

アオミドロ属 (ホシミドロ科) の表層微小管の配向制御に関する研究

岩田和佳

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 (〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3丁目2番1号)

Kazuyoshi Iwata: Studies on regulation of the orientation of cortical microtubules of *Spirogyra* (Zygnemataceae). Jpn. J. Phycol. (Sôru) 68: 134-142, November 10, 2020

The mechanism regulating the orientation of cortical microtubules (MTs), which has not been fully understood in plant cells, was investigated using green algae *Spirogyra* spp. In *Spirogyra fluviatilis* cells treated with dimethylaminopurin, NaCl or KCl, the orientation of MTs changed from transverse to left-handed oblique. This change was also observed in cells treated with mannitol with EDTA. This is the first report of the modification of MT orientation without destruction of MTs in *S. fluviatilis*. The longitudinal orientation of MTs, however, appeared only in cells with destruction of MTs. The inhibition of longitudinal MTs in cells treated with lovastatin, under destruction of MTs, implied the appearance of longitudinal MTs could be related to sterol synthesis. In cells cut in burst buffer and pretreated with mannitol and EDTA, according to the experiment of plasma membrane ghost made from tobacco cells, CaCl₂ induced changes of MT orientation from transverse to left-handed oblique and then to random. These changes seemed to correspond to the increase of randomness which involves orientation of MTs. This method might be useful for study of MT orientation. From these results including those of *S. ellipsospora*, new idea and research method of MT orientation of *Spirogyra* cells were proposed.

Key Index Words: D₂O, mannitol, microtubule, Spirogyra

Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Harima Science Park City, Hyogo 678-1297, Japan
Contact information: k-iwata@arion.ocn.ne.jp

緒言

タンパク質チューブリンが重合して形成される微小管は、植物細胞の原形質膜直下では、互いに平行に並び、表層微小管 (cortical microtubule) と呼ばれる (Ledbetter & Porter 1963)。表層微小管は、原形質膜のセルロース合成酵素の移動方向を制御するため、その配向は細胞壁中のセルロース繊維の配向と一致する (Lei *et al.* 2012)。従って、表層微小管の配向は、細胞の形態形成に関与すると考えられている。

表層微小管の配向を制御するメカニズムに関しては、陸上植物を用い、分子レベルで様々な知見が得られている。微小管形成、切断は配向を制御する基礎的現象と考えられており、植物の細胞表層においても研究されてきた。表層微小管形成については、 γ -チューブリン複合体を足場としている可能性が、シロイヌナズナを用いた研究から指摘されている (Murata *et al.* 2005, Nakamura *et al.* 2010)。シロイヌナズナのカタニンタンパク質による *in vitro* の微小管切断 (Stoppin-Mellet *et al.* 2002) や、シロイヌナズナを用いた微小管切断部位へのカタニンの局在の観察 (Lindeboom *et al.* 2013) などの報告もある。これらの知見は、配向制御のメカニズムの理解につながるが、まだ多くの部分が不明な点として残されている。また、自己組織化の視点から、配向制御過程のシミュレーションがおこなわれている (村田 2018) が、シミュレーションの設定と実際の現象との対応に不明な点があり、完全に理解できているとは言い難い。

表層微小管は、藻類にも存在している。システムの複雑化した陸上植物よりも、シンプルな性質を維持しているかも

しれない藻類の方が、本質が窺える可能性があるのではない。接合藻のアオミドロは、表層微小管の脱重合後、再重合させる過程で様々な因子の影響を受け、その配向が変化する。例えば、糖、各種イオン、重水、遠赤外線、次亜塩素酸、各種阻害剤などが挙げられる (Iwata 1995, 2001, Iwata & Itoh 1998, Iwata & Sano 2005a, b, c)。しかし、脱重合させずに配向が変化する現象の報告が無く、artifact (人工産物) 的印象を与えることがあつてか、筆者以外により研究されることが殆どなかった。

本研究では、最初に、脱重合させずに、アオミドロ (*Spirogyra fluviatilis* Hilse) の表層微小管の配向を変化させる処理について報告する。また、脱重合後再重合させる処理と比較し、新規の知見を得ることができたので、新しい解析方法やアオミドロの他の種からの知見と併せて報告する。

材料と方法

S. fluviatilis は、京都府城陽市の池で採取し、C培地 (*Closterium* 用培地, Ichimura 1971) で、23°Cで培養した (Iwata 1995, Iwata and Itoh 1998, Iwata *et al.* 2001)。明暗条件は 16 h light (蛍光灯) -8 h dark, 光強度は 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。また *Spirogyra ellipsospora* Transeau は、培養中のシャジクモ類から分離し、*S. fluviatilis* と同様の方法で培養した。新しい培地に植継いでから 2~7 日経過した細胞 (増殖期) を実験に用いた。

アオミドロには、以下の3つの薬剤処理を行った。微小管

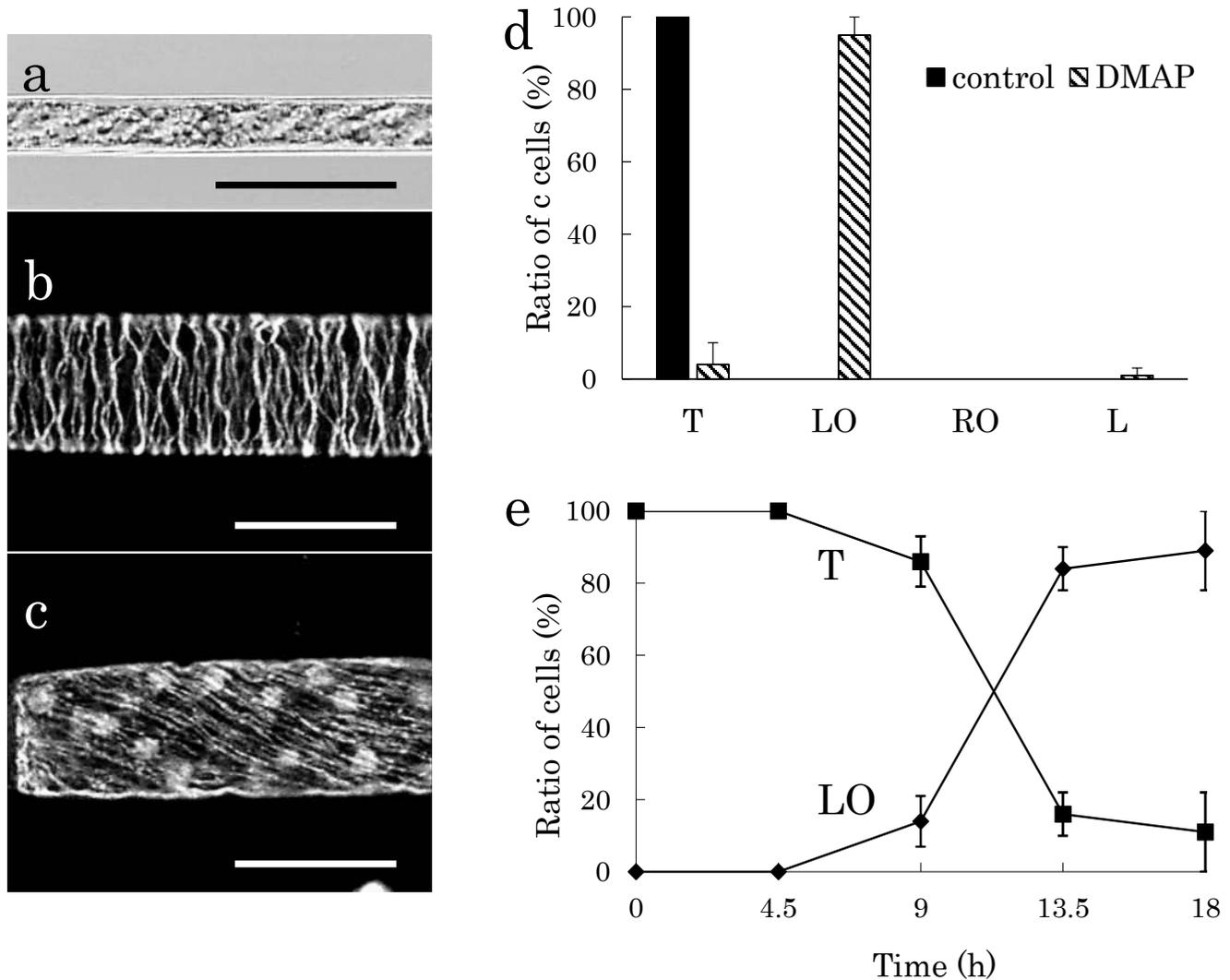


Fig. 1. Effect of DMAP on cortical microtubules of *Spirogyra fluviatilis*. a. *S. fluviatilis* cells. Bar = 100 μm . b, c. Fluorescence microscopy of microtubules, transverse (b) and oblique (left-handed helix) (c). Bars = 30 μm . d. Orientation of cortical microtubules treated with DMAP for 18 h. e. Time course change of orientation of cortical microtubules treated with DMAP. Experiments (d, e) were repeated five times and average values are shown with standard error. T, transverse; LO, left-handed oblique; RO, right-handed oblique; L, longitudinal.

の脱重合を伴わない処理, 脱重合を伴う処理, 細胞切断処理である。なお, 薬剤処理を行う際, 植継時の細胞量や aging のばらつきのため, データにばらつきが生じやすいので, 比較する細胞は同時に処理した。

微小管の脱重合を伴わない処理は以下の通りである。*S. fluviatilis* を処理する溶液には, 人工池水 (0.1 mM KCl, 0.1 mM CaCl_2 , 1 mM NaCl, 1 mM HEPES-Na, pH 7.0) を用いた。5 mM ジメチルアミノプリン (DMAP) 溶液で, 4.5, 9, 13.5, 18 h, 0.30 M マンニトール, 100 mM NaCl, 100 mM KCl, 40% D_2O 溶液で 18 h 処理した。微小管を脱重合させる場合より感受性が低いことが予想されたため, NaCl と KCl については, 濃度を脱重合させる場合より高めに設定した。藻体をピンセットでひとつつまみ, 6 well マイクロプレート (AGC テクノグラス) に入れた各溶液中

に入れ, 各処理時間静置した。また, マンニトール溶液では, 0.5 mM EGTA または EDTA を加える実験も行った。DMAP は, DMSO に 250 mM 溶解したものを保存液とした。*S. ellipsozpora* の処理溶液は, 人工池水に 0.25 M マンニトールと 0.5 mM EDTA を加えたものを用い, 18 h 処理した。明暗条件は 4.5, 9 h は明条件, 13.5, 18 h は最初の 12 h は明条件, 残りは暗条件, 光強度は $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。

微小管の脱重合を伴う処理 (脱重合法) は以下の通りである。溶液には, 上記の人工池水を用いた。*S. fluviatilis* を, ピンセットで 24 well マイクロプレート (AGC テクノグラス) に移し, 微小管破壊剤 amiprophosmethyl (APM) 3 $\mu\text{g/L}$ で 1 h (DMAP, マンニトール, 40% D_2O 各溶液処理の場合), または 24 h (NaCl, KCl 各溶液処理の場合) 表

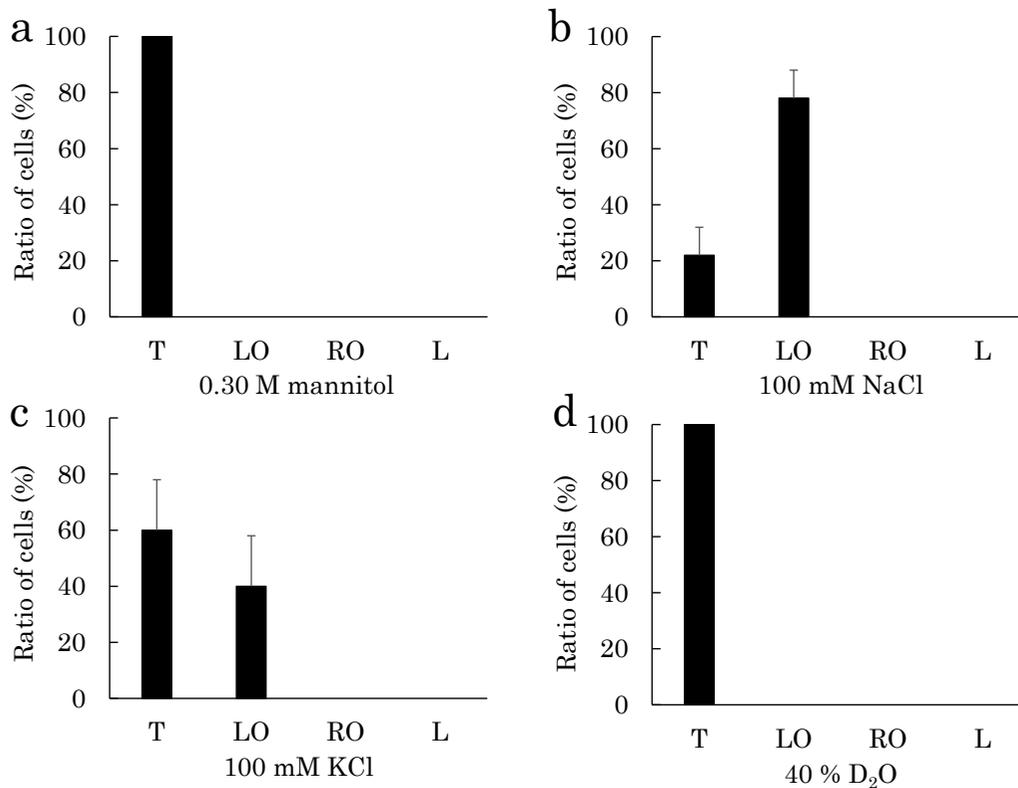


Fig. 2. Orientation of cortical microtubules of *Spirogyra fluviatilis* cells treated with mannitol (a), NaCl (b), KCl (c) and D₂O (d). T, transverse; LO, left-handed oblique; RO, right-handed oblique; L, longitudinal. Experiments were repeated five times and average values are shown with standard error. *P<0.05 **P<0.01 (t-test)

層微小管を破壊した。なお、APM 処理時間は、縦方向（配向については後述）の微小管が形成される時間に設定した。DW で3回すすぎ、APM を洗い流した後、5 mM DMAP, 0.30 M マンニトール, 50 mM NaCl, 50 mM KCl, 40% D₂O 各溶液, またはこれらの溶液に 20 μ M ロバスタチン（ステロール合成阻害剤）や 20 μ M Gd（機械刺激受容チャンネル阻害剤）を加え、1.5 h 静置し、表層微小管を再重合させた。これらの処理は明条件で、光強度は 90 μ mol m⁻² s⁻¹ とした。

次に、植物細胞の表層微小管を解析する際に用いる細胞膜ゴーストの手法 (Colling *et al.* 1998) に習い、細胞切断処理を行った。この方法でも、溶液には上記の人工池水を用いた。*S. fluviatilis* は、ピンセットで 6 well マイクロプレートに移し、0.30 M マンニトールと 0.5 mM EDTA もしくは一方のみの溶液中で 0 h, 1 h または 2 h 静置したのち、溶液を軽く切り、CaCl₂ を 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM または 10 mM 含んだ burst buffer (50 mM PIPES, 2 μ M MgCl₂, 5 mM EGTA (pH 7.0)) 中で、カミソリで切断した。burst buffer は、細胞膜ゴースト作成に用いるものに類似した組成にした。その後パストゥールピペットで 24 well マイクロプレートに、CaCl₂ を各濃度で含んだ burst buffer ごと移し一定時間静置した。*S. ellipsozpora* についても同様に行った。0.25 M マンニトールと 0.5 mM EDTA の溶液中で 1 h 静置したのち、1 mM CaCl₂ を含んだ burst buffer 中で、カミソ

リで切断し、30 min 静置した。その後、切断した細胞（以下、cut cells と呼ぶ）は、表層微小管の観察に用いた。

表層微小管の観察は、次のように行った。アオミドロ藻体を NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 緩衝液（以後、Na リン酸緩衝液と呼ぶ）(pH 7.0) で希釈（最終濃度 50 mM）した 3.7% ホルムアルデヒド溶液で 30 min 固定し、固定液中でカミソリにより切断した。cut cells については、24 well マイクロプレート内で burst buffer を除去後、3.7% ホルムアルデヒド溶液で 30 min 固定した。固定後の操作は、2 mL エッペンドルフチューブ中で行った。50 mM Na リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 3 回すすいだ後、界面活性剤溶液 (Na リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈（最終濃度 50 mM）した 1% Nonidet P-40, 0.4 M マンニトール) で 3 h 処理した。界面活性剤溶液を除いた後、100 倍希釈の monoclonal 抗 chicken α tubulin 抗体 (Oncogene Research Products, San Diego, CA, USA) で一晩処理 (4°C) した。50 mM Na リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 3 回すすいだ後、200 倍希釈の抗 mouse Ig G 抗体 (Alexa-488 結合) (富士フイルム和光純薬) で 2 h (室温) 処理した。50 mM Na リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 3 回すすいだ後、0.1% *p*-phenylenediamine dihydrochloride を含んだ Mowiol solution (Osborn & Weber 1982) を用いてプレパラートを作成し、蛍光顕微鏡 BX50 (オリンパス) で観察し配向を決定した。配向については、伸長軸に対し 80~90°

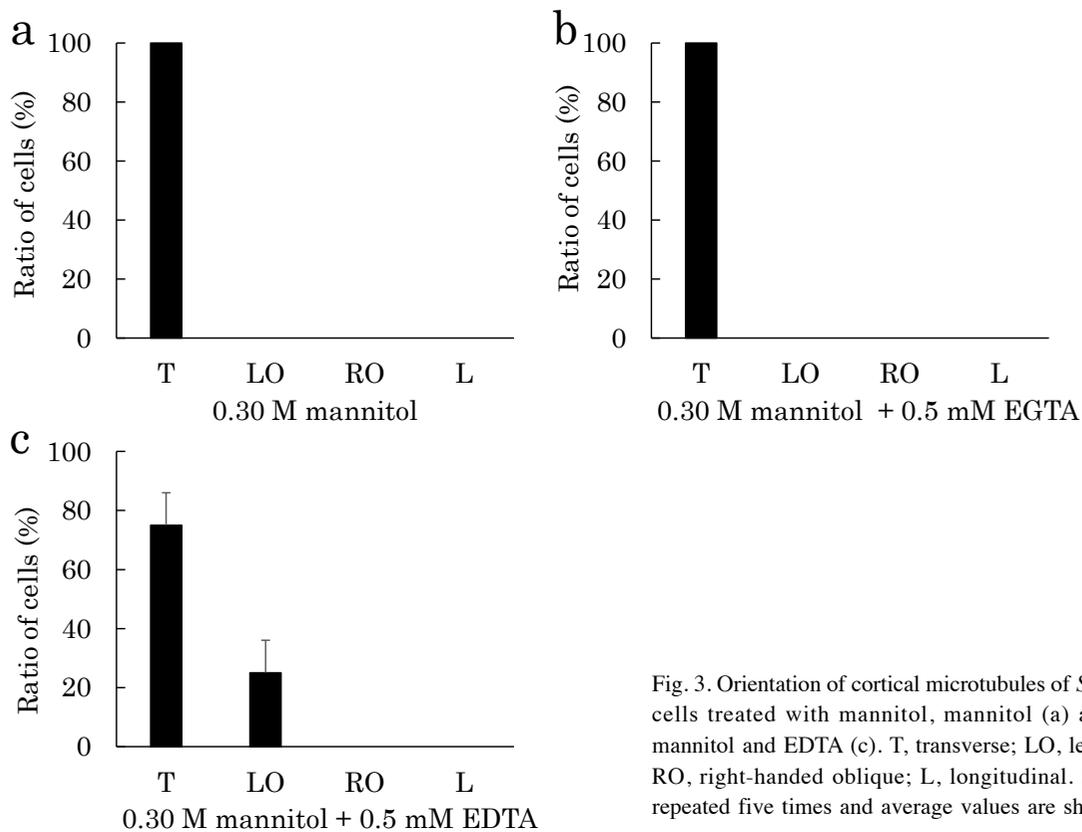


Fig. 3. Orientation of cortical microtubules of *Spirogyra fluviatilis* cells treated with mannitol, mannitol (a) and EGTA (b), or mannitol and EDTA (c). T, transverse; LO, left-handed oblique; RO, right-handed oblique; L, longitudinal. Experiments were repeated five times and average values are shown with standard error.

を横、10~80°を斜め、0~10°を縦と定義し、各方向の表層微小管を持つ細胞の、全体の細胞数 (20) に対する割合を求めた。実験は5回行い (総細胞数 100)、平均値を求めた。目視で決定しにくい細胞は、蛍光像を CCD カメラ DP70 (オリンパス) で撮影し、配向を決定した。また、斜めは左らせん、右らせんに分けた。

NaCl, KCl, GdCl₃, マンニトール, エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) はフジフィルム和光純薬, ロバスタチンはフナコシ, グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA) と DMAP はシグマアルドリッチ, D₂O (重水) は、ナカライテスクからそれぞれ購入した。

結果と考察

微小管は構成タンパク質チューブリンや微小管付随タンパク群がリン酸化の対象となっているため (Sasabe & Machida 2012, Fujita *et al.* 2013), 最初にリン酸化阻害剤 DMAP の影響を調べた。*S. fluviatilis* (Fig. 1a) は対照 (2% DMSO で 18 h 処理) ではすべての細胞が横方向の表層微小管 (Fig. 1b) を持っていたが、リン酸化阻害剤 DMAP で 18 h 処理すると、左らせんの表層微小管 (Fig. 1c) を持つ細胞が 95% 観察された (Fig. 1d)。これは、*S. fluviatilis* において表層微小管を脱重合させることなく配向を変化させる最初の例となった。しかし、この現象におけるリン酸化阻害剤 DMAP のターゲットは不明であった。例えば、チューブ

リンのリン酸化は微小管を不安定化するが、不安定化の阻害により表層微小管の配向が変化することは理解しにくい。

経時変化を調べると、13.5 h で左らせんの割合が 84% になり、18 h (89%) とあまり変わらなかった (Fig. 1e)。13.5 h から 18 h にかけて、表層微小管の配向の割合があまり変化しないことから、この処理では主に左らせんになると考えられた。

脱重合法で、表層微小管を縦にすることが知られているマンニトール, NaCl, KCl, 重水 (Iwata 1995, 2001, Iwata & Itoh 1998, Iwata & Sano 2005a) についても同様に 18 h 処理したところ、NaCl と KCl 溶液では左らせんが出現したものの、マンニトール, 重水については横のまま影響が見られなかった (Fig. 2)。マンニトールは原形質膜を通過しないが、重水は通過するので、この結果と通過の有無との相関は確認できなかった。また、これらの処理で縦の配向をもつ細胞が出現しなかった (Fig. 2) ことから、脱重合させないと、縦方向の表層微小管は形成されない可能性が考えられた。

次に、脱重合法で表層微小管の配向に影響を与えることが知られているキレート剤 (Iwata 2001) の影響を、単独では影響のなかったマンニトール, 重水との組み合わせで調べたところ、マンニトールの場合、EGTA では影響が見られなかったが、EDTA を加えると左らせんを持つ細胞が約 26% 見られた (Fig. 3)。また重水の場合は影響が見られなかった (data not shown)。EDTA は殆ど原形質膜を通過しないことから、

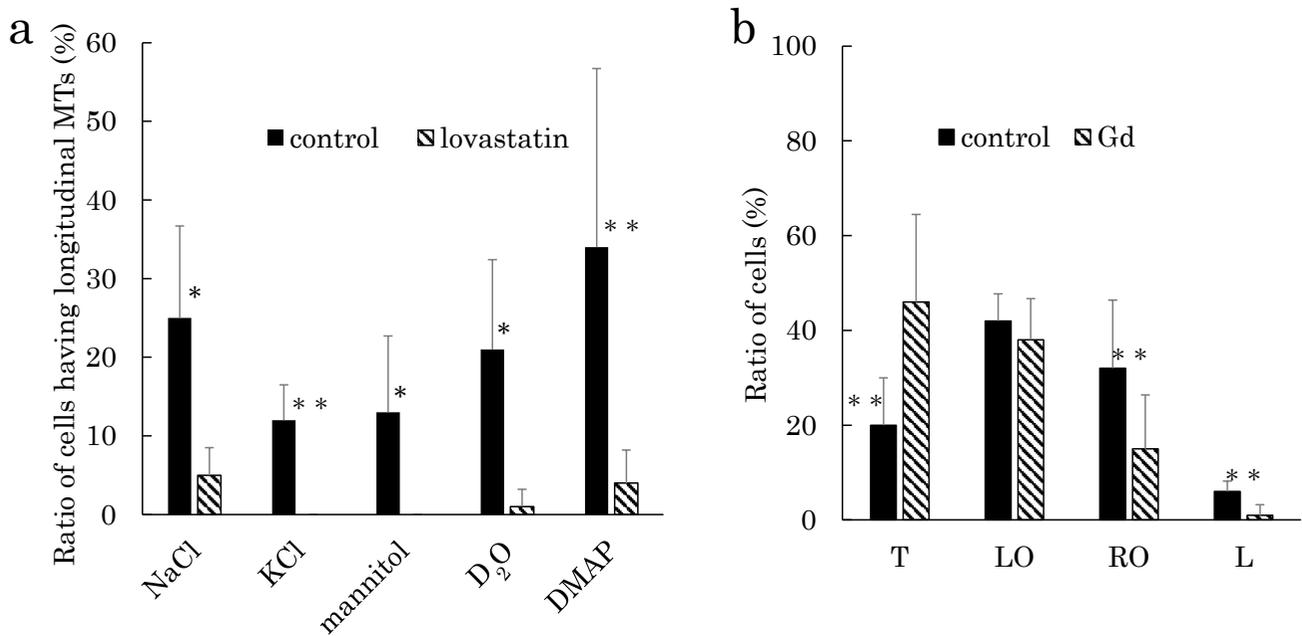


Fig. 4. Effect of reagents on orientation of cortical microtubules of *Spirogyra fluviatilis* cells. a. Effect of lovastatin, inhibitor of sterol synthesis, on ratio of cells having longitudinal microtubules treated with NaCl, KCl, mannitol, D₂O and DMAP. Experiments were repeated five times and average values are shown with standard error. *P<0.05, **P<0.01 (t-test). b. Effect of Gd³⁺, inhibitor of mechanosensing channel, on orientation of cortical microtubules treated with D₂O. T, transverse; LO, left-handed oblique; RO, right-handed oblique; L, longitudinal. Experiments were repeated five times and average values are shown with standard error. *P<0.05, **P<0.01 (t-test).

原形質膜の外側に存在する Mg が配向制御に関わっている可能性がある。脱重合法では、EDTA 単独で配向に左らせんが見られることが知られており (Iwata 2001), その結果とも矛盾しない。

しかし、この結果も含め、脱重合法で見られる縦方向の表層微小管を持った細胞は、脱重合させない場合殆ど見られなかった。この理由について、縦になるためには脱重合により起こる何らかの変化が必要であることが考えられる。この変化を特定するためには、縦方向の表層微小管を持つ細胞の増加を阻害する阻害剤の検索が有効であると思われる。そこで、脱重合法で表層微小管を縦にすることが知られているマンニトール、NaCl, KCl, 重水に加え、DMAP について、まずロバスタチン (ステロール合成阻害剤) (Alberts *et al.* 1980) の影響を調べたところ、縦方向の表層微小管の出現はロバスタチンで阻害され、KCl と DMAP で 1% 水準、マンニトール、NaCl, 重水では 5% 水準で有意差が見られた (Fig. 4a)。また、ランダムな表層微小管を持つ細胞や、微小管の重合が阻害された細胞は見られなかった。このことから *S. fluviatilis* で表層微小管が縦になるためには、微小管が脱重合した場合にロバスタチンが阻害する因子、例えば膜のステロールが重要であることが推測された。陸上植物では、表層微小管の配向変化と膜のステロールは植物器官の示す抗重力反応に関与している。しかし、表層微小管の配向変化とステロール合成は、独立した現象であると考えられている (Hoson *et al.* 2009)。陸上植物が、淡水から上陸したときに、両者

の関係が変化した可能性がある。アオミドロでの表層微小管の配向変化に対するステロールの役割の研究は、表層微小管の配向制御という視点だけでなく、植物進化の視点からも興味深い。特に、アオミドロ属は、陸上植物に最も近い淡水藻の分類群に含まれる (Delaux *et al.* 2015) ことを考えると、興味はさらに深まる。

重水は、微小管を安定化させることが知られている (Itoh & Sato 1984)。しかしロバスタチンが重水の影響を阻害することから、重水はロバスタチンのターゲットの因子を介して、間接的に影響していることが示唆された。例えば、原形質膜の脂質が関与している可能性が考えられる。そこで、原形質膜に影響を与える可能性のある他の阻害剤の影響を調べることにした。機械刺激受容チャネル阻害剤である Gd³⁺ を用い、

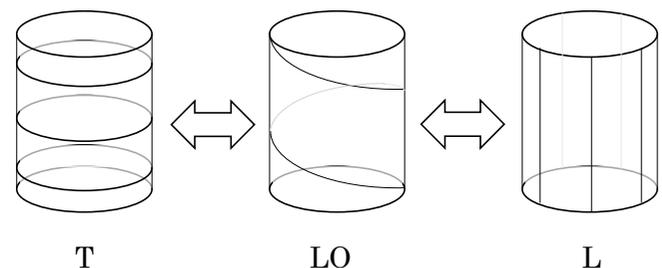


Fig. 5. Three phases of orientation of cortical microtubules of *Spirogyra fluviatilis* cells. T, transverse; LO, left-handed oblique; L, longitudinal.

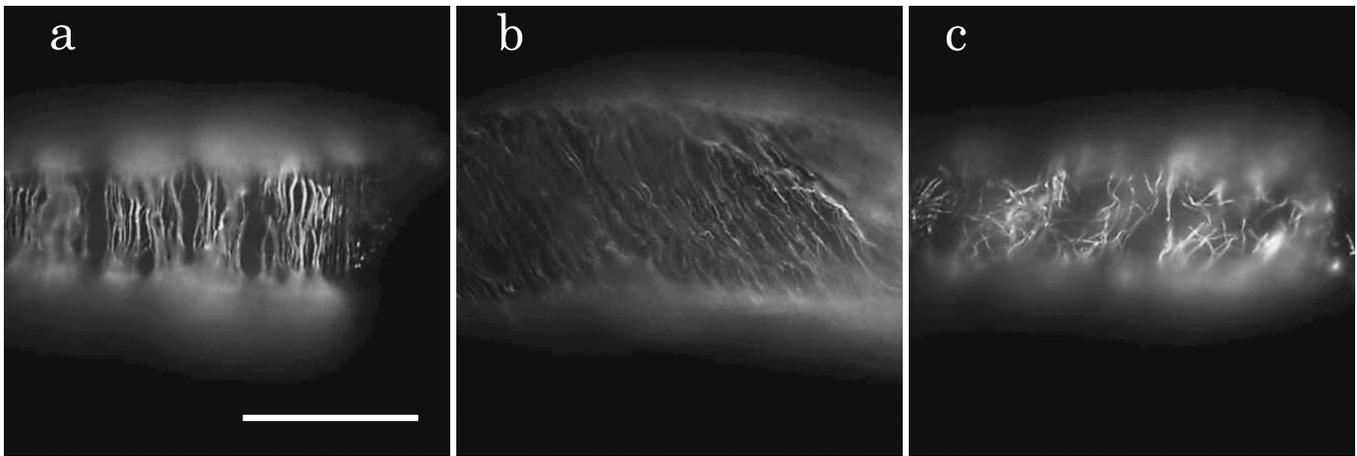


Fig. 6. Fluorescence microscopy of cortical microtubules of cut cells of *Spirogyra fluviatilis*. a. Transverse microtubules. b. Oblique microtubules. c. Random microtubules. Bar = 30 μm .

表層微小管の配向に対する重水の影響への阻害作用を検討した。ロバスタチンを用いた実験と同様の実験を行ったところ、縦方向の表層微小管の出現を阻害し、1%水準で有意差が見られた (Fig. 4b)。従って、重水の影響が原形質膜を介している可能性は十分あると思われる。その場合には、原形質膜の結合水としての重水が意味を持っている可能性 (例えば重水そのものが原形質膜に機械刺激を与えるなど) があり、表層微小管の配向を考える場合には、結合水をも含めたシステムを考えることにも意味があるかもしれない。

また、表層微小管が縦になるためには、ステロール合成のように新たな代謝経路の活性化が必要であると考えられた。脱重合法と異なり、脱重合させない今回の手法では、この活性化が起こらない可能性がある。これらのことから、*S. fluviatilis* の表層微小管の配向には、横、左らせん、縦と大雑把に3つの独立した相が存在すると考えられる (Fig. 5)。左らせんも、1つの安定相として存在している可能性がある。

次に、マンニトールと EDTA による表層微小管の配向変化に対するイオン濃度等の直接的影響を見るために、細胞膜ゴーストの手法 (Colling *et al.* 1998) に類似の新規の実験系で解析した。未固定の細胞を burst buffer の中で切断し、原形質膜に結合した表層微小管が burst buffer 中に露出した cut cells にした。そして、buffer の成分を変えることによる表層微小管の配向変化を調べた。

0.30 M マンニトールに 0.5 mM EDTA を加えた溶液中で 1 h 静置した cut cells を、 CaCl_2 を加えた burst buffer 中で 0.5 h 静置すると、0.01 mM と 0.1 mM では表層微小管は横のみ (Fig. 6a) であったが、1 mM では左らせんの細胞 (Fig. 6b) が見られた。10 mM では配向がランダムな細胞 (Fig. 6c) が約 74% に増加した (Fig. 7a)。 Ca^{2+} は、微小管を脱重合させ (O'Brien *et al.* 1997)、束化した微小管を破壊していくと考えられることから、横から左らせん、左らせんからランダムな過程は、乱雑さの増大に対応していると考えられ

る。

また、1 mM CaCl_2 の時の経時変化を調べると、0.5 h ではランダムは殆ど見られなかったが、1 h では約 30% 見られた (Fig. 7b)。前処理時間についても検討したが、時間経過に連れランダムが増加した (Fig. 7c)。これらにおいても、横から左らせん、左らせんからランダムと変化した (Fig. 7d)。特に、前者は、細胞切断後、即ち細胞死後の経時変化であり、乱雑さの増大と対応している可能性が高い。前述したように、左らせんは独立した相であると考えられることから、この相は乱雑さがある程度増大した状態を反映していると考えられる。

Fig. 1 と Fig. 2 の結果は、乱雑さの増大で解釈できる可能性がある。単独で表層微小管の配向に影響のなかったマンニトールは原形質膜を通過できなかったため、また重水は細胞内の軽水に比べ動きが遅く、微小管を安定化させる作用があるため、配向変化を伴う程度の乱雑さの増大につながらなかったのかもしれない。影響のあった DMAP, NaCl, KCl は、細胞内に入り込み乱雑さを増大させたと解釈することができる。なお、前処理は、マンニトール、EDTA 単独では配向に殆ど影響しなかった (data not shown)。また、これらの結果から、この新規の解析法は表層微小管研究に役立つ可能性が考えられた。

重水が表層微小管の配向に与える影響から、表層微小管の配向制御について、原形質膜の結合水をも含めたシステムを考える必要性については既に述べた。近年、原形質膜表面のような親水性の表面付近に、構造を持った第 4 の水の相 (固体と液体の間) が存在するという主張があり、構造を持った液晶様の水という言葉がなされている (Pollack 2014)。液晶には、圧力や温度の変化により、特徴を持った構造が出現するタイプが存在する (吉見・藤森 2016)。*S. fluviatilis* の表層微小管の配向は膨圧と相関があることが報告されており (Iwata *et al.* 2001)、また今述べた乱雑さの増大は温度上昇

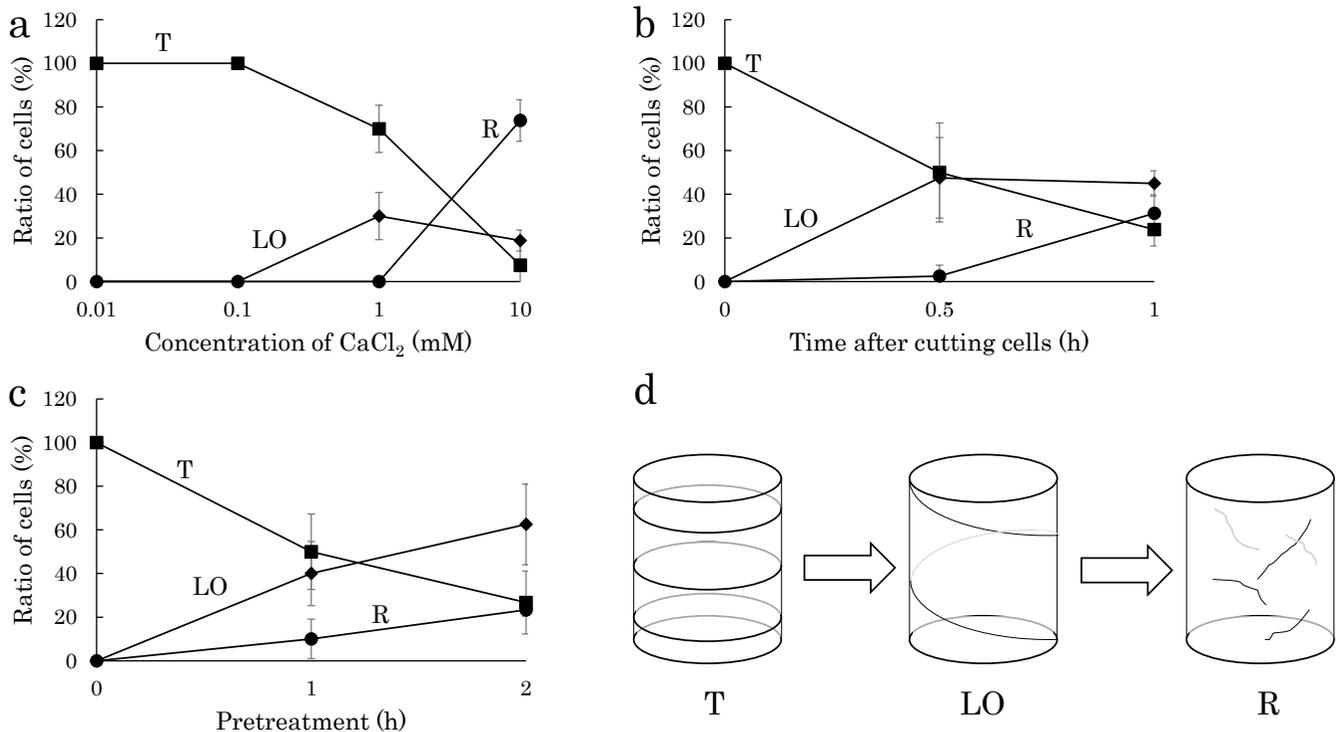


Fig. 7. Orientation of cortical microtubules of cut cells of *Spirogyra fluviatilis*. a. Relationship between orientation of cortical microtubules and concentration of CaCl₂. b. Change of orientation of cortical microtubules after cutting cells. c. Relationship between orientation of cortical microtubules and time length of pretreatment in 0.3 M mannitol and EDTA solution. d. Three phases of orientation of cortical microtubules. T, transverse; LO, left-handed oblique; R, random. Experiments were repeated four times and average values are shown with standard error.

に対応すること、更には構造、方向性を持つこと等、表層微小管とそれを取り巻く環境と、液晶とは類似点が多いことは興味深い。液晶とのアナロジーで研究を進めると新たな方向性が開けるかもしれない。

次に、マンニトールと EDTA の影響を、別種のアオミドロ、*S. ellipsozona* についても検討した。0.3 M マンニトールでは原形質分離することがあるため、0.25 M にした。溶液中で 18 h 置くと、殆どの細胞で表層微小管が原形質膜から遊離し、葉緑体に、その長軸方向に沿って張り付くように見えた (Fig. 8a-c)。cut cells においても同様の傾向が見られた (Fig. 8d, e)。しかし、直径が大きいせい、カミソリで切断するとき変形することが多かったため、定性的評価のみに止めた。同じアオミドロ属でも、表層微小管と原形質膜との関係に違いがある可能性がある。

表層微小管の配向制御については、最近、自己組織化の視点から解釈しようとされており、村田 (2018) の総説に詳しい。シミュレーションにより、細胞の形状などの因子から表層微小管の配向を求める試みがなされている (Allard *et al.* 2010, Mirabet *et al.* 2018, Chakraborty *et al.* 2018)。しかし、通常のシミュレーションでは表層微小管の初期状態はランダムに設定するが、細胞分裂後や微小管脱重合後のリカバリーで表層微小管列が形成されるときには、初期の微

小管はランダムではないとの報告もあり (Lindeboom *et al.* 2013)、設定に問題が存在する可能性がある。また、配向が変化する場合、複数の配向が細胞中に混在する状況が設定される。しかし、今回用いた *S. fluviatilis* では、例えばマンニトールにより縦方向に配向した表層微小管が斜め方向を経て横方向に変化する (Iwata 2001) が、その過程では、現在まで一方向に配向した微小管しか観察されていない。本論文では原形質膜の結合水について触れたが、自己組織化で解釈するにしても、システムを構成する個々の因子に対する更なる理解が必要であるように思われる。

本研究では、アオミドロの表層微小管について、脱重合を伴わない配向変化の系、cut cells を利用した解析方法の開発などについて紹介し、表層微小管配向の 3 つの相 (Fig. 5) という概念、原形質膜の結合水の関与の可能性などについて言及した。

藻類には、陸上植物に比べシンプルな性質を維持し、本質へのアプローチが容易な可能性がある。また、単細胞や一列に並んだ細胞群、巨大細胞などの種があり生理学的実験も容易であるという長所がある。巨大単細胞のシャジクモ科の表層微小管は以前から研究されている (例えば、Wasteneys & Williamson 1989, Iwata & Shinmen 2007, Sommer *et al.* 2015) が、もう一工夫でさらに興味深い研究対象になる可能

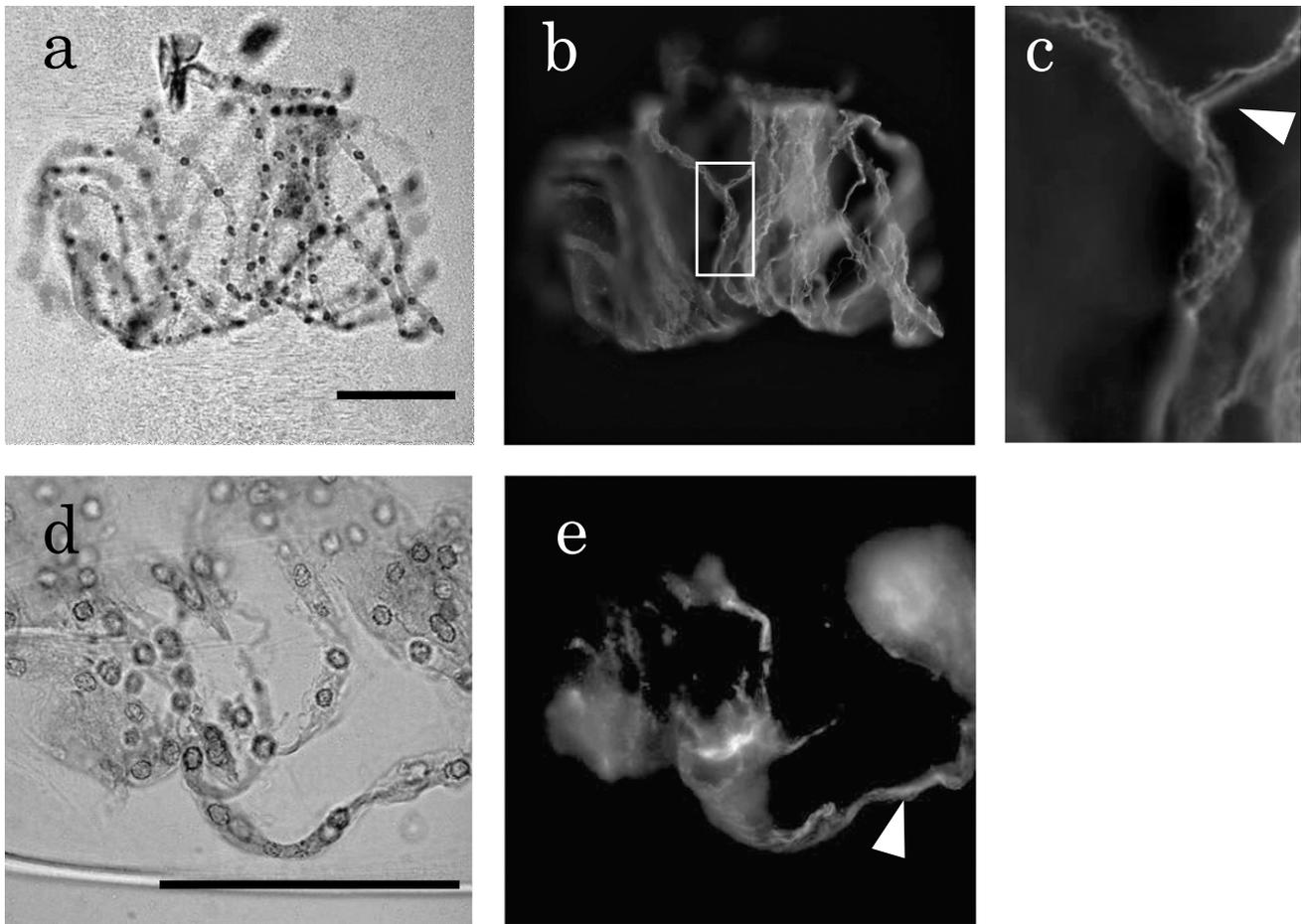


Fig. 8. Photographs of cortical microtubules of cells and cut cells treated with mannitol and EDTA of *Spirogyra ellipsospora*. a. Cell observed in bright field of view. b. Microtubules of the cell which is the same as (a). c. Microtubules of the cell enlarged in white square in (b). d. Cut cell observed in bright field of view. e. Microtubules of the cell which is the same as (d). Arrowheads indicate microtubules. Bars = 30 μ m.

性があるのではないか。本研究が、藻類を用いた表層微小管の研究にもっと目を向けるきっかけになればと考える次第である。

引用文献

- Allard, J. F., Wasteneys, G. O. & Cytrynbaum, E. N. 2010. Mechanisms of self-organization of cortical microtubules in plants revealed by computational simulations. *Mol. Biol. Cell.* 21: 278–286.
- Alberts A.W., Chen J., Kuron G. *et al.* 1980. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3957–3961.
- Chakraborty, B., Blilou, I., Scheres, B. & Mulder, B. M. 2018. A computational framework for cortical microtubule dynamics in realistically shaped plant cells. *PLoS Comput. Biol.* 14: e1005959.
- Collings, D. A., Asada, T., Allen, N. S. & Shibaoka, H. 1998. Plasma membrane-associated actin in Bright Yellow 2 tobacco cells. *Plant Physiol.* 118: 917–928.
- Delaux, P., Guru, V., Radhakrishnan, G. V., Jayaraman, D. *et al.* 2015. Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112: 13390–13395.
- Fujita, S., Pytela, J., Hotta, T. *et al.* 2013. An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 23: 1969–1978.
- Hoson, T., Soga, K. & Wakabayashi, K. 2009. Role of the cell wall-sustaining system in gravity resistance in plants. *Biol. Sci. Space* 23: 131–136.
- Ichimura T. 1971. Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. In: Nishizawa, K. (ed.) *Proceedings of the 7th International Seaweed Symposium*. pp. 208–214. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Itoh, T. J. & Sato, H. 1984. The effects of deuterium oxide (D_2O) on the polymerization of tubulin in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 800: 21–27.
- Iwata, K. 1995. Regulation of the orientation of cortical microtubules in *Spirogyra* cells. *J. Plant Res.* 108: 531–534.
- Iwata, K. 2001. *Studies on Factors Affecting the Orientation of Cortical Microtubules in Selected Plant Cells*. Doctoral Thesis. Kyoto University, Kyoto.
- Iwata, K. & Itoh, T. 1998. Effect of ion on the orientation of cortical microtubules in *Spirogyra* cells. *Plant Cell Physiol.* 39: 1099–1103.
- Iwata, K. & Sano, Y. 2005a. Effect of D_2O on the orientation of cortical microtubules in *Spirogyra* cells. *J. Biol. Macromol.* 5: 61–68.

- Iwata, K. & Sano, Y. 2005b. Effect of functional water treated with materials irradiating far-infrared light on the orientation of cortical microtubules in *Spirogyra* cells. *J. Biol. Macromol.* 5: 31–38.
- Iwata, K. & Sano, Y. 2005c. Effect of electrolyzed water on the orientation of cortical microtubules in *Spirogyra* cells. *J. Biol. Macromol.* 5: 53–60.
- Iwata, K. & Shinmen, T. 2007. Microtubule orientation in globular leaflet cells of *Chara inflata*. *J. Plant Res.* 120: 647–650.
- Iwata, K., Tazawa, M. & Itoh, T. 2001. Turgor pressure regulation and the orientation of cortical microtubules in *Spirogyra* cells. *Plant Cell Physiol.* 42: 594–598.
- Ledbetter, M. C. & Porter, K. R. 1963. A “microtubule” in plant cell fine structure. *J. Cell Biol.* 19: 239–250.
- Lei, L., Li, S., & Gu, Y. 2012. Cellulose synthase complexes: Composition and regulation. *Front. Plant Sci.*: 10.3389/fpls.2012.00075
- Lindeboom, J. J., Nakamura, M., Hibbel, A. *et al.* 2013. A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science* 342: 1245533.
- Mirabet, V., Krupinski, P., Hamant, O., Meyerowitz, E. M., Jonsson, H. & Boudaoud, A. 2018. The self-organization of plant microtubules inside the cell volume yields their cortical localization, stable alignment, and sensitivity to external cues. *PLoS Comput. Biol.* 14: e1006011.
- 村田隆 2018. 表層微小管「列」：自己組織化する繊維. *BSJ-Review* 9: 111–119.
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T. I. *et al.* 2005. Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nat. Cell Biol.* 7: 961–968.
- Nakamura, M., Ehrhardt, D. W. & Hashimoto, T. 2010. Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the centrosomal *Arabidopsis* cortical array. *Nat. Cell Biol.* 12: 1064–1070.
- O'Brien, E. T., Salmon, E. D. & Erickson, H. P. 1997. How calcium causes microtubule depolymerization. *Cell Motil. Cytoskeleton* 36: 125–135.
- Osborn, M. & Weber, C. 1982. Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: Tubulin-containing structures. In: Wilson, L. (ed.) *Methods in Cell Biology.* 24. pp. 97–132. Academic Press, New York.
- Pollack, G. 2014. *The Fourth Phase of Water - Beyond Solid, Liquid, and Vapor.* Ebner and Sons, Seattle.
- Sasabe, M. & Machida, Y. 2012. Regulation of organization and function of microtubules by the mitogen-activated protein kinase cascade during plant cytokinesis. *Cytoskeleton* 69: 913–918.
- Sommer, A., Hoeflberger, M., Hoepflinger, M. C. *et al.* 2015. Convolved plasma membrane domains in the green alga *Chara* are depleted of microtubules and actin filaments. *Plant Cell Physiol.* 56: 1981–1996.
- Stoppin-Mellet, V., Gaillard, J. & Vantard, M. 2002. Functional evidence for in vitro microtubule severing by the plant katanin homologue. *Biochem. J.* 365: 337–342.
- Wasteneys, G. O. & Williamson, R. E. 1989. Reassembly of microtubules in *Nitella tasmanica*: assembly of cortical microtubules in branching clusters and its relevance to steady-state microtubule assembly. *J. Cell Sci.* 93: 705–714.
- 吉見岳久・藤森裕基 2016. 分子が配向を保つ液体——液晶. *化学と教育* 64: 220–223.

(Received June 1, 2020; Accepted August 3, 2020)