ミニレビュー

ナガサキツノゴケの色素体 DNA 複製サイクルに関する研究

泉 好弘

大分大学 教育学部 生物学教室 (〒870 - 1192 大分市大字旦野原 700 番地)

Studies on Plastid DNA Replication Cycle in *Anthoceros punctatus*

Yoshihiro Izumi

Institute of Biology, Faculty of Education, Oita University, Oita, 870-1192 Japan.

Summary

We have investigated the plastid DNA replication cycle of *Anthoceros punctatus*. In mitotic cycles of this species, plastids divided into two daughter plastids with DNA synthesis. By contrast, in spore mother cells, the DNA content of plastids which had completed their division was halved as well as the DNA content of cell nuclei. The plastid DNA content of unfertilized egg cells did not change before and the fertilization because of preferential digestion of organelle DNA in sperm cells. In the 2n-generation, plastids multiplied by binary fission, with DNA duplication. It is thought that plastid DNA content is halved in spore mother cells, but recovers before, or immediately after, spore germination. In the n-generation, plastids multiplied by binary fission, with DNA duplication, and the plastid DNA content was maintained at the same level as that of the 2n-generation.

Key words: Hornwort ; *Anthoceros punctatus* ; Plastid division ; Plastid nucleus ; DNA content.

はじめに

色素体やミトコンドリアのようなオルガネラは、固有の DNA を持ち、自身の分裂によってのみ増殖することが知られている。オルガネラ DNA は、特異的な塩基性タンパク質と結合しており、それらはオルガネラ核と呼ばれている (e. g. Kuroiwa 1982)。

オルガネラの分裂周期に関する研究は、まず真性粘菌 *Physarum polycephalum* のミトコンドリアを材料に用いて行われた (e. g. Kuroiwa 1982, Kawano 1991)。一方、色素体の分裂サイクルは、単細胞性の藻類を用いて詳細に研究された (e. g. Kuroiwa 1989, 1991, Suzuki *et al.* 1994)。

著者らが研究を始めた時点では、陸上植物における色素体の分裂サイクルに関する詳細な研究は、ほとんど行われていなかった。多くの陸上植物では、1 個の細胞中に多数の色素体が存在し、色素体分裂は常に同調的に起こるわけではないため、個々の色素体のふるまいを明らかにすることは困難であった。

コケ植物であるツノゴケ類は、ライフサイクルの大部分で 1 細胞中に色素体が 1 個のみ含まれるため、古くから色素体分裂が観察されてきた。そこで著者らは、ナガサキツノゴケ (*Anthoceros punctatus*) を材料として用い、色素体分裂の研究を行った。本総説では、同種の体細胞分裂サイクル、孢子形成過程およびライフサイクルの各期における色素体 DNA の複製サイクルについて紹介する。

培養細胞における色素体分裂

ナガサキツノゴケの体細胞分裂サイクルにおける色素体の分裂様式を明らかにするために、同種の配偶体由来カルスを材料として用いた。カルスは分裂活性の高い未分化の細胞塊であるが、数百～数千個の細胞から成るため、プロトプラストの単離・培養系を確立した (Ono *et al.* 1992)。

Fig. 1. ナガサキツノゴケ培養細胞（プロトプラスト）の色素体分裂過程の模式図.

ナガサキツノゴケのカルスからプロトプラストを単離、培養して、色素体の分裂過程を経時的に観察した結果、色素体は、伸長して大きくなり、中央部でくびれて2個の娘色素体に分裂することが明らかになった (Fig. 1)。さらに、単離直後のプロトプラストを 4', 6-diamidino-2-phenyleindole (DAPI) で染色して、画像解析装置 (CHIAS, Fukui 1985, 1986, 1988) で色素体の DNA 量を測定した結果、同種の色素体は大きくなる過程で自身の DNA を2倍に複製した後、中央部でくびれて2個の娘色素体に分裂することが明らかになった (Fig. 2)。

今日では、色素体の分裂様式は、DNA 複製サイクルの違いによって2つのタイプに分類される。1つのタイプは *Cyanidioschyzon merolae* によって代表され、この種の色素体は DNA の複製を伴った分裂によって増殖する (Suzuki *et al.* 1994)。他方のタイプは、*Cyanidium caldarium* RK-1 によって代表され、この種の内性胞子分裂の間の色素体分裂サイクルにおいて、2倍以上の DNA 複製を伴う分裂サイクルと DNA 複製を伴わない分裂が存在する (Kuroiwa 1989)。ナガサキツノゴケの体細胞分裂サイクルにおける色素体は、*C. merolae* と同様に、DNA 複製をとまなう2分裂によって増殖すると考えられる。

Fig. 2. ナガサキツノゴケ培養細胞の体細胞分裂サイクルにおける色素体DNA量の変動.

Type A, 小型の色素体を1個持つ細胞.
Type B, 中型の色素体を1個持つ細胞.
Type C, 大型の色素体を1個持つ細胞.
Type D, くびれた色素体を1個持つ細胞.
Type E, 小型の色素体を2個持つ細胞.

Izumi *et al.* (1993) より改変して引用.

孢子母細胞における色素体分裂

先に述べたように、オルガネラの分裂サイクルは、単細胞性の藻類の色素体や、真性粘菌のミトコンドリア等で詳細に調べられているが、これらの報告は全て体細胞分裂サイクルにおいて調べられたものであった。細胞周期の異なる孢子形成過程でのオルガネラの挙動は、ツノゴケ類やセン類を用いて調べられているが、これらは孢子母細胞の極性の確立と色素体の位置の関係について調べたものであった (Brown and Lemmon 1987a, b, 1990, Busby and gunning 1988)。また、Miyakawa *et al.* (1984, 1994) は、コウボを用いて孢子形成過程におけるミトコンドリアとミトコンドリア核様体 (核) の挙動を報告している。しかしながら、筆者が調べた範囲では、孢子形成過程でのオルガネラ DNA 量の変動を調べた報告は全くなかった。そこで、孢子形成過程の色素体の分裂サイクルと細胞核の分裂サイクルの関係を明らかにするために、野外に生育するナガサキツノゴケの孢子体を用いて、減数分裂を行う孢子母細胞の各々の色素体分裂段階における色素体 DNA 量の相対的な変化を調べた。

Fig. 3 は、ツノゴケ類の孢子形成過程を模式的に示したものである。胞原細胞から形成された孢子母細胞は、孢子体中に遊離し、球形となる。初期の段階の孢子母細胞には 1 個の色素体と 1 個の細胞核が含まれる。その後、色素体は伸長、湾曲して細胞核を取り囲み、2 個の娘色素体に分裂する。色素体はさらにもう 1 度分裂して 4 個になるが、この

Fig. 3. ツノゴケ類の孢子形成過程の模式図.

時点では細胞核はまだ 1 個のままである。その後、細胞核の減数分裂が起こり、最終的に 1 個の色素体と 1 個の細胞核を含む孢子が 4 個形成される。このように、ツノゴケ類の孢子形成過程では、色素体は細胞核の減数分裂に先行して 2 回分裂し、4 個の娘色素体を形成した後、細胞核の減数分裂が起こり、1 個の色素体と 1 個の細胞核を持つ孢子を 4 個形成する。孢子母細胞における 2 回の色素体分裂は、細胞核の減数分裂に相当すると考えられる。

Fig. 4 は、ナガサキツノゴケの胞原細胞と孢子母細胞を DAPI 染色し、画像解析装置で色素体の DNA 量を測定した結果を模式的に示したものである。胞原細胞および孢子母細胞の最初の段階の色素体 DNA 量は、同種の培養細胞の間期における色素体 DNA 量とほぼ同じ値であったが、伸長・湾曲した色素体を 1 個持つ孢子母細胞では、約 2 倍になっていた。色素体を 2 個持つ孢子母細胞では、色素体 1 個当たりの色素体 DNA 量は元の量に戻り、色素体を 4 個持つ孢子母細胞では、約 1/2 となっていた。これらの結果は、孢子母細胞の 1 回目の色素体分裂では、色素体は自身の DNA を 2 倍に複製して分裂するが、2 回目の分裂では DNA を複製せずに分裂し、色素体 DNA 量は最終的に半減することを示している。

筆者が調べた範囲では、これまでに減数分裂を行う孢子母細胞におけるオルガネラの DNA 複製

サイクルに関する報告は全くなく、本研究において、ナガサキツノゴケの胞子母細胞の色素体は、細胞核の減数分裂と同様に2回の連続した色素体分裂によって、色素体1個当たりの色素体DNA量を半減させることが初めて明らかになった。

ライフサイクルの間での色素体DNA量の変動

多くの生物において、雌性配偶子由来のオルガネラDNAのみが母性遺伝によって子孫に伝達されることが知られている。先に述べたように、ナガサキツノゴケの胞子母細胞における色素体は、最初の色素体分裂では自身のDNAを2倍に複製して分裂するが、2回目の色素体分裂ではDNA複製せずに分裂

し、最終的に色素体のDNA量は細胞核のDNA量と同様に半減した。ナガサキツノゴケにおいて、雌性配偶子由来の色素体DNAのみが母性遺伝によって子孫に伝達されるならば、受精卵における色素体DNA量は半数体の植物体のそれと等しくなることになる。さらに、もし、この種の色素体DNAの複製サイクルがライフサイクルの間で細胞核のそれと完全に一致すると、色素体DNA量は一世代ごとに半減することになる (Fig. 5)。

しかしながら、*Physarum polycephalum* において、ミトコンドリアDNAの複製サイクルは、ライフサイクルの間で変化することが報告されている (Kawano *et al.* 1983, Kawano 1991)。Kuroiwa *et al.* (1981) は、高等植物において、色素体DNA量が発芽の際に著しく増加することを報告している。ナガサキツノゴケの色素体DNAが母性遺伝によって子孫に伝達されるならば、この種の色素体DNA量はライフサイクルの特定の時期に回復する可能性が考えられる。

Fig. 6は、ツノゴケ類のライフサイクルを模式的に示した物である。胞子体から放出された胞子は、発芽し、成長してn世代の配偶体となる。配偶体が成熟すると

Fig. 4. ナガサキツノゴケの胞子形成過程における色素体DNA量の変動。

- Type I, 色素体を1個持つ胞原細胞。
- Type II, 色素体を2個持つ胞原細胞。
- Type III, 小型の色素体を1個持つ胞子母細胞。
- Type IV, 湾曲した色素体を1個持つ胞子母細胞。
- Type V, 小型の色素体を2個持つ胞子母細胞。
- Type VI, 伸長した色素体を2個持つ胞子母細胞。
- Type VII, 色素体を4個持つ胞子母細胞。

Izumi and Ono (1994) より改変して引用。

Fig. 5. オルガネラDNAの伝達様式が母性遺伝で、細胞核と色素体のDNA複製サイクルがライフサイクルを通して完全に一致すると仮定した場合のDNA量の変動を示した模式図。

造卵器と造精器を形成し、それぞれ卵細胞と精子を形成する。その後、精子は造卵器内の卵細胞と授精し、授精卵は分裂を繰り返して、造卵器の位置に $2n$ 世代の胞子体を形成する。その胞子体の内部では、胞子母細胞が減数分裂をして胞子を形成し、胞子が成熟すると胞子体の上部が開裂して、胞子が放出される。ナガサキツノゴケのライフサイクルの間での色素体 DNA 量の変動を明らかにするために、 $2n$ 世代として胞子体内部の細胞、 n 世代として精細胞、卵細胞および発芽初期の配偶体細胞の色素体核の観察と DNA 量の測定を行った。

Fig. 6. ツノゴケ類のライフサイクルの模式図.

Fig. 7 は、ナガサキツノゴケの造精器と造卵器の典型的な DAPI 染色像である。球形の細胞核を含む精細胞では、細胞質中にオルガネラ核が観察された (Fig. 7 A)。しかしながら、伸長し始めた細胞核を含む精細胞および完全に伸長した細胞核を含む精細胞では、オルガネラ核は観察されなかった (Fig. 7 B, C)。これらの結果から、精細胞のオルガネラ核は精子形成過程で消失し、次世代には伝達されないと考えられる。一方、卵細胞では、細胞核のまわりに色素体核が観察された (Fig. 7 E)。卵細胞の色素体 DNA 量は、胞原細胞の値とほぼ同じで、胞子母細胞の最終段階の値の約 2 倍であった (Fig. 8)。

Fig. 7. ナガサキツノゴケの精細胞 (造精器) と卵細胞 (造卵器) の DAPI 染色像.

A, 球形の細胞核を含む精細胞. 細胞核 (arrowhead) のまわりにオルガネラ核 (arrow) が観察される. B, 伸長し始めた細胞核を含む精細胞. C, 長く伸長した細胞核を含む精細胞. D, 造卵器の透過光像. E, 造卵器の DAPI 染色像. 細胞核 (arrowhead) のまわりに色素体核 (arrow) が存在する. 全てのスケールバーは $10\mu\text{m}$ を示す. Izumi and Ono (in press) より改変して引用.

胞子体細胞と胞子発芽初期の配偶体細胞の色素体 DNA 量はほぼ同じ値であった (Fig. 8)。分裂間期の色素体 DNA 量は、胞原細胞の値とほぼ同じで、胞子母細胞の最終段階の値の約 2 倍であった (Fig. 8)。これは胞子形成過程で半減した色素体 DNA 量は、胞子発芽の前あるいは直後に倍化して元の値に戻ることが示している。胞子体細胞と配偶体細胞の色素体 DNA 量は、色素体の伸長に伴って増加し、最大で約 2 倍の値を示した (Fig. 8)。これは、胞子体および配偶体の体細胞分裂サイクルでは、色素体は細胞核と同様に、自身の DNA を 2 倍に複製して 2 個の娘色素体に分裂することを示している。

ナガサキツノゴケの色素体 DNA 量がライフサイクルの間で以下に示すように変化すると考えられる。精細胞の色素体 DNA は、母性遺伝をするため、精子形成の過程で消失する。そのため、卵細胞の色素体 DNA 量は、受精の前後で変化しない。その後の胞子体細胞の分裂サイクルでは、色素体は自身の DNA を 2 倍に複製して 2 個の娘色素体に分裂するサイクルを繰り返す。そのため、色素体 DNA 量は、複相世代を通じて同じ量が維持される。その後、色素体 DNA 量は胞子形成過程で半減するものの、胞子発芽の前後で倍化して元の量に戻る。以後の体細胞分裂サイクルでは胞子体細胞と同様の分裂サイクルを繰り返し、単相世代でも複相世代と同じ量の色素体 DNA が維持される (Fig. 8)。

おわりに

これまでの研究で、ナガサキツノゴケの色素体 DNA 量は胞子形成過程で半減するものの、胞子発芽の前後で倍化して元の量に戻ることが明らかになった。ところで、色素体の DNA 量が胞子形成過程で細胞核と同様に半減することにどのような意味があるのだろうか。最後に、この点について言及すべきではないかと思われるが、このような現象は、現時点ではナガサキツノゴケでしか確認されておらず、何とも言いようのないのが現状である。著者らは、他のツノゴケ類についても胞子母細胞の DAPI 染色を試みたが、色素体内にデンプン粒が蓄積されるため、色素体核を観察することは不可能であった。今後、より多くの種で、特に下等な藻類で胞子形成過程での色素体 DNA 複製サイクルが明らかになると、何らかの仮説が立てられるのではないかと考えている。

謝辞

本総説に関連する研究を行うにあたりご協力とご助言を頂いた、熊本大学の小野莞爾博士、高宮正之博士、北陸農業試験場の福井希一博士に深く感謝する。

引用文献

- Brown, R. C. and Lemmon, B. E.** (1987a) Division polarity, development and configuration of microtubule arrays in bryophyte meiosis. I. Meiotic prophase to metaphase I. *Protoplasma* **137**: 84-99.
- Brown, R. C. and Lemmon, B. E.** (1987b) Division polarity, development and configuration of microtubule arrays in bryophyte meiosis. II. Anaphase to the tetrad. *Protoplasma* **138**: 1-10.
- Brown, R. C. and Lemmon, B. E.** (1990) The quadripolar microtubule system and meiotic spindle ontogeny in hornworts (Bryophyta: Anthocerotae). *Amer. J. Bot.* **77**: 1482-1490.
- Busby, C. H. and Gunning, E. S.** (1988) Establishment of plastid-based quadripolarity in spore mother cells of the moss *Funaria hygrometrica*. *J. Cell Sci.* **91**: 117-126.
- Fukui, K.** (1985) Identification of plant chromosomes by image analysis method. *The Cell Tokyo* **17**: 145-149. (in Japanese)
- Fukui, K.** (1986) Standardization of karyotyping plant chromosomes by newly developed chromosome image analyzing system (CHIAS). *Theor. Appl. Genet.* **72**: 27-32.
- Fukui, K.** (1988) Analysis and utility of chromosome information by using the chromosome image analyzing system, CHIAS. *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.* **4**: 153-176.
- Izumi, Y. and Ono, K.** (1994) Pattern of the plastid division in spore mother cells of the hornwort *Anthoceros punctatus*. *J. Plant Res.* **107**: 147-152.
- Izumi, Y. and Ono, K.** Changes in plastid DNA content during the life cycle of the hornwort *Anthoceros punctatus* L. *Cytologia* (in press).
- Izumi, Y., Ono, K., Takamiya, M. and Fukui, K.** (1993) Chloroplast division in cultured cells of the hornwort *Anthoceros punctatus*. *J. Plant Res.* **106**: 319-325.
- Kawano, S.** (1991) The life cycle of mitochondria in the true slime mould, *Physarum polycephalum*. *Bot. Mag. Tokyo* **104**: 97-113.
- Kawano, S., Nishibayashi, S., Shiraishi, N., Miyahara, M. and Kuroiwa, T.** (1983) Variance of ploidy in mitochondrial nucleus during spherulation in *Physarum polycephalum*. *Exp. Cell Res.* **149**: 359-373.
- Kuroiwa, T.** (1982) Mitochondrial nuclei. *Int. Rev. Cytol.* **75**: 1-59.
- Kuroiwa, T.** (1989) The nuclei of cellular organelles and the formation of daughter organelles by the plastid-dividing ring. *Bot. Mag. Tokyo* **102**: 291-329.
- Kuroiwa, T.** (1991) The replication, differentiation and inheritance of plastids with emphasis on the concept of the organelle nuclei. *Int. Rev. Cytol.* **128**: 1-62.
- Kuroiwa, T., Suzuki, S., Ogawa, K. and Kawano, S.** (1981) The chloroplast nucleus: distribution, number, size and shape, and a model for the multiplication of the chloroplast genome during chloroplast development. *Plant Cell Physiol.* **22**: 381-396.
- Miyakawa, I., Aoi, H., Sando, N. and Kuroiwa, T.** (1984) Fluorescence microscopic studies of mitochondrial nucleoids during meiosis and sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **66**: 21-38.
- Miyakawa, I., Higo, K., Osaki, F. and Sando, N.** (1994) Double staining of mitochondrial nucleoids in the living yeast during the life cycle. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **40**: 1-14.
- Ono, K., Izumi, Y. and Takamiya, M.** (1992) Isolation, culture and thallus regeneration of protoplast from the hornwort *Anthoceros punctatus* L. cultured cells. *Plant Tissue Culture Letters* **9**: 27-31.
- Suzuki, K., Ehara, T., Osafune, T., Kuroiwa, H., Kawano, S. and Kuroiwa, T.** (1994) Behavior of mitochondria, chloroplasts and their nuclei during the mitotic cycle in the ultramicroalga *Cyanidioschyzon merolae*. *Eur. J. Cell Biol.* **63**: 280-288.