

論文内容の要旨

論文題目

Studies on FtsZ dynamics and a division apparatus in the cyanelle of
Cyanophora paradoxa (Glaucocystophyta)

灰色植物のシアネレ分裂における FtsZ の動態と分裂装置の
微細構造に関する研究

氏名 佐藤 繭子

序論

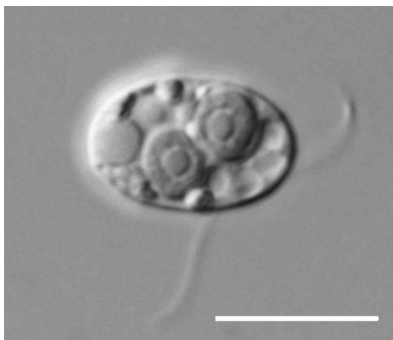


図1 灰色藻 *Cyanophora paradoxa* の細胞。2本の鞭毛と、1~2個の葉緑体(シアネレ)を持つ。Bar = 5 μ m.

葉緑体は、細胞内共生により誕生し、その起源はシアノバクテリアだと推定されている。また葉緑体は、独自のゲノムDNAを持ち、半自立的に分裂して増殖する。分裂に関わる装置として原核生物由来と真核生物由来のものがあることが近年の研究で明らかになってきた(Osteryoung and Nunnari, 2003)。原核生物由来の分裂装置については、*ftsZ*, *minD*, *sulA* などシアノバクテリアから陸上植物にいたるまで保存されている遺伝子がいくつか見つかっているものの、葉緑体

における機能はほとんど明らかになっていない。真核生物由来の分裂装置として、葉緑体の内側と外側にある二重の葉緑体分裂リング(Plastid-dividing ring: PD リング)と、ダイナミンが見つかっており、これらが分裂の原動力としての役割を果たしていると考えられている。

1924年、Korschokoffは、シアノバクテリアによく似た細胞器官をもつ鞭毛藻を発見し、*Cyanophora paradoxa* と名づけた(図1)。1929年、Pascherは、この細胞器官が共生したシアノバクテリアそのものだと考え、特別にシアネレ(cyanelle)と呼ぶことにした。シアネレは、後にゲノムサイズがシアノバクテリアの20分の1以下であることが明らかになり(Herdman 1977, Stirewalt *et al.* 1995)、現在では完全な葉緑体と考えられている。*C. paradoxa* を含む灰色植物門の藻類の葉緑体は、葉緑体二重包膜の間にペプチドグリカン層を維持している。ペプチドグリカン層は他の植物の葉緑体では既に失われており、灰色藻は植物の系統進化を考える上で重要な位置にある(Iino and Hashimoto, 2003)。

本研究では、灰色藻のシアネレの分裂装置を明らかにすることを目的とした。特に、植物の進化で葉緑体分裂制御システムがどのように獲得されてきたのか、原核生物由来の分裂装

置が果たす機能について明らかにしたいと考えた。

結果と考察

1. 原核生物由来の葉緑体分裂遺伝子の探索

(1) 原核型葉緑体分裂遺伝子の単離

縮重プライマーを用いた PCR 法により, *C. paradoxa* のゲノム DNA から, シアノバクテリアや葉緑体型の分裂遺伝子 *ftsH*, *ftsZ*, *minD* に相同な部分配列が得られた. このうち, 原核生物の細胞分裂面にリングを形成し, 原核型分裂装置の基盤を構成する *ftsZ* について, RACE 法と Inverse PCR 法を用いて全塩基配列を決定した(*CpFtsZ-cy*). 予測されるアミノ酸配列を TargetP プログラムで解析すると, N 末端の 35 アミノ酸残基が葉緑体移行ペプチドであると予測された.

(2) 葉緑体型 FtsZ の分子系統解析

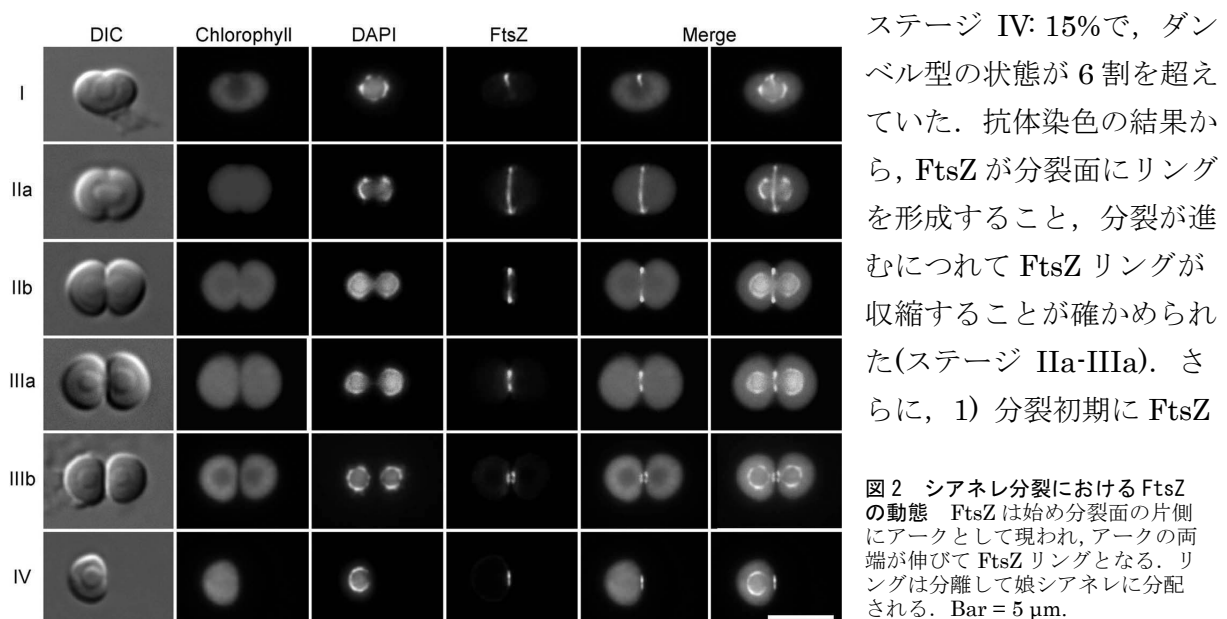
植物葉緑体で機能する FtsZ の系統関係については, 紅色植物・シアノバクテリア・緑色植物 FtsZ2 のクレードと, 緑色植物 FtsZ1 のクレードに分かれることが知られている. 近隣結合法を用いた分子系統解析から, *CpFtsZ-cy* は, 緑色植物の FtsZ1 に近縁である可能性が示唆された.

2. シアネレ分裂における FtsZ の動態

(1) FtsZ リング形成過程の観察

葉緑体二重包膜の間にペプチドグリカン層が維持されているシアネレでは, 他系統の葉緑体分裂に比べ, 原核生物型の分裂装置の機能が重要であることが考えられた. そこでシアネレでの FtsZ の局在を, 抗 FtsZ 抗体を用いた間接蛍光抗体染色により調べた(図 2).

クロロフィルの自家蛍光からシアネレの分裂過程を 4 つのステージに分けた(図 2, ステージ I-IV). シアネレは, 片側がくびれた腎臓型(ステージ I), くびれが分裂面全周に広がったダンベル型(ステージ II)を経て, 分裂面の隔壁形成が完了し(ステージ III), 分裂する(ステージ IV). また各ステージの頻度は, ステージ I: 21%, ステージ II: 32%, ステージ III: 32%,



が分裂面片側に弧を描くように局在していた(ステージ I). これを FtsZ アークと呼ぶことにした. FtsZ アークが見られるシアネレは分裂面の片側のみがくびれているもので, くびれの位置と FtsZ の局在は一致していた. 2) 分裂の最後に, FtsZ リングが分裂面に対して平行に分離していた(ステージ IIIb). これら二つの特徴は, シアネレが分裂時にペプチドグリカン隔壁を形成することに起因していると考えられ, 他の葉緑体には見られないものである.

(2) ペプチドグリカン合成が FtsZ アーク・リング形成におよぼす影響

原核生物の細胞分裂では, 最初に FtsZ が分裂面に足場となるリングを形成し, 続いてペプチドグリカン合成に関わる分裂装置のタンパク質複合体がリクルートされる(Margolin, 2005). *C. paradoxa* ではペプチドグリカン合成酵素 (Penicillin binding protein: PBP)の存在が生化学的研究から示唆されている. シアネレにおける FtsZ アーク・リング形成と PBP との関係調べるため, PBP の活性を阻害する β -ラクタム系抗生物質アンピシリンを用いて阻害剤実験をした. シアネレでは分裂終了後すぐに次の分裂が開始されるため, 分裂周期を通してくびれの入ったシアネレが観察される. しかし, アンピシリン処理の結果, くびれない球形のシアネレが見られるようになった. くびれないシアネレで FtsZ の抗体染色を行うと, FtsZ アークまたはリングが形成されていた. このことから, FtsZ の局在化は PBP とは独立に起こることがわかった. またペプチドグリカン合成阻害条件下では FtsZ の収縮・分離が阻害されていた. このことから, FtsZ の収縮・分離はペプチドグリカン隔壁形成にもなって起こることが示唆された.

3. シアネレ分裂装置の微細構造

(1) 走査型電子顕微鏡を用いたシアネレ外包膜表面の分裂装置の探索

シアネレ包膜を外側から絞り込む分裂装置が存在するかを調べるため, シアネレを単離し, フィールドエミッション型走査型電子顕微鏡(FE-SEM)を用いて, シアネレ表面の微細構造を観察した.

包膜の陥入はシアネレ表層の一箇所にできる溝から始まる. シアネレは, 深い溝をもつハート形になってから, くびれが拡大してダンベル状になる. くびれた表層に Outer PD リングが観察されることはなかった. これまでに SEM で観察されている他の葉緑体に比べ, 分裂面は鋭い角度で陥入しており, バクテリアの分裂面と類似していた. 分裂面の最初のくびれの位置と長さとはアーク状の FtsZ と一致している. 包膜陥入には, FtsZ リングを含むシアネレ内部の分裂装置が関与すると考えられる.

(2) 透過型電子顕微鏡を用いたシアネレ内部の分裂装置の解析

従来の化学固定に加え, 急速凍結と加圧凍結固定法で細胞を固定し, 分裂面内部の微細構造を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した. 化学固定法と凍結固定法の両方で Inner PD リングが観察できた. 化学固定法で見られた Inner PD リングは内包膜陥入部にドット状の電子密度の高い構造として観察された. 凍結固定法で観察された Inner PD リングは, 陥入部に沿うようなバンド構造をしていた. Inner PD リングは, シアネレ分裂初期には現れず, 内包膜の陥入が進んだシアネレで観察された. FtsZ はシアネレ分裂初期から分裂面に局在しているため, Inner PD リングとは異なる構造であることが示唆される. また透過型電子顕微

鏡頭観察においても、外包膜の上に Outer PD リングに相当する構造は観察されなかった。

結論

本研究では、ペプチドグリカンを維持した葉緑体である灰色藻シアネレの分裂装置について以下のことを明らかにした。

1. 予測されるアミノ酸配列を用いた分子系統解析で、CpFtsZ-cy は緑色植物の FtsZ1 ファミリーの基部に位置した。
2. 光学顕微鏡と走査型電頭の観察から、シアネレ分裂は全周で同時に起こるのではないことがわかった。
3. 抗 FtsZ 抗体による間接蛍光抗体染色の結果より、シアネレの FtsZ リングは FtsZ アークを経て形成され、これは走査型電頭で観察されるくびれの位置と一致すると予測される。
4. FtsZ の局在化はペプチドグリカン合成酵素とは独立に起こる。FtsZ の収縮・分離はペプチドグリカン隔壁形成にともなって起こり、その過程はアンピシリンで阻害される。
5. 透過型電頭を用いた分裂面の微細構造の観察から、陥入した内包膜の下に Inner PD リングが観察できた。外包膜の上に Outer PD リングに相当する構造は観察されなかった。

発表論文

- 1) Sato M., Nishikawa T., Yamazaki T., Kawano S. Isolation of the plastid *FtsZ* gene from *Cyanophora paradoxa* (Glaucocystophyceae, Glaucocystophyta). *Phycol. Res.* 53, 93-96 (2005).