

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の性転換株における性特異的な接合装置の空間配置

印南 椋矢 (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・目的〉

同形、異形配偶をおこなう多くの緑藻植物において、配偶子は2本の鞭毛と光受容装置である眼点をもち、走光性や走化性を利用して出会い受精する。配偶子が出会うと細胞先端部に位置する接合装置(細胞融合装置)の領域で融合し、4本鞭毛の動接合子を形成する。多くの緑藻植物において、接合装置の位置は、2つの性の中で異なることが分かっている。例えば、*Chlamydomonas reinhardtii* の同形配偶子( $mt^+$ と $mt^-$ )では、鞭毛運動面を基準にすると、 $mt^+$ 配偶子の接合装置は眼点に対し反対側、 $mt^-$ では同じ側にある。この結果、受精後の動接合子では、2つの眼点が細胞の同じ面に並ぶことになる。このことは動接合子が正しい走光性を示すことができるという点で重要だと考えられている。また、接合装置の空間配置の違いは、同形、異形配偶に関わらず認められるために、2つの性を区別する普遍的な形態的な特徴であると考えられている。このような配偶子の形態的な特徴は、特定の“性”あるいは“交配型”と結びついた性質であると考えられるが、その詳しい仕組みはまだ分かっていない。

そこで、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第一歩として、*C. reinhardtii* を用いて交配型( $mt^+$ と $mt^-$ )と接合装置の空間配置の関係を解析することを試みた。*C. reinhardtii* では、性決定遺伝子 *MID* が知られており、*MID* があると  $mt^-$ 、無いと  $mt^+$  になることが分かっている。*MID* を欠損した  $mt^+$  株の配偶子は  $mt^+$  として振る舞い、*MID* が挿入された  $mt^+$  株は  $mt^-$  に性転換する。しかし、性転換に伴い接合装置の配置も変わるかどうかは調べられていない。そこで、本研究では、*C. reinhardtii* の性転換株を用いて配偶子細胞内での接合装置の位置を調べた。

## 〈材料と方法〉

*C. reinhardtii* の野生株 CC124( $mt^-$ )、CC125( $mt^+$ )及び性転換株 CC3712(*MID* 欠損、 $mt^- \rightarrow mt^+$ )、CC3947(*MID* 挿入、 $mt^+ \rightarrow mt^-$ ) は TAP 培地で 23°C、約 240  $\mu\text{mol/s/m}^2$  の連続照明下で培養した。配偶子形成の誘導は、TAP1/2N 寒天培地上で 23°C、約 240  $\mu\text{mol/s/m}^2$  の連続照明下で培養後、配偶子形成誘導培地に懸濁し 4 時間、25°C で震盪培養することで行った。配偶子の融合方向は、 $mt^+$  と  $mt^-$  配偶子を混合し、30 分後に配偶子懸濁液と 2% グルタルアルデヒドを等量混合することによって固定し、ついで光学顕微鏡で動接合子を観察することで確認した。

また、 $mt^+$  配偶子の接合装置からアクチンが重合して伸長した受精管を観察するために、10mM dbcAMP と IBMX を  $mt^+$  株 (CC125、CC3712) の配偶子に添加し、受精管の伸長を誘導した。そして、まず電界放射型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) での観察のため、2% グルタルアルデヒドによる固定、タンニン酸、オスミウムを用いた導電染色、エタノール脱水後に凍結乾燥させ観察した。また、受精管の蛍光抗体染色のため、5% パラホルムアルデヒドと 3% Triton X100 の混合溶液による固定、メタノール処理を行い、微小管性鞭毛及び鞭毛根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 で染色し蛍光顕微鏡で観察した。

## 〈結果と考察〉

動接合子の光学顕微鏡観察の結果から、接合が確認された性転換株 CC3947( $mt^+ \rightarrow mt^-$ ) と野生株 CC125( $mt^+$ ) の接合子のうち、野生株同士の組み合わせ (CC124xCC125) と同じように2つの眼点が細胞の同じ面に並ぶ向きで接合するものが 100% であった。従って、性転換株 CC3947 も CC124 と同じ向きで接合すると考えられる。CC124 では、眼点と同じ側に接合装置があることが分かっているので、CC3947 の接合装置も、眼点と同じ側にあることが示唆された。

性転換株 CC3712( $mt^- \rightarrow mt^+$ ) は接合に必要な遺伝子 (*fus1*) を持っていないために野生株 CC124( $mt^-$ ) と接合できなかった。そこで、接合装置から伸長した受精管を FE-SEM と蛍光抗体法で観察することによって接合装置の位置を確認した。その結果、FE-SEM では、CC3712 の受精管が野生株 CC125( $mt^+$ ) と同じように眼点の反対側に位置していることが確認できた。また、蛍光抗体染色では、(1) 接合装置が4本の鞭毛根 (1s, 1d, 2s, 2d) のうちの1本の側に位置していること、(2) 眼点に接する 2s 鞭毛根が一番長いことを利用して、その位置を判断した。その結果、眼点に接する 2s 鞭毛根及び同じ向きに位置する 1d 鞭毛根の位置には受精管は見られず、眼点と反対側に位置する 1s 鞭毛根と 2d 鞭毛根の間 (83.3%) および 1s 鞭毛根 (14.3%)、2d 鞭毛根 (2.4%) の基部に分布していることが確認できた。従って、CC3712 の接合装置は、CC125( $mt^+$ ) と同様に眼点と反対側に位置していると考えられる。これにより、*MID* 挿入欠損による性転換に伴い、接合装置の位置も転換することが明らかになった。従って、接合装置の空間配置も *MID* によって制御されていることが示唆される。

## 〈今後の予定〉

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、抗生物質耐性遺伝子の挿入による変異体を作成し、*MID* よりも下流に位置し接合装置の位置決定に関わる新たな遺伝子の探索を進めていきたい。

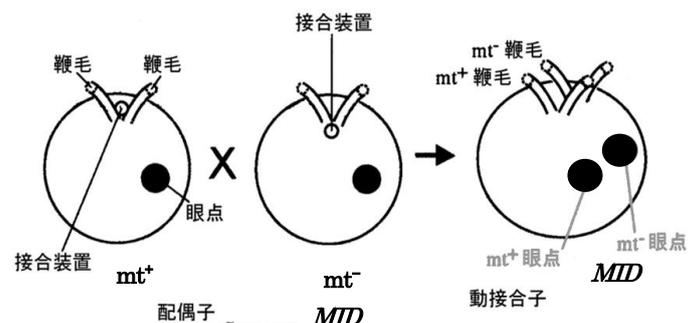


図: *C. reinhardtii* の配偶子における接合装置の位置と動接合子