

鉄含有量の豊富な高等植物細胞の培養

～鉄分不足解消に向けての試み～

2007年3月修了 先端生命科学専攻 植物全能性制御システム解析学分野 学生証番号 56539

半田 耕一

キーワード: 鉄イオン、細胞周期、培養、カルシウム、細胞死 指導教員 馳澤 盛一郎 教授

序論

鉄イオンは我々人間にとって様々な酵素の補因子として働く必須微量元素であり、また植物にとってもクロロフィルの生合成、光合成、呼吸などを行う際に必須なイオンである。鉄イオンは環境によって Fe^{2+} (還元型) 及び Fe^{3+} (酸化型) となり、酸化還元反応を容易にすることで、様々な生理現象を司る酵素の補因子となり得ている。最近の WHO の報告では、世界全体で 20 億人が貧血症またはその予備群であり、そのうち鉄欠乏が病因である人は 5 割に達するとされている。貧血症の予防、改善には鉄剤投与が用いられているが、鉄イオンは生体内で二価から三価へ遷移する際に活性酸素種、特に毒性の強いヒドロキシルラジカルを発生するフェントン反応と呼ばれる化学反応を触媒することから、過剰量の二価鉄イオンは生体内で毒性を持つと考えられている。それに対し、植物体は吸収した鉄イオンを有機酸によってキレートすることで、その毒性を弱めていることから、世界的な貧血症を改善するには鉄分を豊富に含んだ植物を育てることが重要な課題と考えられる。そこで、本研究ではまず、高等植物細胞に対して高濃度の二価鉄イオン添加が与える影響についてタバコ培養細胞 BY-2 を用いて、細胞死、細胞周期を中心として詳細な解析を行った。さらに、得られた結果をもとに細胞周期特異性を生かして、鉄分を豊富に含む細胞の培養を試みた。

結果および考察

1. タバコ BY-2 細胞における二価鉄イオン添加による細胞死の誘導

培養 7 日目の BY-2 細胞を継代時に、含まれる鉄イオン量を変えた培地に移植し、その後 24 h の細胞死の割合を測定した。その結果、 Fe^{2+} 0.1 mM を含む培地 (コントロール) では細胞死がほとんど見られなかったのに対し、 Fe^{2+} 1.0 mM を添加

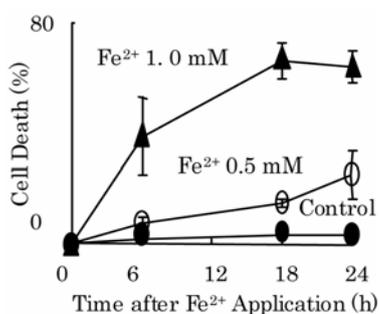


図1 過剰量 FeSO_4 添加による細胞死の誘導

グラフは独立した3回の実験での平均値を、バーは標準誤差 (S.E.) を表す。以下同様。

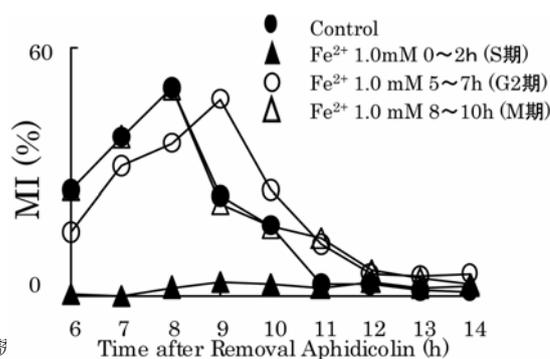


図2 過剰量 FeSO_4 添加による細胞周期進行の停止

した培地へ移植すると移植後 18 h における細胞死の割合は約 60 % にまで達した (図 1)。細胞死に至るまでの過程では、活性酸素種 (ROS) の発生や、カルシウムスパイクの発生がみられた。細胞死の誘導時には細胞周期が停止することが知られているため、Aphidicolin 細胞同調系を用いて、 Fe^{2+} 1.0 mM 添加後の細胞周期の推移について分裂指数 (Mitotic Index ; MI) を指標として調べた。その結果、 Fe^{2+} 1.0mM を S 期に添加した場合にのみ、その後の細胞周期の進行が停止した (図 2)。これらのことから高濃度の Fe^{2+} 添加は高等植物細胞に対して細胞周期の時期特異的に酸化ストレス様の障害を与えると考えられた。

2. 鉄分豊富なタバコ BY-2 細胞の培養

鉄分豊富な細胞の培養を目指し、高濃度鉄を添加しても細胞死が誘導されないように、3つのアプローチを考えた。(1) 高濃度 Fe^{2+} を細胞周期 S 期に添加すると細胞に対し障害をもたらしたことから、その前の G1 期に Fe^{2+} 1.0 mM を添加し、S 期では 0.1 mM に戻した。その結果、細胞周期の進行に影響はほとんど見られなかったが (図 3 a)、コントロールに比べて約 12 倍の鉄イオンを蓄積していた (図 4、 Fe^{2+} 1.0 mM → LSD)。また、 Fe^{2+} 1.0 mM 添加により二価鉄イオントランスポーターをコードする *Nramp1* の発現が上昇していたことから、*Nramp1* が高濃度鉄添加への応答に何らかの役割をはたしていることが考えられた。

(2) S 期でも細胞に鉄イオンを蓄積させ更に細胞中の鉄イオンを増大させる方法の確立を試みた。二価鉄イオントランスポーターは基質特異性が低く Fe^{2+} だけでなく様々な二価カチオンを通すことが知られている。そこで、 Mg^{2+} と Fe^{2+} を競合させることで Fe^{2+} の誘導するストレスを軽減させ、細胞内の鉄イオン含有量を増大させる試みを行った。S 期に Fe^{2+} 1.0 mM と Mg^{2+} 4.5 mM とを同時に添加したところ、 Fe^{2+} 1.0 mM 添加のみでは完全に停止した細胞周期進行が部分的に回復し (図 3 b)、細胞の鉄イオン含有量はコントロールの 20 倍にまで増加した (図 4、 Fe^{2+} 1.0 mM → Fe^{2+} 1.0 mM + Mg^{2+} 4.5 mM)。このことから、 Mg^{2+} は細胞内への急激な Fe^{2+} 流入を抑え、ストレスを軽減する効果があると考えられた。

(3) 高濃度鉄添加によりカルシウムスパイクが誘導されたが、このカルシウムスパイクは細胞周期進行を停止、遅延させるシグナルであることが知られている。そこでカルシウム特異的キレート剤 EGTA を用いて培地中のカルシウムイオンをキレートし、カルシウムスパイクを抑制したところ、細胞周期進行の停止が回復し、細胞内の鉄イオン含有量が増大することが示された。

まとめ

BY-2 細胞に多量の鉄分を含有させるためには、 Fe^{2+} 添加がストレスとなる S 期 (図 5 ①) を避けて、その前の G1 期に Fe^{2+} 添加を行う必要がある (図 5 ②)。S 期に添加した場合でも Mg^{2+} (図 5 ③) や、EGTA (図 5 ④) を同時添加することで、細胞毒性を緩和することが可能となる。本研究で得られた結果から、鉄分豊富な野菜、穀物への応用を考えると、細胞の分裂生長が著しく S 期がかなりの時間を占める種子の段階においては Fe^{2+} はストレス源となりやすいので、 Mg^{2+} によって Fe^{2+} の緩やかな吸収を促すことが望ましい。また、植物体では組織の成熟に従い G1 期 (あるいは類似の G0 期) の細胞がそのほとんどを占めるようになるので、 Fe^{2+} はストレス源となり得なくなる。つまり、生長に応じて Mg^{2+} を減らして Fe^{2+} を増やす育成方法を取ることが望ましい。

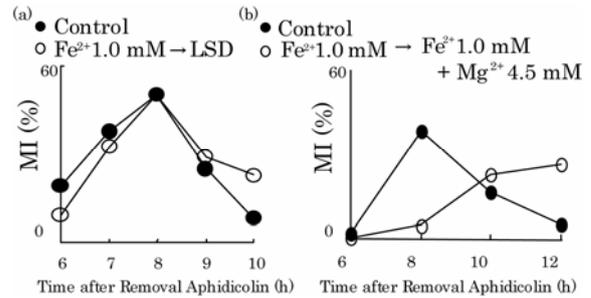


図3 $FeSO_4$ 添加後の細胞周期進行の推移

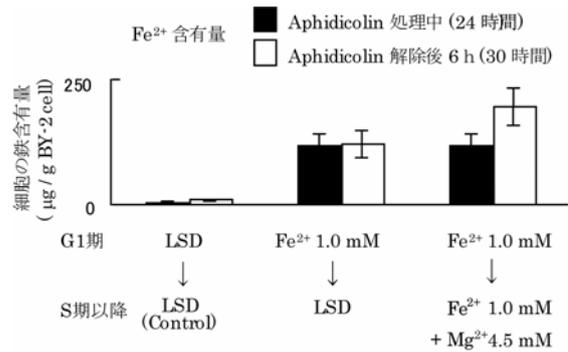


図4 細胞中の鉄イオン量の測定

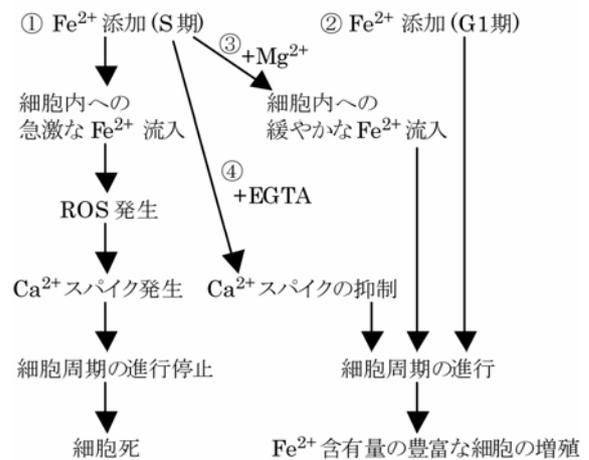


図5 鉄分含有量の豊富な細胞培養の模式図