【150】

氏　名（本籍）	吉　田　昌　樹（よしだ　まさき）（栃 木 県）
学 位 の 種 類	博　　士（理　　学）
学 位 記 番 号	博　甲　第　3982　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	**Studies on Silica Scale-Bearing *Hyalolithus neolepis* gen. et sp. nov. (Haptophyta): Taxonomy, Molecular Phylogeny and Characterization of Its Unique Silicification Process** （珪酸質の鱗片をもつ新属新種ハプト藻 *Hyalolithus neolepis* の研究：分類，分子系統，珪酸化の特性について）

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	学術博士	橋　本　哲　男
副　査	筑波大学教授	理学博士	指　田　勝　男

論 文 の 内 容 の 要 旨

ハプト植物は海洋に広く分布し，珪藻，渦鞭毛藻とともに，海洋の一次生産者として重要な役割を果たしている。ハプト植物の中でも，特に円石藻と呼ばれる一群は細胞表面に特徴的な炭酸カルシウムの鱗片である円石（coccolith）を持つことで知られ，その石灰化は地球規模の CO_2 濃度変動に大きな役割を果たしてきたと考えられている。一方で，珪藻は珪酸化を行う。珪藻は不等毛植物門に属し，珪酸質の細胞被殻に覆われている。不等毛植物には珪酸化を行う生物が多く含まれている。生物による無機カルシウム塩や珪酸質の生成はバイオミネラリゼーションと呼ばれる。バイオミネラリゼーションの性質は高次分類群ごとに安定していると考えられており，微細藻類では，石灰化はハプト植物，珪酸化は不等毛植物という対比は教科書のレベルでとりあげられている重要な性質である。

吉田氏は，北海道後志海山近海において，透明な鱗片をもつ植物プランクトンを採取した。この藻類を培養し，光学顕微鏡，走査顕微鏡，透過型電子顕微鏡による観察を行ったところ，この藻類は，ハプト藻であること，しかし鱗片は石灰質ではなく珪酸質であることが明らかになった。すなわち，珪酸質の鱗片を形成するハプト藻の初めての発見である。本研究で，吉田氏は，この *Hyalolithus neolepis* と命名した珪酸質鱗片をもつハプト藻について，微細構造，分子系統などの手法を用いて詳細な記載を行った。

細胞とハプトネマ：細胞は，球形で直径 10-15 μm（鱗片層を含めると 20-30 μm）。遊泳能はない。細胞径の 1.5 倍程の長さのまっすぐに伸びる糸状の構造をもつ。透過型電子顕微鏡により，この構造はハプト藻に特異的に見られるハプトネマであることが確認された。

鱗片の形態と組成：鱗片は帽子形でやや崩れた楕円形をしており，直径は 4-7 μm であった。鱗片の中央部は二箇所でゆるやかに隆起，辺縁部は上方に反り返っており，辺縁部以外の部分には直径 100-200nm の小孔が多数空いていた。偏光顕微鏡観察の結果，鱗片に光学的異方性は認められなかった。このことから石灰質である可能性は否定された。X 線元素分析により，鱗片は Si のピークを示すことから，珪酸質であることが確認された。

細胞内構造：細胞にはハプト藻に特徴的な構造が多数確認された。細胞は珪酸鱗片の層の下に小さな有機鱗片を持ち，また光学顕微鏡では確認できなかった短い二本の鞭毛を持つ事も明らかとなった。有機鱗片は鞭毛装置直下のゴルジ体で形成される。鞭毛装置はハプト藻特有のものであった。

分子系統解析：18S ribosomal DNA 及び *rbc*L 遺伝子配列を用いて最尤法による系統樹を構築し，分子系統解析を行った。その結果，*H. neolepis* はハプト植物門プリムネシウム目に含まれ，*Prymnesium* 属及び *Chrysochromulina* 属に近縁である事が分かった。

遊走細胞：珪酸鱗片を持つ不動細胞の他に，本種は遊泳細胞相を持つ。遊走細胞はハプトネマと二本の鞭毛を持ち，ゆっくり遊泳する。珪酸鱗片はもたないが，中央に突起のある有機鱗片を持つ。遊走細胞は現在ごく一部の株でのみ確認され，また容易に不動の細胞へ戻ってしまう為に十分な個体数が得られず，詳細な構造観察は行えなかった。

鱗片形成過程：珪酸鱗片は細胞後部の空隙に面した膜系（SDV）内で形成されていた。珪酸鱗片は一つの細胞の中で複数枚が同時に形成されることもあり，それぞれ独立の SDV に入っていた。形成のごく初期の鱗片では，珪酸の粒子が配列している様子が観察された。鱗片の近くに，細胞骨格などの他の構造は確認されなかった。PDMPO（LysoSensor Yellow/Blue DND-160）を用いて，珪酸の分布状況を調べた。その結果，細胞後部の空隙と細胞質の境界が明瞭に染色され，この部位で珪酸鱗片が形成される結果を支持した。

silaffin 遺伝子配列：珪藻で報告されている珪酸顆粒化タンパク silaffin 遺伝子 sil1 の配列を元にプライマーを作成し，*H. neolepis* の DNA を用いて nested PCR を行ったところ，珪藻の *Cylindrotheca fusiformis* のものと酷似した配列断片が得られた。sil1 配列の 798bp の内，得られた配列の前半部分では，*C. fusiformis* との違いは僅か 2 塩基であった。後半の反復領域では 1 塩基の変異の他，2 箇所計 69 塩基に達する大規模な反復単位の欠失が確認された。

以上の観察と解析から，*H. neolepis* はハプト植物門に属し，同植物門で唯一珪酸化を行う藻類であること，円石藻よりも有機鱗片のみを持つ属に近縁であることが明らかになった。石灰化能と珪酸化能の直接的な関連性はみられず，これは，*H. neolepis* における珪酸鱗片の形成場所が，円石藻の円石形成場所とは異なることからも支持された。PCR により silaffin 様の配列断片が増幅された事から，*H. neolepis* の珪酸化能は，*C. fusiformis* 或いはそれに近縁な藻類より LGT（遺伝子水平伝播）等によりもたらされた可能性が高いと考えられる。この配列に関しては，今後 RT-PCR や fluorescence *in-situ* hybridization 等の手法により検証を行っていく必要がある。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は，*Hyalolithus neolepis* という一新属新種のハプト藻の観察，解析を通じて，藻類学，原生生物学の分野でこれまでドグマとして受け入れられてきた，石灰質か珪酸質など高次分類群に特有とされるバイオミネラリゼーションの性質が必ずしも安定なものではないことを示したものである。本研究の最大の意義はこの発見にある。教科書の記述を書き換える成果であり，高く評価できる。吉田氏は，本生物について光学顕微鏡，走査型および透過型電子顕微鏡による詳細な観察を行い，正確な記載を提供した。また，分子系統解析によって *Hyalolithus neolepis* の系統上の位置を明らかにすることで，ハプト植物における珪酸化能の出現について分類，進化的視点から考察することを可能にした。珪酸化部位で発色する蛍光色素を用いた観察を行い，珪酸化過程についてもあらたな知見をもたらした。さらに，珪藻の珪酸化タンパク質である silaffin の遺伝子に類似した配列を *Hyalolithus neolepis* の DNA 中に見いだし，珪藻からハプト藻への珪酸化能の水平伝播の可能性を示した。検証をさらに重ねる必要があるが，この結果は真核生物におけるバイオミネラリゼーションの進化に関する新たな研究に発展することが期待される。

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認める。