

重金属過剰条件で培養したシロイヌナズナ細胞の過敏反応の変化

吉野, 加奈子 / YOSHINO, Kanako

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

56

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2015-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00011462>

重金属過剰条件で培養した シロイヌナズナ細胞の過敏感反応の変化

EFFECT OF EXCESS HEAVY METAL CONDITIONS ON INDUCTION OF HYPER-SENSITIVE RESPONSE OF
ARABIDOPSIS CELL CULTURE INDUCED BY APPLICATION OF A FLAGELLIN PEPTIDE

吉野 加奈子

Kanako YOSHINO

指導教員 佐野 俊夫

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻植物医科学領域修士課程

Some heavy metals are used as essential trace elements for plant growth. However, plants can't grow in both excess and deficient concentrations of heavy metals. In this study, I examined the effect of excess heavy metal conditions on induction of hyper-sensitive cell death. The *Arabidopsis thaliana* cell-culture (MM2d) was exposed to the excess condition of five heavy metals (Cu, Fe, Zn, Mn and Cd) and cell death was induced by application of a flagellin peptide 22 (flg22) that acted as a pathogen-associated molecular pattern triggering the immune response in plants. After application of flg22, I observed the rate of cell death, production of reactive oxygen species (ROS), gene expression of a pathogenesis-related gene of *WRKY22* and superoxide dismutase (SOD) genes and finally the change of the amount of anti-oxidant substances. As a result, although significant differences were not observed between the control and these excess heavy metal conditions, repression of *SOD* gene expression by flg22 application suggested the involvement in the effective induction of hyper-sensitive cell death.

Key word: *Arabidopsis thaliana*, *flagellin*, *heavy metals*, *ROS*, *SOD*

1. 諸言

重金属無機要素は微量必須元素として、その過不足によって植物に生理障害を引き起こす。また、適度な重金属無機要素の施肥は、静的抵抗性を高め植物病を予防することも知られている。そのため、重金属無機要素の過不足と植物耐病性との関係性を調べることは、より病気に強い植物を育てる肥料条件の検討に繋がると考えられる。

本研究では、シロイヌナズナ培養細胞 (MM2d) と植物の過敏感反応を誘導するエリシターであるフラジェリンペプチド (flg22) を用い、重金属過剰条件における過敏感細胞死率の変化を測定した (1)。そして、細胞死誘導過程に生じる、活性酸素発生、病害応答遺伝子発現お

よび、活性酸素除去酵素遺伝子発現、総抗酸化物質含有量変化の測定を行い、重金属ストレスが過敏感細胞死誘導に与える影響を調べた。

2. 方法

改変リンスマイヤー・スクーグ培地 (L 基本培地) で継代培養した MM2d 細胞に重金属を過剰処理し、培養を行った。重金属は、銅 (Cu)、鉄 (Fe)、亜鉛 (Zn)、マンガン (Mn)、カドミウム (Cd) の 5 種を用いた。L 培地には微量重金属要素として 0.1 mM CuSO₄、0.1 mM FeSO₄、0.1 mM MnSO₄、0.03 mM ZnSO₄、が含まれている。過剰培地は 10 mM Cu (基本培地の 100 倍濃度)、1 mM

Fe (10 倍濃度)、1 mM Zn (30 倍濃度)、1 mM Mn (10 倍濃度)、20 mM Cd (基本培地には含まれない) に設定した。過敏感細胞死の計測は、各種重金属過剰培地で 24 時間培養した MM2d に flg22 10 nM を処理し、更に 24 時間培養し過敏感細胞死を誘導した。死細胞の判定にはエバンスブルー染色を用い、過敏感細胞死率を算出した。活性酸素発生量は活性酸素検出試薬 DCFH-DA を用い、マイクロプレートリーダーで蛍光強度を計測して求めた。更に過敏感細胞死誘導時の細胞応答を調べるために、病害応答遺伝子 *WRKY22* と活性酸素除去酵素 *SOD* (スーパーオキシドディスムターゼ) 遺伝子発現量変化をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。*SOD* 遺伝子には *AtCSD1* (細胞質型)、*AtMSD1* (ミトコンドリア型)、*AtFSD1* (葉緑体型) の 3 種を用いた (2)。いずれも内在性コントロールには *Actin* 遺伝子を用いた。総抗酸化物質含有量は、各区の MM2d 細胞 100 mg からメタノール抽出した後、Folin-Denis 法により呈色し、波長 760 nm の吸光度を測定しカテキン相当量として算出した。

3.結果

基本培地で培養したシロイヌナズナ MM2d 細胞にフラジェリンペプチド flg22 を添加すると、24 時間後に約 15 % の細胞が過敏感細胞死を起こした (図 1)。基本培地に各種重金属を添加して細胞を培養したところ、いずれの過剰区でも対照区に比べ過敏感細胞死率に大きな変化は見られなかった (図 1)。

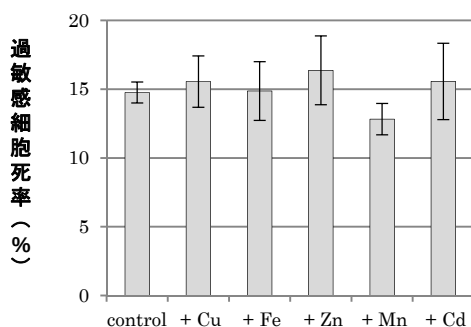


図 1. 各重金属過剰培地における過敏感細胞死率変化。flg22 処理 24 時間後の細胞死率を表す。過敏感細胞死率は、「(flg22 処理区) - (flg22 無処理区)」として算出した。実験 7 回の平均と標準誤差を示す。

MM2d 細胞の flg22 に対する病害応答を確認するため、病害応答関連遺伝子である *WRKY22* の発現量を調べたところ、対照区では約 6 倍の発現量の増加が見られ、いずれの過剰区でも同様の結果が得られた (図 2)。

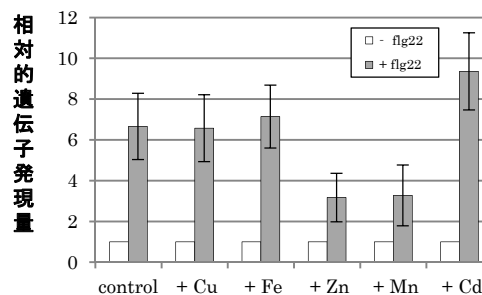


図 2. 各重金属過剰培地における *WRKY22* 遺伝子発現量変化。flg22 無処理区を 1 として、各重金属過剰区の相対的遺伝子発現量を表す。実験 3 回の平均と標準誤差を示す。

過敏感反応において初期に活性酸素が急激に発生することから、flg22 処理の有無による活性酸素発生量の差異を調べた結果、flg22 処理後の初期段階で急激な増加が見られ、時間経過によって緩やかになり安定する傾向が見られた (図 3)。鉄過剰条件において発生量が多い傾向にあったが、他の重金属添加条件では基本培地条件と同程度の発生量であった (図 3)。

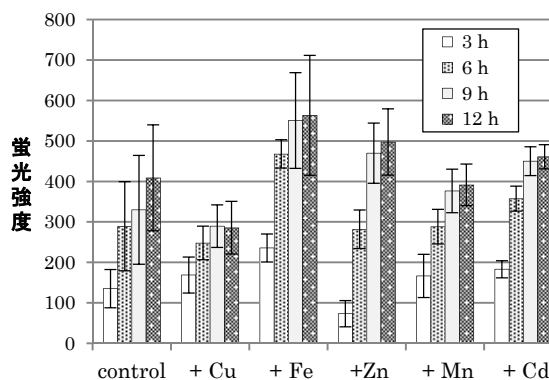


図 3. 各重金属過剰培地における flg22 処理後の活性酸素発生量経時変化。活性酸素検出試薬 DCFH-DA を用い、各培地における「(flg22 処理区) - (flg22 無処理区)」の時間経過毎の発生量を表す。実験 4 回の平均と標準誤差を示す。

細胞内の活性酸素除去方法には主に、酵素による分解と抗酸化物質による除去が考えられる。そこで、活性酸素除去酵素の一つ、*SOD* の遺伝子発現量変化と総抗酸化物質含有量変化を測定した。そのうち *AtCSD1* 発現量は

銅、鉄、亜鉛の過剰条件下で増加しており、そして、flg22 処理によりほとんどの試験区において3種のSOD遺伝子発現量の低下が見られた(図4)。

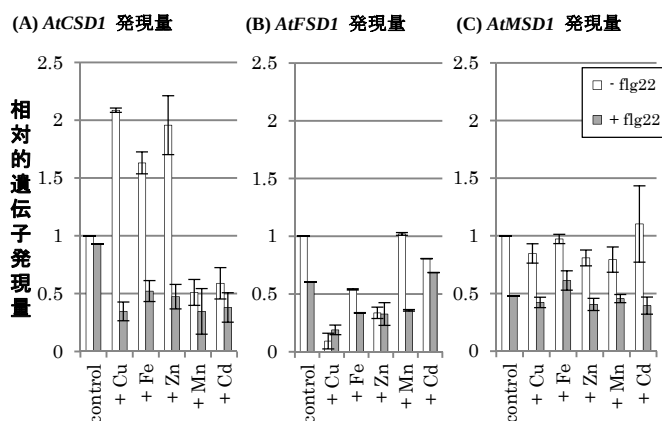


図4. 各重金属過剰培地における各SOD遺伝子発現量変化。(A) *AtCSD1*、(B) *AtFSD1*、(C) *AtMSD1*。control 区の flg22 無処理を 1 として各区の 24 時間後の遺伝子発現量を表す。実験 3 回の平均と標準誤差を示す。

総抗酸化物質含有量の変化を測定したところ、いずれの培養条件下においても flg22 処理 3 時間後に減少し、その後は時間経過により含有量の回復が見られ、24 時間後には flg22 処理直後よりも含有量が増す傾向が見られた(図5)。

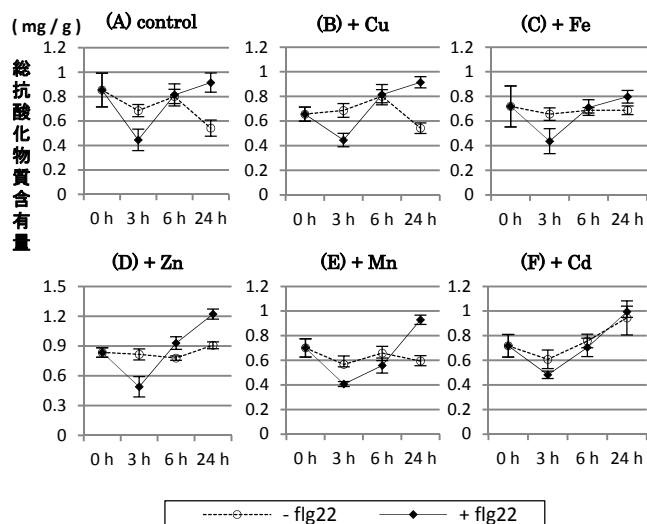


図5. 各重金属過剰培地における総抗酸化物質含有量経時変化。(A) control、(B) + Cu、(C) + Fe、(D) + Zn、(E) + Mn、(F) + Cd。Folin-Denis 法で呈色、760 nm で定量しカテキン相当量として算出した。実験 3 回の平均と標準誤差を示す。

4.考察

各重金属過剰培地での過敏感細胞死率は基本培地条件と同等であったが、いずれの条件でも flg22 処理による病害応答遺伝子 *WRKY22* の発現量増加が見られたことから、flg22 に対する応答があることが確認できた。いっぽう、SOD 遺伝子の発現量はほとんどの試験区で flg22 処理により減少した。SOD は細胞内に発生する活性酸素を除去し細胞を正常な状態を保つ機能を担うと考えられている。実際、細胞質型 SOD である *AtCSD1* 遺伝子発現量が Cu、Fe、Zn の過剰条件下で flg22 無処理区において増加しているのは、重金属添加により生じる酸化ストレスに反応した可能性が考えられる。反対に、過敏感反応時には SOD 遺伝子発現を抑えることで活性酸素の除去を抑え、素早く過敏感細胞死を誘導することで、周囲の細胞への感染拡大を抑制しているのかもしれない。また、細胞内の総抗酸化物質含有量は flg22 処理 3 時間後に減少し、その後増加傾向が見られた。今回、抗酸化物質測定に用いた Folin-Denis 法は、細胞内の還元物を検出しているので、過敏感反応の初期段階で急激に生じた活性酸素により抗酸化物質が酸化され、還元力が無くなったことを表していると思われる。そして、過敏感反応の後期段階では抗酸化物質が再合成され、見かけの活性酸素増加量が緩やかになったと思われる。

今回の報告では flg22 処理による、病害応答遺伝子の発現、活性酸素の発生、活性酸素除去酵素遺伝子、SOD 発現量の低下、総抗酸化物質量の減少が観察できた。しかし、重金属処理による過敏感反応の程度の差を確認することはできなかった、今後は植物体を用いた研究にも着手し、重金属過剰が与える植物の耐病性への影響を調べたい。

参考文献

- (1) Georg F, Juliana D. Duran, Sigrid V and Thomas B(1999) : Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. The Plant Journal 18(3), 265-276
- (2) Ruth Grene A, Neval E and Lenwood S.Heath (2002) : Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany Vol.53, No.372