

植物の液胞構造の多様性と可変性を観察することに成功 —分子を可視化する緑色蛍光タンパク質は諸刃の剣である—

タンパク質に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を組み入れて可視化する方法は生命科学に不可欠です。名古屋大学大学院生命農学研究科の瀬上紹嗣博士、前島正義教授らの研究グループは、GFP を植物の液胞膜プロトンポンプに組み入れると、GFP 分子同士が二量体を形成することにより膜を接着させる人為的な影響が生じ、バルブと呼ばれる液胞内構造が形成されることを見出しました。そして、二量体化しない GFP を組み入れることにより、生細胞での液胞の構造がダイナミックに変化する姿と、プロトンポンプが若い細胞、糖含量の高い細胞に多いという特徴を明らかにしました。

本研究成果は、2014年8月13日付、国際誌 The Plant Cell (プラントセル) のオンライン速報版に掲載されました。

植物の液胞構造の多様性と可変性を観察することに成功 —分子を可視化する緑色蛍光タンパク質は諸刃の剣である—

【ポイント】

- 植物細胞内にある液胞^{注1)}の膜で水素イオン能動輸送を司るタンパク質 H⁺ピロホスファターゼ^{注2)}に緑色蛍光タンパク質(GFP)^{注3)}を組入れることで分子と液胞膜の可視化に成功しました。
- 通常の GFP を利用すると、GFP が結合して二量体を形成するという特性による人為的な膜構造が生ずることを明らかにしました。
- 二量体化しない GFP を酵素に組入れて観察するとバルブは観察されず、液胞の中に板状、筒状の構造が生じ、相互に変換する姿をリアルタイムで観察することに成功しました。

【要旨】

タンパク質分子はそのままでは見ることはできませんが、ノーベル賞に輝く下村脩博士が発見したオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質(GFP)を、目的タンパク質に遺伝子工学的に結合させることで、目的分子が生物のどの組織に多いのか、細胞のどこに存在するのか、時間的にどのように変化するのかを、生きた生物を対象にして観察できるようになり、生命科学を飛躍させました。

名古屋大学大学院生命農学研究科の瀬上紹嗣博士、前島正義教授らの研究グループは、植物の液胞膜に存在し、液胞という大きな細胞内オルガネラの内部を酸性化するプロトンポンプ(水素イオン能動輸送体)に注目し、そのタンパク質分子の機能を維持したまま GFP と結合させることに成功し、プロトンポンプがどの細胞に多いかを明らかにするだけでなく、液胞の形状と動態を明らかにしました。

研究の過程で大事なポイントを発見しました。つまり、分子に GFP を連結させて可視化する方法は世界の研究者が応用していますが、天然の GFP は2つの分子が結合して二量体を形成する性質があり、そのため液胞の膜にある GFP が互いに結合して膜を接着し、多数の小さな球状構造(バルブ:電球の意)が形成されることを見出したのです。あるがままの細胞を解明するという点では、GFP が人為的な構造物を形成してしまうので、動植物微生物を問わず生命科学の実験上留意すべき特性といえます。

そこで瀬上博士らは、二量体化しない GFP をプロトンポンプに組入れることでバルブのない状態で観察し、細胞分裂後の若い細胞で小さな液胞が構造を変化させている姿、具体的には、液胞の中の板状、筒状、あるいは小胞状構造が相互に変換するダイナミックな姿を捉えることに成功しました。これまでは電子顕微鏡による観察から液胞の構造が議論されてきましたが、生きた植物でのリアルタイム観察により、液胞形態の変動を理解できるようになりました。加えて、このプロトンポンプが若い細胞と糖含量の高い細胞に多いことを見出しました。

【背景】

植物細胞は動物細胞に比べて数十から千倍の容積をもちますが、成熟細胞の容積の90%以上は液胞と呼ばれる細胞小器官(オルガネラ)が占めています。この液胞の中は、液胞膜の2種の水素イオン輸送ポンプ(プロトンポンプ)の機能によって酸性になっています。H⁺-ATPase と H⁺-ピロ

ホスファターゼの機能上の役割分担を明らかにするため、特に H⁺-ピロホスファターゼがどの細胞に多く存在し、機能しているのかの情報が求められていました。また、分裂後の若い小さな細胞が 100 倍以上に増大する過程で、液胞がどのように形状を変化させていくのかも解明が必要でした。すなわち、液胞の増大は植物の成長に欠かせないプロセスでもあります。

こうした背景の中で、H⁺-ピロホスファターゼを可視化して動態を明らかにするため、緑色蛍光タンパク質(GFP)と連結した分子を植物に導入しました。できる限り生理的な、あるがままの植物を観察することが重要ですので、GFP を連結しても酵素の機能を保持し、発現細胞の特徴も本来の状況を反映し、発現量も通常植物と同程度であることの条件を克服することが求められていました。こうした課題を克服したのですが、最後の壁は、GFP 自身が相互に連結して二量体を形成するという特性をもつという点でした。結果的には GFP が膜の接着を誘導するという人為的な現象を証明することとなり、この課題を克服するために、二量体を形成しない単量体型 GFP を酵素に連結して遺伝子導入して解析を進める必要がありました。

【成果の意義】

緑色蛍光タンパク質(GFP)を研究対象のタンパク質に組入れて、生物あるいは細胞に遺伝子導入して、分子の挙動を蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡で観察するという手法は、生命科学の基本研究手法の一つとなっています。試験管の中ではなく、生きた生物、細胞での可視化したタンパク質分子を解析することにより、時空間レベルでの大量情報を得ることができます。しかし、今回の実験により、GFP 自身が二量体を形成することで、細胞の中の構造を変化させてしまうことが明らかになりました。従来バルブ（緑色に光る電球という意味での命名）と呼ばれ、論文に記載されていた液胞内の小さな球状構造が、実際には GFP というラベルを膜タンパク質に付けていたために生じた人為的なものであることを証明しました。

この研究では、液胞の膜に存在し、液胞の中に水素イオン（プロトン）をエネルギーと使って能動的に組入れる H⁺-ピロホスファターゼを可視化の対象としています。GFP のアミノ酸配列の中で、分子同士が結合する部分のアミノ酸 1 残基のみを置換した単量体型 GFP を H⁺-ピロホスファターゼに組入れて、観察したところバルブは検出されないという結果も踏まえて、バルブが人工的な産物であるとの結論を導き出しました。これは、生物種を問わず世界のタンパク質可視化研究をしている科学者に伝えるべき内容であり、単量体型 GFP を使用することで問題を回避できることを示し GFP の価値をより確かなものにする貴重な成果でもあります。

そして、正しく観察した H⁺-ピロホスファターゼの存在様式や可視化した液胞の観察から、分裂後の小さな細胞では小さな液胞が多数存在し液胞膜の表面積を確保していること、細胞が成長するにしたがって液胞も融合して巨大化していくこと、そのプロセスでは液胞膜の陥入構造、平板構造、筒状構造が相互に変換していること、その変換がトランスバキュオラスとランドとして知られる構造の原型となっていることを明らかにしました。

【発表雑誌と著者】

国際誌 The Plant Cell（プラントセル） 2014 年 8 月 13 日付オンライン速報版に掲載

(doi: 10.1105/tpc.114.127571)

<http://www.plantcell.org/>

論文タイトル

Dynamics of Vacuoles and H⁺-Pyrophosphatase Visualized by Monomeric Green Fluorescent Protein in *Arabidopsis*: Artifactual Bulbs and Native Intravacuolar Spherical Structures

著者

Shoji Segami, Sachi Makino, Ai Miyake, Mariko Asaoka, and Masayoshi Maeshima

研究グループ

本研究は、瀬上紹嗣、牧野沙知、三宅愛、浅岡真理子、前島正義（いずれも名古屋大学農学部および生命農学研究科）の共同研究として実施されました。

発表者

瀬上 紹嗣（名古屋大学大学院生命農学研究科博士研究員）

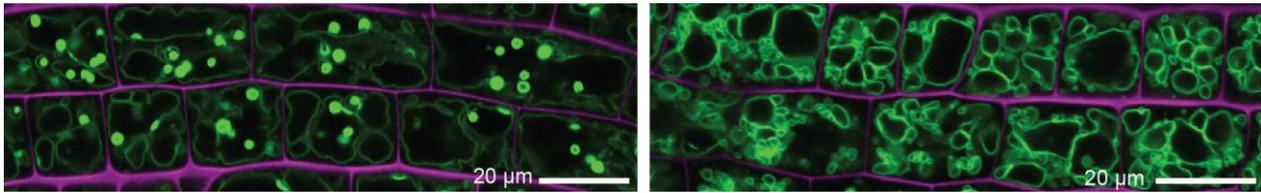
牧野 沙知（元名古屋大学農学部 学部学生）

三宅 愛（元名古屋大学大学院生命農学研究科博士課程前期課程 大学院学生）

浅岡 真理子（名古屋大学大学院生命農学研究科博士課程後期課程 大学院学生）

前島 正義（名古屋大学大学院生命農学研究科 教授）

【異なる GFP を使用して観察した細胞の比較】



(左) 二量体化する GFP を酵素（プロトンポンプ）に連結して観察

強い緑色がバルブ（電球の意）と呼ばれる構造。細胞壁を紫色に染めています。

(右) 単量体型 GFP をプロトンポンプに連結して観察

バルブは観察されません。複雑な液胞形態が見えます。細胞が成長するとこれらの小さな液胞が巨大化していきます。

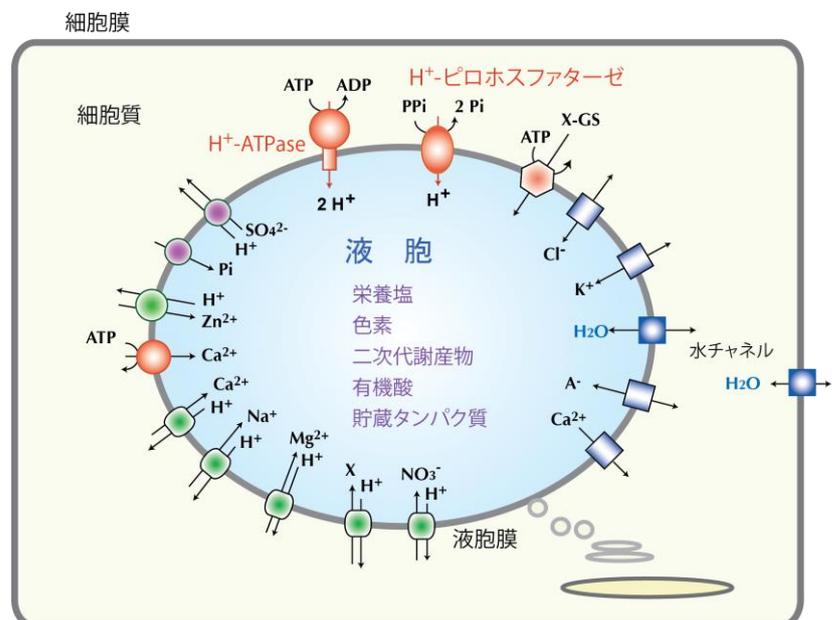
いずれもシロイヌナズナ芽生えの根を観察しています。

【用語解説】

注 1) 液胞

どの植物細胞にも存在し、成熟細胞の体積の 90%以上を占める巨大オルガネラです。液胞の中には、当面必要としない無機イオン、糖、貯蔵タンパク質、アントシアニン、植物にとっての防御物質などを集積しています。こうした物質集積は浸透圧を高め、細胞を成長させる駆動力ともなっています。果物の糖、花卉の色素、ダイズなどの貯蔵タンパク質なども液胞に蓄積していますので応用面でも重要なオルガネラです。液胞膜にはこうした成分を選択的に輸送する多様な輸送装置が組み込まれています（図 1 参照）。液胞の中には酸性条件で機能を発揮する加水分解酵素も多種類存在しています。

【図 1】 植物の液胞と膜輸送システムの模式図



注2) H⁺-ピロホスファターゼ

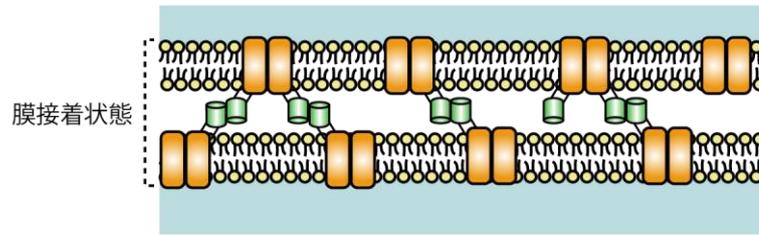
ピロリン酸と呼ばれる無機成分を加水分解して得られるエネルギーを利用して水素イオン（プロトン）を液胞の中に能動輸送し、液胞内の酸性度を維持しています。ピロリン酸は核酸、タンパク質、細胞壁などの高分子合成の過程で副産物として生じます。これを「燃えるごみ」としてエネルギー利用するのが H⁺-ピロホスファターゼです。液胞を酸性化することは、内部の多様な加水分解系酵素の機能発現に不可欠であり、さらに、液胞膜を介してプロトンの濃度勾配を維持するという意味もあります。液胞の中に集積しているプロトンが細胞質側に出る反応と、ナトリウムイオンなどを液胞の中に能動輸送する反応が共役しています。ですから耐塩性植物にとっても液胞が酸性であることは不可欠です。

注3) 緑色蛍光タンパク質(GFP)

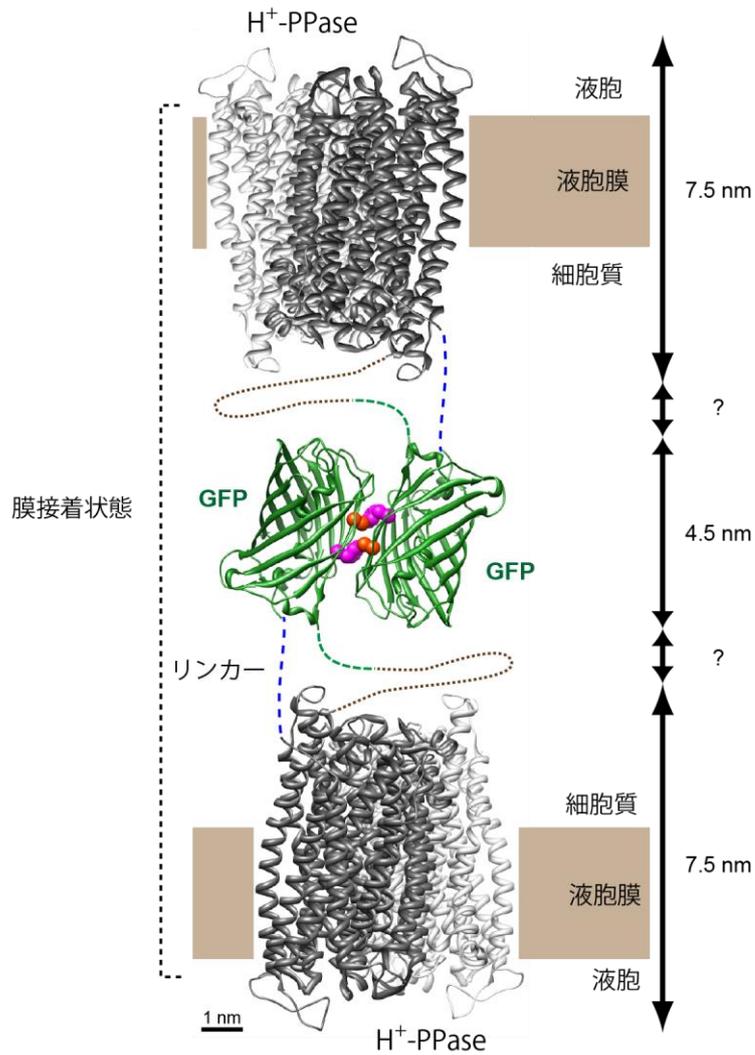
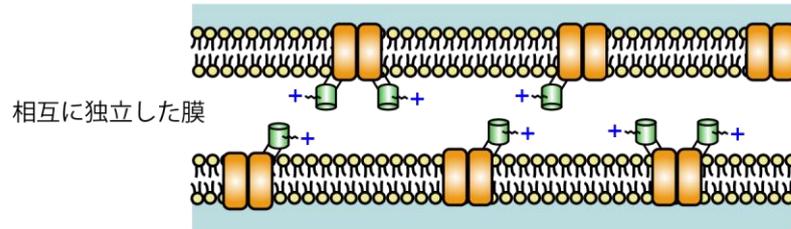
ノーベル賞に輝く下村脩博士がオワンクラゲで見出した緑色蛍光タンパク質です。アミノ酸 238 個からなる平均的なサイズのタンパク質ですが、特徴は励起光を照射すると緑色の蛍光を発する点にあります。決して小さな分子ではありませんので、この GFP を連結することで、目的タンパク質の機能が低下するケースが少なくありません。

図2は、二量体化した GFP が膜を接着させている状況を示す模式図です。GFP と酵素（プロトンポンプ, H⁺-PPase）は三次元分子構造を反映しています。

天然型 (二量体型) GFP を H^+ -PPase に組み入れた場合



単量体型 GFP を H^+ -PPase に組み入れた場合



【図 2】 H^+ -ピロホスファターゼに連結した GFP が二量体を形成して膜を接着している。