



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Relationship between actin plate formation and cytokinesis progression in apical cells of the brown alga <i>Sphacelaria rigidula</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	青木, 日向子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第15722号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91860
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hinako_Aoki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士 (環境科学)

氏名 青木 日向子

学位論文題名

Relationship between actin plate formation and cytokinesis progression
in apical cells of the brown alga *Sphacelaria rigidula*
(褐藻ワイジガタクロガシラ頂端細胞における
アクチンプレート形成と細胞質分裂進行の関係性について)

多細胞生物にとって、核分裂後の娘核を物理的に仕切る細胞質分裂の過程は、その体制を維持するための重要なステップである。細胞質分裂に関わる装置は、主に微小管とアクチンからなるが、その配向は系統群間及び生物種間でも差異が見られる。オピストコンタ系統群に属する動物細胞では、分裂面の細胞膜直下にアクチンリングが出現する。アクチンリングが細胞内部に収縮することで細胞膜のくびれ込みが生じ、求心的に分裂する。一方、アーケプラスチダ系統群に属する陸上植物では、微小管を主な構成要素とするフラグモプラストが娘核間に出現する。フラグモプラストは、新しい細胞の仕切りである隔膜に対して垂直に配向し、細胞内部から親細胞壁に向けた遠心的な隔膜の拡張に関与する。褐藻は、ストラメノパイル系統群に属する海産多細胞生物であり、娘核近傍にある中心体から娘核間に向けて伸長した微小管同士が交差する位置が分裂面となる。分裂面には、微小管によって輸送されたゴルジ小胞が集積し、平板小囊と呼ばれる膜構造と融合することで隔膜が細胞内部より形成され、遠心的に発達することで細胞質分裂が完了する。褐藻の細胞質分裂には、他の真核細胞では観察されていないプレート状アクチン構造 (アクチンプレート、AP) が分裂面に出現する。APは、隔膜の融合と発達に関与していることが先行研究から示唆されているが、形成と機能に関しては不明な点が多い。その理由の一つとして、分裂面においてアクチンと膜構造を同時に観察することが困難であったため、両者の時空間的關係性を捉えきれなかったことが挙げられる。そこで、本研究では、褐藻ワイジガタクロガシラ (*Sphacelaria rigidula*) の頂端分裂細胞を用いて、APの発達と隔膜形成との関係を明らかにする目的で、APと隔膜の同時染色を可能にし固定細胞と生細胞での詳細な観察を行った。

ワイジガタクロガシラの細胞質分裂は分裂面で細胞膜の陥入が生じることで求心的に進行すると報告されている。このことは、これまで観察されてきた褐藻の細胞質分裂の特徴とは異なっている。しかしながら、分裂様式が異なっているにも関わらず、分裂面へのAPが観察されている。褐藻の細胞質分裂におけるAPの働きを明らかにするためには、ワイジガタクロガシラの細胞質分裂について再検討する必要がある。そこで最初に膜結合性色素であるFM4-64FXを用いた生細胞における経時観察と透過型電子顕微鏡による微細構造観察を行った。その結果、分裂面の細胞膜の陥入は確かに

観察されたが、その部位は内部へ進行せず、それとは独立して隔膜が細胞内部から生じていることが明らかになった。ゴルジ体の機能に作用するbrefeldin A (BFA) を用いて、隔膜形成を遅延させた場合でも、陥入部の細胞内部への発達には観察されなかったことから、ワイジガタクロガシラの細胞質分裂は他の褐藻と同様に、隔膜が細胞内部から親細胞壁に向かって遠心的に進行することで完了することが明らかになった。続いて、APと隔膜の形成・拡大との関係を調べるために、固定細胞におけるFM4-64FXによる膜構造の染色と、蛍光標識ファロイジンによるアクチンの二重染色による観察を行った。その結果、APと隔膜形成は同所的に存在し、共に拡大していく様子が捉えられた。同様の方法で、BFA処理によって隔膜形成を阻害すると、APの拡大も停止することが示され、APと隔膜の拡大が連動していることが確認された。また、BFA処理で細胞質分裂の進行が阻害されている細胞について微小管配向を調べたところ、発達途中のAPの縁辺部に微小管が付随している様子が観察された。このことから、APの拡大に微小管が関係している可能性が示された。続いて、隔膜形成・拡大におけるAPと微小管の関係性について調べるために、蛍光標識したファロイジン、アクチン、チューブリンを細胞内へ顕微注入し、生細胞で経時観察を行った。①APと隔膜形成との関係については、Alexa Fluor 488標識ファロイジンとFM4-64FXを用いて調べた。この観察により、APがやや先行して分裂面に出現し、隔膜形成が遅れてその場所で生じていることが明らかになった。②APと微小管の関係については、ローダミン標識アクチンとHiLyte Fluor 488標識チューブリンを同時に顕微注入することで調べた。その結果、AP出現前に、中心体から伸長してくる微小管の交差領域に偏りが見られ、微小管が多く見られる部分でAPが形成されていることが示された。そして、拡大するAPの縁辺に微小管が存在している様子が観察された。③微小管と隔膜形成との関係については、HiLyte Fluor 488標識チューブリンとFM4-64FXを用いて調べた。その結果、APの出現と同様に微小管が比較的多く交差する領域で隔膜形成が生じていることが明らかになった。隔膜の拡大時はその縁辺部に微小管が配向している様子が観察された。APおよび隔膜の拡大が完了すると、微小管は細胞質分裂面から離れ、娘核間の距離が大きくなっていった。

本研究では、ワイジガタクロガシラの頂端細胞を用いて、その細胞質分裂進行過程について微細構造観察を行い、他の褐藻と同様に隔膜の遠心的拡張による進行していることを明らかにした。また、褐藻におけるAP、隔膜の同時観察を固定細胞と生細胞で可能にした。加えて、隔膜形成におけるAP、微小管の挙動を生細胞で経時的に観察することを褐藻で初めて行った。これらの結果から、微小管の配向がAPの出現位置に影響すること、APの形成によってその位置に隔膜形成が開始されるという3者の時空間的關係を示すことができた。先行研究より、微小管は隔膜形成に必要なゴルジ小胞を分裂面に供給する働きを有していることが報告されているが、微小管はAPと協働して、隔膜形成と拡大に関与していることも示唆された。

動物や陸上植物細胞質分裂では、アクチンや微小管の配向変化を制御するタンパク質が報告されており、そのタンパク質の機能解析を通して、細胞質分裂における細胞骨格の役割に関する研究が進められている。褐藻においても近年、多くの種でゲノム解析が進められており、CRISPR-Cas9によるゲノム編集技術が褐藻シオミドロ (*Ectocarpus species 7*) とマコンブ (*Saccharina japonica*) で確立されている。今後は褐藻において細胞質分裂関連タンパク質の探索がゲノム解析を通して行われ、その機能や生細胞イメージングにゲノム編集技術が利用されることで、褐藻の細胞質分裂に関する研究が進むことを期待する。また、このような研究を通して、真核生物において、褐藻だけが細胞質分裂時にAPを出現させている進化的な経緯についても、明らかになってくるのではないかと考える。