

学位論文題名

Study on intercellular movement of molecules through plasmodesmata at a cellular level using protonemata of *Physcomitrella patens*

(ヒメツリガネゴケ原糸体を用いた細胞レベルでの原形質連絡を介する分子の細胞間移動についての研究)

学位論文内容の要旨

細胞間コミュニケーションは多細胞生物における成長、発生、環境応答において必須であると考えられている。植物と動物は多細胞性を独立に進化させ、その中で効率的な細胞間コミュニケーションを実現するため、独自のメカニズムをそれぞれ発達させてきた。植物では、隣り合う細胞同士は細胞壁を貫通する原形質連絡 (plasmodesmata, PD) と呼ばれるトンネル状の構造体によって直接的に連結されている。この PD は水、イオン、代謝産物、タンパク質や核酸などの様々な低分子および高分子の細胞間輸送に機能しており、これは植物の成長、発生、環境応答の中で厳密に制御されている。

PD を介する分子の細胞間移動は、細胞壁における PD の密度や PD そのものの開口度によって制御されていることが知られている。特に PD の開口度は、PD の中を拡散によって移動できる分子の上限のサイズによって定義されるサイズ排除限界 (size exclusion limit, SEL) と呼ばれる指標によって評価される。PD の密度や SEL の動的な変化によって、PD を介する分子の細胞間移動は植物の発生の中で時空間的に制御されていることが知られている。このような PD を介する分子の細胞間移動の動的な制御は、植物の発生過程において「シンプラスティックフィールド」と呼ばれる細胞もしくは細胞群の確立に繋がるということが知られている。このシンプラスティックフィールドに含まれる細胞 (群) は、周囲の細胞群との細胞間コミュニケーションが制限され、周囲から隔離された状態に維持される。この隔離された細胞 (群) は周囲の細胞群とは独立した発生過程を経る。このように、PD を介する分子の細胞間移動の制御は植物の発生過程において細胞レベルもしくは組織レベルで重要な役割を果たしていると考えられている。

これまで、PD を介する分子の細胞間移動の制御は、蛍光色素や蛍光タンパク質の細胞間移動の観察を通して評価されてきた。なぜならば、これらのトレーサーは単純拡散によって PD 経由で細胞間を移動し、その移動度は PD を介する分子の細胞間移動の制御要因である PD の密度や SEL に依存するからである。しかしながら、このようなトレーサーの細胞間移動を、三次元的に構築された組織や器官において細胞レベルで解析することは技術的に難しい。なぜならば、まずトレーサーを組織や器官の内部にある任意の単一細胞のみに導入することが困難であり、またたとえ単一細胞にうまくトレーサーを導入できたとしても、それらの三次元的な細胞間移動を正確に追跡することもまた困難だからである。このような問題点から、個々の細胞の状態などに応じて PD を介する分子の移動がいつどのように制御されるのかといった知見はあまり得られていない。

従って、本研究において私はモデルコケ植物であるヒメツリガネゴケの原糸体と呼ばれる組織を用いて、PD を介する分子の細胞間移動を細胞レベルで解析するための新しい実験系を提案した。原糸体は個々の細胞が一行に並んだ糸状組織である。糸状組織では一次元的で単純な細胞間コミュニケーションを観察でき、また個々の細胞が露出しているため任意の単一細胞のみにトレーサーを導入することが容易である。さらに、コケの原糸体では、PD の微細構造が電子顕微鏡によって観察されており、その構造は種子植物の PD と類似することが示

されている。これらのことから、原糸体は PD を介する分子の細胞間移動を細胞レベルで解析するうえで有用な材料であると考えられる。加えて、原糸体は頂端細胞の連続的な細胞分裂によって伸長を続け、頂端の若い細胞は原糸体の基部に向かって順次分化していく。そのため、原糸体では細胞の分化状態の変化も細胞レベルで観察することができ、個々の細胞の状態に応じた PD を介する分子の細胞間移動の制御についても調べることができる。

さらに私は、原糸体において PD を介する分子の細胞間移動を細胞レベルで研究するために、光変換型蛍光タンパク質 Dendra2 を構成的に発現するヒメツリガネゴケの形質転換体を作出した。Dendra2 は元々緑色の蛍光を持つ蛍光タンパク質であるが、紫外光の照射によってその蛍光の色を緑色から赤色に変換させることができる。この Dendra2 を構成的に発現する形質転換体の原糸体において、私は任意の単一細胞に紫外光を照射し、その細胞に存在する Dendra2 のみを赤色に光変換し、この赤色に変換された Dendra2 がその隣の原糸体細胞へ移動していく様子をタイムラプスイメージングによって捉えることに成功した。私はさらに Dendra2 の細胞間移動を定量的に評価するために、紫外光を照射した細胞とその周囲の細胞の蛍光強度の経時変化をそれぞれ定量し、Dendra2 の細胞間移動のカイネティクスを得た。私はこのような Dendra2 の細胞間移動に関する定量的な解析手法を用い、まず初めに原糸体において PD を介する分子の細胞間移動の方向性について調査した。その結果、より分化が進んだ原糸体の基部において Dendra2 は光変換された細胞から基部方向というよりはむしろ頂端方向へ移動しやすいことを見出した。また、この頂端方向へ向かう分子の細胞間移動は原糸体の成長を停止させることで見られなくなることがわかった。これらの結果は、原糸体ではその成長に応じて分子を頂端方向へ方向性を持って輸送する仕組みが存在することを示唆している。

次に私は、原糸体の細胞の位置に応じて PD を介する分子の細胞間移動が制御されているのかどうか、されているのならばどのように制御されているのかという問題を調査した。私は、Dendra2 の細胞間移動が単純拡散によって起こっていると仮定し、Dendra2 の細胞間移動に関する数学的モデルを確立し、これを実際の観察から得られた Dendra2 の細胞間移動のカイネティクスとフィットさせることによって、Dendra2 の細胞間移動の速度定数を算出した。この速度定数を原糸体の細胞の位置に応じて算出し比較した結果、Dendra2 の細胞間移動の速度定数が原糸体の頂端から基部に向かって上昇していることがわかった。さらに私は、この Dendra2 の細胞間移動の速度定数が原糸体の基部に向かって上昇することの原因を調べるために、電子顕微鏡を用いて Dendra2 の移動経路であると考えられる PD の密度と構造を観察し、原糸体の頂端と基部でそれらを比較した。その結果、PD の密度は原糸体の頂端と基部の間で大きく変わらないのに対し、PD の孔のサイズが頂端より基部で有意に大きいことを見出した。これらの結果は、原糸体では細胞の位置に応じて PD の孔のサイズを変化させることにより PD を介する分子の細胞間移動を制御する仕組みが存在することを示唆している。

本研究では以上の研究結果から、原糸体では分子のサイズや細胞の位置に応じて PD を介する分子の細胞間移動を制御する仕組みが存在し、それが原糸体のような糸状組織における細胞の成長や分化において重要な役割を果たしている可能性を示唆することができた。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	藤 田 知 道
副 査	教 授	山 本 興太郎
副 査	教 授	山 口 淳 二

学 位 論 文 題 名

Study on intercellular movement of molecules through plasmodesmata at a cellular level using protonemata of *Physcomitrella patens*

(ヒメツリガネゴケ原系体を用いた細胞レベルでの原形質連絡を介する分子の細胞
間移動についての研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

細胞間コミュニケーションは多細胞生物における成長、発生、環境応答において必須であると考えられている。植物では隣り合う細胞同士のコミュニケーションは、細胞壁を貫通する原形質連絡 (plasmodesmata, PD) と呼ばれる構造体によって直接的になされている。この PD は水、イオン、代謝産物、タンパク質や核酸などの様々な分子の細胞間輸送に機能しており、厳密に制御されていない。

これまで、PD を介する分子の細胞間移動の拡散制御は、蛍光色素や蛍光タンパク質の細胞間移動の観察を通して評価されてきた。しかしながら、このようなトレーサーの細胞間移動を、三次元的に構築された組織や器官において細胞レベルで解析することは技術的に難しい。トレーサーを組織や器官の内部の任意の単一細胞のみに導入することは困難であり、またたとえ単一細胞にトレーサーをうまく導入できたとしても、それらの三次元的な細胞間移動を正確に追跡することは容易ではない。このような問題点から、個々の細胞の状態などに応じて分子の拡散移動が PD を介していつどのように制御されるのかといった知見はほとんど得られていない。

本論文では、モデルコケ植物ヒメツリガネゴケの原系体に着目し、PD を介する分子の拡散による細胞間移動を細胞レベルで解析するための新しい実験系を提案している。原系体は個々の細胞が一行に並んだ糸状組織であり、このような糸状組織では一次元的で単純な細胞間コミュニケーションを観察でき、また個々の細胞が露出しているため任意の単一細胞のみにトレーサーを導入することが容易である。さらに原系体は頂端側の細胞群が増殖活性が高く、基部に向かって順次分化していく。そのため、原系体では細胞の分化状態の変化も細胞レベルで観察でき、個々の細胞の分化状態に応じた PD を介する分子の細胞間移動の違いについても調べることができる。

さらに本論文では、PD を介する分子の拡散移動を研究するために、光変換型蛍光タンパク質 Dendra2 を構成的に発現するヒメツリガネゴケ形質転換体を作出し利用している。Dendra2 は元々緑色の蛍光を持つ蛍光タンパク質であるが、紫外光の照射によりその蛍光色を緑色から赤色に変換させることができる。この Dendra2 形質転換体の原系体において、任意の単一細胞に紫外光を照射し、Dendra2 を赤色に変換し、この赤色に変換された Dendra2 が隣接する細胞へ移動していく様子をライブセルイメージングによって捉えることに成功した。このような実験系を用いることにより、原系体において Dendra2 は、光変換された細胞から頂端方向へ移動しやすいことを見出した。またこの頂端方向へ向かう Dendra2 の細胞間移動は原系体の成長を停止させることで見られなくなることを明らかにした。これらの結果は、原系体ではその成長に応じて分子を頂端方向へ方向性を持って輸送する仕組みが存在することを示唆していた。

次に、原系体の細胞の位置に応じて分子の細胞間移動が制御されているのかどうか、またされてい

るならばどのように制御されているのかという問題に挑み、Dendra2 の細胞間移動を定量解析できる数理モデルを考案し、それを用いて Dendra2 の拡散速度定数が原糸体の頂端から基部に向かって上昇していることを見出した。さらにこの原因を調べるため、電子顕微鏡を用いて PD の密度と構造を原糸体の異なる位置の細胞間で比較したところ、PD の密度は原糸体の頂端と基部の間でほぼ一定であったのに対し、PD の孔のサイズが頂端より基部で有意に大きいことを見出した。これらの結果は、原糸体では細胞の位置に応じて PD の孔のサイズを変化させることにより PD を介する分子の細胞間移動を制御する仕組みが存在することを示唆していた。

以上の結果等により、著者は、原糸体では分子のサイズや細胞の位置に応じて PD を介する分子の細胞間移動を制御する仕組みが存在し、それが原糸体のような糸状組織における細胞の成長や分化において重要な役割を果たしているという新しい成長と物質輸送のモデルの提唱に成功している。このように細胞間コミュニケーションと細胞の運命制御が被子植物のみならずコケ植物でも共通に重要な役割を果たしている可能性を見出し、今後それらを制御するメカニズムを陸上植物においていち早く明らかにできる可能性を拓き、また陸上植物におけるこのような制御メカニズムの共通性や多様性を明らかにできる手懸りを与える研究として、本論文は重要な貢献を果たしたものと評価できる。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。