells and glass beads wrapped in a *Boergesenia* cell wall sack not inside out (E). No tenaculum on daughter cells was induced by contact with hydrophilic substrata agar blocks (F), tapioca balls (G) and dead daughter cells (arrowheads) fixed with fixation (H). Arrows, tenacula.

のいずれも娘細胞に付着細胞の形成を誘導しなかった。さらに、固定したキッコウグサの娘細胞を、生きているキッコウグサの娘細胞とともにマガタマモの細胞壁の袋に入れて培養したが、付着細胞は形成されなかった (Fig. 5H)。

プロトプラストから再生したバロニアの細胞をキッコウグサの娘細胞と一緒にマガタマモの細胞壁の袋に入れて培養した (Fig. 6A)。バロニアの細胞に接着していたキッコウグサの細胞表面に付着細胞が形成された (Fig. 6B)。バロニアの細胞表面からはキッコウグサとは異なるレンズ状の付着細胞 (fibula, *pl.* fibulae) が形成された (Fig. 6C)。マガタマモの不動細胞とキッコウグサの娘細胞をマガタマモの細胞壁に入れて培養すると (Fig. 6D)、キッコウグサの細胞表面に付着細胞ができた (Fig. 6E)。マガタマモの細胞表面には新たな細胞は形成されなかったが、細胞の一部が伸長した (Fig. 6F)。

4. 水中と気中の境界における小細胞の形成

分割細胞分裂後1日の娘細胞を培養液の水面に浮かべて培養した (Fig. 7A)。浮かべた後1日で細胞の気中に露出している部分の葉緑体の分布が疎になった。その後1-3日で水中と気中の境界に沿って葉緑体が集合する部位がいくつかでき (Fig. 7B)、その葉緑体の集合部位から、付着細胞と類似するレンズ状の小細胞が形成された (Fig. 7C)。分割細胞分裂後1日、2日、3日の娘細胞が5日間水面に浮かべられたと

きに形成した小細胞の数は、娘細胞1つあたり平均してそれぞれ7, 11, 4個であった。これらの小細胞は、娘細胞を7日以上水面で浮かべておくと、仮根のように先端が伸長した (Fig. 7D)。

個々の間期核は数本の短い核周辺微小管 (perinuclear microtubules) で囲まれた (Fig. 7E)。核周辺微小管の分布は核の分布と一致したが、核分裂は観察されなかった。葉緑体が集合した部位 (cf. Fig. 7B) には核周辺微小管、すなわち間期核も集合していた (Fig. 7Eの矢印)。核と葉緑体が集合している部位の周縁に沿って、短い刷毛のように配列する微小管が出現し (Fig. 7F)、隔壁が求心的に形成されてレンズ状の小細胞になった (Fig. 7G)。

APMを含む培地の水面に娘細胞を浮かべて培養した。APMを含まない培地の水面に浮かべて培養した娘細胞 (対照) は3日以内にレンズ状小細胞を形成したのに対し、APMを含む培地に浮かべた娘細胞からは10日間培養してもそのような小細胞は形成されなかった。3日間APMを含む培地に浮かべた娘細胞では、微小管は観察されなかった。また、対照の娘細胞の核はほぼ等間隔で分布したが、APMで処理した娘細胞の核の分布は不均一となった (Fig. 7H)。

考察

キッコウグサでは、分割細胞分裂によって形成した数個以

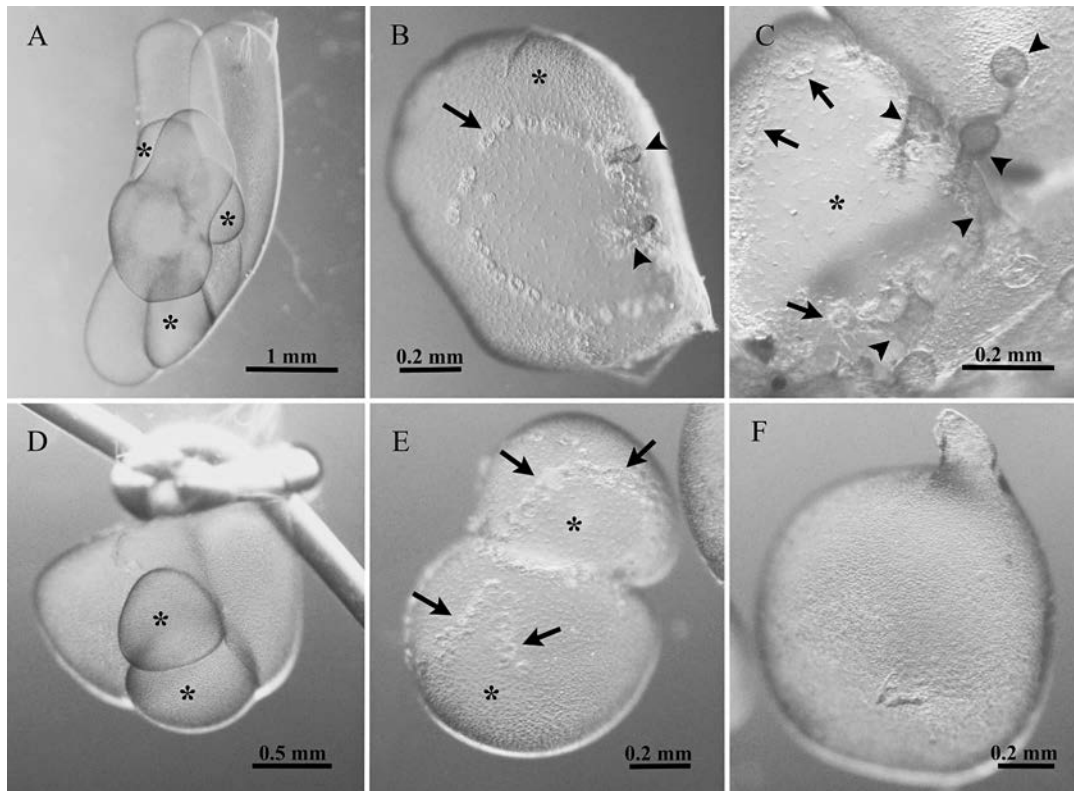


Fig. 6. Daughter cells of *Dictyosphaeria cavernosa* (asterisks) were put together with regenerated cells from protoplasts of *Valonia* (A) and applanospores of *Boergesenia* (D) in *Boergesenia* cell wall sacks and cultured for 14 days. B, *Dictyosphaeria* daughter cells produced tenacula along peripheries of the contact surfaces with *Valonia* cells. C, *Dictyosphaeria* daughter cells produced tenacula along peripheries of the contact surfaces with *Boergesenia* applanospores. Fibulae (arrowheads) produced by *Valonia* cells adhering to the surfaces of *Dictyosphaeria* daughter cells (B, C). No tenaculum or fibula formed on a *Boergesenia* cell (F). Asterisks, *Dictyosphaeria* daughter cells; arrows, tenacula.

上の娘細胞は、母細胞の細胞壁の内壁に沿って分布し、拡大成長することで互いに接着する (Enomoto & Okuda 1981)。接着し合った娘細胞同士は互い違いに付着細胞を形成して連結する (Børgesen 1912, 1913)。本研究では、キッコウグサの娘細胞同士を連結する付着細胞の形成要因を実験形態学的に明らかにした。

分割細胞分裂後 5–6 日で、母細胞内で接着し合った娘細胞は付着細胞を形成した。しかし、分割細胞分裂後に母細胞から取り出し、互いに分離させて培養した娘細胞は、そのままでは付着細胞を形成しなかった。そこで、娘細胞同士が接し合っただけで密着することが、娘細胞に付着細胞を形成させる要因になるかどうかを確かめた。キッコウグサの母細胞から取り出した娘細胞をマガタマモまたはバロニアの細胞壁の袋に入れ、人為的に娘細胞同士を接着させて培養した。キッコウグサの娘細胞は、自分の母細胞の内部以外の環境に移されても、接着し合った娘細胞同士で付着細胞を形成した。しかし、分割細胞分裂後の経過日数が長い娘細胞ほど付着細胞を形成する割合が小さくなった (Fig. 3)。分割細胞分裂後 2–7 日間互いに分離して培養した娘細胞をマガタマモの細胞壁の袋に入れて互いに接着させて培養すると、培養開始後 14 日でほとんど全ての娘細胞が付着細胞を形成した。それに対して、分

割細胞分裂後 8–12 日間互いに分離して培養した娘細胞を、マガタマモの細胞壁の袋の中で接着させて 14 日間培養したとき、付着細胞を形成する娘細胞は約 6 割まで減少した。さらに、分割細胞分裂後 13–15 日間互いに分離して培養した娘細胞では、14 日間マガタマモの細胞壁の袋の中で接着させたとき、付着細胞を形成した娘細胞は全体の約 3 割であった。このことは、付着細胞を形成する能力は細胞分裂後の経過時間が短くて若い娘細胞ほど高く、娘細胞の齢が進むほど低下することを示している。

娘細胞が付着細胞を形成するために接着する相手は娘細胞以外の基質でも有効であることが明らかになった。付着細胞の形成を誘導する基質または成分はガラス、ジルコニア、ポリスチレン、アルミナ、パラフィンであった。これらの基質は表面が疎水性であると考えられる。一方、親水性の基質と考えられる寒天、タピオカ、糸コンニャク、ナタデココは、これらと接着した娘細胞に付着細胞を形成させる効果はなかった。

マガタマモの細胞壁の袋にキッコウグサの娘細胞を入れて培養したとき、付着細胞は娘細胞同士の間には形成されたが、袋として使用したマガタマモの細胞壁内壁と娘細胞との間には形成されなかった。しかし、マガタマモの細胞壁で包んだ

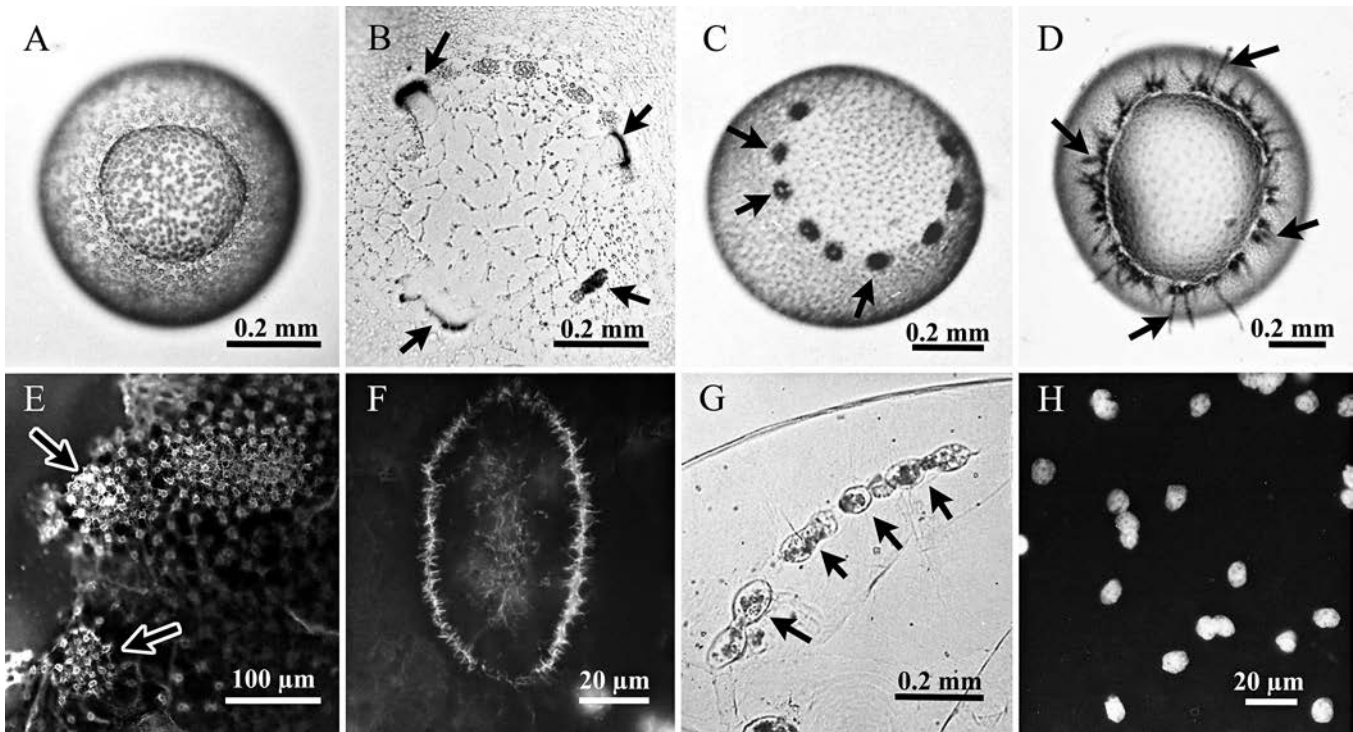


Fig. 7. Inducing small lenticular cells of *Dictyosphaeria cavernosa* similar in structure to tenacula. Upper views of *Dictyosphaeria* daughter cells that were held floating on the surface of culture medium (A–D). A, a part of cell exposed to air. Several cilia where chloroplasts accumulated appeared along the boundary between water and air (arrows in B) and developed into small lenticular cells (arrows in C), which later elongated like rhizoids (arrows in D). E, immunofluorescence of perinuclear microtubules surrounding each of interphase nuclei. Dense distribution of perinuclear microtubules at the cilia where chloroplasts accumulated. F, brush-like short microtubules located at the leading edge of centripetally growing septum. G, small lenticular cells (arrows) divided from a daughter cell by septa. H, random arrangement of nuclei stained with DAPI.

ガラスビーズは娘細胞に付着細胞の形成を誘導した。この場合、娘細胞はマガタマモの細胞壁の袋の中で拡大成長し、マガタマモの細胞壁で包まれたガラスビーズに強く押し付けられ、両者の接着面は水が浸入できないほど密着していた。

生きているキッコウグサの娘細胞同士を接着させると付着細胞が誘導されるのに対し、固定剤で固定したキッコウグサの娘細胞は、生きているキッコウグサの娘細胞の付着細胞形成を誘導しなかった。疎水性表面をもつ基質が娘細胞に付着細胞形成を誘導する効果をもつことから、生きているキッコウグサの細胞は疎水性表面をもつとみなすことができる。キッコウグサの娘細胞は接着する相手が生きている細胞であれば、他種のバロニアの細胞とマガタマモの細胞の間でも付着細胞を形成することが本研究で明らかになった。

キッコウグサの娘細胞は、接着する相手が生きている同種または異種の細胞、あるいは表面が疎水性と考えられる基質であるときは、必ずそれらとの接着面の境界または縁に沿って付着細胞を形成した。しかし、双方が完全にぴったりと隙間なく接着・密着している面には付着細胞は形成されなかった。キッコウグサの藻体が水中に浸っているとき、娘細胞同士の接着面の縁は、水に直接触れていない接着面全体と水に触れている部分との境界にあたる。付着細胞はまさにその境界の水際に形成した。この場合、接着面全体は疎水性表面を

もつと考えられる基質、または同様に疎水性表面をもつと考えられる生細胞との間でつくられており、それゆえ、その面全体に水が侵入できない、水がはじかれている環境になっていると推察される。それに対し、キッコウグサの娘細胞と寒天や糸コンニャクなどの親水性の基質との接着面は、接着面以外の部分と同様に水に触れている環境になっていると推察される。キッコウグサの娘細胞は、親水性の基質と接着しているときでも、細胞全体が水に浸っているのと同じ環境にいると認識していると考えられる。

キッコウグサの娘細胞を培地の水面に浮かべることで、付着細胞と類似する小細胞の形成が誘導された。この小細胞と付着細胞の特徴は以下の点で一致した。1つは、細胞の形成に先立って葉緑体などの原形質が集合する部位ができること。2つ目に、その部位が少し隆起した後、娘細胞との間に隔壁ができてレンズ状の細胞となること。3つ目に、両者の細胞の直径が同様に 30–50 μm であること。4つ目は、両者の細胞はどちらも伸長すること。ただし、付着細胞は「柱」(trabecula; *pl.* trabeculae) を伸ばし、先端が付着器 (haptera) となって隣接する娘細胞に付着する (Enomoto & Okuda 1981)。それに対し、水面に浮かべた娘細胞が形成したレンズ状の小細胞は、気中へ向かって仮根のように先端が伸長した。このように、両者は構造上同じ細胞であると考えられる。

さらに、両者はそれぞれの細胞を形成する誘導要因も一致すると考えられる。なぜなら、水面に浮かべた娘細胞が形成したレンズ状の小細胞は、水中と気中（疎水性）の境界の水際に形成されたからである。キッコウグサの娘細胞の表面には、水中と疎水性特性との境界を認識し、そこに付着細胞を誘導するしくみが存在すると推察される。

バロニア属の種はレンズ状細胞形成という様式で細胞が分裂する (Okuda *et al.* 1997)。形成されるレンズ状細胞は大きさと成長様式、役割において2つのタイプがある (Camaya & Okuda 2009)。大きなレンズ状細胞は、拡大成長し、細胞数を増加させることでバロニアの藻体を多細胞体制として発達させる。小さなレンズ状細胞は、先端成長して糸状の仮根に発達し、細胞または藻体を基物に付着させる。バロニアの細胞同士を接触させると、その間に原形質が局所的に集まり、その部位に小さなレンズ状細胞が形成されて仮根となり、隣接する細胞表面に付着する (Elvira *et al.* 2012)。原形質が局所的に集まった周縁部には、短い刷毛のような微小管が分布し、それに沿って隔壁が求心的に形成され、小さなレンズ状細胞ができる。これは、水面に浮かべたキッコウグサの娘細胞におけるレンズ状の小細胞の形成過程と一致する。本研究において、キッコウグサの娘細胞とバロニアの細胞をマガタマモの細胞壁の袋の中に入れて培養したところ、両細胞の接着面に沿って、それぞれ付着細胞と小さなレンズ状細胞を形成した。付着細胞と小さなレンズ状細胞はどちらも隔壁形成によって分裂したことから、キッコウグサの付着細胞はバロニアにおける小さなレンズ状細胞に相当すると考えられる。そうであれば、キッコウグサは分割細胞分裂とレンズ状細胞形成の2つの細胞分裂様式を併せもつことになる。

まとめ

シオグサ目多核緑藻には、分割細胞分裂と隔壁形成の2つの細胞質分裂様式がある。レンズ状細胞形成は、非常に顕著な不等分裂であるが、隔壁形成による細胞質分裂の範疇に入る。隔壁は母細胞の細胞壁の最内層が原形質側へ陥入することで求心的に発達し、母細胞を2つの娘細胞に分離する (Enomoto & Hirose 1971, Okuda *et al.* 1997)。その結果、分裂した2つの娘細胞は母細胞壁と隔壁を共有する。このように、2つの娘細胞は共有する隔壁によって堅く結びついている。これが多細胞柔組織の基本構造となる。一方、分割細胞分裂は隔壁形成の過程がない点で独特である。分割細胞

分裂した娘細胞は発生学的に多細胞柔組織には発達しない。分割細胞分裂した娘細胞がばらばらにならず、互いに連結し合って多細胞体制を維持することが、キッコウグサにおける付着細胞の役割であると結論される。また、キッコウグサ以外に分割細胞分裂を行う種や細胞群体を構成する種において、細胞分裂後に娘細胞が連結するしくみを明らかにすることは、本研究結果と併せて、植物の多細胞体制構築についての多様性と進化を考察する上で意義があると考えられる。

引用文献

- Børgesen, F. 1912. Some Chlorophyceae from the Danish West Indies. II. Bot. Tidsskr. 32: 241–273.
- Børgesen, F. 1913. The marine algae of the Danish West Indies. Part 1. Chlorophyceae. Dansk Bot. Ark. 1: 1–58.
- Camaya, A. P. & Okuda, K. 2009. Cellular Morphogenesis in *Valonia* sp.: with emphasis on the formation of lenticular and rhizoid cells. Kuroshio Sci. 2: 151–159.
- Elvira, P. R., Sekida, S. & Okuda, K. 2012. Rhizoid formation in *Valonia* (Siphonocladales, Chlorophyceae). Phycologia 51: 391–402.
- 榎本幸人 1979. 緑藻マガタマモの小球体の分離と培養. 西澤一俊・千原光雄 (編), 藻類研究法. pp. 142–148. 共立出版. 東京.
- Enomoto, S. & Hirose, H. 1971. On the septum formation of *Microdictyon okamurai* Setchell. Bull. Jpn. Soc. Phycol. 19: 90–93.
- Enomoto, S. & Okuda, K. 1981. Culture studies of *Dictyosphaeria* (Chlorophyceae, Siphonocladales) I. Life history and morphogenesis of *Dictyosphaeria cavernosa*. Jpn. J. Phycol. 29: 225–236.
- Enomoto, S., Hori, T. & Okuda, K. 1982. Culture studies of *Dictyosphaeria* (Chlorophyceae, Siphonocladales) II. Morphological analysis of segregative cell division in *Dictyosphaeria cavernosa*. Jpn. J. Phycol. 30: 103–112.
- 神谷充伸 2012. 海藻. 誠文堂新光社. 東京.
- Okuda, K., Mine, I. & Ueno, S. 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.
- Starr, R. C. & Zeikus, J. A. 1987. UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. J. Phycol. 23 (supplement): 1–47.
- 田中次郎・中村庸夫 2004. 日本の海藻. 平凡社. 東京.
- 館脇正和 1971. 海藻の培養. 海洋科学 3 (11): 784–789.
- 吉田忠生 1998. 新日本海藻誌. 内田老鶴圃. 東京.

(Received June 11, 2020; Accepted July 6, 2020)