

# 液胞の発達を伴う高等植物細胞の生長機構の解析

植物全能性制御システム解析学分野 学生証番号 56512 大窪 恵美子  
指導教員 馳澤 盛一郎

## 序論

生物にとって生長は基本的な生理現象である。一般的に、動物では細胞数の増加が生長量の大部分を占めるが、植物では分裂後の細胞体積の増加が生長量の大部分を占める。植物の茎や根で観察される伸長生長は、細胞の体積増加とその方向性の両者を厳密に制御することで実現される。植物細胞の体積増加は細胞壁を内側から押す力（膨圧）によってなされるが、膨圧の発生には浸透圧調節物質を蓄積することで水を取り込む液胞が重要な役割を果たすと考えられる。一方、細胞の体積増加の原動力である膨圧には方向性がないため、細胞骨格である微小管やアクチン繊維が植物細胞の形づくりに関して方向性の制御に関与すると考えられる。

そこで、本研究では液胞の発達を伴う植物細胞の生長のしくみを明らかにするために、細胞体積の増加に必須である液胞構造と、細胞形態の制御に必要な細胞骨格系の 2 種の細胞内構造に注目した。まず、液胞への水輸送に関わる液胞膜型アクアポリン (TIP) に着目し、培養系や液胞の形態学的な知見が充実しているタバコ BY-2 細胞の TIP を同定した。次に、巨大液胞を除去した細胞であるミニプロトプラストから巨大液胞の発達と細胞の伸長生長を誘導する実験系を確立し、液胞の発達を伴う細胞生長における TIP の役割について解析した。さらに、この細胞生長誘導系を用いて、植物細胞の伸長生長における細胞骨格系の役割について解析した。

## 結果と考察

### 1. 液胞の発達を伴う細胞生長における TIP の関与

#### タバコ BY-2 細胞における液胞膜型アクアポリン遺伝子 (*NtγTIP*) の同定

細胞生長における液胞発達の役割を解析するために、タバコ BY-2 細胞の液胞膜型アクアポリン遺伝子を同定し、*NtγTIP* (*Nicotiana tabacum*  $\gamma$ -tonoplast intrinsic protein) と名付けた。また、*NtγTIP* の細胞内局在を調べるため、*NtγTIP* に GFP を融合したタンパク質 (*NtγTIP-GFP*) を恒常的に発現するタバコ BY-2 の形質転換細胞を作成し、BY-GG (transgenic BY-2 cells expressing *NtγTIP-GFP*) 細胞と名付けた。顕微鏡観察の結果、*NtγTIP-GFP* は液胞膜に局在していることが確認された。また、BY-GG 細胞ではコントロールとして用いた液胞膜可視化細胞である BY-GV 細胞と比べて *NtγTIP* の発現量が約 3 倍に増加しており、BY-GG 細胞から調製した単離液胞は、低浸透圧処理に対する液胞の体積増加が速くなったため、*NtγTIP-GFP* がアクアポリン活性を保持している可能性が示された。

#### ミニプロトプラストの巨大液胞再生系の確立

液胞の発達過程を経時的かつ詳細に解析するため、BY-GV 細胞より巨大液胞を取り除いたミニプロトプラストから巨大液胞を再生させる培養系を確立した。タバコ BY-2 細胞 (図 1A) を酵素処理によってプロトプラスト化 (図 1B) し、高密度溶液中で遠心し、ミニプロトプラスト (図 1C) を調製した。ミニプロトプラスト回収直後は、巨大液胞はほぼ完全に除去されていたが (図 1C)、伸長培地で培養したところ、培養 6 時間目には網状の液胞が細胞全体に展開し (網状液胞)、12 時間目には均一な網状の液胞の径が太くなり (チューブ状液胞)、24 時間目以降には伸長方向の両端に偏りをもって巨大液胞が再生した (図 1D)。本培養系で

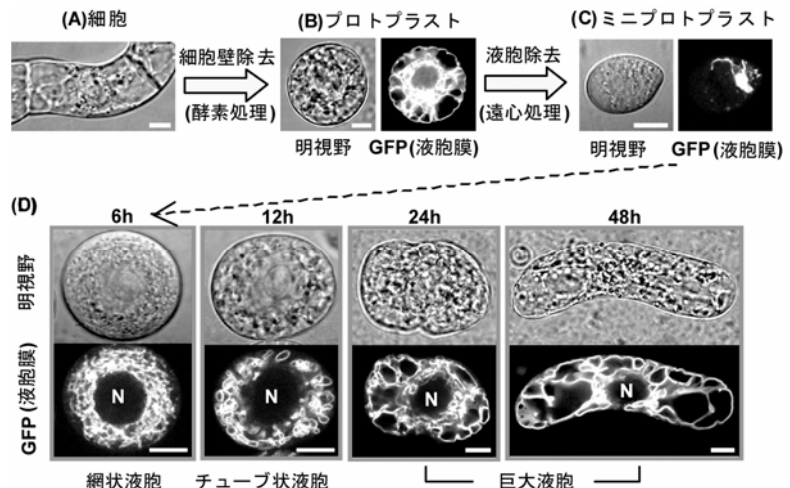


図1 巨大液胞の除去と再生。N:細胞核 Scale bars: 10 μm

は液胞の再生が同調的に起こるため、これまで *in planta* では解析が困難であった液胞構造の顕微鏡観察のみならず、液胞の発達段階に応じた目的遺伝子の発現解析も容易になった。

### ミニプロトプラストの液胞発達過程における NtyTIP の機能解析

ミニプロトプラストの液胞の発達過程における *NtyTIP* の発現量を定量したところ、培養開始後 8 時間目および 32 時間目に *NtyTIP* の発現量が高くなることがわかった (図 2)。培養開始後 8 時間目は網状液胞からチューブ状液胞への移行が、32 時間目は巨大液胞の発達がそれぞれ最も顕著に観察される時間帯であったため、*NtyTIP* の発現調節により液胞発達および伸長生長が制御されている可能性が考えられた。この可能性を検討するため、*NtyTIP* を恒常的に発現する BY-GG 細胞とコントロールである BY-GV 細胞からミニプロトプラストを調製し、両者の液胞構造の変化を解析した。その結果、BY-GG 細胞では、BY-GV 細胞と比べて網状液胞の消失が早まり、チューブ状液胞や巨大液胞をもつ細胞の割合が増加したことから、液胞の発達が促進されることが示された (図 3)。さらに、伸長生長に伴う細胞形態の変化を顕微鏡画像から定量的に評価したところ、BY-GV 細胞の場合、培養 24 時間で細胞断面積が約 2.1 倍に増加したのに対し、BY-GG 細胞の場合、約 2.5 倍に増加することがわかった (図 4)。また、細胞の長軸と短軸の長さを調べたところ、いずれも BY-GG 細胞の方が BY-GV 細胞よりも増加していたが、細胞伸長度 (細胞長軸/細胞短軸) では有意な差はみられなかった。以上の結果から *NtyTIP* の恒常的発現により液胞の発達と細胞生長が促進され、細胞生長において液胞膜型アクアポリン *NtyTIP* が細胞の体積増加に関与する可能性が示された。

### 2. 液胞の発達を伴う細胞生長における細胞骨格の役割

微小管を可視化した細胞を用いて、ミニプロトプラストの生長における表層微小管の配向の変化を観察した結果、まずランダムな配向をもつ表層微小管が出現し、その後、細胞伸長方向の決定とともに伸長方向に対して垂直な配向をもつ表層微小管が観察された。そこで、細胞の伸長方向の決定以前に微小管を破壊したところ、細胞の伸長方向がはっきりせず、ほぼ球状のまま肥大した。一方、細胞の伸長方向決定後に微小管を破壊しても、細胞体積や細胞伸長度の増加には影響がなかった。以上の結果から、表層微小管はミニプロトプラストの伸長方向の決定に重要な役割を果たすが、液胞体積や細胞体積の増加には直接関与しないと考えられた。次に、アクチン繊維を可視化した細胞からミニプロトプラストを調製し、FM4-64 により液胞膜を染色し、同時に可視化したところ、液胞膜に近接するアクチン繊維が観察された。そこで、アクチン繊維を破壊したところ、液胞構造は変形し、複数の液胞へと断片化した。細胞体積や細胞伸長度の増加には影響しなかった。よって、アクチン繊維は液胞構造の維持には必須であるが、細胞体積の増加には直接関与しないと考えられた。

#### まとめ

- ・タバコ BY-2 の液胞膜型アクアポリン遺伝子 *NtyTIP* を同定した。
- ・巨大液胞を除去したミニプロトプラストから液胞発達を伴う細胞生長を誘導する培養系を確立した。
- ・細胞の体積増加に液胞膜型アクアポリン *NtyTIP* が関与している可能性を示した。
- ・細胞の伸長方向の決定には表層微小管の配向が、液胞構造の維持にはアクチン繊維が重要な役割を果たすことを示した。
- ・液胞の吸水による体積増加は細胞骨格に依存しない可能性を示した。

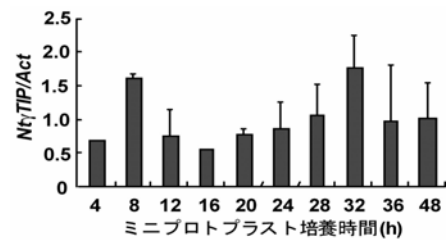


図2 ミニプロトプラストの液胞発達過程における *NtyTIP* の発現量の変化. Bars: SE

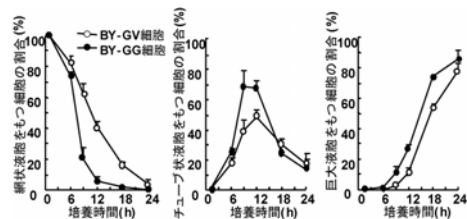


図3 *NtyTIP* 過剰発現によるミニプロトプラストの液胞発達の促進. 左; 網状液胞をもつ細胞の割合. 中; チューブ状液胞をもつ細胞の割合. 右; 巨大液胞をもつ細胞の割合. Bars: SE

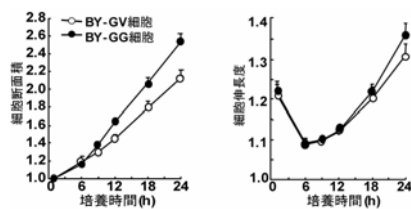


図4 *NtyTIP* 過剰発現によるミニプロトプラストの生長促進. 左; 細胞断面積の変化. 右; 細胞伸長度の変化. Bars: SE

修了年月 2007年3月

専攻・コース名 先端生命科学

氏名 大窪恵美子

論文題目 液胞の発達を伴う高等植物細胞の生長機構の解析

キーワード 液胞, アクアポリン, 細胞生長, ミニプロトプラスト, 細胞骨格

指導教員名 馳澤盛一郎

指導教員役職 教授