

シズンを用いたオルガネラによる細胞周期調節機構の解析

小林 勇氣^{1*}・兼崎 友²・田中 寛¹

酸素呼吸を行う α -プロテオバクテリアが原始真核細胞に共生することによって、呼吸を行う細胞内小器官（オルガネラ）ミトコンドリアが誕生した。この共生によって、最初の真核細胞が生まれたと考えられている。さらに、そこに光合成を行うシアノバクテリアが細胞内共生することによって葉緑体を持つ植物細胞が生まれた。

現在の真核細胞においてミトコンドリア、葉緑体はオルガネラの一つとして自立性を示すことなく粛々とエネルギー生産の場として機能している。ミトコンドリア、葉緑体は共生体由来の特徴として核ゲノムとは別の独自のゲノムを持っており、転写翻訳が行われている。しかし、ミトコンドリア、葉緑体の機能に必要な遺伝子群の大半は核ゲノムにコードされている。このため呼吸や光合成などの主要な機能は核に支配されていると考えられている。共生以前や、共生当初はミトコンドリア、葉緑体は細胞の大きさ、ゲノムサイズ共に核と対等に存在したはずである。これは、共生の結果生まれた真核細胞が進化していく上でそれぞれのゲノムに存在する重複した機能を統合し、取捨選択したためと推察される。その結果、葉緑体、ミトコンドリアの機能維持や調節に必要な遺伝子は核に移され、核を中心とした効率的な生命維持システムを構築してきたのだと考えられる。このように別個の細胞であったものが、現在の真核細胞のように1つにまとまるにはどのようなプロセスがあったのであろうか？ 3種の原核生物を膜で囲って1つにしたところで1つの生物にはならないように、種々の問題についてトライアンドエラーを繰り返し、淘汰された結果、現在の真核生物に進化したことは想像に難くない。そこには別種の細胞を統合し、システムティックに連動させるシステムの存在が不可欠である。別個の細胞を1つの細胞にするために必要なものは数多くあるが、第一に細胞分裂の協調システムの確立が不可欠であると考えた。細胞分裂は生命の根幹をなす重要なシステムであり、細胞は個々に独自の周期を持って分裂を行っている。別個の細胞が1つの細胞になるためには、各々がバラバラに分裂を繰り返したのでは成り立たない。そこには異なる別種の細胞であった物の分裂を協調させる機構が必要である。しかしながら、高等生物ではこのような機構について、これまで深く追求されていなかった。このようなオ

ルガネラと核の協調機構を調べるためには、共生途上や共生直後のような細胞を調べることが理想的である。そうでなくとも、可能な限り共生当初の性質を残した細胞の解析が必要である。そのような視点から現在、単細胞紅藻 *Cyanidoschyzon merolae*（シズン）を用いて解析が行われている。シズンは核、ミトコンドリア、葉緑体を各1個ずつしか持たない。さらにオルガネラに含まれるゲノムDNAは細胞周期の特定の時期に複製し、オルガネラ自体も順次分裂した後、娘細胞に分配される。まさに想定される細胞内共生を開始した当時の細胞のようであり、他の真核生物では見られない特徴である。シズンの詳細な生物学的特徴の説明は別稿に譲るが、原核生物から真核生物への共生を介した進化のプロセスを解き明かす上でシズンはこの上ない材料である。本稿では、シズンを用いた細胞周期におけるオルガネラと核とのDNA複製を主眼とした協調機構の解析と、その結果予想されるモデルについて紹介する。

オルガネラによる核DNA複製の制御

シズンは独立栄養性の光合成生物であり、明暗周期を与え培養することによって、高度な同調培養が可能である。暗処理によって細胞周期がG1期で停止し、光を当ててS期に移行する。この際、まずミトコンドリアと葉緑体のDNA複製が先行して起こり、つづいて核のDNA複製が行われる。ミトコンドリアと葉緑体はそれぞれ10コピー以上の環状のDNAを持つが、DNA複製はほぼ同時に起こるため、ここではODR（オルガネラDNA複製）として合わせて扱う。一方、核の複製はNDRと呼ぶことにする。DNA複製において、ODRがNDRに先行して行われることは過去の研究により示されていたが¹⁾、ODRとNDRをつなぐ情報伝達系についての知見はなかった。著者らはこの情報伝達系を明らかにするため研究を行った。ODRは光照射により開始されODRの終了する時期からNDRが開始される（図1）。光照射を行わなければODRもNDRも開始されない。一般的に、NDRの開始は、G1/S期で特異的に活性化されるCDKによるリン酸化に制御されていることが知られている。CDK活性の測定により、シズンでも同様の機能を持つG1/S期特異的なCDK（CDKA）が存在することが明らか

* 著者紹介 千葉大学大学院園芸学研究所（特任研究員） E-mail: kyuki@office.chiba-u.jp

¹千葉大学大学院園芸学研究所、²東京農業大学生物資源ゲノム解析センター

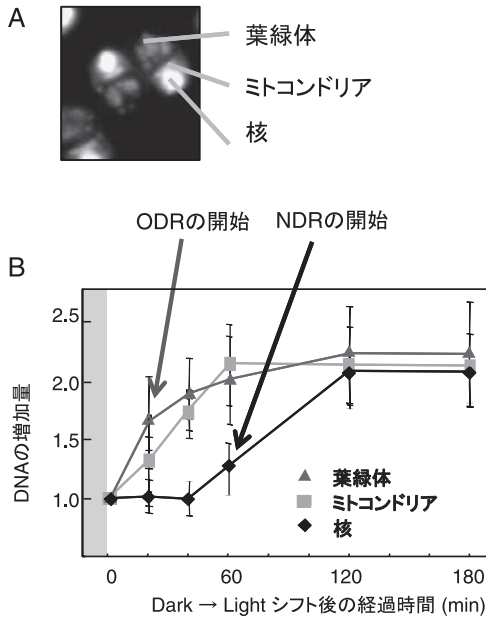


図1. DAPI染色によるDNA量増加の観察. DNAを特異的に染色する蛍光色素であるDAPIを用いてシズンを染色し, 蛍光顕微鏡観察することでDNA量を定量した. (A) DAPI染色後のシズンの観察像. (B) 同調培養中のシズンを経時的にサンプリングし, DNA量を測定することにより, 変化をグラフ化した. まずオルガネラのDNA複製が始まり, その後核の複製が始まっている.

になった. そこでCDKAを阻害する薬剤 (CDK2インヒビター) を添加し, DNA複製を観察した. その結果, NDRはCDK2インヒビターの影響により阻害されたが, ODRはまったく影響を受けなかった. 一方, ODRを阻害するためにDNAジャイレースの阻害剤であるナリジキシン酸を添加したところ, ODRだけではなくNDRとCDKAの活性も阻害された. このことからODRの開始はCDKAの活性化に必須であることが示唆される. 以上の結果は, ODRの活性化をCDKAの活性化につなげるシグナルが存在していることを示している. ODRはオルガネラ内の反応であるので, オルガネラから核への通常とは逆のシグナル伝達であるといえる. ミトコンドリアや葉緑体を構成する多くの遺伝子は核にコードされているため, 常に核による制御を受けている. しかし, 環境変化によって引き起こされるオルガネラの内部環境の変化 (光合成活性, 呼吸活性など) をモニターし, 核に伝達する機構が存在することが近年明らかにされてきた. これは通常の「核からオルガネラへ」, ではなく逆の「オルガネラから核へ」のシグナル伝達であることから, レトログレードシグナルと呼ばれている (図2). レトログレードシグナルは未だ明らかにされていないことが多いが, 活性酸素種 (ROS), 細胞内酸化還元電位 (レドックス), テトラピロールなどがシグナルとして働いているこ

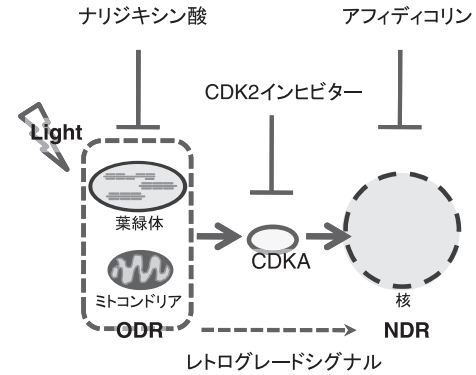


図2. オルガネラからのシグナルにより核の複製は制御されている. 原核生物のDNAジャイレースの阻害剤であるナリジキシン酸の添加により, ODRを阻害するとCDKAおよびNDRの活性化が起こらない. 一方CDKAを阻害するCDK2インヒビターを添加すると, NDRは阻害されるが, ODRは阻害されない. NDRの阻害剤であるアフィディコリンを添加しても同様の結果であった. このことからオルガネラから核へのNDRを活性化するシグナル (レトログレードシグナル) が存在することが明らかになった.

とが確認されている.

葉緑体からのテトラピロールシグナルによる核DNA複製の制御

ODRによるNDRの制御は, まさにレトログレードシグナルであると言える. では, 実際にODRの状況をCDKAの活性化につなげるシグナル物質は何であろうか? 著者らはレトログレードシグナルの1つであるテトラピロールに着目して解析を行った. テトラピロールは, 生体内では主にクロロフィルやHeme, そして, それらを合成する過程の中間体として存在している (図3-A). 酵母ではミトコンドリアで機能する電子伝達遺伝子の発現が, ミトコンドリアで合成されるHemeシグナルによって調節されている²⁾. また, Hemeの蓄積がシグナルとなり, Heme合成のネガティブフィードバックを誘導する. 植物では, 葉緑体ストレスのシグナルはMg-ProtoIXやMg-ProtoIXmeにより, 核に伝えられていることが示唆されていた³⁾. そこで, 暗処理によってODRを阻害したシズン細胞に種々のテトラピロールを添加したところ, ProtoIXとMg-ProtoIXを添加した時にNDRのみが誘導され, 他のテトラピロールではODRもNDRも誘導されなかった. さらに光照射後, Mg-ProtoIXの合成阻害剤であるオキシフルオルフェンを添加したところ, NDRが阻害された. 次いで細胞内のCDKA活性を測定した. Mg-ProtoIX添加によってCDKAが活性化し, オキシフルオルフェン添加によって阻害されることが明らかになった. また, 経時的に細胞内のテトラピロール蓄積量を測定した結果, 光照射後ODRが開始され, そ

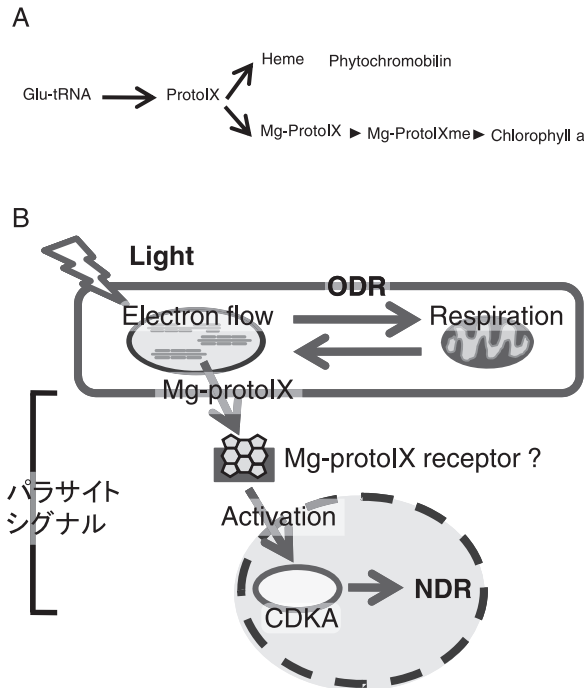


図3. パラサイトシグナルによるNDRの活性化モデル。(A) テトラピロール合成経路。(B) 光によりODRが活性化されると、シグナルとしてテトラピロールであるMg-ProtoIXが葉緑体から放出される。これがシグナルとなって、CDKAが活性化されNDRが開始される。ミトコンドリアと葉緑体のDNA複製は同時に起こるため何らかの相互作用があると推察される。

の後NDRが開始される間に一過的なMg-ProtoIXの蓄積が確認された。これらの結果からODRの開始によって、Mg-ProtoIXが細胞内に蓄積し、これがシグナルとなってNDRを誘導していると考えられた⁴⁾。Mg-ProtoIXはクロフィルの合成中間体として葉緑体で生成される。したがって、核のDNA複製は葉緑体からのシグナルによって制御されていることが明らかになった(図3-B)。

テトラピロールによるDNA複製制御とストレス応答

種々のテトラピロールは細胞内に蓄積することで、核コードの遺伝子の発現を制御していることが知られている。それではMg-ProtoIXの蓄積が核コード遺伝子の転写に影響を与え、NDRが誘導されているのだろうか？そこで、Mg-ProtoIXを添加したシズンを用い、マイクロアレイ解析により転写産物をプロファイリングした。その結果、Mg-ProtoIX添加によって遺伝子発現はほぼ変化しないと結論された。この結果はMg-ProtoIXの蓄積が転写を制御し、遺伝子発現の活性化によりNDRを引き起こすわけではないことを示している。また、種々の濃度のMg-ProtoIXを添加し、マイクロアレイ解析とNDRの開始を観察した。その結果、低濃度のMg-ProtoIX

処理ではNDRが誘導されるが、転写には変化がなかった。一方、高濃度で処理すると、逆にNDRが阻害され、この際にはいくつかの遺伝子の転写が活性化されることが明らかになった。この条件で転写が活性化される遺伝子は、HSP90などのストレス応答遺伝子群であった。このことから低濃度のMg-ProtoIXの蓄積は、シグナルとしてNDRを誘導するが、高濃度の蓄積は活性酸素種(ROS)などを発生させ、ストレス応答を引き起こすのではないかと示唆された⁵⁾。

ODRとNDRとの共役と可塑性

シズンには核、葉緑体、ミトコンドリアが1つずつしか存在せず、細胞分裂時にそれらの周期を同期することが正常な分裂に必要なために、このような制御系が存在すると思われる。では、このようなオルガネラによる細胞周期制御はシズンのような原始的な藻類のみに存在し、高等植物には存在しない現象なのだろうか？高等植物ではODRとNDRは無関係におこることが報告されている。しかし、器官形成が行われる分裂組織では、発生初期段階にODRが活発に行われ、NDRはその後の時期に活性化される⁶⁾。このことから、分裂組織ではシズンのようなODRとNDRの協調が保存されていると考えられた。そこで、タバコ培養細胞BY-2を用いた解析を行った。BY-2は根由来の培養細胞でありODRの開始に光を必要としないため、BY-2にナリジキシン酸を添加してODRを阻害した。その結果、NDRも阻害された。そして、このNDRの阻害はMg-ProtoIX添加によって解除された。同時にCDKA活性も測定したが、シズンと同様にMg-ProtoIX添加によって活性化することが明らかになった。

シズンは葉緑体の成立後、比較的早い時期に高等植物を含むグループとは分岐したと考えられているが、驚くべきことに高等植物にもODRとNDRの協調機構が保存されている。これはODRとNDRの協調が、真核生物において生命維持の根幹をなすシステムの1つであることを示している。ただし、このような協調性は多細胞系のすべての細胞で見られるわけではなく、細胞や器官分化のごく初期にのみ観察される。著者らはこのような、分化初期に行われているODR-NDR-分裂が共役した細胞周期制御メカニズムを“organelle-guided cycle (OGC)”と名づけている。一方、植物器官の構築においては、分化中期になるとODRの共役が外れ、NDRと細胞分裂のみが協調した“mitotic cycle”に移行する。そして分化後期ではNDRと分裂の共役も外され、分裂を伴わずゲノムのコピー数だけが増え、細胞自体が巨大化していく

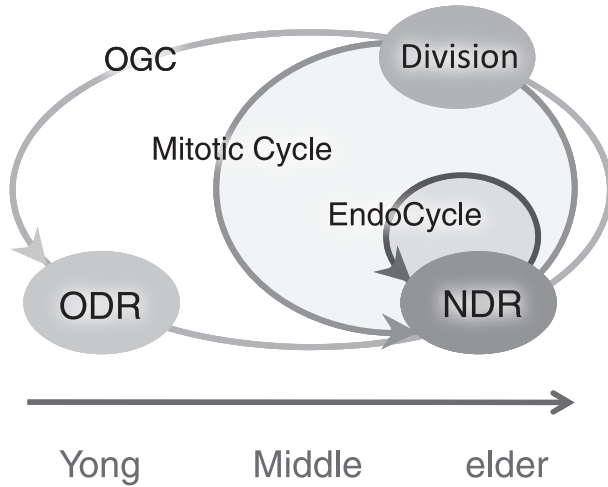


図4. 細胞の分化に伴う細胞周期制御機構の変化. 高等植物では組織分化の初期段階では ODR-NDR-分裂が協調された organelle-guided cycle (OGC) によって制御されるが, 分化中期では NDR-分裂のみが協調した mitotic cycle に, 分化後期では分裂を伴わず核ゲノムのコピー数だけがが増えていく endocycle に細胞周期のパターンが変化していく.

“endocycle” に変化する. このような組織分化に伴って, 細胞周期の様相が変化していくように見え, これが器官分化に重要な役割を果たしているように見えるのである (図4).

パラサイトシグナル研究の今後

レトログレードシグナルは他にもいくつか知られているが, Mg-ProtoIX を介した ODR と NDR の制御機構, 共生体由来である葉緑体からのシグナルであることから, 著者らは「パラサイトシグナル」と呼んでいる. パラサイトシグナルの研究は始まったばかりで未知の部分が多く, 全容を知るには今後多くの報告を待たねばならない. しかしながら, 今後明らかにしていくべき大きなポイントは2つあると考える.

1つは, Mg-ProtoIX による CDKA の活性化の理解である. 現在はまだ現象を捉えたただけであり, 分子的な実態の解明には未だ至っていない. 著者らは Mg-ProtoIX のレセプターが存在し, CDKA と相互作用することで, 活性の調節を行っているという仮説を立てて検証を行って

る. 最新の著者らの実験結果から, Mg-ProtoIX による CDKA の活性化にはどうやらプロテアソームによるタンパク質分解が密接に関わっているであろうことが予測されている.

もう1つは, ODR の開始機構の解明である. シーズンでは光照射により ODR が開始される. この ODR の開始は, 光合成の電子伝達や呼吸鎖の電子伝達を阻害すると起こらない. これは, ODR の開始がファイトクロムのような特異的な光レセプターを介して制御されているわけではないことを示している. また, 阻害剤の実験から, CDKA 以外の未同定の CDK の活性が ODR の開始に必要であることが示唆されており, 現在解析を進めている. これらの解析が進むことによって, パラサイトシグナル伝達系の全容が明らかになることを期待している.

これまで多くの知見によって示されているように, 細胞内共生によって生まれたオルガネラは, 共生当初は核と同程度の数の遺伝子を保有していたことだろう. しかし, 進化の過程でオルガネラの保有していた遺伝子は核に取り込まれ, 本来オルガネラが持っていた多くの機能が核による支配を受けるようになったと考えられている. そして, 近年の研究からオルガネラからの多種多様なレトログレードシグナルが発見されてきたように, 一方的に核の支配を受けるだけでなく, 双方向に情報の伝達が行われていることが明らかにされている. これらのことは, 核とオルガネラとの協調関係が, 細胞の生命活動維持に必須であることを示している. 著者らの研究成果は, オルガネラによる細胞周期のチェックポイントと呼べるものであり, オルガネラと核との関係を見直す新しい視点といえる.

文 献

- 1) Suzuki, K. *et al.*: *Eur. J. Cell Biol.*, **63**, 280 (1994).
- 2) Mense, S. M. and Zhang, L.: *Cell Res.*, **16**, 681 (2006).
- 3) Strand, A. *et al.*: *Nature*, **421**, 79 (2003).
- 4) Kobayashi, Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 803 (2009).
- 5) Kanesaki, Y. *et al.*: *Plant Signal Behav.*, **4**, 1190 (2010).
- 6) Sakai, A. *et al.*: *Int. Rev. Cytol.*, **238**, 59 (2004).