

A mechanism for protection of living cells from injury caused by dying cells
— Functional analysis of the TED4 protein secreted from developing tracheary elements —

植物のプログラム細胞死に伴う死細胞限定化機構
— 管状要素により分泌される TED4 タンパク質の機能解析 —

遠藤 暁詩

序

プログラム細胞死は動物と同様、植物においても正常な発生過程や、様々な外的ストレスに適応する上で欠くことのできない役割を担っている。道管・仮道管を構成する管状要素の分化においては、細胞は自らを分解し中空の構造物となることで通道要素として機能する。この管状要素の細胞内容物の分解には、液胞崩壊の後に機能するいくつかのプロテアーゼやヌクレアーゼ等が関与していることが近年の研究から明らかにされつつある。

動物の細胞死における最終的な細胞内容物の分解は、死細胞を取り込んだ他の細胞によって成される。一方、植物ではそのような死細胞除去システムは見つかっておらず、自己分解に用いられた加水分解酵素が活性を失わずに周辺に流出している可能性がある。

TED4 遺伝子はヒヤクニチソウ管状要素分化系において、管状要素に特徴的な形態変化が観察される以前から発現する遺伝子である。TED4 の機能を解明するための基礎として、修士課程において私はタンパク質レベルでの局在解析を行った。その結果 TED4 は細胞外に分泌されるタンパク質で、管状要素や師管要素、そして繊維細胞といった死に行く細胞にそれぞれの分化の初期から強く発現することを明らかにした。TED4 はオオムギの非特異的脂質輸送タンパク質 LTP2 と類似したタンパク質をコードしている。近年、Jones (1995, 1997) によってオオムギ LTP2 がプロテアーゼインヒビターとして機能することが示されたことから、TED4 タンパク質が死細胞から漏出するある種のプロテアーゼの活性を細胞外で阻害していることが予想された。そこで博士課程では、ヒヤクニチソウ管状要素分化系を用いて、まず TED4 タンパク質のプロテアーゼインヒビターとしての機能を検証し、次に細胞外で実際に標的プロテアーゼと相互作用していることを明らかにした上で、TED4 タンパク質が管状要素の細胞死の過程において周辺の細胞の生存に寄与している可能性を示した。

結果と考察

1. TED4 タンパク質のプロテアーゼインヒビター活性

ヒヤクニチソウ管状要素分化系では、単離葉肉細胞から管状要素への同調的な分化が誘導される。これまでに酸性に至適 pH を示すプロテアーゼの Z-Phe-Arg-MCA 分解活性が、培養細胞中で管状要素の自己分解の時期に、一過的かつ管状要素分化特異的に検出されることが示されている(図 1)。そこでまず、この分解活性に対する TED4 タンパク質の影響を組み替え TED4 タンパク質を用いて調べたところ、20-25% の阻害効果が認められた(図 2)。一般にタンパク質性プロテアーゼインヒビターは、標的プロテアーゼと強固な複合体を形成することが知られていることから、次に TED4 タンパク質をリガンドとした標的タンパク質のアフィニティー精製を試みた。得られた結合タンパク質を SDS-PAGE で分離したところ、複数のポリペプチドが TED4 タンパク質に結合していることが分かった(図 3A)。さらにこの TED4 結合タンパク質を二次元電気泳動で分離したところ、ポリペプチドの分離パターンが植物の 20S プロテアソームと非常に類似していた(図 3B)。そこで既知のプロテアソームインヒビターである lactacystin を用いて、管状要素分化特異的 Z-Phe-Arg-MCA 分解活性に対する TED4 タンパク質の影響を詳細に調べた(図 4)。その結果、lactacystin が TED4 タンパク質と同程度の阻害効果を示し(図 4A)、TED4 タ

ンパク質による阻害効果が lactacystin 存在下では検出されないことから (図 4B)、TED4 タンパク質によって阻害されていた活性はプロテアソーム由来であることが示唆された。

2. 管状要素分化過程におけるプロテアソームの関与

TED4 タンパク質の標的と予想されるプロテアソームの挙動を調べるために、イネのプロテアソーム C2 サブユニットに対する抗体を精製した後、免疫学的解析を行った。まず、この抗体がヒヤクニチソウ管状要素分化系でも C2 サブユニットと考えられるバンドを特異的に認識することを示した (図 5)。次に、管状要素におけるプロテアソームの蓄積を明らかにするために、ヒヤクニチソウ植物体の組織切片に対する免疫染色を行った (図 6)。その結果、シグナルは未成熟な管状要素の細胞質と幾つかの維管束細胞の核に認められた。続いて管状要素の二次壁肥厚が始まった時期に、プロテアソームインヒビターである lactacystin を培地に添加して培養を行い、管状要素分化におけるプロテアソームの役割を調べた。管状要素の二次細胞壁の形成は lactacystin 添加によっても遅れることなく進行するが (図 7A)、72-96 時間目では lactacystin によって細胞内容物の消失が抑制されることが示され (図 7B)、プロテアソームが管状要素の自己分解過程に関与する可能性が示唆された。

3. 管状要素自己分解過程における TED4 タンパク質とプロテアソームの相互作用

プロテアソームが未成熟な管状要素に蓄積されていることと TED4 タンパク質が管状要素の自己分解以前から培地に分泌されていることから、両者の相互作用は管状要素の自己分解によって細胞外にプロテアソームが流出することで成立するものと予想された。そこで自己分解によりプロテアソームを含む細胞内容物が培地に流出してくる時期の培地タンパク質から、抗体カラムを用いて TED4 タンパク質および TED4 結合タンパク質の単離を試みた (図 8)。その結果、抗 TED4 抗体カラムに結合した画分に TED4 タンパク質 (図 8C) とプロテアソーム C2 サブユニット (図 8B) が検出され、TED4 タンパク質とプロテアソームが培地中で複合体を形成することが示された。また、TED4 タンパク質が培地中でプロテアソームのインヒビターとして機能しているか調べるために、管状要素の自己分解の直前 (培養 56 時間目) に細胞を新しい培地に移すことで培地中から TED4 タンパク質が除去された状態をつくった。このような培地交換を行った場合でも管状要素の分化は通常通りに進行した (図 9A)。培養 60-72 時間目には培地交換の有無に関わらず、管状要素から流出した細胞内容物由来と考えられる Z-Phe-Arg-MCA 分解活性が培地中に検出された (図 9A)。また、培地中から TED4 タンパク質を除去した場合、Z-Phe-Arg-MCA 分解活性の一部が lactacystin により阻害されることから (図 9C)、TED4 タンパク質が存在しない培地中 (図 9B) ではプロテアソームが活性を持つことが示唆された。さらに、TED4 タンパク質が lactacystin と同様の阻害効果を持つこと、この TED4 タンパク質の阻害効果は lactacystin によって打ち消されることから (図 9C)、TED4 タンパク質が培地中でプロテアソーム活性を阻害していることが示唆された。次に、培地中に存在するプロテアソーム活性を特徴づけるために、従来からプロテアソーム活性の検出に用いられている 3 種類の基質を用いた活性測定を行った (図 10)。その結果、TED4 タンパク質の非存在下でのみ、プロテアソームのキモトリプシン様活性が lactacystin と TED4 タンパク質により阻害されることが明らかとなった (図 10A)。これらの結果から、プロテアソームは活性を持った状態で管状要素から細胞内容物と共に漏出し、漏出したプロテアソームの活性は培地中に蓄積されている TED4 タンパク質によって阻害されていることが強く示唆された。

4. 管状要素分化における TED4 タンパク質の役割

本来細胞内で働く加水分解酵素が、細胞外でその分解活性を発揮してしまうような状況は、周辺の細胞に有害であることが予想されることから、TED4 タンパク質除去による非管状要素細胞のダメージを調べた (図 11)。管状要素の自己分解の直前に TED4 タンパク質を培地から除去した場合、自己分解終了後では通常の培養に比べて非管状要素細胞の死亡率が増加していた (図 11A)。この死亡率の増加は、TED4 タンパク質を除去した際に GST-TED4 を代わりに添加しておくことで抑制された (図 11A)。したがって、TED4 タンパク質は管状要素分化過程において周辺の細胞の生存に寄与していることが明らかとなった。この TED4 タンパク質の死亡率抑制効果が、プロテアソームの活性を阻害していることに起因するものであれば、lactacystin によっても同様の死亡率抑制効果が得られると考えられた。そこで TED4 タンパク質除去の際に、新しい培地に lactacystin を添加して培養を行ったところ、lactacystin によっても死亡率の抑制が認められた (図 11B)。以上の結果より、管状要素の自己分解過程において細胞内容物が漏出する際に、TED4 タンパク質はプロテアソームに対するインヒビターとして機能することで、周辺の細胞を損傷から守っていることが示唆された (図 12)。

まとめ

1. TED4 タンパク質は、自己分解に伴って上昇する管状要素分化特異的タンパク質分解活性に対して、プロテアソームの活性を選択的に阻害することが示唆された。
2. 管状要素に蓄積されるプロテアソームは自己分解過程にも関与し、その後細胞外へ漏出することが示唆された。
3. TED4 タンパク質は細胞外においてプロテアソームに対するインヒビターとして機能することが示された。
4. 管状要素のプログラム細胞死において TED4 タンパク質は、細胞外に漏出したプロテアソームの活性を阻害することで周辺の細胞を守る役割をしていることが示唆された。

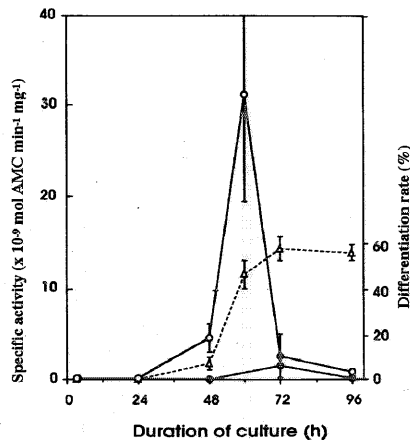


図1. ヒヤクニチソウ管状要素分化系における Z-Phe-Arg-MCA 分解活性の経時的変化
管状要素分化 (Δ) に伴った細胞内の Z-Phe-Arg-MCA 分解活性 (\circ) の上昇は pH 5 の反応液中で過剰的に検出される。Minami and Fukuda 1995, *Plant Cell Physiol.* より引用。

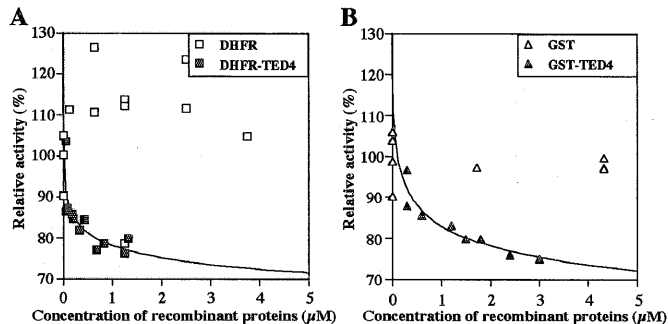


図2. 組み替え TED4 タンパク質の管状要素分化特異的 Z-Phe-Arg-MCA 分解活性に対する影響
培養後 60 時間目の細胞粗抽出液中の Z-Phe-Arg-MCA 分解活性を pH 5 で測定した。測定直前に DHFR あるいは DHFR-TED4 (A)、GST あるいは GST-TED4 (B) を横軸に示した濃度になるように添加した。

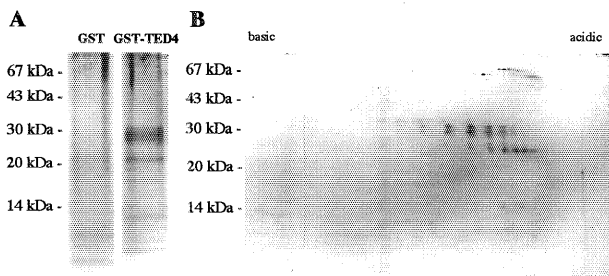


図3. 培養細胞からの TED4 結合タンパク質の精製
管状要素分化誘導条件下、60 時間目の細胞内可溶性タンパク質を CM-Sepharose で濃縮し、GST、GST-TED4 をリガンドとしたアフィニティー精製を行った。アフィニティーカラムを 0.5 M NaCl を含む 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) で十分に洗浄した後、7 M Urea を含む 100 mM glycine-HCl buffer (pH 3.0) で GST および GST-TED4 にそれぞれ結合していたタンパク質を溶出させた。(A) GST および GST-TED4 結合タンパク質の SDS-PAGE における泳動像。(B) GST-TED4 結合タンパク質の二次元電気泳動における泳動像。

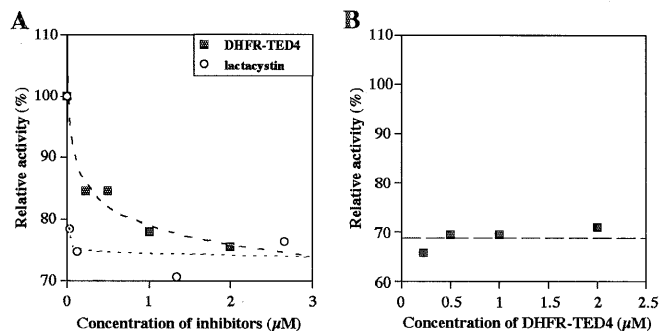


図4. Lactacystin と TED4 タンパク質の、管状要素分化特異的 Z-Phe-Arg-MCA 分解活性に対する阻害効果の比較
培養後 60 時間目の細胞粗抽出液中の Z-Phe-Arg-MCA 分解活性を pH 5 で測定した。A、測定直前に lactacystin あるいは DHFR-TED4 を横軸に示した濃度になるようにそれぞれ添加した。B、異なる濃度の DHFR-TED4 を 2 μM lactacystin と共に添加して分解活性を測定した。

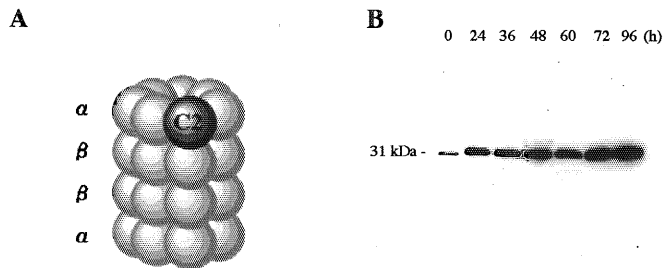


図5. ヒヤクニチソウ管状要素分化系におけるプロテアソームの蓄積パターン
A、プロテアソーム触媒ユニットである 20S プロテアソームの模式図。C2 サブユニットは α タイプのサブユニットの一つ。OsPAF1 と呼ばれる。以降の解析は、イネの C2 サブユニットに対する抗体を用いて行った。B、ヒヤクニチソウ管状要素分化系におけるプロテアソーム C2 サブユニットの蓄積パターン。管状要素分化条件下で図に示された時間培養した細胞から可溶性タンパク質を調製し、各レーン 80 μg でそれぞれイムノブロット解析を行った。

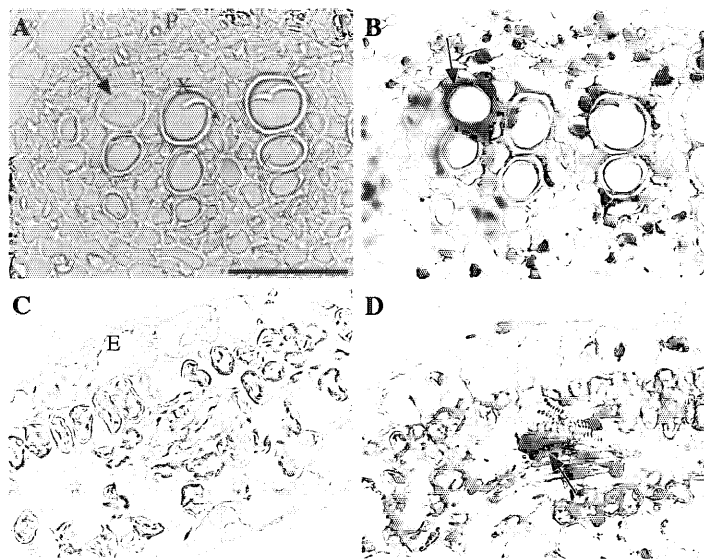


図6. ヒヤクニチソウ植物体におけるプロテアソーム C2 サブユニットの局在パターン
播種後 2 週間目の植物体の、莖頂近傍の節間 (A と B) および未展開の本葉 (C と D) の横断切片に対し免疫染色を行った。A と C、抗 C2 サブユニット抗体処理無し。B と D、抗 C2 サブユニット抗体処理あり。E、表皮; P、節部; X、木部; 矢印、未成熟な管状要素; スケールバー、50 μm。

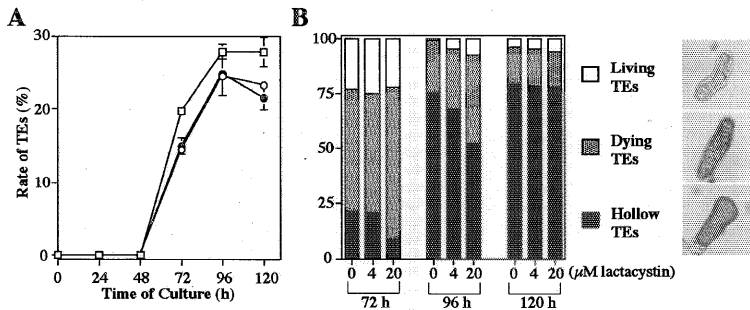


図7. 管状要素分化の自己分解過程に対する lactacystin の影響
Lactacystin は培養後 48 時間目に培地に添加した。A. 4 μM lactacystin 添加 (○)、20 μM lactacystin 添加 (●) および無添加 (□) の場合の管状要素 (TE) 率の経時変化。エラーバーは標準誤差を示す。B. A の各培養条件下での living TEs, dying TEs, hollow TEs の全管状要素に占める割合。Evan's blue で染色されずかつ細胞内容物が観察されるものを living TEs, evan's blue で染まる管状要素を dying TEs, evan's blue で染色されない中空の管状要素を hollow TEs と区別した。無添加の培養と比較して、20 μM lactacystin 添加の場合培養 72 時間目および 96 時間目において dying TEs の増加と hollow TEs の減少が認められた ($P < 0.02$, $n = 3$, 二標本 t 検定)。

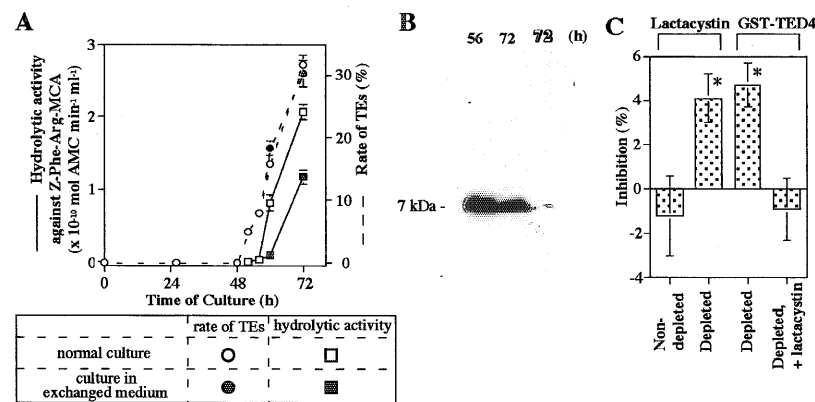


図9. 培地中でのプロテアソームの加水分解活性の検出
A. 管状要素 (TE) 率と培地中の Z-Phe-Arg-MCA 分解活性の経時変化。培養後 56 時間目において細胞を新しい培地に移して培養を継続した。B. 培地中の TED4 タンパク質蓄積量。通常の培養条件下で 56 (56)、72 (72) 時間目、および 56 時間目に培地交換を行いさらに 16 時間培養を継続した場合 (72) の培地タンパク質に対するイムノブロット。C. TED4 タンパク質を除去した培地中の Z-Phe-Arg-MCA 分解活性に対する lactacystin および GST-TED4 のインヒビター活性。通常の培養後 72 時間目の培地 (Non-depleted) と培地交換処理を経て合計 72 時間培養した際の培地 (Depleted) 中の Z-Phe-Arg-MCA 分解活性のうち、2 μM lactacystin と 2 μM GST-TED4 によって抑制された割合を縦軸に示した。「Depleted, + lactacystin」は GST-TED4 のインヒビター活性を測定する前に、培地サンプルに 2 μM lactacystin を添加してあることを意味している。「*」ではインヒビター活性が認められる ($P < 0.02$, $n = 6$, 一標本 t 検定)。エラーバーは標準誤差。

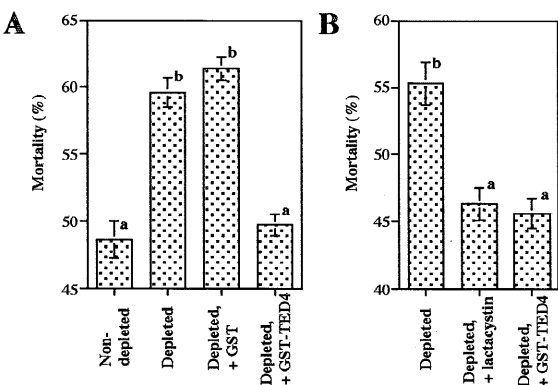


図11. TED4 タンパク質による死亡率の抑制効果
培養後 96 時間目において、evan's blue を排除できない、または構造が著しく損なわれている非管状要素細胞を死細胞とした。管状要素はすべて生細胞とした。培地交換による TED4 タンパク質の除去 (Depleted) は培養後 56 時間目に行った。また「+ GST」、「+ GST-TED4」、「+ lactacystin」は培地交換の際に新しい培地にそれぞれ 2 μM になるように添加したことを示す。「a」と「b」では差が認められる (A と B いずれも $P < 0.001$, $n = 6$, 二標本 t 検定)。エラーバーは標準誤差。A. TED4 タンパク質除去による死亡率への影響。B. lactacystin と TED4 タンパク質による死亡率抑制効果の比較。

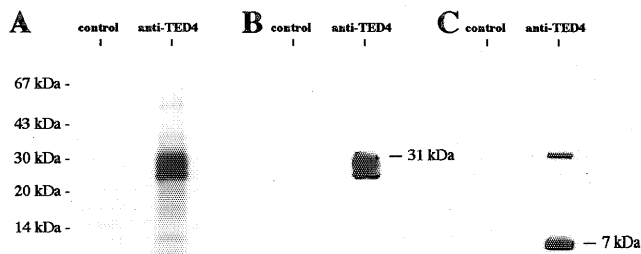


図8. 細胞外における TED4 タンパク質-プロテアソーム複合体の検出
培養後 60 時間目の培地から、100 kDa 以上のタンパク質を回収し、抗マウス IgG1 抗体 (control) および抗 TED4 抗体 (anti-TED4) をそれぞれ Sepharose に共有結合させて作製した抗体カラムに添加した。0.5 M NaCl を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) でカラムを十分に洗浄した後、100 mM glycine-HCl (pH 2.5) で結合していたタンパク質を溶出させた。A. それぞれの抗体カラムから溶出させたタンパク質の SDS-PAGE による泳動像。B. 抗 C2 サブユニット抗体を用いた A に対するイムノブロット。C. 抗 TED4 抗体を用いた A に対するイムノブロット。

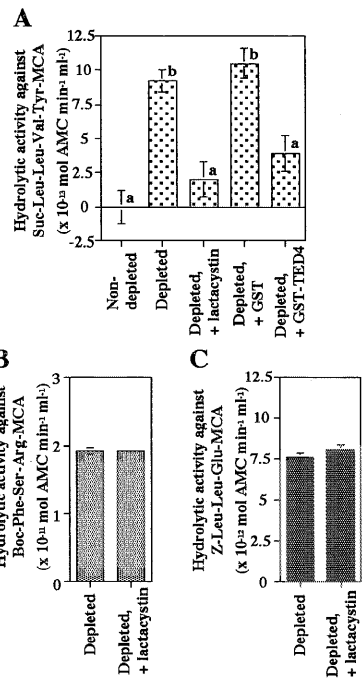


図10. 培地中でのプロテアソームの加水分解活性の検出
培養後 56 時間目における培地交換処理を経て合計 72 時間培養した際の培地 (Depleted) を中性 pH に調整し、その培地中の加水分解活性を Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (A)、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (B)、および Z-Leu-Leu-Glu-MCA (C) を基質として測定した。「+ lactacystin」、「+ GST」、「+ GST-TED4」はそれぞれを 2 μM 加えてから分解活性を測定したことを示す。「a」と「b」では差が認められる ($P < 0.02$, $n = 4$, 二標本 t 検定)。エラーバーは標準誤差。

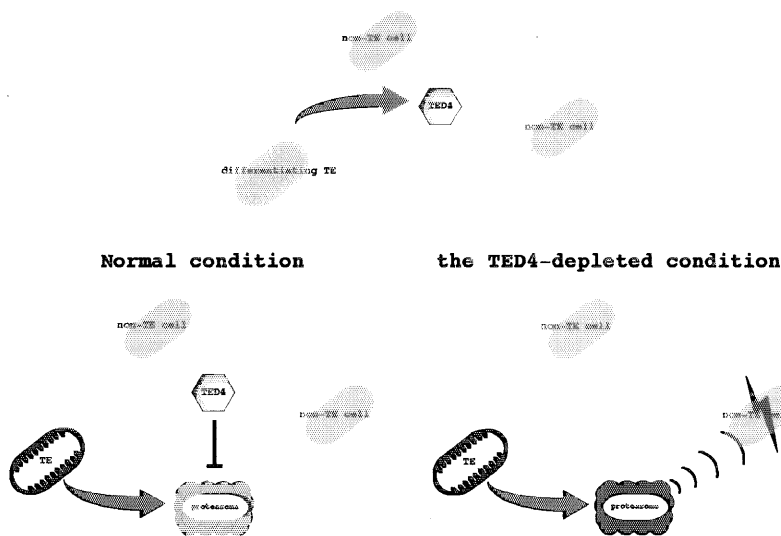


図12. 本研究のまとめ
管状要素の自己分解開始前 (上段)、自己分解開始後 (下段) での、細胞外における TED4 タンパク質とプロテアソームの挙動を模式的に表現した。TE、管状要素。