

「見えた」太古の植物細胞の姿—超高分解能FE-SEMが明らかにした灰色植物の真の微細形態と多様性

The Ancient Plant Cell Now “Visible” — Native Ultrastructural Feature and Diversity of Glaucophytes Unveiled by Ultra-High Resolution FE-SEM

高橋 紀之^{*1}, 野崎 久義^{*2}

1. はじめに

植物の姿と聞いて、何を思い浮かべるであろうか。我々の身の回りには陸上植物が繁茂しており、我々は日々これらを利用しながら生活している。この陸上植物は緑色植物と呼ばれるグループの1つである(図1)¹⁾。アサクサノリなどで人との関わりも深い紅藻は広く海洋に分布しているが、こちらは紅色植物と呼ばれるグループである(図1)。これらの植物は複雑な多細胞の体制が進化しており、肉眼で直接その姿を捉えることができるため、馴染み深い生き物である。このような植物の共通祖先、すなわち「最初の植物」の姿は一体どのような形態であったのであろうか。これを紐解く鍵となる植物が知られている。それは灰色植物と呼ばれる生物で、緑色植物・紅色植物と並んで植物の3大グループを構成している(図1)¹⁻³⁾。灰色という名前を冠しているが、実際には青緑色～碧色を呈する美しい植物である(図1)。しかし他の2グループとは対照的に、単細胞～群体性の淡水産微細藻の稀産種が20種程度知られているに過ぎない^{3,4)}。

植物界

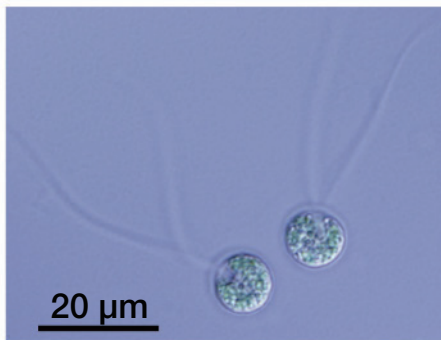
灰色植物

グ라우コキスチス目



Glaucocystis nostochinearum

グロエオカエテ目



Gloeochaete wittrockiana

キアノポラ目



Cyanophora paradoxa

紅色植物



サクラノリ



ユカリ

緑色植物



トクサ



オオシオグサ

図1 植物の主要な3系統群：緑色植物・紅色植物・灰色植物。3目よりなる灰色植物は青緑色～碧色の淡水産微細藻稀産種しか知られていないが、試験管内の培地で培養可能である。文献¹⁾より転用した。

植物の始まりである10-20 億年前は先カンブリア時代であり、我々動物の祖先がまだ単細胞生物として泳いでいた頃である¹⁾。当時の植物の祖先はまだ光合成能力はなく、2本の鞭毛によって自由に泳ぎ回り、餌を捕食していたと考えられている。このような従属栄養性の鞭毛虫がシアノバクテリアを細胞内に取り込み、光合成によって得られた産物を利用する見返りにシアノバクテリアに光の当たる棲息場所を与えるという共生(細胞内共生)を始めた(図2)。

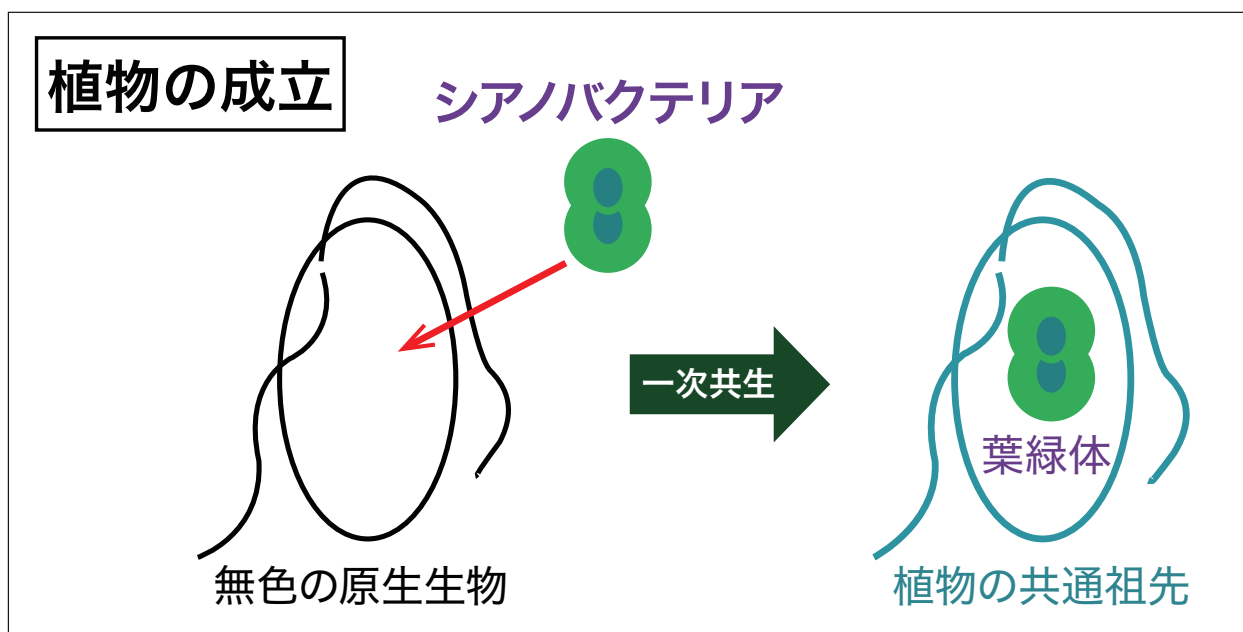


図2 細胞内共生による植物成立の模式図。10-20 億年前、光合成をしない原生生物が光合成細菌シアノバクテリアを取り込み、葉緑体を有する最初の植物細胞が誕生した。文献¹⁾より転用した。

両者は徐々に一体となって、統制のとれた1つの生物へと進化し、シアノバクテリアは現生の植物の葉緑体となった。このような細胞内共生による植物細胞成立のシナリオは細胞内共生説として広く受け入れられている⁵⁾。しかし、シアノバクテリアを取り込んだ従属栄養性の鞭毛虫の系統についてはほとんど分かっていない。一方、色素体の色素組成や形態がシアノバクテリアに極めて類似していることが特徴である、現生の灰色植物、中でも単細胞遊泳性のキアノポラ(*Cyanophora*)はこの当時の植物の姿を未だに留めている生きた化石と考えられ(図1)、全ゲノム解析を含めた様々な研究に用いられている⁶⁾。最近の研究によれば特異な細胞外被構造を有するキアノポラは最初の植物の姿、あるいはシアノバクテリアを取り込んだ鞭毛虫そのものの姿を留めていると示唆されている^{7, 8)}。この姿を走査電子顕微鏡(SEM)によって直接捉える試みはこれまでも行われていた⁹⁾にもかかわらず、従来の汎用SEMではこの真の姿を明らかにできていなかった。

2. 微細藻類としての灰色植物の観察手法

近年、様々な微細藻類で培養が可能となってきたため、野外試料を直接観察に用いる必要がなくなってきた。灰色植物では、試験管に入れた培地に1個体を接種し明所条件で培養すると、クローン細胞で構成された培養株が得られ、順次新しい培地に接種してゆくことで継体培養による維持が可能である。このようなクローン培養株は遺伝的に均質な生物から構成されるため、野外試料を直接用いるのに比べ、再現性のある実験材料として広く用いられている。灰色植物は稀産であり、このような培養株の数は限られていることから、我々は世界各地の保存培養機関より保存培養株を取り寄せ利用しており、さらには野外採集試料から新たに新規培養株を確立することで、クローン株レベルでの細胞微細形態の観察を行っている^{3, 10)}。

3. 原始的植物細胞のFE-SEM観察

陸上植物の細胞は細胞膜で包まれた原形質体(プロトプラスト)とその外側をとり囲む細胞壁で構成されている。一方、微細藻類では必ずしも細胞壁は存在せず、細胞壁とは独立に細胞原形質体の表層に細胞膜以外の構造(細胞外被構造)が存在する場合がある。灰色植物キアノポラ属は細胞壁を持たず、プレートを含んだ扁平小胞であるプレート小胞が細胞膜を裏打ちする特異な細胞外被を持つことは知られていた⁹⁾が、これを反映した表面の微細構造は知られていなかった。

我々はまず汎用 SEM を用いて酸化オスミウムで単固定したキアノポラ・パドクサ(*Cyanophora paradoxa*)の細胞の観察を行った¹⁰⁾。本種はキアノポラ属の中で最も普通に利用されている種であり、灰色植物を代表するモデル生物でもある(図1)。加速電圧15 kV では従来の報告⁹⁾と同様に細胞表面に外被の構造が観察されなかった。ところが、電子線が透過せず細胞表面構造が観察可能となる低加速電圧で細胞外被表面に微細構造が存在することが明らかとなった(図3)¹⁰⁾。

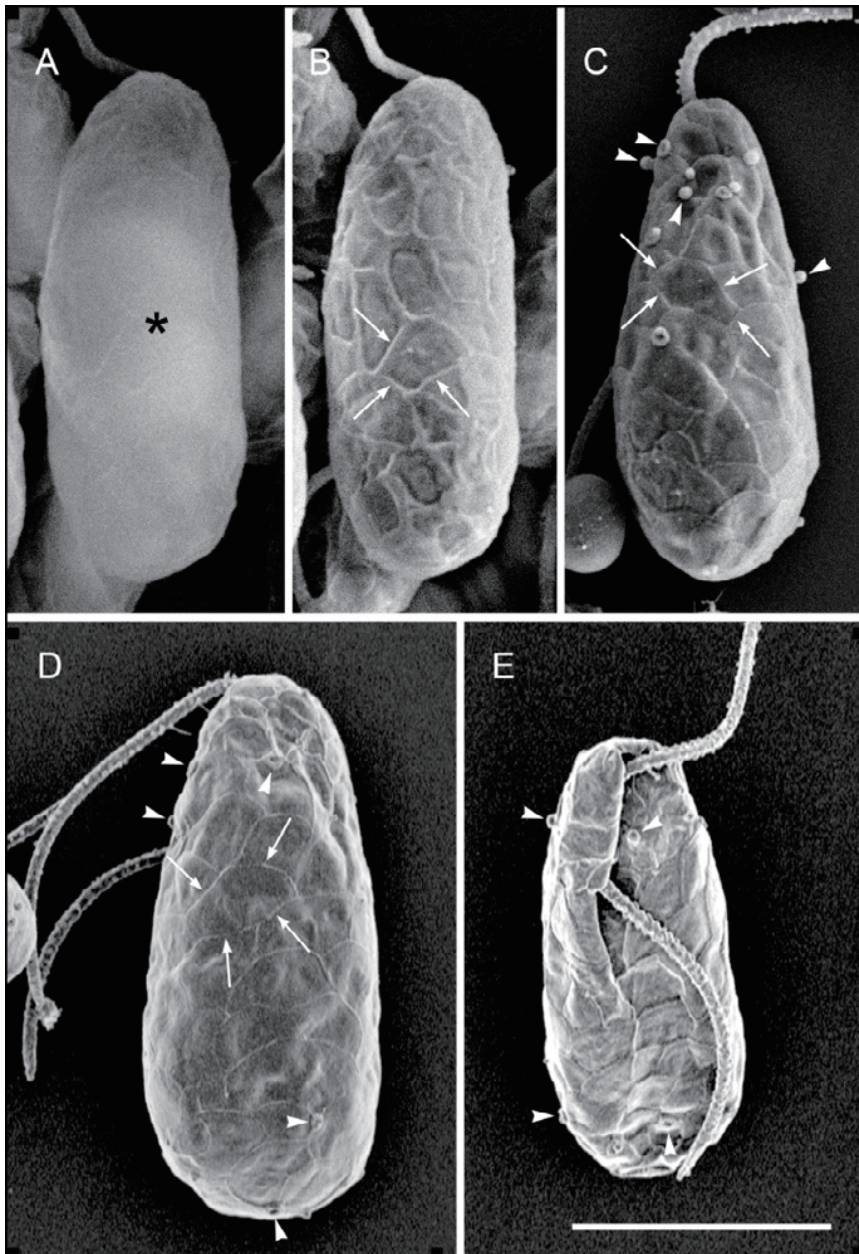


図3 灰色植物キアノポラ・パドクサ(*Cyanophora paradoxa*)を用いた走査電子顕微鏡(SEM)法の比較。Bar = 5 μ m。

(A)四酸化オスミウム単固定, 汎用SEM 像, 加速電圧 15 kV。

(B)四酸化オスミウム単固定, 汎用SEM 像, 加速電圧 5 kV。低加速電圧で表面構造が現れた。

(C)四酸化オスミウム・グルタルアルデヒド二重固定, 汎用SEM 像, 加速電圧 5 kV。固定法をよりマイルドなものとすることでアーティファクトの少ない構造が観察できた。

(D, E) 四酸化オスミウム・グルタルアルデヒド二重固定, 電界放出形(FE-) SEM 像, 加速電圧1 kV。低加速電圧FE-SEM 法によって、嶺で囲まれた模様が鮮明に観察できた。文献¹⁰⁾より転用した。日本メンデル協会の転載許可による。

しかし、キアノボラの細胞外被の微細な模様を捉えるには汎用 SEM の分解能では不十分であった。そこで超高分解能電界放出形 SEM (FE-SEM) による表面観察を実施した(日立ハイテクデモルームSU8020 を利用させて頂いた)。近年の超高分解能 FESEM は電界放出銃の印加電圧に比べても低い照射電圧が可能となっており、低加速電圧超高分解能観察が可能な FE-SEM であれば外被表面の微細構造の詳細が明らかになると期待したのである。この結果、キアノボラ・パラドクサの細胞表面全体を覆う、嶺により縁どられた模様が認められた¹⁰⁾ (図3)。キアノボラの細胞膜表面全体がこのような緻密な微細な模様で覆われているとは思ってもよらなかったもので、観察している我々にとっては驚きであった。そしてこの嶺構造を解明するため、超薄切片透過電子顕微鏡 (TEM) 観察を行ったところ、嶺は細胞膜を裏打ちするプレート小胞の境界における反り上がりによって形成されていることが分かった¹⁰⁾。キアノボラの細胞は細胞壁を欠くため、このような強固なプレートを包んだ扁平小胞が隙間なく細胞膜を裏打ちすることで細胞の支持機能を担っていると考えられる。その結果プレート小胞同士に重なりが生じ、細胞膜表面に嶺や模様という緻密な構造が生じていたのだ。超高分解能 FE-SEM が、細胞膜の表面全体にちりばめられた裏打ちする扁平小胞がもたらす緻密な微細模様を捉えたのであった。我々のその後の研究成果によれば、この「細胞膜の内側で小葉状の扁平小胞が密に裏打ちする細胞外被構造」を有するキアノボラ様の鞭毛虫が灰色植物ひいては植物の共通祖先であったと推測されている⁸⁾。FE-SEM によって10-20 億年前の最初の植物の姿を微細構造レベルで「見た」瞬間であった。

4. 原始的植物の種の多様性

さてキアノボラ属と一口で言っても、キアノボラ・パラドクサ1種だけが存在する訳ではない。本属の種多様性が分からなければその共通祖先、最初の植物の姿にまで遡る共通の特徴も分からない。緑色植物・紅色植物と同じ時間進化してきたのだから、灰色植物においてもそれなりの形態の多様化があつて然るべきであると考え、我々は灰色植物の種分類学的研究を実施している²⁾。キアノボラ属には従来3種が記載されていたが、多くのクローン株を用いた微細形態の多様性に着目した研究は実施されていなかった³⁾。そこでキアノボラ・パラドクサで認められた細胞外被構造などの微細形態に着目した比較形態観察を開始した。最新の電子顕微鏡機器を用いることで、微細な灰色植物であっても巨視的な植物と同じように形態による種分類ができると期待したからである²⁾。

我々が独自に確立した新規株を含む培養株8株全株を用いて、低加速電圧 FE-SEM と超薄切片 TEM による形態比較を行った(図4)。

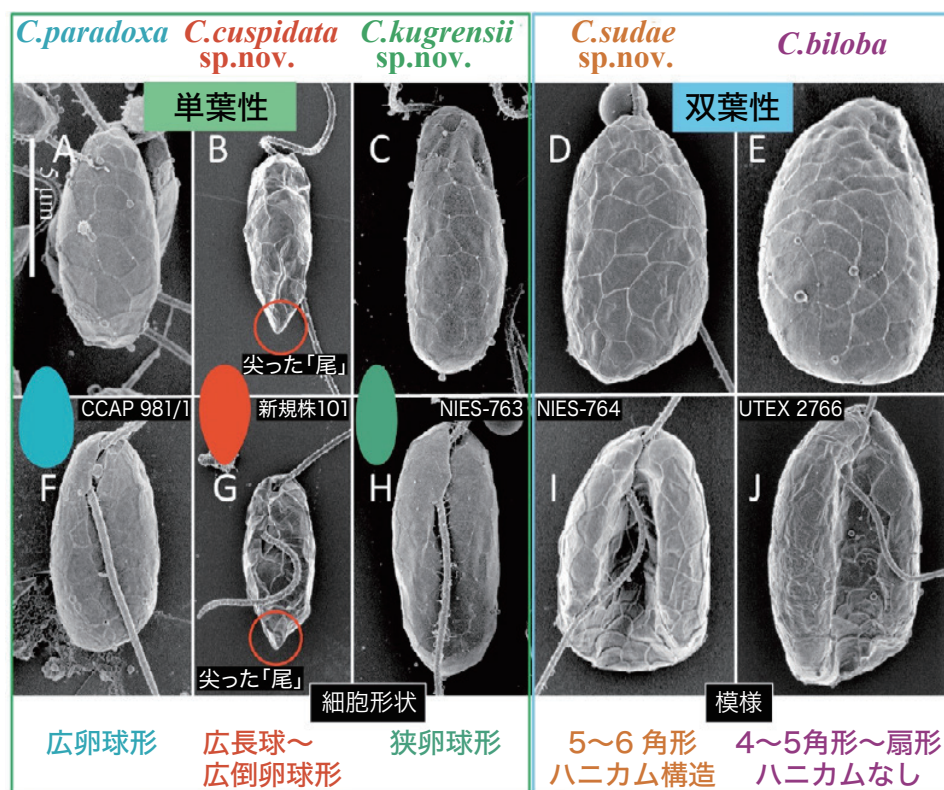


図4 Cyanophora 属5種の低加速電圧電界放出形走査電子顕微鏡写真。Bar=5 μm。(A, F)キアノボラ・パラドクサ(*Cyanophora paradoxa*)。(B, G) 新種キアノボラ・クスピデータ(*Cyanophora cuspidata*)。細胞後端は時に非常に尖った尾を形成していた。(C, H) 新種キアノボラ・クグレンシー(*Cyanophora kugrensis*)。(D, I) 新種キアノボラ・スダエ(*Cyanophora sudae*)。模様は5~6角形でハニカム構造様。(E, J) キアノボラ・ピロバ(*C. biloba*)。模様は4~5角形~扇型。文献³⁾より引用・改変した。John Wiley and Sonsの転載許可による(License Number: 3790920895102)。

その結果、先述のキアノポラ・パロドクサで判明した、細胞膜を裏打ちするプレート小胞が重なりあって細胞全体を覆うという外被微細構造は本属に共通する特徴であることが分かった³⁾。一方、本属は腹側から見て細胞の中央に深い溝が走り左右の両葉に分かれる双葉性の種と、このような葉の分化の見られない単葉性の種とに大きく分類された(図4)。

双葉群において嶺で囲まれた細胞表面の模様を細胞背側で比較したところ、キアノポラ・ビロバ(*Cyanophora biloba*)で4~5角形~扇型であるのに対し、新種キアノポラ・スダエ(*Cyanophora sudaе*)では5~6角形のハニカム構造様であり、両種をこの表面の模様によって識別することができた(図4)³⁾。フリーズフラクチャ(凍結切断)TEMによって細胞膜を剥がして観察した結果、低加速電圧FE-SEMで観察される模様が内部のプレート小胞の形態を反映していた(図5)。

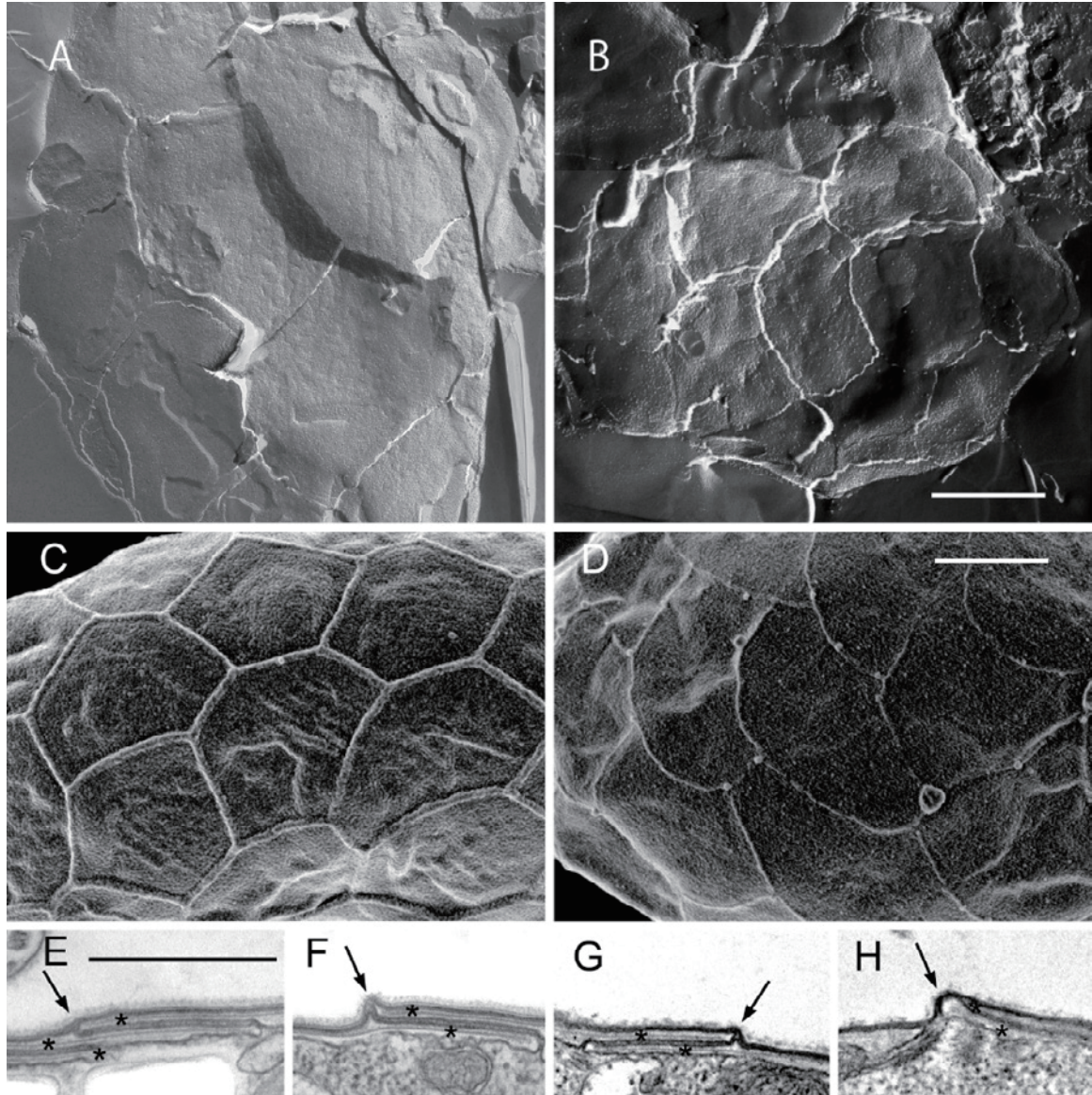


図5 フリーズフラクチャ透過電子顕微鏡(TEM) (A, B)、電界放出形走査電子顕微鏡写真(C, D)と超薄切片TEM(E-H)。細胞表面全体を覆う模様は嶺により縁どられるが、嶺はプレート小胞の境界における反り上がりによって形成され、模様は内部のプレートの形態を反映していた。Bar=1 μm。(A, C, E, F)新種キアノポラ・スダエ(*Cyanophora sudaе*)。(B, D, G, H)キアノポラ・ビロバ(*C. biloba*)。文献³⁾より引用・改変した。John Wiley and Sonsの転載許可による(License Number: 3790920895102)。

単葉群では、新種キアノポラ・クスピダータ(*Cyanophora cuspidata*)がしばしば細胞後端に非常に鋭く尖った尾を形成する点で区別できた(図4)³⁾。この尾は低加速電圧FE-SEM法によって初めて非常に鋭利であり本種に固有であることが明瞭に示された。さらに細胞の輪郭が明瞭なSEM写真上では詳細な細胞形状が測定でき、種間の統計的な形態差が判明した。キアノポラ・クスピダータでは細胞前端の方がより膨らむ(頭でっちな)広長球~広倒卵球形であった。一方、キアノポラ・パロドクサではずんぐりした卵のような広卵球形であり、新種キアノポラ・クグレンシー(*Cyanophora kugrensi*)では細長い卵のような狭卵球形であった(図4)。

以上の分類学的研究³⁾によって3新種が明らかとなり(図4)、本属には従来の2倍にも相当する種が存在することが判明した。このことからこれまでは非常に小さな系統群と考えられてきた灰色植物にも光学顕微鏡のみでは判別が難しい未記載種がかなり存在することが示唆された。この中で低加速電圧 FE-SEM 観察による形態比較は種を識別する分類形質を発見するのに有効であり、細胞全体を観察できる利点を活かし微細構造レベルの識別点を明らかとした。より高倍率の観察も可能な FE-SEM では、細胞膜表面のナノスケールのざらつきに種間差が認められたのだが、現状では分類形質として採用していない²⁾。近い将来本属の利用可能な培養株が増えることで、このスケールでの分類形質によって更なる新種を識別できるようになるかもしれない。

5. 微細藻類の分類学と形態学のこれから

これまで概観したように低加速電圧 FE-SEM 法による形態比較は微細構造レベルの分類形質を明らかにし、微細藻類の種を識別するのに威力を発揮した。さらに現在を生きる我々が直接観察することのできない10-20億年前の植物の最初の姿を「見る」ことができた。より多くの灰色植物や真核生物で微細構造レベルの種分類が進めば、これらの過去の姿や進化の過程を推測することができるかも知れない^{2,8)}。現在我々はキアノポラとは別の灰色植物であるグラウコキスティス(*Glaucocystis*)属(図1)の種レベルの分類学研究を実施している¹⁾。本属ではキアノポラとは異なり厚い細胞壁を持つので⁸⁾、低加速電圧 FE-SEM による細胞外被の直接観察は困難である。このため我々は超高压電子顕微鏡(H-3000)を用いたトモグラフィーによる外被構造の立体微細構造レベルの観察を行っている。また、超高分解能 FE-SEM(SU8220)を用いた細胞壁表面の微細構造観察も実施している。超高压電子顕微鏡による比較形態学的な観察は微細藻類の分類に用いられたことはいまだにないが、細胞壁の内側の原形質体の3次元構造が直接観察できるので、今後細胞微細構造の多様性を用いて微生物を分類するのに非常に有用であると考えられる。

2015年はずいぶん故外村彰博士の悲願でもあった原子分解能・ホログラフィー電子顕微鏡が完成した年となった¹¹⁾。生物試料についても昨今の技術革新によって FE-SEM や走査型プローブ顕微鏡(SPM)による表面構造全体の詳細な超高分解能観察が可能となり、細胞表面の凹凸のような3次元情報も容易に得られるようになっている。一方、超高压電子顕微鏡や集束イオンビーム(FIB-)SEMを用いることで細胞内部の3次元情報も丸ごと得られるような時代が訪れた。これらの次世代の超微形態観察は、断片的な情報しか得られなかった従来の電顕観察に取って代わって今後の微生物分類の主流となると期待される。分類学と次世代微細形態学が融合することで、現生の生物と祖先的生物の3次元レベルの微細な姿が明らかとなっていくことであろう。この分野からも電子顕微鏡の益々の技術革新が期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、共同研究として低加速電圧 SEM 観察法・固定法を丹念に御教授下さった佐藤繭子、豊岡公德両博士(理化学研究所)には非常に御尽力頂いた。また、フリーズフラクチャ TEM 観察に関しては、高知大学において川村真依氏、奥田一雄教授の親切な御指導の下、共同研究を行った。FE-SEM は日立ハイテクのデモルーム SU8020 を利用させて頂き、観察に際しては檀紫氏、渡邊俊哉氏に御助力を頂いた。藻類試料では川舩かおる博士(東京工業大学)にお世話になり、松崎令博士(東京大学)には微細藻類の取扱いから分子実験まで様々な面で大変面倒をお掛けした。

参考文献

- 1) 高橋紀之, 東京大学博士論文 (英文), 東京 (2016).
- 2) 高橋紀之, 野崎久義, *Plant Morphology* **29**, 49-54 (2016).
- 3) T. Takahashi *et al.*, *J Phycol.*, **50**, 1058-1069 (2014).
- 4) L. Kies, in *Algae and symbioses*, Reisser W (ed.), Bristol, **353-377** (1992).
- 5) L. Sagan, *J Theor Biol.*, **14**, 225-274 (1967).
- 6) D. C. Price *et al.*, *Science*, **335**, 843-847 (2012).
- 7) F. W. Spiegel, *Science*, **335**, 809-810 (2012).
- 8) T. Takahashi *et al.*, *Sci Rep.*, **5**, 14735 (2015).
- 9) P. Kugrens *et al.*, *J Phycol.*, **35**, 844-854 (1999).
- 10) T. Takahashi *et al.*, *Cytologia.*, **79**, 119-123 (2014).
- 11) T. Akashi *et al.*, *Appl Phys Lett.*, **106**, 074101 (2015).

著者紹介

^{*1} 高橋 紀之

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 博士後期課程修了 博士 (理学)

^{*2} 野崎 久義

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 准教授 博士 (理学)