

論文内容の要旨

論文題目

Mechanism of pavement cell morphogenesis and stomatal distribution patterning in plant leaf epidermis (葉の表皮組織における細胞形態と気孔分布に関する研究)

氏名 秋田 佳恵

【序論】

葉は植物にとって効率的に光合成を行う重要な器官である。より多くの日光を受けるには葉面積の拡大が必要であり、それを実現するのが二次元的に広がる一層の表皮組織である。葉の表皮組織は主に表皮細胞と孔辺細胞からなる。多くの双子葉植物における表皮細胞は、扁平だが隣接する表皮細胞同士が入り組んだ複雑なジグゾーパズル型をしており、成熟に伴って形状を変化させることから（図 1）、特有の形態形成機構が存在すると考えられる。本研究では、葉の表皮組織の構築について細胞レベルでの理解を目的とし、葉の拡大に関与する表皮細胞の形態形成、および葉が行う光合成に関与する孔辺細胞の分布について研究を行った。

植物細胞は細胞膜の外側であるアポプラスト領域に細胞壁を有する。そのため植物細胞の成長には、細胞内の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、アポプラストへ細胞壁成分を分泌する膜交通経路が重要である。このアポプラストへの膜交通、すなわちエキソサイトーシスは、先端成長を行う根毛や花粉管の先端で活発に行われており、そこにはゴルジ体および分泌小胞が密集している。本研究では、これまで知見の乏しかった表皮細胞のエキソサイトーシスに着目し、ゴルジ体マーカーを用いて可視解析を行った。

植物細胞の成長方向の制御には、細胞成長方向の「たが」として機能するセルロース微繊維を、自身と同じ向きに配列させる微小管が関与する。拡散成長を行う茎や根を構成する細胞では、微小管が器官の伸長方向と垂直に配向し、細胞は細長く伸長する。表皮細胞においても微小管の重要性は示唆されているが、配向および役割に関する統一的な見解は得られていない。本研究では、

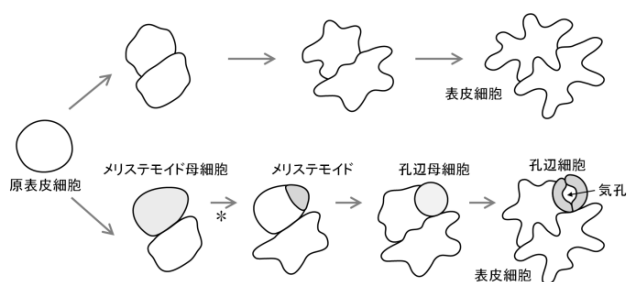


図 1：葉の表皮組織を構成する細胞の成熟過程の模式図 表皮細胞は隣接細胞の突出領域と湾入領域が協調して細胞成長する。メリステモイド母細胞の不等分裂(*)により将来、孔辺細胞となる気孔系譜細胞が決定し、段階的に孔辺細胞へと分化する。

定性的に評価されていた表皮細胞の微小管配向について画像処理技術による定量的解析を行った。

葉の表皮組織には、一対の孔辺細胞に囲まれた小孔である気孔が存在する（図 1）。気孔は、葉から水を蒸散させることで根における吸水や養分の取り込みを促進し、光合成ではガス交換を行う通気孔の役割をもつ。いくつかの双子葉植物では気孔が隣接しないよう分布しており、この気孔配置の規則は *one-cell spacing rule* と呼ばれている。この気孔分布には気孔分化の鍵因子である複数の転写因子の関与が報告されている。本研究では、外的要因による影響を調べるため、播種段階からスクロース水溶液への水浸処理を行い、気孔分布を調べた。

【結果と考察】

1. 表皮細胞の湾曲部形成に関与する局所的な膜交通

ゴルジ体トランス槽を蛍光標識する Sialyl Transferase (ST) -mRFP を発現するシロイヌナズナの葉表皮組織において、ST-mRFP がゴルジ体の他に、表皮細胞辺縁部にも局在することを見出した（図 2）。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明らかとなり、mRFP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法においてもアポプラストへの局在が確認された。さらに、ST-mRFP のアポプラストへの局在と細胞成長の関係を明らかにするため、発芽後 40 日目の成熟個体を用いて葉身の長さが異なる葉を観察したところ、葉の成熟に伴い 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（図 3）。

また、成熟葉において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。そこで、湾曲部を 2 細胞間で突出領域と湾入領域が入り組む部分、または 3 細胞が隣接して三つ又となっている部分に分けて、湾曲部の曲率と mRFP 蛍光輝度を測定したところ、2 細胞間からなる湾曲部でのみ、曲率と mRFP 蛍光輝度の相関関係が認められた（図 4）。さらに、膜交通の阻害剤ウォルトマンニンを追加した蒸留水中で展開させた子葉を観察したところ、表皮細胞の湾曲が弱まり、曲率と mRFP 蛍光輝度の相関関係は認められなかった。これらの結果から、表皮細胞の形態形成過程では 2 細胞間からなる湾曲部に標的された局所的なエキソサイトシスが起きていることが示唆された。

膜交通に関わる超微細構造を捉えるため、透過型電子顕微鏡を用いて表皮組織を観察したところ、野生株において細胞膜の直径 200-800 nm の特徴的な陥入構造と、その陥入構造に取り囲まれ

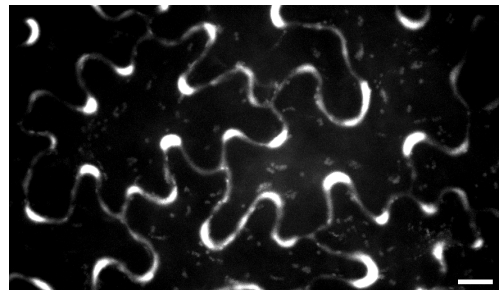


図 2: ST-mRFP 発現株の表皮組織。ゴルジ体および表皮細胞辺縁部で mRFP 蛍光輝度が高い。Bar = 10 μ m

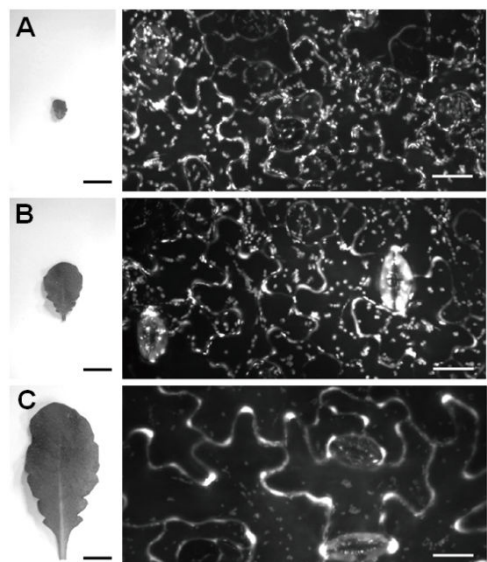


図 3: 葉の成熟に伴う ST-mRFP 局在変化。葉身の長さ 3 mm (A)、10 mm (B)、25 mm (C) の葉 (左) の表皮組織 (右)。ST-mRFP はドット状のゴルジ体から、アポプラストへと主な局在を変化させた。Bars = 5 mm (左)、10 μ m (右)。

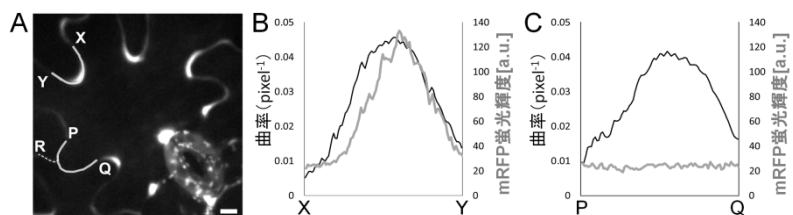


図 4: 細胞湾曲部の曲率と mRFP 蛍光輝度。解析した画像例(A)における 2 細胞間の湾曲部（線分 XY）について(B)、および三つ又の湾曲部（線分 PQ）について(C)、曲率（黒色）と mRFP 蛍光輝度（灰色）を測定した。2 細胞間の湾曲部においてのみ、曲率と mRFP 蛍光輝度に相関がみられた。Bar = 5 μ m。

たアポプラスト領域に直径 30-100 nm の小胞状構造が、化学固定および凍結固定した試料で観察された (図 5)。この構造は paramural body (PMB) と呼ばれ、オオムギにおける病原菌への防御応答時や、イネの細胞内輸送に関する変異体にて観察例がある。これらの PMB は、細胞質成分を多数含む小胞構造である多胞体が、エキソサイトーシスを行う過程で細胞膜と融合した結果生じた構造である可能性が指摘されている。本研究の PMB は葉身 2-3 mm の若い葉においてよく観察されたことから、表皮組織の成熟過程で細胞の面積拡大に伴う多量の分泌が行われる時期に、多胞体がエキソサイトーシスで働く可能性が示唆された。

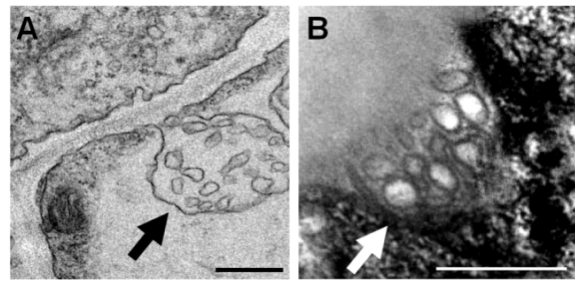


図 5：表皮組織における PMB
化学固定(A)および凍結固定(B)した表皮組織において、PMB (矢印) が確認された。Bars = 500 nm.

2. 表皮組織における微小管の配向と役割

微小管を蛍光標識した GFP-tubulin β 発現シロイヌナズナの表皮組織を撮像し、画像処理技術により微小管を線分として抽出すると共に、表皮細胞の複雑度を測定した。また細胞形状の指標として細胞領域から得た細胞中心軸に対する、微小管の平均角度 ($\Delta\theta$) を個々の表皮細胞について測定した。細胞内のすべての微小管が細胞中心軸に平行または垂直に配向する場合、 $\Delta\theta$ はそれぞれ 0° または 90° を示す。測定の結果、微小管は細胞伸長方向と比較的平行に配向することが明らかとなった (図 6)。この配向は、拡散成長における微小管配向よりも、細胞の一部分が伸長する先端成長における微小管配向と類似していることから、表皮細胞の突出領域形成は局所的な先端成長様式である可能性が示唆された。

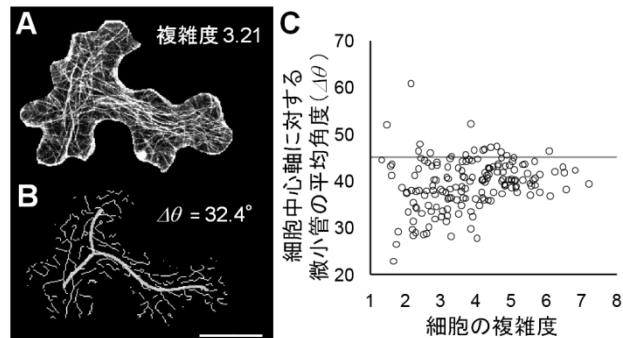


図 6：表皮細胞における微小管配向
表皮細胞を領域分割し(A)、微小管 (B 細線) と細胞中心軸 (B' 太線) を抽出した。細胞中心軸に対する微小管の平均角度 ($\Delta\theta$) は概ね 45° 未満であった(C)。N = 166。Bar = 10 μ m.

さらに表皮組織の構築と微小管構造との関係を調べるため、阻害剤を添加した蒸留水中で展開させた子葉を観察した。微小管の重合阻害剤プロピザミド、コルヒチンおよびオリザリンを処理したところ微小管は破壊され、微小管の脱重合阻害剤タキソールを処理した場合には、長く渦巻いた微小管構造が観察された。いずれの微小管阻害剤においても表皮細胞の湾曲が顕著に弱まったことから、微小管の重合と脱重合が表皮細胞の形態形成に重要であると示唆された。

3. スクロース水溶液を用いた水浸処理による one-cell spacing rule への影響

表皮組織の電子顕微鏡観察を行う過程で、1-5%スクロース水溶液に水浸処理したシロイヌナズナの子葉において、one-cell spacing rule が破綻し、気孔が隣接してクラスター化することを発見した。気孔のクラスター化は 3%グルコース水溶液および 3%フルクトース水溶液への水浸処理でも観察されたが、3%マンニトール水溶液では確認されなかったため、浸透圧による影響ではないことが示された (図 7)。気孔は、メリステモイド母細胞の不等分裂 (図 1*印) により細胞運命の異なる娘細胞がつくられ、一方が気孔系譜細胞となり、メリステモイド、孔辺母細胞、孔辺細胞と段階的に分化することで発生する (図 1)。そこで、気孔をクラスター化させるスクロース処理が、表皮組織における細胞運命に変化を及ぼすかを調べるため、小胞体マーカー GFP-ER により気孔系譜細胞を特異的に標識するエンハンサートラップライン E1627 を 3%スクロース水溶液

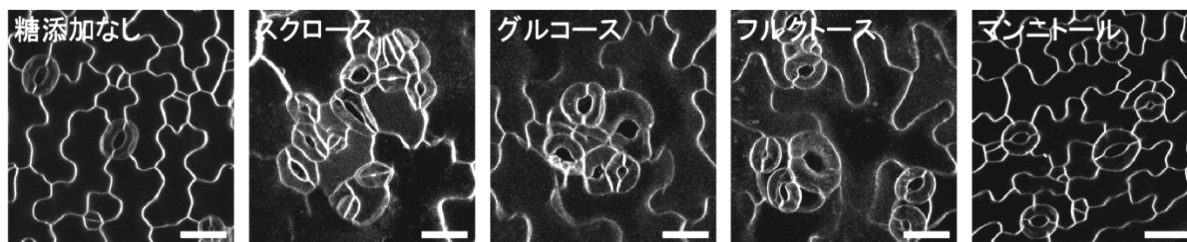


図 7：各種水溶液への水浸処理が及ぼす気孔分布への影響 蛍光色素 FM4-64 により細胞膜を染色した。スクロースおよびグルコース、フルクトース水溶液内で発芽した子葉では one-cell spacing rule が破綻した。Bars = 20 μm.

中で発芽させたところ、気孔に隣接するジグゾーパズル型の細胞においても GFP 蛍光が確認された (図 8)。この結果は、本来は気孔系譜細胞のみで発現する遺伝子が気孔系譜以外の細胞でも発現していることを示しており、スクロース処理が表皮組織において細胞運命を変化させたことを示唆している。

スクロース処理により気孔の隣接細胞の遺伝子発現が変化した原因について、気孔系譜細胞が決定する不等分裂時に (図 1*印)、細胞を仕切る新しい細胞壁に異常が生じた可能性が考えられた。植物の細胞分裂過程では、細胞壁の前駆体である細胞板が拡大する際、カロースの蓄積を伴う。カロースを標識するアニリンブルー染色の結果から、スクロース処理区では分裂面における顕著なカロース蓄積が認められなかった (図 9)。以上の結果は、スクロース処理が細胞壁形成の異常を介して気孔のクラスター化をもたらしたことを示唆する。気孔系譜細胞の段階的な分化を制御する気孔分化の鍵因子が、不完全な細胞壁を通して隣接細胞に漏れ出て細胞運命を変化させた可能性が示された。本研究で確立したスクロース水溶液への水浸処理は、有用かつ簡便な実験手法であることから今後、気孔の発生や細胞壁合成の研究にも貢献すると期待される。

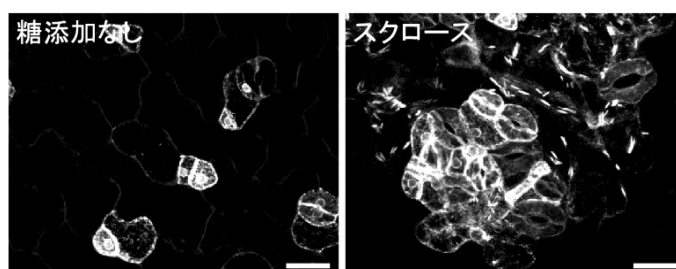


図 8：気孔系譜マーカーへの影響 スクロース水溶液への水浸処理により、孔辺細胞に隣接するジグゾーパズル型細胞においても気孔系譜マーカーの発現が確認された。Bars = 20 μm.

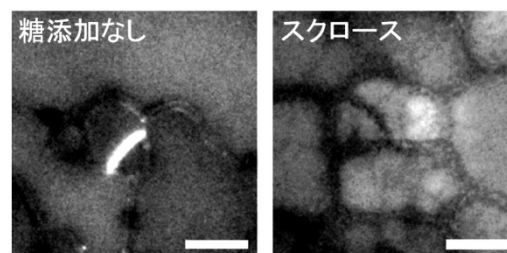


図 9：メリステモイド母細胞の不等分裂におけるカロース蓄積 スクロース処理区では、顕著なアニリンブルー蛍光が確認されなかった。Bars = 10 μm.

【結論】

表皮細胞の形態形成に着目した研究から、湾曲部形成に関与する局所的なエキソサイトシスの存在が示唆された。また微小管配向の定量的解析により、表皮細胞の突出領域形成は局所的な先端成長様式である可能性が示された。これらは今後、表皮細胞のジグゾーパズル型という特殊な細胞形状がもつ生理学的意義にも迫る研究である。さらにスクロース水溶液への水浸処理が表皮組織における細胞運命を変化させたことから、植物細胞における細胞壁は細胞形状だけではなく細胞分化にも関与し、ひいては葉という器官の形状や機能にも影響する可能性が示された。