

論文の内容の要旨

Origin of Organelles in the View of Their Division — Studies on *ftsZ* Genes Involved in Organelle Division —

（ 分裂から見たオルガネラの起源 — オルガネラ分裂に関わる *ftsZ* 遺伝子の解析 — ）

氏名 高原 学

序

ミトコンドリアと色素体は、それぞれ細胞内呼吸や光合成という、生命に欠かせない機能を担う重要な細胞内小器官である。しかし、それらが細胞内で分裂・増殖するメカニズムには、まだ未解明の部分が多い。これまでに、これらのオルガネラの分裂にはそれぞれの分裂リングが重要な役割を果たしていることが形態学的に明らかにされてきた。色素体の分裂は、色素体包膜の内外に多重のリング状構造を形成する色素体分裂リングによって制御され(Mita *et al.* 1986, Hashimoto 1986), 原始的な藻類から高等植物まで見られる普遍的な分裂装置と考えられている。またミトコンドリアの分裂においても同様の構造をとるミトコンドリア分裂リングが存在する(Kuroiwa *et al.* 1993)。しかし、それらの構成成分やオルガネラ分裂の分子機構についてはまだほとんど明らかではない。

ミトコンドリアと色素体は、それぞれ α プロテオ細菌と藍色細菌が原始真核細胞へ細胞内共生することにより誕生した。これらのオルガネラの祖先となった原核生物では*ftsZ*を始めとする多数の細胞分裂遺伝子が細胞の分裂に関わっている。なかでも*ftsZ*は分裂面にリング状構造を形成し(Bi & Lutkenhaus 1991), 原核生物に普遍的に存在する最も基本的な分裂遺伝子と考えられている。近年、*ftsZ*が真核生物の葉緑体の分裂にも関与することが知られてきた(Osteryoung & Vierling 1995, Strepp *et al.* 1998)。細菌の分裂に中心的な役割を果たす*ftsZ*のオルガネラでの機能を知ることは、オルガネラ分裂機構の解明とともに、細胞内共生した細菌がオルガネラ化する過程の解明にもつながると考えられる。

本研究では、分裂装置が明瞭で、体制が単純であり、また原始的と考えられている単細胞原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* を研究材料に用い、*ftsZ* 遺伝子を単離し解析を行った。博士課程ではまず色素体型 *ftsZ* 遺伝子 (*CmftsZ2*) を新たに単離した。*CmFtsZ2* は葉緑体の分裂期特異的に発現しており、葉緑体内部に局在が見られたが、免疫電顕法では色素体分裂リングへの局在は見られなかった。さらに、従来存在しないと考えられていたミトコンドリア型 *ftsZ* 遺伝子 (*CmftsZ1*) を *C. merolae* から発見した。*CmFtsZ1* も分裂期特異的に発現しており、ミトコンドリアへの局在が示

唆された。

結果と考察

1. 単細胞原始紅藻*C. merolae*からの色素体型*ftsZ*遺伝子(*CmftsZ2*)の単離

修士課程において*C. merolae*から単離した*ftsZ*遺伝子(*CmftsZ1*)は、分子系統解析などから藍色細菌や他の植物の*ftsZ*と近縁な色素体型の*ftsZ*遺伝子とは別タイプのもので推定された。*C. merolae*を用いて色素体分裂と*ftsZ*の関係を解析するため、博士課程においてはまず*C. merolae*から色素体型*ftsZ*の単離を試み、PCR法を用いて*C. merolae*から*CmftsZ1*とは異なる新規の*ftsZ*遺伝子(*CmftsZ2*)の単離に成功した。

*CmftsZ2*は503残基からなる遺伝子産物(*CmFtsZ2*)をコードしていた。分子系統解析から、*CmFtsZ2*は藍色細菌や植物・藻類の*FtsZ*と同じグループに属し、*CmFtsZ2*が確かに色素体型であることが示された(図1)。またそのN末領域は葉緑体移行シグナルに特徴的な性質を備え、*CmFtsZ2*が色素体に局在する可能性が示唆された。

*CmftsZ2*をプローブにゲノミックサザンプロットを行ったところ、*CmftsZ2*は*CmftsZ1*と同様、*C. merolae*のゲノム中に1コピー存在することが示された。

2. *CmftsZ2*の発現の分裂周期中での時期特異性の解析

大腸菌では、*FtsZ*蛋白質は細胞分裂周期を通じて存在し、分裂期特異的に分裂面に局在・重合することにより分裂をコントロールしていると考えられている。真核生物での*ftsZ*の発現調節を明らかにし、発現パターンと色素体分裂の関係を解明するため、まず*CmftsZ2*の発現変化を解析した。

*C. merolae*は12時間明暗周期により、細胞とオルガネラの分裂を同調化できる。この同調培養系を用いて経時的なノーザンプロットを行ったところ、*CmftsZ2*の転写産物の蓄積が分裂期直前で特異的に見られることが明らかになった(図2)。

この発現の時期特異性を蛋白質レベルで検証するため、*CmFtsZ2*に対する抗体を作製した。*CmFtsZ2*のC末側195アミノ酸に6×Hisタグを融合させた融合蛋白質を大腸菌を用いて発現させ、精製の後マウスに免疫した。得られた抗血清を用いてウェスタンプロットを行ったところ、確かに抗原に用いた融合蛋白質に反応し、また*C. merolae*の全蛋白質に対しては約60 kDaのシングルバンドが検出された(図3)。

*C. merolae*の同調培養系を用いて*CmFtsZ2*蛋白質量の経時的変化をウェスタンプロットで調べたところ、分裂が同調して起こる暗期の初期において*CmFtsZ2*蛋白質量が時期特異的に増加することが明らかになった(図2)。これらの結果から、*CmFtsZ2*は色素体の分裂期に時期特異的に発現し、また転写レベルでの発現調節を受けていることが示唆された。また、*CmFtsZ2*は分裂終了後、速やかな分解を受けることも示唆された。

3. *CmFtsZ2*蛋白質の*C. merolae*細胞内での局在

*C. merolae*の分裂期と間期の単離葉緑体に対してウェスタンプロットを行ったところ、抗*CmFtsZ2*抗体のシグナルは分裂期の葉緑体にのみ強く反応した(図4)。さらに、抗*CmFtsZ2*抗体を用いて免疫電顕法を行った結果、金コロイドの粒子は*C. merolae*の葉緑体中に特異的に見られた(図5)。これらの結果から*CmFtsZ2*は確かに葉緑体内部に局在することが示された。しかし、色素体分裂リング上への局在は見られず、むしろチラコイド膜領域に金コロイドの粒子の多くが局在

していた。この結果からCmFtsZ2は色素体分裂リングの主成分ではない可能性が高いと推察された。

4. 新規のミトコンドリア型ftsZ遺伝子の発見とその解析

*C. merolae*から最初に単離したftsZ遺伝子(CmftsZ1)は、分子系統解析の結果、*Agrobacterium*など、ミトコンドリアの祖先と考えられている α プロテオ細菌と同じグループに属することがわかった。このことから、CmftsZ1は従来存在しないと考えられていたミトコンドリア由来のftsZ遺伝子であることが示唆された。

このCmftsZ1について、発現の経時的変化を解析したところ、CmftsZ2と同様、転写産物の蓄積が分裂期直前で特異的に見られることが明らかになった(図7)。

さらにCmFtsZ1に特異的に反応する抗体をCmFtsZ2と同様に作製した(図6)。この抗体を用い、CmFtsZ1蛋白質の経時的変化をウェスタンブロットで調べたところ、分裂が同調して起こる暗期の初期においてCmFtsZ1蛋白質が時期特異的に増加することが明らかになった(図7)。これらの結果から、CmFtsZ1もCmFtsZ2同様、分裂期に時期特異的に発現し、また転写レベルでの発現調節を受けていると考えられる。

単離葉緑体を用いたウェスタンブロットでは、抗CmFtsZ2抗体のシグナルが分裂期の葉緑体のみ強く反応したのに対し、抗CmFtsZ1抗体の反応は葉緑体には見られず、葉緑体単離の際の別のミトコンドリアを含む粗画分に反応が見られ、CmFtsZ2とは局在の面で異なる挙動を示すことがわかった(図8)。また、*C. merolae*全蛋白質に対する抗CmFtsZ1抗体を用いたウェスタンブロットでは、推定分子量43kDaより小さい約36kDaのバンドが検出された。このサイズはCmFtsZ1蛋白質のN末領域を除いて強制発現させた際の産物のサイズ(約35kDa)とほぼ一致し(図6)、細胞内でCmFtsZ1のN末領域が切断されている、つまりN末領域がシグナルペプチドであることが示唆された。さらにCmFtsZ1のN末領域はミトコンドリア移行シグナルに特徴的な性質を備えていた。以上の結果を総合して、CmFtsZ1はミトコンドリアに局在する可能性が高いと考えられる。

まとめ

本研究から以下のようなことが明らかになった。

1. 単細胞原始紅藻*C. merolae*から色素体型ftsZ遺伝子(CmftsZ2)を新たに単離し、*C. merolae*が色素体型・ミトコンドリア型両タイプのftsZ遺伝子を併せ持つことを見いだした。
2. CmftsZ2が色素体の分裂期特異的に発現することを明らかにした。
3. CmFtsZ2が色素体内部に局在することを明らかにしたが、色素体分裂リングへの局在は見られなかった。
4. 新規のミトコンドリア型ftsZ遺伝子(CmftsZ1)を*C. merolae*で見いだした。CmftsZ1もオルガネラの分裂期特異的に発現することを明らかにした。またCmFtsZ1はミトコンドリアに局在することが示唆された。

発現の時期特異性から、ftsZがオルガネラ分裂に関与していることが強く示唆されたが、分裂リングへの局在は見られなかった。このことから、ftsZの機能はオルガネラ化の過程で宿主細胞によって大きく変えられていったことが推測される。このような分裂機構の大きな変化はオルガネラ遺伝子の細胞核への大量移行などとともに、宿主細胞によるオルガネラのコントロールに大きな役割を果たしたのではないかと考えられる。

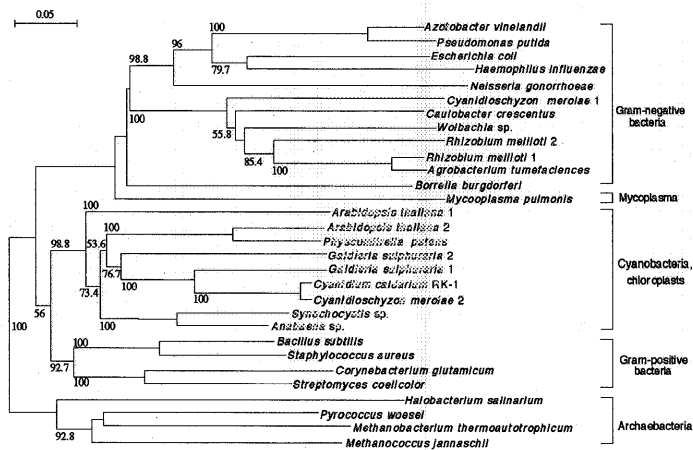


図1 シアニジウム類と既知のFtsZによる分子系統樹

各生物のFtsZの配列の中から保存性の高い中央部約300アミノ酸を用い、近隣結合法で作製した。数字は1000回試行の際のブートストラップ値(%、50%以上のみ)を、バーの長さは遺伝的距離を示す。*C. merolae*の2つのFtsZを赤文字で示した。またαプロテオ細菌を青文字で、藍色細菌と植物・藻類のFtsZを緑文字で示した。

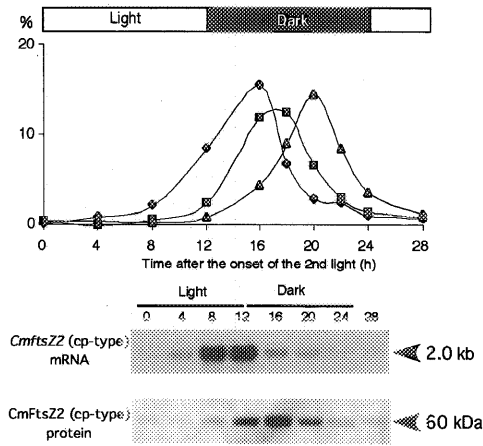


図2 CmftsZ2の転写産物量と蛋白質量の経時的変化

グラフは*C. merolae*の同調培養系の第2周期の各細胞の頻度を示す。◇は横伸長した葉緑体を持つ細胞、■はくびれている葉緑体を持つ細胞、▲は分裂が完了した葉緑体を持つ細胞を示す。この同調培養系から4時間おきに細胞を回収、RNAを抽出して5 μgずつを泳動し、*CmftsZ2*のORF全長をプローブにノーザンブロットを行った(上段)。また、同じ同調培養系から4時間おきに細胞を回収、蛋白質を抽出して50 μgずつを泳動し、抗*CmftsZ2*抗体を用いてウェスタンブロットを行った(下段)。

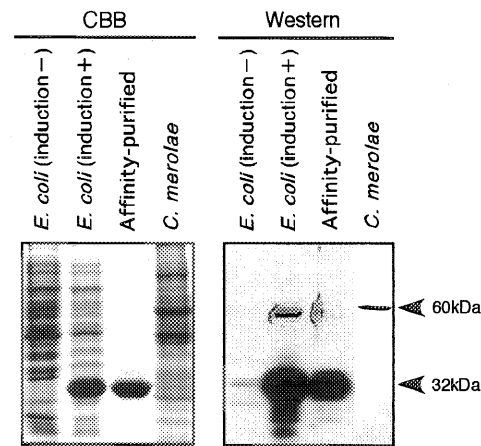


図3 CmFtsZ2の強制発現と抗CmFtsZ2抗体の作製

CmFtsZ2 (503アミノ酸)のC末側195アミノ酸に6×Hisタグを融合させた融合蛋白質を大腸菌を用いて発現させたところ、約32 kDaの蛋白質の発現が見られた。これを精製の後マウスに免疫し、得られた血清を用いてウェスタンブロットを行ったところ、抗原に用いた融合蛋白質に反応した。また*C. merolae*の全蛋白質に対しては約60 kDaのシングルバンドが検出された。

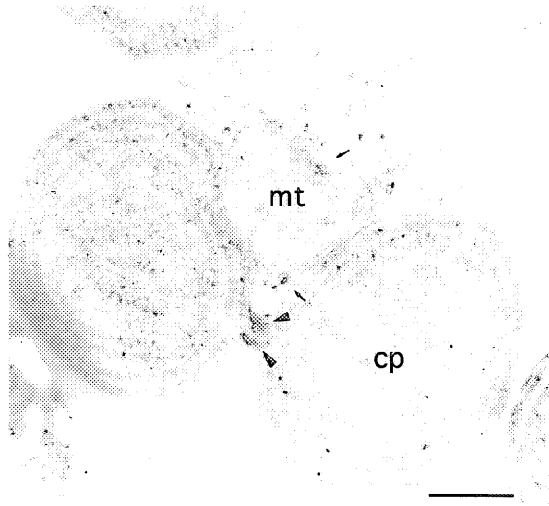


図5 *C. merolae*細胞への抗CmFtsZ2抗体を用いた免疫電顕

*C. merolae*細胞を1% GAで固定、LR White樹脂に包埋後、切片を作製し、抗CmFtsZ2抗体を用いて免疫電顕法を行った。ここでは分裂中の細胞の像を示す。矢頭は染色体分裂リング、矢印はミトコンドリア分裂リングを示す。またmtはミトコンドリア、cpは葉緑体を示す。バーは500nm。金コロイドの粒子は葉緑体内部のチラコイド膜上に多く観察された。

isolated chloroplasts

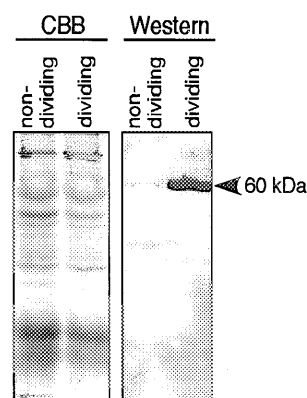


図4 単離した*C. merolae*の色素体に対する抗CmFtsZ2抗体のウェスタンブロット

分裂期と間期の単離した*C. merolae*葉緑体から蛋白質を抽出、50 μgずつを泳動して抗CmFtsZ2抗体でウェスタンブロットを行った。

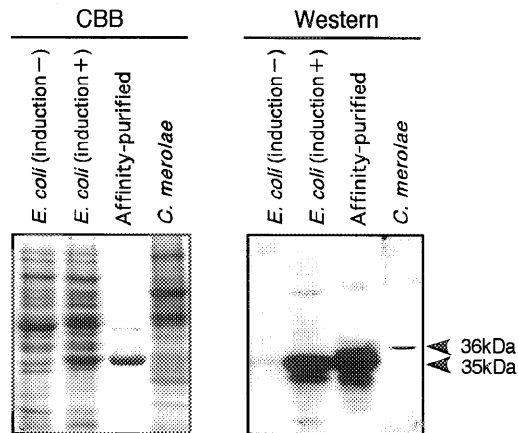


図6 CmFtsZ1の強制発現と抗CmFtsZ1抗体の作製

CmFtsZ1 (409アミノ酸)のN末を除いた307アミノ酸に6×Hisタグを融合させた融合蛋白質を大腸菌を用いて発現させたところ、予想通り約35 kDaの蛋白質の発現が見られた。これを精製の後マウスに免疫し、得られた血清を用いてウェスタンブロットを行ったところ、確かに抗原に用いた融合蛋白質に反応した。また*C. merolae*の全蛋白質に対しては約36 kDaのシングルバンドが検出された。

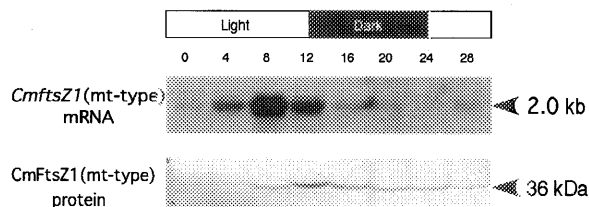


図7 CmftsZ1の転写産物量と蛋白質量の経時的発現変化

図2と同じ同調培養系を用い、*CmftsZ1*のORF全長をプローブにノーザンブロットを行った(上段)。また、同じ同調培養系を用い、抗CmFtsZ1抗体を用いてウェスタンブロットを行った(下段)。

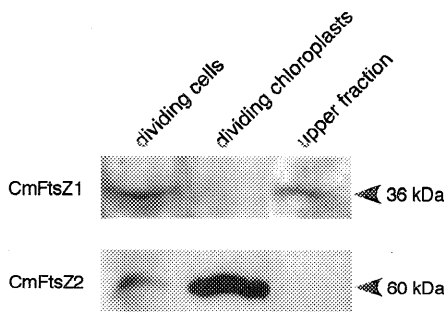


図8 単離した*C. merolae*の色素体に対する抗CmFtsZ1抗体のウェスタンブロット

分裂期の*C. merolae*細胞と単離葉緑体から蛋白質を抽出し、50 μgずつを泳動して抗CmFtsZ1抗体と抗CmFtsZ2抗体でウェスタンブロットを行った。*CmFtsZ2*は分裂期の単離葉緑体に強く反応し、葉緑体に局在することが示された。一方、*CmFtsZ1*は単離葉緑体には反応せず、単離葉緑体より上方のミトコンドリアを含む粗画分に反応した。