

氏名(本籍)	なか しま ゆ か 仲 島 由 佳 (北 海 道)
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	博 甲 第 2777 号
学位授与年月日	平成14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	生物科学研究科
学位論文題目	Study on the Role of Microtubules Related to the Nuclear Behaviors during Conjugation of <i>Paramecium caudatum</i> (ゾウリムシの接合中の核行動における微小管の役割の解析)
主査	筑波大学教授 理学博士 高 橋 三保子
副査	筑波大学教授 理学博士 沼 田 治
主査	筑波大学教授 理学博士 林 純 一
主査	筑波大学教授 理学博士 掘 輝 三

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

原生動物繊毛虫のゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の有性生殖過程は接合と呼ばれ、微小管の関与が示唆される核選択と核交換という2つのダイナミックな核行動がみられる。しかしながら、どのようなタンパク質がどのような形で核行動に関与しているのかは明らかになっていない。著者は、ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の接合における核行動と微小管の挙動に注目し、間接免疫蛍光法・電子顕微鏡・抗体の顕微注入による解析を行ったものである。論文は以下の3部で構成されている。

### 1) 核選択における微小管の役割:

ゾウリムシは接合対を形成し、有性生殖を行う。ゾウリムシは大核(栄養核)と小核(生殖核)という異なる2種類の核を1つずつもち、接合が始まると小核は減数分裂を行い4つの核を形成する。4核のうち3核が退化し、1核だけが生き残る(核選択)。

そこで、減数分裂後の核選択の過程における微小管の局在を明らかにするために、モノクローナル抗 $\alpha$ -tubulin抗体を用いた間接免疫蛍光抗体法を行い、微小管の局在を調べた。減数分裂終了後、囲口錐に入った1核の周りにはのみ細胞質微小管が放射状に形成されることを明らかにした。さらに、減数分裂中の細胞の細胞質に抗 $\alpha$ -tubulin抗体の顕微注入を行ったところ、減数分裂は正常通り行われ4つの核を形成したが、囲口錐への核の移動は行われず、全ての核が退化した。このように、細胞質微小管が核選択時の核行動にはたらいっていることを示唆した。

### 2) 核交換における微小管の役割:

減数分裂後、生き残った1核は有糸分裂を行い移動核と静止核を形成する。接合対の両細胞は部分的に融合した細胞膜によって隔てられており、移動核はその接合面の膜を通り抜け(核交換)、相手細胞の静止核と融合することによって受精核を形成する。これまでは移動核は核のアメーバ運動により能動的に接合面を通過すると考えられてきた。しかし、抗 $\alpha$ -tubulin抗体を用いた間接免疫蛍光抗体法を行ったところ、移動核の周りにのみ細胞質微小管が放射状に形成され、その後、移動核は、細胞質微小管と接合面の膜に挟まれるように凸レンズ型に変化した。次に、移動核は伸長しながら接合面を通過し、相手細胞内へと移動すること、さらに、接合面を通過した後、接合面に一端を付けたまま伸長することによって相手細胞の静止核と融合し受精核を形成すること、を明らかにした。核交換中の細胞の電子顕微鏡観察では、移動核が接合面を通り抜ける時、核内微小管は核の移動方向に沿っ

て形成されており、その先端には、沢山の微小管が進行方向に沿って局在した。また、有糸分裂中の細胞の細胞質への抗 $\alpha$ -tubulin抗体の顕微注入を行った細胞では、有糸分裂は正常に進行するが、核交換を行わず、受精核形成も行わないことを明らかにした。

核交換には細胞質微小管によって核を相手細胞側へ押し出すこと、核内微小管による核の伸長、この両方が関与していることを強く示唆した。

### 3) 核行動に関わる微小管形成中心の役割:

ゾウリムシは中心小体や中心体のような特別な構造を持たない。微小管形成中心の構成タンパク質の一つである $\gamma$ -tubulinのゾウリムシにおけるC末端側に対応するcDNAを発現ベクターに組み込み、発現させたものを抗原としてモルモット血清(Pcg3)を得た。Pcg3を用いて接合中の $\gamma$ -tubulinの局在を調べたところ、接合中の全時期において小核内に局在すること、核選択時の生き残る核と核交換時の移動核の周りを囲むように点在こと、を明らかにした。無小核細胞では、このような細胞質微小管の形成は見られず、核の存在が細胞質微小管の形成や $\gamma$ -tubulinの集合に必要であることを示唆した。

## 審査の結果の要旨

著者は、ゾウリムシの接合中のダイナミックな核行動に着目し、これまでに全く不明であった核選択時の細胞質微小管の局在を明らかにし、抗体の顕微注射による解析を加えてその役割を考察した。さらに、細胞質微小管と核内微小管の両方が核交換に必要であることを示したことは、これまでのゾウリムシの核交換の考えを覆す新規の知見であり、国際的にも高く評価されている。また、細胞質微小管の形成や $\gamma$ -tubulinの集合における小核の存在の関与を示唆したのは本研究が始めてであり、今後のこの分野の発展に寄与することが期待される知見を得たものである。

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。