

防御応答に関連した細胞死における液胞動態の解析

植物全能性制御システム解析学分野 47-136325 平川由美

指導教員 馳澤盛一郎

【序論】

動物のように免疫細胞を持たない植物は、病原体である菌類や細菌、ウイルスなどが感染すると、感染を受けた細胞に自律的な細胞死を起し、感染細胞を犠牲にして病原体を死滅させ、病原体が植物体全身に蔓延することを防ぐ。つまり、植物細胞の自律的な細胞死は植物の病原体に対する防御応答の一環である。この防御応答において、植物細胞に特有なオルガネラである液胞が重要な役割を果たしている。液胞は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だけでなく、動物のカスパーゼに類似したプロテアーゼである液胞プロセッシング酵素が局在し、これらの細胞質や細胞膜への曝露が自律的細胞死の要因であると考えられている。さらに、病原性卵菌類由来タンパク質により誘導される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から、液胞の構造変化が防御応答における細胞死に重要と考えられる。しかし、液胞の単純化や崩壊といった現象が多様な細胞死の過程において必須かつ普遍的であるか否かは不明で、この過程を伴わない細胞死の存在も考えられる。一方、野菜類軟腐病細菌 *Erwinia carotovora* は植物病原細菌で、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 (*EcCF*) 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が誘導されるなど分子的な知見は蓄積していたものの、その過程に関する細胞生物学的知見は乏しかった。そこで本研究では、*EcCF* 誘導性細胞死による新規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一連の可視化形質転換株が作成されているタバコ BY-2 細胞に *EcCF* を処理し、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。

【結果と考察】

EcCF を用いた高頻度の細胞死誘導系を確立した

細胞周期を S 期に同調した BY-2 細胞に対して *EcCF* を処理したところ、濃度依存的に細胞死が誘導された。そこで *EcCF* の処理時間依存性を調べたところ、20% *EcCF* 処理 4 から 8 時間後までの細胞死増加率が約 $8.1\% \text{ h}^{-1}$ と最も高く、24 時間目の細胞死亡率は約 90% に達した (図 1)。これより、20% *EcCF* 処理 4 から 8 時間後までが細胞死の観察に効率的であることがわかり、利便性の高い新規細胞死誘導系の確立に成功した。

EcCF 誘導性細胞死において液胞膜の単純化が観察された

液胞膜マーカー GFP-VAM3 を用いて 20% *EcCF* 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。*EcCF* 処理直後は S 期に特徴的な巨大液胞を貫通する細胞質糸が観察されたが (図 2A)、細胞質糸は 2-3 時間のうちに失われて液胞が単純化し (図 2B)、液胞膜の動きが停止し始めた (図 2C)。最終的には、液胞の収縮が観察された (図 2D)。これより、*EcCF* 誘導性細胞死においても液胞膜構造の単純化と崩壊が起こることがわかった。

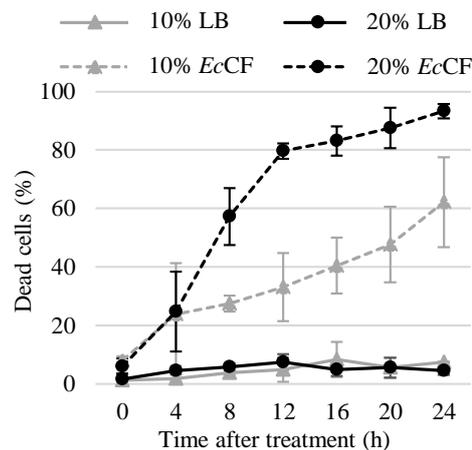


図 1. *EcCF* 誘導性細胞死の処理時間依存性。

LB: LB 培地 (コントロール)、*EcCF*: *E. carotovora* 培養濾過液。3 回の独立した実験における細胞死亡率の平均値 ± 標準偏差を示した。

液胞膜崩壊の前に細胞膜の健全性が失われた

EcCF 誘導性細胞死における液胞膜崩壊と細胞膜崩壊の時間的関係を調べるため、液胞内腔を蛍光標識する BCECF と細胞膜の健全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。*EcCF* 処理直後、BCECF はほぼすべての細胞で保持され、Evans blue は細胞外に局在していた (図 3A)。処理 4 時間後、まず Evans blue が細胞内に流入し (図 3B 右矢印)、その後に BCECF 蛍光が消失した細胞が高頻度に観察された (図 3C)。これより、*EcCF* 誘導性細胞死過程では液胞膜が崩壊する前に細胞膜の健全性が失われることが示唆された。

【総括】

これまで報告されていた植物の自律的細胞死の多くはまず液胞構造が単純化するとともに、細胞死に先行した液胞崩壊が観察されていた。そのため、液胞崩壊は細胞死の実行要因であり、液胞構造の単純化は吸水による液胞の破裂の準備段階として捉えられていた。

本研究では、独自に確立した高効率な *EcCF* 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健全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 (図 4)。この結果は液胞崩壊を介さない細胞膜崩壊メカニズムの存在を示唆しており、植物の多様な自律的細胞死の実行に液胞が直接的に寄与するか否か見直されるきっかけになることが期待される。

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に、液胞構造の単純化が認められた。液胞には、細胞死の実行の他にも、病原体に対する忌避物質の生産・蓄積という生理機能がある。そのため、液胞の単純化は、液胞膜の分解を伴う細胞内容物の消化によって病原体に対する忌避物質を液胞内に多量に蓄積し、液胞崩壊による病原体への攻撃に備えるもので、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。

【発表論文】

Hirakawa Y, Nomura T, Hasezawa S, Higaki T: Simplification of vacuole structure during plant cell death triggered by culture filtrates of *Erwinia carotovora*. *J Integr Plant Biol* 57: 127-135. (2015) (2015年1月9日 研究科ニュースに掲載)

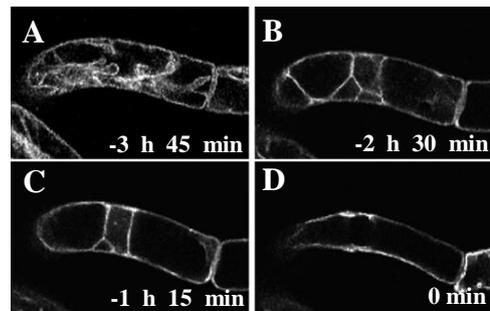


図 2. GFP-VAM3 を用いた *EcCF* 処理による液胞膜単純化の観察。画像右下に示した時間は、液胞が収縮した時点を 0 min と定義した。

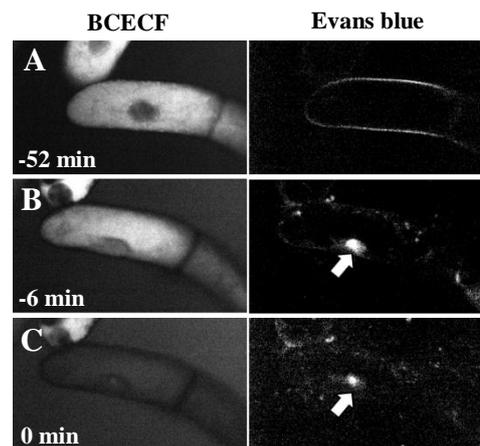


図 3. *EcCF* 処理による液胞膜崩壊と細胞膜崩壊の時間的関係。左: BCECF, 右: Evans blue。矢印は Evans blue の細胞内への流入を示す。画像の左下の時間は BCECF 蛍光が消失した時点を 0 min と定義した。

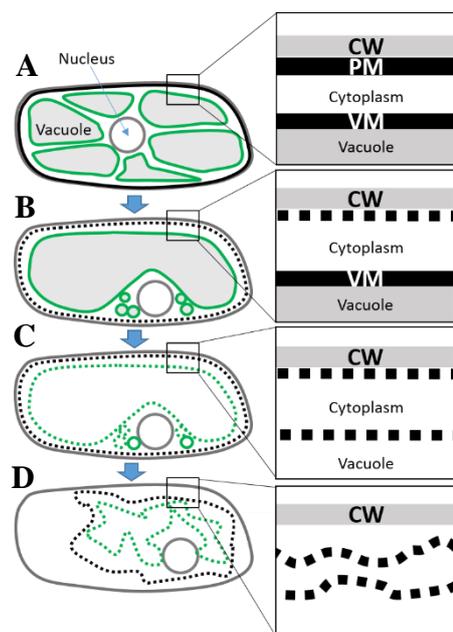


図 4. *EcCF* 誘導性細胞死における液胞膜と細胞膜崩壊過程の模式図。左は細胞全体、右は細胞表層の拡大図を示す。CW: 細胞壁、PM: 細胞膜、VM: 液胞膜。