

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25年 5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22770063
 研究課題名（和文） 液胞型プロトンピロホスファターゼの局在から見る植物液胞形成の仕組み
 研究課題名（英文） Localization of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and vacuole biogenesis in plant cells
 研究代表者
 西川 繭子（佐藤繭子）(NISHIKAWA MAYUKO)
 独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・技師
 研究者番号：80550376

研究成果の概要（和文）：植物の液胞形成初期過程を微細構造レベルで明らかにすることを目的に、液胞膜タンパク質 V-PPase を指標として、シロイヌナズナとタバコの根端組織を透過電子顕微鏡で観察した。小さい液胞が融合して巨大化する様子が見られた一方、前形成層の細胞では V-PPase が高密度で局在するリング状膜構造体が存在し、均一な粒子を含む液胞に融合していた。根端組織のうち、前形成層では、他の細胞層と液胞の形成過程が異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To investigate how plant vacuoles are generated, I examined Arabidopsis and Tobacco root tip tissues by electron microscopy. The anti-vacuolar H⁺-pyrophosphatase (V-PPase) antibody was used for immunogold labeling, and positive signals in the vacuolar membrane and a ring-like structure were detected especially in the procambium. Some ring-like structures fused with vacuoles that containing homogenous particle. Vacuole genesis of the procambium may different from other cell layer of root.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：植物、電子顕微鏡、液胞、液胞膜

1. 研究開始当初の背景

液胞は、植物細胞の体積の90%を占め、タンパク質の貯蔵や分解だけでなく、細胞の伸長などの形態形成に重要な働きを担っている。透過電子顕微鏡（TEM）による形態観察により、液胞は、ゴルジ体や小胞体の一部が分化して形成されると言われているが、その

形成の仕組みは未だ明らかでない部分が多い。

本研究の先行研究において、Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase（液胞型プロトンピロホスファターゼ；V-PPase）を認識する抗体を用いてシロイヌナズナとタバコ根端組織の免疫電顕を行った際、液胞膜の他に V-PPase

が高密度で局在するリング状構造体が見出された。この構造体は、通常の電顕構造観察では目立たない。しかし、抗 V-PPase 抗体が特異的に反応するため、免疫電顕法により他のオルガネラと明らかに区別できる。V-PPase は、細胞質やオルガネラを取り囲むリング状構造体の、膜上に局在していた。また互いに融合して小さい液胞に変換しているような部分や、大きな液胞に融合しつつある様子も見られた。このような構造体に液胞膜タンパク質が局在する例は、これまでに報告がなかった。V-PPase が液胞膜タンパク質であることから、この新奇構造体は、形成途中の液胞であると推測された。

2. 研究の目的

本研究では、V-PPase が植物液胞形成、特に形成の初期段階で重要であると推定し、この新奇構造体の形態解析を通して、液胞の由来や液胞形成の仕組みを明らかにすることを目的とした。さらに V-PPase が形態形成に果たす役割について、形態学的視点からの解明を目指した。

3. 研究の方法

シロイヌナズナもしくはタバコ芽生えの根端を高圧凍結装置で凍結固定した。凍結置換固定液として、免疫電顕法の場合は 1%グルタルアルデヒド・1%四酸化オスミウム/アセトン溶液を使用し、オスミウムを加えることで、膜構造のコントラストを高めた。抗体染色の際には、固定に四酸化オスミウムを用いていることから、事前に切片のエッチング処理を行った。構造観察法の場合は 2%オスミウム/アセトン溶液を使用した。

(1) 根端組織におけるリング状構造体の分布

タバコの根端組織について、V-PPase の免疫電顕および微細構造観察を組織全体にわたって行い、どこにリング状構造体が存在するかを確認した。

(2) リング状構造体の 3 次元構造の把握

V-PPase が局在するリング状構造体の超微細構造を立体的に把握するため、タバコの根端組織について、連続切片法による立体構築を試みた。

(3) 他の液胞膜タンパク質と V-PPase との局在比較

リング状構造体を構成する膜タンパク質を明らかにするため、V-PPase 以外の ATPase や水チャンネルなどの液胞膜タンパク質に対する抗体を用いて、免疫電顕を行った。

4. 研究成果

シロイヌナズナとタバコの根端の両方について試料を作製したが、電顕観察の結果、タバコ根端細胞におけるリング状構造の方がより複雑で明瞭な形態をしていた。そこで本研究では、以降タバコ根端に注目して解析を行った。

(1) 根端組織でのリング状構造体の分布

抗 V-PPase 抗体による免疫電顕観察と通常の微細構造観察を行った。リング状構造体は中心柱に存在しており、特に前形成層に多く分布していた。根端組織全体を、広範囲にわたって見ることで、リング状構造体の分布特異性を明らかにできた。

リング状構造体が融合している液胞内部は、密度の均質な粒子が詰まっており、分解途中と考えられる小胞や膜が含まれていた。前形成層以外の根端細胞で、このような液胞はほとんど観察されなかった。

また、吸水後 3 日目、9 日目、11 日目、20 日目のいずれの根端においてもリング状構造体は観察され、その組織内分布は吸水後の日数によって変わらなかった。

(2) リング状構造体の 3 次元構造の把握

連続切片の観察により、単一切片で二次元ではリング状に見える構造体が、実際には数 100 μm にわたって連続するシート状の膜構造体であることが明らかとなった。

(3) 他の液胞膜タンパク質と V-PPase との局在比較

リング状構造体とオートファジーの関連が考えられたことから、オートファジー関連タンパク質の一つ、ATG8 の抗体を用いて免疫電顕法を行った。また ATPase や水チャンネルタンパク質についても免疫電顕法を行ったが、現在までにリング状構造体への局在を示すポジティブな結果は得られていない。

当初、V-PPase が高密度で局在するリング状構造に関しては、静止中心から始まる根端細胞の分化に伴う、液胞の発達初期過程と推測していた。しかし、本研究の結果から、リング状構造は全ての細胞系列で見られる訳ではないことが明らかとなった。つまり、リング状構造体は液胞に普遍的な形成初期状態というよりも、前形成層特異的に発達した、液胞膜の一状態である可能性が考えられる。根端組織において、前形成層では、他の細胞層と液胞の形成過程が異なることが示唆された。

本研究は、日本植物生理学会と日本顕微鏡学会で発表するとともに、非公開ミーティング等で報告した。現在、本研究に関する論文をまとめている。

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 8 件)

①Kobayashi, K., Baba, S., Obayashi, T., Sato, M., Toyooka, K., Keränen, M., Aro, E.M., Fukaki, H., Ohta, H., Sugimoto, K., Masuda, T. (2012) Regulation of Root Greening by Light and Auxin/Cytokinin Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 1081-1095. 査読有. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.092254>.

②Kanaya, T., Hase, K., Takahashi, D., Fukuda, S., Hoshino, K., Sasaki, I., Hemmi, H., Knoop, K.A., Kumar, N., Sato, M., Katsuno, T., Yokosuka, O., Toyooka, K., Nakai, K., Sakamoto, A., Kitahara, Y., Jinnohara, T., McSorley, S.J., Kaiho, T., Williams, I.R., Ohno, H. (2012) The Ets Transcription Factor Spi-B Is Essential for the Differentiation of Intestinal Microfold (M) Cells. *Nature Immunology* 13: 729-736. 査読有. DOI: 10.1038/ni.235

③Yamauchi, D., Tamaoki, D., Hayami, M., Takeuchi, M., Karahara, I., Sato, M., Toyooka, K., Nishioka, H., Terada, Y., Uesugi, K., Takano, H., Kagoshima, Y., Mineyuki, Y. (2012) Micro-CT observations of the 3D distribution of calcium oxalate crystals in cotyledons during maturation and germination in *Lotus miyakojimae* seeds. *Journal of Electron Microscopy* 印刷中. 査読有. DOI: 10.1093/jmicro/dfs079

④Kawafune, K., Sato, M., Toyooka, K., Nozaki, H. (2012) Ultrastructure of the rickettsial endosymbiont "MIDORIKO" in the green alga *Carteria cerasiformis* as revealed by high-pressure freezing and freeze-substitution fixation. *Protoplasma* 印刷中. 査読有. DOI: 10.1007/s00709-012-0469-4

⑤Akai, M., Onai, K., Kusano, M., Sato, M., Redestig, H., Toyooka, K., Morishita, M., Miyake, H., Hazama, A., Checchetto, V., Szabò, I., Matsuoka, K., Saito, K., Yasui, M., Ishiura, M., Uozumi, N. (2011) Plasma membrane aquaporin AqpZ is essential for glucose metabolism during photomixotrophic growth of *Synechoc*

ystis sp. PCC 6803. *Journal Biological Chemistry* 286: 25224-25235. 査読有. DOI: 10.1074/jbc.M111.236380

⑥Minamisawa, N., Sato, M., Cho, K.H., Ueno, H., Takechi, K., Kajikawa, M., Yamato, K.T., Ohyama, K., Toyooka, K., Kim, G.T., Horiguchi, G., Takano, H., Ueda, T., Tsukaya, H. (2011) ANGUSTIFOLIA, a plant homolog of CtBP/BARS, functions outside the nucleus. *Plant Journal* 68: 788-799. 査読有. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04731.x

⑦Nishimura, T., Toyooka, K., Sato, M., Matsumoto, S., Lucas, M.M., Strnad, M., Baluska, F., Koshiba, T. (2011) Immunohistochemical observation of indole-3-acetic acid at the IAA synthetic maize coleoptile tips. *Plant Signaling & Behavior* 6: 2013-2022. 査読有. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112455>

⑧Nishikawa, T., Kajitani, H., Sato, M., Mogi, Y., Moriyama, Y. and Kawano, S. (2010) Isolation of Chloroplast FtsZ and AtpC, and Analyses of Protein Targeting into the Complex Chloroplast of Haptophyta *Pavlova pinguis*. *Cytologia* 75: 203-210. 査読有. URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/cytologia/75/2/75_2_203/_article

[学会発表] (計 8 件)

①佐藤繭子、朽名夏磨、澤木史江、若崎眞由美、桧垣匠、吉田拓弘、桜井哲也、馳澤盛一郎、持田恵一、永田典子、豊岡公德 「電顕アトラス：高圧凍結技法を取り入れた広域電顕像撮影システムの開発」 第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 21 日 (岡山市)

②佐藤繭子、後藤友美、松岡健、豊岡公德 「V-PPase の細胞内局在から見るタバコ根端分裂組織の液胞形成」 第 68 回日本顕微鏡学会学術講演会、2012 年 5 月 15 日 (つくば市)

③佐藤繭子、後藤友美、松岡健、豊岡公德 「タバコ根端組織における液胞型プロトンピロホスファターゼの細胞内局在」 第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 18 日 (京都市)

④佐藤繭子、後藤友美、豊岡公德 「タバコ根端組織における液胞形成：液胞型プロトンピロホスファターゼの細胞内局在」 第 23 回日

本植物形態学会大会、2011年9月16日（東京都文京区）

⑤佐藤繭子、後藤友美、豊岡公德「高圧凍結技法を用いた植物液胞形成過程の微細構造解析」第67回日本顕微鏡学会学術講演会・シンポジウム、2011年5月17日（福岡市）

⑥ 佐藤繭子、後藤友美、豊岡公德、松岡健「植物根端の液胞形成における新奇構造体の解析」第52回日本植物生理学会年会、2011年3月22日、要旨公開により学会成立（仙台）

⑦ Mayuko Sato, Yumi Goto, Ken Matsuoka, Kiminori Toyooka. “Immunocytochemical Analysis of vacuole formation process by using high-pressure freezing technique” International Microscopy Congress 17, 2010年9月23日（Brazil, Rio de Janeiro）

⑧佐藤繭子、河合たか子、若崎真由美、松岡健、豊岡公德「植物根端の液胞形成における新奇構造体の解析」第66回日本顕微鏡学会学術講演会、2010年5月24日（名古屋市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 繭子（佐藤繭子）（NISHIKAWA MAYUKO）

独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・技師

研究者番号：80550376