

学位論文題名

Ultrastructural observation and proteomics analysis on flagella of brown algal swarmers

(褐藻遊泳細胞の鞭毛についての微細構造観察とプロテオミクス解析)

学位論文内容の要旨

不等毛藻類は、真核生物の中にあつてストラメノパイル系統群のうち光合成を行うグループ（葉緑体二次共生植物）であり、地球水圏において主要な一次生産者である珪藻・褐藻が含まれる。また、ピコプランクトンの研究が進むにつれてペラゴ藻・ポリド藻などの新たな分類群の報告が相次いでおり、現在では14の網に分けられている。ストラメノパイル・不等毛藻類に属する生物は以下の特徴を有する。1) 前後に伸びる2本の鞭毛を有している、2) 前方に伸びる鞭毛にはマスチゴネマと呼ばれる小毛が付着している、3) 2本の鞭毛は長さ・機能が異なり、長い前鞭毛は細胞を前方に引っ張る原動力となり、短い後鞭毛は光刺激等に対する方向舵の役割を演じている。すなわち、鞭毛の構造と機能の理解は、ストラメノパイル系統群の生物進化、環境適応を考える上で必須である。本研究では、褐藻遊泳細胞の2本の鞭毛について、電子線トモグラフィーを用いた超微細構造解析と質量分析 (LC-MS/MS) による鞭毛プロテオミクスからタンパク質の網羅的解析を行った。

電子線トモグラフィーでは+60°から-60°に順次傾斜角を変化させながら対象物を撮影し、最終的にコンピューター解析による厚さ2nmのセクションイメージングが可能となる。褐藻モデル生物であるシオミドロの遊泳細胞を、通常の化学固定ではなく液化プロパンによる急速凍結置換法を用いて作製した試料（厚さ100-200nm）について、トモグラフィー装置を付けた加速電圧200kVの透過型電子顕微鏡による観察を行った。このようにして得られた超微細構造の解析から、前鞭毛膜に付着するマスチゴネマは単に膜表面に付着しているのではなく、付着部位と鞭毛軸糸の2連微小管を連結する繊維構造が存在していることが明らかになった。また、遊泳細胞の走光性に関与すると考えられる後鞭毛基部の膨潤部（パラフラジェラボディ）は電子密度の高い物質と結晶性構造からなり、鞭毛軸糸に対して規則性のある空間的配置をとることを示した。さらに、遊泳細胞形成時の鞭毛伸長には、細胞質側からの小胞が付加されていることも明らかになった。

褐藻シオミドロの全ゲノム情報が2010年に明らかとなり、ゲノムデータベースを利用したプロテオミクス解析が可能となった。本研究ではフィールドから採集したワタモ、カヤモノリを材料として、大量の遊泳細胞から鞭毛を単離しプロテオミクス解析を行った。ワタモ、カヤモノリは分子系統学的にシオミドロと近い関係にあるため、シオミド

ロのゲノム情報を基盤に解析を進めることができる。その結果、信頼度の高い598個のタンパク質が同定され、ホモログ検索、ドメイン解析から個々のタンパク質の機能が推定された。鞭毛タンパク質の中ではATP関連タンパク質が最も多く存在しており、カルシウム関連タンパク質、微小管モーター関連タンパク質がそれに続いた。鞭毛運動のエネルギー生産に関連するものとして、4種類の解糖系酵素とクレアチンキナーゼが存在していることを見いだした。クレアチンキナーゼは後生動物に存在しており、陸上植物には存在していないと報告されている。褐藻遊泳細胞の鞭毛で発見されたことは、ストラメノパイル系統群・不等毛藻類の進化を考える上で興味深いものである。

さらに、褐藻ワタモ遊泳細胞の598個の鞭毛タンパク質について、今までに全ゲノム情報が明らかとなっている珪藻類、卵菌類、クラミドモナス、シロイヌナズナ、トリパノソーマ、ヒトと比較検討した結果、最も高い相同性を示したものは、同じストラメノパイル系統群に属する卵菌類であった。同じ系統群に属する珪藻類が卵菌類よりも低い相同性を示した理由として、珪藻類の精子は1本の鞭毛を有し、軸糸構造が一般的な9+2構造ではなく中心の2本の微小管が欠落した9+0構造であることが知られており、今回の結果はそれを反映しているものと考えられる。

前述したように褐藻遊泳細胞の2本の鞭毛は長さ・形態・機能において大きな違いを持っている。そこで、前後鞭毛をそれぞれ別々に単離し、プロテオミクスを行った。その結果、前鞭毛に特異的に存在しているタンパク質として25個、後鞭毛では53個を明らかにした。前鞭毛特異的タンパク質中には予想された通り、マスチゴネマ関連タンパク質が存在し、加えて解糖系関連酵素、巨大タンパク質であるタイチン様のタンパク質(分子量1800kD)などが存在していた。後鞭毛に特異的なタンパク質としては、LOV (light-oxygen-voltage)/RGS (regulator of G protein signalling)の2つのドメインを持つタンパク質に加えて、鞭毛軸糸構造に関連するラディアルスポークタンパク質、鞭毛内輸送に関与するIFT (intraflagellar transport)タンパク質が存在していた。タイチン様タンパク質は、電子線トモグラフィ解析で確認された前鞭毛膜に付着するマスチゴネマと鞭毛軸糸の2連微小管を連結する繊維構造に相当するものではないかと考えられる。また、鞭毛軸糸構造や鞭毛内輸送に関連するいくつかのタンパク質が後鞭毛に特異的に存在したことは、褐藻を含むストラメノパイル系統群・不等毛藻類の2本の鞭毛の形態と機能の異質性を分子レベルで反映しているものと考えられる。

褐藻、黄金色藻、シヌラ藻などの遊泳細胞は、波長450nm付近の青色光に対して走光性を示すことがよく知られており、後鞭毛に局在する緑色自家蛍光を発するフラビン結合タンパク質がその機能を担っていると考えられてきた。今回の研究で明らかとなったLOV/RGSドメインを有するタンパク質は、青色光下で活性化しGタンパク質を介して褐藻遊泳細胞の走光性に関与している新奇青色光受容体である可能性が示唆された。

以上の研究から、褐藻遊泳細胞の鞭毛は、緑藻クラミドモナスやヒトなどの後生動物の鞭毛とは共通性を有しつつも、水圏環境下での生活環の制御と適応により特異的に進化を果たしてきたことを明らかにすることができた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	本村泰三
副査	教授	上田宏
副査	教授	山羽悦郎
副査	准教授	長里千香子
副査	准教授	星野洋一郎

学位論文題名

Ultrastructural observation and proteomics analysis on flagella of brown algal swarmers

(褐藻遊泳細胞の鞭毛についての微細構造観察とプロテオミクス解析)

不等毛藻類は、真核生物の中にあつてストラメノパイル系統群のうち光合成を行うグループ(葉緑体二次共生植物)であり、地球水圏において主要な一次生産者である珪藻・褐藻が含まれ、現在では14の網に分けられている。ストラメノパイル・不等毛藻類に属する生物は以下の特徴を有する。1) 前後に伸びる2本の鞭毛を有している、2) 前方に伸びる鞭毛にはマスチゴネマと呼ばれる小毛が付着している、3) 2本の鞭毛は長さ・機能が異なり、長い前鞭毛は細胞を前方に引っ張る原動力となり、短い後鞭毛は光刺激等に対する方向舵の役割を演じている。すなわち、鞭毛の構造と機能の理解は、ストラメノパイル系統群の生物進化、環境適応を考える上で必須である。本研究では、褐藻遊泳細胞の2本の鞭毛について、電子線トモグラフィーを用いた超微細構造解析と質量分析(LC-MS/MS)による鞭毛プロテオーム解析を行った。

最初に、褐藻モデル生物であるシオミドロの遊泳細胞を、液化プロパンによる急速凍結置換法を用いて作製した試料について、トモグラフィー装置を付けた加速電圧200kVの透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、前鞭毛膜に付着するマスチゴネマは膜表面に付着しているだけでなく、付着部位と鞭毛軸糸の2連微小管を連結する繊維構造が存在していることが明らかにした。また、後鞭毛基部の膨潤部は電子密度の高い物質と結晶性構造からなり、鞭毛軸糸に対して規則性のある空間的配置をとることを示した。さらに、遊泳細胞形成時の鞭毛伸長には、細胞質側からの小胞が付加されていることも明らかにした。

次に、褐藻シオミドロの全ゲノムデータベースを利用して、フィールドから採集したワタモ、カヤモノリを材料として、大量に放出された遊泳細胞から鞭毛を単離し、プロテオーム解析を行った。その結果、信頼度の高い598個のタンパク質が同定され、ホモログ検索、ドメイン解析から個々のタンパク質の機能が推定された。鞭毛タンパク質の中では、ATP関連タンパク質が最も多く存在しており、カルシウム関連タンパク質、微小管モーター関連タンパク

質がそれに続いた。鞭毛運動のエネルギー生産に関連するものとして、4種類の解糖系酵素とクレアチンキナーゼが存在していることを見いだした。クレアチンキナーゼは後生動物に存在しており、陸上植物には存在していないと報告されている。この発見は、ストラメノパイル系統群・不等毛藻類の進化を考える上で興味深いものである。さらに、褐藻ワタモ遊泳細胞の598個の鞭毛タンパク質について、珪藻類、卵菌類、クラミドモナス、トリパノソーマ、ヒトなどと比較検討した結果、最も高い相同性を示したものは、同じストラメノパイル系統群に属する卵菌類であった。

さらに、前後鞭毛をそれぞれ別々に単離し、プロテオーム解析を行い、前鞭毛に特異的に存在しているタンパク質として25個、後鞭毛では53個を見いだした。前鞭毛特異的タンパク質中には、マスチゴネマ関連タンパク質に加えて、解糖系関連酵素、巨大タンパク質であるタイチン様のタンパク質（分子量1800kD）などが存在していた。後鞭毛に特異的なタンパク質としては、LOV (light-oxygen-voltage)/RGS (regulator of G protein signalling) の2つのドメインを持つタンパク質に加えて、鞭毛軸糸構造に関連するラディアルスポークタンパク質、鞭毛内輸送に関与するIFT (intraflagellar transport) タンパク質が存在していた。タイチン様タンパク質は、電子線トモグラフィ解析で確認された前鞭毛膜に付着するマスチゴネマと鞭毛軸糸の2連微小管を連結する繊維構造に相当するものと考えられる。また、鞭毛軸糸構造や鞭毛内輸送に関連するいくつかのタンパク質が後鞭毛に特異的に存在したことは、褐藻を含むストラメノパイル系統群・不等毛藻類の2本の鞭毛の形態と機能の異質性を分子レベルで反映しているものと考えられる。

褐藻、黄金色藻、シヌラ藻などの遊泳細胞は、波長450nm付近の青色光に対して走光性を示すことが古くから知られており、後鞭毛に局在する緑色自家蛍光を発するフラビン結合タンパク質がその機能を担っていると考えられてきた。今回の研究で明らかとなったLOV/RGSドメインを有するタンパク質は、青色光下で活性化し、Gタンパク質を介して褐藻遊泳細胞の走光性に関与している新奇青色光受容体である可能性が示唆された。

以上の研究から、褐藻遊泳細胞の鞭毛は、緑藻クラミドモナスやヒトなどの後生動物の鞭毛とは共通性を有しつつも、水圏環境下での生活環の制御と適応により特異的に進化を果たしてきたことを明らかにすることができた。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。