

博士学位論文

Doctoral Thesis

ラビリントウモコ類を特徴づけるボスロソームと外質ネットに関する

細胞学的研究

Cell Biological Study on Bothrosome and Ectoplasmic Net System

Characterizing Labyrinthulomycetes.

岩田いづみ

Izumi IWATA

2017年1月

January, 2017

甲南大学大学院 自然科学研究科 生命・機能科学専攻

Graduate School of Natural Science, Konan University

要旨

ラビリントウモ類は、海洋の分解者である可能性が示唆されている菌様原生生物である。この生物群が持つ仮足状の外質ネットは、栄養源となる基質に付着し、セルラーゼなどの分解酵素を分泌することで、栄養摂取に関与すると考えられている。一方、外質ネットの微細形態は、内部にはリボソームも存在せず、細胞表面にある電子密度の高い構造と膜の複合体であるボスロソームで細胞体と区切られており、他の生物で観察される仮足とも異なっている。本研究では、その形態の特殊性から詳細な構造や機能など基本的な情報すら未知であったボスロソームと外質ネットを理解することを目的とし、まずは、遊走細胞が栄養細胞になる着生過程におけるボスロソームの形成過程の観察からボスロソームに関与するオルガネラを探索し、アクチンとの関係性についても観察を行った。

Schizochytrium aggregatum の着生過程において、遊走細胞が鞭毛を喪失した直後の球形化した細胞で、前鞭毛基底小体の前方の位置にボスロソームが初めて観察された。その配置は、2つのゴルジ体の近傍であったことから、ゴルジ体とボスロソームの間には密接な関係があるものと推察された。次に、抗アクチン抗体を用いた間接蛍光抗体法および、免疫電子顕微鏡法での観察から、アクチンは外質ネットとボスロソーム周辺の細胞質基質に局在したが、電子密度の高い構造への抗体反応はみられなかった。つまり、ボスロソームはアクチン重合核ではなく、別の機能をもつことが示唆された。

さらに、外質ネットの形態と機能の関係性に迫るべく、培養条件によって

異なるセルラーゼ活性状態での外質ネットの形態を観察した。*S. aggregatum* を異なる基質が含まれた培地で培養すると、セルラーゼの活性には差があり、特に海藻や海草類では、培養初期から高いセルラーゼ活性を示すことが分かった。また、基質に付着している外質ネットでは、太い外質ネットに、強いアクチンの局在が観察された。さらに、基質に付着した外質ネットの微細形態は、繊維状の構造や内部の膜系が発達するなど変化がみられた。蛍光標識グルコースとの培養実験から、外質ネットはグルコース吸収能を持ち、特に基質存在下ではグルコースの取り込み速度が上がると考えられた。これらの結果から、外質ネットは、分解酵素の分泌だけでなく、状況に応じて基質の認識や、栄養の吸収といった様々な機能を持ち、外質ネットの形態変化は、そうした機能の違いに関与している可能性が考えられた。

| | |
|--|-----|
| 目次 | |
| 要旨 | i |
| 目次 | iii |
| 1. 緒言 | 1 |
| 2. 背景 | 4 |
| 2.1 ラビリントチュラ類の分類 | |
| 2.1.1 高次分類群祖先的ストラメノパイル生物群での系統的位置づけ | |
| 2.1.2 ラビリントチュラ類の生物群内での分類 | |
| 2.2 ラビリントチュラ類の細胞構造 | |
| 2.2.1 一般的な形態 | |
| 2.2.2 脂質蓄積 | |
| 2.2.3 外質ネットとボスロソーム | |
| 2.2.4 ラビリントチュラ類の生態と栄養摂取 | |
| 2.2.5 ラビリントチュラ属の滑り運動 | |
| 3. ボスロソームの形成過程の観察 | 18 |
| 3.1 序論 | |
| 3.2 材料と方法 | |
| 3.2.1 使用した株と培養 | |
| 3.2.2 外質ネットの形成 | |
| 3.2.3 遊走細胞と着生過程の誘導 | |
| 3.2.4 カヤモノリ <i>Scytosiphon lomentaria</i> の試料の回収 | |
| 3.2.5 光学顕微鏡観察 | |
| 3.2.6 透過型電子顕微鏡観察 | |
| 3.2.7 間接蛍光抗体法による免疫蛍光顕微鏡観察 | |
| 3.2.8 アクチンとセントリンの電気泳動と免疫ブロット | |
| 3.2.9 免疫電子顕微鏡法 | |
| 3.3 結果 | |

- 3.3.1 遊走細胞の一般的な形態と鞭毛装置構造
- 3.3.2 遊走細胞の着生過程の光学顕微鏡観察と細胞内部の形態変化
- 3.3.3 外質ネットとボスロソームにおけるアクチンの局在
- 3.4 考察
 - 3.4.1 ボスロソームの個体発生と相同な構造の探索
 - 3.4.2 アクチンと外質ネットおよびボスロソームとの関係性
 - 3.4.3 外質ネット上でのアクチンの役割
- 4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化 — 36
 - 4.1 序論
 - 4.2 材料と方法
 - 4.2.1 使用した株
 - 4.2.2 遊走細胞放出誘導と外質ネットの観察
 - 4.2.3 間欠撮影
 - 4.2.4 セルラーゼ活性測定
 - 4.2.5 2-NBDG によるグルコースの局在の観察
 - 4.2.6 ファロイジンでのアクチンの局在の観察
 - 4.2.7 透過型電子顕微鏡観察
 - 4.3 結果
 - 4.3.1 様々な基質でのセルラーゼ活性
 - 4.3.2 セルラーゼ活性の経時的な変化
 - 4.3.3 外質ネットの形態比較
 - 4.3.4 外質ネットのタイムラプス撮影
 - 4.3.5 2-NBDG での外質ネットでのグルコースの局在の観察
 - 4.3.6 透過型電子顕微鏡観察
 - 4.3.7 ファロイジン染色
 - 4.4 考察
 - 4.4.1 外質ネットからの分解酵素分泌の活性化と基質の感知
 - 4.4.2 外質ネットからの栄養吸収
 - 4.4.3 外質ネットによる基質の感知
 - 4.4.4 外質ネットの微細形態変化

5. 総合考察 _____ 54

5.1 ラビリントウシ類の系統的考察

5.1.1 鞭毛装置構造比較

5.1.2 細胞内部の形態比較 —パラヌクリアーボディ—

5.1.3 ボスロソーム・外質ネットシステムの獲得と喪失

5.2 外質ネットの栄養摂取および輸送系に関する考察

5.2.1 外質ネットによる基質の認識

5.2.2 外質ネットからの栄養吸収

5.2.3 外質ネットでの輸送とアクチンとの関係性

5.2.4 外質ネットからの分解酵素の分泌と栄養摂取機構の仮説

5.2.5 ボスロソームと外質ネットでの輸送系との関係性

5.3 ラビリントウシ類の環境中での生存戦略に関する考察

5.3.1 カップ状構造と2重膜構造

5.3.2 遊走細胞による走化性と外質ネットによる栄養源の探索

5.3.3 外質ネットからの分解酵素分泌と属ごとの生存戦略の違い

5.4 ラビリントウシ類利用に関する新たな可能性

5.5 本研究の意義と将来展望

謝辞 _____ 73

引用文献 _____ 75

図表 _____ 98

1. 緒言

ラビリンチュラ類は海洋に普遍的に存在する従属栄養性の菌様原生生物である (Moss 1986; Frank et al. 1994; Bremer 1995; Sathe-Pathak et al. 1993; Raghukumar et al. 1995; Raghukumar & Raghukumar 1999)。様々な細胞外分解酵素 (セルラーゼ, リパーゼ, プロテアーゼ, ホスファターゼ, ペクチナーゼ, キシラーゼ) を産生し, 生物の死骸や排泄物などの有機物であるデトライタスを分解出来る能力を持つことから, 菌類やバクテリアのように海洋生態系における有機物の分解において重要な役割を持つと考えられている (Raghukumar et al. 1994; Bremer 1995; Bremer & Talbot 1995; Bongiorno et al. 2005; Taoka et al. 2009)。しかしながら, 現状では, ラビリンチュラ類が環境中で何を栄養源とし, それをどのように摂取しているのか, といった基本的なことすら明確になっていない。分解吸収に関係すると考えられている構造として, 基質に付着する仮足状の外質ネットがある (e.g.; Porter 1990; Moss 1986)。しかし, その形態をみると, 一般的な仮足とは異なり, ボスロソームという細胞表面にあり電子密度の高い物質と膜の複合体で細胞体と仕切られ, 内部にはリボソームも存在しないという, ラビリンチュラ類にしかみられない特殊な構造となっている (Moss 1985; Porter 1969, 1972, 1990; Perkins 1972, 1973a)。そのため, 外質ネットから分解酵素を分泌するならば, 分解酵素は, 細胞体にあるリボソームで合成され, 外質ネットの起点であるボスロソームを介して輸送されなければならないはずである。これまでの研究から, 外質ネットの具体的な機能について言及した例は少なく, 特に, 外質ネットの起点となるボスロソームの機能は全くの未知であった。

そこで、ボスロソームと外質ネットを介する栄養摂取機構を解明する糸口をつかむために、まずは外質ネットの起点となるボスロソームの形成過程についての詳細な観察を行い、その出現位置を把握し、他のオルガネラとの配置の関係性を探ることを目的とした。

また、ラビリントチュラ科で見られる特徴的な滑り運動は、外質ネットに局在するアクチンが運動の駆動力として働いていると示されている (Dietz & Schnetter 1999; Nakatsuji & Bell 1980; Preston & King 2005)。アクチンは真核生物での仮足伸長に一般的な細胞骨格因子である (DeMali & Burridge 2003; Revenu et al. 2004; Small et al. 2002)。これらのことから、外質ネットによる運動性を持たない、ヤブレッツボカビ科の外質ネットでもアクチンが局在しているだろうと考えた。そこで、まずは、*S. aggregatum* の外質ネットにおけるアクチンの局在を明らかにした。さらに、形成されたボスロソーム・外質ネットシステムの指標としてアクチンを用いて、光学顕微鏡下で、着生過程におけるアクチンの局在の観察を行った。最終的に賦活化による免疫電子顕微鏡観察を行い、微細構造レベルでの外質ネットとボスロソームでのアクチンの局在性について検討した。

さらに、本研究では、外質ネットでの分解酵素の分泌機構の解明に関する基礎的な情報を提供するべく、これまでに明らかにした外質ネットに存在するアクチン、および、外質ネットの機能である分解酵素の分泌に着目した。外質ネットの微細構造観察は、Perkins (1973a) によって報告されており、内部には、膜系の構造が観察されているが、その形態は可変的であり、それらの構造と外質ネットからの分解酵素分泌との関係性は明らかになっていない。また、ラビリントチュラ類では、種々の細胞外分解酵素の産生が知られているが、特に本研

究で扱っている *S. aggregatum* においては、セルラーゼの活性が高いことが示されている (Bremer 1995; Bremer & Talbot 1995; Nagano et al. 2011)。ラビリinchュラ類は、難分解性の有機物であるセルロースを細胞壁の主成分とする落葉や、海藻類などからもその存在が確認されている (e.g.; Porter 1990)。そこで、本研究では、セルロース源として様々な基質を含む培地、あるいは、セルロース源のない条件など、様々な培養条件における *S. aggregatum* のセルラーゼ活性を計測した。外質ネットからの分解酵素分泌の高い状態と低い状態を検討し、そうした異なる状況下における外質ネットの形態変化を光学顕微鏡および、電子顕微鏡で観察した。さらに、外質ネットからの栄養吸収能の有無を明らかにするために、蛍光標識したグルコースとの培養を行った。また、アクチンの局在の観察も行い、外質ネットでの餌となる基質の認識から、栄養の吸収に至る外質ネットの基礎的な細胞学知見を提供すべく研究を行った。

2. 背景

2.1 ラビリンチュラ類の分類

2.1.1 高次分類群祖先的ストラメノパイル生物群での系統的位置づけ

ラビリンチュラ類の属するストラメノパイル生物群は、遊泳細胞期に不等長の 2 本鞭毛を持ち、前鞭毛に管状小毛（マスチゴネマ）を持つことで特徴づけられる生物群である（Adl et al. 2012; Patterson 1989）。ストラメノパイル生物群は、独立栄養性の珪藻類や、褐藻類だけでなく、混合栄養性、細菌捕食性、寄生性など多様な栄養様式を持つ生物群を含む大きなグループとして認識されている（Andersen et al. 1993; Ben Ali et al. 2002; Daugbjerg & Andersen 1997; Riisberg et al. 2009; Van de Peer et al. 1996）。形態と分子系統の解析から、独立栄養性のストラメノパイル生物群の根元に位置する祖先的生物群には、従属栄養性の生物群が位置している（Ben Ali et al. 2002; Daugbjerg & Andersen 1997; Riisberg et al. 2009; Riisberg et al. 2009; Leipe et al. 1996; Massana et al. 2004）。ストラメノパイル生物群には以下の 7 つの主要な従属栄養性のクレードが存在している。(1) ビコソエカ類（バクテリア捕食性）（Karpov et al. 2001）、(2) プラシディア類（バクテリア捕食性）（Moriya et al. 2002）、(3) ラビリンチュラ類（浸透栄養性）（Honda et al. 1999; Tsui et al. 2009）、(4) ブラストシステイス類（動物寄生性）（Arisue et al. 2002; Silberman et al. 1996）、(5) オパリナ類（opalinids & proteromonads, 両生類とは虫類に寄生）(6) ディベロパイエラ（細菌捕食性）（Leipe et al. 1996; Tong 1995）(7) 卵菌とサカゲツボカビ類（Dick 2001; Riisberg et al. 2009）である。このように、ストラメノパイルには多様な生

物群が属するが、鞭毛装置構造には基本的に共通性がみられる。鞭毛装置構造とは、鞭毛、基底小体その周辺の構造を含む細胞骨格として機能する構造である (Moestrup 1982; Andersen 1991; Moestrup 2000; Yubuki & Leander 2013)。鞭毛装置構造は複雑で着目する形質が多く、運動を始め細胞の分裂、接合、細胞形態維持など重要な機能に関与している (Moestrup 1982)。また、保守性と多様性を併せ持つことから相同性を認識することが出来るため、様々な生物間で比較が可能であり、特に微小管性の鞭毛根は、基底小体を基準とした配置からナンバリングされ、系統比較のための主要な形質として用いられている (Yubuki & Leander 2013; Moestrup 2000; Andersen 1991; Melkonian 1980, 1982)。ストラメノパイル生物群では、前鞭毛基底小体 (B2) から細胞表面を走行するリブを持つ R3 と、その反対側に位置する R4、後ろ鞭毛基底小体 (B1) から走行する R1 と R2 の4つの微小管性の鞭毛根が基本となっており、細菌捕食性の生物群では、R2は細胞後方で2叉に分かれ、腹側の細胞口を構成する (Yubuki & Leander 2013; Andersen 1991)。ラビリンチュラ類でも、Barr & Allan (1985) が観察した *Thraustochytrium aureum* の鞭毛装置構造では、4つの鞭毛根 (R1-R4) が存在し、バクテリア捕食は行わないものの、R3の微小管が二叉に分かれている。ラビリンチュラ類は、祖先的ストラメノパイル生物群として、1つのクレードを構成するが、ボスロソームというこの生物群にユニークな形態的特徴を持つことなどから、他の祖先的ストラメノパイル生物群との関連性は不明な状態となっており、独立した生物群であると認識されている。

2.1.2 ラビリンチュラ類の生物群内での分類

海洋や汽水域に生息するラビリンチュラ類は、伝統的には狭義のラビリンチュラ科とヤブレッツボカビ科の2つの生物群が分類されてきた (e.g.; Olive 1975; Porter 1990)。ラビリンチュラ類に属するこれらの2つの生物群は、全く異なる外観形態を有するため、それぞれ別の分類の歴史をたどってきたが、ゴルジ体で合成される多重鱗片状外皮を保持すること、他の生物群にみられない電子密度の高いボスロソーム (bothrosome, sagenogenetosome, sagenogen) を持ち、ボスロソームから仮足状の外質ネット (ectoplasmic nets, trackway, slimeway) を展開するといった類似性から、同じ生物群に分類されるようになった (Fig. 1, Moss 1985; Porter 1969, 1972, 1990; Perkins 1972, 1973a)。一方で、近年の分子系統解析から、ヤブレッツボカビ科は単系統を形成せず、アプラキトリウム類 (aplanochytrids)、オブロンギキトリウム類 (oblongichytrids)、狭義のヤブレッツボカビ類 (thraustochytrids) の少なくとも3つの系統群から構成されており、狭義のラビリンチュラ類 (labyrinthulids) を含めて、ラビリンチュラ類全体としては、少なくとも4つに分かれることが示唆されている (e.g.; Yokoyama et al. 2007; Tsui et al. 2009)。さらに、近年になって遊走細胞やボスロソームを持たず、陸生や淡水生の広義のディプロフリス類もラビリンチュラ類として認識されるようになってきている (Anderson & Cavarier-Smith 2012; Gomaa et al. 2013; Takahashi et al. 2014)。本論文では、伝統的な分類体系に従い、ラビリンチュラ科とヤブレッツボカビ科を狭義のラビリンチュラ生物群として解説する。

2.2 ラビリンチュラ類の細胞構造

2.2.1 一般的な形態

ラビリンチュラ類での最初の微細構造の観察は、Goldstein et al. (1964) によって *Thraustochytrium aureum* に対して行われた。その後、分類学的な興味から、1970年代、80年代を中心に様々な属で、微細構造の観察が進められてきた (Alderman et al. 1974; Harrison & Jones 1974a, b, c, Azevedo & Corral 1997; Barr & Allan 1985; Bower et al. 1989; Bower 1987; Chamberlain & Moss 1988; Darley et al. 1973; Jones & O'Dor 1983; Jones & Alderman 1971; Kazama 1972a, b; 1973; 1974a, b 1975; McLean & Porter 1982; Moss 1980, 1985, 1986; Perkins & Amon 1969; Perkins 1972, 1973a, b, 1976; Porter 1969, 1972; Raghukumar 1982a, b)。

ラビリンチュラ類は、遊走細胞が着生し、栄養細胞となり、栄養細胞は分裂し、遊走子嚢となり、遊走子を放出するという生活史を持つ (e.g.; Porter 1990)。いずれの段階においても、真核生物に一般的なオルガネラである核、小胞体、ゴルジ体、管状クリステのミトコンドリア、中心体が観察され、核に付随するパラヌクリアーボディや、細胞の栄養状態によって、多数の油滴を持つ。遊走細胞では、前鞭毛に管状小毛が観察されており、Barr & Allan (1985) が観察した *T. aureum* の鞭毛装置構造では、4つの鞭毛根 (R1-R4) が存在し、R3の微小管が二叉に分かれている。また、Perkins & Amon (1969) は、ラビリンチュラ科 *L. algeriensis* の遊走子形成中の細胞で、減数分裂期の第一分裂で見られる相同染色体の密着した対合を示す“シナプトネマ構造”を観察しており、ラビリ

ンチュラ科での有性生殖の可能性を示唆している。また、ラビリンチュラ科の遊走細胞には、眼点が存在する (Perkins & Amon 1969)。いずれも大変興味深い形態であるが、ラビリンチュラ科での遊走子形成の誘導は大変難しく、その後の報告はない。ラビリンチュラ類のゴルジ体から合成される細胞壁は、ラビリンチュラ科では一層、ヤブレッツボカビ科では、多層構造となっている (Darley et al. 1973; Moss 1985)。細胞壁は硫酸多糖と主に、ガラクトース、またはフコース、そしてタンパク質からなる (Chamberlain 1980; Bahnweg & Jäckle 1986)。*Aplanochytrium* 属では、走査型電子顕微鏡で観察すると、規則性の高い六角形の細胞表面の壁構造が観察出来る (Leander et al. 2004)。一方で、細胞壁の厚さには属ごとで差がある (Yokoyama & Honda 2007)。また、外質ネットでは、細胞壁は観察されない (Perkins 1973a)。

2.2.2 脂質蓄積

前述したように、ラビリンチュラ類の栄養細胞は、栄養状態によって多数の油滴を細胞内に蓄積する。このラビリンチュラ類の持つ油滴には、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、ドコサペンタエン酸 (DPA)、アラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が含まれていることから注目され (e.g.; Ellenbogen et al. 1969; Bajpai et al. 1991; Bowles et al. 1999; Singh & Ward 1997)、その産業的な価値から、1990年代から多数の論文や特許が公開されるようになった。そうした流れに伴い、微細構造解析も油滴の蓄積に着目した報告がなされている (Morita et al. 2006)。油滴は細胞質および液胞内にみられるが、油滴の存在場所によってその

主成分は異なると報告されている（吉田 2016）。ラビリントチュラ類では、ゲノム情報が公開されており、遺伝子操作も可能になっている（Sakaguchi et al. 2012; Cheng et al. 2012）。こうした背景から、ラビリントチュラ類の微細構造学的研究もより実利的な用途に合わせた観察にシフトしていくことが想像される。また、こうした油滴を作り出す元になる環境からのラビリントチュラ類の栄養摂取機構は未だ解明されていないが、Moss（1980）は *Ulkenia visurgensis* で、ボスロソームにつながる小胞体が平行に列を成し、油滴へとつながることで、おそらく油滴を合成していると思われる像を示している。ラビリントチュラ類の栄養摂取機構の解明は、今後の研究において最も基礎的な情報として必要になると考えられる。

2.2.3 外質ネットとボスロソーム

ラビリントチュラ科とヤブレッツボカビ科に特徴的なボスロソームと外質ネットは、透過型電子顕微鏡による微細構造観察が積極的に行われてきた。ラビリントチュラ類の外質ネットは、属や、科ごとに特徴が見られる。一般的なヤブレッツボカビ科では、外質ネットは基質に付着し、運動を示さないが、ヤブレッツボカビ科の内でも、*Aplanochytrium* 属では、楔状形、楕円型、球形の栄養細胞を有し、外質ネットをつかっただうような運動性を持ち、また、ラビリントチュラ科 *Labyrinthula* 属は、細胞体が外質ネットに包まれており、外質ネットの中を細胞体が滑るように移動する（e.g.; Leander et al. 2004）。このラビリントチュラ科で、Stey（1968）は、栄養細胞が展開する“slimeway”（=外質ネット）と細胞体

の接続部位に存在するオルガネラを観察している。この報告が、ボスロソームの初めての記載である。Porter (1969) は、Stey (1968) が観察したそのオルガネラを、透過型電子顕微鏡で観察し、原形質膜の栓のように基部に位置していたことから、“ボスロソーム”と名付けた。さらに、外質ネットとつながっていたことから、ボスロソームは、細胞運動に関係すると考えられた。一方で、Perkins (1972) は、ボスロソームと同様のオルガネラを外質ネットによる運動性をもたないヤブレッツボカビ科の 2 種の外質ネットの基部でも観察し、この構造に関して、sagenogenetosome と名付けて報告した。同時期に、ラビリントウモコ科の“slimeways”とヤブレッツボカビ科の外質ネットに相同性が認識されたことで (e.g.; Olive 1975), 現在では、ボスロソームと sagenogenetosome は同じオルガネラとして認識されている。

いずれの科においても、ボスロソームの形態は、電子密度の高い集合体からなり、細胞表面の原形質膜の凹んだ位置にある、外質ネットとの膜の区切りに位置している。Perkins (1972) と Moss (1980) はボスロソームの形態を様々な属で観察している。ボスロソームの細胞体側の表面では、小胞体の膜成分と連続した膜が、囊板や小胞が数珠状につながったような膜構造を示し、外質ネット内部の膜と連続した単位膜として存在しているように見られた。また、そうした形態は、科や属ごとに特色が見られ、ボスロソームあるいは、ボスロソームの電子密度の高い構造の数や配置が異なっている (Moss 1980)。ラビリントウモコ科では、おそらく、20 以上のボスロソームが細胞表面に分布している (Porter 1969; Perkins 1972)。一方で、ヤブレッツボカビ科の外質ネットは、*Thraustophytrium motivum* のように、1 つのボスロソームから、複数の電子密度

の高い構造があるか、あるいは、*Japonochytrium* sp. や *Schizochytrium aggregatum* のように、1つのボスロソームに1つの電子密度の高い構造があるかのいずれかである (Perkins 1972)。ボスロソームは状況が変わっても一定の形態を示すことが明らかになっているが (Perkins 1972), *Ulkenia visurgensis* では、ボスロソームとつながる細胞体内部の膜の形態は、小胞体膜が平行に並ぶ様子や、核に付随し、閉じた膜系であるパラヌクリアーボディと関連するようになるなど、細胞が成長するにつれて、高度に組織化されていく様子が観察されている (Moss 1980)。その組織化は、細胞分裂の度に元の単純な形態へともどる。また、外質ネットの内部は、オルガネラを欠くが、膜の構造が観察され (“internal membrane system”), それらの膜は、管状構造、あるいは膜が融合することで、管の横断面のような“窓”と融合部の電子密度の高い構造もつ複合体 (“fenestrated membrane arrays”) として観察されるなど、状況や外質ネットの部位によって可変性がある (Perkins 1973a, b)。このように、外質ネットおよびボスロソームは、ラビリントチュラ類の微細構造学的研究の中で、最も集中的に研究されてきた細胞内構造であるが、その詳細な構造や機能は未だに不明確である。

2.2.4 ラビリントチュラ類の生態と栄養摂取

ラビリントチュラ類は、沿岸域に生息する海藻、世界中の汽水、沿岸、外洋、深海、熱帯、極域などの様々な環境からその存在が報告されており、菌類やバクテリアのように海洋生態系における有機物の分解と無機化において重要な役割を持つと考えられている (Raghukumar et al. 1994; Bremer 1995; Bremer & Talbot

1995; Bongiorno et al. 2005; Taoka et al. 2009)。世界各地の河口や海岸近くの海洋生息地に見出されるラビリンチュラ科は、デトライタス、微細藻類、珪藻、スパーティナ、アマモ、トチカガミなどの海洋性の維管束植物などからよく分離される (Porter 1990)。一方で、ヤブレッツボカビ科は、腐敗した海藻やマングローブの葉などの死んだ有機物から分離される (Raghukumar 1994; Leñaño et al. 2001; Fan et al. 2002)。また、ヤブレッツボカビ科の細胞は大型藻類と培養すると、個体数が藻体の老化と腐敗後に増加するが、健全期では増加しないことから、ほとんどのヤブレッツボカビ科では、腐朽性であると考えられている (Raghukumar et al. 1992)。また、Renn et al. (1935) の報告で、アメリカやヨーロッパの北大西洋沿岸に繁茂していたアマモ (*Zostera marina*) の感染症による死滅の原因が、ラビリンチュラ科によるものと報告されてから、疫学的な関心からも注目されるようになった (Young 1943; Pokorny 1967)。ラビリンチュラ類の病原性に関する報告は度々されており、QPX での二枚貝への寄生は、甚大な被害をもたらしており、*Aplanochytrium haliotidis* では、アワビへの寄生が報告されている (Bower 1987)。

ラビリンチュラ類は世界各地でその存在が確認され、長年、海洋生態系での重要性が示唆されているものの (Leñaño & Damare 2012)、実際の海洋環境中での栄養源や、栄養摂取様式などは未だ解明されてはいない。ラビリンチュラ類の栄養細胞は、種々の分解酵素を細胞外に分泌し、餌となる基質を分解消化する (Raghukumar 2002)。つまり、ラビリンチュラ類の栄養獲得様式は捕食ではなく、栄養吸収であり、こうした細胞外の分解酵素の分泌が、ラビリンチュラ類がバクテリアと対をなす海洋における真核生物の分解者といわれる要因でもあ

る。ラビリンチュラ類は、難分解性多糖類であるセルロースを分解するセルラーゼを初めとして、様々な細胞外分解酵素（リパーゼ、プロテアーゼ、ホスファターゼ、ペクチナーゼ、キシラーゼ）の活性が報告されている（Raghukumar et al. 1994; Bremer 1995; Bremer & Talbot 1995; Bongiorno et al. 2005; Taoka et al. 2009）。Perkins（1973）は、外質ネットが松花粉のスポロポレニンやセルロースなどから構成された難分解性の細胞壁を破り、内部に侵入している様子を観察している。また、Porter（1972）が行った微細構造観察では、ラビリンチュラ科の栄養細胞が直接微生物細胞に接触せず、餌となる細菌、酵母や微細藻類細胞が、外質ネット膜に取り込まれた後、微生物細胞の周囲に電子密度の高い構造を観察している。また、*A. hariotidis* の細胞が感染する様子を観察すると、外質ネットが寄生主体内に侵入している様子が観察されている（Bower et al. 1989）。さらに、Coleman & Vestal（1987）は、細胞膜を通過し、細胞内に局在するエステラーゼの加水分解によって緑色蛍光を発する Fluorescein diacetate（FDA）という試薬を用いて、*T. striatum* の外質ネット上での、分解酵素の活性を示した。こうした過去の報告から、分解酵素は、外質ネットから分泌されると考えられている。Perkins（1973a）が観察した外質ネットの内部には、膜系（“internal membranous cisternae”）が存在する。この膜系は時として、小管状の膜の構造（“tubular arrays”）や、それらが融合することで、電子密度の高い構造体（“anastomosing arrays”）となり、管の断面が窓の様に（“fenestrated arrays”）見える構造が観察されており、分解酵素の輸送に使われているのではないかと推測されている。外質ネットは、基質への付着、細胞表面積の増大、分解酵素の分泌から、有機物質の消化吸収に関わっていると考えられている（Leaño &

Damare 2012)。しかし、外質ネットでの分解酵素の輸送では、細胞骨格との関わりや、小胞輸送や拡散といったような輸送の分子メカニズム、栄養分の取り込みや基質の認識が外質ネットを介して行うことが出来るのかといった、外質ネットの基本的な細胞学的知見は未だ乏しく、栄養摂取機構の全貌は明らかにはなっていない。

2.2.5 ラビリントウチウラ類の滑り運動

ラビリントウチウラ類の外質ネットのよく知られたもう一つの機能として、ラビリントウチウラ科で見られる外質ネットを介した滑り運動がある。ラビリントウチウラ科の紡錘形の栄養細胞は、網目状の外質ネットの内部を滑走運動で移動する。この特異な細胞構造は古くから注目を集め、その運動機構の解明に向けて、細胞学的な手法を用いた研究がなされてきた。ラビリントウチウラ科の紡錘形細胞は、最大1~2 μm /秒の速度で滑走し、主に広がっている外質ネットの周辺に向かって一方向の様式で広がっていくが (Young 1943)、逆向きにも動く (Watson & Raper 1957)。同時に、細胞は細胞の向きが180°回転しても、元の方向に滑り続けていることも観察されている (Preston & King 2005)。こうしたラビリントウチウラ科の紡錘形細胞の滑走運動は、外質ネットの膜上の軌道に細胞が存在するときのみ行うことが出来る。実際に、外質ネットの先端から先へは細胞は移動することは出来ず、外質ネットの軌道から取り除かれた裸の紡錘形細胞は基質上で滑走することは出来ない (Bell et al. 1978; Preston & King 2005)。そうした滑走する紡錘形細胞を囲む軌道となる外質ネットは、微細な糸状仮足を介して基質の上

に浮遊しているように見え、Preston と King (1996) らはこの経路を、"microscopic overhead urban monorail system." (超小型の上空都市モノレールシステム) と描写している。紡錘形細胞が外質ネットを滑走するにつれて、通常、狭い外質ネットは通過する細胞によって拡張され、そして、いくつかの繊維に分割されるものもあるが、最終的に、複数の細い外質ネットの融合により、外質ネットの大きな軌道の形成を起こす (Preston & King 2005; Young 1943)。

こうしたラビリントウ科の紡錘形細胞の滑走は、アクチン・ミオシンに基づくことが示されている。外質ネット内では、6 nm のマイクロフィラメントの線状配列が超微細構造研究によって記録されており、ミオシン S1-フィラメント標識と抗アクチン抗体を用いた蛍光顕微鏡観察、および、蛍光のファロイジンプローブでの観察によって、それらの繊維は、アクチンとして同定された (Dietz & Schnetter 1999; Nakatsuji & Bell 1980; Nakatsuji et al. 1981; Preston & King 2005)。アクチンは、外質ネットだけでなく、紡錘形細胞においても検出されており、いくつかの報告によると、アクチンは細胞体でも同時に拡散的に分布しており、アクチンは、細胞の細胞質に濃縮されるか、または紡錘形細胞表面を覆う内部の外質ネットの膜とおそらく関連していると考えられている (Dietz & Schnetter 1999; Nakatsuji & Bell 1980; Preston & King 2005)。

ラビリントウ類の外質ネットでのミオシンの発現は、それぞれ異なる抗ミオシン抗体を用いたいくつかの報告がある。Pan-myosin 抗体を用いた Dietz & Schnetter (1999) は、内部マトリックス膜を含む、紡錘形細胞の皮質においてミオシンを検出したが、Pan-myosin 抗体またはミオシン II 抗体のいずれを用いても、外質ネット内で染色は観察されなかった。一方、Nakatsuji & Bell (1980) は、

ミオシン抗体での、外質ネットの染色を報告している。Preston & King (2005) は、ミオシン I および II の保存領域を標的とするミオシンペプチド抗体を用いた観察で、外質ネットでの拡散した染色を観察したが、最も強固な染色は紡錘形細胞の皮質領域にみられた。いずれかのペプチド抗体を有するラビリenchュラ類の抽出物のイムノブロットは、約 96 kDa で移動する単一の交差反応を示している。ラビリenchュラ類のミオシンの予備 PCR スクリーニングにより、ミオシン I ファミリーのモーターと配列類似性を有するいくつかの候補が明らかになっている (Preston & King 2005)。また、ミオシン ATP アーゼ阻害剤 BDM を用いた実験から、このような運動性が実際にアクチン・ミオシン系によって引き起こされるという主張を支持している。

こうした研究によって、ラビリenchュラ類の特徴的な滑走運動は、アクチン・ミオシン系によって駆動されることが明らかになってきたが、運動装置の分子構造を理解するためには、ラビリenchュラ類の外質ネットにはどういったミオシンが局在しており、それらがどのように機能しているのか、および生化学的、形態学的技術の組み合わせを用いたアクチンとミオシンのより正確な局在化を明らかにする必要があるだろう。ラビリenchュラ類を含むストラメノパイル生物群、および、繊毛虫、アピコンプレクサ、渦鞭毛藻からなるアルベオラータはクロムアルベオラータ生物群として認識されるが、この生物群は、クラス XIV, XXII, XXIII, XXIV に属する極めて特徴的なミオシンを持っていることが報告されている(Foth et al. 2006)。

ラビリenchュラ類の滑走運動とボスロソームの関係性については不明であるが、Nakatsuji & Bell (1980) は、ボスロソームからカルシウムイオンを放出し

ている, Prestone & King (2005) は, ボスロソームはミオシンのアンカーとして機能しているのではないかと仮説を立てている。ボスロソームは, 外質ネットと細胞体の唯一の接続点であり, 特徴的な運動機構を可能にする鍵となる構造として, その機能の解明が必要である。

3. ボスロソームの形成過程の観察

3.1 序論

ラビリンチュラ類は菌様原生生物で前鞭毛に鞭毛小毛を持つことで特徴付けられる褐藻や卵菌類と同じストラメノパイル生物群に属している (Leipe et al. 1994; Adl et al. 2012; Patterson 1989)。分子系統樹上では根元に位置し、捕食性のピコソエカ類などと同様に祖先的ストラメノパイル生物群として認識されている (Riisberg et al. 2009; Leipe et al. 1996; Massana et al. 2004)。ラビリンチュラ類は、ラビリンチュラ科とヤブレッツボカビ科といった形態も運動性も異なる 2 つの科から構成され、系統樹上で独立した単系統を形成し (e.g.; Honda et al. 1999)、ボスロソームと呼ばれるユニークな共有派生形質を持つ (Moss 1985; Porter 1969, 1972, 1990; Perkins 1972, 1973a)。

ボスロソームは透過型電子顕微鏡で観察すると、細胞表面の原形質膜の陥入した領域に位置し、その構造は電子密度の高い構造 (以下 the electron-dense material of the bothrosome [EDMB] と略) と、小胞体が繋がった複雑な膜構造の複合体として観察される (Moss 1985; Porter 1969, 1972; Perkins 1972, 1973a)。ボスロソームから展開される仮足状の外質ネットには、ミトコンドリアやリボソームといったオルガネラが全く観察されず、膜の陥入が観察されるのみである (Moss 1985; Porter 1972; Perkins 1973)。このようにラビリンチュラ類が発達させる外質ネット・ボスロソームシステムは、アメーバなどの他の生物で見られる仮足とその形態は大きく異なっている (e.g.; Hardham 2007; Kazama 1972c; Page 1987; Cavalier-Smith & Karpov 2012)。ラビリンチュラ類は外質ネットを伸長

させて基質や宿主細胞に付着し (Perkins 1973a; Bower et al. 1989; Porter 1972), 外質ネットから分解酵素を分泌することが示唆されている (Coleman & Vestal 1987; Leño & Damare 2012; Moss 1986; Bongiorno et al. 2005; Bremer & Talbot 1995; Nagano et al. 2011)。しかしながら, 外質ネットとボスロソームの機能や由来はその形態の特殊性から未だに明らかになっていない。

そこで, 本研究では, ボスロソームに関係のあるオルガネラ, あるいは, 由来となるようなオルガネラを検討するべく, 遊走細胞から栄養細胞になる個体発生の過程を, 他の生物群と比較した。おそらく, 外質ネットをもたない遊走細胞 (e.g.; Porter 1990) が外質ネットをもつ栄養細胞になる着生過程において, ボスロソームは *de novo* に形成されるはずである。着生過程は大型藻類では, 褐藻類の *Ectocarpus* (Baker & Evans 1973) や, 緑藻類では, *Ulva* (Callow & Callow 2006) 卵菌類では, *Pythium* や *Phytophthora* (Hardham 2007), 菌類の *Blastocladiella* (Lovett 1968) などの幅広い生物群で, 研究が行われている。一方で, ラビリンチュラ類の遊走細胞の着生過程を詳細に観察した報告はない。また, ラビリンチュラ類の栄養細胞は丸く, 前後左右の区別がつかないことから, ボスロソームの形成位置を正確に捉えるには細胞内の“軸”となる構造が必要であると考えた。そこで, 鞭毛装置構造に着目した。鞭毛装置構造は鞭毛, 基底小体その周辺の繊維性構造を含んだ総称で, 形態形質の連続性から系統を辿ることが出来る系統のマーカースとして使われてきた (Andersen 1991; Yubuki & Leander 2013; Moestrup 1982)。一方で, 真核生物の細胞内における重要な機能に関与しており, 細胞内のオルガネラの位置の保持にも関わっている (Moestrup 1982, Feldman et al. 2007)。そこで, 鞭毛装置構造を基準とした細胞内でのボスロソームの配置を

透過型電子顕微鏡観察によって決定し、同様の配置に他の生物で、ボスロソームと相同となるオルガネラがないかを探索しようと考えた。ラビリンチュラ類の遊走細胞では、1985年に Barr & Allan らによって *T. aureum* で鞭毛基部領域の微細構造解析が行われているのみで細胞全体での鞭毛根の走行や、オルガネラの配置との関係性を解析した情報はない。そこで、本研究では、遊走細胞の細胞全体での鞭毛装置構造とオルガネラとの絶対的配置の解析を行った。その後、遊走細胞が、外質ネットを持つ栄養細胞になる着生の過程において、鞭毛装置構造を基準とした細胞内のオルガネラの配置の変化を捉え、ボスロソームがいつどこに形成されるのかを観察した。

ボスロソーム・外質ネットシステムを光学顕微鏡上で観察するためには、マーカーとなる分子が必要である。ラビリンチュラ科では細胞体は外質ネットに包まれて滑るように動く滑走運動が観察され、そのメカニズムについては、外質ネットに局在したアクチン・ミオシンによって行われると報告されている (Dietz & Schnetter 1999; Nakatsuji & Bell 1980; Preston & King 2005)。真核生物での仮足に代表される細胞膜の突起が起こるメカニズムにおいては、細胞骨格であるアクチン繊維が重要な役割を果たしていることは一般的に知られている (DeMali & Burridge 2003; Revenu et al. 2004; Small et al. 2002)。本研究で用いた、ヤブレッツボカビ科の *Schizochytrium aggregatum* では、栄養細胞の細胞体は外質ネットに包まれておらず、球形で外質ネットによる運動は見られないが (Moss 1985, 1986; Porter 1990; Perkins 1972)、外質ネットおよびボスロソームにおいて、アクチンが存在する可能性は高いと考えられる。そこで、アクチンはボスロソームおよび外質ネットを光学顕微鏡で観察するための指標となる分子となると

考えた。

本研究では、以上の背景をふまえて、ボスロソームの形成過程をより良く理解するために、以下の3つの調査を行った。

- 1) *Schizochytrium aggregatum* の遊走細胞の鞭毛装置構造と、細胞内部のオルガネラの絶対的配置を把握した。
- 2) ボスロソームの進化的な起源となるオルガネラを明らかにするために、透過型電子顕微鏡観察から、着生過程の細胞において、出現したボスロソームの配置を決定した。
- 3) 着生過程におけるアクチンの局在の変化を蛍光顕微鏡および、免疫電子顕微鏡法によって明らかにした。

3.2 材料と方法

3.2.1 使用した株と培養

Schizochytrium aggregatum (ATCC28209) はアメリカンタイプカルチャーコレクション (Manassas, VA, USA) より購入し、25°Cで 0.05%酵母エキス, 0.1%ポリペプトン, 0.2%グルコースを半海水 (1:1 自然海水/蒸留水) に溶かした培地 (d-GPY 培地) で維持した。

3.2.2 外質ネットの形成

d-GPY 培地 20 ml を入れたシャーレにカバーガラスを沈め、25°Cで 1 日培養することで、細胞はカバーガラス上に外質ネットを発達させた。

3.2.3 遊走細胞と着生過程の誘導

液体培地で培養した *S. aggregatum* の細胞を d-GPY 液体培地に 1.5%のアガロースを入れ、作製した寒天培地に塗布し、25°Cで 1 日培養した。細胞が寒天上にコロニーを形成した後に、滅菌海水を加え、3 時間インキュベートを行い、遊走細胞を放出させた。その後、遊走細胞を含む海水に松花粉を添加することで、着生を誘導した。

3.2.4 カヤモノリ *Scytosiphon lomentaria* の試料の回収

S. lomentaria は、2015 年の 5 月に日本、兵庫県、淡路島（34°59.55N, 134°58.43E）でサンプリングされた。配偶体を海水で洗浄した後、約 10°C の暗所で保持した布の上に置いた。数日後、配偶体を冷たい海水中に浸し、日光下に移した。配偶体から放出された遊走細胞を遠心分離（20,630 × g, 5 分）により回収した。

3.2.5 光学顕微鏡観察

光学顕微鏡観察には、微分干渉顕微鏡（BX60; Olympus, Tokyo, Japan）を用い、AxioCam HRc カメラ（Carl Zeiss, Hallbergmoos, Germany）で撮影した。

3.2.6 透過型電子顕微鏡観察

遊走細胞と着生過程の細胞を遠心分離によって回収し、2.5%グルタルアルデヒド、0.1%スクロースを 0.1 M のカコジル酸バッファーで、1.5 時間 25°C 下で固定した。数回カコジル酸バッファーで洗浄した後、サンプルを 0.1 M のカコジル酸バッファーに溶かした 1% OsO₄ で後固定した。その後、カコジル酸バッファーで数回洗浄し、エタノールシリーズで脱水を行った。プロピレンオキシドを介して Quetol 651 樹脂に包埋し、60°C, 24 時間で重合させた。超薄切片は、マイクロトーム（Leica Ultracut R; Leica, Wien, Austria）を用い、ダイヤモンドナイ

フで作製し、フォルムバルコートしたグリッドにマウントした。酢酸ウランと鉛で染色した後、JEM-2000FX (JEOL, Tokyo, Japan) 透過型電子顕微鏡で観察を行った。

3.2.7 間接蛍光抗体法による免疫蛍光顕微鏡観察

サンプルを 2%グルタルアルデヒド, 3%パラフォルムアルデヒド, 3% NaCl を PHEM buffer (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ pH 7.4) に溶かした固定液で, 氷上で 30 分間固定した。PBS で 5 分間 3 回振盪洗浄を行った。その後, 着生過程の細胞は, ポリ-L-リジンでコートされたカバーガラスに接着させた。5% Triton X-100 に液交換し, 30 分間振盪処理を行った。PBS で 5 分間 3 回振盪洗浄を行った。0.1% NaBH₄ に液交換し, 20 分間振盪処理を行った。PBS で 5 分間 3 回振盪洗浄を行った。カバーガラス上の水分を拭き取り, モイストチャンバーのろ紙上においた。2.5% スキムミルク, 5% ヤギ血清, 0.05% NaN₃ を PBS に溶かしたブロッキング液で, 37°C, 30 分間インキュベートした。サンプルは抗アクチンモノクローナル抗体 (C4; MP Biomedicals, Solon, OH, USA; PBS で 500 倍希釈) か, ポリクローナル抗セントリン抗体 (本村博士から分譲; PBS で 500 倍希釈) で 37°C, 60 分でインキュベートした。PBS で洗浄した後, 細胞は, FITC で標識された抗マウス IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA; PBS で 500 倍希釈) , または, Alexa Fluor 594 で標識された抗ラビット IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; PBS で 50 倍希釈) で 60 分 37°C でインキュベートした。PBS で洗浄し, 細胞は

0.5 mg mL⁻¹ の DAPI で 10 分間染色し, さらに PBS でリンスした。最終的に 0.2% p-フェニレンジアミンを含む Mowiol 4-88 でマウントした。サンプルは, AxioVision software (Carl Zeiss) のソフトウェアでコントロールした AxioCam HRc digital camera で撮影した。

3.2.8 アクチンとセントリンの電気泳動と免疫ブロット

S. aggregatum の細胞は遠心分離 (20,630 × g, 5 分, 4°C) で回収し, ペレットにした。2% SDS, 50 mM トリスバッファー (pH 6.8) 6% メルカプトエタノール, 10% グリセロール, 0.0025% BPB を含むサンプルバッファーを適量加え, ピペッティング, ボルテックスなどで細胞を完全に懸濁した後に, 5 分間ボーイルした。*S. aggregatum* と *S. lomentaria* のタンパク質は, 15%に調整したポリアクリルゲルで電気泳動することにより分画し, PVDF 膜に転写した。全タンパク質のレーンはコマジープリリアンドブルー-R-250 で染色した。抗体反応をする残りのレーンはメタノールを介して, 0.05% Tween 20 を含むトリスバッファー (TBS-T) に置き換えて, 1%BSA を TBS-T に溶かしたブロッキング液で 30 分間インキュベートした。膜は TBS-T で 500 倍希釈した抗アクチン抗体, またはブロッキング液で 500 倍希釈した抗セントリン抗体で 37°C, 60 分間インキュベートした。TBS-T で洗浄した後に, 抗マウス IgG か, 抗ラビット IgG (両方とも Promega, Madison, WI, USA; TBS-T で 500 倍希釈) で 37°C, 60 分間インキュベートした。TBS-T で洗浄を行い, 膜を ProtoBlot II AP Systems で染色し, 抗体反応を可視化した。

3.2.9 免疫電子顕微鏡法

上記電子顕微鏡観察で示したように、細胞を樹脂に包埋した。ニッケルのメッシュにマウントした超薄切片を 0.5 M Tris buffer (pH 9.0) 中で 95°C, 2 時間加熱した。0.1% Tween 20 と 1% BSA を TBS に溶かしたブロッキングで 30 分室温でインキュベートした。その後、切片を抗アクチン抗体 (PBS で 20 倍希釈) で 4°C で一晩インキュベートした。その後、0.4 M 塩化ナトリウムを添加した 10 mM トリスバッファー (pH 7.4) の洗浄液で洗浄し、金標識した抗マウス IgG (BBI Solutions, Cardiff, UK; ブロッキング液で 50 倍希釈) を用い、1 時間室温で染色した。その後、洗浄液で洗浄し、酢酸ウランと鉛で染色し、JEM-2100 透過型電子顕微鏡で観察した。

3.3 結果

3.3.1 遊走細胞の一般的な形態と鞭毛装置構造

Schizochytrium aggregatum の遊走細胞は、長さ 6 μm 、横幅 3 μm で 2 本の鞭毛が腹側の側方から生じていた (Fig. 2A)。細胞体は光学顕微鏡下で観察すると、卵形をしていた。細胞一個体の連続切片による、透過型電子顕微鏡観察を行い、立体再構築を行うことで、遊走細胞の細胞内部のオルガネラの配置、鞭毛装置構造を決定した。*S. aggregatum* の細胞内部の形態は、他のストラメノパイル生物群の細胞内部の形態と基本的に一致していた (Fig. 5)。核は鞭毛基部に付随する形で細胞の中央に位置していた (Fig. 3A, B; Fig. 5)。ゴルジ体は、核の右上に位置していた (Fig. 3A, B)。核に近接する閉じた膜系であるパラヌクリアーボディは、背側後方の核を挟んで鞭毛基部と対照的な位置に観察された (Fig. 3D)。一重膜で包まれ、電子密度の高い物質を内包する小胞は鞭毛基部に沿った配置、あるいは背側の細胞膜の細胞表面に配置していた (Fig. 3C)。また、遊走細胞には、ボスロソームは観察されなかった。

鞭毛装置構造は鞭毛基部から走行する 4 つの微小管から構成され (R1-4 in Fig. 4A, B; Fig. 5)、*T. aureum* の鞭毛装置構造と基本的に一致していた (Barr & Allan 1985)。鞭毛基部は腹側から観察すると 30° の角度で配置しており、後ろ鞭毛基底小体の前端部は、前鞭毛基底小体の後端部から 3 分の 2 の部位に近接していた (Fig. 4A, B)。2 つの微小管性の鞭毛根、R3 と R4 は前鞭毛基底小体から生じ前方へ走行していた (Fig. 4A-D)。鞭毛根 R1 と R2 は後ろ鞭毛基底小体

から生じていた (Fig. 4A-E)。R3 は 3 本の微小管 (Fig. 4F) とリブ (arrowhead in Fig. 4B, G) から構成され, 細胞を取り巻くように前方から左方向へと走行していた (Fig. 4A, B)。R4 は R3 の反対側に位置し, 1 本の微小管から構成されていた (Fig. 4G)。2 本の微小管から構成されている R1 は後ろ鞭毛基底小体の R2 と反対側に位置しており, 細胞後方に走行していた (Fig. 4C-E)。R2 は, 7 本の微小管から構成され, 微小管の横断面をみると, 基部で 7 本の微小管が槓状に配置し (no. 1-7 in Fig. 4H), 細胞後方に行くにつれて, 5+2 本 (no.1-5 and no.6, 7) に分かれた微小管が L 字の配置をとり (no. 1-5 and no. 6, 7 in Fig. 4I), no. 5 の微小管が消失し, no. 6 と no. 7 の微小管が腹側に移動することで (Fig. 4E), R2 は 2 又に分かれて細胞後方へと弧を描くように走行していた (Fig. 4B, J, K)。また, R2 の微小管には, ミトコンドリアが近接して配置していた (Fig. 4B, K)。

3.3.2 遊走細胞の着生過程の光学顕微鏡観察と細胞内部の形態変化

光学顕微鏡で生細胞の着生過程を観察した。着生過程は大きく分けて 5 つの段階から構成されていた (Fig. 6)。遊走細胞はまず, 1) 松花粉への走化性を示し, 基質か, あるいは他の付着している細胞へと接触した (Fig. 6A)。2) 10 分ほどで, 紡錘形であった細胞体はだんだんと丸くなっていった (Fig. 6B)。3) 約 1 分間の内に, 鞭毛が後ろ鞭毛前鞭毛の順番で鞭毛先端からだんだんと消失していった (Fig. 6C)。4) 鞭毛も外質ネットもない丸い細胞が観察された (Fig. 6D)。5) 最後に細胞は外質ネットを展開した (Fig. 6E)。

この着生過程における細胞内部の形態変化を透過型電子顕微鏡で観察した

(Fig. 7)。細胞体がだんだんと丸くなっていくステージでは、細胞体の内部の形態は、遊走細胞時のオルガネラの配置を維持していたが、いくつかの変化がおこっていた。鞭毛根は短くなっていた (Fig. 7A, B)。小胞がさらに膜に包まれた形態 (以下二重膜構造, Fig. 7E-G, white arrowheads in Fig. 7C, D), さらに, カップ状の形態を示す小胞が観察された (Fig. 7H; white double arrowheads in Fig. 7C)。これら小胞は, トランスゴルジネットワークと細胞膜の間に観察された (Fig. 7C, D)。多数の小胞が細胞の前方の腹側細胞膜外に観察された (black arrowheads in Fig. 7B, D)。遊走細胞時には背側にのみ観察されたパラヌクリアーボディは基底小体の近くにも出現した (Fig. 7B, I)。

鞭毛喪失後の形態の丸い細胞では, 核, 基底小体, 鞭毛根, ゴルジ体などのオルガネラの配置は変わっていた (Fig. 8A, C, E)。核と付随する鞭毛装置は細胞表面から離れ, 細胞の内部に観察された (Fig. 8E)。高度に組織化された鞭毛装置はもはや観察されず, R2 と R3 の短い鞭毛根が鞭毛基部に残っているのみであった。新しいゴルジ体が出現し, 2つのゴルジ体は核のそばに配置していた (Fig. 8A, C, E)。多数のマスチゴネマ小胞が腹側の後方に観察された (Fig. 8H)。しかし, 細胞体がだんだんと丸くなっていくステージで観察された細胞前方部にあるエキソサイトーシスされたと考えられる小胞および, そうしたエキソサイトーシス領域は観察されなかった (Fig. 8A-F)。このステージで, ボスロソームは細胞の前方の腹側に新たに出現し, その配置は遊走細胞時の R4 の位置と一致していた (Fig. 8A-F)。出現したボスロソームには, 2つの EDMB (arrowheads) が存在し, EDMB からは外質ネットが展開されていた (Fig. 8B, D, G)。また, ボスロソーム周辺には, 二重膜構造や, カップ状構造が観察されていた (white

arrowheads in Fig. 8F)。ボスロソームの位置関係を見てみると、ボスロソームは、2つのゴルジ体と最も近接する細胞膜上に形成されていることが分かった (Fig. 12)。

3.3.3 外質ネットとボスロソームにおけるアクチンの局在

S. aggregatum と *S. lomentaria* での Western blot の結果から、アクチンと一致する 42 kDa の単一のバンド (Fig. 9B)、 セントリンと一致する 19 kDa の単一のバンドが検出され (Fig. 9 D, F), それぞれの抗体が特異的に標的タンパク質に結合していると考えられた。

そこで、細胞内でのアクチンの局在を免疫蛍光顕微鏡で観察した (Fig. 10)。アクチンは栄養細胞の発達した外質ネット (arrows in Fig. 10F, H) と細胞体には観察されたが (arrowheads in Fig. 10F), 鞭毛を保持する初期の着生過程の細胞においては観察されなかった (Fig. 10A, B)。遊走細胞が着生し、丸くなっていくステージで、アクチンはスポットとなって出現し (arrowheads in Fig. 10D), スポットの配置は、基底小体のすぐ側であった。さらにスポットからは外質ネットが展開していた (arrows in Fig. 10F, H)。このことから、ボスロソームにはアクチンが局在している可能性が考えられた。

次に、免疫電子顕微鏡法で、ボスロソームでのアクチンの局在を観察した (Fig. 11)。抗アクチン抗体による微細構造レベルでのアクチンの局在を観察したところ、金粒子は細胞質と外質ネット内部に観察されたが、ボスロソームの EDMB (arrowhead in Fig. 11) と周辺のリボソームがない領域には観察されなか

った (Fig. 11B)。また, 非特異的領域であるミトコンドリアおよび, 基底小体にはほとんど金粒子は観察されなかった (Fig. 11A)。ネガティブコントロールとして 2 次抗体のみ反応させた際には, 金粒子は観察されなかった (data not shown)。

3.4 考察

3.4.1 ポスロソームの個体発生と相同な構造の探索

本研究で観察した着生過程におけるポスロソームの形成過程から、ポスロソームの配置は鞭毛装置構造の前鞭毛基底小体上部の R4 のすぐ側に配置し、形成されたポスロソームはゴルジ体から最も近い細胞膜上に観察されたことから (Fig. 12)、ポスロソームとゴルジ体との間に関係性があると考えられた。様々な生物群の着生過程の研究において、ゴルジ体から合成された小胞が細胞外へと分泌される様子が観察されている (Evans & Christie 1970; Baker & Evan 1973; Hoch & Mitchel 1972; Hemmes & Hohl 1971; Hardham & Gubler 1990; Grove & Bracker 1978)。また、系統的に幅広い生物の遊走細胞で、腹側から基質に対して付着することが知られており、その付着面においては、ゴルジ体から分泌された多糖質の付着物質を内包した小胞の分泌により、細胞の基質への接着を可能にする (Callow & Callow 2006; Hardham 2007; Sing & Bartnicki-Garcia 1975; Lehnen & Powell 1989; Oliveira et al. 1980; Baker & Evans 1973; Henry & Cole 1982)。ポスロソームが展開する外質ネットは、基質に付着することから、本研究の *S. aggregatum* でも、基質への付着部位、つまり、基質に付着する外質ネットを展開するポスロソームの形成位置は腹側であった。また、褐藻類 *Ectocarpus* で観察された付着部位 (pad of adhesive site) は、付着小胞内部の糖質由来の付着物質が分泌に伴い、凹んだ細胞膜は部分的に電子密度が高く観察され、同時に、ゴルジ体と付着部位の間には小胞体が近接して配置しており、小胞体はゴルジ

体からの小胞輸送の膜供給に寄与していると考えられている (Baker & Evans 1973)。こうした、細胞内での配置と形態的な一致点から考えると、ボスロソームおよび外質ネットは、他の生物群の着生過程において、付着部位を作り出す膜系が特殊化した形態なのかもしれない。

一方で、二重膜形態をとる多数の小胞が着生過程におけるボスロソーム形成前のステージで、ゴルジ体のトランス側、腹側の細胞膜上にも同時に観察されており、その後、それらの小胞は細胞外へと分泌されることが考えられた。同様の現象は、Schnepf et al. (1978) の卵菌 *Lagenisma coscinodisci* の遊走子形成中に観察されており、おそらくゴルジ体から形成された小胞がカップ状の形態をとり、二重膜構造へと変化していく様子が記載されている。そして、その小胞は最終的にエキソサイトーシスされる。細胞体が丸い時期に観察された細胞前方にある細胞膜の凹んだ領域の外側には、多数の小胞が観察されており、二重膜構造がエキソサイトーシスされて、内部の一重膜の構造が放出された物だと考えられた。さらに、そうしたエキソサイトーシス領域は、ボスロソーム形成後には観察されず、カップ状の形態や二重膜構造がボスロソームの周辺に観察された。このことから、このエキソサイトーシス領域はボスロソームの前駆体なのかもしれないと考えられた。

3.4.2 アクチンと外質ネットおよびボスロソームとの関係性

ボスロソームの形成過程において、アクチンがボスロソーム形成箇所に強い局在を示し、外質ネットにおいてもアクチンの局在が見られたが、ボスロソーム

ームには局在が見られなかったことから、ボスロソームおよび外質ネットの形成過程において、アクチンが重要な働きを持つのではないかと考えられた。一般的な仮足の伸長においては、アクチンが関与していることは広く知られている (e.g.; Small 2002)。卵菌 *Aphanomyces cochioides* では、着生過程において、付着部位にアクチンが局在し、仮足を伸長させることが報告されている (Islam et al. 2008)。本研究でも同様に、ボスロソームの形成部位に観察されたアクチンの強い局在が観察されたことから、外質ネットを形成する膜の突起構造を作るために必要なのだと考えられた (Fig. 13)。一方で、植物や酵母では小胞体の変化にアクチンが必要であることが知られている (e.g.; Voeltz et al. 2002; Staehelin 1997)。ボスロソームに連続した小胞体は、外質ネット内部の膜との連続性が示唆されており (Perkins 1972)、小胞体から外質ネット内部へと繋がる膜の形態形成において、アクチンが小胞体膜をボスロソームあるいは仮足先端へと膜を移動させる役目を持っていると考えられた (Fig. 13)。

しかし、免疫電子顕微鏡の観察から、ボスロソームには、アクチンの局在は観察されなかった。ボスロソームの電子密度の高い構造 (EDMB: The electron dense material of the bothrosome) では、高度に凝集された小胞体膜と生体膜が近接して存在している (Moss 1985 ; Porter 1969, 1972; Perkins 1972, 1973a)。小胞体膜と生体膜の結合は生物学において一般的な現象である。また、その際には、膜をアンカーするタンパク質が存在し、近接した膜の配置を維持していることが知られている (Stefan et al. 2013; Carrasco & Meyer 2011; Staehelin 1997)。ボスロソームの複雑な膜の形態形成にはそうしたアンカータンパク質が必要であると考えられ、EDMB にアンカータンパク質が存在する可能性が考えられた。生

体膜・小胞体膜の結合 (ER-PM connections) の生物学的意味としては, Ca^{2+} の交換や, 膜の供給をするための脂質の輸送が積極的に研究されている (Stefan et al. 2013; Carrasco & Meyer 2011; Staehelin 1997)。一方で, ボスロソームは他の生物群で観察される ER-PM connections よりも小胞体膜が密に凝集され, 折り畳まれるような非常に特徴的な形態を示すことから, 既知ではない機能を持っている可能性が考えられた。

3.4.3 外質ネット上でのアクチンの役割

ラビリンチュラ属で外質ネットに局在するアクチンは, 滑り運動との関連性のみが強調されてきた (Preston & King 2005; Dietz & Schnetter 1999; Nakatsuji & Bell 1980)。しかし, 本研究で観察を行った *S. aggregatum* は外質ネットによる運動性を持たない (Leander et al. 2004)。外質ネットからは, 分解酵素の分泌が示唆されており (Coleman & Vestal 1987; Perkins 1973a), 外質ネット内にはタンパク質の合成の場となるリボソームが観察されないことから (Perkins 1973a; Moss 1980), 分解酵素は細胞体で合成されて, 外質ネット内部を輸送されると考えられる。アクチンが内部の膜の形態形成に関与しているとする, アクチンは分解酵素などの輸送にも関与しているのかもしれない。一方で, ラビリンチュラ類の祖先が *Aplanochytrium* 属 や *Labyrinthula* 属 のような外質ネットによる運動性を共通して持つならば, 運動性を喪失した外質ネットでも, アクチンは名残として未だ存在しているといった可能性もあると考えられた。

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

4.1 序論

浸透従属栄養性で単細胞の菌様原生生物であるラビリンチュラ類は、海洋や汽水域で出現し (Ueda et al. 2015; Naganuma et al. 1998; Kimura et al. 1999) , 生きている藻類, 海洋のデトライタス, 植物プランクトン凝集体, 水柱, 無脊椎動物および他の多くの基質でその存在が確認されている (Moss 1986; Frank et al. 1994; Bremer 1995; Sathe-Pathak et al. 1993; Raghukumar et al. 1995; Raghukumar & Raghukumar 1999) 。ラビリンチュラ類は, 様々な細胞外分解酵素 (セルラーゼ, リパーゼ, プロテアーゼ, ホスファターゼ, ペクチナーゼ, キシラーゼ) を産生し, 海洋のデトライタスを分解出来る能力を持つことから, 菌類やバクテリアのように海洋生態系における有機物の分解と無機化において重要な役割を持つと考えられている (Raghukumar et al. 1994; Bremer 1995; Bremer & Talbot 1995; Bongiorno et al. 2005; Taoka et al. 2009) 。すなわち, ラビリンチュラ類の海洋生態系での役割を解明するために, この生物群での栄養摂取機構を解明することは重要である。

セルラーゼの生産は, 難分解性の有機物であるセルロースを主要な細胞壁成分とする陸上植物や海藻類由来のデトライタスの分解に寄与すると考えられる。Bremer (1995) と Bremer & Talbot (1995) は, 基質として carbo-xymethyl-cellulose (CMC) を用いて *Schizochytrium aggregatum* での細胞外セルラーゼ (β -1,4-glucanase) の活性を検出した。さらに, Nagano et al. (2011) は, 複数のヤブレッツボカビ科を用いてセルラーゼの測定を行い, *S. aggregatum* で特に高いセルラーゼ活性を確認している。セルラーゼを含む細胞外分泌分解酵

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

素は、仮足様形態であり、基質に付着する外質ネットから分泌されると考えられている (Coleman & Vestal 1987; Leño & Damare 2012; Perkins 1973a; Moss 1986)。外質ネットの微細形態はPerkins (1973a) によって詳細に観察されている。外質ネットの内部には、リボソームやミトコンドリアといった形態が見られず、内部には貫入した膜構造が観察されており、膜構造は状況によってその形態が変化していた。また、外質ネットは、この生物群に特徴的な形態である電子密度が高く、小胞体が連続するボスロソームから展開され、この生物群を特徴づける形態となっている (Moss 1985; Porter 1969, 1972, 1990; Perkins 1972, 1973a)。

外質ネットはこれまで、光学顕微鏡および、電子顕微鏡による形態観察から、付着や分解酵素の分泌、栄養摂取など様々な機能が類推されており、ラビリントウ類の栄養摂取機構を理解する上で、重要な形態であると考えられているものの、その機能に関する知見はあまりにも乏しい。分解酵素の分泌に関しても、外質ネットの内部には、タンパク質の合成の場であるリボソームがないことから、細胞体で合成された分解酵素などのタンパク質は、ボスロソームを通過し、外質ネットから分泌されると考えられるが、外質ネット内の輸送系に関しては、未だ全くの不明な状態にある。菌類の仮足においては、アクチンと、微小管が主要な細胞骨格として存在し (Heath 1995)、微小管は仮足の長軸に沿って配向し、分泌小胞、核などといったオルガネラの長距離輸送に関わっている (Steinberg & Fucus 2004)。前章で特に詳しく説明したように、ラビリントウ科では、Dietz & Schnetter (1999) と Preston & King (2005) が、特徴的な滑り運動を行うラビリントウ属の外質ネットでアクチンが局在すること

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

を示している。私たちは、さらに外質ネットによる運動性のない*S. aggregatum* の外質ネットでもアクチンが局在していることを見いだした。本研究では、ラビリンチュラ類の栄養摂取機構の解明を最終目標に、外質ネットでの分解酵素の分泌から栄養吸収に関する細胞学的な基礎情報を提供すべく、*S. aggregatum* を用いて以下のような課題を遂行した。

- 1) 様々な培養条件での異なる活性状態での外質ネットの形態比較
- 2) 蛍光標識グルコース 〈2-NBDG : 2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose〉を用いた外質ネットからのグルコース吸収能の可視化
- 3) 外質ネットの基質付着時の形態変化の観察
- 4) 外質ネット内部の微細構造観察
- 5) ローダミンファロイジンによる外質ネットでのアクチンの局在の観察

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

4.2 材料と方法

4.2.1 使用した株

ATCC28209 *Schizochytrium aggregatum* は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入し、25°C、d-GPY 液体培地 [0.2% グルコース、0.1%ポリペプトン、0.05%酵母エキスを 50%マリンアート(1:1人工海水/蒸留水)で溶かした] で維持した。

4.2.2 遊走細胞放出誘導と外質ネットの観察

S. aggregatum の細胞を d-GPY 寒天培地 (d-GPY に 1.5%の寒天を加えて固めた) に塗布し、1日間、静置、25°C条件下で維持した。細胞が寒天上にコロニーを形成したことを確認し、滅菌人工海水 (マリンアート) を加え、3時間ほど維持し、遊走細胞が十分に放出されたことを確認した。その後、深底シャーレにカバーガラスを沈め、d-GPY 20 ml あるいは、50%人工海水マリンアート 20 ml にクロレラを 0.4 g 添加した培地中に遊走細胞を 500 µl 入れた。1日培養を行い、微分干渉顕微鏡で沈めたカバーガラス上に固着した細胞と展開された外質ネットの観察を行った。微分干渉顕微鏡 (BX60; Olympus, Tokyo, Japan) を用い、AxioCam HRc カメラ (Carl Zeiss, Hallbergmoos, Germany) で撮影した。

4.2.3 間欠撮影

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

上記の方法で放出させた遊走細胞を、50%人工海水マリンアートにクロレラを添加した培地 1 ml を含む OG チャンバーに数滴入れて、倒立顕微鏡で 1 分間ごとに約 8 時間にわたる撮影を行った。撮影には、微分干渉倒立顕微鏡 (IX70; Olympus, Tokyo, Japan) でデジタルカメラ (DMC-GX1, Panasonic, Tokyo, Japan) を用いた。

4.2.4 セルラーゼ活性測定

培養条件は、液体培地では 20 ml の d-GPY ; d-GPY 液体培地, CMC + 0.1% 栄養培地 ; [0.2% CMC (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) , 0.1% yeast extract, 0.1% polypepton を 50%人工海水マリンアートで溶かした] , ASW ; 50%人工海水マリンアートでの培養を行った。基質を含む培地では、深底シャーレに 50%人工海水マリンアートを 20 ml 入れ, 0.04 g の基質を加えた。基質は、ドライクロレラ, アオサ (*Ulva* sp. 夙川河口で採集), アマモ (*Zostera* sp. 石垣島で採集), スサビノリ *Pyropia* sp., ワカメ, カツオブシ, サクラエビ, ゴマの種子 (以下ゴマ), ホウレンソウの葉 (以下ホウレンソウ), 茶色および黒に変色したマングローブの落葉 (以下マングローブ落葉) をシリカゲルで乾燥させ, ミルミキサーで粉砕した後に, 95°C, 2 時間で 2 回, 滅菌したものを添加した。あるいは, セロファン膜 + 0.1%栄養培地; (4 cm² のセロファン膜を 4 枚, 0.1% yeast extract, 0.1% polypepton を 20 ml の 50%人工海水マリンアートで溶かした) を使用した。培養では, 上記の方法で放出させた遊走細胞をそれぞれのシャーレに 500 μ l 入

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

れ、静置、室温、25°Cで5日間、維持した。セルラーゼ活性測定においては、CMC-agar (Bremer & Talbot 1995; Nagano et al. 2009; Fig. 14)を用いた。CMC-agarは、0.1% CMC (carboxymethylcellulose sodium salt) , 1.5% agar, と 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0) を混合した。無菌のコルクボーラーを使い、7mmの直径のウェルを寒天に作製した。測定は5日目 (d-GPY, CMC + 0.1%栄養培地, ASW, セロファン膜 + 0.1%栄養培地, ドライクロレラ, アオサ, アマモ, スサビノリ, ワカメ, カツオブシ, サクラエビ, ゴマ, ホウレンソウ, マングローブ落葉), あるいは, 1日 (d-GPY, ASW, セロファン膜 + 0.1%栄養培地, ドライクロレラ, アマモ, ワカメ, ゴマ) ごとに行った。培養液中の細胞のいない上澄みを1mlずつ取り, 830gで10分間, 遠心分離したあと, さらに上澄みを50 µl取り, CMC-agar プレーットのウェルに入れた。28°Cで16時間維持し, その後, プレーットはCMCを染色する0.1%コンゴレッド溶液で30分間, 室温で染色した。1.0 M NaClで3回洗浄した後に最終的に5%酢酸溶液に5分間さらすことで, セルラーゼの酵素反応がおこった領域 (透明体=ハロ) と反応していない領域の区別を明確にし, 最後にハロの大きさを計測した。細胞数の計測は培養5日目のサンプルのシャーレの底面における基質のない領域 (0.4 µm²) において, 固着する栄養細胞の数を計測した。全ての計測は3つの実験区で行い, 平均値および標準偏差を求めた。

4.2.5 2-NBDGによるグルコースの局在の観察

外質ネットの形成は上記方法と同様である。実験手法の流れを示した模式

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

図を Fig. 15 に示す。d-GPY 20 ml, 50%人工海水マリンアート 20 ml, 50%人工海水マリンアートを 20 ml にクロレラを 0.4 g 添加した培地, d-GPY 培地 20 ml にクロレラを 0.4 g 添加した培地で細胞を 1 日間培養した。外質ネットを展開したカバーガラスを培養液中から取り出し, 50%人工海水マリンアートで希釈した 20 μ M の 2-NBDG を 1 滴ずつのせて, 乾燥しないようにモイストチャンバー内で 2 h, 室温で維持した。サンプルは, AxioVision software (Carl Zeiss) のソフトウェアでコントロールした AxioCam HRc digital camera で撮影した。

4.2.6 ファロイジンを用いたアクチンの局在の観察

外質ネットの形成方法は上記方法と同様である。50%人工海水マリンアートを 20 ml にクロレラを 0.4 g 添加した培地で培養を行い, 2%グルタルアルデヒド, 3%パラフォルムアルデヒド, 3% NaCl を PHEM buffer (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ pH 7.4) に溶かした固定液と培養液を 1:1 で混合し, カバーガラスごと氷上で 30 分間固定した。PBS で 5 分間 3 回振盪洗浄を行った。5% Triton X-100 に液交換し, 30 分間振盪処理を行った。PBS で 5 分間 3 回振盪洗浄を行った。0.1% NaBH₄ に液交換し, 20 分間振盪処理を行った。PBS で 5 分間 3 回振盪洗浄を行った。カバーガラス上の水分を拭き取り, モイストチャンバーのろ紙上においた。ファロイジン溶液 (10 unit mL⁻¹ in PBS), 室温で 2 時間染色した。その後, PBS で 3 回洗浄した後, 最終的に 0.2% p-フェニレンジアミンを含む Mowiol 4-88 でマウントした。サンプルは, FV1200 IX83 共焦点顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) で撮影した。

4.2.7 透過型電子顕微鏡観察

外質ネットの形成方法は上記方法と同様である。実験手法の流れを示した模式図を Fig. 16 に示す。50%人工海水マリンアートを 20 ml にクロレラを 0.4 g 添加した培地で培養を行い、カバーガラスごと 2.5 %グルタルアルデヒド、0.1 %スクロースを 0.1 M のカコジル酸バッファーで、1.5 時間 25°C 下で固定した。数回カコジル酸バッファーで洗浄した後、サンプルを 0.1 M のカコジル酸バッファーに溶かした 1% OsO₄ で後固定した。その後、カコジル酸バッファーで数回洗浄し、エタノールシリーズで脱水を行った。プロピレンオキシドを介して Spurr 樹脂 (Polyscience Inc., Warrington, England) に包埋し、70°C、24 時間で重合させた。重合した試料をドライヤーで加熱し、液体窒素で急冷することでガラスのみを取り除いた。超薄切片は、ミクロトーム (Leica Ultracut R; Leica, Wien, Austria) を用い、ダイヤモンドナイフで作製し、フォルムバルコートしたグリッドにマウントした。酢酸ウランと鉛で染色した後、JEM-2100 (JEOL, Tokyo, Japan) 透過型電子顕微鏡で観察を行った。

4.3 結果

4.3.1 様々な基質でのセルラーゼ活性

S. aggregatum の細胞外分泌セルラーゼは、茶色および黒に変色したマングローブの落葉、および人工海水中での培養以外の培養条件下で活性がみられた（灰色の棒グラフ, Fig. 17）。また、基質によってセルラーゼの活性には差が観察された。セルラーゼ活性測定の標準的な培養条件である CMC+1%栄養培地（Nagano et al. 2011）の活性は他の培養条件において中間の値（平均値 2.3）を示し、CMC+セロファン膜 (2.4), あるいはセルロース源のない d-GPY 培地 (2.1) とほぼ同じであった。一方で、藻類やアマモといった培養条件は、CMC + 1% 栄養培地よりも高い活性を示した。また、セルロースを含まない培養条件（カツオブシ, d-GPY, サクラエビ, ASW）でもセルラーゼの活性は見られ、同時にセルロース源を含む培養条件と、セルロース源を含まない培養条件でセルラーゼ活性に顕著な差は見られなかった、例えば、セルロースを含むハウレンソウ (1.43) やゴマ (1.46) などは、活性を持つ培養条件で最も値が低かった。最も高い活性を示したのは陸生のドライクロレラ (4.03) であり、海生の藻類やアマモが後に続いていた。最も高いセルラーゼ活性を示したドライクロレラの細胞数は 119.9 であり、細胞数は他の他の培養条件と比べると中間値を示した。同様に、高い活性の観察された培養条件（海藻やアマモ）では、相対的に細胞数は少なかった。一方で、活性の低い培養条件では細胞数はより高い傾向が見られた（白い棒グラフ, Fig. 17）。また、活性の観察されなかったマングローブ落葉

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

や ASW といった培養条件においては、細胞数も低かった。細胞数の平均をセルラーゼ活性の平均値で割った商を比べてみると、セルラーゼ活性の高かった藻類やアマモといった培養条件では、単位細胞あたりの活性が高いと考えられた (Fig. 18)。

4.3.2 セルラーゼ活性の経時的な変化

セルラーゼの活性を示さなかった ASW 以外の培地においては、セルラーゼの活性は徐々に上昇することが分かった (Fig. 19)。最も高い活性を示すドライクロレラでは、培養 1 日目から 3 日目の培養初期にセルラーゼ活性の高い上昇を示し、全体を通してセルラーゼ活性は他の培養条件と比べて高い推移を示していた。ワカメでは、培養 1 日目から 3 日目にかけてセルラーゼ活性の高い上昇が見られたが、4 日目、5 日目では上昇はだんだん見られなくなった。アマモも同様に培養 1 日目から活性が見られ、日を追うごとにセルラーゼ活性は上昇していた。また、セロファン膜 + 0.1% 栄養培地, d-GPY 培地, ゴマを添加したこれらの培地においては、セルラーゼの活性はいずれも同様の推移を示した。いずれの培地においても、培養 2 日目からセルラーゼ活性が観測され、活性は 2 日目から 3 日目と、4 日目から 5 日目にセルラーゼ活性の高い上昇が見られた。また、培養 3 日目から 4 日目にかけて、セルラーゼの活性の上昇は見られなくなるか、あるいは減少することが分かった。全体を相対的に見てみると、セルラーゼの活性は、1) セルラーゼの活性に対して細胞数が比較的少なかった藻類 (ドライクロレラ, ワカメ) やアマモといった培養条件と、2) 細胞

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

数が多かったセロファン膜 + 0.1% 栄養培地, d-GPY 培地, ゴマといった培養条件で分けられると考えられた。特に前者の藻類（ドライクロレラ, ワカメ）やアマモといった培養条件では, 培養 1 日目から活性が見られる傾向があると考えられた。

4.3.3 外質ネットの形態比較

培養 1 日目の d-GPY 培地とクロレラを添加した培地での外質ネットの形態を比較すると, いずれの培養条件においても, 外質ネットを放射状に展開する様子が観察された (Fig. 20)。d-GPY 培地においては, 軸となる外質ネットからより細かい外質ネットが展開され, 密なネットワークを形成していた (Fig. 20A)。クロレラと培養した細胞では, 基質に付着していない外質ネットは d-GPY 培地で観察された外質ネットと同様に細かったが, 基質に付着する外質ネットは顕著に太くなっていた (arrowheads in Fig. 20B)。同じ個体から付着している太い外質ネットが何本も同一の基質に付着している様子も観察された (Fig. 20B)。また, 基質に付着した外質ネットから, 細かい外質ネットが分岐している様子も観察された。しかし, d-GPY 培地ほど, 細かい外質ネットの密な網目状のネットワークは形成していなかった。クロレラと培養した細胞では, 80 μm 以上離れたクロレラに細胞から展開される太い外質ネットが付着している様子も観察された (data not shown)。さらに, いずれの培地においても異なる個体同士の外質ネットが連続している様子が観察された。

4.3.4 外質ネットのタイムラプス撮影

遊走細胞は、チャンバーの底面に着生した後の数時間は、外質ネットを展開し、細胞体は外質ネットを使って移動し、餌となるクロレラへと接近した。外質ネットを広く展開した後は、細胞体は動かず、外質ネットのみが流動的に動いていた。基質に付着していない細胞体は、放射状に網目状の密な外質ネットを展開した (Fig. 21A)。細い外質ネットが基質に付着する (white double arrowhead in Fig. 21B) と基質との付着部は太くなり、さらに細胞体側から外質ネットはだんだんと太くなっていった (white double arrowhead in Fig. 21C)。基質に付着した外質ネットから側方に分岐した外質ネットが観察された (black arrowhead in Fig. 21C)。分岐した外質ネットはさらに分岐を繰り返すが (black double arrowheads in Fig. 21D)、その後、分岐は観察されなくなり1本の外質ネット (black arrowhead in Fig. 21E) となった。同時に始めに付着した外質ネット (white double arrowhead in Fig. 21D) も観察されなくなった。基質に付着していない放射状に展開された外質ネットは、最終的に退縮し、基質と付着した太い外質ネットが観察された (black arrowhead in Fig. 21F)。

4.3.5 2-NBDG での外質ネットでのグルコースの局在の観察

蛍光標識したグルコース (2-NBDG) は、全ての培養条件において細胞体で観察された。培地にクロレラを添加していない培養条件 (Fig. 22E-H) の方が、クロレラを添加した培養条件 (Fig. 22A-D) よりも細胞体での蛍光がより強く観

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

察された。また、溶媒が d-GPY である培養条件 (d-GPY + クロレラ; Fig. 22C-D, d-GPY; Fig. 22 G, H) ではおそらくボスロソームだと考えられる領域で強い蛍光が観察された。クロレラを添加した培養条件では (Fig. 22 A-D), 特に太い外質ネット上で、グルコースの蛍光が観察された。d-GPY, ASW で培養した細胞 (Fig. 22E-H) でも、わずかに外質ネット上で蛍光が観察された。

4.3.6 透過型電子顕微鏡観察

外質ネットは多様な微細形態が観察された。外質ネットの内部にはリボソームやミトコンドリアといった形態は観察されず、内部には様々な内部構造 (“net element” in Perkins 1973a) が観察された (Fig. 23)。細胞体に近接した基質に付着していない外質ネットでは、多数の分岐した外質ネットが観察されたが、外質ネット内部に目立つ構造は観察されなかった (Fig. 23A)。細胞体周辺には、繊維状の構造が観察された (asterisk in Fig. 23A)。また、細胞体周辺の太い外質ネット膜の外側 (black arrowhead in Fig. 23A) には繊維状構造を生じる電子密度の高い球状の構造が観察された (Fig. 23F)。また、細い外質ネットの内部には、小胞の様な構造が観察されることがあった (black arrowhead in Fig. 23B)。そうした枝分かれした外質ネットの間を埋めるように、網目状の目立たない曲線状の外質ネットが観察され、そうした外質ネットには規則的に膨らみが観察された (Fig. 23D)。また、クロレラと培養した際のボスロソームの横断面は、約 100 nm の大きさで電子密度が高く、着生直後のボスロソームの大きさと大きく変化はなかった (Fig. 23E)。一方で、これまで報告されていたボスロソームの横断

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

面では観察されていない (Moss 1985), 周囲に多数の繊維状の構造 (asterisk in Fig. 23E) が観察された。また, ポスロソームから展開されてすぐの外質ネットの内部には, 膜の構造が観察された (Fig. 23 E)。

外質ネットの基質との付着面付近では, 外質ネットの細胞膜は隆起しているような構造 (white arrowhead in Fig. 23C) が観察された。外質ネットは基質に沿って広がり, 基質の内部に侵入していた (white double arrowhead in Fig. 23C)。付着部の外質ネットの内部には, 電子密度が低く, 膜様構造 (black arrowhead in Fig. 23C) や, 繊維状構造 (black double arrowhead in Fig. 23C) などが観察され, 外部と基質との間には, 多数の繊維状構造 (asterisk in Fig. 23C) が観察された。基質と細胞体をつなぐ外質ネットでは, 同様の繊維状構造が内部に存在する様子が観察された (Fig. 23H, I, J)。この繊維状構造は, 基質に近いほど, ネット内部に少なく, ネット外部で多く観察された。繊維状構造が外部で発達している外質ネットで, 電子密度が高く, 窓があるように見える構造 (“fenestrated membrane arrays” in Perkins 1973a) が観察された (black arrowhead in Fig. 23G)。

4.3.7 ファロイジン染色

クロレラと培養した細胞の外質ネットでは, 基質に付着する外質ネットが太くなっており, そうした外質ネットではファロイジンで染色した F-アクチンの蛍光も強くなっていた (Fig. 24)。アクチンの局在は外質ネットの長軸に沿って細胞体から外質ネットの先端まで直線的に配置していた。

4.4 考察

4.4.1 外質ネットからの分解酵素分泌の活性化と基質の感知

ラビリenchウラ類の外質ネットは基質に付着し、分解酵素の分泌を行っていると考えられてきたが、外質ネットからの分解酵素の分泌機構は未だ未解明であった。本研究で様々な培養条件でのセルラーゼの活性の差を観察したことで、ラビリenchウラ類の細胞外分泌酵素の一つであるセルラーゼの活性は、培養条件によって異なることが明らかになった。さらに、活性の高い培養条件では、個々の細胞からの分解酵素分泌活性が高いと考えられた。つまり、細胞は特定の基質や栄養素が少ないなど消極的な理由も含む様々な環境を感知し、セルラーゼの分泌を活発にしている可能性が考えられた。さらに、セルラーゼの活性の経時的な変化をみてみると、藻類・アマモでは、セルラーゼの培養1日目からセルラーゼの活性が計測されたことから、遊走細胞は着生してすぐに基質を感知し、セルラーゼを分泌している可能性が考えられた。また、分解酵素分泌の機能を有すると考えられる外質ネットは、クロレラ、d-GPYのいずれの培養条件においても観察されたが、クロレラと付着した外質ネットは太くなっていた。過去にも基質と付着した外質ネットが太くなることが報告されている (Yokoyama et al 2007; Yokoyama & Honda 2007)。餌となる基質存在下での分解酵素の活発な分泌は、太い外質ネットから行われていると考えられた。

4.4.2 外質ネットからの栄養吸収

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

ラビリントウ類の外質ネットからの栄養摂取に関しては、光学顕微鏡および、電子顕微鏡による形態観察から、その機能が示唆されてきたが、外質ネットからの物質の取り込みに関しては不明であった。本研究では、蛍光標識グルコース (2-NBDG) を用いることで、外質ネットはグルコース吸収能力を有することを初めて明らかにした。外質ネットでの 2-NBDG の蛍光はクロレラ存在下で強かったことから、餌となる基質が存在している条件で、外質ネットからの栄養吸収速度があがると考えられた。また、高栄養条件 (d-GPY) の溶媒で培養した細胞では、ボスロソーム付近でグルコースの強い蛍光が観察され、栄養状態によって、グルコースの取り込み位置が変わる可能性が考えられた。

4.4.3 外質ネットによる基質の感知

これまでの観察から、餌となる基質の存在しない d-GPY 培地で培養した際にも、外質ネットは観察された。また、クロレラとの培養で観察された外質ネットと比較すると、細い外質ネットが放射状に密に展開されていた。このことから、外質ネットには、分解酵素の分泌、栄養分の吸収以外にも機能がある可能性が考えられた。クロレラと培養した細胞では、細胞は放射状に外質ネットを展開しており、クロレラと付着することで太くなっていく様子が観察された。また、基質に付着していない外質ネットは退縮していった。こうした形態変化は、真菌類の *Hypholoma fasciculare* と *Phanerochaete velutina* を寒天上で培養した際の菌糸においても観察されている (Boody 1993)。これらの生物が放射状に

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

展開した菌糸は、基質となる木片に接触すると成長パターンが変化する。放射状の伸長は停止し、木片と付着する菌糸は肥厚し、同時に非結合性菌糸の退縮が観察された。こうした非結合性菌糸の退縮は、接触する基質の大きさに依存し、菌糸が基質の炭素量を感知することで、より効率的な栄養の吸収に貢献していると考えられる。ラビリントウ類の外質ネットでも、形態を流動的に変化させて、より効率の良い栄養摂取を実現しているのかもしれない。

4.4.4 外質ネットの微細形態変化

外質ネットの微細構造観察では、細胞外に多数の繊維状構造が観察された。Raghukumar et al. (2000) が行った走査型電子顕微鏡による外質ネットの微細構造観察では、基質との付着を促す細胞外多糖類は、外質ネットでは観察されなかったが、細胞体周辺で、餌となる基質のない条件で、“adhesion cap” 構造が観察された。また、細胞の基質への付着に、外質ネットが必須ではなく、基質との付着は細胞表面の疎水性相互作用によると主張している。本研究の観察からも、基質に付着していない外質ネットでは、繊維状構造などは観察されず、光学顕微鏡下で流動的に動いている様子が観察された。また、細胞体では繊維状構造は観察され、Raghukumar et al. (2000) で観察された“adhesion cap” 構造と同質のものであると考えられた。また、基質に付着した外質ネットでは、繊維状構造が内部に観察され、またそれらは、細胞外に分泌されていたことから、基質への付着をより強固にしていると考えられた。基質に付着した外質ネットと付着していない外質ネットでは同じ細胞から展開された外質ネットでも、内

4. 異なる培養条件におけるセルラーゼ活性と外質ネットの形態変化

部の形態には差が観察された。外質ネットは、基質に付着するまでは、物質の感知、基質に付着した後は、分解酵素の分泌、栄養分の吸収と機能が変わっていくと考えられ、形態の違いがそうした機能の違いを生み出していると考えられた。また、基質に付着した外質ネットでは、多数の膜が折り重なるような構造が観察された。この形態は、内部の膜構造の、“dense array of internal membrane”として、Perkins (1973a) が *T. motivum*, *L. algeriensis*, *L. minuta* (現在の分類体系では *A. minuta*) で観察しており、ラビリントウ類の外質ネットの機能において重要な構造だと考えられる。また、本研究の結果から、太い外質ネット上には、アクチンの強い局在が観察された。一方で、微小管は観察されなかった。外質ネットの内部で観察された特徴的な膜の形態形成や、小胞などの輸送にアクチンが関わっているのかもしれないと考えられた。

5. 総合考察

5. 総合考察

5.1 ラビリンチュラ類の系統的考察

5.1.1 鞭毛装置構造比較

Schizochytrium aggregatum の鞭毛装置構造では、4つの鞭毛根と、2又に分かれた R2 が観察され、この形態は Barr & Allan (1985) によって報告された *Thraustochytrium aureum* の鞭毛装置構造と基本的に一致していた。また、本研究で細胞全体の鞭毛装置構造を決定したことで、R2 の形態は *S. aggregatum* では微小管の本数が 7 本で細胞後方まで弧を描くように走行しているのに対して、*T. aureum* での R2 の微小管の本数は 6 本であり鞭毛基部付近までしか走行していないなど、違いが観察された。*S. aggregatum* と *T. aureum* は、分子系統樹上では、比較的近い位置に出現する (Tsui et al. 2009; Yokoyama & Honda 2007)。鞭毛装置構造は、保守性の高い形態であることから、微小管の本数の違いは、ラビリンチュラ類という生物群内での高い多様性を示していると考えられた。

また、本研究では、*S. aggregatum* の遊走細胞内部のオルガネラの絶対的配置を鞭毛装置構造を基準に決定した。基底小体に付随して配置する核、核に付随し、右上部に配置するゴルジ体など、基本的な形態は他のストラメノパイル生物群と一致していた。さらに、捕食装置である R2 が槌状の配置から L 字をとり、2又に分かれて細胞後方へ走行していくこと、さらに R2 にミトコンドリア

が密接して配置しているといった特徴は、バクテリア捕食性のストラメノパイル生物群に一般的に観察される特徴であった (Andersen & Wetherbee 1992; Honda et al. 1995; O' Kelly & Patterson 1996; Karpov 2001; Moriya 2000,2002)。卵菌 (e.g.; Barr & Allan 1985; Barr & Désaulniers 1989; Bortnick et al. 1985) や、オクロ植物 (e.g.; Andersen 1991; Motomura 1989; Inouye et al. 1992; Santos & Leedale 1991) といった非捕食性の生物群では、R2 の 2 叉の走行は観察されない。このことは、ラビリンチュラ類は捕食性の共通祖先から進化し、比較的最近になって捕食能を失い、その名残が R2 のすきまとして未だその形態を残している可能性が考えられた。また、これまで報告されているラビリンチュラ類とビコソエカ類を含んだ分子系統解析では、これら 2 つの系統群が姉妹群になるといった系統樹もあることから、(e.g.; Leipe et al. 1994; Riisberg et al. 2009) ラビリンチュラ類と捕食性の生物群との関連性は十分に示唆されるものだと考えられた。

5.1.2 細胞内部の形態比較 –パラヌクリアーボディー–

本研究では、*S. aggregatum* の遊走細胞内で基底小体と核を挟んで対照的な位置に配置するパラヌクリアーボディーが、ミトコンドリアと近接して配置していた。ストラメノパイル生物群でパラヌクリアーボディーと同定されている構造はビコソエカ類の *Acronema sippewissettensis* (Teal et al. 1998)、プラシディア類の *Placidia cafeteriopsis* (Moriya et al. 2002) で報告されている。この配置とミトコンドリアの関係性は、*A. sippewissettensis*, *P. cafeteriopsis* でも同様に観察され、このような祖先的なストラメノパイル生物群で構造、配置などの一致点が

観察されたことは、パラヌクリアーボディーが祖先的な形質として認識できるオルガネラであると考えられ、ラビリンチュラ類が祖先的な形質も未だに色濃く残す生物であると認識できると思われた。

5.1.3 ボスロソーム・外質ネットシステムの獲得と喪失

形態的に見ると、ラビリンチュラ類は、比較的最近になって捕食能を失ったように思われる。ラビリンチュラ類の系統樹では、それぞれの属の系統群は、根元の枝長は短く箒状に分岐していることから、短期間の内に多様性が確立されたと考えられる (e.g.; Tsui et al. 2009; Honda et al. 1999)。ラビリンチュラ類は、世界中に普遍的に存在することから、ボスロソーム・外質ネットシステムの獲得がこの生物群の繁栄に貢献していると考えられる。ボスロソーム・外質ネットシステムの進化を考える上では、ラビリンチュラ類に近縁で、ボスロソームを持たない陸生、および淡水生のディプロフリス類（アンフィフィラ目、アンフィトレマ目）との関係性に言及する必要がある (Takahashi et al. 2014; Dystra & Olive, 1975, Dykstra & Porter 1984, Anderson & Cavarier-Smith 2012; Gomaa et al. 2013)。これらの生物は、ラビリンチュラ類の系統樹上で異なる位置に出現しており、アンフィフィラ目はアンフィトレマ目よりも、ヤブレッツボカビ科に近縁であり、さらに、ラビリンチュラ科とアプラノキトリウム科はラビリンチュラ類のグループで最も祖先的な位置に出現する (Anderson & Cavarier-Smith 2012; Gomaa et al. 2013; Takahashi et al. 2014)。これらのことから、ボスロソームを持たない生物群は系統樹上で異なる位置に出現するように見えるが、一方で、目

間の支持は弱くはつきりとしたことが言えない (Anderson & Cavarier-Smith 2012; Gomaa et al. 2013; Takahashi et al. 2014)。しかしながら、ボスロソームがこの生物群に特徴的な形態であることから考えると、ボスロソームおよび、外質ネットシステムの獲得は、ラビリンチュラ類および、近縁の生物群で、1 度起こり、ボスロソームを持たない生物群では、喪失したと仮定できる。ボスロソームを持つ生物群はほとんどが海洋か、汽水に存在する (Leaño & Damare 2012)。ボスロソームを失った生物群が淡水や陸に進行したと考えることも出来るが、ボスロソームは、そうした海洋か、汽水での栄養摂取に必要であり、淡水生や陸生のラビリンチュラ類では必要とされなくなり、喪失したと考えた方が自然だと思われる。ボスロソーム・外質ネットシステムの機能が明らかになれば、こうしたラビリンチュラ生物群内でのボスロソームの獲得と喪失に関する系統学的な議論が可能になるはずである。

5.2 外質ネットの栄養摂取および輸送系に関する考察

5.2.1 外質ネットによる基質の認識

本研究の *S. aggregatum* では、基質に付着する外質ネットの太い形態は、外質ネットと餌となる基質との物理的な接触によってもたらされ、外質ネットを介した基質を感知する機能があると考えられた。同時に d-GPY で観察された網目状の密な外質ネットは、細胞体の周りに餌となる基質が存在するかを感知す

るための“センサー”として働いていると考えられた。20 μm の細胞体から展開される外質ネットは直径で約 80 μm にもおよび、さらに異なる細胞から出た外質ネットは融合することが出来ることから (data not shown), 同一の細胞集団が感知できる表面積は、細胞体のみで感知する表面積よりも遙かに広く、自然界において効率的に餌をとらえることに貢献出来るのかもしれない。

S. aggregatum では、セルラーゼの基質となるセルロースを含まない培地において段階的にセルラーゼ活性は上がっており、最終的なセルラーゼ活性も高かった。菌類では、数日の内に栄養を添加した 1 L あたりに培養液中で 20 g の細胞外分泌酵素が分泌されることが知られている (Sprey 1988; Peberdy 1994)。ラビリンチュラ類の細胞でも基質を感知し、分解酵素を分泌する特定の基質やセルロースの有無や栄養素が少ないといった条件のない状態でも、ある程度栄養があり細胞数が増えれば、個々の細胞から恒常的に一定の分解酵素を分泌すると考えられた。こうした定常的な分解酵素の分泌は、細胞にとってコストがかかると考えられるが、なぜ必要なのか。1つの可能性として餌となる基質の存在を感知するために必要なのかもしれない。また、分解酵素によって分解される基質が存在すると、グルコースなどの分解産物が生成され、そうした分解産物が外質ネット上の受容体に受け取られて、分解酵素分泌が活性化するのもかもしれない。仮足によって認識されるシグナル分子としては、真菌類の *Magnaporthe grisea* で知られており、イネいもち病の病原菌として研究されてきたこの生物では、植物のクチクラを構成するポリマーの一つである cutin を感知すると、仮足内のシグナル経路が活性化される (Dean, 1997; Tucker & Talbot, 2001)。ラビリンチュラ類は属ごとに栄養源として様々な基質を利用している可

能性が考えられるため (e.g.; Leñaño & Damare 2012; Raghukumar 2002; Raghukumar et al. 1992), 属ごとに異なる栄養源を感知する可能性が考えられる。個々のラビリンチュラ類の系統群で分解酵素の活性の高さが異なっていることから (Taoka et al. 2009; Nagano et al. 2011), 分解酵素を定常的に分泌することは、それぞれの属が栄養源とする基質の認識を助けているのかもしれない。

さらに、細い外質ネットが基質に付着し、基質と付着する太い外質ネットを形成するまでには、多数の分岐が観察された。そうした外質ネットの分岐は太い外質ネットが形成されると観察されなくなり、最終的に形成される太い外質ネットは、細胞体と基質を直線的につないでいた。このことから細胞はまず網目状の外質ネットによって、基質からの最短経路を探索し、物質の輸送距離を短くすることでより効率的に栄養を吸収しているのではないかと考えられた。また、基質に付着した外質ネットからは多数の繊維状物質が分泌されていた。マングローブの葉が落葉すると、汽水にさらされて、葉に含まれる養分は溶脱される (中桐 2001)。ところが、落葉直後にすばやく侵入する卵菌 *Haliphthora* は、菌糸によって、養分を固定することが出来る (Fell & Master 1980)。ラビリンチュラ類の外質ネットは分解酵素を分泌し、細胞壁を分解する様子が観察されている (Perkins 1973a)。そうすると、海草類などであっても、落葉したマングローブと同様に、分解された細胞壁から内部の養分が流出してしまうと考えられる。*S. aggregatum* で観察された繊維状物質は、分解酵素によって破壊された基質面で養分を固定化するために存在しているのかもしれない。ボスロソームの形成過程の観察においても、他の生物での付着部とボスロソーム・外質ネットシステムは、関係性があるように思われた。世界中の海で普遍的に存在す

ることを可能にした要因となる進化的な獲得形質であるボスロソーム・外質ネットシステムの由来を明らかにするためには、外質ネットの付着機構により注目して研究を進めていく必要があると思われた。

5.2.2 外質ネットからの栄養吸収

外質ネットからの栄養吸収を行うためには、水溶性のグルコースなどが細胞内に取り込まれる際に障壁となる細胞膜の脂質二重膜を通過するために、トランスポーターが必要であると考えられる (Boles & Hollenberg 1997; Özcan & Johnston, 1999)。出芽酵母には、グルコースが豊富な環境で発現される低親和性トランスポーターと、グルコースが制限された環境で発現される高親和性グルコーストランスポーターの2種類が存在する (Reifenberger et al. 1995; Özcan & Johnston 1999; Maier et al. 2002)。グルコースが豊富な溶液 (d-GPY) であった培養条件の細胞では、ボスロソーム付近で 2-NBDG の強い蛍光が観察された。一方で、グルコースが制限された環境である海水のみで培養した細胞で、2-NBDG の蛍光はボスロソーム周辺や外質ネットで低かった。このことから、溶媒が低栄養である条件に合わせたグルコーストランスポーターの発現が起こっており、その局在は異なる可能性が考えられた。また、グルコースが豊富な条件ではボスロソーム周辺に低親和性トランスポーターが局在している可能性が考えられた。*S. aggregatum* の栄養細胞は分厚い細胞壁で覆われていることから (Yokoyama & Honda 2007)、細胞壁のないボスロソーム周辺に局在することが最も効率的なのかもしれない。クロレラと培養した条件で観察された外質ネットでのグルコ

ースの蛍光が観察されたことから、基質を認識するとグルコーストランスポーターは、外質ネットに配置され、付着した餌の外質ネットからの栄養吸収を助ける可能性が考えられた。

5.2.3 外質ネットでの輸送とアクチンとの関係性

外質ネットでは、分解酵素の分泌のように細胞体から外質ネットへの輸送、栄養分の吸収といった外質ネットから細胞体へ向かう双方向の輸送系が存在する可能性が考えられた。そうした輸送はどのように行われるのか。菌類の菌糸内部には主要な細胞骨格因子として、アクチンと微小管が存在する (Heath 1995)。卵菌ではアクチンは菌糸の先端にキャップを形成し (Heath 1987)、他の菌類では、仮足先端部において小さなパッチ状に観察される (Bartnicki-Garcia 1996)。菌類の菌糸の縦軸にそって微小管は配置しており、エキソサイトーシス小胞などの長距離の輸送に関与している (Steinberg & Fuchs 2004; Bartnicki-Garcia 1996)。本研究で観察されたアクチンの局在は、真菌類で観察される微小管との配置と同様に外質ネットの長軸にそった配置が観察された。外質ネットの内部で観察された特徴的な膜の形態形成や、小胞などの輸送にアクチンが関わっているのかもしれないと考えられた。さらに、真菌類の菌糸の内部には、細い膜で連結されていると考えられる液胞が存在し、ぜん動運動することで長い菌糸間で溶質を迅速に輸送することが出来ることが知られている (Rees et al. 1994; Cole et al. 1998; Ashford et al. 2001)。ラビリントウチラで観察された膜の構造体も、分解酵素や栄養分などの長い距離をより効率的に輸送するための機能があるのかもしれ

ない。また、真菌類では、菌糸の先端において、小胞がエキソサイトーシスされることで、タンパク質の細胞外分泌と、細胞壁と膜の供給が行われ、菌糸の伸長に貢献する (Harold 1997)。クロレラに付着した外質ネットの隆起した特徴的な形態は、分解酵素を特異的に基質に放出している可能性が考えられた。

5.2.4 外質ネットからの分解酵素の分泌と栄養摂取機構の仮説

外質ネットでは状況に応じて、餌となる基質の探索、基質の感知、分解酵素の分泌、栄養分の吸収といった様々な機能があると考えられた。そうした機能の変遷には、微細構造の形態とアクチンの局在性の変化が関わっている可能性が考えられた。そこで、外質ネットの機能に関して、以下のような仮説を立てた (Fig. 25)。まず、遊走細胞は着生し、栄養細胞になると、放射状に細い外質ネットを密に展開する。細胞体からは、付着性の物質が放出され、固着する。外質ネットが餌となる基質に付着すると、外質ネットを介して細胞は基質を感知し、外質ネットの形態を変化させる。外質ネットはさらに分岐を繰り返しながら、付着部との最短経路の外質ネットのみを残し、非結合の外質ネットは縮小していく。最終的に付着する外質ネットは太くなり、基質との付着部では、外質ネットが隆起する。外質ネット外に付着物質である繊維性の物質が放出され、基質との結合をより強固なものにしていく。その後、外質ネット内部では、膜状の構造の発達が見られ、分解酵素の分泌、および、栄養分の吸収が活発になる。このように外質ネットでは、これまで想定されていたよりも複雑な輸送系が存在する可能性が考えられた。

5.2.5 ボスロソームと外質ネットでの輸送系との関係性

本研究では、ラビリントチュラ類という生物群を特徴づける重要なオルガネラでありながら、基礎情報の不足していたボスロソームおよび外質ネットの基礎的な情報を付与することが出来た (Fig. 26)。ボスロソームは連続する小胞体以外のオルガネラとの関連性はこれまで未解明であったが、本研究のボスロソームの形成過程の観察から、ボスロソームとゴルジ体との関連性を導きだした。さらに、外質ネットや、ボスロソーム周辺にも局在していたアクチンは、免疫電子顕微鏡の観察から、ボスロソーム周辺の細胞質および、EDMB には局在せず、ボスロソームはアクチンの形成中心として機能しているわけではないということが明らかになった。また、アクチンは、外質ネットの長軸に沿って、基質に付着する外質ネットで強く局在しており、外質ネットの伸長だけではなく、内部の輸送にも関わっている可能性が考えられた。以上の結果からボスロソームとゴルジ体との関連性と、アクチンがボスロソームを介した物質輸送を担う運び手である可能性を示した。一方で、ボスロソームから展開される外質ネットにおいても、これまでとらえられてきたよりも多くの機能を有する構造であることが明らかになってきた。

外質ネットは、餌となる基質を認識し、形態を変え、最短経路で基質からの分解酵素の分泌、栄養分の吸収などを行う。それぞれの機能に併せて外質ネットの内部の形態は、多様な変化を遂げると考えられた。また、そうした物質の輸送は、双方向であり、外質ネットは、多様な物質を的確に目的地へと運ばな

くてはならない。内部の膜や小胞は、栄養分や分解酵素などの異なる分子を区切り、円滑な輸送系が実現するために尽力しているのかもしれない。こうした状況において、外質ネットと細胞体ではめまぐるしく物質のやり取りが行われることは想像するに容易いが、やはりここでも、ボスロソームを無視することは出来ない。なぜなら、全ての分子の輸送は、基部にあるボスロソームを通過して初めて実現されるからである。では、輸送の鍵となるボスロソームの機能とは一体何なのであろうか。生物に一般的な細胞外タンパク質輸送・分泌経路では、小胞体上のリボソームで合成されたタンパク質は、ゴルジ体で修飾を受けた後に、細胞外へ輸送されると説明されている。しかし、これまでの研究とボスロソームの形態的特徴から総合的に解釈すると、ラビリントウ類の分解酵素の分泌経路は、一般的な経路と異なった経路が存在する可能性が考えられる。ボスロソーム・外質ネットを含む周辺の膜系が、ゴルジ体の変形または、ゴルジ体の機能を有する特殊なオルガネラとして機能すると想定し、外質ネットからの細胞外分泌経路に関して、以下のような仮説を立てた；1) 細胞内のボスロソームと連続する小胞体によって、分解酵素などのタンパク質が合成される。2) ボスロソーム・外質ネットを含む周辺の膜系が、ゴルジ体の代わりとなり、酵素の修飾を行う。3) 酵素は、ボスロソームから外質ネットに局在するアクチンによって輸送され、小胞輸送系により、外質ネットから細胞外へ分泌される。実際にラビリントウ類の細胞内でこうした経路が存在するかどうかは定かではないが、他の生物の細胞内で小胞体で合成されたタンパク質がゴルジ体を経由せず輸送される経路は少数ではあるが、過去に報告されている。カボチャの種の成熟における貯蔵タンパク質では、ゴルジ体から独立した輸送に関

与している PAC (precursor-accumulating) 小胞が存在し、ゴルジ体をバイパスした輸送が知られている (Hara-Nishimura et al. 1998)。また、田中 (1984) は白癬菌 *Arthroderma vanbreuseghemii* の有性生殖過程において、細胞膜にある concentric membrane system (=lomasome 様構造) での炭化水素の集積、およびチアミンピロリン酸活性が局在することを示し、concentric membrane system が、高等植物におけるゴルジ体の機能を有し、細胞壁の生成と分泌への関与を示唆している。こうした例では、PAC 小胞や、concentric membrane system のように、ゴルジ体の代わりとなる構造が存在しており、ボスロソームもこれらの構造と同様に、ゴルジ体の機能を有する特殊なオルガネラとして機能している可能性は、十分に考えられる。また、本研究の結果から、*S. aggregatum* の分解酵素の分泌は、基質特異性があり、餌となる特定の基質存在下ではこれまで想定されていたよりも多量の分解酵素を分泌している可能性が考えられた。こうした大量の分解酵素を一度に分泌するために、ゴルジ体だけでは担えない合成系の一端をボスロソームが担うようになったのかもしれない。

5.3 ラビリントウ類の環境中での生存戦略に関する考察

5.3.1 カップ状構造と2重膜構造

本研究では、着生過程の細胞内で、カップ状の小胞が観察された。細胞内で小胞がカップ状の形態を示す有名な例としてオートファゴソームが挙げられる。

オートファジーの過程でみられるオートファゴソームは、二重膜の囊がくびれ、カップ状の形態をとることで、分解対象となる細胞質成分を包み込むが、そうした膜の形態形成には様々な因子が関わっている (Lamb et al. 2013; Reunanen et al. 1985)。ラビリントチュラ類のカップ状の形態も様々な因子の関わりによって形成されると考えられる。また、そうしたカップ状の形態は、最終的に細胞外へ放出されると考えられた。細胞外小胞 (EVs) は、原核生物などの生物から高等真核生物および植物に至る細胞によって進化的に保存された形態である (Yanez-Mo et al. 2015)。細胞が放出する EVs の内でも、エキソソーム (exosome) は、エンドソームネットワークから形成された多胞体 (MVBs) が細胞膜と融合することによって放出される 40~100 nm の小胞である (Harding et al. 1983 ; Pan et al. 1985 ; Raposo & Stoorvogel 2013 ; Yanez-Mo et al. 2015)。本研究で観察された細胞外に分泌されると考えられる 2 重膜の小胞は、約 100 nm の直径を示し、エキソソーム小胞と類似する形態ととらえることが出来る。また、EVs の機能は、他の細胞への情報を伝達し、受け取った細胞の機能に影響を及ぼす能力にあり、EVs は自身の細胞間の連絡だけではなく、他生物の細胞へのシグナルとしても用いられている (Yanez-Mo et al. 2015)。多くの寄生虫 (*Plasmodium* spp., *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma* spp., *Babesia* spp. など) を含むアピコンプレクサ類では、宿主と寄生虫との間の細胞間連絡における EVs の関わりが注目されている。*P. falciparum* および *P. vivax* での研究から、EVs が細胞間連絡として作用することが示されている (Regev-Rudzki et al. 2013; Mantel et al. 2013)。これらの研究では、両方の研究は、エキソソーム様小胞および微小胞が他の感染赤血球へ移動することで、配偶子形成を誘導し、

寄生虫に敵対的環境から逃れる経路を提供することを示唆している。本研究で、観察された小胞が多細胞への影響に関与するならば、以下のようなことが2つの仮説が想定される；1) 自身のクローン細胞へシグナルを送り、餌の存在を伝達する。2) 寄生的な栄養摂取を確立するために、餌となる細胞へ働きかける。ラビリントチュラ類での細胞間あるいは、他生物への連絡は今後解明していくべき課題ととらえられるだろう。

5.3.2 遊走細胞による走化性と外質ネットによる栄養源の探索

ラビリントチュラ類の生活史には、運動性のある遊走細胞世代が存在し、遊走細胞は特定の物質への走化性があることが知られている (Fan et al. 2002)。また、基質に対して細胞は、特定の領域から内部に侵入する様子が見られる (Clokic 1970)。同じ海藻表面でも、侵入しやすい“弱い”箇所があり、外質ネットによる感知システムは海藻表面でのより栄養摂取しやすい領域を探る働きがあると想像される。つまり、細胞は、餌から遠く離れているときには、走化性によって餌へと近づき、餌となる基質への付着が確立した後に、時には栄養摂取を行う部位を外質ネットの感知システムによって決定するのではないかと考えられた。

5.3.3 外質ネットからの分解酵素分泌と属ごとの生存戦略の違い

ラビリンチュラ類のセルラーゼの分泌には、基質による差がみられ、興味深いことに、藻類やアマモで顕著に高かった。CMC-コンゴレッド染色でセルラーゼ活性を計測した Bremer (1995) と Bremer & Talbot (1995) の研究から、*S. aggregatum* は、 β 1,4-glucanase を持つことが明らかになっているが、結晶性セルロースを分解できる酵素をもつかどうかは定かではない。本研究でセルラーゼ活性の見られなかったマングローブの落葉や、活性の低かったハウレンソウを含む陸上植物の細胞壁は、結晶性が高く、活性の高かった海藻類の細胞壁の構成成分では、セルロースの割合は低い上に純粋な β 1.4-グルカンであることはあまりなく、それらはキシロースなどの糖類を多く含む (Mackie & Preston 1974)。緑藻類では、乾燥重量でセルロースの割合は 70%であるが、紅藻や、褐藻類の含有比はより低い (Frei & Preston 1964; Kloareg & Quatrano 1988)。紅藻、緑藻では、ヘミセルロースを成分とするものもある。また、海藻では細胞壁成分として、それぞれの種で特色をもつ粘質多糖類を持つ。紅藻ではアガールやカラゲナン、フノランおよびポリフィランであり、褐藻には、アルギン酸やフコイダンがある (Kraan 2012; Raposo et al. 2015)。また、アマモは、低メチル化ペクチン (zosterin)、硫酸化多糖類を含む (Popper et al. 2011)。基質の感知においては、こうした陸上植物と海藻との細胞壁成分の違いも関わりがあるのかもしれない。また、前述したように、マングローブの葉は落葉すると、汽水にさらされて、葉に含まれる養分は溶脱される。しかしながら、海中で生育する海藻類では、こうした養分の溶脱は起こらないはずである。実際に、セルラーゼの活性の高い藻類やアマモを添加した培養条件での細胞数は低かった。おそらく、そうした基質は *S. aggregatum* の細胞にとって“食べにくい”餌なのであろう。つまり、

そうした基質から栄養分を取り入れるためには、細胞壁の積極的な分解は、必須であると考えられる。

一方で、ラビリンチュラ類は近年、有用物質（不飽和脂肪酸や抗酸化色素）の産生能力の高さが注目されている（e.g.; Ellenbogen et al. 1969; Bajpai et al. 1991; Bowles et al. 1999; Singh & Ward 1997）。こうした応用面で、最も知名度の高いラビリンチュラ類である *Aurantiochytrium* 属は、細胞内に高度不飽和脂肪酸を高濃度に蓄積する生物として有名になった。Yokoyama & Honda（2007）によって命名されたこの属の特徴は、“外質ネットを発達させない”ことである。同時に Nagano et al.（2009）が *Aurantiochytrium mangrovei* のセルラーゼ活性は見られないことを報告している。このことから、外質ネットによる分解酵素の分泌や、基質の感知などは行っていないのかもしれない。しかし、*Aurantiochytrium* 属は高増殖性を示し、培地中の糖を大量にかつ、迅速に取り込むことができる。本研究で観察された *S. aggregatum* のように外質ネットによる糖の吸収を使わず、*Aurantiochytrium* 属では、細胞体からの糖の吸収のみで他の種よりも高い増殖能力があると考えると、この種が非常に特殊であることをうかがわせる。*Aurantiochytrium* 属では壁が薄いことも、こうした能力の副産物としての形態を表しているのかもしれない（Yokoyama & Honda 2007）。こうしたラビリンチュラ類内での外質ネットの形態は、属ごとによって差があることは経験的に知られている。外質ネットとボスロソームが外界からの栄養摂取に密接に関わっていることから推測するに、こうした違いは生態中での生存戦略を表している可能性がある。ラビリンチュラ類では、同じ場所でも季節変動が見られ、外界の環境によって棲み分けが起こっていることが示唆されている（Ueda et al. 2015）。

実際に、*Aurantiochytrium* 属が良く分離されるマングローブ域は、落葉による恒常的な有機物の供給がある富栄養な海域であり、特定の基質の認識よりも、海水中に溶出した有機物を効率的に吸収した方が、有利だと考えられる。外質ネットの展開度、基質の認識機構など、ラビリンチュラの細胞学からのアプローチが、ラビリンチュラ類の海洋生態系での分解者としての役割の理解を進めることに繋がるかもしれない。

5.4 ラビリンチュラ類利用に関する新たな可能性

セルラーゼ活性測定の標準培地である CMC + 栄養培地の活性は、セルロースを含まない d-GPY 培地でのセルラーゼ活性とほぼ同等であったことから、細胞は CMC をセルラーゼ分泌のための基質と認識していない可能性が考えられた。これまでも、ラビリンチュラ類でのセルラーゼの測定は行われているが、もしかすると、生物学的なセルラーゼ分泌のポテンシャルはこれまで想定されていた物よりも高い可能性がある。

ラビリンチュラ類が、高濃度の脂質を蓄積する生物学的意味の1つの可能性として外質ネットの展開があるのではないかと考えられる。リン脂質から構成される外質ネットを広大な面積に恒常的に作り出すためには、相当な栄養源が必要だと考えられる。つまり、外質ネットを展開すればするほど、細胞は脂質を消費していくはずである。ラビリンチュラ類による脂質蓄積は、今後も検討

が進められていく大きな課題である。そのための遺伝子操作では、外質ネットの形態にも着目点としてあげられるだろう。

5.5 本研究の意義と将来展望

ラビリンチュラ類は、産業応用や、生態学的な重要性などから、世界各地で研究が行われ、近年は遺伝子操作なども可能となっている。それにも関わらず、本生物の形態観察の技術蓄積は未熟であり、特定遺伝子産物の局在解析は十分に進んではない。しかしながら、今後のラビリンチュラ学を進展させるためには細胞学は必要である。本研究では、これまでラビリンチュラ研究においては細胞学は必要である。本研究では、これまでラビリンチュラ研究において不足している形態学的知識を提供しただけでなく、さらに、ラビリンチュラ類において分子生物学と形態観察を統合した「分子細胞生物学」を実施する上で、基盤として必要になる免疫電子顕微鏡法の立ち上げに成功した。さらに、現在の生物学において、これまでの知見を多様な角度から再検証するためにも、モデル生物以外を対象とした研究は重要であり、ラビリンチュラ類は、既存のモデル生物とは系統的に離れているだけでなく、培養や実験操作も容易で単純な形態をしていることなどから、再検証に適しているばかりか、新たなモデル生物としても大いに期待できる。実際に、本研究の観察から、パラヌクリアーボディは祖先的なストラメノパイル生物群で共通した形態であることを示しており、ラビリンチュラ類では、栄養細胞でパラヌクリアーボディの発達が見られている。パラヌクリアーボディは、マイクロボディとの相同であるといった主

張も存在するが、その真偽は明らかではない。ラビリンチュラ類での生物学的な研究が容易になることで、例えばパラヌクリアーボディのように、原生生物で観察されるオルガネラの研究が容易になり、真核生物での細胞学がより進歩することが期待できる。その中で、本研究においてラビリンチュラ類での分泌機構の解明から、ボスロソームと外質ネットの機能解明は、生物学の常識と思われているオルガネラの機能の再認識に迫ると同時に、原生生物における細胞学の第一歩として位置づけられると考えている。

謝辞

博士学位論文の作成にあたり、懇切丁寧なご指導を賜りました甲南大学 理工学部 生物学科 本多大輔 教授に心より深謝申し上げます。著者が同大学 理工学部 生物学科 4 回生の卒業研究から、同大学大学院自然科学研究科 生物学専攻 修士課程、同大学大学院 自然科学研究科 生命・機能科学専攻 博士後期課程に在学中の 6 年間、本多大輔 教授の指導のもとで研究を行いました。時に厳しく、時に優しく、研究者としてのあり方を、常に研究への情熱を持って指導いただきました。そうしたご指導のおかげで、研究者として大きく成長することが出来、今日、博士学位論文の完成に至ることができました。

また、以下に名前を挙げさせて頂く方々のご尽力があり、学位を取ることが出来、研究者としての第一歩を踏み出すことができました。本論文をご精読いただき貴重なコメントをいただきました、甲南大学 理工学部 生物学科 西村いくこ 教授、日下部岳広 教授、渡辺洋平 准教授、久原篤 准教授、同大学 理工学部 機能分子化学科 茶山健二 教授、村上良 准教授に深く感謝いたします。タンパク質実験や電子顕微鏡技術に関するご指導、ご協力を初めとして、研究全体を通してあらゆる面からご助言とご指導をいただきました、佐賀大学 低平地沿岸海域研究センター 木村圭 講師ならびに、瀬戸内海区水産研究所 環境保全研究センター 有害・有毒藻類グループ 外丸裕司 主任研究員に深く感謝いたします。セントリン抗体を分譲いただき、タンパク質実験操作に関してご助言、ご指導をいただきました 北海道大学 北方生物圏フィールド科学センター 室蘭臨海実験所 本村泰三 教授に深く感謝いたします。賦活化による免疫電子顕

微鏡法について、技術指導、ご助言をいただきました 広島大学 自然科学研究支援開発センター 遺伝子実験部門 小池香苗 氏、広島大学大学院 生物圏科学研究科 小池一彦 教授に深く感謝いたします。急速凍結置換法、および電子顕微鏡操作に関して技術指導、ご助言をいただきました奈良先端科学技術大学院大学 監事、奈良女子大学 名誉教授 野口哲子 先生、奈良女子大学 理学部 鈴木玲子 氏に深く感謝いたします。セルラーゼ活性測定法について、技術指導、ご助言をいただきました、宮崎大学 農学部 海洋生物環境学科 田岡洋介 准教授に深く感謝いたします。また、共に研究に励んできた系統分類学研究室のすべての皆様に感謝いたします。

最後に、私の研究者としての理想であり続けてくれた父と、いつも笑顔で優しく見守ってくれた母、そして、変わらず私を信じ、支えてくださった家族に、心より深謝いたします。なお、本研究の一部は笹川科学研究助成（研究番号：27-745，平成27年度）によって行われました。

引用文献

- Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J and others (2012) The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59(5):429–493
- Alderman DJ, Harrison JL, Bremer GB, Jones EBG (1974) Taxonomic revisions in the marine biflagellate fungi: the ultrastructural evidence. *Mar Biol* 25:345–357
- Andersen RA (1991) The cytoskeleton of chromophyte algae. *Protoplasma* 164:143–159
- Andersen RA, Saunders GW, Paskind MP, Sexton JP (1993) Ultrastructure and 18S rRNA gene sequence for *Pelagomonas calceolata* gen. et sp. nov. and the description of a new algal class, the Pelagophyceae Classis nov. *J Phycol* 29(5):701–715
- Andersen RA, Wetherbee R (1992) Microtubules of the flagellar apparatus are active during prey capture in the chrysophycean alga *Epipyxis pulchra*. *Protoplasma* 166(1):8–20
- Anderson OR, Cavalier-Smith T (2012) Ultrastructure of *Diplophrys parva*, a new small freshwater species, and a revised analysis of Labyrinthulea (Heterokonta). *Acta Protozool* 51(4):291–304
- Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, Yano TA, Hasegawa M (2002) Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J Eukaryot Microbiol* 49(1):42–53

- Ashford AE, Cole L, Hyde GJ (2001) Motile tubular vacuole systems. In *The Mycota VIII: Biology of the Fungal Cell*, ed. R. J. Howard & N. A. R. Gow. Berlin: Springer-Verlag, pp. 243–265.
- Azevedo C, Corral L (1997) Some ultrastructural observations of a thraustochytrid (Protoctista, Labyrinthulomycota) from the clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis Aquat Org* 31(1):73–78
- Bahnweg G, Jäckle I (1986) A new approach to taxonomy of the Thraustochytriales and Labyrinthulales. In: Moss S.T. (ed.): *The Biology of Marine Fungi*. pp.131–140. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bajpai PK, Bajpai P, Ward OP (1991) Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC34304. *J Amer Oil Chem Soc* 68(7):509–514
- Baker JRJ, Evans LV (1973) The ship fouling alga *Ectocarpus* I. Ultrastructure and cytochemistry of plurilocular reproductive stages. *Protoplasma* 77(1):1–13
- Barr DJS, Allan PME (1985) A comparison of the flagellar apparatus in *Phytophthora*, *Saprolegnia*, *Thraustochytrium*, and *Rhizidiomyces*. *Can J Bot* 63(1):138–154
- Barr DJS, Désaulniers NL (1989) The flagellar apparatus in zoospores of *Phytophthora sojae* f.sp. *glycines* and *P. megasperma*. *Can J Bot* 67(6):1916–1926
- Bartnicki-Garcia S (1996) The hypha: unifying thread of the fungal kingdom. A *Century of Mycology* (ed. by B. C. Sutton), pp. 105–133. Cambridge

University Press, Cambridge.

Bell E, Sher S, Solomon D, Nakatsuji N (1978) *Labyrinthula* cells and matrix: An interacting motile system. *Biol Bull* 155: 428

Ben Ali A, De Baere R, De Wachter R, Van de Peer Y (2002) Evolutionary relationships among heterokont algae (the autotrophic stramenopiles) based on combined analyses of small and large subunit ribosomal RNA. *Protist* 153(2):123–132

Boddy L (1993) Saprotrophic cord-forming fungi: warfare strategies and other ecological aspects. *Mycol Res* 97(6): 641–655

Boles E, Hollenberg CP (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 21(1): 85–111

Bongiorni L, Pusceddu A, Danovaro R (2005) Enzymatic activities of epiphytic and benthic thraustochytrids involved in organic matter degradation. *Aquat Microb Ecol* 41(3):299–305

Bortnick RN, Powell MJ, Bangert TN (1985) Zoospore fine structure of the parasite *Olpidiopsis saprolegniae* variety *Saprolegniae* (Oomycetes, Lagenidiales). *Mycologia* 77(6):861–879

Bower SM (1987) *Labyrinthuloides haliotidis* n.sp. (Protozoa: Labyrinthomorpha), a pathogenic parasite of small juvenile abalone in a British Columbia mariculture facility. *Can J Zool* 65(8):1996–2007

Bower SM, Mclean N, Whitaker DJ (1989) Mechanism of infection by

- Labyrinthuloides haliotidis* (Protozoa: Labyrinthomorpha), a parasite of abalone (*Haliotis kamtschatkana*) (Mollusca: Gastropoda). *J Invertebr Pathol* 53(3):401–409
- Bowles RD, Hunt AE, Bremer GB, Duchars MG, Eaton RA (1999) Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production. *J Biotechnol* 70(1–3):193–202
- Bremer GB (1995) Lower marine fungi (labyrinthulomycetes) and the decay of mangrove leaf litter. *Hydrobiologia* 295(1):89–95
- Bremer GB, Talbot G (1995) Cellulolytic enzyme activity in the marine protist *Schizochytrium aggregatum*. *Bot Mar* 38:37–41
- Callow JA, Callow ME (2006) The *Ulva* spore adhesive system. In: Smith, AM, Callow JA (eds) *Biological Adhesives*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 63–78
- Carrasco S, Meyer T (2011) STIM proteins and the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Annu Rev Biochem* 80:973–1000
- Cavalier-Smith T, Karpov SA (2012) *Paracercomonas* kinetid ultrastructure, origins of the body plan of Cercomonadida, and cytoskeleton evolution in Cercozoa. *Protist* 163(1):47–75
- Chamberlain AHL (1980) Cytochemical and ultrastructural studies on the cell walls of *Thraustochytrium* spp. *Bot Mar* 23(11): 669–677

- Chamberlain AHL, Moss ST (1988) The thraustochytrids: a protist group with mixed affinities. *Biosystems* 21(3-4):341-349
- Cheng R, Ma R, Li K, Rong H, Lin X, Wang Z, Yang S, Ma Y (2012) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Microbiol Res* 167(3):179-186
- Clokie J (1970) Some substrate relationships of the family Thraustochytriaceae. *Veröff Inst Meeresforschung Bremerh* 12:329-351
- Cole L, Orlovich DA, Ashford AE (1998) Structure, function, and motility of vacuoles in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 24(1-2): 86-100
- Coleman NK, Vestal JR (1987) An epifluorescent microscopy study of enzymatic hydrolysis of fluorescein diacetate associated with the ectoplasmic net elements of the protist *Thraustochytrium striatum*. *Can J Microbiol* 33(10):841-843
- Darley WM, Porter D, Fuller MS (1973) Cell wall composition and synthesis via Golgi-directed scale formation in the marine eukaryote, *Schizochytrium aggregatum*, with a note on *Thraustochytrium* sp. *Arch Mikrobiol* 90(2): 89-106
- Daugbjerg N, Andersen RA (1997) A molecular phylogeny of the heterokont algae based on analyses of chloroplast-encoded *rbcL* sequence data. *J Phycol* 33(6):1031-1041
- Dean RA (1997) Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 35: 211-234

- DeMali KA, Burridge K (2003) Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J Cell Sci* 116(12):2389–2397
- Dick MW ed (2001) Including Accounts of the Marine Straminipilous Protists, the Plasmodiophorids, and Similar Organisms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Dietz C, Schnetter R (1999) Interaction of two myosins with microfilaments causes locomotion in *Labyrinthula* sp. *Protoplasma*, 206:97–104
- Dykstra MJ, Olive LS (1975) *Solodiplophrys*: an usual sorocarp-producing protist. *Mycologia* 67: 873–879
- Dykstra MJ, Porter D (1984) *Diploph marina*, a new scale-forming marine protist with labyrinthulid affinities. *Mycologia* 76(4): 626–632
- Ellenbogen BB, Aaronson S, Goldstein S, Belsky M (1969) Polyunsaturated fatty acids of aquatic fungi: possible phylogenetic significance. *Comp Biochem Physiol* 29: 805–811
- Evans LV, Christie AO (1970) Studies on the ship-fouling alga *Enteromorpha*. I. Aspects of the fine structure and biochemistry of swimming and newly settled zoospores. *Ann Bot* 34:451–466
- Fan KW, Vrijmoed LLP, Jones EBG (2002) Zoospore chemotaxis of mangrove thraustochytrids from Hong Kong. *Mycologia* 94(4):569–578
- Feldman JL, Geimer S, Marshall WF (2007) The mother centriole plays an instructive role in defining cell geometry. *PLoS Biol* 5(6):e149

- Fell JW, Master IM (1980) The association and potential role of fungi in mangrove detrital systems. *Bot Mar* 23: 257–263
- Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(10):3681–3686
- Frank U, Rabinowitz C, Rinkevich B (1994) In vitro establishment of continuous cell cultures and cell lines from ten colonial cnidarians. *Mar Biol* 120:491–499
- Frei E, Preston RD (1964) Non-cellulosic structural polysaccharides in algal cell wall. II. Association of xylan and mannan in *Porphyra umbilicalis*. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 160, pp. 314–327
- Goldstein S, Moriber L, Hershenov B (1964) Ultrastructure of *Thraustochytrium aureum*, a biflagellate marine phycomycete. *Mycologia* 56:897–904
- Gomaa F, Mitchell EAD, Lara E (2013) Amphitremida (Poche, 1913) is a new major, ubiquitous labyrinthulomycete clade. *Plos One* 8(1): e53046
- Grove SN, Bracker CE (1978) Protoplasmic changes during zoospore encystment and cyst germination in *Pythium aphanidermatum*. *Exp Mycol* 2:51–98
- Hara-Nishimura I, Shimada T, Hatano K, Takeuchi Y, Nishimura M (1998) Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* 10:825–836
- Hardham A, Gubler F (1990) Polarity of attachment of zoospores of a root pathogen and pre-alignment of the emerging germ tube. *Cell Biol Int Rep*

14(11):947–956

Hardham AR (2007) Cell biology of plant-oomycete interactions. *Cell Microbiol* 9(1):31–39

Harding C, Heuser J, Stahl P (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97:329–339

Harold FM (1997) How hyphae grow: morphogenesis explained? *Protoplasma* 197:137–147

Harrison JL, Jones EBG (1974a) Ultrastructural aspects of the marine fungus *Japtonochytrium* sp. *Arch Microbiol* 96: 305–317

Harrison JL, Jones EBG (1974b) Ultrastructural observations on the formation of zoospores in *Thraustochytrium kinnei* Gaertner. *Trans Mycol Soc Japan* 15: 273–288

Harrison JL, Jones EBG (1974c) Zoospore discharge in *Thraustochytrium striatum*. *Trans Br Mycol Soc* 62(2):283–288

Heath IB (1987) Preservation of a labile cortical array of actin filaments in growing hyphal tips of the fungus *Saprolegnia ferax*. *Eur J Cell Biol* 44:10–16

Heath IB (1995) The cytoskeleton. *The Growing Fungus* (ed. by N. A. Gow and G. M. Gadd), pp. 99–134. Chapman & Hall, London.

- Hemmes DE, Hohl HR (1971) Ultrastructural aspects of encystation and cyst-germination in *Phytophthora parasitica*. J Cell Sci 9:175–191
- Henry EC, Cole KM (1982) Ultrastructure of swarmers in the Laminariales (Phaeophyceae). I. Zoospores. J Phycol 18:550–569
- Hoch HC, Mitchel JE (1972) The ultrastructure of zoospores of *Aphanomyces euteiches* and of their encystment and subsequent germination. Protoplasma 75(1):113–138
- Honda D, Kawaichi M, Inouye I (1995) *Sulcochrysis biplastida* gen. et sp. nov.: Cell structure and absolute configuration of the flagellar apparatus of an enigmatic chromophyte alga. Phycol Res 43(1):1–16
- Honda D, Yokochi T, Nakahara T, Raghukumar S, Nakagiri A, Schaumann K, Higashihara T (1999) Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene. J Eukaryot Microbiol 46(6):637–647
- Inouye I, Hara Y, Chihara M (1992) Further observations on *Olisthodiscus luteus* (Raphidophyceae, Chromophyta): the flagellar apparatus ultrastructure Jpn J Phycol 40:333–348
- Islam MT (2008) Dynamic rearrangement of F-actin organization triggered by host-specific plant signal is linked to morphogenesis of *Aphanomyces cochlioides* zoospores. Cell Motil Cytoskeleton 65:553–562
- Jones EBG, Alderman DJ (1971) *Althornia crouchii* gen. et sp. nov., a marine biflagellate fungus. Nova Hedwigia 21: 381–399

- Jones GM, O'Dor RK (1983) Ultrastructural observations on a thraustochytrid fungus parasitic in the gills of squid (*Illex illecebrosus* LeSueur). *J Parasitol* 69(5): 903–911
- Karpov SA, Sogin ML, Silberman JD (2001) Rootlet homology, taxonomy, and phylogeny of bicosoecids based on 18S rRNA gene sequences. *Protistology* 2(1):34–47
- Kazama F (1972a) Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. zoospores I. Kinetosome. *Arch Mikrobiol* 83:179–188
- Kazama FY (1972b) Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. zoospores II. Striated Inclusions. *J Ultra Res* 41:60–66
- Kazama F (1972c) Development and morphology of a chytrid isolated from *Bryopsis plumosa*. *Can J Bot* 50: 499–505
- Kazama F (1973) Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. zoospores. III. Cytolysome and acid phosphatase distribution. *Arch Mikrobiol* 89:95–104
- Kazama FY (1974a) Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. Zoospores. IV. External morphology with notes on the zoospores of *Schizochytrium* sp. *Mycologia* 66: 272–280
- Kazama FY (1974b) The ultrastructure of nuclear division in *Thraustochytrium* sp. *Protoplasma* 82: 155–175
- Kazama FY (1975) Cytoplasmic cleavage during zoosporogenesis in *Thraustochytrium* sp.: ultrastructure and the effects of colchicine and D₂O.

J Cell Sci 17:155–170

Kimura H, Fukuba T, Naganuma T (1999) Biomass of thraustochytrid protoctists in coastal water. *Mar Ecol Prog Ser* 189:27–33

Kloareg B, Quatrano RS (1988) Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 26: 259–315

Kraan S (2012) Algal polysaccharides, novel applications and outlook. In *Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*; InTech: Rijeka, Croatia, Chapter 22, pp. 489–524

Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 759–774

Leander CA, Porter D, Leander BS (2004) Comparative morphology and molecular phylogeny of aplanochytrids (Labyrinthulomycota). *Europ J Protistol* 40:317–328

Leaño EM (2001) Straminipilous organisms from fallen mangrove leaves from Panay Island, Philippines. *Fungal Diversity* 6: 75-81.

Leaño EM, Damare V (2012) Labyrinthulomycota. In Gareth JEB and Pang K (eds) *Marine and fungal-like organisms*, De Gruyter, Germany., pp 215–243

Lehnen Jr LP, Powell MJ (1989) The role of kinetosome-associated organelles in the attachment of encysting secondary zoospores of *Saprolegnia ferax* to

substrates. *Protoplasma* 149:163–174

Leipe DD, Tong SM, Goggin CL, Slemenda SB, Pieniazek NJ, Sogin ML (1996) 16S-like rDNA sequences from *Developayella elegans*, *Labyrinthuloides haliotidis*, and *Proteromonas lacerate* confirm that the stramenopiles are a primarily heterotrophic group. *Europ J Protistol* 32:449–458

Leipe DD, Wainright PO, Gunderson JH, Porter D, Patterson DJ, Valois F, Himmerich S, Sogin ML (1994) The stramenopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from *Labyrinthuloides minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. *Phycologia* 33(5):369–377

Lovett JS (1968) Reactivation of ribonucleic acid and protein synthesis during germination of *Blastocladia* zoospores and the role of the ribosomal nuclear cap. *J Bacteriol* 96(4):962–969

Mackie W, Preston RD (1974) Cell wall and intercellular region polysaccharides. In *Algal Physiology and Biochemistry* (Ed. W.D.P. Stewart), Blackwell Sci. Publ., Oxford, pp. 40–85

Maier A, Völker B, Boles E, Fuhrmann GF (2002) Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Res* 2:539–550

Mantel PY, Hoang AN, Goldowitz I, Potashnikova D, Hamza B, Vorobjev I, Ghiran I, Toner M, Irimia D, Ivanov AR, Barteneva N, Marti M (2013) Malaria infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune

- system. *Cell Host Microbe* 13(5):521–534
- Massana R, Castresana J, Balagué V, Guillou L, Romari K, Groisillier A, Valentin K, and Pedrós-Alió C (2004) Phylogenetic and ecological analysis of novel marine stramenopiles. *Appl Environ Microbiol* 70(6):3528–3534
- McLean N, Porter D (1982) The yellow-spot disease of *Tritonia diomedea* Bergh, 1894 (Mollusca: Gastropoda: Nudibranchia): Encapsulation of the thraustochytriaceous parasite by host amoebocytes. *J Parasitol* 68(2):243–252
- Melkonian M (1980) Ultrastructural aspects of basal body associated fibrous structures in green algae: a critical review. *Biosystems* 12(1-2):85–104
- Melkonian M (1982) Structural and evolutionary aspects of the flagellar apparatus in green algae and land plants. *Taxon* 31(2):255–265
- Moestrup Ø (1982) Flagellar structure in algae: a review, with new observations particularly on the Chrysophyceae, Phaeophyceae (Fucophyceae), Euglenophyceae and Reckertia. *Phycologia* 21:427–528
- Moestrup Ø (2000) The flagellate cytoskeleton: introduction of a general terminology for microtubular flagellar roots in protists. *The Flagellates, Unity, Diversity and Evolution*. London & New York : Taylor, 2000. p. 69-94.
- Morita E, Kumon Y, Nakahara T, Kagiwada S, Noguchi T (2006) Docosaehaenoic acid production and lipid-body formation in *Schizochytrium limacinum* SR21. *Mar Biotechnol* 8:319–327
- Moriya M, Nakayama T, Inouye I (2002) Ultrastructure and 18S rDNA sequence

- analysis of *Wobblia lunata* gen. et sp. nov., a new heterotrophic flagellate (Stramenopiles, *Incertae sedis*). Protist 151:41–55
- Moriya M, Nakayama T, Inouye I (2000) A new class of the stramenopiles, Placididea Classis nova: description of *Placidia cafeteriopsis* gen. et sp. nov. Protist 153:143–156
- Moss ST (1980) Ultrastructure of the endomembrane – sagenogenetosome – ectoplasmic net complex in *Ulkenia visurgensis* (Thraustochytriales). Bot mar 23:73–94
- Moss ST (1985) An ultrastructural study of taxonomically significant characters of the Thraustochytriales and the Labyrinthulales. Bot J Linn Soc 91:329–357
- Moss ST (1986) Biology and phylogeny of the Labyrinthulales and Thraustochytriales. In S. T. Moss (Ed.), The Biology of Marine Fungi, pp. 105–129. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.
- Motomura T (1989) Ultrastructural study of sperm in *Laminaria angustata* (Laminariales, Phaeophyta), especially on the flagellar apparatus. Jpn J Phycol 37:105–116
- Nagano N, Matsui S, Kuramura T, Taoka Y, Honda D, Hayashi M (2011) The distribution of extracellular cellulase activity in marine eukaryotes, thraustochytrids. Mar Biotechnol 13:133–136
- Naganuma T, Takasugi H, Kimura H (1998) Abundance of thraustochytrids in coastal plankton. Mar Ecol Prog Ser 162:105–110

- Nakatsuji N, Bell E (1980) Control by calcium of the contractility of *Labyrinthula* slimeways and of the translocation of *Labyrinthula* cells. *Cell Motility* 1:17–29
- Nakatsuji N, Nakatsuji T, Bell E (1981) Formation of whirling aggregates by *Labyrinthula* vegetative cells. *Exp Cell Res* 131: 412–417
- O’Kelly CJ, Patterson DJ (1996) The flagellar apparatus of *Cafeteria roenbergensis* Fenchel & Patterson, 1988 (Bicosoecales = Bicosoecida). *Europ J Protistol* 32:216–226
- Olive LS (1975) *The Mycetozoans*. Academic Press, New York, pp 215–292
- Oliveira L, Walker DC, Bisalputra T (1980) Ultrastructural, cytochemical, and enzymatic studies on the adhesive "plaques" of the brown algae *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. and *Nereocystis luetkeana* (Nert.) Post. et Rupr. *Protoplasma* 104:1–15
- Özcan S, Johnston M (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(3):554–569
- Page FC (1987) The classification of 'naked' amoebae (Phylum Rhizopoda). *Arch Protistenkd* 133:199–217
- Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101:942–948
- Patterson DJ (1989) Stramenopiles: chromophytes from a protistan perspective.

In Green JC, Leadbeater BSC, Diver WI (eds) The chromophyte algae: problems and perspectives. Systematic Association Special, Vol. 38. Clarendon Press, Oxford, pp 357–379

Peberdy JF (1994) Protein secretion in filamentous fungi - trying to understand a highly productive black box. Trends Biotechnol 12:50–57

Perkins FO (1972) The ultrastructure of holdfasts, “rhizoids” and “slime tracks” in traustochytriaceous fungi and in *Labyrinthula* spp. Arch Microbiol 84:95–118

Perkins FO (1973a) Observations of thraustochytriaceous (Phycomycetes) and labyrinthulid (Rhizopodea) ectoplasmic nets on natural and artificial substrates—an electron microscope study. Can J Bot 51:485–491

Perkins FO (1973b) A new species of marine Labyrinthulid *Labyrinthuloides yorkensis* gen. nov. spec. nov. – cytology and fine structure. Arch Mikrobiol 90: 1–17

Perkins FO (1976) Fine structure of lower marine and estuarine fungi. In : (Ed., Jones, E. B. G.), Recent Advances in Aquatic Mycology. pp. 279–312. Elek Science. London.

Perkins FO, Amon JP (1969) Zoosporulation in *Labyrinthula* sp.; an electron microscope study. J Protozool 16(2):235–257

Pokorny KS (1967) *Labyrinthula*. J Protozool 14(4):697–708

Popper ZA, Michel G, Hervé C, Domozych DS, Willats WG, Tuohy MG, Kloareg

- B, Stengel DB (2011) Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annu Rev Plant Biol* 62: 567–590
- Porter D (1969) Ultrastructure of *Labyrinthula*. *Protoplasma* 67:1–19
- Porter D (1972) Cell division in the marine slime mold, *Labyrinthula* sp., and the role of the bothrosome in extracellular membrane production. *Protoplasma* 74:427–448
- Porter D (1990) Phylum Labyrinthulomycota. In: Margulis L, Corlis JO, Melconian M, Chapman DJ (eds) *Handbook of Protoctista*. Jones and Bartlett, Boston, pp 388–398
- Preston TM, King CA (2005) Actin-based motility in the net slime mould *Labyrinthula*: evidence for the role of myosin in gliding movement. *J Eukaryot Microbiol* 52(6):461–475
- Preston TM, King CA (1996) Strategies for cell-substratum dependent motility among protozoa. *Acta Protozool* 35:3–12
- Raghukumar S (1982a) Fine structure of the thraustochytrid *Ulkenia amoeboidea*. I. Vegetative thallus and formation of the amoeboid stage. *Can J Bot* 60(7):1092–1102
- Raghukumar S (1982b) Fine structure of the thraustochytrid *Ulkenia amoeboidea*. II. The amoeboid stage and formation of zoospores. *Can J Bot* 60(7):1103–1114
- Raghukumar C, Nagarkar S, Raghukumar S (1992) Association of thraustochytrids

- and fungi with living marine algae. *Mycol Res* 96(7):542–546
- Raghukumar S (2002) Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids). *Europ J Protistol* 38:127–145
- Raghukumar S, Anil AC, Khandeparker L, Patil JS (2000) Thraustochytrid protists as a component of marine microbial films. *Mar Biol* 136:603–609
- Raghukumar S, Raghukumar C (1999) Thraustochytrid fungoid protists in faecal pellets of the tunicate *Pegea confoederata*, their tolerance to deep-sea conditions and implication in degradation processes. *Mar Ecol Prog Ser* 190:133–140
- Raghukumar S, Sathe-Pathak V, Sharma S, Raghukumar C (1995) Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. III. Field studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora apiculata*. *Aquat Microb Ecol* 9:117–125
- Raghukumar S, Sharma S, Raghukumar C, Sathe-Pathak V, Chandramohan D (1994) Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. IV. Laboratory studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora apiculata* Blume. *J Exp Mar Biol Ecol* 183:113–131
- Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Bio* 200(4):373–383
- Raposo MFJ, Morais AMB, Morais RMSC (2015) Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar Drugs* 13: 2967–3028

- Rees B, Shepherd VA, Ashford AE (1994) Presence of a motile tubular vacuole system in different phyla of fungi. *Mycol Res* 98(9): 985–992
- Regev-Rudzki N, Wilson DW, Carvalho TG, Sisquella X, Coleman BM, Rug M, Bursac D, Angrisano F, Gee M, Hill AF, Baum J, Cowman AF (2013) Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell* 153:1120–1133
- Reifenberger E, Freidel K, Ciriacy M (1995) Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol Microbiol* 16(1):157–167
- Reunanen H, Punnonen EL, Hirsimäki P (1985) Studies on vinblastine-induced autophagocytosis in mouse liver. V. A cytochemical study on the origin of membranes. *Histochemistry* 83:513–517
- Revenu C, Athman R, Robine S, Louvard D. (2004) The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(8):635–646
- Riisberg I, Orr RJS, Kluge R, Shalchian-Tabrizi K, Bowers HA, Patil V, Edvardsen B, Jakobsen KS (2009) Seven gene phylogeny of heterokonts. *Protist* 160(2):191–204
- Sakaguchi K, Matsuda T, Kobayashi T, Ohara J, Hamaguchi R, Abe E, Nagano N, Hayashi M, Ueda M, Honda D, Okita Y, Taoka Y, Sugimoto S, Okino N, Ito M. (2012) Versatile transformation system that is applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for Thraustochytrids. *Appl Environ Microbiol* 78(9):3193–3202

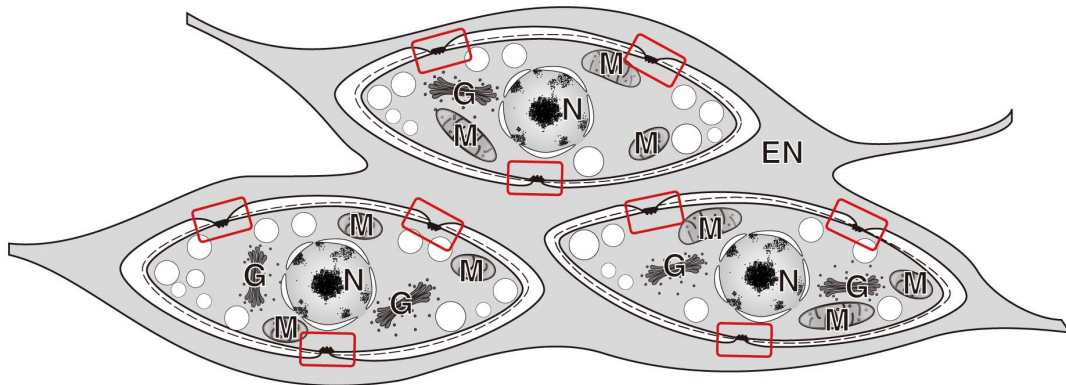
- Santos LMA, Leedale GF (1991) *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae): ultrastructure of the zoospores, with special reference to the flagellar apparatus. *Protoplasma* 164:160–167
- Sathe-Pathak V, Raghukumar S, Raghukumar C, Sharma S (1993) Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. I – Field studies on decomposition of the brown alga *Sargassum cinereum* J. Ag. *Indian J Mar Sci* 22:159–167
- Schnepf E, Deichgräber G, Drebes G (1978) Development and ultrastructure of the marine, parasitic Oomycete, *Lagenisma coscinodisci* Drebes (*Lagenidiales*): formation of the primary zoospores and their release. *Protoplasma* 94(3):263–280
- Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG (1996) Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 380:398
- Sing VO, Bartnicki-Garcia S (1975) Adhesion of *Phytophthora palmivora* zoospores: electron microscopy of cell attachment and cyst wall fibril formation. *J Cell Sci* 18(1):123–132
- Singh A, Ward OP (1997) Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6). *Adv Appl Microbiol* 45: 271–312
- Small JV, Stradal T, Vignal E, Rottner K (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 12(3):112–120
- Sprey B (1988) Cellular and extracellular localization of endocellulase in *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol Lett* 55:283–294

- Staelin LA (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* 11(6):1151–1165
- Stefan CJ, Manford AG, Emr SD (2013) ER-PM connections: sites of information transfer and inter-organelle communication. *Curr Opin Cell Biol* 25(4):434–442
- Steinberg G, Fucus U (2004) The role of microtubules in cellular organization and endocytosis in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *J Microsc* 214(Pt2):114–123
- Stey H (1968) Nachweis eines bisher unbekanntes Organells bei *Labyrinthula*. *Z Naturforsch* 23b:567
- Takahashi Y, Yoshida M, Inouye I, Watanabe MM (2014) *Diplophrys mutabilis* sp. nov., a new member of Labyrinthulomycetes from freshwater habitats. *Protist* 165:50–65
- Taoka Y, Nagano N, Okita Y, Izumida H, Sugimoto S, Hayashi M (2009) Extracellular enzymes produced by marine eukaryotes, thraustochytrids. *Biosci Biotechnol Biochem* 73(1):180–182
- Teal TH, Guillemette T, Chapman M, Margulis L (1998) *Acronema sippewissettensis* gen. nov. sp. nov., microbial mat bicosoecid (Bicosoecales = Bicosoecida). *Europ J Protistol* 34(4):402–414
- Tong SM (1995) *Developayella elegans* nov. gen., nov. spec., a new type of heterotrophic flagellate from marine plankton. *Europ J Protistol* 31(1):24–31

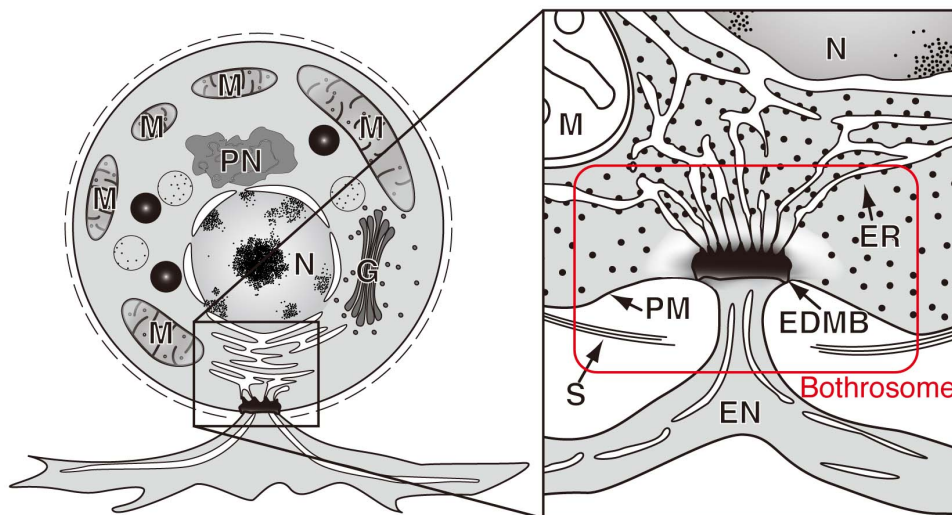
- Tsui CKM, Marshall W, Yokoyama R, Honda D, Lippmeier JC, Craven KD, Peterson PD, Berbee ML (2009) Labyrinthulomycetes phylogeny and its implications for the evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Mol Phylogenet Evol* 50(1):129–140
- Tucker SL, Talbot NJ (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 39:385–417
- Ueda M, Momura Y, Doi K, Nakajima M, Honda D (2015) Seasonal dynamics of culturable thraustochytrids (Labyrinthulomycetes, Stramenopiles) in estuarine and coastal waters. *Aquat Microb Ecol* 74:184–204
- Van de Peer Y, Van der Auwera G, De Wachter R (1996) The evolution of stramenopiles and alveolates as derived by "substitution rate calibration" of small ribosomal subunit RNA. *J Mol Evol* 42(2):201–210
- Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA (2002) Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* 3(10):944–950
- Watson SW, Raper KB (1957) *Labyrinthula minuta* sp. nov. *J Gen Microbiol* 17: 368–377
- Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB and others (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4:27066
- Yokoyama R, Honda D (2007) Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae,

- Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48(4):199–211
- Yokoyama R, Salleh B, Honda D (2007) Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48(6):329–341
- Young III EL (1943) Studies of *Labyrinthula*. The etiologic agent of the wasting disease of eelgrass. *Am J Bot* 30:586–593
- Yubuki N, Leander BS (2013) Evolution of microtubule organizing centers across the tree of eukaryotes. *Plant J* 75:230–244
- 田中壯一 (1984) 白癬菌の有性生殖過程 -*Arthroderma vanbreuseghemii* の微細構造- *Jpn J Med Mycol* 25: 108–117
- 吉田昌樹 (2016) オーランチオキトリウムによる炭化水素生産 海洋と生物 38: 46–48
- 中桐昭 (2011) ラビリンチュラの生態および培養と保存法について 海洋と生物 132:32–38

图表



ラビリントチュラ科



ヤブレッツボカビ科

Fig. 1 ラビリントチュラ類の栄養細胞とボスロソームの模式図。EDMB, ボスロソームの電子密度の高い領域; EN, 外質ネット; ER, 小胞体; G, ゴルジ体; M, ミトコンドリア; N, 核; PM, 細胞膜; PN, パラヌクリアーボディ; S, 鱗片

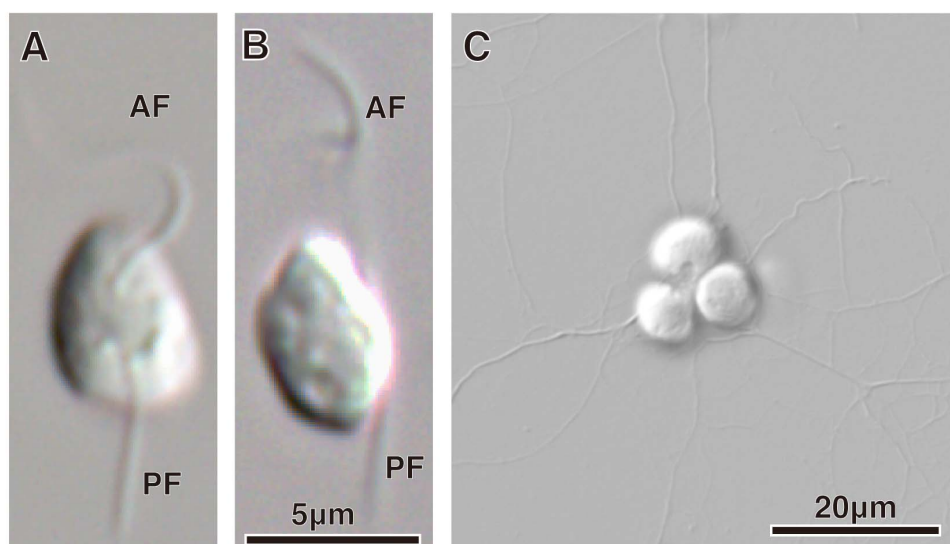


Fig. 2 *S. aggregatum* の光学顕微鏡写真。遊走細胞は、2本の不等長の鞭毛を持つ。**A.** 腹側から見た図。**B.** 右側からみた図。**C.** 外質ネットを展開する栄養細胞。AF, 前鞭毛 ; PF, 後鞭毛

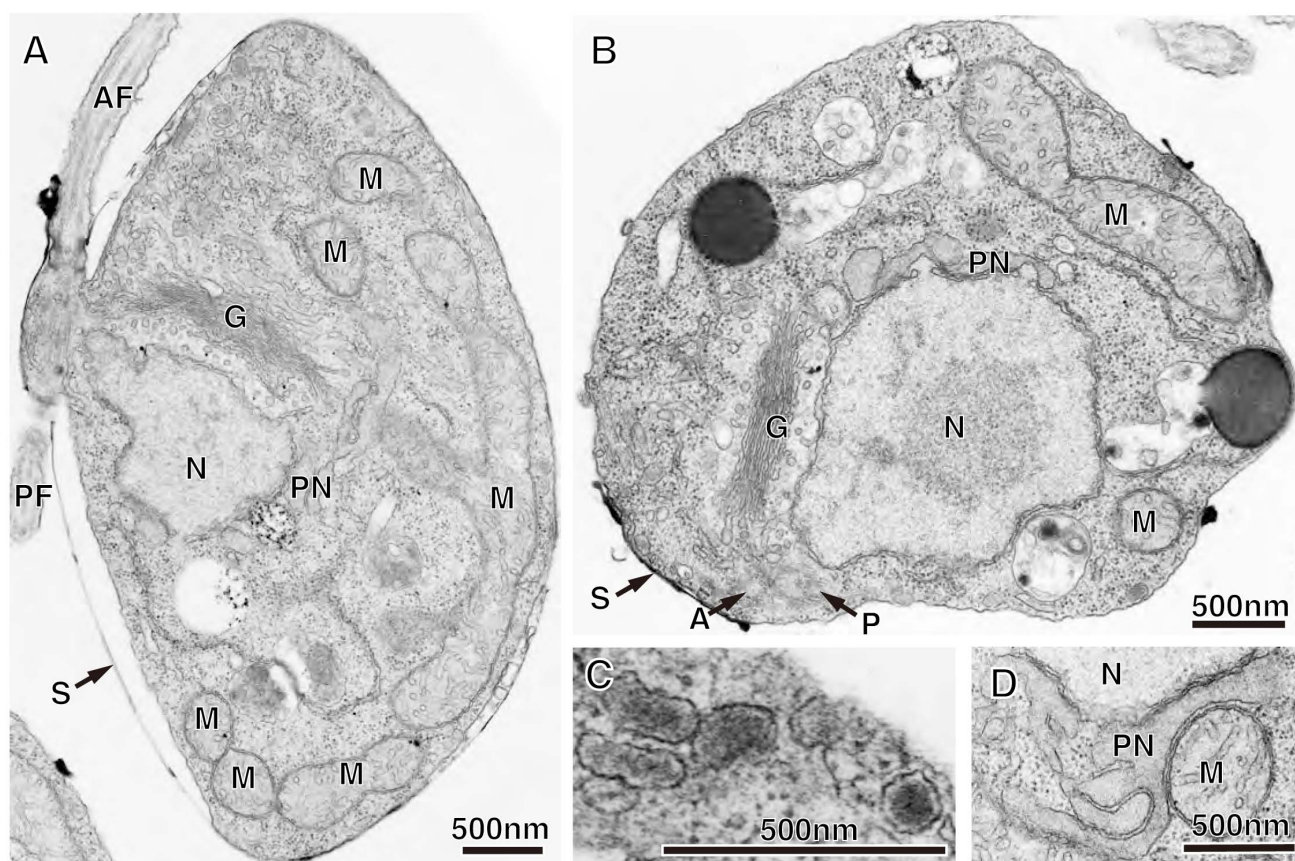


Fig. 3 *S. aggregatum* の透過型電子顕微鏡像。核 (N) は細胞の中央にあり、ゴルジ体 (G) は核のすぐそばに配置していた。パラヌクリアーボディ (PN) は基底小体 (AK, PK) と反対側の核に付随して見られた。**A.** 細胞の縦切りの像。**B.** 細胞の横切りの像。**C.** 電子密度の高い小胞。鞭毛根に沿って配置していた。**D.** パラヌクリアーボディに近接してミトコンドリア (M) が観察された。AF, 前鞭毛; PF, 後鞭毛; S, 鱗片

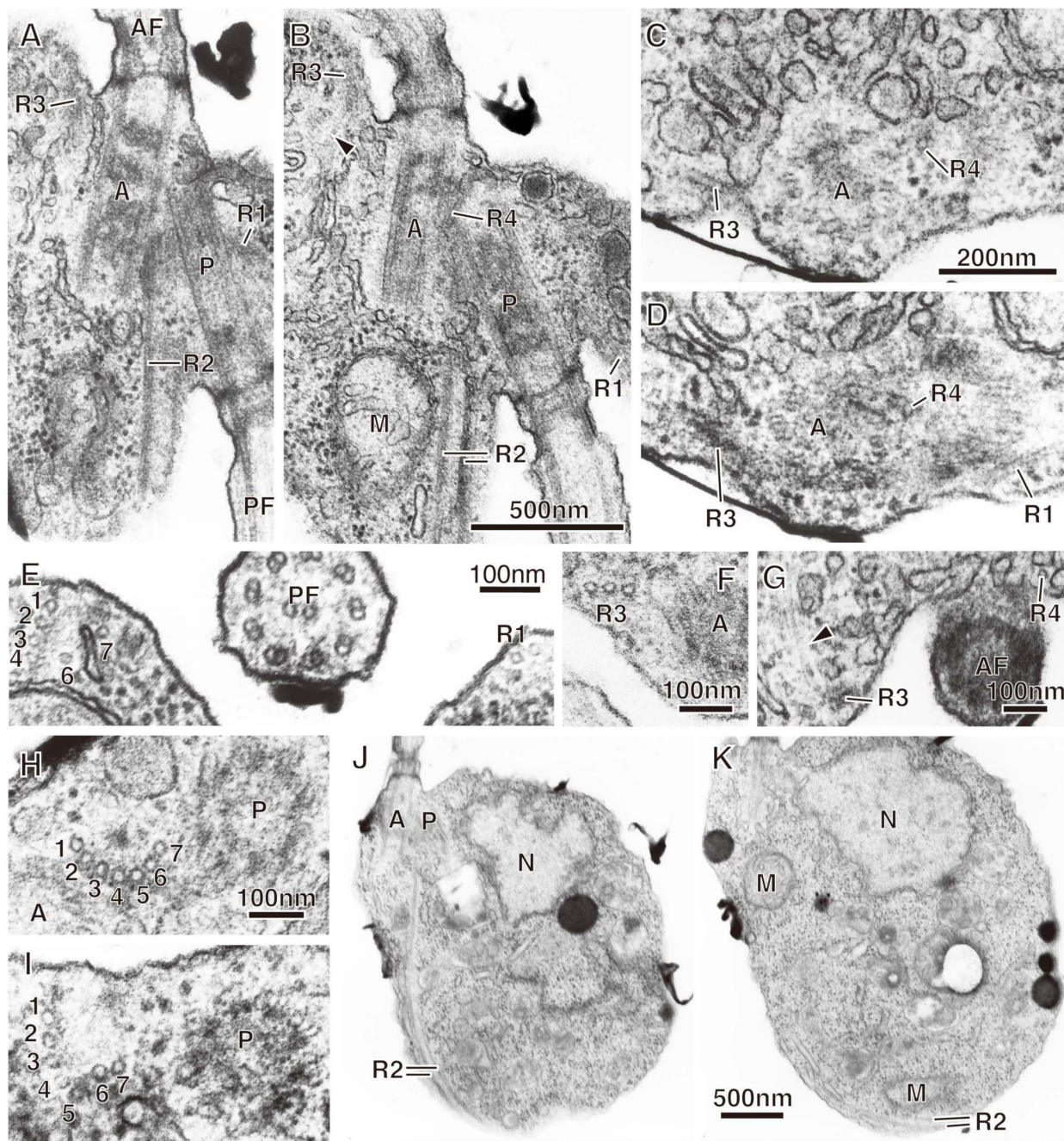


Fig. 4 *S. aggregatum* の鞭毛装置の透過型電子顕微鏡像。鞭毛根 R3, R4 は前鞭毛基底小体から生じており、R1 と R2 は後鞭毛基底小体から生じていた。R3 ではリブが観察された。A, B. 基底小体の縦切りを腹から見た際の鞭毛根の走行。C, D. 1 連の連続切片における連続していない切片像。E. 後鞭毛の横切り像 R1 は 2 本の微小管から構成されていた。F. 前鞭毛の横切り像。R3 は 3 本の微小管から構成されていた。G. 前鞭毛の横切りの像。R4 は 1 本の微小管から構成されていた。H, I. R2 (1-7) の配向。1 連の連続切片における連続していない切片像。R2 の 7 本の微小管は基底小体付近では、槌状の形態 (H) をとり、細胞後方に行くにつれて、5 本と 2 本の微小管が L 字の形態 (I) をとり、5 番目の微小管が消失し、2 本の微小管が腹側に移動し、2 又に分かれた (E)。J, K. 1 連の連続切片における連続していない切片像。細胞の後方に行くにつれて R2 は 2 又に分かれ、ミトコンドリアは R2 に付随して観察された。

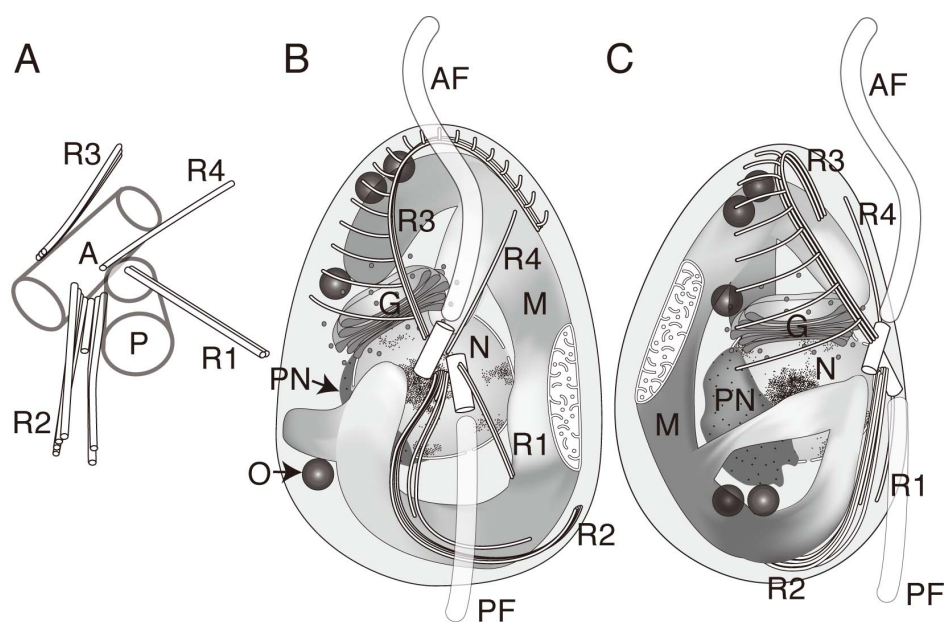


Fig. 5 *S. aggregatum* の遊走細胞の鞭毛装置構造と細胞内部の形態の模式図。A. 鞭毛根の配向を腹側から見た際の図。B. 鞭毛装置とオルガネラの配置を腹側から見た図。C. 鞭毛装置構造とオルガネラを右側から見た図。A, 前鞭毛基底小体 AF, 前鞭毛 ; G, ゴルジ体 ; M, ミトコンドリア ; N, 核 ; P, 後鞭毛基底小体 ; PN, パラヌクリアーボディ ; PF, 後鞭毛 ; R1-4, 鞭毛根 1-4



Fig. 6 *S. aggregatum* の着生過程の光学顕微鏡像。A. 遊走細胞は基質に付着した。B. 付着から 10 分後、細胞はだんだんとまるくなっていった。C. 11 分後、鞭毛は後鞭毛、前鞭毛の順番で消失した。D. 12 分後、鞭毛も外質ネットもない丸い細胞が観察された。E. 18 分後、細胞は外質ネット (arrow heads) を展開した。AF, 前鞭毛 ; PF, 後鞭毛

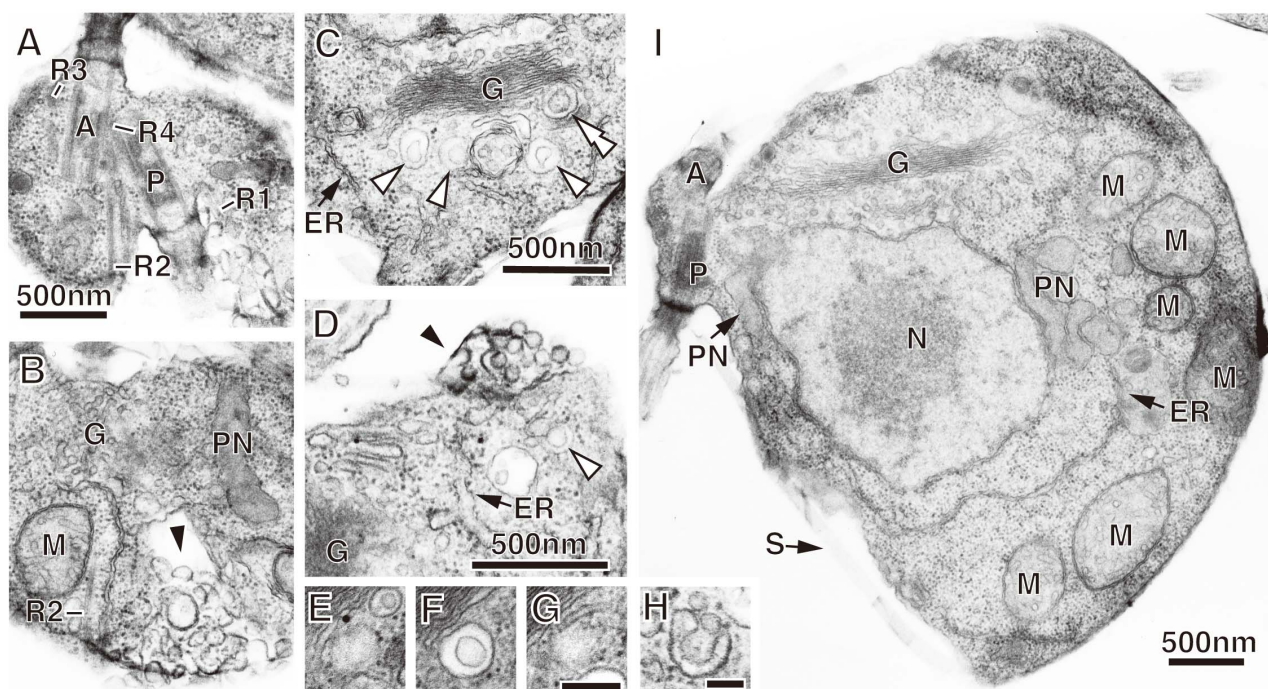
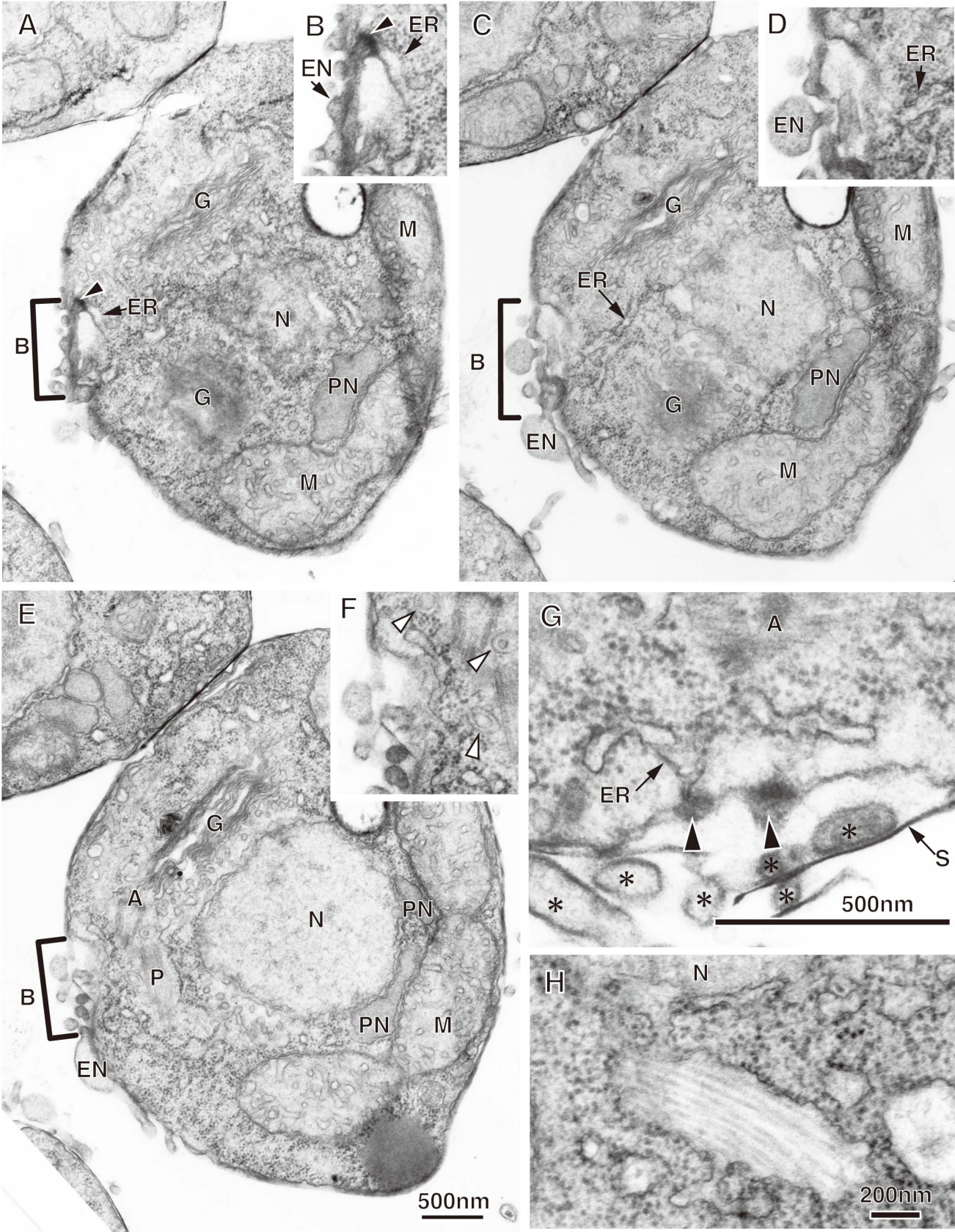


Fig. 7 丸い細胞形態を持つ、着生中の *S. aggregatum* の透過型電子顕微鏡像。パラヌクリアーボディは、基底小体付近にも観察された。このステージでは、ボスロソームは観察されなかった。**A, B.** 鞭毛装置構造の腹側から見た1連の連続切片における連続していない切片像。鞭毛根 (R1-4) は未だ基底小体付近に観察された。**C.** 二重膜に包まれたいくつかの小胞 (white arrowheads) とカップの形状の小胞 (double arrowhead) がゴルジ体と、細胞膜の間に観察された。**D.** エキソサイトーシスによって分泌されたと考えられる小胞が観察された (black arrowhead)。**E-G.** 二重膜に包まれた小胞の連続切片像。**H.** カップの形状の小胞。**I.** 細胞の縦切りの像。A, 前鞭毛基底小体; ER, 小胞体; G, ゴルジ体; M, ミトコンドリア; N, 核; P, 後鞭毛基底小体; PN, パラヌクリアーボディ; S, 鱗片 **G, H** のスケールバーは 200nm を示している。

Fig. 8 鞭毛喪失後の丸い細胞の *S. aggregatum* の透過型電子顕微鏡像。 **A, C, E.** ボスロソーム (B) および EDMB (arrowhead) と小胞体 (ER) と外質ネット (ER) との連続性を示す, 1 連の連続切片における連続していない切片像。ボスロソームは基底小体すぐ側の細胞の腹側の位置に出現した。2 つのゴルジ体はボスロソームに近接して観察された。高倍率のボスロソーム領域をそれぞれ (**B, D, F**) 示した。カップ状の小胞と二重膜の小胞 (white arrowheads) が観察された。 **G.** 2 つの EDMB から, 外質ネット (asterisks) が生じていた。 **H.** 細胞の背側にマスチゴネマ小胞が観察された。



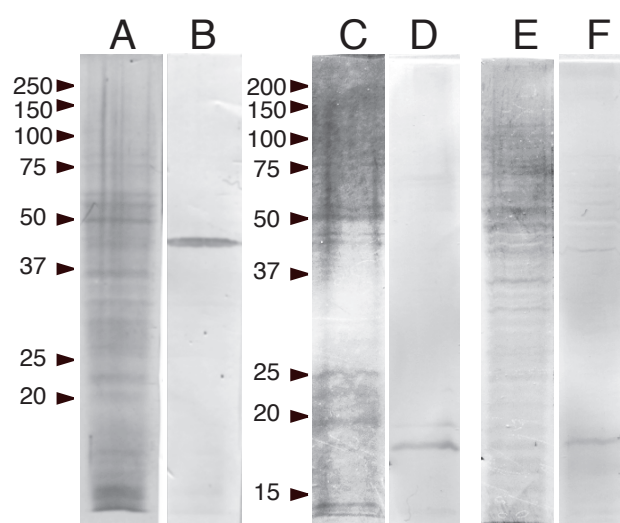


Fig.9 *S. aggregatum* と *S. lomentaria* の遊走細胞からの抽出物によるイムノブロット解析。
A, C. *S. aggregatum* のクマシーブリリアントブルー染色。**B.** 抗アクチン抗体と反応させると、
アクチンの分子量 42-kDa の単一のバンドが見られた。**E.** *S. lomentaria* のクマシーブリリアン
トブルー染色。**D, F.** 抗セントリン抗体と反応させると、セントリンの分子量 19-kDa と一致す
る *S. aggregatum* と *S. lomentaria* の単一のバンドが見られた。

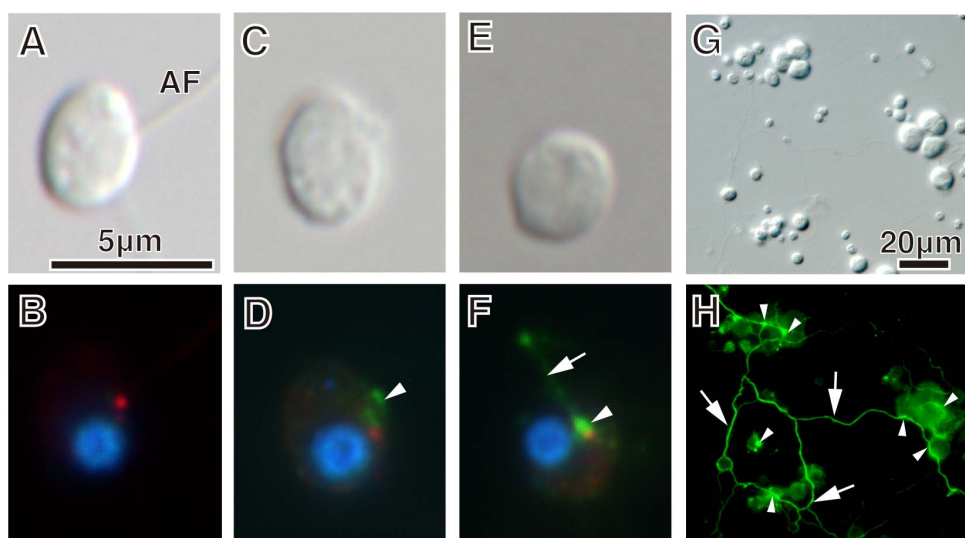


Fig. 10 *S. aggregatum* の免疫蛍光染色でのアクチンの局在の観察。**A-F.** 着生した細胞。**G. H.** 外質ネットを展開した栄養細胞。微分干渉像 (**A, C, E, G**) と免疫蛍光染色 (green, actin; red, centrin) と DAPI 染色 (blue)。鞭毛のある細胞では、アクチンの局在は観察されない (**A, B**) が、丸い細胞ではセントリンの近くにアクチンがスポット (arrowheads) となって観察された (**C, D**)。アクチンは外質ネット (arrows) と細胞体にも観察された (**G, H**)。丸い細胞において外質ネットはアクチンのスポット (arrowheads) から展開されていた (**E, F**)。

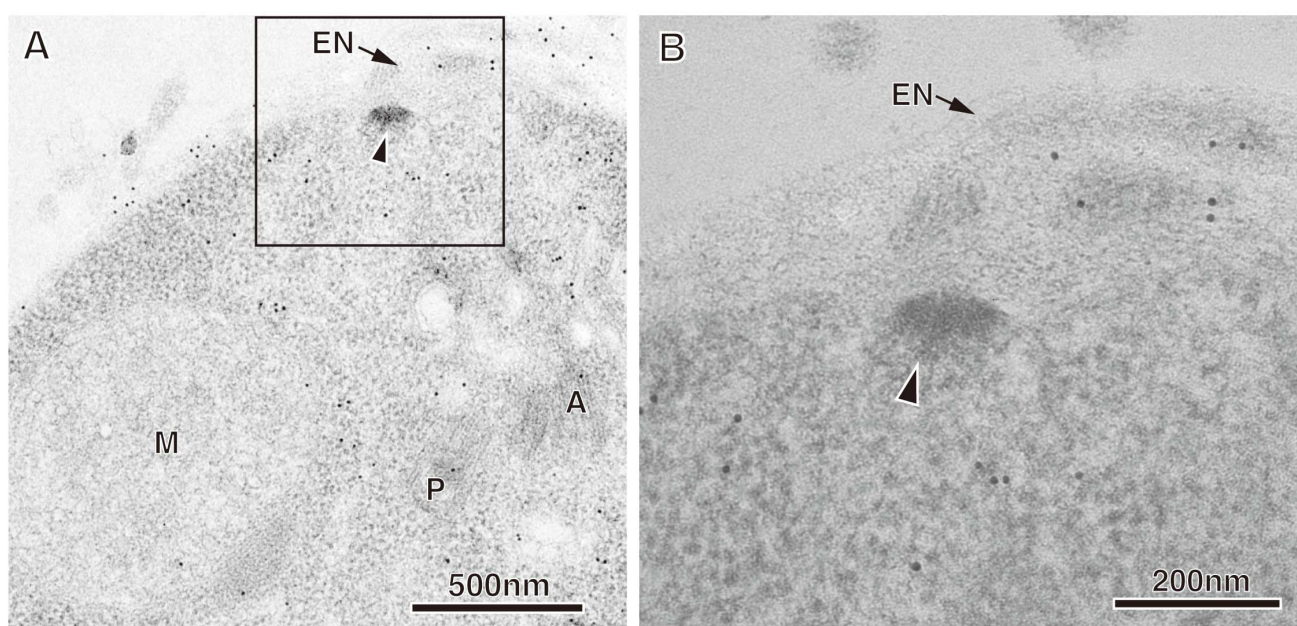


Fig. 11 抗アクチンを用いた免疫金標識。A. アクチンは細胞質と外質ネット (EN) には観察されたが、ミトコンドリア (M) や、基底小体 (A, P) には観察されなかった。B. アクチンは EDMB (arrowhead) や、その周辺のリボソームのない領域には観察されなかった。

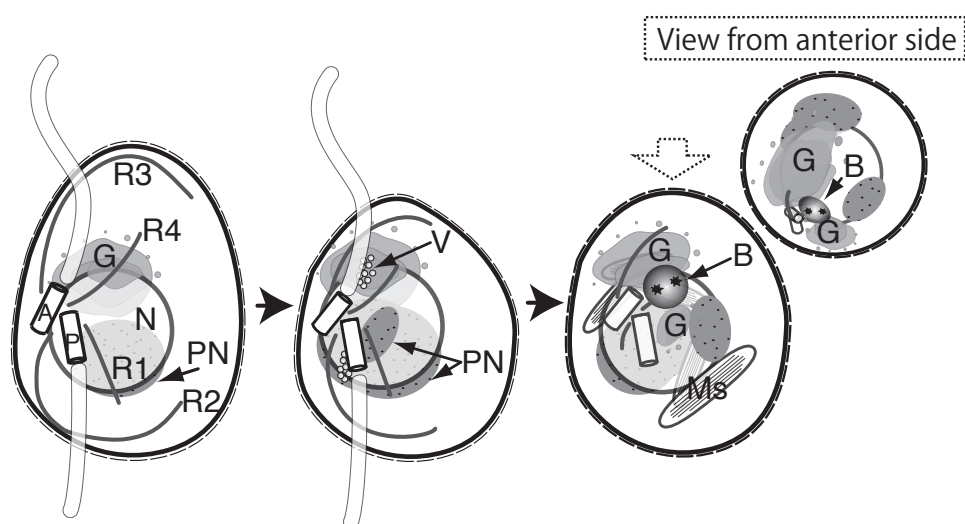


Fig. 12 *S. aggregatum* の着生過程の模式図。ボスロソームはボスロソームは前鞭毛基底小体の前方に位置していた。A, 前鞭毛基底小体; G, ゴルジ体; M, ミトコンドリア; Ms, マスチゴネマ小胞 N, 核; P, 後鞭毛基底小体; PN, パラヌクラーボディ; R1-4, 鞭毛根 1-4; V, 小胞

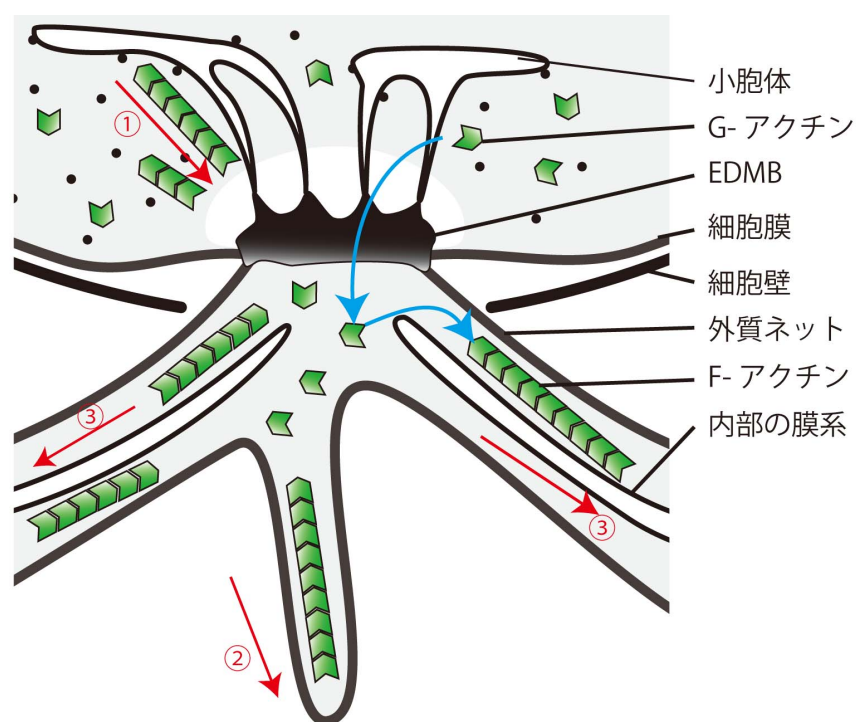


Fig. 13 ボスロソームと外質ネットとアクチンとの関係を表す仮説の模式図。単量体アクチンは、すばやくボスロソームを通り抜け、外質ネットで、重合しF-アクチンとなる（青の矢印）。アクチンは、まず、小胞体をEDMBへと導き、ボスロソームと小胞体が接続する（赤矢印①）。また、アクチンは、外質ネットの伸長（赤矢印②）と内部の膜系の形態形成（赤矢印③）に関わる。

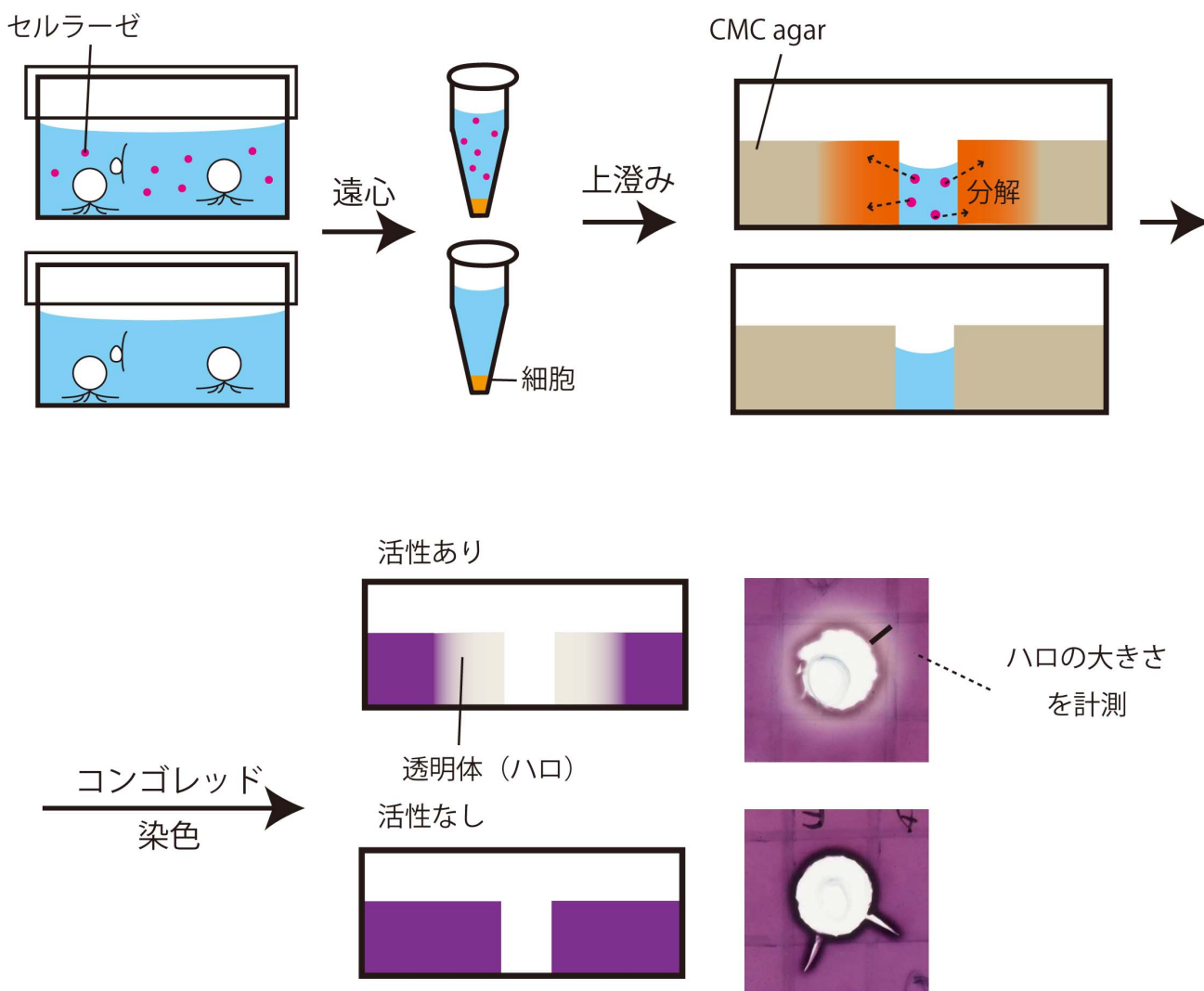


Fig. 14 セルラーゼ活性測定法の模式図。

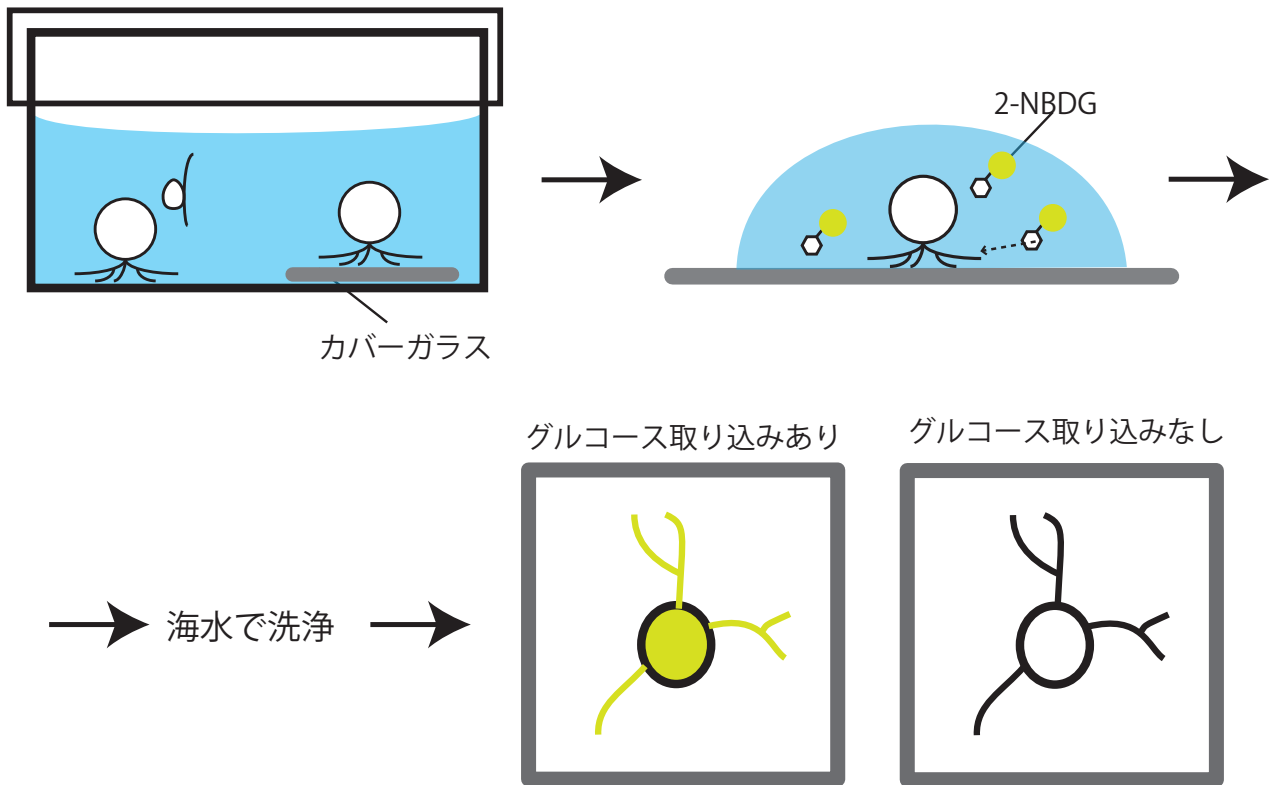


Fig. 15 2-NBDG を用いたグルコース取り込み量の測定法の模式図。

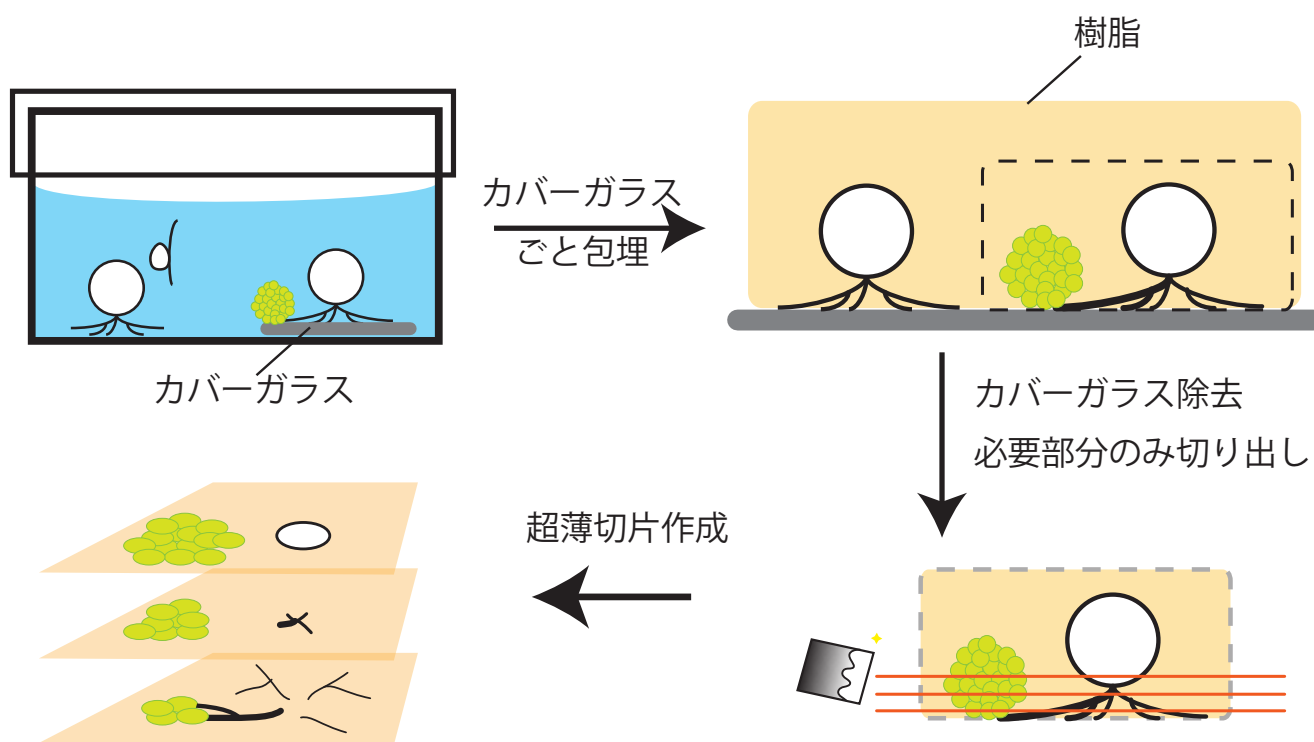


Fig. 16 外質ネット観察の超薄切片作成方法の模式図。

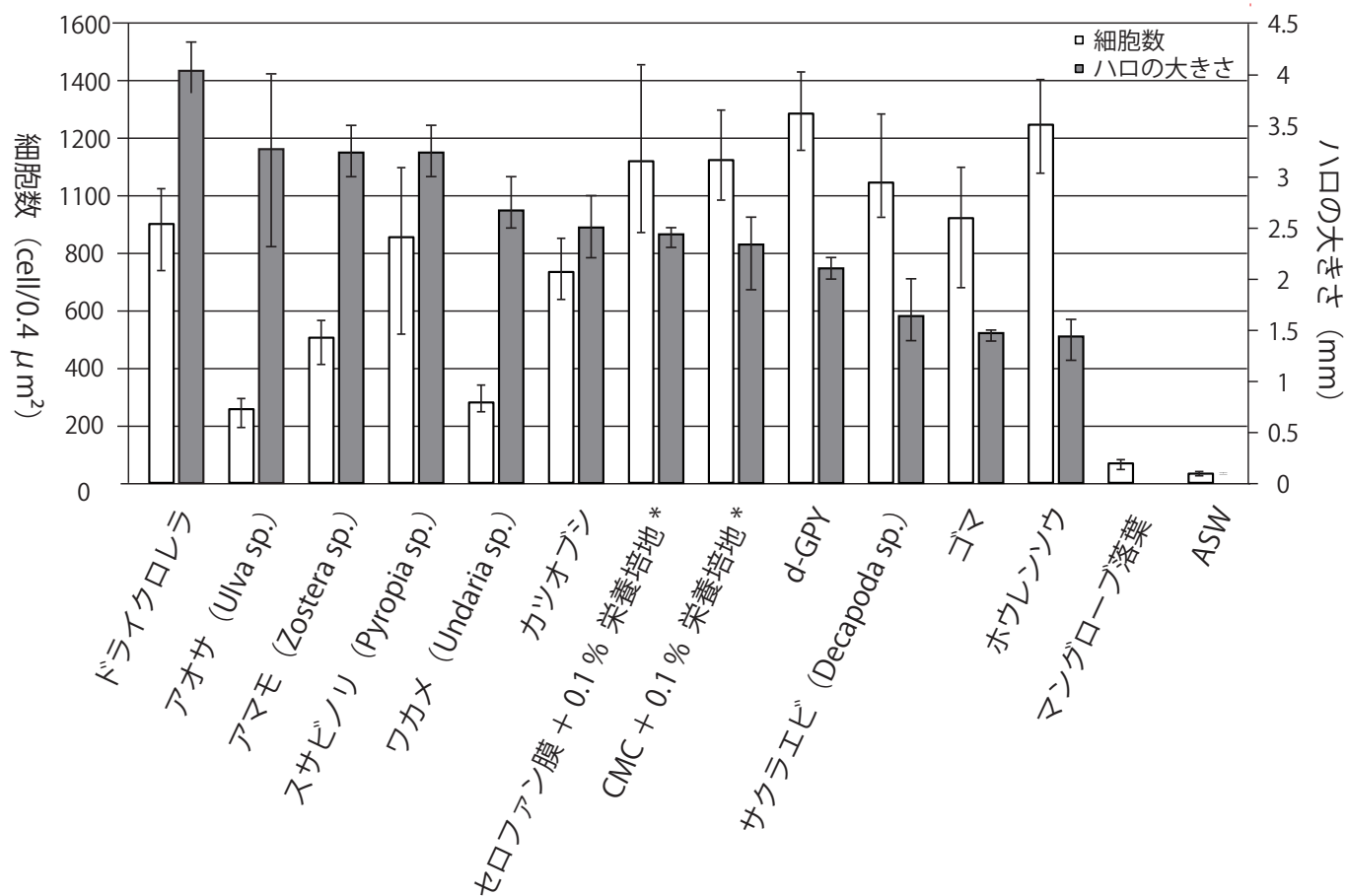


Fig. 17 *S. aggregatum* での様々な基質条件下での細胞外分泌セルラーゼの検出。各液体培地での培養5日目に、CMC agar でインキュベート後、コンゴレッド染色で検出された透明体と、各培地での単位面積中でのシャーレの底面に固着した細胞数を示す。透明体の大きさと細胞数の値は、共に n=3 で行った平均値と最大値、最小値を示している。*：0.1% polypeptone, 0.1% yeast extract を含む栄養培地

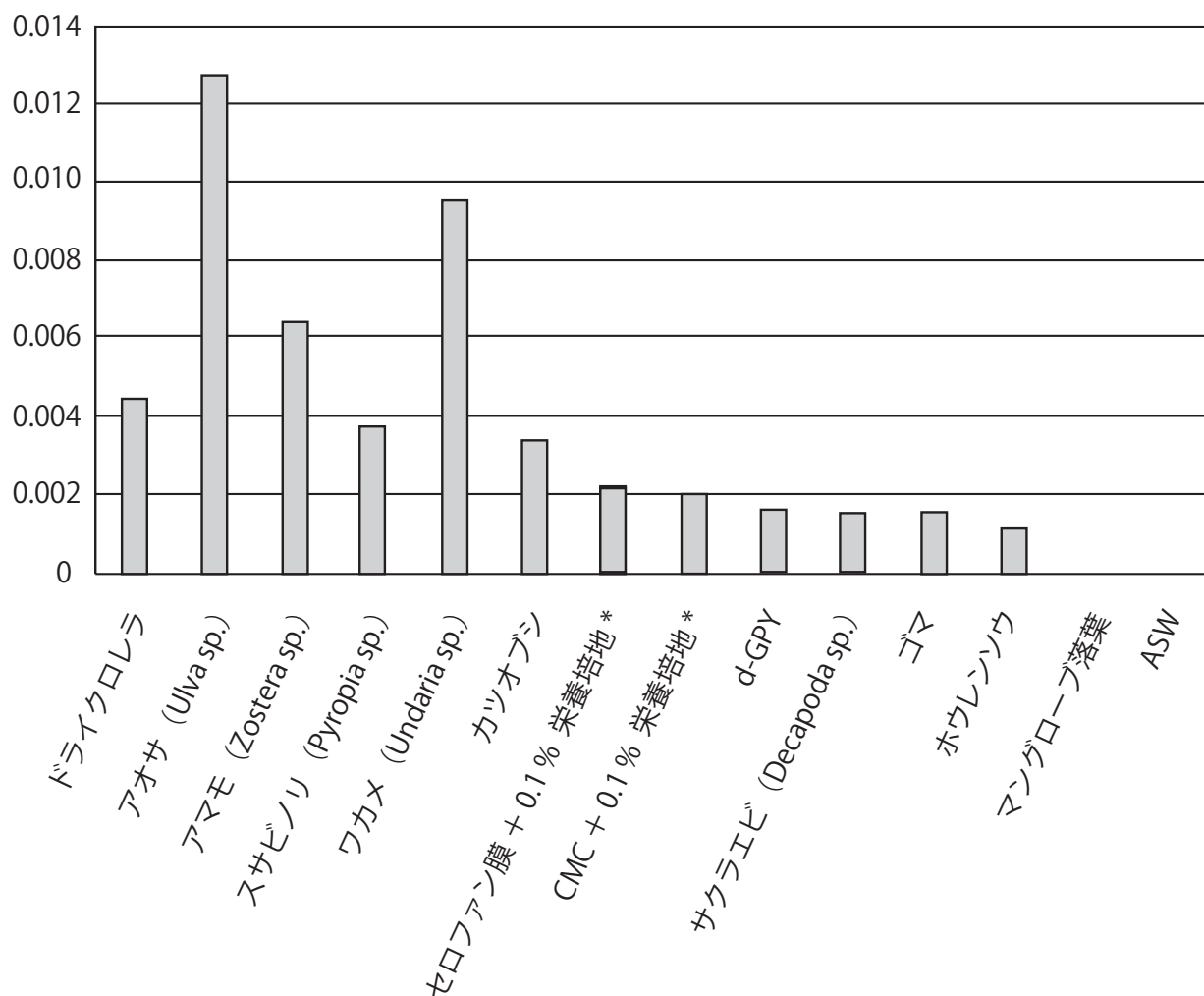


Fig. 18 *S. aggregatum* での様々な基質条件下での細胞外分泌セルラーゼ活性測定で、5日目に、CMC agar でインキュベート後、コンゴレッド染色で検出された透明体の平均値 (n=3) を、各培地での単位面積中でのシャーレの底面に固着した細胞数の平均値 (n=3) で割った商を示す。*: 0.1% polypeptone, 0.1% yeast extract を含む栄養培地。

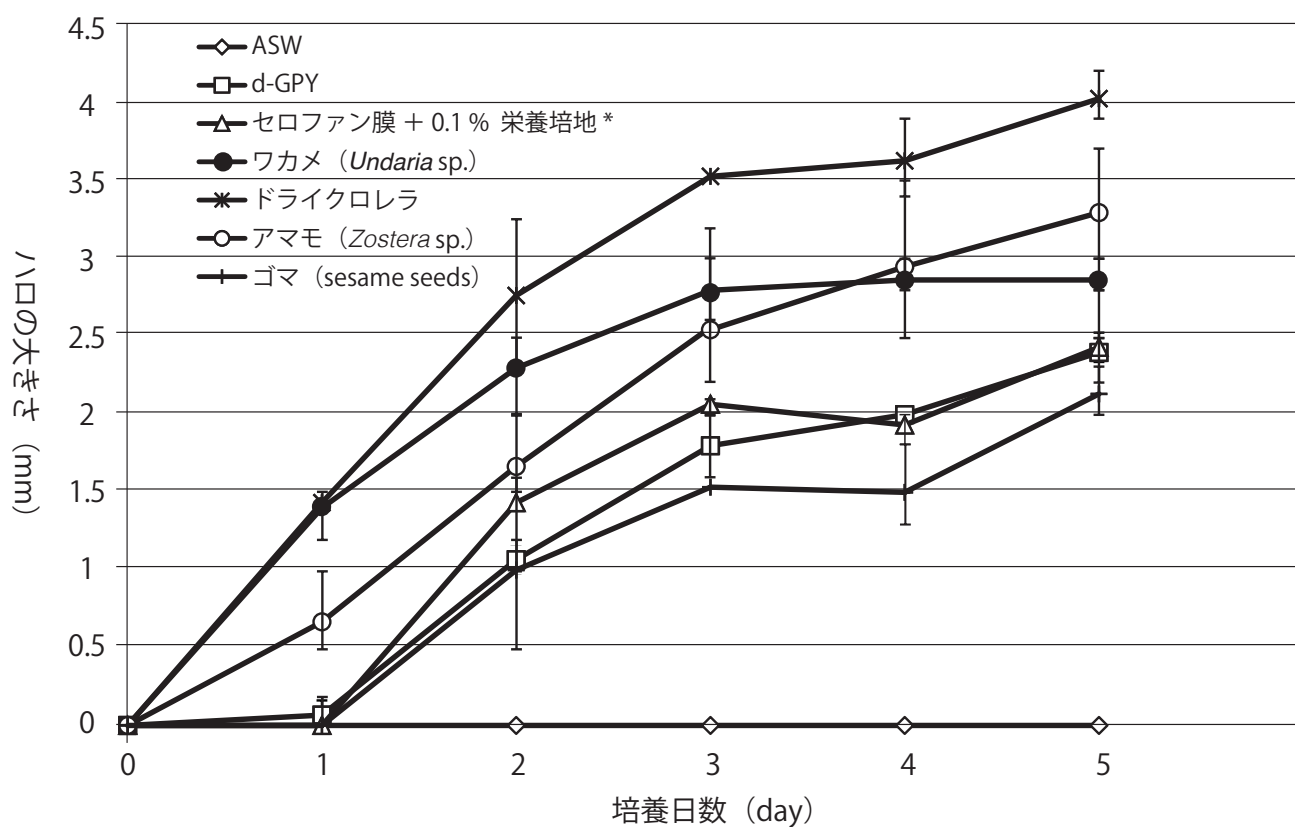


Fig. 19 *S. aggregatum* の異なる基質条件下でのセルラーゼ活性の経時的な変化。各液体培地で5日間培養を行い、1日ごとに CMC agar でインキュベート後、コンゴレッド染色で検出された透明体の大きさを n=3 で計測した平均値と最大値、最小値を示している。*: 0.1% polypeptone, 0.1% yeast extract を含む栄養培地。

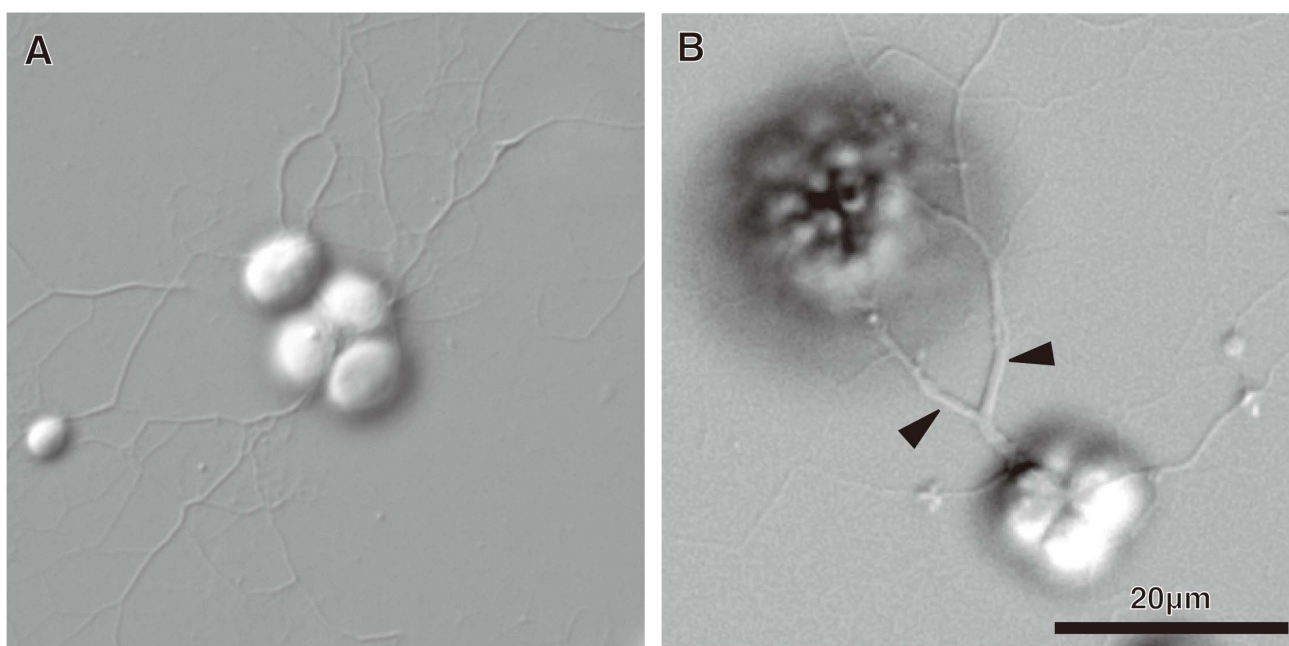


Fig. 20 *S. aggregatum* の外質ネットの形態。 **A.** d-GPY 培地で生育した細胞。均一な太さの外質ネットが放射状に広がっていた。 **B.** 海水にクロレラを添加した培地で生育した細胞。基質に付着する外質ネット (black arrowheads) は太かった。

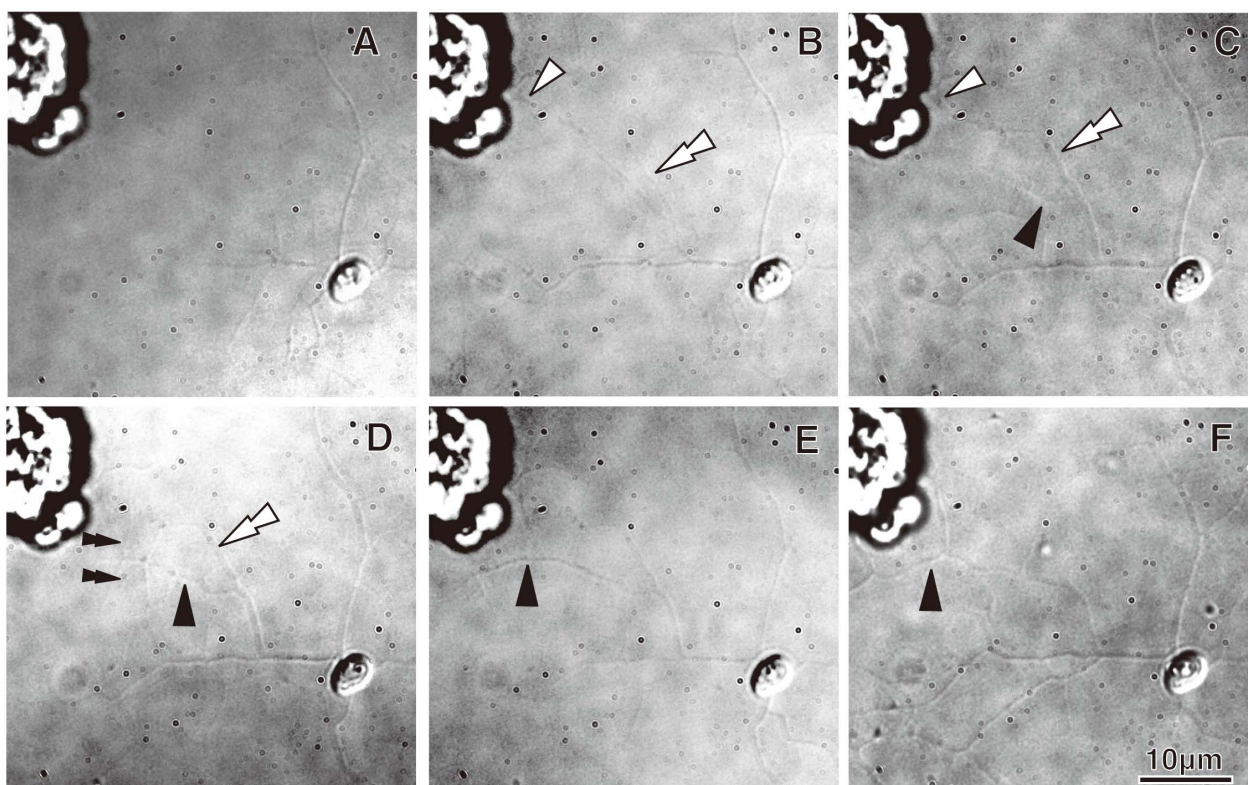


Fig. 21 外質ネットの形態変化の光学顕微鏡写真。海水にクロレラを添加した培地で *S. aggregatum* を生育し、タイムラプス撮影を行った (A, 0分後; B, 5分後; C, 21分後; D, 30分後; E, 35分後; F, 95分後)。遊走細胞は着生し栄養細胞になった後、外質ネットを放射状に展開した (A)。外質ネットがクロレラに付着すると (B), 付着した部分の外質ネット (white arrowhead) は太くなり、さらに外質ネットは細胞体側から順に太くなった (white double arrowhead)。側方から分岐した外質ネット (black arrowhead) が出現した (C)。分岐した外質ネットからはさらに分岐した外質ネット (double arrowheads) が観察され (D), 最終的に1本の外質ネットになり (E), 基質に付着する太い外質ネットとなった (F)。

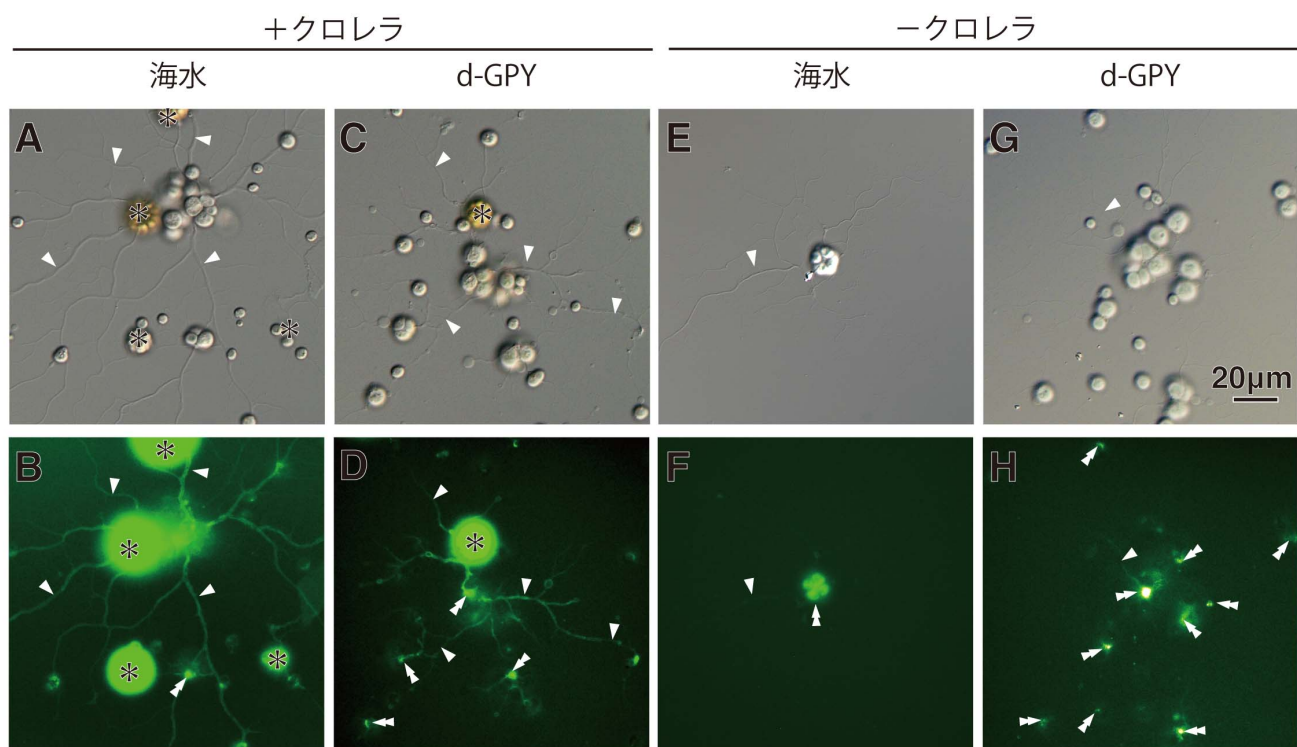
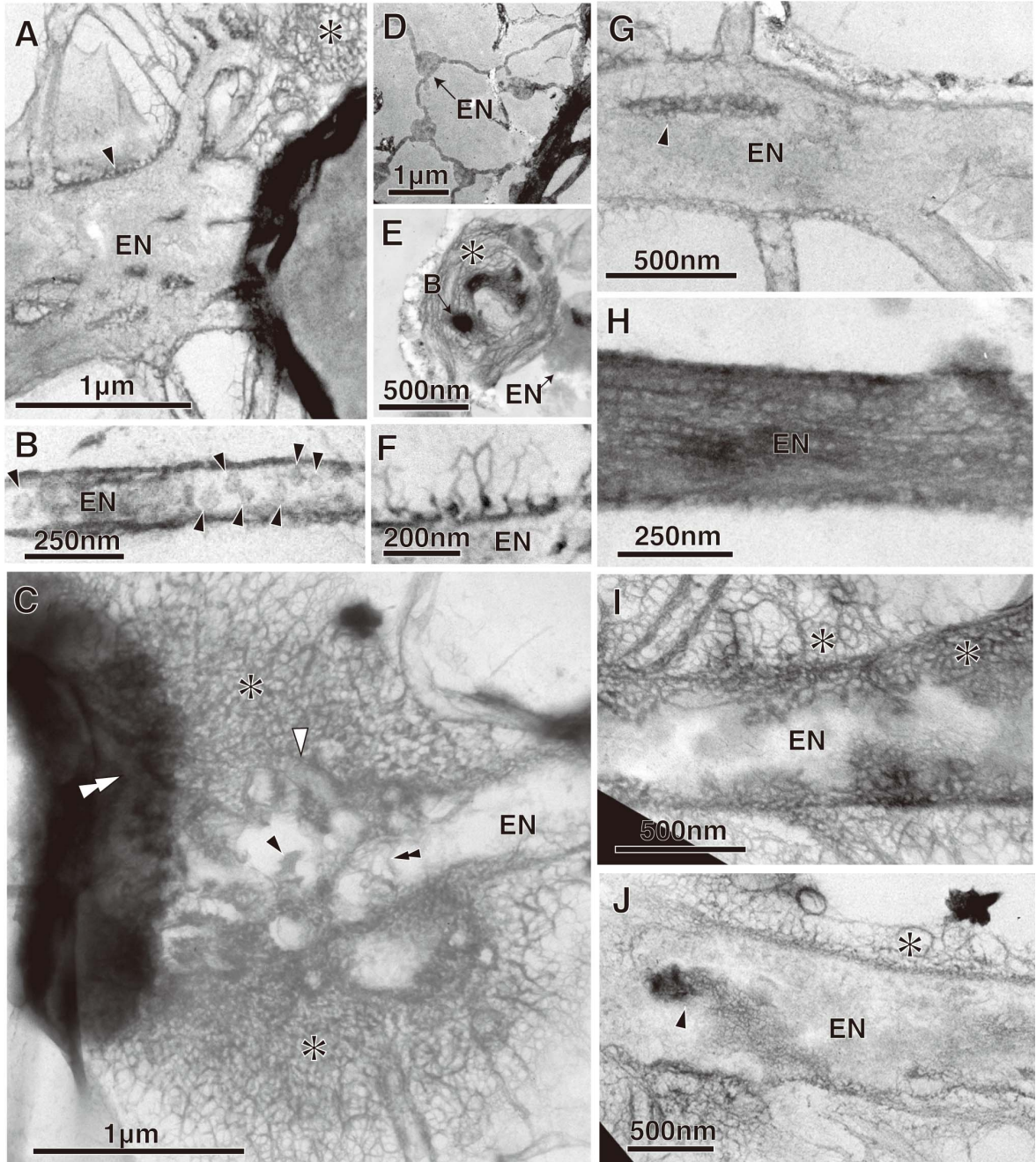


Fig.22 2-NBDG による *S. aggregatum* の外質ネットでのグルコース局在。微分干渉像 (**A, C, E, G**) と 2-NBDG (緑) の蛍光写真 (**B, D, F, H**)。asterisk はクロレラ, arrowheads は蛍光する外質ネット。double arrowheads は, ボスロソーム周辺での蛍光。全ての写真は同一の倍率。 **A, B.** 海水にクロレラを添加した培地で生育した細胞。外質ネットに蛍光が観察された。 **C, D.** d-GPY 培地にクロレラを添加した培地で生育した細胞。外質ネットに蛍光が観察された。 **E, F.** 海水で培養した細胞。外質ネットでの蛍光はわずかにしか観察されず, 細胞体全体が光っていた。 **G, H.** d-GPY 培地で生育した細胞。外質ネットに蛍光はわずかにしか観察されないが, 対照的にボスロソーム付近で強い蛍光が観察された。

Fig. 23 *S. aggregatum* の外質ネットの電子顕微鏡像。海水にクロレラを添加した培地で生育した際の外質ネット (EN)。 **A.** 細胞体から放射状に展開される外質ネット。細胞体および、細胞体周辺の外質ネットの外部には、繊維状の構造 (asterisk) が観察され、細胞膜表面には電子密度の高い球状の構造 (arrowhead) が観察された。 **B.** 細い外質ネットの内部に多数の小胞 (black arrowheads) が観察された。 **C.** 基質に付着した外質ネットの付着面。外質ネットの外形は多数の隆起 (white arrowhead) を示し、基質へ付着していた (double white arrowheads)。外質ネットの内部は電子密度が低く、繊維状の構造 (double black arrowhead) や、膜状の構造 (black arrowhead) が観察されることもあった。外質ネットの外部と基質との間には多数の繊維状の構造 (asterisk) が観察された。 **D.** 太い外質ネットの編み目を縫うように、規則的に膨らみを持つ、曲線状の細い外質ネットが観察された。 **E.** ボスロソーム (B) の横断面。ボスロソーム周辺にも、繊維状構造 (asterisk) が取り巻くように観察された。 **F.** 細胞体周辺の外質ネットで観察される電子密度の高い球状の細胞外構造と繊維状構造。 **G.** 基質へと繋がる外質ネット。外質ネット内部は、基質に付着していない外質ネット (A) と同様の電子密度であるが、度々電子密度の高い棒状の構造 (arrowhead) が観察される。外質ネットは分岐している。 **H.** 基質へと繋がる外質ネット。内部に繊維状の構造が詰まっているが、細胞外には繊維状構造はない。 **I.** 外質ネットの内部の繊維状構造 (asterisk) は外質ネット外に放出された。 **J.** 外部に繊維状構造 (asterisk) を持つ外質ネットの内部には膜状の構造 (arrow head) が観察された。



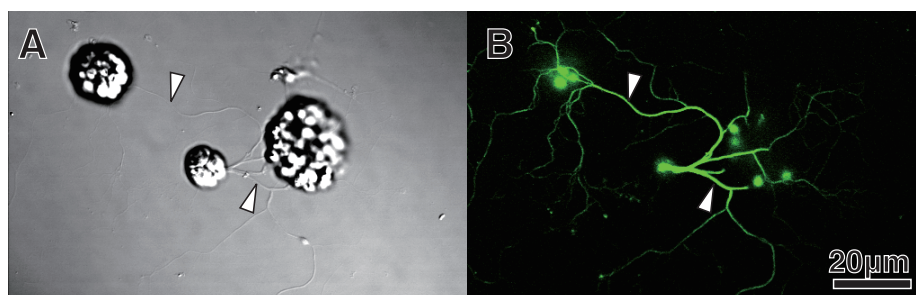
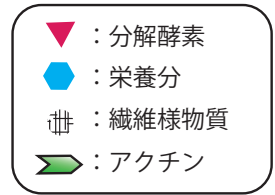
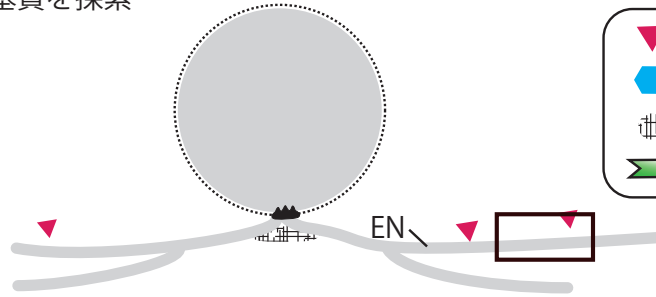
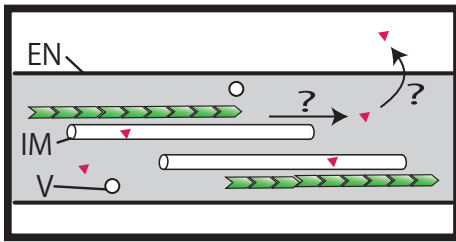
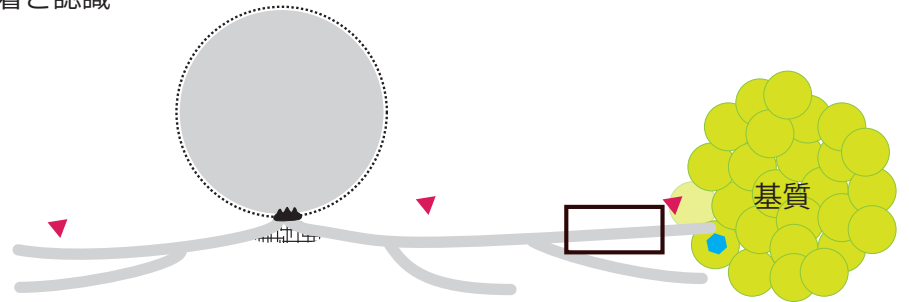
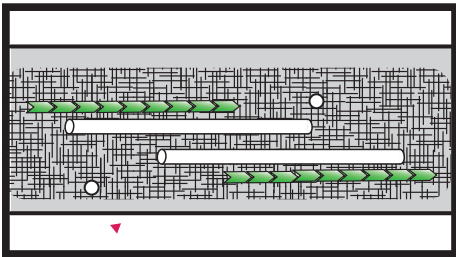


Fig. 24 *S. aggregatum* の外質ネットのファロイジン染色によるアクチンの局在。海水にクロレラを添加した培地で *S. aggregatum* を生育し、微分干渉像 (A) と F-アクチン (緑) の蛍光顕微鏡像 (B)。基質に付着する外質ネット (white arrowhead) では、強い蛍光が観察された。

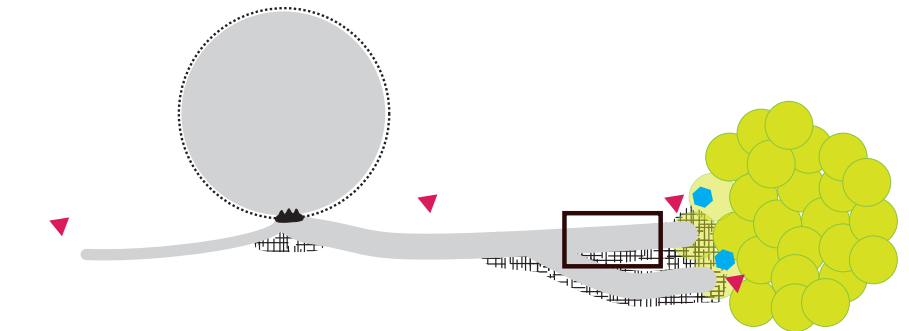
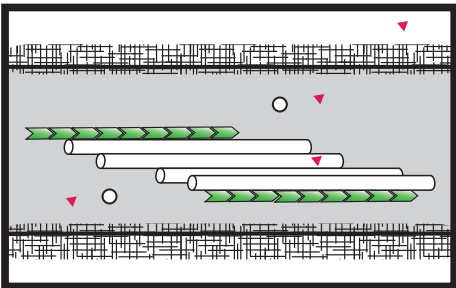
1) 外質ネットを放射状に展開し、基質を探索



2) 外質ネットを介した基質への付着と認識



3) 外質ネットの固着と肥大化



4) 外質ネットからの分解酵素の分泌と栄養分の吸収

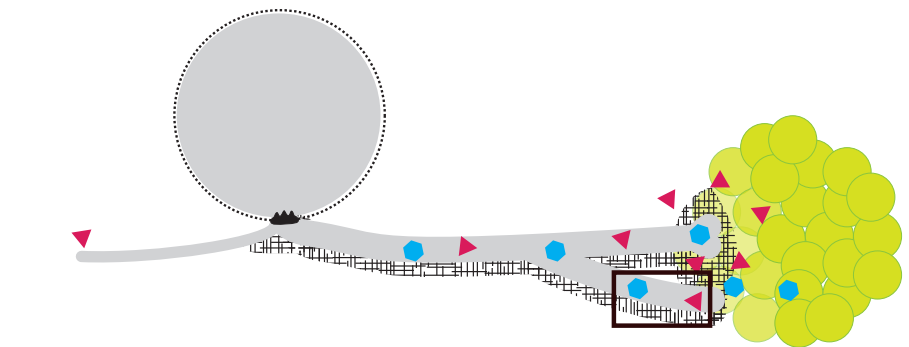
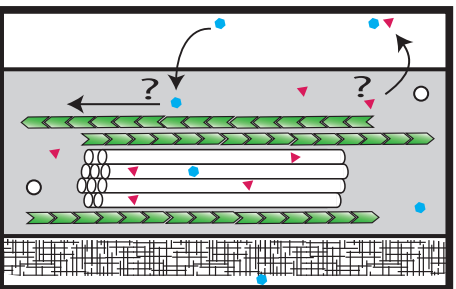


Fig. 25 外質ネットからの分解酵素分泌過程に関する仮説の模式図。EN：外質ネット，IM：内部の膜系，V：小胞

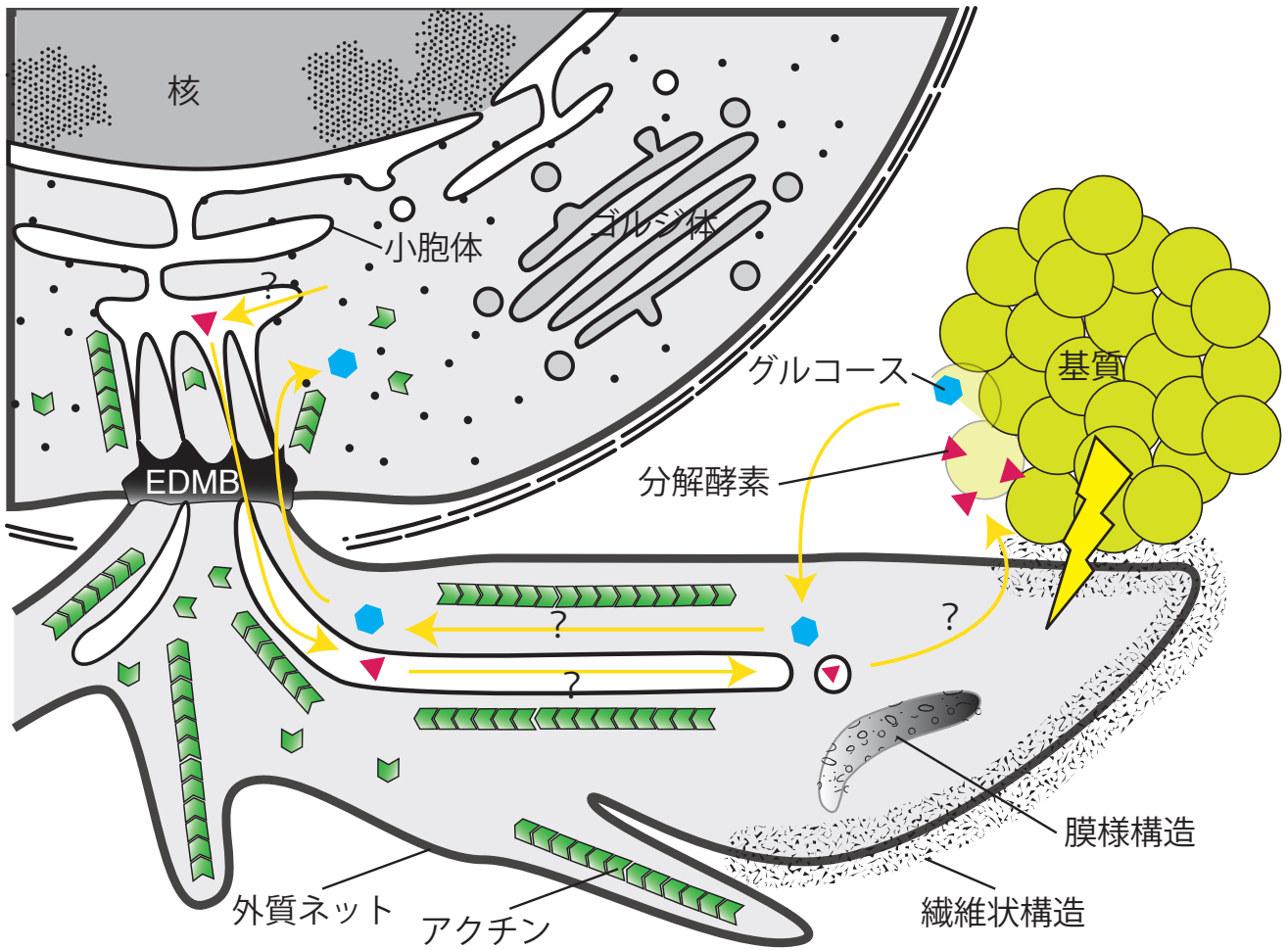


Fig. 26 外質ネットからの基質に対する分解酵素分泌機構の仮説の模式図。