



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on cell wall structure during morphological changes in brown algae [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	與那嶺, 里菜
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第14770号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85792
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	YONAMINE_Rina_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士 (環境科学)

氏名 與那嶺 里菜

審査委員	主査	教授	長里 千香子
	副査	教授	山羽 悦郎
	副査	教授	星野 洋一郎
	副査	教授	井上 晶 (大学院水産科学研究院)
	副査	助教	市原 健介

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、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。そのため、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す、細胞の形態にも影響を及ぼすと考えられる。褐藻では、細胞の分化や発生における細胞壁構造の変化について、形態学的、生化学的なアプローチが個々に行われてきた。しかしながら、形態変化と細胞壁構造の変化との直接的な関係を示す知見はこれまでにない。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・伸長、および、マコンブ (*Saccharina japonica*) 配偶体の生殖器官形成という、褐藻における代表的な2つの形態形成を取り上げ、微細構造観察による細胞壁構造、細胞壁多糖類に対する特異的抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析、および細胞壁多糖類合成酵素候補遺伝子の発現解析を行った。

本研究では、褐藻細胞壁中に最も多く存在し、透過型電子顕微鏡 (TEM) において繊維構造として観察されるアルギン酸の局在変化、構造変化に着目して研究が行われた。アルギン酸はマンヌロン酸 (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の割合が高いと柔らかく、Gの割合が高いと硬い性質を示すことが知られている。エゾイシゲ接合子の仮根形成・伸長における細胞壁構造の変化を調べた結果、(1) 仮根形成前より繊維の配向や染色性の違いによって区別できる内層 (L3)、中層 (L2)、外層 (L1) の三層で構成されていること、(2) 仮根伸長が進むと葉状部 (仮根部の反対側に相当する) と仮根部の移行部分では葉状部から続いている外側2層が消失し、仮根部の先端はL1層のみで覆われていること、(3) 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行った免疫電子顕微鏡解析では、2つの抗体は、葉状部、仮根部に問わず、細胞壁の内側半分 (細胞膜側より) に陽性を示すこと、(4) 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、仮根先端部分を覆う細胞壁は、葉状部と比較してM-richのアルギン酸 (柔軟な性質を示す) で構成されていることが明らかになった。加えて、受精後3、10、24時間の接合子を用いて行ったトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) の結果から、仮根形成直前 (受精後10時間) と伸長時 (受精後24時間) で、2つのマンヌロナン

C5 エピメラゼ (MC5E) の発現変動が検出された。褐藻におけるマンヌロナン合成酵素は未だ同定されていないが、細胞膜中に存在すると予測されている。その酵素の働きによって、細胞外へ紡ぎ出されるように形成されるマンヌロナンの一部が G へ変換することでアルギン酸が合成されると考えられている。この時に働くのが MC5E である。本研究で発現変動が見られた 2 つの MC5E のうち 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のではないかという考察が行われた。

マコンブ配偶体は鉄飢餓状態で成熟が抑制され、鉄を添加することで成熟が誘導される。成熟誘導により、雌雄配偶体の体細胞の一部が突出することで造精子もしくは造卵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結果、(1) 鉄添加後 6 日目の雄性配偶体では、造精子形成が観察され、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、(2) 鉄添加 6 日目の雌性配偶体では、造卵器形成の初期段階と思われる細胞の突出が確認されたが、細胞壁構造の顕著な変化は観察されなかったこと、(3) 鉄添加に伴う体細胞の細胞壁には変化が見られなかったこと、(4) 鉄飢餓状態と鉄添加後 3、6 日目の雌雄配偶体に対してトランスクリプトーム解析を行った結果、セルロース、硫酸化フカンの合成酵素候補遺伝子、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すこと、一方、(5) 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ることが示された。この研究から、造精子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のではないかという考察が行われた。

本研究を通じて、エゾイシゲ接合子の仮根形成・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、形態および細胞壁合成酵素候補遺伝子の発現変動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、今回の研究において発現変動の見られた MC5E を中心に機能解析、局在解析を進めることで、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っていくものと期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位なども合わせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。