

植物細胞の形態形成・形態制御に関する新しい仮説の提示と検証

Proposal and Examination of a New Model in Plant Morphogenesis

研究代表者 東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授 駒澤 盛一郎

Seiichiro HASEZAWA, Ph.D., Professor of Plant Cell Biology, Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

我々はこれまで高度に同調したタバコ培養細胞 BY-2 を間接蛍光抗体染色法により、M/G1 境界期において表層微小管が再形成する過程を観察してきた。しかし、早い変化を捉えるためには 1 つの生細胞内での連続観察の必要があるため、GFP-チューブリン融合タンパク質を恒常に発現するタバコ培養細胞の形質転換株 (BY-GT16) を作製し、生細胞内での微小管動態の経時観察に成功した。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いた詳細な経時観察の結果、フラグモプラスが消失した後早い時間に細胞表層に蛍光輝点が現れ、そこから最初の表層微小管が伸長することが分かった。また、液胞膜タンパク質と GFP の融合タンパク質を発現する BY-GV を確立した。この細胞を用いて、共焦点レーザー顕微鏡の連続光学切片をもとに、立体画像構築とモデリングを行った。その結果、液胞構造の立体的な構成と、細胞周期の進行に伴う動態の全容が明らかになった。

Abstract

We have observed CMT reorganization by immunofluorescence microscopy, and reported that MTs were nucleated from daughter nuclear surfaces prior to the CMTs (Kumagai and Hasezawa, 2001). However, we could not precisely define the time-course of events because of the rapid transition from phragmoplasts to CMTs. To observe such rapidly occurring events, we used the green fluorescent protein (GFP) and α -tubulin fusion protein as probes of MTs in living cells (Hasezawa et al., 2000; Kumagai et al., 2001). In addition, we attempted to use the dye, FM4-64, to visualize vacuoles in living cells (Kutsuna and Hasezawa, 2002). By combining these two methods, we are therefore able to discuss the mechanisms by which daughter cells prepare the machinery for cell expansion in the proper directions.

【研究の目的】

植物細胞の外側には多糖類によって構成される細胞壁があり、この中のセルロースの細い糸(微纖維)の束が一種のタガとして働き、細胞は纖維の向きに対して直角の方向に成長する。このセルロース微纖維の配列の方向(配向)は

細胞表層に存在する微小管(表層微小管)の配向によって決められることが知られている。つまり、微小管の向きが最終的には細胞の形を決める。このように、微小管は細胞の成長や分化にとって重要であり、その形成・配向の制御機構を理解することが必要である。また、植物細

胞の中で大きな容積を占める液胞について、分裂周期や細胞伸長時の動態を観察することで、その細胞形態形成への寄与を明らかにすることも重要と考えられる。本研究では、これらの機構の解明を目的として、1) 微小管の動態を生細胞で経時的に観察できる実験系の確立と改良、2) その実験系を用いた分裂期を中心とした微小管の動態の観察、3) 微小管形成に関する微小管形成中心タンパク質および微小管が制御するセルロース合成酵素の動態、4) 植物細胞中で最大の体積を占める液胞の動態、などを生細胞で経時的に観察できる実験系の確立と動態の解析を目指した。

研究の背景としては、以前より我々は表層微小管が「いつ」、「どこで」、「どのように」形成されるかについて、細胞の分裂周期の同調が容易なタバコの培養細胞 BY-2 を用いて解析してきた。詳細な観察により、M 期の終わりに微小管が核の周囲から細胞表層を通って細胞長軸に平行に伸長し、ついで長軸に垂直な微小管が形成されて間期の表層微小管が完成することが分かってきた。最近では、GFP-チューブリン融合タンパク質を発現する培養細胞を作成してこれを経時的に観察することで、生細胞における M 期を通した微小管の動態を高等動植物では世界で初めて観察に成功するとともに表層微小管の起源とセルロース微纖維の制御機構についても新しい知見を得ている (Hasezawa et al. 2000, Hasezawa & Nozaki 1999)。一方、微小管の形成に関与していると考えられるタンパク質についても検討し、49kDa のタンパク質を見出した。このタンパク質は微小管が形成される部位 (微小管形成中心) に存在し、微小管の形成に関して重要な役割を担っている (Kumagai et al. 1999)。また、微小管以外の細胞骨格系 (アクチン纖維な

ど) も植物細胞の形態形成に関わっており、それらの微小管に関わる因子についても研究を行っている (Hasezawa et al. 1998, Miyake et al. 1997)。微小管やアクチン纖維はまた環境変化に対する植物の応答・適応を考える上で重要である。その例としてソラマメの気孔の開閉における表層微小管の役割について解析を行っている。この気孔の開閉は孔辺細胞の形態変化によるものですが、この現象と微小管の関わりについて検討した。その結果、朝に気孔が開くときには孔辺細胞の表層微小管の放射状ネットワークが必要なこと、気孔が閉じる夕方にはこの微小管のネットワークが消失するとともに微小管を作るチューブリンタンパク質も分解されるという日周期があることなどが分かってきた (Fukuda et al. 1998, 2000)。このように、我々は細胞生物学の視点から細胞骨格に注目した解析を行うことで、植物細胞の形態形成・形態制御の機構を解明することを目的として研究を続けている。我々の微小管に注目した植物の形態形成機構解明へのアプローチは極めてユニークであるばかりでなく、従来から世界に先駆けた利用価値の高い実験系の開発を行っている点でも特色がある。従って、これらの実験系および新しく開発予定の実験系を用いた研究では、他所では得がたい成果が期待できると考えた。

上記の研究の中で特に「表層微小管の再形成機構の解明」および「微小管形成中心タンパク質の探索」の研究は、他に類をみないユニークな研究として評価されている。また、「孔辺細胞の開閉の日周期における微小管の関与」も我々が最初に発見した現象である。さらに、GFP-チューブリン遺伝子を恒常的に発現する培養細胞系は、BY-2 の分裂同調系と共に当該研究分野において現在世界で最も優れた観察

系と言える。本研究ではさらなる実験系の改良を試み、今までに成し得なかった詳細な観察による解析を目指した。

【研究の経過と成果】

高等植物細胞に特徴的な表層微小管は細胞の形態形成において主要な役割を担っていることが知られている。我々はこれまで高度に同調したタバコ懸濁培養細胞 BY-2 を化学固定した後に間接蛍光抗体染色法を用いて、M/G1 境界期において表層微小管が再形成する過程を観察してきた。しかし分単位に起こる変化を捉えるためには 1 つの生細胞内で連続的に観察をする必要があることから、GFP (Green Fluorescent Protein)-α-チューブリン融合タンパク質を恒常的に発現するタバコ培養細胞の形質転換株 (BY-GT16) を作製し、生細胞内における微小管動態の経時観察に成功した。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いた詳細な経時観察の結果、M 期終期から G1 期への移行期に表層微小管が再形成する際、フラグモプラストが消失した後ごく早い時間に細胞表層に蛍光輝点が現れ、そこから最初の表層微小管が出現・伸長することが分かった。それらの微小管は引き続き細胞長軸に平行な方向に伸長し、細胞の端に届いた後に分裂面近傍より垂直な方向の表層微小管が出現して細胞全体に広がることが観察された。これにより平行な表層微小管が垂直な表層微小管に先立って出現することが確認された (Kumagai et al. 2001, Fig.1)。さらにデコンボリューション顕微鏡を用いて細胞の中央から表層までを経時観察したところ、フラグモプラストの崩壊に伴って娘核の核膜近くに蛍光が集積し、その後核膜表面から太い微小管の束が伸長して細胞表層に達した時点で蛍光輝点を形成することが分か

った (Yoneda and Hasezawa 2003)。また共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞表層の経時観察を行い、細胞長軸に平行な微小管が出現してからそれと垂直な微小管が出現するまでの移行過程についても、微小管形成中心タンパク質である β -tubulin の観察も加えて検討した。その結果、核膜表面の微小管派生から表層微小管の完成までの統合的理理解が可能になった (Kumagai et al. 2003)。

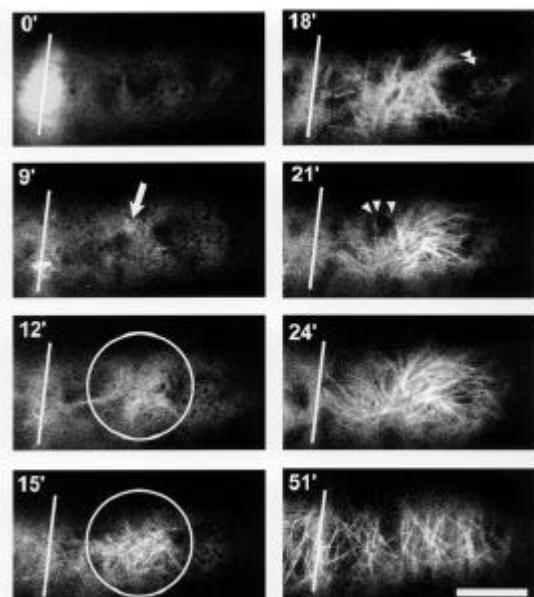


Fig. 1 Reorganization of cortical microtubules at the M/G1 interface, observed in BY-GT16 cell

また、我々は高等植物細胞の形態形成における液胞の寄与についても研究を行った。高等植物細胞の液胞はさまざまな機能を持ち、形態についても多様であることが知られている。近年、一個の細胞内において液胞の機能が分化に伴って変化することや機能の異なる複数の液胞が共存することが分かってきた。一方、細胞の形態形成や細胞分裂のような現象に液胞がどのように関与しているかについてはまだ不明な点も多い。生細胞における液胞の動態を可視

化すべく、脂溶性の蛍光色素である FM4-64 によるパルスラベルを行い、タバコ培養細胞 BY-2 の細胞周期各期における液胞の動態の観察に成功した。観察の結果、G2 期の終わりよりフラグモソーム中にチューブ状の液胞構造が連なったネットワークが微小管の分裂装置を取り巻くように生じることを見出し、TVM(tubular structure of vacuolar membrane)と名付けた。後期以降ではチューブ状構造はフラグモラスト近傍にも出現すること、G1 期初めに細胞板と娘核の間にある液胞構造のいくつかは核が細胞板から離れて行くにつれて体積を増加して大きな間期の液胞に成長することなどが明らかになった (Kutsuna & Hasezawa 2002, Fig. 2)。

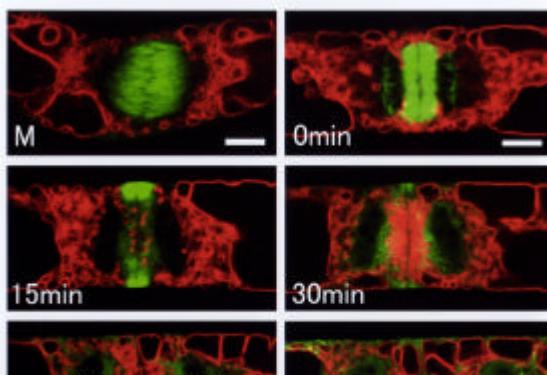


Fig. 2 Vital staining of vacuoles and microtubules with FM4-64 and GFP- α -tubulin in BY-GT16 cell

さらに詳細な経時観察のため、シロイヌナズナの syntaxin ファミリーに属する AtVam3p と GFP の融合タンパク質を恒常に発現するタバコ BY-2 細胞の形質転換株 BY-GV(transgenic BY-2 cells stably expressing GFP-AtVam3p fusion protein)を確立した。この BY-GV 細胞を用いて、共焦点レーザー顕微鏡によって得られた連続光学切片をもとに、新規に独自で開発した立体画像構

築ソフト SSR による立体画像構築とモデリングを行った。その結果、TVM を含む液胞構造の立体的な構成と、細胞周期の進行に伴う動態の全容が明らかになった (Kutsuna et al. 2003)。

【まとめと今後の展望】

上記の形質転換細胞を用いた生細胞での微小管や液胞構造の細胞周期を通じた観察により、例えば M/G1 境界期の微小管再形成の蛍光輝点や M 期の分裂装置を取り巻く TVM などの新知見が得られた。また、SSR などの技術的な進展も得られたことから予想以上の成果が得られたものと考える。今後はこれらの実験系を駆使することで、高等植物の細胞形態形成における微小管と液胞の役割に関する解析が飛躍的に進むことが期待される。

【助成関連発表論文リスト】

1. Kumagai, F. and Hasezawa, S.: *Plant Biol.* 3, 4-16 (2001)
2. Kumagai, F. et al.: *Plant Cell Physiol.* 42, 723-732 (2001)
3. Kutsuna, N. and Hasezawa, S.: *Plant Cell Physiol.* 43, 965-973 (2002)
4. Kumagai, F. et al.: *Eur. J. Cell. Biol.* 82, 43-51 (2003)
5. Kutsuna, N. et al.: Submitted.
6. Yoneda, A. and Hasezawa, S.: Submitted.