ミニレビュー

同調培養 Chlamydomonas におけるミトコンドリアの動態

江 原 友 子

東京医科大学・微生物学教室

(〒160-8402 新宿区新宿6-1-1)

Behavior of mitochondria in synchronized cells of Chlamydomonas reinhardtii
Tomoko Ehara

Department of Microbiology, Tokyo Medical College,
6-1-1 Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8402, Japan

《要 旨》

ミトコンドリアは細胞周期において、どのように形態変化をしながら娘細胞に分配されるのだろうか。われわれは単細胞緑藻 Chlamydomonas reinhardtii の細胞周期でミトコンドリアの形態がダイナミックに絶え間無く変化する姿を生体観察によって捕らえた。そして、細胞の成長期には呼吸活性の低下を伴って、巨大ミトコンドリア(塊状形態)が2度出現する現象を見出し、それらの動態を細胞周期中に位置づけた。また、電子顕微鏡による2次元的な超微形態観察からそれらの現象を裏付けると共に、連続超薄切片を作成してコンピュータ・グラフィックス(CG)で細胞の再構築をおこない、3次元解析をすることでミトコンドリアの全体像を明らかにした。

Chlamydomonas の細胞周期中で起こるミトコンドリアの様々な動態を通して、独自の遺伝情報と発現系をもちながら半自律的に自己増殖するミトコンドリアが、どのようにして次世代へ連続性をもって受け継がれいくのか、その基本的な問題について考察する。

Abstract

Cells of Chlamydomonas reinhardtii Dangeard were synchronized under a 12 hour light: 12 hour dark regimen. Behavior of mitochondria in these synchronized cells was examined by fluorescence microscopy using a mitochondrial membrane-binding fluorescent dye, DASMP, as a specific vital stain as well as by electron microscopy. Three-dimensional models of mitochondria in synchronized cells of C. reinhardtii were constructed from their electron microscopic profiles in serial cell sections using the computer graphics techniques. Based on these observations, the mitochondrial morphologies of C. reinhardtii in the cell cycle were classified into five types. These results were discussed in relation with those reported by previous workers.

Key words: Chlamydomonas reinhardtii, synchronized culture, giant mitochondrion, behavior of mitochondria

《はじめに》

ミトコンドリアは細胞周期中(生活環)で常に一定の形態を維持するのではなく、形態をダイナミックに変化させることが分かってきた。ミトコンドリアに固有のDNAが存在することが明らかになったのは、葉緑体DNAの発見とほぼ同時期で約35年前である(Nassら 1962)。ミトコンドリア内にDNase感受性の繊維状や棒状の構造が電子顕微鏡観察で示され、その後、この構造が細胞核のDNAと同様に数種の核タンパク質を伴い高度に組織されたミトコンドリア核であり、ミトコンドリア分裂に伴ってミトコンドリア核も分裂して分配されることが報告された(Kuroiwa 1982)。最近の分子生物学的研究から植物細胞の核、葉緑体、ミトコンドリアのDNAゲノムに相同的な塩基配列が報告されている。このことは進化の過程で異なるオルガネラ間でDNAゲノムの移行が起こった可能性を示唆している。ミトコンドリアの起源とされる好気性細菌は共生進化する間にそのDNAゲノムを細胞核へ移行していったと推測され、現在のミトコンドリアには形態形成や機能に関わる一部の遺伝子だけが残されたことで、細胞核に依存性の高い半自律性の自己増殖系に変化したと考えられている。近年、分子・遺伝学的研究が進展するに伴って、今まであまり関心を持たれていなかったオルガネラ(葉緑体、ミトコンドリア)の形態変化が見直されて注目されるようになり、細胞周期中でのオルガネラの動態について関心が高まってきている。

先に、われわれは1個の葉緑体を内在する C. reinhardtii を材料として細胞周期中における葉緑体核様体の形態観察をおこない、細胞周期中で核様体が頻繁に融合、分散を繰り返して娘細胞に分配されること、並びにこの間に細胞核と葉緑体との間で連携が見られることをDAPI-蛍光顕微鏡観察および免疫電顕観察で報告した(Eharaら 1990a, 1996)。一方、複数の葉緑体を内在する単細胞ベン毛藻の Euglena gracilis を材料として、細胞周期中また葉緑体形成過程で起こる葉緑体のダイナミックな形態変化についても観察をおこない、その過程で複数の葉緑体が一時的に1個に融合して巨大化することを蛍光顕微鏡および電子顕微鏡観察から明らかにした(Eharaら 1990b, Tsukadaら 1986)。また、その過程で葉緑体核様体は葉緑体の形態変化に伴って融合、分散を繰り返し、巨大葉緑体の形成時には葉緑体核様体が相互に融合して紐状形態をとり、この時期には細胞核との間で連携が持たれる可能性を示唆した(Eharaら 1985, Osafune 1993)。そして、どちらの藻類の場合においても、報告されている葉緑体DNA合成の時期が葉緑体核様体の融合時期とほぼ一致することが分かった(Cook 1966, Brandt 1975, Chiang and Sueoka 1967)。

ミトコンドリアが細胞周期中でどのような形態変化を示すかについては藻類、真菌、酵母などで1970年代ごろから個数、形状、分布などが調べられ、超薄連続切片法-電顕観察を主に多くの研究報告がされている。しかし、ミトコンドリアの形態や個数は環境条件によって著しく変化すること、また、従来から行なわれてきた電顕観察法では多くの細胞を観察することが困難である

ために情報に限りがあり、形態を特定することには限界があった。最近、ミトコンドリア観察に蛍光染色剤が使用されるようになり、今までより多くの情報を基に細胞周期中のミトコンドリアのダイナミズムを追跡し、明らかにすることが可能になった。われわれは無性生殖的に生活環を営む *C. reinhardtii* を実験材料として同調培養し、その細胞内のミトコンドリアの形態変化を蛍光染色法-生体観察で経時的に詳細に追跡すると共に、超薄連続切片作成による3次元画像解析による電顕観察をおこない両面から詳細に見直すことを試みた。

《単細胞藻類における同調培養法》

同調培養法は細胞集団の多くの細胞が極めて良い同調性を示し、生活環の各段階をほぼ同時に経過しながら成長、分裂を繰り返して増殖するという優れた特徴をもつ実験方法として単細胞藻類の *Chlorella* を用いて創案された(Tamiya 1966)。従来の研究では実験対象である細胞のステージが一定でなく、混在する実験条件で行なわれることが多かった。そのため細胞内のオルガネラの実態を明確に捕らえることは困難であったが、同調培養法を藻類研究に応用することで細胞周期(生活環)の推移に伴う形態変化や生理、生化学的变化を充分量の試料で経時的に追跡することが可能になった。われわれが実験材料として用いた *C. reinhardtii* における同調培養法は24時間を1サイクルとして明暗条件(明期12時間:暗期12時間)を反復する方法でおこなわれる(Mihara and Hase 1971)。同調培養した *C. reinhardtii* の細胞集団は明期で成長し、暗期に入ると間もなく核、葉緑体、ミトコンドリア分裂が続いて起り、それらのオルガネラは細胞分裂に伴って2個の娘細胞へ分配される。その後、暗期の半ばに掛けて起こる2度目の分裂で、さらに4つの娘細胞に受け渡される。暗期の終わりには、各娘細胞が一斉に細胞外へ放出されて細胞周期は完了する(図 1)。同調培養法の応用は細胞周期中でダイナミックな形態変化を示すミトコンドリアの挙動を詳細に研究する上で不可欠といえよう。

《生体観察で捕らえたミトコンドリアのダイナミズム》

従来、ミトコンドリアの染色剤としてヤヌスグリーンBが汎用されてきたが、近年ではローダミン123、DiOC₆(3,3'-dihexyloxa-carbocyanine)、DASPMI(dimethylaminostyryl-methyl-pyridinium-iodide)などの蛍光染色剤が使用されるようになり、ミトコンドリアの形態観察が容易になった。われわれの研究室ではミトコンドリアの観察にDASPMI蛍光染色剤を使用している。DASPMI蛍光染色剤は生体染色することが可能で、蛍光波長が黄色であることから植物細胞の観察時に障害となる葉緑体の自家蛍光-赤色との区別がしやすいという利点をもっている(Bereiter-Hahn 1976)。われわれは同調培養した *C. reinhardtii* の細胞集団をDASPMIで生体染色することでミトコンドリアを経時的(30分あるいは1時間毎)に蛍光顕微鏡下で観察し、得られた情報からミトコンドリア形態を5つのタイプに別け、それらの出現頻度を統計処理によって表した。このような方法によって客観的な視点からミトコンドリアを捕らえ、細胞周期中で規則的な形態変化を

示すこと、並びに成長期に2度(初期および後半)塊状のミトコンドリアが出現することを明らかにした(Eharaら 1995)。その概要を述べると、明期0時間細胞(成長期-光照射直後)に観察される紐状ミトコンドリアは約1時間のうちに塊状の形態へと変化をして一時的に巨大化し、その現象のピークは明期1.5時間に見られる(図 2-A, -B)。その後、明期4時間細胞では再び紐状形態へと変化して塊状のミトコンドリアは全く観察されない。このことは個々の細胞内でこの現象が極めて短時間に起こることを示唆している。成長期中期の細胞では約80%のミトコンドリアが顆粒状形態をとる。成長期の前半に見られる形態変化(紐状→塊状→紐状)は後半において再度繰り返され(図 2-C)、細胞分裂期(暗期)に入るとミトコンドリアは紐状から更に細い網目状形態へ変化する(図 2-D)。その網目状のミトコンドリアは2回の細胞分裂に伴って4つの娘細胞に分配され、分裂が終了すると娘細胞内で顆粒状形態となる(図 2-E, -F)。そして、それらのミトコンドリアは細胞周期の終わり24時間までに各娘細胞内で次第に融合して紐状形態に再び戻る(図 2-G)。図1にはこのように刻々と変化するダイナミックな動態を細胞周期中に位置づけている。

Chlamydomonasの塊状の巨大ミトコンドリア形成時期と、Ryanら(1978)が報告しているミトコンドリアDNAの合成時期がほぼ一致していることは興味深い。

《電子顕微鏡観察による巨大ミトコンドリア像》

一般的に2次元切片上で電顕観察されるミトコンドリア像は比較的小さな球形または楕円形などの形態で細胞内に多数である。しかし、連続超薄切片を作成し、CGなどを用いた再構築による3次元解析では、それらの2次元観察情報が必ずしもミトコンドリアの実態を反映していないことが分かる。巨大ミトコンドリアについての報告は3次元再構築の研究が報告されるようになった1970年代ごろからであるが、その定義については様々であった。例えば、Osafuneら(1973, 1975)やCalvayracら(1972)はEuglenaのミトコンドリアが細胞周期中で形態や個数をダイナミックに変化させると共に、その過程でミトコンドリアの相互融合による塊状または紐状の巨大なミトコンドリアが一時的に出現すると報告している。一方、Pellegriniら(1980)はEuglenaの場合、細胞周期を通じてミトコンドリアは唯一個で巨大な網目状形態であるとしている。われわれがC. reinhardtiiの細胞周期中で捕らえた巨大ミトコンドリアの微細構造はマトリクスの面積が通常より数倍に拡大し、ミトコンドリア全体あるいは一部が塊状形態を示している。そして、その塊状部のマトリクスは電子密度が低い(図 4)。このような微細構造の特徴はEuglenaの巨大ミトコンドリア形態と類似性が高い。この巨大化現象は化学固定よりも生体に近い固定法とされる急速凍結置換法においても再確認することができた。塊状ミトコンドリアのもう一つの特徴は細胞核と極めて近接して位置し、細胞核との隣接部位では連携を推測させる像が多く観察されることである(図4 矢印)。一方、ChlamydomonasについてはArnoldら(1972)、Blankら(1980)が細胞周期中に紐状の巨大なミトコンドリアが出現することを連続超薄切片法-電顕観察で立体モデルを構築して報告しているが、塊状形態のミトコンドリアの存在については述べていない。これは

彼らの実験では細胞採取が4時間毎の間隔でおこなわれていることから、巨大ミトコンドリアの出現を見逃していると考えられる。細胞周期中でミトコンドリアが形態を変化させる過程で見られる分散あるいは分裂方法は、マトリクスへの内膜貫入と細胞質からの外膜の供給によって進行する(図 5)。これは従来から高等植物などで報告されている場合と同様である。

《CGによるミトコンドリアの3次元解析》

細胞のCG観察はオルガネラの形態を3次元的に捕らえ、全体像を詳細に解析する上で欠かすことができない。われわれは *Chlamydomonas* の細胞周期におけるミトコンドリアのダイナミックな形態変化を3次元解析することを目的として、各ステージの細胞の連続超薄切片を作成し、各切片の電顕観察情報をコンピュータに入力してCGで表した。明期0.5時間細胞(放出直後の娘細胞)のミトコンドリア2次元観察像は球や楕円の比較的小さい形態で示される(図 3)。しかし、CG解析では、想像される球体や楕円体構造とは異なり、一部で分岐した紐状形態のミトコンドリアが細胞内に2個あることが分かった(図 7-A)。また、塊状のミトコンドリアが生体観察などで確認された明期1.5時間細胞のCG解析では、ミトコンドリアが巨大な1個の球体あるいは突起のある塊状形態で、核に隣接した位置に観察された。塊状のミトコンドリアとその前後の紐状形態のミトコンドリアについて体積、表面積値を比較すると、塊状のミトコンドリア形成時期には表面積値が約50%減少している。しかし、その体積値については変動がほとんどない。このことはミトコンドリアの巨大化現象が複数のミトコンドリアの融合によって起こると考えられる。また、その時に見られる表面積値の急激な減少は、塊状のミトコンドリア形成時期に見られる呼吸機能の一時的な低下とも一致している。成長した分裂直前の細胞になると蛍光顕微鏡の浅い焦点深度ではミトコンドリアの形態判別が困難になる(図 2-D)。また、同時期の細胞の電顕切片上で観察される多数のミトコンドリアがそれぞれ独立しているのか、あるいは相互に連結しているのかについては2次元観察では明らかでない(図 6)。図 6の細胞をCGで3次元的に解析をおこなうとミトコンドリアは細く複雑に分岐した網目状形態で、その先端の一部が細胞表層近くに葉緑体を貫通して伸び出していることが分る(図 7-E)。また、この網目状ミトコンドリアの体積値は娘細胞(図 7-A)の約4.5倍、表面積値は約7倍に増加していた。これは網目状ミトコンドリアが大きく複雑な形態をしていることを裏付ける。細胞の3次元再構築によるCG解析によってミトコンドリアの全体像を把握することは、生体観察をより確かなものとするだけでなく、超微形態の視点からオルガネラのダイナミズムを解析する上でこれから益々有用な方法となるであろう。

《おわりに》

本稿は、主に同調培養した*Chlamydomonas*の細胞周期中でミトコンドリアが示すダイナミックな動態について簡単に紹介した。固有のDNA遺伝子をもつオルガネラは細胞周期中で異なるオルガネラ相互の連携をとり、それぞれが独自の規則性をもって細胞周期中で融合、分裂を繰り返すことが分かってきた。オルガネラが細胞周期中で一時的に塊状形態で巨大化する意味については

明らかではないが、独立して存在する複数の小型のミトコンドリアが相互間で融合することによって、DNA遺伝子相互の組換、複製や情報交換などがおこなわれる可能性が考えられる。オルガネラの一時的な巨大化は細胞周期中でそのような“場”の提供を意味しているのかも知れない。今後、このようなオルガネラのダイナミックな動態の意義についてはオルガネラの遺伝子解析や組換実験などのような分子細胞形態学的手法によって解明されていくものと思われる。

この総説は平瀬賞受賞対象論文 Ehara T, ら(1995)から主として引用した。

《References》

- Arnold C.G., Schimmer O., Schötz F. und Bathelt H. (1972) Variety of mitochondrial shapes, sizes and volumes in Chlamydomonas reinhardtii. Arch. Mikrobiol., 81:50-67.
- Bereiter-Hahn J. (1976) Dimethylaminostyrylmethylpyridiniumiodine(DASPMI) as a fluorescent probe for mitochondria in situ. Biochim. Biophys. Acta, 423:1-14.
- Blank R. and Arnold C.G. (1980b) Variety of mitochondrial shapes, sizes and volumes in Chlamydomonas reinhardtii. Protoplasma, 104:197-191.
- Brandt P. (1975) Zwei Maxima plastidärer DNA-Synthese mit unterschiedlicher Lichtabhängigkeit im Zellzyklus von Euglena gracilis. Planta, 124:105-107.
- Calvayrac R., Butow R.A. and Lefort-Tran M. (1972) Cyclic replication of DNA and changes in mitochondrial morphology during the cell cycle of Euglena gracilis (Z). Exptl. Cell Res., 71:422-432.
- Chiang K.S. and Sueoka N. (1967) Replication of chloroplast DNA in Chlamydomonas reinhardtii during vegetative cell cycle: its mode and regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 57: 1505-1513.
- Cook J.R. (1966a) The synthesis of cytoplasmic DNA in synchronized Euglena. J. Cell Biol., 29:369-373.
- Ehara T., Osafune T. and Hase E. (1985) Interactions between the nucleus and cytoplasmic organelles during the cell cycle of Euglena gracilis in synchronized cultures III. Associations between the nucleus and chloroplasts at an early stage in the cell cycle under photoorganotrophic conditions (Part II) Plant Cell Physiol., 26:1155-1165.
- Ehara T., Ogasawara Y., Osafune T. and Hase E. (1990a) Behavior of chloroplast nucleoids during the cell cycle of Chlamydomonas reinhardtii (chlorophyta) in synchronized culture. J. Phycol., 26:317-323.
- Ehara T., Osafune T. and Hase E. (1990b) Interactions between the nucleus and cytoplasmic organelles during the cell cycle of Euglena gracilis in synchronized cultures IV. An aggregate form of chloroplasts in association with the nucleus appearing prior to chloroplast division. Exptl. Cell Res., 190:104-112.
- Ehara T., Osafune T. and Hase E. (1995) Behavior of mitochondria in synchronized cells of Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyta). J. Cell Sci. 108:499-507.
- Ehara, T., Osafune T. and Hase E. (1996) Association of nuclear and chloroplast DNA molecules in synchronized cells of Chlamydomonas reinhardtii. J. Electron Microsc., 45:159-162
- Kuroiwa, T. (1982) Mitochondrial nuclei, Int. Rev. Cytol., 75:1-59.
- Mihara S. and Hase E. (1971) Studies on the vegetative life cycle of Chlamydomonas reinhardtii Dangeard in synchronous culture I. Plant Cell Physiol., 12:225-236.

- Nass M.M.K. and Nass S.(1962) Fibrous structures within the matrix of developing chick embryo mitochondria. *Expl. Cell Res.*, 26:424-437.
- Osafune T.(1973) Three-dimensional structures of giant mitochondria, dictyosomes and "concentric lamellar bodies" formed during the cell cycle of *Euglena gracilis* (Z) in synchronized culture. *J. Electron Microsc.*, 22:51-61.
- Osafune T., Mihara S., Hase E. and Ohkuro I.(1975) Formation and division of giant mitochondria during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture I. Some characteristics of changes in the morphology of mitochondria and oxygen-uptake activity of cells. *Plant Cell Physiol.*, 16: 313-326.
- Osafune T., Ehara T., Hase E. and Schiff J.A.(1993) Stage-dependent association of nuclear and chloroplast DNA molecules through bridges transiently formed between the two organelles in synchronized cells of *Euglena gracilis*. *J. Electron Microsc.*, 42:197-201.
- Pellegrini M.(1980) Three-dimensional reconstruction of organelles in *Euglena gracilis* Z. I. Qualitative and quantitative changes of chloroplasts and mitochondrial reticulum in synchronous photoautotrophic culture. *J. Cell Sci.*, 43: 137-166.
- Ryan R.D., Grant K., Chiang S. and Swift H.(1978) Isolation and characterization of mitochondrial DNA from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:3268-3272
- Tamiya H.(1966) Synchronous cultures of algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 17: 1-26.
- Tsukada S., Ehara T., Sumida S., Osafune T. and Hase E.(1986) Behaviour of proplastids and their nucleoids in dark-organotrophically grown cells of *Euglena gracilis* transferred to an inorganic medium. *Br. Phycol. J.*, 21: 155-163.

図 1. 同調培養 *Chlamydomonas reinhardtii* の細胞周期におけるミトコンドリアの動態を模式化した。
 白矢印は12時間の明期(成長期)を、黒矢印は12時間の暗期(分裂期)を表し、24時間を1サイクルとしている。この間に観察されたダイナミックなミトコンドリア(M)の形態変化を細胞周期中に位置づけた。
 N: 細胞核、M: ミトコンドリア(黒色)、CP: 葉緑体(白色)を示す。

図 2-A～G. 同調培養 *Chlamydomonas reinhardtii* のミトコンドリア蛍光顕微鏡写真(DASMPI染色)。

写真上で明るく見える部位が蛍光染色されたミトコンドリア像。N: 細胞核。-A, -B: 塊状のミトコンドリア(明期-1.5時間細胞)。-C: 塊状ミトコンドリア(明期-10時間細胞)。ミトコンドリアは核を取り囲むように位置している。-D: 網目状ミトコンドリア(13時間細胞-暗期1時間)。蛍光顕微鏡の焦点深度が浅いため一断面のみが示されている。-E: 娘細胞(2分裂)に分配される網目状のミトコンドリア。-F: 娘細胞の顆粒状ミトコンドリア(4分裂直後)。-G: 4娘細胞の紐状ミトコンドリア(娘細胞放出直前)。

図 3.～図 6. 同調培養 *Chlamydomonas reinhardtii* の電子顕微鏡切片写真。M: ミトコンドリア、N: 細胞核、CP: 葉緑体。

図 3. 図 7-A に示す細胞の連続超薄切片の1枚(明期-0.5時間細胞)。

図 4. ミトコンドリアのマトリクスは拡大し、クリステはマトリクスの周辺のみを観察される。細胞核と塊状の巨大ミトコンドリアとの連携を示唆する像が観察される(矢印, 明期-1.5時間細胞)。

図 5. 塊状の巨大ミトコンドリアから紐状形態へ移行する過程で、マトリクスに内膜の隔壁が形成される(矢印, 明期-2時間細胞)。

図 6. 図 7-E, -F に示す細胞の連続超薄切片の1枚。ミトコンドリアは細胞質全体に散在している。断面は直径0.3 μm前後で小さい(13時間細胞-暗期1時間)。

図 7-A～F. コンピュータ・グラフィックス再構築による同調培養 *Chlamydomonas reinhardtii* のミトコンドリア3次元解析写真。M: ミトコンドリア、N: 細胞核、CP: 葉緑体。-A: 紐状ミトコンドリアが観察される(明期-0.5時間細胞)。-B, -C: 塊状の巨大ミトコンドリア(明期-1.5時間細胞)。-D: 紐状ミトコンドリア(明期-4時間細胞)。ミトコンドリアの顆粒状への移行が観られる。-E: 網目状ミトコンドリア(13時間細胞-暗期1時間)。-F: 図-EのCG上で葉緑体の表面構造を表示し、ミトコンドリアとの位置関係を示している。網目状ミトコンドリアの先端部が葉緑体の表層に貫通しているのが分かる。