

氏名	島田 真帆
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	自博甲第 2 2 号
学位授与年月日	令和 8 年 3 月 1 9 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
文部科学省報告番号	甲第 8 8 6 号
専攻名	創成理工学専攻
学位論文題目	繊毛虫 <i>Spirostomum ambiguum</i> の再生過程における形態修復について (Morphological reconstruction during cell regeneration in the ciliate <i>Spirostomum ambiguum</i>)
論文審査委員	主査 島根大学教授 広橋 教貴 島根大学教授 児玉 有紀 島根大学教授 吉田 真明 島根大学准教授 石田 秀樹

論文内容の要旨

生物は、進化の過程で複雑な身体構造を獲得し、多様な環境での生活を可能にしてきた。進化の過程で獲得した能力の一つに「再生能力」がある。生物の再生現象は多細胞生物において広く知られているが、単細胞生物においても再生能力をもつものがある。多細胞生物における再生現象は、損傷した細胞が脱落し、新しい細胞によって損傷した組織や器官が形成されることで再生する「組織レベル・器官レベルの再生」である。一方で、単細胞生物における再生現象は、損傷した細胞そのものが修復して再生する「細胞レベルの再生」である。

生物の再生現象についてはこれまで多くの研究が行われてきたが、そのほとんどが多細胞生物を対象とした「組織レベル・器官レベルの再生」についての研究であり、「細胞レベルの再生」についての研究は非常に少ない。多細胞生物においては全身に幹細胞をもつことで高い再生能力をもつ扁形動物のプラナリアを筆頭に、様々な種において近年も積極的に再生研究が行われており、再生過程の遺伝子発現など分子レベルの研究も多く行われている。一方で単細胞生物においては、繊毛虫類や有孔虫類など一部の原生生物が再生能力をもつことが知られているが、その研究例は多くない。繊毛虫類の中でも異毛綱に属する種は特に再生能力が高く、その細胞の大きさから顕微手術が容易なこともあり、古くから「細胞レベルの再生」の研究の対象とされてきた。異毛綱に属する *Blepharisma*, *Spirostomum*, *Stentor* は 19 世紀頃から再生研究が行われており、*Stentor* については近年も分子レベルでの再生研究の例がいくつかある。しかし、*Blepharisma* および *Spirostomum* においては分子レベルでの再生研究の例はなく、顕微手術による研究についても断片的である。特に *Spirostomum ambiguum* は、細胞が巨大で操作性に優れ、後端に収縮胞をもつため前後軸の識別が容易であり、さらには *Stentor* とは異なる形態特性を持つことから、既存の研究を補完しうる、再生制御の解明に最適なモデルである。単細胞生物における再生

メカニズムを明らかにすることで、多細胞生物での再生現象について細胞レベルでの理解を深めるとともに、単細胞生物から多細胞生物まで広くみられる再生現象の進化についても解明できる可能性があると考え。本研究では、前後軸の判別が容易な大型の繊毛虫 *Spirostomum ambiguum* の再生能力をより詳細に明らかにすることを旨とした。特に、切断後の断片の増殖能力の有無や、大核を含まない細胞断片の再生に注目し、光学顕微鏡を用いた観察を行った。また、損傷した細胞が再生するためには損傷部分の膜修復が必須であると考え、走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いた再生過程の膜修復の観察を行った。

S. ambiguum は2つに切断されると、どちらの断片も生存し、再生した。切断によって収縮胞を失った前方断片は、切断から数分後に断片の後端部に新しい収縮胞を形成した。切断面は切断直後は直線的で目立っていたが、切断から1日後には丸みを帯びて目立たなくなっていた。切断から数日後には、両断片とも通常の細胞と同様に増殖した。細胞が3つに切断されると、切断されて収縮胞を失った前方および中央の断片において、切断から数分後に新しい収縮胞が形成された。中央断片において、新しい収縮胞は必ず断片の後端部に形成され、断片の前方に形成されることはなかった。この結果から、*S. ambiguum* の前後軸は切断後も維持されている可能性が示唆された。細胞の前端から切り出した大核を含まない小断片においても、切断から数分で新しい収縮胞が形成された。大核を含まない小断片のうちいくつかは切断から2日後も生存し、通常の細胞と同様の細長い形態を示した。この結果から、収縮胞の形成など一部の形態修復には大核が不要であることが示された。細胞の前端から切り出した小断片のうち、切断から2日後に食胞の形成によって口の再生が確認されたものは全て断片内に大核があり、大核を含まない断片においては食胞が形成されなかった。この結果から、口の形成には大核が必要である可能性が示唆された。走査型電子顕微鏡による切断面の観察から、*S. ambiguum* は切断後すぐに切断面を繊毛の無い膜で覆うことで細胞内容物の流出を防いでいることが明らかになった。繊毛の無い膜の面積は時間経過とともに狭くなり、切断からおおよそ24時間後には切断面が繊毛で覆われ、修復が完了する。透過型電子顕微鏡で細胞内部を観察すると、通常の繊毛がある膜の部分には繊毛列の構造や膜の裏打ち構造などがみられ、繊毛列の部分にミトコンドリアが密集している様子もみられる。一方で繊毛の無い膜の部分には繊毛列の構造はみられず、膜の内側部分にはミトコンドリアではなく小胞が密集していた。繊毛の無い膜の表面には通常の細胞膜と同様に毛羽立ち状の構造がみられたが、切断後に切断面の内側に密集する小胞の膜の内側には毛羽立ち状の構造がみられなかった。この構造の違いから、切断後に切断面を覆う繊毛の無い膜は損傷部分の周辺の細胞膜が伸展して形成されている可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

本論文は、単細胞生物である繊毛虫 *Spirostomum ambiguum* をモデルに用い、細胞レベルでの形態再生と膜修復のメカニズムを、高度な顕微鏡技術と細胞生理学的実験によって多角的に検討し、学術的に優れた成果をまとめたものである。多くの再生研究が多細胞生物を対象としている中で、細胞一個の単位での修復過程に関する知見は未だ乏しく、本研究はこの重要な学術的空白を埋める独創的な取り組みとして高く評価できる。

本論文は全4章から構成されている。第1章の序論では、細胞レベルの再生研究の歴史的背景と本種のモデル生物としての優位性が論理的に提示されている。第2章における実験手法の確立については、操作性に優れた「まつ毛」による微細切断などユニークな技法の導入や、従来困難であった脆弱な

繊毛虫に対する水凍結乾燥法および加圧凍結置換法を用いた電子顕微鏡試料作製技術が高く評価される。これにより、アーティファクトを極限まで排除した高解像度の観察が可能となり、本研究の信頼性を担保する重要な技術的基盤となっている。

第3章および第4章における研究成果は、極めて高い新規性を有している。まず、切断された前後断片がいずれも生存・増殖可能であることを通時的に実証し、再生細胞の倍加時間が通常細胞と遜色ないことを定量的に示した点は、本種の再生能力の高さを示す強固な証拠である。特に、大核を含まない小断片においても収縮胞の形成や基本的な形態維持が可能であることを突き止めたことは、細胞の自律的な形態形成能力を示す重要な知見である。一方で、細胞口の再生には大核(遺伝子発現)が必須であることを明確に示し、本種の再生には「構造依存」と「遺伝子依存」という二相性の制御機構が存在することを提唱した点は、単細胞生物の再生戦略を理解する上で極めて高い学術的価値を有している。

さらに、電子顕微鏡を用いた膜修復の微細構造解析では、切断後数分以内に繊毛のない新たな膜が切断面を被覆し、内容物の流出を防ぐプロセスを鮮明に捉えることに成功した。この修復膜が周辺細胞膜の伸展に由来する可能性を示唆した考察は、細胞膜の動的な修復システムに関する新たな議論を提起するものである。

以上の成果は、原生物学および細胞生物学の基礎的発展に大きく寄与するのみならず、将来的な細胞単位の修復技術や再生医療への理論的貢献も期待できる。また、得られた成果の一部は、指導教員による精査を経て、信頼のおける学術誌(Shimada et al., 2024 等)に公表されており、本審査において粗悪学術雑誌への掲載がないことも確認済みである。したがって審査委員会は、本提出論文の内容および公聴会における発表と質疑応答を総合的に検討した結果、申請者の論文は博士(理学)の学位授与に十分に値するものと全員一致で判定した。