

氏名	高塚 千広
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 915 号
学位授与年月日	平成 25 年 9 月 20 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	タバコ培養細胞を用いた植物のオートファジーの解析
論文審査委員	委員長 教授 森安 裕二 委員 教授 金子 康子 委員 教授 田中 秀逸 委員 准教授 竹澤 大輔

論文の要約

序論

オートファジーは真核細胞が備えている細胞内のタンパク質を分解する機構の一つである。その生理的意義の第一は栄養飢餓条件下で自己タンパク質を分解してアミノ酸を調達することと考えられるが、オートファジーは個体の発生過程に寄与したり細胞内タンパク質代謝回転にも関与して細胞の恒常性維持に寄与しているとも考えられている。酵母や哺乳動物細胞で詳細に研究されているマクロオートファジー経路では、分解される細胞質はまずオートファゴソームという膜構造の中に隔離され、オートファゴソームがプロテアーゼを持つリソソームや液胞と融合して細胞内タンパク質が分解される。植物細胞は液胞を持ち、そのオートファジー経路は酵母と同様にオートファゴソームが液胞と融合してタンパク質が分解されると解釈されている。但し、植物のオートファジー経路について一致した見解は得られておらず、タバコ培養細胞を用いたオートファジー経路の研究では、オートファゴソームは液胞と融合する前にプロテアーゼを獲得してオートリソソームへと成熟し細胞質タンパク質を分解すると主張されている。そこで本研究では、植物細胞にリソソームが存在することを証明するため、タバコ培養細胞からオートリソソームを単離し、その特徴を調べた。さらに、マクロオートファジー経路以外のオートファジー経路を探して光学及び電子顕微鏡観察を行った。

結果

1. タバコ培養細胞からのオートリソソームの単離と特徴づけ

タバコ培養細胞をショ糖を含まない培地に移し、システインプロテアーゼ阻害剤 E-64c を添加して培養すると、内部に分解途上のオルガネラを含んだ直径 1～6 μm の膜構造が蓄積する。この膜構造は内部が酸性であり、E-64c により膜構造内部のタンパク質分解の過程が滞ったために細胞内に蓄積したオートリソソームであると考えられる。これまでに、酵素細胞化学染色によりこのオートリソソームにはリソソームのマーカー酵素である酸性ホスファターゼが局在することが示されている。本研究では、オートリソソームを蓄積しているタバコ培養細胞から Percoll 平衡密度勾配遠心法を用いて細胞分画を行った。調製した分画について、液胞とリソソームのマーカー酵素である酸性ホスファターゼの活性を測定すると、高密度側と低密度側の 2 つの画分に活性が検出された。低密度側のピークはオートリソソームを蓄積していない細胞から

調製された場合にも同様に見られ、この活性は液胞に局在する酸性ホスファターゼに起因すると考えられた。それに対して、高密度側のピークは、オートリソソームを蓄積している細胞から調製した場合にのみ検出されたので、高密度側のピークを与える分画が、オートリソソームを含む分画であると判断した。オートリソソーム画分のタンパク質をウェスタンブロット法で解析し、液胞型 H⁺-ATPase の A と B の両サブユニットと酸性ホスファターゼを同定した。さらに、ポリアクリルアミドゲル上でのプロテアーゼ活性染色によりオートリソソームの分画にシステインプロテアーゼ活性を検出した。これらの結果は、単離したオートリソソーム内部にシステインプロテアーゼが存在すること、液胞型 H⁺-ATPase がオートリソソーム膜に局在し、オートリソソーム内部を酸性化して加水分解酵素の反応を支えることを示唆している。

2. タバコ培養細胞のシヨ糖飢餓にตอบสนองした 2 種類のオートファジーの解析

タバコ細胞をシヨ糖飢餓培地に移した直後に E-64c を加えて培養を続け、細胞を光学顕微鏡観察すると、ほぼすべての細胞がオートリソソームを蓄積していた。しかし、24 時間後に E-64c を加えて培養しても、細胞はオートリソソームをほとんど蓄積しなかった。このことは、オートリソソーム形成はシヨ糖飢餓処理 24 時間以内に終了することを示唆している。すなわち、マクロオートファジーは一過的にしか起きず、24 時間以内に終了すると考えられた。シヨ糖飢餓処理された細胞は、マクロオートファジー終了後も 3 日間は生きており、この間、細胞内プロテアーゼ活性は増加し、細胞内タンパク質含量は減少し続けた。このことは、マクロオートファジー終了後も細胞内では別のオートファジー経路によるタンパク質分解が続くのではないかと予想させた。そこで、シヨ糖飢餓 2 日後の細胞を光学顕微鏡で観察すると、液胞内に顆粒状構造が有意に蓄積していることがわかった。この液胞内顆粒は E-64c 処理により液胞内のシステインプロテアーゼを阻害すると増加した。電子顕微鏡観察は、液胞内に蓄積してくる顆粒状構造は分解途上の細胞質であること、液胞周辺には直径約 1 μm で小さな液胞が多数出現することを示し、これら小さな液胞と液胞が融合する過程で間隙の細胞質が液胞に輸送されることを示唆した。哺乳動物細胞のマクロオートファジー阻害剤 3-methyladenine (3-MA) は、タバコ培養細胞のマクロオートファジーを阻害し、液胞への細胞質顆粒の蓄積も阻害したが、3-MA による後者の阻害は 3-MA による前者の阻害とは関係がなかった。これらの結果は、細胞は、一過的なマクロオートファジーを終えた後、液胞が関与する新奇なオートファジーを実行することを示している。

結論

本研究では、タバコ培養細胞をシヨ糖飢餓培地に移すとマクロオートファジーが誘導されるが、これは一過的であり、この後に液胞が分解の場となる新奇オートファジー経路が活性化することを示した。さらに、マクロオートファジーでタンパク質分解の場となるオートリソソームを単離し、哺乳動物リソソームと同様に、酸性ホスファターゼやプロテアーゼなどの加水分解酵素、液胞型 H⁺-ATPase が局在することを明らかにした。