

# 論文内容の要旨

## 論文題目

**Studies on FtsZ ring formation and chloroplast DNA synthesis in the unicellular green alga *Nannochloris bacillaris* under phosphate-enriched culture**

**単細胞緑藻 *Nannochloris bacillaris* の富リン酸培養下における FtsZ リング形成と葉緑体 DNA 合成に関する研究**

氏名

墨谷 暢子

## 序論

原核生物由来の葉緑体分裂タンパク質FtsZは、葉緑体分裂の初期にリング状構造を形成する。葉緑体は普通1回の分裂に1つのFtsZリングしかもたない。しかし、1つの葉緑体が複数のFtsZリングをもつ例がゼラニウムやタバコ培養細胞BY-2で報告されている。不等分裂するゼラニウムの胚帽細胞の葉緑体では、1葉緑体に複数のFtsZリングが観察される(Kuroiwa et al. 2001)。タバコBY-2細胞では植え継ぎ直後に葉緑体DNAが増加し、葉緑体の巨大化、FtsZリングの多重化が起きる(Momoyama et al. 2003)。また、シロイヌナズナでFtsZリング形成位置調整タンパク質minDやminEの発現量が変化するとランダムな間隔に局在した多重FtsZリングが観察される(Fujiwara et al. 2008)。

水圏の富栄養化は主に窒素(N)やリン(P)などの栄養塩類の濃度が原因と考えられている。自然界では、リンは、 $Al^{3+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Ca^{2+}$ と結合して土壌や湖の不溶性沈殿となりやすいため、藻類の要求量に対して欠乏する傾向にある。その結果、リンは、窒素と並んで藻類の増殖における制限因子となっている(Barsanti and Gualtieri 2005)。単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* はリン欠乏下で培養すると葉緑体DNA量が減少する(Yehudai-Resheff et al. 2007)。葉緑体DNAがリン源となり得るということは以前から知られており(Sears and VanWinkle-Swift 1994)、植物はDNAのみをリン源として栽培できることも知られている(Chen et al. 2000)。こうしたことから、環境中のリン濃度により、葉緑体はその分裂やDNA量を調整している可能性がある。

本研究では、バクテリアでゲノムDNAとFtsZリング形成がリンクしている点に着目し、富リン酸下におけるFtsZリング形成と葉緑体DNA合成について調べた。研究材料には、単細胞緑藻 *Nannochloris bacillaris* を用いた。単細胞緑藻であることは、分化した高等植物と異なり、リン酸

の影響を直接観察可能にさせると考えられる。またその構成は、1細胞に1葉緑体と単純であり分裂様式も2分裂と単純である(Arai et al. 1998, Yamamoto et al. 2001, 2003, 2007)。 *N. bacillaris* では緑色植物の *FtsZ1*、*FtsZ2* グループにそれぞれ属する *NbFtsZ1* と *NbFtsZ2* が単離されている(Koide et al. 2004)。以上の点から本研究には *N. bacillaris* が適した材料であると考えた。

## 結果と考察

### 1. 葉緑体分裂周期における *FtsZ* の発現

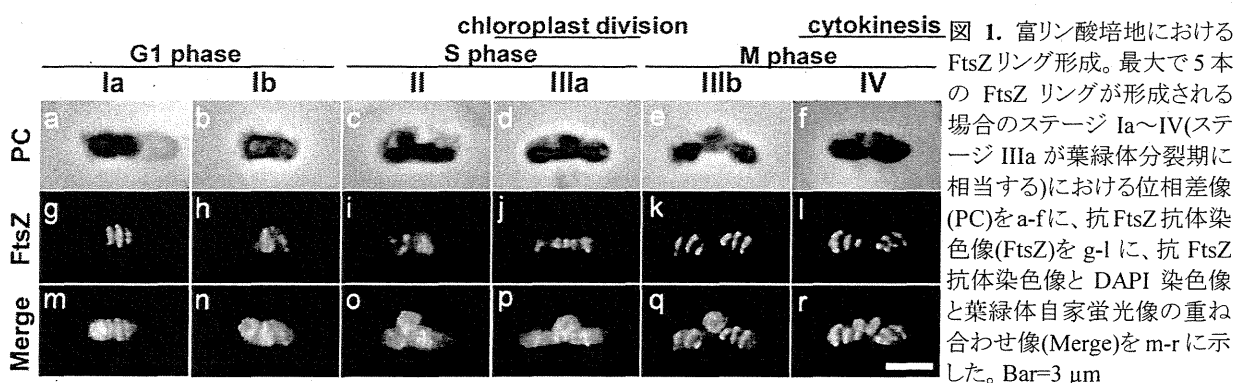
緑色植物の多くは1細胞に多数の葉緑体をもち同調せずに分裂するため、葉緑体分裂周期における *FtsZ1* と *FtsZ2* の発現様式はわかっていなかった。葉緑体分裂周期における *NbFtsZ1* と *NbFtsZ2* の発現を調べるために、*N. bacillaris* の同調培養系を検討した。*N. bacillaris* の培養に用いている  $F^+$  培地中より有機物を除いた  $F^-$  培地で12時間明期、12時間暗期で培養すると約80%の細胞が同調して分裂した。 $F^-$  培地では *FtsZ* リングは葉緑体分裂期に形成された。この培養系において *NbFtsZ1* は葉緑体分裂期特異的に発現した。一方、*NbFtsZ2* は細胞周期を通して常に発現していた。

### 2. 富リン酸下で誘導される多重 *FtsZ* リング

#### 1) リン酸濃度によって変化する *FtsZ* リングの形成パターン

$F^+$  培地中の  $\beta$  グリセリン酸塩濃度を0~2 mMと変えて培養した。細胞の倍加時間や、細胞長の平均はほとんど変わらなかった。培地中のリン酸濃度は増殖速度や大きさに影響を与えない。

抗 *NbFtsZ* 抗体を用いて *FtsZ* リングを観察した。1 mM では、*FtsZ* リング本数は細胞分裂直後から葉緑体分裂期へ細胞周期が進行するにつれて増加し、最大で4本の *FtsZ* リングが形成された。2 mM では、葉緑体分裂期に最大1つの葉緑体あたり6本の *FtsZ* リングが観察された。増殖速度や大きさに影響が無かったにも関わらず、培地中のリン酸濃度に応じて *FtsZ* リングの本数が変化したことは、リン酸濃度が *FtsZ* リングの形成パターンを変えることを示唆する。



#### 2) 多重 *FtsZ* リングをもつ葉緑体における PD リング形成

富リン酸下では *FtsZ* リングは複数形成されたが、1細胞周期に葉緑体分裂が複数回起こることはなかった。葉緑体分裂で力を発するのは、透過型電子顕微鏡(TEM)で観察される PD リングであるとされている。そこで、多重 *FtsZ* リングが形成されるときに PD リングの本数を調べるために、富リン酸培地で培養した細胞を TEM で観察した。TEM 下では *FtsZ* リングは観察できない。また、PD リングを構成するタンパク質はまだ同定されていない。そのため PD リング構造と *FtsZ* リング構造は同時に観察できないが、富リン酸培地で培養した細胞では *FtsZ* リング本数は葉緑体が長くなるにつれて増加したので、葉緑体長から *FtsZ* リングの本数を推測できる。*FtsZ* リングが複数本あると推測される葉緑体の分裂面には PD リングが形成されていたが、分裂面以外の箇所にも PD リ

ング様構造は観察できなかった。このことより FtsZ リングと PD リングの形成のトリガーが異なるため、富リン酸下でも細胞周期における葉緑体分裂は 1 回に保たれることが推測された。

### 3) 培地中のリン酸濃度と葉緑体 DNA 量

リン酸濃度を変えたとき FtsZ リング本数が細胞周期の進行にともなって増加したことは、1 細胞周期の中でのリング形成回数が増加したためだとみられる。バクテリアでゲノム DNA と FtsZ リング形成がリンクしている点、リン欠乏時に葉緑体 DNA 量が減少した点を考慮すると、富リン酸下では葉緑体 DNA 合成が持続したためリング形成回数が増加したと考えられる。そこで、貧リン酸培地と富リン酸培地で培養した細胞の葉緑体 DNA 量に着目した。貧リン酸、富リン酸培地ともに、細胞長に比例して葉緑体 DNA 量は増加した。しかし、富リン酸培地のほうが、貧リン酸培地よりも葉緑体 DNA 量は 2~3 倍多かった。富リン酸下での葉緑体 DNA 量増加はリンを葉緑体 DNA の形で蓄えるためにおこったと推測される。富リン酸下での多重 FtsZ リング形成と葉緑体 DNA 量の増加との関連を調べるため、富リン酸培地中に FdUr を添加して葉緑体 DNA 合成を阻害した時の FtsZ リング形成を調べた。FtsZ リング本数は富リン酸下で培養されたにも関わらず 1 本であった。FtsZ リング形成と葉緑体 DNA 合成はリンクしていて、多重 FtsZ リングはリン酸濃度の増加にともない葉緑体 DNA 量が増加した結果形成されたことが示唆された。

## 3. FtsZ リング形成と葉緑体 DNA 合成

### 1) 葉緑体 DNA 合成をともなわない葉緑体分裂と FtsZ リング

多重 FtsZ リングのうち葉緑体分裂に用いられるのは、1 細胞周期につき 1 本だけである。葉緑体分裂には葉緑体 DNA 合成をともなう分裂と、ともなわない分裂がある (Kuroiwa et al. 1989)。過剰に形成された FtsZ リングは、葉緑体 DNA 合成をともなわない葉緑体分裂のときに使われるのではないかと考えた。この可能性を検討するために、富リン酸培地から無機培地へ細胞を植え継いだときの葉緑体 DNA 合成と FtsZ リング形成について調べた。

富リン酸培地から無機培地へ植え継いだ細胞を明所で培養すると、始めの 15 時間は、細胞は富リン酸培地中と同じ倍加時間で増殖した。15 時間以降、倍加時間は無機培地中とほぼ同じ倍加時間となった。葉緑体 DNA はほとんど合成されなくなり、葉緑体核様体あたりの DNA 量は時間が経つにつれ減少した。FtsZ リングの本数は 24 時間で 1 本に減少した。無機培地へ植え継いで暗所で培養すると、15 時間で分裂は完全に停止し葉緑体 DNA 合成は停止した。FtsZ リングは多重のまま形成され続けた。無機培地に植え継ぐと、活発な葉緑体 DNA 合成と FtsZ リング形成をともなわずに既存の多重 FtsZ リングを用いて葉緑体は分裂することがわかった。

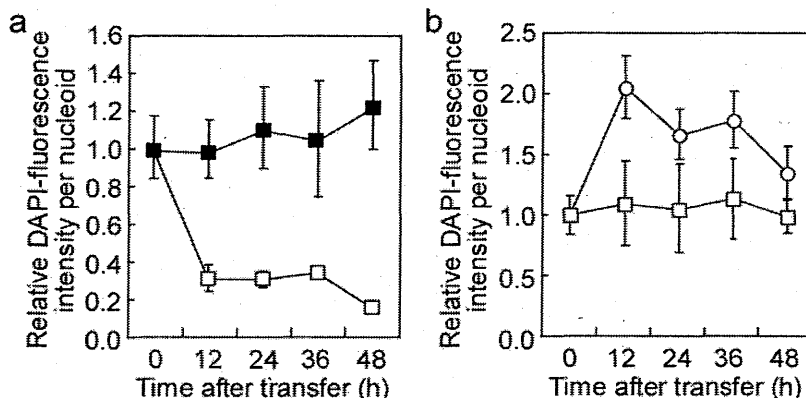


図 2. 細胞を植え継いだ時の核様体あたりの葉緑体 DNA 量の変化。細胞を DAPI で染色し葉緑体上の DAPI 蛍光強度を核様体数で割ることにより核様体あたりの葉緑体 DNA 量を見積もった。  
a. 富リン酸培地から無機培地へ植え継いで明所(□)もしくは暗所(■)で培養した細胞の核様体あたりの葉緑体 DNA 量の変化。  
b. 無機培地から無機培地(□)もしくは富リン酸培地(○)へ植え継いで明所で培養した細胞の核様体あたりの葉緑体 DNA 量の変化。バー=標準誤差

## 2) 葉緑体 DNA 合成をともなう葉緑体分裂と FtsZ リング

葉緑体 DNA 合成と FtsZ リング形成が培地中のリン酸濃度に応答しているかを確かめるために、無機培地、明所で培養した細胞を富リン酸培地へ戻した。植え継いで 12 時間まで、細胞はほとんど増加しなかったが、細胞長の増加、核様体あたりの葉緑体 DNA 量の増加とそれにともなう核様体の形態の変化、活発な葉緑体 DNA 合成がおきていた。FtsZ リングは 12 時間目にはすでに 1 葉緑体に複数本形成されていた。細胞は富リン酸環境になると短時間でリンを取り込んで葉緑体 DNA を合成し、これにともない FtsZ リングも複数形成されることが示された。

### 結論

培地中のリン酸量を増加する実験により、通常は葉緑体分裂期に 1 本形成される FtsZ リングが、リン酸濃度に応じて複数形成されることがわかった。これは特に富リン酸下で細胞がリンを葉緑体 DNA の形で蓄えようとして活発な葉緑体 DNA 合成が起こったことに誘導されて、1 細胞周期に複数回リング形成がおこったからであった。しかし、1 回の分裂に用いられたリングは 1 本だけであった。余剰の FtsZ リングは細胞が貧栄養に晒され、葉緑体 DNA 合成をともなわない葉緑体分裂を行うときに用いられることが富リン酸培地から無機培地へ植え継いだときの葉緑体 DNA 合成と FtsZ リング形成を調べた実験より示された。

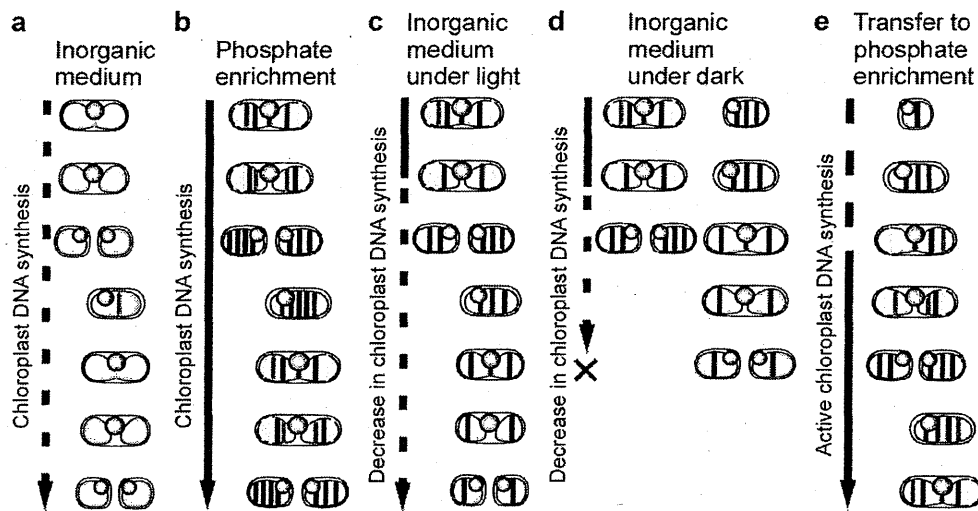


図 3.

培養条件ごとの葉緑体 DNA 合成と FtsZ リング形成のモデル図。a. 無機培地、b. 富リン酸培地、c. 富リン酸培地から無機培地へ植え継ぎ明所で培養もしくは d. 暗所で培養したとき、e. 無機培地から富リン酸培地へ植え継いだときの、FtsZ リング形成と葉緑体 DNA 合成を示す。