

博士論文（要約）

**Cell biological studies on
phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* culture filtrate-induced cell death
in tobacco BY-2 cells**

(植物病原細菌 *Erwinia carotovora* 培養濾過液誘導性細胞死の細胞生物学的解析)

平川 由美

固着性の植物は、様々な生物学的ストレスに対する防御機構を持っている。例えば、伝染性の病害を引き起こす菌類や細菌、ウイルスなどの病原体が感染すると、植物は感染を受けた領域で自律的な細胞死を起こして病原体を死滅させ、隣接細胞ひいては植物体全身に蔓延することを防ぐ。つまり、動物のように免疫細胞を持たない植物にとって、自律的な細胞死は病原体に対する防御応答機構の一環である。

植物細胞の体積の大部分を占める液胞は、養分の蓄積や細胞形態の維持、動物細胞のリソソームのように分解区画としての機能を担うなど多様な役割を果たしている。また、動物のカスパーゼ様活性を持つシステインプロテアーゼである液胞プロセシング酵素が局在する。防御応答や発生過程における植物の自律的細胞死過程において、液胞構造の単純化の後に液胞膜が崩壊することが広く認められており、液胞プロセシング酵素が細胞質や細胞膜へ曝露されることが自律的細胞死の実行要因である可能性が指摘されている。さらに、植物病原細菌による細胞死では細胞死に先立って液胞膜と細胞膜が融合し、液胞内容物を直接細胞外に放出するという細胞死の様式も報告されている。

一方、植物病原細菌である*Erwinia carotovora*は、ハクサイなどの野菜類をはじめシロイヌナズナやタバコ、ヒメツリガネゴケなどの広範な植物種に感染する。*E. carotovora*の培養濾過液 (Filtrate) を植物体に処理した場合、防御応答関連遺伝子の発現上昇や自律的細胞死の誘導が起こることが報告されており、Filtrateにより誘導される細胞死の様式に興味を持たれた。そこで本研究では、Filtrate誘導性細胞死による新奇の液胞崩壊過程の可能性を探索するため、細胞内構造の観察に適した可視化形質転換株が確立されているタバコBY-2細胞を用いた細胞死誘導系を確立し、細胞死過程における液胞動態のライブイメージング解析を行った。

始めに、Filtrateを用いた高頻度細胞死誘導系の確立と細胞死誘導の初期応答について検証した。細胞周期をS期に同調したBY-2細胞に対して遠心とフィルター濾過により菌体を除去したFiltrateを処理したところ、防御応答マーカー遺伝子*HSR203j*の発現上昇が起こること、Filtrateの処理濃度依存的に細胞死が誘導されることが確認された。そこでFiltrateの処理時間依存性を調べたところ、20% (v/v) Filtrate処理後4から8時間目までの細胞死増加率が約8.1% h⁻¹と最も高く、24時間目の細胞死率は約90%に達した。これより、20% Filtrate処理後4から8時間目までが細胞死過程を効率的に観察できる時間帯であると考えられた。

また、Filtrate処理3分後までに一過的な活性酸素種 (ROS) の産生が起こることを見出した。さらに、Filtrate処理後4時間目まで持続的なROS産生も検出された。Ca²⁺キレート剤BAPTAまたはプロテインキナーゼ阻害剤k252aを処理したところ、一過的なROS産生が抑制された。これらの阻害剤は、持続的なROSも阻害した。以上の結果より、Filtrate処理によりCa²⁺の細胞内流入やリン酸化反応を介したROS産生機構が惹起される可能性が示唆された。さらに、蛍光色素FM4-64を用いてFiltrate誘導性細胞死過程におけるエンドサイトーシスの変化を調べた。FM4-64はエンドサイトーシスのトレーサーであり、パルスラベル後の細胞膜上の蛍光輝度の減少速度によってエンドサイトーシスの活性を調べることができる。経

時観察と輝度測定の結果、LB処理区と比べてFiltrate処理区で速やかに細胞膜上のFM4-64蛍光輝度が減少することがわかった。以上の結果より、Filtrate処理によりエンドサイトーシスが亢進される可能性が示唆された。

次に、Filtrate 誘導性細胞死における細胞骨格系の変化を解析するため、細胞周期を S 期に同調した細胞を用いてアクチン繊維および表層微小管の観察を行った。アクチン繊維マーカーGFP-ABD2 と死細胞を特異的に染色する Evans blue を用いて、Filtrate 誘導性細胞死過程におけるアクチン繊維の変化を経時観察した。その結果、細胞中央部で細胞核と細胞膜を繋ぐように配向していたアクチン繊維が、Filtrate 処理により次第に消失する様子が観察された。また、Evans blue が細胞内へ流入した死細胞では、アクチン繊維は完全に消失していた。さらに、細胞中央部のアクチン繊維が消失した生細胞は、Filtrate 処理後 4 時間目に高頻度に観察されることを確認した。以上より、Filtrate 誘導性細胞死に伴い、アクチン繊維は消失することがわかった。次に、チューブリンマーカーGFP-tubulin を用いて表層微小管を観察した。その結果、Filtrate 処理後 4 時間目においても、処理直後と同様にほとんどの生細胞で表層微小管の構造が保持されていた。また、微小管の重合や脱重合も観察された。さらに、Evans blue の流入が確認された死細胞においても、表層微小管が残存していた。以上の結果より、Filtrate 誘導性細胞死過程において表層微小管は保持されることが示唆された。

最後に Filtrate 誘導性細胞死における液胞動態を解析するため、液胞膜マーカーGFP-VAM3 を用いて細胞周期を S 期に同調し、20% Filtrate 処理 8 時間後までの液胞膜の構造変化を経時的に観察した。Filtrate 処理直後は、S 期の細胞に特徴的な巨大液胞を貫通する多数の細胞質糸を持つ複雑な構造が観察されたが、細胞質糸は 2 から 3 時間のうちに失われて液胞が単純化し、Filtrate 処理直後と比べると液胞膜の動きが停止し始めた。最終的に液胞が収縮し、原形質分離を起こした。これより、Filtrate 誘導性細胞死において液胞膜構造の単純化と崩壊が起こることがわかった。さらに、細胞中央部のアクチン繊維が消失した細胞が高頻度に観察される時期と相関があることから、液胞構造の単純化にはアクチン繊維の消失が関与していることが示唆された。Filtrate 誘導性細胞死における液胞膜と細胞膜の透過性の変化の時間的関係を調べるため、液胞内腔を蛍光標識する BCECF と細胞膜の透過性が失われた場合に細胞内に流入する Evans blue を同時に処理して経時的に観察した。Filtrate 処理直後、BCECF はほぼすべての細胞内に保持され、Evans blue は細胞外に局在していた。処理 4 時間後、まず Evans blue が細胞内に流入し、その後に BCECF 蛍光が消失した細胞が観察された。そこで、BCECF と Evans blue の局在に基づいて、BCECF の蛍光が保持され、Evans blue の細胞内への流入が認められない細胞を TypeA、BCECF の蛍光が保持され、Evans blue の細胞内への流入が認められた細胞を TypeB、BCECF の蛍光が消失し、Evans blue の細胞内への流入が認められた細胞を TypeC と分類し、出現頻度を経時的に計測した。その結果、Filtrate 処理直後は Type A が約 90%以上を占めたが、処理後 4 時間目には Type C が増加し、Type A は減少し始めた。また、Type B は処理後 4 時間目に最も多く観察されたが、

出現頻度は約 5%であった。その後、Type C の細胞数が増加した。BCECF と Evans blue を用いた経時観察より、Type B の状態を保っているのは約 6 分であったことから、Type B の出現頻度が低かったのは、Type B の状態を保っている時間が短く、即座に Type C へ移行するためであると推測される。また、いずれの時間帯においても BCECF の蛍光が消失し、Evans blue の細胞内への流入が認められるような 3 タイプに属さない細胞は確認されなかったことから、Type B の過程を経て細胞死に至ることが考えられる。これより、Filtrate 誘導性細胞死過程では液胞膜が崩壊する前に細胞膜の透過性が失われることが示唆された。本研究で独自に確立した高効率な Filtrate 誘導性細胞死実験系を用いたイメージング解析により、液胞崩壊に先立って細胞膜の透過性が失われる細胞死の様式の存在をはじめて明らかにした。この結果は、植物の多様な自律的細胞死の実行に液胞崩壊を介さない細胞死誘導メカニズムが存在することや、細胞膜の防御応答における新たな寄与を示唆する結果となった。また、興味深いことに本実験系においても従来の自律的細胞死実験系と同様、液胞構造の単純化が認められたことから、この過程は防御応答に関連した細胞死過程において普遍的な現象である可能性が示唆された。