

シロイヌナズナ葉表皮細胞の形態形成に関与する膜交通および細胞骨格の解析

植物全能性制御システム解析学分野 指導教員 馳澤 盛一郎

2011年3月修了 学籍番号 47-096302 秋田 佳恵

【序論】

細胞の形態形成は、細胞機能や多細胞生物の体制を担う重要な過程である。植物細胞は全体が均一に成長する拡散成長と、細胞の一部が一方向に突出する先端成長により、さまざまな形態を実現することが知られている。植物細胞の中でも特に双子葉植物の葉表皮細胞はジグソーパズル型の複雑な形態をとる。この形態形成過程では、隣り合う細胞の突出領域と陥入領域が協調して入り組みながら細胞成長する点で特徴的であり、その細胞生物学的な過程の解明が待たれている。

植物細胞の成長には、小胞が細胞膜と融合して新たな細胞膜成分を供給するとともに、細胞膜外（アポプラスト）へ細胞壁成分を分泌する膜交通経路（エキソサイトーシス）が不可欠である。先端成長する根毛や花粉管の先端ではエキソサイトーシスが活発であり、ゴルジ体およびゴルジ体由来する分泌小胞が先端部に密集することが知られている。一方、植物の根や茎を構成する細胞では細胞骨格構造により成長方向が制限されることが知られている。しかしながら、葉表皮細胞においてエキソサイトーシスや細胞骨格による成長方向の制御機構の存在は不明瞭であった。そこで本研究では、ライブイメージングと電子顕微鏡を用いて、シロイヌナズナの葉表皮細胞の形態形成における膜交通と細胞骨格構造の可視化解析を行った。

【結果と考察】

ゴルジ体トランス層マーカースT-mRFPを用いた表皮細胞における膜交通の局在性の解析

共焦点レーザー顕微鏡を用いて 35S プロモーター下でトランス槽マーカースT-mRFPを発現するシロイヌナズナの成熟葉の表皮組織を観察したところ、ゴルジ体のほかに、表皮細胞辺縁部においても mRFP 蛍光が局在することを新たに見出した（図 1A）。ST-mRFP 発現株に対し、原形質分離およびアポプラスト画分抽出を行った結果、mRFP は表皮組織のアポプラストに局在することがわかった。

ST-mRFP のアポプラスト局在と細胞成長の関係を明らかにするため、発芽後 40 日目の成熟した個体を用いて葉齢の異なる葉を観察したところ、細胞成熟に伴って ST-mRFP はゴルジ体からアポプラストへと主な局在を変化させた。また、成熟葉において表皮細胞辺縁部のアポプラストに局在する ST-mRFP は、辺縁部のなかでも特に湾曲部に集積しているように観察された（図 1A 矢尻）。そこで、細胞辺縁部の曲率と mRFP 蛍光輝度を定量的に評価したところ、曲率が高いほど mRFP 蛍光も高いことがわかり（図 1B）、表皮細胞辺縁部のアポプラストにおける ST-mRFP は細胞湾曲部において顕著に集積していることが示された。これらの結果から、細胞成熟の過程でゴルジ体からアポプラスト、特に細胞湾曲部へ標的された局所的なエキソサイトーシスが存在する可能性が示唆された。

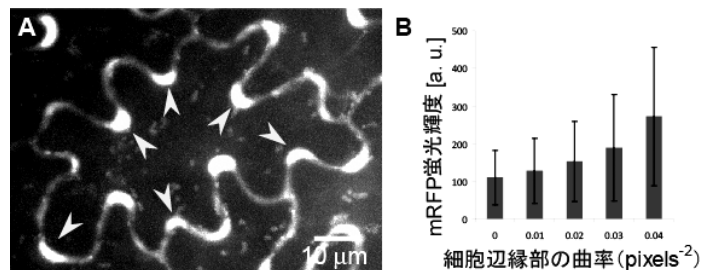


図 1. (A) 解析に供した画像例。矢尻で細胞辺縁部における ST-mRFP の集積を示した。(B) 細胞辺縁部の曲率と mRFP 蛍光輝度の関係。曲率が高いほど mRFP 蛍光が高い傾向が認められた。

透過型電子顕微鏡を用いたアポプラストにおける微細構造の解析

葉表皮細胞における局所的な膜交通に関わる微細構造を捉えるため、発芽後 40 日目の野生株の若い葉（葉身の長さ 2-3 mm, 8-10 mm）の表皮組織を透過型電子顕微鏡に用いて観察した。その結果、表皮細胞において、直径およそ 200-800 nm の細胞膜の特徴的な陥入構造と、その陥入構造に取り囲まれたアポプラスト領域に細胞質由来と思われる直径およそ 20-50 nm の小胞状構造が多数見出された（図 2 矢印）。この観察から、多胞体と呼ばれる細胞質成分を多数含む小胞が細胞膜と融合する可能性が示唆された。動物において多胞体がエキソサイトーシスに関わることは既に知られているが、植物ではその存在が明らかになっておらず、植物における新奇の細胞間コミュニケーション機構の存在が示唆された。



図 2. 葉表皮細胞の電子顕微鏡観察。アポプラスト領域に細胞質由来と考えられる多数の小胞状構造が観察された。Bar=0.5 μ m

突出領域基部においてゴルジ体のクラスターおよびアクチン繊維の束化構造が観察された

局所的なエキソサイトーシスの存在が示唆された突出領域について、ゴルジ体シス層マーカーERD2-GFP を用いて経時観察を行った結果、突出領域の細胞輪郭に沿うように盛んに動くゴルジ体（図 3 丸印）および、突出領域の基部においてクラスター化したゴルジ体が存在することが見出された（図 3 矢印）。また、アクチン繊維マーカーGFP-ABD2 により、突出領域の基部において突出方向に対し垂直に並んだアクチン束が観察された（図 4A 矢印）。これらの結果から、突出領域の基部においてアクチン束がゴルジ体のクラスター化に関与している可能性が示唆された。また、微小管マーカーGFP-tubulin β により、微小管は表皮細胞の中心軸と同じ方向に配向することで細胞成長方向を制御する可能性が示唆された（図 4B）。

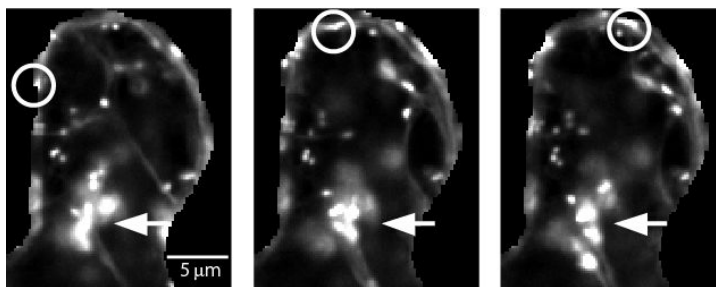


図 3. 葉表皮細胞におけるゴルジ体の経時観察（30 秒間）。突出領域の細胞輪郭に沿って動くゴルジ体（丸印）および突出領域の基部においてクラスター化したゴルジ体が観察された（矢印）。

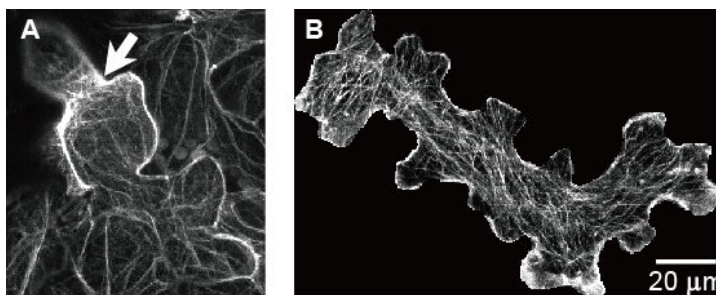


図 4. 葉表皮細胞における細胞骨格の観察。アクチン繊維は突出領域基部において束化していた（A 矢印）。微小管は細胞の中心軸と同じ方向に配向していた（B）。

【総括】

本研究の結果、葉表皮細胞において細胞湾曲部へ標的されたエキソサイトーシスの存在が示唆された。今後、電子顕微鏡観察により見出されたアポプラストにおける多数の小胞状構造について mRFP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法により植物における多胞体のエキソサイトーシスへの関与を直接的に示したいと考えている。また、細胞骨格による成長方向の制御が局所的な膜交通と協調的に機能することで、ジグソーパズル型の細胞形態形成が実現することが考えられた。