

## 論文の内容の要旨

論文題目 A Study on the Mechanism of Nuclear Degradation during Autolysis of Tracheary Elements  
(管状要素自己分解プログラムにおける核分解機構の研究)

氏名 井藤 純

道管・仮道管を構成する管状要素は、成熟すると、特徴的な二次壁を持つ中空の死細胞となる。管状要素の分化過程では、二次壁形成とほぼ同時にプログラム細胞死が誘導される。このプログラム細胞死の実行過程では、管状要素細胞が自ら細胞内容物を分解すること、この自己分解は液胞崩壊を引き金として進行すること、さらに、自己分解過程では、酸性加水分解酵素の活性が一過的に上昇することなどが明らかとなっている。細胞死の実行過程で起こる諸事象の中でも、核分解は細胞の死を決定付けるという意味において非常に重要な事象と考えられる。脊椎動物、昆虫や線虫の代表的なプログラム細胞死であるアポトーシスでは、少なくとも核 DNA の分解過程は3段階に分けられ、これには複数の DNase が厳密な制御下、協調的に作用していることが知られている。管状要素自己分解過程で起こる核分解は液胞崩壊後、10分以内に起こることが報告されているが、その分子機構については不明である。そこで、本研究では、核 DNA 分解を触媒する DNase に着目し、管状要素自己分解過程で起こる核分解機構の解明を試みた。本研究では、まず、*in vitro* ヒヤクニチソウ管状要素分化系 (図 1) を用いて、管状要素分化過程で自己分解の時期に発現が上昇する S1 型ヌクレアーゼ遺伝子 *ZEN1* の遺伝子産物の免疫局在解析を行った。また、同時に、*ZEN1* と同じような発現パターンを示す他の加水分解酵素、*ZRNase I* (リボヌクレアーゼ遺伝子) と *ZCP4* (システインプロテアーゼ遺伝子) の遺伝子産物についても、特異抗体を作製し、免疫局在解析を行った。そして、これらの結果をもとに、自己分解特異的加水分解酵素の細胞内局在と機能との関係を考察した。次に、*ZEN1* を含め管状要素分化過程で活性化される DNase を再探索したのち、*in vitro* で核 DNA 分解能をもつ DNase を調査した。*in vitro* で核 DNA 分解能を有していた *ZEN1* について、逆遺伝学的手法を用いて *in vivo* での核分解に果たす役

割を解析した。最後に、得られた結果を総合して、管状要素自己分解過程で起こる核分解機構について考察した。

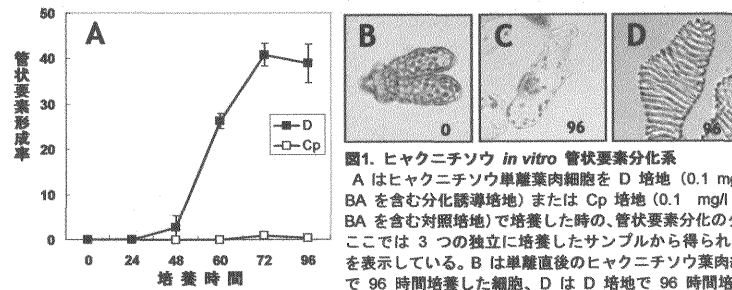


図1. ヒヤクニチソウ *in vitro* 管状要素分化系  
A はヒヤクニチソウ単離葉肉細胞を D 培地 (0.1 mg/l NAA と 0.2 mg/l BA を含む分化誘導培地) または Cp 培地 (0.1 mg/l NAA と 0.0001 mg/l BA を含む対照培地) で培養した時の、管状要素分化のタイムコースを示す。ここでは 3 つの独立に培養したサンプルから得られた平均値と標準偏差を表示している。B は単離直後のヒヤクニチソウ葉肉細胞、C は Cp 培地で 96 時間培養した細胞、D は D 培地で 96 時間培養して分化した管状

### 1. ZEN1 の液胞蓄積機構の解析

抗 ZEN1 抗体を作製し、ZEN1 タンパク質の発現を調べたところ、ZEN1 は管状要素自己分解過程で、分化誘導条件でのみ、一過的に発現が上昇することが明らかとなった。次に、ZEN1 を発現している細胞を特定するため、whole mount での免疫染色を行った。光学顕微鏡レベルでは、ZEN1 シグナルは管状要素細胞で多く見られたが、一部、二次壁が見られない細胞にもシグナルが認められた。より詳細な細胞内局在を把握するため、免疫電顕による局在解析を試みた。材料として、分化途中の細胞が多く存在する培養 54 時間目の細胞を凍結置換固定したものを用いた。その結果、ZEN1 は電子顕微鏡レベルで二次壁が認められる細胞にのみシグナルが検出されたことから、シグナルが認められた非管状要素細胞は光学顕微鏡レベルでは捉えられないが、二次壁形成のごく初期段階にある管状要素細胞であると予想された。また、免疫電顕の結果、ZEN1 は分化しつつある管状要素の液胞に蓄積することが示された

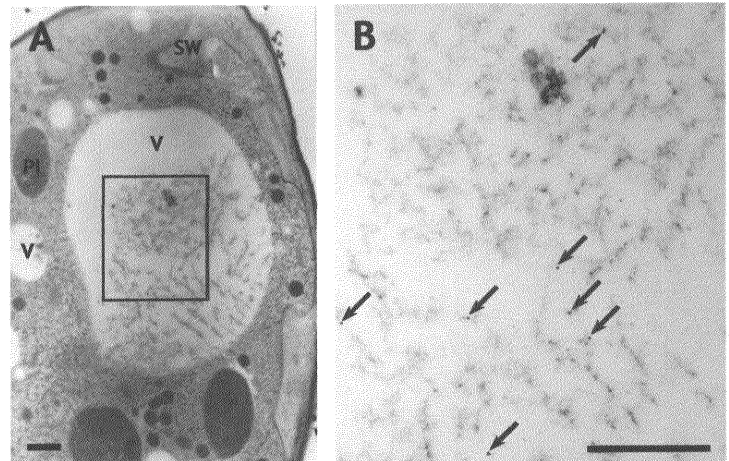


図 2. 培養 54 時間目の培養細胞における ZEN1 タンパク質の免疫電顕像  
D 培地で 54 時間培養した細胞を凍結置換固定後、樹脂に包埋し、90 nm の超薄切片を作製した。それらを抗 ZEN1 抗体を用いて免疫染色を行い、さらに、ウラニル・鉛で二重染色した後、電子顕微鏡下で観察した。A は抗 ZEN1 抗体で免疫染色した培養 54 時間目の管状要素細胞の免疫電顕像。B は A のアスタリスクで示した部分の拡大像。矢印は ZEN1 シグナルを示す。M, ミトコンドリア; PI, プラスチド; SW, 二次細胞壁; V, 液胞。バーは 1.0 μm を示す。

(図 2)。ZEN1 は N 末にシグナルペプチドと予想される配列を含んでおり、細胞内では分泌経路に乗って輸送される事が予想された。実際、ZEN1 シグナルはゴルジ体、ゴルジ小胞で検出された。さらに、培養 50 時間目に輸送阻害剤 Brefeldin A (BFA, 終濃度 8 μg/ml) を加え 1 時間処理した細胞を材料に免疫電顕を行ったところ、BFA 処理の結果崩壊したと思われる ER/ゴルジ体、ER/ゴルジ体が小胞化した Brefeldin induced vesicle (BV) に多数の ZEN1 シグナルが観察された。以上の結果から、ZEN1 は管状要素細胞で発現し、ER→ゴルジ体→ゴルジ小胞という分泌経路を経て液胞へと輸送されることがわかった。また、オートファジーの経路を阻害することが知られるシステインプロテアーゼの阻害剤、E-64d で処理した細胞の免疫電顕の結果、ZEN1 の液胞への輸送はオートファジーの経路を介さないことも示された。

次に、ZEN1 と同じような発現パターンを示す他の加水分解酵素、ZRNase I と ZCP4 についても、それぞれの特異抗体を作製し、免疫局在解析を行った。いずれも ZEN1 同様、未成熟な管状要素特異的に蓄積し、細胞内ではゴルジ体、ゴルジ小胞、液胞に蓄積することがわかった。これらの結果から、

管状要素自己分解関連酵素は同様な経路で液胞に積極的に蓄積されることが明らかになった。

## 2. 管状要素自己分解過程の核 DNA 分解に関わる DNase

管状要素自己分解過程の核 DNA 分解を触媒する DNase を解析するためには、まず、管状要素分化過程でどのような DNase が活性化されているかを調べる必要がある。そこで、はじめに、管状要素分化過程で活性化される DNase を特定するため、*in gel* DNase assay を中性、酸性条件、異なるイオン存在下など様々な条件を変えて行った。その結果、管状要素分化過程では少なくとも異なる 5 種類の DNase の活性が検出され、この内、自己分解の時期にのみ活性化されているのは ZEN1 と 24 kDa  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  要求性ヌクレアーゼの 2 種類のみであった。ZEN1 は中性、酸性どちらでも活性をもち得るが、酸性条件下の方がより強い活性を示す。一方、24 kDa ヌクレアーゼは中性条件下でのみ活性を持つ。以上の結果から、ZEN1 と 24 kDa ヌクレアーゼは別々の細胞内コンパートメントで活性化され、管状要素自己分解過程で起こる核 DNA の分解に関与している可能性が示唆された。これらの DNase の *in vitro* での核 DNA 分解能を調べるため、*in vitro* エンドヌクレアーゼ活性を測定した。培養 20 時間目のヒヤクニチソウ培養細胞から単離した核を培養 24、60 時間目の細胞抽出液と反応させたところ、培養 60 時間目の細胞抽出液を酸性条件、 $\text{Zn}^{2+}$  存在下で反応させたときのみ、核 DNA 分解活性が検出された。この条件で活性化される DNase は ZEN1 と 40 kDa ヌクレアーゼの 2 種類である。そこで、培養 60 時間目の細胞抽出液を抗 ZEN1 抗体とインキュベートさせた後に単離核を加えて核 DNA 分解能を調べたところ、免疫前抗血清では影響はないが、抗 ZEN1 抗体を加えると  $\text{Zn}^{2+}$  依存的な核 DNA 分解がほぼ完全に抑制されることがわかった。この結果から、ZEN1 が管状要素自己分解での核 DNA 分解の鍵酵素であることが示された。

次に、*in vivo* での管状要素の核 DNA 分解に対する ZEN1 の機能を探るため、分化直前の細胞にパーティクルガン法によりアンチセンス ZEN1 遺伝子を導入した。この方法では、アンチセンス遺伝子と一緒に GUS 遺伝子を導入しており、GUS 染色で青く染まった細胞を遺伝子導入に成功した細胞とみなしている。遺伝子導入効率は約 3%であり、遺伝子導入による分化率の変化は認められなかった。遺伝子導入後 26 時間目（培養 66 時間目）では、全体の約 20%の細胞が管状要素へと分化しており、その内、

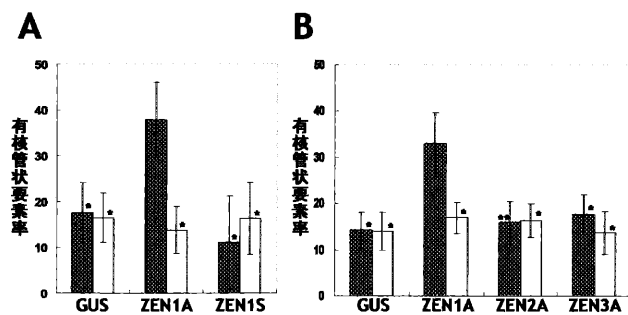


図 3. アンチセンス ZEN1 遺伝子導入による管状要素細胞での核 DNA 分解の抑制

(A, B) 金粒子でコーティングした GUS 遺伝子 p35SGUS (GUS) をアンチセンス ZEN1 遺伝子 p35SZEN1A (ZEN1A)、センス ZEN1 遺伝子 p35SZEN1S (ZEN1S)、アンチセンス ZEN2 遺伝子 p35SZEN2A (ZEN2A) あるいはアンチセンス ZEN3 遺伝子 p35SZEN3A (ZEN3A) とパーティクルボンパードメント法により D 培地で 40 時間培養した細胞に導入し、さらに 26 時間培養した後、回収した。回収した細胞を X-Gluc で 12 時間染色した後、観察直前に DAPI 染色を 15 分行い、GUS 染色された管状要素細胞、されなかった管状要素細胞、それぞれにつき、核の有無を顕微鏡下で計測した。黒いカラム: 全形質転換された管状要素当たりの形質転換された有核管状要素の割合。白いカラム: 全非形質転換管状要素当たりの管状要素の割合。ここでは 3 つの独立に培養したサンプルから得られた平均値と標準偏差を表示している。p35SZEN1A が導入された細胞とその他のコンストラクトが導入された細胞の値には、有意差がある (\*,  $P < 0.02$ , two sample *t* test; \*\*,  $P < 0.05$ , two sample *t* test)。

非形質転換管状要素では、15%の管状要素が核を有していた (図 3A 白カラム)。形質転換管状要素では、センス遺伝子を導入した場合には、ベクターのみを導入したコントロールと差が見られなかったが、アンチセンス ZEN1 遺伝子が導入された管状要素では、核分解が抑制されていた (図 3A)。さらに、ZEN1

と同じ S1 型ヌクレアーゼ遺伝子ファミリーに属し、管状要素分化過程で発現する *ZEN2*、*ZEN3* 遺伝子のアンチセンス遺伝子を導入したところ、これらの遺伝子では核分解は影響されなかった (図 3B)。以上の結果から、*ZEN1* が管状要素自己分解過程で起こる核 DNA の分解を触媒する主要なヌクレアーゼであることが明らかとなった。

本研究では、自己分解関連遺伝子の一つである *ZEN1* を中心に取り上げ、(1) *ZEN1* は管状要素に分化しつつある細胞でのみ発現し、その液胞に蓄積している、(2) *ZEN1* の液胞輸送経路は ER、ゴルジ体を介した分泌経路である、(3) *ZEN1* と同じ時期に発現する他の加水分解酵素遺伝子 *ZRNase I* と *ZCP4* の遺伝子産物も *ZEN1* と同様の経路を経て液胞に蓄積している、ことを明らかにした。

さらに、自己分解過程での核 DNA 分解に着目し、(4) 管状要素分化過程で活性化される DNase は 5 種類存在し、その内、自己分解の時期にのみ活性化されるものは 2 種類 (*ZEN1*、24 kDa ヌクレアーゼ) である、(5) *ZEN1*

は *in vitro* で酸性条件下で  $Zn^{2+}$  依存的に核 DNA 分解を触媒できる、(6) *in vivo* での *ZEN1* 遺伝子発現の阻害は管状要素細胞の核 DNA 分解を阻害する、ことを見出した。

これらの結果をもとに以下の仮説を提案した (図 4)。*ZEN1* は管状要素へと分化しつつある細胞で、自己分解直前に *ZRNase I* や *ZCP4* といった自己分解関連酵素に共通した発現誘導機構により発現が誘導される。合成された *ZEN1* 及び *ZRNase I* や *ZCP4* は、N 末に存在するシグナルペプチドの働きにより、ER 内腔へ導かれ、さらにゴルジ体へと輸送される。ゴルジ体から、各酵素はおそらく別々のゴルジ小胞によって液胞へと運ばれる。*ZEN1* の至適 pH は酸性領域であることから、液胞内で活性化された *ZEN1* は液胞崩壊後に機能すると予想される。また、自己分解直前の時期になると、*ZEN1* が液胞内に蓄積される一方で、24 kDa  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  要求性ヌクレアーゼは直接核にターゲットされ、核内の  $Ca^{2+}$  濃度の上昇により活性化され、二本鎖 DNA の部分消化を触媒する。液胞崩壊後、液胞内に蓄積していた *ZEN1* 及び他の酸性加水分解酵素の協調的な働きにより、大規模な核分解が促進され、核 DNA はほぼ完全に消化される。その後、穿孔から漏れ出た DNA の残渣が培地中に分泌された DNase(s)により完全消化される。

今後は、*ZEN1* のシロイヌナズナホモログ *BFN1* の発現解析やノックアウトの解析を通して、今回発表した核分解機構が他の植物プログラム細胞死にも関与しているかどうかについて検討する予定である。また、本研究で提唱した核 DNA 分解機構のモデルを検証するために、新たに同定された 24 kDa ヌクレアーゼに関して、遺伝子の単離、細胞内局在の特定、さらには  $Ca^{2+}$  イオン濃度の変化と活性化の関係性を明らかにする必要がある。

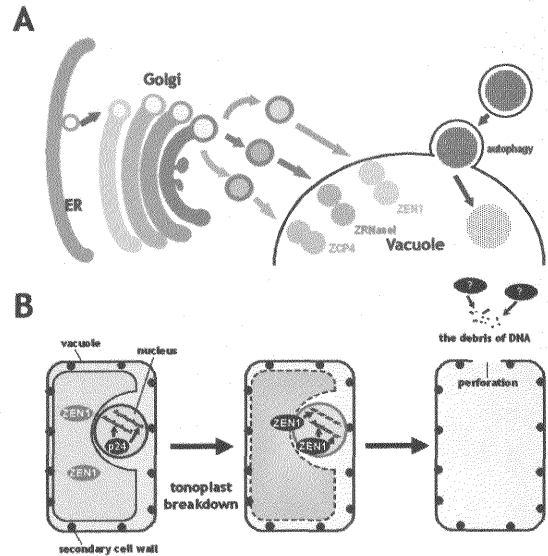


図 4. 管状要素分化過程における核 DNA 分解のモデル図  
(A) ヌクレアーゼ、プロテアーゼの液胞への蓄積。  
(B) 液胞崩壊前後の核 DNA の分解。