

(様式第 1 3 号)

## 学 位 論 文 要 旨

氏名:尾崎佑磨

題目: きのこ子実体に適した電子顕微鏡試料作製法の開発とその活用に関する細胞学的研究

(Establishment of specimen preparation method for electron microscopic analysis of mushroom fruiting bodies and its application for morphogenesis study)

菌類・きのこの生理・生態に関する基礎知見の蓄積は不十分であり、子実体形成機構に関して不明な点が多く残されている。そこで本研究では子実体形成、すなわち、形態形成に関する基礎知見を解明することを目的に、形態学的側面からこれらの課題にアプローチすることを目指した。電子顕微鏡は高い分解能により細胞の微細構造を可視化することができる。しかし、電子顕微鏡で観察するためには、一般的に、固定した生物試料の原形が保持され、水分が取り除かれ、さらには電子線照射に耐えられることが前提条件となる。すなわち、細胞・組織が本来有する微細構造を保持できる有効な試料作製技術の開発が求められる。これまで試料作製に関して、主に動物の細胞・組織を中心とした技術革新が展開されてきた。しかし菌類の細胞には動物の細胞には存在しない細胞壁や発達した液胞が存在するため、動物細胞における試料作製技術をきのこに転用しても高コントラストで、かつ、高解像度の微細構造を捉えることが難しいという問題があった。そこで本研究では、世界的に広く生産され商業的にも価値の高い食用きのこ、ヒラタケ*Pleurotus ostreatus*を用いて有効な試料作製技術を開発し、その手法を用いて形態形成に関する基礎知見の解明を目指した。

第2章では透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察のための試料作製技術についてヒラタケ幼子実体の柄を構成する組織を対象に検討した。一般的にTEMで生物試料を観察するためには、細胞に樹脂を浸透させ、樹脂包埋試料を作製し、そこから薄く切り出した切片を観察する方法が用いられている。高コントラスト・高解像度の画像が取得しやすいエポキシ樹脂 (主剤) の重合には、硬化剤と加速剤の樹脂混合物を用いる。本研究では、きのこ試料へのエポキシ樹脂浸透処理過程において用いられる加速剤の有無が、細胞内微細構造に与える影響について調査した。その結果、加速剤無添加の樹脂混合物を用いた場合、加速剤を添加した場合と比較して全体的に細胞膜、及び、細胞小器官の膜のコントラストが低下した。ミトコンドリア、また、ほとんどの核膜、粗面小胞体膜は膜構造を認めることが不可能であった。これらのことから、加速剤は樹脂の重合反応を加速させる物質であるが、細胞内の膜のTEM像に影響を与えることが示された。従って、細胞内の膜を対象とした解析をするにあたっては、加速剤を添加した樹脂混合物を用いることが適正であることが示唆された。

第3章では走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察のための試料作製技術について、ヒラタケ成熟子

実体の子実層托を対象に検討した。ヒラタケ子実層托をグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムによる二重固定をした試料をt-ブチルアルコール凍結乾燥をしてSEMで観察すると、細胞は著しく収縮して変形を生じ、本来の細胞表面における微細構造を観察できないという問題が認められた。そこで試料の固定法を改良した結果、四酸化オスミウム、タンニン酸、四酸化オスミウムによる三重固定 (OTO三重固定) をすると、t-ブチルアルコール凍結乾燥を経ても細胞の収縮を生じず、微細構造の観察が可能であることを明らかにした。同一条件下で作製した試料をTEMで観察した結果より、細胞表面を観察するためのSEM試料作製においても、四酸化オスミウムを細胞壁、細胞質に十分浸透させ結合させることがt-ブチルアルコール凍結乾燥法による細胞の収縮を抑制するために重要であることが示唆された。

細胞内自食作用であるオートファジーは生物の様々な代謝に広く関与することが知られている。また、酵母の孢子形成や植物病原菌の病原性獲得など、菌類の形態形成にオートファジーが関与することが報告されている。一方、生活環の主体を菌糸体として生息するきのこは子実体を形成する場面では著しい形態形成を伴う。そこで第4章では、きのこ子実体形成場面におけるオートファジーの関与を調査するべく、ヒラタケにおけるマクロオートファジー (以下オートファジー) 関連構造体のTEM観察による検出を試みた。観察の結果、細胞質中に細胞質成分を含む内外二重膜構造体が観察された。連続切片を観察した結果、二重膜構造体の内容物が二重膜により細胞質から完全に隔離されていることが明らかとなった。また、構造体の形と大きさ、限界膜の厚み、さらに液泡と相互作用する場面が観察されたことから、二重膜構造体はオートファゴソームであると判断した。なお、細胞質ゾルを隔離したオートファゴソームには内容物に関して多様性が認められたこと、また担子菌類に特有の隔壁構造を構成するかっこ体がオートファゴソームによって隔離されていたことが判明したが、これらはきのこの細胞において特異的に認められる現象であると思われる。さらにオートファゴソームに成熟する前の構造体、隔離膜が検出され、きのこにおけるオートファジー経路を推定した。

本研究は、菌類・きのこを対象とした電子顕微鏡観察のための新たな技術を提案し、さらにその活用例を示した。得られた知見は今後の菌類・きのこにおける形態形成機構の詳細を解析する上で極めて有益である。