

# 論文の内容の要旨

## Studies on the Mechanism of Reactive Oxygen Species Generation Involved in Tracheary Element Differentiation

論文題目 管状要素分化誘導に関わる活性酸素発生機構の研究

氏名 中名生幾子

### 序論

高等植物の道管は、根から吸収した水分や塩類を運搬するために、極めて特殊な形態的分化を遂げる。細胞表層では、水の強い陰圧に耐えられるようにリグニン化した二次細胞壁が形成され、細胞内では核をはじめとする細胞内容物が完全に消失し空洞の筒を作る。このように、一つの細胞で二次細胞壁形成、リグニン化、プログラム細胞死等の一連の事象が時間的空間的に秩序だてて起こるためには、それらを統率するシグナルの存在が不可欠であると考えられる。あることが分かっているが、それらを受容する仕組みや、その後のシグナリングについては現在のところほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、近年、細胞のシグナル分子としての働きを担っていることが近年明らかになりつつある活性酸素に着目し、ヒヤクニチソウ *in vitro* 管状要素分化系を用いて、管状要素分化における活性酸素の役割を解明するとともに、その発生機構を明らかにすることを目的として行った。

### 結果と考察

#### (1) *in vitro* 管状要素分化で生じる活性酸素に関する解析

植物の維管束組織で活性酸素の発生が盛んに起こっていることは広く知られている。そこで、この活性酸素の管状要素分化に関わる役割を知るために、ヒヤクニチソウ *in vitro* 管状要素分化系を用いて以下の実験を行った。まず、分化の過程でどのような活性酸素種がどのようなタイミングで発生しているのかを調べた。nitro blue tetrazolium (NBT) は活性酸素の中でも $O_2^-$ を検出し、青色の不溶性色素のブルーホルマザンが $O_2^-$ 発生部位に沈着する。この試薬を用いて培養細胞を染色した結果、管状要素分化条件で培養した細胞で特異的に細胞の先端が染色された。この染色は管状要素分化初期に一過的にみられ(図1)、 $O_2^-$ スカベンジャーであるMCLAにより阻害された。このことから、この染色が $O_2^-$ の発生

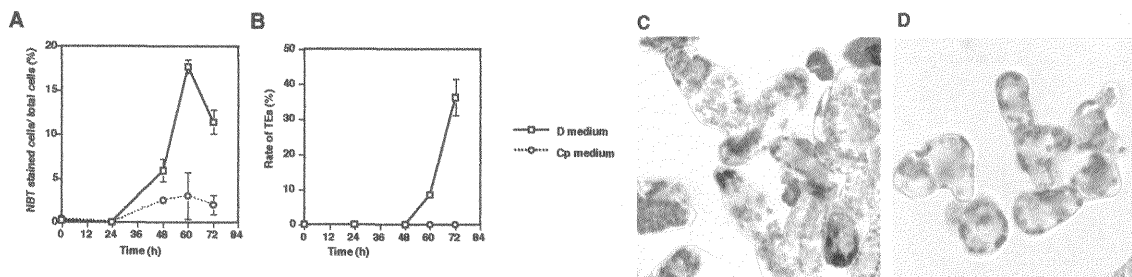


図1 培養細胞のNBTによる染色

(A) 分化誘導培地 (D medium) と対照培地 (Cp medium) で培養した細胞をNBT染色液 (250  $\mu$ M NBT, 10  $\mu$ M DDC, 1 mM  $NaN_3$ , 50 mMリン酸カリウム緩衝液 pH 7.8) で10分染色し洗浄後顕微鏡下で先端が青く染まる細胞の割合を測定した。(B) 同培養での管状要素分化率 (C) 分化誘導培地で培養開始48時間目にNBT染色した細胞。(D) 対照培地で培養開始48時間目にNBT染色した細胞。

によるものであり、管状要素分化初期に細胞先端に $O_2^-$ を発生する細胞が存在することが示された。またNBTの染色はNADPH oxidaseの阻害剤であるdiphenyleneiodonium (DPI) で阻害された。このことより、 $O_2^-$  はNADPH oxidase 様の酵素によって生じることが示唆された。一方、細胞の  $H_2O_2$  を diaminobenzidine (DAB) を用いて検出したところ、培養開始48時間目以降、 $H_2O_2$  は細胞全体に存在しており、NBT染色で見られたような局在性はなかった。このことは、局所的に発生する  $O_2^-$  がリグニン合成の基質である  $H_2O_2$  の前駆物質として発生されるものでないことを示唆している。

次に、この局所的な細胞表層の $O_2^-$ と二次細胞細胞壁形成との関連を、各種蛍光標識レクチンとNBTの二重染色により調べた。そのうちFITC-WGAで認識される部位が $O_2^-$ 発生領域に一致した(図2)。

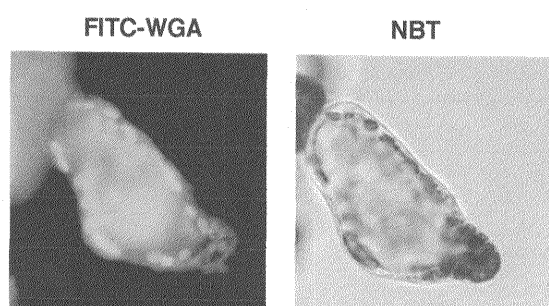


図2 FITC-WGAとNBTによる二重染色

培養開始48 時間目の細胞を $2\mu\text{g/ml}$  FITC-WGAにより10 分間染色し、さらにNBT染色液で10分間染色した細胞を蛍光顕微鏡により観察した。bar =  $20\mu\text{m}$

FITC-WGAは、管状要素二次壁形成初期に細胞先端の二次壁を認識する。これらの結果から、 $O_2^-$ 発生と二次細胞壁沈着開始部位が一致することが明らかとなった。 $O_2^-$ の機能を調べるために、 $1\mu\text{M}$  DPIを二次細胞壁形成前に培地に添加し $O_2^-$ 発生を阻害して培養を継続したところ、分化が著しく阻害された。この時、WGAで認識される初期二次細胞壁形成も阻害されていた(図3)。一方、二次細胞壁

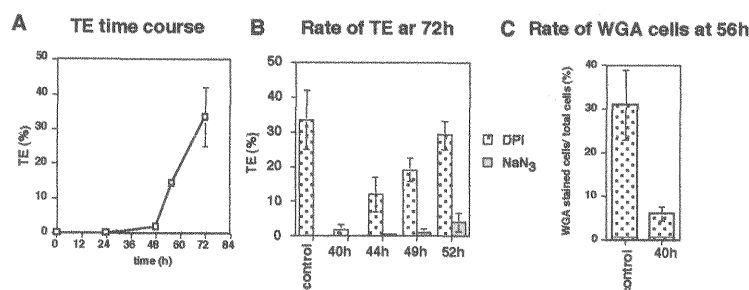


図3 NADPH oxidase阻害剤による管状要素二次壁形成開始の阻害

(A) (B), (C)の培養のDPI無添加条件での管状要素分化率。(B) 培養開始後40, 44, 49, 52 時間目にそれぞれ $1\mu\text{M}$  DPI (DPI) あるいは $100\mu\text{M}$   $\text{NaN}_3$  ( $\text{NaN}_3$ ) を培地に添加し培養を継続し、72 時間目の管状要素分化率を計測した。controlはDPI無添加。(C) 培養開始後40 時間目に $1\mu\text{M}$  DPIを培地に添加し培養を継続し、56 時間目にRhodamine-WGAで染色される細胞の割合を計測した。controlはDPI無添加。

形成開始直後に与えたときには、二次細胞壁形成そのものも(図3)、その後におけるリグニン沈着も阻害しなかった。次に、この現象を遺伝子レベルで解析した。二次細胞壁形成を阻害するタイミングでDPIを与え、道管及び木部柔細胞で発現しリグニン合成の鍵酵素と考えられるフェニルアラニンアンモニリアーゼ遺伝子PAL1と、未成熟な道管に特異的に発現し細胞死に関連するシステインプロテアーゼ遺伝子ZCP4のmRNA量を調べた。すると、DPI添加によりPAL1 mRNA蓄積は培養60時間目では抑制されたものの後はほとんど抑制されなかったが、ZCP4 mRNAの蓄積は抑えられた。これらの結果が

ら、NADPH oxidase様の酵素の活性は、二次細胞壁形成と細胞死の両方の過程のイニシエーションに必要であるがリグニン合成そのものには必要ないことが示唆された。

## (2) 管状要素分化特異的Rac small GTPase に関する解析

植物の細胞膜NADPH oxidaseは動物の食細胞の細胞膜NADPH oxidaseと非常に似た性質を持ち、過敏反応でのオキシデーティブーストに関わっていることが様々な植物で明らかになってきている。また、NADPH oxidaseは膜タンパク複合体でRac small GTPase を制御因子とすることが知られている。そこで、管状要素二次細胞壁形成初期に見られるO<sub>2</sub>-発生に関わると考えられるNADPH oxidase複合体の活性制御機構に迫るため、ヒヤクニチソウ管状要素分化特異的に発現するRac small GTPaseの単離を試み、最終的に2クローンの単離に成功した。単離した二つのRac small GTPaseはアミノ酸レベルで82.1%の一致度を示し、植物のRac small GTPaseの系統樹の中では別々のサブグループに属していた。二つの遺伝子がコードするタンパクが実際にsmall GTPaseの特性を有しているか確かめるために、大腸菌によりリコンビナントタンパクを作成しGTP結合活性、GTP加水分解活性を測定した。その結果ZeRAC1, ZeRAC2ともにGTP結合活性、GTP加水分解活性を有する事が明らかとなった。

次に、GFP融合タンパクを用いて細胞内局在を調べた。wild typeのZeRAC1のN末にGFPを融合させたものは、細胞質、細胞膜など細胞によって様々な局在を示したが、17番目のグリシンをバリンに変えたconstitutive active型のZeRAC1にGFPを融合させたタンパクの局在を調べたところ、ほとんどの細胞で細胞膜に局在していた。一方、wild typeのZeRAC2のN末にGFPを融合させたタンパクは細胞膜に局在した。このことから、ZeRAC1は活性型になって初めて細胞膜に局在するが、ZeRAC2は基本的に細胞膜に局在することが示された。また双方とも、C末端のグラニルグラニル化シグナルを欠損させると細胞質にとどまったことから、細胞膜への局在はC末端に修飾されたグラニルグラニル基を介して起こることが示された。

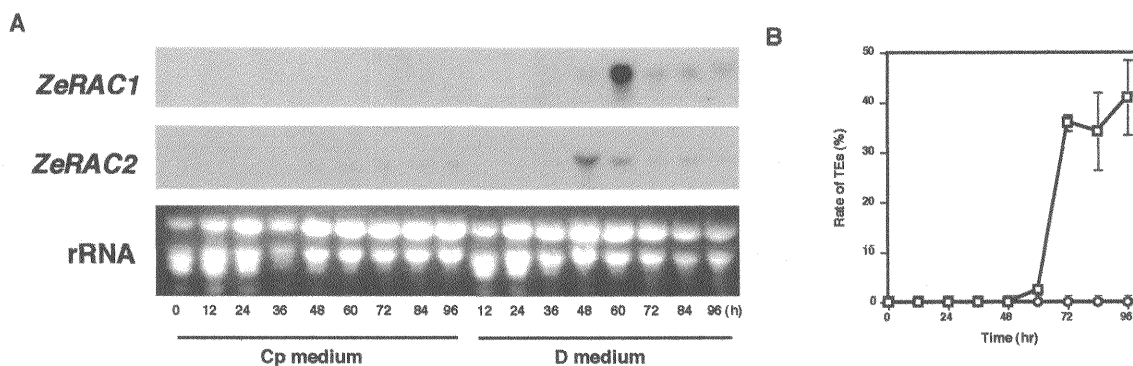


図4 ZeRAC1およびZeRAC2の経時的RNAゲルブロット解析

(A) 分化誘導培地 (D medium), 対照培地 (Cp medium) での図に示した時間における各遺伝子の発現量を比較した。最下段にエチジウムブロミドによるゲル染色像を示した。(B) 同培養での管状要素分化率

*In vitro*管状要素分化系でのZeRAC1およびZeRAC2 mRNAの発現を経時的に調べたところ、ZeRAC1は60時間目をピークに、ZeRAC2は48時間目をピークに、双方とも管状要素分化培地でのみ二次細胞壁形成初期に一過的な発現がみられた (図4)。また、植物体でのZeRAC1, ZeRAC2 mRNAの蓄積パターンを*in situ* hybridizationにより調べた。その結果、ZeRAC1は木部柔細胞、未成熟な道管、師部細胞に強

く発現し、*ZeRAC2*は道管に隣接する柔細胞、未成熟な道管、師部細胞に強い発現がみられた。これらの結果から、*ZeRAC1*、*ZeRAC2*はともに維管束細胞に強く発現し、管状要素形成過程では二次細胞壁形成や細胞死などの形態変化に先立って一過的に発現することが明らかになった。この発現のタイミングは局所的 $O_2^-$ 発生のタイミングと一致することから、これらRac small GTPaseがNADPH oxidase複合体の活性制御を介して $O_2^-$ の発生に関与している可能性が考えられた。

そこで、これらRac small GTPaseが実際に二次細胞壁形成に先立つ局所的 $O_2^-$ 発生の制御に関与しているかどうかを明らかにするために、それぞれ*ZeRAC1*の22番目、*ZeRAC2*の20番目のスレオニンをアスパラギンに変えるdominant negative型の*ZeRAC*遺伝子をパーティクルボンバードメント法により管状要素培養細胞に導入し、NBT染色を行った。導入のコントロールとしてGFP遺伝子をco-transformし、GFPが発現している細胞のうちNBTで染色される細胞の割合を比較した(図5)。その結果、dominant

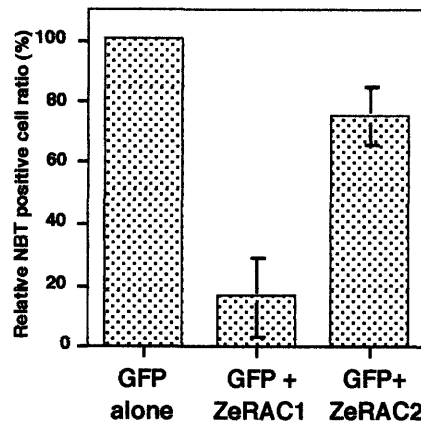


図5 dominant negative 型*ZeRAC1*および*ZeRAC2* コンストラクトの導入による $O_2^-$ 発生への影響

培養開始40時間目の細胞にGFPコンストラクトのみ(GFP alone), dominant negative 型*ZeRAC1*コンストラクトとGFPコンストラクト(GFP+*ZeRAC1*DN), dominant negative 型*ZeRAC2* コンストラクトとGFPコンストラクト (GFP+*ZeRAC2*DN) をそれぞれ導入し培養を継続し、65時間目にNBT染色を行った。GFPで光っている細胞のうち、先端が NBT で青く染まっている細胞の割合を計測し、GFPコンストラクトのみ導入した時のその値を100 として相対値を表した。培養細胞全体のうち先端がNBTで青く染まっている細胞の割合はどの培養でも有意差はなかった。結果は独立した5回の実験での値の平均値で表した。error barは標準偏差。

negative型*ZeRAC2*を導入したものはGFPのみを導入したものと比較してほとんど変わりがなかったが dominant negative型 *ZeRAC1*を導入したものは、NBTで染色される細胞の割合が減少していた。このことから、*ZeRAC1*が二次細胞壁形成に先立つ局所的な $O_2^-$ 発生にNADPH oxidase複合体の活性制御を介して関与していることが示唆された。

次に、*ZeRAC1*により制御されるNADPH oxidase遺伝子の単離を試みた。まず、ハクニチソウESTライブラリーを用いたマイクロアレイで二次細胞壁形成初期特異的に発現が見られるNADPH oxidaseの部分配列を有する5個のクローンを見出した。これらの配列をもとに全長のNADPH oxidase cDNAの単離を試み、二つの全長cDNA, *Zerboh1*および*Zerboh2*を単離した。それらの塩基配列を解析したところ、ESTより見出された5クローンはすべて*Zerboh2*に由来するものであった。このことより、活性酸素発生系システムのコンポーネントであると考えられる*ZeRAC1* と*Zerboh2*が局所的 $O_2^-$ 発生のタイミングと一致して発現することが明らかとなった。