

<p>ふりがな 氏名（本籍） 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目</p> <p>発 表 誌 名</p>	<p>エルビラ ポール ロメル ベラスコ ELVIRA PAUL ROMMEL VELASCO (フィリピン) 博士 (学術) 甲総黒博第3号 学位規則第4条第1項該当 平成24年3月23日 Cytomorphogenesis in <i>Valonia</i> (Siphonocladales, Chlorophyceae): Ultrastructural and Biochemical Studies on Cell Regeneration and Rhizoid Differentiation (パロニア属植物 (緑藻綱, ミドリゲ目) の細胞 形態形成: 細胞再生と仮根分化に関する微細形態学および生化学的研究) Elvira PR, Sekida S, Okuda K, 2011. Rhizoid formation in <i>Valonia</i> (Siphonocladales, Chlorophyceae). <i>Phycologia</i> (in press) Elvira PR, Okuda K, 2011. Cytoskeletal and Ultrastructural Studies on Regenerating Cells from the Protoplasts of <i>Valonia</i> (Siphonocla- les, Chlorophyceae). <i>Kuroshio Science</i> 5-1:39-49</p> <p style="text-align: center;"> 審査委員 主査 教 授 奥田 一雄 副査 准 教授 関田 諭子 副査 准 教授 久保田 賢 副査 (外部審査委員) 諸岡 慶昇 副査 (外部審査委員) Bonifacio F. Cayabyab </p>
<p>論文の内容の要旨</p>	
<p>The genus <i>Valonia</i> (Siphonocladales, Chlorophyceae) is composed of marine algal species possessing large, spherical to clavate, green, coenocytic cell clusters attached to the substrata by numerous rhizoids. <i>Valonia</i> is a macroalga displaying basic properties of multicellularity achieved through cytomorphogenesis [(Greek <i>cyto</i> (=cell) + <i>morphi</i> (=shape) + <i>genesis</i> (=creation)] and differentiation of specialized parts such as reproductive, branch and rhizoid cells, which enable it to effectively colonize, and proliferate in, its benthic environment. These cellular processes are of utmost importance in understanding plant cell growth and development. Properly describing macroscopic changes that constitute growth and development necessitates microscopic investigations at the cellular level. Through such an approach, the role of the interconnectivity and interactions among cellular components, including the wall, membrane, cytoskeleton and organelles, in defining cell function and form can be elucidated. Due to the large size and conspicuous branch and rhizoid cell formation stages in <i>Valonia</i>, the use of this genus in these methods of investigation is highly advantageous.</p> <p>This research utilized <i>Valonia</i> to investigate the regeneration of cells from protoplasts, induction of rhizoid formation, and differentiation of rhizoids,</p>	

論文の内容の要旨

to demonstrate cytomorphological properties that are relevant in maintaining cell integrity and sustaining growth in varying conditions inherent to marine environments. The aim of this thesis is to identify and describe the ultrastructural and biochemical mechanisms facilitating cytomorphogenetic processes involved in cell regeneration from protoplasts and rhizoid differentiation with emphasis on the role of environmental physicochemical conditions. The strategy of this project is based on the employment of environmental stimuli to activate cellular changes across three species of *Valonia*: *V. macrophysa*, *V. fastigiata* and *V. aegagropila*. These cellular changes were described through various biochemical, staining and microscopy techniques. A series of culture studies led to a preliminary assessment of pertinent morphological properties of the three species exploited in the succeeding studies. Cell regeneration from protoplasts was evaluated as a method of propagation with gainful application in later rhizoid differentiation experiments that required numerous cell samples. The process of rhizoid differentiation was then monitored starting from rhizoid induction, rhizoid elongation, and up to rhizoid attachment to a substratum. As a result, the following findings were obtained:

1. Culture Studies in Three Species of *Valonia*

In the first study, observations on the different life stages revealed common and unique characteristics among the three species of *Valonia* that proved relevant in their identification. A common trait that was confirmed was wound healing and cell regeneration from protoplasts, investigated further in detail in the next chapter. A correlation among the unique traits such as cell shape, rhizoid and tenacular cell (a rhizoid-like structure) formation was suggested. This correlation led to the determination and comparison of the properties of rhizoids and tenacular cells in a later study. As a consequence, this chapter suggested the possibility of exploring the use of cytomorphogenetic information in explaining the rationale behind the current species concepts in *Valonia*.

2. Cytoskeletal and Ultrastructural Studies on Regenerating Cells from the Protoplasts of *Valonia* (Siphonocladales, Chlorophyceae)

In the second study, a detailed description of the various ultrastructural

論文の内容の要旨

modifications during cell regeneration from protoplasts was obtained. The organellar, cytoplasmic, cytoskeletal and wall modifications in *V. macrophysa*, *V. fastigiata* and *V. aegagropila* were connected to the changes in morphology of protoplasts. The following major points were thereby found:

(1) a polysaccharide matrix provided the initial covering of the protoplasts, (2) a concurrent rearrangement of cortical microtubules (CMTs) and actin filaments (AFs) facilitated the contraction, distribution and shape transformation of the protoplasm and (3) a rapid construction of the plasma membrane and cell wall completed the regeneration of the cell from the protoplast. These stages ensured the integrity and survival of the fragmented protoplasts during extrusion of the protoplasm after mechanical wounding, a common occurrence in the rough environment of macroalgae such as *Valonia*. As mentioned, this capability found an application as a rapid method of propagation for other experiments on *Valonia* requiring young, numerous cells.

3. Rhizoid Formation in *Valonia* (Siphonocladales, Chlorophyceae)

In the third study, the various mechanisms governing the initiation of rhizoid formation in *Valonia* was enumerated. It was found that rhizoids can be induced on any area of the cell, not just around basal regions where they usually form. Moreover, the following important aspects of induction of rhizoid formation were ascertained: (1) hydrophobic substrata, and not hydrophilic substrata, induced rhizoid formation, (2) in order for rhizoids to form between two cells, the distance between the cell surfaces must be within 0.5 mm (3) the contactless exposure between two cells must last for more than 48 hours for rhizoids to be induced to form, (4) amorphous materials, mainly composed of sugars, must accumulate on the target cell surface and not be easily dissolved on the substratum surface, (5) rearrangement of CMTs may define the area where rhizoid formation occurs, (6) AFs facilitated the movement and accumulation of protoplasmic materials through protoplasmic streaming toward the area of interest, and (7) after the above requirements were satisfied, the cell wall

論文の内容の要旨

swelled and the protoplasmic mass was separated from the mother cell by a septum, resulting in a nascent lenticular cell that extends via tip growth and eventually attaches onto a substratum surface. Aside from these findings, an important implication was inferred regarding *Valonia* and related macroalgae that develop into reticulate thalli since these algae feature rhizoid-like structures called tenaculae. Tenaculae form between two adjacent thallus cell surfaces and may have the same induction mechanisms as rhizoids. This can be considered as a fine example wherein cellular studies may be used to explain the overall morphology of macroalgae, such as *Valonia*, that should be helpful when settling species identity.

5. Effect of Substratum Hardness on *Valonia* Rhizoid Differentiation

In the fifth study, the events comprising rhizoid attachment to substrata, which represent the completion of the rhizoid formation process after induction and elongation, were illustrated in *V. aegagropila*. These involved branching and formation of attachment structures called 'haptera.' Various substratum properties affect the behavior of rhizoids of macroalgae; however, substratum surface energy has been reported to play a major role during rhizoid attachment. This study explored this phenomenon by building a case for isolating the effects of substratum surface energy through hydrophobicity and hardness. In doing so, the following results were obtained: (1) substratum hydrophobicity did not determine the form of rod-shaped and rosette-shaped rhizoids, (2) soft substrata promoted rod-shaped rhizoids while hard substrata supported rosette-shaped rhizoids, (3) increasing hardness, even in a hydrophilic substratum such as agar, induced increasing degrees of tip branching in elongating rhizoids, (4) tip branching in agar could have been influenced by the puncture resistance of agar surfaces against the protruding, relatively softer, cell wall of the rhizoid domed-tip, (5) apart from the cell wall, CMTs may regulate the shape modifications along the tip region of rhizoids. These

論文の内容の要旨

results suggested that in the marine environment, *Valonia* and related macroalgae may utilize rhizoid branching on substrata with varying hardness and adhesion on hydrophobic surfaces.

The dominant connection among the studies comes from the sequence of cellular events naturally occurring in *Valonia*. Based from the major results, the following general conclusions regarding cytomorphogenesis in *Valonia* were gained: (1) a range of synchronized rearrangements of cellular components ensures the survival and integrity of wounded cells, (2) cytoskeletons function in multiple capacities during wound healing and rhizoid formation, (3) the cell wall and extracellular amorphous material serve as one of the cell's means of interaction with the external physical environment, and (4) the lineage of nascent rhizoid cells does not predict their fate as various environmental stimuli can direct the growth mode of rhizoids. In summary, this thesis have successfully revealed multiple cytomorphological characteristics in *Valonia* through the modification of natural environmental parameters and subjecting cells to such conditions while extracting ultrastructural and biochemical information and relating these information to the overall multicellular morphology of *Valonia*.

論文審査の結果の要旨

一般に、高等植物は約 40 の異なるタイプの細胞からなる。これらの細胞は分裂、成長を含む一連の発生・形態形成を通じて形態的かつ機能的に分化する。細胞の発生・形態形成の過程は、その植物の遺伝的プログラムに制御されるだけでなく、自然界の様々な外的環境要因によっても調節される。細胞の発生・形態形成のメカニズムを明らかにすることは、植物科学のもっとも重要な研究課題の 1 つである。

バロニア属の種は緑藻綱ミドリゲ目バロニア科に属する海藻で、熱帯域から亜熱帯域の沿岸に広く分布している。藻体は単一または数 10 個までの巨大な多核細胞から構成され、藻体下部の細胞から生じる多数の仮根によって岩に固着する。申請者は、土佐湾とフィリピン沿岸で採集したバロニア属 3 種を用い、生理学および細胞生物学的手法を駆使して細胞の再生・成長および仮根の形態形成を明らかにしている。学位論文の中核をなすのは、独自の実験系を開発し、仮根の分化が細胞外へ分泌される多糖類の蓄積によって誘導され、かつ細胞に接近させる材料基質の表面特性に依存するという新知見を得ていること。さらにまた、仮根の成長様式が光の有無によって変換される事実を見だし、植物の細胞分化を理解する上で新たな側面を切り拓いているところである。

学位論文は全体が 7 つの章で組み立てられており、第 1 章の緒言と第 7 章の総合考察・結論を除く 2 章から 6 章が主な研究成果となっている。なお、3 章と 4 章は、申請者が参考論文として 2 報の学会誌等掲載論文の内容であり、5 章の内容は、本学位論文の提出後に学会誌への掲載が受理された論文を踏まえて記載されている。それぞれの章の内容は概略以下の通りである。

緒言では、研究の背景、バロニア属植物の特徴、研究目的、何をどこまで明らかにするかについて、用いる手法を含めて詳細に解説している。

バロニア属 3 種における培養研究

採集地の異なる *Valonia macrophyssa* (高知県横浪半島沿岸)、*V. fascigiata* (高知県大月町沿岸)、*V. aegagropila* (フィリピン・ルソン島カガヤン州サンタアナ) から分離した生殖細胞を培養し、それぞれの種における細胞の形、枝細胞の出方、細胞間を繋ぐ接着細胞の有無と形、仮根の形成部位と数、傷害に対する再生能力等の特徴を、野外採集個体の形態と比較しながら、明らかにしている。培養実験では、3 種ともに仮根はガラス製の培養容器の内側に接している細胞の下部から発出すること、また、接着細胞の存在が *V. fascigiata* の分類形質として記載されているが、*V. fascigiata* だけではなく他の 2 種も隣り合う細胞間に接着細胞 (tenaculae) が形成され、その形態が仮根と類似するという結果を得ている。細胞の切断という傷害に対し、3 種ともに細胞が治癒・再生することを観察している。これらの培養実験の結果から、以下の章で扱われる細胞の再生と仮根形成を解析するための基本的な実験系を確立している。

論文審査の結果の要旨

プロトプラストから再生するバロニア細胞における細胞骨格と微細構造

バロニア属3種において、切断した細胞から培地中へ絞り出した原形質は収縮して球形のプロトプラストになり、そのプロトプラストは細胞壁を形成して新しい細胞に再生する。このような傷害治癒と細胞再生の過程における原形質体の形の変化、微小管とアクチンフィラメントの挙動、細胞壁形成を間接蛍光抗体法と超薄切片法による電子顕微鏡観察により明らかにしている。絞り出された原形質は多糖類を含むマトリックスに包まれたまま収縮し、プロトプラストになること、原形質の収縮は細胞表層微小管の脱重合と束化したアクチンフィラメントの出現に随伴すること、球形のプロトプラストになるとアクチンフィラメントが消失し、微小管が際重合して細胞壁形成が始まるという結果を得ている。各種の微小管破壊剤とアクチンフィラメント脱重合剤の効果から、微小管は原形質の収縮運動に影響しないが、再生細胞の細胞小器官の分布に関係するのに対し、アクチンフィラメントは原形質の収縮運動に関与し、かつ再生細胞の生存に不可欠であると考察している。プロトプラストから多数の再生単細胞（無仮根）を得る方法は、仮根の誘導および分化・形態形成のための研究に活用されている。

バロニア属植物の仮根形成

バロニア属植物の仮根は母細胞の任意の部位で形成（細胞分裂）するレンズ状細胞が細く伸長して発達する。仮根形成が母細胞のどの部位で起こるのか、仮根形成を誘導する外的環境要因や物質が存在するのか、誘導後に起こる仮根形成の過程などを、それぞれ各種の基質材料、組織染色と蛍光標識レクチン、間接蛍光抗体法を用いて明らかにし、以下の主な結果を得ている。細胞表面に各種の基質材料を接触させると、ガラス等の疎水性基質と接触している細胞表面部位で仮根形成が誘導され、寒天等の親水性基質との接触では仮根形成は誘導されなかった。互いに接触させた2つの細胞の接触面でも仮根形成が誘導されたが、仮根形成は必ずしも両細胞の接触を必要とせず、細胞間の距離が0.5 mm以内であれば、仮根形成が誘導された。仮根誘導が成立するために両細胞を接触または近接させる時間は少なくとも48時間が必要であった。両細胞の接触部の周辺および近接部位に不定形物質が蓄積したが、不定形物質を除去すると仮根が誘導される割合が減少した。不定形物質は細胞表面全体に渡って分泌される多糖類であり、 β -D-glucose, α -D-mannose, β -D-galactose, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-glucosamine 残基を含むことが示唆された。仮根形成が誘導されると、その部位の細胞表層微小管の配列がランダムとなり、アクチンフィラメントの収縮により周辺の原形質が集合した。集合した原形質は、それと母細胞の原形質を分割する隔壁が形成されることにより、小さなレンズ状細胞に分裂した。

論文審査の結果の要旨

レンズ状細胞の頂部が突出・伸長して仮根が発達した。これらの結果から、細胞は細胞表面全体に分泌される多糖類が蓄積する部位に疎水性基質が存在することを感受し、感受した刺激がその部位の細胞領域に伝えられ、細胞骨格が関与する原形質の集合とレンズ状細胞の分裂、仮根形成という応答が導かれると考察している。また、バロニア細胞におけるこのような仮根形成の誘導メカニズムは、細胞同士が *tenaculae* で結合するアミモウやアオモグサなどの他のミドリゲ目多核緑藻の形態形成にも重要な役割を果たしていると推察している。

人為的に誘導できる成長様式の変換はバロニアの仮根分化に影響を及ぼす

細胞・組織が特異的な構造、機能、遺伝子発現を示す状態に変化することを分化と呼び、また一般に、分化は不可逆のプロセスである。バロニア属植物の仮根は、拡大成長する卵形の大型細胞から分裂し、先端成長する糸状体が発達するので、仮根形成は細胞分化であると同時に形態形成であるとみなせる。発生初期の仮根が外的環境にどのように反応するかを *V. aegagropila* を用いて調べ、仮根形態と成長特性に影響を及ぼす種々の環境要因が存在することを明らかにし、概要以下の結果を得ている。水中または軟らかい基質中で、また、暗黒条件下でも仮根は先端成長を継続する。先端成長している仮根に $10 \text{ mmol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 以上の強度の光を照射すると、先端成長が阻害され、先端のすぐ下部が拡大成長に変換し、球形に膨張した。光照射のもとで拡大成長する仮根を暗黒条件に移すと、以前に成長していた先端部で先端成長が再開した。このような成長様式の変換は光条件や基質を調整することで可逆的に何度でも制御でき、その結果、一本の串にいくつかの団子が連なったような形態の仮根になった。光合成電子伝達系の阻害実験により、光合成のような光依存過程が成長様式の変換に関与することが示唆された。仮根に拡大成長を継続させることによって大きく発達する膨張部は、形態的および機能的に卵形の大型細胞と同様に、レンズ状細胞形成によって新たな仮根を形成した。これらの結果から、バロニアにおける先端成長中の仮根は、その形態と機能において予め既定されておらず、分化が成立した状態に達する途中段階にあると考察している。無傷の細胞で成長様式が変換して細胞の構造・機能が変化する事実は植物では最初の知見であり、細胞の運命を決める分化のプロセスを理解する上で新しい認識をもたらしている。

バロニア属植物の仮根分化に関する基質の堅さの効果

上記の研究では、仮根の成長に焦点が当てられたが、仮根の主たる役割は基物への付着である。仮根が仮根として分化していることを示す特異的機能が果たされるのは、最終的に基物に付着することである。ここでは、*V. aegagropila* を用い、仮根が付着する基物の表面エネルギー（疎水性能と堅さ）の影響と効果を明らかにしている。仮根が基物に付着するとき、仮根先端が分岐し、いわゆるロゼット状の付着器 (*haptera*) の形態を形成するが、基物に付着しないときは、仮根は先端成長を続ける。基物として種々の基質材料を用い、概ね以下の結果を得ている。基質の疎水性能は先端成長の継続か付着器形成かの決定に関係しなかった。しかし、その決定は基質の堅さに関係し、軟質基質では先端成長が継続したのに対し、硬質基質は寒天のような親水性物質であっても付着器形成を誘導した。基質として用いる寒天の濃度の増加に伴い、付着器の分岐が増加

論文審査の結果の要旨

したが、これは寒天内に穿孔する仮根先端の細胞壁強度に対する寒天の破碎耐性の程度に依存した。先端成長する仮根の細胞表層微小管は仮根の軸に平行に配列して先端に収斂したが、仮根が基物に付着し、仮根先端が複数の分岐をもつ付着器に発達するとき、平行配列する表層微小管は複数の束になって付着器のそれぞれの分岐の先端に収斂した。これらの結果から、仮根の先端部は接触する基物の堅さを認識し、その刺激を感受すると、仮根先端の表層微小管の収斂部が分割し、付着器の分岐を形成するという応答に至ると考察している。このような仮根の付着器形成メカニズムは、仮根が本体細胞または藻体を支えるに足る固い基物に到達して初めて付着器を発達させるという藻類の生態的適応に役に立っていると推察している。

最終章の総合考察では、細胞の形態形成と分化を研究するためのモデル生物としてのバロニア属植物の有効性を検討し、実験材料として用いたバロニア属3種の生殖・発生・形態形成を含む生活史を明らかにする中で、仮根形成を研究の焦点に絞った根拠を説明して本学位論文の植物科学における位置づけをまず明確にし、その上で、成果の中心をなす細胞再生および仮根の分化と形態形成に関する研究結果に詳細な考察を加え、最後に今後の研究課題について具体的に言及している。

本学位論文は、バロニア属植物の仮根形成の始まりから終わりまでを、形成誘導、成長、付着器形成の3つの連続する異なる素過程に区別し、各素過程における外的環境要因とそれらによる刺激の感受および細胞応答を細胞生物学的・細胞生理学的に明らかにしている。特に、仮根形成誘導は母細胞が細胞表面全体に分泌している多糖類物質の局所的な蓄積によって起こる事実、発達中の仮根が光条件に依存して成長様式を変換し、細胞分化の方向を変える事実、さらに仮根の先端が基物の堅さを認識して付着器を形成し、最終的にその機能を果たす仮根に確定分化する事実を見いだしたことは、申請者の高いオリジナリティーを示すものであり、植物の分化と細胞の運命がどのように調節されているかを解明する植物細胞学の研究に大きく貢献し、学位論文の核心部分として高く評価できる。また、本研究で明らかにされたバロニア属植物の仮根がもつ種々の生理学的特性を基礎にし、自然界で大型藻類が仮根を形成して岩上に着生するしくみを細胞レベルで説明することが可能となることから、本学位論文は、沿岸植生とその生態系を研究の範疇とする黒潮圏科学にも密接に関連する内容を含むと考えられる。