



## ペプチドグリカン層をもつ葉緑体である シアネレの分裂と FtsZ リング形成

### FtsZ Ring Formation and Division of the Cyanelle Which is a Chloroplast with a Peptidoglycan Layer

佐藤 繭子<sup>a</sup>, 豊岡 公德<sup>a</sup>, 平田 愛子<sup>b</sup>,  
南雲 保<sup>c</sup>, 河野 重行<sup>b</sup>

Mayuko Sato, Kiminori Toyooka, Aiko Hirata, Tamotsu Nagumo  
and Shigeyuki Kawano

<sup>a</sup>理化学研究所・植物科学研究センター

<sup>b</sup>東京大学大学院・新領域創成科学研究科

<sup>c</sup>日本歯科大学・生命歯学部

**要旨** 灰色藻の葉緑体（シアネレ）は、二重包膜にペプチドグリカン層をもち、原始的な特徴を残している。シアネレの分裂様式を明らかにするため、原核生物の細胞分裂タンパク質 FtsZ の動態を間接蛍光抗体染色法で調べ、走査電顕と透過電顕を用いて微細構造を観察した。シアネレでは他の植物の分裂機構とは異なり、シアネレの外側からの力ではなく、ペプチドグリカン隔壁形成にともなうシアネレ内側で発生する力が分裂の原動力となっている。

キーワード：シアネレ、ペプチドグリカン、葉緑体分裂、FtsZ

#### 1. はじめに

葉緑体はシアノバクテリア細胞内共生によって誕生した。

シアノバクテリアを含む原核生物の細胞分裂では、分裂面で細胞壁が内部へ向かって合成されて隔壁を形成し、最終的に細胞壁溶解酵素により隔壁が分解されて、2つの娘細胞に分離する。隔壁の形成過程では、種々のタンパク質が分裂面へとリクルートされて、分裂装置を形成することが知られている<sup>1)</sup>。FtsZ はその一つでチューブリンに構造的相同性のある GTP 結合タンパク質である。分裂に先立って分裂面細胞膜直下にリングを形成して収縮し、細胞分裂で最も重要な働きをしていると考えられる。

葉緑体は、独自のゲノム DNA をもち、半自立的に分裂して増殖する。その際、FtsZ を始めとする原核生物由来の分裂装置と、葉緑体の内外にある二重の Plastid-dividing ring (PD

リング) やダイナミンといった真核生物由来の分裂装置が、協調して働いていることが近年の研究で明らかになってきた<sup>2,3)</sup>。紅色植物と緑色植物の葉緑体では、そのうち真核生物由来の分裂装置が、分裂の原動力となっていると考えられている。

灰色植物門は4属からなる小さな分類群であるが、葉緑体の進化を考える上で極めて興味深い存在である。灰色植物は、紅色と緑色植物と同様に、一回の細胞内共生（一次共生）によって誕生した系統で、淡水産の単細胞藻類である。灰色植物の葉緑体は、シアネレ (cyanelle) と呼ばれ、葉緑体包膜にペプチドグリカン層を維持している。ペプチドグリカン層はシアネレ以外の葉緑体では既に失われており (図1)、シアネレの機能と動態を観察することで、シアノバクテリアから葉緑体への進化過程の一端を明らかにできると考えられる。本稿では、灰色藻の一種 *Cyanophora paradoxa* (図2) のシアネレ分裂過程について、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を用いて、これまでに行った解析結果について紹介する。

#### 2. シアネレ分裂における FtsZ の動態

##### 2.1 FtsZ リング形成過程の観察

葉緑体二重包膜の間にペプチドグリカン層が維持されているシアネレでは、他系統の葉緑体分裂に比べ、原核生物型の分裂装置の機能が重要であることが考えられた。そこで原核生物の細胞分裂面にリングを形成し、原核型分裂装置の基盤を構成する FtsZ タンパク質に着目し、シアネレでの FtsZ の局在を、抗 FtsZ 抗体を用いた間接蛍光抗体染色により調べた (図3)。 *C. paradoxa* では、葉緑体分裂に関わる FtsZ 遺伝子 (*CpFtsZ-cy*) が既に単離されている<sup>4)</sup>。

細胞を3%パラホルムアルデヒドで30分間固定し、ポリリジンコートしたカバーガラスに貼付けて以降の処理を行った。貼付けの際に、細胞を押し潰すことでシアネレを細胞外に放出させ、抗体の反応性を高めた。図3に示した蛍光顕微鏡像は、細胞外に単離されたシアネレを示している。一次抗体には単細胞微細緑藻ナノクロリスの抗 FtsZ 抗体を、二次抗体には Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。

クロロフィルの自家蛍光からシアネレの分裂過程を4つのステージに分けた (図3, ステージ I - IV)。シアネレは、片側がくびれた腎臓型 (ステージ I)、くびれが分裂面全周に広がったダンベル型 (ステージ II) を経て、分裂面の隔壁形成が完了し (ステージ III)、分裂する (ステージ IV)。また、各ステージの頻度は、ステージ I : 21%, ステージ II : 32%, ステージ III : 32%, ステージ IV : 15% で、ダンベル型の状態が6割を超えていた。抗体染色の結果から、FtsZ が分裂面にリングを形成すること、分裂が進むにつれて FtsZ リングが収縮することが確かめられた (ステージ II a-III a)。さらに、1) 分裂初期に FtsZ が分裂面片側に弧を描くように局在していた (ステージ I)。これを FtsZ アークと呼ぶことにした。FtsZ アークが見られるシアネレは分裂面

<sup>a</sup> 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22 東研究棟 E612

TEL: 045-503-9572; FAX: 045-503-9591

2008年11月15日受付

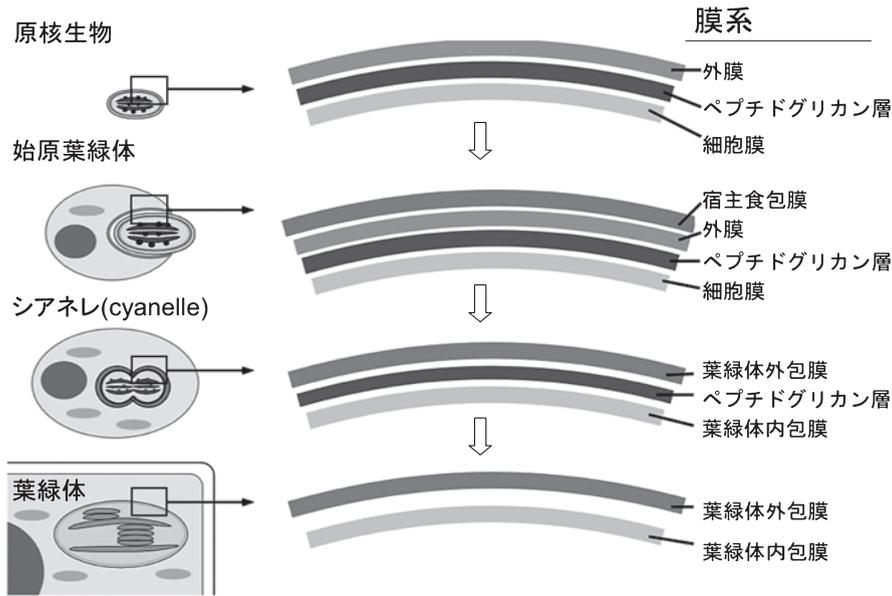


図1 原核生物から葉緑体へと至る膜系の変化の模式図。

の片側のみがくびれているもので、くびれの位置と FtsZ の局在は一致していた。2) 分裂の最後に、FtsZ リングが分裂面に対して平行に分離していた (ステージ III b)。これら二つの特徴は、シアネレが分裂時にペプチドグリカン隔壁を形成することに起因していると考えられ、他の葉緑体には見られないものである。

## 2.2 ペプチドグリカン合成が FtsZ アーク・リング形成におよぼす影響

原核生物の細胞分裂では、最初に FtsZ が分裂面に足場となるリングを形成し、続いてペプチドグリカン合成に関わる分裂装置のタンパク質複合体がリクルートされる<sup>5)</sup>。 *C. paradoxa* ではペプチドグリカン合成酵素 (Penicillin binding protein: PBP) の存在が生化学的研究から示唆されている。シアネレにおける FtsZ アーク・リング形成と PBP との関係調べるため、PBP の活性を阻害する  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬

アンピシリンを用いて阻害剤実験をした (結果未掲載)。シアネレでは分裂終了後すぐに次の分裂が開始されるため、分裂周期を通してくびれの入ったシアネレが観察される。しかし、アンピシリン処理の結果、くびれない球形のシアネレが見られるようになった。くびれないシアネレで FtsZ を抗体染色すると、FtsZ アークまたはリングが形成されていた。このことから、FtsZ の局在化は PBP とは独立に起こることがわかった。またペプチドグリカン合成阻害条件下では

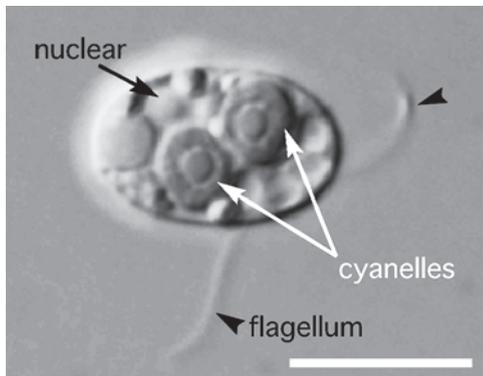


図2 *Cyanophora paradoxa* の微分干渉像。2本の鞭毛(flagellum, 黒矢頭)と、通常2つの葉緑体(cyanelle, 白矢印)をもつ。Bar は 5  $\mu$ m。

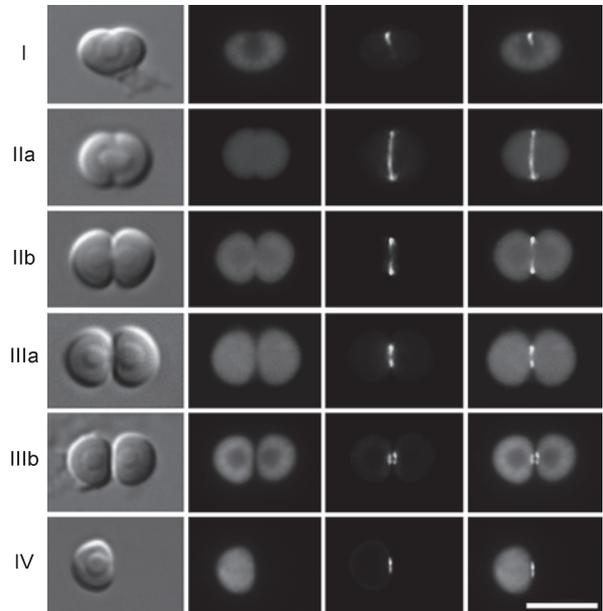


図3 抗 FtsZ 抗体による間接蛍光抗体染色像。シアネレの分裂過程に沿って並べた。左から微分干渉像、クロロフィル a の自家蛍光像、FtsZ の抗体染色像、自家蛍光と抗体染色の合成像。Bar は 5  $\mu$ m。(文献<sup>7)</sup> から改変して引用)

FtsZ の収縮・分離が阻害されていた。このことから、FtsZ の収縮・分離はペプチドグリカン隔壁形成にともなって起こることが示唆された。

これらの結果は、シアネレにおいて FtsZ とペプチドグリカン合成の関係が、原核生物同様に維持されていることを示している。

### 3. シアネレ分裂装置の微細構造

*C. paradoxa* のシアネレでは、化学固定法による透過電顕観察により、葉緑体内包膜のストロマ側にシアネレリング (cyanelle ring, 他系統の葉緑体の Inner PD リングに相当すると思われる) が観察されている<sup>6)</sup>。高分解能走査電顕と、構造保存性の高い凍結固定法を用いた透過電顕法により、さらに詳細な観察を試みた。

#### 3.1 走査型電子顕微鏡を用いたシアネレ外包膜表面の分裂装置の探索

シアネレ包膜を外側から絞り込む分裂装置が存在するかを調べるため、シアネレをフレンチプレス処理により無傷単離し、表面の微細構造を観察した。単離シアネレを 1.5% グルタルアルデヒドで固定の後、1% OsO<sub>4</sub> による後固定、エタノール上昇系列で脱水、酢酸イソアミル置換、臨界点乾燥、Pt-Pd コーティングを経て、フィールドエミッション型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM, Hitachi S-5000) で観察した。

SEM で観察したシアネレ外包膜表面構造を、図 4 に分裂過程に沿って示した。包膜の陥入はシアネレ表層の一箇所にできる溝から始まる。シアネレは、深い溝をもつハート形になってから、くびれが拡大してダンベル状になる。くびれた表層に Outer PD リングが観察されることはなかった。これまでに SEM で観察されている他の葉緑体に比べ、分裂面は

鋭い角度で陥入しており、バクテリアの分裂面と類似していた。分裂面の最初のくびれの位置と長さとはアーク状の FtsZ と一致している。包膜陥入には、FtsZ リングを含むシアネレ内部の分裂装置が関与すると考えられる。

#### 3.2 透過型電子顕微鏡を用いたシアネレ内部の分裂装置の解析

従来の化学固定法に加え、急速凍結と加圧凍結固定法で細胞を固定し、分裂面内部の微細構造を TEM で観察した。TEM 観察には、化学固定法 2 種：① 2.5% グルタルアルデヒドと 1% OsO<sub>4</sub> の二重固定、② 2.5% グルタルアルデヒドと 1% KMnO<sub>4</sub> の二重固定) と、凍結固定法 2 種：① 急速凍結固定 (浸漬法, Leica EM CPC)、② 加圧凍結固定 (Bal-Tec HPM010)、で作製したサンプルを用いた。凍結固定後のサンプルは 2.5% グルタルアルデヒド・アセトン溶液で凍結置換し (Leica EM AFS)、-80°C から室温まで温度を上昇させた。その後、2% OsO<sub>4</sub>・アセトン溶液中で 40°C、4 時間反応させた。Spurr 樹脂を徐々に濃度を上げながら浸透させた後 (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12.5, 25, 50, 75, 100%)、包埋し、60°C で 3~6 日間重合させた。超薄切片は、3% 酢酸ウランで 2 時間、クエン酸鉛で 10 分間電子染色し、透過型電子顕微鏡 (Hitachi H-7600) で観察した。

化学固定法と凍結固定法の両方でシアネレリングが観察できた。化学固定法では、シアネレリングは内包膜陥入部にドット状の電子密度の高い構造として確認できた (結果未掲載)。凍結固定法では、シアネレリングは陥入部に沿うようなバンド構造をしていた (図 5)。シアネレリングは、シアネレ分裂初期には現れず、内包膜の陥入が進んだシアネレで観察できた。また TEM 観察においても、外包膜の上に Outer PD リングに相当する構造は観察できなかった。

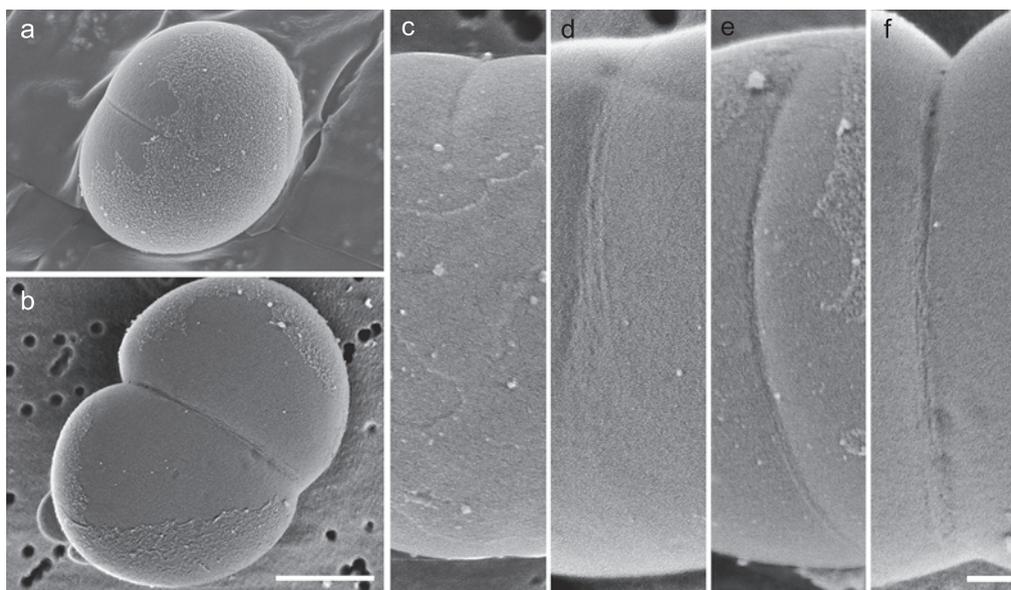


図 4 単離シアネレの走査型電顕像。分裂初期のシアネレ (a) と、ダンベル型のシアネレ (b) の全体像。シアネレの分裂面の拡大像を、分裂過程に沿って c-f の順に並べた。Bar は 1 μm。

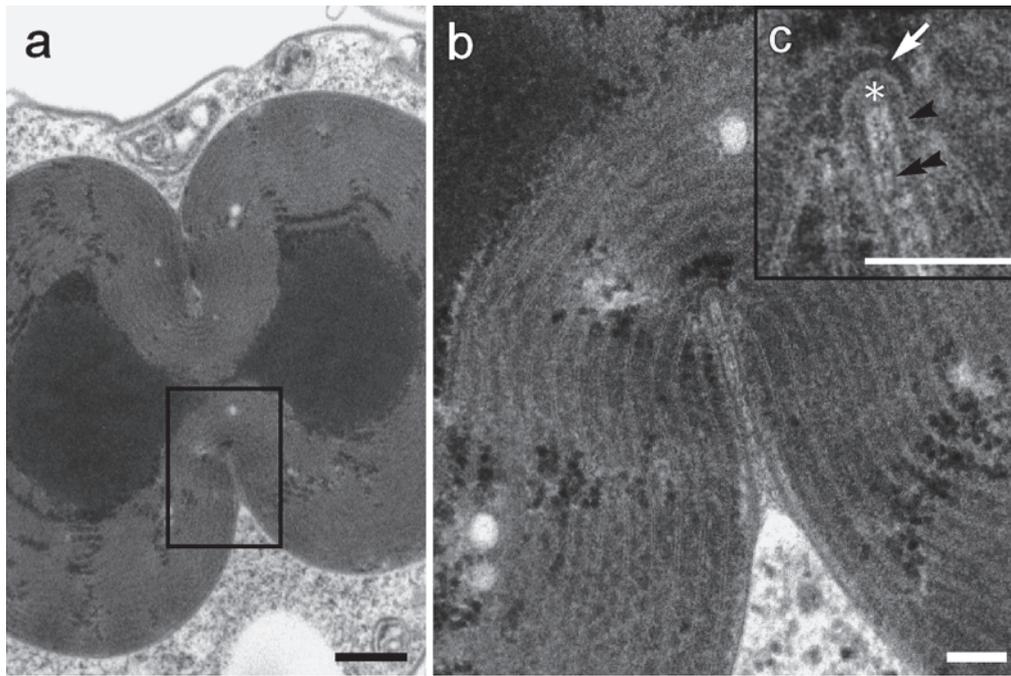


図5 急速凍結固定法によるシアネレの透過電顕像。aの枠で囲った領域を拡大してbに示した。cは分裂面陥入部の高拡大像。アスタリスクはペプチドグリカン層、矢頭はシアネレの内包膜、二重矢頭は外包膜、白矢印はシアネレリング。Barは500 nm(a), 100 nm (b, c)。(文献<sup>8)</sup>から一部改変して引用)

## 5. おわりに

これまでの研究から、ペプチドグリカンを維持した葉緑体である灰色藻シアネレ分裂装置の微細構造を明らかにした。シアネレ分裂は分裂面全周で同時に起こるのではなく、分裂面の片側に形成される深い溝より始まっていた。抗 FtsZ 抗体による間接蛍光抗体染色の結果から、シアネレの FtsZ リングは FtsZ アークを経て形成され、これは SEM で観察されるくびれの位置と一致すると予測される。また TEM 分裂面の微細構造の観察から、陥入した内包膜の下にシアネレリングが観察できた。細胞内構造の保存性が高いとされる凍結固定法を用いた TEM に加え高分解能 SEM で観察したが、シアネレの外包膜の上に Outer PD リングに相当する構造は確認できなかった。以上の結果から、シアネレでは外側からの力ではなく、ペプチドグリカン隔壁形成をともなうシアネレの内側で発生する力が、シアネレ分裂面を収縮させる原動力となっていると考えられる。これは、Outer PD リングやダイナミンが分裂の原動力となっている他の植物の葉緑体とは異なっており、様式の上ではむしろバクテリアの細胞分裂に近い。葉緑体包膜におけるペプチドグリカン層の有無が、葉緑体分裂様式の進化に重要な役割を果たしたと考えられる。

## 謝 辞

FE-SEM のデータ取得に際しては、筑波大学生命環境科学研究科の宮村新一准教授にご助言いただきました。ここに記してお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 石川 周, 小笠原直毅: 蛋白質核酸酵素, 53, 1725-1731 (2008)
- 2) Miyagishima, S.: *J. Plant Res.*, 118, 295-306 (2005)
- 3) Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Misumi, O., Nishida, K., Yagisawa, F., Fujiwara, T., Nanamiya, H., Kawamura, F. and Kuroiwa, T.: *Science*, 313, 1435-1438 (2006)
- 4) Sato, M., Nishikawa, T., Yamazaki, T. and Kawano, S.: *Phycol. Res.*, 53, 93-96 (2005)
- 5) Margolin, W.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 862-871 (2005)
- 6) Iino, M. and Hashimoto, H.: *J. Phycol.*, 39, 561-569 (2003)
- 7) Sato, M., Nishikawa, T., Kajitani, H. and Kawano, S.: *Planta*, 227, 177-187 (2007)
- 8) Sato, M., Mogi, Y., Nishikawa, T., Miyamura, S., Nagumo, T. and Kawano, S.: *Planta*, 229, 781-791 (2009)