

令和元年6月11日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07423

研究課題名(和文)細胞壁分子相互作用の原子間力顕微鏡による連続観察

研究課題名(英文) Continuous observation of interaction among cell wall molecules by atomic force microscopy

研究代表者

峯 一郎 (Mine, Ichiro)

高知大学・教育研究部総合科学系黒潮圏科学部門・准教授

研究者番号：00274358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞成長の主要因と考えられる細胞壁のセルロース微繊維(CMF)とそれらの間隙に存在するマトリックス要素の微細形態を、巨大細胞性藻類3種から切り出した細胞壁内面を液中に置いた状態で原子間力顕微鏡により観察した。シャジクモでは細胞の成長方向に垂直に並んだCMFをつなぐ繊維状構造が、バロニアでは個々のCMFだけではなく細胞壁の層の間を接着させる繊維状の構造が、また、フシナシミドロではCMFの間隙にあるマトリックス成分が顆粒状構造であることがそれぞれ観察された。細胞壁を引き伸ばしたときにこれらの構造がどうなるのか、今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞壁の伸びやすさなどの力学的な性質は植物や藻類、菌類における細胞成長の主要因と考えられており、本研究でその微細な形態が明らかになったマトリックス成分はセルロース微繊維(CMF)との相互作用により細胞の成長を制御していることが予想される。また、これらの微細構造は液中AFM観察という特殊な方法で初めて明らかになったが、人為産物のない生物の真の構造を観察する方法として、今後、生物学の多くの分野で応用されることが予想される。

研究成果の概要(英文)：Fine structure of cellulose microfibril (CMF) and matrix components present among the gap of CMFs was observed on the inner surface of cell wall fragment cut from three species of giant-celled algae by atomic force microscopy in liquid. Fibrous structures that connect among CMFs arranged in a direction perpendicular to the direction of cell growth in Chara, fine fibrous structures that connect neighboring CMFs and layers of the cell wall of Valonia and granular structures of the cell wall matrix component in Vaucheria were observed. Behavior of these structures in the cell wall under tension should be investigated in future.

研究分野：藻類の細胞生物学

キーワード：細胞壁 原子間力顕微鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞壁の伸びやすさと内部構造

細胞壁は機械的強度を有する植物細胞の「入れ物」であり、膨圧によって膨らもうとする細胞(原形質)を外から押さえつけてその形を限定しているが、細胞の伸長成長に伴って細胞壁も不可逆的に伸長する。細胞壁には膨圧由来の大きな張力が平面方向にかかっており、細胞壁を伸長させる原動力になっている[1]が、細胞壁の伸びやすさが細胞成長の主要因であり、それは時間的および空間的に適切に調節されていることが、成長速度の異なる条件で単離し、人為的な張力をかけた細胞壁の伸長量あるいは応力緩和(緩み)を測定する実験により示されてきた[2][3]。

一方、細胞壁は、セルロース微繊維(CMF)などの骨格要素とそれらの間隙に存在するマトリックス要素の2種の要素から構成され、これら骨格要素とマトリックス要素の相互作用が細胞壁の伸びやすさを調節・規定するモデルが提唱されている[1]。実際に、凍結割断・ディープエッチング・レプリカ試料の透過型電子顕微鏡(TEM)観察により、細胞壁の骨格要素とマトリックス要素の三次元的な結合が明らかになっており、上述モデルを支える根拠となっている[4][5]。しかし、TEMによる観察には材料の固定、およびレプリカ作成後の材料自体の分解除去が必要であり、そのような観察で得られた個別試料の「静止画」からは、微細形態の経時変化を理解することは困難で、細胞壁伸長という動的な過程における細胞壁分子の機能を明らかにすることは不可能であった。

(2) 原子間力顕微鏡の生物学における応用

約30年前に発明された原子間力顕微鏡(AFM)は微小な探針で試料表面をなぞりながら走査し、原子分解能で三次元的な凹凸形状情報を得る装置であり、試料をそのまま非破壊的に、連続的に、かつ大気中や液中で観察することが可能である。真空中の試料を観察するTEMでは考えられない、このような利点に基づいて生物学への応用も進められてきている[6]。

機械的強度を有する細胞壁はAFM観察に適した材料であり、過去20年ほどの間に細胞壁微細構造のAFM観察が数多く行われてきた[7参照]。それらの研究は、微細形態の観察にとどまらず、AFMの派生技術である走査プローブ顕微鏡(SPM)を活用した細胞壁要素の生化学的特性や力学的性質に関する研究も含まれており、AFM/SPMによる細胞壁研究のさらなる発展が期待されている。

(3) 研究当初までの研究成果と着想に至った経緯

応募者らは、細胞壁の伸びやすさと内部構造の関連を更に詳しく研究する材料として、個々の細胞成長を観察でき、細胞壁の特定部位の引っ張り実験が可能である巨大細胞性藻類に着目し研究を続けてきた。これらの材料では徒手による原形質除去により細胞壁を単離することが可能であり、単離細胞壁における細胞の伸長部位と伸長方向を特定することも容易である。また、いくつかの種では、国内外の研究により細胞壁の微細構造がAFMあるいはTEMにより明らかになっており、単離した細胞壁の伸びやすさを調節する生理的要因も解明されている[8]。応募者らは先端成長を行うフシナシミドロ巨大細胞から単離した細胞壁の引っ張り実験を行い、成長点の細胞壁が最も伸びやすく、その伸びやすさがpHにより可逆的に調節され、伸びにくい円筒形部分の細胞壁が新たな成長点(枝)の形成部位において再び伸びやすくなることを明らかにした[9][10]。

さらに細胞壁のTEM像とAFM像の比較(右図)により細胞壁各要素の詳細な立体構造観察にAFMが有用であることを実証するとともに、細胞成長部位に特異的に存在するマトリックス要素の微細構造を明らかにした[7][10]。

このような研究成果に基づいて応募者は「AFMを用いれば引っ張り実験の最中に細胞壁の微細構造の変化を観察できる」という着想を得るに至った。

[1] Cosgrove DJ (1997) *Plant Cell* 9: 1031 [2] Masuda Y (1990) *Bot. Mag. Tokyo* 103: 345 [3] Cosgrove DJ (1993) *New Phytol.* 124: 1 [4] McCann M 他(1990) *J. Cell Sci.* 96: 323 [5] Fujino T 他 (2000) *Plant Cell Physiol.* 41: 486 [6] Hörber JKH & Miles MJ (2003) *Science* 302:1002 [7] Mine I, Okuda K (2006) *Planta* 225: 1135 [8] Toole GA 他 (2002) *Planta* 214: 468 [9] Mine I, Okuda K (2003) *Planta* 217: 425 [10] Mine I 他(2007) *Planta* 226: 971

2. 研究の目的

本研究では、様々な様式で成長する巨大細胞性藻類から単離し、張力をかけた細胞壁の応力緩和の過程における、骨格要素とマトリックス要素の微細形態の経時的な変化をAFMによる液中観察により明らかにする。

材料として(1)先端成長を行う黄緑藻フシナシミドロの円筒形細胞、(2)散在成長を行う緑藻シャジクモの節間細胞、(3)異方性成長を行う緑藻パロニアの栄養細胞、を用いて、細胞壁に張力を加えた条件下において、また、水溶液(緩衝液)中において、次の2通りの細胞壁微細構造のAFM連続観察を行う。

(A) 応力緩和における細胞壁要素の形態変化: 張力をかけた状態で固定化した細胞壁においてAFMにより骨格要素とマトリックス要素の微細構造の経時変化を調べることにより、応力緩和

に關与するこれら細胞壁分子の形態変化を明らかにする。

(B) 生理的条件による影響の評価：試料を漬ける緩衝液の組成を変化させ、細胞壁の伸びやすさを变化させた状態で、上記のような観察を行う。例えば、細胞壁の伸びやすさの変化に伴う分子間結合の消長を調べることなどにより、細胞壁の伸びやすさに關与する骨格要素とマトリックス要素の相互作用を生理学的に調節する仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 材料の調達

以下の通り、3種類の巨大細胞性藻類の培養株を確保した。

黄緑藻フシナシミドロの一種 *Vaucheria frigida* C.Agardh 淡水産。国立環境研究所微生物系統保存施設から分譲された培養株を用いた。藻体は太さ 80 μm 程度の円筒形細胞からなり、細胞の両端で局所的に行われる先端成長により伸長成長し、不規則に分枝する。成長先端部位を含む細胞断片を切り取り、原形質を絞り出すことにより単離した細胞壁において、成長部位の細胞壁部分に張力をかけるために、円筒形部分を二分して反対方向に引っ張る実験を行った。

緑藻シャジクモ *Chara braunii* Gmelin 淡水産。国立環境研究所微生物系統保存施設から分譲された培養株を用いた。太さ 0.2 mm 程度の円筒形で、長軸方向に（偏りのある）散在成長を行う節間細胞を用いる。細胞を縦に切開し、緩衝液のピペティングにより原形質を除去し細胞壁を単離し、断片の両端を引っ張ることにより張力をかけた。

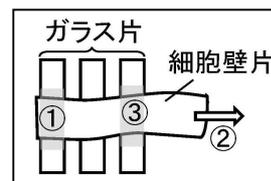
緑藻バロニア *Valonia utricularis* C.Agardh 海産。台湾緑島で採集した生体試料から確立した培養株を用いた。細胞分裂直後のレンズ状細胞が大きさ数 mm のこん棒状の細胞に発達する過程では、長軸方向の成長が優勢である異方性の細胞成長を示す。細胞の一部を切り取り、内側を豚毛でなぞることにより原形質を除去して細胞壁断片を単離し、長軸方向あるいは短軸方向に引っ張ることにより張力をかけた。

(2) 試料観察容器の作成

AFM による観察範囲はおおよそ $1 \times 1 \mu\text{m}$ であり、分解能は数 nm と微小なので、緩衝液中に漬けたままの細胞壁試料に張力をかけた状態で、微細構造観察の妨げにならないように確実に固定することが可能な試料観察容器が必要である。また、AFM の探針をつけたカンチレバーはほぼ水平に試料に接近するので、観察部位は周囲より多少でも突出していなければならない。これらの条件を満たす既製品はないので、本研究では次のような試料観察容器を設計・製作した。

血球計算盤用カバーガラス（ $22 \times 24 \times 0.5 \text{ mm}$ ）に同カバーガラスを $1 \times 4 \text{ mm}$ に切り分けたガラス片（東京電子工業（株）による加工）を 3 枚、おおよそ 0.7 mm の間隔を開けて横に並べて接着剤（エクセルエポ、セメダイン（株））により接着した（右図）。

短冊状に切り出した細胞壁片を 3 枚のガラス片にわたって横たわるように置き、細胞壁片の一端を 3 枚のガラス片の一端のガラス片に接着した（図中 ①）。細胞壁のもう一端を横方向に引っ張りながら（②）、反対側の端のガラス片に細胞壁を接着した（③）。細胞壁表面の AFM 観察は中央のガラス片上にある細胞壁部分において行い、カンチレバーが図の上下方向になるように置いた。なお、ガラスと細胞壁との接着にはシアノアクリレート系瞬間接着剤（3000RX、セメダイン）を用いた。

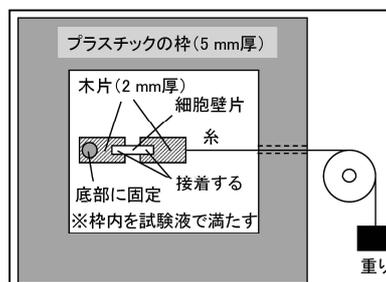


(3) 細胞壁にかかる張力の大きさと方向

それぞれの材料の細胞壁にかかる張力の大きさは、生きている状態で膨圧によって生ずる張力と同程度を基準として調整する。生細胞において細胞壁の平面方向にかかる張力の大きさは、細胞の直径、細胞壁の厚さおよび膨圧によって算出する。膨圧は細胞に穿孔した圧力プローブ内にかかる圧力として測定、あるいは文献などによる測定値を用いた。細胞壁の厚さは細胞壁の表面と試料基盤表面との高さの違いとして AFM で測定した。

(4) 細胞壁の引張り試験

植物・藻類の組織や細胞壁の引張り試験では、従来試料の両端をクランプで挟んで固定する方法が採られていたが、巨大細胞性藻類の 1 細胞から切り出される細胞壁の長さは普通数ミリ、最大でも 10 mm 程度であり固定が困難である。そこで、透明アクリル板上にプラスチック枠を接着して右図（上面観、ただし重りと定滑車は側面観）のような引張り試験装置を作成した。細胞壁片（幅約 1 mm）の表面にはあらかじめ炭素粒子を散布して置き、その両端を木片（ヒノキ、 $5 \times 3 \times 2 \text{ mm}$ ）に 3000RX で接着し、枠内を試験液で満たしてから、重りを系につないで引っ張り、実体顕微鏡で細胞壁片表面の炭素粒子間の距離の変化により細胞壁の伸び量を測定した。



(5) 細胞壁表面の AFM 観察

生体材料のような柔らかい試料表面の AFM 観察は、探針を共振周波数で加振して行う (AC モード AFM) が、液中では探針運動が水の抵抗により妨げられるため AC モードでの AFM 観察は困難であった。しかし、(バネ定数が小さく、短いカンチレバーを持つ)液中観察に特化した探針を、ノイズが小さく定量性に優れた AFM 本体に取り付け、サーマル・チューニング法により加振周波数を選択することにより、液中の試料であっても高分解能の AFM 形状像を安定的に取得できるようになっている。本研究では、AFM として MFP-3D-SA (オックスフォード・インストゥルメンツ社 アサイラム・リサーチ事業部)、探針として BL-AC40TS (オリンパス (株)) を用いた。

4. 研究成果

(1) バロニア

細胞壁の微細構造

本藻の細胞壁は交差多層構造、つまり細胞壁は多数の層からなり各層では CMF が同じ方向に平行に配列しており、隣り合う層の CMF 配列の方向は 80~120 度異なっている。その細胞壁内外表面における細胞壁の骨格要素とマトリックス要素の原子分解能形状像を大気中、および液中 AFM により観察した結果、これまで詳しい構造が知られていなかった本藻細胞壁の繊維状マトリックス成分が、平均 0.8 nm の太さで、細胞壁の CMF に巻き付くように存在することが明らかになった。さらに、細胞壁の多層構造において隣り合う層の境界面に、同成分と同様の繊維状構造が、集塊をなして存在することが明らかになった。また、同成分の生化学的な特徴を明らかにするために、数種のタンパク質分解酵素、糖鎖分解酵素による処理を施した細胞壁で同成分の形態を観察したが明確な影響は認められなかった。その一方で、市販の蛍光標識した 19 種類のレクチンで処理したところ、N-アセチルガラクトサミンを特異糖とするナヨクサフジ (*Vicia villosa*) レクチンが、細胞壁の内面や層間の境界面に特異的に結合することが明らかになり、同成分が N-アセチルガラクトサミンを含む多糖類であることが示唆された。

本藻の細胞壁では、酸性条件下において細胞壁の層が剥離しやすくなることが知られているが、同様の酸性条件処理により本成分の著しい変形が生じ、密度が有意に減少した。この結果は同成分が、多層構造をなす本藻の細胞壁において、層間を結合させることによりその構造維持に機能することを示唆する。なお、本藻の細胞壁は観察の基盤であるガラス表面に水中で固定することはできなかったが、予め基盤上に接着したガラス片の上に置いた細胞壁の周囲の部分をガラス片の側面に 3000RX で接着することにより、AFM 観察が可能な程度固定することができた。また、以上の観察の結果は本研究の「主な発表論文」として公表されている[1][2]。

細胞の引張り試験

本藻の細胞壁について、上述の方法で引張り試験を行ったが、pH 4 の酸性条件においても、また、pH 7 の中性条件においても細胞壁の伸展は認められなかった。これは同属別種 (オオバロニア, *V. ventricosa*) の細胞壁を垂直に置きクランプで挟んで伸展を調べた先行研究[3]で同種の細胞壁が酸性条件下で著しく伸展するという結果と異なっている。この相違の理由が、種の違い、あるいは方法の違いに寄るのかについてはまだ明らかになっていない。

張力をかけた細胞壁の連続 AFM 観察

前項のように本藻の細胞壁を伸展させる条件が明らかにならなかったため、張力をかけた細胞壁におけるマトリックス成分の詳しい観察は本研究では行っていない。

(2) シャジクモ

細胞壁の微細構造

本藻の節間細胞の細胞壁は、交差多層構造を示すバロニアのそれとは異なり、マルチネット型の CMF 配列を示す。つまり細胞壁内面に面した形成されたばかりの層では、CMF は細胞の成長方向である細胞長軸と直角方向に配列していますが、細胞の長軸方向への成長にともなって外側の層に移って行くと、いろいろな方向にずれて行って、最終的には CMF の配列方向はランダムになる。その細胞壁の内外面の表面の微細構造を大気中・液中 AFM で観察した。なお、シャジクモとフシナシミドロの細胞壁は、表面をポリリジン処理したカバーガラス上の緩衝液中に細胞壁を置き、水分を取り除いて数秒間置いてガラス表面に密着させることにより、再び緩衝液中に戻しても接着した状態を維持できることが分かったので、細胞壁の液中 AFM 観察もこのような方法によってガラス面に固定した細胞壁について行った。

細胞壁の外表面は不定形の構造に被われていて CMF を観察することはできなかったが、内面では CMF は細胞長軸方向と垂直に配列する CMF が観察された。さらに CMF 同士を細胞長軸方向に連結する繊維状構造が多数観察された。本藻の同属他種 (*C. corallina*) の細胞の成長や細胞壁の引張り試験などによる研究では、ペクチン酸がカルシウムイオンの存在下で重合し、代謝回転しながら細胞壁の CMF を細胞成長方向に連結することにより細胞壁の伸びやすさを制御していることが報告されている[4]。本研究で観察された上記のような繊維状構造についても、その数が、カルシウムキレート剤である EGTA で処理した細胞壁においてに減少したことから、この構造がペクチン酸を含んでいる可能性が示唆された。

また、CMF の太さは大気中 AFM の観察像では、液中 AFM のそれよりも変異が大きかったことから、本藻細胞壁の人為産物のない微細構造を観察するためにはやはり液中 AFM が必要であることが明らかになった。

細胞の引張り試験および張力をかけた細胞壁の連続 AFM 観察

本研究で使用した本藻の培養株の培養株提供元の技術職員から指導して頂いた培養方法のうち、川砂と腐葉土を使用して培地を製作する方法を本研究では用いたが、節間細胞の成長が検出できるほど速く、また、10 ミリ以上まで伸長するような培養条件を整えることが出来なかった。そのため、細胞の引張り試験および張力をかけた細胞壁の連続観察を行うことが出来なかった。現在、他の培養方法である水田の土を用いる方法の採用を目指して、培養資材の供給体制を整備している。

(3) フシナシミドロ

細胞壁の微細構造

本藻の細胞壁の内外面の微細構造も大気中および液中 AFM により観察された。その結果、大気中では不定形の構造として観察された内外表面の主要マトリックス成分の内部構造が、液中 AFM によって大きさ 20 ~ 40 nm 程度の顆粒の集合からなることが観察されるようになった。このことからフシナシミドロにおいても、人為産物のない微細構造を観察するためには液中 AFM が必要であることが示された。

細胞の引張り試験および張力をかけた細胞壁の連続 AFM 観察

本藻の細胞は先端成長で成長するため、円筒形の細胞のドーム状末端部でのみ細胞の成長が行われる。そのため本研究では当初、成長先端部位を含む細胞断片を切り取り、原形質を絞り出すことにより単離した細胞壁において、円筒形部分を二分して反対方向に引っ張ることによりその中間にある成長部位の細胞壁部分に張力をかける、という計画であった。しかし、実際にやってみると、直径 80 μm の円筒形部分よりもさらに小さい先端部位を、成長部位を細胞壁を傷つけないままに切り出すことは、少なくとも実体顕微鏡下による徒手の作業では困難であった。そのため、本研究ではフシナシミドロについても引張り試験および張力をかけた細胞壁の連続観察を行うことが出来なかった。現在、倒立顕微鏡で観察しながら、顕微解剖装置を用いて、無傷の成長部位細胞壁を切り出す方法を検討中である。

[1] Mine 他 (2018) *Cytologia* 83: 99, [2] Mine 他 (2018) *Protoplasma* 255: 1575, [3] Tepfer & Cleland (1979) *Plant Physiol.* 63: 898, [4] Proseus & Boyer (2007) *J. Exp. Bot.* 58: 4283

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Ichiro Mine, Sho Suzuki, Kun-Feng Li and Satoko Sekida, pH-dependent maintenance of cell wall integrity in the giant-celled green alga *Valonia utricularis*, *Cytologia*, 査読あり, 83 巻, 2018 年, 99-102 ページ, DOI: 10.1508/cytologia.83.99
- (2) Ichiro Mine and Satoko Sekida, Fibrous matrix component of cell wall in the giant-celled green alga *Valonia utricularis* observed by atomic force microscopy in liquid, *Protoplasma*, 査読あり, 255 巻, 2018 年, 1575-1579 ページ, DOI: 10.1007/s00709-018-1251-z

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 峯 一郎, 巨大細胞性緑藻バロニアの細胞壁のマトリックス成分と力学的性質, 日本植物学会第 81 回野田大会, 2017 年
- (2) 峯 一郎, 巨大細胞性緑藻バロニアの細胞壁マトリックス成分の液中 AFM 観察, 日本植物学会第 80 回沖縄大会, 2016 年

6. 研究組織

(該当ありません)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。