車軸藻脱膜モデルによる原形質流動の研究

東京大学・理学部・植物学教室 新 免 輝 男
平安女学院短期大学 富 永 義 人
東京大学・理学部・植物学教室 田 沢 仁

Characeae/cytoplasmic streaming/actin/myosin/ Ca^{2+}

A. はじめに

多くの植物細胞内では活発な原形質流動が観察されるが、これは細胞内における物質の輸送に役立っているものと思われる。今まで最もよく研究されてきた材料は車軸藻類や真性粘菌であるが、その最大の理由はこれらの細胞が非常に大きいため実験に用い易いことにある。車軸藻類においては神谷と黒田(1956)¹⁾が、流動力は固定したゲル状の原形質外質とゾル状の原形質内の界面に発生する滑りの力であることを示して以来、その実体の解明が活発に行われてきた。その結果ゲル層の内側にはアクチン繊維が配列していることが明らかとなり、さらにゾル状の内質中にはミオシン様タンパク質が存在することが示唆された。これらの結果から現在では、車軸藻類における原形質流動の原動力発生装置の実体は筋肉と同じアクトミオシン系であると考えられている。²⁾

我々も車軸藻類の原形質流動の機構を脱膜モデルを用いて研究してきた。我々の開発した脱膜の方法は植物細胞の特徴を利用したものなので、まず車軸藻類の節間細胞の構造から説明する。節間細胞は円柱形で直径1mm、長さ十数cmにも達する巨大なものである。その縦断面を図1に示す。最外層は植物細胞特有のセルロースを主成分とする細胞壁で、低分子に対する透過性は非常に高いがタンパク質のような高分子は通さない。その内側は原形質膜で細胞内外の実質上の拡散

障壁となっている。細胞の中心部には細胞全体積の90-95%を占める液泡があり細胞液で満たされている。原形質は原形質膜と液胞膜にはさまれている。原形質の外質に葉緑体が固着しており、その内表面にアクチン繊維の束がある。

B. 脱膜モデルの調整法

i) 液胞膜除去モデル³⁾: 細胞の両端を鋏で切り開いた後、液胞内を Ca^{2+} のキレート剤であるEGTAを含む液で灌流し、細胞の両端を糸でくくる。液胞内の Ca^{2+} を除くことによって液胞膜が消失するので細胞内灌流により原形質の組成を制御できる。(図1)。液胞膜消失後、原形質内質は細胞内に散らばるが、アクチン繊維に結合している内質は正常な速度(50-100 $\mu\text{m}/\text{sec}$)で流動を続ける。また原形質膜はその機能を失わないので、液胞膜除去細胞は原形質膜の電気生理学的な研究に利用できる。これに関しては著者らが本誌で紹介した。⁴⁾

ii) 原形質膜除去細胞⁵⁾: 節間細胞をEGTAを含む液で約30分間前処理した後、氷で冷した高張のEGTA液で処理することにより原形質分離を起こさせる。 Ca^{2+} 除去と低温下の原形質分離によって原形質膜が細胞壁から急激に離れる際に、原形質膜に不可逆的に穴があく(図1)。顕微鏡観察や中性赤の透過性でみる限りでは液胞膜はその構造を維持している。従って原形質は液胞膜と細胞壁(または穴のあいた原形質膜)に囲まれているため処理後も原形質がもとの構造を維持している。原形質膜にどの程度の変化が起っているかは明らかではないが、一応ここでは原形質膜除去細胞と呼ぶことにする。

室温で原形質流動を観察しながら急速に原形質膜に穴を開けるには電気パルス法を用いる。⁶⁾細胞を2mm離れた2本の平行な白金または銀-塩化銀電極間に置き、外液にはEGTA液を用いて強度70V、持続時間10-30 msec程度の電圧パルスを与える。

図1. 車軸藻類の脱膜モデル

C. 原形質流動の再構成実験(図2)⁷⁾

車軸藻類の原形質流動の力はアクチン繊維と原形質内質(ミオシン)の相互作用によって発生しているので、それぞれを別々の車軸藻の細胞から調製し、原形質流動を再構成することが可能である。まずEGTA灌流により液胞膜除去細胞を調製する。次にこの細胞の持つ原形質内質(ミオシン)を流動力発生に関して不活性化する。その方法としてNEM^{*})や高温処理がある^{8,9,10)}ミオシンはこれらの処理によって不活性化されるが、アクチンはその機能を失わない。また液胞膜除去細胞内をEDTAまたはCyDTA^{**)}を含む液で灌流して Mg^{2+} を除去すると原形質内質は不活性化されるが、アクチン繊維は影響を受けない。⁷⁾他方節間細

図2. 流動再構成

胞の液胞内をEGTA液で灌流し、加水分解酵素、ポリフェノール、 Ca^{2+} 等を含む細胞液を洗い流した後、原形質全体を指でしごき出す。遠心処理により葉緑体、核等を除いた分画を原形質内質標品として調製し、これを先に用意したアクチン供与細胞内に灌流して流動を再構成する。車軸藻原形質内質の代わりに種々の生物から純化したミオシンを用いて再編成を行なうこともできる。

*) N-ethylmaleimide, SH基に共有結合し、ミオシンATPaseを阻害する。

**) cyclohexanediamine-N,N'-tetraacetic acid, Ca^{2+} と共に Mg^{2+} もキレートする。

D. 車軸藻類の原形質流動の基本的性質

i) エネルギー源

流動力発生にアクチン-ミオシン系が関与しているならば、そのエネルギー源として当然ATPが予想される。それはまず液胞膜除去細胞で^{3,11,12)}続いて原形質膜除去細胞で証明された^{5,13)}原形質膜除去細胞では細胞外灌流液のATPで原形質流動を容易に制御できる(図3)。図4に液胞膜除去細胞における流速のATP濃度依存性が示してある。流速に対するATPの飽和濃度は約0.2 mMで、正常細胞の原形質中のATP濃度0.5-1 mM¹⁴⁾は流速に関して飽和していることがわかる。

図3. *Nitella* 原形質膜除去細胞の原形質流動に対するATPと Mg^{2+} の効果⁵⁾ Mg・ATPにより流動は活性化されATPの除去(Mg)で停止する。 Mg^{2+} の除去(CyDTA)は流動を不可逆的に阻害する。

図4. *Nitella* 液胞膜除去細胞における流速(V)のATP濃度依存性¹²⁾黒丸は灌流液にフوسفフェノールピルビン酸とピルベートキナーゼを加えた結果。

ii) Mg^{2+} 依存性

車軸藻類の原形質流動には Mg^{2+} も不可欠である。 Mg^{2+} はミオシンATPaseの補助因子としてだけでなく、流動に必要な構造の維持に重要な働きをしている

らしい。液胞膜除去細胞において ATP を 1 mM に固定し $MgCl_2$ 濃度を変えたところ 0.5 mM まではほとんど流動が見られず、ATP と同量の 1 mM 以上で初めて正常な流速が測定された。 Mg^{2+} ATP をともに 0.25 mM にした場合は流動が観察された。¹²⁾ ATP が Mg^{2+} を強く結合することから考えて、流動の発現には遊離の Mg^{2+} が必要であることがわかる。さらに CyDTA で一度処理すると流動は不可逆的に阻害される。¹²⁾ この現象は原形質膜除去細胞でも見られた。^{5,13)} 図 3 は原形質流動は ATP により可逆的に制御されるが、一度 CyDTA で Mg^{2+} を除去すると次に $Mg \cdot ATP$ を加えても流動は回復しないことを示している。

Mg^{2+} 除去によってアクチン繊維と原形質内質のうちどちらが可逆的に阻害されるのかを見るために再構成実験を行なった (図 2)。アクチン繊維を CyDTA で前処理した場合は流動が再構成できたが、原形質内質を前処理した場合は流動が起らなかった。このことから Mg^{2+} 感受性物質は原形質内質中にある Mg^{2+} は流動に必要な構造の維持に関与していることが考えられる。

iii) その他の性質

流動の最適 pH は 7 で酸・アルカリ性で強く阻害される。¹⁵⁾ またヴァナジン酸^{***)} によって阻害されない。¹⁶⁾

E. 原形質流動の Ca^{2+} による制御

車軸藻類の原形質流動は電気や機械的刺激によって活動電位が発生すると 1 秒以内に停止し、数分かけて元の流速まで回復する。¹⁷⁾ この流動停止には Ca^{2+} が関与していることがわかってきた。液胞膜除去細胞の原形質膜は興奮性を維持しており、電気刺激によって活動電位を発生するがこの時流動の停止が起らない。³⁾ これは液胞膜除去細胞中には強力な Ca^{2+} キレート剤 EGTA が含まれているからであろうと考えられた。節間細胞より分離した原形質内質滴は表面膜をもちその中にはしばしば外質から外れた葉緑体が含まれている。葉緑体のまわりにアクチン繊維が結合している場合は葉緑体が自転をする。このような原形質滴内に Ca^{2+} を電気泳動で注入すると、葉緑体の回転は停止し、やがて回復する。⁸⁾ また正常細胞の外液に高濃度の K^+ を加えて原形質膜の興奮性を失わせたと、 Ca^{2+} をつめた微小電極を原形質内に刺入して電気泳動で Ca^{2+} を注入すると原形質流動は一過性に停止する。¹⁹⁾ このよう

に正常細胞では流動が Ca^{2+} で可逆的に制御される。

Williamson と Ashley²⁰⁾ は、 Ca^{2+} が結合すると発光するタンパク質エクオリンを原形質内に注入し、膜興奮時に Ca^{2+} が増加することを報告している。液胞膜除去細胞においても同様のことが観察された。²¹⁾ EGTA の濃度を 1 mM にしエクオリンを加えた灌流液で液胞膜除去細胞を調製した。この様にして調製した液胞膜除去細胞に電気刺激で活動電位を発生させると、 Ca^{2+} の増加を示す発光が見られた。

以上の事実はいずれも膜興奮に伴う流動停止は一過的な Ca^{2+} 濃度増加によることを示唆している。さらにこれを確認するためには原形質流動の Ca^{2+} 濃度依存性を詳しく測定する必要があるが、その目的には脱膜モデルが適している。まず液胞膜除去細胞において流速の Ca^{2+} 濃度依存性を測定した。^{22,23)} EGTA 灌流によって液胞膜を除去した後、種々の Ca^{2+} 濃度の液で灌流を行い流速を測定した (図 5)。 10^{-4} M の Ca^{2+} は流

図 5. 液胞膜除去細胞 (黒丸) および原形質膜除去細胞 (白丸) における流速の Ca^{2+} 依存性²²⁾

動を全く阻害せず、 5×10^{-4} M で初めて阻害が起こった。しかしながら 10^{-3} M でも完全に流動を止めることはできなかった。またこの様な高濃度の Ca^{2+} で流動を止めると、 Ca^{2+} を除去しても流速は少ししか回復しなかった。Williamson と Ashley の報告によると、*Nitella* では原形質中の Ca^{2+} は静止時の 0.4 – 1.1 μ M から興奮時には 43 μ M に、*Chara* では静止時の 0.1 – 0.2 μ M から 6.7 μ M へとそれぞれ増加する。7 または 43 μ M の Ca^{2+} では液阻膜除去細胞では流動は全く阻害を受けない。

一方原形質除去細胞の流動の Ca^{2+} 依存性を調べたところ液胞膜除去細胞とは定量的に全く違う結果が得られた。²⁴⁾ 10^{-6} M Ca^{2+} がほぼ完全に流動を阻害し (図 5)、かつその阻害は完全に可逆的であった (図 6)。この結果は活動電位発生時の Ca^{2+} (7 または 40 μ M) による流動停止を十分に説明できる。ところが *Nitella*

***) ダイニン ATPase は低濃度で阻害するがミオシン ATPase は高濃度でのみ阻害する。

図6. *Nitella* 原形質膜除去細胞における流動の Ca^{2+} による可逆的阻害²²⁾ 図の上の数字は細胞外灌流液中の Ca^{2+} 濃度 (M) を示す。

における静止時の原形質 Ca^{2+} 濃度が $0.4 - 1.1 \mu\text{M}$ ²⁰⁾ とすると、流動は静止時にも阻害されるか停止することになる。エクオリン発光による Ca^{2+} 濃度の推定にある程度の誤差は避けられない。静止時の Ca^{2+} 濃度は恐らく 10^{-7}M 以下であろう。

原形質膜除去細胞に較べてなぜ液胞膜除去細胞では原形質流動の Ca^{2+} 感受性が悪いのであろう。両者における大きい違いは前者では原形質内質がもとの構造を保っているのに比して、後者では内質の構造はこわれてしまっている。液胞膜消失後、内質中の流動制御に必要な構造もこわれてしまった可能性がある。液胞膜除去細胞の原形質流動を詳しく観察すると、 Ca^{2+} 感受性の高い内質顆粒と低いものが存在することがある。²³⁾

流動停止を起こす Ca^{2+} はどこからくるのであろうか。原形質膜が興奮すると液胞膜も活動電位を発生することが知られている。²⁵⁾ しかし細胞を遠心処理することによって液胞をほとんどなくしても膜興奮に伴う流動停止は起こる²⁵⁾ また内質中に遊離して回転している葉緑体の回転は膜興奮時に原形質膜に近いところほど早く止まる。²²⁾ これらの事実は流動停止の情報が原形質膜からきていることを示す。原形質膜が興奮すると外液から細胞内への Ca^{2+} 流入の増加が起こる。外液の Ca^{2+} が 0.1mM の場合静止時の Ca^{2+} の流入量は $4 \times 10^{-14}\text{mol/cm}^2/\text{sec}$ であるが、活動電位のピーク時はその90倍の $3.6 \times 10^{-12}\text{mol/cm}^2/\text{sec}$ に増える。²²⁾ 細胞全体積のうち原形質が5パーセントを占めるとすると興奮のピーク時には原形質中の Ca^{2+} は約 $6 \mu\text{M}$ に増加することになる。この濃度では原形質膜除去モデルで得られた結果によると流動は完全に停止する。しかしながら骨格筋の小胞体と同じ様に Ca^{2+} の遊離、吸収を行なう細胞器官が関与している可能性も残され

ている。

膜興奮時に原形質中に遊離した Ca^{2+} は何らかの方法で除去されて流動が回復するであろう。脱膜モデルを用いると EGTA によって流動回復を促進できる。外液の K^+ 濃度を上げると化学的に膜興奮を起こすことができるが同時に流動の停止も起こる。外液に高濃度の K^+ と共に EGTA, ATP, Mg^{2+} を加えて膜興奮を起こさせると、流動は停止後ゆっくりと回復する。ところが流動停止直後に細胞に強い電気パルスを与えて原形質膜に穴をあけると EGTA が原形質に入り、流動回復を促進する。²⁶⁾

正常な状態では Ca^{2+} はどこに行くのであろうか。細胞を遠心処理することによって調製した内質の多い細胞片では K^+ 刺激後の流動の回復が促進され、少ない細胞片では阻害される。²⁶⁾ 即ち原形質内質に原形質中の Ca^{2+} 濃度を下げる働きをする要因が存在するものと思われる。

F. 純化ミオシンによる流動再編成

車軸藻類の原形質内質で流動力発生に関与しているのがミオシンであるとする、他の生物から調製したミオシンと車軸藻類のアクチンの間でも流動を再構成できる可能性がある。直径 $2 \mu\text{m}$ のラテックスビーズの表面をポリリジン処理し、そのまわりにウサギ骨格筋から純化したミオシンを固定した。このミオシン固定ビーズを図2に従って液胞膜除去 *Chara* 細胞の中に入れると、 $1 \mu\text{m}/\text{sec}$ で動いた。アクチン繊維の極性が逆転する中立線の所でビーズの運動方向が逆転していることから、この運動はアクチン繊維とミオシンの相互作用による能動的なものであることがわかる。²⁷⁾ Sheetz と Spudich²⁸⁾ は切り開いた事軸藻においてヘビーメロミオシンを固定したビーズがアクチン繊維にそって動くことを以前に報告している。

アクトミオシンの活性の制御は骨格筋ではアクチンに結合したトロポニン・トロポミオシンによってなされていることはよく知られている。ところが近年アクトミオシン ATPase の Ca^{2+} 制御がミオシンによってなされている例が多く見だされてきた。ホタテガイ、真性粘菌もその例であるが、前者では Ca^{2+} で活性化され²⁹⁾ 後者では阻害される。^{30,31)} そこでこれらのミオシンをビーズに固定して再構成実験を行なった。ホタテガイミオシンの場合 Ca^{2+} がないと全く動かなかったが、 $1.6 \times 10^{-4}\text{M}$ の Ca^{2+} を加えると $1 \mu\text{m}/\text{sec}$ で動いた。真性粘菌ミオシンの場合は Ca^{2+} のない状態で $1.6 \mu\text{m}/\text{sec}$ で動き、 $1.6 \times 10^{-4}\text{M}$ Ca^{2+} により 0.6

$\mu\text{m/sec}$ へと阻害された。³²⁾ このようにビーズの動きの Ca^{2+} 制御はミオシンによってなされていることがわかる。これはアクチン繊維には Ca^{2+} 感受性がないことを示しており、車軸藻類の原形質流動の Ca^{2+} 制御は内質 (ミオシン) が行っていることが示唆される。

おわりに

車軸藻の脱膜モデルが開発されたことによつて植物細胞の原形質流動の基本的な性質が明らかになった。アクトミオシン系による運動は一般に Ca^{2+} によって活性化されるが、車軸藻類の場合は真性粘菌と並んで制御が逆転しており、アクトミオシン系の Ca^{2+} 制御を考える上で興味ある材料となり得る。分子レベルの解析が待たれるところである。車軸藻類のアクチン繊維はきれいに極性をそろえて配列しており、異種生物のミオシンとも相互作用する。これらの点で車軸藻の脱膜モデルは、広くアクトミオシンの運動機構や Ca^{2+} 制御機構の解明に貢献する可能性がある。

文 献

- 1) Kamiya, N., Kuroda, K. (1956) *Bot. Mag. Tokyo*, 69, 543-554
- 2) Kamiya, N. (1981) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32, 205-236
- 3) Tazawa, M., Kikuyama, M., Shimmen, T. (1976) *Cell Structure Function*, 1, 165-176
- 4) 新免輝男, 田沢仁 (1981) *生物物理*, 21, 254-260
- 5) Shimmen, T., Tazawa, M. (1983) *Protoplasma*, 115, 18-24
- 6) Shimmen, T., Tazawa, M. (1983) *Protoplasma*, 117, 93-96
- 7) Shimmen, T., Tazawa, M. (1982) *Protoplasma*, 113, 127-131
- 8) Chen, J. C. W., Kamiya, N. (1975) *Cell Structure, Function*, 1, 1-9
- 9) Chen, J. C. W., Kamiya, N. (1981) *Cell Structure, Function*, 6, 201-207
- 10) Kamitsubo, E. (1982) *Protoplasma*, 109, 3-12
- 11) Williamson, R. E. (1975) *J. Cell Sci.* 17, 655-668
- 12) Shimmen, T. (1978) *Cell Structure Function*, 3, 113-121
- 13) Shimmen, T., Tazawa, M. (1982) *Protoplasma*, 112, 101-106
- 14) Mimura, T., Shimmen, T., Tazawa, M. (1984) *Planta*, 162, 77-84
- 15) Tazawa, M., Shimmen, T. (1982) *Bot. Mag. Tokyo* 95, 147-154
- 16) Shimmen, T., Tazawa, M. (1982) *Plant Cell Physiol.* 23, 669-677
- 17) Tazawa, M., Kishimoto, U. (1968) *Plant Cell Physiol.* 9, 361-368
- 18) Hayama, T., Tazawa, M. (1982) *Protoplasma*, 102, 1-9
- 19) Kikuyama, M., Tazawa, M. (1982) *Protoplasma*, 113, 241-243
- 20) Williamson, R. E., Ashley, C. C. (1982) *Nature*, 296, 647-651
- 21) Kikuyama, M., Tazawa, M. (1983) *Protoplasma*, 117, 62-67
- 22) Hayama, T., Shimmen, T., Tazawa, M. *Protoplasma*, 99, 305-321
- 23) Tominaga, Y., Tazawa, M. (1981) *Protoplasma*, 109, 102-111
- 24) Tominaga, Y., Shimmen, T., Tazawa, M. (1983) *Protoplasma*, 121, 178-185
- 25) Kikuyama, M., Tazawa, M. (1976) *J. Membrane Biol.* 29, 95-110
- 26) Shimmen, T., Tominaga, Y., Tazawa, M. (1984) *Protoplasma*, 121, 178-185
- 27) Shimmen, T., Yano, M. (1984) *Protoplasma*, 121, 132-137
- 28) Sheetz, M. P., Spudich, J. A. (1983) *Nature*, 303, 31-35
- 29) Kendrick-Jones, J., Szentkiralyi, E. M. Szent-Györgi, Z. G. (1976) *J. Mol. Biol.* 104, 747-775
- 30) Ogihara, S., Ikebe, M., Takahashi, K., Tonomura, Y. (1983) *J. Biochem.* 93, 205-223
- 31) Kohama, K., Kendrick-Jones, J. (1982) *J. Muscle Reseach & Cell Montility*, 3, 491
- 32) Shimmen, T., Kohama, K. (1984) *International Cell Biol.* p. 504. Eds. Seno, S., Okada, Y. Japan Society Cell Biol. Tokyo

ABSTRACT

Studies on the Cytoplasmic Streaming in Demembrated Characeae Cell Models

Teruo SHIMMEN, Yoshito TOMINAGA* and Masashi TAZAWA

Department of Botany, Faculty of Science, University of Tokyo, Hongo, Tokyo

*St. Agnes Junior College for Women, Kamikyo-ku, Kyoto

Two types of demembrated cell models have been established using Characeae internodal cells; the tonoplast-free cell model and the plasmalemma-permeabilized cell model. In these models, both ATP and Mg^{2+} were essential for the maintenance of cytoplasmic streaming. Ca^{2+} inhibited the streaming in both models. However, the Ca^{2+} -sensitivity of the streaming in the plasmalemma-permeabilized model was 1000 times higher than the tonoplast-free model, suggesting that some Ca^{2+} -sensitizing component was dispersed or disorganized by the disintegration of the tonoplast. Using the actin bundles present in the tonoplast-free cells, the streaming was reconstituted with the endoplasm from other Characeae cells or the rabbit skeletal muscle, scallop or *Physarum* myosin. Ca^{2+} accelerated the streaming reconstituted with scallop myosin but inhibited that reconstituted with *Physarum* myosin. These opposite effects of Ca^{2+} on reconstituted streamings agree with the effects of Ca^{2+} on the respective actomyosin ATPases.

しんめん てるお

1948年兵庫県生。1970年愛媛大学文理学部卒業。1977年大阪大学理学博士。博士課程存学中以来、車軸藻類の電気生理学の研究を行ってきたが1981年頃から主として原形質流動を手がけ初めた。しかしながら実験材料として長所の多い車軸藻類から未だに離れられずにいる。1983年に本誌に総説を寄稿して以後に身辺に起こった変化としては二人目の娘が生まれたことである。

☎(03) 812-2111 内線 4451

とみなが よしと

1943年東京都生れ。68年国際基督教大学卒。同年、大阪大学大学院理学研究科で生理学を学び始めるも卒業できず、74年退学。アオミドロ・ホシミドロの形態形成や車軸藻の原型質流動を手懸けてきた。どちらの場合も制御機構に興味がある。73年に結婚後ヒトの発生過程の制御機構にも関心をもち、研究費を稼ぐため、74年京都の平安女学院短期大学に勤務して現在にいたる。

☎(075) 431-1181

たざわ まさし

今年の11月1日で東京生活が7年になります。もう残り5年しかありませんが、細胞運動の方は新免講師に頑張ってもらおうとして、膜輸送の仕事では、プロポンポンの調節機構、その生理的意義、細胞の浸透調節の機構、高等植物における膜興奮の生理的意義などに取り組んでいきたいと思っています。私の体とお酒の事で御心配下さる方が居られますが steady state ではないかと勝手に判断しております。

☎(03) 812-2111 内線 4451