

分裂酵母におけるアクチン細胞骨格の超微構造学的解析

物質・生物機能科学専攻 博士課程後期3年
高木 智子 (指導教員 大隅正子)

分裂酵母のアクチン細胞骨格及びアクチン関連タンパク質に関する研究の多くは分子生物学的に行われ、細胞形態の保持、物質の輸送・分泌など、細胞活動において重要な役割を担うことが示唆されてきた。一方、形態学的研究において蛍光顕微鏡 (FM) 解析により、F-アクチンがパッチ、ケーブル、リングの構造を示すことが知られているが、その微細構造の解析は進んでいない。細胞壁の形成過程の研究から、アクチン細胞骨格は細胞壁の形成に重要な役割を果たしていることが示唆されてきた。本研究は、アクチン細胞骨格の微細構造について、透過電子顕微鏡 (TEM) 法及び免疫電子顕微鏡法 (IEM) により解析した。さらに、細胞壁形成におけるアクチン細胞骨格の関与について、FM 法、超薄連続切片法および三次元構築法を用いて解析した。

まず、加圧凍結置換固定法を用いて、分裂酵母の栄養増殖細胞の微細構造を解析した。IEM による解析から、細胞の成長端や隔壁形成部位 (細胞質分裂部位) に局在するフィラソームと不定形な繊維状構造体が、アクチン細胞骨格から構成されることを明らかにした。細胞質に存在する 8-10 nm Φ の微細繊維からなる短い繊維束も、アクチン細胞骨格である可能性を示した。これら 3 種の微細構造は、その大きさから FM 法で観察されている F-アクチンパッチに相当すると考えられる。また、細胞の長軸方向にそって、8-10 nm Φ の微細繊維からなる約 1.2 μ m の長さの繊維束が認められ、FM 法で見られている F-アクチンケーブルに相当することを明らかにした。さらに、細胞質分裂部位において、細胞膜の落ち込み (陥入、分裂溝) に存在する 8-10 nm Φ の微細繊維束がアクチン細胞骨格から構成されることが確認でき、F-アクチンリング (収縮環) であることが判明した (教育研究施設の概要と研究報告, 電子顕微鏡施設, p.129 参照)。

以上の結果から、F-アクチンパッチが少なくとも 3 種類の微細構造を持つことに注目し、なかでも、細胞壁が形成される細胞の成長端や細胞分裂部位に存在するフィラソームの細胞壁再生過程における局在について解析した。RuO₄ 固定法を用いた TEM 解析から、再生プロトプラストではフィラソームが多数認められた (図 1)。連続切片法による微細構造の解析から、フィラソームは中心に microvesicle を含む球形の構造であることが明確となった (図 1b 挿入図)。三次元構築法による解析から、再生プロトプラストのフィラソーム数は、栄養増殖細胞に比べて 2 倍に増加し、細胞壁の再生する側に多数局在することが判明した (図 2)。また、再生時間の経過と共に細胞内部から、細胞膜直下に局在するフィラソームが増加し、細胞内部では球形であったフィラソームが細胞膜の直下では半球形に変化し、中心にあった microvesicle が細胞膜に融合することを明らかにした (図 3)。さらに、アクチン細胞骨格の変異株 (*cps8*) を用いた細胞壁再生過程の FM 像は、F-アクチンパッチの異常な局在パターンを示した。TEM 解析により、この変異株においては、グルカンネットワークの密度が粗になり、野生株で観察される幅広のリボン状構造が認められなかった。以上の結果から、F-アクチンパッチであるフィラソームは、細胞壁物質またはグルカン合成酵素などの細胞壁に関連するタンパク質の輸送に関与していることが強く示唆された。

次に、フィラソームが輸送していると推察される細胞壁物質の構築の動態を解明するため、各種グルカン抗体を用いて、細胞壁再生過程を IEM により解析した。細胞壁の約半量を占める β -1,3-グルカンに対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、グルカンネットワークの初期の段階である不定形の粒子状構造や、これが引き伸ばされてできる細い繊維、さらによじれ合って連結したりボン状構造に沿うように β -1,3-グルカンを示す金粒子が確認された (図 4a)。また、細胞壁の約 3 割を占める α -1,3-グルカンの抗体を用いて免疫染色した場合、 α -1,3-グルカンを示す金粒子は、初期繊維がよじれ合う部位に局在した (図 4b)。細胞壁

の約2%を占める β -1,6-グルカンは、 β -1,3-グルカンや α -1,3-グルカン抗体の標識に比べて少量ではあったが、グルカン繊維がよじれ合う部位や分岐している部位に検出された(図4c)。以上の解析により、3種のグルカンは、よじれ合いながら三次元的に構築されることが推察され、その出現のタイミングの違いにより、標識の検出量に違いが生じることが判明した。

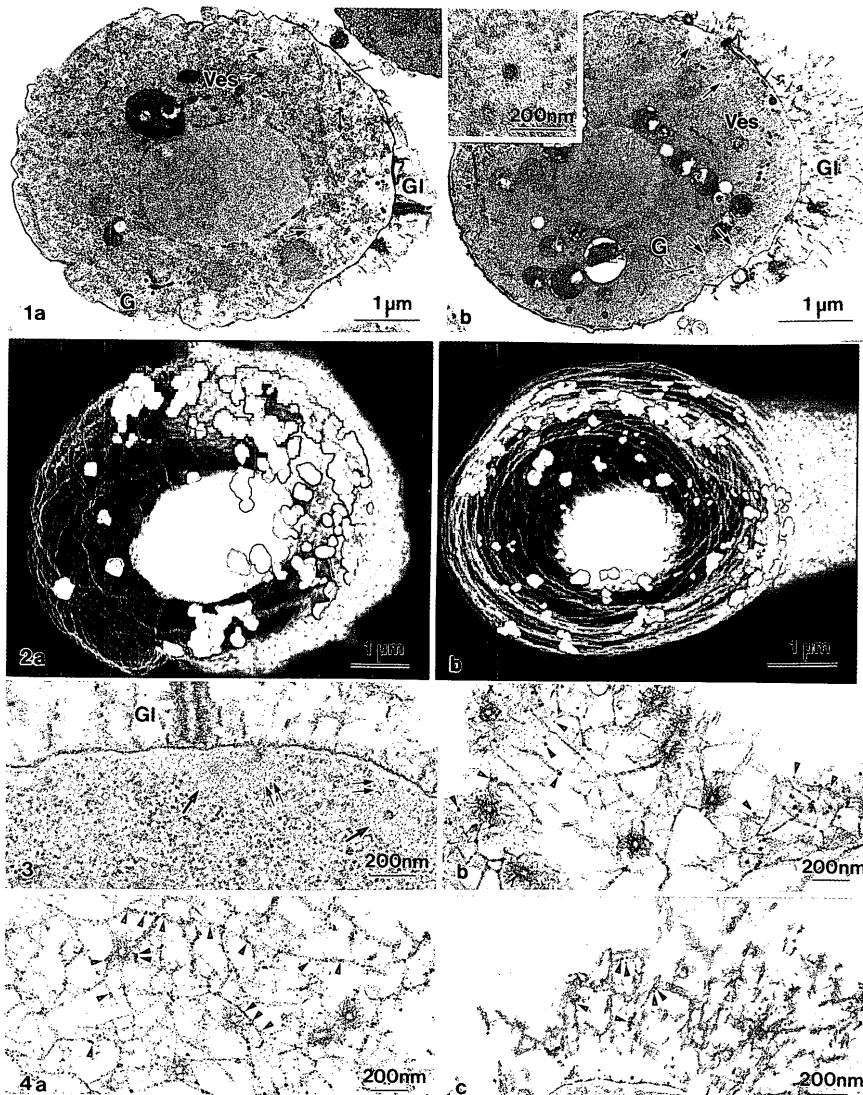


図1. 再生1.5時間目 (a) と再生3時間目 (b) のTEM像。グルカンネットワーク (Gl) が細胞の片側から新生している。細胞内部では、ゴルジ体 (G)、小胞 (Ves) などのオルガネラと共にフィラソーム (←、挿入図) が認められた。
 図2. 再生1.5時間目 (a) と再生3時間目 (b) の細胞の三次元構築像。白色、細胞膜;青色、グルカンネットワーク;水色、核;オレンジ色、細胞内部に局在するフィラソーム;黄色、細胞膜に接触しているフィラソーム。フィラソームが、グルカンネットワークの新生している側に局在している。
 図3. グルカンネットワークが新生している部位のTEM像。細胞内部のフィラソームは球形 (←) を示し、細胞膜直下のフィラソームは半球形 (⇐) を示した。
 図4. 再生3時間目の細胞の抗直鎖 β -1,3-グルカン抗体 (a)、抗低分子量 α -1,3-グルカン抗体 (b)、抗高分岐 β -1,6-グルカン抗体 (c) によるIEM像。◀, 金粒子。

博士論文の一部は Osumi, M., Sato, M., Ishijima, S.A., Konomi, M., Takagi, T. and Yaguchi, H. (1998) Dynamics of cell wall formation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Fung. Genet. Biol.* **29**: 207-233. および Takagi, T., Ishijima, S.A., Ochi, H. and Osumi, M. (2003) Ultrastructure and behavior of actin cytoskeleton during cel wall formation in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Electron. Microsc.* **52**: in press. にそれぞれ公表した。