

令和元年6月13日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04813

研究課題名(和文)細胞内の3オルガネラ分裂マシンの構造と機能に関するゲノム形態学的解明

研究課題名(英文) Genome-morphological elucidation of structure and function of intracellular 3 organelle division machinery

研究代表者

黒岩 常祥 (KUROIWA, Tsuneyoshi)

日本女子大学・理学研究科・客員教授

研究者番号：50033353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞は細胞核の他、ミトコンドリアなど6種の細胞小器官(オルガネラ)により生命活動が維持されており、これらは細胞核と共に分裂/増殖する。申請者らはミトコンドリア、葉緑体及びペルオキシソームが、分裂マシンであるMDリング、PDリング、PODリングの収縮によって分裂/増殖することを捉えた。本研究目的は各リングの組成を知り、共通性を解明し、進化的意義を考察することであった。その結果PDとMDリングが共通の糖繊維の束であること、MD、PODリングが共通の酵素(dynamo 1)により分裂する機能を解明した。更にMDとPDの類似性から、両オルガネラが共通の祖先から誕生した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核細胞は細胞核の他に6種の細胞小器官が生命活動を支えている。ミトコンドリアはエネルギー源ATPを生み出す、その際に大量のCO₂や猛毒の活性酸素を発生させる。これらを無毒化するのがペルオキシソームである。ミトコンドリア病や癌、ペルオキシソーム病などには、これら細胞小器官の細胞内数が関与している。本研究成果はこうした医療にも応用されよう。一方植物は、葉緑体が光合成によりCO₂を固定し温暖化を防ぐと共に、O₂と糖(食料)を生み出し、地球環境の維持や生物の生存を支えている。医療にも、植物の生産性の向上にも、分裂マシンの基本機能の解明は必須であり、これを使った応用研究の貢献は大きい。

研究成果の概要(英文)：In addition to cell nuclei, eukaryotic cells are maintained in vital activity by six types of organelles such as mitochondria that divide / proliferate with the cell nucleus. The applicants have so far grasped that mitochondria, chloroplast and peroxisomes divide / proliferate by contraction of the dividing machinery: MD ring, PD ring and POD ring. Therefore, the purpose of this research was to know the composition of each ring, elucidate the commonality, and consider the evolutionary significance. As a result, we clarified that PD and MD rings are a bundle of glucose fibers, and that MD and POD rings function to contract and divide by a common enzyme (dynamo 1). Furthermore, the similarity between MD and PD suggested that both organelles were born from a common ancestor.

研究分野：基礎生物学

キーワード：葉緑体分裂マシン ミトコンドリア分裂マシン ペルオキシソーム分裂マシン シゾンゲノム 細胞小器官

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者らは、ミトコンドリアと色素体(葉緑体)が“細胞内の小細胞”の様に独自の核(核様体; DNAとタンパク質複合体)を持ち、オルガネラ核分裂後、細胞質分裂と同じように分裂(オルガネラキネシス、オルガネラ分裂)することを明らかにしてきた。ミトコンドリアの核分裂に関しては、オルガネラ核が大きな粘菌で核分裂の分子機構の解明が進んだが、ミトコンドリアキネシスの研究については粘菌では分裂マシンが小さく難しく進んでいなかった。一般に葉緑体核も小さかったが突然変異体の導入により分子機構解明への道が拓かれ、最近突然変異体を用いた遺伝子MOCの解析から新たな分子レベルでの展開が見えた。オルガネラ分裂後に起こるキネシスの分子細胞生物学的研究については、原始紅藻を使い、大きなミトコンドリアと葉緑体の分裂マシンを発見することにより、漸く解明への道が拓かれた。

(2) オルガネラキネシスの分子機構の解明については、主に原始紅藻類を用い、色素体やミトコンドリアがそれぞれPDリング、MDリングを基盤に構成された分裂マシンを使って分裂/増殖することが解明され、2010年、PDリングが直径約7nmの糖のフィラメントの束を基盤とし、ダイナミン2等と共役して機能していることが分ってきた(引用文献)。しかしミトコンドリアのMDリングは小さく大量単離が難しいため、その解析は進まなかった。

また2013年に単膜系のオルガネラであるペルオキシソームも、分裂マシン(PODリング)を使って分裂していることを発見した(引用文献)。葉緑体やミトコンドリアの分裂マシンは、細菌由来のFtsZリングを中心とする基質(内)側のリングと、繊維束のMD/PDリングとダイナミンなどから成る細胞質(外)側のリングの、二重のリング構造から構成されている。一方ペルオキシソームでは内側の膜の消失とともに、内側リングは無く、構造がシンプルである。従ってオルガネラの分裂に関わる基本構造の解明が進むと考えた。

2. 研究の目的

(1) ミトコンドリアと葉緑体が独自の核(核様体; DNAとタンパク質複合体)を持ち、核(様体)分裂後、細胞質分裂と同じように分裂(オルガネラキネシス)/増殖することが明らかになった。オルガネラキネシスについては、独自のPD/MDマシンが出現して働く事、更にPDリングについては本体である繊維の束が直径約7nmの糖フィラメントで形成されていることが分かった。しかしMDリングは小さく単離が難しかった。本研究ではMDリングの無傷、大量単離を目指し、その構成成分の解析によってキネシスの本体を明らかにすることを目的とした。

(2) 単膜系のペルオキシソームも分裂マシン(PODマシン)を使って分裂/増殖していることが分かってきた。そこでこれらのPODマシンの構造と機能を解明し、複膜系のPDリングやMDリングと比較して、それぞれのマシンの特性とともに共通の基本特性を明らかにする。そしてそれらの結果を基盤に、細胞小器官の誕生機構を考察することである。

3. 研究の方法

(1) これらの目的を遂行するために、100%ゲノム解読情報を基盤にしたオミクス解析、所謂ゲノム形態学的手法を用いた。シゾンの同調培養系の確立 各分裂マシンの単離 各分裂マシンに含まれるタンパク質のMALDI-TOF MSによる解析そしてそれらタンパク質の同定などである。これらを基盤に複膜系の微小なMDマシンやMDリングの単離を行う。小さく単離が困難であるとされたMDマシンについて、微小管破壊剤(カンプトテシリン)処理を試みた。この阻害剤処理で細胞内で葉緑体は分裂を続けるが、ミトコンドリアは分裂できず大きくなりMDリングも中央部に集積する。この方法を用いて、ミトコンドリア分裂マシンを単離した。

(2) 単膜系のPODマシンの構造と機能を複膜系のPD/MDマシンと比較し、3分裂マシンの基本特性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 単離したミトコンドリア分裂装置のプロテオームなどマルチオミクス解析 これまでに解明した葉緑体の分裂マシンの構造と機能を参考に研究を進めた。組織化学的染色法でMDリングを調べたところ、糖反応を示した。そこでミトコンドリア分裂マシンを葉緑体分裂マシンとの複合体として単離し、マルチオミクス解析(ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスなど)を行い、ミトコンドリア分裂関連遺伝子群を見出した。更にこの中から糖転移タンパク質の遺伝子を抽出し、MDR1遺伝子と名づけた。

(2) MDR1タンパク質 MDR1遺伝子はミトコンドリア分裂期に発現し、MDR1タンパク質を合成することが明らかになった。免疫蛍光顕微鏡法により、このタンパク質はミトコンドリア分裂マシンの細胞質側にあり、リングの収縮に関与していることが明確になった。更に免疫電子顕微鏡で調べたところ、分裂リングが緩み裸出している繊維の上に金コロイドの反応が現れていた。

(3) 巨大ミトコンドリア分裂マシンの誘導 更にミトコンドリア分裂マシンの構造と機能を詳細に解析するためには大量のMDリングが必要となる。細胞周期阻害剤（カンプトテシリン）処理を行うと、葉緑体は分裂を繰り返し小さくなるがミトコンドリアは分裂せず大きくなった。この大きな分裂マシンを純化生成し、成分分析を行った結果、MDR1はMDリングを構成する。

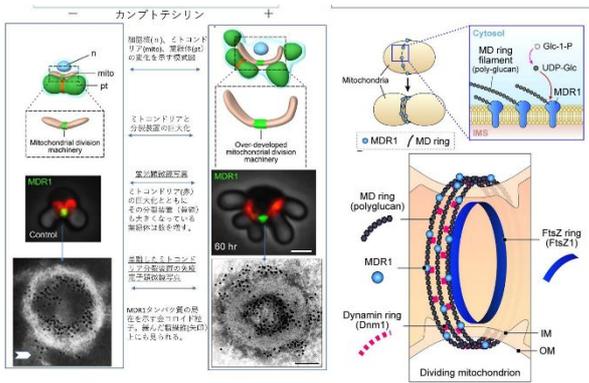


図1 カンプトテシリン処理による巨大ミトコンドリアの作出(左)と分裂リング形成モデル(右)。処理により葉緑体は分裂するがミトコンドリアは分裂せず大きくなる。ミトコンドリア(赤蛍光)と共に分裂装置(緑蛍光)も大きくなる。下はMDR1タンパク質がリング上に現れることを示すネガティブ免疫電子顕微鏡像。モデルではミトコンドリア分裂装置は基質にあるFtsZリングを主体とする内側のリングと、細胞質側の、糖の繊維の束とダイナミン等からなる外側のリングで形成されていることを示している。その糖繊維とダイナミンリングの滑り収縮によっ

てミトコンドリアは分裂する(Yoshida et al. 2017)。

糖転移タンパク質であること、ナノフィラメントは高分子グルコースから構成されていることが明らかになった。従ってMDリングナノフィラメントはMDR1がグルコースを重合させたポリグルカンフィラメントの束であること、更にPDリングとの高い共通性が明らかになった。

(4) MDR1遺伝子はミトコンドリアの増殖に必須 MDR1遺伝子をアンチセンス法で破壊すると、ミトコンドリアの分裂は阻止された。またこの分裂マシンからMDR1タンパク質は検出されなかった。このことからMDR1遺伝子がミトコンドリアの分裂に必須であることが明らかになった。

(5) MDR1遺伝子の獲得がミトコンドリアの誕生や、真核細胞の誕生に必須 MDR1と類似した遺伝子はシズン以外の多数の多細胞生物にも発見されており、またPDリングも類似の構成成分(PDR1)を持っていることから、MDR1,PDR1遺伝子の獲得が真核細胞、真核植物の誕生に深く関係していたと考えられる。

(6) ミトコンドリアとペルオキシソームの分裂の類似性 ペルオキシソームの分裂(POD)マシンが他のPDやMDマシンよりシンプルなことから、一般性を求めるにはこの解析を進めるのが良いと考えた。光同調培養法により分裂期ペルオキシソームを単離し、包膜と基質を溶かす事により、PODマシンの純化単離に成功した。このプロテオミクス解析をした結果、リングの収縮機能に関与するダイナミンの他に、幾つかの物質が含まれていることが分り、その中でも特に真核生物で共通性の高い遺伝子に注目し、この遺伝子をDYNAMO1とした。

(7) DYNAMO1の構造と機能 免疫蛍光電子顕微鏡法からDYNAMO1はPODリングの他、MDリングの主要構成物の一つである事が明らかになった。これらマシンは骨格となる繊維状リングと収縮力を発揮するダイナミンリングから構成されているが、DYNAMO1はダイナミンリング上に局在していることが明らかになった。更に研究を進めると、DYNAMO1は1 ATPを1 GTPに変換する酵素であった。GTPaseであるダイナミンは、この酵素が作ったGTPを使って分裂のための収縮力を発揮している事が強く示唆された。

(8) ミトコンドリアとペルオキシソームは共通の祖先から これまでのミトコンドリアとペルオキシソームの分裂マシンの解析から、これらの分裂を起こすMDマシンとPODマシン

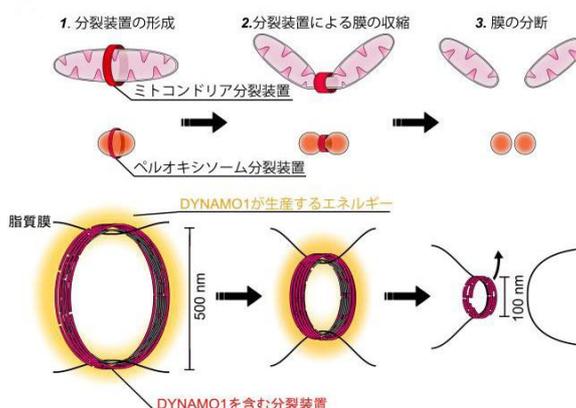


図2 DYNAMO1 (ATPをGTPに変換する酵素)のミトコンドリアとペルオキシソーム分裂装置上での局在と機能。同じDYNAMO1がミトコンドリアとペルオキシソームの分裂装置の形成過程から現れ、収縮と共役し、膜の分断とともに消失した。これはDYNAMO1がその分裂装置開始領域に局在し、GTPを供給し、そのエネルギーを使って両オルガネラが分裂収縮するためと思われる(Imoto et al. 2018)。

の構造が非常に類似していることが明らかになった。この二つのリングは同じ共通の祖先オルガネラから生じ、ペルオキシソームの方は進化と共に内基質にあったDNAを失い、FtsZ系に関わる内膜も失ったと考えられる。つまりミトコンドリアとペルオキシソームは言わば“姉妹”と考えられる。

<引用文献>

Yamato Yoshida, Haruko Kuroiwa, Osami Misumi, Masaki Yoshida, Mio Ohnuma, Takayuki Fujiwara, Fumi Yagisawa, Shunsuke Hirooka, Yuuta Imoto, Kazunobu Matsushita, Shigeyuki Kawano, Tsuneyoshi Kuroiwa, Chloroplasts divide by contraction of a bundle of nanofilaments consisting of polyglucan *Science* 329, 949-953 2010 査読有 DOI :10.1126/science.1190791

Yuuta Imoto, Haruko Kuroiwa, Yamato Yoshida, Mio Ohnuma, Takayuki Fujiwara, Masaki Yoshida, Keiji Nishida, Fumi Yagisawa, Syunsuke Hirooka, Shinnya Miyagishima, Osami Misumi, Shigeyuki Kawano, Tsuneyoshi Kuroiwa, Single-membrane-bounded peroxisome division revealed by isolation of dynamin-based machinery *Proc. Nat. Acad. Sci.* 110, 9583-9588 2013 査読有

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Yuuta IMOTO, Yuichi ABE, Kanji OKUMOTO, Mio OHNUMA, Haruko KUROIWA, Tsuneyoshi KUROIWA and Yukio FUJIKI Dynamics of the nucleoside diphosphate kinase protein DYNAMO2 correlates with the changes in the global GTP level during the cell cycle of *Cyanidioschyzon merolae* *Proc. Jpn. Acad. Ser.* B95, 75-85 2019 査読有 DOI :10.2183/pjab.95.007

Yuuta Imoto, Yuichi Abe, Masanori Honsho, Kanji Okumoto, Mio Ohnuma, Haruko Kuroiwa, Tsuneyoshi Kuroiwa and Yukio Fujiki Onsite GTP fuelling via DYNAMO1 drives division of mitochondria and peroxisomes *Nature Communications* 9, 4634 (2018) 査読有 DOI :10.1038/s41467-018-07009-z

Yamato Yoshida, Haruko Kuroiwa, Takashi Shimada, Masaki Yoshida, Ohnuma Mio, Takayuki Fujiwara, Yuuta Imoto, Fumi Yagisawa, Keiji Nishida, Shunsuke Hirooka, Osami Misumi, Yuko Mogi, Yoshihiko Akakabe, Kazunobu Matsushita, Tsuneyoshi Kuroiwa, Glycosyltransferase MDR1 assembles a dividing ring for mitochondrial proliferation comprising polyglucan nanofilaments. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 114, 13284-13289 (2017) 査読有 DOI :10.1073/pnas.1715008114/-/DCSupplemental.

Yuuta Imoto, Yuichi Abe, Kanji Okumoto, Masanori Honsho, Haruko Kuroiwa, Tsuneyoshi Kuroiwa, Yukio Fujiki Defining the dynamin-based ring organizing center on the peroxisome-dividing machinery isolated from *Cyanidioschyzon merolae* *J Cell Science*, 130, 853-867 (2017) 査読有 DOI :10.1242/jcs.199182

Yusuke Kobayashi, Osami Misumi, Masaki Odahara, Kota Ishibashi, Masafumi Hirono, Kumi Hidaka, Endo Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama, Hiroshi Iwasaki, Tsuneyoshi Kuroiwa, Holliday junction resolvases mediate chloroplast nucleoid segregation, *Science*, 356, 631-634 (2017) 査読有 DOI :10.1126/science.aan003

[学会発表](計 5 件)

吉田大和、黒岩晴子、嶋田崇史、吉田昌樹、大沼みお、藤原崇之、井元祐太、八木沢英美、西田啓二、廣岡俊亮、三角修己、茂木祐子、赤壁善彦、松下一信、黒岩常祥: ミトコンドリア分裂リング合成遺伝子MDR1の同定と機能の解析. 日本植物学会第82回大会, 広島, 2018年9月14日~16日

黒岩常祥、黒岩晴子、永田典子、本多珠巳、田草川真理、三角修己、加藤翔一、乾弥生、松永朋子、松永幸大: 真核細胞の基本構造と機能をシゾンとメダカモの比較ゲノム形態から解く(2). 日本植物学会第82回大会, 広島, 2018年9月14日~16日

黒岩常祥、黒岩晴子、永田典子、田草川真理、三角修己、加藤翔一、乾弥生、松永朋子、松永幸大: 真核細胞の基本構造と機能をシゾンとメダカモのゲノム形態から解く. 日本植物学会第81回大会, 野田, 2017年9月8日~10日

八木沢英美、藤原崇之、宮城島進也、中村宗一、黒岩晴子、黒岩常祥: 単細胞緑藻 *Cyanidioschyzon merolae*の細胞質分裂におけるESCRTの役割. 日本植物学会第81回大会, 野田, 2017年9月8日~10日

松永朋子、加藤翔一、岡村枝里佳、坂本卓也、乾弥生、黒岩常祥、松永幸大: 単細胞藻類

シゾンのオーロキナーゼによるミトコンドリア分裂制御機構の解析.
日本植物学会第81回大会, 野田, 2017年9月8日~10日

〔図書〕(計1件)

Kuroiwa, T., Miyagishima, S., Matsunaga, S., Sato, N., Nozaki, H., Tanaka, K., Misumi, O.,
Springer, *Cyanidioschyzon merolae*: A New Model Eukaryote for Cell and Organelle
Biology, 2018, 1-365

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 永田 典子
ローマ字氏名: (NAGATA, noriko)
所属研究機関名: 日本女子大学
部局名: 理学部
職名: 教授
研究者番号: 40311352

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 黒岩 晴子
ローマ字氏名: (KUROIWA, haruko)
研究協力者氏名: 井元 祐太
ローマ字氏名: (IMOTO, yuuta)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。