

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉永恵子

植物において、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、病原感染による過敏細胞死、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、シロイヌナズナを材料として、動物の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人為的に引き起こされる植物プログラム細胞死の過程における、オルガネラの動態に注目して解析を行った。

第 1 章では、最新の知見をふまえて、動物細胞のプログラム細胞死であるアポトーシスと動物のプログラム細胞死を比較し、その類似点と相違点を明確にしたうえで、本研究の目的と意義について論じている。

第 2 章では、Bax による植物細胞死誘導機構をオルガネラの動態から解析した。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ことが知られている。Bax の相同遺伝子は植物や酵母には存在しない。しかし、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) 誘導系ベクターを利用して形質転換シロイヌナズナを作製し、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 Bax 発現させることで、人為的に植物細胞死を誘導する系を確立した。DEX で発現誘導される Bax とオルガネラ移行シグナルを融合した GFP の両方の遺伝子を発現するシロイヌナズナを用いて、Bax 誘導後のオルガネラの動態を観察した。その結果、Bax 発現後初期にミトコンドリアは小型化し、その形態が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と崩壊がみられた。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 と GFP を融合したタンパク質を発現させると、植物細胞中においても Bax はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアの膜電位が低下するが明らかとなった。以上の結果から、Bax が植物細胞死を誘導する際にも、ミトコンドリアが重要な役割を担うことが示唆された。

第 3 章では、活性酸素種 (ROS) で誘導した細胞死におけるミトコンドリアの動態変化を観察した。ROS はさまざまな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。また、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。本研究

では、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ことを確認した。そこで、GFP によりミトコンドリアを可視化したシロイヌナに、ROS 誘導剤として過酸化水素、パラコート、メナジオンを処理し、ミトコンドリアの動態を観察した。その結果、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、その後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過酸化水素で処理した細胞では、ミトコンドリアの断面積、最大直径がともに約 1/2 に減少していた。また単位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過酸化水素処理した細胞では、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。これらの結果から、細胞死の過程でミトコンドリアの断面化が促進している可能性が示唆された。

第 4 章では、ミトコンドリアの分裂を阻害が細胞死へ与える影響を調べた。ミトコンドリアの形態は分裂と融合のバランスによって維持されると考えられている。シロイヌナズナのミトコンドリア分裂装置 DRP3 のドミナントネガティブ型遺伝子を発現させた形質転換体はミトコンドリアの分裂が阻害され、ミトコンドリアが管状に伸長する。第 2 章、第 3 章の結果から、植物細胞死の過程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。動物細胞では、ミトコンドリアの分裂を阻害すると、アポトーシスが阻害されることが報告されている。そこで、DRP3 のドミナントネガティブ型遺伝子を用いてミトコンドリアの分裂を阻害した形質転換体で Bax を発現させ、細胞死を誘導した。その結果、ミトコンドリアの分裂を阻害した場合でも、野生型と同じように細胞からのイオン漏出が認められ、細胞死が進行することがわかった。ところが、野生型では細胞死の過程でミトコンドリアが断面化し小型化する現象が見られるのに対し、ミトコンドリアの分裂を阻害すると小型化した球状のミトコンドリアが数珠状に連なっていることがわかった。この数珠状に連なったミトコンドリアの形態は、ミトコンドリアが断面化する過程でミトコンドリアがくびれるところまでは進行するものの、最後の膜を切り離す段階で止まっているものと推察された。この現象は、Bax で誘導された細胞死だけではなく、過酸化水素、メナジオン、パラコートにより ROS を発生させて細胞死を誘導した場合においても観察された。さらに、DRP3 に点変異を持つ突然変異体を用いた実験でも、同様の結果が得られた。以上の結果から、植物細胞死の過程ではミトコンドリアの分裂が活性化することが明らかとなった。

以上本研究では、動物のアポトーシス促進因子である Bax によって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を明らかにした。さらに、このミトコンドリアを介した細胞死のカスケードは、ROS 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ことが示された。植物の細胞死は、発生、生殖、病虫害耐性などさまざまな現象に深く係っていると考えられている。本研究で得られた知見は、これらの現象を解明する上での基盤となるものであり、学術上また応用上極めて価値あるものである。したがって、審査委員一同は本論文が博士（農学）に値するものと認めた。