

# 学位論文内容の要旨

博士 (環境科学) 氏名 與那嶺 里菜

## 学位論文題名

Studies on cell wall structure during morphological changes in brown algae  
(褐藻の形態形成に伴う細胞壁構造の変化に関する研究)

植物の細胞外被である細胞壁は、セルロースをはじめとする多糖類、タンパク質、フェノール類によって構成されており、細胞形態を維持し、生物的・非生物的なストレス要因から植物体を防御する鎧のような役割を有している。細胞壁は変化する環境に応じて、構成成分の調節や、成分間の相互作用の改変を柔軟に行っていると考えられている。褐藻はコンブやワカメなどを含む生物群で、沿岸域に生育し、全ての種が多細胞体制をとる光合成生物である。多くの褐藻の生育場所は潮間帯であり、陸上の植物とは異なる環境状況である。そのため、潮汐による乾燥や塩分濃度の変化、波の動きなどによるダメージを軽減できる特性を持った細胞壁を有しているといえる。褐藻の細胞壁は多くの植物の細胞壁に見られるセルロースに加えて、アルギン酸、硫酸化フカンという褐藻特有の多糖類で構成されている。アルギン酸は褐藻の細胞壁の中で最も含有量の多い多糖類として存在している。また、マンヌロン酸 (M) とグルロン酸 (G) からなる直鎖状をとり、Mに富む領域 (M-richブロック) とMGがランダムに配向する領域 (MGブロック) で構成されている。MとGの比率はアルギン酸の物理的特性に影響し、Mブロックの割合が高いと柔らかく、Gブロックの割合が高いと硬い性質を示す。硫酸化フカンは硫酸化フコースを含む多糖類で、種によっては他の構成糖が加わり、ヘテロな硫酸化多糖として存在している。細胞壁を構成している多糖類は成長期や成熟期によって割合が変化すること、またアルギン酸や硫酸化多糖の構成が変化することが報告されている。細胞壁の構造変化は、細胞壁の力学的性質の変化をもたらし、細胞の形態にも影響を及ぼすと考えられる。しかしながら、褐藻においては、細胞や組織レベルで、形態変化と細胞壁構造の関係にアプローチする研究はほとんど行われていない。本研究では、褐藻エゾイシゲ (*Silvetia babingtonii*) 接合子の初期発生における仮根形成、および、マコンブ (*Saccharina japonica*) 配偶体の生殖器官形成という、2つの発生における形態形成を取り上げ、形態変化と細胞壁構造の変化を明らかにすることを目的として研究を行った。

エゾイシゲ未受精卵や発生初期の接合子は、細胞成分が均一に分布し、完全な球状を示す。しかし、発生過程で細胞成分の不均一が生じ、18°C連続照明の培養条件において、受精後12時間で一方向から仮根 (将来付着器になる部分) が形成される。最初の細胞質分裂は受精後20時間で観察され、仮根伸長方向に対して垂直に行われ、仮根細胞とその反対側にある葉状細胞が形成される。仮根細胞と葉状細胞の2回目の分裂は受精後24時間で完了し、その間、仮根は伸長を続けている。球形の細胞を覆っていた均一な細胞壁が、どのような構造変化を経ているのかを明らかにするために、透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察、抗アルギン酸抗体を用いた免疫電子顕微鏡法、トランスクリプトーム解析を行った。TEMによる観察は、仮根形成直後の受精後12時間の接合子と、仮根が伸長している受精後24時間の接合子を対象に行った。その結果、受精後12時間の接合子では、細胞壁は葉状部、

仮根部にかかわらず、繊維の配向や染色性の違いによって区別できる内層、中層、外層の三層から構成されていることが明らかになった。一方、受精後24時間の接合子では、葉状部の細胞壁は、受精後12時間の接合子と同様に三層構造をとっているが、仮根部の先端は葉状部から続く内層のみで覆われていることから、仮根伸長の途中で外側二層が消失することが明らかになった。更に、受精後24時間の細胞壁において、葉状部と仮根部を構成する細胞壁のアルギン酸の性質の相違について調べるために、アルギン酸のM-richブロック、MGブロック構造を認識する抗体を用いて免疫電子顕微鏡法を行なった。2つの抗体は、葉状部、仮根部に関わらず、細胞壁の内側半分（細胞膜側より）に陽性を示した。標的構造への抗体結合を示す金粒子の数をカウントし、局在パターンを調べたところ、MGブロックはM-richブロックよりもやや細胞膜側に存在していることが示された。アルギン酸はマンヌロナン合成酵素の働きによって形成されたマンヌロナンの一部がGへ変換することで合成される。この時に働くのがマンヌロナンC5-エピメラーゼ (MC5E) であり、細胞壁中に存在していると考えられている。一方、マンヌロナン合成酵素は現時点において、細胞内での局在は明らかにされていないが、合成されたマンヌロナンの一部はMC5Eの影響を受けてすぐにMGブロックへ変換されることが示唆された。トランスクリプトーム解析は受精後3、10、24時間の接合子を用いて行った。その結果、仮根形成直前と伸長時で、2つのMC5Eの発現変動が検出された。1つは仮根形成前の受精後10時間までに遺伝子発現が抑制されており、もう1つは受精後24時間に遺伝子発現が増加していた。このことから、前者のMC5Eは細胞壁に見られる多層構造の形成や仮根形成における細胞壁の部分的拡張に関わっており、後者のMC5Eは仮根の伸長に応じた細胞壁の改変に関与すると考えられる。

マコンブ (*Saccharina japonica*) 配偶体は鉄欠乏培地で培養すると成熟が抑制され、鉄を添加することにより成熟が誘導される。鉄添加培地では、雌雄配偶体の体細胞の一部が突出することで造卵器もしくは造精子器形成が開始される。この時の形態変化と細胞壁構造の変化についてTEM観察とトランスクリプトーム解析を行った。鉄を添加して6日目の雄性配偶体では、造精子器が形成されているのが観察された。造精子器は三角錐の形をしており、精子が放出される先端部分の細胞壁繊維の配向が疎になっていることが観察された。一方、鉄を添加して6日目の雌性配偶体においては、体細胞の側面から細胞の一部が突き出ている状況が観察された。これは、造卵器形成の初期段階と見られたが細胞壁構造の顕著な変化は観察されなかった。成熟に伴う遺伝子の発現変動は、鉄欠乏状態と鉄を添加して3、6日目の雌雄配偶体を用いて調べた。その結果、セルロース、硫酸化フカンの合成に関与すると予測される遺伝子、および、アルギン酸合成過程でマンヌロナン合成までに関わるほとんどの遺伝子が安定的に発現を示していることが明らかになった。一方、今回の実験の条件では造卵器形成の完了は見られなかったが、雌性配偶体で7つのMC5Eの遺伝子発現が鉄添加後3日目から減少していた。この研究から、造精子器に比べて造卵器は大きな構造であり、その構造を体細胞の側面から形成するために、細胞壁の改変、特にアルギン酸の性質が変化していることが予測された。

本研究を通じて、エゾイシゲ接合子の仮根伸長とマコンブの生殖器官形成という形態形成時における細胞壁構造の変化について、形態および細胞壁代謝に関わる遺伝子の変化から調べることができた。特にいくつかのMC5E遺伝子の発現に変動が見られたが、これらの遺伝子を含め、褐藻の細胞壁合成に関わる多くの遺伝子はまだ予測の範囲内であり、実際の機能解明は進んでいない。今後は、褐藻においても利用できるようになったCRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集ツールを応用することで、褐藻における形態形成と細胞壁構造の関係理解につながると期待される。