

学位論文審査の結果の要旨

氏名	平賀 旭
審査委員	主査 佐藤 成一 副査 小南 哲也 副査 井上 雅裕

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

審査結果の要旨(2,000字以内 標準書式：日本工業規格 A4, 11ポイント, 1行38字, 1頁40行, 左右余白25mm)

細胞は、様々な形態学的・生理学的なプロセスを経て死に至ることが知られているが、一般的に2つのタイプに大別されている。一つは個体に有利にはたらくプログラム細胞死(PCD)であり、もう一つは壊死(ネクローシス)と呼ばれる過激な物理・化学的刺激による細胞死である。動物細胞における2つの細胞死の特徴は、形態学的にも分子レベルでもよく説明されているが、植物細胞においては、PCDの実行プログラムに関する分子レベルの解明はほとんど進んでおらず、形態学的レベルの研究も十分ではない。本研究はタバコ BY-2 細胞を振とう培養条件から、静置条件下に置いたときに誘導される細胞死について、①細胞死の誘導要因及び②細胞死の過程における形態学的・生理学的な特徴を分析し、植物のPCDに関する理解を深めるための情報を得ることを目的としている。

申請者は振とう条件下での培養を静置すると、対数期の細胞は定常期の細胞に比べて速い速度で死に至ることを明らかにした。この細胞死には培地の状態、細胞密度及び細胞周期が関係しているのではないかと考え、それぞれについて検討を試みている。まず、4(対数期)及び7日目(定常期)の振とう培養液を細胞と培養液に無菌的に分離し、細胞を新培地、対数期あるいは定常期の培地に移して、静置した後死細胞の頻度を調べた。その結果、対数期及び定常期の細胞はいずれも新培地では古い培地に比べ細胞死の頻度が下がること、また古い培地に移し静置すると対数期の細胞の方が定常期の細胞より高い頻度で細胞死を誘導することを明らかにした。細胞密度を変えて新培地に戻し静置下に置き細胞死の頻度を測定したところ、細胞密度が高くなるとその頻度が高くなることを見出した。申請者は、これらの結果から培地を静置すると細胞が沈殿し局所的に細胞密度が高くなることから低酸素状態になり、栄養組成の枯渇や老廃物の蓄積などの環境要因が重なり細胞死が誘導されるのではないかと考察している。さらに、対数期の細胞が細胞死を誘導しやすい原因として細胞周期が関係しているのではないかとの推論を立て、ヒドロキシ尿素及びアフィディコリンを用いて細胞の同調化を試み、分裂指数と細胞死の頻度の関係を調べている。その結果、分裂指数が高くなると細胞死の頻度が有意に高くなることを見出し、その細胞死の誘導に細胞周期のチェックポイントが関係している可能性を指摘している。

細胞死の形態学的な特徴を分析するため、光学及び電子顕微鏡による詳細な観察を行っている。その結果、最初に細胞膜の選択的透過性が失われること、そして液胞膜が崩壊し、その後プロト

プラストの収縮が起こることを明らかにした。この時期の細胞質では、細胞小器官を見ることはできず、それらの残滓と思われる多数の膜の小胞や多重膜複合体が形成されていることを報告している。動物細胞のアポトーシスで見られる染色質の凝縮、核膜の陥入、細胞質の断片化を報告しているが、アポトーシス小体の形成は見られないとしている。また、TUNEL 分析と電気泳動法によりこの細胞死に伴い DNA がヌクレオソーム単位で分解されることを見出した。さらに、細胞死に伴いミトコンドリアの膜電位が消失することを示唆している。これらの特徴はアポトーシスにも見られる。このように、タバコ BY-2 細胞の静置条件下で誘導される死細胞の特徴にはアポトーシスと共通の特徴が数多く見られる一方、液胞の崩壊、細胞小器官の早期崩壊及びアポトーシス小体の不出現という違いもあることを明らかにしている。

以上のように、本論文には数多くの新規の知見が含まれており、植物の細胞死の理解を深めていく上で重要であると考えられる。この論文は平成 26 年 2 月 6 日開催の公聴会で発表された後、質疑応答が行われ、適切な回答が得られた。引き続いて行われた審査会で博士（理学）の学位に相応しい内容であることを委員全員で確認した。