

博士論文審査報告書

氏名 山岡 望海 (ヤマカ ヲヰ)
学位の種類 博士 (理学)
学位記番号 博理第94号
学位授与報告番号 甲第264号
学位授与年月日 平成28年3月22日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
論文題目 The gliding mechanism of diatoms

「ケイソウの滑走運動機構」

論文審査委員 (主査) 教授 宮澤 淳夫
(副査) 教授 吉久 徹
(副査) 教授 阪口 雅郎
(副査) 教授 大岩 和弘
(副査) 准教授 洲崎 敏伸

(神戸大学大学院理学研究科)

(副査) Tobias I. Baskin

(Professor, Biology Department, University of Massachusetts)

(副査) 准教授 園部 誠司

1. 論文内容の要旨

単細胞性の羽状目ケイソウは基質上を滑走運動することが知られているがその機構は解明されていない。また、群体性の *Bacillaria paxillifer* では隣接する細胞同士が滑走運動するがその機構も不明である。本論文で申請者は単細胞性の *Pleurosigma* sp. と群体性の *Bacillaria paxillifer* について形態学および生化学的な解析を行った。はじめに、*Bacillaria paxillifer* の運動を定量的に解析し、さらに形態学的解析をおこなった。その結果、アクトミオシン系が関与していることを阻害剤を用いた実験で明らかにし、蛍光ファロイジン染色によりアクチン束の観察に成功した。さらに、電子顕微鏡により縦溝近傍にアクチン様繊維構造を見出し、繊維構造と細胞膜の間に新たに高電子密度の構造を発見した。これらの結果から、*Bacillaria paxillifer* においても単細胞性のケイソウと同様に滑走運動にアクトミオシン系が関与していると結論した。これまで単細胞性のケイソウでアクトミオシンの関与が示唆されていたが、モータータンパク質に関する生化学的な知見がなかったことから、申請者は次に単細胞性の *Pleurosigma* sp. を用いてモータータンパク質の同定を試みた。その結果、ミオシン様の性質を持つ分子量約 130 kDa のポリペプチドを

見出した。モノクローナル抗体を作製して分布を調べ、130 kDa ポリペプチドがアクチンあるいは縦溝に沿って存在していることを示した。これらの結果から、申請者は130 kDa ポリペプチドが滑走運動に関わるミオシンではないかと予想した。ケイソウの滑走運動には細胞と基質あるいは細胞同士をつなぐ粘液繊維が重要な役割を果たしていると考えられていたが、そのダイナミクスを生細胞で観察した例はなかった。そこで申請者は蛍光レクチンを用いて *Pleurosigma* sp. と *Bacillaria paxillifer* において粘液繊維の観察を試みた。その結果、それぞれのケイソウにおいて特徴的な粘液繊維の運動を観察することに成功し、また両方で粘液繊維に含まれる糖成分が異なることを見出した。申請者はこれらの研究を通じて単細胞性および群体性のケイソウにおける滑走運動機構の共通点と相違点について議論した。

2. 論文審査結果

ケイソウの滑走運動はよく知られており長い間生物学者を魅了してきたが、その分子機構に関する研究はほとんどなかった。この論文で申請者はこの問題に正面から挑み一定の成果を挙げた。特に生化学的手法を用いてミオシン様タンパク質をケイソウから単離したことは特筆すべきことである。ここで見出されたミオシン様タンパク質が滑走運動に関わることが完全に証明されるにはさらなる証拠の蓄積が必要であるものの、このタンパク質がケイソウ滑走運動の研究の次の主たるターゲットであることは確かであり、ケイソウの細胞骨格研究において生化学的手法が利用できることを示した功績は大きい。また、蛍光標識レクチンを用いた粘液繊維の可視化は非常にユニークな手法であり、これまで謎の多かった滑走運動と基質との関連を明らかにする有力な手段となるだろう。さらに、申請者によって単細胞性および群体性のケイソウを用いた比較研究手法に有効性が示され、今後この分野における研究に新たな視点を与えるものと期待される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成28年1月27日、論文内容及び関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

*Baskin 委員の審査結果については別紙（英文）として添付する。

Evaluation Report for Doctoral Thesis

Title : The gliding mechanism of diatoms

Applicant : Nozomi Yamaoka

1. Abstract of the thesis

Some of unicellular pennate diatoms can move over the substratum and this motion called gliding has been known for long time. However, the molecular mechanism of this motion was not understood well. It is also true for unique gliding motion of a colonial pennate diatom, *Bacillaria paxillifer*, in which a pair of two adjacent cells in a colony glide with each other. Here, I report morphological and biochemical analyses of two kinds of diatoms, unicellular *Pleurosigma* sp. and colonial *B. paxillifer*. First, I carried out quantitative analyses of gliding motion of *B. paxillifer* and morphological analyses of this diatom. I demonstrated involvement of the actomyosin system in gliding motion of this diatom using actomyosin inhibitors, and observed actin bundles by fluorescence-labeled phalloidin staining. I also found the actin-like filaments near the raphe, where the adjacent cells attach to each other, and novel electron-dense structures located between the plasma membrane and these actin-like filaments. These results indicated that gliding motion of *B. paxillifer* is powered by the actomyosin system as proposed in unicellular gliding diatoms. Second, I performed biochemical search to identify a putative motor protein(s) to drive gliding motion in a unicellular diatom, *Pleurosigma* sp. because there was no biochemical information of such a motor protein(s) despite the fact that the pivotal role of actin filaments in gliding of unicellular diatoms has been postulated. I found a 130 kDa actin-binding polypeptide that has some myosin-like features. Immunofluorescence microscopy with a monoclonal antibody against this 130 kDa polypeptide demonstrated its localization along the raphe even in the absence of the actin bundles, suggesting that the protein forms linkage between the actin filaments and the plasma membrane. From these results, I proposed that the 130 kDa polypeptide is a candidate for a motor protein that powers gliding motion in the unicellular diatom. Third, I investigated saccharide components of extracellular mucilage both in *Pleurosigma* sp. and in *B. paxillifer*. It has been postulated that gliding motion of diatoms depends on extracellular mucilage and its movement is driven by intracellular actomyosin, but there is no direct observation of mucilage movement during gliding in living diatoms. Here, I described some characteristics of movement of mucilage secreted from *Pleurosigma* sp. and *B. paxillifer* using fluorescein-labeled lectins. I also found that mucilage of these two kinds of diatoms has different saccharide compositions. Finally, I will discuss, from these

findings and previous observations, common and different points of gliding mechanism and its regulation between the unicellular and colonial diatoms.

2. Evaluation of the thesis and the final examination

Gliding motion of diatoms has been a familiar phenomenon and has attracted biologists for a long time, but there have been few studies on its molecular mechanism. In this thesis, Mr. Yamaoka has made a frontal attack on this problem and attained certain achievements. Especially, it deserves special mention that he succeeded in isolating a myosin-like protein that is localized with the actin bundles near the raphe from *Pleurosigma* sp. by the biochemical approach. Although additional pieces of evidence are required for rigorous proof of involvement of the 130 kDa polypeptide in the gliding, this protein is indeed the primary target for the next studies of gliding mechanism in the diatom, and the achievement to show that biochemical techniques are applicable to the study of the diatom cytoskeleton is also valuable. In addition, visualization of mucilage secreted from the diatoms with fluorescence-labeled lectins is unique and effective. This will be a powerful tool to examine how the diatoms interact with the substratum during their gliding. His comparative studies using unicellular and colonial diatoms were proved to be fruitful, and this style of analyses will deliver further new insights into this field of biology.

Thus, the reading committee members listed below hereby state our full approval of the thesis completed by Mr. Yamaoka in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science in the Graduate School of Life Science.

The committee also certifies that the applicant passed the final oral examination on his thesis and related issues held on January 27 in 2016.