

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

関田 諭子・奥田 一雄*

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)

Satoko Sekida and Kazuo Okuda*: Septum formation and cytoskeleton in cladophoralean, coenocytic green algae. I. Septum formation of *Chaetomorpha moniligera*. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 70: 167–176, November 10, 2022

The detailed septum formation processes and the occurrence and behavior of microtubules and actin filaments during cell division were examined in *Chaetomorpha moniligera* belonging to the Cladophorales. The incipient septum formation was the appearance of a circumferential band, where cortical microtubules were disconnected into two portions. The plasma membrane furrow that had started from the circumferential band was followed by the centripetal ingrowth of the septum. Brush-like microtubules quite distinct from cortical microtubules were continuously localized at the leading edges of the plasma membrane that were intruding towards the vacuole. They disappeared when the septum completed to close its center pore. A microtubule disrupting drug (amiprophos methyl) destroyed microtubules at the leading edges of the plasma membrane so as to inhibit septum formation. The brush-like microtubules differed from both a phragmoplast and a phycoplast in their arrangement and localization. These results demonstrate that the brush-like microtubules may be involved in septum formation as a part of peculiar cytokinetic apparatuses in *C. moniligera*.

Key Index Words: actin filaments, cell division, *Chaetomorpha moniligera*, *Cladophorales*, coenocytic green algae, cytokinesis, indirect immunofluorescence microscopy, microtubules, phragmoplast, phycoplast, septum formation

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

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

緒言

アオサ藻綱シオグサ目に属する緑藻は、熱帯から寒帯の海岸および陸水に生育し (吉田 1998, 廣瀬・山岸 1977), 多核細胞からなる藻体をもつ (van den Hoek *et al.* 1995)。栄養細胞の構造上の特徴は以下の通りである。細胞の体積のほとんどは中心液胞が占める。原形質は中心液胞と細胞壁の間にはさまれた薄い層として存在し, 多数の核および葉緑体などの細胞小器官を含む。原形質膜のすぐ内側には, 互いに平行に配列する表層微小管 (cortical microtubules) が分布する (Shihira-Ishikawa 1987, La Claire 1987)。隣り合う間期核はほぼ均等距離で分布し, それぞれの核を取り囲む核周辺微小管 (perinuclear microtubules) が存在する。核分裂は細胞質分裂とは必ずしも同調しないが, 細胞の不特定な領域内に存在する複数の核は同調して分裂する (Motomura 1996)。

シオグサ目多核緑藻においては, 主要な細胞質分裂の様式は2つある (Leliaert *et al.* 2007)。1つ目の様式は母細胞を2つの娘細胞に仕切る隔壁形成である。形成される隔壁は, 母細胞の側壁内側の周囲から始まり, 液胞へ向かってカメラの絞りが閉じるように求心的に発達する (Kornmann 1969,

Enomoto & Hirose 1970, 榎本・広瀬 1971)。バロニア科の種では, 原形質が細胞の局所的な領域に集まり, その部分でレンズ状の新たな細胞が形成される (Okuda *et al.* 1997)。これをレンズ状細胞形成と呼ぶ (吉田 1998)。形成されるレンズ状細胞と母細胞の間には, 母細胞壁の内壁から斜めに液胞方向へ求心的に発達する隔壁が形成し, その隔壁によってレンズ状細胞が母細胞から切り出されるように分裂する (Okuda *et al.* 1997, 熊田ら 2009a)。

細胞質分裂のもう1つの様式は分割細胞分裂である。分割細胞分裂では, 母細胞の原形質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となる (Enomoto & Okuda 1981, Okuda *et al.* 2016)。これらの娘細胞が成長して互いに結合することで, 藻体は多細胞体へと発達する。

一方, シオグサ目多核緑藻の多くの種では, 細胞が傷つけられたとき, 原形質が速やかに収縮して傷口を閉じさせ, その後, 収縮した原形質が細胞壁を形成して新たな細胞に再生する (La Claire 1982)。細胞のこのようなはたらきを傷害治療または創傷治療 (wound healing) と呼ぶ。細胞傷害が引き

金となって起こる原形質の収縮運動はアクチンフィラメントが関与することが知られている (La Claire 1989, Satoh *et al.* 2000)。傷害治癒との関連において、マガタマモとオオバロニアの細胞は細胞壁内壁全体に沿って多数の不動胞子様の小球体を形成するが、このような小球体の形成は人為的に細胞を針で突いて傷つけることでも誘導できる (Enomoto & Hirose 1972, Nawata *et al.* 1993)。Olsen & West (1988) は、このような自発的に起こる、または人為的に誘導される小球体の形成を、分割細胞分裂の変形 (modified) であると考えている。

ところで、細胞分裂の過程と遊走細胞の鞭毛装置の構造は、緑藻類の系統群を分類するための重要な特徴または形質となる (堀 1983)。堀 (1983) によれば、緑藻類の細胞分裂は3つの核分裂のタイプと5つの細胞質分裂の様式 (A-E) に分類される。核分裂前期に核膜が消失し、終期に中間紡錘体が残存する1つ目の核分裂タイプでは、核分裂の軸と平行に配列するフラグモプラスト (phragmoplast) という多数の微小管が出現し、細胞板は遠心的 (A) または求心的 (B) に発達する。2つ目は核分裂終期に中間紡錘体が早期に崩壊するタイプで、核分裂の軸と垂直方向に配列するファイコプラスト (phycoplast) という多数の微小管が出現し、細胞板は遠心的 (C) または求心的 (D) に発達する。3つ目は核分裂中に核膜が崩壊しないタイプで、フラグモプラストとファイコプラストのような微小管系は出現せず、原形質膜の環状収縮 (furrow) によって細胞質が分裂する (E)。この E における細胞質分裂の様式は、アオサ藻綱に分類される種に見られる (堀 1983, 千原 1997)。

アオサ藻綱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に関する細胞学的な研究は少ない (McDonald & Pickett-Heaps 1976, Okuda *et al.* 1997)。著者らは、シオグサ目多核緑藻の隔壁形成における微小管とアクチンフィラメントの挙動および役割を2つの相互に関連する研究論文で明らかにする。第1報となる本研究では、シオグサ科のタマジユズモを用い、円柱形の細胞を横断する隔壁によって細胞分裂する過程と細胞骨格の挙動を報告する。第2報は、卵型の細胞をもつフサバロニア (熊田ら 2009b) を用い、レンズ状細胞の形成過程とそれに伴う隔壁形成および細胞骨格の挙動について報告する。これらの2つの研究結果から、タマジユズモとフサバロニアの両種において、隔壁形成に関与する独特の微小管が出現することが明らかになった。本研究では、アオサ藻綱に属するシオグサ目における細胞質分裂の様式と微小管の関与について、ヒビミドロ目モツレグサ属とシリオミドロ属の多核緑藻の種との比較を加えて考察した。

材料と方法

タマジユズモ (*Chaetomorpha moniligera* Kjellman 1897) は2017年9月20日に北海道室蘭市電信浜で採集した。採集された藻体は2本鞭毛をもつ遊走細胞を放出したが、その雌雄性は明らかにできなかった。本研究では、この2本鞭毛の遊走細胞から発生した株を用いた。藻体は栄養強化海

水 (Provasoli's enriched seawater = PES, Provasoli 1968, 舘脇 1971) で培養したが、栄養強化する PES 原液は標準量の1/4とした。藻体は約200 mLの培養液を含む腰高シャーレの中で、温度15°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の条件で培養した。

タマジユズモの隔壁形成の過程を観察・記録するため、デジタルカメラ (Coolpix P6000, Nikon Co., Ltd, Tokyo, Japan) を装着した実体顕微鏡 (SZX7, Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japan) を使用した。インターバル撮影は5分おきに行った。

隔壁を形成している細胞を固定して樹脂包埋し、光学顕微鏡で観察するための切片を作製した。細胞を1% 四酸化オスミウムを含む海水で8時間固定し、海水で洗浄後、2% グルタルアルデヒドと1% タンニン酸を含む海水で1時間再固定した。海水で洗浄後、定法に従ってアセトン脱水し、Spurrの樹脂 (Spurr 1969) に包埋した。ウルトラミクロトーム (Ultracut UCT, Leica Microsystems, Germany) を用い、厚さ約1 μm の切片を作製した。切片は1% トルイジンブルーOで染色して観察した。

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奥田ら (2000) に従った。その概略を以下に記載する。緩衝液の組成は、587 mM NaCl, 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA, 50 mM PIPES (pH 7.0) であった。8% パラホルムアルデヒド、0.5% グルタルアルデヒドおよび1% DMSOを含む上記の緩衝液を固定液として用いた。細胞は固定液に浸漬後、約2分でカミソリ等によって切断し、液胞の内容物を洗い出した。5分後、その細胞断片を固定液からPBSに移し、柄付針等を使って細胞壁から剥がした原形質を、poly-L-lysineでコーティングしたカバーガラス上に広げて貼り付けた。カバーガラスに貼り付けた原形質試料は、0.5 mg/mLの NaBH_4 を含むPBSに移して固定剤を還元・除去し、さらに5% Nonidet P40を含むPBSに移してクロロフィル等の色素を抜いた。一次抗体溶液は、酵母の β チューブリンに対するラットの抗チューブリンモノクローナル抗体 (YL1/2, Sera Labs, Crawley Down, UK) の25倍希釈液25 μL と、合成アクチンペプチドに対するウサギの抗アクチンモノクローナル抗体 (A2066, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) の25倍希釈液25 μL からなる混合液であった。二次抗体溶液として、FITCで標識したヤギの抗ラットIgG抗体 (F6258, Sigma-Aldrich) 25倍希釈液25 μL と、TRITCで標識したヤギの抗ウサギIgG抗体 (T6778, Sigma-Aldrich) 25倍希釈液25 μL の混合液を用いた。前述のNonidet P40で処理した原形質試料は、PBSで洗浄後、一次抗体溶液によって5°Cで6–10時間処理した。試料はその後PBSで洗浄し、二次抗体溶液によって室温で2時間処理した。PBSで洗浄後、試料は最終的にDAPIを含むVECTASHIELD mounting medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) を用いてスライドガラス上にマウントした。微小管とアクチンフィラメントの免疫蛍光像とDAPIで染色した核、および原形質の微分干渉像は、落射蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus Optical, Co., Ltd.) で観察した。

タマジユズモの細胞の中央部をカミソリで2つの断片に切断し、傷害治癒が起こるかどうか調べた。細胞断片は切断後3分で固定し、間接蛍光抗体法によって微小管とアクチンフィラメントを観察した。

微小管破壊剤アミプロフオスメチル (APM) とアクチンフィラメント破壊剤ラトランキュリン B (Latrunculin B) の隔壁形成に及ぼす効果を調べた。APM と Latrunculin B は、最終濃度がそれぞれ 100 μM (0.1% DMSO を含む) と 50 μM (0.1% DMSO を含む) となるように培養液に溶解した。

結果

1. タマジユズモの隔壁形成と細胞骨格

タマジユズモの未分裂の栄養細胞を観察した。細胞は円柱形を呈し (Fig. 1A), 円盤状の隔壁 (Fig. 1A の矢印) が隣接する細胞を隔てた。まず、細胞の側壁に接する原形質を観察した。Fig. 1B-F は同一細胞の同一部位を撮影した写真である。表層微小管は原形質の表層に分布し、細胞の縦方向と平行に配列した (Fig. 1B)。原形質の内部に焦点を合わせると、核周辺微小管が観察された (Fig. 1C)。核周辺微小管は個々の間期

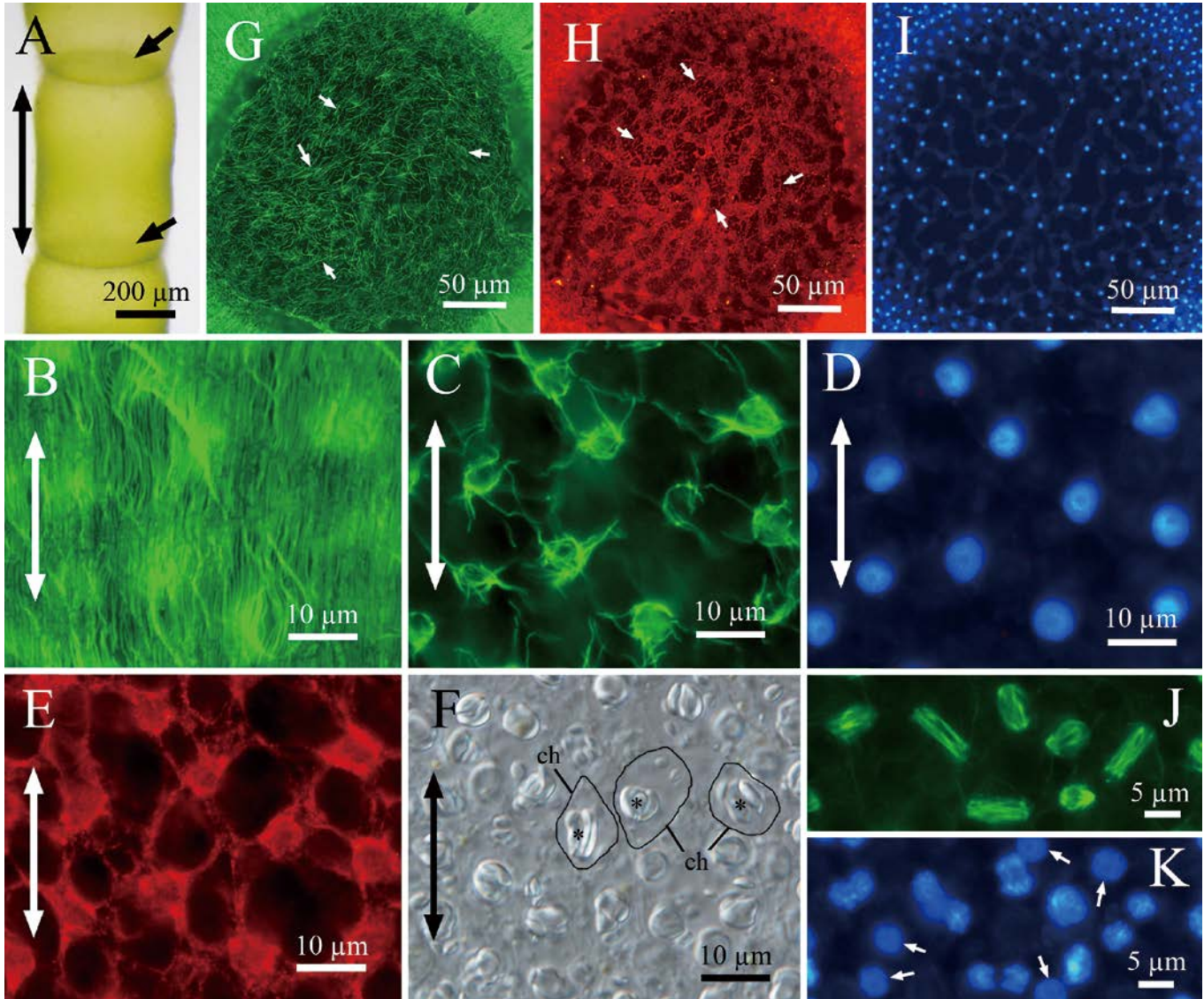


Fig. 1. Vegetative cells before cell division in *Chaetomorpha moniligera*. A, Cylindrical cells were seen from diagonally above. Arrows, septa. B and C, immunofluorescence images of cortical microtubules (B) and perinuclear microtubules (C). D, nuclei stained with DAPI distributed evenly. E, actin filaments showing reticulated arrangement. F, a differential interference contrast image of the protoplasm in the specimen for immunofluorescence microscopy. Showing the outlines of individual chloroplasts (ch) containing pyrenoids (asterisks). Double-headed arrows in A-F showing the longitudinal directions of the cells. The same area of the lateral side of the cell was photographed in B-E. G, many short microtubules (arrows) with random arrangement. H, actin filaments (arrows) showing reticulated arrangement. I, nuclei stained with DAPI distributed evenly. The same area of the protoplasm on the septum was photographed in G-I. J and K, nuclear divisions synchronized within indefinite area of the cell. The same area of the lateral side of the cell was photographed in J and K. J, immunofluorescence of spindle microtubules. K, nuclei stained with DAPI. Arrows, interphase nuclei.

核 (Fig. 1D) を囲んだ。アクチンフィラメント (Fig. 1E) は、葉緑体 (Fig. 1F の ch) や核の周囲の原形質内で網状に分布した。次に、隔壁 (Fig. 1A の矢印) に接する原形質に存在する表層微小管 (Fig. 1G), アクチンフィラメント (Fig. 1H) および核 (Fig. 1I) を観察した。短い表層微小管 (Fig. 1G の矢印) が多数、ランダムに配列していた。アクチンフィラメント (Fig. 1H の矢印) は比較的疎に分布する原形質内で網状に分布した。間期核はほぼ等間隔に分布した (Fig. 1I)。上記のように間期核のみからなる細胞の他に、核分裂している細胞もあった。この場合、個々の核が別々に不規則に分裂するのではなく、細胞内のある一定の範囲に分布する複数の核が同調して分裂した (Fig. 1J, K)。分裂中の核では、核周辺微小管が消失し、紡錘体微小管 (Fig. 1J) が観察された。分裂前または分裂後と考えられる核 (Fig. 1K の矢印) でも、核周辺微小管は観察されなかった。

細胞分裂と隔壁形成の過程を実体顕微鏡像 (Fig. 2) と細胞の縦断面の切片像 (Fig. 3) によって示す。隔壁形成は母細胞の側面の周囲に沿って始まった (Figs 2A, B, 3A)。隔壁 (Fig. 3B, C の矢印) は母細胞の側壁の内壁周囲から、液胞の中心方向へ伸長した (Fig. 3D)。伸長中の隔壁の厚さは母細胞壁よりも顕著に薄かった (Fig. 3E, F)。この間、隔壁はカメラの絞りの穴が小さくなるように求心的に発達し (Fig. 2C-E)、最後にその中心の穴が塞がった (Figs 2F, 3G-I)。原形質連絡は観察されなかった。隔壁は形成開始後約 10 時間で完成し、その結果、母細胞は隔壁によって 2 つの娘細胞に分裂した。

隔壁が発達するとき、母細胞の原形質膜は原形質とともにその隔壁を取り巻くように液胞側へ陥入した (Fig. 3A-F)。従って、原形質膜が陥入する部分では、将来の娘細胞の原形質が、発達中の隔壁の上下の面に回り込んで存在し、互いに近接した (Fig. 3B, C, E, F)。そのため、実体顕微鏡では、上の原形質と下の原形質に分布する葉緑体 (Fig. 3E, F の ch) は隔壁を介して重なるので、隔壁が濃い緑色の環状の領域として観察された (Fig. 2A-F)。隔壁形成の最後の段階 (Fig. 2F) では、隔壁の中心の穴の周囲にまで陥入してきた母細胞の原形質膜は融合し、2 つの娘細胞の原形質膜へと二分された (Fig. 3G-I)。実体顕微鏡で観察したこのような隔壁形成の動画を補足資料 (Fig. S1) に示す。

隔壁形成が開始する直前の段階において、細胞側面の原形質膜上に配列する表層微小管を観察した (Fig. 4A の矢印)。連続していた表層微小管が上下に分断した結果、微小管の存在しない幅の狭い帯状の原形質膜部分 (横方向に伸びる細い黒い帯) が細胞側面の周囲に沿って出現した (Fig. 4A の矢頭)。間期核は未分裂細胞と同様に均等分布した (Fig. 4B)。隔壁形成中に核分裂は観察されなかった。隔壁形成が開始した直後、上記の表層微小管のない幅の狭い帯状の原形質膜部分が液胞側へ陥入し始めた (Fig. 4C)。このとき、その帯状の原形質膜部分は、陥入し始めた原形質膜の最先端部位となった (Fig. 4C の矢頭)。帯状の原形質膜最先端部位の上部と下部のそれぞれから表層微小管とは異なる短い微小管が多数発出した (Fig. 4C の二重矢印)。

隔壁が環状の形態に発達した分裂途上の細胞 (cf. Fig. 3D) の縦断面における各部位を模式的に示した (Fig. 4D)。細胞側面上部 (LU) と下部 (LL)、発達中の隔壁上部表面 (TS) と下部表面 (BS)、陥入している原形質膜の最先端 (LE) の各部位を含む原形質試料における微小管を観察した (Fig. 4E)。Fig. 4E の中央部に多数の刷毛状の微小管 (二重矢印) が分布し、陥入している原形質膜の最先端 LE から発出した。これらの微小管が発出する LE の上部 TS と下部 BS の比較的暗い領域は、それぞれ発達中の隔壁上面と下面に接していた原形質であるが、これらの領域には表層微小管は観察されなかった。Fig. 4E の最上部 (LU) と最下部 (LL) の領域はそれぞれ将来の娘細胞側面の原形質が分布していた。LU と LL の原形質膜上には細胞の縦方向に平行配列する表層微小管 (Fig. 4E の矢印) が存在したが、それらはもともと母細胞側面に配列していた表層微小管が上下に分断して残存したものであった。このように、刷毛状の微小管が発出する LE とその上下の領域 (TS, BS) は液胞側へ陥入している原形質膜を含む原形質であり、この原形質が試料作製の過程でカバーガラス上へ平面に広げられた結果、Fig. 4E で示すような配置となった。

Fig. 4F は発達中の隔壁を斜め上方から見た模式図で、隔壁上部表面 (TS) および陥入する原形質膜の先端部 (LE) を示す。発達中の隔壁上部表面の原形質 (TS) における微小管を上方から観察した (Fig. 4G, H)。液胞の中心方向へ求心的に陥入する

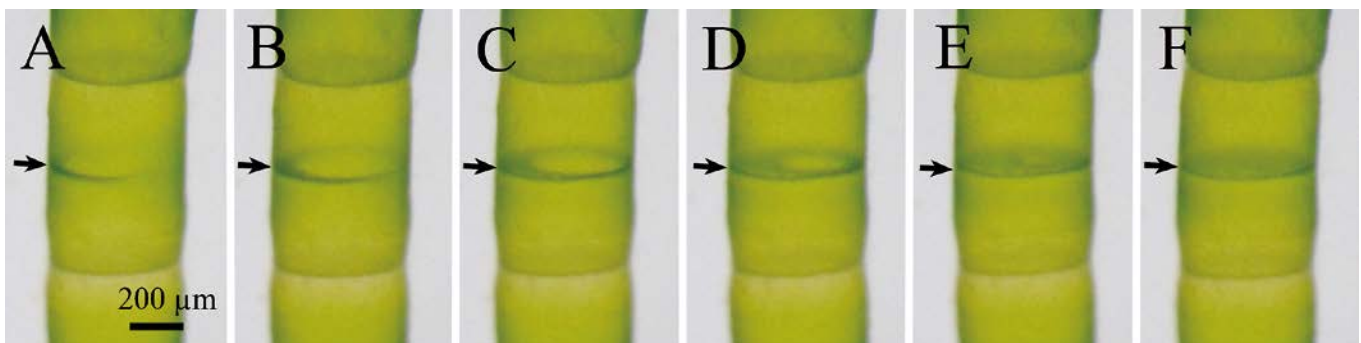


Fig. 2. Septum formation processes shown by serial photographs that were taken every 2 h. Arrows, planes of cell plates developing.

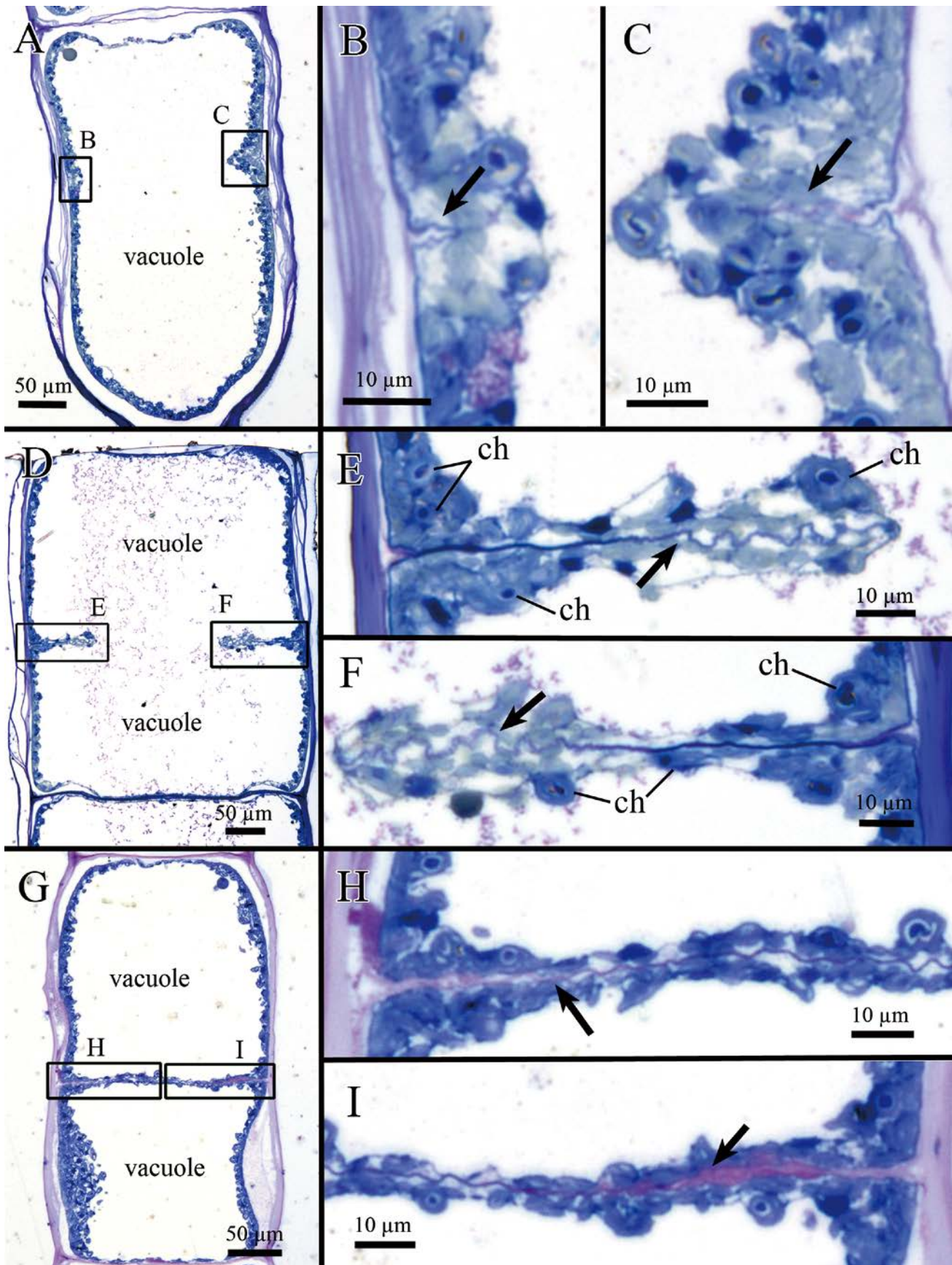
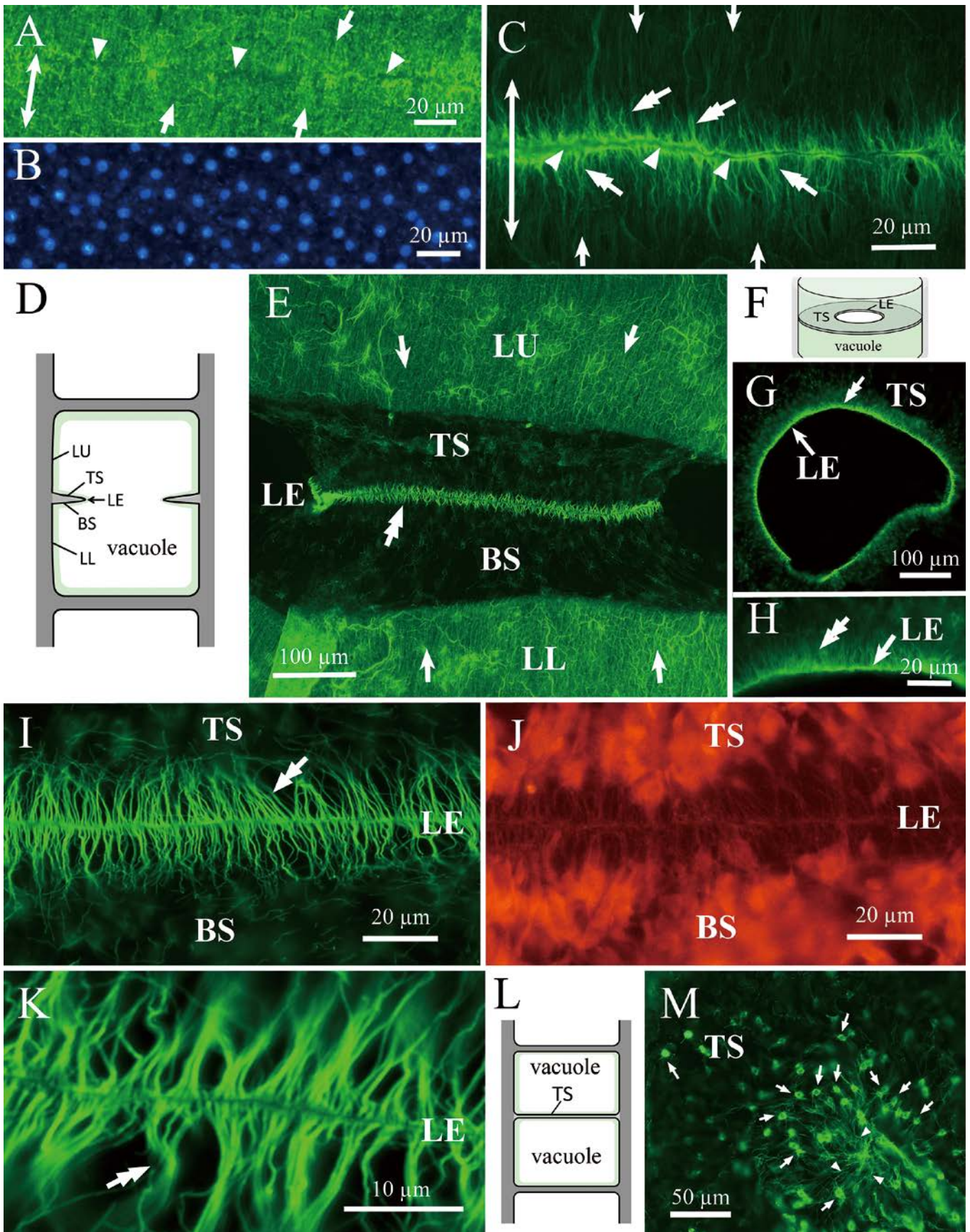


Fig. 3. Longitudinal cross sections of dividing-cells in *Chaetomorpha moniligera*. Centripetal ingrowth of the septa in early (A-C), middle (D-F) and final (G-I) stages. No plasmodesma was observed. Arrow, developing septa. ch, chloroplast.



原形質の先端部 (LE) の周縁に沿って刷毛状の微小管 (Fig. 4G の二重矢印) が配列した。刷毛状の微小管 (Fig. 4H の二重矢印) は LE から TS 平面方向へのみ発出しているように見えた。

Fig. 4I, K は Fig. 4E の中央部で示した微小管分布域の拡大像である。横方向に伸びる幅の狭い黒帯は、陥入している原形質膜の最先端 (LE) を示す。その原形質膜の最先端の上部と下部のそれぞれから多数の微小管が発出した (Fig. 4I の二重矢印)。微小管は短く、波打っており、全体として刷毛状の形を呈した (Fig. 4K の二重矢印)。これらの刷毛状微小管は、発達中の隔壁の上面 (TS) および下面 (BS) に接する原形質膜に密接していた (Fig. 4I)。刷毛状微小管 (Fig. 4I) を観察した同一試料の同一場所では、アクチンフィラメントは観察されなかった (Fig. 4I)。模式図 (Fig. 4L) で示す完成した隔壁の上部表面 (TS) において、微小管を観察した (Fig. 4M)。隔壁の中心の穴が塞がったとき、刷毛状の微小管は消失した。形成直後の隔壁表面の原形質においては、中央部分で放射状に配列する微小管 (Fig. 4M の矢印) が出現し、周囲には分裂期の核 (Fig. 4M の矢印) が多数分布した。その後、隔壁表面の原形質は、短く、ランダムに配列する表層微小管と比較的疎に分布する間期核を含んだ (cf. Fig. 1G, I)。

隔壁を形成し始めた細胞を微小管破壊剤 APM (アミプロフォスメチル) で処理したとき、隔壁形成は速やかに停止した (Fig. 5A, B)。また、隔壁形成中の細胞を APM で 2 時間処理した後に固定し、微小管 (Fig. 5C) とアクチンフィラメント (Fig. 5D) を見るために抗体染色した。母細胞側面 (LU, LL) の表層微小管は残存したが、陥入する原形質膜の先端部 (LE) には、微小管とアクチンフィラメントは観察されなかった。一方、隔壁を形成し始めた細胞を Latrunculin B で処理したとき、隔壁の形成速度が遅くなり、約 2 時間で停止した。Latrunculin B の処理後 3 時間で細胞を固定して抗体染色すると、母細胞側面の表層微小管および原形質膜陥入部の先端に分布する刷毛状の微小管は無処理の細胞の場合と同様に観察された。

タマジユズモの細胞をカミソリで横方向に 2 つに切断する

と、直後に 2 つの細胞断片のそれぞれの原形質が収縮し、切断後 2-3 時間で球状の原形質のかたまりとなった。切断後 3 分で固定した細胞の切断部 (Fig. 6A-C の破線) の側面では、表層微小管 (Fig. 6B の矢印) はほぼ平行配列したままで切断部から縦方向へ後退した。一方、切断部付近には湾曲した多数のアクチンフィラメント (Fig. 6C の矢印) が新たに出現した。

考察

本研究で用いたタマジユズモを含むシオグサ目緑藻は、1 つの細胞に数百から数千の核を含む多核細胞からなる (van den Hoek *et al.* 1995)。一般的に単核の細胞では、細胞分裂は核分裂とそれに続く細胞質分裂からなる一連の過程である。しかし、シオグサ目多核緑藻では、細胞質分裂は個々の核分裂に直接引き続かず、その結果、核分裂を伴わない細胞分裂が起こる。また逆に、細胞質分裂を伴わない同調的な核分裂も起こる (Motomura 1996)。細胞の不特定な領域で多数の核が同調して分裂する現象は本研究でも観察された。タマジユズモの栄養細胞では、核分裂とは関係なく、隔壁形成によって多核の母細胞が多核の娘細胞に分裂した。そのとき、母細胞の核や葉緑体、細胞小器官等を含む原形質がそのまま娘細胞に分配された。核分裂と細胞質分裂が直接に連関しない多核緑藻では、核分裂のない独立した細胞質分裂だけの細胞分裂が存在すると考えられる。

細胞質分裂の主要な様式は、隔壁形成と、隔壁形成によらない分割細胞分裂の 2 つが知られている (Leliaert *et al.* 2007)。さらに、隔壁形成による細胞質分裂は 2 つのタイプがある。1 つは本研究で扱ったタマジユズモの細胞分裂で、円柱形の母細胞が円柱形の娘細胞へほぼ等分裂するタイプである。2 つ目は第 2 報で取り上げるフサバロニアのレンズ状細胞形成で、卵形の母細胞の表面からレンズ状の小さな細胞が局所的に分裂するタイプである。レンズ状細胞形成は極端な不等分裂である (奥田ら 2020)。

本研究では、タマジユズモの隔壁形成時に特異的に出現す

Fig. 4. Septum formation in *Chaetomorpha moniligera*. Microtubule immunofluorescence images in the lateral side of the cells (A, C, E, I, K) and in the top surface of the septa (G, H, M). A, cortical microtubules (arrows) were disconnected into two portions to make a narrow band of the plasma membrane without microtubules (arrowheads) right before septum formation has started. Double-headed arrow shows the longitudinal direction of the cell. B, nuclei stained with DAPI were distributed evenly in the same area as A. C, brush-like short microtubules (double arrows) distinct from cortical microtubules (single arrows) appeared immediately after septum formation had started. The brush-like microtubules terminated at the leading edges of the invagination or furrow of the plasma membrane (arrowheads) and made two rows above and below the leading edges. Double-headed arrow shows the longitudinal direction of cell. D, diagram of the cross section of cell showing the areas and cites observed in E, I, J, K. Lateral of upper half (LU) and Lateral of lower half (LL) of cell. Top surface (TS) and bottom surface (BS) of septum. LE, the leading edges of the furrow of the plasma membrane. Abbreviations in D are also applied to those indicated in E, I, J, K. E, microtubule immunofluorescence image of the lateral side of the dividing-cell. Brush-like microtubules (double arrow) appeared along LE, but no cortical microtubule was found on TS and BS. Cortical microtubules (arrows) on LU and LL originated from those in the mother cell. F, diagram of the plane of developing septum showing the areas and cites observed in G, H. G and H, in the surface view of only one side of the developing septum (F), brush-like microtubules arose out of the margin of LE toward one direction (double arrow in G, H). During centripetal ingrowth of septum, brush-like microtubules (double arrow in E, I, K) continued to be localized all over on the leading edges of the furrow of the plasma membrane (LE). I, brush-like microtubules on LE look like a tinsel. J, no immunofluorescence of actin filaments on LE was seen in the same area as I. K, high magnification of brush-like microtubules undulated on LE. Brush-like microtubules go to two opposite directions. LE was a narrow transverse band, where two parts of the plasma membrane in TS and BS were actually folded to cover both the surfaces of developing septum. L, diagram showing the top surface of completed septum (TS). M, radially arranged cortical microtubules (arrowheads) appeared on the center area of TS shown in L. Small arrows, nuclei in mitotic phases.

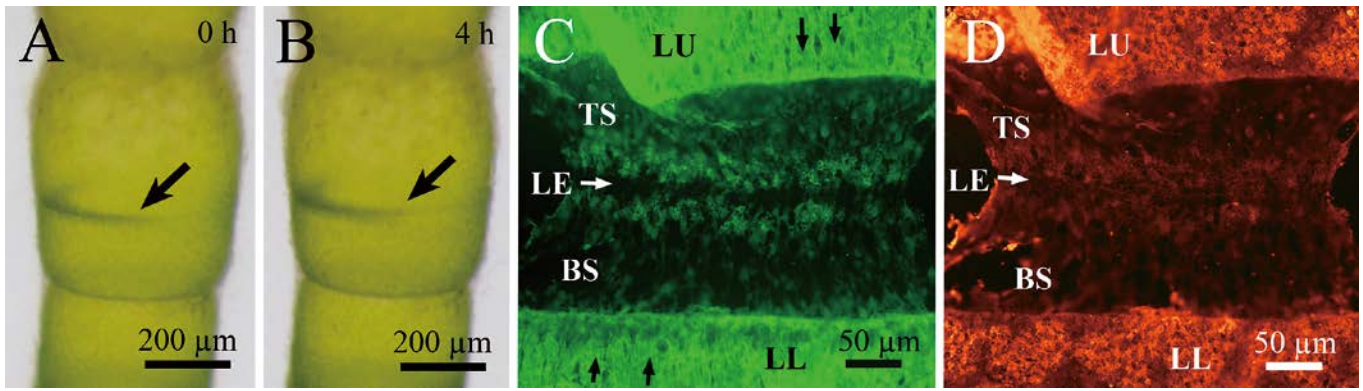


Fig. 5. Effects of APM on septum formation in *Chaetomorpha moniligera*. Cells were photographed from diagonally above 0 h (A) and 4 h (B) after treated with APM. Arrows, septa. Immunofluorescence images from microtubules (C) and actin filaments (D) in the cells 2 h after treatment with APM. C, no microtubule was found on LE. D, no microfilament was found on TS, LE and BS. The same area was photographed in C and D. Abbreviations in C, D follow those indicated in Fig. 4D. Black arrows in C, cortical microtubules that originated from the mother cell remained intact.

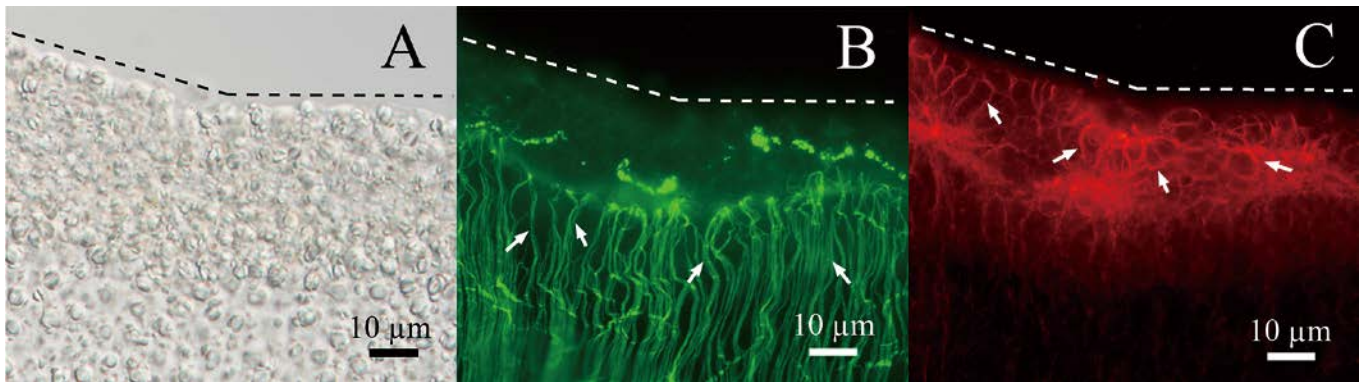


Fig. 6. A wounded cell in *Chaetomorpha moniligera*. A differential interference contrast image (A) and immunofluorescence images of cortical microtubules (B) and actin filaments (C) 3 min after the cell was wounded. The same area was photographed in A–C. A, the region of protoplasm. B, cortical microtubules (arrows) retracted from the edge of the wound. C, actin filaments (arrows) that ramified and curved appeared near the edge of the wound. Broken lines, where the cell was cut.

る刷毛状の微小管の存在を間接蛍光抗体法によって初めて明らかにした。タマジユズモの隔壁形成の過程と微小管の挙動を模式的にまとめた (Fig. 7)。

McDonald & Pickett-Heaps (1976) は、シオグサ目に属するカモジシオグサ (*Cladophora glomerata*) を用い、栄養細胞における核分裂と細胞質分裂を電子顕微鏡で観察した。その結果、細胞質分裂、すなわち隔壁形成の間にフラグモプラストとファイコプラストの両方とも存在しなかったけれども、発達中の隔壁に微小管が結合していたと報告している (McDonald & Pickett-Heaps 1976)。生殖細胞形成における細胞分裂の微細構造についての研究は、ミヤビシオグサ (Scott & Bullock 1976) とキッコウグサ (Hori & Enomoto 1978) でなされている。これら兩種では、分裂したそれぞれの核を1つずつ生殖細胞へ分配するための細胞質分裂の過程において、フラグモプラストとファイコプラストの両方とも出現しなかった。生殖細胞形成における細胞質分裂では、隔壁は形成されない。

本研究は、タマジユズモの隔壁が形成する間に、刷毛状の

微小管が、隔壁の伸長部すなわち液胞側へ陥入する原形質膜の最先端に継続的に存在することを明らかにした。隔壁形成中に新たなアクチンフィラメントは出現しなかった。その間、母細胞由来の表層微小管は分断後も細胞側面に残存し、配列等の変化は観察されなかった。刷毛状の微小管は、隔壁を形成し始めるときに出現し、隔壁の完成後に消失した。また、隔壁形成の開始の初期に微小管破壊剤 APM で処理した細胞では、隔壁形成が速やかに停止し、刷毛状の微小管が消失した。これらのことは、タマジユズモの隔壁形成における液胞側への原形質膜陥入には、アクチンフィラメントではなく、刷毛状の微小管が関与していることを強く示唆する。しかし、刷毛状微小管の機能についての詳細は明らかではない。

シオグサ目多核緑藻のいくつかの種は傷害治癒という特性をもつ (La Claire 1982)。本研究では、タマジユズモの細胞を切断した後、原形質は速やかに収縮して切断部を閉じた。この間、既存の表層微小管は切口から後退したのに対し、アクチンフィラメントは切口付近で新たに出現した。傷害治

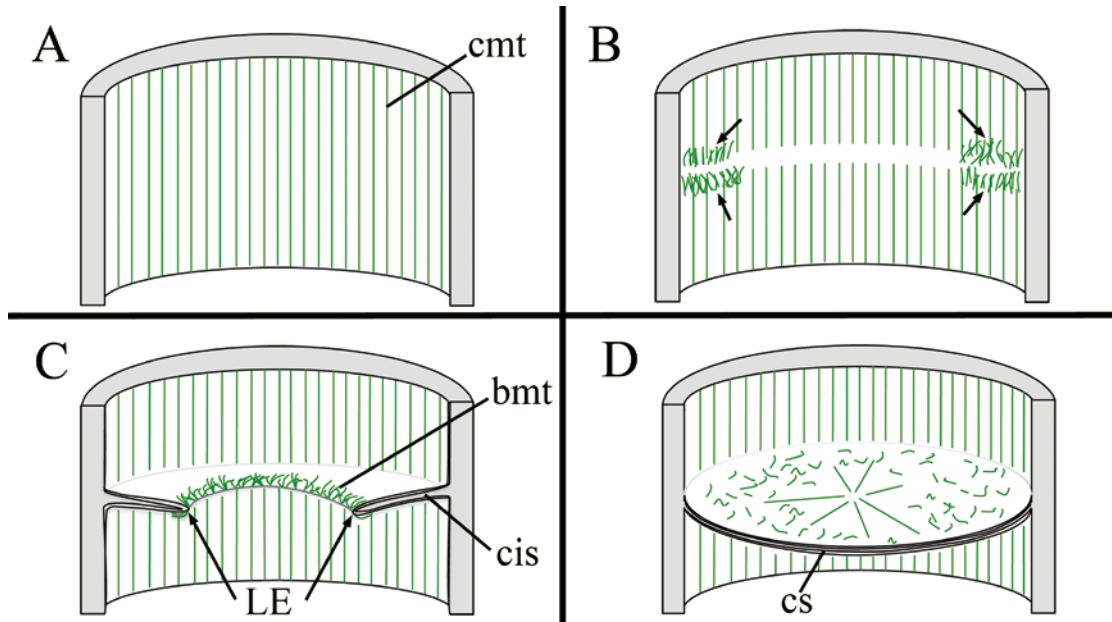


Fig. 7. Schematic representation of changes in the occurrence and arrangement of microtubules during septum formation in *Chaetomorpha moniligera*. A-D, the inner lateral sides of the cells cut longitudinally and the upper sides of septa, viewed from diagonally above. A, cortical microtubules (cmt) arranged parallel to the longitudinal axis of the cell before septum formation. B, a circumferential band where cortical microtubules were disconnected into two portions. Short microtubules (arrows) that issue from parts of the circumferential band occurred just after the beginning of septum formation. C, centripetal ingrowth of the septum (cis) followed the plasma membrane furrowing that had started from the circumferential band in B. Brush-like microtubules (bmt) continuously localized at the leading edges (LE) of the plasma membrane that are intruding towards the vacuole. D, radial and random arrangement of microtubules appeared on the surface of the complete septum (cs).

癒における原形質の収縮運動は、表層微小管ではなく、アクチンフィラメントが関与し、また、そのときの表層微小管の挙動は原形質の収縮運動からの受動的な影響によるものと考えられている (La Claire 1987, 1989, Satoh *et al.* 2000)。

タマジユズモの刷毛状微小管は、娘細胞同士を結ぶ細胞質分裂の軸（この場合、核分裂の軸ではない）に対して垂直な面に配列したので、フラグモプラストではない。しかし、以下の理由により、刷毛状微小管はファイコプラストでもないと考えた。タマジユズモの隔壁形成の間に出現する微小管は、陥入する隔壁の最先端の原形質膜に密接する短い刷毛状微小管だけであった。陥入する最先端の原形質以外の隔壁の上面と下面の原形質には、新たに発生するような他の微小管は存在しなかった。さらに、原形質膜が陥入していく先には液胞しか存在しなかったので (Fig. 3D-F), そのような液胞部分で微小管が出現することはなかった。細胞質分裂にファイコプラストが関与する種では、分裂直後の2つの娘核の間に分布している原形質内でファイコプラストが出現する (Pickett-Heaps 1975)。逆に言えば、ファイコプラストの出現は隔壁形成または原形質膜の陥入を予定する領域全体にあらかじめ原形質が分布することを前提とする。これらの点から、タマジユズモの細胞質分裂にはファイコプラストは存在しないと考える。

ヒビミドロ目モツレグサ属とシリオミドロ属の種はシオグサ目と同じアオサ藻綱に分類されている (Brodie *et al.* 2007)。モツレグサ属とシリオミドロ属の種は多核細胞からな

り、隔壁形成によって細胞分裂をする (Hudson & Waaland 1974, Lokhorst & Star 1983, Aruga *et al.* 1996)。これらの種では、隔壁形成予定面の周囲に沿って輪状の微小管の束が形成され、その領域で複数の核が同調的に分裂する。分裂した娘核が将来の娘細胞側へ移動した後、母細胞壁の内壁全周から求心的に隔壁が形成し始める。このとき、輪状の微小管の束は、陥入する隔壁の最先端およびその周囲を取り巻く原形質に存在するので、それらの微小管が隔壁形成に関わっている可能性がある (Hudson & Waaland 1974, Aruga *et al.* 1996)。Lokhorst & Star (1983) は、モツレグサ属とシリオミドロ属の種において、このような陥入する隔壁の最先端に分布する輪状の微小管は、細胞質分裂に関係する微小管系として縮小した (reduced) ファイコプラストとみなすという提案をしている。

形成中の隔壁の最先端の原形質に微小管が局在し、その微小管が隔壁形成に関与するという可能性があることは、上記のモツレグサ属およびシリオミドロ属の種とタマジユズモで共通する。しかし、微小管の配列様式および方向が双方の間で大きく異なる。モツレグサ属とシリオミドロ属の種では、発達中の隔壁の中央の穴の縁に沿い、その縁と同方向へ輪になって配列する微小管の束をつくる。それに対して、タマジユズモでは、隔壁中央の穴の縁から、その縁とほぼ直角方向へ著しい数の短い微小管が発出し、発達中の隔壁の上下面に回り込む (Fig. 7C)。このように、タマジユズモの刷毛状微小管は、フラグモプラストでもファイコプラストでもなく、また、モツレグサ

属とシリオミドロ属の種における縮小したファイコプラストでもなく、求心的隔壁形成を伴う原形質膜の陥入に関わるシオグサ目独特の細胞質分裂装置の一部であると考えられる。

謝辞

研究材料のタマジユズモを採集いただき、また、有益なご助言をいただいた北海道大学名誉教授の本村泰三博士に感謝申し上げます。

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.
- Brodie, J., Maggs, C. A. & John, D. M. 2007. Green seaweeds of Britain and Ireland. British Phycological Society, London.
- 千原光雄 1997. 藻類多様性の生物学. 内田老鶴圃. 東京.
- Enomoto, S. & Hirose, H. 1970. On the life-history of *Anadyomene wrightii* with special reference to the reproduction, development, and cytological sequences. *Bot. Mag.* 83: 270–280.
- 榎本幸人・広瀬弘幸 1971. タノモグサ *Microdictyon okamurai* Setchell の隔壁形成について. *藻類* 19: 90–93.
- Enomoto, S. & Hirose, H. 1972. Culture studies on artificially induced aplanospores and their development in the marine alga *Boergesenia forbesii* (Harvey) Feldmann (Chlorophyceae, Siphonocladales). *Phycologia* 11: 119–122.
- Enomoto, S. & Okuda, K. 1981. Culture studies of *Dictyosphaeria* (Chlorophyceae, Siphonocladales) II. Morphological analysis of segregative cell division in *Dictyosphaeria cavernosa*. *Jpn. J. Phycol.* 30: 103–112.
- 廣瀬弘幸・山岸高旺 1977. 日本淡水藻類図鑑. 内田老鶴圃. 東京.
- 堀輝三 1983. 細胞構造にみる緑藻類の系統と進化. *遺伝* 37(5): 16–23.
- Hori, T. & Enomoto, S. 1978. Developmental cytology of *Dictyosphaeria cavernosa*. I. Light and electron microscope observations on cytoplasmic cleavage in zooid formation. *Bot. Mar.* 21: 401–408.
- Hudson, P. R. & Waaland, J. R. 1974. Ultrastructure of mitosis and cytokinesis in the multinucleate green alga *Acrosiphonia*. *J. Cell Biol.* 62: 274–294.
- Kormann, P. 1969. Gesetzäßigkeit des Wachstums und der Entwicklung von *Chaetomorpha darwinii* (Chlorophyta, Cladophorales). *Helgoländer wiss. Meeresunters.* 19: 335–354.
- 熊田美里・大葉英雄・田中次郎 2009a. 海産緑藻オオバロニア *Ventricaria ventricosa* の不動胞子の発生. *藻類 Jpn. J. Phycol. (Sôru)* 57: 81–85.
- 熊田美里・渡辺剛・大葉英雄 2009b. 沖縄県宮古列島の海藻植生. *みどりいし* 20: 24–33.
- La Claire, J. W. II. 1982. Cytomorphological aspects of wound healing in selected Siphonocladales (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 18: 379–384.
- La Claire, J. W. II. 1987. Microtubule cytoskeleton in intact and wounded coenocytic green algae. *Planta* 171: 30–42.
- La Claire, J. W. II. 1989. Actin cytoskeleton in intact and wounded coenocytic green algae. *Planta* 177: 47–57.
- Leliaert, E., De Clerck, O., Verbruggen, H., Boedeker, C. & Coppejans, E. 2007. Molecular phylogeny of the Siphonocladales (Chlorophyta: Cladophorophyceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 44: 1237–1256.
- Lokhorst, G. M. & Star, W. 1983. Fine structure of mitosis and cytokinesis in *Urospora* (Acrosiphoniales, Chlorophyta). *Protoplasma* 117: 142–153.
- McDonald, K. L. & Pickett-Heaps, J. D. 1976. Ultrastructure and differentiation in *Cladophora glomerata*. I. Cell division. *Amer. J. Bot.* 63: 592–601.
- Motomura, T. 1996. Cell cycle analysis in a multinucleate green alga, *Boergesenia forbesii* (Siphonocladales, Chlorophyta). *Phycol. Res.* 44: 11–17.
- Nawata, T., Kikuyama, M. & Shihira-Ishikawa, I. 1993. Behavior of protoplasm for survival in injured cells of *Valonia ventricosa*: involvement of turgor pressure. *Protoplasma* 176: 116–124.
- 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.
- 奥田一雄・櫻井納美・湯浅健・峯一朗・松井透 2000. 巨大細胞性緑藻の細胞骨格を観察するための間接蛍光抗体法. *Mem. Fac. Sci. Kochi Univ., Ser. D (Biol.)* 21: 49–57.
- Okuda, K., Sekida, S., Hasebe, A., Iwabuchi, M., Kamiya, M. & Hishinuma, T. 2016. Segregative cell division and the cytoskeleton in two species of the genus *Struvea* (Cladophorales, Ulvophyceae, Chlorophyta). *Phycol. Res.* 64: 219–229.
- 奥田一雄・関田諭子・高野友子・的野はる奈・郷裕絵 2020. 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. *藻類 Jpn. J. Phycol. (Sôru)* 68: 125–133.
- Olsen, J. L. & West, J. A. 1988. *Ventricaria* (Siphonocladales-Cladophorales complex, Chlorophyta), a new genus for *Valonia ventricosa*. *Phycologia* 27: 103–108.
- Pickett-Heaps, J. D. 1975. Green algae. Structure, reproduction, and evolution in selected genera. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Provasoli, L. 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe, A. & Hattori, A. (eds.) *Culture and Collections of Algae. Proceedings of the U.S.-Japan Conference, Hakone, Japan September 1966.* Japanese Society of Plant Physiology, Kyoto, Japan, pp. 63–75.
- Satoh, T., Sakurai, N. & Okuda, K. 2000. Cytomorphogenesis in coenocytic green algae. VI. Dynamic changes in the actin cytoskeleton during wound-induced contraction in *Valonia utricularis*. *Hikobia* 13: 153–161.
- Scott, J. L. & Bullock, K. W. 1976. Ultrastructure of cell division in *Cladophora*. Pregametangial cell division in the haploid generation of *Cladophora flexuosa*. *Can. J. Bot.* 54: 1546–1560.
- 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: 31–49.
- 館脇正和 1971. 海藻の培養. *海洋科学* 3(11): 784–789.
- van den Hoek, C., Mann, D. G. & Jahns, H. M. 1995. *Algae. An Introduction to Phycology.* Cambridge University Press, Cambridge.
- 吉田忠生 1998. 新日本海藻誌. 内田老鶴圃. 東京.

補足資料

本論文の補足資料 (Fig. S1) については、日本藻類学会のWEBサイト (<http://sourui.org/publications/sorui/list/index.html>) で論文と同時に公開される。

Fig. S1. A video showing septum formation in *Chaetomorpha moniligera*.

(2022年8月3日受付, 2022年9月28日受理)
通信担当編集委員: 芹澤(松山) 和世