

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657034

研究課題名(和文)細胞壁ポリマーのライブセル・イメージング技術の開発

研究課題名(英文)Development of live cell imaging techniques for cell wall polymers

研究代表者

橋本 隆 (Hashimoto, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：80180826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：植物生細胞でセルロースなどの生体ポリマーの存在様式を追跡できる蛍光プローブは次世代の細胞壁ダイナミクスの研究には不可欠である。本研究では、細胞壁分泌タンパク質(expansin)のシグナルペプチド、セルロース分解酵素(Trichoderma reeseiのセルビオヒドロラーゼ)の結晶性セルロース結合モジュール、細胞膜受容体(BR11)の膜貫通領域、蛍光タンパク質(GFP)をこの順番でつないだ誘導タンパク質を作製し、タマネギ表皮細胞で一過的に発現させた。GFP蛍光は細胞表層で粒子状に観察されたが、繊維状には見られなかった。形質転換植物体での詳細な観察が必要である。

研究成果の概要(英文)：Fluorescent probes that track and monitor dynamic status of biopolymers, such as cellulose microfibrils, in living plant cells are essential for next-generation dynamic studies of plant cell wall. In this study, we fused in tandem a signal peptide from cell wall protein (expansin), a crystal cellulose-binding module from cellulose degrading enzyme (cellobiohydrolase from Trichoderma reesei), a membrane-spanning domain of plasma membrane receptor (BR11), and green fluorescent protein (GFP), and transiently expressed this fusion protein in onion epidermal cells. GFP fluorescence was detected in cortical regions as dots but not in linear filaments. Detailed observation using transgenic plants is necessary.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：セルロース 可視化 蛍光標識 植物細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞構成成分を非破壊的に標識し、生きた細胞や個体でその存在様式を経時的に追跡できる生体プローブは現代細胞生物学において必須の研究ツールである。我々はこれまでに植物細胞の微小管細胞骨格を蛍光蛋白質で標識し、表層微小管パターンの形成機構を解明してきた。微小管やアクチンといった細胞内生体ポリマーは標識プローブが充実してきているが、植物細胞壁を構成する種々の多糖ポリマーを非破壊的に標識・可視化することは現在のところ不可能である。

植物細胞壁はセルロース微繊維を主要成分として、ヘミセルロースやペクチンなどの多糖、リグニン、分泌タンパク質などで構成される。これらの細胞壁構成成分は一見静的で変化が乏しいと考えられがちであるが、細胞の伸長や分化、外界刺激や病害虫の感染などによりダイナミックに変化する。例えば、セルロースは、細胞の伸長や分化に伴い、細胞の内側から外側に向かって繊維の配向が異なる数層のラメラ構造をとる。しかし、どのようにセルロース微繊維の配置が回転して層を形成するのか不明である。また、細胞膜に埋め込まれた酵素複合体から最大 36 本のセルロース鎖が同時に合成され、時間と共に近傍のセルロース鎖が水素結合で強固に束化し、結晶性のセルロース微繊維が出来上がるが、何時結晶性束になるのか、特定の高次構造をとらない非結晶性のセルロースが細胞壁にどのように分布しているのか、結晶性状態は細胞状態により変化するのか、はわかっていない。

このような細胞壁多糖成分の状態や変化を生きた細胞で観察する技術は、不明な点が多い植物細胞壁の機能をより深く理解するうえで、必要不可欠である。また、バイオエタノールの原材料として植物細胞壁を捉えた場合も、セルロースの結晶性状態の変化は有用な情報である。

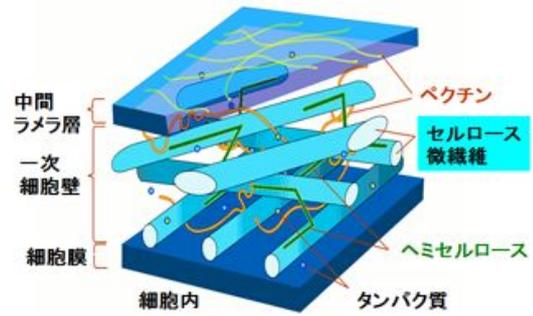


図 植物細胞壁の構造。セルロース微繊維は細胞膜表面で合成され、配向の異なる複数の層となって沈着する。

2. 研究の目的

各種植物細胞壁ポリマーに特異性をもって結合する糖結合蛋白質モジュールがバクテリアやカビの細胞壁分解酵素に見出されている。これらのモジュールは糖加水分解触媒ドメインとは独立して機能することから、標識タグを結合させることにより、固定処理した植物切片中の細胞壁ポリマーを免疫組織化学染色で蛍光標識することが近年行なわれている (J. Biol. Chem. 281: 29321-29329, 2006 など)。しかし、生きた植物細胞や植物個体で糖結合モジュールを利用した細胞壁成分のライブセル・イメージングには世界中のどの研究室もいまだに成功していない。我々の先行研究でも、このような単純な融合蛋白質では生体ポリマーを蛍光標識することが困難であることが判明した (未発表)。

生きた植物細胞で糖結合モジュール標識蛍光タンパク質を発現させ、イメージングを行なうには複数の克服すべき課題が存在する。本研究では、植物の細胞膜受容体のバックボーンを利用することにより、これらの問題点を克服し、植物細胞生物学の有用な解析ツールを提供するものである。

3. 研究の方法

結晶性セルロース微繊維をターゲットとして、細胞壁多糖標識ライブセル・プローブを開発する。結晶性セルロースに結合するモジュール (CBM; cellulose-binding module)

と Green Fluorescent Protein (GFP)を細胞膜受容体由来のシグナルペプチドと膜貫通領域に組み合わせてキメラ蛍光タンパク質を発現する遺伝子を作製する。この標識遺伝子をタバコ培養細胞やアラビドプシス植物体で発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞壁最内層のセルロース微繊維の1本1本を生細胞で識別し、細胞の伸長や分化に伴うセルロース配置の変化を観察する。

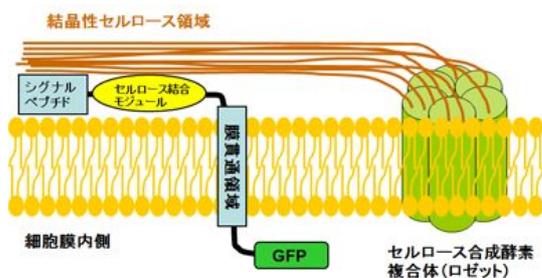


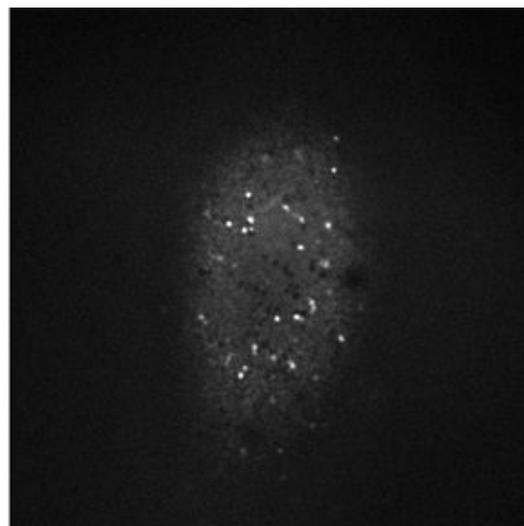
図 標識プローブが最内層の結晶性セルロースを蛍光標識する概念図。

4. 研究成果

最初に、シグナルペプチドとしてどの細胞壁局在タンパク質の N-末端ペプチドが有効かを調べた。数種の植物タンパク質のシグナルペプチドを検討したところ、expansin のものが蛍光タンパク質 (mCherry) を効率よく細胞外に分泌することが判明した。次に、発表されている情報をもとに、セルロース結合モジュールと細胞膜貫通領域の候補をピックアップし、それらの機能性が証明されているものとして、セルビオヒドロラーゼとブラシノサイド受容体 BRI1 のものが最有力候補となった。

次に、選択した各種コンポーネントをつなぎ合わせた。細胞壁分泌タンパク質 (expansin) のシグナルペプチド SP9、セルロース分解酵素 (*Trichoderma reesei* のセルビオヒドロラーゼ) の結晶性セルロース結合モジュール CBH1、細胞膜受容体 (BRI1) の膜貫通領域、蛍光タンパク質 (GFP、TagRFP、または mCherry) をこの順番でつないだ誘導タンパク質を作製し、パーティクル・ボンバードメント法を用いてタマネギ表皮細胞で

一過的に発現させた。GFP 蛍光は細胞表層で粒子状に観察されたが、繊維状には見られなかった。これらの粒子状の蛍光は細胞表層を移動することが見られた。



タマネギ表皮細胞で一過的に発現させた標識プローブ (SP9-CBH1-BRITM-GFP)

一過的に多量のタンパク質を発現させたために、凝集状態になった可能性がある。そこで、形質転換アラビドプシス植物体を作製して、恒常的な発現による標識を調べている。今回の研究期間では成果が間に合わなかったが、細胞表層での特徴的な蛍光標識パターンを近いうちに観察する予定である。今後は、各種プロモーターを検討するとともに、誘導系を用いて発現レベルを調整し、詳細な観察を行うことにより、本可視化システムの有効性を実証する必要がある。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/hashimoto/>

6．研究組織

(1)研究代表者

橋本 隆（HASHIMOTO, Takashi）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ

エンス研究科・教授

研究者番号：80180826

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

（ ）

研究者番号：