

論文題目

Analysis of mitochondrial division and identification of the plant essential gene set using microalgae

(微細藻類を用いたミトコンドリア分裂と植物必須遺伝子群の同定解析)

加藤 翔一

論文要約

生命を理解するうえで、代謝や細胞分裂、セントラルドグマにかかわる分子機構など、生物種に普遍的な分子機構の解析は必須である。普遍性の高い分子機構には、しばしば遺伝的冗長性が備わっている。例えば、ホモログ遺伝子がゲノム中に複数存在する場合、一つの遺伝子を阻害したとしても、残りのパラログが働く。これは、遺伝子の解析を進めるうえでは問題点となる。私は、植物において普遍的な分子機構を調べるために、微細藻類を用いた。微細藻類は、細胞内構造が非常にシンプルである特性を持つとともに、ゲノムサイズが非常に小さく、遺伝的冗長性が低い。特に微細藻類の中でも、最も遺伝子数の少ない原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) を用いて、普遍性の高い生命現象である細胞分裂の解析を行うことにした。

そこで、シゾンを細胞分裂に関係するオーロラキナーゼの逆遺伝学的解析を試みた。オーロラキナーゼは、すべての真核生物で保存されている分裂期キナーゼである。多くの生物において、複数のホモログが存在しており、紡錘体極に局在し紡錘体形成を促すタイプと、染色体凝集や紡錘体チェックポイントに関与する2タイプに分類される。興味深いことに、シゾンにおいてはオルソログとして CmAUR のみが発見された。冗長性の影響を受けない CmAUR の解析を行うことで、細胞分裂機構が明らかにすることを目的とした。

まず、免疫染色法によって CmAUR の細胞内局在解析を行った。その結果、紡錘体への局在が観察された。加えて、興味深いことに、強いミトコンドリアへの局在が観察された。加えて、オーロラキナーゼの自己リン酸化抗体を用いて、活性化した CmAUR が細胞内のどこに局在するのか蛍光免疫染色によって確認したところ、ミトコンドリア分裂点に局在が観察された。シゾンはミトコンドリアを細胞に一つしか有しておらず、細胞分裂期に一回分裂する性質を持つ。この結果から、CmAUR はミトコンドリア分裂に関与していると仮説をたてた。野生型およびキナーゼ活性を失ったバリエーションの CmAUR を一過的に強発現させたところ、どちらもミトコンドリア分裂が抑制された。ミトコンドリア分裂制御における CmAUR の下流因子を探すため、既知のミトコンドリア分裂制御タンパク質を用いたキナーゼアッセイを実施した。その結果、ミトコンドリア分裂の中心的分子である、DRP1 のオルソログである CmDnm1 の T139 および、S732 が CmAUR によってリン酸化を受けることが分かった。興味深いことに CmDnm1 の非リン酸化バリエーションである T139A およびリ

ン酸化を模したバリエーションである T139E をシズンにおいて強発現させたところ、CmAUR の実験と同様、どちらもミトコンドリア分裂を阻害した。この結果は、CmAUR による CmDnm1 のリン酸化のオン・オフがミトコンドリア分裂の進行に必要であることを示唆する。

オーロラキナーゼによる直接的な DRP1 リン酸化を介したミトコンドリア分裂制御は、今まで報告のない現象であり、微細藻類を用いた解析の有用性が示された。さらに普遍的な分子機構を包括的に調べるために、植物の最小の遺伝子セットを同定することが有用と考えた。最小レベルの微細藻類のゲノム情報を利用することで、最小遺伝子セットに迫ることができると考え、緑藻植物門に属する *Medakamo hakoo* (メダカモ) に着目した。メダカモは、近年淡水から同定された、単細胞性の藻類である。DAPI 染色によって、植物の中で最もゲノムサイズが小さい可能性が指摘されていたものの、いまだゲノム解読は行われていなかった。そこで、私はメダカモゲノム解読プロジェクトに参画し、メダカモゲノムの特徴の解析と、植物にとって最小の遺伝子セットを調べることを目的に研究を行った。

まずメダカモゲノムプロジェクトによって行われた、DNA 配列解読および RNAseq 解析のデータによって遺伝子予測を行った。総コンティグは 18 であり、この内 16 個のコンティグが末端に繰り返し配列を持つ染色体由来であった。残りの環状構造を持つ 2 個コンティグはオルガネラ DNA だった。総コンティグ数は約 15.8Mb であり、核にある遺伝子数は 6,399 個であった。この遺伝子数は、今までゲノムが解読された緑色植物の中で最小であった。18S rDNA の系統解析により、南極で単離されたコリスティス系統のトレボクシア藻である *Coccomyxa subellipsoidea* に近縁であることが分かった。オントロジー解析の結果、メダカモゲノムでは、セントラルドグマに関連する遺伝子数が他種の生物と比べて少なくなっていた。次に、メダカモと微細藻類であるシズン、*Ostreococcus tauri* の 3 種で共有されている 2054 種類のオルソロググループを同定した。その中で、出芽酵母ゲノムも共有している真核生物に保存されたオルソロググループは 1411 種類、植物特異的オルソロググループは 613 種類であった。それぞれのオルソロググループに属するメダカモ遺伝子と、メダカモ特異的な遺伝子を比較したところ、真核生物に保存されている遺伝子群および植物細胞に保存されている遺伝子群は、メダカモ特異的な遺伝子群よりも遺伝子発現が高かった。これはハウスキーピング遺伝子が植物共通の遺伝子として、保存されていることを示している。

次に、各遺伝子群におけるオントロジーの比率を比較した。興味深いことに、微細藻類 3 種で保存されていた遺伝子群のオントロジーは、メダカモゲノムの構成比率とほとんど一致していた。一方で、植物特異的な遺伝子群では、代謝関連の遺伝子群の比率が増加していた。この結果は、植物における最小遺伝子セットの特異性が、代謝関連の遺伝子によって特徴づけられることが示唆している。

また、メダカモゲノムの進化を考察するため、オルソログ解析を通じて、ほかの真核生物では保存されていながら、メダカモでは失われた遺伝子の解析を行った。その結果、リボソームやプロテアソームなどを構成するいくつかの必須遺伝子が失われたようであった。し

かしながら、メダカゲノムで失われた遺伝子の多くは、Hypothetical protein であり、どのような特徴のある遺伝子が多く失われたかに関しては、今後の課題となった。

微細藻類ゲノムの解析により、植物における最小遺伝子セットの候補を得ることができた。この最小遺伝子セットは、特異的な代謝機構によって特徴づけられていると考えられる。この機構の詳細を、今後シズンなどの微細藻類を用いた分子遺伝学的な解析で明らかにできると期待できる。また、今後ゲノム合成技術や染色体導入技術の発展によって、冗長性の最も低い植物細胞を設計することが可能になると期待できる。