

ミトコンドリアと色素体の増殖と遺伝の機構の 研究を通して生命の本質を探る

黒 岩 常 祥

窓の外を眺めると、例年にない暖かさのためか、もう梅が満開に咲き誇っている。基生研の完成とともに植えられた手前の20本程の紅梅の奥に、1本の朽ち果てそうな白梅がある。私が初めて岡崎に來た年には、この白梅は枝振りもよく、見事に花が咲き沢山の實をつけた。それから数年間、研究所建設の機材を立て掛けられたり、時には機材の中に埋められたり、また飯場の人達はその下で焚き火をしたりした。そんなこともあってこの数年は殆ど花を咲かせなかったのであるが、今年はどういう訳か少し花をもっている。9年前と同じように咲くにはまだ時間がかかろう。

1977年の冬、風が強く寒い日に、私は初めて岡崎に來た。それまで岡山大学にいた私は、基生研建設という、植物学会、動物学会を中心とした基礎生物学における国家的なプロジェクトが進んでいることを知らなかったし、転任が決まった時には既に研究所ができていると思いこんでいた。また広い大学キャンパスを見慣れていたこともあって、第一印象は、建物が無いということ、続いて何故このような狭い土地に建てるのだろうかということであった。これでは研究どころではなく、その日から研究所建設の先発隊の一人として最前線に加わった。研究室の設計、電気の配線、物品の購入、研究所のブロックができる度の引っ越し、研究会のお世話等、大変な労働作業であった。それにもまして精神的に厳しい状況に置かれていた。これは恐らく私だけでなく、先発隊に加わった全ての教官、奨励研究員、そして管理局の人達にとっても同じことであつたであろう。

細胞機構部門の発足と研究体制

大阪大学を定年退官された神谷宣郎先生が1977年9月に基生研の教授として赴任され、細胞機構部門は生殖部門に続く、基生研の2番目の部門として発足した。同年11月に吉本康明氏が助手に、12月には黒岩が助教授として加わった。翌年、それまで奨励研究員だった小川和男氏が助手に採用され、ここの研究室の体制が整った。1981年4月神谷宣郎教授の定年とともに吉本康明氏は細胞増殖部門の助手として移り、1983年1月より、黒岩が細胞機構部門を引き継ぐこととなった。7月には河野重行氏が助手に、12月には長田敏行氏が名古屋大学より助教授として迎えられ、現在の研究室体制の基礎はほぼ固まった。これら教官の他に、技術課からは中村宗一、難波千営子の両氏が加わり、機器管理のかたわら藻及び菌類の重要な突然変異の分離や蛋白質の同定を行い、当部門の研究を一段と厚みのあるものとしている。この他に技術補佐員として永谷恵子氏が研究活動を支援している。これらの職員の他にこれまで奨励研究員もしくは非常勤の講師として当研究室の研究活動を支えてくれたのは、

松村文男氏（米国ラトガース大学，助教授），鈴木孝仁氏（名古屋大学，助教授），西林双龍氏（三菱植物工学研究所，研究員），三田高志氏（静岡県立大学，助手）がいる。また現在，大学院受託学生として研究活動に参加している者に，宮村新一氏（名古屋大，理），安田智子氏（茨城大，理），根本泰行氏（東大，理）がおり，企業から鎌田庸宏氏が参加している。

過去9年間における細胞機構部門の研究活動は，前半の神谷教授を中心とした「細胞運動の機構に関する研究」と，後半の私が主宰する「細胞小器官（オルガネラ）の増殖と遺伝の機構の研究」に分けられる。

過去9年間の前半

神谷名誉教授は，先生独自の発想法，巧みな実験方法，適材の選択等によって，筋肉に限定されていた運動の機構の研究を，40年以上も前に粘菌や植物にまで拡張する事によって，現象の一般化に成功し，当時既に細胞運動の機構全般にアクチンが深いかわりをもつことを予測した。それから常にも世界の第一線に立って細胞運動の研究を進めてこれ，細胞運動の諸問題を次々に解明するとともに，新しい現象の発見をされた。基生研においても吉本康明氏，松村文男氏とともに，興味深い多くの研究をされた。この成果に関しては，先生ご自身が基礎生物学研究所年報1号に書いておられるので，ここでは省略したい。

奇妙な生物，粘菌

研究所設立前半は，雑用に追われ研究を続けることが不可能に近かった。しかし研究活動を止めることは断じてできなかったし，止めたら最早立ち直れないのでは無いかと言う不安に時々襲われた。僅かでも前進すれば良いと思いながら，雑用の終わった深夜2時から，現在の1/10のスペースもない狭い，倉庫兼研究室で研究を始めることもあった。こうした厳しい条件下でもなんとか研究を続けてこれたのは，既に岡山大学で，現在の研究の基本となる生物現象を，神谷先生の使われていたのと同じ真性粘菌 (*Physarum polycephalum*) で発見しており，その本質を早く知りたいと切望していたことにある。

粘菌は生活環のある時期には，動物の培養細胞のように這いずりまわり，少し水があれば，あっという間にべん毛を生やし，精子のように変わり泳ぎまわる。雌雄の配偶子が接合（受精）すると変形体になる。変形体は多核の単細胞であり，巨大なものは直径3mになることもある。これは栄養がなくなると突然キノコをつくり，植物のように変身する。食用になることもなく，医療に役立つ薬がとれたということもほとんど聞かない。が，基礎研究の面から見ると，極めて重要な生物なのである。変形体内では原形質流動が活発であるため，60年も前から細胞運動の機構の研究のために使われており，現在も非常に活発に研究が進められている，非筋の運動機構の研究分野が開かれる端緒となった生物である。また，自然状態でほぼ100%細胞核分裂が同調して起こるため，細胞周期や細胞核分裂の制御の研究に，極めてよく使われるようになってきた。

私は15年前まで「細胞核染色体の分配及び分散と凝縮の機構」をテーマに研究していた。しかし細

胞核染色体では DNA 分子が長過ぎて、遺伝子の制御に関与する極微的な染色体の分散と凝縮をとらえるには限界があると考えていた。従って、できれば短い DNA をもつ生物で、DNA に蛋白質が付いているものは無いかと探していた。が、そのような生物を発見することはできなかった。その頃、細胞内小器官のミトコンドリアと葉緑体にも、短い、蛋白質をもたない裸の DNA が存在しているらしいことが生化学的に分かってきた。しかし普通の生物のミトコンドリアと葉緑体の中に DNA 分子を観察することは簡単にはできなかった。粘菌の細胞を観察しはじめてから間もなく、奇妙なことに気付いた。気付いたというより、探し求めていたものにぶつかったといった方が良いかも知れない。即ちミトコンドリア内にある黒い（電子密度の高い）棒状の構造が、他の生物のミトコンドリアには見られない程の多量の DNA, RNA と蛋白質を含み、独自の「核」となっていることが明らかとなったのである。（図 1 a）。今まで見えないとされていたものが容易に見える。これによって、先ずミトコンドリアの分裂機構の研究を、その核分裂と基質のキネシスに分けて研究できるようになる。更にミトコンドリアの核を単離することによって、オルガネラの遺伝子の、蛋白質による制御の研究もできる等、夢は大きく広がった。それ以来今日まで、こうした線に沿った研究を主軸として続けている。

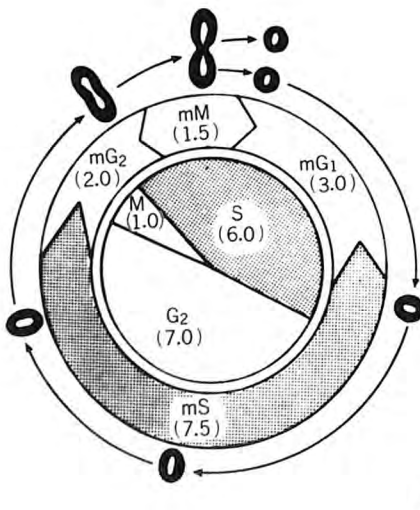
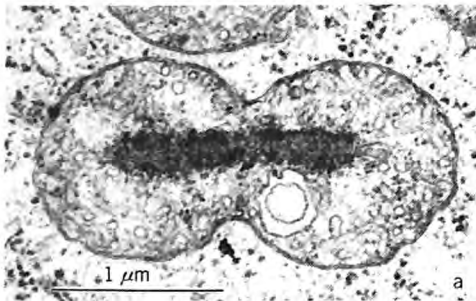


図 1 粘菌の変形体の分裂期ミトコンドリアの電子顕微鏡写真 (a) と細胞核 (b の内円) およびミトコンドリアの分裂周期 (b の外円)。

ミトコンドリアは電子密度の高い核 (DNA, RNA, タンパク質の複合体) を含んでおり (a), 細胞核と同じように14時間周期で倍加する (b)。細胞核の分裂周期の G_1 期 (G_1), S 期 (S), G_2 期 (G_2), 分裂期 (M) に対応し、ミトコンドリアにも G_1 期 (mG_1), S 期 (mS), G_2 期 (mG_2), 分裂期 (mM) がある。() 内は時間を示す。

ミトコンドリアとは、葉緑体とは

一般に、ミトコンドリアは細胞内エネルギーの産生場として、又葉緑体は光合成の場としてだけ考えられがちであるが、ここでは少し角度を変えて見たこれらオルガネラについて説明したい。

我々の身体は約60兆個の細胞から成り立っていると言われているが、そのどの細胞にもミトコンドリアが含まれている。一つの細胞には約500-1000個のミトコンドリアが含まれているから、単純計算すると身体全体では3京個にもなり、更にDNA分子はミトコンドリア当たり3-10であるから、12京分子にもなる。これらは身体全体に均一に分布しているのではなく、その量は組織の機能に対応して増減する。活動性の高い肝臓の細胞は、約3000個の球形のミトコンドリアを含み、すい臓の細胞は更に多数の棒状のミトコンドリアを含んでいる。一方副腎髄質の細胞では数10の小球形のミトコンドリアを含んでいるにすぎない。これらミトコンドリアが我々の身体の隅々にまで分布し、身体を動かしたり、ものを考えたり、聞いたり、食べたり等、身体の活動のエネルギー源であるATPを産生する変換装置として働いている。この様に身体全体を埋め尽くすように分布する多数のミトコンドリアは、もとをたどれば1個の受精卵内に含まれていたミトコンドリアが、細胞の発生とともに分裂増殖し、最終的に組織特有なものとして分化して生じたものである。同様のことが動物細胞のみならず、多細胞藻類、苔、羊歯類そして高等植物についても言える。

下等な藻から高等植物に至るまで、植物も細胞を基本として形成されている。ただ植物細胞では、動物とおなじように細胞核とミトコンドリアを含む他に、光合成を行なう細胞小器官として葉緑体を含んでいる。葉緑体は、葉の形態形成の過程で、独自のDNAを含む原色素体が、分裂増殖しながら分化し、やがて光合成を行なうようになったものである。原色素体は葉緑体の他、アミロプラスト、白色体、有色体（これらをまとめて色素体という）等に分化しうる能力をもっている。

動物、植物細胞でDNAを含む細胞内の小器官は、細胞核、ミトコンドリア及び色素体である。ミトコンドリアと色素体が独自の核（DNA, RNA, 蛋白質複合体）をもち、核分裂を伴いながら分裂増殖することが明確になってきたのは、これから述べる粘菌のミトコンドリアの研究を端緒としてであろう。

核分裂するミトコンドリア

真性粘菌のミトコンドリアは、直径1.5 μ mの球形のものが、卵形、亜鈴形となって分裂増殖する。これはものが増える時のもっとも単純な様式である。ミトコンドリアが1個から2個になるまでの時間、所謂分裂周期は、細胞核と同じ14時間であり、細胞核分裂後1.5時間してから分裂をする（図1 b）。蛍光色素のエチジウムブロミド Ethidium bromide (EB) や4-6-ディアマジノ-2-フェニルインドール 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色し、蛍光顕微鏡で観察すると、生きている細胞内（図2 a, b）や固定した細胞内（図2 c）でミトコンドリア核分裂を容易に観察することができる。電子顕微鏡（電顕）で観察すると、ミトコンドリア内部には、多数の管状のクリステがあり、中心部に電子密度の高い、直径0.25 μ m、長さ0.7 μ mの円柱状のミトコンドリア核がある（図2 d, e）。ミトコンドリア核は繊維性である。これが多数のDNA分子を含んでいること

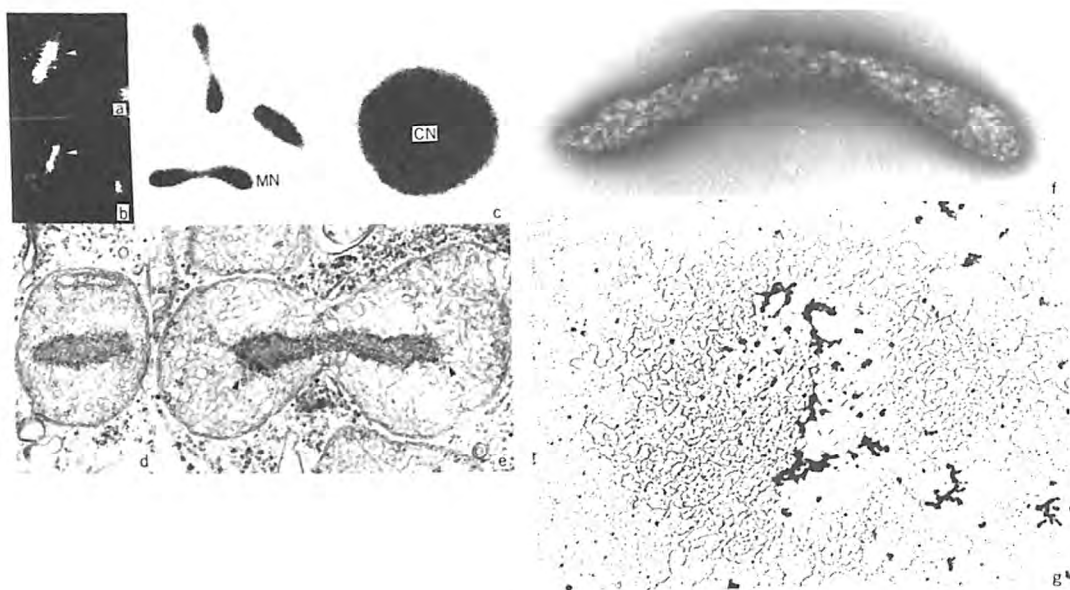


図2 ミトコンドリア DNA のタンパク質による高次構造化の証拠。

a～c：分裂期ミトコンドリアの蛍光顕微鏡写真。aはDASPMI染色，bはEB染色後の暗視野テレビ画像で，矢印で示したものがミトコンドリアである。a，bとも同視野，cはDAPI染色による固定像で，ミトコンドリア核(MN)，細胞核(CN)を示す。d，e：ミトコンドリアの超薄切片像。dはmG₁期，eはmM期。f：単離された分裂期ミトコンドリア核のネガティブ電顕像。g：fをタンパク質分解酵素で処理した後のシャドウイング電顕微鏡像。生きている細胞内で分裂期にあるミトコンドリア核は亜鈴形を示し，電子顕微鏡で観察するとちょうど対応する部分に，電子密度の高い亜鈴形の構造となって現われる。ミトコンドリア核は亜鈴形を保ったまま無傷に単離することができる(f)。タンパク質分解酵素で単離された核を処理すると，沢山のDNA分子が核から徐々に裸出してくるのが観察される(g)。このことから，ミトコンドリアDNA分子は裸で存在しているのではなく，タンパク質によって高次に組織化されていることがわかる。また分裂期には，ミトコンドリア核の両端がクリステと思われる膜の一部と結合しているのがみられる(eの矢印)。

は，無傷に単離したミトコンドリア核(図2 f)を蛋白質分解酵素で処理すると，多数のDNA分子が遊離してくることによって容易に分かる(図2 g)。このミトコンドリア核を解体し続けると，最終的には22 μ mの線状のDNA分子が沢山裸出してくる(図3 a)。詳細な生化学的及び蛍光定量解析によって，1個のミトコンドリア核には，同じ性質のDNA分子が32本と，それを高次に組織化する，分子量32, 39, 41kdの蛋白質が含まれていることが分かった。長さ22 μ mのミトコンドリアDNA分子が32であるから，約700 μ mもの長さのDNA分子が，約0.7 μ mの核の内部におしこまれていることになる。どのように配列されているのか，例えば縦か横かは，未だ明らかでない。しかしこのようにミトコンドリア核においても，「DNA分子が強くおしこまれた核の状態で転写や複製等の機能が遂行されている」ことは，DNAの一般的機能を考える上で最も注目すべきことである。DNA合成の進行とともに，ミトコンドリア核は太さを変えずに長軸方向に伸長する。約1.5 μ mの長さになると中央部分がくびれ，両端が脹らみながら正確に均等2分裂する。この時，既に複製を終えて64となったDNA分子は，32DNA分子ずつ娘ミトコンドリア核に分配される。ミトコンドリア核がくびれ始める直前に，ミトコンドリアの中央部分がくびれを開始し，ミトコンドリア核分裂直後にミトコンドリア自体も分裂する(図2 e)。ミトコンドリア自体の分裂をミトコンドリオリ

が、ミトコンドリアでは、くびれが進んだ時にのみ、分裂面に少し電子密度の高い環が現われる程度で、色素体のそれのように明瞭でない。分裂中のミトコンドリア核の表面をみると、しばしばクリスネシスという。色素体では、色素体自身の分裂に関係した分裂環が分裂面に現われることを発見したテの一部が付着しているのが観察される。これが後で述べるように、ミトコンドリア DNA の分配に関係しているらしい。このような一連のミトコンドリアの分裂過程は、高輝度の DNA 結合蛍光色素 DAPI による染色法の確立と、高感度蛍光顕微鏡の開発により、原生生物、藻、高等動植物等、多くの真核生物でも観察できるようになった。又こうした技術、DAPI 染色、高感度蛍光顕微鏡の開発、TV を用いた VIM 系による蛍光顕微測光法の確立は、今まで細胞核においてのみ観察され、ミトコンドリア、色素体における存在が疑問視されていた DNA を確実に可視化し、又定量化も可能とし、従来の顕微鏡像からもたらされていた細胞についての概念を一変させたと考えている。

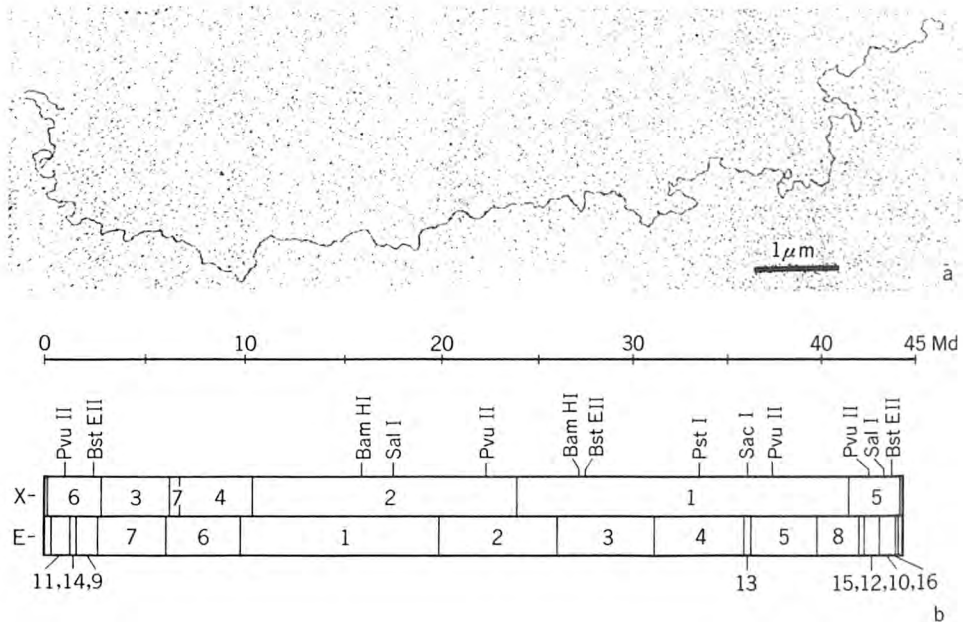


図3 ミトコンドリアDNA分子(a)とその制限酵素地図(b)。
膜との結合部位は *EcoR1* 断片の8番目 (E-8) 末端近くにある。

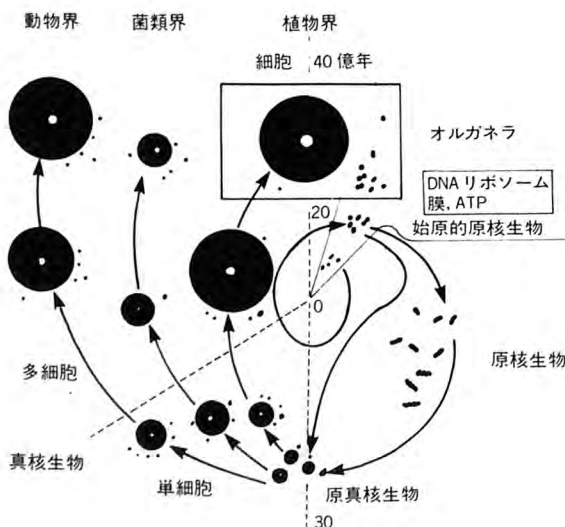
ミトコンドリアと色素体を「原始細胞の生きた化石」としてとらえる

ミトコンドリアの核分裂機構の研究によって、生物の基本的特質である“増殖”の原型の解明に迫りうるのではないかと考えている。どのようなものを生物の原型とみなすかは、現在のところ研究者により多少異なる。しかし基本的には、膜系に包まれ、遺伝子の連鎖系である染色体 (DNA) を持ち、蛋白合成に必要なリボソーム、RNA、DNA の合成に必要な酵素群とエネルギー系としての ATP 等を含んでいる構造体であり、代謝、増殖、遺伝、運動等を行うものであろう。これらの点に関する限り、ミトコンドリアや色素体もバクテリアや高等生物等の細胞自体と同様に、生物の原型として満足する条件を備えているように思われる。又これらはミトコンドリアと色素体が、今から10数億年前に、

原始的な生物が別の生物の細胞質に入り込み、共生関係になって生じたものと考えられている根拠でもある。この点に関しては少し補足説明が必要と思われるので、図4を参照されたい。

生命は約35億年前に発生したと言われている。それから20億年というとても長い時間を経て、生物は細菌、らん藻（シアノバクテリア）、そして原核緑藻のような微細な原核生物（ミトコンドリアと色素体を含まない、核膜がないもしくは未発達な生物、Ancestral Prokaryote...Prokaryote）へと進化した。そして今から約15億年前に好気性細菌が、これらの生物のうちアメーバ状形態を示す、マイコプラズマに似た原核生物（宿主）の細胞質に侵入して共生関係を開始し、やがて宿主の細胞核がもっているものと類似の遺伝子群は消失、もしくは宿主細胞核に移行した。このために、好気性細菌から変化した原ミトコンドリアは、もはや自律的に増殖できなくなり、半自律性のミトコンドリアに変わっていった。こうして原真核生物 (Protoeukaryote) が誕生した。この真核生物を源として、単細胞の原生生物、更に多細胞の動物、菌類へと進化した。植物は、原真核生物が誕生して間もなく、この細胞質にらん藻、あるいは原核緑藻が入り、ミトコンドリアができたのと類似の方法により、共生関係を保ちながら葉緑体になることによって誕生した。葉緑体ははじめチラコイドやグラナなどがあまり発達していない、原色素体のようなものであったと思われる。動物 (Animalia)、植物 (Plantae)、菌類界 (Fungi) はこうして形成されていった。この過程で獲得された生物の多様性と、著しい機能、形態の拡大は、“雌雄”に代表される有性生殖による細胞核遺伝子の組み換えによって、新しい組み合わせの作出がおこり、拍車がかけられたと思われる。こうして多細胞生物 (Multicellular Eukaryote) の細胞核情報 (DNA) は進化とともに多くなり、細胞核は下等な真核生物に比べると、著しく大きくなったと推定される。一方、ミトコンドリアと色素体は、原核生物の形成以後現在まで、生物としての原始的体制を保ちながら、機能的には著しい進化をとげず、生物としての原始的体制を保ちながら細胞に内在している、所謂“原始細胞の生きた化石”と考えることもできる。

図4 原核細胞、真核細胞およびミトコンドリアと色素体のようなオルガネラの相互関係を示す図。



35億年前に発生した生命は、始原的の原核生物となり、原核生物へ進化し、その一部はかなり大きくなった。そのような細胞質に好気性バクテリアが共生し、原真核生物が発生した。これは細胞核情報を蓄えながら高等な動物、菌類へと進化した。植物は、すでにミトコンドリアの形成されている真核細胞に、藍藻もしくは原核緑藻が共生し、やがて葉緑体となったために形成された。こうして現在の動物界 (Animalia)、菌類界 (Fungi)、植物界 (Plantae) ができた。数字は生命発生後の年数 (億年) を示す。これらの生物とオルガネラの共通点は、DNA、RNA、リボソームなどを含み、膜に包まれ、分裂増殖することである。

細胞核染色体とミトコンドリア核染色体の仕分けの機構

生物やオルガネラの持つ基本特性のなかで、我々が最も興味を抱いてきた現象は、「染色体の仕分けの機構」である。DNA と染色体の複製の機構はかなり解明されてきたが、複製された染色体がそれぞれの娘細胞あるいはオルガネラにどのように仕分けされるかは、その現象の普遍性にもかかわらず明らかにされていない。高等動植物の細胞核染色体では、染色体を構成する DNA の一部に特別な分化した領域として動原体があり、その部分に 1 個当たり数10本の微小管が付着し、染色体を両極に牽引する。これほど多数の微小管が必要なのは、その染色体に含まれている DNA 量が 10^{-13} g (3cm) と多いためである。同じ真核細胞の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の最小の染色体では、染色体に含まれる DNA 量は僅か 6×10^{-16} g (0.2mm) で、高等動植物の細胞核染色体の $1/150$ となっている。この場合には、染色体を牽引する微小管の数は 1 本である。ほとんどの真核生物の細胞核染色体 DNA は、DNA—継ぎ手—微小管—膜の順に結合している。核膜の発達していない原核生物の染色体 DNA は 4×10^{-13} g (約 1mm) で、酵母の染色体よりも DNA 量が多いが、微小管はなく、DNA—継ぎ手—膜—細胞壁の順に並んでいる。更に DNA 量が $5 \sim 100 \times 10^{-16}$ g ($5 \sim 60 \mu\text{m}$) と少ないミトコンドリアや色素体の染色体 DNA では微小管はない。この場合には DNA—継ぎ手—膜という結合構成をなし、他の構造は見られない。真核細胞核でも渦べん毛藻類の場合になると、微小管と膜の結合関係は逆になり、染色体 DNA—継ぎ手—膜—微小管となる。しかしこのような微小管のない生物や、ミトコンドリアのようなオルガネラでも、染色体 DNA の均等 2 分配は極めて正確に進行する。このことから、染色体 DNA の分配に関する共通項だけを見ると、分配されるべき染色体 DNA と、膜及びそれらに介在する継ぎ手が、最低限必要であることが分かる。多くの生物の核分裂における微小管は、この継ぎ手と膜の間に発達した、一つの重要な染色体 DNA の両極への牽引構造であろう。

さて、この染色体—継ぎ手—膜の関係を究明するにはどのような方法で解析したら早道であろうか。従来このような染色体の分配に関する研究は、ウニ卵で活発に行なわれていたが、最近では動物培養細胞、酵母細胞、大腸菌で遺伝子工学的方法を積極的にとりいれてなされ、その動原体領域の DNA の解析も進んでいる。しかし未だ染色体 DNA の分配の仕組みは明らかでない。

我々は先に述べたように、極めて原始的な生物の基本的特性をそのまま残していると思われるミトコンドリアや色素体でも、このような「染色体 DNA の分配」の仕組みに関する研究が可能ではないかと考えた。その大きな理由は、染色体の長さが高等生物の $1/50000$ と極めて短いにもかかわらず、複製された染色体 DNA は均等 2 分配されることから、細胞核染色体と同様の分配様式が採られ、しかも全染色体に対する動原体の部分の占める割合が大きいこと、及び均一の 32 本の染色体があることから、動原体部分も均一の 32 対のものが含まれており、解析がし易いと考えたからである。

ミトコンドリアにも動原体様の構造がある

真性粘菌の変形体は、原形質運動の極めて盛んな運動性の高い時期にある。このような時期には、ミトコンドリア当たりの DNA 分子数は 32 から 64 となり、32 分子ずつ娘ミトコンドリアに正確に分配されている。しかし栄養が無くなり始めると変形体の活動性は著しく低くなり、ミトコンドリアの

呼吸活性も落ちる。この時ミトコンドリアはDNAの複製をせずに、3-4度繰り返して分裂しやがて小球形となる。従ってDNA量も少なくなり、量も少ないものでは1個当たり4分子となる。ここで興味深いのは、DNAの量にかかわらず、ミトコンドリア核分裂（DNAの分配）とミトコンドリオキネシスが規則的に起こることである。このことは当然のことながら、ミトコンドリアDNA分子のなかに、分裂に直接関与する部分があることを強く示唆している。

粘菌にDNA分子の変性剤、エチジウムブロミドを投与したところ、奇妙な現象が観察された。処理後24時間経った変形体に、DNAを含まない、無核ミトコンドリアが多数出現していた。無核ミトコンドリアは増殖できず、やがて分解され消滅した。これがどのように出現してくるのかを観察しているうちに、エチジウムブロミドで処理したものでは、ミトコンドリア核が垂鈴形になった娘ミトコンドリアに1個ずつ分配されるのではなく、片方のみに入っていることに気づいた。このことは、エチジウムブロミドがミトコンドリオキネシスを阻害せず、ミトコンドリア核分裂を阻害した結果であると思われる。つまりエチジウムブロミドがDNAの二重螺旋のなかに入り込み、DNAの高次構造を変えてしまい、ミトコンドリア染色体DNA—継ぎ手—膜の関係のうち、染色体と継ぎ手の部分の結合を切り放した結果と推定された。では、このようなことが試験管内で再現できるであろうか。

ミトコンドリア染色体の分配における継ぎ手の役割

ミトコンドリア染色体DNA—継ぎ手—膜の部分をどのように取り出すか。もしDNAが膜と特異的に結合しているのならば、単離したミトコンドリアに色々な物理的破砕力を加え、ミトコンドリアをばらばらにした時に、ミトコンドリア染色体DNA分子の一部だけがミトコンドリア膜分画に含まれてくるにちがいない。そこで粘菌から単離したミトコンドリアに、弱い状態から次第に強い状態の物理的破砕力を加え、各段階で膜に結合しているDNAをCsCl密度勾配遠心にかけて、そのGC含量を調べた。その結果、膜に結合しているDNAは全体の僅か2%程度であるが、明らかに他の部分に比べATに富んでいることが分かった。このことから、ミトコンドリア染色体の特定の部分がミトコンドリア膜に結合していることが示唆された。さらにこのATに富んだDNA領域を制限酵素で詳しく解析し、粘菌ミトコンドリアDNAの物理的地図を作成した（図3b）。ミトコンドリアDNAは制限酵素Eco R1では16の断片に分けられる。破砕力を変えながら、各段階で膜に結合しているDNA断片を調べると、16の断片の内、長い方から4、5および8番目のバンドだけ濃くなっており、最も強く破砕した時では、8番目が最もよく膜に残っていた（■5a-e）。このミトコンドリア染色体DNAの末端部分に近いEco R1の8番目は、僅か3Mdの長さである。この分子領域のどこかに継ぎ手との結合の秘密が隠されているに違いない。

次にこれら膜とDNAの“継ぎ手”となっている物質について調べてみた。まず、膜—継ぎ手—DNA複合膜分画を単離した。これを色々な酵素で処理し、DNAの遊離を調べた。RNA分解酵素処理ではDNAが殆ど遊離しなかったのに対して、蛋白質分解酵素処理では、蛋白質は約10%が膜分画から遊離するだけであったが、DNAは90%以上が遊離してきた。つまり、蛋白質（ペプチド）が継ぎ手として働いていることを示していた。では、継ぎ手はどのような蛋白質であろうか。DNA—継

ぎ手（蛋白質）—膜から膜だけを外すフェネチルアルコール処理を行なうと、膜と継ぎ手の部分ではなれ、DNA—継ぎ手が遊離してきた。この継ぎ手蛋白質を2次元電気泳動法で調べると、DNA—継ぎ手—膜の分画では約70種であったが、継ぎ手蛋白質分画には、分子量20kをはじめ、14種含まれていることが分かった。次に14種の蛋白質の継ぎ手内における分布を大まかに調べるため、膜—継ぎ手—DNA複合膜分画から、DNAを物理化学的に引き離すことを試みた。エチジウムブロミド処理し、ねじれたDNAとともに、継ぎ手の中にある蛋白質が出て来ることを推定した。蛋白質を調べてみると6種あり、驚いたことにはこの全てが、フェネチルアルコール処理の時に遊離してくる、14種の蛋白質の中に含まれているものであった。このことは、膜分画に含まれる継ぎ手に関係した蛋白質のうち、ある種のものは膜に極めて近いところに、ある種のものはDNAに隣接したところに存在していることを示唆している。つまり継ぎ手と考えられる蛋白質が幾つかあり、これらが特定の位置を占めることによって機能しているらしい。実際に継ぎ手の部分を破壊するエチジウムブロミドやフェネチルアルコールで細胞を処理すると、ミトコンドリア核分裂の障害が起きた（図5 f—k）。現在この継ぎ手に結合する領域のDNAの塩基配列の決定、及び継ぎ手となる蛋白質の同定と局在の解明を急いでいる。

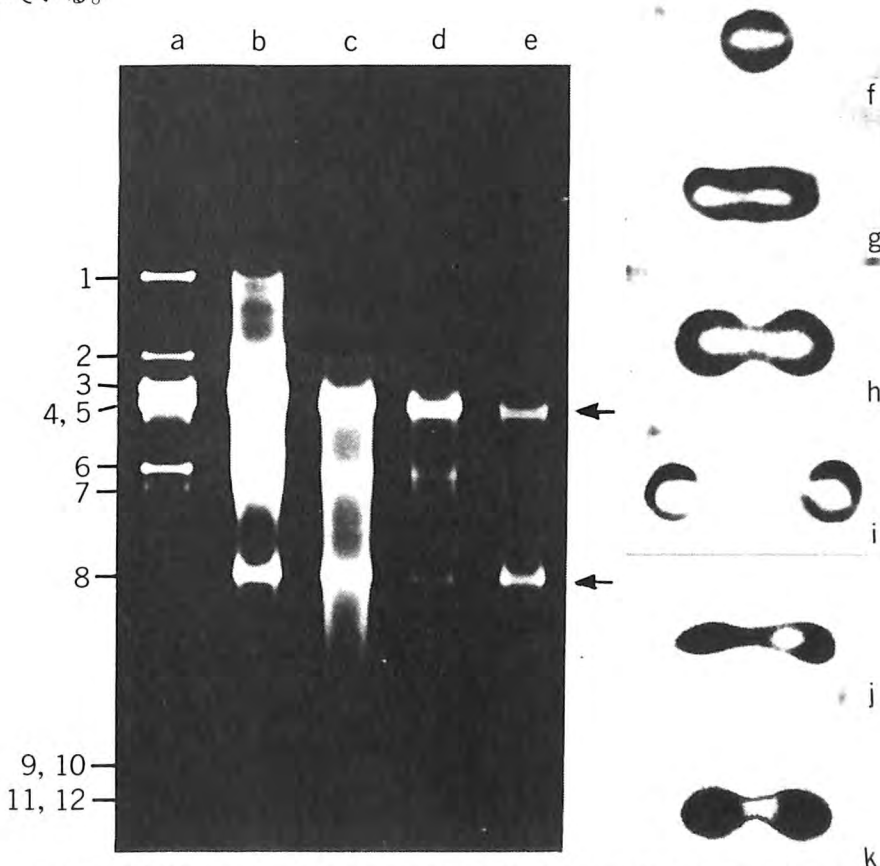


図5 いろいろな物理的力によって破碎された粘菌ミトコンドリア膜分画から得られたDNAの、制限酵素 (*EcoRI*) による切断パターン (a~e)。aは無傷のミトコンドリアDNAの切断パターン。eからeへと破碎力が強くなるにしたがって、4, 5と8番目のDNA断片 (矢印) が多く得られてくる。輝度の比から、8番目が膜によく結合していると推定される。ミトコンドリアの分裂過程を示すDAPI蛍光位相差像 (f~k)。ミトコンドリア核は強い蛍光を発する棒状の構造を呈する。EB未処理 (f~i) では、ミトコンドリア核は均等に分配される (f) が、処理すると (j, k)、ミトコンドリア核は垂鈴形の娘ミトコンドリアの一方 (j) や中央部分に残される (i)。

ここでは述べなかったが、粘菌のミトコンドリアで解明されてきた諸問題に対する解答を高等植物を含む多くのミトコンドリアや色素体へ応用し、多くの点で共通性を得ている。今や「ミトコンドリアと色素体の DNA は裸で存在するのではなく、独自の蛋白質と結合し、高次な核構造をとっており、分裂に際して、原始的（？）な分裂装置を使いながら、娘オルガネラに2分配されること」は確かなことと言えよう。こうしたオルガネラの核分裂の機構の研究は、単に細胞内オルガネラの増殖機構の研究にとどまることなく、細胞そのものの増殖、即ち生物学の基本的問題である「染色体の分配もしくは仕分け」の分子機構の解明にもつながるのではないかと期待している。

さて、ミトコンドリアと色素体 DNA が、オルガネラ内に分子として裸で存在するため、光学顕微鏡レベルでも電子顕微鏡レベルでも、観察する事は不可能なことという概念が長い間支配していたが、これらの DNA が組織化され核構造をとっているとなると顕微鏡での観察も可能になり、また細胞学的アプローチの中が広がって、新たな研究への道につながった。その例がこれから述べる母性遺伝の研究である。

細胞内の DNA を含む3器官のうち、ミトコンドリアと色素体が細胞核と著しく異なる点の一つある。細胞核内の DNA の遺伝子セット（ゲノム）は、殆どの場合両親から1セットずつ受精を通して受け継がれたものであるが、ミトコンドリアと色素体の形質は全て母親からだけ伝達されており、父親からのものはない。この現象を母性遺伝という。我々の身体を埋め尽くし、活動の全てを支配しているミトコンドリアの遺伝子も、我々の「食料」の源であるデンプンを生産する、植物の色素体の遺伝子も、全て「母性遺伝」により母から子に伝達される。何故であろうか。過去9年の後半では「ミトコンドリアと色素体の核分裂の機構」を研究すると共に、この「母性遺伝の機構」の解明に全力が傾けられた。

母性遺伝の細胞機構の発見

1909年、コレンスがオシロイバナで母性遺伝現象を発見してから約80年経つ。この間に、この現象が高等植物だけでなく、菌類、藻類そしてヒトを含む動物でもおこる、高い普遍性を示すことが明らかとなった。しかしどのような仕組みで、このミトコンドリアと色素体の遺伝が起きるかに関する研究は極めて少ない。一般に知られている説は、卵細胞は大きく、沢山のミトコンドリアや色素体を持つが、精子は殆ど持たず、仮に持っているとしても少なく、それは受精後の受精卵が分裂を繰り返すうちに、除去されてしまうというものであった。その結果、子に伝達されるのは母方の形質だけであり、従って母性遺伝が起こると信じられてきた。しかしこれらの説はほとんど実証のないものであった。1954年セガーは、単細胞緑藻の同型配偶子生物クラミドモナスでも、母性遺伝が起こることを示した。1970年代、この現象の説明をめぐる、ギラムとセガーの二つの研究室が、遺伝学的方法と生化学的方法を用いてそれぞれ異説を立て激突していた。現在では彼等が呈示した説はともに完全に否定されている。

一方我々は200種以上の生物のミトコンドリアと色素体 DNA の高次構造化を調べ、クラミドモナスの葉緑体 DNA も、他の生物と同様に高次に組織化された核構造をとっていることを、高分解能蛍

光顕微鏡法で明らかにしていた。従って、母性遺伝の機構として、雌雄配偶子の接合後、雌由来の葉緑体 DNA が選択的に増えるにしても、又雄由来の葉緑体 DNA が選択的に減少するにしても、容易に観察できるに違いないと考えた。これに気付いた時には、もうクラミドモナスは手元になかったので、たまたま別の実験に使って残っていた同型配偶子藻のカサノリ (*Acetabularia calyculus*) を使った。雌雄の配偶子が接合すると間もなく、両親由来の細胞核はお互いに融合し、1 個の受精核となった。しかし葉緑体では、片親由来の葉緑体核 (DNA) が完全に消失し、もう一方の親由来のものはそのまま残っていた。次に材料を、雌雄性がはっきりしているクラミドモナスに変えた。クラミドモナスでも、雌雄の配偶子が接合すると、僅か40分で雄由来の葉緑体核が選択的に消失し、雌由来のものはそのまま残ることを観察した。これが細胞質遺伝 (母性遺伝) の細胞機構の発見である。1981年12月31日の夜中のことであった。その後、雄配偶子由来の葉緑体核の選択的消化がクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) 以外の他の生物でも起きるかどうかなを調べた。同型配偶子生物カサノリ (*Acetabularia calyculus*)、キッコウグサ (*Dictyosphaeria cavernosa*)、ヒトエグサ (*Monostroma latissimum*)、異型配偶子生物ハネモ (*Bryopsis maxima*)、シダ、多くの高等植物等で調べた。これまで調べたほとんどの生物で、消化の時期的差はあれ、接合子内における片親配偶子由来の葉緑体核の選択的消化は起こっており、真核生物に共通の現象であることが分かって来た。ではどのような機構で「選択的消化」は起きるのであろうか。この現象の普遍性の証明とともに、その機構を細胞と分子のレベルで解析するための研究プロジェクトを発足させた。材料として、培養が簡単であること、母性遺伝に関する突然変異体が得易い等の理由で、これまでどおり主にクラミドモナスを用いた。

母性遺伝には DNA 分解酵素が必要

クラミドモナスの雌雄の配偶子とも、2 本の鞭毛、鞭毛の基部に数個のミトコンドリア、中央に1 個の細胞核、鞭毛と反対側に1 個のカップ形をした葉緑体を含んでいる。DNA に特異的に結合する蛍光色素 DAPI で染色すると、細胞核の他に、葉緑体内に6—8 個の小球形の葉緑体核が観察される。蛍光顕微鏡法で調べると、1 個の葉緑体核内に7—10の葉緑体 DNA 分子が含まれていた。従って1 個の葉緑体には、約50—80の葉緑体 DNA 分子が含まれていることになる。雌雄の配偶子の接合後僅か40分で、雄配偶子由来の葉緑体核は完全に消失した。一方雌配偶子由来の葉緑体核はそのまま残った (図6)。そこで葉緑体核の選択的消化の機構を生理学的にさぐるには、接合後40分の間に、蛋白質合成阻害剤、RNA 合成阻害剤等を投与し、選択的消化がおこるかどうかなをみればよい。DNA 分解酵素の阻害剤である ATA, EB を与えると、葉緑体核の消化が完全に阻害された。このことから、細胞学的に観察される葉緑体核の消失は、技術的あるいは細胞の生理学的条件が原因で生じるのではなく、明らかに DNA 分解酵素による DNA の分解によるものと考えられた。では、どのような性質の DNA 分解酵素であろうか。葉緑体核は、消化がはじまると僅か10分で完全に消化されてしまうこと、EDTA よりも EGTA の存在下で葉緑体核の消化が阻害されることから、制限酵素のようなものではなく、 Ca^{++} 要求性のヌクレアーゼであると考えた。そこで接合子から酵素を分離した。細胞内における作用時の pH, Ca^{++} 濃度から判断して、実際に働いているのは、分子量 26kd のヌクレアー

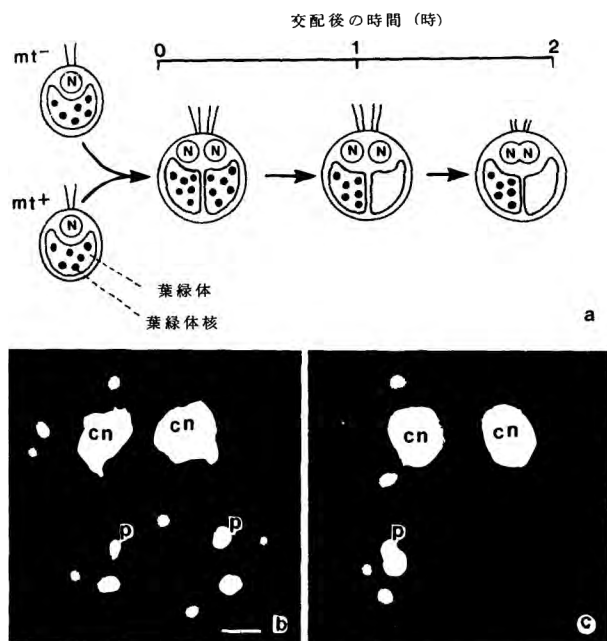


図6 クラミドモナス葉緑体DNAの母性遺伝の細胞機構を示す模式図(A)と雌雄配偶子の接合後10分(B)、40分(C)における接合子内の細胞核(cn)と葉緑体核(p)を示す蛍光顕微鏡写真。

雌(mt^+)雄(mt^-)配偶子の接合後10分では、雌雄配偶子由来の葉緑体核は消失しないが、40分すると、1個の葉緑体当たり8~10個ある雄由来葉緑体核のすべてが消化され(Aのcontrol, Cの右半分)、雌由来葉緑体核はそのまま残る(Aのcontrol, Cの左半分)。したがって、子に伝達されるのは雌由来葉緑体DNA(遺伝子)だけということになり、母性遺伝子が記さる。スケールは1 μm 。

ゼCと判断した。この酵素を分離して、ヌクレオチド分解特性を調べると、エンドとエキソヌクレアーゼ活性をもっていることが分かり、葉緑体核の早い分解が説明できた。この酵素液にモデル雌雄配偶子(細胞構造は残っているが死んでいる)を入れると、雄配偶子内の葉緑体核だけが消失し、雌配偶子内の葉緑体核は消失しなかった。

母性遺伝子の分子機構……能動消化説

一般に、各種分解酵素はライソゾームに含有されていることが知られている。クラミドモナスで、ヌクレアーゼCがライソゾームに含まれていることは未だ証明されていない。が、このような酵素が働くためには蛋白質が必要であろうと考えた。また雌雄配偶子の接合後、極めて多量の粗面小胞体が発達して来ることから、新たに合成される蛋白質が葉緑体核の選択的消化に関与している可能性があった。そこでこの蛋白質がどのような分子であるかを知るため、各種生理学的阻害剤、UV、突然変異体等を用い、 ^{14}C ロイシンと ^{35}S メチオニンの取り込みによる2次元電気泳動法で、葉緑体核の消化阻害と、非合成の蛋白質(ポリペプチド)との相互関係を調べた。その結果、接合後30分以内に合成される約200種の蛋白質のうち、消化に直接関係している5種(MW 94kd, 94kd, 94kd, 50kd, 48kd)が発見された。アクチノマイシンDで処理すると、これらの蛋白質の合成は起こらず、選択的消化も起こらなかった。このようなことから、これらの蛋白質が細胞質で合成されるためには、新たに合成されるRNAが必要と推定された。

葉緑体核を消すことに関与する RNA が、雌雄どちらの細胞核から出されるのかを、UV 光の作用スペクトル、阻害剤、突然変異体を用いて調べた。接合直前の雄配偶子を UV 照射し、UV 照射していない雌配偶子と交配する。この逆をも行う。その結果極めて明瞭に、雌配偶子を UV 照射したときのみ、選択的消化が阻害された。またこの消化阻害の作用スペクトルは完全に核酸の吸収スペクトルと一致した。更に消化を起こせない雌配偶子の突然変異体を分離することに成功した。雄葉緑体 DNA の消化を起こせないものでは全て、上に述べた蛋白質は合成されていなかった。以上のことから、接合子内における雄配偶子由来の葉緑体核の消化に関与する RNA は、雌由来細胞核内で合成されると結論した。現象の普遍性の確証のために、選択的消化に関与している蛋白質の遺伝子の検索を開始している。

このような一連の考えをまとめて「母性遺伝の能動消化説」として発表した (図 7)。

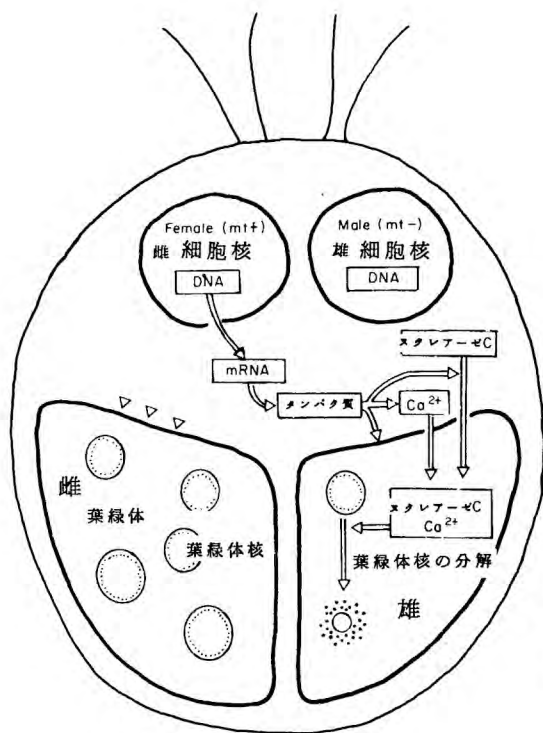


図 7 若い接合子中の葉緑体 DNA の母性遺伝機構の能動消化説に基づく模式図。
雌配偶子 (△) は配偶子形成の間、雌葉緑体 DNA をとりまく領域を変化させることによって、ヌクレアーゼ C に対する葉緑体 DNA を保守する能力を得る。雌雄配偶子の接合直後、mRNAs が、接合子中の雌由来の細胞核中で合成される。その後 mRNAs によってコードされた蛋白質が細胞質中で合成され、直接的あるいは間接的にヌクレアーゼ C を活性化する。ヌクレアーゼ C は雄由来の葉緑体 DNA を選択的に消化する。雌由来の葉緑体 DNA はそのまま残り、子に伝えられ、母性遺伝子が行われる。

母性遺伝……非遺伝子組み換えの仕組みとその意味

母性遺伝の研究が進むのと並行して、母性遺伝が何故生物にとって必要であるのか、つまりその意義はなにかということが新たな研究課題となった。これには幾つかの考え方があろう。色素体の塩基配列を、下等から高等な真核生物に至るまで調べてみると殆どちがいが無いという。生物にとって、効率よいエネルギーの獲得法の確保は、最も重要であり、基本的な生存条件の一つであろう。この方

法が遺伝子の組み換えによって次々に変わって行くとしたら、生物にとって非常に不利であったに違いない。そこで、遺伝子の組み換えを起こさないような母性遺伝の機構が発達したとも考えられる。もしそうであるなら、細胞核内の遺伝子にも、同じように遺伝子の組み換えを起こさないような機構があるに違いない。細胞核染色体の rRNA の遺伝子についても、下等から高等な真核生物に至るまで、その塩基配列は色素体 DNA のそれと同じように、生物種による基本的差が殆どないという。そこで、rRNA の遺伝子の減数分裂過程における挙動を追跡した。

細胞核の rRNA 遺伝子領域におけるリング構造の形成

昔からコウボキンとして知られている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、非常に多くの研究者により遺伝学、生化学、発酵学などさまざまな分野で使われている材料にもかかわらず、細胞核染色体が非常に小さいこと、又明瞭な分裂像を示さないことから、100年来、染色体数の決定がなされていなかった。しかし新たに開発した蛍光顕微鏡や DAPI 蛍光色素の使用により、その染色体数が16本であることをつきとめた。そしてそのうち最も大きな染色体を核小体染色体として同定した。次にこの染色体の rRNA 遺伝子に注目し、その挙動を調べた。その結果、減数分裂期の他の遺伝子領域がシナプトネマルコンプレックスを形成し、遺伝子の組み換えを起こしている時に、この rRNA の遺伝子領域だけは、両親由来の染色体がお互いに反発し、リング構造を形成していた。これは、遺伝学的にみた rRNA の遺伝子領域が組み換え率において極めて低いという事実と一致している。また、組み換え率の低さは、rRNA の遺伝子の塩基配列が、下等から高等な真核生物に至るまで共通性の高い説明ともなろう。リングの形成現象は、酵母だけでなく、これまで調べた多くの菌類にも見つかって来ており、母性遺伝現象とともに、生物にとって最も必要な遺伝子を保守する機構の一つなのかもしれない。母性遺伝現象の分子レベルでの解析と同様に、リング形成の分子レベルでの解析が待たれるところであろう。

二つの代表的研究に焦点を絞りながら、過去9年の研究の成果を述べてきた。研究の新しい展開が、木の太い主軸から分枝するように、幾つか産まれたのは幸いであった。今思うと、思いがけない現象の展開や発見には、専門が異なる研究者との出会いが重要であった。そのような意味で、我々の研究を支えてくれたのは、これまで出会った多くの共同研究者であった。共同利用の研究所であるからこそ、このような研究者にもめぐりあえたのではないかと感謝している。過去9年間は研究者としてよりも、むしろ人間としての斗いでもあったが、多くの優れた同僚研究者にめぐり会うことができたのもたしかである。現象の発見にはあまり費用がかからない。しかしその解析には莫大な研究費と、多くの研究者が必要である。これから先を考えると、岡崎にはじめて来た時とおなじように、責任の重大さと大きさを痛感せざるを得ない。

この文章は、忙しい2月末に少しずつ書いたせいもあって、筆をおく頃になると、白梅もすっかり花をつけ終えたように見える。毎年沢山の実をつけるような安定した大木に蘇ることを願いながら終わりとしたい。

本稿の一部には昨年6月「科学」に書いた部分を引用している。

(細胞機構研究部門教授)