

シズンを用いた色素体・ミトコンドリア分裂機構の解析

吉田 大和・黒岩 常祥*

1953年にハワードとペルクによって、G1, S, G2, M 期からなる細胞周期の概念が提唱されて以来今日まで、細胞周期と言えば、細胞核分裂周期 (mitotic cycle) として理解されてきた。また基礎生物学的にも、癌の治療や再生医療、食糧生産に関わる細胞の増殖の問題にしても細胞核分裂周期のみを考慮する傾向が強い。しかしながら、すべての真核細胞の基本的な内部構造は、細胞核の他に独自のDNA (ゲノム) をもつ、複膜に包まれたミトコンドリアと、植物であれば色素体 (葉緑体)、さらに単膜系のER (小胞体)、ゴルジ体、リソソーム (液胞) をもつマイクロボディから構成されている。また膜には包まれていないが微小管、中心体のような細胞骨格系も細胞社会に加わる。したがって細胞増殖を考えるためには、細胞核分裂周期だけでなく、それらと連携して機能する各細胞小器官の増殖周期を考慮する必要がある (図1)²⁾。

1973～1977年に、真正粘菌でミトコンドリアが独自の核 (核様体、DNAとタンパク質の複合体) を含み、核分裂を伴いながら分裂増殖していることが発見された。その結果、細胞周期は細胞核分裂周期とミトコンドリア分裂周期から成り進行することが分かった。1977年に電子顕微鏡観察により真正粘菌で、1982年にはシャジクモで、ミトコンドリアの分裂面に分裂装置様の構造が発見された^{3,4)}。ところが、一般に研究に使用されるパイコント (植物)、オピストコント (動物・菌類)、アメーバ類の細胞では、細胞核に比べると、その他の細胞小器官は小さいこと、形が不定形であること、数が多いことから分裂・増殖の仕組みを解析するのが難しかった。

そこで、最も単純な形態の真核生物の探索が行われた。そのためには、真核生物は高温、強酸性の海洋で誕生し

たと考えられていること、分子系統解析から最も早く分岐した真核生物の「基」となる生物は菌類でなく紅藻であること、そしてこれまでの研究から、細胞の分裂を自然に同調されるには光センサーとしての葉緑体を含んでいることなどが考慮された。その結果、高温、酸性の温泉に生息し、ミトコンドリアと色素体がそれぞれ1個で、独自の分裂周期をもつ原始紅藻類 (ガルデア、シアニジウム、シアニディオシズン [シズン]) を、最適な研究材料として見いだした。

1986年にはシアニジウムで色素体の分裂面の外側にリングが発見され、色素体分裂リング (plastid-dividing ring, PDリング) と名づけられた⁵⁾。さらに1993年にはシズンで、ミトコンドリアの分裂面の外側にミトコンドリア分裂リング (mitochondrial-dividing ring, MDリング) が発見された。その後、研究が進み、色素体とミトコンドリアは、ダイナミックトリオと呼ばれる3種のリング (PD/MD, FtsZ, ダイナミン) による複合装置を使って分裂増殖していることが明らかとなった⁶⁾。FtsZリングは細菌由来のGTPaseタンパク質であり、基質内にリングを形成する^{7,8)}。一方、ダイナミンもGTPaseタンパク質であるが真核生物固有の遺伝子であり、オルガネラの外膜上にリングを形成する⁹⁻¹¹⁾。こうしたことから、色素体とミトコンドリアの分裂装置はバクテリア由来のFtsZリングと宿主真核細胞由来のPD/MDリング、ダイナミンリングのキメラ構造であると考えられる⁶⁾。しかしながら、これらの個々のリング構造や機能だけでなく、色素体とミトコンドリアの分裂増殖の全貌を解明するためには、これらオルガネラの分裂装置を無傷に単離し、そのプロテオミクスにより全構成物質とその関連遺伝子

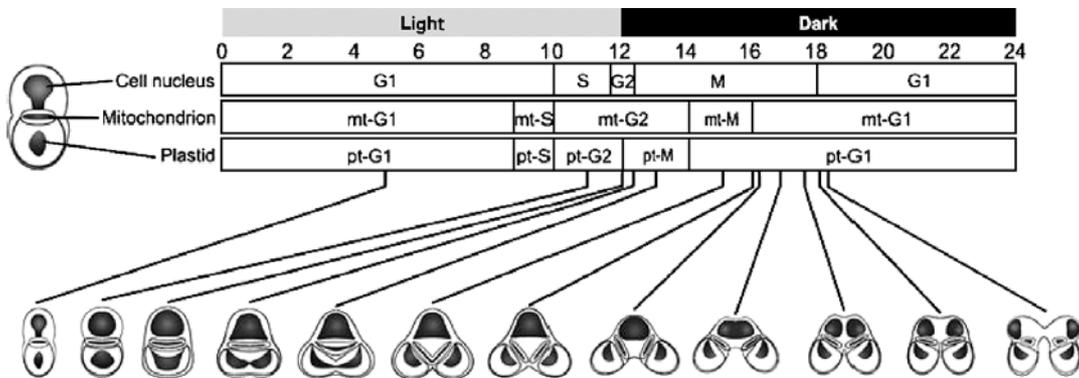


図1. 原始紅藻シズンの細胞内における細胞核・ミトコンドリア核・色素体核の細胞周期のモデル図

* 著者紹介 立教大学理学研究科極限生命情報研究センター (特任教授) E-mail: tsune@rikkyo.ne.jp

を同定することが必須である。

本稿では、シズンの細胞学的特長を利用することで、初めて無傷に単離することができた色素体・ミトコンドリア分裂装置の解析の結果明らかになってきた色素体とミトコンドリアの分裂増殖機構を紹介する。

原始紅藻シアニディオシズン

シズンは1細胞あたり細胞核、色素体、ミトコンドリアをそれぞれ1個含み、また、単膜系の基本細胞小器官もほとんどが1個である(図2)。光の明暗で細胞分裂周期を完全に同調化できるため、ミトコンドリアと色素体を含め、ほとんどの細胞小器官を同調的に分裂させることができる。シズンは細胞小器官の分裂を同調化できる唯一の真核生物である。さらに細胞核、ミトコンドリアと色素体の、それぞれが球形に近い単純形であること、ミトコンドリアと色素体の分裂装置も大きいこと、さらに細胞壁がアマータイプであり各細胞小器官の分画が可能であるなど、色素体とミトコンドリア分裂の機構の解析に有利であった。

しかしながら色素体とミトコンドリアの分裂装置は円周それぞれ約2 μm と約1 μm と非常に小さく、単離した装置の微量なタンパク質の解析をするためには、超高感度・高分解能の質量分析装置(MALDI-TOF-MS)による解析が必要であった。それに先立ち、ゲノムの配列情

報が必須であった。このため、本研究を進めるための先行研究として「シズンゲノム解読プロジェクト」を推進し、まず99.98%を解読し、さらに未解明だった48箇所を解読し、真核生物として初めて細胞核、ミトコンドリアそして色素体のそれぞれ100%ゲノム解読に成功した。全塩基数は16,546,747であった¹²⁻¹⁴。ゲノム解読の結果、シズンゲノムには4775遺伝子しかなく、イントロンを含む遺伝子はわずかに26遺伝子しか存在しないことが分かった。これによりシズンは細胞構造のシンプルさだけでなく、ゲノム構造もきわめてシンプルな生物であることが分かり、100%完全解読されたゲノム情報とともに、プロテオーム解析にきわめて適した生物であることが明らかになった。

色素体分裂装置の構造と分子機構

高度同調培養系を使って細胞分画を行い、分裂期色素体を大量に単離した。次にこれを非イオン性界面活性剤nonidetP-40(NP-40)で処理し、外胞膜と色素体分裂装置複合体画分を得た。さらに*n*-octyl- β -D-glucopyranoside(OG)で処理し、色素体外膜のみを溶解することで無傷な色素体分裂装置画分を得ることに成功した(図2)。単離した色素体分裂装置は、閉鎖リング状の形態以外にも、超らせん状やらせん状構造のものが確認された¹⁵(図2)。これらは単離によって色素体分裂装置が包膜から外れたため、超らせん構造となったと考えられた。つまり分裂装置は強い収縮力を出していることが示唆された。さらに収縮が進むとリングの幅は太くなり、色素体は分断された。

この色素体分裂装置には、ダイナミックトリオ(PDリング、ダイナミン、FtsZ)の分子が含まれ、それぞれリングを形成していた。どのリングが、あるいはどの要素が収縮力を発生させているのだろうか。そこでFtsZだけを遊離した分裂装置、あるいはダイナミンだけを除去した色素体分裂装置を調製した。その結果、FtsZが遊離した分裂装置と無傷な分裂装置では、らせんが観察されたが、ダイナミンが遊離したものでは、らせん構造をとらず、直線状に伸びたままの構造を示した(図3)。このことからダイナミンが収縮力の発生に重要な役割を果たしていると考えられた。そこで、微細な分子を動かすことができる光レーザーピンセット装置を開発し、それを使ってダイナミンを保持する色素体分裂装置の一端を摘み引っ張ったところ、元の4倍まで引き伸ばされ、離すと元の形状へと収縮した。一方、ダイナミンが遊離した分裂装置では、このような伸縮反応は起きなかった(図3)。この結果から、色素体分裂装置の中で収縮の起動力を発生させているのはFtsZではなくダイナミン分子が関係していることが分かった。またダイナミン分子の挙動を免疫電子顕微鏡法で詳細に解析した結果、ダイナミンは次の2つのステップで色素体の分裂に加わっていることが

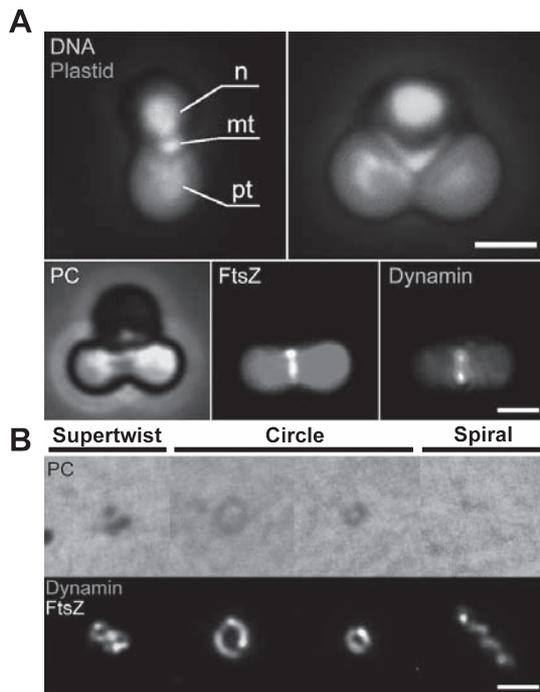


図2. 原始紅藻シズン。(A) 間期・分裂期のシズンのDAPI像と色素体分裂面に形成されたFtsZリングとダイナミンリング。(B) 無傷に単離された色素体分裂装置。Scale bar, 1 μm 。n, 核; mt, ミトコンドリア; pt, 色素体。

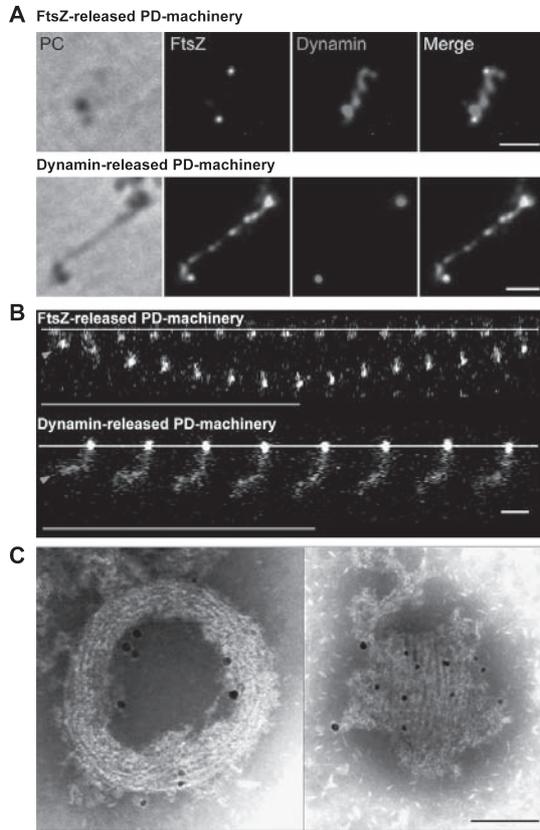


図3. 単離色素体分裂装置の機能解析. (A) らせん構造を維持するためにはGTPaseタンパク質であるダイナミンが必須である. (B) ダイナミンが結合している色素体分裂装置だけが収縮反応を示す. (C) 単離色素体分裂装置の電子顕微鏡像. ダイナミンは外側のPDリング繊維間に挟まるようにして結合している(小さな金粒子) Scale bar, 1 μm (A, B), 200 nm (C).

示唆された. (i) 色素体分裂前期では, ダイナミン分子はPDリングの外側の繊維の間隙に結合し, PDリング繊維間をスライディングさせることによって色素体分裂のための収縮力を発生させる. 次に(ii) 色素体分裂後期では, 外側に結合していたダイナミン分子はリングの内側へと移動し, 色素体膜へ直接作用して膜のくびり切りを行う. このような2段階での制御によって, 色素体の分裂は行われていることが明らかになった¹⁵⁾.

FtsZによる次期色素体分裂面の位置決定

では, 共生細菌由来のFtsZはどのような役割を担っているのだろうか. 高度同調培養系を用いてシゾンの色素体分裂過程におけるFtsZの挙動を詳細に解析した. FtsZは分裂装置のうち最初に形成されることから, 色素体分裂装置の基盤構築のための位置を決定する役割を果たすと考えられる. この位置決定はどのようになされるか, 色素体の分裂が終了する直前の細胞を調べたところ, 娘色素体内に親FtsZリングに対して直角に娘リング構造が現れ, 色素体分裂が終了する際にはどちらのリング構

造も分解された. この結果はFtsZが色素体分裂装置の基盤を構築する役割だけでなく, 娘色素体において次の色素体分裂面を決定していると考えられる¹⁶⁾.

上記の解析結果, およびこれまでの研究から, 色素体の分裂装置ができあがるには, G1期の終わりにミトコンドリアと色素体のDNA合成(mtS, cpS)が終わると同時に, 色素体の中心部の内側にFtsZとPDリングが形成される. 続いて外側PDリング, ダイナミンリング, ミトコンドリアの内外リングが形成され, 色素体PDリングの収縮と分断が起きる.

ミトコンドリア分裂装置の構造と分子機構

ミトコンドリアの分裂はダイナミックトリオ(MD, FtsZ, ダイナミン)の他に, 最近, ミトコンドリアダイナミンをミトコンドリア分裂面に結合させるアダプター分子として働くMda1がミトコンドリア分裂装置構成タンパク質の1つであることが明らかになった¹⁷⁾. しかしながらミトコンドリア分裂装置構成タンパク質, 特に内側の構成タンパク質は, FtsZの他, ほとんど明らかになっていない. 内側は細菌由来の分裂タンパク質から形成されているはずなので, FtsZほか, Fts遺伝子群の10ほどのタンパク質から形成されていてもよいが, 実際には宿主細胞との共生過程でほとんどが失われ(奪われ), ミトコンドリアの分裂タンパク質としてはFtsZのみが残ったと考えられた. ではFtsZ以外のバクテリア分裂遺伝子はどのように失われたのであろうか.

そこで, こうした問題を含むミトコンドリアの分裂機構の全貌を解明するため, ミトコンドリア分裂装置を無傷に単離し, プロテオーム解析を行い, そこに含まれる全タンパク質を明らかにすることにした. しかしミトコンドリアの分裂装置は色素体の分裂装置に比べ小さく, 脆弱な構造体であったため, ミトコンドリアの分裂装置を単体で単離することは困難であった. そこで過去の電子顕微鏡写真を見直したところ, 細胞分裂の初期においてはミトコンドリアと色素体分裂装置が結合した構造をとり, 後期にはお互いに分離することが分かった(図4). この性質を利用し, まず分裂前期のミトコンドリア・色素体分裂装置複合体を単離した(図4)¹⁸⁾. 免疫蛍光・電子顕微鏡法により詳細に調べた結果, ミトコンドリア分裂装置は, 幅が約4から6 nm程度の極細な繊維からなるMDリングを中心に複数のタンパク質が結合し, その構造は色素体分裂装置に類似しており, 収縮における同様の機械的仕組みを備えていることが示唆された.

さらにミトコンドリアの分裂装置に含まれるタンパク質の全貌を解明するため, 色素体とミトコンドリアの分裂装置のプロテオーム解析を行い, さらにマイクロレイ解析から色素体とミトコンドリアの分裂期に特異的な発現パターンを持つものを検索した結果, 全色素体・ミ

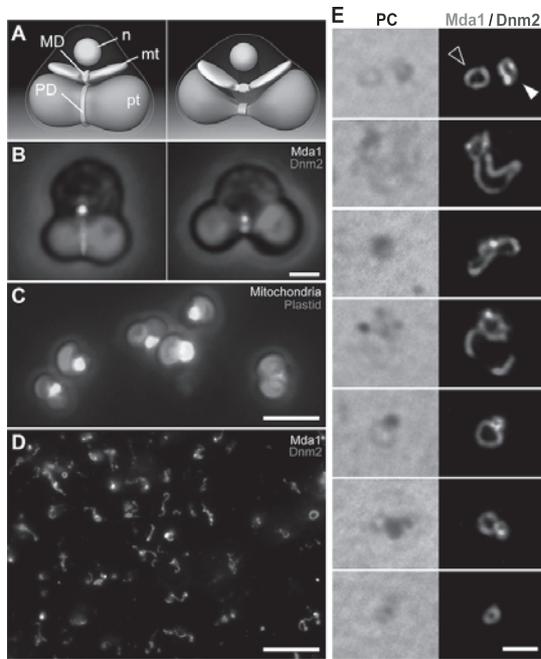


図4. ミトコンドリア・色素体分裂装置複合体の単離. (A, B) 分裂前期のみ, 2つの分裂装置が結合している. (C) 単離ミトコンドリア・色素体複合体. (D, E) 単離ミトコンドリア・色素体分裂装置複合体. Scale bar, 1 μm (B, E), 3 μm (C), 5 μm (D).

トコンドリア分裂装置構成タンパク質, 47遺伝子を同定することに成功した¹⁸⁾. ここから, すでに分かっている色素体の分裂装置タンパク質を引くことによって, ミトコンドリアの分裂装置を形成するタンパク質が解明された.

新規ミトコンドリア分裂タンパク質ZED

ミトコンドリア分裂装置タンパク質の中で, 配列予測プログラム (Target-P) を用いて, 新規ミトコンドリア内部の分裂タンパク質を同定し, ZEDと名づけた¹⁸⁾. 詳細な解析の結果, ZEDタンパク質はバクテリア分裂タンパク質 ZapA¹⁹⁾ の機能的アナログと予想され, タンパク質分解プロセッシングの後に分子間自己会合構造をつくり, FtsZとともにミトコンドリア分裂装置の基盤構造を構築していると考えられた (詳細は大沼の項を参照). 一連のZEDの解析結果から, 宿主細胞は, 共生の際に, 共生細菌からZED (ZapA) のように遺伝子を抜きとり, 改変し, ミトコンドリアの内部分裂装置へと変換していったことが明らかとなった¹⁸⁾.

単膜系の細胞小器官の分配遺伝

ミトコンドリアと色素体は, 分裂装置によって分断された後, 娘細胞へと分配される. 興味深いことに, 色素

体の分配には, 微小管からなる紡錘体は関与しないが, ミトコンドリアと細胞核染色体の分配には, 微小管からなる紡錘体が関与していることが明らかとなってきている²⁰⁾. さらに単膜系のゴルジ体とERは細胞核とともに, 細胞核微小管を使って分配される²⁰⁾. 残りのマイクロボディとライソソーム (液胞) はミトコンドリアに付着し, ミトコンドリア微小管を使って分配遺伝される. ライソソームの分配には新規に発見されたVIG1 [TSUKISOI] タンパク質が必須であることが明らかとなってきた²¹⁾. さらに最近, ついにPDリングを構成する色素体分裂リング遺伝子PDR1 [KUSANAGI] を同定した²²⁾. シズンを使って今後も細胞周期との関連で細胞小器官の分配遺伝に関わる研究が飛躍的に進むと期待される.

こうした真核細胞の基本的な構造の構築や増殖の問題は近い将来, 構造生物学の大きな研究対象となろう. すでに高温に棲む真核生物 “シズン” を使ったタンパク質の高次構造の解析研究は, 世界的な流行の兆しを見せている²³⁾.

文 献

- 1) Imoto, Y. et al.: *Protoplasma*, **241**, 63 (2010).
- 2) Gillham, N. W. et al.: *Annu. Rev. Genet.*, **28**, 71 (1994).
- 3) Kuroiwa, T.: *J. Cell Biol.*, **72**, 687 (1977).
- 4) Kuroiwa, T.: *Int. Rev. Cytol.*, **75**, 1 (1982).
- 5) Mita, T. et al.: *Protoplasma*, **130**, 211 (1986).
- 6) Miyagishima, S. et al.: *Trends Plant Sci.*, **8**, 432 (2003).
- 7) Osteryoung, K. W. and Vierling, E.: *Nature*, **376**, 473 (1995).
- 8) Miyagishima, S. et al.: *Plant Cell*, **13**, 2257 (2001).
- 9) Miyagishima, S. et al.: *Plant Cell*, **15**, 655 (2003).
- 10) Gao, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4328 (2003).
- 11) Praefcke, G. J. and McMahon, H. T.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 133 (2004).
- 12) Matsuzaki, M. et al.: *Nature*, **428**, 653 (2004).
- 13) Misumi, O. et al.: *Plant Physiology*, **137**, 567 (2005).
- 14) Nozaki, H. et al.: *BMC Biol.*, **5**, 28 (2007).
- 15) Yoshida, Y. et al.: *Science*, **313**, 1435 (2006).
- 16) Yoshida, Y. et al.: *Cytologia*, **73**, 197 (2008).
- 17) Nishida, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4736 (2007).
- 18) Yoshida, Y. et al.: *Curr. Biol.*, **19**, 1491 (2009).
- 19) Gueiros-Fiho, F. J. and Loisick, R.: *Genes Dev.*, **16**, 2544 (2002).
- 20) Yagisawa, F. et al.: *Planta*, **226**, 1017 (2007).
- 21) Fujiwara, T. et al.: *Plant Cell*, **22**, 772 (2010).
- 22) Yoshida, Y. et al.: *Science*, **329**, 949 (2010).
- 23) Markley, J. L. et al.: *J. Struct. Funct. Genomics*, **10**, 165 (2009).