



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/doktoral.r7241
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/100100
Type	doctoral thesis
File Information	HARADA_Minori_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士 (環境科学)

氏 名 原田 実

審査委員 主査 教授 長里 千香子
副査 教授 星野 洋一郎
副査 准教授 市原 健介
副査 教授 小亀 一弘 (大学院理学研究院)
副査 教授 藤田 知道 (大学院理学研究院)
副査 名誉教授 本村 泰三 (北海道大学)

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)

コンブやワカメなどの褐藻類は、系統進化学的にはストラメノパイル系統群に属し、陸上植物、緑藻類、紅藻類とは大きく異なる生物群である。ストラメノパイル系統群の特徴として、遊泳細胞 (配偶子・遊走子) が長さや機能の異なる2本の鞭毛を持つことが挙げられる。長い前鞭毛にはマスチゴネマと呼ばれる管状小毛が多数付着しており、短い後鞭毛は遊泳方向の制御に関与すると考えられてきた。ストラメノパイル系統群の遊泳細胞は、動物精子と同様に前鞭毛の波形運動によって遊泳するが、前鞭毛が細胞を引っ張るように前進するという特徴を持つ。この現象は、前鞭毛に付着したマスチゴネマに由来すると考えられてきた。また、後鞭毛は、性フェロモンへの応答や走光性に伴う遊泳方向の転換に関与すると推定されている。しかし、これら異質2本鞭毛の機能や制御機構について、分子レベルでの実験的検証はほとんど行われていなかった。

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 *Ec32* 株を材料として、異質2本鞭毛の機能解析を行った。まず、マイクロインジェクションによってCRISPR-Cas9複合体を単子嚢へ導入することで、褐藻類において初めてゲノム編集技術を確立した。単子嚢は成熟過程で同調的な核分裂を繰り返して多核化し、最終的に多数の遊走子を形成するため、一度の導入操作で複数の変異体を得られる特徴を持つ。さらに、アデニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ (*APT*) 遺伝子を標的としたノックアウトと2-フルオロアデニンによる選抜法を確立し、効率的な変異体作出系を構築した。これにより、褐藻における遺伝子機能解析のための新たな実験基盤が整備された。

次に、前鞭毛のマスチゴネマ主要構成タンパク質をコードする*MAS1*遺伝子をノックアウトした*mas1*変異体を作出した。免疫染色および透過型電子顕微鏡観察により、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確認された。高速ビデオ解析の結果、*mas1*変異体でも配偶子は前進遊泳を維持しており、従来考えられていた「マスチゴネマによる遊泳方向の逆転」は認められなかった。一方で遊泳速度は野生株の1/6まで低下し、前鞭毛

の振幅と振動数は増加していた。これはマスチゴネマの消失により水中抵抗が低下したためと考えられた。また、絵の具粒子の動態観察から、前鞭毛自身の運動によって鞭毛末端から基部方向への水流が形成されていることが確認された。さらに、*masI*変異体由来の雌雄配偶子は正常に受精し、胞子体へと発生した。これらの結果から、マスチゴネマは受精そのものには関与せず、配偶子や遊走子といった遊泳細胞の遊泳効率や推進力の増強に寄与する構造であることが明らかとなった。

さらに、後鞭毛に存在する青色光受容体候補ヘルムクロームについて解析を行った。ヘルムクロームはLOVドメインとRGSドメインを持ち、後鞭毛に局在すること、また走光性を示さない褐藻では対応遺伝子が欠失していることなどから、光受容体として推定されていた。そこでヘルムクローム遺伝子をノックアウトしたところ、後鞭毛で観察される抗体シグナルと緑色自家蛍光が消失した。また、電子顕微鏡観察により、後鞭毛基部の膨潤部内部に存在する結晶構造も消失していることが示された。さらに、高速ビデオカメラと青色光照射系を組み合わせた解析により、*helmchrome*変異体では負の走光性が完全に失われることが明らかとなった。以上より、ヘルムクロームは褐藻遊泳細胞における青色光受容体として機能しており、遊泳細胞の走光性制御に必須であることが示された。

本研究は、褐藻において初めてゲノム編集技術を確立するとともに、異質2本鞭毛それぞれに特徴的な構造や運動制御機構を分子レベルで解明したものである。特に、マスチゴネマの推進力強化機能およびヘルムクロームの青色光受容体としての役割を実証した点は、新規性と学術的意義が高い。さらに、本研究で構築されたゲノム編集技術は、今後の褐藻類における細胞生物学・発生学・進化学研究を大きく発展させる基盤技術としても重要である。審査委員一同は、これらの成果を高く評価するとともに、申請者が十分な研究能力および学識を有していることを認め、博士（環境科学）の学位を受けるにふさわしい資格を有するものと判定した。