

## 特集：観て考える，考えて観る—細胞内オルガネラの空間構造変化

## 細胞質遺伝現象における細胞学と生化学・分子生物学の間 —観る—

黒岩常祥

筆者は学生の時から染色体を中心とする細胞遺伝学に興味を持った。ところが、細胞遺伝学的な知見を生化学的解析に発展させようとする、一般的な分裂組織では、細胞分裂が非同調的に起こり、その後の解析が難しかった。真正粘菌のモジホコリカビ (*Physarum polycephalum*) の変形体 (多核体) は、細胞核分裂が100% 同調して起こり理想的な研究材料であった。ところが偶然、ミトコンドリアが大量のDNA (約2.7Mbp) を含み電子密度の高い棒状の核 (DNA とタンパク質の複合体) を作り、核分裂を伴いながら分裂・増殖することを発見した。細胞核で言えば、ユスリカの唾液腺染色体に相当するような、ミトコンドリアの増殖の研究に最適な材料であった。この材料での研究を基盤に、真核細胞は細胞核、ミトコンドリア核、そして色素体 (葉緑体) 核の三種の核からなるという「細胞三核説」を提唱し、細胞質遺伝学的研究を進めてきた。主な研究対象は、ミトコンドリアと色素体の、1) 誕生、2) 分裂・増殖そして3) 遺伝 (母性遺伝) 機構の解明であった。本稿では、これらの現象を解く過程で起きた細胞学と生化学・分子生物学研究の間に起きた数少ない“不可解な不一致”を取り挙げてみたい。

## 1. 真核生物の誕生機構

真核細胞を構成する細胞核以外の基本的な細胞小器官 (オルガネラ) としては、二重膜に包まれた構造体としてミトコンドリアと、植物であればさらに色素体 (葉緑体など) があり、一重膜に包まれた構造体として、小胞体、ゴルジ体、リソソームに加えてマイクロボディがある。これらオルガネラが、真核細胞の誕生とともにどのように生まれてきたか、ゲノム科学の進展とともにその様子が明らかになってきた。ミトコンドリアと色素体は比較的オルガネラとしては大きいため、古くから注目されてきた。これらオルガネラが細菌の共生で生じたとの考えは、1800年代

からの細胞学的観察に基づいている。しかし従来数多くあった共生関係の研究を、新たにまとめ、分かり易い共生説として発表したのが、有名なL.マーグリスの「真核細胞の起源説」である。マーグリスは1963年にミトコンドリアと色素体に微量ながらDNAが発見されたことを骨格に真核生物の共生説を見事に構築した (図1A-C)<sup>1)</sup>。この時、彼女はもう一つ重要な運動性オルガネラ、鞭毛の起源が運動性の細菌、スピロヘータに由来するという独自の説を提唱し共生説に新風を吹き込んだ (図1A, B)。スピロヘータが真核細胞に付着する様子や接着部の微細構造が、共生過程にあるオルガネラに酷似し、また鞭毛基部 (基粒体) に似ていることを示した。さらに、鞭毛の基部にDNA様の繊維も観察されていた。しかしこの基部におけるDNAの存否は鞭毛共生説の論争的であり実験的な証明が待たれていた。

1989年多くの生化学・分子生物学者が決定的と評した一つの論文が発表された。ロックフェラー大学の分子生物学者D.ラックのグループが緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*; クラミー) を使って2本の鞭毛基部にDNAが存在することを明らかにしたというのである

立教大学極限情報研究センター，理学研究科 (〒171-8501 東京都豊島区池袋3-34-1)

Disagreement between cytology and biochemistry/molecular biology in studies of organelle inheritance—observation—  
Tsuneyoshi Kuroiwa (Research Information Center for Extremophile, Graduate School of Science, Rikkyo University, Nishiikebukuro 3-34-1, Toshimaku, Tokyo 171-8501, Japan)

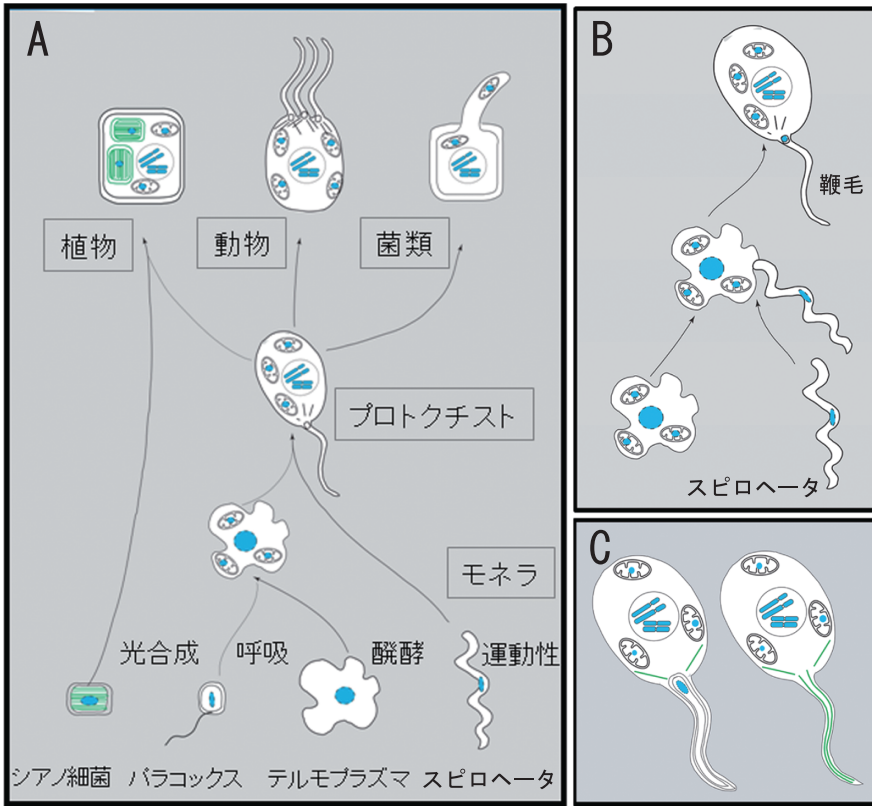
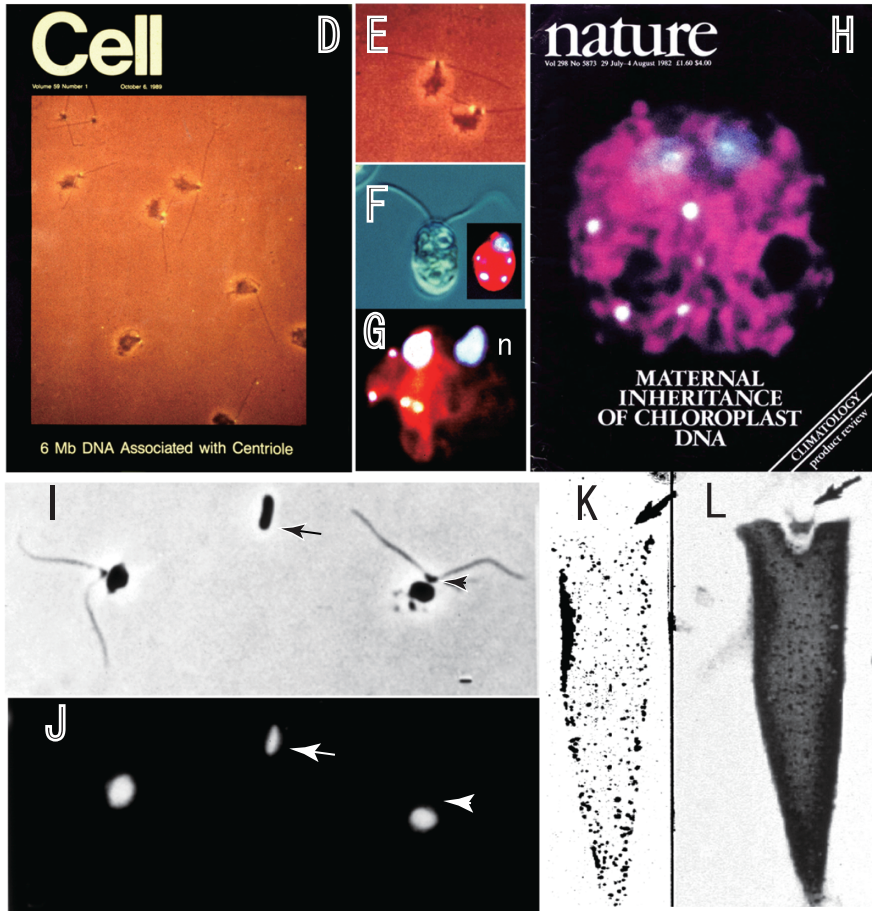


図1 真核生物におけるオルガネラの誕生機構

A: L.マーグリスの真核生物の起源仮説。光合成, 呼吸, そして運動に関わる原核生物が宿主生物に共生し, それぞれ真核生物の葉緑体, ミトコンドリアそして鞭毛になったとの説。青色はDNA。文献1を参考に改変。B: Aの宿主細胞(左)へスピロヘータが共生し鞭毛が形成される様子を拡大。C: 鞭毛基部にDNAがあるとする説(左)と実際の観察像(右)。鞭毛は緑。D, E: クラミドモナス(クラミー)の2本の鞭毛の基部(基粒体)にDNA発見を伝える論文。EはDの拡大。文献2より。F-H: クラミーの鞭毛基部にDNAがないことを示すDAPI蛍光顕微鏡像。大きな白色顆粒と小さな白色顆粒はそれぞれ細胞核(n)と色素体(葉緑体)核を示し, 葉緑体は赤い自家蛍光を放つ。Fは2本の鞭毛を持つ配偶子のノマルスキー像とDAPI蛍光顕微鏡像。Gは雄に葉緑素を持たない突然変異体の配偶子(右)と野生型の雌配偶子(左)を交配し, 40分後の接合子。雄配偶子由来の色素体DNAの分解が起きている。Hは文献4より。I, J: 単離したクラミーの鞭毛, 鞭毛基部そして細胞核の複合体と大腸菌(矢印)のDAPI染色後の位相差(I)蛍光(J)顕微鏡像。細胞核, 大腸菌核は光るが鞭毛基部は光らない(矢頭)。文献5より。K, L: ウニの精子のDNA抗体の金コロイド(K)と細胞(L)に焦点を合わせた免疫電子顕微鏡像。DNAの存在を示す金コロイド粒子は鞭毛基部(基粒体)には現れない(矢印)。文献6より。スケールは1 $\mu$ m





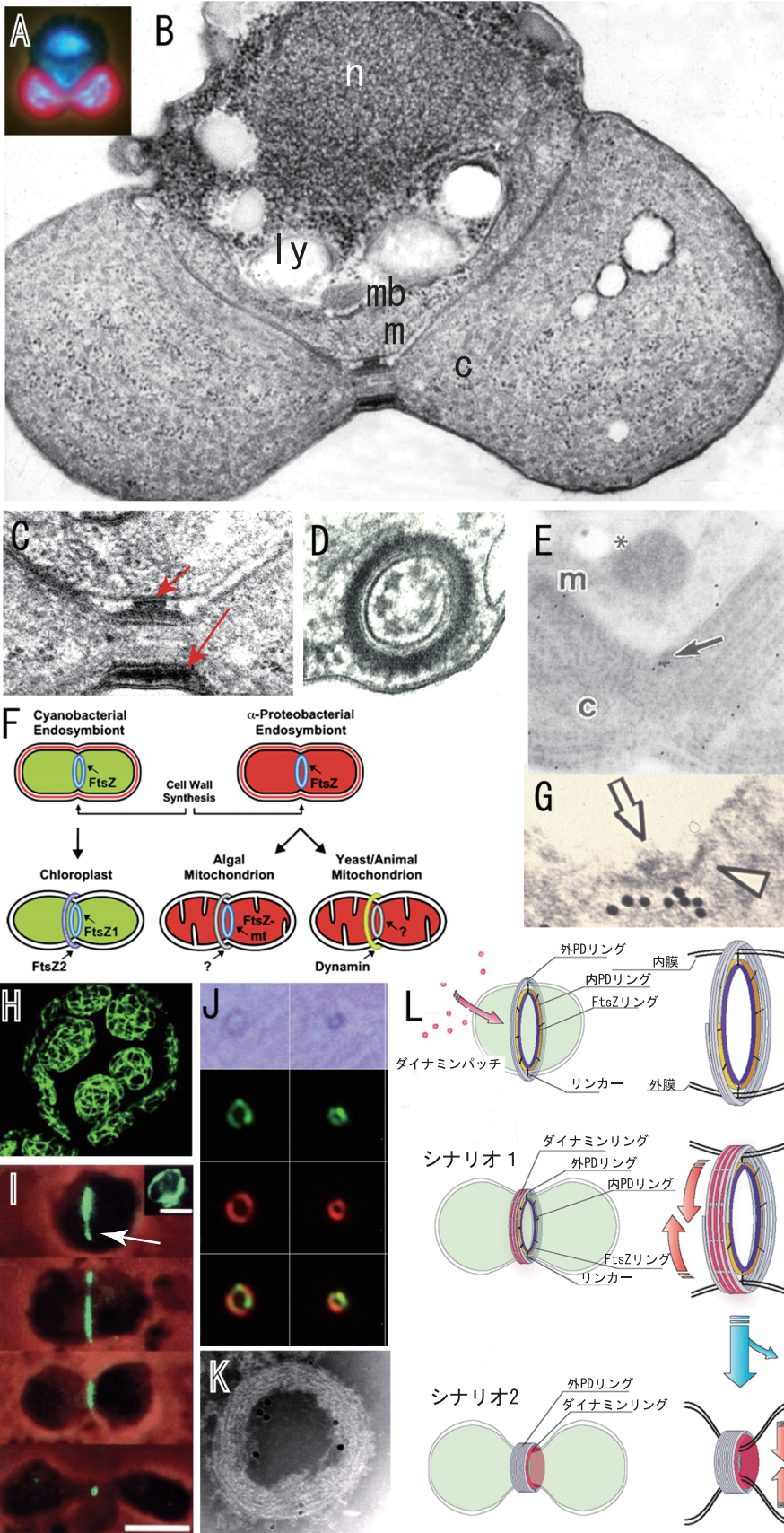


図2 ミトコンドリアと葉緑体の分裂機構

A: シズンの分裂細胞のDAPI蛍光顕微鏡像。上から細胞核, ミトコンドリア核そして葉緑体核。葉緑体は赤い自家蛍光を発する。B-D: Aの時期の細胞核 (n), リソソーム (ly), マイクロボディ (mb), ミトコンドリア (m), 葉緑体 (c) を示す電子顕微鏡 (TEM) 像。CはBの拡大像。ミトコンドリアの分裂装置 (小矢印) と葉緑体の分裂装置 (大矢印) の断面が見える。Dは葉緑体の分裂装置の輪切り。2重のリング構造が分かる。E: シズンのマイクロボディ (\*), ミトコンドリア (m), 葉緑体 (c) におけるGTPase, FtsZの局在を示す免疫電子顕微鏡像。FtsZの局在を示す金コロイド粒子は分裂面の内側に現れている (矢印)。文献16より。F: オスターヤングのモデル。文献17より。G: シズンの葉緑体の分裂装置の断面でのFtsZの局在を示す拡大免疫電子顕微鏡像。外PDリング (矢印) と内PDリング (矢頭) より更に内側にFtsZリングの断面を示す金コロイド粒子が現れている。金粒子の下に電子密度の高いリングは観察されない。文献23より。H: レスキーらのFtsZがヒメツリガネゴケの葉緑体内で編み目構造をとることを示すFtsZ-GFP蛍光顕微鏡像。文献22より。I: ユリの葉緑体内でのFtsZリングを示す位相差蛍光顕微鏡像。FtsZリング (矢印, 緑色蛍光) は分裂過程を通じて色素体の中央にある分裂面に現れる。右上はリングを示す。文献20より。J: シズンの分裂の時期が異なる葉緑体から単離した分裂装置の上から位相差, FtsZ蛍光 (緑), ダイナミン (赤) 及び統合の蛍光像。K: その単離葉緑体の分裂装置の電子顕微鏡像。分裂装置は細い繊維の束であることがわかる。文献29より。L: 葉緑体の分裂モデル。分裂装置はFtsZリング, 内外PDリング, ダイナミンリングからなる。GTPase, ダイナミンを含むパッチが分裂面に移動しダイナミンリングが形成される。細胞質側の外PDリングとダイナミンリングは基質 (内) 側のPDリングとFtsZリングに, リンカーで膜を介して繋がっている。分裂はシナリオ1と2の2段階で進む。分裂初期のシナリオ1では, ダイナミンは外PDリングを形成する繊維と協調して, 滑りを助け収縮を行う。分裂後期のシナリオ2では, ダイナミンはリングの内側に入りこみ, 膜を分断する。文献29より。



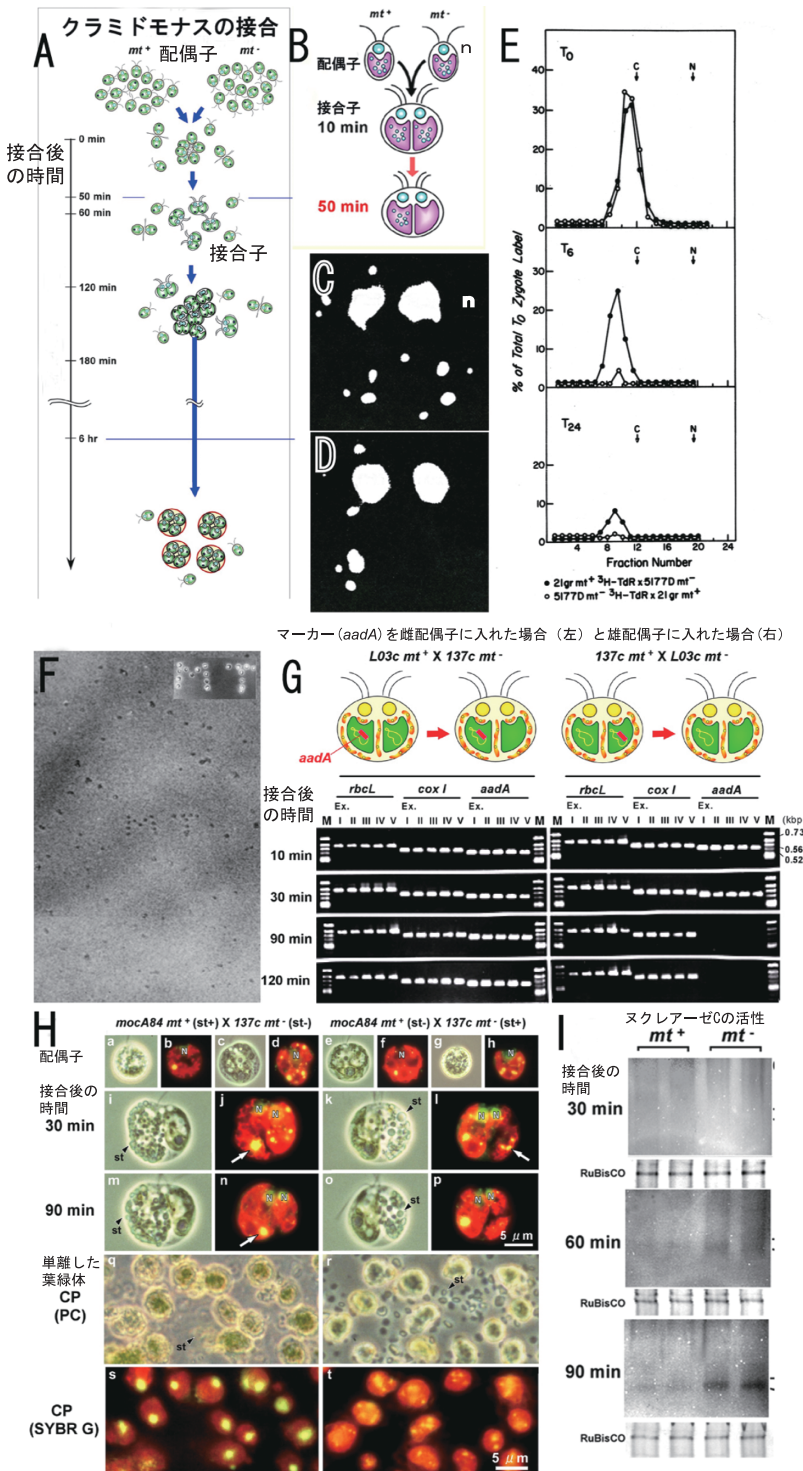


図3 母性遺伝の機構 (1)

A: クラミドモナス (クラミー) の生殖過程. 2 本鞭毛の雌 (mt<sup>+</sup>) 雄 (mt<sup>-</sup>) の配偶子を混合すると、接合が始まり、4 本鞭毛の接合子が形成される. やがて鞭毛も消失する. 接合は完全同調しては起こらない. B: 交配後の時間を追って接合子を観察すると、50 分以内に雄 (mt<sup>-</sup>) 配偶子由来の葉緑体 (赤) 内の葉緑体核が選択的に消失する (右). C, D: 実際の接合直後 (C) と 40 分後 (D) の接合子の DAPI 蛍光顕微鏡写真. 上の 2 個の大きく光る顆粒は細胞核 (n), その下の小さい顆粒は葉緑体核である. 時間の経過とともに雄由来の葉緑体核が完全に消失する (D の右). E: セガーの実験 (本文参照). 文献 33 より. F: 光ピンセットでミトコンドリアを動かし MT と描いた (中央). 右上はその DAPI 位相差蛍光顕微鏡像. G: 光ピンセットで接合後の 1 個の接合子を取り、葉緑体の遺伝子 (rbcL), ミトコンドリア遺伝子 (coxI), そしてマーカー遺伝子 (aadA) を PCR で増やした. 5 回 (I-V) の実験をおこなった. 葉緑体核の消失とともに雄由来のマーカー遺伝子が選択的に分解されている (左下, 90-120 分) (本文参照). 文献 37 より. H: 接合後、接合子から雌雄配偶子由来の葉緑体の単離. 育てる環境を変えて配偶子内のデンプン粒量を変え (st<sup>+</sup>, st<sup>-</sup>), その重さの差から各葉緑体を単離した. 雌配偶子の葉緑体にデンプン粒を持たせた場合の交配 (a-d, I, j, m, n) と、雄配偶子の葉緑体にデンプン粒を持たせた場合 (e-f, k, l, o, p) の交配を行い、葉緑体を単離した. 雌雄を区別するために葉緑体核が 1 個の moc 突然変異体を使った (黄色い 1 点) (本文参照). 雌由来葉緑体 (q, s) と雄由来葉緑体が単離 (r, t) されている. 文献 38 より. I: H で得た葉緑体内のヌクレアーゼ C 活性. 時間が経つと、雄由来の葉緑体に活性が現れ (右下, 60-90 分), 細胞質から雄由来葉緑体へヌクレアーゼ C が入ったのが分かる.



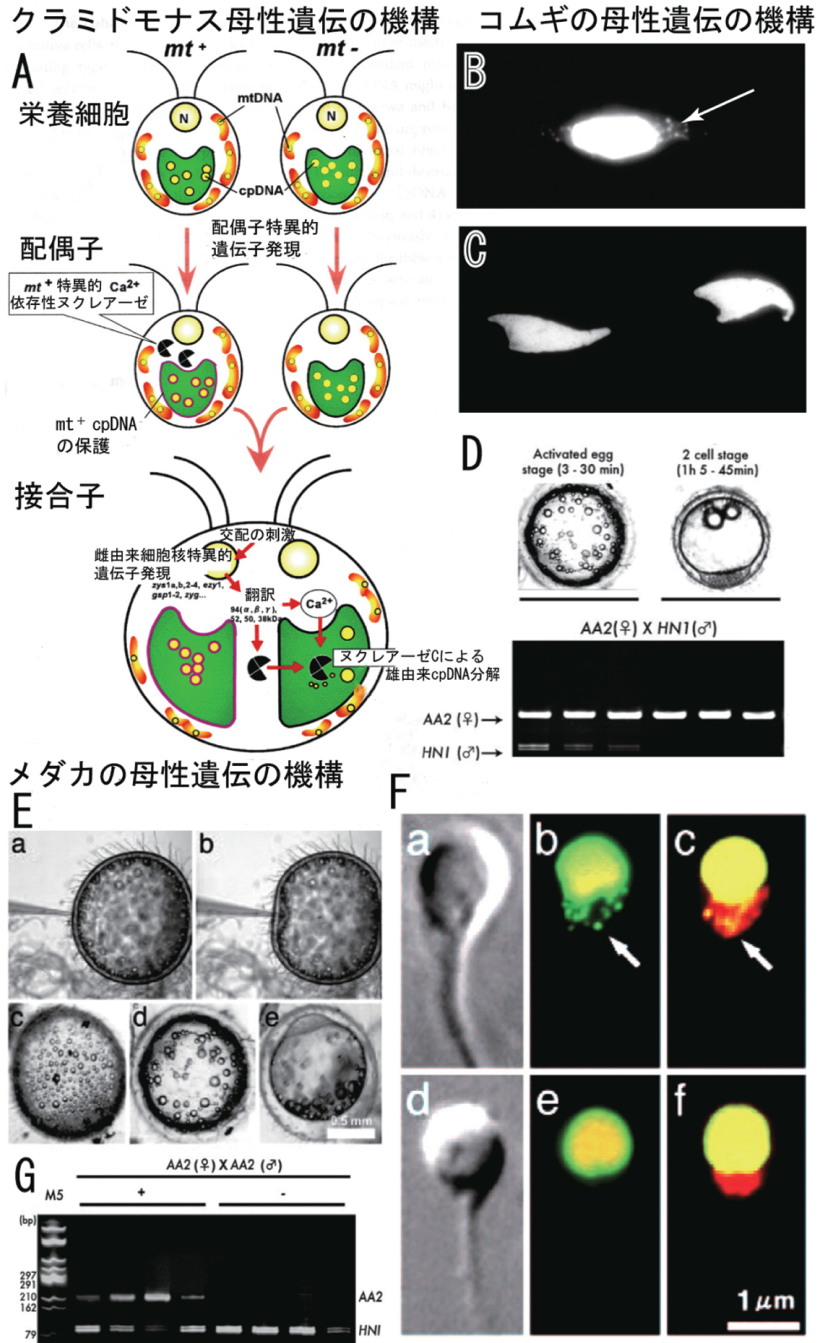


図 4 母性遺伝の機構 (2)

A: クラミの葉緑体ゲノム DNA の母性遺伝の機構。栄養細胞が飢餓になると生殖細胞 (配偶子) が形成される。この時、雌配偶子内に葉緑体 DNA を保護する機構と共に、Ca<sup>2+</sup> 要求性のヌクレアーゼ C が合成される。雌雄の配偶子が交配し接合子が形成されると、その刺激で雌由来の細胞核から、少なくとも 4 個の遺伝子が活性化され、それらの産物がヌクレアーゼ C の雄由来葉緑体への侵入を助ける。ヌクレアーゼ C が雄由来葉緑体 DNA の分解をする。文献 38 より。B, C: コムギ (*Triticum aestivum*) の母性遺伝の機構を示す DAPI 蛍光顕微鏡像。雄原細胞 (B) が 2 個の精細胞 (C) に変換する時に、葉緑体 (色素体) とミトコンドリア核 DNA (矢印) は分解される。文献 39 より。D-F: メダカ (*Oryzias latipes*) の母性遺伝の機構。D: 異なるミトコンドリアゲノムを持つ卵 (AA2) と精子 (HNI) で受精を行い、時間の経過に従って DNA を PCR で解析した。その結果、精子由来のミトコンドリア DNA (HNI) のみが選択的に分解され、卵由来の DNA (AA2) は残った。E-G: サイバークリーンで精子を染色し人工授精させた。E: 人工授精でも受精過程は正常に進行した (a-e)。F: この過程における精子を位相差 (a, d)、蛍光顕微鏡 (b-f) で観察すると、受精直前の精子には、ミトコンドリア (赤い蛍光) 内に数個のミトコンドリア核が見られるが (b, c)、時間が経つとミトコンドリアはあるが、ミトコンドリア核が消失する (e, f)。G: 雌雄のミトコンドリアマーカー遺伝子を逆にして、受精卵から光ピンセットでミトコンドリア核が消えていない精子 (+) と消えている精子 (-) とを掴みだし、PCR で解析した。ミトコンドリア核が消えた精子では DNA のシグナルは現れない (AA2)。文献 40 より。

(図 1D, E)<sup>2)</sup>. 鞭毛の運動機構を解析するため動きが異常となった突然変異体を分離し, その *uni* 遺伝子の同定, 塩基配列の決定を行い, 単離した遺伝子を標識し, *in situ* ハイブリッド形成による遺伝子がのった染色体 (大腸菌のゲノムより大きな 6Mbp) の位置の同定など, 生化学・分子生物学的技術を駆使して解析した結果, 蛍光輝点が 2 本の鞭毛の基部にそれぞれ 1 個現れたのである. その像は「Cell」の表紙を飾った (図 1D). DNA を染色する DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole) 染色でも鞭毛の基部が光っている像を示した. この分子生物学・生化学を基盤にした一連の結果からすると, 鞭毛基部に DNA が局在することは疑いの余地がなく, 多くの研究者がそれを認めた. 特に, 鞭毛がスピロヘータの共生によって誕生したとの説を提唱しているマーグリスは感激したという.

ところが, 細胞観察に興味を持つ筆者は, 次の点からこの論文に疑いを持った. 1) 鞭毛は細胞質内の微小管の延長となる突起であり, その基部には予想に反して膜に包まれた構造はない (図 1C 右). 2) 鞭毛の基部にある DNA 量が 6Mbp と, 大腸菌 4.6Mbp をはるかに越える量である. この量は, DAPI の蛍光染色だけでなく, 電子顕微鏡法による組織化学的方法でも DNA 繊維の塊 (核) として, 観察できるはずである. 3) これが重要なのだが, 筆者は, 1982 年以來, クラミーをはじめ多くの真核生物を用いて, オルガネラの母性遺伝や分裂・増殖の機構を高分解能の DAPI 蛍光顕微鏡法などを使って, 超微量の DNA を観察してきたが, 細胞には細胞核, ミトコンドリア核, 色素体核以外に DNA のシグナルを見出すことが出来なかった (細胞三核説) (図 1F-H)<sup>3,4)</sup>. 特に母性遺伝機構を証明した雄配偶子由来の色素体核が消失しているクラミーの DAPI 像はネイチャー誌の表紙を飾っていた (図 1H)<sup>4)</sup>. 筆者は改めて鞭毛基部に DNA がないことを証明する幾つかの実験を行った. この際, 対照として 4.6Mbp の染色体を持つ大腸菌を混入させたところ, 大腸菌の核は明確に光るものの, 鞭毛基部には輝点を観察することが全くできなかった (図 1I, J)<sup>5)</sup>. また鞭毛基部を単離して調べたが, この手法でもそこに DNA の存在を示せなかった. 同じ頃, エール大学の J.R. ローゼンバウムのグループも, DNA の存在に疑いを抱いた. 彼らはクラミーとウニの精子を用いて DNA 抗体による免疫電子顕微鏡法で調べたが, DNA の存在を示す金コロイド粒子を鞭毛基部に見出すことができなかった (図 1K, L)<sup>6)</sup>. では, 何故, 抗体反応が鞭毛基部に現れたのか. なによりも絶対にありえない DAPI の蛍光シグナルが鞭毛基部に現れた蛍光写真はどのように撮影されたのか. 未だに謎である. やはり, 鞭毛の共生説には疑いがある. しかしミトコンドリアと色素体は完全ではないがそれらのゲノムの DNA の塩基配列から共生説で説明ができる. また細胞核やマイクロボディが共生によって誕生

したとの考えもあるが, それは別の機会に紹介したい. 共生によって生まれたミトコンドリアや色素体は分裂増殖し, ミトコンドリアは細胞の発電所として ATP を合成し, 色素体は光合成の場として機能している.

## 2. ミトコンドリアと色素体の分裂機構

ミトコンドリアと色素体は, 体細胞において分裂を繰り返して増殖し, 娘細胞へと受け継がれてゆく. このミトコンドリアと色素体の分裂は, 真核生物や原核生物の分裂と同様に, 核分裂と細胞質分裂に相当するミトコンドリオキネシス, プラスチドキネシスからなっている. 電子密度の高い棒状のミトコンドリア核を持つ粘菌が<sup>3,7)</sup>, さらにミトコンドリオキネシスに関わる明瞭な分裂装置 (リング) を持っていれば, ミトコンドリアの分裂の研究に最適だった. しかし, 粘菌では, 分裂装置は小さく, 細胞当たりのミトコンドリアの数が多く, ランダムに分裂したため, ミトコンドリオキネシスの解析は難しかった<sup>3,7)</sup>. これは粘菌ばかりでなく酵母, 動物 (オピストコンタ) など他の真核生物でも同じであった. またほとんどの真核生物ではミトコンドリアがアメーバ状, 編み目状など不定形を呈し, 更に融合と分裂を繰り返した<sup>2,8)</sup>. そこで, 誕生後まもない始原的な真核生物であれば, ミトコンドリアや色素体の数も少なく, 形がシンプルで, オルガネラの分裂・増殖の研究がし易いと考えた. 原始地球環境が残る現代の場「温泉」で国内外を 10 年ほど探索した. その際, 色素体を持っている生物に拘わった. 動物・菌類 (オピストコンタ) やアメーバ類 (アメーボゾア) の細胞とともに, 色素体を持つ真核植物 (バイオコンタ) の細胞の基本構築原理をも解明したいと思ったこと, 及び単細胞緑藻クロレラでは, 光の明暗周期で細胞分裂が同調して起こるとの報告があり, 植物であれば細胞分裂の同調系が簡単に得られると思ったからである<sup>9)</sup>. その結果, 最終的に 1978 年にイタリアの温泉で発見されたが, ほとんど研究に使われていない原始紅藻シアニディオシゾン (*Cyanidioschyzon merolae*; シゾン) に至った. 国内を探したが見つからず, 1991 年採集目的でイタリアに赴いた. シゾンは細胞の直径が 1.5~2 $\mu$ m であり, 大腸菌に近いサイズであった (図 2A)<sup>10)</sup>. しかし幸いなことに真核生物が持つ基本的オルガネラである細胞核, ミトコンドリア, 色素体, 小胞体, ゴルジ体, マイクロボディが全て 1 個で, しかも単純形であった. リソソーム (液胞) だけが多く 4 個であった (図 2A, B)<sup>11,12)</sup>. シゾンも光の明暗周期で細胞分裂が完全に同調し, その結果としてオルガネラも, 色素体, ミトコンドリア, マイクロボディ, 細胞核, ゴルジ体の順に同調的に分裂した<sup>11)</sup>. このシゾンで真核生物として最も大きなミトコンドリアと色素体の電子密度の高い分裂装置 (リング) を発見し, それぞれ MD リング, PD リングと名づけた (図 2C, D)<sup>10,13,14)</sup>.



MD リングも PD リングも、基本的には内リング（基質側）と外リング（細胞質側）の 2 重リングであり、サイズの違いはあるが、これらはほとんどの真核生物にあった<sup>15)</sup>。

PD リングがどのような物質できているか、興味があった。葉緑体がシアノ細菌（藍藻）の共生によって形成されたという考えから（図 1A）、1999 年、既に明らかとなっていた細菌の分裂に直接関わる GTPase である *ftsZ*（分裂に失敗した温度感受性の突然変異体が、繊維のように長くなることから *filamentous temperature sensitive* と名付けられた）遺伝子産物の抗体を作製し、シゾンの葉緑体で FtsZ の局在を免疫電子顕微鏡で調べたところ、そのシグナルは PD リング上ではなく、葉緑体の分裂面の内側に現れた（図 2E）<sup>16)</sup>。

2000 年に、二つ続けてオルガネラの分裂に関わる不可解な生化学・分子生物学的研究が発表された。K.W.オスターヤングのグループは、既に細菌の分裂に必須な *ftsZ* 遺伝子のオルソログが植物シロイヌナズナに存在することを発見していたが、2000 年その遺伝子は *ftsZ1* と *ftsZ2* の二つパラログであることに気がついた。FtsZ1 にはシグナルペプチドがあり FtsZ2 にはない。そこで、単離した葉緑体へ、それらのタンパク質が浸入するかどうかを生化学的に良く利用される *in vitro* の輸送実験系で調べた。その結果は FtsZ1 の産物は葉緑体内に入るが FtsZ2 は入らないという予想通りの実験結果であった。そこで、彼女は FtsZ1 の産物は既に筆者らが見つけていた内側のリング、FtsZ2 の産物は細胞質側の外側のリングを形成するというモデルを提唱した（図 2F）<sup>17)</sup>。ここで直ぐに二つの疑問が生じた。一つは未だこの時点ではゲノムが完全解読はされていないので、両遺伝子の塩基配列が完全であるという保証はないということである。もう一つはほとんどの細菌では FtsZ リングは、蛍光顕微鏡で分裂面に観察されるが、免疫電子顕微鏡では金コロイド粒子の連続として観察されても、実体が電子密度の高い構造として直接観察されることがないことである<sup>18)</sup>。にもかかわらずモデルでは FtsZ リングを電子密度の高いリングとして記載していた（図 2F）。筆者らは直ぐにシゾンと高等植物で FtsZ の局在を免疫電子顕微鏡で調べたが FtsZ1 と FtsZ2 の存在を示す金コロイド粒子は、1999 年の FtsZ 実験の通り、外 PD リング上ではなく、ともに分裂面の内側に現れた<sup>19,20)</sup>。よく見ると、そのシグナルの位置は、電子密度の高い内リングの更に内側であった（図 2G）。シロイヌナズナのゲノム解読が終了してみると FtsZ1 と FtsZ2 共にシグナルペプチドがあることが分かった<sup>21)</sup>。 *in vitro* の輸送実験系の結果はなんだったのか。

このようなことは過去の問題ではない。エンドサイトシスの小胞形成の際に、電子密度の高い直径 40nm ほどのリングが現れ、小胞を分断・形成させることは良く知られて

いる。このリングを *in vitro* の実験結果を主に GTPase ダイナミンであると考えている。しかしながら体積でそれより 1 万倍以上も大きなシゾンのミトコンドリアや色素体のダイナミンリングが、金コロイドの下に電子密度の高いリングとして現われたことがない<sup>15)</sup>。これはこれから決すべき問題であるが *in vitro* の実験結果の *in vivo* への安易な適用は注意すべきである。

もう一つ色素体の分裂に関して不可解な報告がある。ヒメツリガネゴケは植物でも相同組換えが比較的容易にできることで多くの研究者が利用する材料である。R.レスキーらのグループはこの技術を使って植物の様々な問題の解明に積極的である。1998 年 FtsZ の遺伝子を破壊すると、大型の葉緑体が出現し、FtsZ 遺伝子が葉緑体の分裂に関与していることを示唆した。2000 年暮れレスキーらは驚くような *ftsZ* 遺伝子産物の局在を示す実験結果を発表した。*ftsZ* 遺伝子に GFP 遺伝子を繋いでその産物の局在を観察した結果、蛍光は葉緑体の分裂面ではなく、葉緑体いっばいに広がる網目構造として現れ、分裂面にのみ局在することはなかった<sup>22)</sup>。しかしこの結果についても直ぐに疑問を抱いた。1991 年以来細菌の FtsZ リングの局在が調べられ、免疫電子顕微鏡法でも GFP 法でも、FtsZ リングの局在は細菌の分裂面であり、菌体全体に網目として観察されることがなかった。共生によって誕生した葉緑体だから局在が変わったとは考えにくい。筆者らも、シゾンとユリの FtsZ 遺伝子の抗体を得て実験をするとともに（図 2I）<sup>23)</sup>、後にオスターヤングから FtsZ1、2 の抗体を得て免疫蛍光顕微鏡と免疫電子顕微鏡法で調べた。それらの結果は 1999 年に得た結果を支持するとともに、明らかにシゾンでも高等植物でも FtsZ は分裂面の基質側にリングを形成していた<sup>23,24)</sup>。オスターヤングのグループも FtsZ リングは葉緑体の分裂面に局在することを示し、網目構造は GFP の過剰発現と関係していることを示唆した<sup>25)</sup>。GFP は簡単で直ぐにその産物の局在が分かることから非常に多くの研究に使われている。しかしながらこのような事例を目の当たりにして、過剰発現や組換えタンパク質であるという事実が蔑ろにされて、GFP の局在解析のみで結論とする風潮には危惧を抱かざるを得ない。

シゾンはミトコンドリアと色素体の分裂装置が大きいことに加え、更に培養法の改良で完全に分裂を同調化させることができるようになった。また細胞周期の各期にある個々のオルガネラを単離できるようにもなった。更に有益なことに 2004 年にゲノム解読を終え<sup>26)</sup>、2007 年真核生物としてはじめて 100% 全塩基配列（細胞核ゲノム、16,546,747bp；ミトコンドリアゲノム、32,211bp；色素体ゲノム、149,987bp）の決定に成功した<sup>27)</sup>。細胞核の遺伝子数も大腸菌 O157 より 500 少ない 4775、遺伝子のパラログも少なく、遺伝子にイントロンがほとんどなかった。シ

ゾンは高温温泉に棲息するため、タンパク質が安定であることを考えると、これまで進めてきたミトコンドリアの分裂装置の細胞機構<sup>28,29)</sup>をはじめ、単離した色素体分裂装置のMALDI TOF-MAS解析が容易となり、分裂装置を構成する全タンパク質とその遺伝子、そしてそれらの高次構造の解析が可能となってきた(図2J, K)<sup>29,30)</sup>。色素体の分裂装置も20種余りのタンパク質から形成されており、幾つかのタンパク質は各ドメインが機能を分担している可能性もでてきた。例えば、ダイナミンは、分裂装置が収縮する初期には、収縮力を出すのを助け、収縮が終わりに近づくと、分裂装置内を分裂膜面に移動し、これらの膜を分断し、色素体の分裂を完了させる(図2L)。恐らくダイナミンの各ドメインが機能を分担しているからこのような複数の働きをすることが可能になるのであろう。少ない分子を如何に効率よく働かすかについてRNAでも見られる。これまでシゾンのゲノム解読で不足があったコドン表も、エディティングやスプライシングに加えた新たなtRNAの編集機構の発見により完成された<sup>31)</sup>。

最近研究室セミナーで面白いことがあった。若い研究者には遺伝子が同定されていない構造はないに等しいとの考えが強い。ミトコンドリアや色素体の分裂面の構造モデルを示すのに、免疫蛍光顕微鏡法やGFPで観察されるFtsZリング、ダイナミンリング、そして遺伝子が分かっている複数のリング構造を明示したが、電子顕微鏡で明瞭に観察されるが、遺伝子が未決定のMDとPDリング構造は示されていなかった。単離した分裂リングの電子顕微鏡像があってもある(図2J, K)<sup>29,30)</sup>。構造を重視する研究室でもこのような状態である。あまり現在の流行である遺伝子・GFP蛍光顕微鏡法に振り回されることなく、真理の探究に謙虚になり、免疫電子顕微鏡観察をも重視して欲しいと願っている。

### 3. 母性遺伝の機構

体細胞内で分裂増殖を続けたミトコンドリアと色素体は、生殖過程を経て、母性(片親)遺伝によって子に伝達されることが遺伝学的に良く知られている。しかしその機構についてはあまり知られていない。この解析過程で起きた不可解な実験・仮説について最後に述べる。母性遺伝の基本となる遺伝現象は、1909年C.R.コレンスによってオシロイバナで、E.パウワーによって高等植物ゼラニウムで発見された。葉の斑入りの性質が、雌しべ(母方)の形質に依存して起こり、やがてこれは葉緑体の遺伝であることが明らかになる。1950年代に入ると、母性遺伝の機構を解明するために、同型配偶子のクラミーが使われ始めた。R.セガーは、ストレプトマイシン耐性能が交配型(+, 母方; -, 父方)に依存して片親(母性)遺伝することに気付いた。次にこの遺伝子がメンデル遺伝様式を示さないこ

とから、細胞質中の葉緑体にあると想定し、1963年に葉緑体を単離し、M.石田と共にDNAの存在を明らかにした。この発見を基盤に1972年セガーらは、母性遺伝の機構を解明するために、雌雄の配偶子を交配させ、接合子からDNAを抽出して解析した(図3)。雌雄を区別するため、片方の親の配偶子のDNAのみを同位元素<sup>15</sup>Cで標識し、またその逆を行い交配させた。交配後時間の経過に従ってDNAを抽出し、CsCl密度勾配遠心にかけて、主DNA(細胞核DNA)とサテライトDNA(葉緑体と考えて、ミトコンドリアDNAについては無視)のピークの変化を追跡した。その結果、母方を<sup>15</sup>Cで標識した場合、交配後6時間するとそのピークは現れたが、父方を標識した場合、サテライトのDNAのピークは低くなっていた。この差は交配後の時間経過とともにより顕著になった。そして24時間後、雄配偶子由来の葉緑体DNAはほぼ完全に消失した<sup>32)</sup>。1982年、筆者らは超高分解能蛍光顕微鏡観察法による母性遺伝の細胞機構を発表した(図3B-D)。この時、セガーが放射性同位元素を[<sup>3</sup>H]チミジンに変えたもう一つの生化学的実験を発表しているのを知った(図3E)。この場合も、雌雄の配偶子の接合後6時間すると、雄配偶子由来の葉緑体DNAが急速に減少を始めたが(3E-T6)、24時間後でも僅か存在した。一方、雌配偶子由来の葉緑体DNAも僅かながら減少をはじめ、24時間後には僅かとなった(図3E-T24)<sup>33)</sup>。この分子機構として、セガーは、当時W.アーバーが細菌のDNAとファージとの関係で明らかにした「制限と修飾」の機構を採用した。即ち雌配偶子由来の葉緑体DNAは接合後6時間してメチル化され、雄由来の葉緑体DNAはメチル化されない。その結果、交配後制限酵素が働き雄由来の葉緑体DNAのみが選択的に分解され、母性遺伝が起こると考えた。ところがその後、雄由来の葉緑体DNAをメチル化した配偶子と正常な雌配偶子との交配を行った場合も、葉緑体DNAを薬剤(5-aza Cyt)でメチル化をしなくした雌配偶子と正常な雄配偶子との交配でも、正常な母性遺伝は起きたのである<sup>35,36)</sup>。メチル化は主役ではないようだ。そしてこれまで母性遺伝に関わる肝心の制限酵素も発見されていない<sup>36,37)</sup>。

1981年新たに開発した高分解能蛍光顕微鏡で、細胞核の実験で残った同型配偶子生物のカサノリ(*Acetabularia calyculus*)の受精を観察していて、雌雄配偶子の交配直後に片方の親由来の1個のカップ形の葉緑体内に7-8個ある葉緑体核が選択的に消失していることに気がついた。そこで、遺伝学的に解析できる同型配偶子生物のクラミーを使うことにした。その結果、クラミーでもカサノリと全く同じ現象が起きていることが分かった。雌雄の配偶子を交配し接合子内の葉緑体核の挙動を観察すると、10分後の接合子内では雌雄の配偶子由来の葉緑体核は観察されたが(図3B, C)、40-50分すると雄配偶子由来の葉緑体にある



6~8個の葉緑体核がほぼ同時に周辺から消失を始め完全に消失したが、雌配偶子由来の葉緑体核は変化せずに残った(図3B-D)<sup>4)</sup>。この短時間に起こる選択的DNA分解こそ母性遺伝の仕組みであると確信し、「母性遺伝の能動的消化説」として提示した。しかし先に述べたように、生化学的実験では完全消失には24時間もかかっていた。さてここからが問題である。母性遺伝の機構は、細胞学的観察による1時間以内で起こるのだろうか、生化学・分子生物学的結果の6時間にはじまり24時間かかるのだろうか。この時間的ギャップに20年近くも議論が集中することになった。生化学者は細胞学的観察結果の説明として、色素体核は1時間以内で分散するが、DNA分子が分解されずに残っており、DNAが分解されるのは6~24時間経ってからだという。筆者らの反論は、1)この蛍光顕微鏡法では、1個の遺伝子や各種DNAフェージ(12~140kbpまで)も観察できることから、色素体核の消失は「分散」でなく明らかな「分解」によるものである、2)生化学実験では、数万以上の雌雄の配偶子を混合した、配偶子や接合子集団からDNAを抽出し解析することになる。しかし図3Aに示すように、接合過程が全ての個体で完全に同調的に進まない。例えば、10分後では、混合溶液中には、まだ接合していない雌雄の配偶子や雄由来の葉緑体DNAが分解されていない接合子が含まれる。50分後になると、配偶子の接合は進むが、未だ接合していない雌雄の配偶子も含まれる。接合子の一部には、雄由来の葉緑体DNAが分解しているものも現れるが、まだ消失していない接合子も多数ある。生化学実験ではこの様々な細胞集団を経時的に集めDNAを抽出するので、実際に雄由来の葉緑体DNAが消えていても、集団として全部が消失するまでに時間がかかる。そこで、この論争を打破するために、光ピンセット法を改良し(図3F)、交配後各時間を経た1個の接合子の遺伝子をPCR法で解析することにした。葉緑体のDNAマーカーとして*rbcL*遺伝子、ミトコンドリア遺伝子として*cox1*、更に雌雄配偶子由来の葉緑体DNAを区別するために、葉緑体DNAに大腸菌の遺伝子*aadA*を導入して使った(図3G)。その結果、接合後1時間ほどで、雄葉緑体核の「消失」とともに、*aadA*の増幅は見られず、雄配偶子由来の葉緑体DNAが選択的に「分解」していることが明らかとなった(図3G)<sup>37)</sup>。その後、突然変異体を用いて多くの解析が進んだ。

特にヌクレアーゼC(140kDa)がほんとうに雄配偶子由来の色素体を選択的に浸入し、8個ある色素体核内のDNAの分解を行うかが研究の焦点となった。しかし配偶子が同形であり、葉緑体も同じサイズであることが解析を拒んだ(図3H)。それぞれを区別して単離することができない。そこで、雌雄の葉緑体の重さに差をつけるため、光の明条件で育て多くのデンプン粒を含んだ葉緑体を持った

雌配偶子と、暗条件で育てほとんどデンプン粒を持たない配偶子を交配してから、葉緑体を単離した。またその逆を行った。雌雄の葉緑体の区別には葉緑体核が1個の突然変異体(MocA84)を用いた。その結果、接合後ヌクレアーゼCは選択的に雄由来の葉緑体に浸入し、そのDNAを分解することが明らかとなった(図3I)<sup>38)</sup>。母性遺伝の機構を整理すると、雌雄の配偶子が形成されると、雌の配偶子内に雄のDNA分解に関わるヌクレアーゼCが合成される。これとともに雌配偶子内のDNAを保護する機構が生まれる。一方、雄配偶子内には保護機構が形成されない。この状態で雌雄の配偶子は接合する。接合の刺激により、雌配偶子由来の細胞核内において多くの*zys*遺伝子が活性化され、ヌクレアーゼCの雄配偶子由来の色素体への浸入を助ける。ヌクレアーゼCは選択的にDNAを分解し、母性遺伝が起こる。この「能動的消化機構」は接合後1時間以内に起こる(図4A)。この機構は同型配偶の粘菌のミトコンドリアから異型配偶生物、更に卵生殖の高等植物(コムギなど)の色素体とミトコンドリアDNAでも起きていた(図4B, C)<sup>39)</sup>。

最近メダカを使ってこの「母性遺伝の能動的消化機構」の検証を試みた(図4D-F)。高等動植物のように卵生殖するものでは、母性遺伝の機構として一般に受け入れられているのは、卵は大きく沢山のミトコンドリアを含んでおり、精子は小さくミトコンドリアはほとんどない。従って受精すると、子に伝達されるのはほとんど卵のミトコンドリアであり、その結果母性遺伝が起こるとの説である。そこで、ミトコンドリアDNAの配列の異なる精子と卵を使った(AA2, *HVI*)。先ず精子のミトコンドリアDNAは精子形成過程で細胞核当たり450コピーあったものが中片を形成する段階では70コピーへと減少した。これが受精する。受精後経時的にDNAの挙動を解析してみると、1時間ほどで、選択的に精子由来のDNAが完全分解されていた。一方卵由来のミトコンドリアDNAはそのまま残っていた(図4D)。この過程を1個の精子と1個の卵で検証するため、精子のDNAをサイバークリーンで標識し、人工受精させた。受精は正常に進行した(図4E-G)。受精卵から1個の精子を光ピンセットで経時的に取り出し観察するとともに、PCRでDNA量を調べた。その結果、精子のミトコンドリアの形が残っている時でも、そのDNAは分解されていることが明らかとなった<sup>40)</sup>(図4F, G)。母性遺伝の基本機構は真核生物に共通であることが示唆される。幸いなことに最近クラミーとメダカのゲノムの全塩基配列が決定された。これによって観察に始まった母性遺伝の積極的消化機構に拘わる全タンパク質とその遺伝子解明が期待できる。現象の真理は一つである。この解明のためには1個の細胞やオルガネラの生化学・分子生物学的解析が必要である。

オルガネラの分裂装置や母性（片親）遺伝がほとんどの真核生物に見られることから、筆者は、これらは宿主となる真核生物の細胞核ゲノムが、共生体（菌、オルガネラ）を制御するために作った、真核生物誕生の鍵となる機構と考えている<sup>41)</sup>。

本稿をまとめるにあたり、立教大学生研機構研究員三角修己博士に協力頂いた。また図3A, B（西村芳樹氏原図）を使用した。この場を借りてお礼を申し上げたい。

## 文 献

- 1) Margulis, L. (1970) *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press, New Haven.
- 2) Hall, J.L., Ramanis, Z., & Luck, D.J.L. (1989) *Cell*, **59**, 121-132.
- 3) Kuroiwa, T. (1982) *Int. Rev. Cytol.*, **75**, 1-59.
- 4) Kuroiwa, T., Kawano, S., Nishibayashi, S., & Sato, C. (1982) *Nature*, **298**, 481-483.
- 5) Kuroiwa, T., Yorifuzi, H., Yabe, N., Ohta, T., & Uchida, H. (1990) *Protoplasma*, **158**, 155-164.
- 6) Johnson, K.A. & Rosenbaum, J.R. (1990) *Cell* **616-619**.
- 7) Kuroiwa, T., Kawano, S., & Hizume, M. (1977) *J. Cell Biol.*, **72**, 687-694.
- 8) Miyakawa, S., Aoi, H., Sand, N., & Kuroiwa, T. (1984) *J. Cell Sci.*, **66**, 21-38.
- 9) Tamiya, H. (1963) *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **17**, 188-214.
- 10) Kuroiwa, T., Suzuki, K., & Kuroiwa, H. (1993) *Protoplasma*, **175**, 173-177.
- 11) Misumi, O., Matuzaki, M., Nozaki, H., Miyagishima, S., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Kuroiwa, H., & Kuroiwa, T. (2005) *Plant Physiol.*, **137**, 567-585.
- 12) Yagisawa, F., Nishida, K., Kuroiwa, H., Nagata, T., & Kuroiwa, T. (2007) *Planta*, **226**, 1017-1029.
- 13) Suzuki, K., Ehara, T., Osafune, T., Kuroiwa, H., Kawano, S., & Kuroiwa, T. (1994) *Europ. J. Cell Biol.*, **63**, 280-288.
- 14) Kuroiwa, T., Kuroiwa, H., Sakai, A., Takahashi, H., Toda, K., & Itoh, R. (1998) *Int. Rev. Cytol.*, **181**, 1-42.
- 15) Kuroiwa, T., Nishida, K., Yoshida, Y., Fujiwara, T., Mori, T., Kuroiwa, H., & Misumi, O. (2006) *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell.*, **1763**, 510-521.
- 16) Kuroiwa, T., Takahara, M., Miyagishima, S., Ohashi, Y., Kawamura, F., & Kuroiwa, H. (1999) *Cytologia*, **64**, 333-342.
- 17) Osteryoung, K.W. (2000) *Plant Physiol.*, **123**, 1213-1216.
- 18) Bi, E. & Lutkenhaus, J. (1991) *Nature*, **354**, 161-164.
- 19) Mori, Y., Takahara, M., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., & Kuroiwa, T. (2001) *Cytologia*, **66**, 113-115.
- 20) Mori, T., Kuroiwa, H., Takahara, M., Miyagishima, S., & Kuroiwa, T. (2001) *Plant Cell Physiol.*, **44**, 555-559.
- 21) The Arabidopsis Genome Initiative (2000) *Nature*, **408**, 796-815.
- 22) Kiessling, J., Krusee, S., Rensing, S.A., Harter, K., Decker, E.L., & Reski, R. (2000) *J. Cell Biol.*, **151**, 945-950.
- 23) Miyagishima, S., Takahara, M., Mori, T., Kuroiwa, H., Higashiyama, T., & Kuroiwa, T. (2001) *Plant Cell*, **13**, 2257-2268.
- 24) Kuroiwa, H., Mori, T., Takahara, M., Miyagishima, S., & Kuroiwa, T. (2002) *Planta*, **215**, 185-190.
- 25) Vitha, S., McAndrew, R.S., & Osteryoung, K.W. (2001) *J. Cell Biol.*, **153**, 111-120.
- 26) Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-i, T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, S., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, Y., Nishimura, Y., Nakao, S., Kobayashi, T., Momoyama, Y., Higashiyama, T., Minoda, A., Sano, M., Nomoto, H., Oishi, K., Hayashi, H., Ohta, F., Nishizaka, S., Haga, S., Miura, S., Mrishita, T., Kabeya, Y., Terasawa, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Asakawa, S., Takano, H., Ohta, N., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y., & Kuroiwa, T. (2004) *Nature*, **428**, 653-657.
- 27) 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 j-Chung, Nakamura, S., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Sato, N., & Kuroiwa, T. (2007) *BMC Biology*, **5**, No 28.
- 28) Nishida, K., Takahara, M., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., Matsuzaki, M., & Kuroiwa, T. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 2146-2151.
- 29) Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Misumi, O., Nishida, K., Nanamiya, H., Yagisawa, F., Fujiwara, T., Kawamura, F., & Kuroiwa, T. (2006) *Science*, **313**, 1435-1438.
- 30) Nishida, K., Yagisawa, F., Kuroiwa, H., Yoshida, Y., & Kuroiwa, T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 4736-4741.
- 31) Soma, A., Onodera, A., Sugahara, J., Kanai, A., Yachie, N., Tomita, H., Kawamura, F., & Sekine, Y. (2007) *Science*, **318**, 450-453.
- 32) Sager, R. & Lane, D. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**, 2410-2413.
- 33) Sager, R. (1981) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **361**, 209-218.
- 34) Burton, W., Grabowy, C., & Sager, R. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 1370-1394.
- 35) Feng, T.Y. & Chiang, K.S. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 3438-3442.
- 36) 黒岩常祥 (1990) 日経サイエンス, **20**, 66-79.
- 37) Nishimura, Y., Misumi, O., Matsunaga, S., Miyagishima, S., Yokota, A., & Kuroiwa, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 12577-12582.
- 38) Nishimura, Y., Misumi, O., Kato, K., Inada, N., Momoyama, Y., & Kuroiwa, T. (2002) *Genes and Dev.*, **16**, 1116-1128.
- 39) Miyamura, S., Kuroiwa, T., & Nagata, T. (1987): *Protoplasma* **141**, 315-321.
- 40) Nishimura, Y., Yoshinari, T., Naruse, K., Yamada, T., Sumi, K., Mitani, H., Higashiyama, T., & Kuroiwa, T. (2006) *Proc Natl. Acad. Sci.*, **103**, 1382-1387.
- 41) 黒岩常祥 (2005) 蛋白質 核酸 酵素 **50**, 2210-2034.