

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18091

研究課題名(和文) 真核藻類の葉緑体分裂開始による細胞周期のチェックポイントの解除機構とその普遍性

研究課題名(英文) Mechanism of chloroplast division checkpoint release in unicellular algae and generality

研究代表者

墨谷 暢子 (SUMIYA, Nobuko)

慶應義塾大学・商学部(日吉)・助教

研究者番号：80534601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体を1～2個しかもたない単細胞藻では細胞と葉緑体は協調して分裂する。分裂を協調させる仕組みとして、葉緑体の分裂が開始してはじめて細胞が分裂するという仕組みが存在する。本研究課題では、この仕組みの分子機構を解明するために、葉緑体分裂が阻害された細胞で発現が抑制されるサイクリンBの発現制御機構に取り組んだ。サイクリンBの発現は陸上植物と類似した(ただし全く同じではない)機構により制御される可能性が高いことがわかった。また、細胞あたりの葉緑体の数が2～4個の単細胞藻においてもこの機構があるかについて解析を行ったところ、類似した機構が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

G2/M期移行のサイクリンBの発現量に依存した制御は真核生物に広く保存されることが知られている。単細胞藻において、その発現量は細胞と葉緑体の分裂の協調機構に深く関与することが示唆されたが、藻類におけるサイクリンB調節機構については陸上植物と類似した機構であることを本研究ではじめて示唆した。また葉緑体の分裂が開始してはじめて細胞が分裂するという、細胞と葉緑体の分裂を協調させる仕組みは細胞あたりの葉緑体の数が1個でない単細胞藻にも保存された仕組みであることを示した。これらの結果は細胞周期進行という観点から藻類と陸上植物を比較するための有用な情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：In unicellular algae with only one or two chloroplasts, the cell and chloroplast divide in a coordinated manner. One of the mechanisms for coordinated division is that cytokinesis occurs only after the onset of chloroplast division. To elucidate the molecular mechanism, I addressed the regulation mechanism of cyclin B expression, which is repressed in chloroplast division inhibited cells. The cyclin B expression is regulated by a similar (but not exactly the same) mechanism of that in land plants. I also analyzed whether this mechanism exists in a unicellular alga with 2 to 4 chloroplasts per cell and found the existence of a similar mechanism.

研究分野：藻類の細胞生物学

キーワード：単細胞藻 細胞周期 葉緑体分裂

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

葉緑体は原核生物であるシアノバクテリアが真核生物の細胞と共生したことによって誕生したとされる。シアノバクテリアが細胞内共生により葉緑体になる過程では、宿主細胞の分裂周期とシアノバクテリアの分裂周期の相互制御が必要であったと考えられる。陸上植物の細胞には1細胞あたり多数の葉緑体が含まれて、これらは細胞の分裂とは協調せずにランダムに分裂する。一方で単細胞藻の多くは細胞あたり葉緑体を1~数個しかもたない。このことは単細胞藻では葉緑体成立時に獲得された宿主細胞周期と葉緑体分裂周期の相互制御機構が維持されているが、陸上植物への進化の段階でこの制御機構は失われたであろうことを示唆する。

単細胞藻における細胞と葉緑体の分裂周期の協調機構としてはこれまでに、細胞周期のS期特異的な葉緑体分裂遺伝子の発現が示されていた。この機構はさまざまな単細胞藻において普遍的に保存されていることがわかってきた。研究代表者はこれに加えて、葉緑体分裂開始後にM期前期以降への進行を許可するという細胞周期チェックポイントの解除機構もあることを、葉緑体を1つかもたない単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* を用いて明らかにした(Sumiya et al. 2016)。 *C. merolae* において葉緑体分裂タンパク質 FtsZ の過剰発現により、葉緑体分裂開始直前に葉緑体の分裂を阻害すると細胞周期がM期前期で抑止される。一方で、葉緑体分裂開始後に FtsZ の過剰発現や同じく葉緑体分裂タンパク質である DRP5B のドミナントネガティブ型の過剰発現の誘導により葉緑体分裂を阻害しても、葉緑体の分裂が終了していないのにも関わらず細胞周期が進行する。結果として細胞分裂の完了に失敗した細胞が生じる。同様の現象は、より原始的な藻類である灰色藻 *Cyanophora paradoxa* においても見いだされた。以上のことより、葉緑体分裂の開始を感知して細胞周期チェックポイントを解除するという機構は、葉緑体が獲得されて間もない時期に獲得されたことが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が見出した、葉緑体分裂の開始を感知してM期前期以降への進行を許可する細胞周期チェックポイントの解除機構について多様な藻類の中での普遍性を明らかにする。具体的には、この細胞周期チェックポイントは、細胞あたり葉緑体が1~2個の単細胞藻でその存在が明らかになった。多様な藻類の中でこのチェックポイント機構の普遍性を明らかにするために、細胞あたりの葉緑体の数がこれまで解析された藻類よりも多い単細胞藻を用いた解析を行う。

また並行して、この細胞周期チェックポイントの解除機構の分子メカニズムの解明を目指した基礎基盤研究を実施する。葉緑体分裂の阻害という事象が如何にして細胞周期調節因子へ作用するのか、そのシグナル伝達経路を明らかにするための、細胞周期調節の候補因子の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 藻類における細胞周期と葉緑体分裂周期の協調機構の普遍性

単細胞藻類の多くは細胞あたり葉緑体を1~数個しかもたない。これまで研究代表者は葉緑体を1つだけもつ単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* と灰色藻類 *Cyanophora paradoxa* を材料に細胞周期チェックポイントの存在を明らかにしてきたが、葉緑体を複数個もつ藻類においてもこの機構が存在するか解析されたことがなかった。灰色藻類 *Cyanophora paradoxa* の近縁種の *Cyanophora sudaе* は葉緑体を2~4個もつ。灰色藻の葉緑体はペプチドグリカン壁に覆われており、ペプチドグリカンに作用する阻害剤により葉緑体分裂を阻害することが可能であることから、*Cyanophora sudaе* に阻害剤を作用させてその表現型を観察することにより、葉緑体を複数もつ藻類における細胞周期と葉緑体分裂周期の協調機構について探る。

(2) 細胞周期チェックポイントの解除機構を理解するための単細胞藻のG2/M期移行機構の解明

葉緑体分裂開始前に葉緑体分裂を阻害した細胞ではG2/M期移行に中心的な役割を果たすサイクリンBの発現が抑制されたことから、細胞周期チェックポイントはサイクリンBの発現調節機構と関連することが示唆される。サイクリンBは通常G2/M期特異的に転写翻訳される。このサイクリンBの細胞周期時期特異的な転写制御は、陸上植物ではプロモーター領域に存在するMSA motif ((T/C)C(T/C)AACGG(T/C)(T/C)A)により規定されることが知られている。単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* のサイクリンBの上流2000bpにはAACGG配列が4箇所存在する。そこでサイクリンB上流2000bpにレポーター遺伝子としてGFPをつなげたコンストラクトを導入した形質転換株を作成した。また、AACGG配列に変異を導入したものを導入した形質転換株も作成し、GFPの発現様式を調べることでサイクリンBの細胞周期特異的な発現とAACGG配列との関連を調べた。

4. 研究成果

(1) 藻類における細胞周期と葉緑体分裂周期の協調機構の普遍性

灰色藻 *Cyanophora sudaе* の細胞に対して様々な阻害剤を作用させて表現型を観察した。阻害剤 camptothecin によりS期で抑止した細胞では葉緑体分裂に関与する遺伝子の発現の上昇がみられた。また細胞あたりの葉緑体の数が4個から8個に増加した細胞が観察された。これらの結果は、他の藻類でも報告されているようなS期特異的な葉緑体分裂遺伝子の発現による葉緑体分裂開始時期の規定という機構が *C. sudaе* にも存在することを示すものである。

次に *C. sudaе* に対してペプチドグリカン合成阻害剤であるアンピシリンを作用させたときの表現型

について観察した。阻害剤を作用させないコントロールでは 4 葉緑体をもつ細胞が 7 割近く存在するのに対し、アンピシリンを作用させた細胞では 8 割が 2 葉緑体をもつ細胞となった。また、1 葉緑体をもつ細胞も 1 割程度生じた。アンピシリンを作用させた細胞の葉緑体では葉緑体の分裂開始を抑制することから、*C. sudae* では葉緑体分裂開始を阻害すると細胞あたりの葉緑体の数が 1 個になるまでは細胞周期が進行することがわかる。ただし 1 葉緑体 2 核をもつ細胞は存在しなかったため、細胞あたりの葉緑体が一つの藻類と同様に葉緑体分裂の開始を阻害すると最終的には細胞周期の M 期中期より前の段階で抑制すると思われる。

灰色藻の葉緑体の分裂時には分裂面に隔壁の陥入がおきたのちに壁中央が分解されることにより 2 つの娘葉緑体に分かれる。この分解の段階を阻害するセファレキシンを作用した細胞では 4 葉緑体をもつ細胞が減少すると同時に 2 葉緑体をもつ細胞が増加し、次に 1 葉緑体をもつ細胞が増殖した。この割合の変化は葉緑体が分裂していないのにも関わらず細胞分裂が進行することを示唆する。

アンピシリンとセファレキシンという 2 つの葉緑体分裂の異なる過程を阻害する阻害剤を作用させたときの結果から、葉緑体分裂開始後のタイミングを阻害しても細胞周期が進行する点、葉緑体分裂開始前の阻害が細胞周期進行を抑制する点は、葉緑体を 1 つもつ単細胞藻と同様であることが示された。また葉緑体分裂開始前の葉緑体分裂阻害で細胞周期進行が止まるのは細胞あたりの葉緑体の数が 1 つになってからであったことから、細胞は葉緑体の数を検知する仕組みをもっていることが示唆された。

(2) 細胞周期チェックポイントの解除機構を理解するための単細胞藻における G2/M 期移行機構の解明

サイクリン B の上流 2000bp に存在する MSA motif 様配列 AACGG に変異を導入していない株では GFP は G2/M 期特異的な発現を示したのに対し、AACGG 配列に変異を導入された株では G2/M 期特異的な発現が見られなくなったことから、*C. merolae* でも MSA motif 様配列は G2/M 期特異的な発現に関与することが示唆された。またサイクリン B の上流 2000bp には AACGG 配列が 4 箇所存在するが、変異を導入したときに、常に発現する箇所と発現が消失する箇所とが存在することから、サイクリン B の G2/M 期特異的な発現の制御には少なくとも 2 通りの経路が関与することが示唆された。

陸上植物では MSA motif に R1R2R3 Myb が結合することが知られている。*C. merolae* ゲノムには R1R2R3 Myb は Locus ID: CMT134C のひとつだけ存在する。CMT134C の発現について調べると S/M 期特異的に転写され、M 期特異的にリン酸化される核局在のタンパク質であることがわかった。陸上植物のゲノムには R1R2R3 Myb の複数のパラログが存在し、G2/M 期特異的な遺伝子発現を活性化する活性型・抑制する抑制型・細胞周期と非生物学的ストレスの双方に関わるグループの 3 つに分かれる。CMT134C の発現パターンは陸上植物の活性型 R1R2R3 Myb と似ており、CMT134C がサイクリン B をはじめとする MSA motif を介して G2/M 期特異的に発現する遺伝子の発現制御に関与する可能性が高いことが示唆された。今後 CMT134C が G2/M 期特異的な遺伝子発現にどのように関与するのか、また葉緑体分裂を感知して M 期前期以降への進行を許可する細胞周期チェックポイントに関係するのかどうかについてさらなる解析が必要となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sumiya Nobuko	4. 巻 30
2. 論文標題 Mechanism of coordination between cell and chloroplast division in unicellular algae	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLANT MORPHOLOGY	6. 最初と最後の頁 83-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.5685/plmorphol.30.83	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 墨谷暢子	4. 巻 3
2. 論文標題 単細胞藻の細胞と葉緑体の分裂の相互制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 251-255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 墨谷暢子
2. 発表標題 灰色藻Cyanophora sudaеの細胞周期進行と葉緑体分裂
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 墨谷暢子
2. 発表標題 単細胞藻類における細胞分裂と葉緑体分裂の協調機構
3. 学会等名 日本植物形態学会第29回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 墨谷暢子
2. 発表標題 単細胞紅藻Cyanidioschyzon merolaeにおけるR1R2R3 Myb の機能解析
3. 学会等名 日本植物形態学会第 31 回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 墨谷暢子
2. 発表標題 単細胞紅藻Cyanidioschyzon merolaeにおけるG2/M期移行
3. 学会等名 日本植物学会第83 回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Sumiya N., Miyagishima S.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 12
3. 書名 Metabolic Engineering of Cyanidioschyzon merolae. In: Kuroiwa T. et al. (eds) Cyanidioschyzon merolae A new model eukaryote for cell and organelle biology	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----