

植物細胞の形態維持と液胞膜の動態

井上 悠子（理工学研究科・助教）

1 研究の目的

植物は栄養が得られなくなると、自らの細胞内でその構成成分をダイナミックに分解することで生命維持をはかる。この分解を、タバコ培養細胞を用いて生化学的に定量してみると、2日間のショ糖飢餓によって正味のタンパク質量がおよそ60%に減少した。また正味のリン脂質量もおよそ50%に減少した。しかしながらその際、細胞の形態を観察するとその体積にはほとんど変化が見られない。この理由として、成熟した植物細胞の体積のほとんどを占める巨大なオルガネラである「液胞」が、空間充填材としての役割を担っていることが挙げられる。これまでに、私たちのグループによる形態学的な解析から、飢餓に伴って起こる液胞の伸長がすでに観察されている。しかしながら、どのようなメカニズムがこの液胞の膜動態を伴う形態変化を制御しているのかに関する詳細な知見はまだ得られていない。

そこで本研究では、オートファジーに着目した。オートファジーは飢餓条件下で誘導されるバルクの分解メカニズムであり、一連の膜動態によってそのプロセスが遂行される。まず細胞内に生じた遊離の膜構造が細胞質成分を包み込んで、二重膜構造を持つ小胞、オートファゴソームを形成する。その後、オートファゴソームの外側の膜が液胞やリソソーム膜と融合することによって加水分解酵素を獲得し、内包物が分解される。私はこの膜融合が、液胞が伸長する際に必要となる膜の供給源として働くのではないかと考えた。このことを明らかにするため本研究では、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のオートファジー欠損株である *atg5* を解析に用いた。*atg5* 株の根の形態観察および *atg5* 株から作成したシロイヌナズナ培養細胞を用いた液胞膜動態の観察を通じ、飢餓で起こるオートファジーと液胞膜の動態の関連を明らかに出来るのではないかと考えている。

2 成果

[1] *atg5* 株は野生株 (WT) と比較すると根の伸長速度が遅く、個々の細胞の大きさが小さい。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のオートファジー欠損株である *atg5* 株と WT の播種一週間ほどの芽生えから根端数ミリを切り取って、ショ糖を含む培地中で培養した。私たちはこれまでの研究で、シロイヌナズナの根端付近の細胞ではショ糖が存在するにも関わらず、常にオートファジーが起こっていることを見いだしている。切り取った根の長さを1日毎に測定すると、WT の根の伸長速度に対して *atg5* 株の根の伸長速度が遅いことが明らかになった。*atg5* 株に関しては独立の由来の2種を用いて同様の結果が得られることを確認した。根の伸長は、まず根端における細胞分裂と、分裂した個々の細胞の伸長により起こる。そこでさらに根端から一定の距離に位置する細胞の大きさを *atg5* 株と WT の両方において調べると、*atg5* 株では WT より細胞の大きさが有為に小さいことが明らかになった。このことから、*atg5* 株は WT に比べて個々の細胞の伸長の速度が遅いのではないかと考えた。この細胞の伸長の速度に差が生じる理由をさらに詳細に解析するため、*atg5* 株と WT の胚軸からカルスを誘導し、シロイヌナズナ培養細胞を作成した。

[2] *atg5* 株由来の培養細胞では WT と比較すると、液胞が小さいことが観察された。

atg5 株と WT から作成したシロイヌナズナ培養細胞を、FM4-64 を含む液体培地で3時間培養する

ことにより液胞膜の染色を行った。その後、共焦点レーザー顕微鏡下で細胞内の液胞像を観察した。WT では細胞体積のほとんどを占める大きな液胞像が観察されるのに対し、*atg5* 株では、液胞が小さく、またその周辺にはさらに小さな液胞が多数観察された。さらに、システインプロテアーゼの阻害剤である E-64d を加えて *atg5* 株、WT の観察を行った。これまでの研究から、E-64d を加えるとオートファジーが分解のプロセスにおいて阻害され、液胞内やその周辺に未分解物を含む膜構造の蓄積が生じることがすでに明らかになっている。WT に E-64c を加えると液胞内に未分解物の蓄積が観察された。液胞の大きさはコントロールと比較して小さくなり、その周辺にはさらに小さな液胞が多数観察された。この像は、*atg5* 株の顕微鏡観察結果と似ていた。それに対し、*atg5* 株に E-64d を加えても形態学的に大きな差は見られなかった。

これらの結果をまとめると、(1) 液胞の拡大のプロセスでは、無数の小液胞が融合して巨大な液胞を生じる、(2) この小液胞同士の融合は Atg5 欠損および E-64d 存在下で阻害されることが明らかになった。すなわち Atg5 を必須とするオートファジーが液胞の拡大に貢献しており、そのことが根の伸長にも寄与していることを表している。今後は、電子顕微鏡による液胞膜の動態の解析や他のオートファジー欠損株の解析を通して、オートファジーの膜動態と液胞融合の具体的なモデルを提唱していきたいと考えている。