

***Euglena* 細胞のタンパク質分子の輸送経路:
電子顕微鏡による細胞内小器官の連携に関する研究**

長 船 哲 齊* ****・田 中 和 幸*・Harvard LYMAN***
江 原 友 子**・角 田 修 次**

(平成 12 年 10 月 19 日受付, 平成 12 年 12 月 12 日受理)

**Electron Microscopic Studies of LHCP II Apoprotein in *Euglena*:
Possible Role of Golgi, ER and COS**

Tetsuaki OSAFUNE, Kazuyuki TANAKA, Harvard LYMAN,
Tomoko EHARA and Shuji SUMIDA

Light-induced development of thylakoids in proplastids of dark-grown wax-rich cells of *Euglena gracilis* Z transferred to an inorganic medium containing ammonium salt as nitrogen source with aeration was followed by light. When the dark-incubated cells were exposed to light, many thylakoids are extending as outgrowths of the prothylakoids embedded in the prophyrenoid. After 48 h in light, a cell contains chloroplasts with fully extended thylakoids. A single pyrenoid is located in the center of the chloroplast, and paramylum is formed outside the chloroplast envelope surrounding the pyrenoid. These chloroplasts are fully competent in photosynthesis.

Cells of *Euglena* contain a light-harvesting chlorophyll *a/b* complex associated with photosystem II. In *Euglena*, the formation of the 26.5 kDa principal light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein of photosystem II (LHCP II) has a number of unusual features. The precursors to LHCP II are large polyproteins containing multiple copies of LHCP II, and photocontrol of their formation is largely translational. Under conditions favoring LHCP II accumulation in the thylakoids, a reaction with anti-LHCP II antibody can be observed in the Golgi by immunogold electron microscopy. The compartmentalized osmiophilic structure (COS) also shows an immunoreaction. These observations, and others discussed in this paper, suggest that light permits translation of polyprotein LHCP II precursors on cytoplasmic ribosomes of the rough endoplasmic reticulum (ER) and that these pass through the ER to the Golgi where, presumably, further modifications take place. Since an LHCP II immunoreaction is found in Golgi vesicles, these may transport the nascent LHCP II to the plastid and facilitate its uptake.

Key words: *Euglena* cell, LHCP II, intracellular transport, organelle

キーワード: ユーグレナ細胞, 光化学系 II 集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体, 細胞内輸送, 細胞内小器官

I. 序 論

緑色植物は無限の太陽光エネルギーを利用して, 空気中の CO₂ と H₂O から有機物を独自に合成できる地球上で唯一の独立栄養生物である。光合成によって放出される O₂ は, 地球上のすべての生命の繁栄を支えている。緑

色植物の重要性を今こそ再認識し, その保全と積極的な基盤研究の展開が重要な課題になっている。緑色植物が光合成を行っている細胞内小器官は色素体(葉緑体)と呼ばれ, 遺伝子 DNA を含む半自律的な小器官である。葉緑体は *de novo* に合成されることはなく, 細胞周期中

* 自然科学研究室(生命科学), ** 東京医科大学(微生物学教室), *** Present address: The State University of New York, USA, **** 名古屋大学大学院客員教授(長船哲齊)

では一定の時期に分裂、融合や分岐などのダイナミックな動態を示すことが知られている^{1,2)}。近年タバコ、ゼンゴケやイネの葉緑体でDNAの全塩基配列が決定され、葉緑体のもつ光合成機能は、葉緑体と細胞核の両遺伝情報に支配されていることが明確になってきた。光合成炭酸固定酵素リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼの小サブユニットは細胞核のDNAにコードされ細胞質で合成された後、包膜を通過して葉緑体に輸送され、葉緑体内で合成された大サブユニットと結合し機能する場所へ適切に配置される^{3-5,9)}。このような光合成に関与する重要なタンパク質分子の合成、輸送経路、特定の構造への組込や配置などの解明は興味ある研究課題となっている⁶⁻⁹⁾。

本研究は超微形態学的手法によって光合成タンパク質分子の葉緑体への輸送経路を解明するため、チラコイド膜タンパク質である光化学系IIの集光性クロロフィル結合タンパク質分子(LHCP II)の輸送に関与する細胞内小器官の相関性について急速凍結置換固定法、連続超薄切片法-電子顕微鏡で追跡したものである。

II. 実験材料と方法

1. 供試藻株

Euglena gracilis Z株(*Euglena*)は東京大学応用微生物研究所藻類保存部門から分与された。細胞は東京医科大学微生物学教室および日本体育大学健志台校舎自然科学研究室において、1973年より暗所、従属栄養条件下で継代培養したものを本実験に使用した¹⁰⁾。

2. 培養操作

*Euglena*細胞はすべてgreen safety light条件下において、無菌操作および暗培養に関する実験を行った¹¹⁾。

3. 暗所、従属栄養培養条件

暗所、従属栄養条件下で培養した*Euglena*を暗静置培養し、細胞質内部に脂質(ミニステルミニステート)の蓄積した細胞を得た。

有機培地の組成: 蔗糖 15.0 g, DL-aspartic acid 2 g, DL-malic acid 1 g, glycine 2.5 g, KH₂PO₄ 0.3 g, MgSO₄ 0.4 g, L-glutamic acid 3 g, CaCO₃ 0.08 g, ammonium succinate 0.6 g, thiamine 0.1 mg を 1,000 ml の蒸留水に溶かした(pH 3.5)。使用時に vitamin B₁₂ (5 μg/l) を無菌操作によって添加した。滅菌はオートクレーブ(Tomy SS-320)で 121°C, 1 kg/m², 15 分間行った。

4. 光独立栄養培養条件

暗所、従属栄養条件下で培養した*Euglena*をCramer Myers培地を修正した培養液(無機培地)を使用した。*Euglena*細胞を無機培地中で3回洗浄を行った後、細胞

数を 1.0 × 10⁴ cells/ml の個数濃度になるように調整した。無機培地に浮遊した細胞は 500 ml の偏平 flask に移し、2% (v/v) の二酸化炭素(CO₂)を含有する空気を通しながら 144 時間、暗所で培養した後、1,500 lux の昼光色蛍光灯(東芝)を照射、培養温度 26°C で実験を行った。

無機培地の組成: KH₂PO₄ 1 g, (NH₄)₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, CaCl₂·2H₂O 0.026 g, FeSO₄·7H₂O 3.3 g, thiamine 0.1 mg, 0.5 μg vitamin B₁₂, 1 ml の trace element 液を 1,000 ml の蒸留水に溶かした。

5. クロロフィルの測定

暗培養した*Euglena*細胞を無機培地に移し、144時間、暗培養した。そのような細胞に照度 1,500 lux の蛍光灯を照射し、直後の細胞を 0 時間細胞として試料の採取を行った。試料は 2,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し、沈査を -20°C で凍結した。クロロフィルの抽出には 80% アセトン溶液を沈査と等量加え、60°C, 5 分間静置した。その後、試料を 2,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し、上清をクロロフィル溶液として分光光度計(島津 UV-1200 GLP)を用いて測定し、下記の式によりクロロフィル量を算出した¹⁴⁾。クロロフィル量 (mg/l) = OD₆₅₂ × 27.6。

6. 細胞数の測定法

*Euglena*の細胞数は精密粒度分布測定装置コールター Z-2 型(Coulter, USA)を用いて算出した¹¹⁾。

7. 急速凍結置換固定

*Euglena*の急速凍結置換固定法には Universal Cryofixation & Cryopreparation 装置(Leica EM CPC, Austria)を用いて浸漬法で行った¹²⁾。同調培養した*Euglena*培養液を経時的に 50 ml 採取し、遠心速度 500 × g, 4°C で沈査を得た。グリッドに細胞懸濁液を 1 滴積載し、ろ紙を用いて培養液を除いた後、Leica EM CPC 装置のプロパン溶液を液体窒素(-210°C)で -185°C に冷却し、*Euglena*細胞を急速凍結した。凍結された細胞を -196°C に保ったグルタルアルデヒド・アセトン溶液の置換溶媒に移し、24 時間後、-20°C で 8 時間、次いで 4°C, 24 時間の置換固定した。その後、100% アセトン溶液で試料を洗浄し、Epoxy 樹脂(Poly-sciences 社, USA)に包埋して 60°C, 3 日間の加熱重合を行った¹³⁾。

8. 電子顕微鏡試料の化学固定

採取した*Euglena*細胞培養液中に、直接グルタルアルデヒド(50%水溶液: EM Lab., USA)を最終濃度が 1% (v/v) になるように添加し、4°C, 60 分間処理した。次に 1% 四酸化オスミウム水溶液(v/v)で、温度 4°C, 60 分間の二重固定を行った。試料は 2% アガロース(ナ

カラitekス KK) に包埋したのち、約 1 mm^3 の寒天ブロックを作製した。寒天ブロックは 50~90% エタノール系列と 90~100% アセトン系列で脱水した後、Spurr 樹脂 (Poly sci., USA) に包埋した。試料の超薄切片は超ミクロトーム (Dupont MT-1 型および LEICA, UCT 型) を用いて薄切した。

9. 抗 LHCP II 抗体の作製

光化学系 II・集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質複合体 (LHC II) は単細胞鞭毛藻 *Euglena gracilis* var. *bacillaris* B 株から抽出、精製してウサギから抗 LHCP II 抗体を得た。当抗体は米国マサチューセッツ州、ブランドイス大学光細胞小器官研究所長 Jerome A. Schiff 教授 (Abraham and Etta Goodman Professor) から分与された。

10. 免疫電子顕微鏡法

Euglena の免疫電子顕微鏡観察はすでに報告した方法に準じて行った¹⁵⁻¹⁷⁾。*Euglena* 細胞の培養液中に最終濃度が 1% (v/v) になるようにグルタルアルデヒドを添加し 4°C, 60 分間固定した。試料を 4 回新鮮培養液で洗浄後、2% アガロース (ナカラitekス KK) に包埋し、約 1 mm^3 前後の寒天ブロックを作製した。寒天ブロックを 50~90% エタノール系列および 90~100% アセトン系列で脱水し、Epoxy 樹脂に包埋した。試料は超ミクロトーム (Leica 社製 UCT, Austria) で 120 nm の厚さに連続的に超薄切し、ホルムバルまたはコロジオンの支持膜を張ったニッケル製の特殊グリッド (日新 EM) に積載した。薄切試料の抗原を樹脂表面に露出させるため、0.3% 過酸化水素で 3~5 分間処理した。次に、0.01 M リン酸緩衝食水 (PBS) で 4 回洗浄を行っ

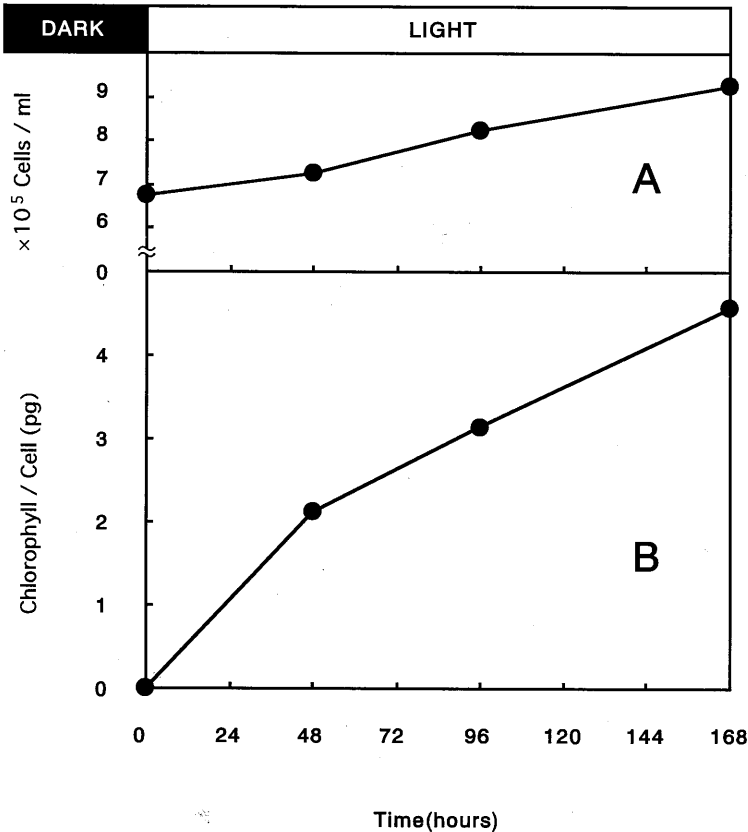


図 1A 静置培養 *Euglena* 細胞を無機培地に移し、光照射したときの細胞数の変化。

従属栄養条件下の静置培養 *Euglena* 細胞を無機培地に移し、144 時間培養した後、光照射直後を 0 時間細胞として 168 時間まで経時的に細胞数の変化を追跡したものである。細胞は無機培地中でも細胞分裂が起こることがわかる。

図 1B 静置培養 *Euglena* 細胞を無機培地に移し、光照射したときのクロロフィル量無機培地中で細胞数と細胞当たりのクロロフィル量の増加がみられた。

た。洗浄操作はパラフィルムの上にPBSを水滴状に並べ、グリッドを順次に各々のPBS中へ移動させた。ブロッッキングは洗浄後、PBSに1%ウシ血清アルブミン

を添加したBSAで30分間処理した。一次抗体は抗LHCP II抗体を用いた。抗LHCP II抗体はBSAで20倍に希釈し超薄切片上で37°C、20分間反応させた。次

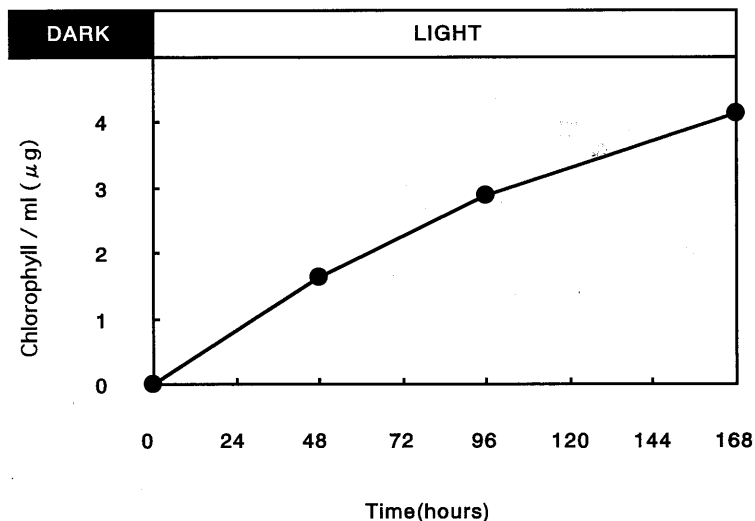


図2 静置培養 *Euglena* 細胞を無機培地に移し、光照射した時のクロロフィル量の変化。
Euglena 細胞を無機培地に移し光照射すると培養液当たりのクロロフィル量は増加する。

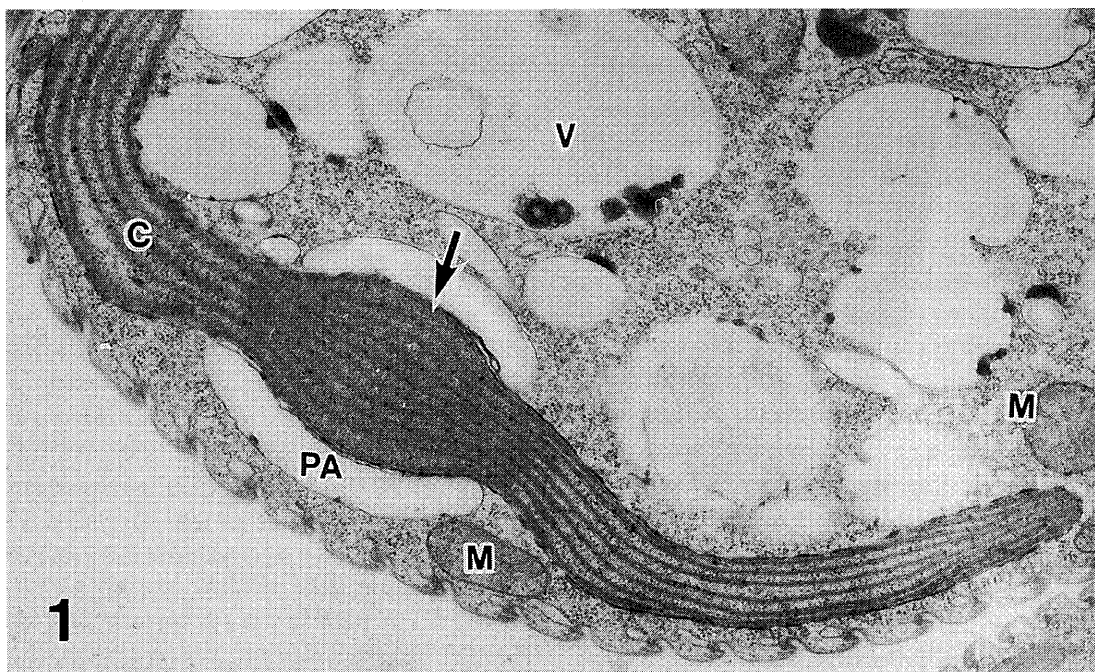


写真1 暗培養0時間細胞に光を168時間照射した細胞に見られる葉緑体の電子顕微鏡像。葉緑体は発達し、チラコイド膜はラメラ構造を形成しピレノイド構造(矢印に示す)を貫通している。ピレノイド構造の周囲、ストロマ側には光合成産物ではないかと思われるパラミロン(PA)の蓄積が見られる。

に、超薄切片を 0.05% Tween-20 を含む PBS で洗浄した。二次抗体には 5 nm または 20 nm ゴールド (EY Lab. Inc., USA) を用いた。処理した超薄切片は 0.05% Tween-20 を含む PBS で 15 分間洗浄した後、さらに自動洗浄装置 (MW-1, 日新 EM) を用いて約 15 分間の水洗を行った。次に、3% 酢酸ウラニルで 30 分間染色し水洗、乾燥した¹⁵⁻¹⁷⁾。

11. 透過型電子顕微鏡の観察と撮影

Euglena 試料は本学健志台キャンパス電子顕微鏡室の電子顕微鏡 JEOL-100 CX 型 (日本電子 KK) により、加速電圧 80 kV で観察、撮影した¹⁵⁻¹⁷⁾。

III. 結 果

図 1-A は暗所、従属栄養条件下の静置培養 *Euglena* 細胞を無機培地に移し 144 時間後、光照射直後を 0 時間細胞として、168 時間まで経時的に細胞数の変化を追跡したものである。光照射すると細胞数の増加がみられる (図 1-A)。すなわち、細胞は無機培地中でも細胞分裂が起こることがわかる (図 1-A)。図 1-B はこのような

細胞における細胞当たりのクロロフィル量を測定したものである。暗培養 0 時間細胞に光照射するとクロロフィル合成が急激に起こる (図 1-B)。図 2 は培養液当たりのクロロフィル量を示し、細胞当たりと同様に増加している。写真 1 は暗培養 0 時間細胞に光を 168 時間照射した細胞にみられる葉緑体の電子顕微鏡像である。葉緑体は発達し、チラコイド膜はラメラ構造を形成しピレノイド構造 (矢印に示す) を貫通している (写真 1)。ピレノイド構造の周囲、ストロマ側には光合成産物ではないかと思われるパラミロン (PA) の蓄積が見られる (写真 1)。

写真 2 は *Euglena* 細胞を無機培地に移し、光照射直後を 0 時間細胞として 8 時間細胞の電子顕微鏡超薄切片像である。*Euglena* 細胞をグルタルアルデヒドおよび 2% オスミック酸固定液 (50 mM リン酸緩衝液, pH 7.4) で固定し透過型電子顕微鏡で観察した。写真の矢印はそれぞれ小胞体 (ER), COS 構造, ゴルジ装置 (G) およびプロプラスチド (PP) を示している。細胞質内には、小胞体 (ER), COS 構造, ゴルジ装置 (G) およびプロプラスチド (PP) が相互に接近して観察される (写真 1)。

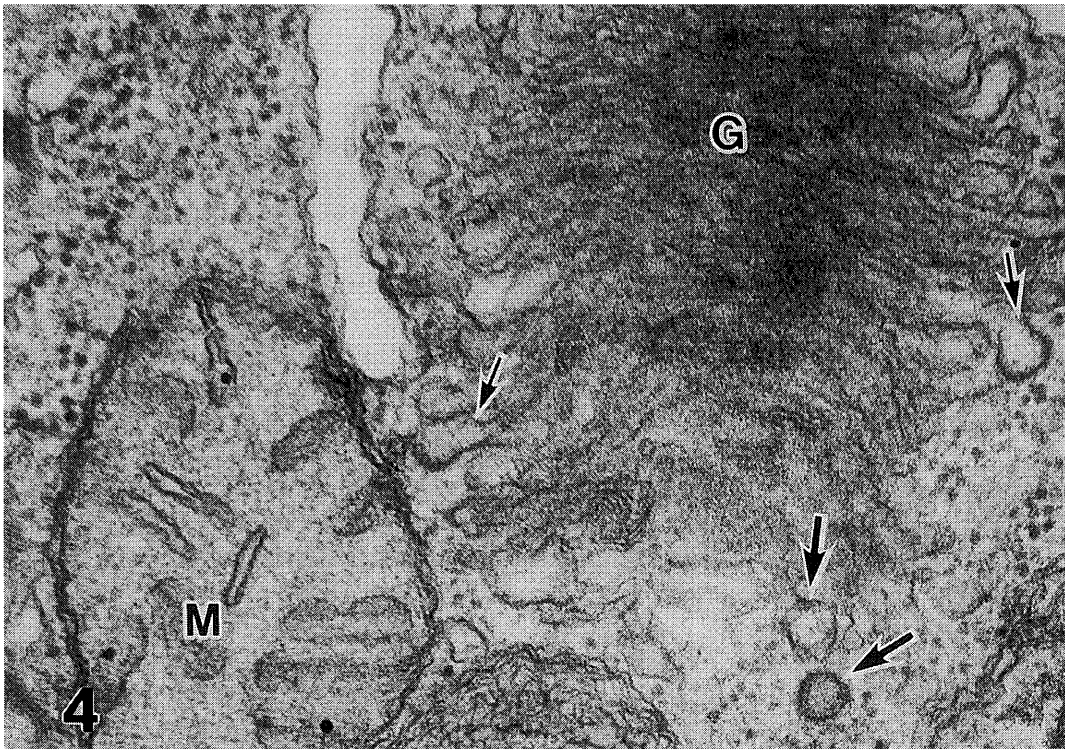


写真 4 *Euglena* 8 時間細胞のゴルジ装置の電子顕微鏡超薄切片像。
ゴルジ装置の *trans* 面には矢印に示すように直径 50 nm のゴルジ小胞 (Golgi vesicle) や大型のゴルジ液胞 (Golgi vacuoles) が観察される。

COS 構造は四酸化オスミウムに親和性が強く、高電子密度で約 $1\ \mu\text{m}$ の球体を示す (写真 2)。

写真 3(A, B) は 8 時間細胞の連続超薄切片法-電子顕微鏡超薄切片像である。細胞核 (N) の外膜と小胞体 (ER: 矢印に示す) が連結している (写真 3)。粗面小胞体が COS 構造の内部を網目状に貫通しているのがわかる (写真 3 矢印)。さらに、核膜と小胞体との連結する付近にはクロモゾームが特異的に接近している (写真 3)。

写真 4 は 8 時間細胞のゴルジ装置の電子顕微鏡超薄切片像である。ゴルジ装置の trans 面には矢印 (図 4) に示す、直径 $50\ \text{nm}$ のゴルジ小胞 (Golgi vesicle) や大型のゴルジ液胞 (Golgi vacuoles) が観察される (写真 4)。

写真 5 は 24 時間の連続超薄切片法-電子顕微鏡超薄切片像の 1 枚である。プラスチド構造 (PP) 側へゴルジ装置 (G) の trans 面が見られる (写真 5)。そして、ゴルジ装置の trans 面のトランスゴルジ網 (trans Golgi network: CGN) から形成された小胞とプラスチド構造との相互の association が観察される (写真 5 矢印)。

写真 6 は 48 時間細胞の急速凍結置換固定法¹²⁾による免疫電子顕微鏡法-電子顕微鏡像である。48 時間細胞を急速凍結置換固定法で固定し、超ミクロトームで薄切した後、超薄切片を抗光化学系 II・集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質複合体 (LHCP II) 抗体を反応させ、コロイド金粒子で処理したものである (写真 6)。超薄切片に見られるゴルジ装置、ゴルジ液胞および葉緑体の上には、LHCP II の配置を示すコロイド金粒子の局在性が観察される (写真 6)。

IV. 考 察

電子顕微鏡の開発や改良に伴って、1940 年頃から植物の研究にも電子顕微鏡が利用されるようになり、葉緑体の微細構造の本格的な解析が始まった。電子顕微鏡による葉緑体構造の最初の観察はドイツの Kausche と Ruska によって行われている。すなわち、タバコ細胞より分画した葉緑体を支持膜上に直接積載し、透過電顕像として葉緑体の膜構造を観察した。その後、ミクロトームによる超薄切片技法が導入され、その改良に伴って細胞内小器官の内部構造の解明が可能になった。Steinmann は超薄切片技法を用いて、アオミドロおよびイタミドロの超薄切像から、後にチラコイド膜と呼ばれる内膜構造の存在を明らかにした。1962 年、Menke によって葉緑体の薄切像にみられる袋状構造はチラコイド膜 (thylakoid membrane) と命名された。写真 1 は単細胞鞭毛藻 *Euglena* 細胞の葉緑体の電子顕微鏡超薄切片像である。葉緑体は包膜に囲まれ、無構造のストロマ

(stroma) からなり、その内部にはチラコイド膜と呼ばれる発達した扁平な袋状の膜が観察される。写真 1 に示すようにチラコイド膜は相互に層状に重なりラメラを形成し、チラコイド膜内には、クロロフィルをはじめとする光合成反応に必要な多くのタンパク質分子が組み込まれている。高等植物の葉緑体と比べ包膜は 3 重で、チラコイド膜は長軸方向に平行して観察されグラナ構造を欠き、中央部に電子密度の高いピレノイド (pyrenoid) と呼ばれる構造を貫通している (写真 1)。ピレノイド (写真 1 矢印) は大部分の真核藻類や一部のコケ植物の葉緑体に見られ、その構造は膜を欠き球体で、大きさや構造は生物によって異なることが知られている。ピレノイドは光合成炭酸固定酵素リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) の貯蔵場所^{9, 17)}といわれ、光合成に関与しているが詳細な機能についてはよくわかっていない。

光合成タンパク質分子の輸送に関する研究は生化学者の Brandt らによって行われている¹⁸⁾。すなわち、同調培養した *Euglena* の光化学系 II・集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質複合体 (LHCP II) タンパク質分子を ^{14}C で標識し、チラコイド膜への輸送経路、ステージを経時的に追跡している。Osafune らのグループは免疫電子顕微鏡法を用いて、それらを分子細胞形態学的に追跡している。

Osafune らは暗所で培養した *Euglena* 細胞に光を照射し、葉緑体が形成する過程で、LHCP II タンパク質分子がゴルジ装置を経由し、葉緑体へ輸送される現象を最初に発見した¹⁹⁾。さらに、そのような現象は同調培養した *Euglena* の cell cycle 中でも観察されることを明らかにした¹⁶⁾。すなわち、分泌タンパク質以外の光合成タンパク質分子 LHCP II がゴルジ装置を通過することを初めて確定した^{16, 19~21)}。

本研究はこのような LHCP II タンパク質分子が細胞核にコードされ合成された後、どのような過程を経由して、葉緑体に輸送されるのかを電子顕微鏡で追跡したものである。実験には *Euglena* 細胞を用いて行った^{3, 4)}。*Euglena* 細胞の葉緑体は環境条件の変化に応じ、可逆的な退化と再形成を示すことが知られ、葉緑体形成過程の解明には優れた研究材料として世界中の研究者に用いられてきた。*Euglena* を独立栄養条件下で培養すると、写真 1 にみられるように葉緑体の構造がよく発達し、細胞周辺に沿って細胞当たり、8 個前後観察される。このような完成された葉緑体 (写真 1) をもつ細胞を従属栄養条件下で暗培養すると、細胞分裂に伴って葉緑体は退化し約 3 週間で内部にラメラ構造を欠いた、未発達の葉緑

体であるプロプラスチド (proplastid) になる。

先に、Osafune らの研究グループでは前培養条件を適切に選べば、細胞を暗所で無機培地に移すことにより、葉緑体発達の初期暗過程の進行が観察できる新しい実験系を最初に確立した⁴⁾。すなわち、*Euglena* 細胞を静置培養すると、5日間で細胞質内にパラミロンや脂質が大量に蓄積する。このような脂質蓄積細胞を従来の化学固定し、電顕観察すると脂質は paracrystalline form として観察される^{4, 14)}。一方、急速凍結置換法による固定では全く異なり液泡状で、従来の光学顕微鏡像ともよく一致する⁴⁾。その結果、未発達のプロプラスチド構造はストロマは狭く葉状で、内膜に沿った一層のガードルチラロイド膜以外の内部構造は認められなかった。このようなプロプラスチドをもつ細胞をアンモニウム塩を含む無機培地に移し、暗所で炭酸ガスを通気すると脂質の減少に伴って、クロロフィルの合成能、光合成炭酸固定酵素リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼの比活性、タンパク質も増大し、プロプラスチドの内部構造の一部発達が起こる¹²⁾。これは通気することにより、細胞質内に蓄積した脂質が酸化分解され炭素中間体、エネルギー源が供給された結果によるものである⁴⁾。脂質蓄積細胞に通気を開始した直後を0時間とすると、24時間後にみられるプロプラスチドはストロマが拡張し、プロラメラ体様構造 (PLB) が形成される¹⁴⁾。その後、PLBの近傍にプロピレノイドの形成が始まる⁴⁾。われわれは連続超薄切片-免疫電子顕微鏡像をコンピュータ・グラフィックスで処理し、ピレノイド構造とストロマに局在するゴールド粒子の分布を定量し、暗所でピレノイド構造が形成されることを発見した⁴⁾。すなわち、従来からピレノイドの形成には光照射が必要とされてきたが、われわれの研究結果からピレノイドの形成には、必ずしも光を必要としないことが明らかになった。暗所144時間後、プロプラスチド構造の発達はこれ以上進行しない。正常な構造と機能をもった葉緑体が再形成されるためには、光照射が必要である^{4, 14)}。

本研究はわれわれが開発した上述のような実験系を用いて、細胞内小器官の電子顕微鏡観察を行った。図1, 2は暗培養した *Euglena* 細胞を無機培地に移し光を照射したものである。無機培地中でも細胞分裂とクロロフィル合成が起こることがわかる (図1, 2)。クロロフィル量の増加と葉緑体の発達は一致することが知られている。写真1は168時間光照射によって得られた正常な光合成能を有する完成された葉緑体像である。

写真2は暗培養0時間の *Euglena* に光を8時間照射した細胞の電子顕微鏡超薄切片像である。 *Euglena* 細胞

をグルタルアルデヒドおよび2% オスミック酸固定液 (50 mM リン酸緩衝液, pH 7.4) で固定し透過型電子顕微鏡で観察した。細胞質内には、小胞体、COS 構造、ゴルジ装置およびプロプラスチドが相互に接近して観察される (写真2)。すなわち、小胞体、COS 構造、ゴルジ装置およびプロプラスチドが相互に近接して配置されている。光化学系 II・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体である LHCP II は細胞核にコードされ、細胞質のリボゾームで合成され、何らかの方法で葉緑体に輸送されることが生化学的に示されている^{22~26)}。Osafune のグループは免疫電子顕微鏡法とコンピュータ・グラフィックス解析により、LHCP II タンパク質分子はゴルジ装置を経由して葉緑体へ輸送されることを最初に見いだした^{19~21, 27)}。光合成タンパク質 LHCP II は分泌タンパク質以外のタンパク質であることが知られている。このような光合成タンパク質分子が細胞内小器官のゴルジ装置を経由する事実は、LHCP II が粗面小胞体のリボゾーム上で合成されるものと考えられる。

写真3は8時間細胞の連続超薄切片法-電子顕微鏡超薄切片像を示している。薄切片像から、細胞核の外膜と小胞体 (矢印) が連結しているのがわかる (写真3)。写真3の COS 構造³⁾は四酸化オスミウムに親和性が強く、高電子密度で直径約 $1 \mu\text{m}$ の球状構造を示す。COS 構造の内部は粗面小胞体 (ER) が網目状に貫通している (写真3矢印)。すなわち、写真3の結果から ER が COS 構造と密接な連携が示唆される。先に報告したように、LHCP II タンパク質分子は葉緑体形成過程で、一時的に COS 構造に局在することが観察されている³⁾。したがって、ER で合成された LHCP II は ER から COS 構造へ最初に輸送されると考えられる。さらに、核膜と小胞体との連結する付近には遺伝子 DNA が配置され、クロモゾームが特異的に接近している像が観察される (写真3)。このような現象については未だ報告はみられず、今後の興味ある研究課題であると思われる。

写真4は8時間細胞のゴルジ装置の電子顕微鏡超薄切片像である。ゴルジ装置の *trans* 面には矢印 (図4) に示す、直径 50 nm の Golgi vesicles や大型の Golgi vacuoles が観察される (写真4)。LHCP II タンパク質分子は ER から COS 構造を通過して、ゴルジ装置に輸送され、Golgi vesicles や Golgi vacuoles によって運ばれると考えられる。そのため写真2に示すように小胞体、COS 構造、ゴルジ装置およびプロプラスチドが相互に近接して配置されることが示唆される。

写真5は24時間の連続超薄切片法-電子顕微鏡超薄切片像の1枚である。プラスチド構造側へゴルジ装置の

trans 面が一致して観察される (写真5)。この結果はゴルジ装置の *trans* 面の *trans* Golgi network から形成された Golgi vesicles や Golgi vacuoles によって, LHCP II が発達中のプラスチド構造へ輸送されると考えられる。写真5 矢印は LHCP II を内在した Golgi vesicles や Golgi vacuoles が直接にプラスチド構造へ運ばれ連結している像である。プラスチドに運ばれた LHCP II は何らかの方法で内部に組み込まれ, シャペロン様タンパク質分子の介在によって, *Euglena* のチラコイド膜に適切に配置されると思われる。

写真6は48時間細胞の急速凍結置換固定法による免疫電子顕微鏡法-電子顕微鏡像である。従来, *Euglena* 細胞における固定法は化学固定法が主流であった¹⁰⁾。しかし, 化学固定法を用いる限り, グルタルアルデヒドによるタンパク質分子の破壊やアーティファクトなどの問題を払拭することは不可能であった。今回, 新しく開発されたライカ製の急速凍結置換固定法により, 生体に近い像を得る試みを行った。すなわち, 光照射48時間細胞を急速凍結置換固定法で -198°C で固定し, 超ミクロトームで薄切した後, LHCP II 抗体を反応させコロイド金粒子で処理したものである (写真6)。超薄切片に見られるゴルジ装置, ゴルジ液胞および葉緑体の上には, LHCP II の配置を示すコロイド金粒子の局在性が観察される (写真6)。この結果は化学固定-免疫電子顕微鏡法ともよく一致することが明らかになった^{19~21)}。すなわち, 写真6に観察されるように, LHCP II タンパク質分子はゴルジ装置, Golgi vesicles や Golgi vacuoles (矢印) および葉緑体に特異的に局在している。以上のように電子顕微鏡観察の結果から, 光化学系 II・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体 LHCP II は ER 上のリボゾームで合成された後, COS 構造, ゴルジ装置, Golgi vesicles や Golgi vacuoles の連携によって発達中のプラスチド構造へ輸送され, チラコイド膜へ組込まれると思われる。

V. 結 語

現在, 細胞核にコードされ細胞質で合成された光合成タンパク質分子が, ダイナミックな挙動と複雑な構造をもつ機能単位複合体への組込経路の解析に, 多くの研究者の関心が集まっている。そして細胞核支配の光合成タンパク質分子の輸送機構については, 生化学的, 分子生物学的な研究を中心にした多くの研究が世界中で行われている^{3~9, 22~27)}。

Euglena の光化学系 LHCP II タンパク質分子は細胞核にコードされ, 細胞質で前駆体が合成されたのち, 何

らかの方法によって葉緑体に輸送され最終的な局在場所に配置されることが知られている (Schmidt and Mishkin, 1986)²⁴⁾。*Euglena* では細胞質で合成された前駆体が, どのようにして葉緑体に輸送され, どのように複雑な構造をした葉緑体包膜を通過するかなどについては現在不明である。先に, Osafune らのグループは *Euglena* 細胞の LHCP II タンパク質分子の動態を免疫電子顕微鏡法により追跡し, ゴルジ装置を経由し葉緑体へ輸送されることを発見した^{20~22)}。

本研究は *Euglena* 細胞を急速凍結置換固定法 (-198°C) で固定し, 電子顕微鏡を用いて LHCP II タンパク質分子の輸送に関与する細胞内小器官の相互の連携を追跡したものである。写真2に示すように, *Euglena* の葉緑体形成過程で細胞質内の小胞体, COS 構造, ゴルジ装置およびプロプラスチドが相互に接近して観察された。これらの結果は LHCP II タンパク質分子がゴルジ装置を経由することと整合性がみられる (考察参照)。写真6は急速凍結置換固定した *Euglena* 細胞の免疫電子顕微鏡像である。超薄切片に見られるゴルジ装置, ゴルジ液胞および葉緑体の上には, LHCP II の配置を示すコロイド金粒子の局在性がみられ, 化学固定法での観察結果と一致することがわかった。したがって, LHCP II タンパク質分子は細胞核にコードされ, 粗面小胞体 (ER) のリボゾームで合成された後, COS 構造を経由する。次に, LHCP II は従来の分泌タンパク質と同じような過程で vesicles によってゴルジ装置に輸送される²¹⁾。写真5は Golgi vesicles, Golgi vacuoles (矢印) がプラスチドに運ばれ, 包膜へ融合する像を示している。

プラスチド構造へ運ばれた LHCP II タンパク質分子は, プラスチドの binding site から, どのようにしてプラスチド構造の内部に輸送され, どのようにして最終局在部位のチラコイド膜に組込まれるのかは今後の重要な研究課題である。

謝 辞 本研究の一部は文部省科学研究費・基盤研究 (C-2) 第 09640795 号および 2000 年度風戸奨励基金の補助によって行われた。

本研究の一部は日本電子顕微鏡学会・第 56 回学術講演会 特別講演で報告した。

文 献

- 1) Ehara, T., Osafune, T. and Hase, E.: Behavior of mitochondria during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* in synchronized

- culture. *J. Cell Science*, **108**, 499-507 (1995).
- 2) Ehara, T., Osafune, T. and Hase, E.: Association of nuclear and chloroplast DNA molecules in synchronized cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Electron Microscopy*, **45**, 159-162 (1996).
 - 3) Osafune, T., Schwartzback, S. and Yamato, M.: Immunocytochemical localization of RuBisCO in the compartmentalized osmiophilic body in dark-grown cells of *Euglena gracilis* Z. *J. Electron Microscopy*, **45**, 239-241 (1996).
 - 4) Osafune, T., Ehara, T., Osafune, K. and Hase, E.: Immunogold localization of RuBisCO in developing proplastids of dark-grown wax-rich cells of *Euglena* transferred to an inorganic medium in the dark. *Electron Microscopy II*, World Scientific, Singapore, New Jersey, London (1992), pp. 191-195.
 - 5) 渡辺 昭: チラコイド膜タンパク質の輸送と分子集合—細胞核支配タンパク質を中心に—。植物細胞工学, **2**, 219-227 (1990).
 - 6) Bogorad, L.: Factors associated with the synthesis of chlorophyll in the dark in seedlings of *Pinus jeffreyi*. *Bot. Gaz.*, **3**, 221-241 (1950).
 - 7) Keegstra, K. and Olsen, L. J.: Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Ann. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol.*, **40**, 471-501 (1989).
 - 8) Cunningham, Jr. F. X. and Schiff, J. A.: Chlorophyll-protein complexes from *Euglena gracilis* and mutants deficient in chlorophyll b. II. Polypeptide composition. *Plant Physiol.*, **80**, 231-238 (1986).
 - 9) Kiss, J. Z., Vasconcelos, A. C. and Triemer, R. E.: Paramylon synthesis and chloroplast structure associated with nutrient levels in *Euglena*. *J. Phycol.*, **22**, 327-333 (1986).
 - 10) Osafune, T.: Three-dimensional structures of giant mitochondria, dictyosomes and "concentric lamellar bodies" formed during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture. *J. Electron Microscopy*, **22**, 51-61 (1973).
 - 11) Osafune, T. and Hase, E.: Some structural characteristics of the chloroplasts in the "glucose bleaching" and re-greening cells of *Chlorella protothecoides*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **168**, 533-542 (1975).
 - 12) Osafune, T., Sumida, S., Hase, E. and Schiff, J. A.: Light-independent processes in the formation of thylakoids and pyrenoid in proplastids of dark-grown cells of *Euglena gracilis*. *J. Electron Microscopy*, **39**, 245-253 (1990).
 - 13) Osafune, T.: Studies of three-dimensional structures of mitochondria during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture. *J. Tokyo Med. Coll.*, **35**, 873-879 (1977).
 - 14) Sumida, S., Osafune, T., Ehara, T. and Hase, E.: Light-induced development of thylakoids in proplastids of dark-grown wax-rich cells of *Euglena gracilis* transferred to an inorganic medium. *J. Electron Microscopy*, **41**, 154-167 (1992).
 - 15) Osafune, T., Ehara, T., Schiff, J. A. and Hase, E.: Stage-dependent association of nuclear and chloroplast DNA molecules through bridges transiently formed between the two organelles in synchronized cells of *Euglena gracilis*. *J. Electron Microscopy*, **42**, 197-201 (1993).
 - 16) Osafune, T.: Three-dimensional distribution of LHCP II apoprotein immunoreaction in synchronous cells of *Euglena*. *Plant Morphology*, **3**, 49-55 (1991).
 - 17) Osafune, T., Yokota, A., Sumida, S. and Hase, E.: Immunogold localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase with reference to pyrenoid morphology in chloroplasts of synchronized *Euglena gracilis* cells. *Plant Physiol.*, **92**, 802-808 (1990).
 - 18) Brandt, P. and von Kessel, B.: Cooperation of cytoplasmic and plastid translation in formation of the photosynthesis apparatus and its stage specific efficiency. *Plant Physiol.*, **72**, 616-619 (1983).
 - 19) Osafune, T., Schiff, J. A., and Hase, E.: Immunogold localization of LHCP II apoprotein in the Golgi of *Euglena*. *Cell Struct. Funct.*, **15**, 199-105 (1990).
 - 20) Osafune, T.: Immunoelectron microscopic studies on the behavior of LHCP II in *Euglena*. *Plant Morphology*, **8**, 45-59 (1996).
 - 21) 長船哲齊: 生命科学における電子顕微鏡の役割。日本体育大学体育研究所雑誌, **22**, 129-145 (1997).
 - 22) Rikin, A. and Schwartzbach, S. D.: Regulation by light and ethanol of the synthesis the light harvesting chlorophyll a/b binding protein of photosystem II in *Euglena*. *Planta*, **178**, 76-83 (1989).
 - 23) Schiff, J. A., Schwartzbach, S. D., Osafune, T. and Hase, E.: Photocontrol and processing of LHCP II apoprotein in *Euglena*: Possible role of Golgi and other cytoplasmic sites. *J. Photochem. Photobiol.*, **11**, 219-236 (1991).
 - 24) Schmidt, G. W. and Mishkind, M. L.: The transport of proteins into chloroplasts. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 879-912 (1986).

- 25) Sulli, C. and Schwartzbach, S.: The polyprotein precursor to the *Euglena* light harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein is transported to the Golgi apparatus prior to chloroplast import and polyprotein processing. *J. Biol. Chem.*, **270**, 13084-13090 (1995).
- 26) Sulli, C. and Schwartzbach, S.: A soluble protein is imported into *Euglena* chloroplasts as a membrane-bound precursor. *The Plant Cell*, **8**, 45-53 (1996).
- 27) Osafune, T.: A three-dimensional computer generated model of a synchronously dividing *Euglena* cell at light dark cycle constructed based on serial sections. *Cytologia*, **65**, 2-3 (2000).

- 写真 2 *Euglena* 細胞を無機培地に移し、光照射 8 時間細胞の電子顕微鏡超薄切片像。
写真の矢印はそれぞれ小胞体 (ER), COS 構造, ゴルジ装置 (G) およびプロプラスチド (PP) を示している。細胞質内には, 小胞体 (ER), COS 構造, ゴルジ装置 (G) およびプロプラスチド (PP) が相互に接近して観察される。COS 構造は四酸化オスミウムに親和性が強く, 高電子密度で三次元観察では約 $1 \mu\text{m}$ の球体を示す。
- 写真 3 (A, B) *Euglena* 8 時間細胞の連続超薄切片法-電子顕微鏡超薄切片像。
細胞核 (N) の外膜と小胞体 (ER: 矢印) が連結している。粗面小胞体が COS 構造の内部を網目状に貫通しているのがわかる (矢印)。また, 細胞核膜と小胞体との連結する付近には, クロモゾームが特異的に接近している。
- 写真 5 *Euglena* 24 時間細胞の連続超薄切片法-電子顕微鏡超薄切片像の 1 枚を示す。
プラスチド構造 (PP) 側の方向へゴルジ装置 (G) の *trans* 面が見られる。そして, ゴルジ装置の *trans* 面のトランスゴルジ網 (*trans* Golgi network: CGN) から形成された小胞とプラスチド構造との相互の association が観察される (矢印)。
- 写真 6 *Euglena* 48 時間細胞の急速凍結置換固定法による免疫電子顕微鏡法電子顕微鏡像。
光照射 48 時間の *Euglena* 細胞を急速凍結置換固定法で固定し, 超ミクロトームで薄切した後, 超薄切片を抗光化学系 II・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体 (LHCP II) 抗体を反応させ, コロイド金粒子で処理したものである。超薄切片に見られるゴルジ装置, ゴルジ液胞および葉緑体の上には, LHCP II の配置を示すコロイド金粒子の局在性が観察される。

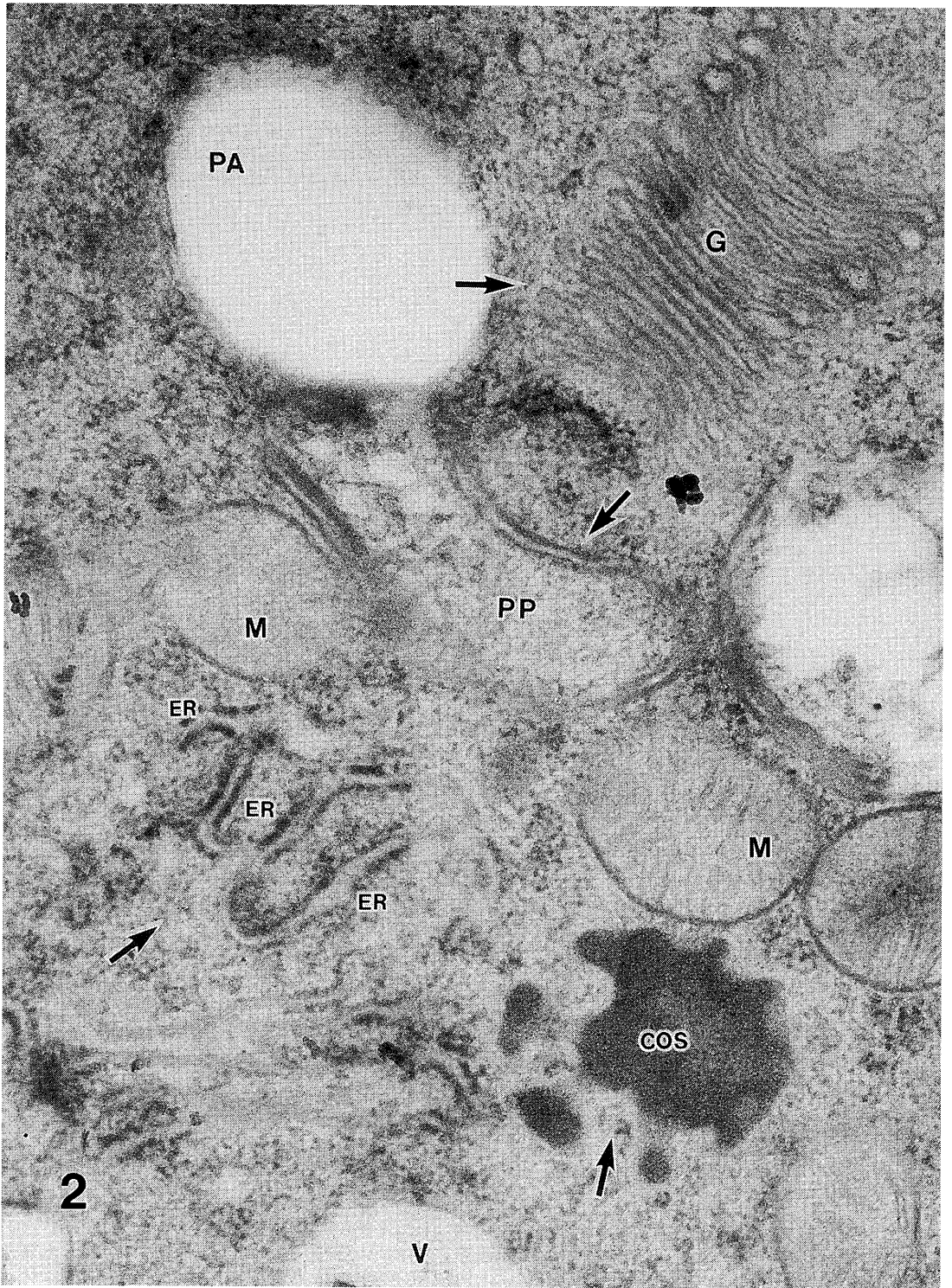


写真 2

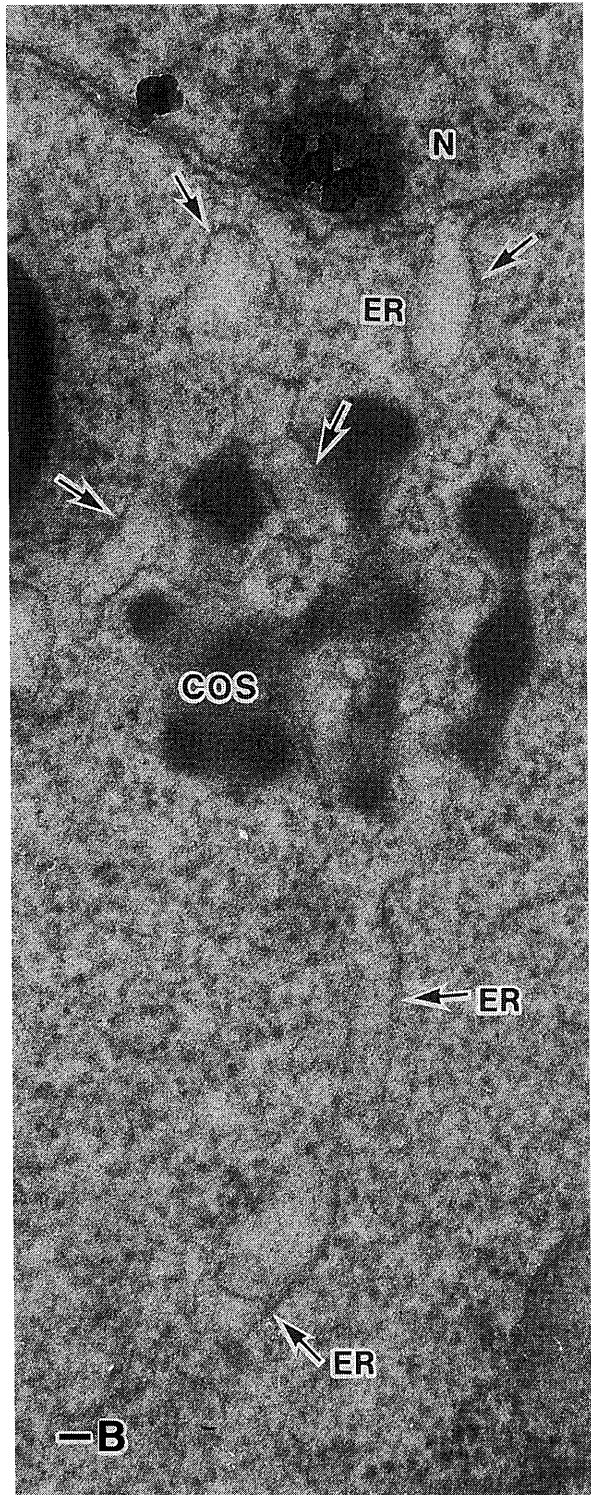
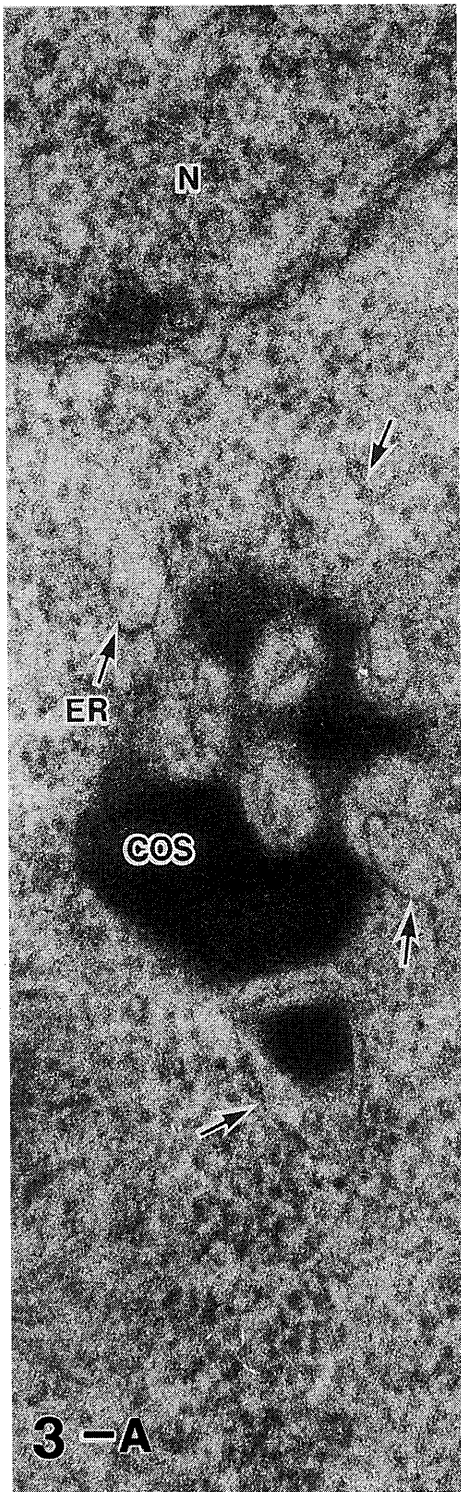


写真 3

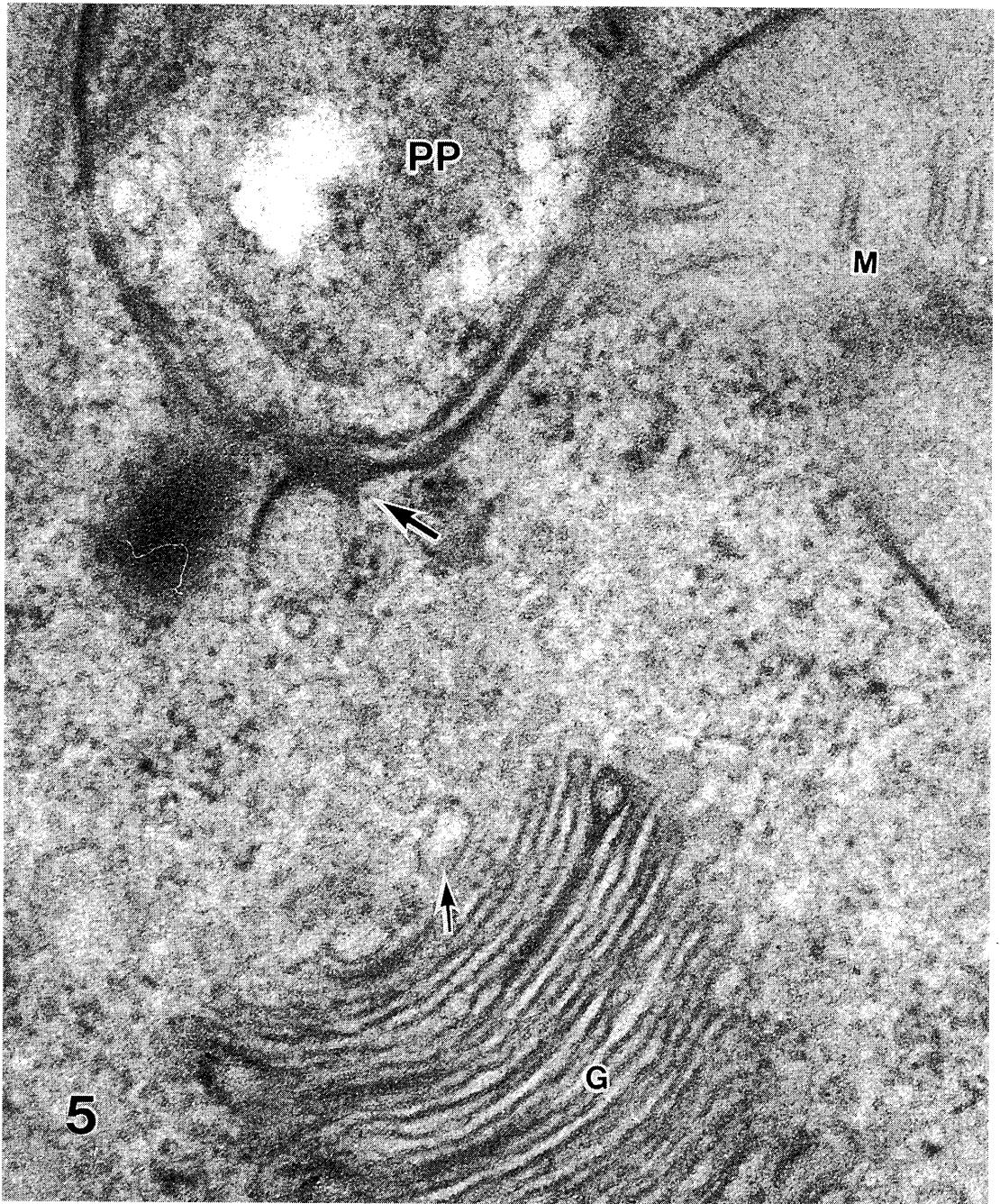


写真5

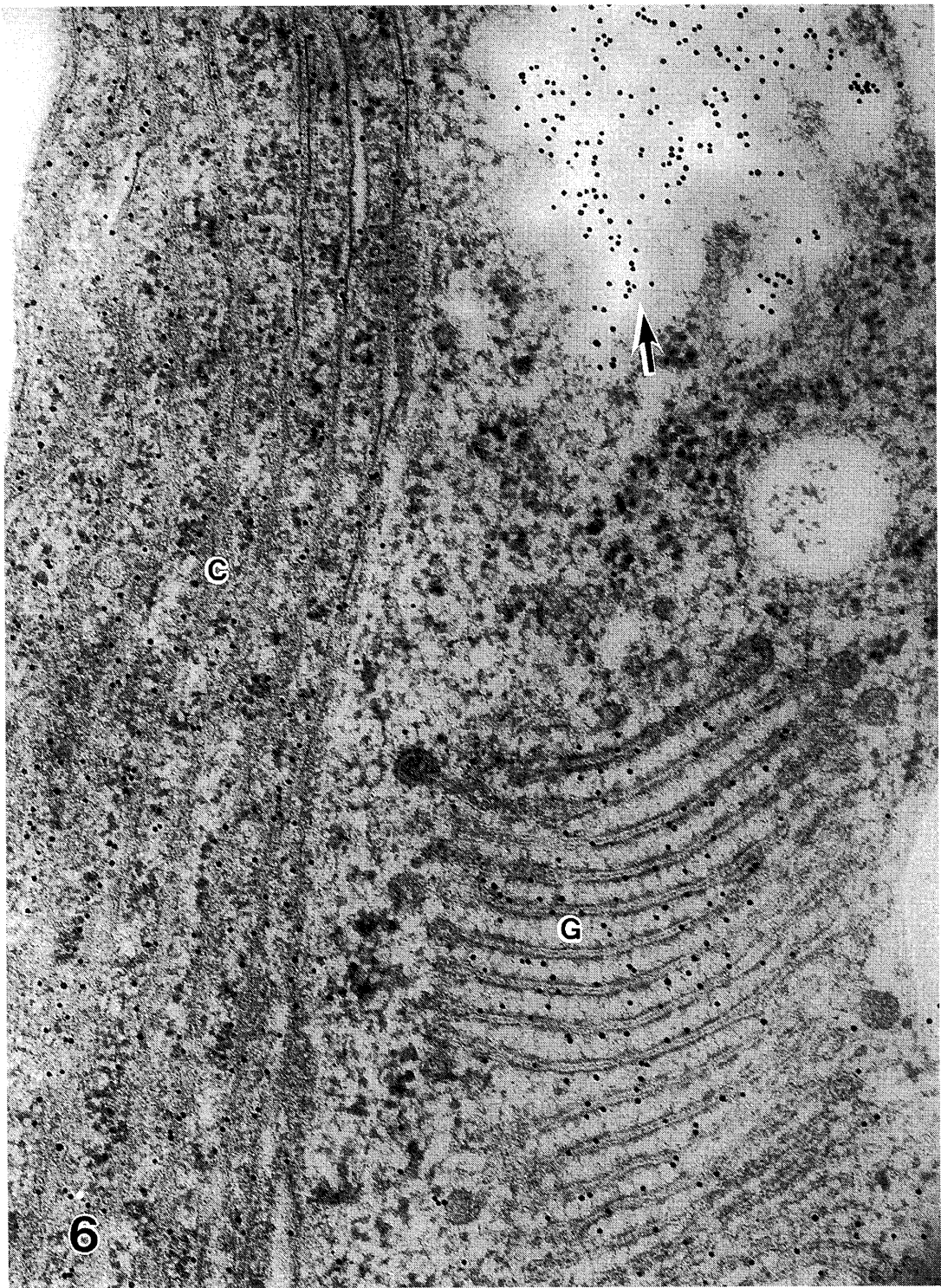


写真 6