

学位論文題名

Histomorphological analysis of parthenogenesis and sexual reproduction in the water flea, *Daphnia pulex*

(ミジンコにおける単為生殖と有性生殖機構の組織形態学的解析)

学位論文内容の要旨

酵母からヒトに至るまで、真核生物の有性生殖における減数分裂の機構はよく保存されている。一方、様々な分類群において、独立に獲得された単為生殖は、減数分裂の機構の一部を改変することで実現されているとはいえ、多様である。例えば、第1または第2減数分裂をスキップするものや、減数分裂の前に余計に1回の複製を起こすものなど、多岐にわたる。それぞれのケースにおいて減数分裂という有性生殖に必須である機構のどの部分に改変が入ることで単為生殖が獲得されたのかを理解することは、生殖様式の進化機構を考える上で重要である。そのためには、様々な動物種においてどのようにして単為生殖が実現されているのかを生殖細胞の分裂様式のレベルで記載するとともに、単為生殖と有性生殖の利点と制約に関する議論が必要となる。本研究はその一助となることを目指して行われた。

ミジンコは、通常は単為生殖で増殖しているが、環境が悪化するとオスを産み有性生殖をすることが古くから知られており、単為生殖と有性生殖の両方の分裂様式の比較研究およびそれら生殖様式の切り換え機構の研究に好個の材料である。また、2011年に甲殻類で初めて全ゲノムが解読され、ゲノム研究の環境も整備されてきたため、分子メカニズムの解明にまで研究を展開することも容易である。しかし私が研究を開始した時点においては、それぞれの生殖様式の詳細な記述すらなされていなかった。そこで本研究では、研究の基礎となるミジンコの単為生殖および有性生殖機構を組織形態学に解析することを目的とし、ミジンコの継代飼育法と生殖様式を解析するモデル系として利用するための基盤をまず確立した。続いて、単為生殖および有性生殖様式の解析を行った。さらに、得られた結果に基づいて単為生殖と有性生殖を切り換える機構についての仮説を立て、今後の研究の展望について考察した。

I. 生殖様式を解析するモデル生物としてのミジンコ

生殖様式を明らかにするモデル系の一つにすることを目指して、実験室条件下でミジンコの継代飼育を行う方法を確立した。まず生活環の詳細な解析を行い、長日(明期:暗期=14:10時間)、18℃、単細胞緑藻のクラミドモナスを一日おきに与える条件では、基本的に単為生殖のみで増殖することを見出した。成体は、脱皮を行うとどの個体も決まって13分で産卵を開始し、背部の育房内に生み出された卵は3日かけて親と同じ形態にまで発生してから、体外に放出される。そして産仔が終わると再び脱皮・産卵を行う。多くの個体は、この脱皮・産卵・産仔のサイクルを繰り返し、1ヶ月ほど生存した後死亡する。一方、短日条件(明期:暗期=10:14時間)、18℃、クラミドモナスを2日おきに与える条件で、雄を産み有性生殖が誘導されることがわかった。

II. 単為生殖において発見された減数しない減数分裂

ミジンコの単為生殖は、体細胞分裂と同じ均等分裂が1回だけ起こる様式と言われてきたが、異論のない形態学的証拠が示されていたわけではない。そこで、単為生殖卵の形成過程を明らかにするため、組織形態学的解析を行った。その結果、ミジンコの単為生殖卵は、“減数しない”減数分裂により形成されることが明らかとなった。そこではまず、第1減数分裂中期までは、正常な減数分裂と同じ様相で進行する。つまり、第1減数分裂前期には、相同染色体の対合が観察され、その後二価染色体が赤道面に並んで分裂中期となる。そして、両極へと分かれはじめ後期になるが、早い時期に分裂が停止する。その後、分かれかけた染色体は再び赤道面に戻って並び直し、第2減数分裂に相当する分裂を行って2倍体卵となって

卵割を開始した。これを、通常の減数分裂過程と比較すると、第 1 分裂に相当する分裂が後期の途中で停止し、スキップされていることになる。この発見は、有性生殖と単為生殖において減数分裂と体細胞分裂という全く異なる細胞分裂機構を使い分けるとされていた先行研究を覆すものであった。

III. 減数しない減数分裂における紡錘体形成と γ チューブリンの空間分布

II. で明らかとなった単為生殖を可能にする“減数しない”減数分裂と通常の減数分裂とで、分裂様式の違いを生み出す原因を探るため、紡錘体の構成や挙動に焦点をあて、紡錘糸を構成する α チューブリン、中心体を構成する γ チューブリンの免疫染色を行った。その結果、単為発生する卵には中心体のない樽型の紡錘体が観察された。さらに、 γ チューブリンは中心体があるはずの両極ではなく紡錘糸上の両極側に寄って広く分布していた。単為発生卵では、卵割（体細胞分裂）が開始すると典型的な紡錘型の紡錘体が見られるようになるため、それまでの間に中心体が形成（再生）されることになる。極体を放出する減数分裂が成功するためには、①紡錘体を卵膜の直下に配置する、②核分裂のチェックポイントを通過できる安定した紡錘体を形成することが重要となるが、それらは紡錘糸形成の起点となる γ チューブリンの局在に支配されていると考えられる。したがって、単為発生卵での γ チューブリンの分布の違いによって第 1 減数分裂が進行するか、スキップするかが決定される可能性が示唆された。

IV. 有性生殖

ミジンコでも有性生殖においては、他の動物と同様の減数分裂が起こっていると考えられるが、いつどこで受精が起こり、“正常な”減数分裂が進行するのかについての詳細は報告されていない。単為生殖でみられる“減数しない”減数分裂と比較研究するためにも、有性生殖様式の様式を明らかにすることが必要である。そこで、まず誘導した雄の生殖器官の組織形態学的特徴を観察し、交尾行動を確認した。続いて雌に受け渡された精子が受精に至る経路と減数分裂過程を解析した。その結果、ミジンコの精子は、長さ 6-9 μm 、厚さ 1-2 μm の棒状の形態であり、鞭毛を持たず、ミジンコを含む枝角目に共通の性質を持つことがわかった。この形態の精子では活発な運動はできず、細胞の変形による短距離の移動くらいしか期待できないと考えられた。続いて交尾行動を観察したところ、雄は雌の生殖口および育房周辺に放精していたので、受精は卵巣内で起こるか、産卵後に育房内で起こると推測された。一方、卵成熟過程を見ると、第 1 減数分裂は卵巣卵で起こり、産卵後の卵において第 2 減数分裂が起こっていた。受精のタイミングを明らかにすることはできなかったが、産卵直後の卵内にて侵入した精子が確認できたことから、第 1 減数分裂のいずれかの段階で受精が起こることは確認された。

以上の結果を総合し、次の生殖機構切り換え仮説を立てた。『成熟卵は、第 1 減数分裂中期か後期で受精を待ち、受精が起こらないと第 1 減数分裂を途中で停止した後、第 2 減数分裂に相当する分裂のみを行う。それに対して、受精が起こった場合には減数分裂が進行して、1 倍体の卵と 1 倍体の精子が融合して 2 倍体となって発生する。』もしも、精子の持ち込む因子が第 1 分裂の成否を決定することが明らかになれば、単為生殖と有性生殖を受精の有無で制御するきわめてシンプルな機構の発見ということになる。いずれにしても、この種においていかにして有性生殖と単為生殖を使い分けられているかを明らかにできれば、「真核生物で広く保存されている機構」と「ミジンコ独自の機構」、すなわち分裂様式の一様性と多様性を事実として提示できると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 柄 内 新

副 査 特任教授 片 倉 晴 雄

副 査 准教授 三 浦 徹

(環境科学院)

学 位 論 文 題 名

Histomorphological analysis of parthenogenesis and sexual reproduction in the water flea, *Daphnia pulex*

(ミジンコにおける単為生殖と有性生殖機構の組織形態学的解析)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

精子による受精を必要としない単為生殖は有性生殖と同じように卵を介して次世代をつくる。哺乳類を除くほとんどすべての動物群の進化過程において独立に獲得されたと考えられる単為生殖は、有性生殖機構の一部を改変することで実現されていることは共通しているが、その様式は動物群によってきわめて多様である。その上、単為生殖についての研究報告の多くは古いものであり、その現象を詳細に記載し、さらには分裂様式を支配する分子メカニズムまで明らかにした研究もほとんどない。

ミジンコは、通常は単為生殖で増殖しているが、環境が悪化するとオスを産み有性生殖をするため、単為生殖と有性生殖の比較研究さらにそれら生殖様式の切り換え機構の研究に適している。また、ミジンコは甲殻類で初めて全ゲノムが解読され、進化発生学の新しいモデル生物として注目され始めている。しかし、研究の基盤となる各生殖様式の詳細な記述はなされていなかった。そのため、学位請求者はミジンコを2つの生殖様式研究するための最先端モデル動物として確立するための基盤となる組織形態学的研究を行った。

第1章では、生殖様式を明らかにするモデル生物のひとつとしてミジンコを利用する大前提となる、実験室条件下での継代飼育法を確立した。さらに、生活環を解析し、単為生殖と有性生殖それぞれを誘導する条件を検討して、第2章以降の実験に用いた。

第2章では、単為発生卵の形成過程を明らかにするため、組織形態学的な解析を行った。その結果、ミジンコの単為発生卵は‘減数しない’減数分裂で形成されることが明らかとなった。単為発生卵の成熟過程も、第1減数分裂中期までは正常な減数分裂と同じ様相で進行する。しかし、後期の途中で分裂は停止し、分かれかけた染色体は再び赤道面に戻って並び直し、第2減数分裂に相当する分裂を行って2倍体卵となって卵割を開始した。これを、通常の減数分裂と比較すると、第1減数分裂に相当する分裂が後期の途中で停止し、スキップされていることになる。この発見は、有性生殖と単為生殖に

において減数分裂と体細胞分裂という全く異なる細胞分裂機構を使い分けるとされていた先行研究の結果を覆すものであった。

第3章では、第2章で明らかとなった単為発生を可能にする‘減数しない’減数分裂と通常の減数分裂とで、分裂様式の違いを生み出す原因を明らかにする目的で紡錘体の構成や挙動に焦点をあてた解析を行った。紡錘糸を構成する α チューブリン、中心体を構成する γ チューブリンの免疫組織化学染色を行った結果、単為発生する卵には中心体のない樽型の紡錘体が観察された。さらに γ チューブリンは中心体があるはずの両極ではなく紡錘糸上の両極側に寄って広く分布していた。単為発生卵では卵割（体細胞分裂）が開始すると中心体のある紡錘型の紡錘体が見られるようになるため、それまでの間に中心体が再形成されることになる。

第4章では、単為生殖でみられる‘減数しない’減数分裂と比較研究するため、有性生殖過程の組織形態学的な解析を行った。短日条件でオスを誘導し生殖器官の特徴を観察したところ、精子は鞭毛を持たない棒状の形態をしており、活発な運動をしないことも明らかとなった。交尾行動を観察したところ、オスはメスの生殖口および育房周辺に放精していたので、受精は産卵前に卵巣内で起こるか、産卵直後に育房内で起こることが推測された。一方、卵成熟過程を見ると、第1減数分裂は卵巣卵で起こり、産卵後の卵において第2減数分裂が起こっていた。産卵直後の卵内には侵入した精子も確認できたことから、第1減数分裂過程のどこかで受精が起こると示唆された。

本研究をふまえて、学位請求者は次のような作業仮説を提出している。成熟卵は、第1減数分裂中期か後期で受精を待ち、受精が起こらないと第1減数分裂を途中で停止した後、第2減数分裂に相当する分裂のみを行い2倍体となる（単為生殖）。それに対して、受精が成立すると正常な減数分裂が進行し、1倍体の卵と1倍体の精子が融合して2倍体となって発生する（有性生殖）。つまり、減数分裂の進行と停止が受精の成否で切り換わるということで、これは卵が受精してもしなくても、その後の2倍体個体の発生が保証されるというきわめて効率のよい生殖様式である。

博士研究において、学位請求者はミジンコを用いて、2つの生殖様式を解析するための実験系を確立し、ミジンコが生殖様式の進化過程を明らかにするモデル生物として非常に興味深く、有用な材料であることを示した。さらに、単為生殖および有性生殖について数多くの新知見を得ており、生殖機構の進化発生学研究に対しての貢献は大きい。

よって本学位請求者は、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られる。