

氏 名 初谷 紀幸

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第 810 号

学位授与の日付 平成 1 6 年 9 月 3 0 日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 植物の過敏感細胞死における液胞プロセシング酵素の機能  
解明

論文審査委員 主 査 教授 大隅 良典  
助教授 小川 和男  
教授 西村 いくこ（京都大学）

## 論文内容の要旨

植物には病原体の感染に対して生体を防御するための過敏感反応と呼ばれる誘導性の防御機構が存在する。過敏感反応の誘導により感染細胞は急速な細胞死（過敏感細胞死）を引き起こし、病原体を封じ込める。これにより植物は感染の拡大を抑え、全身感染から免れる。過敏感細胞死は植物における代表的なプログラム細胞死である。動物のプログラム細胞死では、カスパーゼを実行因子とする細胞死機構が知られているが、植物におけるプログラム細胞死の機構は全く解明されていない。植物においても過敏感細胞死を含む多くのプログラム細胞死の過程でカスパーゼ様の活性が検出されており、その細胞死がカスパーゼの阻害剤により抑えられることが報告されている。このことから植物のプログラム細胞死にもカスパーゼ様の活性をもったプロテアーゼが関与していることが示唆されてきた。しかし未だに植物におけるカスパーゼ様活性の実体は明らかにされていない。最近、本研究室におけるシャジクモ (*Chara corallina*) を用いた研究から、カスパーゼ-1様活性が液胞に局在していること、またシロイヌナズナの液胞プロセシング酵素

(vacuolar processing enzyme, VPE) にカスパーゼ-1様活性があることが明らかとなった (黒柳、2002)。VPEは液胞の機能タンパク質を成熟型や活性型に変換する酵素として本研究室によって発見されたプロテアーゼである。そこで本研究では植物のプログラム細胞死機構の全貌を解明することを目指し、□) 過敏感細胞死の過程で誘導されるカスパーゼ-1様活性の実体がVPEであること、□) VPEは植物特有の液胞主導型細胞死機構を制御する重要な鍵酵素であることを証明した。

実験ではTMVに対する抵抗性遺伝子「N」を持つタバコ (*Nicotiana tabacum*) を用いた。温度依存的なN遺伝子の機能を利用して、過敏感細胞死の指標となる病斑を同調的に誘導した。この病斑形成が、カスパーゼ-1の阻害剤によって抑えられることを見出した。この結果は、TMV感染による過敏感細胞死にカスパーゼ-1様活性をもつプロテアーゼが関与していることを示唆している。

カスパーゼ-1様活性をもつプロテアーゼを同定するために、ピオチン標識した非可逆的なカスパーゼ阻害剤を用いて、酵素-阻害剤の複合体を検出するためのインヒビター・プロット法を開発した。この方法により阻害剤を浸潤させた感染葉から、カスパーゼ様活性をもつ40 kDaと38 kDaの複合体タンパク質を検出することができた。次にこの複合体タンパク質を同定するための実験を行った。その結果、①複合体形成はVPEの阻害剤によって競合的に阻害された、②VPEの特異抗体を用いたイムノプロット解析でもインヒビター・プロット法で検出された複合体タンパク質と同じ分子量のタンパク質が検出された、③VPE抗体を用いて免疫沈降を行った後の上

清でインヒビター・ブロット解析を行ったところ、複合体タンパク質のシグナル強度が減少した。④ VPE 活性がカスパーゼの阻害剤で顕著に抑えられた。⑤ 過敏感細胞死はカスパーゼ-1 の阻害剤と同様に VPE の阻害剤によっても抑えられた。これら五つの実験結果を総合して、カスパーゼ-1 様活性をもつプロテアーゼが VPE であり、VPE が過敏感細胞死に関与することが強く示唆された。この仮説を *in vivo* で証明するために、ウイルス誘発性遺伝子サイレンシングにより内在性の VPE 遺伝子の発現を抑制させた植物体を用いて解析を行った。VPE サイレncing 植物では VPE 活性だけでなく、カスパーゼ-1 様活性も顕著に低下していた。この結果は植物におけるカスパーゼ-1 様活性の実体が VPE であることを *in vivo* で証明したものである。また VPE サイレncing 植物では TMV 感染による過敏感細胞死が顕著に抑えられることを見出した。この結果は液胞内のプロテアーゼである VPE が植物のプログラム細胞死において重要な機能を果たしているということを端的に示している。

次にウイルス感染葉の細胞を電子顕微鏡で観察したところ、葉に病斑が形成されはじめる前に、液胞膜が部分的に崩壊されることが分かった。この液胞膜の崩壊は時間経過に伴って広範囲に広がり、過敏感反応の開始後 24 時間で完全に崩壊した。しかし VPE サイレncing 植物では 24 時間後も液胞膜の崩壊は全く起こっていなかった。この結果から VPE は植物の細胞死過程で液胞膜の崩壊に関与することが示唆された。液胞膜の崩壊により、液胞内の加水分解酵素が細胞礎質に漏出することが予想され、その結果、細胞死の進行が促進されるのではないかと考えられた。また植物におけるプログラム細胞死の過程で液胞内のヌクレアーゼ活性が上昇することが報告されている。そこでウイルス感染葉における核 DNA を調べたところ、過敏感反応の開始後 24 時間で 50 kbp に断片化していた。しかし VPE サイレncing 植物では核 DNA の断片化が全く起こっていなかった。この結果から VPE を介した液胞膜の崩壊が核 DNA の断片化に深く関わっていることが示唆された。

本研究により、植物には動物とは異なる液胞主導型の細胞死機構が存在し、VPE はその細胞死過程で機能する重要な鍵酵素であることが明らかになった。植物細胞独自の VPE を介した細胞死機構の解明は、様々なシグナルにより誘導される植物の細胞死の研究に新規の知見をもたらすと期待される。

## 論文審査結果の要旨

植物は病原体の感染に対する生体防御機構として過敏感細胞死を誘導する。過敏感細胞死は植物における代表的なプログラム細胞死であるが、その分子機構はほとんど解明されていない。一方、動物のプログラム細胞死では、カスパーゼを実行因子とする細胞死機構が知られている。過敏感細胞死がカスパーゼの阻害剤によって抑えられることから、植物のプログラム細胞死にもカスパーゼ活性を持つプロテアーゼが関与していると考えられている。しかし、植物からカスパーゼのホモログは見つかっておらず、活性の実体は不明であった。

申請者は植物のプログラム細胞死機構の全貌を解明することを目指し、タバコモザイクウイルス (TMV) の感染によって誘導される過敏感細胞死について解析を行い、以下の知見を得た。ビオチン標識したカスパーゼ阻害剤を用いて、TMVに感染したタバコ葉からカスパーゼ活性をもつタンパク質を同定する方法を開発した。この方法により TMV の感染によって誘導されるカスパーゼ活性を担うタンパク質が液胞プロセシング酵素 (VPE) であることを見出した。VPE は液胞に局在し、液胞の機能タンパク質を成熟型や活性型に変換する酵素である。VPE 遺伝子の発現を抑制した植物では、カスパーゼ活性が失われるとともに過敏感細胞死が抑制されることが示された。以上の結果は、過敏感細胞死に関わるカスパーゼ 1 活性の実体が VPE であり、VPE は過敏感細胞死を制御する重要な鍵酵素であることを証明した。植物のプログラム細胞死を制御するプロテアーゼの同定は世界で初めてである。

また、電子顕微鏡並びに共焦点レーザー顕微鏡観察の結果から、TMV の感染を受けた感染葉では過敏感細胞死に先立って液胞膜が崩壊することを見つけた。VPE 遺伝子の発現を抑制した植物では、液胞膜の崩壊が起こらないために細胞死が抑制されることが示され、液胞膜の崩壊が過敏感細胞死に必須な現象であることを見出した。動物において死にゆく細胞は貪食細胞によって除去される。しかし、細胞壁に囲まれた植物の細胞は自力本願的に自らを消化しなくてはならない。そのために植物の細胞が死に向かうときには、多様な分解酵素を含む液胞を破壊することにより細胞成分の分解を促進することが分子レベルで初めて証明された。細胞死が液胞の VPE によって制御されている事実は、動物の細胞死が細胞質ゾルの

カスパーゼによって制御されていることと対照的であり、進化の面からも興味深い。

植物の病害に対する生体防御機構に細胞死がどの程度の重要性を担っているかは議論の的であった。VPE遺伝子の発現を抑制した植物では、Pathogenesis related (PR) タンパク質の合成に代表される病害抵抗性反応は誘導されるにも関わらず、細胞死が抑えられるために、TMVに対する抵抗性を失っていることを見出した。この結果は植物の生体防御機構における細胞死の重要性を直截に示している。

これらの結果は、植物におけるプログラム細胞死の分子機構ならびに生体防御機構を解明する上で重要な発見を含んでおり、学位論文として十分に価値があると判断した。