

学位論文要約 十川 太輔

受精は、精子が卵に接近して融合することで成立する。一般に、受精の際には精子誘引物質が卵から放出され、精子はその濃度勾配を感知して卵へ向かう。この現象は精子走化性と呼ばれ、植物から動物に至るまで広く見られる。精子走化性に関する研究は 100 年以上前から行われている。動植物において、初めて精子走化性が見つかったのはシダ植物のワラビであり、その精子誘引物質はリンゴ酸イオンであった (Pfeffer 1884)。精子走化性のしくみは、ウニやホヤなど一部の生物で理解が進んでいるが、精子が精子誘引物質の濃度勾配を認識し、卵に接近するしくみについては未だ不明な点が多く、生物種間の共通性・多様性に関する知見も乏しい。

本研究では、精子走化性研究の実験プラットフォームとしてゼニゴケを用いる。ゼニゴケは、半数性、低い遺伝子冗長性、充実したゲノム情報、容易で選択肢が多い形質転換系など、これまで精子走化性研究に用いられてきた生物種にはない特性を兼ね備えている。そのため、ゼニゴケを加えることで動植物の精子走化性の知見をさらに広めることができると考えた。また、本研究は多数の形質転換体の作製や系統間の交配を伴い、多数の「生きた」試料の長期安定的保存が必要であった。これまでゼニゴケの胞子、無性芽および葉状体の保存は可能であったが、精子の保存については例がなかった。これらを受け、本研究の第一部ではゼニゴケにおける精子走化性に関わる因子 MpVICSPER1 の解析について、第二部ではゼニゴケ精子超低温保存法の開発について報告する。

これまで、ゼニゴケにおける精子走化性のしくみは不明であり、関与する遺伝子も分かっていなかった。そこで、ゼニゴケをモデルとした精子走化性関連遺伝子の探索が始められた。それまで、マウスの Ca^{2+} チャネル CatSper (Ren et al. 2001)、ヒメツリガネゴケのグルタミン酸受容体様チャネル GLR-like (Ortiz et al. 2017)、ホヤの Ca^{2+} トランスポーター PMCA (Yoshida et al. 2018) が精子内の Ca^{2+} 濃度を制御して精子走化性に関与すると報告されていた。苔類ゼニゴケにおける精子走化性でも、イオンチャネル、あるいはトランスポーターが関与すると推測された。そこで、トランスクリプトームおよびプロテオーム解析により発見

されていた、電位依存型イオンチャネルのホモログをコードし、ゼニゴケの造精器特異的に発現する膜タンパク質遺伝子 *Voltage-gated Ion Channel of SPERM 1*, MpVICSPER1 に着目した。MpVICSPER1 の類似タンパク質を調べたところ、そのホモログは哺乳類などの動物、鞭毛菌類、コケ・シダ植物、藻類には見つかったが、被子植物では認められなかった。そのホモログをもつ生物はいずれも精子あるいは鞭毛をもつことから、MpVICSPER1 は鞭毛形成や鞭毛運動の制御に関与する可能性が予想された。また、MpVICSPER1 およびそのホモログには 4 箇所の Ion transport domain が保存されていた。脊椎動物の電位依存型イオンチャネルと比較したところ、MpVICSPER1 の Ion transport domain にも膜電位の変化を検出する S4 領域および Ca²⁺選択フィルターである CavAb 領域のアミノ酸配列が保存されていた (Tang et al. 2014)。これより、MpVICSPER1 が電位依存性 Ca²⁺チャネルとして機能することが示唆された。続いて、MpVICSPER1 の機能を明らかにするため、ゲノム編集によりその機能欠損株 *Mpvicsper1^{se}* 株を作出した。*Mpvicsper1^{se}* 雄株の葉状体は正常な形態と成長を示したが、雄器托辺縁部の形態にはわずかな違いが認められた。一方、精子については、鞭毛運動に伴う精子尾部の振動が *Mpvicsper1^{se}* 株の精子で 1/2 以下に低下していた。*Mpvicsper1^{se}* 株の精子の平均運動速度も野生株と比較して 10~15 $\mu\text{m s}^{-1}$ (野生株の 37.0~56.9%) に低下しており、方向転換もできなくなっていた。さらに、*Mpvicsper1^{se}* 株の精子は造卵器への走化性を示さず、野生型雌株と交配しても胞子の形成は見られなかった。以上の結果から、MpVICSPER1 は遊泳速度の増加および方向転換に関与していると考えられる。今後、MpVICSPER1 の精子における局在、透過させるイオンの種類、膜電位に対する応答性、上流および下流のシグナル伝達、鞭毛運動制御のしくみを明らかにする必要がある。

次にゼニゴケにおける生体試料の長期安定保存法の一つとして、精子の超低温保存法を開発した。一般に、凝固点よりも低温では、細胞内外で氷晶形成が始まる。氷晶が細胞内で発生・成長すると、物理的に細胞内構造に障害を与える (Asahina 1967)。細胞外の氷晶形成では、細胞は脱水によるダメージを受ける可能性がある (Asahina 1962)。そのため、細胞を生きた状態で超低温保存するには、氷晶を形成させずに固化させるか、発生した氷晶から細胞を保護する必要がある。この時、凍結保護剤 (cryoprotective agents, CPA) による処理や脱水

による細胞内溶質濃度の上昇、あるいは制御された冷却過程で固化させることが重要である (Mazur 1970)。ゼニゴケ精子の超低温保存条件を設定するため、まず一般的な CPA である糖、アルコール/有機溶媒、タンパク質 (Pegg 2007) が精子の運動に及ぼす影響を評価した。その結果、スクロースは 3%、グリセロールは 4%、DMSO および DMFA は 10%以上でそれぞれ精子運動を阻害した。しかし、これらの水溶液を水で置換して除いたところ、部分的に運動能の回復が見られた。これらの結果より、スクロースおよびグリセロールの各濃度は 2%、卵黄は 5%に設定し、この水溶液を SGY として用いた。

次に、冷却過程を設定した。冷却過程で適切に脱水するため、SGY に懸濁した精子を $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ の速度で -80°C まで冷却し、その後は直ちに液体窒素中 (-196°C) に浸漬した。超低温処理後に常温で解凍すると、精子は保存前の 67.6~75.5%の生存率、54.3%の平均運動速度を維持していた。さらに、超低温保存した精子を野生株雌と交配したところ、多数の胞子が形成され、胞子は正常な葉状体に成長した。以上の結果より、超低温保存した精子は全体的として平均運動速度は低下するものの、受精能を維持していることが明らかとなった。

最後に、上記のゼニゴケ精子超低温保存技術において他のコケ植物精子への応用を検討した。対象として、ゼニゴケに比較的近縁である苔類ジャゴケ属ヒメジャゴケを選んだ。その結果、超低温保存後でも一部のヒメジャゴケ精子は鞭毛運動を維持した状態で遊泳しており、ゼニゴケ精子の保存技術が他のコケ精子にも利用可能であることが示された。以上の結果は、植物精子の超低温保存に成功した最初の報告である。

以上