

植物培養細胞 BY-2 における熱ストレス誘導性の細胞死と細胞周期の関係

植物全能性制御システム解析学分野 47-166320 川口 遼

指導教員 馳澤盛一郎

【序論】

植物細胞は導管形成や胚乳形成といった発生段階、乾燥や高温などの非生物的ストレス、菌類や病原性細菌などの生物的ストレスなどに応答して自発的な死であるプログラム細胞死（PCD: programmed cell death）を行う。動物と異なり免疫系を持たない植物においては、病原菌に感染した細胞がPCDを行うことにより病原菌が植物体に蔓延することを防いでいる。また非生物的ストレスは、同時に複数の細胞や組織、器官等へ広範囲に影響を与えるが、DNA損傷を受けた細胞をPCDによって取り除くことによって遺伝的完全性を保持し、植物体を維持するのに役立っている。一方、タバコ培養細胞BY-2は複雑な組織ではなく細胞鎖として生育するため、これら種々のストレスの再現性を容易に取れる他、その生育速度の早さからモデル培養細胞として広く使われている。しかし、既存のBY-2における熱ショック誘導性のPCDにおける研究では、PCDを引き起こす活性酸素の産生や、熱変性タンパク質の凝集を防ぐHSPの発現などの分子的知見は蓄積しているものの、細胞周期に関する報告はなされていない。さらに熱ショック処理を与える細胞の培養日数は論文によって様々であり、統一されていない。植物体とは異なり、7日間を継代サイクルとするタバコ培養細胞BY-2においては、培養日数によってその細胞の生理や形態はダイナミックに変化しており、同じ温度条件であっても応答に差が生じる可能性が考えられる。また、細胞骨格である微小管の熱ショックによる構造変化とPCDの関係性は深いと考えられるが未知である。そこで本研究では、微小管を可視化したGFP-Tubulin発現株であるタバコ培養細胞BY-GTを用いて、熱ショック誘導性細胞死の培養日数依存性、細胞周期依存性、およびPCDと微小管構造との関係性を明らかにすることを目的とした。

【結果と考察】

54℃以上の熱ショックによる細胞死率は培養日数に依存した

熱ショックによる細胞死応答を確認するため、BY-GT 細胞に対して Water bath を用いて 10 分間の熱ショック処理を行い、Evans blue 染色によって細胞死判定を行った（図 1）。その結果、54℃以上の熱ショックでは継代培養 4 日目の細胞において有意に高頻度の細胞死が誘導されることがわかった。これより細胞周期の進行途中にある継代 4 日目細胞の方が熱感受性が高い一方で、G1、G0 期へ移行した継代 7 日目の細胞においては高頻度の細胞死が抑制されていることが示唆された。

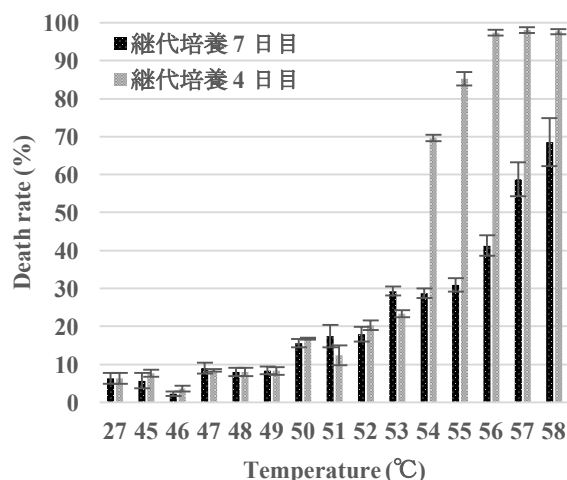


図 1. 熱処理 7 時間後の細胞死率 n>300

熱ショックにより M 期において有意に高頻度の PCD が誘導された

アフジコリン処理によって高度に細胞周期を同調をさせた BY-GT 細胞を用いて、PCD 誘導の最適温度である 53℃の熱ショック処理を行い、熱ショック誘導性細胞死の細胞周期特異性を調べた (図. 2)。その結果、熱ショック 9 時間後において、S 期と M 期の間で 5% 水準の有意差が認められ、M 期において熱感受性が最も高いことが示唆された。また、野生株を用いて比較実験を行なったが、野生株 BY-2 と GFP-Tubulin 発現株 BY-GT の間には有意な差は認められなかった。

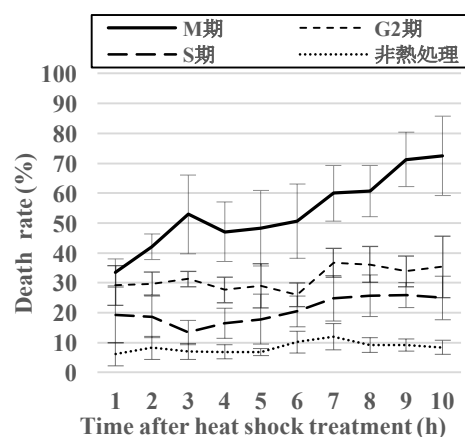


図 2. 細胞周期別の細胞死率 n>300

熱ショック後の細胞死と表層微小管の回復には関係があった

7 時間以内の細胞死率に有意差の見られなかった 45、47、49℃と PCD 誘導の最適温度である 53℃のいずれの熱ショックにおいても表層微小管の繊維状構造が破壊されることを確認したため、通常培養 27℃に戻した後の表層微小管の回復率を調べた (図. 3)。また同様の熱ショック後、通常培養に戻して 5 日後までの細胞死率の推移も同時に調べた (図. 4)。2 日目に 100%の細胞死が誘導された 53℃熱ショックでは 95%の細胞において、4 日目に 91%の細胞死を誘導した 49℃熱ショックでも 67%の細胞において表層微小管の回復が見られなかった。一方で、4 日目にはほぼ 100%の細胞において回復が見られた 45℃熱ショックでは、22%まで細胞死率が抑えられている。変性タンパク質のリフォールディングに参与する HSP は、熱ストレスに応答して発現することが知られており、またその HSP は、微小管および中心体に結合することも知られている。これらのことから、熱ショックによって破壊された微小管構造の回復が、細胞死の抑制を促す可能性が示唆された。

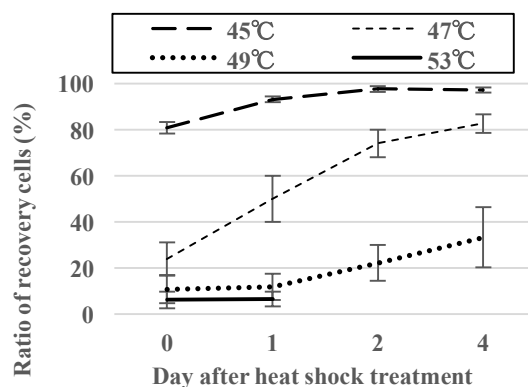


図 3. 表層微小管の回復 n=50

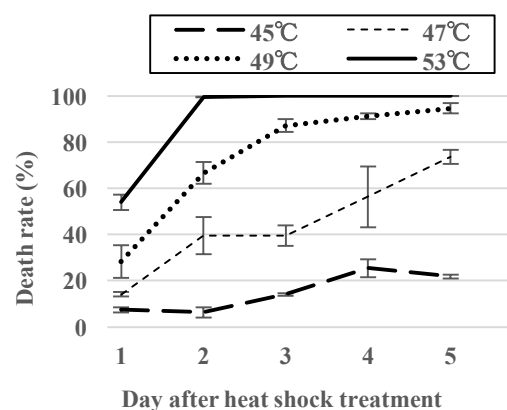


図 4. 熱処理後の PCD 率 n>300

【総括】

これまでもタバコ培養細胞 BY-2 を用いた熱ショック実験は報告されているが、継代日数や細胞周期などの条件に統一性がなかった。本研究において、培養日数と細胞周期により細胞死率に有意差が生じたことから、熱ショック誘導性の PCD を包括的に理解するためには、これらの条件を勘案して理解すべきであると考えられる。また、9 時間以内に見られる M 期に特異的な PCD 誘導と、4 日以内に見られる表層微小管に相関のある PCD 抑制が確認され、タバコ培養細胞における PCD には、異なる誘導及び抑制プロセスがあることが示唆された。