

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06325

研究課題名(和文) 色素体とミトコンドリアの分裂装置の形態構造と分子動作機構の解明

研究課題名(英文) Insights into molecular mechanisms of organelle division rings

研究代表者

吉田 大和 (Yoshida, Yamato)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：80785444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物としては極めてシンプルな細胞構造とゲノム構造をもつシズンは、オルガネラ分裂増殖機構の解析に適した特性を持つ。本研究においてはCRISPR型遺伝子編集技術を応用した遺伝子ターゲティングとオルガネライメージングを同時に実現する新たな遺伝子改変手法シズンカッターを確立することに成功した。同法により、標的遺伝子の改変と同時に細胞核、ミトコンドリア、葉緑体、さらにペルオキシソームの蛍光可視化が実現されるため、オルガネラの形態異常やオルガネラ分裂過程への影響が迅速に評価することが可能となった(Tanaka et al. 2021. J. Cell Sci.)

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、オルガネラ分裂に関する遺伝子群の機能解明が大きく進展した。現在までに5つの遺伝子が新たにミトコンドリアおよび葉緑体の分裂過程に関与していることが示されており、今後の解析により、これらのオルガネラ分裂増殖機構の全貌が明らかになると期待される。また本研究で確立した遺伝子改変技術シズンカッターは、標的遺伝子の改変だけでなく、多様なオルガネラの動態を一度に確認できる画期的手法であり、これまで知られていなかった真核生物細胞内におけるオルガネラ動態の実態が明らかになると期待される。

研究成果の概要(英文)：The simple cellular and genomic structure of unicellular red alga *Cyanidioshyzon merolae* allows us to study fundamental principles relating with cell and organelles proliferation in eukaryotes. In this research, we have established a new gene-targeting system called CZON-cutter. The CZON-cutter is constructed by combining the CRISPR-Cas9 system with organellar localising fluorescent protein markers. By using the system, we have revealed that the completion of mitochondrial and peroxisomal divisions is required for the progression of the cell division cycle (Tanaka et al. 2021 J. Cell Sci.).

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：オルガネラ分裂 ミトコンドリア分裂 葉緑体分裂 CRISPR オルガネライメージング

1. 研究開始当初の背景

葉緑体とミトコンドリアは、それぞれシアノバクテリアとミトコンドリアが宿主真核生物へ細胞内共生した結果誕生したと考えられている。このためどちらのオルガネラも独自の遺伝子発現システムを持ち、分裂することによってのみ数を増やすことが出来る。これまでの研究から、葉緑体とミトコンドリアの分裂増殖には、分裂リングと呼ばれる高次構造体が関与していることが明らかとなっていた。1977 年以来、電子顕微鏡観察によって原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) 等で、色素体とミトコンドリアの分裂面に特殊なリング構造『色素体分裂リング (PD リング)』と『ミトコンドリア分裂リング (MD リング)』が発見された。2006 年には申請者によって、PD リングを中心に FtsZ や Dynamin 等の複数タンパク質から形成される超分子複合体『色素体分裂装置』が世界で初めて単離され、その実態が明らかになってきた (Yoshida et al. *Science* 2006)。さらに『ミトコンドリア分裂装置』 (Yoshida et al. *Curr. Biol.* 2009) の存在も明らかとなり、単離することに成功した。この単離技術を基盤として行われた研究により、PD リングは新規糖転移タンパク質 PDR1 を基点とした高分子グルコース繊維から構成されることを明らかとなった (Yoshida et al. *Science* 2010)。これらの研究と共に、我々はシゾンより単離した分裂リング複合体のプロテオーム解析によって、分裂リングの構成タンパク質群を同定することに成功した。だがこれらの多くは機能不明な新規タンパク質であり、これらのタンパク質の分子機能を明らかにし、オルガネラ分裂リングの構造と分子機構の解明することが急務となっている。また、構成タンパク質の全貌は徐々に明らかとはなっているものの、オルガネラ分裂リングの分子機構は、未だほとんど明らかではない。一方で、オルガネラ分裂増殖機構の解析は、2010 年代以降は全世界的に進展が見られない。これまで色素体とミトコンドリアの分裂機構の研究は、シロイヌナズナや酵母を用いた分裂異常の表現形を示す変異体の解析が多かった。しかしこれらの生物では、1 細胞あたりの色素体とミトコンドリアの数が多く、不定形であり、同調的に分裂せず融合も行うこと、更に分裂装置の単離が不可能などの理由により、国内・国外の関連する研究動向を見ても、複雑な構造からなる分裂装置の分子機構を解析することは極めて困難な状況に陥っている。これはオルガネラ分裂増殖機構の研究分野における未解明の分子機構を解くためには、所謂モデル生物を対象とした分子遺伝学および分子生物学的手法による解析だけでは不可能な状況に至っていることを示している。このため、現状を打破し、オルガネラ分裂増殖機構の分子機構の全貌を明らかにするためには、新たな解析手法による革新的なアプローチが必須である。

2. 研究の目的

葉緑体 (色素体) とミトコンドリアは、古代の細菌が宿主真核生物へと細胞内共生した結果誕生したと考えられており、分裂によって増殖する。これまでの研究から、色素体とミトコンドリアの分裂増殖を実行する超分子ナノマシン「色素体分裂装置・ミトコンドリア分裂装置」の構造が明らかになってきたが、その構成タンパク質、形成機構、収縮動作機構は未だ明らかではない。本研究計画では、我々が確立した色素体とミトコンドリアの分裂装置の単離解析法を基盤とし、色素体・ミトコンドリア分裂装置の全構成タンパク質の同定と機能解析、色素体・ミトコンドリア分裂装置の収縮機構の解明、分裂装置の主要構成物である PD リング・MD リング形成機構の解明を目標とし、“色素体とミトコンドリアの分裂増殖システム”の全貌を明らかにすることを旨とする。本研究では、我々がこれまでに確立した「原始真核生物からのミトコンドリアと葉緑体の分裂装置の単離」 (Yoshida et al. 2017 PNAS) や「ミトコンドリア・葉緑体分裂装置の人工合成」 (Yoshida et al. 2016 Nature Plants) といった手法を基盤とし、以下の 2 つの研究目標を設定する。一つは、ミトコンドリア・葉緑体分裂装置のプロテオミクスによって同定された全 12 個の候補遺伝子群の機能解析や、超解像イメージングによるミトコンドリアと葉緑体の分裂リングの構造のナノレベル構造解析を明らかにすることである。二つ目は、既に分裂リングに同在することが明らかとなっている Dnm2 や FtsZ2 さらに PDR1 といったタンパク質へ蛍光タンパク質タグを導入し、生細胞をつかた葉緑体分裂のリアルタイム蛍光観察を実施し、分裂リングの動態を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

本研究の目的は、真核細胞誕生の鍵を握る色素体とミトコンドリアの分裂増殖機構を明らかにすることである。この目標を達成するため、本研究では原始的な真核生物であるシゾンを用いる。シゾンは、1 細胞あたりに細胞核・ミトコンドリア・色素体をそれぞれ 1 つだけ保持し、明暗周期によって細胞分裂・オルガネラ分裂を高度に同調化することが可能である。ゲノム構造も極めてシンプルであり、様々な遺伝子組み換え技術、発現誘導・抑制系、形質転換体の保存法なども確立している。また現在も色素体とミトコンドリアの分裂装置を単離することが可能な唯一の生物であり、当研究領域において極めて独自性の高い研究が可能である。本研究計画では上記の技術を組合せ、野生型シゾンから単離した分裂装置だけでなく、変異 (または蛍光タグ) を導入したシゾンから変異型分裂装置を単離し、比較解析することによって、分裂装置を構成す

る 各タンパク質の真の機能的役割を明らかにする。

単離色素体・ミトコンドリア分裂装置のオミクス解析によって、現在までに PDR1 (Yoshida et al. *Science* 2010)、ZED(Yoshida et al. *Curr. Biol.* 2009)、TOP(Yoshida et al. *J. Cell Sci.* 2013)、さらに MDR1 (Yoshida et al. *PNAS* 2017, 修正中)といった新規分裂タンパク質の同定に成功しているが、この他にも 39 個の推定分裂装置構成タンパク質群を見出している。これらの候補遺伝子の多くは真核生物に広く保存性があり、オルガネラ分裂期に特異的な遺伝子発現パターンを示すことから、色素体とミトコンドリアの分裂増殖機構に重要な機能を担っていると考えられる。これらの遺伝子群を解析し、色素体とミトコンドリアの分裂装置を構成する全タンパク質の機能を明らかにするためには、ハイスループットな遺伝子機能解析系が必要である。このため、従来の相同組み換えを主体とした遺伝子ターゲティング法による解析と並行して、新たに CRISPR-Cas9 を基盤とした遺伝子機能解析実験系を構築し、これら候補遺伝子群の機能解析を行った。

またこれまでの研究から、色素体の分裂装置は少なくとも「PD リング繊維と Dynamin による滑動機構」(Yoshida et al. *Science* 2006)と、「FtsZ 繊維の重合・脱重合による収縮力発生機構」(Yoshida et al. *Nature Plants* 2016)という 2 種類の収縮機構が組み込まれていることが分かってきたが、依然として分裂装置の収縮機構には不明な点が多い。特にミトコンドリア分裂装置に関しては殆ど明らかになっておらず、解析すべき問題として残されている。本研究では色素体とミトコンドリアの分裂装置単離技術を基盤とし、分裂装置の超微細構造と分子動作機構を 1 タンパク分子分解能から明らかにするため、蛍光タンパク質タグを導入した葉緑体およびミトコンドリアの分裂リングを対象としたリアルタイム蛍光観察により、これらのオルガネラ分裂リング構成タンパク質の細胞内動態の解析を試みた。

4. 研究成果

本研究計画において、解析対象とした遺伝子数は数十に及んだため、従来型の相同組み換えを基盤とした遺伝子導入法による解析では効率よく実施することが困難であった。そのため、我々は今回新たに CRISPR - Cas9 を基盤とした遺伝子ターゲティング手法の確立を試みた。また、標的遺伝子を改変した際に、各オルガネラの形態異常を迅速に検出するため、レポーター遺伝子を用いた各オルガネラの蛍光可視化の同時実施を目指した。Cas9 に Venus を融合した Cas9-Venus を恒常発現させたシゾン細胞株 YMT1 を構築し、次に任意の gRNA 配列を基本となるプラスミド DNA に簡便な方法によって組み込むことで、極めて簡単に目的遺伝子をノックアウトまたは遺伝子導入を実施することが可能となった。この基本プラスミド DNA (gGuide-mitoScarlet) にはレポーターとしてミトコンドリア局在型蛍光タンパク質 mitoScarlet を組み込んであるため、ゲノム編集された細胞は、葉緑体(自家蛍光)に加えて、細胞核(Cas9 - Venus)、ミトコンドリア(mitoScarlet)を即座に観察することが可能である。同手法はシゾンカッターと命名した。シゾンカッターによる遺伝子改変の正確度は非常に高く、約 80%の正確度であった。またシゾンゲノムは 1 コピー(ハプロイド)であること、さらに遺伝子の冗長性も低いいため、所謂オフターゲットによる目的外遺伝子領域のゲノム改編の確率は極めて低く抑えることができた。またこれまでにすでに複数種類の遺伝子を対象としたゲノム編集を実施しているが、遺伝子およびゲノム領域による成功率の変動は確認されておらず、ゲノムワイドに適用可能な技術となっている。さらに遺伝子ターゲティングによる標的遺伝子の破壊の際は、ペルオキシソーム局在青色蛍光タンパク質 perCerulean3 遺伝子カセットを導入することによって、細胞核、ミトコンドリア、葉緑体、さらにペルオキシソームの蛍光可視化が同時に実現されるため、オルガネラの形態異常やオルガネラ分裂過程への影響が迅速に評価することが可能となった。同実験系を用いて、細胞周期における各オルガネラの分裂過程の進行との相互依存関係がより明確となった。同手法を応用することによって、シゾンゲノムの人工的な改変も行えるようになったため、今後は特定遺伝子の機能解析のみならず、ゲノムレベルでの機能解析を行うことも可能となっている。一連の成果は、*Journal of Cell Science* 誌に掲載された(Tanaka et al. 2021. *J. Cell Sci.*)。同成果は各学会における発表(吉田、2022 ゲノム編集学会)のほか、メディアを通じても発信している。シゾン YMT1 株および関連プラスミド DNA は広く配布を開始しており、全世界的に利用する研究機関が増加している。

また、葉緑体分裂関与ダイナミン関連タンパク質に蛍光タンパクタグを融合し、相同組み換えによる形質転換を行った結果、多数の形質転換株を作成することに成功した。超高感度顕微鏡観察による一分子分解能で動態を解析した結果、葉緑体分裂装置の収縮に伴ってダイナミンタンパク質は局所的な蛍光輝度が指数関数的な増加を示した。さらにタイムラプスイメージング解析の結果、形成された葉緑体分裂リングは毎分 20 ナノメートルの速度で収縮し、葉緑体分裂を実行していることが明らかとなった。収縮速度は分裂の前半から終盤にかけて全く同じ速度で実行することから、葉緑体分裂過程を通じて分裂リングの収縮機構は同一の分子機構であると推定された。一方で葉緑体分裂リングを構成するタンパク質は、分裂の進展(分裂リングの収縮)に伴って、蛍光輝度が増加するタンパク質種と、一定の輝度を保つタンパク質種が存在することが分かった。加えて、蛍光褪色回復法による分子動態解析の結果、葉緑体分裂リングの収縮に応じて DNM2 分子がリングに沿って移動していることが明らかとなっている。この結果は、研究計画当初に想定していた葉緑体分裂リングの動作モデルである“スライディング収縮仮説”を支持する結果となった。そこで、さらに詳細な分子メカニズムを解析するため、精製タンパク質を用

いた生化学的アッセイによって分析を試みた。Venus を融合した DNM2 を精製し、GTPase 活性があることを確認した後、特定の化学試薬と共に GTP を添加した結果、GTP 加水分解の遷移過程を捉えることに成功した。これらの結果に加え、変異型 DNM2 を用いた *in vitro/in vivo* タイムラプス解析および単離葉緑体分裂リングの解析結果を統合し、葉緑体分裂リングのキネティックメカニズムの全体像を捉えることに成功した。一部の結果については学術集会などを通じて発表を行っている（吉田、2020 植物学会、2021 植物学会、2022 植物学会、2023 植物オルガネラワークショップなど）。現在、これら一連の結果に基づいた分裂リングの可動モデルシミュレーションを実施しており、モデルの検証を進めている（Yoshida and Mogi, in preparation）。

また並行して進めているオルガネラ分裂関与遺伝子群の機能解析から、複数の新規オルガネラ分裂関与遺伝子群を同定することに成功したため、これらの成果についても一部は既に学術首魁などを通じて発表を行っており（矢部、2021 植物学会）また学術誌へ発表する準備を進めている（Yabe et al. in preparation）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka Naoto, Yoshida Yamato	4. 巻 34
2. 論文標題 Development of a CRISPR-cas9 system “CZON-cutter” for multiplexed organelle imaging in a simple unicellular alga	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLANT MORPHOLOGY	6. 最初と最後の頁 37～45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5685/plmorphol.34.37	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Naoto, Mogi Yuko, Fujiwara Takayuki, Yabe Kannosuke, Toyama Yukiho, Higashiyama Tetsuya, Yoshida Yamato	4. 巻 134
2. 論文標題 CZON-cutter - a CRISPR-Cas9 system for multiplexed organelle imaging in a simple unicellular alga	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.258948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yamato	4. 巻 131
2. 論文標題 The cellular machineries responsible for the division of endosymbiotic organelles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 727～734
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-018-1050-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yamato, Mogi Yuko	4. 巻 68
2. 論文標題 How do plastids and mitochondria divide?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 45～56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfy132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yamato, Taniguchi Yuichi	4. 巻 84
2. 論文標題 Simultaneous Measurements of RNA Molecules Transcribed from Mitochondrial Division or Fusion Genes in Single Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.84.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yamato, Taniguchi Yuichi	4. 巻 84
2. 論文標題 Simultaneous Single-Cell Measurements Demonstrate a Positive Correlation between RNA Copy Number for Mitochondrial Division and Fusion Genes and Mitochondrial Fragmentation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 15~23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.84.15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉田大和, 茂木祐子
2. 発表標題 リアルタイム蛍光観察を基盤とした葉緑体分裂リングの収縮機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田大和
2. 発表標題 シゾンカッター：ゲノム編集と多重オルガネラ蛍光観察を同時に実現するCRISPRイメージング技術の確立
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第7回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田大和
2. 発表標題 オルガネラ分裂リング：葉緑体とミトコンドリアを増やす真の仕組みを解く
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田大和
2. 発表標題 葉緑体分裂リングの仕組みを解く
3. 学会等名 第25回植物オルガネラワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茂木祐子，矢部寛之助，近藤唯貴，平田莉子，東山哲也，吉田大和
2. 発表標題 タンパク質翻訳バーストによる細胞分裂制御機構
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤唯貴，吉田大和
2. 発表標題 単細胞藻類シズンを用いた1細胞形成エネルギーの定量
3. 学会等名 日本植物形態学会第34回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 外山侑穂, 奥田哲弘, 吉田大和, 東山哲也
2. 発表標題 裸子植物ソテツの泳ぐ精子: 単離精子を用いたin vitro精子誘引実験系の開発
3. 学会等名 日本植物形態学会第34回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平田莉子, 茂木祐子, 吉田大和
2. 発表標題 オルガネラ移行シグナルのアミノ酸暗号の理解と実験的検証
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤唯貴, 茂木祐子, 吉田大和
2. 発表標題 単細胞藻類シゾンをを用いた真核生物生体エネルギー論の確立に向けて
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 外山侑穂, 奥田哲弘, 吉田大和, 東山哲也
2. 発表標題 ソテツの受精機構解明に向けた単離精子の顕微操作解析法の開発
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田大和
2. 発表標題 蛍光シグナルを通じてオルガネラ分裂装置のキネティクスを解く
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢部寛之助、茂木祐子、東山哲也、吉田大和
2. 発表標題 真核生物に広く保存された未知の分裂増殖遺伝子群の同定と機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茂木祐子、東山哲也、吉田大和
2. 発表標題 新規ミトコンドリアタンパク質による細胞周期依存的な翻訳制御機構
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢部寛之助、茂木祐子、東山哲也、吉田大和
2. 発表標題 最小ゲノム真核生物シゾンを用いた蛍光顕微鏡観察を基盤とした未知の分裂増殖因子群の探索
3. 学会等名 日本植物形態学会第33回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茂木祐子、田中尚人、藤原崇之、矢部寛之助、外山侑穂、東山哲也、吉田大和
2. 発表標題 シゾンカッター：ゲノム編集とオルガネラ多重可視化を可能にするCRISPR-Cas9システムの開発
3. 学会等名 日本植物形態学会第33回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中尚人、茂木祐子、外山侑穂、東山哲也、吉田大和
2. 発表標題 原始紅藻シゾンにおけるゲノム編集ツールCZON-cutterの確立
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 茂木祐子、西川尚吾、東山哲也、吉田大和
2. 発表標題 分裂期特異的ミトコンドリア核様態タンパク質の同定と機能の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田大和、茂木祐子
2. 発表標題 蛍光タグを融合した色素体分裂装置の三次元構造と分子動作機序の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田大和
2. 発表標題 一分子イメージングと多階層オミクスを基盤としたミトコンドリア・葉緑体分裂増殖機構の解析
3. 学会等名 第52回日本原生生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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, 八木沢芙美, 西田敬二, 廣岡俊亮, 三 角修己, 茂木祐子, 赤壁善彦, 松下一信, 黒岩常祥
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 茂木祐子, 吉田大和
2. 発表標題 人工オルガネラ分裂リングの合成と分子機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------