

論文内容の要旨

論文題目 Molecular cytological studies on *Chlamydomonas reinhardtii* mutant *moc*, which is defective in the dispersion and segregation of chloroplast nucleoids.

(葉緑体核の分散と分配に関わる *Chlamydomonas reinhardtii* 変異株 *moc* の分子細胞学的解析)

氏名 三角 修己

序

葉緑体は植物に必須な独自のゲノムを含んだオルガネラであることから、その形態形成や光エネルギー変換機構と葉緑体の遺伝子発現制御との関連について多くの研究が行われてきた。しかしながら、葉緑体が分裂増殖し、機能を果たすために最も基本的かつ重要である葉緑体 DNA の分配機構や、分化に伴う DNA の分散機構、葉緑体 DNA の高次組織化などに関する研究はきわめて少ない。

葉緑体 DNA は生体内ではタンパク質との高次複合体(葉緑体核)を形成し、その数・大きさ・形態・分布の様式は、生物の系統発生と密接に関係、葉緑体の発達と増殖と共に起きる葉緑体核の均等分配と分散は、藻類から高等植物まで植物細胞で普遍的に見られる現象である(Kuroiwa *et al.*, 1981, Kuroiwa, 1991 Coleman, 1985)。しかし、その分子機構に関してはほとんどわかっていない。

このような葉緑体 DNA の分配や分散の機構を解明するためには、細胞核の形質転換法が確立し(Kindle, 1990)、遺伝学的、分子生物学的、生化学的な解析が可能な単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* が優れた材料になると考えられた。本研究では、*C. reinhardtii* を用い、遺伝子タギング法により突然変異体を多数作製して、その中から葉緑体核の分散及び分配に関する突然変異株 *moc* (monokaryotic chloroplast)を単離し、分子細胞学的なキャラクタライゼーションと生理学的性質を調べ、タギングにより機能しなくなったと考えられる遺伝子の単離を試みた。

結果と考察

1. 遺伝子タギング法による葉緑体核に関する突然変異体の単離

C. reinhardtii の硝酸還元酵素遺伝子(*NIT1*)を硝酸還元酵素欠失株 *nit1/cw15* 株に導入し、硝酸還元活性の回復した 6,000 の独立した形質転換体について、DAPI 染色による蛍光顕微鏡観察を行い、葉緑体核の変異株の選抜を行った。8-10 個程度の小塊として葉緑体に分散している野生株の葉緑体核に対して、その形態や局在が顕著に異なる変異株を 3 種単離することが出来た(図 1)。この 3 種類の突然変異体のなかでも特に、葉緑体核が分散せずに大きく 1 つにまとまる株は 5 系統(A84, G33, G60, I29, H72)単離され、表現型が葉緑体核の形態変化(分散)の機構を解析する上で適していることから、以後この株に *moc* と名前を付け、解析を進めた。

まず、野生株と *moc* 株について葉緑体の分裂過程における葉緑体核を経時的に追跡した。その結果、分散した葉緑体核が均等に娘葉緑体に分配される野生株に対して、葉緑体核の分散が起こらない *moc* 株では、葉緑体分裂の際にきわめて不均等な葉緑体核の分配が生ずる事が明らかとなった(図 2)。分裂後の葉緑体 DNA を DAPI 染色し、その蛍光強度を顕微測光装置 VIMPCS によって定量した結果、野生株では娘葉緑体に約 40 コピーでほぼ均等に分配されたのに対して、*moc* 株では最初の分裂後はおおよそ 60 : 2.5、更に 2 回目の分裂後は 67.5 : 3.7 : 3.0 : 1.8 コピーという不均等な量で娘葉緑体に DNA が分配されることがわかった(図 3)。ところが、不均等分配の起きた 12 時間後の明期の 6 時間目にはほとんどの *moc* 細胞が 40 コピー以上の葉緑体 DNA を含んでいたことから、増殖期における葉緑体 DNA の分配量が少なかった *moc* 細胞では葉緑体 DNA の複製が活性化され、葉緑体当たりのコピー数を増大させることが示唆された。また、*moc* 株の分裂過程におけるミトコンドリア DNA の

動態についても SYBR Green I 染色によって調べた結果、DNA は娘細胞に均等分配されていた (図 4)。 *C. reinhardtii* において葉緑体 DNA とミトコンドリア DNA の分配はそれぞれ独立した機構で制御されていることが示唆された。

2. 電子顕微鏡による微細構造の観察と DNA の局在解析

葉緑体核の局在や形態の変化、分配には膜系と DNA (核) との相互作用が重要な役割を果たしていると考えられている。そこで電子顕微鏡を用いて膜系などの微細構造の観察と、葉緑体 DNA の局在を野生株と *moc* 株で詳細に調べた (図 5)。その結果、野生株、*moc* 株共にピレノイドや膜系などの微細構造は違わなかったが、*moc* 株においてのみピレノイドの近傍にリボソームが含まれない比較的大きな領域が存在していた。抗 DNA 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法で DNA の局在を追跡すると、野生株では葉緑体内部の所々に小さくまとまった金粒子の反応が認められたのに対して、*moc* 株ではピレノイドの近傍の 1カ所に集中して多くの金粒子が反応していた。この結果から *moc* 株のピレノイド近傍のリボソームのない領域は葉緑体核が存在する領域であることが示唆された。また、膜系に顕著な違いが見られなかったことから、*moc* 株の表現型は葉緑体 DNA に直接作用するようなタンパク質の変異によるものであることが推定された。以上の細胞学的な解析により特徴づけられた *moc* 株の性質を表 1 にまとめた。

3. *moc* 株の増殖の特性と老化に関する性質の解析

細胞の分列増殖に関して葉緑体核の形態・局在がどのように影響するか、植え継ぎ後、経時的に細胞数の計測を行った (図 6)。その結果、植え継ぎ後 5 日目までは野生株、*moc* 株共に対数的に増殖し、6 日目で定常期に入った。しかし定常期における *moc* 株の細胞数は野生株のおよそ 3 分の 1 程度であった。この違いを調べるために細胞の分裂を明暗で同調化し、分裂細胞の出現頻度を調べたところ、二分裂後の母細胞壁内で 4 細胞になっている細胞の割合と、分裂後に母細胞壁から出て遊泳する細胞の割合が *moc* 株では野生株より若干減少していた (図 7)。

更に、葉緑体 DNA の分配量の差がその後の細胞活性にどのような影響を与えるかどうかを調べるため、分裂後の細胞について固形培地上で経時観察を行った。その結果、植え継ぎ後 60 日を経過する頃から、*moc* 株においてのみ葉緑体の自家蛍光が減少している細胞の割合が増加し始めた (図 8)。特徴的なのは、分裂後の 4 つの娘細胞のうち 3 細胞について選択的に葉緑体の自家蛍光が減少している点である。このことは葉緑体 DNA の分配量が定常期の老化に反映されたことを示唆している。定常期に入り DNA の複製活性が低下し、葉緑体 DNA を一定量維持できない細胞の老化が進行するものと考えられた。葉緑体 DNA の複製活性並びに葉緑体当たりの DNA 量と老化との関係を調べるために、植え継ぎ後 3 日目と 7 日目の増殖期の細胞培養液に 250 μ l/ml の最終濃度で葉緑体 DNA の複製阻害剤であるノボピオシンを添加し、その後の細胞増殖と細胞の様子について経時的に調べた。その結果、葉緑体 DNA の複製が阻害された状態で細胞分裂が少なくとも 1 度は進行したことが細胞数の増加から推定された。葉緑体の自家蛍光を指標に退化した細胞の割合を調べた結果、野生株では最初の添加から 5 日目では、およそ 5% だったのに対して、*moc* 株では約 50% であった (図 9)。対数増殖期においても、葉緑体 DNA の複製が阻害され、*moc* 株の葉緑体 DNA 量の少ない細胞がコピー数を一定量以上に増加させることが出来なくなると、その細胞が選択的に退化することが示唆された。

4. 遺伝子単離に向けたタギング領域の解析

遺伝子タギング法により 5 系統単離出来た *moc* 株より当該遺伝子を単離するために、まず戻し交配を行って表現型とタギングに用いた外来 DNA の挿入部位との連鎖を調べた。その結果、5 系統中 2 系統 (A84, H72) についてのみ表現型と外来 DNA の挿入部位が連鎖していた。しかしそのうちの 1 系統 (A84) では外来 DNA の検出の手がかりとなるプラスミドのベクター配列が欠落していた。残る 1 系統 (H72) は外来 DNA がタンデムに 3 コピー核ゲノム中に挿入されていた。A84, H72 の 2 系統についてスファージによるゲノミックライブラリーを構築し、形質転換に用いた外来 DNA の配列をプローブ

にタギング領域を含むゲノム DNA 断片のスクリーニングを行った。その結果、H72 株でタギング領域を含むと思われるクローン A2-3 を単離することが出来た。A2-3 クローンをプローブに野生株と *moc* 株のゲノミックサザンを行ったところ、確かに両者間で多型を示したことから (図 10)、今度はこの A2-3 クローンをプローブに野生株の BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、26-76kbp の挿入を含む独立した 7 つのクローンを単離することが出来た (図 11)。現在 H72 株に対してフレオマイシンに耐性を与える *ble* 遺伝子と野生型 BAC クローンとの co-transformation を行って、表現型の相補性について調べている。

まとめ

- ①葉緑体核の分配・分散の機構とその生理学的な意義を調べるために、遺伝子タギング法でクラミドモナスの葉緑体核がまとまる株、非常に細くなる株、不定形になる変異株を 3 種 7 系統単離した。
- ②葉緑体核が分散しない *moc* 株について蛍光顕微鏡・電子顕微鏡により観察を行い、葉緑体核の動態と葉緑体の構造について詳細に解析した。*moc* 株では葉緑体核が分散しないことによって葉緑体 DNA の分配が不均等になったが、対数増殖期には分配量の少なかった細胞でも活発な複製を行い、葉緑体の DNA 量は回復した。葉緑体の微細構造は野生株と *moc* 株とで変わらなかったことから、*moc* 株では葉緑体核と膜系との結合に関係し、葉緑体核の動態変化を規定するタンパク質に変異があるものと予想された。
- ③対数増殖期・定常期共に葉緑体 DNA の複製活性が低下して、葉緑体 DNA を一定量以上維持できない *moc* 細胞は選択的に老化が進行した。
- ④*moc* の表現型を示す 5 系統のうち表現型と外来 DNA が連鎖していた 2 系統について解析を進め、その 1 系統である H72 株について原因遺伝子が含まれると予想される BAC クローンを 7 つ単離し、塩基配列の決定と相補性の解析を行っている。この遺伝子が決定されることによって葉緑体核の分配・分散の機構が解明され、植物細胞における葉緑体核の重要な役割が分子レベルで明らかになるものと考えられる。

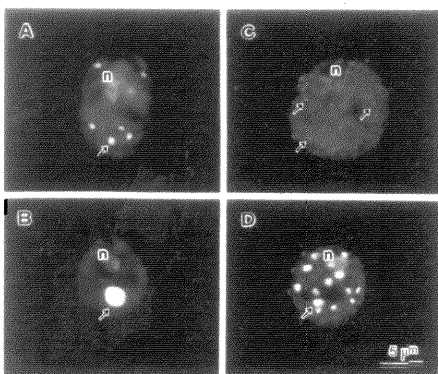


図 1 野生株及び遺伝子タギング法で単離した葉緑体核の突然変異体の蛍光顕微鏡像
(A)野生株：10-8個程度の葉緑体核が分散している
(B)葉緑体核が大きく1つに凝集している株
moc (monokaryotic chloroplast)
(C)葉緑体核が細い紐状になってストロマ中に広がっている株
(D)葉緑体核が野生株より大きく数も多い株
n: 細胞核 矢印: 葉緑体核

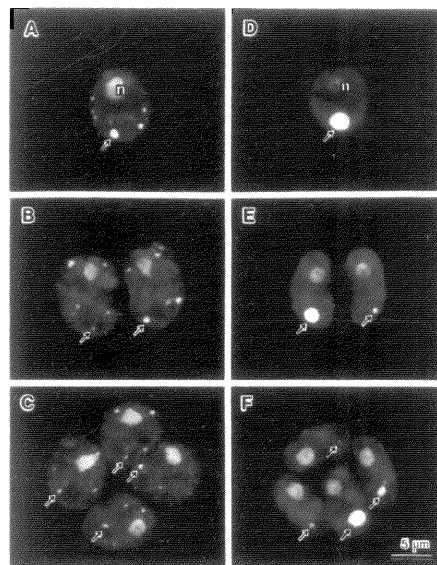


図 2 野生株と *moc* 変異株の分裂周期における葉緑体核の経時的観察結果
野生株(A-C)、*moc*株(D-F)、1細胞期(A, D)、第一分裂後(B, E)、第二分裂後(C, F)。葉緑体核(矢印)が分散している野生株では娘葉緑体にそれぞれ数個の葉緑体核が均等に分配されたが、*moc*株では分裂時に極めて不均等な葉緑体核の分裂が起こり、娘細胞に分配される葉緑体DNAの量に顕著な差が出た。n: 細胞核

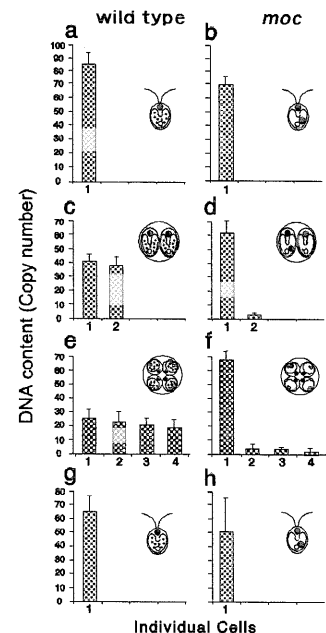


図 3 野生株及び *moc* 株の分裂周期における葉緑体 DNA 量の定量化
明期12時間目の細胞(a, b)、暗期2時間目の第一分裂後の細胞(c, d)、暗期6時間目の第二分裂後の細胞(e, f)、第二分裂後の次の明期6時間目の細胞(g, h)。それぞれ20細胞をランダムに選び、顕微測光装置(VIMPCS)でDNA量を測定し、多いものから順に左から並べ、その平均を示した。

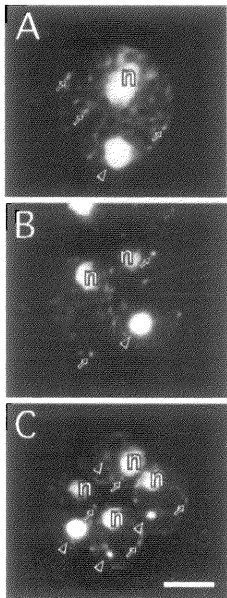


図4 *moc*株の分裂過程におけるミトコンドリアDNAの動態
SYBR Green I 染色によりミトコンドリアDNA(矢印)を可視化した。葉緑体核(矢頭)は不均等に分配されたのに対して、ミトコンドリア核は均等に分配された。
n: 細胞核 パーは5μm。

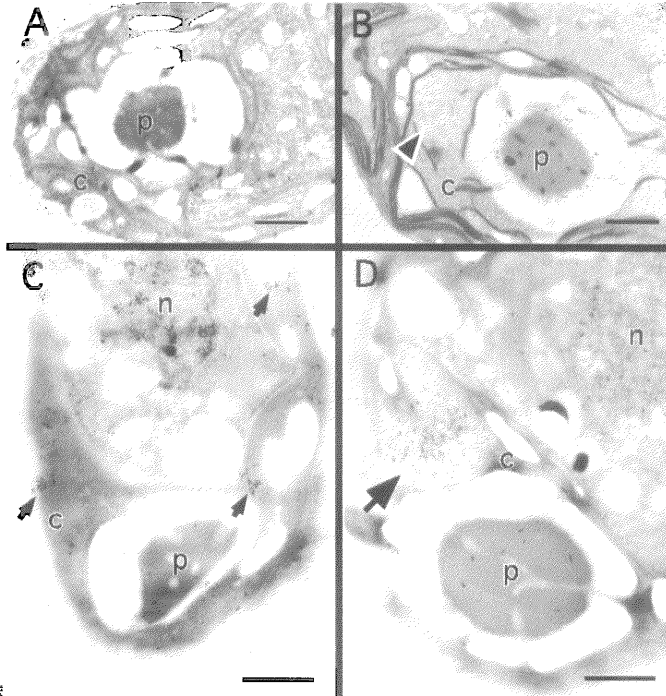


図5 電子顕微鏡による微細構造とDNAの局在解析
野生株(A, C)と*moc*株(B, D)について構造(A, B)と抗DNA抗体を用いたDNAの局在解析(C, D)を行った。*moc*株ではピレノイドの近傍にリボソームを含まない領域が認められた(B矢頭)。野生株では金粒子が小さくままとまって葉緑体内に散在していたが(C矢印)、*moc*株ではピレノイドの近傍1カ所に大量の金粒子がままとまって存在していた(D矢印)。c: 葉緑体 n: 細胞核 p: ピレノイド
バーは0.5μm。

表1 細胞学的解析により測定された野生株及び*moc*株の特性

	wild type	<i>moc</i>
Cell nucleus		
number	1	1
segregation	equal	equal
Chloroplast		
number of nuclei	7-12	1
DNA content	80-90	65-75
DNA segregation	equal	unequal
thylakoid membrane	2-12 stacks	2-10 stacks
diameter of pyrenoid	1-2 μm	1-2 μm
segregation of pyrenoid	equal	equal
DNA replication	active	active
Mitochondria		
number of nuclei	15-50	15-50
DNA segregation	equal	equal

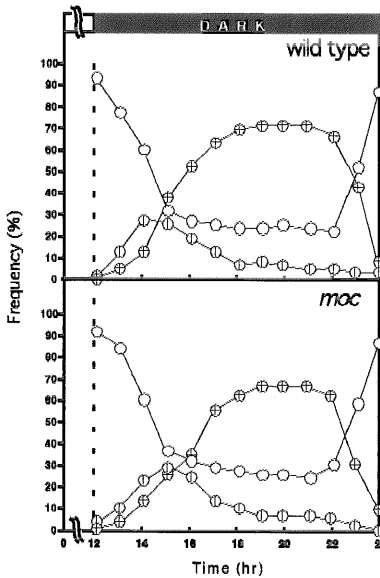


図7 野生株及び*moc*株の分裂期における細胞のタイプとその頻度
明暗の光条件によって同調化した細胞の分裂のタイミングと出現頻度を調べた。野生株、*moc*株共に暗期の二時間目で第一分裂、六時間目で第二分裂が完了した。暗期の終盤に内性胞子の遊泳が起こり1細胞の割合が多くなった。
○: 未分裂細胞 ○●: 第一分裂終了後細胞 ○⊕: 第二分裂終了細胞

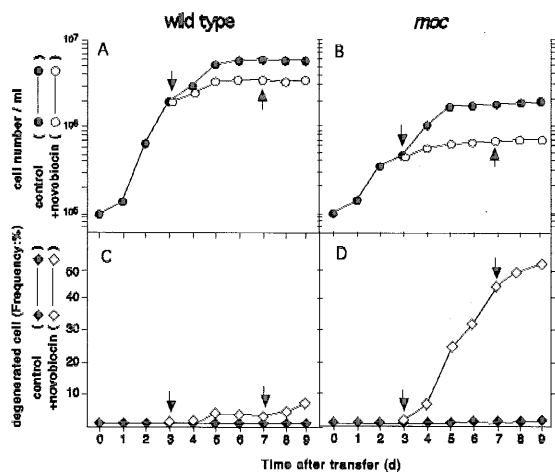


図9 対数増殖期における葉緑体DNA阻害剤の増殖への効果
野生株、*moc*株共に植え継ぎ後3日の細胞に葉緑体DNAの複製阻害剤であるノボピオンを添加して、その後の増殖や細胞に対する影響を調べた。両株共に薬剤添加後はコントロールに比べて増殖が抑制された(A, B)。また、葉緑体の自家蛍光を指標に退化した細胞の割合を調べたところ、*moc*株は野生株よりも10倍程多かった(C, D)。矢印はノボピオンの添加時期を示す。

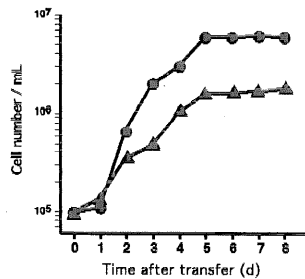


図6 野生株及び*moc*株の増殖の特性
野生株、*moc*株共に植え継ぎ後5日目まで対数的に増殖し、その後定常期に入った。*moc*株の定常期に細胞数は野生株のそれのおよそ3分の1だった。
●: 野生株 ▲: *moc*株

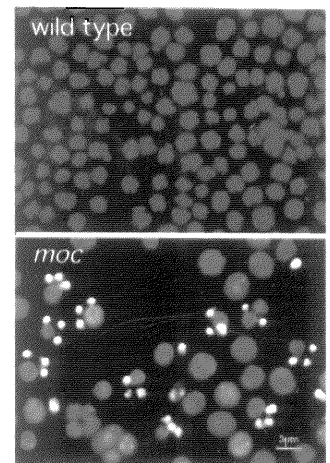


図8 植え継ぎ後60日が経過した野生株及び*moc*株の蛍光顕微鏡像
野生株ではほとんどの細胞が葉緑体の赤い自家蛍光を発していたのに対して、*moc*株では自家蛍光を発せず、白く退化した細胞の割合が多くなっていった。とりわけ注目すべき点は、*moc*株で4細胞の内性胞子のうち3細胞が選択的に退化している点である。

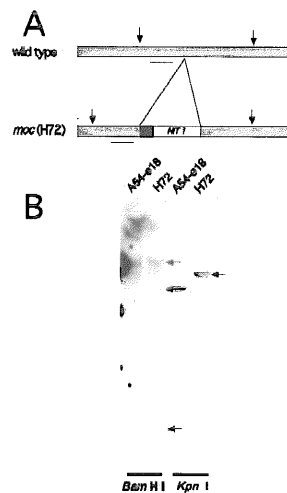


図10 タギング領域の単離
タギング領域の模式図(A)。A2-3クローンをプローブにした形質転換前の細胞(A54-e18株)及びH72(*moc*株)DNAに対するゲノミックサザンハイブリダイゼーション(B)。外来DNAの導入によりH72株ではバンドの位置のシフト及びバンドの複数化(矢印)が起きている。

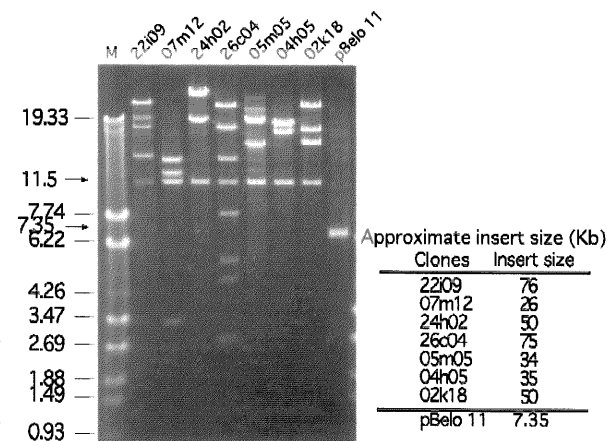


図11 A2-3をプローブに単離されたBACゲノミッククローンをBACライブラリーより外来DNAの導入により分断された遺伝子の全長を含むと考えられるクローンを、A2-3クローンをプローブに7つ単離した。各クローンをEcoRIにより切断してインサートサイズを調べたところ、およそ26-76のゲノムDNAを含んでいることが明らかになった。