

氏 名 (本籍)	坂 牛 慎 司 (岩 手 県)		
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)		
学 位 記 番 号	博 乙 第 2023 号		
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Ultrastructural and Immunocytochemical Studies on the MLS-type Basal Apparatus in the Sperm of <i>Lygodium japonicum</i> (Pteridophyta) (シダ植物カニクサの精子における MLS 型鞭毛装置の微細構造学および免疫細胞学的研究)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	井 上 勲
副 査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治
副 査	筑波大学教授	理学博士	白 岩 善 博
副 査	筑波大学助教授	理学博士	吉 村 建二郎

論 文 の 内 容 の 要 旨

真核生物の遊泳細胞に存在する鞭毛装置は、鞭毛による推進力を生み出すと同時に、細胞分裂極の形成、細胞骨格形成、オルガネラの位置決定など、細胞の主要な働きに関与する重要な器官の一つである。

形態的には、鞭毛、基底小体、微小管性鞭毛根、連結繊維から構築される、細胞内で最も複雑な構造である。また、数百を数える構造タンパク質から構成されると推定され、おそらく生化学的にも最も複雑な構造である。

緑色植物には、鞭毛装置構造の異なる二つの系統がある。一つは、クラミドモナスなどの緑藻綱や海産緑藻のアオサ藻綱を含む緑藻系列で、交叉型の微小管性鞭毛根をもつことで特徴づけられる。一方、陸上植物を含む陸上系列は、発達した 1 本の微小管性鞭毛根（スプライン）上に基底小体が配置され、その根元にラメラ構造の多層構造体（multilayered structure : MLS）が付随する MLS 型鞭毛装置をもつ。コケ、シダ、一部の裸子植物の精子と陸上植物に最も近縁な車軸藻綱シャジクモ目の精子には、スプラインが螺旋形に発達するという共通した特徴があり、シャジクモ目からシダ植物に至る陸上への進出の過程で、精子が緩い螺旋形からきつい螺旋形に変化している。このことから、精子の形を決定する鞭毛装置の形態や精子の遊泳様式を解析することで、陸上植物の生殖の進化過程の一端を明らかにすることができると考えられる。本研究は、MLS 型鞭毛装置の螺旋形態の進化的意義を考察することを目的として、シダ植物カニクサ *Lygodium japonicum* を用いて、鞭毛装置の形成過程、遊泳特性解析、そして螺旋形態の構築に関係する鞭毛装置構成タンパク質の免疫細胞学的解析を行い、以下の結果を得ている。

1) 精子は次の一連の過程を経て形成される。精細胞に鞭毛装置の前駆体であるプレファロプラストが出現し、周縁部に基底小体前駆体が配置される。プレファロプラストから MLS が出現し、スプラインが核に沿って伸長を開始、その後、伸長したスプラインが核を包む。アクチンが細胞前部に偏在し、MLS 上に電子密度の高い帯状構造のクレストが出現し、そこにアクチンが局在する。核とスプラインが接する領域に核質が凝集するとともに、急激な核の螺旋形変形が起こり、精子の中心部にきつく巻いた螺旋形態が完成する。クレ

ストは螺旋形変形の原動力として機能する。一方、スプラインは核質が凝集するためのガイドとしてはたらくとともに、クレストの螺旋形変形の力を核に伝える役割を担っていると考えられる。

2) 精子は障害物に衝突しても後方遊泳による逃避反応を示さないことがシダ植物で初めて見いだされた。後方遊泳は、 Ca^{2+} イオノフォアおよび Ca^{2+} 存在下でも生じなかった。後方遊泳能の欠如は、精子が造卵器内を逆戻りせず進むことであり、造卵器植物の進化の必須要件であったと考えられる。さらに、陸上植物の祖先的生物と位置づけられている緑色藻類 *Mesostigma viride* も後方遊泳を欠くことが確認されたことから、後方遊泳は陸上系列の進化の初期に既に欠失していたことが推測される。

3) 鞭毛装置の進化を理解するためには、それを構成するタンパク質の解析が不可欠である。大量に精子を作る変異株 (an-1 株) を用いて MLS 型鞭毛装置を高純度で得る単離法を確立し、螺旋形を維持した鞭毛装置を単離することに成功した。単離鞭毛装置を抗原としたモノクローナル抗体を作製し、クレストに局在する抗原タンパク質を特異的に認識する hlc, 基底小体周辺物質 (embedding material: EM) 内の抗原を認識する 1C7, 13D10 を得た。hlc 抗原は後期にクレストに凝集するというアクチンと同様の挙動を示すことから、精子の螺旋形形成に関与している可能性が示された。一方、1C7, 13D10 に反応する抗原は、成熟精子の EM のみに局在していた。1C7, 13D10 が反応する抗原タンパク質は、基底小体の配向が確立された後に EM に出現し、基底小体を保持する役割を担うものと考えられる。

以上の結果から、緑色植物の陸上への進出と精子の進化の関連を考察した。精子のきつく巻いた螺旋形態は精子の多鞭毛化および大型化と一致しており、多数の鞭毛を機能的に配置することに寄与していると考えられる。また、螺旋形の精子は可塑的に伸縮して造卵器の細い頸溝内を容易に移動することができる。さらに、精子が後方遊泳能を欠いていたことが、卵を造卵器中に保護する機構を発達させた必須条件であり、こうした性質を背景に、陸上への進出を可能にする乾燥に対する防御を獲得した生殖系が進化したと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

植物の生殖に関する研究は、モデル植物である緑藻綱クラミドモナスを用いて詳細な研究が行われている。一方、緑藻綱とは異なる系統に属する陸上植物については、被子植物の重複受精の研究の進展がめざましい。しかし、その進化的起源であるコケやシダなどの、卵が造卵器に保護され、遊泳性の精子と受精する生殖様式を持つ、いわゆる造卵器植物の生殖については、不明な点が多く残されている。従来の精子の研究は、精子の形態、鞭毛装置の構造の記載に留まり、なぜコケやシダの精子は螺旋形の細胞体をもつのか、なぜ精子は造卵器の奥深く配置された卵に到達できるのか、という疑問に答えた研究は皆無である。著者は、精子の形成過程を、緑色植物の進化と関連づけて研究し、特に螺旋形の細胞の形成が、シダ植物における精子の多鞭毛化と関わって進化してきたことを微細構造とアクチンの局在化の観察と実験をもとに考察している。また、陸上植物の系統では、進化の初期から後方遊泳を欠いていたことが、造卵器の出現を可能にしたことを考察している。これらは、陸上植物の生殖過程の進化を理解する上で貴重な知見である。さらに、本研究においてシダ植物精子の単離法が確立されたことは、陸上植物の精子の分子レベルの研究の基礎となるもので、今後の研究の進展に寄与するものと評価できる。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものとして認める。