

氏 名(本籍)	たか 高	はし 橋	ふみ 文	お 雄
学位の種類	博	士	(農	学)
学位記番号	農	博	第	612号
学位授与年月日	平	成	12年	3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科農学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	多核細胞における青色光による細胞形態形成反応の解析			

論文審査委員	(主 査)	教 授	大 瀧	保
		教 授	亀 谷	壽 昭
		教 授	高 橋	秀 幸
		助教授	片 岡	博 尚

論文内容要旨

1) はじめに

自然界には、多細胞生物のように高度に組織化されていないものの、細胞質分裂(cytokinesis)を行わずに連続した細胞体で部位特異的な構造的、機能的分化を達成している多核細胞(coenocyte)が、多く存在する。これらは細胞のモデルとして有用なだけでなく、多核であることに起因する多くの興味深い現象があるのにも関わらず、あまり詳細な研究はなされていない。

黄色植物界(stramenopile)黄緑藻綱に属するフシナシミドロ(*Vaucheria*)は、多核細胞で花粉管、根毛やカビの菌糸などと同様に先端成長(tip growth)を行う。生殖器官を形成するときや、傷害を受けたとき以外は隔壁を持たない管状の単一の多核体として存在する。直径は約 $50\mu\text{m}$ で 1cm 当たり約 10000 個の核が存在する。フシナシミドロは細胞基部の非成長域から、偶発的に、あるいは光によって成長点を形成し、隔壁で隔てられない枝をつくることや、正負の光屈性を示すことが知られている。これらは一種の細胞形態形成反応であると考えられる。Kataoka(1975)は、光屈性と成長点形成反応が青色光(BL)局所照射によって誘導できることを報告した(図1)。成長点形成過程は非成長域に BL 照射後 30 分以内に葉緑体が照射域に集積し、それと同時にイオン電流の流出が起こり、引き続いて 1-2 時間でイオン電流が流入に転じる。その後 6-7 時間後に、照射域から成長点を隆起する。葉緑体の集積にはアクチンフィラメントの関与を示唆する阻害剤を用いた報告もある。しかし、この細胞形態形成反応の細胞学的、生化学的研究はない。

陸上植物では器官を構成する細胞が分裂し、形を変化させること、あるいは成長方向や成長率を変えることで一連の形態形成反応が起こっている。細胞分裂や細胞内外の物質の輸送、さらには細胞の形態の維持には細胞骨格の一つである微小管(microtubule)が重要な役割を演じている。紡錘体微小管はいうまでもなく、細胞質微小管は、ダイニンやキネシンなどのモーター蛋白を用いて、オルガネラの輸送を行っている。またあるときは細胞膜の裏打ち構造となり、細胞壁の構成要素であるセルロースマイクロフィブリルの配向を決めるのに役立っている。

しかしフシナシミドロは先端成長する多核細胞であるため、陸上植物のメカニズムでは説明ができない。細胞質分裂がないので、前期前微小管束(preprophase band)や隔膜形成体(phragmoplast)の存在は想定できない。はたして、他の先端成長細胞と同様に、微小管は細胞長軸に平行に走っているのか否かについて、何も知られていない。

2) 目的

本研究の目的は、青色光によるフシナシミドロ成長点誘導反応を細胞形態形成反応のモデル系として用いることにより、細胞形態形成における核と微小管の役割を明らかにすることである。I章では、先端成長の条件、すなわち成長が先端成長域に限定された、維持機構を探る。明暗周期が先端成長域の活性に与える効果や、成長域と非成長域を分ける構造的、機能的、基礎を探る。II章では細胞基部の非成長域に青色光(BL)を局所的に照射することにより、照射域から新しい成長点が誘導される一種の光形態形成反応を細胞骨格やオルガネラの変化から詳しく解析する。III章では、II章で発見した重要な知見をさらに発展させる。フシナシミドロ多核細胞内の核の分布や運動の分子機構を明らかにする。

具体的には蛍光顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用い、微小管と核の運動、配置を詳しく観察することにより、青色光受容体からの細胞形態形成反応の時系列制御機構を解明しようとするものである。

図 1

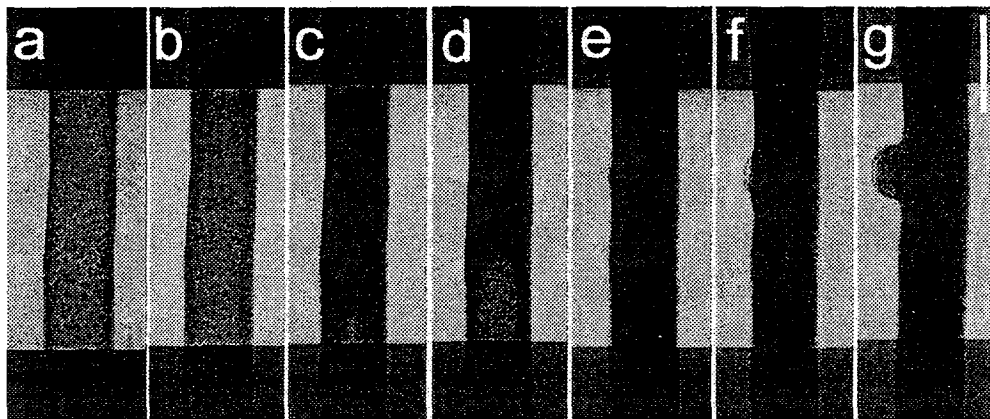


図 1 青色光によって誘導される成長点

a:青色光照射 0min b:10min c:30min d:1h; e:5h f:6h g:7h

3) 結果と考察

1 章 光と先端成長

1)-1 先端成長点

成長点および非成長域における核と微小管の分布と配向を、蛍光顕微鏡法により観察した。L:D=12h:12h を基本培養周期とし、これと L:D=24h:0h(連続明)と L:D(R)=0h:24h(連続暗)のもとで、試料を 4 時間ごとに固定、観察した。細胞の直径は明期では太く、暗期では細くなることがわかった。長さ 100 μ m 当たりの核数を経時的に数えると、直径とは逆に核数は暗期で増え、明期では減少した(図 2,3)。微小管の本数も同様な傾向を示した。しかし、いずれの周期においても成長点における核の分布密度は、基部非成長域の約 2-3 倍高かった。

1)-2 核の細胞内分布と同調的核分裂

他の多核細胞では個々の核が独立に分裂を行うもの、完全に同調するもの、部分的に同調するものが知られているが、フシナシミドロの核分裂は、部分的に同調していることがわかった。核分裂では核膜が消えることがない。間期に細胞長軸に平行に配向していた微小管は消え、分裂前期に紡錘体微小管だけになった。分裂終期に紡錘体微小管は消えるが、娘核間を結ぶ長い(約 10 μ m)微小管が存在した(図 4)。同調した核分裂は成長点から開始し、徐々に基部に伝播することがわかった(図 5)。さらに明暗培養周期(L:D=12h:12h)の明期開始後 2 時間で核分裂の頻度が高まり、その割合は観察した細胞の約 10%に達した。暗期ではほとんど核分裂は起きなかった(図 6)。

考察

フシナシミドロの核の分布は、先端成長域に偏っており、その密度は基部非成長域の 2-3 倍に達する。連続暗にするとこのような核分布の極性がなくなることがわかった。光に依存した核分布の極性配置機構が働いていると考えられる。また先端が維持されるためには一定以上の核の密度が重要であることが示唆される。この多核細胞中の全ての核が同調的に分裂するわけではないが、限られた領域で同調的に分裂が起こることは、細胞内の核間連絡がきちんと取られていることを強く示唆する。成長により、細胞の体積が増加するに従って、核の密度が徐々に減る。成長に必要な核が不足すると、核分裂が引き起こされると考えられる。成長している細胞で核の分布勾配が維持されることが、この仮説を支持している。先端成長域の維持は、そこに存在する核が支配的役割を

果たしていることによると考えられる。同調的核分裂は培養周期の明期に起こることから、光による制御も考えられ、さらなる試みとして、核分裂周期（特にS期）の同定が必要であろう。核分裂または分布が何によって支配されることが理解されれば、多核細胞フシナシミドロの核と成長との関係がより明確になるであろう。

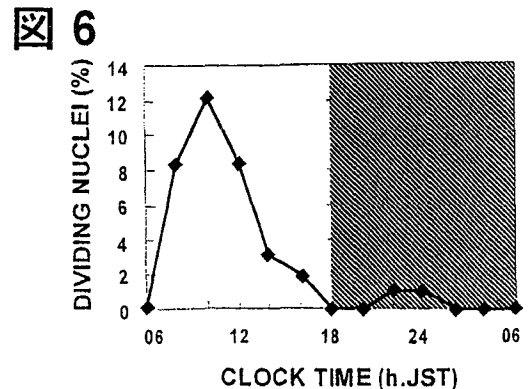
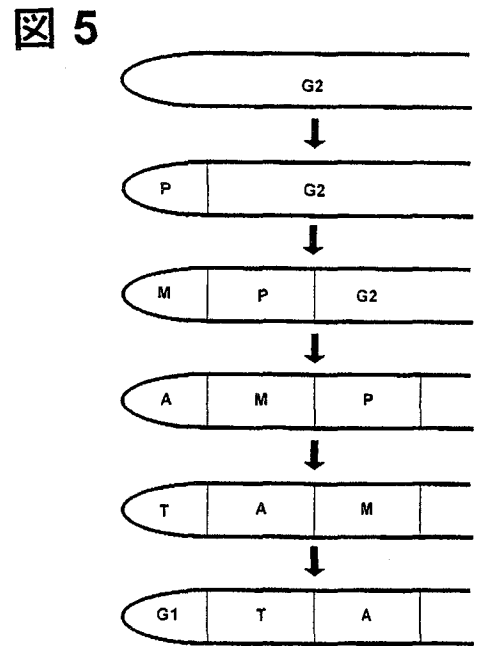
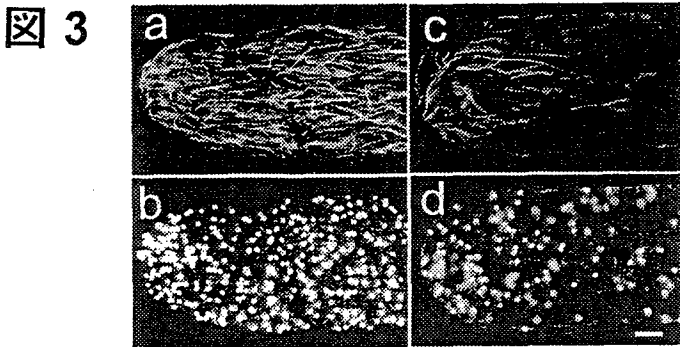
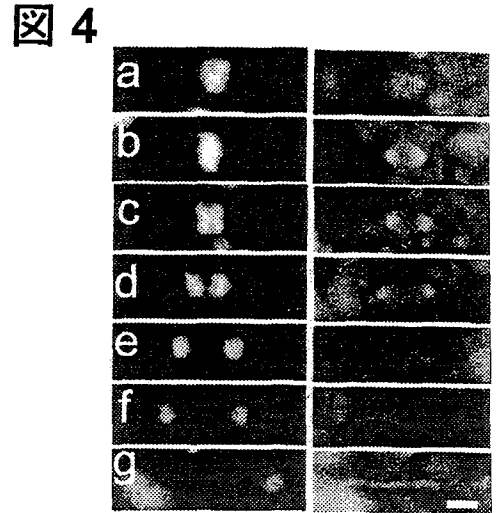
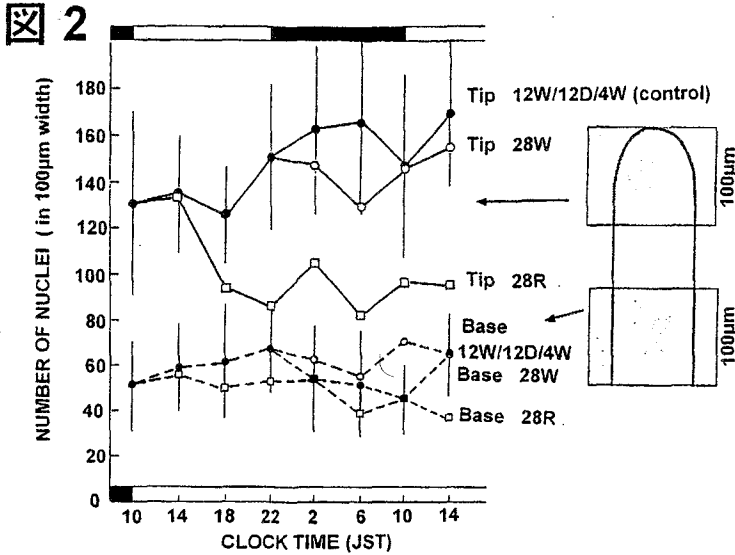


図2 培養周期ごとの核の分布の変化

線：成長域 破線：非成長域

○：L:D=12:12 ●：L:D=24:0 □：L:D=0:24

図3 連続明と連続暗における微少管と核の分布

a,c：微少管 b,d：核

a,b：連続明 c,d：連続暗 bar=10µm

図4 フシナシミドロにおける核分裂

a：前期 b,c：中期 d,e,f：後期 g：終期

bar=2µm

図5 フシナシミドロ細胞における同調的分裂の伝播

G1,G2：間期 P：前期 M：中期 A：後期 T：終期

図6 培養終期における同調核分裂の頻度

縦軸：同調分裂が観察された細胞の割合

横軸：培養終期 6-18が明期で18-6が暗期

II章 成長点の誘導

II)-1 time course

BL 局所照射による成長点誘導の時間経過を調べた。成長点は最短で、BL 照射開始後 4 時間で形成された。BL 照射域の幅を直径より細い 50 μ m から約 10 倍の 500 μ m まで広げた結果、成長点形成率は等しかった(表 1)。直径より細い 50 μ m で照射したとき、照射域からはずれたところに成長点が形成することがあった。

II)-2 細胞内変化

BL 局所照射開始から成長点の形成までの細胞内構造の変化と核および微小管の動態を観察した。細胞の横断切片を TEM で観察すると、葉緑体が 3-5 層に厚く集積しているのが観察された。葉緑体は通常、細胞壁に 1-2 層に並んでいるが、BL 照射によって垂直方向に配位を変え、中心液胞が減少した(図 7)。さらに、液胞内層に膜で囲まれた自食胞が増加した。時間がさらに経過すると中心液胞は照射域で切り離されることもあった。

間接蛍光抗体法で微小管を観察すると、基部の非成長域では、微小管は長軸方向に配向していた。成長点では細胞質が厚く、微小管は細胞質外層では細胞基部と同様に細胞長軸に、細胞質内層ではランダムに配向していた(図 8)。

BL 照射域においては、照射開始 1 時間を超えると細胞質内層で微小管の配向が、長軸に垂直またはランダムにかわった(図 9)。さらに 3 時間を超えると微小管の配向は細胞質内層、外層ともにランダムになり、成長点形成予定域に向かうことが観察された。一方、核は葉緑体の集積と同時、ないし照射後 1 時間から照射域に集積を始め、核の分布密度は、成長点直前には非照射域の約 2.5 倍に達した(図 10)。

II)-3 生理的過程

成長点形成過程を様々な阻害剤、賦活剤を用いて調べた。用いた薬剤を機能別に分類すると、protein kinase C 関連、転写、カルシウム関連、細胞骨格と小胞の輸送、エネルギー代謝に関するものである(表 2)。G-protein 賦活剤であるマストラパンは葉緑体の不規則な凝集や先端の膨潤を引き起こした。PKC の阻害剤である Staurosporine や K252A は葉緑体の集合、成長点の形成を完全に阻害した。さらに、蛋白リン酸化の阻害剤 Dibucaine-HCl や Polymyxine B も効果がなかった。転写阻害剤である Actinomycin D は葉緑体と核の集積を起こすが、成長点形成は完全に阻害した。Actinomycin D はさらに先端成長域の直径を細くし、成長も抑制した。Verapamil, Thapsigargin, TMB-8 などのカ

ルシウムチャンネルブロッカーや細胞内ストアーからのカルシウム流出の阻害剤は発生した枝の先端成長を阻害するが、成長点形成には無効だった。葉緑体の集積はアクチン重合阻害剤である Cytochalasin A によってのみ阻害された。一方、核の集積は微小管重合阻害剤 APM によって完全に阻害された。また小胞体からゴルジ装置への小胞輸送を阻害する Brefeldin A は、先端の成長および成長点の形成を阻害した。光合成阻害剤 DCMU は葉緑体および原形質の集合に影響はなかったが成長点形成を阻害した。

考察

BL による成長点形成反応には蛍光顕微鏡法により、核密度の増加が必須であることがわかった。核の増加は核分裂による可能性が考えられたが、照射域で核分裂が観察されることはまれであり、急激に核数が倍加することもみられなかったため、周辺領域からの移動によると考えられる。成長点形成反応においても 1 章で述べた先端成長と成長域の核密度の関係が成立する。また、微小管束は予定成長点域の方向に配向を変えたことから、核の移動だけでなく、成長に関する物質、既存の細胞壁を溶かす物質を輸送する役目も果たしているのではないかと考えられる。そこには微小管依存的なモーター蛋白ダイニンやキネシンなどの関与が示唆される。Actinomycin D の実験からわかるように、新成長点が形成される部位には新たな遺伝子の発現が必要であることは、さらに、BL による遺伝子発現の可能性を示唆する。BL により、遺伝子発現でつくられた物質の方向づけた輸送に、微小管をレールとしたモーター蛋白系が関与していることを考えると、たいへん興味深い研究の展望が生まれる。本研究では遺伝子発現にいたるまでの、BL による 信号伝達過程を探るため、イオンの流出入や G-protein, PKC などの関与を調べたが、光受容体については未知のままである。この光形態形成反応を理解するには、成長点形成までの時間が長いいため、阻害剤実験などについて、さらなる改良を必要とする。さらに、分子生物学的な実験進めていく必要がある。

表 1 BL 照射幅における成長点形成率
1.95 Wm² の青色光照射 24 時間後の照射幅ごとの成長点形成率

BL-width	50μm	100μm	200μm	500μm
No. of cells used	22	25	41	13
One branch	16 (76.2%)	18 (72.0%)	29 (70.7%)	7 (53.8%)
Two branches	1 (4.8%)	0	6 (14.6%)	3 (23.1%)
Total	17*(80.9%)	18 (72.0%)	35 (85.4%)	10 (76.9%)

* 11 Branches were from adjacent dark area.

図 7

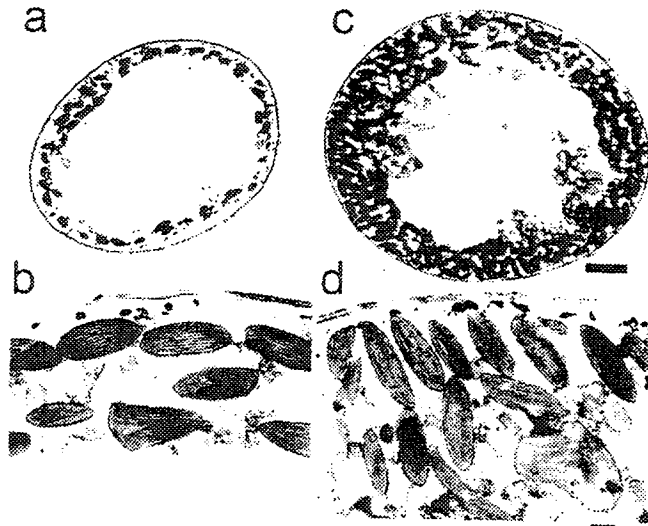


図 9

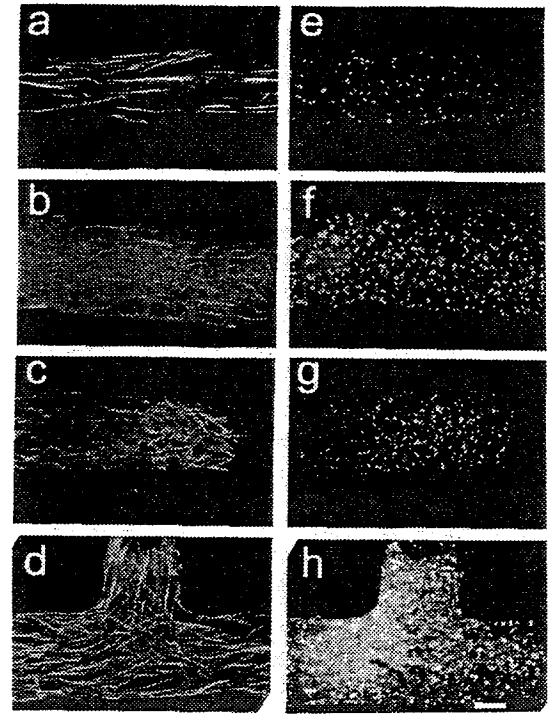


図 8

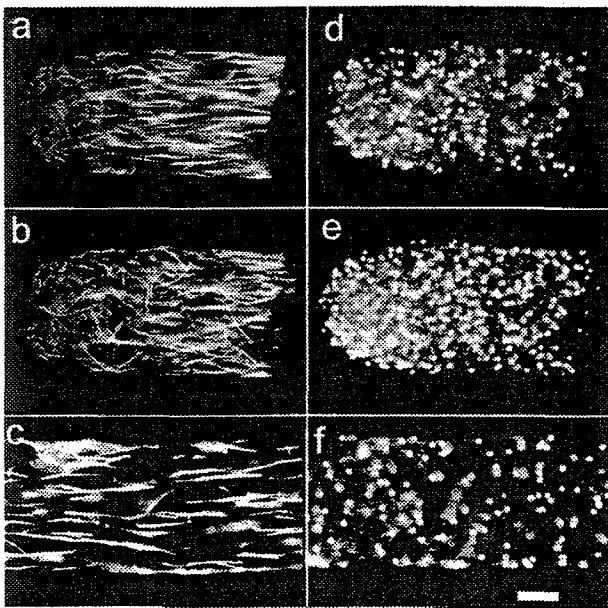


図 10

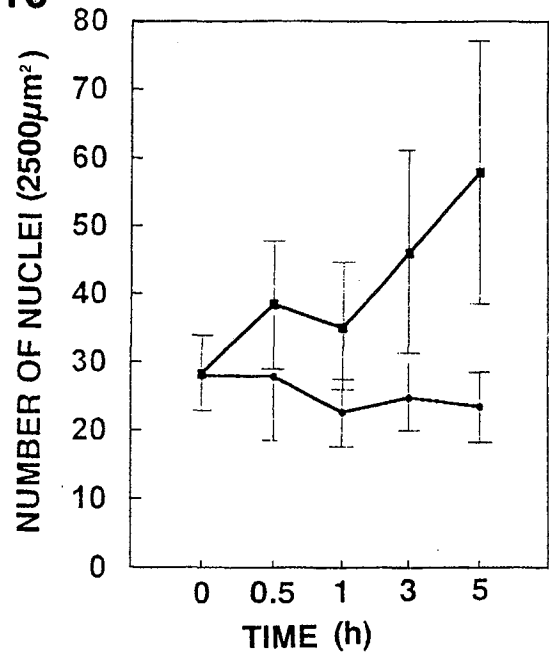


図 7 青色光局所照射における細胞質の変化

a,b : 暗黒化 24 時間 c,d : BL 照射 3 時間 上図 bar=10 μ m 下図 bar=1 μ m

図 8 成長域と非成長域の核と微小管の分布

a,b,c : 微小管 d,e,f : 核 a,d : 細胞外層 b,e : 細胞内層 bar=20 μ m

図 9 青色光による成長点形成過程における核と微小管の分布

a,b,c,d : 微小管 e,f,g,h : 核 a,b : 青色光照射前 c,d : 1 時間 e,f : 5 時間 g,h : 10 時間

図 10 青色光による成長点形成過程における照射域と非照射域の核の分布密度

縦軸 : 核の分布密度 横軸 : BL 照射開始からの時間

■ : 照射域 ● : 非照射域

表2 成長点形成における阻害剤の効果

BL局所照射開始前に薬剤を投与し、葉緑体の集積、成長点の形成と成長について、観察した。阻害剤の濃度は効果のあったところで決定した(図示せず)。

薬剤は1)Protein kinase C 2)カルシウム関連 3)転写 4)細胞骨格、輸送

5)エネルギー代謝にわけ、阻害の効果を観察した。

—:効果なし ++:多少効果あり +++:阻害 ++++:完全に阻害

	Chl. Accumulation	Branch formation	Tip growth	etc
PKC/脱リン酸化阻害				
Mastoparan	—	—	++	直径が太くなる
Staurosporine	+++	+++	+++	
K252A	+	++	+++	
TPA	—	—	—	
Okadaic acid	—	—	—	
Dibucaine-HCl	+++	+++	+++	
Polymyxine B	++	++	++	
Ca/カルモジュリン				
Verapamil	—	++	++	先端成長を阻害
Thapsigargin	—	—	—	
TMB-8	—	—	++	
Transcription				
Actinomycin D	—	+++	+++	直径が細くなる
Cytoskelton				
Cytochalasin A	++	+++	+++	先端成長点崩壊 核不規則凝集
Cytochalasin B	—	—	—	
Cytochalasin C	—	—	—	
Cytochalasin D	—	—	—	
Colchicine	—	+	++	
Vinblastine-SO4	—	++	++	
APM	+	+++	+++	
Taxol	—	++	++	
Brefeldin A	—	+++	+++	
エネルギー代謝				
DCMU	—	++	++	葉緑体不均一集合
Vanadate	++	++	+++	
CCCP	+++	+++	+++	

III章 核の移動機構の探索

III)-1 核から伸びる微小管束

I、II章の結果より、核と微小管が構造的にも、機能的にも密接な関係にあることがわかる。画像解析により、核と微小管の蛍光像を重ね合わせると、微小管の一端に核が接着しているようにみえた。単位面積当たりの微小管束の本数と核の数を比較すると微小管束の数と核数は約 1:1 であり (図 11)、核と微小管は実際、接着していることが示唆された。微小管と核がどのような構造で存在しているかを、核と微小管束が同時に観察できる double band filter を備えつけた蛍光顕微鏡および、透過型電子顕微鏡 (TEM) により詳細に観察した。明らかに微小管束は核から伸びていた。洋梨型の核の前端に存在する一対の中心小体近傍から前方に、一本の微小管束が伸びていた (図 12,13)。また後方にも、一本の短い微小管束が伸びていた。微小管束の横断像を観察し、蛍光顕微鏡で観察された微小管束を構成する微小管の数を数えると、一本の束は、平均約 16 本、多いものでは 50 本近くの微小管で構成されていることがわかった (図 14)。

III)-2 運動方向

この微小管を付随した核がどのように移動しているかを、微分干渉顕微鏡により観察した。写真撮影に当たって、感度の高い ASA1600 のフィルムを用い、連続写真撮影することによって、生きた細胞で核の運動方向および運動速度を計測できるようになった。核は微小管を前にして移動していた。その速度は毎秒 $0.3\mu\text{m}$ であった。

考察

フシナシミドロは、常に一対の中心小体を持っている。中心小体は洋梨型をした核の前端のくぼみの部分に存在していた。中心小体の近傍から微小管束が伸びており、その微小管束を前にして核は移動していた。藻類では鞭毛形成時に鞭毛を二本持つが、その鞭毛基部はそれぞれ中心小体につながっている。フシナシミドロでみられた微小管束は明らかに鞭毛とは異なるが、中心小体が微小管形成中心 (MTOC) の役割を果たしていることについて、電子顕微鏡での詳細な研究が望まれる。フシナシミドロでみつかった核・微小管複合体の構造や、微小管が引っ張る核の運動は、他の生物で知られていない極めて珍しい現象である。しかし、生きた細胞で核の運動を観察するのはそれほど容易ではない。核の移動は葉緑体が少ない部分でしか観察ができず、さらなる改良が必要である。様々な蛍光試薬で生体染色をすること試みたが成功はしなかった。敏感な

検出システムをつくるか、生体染色法を確立する必要がある。葉緑体や核の運動は、アクチンレールや微小管のレールの上を、モーター蛋白を介してすべると考えられているが、フシナシミドロの核の運動は全く新奇なものであった。

図 11

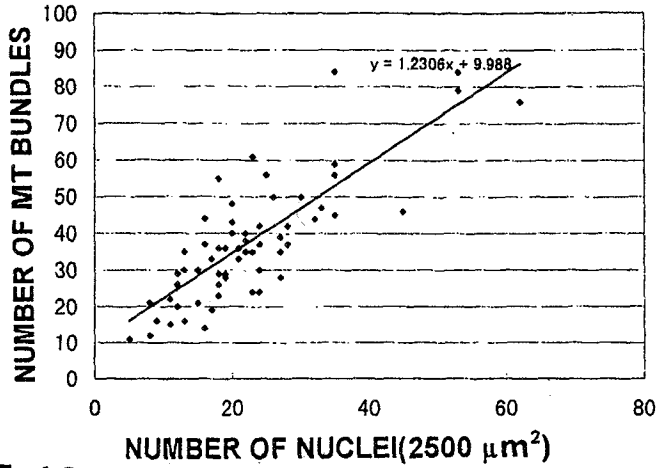


図 12

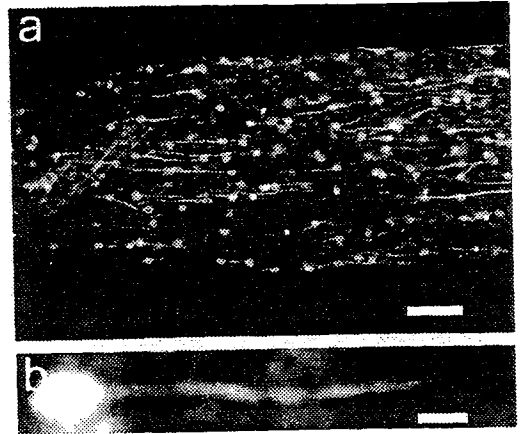


図 13



図 11 微小管本数と核の密度の関係
無作為に 50×50μm あたりの核の数と
微小管の本数を調べ、プロットした。

図 12 微小管と核の二重蛍光像
Double band filter (UV,B) 備え付けの
蛍光顕微鏡(OLYMPUS)により観察。
丸い部分が核で細長い部分が微小管。
a : bar=20μm b : bar =2μm

図 14

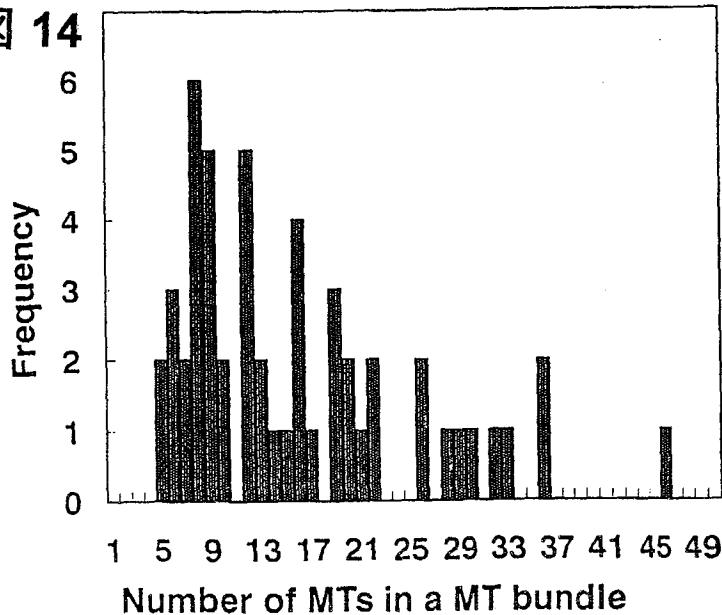


図 13 微小管と核の電顕像
電子顕微鏡による微小管。矢印：微小管
右：縦切り bar=0.25μm
左：輪切り bar=0.2μm

図 14 微小管束の微小管の本数
電子顕微鏡により輪切りにし、無作為に
観察された微小管束中の微小管の数。
縦軸：頻度 横軸：微小管束中の微小管の本数

4) まとめ

本研究は多核細胞の光細胞形態形成、また光運動反応の制御の解明に重要な基礎データを提示した。しかし、BL からの信号伝達過程の全体像をつかむまでにはななかった。今後の展望として1) 核の集合における光受容体の存在を明らかにする。2) 核移動の分子モーターを同定し、核運動機構および集合機構を解明する。3) 集合した核が BL の光受容体となって、BL 依存の遺伝子発現が起こるのか、それとも、別の部位で受けた光信号が照射域の核に伝えられるかを明らかにする。4) いずれの過程にも、どのような遺伝子が BL によって発現するかを探索し、核が成長や成長点形成にどのような制御を行っているのかを知ることである。

今後、さらに細胞学的実験、新たに分子生物的手法を用いることによって、この光形態形成反応における複雑な流れの解明が進むであろう。

5) 発表論文

Takahashi, F., T. Hishinuma, T. Ootaki and H. Kataoka (1999). Blue light-regulated branching in *Vaucheria* I. Requirements of chloroplast- and nuclear accumulation in the irradiated region. *Plant and Cell Physiology* (submitted)

Kataoka, H., F. Takahashi and T. Ootaki (1999). Bimodal phototropism of *Vaucheria* to polarized blue light: parallel and perpendicular phototropism correspond respectively to negative and positive phototropism. *Journal of Plant Research* (in press)

論文審査結果要旨

光形態形成反応は植物にとってその形態や生態系を構築する上で重要であるだけでなく、光合成と同様、その生物生産を高める上でも極めて重要な反応である。この光形態形成には多くの場合、遺伝子発現、細胞分裂、そして細胞伸長が関与し、さらにこれらの動向は植物体を構成する細胞の位置「場」によって異なる。したがって、大型の多細胞植物を用いた光形態形成の解析は、一般に複雑で困難な場合が多い。

申請者は、巨大ではあるがより単純な体制を有する黄色植物フシナシミドロの利用を開発し、その光形態形成機構の解明を試みた。すなわち、数種の異なるフシナシミドロを使用し、青色光によって誘導される細胞の分岐機構を、特に細胞内小器官の動向の変化と植物体における位置との関係に主眼を置きながら、免疫蛍光抗体法や電子顕微鏡観察を駆使して明らかにした。フシナシミドロの細胞は疎らに分岐した管であり、成長しない細胞基部と活発な先端成長をする各枝の先端に分極している。申請者はフシナシミドロを単藻培養することによって、成長中の細胞先端には多数の核が存在し、さらにこれらの核の分裂は細胞先端で開始され、次第に細胞基部に向かって同調的に伝搬していくことを発見した。さらに細胞の先端部には短い微小管束が密集し、基部には細胞軸に平行に走る長い微小管束が存在することを明らかにした。

非成長部域である細胞基部を青色光で顕微照射すると、そこに新たに成長点が誘導されるが、この場合、まず葉緑体が、次いで核と原形質が照射域に集合し、最短4時間で照射域の中央の細胞壁が可塑性することが明らかとなった。各種の阻害剤を用いて成長点誘導形成に至る制御過程を時系列に解析したところ、光合成阻害剤DCMUは葉緑体集合を阻害しないが、分岐の出現を遅らせた。さらに、葉緑体集合にはアクトミオシンが関与すること、そして核の集合は除草剤で微小管脱重合剤であるアミプロフォスメチルで完全に阻害されることから、核の集合には微小管が関与していることを証明した。一方、転写阻害剤は葉緑体や核の集合を阻害しないが、成長点形成を完全に阻害した。

これらの結果から、成長点光誘導反応には多数の核の集合とそこでの新しい遺伝子発現が必要不可欠であり、葉緑体の集合はむしろ光合成を通したエネルギー源獲得として寄与していることを明らかにした。このフシナシミドロで得られた結果は、形態形成には細胞分裂は必ずしも必要ではなく、必要十分な核の局所的な集合と遺伝子発現があれば可能であることを示唆する重要な知見である。さらに申請者は、核の移動・集合の機構を明らかにするため、核と微小管との相互関係を解析したところ、細胞軸に平行に並んでいる長い微小管束は個々の核の前端から伸びており、これら個々の微小管束が個々の核を引っ張って前方へ移動していることを発見した。

フシナシミドロは特殊環境に生育する藻類であるが、比較的大型であるにもかかわらず構造が単純であり、また自栄養で長時間安定した先端成長を維持するなど、光形態形成研究には最も適したモデル植物の一つであることをこの研究は明らかにした。ここで得られた成果は、単細胞性の多核体植物だけでなく、より複雑な構造を有する多細胞植物における光形態形成の解明にも多大な貢献をするものと期待される。

よって審査員一同は、この論文の著者に博士(農学)の学位を授与することが適当と判断した。