

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
 2007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
指導教員	所属・職名		氏名		
	理学研究科・特任教授		黒岩 常祥 印		
自然・人文の別	自然・人文		個人・共同の別	個人・共同 名	
研究課題名	極限環境紅藻のゲノム情報と網羅的タンパク質発現解析を基盤とした細胞増殖原理の解明				
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		藤原 崇之 印		
研究組織	在籍研究科・専攻・学年		氏名		
	理学研究科・生命理学専攻・2年		藤原 崇之		
研究期間	2007 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。)

真核細胞の増殖にとって、細胞小器官を娘細胞に確実に分配することが重要である。しかし高等生物では細胞核の分配機構は複雑であり、また細胞核以外の小器官などは無数に存在し、形状が可変的である事などから解析が困難だった。一方、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae*(シゾン)では、細胞核の分配機構も単純で、各細胞小器官が少数で、分裂分配様式が細胞周期に依存している。本研究ではシゾンの細胞周期のマイクロアレイ解析データを基に、リソソームの分配機構の解析を進め、新規遺伝子である *vip* を発見した。また細胞核構成タンパク質をプロテオーム解析し、細胞核の増殖機構に機能する遺伝子を探索するため、単離法の開発をしている。

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。)

[細胞小器官] [増殖] [細胞周期]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

まず細胞小器官の研究に当たり、当初シズンゲノム解読で残っていた未解読領域の一部を解読した。未発見の遺伝子や機能配列を完全に網羅することが、細胞小器官をポストゲノム解析する上で欠かせないと考えたのである。結果をシズンを 100%完全解読された最初の真核生物とし、共著者として発表した(Nozaki *et al*, 2007 *BMC Biol*)。またゲノムが解読された藻類とシズンの比較ゲノム解析から、シズンが細胞小器官の解析に適していることが判明した(Misumi *et al*, 2008 *J Plant Res*)。そこで完全解読されたシズンのゲノム情報を基盤に細胞小器官の分配機構の解析を進めた。

① シズンにおけるリソソーム分配機構の解析

真核細胞において、貯蔵器官や加水分解小胞として動物ではリソソーム、植物と酵母では液胞が知られている。出芽酵母においては、アクチン、ミオシン、*vac17* また *vac8* が液胞の分配に関わることが知られている(Weisman LS. 2006 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*)。高等動植物においてもリソソーム/液胞が、確率的ではなく能動的な機構で娘細胞に分配・継承されるが、機能する遺伝子は不明である(Dunster *et al*, 2002 *Eur J Cell Biol.*; Jose *et al*, 2006 *Planta*)。出芽酵母の *vac17*, *vac8* は真菌の一部のみにある遺伝子で、真核生物全体におけるリソソーム/液胞の分配機構の説明はできない。高等動植物ではリソソーム/液胞の数が多く、不定形である事が解析を困難にしているようだ。一方、*Cyanidioschyzon merolae* (シズン) のリソソームは分裂期には 6 個前後のみで観察しやすい。リソソームは、間期には細胞質にあるが、分裂期の直前に細胞質からミトコンドリア周辺へ移動し、核分裂期を通してミトコンドリアに結合し続け、細胞質分裂後に細胞質へと戻る(Yagisawa *et al*, 2006 *Planta*)。リソソームの移動には微小管もアクチンフィラメントも関与していない。本研究では、シズンのリソソーム分配機構を解析し、真核生物全般に共通な機構を見出すことを目的とした。

細胞小器官の分裂・分配の時期に発現する遺伝子を調べるため、細胞周期を同調させながら培養したシズンをマイクロアレイ解析にかけた(Fujiwara *et al*, 2007 NCBI GEO)。この遺伝子発現プロファイルを元に *ftsZ*, *dnm2*, *tubulin* などミトコンドリア、葉緑体及び細胞核の分裂・分配遺伝子が誘導される S 期と M 期の合計 162 個の遺伝子群からリソソームの分配機構に関わる遺伝子を探索した。しかしリソソームでの機能がよく知られた遺伝子は無く、ほとんど機能が未解析な遺伝子の中で他生物に共通性のある遺伝子に対象を絞った。この内、出芽酵母で網羅的に解析された GFP 融合タンパク質の局在を参考にして(Huh *et al*, 2003 *Nature*)、エンドソームと液胞に局在を示す遺伝子を発見した。この遺伝子は約 30kDa のコイルドコイルタンパク質で、真核生物のほぼ全てに保存されている。酵母と哺乳類でのわずかな機構解析によれば、エンドソームをリソソーム運搬する機能を持っている。しかしリソソームの分配に関連した機能は報告されてない。この遺伝子を *vip*(vacuole inheritance protein)と名付け、解析を進めた。

マイクロアレイ解析によると *vip* は、リソソームがミトコンドリアに移動する S 期に転写量が増大し M 期に最大に達した。これは定量的リアルタイム RT-PCR によっても確かめられた。また *Vip* が S 期から M 期に特異的に発現するタンパク質であり、免疫蛍光染色によると、*Vip* の局在は G1 期では細胞質にあるリソソームに対する局在は見られなかったが、S 期になるとリソソームに *Vip* が局在し始め、その局在を保持したままリソソームがミトコンドリアの周辺に移動・接着した。そしてこの局在はミトコンドリアとともにリソソームが娘細胞に分配されるまで続き、細胞質分裂後 *Vip* の局在が消えるとリソソームが細胞質に戻った。また、翻訳阻害剤の時期特異的な添加により *Vip* の発現が抑えられた細胞は、細胞周期が進行しているにも関わらず、リソソームが細胞質に残ったままであった。そして細胞質分裂を迎えた細胞は、リソソームの不均一な分配を見せた。これらの結果は、*Vip* がリソソームをミトコンドリアへ輸送し接着させる機能を持ち、リソソームの分配を制御していることが示していた。またホモログとのアミノ酸配列との比較から、*Vip* の C 末部分にシズンに特徴的なコイルドコイル領域が見つかり、これがリソソームをミトコンドリアに接着させるシグナルになっている可能性が考えられた。*vip* は真核生物に広く保存された遺伝子であり、高等生物においても細胞周期を通じて *vip* ホモログの解析を行えば、リソソーム/液胞の分配機構に関する新たな知見が得られるはずである。

研究成果の概要 つづき

Vip の発見は、真核生物において細胞骨格系に依存しないリソソーム/液胞の分配機構における新たな視点を開いた。現在この成果を論文にまとめ、投稿中である。

② シゾン細胞核の単離

シゾンの細胞核は、rDNA 領域がわずかに 3 セットであるにもかかわらず、明確に核小体を形成する。また分配様式は、核膜が消失せず染色体が凝縮しないなど、高等動物と比べる非常に単純である。そこで細胞核の単離法を確立して、質量分析装置で細胞核構成タンパク質を同定し、それを細胞周期ごとに比較すれば、核小体の構成タンパク質、細胞核の分裂に関わる遺伝子群が同定できると考えられた。そこで、まず細胞核の単離法の確立を目指した。

以前よりフレンチプレスによる葉緑体単離法が行われており、細胞核を含む画分があることが分かっていたが、葉緑体の破砕片が多く紛れ込んでおり、イムノブロットングによっても、特にヒストンのシグナルに富む画分はなかった。そこで、より効率よく細胞核が単離できる方法を模索した。

フレンチプレス破砕法より穏やかな条件で細胞を破砕するため、小型のホモジナイザーでトウモロコシでんぷんを混ぜながら細胞を破砕した。DAPI 染色で破砕液を染色すると、単独で浮遊している細胞核が観察できたので、密度勾配遠心法で分画した。各密度で分離された画分を DAPI 染色で観察すると、密度の高い画分に細胞核が見つかった。また各画分を SDS-PAGE で展開すると細胞核が確認された画分のバンドパターンは、葉緑体核画分などと大きく異なっており、10-15kDa の間に特に太い 2 本のバンドが見つかった。当研究室の吉田昌樹博士に協力してもらい、この 2 本のバンドを質量分析装置で解析した結果、ヒストン H3 と H4 であった。このようにヒストンに富む画分が得られたので、現在さらに細胞核の純度を向上させつつ、2 次元電気泳動により展開し、プロテオーム解析を行っている。

③ シゾンにおけるコンデンシン複合体の解析

高等な真核生物の細胞核では、複製された姉妹染色体 1 対ずつが高度に凝縮し棒状染色体を形成し、娘細胞に分配される。この凝縮過程において必須とされているコンデンシン遺伝子群は、古細菌、真正細菌、真核生物と進化の過程で非常に広く保存され、複合体で機能する。脊椎動物では核分裂期に凝縮する染色体上に局在するが、遺伝子発現が抑えられた細胞でも染色体凝縮が全く阻害される訳では無い(Ono *et al*, 2004 *Mol Biol Cell*)。また染色体の凝縮が起こらないシゾンにおいても遺伝子のすべてが保存されているなど(Hirano 2005 *Curr Biol*)、いまだ説明されていない機能があると予測される。

シゾンの細胞周期のマイクロアレイ解析からは 2 つのサブユニットが M 期に誘導されていたことの、サブユニットの全ての遺伝子についてリアルタイム PCR で発現を解析すると、全ての遺伝子発現が G2 期か M 期に最大であった。コンデンシン I 複合体を形成するサブユニットの発現が M 期にピークを持ち、コンデンシン II 複合体のサブユニットの発現は G2 期に最大であった。複合体毎に機能が異なる可能性が示唆された。

本研究では、まずコンデンシンの両複合体の共通のコアタンパク質に注目し、現在局在の解析を行っている。

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 雑誌論文

Nozaki H, Takano H, Misumi O, Terasawa K, Matsuzaki M, Maruyama S, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Fujiwara T, Takio S, Tamura K, Chung SJ, Nakamura S, Kuroiwa H, Tanaka K, Sato N, Kuroiwa T.

A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*.

BMC Biol. **10**. (2007) p5-28.

Misumi O, Yoshida Y, Nishida K, Fujiwara T, Sakajiri T, Hirooka S, Nishimura Y, Kuroiwa T.

Genome analysis and its significance in four unicellular algae, *Cyanidioschyzon merolae*, *Ostreococcus tauri*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Thalassiosira pseudonana*.

J Plant Res. **121**. (2008) p3-17.

2 図書

なし

3 シンポジウム

なし

4 その他

学会発表

○藤原崇之、橋本正樹、阪後貴之、吉田大和、吉田昌樹、西田啓二、八木沢芙美、三角修己、黒岩晴子、黒岩常祥

「ポストゲノム解析を基盤とオルガネラ増殖機構の解明」

日本植物学会第71回大会 2007年9月8日

NCBI: Gene Expression Omnibus へのマイクロアレイ解析データ登録

Cyanidioschyzon merolae cell cycle.

Fujiwara T, Misumi O, Tashiro K, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Yoshida M, Mori T, Sakajiri T, Hashimoto M, Kuroiwa H, Kuroiwa T.

The National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus, Accession: GPL5399. Jun 19, 2007