

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の交配型プラス配偶子における受精管の空間配置に関する研究

秋本 享大 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 宮村 新一 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

真核生物においてオスとメス、2つの性は同形配偶子の交配型プラスとマイナスから進化したと考えられている。しかし、同形配偶子の交配型プラスとマイナスそれぞれが、オスとメスのどちらに対応する性であるのか不明なことが多い。もしも同形配偶子の2つの性と、オスとメスとを結びつける共通の性質があれば、オスとメスの進化を明らかに出来ると考えられる。そのような性質のひとつが緑藻植物の2つの配偶子間にみられる接合装置 (配偶子の原形質膜が特殊化した細胞融合装置) の空間配置の違いである。すなわち、多くの緑藻植物においては、同形、異形配偶子に関わらず、細胞前端から伸びた2本の鞭毛によって遊泳運動を行う配偶子において、片方の性では接合装置は鞭毛運動面に対して光受容装置である眼点と同じ側の細胞前端部にあり、もう一方の性では反対側にある。その結果、受精後の動接合子においては2つの配偶子から由来した2つの眼点が細胞の同じ方向に並び正常な走光性を示すと考えられている。従って、配偶子の受精と動接合子形成にとって接合装置の性特異的な空間配置が重要と考えられる。これまでの透過型電子顕微鏡(TEM)などを用いた先行研究によって接合装置は眼点と同様に配偶子の基底小体から細胞後方に伸びた微小管性の鞭毛根の側に配置していることが明らかになっているが、接合装置がどのようにして細胞の特定部位に配置するのか、その詳細は不明である。そこで、本研究では、接合装置の性特異的な空間配置の仕組みを明らかにするために、配偶子形成が容易でさまざまな突然変異株が知られている緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を用いて、接合装置の空間配置の仕組みについて調べた。とくに交配型プラス株では、受精時に配偶子が活性化することで接合装置からアクチンが重合することによって突起状の受精管が伸長することが知られている。受精管の位置は接合装置の位置に対応するので、本研究では受精管に注目して電界放射型走査型電子顕微鏡(FE-SEM)および蛍光顕微鏡を用いて解析を行った。

材料と方法

C. reinhardtii 野生株 CC125 (交配型プラス) CC124 (交配型マイナス) 変異株 CC4301 (交配型プラス) は TAP 培地で 25°C、約 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の連続照明下で培養した。配偶子誘導は TAP1/2N で明期 12 時間、暗期 12 時間、25°C、約 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で 5 日間培養した後、窒素欠乏培地で 3~5 時間震盪培養を連続照明下で行った。配偶子活性化は 10 mM dbcAMP と 1 mM IBMX を添加し震盪培養を同条件で 1 時間行った。

活性化後、受精管と微小管性鞭毛根の観察のため 4% パラフォルムアルデヒド、メタノールで固定し、微小管性鞭毛根と鞭毛を抗アセチル化チューブリン抗体、受精管を抗アクチン抗体、核を DAPI で染色して蛍光顕微鏡を用いて観察した。また、3% Triton X100 と 5% パラフォルムアルデヒドの混合溶液による固定を行い微小管性鞭毛根と受精管の配置を観察した。

FE-SEM を用いた受精管の観察のため、配偶子を 2% グルタルアルデヒドによる固定、タンニン・オスミウム法による導電染色、脱水後に凍結乾燥して観察した。

コルヒチン処理の実験では配偶子に 0、1、2、4 mg/ml のコルヒチンをそれぞれ加え 100 分間震盪培養をした後、30 分間の活性化処理を行い、同様の蛍光抗体染色を行った。

結果と考察

受精管の配置を調べるために、FE-SEM 蛍光顕微鏡による観察を行った。CC125 の FE-SEM の観察から、受精管は細胞先端部の s 鞭毛根に対応する lateral ridge 上に確認された。さらに受精管と鞭毛根の位置関係を明らかにするため、Triton X100 処理により細胞骨格抽出試料を作成し抗アセチル化チューブリン抗体と抗アクチン抗体で染色して蛍光顕微鏡で観察したところ、受精管が 1s 鞭毛根上で確認された。これらの結果は TEM による先行研究の結果を支持する。このことから、眼点と同様に微小管性鞭毛根が受精管の配置に関与している可能性が示唆された。そこで、受精管の位置決定に対する微小管性鞭毛根の関与を調べるために、細胞骨格変異株である CC4301 を使って観察をした。その結果、CC4301 では細胞あたりの鞭毛の数が 0 本から 5 本の間で変化していたが、受精管は常に微小管性鞭毛根に見られた。さらに、配偶子に対してコルヒチン処理 (1、2、4 mg/ml) を行ったがどの濃度でもコルヒチン未処理の配偶子と受精管の数や配置に大きな違いは見られなかった。

今後の予定

同調培養系を用いて細胞分裂時に微小管性鞭毛根形成されるタイミングで阻害剤の処理をし、受精管の配置への影響を観察したい。

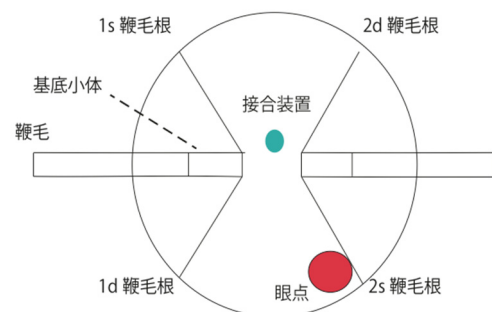


Figure 1: *Chlamydomonas reinhardtii* の交配型プラス配偶子の細胞骨格を鞭毛側から見た模式図