

- 1) Knutson, R.M. (1974) *Science*, 186, 746-747.
- 2) Seymour, R.S. & Schultze-Motel, P. (1996) *Nature*, 383, 305.
- 3) Ito, K., Ogata, T., Kakizaki, Y., Elliott, C., Albury, M.S., & Moore, A.L. (2011) *Plant Physiol.*, 157, 1721-1732.
- 4) Nagy, K.A., Odell, D.K., & Seymour, R.S. (1972) *Science*, 178, 1195-1197.
- 5) Meeuse, B.J.D. & Raskin, I. (1988) *Sex. Plant Reprod.*, 1, 3-15.
- 6) Seymour, R.S., White, C.R., & Gibernau, M. (2003) *Nature*, 426, 243-244.
- 7) Seymour, R.S., Ito, Y., Onda, Y., & Ito, K. (2009) *Biol. Lett.*, 5, 568-570.
- 8) Wagner, A.M., Wagner, M.J., & Moore, A.L. (1998) *Plant Physiol.*, 117, 1501-1506.
- 9) Wagner, A.M., Krab, K., Wagner, M.J., & Moore, A.L. (2008) *Biochem. Biophys. Acta*, 1777, 993-1000.
- 10) Kamata, T., Matsukawa, K., Kakizaki, Y., & Ito, K. (2009) *J. Plant Res.*, 122, 645-649.
- 11) Vanlerberghe, G.C. & McIntosh, L. (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 703-734.
- 12) Onda, Y., Kato, Y., Abe, Y., Ito, T., Ito-Inaba, Y., Morohashi, M., Ito, Y., Ichikawa, M., Matsukawa, K., Otsuka, M., Koiwa, H., & Ito, K. (2007) *FEBS Lett.*, 581, 5852-5858.
- 13) Matsukawa, K., Kamata, T., & Ito, K. (2009) *FEBS Lett.*, 583, 148-152.
- 14) Crichton, P.G., Affourtit, C., Albury, M.S., Carré, J.E., & Moore, A.L. (2005) *FEBS Lett.*, 579, 331-336.
- 15) Ito, T. & Ito, K. (2005) *Phys. Rev. E*, 72, 051909.

伊藤 菊一

(岩手大学農学部

附属寒冷バイオフィロンティア研究センター)

Heat-production and respiration control in Eastern skunk cabbage

Kikukatsu Ito (Cryobiofrontier Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda, Morioka, Iwate 020-8550, Japan)

植物の通気組織形成過程におけるメタロチオネインの組織特異的な発現制御

1. はじめに

プログラム細胞死 (programmed cell death, PCD) は、厳密に制御された能動的な細胞死であり、傷害などによって引き起こされる受動的な細胞死である壊死 (necrosis) とは区別される¹⁾。植物は、病原菌の侵入した細胞から隣接した細胞への感染を防ぐ過敏反応 (hypersensitive response, HR) などの環境への応答、および雌性配偶体や

種子の胚乳形成などの分化の過程において、利他的 (altruistic) な PCD により生体を維持し、発達させている¹⁾。

通気組織 (aerenchyma) は、植物体内に形成される空隙であり、効率的な気体 (酸素, 二酸化炭素など) の循環に重要な役割を果たしている²⁾。イネ科植物の根の通気組織は、皮層細胞 (cortical cell) の選択的な崩壊を伴って形成される (図 1)²⁾。その形成過程においては、クロマチンの凝集, DNA の断片化, 膜に囲まれた小胞の形成など、動物のアポトーシス (apoptosis) と類似の現象がみられることから、PCD の一種として定義されている²⁾。

最近、我々は組織切片から特定の細胞層を切り分ける技術であるレーザーマイクロダイセクション法 (laser microdissection, LM)³⁾を用いて、通気組織形成過程のトウモロコシの根の皮層組織 (cortex) から RNA を抽出し、マイクロアレイ (microarray) による網羅的な遺伝子発現解析を行った⁴⁾。その結果、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の除去に関わるメタロチオネイン (metallothionein, MT) をコードする遺伝子が、通気組織形成が起こる皮層組織特異的に発現抑制されることを見いだした⁴⁾。本稿では、通気組織の分類や形態的な特徴、機能的な意義について概説した上で、通気組織形成の分子機構を、MT による ROS の蓄積の制御を中心に紹介する。

2. 通気組織の分類、形態および機能

土壌粒子間には、水相と気相の両方が存在する。植物の根は、水相から水を吸収すると同時に、気相に存在する酸素を使って呼吸することで、根の代謝や成長に不可欠なエネルギーを維持している。しかし、排水性の悪い土壤では、降雨により気相が水相に置き換わることで、土壤が湛水状態 (waterlogged condition) になる。湛水状態では、土壤中の酸素拡散速度が 10,000 分の 1 程度に減少するために、酸素濃度が急激に低下し、根は酸欠状態に陥る⁵⁾。通気組織は、植物の茎葉部から根の分裂や伸長を担う根端部への効率的な酸素供給の経路となり、酸素濃度が低下した湛水状態の土壤への適応に寄与している²⁾。

通気組織は、形成プロセスの違いから、主に離生通気組織 (schizogenous aerenchyma) と破生通気組織 (lysigenous aerenchyma) の二つに分類される²⁾。離生通気組織は、細胞間隙が拡大することによって形成されるが²⁾、主にイネ科植物の根にみられる破生通気組織は、皮層細胞の選択的な細胞死によって形成される (図 1)²⁾。破生通気組織は、土壤に酸素が十分に存在する好気状態 (aerobic condition) においても根の成長に伴って形成される恒常的通気組織

イネの根における通気組織形成

トウモロコシの根における通気組織形成

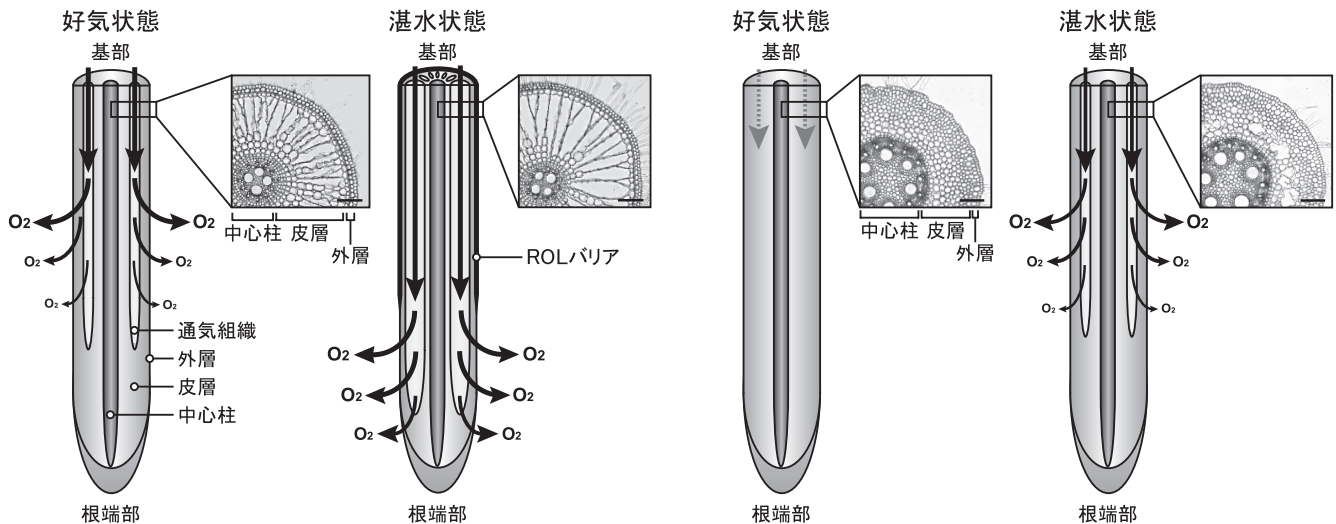


図1 イネ科植物にみられる破生通気組織の形態と機能

イネ科植物の根の破生通気組織は、皮層細胞の選択的な崩壊を伴って形成される。イネを含む湿生植物では、好気状態でも恒常的に通気組織を形成するが、嫌気状態ではさらに誘導的に通気組織の形成範囲を広げる。イネでは、嫌気状態に反応して通気組織からの酸素漏出を防ぐROLバリアを形成することで、根端部への酸素供給を可能にしている。一方、トウモロコシなどの好気的な土壤に適応した植物では、嫌気状態においてのみ誘導的に通気組織を形成する。図中の矢印の向きと太さは、それぞれ酸素の流れる向きと量を示す。根の横断切片写真内のスケールは100 μm 。

(constitutive aerenchyma), および嫌気状態 (anaerobic condition) に応答して形成される誘導的通気組織 (inducible aerenchyma) に分類される (図1)^{2,5)}。恒常的通気組織は、イネを含む湿生植物に多くみられるが、トウモロコシやコムギなどの好気的な土壤に適応した植物にはみられない⁵⁾。一方、誘導的通気組織は、イネだけではなくトウモロコシやコムギなどでも嫌気状態に応答して形成される⁵⁾。また、湿潤な環境に適応したイネでは、嫌気状態に応答して通気組織からの酸素漏出 (radial oxygen loss, ROL) を防ぐROLバリアを形成することで、効率的な根端部への酸素供給を可能にしている (図1)⁵⁾。なお、これ以降、破生通気組織のことを通気組織とする。

3. 誘導的通気組織形成の分子機構

恒常的通気組織、誘導的通気組織の両者に形態的な差異はみられない。しかし、前者は酸素の有無に関わらず根の成長に伴って形成されるのに対して、後者は嫌気状態に応答して形成されることから⁶⁾、これらの通気組織はそれぞれ異なる分子機構で形成されると考えられる。現在までに、恒常的通気組織形成の分子機構は全く明らかになっていない。

イネ科植物の誘導的通気組織の形成は、好気状態であっても植物ホルモンの一つであるエチレンで根を処理することで誘発される^{2,5,7)}。さらに、嫌気状態においてもエチレンの受容阻害剤1-メチルシクロプロペン (1-methylcyclopropene, 1-MCP) で処理することで、その形成が抑制される^{4,5)}。通気組織形成の初期においては、エチレン合成に関わる1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC) 合成酵素 (ACC synthase) およびACC酸化酵素 (ACC oxidase) の活性が高まることから、根で新規に合成されたエチレンが誘導的通気組織形成の重要な調節因子であると考えられている^{2,5,7)}。

トウモロコシでは、生理学的な解析によって、誘導的通気組織形成の分子機構が研究されてきた。その中で、細胞質内の Ca^{2+} 濃度の上昇および Ca^{2+} シグナル伝達の活性化によって、通気組織形成に関わる遺伝子の発現や酵素の活性が誘導されることが示唆されている⁸⁾。エチレンと Ca^{2+} シグナル伝達の関係は明確ではないが、細胞壁の分解を介し、細胞の崩壊に関わるとされているセルラーゼ (cellulase/ β 1,4-endoglucanase) の酵素活性は、 Ca^{2+} 濃度に依存して高まる²⁾。また、エチレンを処理することで、セル

ラーゼ活性の上昇と通気組織形成の誘導が同調的に起こることも報告されている⁸⁾。

4. 誘導的通気組織形成過程で特異的に発現変動する遺伝子とその機能

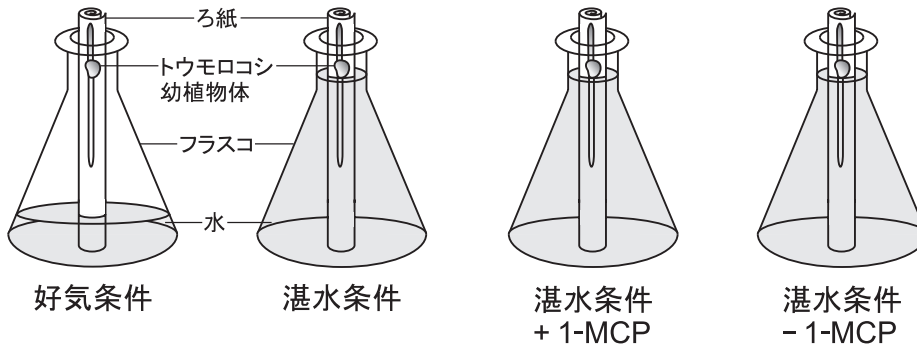
我々は、誘導的通気組織の形成過程において、トウモロ

コシの種子根の皮層組織で特異的に発現が変動する遺伝子を同定した⁹⁾。トウモロコシの幼植物体を好気条件下で処理した場合(図2A)には、通気組織は形成されないが、湛水条件下で処理した場合(図2A)には、根の基部側で通気組織の形成がみられた。しかし、エチレンの受容阻害剤である1-MCPを処理した場合(図2A)、湛水条件下で

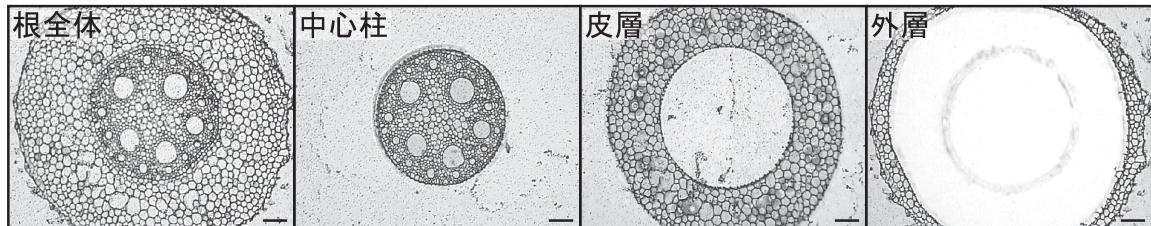
A

実験 1: 好気処理 vs 湛水処理

実験 2: 1-MCP 処理 vs 1-MCP 非処理



B



C

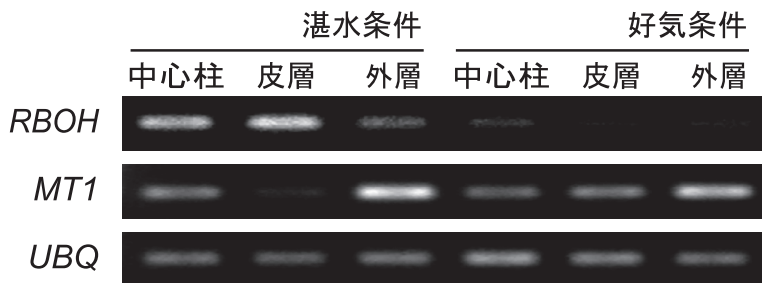


図2 誘導的通気組織形成過程で特異的に発現変動する遺伝子の同定

(A) 実験1では、トウモロコシの種子を濾紙に巻いてフラスコに入れ、下部だけに水を入れた好気条件、及び種子根の基部まで水を入れた湛水条件の間で比較を行った。実験2では、湛水条件下で1-MCP処理の有無による比較を行った。(B) LM法による、根の組織切片からの中心柱、皮層および外層の単離。スケールは100 μm。(C) LM法によって単離した根の中心柱、皮層および外層におけるRBOHとMTの遺伝子発現の比較。UBIQUITIN(UBQ)遺伝子を内部標準として用いた。

も通気組織形成が完全に阻害された⁴⁾。そこで、湛水条件下で通気組織が形成される直前に、湛水条件と好気条件(図2A, 実験1), および湛水条件と1-MCPを処理した湛水条件(図2A, 実験2)の種子根における遺伝子発現をマイクロアレイによって比較し、二つの実験で共通して発現変動する遺伝子を同定した⁴⁾。このとき、通気組織は皮層細胞特異的に形成されることから、マイクロアレイ解析には、LM法によって単離した皮層組織から抽出したRNAを用いた(図2B)。その結果、Ca²⁺シグナル伝達に関わる遺伝子や細胞壁の分解に関わるセルラーゼ遺伝子など、これまでに通気組織形成への関与が示唆されている複数の遺伝子が、通気組織形成過程で発現誘導されることが明らかになった⁴⁾。

さらに、新しい知見として、動物細胞においてROSの発生を担うNADPH酸化酵素の植物ホモログであるrespiratory burst oxidase homolog (RBOH)をコードする遺伝子が、通気組織形成過程の皮層組織で発現誘導されることが明らかになった⁴⁾。RBOHは、細胞膜に局在して、植物の細胞膜外の間隙であるアポプラスト(apoplast)にROSの一種であるスーパーオキシドアニオン(superoxide anion, O₂⁻)を発生させる⁹⁾。発生したO₂⁻は、非常に不安定であり、スーパーオキシドジスムターゼ(superoxide dismutase, SOD)の酵素活性によって、または自発的に過酸化水素(hydrogen peroxide, H₂O₂)に不均化される⁹⁾。シロイヌナズナでは、RBOHによって生成されたO₂⁻によって誘導される遺伝子と植物体に直接H₂O₂を処理することで誘導される遺伝子の約63%が共通することが報告されている⁹⁾。さらに、H₂O₂はアポプラストから細胞内、また細胞間を移動し得ることから、O₂⁻から変換されたH₂O₂が生体内でシグナル分子として機能する可能性が高い⁹⁾。トウモロコシの根の誘導的通気組織形成は、湛水状態であってもNADPH酸化酵素/RBOHの阻害剤であるジフェニレンヨードニウム(diphenyliodonium, DPI)を処理することで抑制される¹⁰⁾。このことから、通気組織形成過程では、RBOHによって生成されたROSがPCDを誘導すると思われる。しかし、好気条件下および湛水条件下におけるRBOH遺伝子の発現を根の各組織で比較解析した結果、根の皮層組織だけではなく、中心柱(stele)や表皮/外皮(epidermis/exodermis)を含む外層においても湛水条件下での発現誘導がみられた(図2C)^{4,10)}。そこで、マイクロアレイ解析の結果から、ROSの除去に関わるType1のMT(MT1)をコードする遺伝子に注目した。MT1遺伝子の発現を、根の各組織で比較解析した結果、根の中心柱や

外層においては常に高く維持されるが、湛水条件下の皮層組織で特異的に発現抑制されることが明らかになった(図2C)^{4,10)}。

5. メタロチオネンによるROSの蓄積の制御

好気性生物の細胞は、生命維持のために不可欠な代謝を行う際、常に分子状酸素の還元によるROSの発生に直面している¹⁾。ROSは、PCDの誘導の鍵となる分子であると同時に、その反応性の高さから細胞にとって有害な分子としての側面をもつ。そのため、生体内におけるROSの蓄積は通常発生と除去の高度なバランスによって維持されている¹⁾。

MTは、構成アミノ酸の3分の1程度がシステイン(cysteine, Cys)残基からなる低分子量(5~10 kDa)のタンパク質である。これまでに、複数の植物型MTが同定されており、アミノ酸配列の保存性から四つのタイプ(Type1~Type4)に分類されている¹¹⁾。MTは、Cys残基の多くが金属に対して配位可能であり、細胞内で金属イオンとの結合と解離を可逆的に行うことで、金属イオン濃度の恒常性に寄与している¹¹⁾。一方で、MTがもつCys残基に含まれるチオール基(-SH)は、ROSに電子を与えて還元し、それ自身はジスルフィド基(-S-S-)に変換される(図3)ことから、MTは豊富なCys残基によってROSを除去する機能を有していると考えられる。実際に、Type2に属するイネのMT2b¹²⁾やType3に属するワタのMT3a¹³⁾が、*in vitro*でO₂⁻やヒドロキシルラジカル(hydroxyl radical, OH)に対して高い抗酸化作用をもつことが明らかになっている。また、MTと結合する亜鉛イオンを溶液に添加した場合、ワタのMT3aの抗酸化作用が抑制されることから、ROSの還元には金属イオンと結合していないチオール基が不可欠であると考えられる¹³⁾。MTのH₂O₂に対する抗酸化作用については報告が得られていないが、H₂O₂は細胞内で金属イオンと反応してOHを生成することから、MTは間接的にH₂O₂の除去に関与する可能性も考えられる(図3)。

分子生物学的な解析からも、MTが植物体内でROSの除去を担うことが報告されている。植物は、病原菌の侵入した細胞から隣接した細胞への感染を防ぐHRの過程において、細胞内にH₂O₂を蓄積させてPCDを誘導する¹²⁾。このとき、RBOH活性の上昇がROSの発生を担うことから、O₂⁻はH₂O₂に変換されて機能すると考えられる。イネのMT2b遺伝子を過剰発現させた個体では、HRの引き金となるH₂O₂の蓄積が抑制されることで病変の形成範囲が広

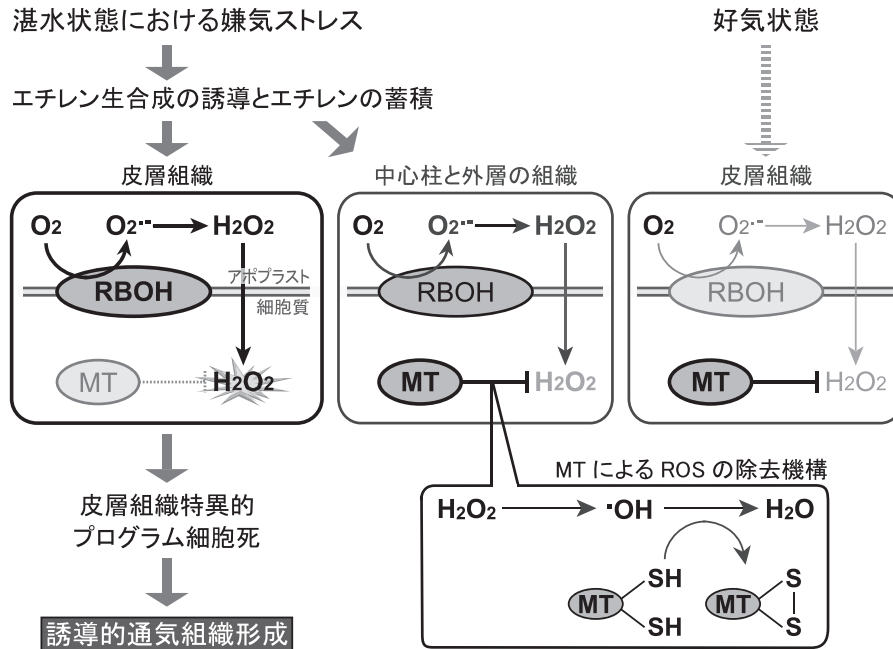


図3 MTによるROSの除去機構と誘導的通气組織形成のモデル

湛水状態では、嫌氣的ストレスに応答したエチレンの蓄積によってRBOHの発現誘導が起こる。RBOHによってアポプラストで生成された $O_2^{\cdot-}$ は、 H_2O_2 に変換されて細胞内に拡散する。 H_2O_2 は中心柱や外層においては、高いレベルで発現するMTの抗酸化作用によって速やかに除去されるが、皮層組織ではMTの発現抑制に伴って H_2O_2 の蓄積が起こり、PCDによる通气組織形成の誘導が起こる。好気状態では、RBOHの発現誘導およびMTの発現抑制は起こらない。

がるが、RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) によって *MT2b* 遺伝子を発現抑制させた個体では、 H_2O_2 の蓄積による PCD が過剰に起こる¹²⁾。また、イネの節に形成される冠根の発生過程では、冠根の発生部位の外側に位置する表皮細胞において、PCD を起こすことにより発根を容易にしている。このとき、HR と同様に、*MT2b* 遺伝子の発現によって H_2O_2 の蓄積が制御されることも報告されている¹⁴⁾。MT 自身も抗酸化活性に加えて、Type 1 に属するイネの MT1a を過剰発現させた個体では、ROS の除去に関わるカタラーゼ (catalase) やアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (ascorbate peroxidase) などの酵素活性が上昇することも報告されている¹⁵⁾。このとき、MT は亜鉛イオンの輸送によって zinc-finger 型転写因子を活性化することが示唆されており、MT による ROS の除去は、MT がもつ抗酸化活性だけでは説明できない複雑な機構であることが垣間見える。

ここまで、植物の MT による ROS の蓄積制御について議論してきたが、誘導的通气組織形成過程において、MT はどのように機能しているのだろうか。湛水状態におい

て、嫌氣的ストレスを受けたトウモロコシの根では、エチレンの蓄積によって RBOH の発現誘導が起こる^{4,10)}。RBOH によって生成された $O_2^{\cdot-}$ は、 H_2O_2 に変換されて細胞内に拡散するが、通气組織が形成されない中心柱や外層においては、MT が高いレベルで発現しているために、 H_2O_2 は速やかに除去されるはずである^{4,10)}。一方、通气組織が形成される皮層組織では、MT の発現抑制によって ROS の除去機能が低下することで、 H_2O_2 の蓄積とシグナルの活性化が起こり、PCD が誘導されることが想定される (図 3)^{4,10)}。このような MT の組織特異的な発現による ROS の蓄積制御は、ROS の関与する植物の環境応答や分化の精密な調節に寄与していると考えられる。

6. おわりに

本稿では、MT による局所的な ROS の蓄積制御が、根の皮層組織特異的な PCD (通气組織形成) に重要である可能性を議論してきた。しかし、通气組織形成過程の皮層組織には、崩壊を逃れて生き残ることで、根の構造を維持する機能を果たす細胞が存在する (図 1)。同じ皮層組織

内の細胞であっても、死ぬ運命の細胞と生き残る運命の細胞がどのように制御されているのかについては理解が進んでいない。MTによる局所的なROSの蓄積制御が、このような皮層細胞の生死を決めているのかもしれない。今後、従来の生理学的、形態学的な研究と連携した分子生物学的な解析によって、細胞レベルでのPCDの制御機構の理解が包括的に進むことを期待する。

謝辞

本稿で紹介した研究は、(独)農研機構・生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の助成により推進された。また、貴重なご意見を頂いた高橋宏和博士(名古屋大学大学院生命農学研究科)に深謝いたします。

- 1) De Pinto, M.C., Locato, V., & De Gara, L. (2012) *Plant Cell Environ.*, **35**, 234-244.
- 2) Evans, D.E. (2003) *New Phytol.*, **161**, 35-49.
- 3) Nakazono, M., Qiu, F., Borsuk, L.A., & Schnable, P.S. (2003) *Plant Cell*, **15**, 583-596.
- 4) Rajhi, I., Yamauchi, T., Takahashi, H., Nishiuchi, S., Shiono, K., Watanabe, R., Mliki, A., Nagamura, Y., Tsutsumi, N., Nishizawa, N.K., & Nakazono, M. (2011) *New Phytol.*, **190**, 351-368.
- 5) Nishiuchi, S., Yamauchi, T., Takahashi, H., Kotula, L., & Nakazono, M. (2012) *Rice*, **5**, 2.
- 6) Shiono, K., Ogawa, S., Yamazaki, S., Isoda, H., Fujimura, T., Nakazono, M., & Colmer, T.D. (2011) *Ann. Bot.*, **107**, 89-99.
- 7) Shiono, K., Takahashi, H., Colmer, T.D., & Nakazono, M. (2008) *Plant Sci.*, **175**, 52-58.
- 8) He, C.J., Morgan, P.W., & Drew, M.C. (1996) *Plant Physiol.*, **112**, 463-472.
- 9) Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A., & Mittler, R. (2011) *Curr. Opin. Plant Biol.*, **14**, 691-699.
- 10) Yamauchi, T., Rajhi, I., & Nakazono, M. (2011) *Plant Signal. Behav.*, **6**, 759-761.
- 11) Freisinger, E. (2011) *J. Biol. Inorg. Chem.*, **16**, 1035-1045.
- 12) Wong, H.L., Sakamoto, T., Kawasaki, T., Umemura, K., & Shimamoto, K. (2004) *Plant Physiol.*, **135**, 1447-1456.
- 13) Xue, T., Li, X., Zhu, W., Wu, C., Yang, G., & Zheng, C. (2009) *J. Exp. Bot.*, **60**, 339-349.
- 14) Steffens, B. & Sauter, M. (2009) *Plant Cell*, **21**, 184-196.
- 15) Yang, Z., Wu, Y., Li, Y., Ling, H.Q., & Chu, C. (2009) *Plant Mol. Biol.*, **70**, 219-229.

山内 卓樹, 西内 俊策, 中園 幹生
(名古屋大学大学院生命農学研究科)

Tissue specific expression of *Metallothionein* gene during aerenchyma formation

Takaki Yamauchi, Shunsaku Nishiuchi and Mikio Nakazono
(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan)

統合失調症の発症における不飽和脂肪酸および脂肪酸結合タンパク質の役割

1. はじめに

脂肪酸はカルボキシ基 (-COOH) 1個をもつカルボン酸のうち、直鎖状構造をとるものである。ヒト体内では主に偶数個の炭素原子を持つ脂肪酸が存在し、炭素数が12個以上のものは長鎖脂肪酸と呼ばれている。また、二重結合(不飽和結合)を持たないものは飽和脂肪酸、二重結合を持つものは不飽和脂肪酸と呼ばれ、不飽和脂肪酸の中で、二重結合が一つのもは一価不飽和脂肪酸(monounsaturated fatty acid: MUFA)、二つ以上のもは多価不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid: PUFA)と呼ばれている。これらの脂肪酸は生体にとって必要不可欠であり、1) 生体膜の構成成分、2) エネルギー源、3) 脂質メディエーターの前駆体、などとして様々な生命現象に関与する。特に多価不飽和脂肪酸は必須脂肪酸として知られており、リノール酸(linoleic acid: LA, ω -6系必須脂肪酸の出発点)、リノレン酸(linolenic acid: LNA, ω -3系必須脂肪酸の出発点)が不足すると皮膚障害や不妊、免疫力の低下など、様々な障害を引き起こす。また、多価不飽和脂肪酸は精神疾患にも関連すると考えられており、1) ドコサヘキサエン酸(docosahexaenoic acid: DHA, ω -3系必須脂肪酸の最終点)やエイコサペンタエン酸(eicosapentaenoic acid: EPA, ω -3系必須脂肪酸の中間点)を精神疾患患者に向精神薬とともに投与すると症状緩和の増強効果が認められること¹⁾、2) 統合失調症では赤血球膜や死後脳で多価不飽和脂肪酸が低下していること^{2,3)}、3) 気分障害では血中の ω -3系多価不飽和脂肪酸が低い患者ほど自殺の危険性が増すこと⁴⁾、4) 精神疾患の前駆症状を示した若年者に ω -3系多価不飽和脂肪酸を投与すると精神疾患発症率が減少し症状が改善すること⁵⁾、などの報告がなされている。しかし、こ