

博士論文

タバコにおけるアルミニウムによる
細胞死と根伸長阻害の分子機構

平成29年3月

苅谷 耕輝

岡山大学大学院
環境生命科学研究科

目次

略記表	・ ・ ・ 1
第1章 研究背景	・ ・ ・ 2
第2章 アルミニウムが誘発する細胞死における <i>VPE</i> 遺伝子の関わり	・ ・ ・ 8
第1節 概要	・ ・ ・ 8
第2節 材料と方法	・ ・ ・ 8
第3節 結果・考察	・ ・ ・ 18
第3章 タバコ培養細胞を用いた <i>VPE</i> 発現抑制系統の作成と解析	・ ・ ・ 31
第1節 概要	・ ・ ・ 31
第2節 材料と方法	・ ・ ・ 31
第3節 結果・考察	・ ・ ・ 36
第4章 アルミニウムによる根伸長阻害における <i>NtSUT1</i> 遺伝子の関わり	・ ・ ・ 43
第1節 概要	・ ・ ・ 43
第2節 材料と方法	・ ・ ・ 43
第3節 結果・考察	・ ・ ・ 49
第5章 結論	・ ・ ・ 62
参考文献	・ ・ ・ 66
謝辞	・ ・ ・ 74
学位論文の概要	・ ・ ・ 75

略記表

Al : アルミニウム(Aluminm)

CSM 液 : カルシウム-スクロース-MES 液(calcium-sucrose-MES medium)

CS 液 : カルシウム-スクロース液(calcium-sucrose medium)

EB : エバンスブルー (Evans blue)

FDA : 二酢酸フルオレセイン(fluorescein diacetate)

FW : 新鮮重 (fresh weight)

PI : ヨウ化プロピジウム(propidium iodide)

ROS : 活性酸素種 (reactive oxygen species)

SUT : スクロース/H⁺共輸送体 (sucrose/H⁺ cotransporter)

VPE : 液胞プロセシング酵素 (vacuolar processing enzyme)

第1章 研究背景

作物生産に利用される土壌は、植物の生育に望ましいものばかりではなく、それらは問題土壌と呼ばれている。問題土壌のうち、世界の農耕可能地の30%を占めるのが酸性土壌である (von Uexküll et al., 1995)。酸性土壌は世界中に広く分布しており、特に熱帯・亜熱帯地域の発展途上国に広く存在する。日本にも酸性土壌の黒ボク土が広く分布している。近年の人口増加における食糧不足を補うためにも酸性土壌で作物を育てることは重要な課題である。

酸性土壌では様々な要因で作物の生育が阻害される。中でもアルミニウム(Al)は土壌鉱物を構成する金属元素として最も多く、約7%を占めていて、土壌の酸性化に伴って Al^{3+} イオンとして土壌水中に溶け出し、根に吸着することによって根端分裂組織に蓄積し、根と根毛の伸長を直ちに阻害し、さらに細胞死を引き起こす要因になっている (Kochian et al., 2005; Gupta et al., 2013; Kochian, 1995)。Alイオンは低濃度で植物毒性を示し、Alイオンによる障害機構については、生理学的、生化学的および分子レベルで解析されている (Ryan et al., 1993; Sivaguru et al., 1998; Tabuchi et al., 2001; Matsumoto et al., 1992; Yamamoto et al., 2002; Sasaki et al., 2004)。

私の所属する研究室では、これまでタバコ培養細胞系統を用い、多くの植物種の根に見られる典型的なAl応答反応である細胞伸長阻害、カロースの分泌 (Ikegawa et al., 2000; Sivaguru et al., 2005; Horst et al., 1997)、細胞死、細胞伸長阻害が見られることが報告されている (Yamamoto et al., 2002; Yamamoto et al., 2001; Abdel-Basset et al., 2010)。また、Alが結合したタバコ培養細胞において、ミトコンドリアの機能障害と活性酸素種 (ROS) の誘発が見出され、細胞増殖阻害の原因として活性酸素種の誘発が強く関係していることが報告されている (Yamamoto et al., 2002)。

一方、植物の細胞死に液胞が関係していることが報告されている (Hatsugai et al., 2004; Li et al., 2012; Kariya et al., 2013; Hatsugai et al., 2015; Biswas et al., 2016) . 液胞は、病原菌 (Hatsugai et al., 2004; Rojo et al., 2004) や熱ストレス (Li et al., 2012) が誘発する細胞死に関わることが報告されており、その因子は液胞に存在するカスパーゼ-1 様活性を示す液胞プロセシング酵素 (vacuolar processing enzyme, VPE) である。また、カスパーゼ-1 阻害剤の使用による細胞死の抑制も報告されている (Gauthier et al., 2007; Kuroyanagi et al., 2005) .

VPE は、元々成熟カボチャの種子における貯蔵タンパク質の成熟に関するシステインプロテアーゼとして発見されているが (Hara-Nishimura and Nishimura, 1987; Hara-Nishimura et al., 1991) , VPE 活性が上昇し液胞が崩壊することで細胞死に至ると考えられている (Mino et al., 2007; Li et al., 2012; Qiang et al., 2012) . VPE は、動物のカスパーゼ-1 と同じ基質特異性を持つプロテアーゼであるが、タンパク質としては全く別物で、細胞死のシグナルによって酵素自身が部分分解によって活性化されることはなく、VPE の活性上昇は *VPE* 遺伝子発現の誘導によってもたらされる

(Kuroyanagi et al., 2002) . 私自身、博士前期課程の研究において、液胞由来の VPE 活性に関わる新しい細胞死の経路をタバコ培養細胞 BY-2 で見出し、①Al の細胞表面への結合→② *VPE* 遺伝子の発現上昇→③VPE 活性の上昇→④液胞の崩壊→⑤細胞膜の損傷→⑥細胞死というモデルを提唱した (Fig. 1) (Kariya et al., 2013) .

そこで、本研究では BY-2 細胞系統を樹立したタバコ品種 Bright Yellow を用い、BY-2 細胞で見られた Al による細胞死の誘発過程が根においても見られるかどうかを検証した。

一方、細胞の伸長には水の吸収が必要であり、水の吸収には液胞中にスクロースや無機イオン等の浸透圧調節物質を蓄積する必要がある。Al は細胞伸長を阻害するが、その原因の一つとして Al によるスクロースの吸収阻害がタバコ培養細胞で報告されていた

(Abdel-Basset et al., 2010; Sameeullah et al., 2013) . スクロースは、芽、茎、花、果実および根などに輸送される(Sauer, 2007). 根は光合成を行わないことから、根の生育に必要なスクロースは、地上部で合成されたスクロースが篩管を通して根端まで輸送される.

その後、スクロースはプラズモデスマーター（原形質連絡）を介して細胞間を移動する（シンプラスト経由）. しかし、篩管から放出されたスクロースは一時的にアポプラストに放出される場合もあり、アポプラストに存在するスクロースの細胞内への取り込みはスクロース/H⁺共輸送体（スクローストランスポーター, SUT）の活性に依存する（アポプラスト経由）.(Sauer, 2007; Rolland et al 2006; Smeekens et al., 2010; Wind et al., 2010; Chen et al., 2015). SUT は、細胞および植物全体のレベルでスクロース分配を制御している(Lalonde et al., 1999; Sauer, 2007; Kühn et al., 2010; Chen et al., 2015).

タバコでは、SUT1 のアンチセンス抑制は、重度の成長遅延をもたらした(Bürkle et al., 1998). これは、葉肉細胞から放出されたスクロースを篩管に取り込む際に必要な SUT1 活性が阻害されることが原因であることが示された. 根伸長には、篩管の末端から根端までのシンプラスト経由の連続性が必要であり、アポプラスト経由もまた必要と考えられている（Bret-Harte and Silk, 1994）.

アポプラスト経由の場合、篩管からアポプラストに放出されたスクロースは、SUT1 を介して根端細胞に回収される. SUT1 の発現は、成熟した葉およびタバコの根においても検出されているが（Bürkle et al., 1998）, 根におけるその機能は不明であった.

これまでに、BY-2 細胞を用いた解析から、Al により NtSUT1 輸送活性が阻害され *NtSUT1* 遺伝子の発現も抑制されること、さらに *NtSUT1* の過剰発現によって Al 処理後の生育が促進されることが報告されていた（Sameeullah et al., 2013）. そこで本研

究では, Al による根伸長阻害における *NtSUT1* 遺伝子の関わりを解析した. タバコ (品種 Samsun NN) を野生系統に, *NtSUT1* の高発現系統ならびに発現抑制 (RNAi) 系統を樹立し, 通常の生育条件における根伸長, ならびに Al 処理による根伸長阻害および細胞死の程度について, 各々根端の遊離糖含量とともに比較解析した.

以上、本研究全体として, Al による植物の細胞死と根伸長阻害の 2 つの主要な障害について, その生成機構の解明をを目的とした (Fig. 2) .

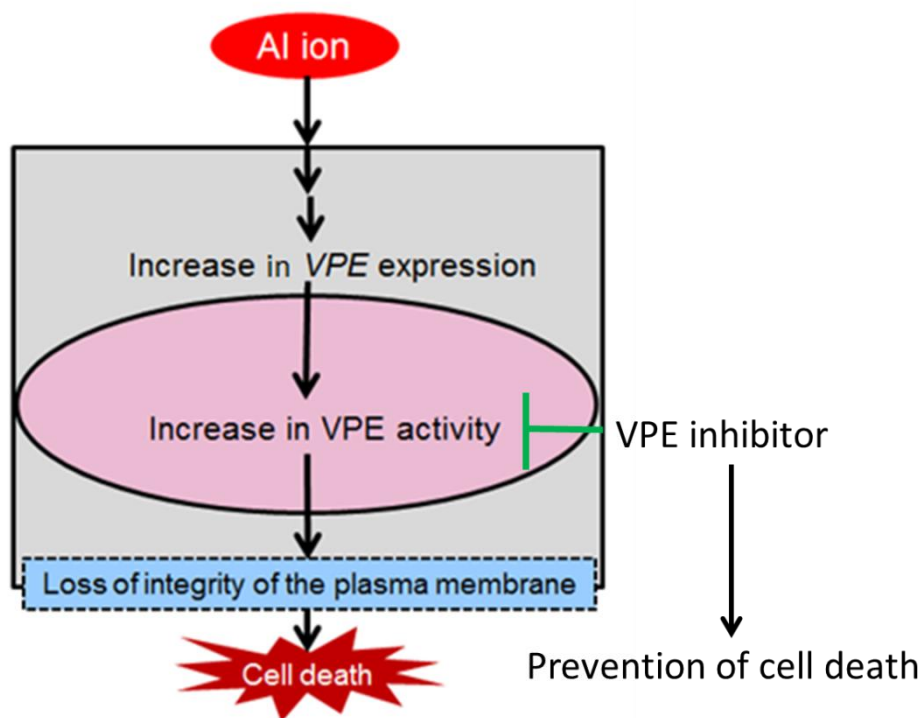


Figure 1 タバコ培養細胞系統 BY-2 における Al による細胞死誘発経路のモデル図
(Kariya et al., 2013)

タバコ培養細胞 BY-2 を用いた解析結果に基づき, Al による細胞死誘発過程は, 次のように進行すると考えられる. ①Al の細胞表層への結合② *VPE* 遺伝子の発現上昇③ *VPE* 活性の上昇④液胞の崩壊⑤細胞膜の損傷⑥細胞死.

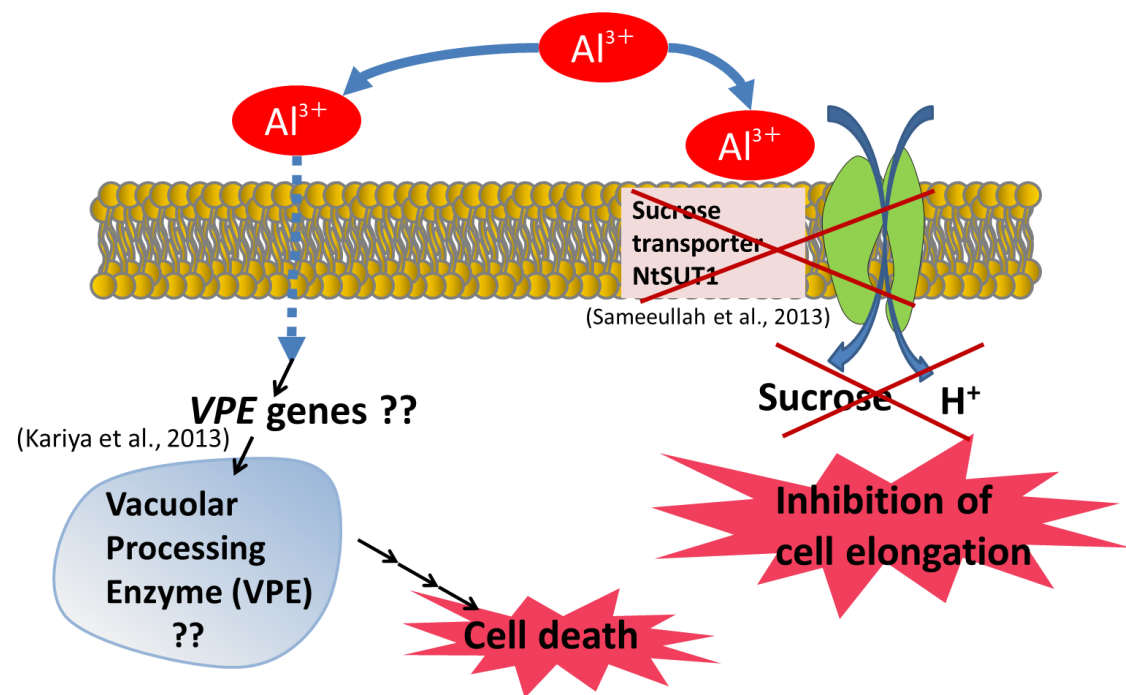


Figure 2 タバコ細胞における Al 障害機構の作業解析

Al は *VPE* 遺伝子の発現上昇, *VPE* 活性の上昇, 細胞死を引き起こす. 一方, Al は NtSUT1 を介したアポプラスト経路のスクロースの取り込みを抑制し, 細胞伸長阻害ならびに細胞死を引き起こす.

第2章 アルミニウムが誘発する細胞死における *VPE* 遺伝子の関わり

第1節 概要

これまでの研究において、タバコ培養細胞系統 BY-2 を用いた解析から、Al の細胞死誘発経路として、①Al の細胞表層への結合② *VPE* 遺伝子の発現上昇③ *VPE* 活性の上昇④液胞の崩壊⑤細胞膜の損傷⑥細胞死というモデルを提唱していた (Fig. 1) . 本研究では、BY-2 細胞系統を樹立したタバコ品種 Bright Yellow を用い、BY-2 細胞で見られた細胞死誘発経路が根において見られるかどうか検証した. なおタバコの *VPE* 遺伝子は4つ報告されており (*VPE1a*, *VPE1b*, *VPE2*, *VPE3*) , これらの分子系統樹解析を行ない Figure 3 に示した. この分子系統樹解析の解析からタバコにおける4つの *VPE* 遺伝子はシロイヌナズナにおける細胞死に関わる *AtyVPE* 遺伝子と相動性が高い (Misas-Villamil et al., 2013; Li et al., 2012) .

第2節 材料・方法

材料と生育条件

タバコ (*Nicotiana tabacum* L.) の品種 Bright Yellow の種子を用い、Figure 4 に示した方法で、Ruakura 培地を用い発芽・生育させたのち、Al 処理法 A (ネット法) もしくは Al 処理法 B (サスペンダー法) を用いて Al 処理を行い下記の様々な解析に用いた. Ruakura 培地の組成を Table 1 に示す (Snowden et al., 1995).

根長の測定

3 日間発芽・成長した根を Al 処理の有無で、1 週間処理した後の根長の主根の長さを物差しを用いて測定し、根長を求めた.

根伸長の測定

Al 処理の前後で、幼植物の主根の長さを物差しを用いて測定し、その差から Al 処理期間中の根長を求めた。

各種染色法

幼植物の Al 処理による根端の細胞を 4 つの染色法(propidium iodide (PI) 染色, Evans blue (EB) 染色, fluorescein diacetate (FDA) 染色, ヘマトキシリン染色)用いて評価した。PI 染色と EB 染色は死細胞, FDA 染色は生細胞を染色する方法で根端における Al による細胞死を評価した。Al 含量をヘマトキシリン染色で評価を行なった。PI 染色は Souchier et al. (1995), EB 染色は Ikegawa et al. (2000), FDA 染色は Widholm et al. (1972), Jones et al. (1985), ヘマトキシリン染色は Polle et al. (1978), Cançado et al. (1999) を一部改変して行なった。

染色はタバコを Figure 4 に示した通りに発芽・生育させ, Al 処理後の根を分取し, 根を蒸留水で洗浄し, 10 mL ビーカーに各染色液 (PI を 0.1%含む水溶液, EB を 0.05%含む水溶液, FDA を 0.01%含むアセトン溶液, ヘマトキシリン 0.1%とヨウ素酸ナトリウム 0.016%を含む水溶液) に入れ, 根をつけて室温で 15 分間振とうした。その際, PI, FDA 染色については遮光した。染色液を蒸留水で 4 回以上 (ヘマトキシリンと EB は滅菌水に色が移らなくなるまで) 洗浄し, 観察まで蒸留水中(室温)に保存した。PI, FDA 染色をした根は遮光して保存した。

蛍光顕微鏡 (model Axiotron; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) と実体顕微鏡 (Olympus SZ2-ILST) を用いて観察した。FDA 染色には蛍光フィルターNo. 9, PI 染色には蛍光フィルターNo. 15 を使用した。

リアルタイム RT-PCR

AI 処理後の根を洗浄し、根端（先端より 5 mm）をカットし濾紙上に回収し（一回の実験で 100 mg FW 程度），乳鉢に入れ液体窒素で凍らせたのち、直ちに乳棒を用いて磨砕した。次に RNeasy Plant Mini kits (Qiagen)を用い、全 RNA を回収し、全 RNA 画分中のゲノム DNA を分解除去するために、RNase-free DNase Kit(Qiagen)を用いた処理を行なった後、First-Strand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT (Invitrogen)を用い、Oligo(dT)12–18 を使って、逆転写を行ない、cDNA を調製した。次に cDNA を用いてリアルタイム RT-PCR を Light Cycler® (Roche, Germany) を用いて行なった。*VPE1a*, *VPE1b*, *VPE2*, *VPE3*, *Actin9* 遺伝子のリアルタイム RT-PCR には KOD SYBR qPCR mix (Toyobo) を用い、PCR 条件は次の様に行なった：98℃で120秒を1サイクル, [98℃で10秒, 55℃で10秒, 68℃で45秒]を40サイクル。各 *VPE* 遺伝子と内部標準遺伝子である *Actin9* のプライマーセットを Table 2 に示す。

VPE 酵素の活性測定

VPE 酵素の活性の測定は、Hatsugai et al. (2004) の方法を一部改変して行なった。AI 処理後の根端（先端より 10 mm）を回収後、液体窒素で凍らせ、乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。そこに抽出バッファー[50 mM sodium acetate (pH 5.5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM E64-d]を入れ、さらによく磨砕したのち、全量を 4℃, 10,000 g で 30 分間遠心後、上清を粗酵素液として回収した。粗酵素液のタンパク量は Bradford 法 (Bradford., 1976) を用いて定量した。VPE の反応は粗酵素液 30 µg を反応液[0.2 mM *z*-Ala-Ala-Asn-methylcoumaryl-7-amide (*z*-AAN-MCA, Peptide Institute, Osaka) -100 mM sodium acetate buffer (pH 5.5)-100 mM DTT]を加え 37℃で反応させ、VPE 基質である *z*-AAN-MCA から遊離する MCA の経時変化を蛍光マイクロプレートリーダー(model Powerscan HT, ainippon

Sumitomo Pharma, Japan)を使い, 励起波長 360 nm, 蛍光波長 460 nm で定量した.

検量線には 7-amino-4-methylcoumarin (AMC, Peptide Institute, Osaka)を用いた.

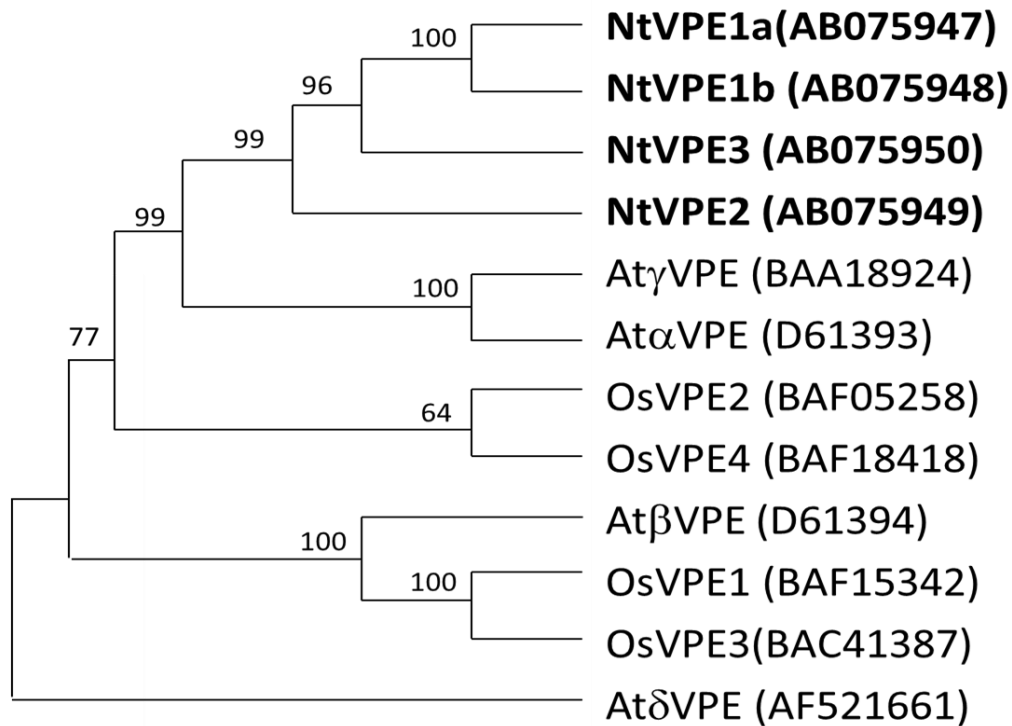


Figure 3 各 *VPE* 遺伝子の分子系統樹解析

樹形図は MEGA 6 プログラム (<http://www.megasoftware.net/index.php>) を使用し、タバコ、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) , イネ (*Oryza sativa* L.) における *VPE* 遺伝子の相動性を調べた.各遺伝子情報は次の通りである. *OsVPE1* (BAF15342), *OsVPE2* (BAF05258), *OsVPE3* (BAC41387), *OsVPE4* (BAF18418), *At α VPE* (D61393), *At β VPE* (D61394), *At γ VPE* (BAA18924), *At δ VPE* (AF521661), *NtVPE1a* (AB075947), *NtVPE1b* (AB075948), *NtVPE2* (AB075949) , *NtVPE3* (AB075950).

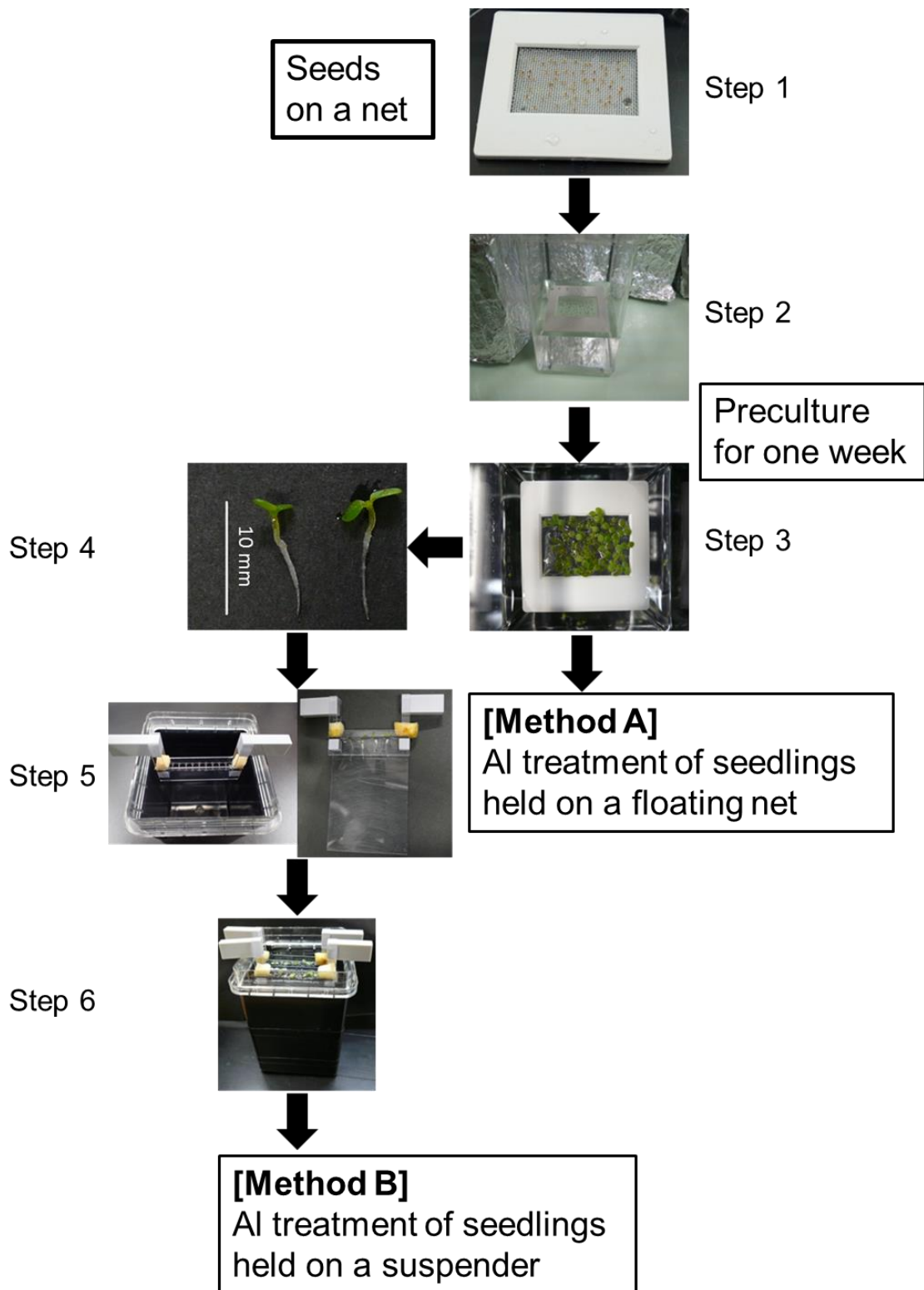


Figure 4 タバコ幼植物体の水耕栽培による Al 処理の流れ

ステップ 1, 2 : タバコの種子をマウントに入れたネット上に置き, 蓋付きボックス中で Ruakura 培地 (pH5.0) 上に浮遊させ (ネット法), 明所 16 時間/暗所 8 時間の光条件で 25°Cにて 1 週間の前培養を行なった.

ステップ 3, 4: 前培養の間に種子が発芽し, ほとんどの植物は約 10mm の長さに成長した.

Al 処理 A (ネット法): ネット上で発芽・生育した植物をそのまま Al を添加もしくは無添加の Ruakura 培地 (pH 4.5) に浮遊させ, 25°Cで明所 16 時間/暗所 8 時間の光条件で処理した.

Al 処理 B (サスペンダー法): 前培養後, 各植物をピンセットでネットから取り出し, 根長を測定し同程度の長さの幼植物をサスペンダーにセットし(ステップ 5, 6), 25°Cで明所 16 時間/暗所 8 時間で Al を添加もしくは無添加の Ruakura 培地 (pH 4.5) で処理した.

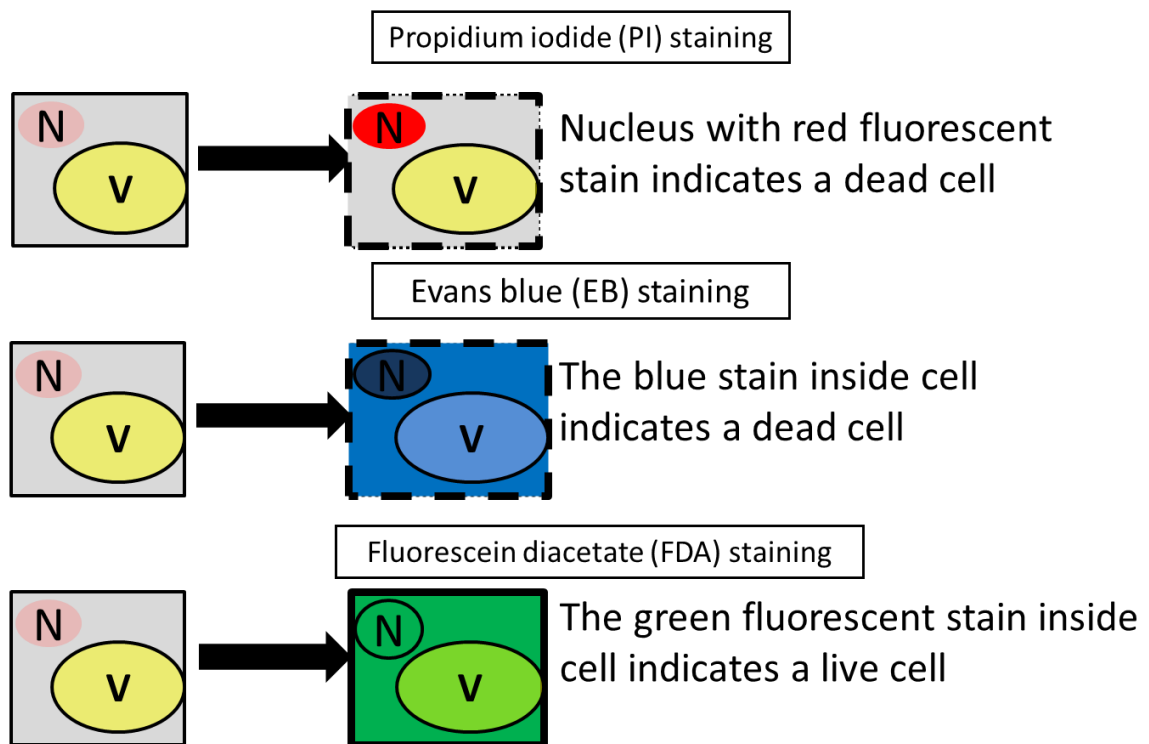


Figure 5 本研究で用いた各種染色方法

死細胞の核のみを赤く蛍光染色する PI 染色，死細胞を青色に染色する EB 染色，生細胞のみを緑色に蛍光染色する FDA 染色を用いて細胞死検定を行なった．いずれの染色も細胞膜の選択的透過性が維持されている（生細胞）か否か（死細胞）に依存した染色法である．

Salt	Concentration
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.1 mM
KNO_3	0.3 mM
NaCl	0.2 mM
NH_4NO_3	0.15 mM
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5 mM
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5 μM
$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	5 μM
H_3BO_3	5 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 μM
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2 μM
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 μM

Table 1 Ruakura 培地の組成 (Snowden et al., 1995)

Gene name (Accession no.)	Primer set
<i>NtVPE1a</i> (AB075947)	Forward primer 5'-ACATAATCCATTTGCCGCCCCTAC-3' Reverse primer 5'-CCGCCATGATCACTATAGAAGATGAG-3'
<i>NtVPE1b</i> (AB075948)	Forward primer 5'-CGGATCAAACGGTTATTGGAATTACCGC-3' Reverse primer 5'-TAGGCATCCCAAGCACTCCAGGACCT-3'
<i>NtVPE2</i> (AB075949)	Forward primer 5'-AGGGCATCATGTTACAGCC-3' Reverse primer 5'-GGGAAAGAGGATCATCCATTAGCTTC-3'
<i>NtVPE3</i> (AB075950)	Forward primer 5'-AAGGAGTTATCATCAATAGTCCTGC-3' Reverse primer 5'-GTACATGAACAGAGAATCCATACCC-3'
<i>Actin9</i> (X69885)	Forward primer 5'-CTATTCTCCGCTTTGGACTTGGCA-3' Reverse primer 5'-AGGACCTCAGGACAACGGAAACG-3'

Table 2 *VPE*遺伝子群, 内部標準遺伝子である *Actin9*のプライマーの配列 (Kariya et al., 2013)

第3節 結果・考察

Al の根伸長への影響について、タバコ品種 **Bright Yellow** を用い、Al 濃度を変えて測定した。Al 処理方法を **Figure 4** に示した。ネット上に播種し発芽・成長させたところ、発芽率は 98% とほとんどの種子が発芽をした。3 日程で双葉が出て、根長が約 2 mm になった。その時点でネットを Al 処理液に移し (Al 処理方法 A, **Fig. 4**) 1 週間処理した後の根長を測定した (**Fig. 6A**)。コントロール処理 (Al 0 μM) の根長の阻害率を 0% として求めると Al 25 μM で 10%, Al 50 μM で 55%, Al 100 μM で 73% であった。但し前培養 3 日間での根長が約 2 mm であり、今回の根長測定はこれを含むため 100 μM Al 処理では根長がほとんど伸びなかったと思われる。すなわち 50, 100 μM Al 処理を含む培地の場合、早い段階で主根が伸びなくなると考えられた。一方、側根については、Al 処理で主根と同程度 (Al 25 μM) もしくは主根よりも長く (Al 50 μM) 伸長していた (**Fig. 6B**)。これは主根の伸長が Al で阻害されたために、主根の代わりに側根が伸びた可能性が考えられた。なお、コントロール処理 7 日間後の側根の数は 2 本あったが、Al 25 μM 処理では 1 本であったことから、Al 25 μM 処理でも、Al による障害が起きていると考えられた。本研究に基づき、その後の Al 処理は Al 50 μM を用いて行った。

Ruakura 培地 (pH 5.0) で 7 日間発芽・成長させたのちの根長は約 10 mm になった。同程度の根長を示した幼植物を用いて、Al 処理方法 B (**Fig. 4**) を用いた Al 処理を 1 日間もしくは 3 日間行い、根長を測定し、Al 処理前後の根長の差より根伸長を求めた (**Fig. 7**)。コントロール (Al 無添加) 処理の根伸長の阻害率を 0% として求めると、1 日間の処理で 55%, 3 日間の処理で 75% であり、Al 処理 1 日間であっても明らかな根伸長阻害が引き起こされていた。

Al による伸長阻害が Al による細胞死の誘発と関連しているかどうかを調べるために、Al 処理を 1 日間もしくは 3 日間行ない根端細胞の生死について 3 種類の染色法を用いて評価した (**Fig. 5**)。

PI 染色は死細胞を蛍光染色する。コントロール (AI 無添加) 処理では PI 染色によって蛍光染色されず生細胞であることが示された。それに対して, AI 処理では1日間および3日目ともに根端が染色されたことから, 死細胞と判断した (Fig. 8)。従って, AI 処理1日間ですでに根端細胞に AI による細胞死が誘発されており, これが根伸長阻害の一因と考えられる。

EB 染色 PI 染色と同様に死細胞を青く染色する。コントロール処理でも青く薄く染色されたが, AI 処理1日間では根端が濃染され, 3日間では根全体が濃染された (Fig. 9)。従って, EB 染色の結果からも PI 染色と同様に, AI 処理1日間ですでに根端細胞に AI による細胞死が誘発されたと判断した。

一方, FDA 染色は生細胞を蛍光染色する。コントロール (AI 無添加) 処理の1日間および3日目の根端はともに蛍光染色されたが, AI 処理では1日間でもすでに FDA の蛍光はほとんど検出されず (Fig. 10), AI による細胞死の誘発が示された。以上の, AI による根伸長阻害ならびに3種類の染色の結果より, AI による細胞死の誘発が一因となって根伸長阻害を引き起こすと考えられた。

AI 処理開始後24時間以内に誘発される細胞死について継時的に解析した。AI 処理開始後3時間ごとに根端の FDA 染色と AI の吸着を検出できるヘマトキシリン染色を行った (Fig. 11)。FDA 染色の結果から6時間目までは細胞が生きていることが確認され, 9時間目において, 根端の蛍光が弱くなり, 12時間目からはさらに蛍光が弱まり, 15時間目以降はほとんど検出されなくなった。ヘマトキシリン染色の結果から, AI の吸着は3時間目でも見られ, 9時間目は, 特に根端が濃染され, FDA 染色の消失部位と一致した。12時間目は基部に向かって濃染される部分が増加し, この場合も FDA 染色の消失部位と一致した。以上の結果より, AI による細胞死の誘発は9時間目くらいに根端から始まりその後, 基部に向かって進むこと, 細胞死の誘発部位で AI の集積が促進されることが明らかになった。

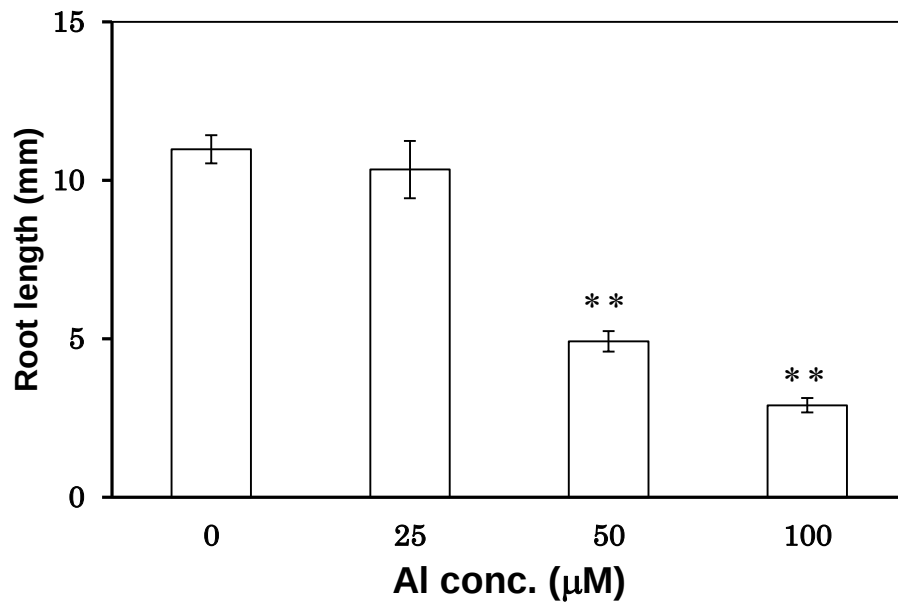
Figure 11 における FDA 染色の結果を定量的に解析するために、根端からの 1mm の蛍光強度を、Image J ソフトウェア（バージョン 1.45）（Schneider et al., 2012）および Java 1.8.0-73 を用いて定量した（Fig. 12）．その結果、Al 処理開始後 6 時間目までは 80% の蛍光量を維持しているが、9 時間目以降は 70% となり、12 時間目以降 18 時間目までには指数関数的に減衰し、24 時間目には 6% となった．以上の結果より、Al による細胞死の誘発は 9 時間目以降急速に進行することが分かった．

Al による細胞死の誘発において、*VPE* 遺伝子の関わりを検討するために、Al 処理時間 24 時間で *VPE1a*, *VPE1b*, *VPE2*, *VPE3* 遺伝子発現（根端 5 mm）の変動を継時的に調べた（Fig. 13）．すべての *VPE* 遺伝子の発現は、6 時間目まではコントロール処理と Al 処理での差はなく、9 時間目から *VPE1a*, *VPE1b* 遺伝子の発現量が Al 処理で上昇しはじめ、*VPE2*, *VPE3* 遺伝子の発現量が Al 処理 24 時間目で上昇した．Al による細胞死の誘発が 9 時間目から見られたことから（Fig. 11）, 細胞死の誘発に *VPE1a*, *VPE1b* 遺伝子の発現上昇の関与が示唆された．

Al 処理に伴い *VPE* 遺伝子群の発現上昇とともに *VPE* 活性が上昇しているかどうか調べた（Fig. 14）．24 時間の Al 処理ののち根端 10 mm から粗酵素液を抽出して *VPE* 活性を調べたところ、Al 50 μ M でコントロールの 1.6 倍、Al 100 μ M で 1.9 倍に増加していた．先端 10 mm の *VPE* 遺伝子群の発現を調べた所、Al 50 μ M の処理によりすべての *VPE* 遺伝子の発現が上昇した．各遺伝子の増加率は次の通りである：*VPE1a*（4.1 倍）, *VPE1b*（4.1 倍）, *VPE2*（2.1 倍）, *VPE3*（2.2 倍）．

以上の結果から、Al は *VPE* 遺伝子群発現および *VPE* 酵素活性を増加させること、特に *VPE1a* および *VPE1b* 遺伝子の発現増加が細胞死の誘発と時間的に連動していることが分かった．さらに根における細胞死のメカニズムは Figure 1 に示したタバコ培養細胞 BY-2 における細胞死のメカニズムと同様であった（Fig. 15）．

(A)



(B)



Figure 6 Al の根伸長への影響

(A)タバコを Ruakura 培地 (pH 5.0) で 3 日間発芽させたのち, Ruakura 培地 (pH 4.5)に移し,異なる Al 濃度 (0-100 μM) で各々 1 週間処理した後,根長を測定した. (B)代表的な幼植物体の写真 (bar = 1 cm).

値は mean ± SEM (n ≥ 60) で示した. 統計処理は Student's t-test を使用し, コントロール処理 (Al 無添加) の根長に対する有意差検定を行なった (**p<0.01).

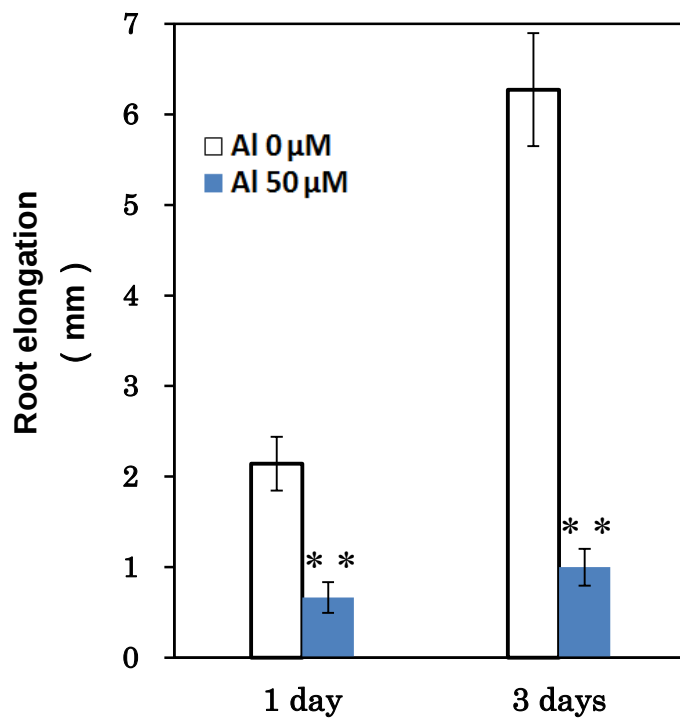


Figure 7 Al による根伸長阻害

タバコ幼植物（発芽後 5 日間程度生育し，同程度の根長を示すもの）を，Ruakura 培地（pH 4.5）に Al（50 μM）を添加もしくは無添加の条件で 1 日間もしくは 3 日間の処理を行ない，処理期間中の根伸長を求めた．

値は mean ± SEM (n ≥ 60) で示した．統計処理は Student's t-test を使用し，コントロール処理（Al 無添加）の根伸長に対する有意差検定を行なった（**p<0.01）．

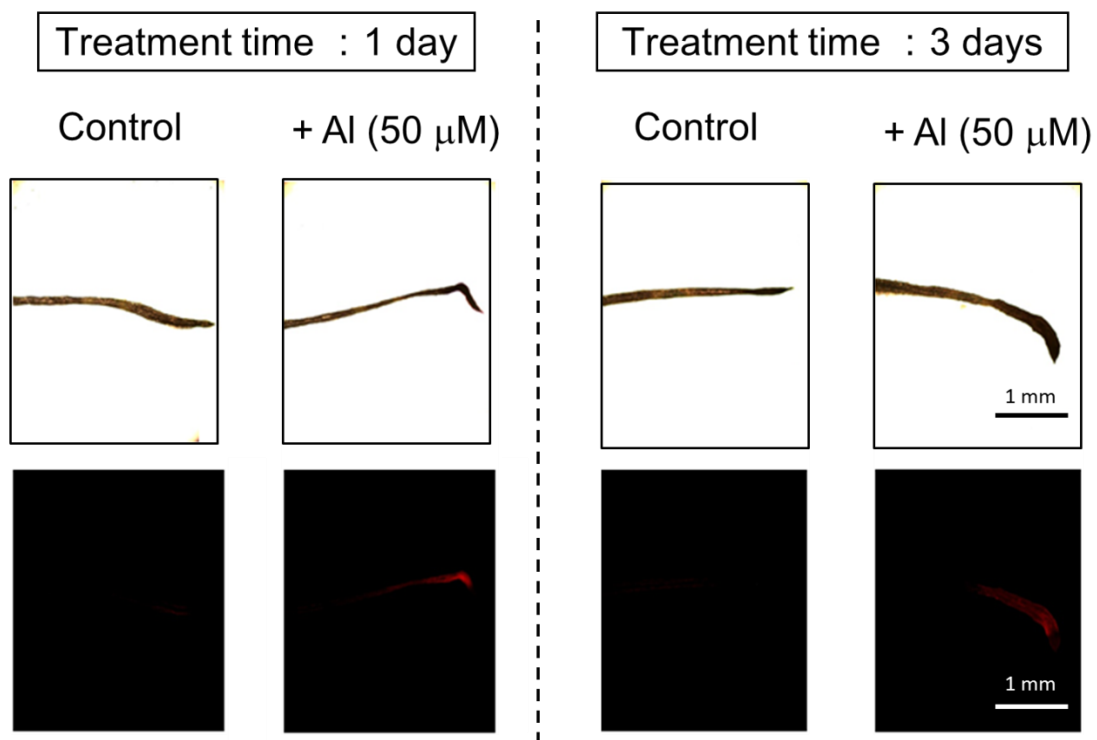


Figure 8 Al による根端における細胞死の誘発 (PI 染色)

タバコ幼植物を用いて Figure 7 と同様の Al (50 μ M) 処理を行なった後, 根端を PI 染色した. ここには, 代表的な幼植物体の写真を示す (bar = 1 mm).

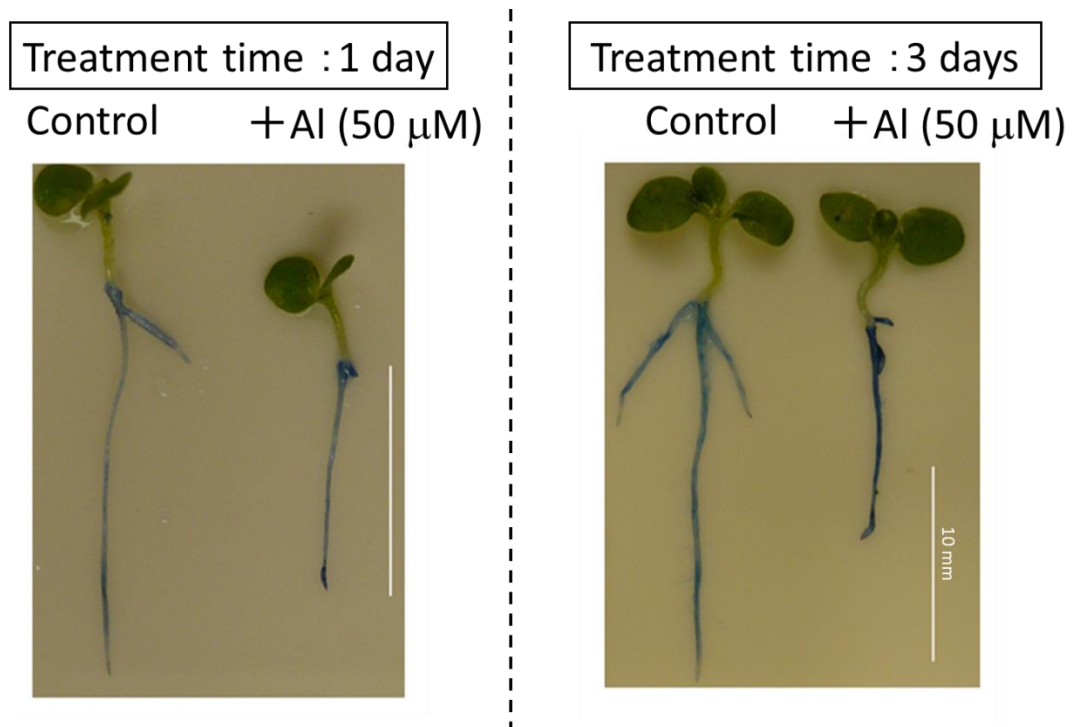


Figure 9 Al による根端における細胞死の誘発 (EB 染色)

タバコ幼植物を用いて Figure 7 と同様の Al (50 μ M) 処理を行なった後、根端を EB 染色した. ここには、代表的な幼植物体の写真を示す (bar = 10 mm).

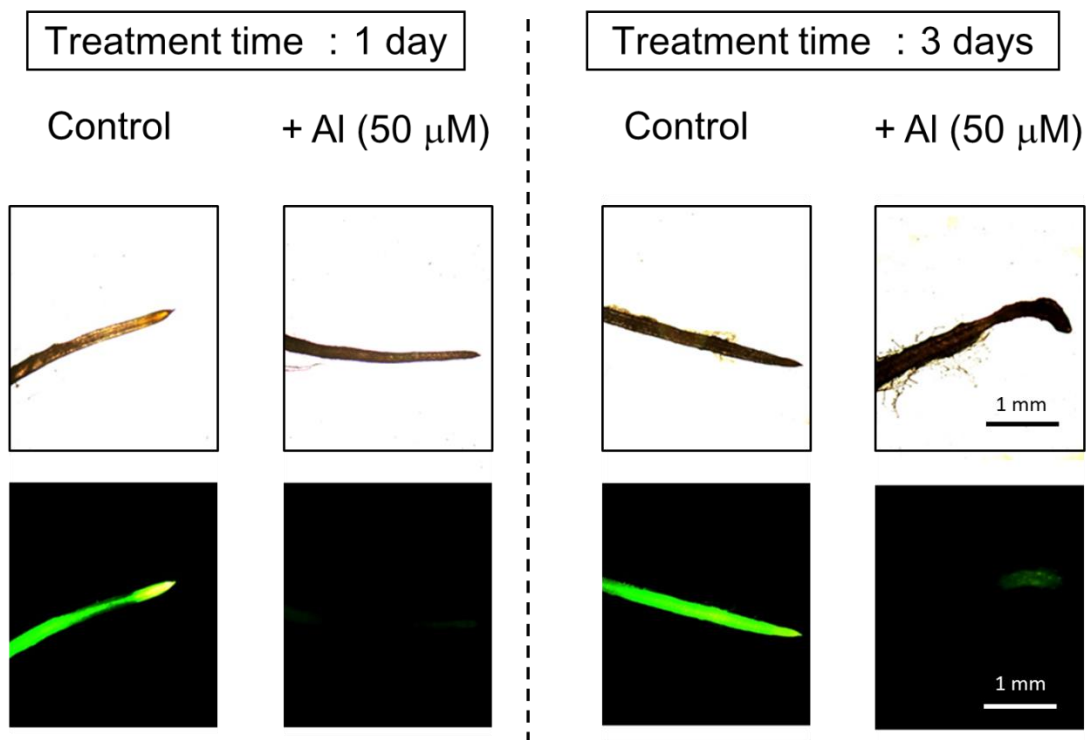


Figure 10 Al による根端における細胞死の誘発 (FDA 染色)

タバコ幼植物を用いて Figure 7 と同様の Al (50 μ M) 処理を行なった後、根端を FDA 染色し生細胞を検出した。ここには、代表的な幼植物体の写真を示す (bar = 1 mm).

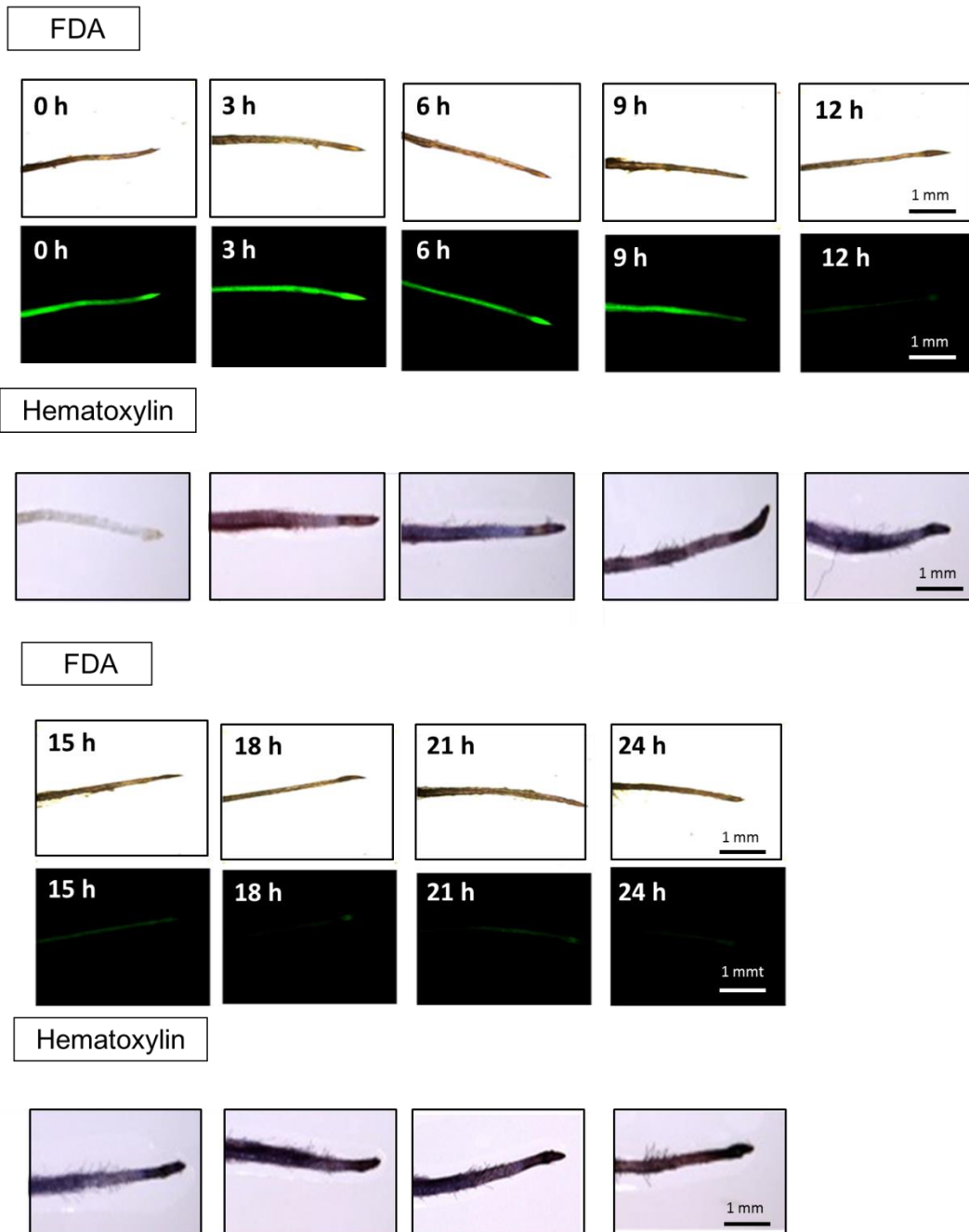
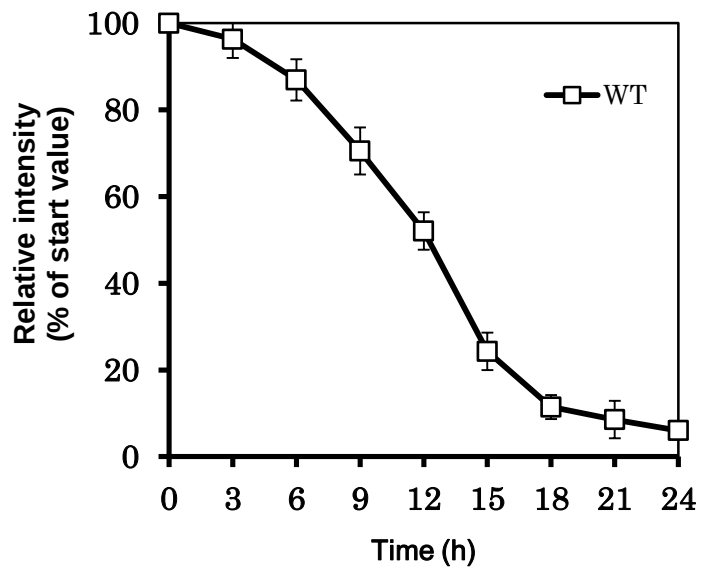


Figure 11 Al 処理期間中の根端における生細胞（FDA 染色）と Al 吸着量（ヘマトキシリン染色）の経時変化

タバコ幼植物を用いて Figure 7 と同様の Al ($50 \mu\text{M}$) 処理を 24 時間行ない、3 時間ごとに根端を FDA とヘマトキシリンで染色した。ここには、代表的な幼植物体の写真を示す (bar = 1 mm).

(A)



(B)

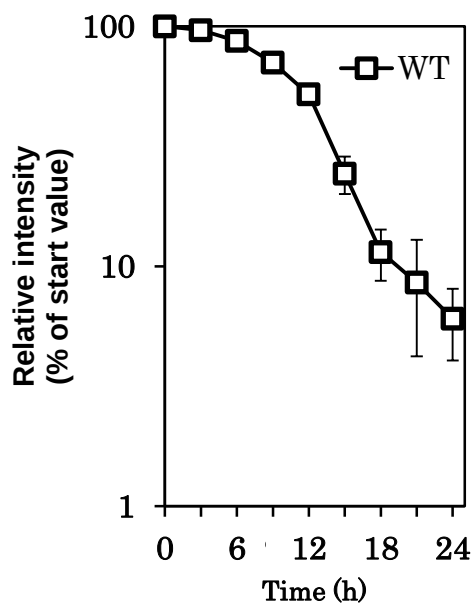


Figure 12 AI 処理期間中の根端細胞の生存率

(A) Figure 11 に示した根端 2 mm が示す FDA 染色による蛍光量をイメージ J を用いて解析した. 処理開始 (0 時間) の蛍光量を 100% として示した. (B) (A) を片対数グラフで表示した. 値は mean $\pm$ SEM ($n \geq 15$) で示した.

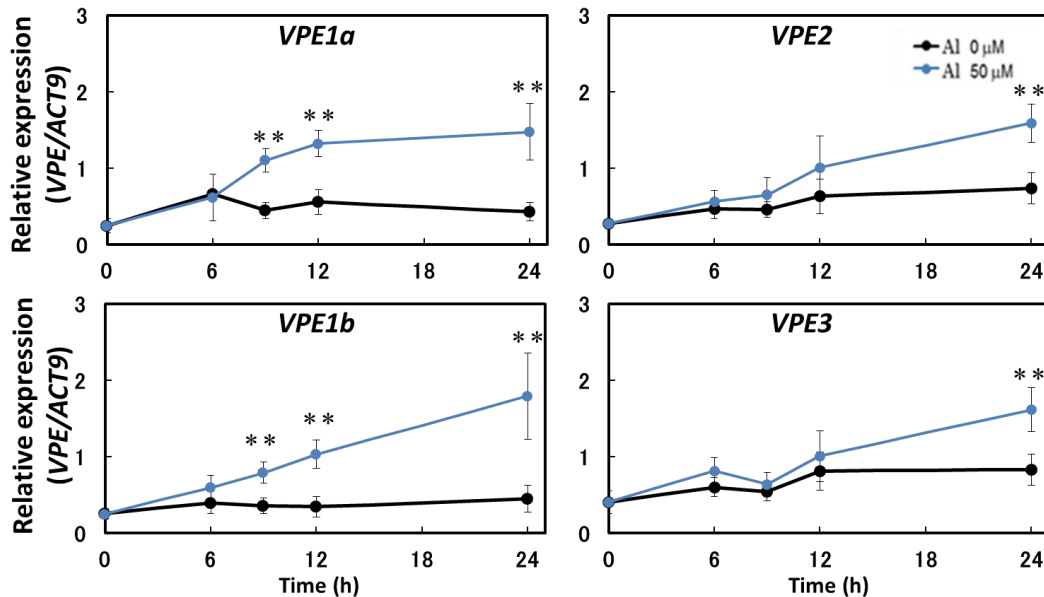
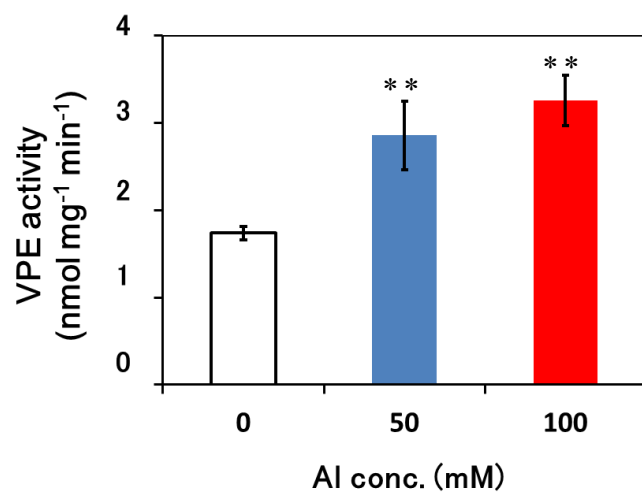


Figure 13 Al 処理期間中の *VPE* 遺伝子の発現解析

タバコ幼植物を用いて Figure 7 と同様の Al (50 μ M) 処理を 24 時間行ない、根端 5 mm より RNA を抽出し、0, 6, 9, 12, 24 時間目の *VPE* 遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR で調べた。 *VPE* 遺伝子の発現量は *Actin9* 遺伝子の発現量に対する相対値として表示した。値は mean $\pm$ SEM(n = 3)で示した。統計処理は Student's t-test を使用し、コントロール処理 (Al 無添加) の *NtSUT* 遺伝子群に対する有意差検定を行なった (**p<0.01)。

(A)



(B)

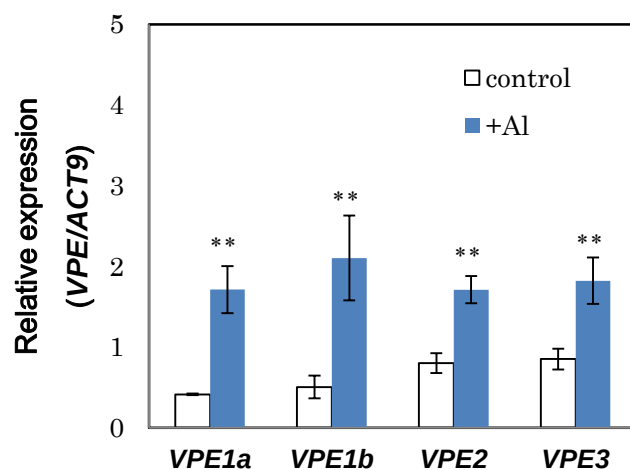


Figure 14 Al の根端における VPE 活性および *VPE* 遺伝子群の発現解析

タバコ幼植物を用いて Figure 7 と同様の Al (50, 100 μ M) 処理を 24 時間行ない、根端 10 mm より粗酵素と RNA を抽出し、VPE 活性 (A) と *VPE* 遺伝子群 (B) の発現量を調べた。VPE 遺伝子群の発現解析は Figure 13 と同様のリアルタイム RT-PCR で行なった。値は mean $\pm$ SEM (n = 3) で示した。統計処理は Student's t-test を使用し、コントロール処理(Al 無添加)の値に対する Al 処理の値について有意差検定を行なった (**p<0.01)。

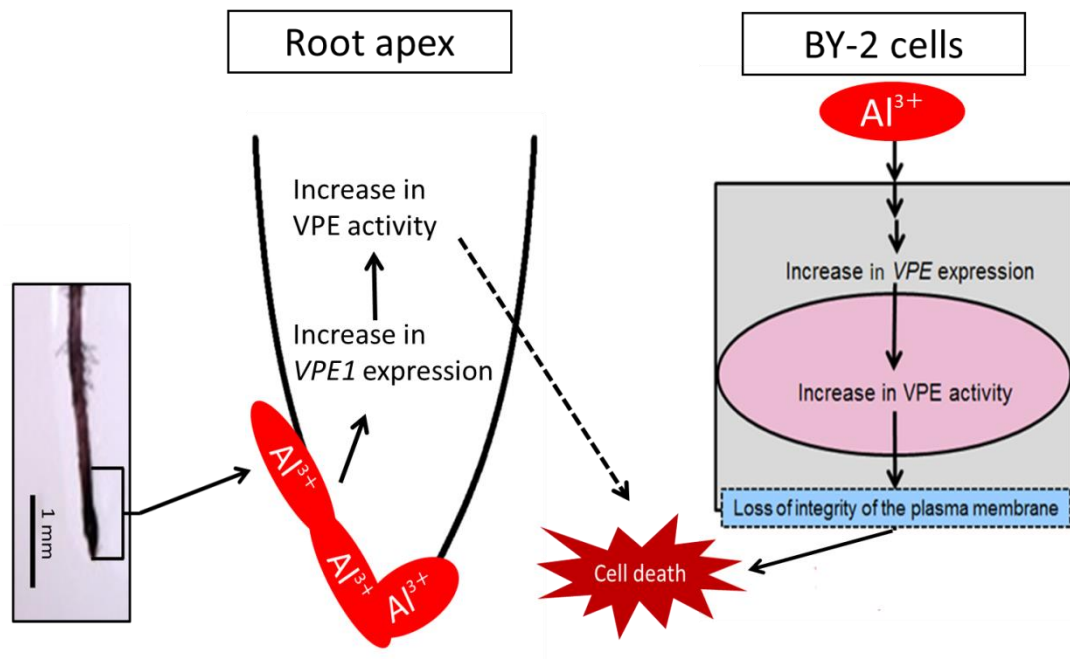


Figure 15 タバコ Bright Yellow とタバコ培養細胞系統 BY-2 の Al による細胞死誘発経路のモデル図

Figure 7, 11, 12, 13, 14 の解析結果に基づき，タバコ幼植物体の根における Al による細胞死誘発過程は，次のように進行すると考えられる．①Al の根の吸着② *VPE1* 遺伝子の発現上昇③VPE 活性の上昇④細胞死．これは Figure 1 に示したタバコ培養細胞 BY-2 の細胞死経路と同様の結果である．

第3章 タバコ培養細胞を用いた *VPE* 遺伝子発現抑制システムの作製と解析

第1節 概要

以前の研究(Kariya et al., 2013)および第2章での研究によって、タバコ培養細胞系統 BY-2 およびタバコ品種 Bright Yellow において、Al による細胞死の誘発機構に *VPE* 遺伝子の普遍的な関与が示唆された。これを BY-2 細胞で直接的に証明するために、*VPE* 遺伝子の発現抑制タバコ細胞系統を作製し、Al に対する応答反応を野生系統と比較解析した。なお、*VPE1a* と *VPE1b* は、分子系統樹解析の Figure 3 で示されたように遺伝子的に相動性が非常に高く、この特性に基づき本研究では、両遺伝子の発現を同時に抑制することが出来た。

第2節 材料・方法

培養条件

タバコ(*Nicotiana tabacum* L.)の品種 Bright Yellow から樹立された培養細胞系統 BY-2 を用いた。細胞の培養は、Murashige-Skoog 培地を改変した改変 MS 培地(pH 5.0, Table 3)に懸濁したものをコニカルフラスコを用い、25℃の暗所で、100 rpm で振とう培養することにより行なった(Yamamoto et al., 2004)。細胞の継代は7日毎に行ない、7日目の細胞培養液 1 mL を改変 MS 培地(pH 5.0)30 mL に再懸濁した。

VPE 発現抑制 (RNAi) システムの作製

タバコ培養細胞系統 BY-2 から *VPE* 発現抑制 (RNAi) 形質転換体作製のため、Table 4 のプライマーを使用し、RT-PCR により *VPE1*, *VPE2*, *VPE3* の遺伝子断片をそれぞれ増幅した。その後、アガロースゲル電気泳動により PCR 断片を分離し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (TaKaRa)を使用して *VPE* 遺伝子群(約 800 bp)断片を回収した。そ

して, *Eco* R I で切断した Gateway エントリーベクター pENTR 3C (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) に各遺伝子断片を, In-Fusion HD Cloning Kit(TaKaRa)を使用して連結した. このエントリープラスミドから *VPE* 遺伝子断片を遺伝子発現抑制用 RNAi バイナリープラスミド, pBI-sense-antisense-GW (Inplanta Innovations, Kanagawa, Japan) に Gateway LR Clonase II 酵素ミックス (ThermoFisher Scientific) を用いることで組み込んだ. このプラスミドを, アグロバクテリウム EHA105 (Hood et al., 1993)を用いて, タバコ培養細胞株 BY-2 に感染させた. 形質転換された細胞は, 200 mg L⁻¹ カナマイシンおよび 500 mg L⁻¹ カルベニシリンを含む寒天改変 MS 培地プレート上で選別し, 50 mg L⁻¹ カナマイシンおよび 50mg L⁻¹ カルベニシリンを含む寒天改変 MS 培地プレートで維持した (Sasaki et al., 2004). 全てのプラスミド構築物は, シークエンス法(ABI 3130xl or ABI 3100 sequencers, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)によって検証した.

Al 処理

根の Al 処理はカルシウム溶液を使用することが多い. そこで, タバコ培養細胞の Al 処理もカルシウム溶液 (3 mM CaCl₂) をベースにしたカルシウム-スクロース-MES (CSM) 液 (3 mM CaCl₂, 3% sucrose, 20 mM MES-BTB, pH 5.0) を用いて行なった. ただし, タバコ細胞は, 根と異なり地上部からのスクロースの供給がないことから, 培地にスクロース(3% sucrose)を供給した. さらに, Al のイオン形態が pH に依存することから 20 mM MES-BTB を用いて pH 5.0 に固定した (Abdel-Basset et al., 2010; Ikegawa et al., 2000). 蒸留水で 10 mM AlCl₃ を調製し, フィルター (Syringe filter, Φ15 mm, pore size 20 μm, Corning, Germany) に通して除菌した. 対数増殖期の細胞を含む培養液を遠心管に分取し, 2,000 rpm で 3 分間遠心した後, 細胞を回収し, 上清を取り除いた. 細胞を洗浄するためにカルシウム-スクロース (CS) 液 (3 mM CaCl₂, 3%

Sucrose; HCl で pH 5.0 に調整) を 10 mL 加えて軽く懸濁し, 2,000 rpm で 3 分遠心した. これを繰り返し, 改変 MS 培地を完全に取り除いたのち, 細胞密度を 10 mg FW mL⁻¹となるように CSM 液(pH 5.0)に再懸濁したものをコニカルフラスコに入れた. その際, 通常, 100 mL のコニカルフラスコに対して細胞液を 30 mL とした. 次に, AlCl₃ を添加し, 25°C の暗所, 100 rpm で振とう培養した. この時, AlCl₃ を添加しないものをコントロール処理とし, 同様に振とう培養をした. 一定時間の培養後, Al 処理細胞, コントロール処理細胞を用いて, 下記の Al 応答反応を調べた.

リアルタイム RT-PCR

詳しい方法は第 2 章・第 2 節のリアルタイム RT-PCR に記載した通りに行なった. なお, 細胞の洗浄には上記の CS 液を使用した.

VPE 活性測定

詳しい方法は第 2 章・第 2 節の根の VPE 活性測定に記載した通りに行なった. なお, 細胞の洗浄には上記の CS 液を使用し, Al 処理後の細胞を 30 mL 分(Al 処理開始時 300 mg FW に相当)を回収した.

EB 染色の定量的評価

詳しい方法は第 2 章・第 2 節の根の染色方法に記載した通りに行なった. なお, 細胞の洗浄には上記の CS 液を使用し, Al 処理後の細胞を 5 mL(Al 処理開始時の 50 mg FW に相当)を回収した. 細胞に取込まれた EB を定量する場合は, 細胞を 1% SDS に懸濁し, 室温で 10 分間静置した後, 3,000 rpm で 5 分間遠心し, 上清を回収した. 上清中の EB 濃度を分光光度計(model UV-1600, Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いて 600 nm で測定した.

Salt	Concentration
KNO ₃	18.8 mM
NH ₄ NO ₃	20.6 mM
KH ₂ PO ₄	1.25 mM
CaCl ₂ •2H ₂ O	3.0 mM
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.5 mM
MnSO ₄ •5H ₂ O	92 μM
H ₃ BO ₃	100 μM
ZnSO ₄ •7H ₂ O	30 μM
KI	5 μM
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	1 μM
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.1 μM
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.1 μM
Na ₂ •EDTA	100 μM
FeSO ₄ •7H ₂ O	92 μM
myo-Inositol	550 μM
Thiamin Hydrochloride	30 μM
Pyridoxine Hydrochloride	4.8 μM
Nicotinic acid	8 μM
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	1.5 μM

Table 3 改変 MS 培地の組成 (Yamamoto et al., 2004)

RNAi line	Primer set
RNAi- <i>VPE1</i>	Forward primer 5'-ATCCGGTACCGAATTAGAGAGCCGTAATGTTTTGAAACTT-3' Reverse primer 5'-GTGCGGCCGCGAATTCCTCCATCCAGGAAATACTGTACAA-3'
RNAi- <i>VPE2</i>	Forward primer 5'-ATCCGGTACCGAATTCCTTTACATTGAGGCTTGTGAATCT-3' Reverse primer 5'-GTGCGGCCGCGAATTTCTGCTCCATTGTTATACAAGAGTT-3'
RNAi- <i>VPE3</i>	Forward primer 5'-ATCCGGTACCGAATTTTACCCTTTTAAATTACTCCGTACC-3' Reverse primer 5'-GTGCGGCCGCGAATTCAGGAAACAGCATACAAGTCACCCA-3'

Table 4 *VPE* 遺伝子群の RNAi 系統作製時に使用したプライマーセット

第3節 結果・考察

BY-2 細胞を野生系統 (WT) として, *VPE* 遺伝子群の発現抑制系統 (RNAi) を作出した. *VPE1a* と *VPE1b* はタバコの複二媒体による相同遺伝子オルソログであると考えられ, 遺伝子配列の 95% と高い相同性を示す. そのため, 両方を同時に抑制する系統を作出した. 各 *VPE* 遺伝子の RNAi 系統を各々 3 系統ずつ独立に作出し, それらを用いて AI 50 μ M 処理 24 時間に伴う発現誘導の程度を比較した (Fig. 16, 17, 18). WT ではすべての *VPE* 遺伝子が AI により発現が上昇した. 一方, *VPE1* 遺伝子 RNAi 系統は AI の有無にかかわらず, *VPE1* 遺伝子の発現が抑制されおり, *VPE2*, *VPE3* 遺伝子の発現は WT と同程度であった. 同様に *VPE2* および *VPE3* の RNAi 系統も, 各々抑制した遺伝子のみの発現が AI の有無にかかわらず抑制されていた. 以上の結果より, *VPE1a*, *VPE1b*, *VPE2*, *VPE3* 遺伝子の RNAi 抑制系統は当該遺伝子のみが抑制されていた. すなわち, 目的 *VPE* 遺伝子の抑制は他の *VPE* 発現には影響しないことが確認された.

次に WT と *VPE* 遺伝子の RNAi 系統を用いて, VPE 活性に対する AI の影響を調べた (Fig. 19). まず AI 無添加での VPE 活性は RNAi 系統間で差がなかった. AI 50 μ M 添加により WT 無添加時よりも VPE 活性が 1.9 倍に増加した. この増加が *VPE1* 遺伝子の RNAi 系統では大きく抑制され AI 処理で 1.2-1.3 倍の増加しか見られなかった. *VPE2* 遺伝子および *VPE3* 遺伝子の RNAi 抑制系統では AI 処理による活性の上昇は WT と同程度に見られた.

次に, AI 処理にともなう細胞死の誘発程度を EB の取り込み量で比較した (Fig. 20). この場合も, AI 無添加での EB の取込み量は WT と RNAi 系統間で差がなかった. AI 50 μ M 添加により WT では無添加時の 1.8 倍に EB 取込み量が増加し, *VPE2* 遺伝子および *VPE3* 遺伝子の RNAi 抑制系統でも AI 添加により 1.7 倍と WT と同程度に上昇したが, *VPE1* 遺伝子の RNAi 抑制系統では AI 添加による上昇は 1.1-1.2 倍程度と著しく抑制されていた.

これらの結果より, AI によって *VPE1a*, *VPE1b*, *VPE2*, *VPE3* 遺伝子すべての発現が上昇するものの, VPE 活性の上昇と細胞死の誘導は, とともに主として *VPE1a*, *VPE1b*, 遺伝子によることが明らかになった.

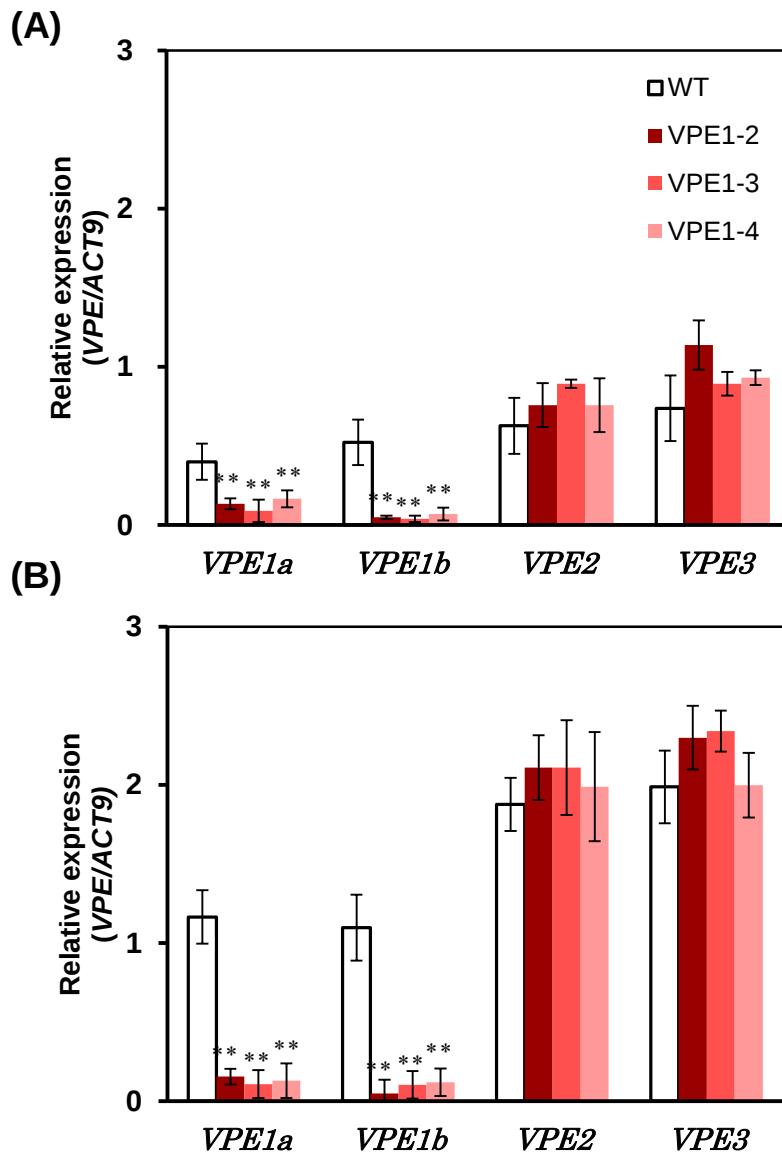


Figure 16 タバコ培養細胞の *VPE1* 遺伝子発現抑制系統における *VPE* 遺伝子群の発現に対する AI の影響

タバコ培養細胞系統の WT と *VPE1* の RNAi 系統 (2, 3, 4) を, AI (50 μ M) を添加 (A) もしくは無添加 (B) で 24 時間処理後の細胞から RNA を抽出し, リアルタイム RT-PCR 法で *VPE* 遺伝子群の発現解析を行なった. *VPE* 遺伝子の発現量は *Actin9* 遺伝子の発現量に対する相対値として表示した. 値は mean $\pm$ SEM (n = 3) で示した. 統計処理は Student's t-test を使用し, WT の値に対する各系統の値について有意差検定を行なった (**p < 0.01).

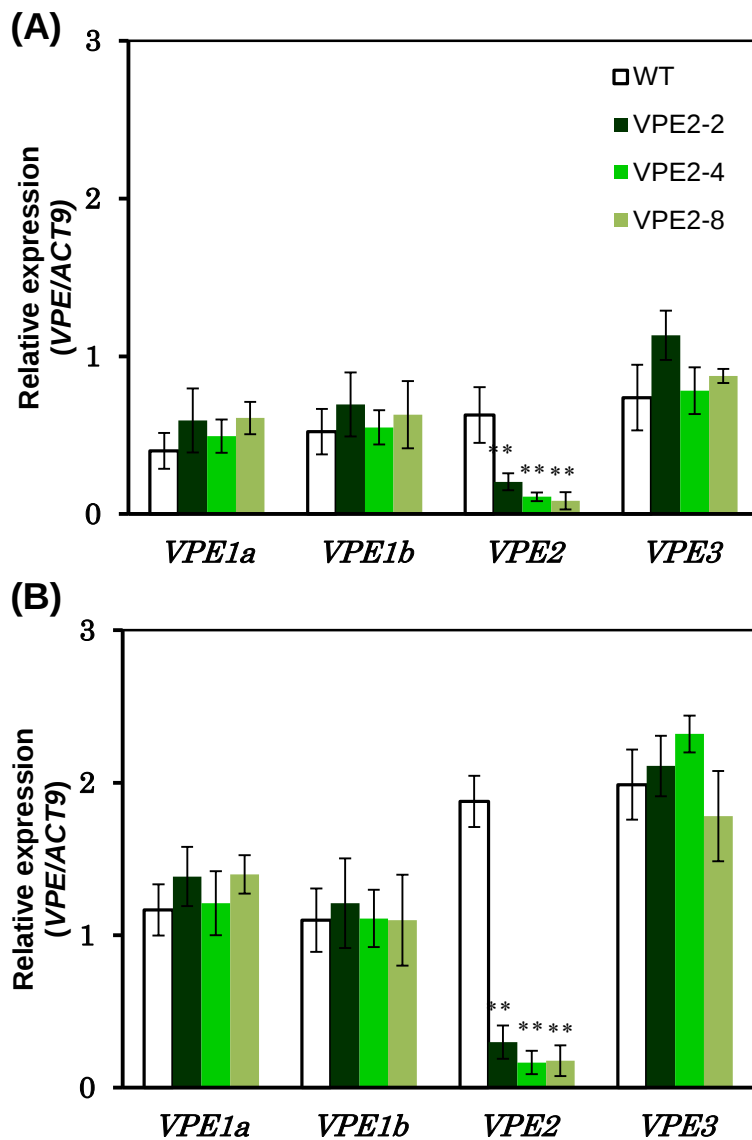


Figure 17 タバコ培養細胞の *VPE2* 遺伝子発現抑制系統における *VPE* 遺伝子群の発現に対する Al の影響

タバコ培養細胞系統の WT と *VPE1* の RNAi 系統 (2, 4, 8) を, Figure 16 と同様の条件で Al (50 μM) を添加 (A) もしくは無添加 (B) 条件で処理後, *VPE* 遺伝子群の発現解析を行なった. *VPE* 遺伝子の発現量は *Actin9* 遺伝子の発現量に対する相対値として表示した. 値は mean ± SEM (n = 3) で示した. 統計処理は Student's t-test を使用し, WT の値に対する各系統の値について有意差検定を行なった (**p < 0.01).

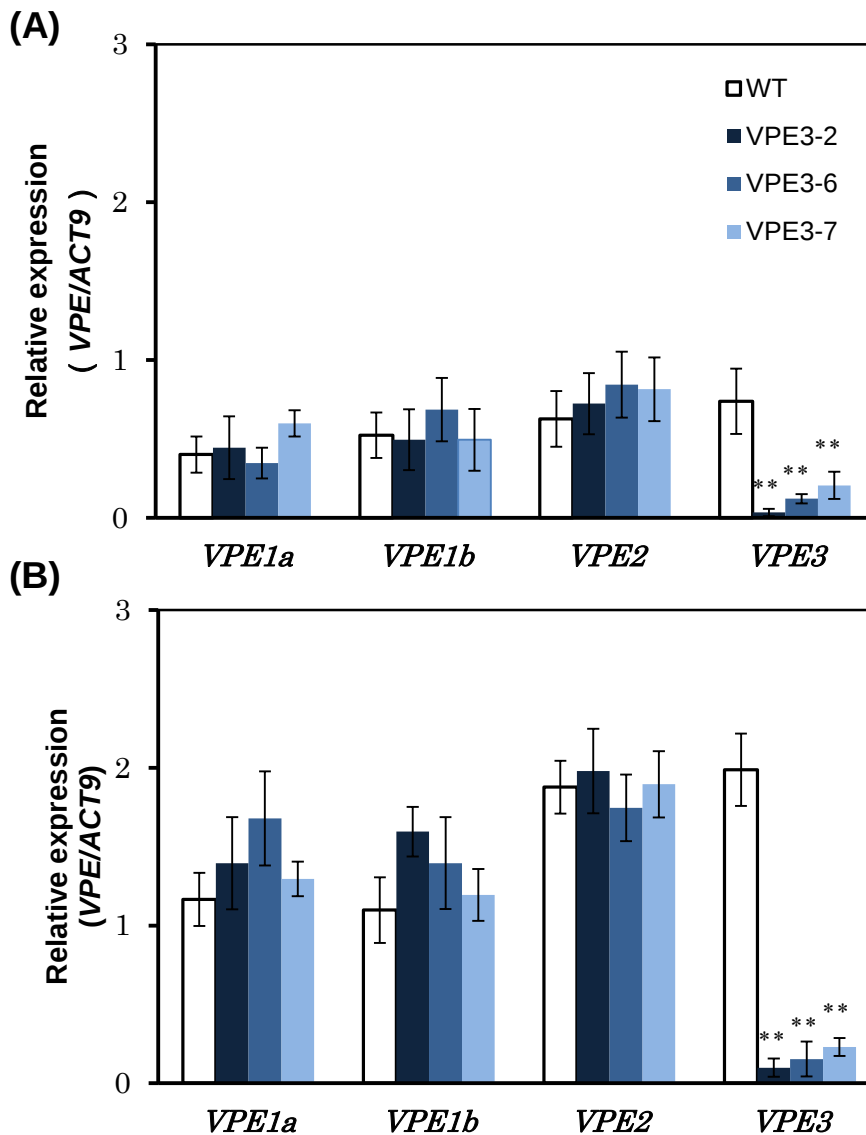


Figure 18 タバコ培養細胞の *VPE3* 遺伝子発現抑制系統における *VPE* 遺伝子群の発現に対する Al の影響

タバコ培養細胞系統の WT と *VPE1* の RNAi 系統 (2, 6, 7) を, Figure 16 と同様の条件で Al (50 μ M) を添加 (A) もしくは無添加 (B) 条件で処理後, *VPE* 遺伝子群の発現解析を行なった. *VPE* 遺伝子の発現量は *Actin9* 遺伝子の発現量に対する相対値として表示した. 値は mean $\pm$ SEM (n = 3) で示した. 統計処理は Student's t-test を使用し, WT の値に対する各系統の値について有意差検定を行なった (**p < 0.01).

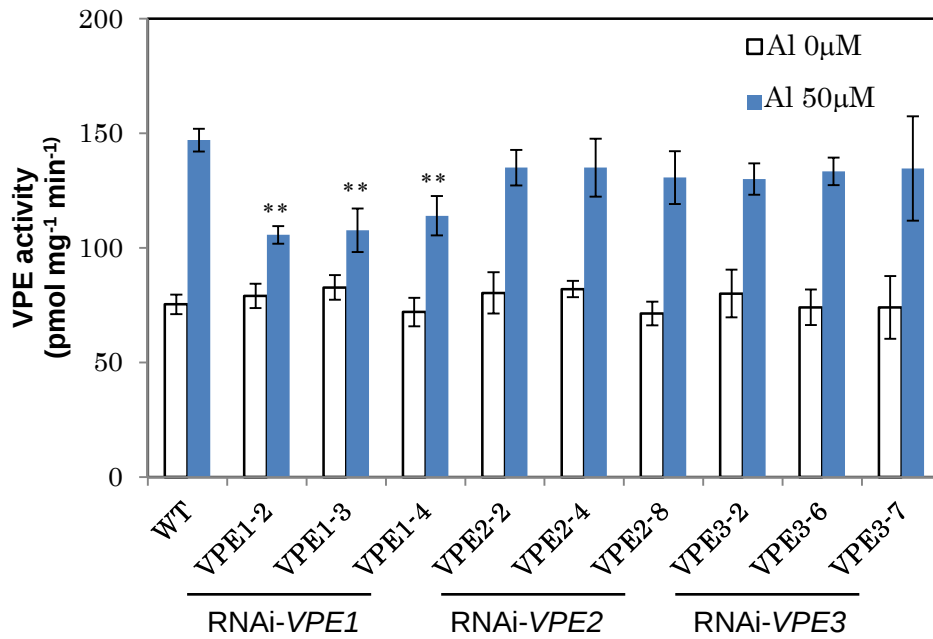


Figure 19 タバコ培養細胞の *VPE* 遺伝子群の発現抑制系統における *VPE* 活性に対する Al の影響

Figure 16, 17, 18 に示したタバコ培養細胞系統を用いて, Figure 16 と同様の Al 処理を 24 時間行ない, 粗酵素液を調製し *VPE* 活性を測定した. 値は mean $\pm$ SEM ($n = 3$) で示した. 統計処理は Student's t-test を使用し, WT の Al 処理の値に対する各系統の Al 処理の値について有意差検定を行なった (** $p < 0.01$).

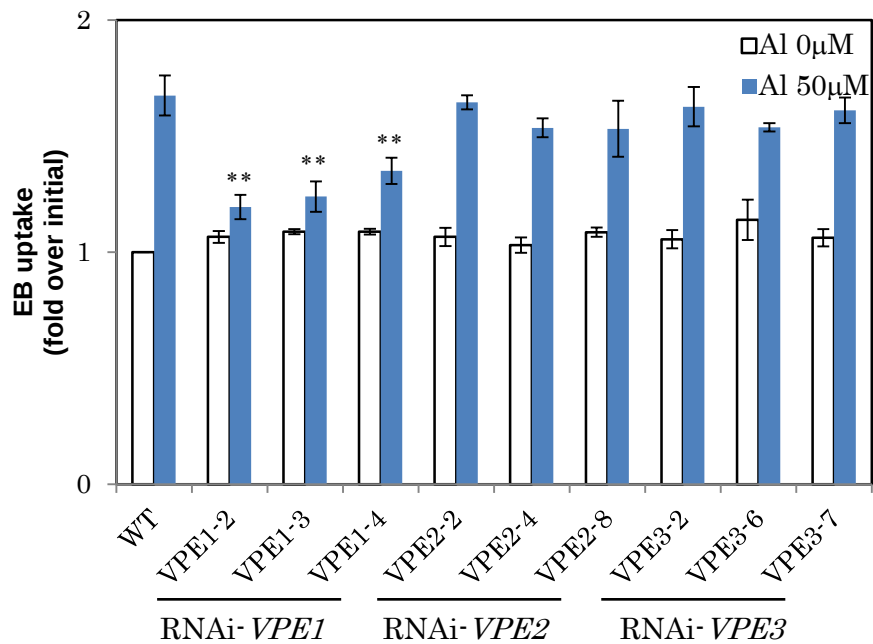


Figure 20 タバコ培養細胞の *VPE* 遺伝子群の発現抑制系統における Al が誘発する細胞死の定量的評価

Figure 16, 17, 18 に示したタバコ培養細胞系統を用いて, Figure 16 と同様の Al 処理を 24 時間行なった後に EB 染色を行い細胞に取込まれた EB 量を定量した. 値は mean $\pm$ SEM (n = 3) で示した. 統計処理は Student's t-test を使用し, WT の Al 処理の値に対する各系統の Al 処理の値について有意差検定を行なった (**p<0.01).

第4章 アルミニウムによる根伸長阻害における *NtSUT1* 遺伝子の関わり

第1節 概要

細胞の伸長には水の吸収が必要であり、水の吸収には液胞中にスクロースや無機イオン等の浸透圧調節物質を蓄積する必要がある (Abdel-Basset et al., 2010) (Fig. 21) . 根は光合成を行なわないことから、根の生育に必要なスクロースは、地上部で合成されたスクロースが篩管を通して根端まで輸送され、その後は主としてシンプラスト経由もしくはアポプラスト経由で細胞へ供給される。アポプラスト経由では、細胞膜に局在するスクロース輸送体を通して細胞内に取り込まれる。(Fig. 22) .これまでに、BY-2 細胞を用いた解析から、Al により NtSUT1 輸送活性が阻害され *NtSUT1* 遺伝子の発現も抑制されること、さらに *NtSUT1* の過剰発現によって Al 処理後の増殖が促進されることが報告されていた (Sameeullah et al., 2013) . そこで本研究では、Al による根伸長阻害における *NtSUT1* 遺伝子の関わりを解析した。また、根端においてスクロースがアポプラスト経由で細胞へ供給される可能性について暗所実験で検証した。暗所では光合成が阻害されるため、根の生育に必要なスクロースは、培養液中のスクロースがアポプラスト経由で SUT 1 を介して細胞内へ供給される (Fig. 23 A, B) .

第2節 材料・方法

材料と生育条件

タバコ(*Nicotiana tabacum* L.)の品種 Samsun NN の種子を用い、Figure 4 に示した通りに発芽・生育させ、Al 処理して各実験に用いた。詳しい方法は第2章・第2節の材料と生育条件に記載した通りに行なった。

リアルタイム RT-PCR

詳しい方法は第 2 章・第 2 節のリアルタイム RT-PCR に記載した通りに行なった。プライマーについては Table 5 を使用した。

NtSUT1 遺伝子の高発現系統と発現抑制系統の作出

タバコ（品種 Samsun NN）を野生系統に、*NtSUT1* の高発現系統（OX）ならびに発現抑制系統（RNAi）の作出を行なった。

根伸長測定

詳しい方法は第 2 章・第 2 節の根伸長測定に記載した通りに行なった。

糖含量の測定

タバコ幼植物体を Figure 4 の方法で発芽・成長させ、Abdel-Basset et al. (2010) の方法を参考にしてタバコ幼植物体の根端（先端より 5 mm）10 本を 250 μ L の 80%（v / v）エタノール水溶液に入れ、室温で 30 分間静置し、エタノール水溶液を回収して可溶性糖を抽出した。抽出後の根を用いて、さらに 2 回エタノール抽出を行ない 3 回分の抽出物を合わせて糖含量の測定に用いた。混合抽出物中の糖含量は、グルコースを標準として用いて、アンスロン-硫酸試薬で 100°C 7 分 30 秒間反応後に分光光度計(model UV-1600, Shimadzu, Kyoto, Japan)で 630 nm で測定した。

FDA 染色

詳しい方法は第 2 章・第 2 節の各染色方法に記載した通りに行なった。

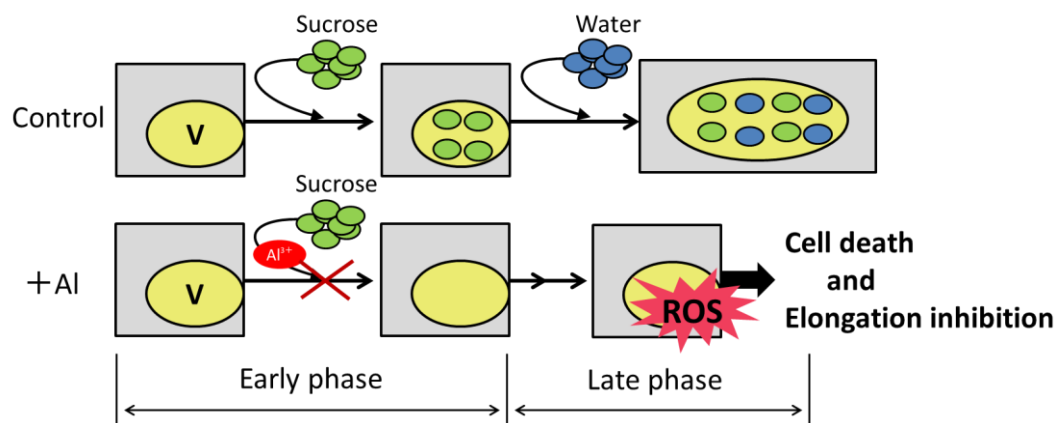


Figure 21 スクロースが関わる細胞伸長と Al による細胞伸長阻害ならびに細胞死誘発のモデル図 (Abdel-Basset et al., 2010)

タバコ細胞は細胞外からスクロースを液胞に取り込み、次いで水を取り込むことによって細胞を伸長させる. Al はスクロースの取り込みを阻害することで、水の取り込みを阻害し細胞伸長阻害に至る (Early phase). その後, ROS を発生し, 細胞死を引き起こす (Late phase) .

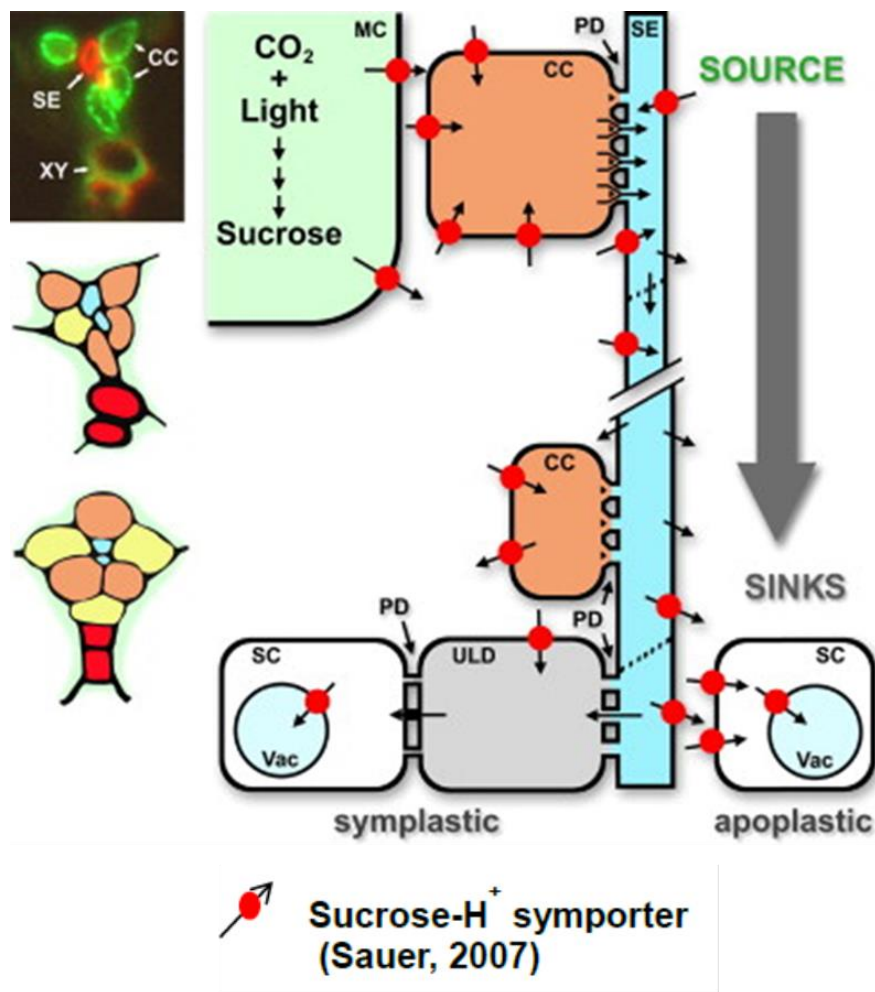


Figure 22 スクロースの細胞への供給—シンプラスト経由とアポプラスト経由
(Sauer, 2007)

根の生育に必要なスクロースは、地上部で合成されたスクロースが篩管を通して根端まで輸送されたものである。根端でのスクロースの輸送には、細胞間を移動する、シンプラスト経由と、篩管からアポプラスト（細胞壁領域）へ放出されたスクロースがスクロース輸送体を通して細胞へ取り込まれるアポプラスト経由がある。

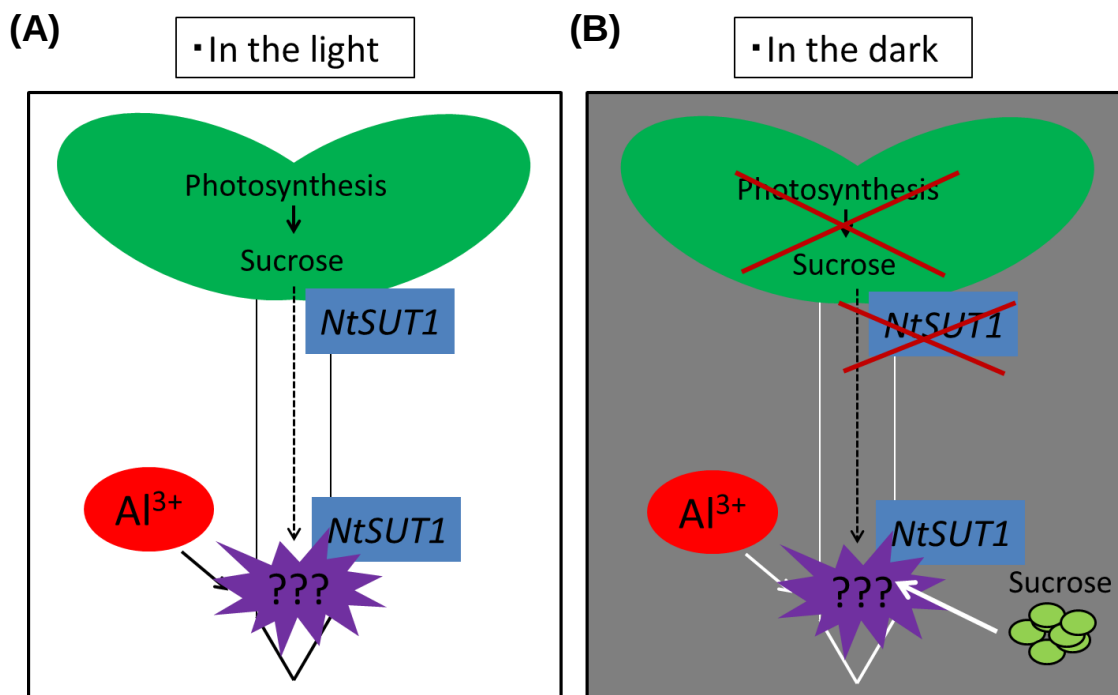


Figure 23 明所と暗所において Al による根伸長阻害におけるスクロース輸送体の関わり

本研究では, Al による根伸長阻害において, 根端で発現するスクロース輸送体 NtSUT1 の関わりを明所 (A) と暗所 (B) で解析した. 根に供給されるスクロースは, 明所では地上部で光合成されたスクロースが篩管を通して根まで運ばれ, シンプラスト経路もしくはアポプラスト経路で根端細胞に供給される. 従って, アポプラスト経路を担う NtSUT1 は, 地上部において光合成産物のスクロースを篩管に積み込むところと, 根端において篩管からアポプラストに放出されたスクロースを細胞内に取り込むところの 2 ヶ所で関与する (A). 暗所では, 光合成が停止し, 根の生育に必要なスクロースの供給源は養液のスクロースであることから, スクロースは NtSUT1 を介するアポプラスト経路で取り込まれる (B). 明所と暗所の条件で Al 処理を行い, 根伸長に対する NtSUT の機能について比較解析した.

Gene name (Accession no.)	Primer set
<i>NtSUT1-L</i> (X82276)	Forward primer 5'-CGTCTTCCTTCTACTCAGCTTAACAATCT-3' Reverse primer 5'- CCAAAAACTCCACACTTAGCGACATA-3'
<i>NtSUT3</i> (AAD34610)	Forward primer 5'-GCAAAGAGGTATATGGGGGC-3' Reverse primer 5'- GGACTGCTAGAGGAATTCCCG -3'
<i>NtSUT4</i> (BAI60050)	Forward primer 5'-AGCCTCTAGATCCCAATCATTGCTC-3' Reverse primer 5'-CACCATAAATTTCTCGACCAAACCA-3'
<i>Actin9</i> (X69885)	Forward primer 5'-CTATTCTCCGCTTTGGACTTGGCA-3' Reverse primer 5'- AGGACCTCAGGACAACGGAAACG-3'

Table 5 *SUT*遺伝子群, 内部標準遺伝子である *Actin9* のプライマーの配列
(Sameeullah et al., 2013)

第3節 結果・考察

タバコには、3つの *NtSUT* 遺伝子 (*NtSUT1*, *NtSUT3*, *NtSUT4*) が報告されている。Sameeullah et al. (2013) の研究では、3つの *NtSUT* 遺伝子の全ての発現が、対数増殖期のタバコ培養細胞 BY-2 において検出され、Al によって抑制されるのは *NtSUT1* 遺伝子のみであった。タバコ幼植物体の根端において *NtSUT3* の発現は Al の有無にかかわらず見られず、*NtSUT4* の発現量は常に見られ Al 添加ありなしで変わらなかった (Fig. 24)。BY-2 細胞と同様に、幼植物においても、*NtSUT1* 遺伝子が Al によってコントロールの 42%まで抑制された。

タバコ培養細胞 SL からクローニングされた *NtSUT1-L* 遺伝子をタバコ (Samsun NN [WT]) に導入し、得られた OX ならびに RNAi 系統の中から 2 系統の OX (OX11, OX12) と 2 系統の RNAi (RNAi42, RNAi51) を作出した。各系統における *NtSUT1* 遺伝子の発現量は WT での発現量を 1 とすると次の通りである: OX11 (7.9 倍), OX12 (5.2 倍), RNAi42 (0.05 倍), RNAi51 (0.01 倍) (Fig. 25 A)。それぞれの発芽率を調べた所、 $97 \pm 1\%$ (WT), $98 \pm 1\%$ (OX11), $99 \pm 1\%$ (OX12), $90 \pm 5\%$ (RNAi42), $91 \pm 4\%$ (RNAi51) (mean $\pm$ SEM, $n \geq 30$) であり、WT や OX に比較して RNAi の発芽がわずかに悪かった。根端 (先端 5 mm) より遊離糖を抽出し、糖含量を、グルコース溶液を標準として測定し比較した (Fig. 25 B)。WT の値を 100% とすると、OX で 126-129%, RNAi で 64-66% であり、WT に比べて根端の糖含量は OX 系統では高く、RNAi 系統では低かった。

WT, OX および RNAi 系統のタバコ幼植物体を異なる Al 濃度 (0, 25, 50 μ M) で 3 日間処理し、根伸長を比較した (Fig. 26 A)。コントロール処理 (Al 0 μ M) で WT の根と比較して、OX 系統はわずかに長く、逆に RNAi 系統は WT の 75% (RNAi51), 76% (RNAi42) と有意に短く、根伸長速度の低下がみられた。Al (25, 50 μ M) 処理 3 日後の根伸長は、全ての系統でコントロール処理よりも抑制されていたが根長は OX > WT

>RNAi という順であった。AI による根伸長阻害の程度を直接比較するために、各系統のコントロール処理の根伸長に対する AI 処理の根伸長を相対値 (%) で表示し比較したところ (Fig. 26 B) , WT と比較して OX 系統は有意に長く, RNAi 系統は有意に低い値を示した。これらの結果は, *NtSUT1* 遺伝子の発現が多いほど AI ストレス条件下での根の生育に対して正の効果を及ぼし, *NtSUT1* 遺伝子の過剰発現により, AI による根伸長阻害効果に対して耐性を獲得していると考えられた。

AI による根の伸長阻害の原因を調べるため、細胞死のマーカーとして、細胞膜の選択的透過性の喪失に着眼し、FDA 染色により比較した (Fig. 27) 。 AI 無添加もしくは AI 50 μ M 添加で 24 時間までの処理を行ない、AI 添加後 0, 9, 12, 24 時間目に根端を FDA で染色し、蛍光顕微鏡下で根端を観察した (Fig. 27) 。 AI が無添加の場合、蛍光強度はすべての系統で 24 時間の処理期間中、常に一定に維持された。一方、AI 50 μ M 添加では、9 時間目以降蛍光の減衰がみられたが、OX>WT>RNAi の順に高い蛍光を維持した。

AI 処理期間中の根端細胞の生存率を比較するために、根端 1 mm の蛍光強度をイメージ J で定量した (Fig. 28 A, B) 。 WT, OX および RNAi 系統について、蛍光強度をそれぞれ求めたところ、FDA の蛍光の減衰パターンは 2 段階あり、1 段階目は処理開始時の 100% から 6-9 時間目の約 80% の蛍光量までのゆっくりとした減衰、2 段階目は 9 時間目以降 24 時間目までの急激な減衰であった。各系統の 80% までの蛍光減衰に至る AI 処理時間は、WT および RNAi 系統で AI 処理開始後約 6 時間まで、OX 系統では AI 処理開始後 9 時間目であった。この結果からも、OX は AI 耐性を持つと考えられる。1 段階目の 80% 蛍光強度に相当する AI 処理時間は WT で 6.6 時間、OX12 で 8.2 時間、OX11 で 9.4 時間、RNAi51 で 5.3 時間、RNAi42 で 5.6 時間であり、RNAi>WT>OX の順で AI による細胞死の誘発開始の時期が早いと考えられた。AI で 24 時間処理した後、根端の蛍光強度はすべての系統において初期値の 10% 未満であったが、OX11 (7.3%) ,

OX12 (8.1%) > WT (5.2%) > RNAi51 (3.2%) , RNAi42 (2.3%) を示した. これらの結果から, AI が誘導する細胞死に対して, OX 系統は WT よりも耐性があり, RNAi 系統は感受性であることが示された.

タバコ幼植物を AI 無添加もしくは AI 50 μ M 添加で 24 時間処理した後の根端糖含量を AI 処理の開始前 (Initial) と比較した所, 糖含量に大きな差はなかった (Fig. 29) . 糖含量はいずれの処理条件においても OX12 > WT > RNAi51 の順に高かった.

NtSUT1 遺伝子は, 地上部の葉肉細胞で作られたスクロースがアポプラスト排出されたのち篩管の判細胞内に取り込まれる部分で機能している (Sauer N., 2007) . また, 根端においても, 篩管からアポプラストに放出されたスクロースの根端細胞への取り込みに *NtSUT1* 遺伝子の機能の関わりが予測される. そこで, このたび *NtSUT1* 遺伝子の WT, OX, RNAi 系統間でみられた AI による根伸長阻害率の違いに, 根端で発現する *NtSUT1* が関与しているかどうかを検討するのに, 地上部で発現している *NtSUT1* 遺伝子の影響を無くすために, 光合成を抑制する暗所で実験を行なった (Fig. 23) .

暗所では, WT の根伸長は完全に阻止されるが, 培地へのスクロースの添加により, 暗所でも根伸長が回復することが当研究室でわかっていた (Fig. 30) . 根伸長に最適なスクロース濃度は 50 mM であったことから, 培地に 50 mM スクロースを添加した暗所で AI 処理を行ない根端の *NtSUT1* 遺伝子の機能を解析した.

根端における *NtSUT1* 遺伝子の機能を明らかにするために, 暗所で処理することによりアポプラスト経由を介して外因的に供給されたスクロースの取り込みに対する *NtSUT1* 遺伝子の機能と AI の阻害効果を調べた (Fig. 31) . 暗所に AI 無添加もしくは AI 50 μ M 添加でスクロースを含む Ruakura 培地 (pH 4.5) に WT, OX11, RNAi51 を 3 日間 AI 処理した後, 糖含量と根伸長を比較した (Fig. 31 A, B) . AI を添加しない場合, WT および OX11 の糖含量は, Initial と同様の数値だったが, RNAi51 は Initial の 50% まで低下した. RNAi の遊離糖の含量は, WT と比較するとわずかに 28% であっ

た. 暗所 3 日間の Al 処理後根伸長は, WT および OX11 において同様であったが, RNAi では WT の 22% まで減少した. これらの結果は, *NtSUT1* 遺伝子の機能が根端における外因性スクロースの取り込みにおいて主要な役割を果たし, *NtSUT1* 遺伝子によって制御される糖含量の増加が根の成長の決定因子であることが示唆された. Al を添加し 3 日間処理した後の遊離糖の含量はそれぞれ Initial の 49% (WT) , 79% (OX11) , および 33% (RNAi51) まで減少した. 根伸長も全ての系統において有意に低下したが OX11 > WT であり, OX は WT よりも Al に耐性が高いことが示唆された. RNAi の根伸長は暗所で強く阻害され, さらに Al によってほとんど伸長しないくらいまで抑制された. 根伸長と根端における遊離糖含量の相関図により (Fig.31 C) , 根端におけるアポプラスト経路を介したスクロース取り込みによる遊離糖含量が根伸長を制御する主要な因子であることを示している.

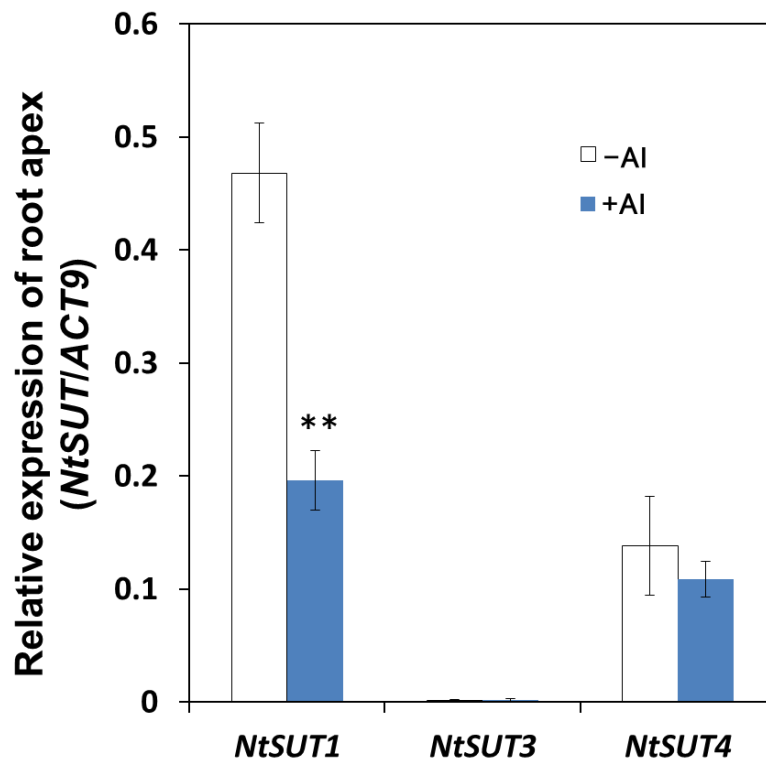


Figure 24 タバコの根端における *NtSUT1*, *NtSUT3* および *NtSUT4* 遺伝子発現に対する Al の影響

タバコを Al 無添加もしくは Al 50 μ M 添加で 24 時間処理した後、根端(先端 5 mm)より RNA を抽出し、*NtSUT* 遺伝子群と *Actin9* 遺伝子の発現量を各々測定した。*SUT* 遺伝子群の発現量は、*Actin9* 遺伝子の発現量に対する相対値として表示した。値は mean $\pm$ SEM (n = 3) で示した。統計処理は Student's t-test を使用し、各々の遺伝子についてコントロール処理の発現量に対する Al 処理の発現量について有意差検定を行った (**p < 0.01)。

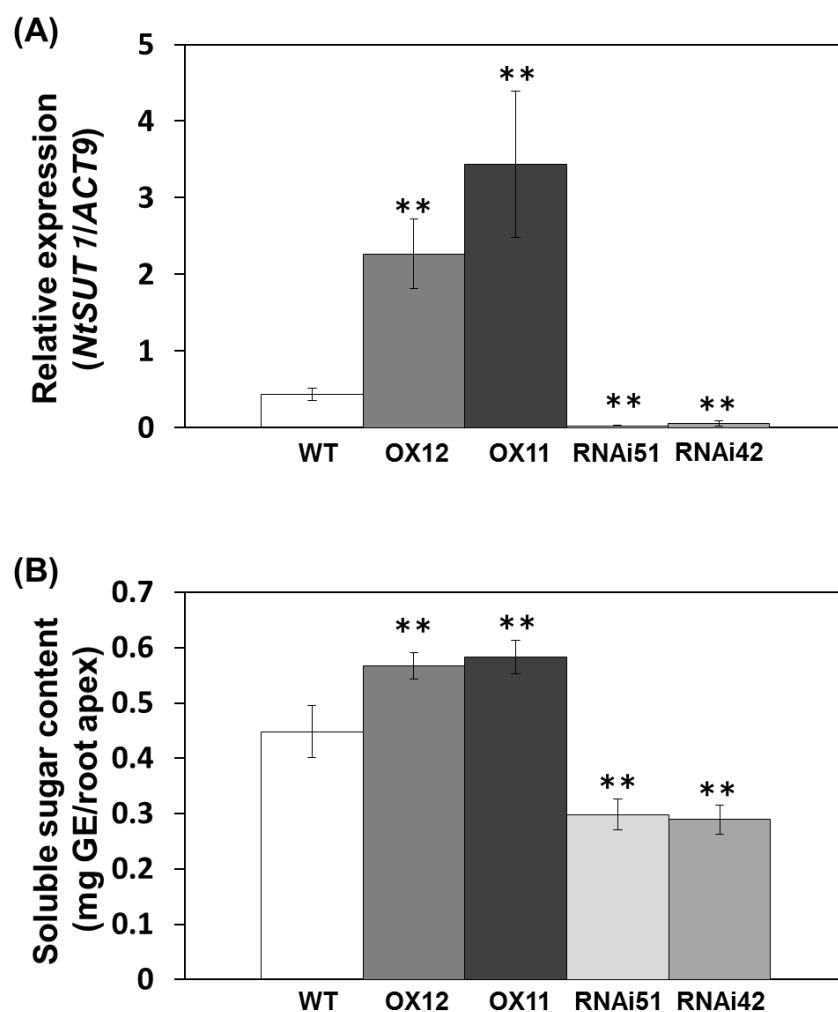


Figure 25 *NtSUT1* 遺伝子の WT,OX,および RNAi 系統の根端における *NtSUT1* 遺伝子の発現量および遊離糖含量

(A) WT, OX および RNAi 系統の根端(先端より 5 mm)より RNA を抽出し, *NtSUT1* 遺伝子と *Actin9* 遺伝子の発現量を各々測定し, *SUT* 遺伝子の発現量を *Actin9* 遺伝子の発現量に対する相対値として表示した.

(B) 根端 (先端 5 mm) より遊離糖を抽出し,糖含量をグルコースの標準を用いて測定し, グルコース当量 (GE) として表示した.

値は mean $\pm$ SEM (n = 3) で示した. 統計処理は Student's t-test を使用し, WT の値に対する各系統の値について,各々有意差検定を行なった (**p<0.01).

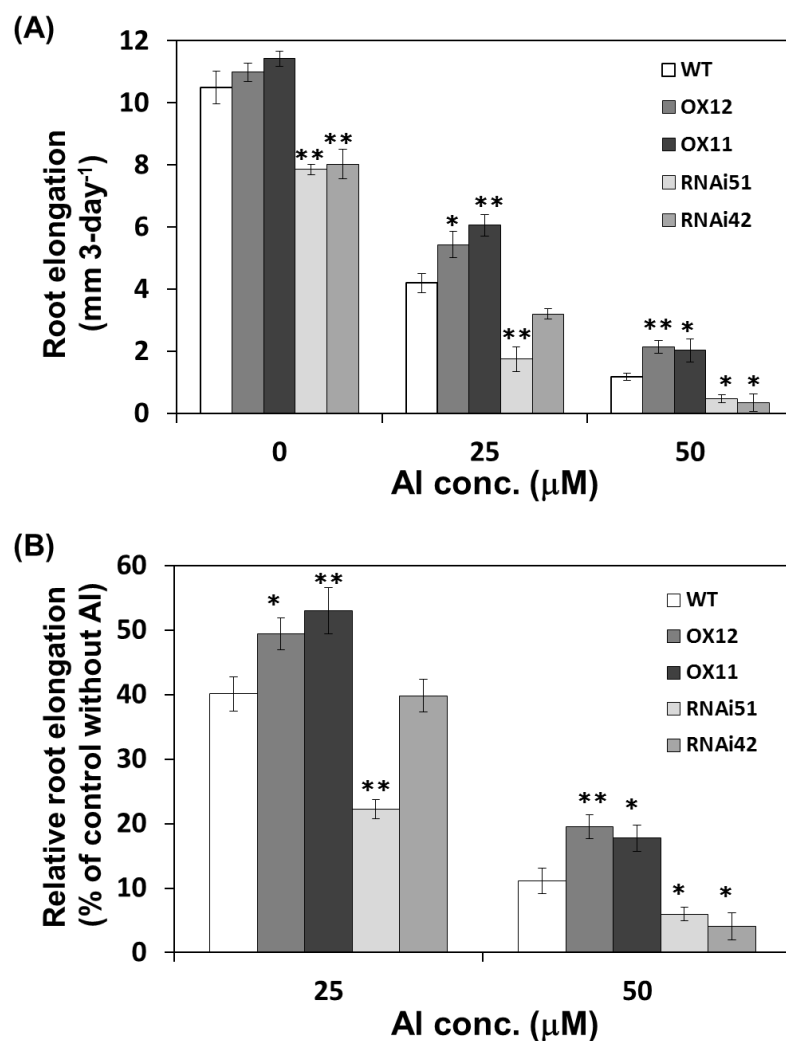


Figure 26 *NtSUT1* 遺伝子の WT,OX および RNAi 系統の根伸長に対する Al の影響

幼植物を異なる Al 濃度 (0, 25, 50 μM) で 3 日間処理した. (A) Al 処理期間中の根伸長. (B) Al の根伸長に対する阻害効果.各系統の根伸長に及ぼす Al の効果を評価するために, コントロール処理 (Al 0 μM) の根伸長に対する Al 処理の根伸長を相対値 (%) で示した.

値は mean ± SEM (n ≥ 45) で示した. 統計処理は Student's t-test を使用し, WT の値に対する各系統の値について各々有意差検定を行なった (**p<0.01, *p<0.05).

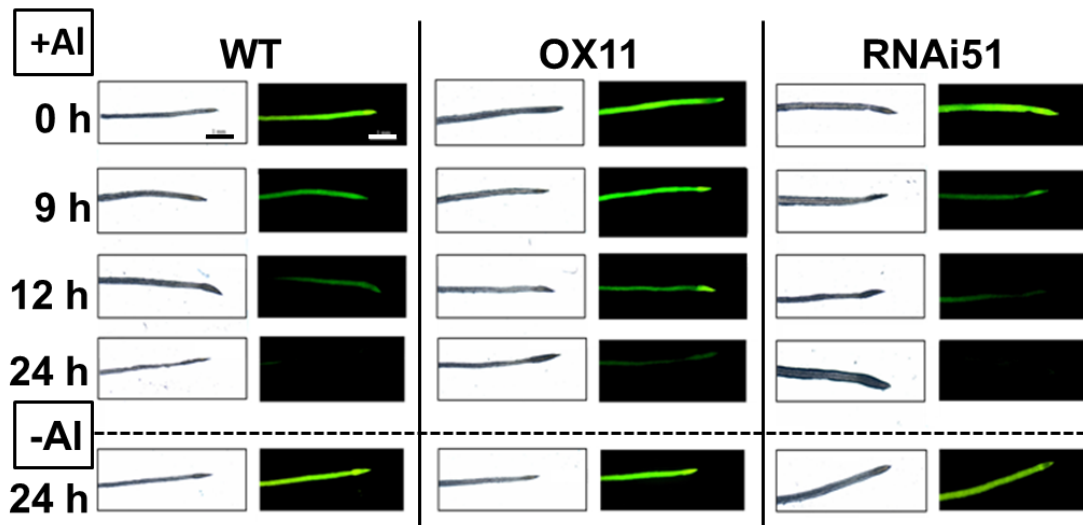
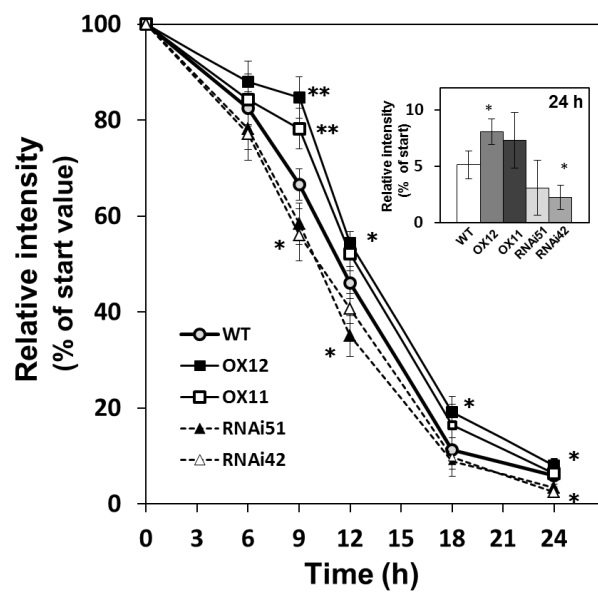


Figure 27 *NtSUT1* 遺伝子の WT, OX および RNAi 系統の根端における 24 時間の Al 処理期間中の細胞死の誘発：FDA 染色による生細胞の定性的評価

Al 無添加もしくは Al 50 μ M 添加で 24 時間までの処理を行ない, Al 添加後, 0, 9, 12, 24 時間目に根端を FDA で染色し, 蛍光顕微鏡下で観察した. 顕微鏡写真は, 代表的な像 ([左]明視野像 [右]蛍光像) を示す (bar = 1mm).

(A)



(B)

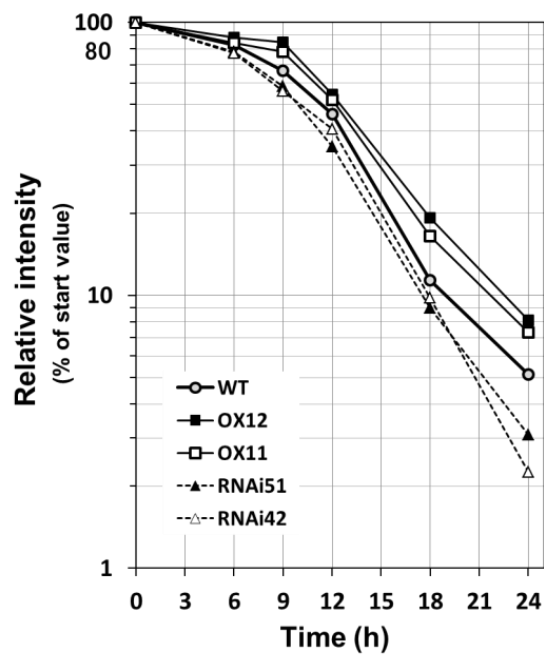


Figure 28 *NtSUT1* 遺伝子の WT, OX および RNAi 系統における AI 処理期間の生存率の低下 : FDA 染色による生細胞の定量的評価

Figure 27 における FDA 染色の蛍光像をイメージ J を用いて解析した. 各系統において 0 時間の値を 100% として各時間の値を示した. (B) (A) の値を片対数グラフで表示した. 値は mean $\pm$ SEM ($n \geq 15$) で示した. 統計処理は Student's t-test を使用し, 各時間において WT の値に対する有意差検定を行なった (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

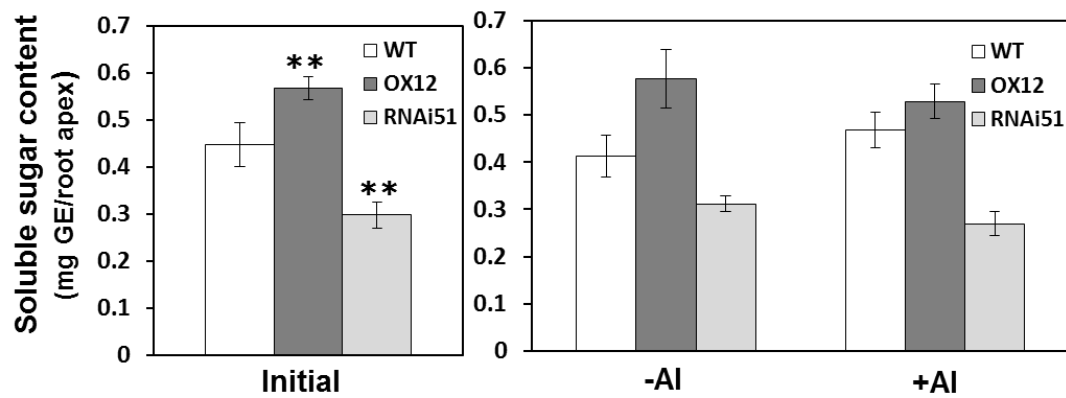


Figure 29 *NtSUT1* 遺伝子の WT, OX および RNAi 系統の根端遊離糖含量に対する Al 処理の影響

幼植物を Al 処理前 (Initial) と Al 無添加もしくは Al 50 μ M 添加の条件で 24 時間処理した後, 根端 (先端 5 mm) より遊離糖を抽出し糖含量を測定した. 各値は, 2 回の反復実験からの mean $\pm$ SEM を表す.

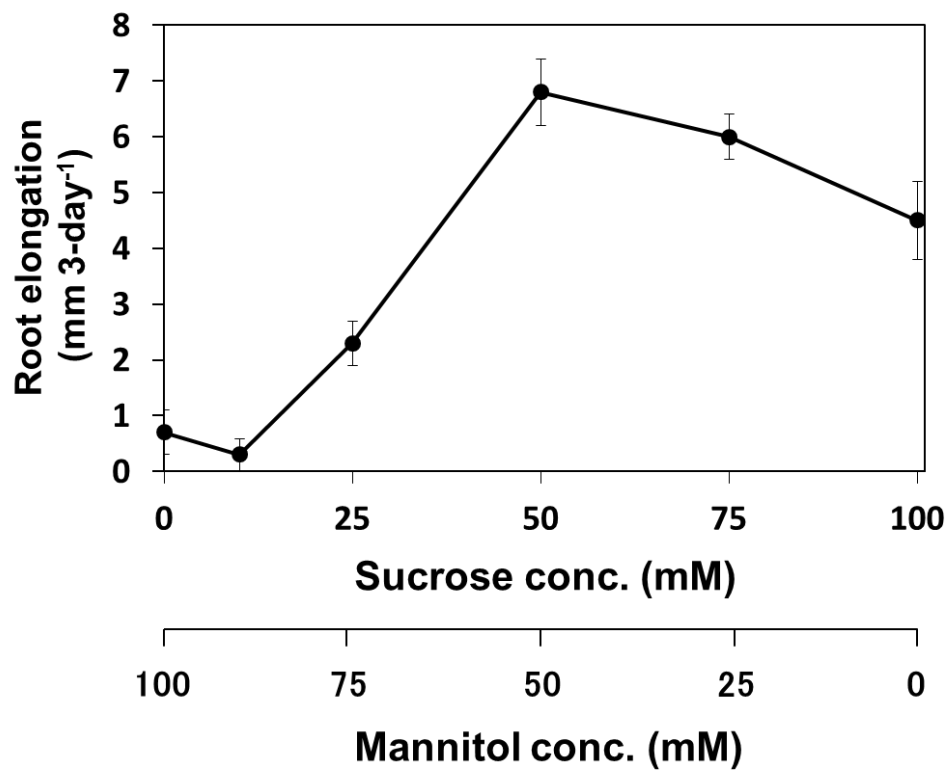


Figure 30 タバコ幼植物における暗所での根伸長に対する培養液に添加したスクロースの影響 (Kariya et al., *in press* より引用)

タバコ幼植物を様々な濃度のスクロースまたはマンニトール (浸透圧調製のために添加) を含む Ruakura 培地 (pH5.0) 中で 3 日間生育させ, その間の根伸長を測定した. 各値は, 1 回の実験からの反復 ($n \geq 19$) の mean $\pm$ SEM を表した.

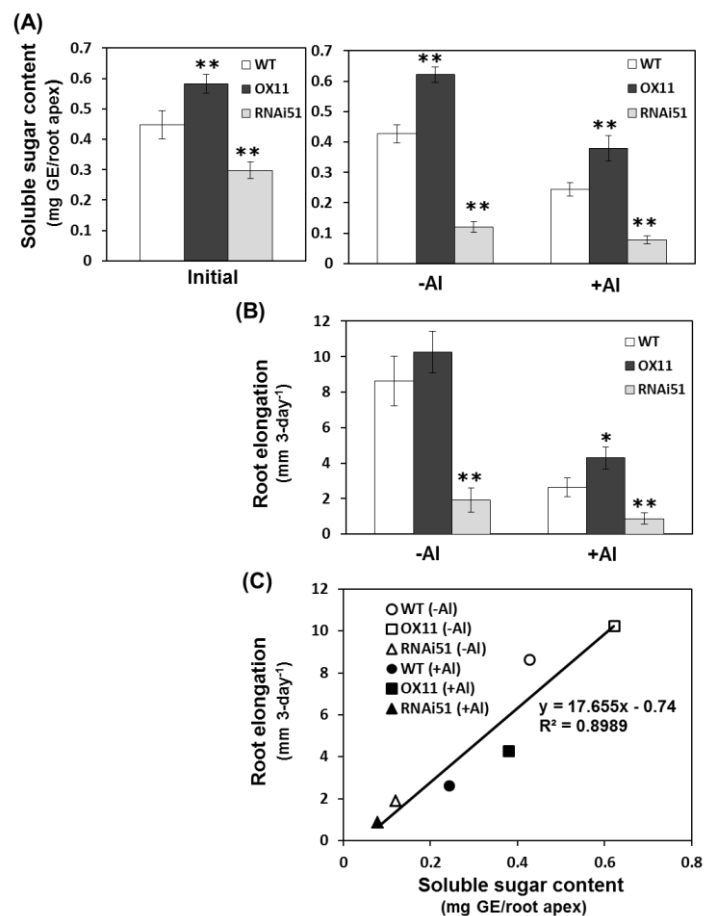


Figure 31 *NtSUT1* 遺伝子の WT,OX および RNAi 系統の暗所での根伸長および根端における遊離糖含量に対する Al の影響

タバコ幼植物を Al 無添加もしくは Al 50 μ M 添加で暗所にて 50 mM のスクロースを含む Ruakura 培地で 3 日間生育させ, Fig. 26 と同様に処理期間中の根伸長と処理後の根端 (先端 5 mm) の遊離糖含量を定量した. (A) 各系統の根端の糖含量 (Fig. 25) (B) に示す値を初期値とともに示した). (B) Al 処理期間中の根伸長. (C) 遊離糖含量 (A) と根伸長 (B) の各系統のそれぞれの値の相関性 (x : 糖含量, y : 根伸長).

(A) および (B) の値は 3 回の独立した実験で得られた mean $\pm$ SEM (n $\geq$ 15) である. 統計処理は Student's t-test を使用し, 各処理において WT の値に対する OX ならびに RNAi 系統の値について有意差検定を行なった (**p<0.01, *p<0.05).

第5章 結論

これまでに、タバコ培養細胞系統 BY-2 を用いた解析から, Al の細胞死誘発経路として, ①Al の細胞表層への結合② *VPE* 遺伝子の発現上昇③ *VPE* 活性の上昇④液胞の崩壊⑤細胞膜の損傷⑥細胞死というモデルを提唱していた (Fig. 1) . 本研究では, BY-2 細胞系統を樹立したタバコ品種 Bright Yellow を用い, BY-2 細胞で見られた細胞死誘発経路が根において見られるかどうか検証した. 幼植物の根において, 24 時間の Al 処理期間における Al の吸着および生細胞の減少を各々特異的な染色試薬であるヘマトキシリンと FDA を用いて検出するとともに, *VPE* 遺伝子群 (*VPE1a*, *VPE1b*, *VPE2*, *VPE3*) の発現変動をリアルタイム RT-PCR で調べた. その結果, Al の添加とともに Al は根の全体に吸着するが, Al 処理開始後 9~12 時間目以降に根端に強く吸着するとともに根端より細胞死が誘発され (Fig. 10, 11) , BY-2 細胞と同様, 細胞死の誘発と連動して *VPE1a*, *VPE1b* の発現が上昇し続いて *VPE2*, *VPE3* の発現が上昇した (Fig. 12) . この結果はタバコ培養細胞株 BY-2 と同様の結果を示した. (Fig. 15)

Figure 10, 11, 12 の結果から, 細胞死のタイミングと *VPE1a*, *VPE1b* の発現の上昇のタイミングに高い相関性が見られることから, Al による細胞死に関わる *VPE* 遺伝子は *VPE1a*, *VPE1b* の可能性が考えられた. また, 以前のタバコ培養細胞の研究 (Fig. 1) においてもタイムコース実験により, Al における細胞死には *VPE1a*, *VPE1b* の関与が考えられた. したがって, 両方の *VPE* 遺伝子の発現抑制系統を作出することで細胞死を抑制できると考えられた.

BY-2 細胞を野生系統 (WT) として, *VPE* 遺伝子群の発現抑制系統 (RNAi) を RNAi-*VPE1* 系統 (*VPE1a*, *VPE1b* を同時に抑制したもの) , RNAi-*VPE2* 系統, RNAi-*VPE3* 系統の 3 系統を作出した. なお, この 3 系統はターゲットにした遺伝子のみを Al の有無にかかわらず抑制していた (Fig. 16, 17, 18) . WT ではすべての *VPE* 遺

伝子が AI により発現が上昇しており, RNAi 系統に関してはターゲットにした遺伝子以外の VPE 遺伝子については WT と同程度であった.

VPE 活性と細胞死の誘発程度を EB の取り込み量で比較したところ, AI 処理において値は RNAi- *VPE2* 系統, RNAi- *VPE3* 系統の 2 系統は WT と同程度であった. 一方, この増加が RNAi- *VPE1* 系統では大きく抑制された (Fig. 19, 20) .

これらの結果より, AI によって *VPE1a*, *VPE1b*, *VPE2*, *VPE3* 遺伝子すべての発現が上昇するものの, *VPE1a*, *VPE1b* 遺伝子が AI で誘発され細胞死に関わることを見出した. よって, タバコにおける AI による細胞死においては *VPE1* (*VPE1a*, *VPE1b*) 遺伝子の発現上昇, VPE 活性の増加, 細胞死というメカニズムが考えられる (Fig. 32) .

タバコ (品種 Samsun NN) を野生系統に, *NtSUT1* の高発現系統ならびに発現抑制系統を作出し, 通常の生育条件における根伸長, ならびに AI 処理における根伸長阻害および細胞死の程度について, 各々根端の遊離糖含量とともに比較解析した (Fig. 25, 26) . その結果, 通常の生育条件ならびに AI 処理条件における根伸長は, *NtSUT1* の発現量が多いほど良く, 遊離糖含量とも相関することから, 根端で発現する *NtSUT1* の機能は, 根伸長に必要なスクロースをアポプラスト経由で供給すると考えられた. さらに, AI が誘発する細胞死も *NtSUT1* の発現量が多いほど抑制され AI 耐性になることを見出した (Fig. 27, 28) .

根端における *NtSUT1* 遺伝子の機能を明らかにするために, 暗所で AI 処理をすることによりアポプラスト経由を介して外因的に供給されたスクロースの取り込みに対する *NtSUT1* 遺伝子の機能を調べた (Fig. 23) . *NtSUT1* 遺伝子の機能が根端における外因性スクロースの取り込みにおいて主要な役割を果たしていることが示唆され, さらに, 根端におけるアポプラスト経由を介したスクロース取り込みによる遊離糖含量が根伸長を制御する主要な因子であり, AI はアポプラスト経由のスクロースの取り込

みを阻害することで遊離糖含量の増加を抑制し根伸長を阻害することを示した (Fig. 31) .

以上の研究により, AI による根の生育阻害において, *VPE* 遺伝子が細胞死の実行因子として機能すること, 根端で発現する *NtSUT1* 遺伝子の機能はアポプラスト経路によるスクロースの供給であり, その高発現により AI による伸長阻害と細胞死誘発が抑制されることを明らかにした (Fig. 32) .

細胞に取り込まれたスクロースは液胞に蓄積され細胞伸長に関わるとともに, 解糖系を経てミトコンドリアで代謝され ATP の生成や活性酸素種の生成にも関わっている. 今後, 液胞と細胞質, ミトコンドリアの機能的な関わりを明らかにすることで, AI による細胞死誘発経路が更に明らかになると思われる.

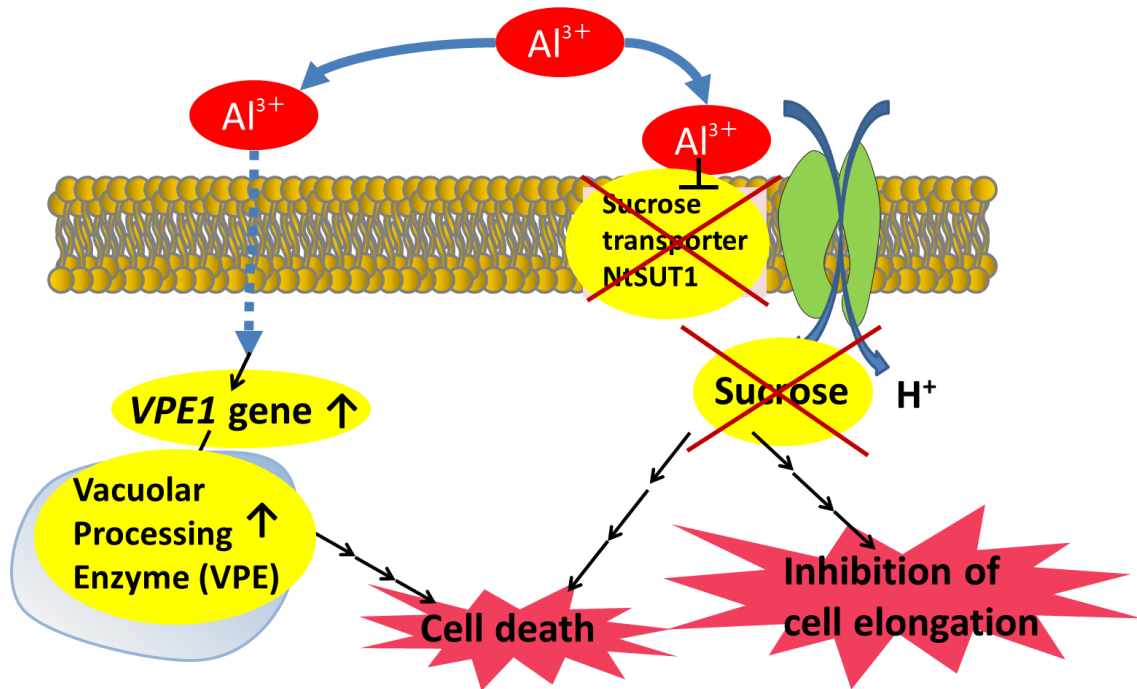


Figure 32 タバコにおけるアルミニウム誘導細胞死および根伸長抑制の分子機構のモデル図

Al は *VPE1* 遺伝子の発現を上昇し、VPE 活性を上昇させることで細胞死を引き起こす。また、 Al は *NtSUT1* 遺伝子の発現ならびに NtSUT1 機能を阻害することにより根伸長を阻害し、さらに細胞死を引き起こす。逆に、*NtSUT1* 遺伝子の高発現は Al による伸長阻害と細胞死を緩和する。

参考文献

Abdel-Basset R., Ozuka S., Demiral T., Furuichi T., Sawatani I., Baskin Y. I., Matsumoto H., Yamamoto Y. (2010) Aluminium reduces sugar uptake in tobacco cell cultures: a potential cause of inhibited elongation but not of toxicity. *J. Exp. Bot.* 61: 1597-1610.

Biswas M. S., Mano J. (2016) Reactive carbonyl species activate Caspase-3-like protease to initiate programmed cell death in plants. *Plant Cell Physiol* 57: 1432-1442.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Bret-Harte M. S., Silk W. K. (1994) Nonvascular, symplasmic diffusion of sucrose cannot satisfy the carbon demands of growth in the primary root tip of *Zea mays* L. *Plant Physiol.*, 105: 19-33.

Bürkle L., Hibberd J.M., Quick W.P., Kühn C., Hirner B., Frommer W. B. (1998) The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol.* 118: 59-68.

Cançado G. M. A., Loguericio L. L., Martins P. R., Parentoni S. N., Paiva E., Borém

A., Lopes M. A. (1999) Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L.) *Theor Appl Genet* 99: 747-754.

Chen L. Q., Cheung L. S., Feng L., Tanner W., Frommer W.B. (2015) Transport of sugars. *Annu. Rev. Biochem*, 84: 865-894.

Gauthier A., Lamotte O., Reboutier D., Bouteau F., Pugin A., Wendehenne D. (2007) Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signal. Behav.* 2: 86-95.

Gupta N., Gaurav S.G., Kumar A. (2013) Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review. *Am. J. Plant Sci.*, 4: 21-37.

Hara-Nishimura I., Inoue K., Nishimura M. (1991) A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature forms. *FEBS Lett.* 294: 89-93.

Hara-Nishimura I., Nishimura M. (1987) Proglobulin processing enzyme in vacuoles isolated from developing pumpkin cotyledons. *Plant Physiol.* 85: 440-445.

Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305: 855–858.

Hatsugai N., Yamada K., Goto-Yamada S., Hara-Nishimura (2015) Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Front Plant Sci.* 6: 234.

Horst W. J., Puschel A. K., Schmohl N. (1997) Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize. *Plant Soil* 192: 23-30.

Ikegawa H., Yamamoto Y., Matsumoto H. (2000) Responses to aluminium of suspension- cultured tobacco cells in a simple calcium solution. *Soil Sci. and Plant Nutr.* 46: 503-514.

Jones K. H., Senft J. A. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 77-79.

Kariya K., Demiral T., Sasaki T., Tsuchiya Y., Turkan I., Sano T., Hasezawa S., Yamamoto Y. (2013) A novel mechanism of aluminium-induced cell death involving vacuolar processing enzyme and vacuolar collapse in tobacco cell line BY-2. *J. Inorg. Biochem.* 128: 196–201.

Kochian L. V. (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 237-260.

Kochian L. V., Pineros M. A., Hoekenga O. A. (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil*, 274: 175-195.

Kuroyanagi M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2002) Activation of Arabidopsis vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide. *Plant Cell and Physiology* 43: 143–151.

Kuroyanagi M., Yamada K., Hatsugai N., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin- induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 280: 32914-32920.

Kühn C., Grof C. P. (2010) Sucrose transporters of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13: 288-298.

Lalonde S., Boles E., Hellmann H., Barker L., Patrick J. W., Frommer W. B., Ward J. M. (1999) The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell*, 11: 707-726.

Li Z., Yue H., Xing D. (2012) MAP Kinase 6-mediated activation of vacuolar processing enzyme modulates heat shock-induced programmed cell death in Arabidopsis. *New Phytologist*. 195: 85–96.

Matsumoto H., Yamamoto Y., Kasai M. (1992) Changes of some properties of the

plasma membrane-enriched fraction of barley roots related to aluminum stress : membrane-associated ATPase, aluminum and calcium. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38: 411-419.

Mino M., Murata N., Date S., Inoue M. (2007) Cell death in seedlings of the interspecific hybrid of *Nicotiana glauca* and *N. glauca*; possible role of knob-like bodies formed on tonoplast in vacuolar-collapse-mediated cell death. *Plant Cell Rep.* 26: 407-419.

Misas-Villamil J. C., Toenges G., Kolodziejek I., Sadaghiani A. M., Kaschani F., Colby T., Bogyo M., van der Hoorn R. A. (2013) Activity profiling of vacuolar processing enzymes reveals a role for VPE during oomycete infection. *Plant J.* 73: 689-700.

Polle E., Konzak C.F., Kittrick J.A. (1978) Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining. *Crop Sci* 18: 823-827.

Qiang X., Zechmann B., Reitz M. U., Kogel K. H., Schafer P. (2012) The mutualistic fungus *Piriformospora indica* colonizes Arabidopsis roots by inducing an endoplasmic reticulum stress-triggered caspase-dependent cell death. *Plant Cell* 24: 794-809.

Rojo E., Martín R., Carter C., Zouhar J., Pan S., Plotnikova J., Jin H., Paneque M., Sánchez-Serrano J. J., Baker B., Ausubel F. M., Raikhel N. V. (2004) VPE γ exhibits

a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Curr. Biol.* 14: 1897-1906.

Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 675-709.

Ryan P. R., Dittomaso J. M., Kochian L. V. (1993) Aluminium Toxicity in Roots: An Investigation of Spatial Sensitivity and the Role of the Root Cap. *J. Exp. Bot.* 44: 437-446.

Sameeullah M., Sasaki T., Yamamoto Y. (2013) Sucrose transporter NtSUT1 confers aluminum tolerance on cultured cells of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.*, 59: 756-770.

Sasaki T., Yamamoto Y., Ezaki B., Katsuhara M., Ahn S. J., Ryan P. R., Delhaize E., Matsumoto H. (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.* 37: 645-653.

Sauer N. (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. Federation of European Biochemical Societies. *Letters*, 581: 2309-2317.

Sivaguru M., Horst W. J. (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* 116: 155–163.

Sivaguru M., Yamamoto Y., Rengel Z., Ahn S. J., Matsumoto H. (2005) Early events responsible for aluminum toxicity symptoms in suspension-cultured tobacco cells. *New Phytol.* 165: 99-109.

Smeekens S., Ma J., Hanson J., Rolland F. (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13: 274-279.

Snowden K. C., Richards K. D., Gardner R. C. (1995) Aluminum-induced genes. Induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips. *Plant Physiol.*, 107: 341-348.

Tabuchi A., Matsumoto H. (2001) Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition *Physiol. Plant.* 112: 353–358.

Widholm J. M. (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.*, 4: 189-94.

Wind J., Smeekens S., Hanson J. (2010) Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry*, 71: 1610-1614.

Yamamoto Y., Kobayashi Y., Matsumoto H. (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.* 125: 199-208.

Yamamoto Y., Kobayashi Y., Devi S. R., Rikiishi S., Matsumoto H. (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cell. *Plant Physiol.* 128: 63-72.

Yamamoto Y., Kobayashi Y., Devi S. R., Rikiishi S., Matsumoto H. (2003) Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil*, 255: 239-243.

von Uexküll H. R., Mutert E. (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* 171: 1-15.

謝辞

本研究を行なうにあたり，山本洋子教授ならびに佐々木孝行助教にご指導，を承りましたことを深く感謝申し上げます．同研究室の土屋善幸さん，小松和枝さん，有吉美智代さん，中島智子さん，東泉恵美さんに多くのご助言，ご協力を頂き此处に感謝の意を表します．また，岡山大学資源植物科学研究所の方々に感謝致します．さらに，本研究は特別研究員奨励費 15J02597 の助成を受けて行われました．

最後に，自分の決めた道を応援し，いつも暖かく見守ってくれた母，兄，祖父母に深く感謝しています．ありがとうございました．

学位論文の概要

酸性土壌では、土壌の構成元素であるアルミニウム (Al) が土壌の酸性化に伴いイオンとして溶出し、細胞死や根伸長阻害を引き起こす。これまでに、申請者らはタバコ培養細胞 BY-2 を用いて Al による細胞死誘発経路を解析し、プログラム細胞死の実行因子と考えられている液胞プロセッシング酵素 (VPE) の発現誘導を見出していた。また、根の伸長成長にはスクロースの供給が必要であるが、タバコ培養細胞において、細胞外 (アポプラスト) からスクロースを取り込むスクロース-H⁺ 輸送体 (NtSUT1) の輸送活性と遺伝子発現が Al で阻害されることが報告されていた。そこで本研究ではタバコ植物体を用い、Al が誘発する細胞死と根伸長阻害における *VPE* 遺伝子および *NtSUT1* 遺伝子の関わりについて、各々解析した。

幼植物の根における Al 応答反応を経時的に解析した結果、Al による細胞死誘発と同調した *VPE* 遺伝子群 (*VPE1a*, *VPE1b*, *VPE2*, *VPE3*) の発現誘導を見出した。次に、BY-2 細胞を用いて *VPE* の発現抑制システムを作製し Al に対する応答反応を野生系統と比較解析した結果、*VPE* 遺伝子 (*VPE1a*, *VPE1b*) が Al で発現誘導され細胞死に関与することが示唆された。Al による根伸長阻害における *NtSUT1* 遺伝子の関わりについて解析するために、*NtSUT1* の高発現ならびに発現抑制システムをタバコ植物体で作出し、通常の生育条件と Al 処理条件で根伸長と根端の遊離糖含量を比較解析した。いずれの条件でも *NtSUT1* の発現量が多いほど遊離糖含量が高く根伸長も良く、さらに Al による細胞死も抑制された。

以上の解析により、*VPE* 遺伝子は Al による細胞死の実行因子であること、*NtSUT1* 遺伝子はスクロースの供給により根伸長を正に制御し、高発現により Al による伸長阻害と細胞死が抑制され Al 耐性になることを明らかにした。