植物細胞にフォーカルコンタクトはあるか

大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻 高木慎吾

It has increasingly become evident that the plant cell wall not only provides a structural scaffold to support plant bodies but also plays crucial roles in regulation of a number of intracellular activities. Based on recent findings obtained in an aquatic monocot *Vallisneria gigantea*, a possible occurrence of structural and/or functional homologues of focal contact in plant cells, the site of animal cells for signal transduction from the exterior as well as for cell-substrate adhesion, is discussed.

actin cytoskeleton / cell wall / cytoplasmic streaming / extracellular matrix / focal contact / *Vallisneria gigantea*

1. はじめに

フォーカルコンタクトは、電子顕微鏡観察によって1971年にトリ繊維芽細胞において初めて見出された。培養細胞やアメーバ細胞が細胞外マトリックスと接着するとき、細胞外の細胞接着性タンパク質、細胞膜貫通タンパク質、細胞内のアクチン細胞骨格によって形成される超分子構造である¹⁾(図1)。近年になって、単なる物理的接着装置としてだけでなく、細胞が細胞外から情報を取り込むサイトとして機能しており、タンパク質キナーゼやGTP結合タンパク質をはじめ種々の情報伝達因子が局在していることが次々と明らかにされている²⁾³⁾。このフォーカルコンタクトと構造的、機能

的に相同なものが、はたして植物細胞にも存在するのだろうかというのが本稿の論点である。私たちの研究室でこれまでに得られた知見を紹介しながら、世界の潮流についても簡単に触れる。

2. バリスネリア葉肉細胞の原形質流動

ジャイアントバリスネリア (*Vallisneria gigantea*, 和名オオセキショウモ) は淡水産の単子葉植物で、熱帯魚ファンに人気の水草である。葉の葉肉細胞は直方体状の形をしており、その中では、核や多数の葉緑体を含んだ細胞質が2面の長い側壁と2面の短い末端壁とに沿って一方向に流れる原形質流動が見られる(図2A)。このような流動パターンを周回型と呼ぶ。植物は動物のように個体レベルで動き回ることはいないが、その細胞質は活発に運動している。植物は細胞容積を増大させることによって成長し、細胞容積の増大の大部分は細胞への吸水によってもたらされる。水は液胞という細胞内コンパートメントに格納される。巨大な液胞の形成に伴って細胞自身が巨大化するので、効率的な物質輸送を保证するために原形質流動が必要であるとする考え方がある⁴⁾⁵⁾。

葉肉細胞の原形質流動は、アクチン繊維の機能阻害剤であるサイトカラシンによって可逆的に阻害される。細胞質が流れている部分を電子顕微鏡で観察すると、50本前後のアクチン繊維が束ねられた構造が細胞膜の近傍に見える(図2B, C)。本稿では触れないが、細胞質の内質(エンドプラズム)中のミオシンがモータータ

図1 フォーカルコンタクトの構築様式の模式図

Possible Occurrence of Focal Contact in Plant Cells

Shingo TAKAGI

Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka University

図2 パリスネリアの葉の模式図とアクチン繊維束
Aの矢印は原形質流動のパターン。B、Cは葉肉細胞のアクチン繊維束の電子顕微鏡写真。Bは縦断面、Cは横断面を示す。下側の白い部分は細胞壁。スケールは100 nm。

図3 パリスネリア単離葉肉細胞
細胞壁分解酵素処理により、葉からさまざまな形状の葉肉細胞が単離される。上から2番目の細胞では、側壁に沿って一方に流れる細胞質が見える。スケールは100 μm。

図4 パリスネリア単離葉肉細胞のアクチン繊維束の配列
単離葉肉細胞を蛍光ファロイジンで染色した。上は正常な周回型、中は渦巻き型、下は垂直型の配列。スケールは50 μm。

ンパク質として機能しており、アクチン繊維束に沿って滑ることにより原形質流動をひき起こしている⁵⁾。細胞に遠心力をかけていったん内質を偏らせても、内質は元と同じ流動パターンをたどって回復するので、アクチン繊維束は細胞表層の外質（エクソプラズム）中にアンカーされていると推測される。

セルラーゼなどの酵素を用いて細胞壁多糖を分解すると、プロトプラストと呼ばれる細胞壁をもたない裸の植物細胞が得られる。酵素の組み合わせなどに工夫を凝らし、パリスネリアの葉からプロトプラストではなく、細胞壁つきの単一葉肉細胞を単離することに成功した⁶⁾（図3）。生葉中では見つかった側壁や末端壁に沿った原形質流動を眺めているうち、意外なことがわかってきた。細胞が原形質分離を起こして、末端壁部分で細胞膜が細胞壁からはずれると、周回型の流動パターンが大きく乱れる。渦巻きになったり、極端な場合には末端壁を経由せず、元のパターンと垂直に側壁と上下の壁とを流れるものまで現れる。アクチン繊維に結合するキノコ毒ファロイジンを蛍光ラベルしたもので細胞を染色し、アクチン繊維束の配列が同様に乱れていることを確認した（図4）。アクチン繊維束と細胞壁とが細胞膜を介して相互作用していることが示唆される。

3. プロテアーゼ感受性の細胞骨格構築維持機構

流動パターンを乱す要因として、原形質分離だけで

表1 酵素液のタンパク質分解活性、原形質分離、流動パターンの乱れの関係

タンパク質分解活性 (units/ml)	原形質分離 (%)	完全な原形質分離 (%)	流動パターンの乱れ (%)
161	80	69	75
130	70	49	56
94	59	43	46
79	51	28	30
73	24	21	21

細胞壁分解酵素液にいろいろな組み合わせでプロテアーゼ阻害剤を加え、カゼインを加水分解する活性を定量した。それらの酵素液でパリスネリアの葉から単離した単一葉肉細胞を高張液で処理し、原形質分離を起こした細胞数、末端壁部分で細胞膜が細胞壁から完全にはずれた細胞数、流動パターンが乱れた細胞数を調べた。各酵素液について、数回の実験から約40個の細胞についての結果を示した。

なく、細胞を単離するときに用いた細胞壁分解酵素標品に混入しているプロテアーゼが気になった。プロテアーゼは、植物の微細管細胞骨格の安定性に影響を与えることが知られている。植物の細胞骨格といえば、アクチン繊維ではなく微細管が圧倒的に有名である。分裂間期の植物細胞では、微細管が細胞膜直下に細胞を取り巻くように並んでいる。細胞質表層微細管と呼ばれ、細胞の形を決めるのに必須の役割を果たしていると考えられている⁷⁾。試験管内で重合させた微細管は低温にすると脱重合するが、タバコ培養細胞の表層微細管は低温耐性である。しかし、細胞壁分解酵素を用いてプロトプラストにすると低温耐性は失われる。微細管に低温耐性を与える因子が細胞壁中に存在するのではないかという発想から、プロトプラスト外にエクステンシンという細胞壁蛋白質を加えると、プロトプラストの表層微細管は低温耐性になった。ところが、プロトプラストをあらかじめプロテアーゼで処理しておくと、エクステンシンの作用は失われる。すなわち、エクステンシンと相互作用するプロテアーゼ感受性因子の仲立ちにより、細胞壁中のエクステンシンが細胞内の表層微細管を安定化しているらしい⁸⁾。

そこで細胞壁分解酵素液にいろいろな組み合わせでプロテアーゼ阻害剤を加え、タンパク質分解活性を定量した。それらの酵素液で単離した単一葉肉細胞を高張液で処理し、原形質分離を起こした細胞の割合、末端壁部分で細胞膜が細胞壁から完全にはずれた細胞の割合、流動パターンが乱れた細胞の割合を調べた⁹⁾(表1) 予想通り、酵素液のタンパク質分解活性と原形質分離および流動パターンの乱れとの間には相関があった。ここで面白いのは、酵素液のタンパク質分解活性が高くなるにつれ、流動パターンの乱れる割合が、完全な原形質分離の割合をより大きく上回ることである。高いタンパク質分解活性をもつ酵素液で単離された細胞のなか

には、末端壁部分での完全な原形質分離を起こすことなく流動パターンの乱れているものがあることになる。私たちははじめ、完全な原形質分離によって細胞膜と細胞壁とが物理的に引き離されることが流動パターンの乱れの直接原因と考えていたが、原形質分離は流動パターンの乱れの必要条件ではなかった。そこで思い切ってトリプシン、キモトリプシン、パパインなどのプロテアーゼで細胞を処理すると、流動パターンもアクチン繊維束の配列も、原形質分離の起きない条件下で乱れた。

細胞をサイトカラシン処理すると、側壁に沿ったアクチン繊維束は速やかに破壊されるが末端壁に沿ったものは残る。このサイトカラシン耐性のアクチン繊維束も、細胞をプロテアーゼで前処理しておくと、続くサイトカラシン処理によって完全に破壊される⁹⁾。さらに、界面活性剤を含む塩溶液で可溶性成分を除去した細胞を電子顕微鏡で観察すると、細胞膜および細胞壁に付着した繊維状の構造が点在して残る¹⁰⁾。この構造は、動物細胞における、細胞外マトリックスとアクチン細胞骨格との相互作用の場であるフォーカルコンタクトを彷彿させた。以上より、「葉肉細胞のアクチン繊維束の細胞内構築は、末端壁部分での細胞膜と細胞壁との接着に依存して、プロテアーゼ感受性因子の関与のもとに維持されている」という仮説に至った。

4. 細胞壁因子の探索

フォーカルコンタクトでは、フィブロネクチンやビトロネクチンなどの細胞接着性タンパク質が、その分子内にあるRGD(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)配列で、RGD受容体である細胞膜貫通タンパク質インテグリンと結合し、さらに数種類の細胞内タンパク質を介してアクチン繊維と相互作用している(図1)。RGD配列を含む合成ペプチドを細胞外から与えると、

細胞の接着や移動が阻害される。一方、鞭毛虫の1種で、RGD配列と同等の機能をもつRYD（アルギニン-チロシン-アスパラギン酸）配列をもつ細胞接着性タンパク質の存在が報告されている¹¹⁾。そこで、RGDもしくはRYD配列を含む合成ペプチドで葉肉細胞を処理したところ、原形質流動のパターンもアクチン繊維束の配列も大きく乱れた¹²⁾。植物細胞に対するRGDペプチドの作用について、プロトプラスト同士の接着や細胞膜と細胞壁との接着が阻害されることは知られていたが、アクチン細胞骨格の構築変化を報告したのは私たちが最初となった。

合成ペプチドは、細胞壁中のRGDもしくはRYD配列をもつタンパク質と競合することによってアクチン繊維束の配列を乱したものと考え、細胞壁因子の探索を試みた。RYDペプチドをヘモシアニンに架橋した抗原に対するウサギ抗血清を作製し、葉から調製した粗抽出画分についてイムノブロットングを行ったところ、SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）上での分子量54および27 kDaの2本のポリペプチドが認識された。間接蛍光抗体法により、抗原が細胞壁に分布していることを確認した¹²⁾。54 kDaという分子量は、他のいくつかの植物で報告されている、ヒトビトロネクチン抗体によって認識されるポリペプチドの分子量とほぼ一致していた。

塩適応したタバコ培養細胞からは、ガラスビーズに親和性をもつ性質を利用してビトロネクチン様のタンパク質が単離されている¹³⁾。SDS-PAGE上での分子量は55 kDaで、ヒトビトロネクチン抗体によって認識される。単離したタンパク質に対する抗体を用いて、免疫電子顕微鏡法により細胞壁に局在することが示され、ポリペプチド鎖延長因子1 α と相同な遺伝子が同定された。この遺伝子については、塩基配列から推定される分子量とSDS-PAGE上での分子量との間に食い違いがあることなどから疑問視されているが、植物細胞壁に細胞接着性タンパク質が存在することについては間違いないと思われる。

5. 細胞膜因子・細胞内因子

私たちも含めて多くの研究室が植物インテグリンの同定を目指しているが、いまだ確たる成果は報告されていない。動物インテグリンに対する抗体によって認識されるものがあるという以外に、RGDペプチドをリガンドとしたアフィニティカラムに結合するものがあることが2, 3例報告されているにすぎない。細胞膜因子は細胞壁因子に比べて種特異性が高いのだろうということになっている。さらに細胞膜因子とアクチン繊維

とをつなぐ細胞内因子については、ほとんど知見がないという寒い状況である。私たちは初心に返り、原形質分離、原形質復帰に伴って原形質流動のパターンが変化する過程を、同一細胞について詳細に連続観察してみた（図5）。アクチン繊維束がより細い束にほどけたり（図5C）、束ごと位置を変える（図5D）局面が明らかとなった。植物細胞でもアクチン結合タンパク質が機能していることを示すものであるが、それらの実体をつきとめるにはかなりの努力を要するであろう。

極論すると、植物では植物体を構成する一つ一つの細胞が、刺激受容、運動、接着、イオン輸送などすべての装置をほんの少しずつもっている。ある器官なり組織なりを取れば機能タンパク質が濃縮して存在しているということがない。このことが生化学的方法論の適用を非常に困難なものにしている。これを克服するため、近年では遺伝子レベルからのアプローチが盛んで、塩基配列の相同性から、細胞壁結合型キナーゼ、レクチン様キナーゼなど、植物に特異的と思われる因子が記載され、細胞外から細胞内への情報伝達に機能しているのではないかと推測されている¹⁴⁾。これら遺伝子の産物の機能解析、局在の把握が今後の研究の1つの流れとなるであろう。

6. おわりに

細胞壁は不活性なコンパートメントで、多糖の網目にすぎず、おもな役割は植物細胞の形の保持であるとされてきた。Kropfらは、褐藻ヒバマタの接合子プロトプラストの発生軸決定に關与するアクチン繊維の細胞

図5 バリスネリア葉肉細胞末端壁における流動パターンの経時変化（林晃之原因）

Aは蛍光ファロイジンによる染色像、Bは原形質分離前、Cは原形質復帰中、Dは原形質復帰後、矢印は原形質流動のパターン。スケールは20 μ m。

内構築が、細胞壁が再生されない限り安定化されないことを示し¹⁵⁾、新しい視点を導入した。この実験系は古くより、細胞生物学的、発生生物学的に重要なテーマを数多く提供し、膨大な知見が集積している¹⁶⁾¹⁸⁾。興味のある方は参照していただきたい。今や細胞壁が、植物の細胞外マトリックスとして、細胞内のさまざまな活動の制御に積極的に関与していることを疑う余地はない。

Ingberのグループは、RGDペプチドやインテグリン抗体でコートした強磁性ビーズを用いて、細胞表面にかかった力がインテグリンを介して細胞骨格に伝えられることを見事に示した¹⁹⁾。オジギソウなどで知られるように、植物が接触などの刺激に応答する現象は有名で、おもに電気生理学的な解析が行われてきた²⁰⁾。細胞壁にかかった力を細胞内へ伝達する装置の存在が強く示唆される。サイエンスのまな板に載せるのは困難と思われてきた現象であるが、今やその分子機構に迫ることが可能な時代となった。そのためにも、また、塩基配列だけから推測していることを生細胞レベルで検証するためにも、植物生理学者は生物物理学的なアプローチを今までにまして積極的に取り入れるべきと感じる。

文 献

- 1) Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G. and Turner, C. (1988) *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 487-525.
- 2) Ruoslahti, E. and Vaheri, A., eds. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 605-731.
- 3) Horwitz, A.R. and Werb, Z., eds. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 563-671.
- 4) 山本啓一 (1997) 生物物理 **37**, 68-72.
- 5) 高木慎吾 (1995) 細胞 **27**, 245-248.
- 6) Masuda, Y., Takagi, S. and Nagai, R. (1991) *Protoplasma* **162**, 151-159.
- 7) 今関英雅, 柴岡弘郎編 (1998) 植物ホルモンと細胞の形, 学会出版センター, 東京.
- 8) Shibaoka, H. (1994) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 527-544.
- 9) Ryu, J.-H., Takagi, S. and Nagai, R. (1995) *J. Cell Sci.* **108**, 1955-1965.
- 10) Masuda, Y., Takagi, S. and Nagai, R. (1992) Plant Cell Walls as Biopolymers with Physiological Functions (Masuda, Y., ed.), p.125-130, Yamada Science Foundation, Osaka.
- 11) Soteriadou, K.P., Remoundos, M.S., Katsikas, M.C., Tzinia, A.K., Tsikaris, V., Sakarellos, C. and Tzartos, S.J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 13980-13985.
- 12) Ryu, J.-H., Mizuno, K., Takagi, S. and Nagai, R. (1997) *Plant Cell Physiol.* **38**, 420-432.
- 13) Zhu, J.-K., Damsz, B., Kononowicz, A.K., Bresnan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1994) *Plant Cell* **6**, 393-404.
- 14) Miller, D., Hable, W., Gottwald, J., Ellard-Ivey, M., Demura, T., Lomax, T. and Carpita, N. (1997) *Plant Cell* **9**, 2105-2117.
- 15) Kropf, D.L., Kloareg, B. and Quatrano, R.S. (1988) *Science* **239**, 187-190.
- 16) Quatrano, R.S. and Shaw, S.L. (1997) *Trends Plant Sci.* **2**, 15-21.
- 17) Kropf, D.L. (1997) *Plant Cell* **9**, 1011-1020.
- 18) Fowler, J.E. and Quatrano, R.S. (1997) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 697-743.
- 19) Wang, N., Butler, J.P. and Ingber, D.E. (1993) *Science* **260**, 1124-1127.
- 20) Shimmen, T. (1996) *Plant Cell Physiol.* **37**, 591-597.