

修士論文

鉄分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～

2005 年度入学

学生証番号 56539 半田 耕一

植物全能性制御システム解析学分野

指導教員 馳澤 盛一郎

目次

目次	1
序論	2 - 5
材料と方法	6 - 8
第 I 章 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	
緒論	9
結果	10 - 12
考察	13 - 14
第 II 章 鉄分豊富なタバコ BY-2 細胞の培養	
緒論	15
II-1 項 G1 期における鉄イオン添加調節	
結果	16 - 17
II-2 項 S 期におけるマグネシウムイオンを用いた 鉄イオン添加調節	
結果	18 - 20
II-3 項 S 期におけるカルシウムキレーターEGTA を用いた 鉄イオン添加調節	
結果	20 - 21
考察	21 - 23
総合考察	24
謝辞	25
引用文献	26 - 32
図表	33 - 48

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要不可欠なイオンである (Guerinot and Yi 1994)。鉄イオンは環境によって二価 (還元型) 及び三価 (酸化型) になるという特性があるため鉄イオンを含む化合物は電子を受け取ったり (還元) 電子を放出したり (酸化) することができるので、植物において様々な生理現象を司る酵素の補因子となり得ている。例えば、植物を鉄飢餓条件で育てると、葉が黄化して生長に著しい悪影響を及ぼすことから、作物の収量を増加させる観点でも鉄イオンは非常に重要なものと考えられる。また動物にとって鉄イオンはヘモグロビンの活性中心金属として機能するため、鉄欠乏は貧血を招くことになる。近年の WHO の報告では世界規模では 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 (WHO 2004)。貧血症の予防、改善には鉄剤投与が用いられるが、生体内で鉄イオンが二価 (還元型) 及び三価 (酸化型) を行き来する際に活性酸素種、特に毒性の強いヒドロキシ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ため、過剰量の二価鉄イオンは生体内では毒性を持つと考えられている (Zhao et al. 2005)。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 (Ishimaru et al. 2006)、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。

動物においてはこれまでに、鉄イオン吸収機構と鉄イオンの示す毒性の機序について多くの知見が得られている。吸収機構としては、動物は鉄イオンをポルフィリン環によって錯体化されたヘム鉄の状態で十二指腸膜から膜を浸透して直接吸収する様式と、非ヘム鉄の状態では *BBM reductase* によって三価の鉄イオンを二価に還元して十二指腸膜上に発現する *DMT-1 (Divalent Metal Transporter 1)* によって吸収する様式がある。一方で、過剰量の鉄イオンを摂取した場合には、鉄イオンは血液中で動物に特有のタンパク質である Tf (トランスフェリン) と呼ばれる鉄イオン結合タンパク質に捕らえられ、鉄イオンと結合した Tf は細胞内の鉄イオン濃度に応じて発現する TfR (トランスフェリン受容体) に結合することで細胞内へ取り込まれることが知られている (Schumann 2001)。この TfR や Tf は鉄イオン濃度に応じた IRE / IRP 制御系と呼ばれる機構により発現が誘導または抑制されている。IRP (Iron Responsive Protein) は細胞内の鉄イオンが高濃度である時には不活性型、反対に細胞内の鉄イオンが低濃度である時には活性型の状態になる。Tf の mRNA の 5' 非翻訳領域、TfR の mRNA の 3' 非翻訳領域には IRP と結合する IRE (Iron

Responsive Element) という短い特異的な塩基配列が存在しており、細胞内の鉄イオンが低濃度になると IRP は Tf の発現量を下げ、TfR の発現量を上げる働きをする。細胞内の鉄イオンが高濃度になるとその逆の過程が起こる (Richard et al. 1993)。しかしこの IRE / IRP 制御系には一つの欠点があり、それは過酸化水素や一酸化窒素などの物質が IRP と IRE の結合能を強めるといものである。すなわち過剰量の二価鉄イオンのフェントン反応によって生じた活性酸素によって IRE / IRP 制御系が機能しなくなることが考えられる (Hentze and Kuhn 1996)。また鉄イオンの細胞周期における役割についても動物において研究がなされており、鉄イオンは NTP を dNTP へと変換する Ribonucleotid Reductase の機能に必要であり、鉄飢餓条件では DNA の合成が行われず、細胞はその周期を G1/S 期で停止させてしまうことが知られており、逆にがん細胞では鉄イオンが細胞周期の異常な亢進を引き起こす (Le and Richardson 2002)。また近年 IRE をもつ細胞周期制御因子 Cdc14A の存在などが明らかになってきている (Sanchez et al. 2006)。

以上のような細胞レベルでの鉄イオンの取り込み機構や鉄イオンの役割の解明は、鉄過剰症の研究に支えられてきた。動物、特に人間は鉄イオンを過剰に摂取することによって多くの鉄過剰症を引き起こすことが知られている。例えば、慢性的な過剰量の鉄イオン摂取によって引き起こされた病気として次のようなものがある。サハラ砂漠地帯に住むバントゥー族は、長きに渡り鉄製のドラム缶で作ったビールを飲み続けた結果、ビール中にドラム缶から溶け出した高濃度の鉄イオンが混入していたため鉄沈着症を起こし、それがもととなって住民の多くが嚢胞性繊維症、インスリン依存型糖尿病、心臓欠陥などを患った (Saltman et al. 1976)。他にも多くの症例があり、アスベストによる肺がんや、中皮腫の発生、いわゆるアスベスト問題 (Mossman et al. 1990) や、遺伝的に引き起こされる鉄過剰症として、サラセミア症候群患者の特異的な疾患 (Olivieri and Brittenham 1997)、Friedreich's Ataxia という神経系と心臓における疾患 (Puccio et al. 2001) がある。

植物における鉄イオンとの関係については近年、シロイヌナズナとイネを中心として鉄イオン欠乏状態における鉄イオン吸収機構の研究が進んできた。鉄イオンは地中に多く含まれているが、全陸地面積の約 25 % を占めるアルカリ性土壌では鉄イオンが不溶態化し、植物が鉄イオンを吸収できなくなることが知られている (Guerinot and Yi 1994)。高等植物は土壌中の鉄イオン低供給状態においても鉄イオンを吸収するため二つの異なる鉄イオン吸収戦略、Strategy I、Strategy II、を発達させている (Marschner et al. 1986, Rüdiger et al. 2003)。Strategy I はイネ科以外のすべての植物が用いており、シロイヌナズナではまず、土壌中の不溶体三価鉄を植物体から分泌するフェノール性物

質でキレートし、キレートした三価鉄イオンを三価鉄還元酵素 FRO 2 によって二価鉄イオンに還元し、同時にキレーターを外す。そして、遊離した二価鉄イオンは二価鉄イオントランスポーターである ZIP (ZRT-IRT1 like proteins) family に属する IRT1 (Iron Regulated Transporter 1) によって細胞内へ吸収される。これら IRT1、FRO2 タンパク質は細胞膜上に存在し、鉄飢餓条件では根においてそれらの遺伝子発現が上昇することが知られている。また IRT 1 タンパク質は鉄充分条件において分解が誘導されることも知られている (Eide et al. 1996, Robinson et al. 1997, 1999, Vert et al. 2001)。Strategy II はイネ科の植物が用いている戦略で、例えばイネでは植物体中で有機酸の一種であるムギネ酸を合成し土壤中に放出する。放出されたムギネ酸は不溶態の三価鉄をキレートすることで可溶化し、ムギネ酸-三価鉄複合体はそのままの形で三価鉄イオントランスポーター YSL 1 (YS-Like 1) によって細胞内へ吸収される (Herbik et al. 1999, Curie et al. 2001)。しかし最新の報告では Strategy I と Strategy II は種によって厳密には分けられておらず、イネにおいても Strategy I が、シロイヌナズナにおいても Strategy II が使われているのではないかと予想されている (Ishimaru et al. 2006)。これらとは別に植物体内での鉄イオンの蓄積、転流に関わると考えられる二価鉄イオントランスポーター Nramp (Natural Resistance-Associate Macrophage Protein) family が存在する。Nramp family は液胞膜や色素体に存在し、根や茎において鉄飢餓条件で発現するものと鉄イオン濃度非依存的に発現しているものがある (Curie et al. 2000, Lanquar et al. 2005)。また最近、酵母において過剰量の鉄イオンを液胞内へ輸送し蓄積する機能を持つと考えられる二価鉄イオントランスポーター CCC1 に相同性の非常に高い VIT1 (Vacuolar Iron Transporter 1) がシロイヌナズナ種子において発現しており、種子中の鉄イオン分布を正常に保つ機能を持つという報告があった (Li et al. 2001, Kim et al. 2006)。

これら植物の鉄イオントランスポーターに関する研究は、土壤中で利用できる少ない鉄イオンを効率よく吸収する方法の基礎研究として進められてきたが、一方で人工的に多量の鉄イオンを与えることにより、植物はどの程度鉄イオンを蓄積することができるのか、あるいは蓄積できないのかといった、植物の鉄過剰症に関連した研究例はほとんどない。唯一挙げられる例としては、洪水発生時に生じる低地における過剰鉄イオン障害がある。これは洪水が起きた際に山地にある鉄鉱石などの一部が溶かされ、そのような水が低地に存在する水田などに流れ込むとイネは必要以上に二価鉄イオンを吸収して生体内でフェントン反応を引き起こし、その後の生育が悪くなり引いては作物収量が低下するという現象である (Becker and Asch 2005)。しかしながらこの研究において、

過剰量の鉄イオンが植物細胞内でどのような機序を持って毒性を示すのかについては詳しく調べられておらず不明な点が多い。

世界的な鉄イオン不足を改善するためには鉄分を多く含む植物の育成が欠かせないが、鉄イオンは単純に与えただけでは動物における鉄イオン障害を考えると、植物に対しても害を及ぼすと考えられる。また、鉄イオン吸収機構には鉄イオンが毒性を持つがゆえに厳密な制御機構が働いていることが考えられるため、何らかの工夫を施して植物中に多くの鉄イオンを含ませるような方法が必要である。そこで、本論文の第Ⅰ章ではまず、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 BY-2 培養細胞を用いて、細胞死、細胞周期を中心として詳細な解析を行うことで高等植物細胞が各種培養条件下でどれだけの鉄イオンを蓄積することができるのかについて検討した。第Ⅱ章では第Ⅰ章で得られた結果をもとに、細胞周期特異性を利用して、鉄分を豊富に含む細胞の培養を試みた。

材料と方法

タバコ BY-2 細胞の培養

タバコ培養細胞 BY-2 は、*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 の芽ばえから誘導したカルスより確立された細胞株で、改変 Linsmaier and Skoog 培地 (LSD, Linsmaier and Skoog 1965, Nagata et al. 1992) 中で培養、維持している。LSD 培地は Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (Wako Co., Osaka, Japan) に、200 mg/L リン酸二水素カリウム、1 mg/L チアミン塩酸塩、100 mg/L ミオ-イノシトール、0.2 mg/L 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、3% (w/v) スクロースを加えて、オートクレーブ前に pH 5.8 に調整したものである。7 日毎に約 1 mL の細胞懸濁液を 95 mL の培地に植え継ぎ、27 °C、暗所、130 rpm のロータリーシェイカーで振盪培養した。

植物材料

タバコ植物体として *Nicotiana glauca* NN を用いた。種子発芽は種子を各種液体培地に浸した濾紙上にプレート内で 7 日間育生した。植物体は種子を水上で 7 日間吸水させ、その後に各種液体培地に浸した濾紙上にプレート内で 10 日間育生した。いずれも室温 23.5 °C、湿度 60%、光量密度 50 μ mol、明期 12 h、暗期 12 h の周期に設定したグロースチャンバー内で行った。

細胞周期の同調

最終濃度 5 mg/L のアフィディコリン (Wako) を含む改変 LS 培地 95 mL に継代 7 日目の細胞 10 mL を移植し、24 時間培養後、LSD 培地 1 L で洗浄し、新たな LSD 培地に移植して培養した。分裂指数の測定は、2% (w/v) グルタルアルデヒドを含む PBS 溶液 (phosphate buffered saline: 150 mM 塩化ナトリウムを含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH7.0) と 1 mg/L DAPI を含む NS 溶液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.25 mM スクロース, 1 mM 塩化マグネシウム, 0.1 mM 硫酸亜鉛 (II), 0.1 mM 塩化カルシウム, 1 mM EDTA, 0.8 mM PMSF, 7 mM メルカプトエタノール) をサンプルに加えて 10 分間静置して細胞核および染色体を蛍光染色し、蛍光顕微鏡下で計数することで行った。また、核 DNA 量測定による細胞周期進行の判定は、細胞をエタノールで固定した後 Galbraith's buffer (45 mM 塩化マグネシウム、30 mM クエン酸ナトリウム、20 mM MOPS、1 μ g/ml TritonX100 (pH 7.0), Galbraith et al. 1983) で洗浄し、核を PI によって蛍光染色し、レーザースキャニングサイトメータ LSC2 (Olympus Co. Tokyo, Japan) を用いて行った。尚、実験条件に応じて LSD 培地組成から FeSO_4 を抜いた培地 (pH 5.8)、 CaCl_2 、 MgSO_4 、 MnSO_4 、

ZnSO₄、CuSO₄、CoCl₂、を抜いた培地 (pH 5.8) を用いた。

evans blue 法による細胞死の測定

0.05 % evans blue (Sigma, St Louis, MO, USA) を細胞と等量混合して染色を行い、明視野顕微鏡下で染色された細胞の数を計測した。

活性酸素種量の測定

活性酸素種に特異的な化学発光プローブである DCFH-DA (CHALBIOCHEM) を用いて、細胞内で発生した活性酸素種量を測定した (Carl et al. 1990)。DCFH-DA を最終濃度 30 μM となるように細胞懸濁液に処理し、蛍光プレートリーダー (1420 ARVO sx MULTILABEL COUNTER, Perkin Elmer) を用いて測定した。また蛍光顕微鏡下でも経時観察を行い、蛍光輝度のイメージングからも定量を行った。

細胞質カルシウムイオン濃度変化の測定

アポエクオリンを恒常的に発現する形質転換 BY-2 細胞 (Takahashi et al. 1997) に発光基質であるセレンテラジン (coelenterazine WS, DOJINDO, Kumamoto, Japan) 1 μM を処理して、24 h 培養することでエクオリンを再構成させ、その後、エクオリンの Ca²⁺ 濃度依存的な発光をルミノメータ (Lumicounter 2500, Microtech Niton, Chiba, Japan) を用いて測定した。測定時には細胞は測定培地 (3 % スクロース、1 mM CaCl₂) に懸濁し、細胞懸濁液 200 μl を円形チューブに入れて回転させることで、細胞が沈殿せずに好気条件を保つようにしながら、測定を行った。

細胞内鉄イオン含有量の測定

培地中に二価鉄イオン添加を行った細胞 100 mg を 3 % スクロース溶液で 2 回洗浄し、細胞壁に付着したイオンを洗い流した後、1 ml の蒸留水、ジルコニアビーズ (半径 1 mm) と混合して、それを細胞破砕機 (Micro Smash, Tomy-Seiko, Tokyo, Japan) で 4000 rpm × 3 回の処理を行うことで細胞を破砕し、溶液中に細胞内成分を溶出させた。溶出液中に含まれる鉄イオン濃度を原子吸光光度計 (AA-6800, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて測定した。

NtNramp1, *NtZIP1* のクローニング

シロイヌナズナから取られている *AtNramp* 遺伝子ファミリー について相同性が高い塩基配列部分に対して縮重プライマー (5'-CCNCAAYCTNTTYCTNCAYTSNGC-3' および

5'-TGNCCNGCRTANGTNCNGTGDATNGT-3') を設計し、PCR 法によってタバコ BY-2 細胞の cDNA Library から cDNA 断片を増幅した。続いて、5' & 3' RACE 法により 5' 端、3' 端の cDNA 断片を増幅し、*NtNramp1* の全塩基配列を決定した。また *NtZIP1* は 理化学研究所のタバコ BY-2 EST データベース TAB (Transcriptome Analysis of BY-2, <http://mrg.psc.riken.jp/strcl/>) から *AtZIP* 遺伝子ファミリーと相同性の高い EST 配列を検索し、その配列情報をもとに 5' & 3' RACE 法を用いて全塩基配列を決定した。

Real time PCR 法による *NtNramp1*, *NtZIP1* の転写産物の蓄積量の定量

BY-2 細胞の Total RNA は Plant RNA Kit (Omega Biotech, CA, USA) を使用して抽出した。5 µg の RNA を基質として逆転写酵素 M-MLV (Promega, WI, USA) により cDNA を合成した。定量的 Real time PCR は Smart Cycler II System (Cepheid, CA, USA) と SYBR Premix Taq (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて行った。内部標準としては、タバコアクチン遺伝子を用い、143-bp 断片 (プライマー配列;

5'-GGAAATTGTCCGTGACATAAAGGAG-3' と

5'-CTCTCAGCTCCGATGGTTATGACTT-3') の増幅量を基準とした。

NtNramp1 の転写産物は 249-bp 断片 (プライマー配列;

5'-AGGAAAGCACGCACCTTCTGG-3' と

5'-GGTCCTCTGCTGAGGCAACTG-3')、*NtZIP1* の転写産物は 155bp 断片 (プライマー配列; 5'-TCGCCATGTTTGAAAGAGAATCC-3' と

5'-CCAGACTGAGCCACCAATCCA-3') の増幅量を定量した。

GFP-*NtNramp1* 挿入 BY-2 細胞の作出

NtNramp1 の ORF を pENTR ベクター (Invitrogen, CA, USA) に組み込み、さらに LR clonase (Invitrogen, CA, USA) によって pGWB ベクター (島根大学、中川強博士より分与) に組み込むことで 35Sプロモーター::*NtNramp1*-GFPコンストラクトを完成させ、これを用いてアグロバクテリウム法 (An 1985) により BY-2 細胞の形質転換を行った。得られたカルスは直径約 1 cm まで生長させてから液体の改変 LS 培地 20 mL 中に懸濁し、蛍光顕微鏡により GFP 蛍光の局在を観察して選抜した。

第I章 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

緒言

植物と鉄イオンの関係については、これまでに過剰な鉄イオンが及ぼす影響についての報告例はほとんどないが、植物体内での鉄イオン量は厳密に制御されており、鉄イオンはキレートされた状態で存在することが知られている (Ishimaru et al. 2006)。これはおそらくキレートされていない二価鉄イオンが引き起こすフェントン反応によって、細胞体内で活性酸素種が発生することを防いでいるものと思われる (Zhao et al. 2005)。ヒトに対しても鉄イオンが二価鉄イオンの状態で存在すると活性酸素種がもととなり、様々な障害が引き起こされることは序論で述べたが、現在では抗がん剤として鉄イオンキレーターの開発が進んでいるほどである (Danuta et al. 2005, Whitnall et al. 2006)。高等植物に対しても過剰量の鉄イオンは同様な障害をもたらすことが予想される。鉄イオンと同じ重金属であるアルミニウムイオンは、高等植物細胞に投与すると活性酸素種を発生し、続いてストレス応答シグナルで知られるカルシウムスパイクを発生させる (Kawano et al. 2003)。また、過マンガン酸カリウムなどの酸化ストレス源として知られる化合物の投与によってもカルシウムスパイクが発生する (Sano et al. 2006)。人間にとっての鉄分の不足を補う手段としては、鉄イオンを直接摂取するのではなく、ニコチアミンなどの植物体由来のキレーターにより、キレートされた鉄分を穀物や野菜を通して摂取することが最善の方法であると考えられる (Ishimaru et al. 2006)。そこでまず本章では、高等植物のモデル細胞株であるタバコ BY-2 細胞を用いて、BY-2 細胞にとって二価鉄イオンが必須元素であるか否かを調べた。また、高濃度の二価鉄イオン培養条件が BY-2 細胞に対してどのような影響を及ぼすかについて、二価鉄イオン添加後の細胞内鉄イオン吸収量の測定、及び誘導される細胞死の測定、さらに細胞死が誘導される過程において活性酸素種、カルシウムスパイクの発生、及び細胞周期の進行遅滞についての測定を行った。最後に二価鉄イオンがタバコ植物体の生育について及ぼす影響についても解析を行った。

結果

二価鉄イオンはタバコ BY-2 細胞の増殖に必要である

まず、タバコ BY-2 細胞にとって二価鉄イオンが必須であるか否かを調べるため、培養 7 日目の細胞を継代時に通常培養条件の FeSO_4 0.1 mM (以降 Fe^{2+} 0.1 mM と略す。) を含む LSD 培地 (コントロール) と、 Fe^{2+} を含まない鉄飢餓培地へ移植するもので培養 1 週間後の細胞の増殖量を比較した。その結果、明視野顕微鏡像ではコントロールに比べ鉄飢餓培地へ移植したものは細胞が小さくて十分に伸長しておらず、生育の悪い様子が伺えた (図 1 a,b)。細胞増殖量を測定したところ、コントロールでは 1 週間で約 100 倍の 10^8 個 / mL に増殖したが、 Fe^{2+} 0 mM の鉄飢餓培地へ移植したものでは約 10 倍の 10^7 個 / mL までしか増殖しなかった (図 1 c)。

高濃度 Fe^{2+} 条件下では細胞死が誘導される

高濃度の Fe^{2+} は活性酸素種の発生を促すフェントン反応を引き起こすことが知られていることから、タバコ BY-2 細胞にも高濃度の Fe^{2+} は何らかの障害をもたらすことが予想される。そこで、培養 7 日目の細胞を継代時に Fe^{2+} 0.1 mM を含む LSD 培地へ移植するコントロールと、 Fe^{2+} 以外の二価カチオンを抜いた培地においてコントロールの 5 倍量の Fe^{2+} 0.5 mM を添加した培地に移植するもの、10 倍量の Fe^{2+} 1.0 mM を添加した培地に移植するものとして、その後 24 h の細胞死の割合を測定した。その結果、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+} 0.5 mM、 Fe^{2+} 1.0 mM を添加した培地へ移植したものでは移植後 18 h において細胞死の割合がそれぞれ約 15%、約 65% にまで達した (図 2 a,b)。細胞死が誘導された Fe^{2+} 1.0 mM を添加した際の細胞中の鉄イオン含有量を Fe^{2+} 添加後 6 h、12 h、18 h、24 h において測定したところ、12 h で含有量は最大となり、その後は大きく減少していた (図 2 c)。

高濃度 Fe^{2+} 条件下では活性酸素種が発生する

Fe^{2+} 1.0 mM 添加は細胞死を誘導したが (図 2 b)、次に、細胞死に至るまでの過程で起きていると考えられるストレス応答性の活性酸素種 (ROS) の発生について調べた。培養 7 日目の BY-2 細胞に Fe^{2+} 1.0 mM、あるいはポジティブコントロールとして強力な酸化ストレス源であり ROS を発生させることが知られている過マンガン酸カリウム (KMnO_4) 1.0 mM を培地に添加し、細胞内の ROS 発生量を測定して比較した (図 3 a)。その結果、各種の試薬添加後 30 min における 添加直前の時点に対する蛍光量比 (Relative

Fluorescence) を測定すると、何も添加しないコントロールではほとんど ROS の発生が見られなかったのに対して、 Fe^{2+} 1.0 mM を添加したものでは KMnO_4 1.0 mM 添加よりやや少ないものの、ROS の発生が見られた。また 7 日目の BY-2 細胞に対しより高濃度の Fe^{2+} 3.0 mM を添加し蛍光顕微鏡像を観察したところ、添加後 10 min に比べて 40 min 後では、細胞内での ROS が大きく増加している様子が観察された (図 3 b)。

高濃度 Fe^{2+} 条件下ではカルシウムスパイクが発生する

Fe^{2+} 1.0 mM 添加が ROS を発生させることが分かったが (図 3 a,b)、一般的に ROS 発生後の細胞内シグナリングの一つとして、細胞外からカルシウムイオン (Ca^{2+}) を取り込んで、細胞内の Ca^{2+} 濃度を一過的に上昇させる、ストレス応答性カルシウムスパイクという現象が起こることが知られている (White and Broadley 2003)。そこで、このようなカルシウムスパイクが高濃度の Fe^{2+} 添加によっても生じるか否かを、カルシウムセンサーであるエクオリンを恒常的に発現するタバコ形質転換 BY-2 株 (Aeq-BY-2 株) を用いて測定した。ポジティブコントロールとして強力な酸化ストレス源であり、カルシウムスパイクを発生させることが知られている KMnO_4 1 mM を 7 日目の Aeq-BY-2 株に添加したところ、添加数十秒後に一過的なカルシウムスパイクの発生がみられた (図 4a)。培地に Fe^{2+} 1.0 mM を添加したものでは、添加後 300 sec から 600 sec において周期的なカルシウムスパイクが発生していたが、 Fe^{2+} 0.1 mM や H_2O の添加ではそのようなスパイクは検出されなかった (図 4b)。

S 期における高濃度 Fe^{2+} 条件下では細胞周期の進行が停止する

Fe^{2+} 1.0 mM 添加は酸化ストレス様の細胞死を引き起こすことが分かったが (図 2 ~ 4)、一般的に細胞は死ぬ前にその細胞周期を停止させることが知られている (Kadota et al. 2004)。そこで Fe^{2+} 1.0 mM 添加の細胞周期への影響を調べた。ここでは Aphidicolin 細胞同調系を用いた (Nagata et al. 1992)。Aphidicolin は DNA polymerase α の特異的阻害剤であり継代 7 日目の細胞を 24 h の処理により、その細胞周期を G1 期と S 期の境界で停止させることができる。Aphidicolin を洗い流すと細胞周期は同調的に進行し、Aphidicolin 解除後 0 h ~ 5 h で S 期、5 h ~ 7 h で G2 期、7 h ~ 9 h で M 期、9 h 以降には G1 期に戻る。例えば Aphidicolin 解除後 8 h の細胞分裂指数 (Mitotic Index: MI) を測定すると約 50 % の値のピークを形成し、ほとんどの細胞が M 期まで進んだことが分かる (図 5 b Control)。レーザースキャニングサイトメトリー (LSC) で同様に測定すると、G1 期と G2/M 期に相当する細胞が存在することを示す、二本のピークを示すことになる (図 5 d、Control)。

この方法を用いて、Aphidicolin 処理時 (G1 → G1 / S 期) に LSD 培地で培養し、Aphidicolin 解除後 (S 期以降) Fe^{2+} 1.0 mM を添加した培地に移してその後の細胞周期の進行を調べた (図 5 a)。その結果、Aphidicolin 解除後 LSD 培地に移したコントロールでは Aphidicolin 解除後 8 h で MI が 50 % 程度まで上昇したのに対して、解除直後から Fe^{2+} 1.0 mM を添加したものでは Aphidicolin 解除後 MI の上昇はほとんど見られなかった (図 5 b)。

次に Fe^{2+} 1.0 mM を細胞周期特異的に培地に添加しその後の細胞周期の進行を調べた。Aphidicolin 処理時 (G1 → G1 / S 期) に LSD 培地で培養し、Aphidicolin 解除後 (S 期以降) Fe^{2+} 1.0 mM を S 期の始めにあたる 0 h から 2 h、G2 期にあたる 5 h から 7 h、M 期にあたる 8 h から 10 h のそれぞれ 2 時間処理した。その結果、 Fe^{2+} 1.0 mM を G2 期、M 期に添加したものでは MI が Aphidicolin 解除後 8 h から 9 h の間にコントロールと同様に 50 % 程度のピークを示したが、 Fe^{2+} 1.0 mM を S 期に添加したものだけは MI が上昇がほとんど見られなかった (図 5 c)。また LSC を用いて細胞周期の進行を調べたところ、コントロール及び Fe^{2+} 1.0 mM を G2 期、M 期に添加したものでは Aphidicolin 解除後 10 h において G1 期へ進行した細胞が見られたのに対して、 Fe^{2+} 1.0 mM を S 期に添加したものでは G1 期へ進行した細胞は見られず、さらに、Aphidicolin 解除後 14 h まで細胞周期が進行せず、細胞周期が S / G2 期で停止したままになっていた (図 5 d)。

高濃度 Fe^{2+} 2.0 mM 条件下での種子発芽、植物体生長の抑制

BY-2 細胞において Fe^{2+} 1.0 mM 添加が細胞死を誘導する障害をもたらしたことから (図 2 ~ 5)、次に培養細胞で観察されたこのような現象が植物体においても見られるか否かをタバコ植物体 *Nicotiana glauca* NN を用いて調べた。LSD 培地上で発芽させたコントロールでは発芽率がほぼ 100 % であったのに対して、培地中に二価カチオンとして Fe^{2+} 2.0 mM のみを添加した培地では発芽率が 40 % 程度にまで低下した (図 6 a)。また、水耕で発芽させ 7 日後の植物体に対して Fe^{2+} 2.0 mM を添加し、添加 10 日後の 1 個体当たりの平均生重量を調べたところ、コントロールの約 1/3 倍にまで減少していた (図 6 b,c)。

考察

タバコ BY-2 細胞の増殖にとって Fe^{2+} は必須である

Fe^{2+} は動物、植物いずれについても必須微量元素であると考えられており (Guerinot and Yi 1994, WHO 2004)、本章においてタバコ BY-2 細胞を用いて実験を行ったところ、培養細胞の増殖に必要であることが分かり、他の動物、植物と同様に鉄イオンを必須としていることが確認できた (図 1)。これまでは

高等植物にとっては Fe^{2+} は光合成や呼吸の機能に必須であると考えられているが(Guerinot and Yi 1994)、動物細胞では、鉄イオンは NTP を dNTP に変換する Ribonucleotid Reductase 活性に必要であり、鉄飢餓条件では DNA 合成が停止することから (Le and Richardson 2002)、植物細胞においても、鉄イオンは DNA 合成を介して細胞分裂に関与している可能性がある。

単純な高濃度の Fe^{2+} 添加は細胞死を誘導する

高濃度の鉄分を含む植物を作成したい場合に容易に考えつくのは、肥料などに高濃度の鉄イオンを含ませて植物に吸収させるという方法であろう。しかしながら、植物細胞は細胞死が起こると膜系が崩壊し、細胞外へイオンを漏出してしまうことが知られている (Mitsuhara et al.1999, Kawai-Yamada et al. 2004)。本章においても BY-2 細胞に対して通常培養条件の 10 倍量である Fe^{2+} 1.0 mM を添加したところ細胞死が誘導され (図 2 a,b)、細胞内の鉄蓄積量は添加 12 h を境に減少したことから、細胞死によって膜系が崩壊し、鉄イオンが漏出したものと考えられる。つまり単純な高濃度の Fe^{2+} 添加では細胞内に多量の鉄分を蓄積する細胞は作出できないと考えられる。

タバコ BY-2 細胞への高濃度の Fe^{2+} 添加は酸化ストレス様の影響を与える

先行研究によりこれまで過酸化水素やメナジオンなどの酸化ストレス源となる化合物を BY-2 細胞に添加すると ROS、およびカルシウムスパイクが発生し、細胞周期の進行が停止することが報告されている (Price et al.1994, Reichheld et al.1999)。本章において Fe^{2+} 1.0 mM を BY-2 細胞に添加したところ ROS の発生、カルシウムスパイクの発生がみられ、細胞周期の進行が停止した (図 3-5)。このことからおそらく高濃度 Fe^{2+} 添加は BY-2 細胞にとって酸化ストレス様の影響を与えるものと考えられる。しかしながらカルシウムスパイクの波形について検討すると、酸化ストレス源と考えられている過マンガン酸カリウム (KMnO_4) や重金属のアルミニウムイオンなどの添加によって発生するカルシウムスパイクはストレスに曝した直後 60 sec 以内に単一ピークを生じるのに対して (図4 a、Kawano et al. 2003)、 Fe^{2+} は添加後 5 min 程度から徐々に周期的なカルシウムスパイクを生じていた。このことは、 Fe^{2+} が他の酸化ストレス源とは異なった機序でカルシウムスパイクを生じさせていることを暗示している。 Fe^{2+} がフェントン反応により ROS の発生を触媒することを考え合わせると (Zhao et al. 2005)、 Fe^{2+} が細胞へ徐々に吸収され、その都度 ROS が発生し、それに応じてカルシウムスパイクが発生するために周期的な波形を示している可能性が考えられる。

高濃度 Fe²⁺ 添加は S 期特異的に細胞周期の進行を停止させる

Aphidicolin 同調系を用いて、細胞周期特異的に Fe²⁺ 1.0 mM を添加したところ、S 期に添加した場合に限って細胞周期の進行が停止した。また G2 期に Fe²⁺ 添加をした細胞の MI のピークの出現時間が若干遅れていたが、これは Fe²⁺ 添加をした Aphidicolin 解除後 5-7 h においてまだ S 期を進行中の細胞が残っていたためであると考えられる (図 5 c, d)。S 期に細胞周期が停止するという現象は酸化ストレスに特有の現象であり、S 期において DNA に損傷を与えたり、DNA 損傷に応じた DNA 修復の過程を遅延させるため細胞周期の進行が停止することが示唆されている (Reichheld et al.1999)。この S 期特異的な鉄イオンの添加が細胞周期を止めるという結果から、本研究の最終目標である「高濃度の鉄分を含みかつ自己増殖能を失わない培養細胞の作成」を考えると、S 期以外で鉄イオンを添加すれば細胞周期は止まらずに細胞は多くの鉄イオンを細胞内に取り込むのではないだろうか、という予想ができる。そこで、第 II 章では細胞周期に着目して高濃度の鉄分を含み、かつ自己増殖能を失わない細胞の培養を試みた。

第Ⅱ章 鉄分豊富なタバコ BY-2 細胞の培養

緒言

世界規模で鉄イオンの必要性を考えてみると、鉄分不足解消は非常に重要な課題である。我々人間が鉄分不足に陥ると貧血症はもとより、骨髄組織の細胞質量不足により正赤芽球の出現や皮膚組織の軟化などが生じる(Itogawa 2003)。鉄分不足の対処方法としては鉄剤と呼ばれる錠剤を投与する治療法が知られているが、鉄剤は反応性の高い鉄イオンで構成されるため、患者個々人の鉄イオン限界濃度を見極めて投与せねば二次的な病気を生じ非常に危険である。また、より現実的に考えると、鉄分不足に陥りやすいのは妊婦や出産直後の女性であり、そのような女性の多くは子供を育てている可能性が高い。これまでも乳幼児が誤って鉄剤を飲んでしまったという報告も多くあるため、鉄剤に頼るのは危険である (Itogawa 2003, WHO 2004)。このような栄養不足の問題に対処すべく近年、分子生物学の発展を背景として高栄養作物を作出する研究が進んでいる。例えば、鉄分と同様に我々が不足しがちな栄養分の一つであるビタミン A に対して、これを補うべくビタミン A 生合成経路中の酵素遺伝子 *psy* (Phytoene synthase)、 β -lcy (β -cyclase) を胚乳特異的に発現するプロモーターに繋いでイネに導入することで、高ビタミン A 含有イネ、通称ゴールデンライスが作出されたことはまだ記憶に新しい (King 2002)。鉄分不足においてもこのような試みがなされつつある。液胞膜、プラスチドに局在し、鉄イオンを蓄積すると考えられている二価鉄イオントランスポーター *Nramp1*、*Nramp2*、*Nramp3* (Curie et al. 2000, Lanquar et al. 2005) や、液胞膜に局在し、なおかつ鉄イオン選択性の非常に高い *VIT1* (Kim et al 2006) は有用な遺伝子であると考えられている。しかしながら遺伝子改変植物への風当たりは強く、将来的な遺伝子飛散、環境汚染、潜在的アレルギーの発生などが懸念されており、社会的な実現可能性 (Celec et al. 2005) を考えると、遺伝子組み換えに頼らない方法も模索すべきである。

そこで本章では、第 I 章で得られた結果をもとに、1. 鉄イオンと細胞周期の関係に着目して、鉄イオン障害が起きにくいと考えられる G1 期に鉄イオンを添加する方法、2. 他の二価カチオンと二価鉄イオンとの関係性から細胞に多くの鉄イオンを取り込ませる方法、3. 高濃度二価鉄イオン誘導的に発生するカルシウムスパイクを抑える方法を試行した。本章を通して高濃度の鉄分含有作物の作出への基礎的な研究として、高濃度の鉄分を含みかつ自己増殖能を失わない高等植物細胞の培養の確立を目指した。

II-1 項 G1 期における鉄イオン添加調節

結果

G1 期で Fe²⁺ 添加を行うと鉄イオン含有量が増大する

第 I 章より、Fe²⁺ 1.0 mM が誘導する細胞周期の進行の停止は、S 期においてのみ生じることが示唆された (図 5 a,b,c)。言い換えれば、Fe²⁺ を S 期に添加せずに他の時期に Fe²⁺ を添加すれば細胞の自己増殖能は保たれ、かつ高濃度の鉄分を含む細胞を培養することが可能になるのではないかと予想される。そこで Aphidicolin 細胞同調系を用い、Aphidicolin 処理時 (G1 → G1/S 期) に Fe²⁺ 1.0 mM を添加し、Aphidicolin 解除後 (S 期以降) では LSD 培地 (Fe²⁺ 0.1 mM) で培養する培養系 (Fe²⁺ → LSD) を試行した (図 7 a)。その結果、分裂指数 (MI) はコントロール (LSD → LSD) とほぼ変わらなかったが、Aphidicolin 解除後も Fe²⁺ 1.0 mM を添加した場合 (Fe²⁺ → Fe²⁺) には、MI の上昇はほとんど見られなかった (図 7 b)。またその際の鉄イオン含有量を測定したところ、コントロールに比べ、Aphidicolin 処理時において Fe²⁺ 1.0 mM を添加したものでは、鉄イオン含有量が約 12 倍にまで上昇していた (図 7 c)。

G1 期に高濃度 Fe²⁺ 添加することでタバコ BY-2 細胞は鉄イオンに適応化する (鉄イオン吸収量の変化)

G1 期においてのみ Fe²⁺ 1.0 mM を添加することで、細胞は自己増殖能を失わず、かつ細胞中の鉄イオン含有量を増加させることができた (図 7 b,c)。このような G1 期においてのみ Fe²⁺ 1.0 mM を添加した際の細胞をさらに詳細に解析するため、次に細胞死を基準とした解析を行った。ここでは、Aphidicolin 細胞同調系を用い、Aphidicolin 処理時 (G1 → G1/S 期)、および解除後 (S 期以降) にそれぞれ LSD 培地、あるいは Fe²⁺ 1.0 mM を添加した培地で培養する計 4 通りの培養系 (それぞれ LSD → LSD、Fe²⁺ → LSD、LSD → Fe²⁺、Fe²⁺ → Fe²⁺ と表記する。図 8 a) についてその後の細胞死の割合を Aphidicolin 解除後 0 h、6 h、12 h について測定した。その結果、LSD → LSD、Fe²⁺ → LSD では細胞死がほとんど見られなかった。一方、LSD → Fe²⁺、Fe²⁺ → Fe²⁺ ではいずれも細胞死が誘導されたが、その割合は Aphidicolin 解除後 12 h において LSD → Fe²⁺ では約 50% であったのに対して、Fe²⁺ → Fe²⁺ では約 30% に低下していた (図 8 b)。

このように Aphidicolin 処理時から Fe²⁺ 1.0 mM を添加したもののほうが細胞死の割合が低下する (図 8 b) という現象を鉄イオンに対する BY-2 細胞の

適応化と考え、この適応化について詳しく解析するため、次にこの過程における鉄イオン含有量の変化を測定した。Aphidicolin 添加 24 時間後と Aphidicolin 解除後 3 時間における鉄イオン含有量を測定し、時間変化を比較した。その結果 LSD → Fe²⁺ では、Aphidicolin 解除からその後 3 時間までの鉄イオン吸収量が、Aphidicolin 処理中 24 時間の鉄イオン吸収量に対して、急激に増加していた。一方、Fe²⁺ → Fe²⁺ では Aphidicolin 解除後の鉄イオン吸収量は同様に増加していたが、LSD → Fe²⁺ に比べてその増加量が抑えられていた (図 8 c)。

G1 期に高濃度 Fe²⁺ 添加することでタバコ BY-2 細胞が鉄イオンに適応化する (二価鉄イオントランスポーター遺伝子発現の変化)

BY-2 細胞の鉄イオンに対する適応化についての更なる解析として、G1 期の二価鉄イオントランスポーターの発現量を調べた。発現解析に先立って、BY-2 細胞から *Nramp* 遺伝子ファミリー、*ZIP* 遺伝子ファミリー のクローニングを行った。*Nramp* 遺伝子ファミリーから *NtNramp1*、*ZIP* 遺伝子ファミリーから *NtZIP1* をクローニングした。いずれも BLAST 検索の結果シロイヌナズナのホモログと考えられる (図 9 a,b)。培養 7 日目の BY-2 細胞継代時に、Fe²⁺ 1.0 mM を添加した培地に移植するものと、LSD 培地に移植するコントロールとで、その時の *NtNramp1*、*NtZIP1* の発現量を Real Time RT-PCR 法によって測定した。その結果、コントロールでは継代後 0 h、24 h において発現量に大きな変化は認められなかった。一方で、Fe²⁺ 1.0 mM を添加した培地に移植したものでは *NtZIP1* の発現には変化が無かったものの、*NtNramp1* においては継代後 0 h に比べ 24 h の発現量が約 1.5 倍に増加していた (図 9 c,d)。さらに Fe²⁺ 1.0mM 添加によって発現量が増加した *NtNramp1* の細胞内局在について調べるため、*NtNramp1* と GFP との融合タンパク質を CaMV 35S プロモーターにより恒常的に発現するようコンストラクト設計した。これをアグロバクテリウム法によってタバコ BY-2 細胞に導入した。得られた形質転換細胞を蛍光顕微鏡によって *NtNramp1*-GFP の細胞内局在を調べたところ、GFP 発現はプラスチドに局在するものと考えられた (図 9 e)。

II-2 項 S 期におけるマグネシウムイオンを用いた鉄イオン添加調節

結果

S 期での Fe²⁺ 添加量の調節による細胞内の鉄分含有量増大の試み

高濃度の Fe^{2+} を含みかつ自己増殖能を失わない細胞の培養条件として、G1 期では Fe^{2+} に対して細胞周期の進行停止や細胞死の誘導などの影響を受けないと考えられるので、前項Ⅱ・1 では G1 期においてのみ Fe^{2+} を添加して細胞の Fe^{2+} 含有量を増加させることができた (図 7 b,c)。ところで、G1 期に続く S 期以降にも Fe^{2+} を添加しそれを細胞が吸収しつつ自己増殖能を失わなければさらなる鉄分豊富なタバコ BY-2 細胞の培養に繋がる。しかしながら S 期における高濃度 Fe^{2+} 条件での培養は酸化ストレス様の障害を引き起こしてしまう。そこで、S 期以降に培地に添加する Fe^{2+} の濃度を 1.0 mM から減少させることで Fe^{2+} がもたらすストレスの軽減を試みた。その結果、Aphidicolin 解除後 (S 期以降) に Fe^{2+} 濃度を 0.2 mM、0.5 mM に下げたところ、細胞周期は進行しているものの、コントロールと比べて MI は低かった (図 10 b)。このときの鉄イオン含有量を測定したところ、Aphidicolin 解除後の鉄イオン含有量の増加はほとんどみられなかった (図 10 c)。つまり、 Fe^{2+} 濃度の直接的な添加調節によって S 期以降の細胞の鉄イオン含有量を増大させることは困難であるということが示唆された。

他の二価カチオンを利用して Fe^{2+} によるストレスを軽減する

鉄イオンを細胞内へ輸送する二価鉄イオントランスポーターについてはこれまでにシロイヌナズナから ZIP, Nramp が同定されている。これらのトランスポーターは二価鉄イオンの取り込みに関して重要な役割を担っているものの、in vitro の実験系において Fe^{2+} だけでなく亜鉛イオン (Zn^{2+})、マンガニオン (Mn^{2+})、カドミウムイオン (Cd^{2+}) など他の二価カチオンも通すことが分かっている (Thomine et al. 2000, Connolly et al. 2002)。すなわち、細胞内への Fe^{2+} 輸送には他の二価カチオンの影響が大きいと予想される。そこで、移植 7 日目の BY-2 細胞の継代時に培地に二価カチオンとして Fe^{2+} 1.0 mM だけでなく CaCl_2 、 MgSO_4 、 MnSO_4 、 ZnSO_4 (以降 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} と略す) をそれぞれ 1.0 mM 個々に添加し、添加後 6 h、18 h の細胞死の割合を測定した。その結果、 Fe^{2+} のみを添加した場合には 18 h において細胞死の割合が約 50% であったのに対して、 Fe^{2+} と同時に Ca^{2+} を添加したものでは細胞死の割合が約 40% に減少した。また Fe^{2+} と同時に Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} を添加した場合にはいずれも約 30% と大きく減少した (図 11 a)。LSD 培地中に含まれる二価カチオンのメジャーコンポーネントは Mg^{2+} 1.5 mM、 Ca^{2+} 3.0 mM であり、総計約 4.5 mM の二価カチオンが含まれている。そこで次に 7 日目の BY-2 細胞継代時の培地に Fe^{2+} 1.0 mM だけでなく Mg^{2+} 4.5 mM、 Ca^{2+} 4.5 mM をそれぞれ同時に添加し、その後の細胞死の割合を測定した。その結果、同時に Mg^{2+} 4.5 mM、あるいは、 Ca^{2+} 4.5 mM を添加した場合には添加後 18 h

における細胞死の割合がそれぞれ約 20 %、約 30 % と Fe^{2+} 1.0 mM のみを添加した場合と比較して大きく低下した (図 11 b)。

Mg^{2+} 同時添加による S 期の Fe^{2+} 添加が誘導する細胞周期進行停止の抑制

Fe^{2+} 1.0 mM 添加によって誘導されると考えられる細胞死が、他の二価カチオンを培地中に同時に添加することによって部分的に回避できた (図 11 a,b)。そこで、 Fe^{2+} 1.0mM 添加によって誘導される細胞周期進行の停止にも他の二価カチオンが影響するかどうかを調べた。ここでは他の二価カチオンとして、細胞に対して比較的安全であり、通常培養条件である LSD 培地に多く含まれている Mg^{2+} を用いた。Aphidicolin 細胞同調系を用い、Aphidicolin 処理時 (G1 → G1/S 期) に Fe^{2+} 1.0 mM を添加し、Aphidicolin 解除後 (S 期以降) に Fe^{2+} 1.0 mM のみ ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$)、あるいは、同時に Mg^{2+} 4.5 mM を添加したもの ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) についてそれぞれ MI を測定しコントロール (LSD → LSD) と比較した (図 12 a)。その結果、 $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ では MI は非常に低く細胞周期の進行がほとんど停止していると考えられた。一方で、 $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ ではコントロールよりは値が低いものの、MI の上昇が観察された (図 12 b)。また LSC によって細胞周期の進行を調べたところ、 $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ では細胞周期は S/G2 期で停止したままであったのに対して、 $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ では Aphidicolin 解除後 10 h においてコントロールと同様に G1 期に進行した細胞が見られた (図 12 c)。次に、この時の鉄イオン含有量を測定した結果、 $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ では、Aphidicolin 解除後 6 h での鉄イオン含有量がコントロール (LSD→LSD) の約 20 倍、 $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{LSD}$ の約 1.6 倍に増加していた。さらに細胞周期進行が停止してしまう $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ と比べても、Aphidicolin 添加後 24 h での鉄イオン含有量が上回るという結果が得られた (図 12 d)。

高濃度 Fe^{2+} 条件下での種子発芽、植物体生長の抑制が Mg^{2+} 同時添加で回避される

Nicotiana glauca NN では Fe^{2+} 2.0 mM の添加により発芽率及び、植物体生重量が大きく低下した (図 6 a,b)。この結果に対して、次に図 11,12 で示唆された Mg^{2+} よる鉄イオン吸収量への作用によって *Nicotiana glauca* NN の生育が回復するか否かについて検討した。培地中に Fe^{2+} 2.0 mM と同時に Mg^{2+} 4.5 mM を添加したところ、 Fe^{2+} 2.0 mM のみでは約 40 % であった発芽率が Mg^{2+} の同時添加によって、ほぼ 100 % まで回復した (図 13 a)。また、水耕で発芽させた 7 日後の植物体に対して Fe^{2+} 2.0 mM のみを添加したものと、 Fe^{2+} 2.0 mM と同時に Mg^{2+} 4.5 mM を添加したものとで添加後 10 日目の

生重量を調べた。その結果コントロールの 1 個体当たりの平均生重量 4.1 mg に対して Fe^{2+} 2.0 mM のみを添加したものでは 1.5 mg にまで減少したが、 Mg^{2+} 4.5 mM を同時に添加したものでは 1.9 mg とやや回復した(図 13 b)。

II-3 項 S 期におけるカルシウムキレーターEGTA を用いた 鉄イオン添加調節

結果

Fe^{2+} 1.0 mM 添加により誘導されるカルシウムスパイクの抑制

Fe^{2+} 1.0 mM 添加は BY-2 細胞に対して周期的なカルシウムスパイクを発生させた(図 4)。カルシウムスパイクは細胞周期の進行を停止あるいは遅延させ、細胞死を誘導するシグナルであることが示唆されていることから (Sano et al. 2006)、 Fe^{2+} 添加時に生じるカルシウムスパイクを軽減することにより、細胞周期進行の停止や細胞死を抑制することを試みた。まず、II-2 項から、 Mg^{2+} が Fe^{2+} 吸収を抑制することが示唆されたことから、Aphidicolin 解除直後の S 期の細胞に対して Fe^{2+} 1.0 mM と同時に Mg^{2+} 4.5 mM を添加したところ、カルシウムスパイクの発生がかなり抑えられた(図 14 a)。また Mg^{2+} 4.5 mM のみの添加ではカルシウムスパイクの発生は見られなかった(図 14 a)。この時、900 sec 間の発光量の積算値を求めると、 Mg^{2+} 4.5 mM の同時添加によって、細胞内へのカルシウムイオン流入量が約 1/4 に抑えられることが分かった(図 14 b)。次に、カルシウムイオンのキレーターである EGTA 500 μM を 1 min 前処理してから Fe^{2+} 1.0 mM を添加しても、カルシウムスパイクの発生が軽減された(図 14 c)。また EGTA のみの添加ではカルシウムスパイクの発生は見られなかった(図 14 c)。この時の 900 sec 間の発光量の積算値を求めると、EGTA 500 μM の前処理によって、細胞内へのカルシウムイオン流入量が約 2/5 に抑えられることが分かった(図 14 d)。

EGTA の添加により鉄イオン吸収量を低下させずに Fe^{2+} による細胞周期進行の停止が抑制できる

Fe^{2+} が誘導するカルシウムスパイクが Mg^{2+} や EGTA の添加によって抑えられることが分かった(図 14 a ~ d)。 Mg^{2+} は鉄イオンの吸収を抑制するが(図 12 d)、EGTA 添加により、鉄イオン吸収量を低下させずに自己増殖能を失わない細胞の培養が可能になるのではないかと予想される。そこで Aphidicolin

細胞同調系を用い、Aphidicolin 解除後 (S 期以降) に EGTA 500 μ M を前処理し、細胞分裂率への効果を調べた。その結果、コントロールと比較して細胞周期の進行は遅れたが、 Fe^{2+} 1.0 mM のみの添加と比べて分裂指数が部分的に回復した (図 15 b)。またこの時の細胞周期の進行を LSC を用いて調べたところ、 Fe^{2+} 1.0 mM のみの添加により S/G2 期で停止した細胞周期の進行が、EGTA 前処理により回復した (図 15 c)。また鉄イオン含有量を Aphidicolin 解除後 6 h について調べたところ、EGTA を前処理しても、無処理と同等の鉄イオン吸収が観察された (図 15 d)。

考察

G1 期における Fe^{2+} 添加によってタバコ BY-2 細胞が鉄イオンに適応化し高濃度の鉄分を含有した細胞の培養が可能となる

これまでに植物の細胞周期進行を遅滞または停止させるストレス源として様々なものが研究されているが、例えば、酸化ストレスとして知られるメナジオンは S 期よりも G1 期において、より強いストレス性の反応を引き起こすことが知られている (Reichheld et al. 1999)。しかしながら、 Fe^{2+} の場合、1 章では S 期においてのみ細胞周期の進行遅滞を示した (図 5 c)。また、II-1 項において $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{LSD}$ の処理によって、コントロールの 12 倍の Fe^{2+} を細胞に蓄積させることができた (図 7 b,c)。これは、 Fe^{2+} がメナジオンとは異なり、G1 期における Fe^{2+} 添加が細胞にとってストレスと認識されていないようなストレス源であることを示唆している。

また、G1 期に Fe^{2+} 1.0 mM を添加してあらかじめ培養しておくこと、S 期での Fe^{2+} ストレスが軽減され、細胞死が抑制されることが示唆されたが (図 8 b,c)、その理由の一つとして BY-2 細胞の鉄イオンへの適応化が考えられる。金属ストレスに対する植物の適応化については先行研究が進んでおり、例えば、過剰な Cd^{2+} や Cu^{2+} などのストレスに曝されると、植物は L 型プロリンを多く生産し、それらが金属キレーターや ROS スカベンジャーとして機能し、環境に適応化することが知られている (Sharma et al. 2006)。また、ニコチアミンは過剰な Zn^{2+} に適応するべく植物体内で生産され、キレーターとして Zn^{2+} を解毒化することも知られている (Weber et al. 2004)。金属ストレスに関する適応化に関しては金属イオントランスポーターの発現変化も重要であり、特に細胞内オルガネラへの蓄積機構は近年明らかになりつつある。例えばシロイヌナズナは過剰 Zn^{2+} ストレスに曝されると、液胞膜局在型 Zn^{2+} トランスポーター ZAT (Zn^{2+} transporter of *Arabidopsis Thaliana*) の発現を上昇させるこ

とで過剰になった Zn^{2+} を液胞内に蓄積し、 Zn^{2+} の毒性から免れている (van der Zaal et al. 1999, Hall and Williams 2003)。過剰量の Fe^{2+} ストレスについても、緒論で示したように液胞膜、プラスチドに過剰なイオンを溜め込む可能性が示唆されていた (Curie et al. 2000, Lanquar et al 2005, Kim et al 2006)。タバコ BY-2 細胞でも G1 期に Fe^{2+} を添加すると *NtNramp1* の mRNA 量が増加し、GFP と *NtNramp1* との融合タンパク質はプラスチドに分布すると考えられたことから (図 9 d,e)、吸収した鉄イオンを速やかにプラスチドへ隔離することで、高濃度鉄イオン添加に適応化した可能性が考えられる。また、鉄イオン吸収速度が抑えられるような細胞膜型トランスポーターの発現変化が起きた可能性も考えられる (図 8 c)。吸収速度の抑制による適応化は、キレーターによる Fe^{2+} 解毒化を考えると、急激な鉄イオン吸収によりキレーター生産が追いつかなくなるのを避けているのかもしれない。

S 期における Fe^{2+} 添加によるストレスを Mg^{2+} で回避することで高濃度の鉄分を含有した細胞の培養が可能となる

G1 期においてのみ過剰量の Fe^{2+} を添加すれば、細胞へのストレスが少なく自己増殖能を失わず、かつ通常の 12 倍高濃度の鉄イオンを含有した細胞を培養することができた (図 7 b,c)。しかしながらこの培養条件では続く S 期以降では過剰量の Fe^{2+} 添加ができないので、それ以上細胞内の鉄イオン濃度を上昇させることができないばかりか、細胞内外の鉄イオン濃度差を考えると、細胞外へ流出してしまう可能性が高い。S 期において Fe^{2+} 濃度を下げて (< 1.0 mM) 添加したところ細胞内の鉄イオン含有量は上昇しなかった (図 10 c)。これは細胞内外の鉄イオン濃度差によるものと考えられた。一方、 Fe^{2+} トランスポーターである *ZIP* 遺伝子ファミリー、*Nramp* 遺伝子ファミリーは Fe^{2+} だけでなく Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} も基質とすることが知られている (Thomine et al. 2000, Connolly et al. 2002) ことから、鉄イオン吸収には他の二価カチオンによる影響が大きいと考えられる。そこで Fe^{2+} 吸収阻害作用を持つイオンを探索したところ、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} は Fe^{2+} 添加が誘導する細胞死を抑えることがわかった (図 11 a)。化学的な性質について、二価カチオンのイオン半径は配位数を考慮しても概ね

$Be^{2+} << Ni^{2+} < Mg^{2+} < Zn^{2+} < Fe^{2+} < Mn^{2+} << Cd^{2+} < Ca^{2+} < Hg^{2+} << Eu^{2+} < Sr^{2+} < Pb^{2+} << Ba^{2+} < Ra^{2+}$ であることが知られている (Shannon 1976)。 Fe^{2+} 添加が誘導する細胞死を抑える効果は $Mn^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$ の順であり (図 11 a)、これは Fe^{2+} のイオン半径に近い順でもあった。イオン半径はトランスポーターやチャネルの基質選択性を考えると非常に重要な指標となる。細胞内にイオンを通すタンパク質は細胞膜状に穴を形成し、その穴を通れる大きさのイオンが細胞内

外へ移動するためである。しかしながら、 Fe^{2+} に非常に近いイオン半径を持つ Mn^{2+} 、 Zn^{2+} はいずれも過剰量では植物にとって金属ストレス（酸化ストレス）となってしまう（Galaris and Evangelou 2002）ため、 Fe^{2+} に比較的構造が類似しかつ細胞に対してストレスにならないと考えられる Mg^{2+} を Fe^{2+} と同時に添加することで、 Fe^{2+} 添加が誘導する細胞死、細胞周期の進行停止を解除することができた（図 11 b, 12 b,c）。おそらくこれは、II-1 項の考察でも触れたが、 Mg^{2+} 存在により細胞への鉄イオン吸収が緩やかに抑えられたため、細胞への急激な鉄イオン流入が引き起こす酸化ストレス様の障害を抑えることができたことから、結果的として細胞周期が進行し（図 12 b,c）、細胞死が抑えられ（図 11 b）、かつ最終的には通常の約 20 倍高濃度の鉄イオンを含有した細胞を培養することができるようになったと考えられる（図 12 d）。

カルシウムスパイク抑制により高濃度の鉄分を含有した細胞の培養が可能となるか

先行研究によりカルシウムスパイクと生理学的な現象との関連が示唆されており、過マンガン酸カリウムや高浸透圧処理、電気刺激などのストレスにより発生するカルシウムスパイクを、EGTA 処理によって細胞内に流入する Ca^{2+} をキレートし阻害すると、本来細胞周期が停止するはずのストレスを受けた後も、そのまま細胞周期を進行させることが明らかになっている（Sano et al. 2006）。II-3 項ではこの知見を活かし、BY-2 細胞に高濃度の鉄イオンを取り込ませ、かつ Fe^{2+} 添加が誘導するカルシウムスパイクを抑えることで（図 14 c,d）、細胞周期の進行を妨げずに、 Fe^{2+} の吸収もよく行えるという培養を可能にした（図 15 b,c,d）。一般的に金属ストレスの多くは酸化ストレスであるとされており（Galaris and Evangelou 2002）、酸化ストレスが引き起こすカルシウムスパイクは ROS が契機となり（Vranova et al. 2002）、電位依存性カルシウムチャンネル TPC1 から Ca^{2+} が流入する（Furuichi et al. 2001, Kawano et al. 2003, Kadota et al. 2005）。従って、 Fe^{2+} 以外にも酸化ストレス源でありながら必須微量元素である Mn^{2+} 、 Zn^{2+} や土壤汚染が問題となる Cd^{2+} など（Galaris and Evangelou 2002）を EGTA による Ca^{2+} 流入ブロックという方法により、効率よく植物に取り込ませることが可能になると予想される。また、EGTA を用いる方法以外にも TPC1 の cosuppression 株（Kadota et al. 2005）を用いても同様なことが可能となるかもしれない。さらに、 Ca^{2+} そのものを培地から取り除いてしまっても細胞外から細胞内へ流入する Ca^{2+} がなくなるので、カルシウムスパイクは生じないと考えられ、 Fe^{2+} の取り込みを促進するにはよい方法である。しかし、 Ca^{2+} そのものも必須元素なので、肥料などへの応用を考えるとイオンバランスを十分に配慮する必要がある。

総合考察

鉄イオンは我々人間、広くは生物全般にとって必須でありながらストレスとなるジレンマを抱えている。第Ⅰ章では高濃度 Fe^{2+} 条件下での酸化ストレス様の毒性についての解析を行い、第Ⅱ章では高濃度 Fe^{2+} 添加の毒性機序を考慮して、鉄分を豊富に含む培養細胞の培養を可能にする方法を試みた。第Ⅰ章においては細胞への Fe^{2+} 添加が他の金属ストレスと同様な酸化ストレス様の障害を示すことが確認できたと同時に、これまでには見られないカルシウムスパイクのパターンを呈示することが明らかとなった(図 16 ①)。第Ⅱ章においては S 期以外で多くの鉄イオンを取り込ませるという方法から、G1 期に Fe^{2+} を添加することで BY-2 細胞の鉄イオンに対する適応化という現象をみることができた(Ⅱ-1 項、図 16 ②)。またさらに、S 期における Fe^{2+} 吸収を可能にするため、 Mg^{2+} の有用性を見出しこれを可能とした(Ⅱ-2 項、図 16 ③)。最後に、カルシウムスパイクを抑制することから鉄イオン吸収の可能性を探った(Ⅱ-3 項、図 16 ④)。

本研究はタバコ BY-2 細胞を用いてはいるものの、常に植物体への応用を念頭において進めた(図 6,13)。現段階において鉄分豊富な野菜、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。植物体では組織の成熟に従って G1 期や類似の 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。したがって成長に応じて Mg^{2+} を減らして Fe^{2+} を増やすような育成方法を取ることが望まれる。現在日本の経済は内向きであり、それゆえ発展途上国の問題への関心は薄いですが、本研究で得られた知見は世界的な鉄分不足に対する問題意識の高まりによって有意義なものとなると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、*Nicotiana Sumsn NN* の種子を分与して下さった東京大学新領域創成科学研究科の宇垣教授、pGWB5 ベクターを分与して頂きました島根大学の中川助教授、に深くお礼申し上げます。

本研究の機会を与えて頂きました東京大学新領域創成科学研究科の馳澤盛一郎教授に心から感謝申し上げます。様々な実験技術を丁寧に御指導頂きました東京大学新領域創成科学研究科の佐野俊夫助手に心からお礼申し上げます。また、理化学研究所の米田新博士、田中洋子博士、カルフォルニア大学の五百城幹英博士、馳澤研究室の朽名夏磨博士、小田祥久博士、桧垣匠さん、大窪恵美子さん、林朋美さんには、最高の研究環境を与えていただきました。心から感謝致します。

引用文献

An, G. (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 79, 568-570.

Becker, M. and Asch, F. (2005) Iron toxicity in rice—conditions and management concepts. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168, 558–573.

Carl, P., LeBel, T., Harry, I. and Stephen, C.B. (1990) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227-231.

Celec, P.K., Renczésová, V.M., Natarajan, S., Pálffy, R., Gardlík, R., Hodosy, J., Behuliak, M., Vlková, B., Minárik, G., Szemes, T., Stuchlík, S. and Turò, J. (2005) Biological and biomedical aspects of genetically modified food. *Biomed. Pharmacother.* 59, 531-540.

Connolly, E.L., Fett, J.P. and Guerinot, M.L. (2002) Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 14, 1347-1357.

Curie, C., Alonso, J.M., Le, J.M., Ecker, R. and Briat, J.F. (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* 347, 749–755.

Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S.L., Briat, J.F., and Walker, E.L. (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe (III) uptake. *Nature* 409, 346–349.

Danuta, S. K. and Richardson, D.R. (2005) The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 57, 547-583.

Eide, D., Broderius, M., Fett, J. and Guerinot, M.L. (1996) A novel iron

regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 5624–5628.

Furuichi, T., Cunningham, K.W. and Muto, S. (2001) A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca^{2+} flux in Arabidopsis leaf cells. *Plant Cell Physiol.* 42, 900-905.

Galaris, D. and Evangelou, A. (2002) The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 93-103.

Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, N.M., Sharma, D.P. and Firoozabady, E. (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissue. *Science* 220, 1049-1051.

Guerinot, M.L. and Yi, Y. (1994) Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.* 104, 815–820.

Hall, J.L. and Williams, L.E. (2003) Transition metal transporters in plants. *J. Exp. Bot.* 54, 2601-2613.

Hentze, M.W. and Kuhn, L.C. (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93, 8175-8182.

Herbik, A., Koch, G., Mock, H.P., Dashkow, D., Czihal, A., Thielmann, J., Stephan, U.W. and Baumlein, H. (1999) Isolation, characterization and cDNA cloning of nicotianamine synthase from barley. A key enzyme for iron homeostasis in plants. *Eur. J. Biochem.* 265, 231–239.

Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsushashi, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K. (2006) Rice plants take up iron as an Fe^{3+} -phytosiderophore and as Fe^{2+} . *Plant J.* 45, 335-346.

Itogawa, Y. (2003) ミネラルの事典 朝倉書店 p220-230

Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Higashi, K., Sano, T., Nagata, T., Hasezawa, S. and Kuchitsu, K. (2004) Crosstalk between elicitor-induced cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 cells. *Plant J.* 40, 131-142.

Kadota, Y., Furuichi, T., Sano, T., Kaya, H., Gunji, W., Murakami, Y., Muto, S., Hasezawa, S. and Kuchitsu, K. (2005) Cell-cycle-dependent regulation of oxidative stress responses and Ca²⁺ permeable channels NtTPC1A/B in tobacco BY-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1259-1267.

Kawai-Yamada, M., Ohori, Y. and Uchimiya, H. (2004) Dissection of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *Plant Cell* 16, 21-32.

Kawano, T., Kadono, T., Furuichi, T., Muto, S. and Lapeyrie, F. (2003) Aluminum-induced distortion in calcium signaling involving oxidative bursts and channel regulation in tobacco BY-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 35-42.

Kim, S.A., Punshon, T., Lanzirotti, A., Li, L., Alonso, M.J., Ecker, R.J., Kaplan, J. and Gueriot, L.M. (2006) Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science* 314, 1295-1298.

King, J.C. (2002) Biotechnology: a solution for improving nutrient bioavailability. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 72, 7-12.

Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schröder, A., Krämer, U., Barbier-Brygoo, H. and Thomine, S. (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.* 24, 4041-4051.

Le, N.T. and Richardson, D.R. (2002) The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1603, 31-46.

Li, L., Chen, O.S., Mcvey, W.D. and Kplan, J. (2001) CCC1 Is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J. Biol. Chem.* 276,

29515-29519.

Linsmaier, E.M. and Skoog, F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18,100-127.

Marschner, H., Romheld, V. and Kissel, M. (1986) Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9, 3–7.

Mitsuhara, I., Malik, K.A., Miura, M. and Ohashi, Y. (1999) Animal cell-death suppressors Bcl-x (L) and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr. Biol.* 9, 775-778.

Mossman, B.T., Bignon, J., Corn, M., Seaton, A. and Gee, J.B. (1990) Asbestos: scientific developments and implications for public policy. *Science* 247, 294-301.

Nagata, T., Nemoto, Y. and Haswzawa, S. (1992) Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 132,1-30.

Olivieri, N.F. and Brittenham, G.M. (1997) Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood.* 89, 739-761.

Price, A.H., Taylor, A., Ripley, S.J., Griths, A., Trewavas, A.J. and Knight, M.R. (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6, 1301-1310.

Puccio, H., Simon, D., Cossee, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P. and Koenig, M. (2001) Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* 27, 181–186.

Reichheld, J.P., Vernoux, T., Lardon, F., Montagu, V.M. and Inzé, D. (1999) Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J.* 17, 647-656.

Richard, D., Klausner, T., Rouault, A. and Harford, J.B. (1993) Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell* 72, 19-28.

Robinson, N.J., Sadjuga, M.R. and Groom, Q.J. (1997) The froh gene family from *Arabidopsis thaliana*: putative iron-chelate reductases. *Plant. Soil.* 196, 245–248.

Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L. and Guerinot, M.L. (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397, 694–697.

Rüdiger, H. and Udo, W.S. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants *Planta* 216, 541-551.

Saltman, P., Hegenauer, J. and Christopher, J. (1976) Tired blood and rusty livers. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 6, 167-176.

Sanchez, M., Galy, B., Dandekar, T., Bengert, P., Vainshtein, Y., Stolte, J., Muckenthaler, M.U. and Hentze, M.W. (2006) Iron regulation and the cell cycle: *J. Biol. Chem.* 281, 22865-22874.

Sano, T., Higaki, T., Handa, K., Kadota, Y., Kuchitsu, K., Hasezawa, S., Hoffmann, A., Endter, J., Zimmermann, U. and Hedrich, R. (2006) Calcium ions are involved in the delay of plant cell cycle progression by abiotic stresses. *FEBS Lett.* 580, 597-602.

Schumann, K. (2001) Safety aspects of iron in food. *Ann. Nutr. Metab.* 45, 91-101.

Shannon, R.D. (1976) Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta. Cryst.* A32, 751-767.

Sharma, S.S. and Dietz, K.J. (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.* 57, 711-726.

- Takahashi, K., Isobe, M., Knight, M.R., Trewavas, A.J. and Muto, S. (1997)** Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic Ca²⁺ in tobacco suspension-culture cells. *Plant Physiol.* 113, 587-594.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M. and Schroeder, J.I. (2000)** Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 97, 4991-4996.
- van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A. and Hooykaas, P.J. (1999)** Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol.* 119, 1047-1055.
- Vert, G., Briat, J.F. and Curie, C. (2001)** *Arabidopsis IRT2* gene encodes a root periphery iron transporter. *Plant J.* 26, 181-189.
- Vranova, E., Inzé, D. and Breusegem, V.F. (2002)** Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53, 1227-1236.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E. and Clemens, S. (2004)** Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J.* 37, 269-281.
- White, P.J. and Broadley, M.R. (2003)** Calcium in plants. *Ann. Bot. (Lond).* 92, 487-511.
- Whitnall, M., Howard, J., Ponka, P. and Richardson, D.R. (2006)** A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 14901-14906.
- WHO (2004)** Assessing the IRON STATUS of population. 6-8, April

Zhao, J., Fujita, K. and Sakai, K. (2005) Oxidative stress in plant cell culture: A role in production of β -thujaplicin by *Cupressus lusitanica* suspension culture. *Biotech. Bioeng.* 90, 621-631.

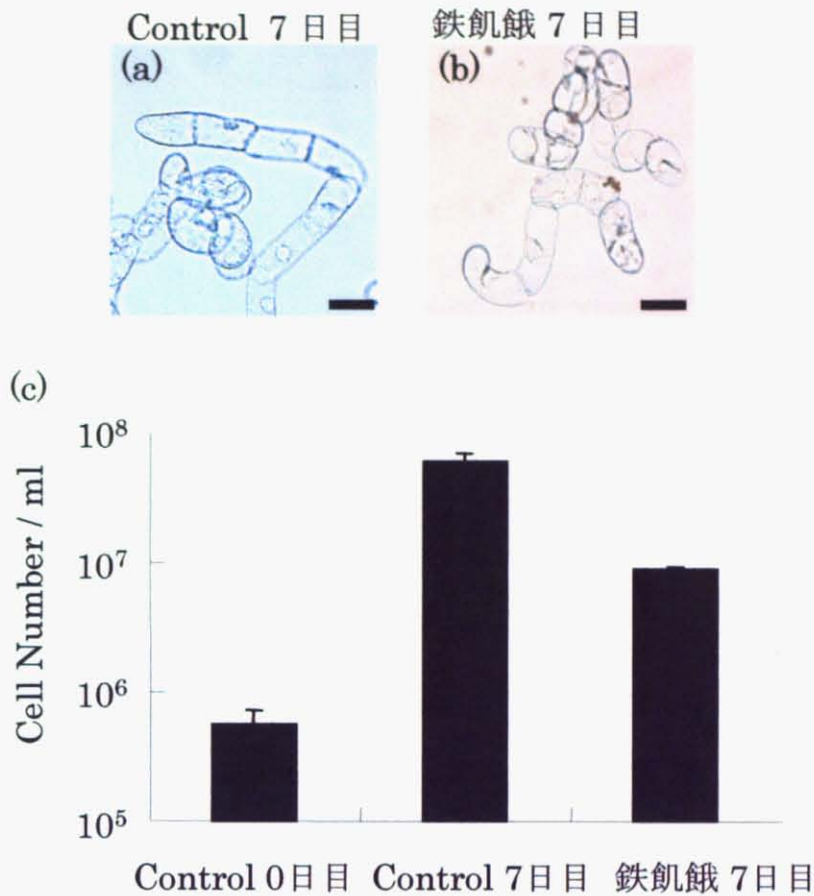


図1 鉄飢餓条件での細胞増殖量の測定

タバコ BY-2 細胞を LSD 培地 (FeSO_4 0.1mM を含む、Control、a)、あるいは鉄飢餓培地 (FeSO_4 を含まない、b) に継代後 7 日目の明視野顕微鏡像。Bar: 50 μm
(c) LSD 培地、鉄飢餓培地で培養後 0 日目と 7 日目の培養液中の細胞密度。グラフは培養液中の細胞密度。各棒グラフは独立した 3 回の実験での平均値を、バーは標準誤差 (SE) を表す。(以下、Bar:SE. n=3 のように略記する。)

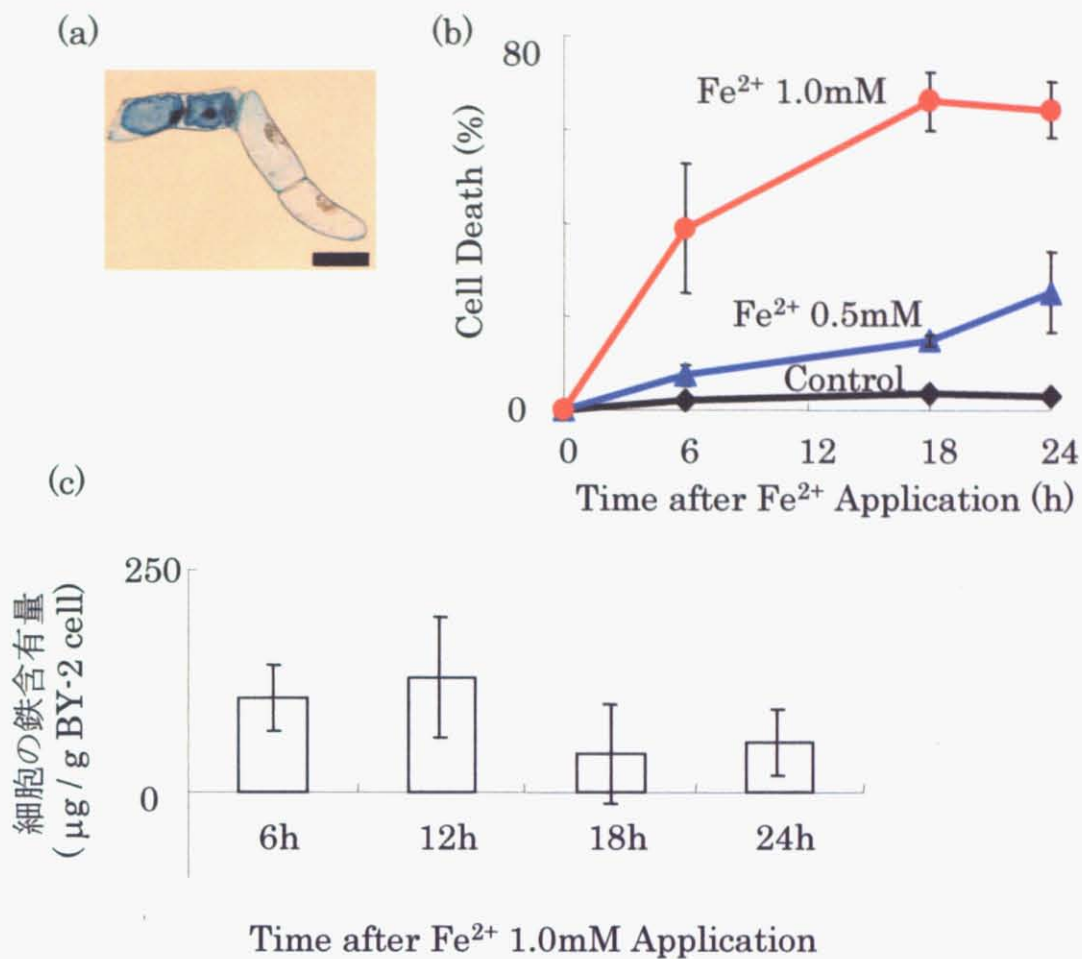


図2 過剰量 FeSO₄ 添加による細胞死の誘導と細胞内鉄イオン濃度の変化

(a) FeSO₄ 1.0 mM (以下 Fe²⁺ 1.0 mM と略す。) 添加後 24 h の BY-2 細胞を evans blue 染色した明視野顕微鏡像。Bar: 50 μm (b) Fe²⁺ 添加後 6 h、18 h、24 h の細胞死の割合。(● Fe²⁺ 1.0 mM、▲ Fe²⁺ 0.5 mM、◆ Control (Fe²⁺ 0.1 mM)) (a) の写真左上のように evans blue で青色に染まった細胞を細胞死した細胞として計測した。(c) Fe²⁺ 1.0 mM 添加後 6h、12 h、18 h、24 h の BY-2 細胞 1 g 当たりの鉄イオン含有量。Bar:SE. n=3

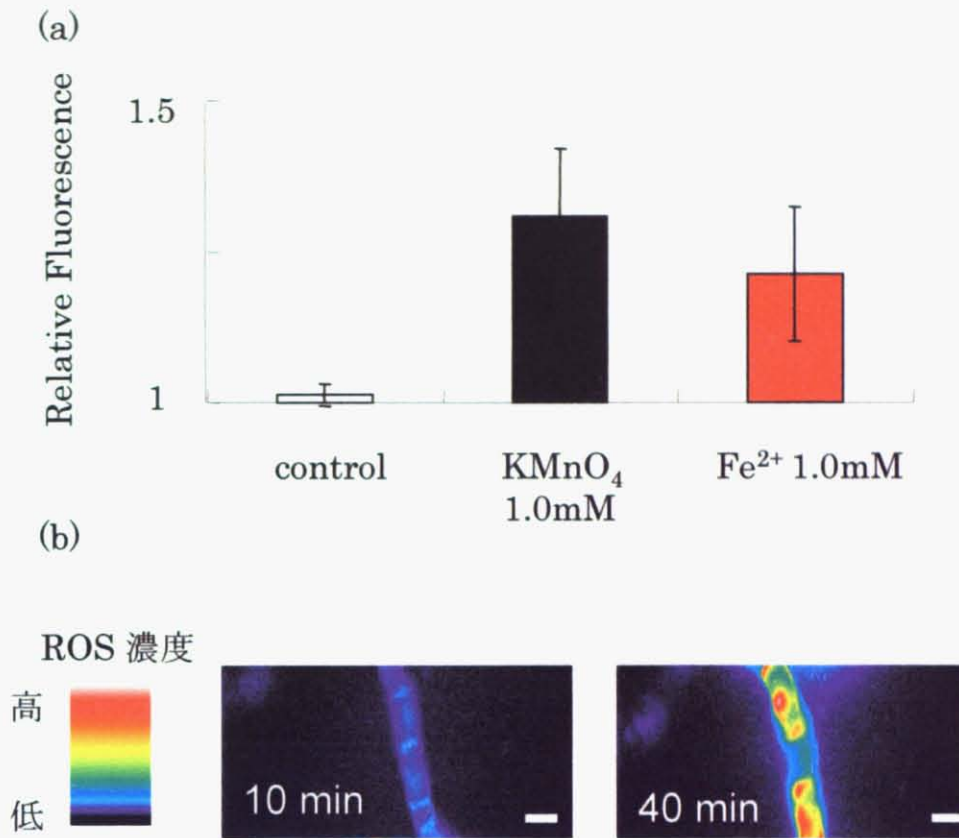


図 3 FeSO₄ 添加により発生する活性酸素種 (ROS) の測定

(a) FeSO₄ 添加による ROS の発生を特異的蛍光指示薬 DCFDA からの蛍光として、蛍光プレートリーダーを用いて測定した。縦軸は試薬添加後 30 min における添加直前の時点に対する蛍光量比を表す。無添加 (Control)、FeSO₄ 1.0 mM、KMnO₄ 1.0 mM 添加による DCFDA の蛍光量比。Bar:SE. n=3 (b) FeSO₄ 3.0 mM 添加後 10 min と 40 min の BY-2 細胞を蛍光顕微鏡で撮影し、DCFDA 蛍光からの蛍光輝度をイメージングした。写真左のカラーバーは相対蛍光輝度を表し、青色は蛍光量が少ないことを、赤色は多いことを表す。Bar: 50 μm

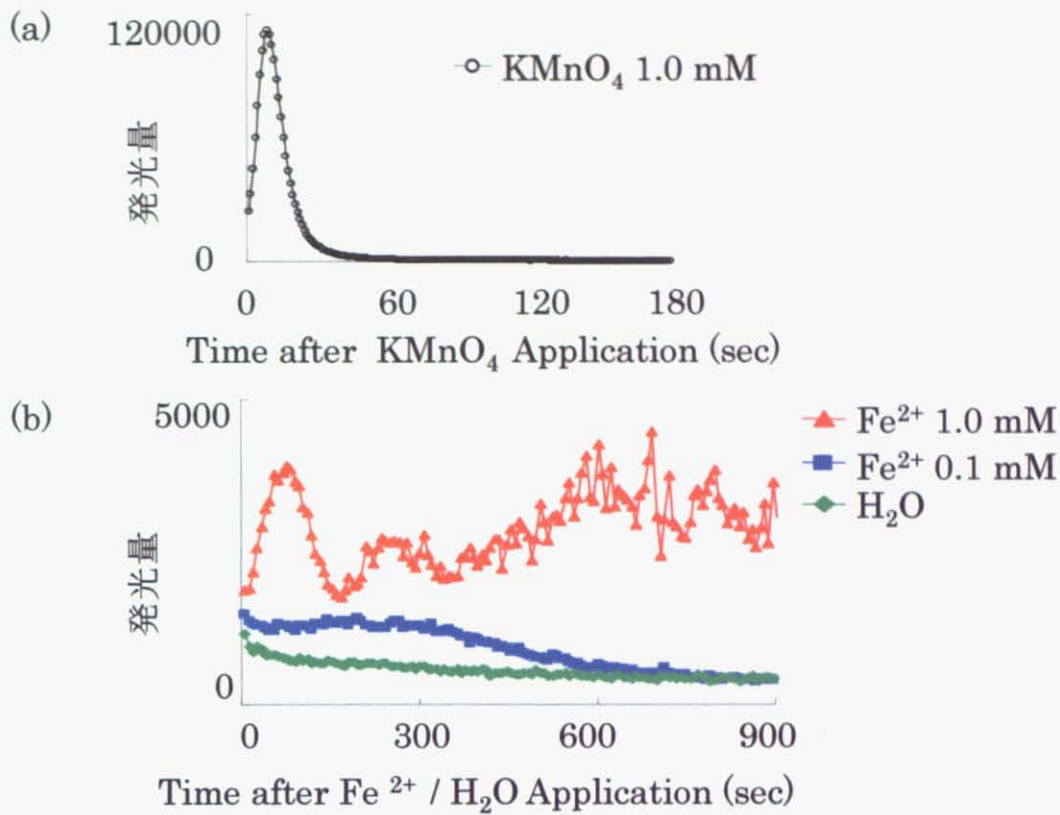


図4 FeSO_4 添加によるカルシウムスパイクの発生

(a) 7日目の Aeq-BY-2 株に対して酸化ストレス源であり、カルシウムスパイクを発生させることが知られている過マンガン酸カリウム (○ KMnO_4) 1.0 mM を添加し、その後の発光量を 1 sec 毎、180 sec の間測定した。(b) 7日目の Aeq-BY-2 株に対して FeSO_4 1.0 mM (Fe^{2+} 1.0 mM) (▲)、 Fe^{2+} 0.1 mM (■)、 H_2O (◆) を添加し、その後の発光量を 7 sec 毎、900 sec の間測定した。

(a) Cell Cycle	G1	G1 / S	S	G2	M
	Aphidicolin 処理		Aphidicolin 解除		
Condition	LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		
	LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		← Fe ²⁺ 1.0 mM →		
	LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		Fe ²⁺ 1.0 mM		
	LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		Fe ²⁺ 1.0 mM		
	LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		Fe ²⁺ 1.0 mM		
Time	0 h	24 h	0 h 2 h	5 h 7h	8 h 10 h

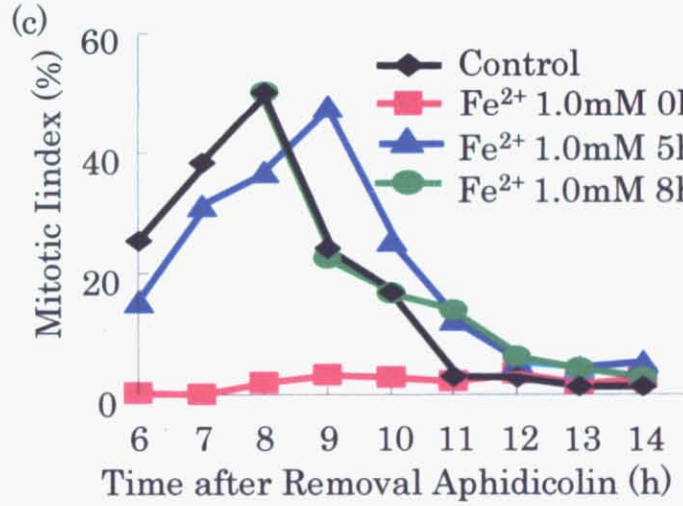
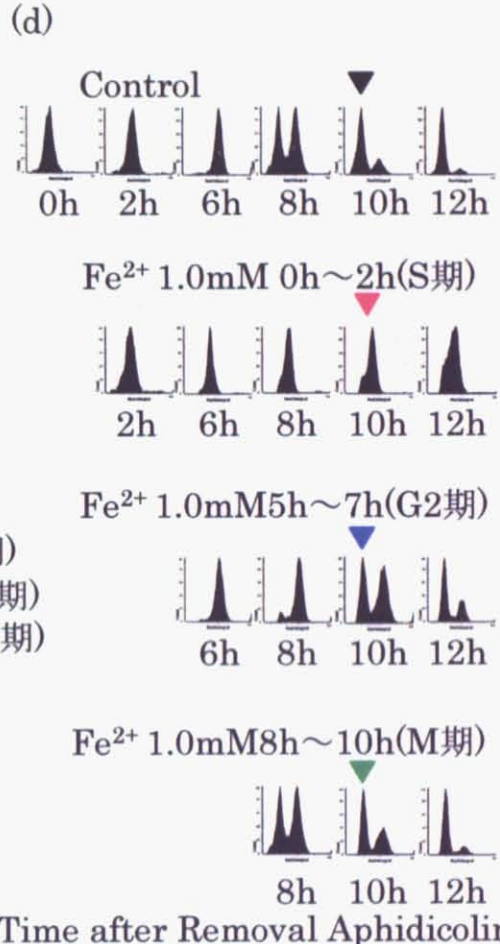
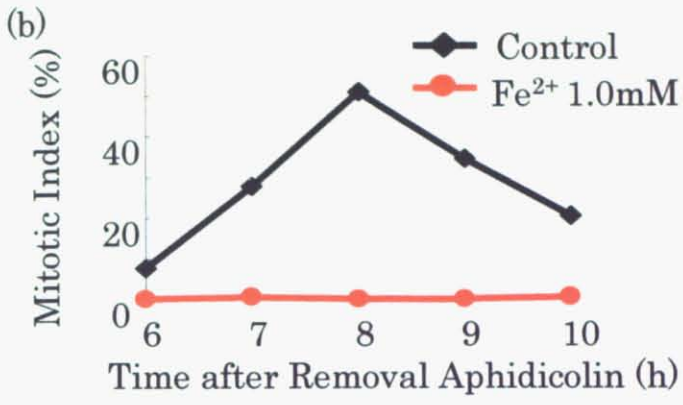


図5 FeSO₄ 添加による細胞周期進行の停止

(a) 以降の実験 (b),(c),(d) において用いた Aphidicolin 細胞同調系の Aphidicolin 解除前後で使用した培地の概略図。(b) Aphidicolin 同調した BY-2 細胞 (Control, ◆)、および、Aphidicolin 解除後に FeSO₄ 1.0 mM (Fe²⁺ 1.0 mM) を添加した場合 (●) の細胞周期進行の推移。(c) Fe²⁺ 添加の影響の細胞周期特异性。Aphidicolin 同調した BY-2 細胞に Fe²⁺ 1.0 mM を Aphidicolin 解除後それぞれ 0-2 h (S 期, ■)、5-7 h (G2 期, ▲)、8-10 h (M 期, ●) に添加し、その後の細胞周期進行の推移を分裂指数 (MI, c)、およびレーザーキャニングサイトメトリー (LSC, d) を用いて測定した。▽ は G1 期まで細胞周期が進行した細胞を表す。

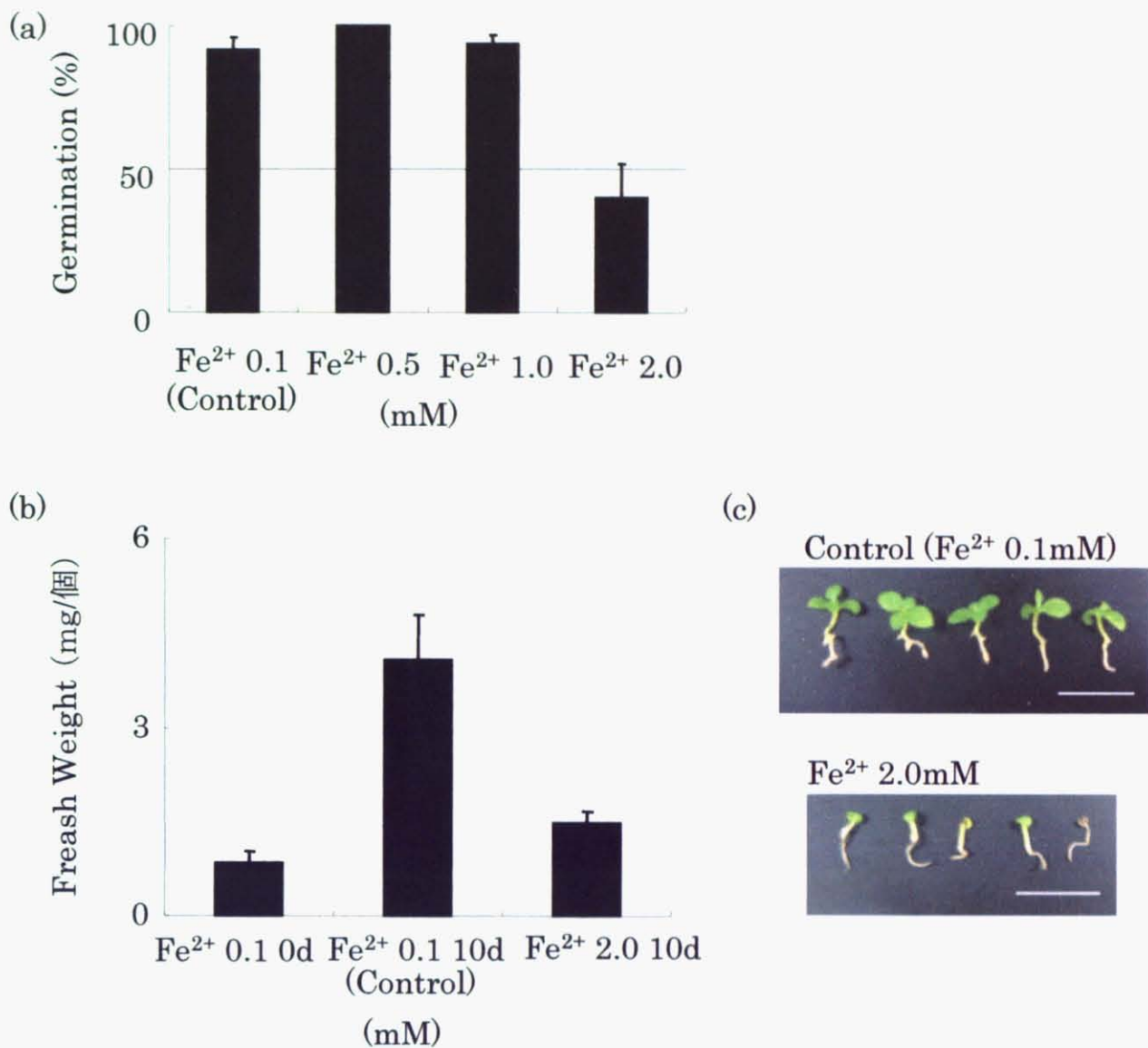


図6 過剰量 FeSO₄ 添加の植物体の生長への影響

(a) タバコ種子 (*Nicotiana glauca* NM) を LSD 培地上 (Control) 及び FeSO₄ 2.0 mM (Fe²⁺ 2.0 mM) を含む培地上に播種し、7 日後に発芽率を測定した。Bar:SE. n=30 (1回につき 10 個体を測定した。)(b) タバコ種子を水耕で 7 日間育成して発芽させ、発芽した植物体を LSD 培地上 (Control) 及び Fe²⁺ 2.0 mM を含む培地上で育成し、生重量を 0 日後、10 日後について測定した。Bar:SE. n=3 (1 回につき 10 個体を測定した。)(c) (b) における 10 日後の植物体の写真。上段は Control、下段は Fe²⁺ 2.0 mM を添加した培地上で育成したもの。Bar: 1cm

(a)

Cell Cycle	G1	G1 / S	S	G2	M
	Aphidicolin 処理		Aphidicolin 解除		
Condition	LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		
	Fe ²⁺ 1.0 mM		LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		
	Fe ²⁺ 1.0 mM		Fe ²⁺ 1.0 mM		
Time	0 h	24 h	0 h	6 h	8 h

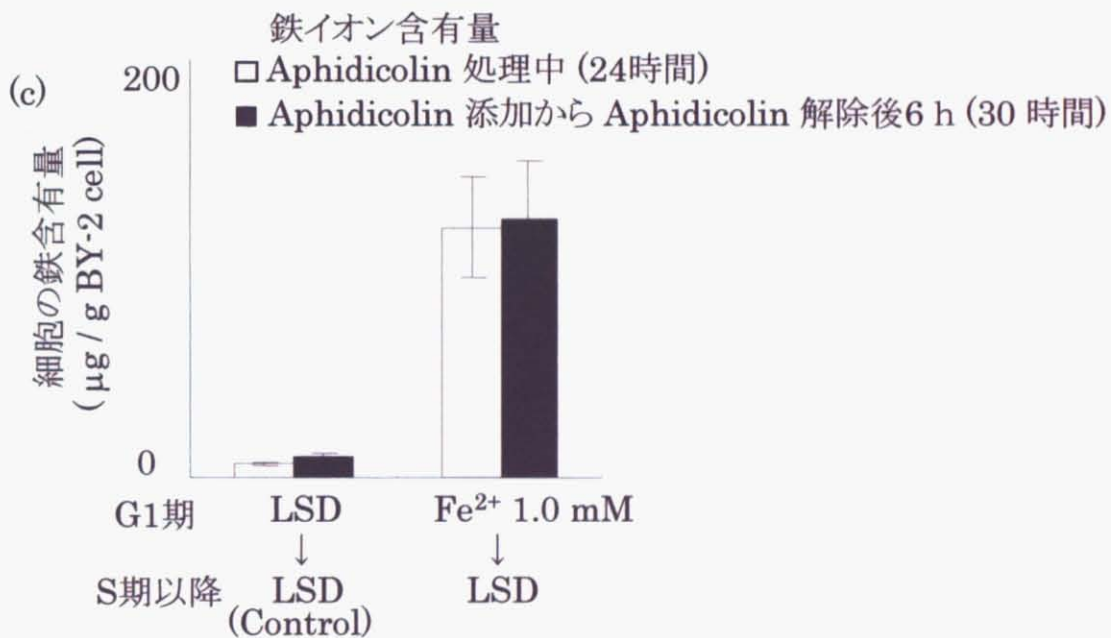
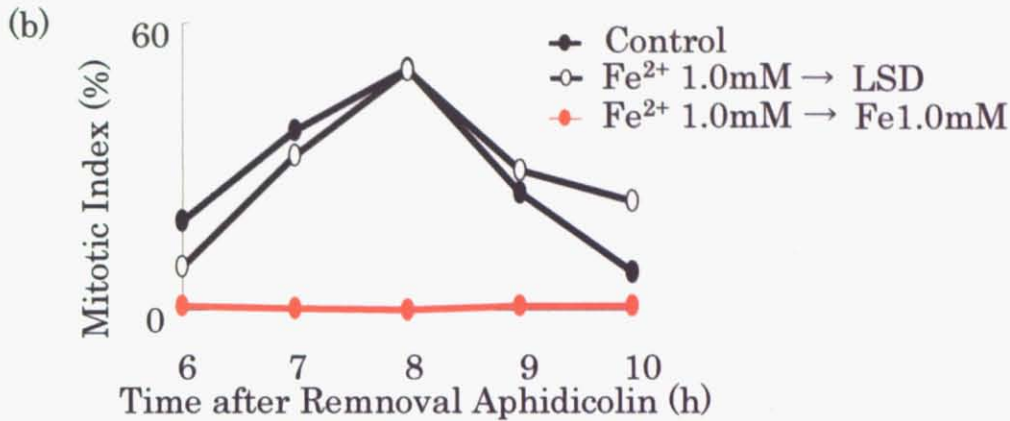


図 7 G1期でのFeSO₄添加による細胞周期と細胞内鉄イオン含有量への影響

(a) 以降の実験 (b),(c) において用いた Aphidicolin 細胞同調系の Aphidicolin 解除前後で使用した培地の概略図。(b) Aphidicolin 同調した BY-2 細胞 (● Control)、Aphidicolin 処理時に FeSO₄ 1.0 mM を添加し、Aphidicolin 解除後は LSD 培地に移したもの (○ Fe²⁺ 1.0 mM → LSD)、Aphidicolin 処理時および解除後ともに Fe²⁺ 1.0 mM を添加した培地で培養したもの (● Fe²⁺ 1.0 mM → Fe²⁺ 1.0 mM)、についてその後の細胞周期進行の推移を分裂指数 (MI) を指標に測定した。(c) Control および Fe²⁺ 1.0 mM → LSD 条件における、Aphidicolin 処理 24 時間後と、Aphidicolin 解除 6 時間後の BY-2 細胞 1 g 当たりの鉄イオン含有量。Bar:SE. n=3

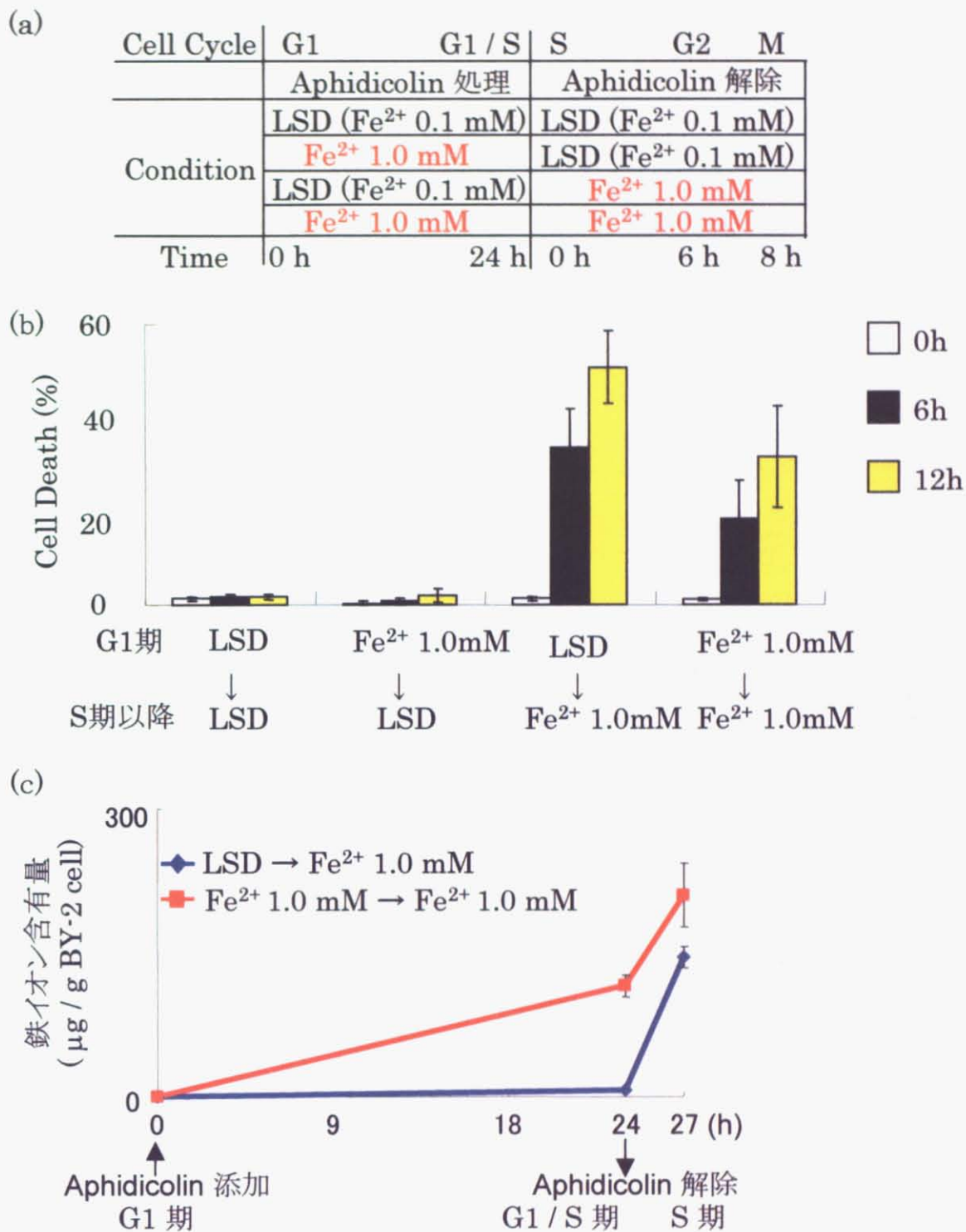


図8 G1期でのFeSO₄添加による細胞死と鉄イオン吸収量測定

(a) 以降の実験 (b), (c) において用いた Aphidicolin 細胞同調系の Aphidicolin 解除前後で使用した培地の概略図。(b) Aphidicolin 同調した BY-2 細胞 (LSD → LSD)、Aphidicolin 処理時に FeSO₄ 1.0 mM (Fe²⁺ 1.0 mM) を添加して Aphidicolin 解除後は LSD 培地に移したもの (Fe²⁺ 1.0 mM → LSD)、Aphidicolin 処理時に LSD 培地で培養して Aphidicolin 解除後は Fe²⁺ 1.0 mM を添加した培地に移したもの (LSD → Fe²⁺ 1.0 mM)、Aphidicolin 処理時および解除後ともに Fe²⁺ 1.0 mM を添加した培地で培養したもの (Fe²⁺ 1.0 mM → Fe²⁺ 1.0 mM)、について Aphidicolin 解除後 0 h、6 h、12 h での細胞死の割合を測定した。Bar:SE. n=3 (c) LSD → Fe²⁺ 1.0 mM と Fe²⁺ 1.0 mM → Fe²⁺ 1.0 mM における、Aphidicolin 処理 24 時間後 (24 h) と、Aphidicolin 解除 3 時間後 (27h) の BY-2 細胞 1 g 当たりの鉄イオン含有量の時間変化。Bar:SE. n=3

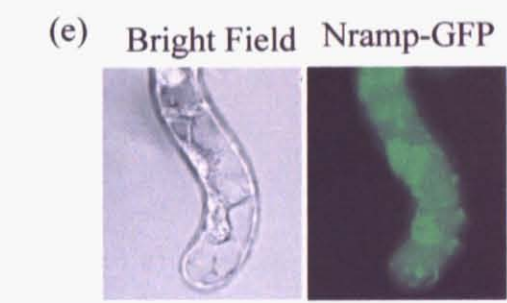
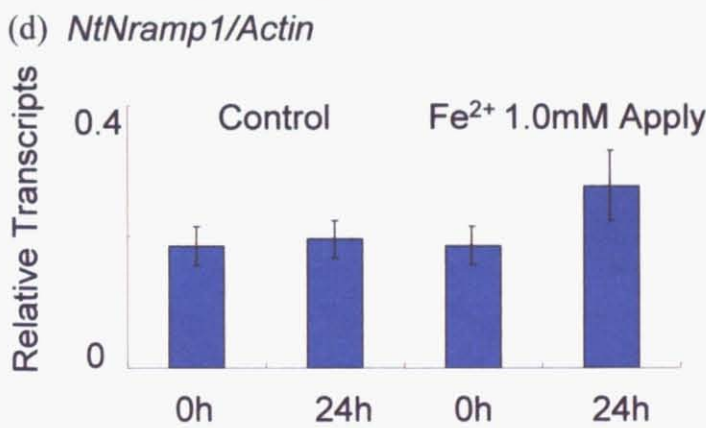
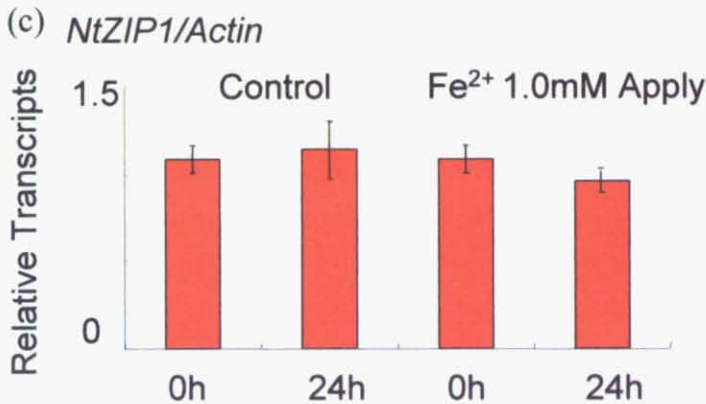
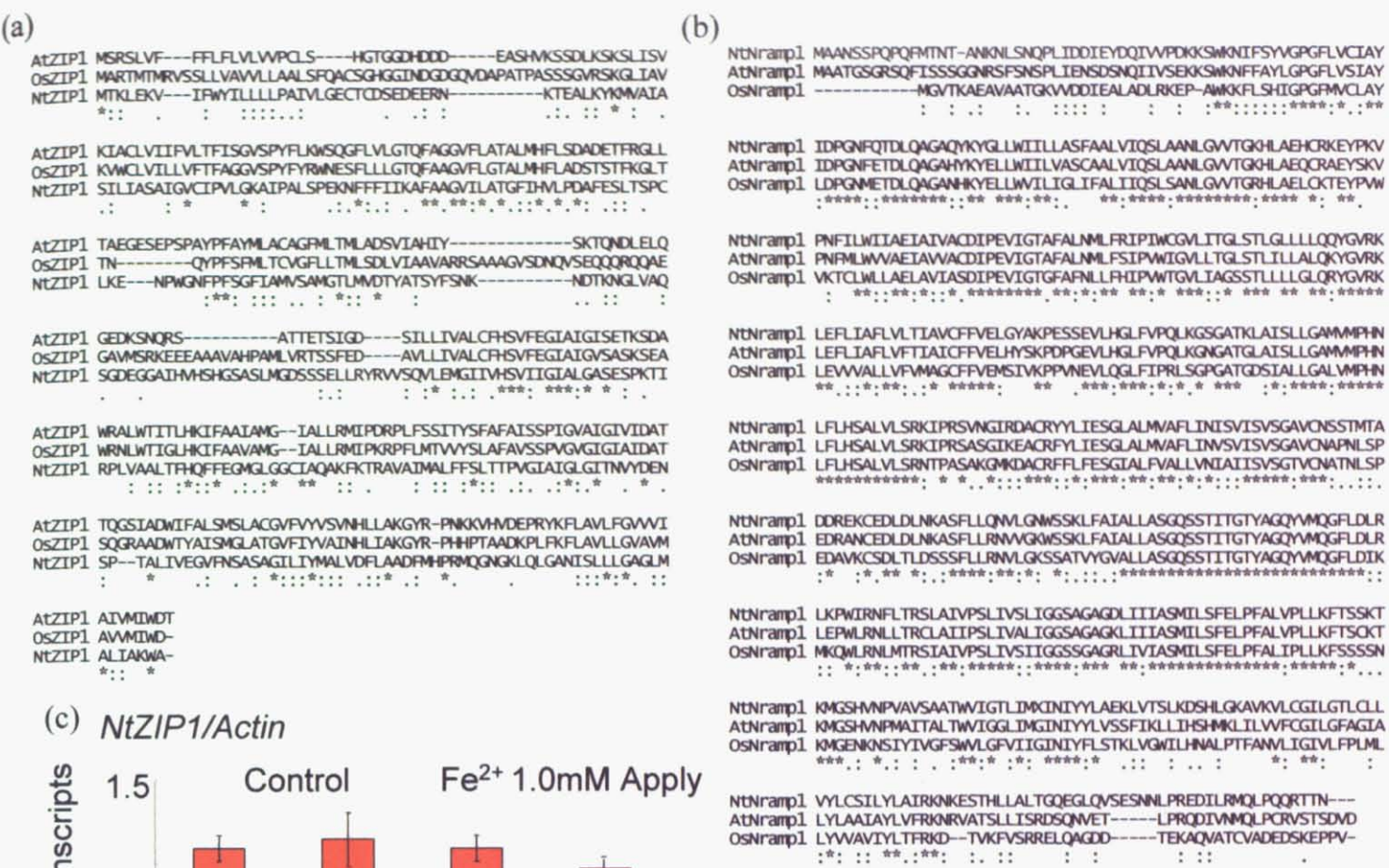


図9 G1期での $FeSO_4$ 添加による遺伝子発現変化の解析

(a) *NtZIP1* のアミノ酸配列。シロイヌナズナおよびイネの *AtZIP1*、*OsZIP1* とのアミノ酸配列を CLUSTALW を用いて比較した。(b) *NtNrap1* のアミノ酸配列。シロイヌナズナおよびイネの *AtNrap1*、*OsNrap1* とのアミノ酸配列を CLUSTALW を用いて比較した。* はアミノ酸の完全一致、: は非常に性質の近いアミノ酸との置換、. は性質の近いアミノ酸との置換、無印はアミノ酸不一致を示す。(c,d) *NtZIP1* および *NtNrap1* の鉄イオン添加による発現量変化。7日目の BY-2 細胞を LSD 培地で培養したもの (Control) と、LSD 培地に $FeSO_4$ 1.0 mM (Fe^{2+} 1.0 mM) を添加して培養したものにおいて、培養後 0 h、24 h における *Actin* 発現量に対する *NtZIP1*、*NtNrap1* の発現量を測定した。Bar:SE. n=3 *NtNrap1-GFP* 導入タバコ BY-2 細胞の明視野顕微鏡像 (e 左)、蛍光顕微鏡像 (e 右)。Bar: 50 μ m

(a)	Cell Cycle	G1	G1 / S	S	G2	M
		Aphidicolin 処理		Aphidicolin 解除		
	Condition	LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		
		Fe ²⁺ 1.0 mM		Fe ²⁺ 0.2 mM		
		Fe ²⁺ 1.0 mM		Fe ²⁺ 0.5 mM		
	Time	0 h	24 h	0 h	6 h	8 h

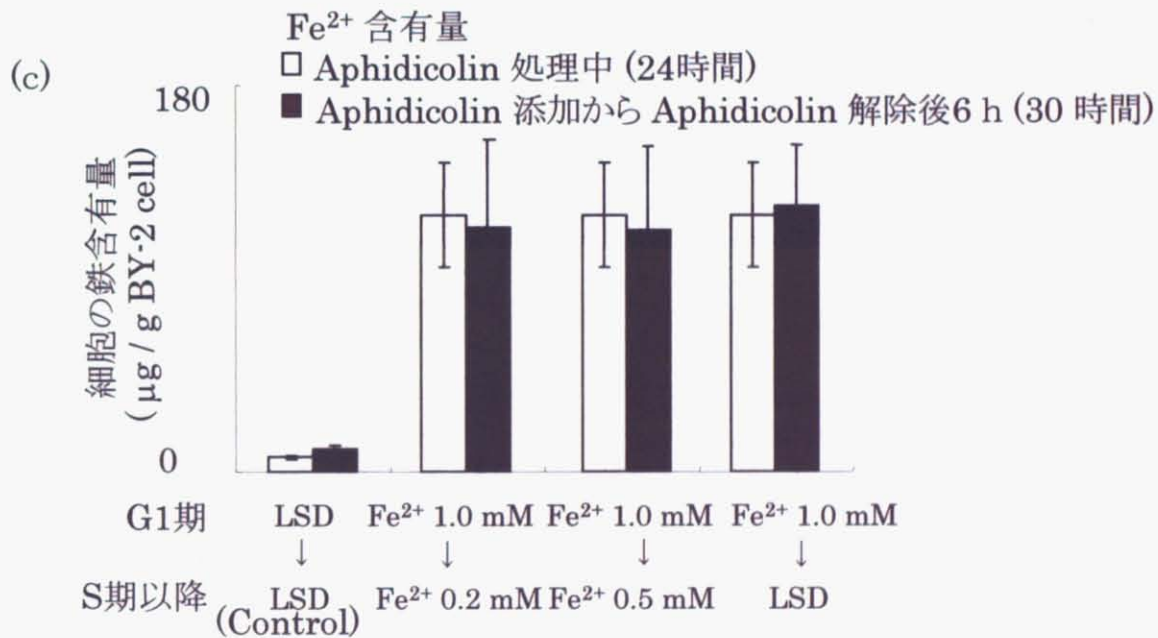
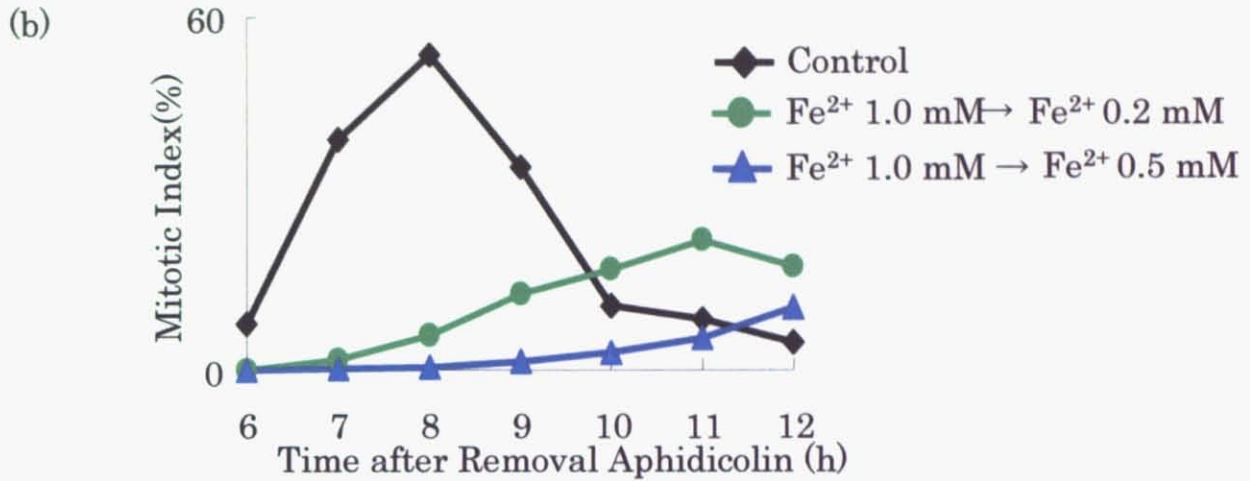


図 10 S 期における FeSO₄ 添加量の調節による細胞周期進行と鉄イオン含有量の変化

(a) 以降の実験 (b),(c) において用いた Aphidicolin 細胞同調系の Aphidicolin 解除前後で使用した培地の概略図。(b) Aphidicolin 同調した BY-2 細胞 (◆ Control)、Aphidicolin 処理時に FeSO₄ 1.0 mM (Fe²⁺ 1.0 mM) を添加し Aphidicolin 解除後 Fe²⁺ 0.2 mM を添加した培地に移したもの (● Fe²⁺ 1.0 mM → Fe²⁺ 0.2 mM)、Aphidicolin 処理時に FeSO₄ 1.0 mM (Fe²⁺ 1.0 mM) を添加し Aphidicolin 解除後 Fe²⁺ 0.5 mM を添加した培地に移したもの (▲ Fe²⁺ 1.0 mM → Fe²⁺ 0.5 mM)、についてその後の細胞周期進行の推移を分裂指数 (MI) を指標に測定した。(c) Control、Fe²⁺ 1.0 mM → Fe²⁺ 0.2 mM、Fe²⁺ 1.0 mM → Fe²⁺ 0.5 mM 及び Aphidicolin 処理時に Fe²⁺ 1.0 mM を添加し Aphidicolin 解除後は LSD の培地に移したもの (Fe²⁺ 1.0 mM → LSD)、について Aphidicolin 処理後 24 h と Aphidicolin 添加から Aphidicolin 解除後 6 h での BY-2 細胞 1 g 当たりの鉄イオン含有量。Bar:SE. n=3

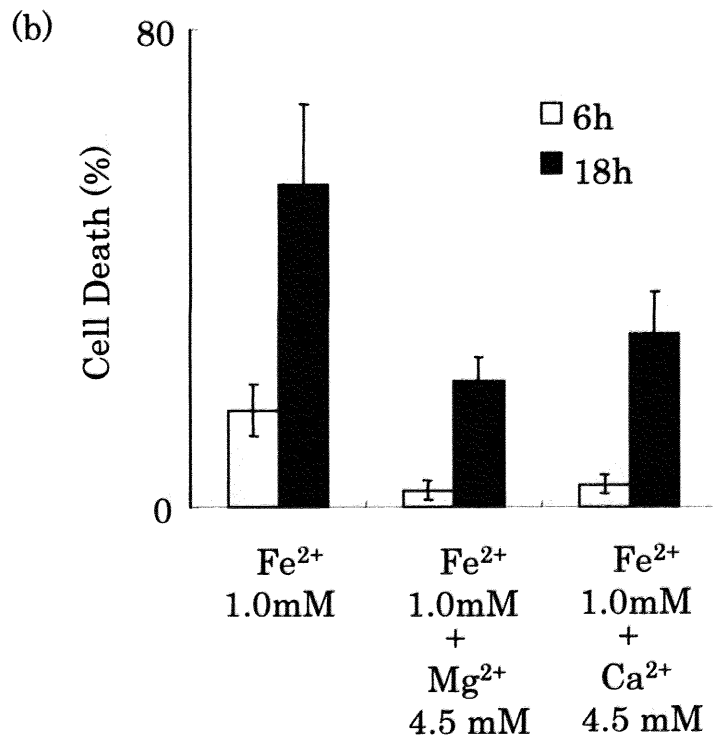
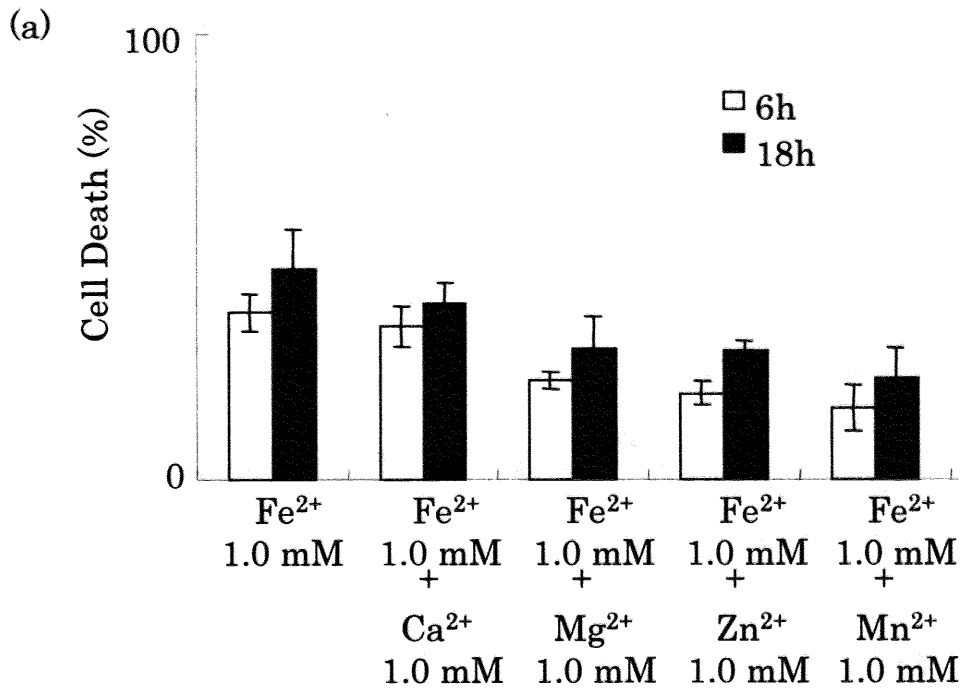


図 11 他の二価カチオンの FeSO_4 誘導性細胞死、細胞増殖量への影響

(a) 移植 7 日目の BY-2 細胞の継代時に FeSO_4 1.0 mM (Fe^{2+} 1.0 mM) のみを含む培地に移植したものと、 Fe^{2+} 1.0 mM に加えてそれぞれ、 CaCl_2 1.0 mM、 MgSO_4 1.0 mM、 ZnSO_4 1.0 mM、 MnSO_4 1.0 mM (以下それぞれ Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} と略す。) を添加した培地で培養した際の移植後 6 h、18 h での細胞死の割合。Bar:SE. n=3

(b) 移植 7 日目の BY-2 細胞の継代時に二価カチオンとして Fe^{2+} 1.0 mM のみを含む培地に移植したものと、 Fe^{2+} 1.0 mM に加えてそれぞれ、 Ca^{2+} 4.5 mM、 Mg^{2+} 4.5 mM を含む培地で培養した際の移植後 6 h、18 h の細胞死の割合。Bar:SE. n=3

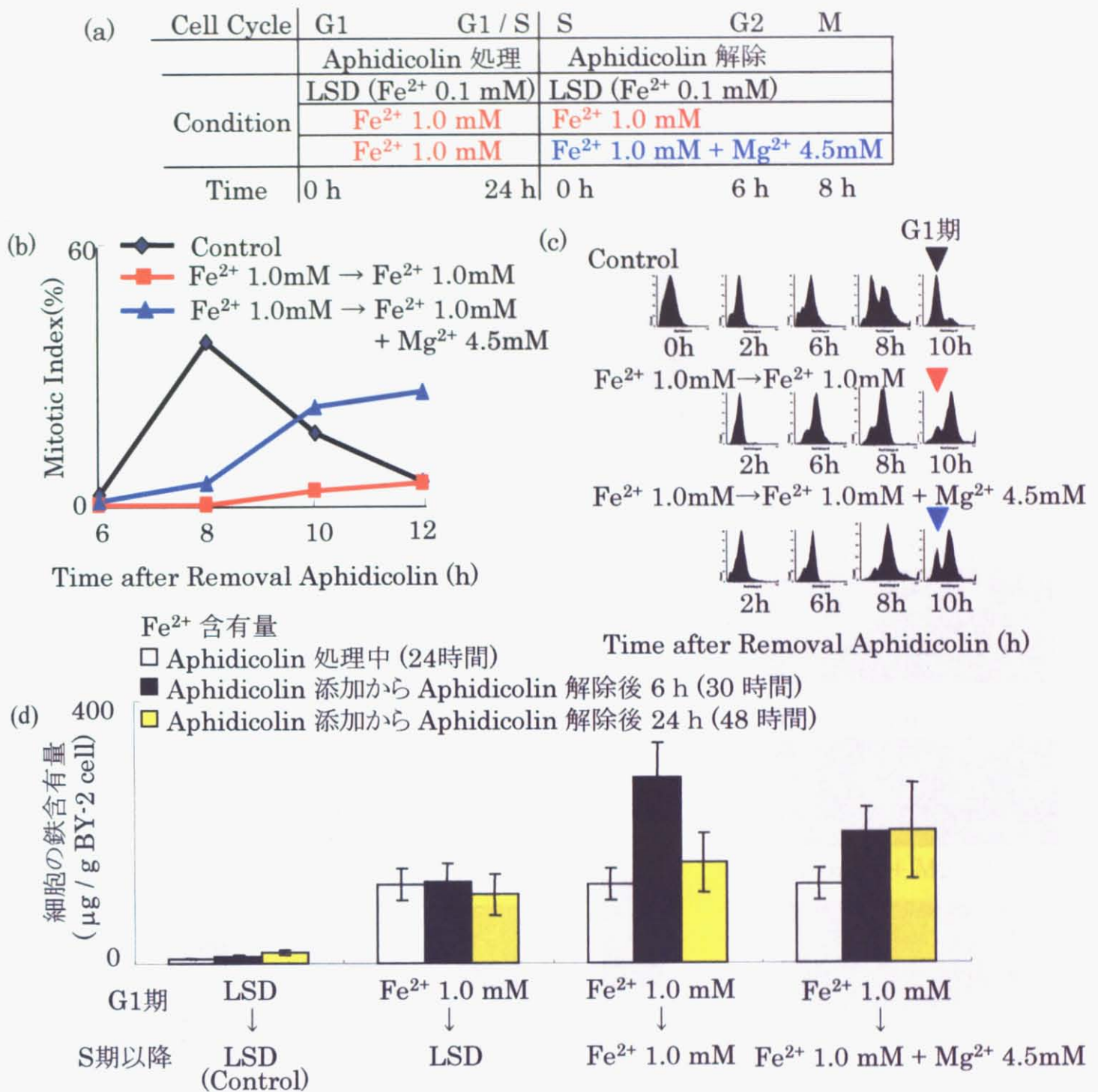


図 12 S 期での MgSO₄ 添加による細胞周期進行停止の抑制

(a) 以降の実験 (b),(c),(d) において用いた Aphidicolin 細胞同調系の Aphidicolin 解除前後で使用した培地の概略図。(b) (c) Aphidicolin 同調した BY-2 細胞 (◆ Control)、Aphidicolin 処理時に FeSO₄ 1.0 mM (Fe²⁺ 1.0 mM) を添加し Aphidicolin 解除後 Fe²⁺ 1.0 mM のみを添加した培地に移植したもの (■ Fe²⁺ 1.0 mM → Fe²⁺ 1.0 mM)、Aphidicolin 処理時に Fe²⁺ 1.0 mM を添加し Aphidicolin 解除後 Fe²⁺ 1.0 mM と MgSO₄ 4.5 mM (Mg²⁺ 4.5 mM) を添加した培地に移植したもの (▲ Fe²⁺ 1.0 mM → Fe²⁺ 1.0 mM + Mg²⁺ 4.5 mM)、それぞれの細胞周期進行の推移を分裂指数 (MI、b)、およびレーザースキャニングサイトメトリー (LSC、c) を用いて測定した。▽ は G1 期に細胞周期が進んだ細胞を表す。(d) S 期での MgSO₄ 添加による鉄イオン含有量の変化。Control (LSD → LSD)、Fe²⁺ 1.0 mM → LSD、Fe²⁺ 1.0 mM → Fe²⁺ 1.0 mM、Fe²⁺ 1.0 mM → Fe²⁺ 1.0 mM + Mg²⁺ 4.5 mM の培養条件において Aphidicolin 処理後 24 時間、Aphidicolin 解除後 6 h、24 h における BY-2 細胞 1 g 当たりの鉄イオン含有量を測定した。Bar:SE. n=3

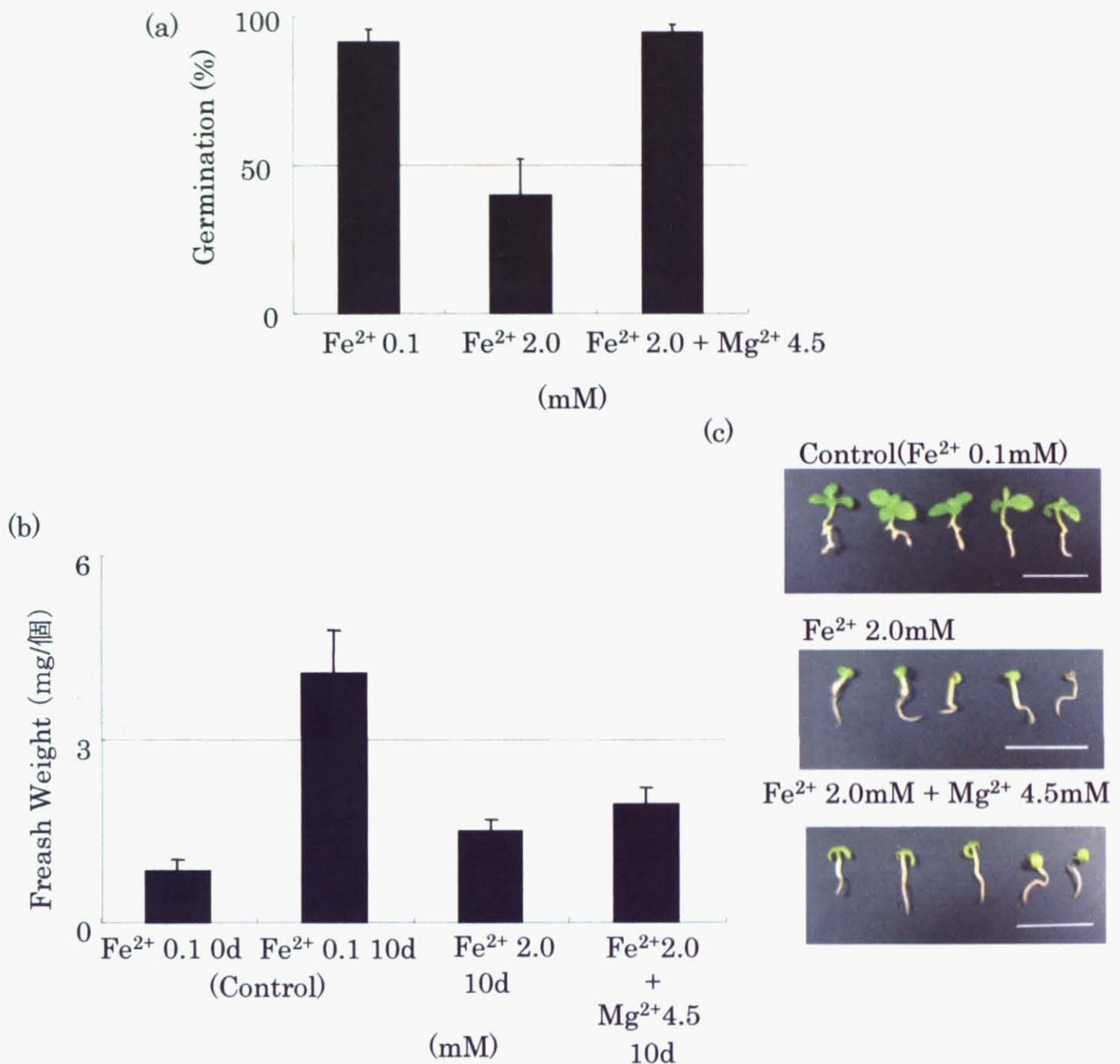


図 13 過剰量 FeSO_4 添加による種子発芽、植物体生長抑制の MgSO_4 同時添加による回避
 (a) タバコ種子 (*Nicotiana glauca* NM) を LSD 培地上 (Fe^{2+} 0.1 mM)、または FeSO_4 2.0 mM (Fe^{2+} 2.0 mM) を含む培地上あるいは Fe^{2+} 2.0 mM と MgSO_4 4.5 mM (Mg^{2+} 4.5 mM) を含む培地上にそれぞれ播種した時の 7 日後の発芽率。Bar:SE. n=3 (1 回につき 10 個体を測定した。)
 (b) タバコ種子を水耕で 7 日間育成して発芽させ、発芽した植物体を LSD 培地上 (Control) または Fe^{2+} 2.0 mM を含む培地上及び Fe^{2+} 2.0 mM と Mg^{2+} 4.5 mM を含む培地上で育成した際の 0 日後、10 日後の生重量。Bar:SE. n=3 (1 回につき 10 個体を測定した。)
 (c) (b) における 10 日後の植物体の写真。上段は Control、中段は Fe^{2+} 2.0 mM、下段は Fe^{2+} 2.0 mM + Mg^{2+} 4.5 mM、それぞれを添加した培地上で育成したもの。Bar: 1cm

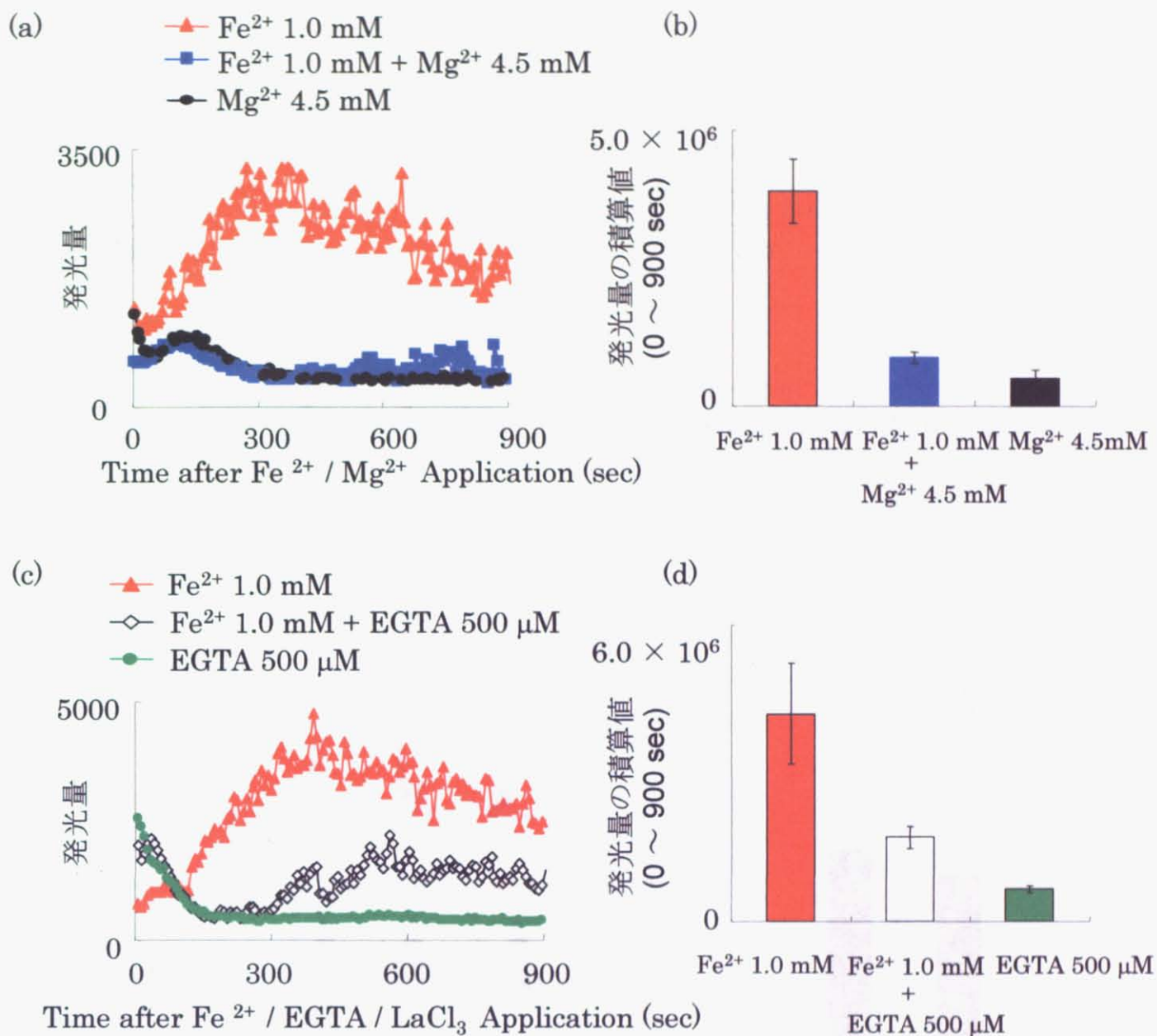
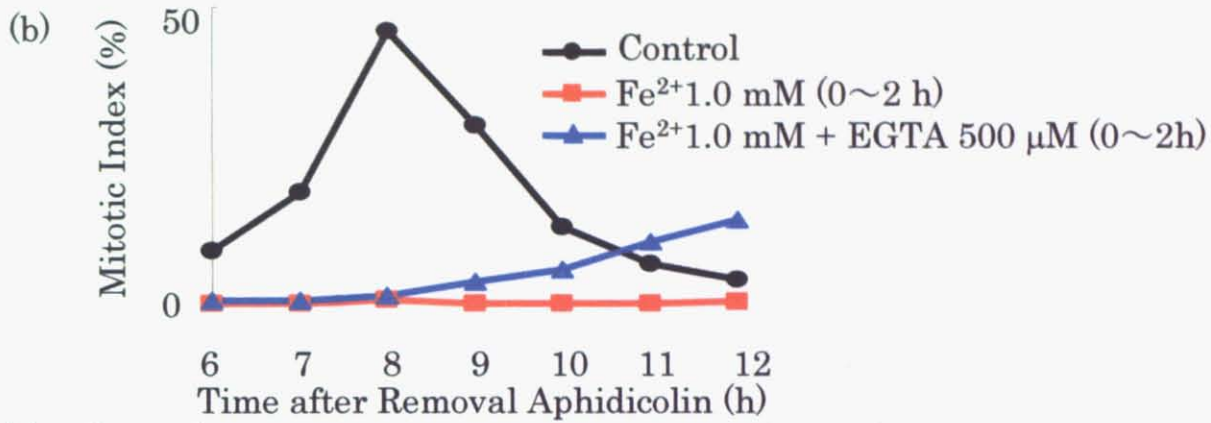


図 14 FeSO₄添加が誘導するカルシウムスパイクの抑制

(a) Aphidicolin 同調した Aeq-BY-2 株に対して、Aphidicolin 解除直後 (S 期) に、Fe²⁺ 1.0 mM (▲)、Fe²⁺ 1.0 mM と同時に MgSO₄ 4.5 mM (Mg²⁺ 4.5 mM) (■)、Mg²⁺ 4.5 mM (●) をそれぞれ添加し、その後の発光量を 7sec 毎、900sec の間測定した。(b) (a)における 0 ~ 900 sec 間の発光量をそれぞれ積算した。Bar:SE. n=3

(c) Aphidicolin 同調した Aeq-BY-2 株に対して、Aphidicolin 解除直後 (S 期) に、Fe²⁺ 1.0 mM (▲)、EGTA 500 μM 添加 1 min 後に Fe²⁺ 1.0 mM (◇)、EGTA 500 μM (●)、をそれぞれ添加し、その後の発光量を 7 sec 毎、900sec の間測定した。(d) (c)における 0 ~ 900 sec 間の発光量をそれぞれ積算した。Bar:SE. n=3

(a) Cell Cycle	G1	G1 / S	S	G2	M
	Aphidicolin 処理		Aphidicolin 解除		
Condition	LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		
	LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		Fe ²⁺ 1.0 mM		
	LSD (Fe ²⁺ 0.1 mM)		Fe ²⁺ 1.0 mM + EGTA 500 μM		
Time	0 h	24 h	0 h	2 h	6 h 8 h



(c) Control

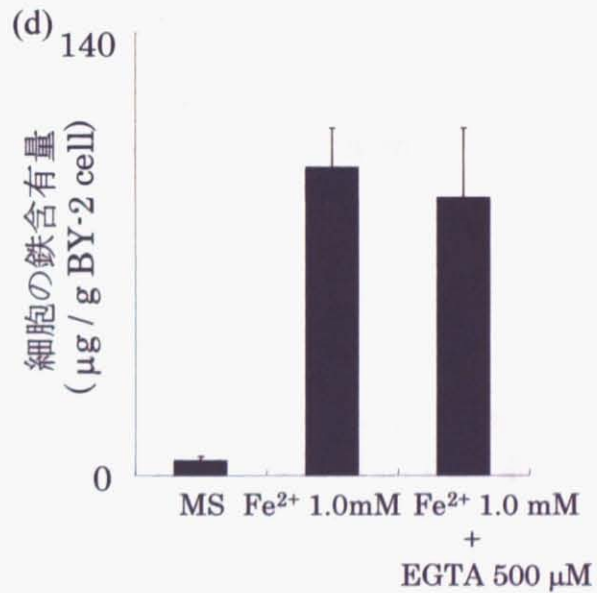
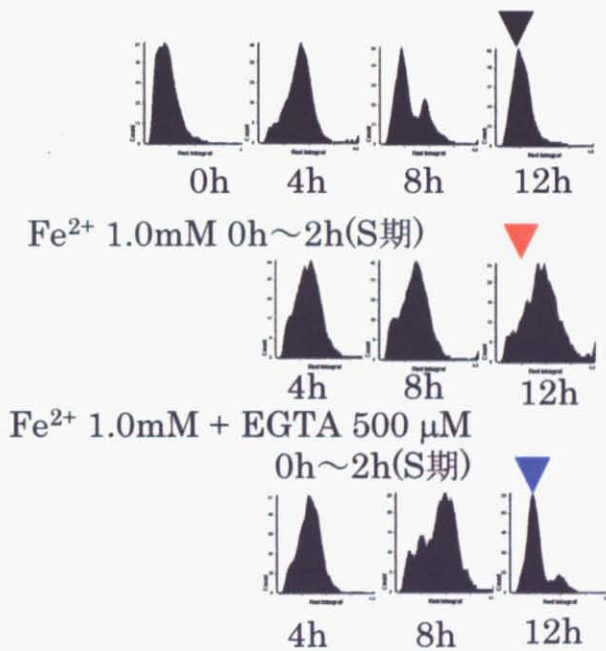


図 15 EGTA 添加による細胞周期進行停止の抑制

(a) 以降の実験(b)、(c)において用いた Aphidicolin 細胞同調系の Aphidicolin 解除前後で使用した培地の概略図。(b) (c) Aphidicolin 同調した BY-2 細胞 (● Control)、Aphidicolin 処理時に LSD 培地 Aphidicolin 解除後 0 h から 2 h の間 FeSO₄ 1.0 mM (Fe²⁺ 1.0 mM) を添加した培地に移植して 2 h 以降は LSD 培地に戻したもの (■ Fe²⁺ 1.0mM 0 h ~ 2 h)、Aphidicolin 処理時に LSD 培地 Aphidicolin 解除後 0 h から 2 h の間 EGTA 500 μM で前処理した Fe²⁺ 1.0 mM を添加した培地に移植して 2 h 以降は LSD 培地に戻したもの (▲ Fe²⁺ 1.0 mM + EGTA 500 μM 0 h ~ 2 h)、それぞれの細胞周期進行の推移を分裂指数 (MI, b)、及びレーザーキャニングサイトメトリー (LSC, c) を用いて測定した。▽ は G1 期に細胞周期が進行した細胞を表す。(c) Aphidicolin 除去後 2 h の Fe²⁺ 含有量。Bar:SE. n=3

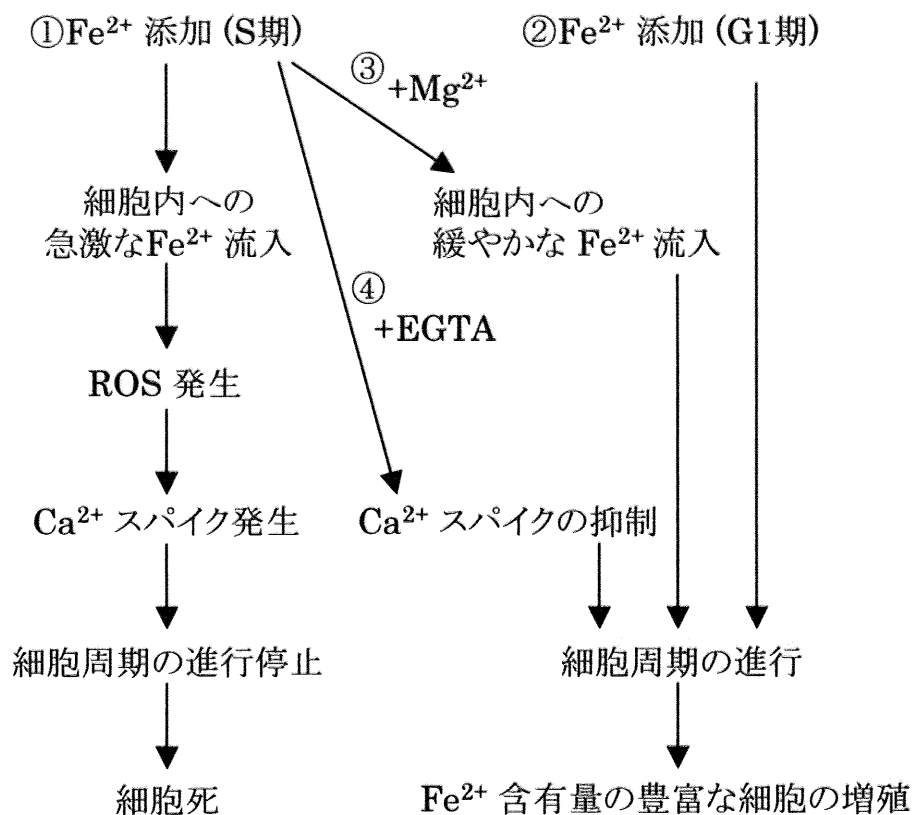


図 16 鉄イオン吸収から細胞死に至るまでの模式図

細胞内に取り込まれた過剰量 Fe^{2+} は ROS、カルシウムスパイクの発生を誘導する。これらのシグナルが S 期に生じて伝わると細胞周期が停止し、細胞死が生じ、蓄積した鉄イオンは細胞外に流出する ①。これらのシグナルが G1 期に生じた場合、そのシグナルが伝わらず、細胞周期は正常に進行して細胞死も生じないことから、 Fe^{2+} を蓄積することができる ②。培地に Mg^{2+} を添加しておくこと、急激な鉄イオン吸収が抑制され、細胞周期停止および細胞死が抑制され、 Fe^{2+} を蓄積することができる ③。培地に EGTA を添加すると、過剰量鉄吸収時でのカルシウムスパイクが抑制され、細胞周期進行の停止や細胞死が抑制され、 Fe^{2+} を蓄積することができる ④。