

論文内容の要旨

論文題目

Molecular networks between cell cycle and mitochondrial division

細胞周期ネットワークにおけるミトコンドリア分裂増殖の分子機構

氏名 西田 敬二

序

ミトコンドリアや葉緑体は細胞内共生したバクテリアを起源としており分裂によってのみその数を増やすことが出来る。真核細胞が増殖する過程でこれらオルガネラの数適切に維持されることや、オルガネラの分裂および形態変化が細胞分化や細胞死の重要なプロセスであることからオルガネラ分裂は細胞周期ネットワークの中に組み込まれていると予想されるがその分子的証拠はなく、またオルガネラ分裂装置の分子機構についての普遍的な知見も限られていた(総説1)。高等な生物では一細胞に何千ものミトコンドリアが存在し、活発に運動して頻繁に融合と分裂を行なっているので分裂という現象のみ純粹に扱うのは困難である。本研究で用いる単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (以下シゾンと略す)は細胞内に一つのミトコンドリアおよび葉緑体を持ち細胞分裂過程において順序良くそれらは分裂する。さらに明暗周期によって高度に細胞分裂を同調化できる。また全ゲノム配列が解読されていて、その冗長性が極小であり基本的なシステムとして解析しやすい(文献1)。修士課程において私はこのシゾンのミトコンドリア分裂において FtsZ と MD ring と Dynamin が協調的に働くことを明らかとし、基本的なモデルとして提唱したが(文献2)、それが葉緑体にも共通する普遍的なオルガネラ分裂機構であることが示された(文献3, 4 および図2)。

博士課程においては真核細胞がオルガネラ分裂を制御する基本システムを明らかとするため、()細胞骨格とミトコンドリアの空間的相互作用、()細胞周期によるミトコンドリアおよび葉緑体分裂の制御機構、()オルガネラ分裂装置の単離精製と構成タンパク質の解析を行った。

結果と考察

シゾンにおける微小管構造とミトコンドリアの関係

一般にオルガネラの挙動は細胞骨格と密接な関係にある。シゾンの微小管とミトコンドリアを蛍光抗体法によって同時に観察すると微小管の極はミトコンドリアの両端に位置し、紡錘体の形成はミトコンドリア分裂の後に起こることがわかった(図3)。電子顕微鏡で観察すると紡錘体極はいわゆる Spindle Pole Body (SPB)に相当する二重の層からなる構造であり、その外層とミトコンドリア外膜が直接結合していた(図4)。従来は細胞骨格を軌道としたモータータンパク質を介する輸送がミトコンドリア分配の中心的機構とみなされていたが、今回見出された極との結合は染色体と共にミトコンドリアを分配する、より確実な機構と考えられる(文献5)。

細胞周期とミトコンドリア分裂の分子ネットワーク

よりミトコンドリア分裂は細胞周期の制御や微小管構築と連動している可能性が考えられた。そこで微小管重合阻害剤である Oryzalin で細胞を処理(以下 Orz と略す)したところ、ミトコンドリアも葉緑体も分裂を完了した状態で細胞周期は停止していた(図5 A, B)。これよりシゾンのミトコンドリアと葉緑体の分裂は微小管を必要としないことが分かる。さらに細胞核 DNA の複製阻害剤である Camptothecin で処理する(以下 Cmp と略す)と細胞周期は S 期で止まると予想されるが、このとき葉緑体は異常に分裂を繰り返すのに対してミトコンドリアの分裂は抑えられていた(図5 A, C, D)。これらのことから葉緑体分裂は S 期で促進され、M 期で抑制されているのに対し、ミトコンドリア分裂は S 期では抑制されて、M 期で一度きり誘導されるといえる。ミトコンドリアにおいて Dynamin (Dnm1)が最終段階に分裂面に集合して分裂を完了さ

せることをすでに明らかとしているが(文献2, 6)、この Dnm1 の局在と微小管を通常の細胞で同時に観察すると Dnm1 と微小管の先端とが接するよう見られた(図6)この微小管とミトコンドリア分裂面との相互作用はミトコンドリア分裂が微小管形成および伸長に關与する、すなわち紡錘体形成のチェックポイント通過に關わる機構であるかもしれない。次に葉緑体とミトコンドリアの分裂に關わる FtsZ と Dynamin の細胞周期における増減を Immunoblot で解析した。葉緑体の FtsZ2 と Dynamin(Dnm2)、ミトコンドリアの FtsZ1 は細胞分裂期に一過的上昇が見られたが、Dnm1 には変動がなかった(図7)。そこで Dnm1 の細胞内局在を薬剤処理した細胞で解析すると Cmp では細胞質に分散している(図8A)のに対し、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理(図8B)あるいは Orz(図8C)では細胞内に一つの輝点として存在した。MG132 処理細胞は M 期で停止していると予想されるがそのときミトコンドリアと葉緑体は分裂を終えていた。従って Dnm1 が M 期特異的に集合することでミトコンドリア分裂が完了することが示された(文献5)。

細胞周期と葉緑体分裂の分子ネットワーク

の結果から葉緑体分裂は S 期特異的に誘導されていると考えられた。そこで薬剤処理下での葉緑体の FtsZ2 と Dnm2 の蓄積量を解析した(図8B)。通常は双方とも分裂期に上昇し、その後 α -tubulin より早い段階で消失する。Orz あるいは MG132 処理下では通常とほぼ同様に消失するが、Cmp では全く減少しないので双方とも S 期に合成され M 期に積極的に分解されていると考えられ、またその分解はプロテアソームに依存しないことも示唆された、さらに細胞質の翻訳阻害剤である Cycloheximide 処理下(以下 Cyh と略す)では Dnm2 は消失するが FtsZ2 はほとんど減少しなかった。Cyh と Cmp 同時では Dnm2 の消失が抑えられることから、Cyh は M 期における FtsZ2 の分解のみ阻害することが分かった。Cyh の細胞を観察すると、通常の葉緑体分裂が終わったあと細胞分裂には至らず 2 つの葉緑体がさらに伸長していた(図9)。このとき FtsZ2 は両方の葉緑体中央に局在するが分裂は起こらない。以上のことから葉緑体分裂は FtsZ2 と Dnm2 両方の S 期における合成と M 期における分解によって制御されていることが強く示唆され、さらに葉緑体内にある FtsZ2 の M 期特異的分解が細胞質の翻訳阻害によって抑制されることから、細胞周期シグナルが葉緑体内に伝わる経路の存在が示された。

オルガネラ分裂装置の精製と構成タンパク質の同定

これまでに基本的なオルガネラ分裂機構として FtsZ、PD/MD ring、Dynamin の三つが主要要素であるとしてきたが、いまだ PD ring あるいは MD ring の正体は不明である。そもそもミトコンドリアにおいては分裂装置の単離、精製というのは全く例がない。そこで私はシゾンの細胞周期を停止させることでミトコンドリア分裂のみ、あるいは葉緑体分裂のみを誘導するなかで特異的に増加するタンパク質を含む分画を生化学的に得ることを試みた。外側の PD ring は界面活性剤や高塩濃度の処理に耐性であることがすでに示されていたので、あえてオルガネラの単離を経ずに直接細胞を破碎して処理して多段階の分別沈殿によって精製した(図10A)。得られた分画を SDS-PAGE および Immunoblot で比較すると Orz (M 期停止)では Dnm1 が、Cmp (S 期停止)では Dnm2 が主要なタンパク質として得られたことから、高度にオルガネラ分裂装置が精製されていることが裏付けられた(図10B)。これら Dynamin のほかに 100kDa 付近にそれぞれ主要なバンドが得られたので、これらを TOF-Mass 解析とゲノム情報から同定したところ、両方とも同一のタンパク質 CMR185C であった。その一次配列から予測されるドメインとしては C 末端に WD40 repeat、中央に Coiled Coil 領域があった(図11A)。いずれのドメインも多種多様なたんぱく質中に見出されるものであるため単純なホモロジー検索ではオーソログを見出すことは困難であるが、これら二つのドメインの配置は出芽酵母においてミトコンドリア分裂異常変異体から同定された遺伝子産物 MDV1 と相同である。酵母における MDV1 の機能は Dnm1 をミトコンドリアに誘導する、あるいは Dnm1 の機能を発動する分子アダプターという解釈が与えられていたが、今回同定した CMR185C の細胞内局在を解析するとミトコンドリア分裂初期からアーチ状の構造を形成し、やがて分裂予定面で閉じたリングとなった(図11B)。Dnm1 との共局在性は後半にのみ顕著であること(図11C)から、CMR185C は単なる Dnm1 の補助的役割を担うのではなく Dnm1 に先立って初期から分裂装置として中心的な役割を果たしていることが示唆された。

結論

- 1、紡錘体極がミトコンドリア両端に結合してミトコンドリア分配と染色体分配が同時に進行するという機構を見出し、ミトコンドリア分裂が紡錘体伸長のためのチェックポイント通過に關与する可能性を示した。
- 2、シゾンのミトコンドリア分裂は Dnm1 の M 期特異的な集合によって完了するという、細胞周期とミトコンドリア分裂の分子ネットワークを初めて明らかとした。
- 3、葉緑体分裂においては Dnm2 と FtsZ2 は S 期特異的に合成されて葉緑体を分裂させ、M 期に入ると分解されるという、ミトコンドリアと相同な分裂装置に対して全く異なる制御機構が働いていることを示した。
- 4、オルガネラ分裂装置の単離精製系を構築してミトコンドリア分裂装置の単離に初めて成功した。その主要なタンパク質 CMR185C を同定し、分裂初期から装置の中心的存在であることを示した。

PC/ mito DNA αTub mito/aTub

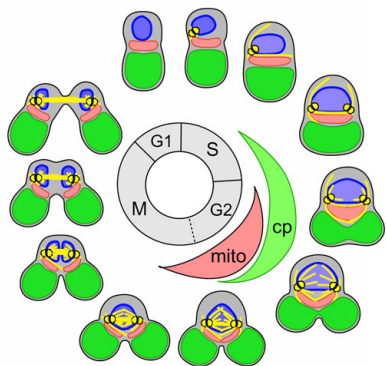


図1 シゾンの細胞分裂周期の模式図

葉緑体の分裂 (cp: 緑)、ミトコンドリアの分裂 (mito: 赤)、細胞核 (青) の分裂と微小管 (黄色) の形成を示す。中央には推定される細胞周期を示している。

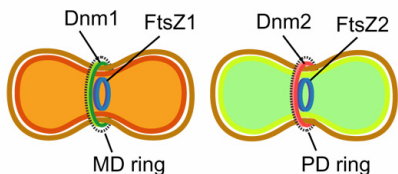


図2 オルガネラ分裂装置の模式図

ミトコンドリア (左) と葉緑体 (右) は共通の分裂機構を持つ。FtsZ は内膜の内側 (高等なミトコンドリアでは存在しない)、Dynamin (Dnm) は外膜上、MD ring は外側と内側、PD ring は外側と膜間と内側に存在するが、図には最も顕著である外側の PD / MD ring のみ示す。(文献 2, 3, 4)

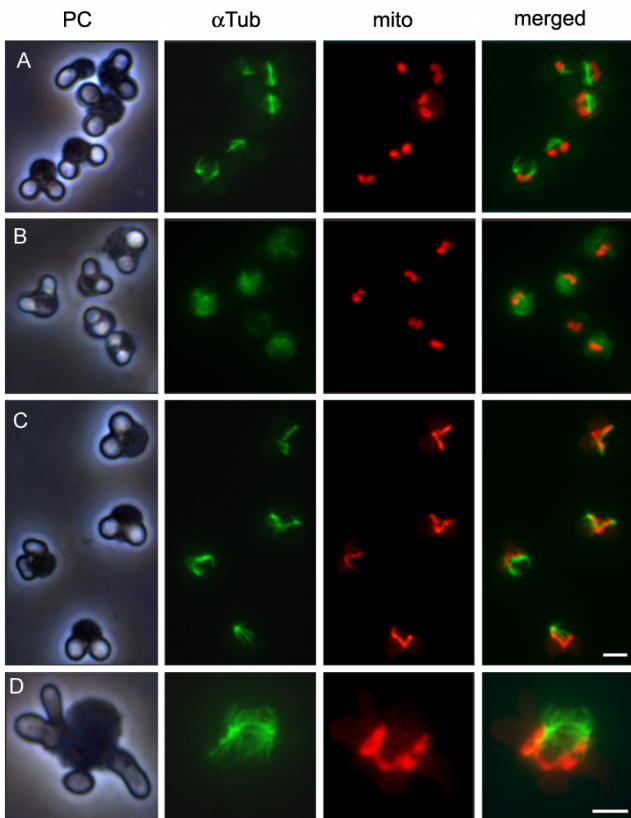


図7 オルガネラ分裂たんぱく質の同調培養下での量的変化

同調培養細胞を二時間おき (細胞分裂前後の 33h から 39h の間は一時間おき) にサンプリングし、各タンパク質に対する抗体で Immunoblot を行なった。Dnm1 以外は分裂期 (34h-38h) に一過的な上昇を示す。mito: ミトコンドリアタイプ、cp: 葉緑体タイプ

微小管極形成
葉緑体分裂
ミトコンドリア分裂
紡錘体形成
核分裂
細胞質分裂

図3 微小管とミトコンドリアの関係

シゾンの細胞周期に従って起こる一連の現象を示す。葉緑体は位相差像 (PC) の明るい領域として見える。ミトコンドリア (mito: 赤) は抗 mtEF-Tu 抗体、微小管 (αTub: 緑) は抗 α-Tubulin 抗体、DNA (青) は DAPI で蛍光染色した。微小管の極はミトコンドリアの端に形成され、ミトコンドリアに沿う微小管が見られる。紡錘体の伸長に従ってミトコンドリアが移動する。Bar: 1μm

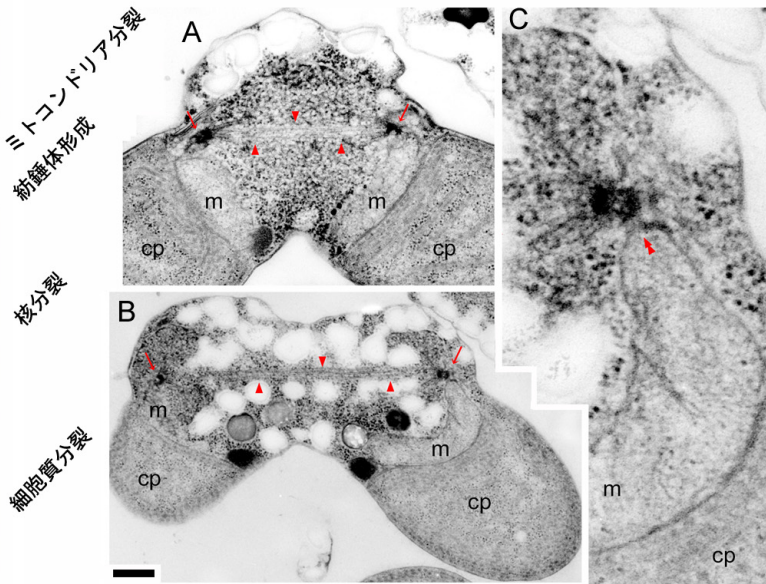


図4 紡錘体極とミトコンドリアの結合を示す電子顕微鏡像

急速凍結で細胞を固定、包埋して超薄切片にして透過型電子顕微鏡で観察した。微小管が束になった紡錘体 (矢頭) があり、その両端に極が電子密度の高い構造として見える (矢印)。極は二層からなるいわゆる Spindle Pole Body 様であり、その外側の層とミトコンドリア外膜が結合する構造 (二重矢頭) が見える。C は B の拡大。cp: 葉緑体、m: ミトコンドリア、Bar: (A と B) 200 nm, (C) 50 nm (文献 5)

図5 細胞周期および微小管形成とオルガネラ分裂との相関

細胞分裂に入る前の段階で微小管重合阻害剤の Oryzalin あるいは細胞核 DNA 複製阻害剤である Camptothecin で処理した同調培養細胞における葉緑体 (位相差像: PC)、微小管 (緑: αTub)、ミトコンドリア (赤: mito) の変化。A: コントロール (DMSO 処理) では分裂したミトコンドリアをつなぐように紡錘体が形成されている。B: Oryzalin 処理では微小管は完全に破壊される。葉緑体は分裂を終え、ミトコンドリアは萎縮しているが分裂を完了して 2 つになっている。C: Camptothecin 処理では微小管は紡錘体にはならず、葉緑体は分裂しているがミトコンドリアは分裂せずに伸びている。D: C の状態からさらに培養を続けると葉緑体だけの分裂が繰り返されて多数の葉緑体を持つ異常な細胞が現れる。Bars: 1μm

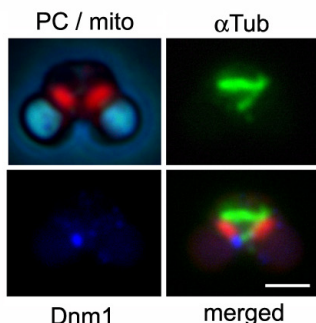
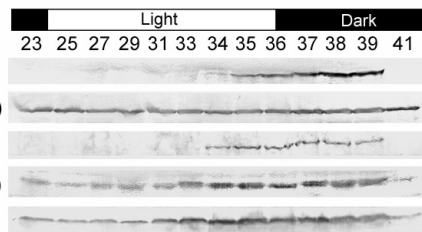


図6 微小管と Dnm1 の局所的相関

紡錘体形成時には片方の極からミトコンドリアに沿って斜めに延びる微小管があり、対側のミトコンドリアの分裂面に達するように見える。Dnm1 は分裂後に一方のミトコンドリアに付随する傾向があるが、その方向性と微小管の配向に相関が見られる。Bar: 1μm (文献 5)



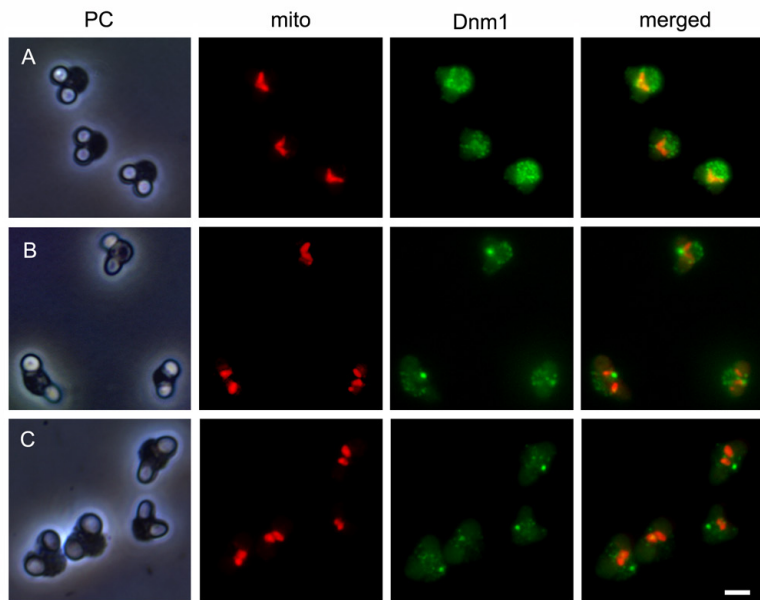


図7 細胞周期に応答するDnm1の局在変化とミトコンドリア分裂

Camptothecin、Oryzalin、およびプロテアソーム阻害剤であるMG132で処理した細胞におけるDnm1の局在を解析した。A: Camptothecin処理では細胞周期はS期で停止し、Dnm1は細胞質に分散した状態でミトコンドリア分裂は抑制されている。B: MG132処理ではM期で停止し、ミトコンドリアの分裂は完了している。このときDnm1は分裂面に集合した状態である。C: Oryzalin処理ではM期で停止し、さらに微小管が破壊されている。ミトコンドリアの分裂は終わってDnm1は集合した状態だが時間と共にミトコンドリアから離れる傾向が見られた。Bar: 1 μ m (文献5)

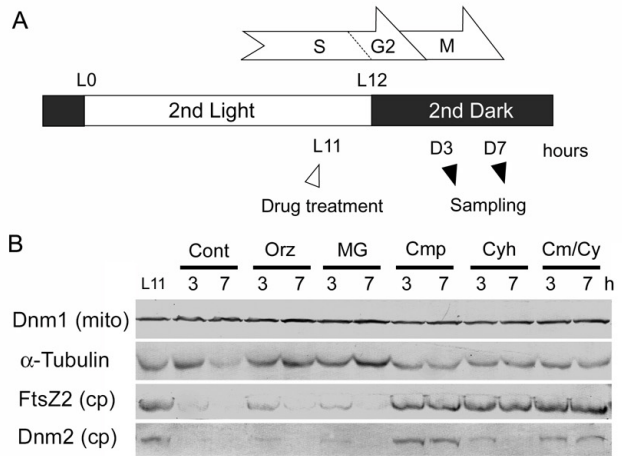


図8 細胞周期に依存するDnm2とFtsZ2の合成と分解

Oryzalin、MG132、Camptothecin、および翻訳阻害剤であるCycloheximideで処理した同調培養における各タンパク質の蓄積量変化をImmunoblotで解析した。A: 実験の流れ。同調培養における二回目の明期11時間目(L11)に薬剤投与した。細胞の回収は薬剤投与前(L11)、4時間後(D3)および8時間後(D7)に行なった。B: 各抗体によるImmunoblotの結果。FtsZ2とDnm2は共にS期で合成されM期で分解される。FtsZ2の分解はCycloheximide処理によって阻害される。Cont: コントロール(DMSO処理) Orz: Oryzalin処理、MG: MG132処理、Cmp: Camptothecin処理、Cyh: Cycloheximide処理、Cm/Cy: CmpとCyhの同時処理。

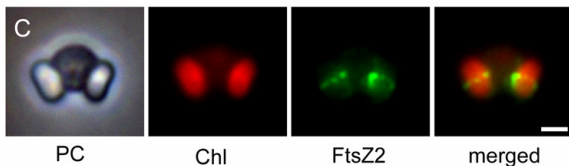


図9 Cycloheximideによって引き起こされる葉緑体分裂の途中停止

Cycloheximide処理下の細胞(図8Bの★)では、Dnm2の分解は起こるがFtsZ2の分解が起こらず、また細胞分裂も阻害される。そのような細胞では一度分裂を終えた葉緑体が再び伸長しており、FtsZ2はその両方の葉緑体の中央に局在するが、それ以上は分裂が進行しない。Chl: 葉緑体の自家蛍光、Bar: 1 μ m

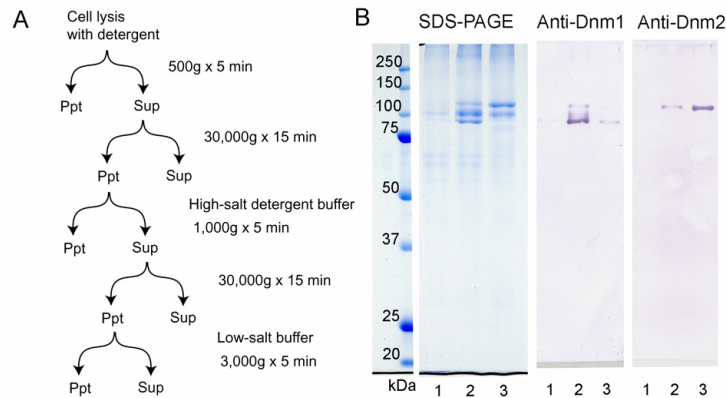


図11 新たなミトコンドリア分裂装置タンパク質

図10で得られたバンド(*と**)のタンパク質を質量分析で同定した結果、同一のタンパク質CMR185Cであった(A)。抗体染色によって細胞内局在を見ると分裂初期から最後まで分裂装置として存在した(B)。Dnm1との共局在性はその後半に著しい(C)。Bars: 1 μ m

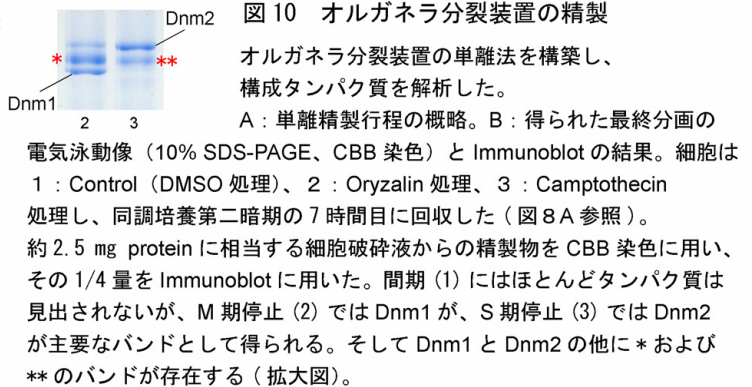
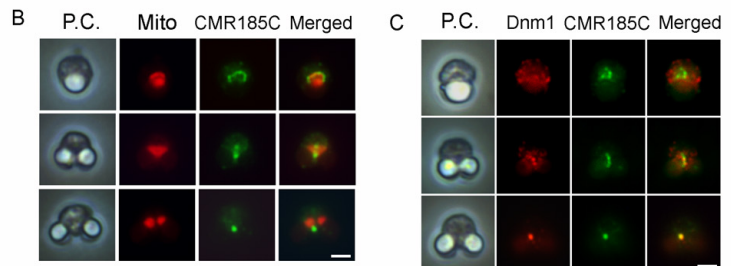
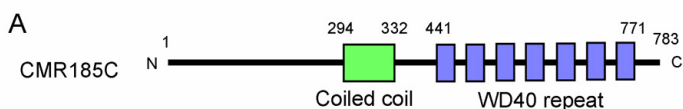


図10 オルガネラ分裂装置の精製

オルガネラ分裂装置の単離法を構築し、構成タンパク質を解析した。

A: 単離精製行程の概略。B: 得られた最終分画の電気泳動像(10% SDS-PAGE、CBB染色)とImmunoblotの結果。細胞は1: Control(DMSO処理)、2: Oryzalin処理、3: Camptothecin処理し、同調培養第二暗期の7時間目に回収した(図8A参照)。約2.5 mg proteinに相当する細胞破砕液からの精製物をCBB染色に用い、その1/4量をImmunoblotに用いた。間期(1)にはほとんどタンパク質は見出されないが、M期停止(2)ではDnm1が、S期停止(3)ではDnm2が主要なバンドとして得られる。そしてDnm1とDnm2の他に*および**のバンドが存在する(拡大図)。



総説 1 Osteryoung KW, Nunnari J. The division of endosymbiotic organelles. *Science*. Dec 5;302(5651):1698-704. 2003

文献 1 Matsuzaki M *et al.*, Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature*. Apr 8;428(6983):653-7. 2004

2 Nishida K, Takahara M, Miyagishima SY, Kuroiwa H, Matsuzaki M, Kuroiwa T. Dynamic recruitment of dynamin for final mitochondrial severance in a primitive red alga. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 18;100(4):2146-51. 2003

3 Miyagishima SY, Nishida K, Mori T, Matsuzaki M, Higashiyama T, Kuroiwa H, Kuroiwa T. A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. *Plant Cell*. Mar;15(3):655-65. 2003

4 Miyagishima SY, Nishida K, Kuroiwa T. An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. *Trends Plant Sci*. Sep;8(9):432-8. 2003

5 Nishida K, Yagisawa F, Kuroiwa H, Nagata T, Kuroiwa T. Cell Cycle-regulated, Microtubule-independent Organelle Division in *Cyanidioschyzon merolae*. *Mol Biol Cell*. May;16(5):2493-502. 2005

6 Nishida K, Misumi O, Yagisawa F, Kuroiwa H, Nagata T, Kuroiwa T. Triple immunofluorescent labeling of FtsZ, dynamin, and EF-Tu reveals a loose association between the inner and outer membrane mitochondrial division machinery in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *J Histochem Cytochem*. Jul;52(7):843-9. 2004