

修士論文

シロイヌナズナの気孔開閉時  
における液胞の動態に関する研究

平成 15 年度入学

植物全能性制御システム解析学分野

学籍番号 36511 金澤 祐子

指導教員 馳澤 盛一郎

目次	1
略号	2
序論	3
材料と方法	
植物材料	6
表皮切片の調製	6
表皮切片の薬剤処理	6
気孔開度の測定	7
孔辺細胞液胞内の観察	7
顕微鏡観察(蛍光顕微鏡、CLSM)	7
孔辺細胞プロトプラストの調整	7
BY-GV7 細胞の培養	8
タバコ培養細胞 BY-GV7 単離液胞の調整	9
プロトプラスト、単離液胞に与えた外部浸透圧変化	9
結果	
孔辺細胞内の液胞の観察法の検討	10
気孔開閉時における孔辺細胞液胞の動態	10
孔辺細胞の液胞内部の形状変化過程	11
浸透圧変化による単離液胞の形状変化	12
考察	
気孔開閉運動における孔辺細胞液胞の役割	14
液胞の形状可塑性	15
液胞膜の可塑性は孔辺細胞特有の現象か	16
まとめ	18
謝辞	19
参考文献	20
図表	24

## 略号

ABA	abscisic acid
BY-GV7	transgenic BY-2 cells stably expressing a GFP- AtVam3p fusion protein line7
CLSM	confocal laser scanning microscopy
FC	fusicoccin
FM4-64	<i>N</i> -(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-diethylamino)phenyl)hexatrienyl pyridinium dibromide
GFP	green fluorescent protein
MES	2- ( N-morpholino ) ethanesulfonic acid
SSR	stereo-structure reconstructor
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

## 序論

陸上に生活する植物は進化の過程において、外部環境に適応するために体表面に気孔という特徴的な細胞構造を形成した。気孔とは一対の孔辺細胞に囲まれた間隙であり、植物の表皮、特に葉の裏側に多く分布している。気孔は植物体内部と大気環境の接点として、蒸散や光合成の際に内部に  $\text{CO}_2$  を供給し  $\text{O}_2$  を外部に放出するガス交換の通路となっている。植物は気孔の開き具合（気孔開度）を調整することで、外部環境に合わせた蒸散やガス交換を行うことが可能である。気孔の開閉は光や湿度、 $\text{CO}_2$  濃度などの外部環境因子に影響を受けるが、ほかに大気汚染ガスなどの接触時に素早く気孔を閉じて身を守るなど、様々な環境変化によるストレスに対する防御にも関わっている。また、これらの応答には植物ホルモンが関与している。気孔は日中に開き夜間は閉じるという日周性を持ち、外部刺激だけでなく、植物の内部に存在する概日リズムによっても制御されている。(Fukuda et al. 1998, 2000, McClung 2000)。この気孔の開閉は、孔辺細胞内外のイオンや水が移動する際の膨圧変化と、孔辺細胞の特徴的な形態により起こることが知られている。孔辺細胞は内外の浸透圧変化を認識し、孔辺細胞の体積を制御して気孔開度を調節する (Assmann 1993)。気孔が機能する際に孔辺細胞内で起こる出来事は多様で、イオン輸送、ホルモン反応、光応答、シグナル伝達、浸透圧制御があり、孔辺細胞は植物細胞内の情報伝達の良いモデルである (Outlaw 2003)。

孔辺細胞の特徴的な形態は、浸透圧変化によってもたらされた膨圧を開閉の動力として利用するために重要である。孔辺細胞の細胞壁は孔の周辺では相対的に厚くなっており、細胞に水が流入した際に孔の側は膨張しにくく、反対側は膨張しやすい。この非対称な膨張によって細胞が屈曲し、気孔が開く。この際の浸透圧変化に関与するイオンとして  $\text{K}^+$ 、malate、 $\text{Cl}^-$ 、sucrose、そしてその他の糖類 (Assmann 1993) が考えられ、浸透圧変化に対する孔辺細胞の膨圧の制御は複雑である。以前より、孔辺細胞の細胞膜や液胞膜状に存在してイオンの動態や気孔開閉に関与するイオンチャネルが研究され、その複雑なネットワークが徐々に明らかになりつつある (Blatt 2000, Hetherington 2001, Ng et al. 2001, Schroeder et al. 2001)。

一方、細胞全体としては、気孔の開閉時に孔辺細胞の体積が変化することは以前から知られていた (Raschke 1975) が、その際の細胞内構造の変化、特に液胞の挙動についてはあまり知られていない。液胞は多くの植物細胞中で巨大液胞 (large vacuole) として最大のコンパートメントとなっており、細胞の形態制御を考える上で非常に重要であると考えられる。液胞内はタンパク質濃度が細胞質に比べて低い組成であるため、体積あたりの生産、維持に必要なコストが細胞質より低い。そのために細胞がその体積および表面積を確保するのに適しており、例えば急速な成長時には細胞は分裂ではなく液胞の体積を増すことによる伸長生長を行っている (Maeshima 1990)。これを液胞の空間充填機能といい、光をはじめとする資源の獲得競争において高さや面積をかせぐ上で重要であると考えられる (Raven 1997)。

さらに液胞は、個体の恒常性維持に関わる多機能なオルガネラでもある (Wink 1993, Marty 1999)。細胞内で物質分解の場として機能することやエンドサイトーシス経路の終末であることなどから、動物細胞のリソソームと相同なオルガネラとされるほか、種子におけるタンパク質の貯蔵 (Jiang and Rogers 2001)、浸透圧やイオン濃度の調節 (Leigh 1997)、色素やアルカロイドといった二次代謝物や外来物質の蓄積 (Coleman et al. 1997, Wink 1997)、プログラム細胞死への関与 (Fukuda, H. 2000)、オートファジーによる細胞内消化 (Robinson et al. 1998) といった様々な機能が知られている。さらに、ひとつの液胞がこれら全ての機能を常に発揮しているのではなく、器官および組織特異的な発現、周囲の環境に応じた発現、分化過程での特異的な発現といった、時間的かつ空間的な制御がなされている。このような液胞機能の多様性とダイナミクスは、高等植物が環境適応において示す高い可塑性に大きく寄与していると考えられる。そこで、孔辺細胞の液胞と気孔開閉運動との関係を明らかにすることを目的とし、気孔の開閉とそれに伴う液胞の形状変化の解析を中心に研究を進めた。

今までに行われてきた孔辺細胞内部に関する形態学的研究は、観察の際に染色剤によって液胞膜を可視化する手法をとるため、多くの場合、細胞の固定を必要とした。本研究で扱う気孔開閉時における液胞の挙動を調べる際には、生細胞での液胞の観察を行う必要があったため、細胞にダメージを与えない方法を検討した。その結果、観察材料とし

て、GFP と液胞膜タンパク質の AtVam3p との融合タンパク質を恒常的に発現させることで液胞膜が可視化したシロイヌナズナ形質転換体を選択し、生細胞での液胞の観察を可能とした (Uemura et al. 2002)。また、気孔の開閉及び孔辺細胞の代謝は、周囲の表皮細胞や葉肉細胞の影響を受ける。そこで孔辺細胞独自の反応についての生理・生化学的研究を行うためには、孔辺細胞を単離する必要がある。その方法として、葉の表皮を剥ぎ取って用いる手法を採用した (Durbin and Graniti 1975)。

本研究では上記のシロイヌナズナの表皮切片を材料とし、孔辺細胞内の液胞の動態が気孔開閉に及ぼす影響を解析することを目的とした。研究は実験の目的に即し、3つの実験系に分けて行った。まず1つめとして、実験条件下で気孔開閉を経時的に観察可能な実験系の確立を行った。表皮切片を葉から剥ぎ取った状態で孔辺細胞の生理活性を保つことにより、気孔開閉運動の連続観察が可能となった。2つめに、孔辺細胞の液胞の気孔開閉への寄与について調べた。経時観察により、気孔開閉時の孔辺細胞液胞を1細胞で観察することができ、その形状変化について比較が可能となった。ここで、得られた連続光学切片より立体画像構築ソフト SSR (Kutsuna et al. 2003) を用いて立体画像を再構築し、体積、表面積の変化とその傾向を算出した。この観察の過程で、孔辺細胞の液胞中に断面が円あるいは楕円形の膜構造が頻繁に観察されたが、この構造に注目して解析を進めた。これは既に報告された bulb (Saito et al. 2002) に類似の構造と考えられるので、本研究では以下バルブ様構造と呼ぶ。電子顕微鏡でもこのような膜構造が観察されているが (Pallas and Mollenha 1972, Staehelin and Chapman 1987)、その意義やトポロジーについてはいまだ仮説の段階に過ぎない。そこで、このバルブ様構造について詳細な観察を行い、周囲の液胞との連続性や構造の形成過程を調べた。3つめとして、上述の実験で観察された気孔開閉時の液胞の動態が、孔辺細胞独自の性質であるのか、植物細胞の液胞膜に普遍的性質によるものかを検討するために、孔辺細胞のプロトプラストから単離液胞を採取し、浸透圧変化による液胞膜の形状変化を観察した。さらに、細胞が大きくて液胞の採取が容易なタバコ培養細胞 BY-GV7 より、単離液胞を調製して同様の実験を行うことで、高等植物に共通する現象かどうか検討した。

## 材料と方法

### 植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia) を人工光形グロースキヤビネット (Koitotron KG-50HLA, KOITO MANUFACTURING CO. LTD, Tokyo, Japan) 内で栽培したものを用いた。培土として、ジフィーセブン (Japan Jiffy-pot Products LTD Kanagawa, Japan) を使用した。明期は午前 7 時から午後 11 時までの 16 時間とし、明期の光の強度は約  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  とした。温度は  $23^\circ\text{C}$ 、また湿度は 60% に設定した。播種後 5~7 週間の、葉が十分に展開した個体において、ロゼット葉を採取した。

### 表皮切片の調製(明条件、暗条件)

葉の裏側の表皮を剥ぎ取り、表皮切片とした。Basal buffer (5 mM MES-Tris (pH6.5), 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM KCl) で満たしたガラス容器中に葉を沈め、表皮が互いに接着しないように注意しながら剥ぎ取って、組織の内側に相当する面が液面に接するよう、ガラス容器に満たした buffer に浮かべて、静置した。その際に buffer は、明条件では Open buffer (5 mM MES-Tris (pH6.5), 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM KCl) を、暗条件では Basal buffer を用いた。光については、明条件では生育条件と同様の約  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  の光を約 2 時間照射し、暗条件では遮光性のアルミホイルで覆って約 2 時間静置した。buffer に浮かべる方法は、Jiang ら (1996) の方法を参考にした。また経時的観察では、光照射の開始時を 0 時間とし、2 時間後に再度観察を行った。

### 表皮切片の薬剤による開口・閉口処理

開口処理は表皮切片を buffer 上に浮かべ、暗中で 2 時間静置した後、 $3 \mu\text{M}$  fusicoccin (FC, Sigma Aldrich Japan Co., Tokyo, Japan) を添加し再び暗中で 2 時間静置して行った。閉口処理は表皮切片を buffer 上に浮かべ白色光下で 2 時間静置した後、abscisic acid (ABA, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を添加し、再び白色光下で約 2 時間静置して行った。

### 気孔開度の測定

表皮切片を CCD カメラ (DP-50, Olympus Co., Tokyo, Japan) を備えた蛍光顕微鏡 (BX-51, Olympus) を用いて倍率 1000 倍で観察し、明視野写真像を撮影した。この明視野像から、気孔の幅の最も大きい部分 (a) と長軸 (b) の長さをそれぞれ Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, U. S. A.) を用いて測定し、その比 (a / b) を算出してその値を気孔開度とした。3 枚の葉から採取した表皮切片よりそれぞれ気孔 50 個以上を無作為に選んで気孔開度を得て、平均値と標準誤差を算出した。

### 孔辺細胞の液胞内の観察

蛍光顕微鏡を用いて孔辺細胞の液胞の観察を行った。

N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)-pyridinium dibromide (FM4-64, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, U. S. A.) による染色は Kutsuna ら (2003) の方法を一部改変し行った。表皮切片を 10  $\mu$  M の FM4-64 を加えた Basal buffer に浮かべ、室温にて一時間染色した。染色後、新しい Basal buffer に移し、約 10 時間室温で静置して液胞膜に薬剤を取り込ませた。

### 顕微鏡観察 (蛍光顕微鏡, CLSM)

表皮切片の観察には、共焦点レーザー顕微鏡システム (CLSM; 倒立顕微鏡 IX70, レーザースキャニングシステム GB-200, Olympus) と、CCD カメラ (DP-50, Olympus) を備えた蛍光顕微鏡 (BX-51, Olympus) を用いた。生細胞の経時観察 (X-Y-T)、連続焦点面での観察 (X-Y-Z) は、径 14 mm カバーグラス付きの径 35 mm ガラスボトムディッシュ (Matsunami Glass Ind., Osaka, Japan) に Basal buffer 0.5~1.0 ml を滴下して底辺に表皮片を表面張力で貼り付け観察した。画像の輝度・コントラスト調整には画像処理ソフトウェア Photoshop を用いた。

### 孔辺細胞プロトプラストの調製

孔辺細胞のプロトプラストの単離方法は Yamazaki ら (2003) と、Pandey ら (2002)



の方法を一部改変して行った。十分に展開したシロイヌナズナのロゼット葉を 80~100 枚採取し、蒸留水で穏やかに洗った。その後ブレンダーに葉と蒸留水 100 ml を入れ、1 分間で破碎した。さらに様子を見ながら 30 秒から 1 分程度破碎した。破碎液を 200  $\mu$  m ナイロンメッシュでろ過し、破碎された表皮片をメッシュ上に、葉肉細胞はろ過液へと分画した。蒸留水でメッシュ上の表皮画分をすすぎ、葉肉細胞を取り除いた。その後表皮画分を第一酵素液 25 ml (1 % (w/v) cellulase YC (Seishin Co. Tokyo, Japan) , 0.02 % (w/v) pectolyase Y23 (Seishin) , 0.25 M mannitol, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 % BSA, pH 5.5) で 25°C、15 分間処理した。その後 200  $\mu$  m ナイロンメッシュでろ過し、表皮片を集めた。次に第二酵素液 25 ml (2 % (w/v) cellulase YC (Seishin) , 0.02 % (w/v) pectolyase Y23 (Seishin) , 0.4 M mannitol, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 % BSA, pH 5.5) で 25°C、1 時間処理した。続いて処理液を 50  $\mu$  m ナイロンメッシュでろ過し、ろ液を集めた。また、メッシュ上に残った表皮片を Washing buffer (5 mM Mes-Tris, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu$  M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 mM アスコルビン酸, 0.55 M mannitol, pH 5.5) で洗浄し、合計で 50 ml にした。さらに集めたろ液を 200 $\times$ g で 5 分間遠心し、最下層の 1~2 ml を残してピペットで上清を取り除き、残った液をプロトプラスト液とした。

#### BY-GV7 細胞の培養

タバコ懸濁培養細胞 BY-GV7 は *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 の芽生えに由来する培養細胞 BY-2 を、アグロバクテリウム感染法により GFP-AtVam3p 融合遺伝子を導入した形質転換株 (Kutsuna and Hasezawa 2002) で、7 日毎に 1 ml の細胞培養液を改変した Linsmaier and Skoog 液体培地 (Linsmaier and Skoog 1965) 95 ml に植え継ぎ、暗黒下で 27°C、130 rpm のロータリーシェイカー上で振とう培養して維持している (Nagata et al. 1992)。上記の培地は Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (Wako) に  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  370 mg/l、ショ糖 3 %、塩酸チアミン 1 mg/l、ミオイノシトール 100 mg/l、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 0.2 mg/l (いずれも最終濃度) を加え、pH 5.8 に合わせてからオートクレーブをしたものである。

#### タバコ培養細胞 BY-GV7 の単離液胞の調製

植え継ぎ後 4, 5 日の細胞懸濁液を約 50 ml ファルコンチューブに分注し、800 rpm で 30 秒間遠心した。上清を捨て、酵素液 (1% (w/v) cellulase YC (Seishin), 0.1% (w/v) pectolyase Y23 (Seishin), 0.35 M mannitol, pH 5.8) 約 40 ml を加え、上下に数回振とうして混合した。次に 30°C のウォーターバス内で 75~80 分酵素処理した。その間 30 分おきにピペットで穏やかに懸濁した。その後 800 rpm で 30 秒間遠心した。後に上清を捨て、0.6 M mannitol を約 40 ml 細胞に直接触れないようにして加え細胞を洗浄し、再び 800 rpm で 30 秒間遠心した。また、上清を捨て、底に残った細胞をパーコール液 (30% percoll, 0.7 M mannitol, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 6.0) 10 ml を分注した遠心管に穏やかに積層し、15000×g で 30 分間遠心した。遠心後、最上層の部分 2~3 ml 程度を単離液胞層とし、以下の実験に用いた。

#### プロトプラスト、単離液胞に与えた外部浸透圧変化

まず、プロトプラストもしくは単離液胞懸濁液を径 14 mm カバーグラス付きの径 35 mm ガラスボトムディッシュに滴下し、低浸透圧処理ではそこに希釈倍率分の蒸留水を加え、高浸透圧処理では必要分の飽和マンニトール溶液 (約 1M) を加えた。その後、約 5 分静置し、CCD カメラ (DP-50, Olympus) を備えた蛍光顕微鏡 (BX-51, Olympus) で観察した。

## 結果

### 孔辺細胞内の液胞の観察法の検討

本研究では、気孔開閉時の孔辺細胞の液胞を生細胞で経時観察する必要があるため、液胞膜のマーカーとして GFP-AtVam3p 融合タンパク質を発現するシロイヌナズナ形質転換体の葉から表皮切片を得て実験を行った。最初に GFP-AtVam3p の局在部位が液胞膜であることを確認するため、表皮片を液胞膜の染色試薬として用いられる FM4-64 で染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて観察した (図 1)。その結果、FM4-64 による染色部位と GFP 蛍光局在部位が一致したので、この形質転換体を液胞観察の目的で使用する事ができると判断した。

次に、気孔開閉運動を観察するために、表皮切片に加える薬剤処理の条件検討を行った。その際、気孔の開き具合を評価する指標として、気孔開度を用いた。気孔開度の定義は、開口部分の短径を長径で割った値とした。その結果、表皮切片を buffer 上に浮かべて暗処理を 2 時間行くと気孔が閉じ、その時の気孔開度は約 0.18 であったが、そこへフシコクシン (FC) を  $3\mu\text{M}$  添加して 2 時間後には気孔が開き、気孔開度は約 0.35 に上昇した。一方、表皮切片を白色光下 ( $100\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) で 2 時間処理すると気孔が開き、その時の気孔開度は 0.25 であったが、そこへアブシジン酸 (ABA)  $100\mu\text{M}$  を添加して 2 時間後には気孔が閉じ、気孔開度が約 0.1 に低下した (図 2)。

### 気孔開閉時における孔辺細胞液胞の動態

気孔開閉運動を生きた孔辺細胞で経時観察することが可能となったので、一つの孔辺細胞の気孔開閉運動に伴う液胞構造の変化を観察した。その結果、まず暗処理により気孔を閉口させ、そこに FC 処理を行って気孔を開口させると、孔辺細胞の液胞構造は複雑に褶曲した形状から、単純で平滑な形状へと変化した (図 3A)。逆に、白色光照射により気孔を開口させた後に、ABA 処理を行って気孔を閉口させると、孔辺細胞の液胞構造は単純で平滑な形状から、複雑に褶曲した形状へと変化した (図 3B)。

この気孔の開閉に伴う液胞構造の変化を数値的に評価するため、開口状態および閉口

状態の孔辺細胞液胞膜の光学切片から、液胞部分の断面積、およびその膜部分の周長を細胞中央部とその上下  $0.5\mu\text{m}$  の計 3 枚について計測し、平均値を得た。次に、得られた周長を断面積の平方根で割った値を複雑度と定義し（図 4A）、液胞構造の複雑性を統計的に評価した。その結果、気孔開度が大きい場合には液胞構造の複雑度は小さく、反対に小さい時はその複雑度が大きいことが分かった（図 4B）。

これまでは気孔の開閉およびそれに伴う液胞構造の変化を細胞中央部付近の平面像を用いて評価したが、孔辺細胞全体での液胞構造の変化を立体的に捉えるために、当研究室において開発された立体構築ソフトウェア・SSR (Kutsuna et al. 2003) を用いて液胞の構造の立体画像構築を行った。立体画像構築のためには、まず CLSM で孔辺細胞の液胞膜の Z 軸方向に連続光学切片を採取し、その画像から液胞膜の輪郭線をトレースした。得た輪郭線を Z 軸方向の間隔をあけて積層し、計算結果に基づき輪郭線の間に格子を形成することで滑らかな表面を形成する。これがサーフェスモデルとしての立体画像となり、体積や表面積の計算を可能にする。（図 5）。

この SSR ソフトウェアを用いて、同一細胞における気孔の開閉を追跡した光学切片像から立体画像を再構築して、液胞構造を比較したところ、FC 処理により気孔を開口させると液胞は膨張して液胞構造も平滑になった（図 6A）。反対に、ABA 処理により気孔を閉口させると、液胞は扁平化し、液胞表面は褶曲して内部構造も複雑になった（図 6B）。SSR ソフトウェアでは従来の立体画像構築ソフトウェアとは異なり、サーフェイスモデルを形成することができるため、立体画像からその表面積と体積とを計算することができる。そこで、気孔の開口状態および閉口状態での孔辺細胞の液胞の表面積と体積を算出した。その結果、気孔開口処理により液胞体積は増加したが、表面積にはほとんど変化が見られなかった（図 7A）。反対に気孔閉口処理により液胞体積は減少したが、この時も表面積はほぼ一定に保たれていた（図 7B）。

### 孔辺細胞の液胞内部の形状変化過程

暗処理および ABA 処理によって気孔を閉口させると液胞構造が複雑化した。そこで、どのように液胞構造が複雑化するのかを観察するために、明処理後の ABA 添加による気

孔閉口の様子を 5 分間隔で追跡した(図 8A)。ABA 添加直後(0 min)に見られた小さな液胞膜の陥入(白矢じり)が、添加 10 分後には大きな陥入構造に、さらに添加 25 分後には液胞を貫通する構造に発達した。また一方では、ABA 添加後 15 分後に見られた小液胞コンパートメント(赤矢じり)が、添加 20 分後には巨大液胞内に陥没し、添加 25 分後にはバルブ様構造に発達する様子がうかがえた。反対に、暗処理によって閉口させた気孔を FC により開口させると、暗処理時に見られた液胞内部のバルブ様構造が開口処理後に消失する様子を観察することができた。(図 8B)。

そこで、気孔閉口時に見られた液胞内部のバルブ様構造に注目し、さらに詳細に観察するため、CLSM を用いて Z 軸方向を連続的に観察した。その結果、ある断面では独立したバルブ様構造に見えていた液胞膜も、別の断面では隣接する液胞の外側の膜と連絡している様子が観察できた(図 9A, B)。また、バルブ様構造の一部が完結していないような馬蹄状構造や(図 9C, 9D 矢印)、シート状に陥入した液胞膜が断面を Z 軸方向にずらすと次第に折れ曲がっていく様子もみられた(図 9D 矢じり)。

このような液胞内膜構造の形成過程を追跡するために、同一細胞での経時観察を行った。ABA 処理により気孔が閉口する際の液胞構造の変化を 30 秒ごとに撮影し観察したところ、シート状陥入構造が馬蹄構造に変わりやがて球状構造に変化していく様子がうかがえた(図 10A, B)。図 10A では、最初は 2 本のシート状の陥入構造だったものが、ABA 添加 1.5 分後には小コンパートメントが巨大液胞に陥入したような馬蹄状構造になり、2 分後に巨大液胞との接点部分が収束して陥入部分は球状に近くなった後、ABA 添加 2.5 分後にはバルブ様構造に発達した。同様に、図 10B では、巨大液胞に隣接する小液胞コンパートメントが ABA 添加 3 分後に馬蹄状構造に発達し、ABA 添加 3.5 分後には図 10A でも見られたように巨大液胞との接点が収束し、最終的に ABA 添加 4 分後にはバルブ様構造に発達した。

### 浸透圧変化による単離液胞の形状変化

気孔の開閉に伴い、孔辺細胞の液胞構造が変化する様子が観察されたが、この液胞構造変化の原因として孔辺細胞特有の細胞壁構造や、孔辺細胞に物質や水分を供給する周

囲の組織の働きによる可能性も考えられる。そこで、細胞壁構造を消化し、孔辺細胞のプロトプラストを調製して周囲の組織から独立させた。この孔辺細胞プロトプラストを培養し、培地に水を添加することで外部浸透圧を低下させると、孔辺細胞プロトプラストは膨張してその直径も増加した（図 11A）。低浸透圧化における孔辺細胞プロトプラストの形状変化は均一ではなく細胞によって差があったが、その直径の平均値を算出した結果、低浸透圧化に伴い直径が増加する傾向が明らかになった（図 11B）。それと平行して液胞の内部構造が平滑化する様子が伺えたが、孔辺細胞のプロトプラストが小さいため詳細な内部構造の観察はできなかった。

そこで、細胞のサイズが大きいこと、細胞増殖が速いこと、プロトプラスト調製や液胞の単離法が確立されていること、などの利点を持つタバコ培養細胞 BY-2 を用いて液胞の単離を行った。実験には本研究で用いたシロイヌナズナ形質転換体と同様に、液胞膜タンパク質 Vam3p と GFP との融合タンパク質を発現して液胞膜が可視化されている形質転換タバコ培養細胞 BY-GV7 を用いた（Kutsuna and Hasezawa 2002）。プロトプラスト調製の後、パーコール溶液中での遠心分離操作により液胞を単離し、外部浸透圧変化に対する応答を調べた。低浸透圧処理では、培地に水を添加して外部浸透圧を低下させると単離液胞は膨張し、その直径も増加した（図 12A, C）。その後、低浸透圧処理をした単離液胞の培地に飽和マンニトール溶液を添加することで外部浸透圧を上昇させたところ、膨張した単離液胞は収縮し、その直径も減少した。続けて外部浸透圧を液胞単離時と同じ程度まで上昇させたところ、液胞の直径は元の値の近くにまで戻った（図 12B）。また、この収縮に伴い単離液胞内部に複雑な膜構造が多数観察されるようになった（図 12B 右下）。

## 考察

### 気孔開閉運動における孔辺細胞液胞の役割

本研究では高等植物の気孔開閉に伴う孔辺細胞液胞の形状変化を、シロイヌナズナ GFP-Vam3p 形質転換体を用いて観察した。この形質転換体は野生型と比べても生育が正常であることが報告されており (Uemura et al. 2002)、実際に気孔開閉運動においても野生型と差は見られず、形質転換による気孔開閉運動への影響は見られなかった (data not shown)。この形質転換体の表皮切片に FC を処理して気孔を開口させると、それに伴って孔辺細胞の液胞構造が平滑化し、反対に ABA を用いて気孔を閉口させると褶曲、収縮が見られた (図 3)。顕微鏡下で得られた画像を元に計算した「複雑度」からも、気孔閉口時に液胞構造が複雑になっていることが明らかとなった (図 4)。タバコ培養細胞 BY-2 を用いた研究では、細胞周期の進行に伴って液胞の構造が変化することが知られているが (Kutsuna and Hasezawa 2002)、孔辺細胞の液胞構造も気孔の開閉に伴ってダイナミックに変化することが明らかになった。

気孔の開口に伴い、孔辺細胞全体の体積が増加することは以前の研究から報告されていた (Raschke 1979, Blatt 2000)。その際、孔辺細胞液胞の体積も増加することが示唆されていたが (Fricker and White 1990) 本研究において、Kutsuna ら (2003) の作成した立体画像再構築ソフトウェア SSR を用いて液胞の立体画像 (サーフェスモデル) を再構築し、その体積を計算したところ、気孔開口時には孔辺細胞の液胞体積が増大し、反対に気孔閉口時には減少することが実際に数値として確かめられた (図 7)。この結果から、気孔開閉時の原動力ともいえる孔辺細胞の体積変化は、液胞の体積変化に負うものではないかと推察できる。今後、何らかの細胞膜マーカーを併用することで細胞質体積を計測し、一細胞における細胞質体積と液胞体積との変化を経時的に追跡することで、気孔開閉時の孔辺細胞体積変化における液胞構造の寄与を実証できると考えられる。また、本研究で用いた立体画像構築ソフトウェア SSR では、液胞の立体画像 (サーフェスモデル) を再構築することでその体積とともに膜面積の計算が可能となった (Kutsuna et al. 2003)。その解析の結果、液胞体積は気孔の開閉に伴って増減することが明らかとなったが、同時に液胞膜表面積の変化を計算したところ、体積とは異なって、気孔開

度の変化に関わらずほぼ一定に保たれることがわかった（図 7）。この結果と、気孔閉口時は液胞構造が複雑化するという結果（図 3、図 4）とをあわせて考えると、気孔開度が低下した場合に見られる液胞構造の褶曲化は、液胞体積減少に伴って必要な表面積分以外の余剰膜を、折り畳みによりリザーブしている可能性が考えられる。反対に、気孔開口時には液胞体積が増加するが、その際に必要な液胞膜は折り畳まれている余剰膜を利用して対応している可能性が考えられる。気孔開口時の液胞膜新規合成の数値を測定したデータはないが、気孔のように可逆的に開閉し、孔辺細胞体積が増減する組織においては、毎回、液胞膜を合成、分解してその体積を変化させるよりは、液胞膜を保持して再利用するほうが外部環境によりすばやく対応でき、かつ経済的と考えられる。

### **液胞膜の形状可塑性**

気孔を ABA 処理によって閉口させると、孔辺細胞の液胞構造が複雑化し、中でもバルブ様構造の蓄積が見られた（図 3、図 10）。反対に FC 処理により気孔を開口させるとこれらの構造は消失したことから、これらの構造は気孔開閉時に液胞の膜構造を保持する上での重要な構造であると考えられる。同様の構造はシロイヌナズナ根から単離したプロトプラストや芽生えにおいても観察され、「bulb」と名づけられている（Saito et al. 2002, Uemura et al. 2002）。シロイヌナズナ芽生えにおける電子顕微鏡を使った詳細な構造観察からは、これらのバルブ構造は二重膜構造からなり、液胞の外側の膜との連結部分が存在し、液胞構造が分断されたものではないことが示唆されている（Saito et al. 2002）。本研究においても、孔辺細胞を Z 軸方向に連続的に観察した結果、この構造は液胞の外側の膜と連結している様子が観察された（図 9A, B）。さらに、顕微鏡像からはこの構造の GFP 蛍光輝度が周りの液胞外膜に比べて高く見えることから、この構造が一重膜ではなく多重膜からなる構造であることが推測される。また、連続切片観察から、ある面では球状構造に見えるものが、別の面ではシート状に液胞が陥入したような構造に見えることから（図 9A）、こうしたシート状の陥没液胞膜構造が球状構造を形成するという過程もありうるのではないかと推察される。Saito ら（2002）はこれらの液胞内膜構造の形成について、（A）シート状陥入構造が球状構造になる、（B）膜小胞が巨



大液胞構造に飲み込まれて液胞内部に球状構造ができる、(C) 多数の小胞が融合して巨大液胞構造を形成する過程の一部、という仮説を提唱しているが、本研究の観察結果は Saito らの仮説のうち、(A) を支持するものであると考えられる。また、孔辺細胞に ABA を添加し、非常に短い間隔 (30 秒間隔) で液胞構造の変化を観察したところ、液胞内部にバルブ様構造が形成された。(図 10A, B) このバルブ様構造が開口処理に伴い消失する様子が観察できたことから (図 8B)、このような液胞内部の球状構造の形成は極めて短時間で行われ、可逆的に消失する可能性も示唆された。この短い時間間隔の観察においては、一平面のみでの観察であるために、液胞内部の膜構造が上下運動した際の異なる断面を捉えているに過ぎない可能性も否定できないが、これらの観察から、液胞内部の膜構造はすばやく可逆的に変化し、気孔開閉に伴う液胞体積変化に寄与している可能性が考えられる。

#### **液胞膜の可塑性は孔辺細胞特有の現象か**

これまでの観察から、孔辺細胞は気孔の開閉に伴ってその液胞構造を変化させることが明らかとなったが、孔辺細胞は気孔を形成するための高度に分化した細胞であり、液胞構造の変化はその特殊な細胞壁形態や周辺の細胞からの影響によるものとも考えられた。しかし、孔辺細胞の細胞壁を消化し、周辺の組織から切り離されたプロトプラストの状態でも外部浸透圧変化に応じた形状変化が見られたことから (図 11A, B)、孔辺細胞プロトプラストそのものに液胞膜構造を変化させる能力があることが判明した。低浸透圧化に対する孔辺細胞プロトプラストの形状変化には細胞によって差があったが、これは表皮片の孔辺細胞においても開閉処理に対する反応に差があることを反映していると考えられる。単離した孔辺細胞のプロトプラストが浸透圧変化に応じて体積を変化させる際にも、液胞の内部構造が変化することが考えられるが、孔辺細胞のプロトプラストが小さく詳細な観察をすることができなかった。そのため細胞のサイズが大きく観察に適しているタバコ培養細胞 BY-2 を用いて単離液胞を調製し、浸透圧変化への応答を観察した。タバコ培養細胞 BY-GV7 から単離した液胞にも外部浸透圧変化による形態変化能力が認められたことから (図 12)、孔辺細胞で見られた液胞構造の動態は孔辺

細胞のみに見られる特異的現象ではなく、高等植物の持つ液胞膜そのものに備わる生物的、化学的性質に基づくものであると考えられる。今後は、液胞膜構造を形成する脂質二重膜構造の化学的性質や、浸透圧調節物質の輸送に関与する液胞膜チャネルや輸送体、そのためのエネルギーを生み出す  $H^+$ -ATPase の機能解析、およびそれらの環境変動に対する活性調節機構を調べることで、気孔の開閉における液胞膜構造の変化の寄与と変化のしくみを明らかにしていくことができると考えられる。

## まとめ

本研究では気孔開閉運動に伴う液胞の動態を明らかにすることを目的として、最初に生細胞で気孔開閉運動とその際の液胞構造の変化を観察できる実験系の確立を行なった。また、複雑に入り組んだ液胞構造を立体的に把握するため、連続切片からの3次元モデリングを行なうソフトウェア SSR を用いることにより、液胞の体積と表面積の計測を可能にした。その結果、気孔の開閉時における孔辺細胞の液胞を観察することにより、気孔の開閉に伴って孔辺細胞の液胞は体積を増減させることが明確に示された。これは、今まで孔辺細胞全体の体積変化については多くの報告があったものの、液胞の体積変化についての詳細な研究が非常に少ない中での、新たな知見である。気孔開閉時の液胞体積の変化にも関わらず液胞膜表面積は一定であるが、内部構造には大きな変化が見られた。また、細胞断面の周径と断面積の関係から導き出された複雑度と気孔開度との関係から、気孔が開けば液胞構造は平滑になり、閉じれば複雑になる傾向が統計的に示された。これらのことから液胞は膜の折り畳みによって表面積をリザーブしており、必要に応じてその構造を変化させることで、新たな膜合成を必要とせずに、急速な形状変化を可能にしているのではないかと考えられる。

植物細胞から細胞壁を除去して得られるプロトプラストや、単離液胞に浸透圧変化を加える実験では、孔辺細胞内の液胞と同様の反応が見られた。これにより、孔辺細胞で観察された液胞の性質が孔辺細胞に特有のものでなく、液胞のもつ一般的な性質によるものであることが示唆された。

孔辺細胞は、特徴的な形態やその分化過程、開閉の際の複雑なシグナル伝達が注目されており、古くからの研究対象であるが未だ解明されていないことも多い。さらに、孔辺細胞は植物細胞の中でも数少ない「動く細胞」であり、分裂期以外の細胞運動における実験系として注目すべき興味深い研究テーマであると考えられる。本研究は、この孔辺細胞の形態制御の機構解明に一石を投じたものとする。

## 謝辞

研究をまとめるにあたり、大変お世話になった以下の方々に、この場を借りてお礼申し上げます。

植物材料のシロイヌナズナの形質転換体 GFP-AtVam3p を分与してくださった京都大学大学院生命科学研究科の佐藤雅彦助教授、植村知博博士、ありがとうございました。

実験に快く協力してくださり、お世話になりました東京大学大学院理学系研究科の中野明彦教授、上田貴志助教授に深く感謝いたします。

日常生活、研究等さまざまな面でお世話になり、話し相手にもなってくださいました地球圏生態学研究室の吉良（岡）恵利佳博士、姜熙炅さん、五百城幹英さん、植物生理学研究室の桑原明日香博士、宮城敦子さん、長野県職員の星野英正さん、ありがとうございました。

研究室のまとめ役として頼りにさせていただき相談役になってくださった植物全能性制御システム解析学分野の米田新さんと、また、日常生活で大変お世話になりました田中洋子さん、小田祥久さん、ありがとうございました。修士論文の中核となるデータを作成する際に使用した画像解析プログラム、SSR を使用させていただき、さまざまな相談にも応じてくださった朽名夏磨さん、ありがとうございました。材料の BY-GV7 を分けてくださった桧垣匠さん、ありがとうございました。そして同期として話し相手にも相談役にもなってくださいくださった大塚康伸さんと光井友梨さん、ありがとうございました。見えない部分で研究室を支えてくださった秘書の光岡泉さんにお礼申し上げます。

基本的な知識のご教授から論文作成に至るまで、丁寧に指導していただき、ご多忙な中で常に相談に応じてくださった佐野俊夫助手、帝京科学大学理工学部の近藤矩朗教授に深く感謝いたします。

最後に、最高の環境を提供してくださり、また常に温かく見守ってくださった指導教官の馳澤盛一郎教授に厚くお礼申し上げます。

## 参考文献

- Assmann, SM. (1993) Signal-transduction in guard-cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 345-375
- Blatt, MR. (2000)  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Cur. Opin. Plant Biol.* 3: 196-204
- Coleman, JOD., Blake-Kalff, MMA., and Davies, TGE. (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trend. Plant Sci.* 2: 144-151
- Durbin, RD. and Graniti, A. (1975) Simple technique for obtaining functionally isolated guard cells in epidermal strips of *Vicia-faba*. *Planta* 126: 285-288
- Fricker, MD. and White, N. (1990) Volume measurement of guard cell vacuoles during stomatal movements using confocal microscopy. *Micro* 90:345-348
- Fukuda, M., Hasezawa, S., Asai, N., Nakajima, N. and Kondo, N. (1998) Dynamic organization of microtubules in guard cells of *Vicia faba* L. with diurnal cycle. *Plant Cell Physiol.* 39: 80-86
- Fukuda, M., Hasezawa, S., Nakajima, N., and Kondo, N. (2000) Changes in tubulin protein expression in guard cells of *Vicia faba* L. accompanied with dynamic organization of microtubules during the diurnal cycle. *Plant Cell Physiol.* 41: 600-607
- Fukuda, H. (2000) Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol. Biol.* 44: 245-253
- Hetherington, AM. (2001) Guard cells. *Cur. Biol.* 11: R588
- Jiang, CJ., Nakajima, N. and Kondo, N. (1996) Disruption of microtubules by abscisic acid in guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol.* 37: 697-701
- Jiang, LW., and Rogers, JC. (2001) Compartmentation of proteins in the protein storage vacuole: A compound organelle in plant cells. *Adv. Bot. Res.* 35:

- Kubitscheck, U., Homann, U. and Thiel, G. (2000) Osmotically evoked shrinking of guard-cell protoplasts causes vesicular retrieval of plasma membrane into the cytoplasm. *Planta* 210: 423–431
- Kutsuna, N. and Hasezawa, S. (2002) Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 43: 965–973
- Kutsuna, N., Kumagai, F., Sato, MH. and Hasezawa, S. (2003) Three-dimensional reconstruction of tubular structure of vacuolar membrane throughout mitosis in living tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 44: 1045–1054
- Leigh, RA. (1997) Solute composition of vacuoles. *Adv. Bot. Res.* 25: 171–194
- Linsmaier, EM. and Skoog, F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100–127
- Marty, F. (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell* 11: 587–599
- Maeshima, M. (1990) Development of vacuolar membranes during elongation of cells in mung bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 31: 311–317
- Maurel, C., Tacnet, F., Guclu, J., Guern, J. and Ripoche, P. (1997) Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 7103–7108
- McClung, CR. (2000) Circadian rhythms in plants: a millennial view. *Physiol. Plant.* 109: 359–371
- Nagata, T., Namoto, Y. and Hasezawa, S. (1992) Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 132:1–30
- Ng, CKY., McAinsh, MR., Gray, JE., Hunt, L., Leckie, CP., Mills, L. and Hetherington, AM. (2001) Calcium-based signalling systems in guard cells. *New Phytol.* 151: 109–120

- Outlaw, WH. (2003) Integration of cellular and physiological functions of guard cells. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22: 503–529
- Pallas, JE. and Mollenha, HH. (1972) Physiological implications of *Vicia - faba* and *Nicotiana - tabacum* guard - cell ultrastructure. *Amr. J. Bot.* 59: 504
- Pandey, S., Wang, XQ., Coursol, SA. and Assmann, SM. (2002) Preparation and applications of *Arabidopsis thaliana* guard cell protoplasts. *New Phytol.* 153 : 517–526
- Raschke, K. (1975) Stomatal action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 26: 309–340
- Raschke, K. (1979) Movements of stomata. in *Physiology of movements*. Springer, Berlin pp 383–441
- Raven, JA. (1997) The vacuole: A cost-benefit analysis. *Adv. Bot. Res.* 25: 59–86
- Reisen, D., Loborgne-Castel, N., Ozalp, C., Chaumont, F. and Marty, F. (2003) Expression of a cauliflower tonoplast aquaporin tagged with GFP in tobacco suspension cells correlates with an increase in cell size. *Plant Mol. Biol.* 52: 387–400
- Robinson, DG., Galili, G., Herman, E. and Hillmer, S. (1998) Typical aspects of vacuolar protein transport: autophagy and prevacuolar compartments. *J. Exp. Bot.* 49: 1263–1270
- Saito, C., Ueda, T., Abe, H., Wada, Y., Kuroiwa, T., Hisada, A., Furuya, M. and Nakano, A. (2002) A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of *Arabidopsis*. *Plant J.* 29: 245–255
- Schroeder, JI., Allen, GJ., Hugouvieux, V., Kwak, JM. and Waner, D. (2001) Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 627–658
- Staehelin, LA. and Chapman, RL. (1987) Secretion and membrane recycling in

- plant-cells novel intermediary structures visualized in ultrarapidly frozen sycamore and carrot suspension-culture cells. *Planta* 171: 43-57
- Uemura, T., Yoshimura, SH., Takeyasu, K. and Sato, MH. (2002) Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes to Cells* 7: 743-753
- Ward, JM. and Schroeder, JI. (1994) Calcium-activated K<sup>+</sup> channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* 6: 669-683
- Wink, M. (1993) The plant vacuole - a multifunctional compartment. *J. Exp. Bot.* 44: 231-246
- Wink, M. (1997) Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. *Adv. Bot. Res.* 25: 141-169.
- Yamazaki, D, Yoshida, S, Asami, T and Kuchitsu, K. (2003) Visualization of abscisic acid-perception sites on the plasma membrane of stomatal guard cells. *Plant J.* 35: 129-139
- Zeiger, E., Farquhar, GD. and Cowan, IR. (1987) Stomatal Function. Stanford University Press, Stanford, California.
- 且原真木 (2003) 水の吸収と輸送 秀潤社「植物の膜輸送システムーポンプ・トランスポーター・チャネル研究の新展開」
- 清沢桂太郎, 田沢仁, 加藤潔 (1991) 朝倉書店 「物質の輸送と貯蔵」



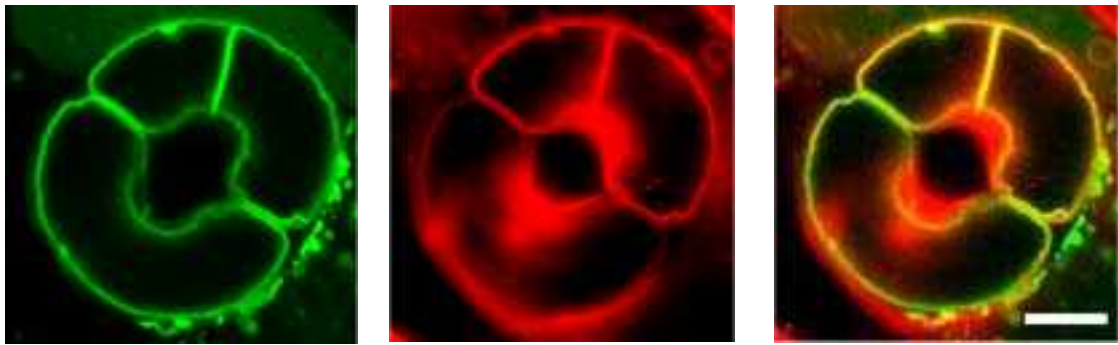
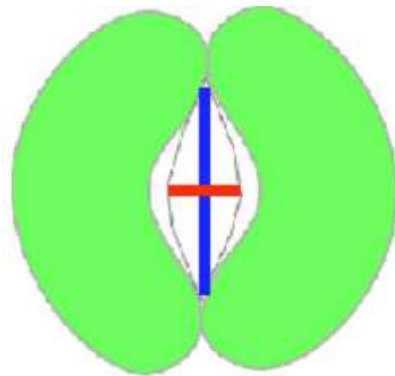


図1 GFP-AtVam3p 融合タンパク質の発現による孔辺細胞の液胞膜の可視化  
左：GFP 蛍光、中：FM4-64 蛍光、右：重ね合わせ  
Bar：5  $\mu$ m.

A



気孔開度 = 短径 / 長径

B

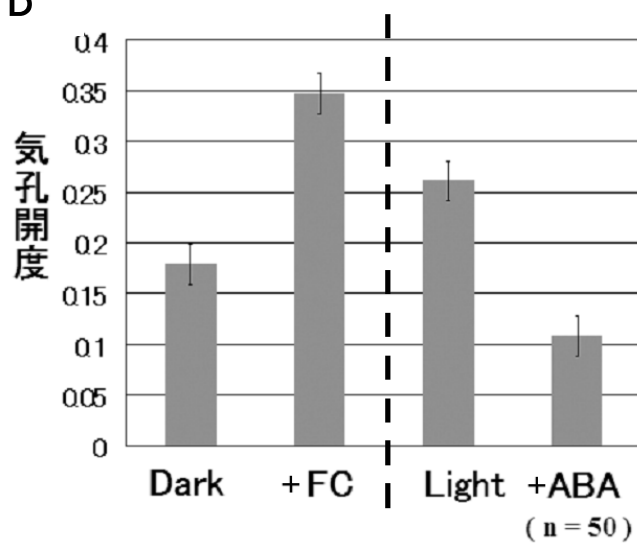


図 2 気孔開口条件および閉口条件の検討

A: 気孔開度の定義

B: 気孔開口、閉口条件の検討結果

Dark: 暗中で 2 時間静置。

+FC: 上記の処理後、 $3\mu\text{M}$  の FC を添加して暗中で 2 時間静置。

Light: 光量  $100\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  の白色光下で 2 時間静置。

+ABA: 上記の処理後、 $100\mu\text{M}$  の ABA を添加して白色光下で 2 時間静置。

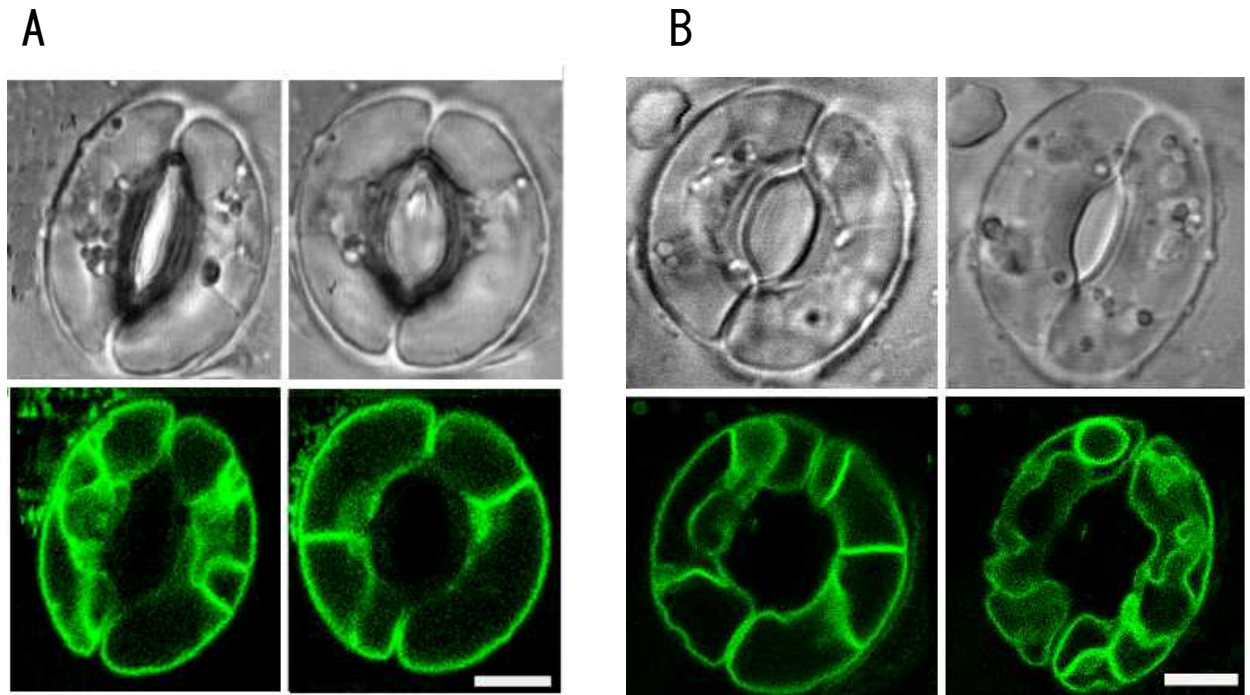


図3 同一孔辺細胞の開閉に伴う液胞構造の変化

A, Bともに上段は明視野像、下段は同時期の GFP 蛍光をあらわす。

左が薬剤処理前、右が薬剤処理 2 時間後。

A: 開口処理 (暗中で 2 時間静置した後 FC 3  $\mu$  M 添加)

B: 閉口処理 (白色光下で 2 時間静置した後 ABA 100  $\mu$  M 添加)

Bars : 5  $\mu$  m

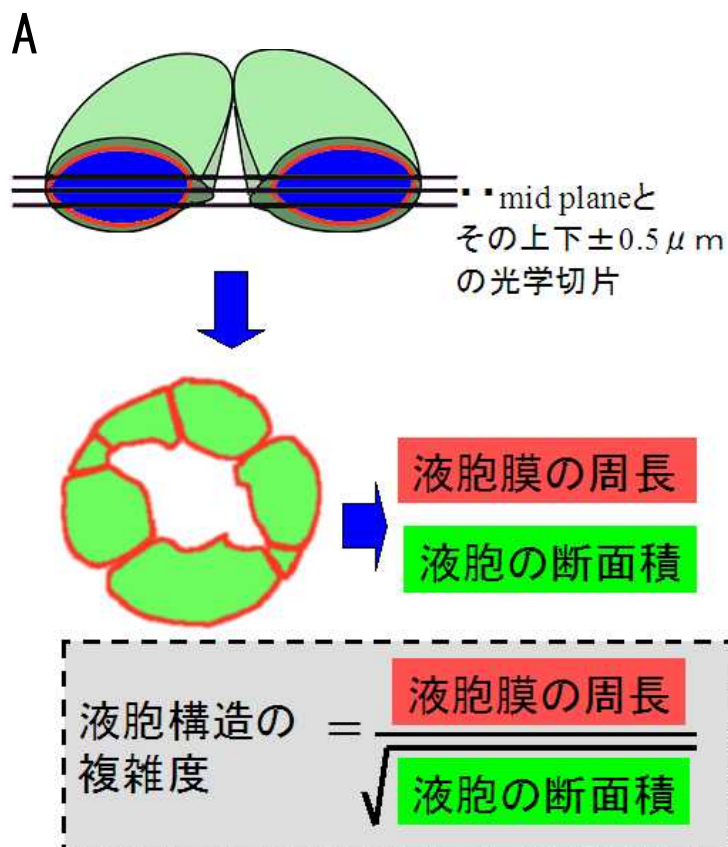


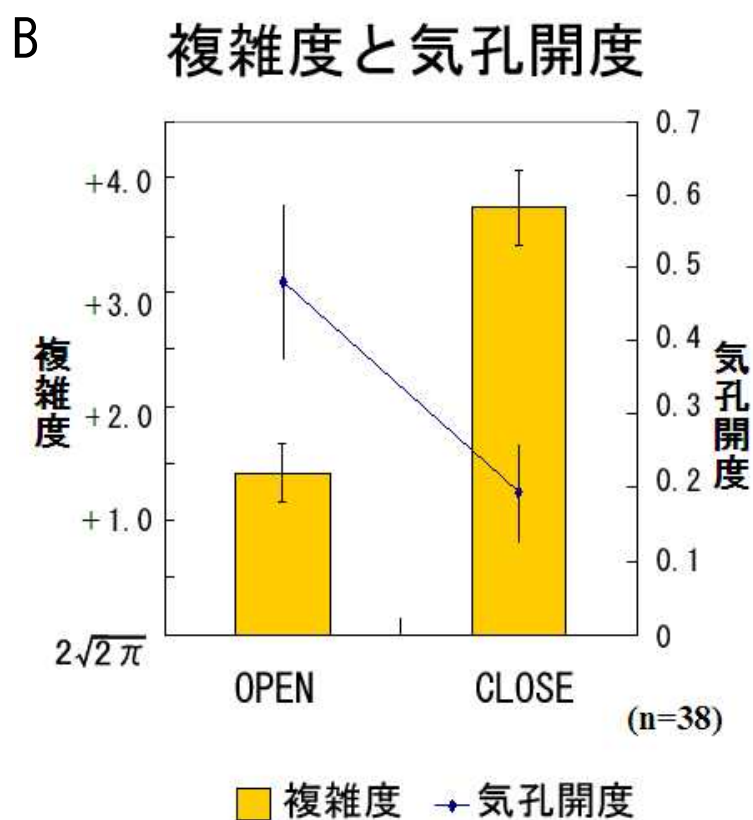
図4 気孔開閉に伴う液胞形状  
の複雑度の解析

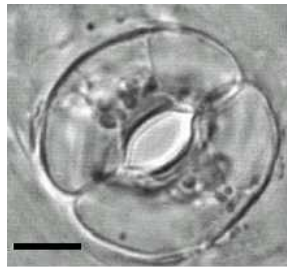
A : 複雑度の定義

B : 気孔開度と複雑度

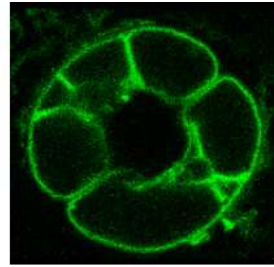
気孔開度(ドット)と複雑度(バ  
ー)を、白色光下で2時間静置し  
た孔辺細胞(OPEN)と、暗中で2  
時間静置した孔辺細胞(CLOSE)  
とで比較した。

複雑度に関しては、最も単純な  
構造を球とし、その複雑度 $2\sqrt{2}\pi$   
 $\pi$ を最低値とする。

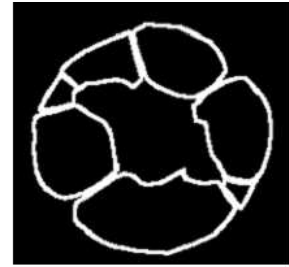




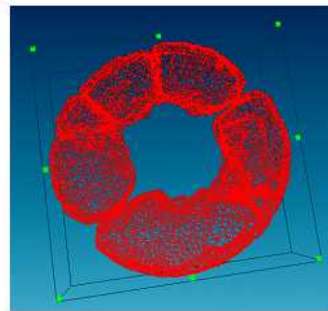
明視野像



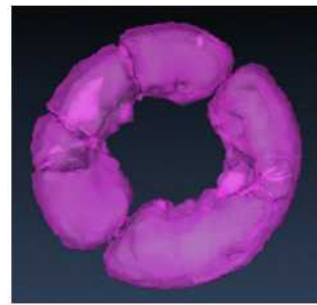
GFP



輪郭線抽出



格子形成



立体画像

図5 SSR (Stereo Structure Reconstructor)  
を用いた3次元構造解析  
Bar : 5  $\mu$ m

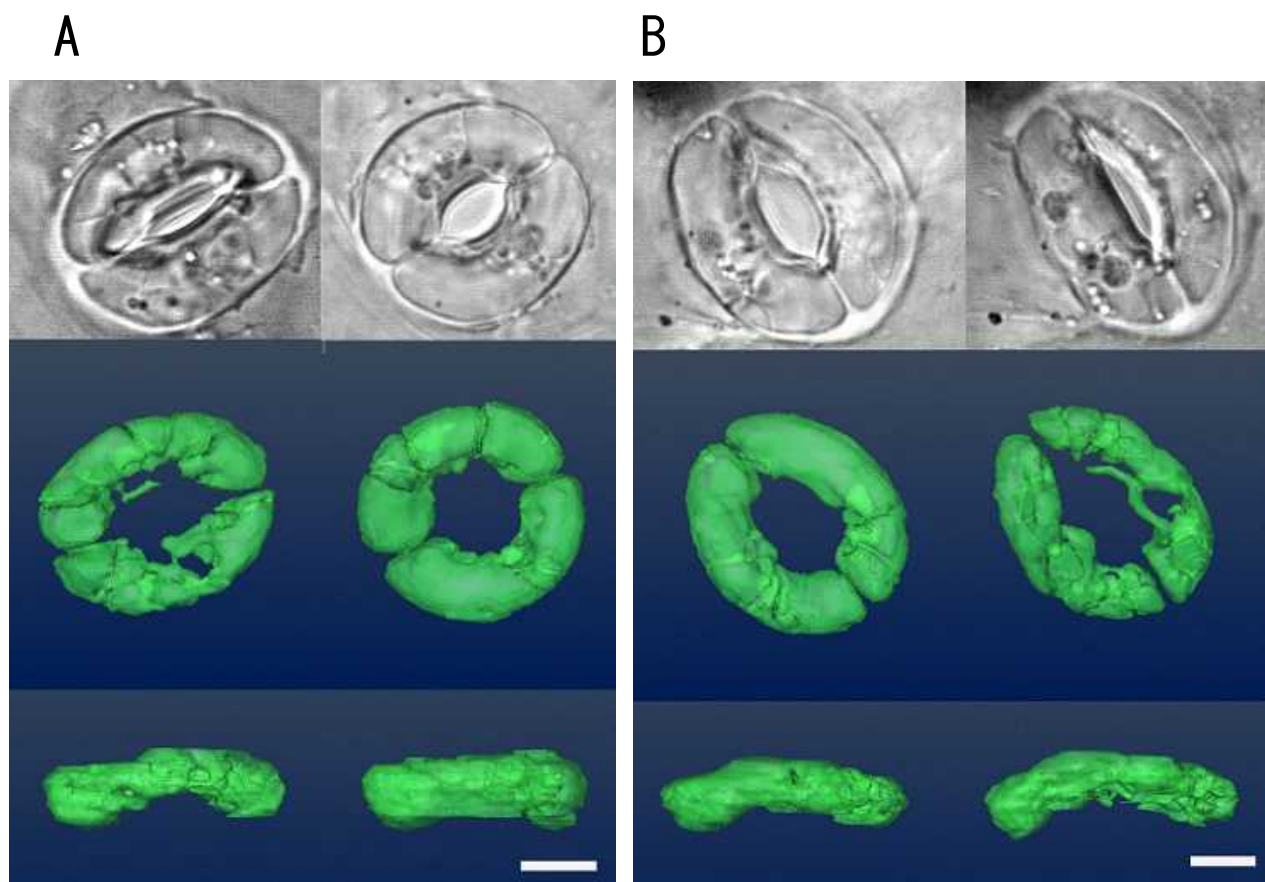


図6 SSRによる液胞の立体画像解析

A, Bともに上段は明視野像、中・下段は同時期の液胞の立体画像をあらわす。中段は正面から、下段は側面から見た図。

左が処理前、右が処理後。

A: 開口処理（暗中で2時間静置した後FC 3  $\mu$ M 添加）

B: 閉口処理（白色光下で2時間静置した後ABA 100  $\mu$ M 添加）

Bars : 5  $\mu$ m

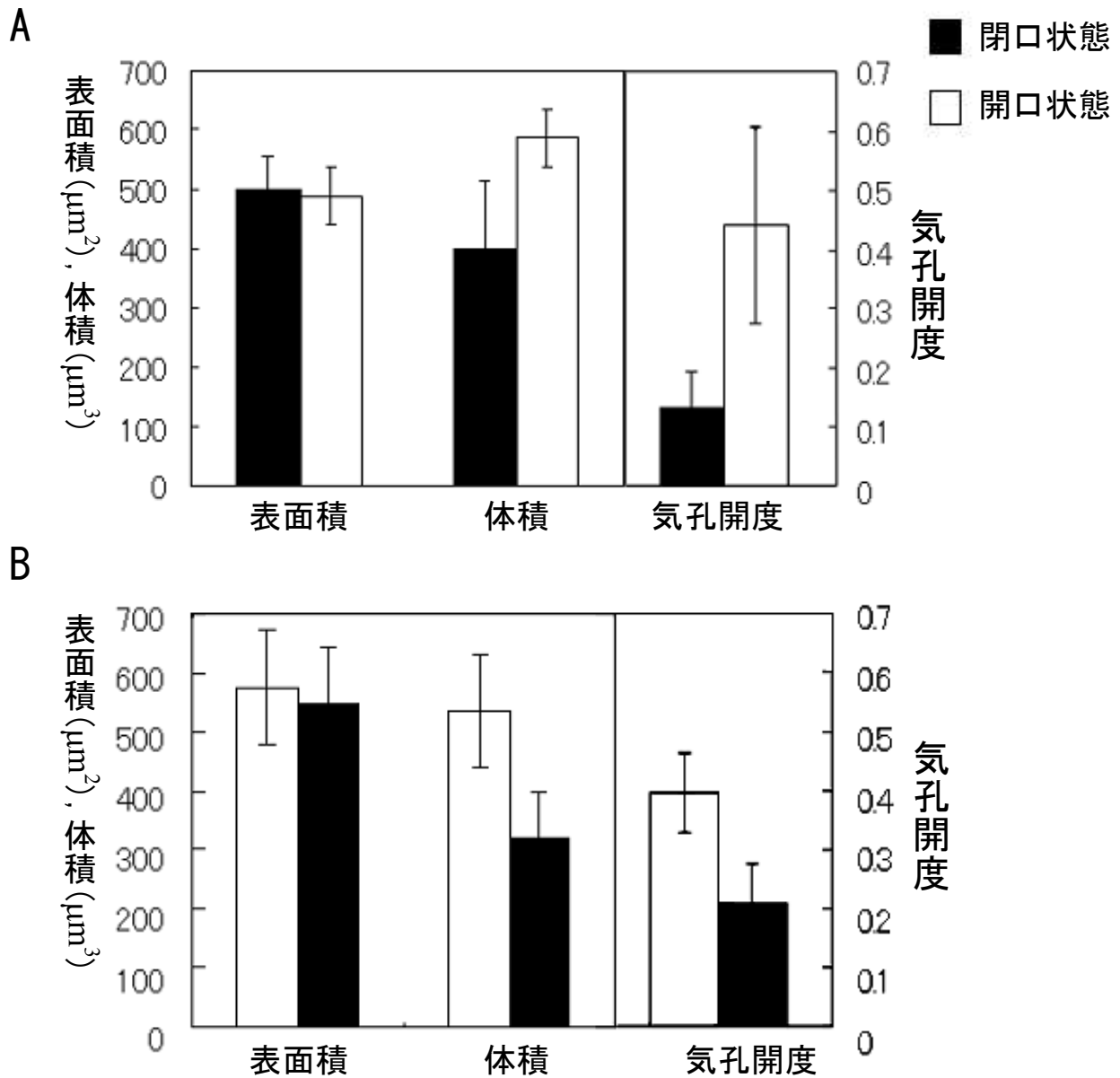


図 7 気孔開閉と液胞の表面積、体積の変動

開口処理、閉口処理前後での表面積、体積、気孔開度を計測した。

A. B とともに左バーは表面積 ( $\mu\text{m}^2$ )、中バーは体積 ( $\mu\text{m}^3$ )、右バーは気孔開度を表す。左バーと中バーは左縦軸、右バーは右縦軸。

バーの色：黒は閉口状態、白は開口状態をさす。

A: 暗中で 2 時間静置し気孔を閉じさせた状態(黒)と、FC を添加し 2 時間静置して気孔を開かせた状態(白)の表面積、体積、気孔開度を計測した。n=5

B: 白色光下で 2 時間静置し気孔を開かせた状態(白)と、ABA を添加し 2 時間静置して気孔を閉じさせた状態(黒)の表面積、体積、気孔開度を計測した。n=6



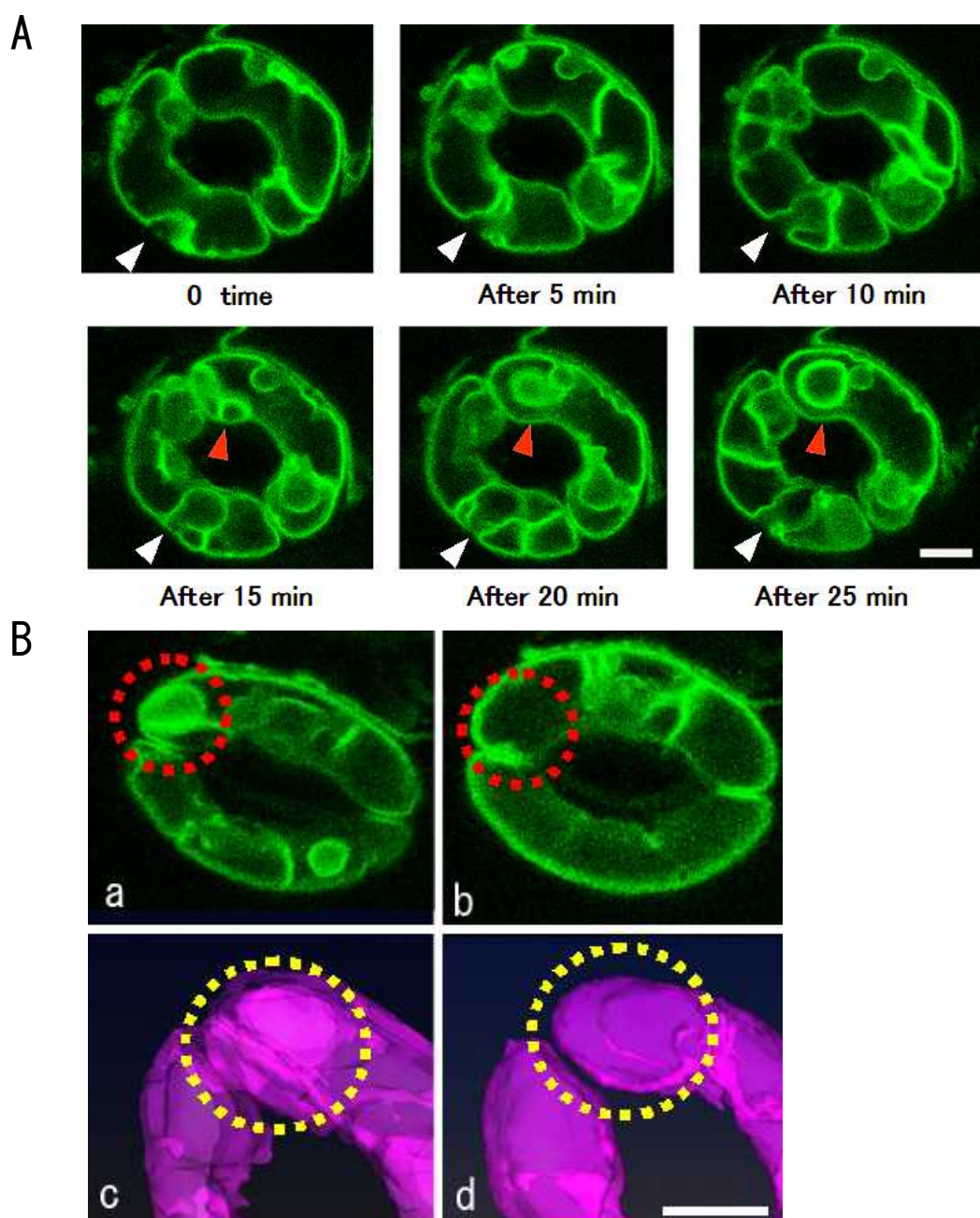


図8 薬剤添加による液胞膜の形状変化

A: 50  $\mu$ M ABA 添加による閉口処理前後の孔辺細胞液胞の形状を観察した。

矢じり(赤): バルブ様構造が形成される様子。

矢じり(白): 液胞膜の陥入が進み液胞を貫通する様子。

B: 3  $\mu$ M FC 添加による開口処理前後の孔辺細胞液胞の形状を観察した。

a, b は GFP 蛍光像、c, d は SSR で再構築した液胞の立体画像を中が透けて見えるように表示したもの。

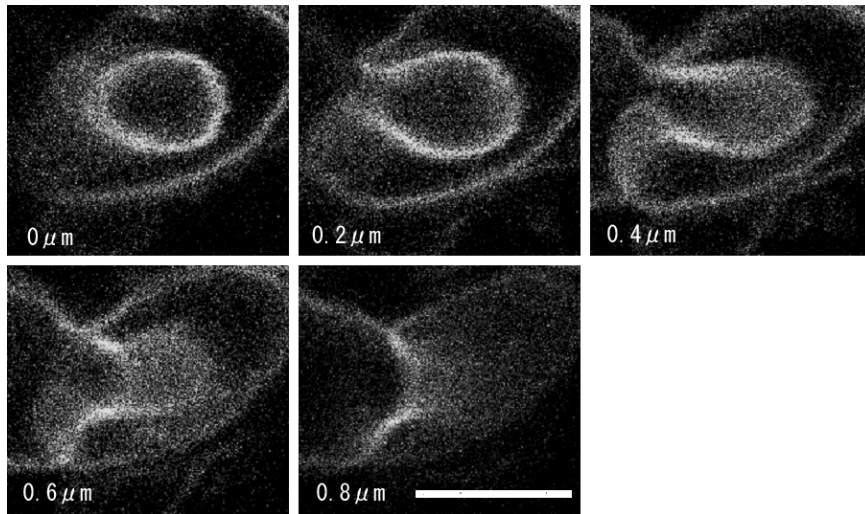
a, c が処理前、b, d が処理後。(FC)

破線サークルはバルブ様構造が存在した箇所を示す。

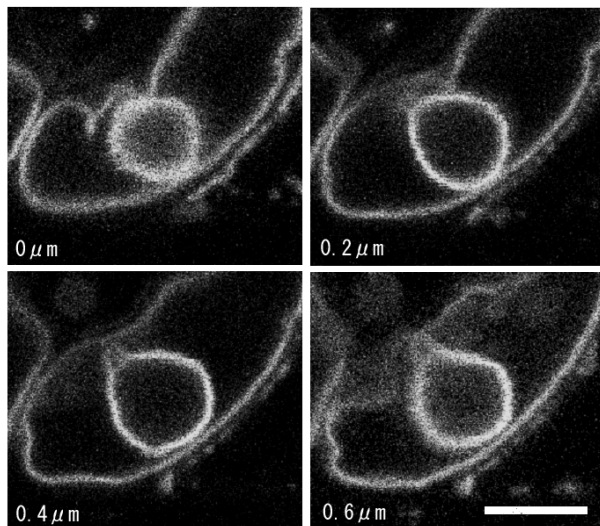
Bars : 5  $\mu$ m



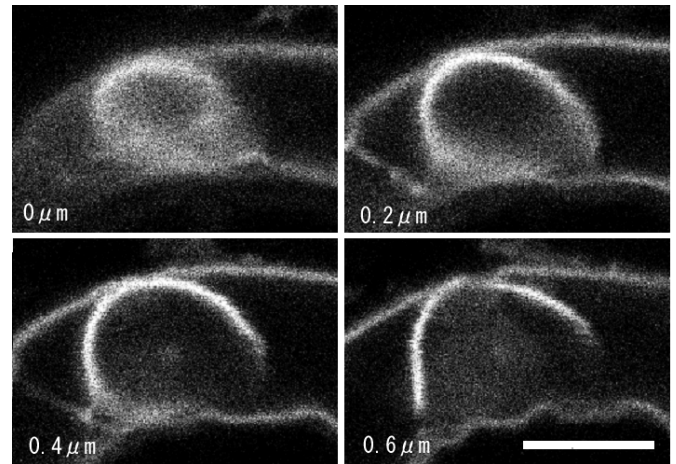
A



B



C



D

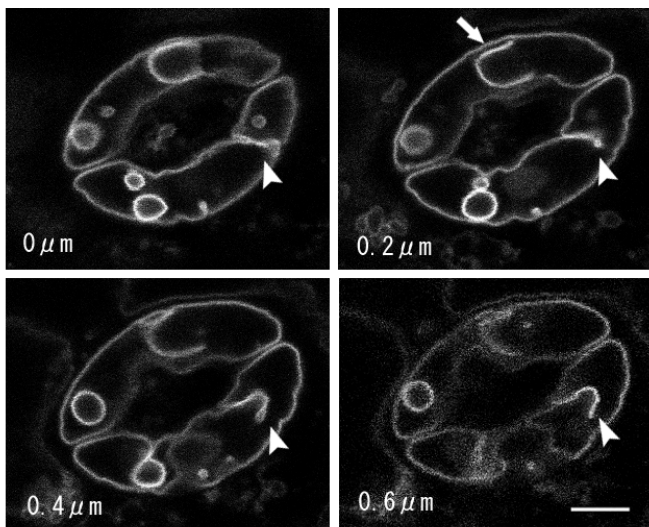


図9 液胞構造のZ軸方向の連続光学切片像  
A, B, C, D はいずれも  $0.2\mu\text{m}$  間隔で撮影した。

A:  $0\mu\text{m}$  ではバルブ様構造を形成しているように見えるが、焦点を  $0.4\mu\text{m}$  ずらすと隣接する液胞の外側の膜と連絡していることがわかる。

B:  $0\mu\text{m}$  では完全な球状に見える構造が、焦点を  $0.4\mu\text{m}$  ずらすと隣接する液胞の外側の膜の一部であることがわかる。

C: 馬蹄状の液胞膜構造

D: 馬蹄状の液胞膜構造（矢印）と、シート状の液胞膜構造が折れ曲がる様子（矢じり）

Bars :  $5\mu\text{m}$

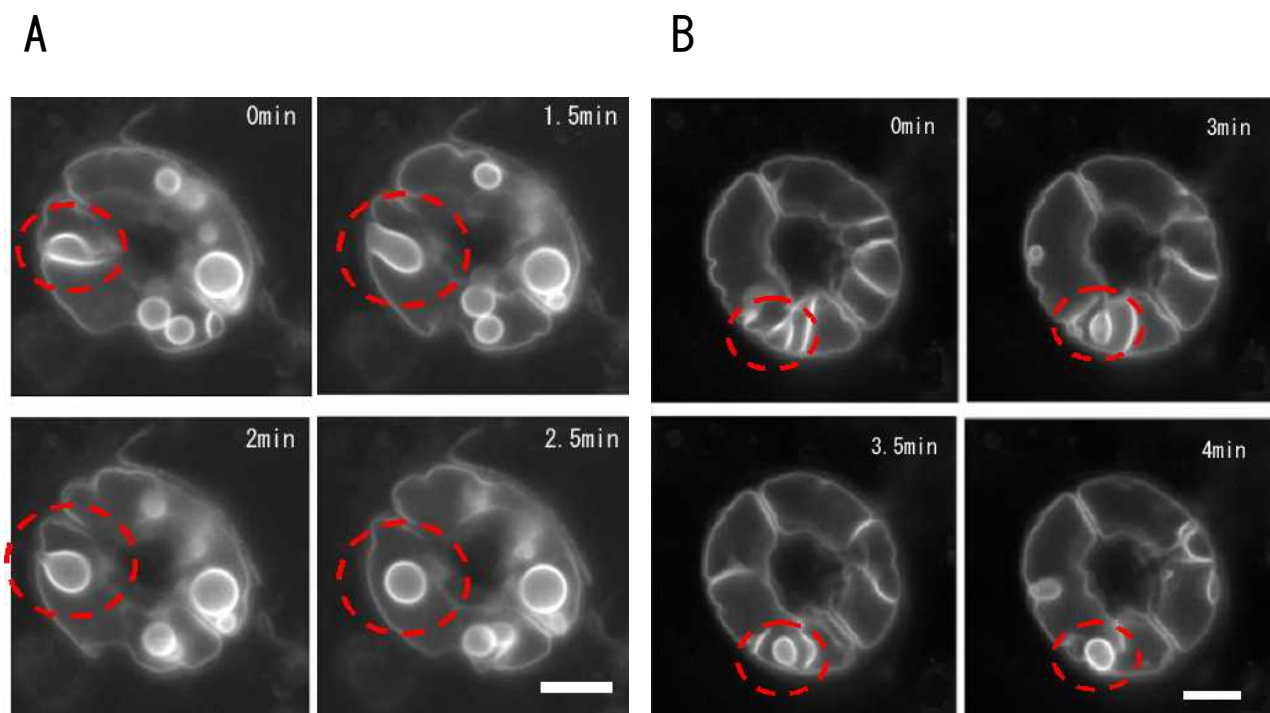


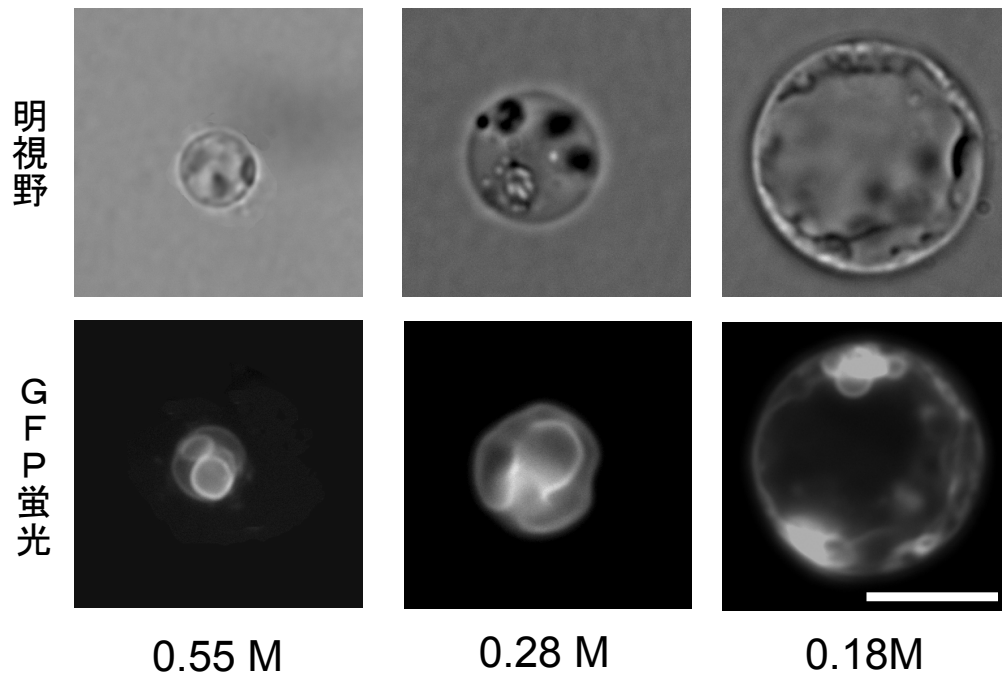
図 10 短時間でのバルブ様構造の形成過程

ABA  $25\mu\text{M}$  を与え、バルブ様構造の形成過程を 30 秒おきに観察した。

破線サークルはバルブ様構造の発生箇所を指す。シート状の陥入構造（A: 0min, B: 0min）が、馬蹄状構造（A: 1.5min, B: 3min）に変わり、球状のバルブ様構造（A: 2.5min, B: 4min）に変化していく様子が見える。

Bars :  $5\mu\text{m}$

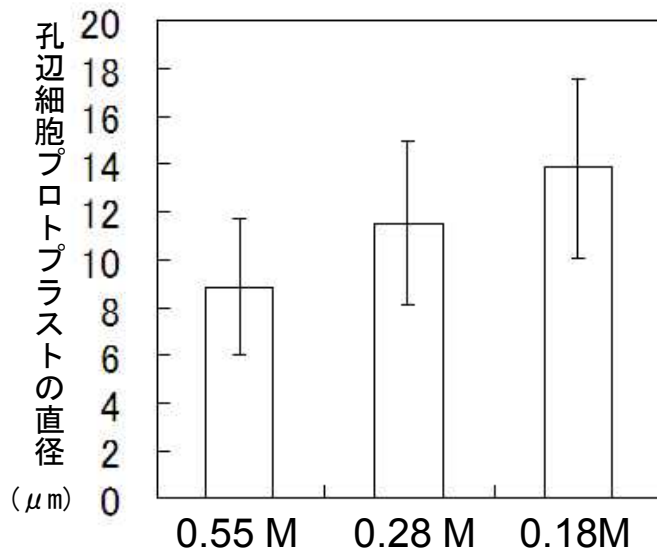
A



Bar: 10  $\mu$ m

浸透圧はマンニトール換算 (M)

B



浸透圧はマンニトール換算 (M)

n=30

図 11 孔辺細胞プロトプラストの浸透圧変化に対する形状変化

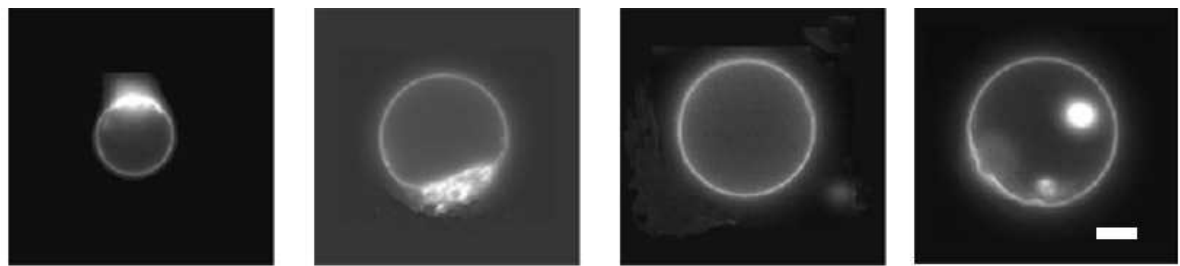
プロトプラスト調製時に用いた buffer (マンニトール 0.55M) に水を加えて外部浸透圧を順次 0.28M, 0.18M へと低下させた。

A: 外部浸透圧を低張にした際の孔辺細胞プロトプラストの様子

上段は明視野像、下段は GFP 蛍光像を表す。

B: 外部浸透圧変化時の孔辺細胞プロトプラストの直径

A



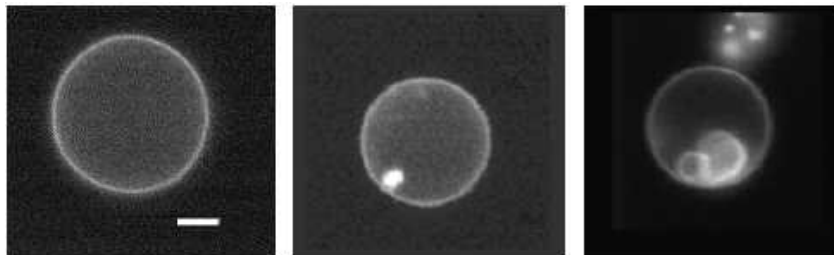
0.6 M

0.3 M

0.24 M

0.2 M

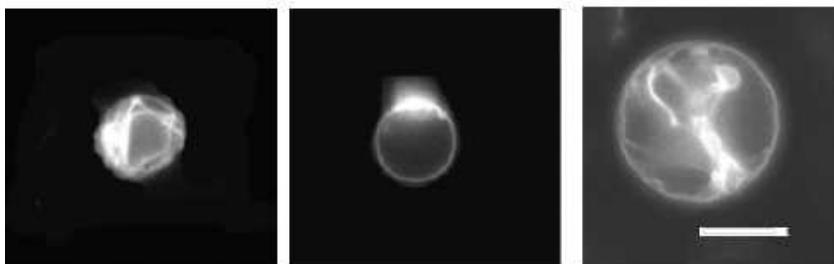
B



0.2 M

0.4 M

0.52 M



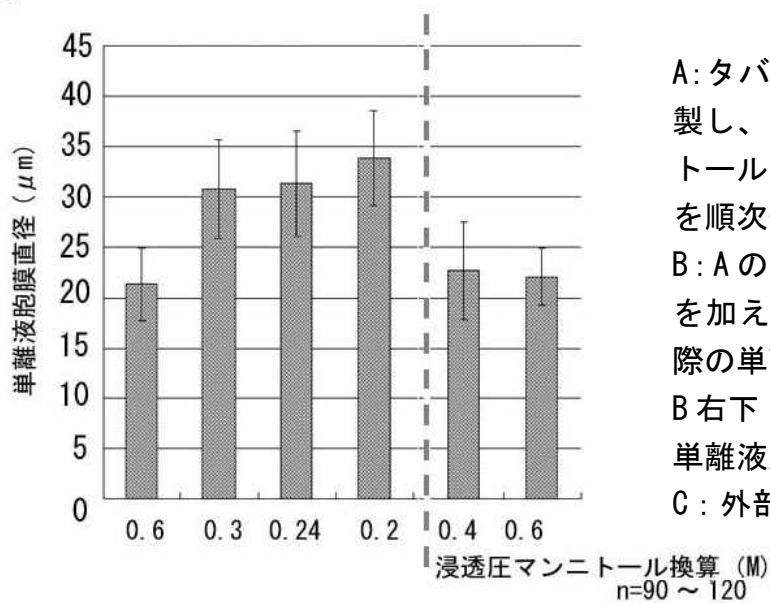
0.6 M

0.6 M (初期状態)

0.6 M (拡大)

浸透圧マンニトール  
換算 (M)  
Bars: 10  $\mu$ m

C



水添加

マンニトール添加

図 12 浸透圧変化時の単離液胞の挙動

A: タバコ BY-GV7 細胞から単離液胞を調製し、その際に用いた buffer (マンニトール 0.6M) に水を加えて外部浸透圧を順次低下させた際の単離液胞の様子。  
B: A の状態に飽和マンニトール (約 1M) を加えて外部浸透圧を順次増加させた際の単離液胞の様子。  
B 右下: B の処理の結果観察された単離液胞内の複雑な内部構造  
C: 外部浸透圧変化時の単離液胞の直径