



2013年6月14日

### 真核細胞誕生の謎を解く DNA を含まない単膜系の細胞小器官に分裂リング(c-Pod)を発見 ～ペルオキシソームに、ミトコンドリア、葉緑体に続く、第三の分裂装置～

#### 研究成果の概要

ペルオキシソーム（マイクロボディ）は脂質代謝（脂肪・油脂、ステロイド等）と有害な活性酸素除去を行い、全ての生物（細胞）の生存に必須な DNA を含まない単膜系の細胞小器官です。ヒトにおいてその形成・増殖障害は II 型糖尿病や致死的疾患 Zellweger 症候群などの先天性代謝異常症（脂肪代謝障害、脳・中枢神経の形成と発達不全などの臨床症状）、アルツハイマー病などを引き起こす原因として知られています。しかしペルオキシソームの発見以来、半世紀の間、その誕生や形成・増殖のしくみは未解決の問題でした。立教大学理学部井元祐太特別研究員（東京大学 JSPS 特別研究員・新領域河野研究室）と黒岩常祥特定課題研究員らのチーム（黒岩晴子博士、大沼みお博士）は、ペルオキシソームが細胞内に 1 個しか持たない原始紅藻シズオンを使い、そのポストゲノム情報を駆使して、ペルオキシソームの分裂に必須な分裂装置（リング）を世界で初めて発見し、c-Pod（**C**yanidioschyzon **P**eroxisome **d**ividing）リングと命名しました。さらに、そのリングの単離に成功し、それが二重のリングから構成される超分子ナノマシーンであること、その主たる構成タンパク質の遺伝子は高等動物にも普遍的に保存されていることを明らかにしました。こうした知見は、今後、ペルオキシソーム分裂の分子機構の解明のみならず、医療などへの応用とともに 20 億年前の真核生物誕生における単膜系細胞小器官の誕生の謎の解明に貢献することが期待されます。研究の成果は 6 月 4 日付米国科学アカデミー紀要に掲載されました。

#### I 研究の背景

ほとんどの生物は 1 個の受精卵が細胞分裂を繰り返し形成されたものであり、ヒトでは約 60 兆個の細胞から構成されています。生命の基本単位である細胞内には、細胞の中心にある細胞核の他に、重要な生命活動を担う、DNA を含む二重膜に包まれた 2 種の細胞小器官（ミトコンドリア、色素体（葉緑体、植物のみ））と、DNA を含まない単膜に包まれた 4 種の細胞小器官（ゴルジ体、小胞体、リソソーム、ペルオキシソーム）が含まれます。これらの細胞小器官は、約 20 億年前に真核細胞が誕生して以来今日まで、細胞分裂の際に娘細胞へと分配・遺伝されてきたと考えられます（図 1A）。この中でミトコンドリアと葉緑体については、これまで同チームが分裂装置を発見し、その誕生や分裂増殖の基本機構を明らかにして来ました。しかし単膜系の DNA を含まない細胞小器官の発生や分裂・増殖の仕組みについては全く明らかではありませんでした。特にペルオキシソームは、生物の 3 大栄養素（糖・脂肪・たんぱく質）の一つである脂肪の代謝や有害な活性酸素の除去、脳の神経細胞膜を構成するプラズマローゲン合成を行い、その増殖・形成障害はペルオキシソーム病など重篤な病気と関係しており、これまで数多くのモデル動物・菌類を使って研究がなされて来ました。しかし、1950 年代にペルオキシソームが発見されて以来、今日までにこの小器官が小胞体から出芽して形成される説、分裂によって増える説など様々な説が提唱されてきており、発生や増殖の仕組みは未解明でした。この原因は、ヒトなど高等動物の細胞では、1 個の細胞当たり、細胞核 1 つに対し、ペルオキシソームが数百から数千あり、しかもそれらがランダムに増えるため（図 1B）、その細胞内での動態が完全に掴めないからと考えられました。

### 1) 細胞分裂の基本的なしくみの解明に最もシンプルな真核生物“原始紅藻シゾン”を使用

上記の問題を克服するため、シゾン（*Cyanidioschyzon merolae*）を使用しました。シゾンは500分の1mmと小さく、1回の細胞分裂が1生活環です。さらに、ヒトやイネなどの真核細胞が含む7種全ての細胞小器官を含み、その数はペルオキシソームを含めほとんど1個です（図1C）。

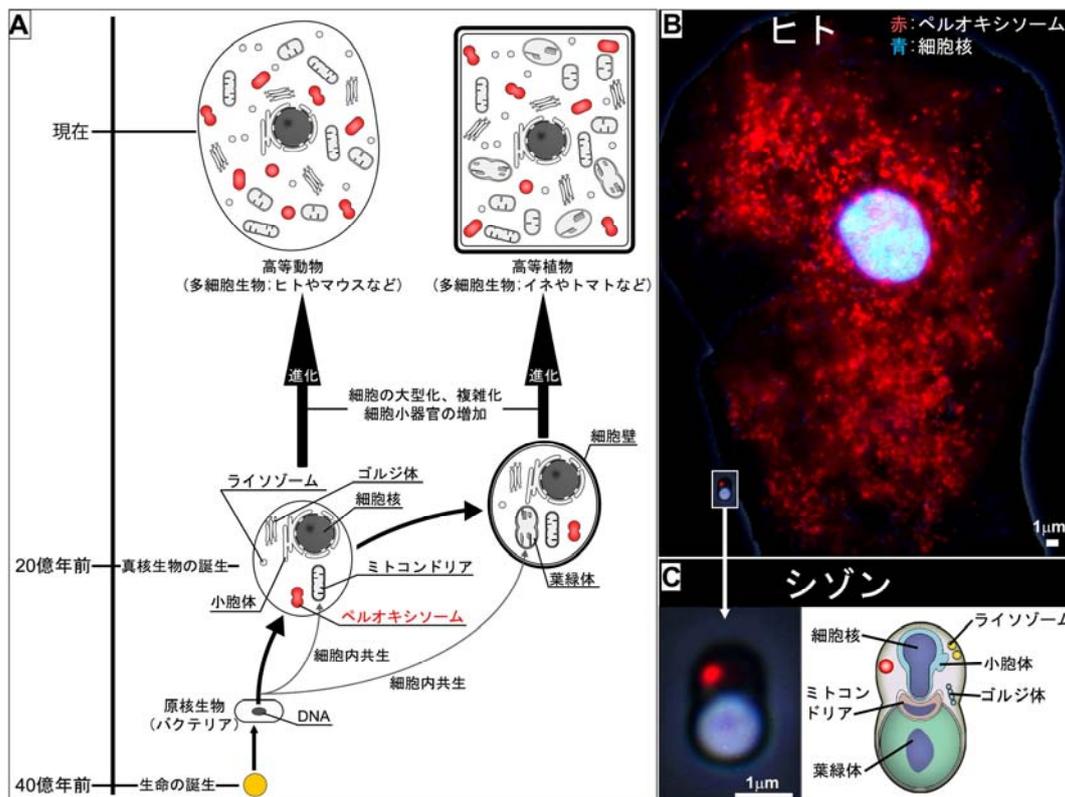


図 1

- すべての真核細胞は、細胞核に加え、細胞内共生（注 1）を起源とし二重膜に包まれたミトコンドリアと葉緑体（植物細胞のみ）、そして単膜につつまれたペルオキシソーム、ライソソーム、ゴルジ体、小胞体を持ちます。これらはすべて分裂によって増殖します。
- ヒトとシゾンの1細胞のペルオキシソームを示す蛍光顕微鏡写真。
- シゾンのペルオキシソームの拡大像と細胞構造のモデル。

### 2) ペルオキシソームの分裂を揃える（同調化）

シゾンは葉緑体を1個含んでいるため、これが光のセンサーとなり、光の明暗で細胞分裂を容易に同調化することができます。これは動物細胞ではできません。シゾンの細胞分裂とともに細胞に含まれる7種の細胞小器官も順次に同調的に分裂します。ペルオキシソームは葉緑体、ミトコンドリアの分裂に続いて細胞核とともに細胞分裂期の最後に分裂します（図2）。

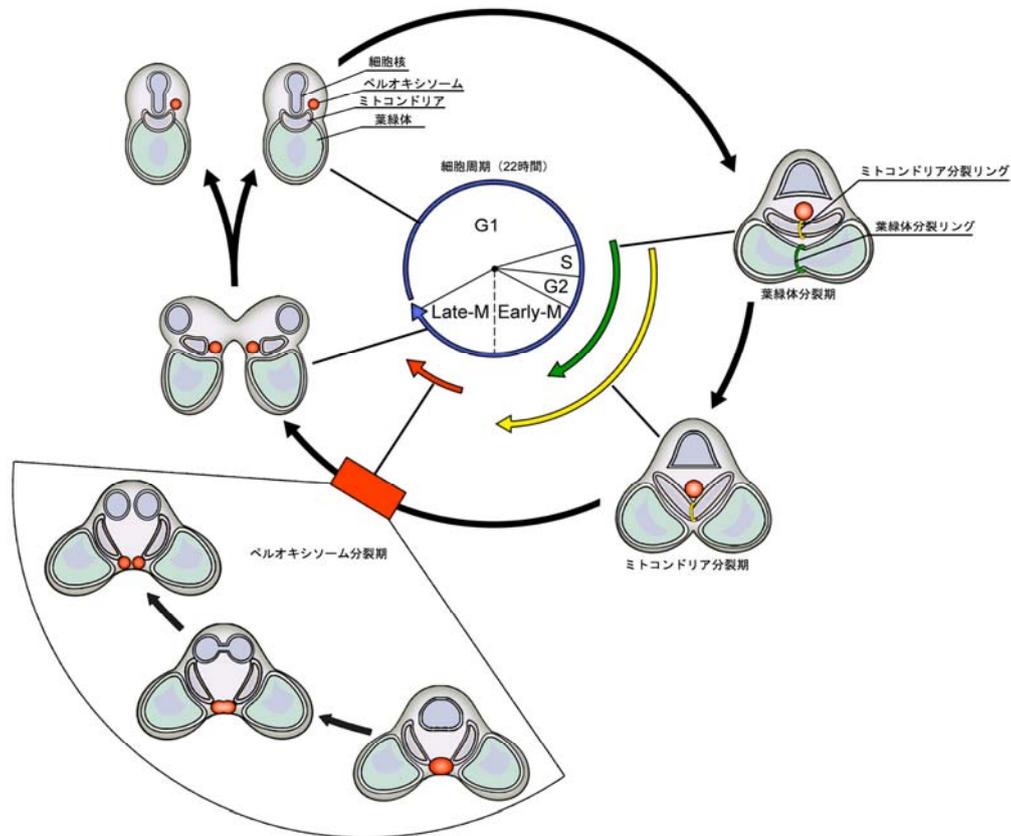


図 2 シゾンの細胞周期および、細胞小器官の分裂周期。葉緑体、ミトコンドリア、そしてペルオキシソームの順に分裂したのち細胞質分裂によって2つの娘細胞に分けられる。

### 3) 細胞分裂の解明に向けた細胞小器官の解析技術の開発

同チームは、これまで細胞と細胞小器官の分裂研究に必須な技術を開発してきました。特に機器とともに、その技術を開発した研究者の協力が重要でした。シゾンのゲノム(注 2) 100%完全解読 (Nature 2004, BMC Biol. 2007, PNAS 2009)、トランスクリプトーム解析 (DNA Res. 2009, Plant Cell 2010, Science 2010)、質量分析装置 (MALTDI TOF-MS AXIMA) によるプロテオーム解析 (注 3) (Science 2006, PNAS 2007) と遺伝子の機能抑制・破壊 (Protoplasma 2009, PNAS 2010) などです。本研究ではこれらゲノム科学的手法を駆使して、次のような成果を得られました。

### II 今回の研究成果

#### 1) 分裂中ペルオキシソームを無傷に大量単離

ペルオキシソームに大量に含まれるカタラーゼをマーカーとした免疫蛍光顕微鏡法による観察から、ペルオキシソームの分裂は葉緑体とミトコンドリアの分裂後に行われることが分かりました (図 3A)。しかしその分裂時間が非常に短い期間でしたので、光の明暗による同調だけでは分裂中のペルオキシソームを十分に観察し、大量に集めることができませんでした。そこで細胞の分裂を阻害する薬剤 (オリザリン) の処理によって、通常の 20 倍の数の分裂中ペルオキシソームを含む細胞を得ることができました。この系を用いて大量に無傷な分裂期ペルオキシソームを単離することに成功しました (図 3B)。この単離画分を高精度の質量分析装置 MALDI-TOF MS (AXIMA Shimadzu) を用いたディファレンシャルプロテオミクス (全タンパク質分析) によって解析し、分裂期のペルオキシソームにのみ含まれる 13 種類のタンパク質を同定しました (図 3C)。

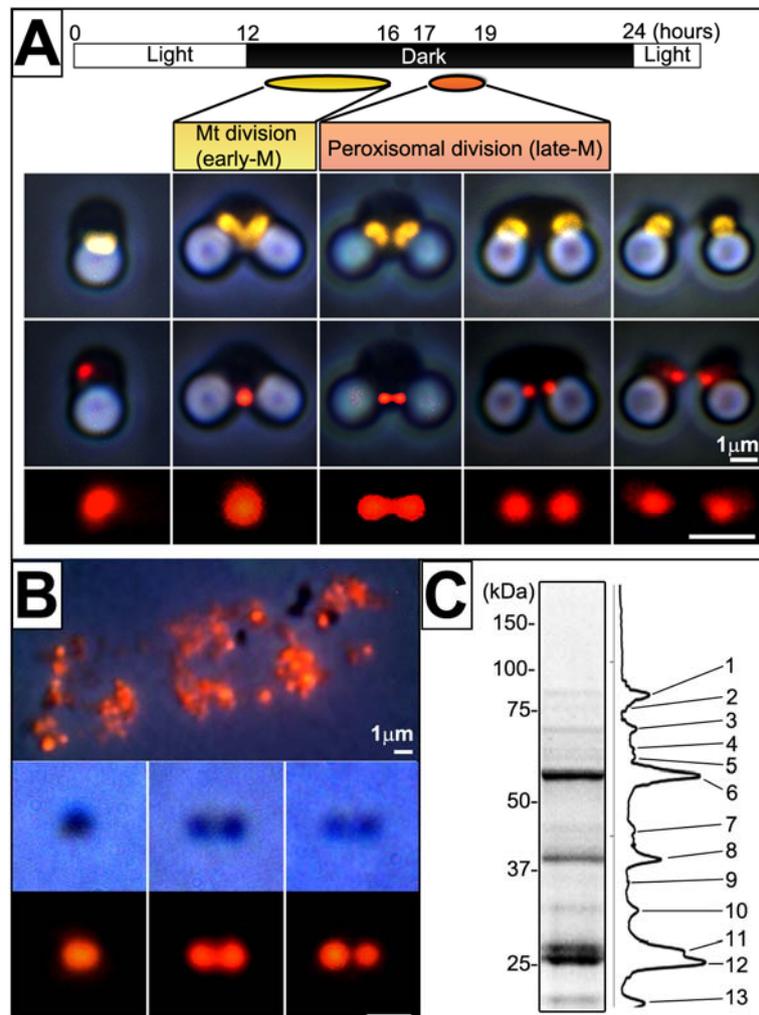


図 3 ペルオキシソームの無傷単離前後の位相差免疫蛍光顕微鏡写真とプロテオミクス

- ミトコンドリア (黄) と、ペルオキシソーム (赤)、葉緑体 (位相差像) とペルオキシソームの拡大像。葉緑体、ミトコンドリアの順に分裂し、その後ペルオキシソームの分裂が行われる。3 つの細胞小器官は均等に 2 分裂し娘細胞へと分配・遺伝される。
- 大量に単離した無傷のペルオキシソーム (上段) と分裂中の拡大位相差蛍光像 (下段)。
- プロテオミクス (SDS-PAGE と MALDI-TOF MS) による分裂期特異的にペルオキシソームに含まれる 13 種のタンパク質の同定。

### 2) ペルオキシソーム分裂装置の同定

解析した 13 種のタンパク質群のうち最も量が多かった一つは、ダイナミン (Dnm1) であることが明らかになりました。ゲノム解析のデータによりシズンには 2 種類のダイナミン (Dnm1 と Dnm2) があり、既に Dnm1 はミトコンドリアの分裂装置に、Dnm2 は葉緑体の分裂装置に使われていることが分かっていました。この結果は、驚くような仮説「ダイナミン Dnm1 はミトコンドリアの分裂に使われた後、ペルオキシソームの分裂に使われる」を導き出しました。この点を確認するため免疫蛍光顕微鏡法でダイナミン Dnm1 の動態を調べました。ダイナミン Dnm1 は分裂面でミトコンドリアの分裂を遂行した後、一度細胞質に移行してから、次にペルオキシソームの分裂面でリングを形成し、今度はペルオキシソームの分裂に参加していました。単離したペルオキシソームの分裂面にはダイナミン Dnm1 が局在していました (図 4A)。そこで、この微細構造を免疫電子顕微鏡法で調べるとダイナミン Dnm1 を含むリング状の構造が分裂面に現れました (図 4B 左)。ダイナミン Dnm1 はリングの外周上に局在していました (図 4B 右)。リングは直径最大で約 500 nm から、最少で 50 nm にまで収縮する分裂装置であることが分かりました。これをペルオキシソーム分裂装置、c-Pod (Cyanidioschyzon Peroxisome dividing) リングと命名しました。

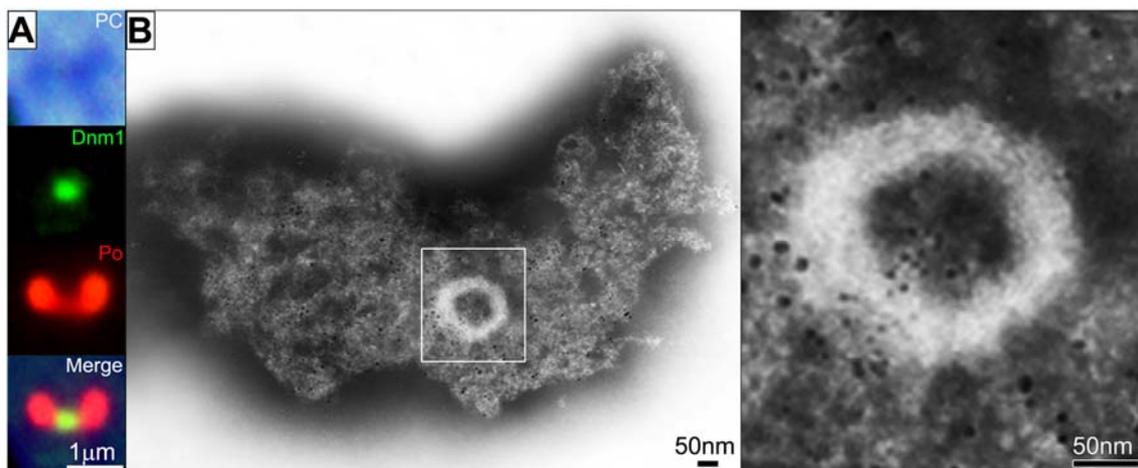


図 4 ペルオキシソーム分裂装置の蛍光顕微鏡像と免疫電子顕微鏡写真

- A. 単離したペルオキシソームの分裂面に局在するダイナミン。ダイナミン (Dnm1、黄緑)、ペルオキシソーム (Po、カタラーゼ、赤)
- B. B. c-Pod リングの免疫電子顕微鏡写真。ダイナミン Dnm1 (15 nm の金粒子)、カタラーゼ (10 nm の金粒子)。ダイナミンリングははがれ易い。

### 3) ペルオキシソーム分裂装置の純化、構造と機能解析

c-Pod リングをさらに強力な界面活性剤で処理することで、純化しました。取り出した分裂装置は、直径が平均 250 nm 程の非常に小さなリングで (図 5A 上段)、ダイナミン Dnm1 が均一にリング状に局在していることが分かります (図 5A 下段)。従って、発見当初はダイナミン Dnm1 を主成分とすると考えられましたが、ダイナミンを活動させるために必要な GTP を添加しても、リングを収縮させることはできませんでした。

そこで免疫電子顕微鏡法で純化した c-Pod リングの微細な構造を観察すると、c-Pod リングはダイナミン Dnm1 を含む外側の DB (Dynamamin-based) -リングと、内側のダイナミンを含まない幅 5 nm のナノフィラメント束からなる F (Filamentous) -リングの 2 重の構造であることが明らかになりました (図 5B)。さらに装置の収縮過程においては、F-リングは、分解されながら収縮することが分かりました。収縮後、最後にペルオキシソーム

膜を分断する過程においては、DB リングのみが観察され、ミトコンドリアと同様にダイナミン Dnm1 がペルオキシソーム膜を直接分断していることが示唆されました。ダイナミン Dnm1 遺伝子の発現を抑えると DB-リングは形成されずペルオキシソーム分裂面の収縮は起こりませんでした。以上の結果から、ペルオキシソームは c-Pod リングによる① DB-リングと F-リングによる収縮、とそれに続く②ダイナミン Dnm1 による膜の分断、という二段階の分子機構で分裂することを明らかになりました (図 5C)。

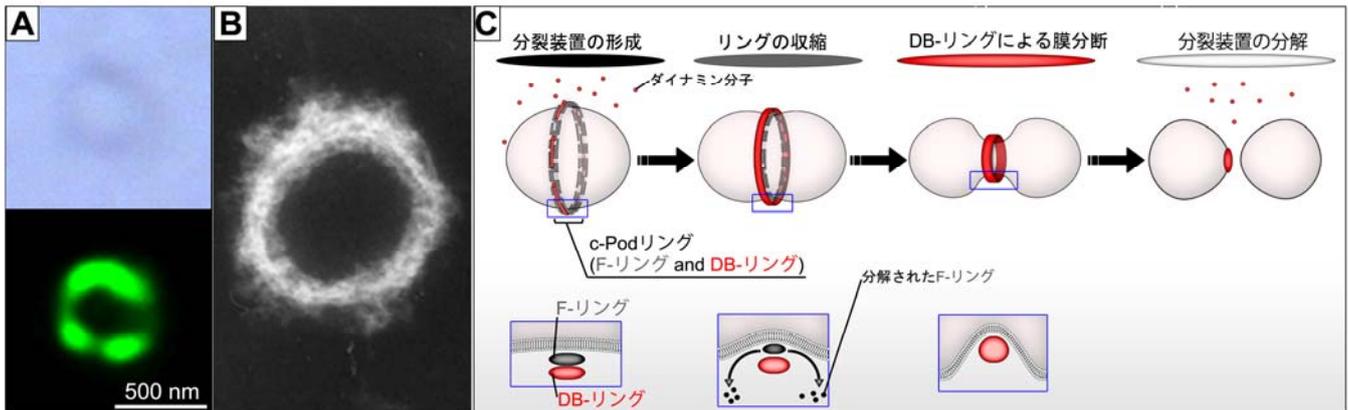


図 5 c-Pod リングの構造と分子機構

- A. ダイナミン Dnm1 で染色した c-Pod リングの位相差 (上段)、および免疫蛍光顕微鏡写真 (下段)。
- B. c-Pod リングの電子顕微鏡写真。
- C. c-Pod リングによるペルオキシソーム分裂の仕組みのモデル。

#### 4) c-Pod リングの発見が示唆する真核細胞誕生におけるペルオキシソームの起源

最後に c-Pod リングとこれまで見つかったミトコンドリアと葉緑体の分裂装置の比較がなされました。驚くべきことに、c-Pod リングに含まれていたダイナミン Dnm1 は、ミトコンドリアの分裂装置 (MD-リング) に含まれているものと全く同じタンパク質でした (表 1)。こうした結果は、これまで同グループが提唱してきた細胞小器官の誕生と進化と矛盾するものではありません。恐らく c-Pod リングが MD-リングの構造をもとに創られた可能性を示唆しています。我々の祖先にあたる宿主真核生物は 20 億年前に細菌であるパラサイト (細胞内共生した  $\alpha$ -プロテオバクテリア) の分裂増殖をコントロールするために MD-リングを獲得しました。また、重要な酵素のいくつかはペルオキシソームの基質とミトコンドリアの内外膜間、及び基質に共通に存在します。ある時点で、ダイナミン Dnm1 を含む MD-リングによる分裂によってミトコンドリア外膜の一部が分裂し、ペルオキシソームが誕生したと推定されます (図 6)。その後、ミトコンドリアでは酸素と糖からエネルギーを作ることになり、ペルオキシソームでは、脂肪酸代謝を行うと共に活性酸素を水と酸素に分解します。我々の細胞の祖先は、このようにペルオキシソームをミトコンドリアの姉妹器官として獲得し、さらにエネルギー代謝機能を 2 つの細胞小器官に分担させるように適応進化したと思われます。これまで、二重膜系細胞小器官であるミトコンドリアと葉緑体の誕生と進化については研究が進められておりましたが、本研究により、初めて単膜系細胞小器官誕生の謎の解明に迫る具体的な証拠が明らかされたと思います。

表1. C-Podリングの特徴と、MDリング、PDリングとの比較

	ペルオキシソーム	ミトコンドリア	葉緑体
<b>・細胞小器官の特徴</b>			
膜	単膜	二重膜	二重膜
DNA	無	有	有
分裂装置	c-Pod	MD	PD
<b>・単離した分裂装置</b>			
<b>構造</b>			
直径 (nm)	150 – 600	150 – 1200	150 – 1300
幅 (nm)	25 – 30	30 – 120	20 – 130
<b>構成物質</b>			
繊維(nm)と、その主成分 (nm)	4 – 5 (未同定)	未同定	5 – 7 (糖鎖)
ダイナミンの種類	Dnm1	Dnm1	Dnm2
バクテリア由来の分裂因子	無	FtsZ1	FtsZ2-
繊維の合成酵素	未同定	未同定	PDR1

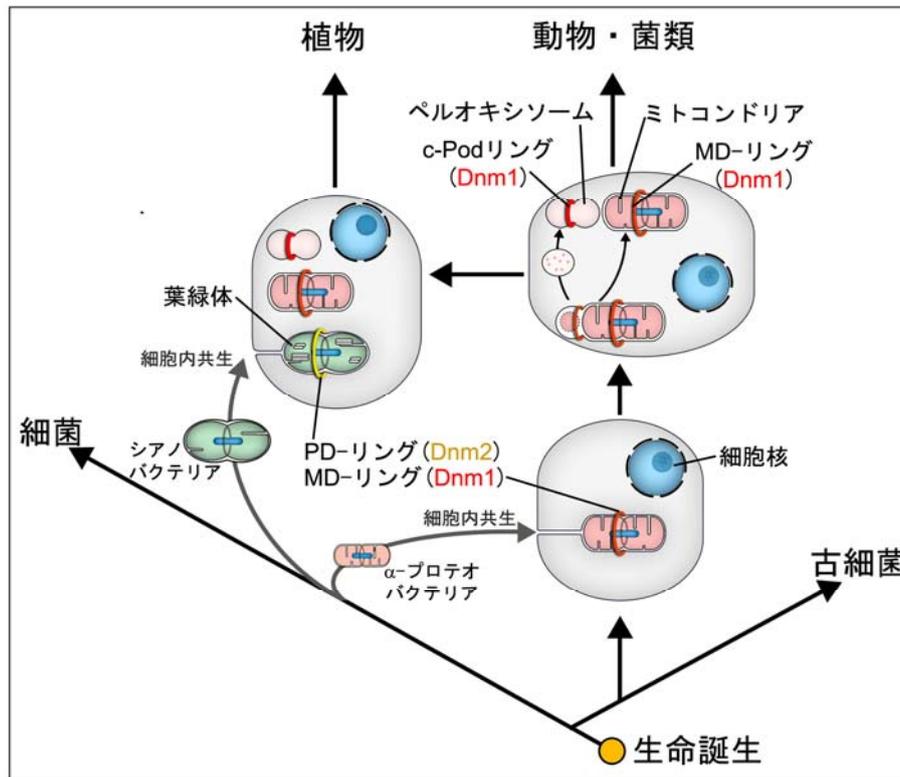


図6 c-Pod リングとペルオキシソームの誕生・進化モデル

### Ⅲ 今後の展開と応用

ペルオキシソームは 1967 年に発見されて以来、真核細胞にとって必須の単膜系オルガネラで、その増殖の異常が重篤な疾患を起こすことから注目されてきましたが増殖のメカニズムは未解明でありました。本研究チームは、この半世紀にわたる問題をシンプルな細胞構造を持つシゾンを用いて、c-Pod リングの発見・解析によって解決しました。今回の知見は今後以下の3つの点で展開と応用が期待されます。

①上述したように、分裂装置を発見し、その解析結果から単膜系のペルオキシソームがミトコンドリアの姉妹と



# 立教大学

## PRESS RELEASE

して誕生したことが示唆されました。同様に、他の単膜系細胞小器官（ゴルジ体、小胞体、ライソゾーム）においてもその分裂機構を明らかにすることで、それらの誕生と進化のしくみが解明されることが期待されます。

②分裂装置が二重膜系（ミトコンドリアと葉緑体）のみならず、単膜系のペルオキシソームでも見つかったことから、今後他の単膜系細胞小器官（ゴルジ体、小胞体、ライソゾーム）においても同様の分裂装置、および増殖のしくみが明らかにされることが MALDI-TOF MS 期待されます。

③c-Pod に含まれていた、いくつかのタンパク質の高等動物における欠損はペルオキシソームの分裂障害や、致死性の重篤な疾患を引き起こす原因になることが知られているため、本研究の知見は医療への応用が期待されます。また、c-Pod リングに類似の分化した装置が脳の神経伝達に関わる小胞形成に使われていることが示唆されており、脳の神経伝達の機構やアルツハイマー病などの病気しくみの解明にも応用されることが期待されます。また、ペルオキシソームは油脂やコレステロール等の代謝にも重要な役割を担うため、有用物質生産への応用も期待されます。

### 注（用語解説）

#### 1) 細胞内共生

1970年マーギュリスが提唱した、真核生物細胞の起源を説明する仮説。ミトコンドリアや葉緑体は細胞内共生した細菌（それぞれ好気性細菌である・ $\alpha$ -プロテオバクテリア、藍藻であるシアノバクテリア）に由来すると考える。細胞内共生を由来とする細胞小器官は二重膜（細菌由来の内膜と宿主の外膜）に包まれ、細菌由来のゲノムを持つ。

#### 2) ゲノム (Genome)

Gene（遺伝子）と -ome（総体）を合わせた造語。生物が持つすべての遺伝情報のこと。すべてのタンパク質は遺伝子の塩基配列（4種類の塩基、アデニン（A）、グアニン（G）、チミン（T）、シトシン（C）の組み合わせ配列）情報を基に作られる。

#### 3) プロテオーム解析

ある生物学的な系におけるタンパク質全体を解析する研究手法。ゲノム情報と質量分析法を用いることで、体内の特定の細胞や組織で作られる全タンパク質の構造と機能を明らかにすること。質量分析法は一般的に MALDI-TOF MS を使って行われる。MALDI-TOF MS はマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置（Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry）の略。MALDI法とは、島津製作所の田中耕一らによって開発されたタンパク質資料をマトリクス（芳香族有機化合物等）中に混ぜて結晶を作り、これにレーザーを照射することでイオン化する方法であり、タンパク質などの高分子化合物であっても安定にイオン化することが可能。適用できる分子量範囲は1~1000000。トリプシンによるタンパク質の断片可後、MALDI法によってイオン化したタンパク質資料を加速し、検出器に到達するまでの時間差を計測することで質量を算出する。これらの各タンパク質断片の質量とゲノム情報から予測される理論値が一致するものを検索し、試料中に含まれている全てのタンパク質を同定する。



# 立教大学

## PRESS RELEASE

### 論文情報

Journal: **Proc Natl Acad Sci USA 110 (23) , 9583-9588 (2013)**

Authors: **Yuuta Imoto, Haruko Kuroiwa, Yamato Yoshida, Mio Ohnuma, Takayuki Fujiwara, Masaki Yoshida, Keiji Nishida, Fumi Yagisawa, Shunsuke Hirooka, Shin-ya Miyagishima, Osami Misumi, Shigeyuki Kawano and Tsuneyoshi Kuroiwa.**

Title: **Single-membrane-bounded peroxisome division revealed by isolation of dynamin-based machinery.**

★本成果の一部は独立行政法人科学技術振興機構（JST）の支援によってなされました。

### 本件に関する問い合わせ先

●立教大学理学部 黒岩常祥 TEL:03-3984-4592 E-mail: tsune@rikkyo.ne.jp

●立教学院広報課 木田英樹 TEL:03-3985-2202 E-mail: koho@rikkyo.ac.jp

〒171-8501 豊島区西池袋 3-34-1