

平成22年4月5日現在

研究種目：基盤研究J(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19207004

研究課題名（和文） 色素体とミトコンドリアの分裂マシンの分子生理機構の解明

研究課題名（英文） Studies for molecular and physiological mechanisms of plastid and mitochondrial division machineries

研究代表者 黒岩 常祥 (Kuroiwa Tsuneyoshi)

立教大学・理学研究科・特任教授

研究者番号：50033353

研究代表者の専門分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：色素体分裂装置、ミトコンドリア分裂装置、分裂マシン、シズンゲノム、*Cyanidioschyzon merolae*

1. 研究計画の概要

本研究は、原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (略称シズン) の同調培養系を使って、先ず葉緑体の分裂装置を解析し、次にミトコンドリアの分裂装置でMDリング複合体を大量かつ無傷に単離し、それを構成する全タンパク質とその遺伝子をMALDI TOF-MS法を使って同定することである。さらに現在、開発中の遺伝子破壊技術を用いて、これらの遺伝子の機能を解析することである。またこの思考を基盤に細胞機能の全貌を解明することである。

2. 研究の進捗状況

(1) 色素体の分裂装置のプロテオーム解析と遺伝子の決定。色素体の分裂装置を純粋に単離し、そのタンパク質を1、2次元ゲル電気泳動で分け、それをMALDI TOF-MSを使って、解析した。これらから得られた5個の候補遺伝子からマイクロアレイやEST解析から最も合理的な遺伝子をクローニングし、抗体を作製し、その局在を解析した。その局在が明らかに分裂装置であることを確認して、数個の遺伝子を同定した。

(2) ミトコンドリアの分裂装置のプロテオーム解析と遺伝子の決定。ミトコンドリアの分裂装置は小さく、弱く当初は単離が困難であった。しかし分裂期の早期にはミトコンドリアと色素体の分裂装置が接着していることに気がついた。そこで、この性質を利用して、先ずミトコンドリアと色素体の複合分裂を単離し、その全タンパク質から、既に得られている色素体の全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のタ

ンパク質を同定した。この方法でも、4個余りが候補タンパク質となった。

(3) 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同定。従来分裂装置のタンパク質は1、2次元ゲル電気泳動で分けていた。しかしゲルの代わりに液体MSを使い、それをMALDI TOF-MSで解析したところ、それぞれに、これまでの10倍近い候補遺伝子を同定できた。

(4) 遺伝子破壊法の開発。これまでシズンで困難だった遺伝子破壊法の開発をおこなった。その結果、相同組み換え、アンチセンス法などを使って、色素体やミトコンドリアの分裂装置の全タンパク質と、それらに関わる遺伝子の機能解析を進めたところ、この系が極めてスムーズに動くことが分かった。これにより得られた候補遺伝子の機能解析への道が拓かれた。現在、候補遺伝子の機能を順次解析し、成果を論文として発表している。また一部を特許として申請した。

3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。

(1) 色素体の分裂マシンの単離に続いて、ミトコンドリアの分裂マシンの純粋単離に成功した。

(2) 分裂装置を構成するタンパク質の分離同定を、ゲノム電気泳動法を使ってきたが、これを液体MSで分けてみた。その結果、従来の10倍のタンパク質を検出できた。

(3) シズンの遺伝子破壊技術は、これまで誰がやっても、困難だったが、この技術開発に成功した。この結果、上記のタンパク質の機能の解析が著しく進んだ。

4. 今後の研究の推進方策

色素体とミトコンドリアの分裂マシンの構造と機能の全貌解明が可能になった。これまでの解析から、多くのタンパク質やそれらの遺伝子が、色素体であれば植物界に広く存在し、ミトコンドリアであれば、動植物界にも多く存在することが明らかとなってきた。これら共通する遺伝子は、植物の生産性の向上が可能であり食料問題の解決に寄与し、またミトコンドリアの増殖は、ミトコンドリア病にも関係しており、こうした医療の面でも大きく利用できると期待される。早急に応用研究へと展開したい。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線) [雑誌(審査英文)論文] (計 32 件)。

- (1) Fujiwara, T., Yagisawa, F., Misumi, O., Tashiro, K., Nishida, K., Yoshida, Y., Yoshida, M., Mori, T., Kuroiwa, H., and Kuroiwa T.:VIG is essential for the vacuole inheritance in Cyanidioschyzon merolae. *Plant Cell* In press.
- (2) Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, M., Misumi, O., Yoshida, Y., Fujiwara, T., and Kuroiwa, H. and Kuroiwa T.: Major vacuolar proteins of the ultra-small unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant J.* 60, 882-892 (2009).
- (3) Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Hirooka, S., Yoshida, Y., Fujiwara, T., Misumi, O., Kawano, S., and Kuroiwa, T.: Novel mitochondrial division protein ZED forms the inner complex structure of the mitochondrial division machinery with the FtsZ ring as revealed by isolated mitochondrial division machineries. *Curr Biol.* 19, 1491-1497 (2009).
- (4) Imamura, S., Kanesaki, Y., Fujiwara, T., Kuroiwa T., and Tanaka, K.: R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, controls the expression of nitrogen assimilation genes in response to nitrogen status in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Proc Natl Acad Sci* 106, 12548-12553 (2009).
- (5) Okuda, S., Tsutsui, H., Shiina, K., Sprunck, S., Takeuchi, H., Yui, R., Kasahara, R.D., Hamamura, Y., Mizukami, A., Susaki, D., Kawano, N., Sakakibara, T., Namiki, S., Ito, K., Otsuka, K., Matsuzaki, M., Nozaki, H., Kuroiwa T., Nakano, A., Dresselhaus, T., Kanaoka, M.M., Sasaki, N. and Higashiyama, T.: Defensin-like peptides LUREs are pollen tube attractants secreted from the synergid cell. *Nature* 458, 251-376 (2009).
- (6) Kobayashi, Y., Kanesaki, Y., Tanaka, A., Kuroiwa, H., Kuroiwa T. and Tanaka, K.: Tetrapyrrole signal as a cell cycle coordinator from organelle to nuclear DNA replication in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 803-807 (2009).

[学会発表] (計 68 件)

- (1) Kuroiwa T. "Isolation of mitochondrial division machineries" Keystone symposia 2009 2009.3.21-3.28
- (2) Kuroiwa T. "Structure and Function of Mitochondrial and Plastid Division Machineries" Gordon Research Conference (Mitochondria and Chloroplasts) 2008.8.10-8.15

[図書] (計 10 件)

現代生物科学入門(全10巻)(浅島誠、黒岩常祥、小原雄治共編) 岩波書店、2009-2010.

- (1) ゲノム科学の基礎
- (2) ゲノム科学の展開
- (3) 構造機能生物学
- (4) 脳神経生物学
- (5) 免疫・感染生物学
- (6) 地球環境と保存生物学
- (7) 再生医療生物学
- (8) システムバイオロジー
- (9) 合成生物学
- (10) 極限環境生物学

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

(1) 名称: 高温環境に生息するシアニジウム類のストレス応答遺伝子の形質導入による高温耐性植物及びかかる植物の製造法
発明者: 黒岩常祥、廣岡俊亮、三角修己、黒岩晴子、吉田昌樹
権利者: 立教大学
種類: 特願
番号: 2009-053834
出願国: 日本

(2) 名称: シアニジウム類由来のプロトンATPアーゼ遺伝子を用いた耐性植物体の作出方法及び該遺伝子の用途
発明者: 黒岩常祥、三角修己、八木沢芙美、黒岩晴子、吉田昌樹
権利者: 立教大学
種類: 特願
番号: 2009-249824
出願年月日: 2009年10月30日
出願国: 日本

(3) 名称: シアニジウム由来のCa²⁺/H⁺アンチポーター遺伝子を用いた耐性植物体の作出方法及び該遺伝子の用途
発明者: 黒岩常祥、浅野啓太、三角修己、黒岩晴子、吉田昌樹
権利者: 立教大学
種類: 特願
番号: 2009-249825
出願年月日: 2009年10月30日
出願国: 日本

○取得状況 (計 2 件)

(1) 名称: 紅藻のシアニジウム属を培養する培地
発明者: 黒岩常祥、八木沢芙美、岡野幸雄、黒岩晴子、三角修己 (立教大学)
権利者: 立教大学
種類: 特願
番号: 4180059
登録年月日: 2008年9月5日
登録国: 日本

(2) 名称: シンズンを選択的に培養する培地
発明者: 黒岩常祥、八木沢芙美、岡野幸雄、黒岩晴子、三角修己 (立教大学)
権利者: 立教大学
種類: 特願
番号: 4180060
登録年月日: 2008年9月5日
登録国: 日本

○代表的な研究成果

[その他]

ホームページ

<http://www2.rikkyo.ac.jp/grp/rice/>