



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functional analysis of the two heterogeneous flagella of the brown algal gametes using CRISPR-Cas9
Author(s)	原田, 実
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	乙第7241号
Issue Date	2026-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7241
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/100100
Type	doctoral thesis
File Information	HARADA_Minori_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士（環境科学）

氏 名 原 田 実

学 位 論 文 題 名

Functional analysis of the two heterogeneous flagella of the brown algal gametes
using CRISPR-Cas9

(CRISPR-Cas9を用いた褐藻配偶子異質2本鞭毛の機能解析)

コンブやワカメといった褐藻類は、系統進化学的にはストラメノパイル系統群（「管状小毛」の意）に属し、陸上植物、緑藻類、紅藻類などとは大きく異なるグループである。この系統群の最大の特徴は、遊泳細胞（配偶子、遊走子）が長さや機能の異なる2本の前後鞭毛を有することである。特に、長い前鞭毛には、マスチゴネマと呼ばれる細かい毛が多数付着している。この系統群の遊泳細胞の鞭毛は、動物精子と同様に波形運動を行うが、遊泳方向はそれとは逆となる。すなわち、前鞭毛が細胞を引っ張るように前進する。これは前鞭毛に付着したマスチゴネマによるものと一般的に考えられてきた。一方、短い後鞭毛は、遊泳細胞の方向制御に関与すると考えられている。例えば、受精の際には、雄性配偶子が雌性配偶子から放出される性フェロモンを感知すると遊泳方向を転換する、あるいは配偶子が正あるいは負の走光性を示す際に、後鞭毛は大きく屈曲して遊泳方向を変化させることが知られている。このようにストラメノパイル系統群の異質2本鞭毛は、進化的に重要な特徴を持つが、その機能や制御機構について、具体的な実験結果に基づく考察はほとんど行われてこなかった。本研究では、全ゲノム解析が完了している褐藻シオミドロ *Ectocarpus* species 7 Ec32株を実験材料として、異質2本鞭毛の機能解析を行うことを目的とした。まず、マイクロインジェクションによるCRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集技術を褐藻類で初めて確立した。次に、前鞭毛に付着しているマスチゴネマを欠損させた*mas1*変異体を作成し、配偶子の遊泳運動を解析した。さらに、後鞭毛に存在し青色光受容体と予測されているヘルムクロームタンパク質の変異体を作成し、配偶子の走光性応答を調べた。

褐藻シオミドロEc32株のゲノム編集は、Cas9タンパク質とgRNAの複合体 (RNP) を含む溶液をマイクロインジェクションにより単子嚢に注入することで行った。単子嚢は遊走子を形成する生殖器官であり、成熟過程で数回の核分裂が同調的に起こり、多核化した後、最終的に数百の遊走子を放出する。そのため、一度のマイクロインジェクションにより複数の変異体を作成できると考えた。まず、ゲノム編集の成否を調べるためにアデニン-ホスホリボシル-トランスフェラーゼ遺伝子 (*APT*) を標的としたノックアウトと、2-フルオロアデニン (2-FA) による選抜法を確立した。次に、マスチゴネマの主要なタンパク質をコードする遺伝子 (*MAS1*) をCRISPR-Cas9を用いたゲノム編集によりノックアウトした。*mas1*変異体から放出された配偶子、また配偶子嚢内の配偶子を対象に、MAS1タンパク質に対する特異的抗体を用いた免疫染色法、および透過型電子顕微鏡による観察を行

ったところ、*masI*変異体では前鞭毛からマスチゴネマが完全に消失していることが明らかになった。次に、高速ビデオ撮影により*masI*変異体と野生株の配偶子の遊泳様式を比較した。その結果、従来考えられてきたようなマスチゴネマによる遊泳方向の逆転は認められず、配偶子は前鞭毛の運動によって前方へ遊泳した。配偶子の遊泳速度は、野生株では $208.8 \pm 55.7 \mu\text{m}/\text{秒}$ であったのに対して、*masI*変異体では $36.3 \pm 11.9 \mu\text{m}/\text{秒}$ と、1/6程度まで低下した。また、変異体では野生型と比較して前鞭毛の振幅は大きくなり、振動数も増加した。これは前鞭毛に付着するマスチゴネマが消失したことで水中での運動抵抗が減少したためと考えられた。*masI*変異体においても配偶子の遊泳方向が逆転しなかったことは、鞭毛の末端から基部に向かう水流が、前鞭毛自身の運動によって生じていることを示唆している。この水流は、前鞭毛付近の絵の具粒子の動きからも確認された。さらに、*masI*変異体から放出された雄性配偶子は、野生型雌性配偶子と正常に受精した。この接合子から複相の胞子体を育て、単子嚢での減数分裂を経て、最終的に*masI*変異体の雌性株を確立した。*masI*変異体の雌性株と雄性株から放出された配偶子は、コントロールと同様に正常に受精した。これらの結果から、雌雄配偶子の前鞭毛に付着しているマスチゴネマは受精には関与していないことが明らかとなった。

最後に、褐藻遊泳細胞の走光性について研究を進めた。従来の研究から、ヘルムクローム (HELMCHROME) は走光性を担う青色光受容体として考えられてきた。その根拠として、1) 他の青色光受容体タンパク質（例えばオーレオクロームやフォトトロピン）に共通して見られるLOV (Light-Oxygen-Voltage) ドメインを持つこと、2) 抗ヘルムクローム抗体が後鞭毛に局在すること、3) 走光性を示さない遊泳細胞を放出するコンブ類などでは、ヘルムクローム遺伝子がゲノム中に存在しないこと、などが挙げられる。ヘルムクロームが真の青色光受容体であることを検証するため、上記と同様の方法でヘルムクローム遺伝子をノックアウトした変異体を作出した。抗ヘルムクローム抗体を用いた免疫染色では、野生型配偶子の後鞭毛で観察される染色シグナルは*helmchrome*変異体の配偶子後鞭毛では認められなかった。褐藻遊泳細胞の後鞭毛は、フラビンに由来すると考えられる緑色の自家蛍光を放つことが知られているが、ヘルムクロームタンパク質の消失に伴ってこの蛍光も消失することが明らかとなった。野生型配偶子の後鞭毛基部には膨潤した部分 (paraflagellar body) が存在し、その内部には結晶状構造が観察される。また、抗ヘルムクローム抗体はこの構造に集中的に局在することが分かっていた。連続切片を用いた電子顕微鏡観察の結果、*helmchrome*変異体の配偶子では、結晶構造が消失しており、膨潤部は小型化していた。走光性を詳細に調査するため、高速ビデオカメラと青色光照射システムをコントローラーで連動させた観察系を構築し、青色光に対する配偶子の負の走光性について記録・解析を行った。その結果、*helmchrome*変異体の配偶子では走光性が完全に消失していた。以上の解析より、ヘルムクロームは新規の青色光受容体タンパク質であり、その機能は、遊走子・配偶子の走光性における青色光受容に関与するものであると結論した。

本研究を通して、ストラメノパイル系統群に属する褐藻の配偶子が持つ2本の異質鞭毛について、それぞれの鞭毛に特徴的な構造・運動・応答に関わる遺伝子の機能を詳細に解析し、新たな知見を得た。