

研究終了報告書

「オルガネラ分裂リングの分子動作機序の解明」

研究期間: 2020 年 12 月 ~ 2024 年 3 月

研究者: 吉田大和

1. 研究のねらい

約 21 億年前にアーキアと α プロテオバクテリアが融合した結果、ミトコンドリアを持った真核生物が誕生したと考えられている。さらにその後、シアノバクテリアに由来する葉緑体を持つ光合成真核生物が出現した。これらの細胞内共生オルガネラは、真核細胞に革新的細胞機能と莫大な生体エネルギー創出能力を与え、真核生物の進化の原動力となっている。だがこうした進化的経緯により、葉緑体とミトコンドリアは細胞内でゼロから創り出すことは出来ず、既存のオルガネラを分断することによってのみ数を増やすことができる。このため、これらのオルガネラの分裂増殖を制御できない限り、細胞分裂を繰り返すたびにこれらは細胞から失われてしまう。ミトコンドリアと葉緑体を安定的に保持できなければ細胞は機能を維持することができないため、これらオルガネラの分裂増殖制御機構のしくみを明らかにすることは真核細胞の基本原則を理解することにも等しい。だが、その分子機構には多くの謎が残されている。

これまでの研究により、ミトコンドリアと葉緑体の分裂増殖は、ポリグルカンナノ繊維や複数種類のタンパク質から構成されるリング型超分子マシンである「分裂リング」によって行われていることがわかっている。だが、複雑な動的な高次構造体であるオルガネラ分裂リングが、どのような分子メカニズムによって動作し、葉緑体やミトコンドリアの分裂を実現するかは未だ明らかではない。そこで本研究では、葉緑体とミトコンドリアの分裂増殖を担う「オルガネラ分裂リング」の分子動作機序と制御機構の全貌を明らかにし、真核生物が細胞内共生オルガネラを分裂増殖させ、永続的に保持することを可能にしている普遍原理の解明を目指す。この目標を達成するため、以下の2つの研究目標: (1)「葉緑体分裂リングとミトコンドリア分裂リングの収縮動作機構の解明」と(2)「オルガネラ分裂増殖機構に関連する全遺伝子の同定と機能の解明」を設定する。

「オルガネラ分裂リングの分子動作機序」を明らかにし、また「オルガネラの分裂増殖に機能する全遺伝子」の構造と機能を理解することによって、真核生物が永続的なオルガネラの維持を可能とした普遍的なオルガネラ創成原理の解明、さらにオルガネラを基盤とした真核生物の生命原理の解明を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、計画目標である「オルガネラ分裂リングの収縮動作に関わる基盤メカニズム」さらに「新たなオルガネラ分裂増殖の制御因子群の同定」を達成した。本研究では、単純な細胞構造を持つ単細胞紅藻シアニディオシゾン(シゾン)を用いて、世界初の *in vitro* 条件下で単離葉緑体の分裂を誘導する実験系を確立し、葉緑体の分裂機構を直接的なアプローチによって解析することを可能にした。同法を基盤とした一連の解析実験により、高次構造体である葉緑体分裂リングは、構成タンパク質の一つである Dnm2 の GTPase 活性によって収縮し、葉緑

体を物理的に切断することが明らかとなった。また葉緑体分裂リングの解析手法を応用し、ミトコンドリア分裂リングに関しても解析を行った結果、ミトコンドリアの分裂リングにおいても極めて似通った動作メカニズムが備わっていることが確認された。どちらの分裂リングも相同な分子動作機構を持つという事実は、分裂リングによるオルガネラ分裂増殖機構は、細胞内共生オルガネラが誕生した進化の初期段階に確立したことが示唆される。分裂リングは宿主細胞が共生バクテリアの分裂・増殖を制御することを可能にし、恒久的なオルガネラ化を実現したと考えられる。

またオルガネラ分裂増殖の制御に関わる遺伝子群を明らかにするため、本研究ではまずシズンにおける CRISPR-Cas9 によるハイスループット遺伝子解析法の確立に取り組み、CRISPR イメージング解析系“シズン・カッター”を開発することに成功した。間期と分裂期における全遺伝子の転写・翻訳レベルでの発現動態を捉え、分裂期特異的に発現する 57 遺伝子が同定されたため、それらの遺伝子を対象にシズン・カッターによる遺伝子機能解析を行った。解析の結果、これらの遺伝子産物には細胞核などのオルガネラや、分裂リングへの局在を示す新奇タンパク質が多数確認された。特に細胞核に局在するものは分裂増殖に特異的な遺伝子発現制御を担っていると予想されたため、重点的に解析を進めた結果、染色体分配に関与する遺伝子群の発現制御などに機能することが明らかとなった。一連の解析により、細胞周期制御とは異なるオルガネラ分裂周期を制御する分子機構の存在が明らかとなった。

このほか、同研究計画から派生した解析によって、ミトコンドリアへのタンパク質移行機構の最小機能単位の解明、さらにコドン使用率の解析を基盤とした遺伝進化に関する新たなモデルを提唱することに成功した。

これらの研究成果を基盤として、現在は分裂リングの収縮過程における構造変化を原子レベルで理解するためにクライオ EM トモグラフィーによる解析など、現在はさらに派生的・発展的な解析へと展開している。

(2) 詳細

研究テーマ A「葉緑体分裂リングとミトコンドリア分裂リングの収縮動作機構の解明」

■ *in vitro* 葉緑体分裂誘導系の確立

まず葉緑体分裂リングの分子動作機構を明らかにするため、単離葉緑体を用いた *in vitro* 条件下における収縮誘導実験系の確立を試みた。条件検討を重ねた結果、2.5 mM GTP 溶液存在下での単離葉緑体の分裂誘導に成功した。Dnm2 に融合した蛍光レポーターVenus の蛍光輝度は、リングの収縮に伴って線形に増加したため、リング収縮に伴って構造変化が起きていることが示唆された。また分裂リングの収縮に伴い遊離リン酸が放出され、GTP が加水分解されていることを確認し、さらに蛍光褪色回復法による解析により、分裂リングは構成分子の大規模なスライディング運動を伴って収縮することがわかった。

■ Dnm2 の二量体形成と GTPase 活性の解析

分裂リングの収縮力は GTPase ドメインを持つ分裂リング構成タンパク質の一つである Dnm2 が創出すると考えられたため、精製タンパク質を用いた生化学解析による検証を試みた。塩化

アルミニウムおよびフッ化ナトリウムを用いた一連の実験により、Dnm2 の Gドメインは GTP 加水分解に際して Gドメイン二量体を形成することがわかった。Dnm2 の Gドメインをホモログタンパク質である Dnm1 の Gドメインに置換したキメラ Dnm2 を用いた解析により、Gドメインホモ二量体化が、葉緑体分裂リングの収縮力の形成において決定的に重要な過程であることを確認した。

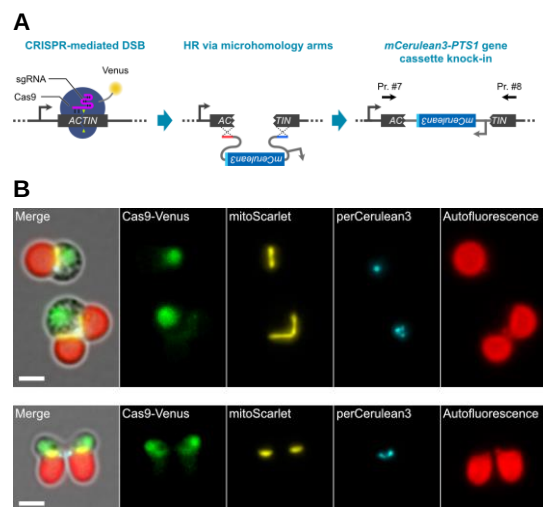
■ 単離葉緑体分裂リングの in vitro 収縮解析と収縮機構モデル

単離した葉緑体分裂リングを用いてさらに詳細な分子動作機構の解析を試みた。部分的に崩壊した単離葉緑体分裂リングの蛍光輝度解析から、葉緑体分裂リングは、一定の幅を持った基本バンドルユニットが数周に渡って巻き付いていくことで円周を小さくすることが推定された。これら一連の結果を統合し、分裂リングの骨格繊維束上に点在する Dnm2 分子が、対面する異なる骨格繊維束上の Dnm2 分子と二量体を形成し、GTP 加水分解に伴うコンフォメーション変化から繊維束のスライディング運動を誘発する一連の収縮動作モデルを提示した。

同様の GTP 依存的な収縮動作は、ミトコンドリア分裂リングにおいても確認されたため、これらの機構は進化的に保存された細胞内共生オルガネラ分裂増殖機構であると考えられた。(Yoshida and Mogi. 2024. in preparation)

■ 「ハイスループット遺伝子改変」と「4 種オルガネライメージング」を両立する新手法“シゾン・カッター”

シゾンを用いて、細胞・オルガネラ分裂期に特異的に発現する遺伝子群を同定し機能を解析する事により、分裂増殖機構の全貌解明を目指した。同目標を達成するためには、シゾン細胞において標的遺伝子の機能を改変した際に、迅速にオルガネラや細胞分裂異常を確認できる実験系が必要であった。このため、CRISPR-Cas9 技術を応用しハイスループット遺伝子改変とオルガネライメージング技術を両立する新技術の確立を試みた。シゾン株へ黄色蛍光タンパク質 Venus と核局在シグナルを融合した SpCas9 遺伝子を導入し、新たな標準株であるシゾン YMT1 株を構築した。さらにガイド RNA を導入する際のプラスミド DNA やノックイン遺伝子カセットへオルガネラ局在シグナルを融合した蛍光レポーターを導入することにより、遺伝子改変された細胞の4種オルガネラを蛍光標識することに成功した(図)。同法により、標的遺伝子を破壊するために必



図：シゾン・カッターによる標的遺伝子破壊とオルガネラ蛍光可視化 | (A) シゾン・カッターによる標的遺伝子のノックアウトの概要。(B) シゾン・カッター法によって Actin 遺伝子を破壊した株の蛍光顕微鏡像。ハイスループット遺伝子改変と同時に細胞核 (Cas9-Venus)、ミトコンドリア (mitoScarlet)、ペルオキシソーム (mCerulean3-PTS1)、葉緑体 (クロロフィル) を蛍光可視化することが可能になった。(Tanaka et al. 2021. J. Cell Sci.)

要な分子生物学実験による作業を単純化することに成功し、これら一連の実験システムを“シゾン・カッター”と命名した。(Tanaka et al. 2021. *J. Cell Sci.*)

■ オルガネラ分裂増殖に関連する遺伝子群の同定

細胞分裂期・オルガネラ分裂期に発現する遺伝子群を特定するため、時期特異的に転写されるだけではなく、翻訳されている遺伝子の特定を試みた。このため、同さきがけ領域の松尾芳隆博士(東京大)との共同研究を実施し、リボソーム・プロファイリング法により分裂期特異的に翻訳レベルが増大する 57 遺伝子を同定することに成功した。これらの遺伝子に対し、シゾン・カッターによる遺伝子破壊実験、さらに蛍光レポーターによる局在解析を試みた。現在までに 5 つの新たなオルガネラ分裂増殖関連遺伝子を同定することに成功している。このうち 3 つは分裂期特異的に細胞核に局在し、残りはミトコンドリアおよびミトコンドリア分裂リングに局在することがわかっている。細胞核に局在する 3 遺伝子産物については、ホモログ遺伝子が真核生物内に広く保存されており、進化的にも重要な遺伝子であると推定される。これらの遺伝子は全て生存に必須であることが示された。現在、これら遺伝子産物による分裂制御機構を特定するため、ゲノム DNA 上の結合領域および核内で機能的に関連するタンパク質の同定を試みている。

■ ミトコンドリアタンパク質移行機構を構成する最小要素の特定

シゾンはミトコンドリアと葉緑体を1つずつしか持たず、ゲノムコードされた遺伝子も真核生物としては極めて少ないことから、これらのオルガネラへのタンパク質移行機構も単純なシステムから構成されると予想された。同予想に基づき、ゲノム情報学的解析によって移行シグナル配列の特性を分析し、合成配列を用いた *in vivo* 解析により、シゾンのミトコンドリア移行シグナル配列は、従来考えられているよりもはるかに単純な必須要素から構成されていることが明らかとなった(Hirata et al. 2024. *bioRxiv.*, under review)。

■ コドン使用率に基づく遺伝子進化のモデルの提唱

単細胞生物においては、同一のアミノ酸をコードするコドン(同義コドン)の使用割合には“コドンバイアス”と呼ばれる生物特異的な偏りが存在することが知られている。コドンバイアスは遺伝子発現制御機構の新たな側面として注目されているが、詳細は不明である。そこでシゾンのゲノム構造の単純性に基づき、遺伝子およびアミノ酸毎の同義コドンの使用率から、コドンバイアスによる遺伝子制御機構の理解を試みた。解析の結果、シゾンの全 ORF におけるコドン適応指数は極めて狭い範囲に収束しており、環境 DNA の取り込みなどによるゲノム流動性が低く、コドン適応度に応じて遺伝子毎の進化速度を見積もることに成功した。ゲノム配列上の変異などによって *de novo* に誕生した ORF(エマージング遺伝子)は特にコドン使用率のランダム性が高く、遺伝子進化過程のモデルを提唱することに成功した(Kondo et al. 2024., under review)。

3. 今後の展開

本研究計画を実施した結果、オルガネラ分裂リングの分子動作機構の基本分子メカニズムを

明らかにすることに成功し、同解析結果によってスライディング収縮モデルが提示された。だが、本研究では分裂リングの基本的・全体的な動作については明らかとなったが、分子レベルでの動作機構については依然として謎が残されている。特にスライディング収縮モデルで示したように、分裂リングは GTPase Dnm2 二量体によるコンフォメーション変化による骨格繊維 PD リングフィラメントの滑動が基盤となるが、それらの動きを分子レベルで捉えることは達成できていない。このため今後は、幾つかのイメージング技術を利用して分裂リングの 1 分子レベル (サブアトムレベル) の“動き”を理解する試みを実施する。東北大学大学院生命科学研究科の横山武司博士との共同研究として、単離した分裂リングと GTP アナログなどを用いて加水分解の途中段階にある分裂リングの形態をクライオ電子顕微鏡トモグラフィー法によって観察し、Dnm2 分子および PD リング繊維の分子レベルでの動態の可視化に向けた準備を進めている。また α -helix リンカーで固定した Venus タグを利用した蛍光偏光観察によって、収縮動作における分裂リング内の Dnm2 分子の方向性の同定を試みる。このほか、Dnm2 のタンパク質構造も明らかではなく、GTP 加水分解時のコンフォメーション変化も想定域を出ないため、単粒子解析などによる Dnm2 の構造解析や、PD リング繊維の構造解析も試みる。

4. 自己評価

本プロジェクトでは、研究計画書に記載した目標の多くを実現することができた。分裂リングの分子動作機構解析については、現在も論文投稿中であり最終的に掲載されるまでには至っていないが、明確な解析結果を得ることができた。同研究テーマが順調に進展した理由としては、さきがけ領域会議などで他のさきがけ研究者との議論などを通じて得られた知見による解析技術の改善・向上が非常に大きく、これらの環境なしに本研究計画がここまで進展することは無かったと思われる。また他のさきがけ研究者との交流を通じて、本研究計画を発展させるためにより有効なアプローチがあることも知ることができたため、今後は共同研究と言う形も含めて、今まで以上に高いレベルで、新しい角度から解析を進められる確信が得られたほか、全く新規な研究プロジェクトも発案することができた。これら他のさきがけ研究者やアドバイザー研究者とは所属学会や組織も違うため、本さきがけプロジェクトがなければ知り合うこともなかったと思われ、何よりも貴重な経験になった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文 (原著論文) 発表

研究期間累積件数: 7 件 (うち 2 件は論文審査中、2 件は投稿準備中)

1. Tanaka, N., Mogi, Y., Fujiwara, T., Yabe, K., Toyama, Y., Higashiyama, T. and ***Yoshida, Y.** (2021) CZON-cutter – a CRISPR-Cas9 system for multiplexed organelle imaging in a simple unicellular alga. *J. Cell Sci.* 134, 1-11.

単純な細胞構造からなる単細胞紅藻シズンにおける CRISPR-Cas9 を基盤としたゲノム編集および細胞核・ミトコンドリア・葉緑体・ペルオキシソームの蛍光可視化を同時に行うハイスループット遺伝子機能解析技術を確立した。同法を利用することにより、細胞やオルガネラ分裂増殖に必須な遺伝子破壊であっても、表現型を確認することが可能となった。

2. Hirata, R., Mogi, Y., Takahashi, K., Nozaki, H., Higashiyama, T. and ***Yoshida, Y.** (2024) Simple prerequisite of presequence for mitochondrial protein import in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. (under review) bioRxiv. DOI: 10.1101/2024.02.19.581091.

ミトコンドリアを構成するタンパク質の 99%は細胞質リボソームによって翻訳され、アミノ末端のペプチド配列の特異性に従ってミトコンドリアへと運び込まれるが、このミトコンドリア移行配列がもつ最小条件は未だ明らかではなかった。一細胞に一つしかミトコンドリアを持たないシズンを用いた合成生物学的解析により、シズンではヘリックスと1つの塩基性アミノ酸があればミトコンドリアへ運ばれることが明らかとなった。

3. Kondo, Y., Kubo, S. and ***Yoshida, Y.** (2024) Optimizing codon usage and gene evolution in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. (under review)

3つの塩基から構成される 64 種類のコドンに対し、生物が用いるアミノ酸は 20 種しかないため、遺伝暗号の縮重が生じる。近年、このコドンバイアスと呼ばれる現象は遺伝子発現において様々な影響を及ぼす発現制御機構の一つであるとみなされている。本論文では、真核生物としては極めてシンプルなゲノム構造を持つシズンにおいて、コドン構造およびコドンバイアスと遺伝子進化の関係を明らかにすることに成功した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表(シンポジウム・招待講演)6 件

1. **吉田大和**.「オルガネラを支配する力の指輪:オルガネラ分裂リングの分子動作機構」, 1SCA-4, 名古屋, 第 61 回生物物理学会年会「界面における細胞骨格のダイナミクス」, 2023 年 11 月 14 日.
2. **吉田大和**.「オルガネラ分裂リングのキネティックメカニズムを解く」, 1pSC06, 札幌日本植物学会, 第 87 回大会「動的高次構造体“オルガネラ”の真の姿を捉える革新的アプローチ」, 2023 年 9 月 4 日.
3. **吉田大和**.「オルガネラを統べる力の指輪」, 三島, 第 2 回細胞分裂研究会, 2023 年 7 月 27 日.
4. **吉田大和**.「葉緑体分裂リングの仕組みを解く」, 仙台, 第 25 回植物オルガネラワークショップ, 「植物オルガネラの構造・動態解析の最前線」, 2023 年 3 月 14 日.
5. **吉田大和**.「オルガネラ分裂リング:葉緑体とミトコンドリアを増やす真の仕組みを解く」, 2C-110, 東京, 第 74 回日本細胞生物学会大会「真核細胞生物学:共通原理に迫る新たな潮流」, 2022 年 6 月 29 日.
6. **吉田大和**.「シズンカッター:ゲノム編集と多重オルガネラ蛍光観察を同時に実現する CRISPR イメージング技術の確立」, S4-1, 京都(オンライン), 日本ゲノム編集学会第 7 回大会「ゲノム編集植物の科学」, 2022 年 6 月 8 日.

学会発表(指導学生による発表など)6 件

1. 近藤唯貴, 吉田大和. 「単細胞藻類シゾンを用いた1細胞形成エネルギーの定量」, P-020, 2022年9月16日, 京都, 日本植物形態学会第34回大会.

※ 日本植物形態学会ポスター賞を受賞

2. 平田莉子, 茂木祐子, 吉田大和. 「オルガネラ移行シグナルのアミノ酸暗号の理解と実験的検証」, 1pA101, 2022年9月17日, 京都, 日本植物学会第86回大会.
3. 近藤唯貴, 茂木祐子, 吉田大和. 「単細胞藻類シゾンを用いた真核生物生体エネルギー論の確立に向けて」, 2aAH10, 2022年9月18日, 京都, 日本植物学会第86回大会.
4. 茂木祐子, 矢部寛之助, 近藤唯貴, 平田莉子, 東山哲也, 吉田大和. 「タンパク質翻訳バーストによる細胞分裂制御機構」, P-096, 2022年9月15日, 京都, 日本植物学会第86回大会.
5. 茂木祐子, 東山哲也, 吉田大和. 「新規ミトコンドリアタンパク質による細胞周期依存的な翻訳制御機構」, 1pA06, 2021年9月18日, 東京(オンライン), 日本植物学会第85回大会.
6. 矢部寛之助, 茂木祐子, 東山哲也, 吉田大和. 「最小ゲノム真核生物シゾンを用いた蛍光顕微鏡観察を基盤とした未知の分裂増殖因子群の探索」, P-030, 2021年9月17日, 東京(オンライン), 日本植物形態学会第33回大会.
7. 矢部寛之助, 茂木祐子, 東山哲也, 吉田大和. 「真核生物に広く保存された未知の分裂増殖遺伝子群の同定と機能解析」, 1pA01, 2021年9月18日, 東京(オンライン), 日本植物学会第85回大会.

日本語総説 1件

1. 吉田大和*. (2022) 単細胞紅藻シゾンにおけるゲノム編集とマルチプレックスオルガネライメージングを実現するハイスループット遺伝子改変技術の確立. *IFO Res. Commun.* 36, 3-14

プレスリリース 2件

1. 科学新聞, 2021年11月26日, 「4種のオルガネラの蛍光可視化とゲノム編集を同時に実現」
2. 日本経済新聞オンライン, 2021年11月11日, 「東大、4種のオルガネラの蛍光可視化とゲノム編集を同時に実現する分子生物学ツール「シゾン・カッター」を確立」