

超微細構造から紐解くシロイヌナズナ の子葉細胞内オルガネラの機能解析

課題番号：15570048

平成15年度～平成18年度科学研究費補助金

基盤研究(C)

研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 林 八寿子

(新潟大学・自然科学系・助教授)

はしがき

細胞内のオルガネラの動態や微細構造解析、変異株における微細構造変化やオルガネラへの影響について、電子顕微鏡を駆使した超微細構造解析によって明らかにした。特にシロイヌナズナの子葉の表皮細胞で我々が発見した ER-body の機能解析を中心に、以下のような研究をおこなった。

1) シロイヌナズナ子葉表皮細胞内で見つかった ER-body の機能形態学的解析

小胞体残留シグナルを付加した GFP を発現させ、ER-body が可視化できる株 (GFP-h) を更に EMS 処理することにより作出した ER-body 形態変異株 3 系統について解析し、それぞれの系統での変異表現型から、ER-body 形成のメカニズムについて考察した。

2) シンタキシンノックアウト株を用いたミロシン細胞内での ER-body の機能解析

t-SNARE であるシンタキシンをノックアウトされている株 (*at-Vam3*) が示すミロシンを異常に蓄積するという現象がどのようなメカニズムであるのかを明らかにした。また、ミロシンを蓄積する特殊な細胞 (ミロシン細胞) 内での ER-body の役割についても解析した。

3) 凍結固定法および、凍結置換法による植物組織体の電子顕微鏡試料作成技術の開発

急速凍結装置 HIF-4K が植物組織細胞の凍結固定に利用できるかどうかを調べた。また、加圧凍結装置 HPM-010 を用いた単細胞緑藻クラミドモナス細胞の凍結固定を試みた。

研究代表者

新潟大学理学部助教授 林 八寿子

研究組織

研究代表者： 林 八寿子 (新潟大学自然科学系・助教授)
研究協力者： 桜井 寿之 (新潟大学大学院・学生)
 中村 潤 (新潟大学・学生)
 西村いくこ (京都大学理学研究科・教授)
 上田 晴子 (日本学術振興会研究員)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	1,400	0	1,400
平成16年度	700	0	700
平成17年度	900	0	900
平成18年度	700	0	700
総計	3,700	0	3,700

研究発表

[1] 学会誌等

1. Ryo Matsushima, Yasuko Hayashi, Kenji Yamada, Tomoo Shimada, Mikio Nishimura and Ikuko Hara-Nishimura. The ER body, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in Arabidopsis. Plant Cell Physiol. 44. 661-666 (2003)
2. H.Ueda C Nishiyama, T Shimada, Y Koumoto, Y Hayashi, M Kondo, T Takahashi, I Ohtomo, M Nishimura, I Hara-Nishimura.:AtVAM3 is required for normal specification of idioblasts, myrosin cells.Plant and Cell Physiol., 47(1), 164-175 (2006)

[2] 学会発表

1. 上田晴子, 林八寿子, 嶋田知生, 西村いくこ
蛍光タンパク質を用いた小胞体の分化の解析, 第 45 回日本植物生理学会年会, 東京, 2004 年 3 月
2. 上田晴子, 西山千晶, 中村潤, 林八寿子, 大友一郎, 高橋卓, 嶋田知生, 西村いくこ
シロイヌナズナ AtVAM3 変異体はミロシナーゼを多量に蓄積する, 第 46 回日本植物生理学会年会, 新潟, 2005 年 3 月
3. 桜井寿之, 松島良, 西村いくこ, 林八寿子
シロイヌナズナにおける ER body 変異体の形態学的解析, 第 46 回日本植物生理学会年会, 新潟, 2005 年 3 月
4. 篠崎晃子, 佐藤渚, 林八寿子
クラミドモナスにおけるペルオキシソーム酵素の輸送シグナルと発現解析, 第 46 回日本植物生理学会年会, 新潟, 2005 年 3 月
5. 上田晴子, 西山千晶, 嶋田知生, 河本恭子, 林八寿子, 近藤真紀, 大友一郎, 高橋卓, 西村幹夫, 西村いくこ.
シロイヌナズナ AtVAM3 (SNARE タンパク質 VAM3 ホモログ) はミロシン細胞の分化に関与する, 第 47 回日本植物生理学会年会, 茨城, 2006 年 3 月
6. 篠崎晃子, 佐藤渚, 林八寿子
クラミドモナスにおけるペルオキシソーム酵素の輸送シグナルと発現解析, 第 46 回日本植物生理学会年会, 新潟, 2005 年 3 月
7. 篠崎晃子, 林八寿子
緑藻におけるペルオキシソーム輸送シグナルの機能解析, 第 70 回日本植物学会年会, 熊本, 2006 年 9 月

[3] 総説・その他

1. 免疫電子顕微鏡法

林 八寿子、西村幹夫

細胞工学 別冊 植物細胞工学シリーズ 2 1、 p211-216(2005)

2. 免疫電子顕微鏡法

林 八寿子、西村幹夫

細胞工学 別冊 植物細胞工学シリーズ 2 2、 p126-131(2006)

3. 高圧凍結および凍結置換法による電子顕微鏡試料作成

林 八寿子

日本作物学会紀事 (Jpn. J. Crop Sci.) vol. 76, p128-130(2007)

研究成果

Chapter 1

シロイヌナズナ子葉表皮細胞内で見つかった “ER body” の機能形態学的解析

要約

粗面小胞体 (rough endoplasmic reticulum, rER) は分泌輸送経路の入り口であり, ここで合成された新生タンパク質は, 液胞やリソソーム, 細胞外へとそれぞれの目的地へ向けて輸送されていく. この分泌輸送経路は, 小胞を介したゴルジ体を経由するものがほとんどであると考えられていたが, 近年, 様々な植物種において小胞体由来の多様な構造体が発見され, ゴルジ体を経由しない輸送経路の存在が明らかとなっている. これら小胞体由来の構造体の形成機構は, すべての植物種において共通したメカニズムをもつと考えられる.

ER body は, シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* の栄養器官の表皮細胞内に特異的に存在する小胞体由来の紡錘状の構造体である. 小胞体残留シグナルを付加した緑色蛍光タンパク質 GFP-HDEL を発現する形質転換シロイヌナズナ (*GFP-h*) では, ER body を可視化することができる. この形質転換体の解析から, ER body の主要構成成分や生理機能が少しずつ明らかにされている. 本研究では, ER body の形成メカニズムや機能を明らかにするために, 子葉の老化に伴う ER body の挙動について詳しい解析を行った. また, *GFP-h* を EMS 処理した突然変異体から ER body の形態が異常であると考えられる 3 つの系統を選び出し, 形態学的な解析を行った.

1. 子葉の老化に伴う ER body の挙動解析

子葉の ER body は, 子葉の老化に伴って, その数が減少する. また, 子葉の基部付近と先端部付近の表皮細胞で, ER body の挙動が異なる. 本研究では, 発芽後 5, 7, 10, 11, 13, 15 日目の *GFP-h* の子葉を共焦点レーザー顕微鏡で観察し, 基部付近と先端部付近に分けてそれぞれの 1 細胞内の ER body を計数した. ER body には, 正常の大きさのものと半分以下の大きさのものがあり, これらを区別して計数した. 1 細胞中の正常型 ER body 数は, 発芽後日数の経過とともに減少し, 基部付近では 15 日目に完全に消失した. 一方, 先端部付近の ER body は基部付近のものと比較して, 緩やかに減少する傾向を示し, 観察期間中に完全に消失する細胞は少数であった. 小型の ER body は, 常時 10 個前後観察されたが, 完全消失直前の 13 日目には基部付近で最大 80 個まで著しく増加した. このことから, 子葉の ER body は, 老化に伴い正常型の形成数が減少し, 一時的に小型のものが数多く形成された後に完全に消失することが明らかとなった.

2. ER body 形態異常株の形態学的解析

GFP-h を EMS 処理した変異体の発芽後 5 日目の子葉を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で観察した. A2 系統では, 表皮細胞内に正常な ER body の数が少なく, 正常な小胞体ネットワークの他に GFP 蛍光を発する異常な凝集体を形成していた. A28 系統では, 小胞体ネットワークは観察されず,

GFP 蛍光を発する小胞状の構造体が観察された。また、A2 系統と同様に細胞内の一部に凝集体を形成していたが、よく観察するとその凝集体は A2 系統のものとは異なり、小胞状の構造体の集合体であるように見えた。B23 系統は、A28 系統と同様に小胞体ネットワークは見られず、A28 系統に見られるような小胞状の構造体が細胞内に分布していた。しかし、A2 や A28 系統のような凝集体は見られなかった。

さらに詳しく GFP-HDEL 融合タンパク質の蓄積部位を解析するために、これらの変異体の細胞内微細構造を透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、CLSM 観察で見られた A2 系統の凝集体は、核の周囲の小胞体が内腔に繊維状の物質を蓄積して、異常に膨らんだものであることが分かった。A28 系統では、細胞質に野生型では見られない小胞状の構造体が多数散在しており、細胞の一部ではこの構造体が著しく集合しているのが観察された。その結果、CLSM 観察で見られた A28 系統の凝集体は、A2 系統の凝集体とは異なり、小胞状の構造体の集まりであることが明らかとなった。B23 系統でも A28 系統と同様な小胞状の構造体が細胞内に見られた。しかし、A28 系統とは異なり細胞内で集合体を形成しない。この A28 と B23 の両系統で見られた小胞状の構造体は、周囲にリボソームが付着している膜をもつことから、小胞体由来であると考えられた。また、各突然変異体には、正常な ER body も存在することが明らかとなった。

そこで、電子顕微鏡で観察されたこれらの構造体が、CLSM 観察で GFP 蛍光を発している構造体と同じであるかどうかを裏付けることと、変異体内での GFP-HDEL 融合タンパク質の輸送経路を詳細に明らかにするために、抗 GFP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行った。その結果、A2 系統では、膨らんだ小胞体内腔に GFP が蓄積しており、A28 系統と B23 系統では、小胞状の構造体内に GFP が蓄積していた。同時に、各変異体の細胞内に存在する ER body にも GFP は蓄積し、液胞にも GFP の存在を示すシグナルが観察された。

これらの結果から、A2 系統は、粗面小胞体で合成された GFP-HDEL が小胞体内腔から放出されることを阻害されて、小胞体内腔に GFP-HDEL が異常に蓄積している株であることが明らかとなった。また、A28 と B23 系統では、GFP-HDEL は小胞体内腔に留まらず放出されるが、ER body ではなく、別の異常に形成される小胞状の構造体にパッキングされていることが明らかとなった。変異体の細胞内に見られる ER body にも GFP-HDEL が蓄積していることから、変異体でも ER body の形成が完全に阻害されているとは言えないが、細胞内に分布する ER body の数が正常株より少ないことから考えて、変異株では正常な ER body の形成が著しく阻害されていると考えられる。粗面小胞体で合成されたタンパク質を輸送するために必要な ER body の形成が阻害されるので、A2 系統では小胞体内腔に GFP が多量に蓄積し、A28 と B23 系統では、新規の小胞状の構造体を介して GFP を液胞へと積極的に輸送していることが推測される。ER body と今回観察された小胞状の構造体との関係はまだ明らかではないが、小胞体は、ER body 形成阻害に対し新規の構造体を形成して、代替の輸送系を発達させることが可能な物質輸送システムの柔軟性をもっていると考えられる。

シンタキシンノックアウト株を用いた ミロシン細胞内での ER body の機能解析

要約

シロイヌナズナ変異体のスクリーニングから、シンタキシン (Vam3) に異常のある2株を選別し、表現型について調べたところ、アブラナ科に特異的な酵素であるミロシナーゼが野生株と比較して多量に発現していることがわかった。シンタキシンとは神経細胞内で発見された小胞輸送に関わる膜貫通型のタンパク質で、t-SNAREのひとつである。小胞輸送は小胞膜にあるv-SNAREと標的膜上にあるt-SNAREが相補的な関係にあり、お互いに相手に対する特異的な選択性を有しており、一致した場合でだけ、標的膜と小胞膜の融合が引き起こされることで正確な輸送経路を機能させている。そのため、シンタキシンが正常に働かない場合は、輸送経路に何らかの異常が生じると考えられる。シンタキシンの欠損による輸送経路の異常が、どのようにしてミロシナーゼ蓄積と繋がるのかを形態学的に解析した。アブラナ科の植物には、ミロシナーゼを蓄積しているのではないかと考えられている細胞内構造体 (DC: Dilated cisternae) が報告されている (Bonnet & Newcomb, 1965)。この構造体は、我々のグループがシロイヌナズナ表皮細胞で発見したER-bodyと類似している。そこで、シンタキシンノックアウト株で見られるミロシナーゼの蓄積にER-bodyが関与しているかどうか電子顕微鏡法を用いて調べた。

まず、通常の固定方法を用いて、電子顕微鏡試料を作成し、細胞内を調べたところ、野生型のロゼット葉では通常見られないER-bodyが、シンタキシンノックアウト株の細胞内では、頻繁に見られた。また、大量のミロシナーゼ蓄積部位を知るために、固定したロゼット葉の組織切片を作製し、スライドガラスに張り付けた後、タンパク質染色剤であるCBB染色をおこなった。その結果、ミロシナーゼを蓄積していると考えられる細胞 (ミロシン細胞) の数が野生株よりもシンタキシンノックアウト株の方が多ことがわかった。また、光学顕微鏡観察からはミロシン細胞の液胞中に、さらにタンパク質濃度の高いER-body様の構造体が多数存在することが確認できた。そこで、ミロシン細胞内を電子顕微鏡で解析した結果、液胞の膜にER-body様の構造体が接触融合している像が観察された。ミロシン細胞の液胞に蓄積しているタンパク質が本当にミロシナーゼであるかどうかを確かめるために、ミロシナーゼの抗体を作成し、免疫電子顕微鏡法によって調べたところ、ミロシナーゼの存在を示す金粒子の局在は、液胞とER-body様構造体に特異的であった。また、液胞内部でもミロシナーゼは均一ではなく、濃い領域が存在することがわかった。これは、ER-bodyによって高濃度で運ばれた後、液胞内で拡散して蓄積されている可能性を示唆する。

ロゼット葉におけるミロシン細胞の分布や、他の組織への形成異常について調べた結果、ミロシン細胞は、正常株でもノックアウト株でも葉脈に沿った領域に見られたが、ノックアウト株では、分布するミロシン細胞の数が多く、また、葉の葉脈の分布に異常が生じていることが明らかとなった。

凍結固定法および、凍結置換法による 植物組織体の電子顕微鏡試料作成技術の開発

要約

急速凍結装置HIF-4Kが植物組織細胞の凍結固定に利用できるかどうかを調べた。また、加圧凍結装置HPM-010を用いた単細胞緑藻クラミドモナス細胞の凍結固定を試みた。

1) 急速凍結装置HIF-4Kを用いた植物組織細胞凍結固定法の試み

日立のヘリウムを用いたメタルコンタクト用装置「HIF-4K」を用いてシロイヌナズナ子葉細胞の固定を試みた。この装置は、ヘリウム温度（4K）に冷却した金属に試料を押し付けて凍結する装置であり、1ステップで8サンプル固定することができる。日立の技術者の協力で、投入速度や凍結後の液体窒素への投入までの速度を変化調節し、4回の実験を行なったが、加圧凍結装置HPM-010で作成した試料の像と比較して、良好な条件での凍結固定はできなかった。急速凍結装置HIF-4Kは、冷媒自身の温度は低いが、常気圧で固定するために、氷晶の形成を回避できないと思われる。動物細胞を用いた実験では、ある程度良好な固定に成功しているため、植物細胞の持つ水分の多さや細胞壁の存在が、氷晶を形成しない凍結の妨げになっていると考えられる。そのため、本研究に用いた凍結固定法による免疫電子顕微鏡試料作成は、すべて、加圧凍結装置HPM-010を用いて行なった。

2) 加圧凍結装置HPM-010を用いた単細胞緑藻クラミドモナス細胞の凍結固定

HPM-010の凍結では、金属のハットの中にサンプルを入れてハットの外側から冷却する。そのため、組織のような細胞集団を固定する場合は、試料がある程度大きいために、その後の作業中に紛失する可能性は少ない。しかし、単細胞緑藻や培養細胞では、細胞が個々バラバラであるために、その後の作業に移る前に紛失する問題点がある。そこで、紛失を避けるために、細胞を寒天に包埋して、固まりのまま凍結固定し、その後の置換作業を行う方法に取り組んだ。3回実験を行なった。寒天に埋め込んだ場合、表面の細胞しか最適条件で凍結されないが、引き続き置換作業の間に寒天表面の大事な細胞は外れてしまうために、最適な凍結条件を得られなかった寒天内部の細胞のみが最終的に残る結果となった。今後は、寒天と同じように溶液の浸透性を持つが寒天よりも細胞をしっかり保持できる素材探しが必要であると思われる。

3) その他

電子顕微鏡試料作成のための高圧凍結および凍結置換法を用いた植物組織の固定法について、マニュアル書を2件、総説を1件、執筆した。