

# プロジェクト名：植物の液胞形成のメカニズムの解明

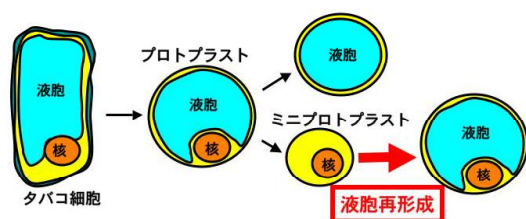
プロジェクト代表者：森安 裕二（理工学研究科・准教授）

## 1 はじめに

動物や植物の体はともに細胞から成るが、植物の細胞には液胞という特有の構造（オルガネラ）が存在する。液胞は細胞体積の大部分を占め、細胞を大きくする機能を担っていると考えられる。例えば、高さ50メートルの高木も、液胞を持たないとしたら1メートル足らずの低木になってしまうと想像される。細胞の成長・形態形成と直接、関連するような液胞を発達させるという進化戦略をとったことは、動物や酵母が持たない植物の顕著な特徴である。

液胞は植物の形態形成に必須の構造であると考えられるが、実際に液胞がどのように形成されるかに関しては十分に理解されていない。これまでに、液胞の形成はオートファジーと密接に関連して起こるという報告がある。

本研究では、(1)タバコ培養細胞から人為的に液胞を取り除いてミニプロトプラストと呼ばれる細胞モデルを作製し（図）、ミニプロトプラストで起こる液胞の再形成を解析した。この実験系では、すでに、液胞がオートファジー起こしながら形成されることがわかっており、本研究では、さらに液胞形成の際に起こっているオートファジーがオートファジー阻害剤3-メチルアデニンで阻害されるかどうかを調べた。一方で、(2)植物の根の先端部分では液胞が盛んに形成・拡大することで細胞成長が起こっていると考えられているので、シロイヌナズナ根の先端部分の成長速度を測定することで、液胞の拡大化を解析した。



タバコ培養細胞は、普通の植物細胞と同様に大きな液胞を持っている。このような細胞をプロトプラストにして遠心力場中に置くと、液胞が脱落したプロトプラスト（ミニプロトプラスト）が作製できる。このミニプロトプラストを培養すると、液胞が再形成しプロトプラストにもどる。

## 2 結果

(1) ミニプロトプラスト内で起こる液胞の形成過程は新奇のオートファジーを伴って起こる。

ミニプロトプラストを培養すると液胞が再形成される。再形成された液胞を光学顕微鏡で観察すると、通常の成熟した植物細胞と同様に、液胞内は比較的、均一な溶液状態になっていることがわかる。しかし、培地にプロテアーゼ阻害剤E-64cを入れると再形成される液胞のなかに、細胞質の部分分解産物が蓄積する。このことは、液胞が形成する過程がオートファジーとカップルして起こっていることを示している。

3-メチルアデニンは、栄養飢餓条件下に置かれたタバコ培養細胞で起こるオートファジーを阻害す

る。ミニプロトプラスト内における液胞形成とカップルして起こるオートファジーも 3-メチルアデニンによって阻害されるかどうかを調べた。ミニプロトプラストを E-64c と 3-メチルアデニンの両方を含む培地で培養しても、形成された液胞内に細胞質部分分解産物が蓄積した。さらに、典型的なオートファジーにおいて中心的な役割を果たすオルガネラであるオートファゴソームを GFP で標識するように細工したタバコ細胞よりミニプロトプラストを調製し、同様の実験を行うと、オートファゴソームの形成は 3-メチルアデニン添加によって起こらなくなったが、液胞形成に伴って起こる細胞質部分分解産物の蓄積は 3-メチルアデニンで阻害されなかった。すなわち、同一のミニプロトプラスト内で 3-メチルアデニン感受性と非感受性の 2 つのタイプのオートファジーが観察できた。

この結果は、液胞が新規に形成するときには、3-メチルアデニン非感受性の新奇のオートファジーが同時に起こることを示唆している。

(2) シロイヌナズナの根の先端では、3-メチルアデニン感受性のオートファジーが液胞の拡大化を介して細胞成長に寄与している。

シロイヌナズナではオートファジー関連遺伝子が破壊された突然変異株が得られており、関連遺伝子のひとつである ATG5 遺伝子が破壊された株の根ではオートファジーが起こらないことが観察されている (Inoue et al. 2006)。このような根における液胞の拡大化にオートファジーが寄与しているかどうかを調べるために、根の成長速度を測定した。

播種後 1 週間のシロイヌナズナ芽生えの根を先端から 5 mm 切断し、1/2 濃度の MS 培地に 3% のショ糖を加えた富栄養条件の培地で振盪培養 (50rpm, 23°C, dark) すると、野生株の根は 1 日で  $2.90 \pm 0.83$  mm (n=15) 伸びたのに対し、ATG5 遺伝子破壊株では *atg5-1* が  $1.98 \pm 0.73$  mm (n=16)、*atg5-2* が  $2.08 \pm 0.60$  mm (n=13) しか伸びなかった。その後も根は 3 日間ほぼ同じ速度で伸び続けた。さらに根の先端から一定距離の細胞の大きさを光学顕微鏡を用いて測定すると、ATG5 遺伝子破壊株は野生株に比べ先端から 500  $\mu$ m 以降の細胞が小さかった。これらの結果は、ATG5 遺伝子破壊株では細胞の伸長が遅くなることにより根の伸長が遅くなっていることを示唆している。

オートファジーを阻害する効果を持つ薬剤である 3-メチルアデニンを培養液に加えて液体培養したところ、野生株において培養 0-1 日間での根の伸長を *atg5-1* と同程度にまで抑制した。このことは、3-メチルアデニンが 0-1 日間ではオートファジー阻害剤として特異的に働いていることを示唆している。しかし 3-メチルアデニンは 2 日目以降の根の伸長を大きく抑え、*atg5-1* 株に対しても伸長抑制効果を示した。このことは、2 日以上にわたる処理の際には、3-メチルアデニンはオートファジー阻害以外の効果をもつことを示唆している。

### 3 今後の展望

本プロジェクト研究の成果をもとに、植物液胞の形成・拡大には 2 つのタイプのオートファジーが関与しており、オートファジーは液胞の拡大化を介して植物細胞の成長に寄与していることをさらに明らかにしていきたいと考えている。