

Analysis of distinct cell cycle control mechanisms in *Chlamydomonas reinhardtii* using single-cell cultivation assay.

「1細胞培養法による単細胞緑藻類クラミドモナスに
共存する独立した細胞周期制御機構の解析」

学生証番号 47720 松村和典

1. 背景

細胞の示す最も重要な生命現象の一つは、細胞周期である。大半の細胞は、細胞分裂完了後、次の分裂までに質量を2倍にすることで、増殖する際、大きさを一定に保っている。このような成長と分裂の調和は、個体の発生過程において、組織や器官が適切な大きさと細胞密度で形成されることを保障する。細胞のほとんどは、細胞周期のうち、 G_1 期のある点において、細胞の成長と分裂の調和を制御している。酵母では、「START」、哺乳類細胞では、「制限点」と呼ばれている。これらの点を通過すると、栄養や増殖因子が無くても分裂を完遂する。ところが、これまでの研究では、細胞周囲の環境を厳密に制御する方法がなかったため、成長と分裂の関係が明確ではなかった。

そこで、厳密に制御可能な栄養源として光に着目し、光合成によりエネルギーを得る、単細胞緑藻類クラミドモナスをモデル生物とした。クラミドモナスの成長と分裂の関係については、大きさを感知して細胞周期を制御するサイザーと、時間を計測して細胞周期を制御するタイマーという2つの機構の共存が提唱されていたが、それぞれの役割について研究グループ間で一致した見解がなかった。また、これまで用いられてきた培養法では、細胞の位置による受容光強度の変化、直接的細胞間相互作用の存在、増殖に伴う栄養源の減少といった欠点があった。さらに、明暗周期により細胞周期を同調させていたが、同調したとは、言い難い結果であった。

そこで、本研究は、照射条件を厳密に制御した光環境下における、単細胞緑藻類クラミドモナスの細胞周期制御機構の役割を、1細胞培養計測系を用いて、明らかにすることを目的とする。

2. クラミドモナス用1細胞培養計測系の開発

細胞間相互作用を排除し、光以外の栄養条件を一定に保つため、所属する研究室で開発されていた「オンチップ1細胞培養系」を、クラミドモナス用に改良した(図1a)。微細加工技術を用いて、スライドガラス上にマイクロサイズの罫い(マイクロチャンバ、図1b)を作成し、その中に細胞を配置した。マイクロチャンバ内の細胞が分裂したら、任意の1つの細胞のみを残して、光ピンセット

トでマイクロチャンバ外へ移動した(図1c)。これで、細胞間の直接相互作用を排除し、常に1つの細胞を観察する系を実現した。

さらに、マイクロチャンバを覆うガラス製の箱を配置して、空気ポンプによりCO₂濃度を一定にした最小培地を0.1 ml/分の速さで灌流し、液性因子による間接相互作用の可能性も排除した。また、光源として顕微鏡の観察光を用いることにより、光源からの距離を常に一定に保ち、強度も減光フィルターで厳密に調整した。細胞の動態は、タイムラプス計測で記録し、画像解析を駆使して体積測定を行い、定量的経時変化を捉えた。野生株は、鞭毛で泳いで逃げるため、鞭毛運動能欠失変異株(*pf18⁺*)を用いた。

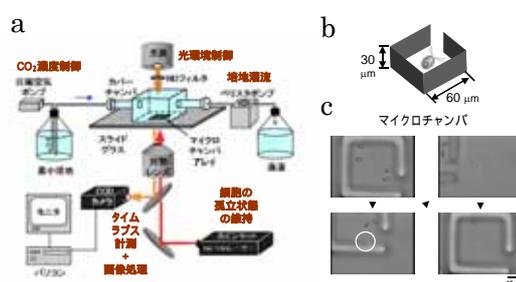


図1 オンチップ1細胞培養計測系の概要図 (a) システム構成 (b) マイクロチャンバの形状 (c) 細胞の孤立状態の維持

3. 連続照射条件下での細胞の成長と分裂の関係

まず、光を連続照射する条件で培養した。10, 20, 40, 100, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ と、さまざまな強度で培養すると、強度によらず、初期体積の約4倍に成長した時点で、分裂期に入り、2回分裂を行い、4つの娘細胞を生んだ。成長(分裂間)期において、細胞の体積が指数関数的な増加をみせたことから、それぞれの強度に対して、単位体積増加速度 μ を求め、分裂期に入った時刻 T との積を計算したところ、光強度によらず、 $\mu T = 1.40 \pm 0.23$ を満たしたところで、分裂期に入ることがわかった。

4. 照射停止条件下での細胞の成長と分裂の関係

次に、細胞が、 $\mu T = 1.40$ を満たす前に、照射を停止した場合、分裂を開始するのかどうかを検討した。10, 100, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の各強度で培養した。いろいろなタイミングで、照射を停止したところ、照射停止時刻を T_L 、光照射時の体積増加速度を μ_L 、分裂期に入った時刻を T_{LD} とすると、細胞は、 $\mu_L T_{LD} = 1.41 \pm 0.19$ を満たした時点で、分裂期に入った。ただし、照射停止時の細胞体積 $V(T_L)$ が、 $V(T_L)/V(0) > 2.1$ を満たすときに限られていた。これを下回っていた場合、細胞は、2日以上経っても、分裂を開始しなかった。また、娘細胞の数は、分裂開始時の細胞体積比 $V(T_{LD})/V(0)$ により決定し、 $1.8 < V(T_{LD})/V(0) < 3.1$ の時は、1回分裂して2個の娘細胞、 $2.9 < V(T_{LD})/V(0) < 4.1$ の場合は、2回分裂して4個の娘細胞になることが分かった。

5. 照射停止再開条件下での細胞の成長と分裂の関係

さらに、培養途中で照射を停止し、細胞が分裂を開始する前に照射を再開する条件を検討した。光強度 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ での培養中に、さまざまなタイミングで照射を停止し、かつ、分裂開始前に照射を再開すると、光を照射した時間を T_L 、明期の成長速度を μ_L 、分裂期に入った時刻を T_{LDL} としたとき、 $\mu_L T_{LDL} = 1.44 \pm 0.22$ を満たした時点で、収縮を開始することが分かった。また、照射停止時の体積比 $V(T_L)/V(0)$ が、2.1を下回り、かつ、照射停止時間が極めて長い(9時間)場合、 $\mu_L T_{LDL}$ は、1.44を大幅に超える。ところが、照射停止時間を除いて計算する、すなわち、照射再開時間を $T_{LD'}$ としたとき、 $\mu_L (T_{LDL} - T_{LD'} + T_L)$ は、1.44に近い値となる。また、娘細胞の数は、分裂開始時の細胞体積比により決定することがわかり、 $V(T_{LDL})/V(0) < 3.2$ の時は、1回分裂して2個の娘細胞、 $2.9 < V(T_{LDL})/V(0) < 4.1$ の場合は、2回分裂して4個の娘細胞になることが分かった。

6. 照射強度を減弱させる条件下での細胞の成長と分裂の関係

培養途中で、照射を停止する代わりに、減弱させる条件を検討した。光強度を減弱させると、細胞は、体積増加速度を、数十分のうちに変化した後の強度に相当する速度に落とした。光強度を減弱させた時刻を T_{L1} 、それまでの体積増加速度を μ_{L1} 、分裂期に入った時刻 T_{L12} をとしたとき、 $\mu_{L1} T_{L12} = 1.48 \pm 0.23$ を満した時点で分裂期に入ることがわかった。強度減弱時の体積比 $V(T_{L1})/V(0)$ が、2.1を下回り、かつ、強度を低下させた場合、 $\mu_{L1} T_{L12}$ は、1.48を大幅に超える。この際に、強度減弱後の成長速度 μ_{L2} と減弱後から分裂期までの時間 T_{L2} に対して、 $\mu_{L1} T_{L1} + \mu_{L2} T_{L2}$ は、1.48に近い値となることがわかった。また、娘細胞の数は、分裂開始時の体積比により決定することがわかり、 $V(T_{L12})/V(0) < 2.7$ の時は、1回分裂して2個の娘細胞、 $2.7 < V(T_{L12})/V(0)$ の場合は、2回分裂して4個の娘細胞になることが分かった。

7. まとめ

以上の知見を整理すると、単細胞緑藻類クラミドモナスの細胞周期制御機構には、3つの要素があることが分かった(図2)。

1. 閾値体積比による分裂可否を決定する機構の存在
2. (単位体積増加速度) × (分裂間期時間) = 一定 を満たす分裂間期を制御する機構の存在
3. 分裂期開始時体積比に応じて娘細胞数(分裂回数)の決定する機構の存在

つまり、細胞は初期体積の2倍以上成長していれば、その後の光の強度・照射時間には影響を受けない。よって、閾値体積比は、閾値サイザー、分列数は、分裂サイザーが決定し、分裂開始のタイミングは、成長速度依存タイマーが決定することが示唆された。

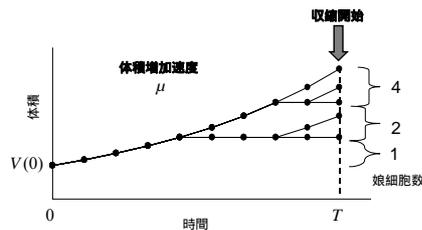


図2 細胞の体積と分裂開始の関係の概略図

単位体積増加速度 μ が、一定ならば、閾値体積比(=照射停止時の体積/初期体積)が、約2倍を越えている限り、同じ時間に収縮を開始し分裂する。約2倍に達していなければ、収縮が開始することはない。娘細胞数は、分裂を開始した時の体積に依存する。分裂開始時の体積が、分裂完了時の体積の約2倍から約3倍に達していれば、1回分裂して2個の娘細胞となる。約3倍から約4倍に達していれば、2回分裂して4個の娘細胞となる。

<参考文献>

- K. Matsumura, T. Yagi and K. Yasuda. "Role of timer and sizer in regulation of *Chlamydomonas* cell cycle." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **306**; 1064-1069. 2003
- K. Matsumura, T. Yagi and K. Yasuda. "Timer control of interdivision time and sizer control of division number in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 投稿中