ISSN 0038-1578

## Vol. 71 No. 3 10 November 2023



The Japanese Journal of Phycology (Sôrui)

第71巻 第3号 2023年11月10日



日本藻類学会 THE JAPANESE SOCIETY OF PHYCOLOGY

## シオグサ目多核緑藻における隔壁形成と細胞骨格 II.フサバロニアのレンズ状細胞形成

関田 諭子<sup>1</sup>·牛嶋 秀貴<sup>2</sup>·岡田 元一<sup>2</sup>·細木 佳奈<sup>3</sup>·奥田 一雄<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>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) <sup>2</sup>高知大学理学部生物学科(〒780-8520高知市曙町二丁目 5-1)

3高知大学大学院理学研究科(〒780-8520高知市曙町二丁目5-1)

Satoko Sekida<sup>1</sup>, Hideki Ushijima<sup>2</sup>, Gen-ichi Okada<sup>2</sup>, Kana Hosogi<sup>3</sup> and Kazuo Okuda<sup>1\*</sup>: Septum formation and cytoskeleton in cladophoralean coenocytic green algae. II. Lenticular cell formation of *Valonia fastigiata*. Jpn. J. Phycol. (Sôrui) 71: 143–155, November 10, 2023

In this study, we used light and electron microscopy to investigate the formation of lenticular cells, microtubule behavior, and septum development in the coenocytic green alga *Valonia fastigiata*. Lenticular cell formation was a two-step process. The first step involved protoplasmic aggregation in a circular area, with centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern appearing along the peripheries. In the second step, the plasma membrane invaginated, and a septum was formed. The centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern split into two parts, creating a circumferential narrow band without microtubules. The plasma membrane then furrowed at the narrow band, and brush-like microtubules emerged at the leading edges of the plasma membrane during septum development. Cells treated with a microtubule-disrupting drug during the first step had a destroyed circular ray pattern and diffused protoplasmic aggregation, while cells treated early in the second step stopped septum formation and had no brush-like microtubules. The septum grew centripetally, with amorphous materials deposited first and then cellulose microfibrils synthesized to thicken it. It has been noted that the brush-like microtubules previously discovered in *Chaetomorpha moniligera*.

#### Key Index Words: actin filaments, cellulose, cytokinesis, electron microscopy, indirect immunofluorescence microscopy, lenticular cell formation, microtubules, multinucleate green algae, septum formation, Valonia fastigiata

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

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Kochi University, 2-5-1 Akebono-cho, Kochi 780-8520, Japan <sup>3</sup>Graduate School of Science, Kochi University, 2-5-1 Akebono-cho, Kochi 780-8520, Japan

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

#### 緒言

バロニア属の種はシオグサ目に属する多核緑藻で、本邦を 含む世界中の熱帯から亜熱帯域の海岸に生育・分布する(吉 田 1998, Eggert et al. 2003)。藻体は、大きさが数 mm を越 える単独もしくは複数の巨大な細胞からなる(Shihira-Ishikawa 1987)。細胞は球形から卵形または棍棒状を呈し、その容積 のほとんどを中心液胞が占める。細胞壁のすぐ内側に分布す る原形質の薄い層の中に何千個以上の核と葉緑体が含まれる。 原形質膜のすぐ内側に表層微小管が平行に配列する。バロニ ア属の一部の種では、2本鞭毛の配偶子を放出する雌雄異株 の配偶体と4本鞭毛の遊走子を放出する胞子体からなる同形 の世代が交代する生活史が知られている(堀 1994)。巨大な 細胞を有するという特徴を活かし、バロニア属の種はイオン ポテンシャルや膨圧に関する生理学的な実験材料に用いられ ている (Asai & Kishimoto 1975)。

シオグサ目多核緑藻の主要な細胞質分裂は,隔壁形成によ る二分裂と,隔壁形成によらない分割細胞分裂の2つの様式 が知られている(Leliaert et al. 2007)。さらに,隔壁形成によ る細胞質分裂には2つのタイプがある。その1つは,前報で タマジュズモ(Chaetomorpha moniligera Kjellman 1897)に おいて報告したように(関田・奥田 2022),円柱形の細胞が その細胞を横断する隔壁によってほぼ等分裂するタイプであ る。隔壁形成による細胞質分裂の2つ目のタイプは,バロニ ア科の種において見られるレンズ状細胞形成である。この場 合,卵形の細胞の原形質の一部を切り出すように隔壁が発達 することで,母細胞表面からレンズ状の小さな細胞が局所的 に分裂する(Okuda et al. 1997)。細胞質分裂のこれら両方の タイプにおいて,隔壁は母細胞の細胞壁の内側から液胞方向 ヘカメラの絞りが閉じるように求心的に発達する。

筆者らは、タマジュズモの隔壁形成において、液胞側へ陥 入する原形質膜の最先端に夥しい数の刷毛状の短い微小管が 出現することを第1報で明らかにした(関田・奥田 2022)。 また、この刷毛状の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、タマジュズモの隔壁形成に関与する独特 の細胞質分裂装置の一部であることを示唆した。本研究は、 シオグサ目多核緑藻の隔壁形成と細胞骨格についての第2報 として、バロニア科に属するフサバロニア(Valonia fastigiata Harvey ex J. Agardh 1887)(熊田ら 2009)のレンズ状細胞形 成について報告する。レンズ状細胞が形成されるときの細胞 表面観の変化に基づき、レンズ状細胞形成をいくつかの段階 に分け、原形質の局所的集積、隔壁形成の進み方、微小管の 配置と挙動、隔壁の構造と成分、および微小管破壊剤の効果 について明らかにした。

#### 材料と方法

フサバロニアは 2009 年 6 月 8 日に高知県大月町西泊の海 岸で採集した。4 本鞭毛をもつ遊走子から発生した株を用い た。藻体は栄養強化海水(ダイゴ IMK 培地,日本製薬株式会 社,東京)で培養した。培地粉体 25.2 gを 200 mL の蒸留水 に溶解後に濾過減菌し,これを IMK 原液とした。オートクレー ブで滅菌した海水 500 mL に対して IMK 原液を 1 mL の割合 で加え,培養液として用いた。藻体は約 200 mL の培養液を 含む腰高シャーレの中で,温度 22°C,白色蛍光灯による 14 h の明期(16  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)と 10 h の暗期からなる明暗周期の 条件で培養した。

フサバロニアのレンズ状細胞形成の過程を観察・記録する ため、デジタルカメラ(Coolpix P6000,株式会社ニコン,東京, 日本)を装着した実体顕微鏡(SZX7,オリンパス光学工業株 式会社,東京,日本)を使用した。インターバル撮影は2 min または5 min おきに行った。

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第1報(関田・奥田 2022)で記載 した方法と同様であった。ただし,固定液に含まれる固定剤 の最終濃度は,4%パラホルムアルデヒドと1%グルタルアル デヒドであった。蛍光像は落射蛍光顕微鏡(BX51,オリンパ ス光学工業株式会社)で観察した。また,微小管破壊剤アミ プロフォスメチル(APM)のレンズ状細胞形成に及ぼす効果 を明らかにする実験においても,関田・奥田(2022)に記載 された方法に従った。

レンズ状細胞を形成している細胞を固定して樹脂包埋し, 光学顕微鏡および電子顕微鏡で観察するための切片を作製し た。細胞を 0.5% グルタルアルデヒド(GA)と 0.5% 四酸化 オスミウム(OsO<sub>4</sub>), 0.1 M カコジル酸ナトリウム(CB)(pH 7.4)を含む 70% 海水(SW)で 15 min 固定した。0.1 M CB を含む 70% SW で洗浄後, 1% GA と 1% タンニン酸, 0.1 M CB を含む 70% SW で 1 h 再固定した。0.1 M CB を含む 70% SW で洗浄後, 1%OsO<sub>4</sub> と 0.1 M CB を含む 65% SW で 8 h 後 固定した。定法に従ってエチルアルコールで脱水し, Spurr の樹脂(Spurr 1969)またはLRホワイトレジン(応研商事, 東京)に包埋した。Spurrの樹脂に包埋した試料は光学顕微 鏡観察および通常の電子顕微鏡観察に用いられた。LRホワ イトレジンに包埋した試料は、後述するように、セルロース を標識するための実験に用いられた。ウルトラミクロトーム (Ultracut UCT, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用い, 光学顕微鏡観察のために厚さ1-2 µm の切片を作製した。切 片は1%トルイジンブルーOまたは0.25 mg/mLのカルコフ ルオールホワイト M2R (Fluorescent Brightener 28, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)で染色した。カルコフルオール ホワイト M2R はセルロースを蛍光染色することが知られてい る (Maeda & Ishida 1967)。

電子顕微鏡観察のために、厚さ 50-100 nm の切片を作製し た。これらの切片の一部は1%酢酸ウラニル水溶液とクエン 酸鉛による二重染色を行った後に電子顕微鏡(JEM-1400,日 本電子株式会社、東京、日本)で観察した。他の切片は、隔 壁にセルロースが含まれるかどうかを調べるために用いた。 Chanzy et al. (1984) は、セルラーゼの一種 (cellobiohydrolase-I = CBH-I) を結合させたコロイド金(CBH-I-conjugated gold) はセルロースを標識することを報告している。この方法を応 用し、電子顕微鏡下で金粒子が付着・分布している部位にセ ルロースが存在することを示すことができる(Okuda et al. 1993)。Chanzy et al. (1984) に従い、粒子径 20 nm のコロイ ド金 (Sigma-Aldrich) を用いて CBH-I-conjugated gold 溶液を 作製した。CBH-I は Novo Industri (Bagsvaerd, Denmark) か ら寄贈されたものを使用した。切片を CBH-I-conjugated gold 溶液で1h処理し、PBSで洗浄後、1% 酢酸ウラニル水溶液で 染色して電子顕微鏡観察した。

レンズ状細胞形成の進行に伴って発達する隔壁の表面観を, 光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した。隔壁の表面を観察する ためには隔壁の表面に付着する原形質を除去する必要がある。 しかし、発達中の隔壁は脆弱なので、そのような隔壁を無傷 で分離するために隔壁の周囲の原形質を物理的に取り除くこ とは困難であった。そのため、本研究では、隔壁から原形質 を取り除くために、化学的な方法を用いた。レンズ状細胞を 形成している細胞を, 市販の塩素系漂白剤(ハイター, 花王, 東京)の原液(6% 次亜塩素酸ナトリウムを含む)に直接浸漬 して処理し、原形質を溶解した。浸漬後約10分で、処理した 細胞を海水中に移し、レンズ状細胞とその周辺部を残すよう に,その他の細胞部分を,カミソリを使って切除した。分離 した発達中の隔壁を含むレンズ状細胞とその周辺部の試料を 蒸留水で洗浄し、一部は倒立顕微鏡(CKX41、オリンパス光 学工業株式会社)の位相差モードで観察した。その他は、電 子顕微鏡観察のためのレプリカ試料作製に用いられた。

電子顕微鏡観察のためのレプリカ試料は, Okuda & Mizuta (1985) に従い, 基本的に真空蒸着型1段レプリカ法(日本電 子顕微鏡学会関東支部, 1975) によって作製した。以下にそ の概略を記載する。上記で示したように, レプリカの元にな る細胞壁試料はハイターで原形質を除去した後,海水と蒸留 水で洗浄し,隔壁を含むレンズ状細胞と周辺細胞壁部分とし て分離されてきたものである。このような試料を,その細胞 壁の内側表面(母細胞の液胞側から見た細胞壁の表面)を上 向きにし,水中でアセチルセルロースフィルム(応研商事, 東京)に載せて密着させ,水中から取り出した。アセチルセ ルロースフィルムに密着した細胞壁試料は自然乾燥後,真空 蒸着器(JEE4B,日本電子株式会社)内に移され,真空度2× 10<sup>4</sup> Paの条件で,白金によるシャドーウィングと炭素蒸着を 行った。シャドーウィングと炭素蒸着を施した試料は70%硫 酸水溶液に浮かべて60℃で3日間処理することで,細胞壁 とアセチルセルロースフィルムを溶解した。レプリカは蒸留 水で3回洗浄後,グリッドに載せて電子顕微鏡で観察した。

#### 結果

#### 1. 原形質の局所的な集積とレンズ状細胞の形成

レンズ状細胞が形成されるとき,細胞全体にわたって均一 に分布していた原形質は,その一部が移動することで,局所 的に集積した。集積してきた原形質は,多数の核と葉緑体を 含み,それら全体を,新たに形成される隔壁が周りの原形質 から分割することで,母細胞からレンズ状細胞が分裂した。 これらの一連の過程の細胞表面観の変化を実体顕微鏡で観察 し(Fig.1),併せて動画を作成した(Movie S1,S2)。また, レンズ状細胞を形成している細胞の断面の切片を作製した (Fig.2)。 レンズ状細胞形成の最初の段階は,細胞の不特定な場所に 原形質が集まり始めたことだった(Fig. 1A)。原形質は半径 0.5-0.6 mmの円形の領域に集合し,葉緑体の分布密度が増加 した結果,原形質が集合する円形領域は濃い緑色を呈し,そ の周辺部分と区別された(Fig. 1B)。原形質は円形領域のとく に周縁部に集積した(Fig. 1Cの矢印)。その後,原形質集積 周縁部の外周に濃緑色の細い環が観察された(Fig. 1Dとその 挿入図の矢印)。表面観におけるこの濃緑色の細い環の出現は, 原形質集積周縁部の端を起点として,母細胞の細胞壁の内側 表面から隔壁が形成され始めたことを示す形態的指標であっ た(Fig. 2A1-3)。

隔壁形成の開始後,細胞の表面観では,原形質集積部の形 と色の変化で隔壁の発達の程度を知ることができた。原形質 集積部は濃い緑色で,指輪の形を呈した(Fig. 1E)。隔壁形成 の進行に伴い,原形質集積部は内側へ拡大し(Fig. 1F),指輪 の穴の直径がカメラの絞りが閉じるように求心方向へ徐々に 小さくなった(Fig. 1E-G)。

形成される実際の隔壁の三次元的な配置や構造は平面観で は明らかにできないので,隔壁形成を細胞断面観で観察した。 上記で述べたように,Fig. 2A1の段階(Fig. 1D)で,原形質 集積周縁部の端から隔壁形成が開始した(Fig. 2A2 と Fig. 2A3 の矢印)。Fig. 2B1の段階(Fig. 1E)では,隔壁は原形質集 積周縁部の原形質を包み込むように母細胞壁の内側から液胞 側の斜め方向へ発達し始めた(Fig. 2B2 と Fig. 2B3の矢印)。 Fig. 2C1の段階(Fig. 1F)では,伸長・発達している隔壁(Fig.



Fig. 1. A series of observations of cell surfaces depicting the process of lenticular cell formation in *Valonia fastigiata*. The images labeled as A through H were taken at different times: 0, 6, 10, 11, 13, 16, 19, and 22 h after the beginning of a dark period, respectively. Arrows in C point towards the peripheries of protoplasmic aggregation. The arrows in the insert of D indicate the initiation of septum formation, which is depicted by a dark green ring appearing outside the peripheries of protoplasmic aggregation.



Fig. 2. Septum formation in *Valonia fastigiata* showing the surface views (A1, B1, C1, D1) and the cross-sectional views (A2–3, B2–3, C2–3, D2–3). A1–3, centripetal ingrowth of a septum (arrow in A3) beginning from the inside of the mother cell wall (MCW) at the outside of the peripheries of protoplasmic aggregation. B1–3, an early-developing septum (arrows in B3) that covers the protoplasm-rich portions. C1–3, a developing septum at the middle stage that looks like a holed coin (C1). Centripetal ingrowth of the septum (arrows in C3) proceeds toward the vacuole between the mother and the lenticular cells. Protoplasm at the side of a lenticular cell (PLC) is distributed much more than protoplasm at the side of a mother cell (PMC). D1–3, an almost complete septum, where the center pore is to be closed (D1). D3 shows that PLC was closely packed on the septum (arrows), while PMC extended sparsely on the opposite side. VM, vacuole of mother cell; VL, vacuole of lenticular cell; n, nucleus; ch, chloroplast.

2C2 と Fig. 2C3 の矢印)の上下に原形質が回り込んだ。Fig. 2C3 は,隔壁の上部(レンズ状細胞側)表面に分布する原形 質(PLC)と隔壁の下部(母細胞側)表面に分布する原形質 (PMC)を示す。隔壁はさらに求心的に伸長・発達し(Fig. 2D2 と Fig. 2D3 の矢印),最後に中心の穴を塞ぐことでレン ズ状細胞が形成された。このように、レンズ状細胞形成は連 続する 2 つの段階からなっていた。すなわち,第1段階は円 形領域への局所的な原形質の移動と集積であり、それに続き、 第 2 段階は原形質集積周縁部の端から始まる求心方向への隔 壁形成であった。

隔壁形成中に将来のレンズ状細胞には、すでに液胞が存在 した(Fig. 2C2 と Fig. 2D2 の VL)。Fig. 2C3 および Fig. 2D3 で示すように、PLCは、PMCよりも多く分布し、また、原形 質の層が厚かった。隔壁が完全に形成された後、隔壁上部表 面に分布していた原形質の多くはレンズ状細胞の側面基部へ 移動し始め(Fig. 1H と Movie S2)、その後、レンズ状細胞は 母細胞から突出するように成長した(Movie S2)。

#### 2. 原形質の局所的な集積に伴う細胞骨格の変化

原形質が移動し,局所的に集積してくるレンズ状細胞形成 の第1段階では,平行配列する表層微小管とは異なる微小管 が出現した。Fig. 3Aは,原形質が集まり始めた円形の原形質 集合領域周辺において,3つのタイプの微小管が分布する部 位とそれぞれの配列様式を模式的に示す。Fig. 3Aの模式図



Fig. 3. Observation of microtubules, actin filaments, and nuclei during lenticular cell formation in *Valonia fastigiata*. A, a diagram of three distinct microtubules distributed inside and outside of protoplasmic aggregation, the portion of a dark green disk. Random microtubules (R) and centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern (CR) appeared in the central area and peripheries of the protoplasmic aggregation, respectively. Cortical microtubules (C) were arranged parallel around the outside of the protoplasmic aggregation. B, immunofluorescence of microtubules that are situated as indicated in A. This image displays various types of microtubules, including randomly arranged ones (indicated by arrowheads), centripetal microtubules arranged in a circular pattern (indicated by arrows), and cortical microtubules (indicated by double arrowheads). C, random microtubules (arrowheads) distributed in the central area of B. Immunofluorescence images of microtubules (D) and actin filaments (E) and nuclei stained with DAPI (F). The same area was photographed in D–F. Broken lines show the outer boundary of the protoplasmic aggregation that stands at the right side of each photo. D, centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern (arrows), and cortical microtubules parallel (double arrowheads). E, actin filaments showing reticulated arrangement (arrowheads). F, nuclei more densely distributed inside the protoplasmic aggregation than the outside.

は Fig. 1B と同じ段階を示している。この写真上に微小管を 緑色の線で描画した。円形の原形質集合領域の周縁とそのす ぐ外側の範囲において、求心方向へ配列する微小管が多数出 現した (Fig. 3A の CR; Fig. 3B の矢印)。これらの微小管は長 さ 100-200 µm であったが、原形質集合領域の中央部(直径 300-400 µm)には分布しなかった。本研究では、この微小 管を周縁求心微小管(centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern = CR)とよぶことにする。原形質集合領 域の中央部では、周縁求心微小管とは異なり、ランダムに配 列する短い微小管が多数存在した(Fig. 3A の R; Fig. 3B, C の 矢頭)。原形質集合領域の周縁部外側よりもさらに外側に分 布する原形質では、平行に配向する表層微小管(Fig. 3AのC; Fig. 3B の二重矢頭)が存在した。Fig. 3D-F では, 原形質集 合領域周辺の同一部位を撮影し,微小管とアクチンフィラメ ント、核の分布を比較した。原形質集合領域はそれぞれの図 の右側に位置し、白色の破線はその原形質集合領域の外側境 界を示している。周縁求心微小管は原形質集合領域の中心方 向へ配列し(Fig. 3D の矢印),原形質集合領域の外側には平 行配列する表層微小管が分布した(Fig. 3D の二重矢頭)。一方, アクチンフィラメントは,原形質集合領域の内側周囲からそ の外側の原形質を通じて網状に分布した(Fig. 3E の矢頭)。 核は,原形質集合領域の外側の原形質部分でほぼ均等に分布 したが,原形質集合領域の内側では,核分裂が起こり,複数 の核のいくつかが数珠つなぎとなり,核の分布密度が高くなっ た(Fig. 3F)。さらに原形質の集合が進むと,原形質集合領域 の周縁部が濃緑色を呈し始め,その部分の原形質層が厚くなっ た(Fig. 1C)。この段階以降,それまでの原形質集合領域を原 形質集積部とよぶことにする。このとき,周縁求心微小管の 長さは 60-80 μm となった。

#### 3. 隔壁形成に伴う細胞骨格の変化

隔壁形成が始まる前(Fig. 4A1-3)と後(Fig. 4D1-3)の 段階において,円形の原形質集積部の表面観と断面を模式的 に表す。Fig. 4D1-3で示す段階は,隔壁形成初期を示すFig. 2A1-3と対応している。Fig. 4A1とFig. 4D1の下図は,原形 質集積周縁部の断面で,原形質が液胞側へ畝のように盛り上 がった状態を示す。それら Fig. 4A1 と Fig. 4D1 の下図の四角 部分を拡大したのがそれぞれ Fig. 4A2, 3 と Fig. 4D2, 3 である。

Fig. 4A2, 3 では、原形質集積周縁部とその外側および内側の領域において、原形質膜上で観察される微小管の区別とそ

れらの分布範囲を両側矢印で示す。Fig. 4A2 の 2 つの微小管 (CR と R) と両側矢印は Fig. 4B に適用され, Fig. 4A3 の 3 つ の微小管(CR1, CR2 および R)と両側矢印は Fig. 4C に適用 される。



Fig. 4A1 で示す段階(Fig. 1C)までは、原形質集積周縁部 とその外側部分にわたって周縁求心微小管(CR)が配列し、 内側部分にはランダムな微小管(R)が分布した(Fig. 4A2 と Fig. 4B)。しかし、隔壁形成が始まる直前になると(Fig. 4A3 と Fig. 4C)、周縁求心微小管(CR)が原形質集積周縁部の端 (円周)に沿って分断し、外側(CR1)と内側(CR2)の微小 管に二分した。その結果、CR1とCR2の間に微小管の存在し ない幅の狭い帯状の原形質膜部分(帯状原形質膜部分とよぶ) が出現した(Fig. 4Cの矢頭)。この帯状原形質膜部分は原形 質集積周縁部全体を取り囲むように一周したので、実際、そ の帯状原形質膜部分は円周の形であった。CR2の内側にはラ ンダム配列する微小管(R)が存在した。後述するように、こ の帯状原形質膜部分は隔壁形成のために液胞側へ陥入した。

Fig. 4D1(= Fig. 1D)と Fig. 4D2は、前述した帯状原形質 膜部分が液胞側へ陥入し始めた直後の段階の模式図である。 Fig. 4D3は、原形質膜の陥入に引き続いて隔壁(S)の形成が 始まった段階の模式図である。Fig. 4D2, 3 では、陥入してい く原形質膜の最先端を LE で示す。Fig. 4D2 は Fig. 4E-G に適 用され、Fig. 4D2の3つの微小管(CR1, CR2 および R)と それらの分布範囲を示す両側矢印は Fig. 4G に適用される。

周縁求心微小管が二分して残った CR1 と CR2 (Fig. 4A3) の間の帯状原形質膜部分 (Fig. 4C の矢頭)が液胞側へ陥入 し始めたとき,陥入する原形質膜の最先端 (LE)には,短 く,夥しい数の刷毛状の微小管が観察された (Fig. 4E, F)。刷 毛状の微小管は LE の上部と下部から互いに反対方向へ発出 し,LE に沿って横に 2 列になって並んだ (Fig. 4F の矢印)。 Fig. 4G は Fig. 4F と同じ場所を撮影したものであるが,原形 質膜の陥入直後においては,焦点を LE よりも浅くすると, CR1, CR2 および R (Fig. 4D2)の微小管が残存していた (Fig. 4G)。しかし,原形質の陥入が進み,隔壁 (Fig. 4D3 の S)が 形成され始めると, CR1 と CR2 は消失した。

Fig. 4H1 で示すように,隔壁が求心的に発達している段階 (Fig. 1F)では,隔壁(S)の形成部位に対応し,陥入してい る原形質膜の最先端(LE)に刷毛状の微小管が分布した(Fig. 4H2)。隔壁が発達・伸長するこのような段階になると,隔壁 の母細胞側とレンズ状細胞側の両方の原形質膜が連続し,か つ,隔壁形成部に対応するLE全体を含む原形質試料を作製 することが困難であった。この場合,隔壁の母細胞側または レンズ状細胞側のどちらか一方の原形質膜だけを含む試料を 作製した。そのため,隔壁形成が進んだ段階の試料では,LE の上部または下部から発出する一列に並ぶ刷毛状の微小管が 観察された(Fig.4H2の矢印)。

#### 4. 陥入する原形質膜最先端部に分布する微小管と小胞

間接蛍光抗体法で観察した刷毛状微小管の分布と配列パ ターンを直接観察し,隔壁を構成する物質の供給に関わる小 胞等が存在するかどうかを明らかにする目的で、隔壁形成中 の段階(Fig. 1E, F)において,液胞側へ陥入する原形質膜 の最先端に分布する原形質と隔壁を超薄切片法により電子顕 微鏡で観察した。Fig. 5A1の模式図で示すように, 陥入する 最先端部の原形質膜とその付近の原形質を, 隔壁の平面に対 して接線方向に切った(隔壁の平面とほぼ平行にかすめるよ うに削いだ) 断面を Fig. 5A2, 3 で示す。Fig. 5A2 の矢印は陥 入する原形質膜を示し,その原形質膜で囲まれた部分(破線 CF) は分裂溝 (cleavage furrow) の一部である。Fig. 5A2 で は、分裂溝(CF)を挟んで右上方にレンズ状細胞側の原形 質(PLC)が位置し、左下方に母細胞側の原形質(PMC)が 位置する (Fig. 2C3; Fig. 2D3)。Fig. 5A2 の四角部分を拡大し たのが Fig. 5A3 である。隔壁平面に接する原形質には、多数 の微小管 (Fig. 5A3 の矢頭) と小胞 (v) が分布したが、微小 管と小胞との直接の付着や結合は観察されなかった。Fig. 5B1 の模式図で示すように、陥入する原形質膜と隔壁の最先端を, 隔壁に対してほぼ垂直方向に切ったときの断面が Fig. 5B2.3 である。Fig. 5B2の矢印は陥入する原形質膜を示し、LE はそ の最先端部位である。その原形質膜で囲まれた部分は分裂溝 (破線 CF)であり、発達中の隔壁の断面が観察された。Fig. 5B2 では、分裂溝(CF)を挟んで右側にレンズ状細胞側の原 形質(PLC)が位置し、左側に母細胞側の原形質(PMC)が

Fig. 4. Changes in microtubule arrangement pattern in Valonia fastigiata. A1, the surface view (upper side) and cross-section (lower side) of a protoplasmic aggregation at the stage indicated by Fig. 1C. A2 and A3 are enlargements of a square in A1 and show the locations and ranges of the distinct microtubules, CR, CR1, CR2 and R. CR and R refer to centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern and random microtubules, respectively. CR divides into CR1 and CR2. A2 and A3 relate to B and C, respectively. B, CR and R were located around the peripheries and central area of a protoplasmic aggregation, respectively, as indicated in Fig. 3A-C. C shows that CR split into two parts, CR1 and CR2, to create a circular, narrow band of the plasma membrane without microtubules (indicated with arrowheads) just before the invagination of the plasma membrane. D1, the surface view (upper side) and cross-section (lower side) of a protoplasmic aggregation at the stage indicated by Fig. 1D. D2 and D3 are enlargements of a square in D1 and have the leading edges of the plasma membrane (LE). D2 shows the different microtubules, including CR1, CR2, and R, just after the beginning of the invagination of the plasma membrane. D2 pertains to E-G. D3, the formation of a septum (S). E and F demonstrate the appearance of brush-like microtubules (indicated with arrows) along the LE right after the circular, narrow band of the plasma membrane has invaginated to create a cleavage furrow. Brush-like microtubules refer to many short microtubules that originate from the narrow transverse band LE towards two opposite directions (indicated with arrows). G shows that CR1, CR2, and R remain, but CR1 and CR2 vanish soon after the formation of the septum (D3). Although F and G utilize the same specimen, G's focus is slightly behind that of F. H1, the surface view (upper side) and cross-section (lower side) of a protoplasmic aggregation at the stage indicated by Fig. 1F. H1 indicates the leading edges of the plasma membrane (LE) and the septum (S) that is growing deeply into a vacuole. In this stage, preparing specimens with protoplasm on both sides of the septum was challenging, H2 shows that brush-like microtubules (arrows) originate from LE and extend to either of two directions.



Fig. 5. Electron micrographs showing microtubules and vesicles in the protoplasm adjacent to a cleavage furrow in *Valonia fastigiata*. A1, a diagram showing the technique for making tangential sections to septum surfaces for A2–3. A2, a cleavage furrow (CF and broken lines) surrounded by the plasma membrane (arrows) near the leading edges of the plasma membrane. The protoplasm of the mother cell (PMC) and the protoplasm of the lenticular cell (PLC) are on the left and right of CF, respectively. A3 is the enlargement of a square in A2 and shows many microtubules (arrowheads) and small translucent vesicles (v) distributed in the protoplasm on the plasma membrane near the leading edges. B1 illustrates how to create cross-sections of a cleavage furrow. B2, a cleavage furrow (CF and broken lines) surrounded by the plasma membrane (LE). The protoplasm of the mother cell (PMC) and the protoplasm of the lenticular cell (PLC) are on the left and right of CF, respectively. B3 is the enlargement of a square in B2 and provides a closer view of the microtubules (arrowheads), translucent vesicles (v), and coated vesicles (double arrowheads) distributed in the protoplasm on a cleavage furrow near the leading edges. Additionally, fibrous material (double arrows) is present in the cleavage furrow or an incipient septum.

位置する。Fig. 5B2 の四角部分を拡大したのが Fig. 5B3 であ る。Fig. 5B3 では, 陥入する原形質膜(小矢印)の左右両側 (PLC 側と PMC 側)に大小多数の低電子密度の小胞(v) お よび微小管(矢頭)が分布した。また,周辺に被覆小胞(Fig. 5B3 の二重矢頭)が観察された。隔壁断面には,染色性の繊 維物質(Fig. 5B3 の二重矢印)が観察された。小胞同士また は小胞と原形質膜との融合は明確には確認できなかった。

#### 5. 隔壁の成分と構造

隔壁の構造および隔壁にセルロースが沈着する時期を光学 顕微鏡と電子顕微鏡で調べた。Fig. 6A-Dは、隔壁形成中(Fig. 2C2, 3の段階)の細胞断面であり、同一試料(ブロック)か らの連続切片の一部を示す。Fig. 6Aは、カルコフルオールホ ワイト M2R で染色された切片の紫外線による蛍光像と、同一 切片の位相差像をマージした写真である。Fig. 6A では、隔壁 形成が始まった基端部位(矢印)と隔壁が形成されている先 端部位(二重矢印)を示す。また、矢頭[B]が形成直後の部 位、矢頭[C]がそれ以前に形成された部位、矢頭[D]が最初に 形成された部位であることを示す。Fig. 6A において、母細胞 壁(MCW)と,すでに形成された隔壁の一部(矢頭[C]から 矢頭[D]を経由して矢印までの範囲)にセルロースの存在を 示す青白い蛍光が観察された。二重矢印から矢頭[B]を経由 して矢頭[C]までの若い隔壁の範囲には,蛍光はほとんど観察 されなかった。

Fig. 6A で矢頭[B],[C],[D]によって示した隔壁のそれぞれ の部位を電子顕微鏡で観察した。電子顕微鏡下でセルロース の有無を検出するために、切片は CBH-I を結合したコロイド 金溶液で処理した。隔壁が形成され始めた部位(Fig. 6B)では、 隔壁の厚さ(Fig. 6B の両側矢印)は 200 nm 未満で薄く、金 粒子は観察されなかった。Fig. 6B よりも以前に隔壁が形成さ れた部位の隔壁(Fig. 6C の両側矢印)は、300-400 nm と厚 くなり、セルロースの存在を示す金粒子(矢印)がいくつか 観察された。最初に隔壁形成が始まった末端部位に近い部域 の隔壁(Fig. 6D の両側矢印)は、厚さ 500 nm を越え、多数 の金粒子(Fig. 6D の矢印)で標識された。

初期に沈着する非セルロース性の物質の微細構造や沈着様 式と,その後に沈着してくるセルロースの形態や配列様式を 明らかにするため,発達中の隔壁の表面構造を光学顕微鏡お



Fig. 6. Increase in thickness and cellulose content during septum formation in *Valonia fastigiata*. A, light micrograph showing a merged image of two different photos in the same section that was stained with Calcofluor White M2R. One photo was taken under a phase contrast microscope, while the other was taken under a fluorescence microscope by UV excitation. Blue-white fluorescence indicates the presence of cellulose in mother cell wall (MCW) and the part of septum between the arrowheads [C] and [D]. Septum formation started from the proximal end (arrow) and proceeded toward the distal end (double arrows). The thickness of the septum is shown by the double arrows in the electron micrographs B, C, and D, which were taken at the positions of arrowheads [B], [C], and [D] indicated in A, respectively. CBH-I-conjugated gold solution was applied to the sections of B–D to detect cellulose. B shows no gold particle in the septum at the position [B]. C, the septum at the position [C] labeled by several CBH-I gold particles (arrows). D, the septum thickening at the position [D] labeled by much more gold particles (arrows). VM, vacuole of mother cell; PL, protoplasm of lenticular cell; VL, vacuole of lenticular cell.

よびレプリカ法によって電子顕微鏡で観察した。隔壁表面の 原形質を溶解するため,形成中のレンズ状細胞を含む母細胞 をハイターで処理し,細胞壁試料を作製した。

Fig. 7A はレンズ状細胞とその周囲の母細胞の一部を含む細胞壁試料を示す。その細胞壁試料の断面の立体模式図と観察方向を示したのが Fig. 7B である。Fig. 7B では、レンズ状細胞を母細胞の液胞側(矢印)から見ており、母細胞の細胞壁(MCW)の内側が底面となり、その上に発達中の隔壁が覆い



被さるように配置されている。母細胞の液胞側の隔壁表面(Fig. 7Bのss)と形成中の隔壁の先端(Fig. 7Bのes)は、それぞ れ Fig. 7Aのssとesに対応する。また、レンズ状細胞頂部に あたる細胞壁の内側表面(Fig. 7Aと Fig. 7Bの\*)は母細胞 の細胞壁内側表面となる。

形成中の隔壁を含む細胞壁試料の表面構造をレプリカ法に より電子顕微鏡で観察した(Fig. 7C-F)。Fig. 7Aで ss 上に示 した C-F は,電子顕微鏡で観察した 4 つの部位である。隔壁 は求心的に(Fig. 7A の矢印)形成されたので,時間的には F, E, D, C の順に形成され, C がもっとも新しく形成された隔壁先 端部位となり,逆に F がもっとも以前に形成された隔壁基端 部位となった。

Fig. 7C は形成中の隔壁の最先端部(矢印)を示す。\*の領 域は母細胞壁内側表面に沈着するセルロースミクロフィブリ ル(CMF)の層である。矢印を境にして左下側の領域には, 隔壁形成のために最初に沈着した不定形の基質物質(#)が観 察された。基質物質が沈着したため,その奥側に存在する母 細胞壁内側表面の CMF 層は見えなかった。Fig. 7D は形成中 の隔壁の最先端からおよそ 50 μm 基端側の部位における隔壁 の表面構造を示す。全体に沈着する不定形の基質物質(Fig. 7D の #)の他に,細いランダムに配向する CMF の沈着が認 められた(Fig. 7D の矢印)。形成中の隔壁の最先端から基端 側へおよそ 100 μm 離れた部位(Fig. 7E)では,不定形の基 質物質(#)の沈着がなおも確認された。CMF(Fig. 7E の矢印) は Fig. 7D で示したものよりも比較的太く,また,ほぼ一定の

Fig. 7. Cell wall materials and structures deposited during septum formation in Valonia fastigiata. A, cell wall specimen that includes the growing septum (ss and es) of a lenticular cell and a part of the mother cell wall (MCW) outside of the lenticular cell. The cell wall specimen was made by the treatment of a mother cell developing a lenticular cell with a chlorine-based bleaching agent to remove protoplasm. Septum formation started from the proximal end (F) and proceeded in order of E, D, and C (arrow) toward the distal end (es). B, a diagram showing how the cell wall specimen in A was observed. Surfaces (ss) and edges (es) of the growing septum were viewed from the inside of a mother cell (arrow). Asterisks in A and B show the inner surfaces of the MCW. C, D, E, and F are electron micrographs showing replicas of the surface structures of the growing septum at the positions of C, D, E, and F indicated in A, respectively. C, the leading edges of the growing septum (arrows), where amorphous materials (#) began to be deposited exclusively on the left bottom side. The asterisk shows the inner surface of the mother cell wall the same as that in each of A and B. D is situated 50 µm proximally from C to the opposite direction of an arrow in A. D, the appearance of thin microfibrils (arrows) oriented in various directions that were embedded in amorphous materials (#). E is situated 50 µm proximally from D. E, the deposition of thicker microfibrils (arrows) and a small number of amorphous materials (#). F is situated 80 µm proximally from E and shows the proximal end of the growing septum (arrowheads). Microfibrils of the septum (arrows) were closely packed without amorphous materials and as thick as those of the MCW.

方向へ配向し,本数も多かった。Fig. 7F は隔壁の基端部(矢頭) を示し,形成中の隔壁最先端からおよそ 180 μm 離れている。 基端部位の隔壁の表面には,一定の方向に配列する太い CMF (Fig. 7F の矢印)が高密度で沈着し,基質物質はほとんど観 察されなかった。基端部よりも左下側の部分は母細胞壁の内 側表面 (Fig. 7F の MCW)であり,隔壁基端部位と同様の太 さの CMF が高密度で沈着していた。

#### 6. 微小管破壊剤 APM の効果

APM 無処理の細胞では、前述したように、レンズ状細胞形 成の第1段階で原形質集合領域の周縁と中央部にそれぞれ周 縁求心微小管とランダム配列する微小管が出現し(Fig. 3B), 原形質集合領域の外側には平行配列する表層微小管が分布し た (Fig. 3D)。そこで、レンズ状細胞形成の第1段階 (Fig. 1B) に APM で 2 h 処理した細胞を固定し, APM のこれらの 微小管に対する影響を調べた。その結果、原形質集合領域に は微小管は観察されなかった(Fig. 8Aの破線の左側)。しかし, 原形質集合領域の外側周囲には平行配列する表層微小管が存 在していた(Fig. 8Aの破線の右側の二重矢頭)。一方で、レ ンズ状細胞形成の第2段階に入ると、これも前述したように、 APM 無処理の細胞においては、原形質膜が液胞側へ陥入し、 隔壁形成が始まった。このとき、陥入している原形質膜の最 先端に刷毛状の微小管が出現した(Fig. 4E, F)。そこで、レン ズ状細胞形成の第2段階の初期(Fig. 1D)に, APM で2h処 理した細胞を固定し、刷毛状の微小管の有無を調べた。その 結果,液胞側へ陥入している原形質膜の最先端(Fig. 8B の矢 印)には微小管は観察されなかった。原形質集積部の外側領 域では、表層微小管(Fig. 8Bの二重矢頭)が残存していた。

このように、レンズ状細胞形成の第1段階における APM による処理は周縁求心微小管とランダム配列する微小管を破 壊し、第2段階での APM 処理は刷毛状微小管を破壊した。 そこで、周縁求心微小管とランダム配列する微小管、または 刷毛状微小管のレンズ状細胞形成におけるはたらきを調べる ため、APM で処理した細胞を実体顕微鏡下で継続的にイン ターバル撮影した。その結果、原形質が集合してくるレンズ 状細胞形成の第1段階の細胞を APM で処理したとき、一旦 集合していた原形質は拡散し、APM 処理後6時間でほぼもと の均一な分布に戻った(Movie S3)。それに対して、隔壁が形 成されるレンズ状細胞形成の第2段階の前半の細胞を APM で処理したとき、2時間以内に原形質の集積は停止し、それ 以後の隔壁形成は阻害された(Movie S4)。しかし、第2段階 の後半に APM で処理した細胞では、原形質の集積は継続し、 結果的に隔壁は形成された(Movie S5)。

#### 考察

筆者らは前報と本報の2つの相互に関連する研究論文を通 し、シオグサ目多核緑藻の隔壁形成と細胞骨格を明らかにし てきた。シオグサ目多核緑藻においては、隔壁形成による細 胞質分裂は2つのタイプがある。1つは細胞を横断する隔壁 によって円柱形の細胞がほぼ等分裂するタイプである。その 例として前報ではシオグサ科のタマジュズモを用いた(関田・ 奥田 2022)。2つ目は母細胞の不特定な部位に集積してきた



Fig. 8. Effect of APM on microtubules specific to each step of lenticular cell formation in *Valonia fastigiata*. A, immunofluorescence of microtubules in a cell fixed 2 h after treatment with APM at the first step (Fig 1B). Broken lines show the outer boundary of the protoplasmic aggregation that stands at the left side of the photo. No microtubule was found within the protoplasmic aggregation, whereas cortical microtubules (double arrowheads) remained partially outside of the protoplasmic aggregation. Compare this photo with Fig. 3B. B, immunofluorescence of microtubules in a cell fixed 2 h after treatment with APM at the beginning of the second step (Fig. 1D). Protoplasmic aggregation is situated at the left side of the photo. The leading edges of the plasma membrane were seen as a faint stria (arrows). No microtubule was found on the leading edges of the plasma membrane. Cortical microtubules (double arrowheads) survived partially in the outer area of the protoplasmic aggregation. Compare this photo with Fig. 4E, F.

原形質を隔壁によって母細胞から切り出し,小さなレンズ状の細胞を形成するタイプである(Okuda et al. 1997)。その例として本報ではバロニア科のフサバロニアを用いた。本報で明らかとなったフサバロニアのレンズ状細胞形成の一連の過程を示すため,細胞の表面観と断面観の変化に対応した微小管の挙動を模式的にまとめた(Fig. S1)。参考のため,タマジュズモの隔壁形成と微小管の挙動についても模式的にまとめた(Fig. S2)。まず,タマジュズモとフサバロニアの2種の隔壁形成の過程と細胞骨格の挙動をそれぞれ比較して考察する。

タマジュズモはレンズ状細胞を形成しないので,その隔壁 形成には,フサバロニアの場合と異なり,原形質が集積する という段階がない。タマジュズモの未分裂細胞における表層 微小管は細胞の側面と平行(細胞の縦方向)に配列する(関田・ 奥田 2022)。この表層微小管は,隔壁形成に先立ち,細胞を 横断する全周に沿って上下に分断する。表層微小管が分断し た帯状部分の原形質膜は,隔壁形成のために細胞の液胞側へ 陥入し始める。

それに対してフサバロニアでは、母細胞の原形質はレンズ 状細胞の形成のために円形の領域に集積するという段階が あった。その円形領域の中心部にはランダムな微小管が分布 したのに対し、周縁部では求心方向へ配向する微小管(周縁 求心微小管 = centripetal microtubules arranged in a circular ray pattern)が新たに出現した(Fig. 3A–D)。ここで注目され るのは、隔壁形成の直前に周縁求心微小管は、原形質が集積 する周縁に沿って分断し(Fig. 4B–C)、それに引き続き、そ の分断部の原形質膜が隔壁形成のために陥入したことである。 微小管の分断に引き続いて原形質膜が陥入したことは、タマ ジュズモの隔壁形成が開始した時の状況と一致する。

原形質膜の陥入のために,タマジュズモでは既存の表層微 小管が分断するのに対し,フサバロニアは,既存の表層微小 管ではなく,新規に周縁求心微小管を構築し,それを分断した。 両種においては,微小管の分断が原形質膜の陥入開始の条件 となる。このように,タマジュズモとフサバロニアの隔壁形 成においては,いつどこでどのように原形質膜が陥入するか を決めるしくみが存在すると推量され,そのしくみの一部は 表層微小管の分断または周縁求心微小管の構築と分断を含む と考えられる。それらの微小管が分断することで初めてその 部位から原形質膜が陥入し,隔壁形成が始まる。

本研究は、フサバロニアの隔壁形成のために陥入する原形 質膜の最先端に刷毛状の微小管が存在することを明らかにし た。フサバロニアの刷毛状の微小管(Fig. 4E, F, H2)は、タ マジュズモの刷毛状の微小管と同様の分布と配列様式を示し た。刷毛状の微小管は、フサバロニアとタマジュズモともに、 隔壁形成が始まったときに出現し、隔壁が完成したときに消 失した。また、両種の隔壁は母細胞の細胞壁の内側から始まっ て液胞方向へ求心的に発達した。さらに両種ともに、隔壁形 成開始後すぐに微小管破壊剤 APM で細胞を処理することで、 隔壁の形成が阻害された。これらのことは、フサバロニアと タマジュズモの隔壁形成には、刷毛状微小管を含む同様の 細胞質分裂装置が関与することを強く示唆する(関田・奥田 2022)。

種子植物においては、ゴルジ体由来の多数の小胞が隔膜形 成体(フラグモプラスト)に集合し、互いに融合して細胞板 が形成される(Verma 2001, 馳澤ら 2015)。細胞板は遠心的 に拡大し、母細胞壁の内側に接することで隔壁が完成する。 細胞板には、ゴルジ小胞が供給する細胞壁多糖類として、最 初にカロースとキシログルカンが蓄積し、隔壁と母細胞壁と の接続後にセルロースとペクチン類が沈着する。一方、アオ サ藻綱シオグサ目に属する種においては、細胞質分裂装置と してフラグモプラストまたはファイコプラストの存在は報告 されていない(堀 1983)。しかし上述したように、フサバロ ニアとタマジュズモでは、隔壁形成に関与すると考えられる 特有の刷毛状微小管が出現する。フサバロニアを用いた本 研究では, 隔壁形成のために陥入する原形質膜または隔壁の 最先端部に接する原形質内には,刷毛状微小管に相当する 微小管と低電子密度の小胞が多数存在することを明らかにし た (Fig. 5A2, A3, B2, B3)。アオサ藻綱では、カモジシオグサ (Cladophora glomerata (Linnaeus) Kützing 1843) (McDonald & Pickett-Heaps 1976) とモツレグサ属 (Acrosiphonia) の種 (Hudson & Waaland 1974, Aruga et al. 1996) においても, 隔 壁が形成される部位に近接して微小管と小胞が分布し、両者 の関連性が指摘されている。

多核緑藻は細胞壁を構成する主要な多糖類成分によって 概ね3つのグループに分けられる(Painter 1983)。1つはセ ルロース性の細胞壁をもつグループで,ここにシオグサ目多 核緑藻が含まれる。2つ目は非セルロース性多糖類の細胞壁 をもつ多核緑藻で,そのうちマンナンを主成分とするグルー プとキシランを主成分とするグループに分かれる。セルロー ス性の細胞壁をもつ多核緑藻では,例えばハリガネジュズ モ(*Chaetomorpha melagonium*(F. Weber et D. Mohr) Kützing 1845)の場合,セルロース含量は41%で,セルロース以外の 多糖類は主にアラビノース残基やガラクトース残基,グルコー ス残基から構成される(Cronshaw *et al.* 1958)。

フサバロニアとタマジュズモでは,隔壁は母細胞壁の内側 表面から液胞方向ヘカメラの絞りが閉じるように発達する。 そのとき,閉じていく絞りの先端部が形成直後の隔壁となる。 そのような若い隔壁がその後どのように発達・変化するかは 明らかにされていなかった。本研究はフサバロニアの発達中 の隔壁の厚さと成分,表面構造を,隔壁の部位と対応させて 明らかにした。隔壁の厚さは,形成直後の隔壁の先端部がもっ とも薄く,それよりも以前に形成された基端側部位へ行くに 従って厚くなった(Fig.6B-D)。また,隔壁が厚くなるに従い, セルロースの含有量は増加した(Fig.6A-D)。これらの事実 は隔壁形成開始後も引き続いて隔壁物質の供給または合成が 継続していることを意味する。

隔壁の表面構造では,形成直後の隔壁は不定形の基質物質 のみからなることから(Fig. 7C),当該部位の原形質に分布し ている刷毛状微小管が,このような最初に沈着する非セルロー ス性の基質物質の供給に関係している可能性があるが、その ことを示す証拠はない。隔壁のさらに基端側の部位に行くに 従い、基質物質に混ざって沈着するセルロースミクロフィブ リル (CMF) の太さと数が増加した (Fig. 7D, E)。CMF は原 形質膜に結合するセルロース合成酵素複合体によって原形質 膜で直接合成される(奥田 1999)ので、フサバロニアにおい てのこれらの部位から始まる隔壁へのセルロースの供給は小 胞のエクソサイトシスによるものではない。バロニア科のマ ガタマモ (Boergesenia forbesii (Harvey) Feldmann 1938) では, 細胞の切断によって誘導したプロトプラストは新たに細胞壁 を形成して球形の細胞へと再生する(Mizuta et al. 1985)。こ のとき.フサバロニアの隔壁形成と同様に、最初に非セルロー ス性の基質物質が沈着し、それに続いて CMF が沈着する。 種子植物の細胞板形成においても、非セルロース性多糖類を 取り込んだ後でセルロースが沈着する(Verma 2001. 馳澤ら 2015)。このように、新たな細胞壁が形成される場合、おそら く CMF 合成の足場または土台となるため、最初に非セルロー ス性多糖類が沈着するというしくみがあると推察される。

#### 謝辞

研究材料のフサバロニアを採集いただいた高知大学総合研 究センター海洋生物研究教育施設の田中幸記博士に感謝申し 上げる。

#### 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.
- Asai, K. & Kishimoto, U. 1975. Effects of sodium, potassium and chloride ions on the membrane potential of *Valonia aegagropila*. Plant Cell Physiol. 16: 93–100.
- Chanzy, H., Henrissat, B. & Vuong, R. 1984. Colloidal gold labeling of 1,4-β-glucan cellobiohydrolase adsorbed cellulose substrates. FEBS lett. 172: 193–197.
- Cronshaw, J., Myers, A. & Preston, R. D. 1958. A chemical and physical investigation of the cell walls of some marine algae. Biochim. Biophys. Acta 27: 89–103.
- Eggert, A., Burger, E. M. & Breeman, A. M. 2003. Ecotypic differentiation in thermal traits in the tropical to warm-temperate green macrophyte *Valonia utricularis*. Bot. Mar. 46: 69–81.
- 馳澤盛一郎・湖城恵・秋田佳恵・桧垣匠 2015. 細胞板形成における 細胞骨格機能のイメージング解析. 植物の生長調節 50: 50–56.
- 堀輝三 1983. 細胞構造にみる緑藻類の系統と進化. 遺伝 37:16-23.
- 堀輝三 1994. 藻類の生活史集成. 第1巻. 緑色藻類. 内田老鶴圃,東京.
- Hudson, P. R. & Waaland, J. R. 1974. Ultrastructure of mitosis and cytokinesis in the multinucleate green alga *Acrosiphonia*. J. Cell Biol. 62: 274–294.
- 熊田美里・渡辺剛・大葉英雄 2009. 沖縄県宮古列島の海藻植生.み どりいし 20: 24–33.
- Leliaert, F., De Clerck, O., Verbruggen, H., Boedeker, C. & Coppejans, E. 2007. Molecular phylogeny of the Siphonocladales (Chlorophyta: Cladophorophyceae). Mol. Phylogenet. Evol. 44: 1237–1256.
- Maeda, H. & Ishida, N. 1967. Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. J. Biochem. 62: 276– 278.

- McDonald, K. L. & Pickett-Heaps, J. D. 1976. Ultrastructure and differentiation in *Cladophora glomerata*. I. Cell division. Amer. J. Bot. 63: 592–601.
- Mizuta, S., Sawada, K. & Okuda, K. 1985. Cell wall regeneration of new spherical cells developed from the protoplasm of a coenocytic green alga, *Boergesenia forbesii*. Jpn. J. Phycol. 33: 32–44.
- 日本電子顕微鏡学会関東支部 1975. 電子顕微鏡生物試料作製法. 丸善, 東京.
- 奥田一雄 1999. 藻類のセルロース合成. 電子顕微鏡 34:81-86.
- Okuda, K., Li, L. Kudlicka, K, Kuga, S. & Brown, R. M. Jr. 1993. β-glucan synthesis in the cotton fiber. I. Identification of β-1,4- and β-1,3glucan synthesized in vitro. Plant Physiol. 101: 1131–1142.
- Okuda, K. & Mizuta, S. 1985. Analysis of cellulose microfibril arrangement patterns in the cell wall of new spherical cells regenerated from *Boodlea coacta* (Chlorophyceae). Jpn. J. Phycol. 33: 301–311.
- Okuda, K., Ueno, S. & Mine, I. 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.
- Painter, T. J. 1983. Algal polysaccharides. In: Aspinall, G. O. (ed.) The polysaccharides, Vol. 2. pp. 195–285. Academic Press, New York.
- 関田諭子・奥田一雄 2022. シオグサ目多核緑藻における隔壁形成と 細胞骨格 I.タマジュズモの隔壁形成. 藻類 70:167–176.
- 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: 31–43.
- Verma, D. P. S. 2001. Cytokinesis and building of the cell plate in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 751–784.
- 吉田忠生 1998. 新日本海藻誌. 内田老鶴圃, 東京.

#### 補足資料

日本藻類学会の Web サイト(http://sourui.org/publications/ sorui/list/71 03.html)で本論文と同時に公開される。

- Movie S1. A video showing lenticular cell formation in *Valonia fastigiata* (ver. 1).
- Movie S2. A video showing lenticular cell formation in *Valonia fastigiata* (ver. 2).
- Movie S3. A video showing that APM caused protoplasmic aggregation to diffuse.

Movie S4. A video showing that APM stopped protoplasmic aggregation.

- Movie S5. A video showing that protoplasmic aggregation continued even after APM treatment.
- Fig. S1. Schematic representation that shows behaviors of protoplasm and microtubules during lenticular cell formation in *Valonia fastigiata*.
- Fig. S2. Schematic representation of changes in the occurrence and arrangement of microtubules during septum formation in *Chaetomorpha moniligera*.

(2023年4月17日受付,2023年9月4日受理) 通信担当編集委員:芹澤(松山)和世

## 賛助 会員

理研食品株式会社(〒985-0844 宮城県多賀城市宮内 2-5-60)

共和コンクリート工業株式会社 (〒060-0808 北海道札幌市北区北8条西3丁目28 札幌エルプラザ11階)

株式会社КАNSOテクノス (〒541-0052 大阪府大阪市中央区安土町 1-3-5)

日本藻類学会和文誌「藻類」では広告を募集中です。詳細は編集委員会委員長までお問い合わせください。

# 皆様のご投稿をお待ちしています

和文誌「藻類」は会員の皆様の原稿で成り立っている雑誌です。原著論文のみならず,総説やミニレビュー,学術資料, その他の記事があります。ご投稿に際しましては,第71巻1号のp.30–33に掲載されました投稿規定,執筆要項,投 稿票,別刷・カラー印刷等申込書をご覧ください。投稿区分,カラー印刷料金や別刷料金と,投稿者が査読候補者を指 名し,希望する論文通信担当編集委員に投稿できるなどの審査体制が示されております。投稿規定,執筆要項,投稿票 は日本藻類学会のWEBサイト(http://sourui.org/publications/index.html)からダウンロードでき,論文通信担当編集委 員の連絡先もWEBサイトで確認できます。現在は電子メールでのデジタルデータの投稿を受け付けていますので,投 稿票はWEBサイトからダウンロードしてご使用ください。皆様のご投稿をお待ちしています。(編)

#### 編集後記

71巻3号をお届けします。前委員長の芹澤先生より引き継 ぎましてからこれで1年になります。大学院生になった20年 以上前に日本藻類学会の会員となり、本棚に和文誌藻類の冊 子が並んでいますが、出版をまとめるようになり、全ページ 数やカラーページ数など、これまで見ることもなかったとこ ろが気になるようになりました。完成しました 2023 年の 71 巻は 188 ページです。近年と比べると 2022 年が 214 ページ, 2021 年が 178 ページ,2020 年が 194 ページでしたので今年 はやや薄めでしょうか。皆様からのご投稿をお待ちしています。 (岩滝 光儀)

表紙 レンズ状細胞が形成されるときに構築されたフサバロニアの微小管配列

制作者: 関田 諭子(高知大学)

**制作者より**:バロニア属の種は多核の巨大細胞からなり,細胞の表層で起こるレンズ状細胞形成とよばれる細胞分裂によっ て新たな細胞をつくります。レンズ状細胞形成は2段階で進み,各段階で特有の微小管が出現することが明らかになりま した。写真はフサバロニアのレンズ状細胞形成の第1段階における微小管配列を示します。中心部にはランダムな微小管 が分布し,その周囲には求心方向に配列する微小管(周縁求心微小管)が新たに構築されました。さらにその外側にもと もと存在していた表層微小管が平行に配列しました。その後,第2段階に入ると,この周縁求心微小管が分断し,その分 断部位で陥入した原形質膜の最先端部に刷毛状微小管が新たに出現し,隔壁形成が始まりました。