

学 位 論 文 題 名

Studies on the behavior and function of centrioles
and centrosomes for the spindle formation
in the fertilization of brown algae

（褐藻植物の受精における紡錘体形成，特に中心子と中心体の挙動，
並びに機能について）

学位論文内容の要旨

褐藻植物の有性生殖には、卵と精子で受精する卵生殖、雌雄の配偶子の大きさが異なる異形配偶子接合、並びに雌雄の配偶子の大きさが等しい同形配偶子接合が存在する。卵以外の褐藻植物の配偶子の多くは、体の腹部から伸びる長短2本の鞭毛を持ち、その基部には基底小体(= basal bodies, centrioles)が存在している。これまで、卵生殖をするヒバマタ、エゾイシコンブ、および卵に鞭毛が存在するために卵生殖への移行段階にあると考えられているミツイシコンブ、同形配偶子接合をするワタモについては、電子顕微鏡・間接蛍光抗体法による観察から受精時に中心子が父性遺伝することが明らかになっていた。本研究では、これまで観察されていなかった異形配偶子接合をするムチモについて、中心子を標識する抗セントリン抗体を用いた間接蛍光抗体法により詳しく観察した。その結果、異形配偶子接合を行うムチモにおいても中心子は父性遺伝であることが明らかになったため、褐藻植物では、すべての有性生殖様式において中心子は父性遺伝を行うと結論付けた。

褐藻植物において中心子は、生殖細胞形成時には鞭毛基部として鞭毛形成に関与するという働き他に、微小管形成中心 (= MTOC) である中心体の構成要素の一つとして細胞内に存在している。中心体は細胞分裂時に紡錘体極の形成に重要な働きを有しており、動物細胞や褐藻植物においては、中心子、並びにその周辺物質からなる。中心子自身は単独では微小管形成中心には成り得ず、中心子周辺物質、特に γ -チューブリンの附随が中心体の微小管重合能には不可欠であると考えられている。しかしながら、現在においても中心体における中心子の働きや、紡錘体形成における中心体の働きについては不明な点が多い。そこで、褐藻植物の接合子の紡錘体形成をモデルとして、雄性配偶子由来の中心子の挙動と中心体の働きについて観察を行った。

まず、卵生殖を行うヒバマタを材料に、1) 正常受精、2) 多精受精、3) 無核卵断片の受精、4) 多核卵の受精、5) 単為発生、6) コルヒチンによる核融合阻害した場合の紡錘体形成について、抗セントリン抗体、抗 γ -チューブリン抗体を用いての間接蛍光抗体法により調べた。セントリンは常に中心子を標識しており、正常受精では中心子付近から微小管が発達する時、特に分裂期直前から核分裂中期にかけて γ -チューブリンは中心子近傍への強い局在性

を示した。多精受精した場合、複数の精子により持ち込まれたそれぞれの中心子が複製・移動して、多極の紡錘体が形成された。基本的に受精に関わった精子の数の2倍の数の紡錘体極が形成された。無核卵断片と精子が融合した場合、その直後に細胞壁が合成され、精核の周辺に微小管が発達した。しかし、精核の染色体の凝縮および紡錘体形成は観察されなかった。複数個の核を含む卵と精子が受精した場合、精核は1個の卵核と融合した。核分裂時には、精核と核融合しなかった卵核も染色体凝縮が起こり互いの染色体が混合された。核分裂期にみられる紡錘体は多極になる場合が多く、そのうちの2つの極にのみ中心子が存在していた。単為発生の場合、染色体凝縮が観察され、微小管が染色体周辺に発達するのが観察された。中心子は存在しないが、2極あるいは3極の紡錘体が形成される場合も観察された。受精直後、コルヒチン処理で核融合を阻害した場合、卵核はDNA合成を経た後に染色体が凝縮するが、精核ではDNA合成を行わずに染色体が凝縮する。精核では中心子が近傍に存在しており、そこから微小管が発達しているのが観察されるが、明確な紡錘体形成は起こらなかった。一方、卵核周辺において核分裂前には明瞭な微小管の極は見られないが、染色体凝縮が進むにつれて単極あるいは2極の紡錘体が形成された。抗 γ -チューブリン抗体を用いて、中心子を含まない紡錘体極が形成される例(多核卵受精、単為発生、核融合阻害)について調べたところ、 γ -チューブリンは常に中心子の存在する微小管極にのみ存在し、中心子の存在しない微小管極には存在しないことが明らかになった。つまり、a) 中心体が存在していても、精核のみでは染色体の凝縮と紡錘体形成は起こらない、b) 中心体が存在しなくても、卵核では単極あるいは2極の紡錘体を形成することができるとことが明らかになった。以上のことから、ヒバマタの受精・発生において、精子由来の中心子は、正確な2極の紡錘体形成に重要な働きを持つということが示唆されたが、同時に、紡錘体形成にとって精子由来の中心子を基本とする中心体の直接的関与だけではなく、卵核側からのある種の要因も重要な機能を担っていることが明らかとなった。卵核側からの要因については不明な点が多いが、電子顕微鏡観察から報告されている卵核膜周辺に存在する生毛体様構造、あるいはNuMA (nuclear mitotic apparatus protein)などのタンパク質が卵核側に存在しているためではないかと考察を行った。

次に、同形配偶子接合を行うカヤモノリを材料に、1) 正常受精、2) 高温ストレスによる核融合阻害、3) 多精受精した場合の紡錘体形成について電子顕微鏡と間接蛍光抗体法を用いて調べ、ヒバマタ(卵生殖)の場合との比較を行った。核融合阻害をした場合、雄核、雌核共にDNA合成を行っていた。中心子は雄性配偶子由来であるため、雄核側では正常な紡錘体が形成されるが、雌核側では染色体凝縮が起こっているにも関わらず極形成は見られなかった。また、中心子が複製・分離する時に1組の中心子が雄核側から雌核側へ移動し、雄核・雌核それぞれの中心子から互いの中心子の方向へ紡錘体微小管が伸び、特徴的な紡錘体を形成する場合も観察された。多精受精の場合、特に1つの雌性配偶子に2つの雄性配偶子が融合した場合、2組の雄性配偶子由来の中心子が複製した。そのため、4極、あるいは3極の紡錘体が形成された。3極の紡錘体が形成される時には、3極のうち1極に2組の中心子が存在する場合と、1組の中心子が離れて存在し紡錘体の極形成に関与しない場合が観察された。カヤモノリの場合には、紡錘体極には常に中心子が存在し、中心子を持たない新たな極形成は観察されなかった。卵生殖を行うヒバマタと同形配偶子接合を行うカヤモノリ接合子での紡錘体形成の違いは、雌雄配偶子における核の凝縮度の相違や接合子への細胞質の寄与の違いにより生じてくるのではないかと考えられる。また、褐藻植物においては、中心体は核分裂時における紡錘体形成に

とどまらず、細胞質分裂にも重要な働きを有することを多精受精の実験から明らかにした。

以上、本論文では、褐藻植物において接合子の紡錘体形成には、雄性配偶子由来の中心子が関与すること、中心体は紡錘体形成のみならず細胞質分裂にも重要な働きを有することを明確に示した。受精時における中心子の父性遺伝は古くより動物において広く知られていることであり、同様な現象が系統的に遠く離れた褐藻植物の受精において観察できたことは極めて興味深いと考える。褐藻植物の接合子をモデルとして紡錘体形成機構を解析することは、真核細胞が有性生殖を獲得した後に核分裂装置の核となる中心子を雄性配偶子由来にした機構の解明につながるものであると考える。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	市 村 輝 宜
副 査	教 授	落 合 廣
副 査	助教授	木 村 泰 三
副 査	助教授	清 水 隆
副 査	助教授	堀 口 健 雄

学 位 論 文 題 名

Studies on the behavior and function of centrioles and centrosomes for the spindle formation in the fertilization of brown algae

(褐藻植物の受精における紡錘体形成, 特に中心子と中心体の挙動,
並びに機能について)

受精における中心子と中心体の挙動および機能の研究は、卵生殖のみが知られている動物を中心にこれまで研究されてきた。中心体は、中心子、並びにその周辺物質からなり、中心子自身は単独では微小管形成中心とは成り得ず、中心子周辺物質、特に γ -チューブリンの附随が中心体の微小管重合能には不可欠であると考えられている。しかしながら、現在においても中心体における中心子の働きや、紡錘体形成における中心体の働きについては不明な点が多い。原生動物、菌類、藻類には卵生殖の他に同型配偶あるいは異型配偶によって有性生殖をするものが多数あり、同型配偶から異型配偶そして卵配偶への進化過程が想定される。真核生物の細胞分裂や接合子の発生に重要な働きをしている中心子と中心体の本質・正体は、このような進化過程を考慮することによって、より解析的な比較研究が可能となり根元的な理解が得られることが期待される。

そこで本論文では褐藻類を研究材料に選ぶことにより、多精受精のみならず、多核卵や無核卵の受精及び単為発生をも含めたより多様な実験系を組み込みながら、卵配偶だけでなく同型配偶あるいは異型配偶によって生殖する種との比較も行い、受精及び接合子の発生過程における雌雄配偶子の中心子と中心体の挙動及び機能を比較研究し、多くの細胞生物学的新知見を得ることを意図して行われた。

卵生殖をするヒバマタ、エゾイシゲ、卵生殖への移行段階にあるミツイシコ

ンブ、同型配偶をするワタモ等については、受精時に中心子が父性遺伝することがこれまでに明らかになっていたが、本研究でまず異型配偶をするムチモについても中心子が父性遺伝することを明らかにし、中心子の父性遺伝が褐藻類に共通していることを示唆した。

次に褐藻類の接合子の紡錘体形成における雄性配偶子由来の中心子の挙動と中心体の働きについて研究を行った。卵生殖するヒバマタを材料に、1) 正常受精、2) 多精受精、3) 無核卵断片の受精、4) 多核卵の受精、5) 単為発生、6) コルヒチンによる核融合阻害した場合の紡錘体形成について、抗セントロリン抗体、抗 γ -チューブリン抗体を用いての間接蛍光抗体法により調べた結果を得た。ヒバマタの受精・発生において、精子由来の中心子は、正確な2極の紡錘体形成に重要な働きを持つが、しかし紡錘体形成にとって精子由来の中心子を基本とする中心体の直接的関与だけではなく、卵核側からのある種の要因も重要な機能を担っている。卵核側からの要因については不明な点が多いが、電子顕微鏡観察から報告されている卵核膜周辺に存在する生毛体様構造、あるいはNuMA (nuclear mitotic apparatus protein)などのタンパク質が卵核側に存在していることを示唆した。

次に同型配偶をするカヤモノリを材料に、1) 正常受精、2) 高温ストレスによる核融合阻害、3) 多精受精した場合の紡錘体形成について電子顕微鏡と間接蛍光抗体法を用いて調べ、ヒバマタ（卵生殖）の場合との比較を行った。カヤモノリの場合には、紡錘体極には常に中心子が存在し、中心子を持たない新たな極形成は観察されない。卵生殖のヒバマタと同型配偶のカヤモノリ接合子における紡錘体形成の違いは、雌雄配偶子における核の凝縮度の相違や接合子への細胞質の寄与の違いにより起因すると考えられる。また、褐藻類において中心体は、核分裂時における紡錘体形成にとどまらず、細胞質分裂にも重要な働きをすることを多精受精の実験から明らかにしている。

本論文では上記のごとく、褐藻類の受精において、接合子の紡錘体形成には雄性配偶子由来の中心子が重要な働きをすること、しかし雌雄配偶子の異型の度合いが進んだ卵配偶では雌核からの物質の関与が中心体の機能に欠かせないこと、中心体は紡錘体形成のみならず細胞質分裂にも重要な働きを有することなどを明示した。受精時における中心子の父性遺伝は古くより動物において広く知られていることであるが、同様な現象が系統的に遠く離れた褐藻類の受精においても観察できたことは極めて興味深い。褐藻類の接合子をモデルとして紡錘体形成機構を解析することによって、核分裂装置の核となる中心子を雄性配偶子に依存させる接合子（受精卵）の発生機構を発展させた真核生物の有性生殖の進化の解明に大きく貢献した。

よって、著者は北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。