

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14770

研究課題名(和文) 対称二分裂におけるオルガネラ分配の質的非対称性の解明

研究課題名(英文) Uneven distribution of organelle proteins during binary fission of Cyanidioschyzon merolae

研究代表者

八木沢 芙美 (YAGISAWA, Fumi)

琉球大学・研究基盤センター・准教授

研究者番号：70757658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：動物、植物、菌類など多くの生物を構築する真核細胞は、ミトコンドリアなどオルガネラを含み、これらは細胞分裂時に母細胞から娘細胞へ分配される。動物の幹細胞やパン酵母は、非対称に分裂し、寿命の異なる二つの娘細胞に分かれる。この際、オルガネラ分配は非均質であり、例えば新しいミトコンドリアは、寿命が長い細胞に選択的に分配される。これは生物の生存戦略の一つであると考えられている。

私達は、一見、対称分裂で増殖する細胞においても同様の戦略が存在する可能性を検証した。本研究では、対称分裂を行う生物でもペルオキシソームというオルガネラが非均質に分配されることを示し、そのメカニズムを解明するツールを得た。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic cells such as animal stem cells and budding yeast divide into two daughter cells with different life spans. In these cells, organelle distribution is asymmetric regarding its quality; for example, young mitochondria are selectively distributed to cells with longer life spans. Such asymmetrical sorting of organelles is considered to be important for maintaining stemness, keeping one daughter cell young.

In this project, we addressed whether similar phenomena may exist in cells that apparently divide symmetrically. Using the unicellular red alga Cyanidioschyzon merolae that proliferates through binary fission, we found that peroxisome inheritance is asymmetrical in terms of its quality. We also developed molecular tools to elucidate mechanisms associated with this phenomenon.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞分裂 ミトコンドリア ペルオキシソーム

## 1. 研究開始当初の背景

人類をはじめ地球上の多くの生物を構成する真核細胞は、固有の機能を担う細胞小器官、即ちオルガネラを含み、これらは細胞分裂時に母細胞から娘細胞へと分配される。研究開始以前の報告で、動物の幹細胞や出芽酵母は、寿命の異なる二つの娘細胞に分裂すること、オルガネラが非均質に分配されることが娘細胞間の差に寄与することが示唆されていた (Katajisto et al. 2015 Science; McFaline-Figueroa et al. 2011 Aging Cell)。即ち、良質なオルガネラは寿命の長い細胞に送られ、質の悪いものは老化する運命にある細胞に分配される。

オルガネラの非均質な分配は、分裂が一見して非対称であるとわかる細胞でのみ知られ、対称分裂を行う単細胞生物では知られていなかった。これらの生物の分裂がオルガネラの質においても対称であるならば、その寿命の維持機構は非常に興味深い。一方、オルガネラの質の非対称性による寿命の規定は、真核生物の進化の初期に獲得された普遍的なしくみである可能性もある。対称分裂におけるオルガネラ分配の非均質性の検証は、真核細胞の寿命、分裂、生存について新しい知見を与えると考えられた。

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) は、対称二分裂のみで増殖し、有性生殖も行わない。オルガネラは数の上では均等分配されるが (Yagisawa et al. 2007 Planta; Yagisawa et al. 2012, 2013 Protoplasma)、一部のオルガネラタンパク質は非対称に分配されることが示唆されていた (予備実験データ)。シゾンは、細胞内構造とゲノムが単純で (Matsuzaki, Yagisawa et al. 2004 Nature)、細胞分裂およびオルガネラの増殖・分配を、明暗周期で高度に同調できる (図1)。さらに、相同組換えによる形質転換系が確立されていた。以上の理由より、本研究では、シゾンをモデルに、対称分裂におけるオルガネラ分配の非均質性の検証に取り組んだ。

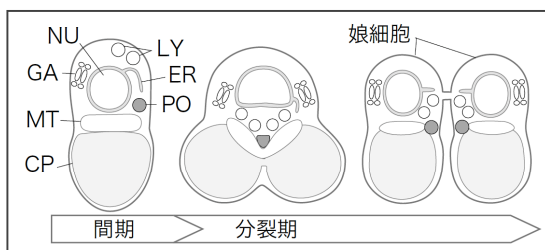


図1 シゾンの細胞分裂の模式図

NU, 細胞核; GA, ゴルジ体; MT, ミトコンドリア; CP, 葉緑体; LY, リソソーム; ER, 小胞体; PO, ペルオキシソーム。

## 2. 研究の目的

真核細胞は、固有の機能を担う細胞小器官、即ちオルガネラを含み、これらは細胞分裂時

に母細胞から娘細胞へと分配される。動物の幹細胞や出芽酵母は、非対称に分裂し、寿命の異なる二つの娘細胞に分かれる。近年、興味深いことに、オルガネラが非均質に分配されることが娘細胞間の差に寄与することが分かってきた。一方、一見、対称分裂を行うように見える生物でも、オルガネラの非均質な分配が見られることが申請者らの実験で示唆されており、細胞の寿命や分裂について新しい問題が提起されている。本研究は、対称分裂で増殖する単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) をモデルに、真核生物の対称分裂におけるオルガネラ分配の質的な非対称性 (非均質性) を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究においては、一般的に老化との関係が知られるミトコンドリアと活性酸素消去に関わるペルオキシソームについて、これらのオルガネラの構成タンパク質の分配が非均質になる可能性を検証した。質の差としては、タンパク質が合成されてからの時間 (タンパク質の新旧) に着目した。

(1) ミトコンドリア構成タンパク質の分配: SNAP-tag やヒートショックプロモーターの利用などにより、タンパク質を合成されてからの時間で区別できるシステムの構築に取り組んだ。

① SNAP-tag 融合タンパク質を発現する細胞に SNAP-tag 用の蛍光試薬を添加すると、共有結合によって SNAP-tag が蛍光ラベルされる。蛍光はさまざまな色のものを用いることができる。シゾンにおいて SNAP-tag が利用出来るか検討するために、ミトコンドリア移行シグナル配列 (EF-Tu の N 末) に SNAP-tag を融合し、ゲノム上に組み込んだ株を作製し、蛍光試薬の添加を行った。

② GFP を融合したミトコンドリアタンパク質を一過的に発現することで、タンパク質の新旧を区別できる細胞株の作製に取り組んだ。このために、Oxa1 (動物細胞で非均質に分配されることが示されているミトコンドリアのトランスポーター) と Cox4 (Cytochrome c oxidase subunit 4) の遺伝子に GFP をコードする配列をヒートショックプロモーター配列につなげ、シゾンのゲノム上に組み込んだ。ヒートショックによる発現が確認できた Cox4-GFP について、細胞分裂を明暗周期により同調し、ミトコンドリア分裂のおこる 12 時間前に発現を誘導した。ミトコンドリア分裂後、細胞質分裂前の細胞を対象とし、一つのミトコンドリアに由来する二つの娘ミトコンドリアにおける GFP の輝度

差を蛍光顕微鏡観察により解析した。

**(2) ペルオキシソーム構成タンパク質の分配**：ペルオキシソームの主要な構成タンパク質であるカタラーゼの分配様式の解析をおこなった。また、ペルオキシソームのライブイメージングや、細胞質分裂の制御系の開発などタンパク質の分配様式を進める上で必要なデータの取得や、システム構築を行った。

① ペルオキシソームがどのように分裂するのか以降の研究の基礎となるデータを取得するために、ペルオキシソーム移行シグナルPTS1 配列のN 末にGFP が融合した株を作製し、ライブイメージングを行った。

② 活性酸素の消去に関わる酵素カタラーゼの分配を、抗カタラーゼ抗体をもちいた間接蛍光抗体染色法により解析した。細胞分裂を明暗周期により同調し、ペルオキシソームの分裂後・細胞質分裂前のステージの細胞を解析対象に、一つのペルオキシソームに由来する娘ペルオキシソームにおけるカタラーゼのシグナル強度を蛍光顕微鏡観察により比較した。また、GFP 融合カタラーゼを恒常的に発現する細胞株を作製し、同様の解析を行った。

③ ペルオキシソームの分裂後、細胞自体がすぐに分裂するため、一つのペルオキシソームに由来する娘ペルオキシソームを識別するのは容易ではない。そこで、細胞質分裂を条件依存的に阻害できるシステムの構築を行った。まず、他生物で細胞質分裂に関わるとされる一連のタンパク質について抗体作製や、遺伝子組換えにより HA-tag 融合タンパク質を発現する細胞株を作製し、蛍光顕微鏡による局在解析を行った。さらに、細胞質分裂後期に分裂面に局在する因子について、優性変異型タンパク質をヒートショックプロモーター下で一過的に発現させる細胞株を作製した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ミトコンドリア構成タンパク質の分配

① シゾンで SNAP-tag が機能するか検討するために、ミトコンドリアのマーカーに SNAP-tag を融合させた形質転換体を作製し、SNAP-tag 結合蛍光試薬を添加した。細胞が壊れかけたものであれば、蛍光は観察されたものの、状態の良い細胞では観察できなかった。このために、ヒートショックプロモーター下で GFP 融合ミトコンドリアタンパク質 (Oxa1, Cox4) を一過的に発現させる系の構築に取り

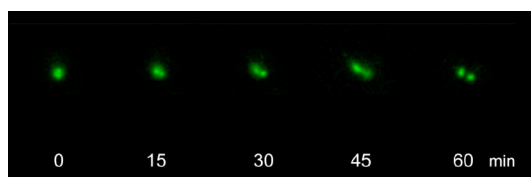
組み、Cox 4 をヒートショックにより一過的発現する系が構築された。

② ミトコンドリア分裂が開始する 12 時間前に Cox4-GFP をヒートショックにより一過的に発現させ、1 つのミトコンドリアに由来する娘ミトコンドリアにおける GFP の輝度を比較した。タンパク質の分配が質により不均等に分配されるのであれば、娘細胞間の輝度に差がみられるはずであるが、明確な差はみられていない。このシステムにより検出できるタンパク質の差が、分配に影響するほど十分大きくなかった可能性があるため、さらなる検討が必要である。

③ 以前の研究により私達は、シゾンにおいてミトコンドリアとリソソームが分裂期特異的に結合することを見いだしている (Yagisawa et al. 2007; Fujiwara et al. 2010)。娘細胞へミトコンドリアが分配される前に、リソソームのはたらきによりミトコンドリアタンパク質が更新される可能性などについても、質の良いミトコンドリアを娘細胞に分配するメカニズムの一つの可能性として検証していきたい。このために、ミトコンドリアとリソソームの相互作用の解析の基盤として、ミトコンドリアとリソソームのダイナミクスをライブイメージングにより同時に解析できる系を作製し、解析を行っている。

##### (2) ペルオキシソーム構成タンパク質の分配

① GFP-PTS1 のライブイメージングを行った結果、ペルオキシソームは伸張し、二つに分裂することが示された (図 2)。これは以前の抗体染色や電子顕微鏡による解析と矛盾のない結果であった。



**図2 シゾンのペルオキシソーム分裂**

ペルオキシソームは伸張し、二つに分かれる。蛍光顕微鏡 (KeyenceBZ-X700) によるGFP-PTS1のライブ撮影。

② GFP-PTS1 株と抗 GFP 抗体と抗カタラーゼ抗体による蛍光染色により、対をなす娘ペルオキシソームにおけるカタラーゼの輝度を比較した結果、カタラーゼは一部の細胞で不均等に分配されることが示された (図 3)。

カタラーゼの不均等分配をさらに解析するために、カタラーゼに GFP を融合した。驚いたことに細胞が持つ本来のカタラーゼが一定の頻度で不均等分配されるのに対し、GFP を融合したカタラーゼは均等二分され

た。

カタラーゼは結晶構造をとることが知られ、結晶構造が分配に影響する可能性や、GFPが結晶構造に影響する可能性が考えられた。

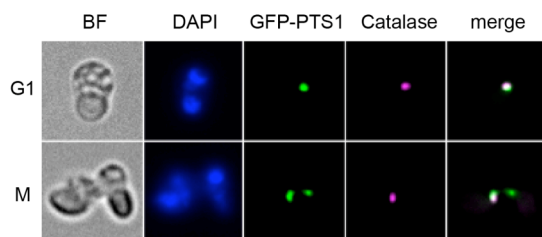


図3 カタラーゼの不均等分配

GFP-PTS1とカタラーゼの蛍光抗体染色。M期に二つに分かれたペルオキシソームの片側のみカタラーゼが存在する。BF, 明視野。

③ 対になる娘オルガネラは、オルガネラの分裂後、細胞質分裂前のステージの細胞をみることで判別している。ペルオキシソームについては、ペルオキシソームの分裂から細胞質分裂までの時間が短く、解析対象のステージの細胞が見つかりにくい。そこで、シゾンで細胞質分裂に関わるタンパク質を局在や機能解析により同定した。このタンパク質の優性変異型タンパク質を一過的に過剰発現させる細胞株を構築し、ペルオキシソームの分裂後かつ細胞質分裂前のステージの細胞を蓄積する系を構築することに成功した (Yagisawa et al. in preparation)。②の結果と合わせ、今後、本システムを用い、ペルオキシソームの非均質分配のメカニズムを解明していきたい。

#### <引用文献>

- ① Fujiwara T., Kuroiwa H., Yagisawa F., Ohnuma M., Yoshida Y., Yoshida M., Nishida K., Misumi O., Watanabe S., Tanaka K., Kuroiwa T. (2010) The coiled-coil protein VIG1 is essential for tethering vacuoles to mitochondria during vacuole inheritance of *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Cell* 22: 772-781
- ② Katajisto P., Döhla J., Chaffer C.L., Pentimikko N., Marjanovic N., Iqbal S., Zoncu R., Chen W., Weinberg R.A., Sabatini D.M. (2015) Stem cells. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science* 348: 340-343
- ③ McFaline-Figueroa J.R., Vevea J., Swayne T.C., Zhou C., Liu C., Leung G., Boldogh I.R., Pon L.A. (2011) Mitochondrial quality control during inheritance is associated with

lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging Cell* 10:885-895

- ④ Matsuzaki M., Misumi O., Shin-I T., Maruyama S., Takahara M., Miyagishima S., Mori T., Nishida K., Yagisawa F., et al. (2004) Genome sequence of the ultra-small unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428: 653-657
- ⑤ Yagisawa F., Fujiwara T., Kuroiwa H., Nishida K., Imoto Y., Kuroiwa T. (2012) Mitotic inheritance of endoplasmic reticulum in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Protoplasma* 249:1129-1135
- ⑥ Yagisawa F., Fujiwara T., Ohnuma M., Kuroiwa H., Nishida K., Imoto Y., Yoshida Y., Kuroiwa T. (2013) Golgi inheritance in the primitive red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. *Protoplasma* 250: 943-948
- ⑦ Yagisawa F., Nishida K., Kuroiwa H., Nagata T., Kuroiwa T. (2007) Identification and mitotic partitioning strategies of vacuoles in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta* 226:1017-1029

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 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：単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の細胞質分裂における ESCRT の役割 (日本植物学会大会 2017 年)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木沢 芙美 (YAGISAWA, Fumi)  
琉球大学・研究基盤センター・准教授  
研究者番号：70757658

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

藤原 崇之 (FUJIWARA, Takayuki)