

コウマクノウキン門 *Allomyces* の鞭毛をもつ雌雄配偶子と接合子の観察

大空 由依 (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】

多くの場合、真核生物の有性生殖は2つの性(交配型)の配偶子が融合することによって行われ、その大きさの差や運動性の違いによって同型配偶、異型配偶、卵生殖に分類される。一般に同型配偶では2つの配偶子はその大きさと形が同じだが、異型配偶では雌雄の配偶子はその大きさの違いによって区別できる。しかし緑藻植物では、性(交配型)が異なる配偶子の接合装置(細胞融合装置)が鞭毛と眼点(光受容装置)に対して異なる位置にあり、同型配偶・異型配偶に関わらず2つの配偶子を形態的に区別できる(図1)。この配置の違いによって、接合子では異なる配偶子由来の鞭毛が同じ方向に並び、2つの眼点が隣り合って並ぶ(図1)。このような性質は、緑藻植物に共通の性質であることが示唆されている。そこで、他の真核生物でも同様に配偶子の細胞融合部位に性特異性が認められるかどうかを確かめるため、緑藻植物とは系統的に離れた *Allomyces* (Opisthokonta) で検証した。

Allomyces は1本鞭毛の遊走子と配偶子を形成する菌類である。遊走子と雌配偶子が脂質顆粒や膜系からなる眼点様の構造 Side Body Complex (SBC) をもち、光受容体タンパク質の存在や、*Allomyces* 属内の数種は走光性を持つことが先行研究で示唆されている(図2)。本研究では、*Allomyces* を用いて緑藻植物で見られるような細胞融合部位の配置に規則性があるかを明らかにするため、以下の2つの目的で実験を行った。

1. 雌雄配偶子は細胞の特定の場所で接着し融合するのか?
2. もし特定の場所で融合するなら、接合子において雌雄配偶子由来の2本の鞭毛とSBCの配置に規則性があるのか?

【材料と方法】

・配偶子形成の誘導

Allomyces macrogynus (ATCC38327), *A. arbusculus* (NBRC105421)は、YpSs 寒天培地 23°Cで1ヶ月おきに継代培養した。配偶子形成の誘導は、3ヶ月以上前に植え継いだ古い菌糸を24h, 35°Cで乾燥した後にDS液体培地を加えて放出させた遊走子をYpSs液体培地に懸濁し、3日間100rpm, 30°Cで振盪培養することで行った。次いで、菌糸をDS液体培地に移すことで配偶子を放出させた。

・接合過程の観察

配偶子放出から30分後に懸濁液を26x20x0.05 mmのチャンバーに入れて光学顕微鏡で配偶子、接合子の行動を観察した。

・電界放射型走査電顕(FE-SEM)での観察

放出から2hの配偶子・接合子懸濁液を2%GAと1:1で混合して4°Cで一晩固定、1%OsO4で後固定、0.1%タンニン酸固定、1%OsO4で再度固定した。フィルタに乗せ、10~95%のEtOH、t-ブチルアルコール脱水ののち凍結乾燥し、白金でスパッタリングを行い、JSM6330Fで観察した。

・集束イオンビーム走査電顕(FIB-SEM)での観察

FE-SEM観察で使用した細胞にHelios nanolab 600iを用いて集束イオンビームを照射することにより細胞を削り断面を観察した。

・高速ビデオでの観察

配偶子、接合子の運動を毎秒200コマで撮影し観察した。

・微分干渉顕微鏡での観察

放出後2~4hの配偶子・接合子を4%GAと1:1で固定後、2000rpmで10分遠心分離して集めた細胞を観察した。

【結果と考察】

・光学顕微鏡と高速ビデオによる接合過程の観察

雌雄配偶子が融合する位置を確認するために、接合の様子を高速ビデオで観察した。その結果、接合の際、雌の鞭毛側に複数の雄が集まる様子が観察できた。さらに、接合子は2本鞭毛を同調させて動かし、しばらく遊泳したのち着生した。

・SBCの視覚化と細胞融合部位の観察

FE-SEMで接合子のSBCが観察できれば、鞭毛との相対的な位置関係がわかる。そこで、FE-SEMでSBCが確認できるか検討した。その結果、雌配偶子と接合子の鞭毛基部近くの細胞膜表面に雄配偶子には見られない滑らかな部分が見つかった。これをFIB-SEMで切断して内部構造を観察したところ、雌配偶子も接合子もその滑らかな構造部分に脂質顆粒が並んでおり、SBCであることが確認できた。次に、SBCの位置をマーカーとして細胞融合部位の位置をFE-SEMで詳細に観察したが、まだはっきりとした結果が得られていない。

・接合子の鞭毛とSBCの配置

接合子における雌雄由来の2本の鞭毛とSBCの位置関係をFE-SEMを用いて調べた。その結果、SBCは2本の鞭毛の並びに対して並行または約45°傾いて並んでいる傾向が見られた。

・微分干渉顕微鏡による接合子の観察

雌配偶子の鞭毛側のどこの位置に雄配偶子が接合したか推測するため、接合して間もない核融合前の接合子を用いて雌雄の核とSBCの位置関係を観察した。この結果は発表会にて報告する。

以上の結果について緑藻植物と比較して議論する予定である。

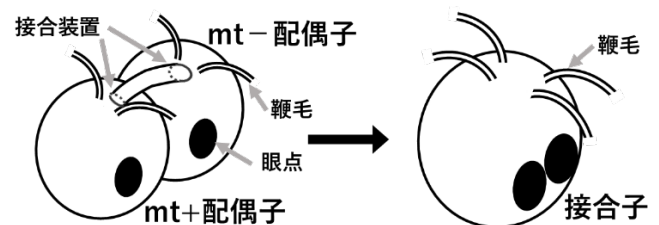


図1. 緑藻植物の配偶子の接合。2つの性で接合装置の配置が違うことで、接合子で2つの眼点が隣り合って並ぶ。

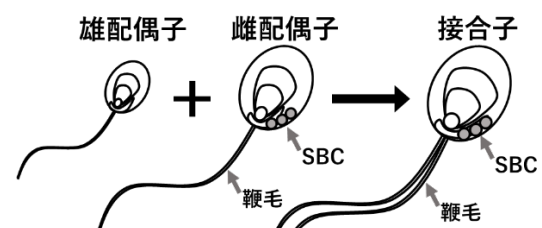


図2. *Allomyces* の配偶子・接合子。雌と接合子はSBCをもつ。