

■ 植物の形態形成分子機構の研究

— イオンビームによる植物細胞アポトーシス誘導体の確立 —

植物形態形成研究グループ ■ 川合 真紀, 小林 泰彦, 大野 豊, 渡辺 宏, 内宮 博文 ■

Molecular Mechanism for Plant Morphogenesis

— Establishment of ion beam-induced apoptosis in plant cells —

Maki KAWAI, Yasuhiko KOBAYASHI, Yutaka OONO, Hiroshi WATANABE
And Hirofumi UCHIMIYA

Research Group for Plant Morphogenesis

High linear energy transfer (LET) ionizing radiation such as ion beams cause more localized dense ionization within the cells compared to low LET radiations such as X-rays and γ -rays. Maize seedlings were irradiated with $^{20}\text{Ne}^{8+}$ generated by the AVF cyclotron. The growth suppression at the different dosages of ion beams was observed in both root and coleoptile. DNA laddering was also observed at the dosage over 100 Gy. In addition, abnormal morphological changes including chromatin condensation, typical of apoptosis in animal cells, were noted by light and electron microscopy. Our results indicate that the ion beams can serve effective tools to induce apoptosis-like cell death in plants.

1 はじめに

細胞が自ら死ぬ能力（プログラム細胞死）は多細胞生物が有する基本的な生命活動の一つである。中でもアポトーシスと称される細胞死現象は、近年、医療分野との関わりから注目され盛んに研究が行われている。動物のアポトーシスでは、DNAの損傷、薬剤、成長ホルモン等の細胞死誘導因子によって、クロマチンの凝縮、細胞核の変形、DNAの断片化等の形態変化が誘因される。放射線によって引き起こされるDNAの損傷に対して、細胞は自己修復機構を活性化させるが、修復不可能な傷に対しては自殺機構を起動する。これらは厳密に制御されたシグナル伝達系を介しており、障害による受動的な死とは区別される。

植物においてもプログラムされた細胞死は形態形成、耐病性、環境ストレス抵抗性の獲得等に重要な役割を担っている（図1）¹⁻³⁾。植物の形づくりにおいては葉の形の決定や、根の内部に形成される破生通気腔

（通気組織）^{4,5)}、維管束の管状要素分化過程などにプログラム細胞死が関与することが知られている。根では先端の根冠細胞が順に死滅していくことが、根の伸長活性の維持に大きく寄与する。また、これまで受け身の細胞死（ネクローシス）と考えられていた葉の老化現象も厳密に制御されており、花粉形成時のタペート細胞や受粉後の花弁が枯死するのも、他器官が効率良く生存するために一部の器官を自殺させるプログラム細胞死の一例と考えられるようになってきた。植物の形態形成の根源を成す現象として細胞死が認識されるようになったものの、その分子機構の詳細は不明である。こうした研究の立ち遅れの原因としては、植物の細胞死誘導システムの確立が未完成な点が挙げられる。動物では γ 線、X線等の放射線を始め、種々の薬剤によるプログラム細胞死誘導系が確立されており、研究の進展に大いに貢献している。植物においても実験系の確立が望まれていたが、これまで成功例は報告されていなかった。植物は動物細胞とは異なり厚い細胞

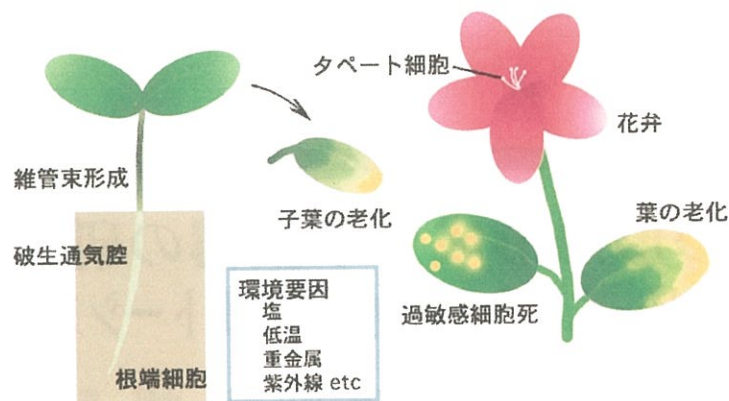


図1 植物で見られる細胞死の例

植物では様々なアポトーシス様の形態変化を伴う細胞死が観察されている。それらは形態形成時に見られるものから、環境ストレスによって誘引されるものまで多岐に渡っている。

胞壁を持ち、莫大なゲノムDNAを細胞内に保有していることから、動物と等線量の γ 線やX線照射ではアポトーシスを誘導する事が難しいと考えられている。それに対し、イオンビームは電子線やX線などに比べてLET (linear energy transfer) が高く、局所的に多量のエネルギーを細胞に与えることができる。本研究ではイオン照射が引き起こす生物効果を検定し、その結果、植物細胞にアポトーシス様細胞死が誘因されることを明らかにした⁶⁾。

2 イオン照射の植物への成長阻害効果

実験材料としては、細胞核が大きく観察が容易であるトウモロコシを用い $^{20}\text{Ne}^{8+}$ (350MeV) や $^{12}\text{C}^{5+}$ (220MeV) を1 Gy から10kGy の範囲で幼苗 (発芽後

2日目) 全体に照射した。シュート及び根の伸長に対する効果を調べた結果、線量に対応した生育阻害効果が検出された。根長に注目し、照射前に対する相対値で示すと、1 kGyのNeイオン照射によって約50%の伸長阻害が見られたが、10kGyまで線量を増加させても完全に根の伸長が停止することはなかった。また、1 kGy-10kGyで照射した植物は1週間後には完全に枯死し、それ以下の線量で照射した植物体は生長するものの、後に著しい不稔性を示した。

3 イオン照射によるアポトーシス様細胞死の検出

アポトーシスの際には細胞内で特異的なエンドヌクレアーゼの活性化が起こり、染色体の特定部位を切断

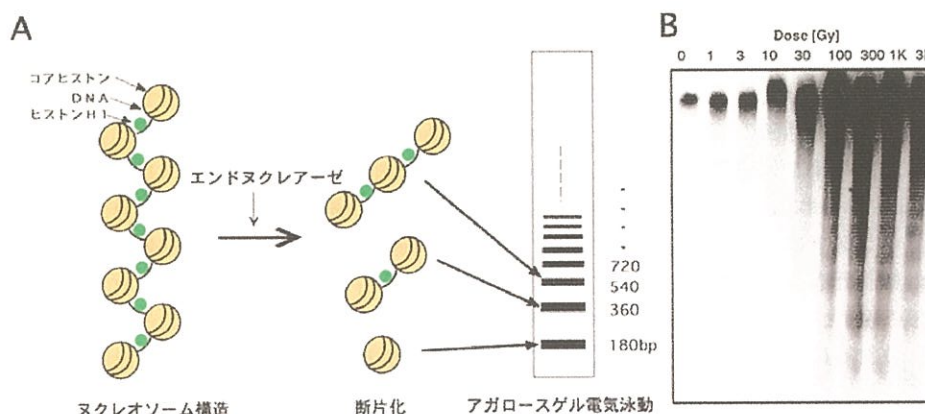


図2 イオン照射によるDNA断片化の検出

(A) アポトーシスによるDNAの断片化の機構

アポトーシス誘導刺激によって活性化されたエンドヌクレアーゼがヌクレオソーム間を切断するため、モノマー (180bp)、ダイマー (360bp)、トリマー (540bp) 等に相当するDNA断片が検出される。障害等による壊死 (ネクローシス) ではこのようなパターンは検出されないことからアポトーシスの指標とされる。

(B) DNAラダーの検出

Neイオン照射48時間後にトウモロコシの根より全RNAを抽出して電気泳動を行った。高線量のイオン照射後にアポトーシスのマーカーとされるラダー化が検出された。

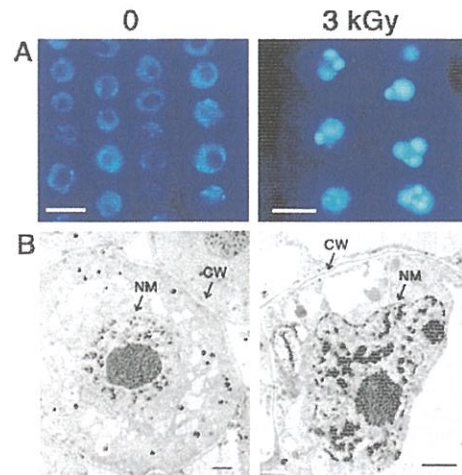


図3 イオン照射による形態変化

(A) DAPI染色による核の形態観察

Ne イオン照射後2日目のトウモロコシの根端部を固定し、テクノビット8100レジンに包埋した後、切片を作製した。核を観察するため、DNAを染色するDAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylidole) 試薬によって染色を行った。UV光下で観察した結果、高線量照射 (3 kGy - 10 kGy) 時に、著しい核の変形、及びクロマチン凝縮が見出された。

(B) 電子顕微鏡による形態観察

コントロール (非照射) 及び Ne イオン (3 kGy) 照射後2日目の根端組織をオスミウム固定し、透過型電子顕微鏡によって観察した。核の変形、及びクロマチン凝縮が観察された。Bar = 2 μm
CW: 原形質膜、NM: 核膜

するため、一般のDNA障害とは異なりクルマチン構造を反映した断片が出現する (図2 A)。こうしたDNAの検出はアポトーシスのマーカーとして利用することができる。そこで、イオン照射後2日目の植物の根を液体窒素で凍結摩砕し、全DNAを抽出した。約10マイクログラムをアガロース電気泳動に処し、エチジウムブロマイド染色の末、UV光下でゲルを観察した。その結果、非照射サンプルからは高分子量体としてDNAが抽出されたが、照射体では約180塩基対を単位とする梯子状の泳動像が得られた (図2 B)。すなわち、イオンビーム照射は植物DNAにアポトーシスと同様のラダー化を引き起こすことが明らかになった。

細胞形態を観察するため、イオン照射固体の根端組織を4%パラホルムアルデヒド-20mM カコシル酸ナトリウム溶液で固定し、エタノールシリーズで脱水した。テクノビット8100レジンに包埋した後、約10ミクロン厚の切片を作成した。スライドガラス上に固定し、細胞核を観察するためDAPI染色を行いUV光下で検鏡した結果、3 kGy - 10 kGy の線量で照射したとき、著しい核の変形及び、クロマチンの凝縮現象が観察された (図3 A)。

さらに詳細に細胞内構造を調べるため、透過型顕微鏡による形態観察を行った (図3 B)。その結果、照射細胞ではクロマチン凝縮に加え、細胞質構造の崩壊、細胞の収縮などのアポトーシスに特有な形態的变化が観察された。この様な形態変化はCイオン照射によっても同様に見出された。

4 イオン照射による植物体の形態変化

これまでの実験は、完全にイオンが透過する深度以下の厚さである根端組織の観察結果であった。一方、これ以上の厚みを持つ地上部への処理では、イオン照射に特徴的な形態変化が見い出された。Cイオン (10kGy) 照射した植物の地上部の切片を詳細に観察した結果、クロマチン凝縮を起こした細胞群 (推定されるイオン透過部位) と正常な部位がはっきりと分断されており、その中間部に細胞壁が著しく肥厚した変型細胞 (ネクロシス様細胞) が存在していた。イオン照射では試料中の透過深度が最大となる地点でエネルギー堆積分布がピークを持つことが知られている。植

物体内で、この勾配に従った生体応答が起きた結果、アポトーシス、ネクロシス、生細胞が層状に配置した形態変化が起きたと考えられる。

5 育種への応用と今後の展望

イオンビーム照射は植物細胞にDNAのラダー化、核の変形、クロマチン凝縮等の形態変化を伴った、アポトーシス様の細胞死を引き起こすことを明らかにした。動物では、放射線誘導性細胞死をモデル系としてアポトーシスに関連する数多くの因子が単離、解析されているが、植物では研究が進んでいない。人為的に細胞死を誘発するシステムの確立は、植物のアポトーシスの機構解明への大きな足がかりになると考えられる。

植物のプログラム細胞死は病原菌への耐性メカニズムや、環境ストレス応答と密接な関係を有しており、低温や高塩環境下でアポトーシス様細胞死が引き起こされていることが知られている。これらの分子機構解明が進み、植物細胞の細胞死をコントロールすることが可能になれば、環境ストレスに強い植物の分子育種

等の道も開かれるであろう。

参考文献

- 1) 内宮博文, 川合真紀: 植物細胞工学シリーズ「植物の形を決める分子機構」(2000)239.
- 2) M. Kawai and H. Uchiyama: *Annals of Botany* 86(2000)405.
- 3) M. Kawai et al.: *FEBS Lett.* 464(1999)143.
- 4) M. Kawai et al.: *Planta*, 204(1998)277.
- 5) P.K. Samarajeewa et al.: *Planta* 207(1999)354.
- 6) M. Kawai et al.: *Plant Biotechnology* 17(2000)305.