

細胞の形を決めるメカニズムについてのアプローチ

大島朗伸, 中川 強, 石田秀樹, 川向 誠

はじめに

細胞レベルでみると生物界には様々形を持った細胞が存在する。丸い細胞もあれば、長い細胞、紡錘形、長方形、真四角のような細胞もある。動物細胞は細胞壁がなくとも形を保っているが、植物はセルロースという厚い細胞壁を有している。原核微生物の代表である大腸菌はペプチドグリカン層という細胞壁と2重の細胞膜を持っている。真核微生物の代表である酵母はグルカンやキチンからなる細胞壁を有している。形態の決定に細胞表層の構造がかなり重要なことは間違いない。細胞表層の構造のみならず、形を制御する因子としてシグナル伝達系の関与も考えられる。本研究では大腸菌、酵母、植物の専門家と電子顕微鏡の専門家が会して遺伝学的手法と形態学的手法を使い、細胞の形態に関する研究を進めることを目的とした。

(1) 細菌細胞の外形を決定する役割を果たしているのはペプチドグリカンという特殊なポリマーから成る網目様の袋であると考えられている。大腸菌の変異株である大腸菌 L-form NC7 は浸透圧保護剤存在下で球状から不定形の外形を示すことからペプチドグリカンを欠損しているものと考えられている。しかし、大腸菌のペプチドグリカン層は薄く、細胞壁の主成分は外膜であることから、外膜も大腸菌の外部形態維持に重要な機能を果たしている可能性も無視できない。そこで、ペプチドグリカン欠損変異株である大腸菌 L-form NC7 における外膜の有無を外膜に存在する蛋白質をマーカーとして調査することにより、外膜が大腸菌の外部形態維持に寄与する可能性について検討した。

(2) 植物表皮の気孔は大気とのガス交換調節を行う重要な構造である。気孔は原表皮細胞から分化した一対の孔辺細胞によって形成される。この分化の過程(原表皮細胞 - メリステモイド - 孔辺母細胞 - 孔辺細胞)は明確かつ観察が容易であり、植物細胞の発達メカニズムを研究するためのよいモデルである。我々は高等植物における細胞形態構築の仕組みを解明することを目的に、シロイヌナズナの気孔形成突然変異体を用いて解析を進めてきたが、本研究課題では特に MC79 突然変異体に着目した。MC79 は leucine rich repeat を持つ receptor like kinase の変異体で、孔辺細胞の伸長方向や湾曲方向が異常にな

る表現型を示す。MC79 receptor kinase は対をなす孔辺細胞の対称的な細胞形態構築に関わる情報伝達系の因子であることが予想される。そこでその情報伝達のタイミングを明らかにするために MC79 の発現部位・発現時期についての解析を行った。

(3) 酵母は動物細胞などと違い、堅い細胞壁を有している。これは自然界で生育するために必要な構造体であるが、その細胞壁はグルコースを単位とするグルカンと N - アセチルグルコサミンを単位とするキチン質から構成されている。グルカンは細胞壁の成分の大部分を占めるため、細胞壁形成に重要であるが、キチンに関してはその役割がよくわかっていない。この細胞壁を合成する酵素はそれぞれグルカンシンターゼやキチンシンターゼであるが、対応する遺伝子を破壊し、キチンを合成できない分裂酵母を誘導することができれば、キチンの役割を調べることができる。そこで、キチンシンターゼ遺伝子を破壊した株を誘導し、酵母の形態を観察した。加えて、シグナル伝達系に関与する変異体のなかから、形態形成に及ぼす変異株について電子顕微鏡観察を行った。

方 法

(1) 大腸菌はまず 1.5% パラホルムアルデヒド, 1.5% グルタルアルデヒド, (0.1M トリス緩衝液, pH7.0) により室温で2時間固定した。0.1M トリス緩衝液 (pH7.0) で洗浄 (室温, 30分3回) し, 1% オスミウム (0.1M トリス緩衝液, pH7.0) で4 時間で2時間固定した。0.1M トリス緩衝液 (pH7.0) で洗浄 (4℃, 30分3回) 後, エタノール系列で各15分ずつ脱水した。その後, 100% エタノールと QY-1 の等量混合液で30分, QY-1 で30分2回, QY-1 と包埋剤である Quetol653 樹脂との等量混合液で2時間, Quetol653 樹脂で2時間3回の置換をした後, 60度の恒温器で24時間かけて樹脂を硬化させた。これまでの作業はすべてマイクロチューブのままでおこなった。硬化した樹脂をマイクロチューブから取り出し, トリミングした後, ウルトラマイクロトーム (ライヘルト, ウルトラカット) で約 50nm の厚さに薄切し, 5% 酢酸ウラニル水溶液で10分間染色, さらに佐藤の鉛溶液で5分間染色を行った。染色した切片を透過型電子顕微鏡 (日本電子, JEM-1200EX) で観察した¹⁾。

(2) 酵母は, 遠心分離機で集菌した後, 2% グルタル

アルデヒド (0.1M リン酸緩衝液, pH7.2) により, 4 で2時間固定を行った. 固定した試料は洗浄後, 1.5% 過マンガン酸カリウムにより 4 で6時間追加固定を行った. 洗浄の後, 最終濃度 1.5% になるように寒天を加えてから冷却し, 寒天包埋ブロックを作成した. このブロックを 1mm 四方の立方体に切り出し, 1% オスミウムで固定した. エタノール系列で脱水した後, QY-1 に置換, さらに Quetol653 樹脂溶液に置換後, 60度の恒温器中で24時間かけて硬化させた. この試料をウルトラミクロトームで約70nmの厚さに薄切し, ウランと鉛で二重染色した. 染色した切片は透過型電子顕微鏡で観察した²⁾.

(3) MC79 の発現パターンを知るため MC79 プロモーター::MC79 タンパク質-GFP を作製してシロイヌナズナ植物体に導入し, 共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った. MC79 突然変異体で異常な孔辺細胞が形成される過程を解析するため, デンタルレジンに葉を押し付けレプリカをとった³⁾. 同一葉で一定時間ごとにレプリカをとることで, 細胞形態が変化するパターンを追跡した.

結 果

(1) 大腸菌由来の細胞壁欠損変異株 L-form NC7 を用いた外膜の大腸菌の形態への関与についての検討

大腸菌外膜には多種のタンパク質が存在しているが, 大量に生産され, 且つ培地浸透圧変化によってその存在量が変化することが報告されている OmpC, OmpF に着目し, L-form NC7 にこれらタンパク質が存在しているかどうかを SDS-PAGE を用い, 浸透圧処理を行った親株と比較することにより検討した. その結果, L-form NC7 においてもこれらのタンパク質は合成されていると考えられる結果を得た. しかしながら, 外膜タンパク質の合成が外膜構造の存在を示す十分条件ではないため, L-form NC7 の凍結切断標品の SEM による観察及び, 超薄切片標品の TEM による観察をさらに行った. その結果, L-form NC7 に外膜構造が存在していることを示唆する結果が得られた (図, 1). この外膜構造がある程度の強度を有しているか否かを調べるため, L-form NC7 に低浸透圧処理を行い, その形態変化を追跡したところ, 細胞の膨潤が観察された. 大腸菌細胞壁の主成分を占めている外膜が存在しているにもかかわらず L-form NC7 は多形を示すこと, また, 低浸透圧環境では L-form NC7 の膨潤が観察されることなどから, 大腸菌細胞の外膜は大腸菌細胞の外部形態の維持機能を果たしていないものと考えられる⁴⁾.

(2) 分裂酵母のキチン合成不能株及びシグナル伝達に関わる Pds1 欠損株の形態への関与

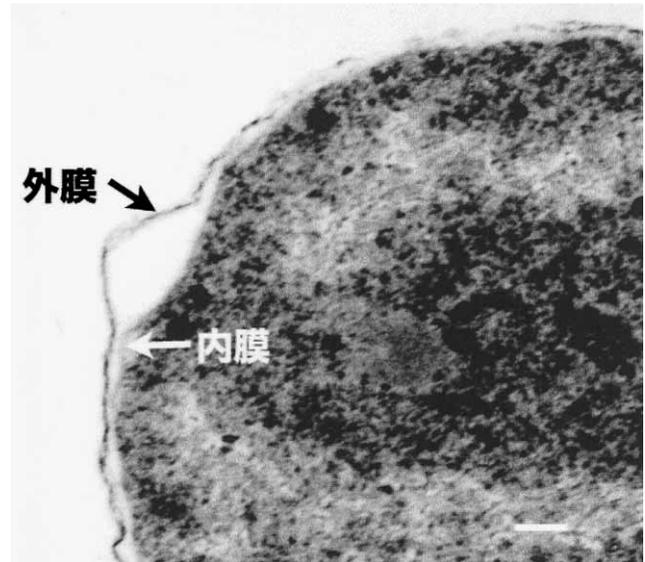


図1. L-form の透過電子顕微鏡像

細胞外縁部分に矢印で示したように, 外膜様構造及び内膜が観察される. 外膜部分にはペプチドグリカン層を観察することは出来ない. bar : 0.1µm

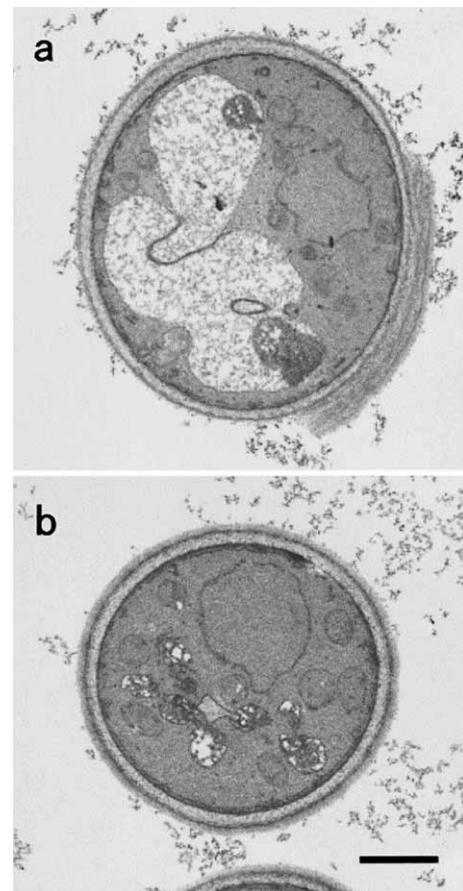


図2. 酵母超薄切片の電子顕微鏡写真

a : 野生株, b : 突然変異株, bar : 1 µm

分裂酵母の細胞壁にはもともとキチン含量が少ない。今回、キチンを合成する酵素である2種類のキチンシンターゼの遺伝子を破壊しキチンを合成できない変異体をとることによってキチンの形態形成に関する役割を知ろうとした。キチンシンターゼ遺伝子の2重破壊株はできたが、電子顕微鏡を使った観察においても特に形態変化は見られなかった。しかしながらキチンシンターゼを欠いた分裂酵母においては孢子を正常に形成できないという性質が見られた。通常4個の孢子を形成する分裂酵母が、2-3個の孢子を形成するものが多く観察された。キチンは孢子形成の最終的な段階で孢子を完成させるのに必要な成分であることがわかった⁵⁾。

分裂酵母の形態に関すると思われる新たな遺伝子の破壊株の観察も同時に行った。*pds1* と銘々した分裂酵母の遺伝子は出芽酵母の *ZDS1* と相同性を示すもので、もともと Ras 欠損酵母の孢子形成不能を抑制する遺伝子として単離したものである。*pds1* 破壊株を作成するとその形態は丸みをおびた形をしていた。そこでその破壊株を電子顕微鏡で観察し、その形態と細胞内構造を観察した。その結果 *pds1* 破壊株では細胞表層構造の変化が若干観察された(図2)。

(3) 孔辺細胞分化に伴う形態構築には受容体型キナーゼを介する情報伝達が必要である。

気孔は植物の体表面に多数存在する孔である。この孔は開閉能力を持ち、光合成に必要な二酸化炭素の取り込みを調節する重要な役割を果たしている。気孔は孔辺細胞という高度に分化した表皮の細胞2個で形成されている。孔辺細胞は環境に応じて開閉するという特殊能力を有する他に、形態的にも非常に特殊化しており、原表皮細胞から孔辺細胞への細胞形態構築には大きな興味を持たれる。これまでに孔辺細胞発達の分子メカニズムを明らかにするために、孔辺細胞が異常な形態となるシロイヌナズナ突然変異体を単離し、その原因遺伝子のクローニングを進めてきた。その結果、植物の細胞間情報伝達で働く受容体型キナーゼ、細胞内の小胞輸送系の因子が孔辺細胞の発達に重要であることがわかってきた。本研究課題では特に受容体キナーゼの働きを調べ、孔辺細胞の形態構築の分子メカニズムを明らかにすることを試みた。

MC79 プロモーター::MC79 タンパク質 - GFP 融合遺伝子導入植物を観察したところ、メリステモイドや孔辺母細胞の細胞膜で GFP 蛍光が観察され、孔辺細胞系列の細胞膜に局在していることがわかった。またメリステモイドを多く有する非常に若い葉で GFP 蛍光を観察したところ、メリステモイドから孔辺母細胞の初期段階で一過的に発現し、孔辺母細胞の分裂ステージでは発現がなくなっ

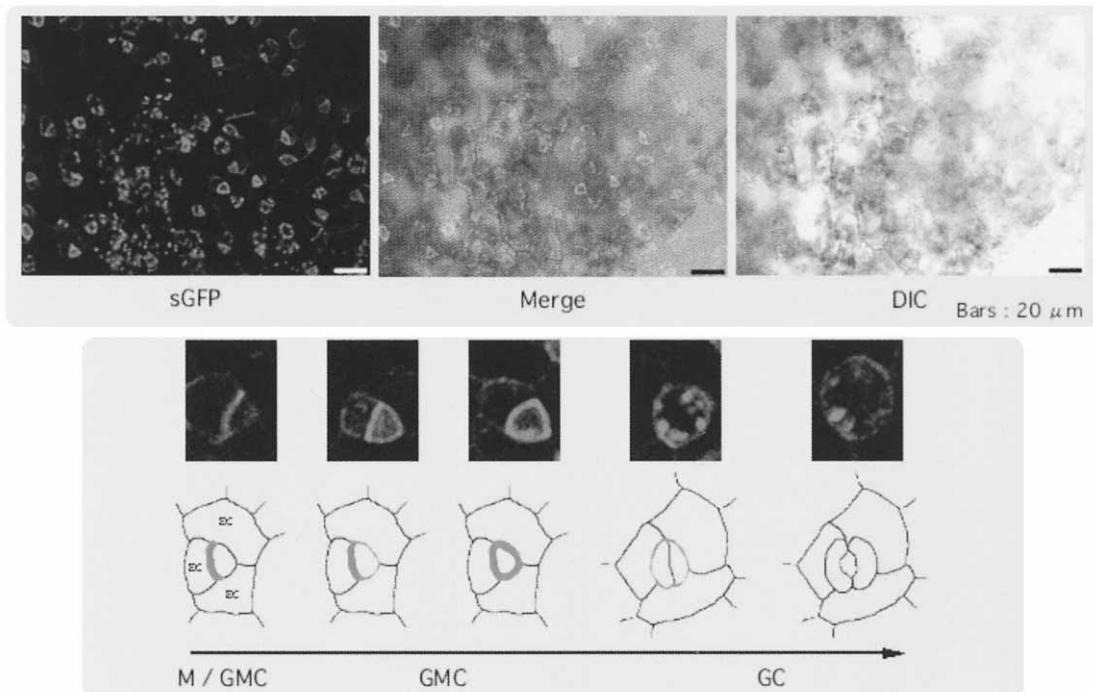


図3. MC79 promoter::protein-GFP を導入したシロイヌナズナの若い葉の蛍光観察。

上段左：GFP 蛍光，上段右：微分干渉像，上段中央：マージ。下段：孔辺細胞の発達に伴う発現パターンの変化。

M：メリステモイド，GMC：孔辺母細胞，GC：孔辺細胞。

ていることがわかった(図3). デンタルレジンで表現型の解析により孔辺母細胞の分裂前の段階から細胞形態の異常が出現し始めることがわかった.

考 察

(1) 今回の実験結果より, 大腸菌の外膜は外部形態維持には関与していないと思われる結果が得られた. 大腸菌をリゾチーム・EDTA 処理することにより得られる L-form と良く似た外形を示すスフェロプラストは, 外膜を持たず, 増殖能力も持たない. 今回の結果と併せて考えれば, 大腸菌にとって外膜は増殖に必要な構造と考えることもできる.

(2) 今回の実験結果より, キチンは分裂酵母においては形態にあまり関与しておらず, むしろ胞子形成に関与することがわかった. 以前外来のキチナーゼを分裂酵母で発現させた時には形態の変化が見られたが, これはキチン質以外のところに影響を及ぼしていたためかもしれない⁶⁾. 分裂酵母の Ras1 は形態形成にも関わるが, その下流で機能していると考えられる Pds1 も正常な形態の維持に必要な因子であることがわかった.

(3) 今回の実験結果より, MC79 遺伝子はメリステモイドから孔辺母細胞の初期段階にかけて一過的に発現していることがわかった. この発現タイミングは突然変異の影響が開始する時期と一致している. メリステモイド/孔辺母細胞のステージは細胞が分裂から分化のモードに切り替わるステージであり, 分化に伴う細胞形態の特殊化に MC79 を介する情報伝達が必要であることが推察された. 細胞外からのシグナルを受け, 特殊な形態となるための細胞骨格アレンジメントの制御を行っていると考えられる.

おわりに

細胞の表層構造については今回の大腸菌の解析により大腸菌における外膜構造の重要性, ペプチドグリカン層の強度維持のための役割がわかった. 分裂酵母の変異体

解析によりキチン質の形態への関与の低さがわかりこれまで言われているように分裂酵母ではグルカンが形態形成に重要であると考えられる. 同時に, 分裂酵母においてシグナル伝達系の因子が形態形成にも関与することがわかった. 植物の気孔形態の MC79 変異体の解析より, 受容体型キナーゼを介したシグナル伝達系の関与が示された. 今回は全く検討していなかったが当然, 細胞内骨格タンパク質であるアクチンや微小管は細胞の形態に大きく影響を及ぼす. 従って, 異なった生物種の解析より, 総合的に考えると形態の形成には細胞の表層の構造, 細胞骨格, それらを制御するシグナル系などが重要であると考えられる.

参考文献

- 1) Yuan, L. H. and Gulyas, B. J., An improved method for processing single cells for electron microscopy utilizing agarose. *Anat. Rec.* 201: 243, 1981.
- 2) Osumi, M., Ultrastructure on yeast: Cell wall structure and function. *Micron.* 29: 207-233, 1998.
- 3) Geisler, M.t., Nadeau, J. and Sack, F. D. Oriented asymmetric divisions that generate the stomatal spacing pattern in *Arabidopsis* are disrupted by the too many mouths mutation. *Plant Cell*, 12: 2075-2086. 2000.
- 4) Onoda, T., Enokizono, J., Kaya, H., Oshima, A., Freestone, P. and Norris, V., Effects of calcium and calcium chelators on growth and morphology of *Escherichia coli* L-form NC-7. *J. Bacteriol.* 182: 1419-1422, 2000.
- 5) Matsuo, Y., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H. and Kawamukai, M., Genetic analysis of *chs1*⁺ and *chs2*⁺ encoding chitin synthases from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 68: 1489-1499, 2004.
- 6) Shimono, K., Matsuda, H., and Kawamukai, M., Functional expression of chitinae and chitosanase, and their effects on morphologies in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 66: 1143-1147, 2002.