

凍結割断法により植物細胞壁の形態形成を探る

木 村 聡

^a 東京大学大学院農学生命科学研究科

キーワード：細胞壁，セルロース合成，凍結割断レプリカ法，急速凍結ディープエッチング法

1. はじめに

植物の細胞壁は細胞や組織の形状を整えながら細胞成長をコントロールし、最終的に植物体を支える強度を与える¹⁾。また病原性生物に対する防御や細胞間の情報伝達を司るなどの生理活性機能を有する¹⁾。植物の細胞壁は多糖類を主成分とした複雑な構造体であり、細胞壁内の多糖類組成とそれらのネットワーク構造は、細胞の伸長や分化過程においてダイナミックに変化する¹⁾。そのため、細胞壁多糖はどこで合成され分泌されるのか、細胞壁内で多糖類はどのように折りたたまれ分布しているのか等、電子顕微鏡を使用した超微細構造レベルでのアプローチが試みられてきた。

細胞壁多糖の主要成分であるセルロースは、原形質膜上で直接合成されて結晶性マイクロフィブリルとして細胞壁へ組込まれるが、原形質膜に局在するセルロース合成装置は凍結割断レプリカ法でのみ観察可能な構造である。植物を含む多くの生物のセルロース合成装置が、凍結割断レプリカ法により明らかにされた。またレプリカ免疫標識法の応用により、セルロース合成装置に局在するセルロース合成酵素の存在も明らかにされた。急速凍結ディープエッチング法により、セルロースを含めた細胞壁多糖のネットワーク構造が明瞭に可視化され、細胞壁の3次元構造を明らかにしつつある。本稿では、凍結割断法の応用により明らかにされた、植物細胞壁の形態形成に関する研究例を紹介する。

2. 凍結割断レプリカ法により明らかにされたセルロース合成装置の構造と多様性

凍結割断レプリカ法はSteere (1957)²⁾により提案され、生体試料を鋳型として金属蒸着により得られたレプリカを透過電子顕微鏡で観察する手法である。凍結割断の際に細胞質膜系の脂質2重層の間を露出させることが可能であることか

ら、超薄切片法では不可能であった膜タンパク質の局在解析を可能にした点で画期的であった³⁾。

1950年代に植物のセルロース合成の場が原形質膜であるらしいことが提案されると、種々の生物で原形質膜上のセルロース合成装置の探索が進められた。そして凍結割断レプリカ法の開発を契機にBrownらは淡水緑藻 (*Oocystis*)⁴⁾、セルロース合成バクテリアである酢酸菌 (*Gluconacetobacter*) の一種⁵⁾、さらに高等植物 (トウモロコシ根端細胞)⁶⁾ の細胞膜上において、それぞれ特徴的な形態を示す膜顆粒の集合体を発見した。膜顆粒集合体は、膜上に押し付けられたセルロースマイクロフィブリルの鋳型の末端に付着するように観察されるため、彼らはそれをterminal complex (TC) と名付けた。TC観察のための凍結凍断レプリカ作製の際、化学固定や氷晶防止剤を使用すると明瞭な形態は観察されず、生きた新鮮組織の急速凍結が重要なポイントであった。その後、海産藻類⁷⁾、細胞性粘菌⁸⁾、ホヤ (動物)⁹⁾ に至る様々な生物種でTCが次々と発見された結果、セルロースの生合成には例外無くTCが関与する考えが広く受け入れられるようになる¹⁰⁾。図1は文献¹⁰⁾を参考にこれまで発見されたTCの形状とそこから合成されるセルロースマイクロフィブリルの形状を模式的に示した図である。TCとセルロースマイクロフィブリルの形状には生物多様性が認められ、進化の過程が興味深い。またTCの形状がどのように制御されているのか、そしてセルロースの形状にどう反映するのか今後の重要な課題である。

3. レプリカ免疫標識法によるセルロース合成装置の免疫標識

凍結割断レプリカ法に関して、現在でも装置の改良や方法論の詳細な検討が進められている。近年開発された重要な方法論として、特にレプリカ免疫標識法が挙げられる^{11~13)}。これは、レプリカの洗浄方法を従来の強酸や漂白剤からsodium dodecyl sulfate (SDS) に置き換えることで、抗原性を維持したまま膜タンパク質やリン脂質をレプリカ膜に固定しておき、レプリカ膜に残っている細胞成分に対して免疫標識を行う方法である。本手法は、凍結割断レプリカ法が膜タンパク質の3次元分布の解析に極めて有効であるにも関わ

Satoshi Kimura: Biogenesis of plant cell wall as revealed by freeze fracturing

^a 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

TEL: 03-5841-5241; FAX: 03-5684-0299

E-mail: akimuras@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

2008年1月10日受付

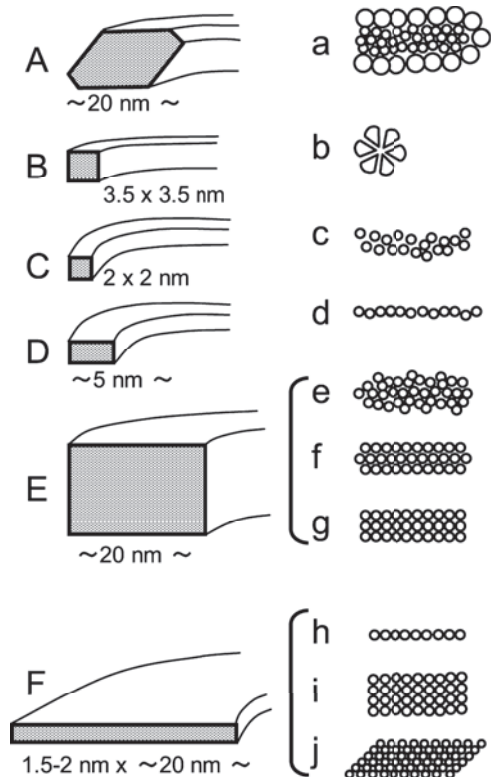


図1 これまで明らかにされたセルロースマイクロフィブリルとセルロース合成装置の形状 (Okuda and Sekida¹⁰) を参考に再描画). セルロース合成装置 (terminal complex, TC) は大きくロゼット TC(b) とリニア TC(a, c-j) に分類され, リニア TC と合成されるセルロースマイクロフィブリルの形状は多様である. (A, a) 原索動物. (B, b) 車軸藻類, 陸上植物. (C, c) 渦鞭毛藻類. (D, d) 細胞性粘菌類. アオサ藻類 (e), 緑藻類 (f), 灰色藻類 (g) は四辺形に近い形状 (E), 渦藻類 (h), 紅藻類 (i), 黄緑藻類 (j) はリボン状 (F) のセルロースマイクロフィブリルを合成する.

ず, 観察されている構造の成分同定が不可能であるという弱点を見事に克服した画期的な方法であり, 膜内成分の構造解析に新展開をもたらす.

セルロース合成酵素が膜貫通タンパク質であることや, TC がセルロースの生合成に関与していることは疑いの無い

事実であったが, TC として観察される原形質膜上の顆粒構造がセルロース合成酵素であることを直接示す証拠は無かった. またセルロース生合成には合成酵素の他に多種のタンパク質が必要であることも指摘されていたので, TC にセルロース合成酵素が本当に存在するのかといった疑問は, 最初の TC が発見されて以来, 指摘され続けた. この問題は, レプリカ免疫標識法を応用することにより解決されると考えられ, 筆者らは, Fujimoto¹¹⁻¹³⁾ の方法を部分的に改良して本法の植物細胞への応用を可能にした^{14,15)}.

筆者らは植物試料として伸長中のアズキ芽生えを使用した, 植物の細胞壁を構成するセルロースなどの多糖類は SDS 処理のみではレプリカ膜から除去できない. そこで SDS 処理に先立ってセルラーゼによる細胞壁の消化処理を加えることでレプリカ膜の清浄化を行った. ここで細胞壁の消化の際, 筆者らは植物細胞のプロトプラスト作製の際に用いる市販の細胞壁分解酵素を使用した. しかしこれらはリグニン性成分を分解する活性が極めて低いため, 木化の進んだ細胞ではレプリカ上の細胞壁成分を完全に取り除けないことも判明した. 従って現時点では, 伸長中の若い植物組織でのみレプリカ免疫標識法が可能である. セルロース合成酵素を標識するための抗体作製に関して, 既にその候補と考えられる Cesa と呼ばれる遺伝子群が報告されており^{16,17)}, それら Cesa がコードする細胞内ドメインの配列を参考に十数残基程度の合成ペプチド抗体を作製して標識を試みたが, ロゼット TC への標識は認められなかった. 一方 Cesa の細胞内ドメインのほぼ全体に対する抗体を作成した結果, 極めて特異的な標識が認められ, ここで高等植物のロゼット TC がセルロース合成酵素を含む構造であることの証明に至った (図2)¹⁴⁾. ロゼット TC は原形質膜の割断面のうち細胞質側 (P 面) にのみ局在し (図2a), これと相補的な割断面 (E 面) にはグロビュールと呼ばれる膜構造が存在する (図2b). Cesa 抗体はグロビュールを全く標識しなかったことから, ロゼット TC に含まれるセルロース合成酵素の触媒部位は細胞質側に存在することが明らかにされた (図2a). なおロゼット TC をほとんど標識しなかった合成ペプチド抗

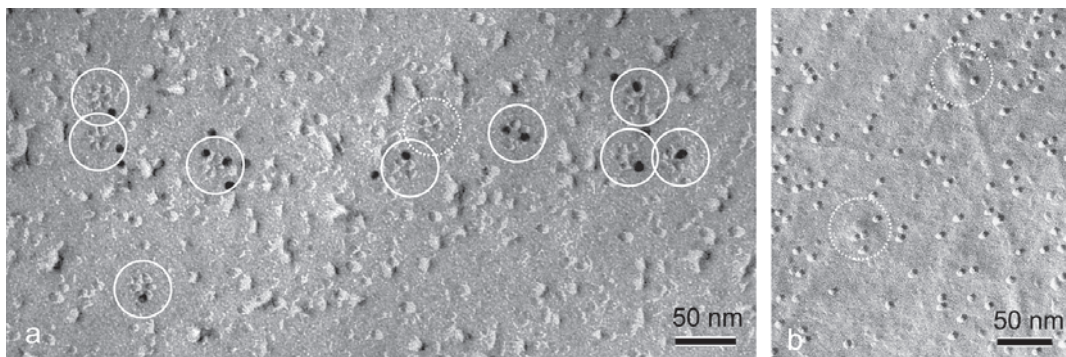


図2 アズキ細胞のロゼット TC のレプリカ免疫標識像. 抗 Cesa 抗体を示す金粒子は P 面に局在するロゼット TC の周囲 20nm の範囲にのみ見られ (a), E 面のグロビュール周囲を含む他の領域では全く観察されない (b). 抗体が反応した TC を実線で, 未反応のものを点線で示す.

体はウエスタンブロットでは合成酵素と考えられるバンドを認識する。詳細な理由は不明であるが、セルロース合成酵素がレプリカ膜で固定されているため、SDS 処理後も抗原部位の露出が完全ではなかったことが原因と考えられる。レプリカ免疫標識法の成功の鍵は、使用する抗体の性質が大きく影響する。植物細胞以外では、セルロース生合成のモデル生物である、酢酸菌のセルロース合成装置の免疫ラベルを試み、ここでは特に、セルロース合成には直接関与しないが、合成酵素の活性化を促すタンパク質（環状グアニル酸結合タンパク質）の局在を検討した。その結果、環状グアニル酸結合タンパク質が酢酸菌のセルロース合成装置の一部であることが明らかにされた¹⁸⁾。

これまでに TC の免疫標識が試みられたのは図 1 に示す生物群のうち、陸上植物とバクテリアの 1 種類ずつのみである。他の生物でも興味深い TC が発見されており、ある種の藻類の TC では凍結切断レプリカの P 面、E 面の両方で膜顆粒構造が観察されている^{7,10)}。また動物であるホヤの TC では、直径の異なる 2 種類の膜顆粒が確認されている^{9,19)}。これらの生物の TC の構成成分に興味をもたれるが、レプリカ免疫標識に着手するためには、遺伝子クローニングや抗体作製、更にこれらの生物が合成する高結晶性セルロースの可溶化技術の開発等の問題が残っている。一方植物細胞では、細胞分化の進行プロセスにおいて細胞壁の生合成に関わる遺伝子群が変化することも報告されている^{1,20,21)}。いずれも今後の重要なテーマといえる。

4. 急速凍結ディープ・エッチング法による植物細胞壁の 3 次元構造

凍結凍断レプリカ法では、凍結時の氷晶形成を防止するためにグリセリン等を使用する場合があるが、氷晶防止剤を使用せずに硝子様凍結を得る、いわゆる急速凍結法が Heuser ら (1979) により開発された²²⁾。急速凍結法により、氷晶防止剤による人工産物の生成の懸念が消えた。しかし本手法が画期的であった点は、凍結切断面の真下の細胞質や細胞壁の水分を昇華させることにより、細胞骨格や多糖類などの三次元構造解析を可能にしたこと、すなわち急速凍結ディープ・エッチング法が確立されたことにある²³⁾。急速凍結ディープ・エッチング法は植物の細胞壁の 3 次元構造の観察にも威力を発揮し、細胞壁の構造研究に新展開をもたらした。なお植物細胞における急速凍結法と凍結切断レプリカの作製の実際に関して、文献²⁴⁾も参照されたい。

急速凍結ディープ・エッチング法により植物細胞壁を観察する最初の試みは McCann ら²⁵⁾によりなされ、その有効性が示された。Fujino ら^{26~28)}も同手法を駆使して、特に異なる分化段階の細胞壁を比較検討することにより、細胞伸長や木化に伴って細胞壁の構造変化がダイナミックに起こることを明らかにした。Fujino らが使用したエンドウ (*Pisum sativum*) の芽生上胚軸は細胞分裂、細胞伸長、伸長停止の各領域を明瞭に区別することが可能であり、細胞分化と細胞

壁の構造変化の追跡に適した試料である。図 3 にエンドウ表皮細胞の急速凍結ディープ・エッチング像を示す。細胞伸長領域の細胞壁では、その全領域において高密度に充填された粒状物質に埋め込まれるようにセルロースマイクロフィブリルが堆積している (図 3a)。一方、細胞伸長が停止した細胞壁では、セルロースマイクロフィブリル間を埋めていた粒状物質の密度が減少し、マイクロフィブリル間に微細な間隙が認められるように変化する (図 3b)。この時、近接するセルロースマイクロフィブリルの間にはそれらを架橋しているような微細な繊維構造も観察されるようになる (図 3b)。細胞壁多糖類の中でもペクチン類は、熱水処理や Ca キレート剤で処理することで容易に細胞壁から抽出される。そこで EDTA 処理を施した細胞壁を調製することにより、ペクチン質を取り除いた細胞壁を観察した (図 3c, d)。EDTA 処理後、セルロースマイクロフィブリルの間を埋めていた粒状構造は完全に消失し、伸長領域の細胞壁ではセルロースマイクロフィブリルだけからなるような構造が (図 3c)、一方、伸長停止領域ではセルロースマイクロフィブリルと、それらを架橋する微細な繊維構造が明瞭に観察された (図 3d)。一連の結果により、ペクチン類は細胞壁内で粒状構造として存在することが明らかとなった。恐らくペクチン分子は、粒状物質が連なった構造であると推測されるが、その詳細は今後の課題である。

ペクチン質の抽出操作で観察が明瞭となったセルロースマイクロフィブリル間の架橋構造であるが (図 3d)、細胞壁の構成多糖の一つであるキシログルカンであると推定された。そこで、架橋構造が観察される伸長停止領域の細胞壁に対して、前述の EDTA 処理に引き続き 4% KOH 処理 (図 3e)、もしくはエンドグルカナーゼ処理 (図 3f) を行った後、同様に急速凍結ディープ・エッチングを行った。その結果、架橋構造はエンドグルカナーゼ処理の試料でのみ完全に消失した (図 3f)。そしてエンドグルカナーゼ処理による溶出物の構成糖分析の結果、それがキシログルカンであることが証明された²⁸⁾。興味深いことに、キシログルカンの量は細胞の伸長と停止の両領域においてほぼ同量存在することが成分分析により確認されている²⁸⁾。キシログルカンはセルロースマイクロフィブリルの表面に水素結合することで 3 次元ネットワークを形成し、細胞壁の伸長を制御することが示されているので、伸長停止領域における急速凍結ディープ・エッチング像は、キシログルカンがセルロースマイクロフィブリルを真に架橋することを直接的に証明するものである。一方、伸長中の細胞壁でキシログルカンがどこに存在するのか興味を持たれる。セルロースマイクロフィブリルに添って堆積していると推測されるが、その詳細は不明である。そこで、細胞壁多糖類の分布を免疫標識と急速凍結ディープ・エッチング法を組合せることにより、明らかにする試みが Suzuki らにより行われ、キシログルカン抗体がセルロースマイクロフィブリルの表面や交差部分に局在することが明らかにされた²⁹⁾。しかし、抗体の浸透や洗浄処理が可能な植物細胞は、培養細胞のような単細胞かつ比較的薄い細胞壁を有する試料に限定さ

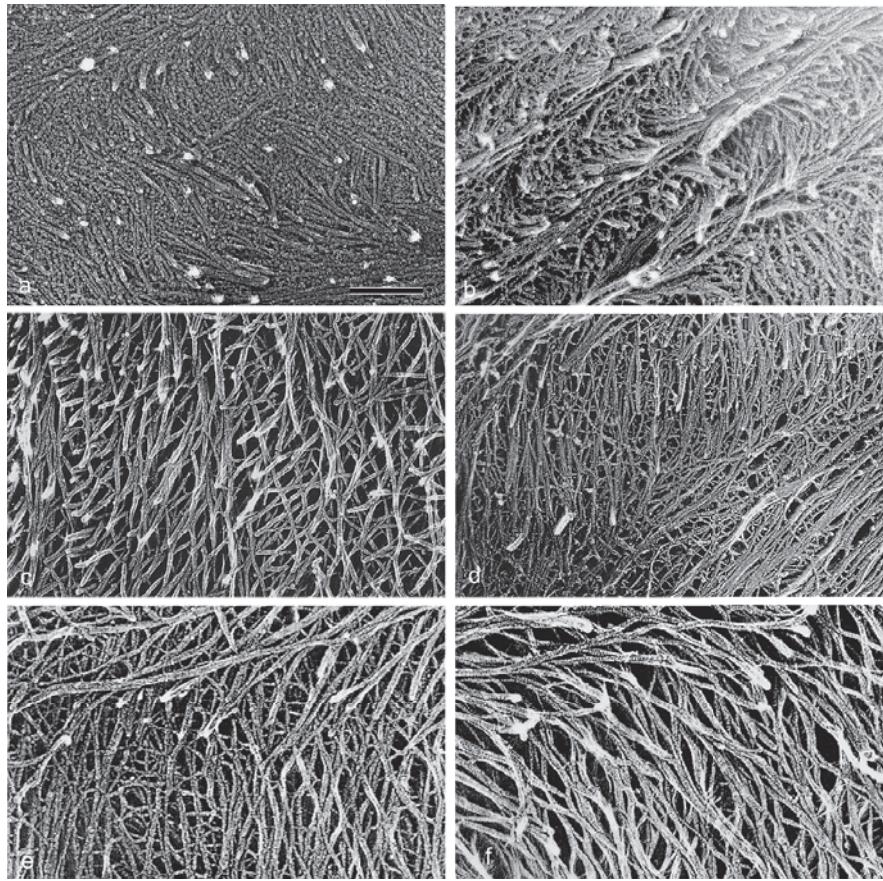


図3 エンドウ芽生の細胞壁の急速凍結ディープ・エッチング像. 伸長中の細胞壁 (a) では、セルロースマイクロフィブリル間を埋め尽くすように粒状物質（ペクチン質）が観察される. 伸長停止領域 (b) では、粒状物質は不鮮明になり、マイクロフィブリル間に間隙が生じると同時に架橋構造が出現する. (c) EDTA 処理後の伸長中の細胞壁. (d) EDTA 処理後の伸長停止領域の細胞壁. EDTA 処理により、細胞壁中の粒状物質（ペクチン質）が消失する. その結果、伸長領域では、セルロースマイクロフィブリルのみからなる構造が、伸長停止領域ではマイクロフィブリル間の架橋構造が明瞭となる. セルロースマイクロフィブリルの架橋構造がキシログルカンであることは、架橋構造が4% KOH 処理で変化しないこと (e)、エンドグルカナーゼ処理で完全に消失すること (f)、により証明された. 図中のスケールバーは50nm.

れた. 植物体を構成する細胞をターゲットに本手法を応用するにはさらなる工夫が必要である.

植物細胞壁の木化は、伸長停止後の細胞壁の二次肥厚とリグニンの沈着によって引き起こされる. 特に樹木細胞で顕著であり、木材はこの強固な細胞壁の集合体である. 木化の過程は極めて複雑な現象であり、植物分野では重要な研究領域の一つである. 木化に伴って変化する樹木細胞壁の構造変化を細胞急速凍結ディープ・エッチング法により追跡する試みもいくつか報告されている^{27,30,31}. Fujino ら²⁷による、ユーカリ (*Eucalyptus*) の例を図4に示す. 伸長中の細胞壁の新生面 (図4a) では細胞長軸と直交し整然と配列したセルロースマイクロフィブリルと、マイクロフィブリル間を架橋する微細繊維状構造が明瞭に観察される. 一方、同ステージにおける細胞間層では、粒状物質が連なった構造がランダムに充填されている様子が観察された (図4b). 伸長停止後、細胞壁の肥厚が始まると、隙間無くセルロースマイクロフィブリルが高密度に堆積し (図4c)、リグニンの沈着に伴いセルロースマイクロフィブリル間の隙間が完全に埋め尽くされる (図

4d). 樹木は多種の細胞群を含み、細胞壁の構造も多様である. これまで観察された細胞壁の構造はごく一部であり、樹木細胞の分化と形態形成の仕組みを明らかにする上で、今後微細構造データの蓄積が望まれる.

5. おわりに

凍結切断法は複雑な工程からなり、技術習得のためには少なからず時間を要する. そして試料の性質の違いにより、数多くの試行錯誤を必要とする. しかし、他の手法では得られない貴重な情報を提供しうるポテンシャルは依然として高い. 植物細胞壁の生合成と分子構築の解明において、凍結切断法の役割は今後も重要と考えられる. また高圧凍結法³²や電子線トモグラフィ法³³との組合せや高分解能SEM^{34,35}等の利用による新展開の可能性も高い. 今後の更なる発展を期待したい.

謝 辞

本稿で紹介した研究成果は京都大学生存圏研究所において

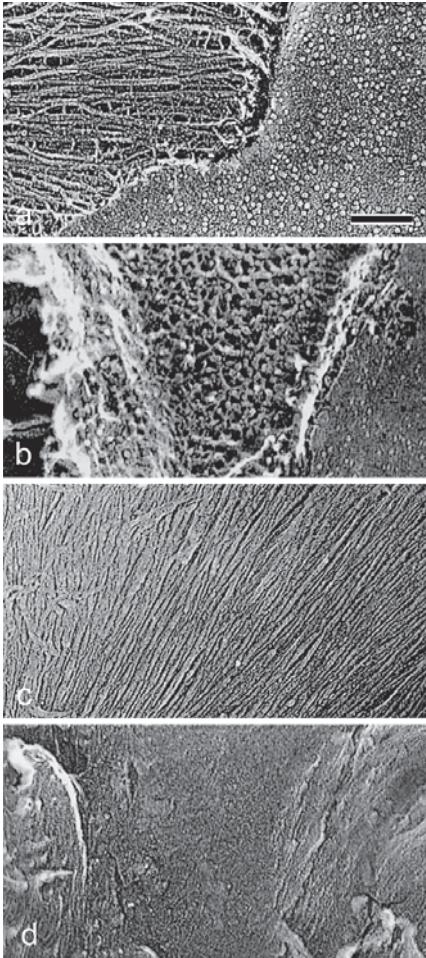


図4 ユーカリ細胞壁の木化に伴う構造変化。(a) 伸長中の細胞壁の新生面ではセルロースマイクロフィブリルが細胞長軸に直交して整然と配列し、架橋構造が明瞭に観察される。(b) 伸長中の細胞壁間層。細胞壁の肥厚時には、セルロースマイクロフィブリルが高密度に堆積する(c)。リグニン沈着は細胞間層を含む全ての領域で進行し、細胞壁内の間隙が全て埋め尽くされる(d)。図中のスケールバーは50nm。

伊東隆夫先生(現・京都大学名誉教授)の指導のもと行われた。また植物細胞壁の3次元構造に関する研究は伊東隆夫先生と藤野猛史博士(現・バージニアテック大)らによるものであり、貴重なデータを使用させていただいた。ここに深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Cosgrove, D.J.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 850-861 (2005)
- 2) Steere, R.L.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 45-60 (1957)
- 3) Branton, R.L. and Moor, H.: *J. Ultrastruct. Res.*, **11**, 401-411 (1964)
- 4) Brown, Jr. R.M. and Montezinos, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 143-147 (1976)
- 5) Brown, Jr. R.M., Willison, J.H.M. and Richardson, C.L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4565-4569 (1976)

- 6) Muller, S.C. and Brown, Jr. R.M.: *J. Cell. Biol.*, **84**, 315-326 (1980)
- 7) Itoh, T.: *J. Cell Sci.*, **95**, 309-319 (1990)
- 8) Grimson, M.J., Haigler, C.H. and Blanton, R.L.: *J. Cell Sci.*, **109**, 3079-3087 (1996)
- 9) Kimura, S. and Itoh, T.: *Protoplasma*, **194**, 151-163 (1996)
- 10) Okuda, K. and Sekida, T.: in Brown, Jr. R.M. and Saxena, I.M. (Eds), *Cellulose: Molecular and Structural Biology*, Springer, Netherlands, UK, 2007, p. 199-216
- 11) Fujimoto, K.: *J. Cell Sci.*, **108**, 3443-3449 (1995)
- 12) 藤本 和: 電子顕微鏡, **30**, 274-280 (1996)
- 13) 藤本 和: 電子顕微鏡, **35**, 129-131 (2000)
- 14) Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, R. and Brown, Jr. R.M.: *Plant cell*, **11**, 2075-2085 (1999)
- 15) Itoh, T., Kimura, S. and Brown, Jr. R.M.: in Brown, Jr. R.M. and Saxena, I.M. (Eds), *Cellulose: Molecular and Structural Biology*, Springer, Netherlands, UK, 2007, p. 237-256
- 16) Pear, J.R., Kawagoe, Y., Schreckengost, W.E. and Delmer, D.P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12637-12642 (1996)
- 17) Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Hofte, H., Planzinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J. and Williamson, R.E.: *Science*, **279**, 717-720 (1998)
- 18) Kimura, S., Chen, H.P., Saxena, I.M., Brown, Jr. R.M. and Itoh, T.: *J. Bacteriol.*, **183**, 5668-5674 (2001)
- 19) Kimura, S. and Itoh, T.: in Brown, Jr. R.M. and Saxena, I.M. (Eds), *Cellulose: Molecular and Structural Biology*, Springer, Netherlands, UK, 2007, p. 217-236
- 20) Somerville, C.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **22**, 53-78 (2006)
- 21) Persson, S., Paredez, A., Carroll, A., Palsdottir, H., Doblin, M., Poindexter, P., Khitrov, N., Auer, M. and Somerville, C.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15566-15571 (2007)
- 22) Heuser, J.E., Reese, T.S., Dennis, M.J., Jan, Y., Jan, L. and Evans, L.: *J. Cell Biol.*, **81**, 275-300 (1979)
- 23) Heuser, J.E. and Salpeter, S.R.: *J. Cell Biol.*, **82**, 150-173 (1979)
- 24) Itoh, T.: in Chaffey, N.J. (Ed.), *Wood Formation in Trees: Cell and Molecular Biology Techniques*, Taylor and Francis Published, UK, 2002, p. 83-98
- 25) MacCann, M.C., Wells, B. and Roberts, K.: *J. Cell Sci.*, **96**, 323-334 (1990)
- 26) Fujino, T. and Itoh, T.: *Plant Cell Physiol.*, **39**, 1315-1323 (1998)
- 27) Fujino, T. and Itoh, T.: *Holzforsch.*, **52**, 111-116 (1998)
- 28) Fujino, T., Sone, Y., Mitsuishi, Y. and Itoh, T.: *Plant Cell Physiol.*, **41**, 486-494 (2000)
- 29) Suzuki, K., Baba, K., Itoh, T. and Sone, Y.: *Plant Cell Physiol.*, **39**, 1003-1009 (1998)
- 30) Nakashima, J., Mizuno, T., Takabe, K., Fujita, M. and Saiki, H.: *Plant Cell Physiol.*, **38**, 818-827 (1997)
- 31) Hafren, J., Fujino, T. and Itoh, T.: *Plant Cell Physiol.*, **40**, 532-541 (1999)
- 32) 栗野達也, 山田祐紀子, 藤田 稔: 顕微鏡, **41**, 212-214 (2006)
- 33) 諸根信弘, 白倉次郎, 楠見明弘: 顕微鏡, **42**, 150-154 (2007)
- 34) Awano, T., Takabe, K., Fujita, M. and Daniel, G.: *Protoplasma*, **212**, 72-79 (2000)
- 35) Marga, F., Grandbois, M., Cosgrove, D.J. and Baskin, T.: *Plant J.*, **43**, 181-190 (2005)