液胞の分配機構

八木沢美美

Division of Biological Sciences, University of California, San Diego,
9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093 USA

要旨: 液胞は、細胞内分解をはじめとする多様な機能を持つ。液胞は、小胞体やゴルジ体から新しく合成される (Hoh et al. 1995, Catlett and Weisman 2000)。それにも関わらず、液胞は、細胞分裂時に母細胞から娘細胞へと分配される。液胞の分配は、細胞が分裂直後から正常に機能するために必要であると考えられる。これまでに知られている液胞の分配機構は、V型ミオシンとアクチンに依存するものであった。これに対し、アクチン系を持たない原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* では、液胞がミトコンドリアに結合することで液胞の分配がおこる。本稿では、真核生物で知られる液胞の分配機構を紹介し、今後の展望について述べる。

Mechanism of vacuole inheritance

Fumi Yagisawa

Division of Biological Sciences, University of California, San Diego,
9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093 USA

Summary: Vacuoles have pivotal roles in intracellular digestion, pH and ion homeostasis, and metabolite storage. Although vacuoles can be synthesized de novo (Hoh et al. 1995, Catlett and Weisman 2000), they are inherited from mother cells to daughter cells during cell division. This vacuolar inheritance would enable cells to function properly right after mitosis. Yeast vacuoles are inherited using class V myosin and actin. In unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*, which lacks conventional actin and myosin, vacuoles are inherited by binding to mitochondria. In this review, I summarize our current knowledge in mechanisms for vacuole inheritance and discuss future perspectives.

Key words: vacuole, lysosome, inheritance, yeast, *Cyanidioschyzon*

はじめに

液胞は、一重膜に囲まれたオルガネラである。膜上には、液胞型 H^+ -ATPase などプロトンポンプが存在し、その内部は酸性に保たれている。液胞は、様々な加水分解酵素を含み、細胞内の不要となったタンパク質、糖、核酸などを分解する。また、液胞の他の機能として、細胞内 pH やイオンの調整、膨圧の発生、二次代謝産物の蓄積、アポトーシスなどが知られる (De 2000)。

液胞の機能は、細胞にとって、非常に重要である。種子植物では、液胞機能の欠損は、形態形成の異常や胚性致死となる (Rojo et al. 2001)。出芽酵母においては、これまでに液胞を恒常的に持たない変異体は得られていない。従って、液胞はやはり必須のオルガネラであるといえる。動物では、リソソームが液胞に相当する。リソソームの機能の不全は、ゴーシェ病やガングリオシド症など 40 種以上のリソソーム病の原因となる。したがって液胞を保持することは、細胞の機能に重要であると考えられる。

液胞やリソソームの形態は生物種や細胞、組織によって違う。たとえば種子植物の茎や葉に存在する細胞は、1つの液胞を含み、それらは細胞体積の殆どを占める。また、出芽酵母の細胞は比較的容積が大きい、5~6個の液胞を持つ。そして、植物の分裂組織や動物細胞のように、容積の小さい液胞・リソソームが細胞内に数十から数百個存在することもある。液胞の分配機構も形態や機能の多様性を反映しているのか、一通りではない。以下にこれまで知られる液胞の分配機構について紹介する。

出芽酵母の液胞の分配機構

液胞の分配機構は、主に出芽酵母で研究されてきた。酵母では、細胞分裂(出芽)の開始と共に、液胞の一部が分裂面付近に移動する。娘細胞が成長すると、液胞は小胞や管状の構造へと変化し、娘細胞の中へ運ばれる。娘細胞の中では、融合し、大きな液胞となる (Weisman 2006)。

酵母では、液胞の分配が異常となる変異体が、複数同定されている。その結果、小胞や管状構造への変化は、脂質ホスファチジルイノシトール-3, 5- ニリン酸を必要とすることが分かっている (Weisman 2003)。また、液胞の娘細胞への輸送は、アクチンとV型ミオシンMyo2に依存する (Hill et al. 1996)。Myo2は、モーター領域とオルガネラ結合領域を持つ。オルガネラ結合領域は、レセプタータンパク質 Vac17を介して液胞膜タンパク質 Vac8と結合する (図 1a, b; Ishikawa et al. 2003, Tang et al. 2003)。

Vac17は、液胞分配を制御する中心的な因子である。まず、Vac17自身が細胞周期依存的な発現をする (Tang et al. 2003)。また、細胞周期をコントロールするCdk1が、Vac17をリン酸化し、Myo2との結合を促進する (Peng and Weisman 2008)。さらに、Vac17とMyo2の結合には、ホスファターゼ Ptc1が必要である (Jin et al. 2009)。Ptc1はMyo2とMyo2が輸送を行う他のオルガネラのレセプターとの結合も介するので (Jin et al. 2009)、オルガネラの輸送を制御するマスター制御因子として注目を集めている。

図1 出芽酵母における液胞の分配
(a, b) 液胞はMyo2、レセプタータンパク質 Vac17、液胞膜タンパク質 Vac8の複合体により、アクチン依存的に分配される。

シズンにおける液胞の分配機構

出芽酵母で研究が進められてきた液胞の分配機構であるが、他の生物ではどうだろうか。

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (通称シズン) は、オルガネラの分配機構の研究に適した生物で、細胞内構造がシンプルで観察しやすく (図2; Kuroiwa 1998, Miyagishima et al. 1999, Imoto et al. 2010, Yagisawa et al. in press), 明暗周期で細胞分裂を同調化できる (Suzuki et al. 1994)。シズンでは、モータードメインを持つミオシンは完全解読されたゲノム上にみつかっていない (Matsuzaki et al. 2004, Nozaki et al. 2007)。またアクチンタンパク質や繊維も、検出されない (Kuroiwa 1998, our unpublished observation)。従って、シズンの液胞の分配は、アクチンやミオシンには依存しないと考えられる。それでは、どのような仕組みで液胞は分配されるのだろうか？

図2 シズンの細胞のモデル図
(a) G1期 (b) M期。ほとんどのオルガネラは、細胞あたり一つずつであり、細胞分裂と同調的に増殖する。er, ER; nu, 細胞核; mt, ミトコンドリア; mb, マイクロボディ; cp, 葉緑体。

我々は、新しい液胞の分配機構を明らかにするために、シズンを用いて解析を行った。シズンの液胞は、直径約500nm、細胞あたり平均約4個の構造体であった (Yagisawa et al. 2007)。蛍光顕微鏡観察により、シズンの液胞は間期に増殖し、その増殖は環境要因と細胞周期の2つに応答することが分かった。また、液胞は、G1期には細胞質中細胞核付近に、M期にはミトコンドリア近傍に局在した (図2a-e)。細胞質分裂時には、液胞は、ほぼ均等に娘細胞に分配された。電子顕微鏡観察により、M期の液胞とミトコンドリアの間には繊維状の構造が存在することが分かった (図2f)。繊維状構造は、液胞をミトコンドリアにつなぐ装置であると推定される。以上の観察結果から、液胞はミトコンドリアに結合し、

図3 シズンにおける液胞の分配 (a-d) ミトコンドリアを抗porin抗体(赤), 液胞を抗液胞型H⁺-ATPase抗体(緑)によって免疫染色. (a) G1期, (b) G2期, (c) M期, (d) M期細胞質分裂中の細胞. (e) 分裂期の細胞の電子顕微鏡像(化学固定). 液胞はミトコンドリアに密着して存在. (f) 急速凍結置換法による電子顕微鏡像. 液胞とミトコンドリアの間の繊維構造(矢印小)と引き延ばされたミトコンドリア膜(矢印大)がみられる. nu, 細胞核; vc, 液胞; mt, ミトコンドリア; mb, マイクロボディ; cp, 葉緑体. スケールは2 μm (d), 1 μm (e), 250 nm (f). (一部, Yagisawa et al. Planta 2007より改変).

ミトコンドリアを媒体として娘細胞に分配されるというモデルを提唱した(図4a, b).

それでは, どのような分子機構によって, 液胞がミトコンドリアに結合するのだろうか. 分裂期における液胞のミトコンドリア近傍への移動は, 微小管非依存的であることが, 阻害剤実験により判明した(Yagisawa et al. 2007). また, 藤原らは, シズンの細胞周期におけるトランスクリプトーム解析(Fujiwara et al. 2009)をもとに, 液胞の分配に関わる因子を探索した. この結果, 液胞がミトコンドリア近傍に局在するためには, vacuole inheritance gene 1 (VIG1)が必要であることが判明した(Fujiwara et al. 2010). VIG1は, Snf7ドメインと4つのcoiled-coil領域を持つ分子

量約30-kDaのタンパク質である. Snf7ドメインを持つタンパク質には, 出芽酵母のVps60/Mos10やほ乳類の動物細胞のCHMP5があり, これらは後期エンドソームにおけるタンパク質輸送に関わっている(Kranz et al. 2001, Shim et al. 2006). VIG1の発現をアンチセンスRNAによって阻害すると, M期の液胞はミトコンドリア

図4 シズンにおける液胞の分配機構のモデル. (a) シズンの液胞はミトコンドリアと結合してミトコンドリアとともに分配される. 分配された後は, ミトコンドリアから解離する. (b) VIG1は液胞がミトコンドリアに結合する時期に発現し, 液胞の周囲に局在し始める. 液胞とミトコンドリアの接着には繊維構造やVIG1が関与している. 液胞が分配された後, VIG1が分解される. vc, 液胞; nu, 細胞核; mt, ミトコンドリア; cp, 葉緑体; fs, 繊維構造.

近傍ではなく, 細胞質中に散在する. VIG1は, 液胞がミトコンドリア近傍に移動, 局在する時期に高発現し, この時のVIG1は, 液胞の周囲に局在する. 細胞分裂後, ミトコンドリアから解離した液胞にはVIG1が検出されないことから, VIG1の合成と分解が液胞の分配を制御している可能性がある(図4b).

シゾンの液胞の分配に関わる因子をさらに探索する土台として、液胞のプロテオーム解析が進められた (Yagisawa et al. 2009). 種子植物以外の植物の液胞は、タンパク質レベルではほとんど理解されていなかったが、G1期のシゾンから単離した液胞を用いて、MALDI-TOF-MSやナノ液体クロマトグラフィーを用いた方法によって100種以上のタンパク質が同定された。その中には、細胞周期依存的な発現を示すタンパク質もあり、今後の解析が待たれる。

他の生物での液胞の分配機構

タバコBY-2培養細胞においては、種子植物の発達した組織と同様に、細胞あたり1つの巨大液胞がみられる。BY-2の液胞は、アクチンに依存して細胞分裂時にその中央部分が複数の管状の構造へと姿を変え、この構造の分断によって液胞が2つに分かれて娘細胞に受けつがれる (Kutsuna et al. 2003)。しかしながら、これらの過程に関わるその他の因子はまだ分かっていない。また植物の分裂組織では、サイズの小さい複数の液胞が存在する。シロイヌナズナの茎頂分裂組織を用いた電子顕微鏡解析では、液胞が変形と分断、融合をしつつ分配される様子が観察されている (Segui-Simarro and Staehelin 2006)。

動物細胞においては、Bergelandら (2001) が、Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いて、リソソームとその生合成に関わる後期エンドソームの挙動を解析した。その結果、これらのオルガネラは細胞あたり約800個存在し、細胞分裂前期には細胞質中に散らばって存在するが、細胞質分裂中に微小官重合中心付近に集まることが分かった。ところが、MDCK細胞において娘細胞に受け継がれるそれらの数は、確立的に受け継がれる場合の予測値と大差がなかった。このため、これらの分配のために仕組みはあるかもしれないが、厳密ではないと考えられている。

今後の展望

真核生物の液胞の分配機構は、酵母、シゾン、種子植物、動物において異なっているように見える。もとの形状を保ったまま分配されることもあれば、液胞膜の変形や融合を伴うこともある。アクトミオシン系に依存した機構があれば、そうでない機構もある。一方で、ある生物の液胞の分配機構の一部が、他の生物にも存

在することもあるだろう。

シゾンの場合は、アクトミオシン系をもたないため、ミトコンドリアとの結合が顕在化しているのかもしれない。たとえば、動物細胞のリソソームはミトコンドリアと近接してみられる場合がある。しかしながら、この現象がどういう意義を持つのか、どういう機構によって起こるのか、まったく明らかではない。したがって、シゾンにおける液胞とミトコンドリアとの接着機構が、動物におけるシステムの解明につながるかもしれないと期待される。

謝辞

本稿では、植物形態学会奨励賞の受賞研究とそれに関する知見をまとめました。受賞対象研究は、日本学術振興会研究員として東京大学と立教大学にて行ったものです。研究の過程では黒岩常祥教授をはじめ研究室の皆様、長田敏行教授、島津製作所の嶋田崇史氏に多大なるご指導を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

引用文献

- Bergeland, T., Widerberg, J., Bakke, O., and Nordeng, T. W. (2001) Mitotic partitioning of endosomes and lysosomes. *Curr Biol* 11: 644-651.
- Catlett, N. L., and Weisman, L. S. (2000) Divide and multiply: organelle partitioning in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 12: 509-516.
- De, D. N. (2000) Plant Cell Vacuoles. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Fujiwara, T., Kuroiwa, H., Yagisawa, F., Ohnuma, M., Yoshida, Y., Yoshida, M., Nishida, K., Misumi, O., Watanabe, S., Tanaka, K., and Kuroiwa, T. (2010) The coiled-coil protein VIG1 is essential for tethering vacuoles to mitochondria during vacuole inheritance of *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Cell* 22: 772-781.
- Fujiwara, T., Misumi, O., Tashiro, K., Yoshida, Y., Nishida, K., Yagisawa, F., Imamura, S., Yoshida, M., Mori, T., Tanaka, K., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T. (2009) Periodic gene expression patterns during the highly synchronized cell nucleus and organelle division cycles in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res* 16: 59-72.
- Hill, K. L., Catlett, N. L., and Weisman, L. S. (1996) Actin and myosin function in directed vacuole movement during cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 135: 1535-1549.
- Hoh, B., Hinz, G., Jeong, B. K., and Robinson, D. G. (1995) Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. *J Cell Sci* 108 (Pt 1): 299-310.
- Imoto, Y., Fujiwara, T., Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Maruyama, S., and Kuroiwa, T. (2010) Division of cell nuclei,

- mitochondria, plastids, and microbodies mediated by mitotic spindle poles in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Protoplasma* 241: 63-74.
- Ishikawa, K., Catlett, N. L., Novak, J. L., Tang, F., Nau, J. J., and Weisman, L. S. (2003) Identification of an organelle-specific myosin V receptor. *J Cell Biol* 160: 887-897.
- Jin, Y., Taylor Eves, P., Tang, F., and Weisman, L. S. (2009) PTC1 is required for vacuole inheritance and promotes the association of the myosin-V vacuole-specific receptor complex. *Mol Biol Cell* 20: 1312-1323.
- Kranz, A., Kinner, A., and Kolling, R. (2001) A family of small coiled-coil-forming proteins functioning at the late endosome in yeast. *Mol Biol Cell* 12: 711-723.
- Kuroiwa, T. (1998) The primitive red algae: *Cyanidium caldarium* and *Cyanidioschyzon merolae* as model system for investigating the dividing apparatus of mitochondria and plastids. *Bioessays* 20: 344-354.
- Kutsuna, N., Kumagai, F., Sato, M.H., and Hasezawa, S. (2003) Three-dimensional reconstruction of tubular structure of vacuolar membrane throughout mitosis in living tobacco cells. *Plant Cell Physiol* 44: 1045-1054.
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin, I.T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, S.Y., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., 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., Morishita, 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., and Kuroiwa, T. (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428: 653-657.
- Miyagishima, S., Itoh, R., Toda, K., Kuroiwa, H., Nishimura, M., and Kuroiwa, T. (1999) Microbody proliferation and segregation cycle in the single microbody in alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta* 208:326-336.
- 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, S.J., Nakamura, S., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Sato, N., and Kuroiwa, T. (2007) A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *BMC Biol* 5: 28.
- Peng, Y. and Weisman, L. (2008) The cyclin-dependent kinase Cdk1 directly regulates vacuole inheritance. *Dev Cell* 15: 478-485.
- Rojo, E., Gillmor, C. S., Kovaleva, V., Somerville, C. R. and Raikhel, N. V. (2001) VACUOLELESS1 is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 1: 303-310.
- Segui-Simarro, J. M. and Staehelin, L. A. (2006) Cell cycle-dependent changes in Golgi stacks, vacuoles, clathrin-coated vesicles and multivesicular bodies in meristematic cells of *Arabidopsis thaliana*: a quantitative and spatial analysis. *Planta* 223: 223-236.
- Shim, J. H., Xiao, C., Hayden, M. S., Lee, K. Y., Trombetta, E. S., Pypaert, M., Nara, A., Yoshimori, T., Wilm, B., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hogan, B. L., Mellman, I., and Ghosh, S. (2006) CHMP5 is essential for late endosome function and down-regulation of receptor signaling during mouse embryogenesis. *J Cell Biol* 172: 1045-1056.
- Suzuki, K., Ehara, T., Osafune, T., Kuroiwa, H., Kawano, S., and Kuroiwa, T. (1994) Behavior of mitochondria, chloroplasts and their nuclei during the mitotic cycle in the ultramicroalga *Cyanidioschyzon merolae*. *Eur J Cell Bio* 63: 280-288.
- Tang, F., Kauffman, E. J., Novak, J. L., Nau, J. J., Catlett, N. L. and Weisman, L. S. (2003) Regulated degradation of a class V myosin receptor directs movement of the yeast vacuole. *Nature* 422: 87-92.
- Weisman, L. S. (2003) Yeast vacuole inheritance and dynamics. *Annu Rev Genet* 37: 435-460.
- Weisman, L. S. (2006) Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 243-252.
- Yagisawa, F., Fujiwara, T., Kuroiwa, H., Nishida, K., Imoto, Y., and Kuroiwa, T. Mitotic inheritance of endoplasmic reticulum in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Protoplasma* in press.
- Yagisawa, F., Nishida, K., Kuroiwa, H., Nagata, T., and Kuroiwa, T. (2007) Identification and mitotic partitioning strategies of vacuoles in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta* 226: 1017-1029.
- Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, M., Ohnuma, M., Shimada, T., Fujiwara, T., Yoshida, Y., Misumi, O., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T. (2009) Identification of novel proteins in isolated polyphosphate vacuoles in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant J* 60: 882-893.

Received: 30 January 2012