

立教大学学術推進特別重点資金 (立教 S F R)
 大学院生研究
 2010年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院	理学	研究科	生命理学	専攻
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年		氏名		
	理学研究科・生命理学専攻・2年		井元 祐太 印		
指導教員	所属・職名		氏名		
	理学部・特任教授		黒岩 常祥 印		
自然・人文・社会の別	自然・人文・社会		個人・共同の別	個人・共同名	
研究課題名	核、ミトコンドリア及び葉緑体の分裂周期を基盤とした細胞増殖のゲノム科学的解明				
研究組織	在籍研究科・専攻・学年		氏名		
	立教大学・理学研究科 生命理学専攻・前期2年		井元祐太		
研究期間	2010 年度				
研究経費	500 千円				

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

細胞は自己の複製と分裂によってのみ増殖する。一般的に複製と分裂のサイクルは細胞周期と呼ばれ、その構造と機能は細胞核のみを中心に研究が進められてきた。しかし、真核細胞は細胞核のみならず複膜系オルガネラ(ミトコンドリア、色素体)と単膜系オルガネラ(小胞体、ゴルジ体、リソソーム、マイクロボディ)をも含む。従って真核細胞の分裂増殖機構を真に理解するには細胞核に加え、オルガネラ分裂周期の理解が必須である。本研究では原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae*(シズン)シズンのゲノム及びポストゲノム情報を基盤に、単膜系オルガネラの一つであるマイクロボディの分裂増殖機構を制御する遺伝子として新たに KIF1 を同定・解析した。また、マイクロボディを含むオルガネラ分画を単離し nanoLC-MALDI TOF-MS を用いて、マイクロボディの分裂を担う新規遺伝子の探索を進めている。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

{ 細胞増殖 } { オルガネラ分裂周期 } { マイクロボディ }

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

1. シゾンのポストゲノミクスを基盤としたマイクロボディ増殖機構の解析

マイクロボディは真核細胞が普遍的に持つ単膜系オルガネラの一つであり、複膜系オルガネラ同様に自己の分裂により増殖する(Schrader and Yoon. 2007 *BioEssays*)。複膜系オルガネラは細胞核同様に独自の細胞周期(Kuroiwa et al. 1977 *J Cell Biol*; Kawano et al. 1979 *Cell Struct Funct*; Imoto et al. 2010 *Protoplasma*)と分裂装置によって増殖する(Kuroiwa et al. 1998 *Int Rev Cytol*; Yoshida et al. 2009 *Curr Biol*; 2010 *Science*)ことが明らかになっている(Imoto et al. 2011 *J. Elect. Micro. In submitted*)。しかし、マイクロボディに関しては一般的なモデル生物では細胞当たりの数が非常に多く形態的に複雑であるため細胞周期を通じた解析は困難であり、分裂に関する現象は未解決であった。一方、シズンは単一で且つ、分裂同調化が可能なマイクロボディを持つ(Miyagishima et al. 1998 *Protoplasma*; 1999 *Planta*)ため解析が容易である。本研究では、真核生物では初めて細胞周期を通して単一のマイクロボディの動態を詳細な蛍光顕微鏡観察により解析し、その増殖を制御する遺伝子 KIF1 をシゾンのポストゲノミクスを基盤に以下のように同定・解析することに成功した。

1-1. 細胞周期におけるマイクロボディの動態

光の明暗周期による分裂の同調化と、免疫二重蛍光染色による解析から以下のことが明らかになった。

(1)G1 期ではマイクロボディは細胞質に単一の球状の構造体として存在するが、S 期の開始とともにミトコンドリアに接着する。(2)G2 期では、マイクロボディはミトコンドリア分裂面に移動する。(3)ミトコンドリア分裂期(M 期前期)において、マイクロボディはミトコンドリアの分裂直前にミトコンドリア分裂面を取り巻くように、形態的な変化を伴う。(4)ミトコンドリア分裂直後にマイクロボディは再び球状の構造体に変化する。(5)M 期中期、後期においてミトコンドリア分配と共にマイクロボディは分裂し、細胞質分裂期には娘細胞側に完全に分配される。

従って、(3)のミトコンドリア分裂期において、マイクロボディがミトコンドリア分裂面に接着し、形態変化を行うことがそれに引き続くミトコンドリアとマイクロボディの分裂に重要であることが示唆された。

1-2. マイクロボディの形態変化時に発現する遺伝子群の同定

2-1.において示された(3)の時期にマイクロボディの形態的变化を担う強く発現する遺伝子が存在するはずである。(3)の時期においては、MD (Mitochondrial division; ミトコンドリア分裂)-ring とマイクロボディが接着しており(Miyagishima et al. 1999 *planta*)、マイクロボディの分裂に関わるミトコンドリア紡錘体が形成される(Imoto et al. 2010 *Protoplasma*)ことが知られている。そこでMD-ringのプロテオーム(Yoshida et al. 2006 *Science*; 2009 *Curr Biol*)に含まれる微小管系周辺のタンパク質であるキネシンに注目した。シズンは KIF1、KIF2、KIF3、KIFi、KIFc の 5 つのキネシンをもち、マイクロアレイデータから KIF1 のみが(3)の時期特異的に転写レベルが上昇していることが示された。

1-3. KIF1 の遺伝子構造解析

分子系統解析から KIF1 は真核生物に普遍的に保存されており、紡錘体形成やオルガネラの位置決定に関わる kinesin-5 のサブファミリーに分類されることが明らかになった。TargetP と TMpred による配列の解析から、KIF1 には N 末端に 90 アミノ酸のミトコンドリア移行シグナル配列が存在し(score=0.600)、その直後には約 20 アミノ酸からなる膜貫通領域が存在することが明らかになった(score=538)。従って KIF1 はミトコンドリアの外膜又は内膜に局在することが予測された。

1-4. KIF1 の局在解析

KIF1 は S 期から M 期にかけて発現するタンパク質であり、免疫蛍光染色と VIMPCS による細胞内局在の解析から以下の 4 段階の KIF1 の局在が示された。(1)KIF1 は S 期からセントロソーム上に局在を始める。(2)G2 期において、KIF1 はミトコンドリア紡錘体に沿ってセントロソームからミトコンドリア分裂面に局在が移動する。(3)マイクロボディの形態的变化及びミトコンドリアの分裂時にはミトコンドリア分裂面において KIF1 が細胞周期を通じて最も高いシグナル強度を持つ。(4)ミトコンドリア分裂後には、KIF1 の局在はセントロソーム上に再構成され、M 期中期以降においては細胞核紡錘体上に局在する。

KIF1 は微小管重合阻害剤であるオリザリンにより細胞を処理した場合においても、ミトコンドリア分裂面に集合した。また、パーコール密度勾配遠心法と、NP-40 処理によるミトコンドリア外膜の単離により、KIF1 が微小管面分とミトコンドリア外膜面分の二つに存在することを明らかにした。従って、ミトコンドリア分裂期においては、ミトコンドリア

研究成果の概要 つづき

紡錘体とミトコンドリア分裂面の外膜上の 2 点において KIF1 が異なった機能を持つことが示唆された。

1-5. アンチセンス法による KIF1 の機能解析

アンチセンス法による KIF1 の発現抑制により以下の 2 つの阻害効果が示された。

(1) マイクロボディは M 期の間、G1 期同様に単一の球状の構造として存在し、1-1.(3)で示された形態変化が阻害された。これらの細胞ではミトコンドリアの分断に中心的な機能を果たすダイナミン CmDnm1 が正常にミトコンドリア分裂面に局在するにも関わらず、ミトコンドリア分裂は阻害された。従って、ミトコンドリア分裂にはそれに先立つマイクロボディの形態変化が必須であると考えられる。

(2) ミトコンドリア紡錘体の形成とマイクロボディの分裂が阻害された。ミトコンドリア紡錘体はオリザリン処理により脱重合すると、マイクロボディの分裂が阻害されることが示されている (Imoto et al. 2010 *Protoplasma*)。これは、本研究の結果と一致しており、KIF1 がミトコンドリア紡錘体の形成に中心的な機能を果たすことによりマイクロボディの分裂に関与すると考えられる。

以上の結果から KIF1 は細胞周期を通じて以下のようにマイクロボディの増殖を制御していると考えられる。

(1) マイクロボディは S-M 期特異的にミトコンドリアに接着する。(2) M 期のミトコンドリア分裂期において、モータータンパク質 KIF1 がミトコンドリア分裂面の外膜上で機能し、マイクロボディがミトコンドリア分裂面を取り巻くように形態的に変化する。(3) マイクロボディの形態的变化が CmDnm1 によるミトコンドリアの分断を誘導し、ミトコンドリア分裂が行われる。(4) ミトコンドリア分裂後、マイクロボディは単一の球状の構造に再構成され、KIF1 により形成されるミトコンドリア紡錘体により分裂が行われる。

細胞周期全体を通じての単一のマイクロボディとミトコンドリアの分裂過程の解析例は本研究が初めてであり、本研究は他の研究機関の研究より独創性の高いものであると言える。特に、M 期におけるマイクロボディとミトコンドリアの相互作用がオルガネラの分裂において重要であるという新たな知見は、真核細胞の膜系オルガネラ増殖の理解の基本になるものであり、当研究科のみならず、国内外の研究者にも大きな影響を与えると考えられる。これらの成果は現在論文にまとめ投稿準備中である。

2. nanoLC-MALDI TOF-MS による新規マイクロボディ分裂遺伝子の探索

1. の成果から、分裂期特異的にマイクロボディがミトコンドリアに接着し、形態的变化を行うことがミトコンドリアとマイクロボディの分裂に重要であることが示された。そこで、パーコール密度勾配遠心法によりフレンチプレスで破碎したシゾン画分を分画した結果、マイクロボディを含む画分が得られた。この画分を取り出し、免疫蛍光染色によりマイクロボディの形態を解析したところ、マイクロボディは M 期にのみ、ミトコンドリアと接着した状態で単離された。そこで、この単離された分裂期マイクロボディ・ミトコンドリアの複合体を当研究室の吉田昌樹博士(現筑波大学生命環境科学研究科)の協力のもと、nanoLC-MALDI TOF-MS によってプロテオミクスを行い、新規マイクロボディ分裂遺伝子の探索を進めた。プロテオーム解析で得られたスコアの高い上位 100 の遺伝子の中には、3 つの N 末端側にマイクロボディの移行シグナルである PTS1 を持つ遺伝子と、8 つの保存性の高い機能未知の遺伝子、そして KIF1 と系統的に近い位置に存在するキネシン KIFi が得られた。さらに候補遺伝子を絞り込むために、マイクロボディ・ミトコンドリア複合体の膜に局在するタンパク質に注目した。一般的に酵母や哺乳動物等、他の真核細胞においては、マイクロボディの膜タンパク質である PEX11 や hFis1 がマイクロボディの増殖に関与することが知られている (Schrader et al 1998 *J Biol Chem*; Koch et al 2005 *Mol Biol Cell*)。しかしこれらのタンパク質は明確にマイクロボディの分裂面には局在せず、またシゾンにおいてはゲノム中に保存されていない (Misumi et al 2008 *J Plant Res*)。1-4. の結果では単離したマイクロボディ・ミトコンドリア複合体を NP-40 で処理することにより、KIF1 を含むオルガネラの膜画分が得られた。現在この画分のプロテオミクスを進めており、解析によって真核生物に普遍的なマイクロボディの分裂に中心的な機能を果たすタンパク質の同定が期待される。

※ この(様式 2)に記入の成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した調書(A 4 縦型横書き 1 枚・自由様式)を添付すること。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

① 学術雑誌に発表した論文
(査読あり)

- 1) **Imoto Y**, Fujiwara T, Yoshida Y, Kuroiwa H, Maruyama S, Kuroiwa T.
Division of cell nuclei, mitochondria, plastids, and microbodies mediated by mitotic spindle poles in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Protoplasma*, 241, (2010), 63-74.
- 2) Yoshida Y, Kuroiwa H, Misumi O, Yoshida M, Ohnuma M, Fujiwara T, Yagisawa F, Hirooka S, **Imoto Y**, Matsushita K, Kawano S & Kuroiwa T.
Chloroplasts divide by contraction of a bundle of nanofilaments consisting of polyglucan. *Science* 329 (5994), (2010), 949-953.
- 3) **Imoto Y**, Yagisawa F, Yoshida Y, Kuroiwa H and Kuroiwa T.
Cytological aspect of cell cycle and organelle dividing cycle. *J. Electron Microscopy*. (2011). In submitted.

② 図書
なし

③ シンポジウム・公開講演会等の開催
なし

④ その他
学会発表

- 井元 祐太, 大沼 みお, 吉田 昌樹, 吉田 大和, 藤原 崇之, 黒岩 晴子, 黒岩 常祥
「細胞核、ミトコンドリア及び葉緑体の3分裂周期を基盤とした、ミトコンドリア紡錘体の発見とその機能解析」
日本植物形態学会第22回大会 2010年9月8日
- 井元 祐太, 大沼 みお, 吉田 昌樹, 吉田 大和, 藤原 崇之, 黒岩 晴子, 黒岩 常祥
「細胞核、ミトコンドリア及び葉緑体の3分裂周期を基盤とした、ミトコンドリア紡錘体の発見とその機能解析」
日本植物学会第74回大会 2010年9月10日