

## 論文の内容の要旨

論文題目：細胞質遺伝の機構 — 1細胞から解析された母性遺伝—  
(Mechanism of cytoplasmic inheritance –Single Cell Analysis of Maternal Inheritance–)

氏名：西村芳樹

### 序

葉緑体やミトコンドリア遺伝子の非メンデル遺伝は、ヒトを含む多くの真核生物に共通する現象である (Kuroiwa, 1991; Gillham, 1994)。従来この現象は、雄配偶子の細胞質が卵に比べて非常に少ないことに基づく物理的排除説によって説明されてきた。しかし雌雄同形の配偶子が接合を行うクラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*: 図 1)に於いて、母性遺伝現象が起こることが遺伝学的に示され (Sager 1954)、さらにその機構として、接合後 24 時間後に雄葉緑体 DNA が雌に比べて減少することが生化学的実験によって示唆されたことから (Sager and Lane 1972)、雌雄の配偶子の大きさによらない積極的な細胞質遺伝機構の存在が提唱されてきた。

クラミドモナスの葉緑体 DNA は、DNA 特異的蛍光色素 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) で染色することにより、葉緑体核様体 (DNA-蛋白質複合体) として視覚化することが出来る。1982 年、黒岩らはこの方法を用いて、雌雄の葉緑体核様体のうち雄側が接合後わずか 40 分ほどで見えなくなるという現象を発見した。しかし、雄の葉緑体 DNA が減少もしくは消失するタイミングについて、細胞学的観察結果(接合 40 分後)と生化学的分析結果(接合 24 時間後)の間には大幅な時間的ずれがあった。

生化学的な実験には、対象を集団として扱うという問題点がある。そのため得られる結果は集団の平均値に過ぎず、個々の細胞について解析することは出来なかった。また、細胞学的観察では、個々の細胞の挙動を明らかに出来ても詳細な分子解析は行えず、そのため雄葉緑体の消失が能動的な分解 (Kuroiwa *et al.*, 1982) と DNA の拡散 (Harris, 1984) の何れによるものなのかをはっきりさせることが出来なかった。

こうした両者の問題点を乗り越え、細胞質遺伝現象を個々の細胞から分子レベルで解き明かすためには、狙った 1 個の細胞を回収して分子解析する、いわば「観察」→「回収」→「解析」という図式に示されるような全く新しい研究手法の確立が必須である。

本研究では、まず現象を連続的に観察し、さらに固定などの処理をせずに分子解析をおこなっていくため、生体染色法の開発に取り組み、生きた細胞での葉緑体及びミトコンドリア DNA の挙動を明らかにした (Nishimura *et al.*, 1998)。次に、観察した 1 個の接合子を試験管に回収して分子解析する手法を開発し、雄葉緑体核様体の消失が雄葉緑体 DNA の急激な分解によることの証明に成功した (Nishimura *et al.*, 1999)。さらに、雄葉緑体 DNA 分解の機構を解析するため、非変性条件でのヌクレアーゼ検出法を用いて母性遺伝に関わり得るヌクレアーゼを探索し、葉緑体母性遺伝に寄与する可能性の高い雌特異的なヌクレアーゼを同定することに成功した。

### 結果と考察

#### 1. 観察

##### 1-1. 細胞質 DNA の生体染色法

DNA 特異的蛍光色素 SYBR Green I を用いることで、生きた細胞において形や輝度の異なる大小 2 種の細胞質 DNA 核様体を観察に成功した (図 2)。そしてミトコンドリア膜特異的蛍光色素 DiOC<sub>6</sub> との 2 重染色、及び顕微測光装置による細胞質輝点の輝度定量を行うことにより、ミトコンドリア膜内に局在する 1 細胞当たり 50-100 個の小球状輝点が、これまで観察されてこなかったミトコンドリア核様体であることが確かめられた (図 3)。

## I-2. 生きた接合子における葉緑体核様体とミトコンドリア核様体の挙動

この SYBR Green I 染色法を用い、まず雄葉緑体核様体の消失過程を生きた接合子で観察した。接合直後、雌雄の葉緑体にはほぼ同数の葉緑体核様体があった。しかし接合後 40 分すると、雄側だけが萎縮し始め、その 10 分後には完全に消失した。一方ミトコンドリア核様体は、雄葉緑体核様体消失の後にも常に両性的に保存されていた。以上の観察より、*C.reinhardtii* において葉緑体とミトコンドリアの遺伝は互いに全く独立した機構によって制御されており、葉緑体 DNA が母性遺伝するのに対して、これまで異種間交雑の実験から父性遺伝すると推定されてきたミトコンドリア DNA は、両性遺伝することが強く示唆された(図 4)。

## II. 回収と解析

### II-1. 雄葉緑体 DNA のトランスフォーメーションによる分子標識

雄葉緑体核様体が消失していく間の葉緑体 DNA の変化を明らかにするには、まず接合子の雌雄の葉緑体 DNA を分子レベルで識別する必要がある。そこで用いたのが葉緑体形質転換株 *L03c* である。この株は葉緑体 DNA 中に大腸菌由来の *aadA* 遺伝子を保持しており、これを野生株と掛け合わせれば、接合子の雌雄葉緑体 DNA のうち片方のみを *aadA* で標識することが出来る。形質転換株と野生株の交配に於いて、雄葉緑体核様体の消失は野生株と同様に観察された (図 6)。

#### II-1. 「光ピンセット・遺伝子解析法」

次に問題となったのは、顕微鏡で観察した接合子を、いかにして試験管に回収するかであった。そこで導入したのが、光ピンセットレーザー顕微鏡 (図 7) である。この装置は、顕微鏡で観察した生の細胞や細胞内小器官を、マイクロ赤外線レーザーによって非接触的に捕捉し、動かすことが出来る。試行錯誤の末、この装置とガラスチャンバーとを組み合わせることで、顕微鏡で狙った 1 細胞をそのまま試験管に回収することに成功した。こうして回収した配偶子に対し、nested-PCR 法によって葉緑体の *rbcL* 遺伝子、ミトコンドリア *coxI* 遺伝子、さらに標識に用いた *aadA* 遺伝子の検出を試みた。その結果、僅か 1 個の細胞からでも全ての遺伝子が明瞭に検出できることが解った (図 8)。

### II-3. 1 個の接合子から明らかにされた雄葉緑体 DNA の分解

「光ピンセット・遺伝子解析法」を用い、細胞集団の中から雄の葉緑体核様体が観察される接合子、されない接合子を狙い、それぞれ 1 個ずつ試験管に回収して、nested-PCR 法による分子解析を行った。

雌葉緑体 DNA を *aadA* で標識した接合子では、雄葉緑体核様体の有無に関わらず *aadA* が明瞭に検出された。これに対し、雄側を標識した接合子では、雄葉緑体核様体の消失と共に *aadA* が全く検出されなくなることが解った (図 9)。このことから、雄葉緑体核様体の消失と共に、雄の葉緑体 DNA は急激に分解され、葉緑体の母性遺伝を決定付けていることが明らかになった。

## III. 葉緑体の分解を担うヌクレアーゼの探索

次に雄の葉緑体 DNA 分解の機構を解明するため、接合前後に於けるヌクレアーゼ活性の変化をゲル内アッセイ法により解析した (図 10)。しかし従来のゲル内アッセイ法は、ヌクレアーゼの SDS による変性と再生を行う必要があり、生体内における活性を正確に解析出来ない可能性があった。そこで非変性条件でのゲル内アッセイ法による再検討を図った結果、2 本のバンド (140kD, 190kD) からなる雌特異的な  $Ca^{2+}$  依存性ヌクレアーゼが初めて同定された (図 11)。このヌクレアーゼは配偶子誘導と共に活性化され、接合子が成熟するにつれて不活性化された。ヌクレアーゼが通常担うとされている機能 (修復、組替え等) からは、こうした挙動を説明することは出来ず、このヌクレアーゼと母性遺伝との関わりが濃厚に示唆された。ヌクレアーゼの不活性化の機構は現在のところ不明であるが、ピレノイドの観察から示唆されたような接合時期に於ける雄の葉緑体特異的な蛋白質の分解系が、この不活性化に関わっている可能性があるとして現在考えられている。

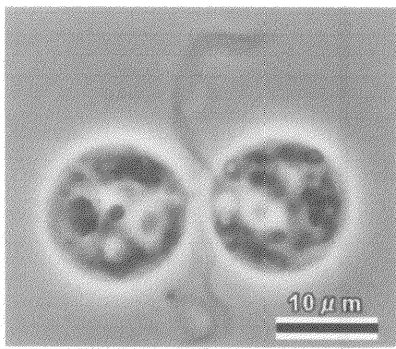


図1. 単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) の接合

雌(左)と雄(右)の配偶子は鞭毛で互いを認識しあって一対のペアを形成し、雌の形成する接合管を介して2核の接合子となる。雌雄の配偶子は等量の細胞質DNAを持っているにも関わらず、細胞質DNAは非メンデル遺伝する。

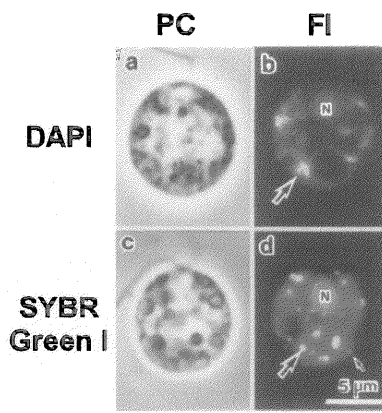


図2. 細胞質DNAの生体染色法の開発

DAPI (a,b)及びSYBR Green I (c,d) 染色した配偶子の位相差像(PC)と蛍光像(FI)。DAPI染色(b)では葉緑体核様体のみが観察されるのに対し、SYBR Green I (d)では、形状の異なる2種の細胞質核様体 (大・小矢印) が生きた細胞で可視化される。

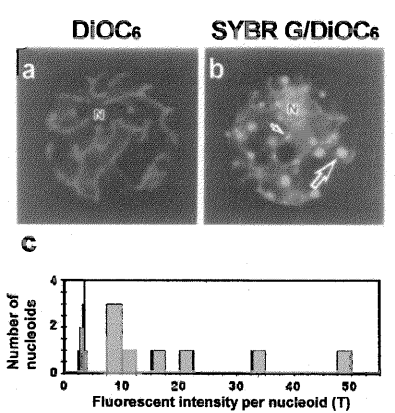


図3. 初めて可視化されたミトコンドリア核様体

生きた配偶子のDiOC<sub>6</sub>染色(a)及びDiOC<sub>6</sub>、SYBR G二重染色像(b)。ミトコンドリア核様体は、DiOC<sub>6</sub>によって染色されたミトコンドリア内の輝点として(小矢印)、葉緑体核様体はミトコンドリア外の輝点(大矢印)として可視化される。それぞれの輝度をヒストグラムにすると(c)、ミトコンドリア核様体(黒)と葉緑体核様体(青)は大小明瞭に異なる分布を示す。

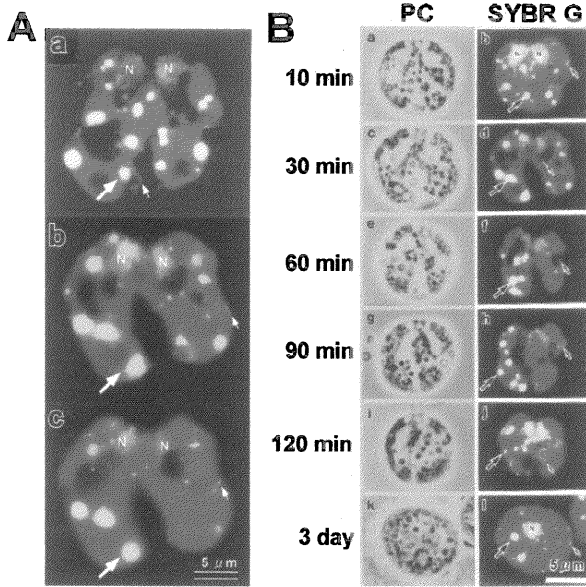


図4. 生きた接合子における葉緑体及びミトコンドリア核様体の継時的観察

A. 接合直後、雌雄の葉緑体にはほぼ同数の葉緑体核様体(大矢印)が観察されるが(Aa)、接合40分すると、雄側が同時に萎縮し始め(Ab)、10分で完全に消失する(Ac)。Ab,Acは同一の接合子。

B. 生きた接合子を継時的に観察した位相差像(PC)及びSYBR Green I染色像(SYBR G)。雄葉緑体核様体消失後(Be,f)、雌雄の葉緑体は融合し(Bg,h)、さらに細胞核が融合して(Bi,j)、接合胞子へと成熟していくが(Bk,l)。その全過程においてミトコンドリア核様体(小矢印)は両性的に保存された。

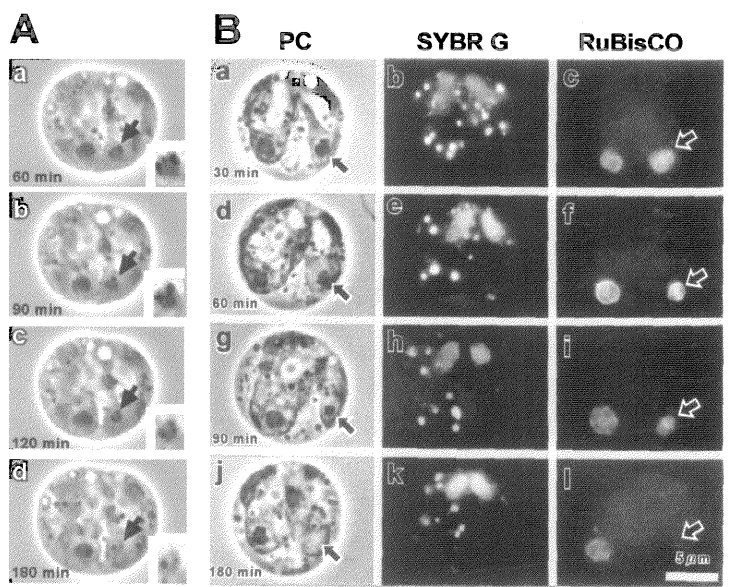


図5. 生きた接合子におけるピレノイドの継時的観察

A. 接合直後は雌雄同形のピレノイドが観察されるが(Aa)、接合後90分すると、しだいに雄側が萎縮し始め(Ab)、3時間後には完全に観察できなくなる(Ad)。枠内は雄ピレノイドの拡大像。

B. 接合子の位相差像(PC)、SYBR Green I染色像(SYBR G)、及び抗RuBisCO(LS)抗体による間接蛍光抗体像(RuBisCO)。位相差像とSYBR Green I像は同視野。雄葉緑体核様体の消失後(Be), 位相差で観察された雄ピレノイドの萎縮(Bd,g)と共にRuBisCOのシグナルも微弱になり、観察されなくなっていく(Bf,i,l)。

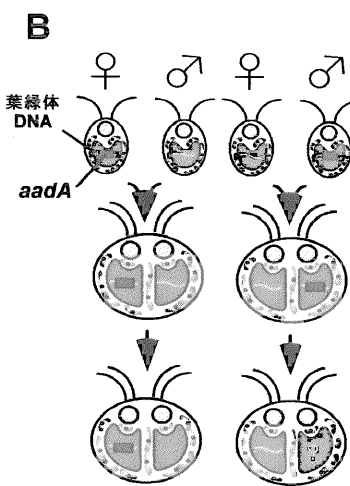
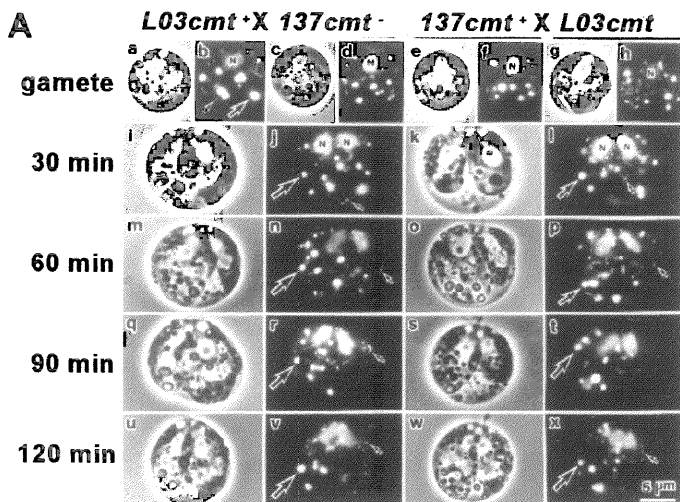


図6. 葉緑体形質転換体(L03c)による雌雄葉緑体DNA標識法の開発

A. 葉緑体形質転換株(L03c)と野生株(137c)を掛け合わせた接合子の位相差像(a,c,e,g,i,k,m,o,q,s,u,w) SYBR Green I染色像(b,d,f,h,j,l,n,p,r,t,v,x)。それぞれ葉緑体核様体を大矢印、ミトコンドリア核様体を小矢印で示す。L03c株を雌雄何れに用いて掛けあわせを行っても、雄葉緑体核様体の消失は野生株と同様に起き(r,t)、ミトコンドリア核様体は両性的に保存された(v,x)。

B. 実験の概念図。葉緑体DNAに外来配列aadA遺伝子を挿入された形質転換株(L03c)と野生株(137c)を掛け合わせることで、接合子の持つ2種の葉緑体DNAのうち、片方のみをaadA配列により標識することができる。

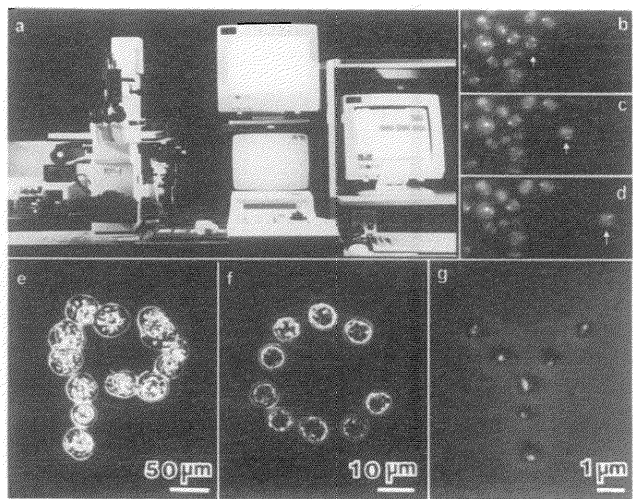


図7. 光ピンセット装置

赤外線マイクロレーザーを搭載した光ピンセット装置の概観(a)。この装置により、顕微鏡で狙った1細胞(オルガネラ)を生のまま無傷で操作することが出来る(b-d:矢印)。実際に光ピンセットで操作したBY-2タバコプロトプラスト(e)、クラミドモナス(f)、粘菌ミトコンドリア(g)。

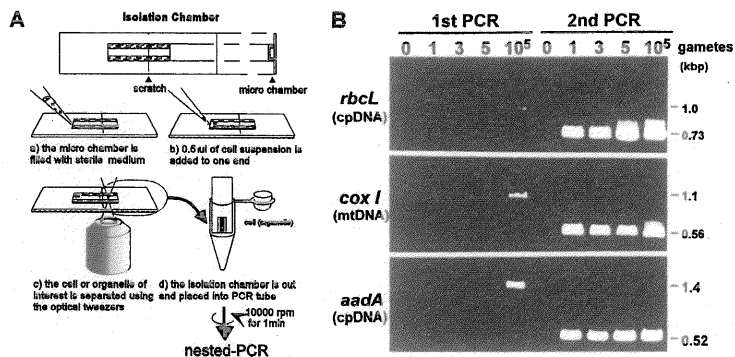


図8. 細胞1個からの遺伝子解析法

A. 光ピンセットによる1細胞顕微回収法の模式図。ガラスマイクロチャンパーに折り線をつけたIsolation Chamber(内部サイズ 9(L) X 1(W) X 0.1(D) mm)を用いて回収を行う。この方法は、1葉緑体、ミトコンドリアに対しても応用可能であり、個々の細胞だけでなく、ミトコンドリアや葉緑体の持つ個性を分子レベルで明らかにしうる手法である。

B. 光ピンセットにより回収した1配偶子細胞からnested-PCR法により *rbclL* (葉緑体DNA)、*cox I* (ミトコンドリアDNA)、*aadA* (標識DNA) 遺伝子の増幅を行った結果。2回目のPCRを行うと、わずか1細胞から全ての遺伝子が明瞭に検出された。

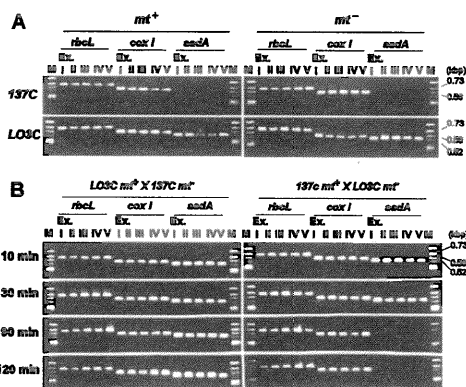


図9. 1接合子から検出された雄葉緑体DNAの分解

1つの配偶子(A)と接合子(B)から *rbclL*, *cox I*, *aadA* 遺伝子を検出した結果。再現性を確かめるために各実験は5回ずつ行った(I-V)。雌葉緑体DNAを *aadA* で標識した場合、*aadA* 遺伝子は接合後常に明瞭に検出されるのに対し、雄葉緑体DNAを標識しておく、接合直後は検出された *aadA* 遺伝子が、雄葉緑体核様体消失と共に(90,120 min)、全く増幅されなくなった。この結果は、核様体の消失と共に葉緑体DNA分子が完全に分解されることを示している。

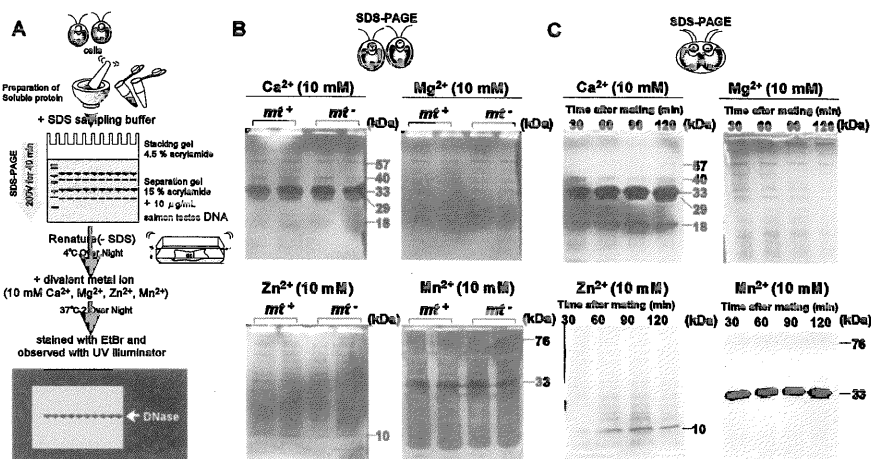


図10. SDS-PAGE/ゲル内アッセイ法によるヌクレアーゼ活性の解析結果

A. SDS-PAGE/ゲル内アッセイ法の模式図。

B. SDS-PAGE/ゲル内アッセイ法により解析したクラミドモナス配偶子(B)と接合子(C)のヌクレアーゼ活性の変化。Ca<sup>2+</sup>(33,29,18 kDa)、Mn<sup>2+</sup>(33kDa)依存性のヌクレアーゼ活性が特に強く検出された。しかし、雌雄の配偶子、あるいは接合子の成熟段階におけるヌクレアーゼ活性の変化は検出されなかった。

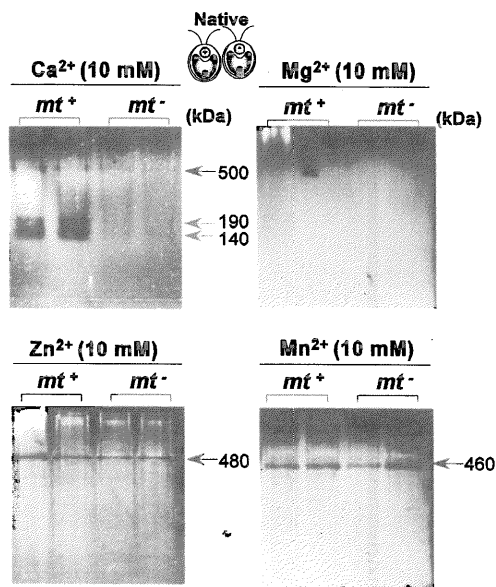


図11. Native-PAGE/ゲル内アッセイ法の開発と雌特異的ヌクレアーゼ活性の発見

Ca<sup>2+</sup>(500, 190, 140 kDa)、Zn<sup>2+</sup>(48- kDa)、Mn<sup>2+</sup>(460 kDa)依存性のヌクレアーゼ活性が其々検出されたが、中でもCa<sup>2+</sup>依存性の190, 140 kDaヌクレアーゼの活性は雌からしか検出されなかった。

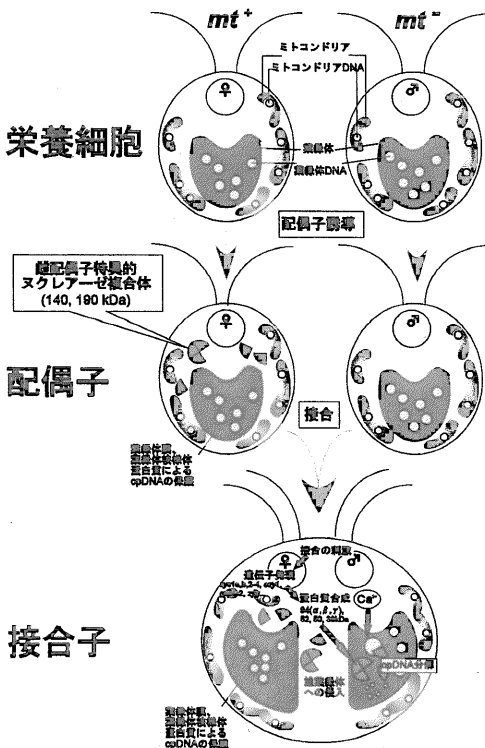


図12. クラミドモナスにおける細胞質遺伝機構のモデル

栄養細胞から配偶子へと分化していく過程で、雌配偶子はヌクレアーゼと自身の葉緑体DNA保護機構(Ogawa *et al.*, 1985)とを備える。雌雄の配偶子が接合すると、細胞質を介して雌特異的ヌクレアーゼが未保護の雄葉緑体DNAに侵入し、雄の葉緑体DNA分子を、開始からわずか10分ほどで完全に分解する(Kuroiwa *et al.*, 1982, Nishimura *et al.*, 1999)。これまでに報告された接合子特異的に発現する遺伝子群(*zys1a,b,2-4* (Uchida *et al.*, 1993), *ezyl1* (Armbrust *et al.*, 1993) *etc.*)が<sup>3</sup>、ヌクレアーゼの活性化もしくは雄葉緑体への侵入促進の役割を担っている可能性がある。また、雌特異的ヌクレアーゼはCa<sup>2+</sup>依存性であることから、これらの遺伝子発現により、雄葉緑体へのCa<sup>2+</sup>の流入の促進に関わっている可能性も考えられる。一方、ミトコンドリアに対してはこのヌクレアーゼは侵入することが出来ないため、ミトコンドリアDNAは両性的に保護される(Nishimura *et al.*, 1998)。