フジテレビジョン賞

細胞機能を維持するペルオキシソームの

分裂装置(リング)の発見

~ゲノム科学が拓く、ナノ構造の分裂装置が制御する単膜系オルガネラ増殖分子機構解明~

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 博士課程3年

井元 祐太

1. 緒 言

ほとんどの真核生物は1個の受精卵が 細胞分裂を繰り返し形成されたものであ り、ヒトでは約60兆個の細胞から構成 されている。生命の基本単位である一つ の細胞内は、遺伝情報の保存と伝達を担 う細胞核に加え、重要な細胞活動を担う、 DNA を含む二重膜に包まれた2種の複 膜系オルガネラ(ミトコンドリア、葉緑 体(植物のみ))と、DNA を含まない単 膜に包まれた4種の単膜系オルガネラ(ゴ ルジ体、小胞体(ER)、リソソーム、ペ ルオキシソーム)から構築されている(図 1)。細胞機能の中心は、生命維持と運動 エネルギー生産を担う複膜系のミトコン ドリア、葉緑体と単膜系のペルオキシ ソームである。これらのオルガネラは分 裂増殖し[1.2]、20億年前の真核細胞誕 生以来、今日まで細胞分裂の際に娘細胞 へと受け継がれてきたと考えられてい る。ミトコンドリアと葉緑体に関しては 分裂装置 (リング) である Mitochondrialdividing(MD) machinery 及び Plastiddividing(PD) machinery の構造が発見 され、分裂の分子機構が明らかになって きた(図2) [3-7]。

一方で DNA を含まない単膜系オルガ ネラのペルオキシソームの分裂機構につ いては研究が少なく全く明らかでなかっ た。ペルオキシソームの基本的な機能は、 生物の3大栄養素の一つである脂質の代 謝や生命活動の際に必ず生じる有害な活 性酸素の除去である[8]。さらに、ヒト などの高等動物では、脳の神経細胞膜を



図1 真核細胞の基本構造



図2 ミトコンドリア、葉緑体の分裂装置 バクテリア由来である FtsZ リングが、分裂初期に内 膜の内側に形成される。MD、PD リングは電子密度 の高い構造体として観察され、外膜の内側 (図では省 略) と外側に形成される。ダイナミン Dnm1 (葉緑体 の場合は Dnm2) 分子が MD ring(葉緑体の場合は PD ring) の繊維間で滑り込み運動を行うことにより装置 は収縮し包膜の収縮が行われる。分裂の最終段階であ る膜の分断にはダイナミンが機能する。

構成し、その根本的な機能を制御しているプラスマローゲンの合成を行う。また、陸上植物 では種子の発芽に必要なエネルギーを供給し、菌類ではペニシリンなどの抗生物質の合成に 関与するなど、ペルオキシソームは地球上のすべての生物の生存を支えている重要なオルガ ネラである[9]。その分裂障害はペルオキシソーム病などの重篤な疾患や代謝異常、アルツ ハイマー型認知症と関係していることから、Rhodin や De Duve らによって1967年にペル オキシソームが発見されて以来[10, 11]、数多くのモデル生物を使って分裂に関する研究が 盛んに行われてきた。しかし、 ヒトなど高等動植物の細胞で は、1個の細胞当たりにペル オキシソームが数百から数千 あり、大きさも小さく、しか もそれらがランダムに増える ため(図3A)、遺伝学的な解 析に留まっていた。そのため、 ペルオキシソームの分裂機 構、特に分裂の中心的役割を 担う分裂装置の構造は半世紀 に渡って全くの未知であり、 その全貌解明は急務の課題で あった。

そこで、著者らは*Cyanidi*oschyzon merolae(シゾン) に着目した。シゾンは高温 (45°C)、強酸性(pH1.5-2.5) の極限環境に生息する原始紅 藻で、1) 一細胞あたりに一 つのペルオキシソームを含み (図3B、C)、2) 光明暗周期



図3 ヒトとシゾンの細胞構造

- A ヒトの細胞におけるペルオキシソーム(赤)と細胞核(青)の位相 差蛍光像
- B シゾンのペルオキシソーム、及び他のオルガネラの位相差免疫 蛍光像
- C シゾンの細胞構造のモデル

シゾンは単一の細胞核、ミトコンドリア、葉緑体 (色素体)、ペルオ キシソーム、ER、ゴルジ体、2~3個のリソソームを含む。DAPI: DNA 染色像、CN: Cell nucleus、MN: Mitochondrial nucleus、PN : Plastid (chloroplast) nucleus、ER: Endoplasmic reticulum、Scale bars = 1 µm.

によってオルガネラの分裂を同調化でき、3)細胞壁が未発達なためオルガネラの単離が容易であるなど、本研究を進めるのに極めて有利な特徴を持っていた。また、ゲノムが完全解読されており、タンパク質遺伝子数は4775個と非常に少ないため質量分析機(MALDI-TOF MS)によるタンパク質の同定が容易である。増殖など基本現象に関わる重要な遺伝子はヒトやイネなどの高等動植物にまで保存されており、真核生物の「基」となるモデル生物であった[12, 13]。

本研究の目的は、ペルオキシソーム分裂装置の構造を同定し、その動作機構を解明するこ とであった。

著者らは、上記のシゾンが持つシンプルな生物学的特徴を最大限に利用し、以下のことを 明らかにした。(1)分裂期ペルオキシソームの単離技術を開発し、MALDI-TOF MS とゲノ ム情報によってナノサイズのリング構造であるペルオキシソーム分裂装置 Peroxisome-dividing (POD) machinery を世界で初めて発見した。(2)分裂期ペルオキシソームから、in vivoの状態を保ったまま POD machinery を単離することに成功した。その微細構造を解析 した結果、装置の正体はダイナミン Dnm1を含む糸状構造 Dynamin-based (DB) ring と、そ の内側に形成され、装置の骨格となる繊維構造 Filamentous (F) ring の二重構造であった。(3) POD machinery の機械的仕組みを調べるために、DB ring と F ring を人工的に乖離、分岐 させ、微細構造をホールマウント免疫電子顕微鏡法・ネガティブ染色法によって解析した。 装置の収縮力発生機構は F ring ではなく DB ring に備わっていることが分かった。(4) DB ring による収縮力発生には、その糸状構造に含まれるダイナミン Dnml 分子が必須であった。 (5) ペルオキシソーム分裂の前半 (分裂面の収縮) では DB ring が発揮する収縮力が内側の F ring に伝わり装置を収縮させ、後半 (包膜の分断) では F ring が分解され DB ring がペルオ キシソーム膜へ直接作用して膜分断を行う。このような POD machinery による2段階での 制御によって、ペルオキシソームの分裂が行われていることが明らかになった[14]。

2. 材料と方法

(1) ペルオキシソームの大量高度分裂同 調培養系の開発

12時間明暗周期で同調培養を行ったシ ゾンのペルオキシソームの分裂過程を、免 疫蛍光顕微鏡法によって調べた結果、葉緑 体とミトコンドリアの分裂後に、ペルオキ シソームが2分裂することが分かった(図 4)。しかし、この期間は非常に短く、ペル オキシソームの分裂同調率が2%未満と極 めて低かった。そこで阻害剤を用いた同調 を検討した。図4に示したように、分裂期 のペルオキシソームは両端が娘ミトコンド リアと物理的に結合している[15.16]。娘 ミトコンドリアの娘細胞への分配とペルオ キシソームの分裂は協調的に進む。娘ミト コンドリアの分配は微小管の働きによって 行われるため[17.18]、微小管重合阻害剤 であるオリザリンで細胞を処理すること で、ペルオキシソームの分裂速度を著しく 遅延させることが可能となった[18]。結果 として、光の明暗とオリザリンを用いた系 により、ペルオキシソームの分裂同調率が 約40%まで上昇している細胞培養液を得 ることができるようになった。



図4 細胞周期におけるペルオキシソームとミ トコンドリアの位相差免疫蛍光染色像と分裂過 程のモデル

PC:位相差像、Mito:ミトコンドリア、Po:ペル オキシソーム、Nu:細胞核、Chl:葉緑体、Sp:紡 錘体極、MTs:微小管、Scale bar = 1 µm.

(2) 分裂期ペルオキシソーム単離法の開発

この大量高度分裂同調培養系を用いてペルオキシソームを分裂期に同調させたシゾン培養 液から、分裂期ペルオキシソームをミトコンドリアと葉緑体との複合体として単離した(図 5A)。この複合体の画分に対して、低調処理と低濃度の非イオン性活性剤による処理で、ミ トコンドリアと葉緑体を選択的に破砕・乖離した画分を得た。これを遠心操作によって純化 し、ペルオキシソームのみを含む画分を得ることに成功した(図5B)。ペルオキシソームの マーカーである、抗カタラーゼ抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡法によって、この画分を観察し たところ、分裂時の形態を保ったまま無傷に 単離されていることが分かった(図5C)。

(3) ホールマウント免疫電子顕微鏡法・ネ ガティブ染色法による POD machinery の 超微細構造の動作機構解析

単離した POD machinery に抗 Dnm1抗体 を結合させ、次にそれらに金粒子(直径 15nm)を含む抗体を反応させた。SDSと Ureaを微量含んだ溶媒を考案し、これによっ て POD machineryを処理し DB ringとF ringを乖離・分岐させることが出来た。こ れをニッケルメッシュにマウントし脱水した のち、高い分解能が得られるネガティブ染色 法を行い透過型電子顕微鏡によって微細構造 を観察した。



図5 単離された分裂期ペルオキシソーム PC:位相差像、Mito:ミトコンドリア、Po:ペル オキシソーム、Scale bar = 1 µm.

3. 結果・議論

(1) ペルオキシソーム分裂装置の同定

2章で述べたペルオキシソームの大量高度分裂同調培養と単離法に基づき、分裂期ペルオ キシソームを大量に単離した。MALDI-TOF MSによって解析した結果、カタラーゼ等と 共にダイナミン Dnm1が含まれていることが分かった。Dnm1は、MD machineryの構成タ ンパク質として知られている[19]。しかしイムノブロット解析によっても、Dnm1はミトコ ンドリアを含む画分に加え、分裂期ペルオキシソーム画分にも非常に濃縮されていることが 分かった。一方、Mda1やFtsZ1、FtsZ2、Dnm2といったミトコンドリア、葉緑体分裂タ ンパク質はペルオキシソーム画分に含まれておらず、Dnm1のみがミトコンドリア分裂に加 えて、ペルオキシソーム分裂にも関与することが予測された。

そこで、免疫蛍光染色法により Dnm1の局在解析を行った。その結果、Dnm1はミトコン ドリア分裂後に細胞質に複数の点状の局在として観察され、その後ペルオキシソームの分裂 面に集められ局在することが分かった(図6)。また、Dnm1が局在していたペルオキシソー ム分裂面を超薄切片の透過電子顕微鏡観察によって解析したところ、分裂面には電子密度の 高い構造体が形成されていることが明らかになった。分裂面に対して平行に近い角度の切片 では、直径約200nmのリング状構造の存在が明らかになった(図7)[14,20]。この構造の正 体を明らかにするため、単離した分裂期ペルオキシソームの免疫蛍光、及びホールマウント 免疫電子顕微鏡解析を行った。その結果、分裂面に Dnm1の局在が保たれたままペルオキ シソームは単離されており(図8A)、Dnm1でラベルした金粒子は分裂面の構造に集中して いることが分かった(図8B)。膜を低濃度の界面活性剤で部分的に溶解したところ、直径約 300nmのリング状構造体 POD machinery を得ることに成功した(図9)。



図6 Dnm1の分裂期ペルオキシソーム における局在 PC:位相差像、Po:ペルオキシソーム、 Enlarged:Merge 像の拡大、Bars:1µm.



図8 単離された分裂期ペルオキシソームにお ける Dnm1 の局在

- A 免疫蛍光像
- B 免疫電子顕微鏡像と分裂面の拡大像

PC:位相差、Po:ペルオキシソーム、15nm 金粒子 : Dnm1、Bar = 1 µm(A)、100nm(B).

図9 膜を部分的に溶解した単離分裂期ペルオ キシソームの電子顕微鏡像

- A ペルオキシソーム包膜とリング状構造体の電子 顕微鏡像
- BA 赤枠拡大像 リング周辺に抗 Dnm1 抗体でラベ ルされた15nm 金粒子が局在している。

CA 白枠拡大像 膜の溶け残り部分に抗カタラーゼ抗体でラベルされた10nm 金粒子が局在している。 Bars = 200nm(A)、50nm(B and C).



図7 分裂期ペルオキシソーム超薄切片 TEM 像

A 分裂面に対して垂直方向の切片像との 拡大像

B 分裂面に対して平行方向の切片像

黄矢印:分裂面に形成される高電子密度構 造体、Bar = 50nm(A)、200nm(B).



(2) ペルオキシソーム分裂装置の単 離と微細構造解析

前節で得られたリング状の装置 POD machinery の動作機構を明らかにす るため、それを単離し装置の微細構造 を明らかにする必要があった。そこで 次に、微量の界面活性剤処理を短時間 行うことで、膜を完全に溶解しPOD machinery を純化した。純化された POD machinerv は位相差では微かに 観察され、免疫蛍光染色ではリング状 に沿って Dnm1 が局在した (図10A)。 POD machinery は、MdalやFtsZ1、 PDR1といった既知のミトコンドリア や葉緑体分裂タンパク質では染色さ れなかった。また、純化された POD machinery の画分は分裂期ペルオキシ ソーム画分に比べ MALDI-TOF MS で検出される Dnm1のバンドが濃く なっていた (図10B)。よって、*in vivo* の状態を反映した POD machinery が 単離されていることが明らかとなっ た。抗 Dnm1 抗体で染色された POD machinery のリング幅は直径が小さく なるほど太くなり、Dnm1の蛍光輝度 の総量は直径に関わらず一定であった (図10C)。従って、POD machinery の収縮過程を通して Dnm1 は分解さ れずに常に一定量含まれていると考え られる。そのため POD machinery は Dnmlのみで構成される装置であると 考えられた。しかし、ホールマウン ト免疫電子顕微鏡法によって微細構 造の解析を行ったところ、抗 Dnml 抗体でラベルされた金粒子はPOD machinery の繊維から約20nm の距離 に局在し(図11A)、リングは部分的に 乖離し易く、Dnmlを含む糸状構造の dynamin-based(DB) ringと、その内 側に形成されている Dnmlを含まな い繊維状構造の Filamentous (F) ring



図10 単離された POD machinery

- A POD machinery の免疫蛍光像
- B POD machineryの純度検定 分裂期ペルオキシ ソーム画分(左)とPOD machinery 画分(右)のSDS PAGE。
- C 抗 Dnm1抗体で染色された POD machinery の直径に 対するリング幅と Dnm1蛍光輝度の総量との相関
- PC:位相差、Po:ペルオキシソーム、Bar = 500nm



図11 POD machinery の免疫電子顕微鏡像 A 単離した POD machinery と一部の拡大像 B 乖離した DB ring と Filamentous ring 黄色矢印:15nm 金粒子:Dnm1、Bars = 200nm(A)、50 nm(A 拡大像、B)

が存在することが分かった(図11B)。以上の結果から、POD machineryの正体は DB ring と F ring の2重構造から成る複合装置であることが明らかになった。

(4) POD machinery の収縮機構解析

前節において、POD machinery が DB ring と F ring の二重構造であることが明 らかとなったが、ではどちらの構造が装置 の収縮力を発生させているのだろうか。そ こで0.2% SDS と20mM Urea を含む溶媒 によって POD machinerv を一定時間処理 し人工的に DB ring と F ring を 強く 乖離 させ、2種類の構造を分岐させた。その結果、 分岐させた DB ring の先端部位は F ring 側に向かって渦巻き状に構造変化を起こす ことが分かった。 一方、 Fring は 構造変 化せず、直線状に伸びた構造を示すことが 分かった。(図12A)。よって、DB ring が 収縮力の発生に重要であると考えられる。 この結果は、アンチセンス法を用いて DB ringに含まれていた Dnmlを発現抑制す ることによっても検証された。Dnml発現 抑制下では Dnm1 で染色される DB ring は分裂面に形成されなかった (図12B)。こ のとき、ペルオキシソームの収縮は阻害さ れ、肥大したペルオキシソームも見られた (図12C)。以上の結果から、POD machinery の収縮力を発生させているのは F ring ではなく、ダイナミン Dnmlを含んだ DB ring であることが分かった。



図12 DB ring の機能解析

- A 分岐させた DB ring(黄色矢印)の構造変化(赤矢印)と F ring(白矢印)、分岐点(青矢印)。
- B Dnm1発現抑制下におけるダイナミンの局在。
- C Dnm1発現抑制下におけるペルオキシソームの直 径。

15nm 金粒子:Dnm1、Scale bars = 50nm(A)、1µm(B)

そこで、POD machinery の収縮機構をさらに検討するために、装置の動作機構が明らか にされている PD machinery や MD machinery(図13A)との比較を行った。DB ring に含ま れていたダイナミン Dnm1 は、直径に関わらず、リング外周から20~30nm の距離に局在し た(図13B)。一方、Dnm1 のホモログであり PD machinery に含まれるダイナミン Dnm2は リングの繊維構造と密着しており、収縮が進むと一部は繊維の内側へ局在していた(図 13B)。これは、PD machinery では繊維間で Dnm2分子が滑り込み運動を行いリングが収縮 力を発揮するためであると考えられる[21]。MD machinery も同様の収縮機構であること が示唆されている[19]。従って、POD machinery は PD、MD machinery とは異なり、ダ イナミン Dnm1を含む DB ring が外側からの力によって収縮力を発揮する構造である。F ring と DB ring を人工的に乖離、分岐させた際に、DB ring が F ring 側向きに渦巻き構造 となったのはそのためと考えられる。恐らくペルオキシソーム分裂の前半には、DB ring は



図13 単離された POD、PD、MD machinery の比較

- A POD(15nm 金粒子(黄矢印):Dnm1)、PD(15nm 金粒子:Dnm2)、MD(15nm 金粒子:Dnm1、10nm 金粒子:Mda1)machineryの構造比較
- B POD machinery 及び PD machinery の直径に対するリングの外周からの ダイナミン金粒子の距離の相関
 Scale bar = 200nm

強い力を内側に形成される F ring へ伝え絞り込んでいるのであろう。

そこで次に、F ring の収縮過程を明らかにするため、PD machinery の構造との比較を行っ た。F ring は部分的に幅4nm 程の繊維断片を含む (図14A)。PD machinery には装置の骨 格となる幅7nm の繊維束が含まれていることが知られているため [7, 22]、F ring と PD machinery は部分的に類似した構造を持つと考えられる。恐らく F ring は POD machinery の骨格となるものであろう。F ring と PD machinery それぞれの、直径に対するリング幅 の相関を調べたところ、F ring は直径に関わらず繊維束の幅は約30nm と一定であった (図 14B)。一方、PD machinery は繊維の分解を伴わず収縮するため [23]、単離されたリングは 直径が小さくなるほど幅は太くなり、最大で約100nm まで太くなることが示された (図 14B)。従って F ring の収縮には繊維の分解を伴うと考えられる。直径50nm 以下の POD machinery では DB ring のみが観察されたため、内側の F ring の分解によって DB ring に 含まれるダイナミン分子がペルオキシソーム膜に直接結合し、膜のくびり切りを行うと考え られる。



図14 F ring の動態解析

- A POD machineryのF ringに 含まれる繊維断片(白枠)の 電子顕微鏡像とその拡大像
- B F ring と PD machinery の
 直径に対するリング幅の相
 関。
- Scale bars = 200nm(A)、10nm(A 拡大像)

4. まとめと今後の展望

本研究によって単膜系オルガネラであるペルオキシソームの分裂装置が DB ringとF ring の2本のリングから成る超分子ナノマシン POD machinery であることが遂に明らかに なった。単膜系オルガネラにおいて分裂装置の構造を発見しその機能を明らかにしたのは本 研究が最初であり、その意義は極めて大きいと考えられる。本研究によって以下のことが明 らかになった。(1) POD machinery は DB ring と F ring から構成されていた。(2) POD machinervの機械的仕組みを調べるために、DB ringと F ringを人工的に乖離・分岐させ る方法を開発し、ホールマウント免疫電子顕微鏡法・ネガティブ染色法を使って1個の POD machinery を対象とした解析を行った。DB ring は F ring から分岐すると、渦巻き状 の構造変化を起こし、一方でF ring は直線状に伸びた構造となっていた。Dnm1の発現抑 制によっても検証され、Dnmlを含む DB ring が POD machinery の収縮力を持つことが分 かった。(3) DB ring と F ring の超微細構造を解析した結果、(i) DB ring によって発揮され る収縮力が F ring に伝わり、F ring が少しずつ分解を伴いながら収縮することで分裂面の 収縮が進行し、(ii) Fringの分解によって DBring が包膜へ直接作用することで膜分断を行 う。このように分子レベルで制御されて機能する、超分子ナノマシン POD machinery を使っ て単膜系オルガネラ、ペルオキシソームの分裂が行われることが明らかになった。(図15) [14]。

今後の展開としては、今回 POD machinery の構造同定および単離法を開発したことに よって、質量分析装置を用いた POD machinery の構成タンパク質の同定、さらにその機能 解析が可能となったため、シゾンの全ゲノムが解読されている点を生かし、MALDI-TOF MS による POD machinery のプロテオーム解析を進め、分裂装置の全機能形成の仕組みを 明らかにすることを目指す。さらに、シゾンは高温環境に生息しており、タンパク質は熱に





POD machinery は収縮力を生み出す DB ring と装置の骨格となる F ring の二重構造から成る。ペルオキシソーム分裂期には、1) DB ring と F ring による収縮、と2) DB ring によるペルオキシソーム胞膜のくびり切り、という二段階の収縮力発生機構が考えられる。

安定性が高く、結晶構造解析に有利である。そこで原子分解能での POD machinery の高次 構造の解明を目指す。

また、POD machinery に含まれていた Dnml ホモログは、オルガネラ分裂、細胞質分裂、 小胞の形成等、いずれも膜分断に機能している[24,25]。よって、POD machinery と同様の 分裂装置が他の膜系にも存在している可能性があり、DNA を含んだ細胞核とミトコンドリ ア、葉緑体の増殖のみならず、単膜系の4種のオルガネラの増殖機構の解明への発展が期待 される[26-28]。脳の神経伝達に関わる小胞形成におけるエンドサイトーシスによる膜分断 にも、POD machinery と類似した高電子密度の構造体が形成されることが分かっている [29]。そこで、今回開発した POD machinery 単離技術などを、脳の神経伝達機構の解明へ 応用することを計画している。

さらに応用的側面として、ペルオキシソーム分裂を制御することによって医療への取り組 みを考えている。ペルオキシソームの形成増殖障害は、その代謝産物の低下を引き起こし、 その結果様々な疾患を引き起こすことが知られている。例えばアルツハイマー型認知症の原 因として、ペルオキシソームにより合成され、神経細胞の形成維持に必須なリン脂質プラス マローゲンの代謝量低下が挙げられる[30]。よって POD machinery のプロテオミクスなど でペルオキシソーム分裂遺伝子を明らかにすることで、ペルオキシソーム増殖異常疾患の病 因遺伝子の解明と治療への発展が期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり,終始熱心なご指導を賜りました東京大学の河野重行教授と立 教大学の黒岩常祥教授に深く感謝いたします。また、この研究を進める上でお世話になった 黒岩晴子博士(立教大学)、大沼みお博士(立教大学)、吉田大和博士(ミシガン州立大学)、藤 原崇之博士(国立遺伝学研究所)、吉田昌樹博士(筑波大学)、西田敬二博士(神戸大学)、八木 沢芙美博士(カルフォルニア大学)、三角修己博士(山口大学)、宮城島進也博士(国立遺伝学 研究所)、廣岡俊亮博士(国立遺伝学研究所)に感謝いたします。

引用文献

- Gillham N W (1994) Organelle Genes and Genomes. Oxford University Press. Oxford, UK.
- Lazarow PB & Fujiki Y (1985). Biogenesis of peroxisomes. Ann. Rev. Cell Biol. 1: 489-530.
- 3) Mita T, Kanbe T, Tanaka K & Kuroiwa T (1986) A ring structure around the dividing plane of the *Cyanidium caldarium* chloroplast. *Protoplasma* 130: 211-213.
- 4) Miyagishima SY, Nishida K & Kuroiwa T (2003) An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. *Trends. Plant. Sci.* 8: 432-438.
- 5) Nishida K, Yagisawa F, Kuroiwa H, Yoshida Y& Kuroiwa, T (2007) WD40 protein Mda1 is purified with Dnm1 and forms a dividing ring for mitochondria before Dnm1

in Cyanidioschyzon merolae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 4736-41.

- 6) Yoshida Y, Kuroiwa H, Hirooka S, Yoshida Y, Fujiwara T, Misumi O, Kawano S & Kuroiwa K (2009) Novel mitochondrial division protein ZED forms the inner complex structure of the mitochondrial division machinery with the ftsz ring as revealed by isolated mitochondrial division machineries. *Curr. Biol.* 19: 1491-1497
- 7) Yoshida Y, Kuroiwa H, Misumi O, Yoshida M, Ohnuma M, Fujiwara T, Yagisawa F, Hirooka S, <u>Imoto Y</u>, Matsushita K, Kawano S & Kuroiwa T. Chloroplasts divide by contraction of a bundle of nanofilaments consisting of polyglucan. (2010) *Science* 329: 949-953.
- Lazarow PB & De Duve C (1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 73: 2043-2046.
- 9) Schrader M & Dariush FH (2008) The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histo-chem. Cell Biol.* 129: 421-440.
- 10) Rhodin J (1954) Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal tubule cells of the mouse kidney. Doctorate Thesis. Karolinska Institutet, Stockholm.
- De Duve C & Baudhuin P (1966) Peroxisomes(microbodies and related particles). Physiol. Rev. 46: 323-57
- 12) Matsuzaki M, Misumi O, Shin-i T, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima S, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Nishida K, 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 & Kuroiwa T (2004) Genome sequence of the ultra-small unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428: 653-657.
- 13) Nozaki H, Takano H, Misumi O, Terasawa K, Matuzaki M, Maruyama S, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Fujiwara T, Takio S, Tamura K, Chung j-Chung, Nakamura S, Kuroiwa H, Tanaka K, Sato N & Kuroiwa T (2007) The first 100% complete eukary-otic genome sequences from the red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *BMC Biol.* 5: 28.
- 14) <u>Imoto Y</u>, Kuroiwa H, Yoshida Y, Ohnuma M, Fujiwara, Yoshida M, Nishida K, Yagisawa F, Hirooka S, Miyagishima S, Misumi O, Kawano S & Kuroiwa T (2013) Singlemembrane-bounded peroxisome division revealed by isolation of dynamin-based machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110: 9583-9588.
- 15) Miyagishima S, Nishimura M, Itoh R, Toda K, Kuroiwa H & Kuroiwa T (1999) Microbody proliferation and segregation cycle in the single microbody-alga *Cyanidioschyzon merolae. Planta* 208: 326-336.
- 16) <u>Imoto Y</u>, Yagisawa F, Yoshida Y, Kuroiwa H & Kuroiwa T (2011) The cell cycle, including the mitotic cycle and organelle division cycles, as revealed by cytological observations. *J. Electro. Micro.* 60: 117-136

- 17) Nishida K, Yagisawa F, Kuroiwa H, Nagata T & Kuroiwa T (2005) Cell cycle-regulated, microtubule-independent organelle division in *Cyanidioschyzon merolae. Mol. Biol. Cell.* 16: 2493-2502.
- 18) <u>Imoto Y</u>, Fujiwara T, Yoshida Y, Kuroiwa H, Maruyama S & 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.
- 19) Nishida K, Takahara M, Miyagishima S, Kuroiwa H, Matsuzaki M & Kuroiwa T (2003) Dynamic recruitment of Dynamin for final mitochondrial severance in a red alga. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100: 2146-2151.
- 20) <u>Imoto Y</u>, Kuroiwa H, Ohnuma M, Kawano S & Kuroiwa T (2012) Identification of Peroxisome-Dividing Ring in *Cyanidioschyzon merolae* Based on Organelle Partner Hypothesis. *Cytologia*. 77: 1-8.
- 21) Yoshida Y, Kuroiwa H, Misumi O, Nishida K, Nnamiya H, Yagisawa F, Fujiwara T, Kawamura F & Kuroiwa T (2006) Isolated chloroplast division machinery can actively constrict after stretching. *Science* 313: 1435-1438.
- 22) Yoshida Y, Kuroiwa H, Misumi O, Yoshida M, Ohnuma M, Fujiwara T, Yagisawa F, Hirooka S, Imoto Y, Matsushita K, Kawano S & Kuroiwa T (2012) Identification of the plastid division gene PDR1. *Plant Morphology*. 24: 81-88.
- 23) Miyagishima S, Itoh R, Toda K, Kuroiwa H & Kuroiwa T (1999) Real-time analyses of chloroplast and mitochondrial division and differences in the behavior of their dividing rings during contraction. *Planta* 207: 343-353.
- 24) Kuroiwa T, Misumi O, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Fujiwara T, Yoshida Y, Hirooka S & Kuroiwa H (2008) Structure, function, and origin of vesicle, mitochondrial and plastid division machineries with emphasis on dynamin rings and electrondense rings. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 271: 97-141.
- 25) Miyagishima SY, Kuwayama H, Urushihara H & Nakanishi H (2008) Evolutionary linkage between eukaryotic cytokinesis and chloroplast division by dynamin proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 15202-15207.
- 26) Yagisawa F, Fujiwara T, Kuroiwa H, Nishida K, <u>Imoto Y</u> & Kuroiwa T (2012) Mitotic inheritance of endoplasmic reticulum in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae. Protoplasma.* 249: 1129-1135.
- 27) Yagisawa F, Fujiwara T, Ohnuma M, Nishida K, <u>Imoto Y</u>, Yoshida Y, Kuroiwa H & Kuroiwa T (2013) Golgi inheritance in the primitive red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. *Protoplasma*. 250: 943-948.
- 28) Yoshida Y, Fujiwara T, <u>Imoto Y</u>, Yoshida M, Ohnuma M, Hirooka S, Misumi O, Kuroiwa H & Kuroiwa T (2013) The kinesin-like protein TOP promotes Aurora localisation and induces mitochondrial, chloroplast and nuclear division. *J. Cell. Sci.* 126: 2392-2400.
- 29) Jakobsson, J., Ackermann, F., Andersson, F., Larhammar, D., Löw, P., & Brodin, L. (2011)-Regulation of synaptic vesicle budding and dynamin function by an EHD ATPase. *The Journal of Neuroscience*, 31: 13972-13980

30) Lizard G, Rouaud O, Demarquoy J, Cherkaoui-Malki M, & Iuliano L (2012) Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type. *Journal of Alzheimer's disease* 29: 241-254.