

プログラム細胞死関連遺伝子シロイヌナズナDAD1 のプロモーターGUS発現解析

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-05-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 林, 潤, 塩島, 淳志, 鈴木, 寛 メールアドレス: 所属: |
| URL | https://fpu.repo.nii.ac.jp/records/29 |

[研究論文]

プログラム細胞死関連遺伝子シロイヌナズナ *DAD1* の プロモーター GUS 発現解析

— Promoter GUS expression analysis of the programmed cell death-related gene Arabidopsis *DAD1* —

林 潤、塩島 淳志、鈴木 寛

1. 緒言

多細胞生物は、その進化の過程で自らの細胞を積極的に死に至らしめる能力を獲得することにより個体全体のホメオスタシスを維持している。オタマジャクシの尾の切断などは形態形成における切断部分の細胞死により生じる。このような細胞死は多細胞生物にとっては形態形成にとって必要不可欠であり、プログラム細胞死 (Programmed Cell Death : PCD) と呼ばれている。

多細胞生物では共通して存在している Bax Inhibitor 1 (BI-1)¹⁾ は PCD を抑制する因子として有名である。Defender against Apoptotic cell Death 1 (DAD1) もまた酵母から動物まで遺伝子が保存されている点では BI-1 と同様であるが、BI-1 ほど研究報告がされていない。

ハムスターの BHK21 細胞系統から温度感受性変異体として単離された tsBN7 細胞は、39.5℃の高温ストレスをかけると細胞死が観察された²⁾。この細胞死はタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドにより阻害される。この tsBN7 細胞の原因遺伝子として *DAD1* 遺伝子が見つかった。tsBN7 細胞の *DAD1* 遺伝子は N 末端から 38 残基目のグリシンがアルギニンに変異し、DAD1 の立体構造が高温により不安定になることから細胞死が起こると解釈されている。また、小胞体膜に局在する DAD1 は小胞体の N-グリコシル化を触媒するオリゴ糖転移酵素複合体 (OST) のサブユニット^{3,4)} であり、小胞体で新生タンパク質のアスパラギン残基へオリゴ糖を結合させる。この N-グリコシル化はタンパク質のフォールディングに必要であり正しく行われないと小胞体ストレスとなり PCD を起こすシグナルとなる。ただし、DAD1 の PCD への関与が OST 依存かどうかについてはまだ決着がついておらずいろいろな仮説が提出されている。

植物では、シロイヌナズナとイネの植物 *DAD1* 遺伝子オルソログは、植物の遺伝子であり

受付日 2020.11.24

受理日 2020.12.28

所 属 生物資源学部

ながらハムスターの tsBN7 細胞を相補する^{5,6)}。また、グラジオラスで *DAD1* 遺伝子の発現が花弁の老化を遅延させることが報告されている⁷⁾。

今回、*DAD1* の器官特異的な発現について解析するために、シロイヌナズナに存在する2種の *DAD1* 遺伝子 (*AtDAD1* 及び *AtDAD2*) のプロモーター GUS 解析を行ったので報告する。

2. 材料と方法

2-1. 材料

器官特異的な発現解析のため *AtDAD1* 及び *AtDAD2* promoter-GUS (β グルクロニダーゼ) 導入シロイヌナズナ (エコタイプ、コロンビア) を作製した。

2-2. 方法

2-2-1. 花茎の染色

1/2 MS 寒天培地に無菌播種後、14 日間生育させ、MGRL 培地を染み込ませたロックウールに幼苗を植え込み 23 °C で生育した。

2-3 週間栽培し各成長段階 (つぼみから花、莢) のある花茎をサンプリングして GUS 染色した。完熟莢は生育条件で完熟するまでの日数が固定できないので、莢が緑色から黄色に変化した直後に花茎とは別にサンプリングした。

2-2-2. 根の染色

1/2 MS 寒天培地に無菌播種後、7 日間生育させ幼苗の根が傷つかないようにピンセットで引き抜き、GUS 染色した。5 % 寒天に封じ込めた後にマイクロスライサーで切片を作製し観察した。

3. 結果

3-1. 根における *AtDAD1*, *AtDAD2* の GUS 組織染色パターン

AtDAD1 及び *AtDAD2* promoter-GUS の根全体を GUS 染色した。その結果、根の先端から中ほどにかけて強い染色が見られた。中ほどから根元に向かって徐々に染色が薄くなっていった (図1-A,C,D,F)。

根を横断面でスライスして観察すると、根の先端の強く染色された部分は維管束を含む中心柱のみが染色されており、その外側は染色されていなかった (図1-B,E)。

根の根冠では、根の先端部とは逆に、根冠細胞と表皮細胞が染色され内部の根端分裂組織は染色されていなかった (図1-C,F)。

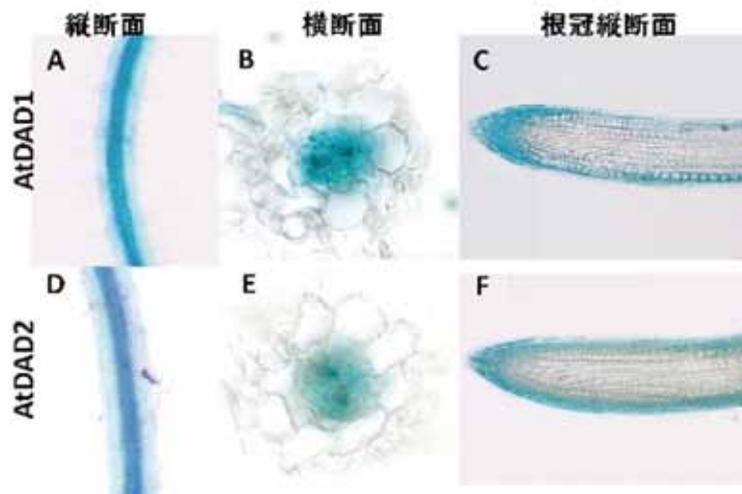


図1 *AtDAD1* (A,B,C), *AtDAD2* (D,E,F) promoter-GUS 導入体の根の GUS 染色 A,D: 縦断面像、B,E: 横断面像、C,F: 根冠縦断面像

3-2. 花の開花から老化、莢の成熟に伴う *AtDAD1*, *AtDAD2* の GUS 組織染色パターン

AtDAD1 及び *AtDAD2* promoter-GUS 導入体の花茎の GUS 染色では、つぼみ及び開花直後では花床部分は全く染色されなかった (図2,3-A,B)。しかしながら、開花後1日が経過すると花床にある、おしべや花弁、がく片の離層部分がかかなり強く染色された (図2,3-C,D)。

その後、日数が経過するにつれて染色が弱くなり (図2,3-E,F,G,H)、開花後 14 日間後では離層部分が染色されなくなった (図2,3-I)。完熟した長角果では長角果の両端から染色が始まり同時に長角果の開裂が見られた (図2,3-J,K,L)。その際には開裂する縫合線にも染色が見られた。

4. 考察

今回の結果から、*DAD1* 遺伝子が花茎において、おしべ、花弁の離層、莢において開裂部分、根においては根端及び維管束系で発現していることが判明し、プログラム細胞死の生じる形態形成組織において *AtDAD1*, *AtDAD2* 遺伝子が発現していることが示された。

根のプログラム細胞死

道管は円筒の道管要素が縦につながってできている組織で被子植物に特有の構造であり、プログラム細胞死によって空洞化して連結している⁸⁾。そのため、シロイヌナズナ *DAD1* が植物体でプログラム細胞死が生じる組織で実際に発現しているかを確かめる指標となった。*ATDAD1*, *ATDAD2* promoter-GUS 導入体の根では先端から中ほどまで維管束部分に GUS 染色が強く見られた。また、根端部分の分裂組織は GUS 染色されなかった (図1-A,B,D,E)。この

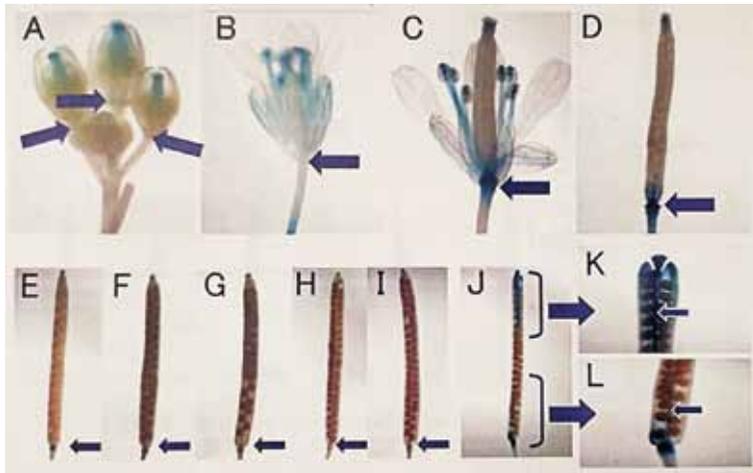


図2 *AtDAD1* promoter-GUS の花茎の各ステージにおける GUS 染色
 A:0DAF, B:1DAF, C: 2DAF, D: 3DAF, E: 6DAF, F: 8DAF, G: 10DAF, H: 12DAF, I: 14DAF, J: 完熟莢, K: 莢上部拡大, L: 莢下部拡大 (DAF : days after flowering)
 青矢印: 離層、白矢印: 莢上部及び莢下部拡大

ことは細胞分裂が頻繁に起こる組織ではプログラム細胞死が起きず、分裂し分化した導管要素が成熟したのちにプログラム細胞死を起こしていること一致する⁸⁾。

また、根冠は根の先端を防護する組織であり、根の重力屈性や根端分裂組織の保護など根の成長に重要な機能を持っている。根冠は先端だけではなく側部根冠という組織が根端の側部にありこの部分はプログラム細胞死により剥がれ落ちると言われている⁹⁾。

今回の実験では *AtDAD1*, *AtDAD2* の両方において根冠先端部が染色されたことから、従来、プログラム細胞死により分離する側部根冠とともに剥離する根冠先端部は生きてままでプログラム細胞死を起こさないとされていることと矛盾する(図1-C,F)⁹⁾。根端細胞のプログラム細胞死は実際に細胞死が起きる細胞とその前段階のプログラム細胞死に関与する遺伝子が発現する細胞が別れているとされている⁹⁾。もしかしたら、従来言われているほど細胞死関連遺伝子の発現は精密でないのかもしれない。また、しかしながら、GUS はターンオーバーが長い酵素であることから、どちらの細胞も GUS 染色されてしまった可能性も考えられる。今後、GFP による共焦点顕微鏡観察など GUS 染色より優れた分解能による解析を行わなければ、そのどちらかは判断つかない。

花茎、莢のプログラム細胞死

図2.B,3-B のおしべが GUS 染色されているのは花粉成熟期のタペート細胞のプログラム細胞死によるものと思われる。花粉成熟の初期では、おしべの葯内の花粉母細胞から減数分裂により生じた未成熟の花粉は特殊な構造の花粉壁を持つ¹⁰⁾。この過程で、花粉成熟後にタペート

層はプログラム細胞死を引き起こす¹⁰⁾。また、つぼみの時の柱頭の GUS 染色は柱頭形成時に形態形成のプログラム細胞死が起きていることを示している可能性がある (図2-A,3-A)。

開花後1日が経過すると花床にあるおしべや花弁、がく片の離層部分がかかなり強く染色され (図2,3-C,D)、その後に日数が経過するにつれて染色が弱くなることは (図2,3-E,F,G,H) この離層形成に *AtDAD1*, *AtDAD2* 遺伝子が強く発現していることを表している。品種によるが多くの花の老化にはエチレンが関与していることから¹¹⁾、植物の DAD1 はエチレンにより誘導されるのかもしれない。

また、図 2 と図 3 の J,K,L より、莢の縫合線の開裂時に *AtDAD1*, *AtDAD2* 遺伝子が発現していた。これは莢 (長角果) の老化誘導によるものなのか、開裂部分のプログラム細胞死なのかは他の老化やプログラム細胞死関連遺伝子の解析の結果を待つ必要がある。

以上、今回の実験により、植物の *DAD1* 遺伝子がプログラム細胞死による形態形成に重要な役割を担っていることが示唆された。また、最近、大豆 *DAD1* の新しい報告¹²⁾ では、*Phytophthora* 属菌耐性に *DAD1* が関与しており、その耐性が小胞体ストレスシグナルの調節によることを示唆しており、*DAD1* は形態形成のプログラム細胞死以外にも重要な役割を担っているのかもしれない。

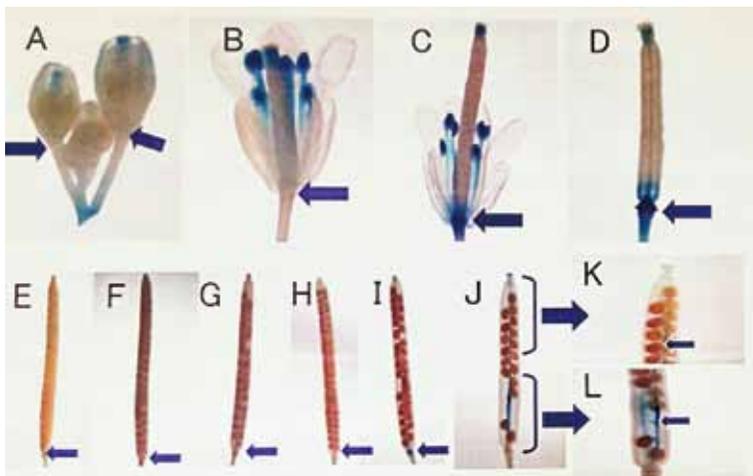


図3 *AtDAD2* promoter-GUS 導入体の花茎の各ステージにおける GUS 染色
 A:0DAF, B:1DAF, C: 2DAF, D: 3DAF, E: 6DAF, F: 8DAF, G: 10DAF, H: 12DAF, I: 14DAF, J: 完熟莢, K:
 莢上部拡大, L: 莢下部拡大 (DAF : days after flowering)
 青矢印 : 離層、白矢印 : 莢上部及び莢下部拡大

引用文献

- 1) Matsumura H et al *Plant J.* 33, 425–434 (2003)
- 2) Nakashima T et al *Mol. Cell Biol.* 13, 6367–6374 (1993)
- 3) Yan A et al *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 7121-7126 (2005)
- 4) Peristera R and Stephen H J. *Cell Sci.* 125 3474-3484 (2012)
- 5) Gallois P et al *Plant J.* 11 1325-1331 (1997)
- 6) Tanaka K et al *Physiology of plant cells* 38 379-383 (1997)
- 7) Yamada T et al *J. Plant Phys.* 161 1281-1283 (2004)
- 8) Fukuda H *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 379-391 (2004)
- 9) Shri Ram Y, Helariutta Y *Current Biol.* 24 374-376 (2014)
- 10) Ito T et al *The Plant Cell* 19 3549-3562 (2007)
- 11) Wolterring EJ, Van Doorn WG *J. Exp. Bot.* 39 1605-1616 (1988)
- 12) Yan Q et al *Front. Plant Sci.* 10 107 (2019)