

同調培養クラミドモナスのピレノイド構造と RuBisCO との相関性¹

津山 薫*・小早川ゆり**・浜田元輔**・清原伸彦**・清田マキ***
江原友子****・長船哲齊*・大和 眞*

(平成 9 年 10 月 13 日受付, 平成 9 年 11 月 7 日受理)

Correlation between the Pyrenoid Morphology and RuBisCO in Chloroplast of Synchronized Cells of *Chlamydomonas reinhardtii*

Kaoru TSUYAMA, Yuri KOBAYAKAWA, Motosuke HAMADA,
Nobuhiko KIYOHARA, Maki KIYOTA, Tomoko EHARA,
Tetsuaki OSAFUNE and Makoto YAMATO

In 1970, Goodenough reported that the pyrenoid and the chloroplast reproduce by fission during mitosis in *Chlamydomonas*. When cells of *Chlamydomonas reinhardtii* are synchronized under the alternations of 12 hr light period and 12 hr dark period, they grow photosynthetically during the light period and divide during the dark period, and the daughter cells (zoospores) produced are liberated with the rupture of mother cell walls into the culture medium toward the dark period.

In this study, behaviors of pyrenoid formation and distribution of RuBisCO during the cell cycle of *Chlamydomonas* were followed with an immunoelectron microscope and western blot. During mitosis, the pyrenoid disappeared and RuBisCO dispersed throughout the stroma in chloroplast.

It is concluded that the pyrenoid of *Chlamydomonas* temporarily breaks down prior to a chloroplast division, and then *de novo* pyrenoid formation occurs in a daughter chloroplast.

Key words: *Chlamydomonas*, pyrenoid, RuBisCO, immunoelectron microscopy

キーワード: クラミドモナス, ピレノイド, リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ, 免疫電子顕微鏡法

序 論

ピレノイドは大部分の真核藻類や植物(ツノゴケ類)の葉緑体に存在し, 光合成炭酸固定酵素リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)の単なる貯蔵器官⁶⁾ではないかと考えられてきたが, 現在その機能についてはまだ良くわかっていない。ピレノイドの形態は藻の種類によって異なるが, 単細胞緑藻クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)のピレノイドは葉緑体の中央部においてその基質中をチラコイド膜(thylakoid)が貫通し, その周囲はデンプンで取り巻かれている^{1,3)}。また単細胞鞭毛藻ユーグレナ

(*Euglena gracilis* Z)のピレノイドもクラミドモナスと類似した構造を示す。しかし, ユーグレナのピレノイドは細胞質側にあるパラミロン(β -1,3 グルカン)によって, その周囲を取り囲まれている¹⁴⁾。それらのピレノイドを電子顕微鏡で観察すると, ピレノイドはストロマ部分に比較し電子密度が高く球体で, その構造は容易に判別することができる。ピレノイド構造の大きな特徴の一つは周囲のストロマと区別する境界膜が存在しない^{8,18)}。最近の研究では, ピレノイドは葉緑体内の単なるタンパク質分子の貯蔵場所ではなく細胞生理学上, 重要な役割をもった細胞内小器官ではないか, と考えられるように

¹ 本研究の一部は第 6 回国際藻類学会で発表した(1997 年 8 月, オランダ・ライデン大学)

* 体育研究所, **運動方法(水泳研究室), ***相模女子大学(食品研究室), ****東京医科大学(微生物研究室), ***** 自然科学研究室(生命科学専攻)

なっている。

1970年、ハーバード大学のGoodenough⁵⁾によって、クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) のピレノイド構造は2分裂様式で分裂し、各々の娘葉緑体に1個ずつ分配されるという電子顕微鏡像が示された。この研究によりクラミドモナスのピレノイドは2分裂様式で分裂し、各々の娘葉緑体に1個ずつ移動するのではないかという説が国際的に支持されている。一方、Osafune^ら^{21, 22)} はノマルスキー微分干渉顕微鏡を用いて、ピレノイド構造が細胞周期中で葉緑体分裂の前に一時的に消失するという現象を観察した。このように、クラミドモナスの細胞周期におけるピレノイド構造の動態には、2説提唱されている。本研究は、先に観察したピレノイド構造が葉緑体分裂の前に一時的に消失する現象を、新しい手法を用いて確認し、この現象の細胞周期における意義を解明することを目的として行った。すなわち、同調培養したクラミドモナスの細胞集団を用い、高分解能ノマルスキー微分干渉顕微鏡により、細胞周期におけるピレノイド構造の変化を経時的に観察した。さらには、ウエスタンブロッティング法によって細胞周期におけるRuBisCOの動態も追跡した。その結果、クラミドモナスのピレノイド構造は葉緑体分裂前に一時的に消失し、*de novo* に形成されることが明らかになり、我々が先に観察した現象が確認された。

方 法

1. 材料および同調培養

クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) を無機培地中で温度26°C、光照度7,000~8,000 luxの蛍光灯(東芝30w)12時間照射し、暗期12時間を反復する同調培養細胞集団を得ることができる^{2, 3, 13)}。光照射直後の細胞を0時間として、24時間まで経時的に試料の採取を行い実験に供した。

2. 細胞容積(PCV)の測定法

同調培養細胞集団における各ステージの培養液をpacked cell volume用ヘマトクリット遠心管に10 ml採取し、1500 g、15分間、4°Cで遠心し細胞の体積を測定した¹³⁾。

3. ノマルスキー微分干渉顕微鏡観察

Nikon X2F顕微鏡に微分干渉装置NTF2Aを用い、対物レンズPlan Apo DIC 60により観察、写真撮影を行った²¹⁾。

4. 抗体

リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)の抗体はユーグレナZ株(*Euglena*

gracilis Z株)から抽出、精製し抗原とした。RuBisCO抗体は中野長久教授(大阪府立大学)から分与された。

5. ウエスタンブロッティング法によるタンパク質の測定

光照射後、経時的に採取した細胞を4°C、×1,600 g、40分間遠心した。そして得られた各細胞の沈査に同容量の10 mMのTris-HCl緩衝液(pH 7.5)を加え懸濁したのち、超音波分散機(エスエムテューUH-50)で10秒間、5回処理し細胞を破壊した。これらの試料は×7,000 g、30分間遠心し得られた上清液を可溶性タンパク質として実験に用いた。試料のタンパク質量はブラッドフォード法により測定した。次に、可溶性タンパク質の試料とサンプルバッファー(蒸留水3.8 ml、0.5 M Tris-HCl(pH 6.8) 1.0 ml、glycerol 0.8 ml、10% SDS(w/v)、1.6 ml、β-メルカプトエタノール 0.4 ml、0.05% プロモフェノールブルー 0.4 ml)を1:1の割合で混合した。各試料から10 μgのタンパク質を12% SDS-ポリアクリルアミドゲルに積載し、電気泳動を行った。タンパク質のゲルから、ニトロセルロース膜への電気的ブロッティングは100 Vで2時間、トランスファーバッファー(25 mM Tris、190 mM glycine、20% methanol、pH 8.3)を用いた。ウエスタンブロットの解析には、ECL、Amersham コマーシャルプロトコールに従った。電気的ブロッティングのち、ニトロセルロース膜はブロッキング溶液(5%の脱脂粉乳を含むTTBS溶液[20 mM Tris-HCl、137 mM NaCl、0.1% Tween-20])で4°C、16時間静置した。その後、1次抗体溶液(TTBS溶液により1,000倍に希釈した抗RuBisCO抗体)中で2時間、室温で振盪した。次に、ニトロセルロース膜を0.02%のTween-20を含むPBS溶液で3回洗浄し、2次抗体溶液(1,000倍に希釈した抗ウサギIgGロバ抗体[Amersham])によって1時間、室温で振盪した。その後、0.02%のTween-20を含むPBS溶液を用いてニトロセルロース膜を室温で3回洗浄し、検出処理を行った。洗浄を終えたニトロセルロース膜をECL検出溶液中に1分間静置したのち、ポラロイドフィルムに約15秒間露光した^{23, 24)}。

6. 電子顕微鏡試料の固定

細胞の固定は経時的に採取した細胞培養液中に、直接グルタルアルデヒド(50%水溶液: EM Lab., USA)を最終濃度が1%(v/v)になるように添加し、4°C、60分間処理した¹⁸⁾。免疫電子顕微鏡法による細胞の観察にはグルタルアルデヒド溶液のみで固定処理した²⁵⁾。一方、細胞の超微細構造の観察には1%オスミック酸水溶液(v/v)で4°C、60分間の二重固定を行った。次に、試料を

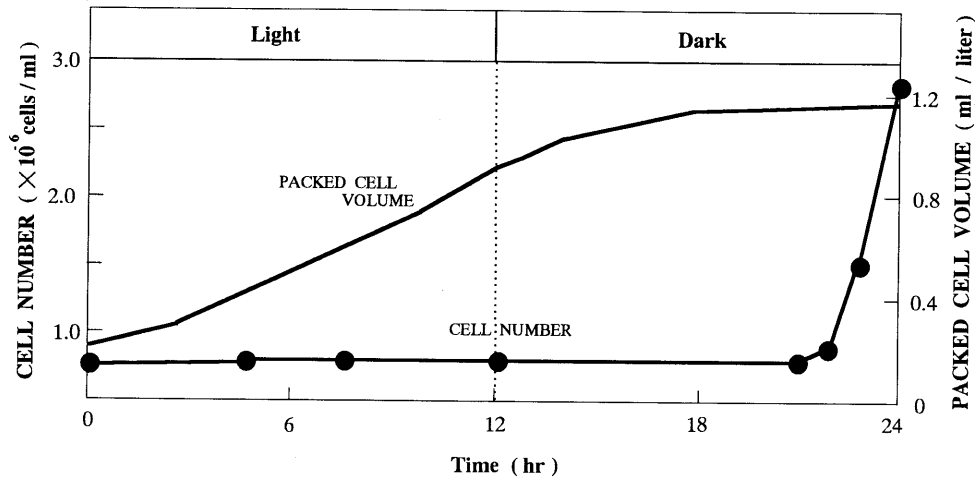


図1 *Chlamydomonas reinhardtii* (クラミドモナス) 細胞周期における細胞数と細胞容積の変化

明暗同調培養法によって培養した *Chlamydomonas reinhardtii* (クラミドモナス) の細胞周期における細胞数 (●) と細胞容積 (packed cell volume) を経時的に測定している。同調培養細胞集団の細胞分裂は明期には起こらず暗期 18 時間前後から始まり、23~24 時間で娘細胞 (zoospore) が 4 個放出される。細胞容積は明期に増加し、暗期に入ると一定値を示している。

2%アガロース (ナカラitekus KK) に包埋したのち、約 1 mm³ の寒天ブロックを作成した。寒天ブロックは 50~90%エタノール系列と、90~100%アセトン系列で脱水し、Epoxy または Spurr 樹脂に包埋した。試料の超薄切片は超マイクローム (Dupont MT-1 型) で作成した。

7. 免疫電子顕微鏡法 (プロテイン A コロイド金法) による染色

Osafune ら^{19,20)} の方法に従って染色した。

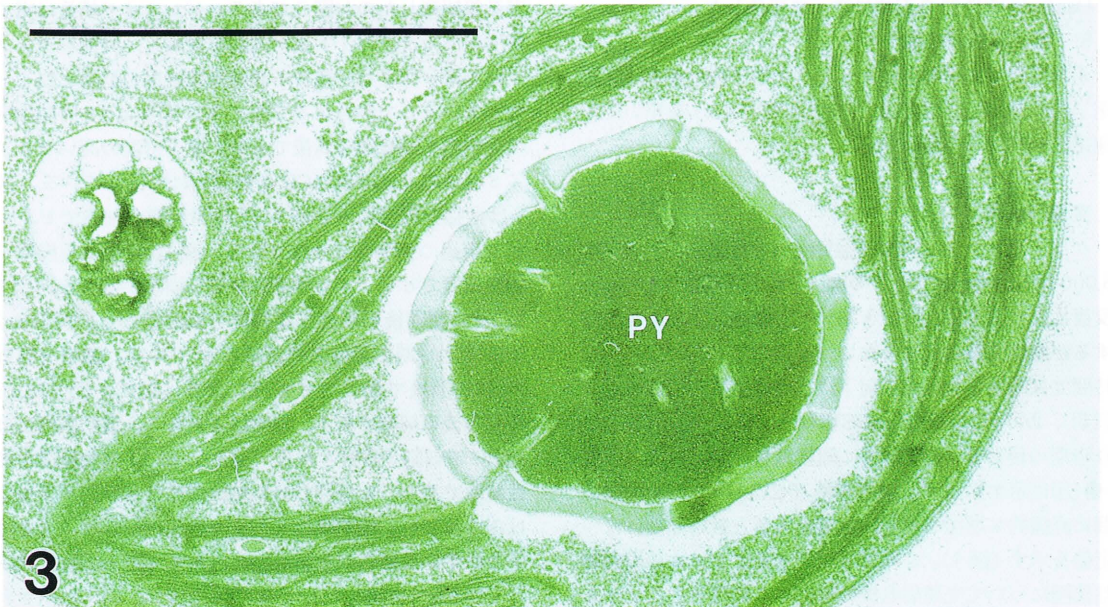
8. 電子顕微鏡観察

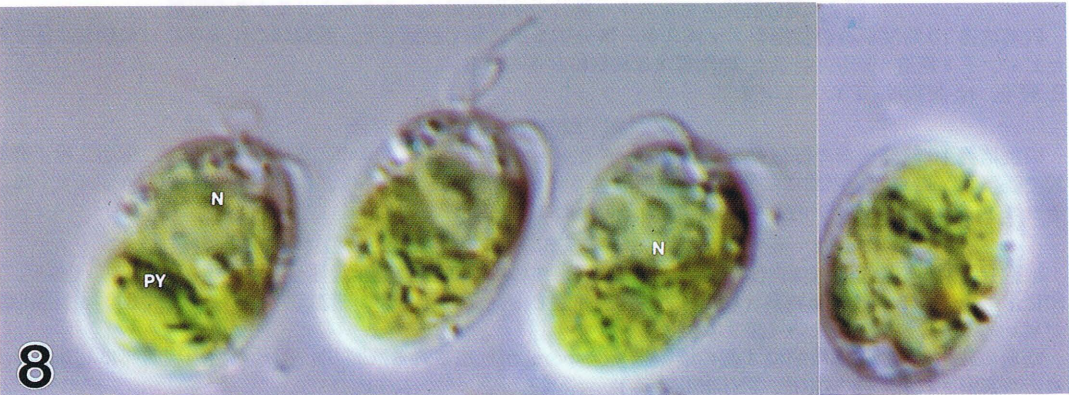
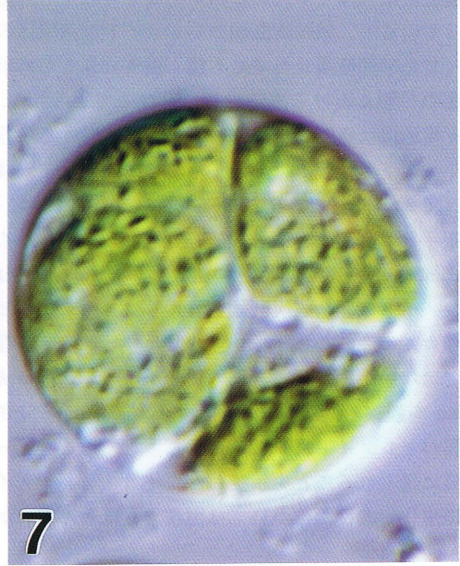
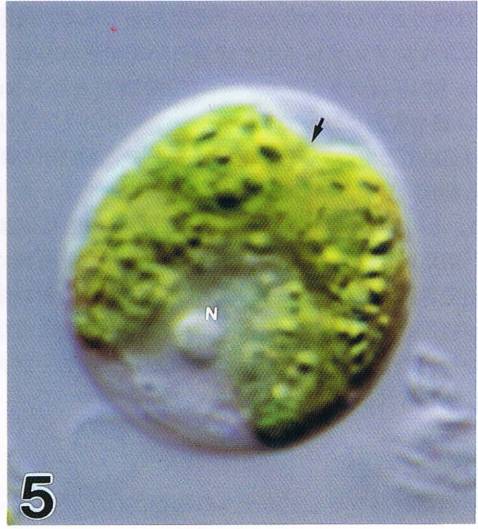
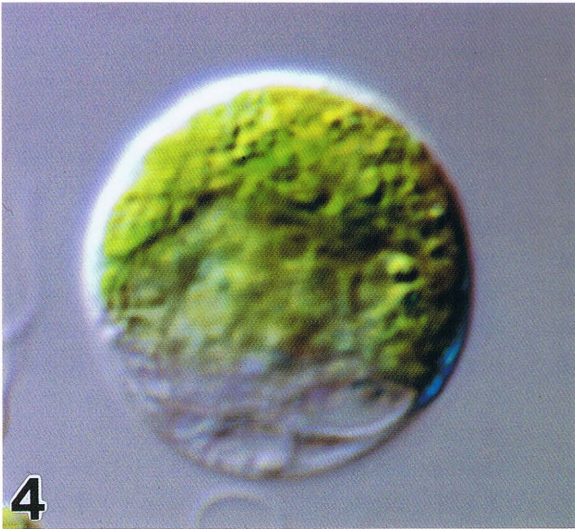
超薄切片は本学健志台キャンパス電子顕微鏡室の大型電子顕微鏡 JEOL-100CX 型 (日本電子 KK) を用いて加速電圧 80 kV で観察した¹⁷⁾。

実験結果

クラミドモナスの同調細胞集団は光合成条件下 (照度 6,000 lux, 温度 26°C) で明期 12 時間, 暗期 12 時間の反復により得ることができる^{2,3,13)}。細胞は明期中に成長するが細胞分裂は起こらない (成長期), そして続く 12 時間では暗所または光照射下でも細胞分裂が起こり (分裂期), 20 時間前後から娘細胞 (zoospore) の放出が始まり暗期の終わり 24 時間後に細胞数は 4 倍になる (図 1 ●印に示す)。また、細胞容積 (PCV) は明期 12 時間の間に直線的な増加を示し、暗期に入ると数時間後には一定値を示す (図 1)。このようなクラミドモナスの同調細胞集団について光照射直後の細胞を 0 時間とし、ノマル

スキー微分干渉顕微鏡によりピレノイドの発達過程を追跡したものが図 2, 4~8 である。ピレノイド構造の発達は光照射直後に開始し、10 時間前後で楕円体をしたピレノイド構造が完成する。図 2 は 10 時間細胞をノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察したもので、矢印はピレノイド構造を示す。ピレノイド構造の周囲はデンプン粒で取り囲まれているのがわかる。このような細胞をグルタルアルデヒド前固定・四酸化オスミウム後固定し、電子顕微鏡観察したのが図 3 である。ピレノイド構造は電子密度が高くチラコイド膜が内部を貫通し、周囲をデンプン粒で取り囲まれ、微分干渉顕微鏡観察の結果と良く一致していることがわかる (図 2, 3)。図 9 は 10 時間細胞の免疫電子顕微鏡写真像である。電子密度の高いピレノイド構造の上に RuBisCO が特異的に局在している。図 4 は細胞分裂前にみられる 17 時間前後の細胞でピレノイド構造の判別はできなくなる。図 10 はその免疫電子顕微鏡像でピレノイド構造は変形し崩壊が始まる。図 5 は 18 時間前後の細胞で葉緑体分裂が起こり、矢印は 2 分裂開始時期の葉緑体形態を示す (図 5)。細胞分裂は 20 時間前後で起こり 2 細胞になる (図 6)。図 7 は 23 時間前後の細胞である。細胞は 4 分裂し、母細胞内には 4 個の娘細胞が観察される (図 7)。図 11 は免疫電子顕微鏡像である。4 分裂した娘葉緑体にはピレノイド構造はみられない。娘葉緑体ストロマ内部にはコロイド金粒子のわずかな集まりが数箇所観察される (図 11, 鎌)。図 8 は 24 時間で放出された 4 個の娘細胞である。放出され





た娘細胞内にはピレノイド構造が観察される(図8)。図12は同じステージの免疫電子顕微鏡像である。矢印に示すようにプロピレノイド構造の形成がみられる(図12)。図13はクラミドモナスの細胞周期におけるRuBisCO量の変動についてウエスタンブロッティング法により追跡したものである。すなわち、光照射直後の細胞を0時間として、経時的に24時間まで測定した(図13)。その結果、RuBisCOは明期には直線的な増加をし、暗期には減少が始まり細胞分裂が開始される前には検出限界以下になることがわかった。図4,5は葉緑体分裂が起こる前の細胞である。したがって、このような時期の細胞のRuBisCO量はウエスタンブロッティング法で検出できなかった(図13)。

考 察

単細胞緑藻クラミドモナスは細胞内に1個のカップ状構造の葉緑体と中央部に典型的なピレノイド構造とをもっている^{4,8)}。単細胞藻類のピレノイドは葉緑体の中にあつて光学顕微鏡レベルでも良く観察できるため単細胞藻類の分類における識別形質にもなっている⁸⁾。ピレノイド構造には周囲の葉緑体ストロマと区別する境界膜はなく、電子顕微鏡では高電子密度の構造として観察される(図3)。また、抗RuBisCO抗体-コロイド金粒子-免疫電子顕微鏡法によって電子密度の高いピレノイドにRuBisCOが特異的に局在する¹⁵⁾(図9~12)。従来から、ピレノイドは光合成炭酸固定酵素リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼの単なる貯蔵場所ではないかとされてきた⁶⁾。Mantonは*Chrysochromulina*を観察し、ピレノイドは葉緑体内部で合成された物質がピレノイドに一時的に集積され、そこを通過して細胞質に送られることを示唆した⁹⁾。しかし、ピレノイドの生理生化学的役割については現在でもほとんどわかって

いない^{6,8)}。RuBisCOは葉緑体DNAにコードされた分子量55 kDaの大サブユニットのタンパク質と細胞核DNAにコードされ細胞質で合成される15 kDaの小サブユニットの両方で構成され、光合成炭酸固定の第1ステップををになっている重要なタンパク質である⁸⁾。最近、単細胞緑藻のピレノイド基質やそれを取り巻くデンプンやパラミロンの大きさが、培養条件や細胞周期によって著しく変化することが見いだされ、ピレノイド構造の生理的役割が注目されるようになった¹⁸⁾。これまで、藻類の光合成炭酸固定に關与するRuBisCOは高等植物と同様に、葉緑体のストロマに存在するRuBisCOが機能しているのではないかと考えられてきた⁸⁾。最近ではピレノイドに局在するRuBisCOが光合成に關与していることがわかってきた^{15,16)}。1990年、Osafuneら¹⁶⁾のグループは同調培養したユグレナ細胞を用いて細胞周期におけるピレノイド構造とRuBisCOの相関性を解析し、ピレノイドに存在するRuBisCO酵素が光合成の炭酸固定に關与している可能性を最初に報告している。すなわち、我々の研究室ではユグレナ細胞のピレノイド構造の機能を知るための一步として免疫電子顕微鏡法を利用し、明暗同調培養法(明期14時間、暗期10時間)の同調培養ユグレナのcell cycleにおけるピレノイド構造の変化とRuBisCOタンパク質分子の動態を経時的に追跡した¹⁶⁾。その結果、免疫電子顕微鏡法によって、ピレノイドが光合成における炭酸固定と密接な關連のあることを見いだした¹⁶⁾。すなわち、ピレノイド構造は光照射開始後およそ10時間でピレノイドおよび葉緑体がcell cycle中で最も発達する¹⁵⁾。そのステージにおける光合成炭酸固定と抽出したRuBisCOのカルボキシラーゼ活性を測定した結果、ピレノイド構造に局在するRuBisCOが機能し光合成の炭酸固定に關与している可能性が高いことが明らかにし

図2 高分解能ノマルスキー微分干渉顕微鏡によるクラミドモナスの観察

同調培養10時間前後の細胞をノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察した。葉緑体の中央部には澱粉粒に囲まれたピレノイド構造(矢印に示す)、細胞質には細胞核がみられる。

F: 鞭毛, N: 細胞核, PY: ピレノイド

図3 電子顕微鏡による超薄切片像

同調培養10時間前後の細胞をグルタルアルデヒド・四酸化オスミウムの二重固定後、包埋、薄切し電子顕微鏡で観察した。葉緑体内部に電子密度の高い球状のピレノイド構造がみられ、周囲を澱粉粒が取り囲んでいる。チラコイド膜がピレノイド内部を貫通しているのがわかる。PY: ピレノイド

図4~8 高分解能ノマルスキー微分干渉顕微鏡によるクラミドモナスの観察

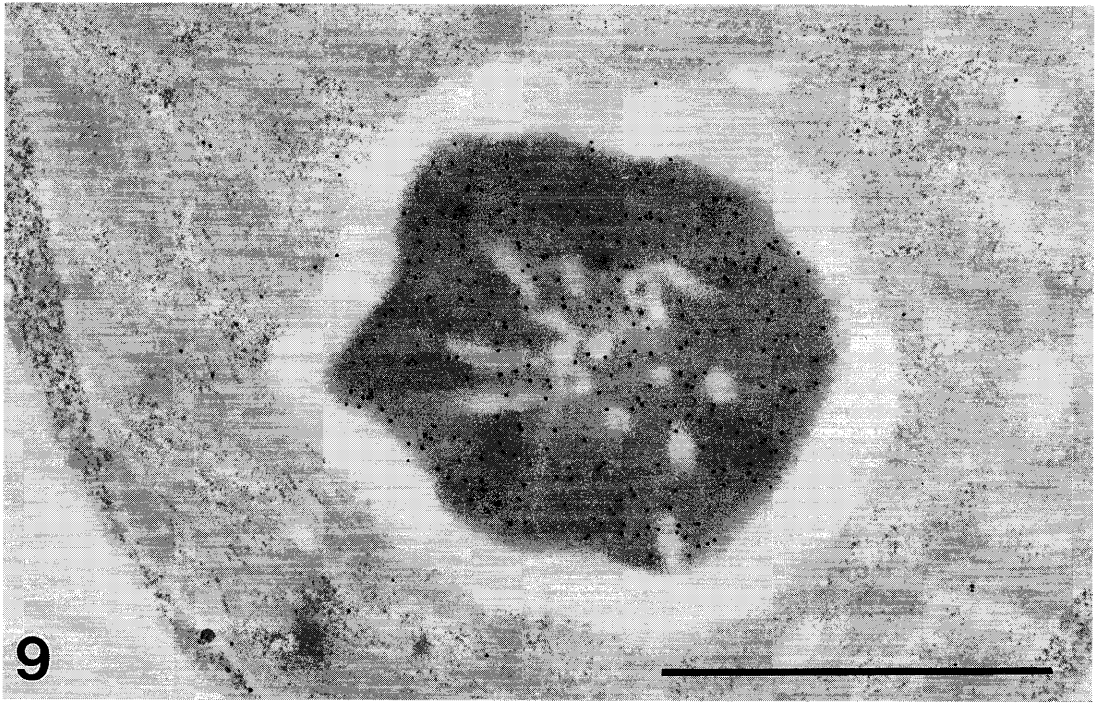
細胞分裂前の細胞で葉緑体内部にピレノイドは観察されない(図4)。葉緑体分裂が開始された細胞(図5; 矢印に示す)でピレノイドは観察されない。2分裂細胞で細胞質の中央部に細胞核がみられる(図6)。4分裂細胞でピレノイドは観察されない(図7)。

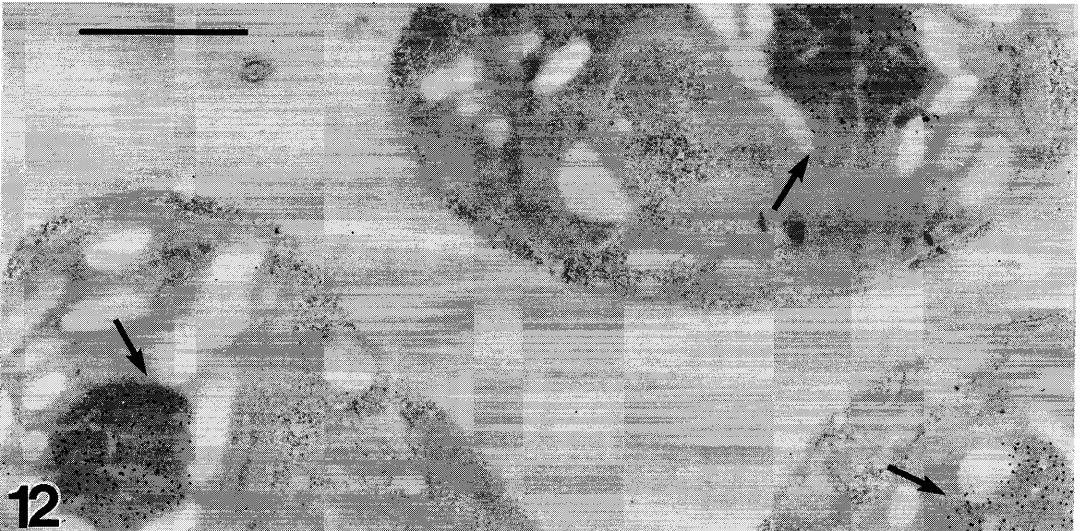
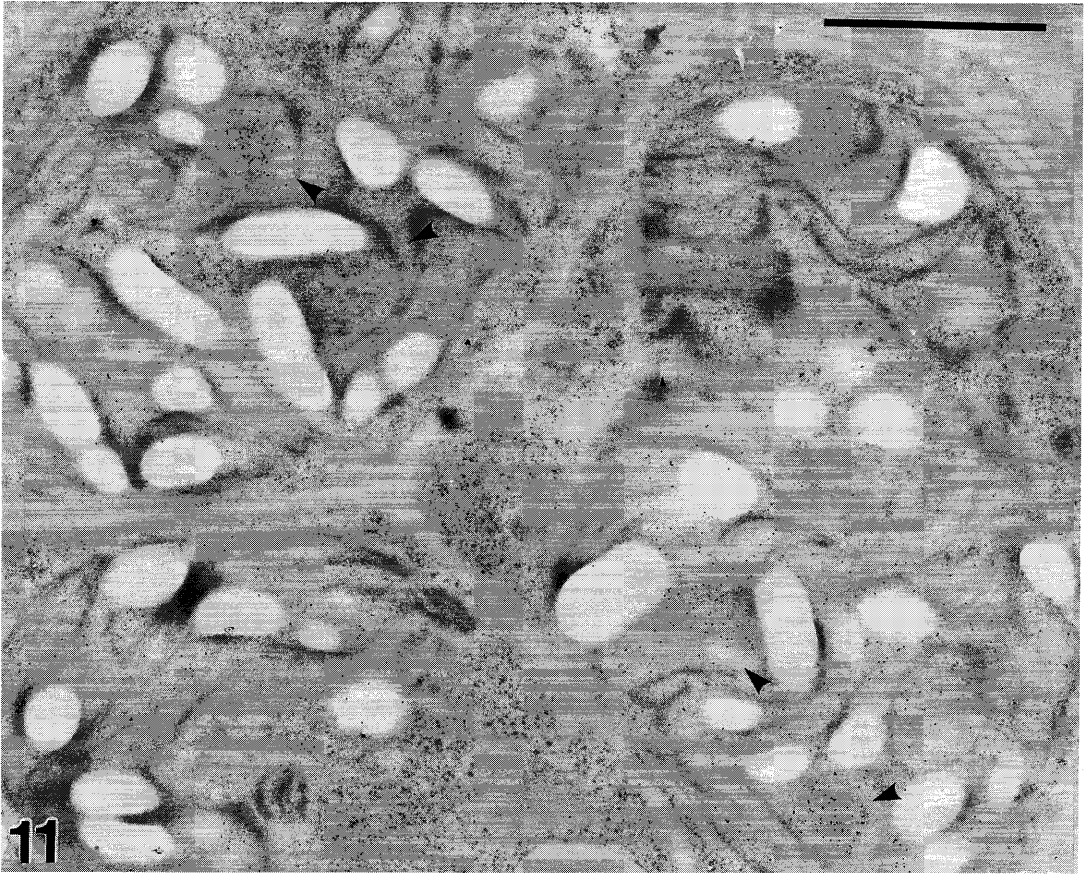
暗期の終わり23~24時間で4個の娘細胞(zoospore)が放出される(図8)。図8の娘細胞内部にピレノイド構造が観察される。N: 細胞核, PY: ピレノイド

た¹⁶⁾。その後、McKay ら¹⁰⁾はクラミドモナスのピレノイド構造に RuBisCO のアクチベースが局在していることを免疫電子顕微鏡法によって見いだした。McKay ら¹⁰⁾の報告は、ピレノイドにある RuBisCO が光合成に関与するのではないか、という我々の結論¹⁶⁾を支持するものである。さらに、ピレノイド構造を取り巻くデンプンの変動と CO₂ 濃度との相関から、ピレノイドが光合成炭酸固定に関与する可能性も示唆されている⁸⁾。また、一部の単細胞藻類では遺伝子 DNA がピレノイド内部に存在している事実がある^{8, 11, 12)}。これは限られた藻類のみにみられる現象であるが、ピレノイド構造が葉緑体核としての役割をになっている可能性も推察される。また、葉緑体の進化の過程を追ううえで重要な現象と思われる。

電子顕微鏡による *Chlamydomonas reinhardtii* (クラミドモナス) の細胞分裂に関する研究の多くは Johnson and Porter によって行われた⁷⁾。1970 年、Goodenough は *C. reinhardtii* の葉緑体分裂と細胞分裂の過程を電子顕微鏡で追跡した⁵⁾。その結果、細胞核の分裂の後、ピレノイド構造と葉緑体は 2 個に分裂し分配されることを報告している。すなわち、ピレノイドは細胞核の分裂後に fission によって 2 分裂し、同時に葉緑体分裂が起こる。その後、続いて細胞分裂が進行する。したがって、ピレノイドが *de novo* に形成されたり、あるいはピレノイド構造の崩壊という現象は観察されないと結論している⁵⁾。本研究は *C. reinhardtii* (クラミドモナス) を明暗同調培養法による同調培養細胞集団を試料とし、高分解能ノマルスキー微分干渉顕微鏡、免疫電子顕微鏡法により葉緑体、ピレノイド構造を経時的に観察した。さらに、ウエスタンブロッティング法により RuBisCO 酵素の変動を明らかにした (図 13)。明暗同調培養法によって同調培養したクラミドモナスは明期には細胞分裂は起こらない (図 1)。この間、細胞容積 (PCV) は直線的に増加し暗期に入ると一定値を保っている。細胞分裂は暗期の終りに開始され、2 分裂、4 分裂し 23~24 時間で 4 個の娘細胞 (zoospore) を放出する (図 1)。このような同調培養細胞集団をノマルスキー微分干渉顕微鏡および免疫電子顕微鏡法で観察すると、光照射 10 時間前後にサイズ約 1 μm 、球体のピレノイド構造が形成される (図 2, 3)。Goodenough⁵⁾はこのようなサイズのピレノイド構造が 2 個に分裂したのち葉緑体に分配されると考えている。すなわち、Goodenough は細胞分裂が開始した細胞中に亜鈴形状をしたピレノイドの超薄切片-電子顕微鏡像を示している。我々の研究室では同調培養した細胞集団を試料とし経時的にピレノイドを追跡した^{21, 22)}。

図 2, 4~8 はノマルスキー微分干渉顕微鏡観察した結果である。細胞分裂前 17 時間、葉緑体が分裂中の 18 時間前後細胞の葉緑体にはピレノイド構造は観察されない。Goodenough⁵⁾が電子顕微鏡で観察したように直径約 1 μm のピレノイド構造が亜鈴型になって 2 分裂するとしたなら、分裂後のピレノイド構造は 0.5 μm 前後のサイズと推測されノマルスキー微分干渉顕微鏡 (Nikon X2 F-EFD/NTF) の分解能で算定し、その形態は顕微鏡で観察できるはずであると考えられる (図 4, 5)。また、我々の研究では 2 分裂細胞、20 時間前後 (図 6) および 4 分裂細胞、22 時間前後 (図 7) にピレノイドの形態は観察されない。次に、ウエスタンブロッティング法で細胞周期における RuBisCO 量を測定したのが図 13 である。RuBisCO 量は光照射直後から増加し、暗期に入り減少する 18 時間前後まで検出限界以下に達する (図 13)。その後、RuBisCO 量は暗期の終わりまで増加することが判る。17 時間前後の細胞 (図 4) のようにピレノイドの形態観察ができないステージでは、ウエスタンブロッティング法による RuBisCO は検出できなかった。一方、図 8 は放出された娘細胞で、葉緑体内部には小型のピレノイドが観察される。これらの事実から、Goodenough⁵⁾の報告したように仮にピレノイドが 2 分裂様式で分裂するとしたら、ピレノイドは図 4~6 の顕微鏡像に観察されるはずである。図 10 の免疫電子顕微鏡像は暗期に入って直後の 14 時間細胞で、明らかに分裂過程ではなく崩壊であろう。このような電子顕微鏡像が Goodenough⁵⁾によって撮影されたものと思われる。図 11 は 4 分裂細胞で、顕微鏡像図 7 と同じステージでピレノイド構造はみられない。しかし、ウエスタンブロッティング法による結果から、*de novo* に合成された RuBisCO はストロマに分散していることを示している。図 11 に観察されるように、娘細胞内のストロマ数個所に分散して RuBisCO の分布域がみられる (鑑に示す)。図 12 は暗期終り 23 時間細胞である。矢印に示すように約 0.2~0.4 μm のプロピレノイドが観察される。この未発達な構造をもったプロピレノイド構造は図 8 のノマルスキー微分干渉顕微鏡像と一致している。すなわち、図 4, 5 に示した細胞内に 2 分裂したプロピレノイドが存在すれば顕微鏡で充分観察されたと思われる。したがって、ピレノイド構造は細胞分裂の前に一時的に消失したことが考えられる。暗期の終わりになると葉緑体内に再びピレノイド構造が形成され、そこには免疫電子顕微鏡法によって RuBisCO が局在していることがわかった (図 12)。これらの結果から、RuBisCO は葉緑体分裂の前に一時的に検出限界以下にまで減少しあるいは





完全に葉緑体内から消失する。したがって、1970年、Goodenough⁵⁾が発表したクラミドモナスの分裂中の2次元超薄切片-電子顕微鏡像は、ピレノイドの崩壊過程の可能性も推察されよう。

以上の実験事実から、*Chlamydomonas reinhardtii* のピレノイドは葉緑体分裂の前に必ずしも2分裂し葉緑体に1個ずつ分配されるのではなく、その時期にピレノイドは一時的に消失し、葉緑体分裂後に娘葉緑体内部で *de novo* に形成されると考えられる。今後はクラミドモナスの培養環境条件の変化に伴うピレノイド構造の挙動を観察する必要があると思われる。

要 約

現在、クラミドモナスの細胞周期におけるピレノイド構造の動態には、2説提唱されている。本研究は、先に我々が観察したピレノイド構造が葉緑体分裂の前に一時的に消失する現象を、新しい手法を用いて確認し、この現象の細胞周期における意義を解明することを目的として行った。すなわち、同調培養したクラミドモナスの細胞集団を用い、高分解能ノマルスキー微分干渉顕微鏡により、細胞周期におけるピレノイド構造の変化を経時的に観察した。さらには、ウエスタンブロッティング法によって細胞周期におけるRuBisCOの動態も追跡した。その結果、クラミドモナスのピレノイド構造は葉緑体分裂前に一時的に消失し、*de novo* に形成されることが明らかになった。

13

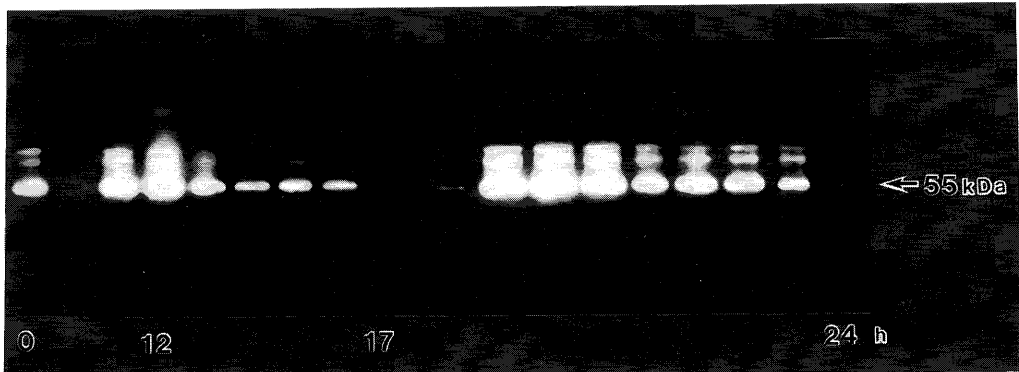


図13 ウエスタンブロッティング法によるRuBisCO量の追跡

クラミドモナスの同調培養集団を経時的に採取し、ウエスタンブロッティング法を用いてタンパク質当たりのRuBisCO量を調べた。RuBisCOは明期12時間まで増加し、暗期に入り減少する。その後、暗期17, 18時間ではウエスタンブロッティング法によるRuBisCOは検出限界以下になり、再び急激な増加がみられた。すなわち、RuBisCO酵素は細胞周期中で *de novo* に合成されることを示している。

図9 同調培養クラミドモナス10時間細胞の免疫電子顕微鏡像

抗リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)抗体-コロイド金粒子処理した10時間細胞を示す。電子密度の高いピレノイド構造にはRuBisCO酵素が特異的に局在しているのがわかる。ピレノイド内部にはチラコイド膜が観察される。

図10 同調培養クラミドモナスの細胞分裂前の免疫電子顕微鏡像

ピレノイド構造の崩壊が開始され、ピレノイドが変形している。矢印はピレノイド構造を示す。

図11 同調培養クラミドモナスの4分裂直後の免疫電子顕微鏡像

細胞は23~24時間で4分裂し細胞周期を完了する。葉緑体内部にピレノイド構造は観察されない。一方、RuBisCO酵素はストロマに複数の領域に特異的な局在性を示している(鏝に示す)。

図12 同調培養クラミドモナスの4分裂細胞の免疫電子顕微鏡像

暗期の終わりに放出された娘細胞内部には未発達のプロピレノイド構造が形成される(矢印に示す)。

謝 辞

研究の一部は平成9年度、文部省科学研究費・基盤研究(C)第09640795号、平成7年度、総合研究(A)第07304082号、基盤研究(C)第07640886号、平成9年度日本体育大学父母会奨励研究費および日本私学振興財団・学術研究振興資金の補助によって行われた。

引用文献

- 1) 江原友子: 同調培養 *Euglena* および *Chlamydomonas* の細胞周期におけるオルガネラの動態の研究, 新潟大学院自然科学・学位論文(理博), 1993.
- 2) Ehara, T., Ogasawara, Y., Osafune, T. and Hase, E.: Behavior of chloroplast nucleoids during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* in synchronized culture, *J. Phycology*, **26**, 317-323 (1990).
- 3) Ehara, T., Osafune, T. and Hase, E.: Behavior of mitochondria during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* in synchronized culture, *J. Cell Science*, **108**, 499-507 (1995).
- 4) Ehara, T., Osafune, T. and Hase, E.: Association of nuclear and chloroplast DNA molecules in synchronized cells of *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Elec. Microscopy*, **45**, 159-162 (1996).
- 5) Goodenough, U. W.: Chloroplast division and pyrenoid formation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Phycol.*, **6**, 1-6 (1970).
- 6) 長谷栄二, 長船哲齊: *Euglena* におけるピレノイドとリブローズ二リン酸カルボキシラーゼの動態, 日本農芸化学会誌, **63**, 1513-1516 (1989).
- 7) Johnson, C. G. and Porter, K. R.: Fine structure of cell division in *Chlamydomonas reinhardtii*. Basal bodies and microtubules, *J. Cell. Biol.*, **38**, 103-125 (1968).
- 8) 堀 輝三, 石川依久子, 原 慶明, 野崎久義, 長船哲齊, 都筑幹夫, 岡田光正, 中山克己, 酒井敦, 宮村新一: 下等植物の葉緑体内構造・ピレノイドの構造と機能の解明, 平成8年度科学研究費補助金 [総合研究(A)(1)] 研究成果報告書, 1997年3月.
- 9) Manton, I.: Observations on plastid development in the meristem of *Anthoceros*, *J. Exp. Bot.*, **13**, 325-333 (1962).
- 10) McKay, R. M. L., Gibbs, S. P. and Vaughn, K. C.: RuBisCO activase is present in the pyrenoid of green algae, *Protoplasma*, **162**, 38-45 (1991).
- 11) Miyamura, S. and Hori, T.: Further confirmation of the presence of DNA in the pyrenoid core of the siphonous green algae genus *Caulerpa* (Caulerpales, Ulvophyceae, Chlorophyta), *Phycol. Res.*, **43**, 101-104 (1995).
- 12) Miyamura, S., Hori, T., Ohya, T., Tohma, T. and Ikawa, T.: Co-localization of chloroplast DNA and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the so-called pyrenoid of the siphonous green algae *Caulerpa lentilifera* (Caulerpales, Chlorophyta), *Phycologia*, **35**, 156-160 (1996).
- 13) Osafune, T., Mihara, S., Hase, E. and Ohkuro, I.: Electron microscope studies on the vegetative cellular life cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeared in synchronous culture I. Some characteristics of changes in subcellular structures during the cell cycle, especially in formation of giant mitochondria, *Plant and Cell Physiol.*, **13**, 211-227 (1972).
- 14) Osafune, T.: Three-dimensional structures of giant mitochondria, dictyosomes and "concentric lamellar bodies" formed during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture, *J. Electron Microscopy*, **22**, 51-61 (1973).
- 15) Osafune, T., Sumida, S., Ehara, T. and Hase, E.: Three-dimensional distribution of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in chloroplasts of actively photosynthesizing cell of *Euglena gracilis*, *J. Electron Microscopy*, **38**, 399-404 (1989).
- 16) Osafune, T., Yokota, A., Sumida, S. and Hase, E.: Immunogold localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase with reference to pyrenoid morphology in chloroplasts of synchronized *Euglena gracilis* cells, *Plant Physiology*, **92**, 802-808 (1990).
- 17) Osafune, T., Schiff, J. A. and Hase, E.: Stage-dependent localization of LHCP II apoprotein in the Golgi of synchronized cells of *Euglena gracilis* by immunogold electron microscopy, *Exp. Cell Res.*, **193**, 320-330 (1991).
- 18) 長船哲齊, 江原友子, 角田修次: *Euglena* 細胞における葉緑体の動態, 電子顕微鏡, **26**, 193-202 (1992).
- 19) Osafune, T., Ehara, T., Tsuboi, S. and Yamada, M.: The occurrence of nonspecific lipid transfer proteins in developing castor bean fruits, *Plant Science*, **113**, 125-130 (1996).
- 20) Osafune, T., Schwartzback, S. and Yamato, M.: Immunocytochemical localization of RuBisCO in the compartmentalized osmiophilic body in dark-grown cells of *Euglena gracilis* Z, *J. Electron Microscopy*, **45**, 239-241 (1996).
- 21) Osafune, T., Tsuyama, K., Hase, E., Ehara, T. and Kiyota, M.: Correlation between the pyrenoid morphology and RuBisCO in a chloroplast of synchronized *Chlamydomonas* cells,

Phycologia, 36 (Suppl.), 81 (1997).

- 22) 津山 薫, 江原友子, 長谷栄二, 長船哲齊: 微細藻類におけるピレノイド構造と RuBisCO の動態, 日本植物形態学会第 9 回大会, 1997 年 9 月 17 日.
- 23) 津山 薫, 北山雅彦, 古田裕子, 江原友子, 長船哲齊, 大和 眞: クラミドモナスの運動性と活性酸素消去酵素との相関性, ユーグレナ研究会

第 12 回研究集会 (1996).

- 24) 津山 薫, 北山雅彦, 北山 薫, Robert K. Togasaki, 小早川ゆり, 浜田元輔, 清原伸彦, 長船哲齊, 大和 眞: *Chlamydomonas reinhardtii* の運動性と活性酸素消去酵素 (Fe-SOD) との相関性, 日本体育大学体育研究所雑誌, 22, 15-24 (1997).