博士（理　学）　関　田　諭　子

学位論文題名

Ultrastructure and development of dinoflagellate cell coverings

（渦鞭毛藻の細胞外被の微細構造と発達）

学位論文内容の要旨

渦鞭毛藻は，淡水から海水域まで広く分布し，生態的にも重要な位置を占めるグループであり，遊走細胞，不動細胞，アメーバ状の細胞を含む多様な生活形態をとる。しかし，渦鞭毛藻の生活史には，２本の鞭毛を有する遊走細胞のステージが必ず存在する。渦鞭毛藻の遊走細胞には，鎧板と呼ばれる硬い板状の細胞外被をもつ有殻渦鞭毛藻と，鎧板をもたない無殻渦鞭毛藻の大きく２つのグループに分類される。

渦鞭毛藻の遊走細胞の細胞外被はアンフィエスマと呼ばれ，外側から順に，原形質膜，扁平で細胞周縁を取り囲むアンフィエスマ小胞，および微小管から構成される。有殻渦鞭毛藻では，アンフィエスマ小胞の内部に鎧板が存在し，その鎧板の形，数，配置のパターンが種によって決まっており，重要な分類形質の一つになっている。しかし，鎧板の配列パターンがどのように決定されるかは明らかにされていない。

有殻渦鞭毛藻のいくつかの種において，遊走細胞が環境の急激な変化などによって細胞外被アンフィエスマを脱ぎ捨てるという現象（ecdysis）が起こる。 ecdysis により，不動細胞が形成され，ペリクルと呼ばれる，アンフィエスマとは異なる細胞外被を形成する。不動細胞の中で形成される新たな遊走細胞は，ペリクルを抜けて外界へ泳ぎ出る。ecdysis の過程におけるアンフィエスマの挙動，ペリクルの形成とその成分，新たに形成される遊走細胞のアンフィエスマの形成については，いままでに詳細な研究はなされてきていない。

渦鞭毛藻では非常に稀であるが，アンフィエスマとペリクルの両方と異なる鱗片（スケール）と呼ばれる細胞外被をもつ特定の種が存在する。スケールは原形質膜の外側に付着するが，スケールの微細形態およびその形成過程はほとんど明らかにされていない。

本研究では，２種の渦鞭毛藻を用いて，アンフィエスマ，ペリクル，スケールを含む細胞外被の微細構造とそれらの発達過程を詳細に明らかにした。ペリクルにおけるセルロースミクロフィブリル(CMF)の存在を証明し，その CMF を合成するセルロース合成酵素複合体を渦鞭毛藻において初めて明らかにした。さらに，遊走細胞の鎧板配列パターンを維持・決定する機構と微小管との間の関連性を初めて明らかにした。

第一章では，有殻渦鞭毛藻 *Scrippsiella hexapraecingula* の遊走細胞のアンフィエスマ構造，ecdysis によるその構造の変化とペリクルの形成，および，新たに形成されるアンフィエスマの形成過程を調べた。本種の遊走細胞の細胞外被は，原形質膜の内側に鎧板を含む完全に独立した個々のアンフィエスマ小胞が分布し，その直下に，数本の束になった微小管が配列する構造を示した。そのようなアンフィエスマ構造は，ecdysis によって劇

的に変化した。まず，遊走細胞の原形質膜とアンフィエスマ小胞の外膜は崩壊し，隣り合うアンフィエスマ小胞の内膜が互いに融合して，細胞質全体を取り囲む連続する膜になった。この内膜由来の連続する膜が，不動細胞の新しい原形質膜（npm）になることを組織化学的に証明した。また，npm の外側には，不動細胞の細胞外被であるペリクルと呼ばれる厚い層が形成され，npm の内側に新しいアンフィエスマ小胞が発達してきた。フリーズフラクチャー法により，そのアンフィエスマ小胞の発達過程を平面的に観察することが可能であった。その結果，アンフィエスマ小胞は，最初，粗い網状に分布し，徐々に網目の部分が縮小するように発達した。最終的に，個々のアンフィエスマ小胞は，網目のない偏平な小胞になり、互いに隣り合う部分で密接して細胞表層全体を覆うようになった。完成したアンフィエスマ小胞の形，数，配置のパターンは，本種の遊走細胞の鎧板の配列パターンと一致した。このことから，鎧板が形成される以前に，アンフィエスマ小胞の配列によって，鎧板の配列パターンが予め決定していることが明らかとなった。さらに，組織化学的手法によって，npm の染色性が ecdysis 後 約 1 時間で変化することが明らかになり，アンフィエスマ小胞内膜から不動細胞の原形質膜として機能するために，膜の組成を変化させていることが推察された。

第二章では，渦鞭毛藻類の細胞外被の構成成分の一つであると考えられているセルロースミクロフィブリル（CMF）に注目して，*S. hexapraecingula* の遊走細胞の鎧板と不動細胞のペリクルの発達過程を明らかにした。鎧板は，遊走細胞のアンフィエスマ小胞の内部を充填するように形成された。初期の遊走細胞では，個々のアンフィエスマ小胞の領域内で，複数の粒状の物質が出現し，徐々に薄いシート状の構造に発達した。その後，アモルファス成分と繊維性の成分から成る厚い板状の構造に発達した。電子回折法によって，鎧板に含まれる繊維性の成分は，CMF であることが証明された。ペリクルは，CMF を含む層（L3）と含まない層（L1，L2）から構成されていた。CMF は，主に，原形質膜に存在する膜結合タンパクであるセルロース合成酵素複合体（TC）によって合成されると考えられており，現在までに，様々な生物において，いくつかのタイプの TC が見つけられている。渦鞭毛藻のペリクルの TC が，本研究で初めて明らかにされた。その TC は，今までに知られている TC の構造とは全く異なる，新しいタイプであることが明らかになった。

第三章では，*S. hexapraecingula* の不動細胞を用いて，圧力処理による表層微小管と鎧板配列パターンへの影響を調べた。圧力の大きさ，および処理時間に依存して微小管が破壊される細胞の割合が変化した。微小管に影響を及ぼさない圧力条件では，新たに形成される遊走細胞の鎧板配列パターンは変化しなかった。しかし，微小管が破壊される圧力条件では，新たに形成される遊走細胞の鎧板配列パターンが顕著に変化した。その変異は，プレートの増加，減少，変形，融合などが複雑に組み合わさった多様なパターンを示した。また，微小管が破壊される細胞の割合が増加すると，鎧板配列パターンが顕著に変異する細胞の割合も増加した。以上のことから，表層微小管は鎧板配列パターンの調節に関与することが示唆された。

第四章では，無殻渦鞭毛藻 *Amphidinium* 属の 2 つの株（HG114，HG115）における遊走細胞の細胞外被の構造とスケールの形成過程について明らかにした。2 株の細胞はほぼ同じ形態を有し，原形質膜の外側に楕円形でリング状の構造を示す微細なスケールが存在した。それらのスケールは，ゴルジ小胞で形成され，その構造は，渦鞭毛藻で今までに報告されているスケールとは異なり，新しいタイプであることが明らかになった。また，*Amphidinium* 属において，本研究で初めてスケールをもつ種が発見された。

本研究において，渦鞭毛藻の細胞外被の微細構造，および形成・発達過程におけるこれら構成要素の動的な変化の詳細を明らかにすることが出来た。

学位論文審査の要旨

主　査　　助教授　　堀　口　健　雄

副　査　　教　授　　山　下　正　兼

副　査　　教　授　　本　村　泰　三

副　査　　教　授　　奥　田　一　雄

（高知大学大学院黒潮圏海洋科学研究科）

学位論文題名

Ultrastructure and development of dinoflagellate cell coverings

（渦鞭毛藻の細胞外被の微細構造と発達）

本研究は水圏生態系における主要な構成要員である単細胞生物，渦鞭毛藻類の細胞外被の微細構造を明らかにするとともに，細胞周期にともなうこの構造の動的な変化を解明したもので，多くの新知見を得た。

渦鞭毛藻類の細胞外被は，原形質膜直下の扁平なアンフィエスマ小胞およびそれに付随する微小管束からなる。有殻渦鞭毛藻では，アンフィエスマ小胞中に板状構造をもつ。この板状構造は，鎧板と呼ばれ，その配列は種特異的であり分類の際の第一義的な形質とされている。しかしながら，細胞分裂過程において，この鎧板がどのような過程を経て発達するのか，どのようなメカニズムで一定のパターンに配列するのか，それに付随する膜系はどのように変化するのかなどについてはほとんど明らかにされていなかった。また，多くの渦鞭毛藻類は細胞周期中に遊泳細胞期と不動細胞期を繰り返すが，それら異なった細胞期では細胞外被構造も異なる。しかしながら，遊泳細胞期→不動細胞期（分裂）→遊泳細胞期と交代していく間に，細胞外被の各構成要素がどのように変化，発達していくかについては明確な知見は存在しなかった。以上の背景を踏まえ，本研究では，超薄切片法，フリーズフラクチャー法，組織化学的方法などを駆使して，上述の未解明の問題に取り組んだ。

まず，遊泳細胞から不動細胞への移行期において，アンフィエスマ小胞の内膜が新しい原形質膜に転換されることを組織化学的手法を用いて初めて証明した。また，不動期に特異的に形成されるペリクルと呼ばれる厚い壁構造中のセルロースミクロフィブリルの存在を証明し，そのセルロースミクロフィブリルを合成するセルロース合成酵素複合体を渦鞭毛藻類において初めて明らかにした。

次に，種特異的な鎧板の配列パターンが細胞分裂期にどのように形成されるかについて，フリーズフラクチャー法を用いて検討した。その結果，不動細胞期において，アンフィエスマ小胞があらかじめ決められた領域内でのみ形成されること，完成したアンフィエスマ小胞の形，配列は遊泳細胞の鎧板配列に完全に一致することをつきとめた。すなわち，板状の鎧板が形成される以前に鎧板配列はアンフィエスマ小胞形成時点で決定されていることを初めて明らかにした。細胞分裂後に泳ぎだした遊泳細胞は発芽直後は鎧板をもたないが，その後アンフィエスマ小胞を埋める形で鎧板を形成することにより，遊泳細胞期初期に種特有の配列をもつ鎧板が完成することも明らかにした。

鎧板配列の一定性がどのようなメカニズムで維持されるのかを明らかにする目的で，微小管と鎧板形成の関係を調べた。渦鞭毛藻の場合，通常用いられる薬剤処理による微小管合成

阻害実験が不可能であったことから，高水圧処理という方法を用いてこの研究に取り組んだ。その結果，微小管が破壊される圧力条件下では，新たに形成される遊泳細胞の鎧板配列パターンが顕著に変化すること，微小管が破壊される細胞の割合の増加にともない，鎧板配列に変異を伴う個体も増加することを示した。この結果，細胞表層微小管が鎧板配列のパターン調節に関与していることが強く示唆された。

さらに，無殻渦鞭毛藻類（鎧板をもたない群）のアンフィディニウム属の細胞外被に細胞鱗片が存在すること，およびその鱗片の形成過程を明らかにした。渦鞭毛藻類における細胞鱗片の報告は数少なく，しかも今回発見した鱗片は，どの生物でも見つかっていない新しいタイプのものであった。

これを要するに，筆者は渦鞭毛藻の細胞外被の微細構造の詳細を明らかにするだけでなく，細胞周期にともなう細胞外被構造の動的な変化を解明したもので，細胞学的な多くの新知見を得たものであり，生物学に貢献するところ大なるものがある。

よって筆者は，北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。