

平成 22 年 4 月 14 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770050

研究課題名（和文）

ダイナミンを指標とした、葉緑体とミトコンドリアの分裂装置の起源に関する解析

研究課題名（英文）

Analyses of the Origin and the Evolution of the Organelle Division Dynamin Proteins

研究代表者

宮城島 進也 (Miyagishima Shin-ya)

独立行政法人理化学研究所・宮城島独立主幹研究ユニット・ユニットリーダー(独立主幹研究員)

研究者番号：00443036

研究成果の概要（和文）：シアノバクテリアの細胞内共生によって誕生した葉緑体は、宿主真核細胞の制御下で分裂することによって増殖する。葉緑体の分裂は、核コードのタンパク質群によって形成される分裂装置の収縮により行われる。分裂装置のうち、シアノバクテリアに由来する部分は、バクテリアのサイトキネシスに起源することが示されている。本研究では、分子系統解析並びに分子遺伝学的な解析により、葉緑体分裂装置の内、宿主真核細胞に由来したダイナミンが真核細胞のサイトキネシスで働くダイナミンから派生して進化したことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Chloroplasts have evolved from a cyanobacterial endosymbiont and have been retained by coordinated chloroplast division in multiplying eukaryotic cells. Chloroplast division is performed by constriction of ring structures at the division site. The cyanobacteria-descended components of the chloroplast division machinery evolved from the cytokinetic machinery of the cyanobacterial endosymbiont. In this study, we have shown that the dynamin for chloroplast division is derived from that involved in eukaryotic cytokinesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 ・形態・構造

キーワード：細胞内共生、細胞質分裂、ダイナミン、葉緑体分裂、ミトコンドリア分裂

1. 研究開始当初の背景

真核細胞のエネルギー変換器、ミトコンドリアと葉緑体は、それぞれアルファプロテオ

バクテリア及びシアノバクテリアが十億年以上前に真核細胞に細胞内共生した結果誕生したと考えられている。バクテリアと同様に、どちらの細胞

内小器官（オルガネラ）も独自のゲノム、リボソーム等の遺伝子情報発現系を持ち、真核細胞内で分裂することによって増殖する。しかしながら、共生バクテリアが本来持っていた遺伝子群の多くは失われ、また一部は宿主真核細胞の核ゲノムに移行したため、ミトコンドリアと葉緑体の機能の大部分は宿主細胞の核コード遺伝子に依存している。従って、ミトコンドリアも葉緑体も自身で増えることはなく、その分裂は宿主細胞の核コード遺伝子群によって行われており、分裂増殖は宿主細胞によって制御されている。言い換えれば、増殖し続けてきた真核細胞は、共生バクテリアの分裂制御機構を獲得した結果、今日まで絶えず両オルガネラを保持できたわけである。真核細胞によるミトコンドリアや葉緑体の分裂制御機構の理解は、宿主植物細胞が、如何にしてバクテリア共生体の分裂機構を改変し、分裂・増殖を制御出来るようになったのかを理解するためにきわめて重要なことである。しかしながら、その分裂機構、制御機構は長い間不明であった。

近年、両オルガネラの分裂は宿主真核細胞の制御下で、それぞれの分裂面に形成される分裂装置（リング）の収縮によって行われることが明らかとなった。さらに、研究代表者らの研究を中心に、分裂装置に含まれる宿主核コードのタンパク質群がようやく同定され始めた。

葉緑体分裂装置には、共生シアノバクテリア由来のタンパク質群と、宿主真核細胞に起源するタンパク質群の両方が含まれている。つまり葉緑体分裂装置は、原核・真核のハイブリッドの装置である。シアノバクテリア由来のタンパク質群としては、シアノバクテリアにおいて細胞質分裂（サイトキネシス）ではたらく自己重合型 GTPase である FtsZ を始め、ARC6 や、FtsZ の分裂面への局在化を誘導する MinD、MinE などが同定されており、これらが葉緑体分裂においてもバクテリアと同様の機能を果たしていることが示されてきた。一方、宿主真核細胞由来のタンパク質群としては、ダイナミン GTPase の一種である DRP5B の他、PDV1、PDV2 等が同定されており、これらも葉緑体分裂に必須であることが分かってきた。

FtsZ を中心とする原核型のオルガネラ分裂機構の起源は細胞内共生したシアノバクテリアのサイトキネシス機構であり、細胞内共生前後の変遷も詳細に理解されている。一方で、真核生物固有のダイナミンファミリーが、様々な膜系の分裂・融合に関与していることは知られているが、葉緑体及びミトコンドリア分裂ダイナミンが、どの様なダイナミンから派生して生じたかについては不明であった。

2. 研究の目的

ダイナミンファミリーは真核生物固有の GTPase 群であり、脂質二重膜表面で自己重合することが知られている。ダイナミンファミリーのタンパク質には、葉緑体やミトコンドリアの分裂に関与するもの他に、エンドサイトーシス、ミトコンドリアの融合、高等植物の細胞板形成に関与するものなどが知られている。つまり、ダイナミンファミリーに属するタンパク質はそれぞれ、何かしらの真核細胞の膜系の分裂ないし融合で働いている。ダイナミンファミリーは植物や藻類だけではなく、真核生物に普遍的に存在することが知られている。このことは植物細胞の祖先が、葉緑体を獲得し葉緑体分裂型ダイナミンを獲得する以前からダイナミンファミリーが真核細胞に存在していたことを示唆している。つまり、葉緑体分裂型ダイナミンは、葉緑体以外の何かしらの膜系の分裂ないし融合で働いていたダイナミンから派生して進化したものと推測される。葉緑体分裂型ダイナミンの起源を理解できれば、葉緑体分裂機構のうち、宿主に由来する部分が真核細胞のどの様な膜系から進化したかを理解することが可能となり、これまでほとんど判っていなかった、細胞内共生時に宿主真核細胞側に生じた膜系の変化が理解できると期待される。

本研究では、分子系統解析により葉緑体分裂型ダイナミンに最も類縁のダイナミン群を探索し、その機能を分子遺伝学、細胞生物学の手法を用いて解析することを目的とした。さらにその結果をふまえて、葉緑体分裂型ダイナミンの起源について考察することで、宿主細胞が、共生シアノバクテリアを葉緑体へと変換する過程で取った戦略を理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、まず、近年精力的に進められている、真核生物のゲノムプロジェクトの情報を活用し、分子系統解析により葉緑体分裂型ダイナミンの起源を探索した。

具体的には、様々なゲノム配列、アミノ酸配列データベースよりダイナミンに類似のアミノ酸配列を収集し、最尤法を用いてダイナミンファミリーの系統解析を行い、葉緑体分裂型ダイナミンと最も近縁のタンパク質群を探索した。

(2) 上記の分子系統解析により、葉緑体分裂型ダイナミンと単系統となる機能未知のタンパク質群が藻類、植物、アメーバ類に見つかった。これら機能未知のダイナミンタンパク質の機能を理解するために以下の方法を取った。

まず、アメーバ類に見つかった機能未知ダイナミンの機能を明らかにするために、細胞性粘菌を用いた解析を行った。

細胞性粘菌の該当遺伝子 (*DlpA*, *DlpB*, *DlpC*) を相同組み替えにより破壊し、それぞれの遺伝子破壊株のアメーバ細胞を顕微鏡により観察した。さらに、抗 *DlpA* ポリクローナル抗体を作成し、間接蛍光抗体法により、*DlpA* の細胞内局在解析を行った。

次に、植物及び藻類に見つかった機能未知ダイナミンの機能を明らかにするために、シロイヌナズナを用いた解析を行った。

シロイヌナズナの該当遺伝子 (*DRP5A*) の破壊株を理化学研究所バイオリソースセンター及び、米国コールドスプリングハーバー研究所より取り寄せ、遺伝子破壊株の表現型を顕微鏡観察により解析した。次に、GFPを融合させた *DRP5A* タンパク質を *DRP5A* プロモーターにより野生株で発現させ、シロイヌナズナにおける *DRP5A* の発現部位を解析した。

さらに抗 *DRP5A* ポリクローナル抗体を作成し、間接蛍光抗体法により、*DRP5A* タンパク質の細胞内局在解析を行った。

上記の分子系統解析、及び、細胞性粘菌とシロイヌナズナを用いたタンパク質の機能解析の結果を統合し、葉緑体成立時に宿主細胞が取った戦略の推察を行った。

4. 研究成果

(1) 葉緑体分裂型ダイナミンの起源を探索するために、様々な系統の真核生物のゲノム情報を用いて、ダイナミンファミリーの分子系統解析を行った。その結果、葉緑体分裂型ダイナミン (図1、緑) と同一起源である機能未知のタンパク質群が見つかった (図1、紫)。さらに、これらのタンパク質群が、葉緑体を持つ植物、藻類の他、葉緑体誕生前に分岐した粘菌類 (アメーバ類)、エクスカバータ類にも存在することが明らかとなった。

この結果は、葉緑体分裂型ダイナミン (図1、緑) が、葉緑体成立以前から存在していた、これら機能未知のダイナミン群 (図1、紫) から派生して進化したことを示唆している。

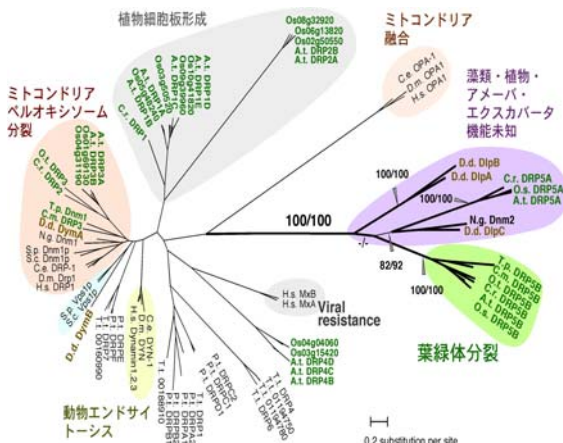


図1 ダイナミンファミリーの系統関係
葉緑体分裂型のタンパク質群を緑、それらと単系統となった機能未知のタンパク質群を紫で囲んである。いくつかの枝の上にはPhyML及びProtMLによるブートストラップ値を表示している。

次に、葉緑体分裂型ダイナミンと単系統と

なる上記の機能未知タンパク質群の機能を、細胞性粘菌で解析した。細胞性粘菌の該当遺伝子 (*DlpA*, *DlpB*, *DlpC*) をそれぞれ破壊したところ、どの遺伝子を破壊した場合も、多核の巨大細胞が出現した (図2)。この結果は、これら遺伝子破壊株では、核分裂は正常に起こるが、サイトキネシスが正常に行えないことを示唆している。

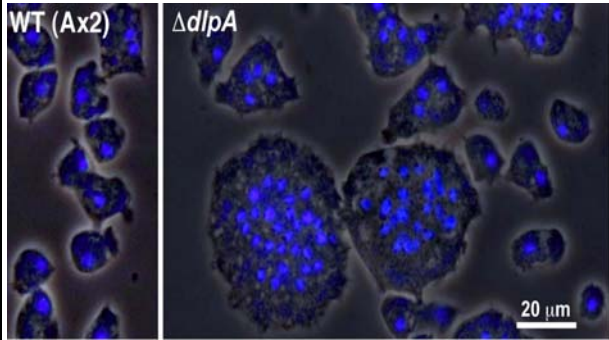


図2 細胞性粘菌野生株 (WT) と *dlpA* 破壊株 ($\Delta dlpA$) のアメーバ細胞
DAPIにより核を青く染色してある。ここでは *dlpA* 破壊株のみを示すが、*dlpB* 破壊株及び *dlpC* 破壊株も同様の表現型 (細胞の巨大化及び多核化) を示した。

さらに、*DlpA* タンパク質に対する特異的抗体を作成し、*DlpA* タンパク質の局在を間接蛍光抗体法で調べたところ、*DlpA* タンパク質がサイトキネシスの分裂溝に局在することが判明した (図2)。以上の結果、細胞性粘菌の *DlpA* はサイトキネシスに直接関与することが明らかとなった。

次に、植物に存在する、該当タンパク質 *DRP5A* の機能をシロイヌナズナを用いて解析した。*DRP5A* 遺伝子破壊株は通常の生育条件 (21°C) では、野生株と同様に成長したが、低温条件 (16°C) では野生株に比べて生育が遅れ、サイトキネシスのパターンに異常が見られた。GFP-*DRP5A* を *DRP5A* プロモーターによって野生株で発現させたところ、GFP-*DRP5A* の蛍光シグナルは細胞周期のM期に特異的に検出された。*DRP5A* タンパク質に対する特異的抗体を作成し、*DRP5A* タンパク質の局在を間接蛍光抗体法で調べたところ、サイトキネシス時の細胞板に局在することが明らかとなった (図2)。以上の結果、シロイヌナズナ *DRP5A* はサイトキネシスに直接関与することが明らかとなった。

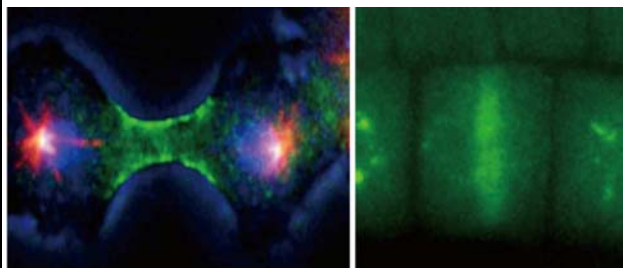


図2 細胞性粘菌 *DlpA* タンパク質 (左、緑色) とシロイヌナズナ *DRP5A* タンパク質 (右、緑色) の細胞内局在

細胞性粘菌の図では、チューブリンをオレンジ、核を青で染色してある。

以上の分子系統解析、細胞性粘菌とシロイヌナズナを用いた実験の結果から、葉緑体分裂ダイナミンが宿主真核細胞のサイトキネシス機構から派生して生じたこと、つまり葉緑体の分裂機構が原核・真核サイトキネシスの融合機構であることが示唆された。

細胞内共生バクテリアをオルガネラとして恒久的に維持していくためには、共生細胞の分裂と宿主細胞の分裂が同期する必要がある。今回の研究結果は、宿主細胞がその分裂に用いていたダイナミンを、細胞内共生体の分裂にも適用することで、共生体・宿主細胞の分裂同調化が可能となったことを示唆している。

今後、ミトコンドリア分裂型ダイナミンの起源も解析していくことにより、本研究において明らかにされた葉緑体についてのことがミトコンドリア、その他の細胞内共生にも適用できる一般原理なのかが明らかになると期待される。

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 5 件)

- ① Kenji Suzuki and Shin-ya Miyagishima (2010) Eukaryotic and eubacterial contributions to the establishment of plastid proteome estimated by large-scale phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.*, 27, 581-590. 査読有り
- ② Kumiko Okazaki, Yukihiro Kabeya, Kenji Suzuki, Toshiyuki Mori, Takanari Ichikawa, Minami Matsui, Hiromitsu Nakanishi, and Shin-ya Miyagishima (2009) The PDV1 and PDV2 components of the chloroplast division machinery determine the rate of chloroplast division in land plant cell differentiation. *Plant Cell*, 21, 1769-1780. 査読有り
- ③ Kenji Suzuki, Hiromitsu Nakanishi, Joyce Bower, David W. Yoder, Katherine W. Osteryoung, and Shin-ya Miyagishima (2009) Plastid chaperonin proteins Cpn60alpha and Cpn60beta are required for plastid division in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 9, 38. 査読有り
- ④ Hiromitsu Nakanishi, Kenji Suzuki, Yukihiro Kabeya, and Shin-ya Miyagishima (2009) The plant-specific protein MCD1 determines the site of chloroplast division in concert with bacteria-derived MinD. *Curr. Biol.* 19, 151-156. 査読有り
- ⑤ Shin-ya Miyagishima, Hidekazu Kuwayama,

Hideko Urushihara, and Hiromitsu Nakanishi (2008) Evolutionary linkage between eukaryotic cytokinesis and chloroplast division by dynamin proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 15202-15207. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

- ① 宮城島 進也、顕微鏡技術とオルガネラの分裂、日本植物学会大会、2009年9月18日、山形市
- ② 宮城島 進也、The origin and evolution of the chloroplast division machinery、日本細胞生物学会大会、2009年6月2日
- ③ 宮城島 進也、Architecture and evolution of the chloroplast division machinery、International Symposium on Bacteria made Organelles made Eukaryotic Cells、2008年11月30日、東京
- ④ 宮城島 進也、Functional and evolutionary analyses of the chloroplast division machinery、2nd Mechanobiology Workshop、2008年11月3日、シンガポール
- ⑤ 宮城島 進也、鈴木 健二、真核起源葉緑体プロテオームを基盤とした葉緑体分裂機構の解析、日本植物学会大会、2008年9月
- ⑥ 宮城島 進也、Chloroplast division machinery、Japan-Switzerland Workshop on Photosynthetic Adaptation and Chloroplast Dynamics、2008年10月9日、奈良市

[図書] (計 2 件)

- ① Wataru Sakamoto, Shin-ya Miyagishima, and Paul Jarvis (2008) Chloroplast biogenesis: control of plastid development, protein import, division and inheritance. *The Arabidopsis Book*, pp. 1-30.
- ② Shin-ya Miyagishima, and Hiromitsu Nakanishi (2009) Chloroplast division machinery: origins and evolutions. In *Red Algae in Genomic Age*. (eds. J. Seebach, D. J. Chapman, and A. Weber), Springer, in press

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/r-world/research/lab/iru/miyagishima/index.html>

<http://www.riken.jp/miyagishima/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮城島 進也 (Miyagishima Shin-ya)

独立行政法人理化学研究所・宮城島独立主幹研究ユニット・ユニットリーダー(独立主幹研究員)

研究者番号：00443036

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中西 弘充 (Hiromitsu Nakanishi)
独立行政法人理化学研究所・宮城島独立主幹
研究ユニット・ユニット研究員
研究者番号：90443001

桑山 秀一 (hidekazu Kuwayama)
筑波大学・生命環境科学研究科・講師
研究者番号：40397659

漆原 秀子 (Hideko Urushihara)
筑波大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：00150087