

(第3号様式)(Form No. 3)

学位論文要旨 Dissertation Summary

氏名 (Name) 平賀 旭

論文名: 静置培養により誘導されるタバコBY-2細胞の細胞死
(Dissertation Title)

細胞死は大きく2つのカテゴリーに分けることができる。一つは動物細胞のアポトーシスで代表されるプログラム細胞死(PCD)で、もう一つはネクローシスである。PCDは計画的な細胞死とも言われるように、決まった時期に決まった場所で起こり、細胞死が個体にとって有利に働く細胞死である。動物細胞のアポトーシスはPCDの一つであり、細胞質の収縮・染色質の凝縮、細胞質および核の断片化、アポトーシス小体の形成そして食細胞の食作用による消失という、はっきりとした形態的变化をたどる。また、シトクロムcの細胞質中への放出からカスパーゼ連鎖反応を経て細胞死に至るまでの、アポトーシス誘導の基本的な分子メカニズムも明らかにされている。一方、植物では、道管の形態形成過程や、低酸素や浸透圧ストレスなどの環境要因によって「計画的な死」は誘導されるが、死の過程でみられる形態学的な特徴は多様である。また、分子的メカニズムについてはほとんど知られていない。

タバコBY-2細胞は、様々な環境要因で細胞死が誘導されることが知られている。本研究では静置培養下で誘導される細胞死について、細胞死の誘導に関係する要因を明らかにし、細胞死の過程で見られる形態的特徴を分析することにより、その細胞死のタイプを考察することを目的として研究を行なった。

静置培養した場合、時間の経過とともに生重量の減少と死細胞の増加がみられた。興味深いことに、対数期の細胞では細胞死が急激に誘導されるのに対し、定常期の細胞では比較的細胞死が起こりにくかった。この原因について検討するために、培地の新旧、細胞密度および細胞の生理学的状態に注目した。その結果、4日間振とう培養した細胞を分離し、新しい培地に植え変えて静置培養すると、細胞死の誘導が起こりにくくなったが、細胞密度が高くなると細胞死が起こりやすくなることが分かった。7日間振とう培養した細胞で同様の実験を行なったところ、いずれの要因についても細胞死の誘導に大きな変化はみられなかった。

振とう培養4および7日目では分裂指数がそれぞれ約5および0%だったため、対数期と定常期の細胞分裂の頻度の違いが静置培養による細胞死の起こりやすさに関与している可能性がある。そこで、ヒドロキシ尿素(HU)とアフィディコリン(APH)を用いて、細胞周期を揃えて培養細胞を静置培養し、細胞周期の進行と細胞死の誘導にどのような関係があるか調べた。その結果、HU除去直後の細胞とAPH除去後4および8時間振とう培養した細胞で細胞死が誘導されやすかった。このことから、静置培養により誘導される細胞死は細胞周期の進行と関係があることが示唆された。すなわち細胞分裂の頻度が高い対数期の細胞では静置培養により細胞死が誘導されやすいが、細胞分裂をほとんど行なわない定常期の細胞では誘導されにくいということが分かった。以上の結果から、タバコBY-2細胞の静置条件下による細胞死の誘導には、培地の低酸素化、栄養の枯渇、細胞の生理学的状態が関係していることが示唆される。

次に、細胞死の進行過程における形態学的特徴について調べた。細胞を静置培養すると、最初に細胞膜の選択透過性が消失して、次に液胞膜の崩壊が起こることが分かった。液胞膜の崩壊のみられる細胞では原形質の萎縮が起こっていた。原形質の萎縮は、アポトーシスの過程で見られる特徴と一致する現象である。また、生細胞の時に観察された細胞小器官はまったく観察されず、代わりに膜に囲まれた小胞構造が多数観察された。この小胞形成は、液胞膜の崩壊によって細胞小器官の内容物が分解・溶出したことによるのではないかと考えられる。原形質の萎縮が進行すると、細胞質が断片化することが示唆された。この特徴はアポトーシスと似ているが、アポトーシス小体のように断片化した核は観察されなかった。核では、振とう培養直後に染色質が均一であったが、静置培養下におくと染色質は凝縮した。このような細胞では液胞が崩壊していることから、染色質の凝縮は液胞の崩壊後に引き起こされると考えられる。電気泳動法により、静置培養下ではDNAのヌクレオソーム単位での断片化していることが示された。染色質の凝縮やDNAのヌクレオソーム単位での断片化はアポトーシスの過程で見られる特徴と一致する現象である。以上の結果から、この細胞の細胞死のプロセスは、細胞膜の選択透過性の消失、液胞の崩壊、加水分解酵素の細胞質中への拡散、細胞小器官の内容物の分解・溶出による膜系化および細胞質の分解による原形質の萎縮、染色質の分解・凝縮を順次たどることが示唆された。従って、この細胞死は以前に報告されているアポトーシス様PCDと考えられる。