

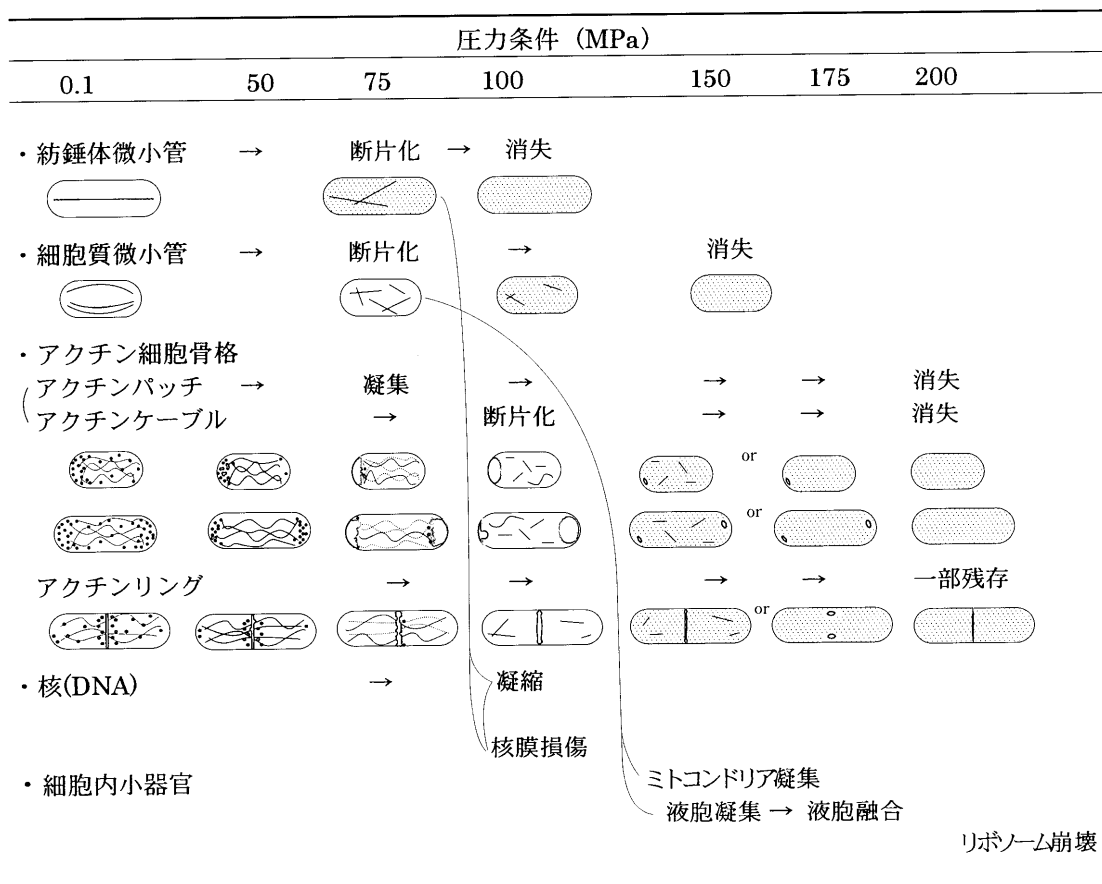
酵母細胞の高圧ストレス応答に関する微細構造学的研究

研究協力課（電子顕微鏡施設）

佐 藤 眞美子

高圧ストレスを受けると細胞は死滅するが、その過程で様々な応答する。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、高圧ストレス応答として、呼吸欠損変異株や高次倍数体の誘導、核膜やオルガネラの膜系の損傷や崩壊、それに伴う細胞内成分の漏出、などの現象が現れるが、それらの全容の解明には至っていない。本研究では、酵母細胞を用いて、高圧ストレスに対する細胞の微細構造の影響を解明するために、細胞骨格を中心にして、蛍光顕微鏡法と急速凍結超薄切片法および加圧凍結置換固定法を用いて透過電子顕微鏡による解析を行った。なお、試験菌として3種類の酵母細胞と1種類の変異株を使用した。

出芽酵母 *S. cerevisiae* に対する高圧ストレスの影響は、100 MPa (1,000 気圧) から始まり、300 MPa 以上ではほとんどの細胞が死滅する。100 MPa で核膜に損傷が生じ、圧力の上昇とともに、オルガネラの損傷が進み、400 MPa では膜系オルガネラは崩壊する。さらに200 MPa のストレスで高頻度に倍数化細胞が出現する。本研究において蛍光顕微鏡観察と凍結超薄切片の免疫電子顕微鏡法による観察結果から、高圧ストレスによる核膜の損傷と微小管の変化、SPBの消失は、核分裂機構の損傷や崩壊を意味し、細胞周期の正常な進行を阻害し、倍数体の形成を引き起こす可能性があることが強く示唆された。また、200 MPa 以下では、微小管はアクチン細胞骨格と共に、回復能を有することが明らかとなった。二形性酵母 *Candida tropicalis* におい

図 1. 酵母細胞 (*S. pombe*) の高圧ストレス応答

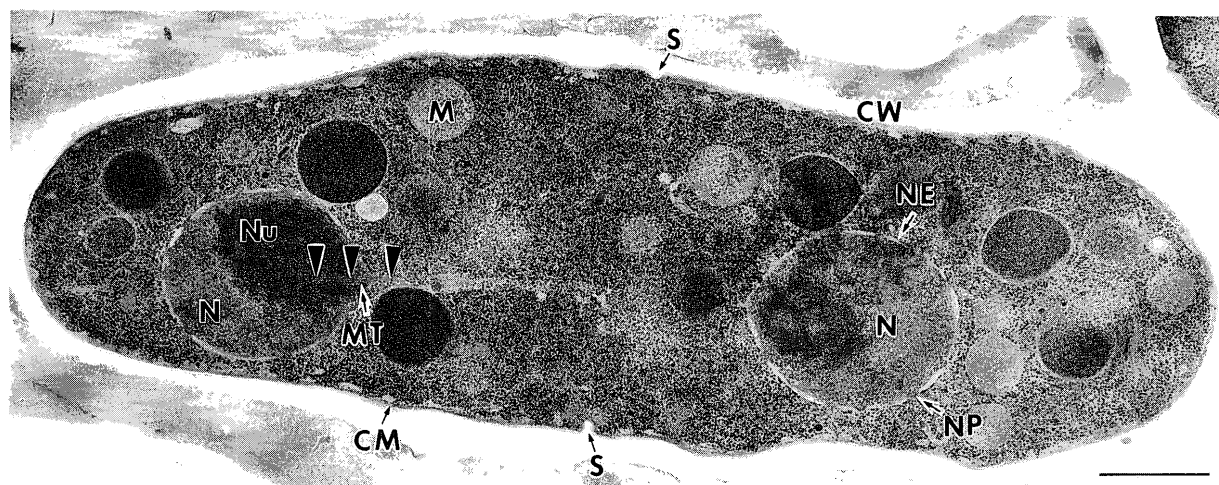


図2. 高圧ストレス解除後の *S. pombe* 細胞の加圧凍結置換固定法による透過電子顕微鏡像

150 MPaの高圧ストレス後22時間培養した細胞では、核膜、液胞、ミトコンドリアは、回復し、核は核小体とクロマチン領域の区別が明瞭になり、微小管 (◄) の回復も確認できた。CM, 細胞膜; CW, 細胞壁; MT, 微小管; N, 核; NE, 核膜; NP, 核膜孔; Nu, 核小体; S, 隔壁陥入部位; V, 液胞。Bar=1 μ m

てもほぼ同様の傾向がみられたが、倍数体の誘導は生じなかった。

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の野生株においては、微小管およびアクチン細胞骨格の高圧ストレスによる崩壊過程が、蛍光顕微鏡観察の結果から明らかとなった。すなわち紡錘体微小管は100 MPa、細胞質微小管は150 MPaで完全に消失し、紡錘体微小管は、細胞質微小管よりも圧力に対する感受性が高いことが判明した。アクチン細胞骨格においては、圧力の上昇に伴い損傷が生じ、圧力に対する感受性は、アクチンパッチ>アクチンケーブル>アクチンリングであることが明らかとなった。これらの細胞骨格の圧力に対する感受性の違いは、細胞骨格関連タンパク質あるいは結合タンパク質の違いによると推察された。高圧処理を施すと、*S. pombe* 細胞は100 MPaで核膜に損傷を生じ、圧力の上昇と共に膜系オルガネラも損傷し、250 MPaで崩壊した。150 MPa処理では、ミトコンドリアの凝集、液胞の凝集、融合が見られた(図1)。また、細胞質や核質、ミトコンドリア基質に高電子密度の部位が出現した。この事実は、高圧によるタンパク質の変性によると推測された。一方、100および150 MPaにおけるアクチン細胞骨格の微細構造の変化が、加圧凍結固定法を用いた電子顕微鏡観察によって初めて明らかになった(教育研究施設の概要と活動報告, 電子顕微鏡施設, p.130 参照)。高圧ストレスによる影響は、150 MPa以下では可逆的であることが判明した(図2)。すなわち微小管やアクチン細胞骨格が高圧ストレスによって脱重合するが、それらの損傷は修復させながら回復すると考えられる。*S. pombe* β -チューブリン低温感受性変異株 *nda3-KM311* 20°C培養のチューブリンが脱重合した細胞を用いた結果も、高圧ストレスに対するアクチン細胞骨格の感受性が、野生株の場合と同様であったことから、アクチン細胞骨格への高圧ストレスに対する影響は微小管とは関わりなく起こることが推察された。また、M期に同調化した細胞では、高圧ストレスによる倍数化細胞の出現率が上昇することが判明した。

以上、高圧ストレスの酵母細胞に対する影響は、種類に依らず共通であったが、感受性は異なると結論づけられた。

高圧ストレス解除後の細胞における、アクチン細胞骨格や微小管の回復過程と、細胞内小器官の微細構造や位置関係の回復過程をさらに追究することにより、細胞骨格と細胞内小器官の配置や移動との関係を明らかにできると考える。また、細胞骨格の関連タンパク質や結合タンパク質に対する高圧ストレス応答、細胞骨格のその他の微細構造や機能についての分子レベルの解析は、今後の重要な課題である。