

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25251039

研究課題名(和文) 真核細胞・共生バクテリアの分裂同調化による光合成オルガネラ成立機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of mechanisms for coordinated proliferation of the eukaryotic host cell and the chloroplast

研究代表者

宮城島 進也 (MIYAGISHIMA, Shin-ya)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授

研究者番号：00443036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 28,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内共生による葉緑体の成立に必須であった、宿主真核細胞と葉緑体の分裂同調化機構を明らかにすることを目的として、種々の真核藻類を用いた解析を行った。その結果、(1)一次共生及び二次共生起源の葉緑体の分裂は宿主細胞周期により、核コード葉緑体分裂遺伝子の発現レベルでS期に限定されること、(2)葉緑体分裂面の収縮開始が宿主細胞の細胞周期進行に必須であること、(3)細胞の安全な複製のために宿主真核細胞の細胞周期進行は、酸化ストレスを生じる光合成の起こらない夜間に限定されることがわかった。つまり、宿主真核細胞・葉緑体の協調増殖は、双方が制約を掛け合うことで成立していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to understand the mechanism for coordinated proliferation of the eukaryotic host cell and the chloroplast which played a pivotal role in endosymbiotic establishment of the chloroplast. By characterizing eukaryotic algae, we found (1) that the division of chloroplast of both primary and secondary endosymbiotic origin is restricted to S phase by S-phase-specific expression of nucleus-encoded chloroplast division genes/proteins, (2) that initiation of chloroplast division site constriction is required for the host cell cycle progression, and (3) that the host cell cycle progression is restricted to night when photosynthesis does not operate to avoid photosynthetic oxidative stress. These results suggest that the division synchronization of the host cell and the chloroplast is enabled by interactive restrictions between the host cell and the chloroplast.

研究分野：進化細胞生物学

キーワード：細胞内共生 葉緑体分裂

1. 研究開始当初の背景

真核細胞内で酸素呼吸を司るミトコンドリアは、20億年ほど前にプロテオバクテリアが真核細胞の祖先に細胞内共生することによって誕生した。光合成を行う葉緑体は、10-20億年前にシアノバクテリアがミトコンドリアを有する真核細胞内に共生することによって成立し(一次共生)。その後、葉緑体を持つ真核藻類が他の非光合成性真核細胞内に複数回独立に共生することにより(二次共生)、多系統の真核生物群に広がっていった。上記の例以外にも、細胞内共生体が真核細胞内でオルガネラ化した例は多数知られている(Wernegreen, 2012)。

細胞内共生バクテリアがオルガネラになる過程において、(i)共生体遺伝子群の宿主核への転移及びその翻訳産物の葉緑体への輸送機構の獲得(ii)葉緑体包膜を介した代謝産物の交換機構の成立(iii)宿主真核細胞による共生体の分裂・増殖制御機構の獲得が必須であったと考えられる。これらのイベントの中で分裂・増殖の制御は、宿主細胞が分裂する際に、共生体を娘細胞に確実に伝播させ、宿主細胞による共生体の恒久的維持を可能とするものである。現存の藻類の葉緑体や、その他の恒久的な細胞内共生関係の観察結果は、共生体の分裂増殖と宿主細胞分裂周期が同調することが、恒久的な細胞内共生関係の確立とその後のオルガネラ化に必須であることを示してきた(図1)。これまで葉緑体の分裂制御機構に関する知見はほとんど無かったが、葉緑体分裂機構とその制御機構が、近年研究代表者らを中心とした研究により、以下のように解明され始めた。

葉緑体の分裂は、その分裂面に形成されるリング状の分裂装置が収縮することによって引き起こされ(Kuroiwa et al., 1998; Miyagishima et al., Plant Cell 2001a)、分裂装置にはシアノバクテリア由来のFtsZを中心としたタンパク質群と(Miyagishima et al., Plant Cell 2001b; Vitha et al., 2001)共生後、宿主真核細胞によって加えられたダイナミンを中心とするタンパク質群が含まれることが明らかとなった(Miyagishima et al., Plant Cell 2003, 2006; Nakanishi et al., Curr Biol 2009等)(一部例外を除いて核コード)。このうちFtsZはバクテリアのサイトキネシス機構、一方ダイナミンは真核細胞のサイトキネシス機構に由来する(Miyagishima et al., PNAS 2008)。つまり葉緑体分裂は共生体、宿主真核細胞両方に由来する分裂機構の融合装置によって行われることが明らかとなった。葉緑体よりも先に成立したミトコンドリアにおいても同様のことが当てはまる(Miyagishima et al., Plant Cell 2003, PNAS 2003, Int Rev Cell Mol Biol 2011)。さらに、紅藻、緑藻、車軸藻(いずれもシアノバクテリアの一次共生由来の葉緑体を有する)を用いた解析の結果、葉緑体の分裂は宿主細胞周期のS期に限定されていること、この制御は葉緑体分裂装置

の構成因子遺伝子群及びそれらにコードされるタンパク質群がS期に特異的に発現することによることが判明した。また、一部藻類の葉緑体ゲノムにコードされている分裂因子群は細胞周期による発現制御をうけないことから、S期特異的な発現機構は、葉緑体から核ゲノムへの遺伝子転移の後に獲得されたことが明らかとなった(Miyagishima et al., Plant Physiol 2011, Mol Biol Evol 2012)。つまり、葉緑体分裂は、宿主細胞周期により遺伝子発現レベルでその時期を制限されており、その結果葉緑体分裂が宿主細胞周期に連動されることが示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、以下の1-3の研究により、葉緑体の分裂増殖が、如何にして宿主細胞によって制御されているのか、逆に、葉緑体の分裂、葉緑体による光合成が、宿主細胞の分裂増殖にどのような影響を与えるのかを解析し、宿主・葉緑体の相互作用による分裂同調化機構を理解することを目的とした。

(1) 宿主細胞周期による葉緑体分裂時期限定の一般性

これまでの葉緑体の分裂機構及びその制御機構の研究は、主に陸上植物、緑藻類、紅藻類を用いて進められてきた。分裂機構の進化についての理解もこれらの系統群の理解のみに基づいている。

一方で、灰色藻 *Cyanophora paradoxa* のゲノムには、葉緑体分裂型ダイナミンを含め、他の系統に存在する宿主起源の葉緑体分裂因子(分裂面細胞質側ではたらく)がコードされていない。灰色藻の葉緑体は他の系統の葉緑体とは異なり、シアノバクテリアと同様に内外包膜の間にペプチドグリカン層を保持している。つまり、シアノバクテリアと葉緑体の分裂装置の中間段階の状態を反映していると考えられる。しかしながら、灰色藻において、宿主と葉緑体の分裂がどのように同調化されているかは不明であった。

次に二次共生起源の葉緑体についてであるが、いくつかの系統で宿主核コードのFtsZ及びダイナミンが葉緑体分裂に関与することが示されてきたが、宿主と葉緑体の分裂同調化機構は不明であった。

そこで、一次共生起源葉緑体における、共生体から宿主への分裂遺伝子転移と、宿主細胞周期による分裂遺伝子発現制御が、灰色藻及び二次共生藻でも見られるか調査し、宿主による共生体分裂制御機構の一般性を調べることを目的とした。

(2) 葉緑体分裂による宿主細胞周期進行の制限

ここまで述べたことは、宿主細胞周期による葉緑体の分裂制御である。一方で葉緑体側が宿主の細胞周期進行に影響を与えるようなことは無いのかということが疑問となっ

た。また、S 期にオルガネラが分裂を開始した後、次の細胞周期まで二度と分裂しないのはどのような機構によるのかという点も疑問となった。例えば、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* を薬剤により S 期で停止させると、葉緑体が繰り返し分裂し、通常は見られない、葉緑体を 4 ないし 8 つ含む細胞が出現する。従って、通常の細胞周期においては、葉緑体分裂を一度に限定する機構が存在すると考えられた。そこで、上記問題に答えることを目的とし、葉緑体分裂装置形成及びその収縮が宿主細胞周期進行に与える影響の解析を行った。

(3) 葉緑体光合成による宿主細胞周期進行の制限

これまでの研究により、細胞内共生によって誕生した葉緑体の分裂は、宿主細胞周期進行によって制御されることが理解され始めた。一方で、宿主細胞周期進行(成長と分裂)はミトコンドリアにおける酸素呼吸、葉緑体における酸素発生型光合成に依存している。これら好気エネルギー変換は宿主細胞質のもつ解糖に比べて高いエネルギーを生み出すことができる一方で、活性酸素種を生み出すという負の面も持ち合わせている。従って、真核宿主の細胞周期進行は共生体由来オルガネラのエネルギー変換に依存する一方で何らかの制約を受けるのではないかと考えられた。

この点に関しては、そのメカニズムと意義は不明であったが、多くの真核藻類において細胞分裂が夜起こることが知られていた。そこで、光合成の起こらない夜と細胞周期進行の関係を解析することで、葉緑体光合成が宿主細胞周期進行に与える影響を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 宿主細胞周期による葉緑体分裂時期限定の一般性

核及びオルガネラのゲノム配列が公開されている、灰色藻 *C. paradoxa*、二次共生起源葉緑体を有するクリプト藻 *Guillardia theta* を材料に選んだ。*G. theta* には共生した紅藻由来の縮退した核(ヌクレオモルフ)が存在するので、宿主細胞周期、ヌクレオモルフの複製周期、葉緑体分裂周期の関係を調べることで、真核細胞が、共生した別の真核細胞の細胞周期をどの様に制御するのかという知見も得られることを期待した。両種とも培養集団の細胞周期を同調させる系を開発し、細胞周期進行と葉緑体分裂(*G. theta* に関してはヌクレオモルフ複製も)関連遺伝子・タンパク質群の発現の関係を解析した。

(2) 葉緑体分裂による宿主細胞周期進行の制限

葉緑体分裂装置の形成・収縮が宿主細胞周期進行に与える影響を解析するために、葉緑体

分裂を任意の段階で停止させる系を開発した。具体的には、紅藻 *C. merolae* において開発した導入遺伝子誘導発現系を用いて、葉緑体型 FtsZ の過剰発現、ドミナントネガティブ型の葉緑体型ダイナミンの発現により、葉緑体分裂を停止させた時の宿主細胞周期の進行状態を解析した。これに加え、灰色藻 *C. paradoxa* の葉緑体分裂をペプチドグリカン合成阻害剤類で停止させ、その細胞周期進行への影響を解析することで、葉緑体分裂が宿主細胞周期に与える影響の一般性を調べた。

(3) 葉緑体光合成による宿主細胞周期進行の制限

紅藻 *C. merolae* の遺伝的改変技術を用い、細胞周期進行の夜間への限定機構を解析した。さらにその制御機構を遺伝学的に改変することにより、光合成が起こる昼間に細胞周期進行が起こる株を作成した。改変株と野生株を比較し、光合成と細胞周期進行が時間的に隔離されている意義を調べた。

4. 研究成果

(1) 宿主細胞周期による葉緑体分裂時期限定の一般性

灰色藻 *C. paradoxa* 培養集団の細胞周期は、他の多くの藻類で用いられる 12 時間明期・12 時暗期培養では同調しなかったため、アフィディコリンの添加と除去による同調培養を行った。その結果、細胞核コードであり、葉緑体内側ではたらく MIND, MINE に加え、葉緑体分裂面の内包膜外側でペプチドグリカン分解にはたらくと考えられる DIPM が S 期に発現することが示された。

クリプト藻 *G. theta* を 12 時間明期・12 時暗期培養により同調培養し、葉緑体分裂関連遺伝子群に加え、ヌクレオモルフ DNA 複製関連遺伝子群の発現時期を解析した。その結果、一次共生葉緑体の場合と同様に、葉緑体コードの葉緑体分裂遺伝子群 (*minD*, *minE*) は細胞周期を通じて一定量の mRNA が存在することが明らかとなった。同様にヌクレオモルフコードのヌクレオモルフ複製関連遺伝子と葉緑体分裂遺伝子 (*FTSZ*) も細胞周期を通じて一定量の mRNA が存在した。一方で、核コードのヌクレオモルフ複製関連遺伝子は宿主の S 期に特異的に発現することが明らかとなった。

これまでの知見と上記の結果をまとめると、一次と二次共生に共通して、共生体側(葉緑体、ヌクレオモルフ)は自身の複製周期による遺伝子発現制御系を喪失し、宿主側が新たに宿主細胞周期依存の共生体分裂遺伝子発現制御系を獲得したことにより、宿主・共生体の分裂同調機構が成立したことが示唆される。

(2) 葉緑体分裂による宿主細胞周期進行の制限

紅藻 *C. merolae* において開発した導入遺伝子

誘導発現系を用いて、葉緑体型 *FtsZ* の過剰発現、ドミナントネガティブ型の葉緑体型ダイナミンの発現により、葉緑体分裂を停止させた時の宿主細胞周期の進行状態を調べた。葉緑体分裂装置形成直前に *FtsZ* を過剰発現し、葉緑体分裂面の収縮前で葉緑体分裂を停止させた場合には宿主細胞周期が M 期前期で停止した。一方で、葉緑体分裂面収縮開始後に *FtsZ* を過剰発現、またはドミナントネガティブ型ダイナミンを発現させ、葉緑体分裂面収縮開始後に葉緑体分裂を停止させた場合には、宿主細胞周期は停止しなかった。これらの結果は、葉緑体分裂がひとたび開始すると、細胞周期が葉緑体分裂装置構成タンパク質群の発現を終える M 期中期まで進行し、その結果葉緑体分裂が 1 細胞周期当たり 1 回に限定されることを示している。さらに、葉緑体分裂と宿主細胞分裂の同調化は、宿主細胞による葉緑体分裂装置形成時期の限定と、葉緑体分裂リングの収縮開始による宿主細胞周期の M 期中期への進行許可という、宿主細胞と葉緑体双方による制約の掛け合いによって成立していることも示唆された (図 1)。さらに同様の実験結果が、葉緑体誕生後初期に分岐した灰色藻でも認められたことから、このような葉緑体と細胞の分裂同調化メカニズムは藻類の共通祖先で、葉緑体成立時に獲得されたものであることも示唆された。

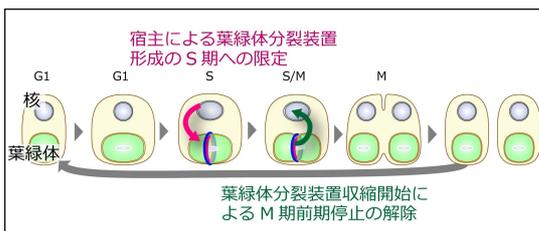


図 1 真核藻類に見られる宿主細胞と葉緑体の相互作用による分裂同調化

(3) 葉緑体光合成による宿主細胞周期進行の制限

紅藻 *C. merolae* において G1/S 移行が主観的に夜に限定されており、これは G1/S 転写因子である E2F のリン酸化が概日リズム制御を受けることに起因することを明らかにした。RB 遺伝子破壊または模擬リン酸化型 E2F の過剰発現により細胞周期進行を概日リズムから離脱させると (昼間も細胞周期進行が起こるようにすると)、細胞は高い酸化ストレスに曝されることが判明した。この結果は、強度の酸化ストレスを生じる光合成 (葉緑体、昼) と細胞周期進行 (宿主細胞、夜) を時間分業させることが、安全に核ゲノム及び細胞を複製し、細胞内共生関係を維持するために重要であることを示唆している。古くから光合成活性が概日リズム制御を受けることが知られているため、細胞周期と光合成の時間分業は宿主の概日時計制御であると考えられる (図 2)。つまり、葉緑体による酸化ストレ

スのために、宿主真核細胞は細胞周期進行を夜間に限定し、安全な細胞複製をする必要が生じたと考えられる。

上記 1-3 の結果、宿主真核細胞と葉緑体の分裂同調化は、宿主による葉緑体の制御という一方の機構によるものではなく、宿主・葉緑体がお互いに制約を掛け合うことで成立していることが初めて明らかとなった。

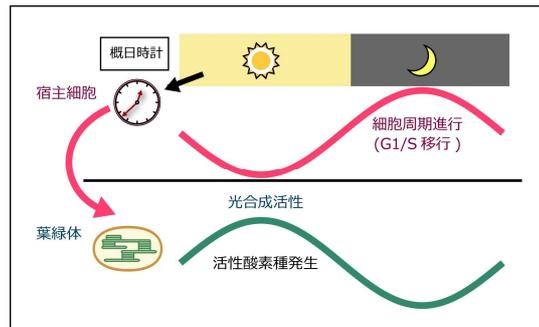


図 2 宿主細胞周期進行と葉緑体による光合成の時間分業

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Sumiya, N. and Miyagishima, S. (2017). Hierarchical order in the formation of chloroplast division machinery in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Commun. Integr. Biol.* e1294298
DOI: 10.1080/19420889.2017.1294298

Onuma, R., Mishra, N., and Miyagishima, S. (2017). Regulation of chloroplast and nucleomorph replication by the cell cycle in the cryptophyte *Guillardia theta*. *Sci. Rep.* Article 2345
DOI: 10.1038/s41598-017-02668-2

Fujiwara, T., Ohnuma, M., Kuroiwa, T., Ohbayashi, R., Hirooka, S. and Miyagishima, S. (2017). Development of a double nuclear gene-targeting method by two-step transformation based on a newly established chloramphenicol-selection system in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Front. Plant Sci.* Article 343
DOI: 10.3389/fpls.2017.00343

Miyagishima, S. (2017). Chloroplast division: A handshake across membranes. *Nat. Plants* 3, 17025. Comments on Wang et al., (2017).
DOI: 10.1038/nplants.2017.25

Sumiya, N., Fujiwara, T., Era, A. and Miyagishima, S. (2016). Chloroplast division checkpoint in the algal cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113,

E7629-E7638.

DOI: 10.1073/pnas.1612872113

Fujiwara, T., Kanesaki, Y., Hirooka, S., Era, A., Sumiya, N., Yoshikawa, H., Tanaka, K., and Miyagishima, S. (2015) A nitrogen source-dependent inducible and repressible gene expression system in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Front. Plant Sci.* 6, 657

DOI: 10.3389/fpls.2015.00657

Sumiya, N., Fujiwara, T., Kobayashi, Y., Misumi, O., and Miyagishima, S. (2014) Development of a Heat-Shock Inducible Gene Expression System in the Red Alga *Cyanidioschyzon merolae*. *PLOS ONE* 9, e111261

DOI: 10.1371/journal.pone.0111261

Miyagishima, S., Fujiwara, T., Sumiya, N., Hirooka, S., Nakano, A., Kabeya, Y., and Nakamura, M. (2014) Translation independent circadian control of the cell cycle in a unicellular photosynthetic eukaryote. *Nat. Commun.* 5, 3807

DOI: 10.1038/ncomms4807

Miyagishima, S., Kabeya, Y., Sugita, C., Sugita, M., and Fujiwara, T. (2014) DipM is required for peptidoglycan hydrolysis during chloroplast division. *BMC Plant Biol.* 14, 57

DOI: 10.1186/1471-2229-14-57

Miyagishima, S., Nakamura, M., Uzuka, A., and Era, A. (2014) FtsZ-less prokaryotic cell division as well as FtsZ- and dynamin-less chloroplast and non-photosynthetic plastid division. *Front. Plant Sci.*, 5, 459

DOI: 10.3389/fpls.2014.00459

〔学会発表〕(計7件)

宮城島 進也「真核細胞と葉緑体の分裂同調化機構」大阪大学タンパク研究所セミナー 真核細胞のオルガネラ研究最前線 2017年3月22日 大阪大学(大阪市)

Shin-ya Miyagishima “Uses of acidic hot spring eukaryotic algae: pure and applied sciences” 東工大光合成科学シンポジウム 2017年1月28日 東京工業大学(横浜市)

宮城島 進也「宿主細胞と共生細胞の分裂同調化によるオルガネラ成立機構」共生・寄生生物学シンポジウム 2016年3月5日 筑波大学(つくば市)

Shin-ya Miyagishima “Coordinating mechanisms of eukaryotic cell and chloroplast proliferation” ESF-EMBO Biology of plastids-towards a blueprint for synthetic organelles 2014年6月22日 Pultusk (Poland)

宮城島 進也「単細胞紅藻

*Cyanidioschyzon merolae*における光合成と細胞成長・分裂の協調機構」日本植物学会第77回大会 2013年09月13日 北海道大学(札幌市)

宮城島 進也「真核細胞と葉緑体の協調増殖機構」第55回日本植物生理学会年会 2014年03月18日 富山大学(富山市)

宮城島 進也, 藤原 崇之, 墨谷 暢子, 恵良 厚子「単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon* におけるエネルギー変換と細胞周期進行の関係」日本植物学会第78回大会 2014年09月12日 明治大学(川崎市)

〔図書〕(計1件)

Kuroiwa, T., Miyagishima, S., Matsunaga, S., Sato, N., Nozaki, H., Tanaka, K., Misumi, O. (Eds.) (2017) *Cyanidioschyzon merolae: A new model eukaryote for cell and organelle biology*. Springer

DOI: 10.1007/978-981-10-6101-1

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nig.ac.jp/nig/ja/research/organization-top/laboratories/miyagishima>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮城島 進也 (MIYAGISHIMA, Shin-ya)
国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授
研究者番号: 00443036