

氏 名	ふか だ かず たけ 深 田 一 剛
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 98 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	緑藻ボルボックスのハッチング酵素に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 井 上 丹 教 授 河 内 孝 之 教 授 佐 藤 文 彦
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

クラミドモナス様の単細胞生物から、ボルボックス目における生物への多細胞進化には、ハッチング時期を遅らせることが重要である。これにより多細胞体制に必要な種々の発生過程を安全に行うことが可能になったと考えられる。クラミドモナスにおいて、母細胞壁から娘細胞が放出されるハッチング過程は、細胞分裂の約5時間後におこる。それに対して、ボルボックスにおける幼生体が親球状体から放出されるハッチング過程は、生殖細胞の最初の分割から約36時間後におきる。つまり、両者間でのハッチング時期の相対的变化は、発生時期が相対的に変化するヘテロクロニー（異時性）にあたる。また、ボルボックスの生殖細胞の最初の分割からハッチングまでの間には、不均等分裂、インバージョン、生殖細胞と体細胞の分化、ECMの蓄積などといったボルボックスの多細胞化には不可欠で、なおかつクラミドモナスでは絶対におこらない発生過程が存在する。このようにボルボックス目に属する緑藻におけるハッチング時期のヘテロクロニック変化は、多細胞進化にとって必要不可欠であり興味深い研究対象である。

現在までに、ハッチング時期に影響を与える遺伝子システムの存在が示唆されているが、ボルボックスのハッチングのメカニズムに関する知識はほとんど得られていない。そのため、申請者は、ボルボックスのハッチング過程の全体像を明らかにすることを目的に、第一段階として、ハッチング酵素を精製し、その分子生物学的な解析を行った。

申請者は、まず、ハッチング後の培地から親の体細胞シートを分解する能力を指標にしてハッチング酵素である分子量125-kDのプロテアーゼを精製した。アミノ酸配列情報を基に単離した全長遺伝子の塩基配列解析の結果、この酵素はサチライシン様セリンプロテアーゼであり、アミノ末端側に一回膜貫通領域を含むプロドメインが存在することを明らかにした。また、ノザンブロット解析により、本酵素をコードする mRNA がハッチング時期よりもかなり以前に発現していることを明らかにした。さらに、ウェスタンブロット解析により、ハッチング前の個体に蓄積されたプロドメインを含む143-kD酵素が、ハッチング時にプロセッシングされ、125-kD酵素が培地中に放出されることを明らかにした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ボルボックス目に属する緑藻におけるハッチング時期のヘテロクロニック変化は、多細胞進化にとって必要不可欠ものの一つである。しかし、ハッチングのメカニズムについてはほとんど解っていなかった。申請者は、ボルボックスのハッチング過程の全体像を明らかにする事を目的に、ハッチング後の培地から親の体細胞シートを分解する能力を指標にしてハッチング酵素を精製し、そのアミノ酸配列から酵素をコードする遺伝子の単離をおこなった。

分子量125-kDのプロテアーゼであるハッチング酵素を精製し、アミノ酸配列情報を基に単離した全長遺伝子の塩基配列解析の結果、この酵素がアミノ末端側に一回膜貫通領域を含むプロドメインをもつサチライシン様セリンプロテアーゼであることをつきとめた。また、ノザンブロット解析により、この酵素をコードする mRNA がハッチング時期よりもかなり以前に発現していることを明らかにした。さらに、ウェスタンブロット解析により、ハッチング前の個体に蓄積されたプ

ロドメインを含む 143-kD の酵素が、ハッチング時にプロセッシングされ、125-kD 酵素が培地中に放出されることを明らかにした。この酵素をコードする mRNA は、親体細胞では発現しておらず、幼生体の体細胞と生殖細胞で発現している。これら申請者の研究は、酵素は幼生体の表面上に提示され、幼生体の上部に存在する親体細胞シートの ECM 成分を分解することにより、親個体に穴が開き幼生体が放出されることを強く示唆するという新しい重要な仮説を導いた。一方、この酵素のカルボキシ末端側はデータベース上のタンパク質と相同性を示さず、この機能未知ドメインは同酵素の約半分を占めている。この機能未知ドメインが、ハッチングそのものや酵素活性においてどのような役割を果たしていることを解明する事は、今後のハッチングのメカニズム解明への大きな手がかりをあたえる。したがって、以上の研究成果をもとにした今後のボルボックス目緑藻におけるハッチングの解析により、多細胞進化の理解が深まることが期待される。よって本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

さらに、平成19年1月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。