

片岡 博尚：第2回多核細胞研究会研究交流会報告

去る9月26日、日本植物学会第65回（東京）大会の関連集会として表記研究交流会をもちました。本会は1997年に発足しました（藻類45:144-145に趣意書と第1回研究交流会の案内があります）。これまで、大きくて生理実験に便利、原形質運動のモデルになる、などという理由で扱ってきた多核細胞を、なぜ多核なのか、多核細胞はどこから進化してきたのか、核分裂と細胞質分裂の関係は？といった多核細胞体制そのものに対する疑問に向き合ってみようとした研究会です。多核細胞は藻類だけではなく、粘菌や接合菌にも見られますし、双子葉植物茎を構成するシンプラストも互いに原形質連絡でつながった巨大な円盤状の多核細胞と言えなくもありません。研究会発足後、会員は40名を越えました。この4年間に多くの萌芽的研究が発展し、いくつかのおもしろい発見が得られました。新しい観点で新奇の課題に挑戦していくばくかの手がかりを得るには4年という期間は必ずしも長すぎることはないでしょう。

今回の交流会では、厳しい時間制限のため藻類多核細胞に関する4講演に絞らざるを得ませんでした。それでも植物学会のレセプションよりこの交流会を選んで下さった参加者は29名に登りました。うち12名は若い学生を含む未会員でした。演者、および、二次会まで活発な議論に参加下さいました皆さんに感謝します。以下にプログラムと講演要旨を掲載します。この機会にさらに多くの方が多核細胞研究会に参加下さることを願っております。会費は無料です。連絡先：kataoka@ige.tohoku.ac.jp

第2回多核細胞研究会研究交流会（東大駒場キャンパス）

- 18:40-19:00 片岡博尚（東北大院・生命科学）
- 19:00-19:20 峯 一朗（高知大・理・自然環境科学）
- 19:30-19:50 幡野恭子（京都大・総合人間・自然環境）
- 19:50-20:10 新免輝男（姫路工大・理・生命科学）
- 20:10-20:30 総合討論—多核細胞研究会発展のために懇親会と総合討論2 渋谷道玄坂にほんばし亭

片岡博尚：多核細胞の光細胞形態形成：核を寄せて形を造る

多細胞植物の形態形成は局所的な核分裂・細胞分裂により始まる。多核細胞（coenocyte）でも形態形成（この場合は細胞形態形成 cytomorphogenesis）において局所的な核分裂が起こるのであろうか？ 多核細胞ならではの全く別の方法、すなわち、核分裂を経ないで、近傍から必要数の核をかき寄せて形を造る系があることを紹介する。

黄色植物（ストラメノパイル）に属する多核細胞フシナシミドロ（*Vaucheria*）の一部領域を適当強度の青色光で照射すると、最短4時間で照射域の中央に成長点が誘導される（Kataoka 1975）。照射開始後直ちに細胞表層にある葉緑体が集合（弱光定位運動）を開始するが、それは、細胞質内層の多数の核（葉緑体やその他の細胞器官も）の集合が始まる1時

間後にはほぼ終息する。核の集合は照射域中央に成長点が新生するまでつづく。集合した核による遺伝子発現が、この光細胞形態形成反応に必須であり、葉緑体集合のみでは成長点を誘導することはできない。葉緑体集合は光合成によるエネルギー供給を通して必要であるにすぎない。核の密度は2-3時間後には隣接する暗領域の約2倍にまで高まる。この時期に照射域で内向き電流が始まるという Kicherer *et al.* (1985) の観察は、この時点で将来の枝の発生位置に新規に合成されたイオンチャンネル蛋白が展開されたことを示唆する。

核の集合運動は極めて特異的な構造によっている。分裂休止期には全ての核から一本の長い（約60 μ m）微小管束が伸びており、核は微小管に引っ張られて（前方）へ移動する。別種のフシナシミドロで同様の核-微小管束複合体が報告されている Ott (1992) が、微小管依存モーター蛋白の同定、核の運動機構やその光制御機構は不明である。核は青色光の受容体か？青色光に露光した核だけが遺伝子発現をするのか？どのような遺伝子の発現が成長点形成に必要なか？枝の位置はどのように決定されるのか？も今後の研究課題である。

強調したいことは、多核細胞フシナシミドロの形態形成には細胞分裂はおろか、核分裂も必要でなく、必要数の核は隣接領域から集めてくればよいという事実である。これが多核細胞にどの程度普遍的な原理かわからないが、このことは多細胞植物の形態形成でも、細胞分裂の必要性は細胞を若返らせるためではなく、緊急に多量な物質生産を可能ならしめる高い核密度にあるかもしれないということを示唆してはいまいか？多核細胞体制の研究から多細胞体制で見逃されてきた特性や機能の原理を発見することができると期待している。

片岡博尚 1999 光シグナルトランスダクション. 蓮沼ら編 p.80-88. Springer, Tokyo. — 片岡博尚 2001 光走性と光屈性. 朝倉植物生理学 5. 環境応答. 寺島一郎編. p.17-39. 朝倉書店. — Takahashi F, Hishinuma T & Kataoka H 2001 Plant Cell Physiol. 42:274-285. — ホームページ <http://www.ige.tohoku.ac.jp/outou/outou-j/kataoka-j.html>

峯一朗：巨大細胞性藻類における先端成長研究-2つの試み

植物細胞の成長様式には成長部位が局在化しない拡散（散在）成長や、細胞の特定の部位で局所的に成長が行われるもの（先端成長、介在成長など）が知られている。先端成長は円柱形細胞の長軸方向への成長がドーム状の先端部位で局所的に行われる成長様式である。菌類や藻類を含む植物の様々なグループの細胞で見られるこの現象は、局所的な細胞成長の典型的な様式と位置付けられ、花粉管、根毛、原糸体、菌糸などさまざまな材料で活発に研究が行われてきた。

一方、仕切りのない巨大な一つの細胞である巨大細胞性藻類の細胞は、同時に一つの個体としてそれぞれの種独自の生活史を営んでいる。生殖細胞が巨大細胞や多核細胞となる例は多くの生物で知られているが、栄養成長期の細胞で大きさが数 cm 以上に達するものは巨大細胞性藻類や真正粘菌など

に限られる。特に前者は細胞形態が比較的単純だが、種によって異なる成長様式により独特の栄養・生殖的形態形成を行うので、細胞の局所的な機能発現・形態形成の機構を明らかにするためのモデル生物として注目されてきた。

巨大細胞性藻類には先端成長を行う種類が少なからず存在する。先端成長という局所的な形態形成の仕組みを研究するために「細胞が大きい」ということを利用して独自の研究ができないだろうか？ 演者が現在試みている2つの研究例を紹介する。

カサノリ栄養細胞における形態形成因子の局在— Poly(A)⁺ RNA の FISH による観察

接ぎ木実験で有名なカサノリ (*Acetabularia, Polyphysa* など) の栄養細胞は単核巨大細胞である。核が一つだけ仮根部にあり円柱状の主軸部は先端成長により上方へ伸長する。先端成長部位には形態形成因子が局在しており、細胞を切断しても先端を含む断片は核がなくても栄養成長(先端成長)を続けることができる。この因子の実体は核から供給された mRNA であることが示唆されてきた。

核で転写された mRNA が細胞内の特定の部位に運搬され局在化することが動物をはじめ多くの生物で明らかになっているが、カサノリ巨大細胞の広大な細胞質における mRNA の動態は、その移動距離が大きいことだけでなく、局所的な形態形成に関与する因子としてその「場」に局在する、という点で興味深い。

演者らは、先端成長を司る遺伝子を含むと考えられるこの mRNA の集団が、どのように核から運搬され、先端成長部位に局在するのかを明らかにするために、オリゴ(dT)をプローブとした蛍光 in situ hybridization 法を用いてカサノリ栄養細胞における mRNA (poly(A)⁺ RNA として) の分布を組織化学的に観察した(1)。その結果、先端成長部位や核周辺における局在に加えて、主軸側面では長軸方向に伸びるアクチン繊維に沿ってすじ状の poly(A)⁺ RNA が多数観察された。このことは、カサノリの先端成長に必要な遺伝子発現の重要な過程である「細胞質内における mRNA の運搬と局在化」が、細胞骨格系に基づく細胞内運動と密接に関連していることを示唆している。

先端成長部位における細胞壁の伸びやすさを測る

植物細胞の成長は、膨圧に耐える機械的強度を持った既存の細胞壁が成長する方向に引き伸ばされながら、その部分へ新たな細胞壁成分が沈着することにより行われると考えられる。既存の細胞壁が伸びることと細胞が成長することが密接に関連するならば、成長が起こる細胞やその部分の細胞壁は他よりも伸びやすくなっているのかも知れない。事実、拡散成長を行う植物細胞では、細胞壁の「伸びやすさ」の増大が膨圧による細胞の伸長成長を引き起こす、という視点に立った研究が行われている(2)。

先端成長を行う細胞においてドーム状先端部位を含む各部分の細胞壁の伸びやすさを調べることにより、成長部位の細胞壁を伸ばすために必要な力や、細胞壁が伸びやすい生理的な条件、といった先端成長の機構を明らかにするための基礎

的なデータが得られることが期待できる。

演者は、顕微解剖が可能な藻類の巨大細胞を用いて、原形質や液胞を除いた先端成長部位の細胞壁の中にオイルを注入し、加圧しながら細胞壁の伸びを観察する実験を行っている。ここでは、これまでハネモやフシナシミドロなどで行った予備的な実験の結果について、生細胞の先端成長における細胞伸長パターンとの比較や実験方法の問題点などを検討する。

(1) Mine I, Okuda K & Menzel D 2001 Poly(A)⁺ RNA during vegetative development of *Acetabularia peniculus*. *Protoplasma* 216:56-65. — (2) Cosgrove DJ 1997 Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell* 9:1031-41.

幡野恭子：緑藻アミミドロの網状群体形成に関わる分子の解析

緑藻アミミドロ (*Hydrodictyon reticulatum*) は初夏から秋にかけて池沼や水田に生息し、主として六角形の網目をもつ袋状の群体である。網目の一辺は1つの円筒形の多核細胞からなり、大きい細胞では長さ約1cm、直径約0.2mmに達する。このような網状の群体は、網目の一辺にあたる多核の母細胞内で形成された数百個の遊走子が、六角形の網目状に接着してつくられる。この網状群体形成過程は、多核細胞と単核細胞との相互交換、細胞の形態変化、細胞接着、細胞の六角形の網目状配列という生物の形づくりを理解する上で重要な現象を含み、なおかつ多細胞生物と比べて体制が単純で、パターン形成の機構を解析するための良い系のひとつである。アミミドロの六角形の網目はどのようにして形成されるのか、そのメカニズムに興味をもち、これまでに群体形成中の細胞の微細構造や細胞内小器官の変化、遊走子を母細胞からひとつずつ分離培養した際の成長パターンなどについて、解析を行ってきた。

近年、パターン形成に関与する分子の探索と機能解析のため、遊走子の破碎液を抗原としてモノクローナル抗体を作製した。得られた抗体のひとつを用いて、単核である遊走子に特異的に発現する抗原分子 Amy1 を見だし、遊走子の分子マーカーとして利用できることを示した(1)。

また、遊走子接着部に局在する分子を認識する抗体が得られた。この抗原分子は遊走子形成初期から群体形成数時間後まで発現した。この分子は母細胞内の原形質領域の分割後、遊走子表面に粒状に分布し、遊走子が多面体に形を変えると他の遊走子との接触部分付近に局在しはじめ、やがて遊走子の接着部に分布した。多面体の遊走子では微小管の1束が鞭毛基部から細胞後方へ伸び、細胞が角張った部分より太くっており、抗原分子はこの微小管の束が太くなる領域に局在していた。遊走子の接着直後には太い微小管の束が細胞接着面付近を通り、抗原分子はこの細胞接着面の微小管の束付近に分布した。さらに免疫電顕でこの抗原分子の細胞内分布を調べた。

また、遊走子に含まれるコンカナバリン A に結合する分子が遊走子の接着に深く関わることを見だしている(2)。

(1) Hatano K, Yamamoto M, Yamada Y & Nishikata T 2000 Zoospore-

specific antigen as a useful marker for molecular analysis of net formation in *Hydrodictyon reticulatum* (Chlorococcales, Chlorophyceae). *Phycol. Res.* 48:143-148. — (2) Hatano K & Ueda J 2000 Effects of concanavalin A on the net formation of zoospores in *Hydrodictyon reticulatum* (Chlorococcales, Chlorophyceae). *Phycol. Res.* 48:155-160.

新免輝男：緑の軸索：植物における電気応答の解析システムとしてのシャジク藻類

植物に機械刺激や傷害を与えると電気的な応答が起こることは以前から知られていた。しかしながらその生理学的な意味は、速い膨圧運動をするオジギソウや食虫植物以外の、いわゆる普通の植物においては知られていなかった。近年、植物の電気応答の意味が明らかになりつつある。例えば、トマトの植物体の一部が傷つけられると、全身的にタンパク質分解酵素の阻害剤が合成されるが、この傷害の情報は電気的に伝えられることが報告されている(Wildon *et al.* 1992)

動物細胞における活動電位の発生機構はイカの巨大軸索を用いた研究によって大きく進歩したことはよく知られている。イカの軸索が巨大であり、さらに、組織を形成していないなどの利点を活かすことにより、詳細な実験が可能であった。シャジクモ類の節間細胞の形や大きさはイカの巨大軸索に匹敵するものであり、皮層がない種類を選ぶことにより、単独の細胞を用いて解析することが可能である。その利点により、シャジクモ類を用いた実験は、植物膜の基本的な特性の解析に大きく貢献してきた(Shimmen *et al.* 1994)。最近、私はシャジクモ類細胞の利点を活かして、植物の機械刺激および傷害に対する電気応答の解析を行っている。

以前から、シャジクモ類の細胞に機械刺激を与えると原形質流動が停止することが知られていた。Osterhoutらはシャジクモ類の細胞に機械刺激や傷害を与えると positive variation や death wave が発生することを報告している (Osterhout & Harris 1929, Osterhout & Hill 1935)。

機械刺激に対する応答

植物が機械刺激を受けた場合、まず受容電位が発生することが考えられる。ハエジゴクやムジナモでは機械刺激を受容するために分化した細胞が知られており、これらの細胞による受容電位の発生が報告されている。しかしながら、その解析は容易ではなく、受容電位発生のイオン機構は解析されていない。岸本は電磁石を用いてシャジクモ類の細胞を刺激し、受容電位を記録することに成功している (Kishimoto 1968)。Staves と Wayne (1993) はオオシャジクモの節間細胞を曲げることによって発生する活動電位の解析を行っている。

私はガラス棒をオオシャジクモの節間細胞上に落とすことによって機械刺激を与え、受容電位を再現性よく発生させることに成功した。ガラス棒の重さ、または落とす高さを変えることにより、刺激の強さを定量的に、しかも簡単に制御できる。この実験系を用いて、機械刺激により発生する受容電位の詳細な解析を行った(Shimmen 1996, 1997a, c)。また、受容電位の発生にはクロライドチャンネルが関与していること

も明らかにした(Shimmen 1997b)。

傷害応答

植物が傷害を受けた場合、その情報を先ず受け取るのは隣の生き残った細胞であると考えられる。複雑な組織を形成し、さらに細胞が小さい高等植物では、特定の細胞の応答のみを抽出して測定することは困難である。しかしながら、シャジクモ類では大きい細胞が一次的にならんでおり、特定の細胞の電位応答を測定することが可能である。

オオシャジクモを用いて、節間細胞が二つつながった試料を調製し、一方の細胞(犠牲細胞)を切断した時に、もう一方の細胞(受容細胞)で発生する電位応答を解析した。犠牲細胞を切断すると、受容細胞に顕著な脱分極反応が誘導された。反応の様式は細胞によって様々であったが、4種類の反応が組合わさっていることがその原因であることが分かった(切断直後の速いピークを伴う脱分極、10分以上も続くゆっくりとした脱分極、活動電位、小さいスパイク)。初期の速い脱分極と長く続く脱分極はすべての細胞においてみられた。活動電位と小さいスパイクについては、発生する細胞と発生しない細胞があった。活動電位は速い脱分極の直後、およびゆっくりとした脱分極の初期に発生した。小さいスパイクもゆっくりとした脱分極の初期に発生した。

すべての細胞で発生する速い脱分極とゆっくりとした脱分極についての解析を行った。その結果、これらの電位反応は受容細胞の端(節)の部分で発生することが分かった。また、外液にソルビトールを加えると、反応が小さくなることから、細胞の膨圧が重要であることが示唆された(Shimmen 2001)。さらに、切断直後の反応にはクロライドチャンネルが関与していることも明らかとなった。

Kishimoto U 1968 Response of *Chara internodes* to mechanical stimulation. *Ann. Rep. Biol. Works Fac. Sci. Osaka Univ.* 16:213-218. — Osterhout WJV & Harris ES 1929 The death wave in *Nitella*. I. application of like solution. *J. Gen. Physiol.* 12:167-186. — Osterhout WJV & Hill SE 1935 Positive variation in *Nitella*. *J. Gen. Physiol.* 18:369-375. — Shimmen T 1996 Studies on mechano-perception in characean cells: development of a monitoring apparatus. *Plant Cell Physiol.* 37:591-597. — Shimmen T 1997a Studies on mechanoperception in characean cells: pharmacological analysis. *Plant Cell Physiol.* 38:139-148. — Shimmen T 1997b Studies on mechano-perception in characean cells: effects of external Ca^{2+} and Cl^{-} . *Plant Cell Physiol.* 38:691-697. — Shimmen T 1997c Studies on mechano-perception in characean cells: decrease in electrical membrane resistance in receptor potentials. *Plant Cell Physiol.* 38:1298-1301. — Shimmen T 2001 Electrical perception of 'death message' in *Chara*: involvement of turgor pressure. *Plant Cell Physiol.* 42:366-373. — Shimmen T, Mimura T, Kikuyama M & Tazawa M 1994 Characean cells as a tool for studying electrophysiological characteristics of plant cells. *Cell Struct. Funct.* 19:263-278. — Staves MP & Wayne R 1993 The touch-induced action potential in *Chara*: inquiry into the ionic basis and the mechanoreceptor. *Aust. J. Plant Physiol.* 20:471-488. — Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb RJ, Reill AJ, Skipper YD, Doherty HM, O'Donnell, PJ & Bowles DJ 1992 Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360: 62-66.