

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 10 年度博士課程進学
氏名 飯倉 寛
指導教官 中西友子

論文題目

Al 処理により誘導されるタバコ培養細胞の応答解析

世界の農業可能面積の約 42% (約 46 億 ha) を占める酸性土壌 (1984 年資料)、このうち 30% 以上が作物の生育不可能な強酸性土壌である。塩類溶脱や酸性雨により土壌の酸性化は現在でも地球規模で進行し、その面積も増加し続けている。土壌の酸性化に伴い、通常不溶性の化学形態をとっているアルミニウム (Al) の可溶性が高まり、交換性 Al (植物有害 Al) が生じる。この Al が酸性土壌における作物生育阻害の主要な原因の一つである。

Al による植物の生育阻害については多くの報告がなされているが、障害はまず根端の伸長阻害に現れる。植物種により Al の伸長阻害濃度は異なるが、Al は極めて短時間で組織内に取り込まれ伸長阻害を引き起こす。しかしその阻害機構については未だ解明されておらず、特に Al の化学形態の複雑性、微量 Al の検出及び定量が困難であることから、細胞内での局在様式、細胞の応答等については不明な点が多い。

近年では根における Al の細胞伸長阻害に関しての報告が多く、組織レベルでの障害メカニズムが注目されている。しかしながら細胞レベルにおける、特に核を含む細胞内オルガネラへの Al の影響についての研究はほとんど進んでいない。細胞単位での Al に対する応答を解析することは根の組織全体に対する Al の影響を解析する上での基盤研究でもある。そこで筆者は研究を通してひとつの細胞、特に細胞内オルガ

ネラへの Al の影響も視野に入れ、Al の細胞に与える影響について調べた。

実験にはタバコ培養細胞 (BY-2) を用いた。通常 BY-2 はムラシゲ・スケーグ培地を用いて培養するが、Al 処理培地は溶液中で Al との結合が考えられるリン (P) と EDTA を除去した培養液を用いた。P の非存在下でも BY-2 は 48 時間までは通常培養と同程度の生育を示した。Al 処理濃度は基本を 100 μM とし、実験により 500 μM までの Al 処理濃度を設定した。

① Al と他の元素との相関解析

Al 処理により、他元素 (Fe, Ca, Mg 等) の細胞内含量へ及ぼす影響を細胞内 Al 含量変化の点から考察した。定量には ICP-AES による解析の他に放射化分析法も用いた。測定した元素の中でも特に細胞内 Fe 含量が Al に特異的な変動を示し、Al 処理による細胞内 Al 含量が増加するに従い Fe 含量も増加した。しかしながら処理溶液中から Fe を除去すると Al 含量の増加が抑えられたため、細胞内への Al の取込みには Fe の存在が重要であることが示された。細胞増殖度に関する Al 障害も Fe 非存在下では低くなることが明らかとなった。また Al 処理に伴う細胞中のホウ素 (B) 含量変化を調べるため PGA (prompt-gamma-analysis) による微量ホウ素の高感度測定法を開発した。B は植物にのみ必須元素であり、かつ Al と同族元素であることから B による Al 障害の緩和作用が期待されたからである。しかしながら、細胞内 B 含量は Al 処理の影響はほとんど受けず、また Al 処理溶液中の B 濃度を 100 μM から 1 mM と変化させても特に Al 障害による細胞増殖度に差はみられなかった。

② 核への Al 処理に対する影響

細胞は定常期よりも対数増殖期の方が Al 障害を受けやすいことが示された。これは細胞壁 (膜) のみならず、細胞内 (特に核) に取り込まれる Al の影響のためではないかと考えられた。そこで、FCM (Flow cytometry) を用いて Al 処理による核の状態変化を解析した。核の検出には PI 染色法を用いたが、16 時間の Al 処理により通常の 2n の核よりも小さい位置における PI 蛍光発色が確認され、この発色の増加は Al 処理濃度や Al 処理時間に依存していた。この結果は DNA の断片化が生じているためと考えられ、細胞壁 (膜) だけでなく核への Al の特異的な影響が存在することが示された。そこで細胞周期における細胞の Al 感受性に差異があるかどうかを調べるため、アフィディコリン処理による同調培養も行った。同調した細胞群を通常培養に移した後、各細胞周期における細胞群に対して 16 時間の Al 処理を行ったところ、S 期と M 期に Al 処理を開始した細胞群に対して DNA の断片化が多く現れることが示された。

③ 細胞レベルでの Al 高感度検出法の確立

Al 障害メカニズムの解析が困難である最大の要因の一つに Al の検出感度が低い事が挙げられる。また実験に有効な Al の放射性同位元素の入手が困難であることから細胞内への Al 局在解析については明確な知見が得られてこなかった。これまで常用されてきたモリンやヘマトキシリン染色では細胞内の細部の Al 分布の解析を行うことは非常に困難である。そこで、高感度の Al 検出が可能な蛍光色素ルモガリオン染色法の確立は本研究を進めるに当たり不可欠な基盤技術である。本研究で確立したルモガリオン染色法により、共焦点レーザー顕微鏡下で細胞内の一定断面における微量 Al を検出することが初めて可能となった。ルモガリオンは Al と特異的に結合し、かつその安定度定数が 5.6×10^7 と非常に高く、長時間のレーザー照射による退色もほとんど認められなかったため、共焦点レーザー顕微鏡下での細胞内細部の Al 局在性解析を行うにあたり、特に優れた蛍光試薬であることが示された。本手法により Al 処理細胞の Al 局在様式の空間的分布が画像として得られ、細胞膜や核、他のオルガネラへの微量 Al の局在様式を検討することが容易となった。

ルモガリオン染色法確立に際しての最大のネックはホルムアルデヒドによる細胞固定処理の際に Al が細胞内で移動するかどうかという点であった。様々な検討の結果、ポリリジンを用いスライドグラスへ細胞を吸着させると、全く同一の細胞をモリン染色後にルモガリオン染色し観察することが可能となり、固定時の Al の移動はほとんど無視できることがわかった。また各処理段階における処理溶液への Al 溶出量を ICP-AES を用いて定量したところ、固定時の Al 溶出は微量であり、上記手法の有効性が裏付けられた。

④ Lumogallion 染色法による細胞内 Al 動態解析

ルモガリオン染色法を用いて Al 処理細胞について経時的な Al 蓄積動態の解析を行った。通常の Al 処理区では時間とともに細胞内への Al 蓄積は一定の増加傾向を示した。局在部位については細胞壁（膜）への Al 吸着のみならず、核への高い Al 局在性が示された。それに比して、-Fe 区また酸化防止剤添加区（AFD 区）においては Al 蓄積による蛍光強度の増加は低く抑えられていた。しかしながら、短時間（～3 時間）の Al 処理で細胞内顆粒への非常に強い Al 局在が認められた。この現象は Fe の有無や過酸化に関わらず生じ、Al 処理時間が 3 時間をすぎると徐々に顆粒が消失していくことが確認された。当初この顆粒はプラスチド（アミロプラスト）、つまり Al 処理によるデンプンの過剰蓄積が生じているのではないかと考えられたが、フェノー

ル-硫酸法によるデンプン定量を行ったところ、Al 処理によるデンプンの過剰蓄積は認められなかった。

次にミトコンドリアや小胞体を染色する DiOC 6 を用いて同時染色を行ったところ、ルモガリオンによる Al 局在性と極めて高い相関が示された。

⑤ Al 処理による Apoptosis 誘導メカニズムの解析

FCM 解析で DNA の断片化が示されたことから、Al 処理によるアポトーシス様現象が生じていることが示唆された。植物細胞でのアポトーシス関連の研究は動物細胞などに比べると非常に遅れており、そのメカニズムについては不明な点が多い。Al 処理による DNA 断片化の原因として第一に考えられるのは Fe 共存下による過酸化ストレスと考えられる。そこで活性酸素検出試薬 H₂DCFDA を用いて各処理区における細胞内活性酸素の検出を行ったところ、Fe 共存下では徐々に活性酸素量が増加したが Fe 非存在下、及び AFD 区では活性酸素はほとんど検出されなかった。

Al 処理による経時的な DNA の断片化過程を詳細に検討するために断片化 DNA をビオチン標識後、フルオレセイン標識ストレプトアビジンで蛍光染色した。Al 処理後 8 時間後から DNA 断片化が現れ始めたが、興味深いことに AFD 区においても Al 処理 24 時間後には DNA の断片化が確認された。この結果は酸化ストレス以外にも断片化を誘導するメカニズムが存在することを示すものである。AFD 区に共通する Al 特異的応答として小胞体への Al 局在性が存在することから、酸化ストレスだけではなく小胞体ストレスによる DNA 断片化の誘導が生じていると考えられた。

1. Iikura, H. *et al.* In Bell, RW. and Rerkasem, B. ed, Boron in Soils and Plants. 1997: 63-67
2. Iikura, H. *et al.* Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry (JRNC). 2001:249 (2) 499-502
3. Nakanishi, T. Iikura, H. *et al.* In Bell, RW. and Rerkasem, B. ed, Boron in Soils and Plants. 1997: 69-72
4. Kataoka, T. Iikura, H. *et al.* Soil Sci. Plant Nutr. 1997, 43: 1003-1007
5. Tanoi, K. Iikura, H. *et al.* Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry (JRNC) 2001:249 (2)