

# 論文内容の要旨

論文題目：

## Structural Analysis of Vacuolar Dynamics in Higher Plant Cells Using Microscopic Image Processing

(顕微鏡画像処理を用いた高等植物細胞における液胞構造の動態解析)

氏名： 朽名 夏磨

### 序論

高等植物の多くの細胞は、発達した液胞により体積の大半が占められ、周囲は堅い細胞壁によって覆われている。このような植物細胞を力学的な構造体としてとらえると、(a) 細胞を覆って細胞の外形を直接的に規定している細胞壁、(b) 細胞体積の大半を占める液胞、そして (c) 他のオルガネラや細胞骨格系を含む細胞質、という 3 つのコンポーネントに大分できる。各コンポーネントのバランスは、細胞分裂、形態形成、形態制御といった細胞の形の変化をともなう現象に深く関与する。また、細胞の種類や周囲の環境によってこれらのコンポーネントが性質や構造を変えることで、組織レベルでの物理的特徴や形態が決定されることが考えられる。例えば細胞質と細胞壁が形態形成に関与するケースとして、表層微小管によるセルロース微繊維の配向の決定と、それによる細胞の伸長方向の制御が挙げられる。

一方、液胞は吸水によって細胞質の増加に比べて少ないコストで体積を増すことができるため、液胞の吸水・膨張による巨大化は細胞の伸長や肥大における主要な手段となっている。また気孔の開閉

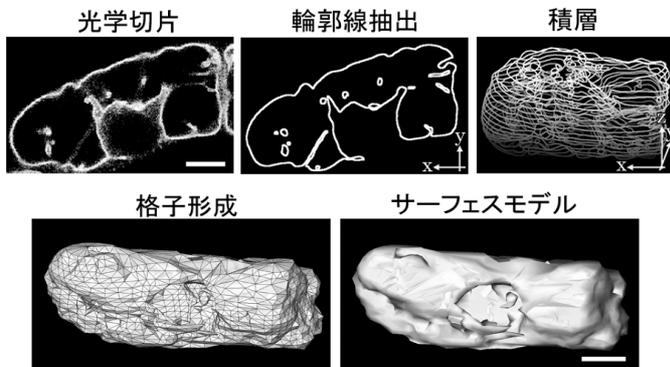


図 1. 立体再構築・解析システム REANT による液胞の立体再構築の流れ。 Bar: 10 μm

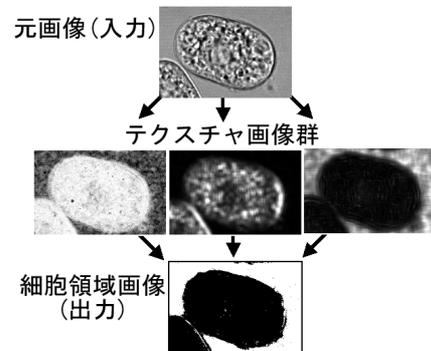


図 2. 自動領域抽出システムによる細胞領域の抽出過程。

における孔辺細胞の形態制御なども、液胞の膨張と収縮を介して行なわれている。しかし、これまで適切な観察方法がなかったことなどから、液胞自体の形態と、細胞の構造変化との関わりについてはよくわかっていない。そこで、細胞分裂や伸長生長といった細胞に大きな形態変化がみられる現象における液胞構造の動態と役割を明らかにすることを目的として、タバコ培養細胞 BY-2 を材料として用いて、生細胞における液胞の形状や動態についての立体的および定量的な解析を行なった。

### 液胞の可視化系の確立と画像解析ソフトウェアの開発

生細胞の液胞を可視化するために、蛍光試薬を用いた液胞膜や液胞内腔の生体染色法を確立した。また、シロイヌナズナの syntaxin のひとつである AtVam3p に GFP を融合したタンパク質を恒常的に発現する BY-2 の形質転換細胞を作出し、GFP 蛍光が液胞膜に局在することを確認し、BY-GV (transgenic BY-2 cells stably expressing a GFP-AtVam3p fusion protein) と名付けた。これらの可視化系の確立により、液胞構造について連続光学切片や動画像などの多様な顕微鏡画像を得ることができるようになった (図 1 光学切片, 図 4 液胞膜, 図 5 液胞膜)。

一方、連続光学切片からの立体再構築・解析システム REANT (reconstructor and analyzer of three-dimensional structure) (図 1) や、顕微鏡画像からの自動領域抽出システム (図 2) など、顕微鏡画像から液胞や細胞全体について形態計測や運動解析を行なうための一連のソフトウェアを独自に開発した。REANT では格子形成のアルゴリズムを新たに考案し、光学切片間の距離が大きな場合にも正しい立体構造を再構築することができるように工夫した。また、自動領域抽出システムについては、ユーザーが示す領域抽出結果を学習させることによって、さまざまな顕微鏡像から目的により異なる領域を自動的に抽出することに成功した。なお、これらのプログラムは BY-2 細胞の液胞に限らず、他種の組織、細胞やオルガネラなど、さまざまな顕微鏡画像に通用する汎用性も備えることができた。

### 細胞分裂時における液胞構造の動態

高等植物の細胞分裂においてはフラグモプラストによる細胞板形成をはじめとして、特徴的な過程や構造の出現が知られている。しかし、細胞分裂と液胞の関係は構造、機能ともに解析が進んでいなかった。細胞周期の進行にともなう液胞構造の動態を経時観察したところ、M 期において分裂装置周囲の細胞質中に、チューブ状の液胞膜の構造が現れることを新たに発見し、これを TVM (tubular structure of vacuolar membrane) と名付けた (図 3)。TVM は、G<sub>2</sub> 期終わりから M 期にかけて核周辺の細胞質中に出現して分裂装置を取り囲むようになること、M 期後期から終期にかけて分裂面近傍にも侵入して娘核の周囲を取り囲むこと、細胞板形成にともな

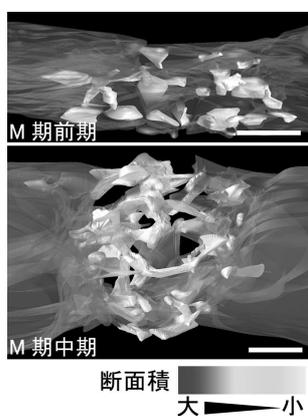


図 3. TVM の立体構造。  
Bar: 10 μm

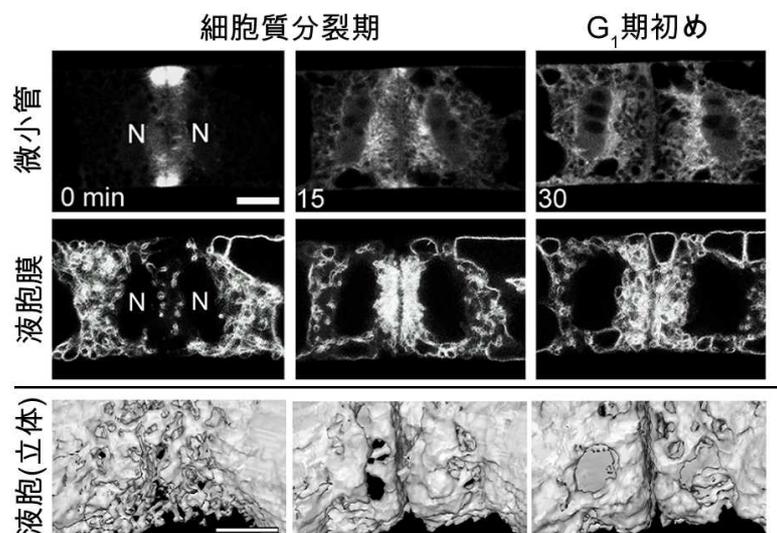


図 4. TVM の細胞板近傍への集積と膨張・融合。N: 核 Bar: 10 μm

って切断され娘細胞へ分配されること、G<sub>1</sub>期初めに娘核と細胞板の間にある TVM が巨大液胞へ発達することがわかった。

とくに細胞質分裂前後の TVM の分布については、フラグモプラスト微小管による遠心的な細胞板形成に続いて TVM が細胞板近傍に集積し、G<sub>1</sub>期初めに速やかに膨張・融合し巨大液胞へ発達することが、微小管との同時観察や一細胞の経時的な立体構造解析から明らかになった (図 4)。G<sub>1</sub>期における核の移動は TVM の膨張・融合による巨大液胞への発達と同時期に起こっていることから、細胞板近傍への TVM の集積は核の位置制御にとって重要と考えられる。

### ミニプロトプラストの伸長誘導時における液胞構造の動態

植物細胞が伸長生長する際には、巨大液胞の形成と膨張が重要な役割を果たす。しかし、巨大液胞の形成過程における液胞形態については不明の点が多い。巨大液胞が形づくられる過程を詳細に観察するため、酵素処理により BY-GV 細胞の細胞壁を除いてプロトプラストとした後、さらに遠心処理を行なうことで巨大液胞を除去してミニプロトプラストを調製し、伸長生長を誘導した。その結果、細胞伸長に先行して特徴的な液胞の構造変化が観察された (図 5A)。立体構造解析により、巨大液胞の再生前に細胞全体に細かな網状の液胞構造が展開することがわかった (図 5B)。これらの液胞再生過程を分類し、培養開始直後でミニプロトプラスト内に残った液胞が偏在した段階 (phase 0)、細胞内全体に網状液胞が展開した段階 (phase 1)、網状液胞の太さが均一のままで全体が膨張した段階 (phase 2)、巨大液胞が一部再生した段階 (phase 3) と定義した。この一連の液胞構造変化は細胞伸長に先行して、培養から 24 時間で順次同調的に起こった (図 6A, B)。

一連の液胞構造変化を定量的に把握するため、明視野像と液胞膜の共焦点像を対象にした形態計測を行なった。それにより、細胞の伸長の 7 割以上が液胞の膨張による貢献であることがわかった (図 6B)。また、液胞の膨張に先行してみられる網状液胞の発達には液胞の周長 (液胞の膜面積に相当) の増加をもたらした (図 6C)。つまり巨大液胞の再生過程では単に液胞が吸水膨張するだけでなく、膜面積の増加が起こっていた。膨

張と膜面積増加の液胞構造に対する影響をあわせて考えるため、「細胞内を液胞が占める割合 (液胞占有率)」と「液胞膜の余剰の度合い (液胞複雑度)」を液胞形態の指標として定義し、各培養時間についてプロットした (図 7A)。その結果、網状液胞の発達によって液胞複雑度は一過的に上昇することがわかった。これは、液胞の膜合成と膨張は平行的に進行するのではなく、まず膜合成が優先して網状液胞を展開し (phase 1~2)、次いで吸水膨張が起こって巨大液胞にまで発達する (phase 3) ことを示す。さらに細胞内での液胞分布の解析にも同じ指標を用いたところ、phase 3

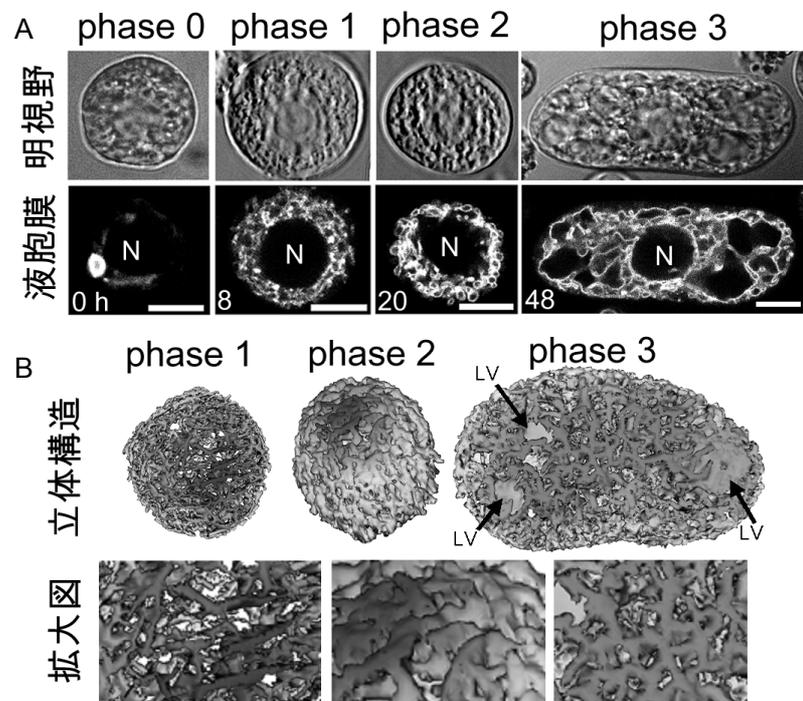


図 5. ミニプロトプラストの伸長生長と巨大液胞の再生. 遠心処理による脱液胞処理後、細胞伸長や巨大液胞の再生に先駆けて網状の液胞が細胞全体に展開した。N: 核 LV: 巨大液胞 Bar: 10  $\mu$ m

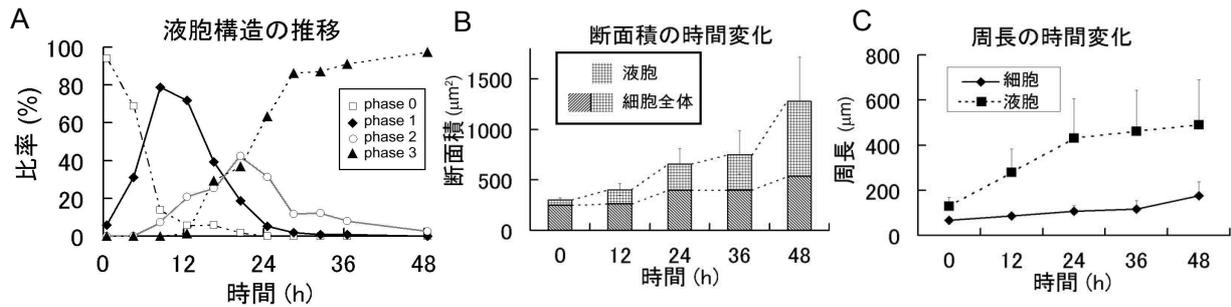


図 6. ミニプロトプラストの伸長生長誘導時における細胞および液胞の形態の時間変化. 液胞の膨張が細胞の伸長生長の主要な原動力であった. 網状液胞は液胞の膨張に先行して発達し(phase 1~2), 液胞の周長を増加させた. Bar: SD

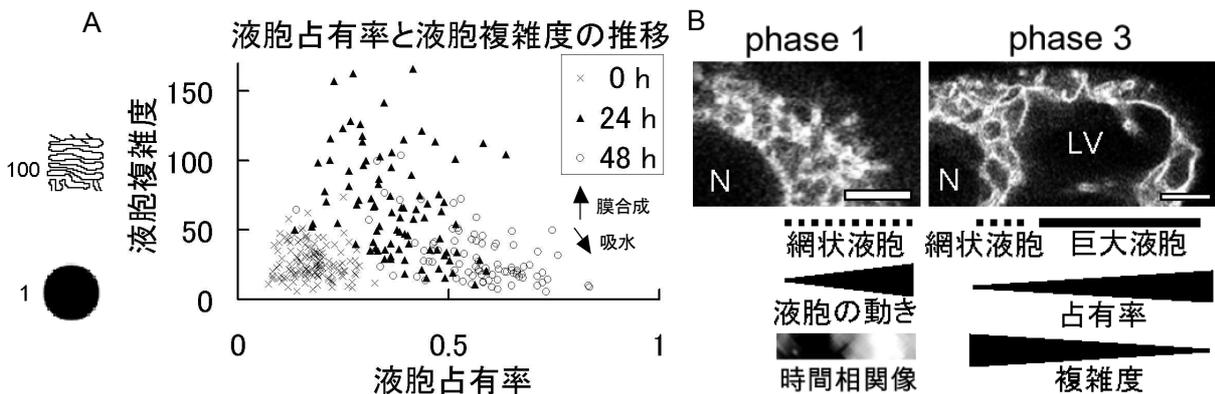


図 7. ミニプロトプラストの伸長生長誘導時における液胞構造の時間的推移と細胞内での勾配. A, 巨大液胞再生に至る液胞構造の動態は, 液胞占有率 (液胞断面積 / 細胞断面積) と液胞複雑度 (液胞周長<sup>2</sup> / 4π液胞断面積) の変化としてとらえられた. 細胞内においては核周囲から細胞辺縁にかけて, 液胞の動きや構造に勾配がみられた. B, 網状液胞から巨大液胞への発達は細胞辺縁部から起こった. 液胞の動きを時間相関像として可視化したところ, 液胞構造が均一に分布する phase 1 の細胞で, すでに液胞の動きに偏りがみられた. 時間相関像は白いほど動きが激しいことを示す. N: 核 LV: 巨大液胞 Bar: 10 μm

において細胞中央の核周辺では網状液胞が残り, 細胞辺縁部では巨大液胞が再生するといった, 液胞の発達の空間的な勾配がみられた (図 7B). すなわち, 網状液胞の膨張は phase 2 以降に不均一化し, 局所的な膨張・融合によって巨大液胞を形成するものと考えられる.

網状液胞や巨大液胞の液胞膜が秒単位で活発な動きを示していることに注目し, 細胞内での液胞膜の動きの空間分布について解析した. その結果, 液胞の形態が均質で偏りが無い phase 1 においても, 液胞膜の動きには核周辺から細胞辺縁部にかけて速度の勾配が存在することが判明した (図 7B). このことは網状液胞の不均一な膨張 (phase 3) に先行して, すでに phase 1 において細胞内で液胞構造の空間的な制御が行なわれていることを示唆する.

## 結論

顕微鏡画像をもとにした立体構造解析, 領域抽出の自動化, 形態や動きの定量化などを可能にする画像解析ソフトウェアの開発を行ない, 液胞構造についての総合的な解析を実現した. この解析で, 細胞分裂やミニプロトプラストの伸長生長ともなって, チューブ状・網状の液胞構造が時期特異的に展開することを明らかにした. チューブ状・網状の液胞構造は細胞分裂と細胞伸長における液胞の膨張過程の先駆けとして位置づけられる. また, 一細胞中で巨大液胞とチューブ状・網状液胞が互いにつながりつつ共存することや, 網状液胞の動く速度が細胞内での位置によって異なることから, 一つの細胞中で一つの液胞が空間的に分化していると考えられる. これらの結果は, 植物細胞の形の変化を実現するために不可欠な因子としての, 液胞構造とその分布の重要性を具体的に示すものである.