

理学博士田沢 仁君の「巨大藻類細胞の生理学的研究、特に細胞灌  
流法と細胞モデルの開発」に対する授賞審査要旨

田沢 仁君が実験に用いた主材料は車軸藻類 (Characeae) の節間細胞で、巨大な円柱状をしている。田沢君はその特長を巧みに利用し、細胞灌流法によって細胞を生かしたまま液胞中の天然細胞液を人工液と置換することに成功した。また、灌流液に  $\text{Ca}^{2+}$  のキレート剤である EGTA を加えると、液胞膜が除去され細胞質の化学環境を細胞の内側から制御できるようになる。この際細胞質流動や細胞膜の機能は保持されているから、この系は植物細胞の一つの新しいモデルと言える。一方細胞を低温下で EGTA を含む高張液で原形質分離すると、細胞膜は細胞壁から離れ半透性を失うが液胞膜は無傷である。この場合は細胞質の化学環境を細胞の外側から制御できる。これも植物細胞の新しいモデルである。

田沢君は自ら開発したこれらの方法と各種の補助的手段を併用して細胞質流動、膜の起電性、膜興奮、膨圧調節、塩耐性など、植物細胞の基本的な生理特性に関して次々に注目すべき業績を挙げた。これらは一四〇余篇の欧文論文として国際的な専門誌に発表されている。以下三項目に大別して概要を述べる。

I、細胞質流動

液胞を灌流する際、液胞膜に加わるズリ応力を利用して細胞質流動の原動力を測定した。その値は  $0.17 \text{ N/m}^2$  で

他の方法で得られた値とよく一致するが、灌流法には操作上著しい利点がある。この方法で活動電位発生時に流動が停止する原因が、従来考えられていたような粘性の増加によるものでなく、原動力の一時的消失によることが明らかになり、さらに膜興奮によって起こる原動力の消失およびその回復に  $Ca^{2+}$  が鍵物質となることを示した。後述のように細胞膜には電圧依存性の  $Ca^{2+}$  チャネルが存在して、興奮時にはまずこのチャネルが開いて  $Ca^{2+}$  が流入し、細胞質の  $Ca^{2+}$  濃度が上昇する。これが流動停止の引金となる。正常細胞では興奮によって流動は一たん停止するが、数分後  $Ca^{2+}$  の濃度が  $10^{-7}M$  以下に下がり、流動が再開する。しかし灌流法によって細胞の内側から細胞質にタンパク質のリン酸化を促進する条件 (ATP-γ-S や脱リン酸化酵素の阻害剤) を与えると、 $Ca^{2+}$  を除去しても  $Ca^{2+}$  で停止した流動は回復しない。一方脱リン酸化を促進する処理 (脱リン酸化酵素を供与) 下では  $Ca^{2+}$  が存在しても流動は回復する。またこの脱リン酸化にはカルモジュリンの関与が一連の実験から示唆されている。いずれにせよ微量の  $Ca^{2+}$  がタンパク質のリン酸化・脱リン酸化を調節しながら流動の停止・回復を制御していることは、細胞質流動調節機構として重要な新知見である。

## II、膜生理学 (起電性イオンポンプと膜興奮)

植物細胞膜に代謝依存性の膜電位が存在することは知られていたが、直接 ATP が膜電位を制御する証拠はなかった。田沢君は液胞膜除去細胞で ATP の濃度を制御し、ATP の加水分解エネルギーによって駆動される起電性イオンポンプが細胞膜に存在することを実証した。また植物細胞でははじめて電圧依存性  $Ca^{2+}$  チャネルの存在を証明した。さらに細胞灌流法によって  $Ca^{2+}$  が直接  $Cl^{-}$  チャネルを活性化することを示した。これによって興奮時に  $Ca^{2+}$

と  $\text{Cl}^-$  の両チャネルのいずれが先に活性化されるかという永年の論争に終止符を打った。

### III、浸透生理学 (膨圧調節と塩耐性)

多くの海産藻類と同様に、汽水産 (brackish) の車軸藻シラタマモも膨圧を調節する。細胞を低張液に移すと膨圧は一時的に上昇するが、やがて  $\text{K}^+$  と  $\text{Cl}^-$  を放出して元の値にもどる。この現象にも  $\text{Ca}^{2+}$  が関与する。すなわち膨圧が上昇するとまず細胞膜の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが開いて外から  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させる (エクロリンの発光によって検出)。ついで  $\text{Ca}^{2+}$  は  $\text{K}^+$  と  $\text{Cl}^-$  チャネルを活性化し、 $\text{K}^+$  と  $\text{Cl}^-$  の流出を促進して細胞の浸透圧を下げ、膨圧も下げる。一方淡水産の車軸藻は高濃度の  $\text{Na}^+$  (100 mM) により傷害をうけ死に至るが、10 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  を共存させると傷害を免れる。このような  $\text{Ca}^{2+}$  の保護作用は高等植物でも古くから知られていたが、この  $\text{Ca}^{2+}$  の作用は細胞内の ATP の存在によって発揮されることがわかった。但しこの場合 ATP のはたらきは AMP、AMPPNP でも代用されることから ATP はエネルギー源として、あるいはタンパク質リン酸化を介して効いているのではなく、イオンチャネルに対する一種のエフェクターとして効いていることが明らかにされた。

これら田沢君の研究は、細胞灌流法その他の方法によって植物細胞の重要な諸機能の調節に  $\text{Ca}^{2+}$  の演ずる役割を実証した点で特筆すべきものである。同君はまた細胞横断浸透法による内向き外向きの水透過性の数理的解析、細胞の浸透圧の微小変化を膨圧変化から測定する膨圧秤法の開発などにも重要な役割を演じ、植物細胞生理学の基礎となる諸問題の解決に新しい道を拓いた。

1. Tazawa, M. (1957). Neue Methode zur Messung des osmotischen Wertes einer Zelle. *Protoplasma* 48, 342-359.
2. Tazawa, M. (1961). Weitere Untersuchungen zur Osmoregulation der *Nitella*-Zelle. *Protoplasma* 53, 227-258.
3. Tazawa, M. (1964). Studies on *Nitella* having artificial cell sap. I. Replacement of the cell sap with artificial solutions. *Plant & Cell Physiol.* 5, 33-43.
4. Tazawa, M. and U. Kishimoto (1964). Studies on *Nitella* having artificial cell sap. II. Rate of cytolysis and electric potential. *Plant & Cell Physiol.* 5, 45-59.
5. Tazawa, M. and N. Kamniya (1966). Water permeability of a Characean internodal cell with special reference to its polarity. *Aust. J. Biol. Sci.* 19, 399-419.
6. Tazawa, M. (1968). Motive force of the cytoplasmic streaming in *Nitella*. *Protoplasma* 65, 207-222.
7. Tazawa, M. and U. Kishimoto (1968). Cessation of cytoplasmic streaming of *Chara* internodes during action potential. *Plant & Cell Physiol.* 9, 361-368.
8. Tazawa, M. and K. Kiyosawa (1973). Analysis of transcellular water movement in *Nitella*. A new procedure to determine the inward and outward water permeabilities of membranes. *Protoplasma* 78, 349-364.
9. Tazawa, M., U. Kishimoto and M. Kikuyama (1974). Potassium, sodium and chloride in the protoplasm of Characeae. *Plant & Cell Physiol.* 15, 103-110.
10. Tazawa, M., M. Kikuyama and S. Nakagawa (1975). Open-vacuole method for measuring membrane

- potential and membrane resistance of Characeae cells. *Plant & Cell Physiol.* **16**, 611-621.
11. Tazawa, M., M. Kikuyama and T. Shimmen (1976). Electric characteristics and cytoplasmic streaming of Characeae cells lacking tonoplast. *Cell Struct. Funct.* **1**, 165-176.
  12. Shimmen, T., M. Kikuyama and M. Tazawa (1976). Demonstration of two stable potential states of plasmalemma of *Chara* without tonoplast. *J. Membrane Biol.* **30**, 249-270.
  13. Hayama, T., T. Shimmen and M. Tazawa (1979). Participation of  $\text{Ca}^{2+}$  in cessation of cytoplasmic streaming induced by membrane excitation in Characeae internodal cells. *Protoplasma* **99**, 305-321.
  14. Hayama, T. and M. Tazawa (1980).  $\text{Ca}^{2+}$  reversibly inhibits active rotation of chloroplasts in isolated cytoplasmic droplets of *Chara*. *Protoplasma* **102**, 1-9.
  15. Kawamura, G., T. Shimmen and M. Tazawa (1980). Dependence of the membrane potential of *Chara* cells on external pH in the presence or absence of internal adenosine-triphosphate. *Planta* **149**, 213-218.
  16. Kawamura, G. and M. Tazawa (1980). Rapid light-induced potential change in *Chara* cells stained with neutral red in the absence of internal Mg-ATP. *Plant & Cell Physiol.* **21**, 547-559.
  17. Tazawa, M. and T. Shimmen (1980). Direct demonstration of involvement of chloroplasts in the rapid light-induced potential change in tonoplast-free cells of *Chara australis*. Replacement of *Chara* chloroplasts with spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.* **21**, 1527-1534.
  18. Tazawa, M. and T. Shimmen (1980). Demonstration of the  $\text{K}^+$  channel in the plasmalemma of tonoplast-free cells of *Chara australis*. *Plant & Cell Physiol.* **21**, 1535-1540.
  19. Shimmen, T. and M. Tazawa (1983). Control of cytoplasmic streaming by ATP,  $\text{Mg}^{2+}$  and cyto-

- chalasin B in permeabilized *Chararaceae* cell. *Protoplasma* 115, 18-24.
20. Tomiなが, Y., T. Shimmen and M. Tazawa (1983). Control of cytoplasmic streaming by extracellular  $Ca^{2+}$  in permeabilized *Nitella* cells. *Protoplasma* 116, 75-77.
  21. Minura, T., T. Shimmen and M. Tazawa (1983). Dependence of the membrane potential on intracellular ATP concentration in tonoplast-free cells of *Nitellopsis obtusa*. *Planta* 157, 97-104.
  22. Minura, T., T. Shimmen and M. Tazawa (1984). Adenine-nucleotide levels and metabolism-dependent membrane potential in cells of *Nitellopsis obtusa* Groves. *Planta* 162, 77-84.
  23. Sakano, K. and M. Tazawa (1985). Metabolic conversion of amino acids loaded in the vacuole of *Chara australis* internodal cells. *Plant Physiol.* 78, 673-677.
  24. Tazawa, M., T. Shimmen and T. Minura (1986). Action spectrum of light-induced membrane hyperpolarization in *Egeria densa*. *Plant & Cell Physiol.* 27, 163-168.
  25. Tomiなが, Y., R. Wayne, H.Y.L. Tung and M. Tazawa (1987). Phosphorylation-dephosphorylation is involved in  $Ca^{2+}$ -controlled cytoplasmic streaming of characean cells. *Protoplasma* 136, 161-169.
  26. Tazawa, M., T. Shimmen and T. Minura (1987). Membrane control in the Characeae. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38, 95-117.
  27. Shiina, T. and M. Tazawa (1987). Demonstration and characterization of  $Ca^{2+}$  channel in tonoplast-free cells of *Nitellopsis obtusa*. *J. Membrane Biol.* 96, 263-276.
  28. Katsuhara, M. and M. Tazawa (1987). ATP is essential for calcium-induced salt tolerance in *Nitellopsis obtusa*. *Protoplasma* 138, 190-192.
  29. Okazaki, Y., Y. Yoshimoto, Y. Hiramoto and M. Tazawa (1987). Turgor regulation and cytoplasmic

- free  $\text{Ca}^{2+}$  in the alga *Lamprothamnium*. Protoplasma 140, 67-71.
30. Shiina, T. and M. Tazawa (1987).  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channel in plasmalemma of *Nitzschopsis obtusa*. J. Membrane Biol. 99, 137-146.
  31. Tazawa, M. and T. Shimmen (1987). Cell motility and ionic relations in characean cells as revealed by internal perfusion and cell models. Internat. Rev. Cytol. 109, 259-312.
  32. Shiina, T., R. Wayne, H.Y. Lim Tung and M. Tazawa (1988). Possible involvement of protein phosphorylation/dephosphorylation in the modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channel in tonoplast-free cells of *Nitzschopsis*. J. Membrane Biol. 102, 255-264.
  33. Wayne, R. and M. Tazawa (1988). The actin cytoskeleton and polar water permeability in characean cells. Protoplasma Suppl. 2, 116-130.
  34. Shiina, T. and M. Tazawa (1988).  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  efflux in tonoplast-free cells of *Nitzschopsis obtusa*. J. Membrane Biol. 106, 135-139.
  35. Takeshige, K. and M. Tazawa (1989). Determination of the inorganic pyrophosphate level and its subcellular localization in *Chara corallina*. J. Biol. Chem. 264, 3262-3266.
  36. Katsuhara, M., T. Minura and M. Tazawa (1989). Patch-clamp study on a  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated  $\text{K}^+$  channel in the tonoplast of the brackish Characeae *Lamprothamnium succinctum*. Plant Cell & Physiol. 30, 549-555.

(理化学研究所 植物生理学部)

櫻 井 謙

Tazawa, M. (ed.). Cell Dynamics I. 193 pp. Springer-Verlag, Wien/New York (1989).

FIG

- Tazawa, M. (ed.). Cell Dynamics II. 159 pp. Springer-Verlag, Wien/New York (1989).
- Tazawa, M., M. Katsumi, Y. Masuda and H. Okamoto (ed.). Plant Water Relations and Growth under Stress. 507 pp. (The 22nd Yamada Conference) Myu K.K., Tokyo (1989).