



Analysis of signal transduction pathways of apoptotic cell death induced by the host-specific toxin, victorin

Sakamoto, Masaru

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2005-09-25

(Date of Publication)

2014-04-18

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3456

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003456>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 3 2 5 】

氏 名・(本 籍)	坂本 勝	(三重県)
博士の専攻分野の名称	博士(農学)	
学 位 記 番 号	博い第98号	
学位授与の 要 件	学位規則第5条第1項該当	
学位授与の 日 付	平成17年9月25日	

【 学位論文題目 】

Analysis of signal transduction pathways of apoptotic
cell death induced by the host-specific toxin,
victorin.
(宿主特異的毒素ビクトリンにより誘導されるプログラム
細胞死のシグナル伝達経路の解析)

審 査 委 員

主 査	教 授	眞山 滋志
	教 授	安田 武司
	教 授	朴 杓允
	助教授	中屋敷 均

(注) 論文内容の要旨の草稿の表紙

(氏名: 坂本 勝 NO. 1)

1. ビクトリンにより誘導される2層性の活性酸素種の生成

先に、エンバクビクトリア葉枯れ病菌 (*Cochliobolus victoriae*) の産出する宿主特異的毒素ビクトリンは、感受性遺伝子Vb保有エンバク品種 (Iowa X469) に対し、明確なDNAラダー及びクロマチン凝集を伴うアポトーシス様細胞死を誘導することが明らかにされている (Tada et al., 2001; Yao et al., 2001)。そこで著者らは、ビクトリンによるアポトーシス様細胞死の誘導メカニズムを明らかにするために活性酸素種の検出を試みた。ビクトリン処理により、感受性品種においてのみ処理後30分から速やかに細胞内での活性酸素種の生成が認められた。処理後30分から2時間までの初期段階では、活性酸素種の発生はミトコンドリアで強く認められ、細胞への酸化ストレスは生じていなかった。細胞死が起こる3時間以降では、細胞内全体で強い活性酸素種の生成が認められ、脂質の過酸化やミトコンドリアへの酸化ストレスを伴うものであった。活性酸素除去剤のSuperoxide dismutaseは初期のミトコンドリアでの活性酸素種の発生を抑え、ビクトリンによる細胞死も抑制した。よって、ビクトリンにより、2層性の活性酸素種の生成が起こり、初期の生成はミトコンドリアに局在し、細胞死の誘導に関わるもの、後期の発生は細胞内全体で認められ、細胞死の実行段階で酸化ストレスを誘導し細胞の崩壊に関与するものと考えられた。「Two Phases of Intracellular Reactive Oxygen Species Production during Victorin-Induced Cell Death in Oats.」を *Journal of General Plant Pathology* に投稿、2005年5月に受理。

2. ビクトリンにより誘導されるミトコンドリア膜電位差の低下は細胞死の実行過程で生じる不可逆的な反応である

アポトーシスの後期(実行)過程では、タンパク質分解酵素(caspase)を始めとする細胞死の実行因子を活性化させるための誘導因子としてミトコンドリアからのシグナル伝達が重要な役割を果たしている。そのシグナル伝達に不可欠なミトコンドリアの生理学的な変化として膜電位差の低下が知られ、近年同様の現象が植物のプログラム細胞死でも生じることが明らかとなった。そこで、ビクトリンによるプログラム細胞死においてミトコンドリアの膜電位差低下が生じるか調査した。膜電位差の低下はビクトリン処理後4時間以降に生じ、30分以内で生じるミトコンドリアでの活性酸素種生成よりもかなり遅れて、細胞死に付随して起こることが明らかとなった。細胞死と膜電位差との同時観察により、ミトコンドリアの膜電位差の低下は細胞の生理的な活性が失われた後、つまり細胞死の後期段階で生じることが明らかとなった。このことから、ビクトリンによる細胞死では、ミトコンドリアの膜電位差の低下は誘導過程の現象ではなく、細胞の崩壊に付随した現象であると考えられた。ミトコンドリアの膜電位差の低下はセリン、システインプロテアーゼ阻害剤によって抑制されたことから、細胞の自己分解過程、つまり細胞死の実行段階で生じる現象であることが示唆された。「Irreversible Component of Cell Death Machinery Accompanied with Cellular Degradation in Oat Plants.」 Submitted

(氏名: 坂本 勝 NO. 2)

3. ビクトリンはミトコンドリアの電子伝達系に間接的に作用し細胞死を誘導する

細胞死の誘導過程におけるビクトリンの動向を明らかにするために、ビクトリンをNHS-FluoresceinでラベルしたVic-Fluor(vicF)を作成し、蛍光照射下で可視化できるようにした。vicFはビクトリンと同様に品種特異的な毒性を維持していた。細胞がすでに死んでいる処理後5時間後の細胞観察によりvicFはミトコンドリアと考えられる細胞小器官に蓄積していることが明らかとなった。葉緑体の自家蛍光、ミトコンドリアの膜電位差との同時観察によりvicFのミトコンドリアへの蓄積は細胞死が生じた細胞でのみ認められたことから、以前の報告にあるビクトリンのglycine decarboxylase complex(GDC)への結合現象(Wolpert et al., 1994)は、ビクトリンの初期認識とは異なることが考えられた。ミトコンドリア細胞壁を取り除いたプロトプラストを用いたsingle cell analysisにより、細胞死の誘導過程ではvicFは細胞内に流入しないことが確認された。また、vicFを30-120分間だけ処理し、その後vicFフリーの溶液に移すと細胞内への蓄積を伴わず細胞死が生じた。これらのことからミトコンドリアへのvicFの蓄積は、細胞死の誘導とは関係ないことが明らかとなった。しかしながら、細胞死誘導期において、ミトコンドリアへの活性酸素の生成が認められ、また、GDC阻害剤により細胞死が促進された。さらにミトコンドリアの電子伝達系阻害剤により細胞死が阻害されたことから、細胞外からの電子伝達系が関与した間接的なGDCの阻害がビクトリンの細胞死誘導の一端を担っていることが示唆された。「Implication of Indirect Interaction of Victorin with Mitochondria during the Induction Phase of Programmed Cell Death.」 Submitted

氏名	坂本 勝		
論文 題目	Analysis of signal transduction pathways of apoptotic cell death induced by the host-specific toxin, victorin. (宿主特異的毒素ビクトリンにより誘導されるプログラム細胞死のシグナル伝達経路の解析)		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	眞山滋志
	副 査	教授	安田武司
	副 査	教授	朴 杓允
	副 査	助教授	中屋敷均
要 旨			
<p>第一章では、ビクトリンにより誘導される活性酸素が、2相性の生成を示すことを明らかにした。エンバクビクトリア葉枯れ病菌(<i>Cochliobolus victoriae</i>)の産出する宿主特異的毒素ビクトリンは、感受性遺伝子 Vb 保有エンバク品種(Iowa X469)に対し、明確な DNA ラダー及びクロマチン凝集を伴うアポトーシス様細胞死を誘導することが先に明らかにされている(Tada et al., 2001; Yao et al., 2001)。そこで著者は、ビクトリンによるアポトーシス様細胞死の誘導メカニズムを明らかにするために活性酸素種の検出を試みた。ビクトリン処理により、感受性品種においてのみ処理後 30 分から速やかに細胞内での活性酸素種の生成が認められた。処理後 30 分から 2 時間までの初期段階では、活性酸素種の発生はミトコンドリアで強く認められ、細胞への酸化ストレスは生じていなかった。細胞死が起こる 3 時間以降では、細胞内全体で強い活性酸素種の生成が認められ、脂質の過酸化やミトコンドリアへの酸化ストレスを伴うものであった。活性酸素除去剤の Superoxide dismutase は初期のミトコンドリアでの活性酸素種の発生を抑え、ビクトリンによる細胞死も抑制した。よって、ビクトリンにより、2 相性の活性酸素種の生成が起こり、初期の生成はミトコンドリアに局在し、細胞死の誘導に関わるもの、後期の発生は細胞内全体で認められ、細胞死の実行段階で酸化ストレスを誘導し細胞の崩壊に関与するものと考えられた。</p> <p>第二章では、ビクトリンにより誘導されるミトコンドリア膜電位差の低下が細胞死の実行過程で生じる不可逆的な反応であることを示した。アポトーシスの後期(実行)過程では、タンパク質分解酵素(caspase)を始めとする細胞死の実行因子を活性化させるための誘導因子としてミトコンドリアからのシグナル伝達が重要な役割を果たしている。そのシグナル伝達に不可欠なミトコンドリアの生理学的な変化として膜電位差の低下が知られ、近年同様の現象が植物のプログラム細胞死でも生じることが明らかとなった。そこで、ビクトリンによるプログラム細胞死においてミトコンドリアの膜電位差低下が生じるか調査した。膜電位差の低下はビクトリン処理後 4 時間以降に生じ、30 分以内で生じるミトコンドリアでの活性酸素種生成よりもかなり遅れて、細胞死に付随して起こることが明らかとなった。細胞死と膜電位差との同時観察により、ミトコンドリアの膜電位差の低下は細胞の生理的な活性が失われた後、つまり細胞死の後期段階で生じることが明らかとなった。このことから、ビクトリンによる細胞死では、ミトコンドリアの膜電位差の低下は誘導過程の現象ではなく、細胞の崩壊に付随した現象であると考えられた。</p>			

氏名	坂本 勝
<p>ミトコンドリアの膜電位差の低下はセリン、システインプロテアーゼ阻害剤によって抑制されたことから、細胞の自己分解過程、つまり細胞死の実行段階で生じる現象であることが示唆された。</p> <p>第三章においては、ビクトリンがミトコンドリアの電子伝達系に間接的に作用し細胞死を誘導することを明らかにしている。細胞死の誘導過程におけるビクトリンの動向を明らかにするために、ビクトリンを NHS-Fluorescein でラベルした Vic-Fluor(vicF)を作成し、蛍光照射下で可視化できるようにした。vicF はビクトリンと同様に品種特異的な毒性を維持していた。細胞がすでに死んでいる処理後 5 時間後の細胞観察により vicF はミトコンドリアと考えられる細胞小器官に蓄積していることが明らかとなった。葉緑体の自家蛍光、ミトコンドリアの膜電位差との同時観察により vicF のミトコンドリアへの蓄積は細胞死が生じた細胞でのみ認められたことから、以前の報告にあるビクトリンの glycine decarboxylase complex(GDC)への結合現象(Wolpert et al., 1994)は、ビクトリンの初期認識とは異なることが考えられた。ミトコンドリア細胞壁を取り除いたプロトプラストを用いた single cell analysis により、細胞死の誘導過程では vicF は細胞内に流入しないことが確認された。また、vicF を 30-120 分間だけ処理し、その後 vicF フリーの溶液に移すと細胞内への蓄積を伴わず細胞死が生じた。これらのことからミトコンドリアへの vicF の蓄積とは独立して細胞死が生じることが明らかとなった。しかしながら、細胞死誘導期において、ミトコンドリアへの活性酸素の生成認められ、また、GDC 阻害剤により細胞死が促進された。さらにミトコンドリアの電子伝達系阻害剤により細胞死が阻害されたことから、細胞外からの電子伝達系が関与した間接的な GDC の阻害がビクトリンの細胞死誘導の一端を担っていることが示唆された。</p> <p>以上のように、本研究は植物病原菌が産出する宿主特異的毒素ビクトリンが宿主であるエンバクに誘導するプログラム細胞死のシグナル伝達経路について多方面からの解析を行い、これまでに明らかにされてこなかった植物のプログラム細胞死の新たな側面を見出した点で画期的なものであり、学位申請者 坂本勝は、博士(農学)の学位を得る資格ありと認める。</p>	