

Volvox carteri の核型決定

小笠原 誠志, 菅井 俊郎, 三輪 五十二
(茨城大・院理工)

Determination of karyotype in *Volvox carteri*

Seiji OGASAWARA, Toshiro SUGAI and Isoji MIWA
(Grad. Sch. Sci. Engn., Ibaraki Univ.)

SUMMARY

The colonial green alga *Volvox carteri* and morphologically close relative species are suited for the study of the evolution of multicellularity and sexual reproduction. However, karyotypes have not been identified in these algae. The difficulty in conducting an observation of the chromosomes of Volvocalean algae can be attributed to their cell walls, chloroplast of cup-shaped around the nucleus, small chromosomes, small genome size and closed mitosis. Previously, we developed a new preparation method of physical treatment of cell for observing mitotic chromosomes in *Pleodorina starrii*. The chromosome size and definite centromeric constrictions were identifiable with this method. In this study, the karyotypes of heterothallic male strains of *V. carteri* were determined. The chromosome number of *V. carteri* was $n=14$. The karyotype consisted of one long submedian centromeric chromosome and 13 short median (or submedian) centromeric chromosomes.

【目的】 群体性の緑藻 *Volvox carteri* とその形態的な近縁種（ボルボックス目）は、多細胞性や性の進化の研究に適している。しかし、これらの藻類では、核型（染色体の数、サイズ、動原体位置）は、不明である。その理由は細胞に細胞壁と核を包むカップ状の葉緑体があり、ゲノムサイズが小さく、核膜が閉じたままで有糸分裂を行うといった要因で、一つ一つの染色体の観察が難しいからである。我々はこれまでにボルボックス目 *Pleodorina starrii* において分裂同調を行い、予め物理的な損傷を与えた細胞をスライドガラスに展開するという、新しく開発した方法によって、良好な分裂像を観察し群体性ボルボックス目で初めて核型を明らかにした。本研究の目的は、*P. starrii* の染色体観察の為に開発した方法をゲノム解読やメス配偶子化遺伝子の発見などが行われている *V. carteri* に適用して、核型を明らかにすることである。

【方法】 *Volvox carteri* Adm（オス）株を SVM 培地で培養し、明暗サイクル 16 : 8、30°C で同調培養した²⁾。ゴニジア（分裂して娘群体となる細胞）を持つ群体をホモジナイザーで数回処理し、群体からゴニジアをとりだした。そのあと、7% パーコールの密度勾配遠心にて分裂細胞を得た。細胞は、メタノール：酢酸（3 : 1）で固定した。その後、5% ギムザ液で 30 分染色した。

【結果】 ボルボックス目の藻の凝縮した染色体が出現するのは、栄養生殖期の娘群体形成の時の分裂と接合子の発芽時である。接合子の発芽は有性生殖能の高い相補的な株が必要であり、接合の誘導から発芽までには長期間かかる、さらに、この時の核は 2 倍体となっているため観察が栄養生殖期と比べると複雑になる。栄養生殖期（有糸分裂）は娘群体形成のためにゴニジアと呼ばれる細胞が、初期発生の卵割のような、連続した細胞分裂を数日おきに一回行う。このとき凝縮した染色体を観察することが可能であるため、栄養生殖期の有糸分裂の観察を行うことにした。

核型の決定には、細胞分裂の同調が不可欠である。*V. carteri* は明暗サイクルで、同調培養が可能である。ゴニジアの分裂は回数を重ねるほど、近接した細胞が密になるので他の細胞の染色体が混ざり、誤ってカウントする可能性があるため、1-2 細胞期のゴニジアが観察に適していると考え、同調培養行っ

た。その結果、ゴニジアの 2 細胞期の同じステージ（2 細胞期）に 20-30% の細胞をそろえることができた。分裂期の細胞の蓄積と染色体の短縮の為に微小管阻害剤を使用した。*P. starrii* の染色体観察にさまざまな微小管阻害剤を検討した結果から、有効だったオリザリンを使用した。*V. carteri* では 0.05 $\mu\text{l/ml}$ で 60 分間処理が観察に最適ということが分かった。細胞壁とカップ状の葉緑体を取り除くために、細い管の先を押し付けながら、細胞を何回か押し出すことで、細胞に物理的な損傷を与えた。その後、Air-dry 法で細胞を展開することにより、良好な広がり染色体を観察し、核型を示すことができた。

V. carteri 染色体数は $n = 14$ であった。核型は 1 個の長い次中部動原体型染色体と短い 13 個の中部動原体型染色体または、次中部動原体型染色体からなっていた。この核型は、過去に報告された *V. carteri*³⁾ の 22 本より、*V. aureus* や *V. tertius*¹⁾ の数に同じまたは近い数であった。*P. starrii* の染色体との共通点としては、第 1 番目の染色体は 1 μm 以上の大きさの次中部動原体型染色体であること。それ以外の染色体は 1 μm 以下の小さな染色体である。

【考察】 従来、藻類の染色体観察は押しつぶし法が用いられてきたが、染色体を広げることはほとんど不可能であった。高等植物の染色体観察では広げるために、細胞壁を酵素で溶かしたあとに、標本を作製している。しかし、微細藻では一般的に細胞壁に対して利用できる分解酵素がない。そのため、以前 *P. starrii* の染色体観察のために、あらかじめ細胞に物理的な損傷を与えて展開する方法を開発した。この方法が *V. carteri* についても適用可能であり、今までの方法では妨げになっていた細胞壁と葉緑体に阻まれることなく、一つ一つの染色体を観察でき、核型を決定することができた。この結果は、物理的な損傷を与えた細胞を使い展開する方法が、細胞壁をもった藻類の核型を決定する強力な方法となることを示す。我々の結果は、動植物で行われているような有糸分裂の細胞遺伝学的な研究がボルボックス目の藻において可能であることを示す。

【文献】

- 1) Cave and Pocock (1951) Am. J. Bot., 37, 800-811.
- 2) Kirk and Kirk (1983) Dev. Biol., 96, 493-506.
- 3) Metzner (1945) Bull. Torrey Bot. Club, 72, 121-136.