

学 位 論 文 題 名

Studies on the cytoplasmic inheritance of mitochondria
in isogamous and oogamous brown algae

(同型配偶子接合および卵生殖を行う褐藻の
ミトコンドリア細胞質遺伝に関する研究)

学位論文内容の要旨

真核生物の有性生殖様式は、同型配偶子接合から異型配偶子接合を経て卵生殖へと進化してきたと考えられ、褐藻類では、これらの3つの異なる有性生殖様式が確認されている。オルガネラ細胞質遺伝研究の多くは、卵生殖の動物や陸上植物、もしくは同型配偶子接合の緑藻クラミドモナスを対象としたものであり、有性生殖様式の進化過程で細胞質遺伝機構がどのように変化してきたかを考察する上で、褐藻類は興味深い生物群である。現在までに褐藻類のミトコンドリアの遺伝様式は、同型配偶子接合と卵生殖の種で報告されてきた。分子生物学的手法、すなわちミトコンドリアDNA (mtDNA) 塩基配列の異なる種や株を掛け合わせた胞子体のmtDNAを調べる手法で、同型配偶子接合と卵生殖の褐藻のミトコンドリアが母性遺伝することが報告されてきた。卵生殖の褐藻については、電子顕微鏡によって精子由来ミトコンドリアが受精卵内で分解される様子が観察され、形態学的にも母性遺伝であることが報告されている。これに対して同型配偶子接合では、雄性配偶子由来ミトコンドリアの分解は観察されてこなかった。さらに、雄性配偶子 (精子) 由来のmtDNAが消失する時期については、どちらの生殖様式でも明らかにされていなかった。本研究では、同型配偶子接合と卵生殖の褐藻に対して雄性配偶子由来mtDNAの消失時期を明らかにし、同時にミトコンドリア分解過程を観察することで、褐藻のミトコンドリア母性遺伝機構の解明とその進化過程について考察することを目的とした。

第1章では、カヤモノリ (*Scytosiphon lomentaria*) を研究材料として用い、同型配偶子接合におけるミトコンドリア細胞質遺伝機構の解明に取り組んだ。雌雄配偶子と受精後36時間までの接合子について、連続切片の電子顕微鏡観察を行い、接合子内のミトコンドリア数の変化を確認した。その結果、受精時に雌雄配偶子から持ち込まれたミトコンドリアは約25個で、その数は最初の細胞質分裂まで変化せず、ミトコンドリア同士の融合や分裂が接合子では起こらないことを確認した。次にmtDNA塩基配列の異なるカヤモノリの株を掛け合せ、単一発芽体に対してPCR (single germling PCR) を行う方法と、それぞれの株のmtDNA塩基配列を認識するよう設計したプライマーによるPCR法によって、雄性配偶子由来のmtDNAが4細胞期以降の胞子体で消失し始めることを明らかにした。この時期の胞子体の電子顕微鏡観察を行うと、電子密度が低くクリステが分散した異常な形態を示すミトコンドリアが観察され、これが分解途中の雄性配偶子由来ミトコンドリアである可能性が示唆された。これらの結果を総合すると、雄性配偶子由来のミトコンドリアとmtDNAは、1細胞期の接合子内で分解されず4細胞期まで保持されること、そして4細胞期以降の胞子体のそれぞれの細胞内で分解、消失することが考えられた。ミトコンドリア母性遺伝とmtDNAのメチル化の関連について調査するために

bisulfite法による雌雄配偶子mtDNAのメチル化程度を比較したが、雌雄の配偶子間でメチル化程度に差が見られなかった。つまり、同型配偶子接合で起こる雄性配偶子由来mtDNAの選択的消失には、mtDNAのメチル化は関与していないことが示唆された。

第2章では、卵生殖を行う褐藻について研究を行った。ヒバマタ (*Fucus distichus*)、エゾイシゲ (*Silvetia babingtonii*)、ワカメ (*Undaria pinnatifida*) を材料として、抗DNA抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察とmtDNAを対象とした精子のsingle cell PCR法により、精子ミトコンドリアにDNAが存在していることを確認した。次に、受精卵内に持ち込まれた精子mtDNAの消失時期を特定するために、ワカメを材料としてmtDNA塩基配列の異なる株を掛け合わせた接合子に対する株特異的なsingle germling PCR法を確立し、精子のmtDNAが受精直後の1細胞期接合子の間に消失することを明らかにした。ワカメの1細胞期接合子の電子顕微鏡観察では、精子ミトコンドリアが分解されていることを確認することができた。これらの結果から、精子ミトコンドリアとmtDNAは、受精時に卵細胞内に持ち込まれ、受精後の早い時期にミトコンドリアとmtDNAがともに分解されると示唆された。一方、精子と卵のmtDNAのメチル化程度をウガノモク (*Cystoseira hakodatensis*) を用いて調査し、精子と卵の間でmtDNAのメチル化程度に差がある可能性を見出した。

第1章の同型配偶子接合、第2章の卵生殖におけるミトコンドリア細胞質遺伝機構に関する研究から、どちらの有性生殖様式においても雄性配偶子 (または精子) 由来のミトコンドリア分解とmtDNAの消失が同時期に起こる可能性が示された。しかし雄性配偶子由来のmtDNAの消失については、卵生殖のほうが同型配偶子接合よりも早い段階で起こる。ミトコンドリアの分解について注目すると、卵生殖ではミツイシコンブ (*Laminaria angustata*) で報告されているように、精子ミトコンドリアは、小胞体様膜構造で囲われた後にライソゾームで分解されるオートファジー経路によって分解されている可能性が示唆される。これに対して同型配偶子接合で観察されたクリステの分散したミトコンドリアの近傍には、その様な膜構造は確認できておらず、雄性配偶子由来のミトコンドリア分解にオートファジーが関与するかどうかは不明であった。むしろ同型配偶子接合の褐藻では、真性粘菌で報告されているような、雄性配偶子由来mtDNAの選択的分解が最初に起こり、DNAを失ったミトコンドリアが後に分解、排除される可能性も考えられる。卵生殖へと進化してゆく過程で、オートファジーによる精子由来ミトコンドリアの選択的分解機構と、mtDNAのメチル化による選択的mtDNA分解機構が獲得され、同型配偶子接合よりも早い段階で精子由来ミトコンドリアとmtDNAが消失されるようになった可能性も考えられる。これらの可能性を証明するためには、どちらの有性生殖様式についてもミトコンドリアとmtDNAの分解の時期と過程を詳細に明らかにする必要がある。今後は、本研究によって明らかになったmtDNA分解時期に焦点をおき、この時期のミトコンドリアとmtDNAの分解過程を、電子顕微鏡とミトコンドリアとDNAの特異的染色法を用いた蛍光顕微鏡観察を中心に明らかにしていく必要があると考えられる。

本研究は、Single germling PCR法を中心とした分子生物学的手法と電子顕微鏡観察を組み合わせることで、褐藻におけるミトコンドリアとmtDNAの受精後の挙動を明らかにした。さらに、同型配偶子接合と卵生殖におけるミトコンドリア細胞質遺伝機構を具体的な実験結果から比較することにより、有性生殖の進化とオルガネラ細胞質遺伝の関連について考察できたと考えている。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	本 村 泰 三
副 査	教 授	上 田 宏
副 査	教 授	山 羽 悦 郎
副 査	准教授	宗 原 弘 之
副 査	准教授	長 里 千香子

学 位 論 文 題 名

Studies on the cytoplasmic inheritance of mitochondria in isogamous and oogamous brown algae

(同型配偶子接合および卵生殖を行う褐藻の
ミトコンドリア細胞質遺伝に関する研究)

有性生殖におけるオルガネラの細胞質遺伝に関する研究の多くは、卵生殖を行う動物・陸上植物やモデル生物である単細胞性緑藻クラミドモナスを中心に行われてきており、それらと系統を異にする他生物群を材料とした研究は極めて少ないのが現状である。真核生物の有性生殖様式は同型配偶子接合から異型配偶子接合を経て卵生殖へと進化してきたと考えられており、これらの3つの異なる有性生殖様式が確認されている褐藻は、有性生殖様式の進化過程で細胞質遺伝機構がどのように変化してきたかを考察する上で興味深い生物群であると言える。本研究では、同型配偶子接合と卵生殖を行う褐藻数種を材料に、分子生物学的手法と電子顕微鏡による超微細構造観察から雄性配偶子由来ミトコンドリアDNA (mtDNA) の消失時期とミトコンドリア分解過程を明らかにし、褐藻のミトコンドリア母性遺伝機構の解明とその進化過程について考察することを目的に研究を行った。

最初に、カヤモノリ (*Scytosiphon lomentaria*) を研究材料として用い、同型配偶子接合におけるミトコンドリア細胞質遺伝機構の解明に取り組んだ。雌雄配偶子と受精後36時間までの接合子の完全連続切片の電子顕微鏡観察から、受精時に雌雄配偶子から持ち込まれたミトコンドリアは約25個であること、その数は接合子の最初の細胞質分裂まで変化しないことから、接合子内ではミトコンドリア同士の融合や分裂が起こらないことを確認した。次にmtDNA塩基配列の異なるカヤモノリの雌雄株を掛け合せ、単一発芽体に対してPCR (single germling PCR) を行う方法と、それぞれの株のmtDNA塩基配列を認識するよう設計したプライマーによるPCR法によって、雄性配偶子由来のmtDNAが4細胞期以降の胞子体で消失し始めることを明らかにした。この時期の胞子体の電子顕微鏡観察を行うと、電子密度が低くクリ

ステが分散した異常な形態を示すミトコンドリアが観察され、これが分解途中の雄性配偶子由来ミトコンドリアである可能性が強く示唆された。ミトコンドリア母性遺伝とmtDNAのメチル化との関連について調査するためにbisulfite法による雌雄配偶子mtDNAのメチル化の程度を比較したが、雌雄の配偶子間では差が見られなかった。

次に、卵生殖を行う褐藻ヒバマタ (*Fucus distichus*)、エゾイシゲ (*Silvetia babingtonii*)、ワカメ (*Undaria pinnatifida*) を材料として、抗DNA抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察とmtDNAを対象とした精子のsingle cell PCR法により、成熟した精子のミトコンドリアにDNAが存在していることを確認した。さらに、ワカメのmtDNA塩基配列の異なる株を掛け合わせた接合子に対して行った株特異的なsingle germling PCR法から、精子のmtDNAは受精直後の1細胞期接合子の間に消失することを明らかにした。詳細な電子顕微鏡観察からは、精子ミトコンドリアは小胞体様膜構造で囲われた後にライソゾームで分解されていることを確認することができた。これらの結果から、精子ミトコンドリアとmtDNAは、受精時に卵細胞内に持ち込まれ、受精後の早い時期にミトコンドリアとmtDNAが同時に分解されることが示唆された。一方、精子と卵のmtDNAのメチル化程度をウガノモク (*Cystoseira hakodatensis*) を用いて調査し、精子と卵の間でmtDNAのメチル化程度に差がある可能性を見出した。

以上の結果から、同型配偶子接合、卵生殖ともに雄性配偶子（または精子）由来のミトコンドリア分解とmtDNAの消失が同時期に起こる可能性が示された。しかし、これらの消失については、卵生殖のほうが同型配偶子接合よりも早い段階で起っていた。ミトコンドリア自体の分解について注目すると、卵生殖では精子ミトコンドリアは小胞体様膜構造で囲われた後にライソゾームで分解されるオートファジー経路によって分解されているのに対して、同型配偶子接合では観察された内部クリステ構造の分散したミトコンドリアの周辺にその様な膜構造は確認できておらず、雄性配偶子由来のミトコンドリア分解にオートファジーが関与するかどうかは不明であった。むしろ褐藻の同型配偶子接合では、雄性配偶子由来mtDNAの選択的分解が最初に起こり、DNAを失ったミトコンドリアが後に分解、排除される可能性も考えられた。有性生殖の進化において同型配偶子接合から卵生殖へと変化してゆく過程で、オートファジーによる精子由来ミトコンドリアの選択的分解機構が獲得され、同型配偶子接合の場合よりも早い段階で精子由来ミトコンドリアとmtDNAが消失されるようになった可能性を示唆するに至った。また、卵生殖における精子由来ミトコンドリアの選択的消失には、卵と精子間でのmtDNAのメチル化の程度差も一つの要因であることを示した。

本研究は、single germling PCR法を中心とした分子生物学的手法と電子顕微鏡観察を組み合わせることで、褐藻におけるミトコンドリアとmtDNAの受精後の挙動を明らかにした。さらに、単一系統群を用いた具体的な実験結果から同型配偶子接合と卵生殖におけるミトコンドリア細胞質遺伝機構を比較することにより、有性生殖の進化とオルガネラ細胞質遺伝の関連について考察できたものと考えてられる。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。