

氏名	城倉 圭		
学位の種類	博 士 (理学)		
学位記番号	博 甲 第 9 4 4 7 号		
学位授与年月日	令和2年3月25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	Molecular Characterization of Comb Plates in the Ctenophore <i>Bolinopsis mikado</i> (カブトクラゲ櫛板の分子構築に関する研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	稲葉 一男
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	三浦 謙治
副査	筑波大学教授	理学博士	小林 悟
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	中野 賢太郎

論 文 の 要 旨

繊毛は真核生物の波打ち運動装置である。その構造は9+2本の微小管と分子モーターであるダイニン、およびダイニンを調節するさまざまな付属物からなっており、進化的にも高く保存されている。繊毛波は、繊毛を真っ直ぐにし推進力を生み出す有効打と、繊毛を大きく屈曲させ、できるだけ抵抗を少なくした回復打からなる非対称波である。位相をずらしながら非対称波が隣の繊毛に伝わっていく半同調性は、繊毛どうしの流体力学的な相互作用を生み出し、効率よく水流を発生させる上で重要であると考えられる。

繊毛は粘性抵抗の支配する小さな生物の運動に有利であると考えられるが、これを逸脱し、繊毛を極度に巨大化した生物が有櫛動物、すなわちクシクラゲ類である。クシクラゲの櫛板は、繊毛が数万本束化し、板状になった運動器官で、複合繊毛の1種である。櫛板内では各繊毛の中心対微小管を結ぶ面が全て並行で、この面を境に上下に波打つ。このことが櫛板内の繊毛が協調して波打ち、櫛板が運動する上で重要である。構造的には、各中心対微小管の外側に位置するダブルット微小管から細胞膜に向かって突起が伸びている。この構造を compartmenting lamella (CL) とよび、繊毛間の協調運動に重要であると考えられる。しかしながら、櫛板に関する生理学的な研究が多く行われてきたのに対し、CLの分子構築に関する研究は皆無であった。

本論文で著者は、コンスタントな使用が困難であったクシクラゲの1種、カブトクラゲ (*Bolinopsis mikado*) の成体を長期間飼育することに成功した。また、給餌の工夫により、成熟した卵と精子を効率よく得ることに成功し、研究材料としてカブトクラゲの利便性を大幅に向上させた。

次に著者は、CLを構成するタンパク質を同定するために、マグネシウムとカルシウムを含まない海水でカブトクラゲの成体を処理し、櫛板の脱離を行った。単離した櫛板を除膜し、高塩濃度溶液で処理することにより、CLを含む抽出液を得た。抽出液に含まれる主要なタンパク質を質量分析計で同定したところ、既知の

タンパク質と相同性を示さない分子量 64,000 のタンパク質を見出した。すでにゲノム情報が得られている有櫛動物種を検索したところ、このタンパク質はいずれの種にも含まれることが明らかとなった。著者は、このタンパク質を CTEN064 と命名し、その櫛板内局在と運動における機能を解析した。

まず著者は、CTEN064 に特異的に反応する抗体を作製した。ウェスタンブロッティング法により、CTEN064 は日本に生息する他の有櫛動物 3 種にも存在することを明らかにした。さらに、間接蛍光抗体法と免疫電子顕微鏡法を用いて局在を調べた。その結果、CTEN064 が櫛板遠位領域の CL にのみ局在することを明らかにした。CTEN064 が櫛板の形成や運動において果たす役割を明らかにする目的で、モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) による CTEN064 遺伝子の翻訳阻害を試みた。著者はあえて卵膜がついたままの受精卵に注入することにより、その後の発生を正常に進行させることを可能にした。CTEN064 の翻訳が抑制された幼生 (モルファント) では、櫛板の長さや有効打幅、振動数は正常なものの、櫛板の遠位部分の屈曲が大きくなること、および櫛板の 15% で三次元的な繊毛打を示すことを明らかにした。このような櫛板の運動変化を起こす機構を明らかにするために、著者は CTEN064 モルファントの櫛板の微細構造を電子顕微鏡で観察した。その結果、15% あまりの繊毛軸糸で CL が欠損していること、少数の繊毛では軸糸が 180° 回転していることがわかった。繊毛運動の半同調性は保たれていた。

CL は櫛板の根本から先端まで存在している。次に著者は、CTEN064 以外の CL 成分を同定する目的で、櫛板の LC-MS/MS 解析により同定したタンパク質から、低含量のものや繊毛タンパク質として知られているものを排除した上で、櫛板細胞の単一細胞トランスクリプトームのデータに基づき、4 種のタンパク質を絞り込んだ。このうちの 1 種は、CTEN064 と同様に有櫛動物に特異的に存在している新規タンパク質であり、著者は CTEN0189 と命名した。特異的抗体を作製し局在解析をしたところ、CTEN0189 は櫛板遠位領域の CL に存在し、CTEN064 の局在と明確に分離されることがわかった。さらに、CTEN0189 モルファントでは遠位領域の 80% 近い CL が欠損すること、近位領域に存在する CTEN064 の発現には影響がないことを明らかにした。モルファントの櫛板は、粘性を高めた海水では波の非対称性が失われ、対称波に近くなることを見出した。また、櫛板間の半同調性が失われることも明らかにした。

以上の結果から、著者は CL の近位領域と遠位領域では構造的にも機能的にも異なることを見出した。すなわち、近位領域では繊毛の配向をそろえ、遠位領域では非対称波を維持するために重要な役割を果たしている。この機能分担により、巨大な櫛板の推進力に必要な平面波と有効打を生み出されると結論した。

審 査 の 要 旨

本研究で著者は、有櫛動物カブトクラゲの飼育系や実験系を確立した上で、櫛板内の繊毛束化を司っている compartmenting lamella (CL) の構成タンパク質を 2 種類同定した。これら 2 種類のタンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学により、この 2 種類の局在が近位領域と遠位領域に明確に区分されることを明らかにし、CL が櫛板の根本から先端に存在する一様な構造ではない新たな知見を見出した。さらに、2 種類のタンパク質の翻訳阻害実験により、CL の近位領域と遠位領域が機能的にも役割分担を行い、櫛板の推進力発生に関わっていることを明らかにした。有櫛動物は、後生動物の最も祖先的な生物の一つであることが明らかになっている。本論文は、複合繊毛の分子構築の一部をはじめて明らかにし、繊毛束化の機構に新たな細胞生物学的知見を生み出したのみならず、動物の進化研究にも重要な知見を与えるものである。

令和 2 年 1 月 27 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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