

# 論文審査の結果の要旨

氏名 茂木 祐子

本論文は2章からなり、第1章は緑藻ヒラアオノリの交配型と配偶子の微細構造解析、第2章は4系統間12組の交雑によるオルガネラ遺伝様式の解析について述べられている。

緑色藻類は同形の配偶子が異型化し卵生殖へと至る雌雄の進化過程が見られ、雌雄性の進化を研究する良いモデル生物である。緑藻の配偶子は接合する際、一方の配偶子は眼点と同面で、もう一方の配偶子は眼点と逆面で細胞融合する。これは、眼点を基準としたときに、2つの交配型には細胞融合部位に非対称性があることを意味する。細胞融合部位の非対称性はクラミドモナスをはじめとする数種の緑色藻類で報告されているが、その交配型との関係をオルガネラ遺伝という視点で検証した例はない。本論文提出者の茂木祐子は、同形配偶生殖と異形配偶生殖の中間段階にあると考えられる緑色藻類ヒラアオノリを用いて、細胞融合部位にあるとされる接合装置を走査型電子顕微鏡で可視化する手法を開発し、2つの交配型間で眼点に対して接合装置が非対称に配置することを明らかにした。また、接合装置の非対称性と雌雄との関係性をオルガネラ遺伝の観点から明らかにした。これは、緑色藻類の雌雄生殖細胞分化を理解する上で極めて重要な知見である。

第1章では、フィールドエミッション型走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いてヒラアオノリ配偶子の微細構造解析を行い、接合装置の非対称性を観察している。産地の異なる4系統8株の配偶子をサンプル調製すると、ヒラアオノリの  $mt^+$  では必ず、眼点と同面の鞭毛基部に  $0.6\sim 0.8\mu m$  ほどの膜から少し突き出た接合装置が見られた。一方、 $mt^-$  では、眼点と逆面の鞭毛基部に接合装置が見られ、接合装置の非対称性は交配型に厳密に連鎖していた。走査型電顕で観察された接合装置は、透過型電子顕微鏡で観察すると電子密度の高い膜の下に顆粒が一行に並ぶ、特徴的な構造であった。これは他の緑色藻類で観察されている接合装置構造と一致する。また、接合過程を観察すると、接合装置から細胞膜融合が始まり、一方の配偶子は眼点と同面で、もう一方の配偶子は眼点と逆面で細胞融合していた。やがて融合面は細胞前方から後方へと進み、最後

に細胞膜融合が完了し接合子は球形になっていた。

細胞内において眼点と接合装置の非対称的配向はいかにして可能になるのか、連続切片法を用いた透過型電子顕微鏡観察と配偶子の三次元立体構築により調べた。細胞内は鞭毛根によって仕切られた空間で区別できる。鞭毛根は基底小体の基部を出発点として細胞前方から後方へ伸びる微小管性の構造で、1d、1s、2d、2sの4本があり、これらは互いに十文字型に配列している。透過型電顕連続切片像から鞭毛、鞭毛根、接合装置を三次元立体構築すると、互いに十文字型に配列する4本の鞭毛根(1d, 1s, 2d, 2s)のうち、 $mt^+$ の接合装置は1d鞭毛根の根元(眼点と同面)に、 $mt^-$ の接合装置は2d鞭毛根の根元(眼点と逆面)にあり、交配型による接合装置の非対称的な配置が形成されていた。

第2章では、4系統間12組の交雑によるオルガネラ遺伝様式について述べられている。オルガネラ遺伝様式は、系統間でのオルガネラDNA多型を用いたオルガネラ遺伝マーカーにより調べた。葉緑体では、先行研究で得られていた葉緑体遺伝子の部分配列を基に、インバースPCR法により新たに多型を探索し、PCR解析、PCR-RFLP、PCR-SSP解析で識別できる遺伝マーカーを新規に3つ単離した。ミトコンドリア遺伝マーカーに関しても新規に7つ作製し、葉緑体も含め計10の遺伝マーカーで4系統間のオルガネラDNA多型全てを識別できるようにした。4系統8株の配偶体に配偶子形成を誘導し、4系統間12組の交雑を行った。得られた合計377の孢子体でオルガネラ遺伝マーカーを用いて葉緑体とミトコンドリアの遺伝様式を調べた。その結果、葉緑体は355例(94.2%)の割合で $mt^+$ から片親遺伝していた。一方で、ミトコンドリアは312例(83%)の割合で $mt^+$ から片親遺伝していたが、葉緑体に比べ父性遺伝や両性遺伝といった $mt^-$ の遺伝マーカーが残存する接合子が多く検出された。その出現頻度は葉緑体が22例(5.8%)、ミトコンドリアが65例(17%)で葉緑体の3倍近くになっていた。一方で、葉緑体とミトコンドリアの両方が同時に父性遺伝や両性遺伝になるということではなく、葉緑体の遺伝機構とミトコンドリアの遺伝機構はそれぞれ独立した制御が行われていることが示唆された。

なお、本論文第1章は、加賀美弥生、桑野和可、宮村新一、河野重行との共同研究で、共著論文として論文発表もしているが、本論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。