

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440160

研究課題名(和文) 褐藻類の原形質連絡調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of plasmodesmata in brown algae

研究代表者

長里 千香子 (NAGASATO, Chikako)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号：00374710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞体制をとる褐藻類には隣接細胞間の物質のやりとりを可能にする細胞間連絡構造である原形質連絡が存在している。褐藻類の原形質連絡は直径10-20 nmの管状の構造で、発生段階により出現・分布の異なっていること、細胞質分裂時に形成される一次原形質連絡と成熟した隔壁に新たに形成される二次原形質連絡が存在していることが電子顕微鏡の観察から明らかになった。蛍光標識デキストランを使用した観察から、多列形式的な体制をとる褐藻類では20 - 40 kDa、原形質連絡が隔壁の一箇所に集中して存在するピットフィールドを形成している場合は3 - 10 kDaのところには排除分子量が存在していることが示されている。

研究成果の概要(英文)：Brown algae show multicellularity and possess cellular connections called plasmodesmata which enable exchange of molecules between the neighboring cells. Plasmodesmata take tubular structure with 10 - 20 nm in diameter, and vary appearance and distribution with the developmental stages. Some new findings concerning brown algal plasmodesmata were given in this study as follows; 1) plasmodesmata are divided into primary and secondary plasmodesmata as in land plants, 2) plasmodesmatal size exclusion limit are set between 20-40 kDa in multiseriate species, and 3) pit fields in which plasmodesmata concentrate one place on the cross wall pass molecules less than 10 kDa to the next cell.

研究分野：藻類形態学

キーワード：褐藻類 原形質連絡 発生 微細構造 マイクロインジェクション

## 1. 研究開始当初の背景

緑色植物が持つ原形質連絡は、隔壁に存在する小さな細胞質のトンネル（直径20 - 50 nm）であり、小胞体と連結するデスモチューブが内部を貫通している。原形質連絡は、隣り合う細胞間のイオン、糖、植物ホルモンなどの小さな分子の拡散による移動の他、タンパク質、RNAも選択的に通過している。原形質連絡を通過可能な分子サイズ（SEL; the PD size exclusion limit）に関しては、マイクロインジェクションによる蛍光トレーサー注入による観察結果から、1 kDa以下であるとされている。しかしながら、インジェクションによるアーティファクトも疑われており、GFP形質転換体を用いたタンパク質の発現と移動観察より、少なくともGFPの分子量である27 kDaまでは通過できるのではないかと考えられている。また、SELはウィルスの感染や核-オルガネラとのクロストークによっても変化すると報告もある。SELの調節には、原形質連絡周辺に存在するカロースの合成酵素と分解酵素の関与、アクチン・ミオシンなどの細胞骨格に加えて、カルシウム結合タンパク質であるcentrinやcalreticulinによる収縮モデルも提唱されている。

一方、褐藻類の原形質連絡は直径20 nm程度で、内部にデスモチューブが見られない。原形質連絡の形成過程および出現タイミングを電子顕微鏡を用いて観察を行うと、(1)接合子の初期発生における細胞質分裂では原形質連絡は形成されない、(2)体細胞では原形質連絡形成を伴いながら細胞質分裂が進行する（一次原形質連絡）、(3)多列形成的な体制を持つものでは原形質連絡が密集して存在する壁孔域（ピットフィールド）が存在することが示されていた。褐藻類のSELは、ヒバマタの8 - 12細胞期の接合子に蛍光標識デキストランをインジェクションする方法で確かめられている。その結果、少なくとも10 kDaは原形質連絡内を通過できるといった報告がなされ、同様の方法で求められた緑色植物のSELとは10倍の差があることがわかっている。その他、褐藻類の細胞間物質輸送は、*Macrocystis*（マクロキスティス；ジャイアントケルプと呼ばれ、海底から立ち上がる長い柄と葉状部をもつ全長50 mを越える最大の褐藻類）の柄部分の細胞間には2.4 - 6.0  $\mu\text{m}$ という通常の原形質連絡よりも500倍もの直径をもつ細胞間連絡構造が存在し、その内部を放射性同位体（ $\text{C}^{14}$ ）が移動することで示されている。このように、大型の褐藻類では物質の長距離移行を可能にするために特殊化した細胞間連絡構造が発達していることがわかっている。

褐藻類では、細胞間物質輸送が細胞間連絡構造を介して行われていることは確かではあるが、原形質連絡を通過できる物質の種類（選択性）や、それを調節する分子機構、組織分化に伴う原形質連絡の出現・分布とSELの変化についてはほとんどわかっていない。

## 2. 研究の目的

褐藻類の原形質連絡調節機構を解明するため、構造と機能を支えるタンパク質の同定、周辺多糖類の構成、輸送可能な分子サイズの検討、発生に伴う出現と分布の違いについて、細胞生物学的手法を用いて明らかにしていくことを目的とする。さらに、(狭義の)植物とストラメノパイルという真核生物の二つのスーパーグループに属する緑色植物と褐藻類で、同様の細胞間連絡構造を発達させた背景と意義について理解しようとするものである。

## 3. 研究の方法

(1)単列、(2)多列、(3)組織（表層と髄層）分化の見られる複雑な多細胞体制を有する褐藻類について、原形質連絡の分布様式を透過型電子顕微鏡で調べた。さらに、単細胞である接合子から細胞分裂を繰り返し、組織分化するにあたっての二次原形質連絡の形成過程と原形質連絡の分布変化について、(3)の体制を有する褐藻類を材料に調べた。実際には、接合子の最初の分裂から、10日目までの発芽体に対して、継時的に固定を行った。なお、固定はすべて加圧凍結装置を使用した。

原形質連絡を通過する分子サイズを調べる目的で、分子サイズの異なる蛍光標識デキストラン(3, 10, 20, 40 kDa)および、組み換えGFP (27 kDa)を細胞内にインジェクションし、その移動を観察することで確かめた。陸上植物で示唆されているインジェクションによるアーティファクトを軽減するため、0.1-0.5  $\mu\text{m}$ の針先で試薬を細胞内へ注入することを可能にする熱膨張式レーザーマイクロインジェクションを用いた。

緑色植物の原形質連絡にはアクチン、ミオシンが存在し、SELに影響を与えていることが示唆されている。褐藻類では、微細構造レベルでアクチンを可視化することが困難なため、阻害剤を用い、原形質連絡を介した物質の移動について、阻害作用が見られるかどうかを検証することとした。合わせて、ミオシン、微小管の阻害剤の影響についても調べ、拡散速度や移動量の変化について検討を行った。

## 4. 研究成果

*Halopteris congesta* (クラガシラ目・巨大頂端細胞を有し、3-4 列目以降の細胞は多列形成的、図 1) の細胞に蛍光標識デキストラ

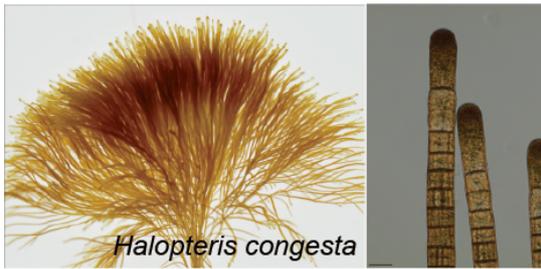


図 1 多列糸状体制を示す *Halopteris congesta*  
右図は頂端部分の拡大図

ン (3 kDa, 10 kDa, 20 kDa, 40 kDa FD), 組換え GFP (rGFP, 27kDa) を頂端部分から注入し、2 時間後に観察を行なった。その結果、3, 10 kDa FD では頂端から 5 列目以降の細胞まで蛍光プローブが移動していたのに対して、20 kDa FD, rGFP では 5 列目でとどまっていることがわかった。40 kDa FD では二列目の細胞へ移動していなかった。蛍光プローブを球形粒状と考えた時のストークス半径を考えると 10, 20, 40 kDa FD および GFP では 2.3, 3.3, 4.5, 2.82 nm となる。FD で考えると SEL は 20 - 40 kDa の間にあることがわかった。また、3, 10 kDa FD を用い、隣接細胞への移動時間、距離、移動量を蛍光プローブを注入した頂端細胞での蛍光強度と比較することで求めたところ、分子サイズが小さいほど、早く移動し、サイズが大きくなると移動量にも制限があることがわかった。次に、3, 10 kDa FD を頂端より 3 列目の細胞へ注入し (図 2), 物質移動の方向性について調べた。3, 10 kDa FD 共に頂端とは反対側の隣接細胞へ先に移動し、時間経過と共に頂端側へも蛍光が見られるようになることが明らかとなった。3 kDa FD では 1 時間経過すると注入した細胞が特定できないほど、すべての細胞がほぼ同じ蛍光強度を示しているのに対して、10 kDa FD では注入から 10 時間経過したのちも他の細胞と区別できることから、分子サイズが大きくなるにつれて移動量が制限されていることが確かめられた。原形質連絡の細胞骨格による調節機構を調べるため、(1)アクチン阻害剤 (latrunculin B, rhodamine-phalloidin), (2)ミオシン阻害剤 (BDM), (3)微小管阻害剤 (nocodazole, taxol) について、あらかじめ藻体を阻害剤で処理をし、10, 20 kDa FD を細胞内に注入する、もしくは阻害剤と FD を同時に注入することで調べた。その結果、これら阻害剤による SEL への影響は顕著には見られないことから、褐藻類の原形質連絡には、陸上植物のようにアクチンなどの細胞骨格は存在していないこと、調節機構が存在しないことが示唆された。

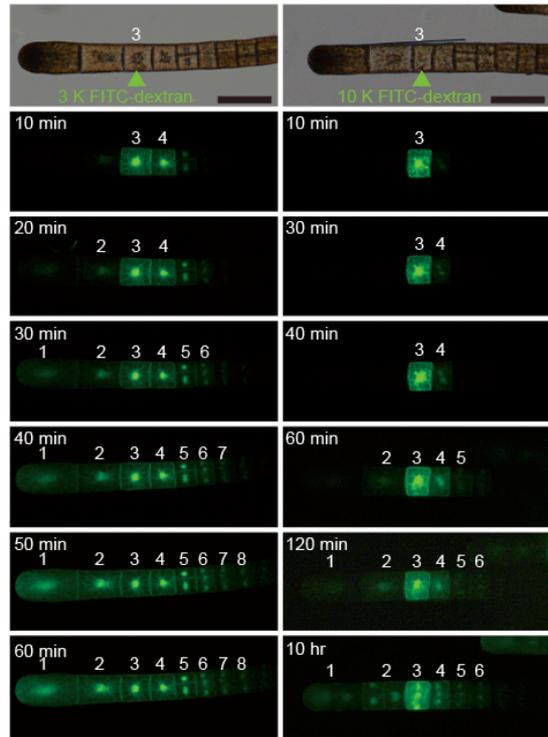


図 2 原形質連絡を介した物質の移動の方向性  
先端部より基部側へ移動しやすい。

ヒバマタの藻体は、表皮、皮層、髄層に分化した体制をもち、褐藻類の中では複雑な多細胞体制を有する。これらの隔壁にはピットフィールドが見られる。しかしながら、単細胞である接合子の 1 回目、2 回目の細胞質分裂を詳細に観察しても、原形質連絡につながる構造は全く観察されない。接合子の発生のどの段階で原形質連絡が出現するのか (二次原形質連絡存在の確認)、ピットフィールドのような原形質連絡の分布変化はいつから生じているのかを電子顕微鏡で観察を行なった。その結果、まだ未分化ではあるが、細胞分裂を繰り返し、10 細胞以上になっている時には、第一、第二細胞質分裂面に原形質連絡が存在していることが確かめられた。葉状部が分裂を繰り返し、表層細胞と髄層細胞へ分化を始める頃に、原形質連絡はピットフィールドを形成し、単列形成的な仮根部では、分散したまま存在していることがわかった。そして、3, 10 kDa FD を細胞内に注入したところ、仮根部では SEL は 10 kDa 以上であるのに対して、葉状部では 3 - 10 kDa の間であった (図 3)。このことは、褐藻類にも緑色植物と同様に二次原形質連絡が存在すること、そして、ピットフィールドを形成した場合では、SEL が小さくなり、より厳密な分子篩として物質移動の選択性が増すのではないかと考える。なお、一次原形質連絡と二次原形質連絡の形態比較を行ったが、両者はほぼ同様であることがわかった。

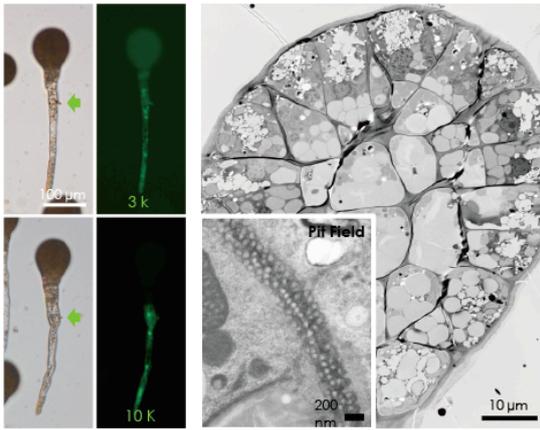


図3 ヒバマタの発芽体(10日目)の原形質連絡の分布と排除分子量  
葉状部では pit fieldが見られるが、仮根部では原形質連絡は散在している。両者は排除分子量の違いが見られる。

SEL の調整に関与すると考えられる原形質連絡周辺の多糖類の性質について調べるために、原形質連絡が分散、もしくはピットフィールドを形成している場合についてアルギン酸、フコイダン、カロースに対する抗体を用いて免疫電子顕微鏡法で解析を行った。その結果、いずれの抗体も原形質連絡周辺に陽性を示さなかった。今後は他の硫酸化多糖類の局在についてレクチンなどを使用して調べて行く必要がある。

緑色植物における原形質連絡のSELと比較して、褐藻類の原形質連絡は直径サイズが小さいにもかかわらず、大きな分子量を通過させていることが明らかとなった。褐藻類の原形質連絡は、細胞質内の小胞体と連結するデスマチューブがないことにより単純な構造をとっており、このことから、口径が小さくても大きな分子が通過しやすくなっているのではないかと考える。一方、電子顕微鏡で原形質連絡の内部構造を詳細に調べていくと、中に車輪用の構造が観察されることがある。この構造と物質移動の方向性、選択性との関連性について調べることは、褐藻類の原形質連絡の特性を理解するのに役立つと考えている。

##### 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 5 件)

- ① Tanaka, A., Hoshino, Y., Nagasato, C. and Motomura, T. (2017) Branch regeneration induced by severe damage in the brown alga *Dictyota dichotoma* (Dictyotales, Phaeophyceae). *Protoplasma* 254:1341-1351. 査読有
- ② Nagasato, C., Tanaka, A., Ito, T.,

Katsaros, C. and Motomura T. (2016) Intercellular translocation of molecules via plasmodesmata in the multiseriate filamentous brown alga, *Halopteris congesta* (Sphacelariales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology* DOI 10.1111/jpy.12498. 査読有

- ③ 長里千香子・寺内真・本村泰三 (2016) 多細胞藻類における一次細胞間連絡の形成. 「顕微鏡」第51巻3号: 140-144. 査読有
- ④ Terauchi, M., Nagasato, C., Inoue, A., Ito, T and Motomura, T. (2016). Distribution of alginate and cellulose and regulatory role of calcium in the cell wall of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Planta* DOI 10.1007/s00425-016-2516-4. 査読有
- ⑤ Nagasato, C., Terauchi, M., Tanaka, A. and Motomura, T. (2015). Development and function of plasmodesmata in *Fucus zygotes*. *Botanica Marina*. 58: 229-238. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 長里千香子・田中厚子・Christos Katsaros・本村泰三: 褐藻 *Halopteris congesta*における原形質連絡の構造と排除分子量の解析, 日本植物学会第79回大会, 2015年9月7日, 新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)
- ② 長里千香子・田中厚子・Christos Katsaros・本村泰三: マイクロインジェクションを用いた褐藻類の原形質連絡における排除分子量の解析, 日本藻類学会第39回大会, 2015年3月22日, 九州大学(福岡県・福岡市)
- ③ Nagasato, C., Tanaka, A., Katsaros, C. and Motomura T.: Development and function of plasmodesmata in *Fucus zygotes*. 7<sup>th</sup> Asian Pacific Phycological Forum, 2014年9月21日, Wuhan (中国)

##### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長里 千香子 (NAGASATO, Chikako)  
北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授  
研究者番号: 00374740

(2) 研究分担者

田中 厚子 (TANAKA, Atsuko)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・特任助教

研究者番号： 40509999

(削除：平成28年3月17日)

(3)研究協力者

藤田 知道 (FUJITA, Tomomichi)

北海道大学・大学院理学研究院・教授