

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03260

研究課題名(和文)オルガネラ分裂/増殖機構を基盤にした真核植物細胞の基のゲノム形態学的解明

研究課題名(英文)Elucidating the basis of plant cells based on the organelle division mechanism of microalgae

研究代表者

黒岩 常祥 (KUROIWA, Tsuneyoshi)

日本女子大学・理学部・研究員

研究者番号：50033353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物に共通のオルガネラの増殖を考慮した細胞分裂の機構を、原始紅藻 *C. merolae* (シゾン) を基盤に調べた。各包膜オルガネラが分裂装置を使って順次分裂すること、更に各分裂装置の構成物質を確かめた。分裂したオルガネラの分配にTOP(キネシン様物質)が働き細胞核分裂を起こし、次に細胞膜の収縮物質(EF1)が作動した。窪んだ中央細胞膜に収縮分子類(ESCRT-III, ALIX, VPS4等)が現れ分裂を促した。ESCRT-IIIは「電子密度の高いリング」と複合体を形成し、最終分断を起こすと推定され、類似のリングはメダカモでも観察された。またシゾンにおいて中期染色体構造が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多様な真核生物を形成する真核細胞の基本構造と機能を解明することにより、細胞増殖のしくみが求められる医学(病気や癌の治療等)、農学(食糧の増産等)に利用される。既に報告したように、本研究の研究協力者の井元祐太博士によってシゾンで見出されたDYNAMO1が、ジョンズホプキンス大学から、癌の転移の阻止に有効との研究が公表されている。

研究成果の概要(英文)：Dynamics of organelle division / proliferation, etc. in eukaryotic cell proliferation, and the mechanism that leads the information to the cell nucleus and cytokinesis was studied using the primitive red alga *C. merolae* as a material. Each organelle divides sequentially using a division device, and each division. The constituents of the device were confirmed. It was revealed that TOP (kinesin-like substance) acts on the distribution of divided organelles and then is involved in cell fission. Subsequently, the cell membrane contractile substance (EF1) functioned, and then molecules involved in central cell membrane disruption (ESCRT-III, ALIX, VPS4, etc.) appeared and divided. ESCR-III was presumed to form a complex with an "electron-dense ring" and cause final fragmentation, and similar rings were also observed in Medakamo. In addition, a metaphase chromosomal structure was confirmed in Schyzon.

研究分野：細胞生物科学 オルガネラ生物科学

キーワード：オルガネラ分裂同調化 オルガネラ分裂装置 細胞質分裂 細胞核分裂 ミトコンドリア分裂 葉緑体分裂 ペルオキシソーム分裂 TOP

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 動植物のような真核生物の真核細胞は1個の細胞核の他、周辺にミトコンドリアなど6種の包膜オルガネラが多数あり、細胞分裂はオルガネラの分裂後、核分裂・細胞質分裂を経て行われる。

(2) これまで先ずオルガネラがどのように分裂・分配されるのか、その終了情報がどのような形で細胞核分裂を誘起し、最後に細胞質分裂が行われるのか、オルガネラの動態を考慮した細胞分裂の研究はほとんどなかった。そこで、オルガネラの分裂/増殖を踏まえた細胞分裂の機構の研究を進めることにした。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は「真核生物に共通のオルガネラの分裂/増殖を考慮した細胞分裂の仕組みを解明すること」である。その目的に最適な真核生物の基となる生物として、単細胞原始紅藻シゾンを選んだ。

(2) シゾンは、1個の細胞核の他に6種の包膜オルガネラを最少セット含むこと、葉緑体を含んでいるため、細胞・オルガネラの分裂を光の明暗で100%近く同調化できること、更に真核生物として初めて100%ゲノム解読がされており、遺伝子数が最少で利用度が高いこと、そして細胞膜も弱く、各種・各時期のオルガネラの単離が容易で、生化学的解析ができること等の特徴がある。これらを土台にして、更に新しいオルガネラの動態を知り、上記の目的を達成する。

### 3. 研究の方法

それぞれの研究目的に沿って、材料の固定、染色、観察を行った。ここではシゾンを中心に述べる。先ずシゾンを高度に同調培養した。

#### (1) 細胞核、ミトコンドリア核、色素体核の蛍光顕微鏡観察

細胞核の中期染色体の観察：細胞核はGC容量の影響を避けるために、新空気乾燥法でグルタルアルデヒド固定後、SYBR Green I で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

ミトコンドリア核と色素体核の観察：細胞核染色体の観察に使った空気観察法を更に改良して蛍光顕微鏡で観察した。

(2) オルガネラ/細胞核/細胞質の分裂及び物質の局在に関する蛍光顕微鏡及び電子顕微鏡観察  
ミトコンドリアとペルオキシソームの分裂に関しては、Miyagishima et al (1999)により始まるmicrobodyの分裂に関する知見と、Fujiki/ Imoto et al (2020)らの観察を基に、両者の相互作用を更に詳細に観察・実験を行った。

葉緑体の分裂に関しては主にYoshida et al (2017)らによるこれまでの資料を参考とし、分裂装置の構成物質の再検討とその挙動の追跡をした。

細胞核と細胞質分裂に関しては、古細菌から動植物まで共通に存在し、分裂に関わると推定されている物質について、シゾンでの存在を調べるとともに、その挙動を遺伝子破壊法及び免疫蛍光顕微鏡法で解析した。

同調培養した細胞分裂各期のシゾンについて蛍光顕微鏡観察、電子顕微鏡観察を行い、更に分裂に関連した物質の局在については免疫蛍光顕微鏡法及び免疫電子顕微鏡法で確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) シゾンの真核生物としての進化的基盤

従来シゾンの細胞核は主にDAPI法で染色観察してきたが、明瞭な中期染色体が観察されなかった。今回の方法で数本の棒状の中期染色体が観察された。ゲノムサイズがより小さなメダカモでは中期染色体は観察されなかった。従ってシゾンは細胞周期の核分裂において、棒状の染色体構造をとる真核生物の基となると考えられた。

またミトコンドリア核は、高等動植物では小さな点状であり、粘菌は棒状、そして酵母では時期によって点状が連鎖したリング状であった。シゾンのミトコンドリア核はこれまで点状と思われていたが、今回の方法で、酵母のように点状が連鎖したリング状であることが明らかになった。この事からもシゾンはより始原的な真核生物と考えられることが分かった。

同様に葉緑体核からも進化的に重要な知見が得られた。褐色藻類は紅藻が二次共生して葉緑体となり誕生したと考えられている。その証拠の一つとして紅藻類も褐色藻類も、その葉緑体核は小さな球状の核が連鎖して首飾りのようにになっている事が示されている。しかしこれまでの報告によるシゾンの葉緑体核はシアノバクテリアのように中心局在型の核であった。今回の方法で紅藻特有の首飾り状の葉緑体核が観察されたことにより、シゾンは紅藻と褐色藻の共通の起源種と考えられるようになった。

以上細胞核、ミトコンドリア核、色素体核の構造からも、シゾンは真核生物の共通の進化的

基盤(基)であると考えられる。

(2)各包膜オルガネラの分裂について、先ず葉緑体の分裂に関しては、1986年 Mita & Kuroiwa らによる分裂装置の発見以来、継続して研究が続けられている。最近では Yoshida et al (2017)により、その分裂装置の構造と機能が解明されてきた。分裂装置は糖繊維、Dynamin、FtsZ 等多くの物質から構成されていた。今回これらの物質の再確認を行った。オルガネラの分裂順位としては、次のミトコンドリアの分裂に引き継がれる。

(3)ミトコンドリアの分裂について、これまでの研究で葉緑体と同様、糖繊維、Dynamin、FtsZ 等からなる分裂装置によって分裂することが明らかになっている。今回その装置内にオーロラキナーゼと DYNAMO1/2 が発見された。オーロラキナーゼは Dynamin に作用し、ミトコンドリアの分裂を制御していることが明らかとなった。類似の仕組みはシゾンとともに、ヒトのミトコンドリアでも確認された。

ミトコンドリアやペルオキシソームなどオルガネラの活動に関わるタンパク質の多くには GTPase が関与している。DYNAMO1/2 は ATP を GTP に変換し、分裂装置に GTP を供給して活性化していると思われる。

更に単膜系のペルオキシソームの分裂に関しては、分裂装置内にバクテリア由来の FtsZ を持たないが、装置の構成物質は類似している。

(4)ミトコンドリアとペルオキシソームの核分裂に向けた共同活動

ミトコンドリアの分裂の開始の時、ペルオキシソームは中央の分裂装置を覆うように結合して、二重リングとなり収縮してミトコンドリアの分裂が完了する。次にペルオキシソームが分裂して2ヶの嬢ペルオキシソームとなり、それぞれが嬢ミトコンドリアと電子密度の高い顆粒で結合して複合体となる。更にこのダブルのオルガネラ複合体の両端に TOP (キネシン様物質) が現れ、両端を反対方向へ引き上げ、複合体の分配を終了する事が確認された。更に TOP は細胞核の中心体両極へ移動し、細胞核分裂に関わることが示唆された。この TOP の動態とここでの機能解明は今後の課題である。

細胞核分裂が終了すると、細胞質分裂が起こる。

(5)シゾンの細胞質分裂に関しては、Imoto et al (2011)により報告されたように、まず Efl 等からなる収縮環が基盤として使われていた。細胞進化とともにアクチン・ミオシンからなる分裂環が加わり複合体となる。シゾンはこの分裂環複合体を使わないが、正常な細胞質分裂が行われる。中央の細胞膜分断には真核細胞共通の物質 (ESCRT-III, ALEX 等) が多重リングを形成し、細胞質分裂が終了した。

(6)これまでの観察は蛍光顕微鏡観察が中心であるが電子顕微鏡でも行っている。特に細胞質分裂の最終段階にある細胞膜の分断に関しては、ESCRT-III と複合体を形成する電子密度の高いリングが観察された。またメダカモにも類似のリングがあり、これが最終分裂装置として重要な働きをしていると考えられる。

(7)高等植物では、色素体の分裂装置は Kuroiwa H et al (1995)らによって発見されているが、その他のオルガネラの分裂装置、オルガネラの結合構造や細胞質分裂の最終リングは現在探索中である。

(8)シゾンで細胞分裂の基本的問題が解明され、その特徴を生かして応用研究に使う場合、大量培養が必要となる。大量の化学薬品の使用を避け微細藻類の特徴を生かした培養法が必要である。今回シゾンが酸性水域に棲息すること、シゾン類の一部が海水でも生存できるとの研究結果から、シゾンで新たな海水を使った大量培養法の構築に成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Fujiki, Y., Abe, Y., Imoto, Y., Honsho, M., Okumoto, M., Miyata, N., Yamashita, T. and Kuroiwa, T.	4. 巻 133
2. 論文標題 Recent insights into peroxisome biogenesis and associated diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cell Science	6. 最初と最後の頁 Cs236943,1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.236943	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 該当する
1. 著者名 Kuroiwa, T., Yagisawa, F., Fujiwara, t., Inui, Y., Matsunaga, S., Kato, S., Matsunaga, S., Nagata, N., Imoto, Y. and Kuroiwa, H.	4. 巻 85
2. 論文標題 Mitotic karyotype of the primitive red alga Cyanidioschyzon merolae 10D	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 107-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1508/cytologia85.107	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 該当する
1. 著者名 Hirooka, S., Tomita, R., Fujiwara, T., Ohnuma, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. and Miyagishima, S.	4. 巻 10 13794
2. 論文標題 Efficient open cultivation of Efficient open cultivation of Cyanidialean red algae in acidified seawater	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Rep. nature research	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70397	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 該当する
1. 著者名 Kuroiwa, T., Yagisawa, F., Fujiwara, T., Misumi, O., Nagata, N., Imoto, Y., Yoshida, Y., Mogi, Y., Miyagishima, SY., and Kuroiwa, H.	4. 巻 86
2. 論文標題 Smooth loop-like mitochondrial nucleus in the primitive red alga Cyanidioschyzon merolae revealed by drying treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 89-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1508/Cytologia 86.89	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 該当する

1. 著者名 Akita, K., Takagi, T., Kobayashi, K., Kuchitsu, K., Kuroiwa, T. and Ngata, N.	4. 巻 258
2. 論文標題 Ultrastructural characterization of macrolipophagy induced by the interaction of vacuoles and lipid bodies around generative and sperm cells in Arabidopsis pollen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protoplasma	6. 最初と最後の頁 129-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00709-020-01557-2	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 該当する

1. 著者名 Imoto, Y., Abe, Y., Honsho, M., Okumoto, K., Ohnuma, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. and Fujiki, Y.	4. 巻 32
2. 論文標題 Molecular basis of local energy generation during mitochondrial and peroxisomal division	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Morph	6. 最初と最後の頁 59-73
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 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 該当する

1. 著者名 Imoto, Y., Abe, Y., Okumoto, K., Ohnuma, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. and Fujiki, Y.	4. 巻 95
2. 論文標題 Dynamics of the nucleoside diphosphate kinase protein DYNAMO2 correlates with the	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Jpn. Acad., Ser. B.	6. 最初と最後の頁 75-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.95.007	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 該当する

1. 著者名 Kato, S., Okamura, E., Matsunaga, T. M., Nakayama, M., Kawanishi, Y., Ichinose, T., Iwane, A. H., Sakamoto, T., Imoto, Y., Ohnuma, M., Nomura, Y., Nakagami, H., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. and Matsunaga, S.	4. 巻 2
2. 論文標題 Cyanidioschyzon merolae aurora kinase phosphorylates evolutionarily conserved sites on its target to regulate mitochondrial division.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0714-x	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 Yagisawa, F., Fujiwara, T., Takemura, T., Kobayashi, Y., Sumiya, N., Miyagishima, S.,	4. 巻 169
2. 論文標題 ESCRT machinery mediates cytokinetic abscission in the unicellular red alga	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00169	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 該当する

1. 著者名 Kuroiwa, T., Ohnuma, M., Imoto, Y., Yagisawa, Y., Misumi, O., Nagata, N. and Kuroiwa, H.	4. 巻 257
2. 論文標題 Evolutionary significance of the ring-like plastid nucleus in the primitive red alga Cyanidioschyzon merolae as revealed by drying.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protoplasma	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00709-020-01496-y	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 該当する

1. 著者名 Fukushima, F., Akita, K., Takagi, T., Kobayashi, K., Moritoki, N., Arimura, S., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., Nagata, N.	4. 巻 259
2. 論文標題 Existence of giant mitochondria-containing sheet structures lacking cristae and matrix in etiolated cotyledon of Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protoplasma	6. 最初と最後の頁 731-542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00709-021-01696-0	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 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 黒岩常祥、八木沢芙美、永田典子、三角修己、藤原崇之、乾弥生、松永朋子、加藤翔一、井元祐太、黒岩晴子、田草川真理、松永幸大
2. 発表標題 シゾンの中期染色体の発見から見えてきたメダカモでの真核生物増殖の原理の解明
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 黒岩晴子、永田典子、黒岩常祥
2. 発表標題 高等植物の卵細胞内オルガネラの胚発生過程における変動
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 秋田佳恵、高木智子、小林啓子、朽津和幸、黒岩常祥、永田典子
2. 発表標題 シロイヌナズナ花粉のリポファジーに関する電子顕微鏡観察
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 黒岩常祥 黒岩晴子 永田典子 三角修己 田草川真理 松永幸大 加藤翔一
2. 発表標題 真核植物の誕生と進化をシゾンとメダカモのオルガネラ核と分裂装置から解く
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 黒岩晴子 永田典子 黒岩常祥
2. 発表標題 高等植物の重複受精前後における胚嚢内細胞の動態について 2
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 八木沢芙美 藤原貴之 宮城島進也 三角修己 中村宗一 黒岩晴子 黒岩常祥
2. 発表標題 原始紅藻Cyanidioschyzon merolaeにおけるポリリン酸キナーゼPPK1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 大沼みお 黒岩晴子 黒岩常祥 広岡俊亮 藤原貴之 宮城島進也 眞田宣明
2. 発表標題 愛媛県鈍川温泉由来の油脂生産藻類とその脂肪滴
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 黒岩常祥
2. 発表標題 私たちの真核細胞はどのように生まれたか？ - オルガネラの分裂装置と遺伝に基づく解析
3. 学会等名 第14回 日韓学術フォーラム（韓国ソウル大学）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒岩常祥 黒岩晴子 永田典子 八木沢芙美 三角修己 乾弥生 松永朋子 加藤翔一 井元祐太 吉田大和 田草川真理 松永幸大
2. 発表標題 真核細胞の細胞小器官の分裂情報を細胞質分裂に伝達する機構のゲノム形態学による解明
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 黒岩晴子 永田典子 黒岩常祥
2. 発表標題 フウロソウ科植物の胚発生過程における細胞内オルガネラの変動について-2
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 廣岡俊亮 富田麗子 藤原崇之 大沼みお 黒岩晴子 黒岩常祥 宮城島進也
2. 発表標題 単細胞紅藻イデユコゴメ類の海水を用いた培養技術開発
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	永田 典子  (NAGATA, Noriko)  (40311352)	日本女子大学・理学部・教授   (32670)	
研究 分担者	八木沢 芙美  (YAGISAWA ,Fumi)  (70757658)	琉球大学・研究基盤センター・准教授   (18001)	

	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
研究 協力者	黒岩 晴子  (KUROIWA, Haruko)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	井元 祐太  (IMOTO, Yuuta)		

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