

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 15 年度博士課程進学
氏 名 吉永 恵子
指導教員名 堤 伸浩

論文題目 植物細胞死におけるオルガネラ動態の解析

多細胞生物は、細胞の分裂・増殖とともに、積極的な細胞死によって個体が維持されている。動物では積極的な細胞死は特に「アポトーシス」と呼ばれている。アポトーシスはエネルギーを必要とし、特有の遺伝子群によって制御される過程により死ぬ現象であるため「プログラム細胞死(PCD)」としてとらえられている。植物のプログラム細胞死では、アポトーシス小体を形成し、隣接した細胞により貧食除去される、という現象は細胞壁の存在が邪魔になり起こらないために「アポトーシス」としてはとらえられていない。しかしながら、植物においても特定の遺伝子により制御されているプログラム細胞死は生命の維持に欠かせない。導管形成、子葉鞘、湖粉層などの器官形成や、老化、病原菌感染による過敏感細胞死、葉の形態形成などが植物プログラム細胞死の例として挙げられる。しかしながら、植物におけるプログラム細胞死は制御因子の同定がほとんど行われていないため、分子機構は未解明な部分が多い。

本研究では、アポトーシス促進因子である Bax や活性酸素誘導剤により細胞死を人為的に引き起こした。これらは DNA の断片化など、アポトーシス様の植物細胞死を誘導する酸化ストレスである。そして酸化ストレス下で引き起こされる植物プログラム細胞死の制御機構を解析することを目的に、オルガネラの動態に注目した解析を行った。

1. Bax による植物細胞死誘導機構の解析

アポトーシス促進因子である Bax は、動物細胞において細胞死のシグナルを受け取るとミトコンドリアに局在し、細胞死カスケードを活性化させる。Bax の相同遺伝子は植物や酵母には存在しない。しかしながら、植物や酵母中で人為的に過剰発現させると細胞死を誘導することが知られている。本研究では、デキサメタゾン (DEX) 誘導系ベクター (pTA7002) を利用し、培地中への DEX 添加や葉への DEX 処理によって植物細胞中での Bax 発現を可能にし、人為的に植物細胞死を誘導できる系を確立した。Bax 誘導性植物細胞死におけるオルガネラの動態を解析するため、Bax 形質転換シロイヌナズナとオルガネラ移行 GFP を有するシロイヌナズナの交配を行い、2 重形質転換体 (mt-GFP/Bax、pt-GFP/Bax) を作出した。これらの 2 重形質転換体に DEX 処理を行い Bax を発現させた後、共焦点蛍光顕微鏡による観察を行った。その結果、Bax 発現後初期にミトコンドリアは桿状から球状へと変化した。葉緑体も内部構造に異常が生じ、内容物が葉緑体中からサイトゾルへと漏出した。また、ミトコンドリアや葉緑体の変化が起こった後に液胞の膨張、崩壊がみられた。これらのオルガネラの形態変化は電子顕微鏡による観察でも確認された。

さらに Bax の植物細胞内局在を調べるため、タバコ培養細胞 BY-2 やシロイヌナズナに対して Bax-GFP の形質転換を行った。その結果、植物細胞中においても Bax はミトコンドリアに局在化した。そして、Bax-GFP を発現した細胞ではミトコンドリアの膜電位が低下していることが明らかとなった。

また、Bax 誘導性細胞死における葉緑体の影響を調べるため、Bax 形質転換シロイヌナズナより誘導したシロイヌナズナ培養細胞を用いた実験を行った。培養細胞では葉緑体は発達しておらず、プロプラスチドのみ存在する。植物体と同様に、シロイヌナズナ培養細胞においても DEX 処理による Bax タンパク質の発現が確認された。DEX 処理を行った結果、Bax 形質転換系統においてのみ、著しい死細胞の増加がみられた。つまり、発達した葉緑体が細胞中に存在しなくても Bax の発現により植物細胞死が誘導されたことから、Bax 誘導性植物細胞死には発達した葉緑体が必須ではないことが明らかとなった。Bax が植物細胞死を誘導する際にも、Bax の局在化や膜電位の低下など、ミトコンドリアが重要な役割を担うと考えられる。

2. ROS ストレス初期に起こるミトコンドリアの動態変化

活性酸素種 (ROS) は様々な生物的・非生物的ストレス下で発生し、細胞死を誘導することが知られている。Bax による植物細胞死においても ROS の発生が Bax 発現後すぐに起

こる。そして、ミトコンドリアは細胞死の際のROS発生器官として注目されている。そこで、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーター下流にミトコンドリア移行シグナルを有するGFP (mt-GFP) を連結したプラスミドを形質転換したシロイヌナズナを用いた実験を行った。mt-GFPシロイヌナズナに過酸化水素 (H_2O_2) やパラコート (Pq)、メナジオン (MD) といったROS誘導剤を処理し、ミトコンドリアの動態を解析した。

まず細胞からのイオン漏出量を測定し、ROS誘導剤の濃度検定を行った。その結果より 100 mM H_2O_2 、0.3 μ M Pq、60 μ M MDを細胞死を誘導するのに適正な処理濃度であると判断し、共焦点蛍光顕微鏡を用いてROSストレス下におけるミトコンドリアの動態を観察した。その結果、ROS誘導剤で処理した細胞では、Bax誘導性細胞死の場合と同様に、処理後初期の段階において桿状から球状へ、そして膨張するというミトコンドリアの形態変化が観察された。また、球状に変化したミトコンドリアは凝集する性質を示した。

さらに、ミトコンドリアの形態変化を数値化した結果、コントロールの細胞にくらべて 100 mM H_2O_2 で 1 日間処理した細胞では、ミトコンドリアの断面積、最大直径がともに約 1/2 に減少していることが明らかとなった。また、撮影した蛍光顕微鏡像を用いて一定面積中におけるミトコンドリアの数を数えた結果、コントロールの細胞にくらべて 100 mM H_2O_2 で 1 日間処理した細胞では、ミトコンドリアの数が約 2 倍に増加していることがわかった。

ミトコンドリアの形態変化に加え、ROS ストレス下ではミトコンドリアの流動が停止していた。植物の場合、ミトコンドリアの動きはアクチン系により制御されていることが知られている。そこで、ミオシン ATPase の阻害剤であるブタンジオンモノキシム (butanedione monoxime; BDM) により mt-GFP シロイヌナズナの処理を行った。その結果、1 時間という短時間の 20 mM BDM 処理により、ミトコンドリアの流動の停止が観察された。同時に他の ROS 誘導剤でみられたようなミトコンドリアの球状への変化と、葉の白色化が認められた。

これらの結果から、ROS ストレスによりミトコンドリアの断片化が促進している可能性が示唆された。また、ミトコンドリアの流動を停止させることによってもミトコンドリアの断片化が起こり、細胞死が誘導されると考えられる。

3. ミトコンドリア分裂制御因子と植物細胞死

正常な細胞では、ミトコンドリアの形状は分裂と融合を繰り返すことで維持されている。シロイヌナズナではダイナミン様タンパク質である DRP3A と DRP3B がミトコンドリアの分裂に関与していることが知られている。また、ドミナントネガティブ型タンパク質、

DRP3B (K56A)を過剰発現させると分裂が阻害され、管状に伸長したミトコンドリアが出現する。本研究から、Bax や ROS 誘導剤により引き起こされる植物細胞死の際に、ミトコンドリアの形態変化が初期の段階で起こることが明らかとなった。このことから、植物の細胞死制御にミトコンドリアの分裂機構が関与している可能性が示唆された。そのため、DRP3B (K56A)過剰発現体や DRP3A 点変異体を用いた実験を行った。

Bax 形質転換シロイヌナズナと DRP3B (K56A)/mt-GFP 形質転換シロイヌナズナの交配により得られた、DRP3B (K56A)と mt-GFP、そして Bax の 3 重形質転換シロイヌナズナに DEX 処理を行い、Bax による細胞死を誘導した。DRP3B (K56A)/mt-GFP/Bax 植物では、Bax の発現によって球状に変化したミトコンドリアが現れたものの、球状のミトコンドリアが数珠状に連なっていた。細胞からのイオン漏出量の測定を行った結果、mt-GFP/Bax 植物と DRP3B (K56A)/mt-GFP/Bax 植物では、どちらも Bax の発現によりイオンの漏出が起こっており、有意差がないことがわかった。

また、DRP3B (K56A)/mt-GFPシロイヌナズナに対してMD、H₂O₂、SA処理、4 日間の暗黒処理 (Dark) を行った。その結果、Baxにより誘導される細胞死と同様に、管状のミトコンドリアが数珠状へと変化し、その後巨大な球状のミトコンドリアが出現した。この数珠状のミトコンドリアの出現は、DRP3Bの機能消失による分裂の不完全化が引き起こした現象であると考えられる。

DRP3A に点変異が挿入されることによりミトコンドリアの分裂障害が起きている DRP3A 点変異体についても、DRP3B (K56A)過剰発現体と同様の知見が得られた。

これらの結果から、植物細胞死初期に起こる形態変化は、DRP3A、B が関与するミトコンドリア分裂機構が活性化することにより引き起こされている現象であると考えられる。

本研究から、動物アポトーシス促進因子 Bax によってもミトコンドリアを介した植物細胞死のカスケードが活性化されることが明らかとなった。そして、そのミトコンドリアを介したカスケードは ROS ストレスにより誘導される細胞死においても同様に機能していると考えられた。また、ROS ストレスによってミトコンドリアの分裂機構が働き、断片化が進行することが明らかとなった。ミトコンドリアはクエン酸回路や電子伝達系を介して ATP を産生する呼吸の場であり、生命の維持には欠かせないエネルギー製造オルガネラである。そのミトコンドリアの断片化を行うことで、物理的な崩壊を招き、ミトコンドリアからのエネルギーを絶つことで細胞死を引き起こしていると考えられる。