

プロジェクト名：ダイズ根粒における窒素固定根粒菌との細胞内共生系の研究
—根粒菌を包む共生膜形成に関わる新規膜輸送モデルの創出—

プロジェクト代表者：金子 康子（教育学部、環境科学研究センター・教授）

1 研究の目的

ダイズなどのマメ科植物は、根粒菌による共生窒素固定により、空気中の窒素を窒素化合物に変換し利用することができる。土壌中の根粒菌は、マメ科植物の根の根毛から分泌される物質に誘引され、複雑な相互作用を経て、植物細胞が形成する感染糸中を通して植物細胞に感染する。感染した根粒菌は、植物細胞が形成する共生体膜に包まれて細胞内共生体として増殖・機能することが知られている。しかし、この共生体膜形成のしくみは分かっていない。ダイズ根粒の微細構造形成と機能発現を解明する研究の過程で、根粒の感染細胞核に隣接して、夥しい量の膜と繊維状構造が集積することを見出した（図1）。また蛍光顕微鏡観察から、根粒感染細胞内の核周辺に、膜とアクチン繊維が共局在することが明らかになった（図2）⁽¹⁾。

本研究では、発達中のダイズ根粒感染細胞内で増殖する共生体膜の形成に、これら植物細胞核付近で形成される膜とアクチン繊維が関与している可能性を探り、新たな細胞内膜輸送のしくみを解明することを目的とする。細胞内共生は、多くの生物を構成する真核細胞の起源としても重要な現象であると考えられており、根粒細胞内共生成立過程の研究から、真核細胞の成り立ちとしくみに関する新たな知見が得られることも期待できる。

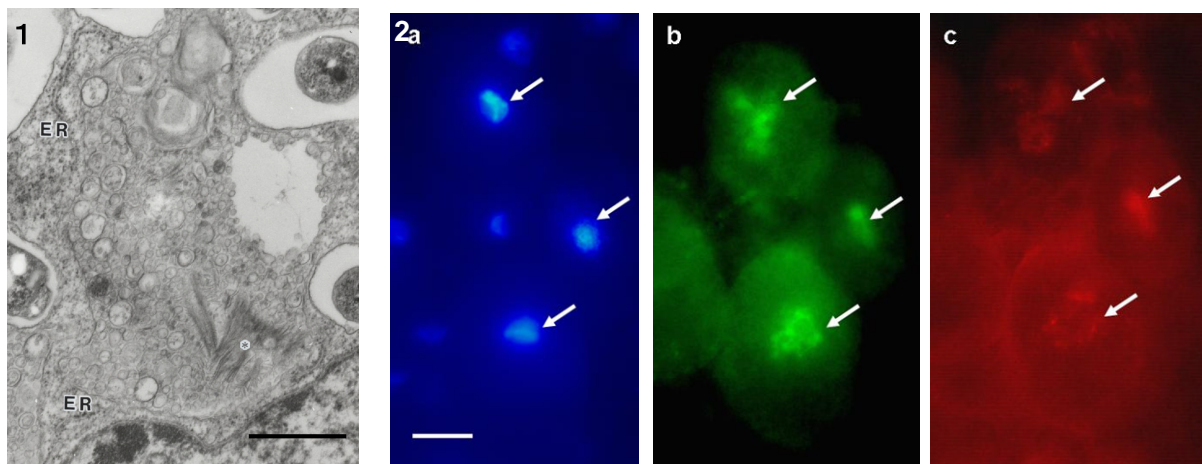


図1 ダイズ根粒感染細胞 図2 ダイズ根粒感染細胞蛍光染色像(a)DNA,(b)膜染色,(c)アクチン繊維

2 研究の進め方

畑、あるいは実験室内で育てたダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) を用いた。生育週数3～4週間の植物体から直径2～4 mm の根粒を採取して観察用試料とした。また、より精細な顕微鏡観察を行うために、細胞壁分解酵素処理により感染細胞を単離することを試みた。

細胞内膜の蛍光染色には DiOC6、小胞体膜の蛍光染色には ER-tracker、アクチン繊維の蛍光染色にはローダミン・ファロイジン、または Alexa568・ファロイジンを用いた。また核の位置を確認するために、DNA をヘキスト 33342 で染色した。採取した根粒をカミソリ刃で薄切し、酵素処理により感染細胞を単離した後、蛍光染色して蛍光顕微鏡で観察した。

さらに、根粒組織の低温・低真空走査電子顕微鏡観察を試みた。薄切した根粒を減圧したスラッシュ室素で急速凍結し、直ちに Alto1000 クライオトランスファーを用いて低真空走査電子顕微鏡 (Hitachi S 3400) 内に装着し、凍結状態を維持したまま、無蒸着で反射電子像を観察した。

3 研究の成果

発達途中の根粒感染細胞における膜とアクチン繊維の共局在を観察したところ、直径 2 mm 程度の根粒では共局在部位は根粒中央部の感染域全体に散在していた。直径 3 mm 程度の根粒では、共局在部位は感染域の辺縁部感染細胞に多く見られた。しかし、直系 4 mm 以上の成熟した根粒では、共局在が見られる頻度は著しく低下した。このことから、膜とアクチン繊維の共局在は発達途中の若い感染細胞に高頻度で見られることと、ダイズ根粒の感染域では中央部から辺縁部に向かって順次成熟していくらしいことが分かった。

ダイズ根粒感染細胞を単離するための条件を検討した結果、複数の細胞が重なることなく、個々の感染細胞の全体像を観察することが可能となり、より詳細な細胞内構造が可視化できた。若い根粒感染細胞の核に隣接して多量の膜とアクチン繊維が共局在する部位から、極めて細い糸状に膜とアクチン繊維が同時に伸長している様子が観察できた。これらの構造が、共生体膜生成のための細胞内膜輸送に関与している可能性がある。このアクチン繊維と共存する膜は、ER-tracker では染色されなかったことから、小胞体膜とは異なる性質を持つ膜であることが分かった。

ダイズ根粒組織を急速凍結し、低温・低真空走査電子顕微鏡で観察した。凍結状態を保ったまま適度に水分を昇華させた後、無蒸着で反射電子像を観察すると、従来の電子顕微鏡観察法では観察することのできなかつた斬新な画像を得ることができた (図 3) ⁽²⁾。加速電圧を変化させる

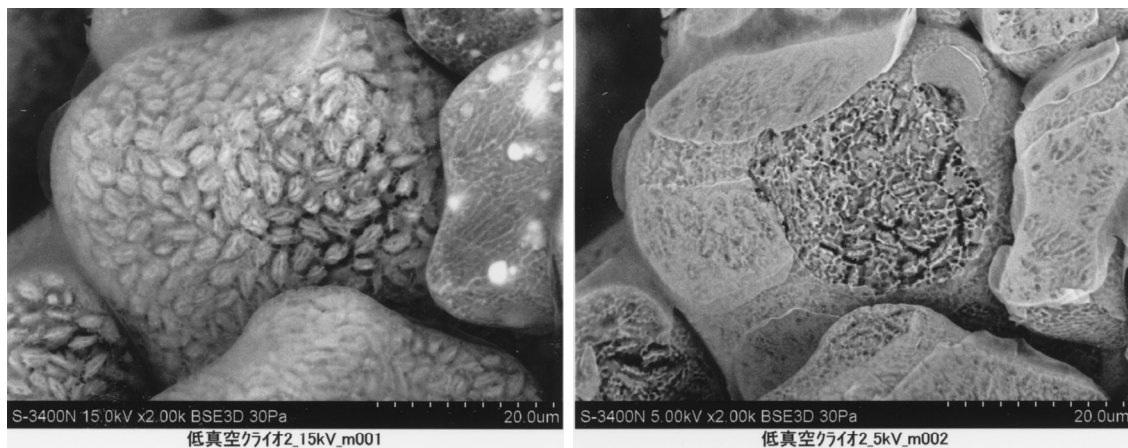


図 3 ダイズ根粒感染細胞の低温・低真空走査電子顕微鏡像

ことにより、細胞表面の情報や、細胞内部の情報など、試料表面からの深度が異なる部位の様子を順次画像化することができた。感染細胞内の根粒菌は数固体ずつ同一方向を向いて並び、繭のような形状の共生体膜に包まれて存在していることが初めて画像化された。また 1 個の感染細胞中に夥しい数の共生体がぎっしりとつまっている様子も明瞭にわかる。これは、急速凍結試料を低温・低真空走査電子顕微鏡観察したことにより、より生きている状態に近い細胞内微細構造を三次元で画像化することによって初めて可能となったものである。今後、この観察手法に元素分析を組み合わせることにより、細胞内構造と物質の局在に関する新知見を得ることが期待される。

1. Bulbul N, Kaneko Y (2009) Plant Biology 11:555.
2. 金子康子、河野昭仁、西村雅子 (2010) 顕微鏡 45, Supl. 1: 226.