

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657019

研究課題名（和文） Planer cell polarity 研究のための
実験系確立の試み研究課題名（英文） An effort to establish a novel experimental system for the study
of planer cell polarity

研究代表者

峰雪 芳宣 (MINEYUKI YOSHINOBU)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：30219703

研究成果の概要（和文）：コレオケータは進化上陸上植物に最も近い藻類である。この藻は1層の細胞でできた単純な体制をしており、多細胞体制の生物の形づくりにそれを構成する個々の細胞がどのように貢献しているかを明らかにする研究には最も適した生物と考えられる。そこで、本研究ではコレオケータを発生生物学のモデル生物とするために、何週間も顕微鏡下で連続観察し、細胞や色素体の輪郭を3Dで追跡でき、外科的手術も可能な実験系を確立し、微小管の役割についての研究を開始した。

研究成果の概要（英文）：*Coleocete scutata* is an alga of Charophytes whose body is consisted of only one cell layer. In order to establish an experimental system for the analysis of the relationships between individual cell shaping and the whole body shaping, we developed the culture system of *C. scutata* that enables us to trace the cell outline and plastid position three dimensionally for many weeks under a microscope. Using this system, the analysis of microtubules in this alga is in progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	0	2,500,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	180,000	3,280,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：形態形成、植物、発生・分化、細胞・組織、PCP、コレオケータ

1. 研究開始当初の背景

(1) 多細胞体制の生物の形づくりに、体を構成する個々の細胞の分裂や成長がどのように貢献しているか、個々の細胞の形態形成と、個体全体での形態形成の関係を明らかにすることは、発生生物学の重要な問題の一つである。動物の発生では、しばしば細胞がシート状になって、個体の形態形成で重要な役割をしていることがある。この場合、細胞がシ

ート状になっているため、3次元(3D)に複雑にからみあった組織や器官や個体に比べ比較的解析が容易である。そのため、シート状の細胞の極性を扱う planer cell polarity (PCP) の研究が盛んになっており、その研究は、ショウジョウバエなどモデル生物を中心に行われており、それに関与する遺伝子が明らかになって来た。しかし、実際の細胞の並びはこれらの遺伝子の影響を受け

る細胞骨格などのタンパク質と、細胞表層での張力など物理的な要素が重要になる。そのため、シートを作っている個々の細胞にどのような力がかかるか、また、そのとき、細胞骨格など、細胞の形を決める因子はどう振る舞うのかを体系的に解析する必要がある。ただ、多くの生物では、細胞のシートだけで存在しているのではなく、隣接する別の組織からの影響も受けているが、ほとんど考慮されていない。これらの問題を解決するには、比較的少ない数の細胞が1層に並んだ単純な体制を持つ生物を扱うことが理想である。

(2) コレオケーテは、20世紀の中頃までは緑藻の比較的下等なグループと考えられていたが、陸上植物同様に細胞板形成で細胞質分裂が行われることや、最近の分子系統学的研究から、シャジクモの仲間(charophyceae)に分類される様になり、陸上植物に最も近い水棲の生物として注目されている。コレオケーテ属の1種 *Coleochaete scutata* は以下の様な特徴が知られている。① 形は1層の細胞シートからなる、円盤状の2次元体制をしており、光学顕微鏡の観察に適している。② 成長は周縁の細胞が並層分裂と垂層分裂を繰り返すことにより、円盤状に成長していく。③ 細胞は1個の大きな葉緑体を持ち、葉緑体以外には自家蛍光がないため、GFPなどの蛍光観察に支障はない。④ 周囲には他の藻類によく見られる寒天層は顕著でなく、細胞間の関係も陸上植物に似ている。⑤ 並層分裂と垂層分裂で細胞質分裂の様式が異なるという観察もあった(これに関しては、現在否定的見解の方が有力である)。⑥ 実験室では、カバーガラスやプラスチックの表面にへばりついて生育するため、阻害剤実験などが簡単に行える。⑦ 田んぼなど、しばしば水がなくなる環境で生育しており、乾いた状態でも、水中でも生育できるため、多様な生理学的実験、例えば細胞を引っ張るなど、が可能である。

コレオケーテは進化的に重要で、分類系統学者を中心に研究されてきたが、細胞生物学、あるいは発生生物学的にはまだ、体系だった研究はなかった。我々は、微小管構築機構がどのように進化して来たかを調べるために、微小管重合に重要なγチューブリンの構造比較の研究を行っている。その関連で、陸上植物への進化の過程で重要なコレオケーテに注目して研究を開始し、最近無菌で生育する株を維持できるようになっていた。ただ、遺伝子組換え体の作製等の技術はまだ確立していない。

2. 研究の目的

車軸藻類のコレオケーテは、細胞が1層に並んだ円盤状の単純な形をしているため、光

学顕微鏡での観察が容易な上、ボディープランを考える上で進化的に興味深い位置にある生物である。本研究では、このコレオケーテをPCP研究の新しい実験系として確立するために、培養方法の検討、細胞骨格を蛍光ラベルした株の作製と、確立した実験系の基礎データを収集することを目的とした。実際には、(1) 発生の過程を長期間、蛍光、微分干渉光学系等で記録観察できるシステムを完成すること、(2) 細胞骨格(微小管とアクチン)を蛍光ラベルした株を作製し、微小管やアクチンの挙動を生きたまま観察できるシステムを作ることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 材料のコレオケーテ (*Coleochaete scutata* Brébisson) として、SAG110.80M株とCPCC305株の2種類の株を使用した。SAG110.80M株は2008年にThe Culture Collection of Algae at the University of Göttingen, Germany (SAG)から、CPCC305株は2008年にCanadian Phycological Culture Centre (CPCC)から入手し維持していたものを使用した。これらの株はC-medium (Ichimura 1971)を入れた直径9cmのプラスチックシャーレで、20℃、16時間明期、8時間暗期で静置培養したものを用いた。観察は、底部にカバーガラスを貼付けた直径3cmのプラスチックの培養用シャーレを使用し、観察は20~25℃で行った。

(2) コレオケーテの連続観察や顕微手術は、我々がJST機器開発プログラムで、細胞全体と、その細胞の特定の表層での分子の挙動を並行して観察できる“局所・大局同時並行タイムラプスシステム(Global-local live imaging microscope (GLIM) system)”

(http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/bio/synth/jst_project.htm)として開発した顕微鏡システムを使用した。このシステムでは、スペクトルイメージングシステムを装備した共焦点レーザー顕微鏡システム(CI, ニコン)と全反射顕微鏡システム(TIRF, ニコン)を装備している。

(3) 間接蛍光抗体法による微小管の観察には、カバーガラスを数枚底に敷いた直径9cmのプラスチックシャーレでコレオケーテを1~2週間培養し、カバーガラスの上に付着し成長した藻体を使用した。固定、染色方法はBrown *et al.* (1994)の方法を参考に、固定、解離、脱色のための薬品の濃度、処理時間を変化させた。1次抗体は、mouse monoclonal anti- α tubulin (Sigma T5168)とsheep polyclonal anti-tubulin (Cytoskeleton #ATN02)を目的に応じて使い分けた。Taxol処理は、DMSOに溶かした10mM

のストック溶液をあらかじめ作製し、必要に応じて適当な濃度に希釈して使用した。

(4) パーティクルガンによる遺伝子導入装置はハンマー弾式遺伝子導入装置（日本医化器械 IPGG-IA-SS）を使用した。遺伝子導入条件の検討には、ヒメミカヅキモのクロロフィル ab 結合タンパク質 (Cab) 遺伝子プロモーターをクラゲの緑色蛍光タンパク質遺伝子に結合した融合遺伝子をもつプラスミド pSA405A（日本女子大学関本弘之博士より譲与）を使用した。まず藻体を湿った紙の上に集め、導入遺伝子を直径 $1\mu\text{m}$ の金粒子に附着させて、 $0.5\mu\text{m}$ のステンレス製振動板を使用して藻体に撃ち込んだ。

4. 研究成果

(1) 本研究の遂行にはコレオケーテの発生の過程を同一の個体で長期間、蛍光光学系（共焦点レーザー、全反射蛍光光学系も含む）や微分干渉光学系などで記録観察できるシステムを完成することが必須である。そこで、まず、培養容器、培地の組成、個体の密度、光条件などを検討した。その結果、SAG110、80M株もCPCC305株も、研究方法の(1)に記した様な条件で培養し、約8週間に1回植え継ぐことにした。このようにして培養した藻体を、観察用のカバーガラスのついた直径3cmのプラスチックシャーレに移し、培養液が蒸発しないようにパラフィルムでシールし、顕微鏡下で長時間の撮影を行った。微分干渉光学系で信頼できる画像を取得する為に、シャーレの底と蓋の両方にカバーガラスを貼付けたシャーレを使用した。長時間観察すると、培養液が蒸発し、蓋のカバーガラスに水滴が生じる問題があった。そこで、蓋のカバーガラスをデフローストのカバーガラスにする事で、倒立顕微鏡での微分干渉光学系を使った数週間の観察を可能にした（図1）。その結果、単一の細胞から円盤状の藻体を形成するまでの間を藻体の全体像について3次元タイムラプス撮影を行うことが可能になった（図2）。

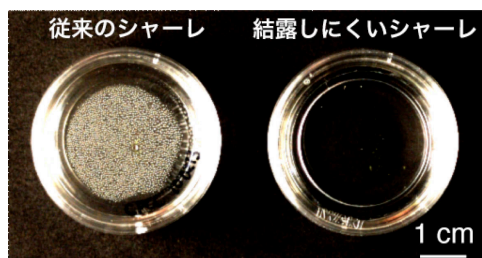


図1 シャーレのコーティングの有無の比較。1週間の培養後、コーティングを改良したシャーレ（右）では全く結露していない。

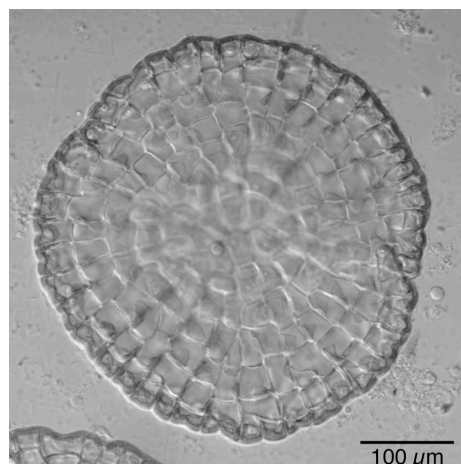


図2 1層の円盤状に成長するコレオケーテ

(2) GLIMシステムは、細胞の局所の分子ダイナミクスと細胞全体の構想変化を並行して捉える為に作ったシステムである。このシステムに、低倍の対物レンズを用い、コレオケーテの円盤状藻体とそれを構成する細胞についてタイムラプス観察を行った。大局および局所撮影の両方で鮮明な像を得ることができ、特に局所撮影では、葉緑体の移動や膜構造の経時的な変化も捉えることができた。この顕微鏡システムは、共焦点顕微鏡システムも備えているので、連続して焦点を変更して画像取得することで3D画像取得が可能であり、コレオケーテの藻体と個々の細胞についての体系的な解析を行うのに、非常にパワフルなシステムである。そこで、このシステムで経時的に3Dで細胞の輪郭と葉緑体の位置を解析する目的で、FM4-64という蛍光プローブで細胞膜を染色し、スペクトルイメージングを使用して、細胞膜の蛍光と葉緑体の蛍光を明確に識別できる方法を確認した（玉置&峰雪 2012、Plant Morphology 24、13-17、図3）。

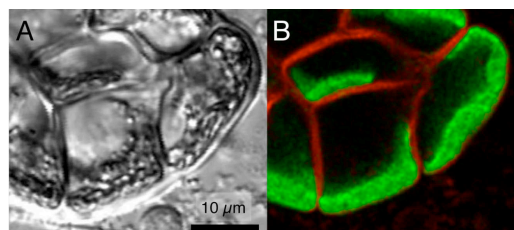


図3 スペクトルディテクタを用いたコレオケーテ藻体の観察像。A. 微分干渉像、B. スペクトルディテクタを用いて細胞膜の蛍光と葉緑体の蛍光シグナルを分離した蛍光像。細胞膜は赤色の疑似カラーで、葉緑体は緑色の疑似カラーで示した。

これにより、今後コレオケーテの成長過程に於けるすべての細胞と葉緑体の位置を3Dで解析が可能になった。今後は、この方法で取

得した時間軸もいれば4次元のデータを解析する方法を構築し、個々の細胞の伸長、分裂と全体の形との関係について解析したいと考えている。また、この顕微鏡システムのレーザーを使うことで、特定の細胞を殺す顕微手術も可能にした。この方法は、今後形態形成の生理学的な解析に有効になると考えられる。

(3) 微小管やアクチンは形態形成に重要な役割を果たす細胞骨格であり、コレオケーテの形態形成でも微小管が関与している可能性は示唆されている。そのため、発生の過程で微小管やアクチン繊維などの挙動を調べるのは重要なことになる。高等植物では、間期に見られる細胞表層を平行に走る微小管が細胞の伸長方向の制御に重要と考えられている。Brown *et al.* (1994)は、微小管分布の観察から、コレオケーテにも表層微小管が存在することを示唆しているが、その像が本当に高等植物間期に見られる表層微小管と同じものかどうか問題があった。そこで、まず、この問題を解決する為に、間接蛍光抗体法の固定から染色までの各ステップの再検証を行った。その結果、コレオケーテの間期細胞の微小管は大部分が細胞質にあり、表層を走る微小管も存在するが、表層を平行に並んで走る多数の微小管は観察できなかった(図4)。この結論を支持する為の実験として、微小管安定化剤タキソール存在下で試料を作製して調べたが、結論は同じであった。

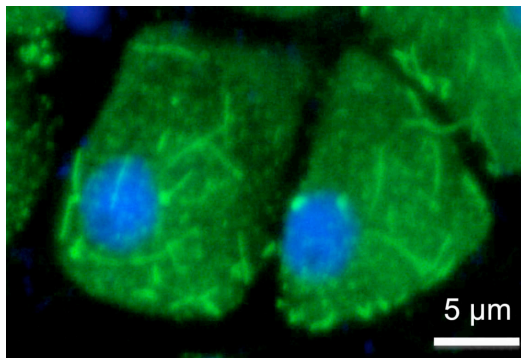


図4 間接蛍光抗体法で微小管を蛍光標識したコレオケーテの間期の細胞。緑：微小管、青：核。

このことは、コレオケーテの間期細胞では、いわゆる高等植物にみられる細胞表層を多数平行に並んで走る表層微小管は存在しないことを示唆する。しかし、微小管重合阻害剤コルヒチンを藻体に処理したところ、藻体における細胞分裂と細胞伸長は抑制されたことから、細胞内に存在する微小管は一般的な高等植物とは異なる方法で細胞の成長を制御していると考えられる。またアクチン重合阻害剤を処理した場合でも同様に藻体に

おける細胞分裂と細胞伸長は抑制されたことから、コレオケーテの細胞分裂および成長にはアクチンも重要な役割を果たすことが示唆された。しかし、微小管やアクチンがどのように関与しているのかは不明である。これらの問題を解決するには、微小管やアクチン繊維の挙動を直接観察する必要がある。

GFP等の蛍光プローブを使って微小管やアクチン繊維をライブイメージングで観察できるようにするためには、これらの遺伝子を導入したコレオケーテの株を作製する必要がある。そこで、コレオケーテへの遺伝子導入方法を検討した。コレオケーテにおける遺伝子導入については未だ報告は無いが、緑藻で同じ車軸藻綱であるミカヅキモにおいて形質転換体の作製が成功している(Abe *et al.*, 2008, *Plant Cell Physiol.* 49: 625-632)ことから、ミカヅキモにおける実験系を参考にし、パーティクルガンによる遺伝子導入法を検討した。従来我々が使用して来たパーティクルガン遺伝子導入装置は、試料の損傷が大きかったため、ハンマー弾式のパーティクルガン遺伝子導入装置を購入し、セットアップした。この装置を使用することで、GFPによると思われる蛍光を示す幾つかの細胞を観察することが出来た。しかし、もっと効率を高めないと形質転換体を得ることは難しいと考え、現在、この装置を使ってさらに遺伝子導入条件を検討し、細胞内での分子のダイナミクスを観察できる方法の確立を目指している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① 玉置大介、峰雪芳宣、Global-Local Live Imaging Microscope (GLIM)による細胞の局所での事象と細胞全体での事象の並行観察、*Plant Morphology*、査読無、24巻、2012、13-17

[学会発表] (計1件)

① 峰雪芳宣、玉置大介、Global-Local Live Imaging Microscope (GLIM)による細胞の局所での事象と細胞全体での事象の並行観察、日本植物学会第75回大会 シンポジウム、2011年9月18日、東京大学(東京都目黒区)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biosynth/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峰雪 芳宣 (MINEYUKI YOSHINOBU)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：30219703

(2) 研究分担者

山内 大輔 (YAMAUCHI DAISUKE)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：40220222