

# ゼニゴケ細胞生物学

恵良厚子・上田貴志  
東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻  
〒113-0033 文京区本郷 7-3-1

Cell biology in liverwort  
Key words: Cytoskeleton, Membrane traffic, Organelle, Rab5, VAMP727

Atsuko Era & Takashi Ueda  
Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo  
7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

## 1. 膜交通システム

真核生物の細胞内には様々なオルガネラが存在し、それぞれに固有のタンパク質が局在している。オルガネラが正常な機能を維持したり、その機能を細胞の内部環境や外部環境・刺激に応答して変化させるたりするためには、タンパク質が各オルガネラや他の目的地へと正確に輸送される必要がある。単膜系オルガネラ（小胞体、ゴルジ体、トランスゴルジネットワーク、エンドソーム、液胞、細胞膜、etc.）

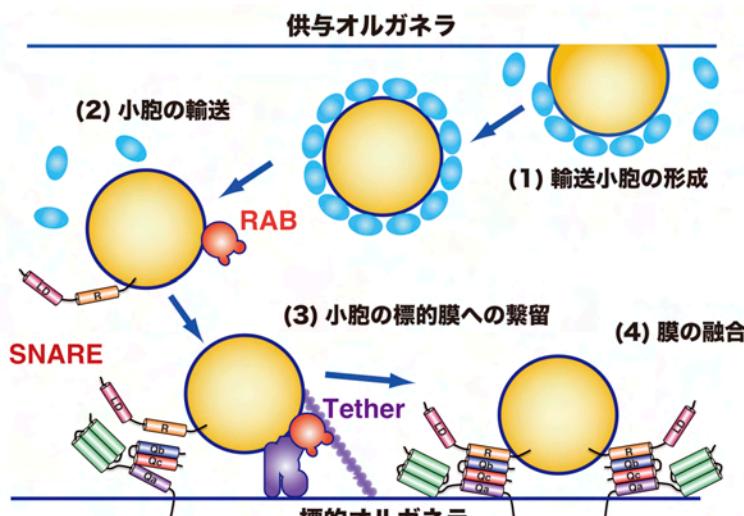


図1 膜交通の分子機構。

間において、その正確な輸送を担っているのが“膜交通”システムである。膜交通は、輸送小胞の出芽、輸送小胞の標的膜への繫留と、それに続く融合のステップが繰り返しこることにより成り立っており、出芽のステップでは被覆複合体、繫留・融合のステップでは Rab GTPase と SNARE タンパク質という、進化的に保存された分子が活躍する（図1）。異なる膜交通経路では異なる被覆複合体、Rab GTPase、SNARE タンパク質のセットがはたらいている。また、これらの分子は固有のオルガネラに局在することから、オルガネラのアイデンティティーを決定付けている分子であるとも言える。

かつて原核生物から真核生物が誕生し、現存の真核生物へと進化する過程で、細胞内の膜構造はその複雑さを増してきた。オルガネラの種類が増え、同時に輸送経路も多様化したはずである。膜交通経路網の全てで、被覆複合体、Rab GTPase、SNARE の三点セットが機能していることから、膜交通の多様化には、これら三点セットをコードしている遺伝子の重複と、それに続く変異の蓄積による機

能の多様化が必要であったことが示唆される。つまり、被覆複合体、Rab GTPase、SNARE の多様化は、膜交通経路の多様化とリンクしているのである（図 2）（Dacks & Field 2007）。

## 2. RAB5 グループの機能の多様化

Rab GTPase は、輸送小胞を標的膜に繋留するステップを調節する分子スイッチである。その中の Rab5 グループは、一部の例外を除き真核生物に広く保存されており、エンドソームにおいて機能している。動物においては、Rab5 が様々なエンドソーム機能の調節を行っていることが知られている（Grosshans et al. 2006）。シロイヌナズナには、*RHA1*, *ARA7*, *ARA6* という 3 つの *Rab5* ホモログがある。*RHA1* と *ARA7* は、動物の Rab5 とよく似た構造を持つ、真核生物に保存されたタイプの RAB5（保存型 Rab5）である。一方 *ARA6* は、保存型 Rab5 とは逆にアミノ末端側に脂質修飾を受けるなど、非常に特徴的な構造を持っている。このタイプの RAB5 は陸上植物に広く保存されているが、動物や菌類を含む他の真核生物の系統には存在しないことから、*ARA6* グループは植物が進化の過程で独自に獲得した植物特異的な RAB5 であると考えられる（マラリア原虫を含むアピコンプレクサの一部には、*ARA6* とある程度の特徴を共有する RAB5 が存在するが、その由来は不明である）。さて、この *ARA6* は、一体どのような膜交通経路を制御しているのだろうか。シロイヌナズナにおいてその細胞内局在を観察してみると、保存型 RAB5 も *ARA6* も、多胞化したエンドソーム（multivesicular endosome: MVE）に局在していた。だが、両者の局在は完全には一致せず、一部重複しつつ異なるエンドソーム集団に局在していることが示された（このことから、エンドソームにも様々な種類があることが分かる）（Ueda et al. 2001）。この局在の違いから、保存型 RAB5 と *ARA6* が、異なる機能を有していることが示唆されていた。そして近年、保存型 RAB5 はエンドソームから液胞膜への、*ARA6* はエンドソームから細胞膜への輸送系路ではたらいていることが、ついに明らかとなった（Ebine et al. 2011）。では、この *ARA6* が局在しているエンドソームによって、細胞膜または細胞外へどのような物質が運ばれているのであろ

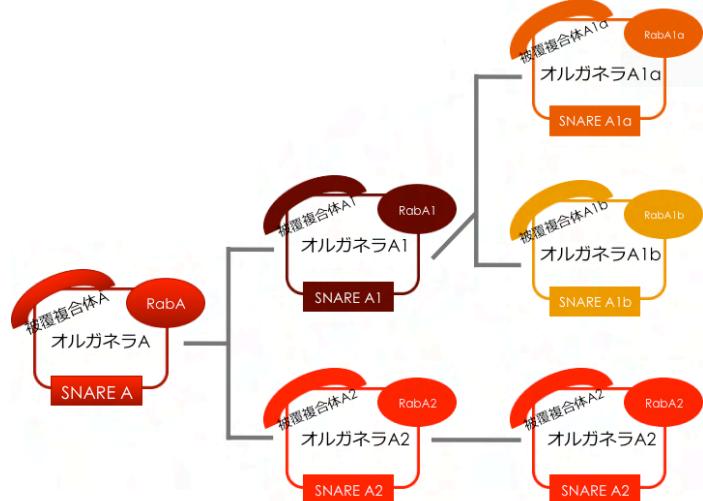


図 2 膜交通制御因子の遺伝子重複と膜交通経路の複雑化。  
(Dacks & Field 2007 より改変)

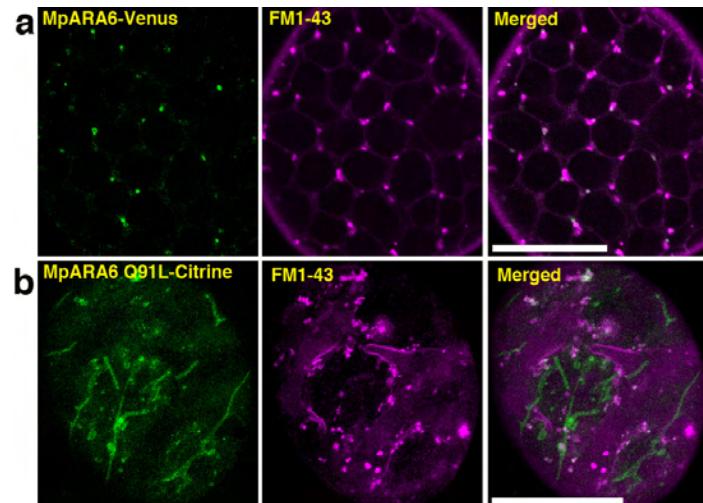


図 3 (a) *MpARA6* の細胞内局在。FM1-43 によりラベルされたエンドソームに局在している。(b) 恒常活性型 *MpARA6* の局在。FM1-43 によりラベルされた液胞膜とは異なる奇妙な膜区画（erasome）に局在している。恒常活性型 Rab は、自身の制御する膜交通経路の最終到達点に蓄積すると考えられている。Bars = 20 μm

A. Era & T. Ueda-2

うか。それは未だ ARA6 がいかなる高次機能の発現に関わるのかという問題とともに未解明であるが、ARA6 経路が少なくともいくつかのストレスに対する耐性に関わるという知見が得られつつある。

さて、前述の通り、この ARA6 タイプの RAB5 は、陸上植物に広く保存されている。陸上植物の基部に位置するゼニゴケも、このタイプの RAB5 を持っている (MpARA6)。では、MpARA6 もシロイヌナズナの ARA6 と同様エンドソームから細胞膜への輸送を制御しているのであろうか。MpARA6 の細胞内局在を調べたところ、やはりエンドソームに局在が認められた (図 3a)。では、MpARA6 はこのエンドソームとどのオルガネラの間での輸送を制御しているのであろうか? 現在までに得られている結果は、MpARA6 が液胞膜とも細胞膜とも異なる奇妙な膜区画 (erasome) への輸送に関わっていることを示唆している (図 3b)。この結果は、ゼニゴケにおいて植物特異的 RAB5 がシロイヌナズナとは異なる機能を有していることを示している。ゼニゴケは進化の過程で独自の膜交通経路を発達させ、世界中の日陰で繁栄する植物となつたのかもしれない。

### 3. 種子植物が持つ SNARE, VAMP727 の本当の起源は?

Rab GTPase のはたらきにより輸送小胞が標的膜に繫留された後、輸送小胞に局在する R-SNARE と標的膜に局在する Q-SNARE とが複合体を形成し、膜融合が起こる。この SNARE の中にも、植物固有のものがある。VAMP7 は R-SNARE の一種で、植物の VAMP7 は VAMP71 と VAMP72 の 2 グループから成り立っている。さらに種子植物には、VAMP72 のサブグループである VAMP727 が存在している。VAMP727 にはアミノ末端側の longin ドメインと呼ばれる領域に特徴的な酸性挿入配列を持っており、類似の R-SNARE は裸子植物以降に現れた植物に高度に保存されている。しかしながら、VAMP727 様の分子の存在は、ヒメツリガネゴケやイヌカタヒバでは確認されていない。このことから、この酸性配列の挿入は、陸上植物の進化の過程において、シダ植物が分岐した後に種子植物の共通祖先で起こったものと思われていた。しかし、ゼニゴケの EST 解析により、酸性挿入配列を有する MpVAMP727 がゼニゴケに存在することが明らかとなった。このことから、VAMP727 への酸性配列の挿入は、コケ植物の分岐以前に起こったこと、ヒメツリガネゴケやシダは二次的に VAMP727 型 VAMP72 を失ったことが示唆される。では MpVAMP727 と VAMP727 は似たような輸送経路で機能しているのか、それは今後の研究課題である。

### 4. ゼニゴケのアクチン纖維

植物細胞において、オルガネラの動きを制御しているのは主にアクチン纖維であるといわれている。また、細胞の形態形成、細胞分裂、先端成長など、アクチン纖維の関わる現象は多岐に渡り、アクチンの挙動が細胞の生命活動に与える影響は非常に大きい (Hasezawa & Kumagai 2002, Hussey et al. 2006, Tijs Ketelaar 2001)。我々は、Lifeact (Riedl et al. 2008) というプローブを用いて、ゼニゴケのアクチン纖維のライブイメージングを試みた (Era et al. 2009)。その結果、アクチン纖維束がその太さに応じて速度を変えつつ滑り運動している様子が観察された (図 4)。運動速度は、細いアクチン纖維ほど大きかった。同様のアクチン纖維の太さによる安定化は、*in vitro* 系やシロイヌナズナの胚軸細胞においても報告されている (Michelot et al. 2007, Staiger et al. 2009)。植物細胞において、アクチン纖維はミオシンに依存した波打ち運動をすることが報告されており、ゼニゴケでもこの波打ち運動が観察された。

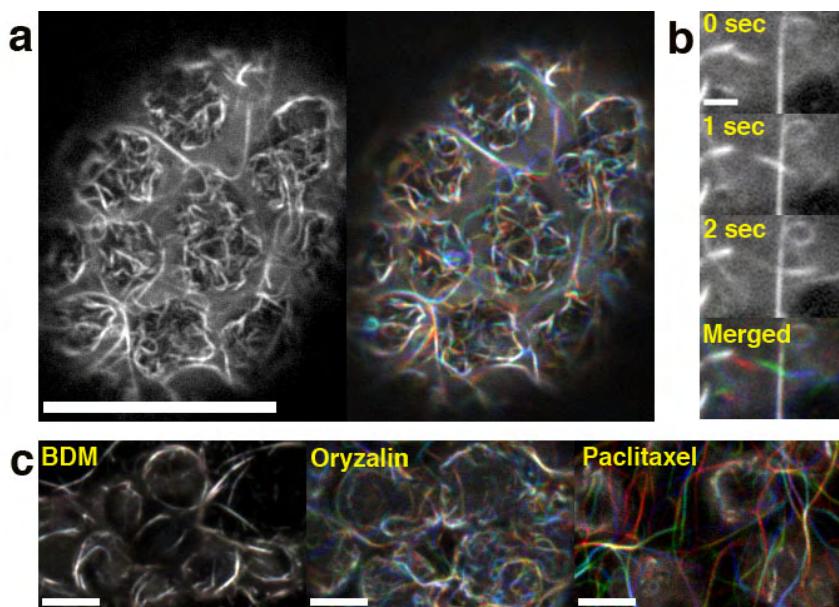


図4 (a) Lifeact-Venusにより可視化されたゼニゴケのアクチン繊維。右図は3秒おきに撮影した画像をそれぞれ赤、緑、青で表示し重ね合わせたもの。Bar = 20 μm。(b) アクチン繊維の滑り運動。Bar = 2 μm。(c) ミオシンATPase阻害剤(BDM), 微小管重合阻害剤(Oryzalin), 微小管安定化剤(Paclitaxel)処理後, 図a右図と同様に表示。Bar = 5 μm

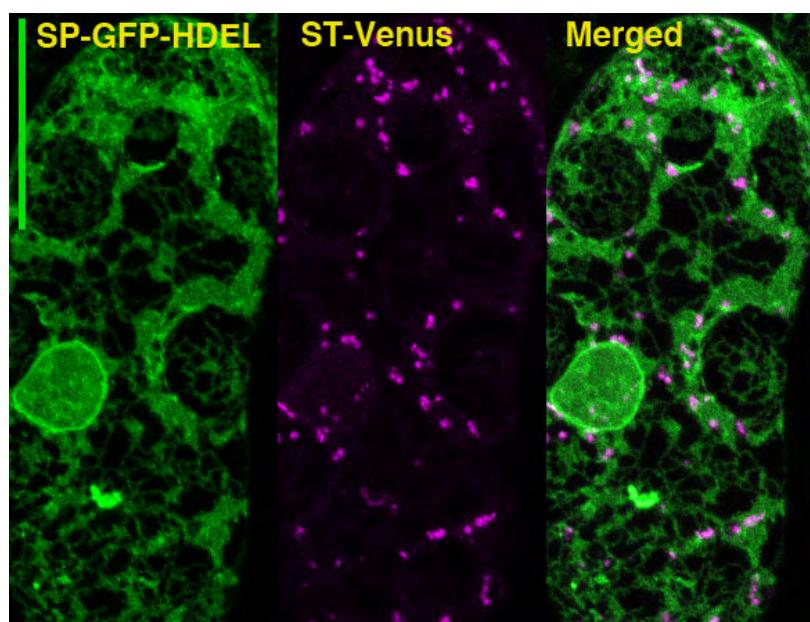
波打ち運動と同様, 滑り運動もまたミオシンに依存していること, また, 微小管を破壊, または安定化させても, 滑り運動が止まることはなく, むしろ運動速度が増すことも明らかとなった(Era et al. in press)。このゼニゴケユニークなアクチン繊維の挙動は, ゼニゴケが独自に発達させた細胞内活動制御システムなのかもしれない。

## 5. フォトギャラリー ~ゼニゴケオルガネラ~

我々は現在, 各種オルガネラマーカーを用い, ゼニゴケの様々なオルガネラを可視化することを試みている。なお観察は, 植継後5日目の長径約5 mmの葉状体全体をスライドグラスに乗せ, その表皮細胞を対象としている。その結果のいくつかを以下に紹介させて頂こう。

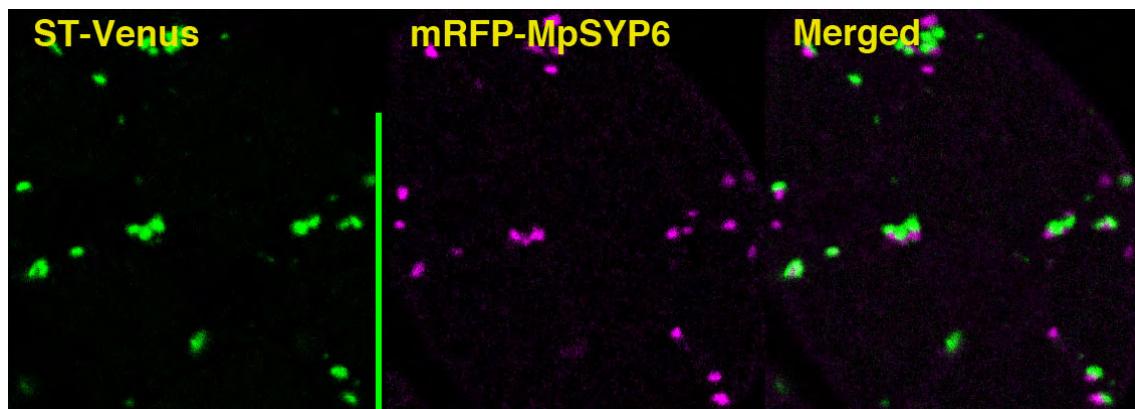
### 5-1. 小胞体とゴルジ体

小胞体の可視化には, 蛍光タンパク質にシグナルペプチドと小胞体局在シグナルを付与したもの(SP-GFP-HDEL)を用いた。小胞体は, 他の動植物同様にシート状構造と網目状構造で構成されている。また, 核膜らしき構造も観察された。小胞体全体が流れるように動いており, 絶えずその模様は変化していた。ゴルジ体を sialyl transferase(ST)を用いて可視化したところ, ドット状の構造が小胞体近傍に観察された。Bar = 20 μm

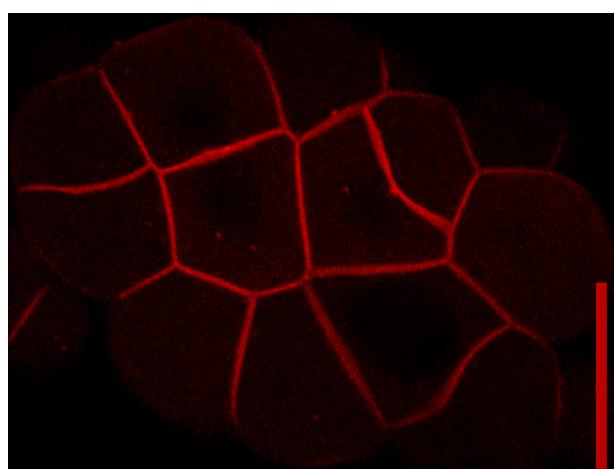


## 5-2. ゴルジ体とトランスゴルジネットワーク (TGN)

TGN の可視化には、シロイヌナズナにおいて TGN に局在することが知られている Q-SNARE, SYP61 の配列をもとにゼニゴケの EST を検索し、得られた MpSYP6 に蛍光タンパク質を融合させたものを用いた。ST により可視化されたゴルジ体と、TGN であると期待される MpSYP6 コンパートメントは、隣接しつつ相互作用するような動きを見せた。Bar = 20 μm



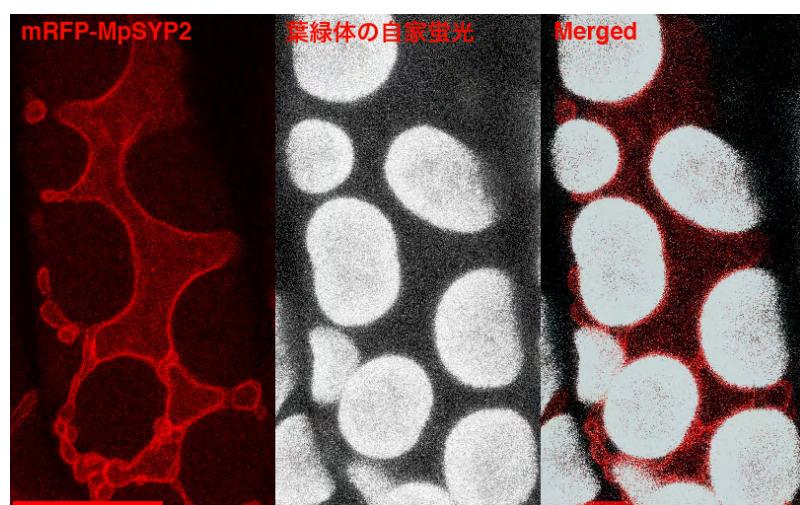
## 5-3. 細胞膜



シロイヌナズナにおいて細胞膜に局在することが知られている、Q-SNARE, SYP11, SYP12, SYP13 の配列をもとにゼニゴケの EST を検索し、得られた MpSYP1 に蛍光タンパク質を融合させ、ゼニゴケの細胞膜を可視化した。Bar = 20 μm

## 5-4. 液胞膜

シロイヌナズナにおいて液胞膜に局在することが知られている Q-SNARE, SYP2 の配列をもとに、ゼニゴケの EST を検索し、得られた MpSYP2 に蛍光タンパク質を融合させ、ゼニゴケの液胞膜を可視化した。ゼニゴケの液胞は葉緑体のごく近傍まで細胞いっぱいに広がっている。液



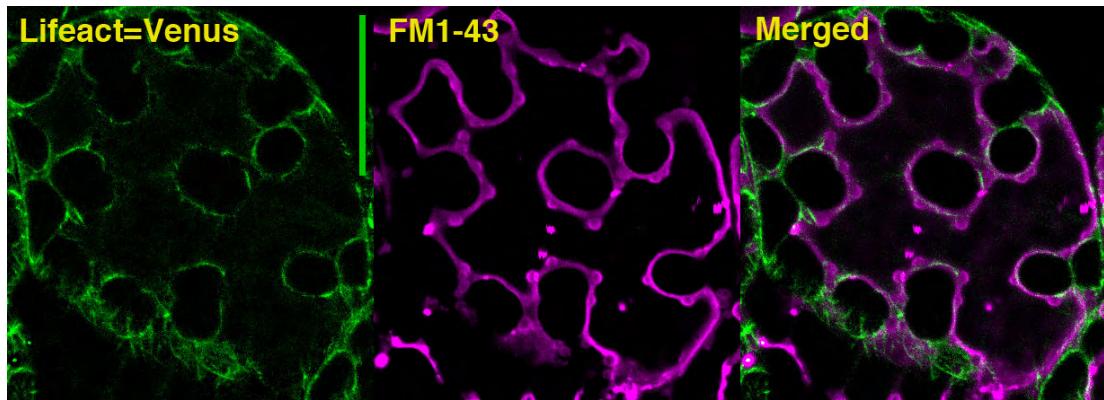
A. Era & T. Ueda-5

胞を貫く原形質糸は観察されない。また、細胞表層付近の液胞膜は非常に複雑な形状を有している。

Bar = 20 μm

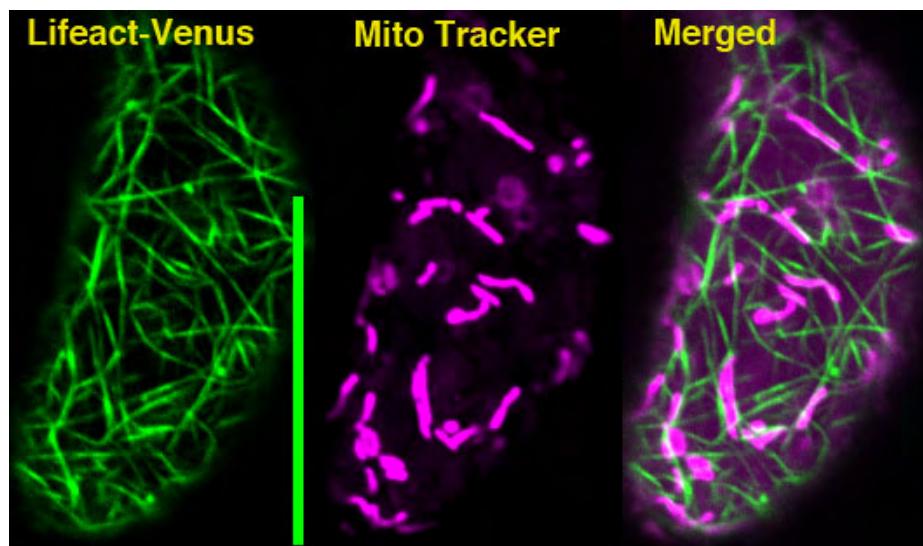
### 5-5. アクチン纖維と液胞膜

先の Lifeact によりアクチン纖維が可視化された細胞において、FM1-43 というエンドサイトーシスの追跡試薬による液胞膜を染色した。液胞膜、細胞膜、葉緑体の間の狭い空間にアクチン纖維が張り巡らされている様子が分かる。Bar = 20 μm



### 5-6. アクチン纖維とミトコンドリア

先の Lifeact によりアクチン纖維が可視化された細胞に対して、Mito Tracker によるミトコンドリアの染色を行った。アクチン纖維に沿った配向を示すミトコンドリアが多数観察された。Bar = 20 μm



## 6. 雜感 -ゼニゴケ細胞生物学の今後-

園芸家達からの嫌われ者、ゼニゴケ。我々の研究室においても、シロイヌナズナの鉢にいつの間にかゼニゴケが生えている…なんてこともある。邪魔だ邪魔だと取り除く際に、間違ってシロイヌナズナの方を抜いてしまうような輩は流石にいない。形態があまりにも異なっているからだ。生物の形態とはつまり、生物の基本単位である細胞が積み重なって目に見えている形である。故に細胞が同じでも積み重なり方が異なるれば、形態も異なってくる訳である。しかし実際には形態の異なる別種の生物では、その細胞の様子までも異なっているものだ。個体をつくる細胞をさらに形造る遺伝子情報が異

なるのだから、それは当然なのだが。原核細胞と真核細胞の違いや、動物細胞と植物細胞の違い、あるいは共通点は誰もが知るところだろう。ではゼニゴケとシロイヌナズナの細胞の違いは?4 億年以上前に存在した共通祖先から、両者にはどのような多様性が生まれていったのだろうか。そしてその多様性は何に起因し、どのような個体レベルの多様性へと繋がっていくのか。また、藻類とゼニゴケの細胞との違いは?ゼニゴケ細胞のどういった特徴が植物の陸上化に有利にはたらいたのか。ゼニゴケという進化的に興味深い生物を用いた細胞生物学の究極目標とは、つまるところそういう問題を解き明かすことであると思っている。

細胞生物学の基本は細胞を観ることである。我々はゼニゴケ細胞のオルガネラや細胞骨格を蛍光タンパク質により可視化して観察を行っている。ゼニゴケも植物であるから、当然ながら植物細胞の持つべきオルガネラを全て備えている。小胞体やゴルジ体、TGNなどのオルガネラは、シロイヌナズナのそれらと概ね同様の形態をとっているようである。今現在までの我々の観察により判明したゼニゴケ細胞の最大の特徴は、細胞いっぱいに広がった液胞膜により狭められた空間を、非常にユニークな動きで駆け回るアクチン纖維だろう。こういった特徴は未だ記述の範囲を脱していないが、このアクチン纖維の動きの役割を今後は知りたいものである。

先に述べたように、オルガネラのアイデンティティーは膜交通に関わる分子で決まる。ゆえに生物の遺伝子を調べ、或る一群の生物だけが持つ膜交通制御分子を見つけたとしたら、その生物群に特徴的な膜交通経路やオルガネラ機能があるだろうと予測できる訳である。我々は陸上植物に広く保存されている ARA6 型 RAB5 の機能をシロイヌナズナとゼニゴケで調べ、陸上植物特異的な膜交通経路を発見できるのではないかと考えた。しかし、どうもゼニゴケの ARA6 型 RAB5 はシロイヌナズナ ARA6 とは異なる経路ではたらいているようである。こうも広く保存されている RAB なので、何か陸上植物共通の重要な役割を担っているかと思っていたものだから、これは驚きである。ARA6 型 RAB5 の機能が植物の各系統でどの程度多様化しているのかは未だ不明であり、非常に興味深い問題である。

同様の考え方から、種子植物にしか存在しないと思われていた VAMP727 は、種子植物特異的な膜交通経路ではたらいているだろうと推測されていた。この「種子植物にしか存在しない」という前提是、「ヒメツリガネゴケやイヌカタヒバは持っていない」という情報に基づくもので、今回我々がゼニゴケの EST を調べた結果、ゼニゴケには VAMP727 様分子が存在することが判明し、この前提は覆った。ヒメツリガネゴケに無いからといって、コケ植物に無いと言ってはならないということを思い知った。さて、シロイヌナズナにおいて VAMP727 は、液胞前区画というオルガネラと液胞や細胞膜との融合時にはたらき、種子形成やストレス耐性に関与していることが明らかとなっている (Ebine et al. 2011, Ebine et al. 2008)。ゼニゴケの VAMP727 はシロイヌナズナの VAMP727 と異なる機能を持っているのだろうか。ゼニゴケは種子をつけないので、当然高次機能発現における役割は異なるだろうが、細胞生物学的レベルではどうだろうか。現在研究中である。

現在我々が取り組んでいるゼニゴケ細胞生物学は、どれもまだまだ研究途にある。それでも膜交通経路や細胞骨格動態の多様性が続々と明らかとなってきた。これらゼニゴケ細胞で見られる特徴がゼニゴケの形態や生態にどのように寄与しているのかを突き止められれば、陸上植物の生存戦略はどのように多様化していくのかといった疑問解決への大きなヒントとなるだろう。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、お世話になりました京都大学の河内孝之先生、石崎公庸先生、近畿大学の大和勝幸先生にこの場を借りて感謝申し上げます。

## 引用文献

- Dacks, J.B., & Field, M. C. 2007. Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system: origin, tempo and mode. *J Cell Sci.* 120: 2977-2985.
- Ebine, K., Fujimoto, M., Okatani, Y., Nishiyama, T., Goh, T., Ito, E., Dainobu, T., Nishitani, A., Uemura, T., Sato, M.H., Thordal-Christensen, H., Tsutsumi, N., Nakano, A., & Ueda, T. 2011. A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat Cell Biol.* 13: 853-859.
- Ebine, K., Okatani, Y., Uemura, T., Goh, T., Shoda, K., Niizuma, M., Morita, M. T., Spitzer, C., Otegui, M. S., Nakano, A., & Ueda, T. 2008. A SNARE complex unique to seed plants is required for protein storage vacuole biogenesis and seed development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 20: 3006-3021.
- Era, A., Kutsuna, N., Higaki, T., Hasezawa, S., Nakano, A., & Ueda, T. 2012. Microtubule stability affects the unique motility of F-actin in *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.* in press.
- Era, A., Tominaga, M., Ebine, K., Awai, C., Saito, C., Ishizaki, K., Yamato, K. T., Kohchi, T., Nakano, A., & Ueda, T. 2009. Application of Lifeact reveals F-actin dynamics in *Arabidopsis thaliana* and the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* 50: 1041-1048.
- Grosshans, B. L., Ortiz, D., & Novick, P. 2006. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 11821-11827.
- Hasezawa, S., & Kumagai, F. 2002. Dynamic changes and the role of the cytoskeleton during the cell cycle in higher plant cells. *Int Rev Cytol.* 214: 161-191.
- Hussey, P. J., Ketelaar, T., & Deeks, M. J. 2006. Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu Rev Plant Biol.* 57: 109-125.
- Michelot, A., Berro, J., Guerin, C., Boujemaa-Paterski, R., Staiger, C. J., Martiel, J. L., & Blanchoin, L. 2007. Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr Biol.* 17: 825-833.
- Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., Sixt, M., & Wedlich-Soldner, R. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods.* 5: 605-607.
- Staiger, C. J., Sheahan, M. B., Khurana, P., Wang, X., McCurdy, D. W. & Blanchoin, L. 2009. Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array. *J Cell Biol.* 184: 269-280.
- Tijs Ketelaar, A. M. C. E. 2001. The cytoskeleton in plant cell growth: lessons from root hairs. *New Phytologist.* 152: 409-418.
- Ueda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., & Nakano, A. 2001. Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 20: 4730-4741.