

論文内容の要旨

Identification and molecular and cellular biological studies on biogenesis of lysosomes in unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*

(単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* におけるリソソームの同定とバイオジェネシスに関する分子細胞生物学的研究)

八木澤 芙美

序

動物細胞のリソソームは細胞内における分解を行い、細胞の機能維持には不可欠なオルガネラである (Holtzman, 1984)。また植物、藻類、菌類にみられる液胞は、基本的には機能や関連遺伝子など動物におけるリソソームと相同性が認められる。リソソームの増殖、維持、それらの細胞周期との関係といったリソソームのバイオジェネシスに関わる研究はこれまで哺乳類、高等植物、酵母における研究が主体であったが、哺乳類ではリソソームの細胞当たりの数が多く、個々のリソソームの挙動を観察することが難しい。また、リソソームは生物、組織、細胞によって多様に分化している。そのため、それらの個々の解析よりも、より原始的な生物の解析により、付加的な現象によって隠れているような根源的なバイオジェネシスの機構が明らかになると考えられた。単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (略称シゾン) は進化上の分岐が早く、複膜系の細胞核、ミトコンドリア、色素体、及び単膜系のゴルジ体、マイクロボディなど 1 個であるという単純な形態をしている。また、シゾンはゲノムの完全解読が進んでおり (現在は完了)、これらの情報を有効に活用できる可能性があった。

そこで、本研究では、シゾンにおける 1) リソソームの同定、2) リソソームの細胞周期における増殖、分配過程の解析を蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を用いて行い、さらにこれらを分子レベルでの解析するために、ゲノム情報を利用し、3) リソソームに関わる遺伝子の探索、リソソーム形成と関わりと考えられる 4) リソソーム内ポリリン酸代謝経路の解析を行った。

1. リソソームの同定

シゾンの細胞は細胞核、ミトコンドリア、葉緑体を 1 つずつ含み、ミトコンドリアは葉緑体に近接し、その分裂過程も容易に観察できる (図 1)。リソソームを可視化するために、従来知られている組織化学的方法を使って

検討した。アミノペプチダーゼの基質である CMAC-Arg、酸性小器官を染色するキナクリン、ポリリン酸を染色するメチレンブルー・クリスタルバイオレット法、高濃度の DAPI で染色した。ポリリン酸は藻類等の液胞に蓄積することが知られている。これらの結果、間期の細胞では細胞質、分裂期にミトコンドリア近くにある直径約 500 nm、細胞あたり平均約 4 個の構造が選択的に染色された。(図 2)。さらにリソソームのプロープである LysoTracker と DAPI による 2 重染色ではそれらのシグナルが一致し、これらがリソソームであると考えられた。電子顕微鏡観察では、既知の構造以外の単膜系の構造として不均一な若干電子密度の高い物質を含む構造、電子密度の非常に高い物質を含む構造、ほとんど内容物がみられず、膜の外側に厚い層のある構造が観察され(図 3)、これらの中間的な構造もしばしば観察された。超薄連続切片より計算されたそれらの直径は平均 300 nm、細胞あたり平均 4 個存在し、光学・蛍光顕微鏡の観察結果とほぼ一致した。植物の液胞膜に局在する液胞型 H⁺-PPase の免疫電子顕微鏡観察を行った結果、これまで観察されリソソーム様構造の上に反応が確認され、これらの構造がリソソームであると同定した(図 4)。

2) 細胞周期におけるリソソームの増殖、分配過程の解析

フラスコで旋回培養しているシソンの細胞を希釈、通気し、12 時間明期、12 時間暗期で培養すると、細胞分裂が同調化し、60 時間の培養で 3 回の同調分裂が起こる。この系を用いて、まず、リソソームの細胞分裂に依存した数の変化を調べた(図 5)。リソソームは、同調培養開始直後に増殖し、栄養条件等の環境の変化に応答してその数が増えたと考えられた。第二分裂以後は、細胞分裂開始直前に同調してその細胞あたりの数を増加させ、リソソームの数は細胞分裂と環境要因の二つによって制御されると考えられた。

次に増加したリソソームがどのように娘細胞に分配されるかということを明らかにするために、細胞分裂過程におけるそのダイナミクスを高濃度 DAPI 法で調べた(図 6)。リソソームは、間期には多くが細胞質中の上部に観察され、分裂期に入り、葉緑体が伸長し始めると、細胞核と葉緑体の間、つまりミトコンドリアの上に移動した。さらに葉緑体の中央が収縮し、分断するまでミトコンドリア接しているように見え、細胞質分裂時には分裂面近くに局在し、細胞分裂と同時にそのまま娘細胞に分配された。細胞質分裂後には細胞質中に戻った。電子顕微鏡観察によっては、分裂期にリソソームはしばしばミトコンドリアに食い込むようにして存在することが明らかとなり、その間に繊維状の構造が発見され、一方、ミトコンドリア膜の一部が引き延ばされてリソソームと接着している様子も観察された(図 7)。リソソームとミトコンドリアはこれらの構造により、強固に結合していることが示唆された。二つの娘細胞での数の差を調べた結果、ほぼ均等に分配されることが明らかとなった。これらの結果により、リソソームがミトコンドリアの分裂を利用し娘細胞に等しく分配される機構を持つことが示唆された。以上のリソソームの細胞周期における挙動を図 8 にまとめる。

このリソソームの細胞質からミトコンドリアへの移動について、細胞周期の進行をとめ、ダイナミン顆粒の細胞質内での移動を阻害する 5-Fluorodeoxyuridine (5FdU) と微小管重合阻害剤であるオリザリンの処理を行った。どちらの処理においてもリソソームは細胞質からミトコンドリア上部に移動した。ゲノム解析の結果から、シソンにおいてアクチン系は欠如しているとされており、リソソームがダイナミン顆粒の移動とは異なる、微小管やアクチン繊維を介さない移動機構を使っていることが示唆された。

3) リソソームに関わる遺伝子の探索

リソソームの増加・動態を分子レベルで解明するためには、リソソームを構築するタンパク質や、輸送に関わる遺伝子等を明らかにする必要がある。シソンのデータベースからリソソームの膜タンパク質、酵素、形成、輸送過程に関わる遺伝子、オートファジーに関わる遺伝子をホモロジー検索により抽出した。シソンにはβ-ガラク

トシダーゼ等の糖分解酵素、カテプシン D を始めとするプロテアーゼ、酸性ホスファターゼ等の酵素、液胞型 H⁺-PPase、H⁺-ATPase の各サブユニット等の膜タンパク質のホモログ等が存在した。リソソームへのタンパク質の輸送では、ゴルジ体から液胞前区画 (PVC) を経由する経路が知られており、酵母において関連遺伝子が多く同定されている。一部について述べると、ゴルジ体からの小胞形成に必要な Vps1、Vps34、PVC における小胞の融合に必要な Vps45、Vil1、PVC からゴルジ体への逆行輸送に必要な Vps26、Vps29、Vps35 はホモログが確認できた。一方、PVC からの小胞と液胞、液胞同士の融合に重要とされている Vps11、Vps16、Vps18、Vps33 のホモログはシゾンでは確認されず、さらに細胞質タンパク質の分解に関わるオートファジーに関する遺伝子のホモログは全く確認できなかった。以上のことから、シゾンにはリソソームが存在し、既知のリソソーム関連遺伝子を持つ一方、複数の重要な遺伝子が欠如しており、他生物の研究により提唱されたリソソームの形成、機能モデルをシゾンに単純に当てはめることができない。このことは、未知の因子、機構が存在する可能性を示唆している。これらを明らかにするために、まずリソソームの単離、TOF-MS 解析によるリソソームタンパク質の網羅的同定を試みた。予備実験段階ではあるが、シゾンでは遺伝子重複やイントロンが少ないことから得られた分画の一次元電気泳動像からでも、容易に遺伝子の同定が可能になってきている。

4. リソソーム内のポリリン酸代謝経路の解析

ポリリン酸は多くの下等な真核生物のリソソームに蓄積しており、リン酸の蓄積以外に、pH、浸透圧、イオン濃度の調節等の機能が示唆されている。初期のリソソーム進化、形成に関わっていた可能性も考えられるが、真核生物のその代謝系は殆ど明らかではない。培地のリン酸量の変化に応じてその合成、分解がダイナミックにおこる系について、マイクロアレイを用いて解析を行ったところ、条件特異的な遺伝子の発現がみられた。

まとめ

本研究ではシゾンにおけるリソソームを同定した。その細胞周期における増殖、分配過程を解析し、リソソームが細胞周期依存、非依存的に増殖し、分裂期には細胞質中からミトコンドリア上部に移動し、ミトコンドリアに接着、分配されることが明らかとなった。また、ホモロジー検索により、リソソームに関連する遺伝子の保存性をシゾンで解析し、いくつかの重要とされてきたホモログが確認できないことから、その形成過程、機能にはこれまで知られていない因子、機構の関与がある可能性が示唆された。また、リソソームのポリリン酸の代謝に関わる遺伝子をマイクロアレイにより解析し、解析の候補となる遺伝子のリストを得た。今後のこれらの遺伝子の解析や、リソソームタンパク質の網羅的解析により、新たなパイオジェネシスの機構が明らかになると考えられる。

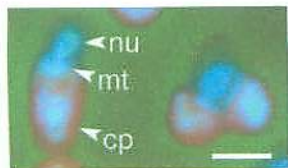


図1 シゾンの細胞のDAPI染色像。間期(左)、分裂期(右)。シズンは細胞核(nu)、ミトコンドリア(mt)、葉緑体(cp)を1つずつ含む。バーは2 μm。

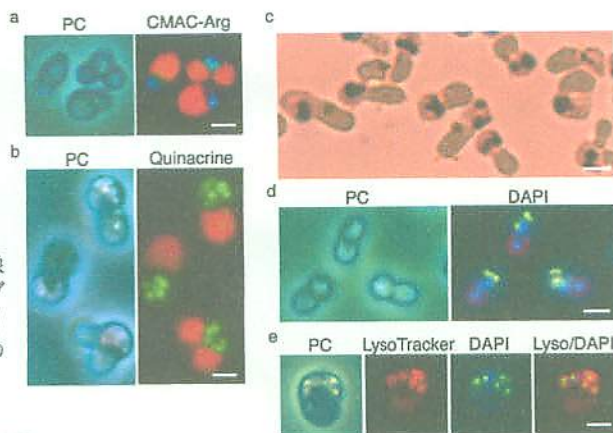


図2 光学顕微鏡下でのリソソーム様構造の可視化。リソソームのプロープ(a, CMAC-Arg, b, キナクリン, c, メチレンブルーとクリスタルバイオレット, d, DAPI, e, LysoTrackerとDAPI)によって細胞を染色したところ、リソソーム様の構造が特異的に染色された。A, Bの赤い蛍光は葉緑体の自家蛍光。PC, 位相差像。バーは2 μm (a-d)、1 μm (e)。

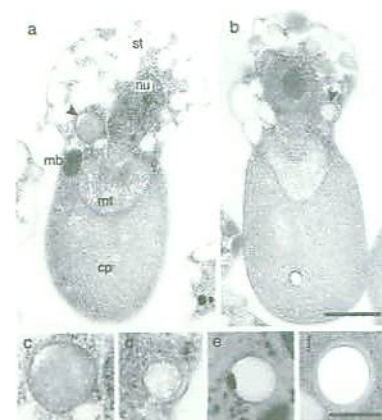


図3 電子顕微鏡下でのリソソーム様構造の観察。a, b, 典型的なシゾンの間期の細胞像。細胞内にはデンプン粒(st)、細胞核(nu)、マイクロボディ(mb)、ミトコンドリア(mt)、葉緑体(cp)、リソソーム様構造(矢頭、c, d, 拡大像)、が確認された。e, 電子密度の高い物質を含む構造、f, 膜の周囲に層状の構造がみられる構造。バーは500 nm (b)、200 nm (f)。

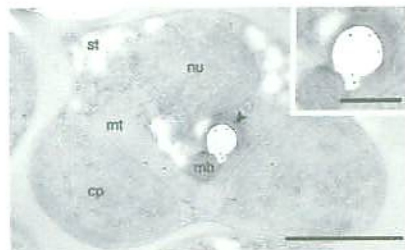


図4 抗液胞型H⁺-PPase抗体による免疫電子顕微鏡像。リソソーム様構造(矢頭)に対して抗体反応がみられ、これらの構造がリソソームであることが示された。右上、拡大像。st, デンプン粒; nu, 細胞核; mt, ミトコンドリア; mb, マイクロボディ; cp, 葉緑体。バーは500 nm、100 nm (右上)。

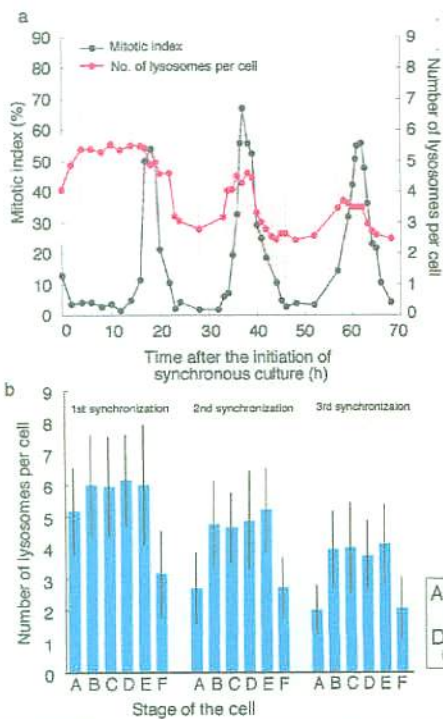


図5 細胞周期におけるリソソームの数の変動。細胞分裂を明暗周期によって同調し、DAPIによって可視化したリソソームの細胞あたりの数をカウントした。68時間の培養では3回の同調分裂が観察された。a, 経時的な変化。b, 分裂のステージ(同調分裂開始直前の間期の細胞(A)、葉緑体の伸長した(B)、くびれた(C)、分裂した(D)細胞、細胞分裂中の細胞(E) 同調分裂終了直後の間期の細胞(F)ごとにカウントし

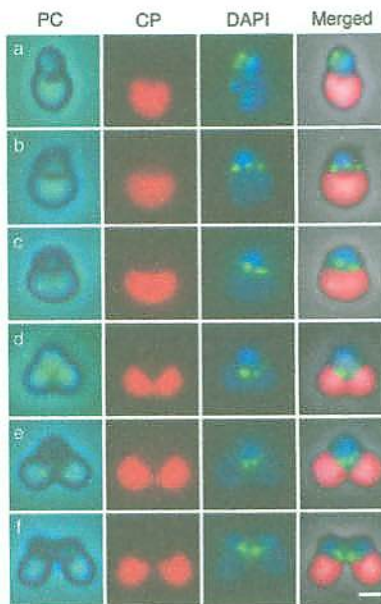


図6 DAPI染色によるリソソームの細胞周期における挙動。間期の間はリソソームは細胞の上側に観察される(a)。葉緑体の横方向への伸長が始まると、葉緑体上部つまりミトコンドリア上部に移動し(b, c)、葉緑体のくびれ込み、分断までその位置に留まる(d, e)。細胞質分裂時には細胞分裂面側に局在することが多く(f)、細胞分裂後に分裂面側を通過して上側に戻っていく。PC, 位相差像, CP, 葉緑体の自家蛍光像。バーは2 μm。

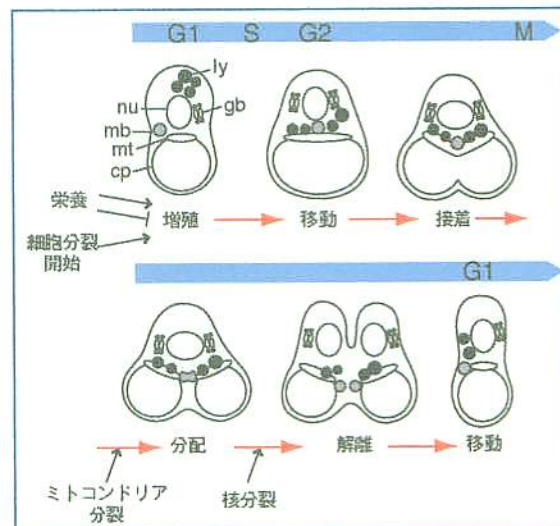
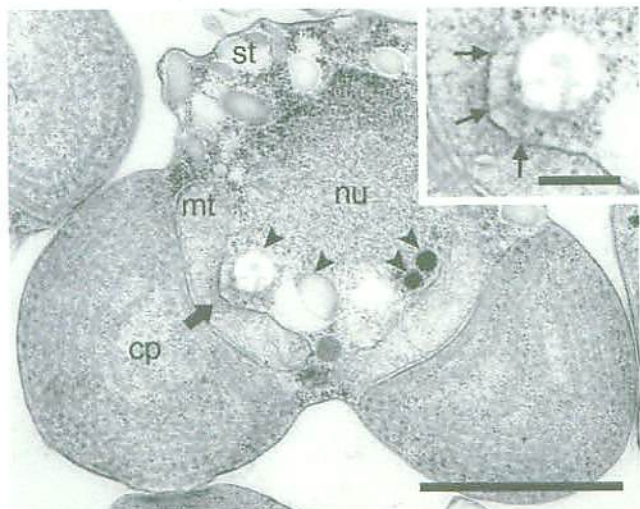


図8 リソソーム分配機構の模式図。リソソームの増殖は栄養等の環境要因と細胞周期によって制御される。葉緑体の伸長が開始されると、核の上の方に局在するリソソームはミトコンドリア上に移動し、ミトコンドリアに結合し、ミトコンドリア分裂により、娘細胞に分配される。細胞核分裂後、ミトコンドリアからの解離が開始され、細胞質分裂終了後は分裂面側を通過して核の上側に戻る。

図7 電子顕微鏡による分裂期(ミトコンドリア分裂終了後)の細胞像。リソソーム(矢頭)はミトコンドリア上に存在する。ミトコンドリアに食い込んでいるものも観察され(矢印)、その間には繊維状の構造が観察される(拡大像、矢印)。st, デンプン粒; nu, 細胞核; mt, ミトコンドリア; cp, 葉緑体。バーは1 μm、400 nm (拡大像)。