

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32686

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650101

研究課題名(和文) マイクロボディの分裂マシンの解明に基づくオルガネラ分裂増殖の全貌解明

研究課題名(英文) Comprehensive understanding of organelle division and multiplication on bases of elucidation of dividing machinery of microbody

研究代表者

黒岩 常祥 (Kuroiwa, Tsuneyoshi)

立教大学・理学部・特定課題研究員

研究者番号：50033353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究者らは膜系オルガネラを最少単位含み、光の明暗でそれらの分裂を同調化させたCyanidioschyzon merolae (シゾン)を使い、複膜系の色素体とミトコンドリアの分裂・増殖に必須な分裂マシンを発見してきた。本研究では、世界で初めて発見した単膜系のマイクロボディ(ペルオキシソーム)の分裂マシンの構造と機能を詳細に解析した。その結果マシンはダイナミン(Dnm1)と細い繊維の束を主とする複合リング構造であった。その収縮機構を複膜系分裂装置と比較した。

研究成果の概要(英文)：The double-membrane-bounded and the single-membrane-bounded organelles are required to fulfill the functions of eukaryotic cells. Cyanidioschyzon merolae cells contain a minimum set of essential organelles and their cell cycles are synchronized by light and dark cycles. We found the dividing machineries (MD and PD) in double-membrane-bounded mitochondria and plastids. In this study, we have found using omics research that a single-membrane-bounded organelle, microbody (peroxisome), divides using a complex of outer ring (POD) containing dynamin (similar to mitochondrial dynamin) and inner ring composed of fine filaments, and proposed a molecular model of microbody machinery. Finally we compared POD, MD and PD.

研究分野：細胞科学

キーワード：マイクロボディ、ペルオキシソーム、膜系オルガネラ、単膜系オルガネラ、複膜系オルガネラ、分裂マシン、ダイナミン

1. 研究開始当初の背景

真核細胞内の生命活動に必須な膜に包まれたオルガネラには複膜系と単膜系がある。研究者らはオルガネラを一つずつしか含まず、光の明暗で高度に同調化できる *Cyanidioschyzon merolae* (略称シゾン) を使い、複膜系の色素体とミトコンドリアの分裂・増殖に必須な分裂マシン (PD、MD と命名) を世界で初めて発見した。更に両分裂マシンの単離やシゾンの 100% ゲノム解読、マイクロアレイの作製、電気泳動・質量分析装置 (MALDI-TOF MS) によるプロテオーム解析、また遺伝子破壊技術の開発等を行い、色素体とミトコンドリアが、核 (様体) の分裂後、FtsZ リング、PD/MD リング、ダイナミンリングからなるダイナミックトリオを基盤にした「分裂マシン」を使って分裂することを明らかにした。こうした複膜系オルガネラの成果は Nature や Science のトピックス、及び分子生物学の教科書「Molecular Biology of the Cell」でも紹介された。

こうした複膜系オルガネラの分裂機構の研究から、単膜系の 4 つのオルガネラについても分裂マシンの存在が考えられた。検証の結果、ER とゴルジ体は細胞核の分裂に依存して遺伝・分配されること、リソソームとマイクロボディはミトコンドリアに付着し、分裂・分配・遺伝されることが明らかとなった。特にマイクロボディの分裂には、その両端にミトコンドリアに接着する装置があり、ミトコンドリアの分裂に依存して分断されることを見出した。この場合にも中央部分が強く括れることから、独自の分裂マシンが働いていることが強く示唆された。しかし従来の電子顕微鏡法では分裂装置を発見することが出来なかった。そこで、シゾンのオミクス科学的方法 (100% 解読された唯一の真核生物のゲノム情報、マイクロアレイ、プロテオーム、遺伝子破壊技術等) を用いて解析すればマイクロボディの分裂マシンを発見できると考えた。

2. 研究の目的

複膜系オルガネラの分裂に関わる分裂マシンの発見から、これまでその構造の複雑さから、分裂増殖の研究が進んでいなかった単膜系のオルガネラ (ER、ゴルジ体、リソソーム、マイクロボディ) についても、シゾンを用いれば分裂分配の機構が解明できると考え、先ず新しい電子顕微鏡固定法を使って単膜系オルガネラの分裂マシンを解析したところ、マイクロボディに分裂マシン様の構造を発見した ()。本研究の目的は、(1) この分裂マシン様構造の確定と (2) その機能を上記のオミクス科学を駆使して解明し、(3) 複膜系オルガネラと比較しながら、オルガネラの分裂の基本機構を解明することであった。

3. 研究の方法

これまでの研究成果を踏まえて次のよう

な方法で研究を遂行する。

(1) シゾンの同調培養系を使った分裂中マイクロボディを含む細胞の単離：

シゾンのマイクロボディが少なく小さいことから、大量培養系を使い、光の明暗 (12/12 時間明暗) で培養し、ほぼ 80% の細胞分裂の同調系を得た。M 期の後期にマイクロボディは短時間で分裂するので、通常の方法では分裂中マイクロボディを集積単離することが難しかった。そこでミトコンドリアが微小管を使って両極に分配される際、マイクロボディに結合してマイクロボディを分裂させる性質を利用することにした。微小管破壊剤であるオリザリン処理 (40mM) し、分裂中マイクロボディを多く含む細胞を集めてプロテオーム解析をした。またミトコンドリア (Mda1)、葉緑体 (PDR1)、マイクロボディ (カタラーゼ) 等オルガネラのマーカータンパク質と、Dnm1 の抗体を使ってウエスタンブロットをおこなった。

(2) 分裂中マイクロボディの単離：

分裂中マイクロボディは単独では小さく壊れ易いので、単離の際には、ミトコンドリアとマイクロボディが結合する性質を利用して、分裂期マイクロボディと娘ミトコンドリアの複合体として単離する方法を開発した。先ず M 期後期の細胞を集めフレンチプレスを使って破砕する。これをパーコールの密度勾配遠心で、細胞核、色素体、その他に分け、ミトコンドリアとマイクロボディ複合体を得た。次にノニデット P40 をはじめ各種界面活性剤で処理し、遠心を繰り返し、マイクロボディとミトコンドリアの複合体から、分裂中マイクロボディのみを遠心単離した。

(3) MS 解析 (液クロを含む) による分裂中マイクロボディを構成する全タンパク質とその遺伝子の同定：

分裂中マイクロボディ画分をトリプシンで処理し、液クロ・MS にかけた。対照として間期の細胞を用いた。また既知の膜系タンパク質等、無関係なタンパク質を除去するため、新開発コンピュ・タソフト (特許取得) を使った。こうして分裂に関わるタンパク質リストの作成を行った。同様にミトコンドリアタンパク質の混入も取り除き、分裂中マイクロボディ形成タンパク質を絞り込んだ。これに基づきゲノム情報から遺伝子を同定した。

(4) 免疫蛍光及び免疫電子顕微鏡法の利用：

in vivo、in vitro におけるダイナミンタンパク質の動態観察、マイクロボディの単離、その分裂装置の単離と関連タンパク質の局在に関しては、これまで研究者らの研究室で用いてきた蛍光顕微鏡、電子顕微鏡法を使った。また関連タンパク質の局在の検定については各種抗体を作製し、免疫蛍光・電子顕微鏡法、特にネガティブ免疫電子顕微鏡法を使

って解析した。

(5)単膜系マイクロボディ分裂マシンを構成するタンパク質の機能解析：

分裂マシンを形成するダイナミンの機能解析にはシゾンで新たに開発したアンチセンス法を使った。更に現在開発中の遺伝子破壊法も考えた。

(6)マイクロボディ分裂マシンと複膜系分裂マシンの構成成分、分裂機構の比較：

従来の方でミトコンドリアと色素体分裂マシンを単離し単膜系マイクロボディ分裂マシンと複膜系分裂マシンの構造、構成成分、収縮機構を比較した。これによって単膜系のオルガネラの分裂と複膜系のオルガネラの分裂の相関が分かり、単膜系のマイクロボディの誕生に関しても分子レベルから新たな知見が得られた。

4. 研究成果

上記の方法で解析した結果、次の成果が得られた。

(1) 分裂期マイクロボディを追跡するためのマーカータンパク質の同定：

シゾンの細胞周期のM期には、オルガネラの分裂は、色素体（グループ）、ミトコンドリアグループ（ミトコンドリア、マイクロボディ、リソソーム）、そして細胞核グループ（核、中心体、ゴルジ体）の順に、オーバーラップしながら進み、最後に細胞質分裂が起きた。マイクロボディの分裂はミトコンドリアの分裂の2時間後に起こり、分裂時間は短かった。そこで、オリザリン処理を行い、マイクロボディを分裂期で停止した。この時期の細胞と通常細胞（WT）で、プロテオーム解析を行ったところ、分裂に関わるタンパク質として、驚いたことに、ミトコンドリアダイナミン（Dnm1）と色素体ダイナミン（Dnm2）の二つのうち、Dnm1 が出現した。コンタミの可能性があったので、抗体を作製し、マーカータンパク質を使いウエスタンブロット解析をしたところ、分裂期マイクロボディを含む細胞にのみ、カタラーゼと Dnm1 が濃縮された。ミトコンドリアダイナミンが、ミトコンドリアの分裂後にマイクロボディの分裂にも使われる可能性が出てきた。

(2)ダイナミン Dnm1 はミトコンドリアとマイクロボディの分裂に使われる：

Dnm1 の抗体を作り免疫蛍光顕微鏡法で、その動態を調べたところ、Dnm1 はミトコンドリアの分裂後、分裂面から細胞質小胞に移行し、マイクロボディの分裂が始まる直前に、今度マイクロボディの分裂面に集まってリングを形成した。このことから、Dnm1 がマイクロボディの分裂に関与していることが明らかになった。このことは後で遺伝子破壊法で確認した。

(3)マイクロボディの分裂マシンの単離：

分裂期マイクロボディの細胞から細胞を破碎し、ノニデット P40 等種々の方法で処理し、遠心分画により、マイクロボディの分裂の前期、中期、後期にある分裂マシンを単離し、免疫蛍光顕微鏡法で観察した。分裂過程を通じ分裂マシンの全輝度が変わらなかったことから、リングは分解されながら収縮していくことが示唆された。分裂中マイクロボディを構成するタンパク質を電気泳動法・MSで解析し、得られた全 30 種の遺伝子のうち約 20 種の未知遺伝子を候補としていた。しかし新たに開発した液クロ・MS法を使ったタンパク質とその遺伝子の同定では、マイクロボディ分裂マシンを形成するタンパク質数は従来の数倍になった。これから既知の膜系タンパク質類等、無関係なタンパク質を開発したコンピュータソフトで除去して当該タンパク質の候補を得た。この過程も含め、常に他のオルガネラの動向やタンパク質の一般性を比較チェックした。

(4)分裂期マイクロボディの構造と単離したマイクロボディ分裂リングの分裂過程での微細構造の動態：

得られた結果から、単膜系のマイクロボディ分裂マシンは基本的には、内側（オルガネラ基質側）と外側（細胞質側）の二重構造ではなく、内側の細菌由来の内 MD リング、FtsZ リングに参与する膜は無かった。今回加圧凍結固定法を使って初めて、分裂面の外側に直径 500nm、幅 30nm のリング構造が観察された。単離したリングをネガティブ免疫電子顕微鏡で観ると、繊維構造からなる内側リングとダイナミンを含む外側リング構造の複合体であり、分裂の進行における収縮とともに、内側のリングを構成する繊維が分解されていった。このことからマイクロボディの分裂は、内側繊維の分解と外側リングの滑りによって起こることが示唆された。このような構造を他の単膜系のオルガネラの分裂でも探索している。

(5) 得られた単膜系マイクロボディ分裂マシンと複膜系分裂マシンの構成成分の比較：

今回の研究で得られた単膜系マイクロボディ分裂マシン(POD)と、複膜系分裂マシン(MD/PD)の構造や構成成分を比較したところ次のような点に違いがあった。POD は MD/PD の直径の約半分、POD は収縮とともに太くならないが、MD/PD は太くなる。これは分裂過程における構成繊維の分解か滑りのみかによる。POD も MD/PD も基本的には直径 10nm 以下の繊維の束である。POD には MD/PD の構成に必至なタンパク質 FtsZ、Mda1 や PDR1 等は同定されていない。最も重要なのは、POD が MD と同じダイナミン Dnm1 を含むが、色素体（葉緑体）タイプの Dnm2 を含まない。

(6)単複膜系オルガネラの分裂機構の解明から予想される細胞の起源や基本モデル:

マイクロボディでの分裂マシンの発見は、他の単複膜系のオルガネラの分裂にも分裂マシンの存在を示唆しており、現在より単純な藻類を含めその一般性を解析するきっかけともなった。またこれまで議論があった単膜系のオルガネラの起源や細胞の基本構造について、新たな考察が加わった。Dnm1をマイクロボディとミトコンドリアで共有していることから、両者の基質、周辺膜の類似性、シグナルペプチドの類似性等を併せて考察すると、これらの祖先が同じであるという仮説を支持する結果となった。

<引用文献>

Imoto, Y., Kuroiwa, H., Ohnuma, M., Kawano, S. and Kuroiwa, T. Identification of peroxisome-dividing ring in *Cyanidioschyzon merolae* based on organelle partner hypothesis. *Cytologia* 77, 2012, 1-8. DOI:10.1508/Cytologia. 77.515.

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)

Kuroiwa, T., Ohnuma, M., Imoto, Y. and Kuroiwa, H. Lipid Droplet Formation in Cells of the Filamentous Green Alga *Klebsormidium nitens* as Revealed by BODI0Y-DiOC₆ and BODIPY-Nile Red Double-staining Microscopy, *Cytologia*, 査読有, 79, 2015, 501-507 DOI: 10.1508/cytologia.79.501.

Kuroiwa, T., Ohnuma, M., Nozaki, H., Imoto, Y., Misumi, O. and Kuroiwa, H. Cytological evidence of cell-nuclear genome size of a new ultrasmall unicellular freshwater green alga, Chlorophyte sp. *Medakamo hakoo*: I. Comparison with *Cyanidioschyzon merolae* and *Ostreococcus tauri*. *Cytologia*, 査読有, 80, 2015, 1-8 DOI: 10.1508/Cytologia.80.1

Ohnuma, M., Yokoyama, T., Inouye, T., Sekine, Y., Kuroiwa, T. and Tanaka, K. Optimization of polyethylene glycol (PEG)-mediated DNA introduction conditions for transient gene expression in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*, *J Gen Appl Microbiol*, 査読有, 160, 2014, 156-159 DOI:10.2323/jgam.60.156.

Aoyama, H., Saitoh, S., Kuroiwa, T. and

Nakamura, S. Comparative analysis of zygosporangium transcripts during early germination in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J Plant Physiol*. 査読有, 171, 2014, 1685-1692 DOI:10.1016/j.jplph.2014.07.016.

Kobayashi, Y., Harada, N., Nishimura, Y., Saito, T., Nakamura, M., Fujiwara, T., Kuroiwa, T., Misumi, O. Algae sense exact temperatures: small heat shock proteins are expressed at the survival threshold temperature in *Cyanidioschyzon merolae* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gen Biol Evol.*, 査読有, 6, 2014, 2731-2740 DOI: 10.1093/gbe/evu216.

[学会発表](計 7件)

黒岩常祥、「真核生物の普遍原理の探求 原核生物より小さな真核生物を基盤に」、東京大学生物科学専攻統合記念シンポジウム、東京大学(東京都・文京区)、2014.9.27

大沼みお、藤原崇之、井元祐太、廣岡俊亮、黒岩晴子、三角修己、黒岩常祥、「シゾンの形質転換系を用いた高温耐性遺伝子過剰発現の効果」、日本植物学会第78回大会、明治大学(神奈川県 川崎市)、2014.9.12

黒岩晴子、大沼みお、三角修己、井元祐太、黒岩常祥、「藻類におけるバイオエネルギー生産に関わる機能を向上させる培地の探索」、日本植物学会第78回大会、明治大学(神奈川県 川崎市)、2014.9.12

黒岩常祥、大沼みお、三角修己、井元祐太、黒岩晴子、「バイオ燃料産生におけるオルガネラの役割」、日本植物学会第78回大会、明治大学(神奈川県 川崎市)、2014.9.12

井元祐太、黒岩晴子、大沼みお、藤木幸夫、黒岩常祥、「ポストゲノミクスを基盤としたペルオキシソーム分裂装置の構造と機能解析」、日本植物学会第78回大会、明治大学(神奈川県 川崎市)、2014.9.12

井元祐太、黒岩晴子、吉田大和、大沼みお、藤原崇之、吉田昌樹、西田敬二、八木沢英美、廣岡俊亮、宮城島進也、三角修己、河野重行、黒岩常祥、「単膜系オルガネラ分裂リングの同定 - ゲノム科学を基盤としたペルオキシソーム分裂装置(POD machinery)の微細構造と分子機構の解析」、第66回日本細胞生物学会大会、東大寺総合文化センター(奈良県

奈良市) 2014.6.11

黒岩常祥、「20億年前に誕生した細胞からあなたまで、そして未来へ」、日本学士院第六十回公開講演会、山梨県立図書館 (山梨県 甲府市) 2014.5.24

〔図書〕(計 6件)

Kuroiwa, T. and Miyakawa, I., Mechanisms of division and inheritance of mitochondria and chloroplasts. In Atlas of Plant Cell Structure, Springer, 202(26-27), 2014
Yoshida, Y., Kuroiwa, H. and Kuroiwa, T., Chloroplasts divide by contraction of a bundle of polyglucan nanofilaments. In Atlas of Plant Cell Structure, Springer, 202(48-49), 2014
Kuroiwa, H. and Kuroiwa, T., Chloroplast division machinery in *Pelargonium zonale* Ait. In Atlas of Plant Cell Structure, Springer, 202 (66-67) 2014

Kuroiwa, H. and Kuroiwa, T., Production of oil bodies in response to nitrogen starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. In Atlas of Plant Cell Structure, Springer, 202 (104-105), 2014

Kuroiwa, H. and Kuroiwa, T., Egg cells with giant mitochondria in higher plant, *Pelargonium zonale* Ait. In Atlas of Plant Cell Structure, Springer, 202 (180-181), 2014

Kuroiwa, H. and Kuroiwa, T., Zygote and sperm cells during early embryogenesis in higher plant, *Pelargonium zonale* Ait. In Atlas of Plant Cell Structure, Springer, 202 (182-183), 2014

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒岩 常祥 (Kuroiwa, Tsuneyoshi)
立教大学・理学部・特定課題研究員
研究者番号：50033353

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：