

メタカスパーゼは植物のプログラム細胞死を制御するか？

南 淳

鶴岡工業高等専門学校物質工学科

1. はじめに

多細胞生物において、細胞分裂によって生じた細胞の一部は個体の死を待たずに死ぬことがある。強い傷害によって死ぬ場合もあるが、個体の利益のために自ら積極的に死んでいく場合もある。後者の細胞死はあらかじめ死に方が決まっていると考えられ、Programmed Cell Death という。PCD は多細胞生物の体づくり（発生と形態形成、細胞の分化）と、恒常性の維持、生体防御に重要な役割を持っている。特に、動物における PCD の一形態であるアポトーシスは、がん、免疫、神経ネットワーク形成など医学的に重要なトピックスと深い関わりを持っていることから多くの研究者からの注目を集め、今まで膨大な量の研究が行われてきた。一方、植物においても PCD は動物と同様に重要な役割を持つが、その分子メカニズムの解明は大きく遅れている。

プロテアーゼ（タンパク質分解酵素）であるカスパーゼがアポトーシスの制御の主役になっていることはよく知られている。細胞内外のシグナルを受容してカスパーゼは活性化し、アポトーシスを引き起こす。植物においても同様な分子メカニズムがあることが期待されていたが、2000年に植物にはカスパーゼ遺伝子が無いこと、遠縁の相同遺伝子としてメタカスパーゼ遺伝子が発見された。以来、メタカスパーゼの植物 PCD への関与に関する論文が提出されてきた。本解説ではここ十数年の植物メタカスパーゼ研究についてレビューし、「植物メタカスパーゼはプログラムされた細胞死を制御するか？」という問題を考える。

2. アポトーシスとカスパーゼ

多くの動物の PCD はアポトーシスとよばれる形態学的な特徴を持つ。そのため、PCD の代名詞として使われる場合がしばしばある。アポトーシスの過

程において、細胞は丸く小さくなり、核が縮小する。細胞表面が不規則に膨らんだ後、細胞は断片化してアポトーシス小体に変化する。アポトーシス小体は食細胞に取り込まれて、そのリソソームに含まれている加水分解酵素により分解される。生化学的には、DNA の電気泳動像がラダー状になることで示される、ヌクレオソーム単位の DNA の切断が指標としてよく用いられている。

2002年にノーベル医学生理学賞を受賞した R. Horvitz らが行った、線虫 *C. elegans* を用いた研究は PCD の分子メカニズム研究の先駆けであった。線虫は 1000 個ほどの細胞から成り立つ小さな多細胞生物であり、その全ての細胞が同定され、どの細胞がどの細胞に由来するかという細胞系譜がわかっている。線虫の発生の過程で 131 個の細胞が決まった時期に PCD を起こし消失する。Sulston と Horvitz は PCD を起こさなくなる突然変異体 *ced* を単離した¹が、このことによって細胞死が遺伝子によって制御されていることが示された。1993年、*ced-3* 遺伝子は哺乳類のインターロイキン-1β 転換酵素(ICE) と相同性のあるプロテアーゼであることが示された²。その後、哺乳類やショウジョウバエなどで相同な遺伝子が見つかり、この酵素はシステインプロテアーゼの一種であり、基質タンパク質のアスパラギン酸の後ろの加水分解を触媒することに由来するカスパーゼ (Cysteine aspartic acid protease) という名前で統一されて呼ばれるようになった。

カスパーゼは多重遺伝子族を作っており、タンパク質の構造、基質特異性など酵素学的性質、細胞内での役割が異なっている。アポトーシスの誘導や初期過程に関与するイニシエーター・カスパーゼ、アポトーシスの実行役であるエフェクター・カスパーゼに大別される。前者にはカスパーゼ 2、8、9、10、後者にはカスパーゼ 3、6、7が含まれる。全てのカスパーゼがアポトーシスに関係しているのではなく、炎症反応に関係するもの(カスパーゼ 1, 4)もある。

カスパーゼは同種または異種のカスパーゼの作用

によって部分分解されて活性化（プロセッシング）され、これは活性化が活性化を招くカスケード現象を招く。カスパーゼは不活性なタンパク質として合成され、特定の2箇所の Asp 残基の後で加水分解され、N 末端側からプロドメイン、p20、p10 と呼ばれる断片になる。活性部位を作る Cys 残基と His 残基がある p20 が2つ、p10 が2つ集合した分子が活性なカスパーゼとなる。イニシエーターカスパーゼのうち、カスパーゼ 9, 2, 1, 4 は CARD (caspase recruitment domain) ドメイン、カスパーゼ 8, 10 は DED (death effector domain) ドメインを持ち、これらの領域を介して、他のタンパク質と相互作用する。様々な細胞内外のシグナルによりカスパーゼのカスケードが起こり、アポトーシスが引き起こされる。細胞内のストレスは細胞内小器官のミトコンドリアに受容され、ミトコンドリアからシトクロム c が放出され、この分子にカスパーゼ 9 と他の分子が結合して複合体を作ると、カスパーゼ 9 が活性化される。活性化されたカスパーゼ 9 はエフェクターカスパーゼを分解して活性化する。一方、細胞死を指令するリガンド（デスリガンド）が細胞表面のレセプターで受容されると、このレセプターとプロドメインを介して結合していたカスパーゼ 8 が切り離され、自己プロセッシングにより活性化する。活性化されたカスパーゼ 8 はカスパーゼ 3 などエフェクターカスパーゼを活性化する。そしてエフェクターカスパーゼは核ラミン、ICAD (Inhibitor of

CAspase-Dependent nuclease)、ポリ(ADP)リボースポリメラーゼを分解する。ICAD の分解は、それに結合していて妨害されていた CAD (CAspase-Dependent nuclease) を放出し活性化させ、このヌクレアーゼによる DNA の分解を導くと考えられている。

このように、カスパーゼはアポトーシスの制御に中心的な役割を果たすが、カスパーゼに依存しない細胞死もあること、カスパーゼ 1 のようにアポトーシスには関連しないカスパーゼもあることに注意しなくてはならない。

3. 植物の PCD

発生、細胞分化、生体防御、環境応答を含む植物生理の様々な局面で PCD は重要な役割を演じている。生殖と胚発生の過程で PCD が起こる。自身の花粉は受粉しない「自家不和合性」においては、花粉が PCD を起こし花粉管に発達できなくなる。花粉管の精核と受精した胚のうちの中央細胞は細胞分裂しデンプンを蓄積する胚乳になるが、これに伴って胚乳を構成する細胞は死ぬ。受精卵は胚と母胎をつ

ながサスペンサーに分化するが、サスペンサーは胚発生が進むと消失する。PCD が形態形成に必須である例は、通気組織やレース状葉の形成で見られる。PCD を伴う細胞分化もある。道管や厚壁組織はリグニン化した厚い二次細胞壁を持った死んだ細胞から成り立っており、前駆細胞が道管の管状要素、厚壁細胞に細胞分化するとき、細胞死が起こる。花卉や緑葉の老化 (Senescence) も一連の遺伝子発現を必要とする PCD の一種と考えられる。

植物は、高温、低温、乾燥、強光、紫外線、活性酸素種など非生物学的ストレスに曝されたとき、それが弱い場合は細胞・組織を生存させるように様々な方法で対処するが、許容範囲を超えたときは積極的に PCD を起こす。病原菌の感染やその毒素の曝露など生物学的ストレスでも同様である。病原菌が感染したとき、特にすみやかに PCD を起こす現象は過敏反応死といい、病原菌の増殖・拡散を防ぐための手段である。

細胞壁で囲まれており、食細胞も存在しない植物の PCD では、動物のアポトーシスとは異なり、細胞は死ぬとき、自ら分解しなくてはならない。最近、植物の細胞死を形態学的に2つのタイプに分類することが提唱された³。一つは「液胞による細胞死」であり、ここでは中央液胞が最初、細胞質を取り込んで液胞内加水分解酵素によって分解し、最終段階で液胞が崩壊して、液胞内加水分解酵素が細胞全体に放出されるものである。発生のプログラム上の PCD や細胞分化に伴う PCD がこれに該当する。もう一つは「ネクロシス」であり、ここでは細胞膜が早い時期に崩壊し、原形質の萎縮が起こる。非生物学的ストレスによって誘発される細胞死が該当する。ただし、過敏反応死は両方の細胞死のイベントが同時進行するし、胚乳の PCD や自家不和合性での PCD はどちらにもあてはまらない。

これら植物の PCD のそれぞれについて、細胞学的な解析や細胞死のシグナル伝達、細胞死の実行の分子メカニズムに関する生化学的、分子生物学的解析が行われた。それらは先行する動物のアポトーシス研究に影響される面も大きかった。いくつかの植物 PCD はアポトーシスに似た形態変化や DNA 分解を示した。それらの PCD においてカスパーゼ活性（人工基質の Asp 残基の後を切断するペプチダーゼ活性）が上昇すること、カスパーゼの阻害剤（Asp を含むオリゴペプチド性化合物）の添加によって阻害されることがわかってきた。そのため植物のカスパーゼ遺伝子を探す試みが行われたが、失敗に終わった。植物にカスパーゼ遺伝子は無いのか？その答えは 2000 年のシロイヌナズナの全ゲノム塩基配列⁴の解明によって、判明することになった。

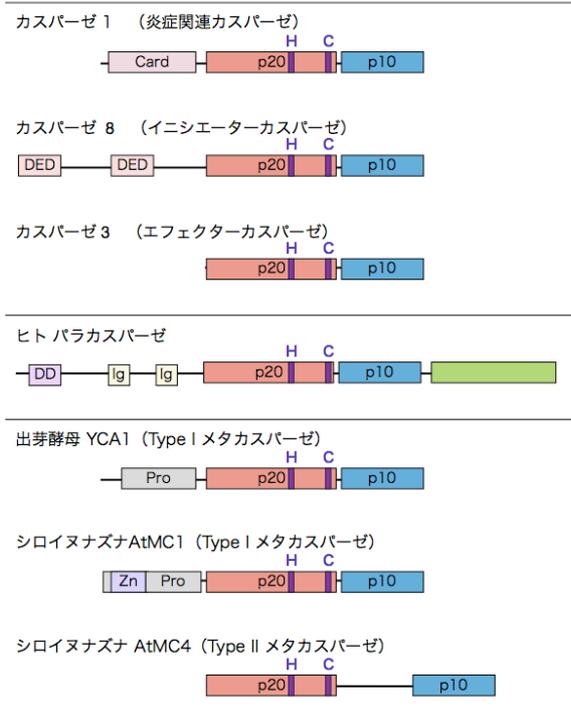


図1 カスパーゼ、パラカスパーゼ、メタカスパーゼの構造。代表的なカスパーゼ、パラカスパーゼ、メタカスパーゼのドメイン構造を模式的に表す。

4. メタカスパーゼの発見

動物と細胞性粘菌にカスパーゼと一部が似た遺伝子（パラカスパーゼ）があることが発見され、その配列に基づき、2000年、Urenらはゲノムデータベースを検索することにより、カスパーゼに関係のある2種類の遺伝子群を発見した⁵。ひとつはパラカスパーゼ、もうひとつは、植物、菌類、クロミスタ（クロロフィル a/c を持つ藻類とその近縁種を含む分類群）が持っているものであり、メタカスパーゼと名付けられた。どちらもカスパーゼの p20 と p10 に相同なドメインを持っており、触媒部位の His と Cys も持っている。なお、この触媒部位の His と Cys は他のシステインプロテアーゼであるジンジパイン R、クロストリパイン、レグメイン (VPE) にも保存されており、これらのシステインプロテアーゼは Clan CD システインプロテアーゼとしてまとめられている。

パラカスパーゼは N 末端側に death domain と 1 つまたは 2 つの Ig ドメインを含むプロドメインを持っており、p10 の C 末端側にも延長配列を持っている。メタカスパーゼは 2 つのタイプがあり、N 末端プロドメインを持つものは Type I、それを持たず、p20 と p10 の間にリンカーと考えられる部分を持つ

ているものは Type II と名付けられた。緑色植物は Type I と Type II 両方を持ち、菌類、クロミスタ、原生動物は Type I メタカスパーゼのみを持っている。シロイヌナズナは 3 つの Type I メタカスパーゼ (AtMC1-3)、6 つの Type II メタカスパーゼ (AtMC4-9) 遺伝子を持っている。

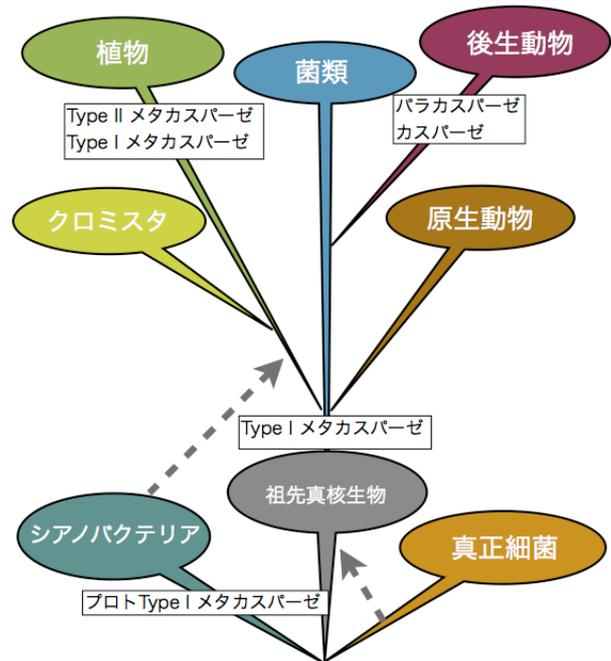


図2 進化系統樹上のメタカスパーゼ、パラカスパーゼ、メタカスパーゼの分布。点線は遺伝子の水平伝播を示す。

ここ十年で、多くの生物種のゲノムが解明されてきて、それは遺伝子の分子進化を考える上での材料を提供した。33種のシアンobacteriaゲノムから、58種のメタカスパーゼに相同性を持つ遺伝子が発見された⁶。緑色植物の祖先と考えられているプラシノ藻類に属するピコプランクトン、オストレオコッカスとマイクロモナスのゲノムも解明されたが、両種とも Type I メタカスパーゼのみを持っていた。しかし、緑藻植物である単細胞のクラミドモナス、多細胞群体を作るボルボックスは 1 つの Type I メタカスパーゼの他に 1 つの Type II メタカスパーゼを持っている⁷。このことは陸上植物の進化の前に Type II メタカスパーゼがあったことを意味する。コケ植物のモデル生物、ヒメツリガネゴケのゲノムには Type I、Type II とも数種の遺伝子が含まれており、陸上植物の進化の初期にメタカスパーゼ遺伝子の重複が起こったことを示唆する。被子植物が持つ Type I、Type II メタカスパーゼ遺伝子の数は種によって異なっており、ポプラは少なくとも 10 個の Type I と予想される遺伝子を持っており、ブドウは Type II を 2 つだけ持っている。

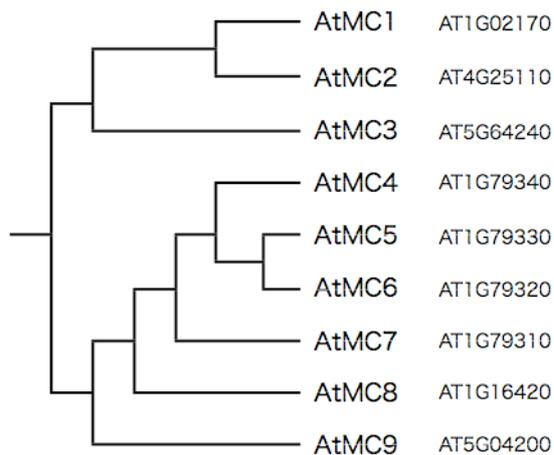


図3 シロイヌナズナメタカスパーゼ遺伝子の分子系統樹。

図3にシロイヌナズナの9つのメタカスパーゼ遺伝子の簡易な（枝の長さは進化的な距離を反映していない）分子系統樹を示す。Type II メタカスパーゼの中で、AtMC9は他の5つとは相同性が低い。これはリンカー配列の長さが大きく異なっているためである。またリンカー配列のアミノ酸配列もかなり異なっている。遺伝子番号が示すように、AtMC9以外のType II 遺伝子は第1染色体上にある。互いに相同性の高いAtMC4,5,6,7はタンデムに並んでおり、これら遺伝子群が遺伝子重複により生じたことを示唆する。

次の重要な発見は、メタカスパーゼがカスパーゼの活性を持っていないということである。

VercammenらはクローニングしたAtMC4とAtMC9遺伝子を大腸菌で発現させた組換えタンパク質の酵素学的性質を調べたが、どちらの組換えタンパク質も各種カスパーゼの特異的基質であるDEVD、YVAD、VADに対する加水分解活性を示さず、代わりにGRR、FR、GKRへの高い加水分解活性を示した⁸。AFKに対してはAtMC4のみ弱い加水分解活性を示した。WatanabeとLamも同様に大腸菌で発現させたAtMCP1bとAtMCP2bそして酵母のメタカスパーゼ遺伝子YCA1もArgに特異的なプロテアーゼ活性を持つことを示した⁹。BozkovらはドイツウヒのType II メタカスパーゼmcII-PaがEGRとGRRを分解し、YEIDとYVADを分解しないことを示した¹⁰。この基質特異性の違いは、カスパーゼ酵素分子の基質ポケットをつくるアミノ酸が塩基性アミノ酸であるのに対し、メタカスパーゼの相当するアミノ酸残基が酸性アミノ酸になっている事によっても支持される¹¹。すなわち、それまで報告されていた植物のPCDに関係するカスパーゼ活性の担い手はメタカスパーゼではないことがわ

かった。したがって、次に、植物のPCDにおいてカスパーゼ活性を担っているプロテアーゼ遺伝子は何かということ、メタカスパーゼが植物や菌類、原生動物のPCDにおいて、動物のアポトーシスにおけるカスパーゼの機能を持っているかどうかという問題が注目された。

5. 酵母のメタカスパーゼの機能

メタカスパーゼのPCDへの関与を示唆する最初の報告は、モデル生物である酵母での研究から提出された。菌類である出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*は単細胞生物であるが、低濃度の過酸化水素を与えるとアポトーシス様（DNAの断片化を伴う）の細胞死を起こす。タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドで阻害されることから、この細胞死は積極的な細胞死すなわちPCDであると考えられる¹²。YCA1と名付けられた出芽酵母の唯一のメタカスパーゼ遺伝子を過剰発現すると、過酸化水素誘導性のPCDが促進され、遺伝子破壊株 $\Delta yca1$ ではPCDが抑制される¹³。また、野生型酵母を10日間程培養し続けると、ほぼ全てが死滅する（齢依存性細胞死）が、 $\Delta yca1$ では30日の培養でも数%が生き残る。このように、メタカスパーゼが酵母の過酸化水素誘導性PCDと齢依存性PCDを制御していると考えられる。しかし、その後、YCA1は細胞周期の進行に関与しているという報告¹⁴、不溶性タンパク質の除去に働いているという報告¹⁵があり、議論は分かれている。

WatanabeとLamは $\Delta yca1$ にシロイヌナズナメタカスパーゼ遺伝子AtMC1b、AtMC2bを過剰発現させると、YCA1を過剰発現させた時と同様にアポトーシス様の細胞死が引き起こされることを示した⁹。また、Heらは $\Delta yca1$ へのAtMC8の過剰発現は過酸化水素誘導性PCDを部分的に回復させることを示した¹⁶。このように遺伝子操作が容易な酵母の、唯一のメタカスパーゼ遺伝子欠損株である $\Delta yca1$ は植物メタカスパーゼの機能解析のツールとして有用でもある。

6. Type II メタカスパーゼと非生物学的・生物学的ストレス誘導性PCD

HoeberichtsらはトマトからType II メタカスパーゼをコードするLeMCA1を単離し、トマト葉に病原菌（菌類）*Batrytis cinerea*を感染させるとLeMCA1の転写が促進されることを示し、メタカス

パーゼが生物学的ストレス誘導性のPCDに関与していることを初めて示唆した¹⁷

さて、植物における遺伝子機能の研究には、モデル植物シロイヌナズナの「逆遺伝学的」解析がよく用いられる。これは、土壤細菌アグロバクテリウムをシロイヌナズナ植物体に感染させ、アグロバクテリウムの持つDNA (T-DNA) をシロイヌナズナのゲノム中に挿入し、挿入されたシロイヌナズナの遺伝子を破壊するものである。T-DNAを挿入する位置はコントロールできないが、このような遺伝子破壊株を数万体作成し、各株のT-DNAの挿入位置はT-DNA末端からの塩基配列を調べ、ゲノムデータベースと照合することで判る。遺伝子破壊株の表現型を調べることによって、その遺伝子の機能を推測する。シロイヌナズナではアグロバクテリウムを用いた形質転換の技術が確立しており、他にも、外来の遺伝子を過剰に発現して、その機能を調べたり、遺伝子発現を調節するプロモーターの解析も他の植物に比べて容易に行える。

AtMC8は、通常の生育状態の植物体では発現がほとんど検出できないが、UV-C、過酸化水素、酸化ストレスを誘導する試薬 methyl viologen (MV) の曝露により発現が強く誘導される¹⁶。AtMC8の過剰発現植物では、FR分解活性が高くなっており、過酸化水素投与とUV照射をしたとき、細胞死の指標値が上がっている。これらは活性部位CysをAlaに置き換えた点突然変異遺伝子を過剰発現した場合には観察されない。AtMC8のノックアウト突然変異体のプロトプラストでは過酸化水素投与とUV照射による細胞死は抑制され、芽生えではMVによる成長阻害が抑制される。これらの結果は、AtMC8がPCDを誘導する酸化ストレスの細胞内情報伝達の一員であることを示している。

WatanabeとLamはシロイヌナズナ植物体での器官別のmRNA量をRT-PCR法により調べている。それによると、AtMC4が主要なType IIメタカスパーゼであり、AtMC9の発現量が多い果実を除く全ての組織、器官においてそのmRNA量は他に比べてかなり高い。また、プロモーターGUSアッセイではAtMC4は根端分裂組織を除く植物体全体、特に、維管束、成熟した葉、胚と花粉に多くに発現していることを示した。AtMC4のノックダウンおよびノックアウト突然変異体の芽生えは、PCDを誘導するMV、actifluorfen、カビ毒素 fumonisin B1 (FB1) を野生型に比べ耐性である¹⁸。AtMC4の過剰発現植物体では、FR分解活性が倍増しており、葉にFB1を与えたときの細胞死が促進されたが、その促進は活性部位Cys→Ala点突然変異過剰発現体では観察されない。avrRpt2遺伝子を持つ *Pseudomonas syringae* はシロイヌナズナ葉に過敏感細胞死をもたらす。

AtMC4ノックアウト植物ではこの病原菌を感染させたときの細胞死が抑制される¹⁸。これらの結果は、AtMC4がPCDを誘導する非生物的小および生物学的ストレスの細胞内情報伝達の一員であることを示している。

7. Type I メタカスパーゼの過敏感細胞死への関与

Type I メタカスパーゼはそのN末端側に長いプロドメインを持つことでType IIと区別される。植物のType I メタカスパーゼのプロドメインにはLSD1という遺伝子と相関性があるZnフィンガーマチーフがあるが、そのLSD1は過敏感細胞死の負の調節因子として知られている。過敏感反応植物では、病原体が体内に侵入すると、サリチル酸やジャスモン酸、エチレンといった植物ホルモンによる情報伝達経路が活性化し、各種の防御タンパク質 (PRタンパク質) が合成される過敏感反応 (HR) が起こる。さらに感染した細胞は自ら死んでいき、病原菌の増殖を防ぐが、これを過敏感細胞死という¹⁹。葉で過敏感細胞死を起こす細胞群とそうでない細胞群との間には明確な境があるが、この境が不明瞭になる表現型を持つ突然変異体として *lsd1* が単離された²⁰。

CollらはシロイヌナズナのLSD1とType Iメタカスパーゼ、AtMC1とAtMC2のノックアウト突然変異体 *lsd1*、*atmc1*、*atmc2* とそれらの多重突然変異体の表現型を解析した²¹。シロイヌナズナの葉にサリチル酸アナログを与えたとき、*lsd1* 突然変異体では過敏感細胞死が起こるが、*atmc1 lsd1* 二重突然変異体では細胞死は抑制され、*atmc2 lsd1* では細胞死が促進される。*atmc1 atmc2 lsd1* 三重突然変異体の細胞死は *atmc1 lsd1* と同程度である。この結果は、AtMC1が *lsd1* 突然変異によって起こるランナウェイ細胞死を正に制御し、それをAtMC2は抑制することを意味する。AtMC1タンパク質とLSD1タンパク質は相互作用し、AtMC2タンパク質はどちらも相互作用はしない。AtMC1遺伝子のN末端延長配列部分を除去した遺伝子を野生型の植物で過剰発現すると、細胞死が起こるが、完全長のAtMC1の過剰発現では発現量が非常に多い形質転換体以外では細胞死の誘導は起こらない。また活性部位と予想されるCysをAlaに置き換えた点突然変異遺伝子を過剰発現した場合も細胞死の誘導は起こらない。AtMC1はLSD1とそのN末端側で相互作用して不活性な状態にあるが、PCD誘導刺激に応じて、その相互作用が解除され、活性化するのではないかと考

えられる。

LSD1 が PCD を誘発する酸化ストレスや強光ストレス²²、低温ストレス²³、さらには、冠水ストレスによって起こる通気組織の PCD²⁴の制御にも関与することが報告されてきている。これらの PCD において LSD1 は Type I メタカスパーゼの活性制御を介して、制御を行っているのかもしれない。

8. Type II メタカスパーゼのサスペンサーの PCD への関与

Bozhkov らは Type II メタカスパーゼがサスペンサーの PCD に関与していることを示した^{10,25}。サスペンサーの消失は発生のプログラム上の PCD の好例である。受精卵はまず最初に、球状の小さな頂端細胞と長く大きな基部細胞に不等分裂する。頂端細胞は細胞分裂を繰り返して大きくなり、順に球状、ハート型、魚雷型の胚に発生していくが、基部細胞は数回の分裂のみ行いサスペンサーになる。サスペンサーは母体と胚をつなぐ役目があるが、胚発生が進むと細胞死を起こし、消失する。この Bozhkov らのグループはドイツウヒ *Picea abies* の体細胞を成長調節物質の投与と除去によって胚発生させる培養実験系を用いている。Type II メタカスパーゼ遺伝子、mcII-Pa が単離され、mcII-Pa の mRNA は細胞死に向かう組織にのみ発現することを *in situ* ハイブリダイゼーションにより示した。また、サスペンサーには著しく高い FESR 分解活性が含まれていた。成長調節物質の添加により体細胞が増殖した後、成長調節物質を除去すると胚とサスペンサーの分化が進行するが、RNAi により mcII-Pa の働きを抑制すると、胚とサスペンサーの分化が進まなくなった。これらの実験結果は mcII-Pa がサスペンサーの細胞死を制御しているようにも見えるが、サスペンサーの分化そのものに関与しているという解釈¹¹も可能である。

9. AtMC9 と木部細胞分化

シロイヌナズナの 6 つの Type II メタカスパーゼのうち、AtMC9 は他のメンバーとは構造が異なっている。p20 と p10 との間のリンカー部分が他のものは 150 アミノ酸残基ほどなのに対し、AtMC9 では 90 残基である。また、組換えタンパク質の生化学的解析により、AtMC4 は pH7 から 8 の弱アルカリ性が至適 pH なのに対し、AtMC9 は pH5 から 6 の弱酸性が至適 pH であることが示された^{9,26}。これは

AtMC4 が細胞質ゾルにあり、AtMC9 がアポプラストにあるという細胞内局在の違い²⁷とよく一致している。AtMC4 は試験内での活性化のために mM (ミリモラー) レベルの Ca^{2+} を必要とするのに対し、AtMC9 は必要としない。逆に AtMC9 は NO による活性化を受ける²⁸が、AtMC4 は違う。AtMC4 は根端分裂組織を除くほぼ全ての組織に発現しているのに対し、AtMC9 は木部細胞に特異的に発現している¹⁸。これらの違いは、AtMC9 は AtMC4 とは異なる働きを持っていることを示唆する。

AtMC9 は管状要素分化に伴う過程に関与していると予想される。道管を構成する管状要素への細胞分化は、リグニン化する二次細胞壁の形成という生合成的イベントと中空の管になるために原形質を自己分解するという分解的イベントが協調して起こる。ヒヤクニチソウの葉肉細胞を用いた試験管内での木部細胞分化誘導実験系はこの細胞分化のメカニズムの解明に大きく寄与してきた²⁹。筆者らはパバインタイプのシステインプロテアーゼ活性 (カスパーゼとは異なるグループのシステインプロテアーゼである) が管状要素への分化に伴って誘導されることを示した。このプロテアーゼをコードすると予想される遺伝子を単離し ZCP4 と名付けたが、この遺伝子は管状要素分化に限定して発現した³⁰。ZCP4 遺伝子のプロモーター解析により上流域には分化途中の管状要素に局在を規定する *cis* 配列が発見され、TERE 配列と呼ばれた³¹。二次細胞壁形成に関与すると考えられる酵素遺伝子や、PCD の実行に関与すると考えられる加水分解酵素遺伝子のいくつかはこの TERE 配列を持っていた。過剰発現により、二次細胞壁形成と PCD を誘発することができる木部細胞分化のマスター遺伝子として NAC ドメインを持つ転写因子 VND6 と VND7 が単離された³²が、この転写因子は TERE 配列に作用する。TERE 配列を持つシロイヌナズナ遺伝子を検索したところ、機能未知の遺伝子がいくつか発見されたが、その一つが AtMC9 であった³¹。GUS レポーターアッセイにより、AtMC9 はシロイヌナズナ植物体中で分化途上の維管束のみに発現すること、また根においては発達中の木部で発現し、分化し終わった道管には発現しないことが示された³³。

VND7 を 35S プロモーターとグルチコルチコイド応答性配列と組み合わせたベクターをタバコ BY-2 培養細胞に形質転換した実験系は、容易に木部細胞分化を誘導することができる³⁴。この実験系での DNA マイクロアレイを用いた木部細胞分化時の遺伝子発現プロファイルの解析により、AtMC9 相同配列を持つ mRNA の量が大きく増加することがわかった。また興味深いことに AtMC4-like と考えられる配列も増加した (Demura, 私信)。木部細胞分化

誘導により、GRR を pH8 において加水分解するプロテアーゼ活性は顕著に増加する(筆者ら、未発表データ)。筆者らはこの実験系を用いたメタカスパーゼの解析を進めているところである。

10. メタカスパーゼの生理学的基質

プロテアーゼの機能を解明する上で最も重要で、かつ最も困難な事はその生理学的な基質すなわち、分解するタンパク質を同定することであろう。Sundström らは植物のメタカスパーゼの基質を初めて明らかにして、かつそれが動物細胞のカスパーゼの基質であることを報告した³⁵。この基質、Tudor staphylococcal nuclease (TSN) は転写の活性化と mRNA のスプライシング、RNA サイレncing の調節に機能する。ヒト培養細胞にアポトーシスを誘導すると、カスパーゼ3の活性が上昇し、TSN は DAVD という配列箇所 で切断された³⁵。このタンパク質分解はカスパーゼ阻害剤によって抑制され、TSN の DAVD 配列を異なるものに改変した時には起こらなかった。また、TSN 遺伝子の働きを RNA サイレncing で抑制すると、アポトーシスの進行が妨げられた。以上の結果は TSN がヒト細胞のアポトーシスにおいてカスパーゼ3の生理学的基質であることを示している。

TSN は植物細胞も持っている。前述したドイツウヒの体細胞胚発生の培養実験系において、胚組織は無傷の TSN のみ持っているのに対し、サスペンサー内の TSN は分断化している。ドイツウヒ培養細胞に過酸化水素を与えて細胞死を誘発した時も、TSN の分断化が観察された。これらの TSN の分断化と細胞・組織の FESR 分解活性の増加は一致しており、さらに mcII-Pa 遺伝子をサイレンシングした時、TSN の分断化が抑制された。ヒト細胞と異なり、植物細胞の TSN の切断箇所は4箇所あると考えられるが、いずれも R または K の後で切断され、これは mcII-Pa の作用箇所と考えられる。以上の結果からサスペンサーの分化、過酸化水素の投与において mcII-Pa の基質であることが示唆される。分断化された TSN は他の因子との相互作用ができなくなり、機能を失う。

一方、TSN を持っていない出芽酵母でも PCD におけるメタカスパーゼの生理学的基質の探索が行われた³⁶。H202 処理した YCA1 過剰発現株と $\Delta yca1$ のデグラドーム解析(細胞の総タンパク質を一次元目の電気泳動で分離し、細胞由来のプロテアーゼで処理した後、二次元目の電気泳動に展開する解析)と MALD-TOF によるタンパク質の同定、抗体を用いた確認により、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒ

ドロゲナーゼ (GAPDH) が YCA1 によって分解されることが示された。H202 処理で PCD を誘導すると、野生型酵母では GAPDH が分解され、 $\Delta yca1$ では分解が見られなかった。以上の事から GAPDH が YCA1 の生理学的基質であることが示唆された。ただし、GAPDH の切断箇所は同定されていない。

11. 翻訳後修飾によるメタカスパーゼの活性の調節

【Ca²⁺とプロセシング】

Ca²⁺は主要なシグナル分子であり、PCD を含む様々な生理学的過程の調節において重要な役割を持っている。試験管内で組換え AtMC4 タンパク質は高濃度(5~50 mM)の Ca²⁺存在下でペプチダーゼ活性を上昇させるが、やがて不活性化する。このことは細胞内の Ca²⁺濃度の上昇でメタカスパーゼが活性化するメカニズムがあることを示唆する。しかし、試験管内で必要な Ca²⁺濃度は細胞内 Ca²⁺濃度(nM~ μ M)を遙かに上回るため、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇をメタカスパーゼの活性化に結びつけるメカニズムの解明が必要である。

カスパーゼと同様にメタカスパーゼも活性の調節においてプロセシングが中心的な役割を果たすと考えられる。精製のための His タグを N 末端に付加した Type II メタカスパーゼを大腸菌で発現させ、精製すると全長のポリペプチドの他にいくつかの低分子量の断片が得られるが、Cys→Ala 置換タンパク質では全長のポリペプチドのみが得られる。この低分子ポリペプチドは、His タグを含む N 末端プロドメインと p20 の間、p20 と p10 の間でタンパク質分解を受けた分子である。p20 と p10 の間の切断の作用部位には Lys または Arg 残基がある。このことは試験管内において、Type II メタカスパーゼは自己触媒的にプロセシングされることを示している。p20-p10 切断部位 Arg を Ala に変えたタンパク質はプロテアーゼ活性を示さないことは、このプロセシングがメタカスパーゼの活性化に必須であることを示唆している。

野生型のシロイヌナズナの地上部に含まれる AtMC4 タンパク質を分析したところ、植物の齢が進むと、全長の AtMC4 が少なくなり、プロセシングされた断片のみになることが示された¹⁸。FB1 を投与したとき、野生型の植物の葉において、プロセシングされた断片が増加した。また、P. syringae を感染させたときも、プロセシングされた AtMC4 が顕著に増加していた¹⁸。

Watanabe と Lam は AtMC4 タンパク質の Ca^{2+} 誘発性プロセッシングについて解析した³⁷。試験管内で AtMC4 タンパク質は Ca^{2+} によって活性化するが、この時、N 末端に His タグを結合した ATMC4 タンパク質は自己プロセッシングし、p10 を含む 18, 22 kDa の断片と p20 を含む 26, 28, 30, 32 kDa の断片を生じる。18, 22 kDa の N 末端は Lys225 の隣の Ser であった。Lys225→Gly の点突然変異タンパク質はペプチダーゼ活性を持っていなかった。よって、Lys225 の後でプロセッシングして p20 と p10 に分かれて活性化し、その後に p20 および p10 それぞれの C 末端側が除去される分解が起こると考えられる。

出芽酵母メタカスパーゼ遺伝子破壊株 $\Delta yca1$ は過酸化水素処理による PCD 誘導が抑制されているが、AtMC4 遺伝子を形質転換した $\Delta yca1$ では PCD 誘導が部分的に解除される。触媒部位 Cys139→Ala の点突然変異 AtMC4 と同様に、Lys225→Gly 点突然変異 AtMC4 を $\Delta yca1$ に形質転換しても、この PCD 表現型回復は起こらなかったことは、Lys225 での切断が PCD の進行に重要であることを示している。

【一酸化窒素シグナル】

一酸化窒素はアポトーシスを含む動植物の多くの生理学的、病理学的過程に関わり、細胞間および細胞内のシグナル分子の一つとされている。一酸化窒素の作用の一つは、タンパク質のシステイン残基の SH 基に共有結合 (NO-S-) する S-ニトロシル化である。プロカスパーゼ 3 の活性部位 Cys は S-ニトロシル化されて不活性な状態に保たれ、Fas リガンド誘導性アポトーシスにおいて S-ニトロシル化が解除されて、カスパーゼ 3 は活性化する。

Belenghi らはシロイヌナズナの AtMC9 が S-ニトロシル化されることを示した²⁸。大腸菌で発現した組換え AtMC9 タンパク質は試験管内で S-ニトロシル化剤により S-ニトロシル化し、シロイヌナズナ AtMC9 過剰発現株の AtMC9 タンパク質も p 20 内で S-ニトロシル化されていることが観察された。Cys145→A の点突然変異では試験管内でも生体内でも S-ニトロシル化しなかった。S-ニトロシル化剤処理は AtMC9 タンパク質の自己プロセッシングとペプチダーゼ活性を阻害したが、プロセッシングし活性化したあとのメタカスパーゼは S-ニトロシル化剤処理によっても活性を失わなかった。この S-ニトロシル化耐性には Cys29 残基が必要であった。NO 存在下で Cys29 が Cys145 の代わりに触媒活性を発揮して自己プロセッシングをする可能性が考えられる。他のメタカスパーゼに関しては S-ニトロシル化に関する情報は無いが、Cys29 に相当する Cys 残基は他のメタカスパーゼにも保存されており、植物メタカスパーゼに共通する、NO が関与する過程におけるメ

カニズムなのかもしれない。

1 2. 結論と展望

サスペンサーの消去という発生上の PCD にドイトウヒの Type II メタカスパーゼ McII-Pa が、酸化ストレス、カビ毒素など無生物的・生物的ストレスが誘導する PCD にシロイヌナズナ Type II メタカスパーゼ AtMC8 と AtMC4 が、過敏反応としての PCD に Type I メタカスパーゼ AtMC1 が、正の制御因子として関わっている事が示されてきた。また、カスパーゼのように、その活性制御は自己プロセッシングによって行われることが示された。植物メタカスパーゼが PCD に関与することはほぼ間違い無いと思われる。それは、これまで見つかってこなかった、さまざまな植物の PCD において共通する分子メカニズムということになる。アポトーシス研究においてカスパーゼを中心に据えて研究が行われてきたように、植物の PCD 研究においてもメタカスパーゼを中心に据えて行われるようになろう。

逆に、植物のメタカスパーゼが PCD 以外の機能は持っていないのかという問題に関しては研究例が皆無である。最近の研究により、カスパーゼは細胞の分化、免疫適応、脳での学習と記憶などにアポトーシス制御を伴わずに関与しているということがわかってきている。単細胞生物である、原生動物や酵母においてはメタカスパーゼが細胞周期の進行や細胞内不溶性タンパク質の除去に関係していることが示されている。系統進化的観点から見れば、祖先メタカスパーゼは細胞死以外の働きを持っていて、動物ではカスパーゼに置換された後に、多細胞化にともない進化した PCD にその酵素が結びつき、植物では Type II メタカスパーゼと重複した後、多細胞化にともない進化した PCD にその酵素が結びついたという、シナリオが考えられる。

メタカスパーゼの植物 PCD における働きに関して解明すべき問題も多い。いくつかの研究はシロイヌナズナの T-DNA 挿入ノックアウト突然変異体を用いて行われてきたが、メタカスパーゼ遺伝子 KO 植物は目立った成長阻害、形態異常などの表現型を示さない。また、誘導条件における PCD の欠損も部分的なものである場合がある。これは同じ働きをする遺伝子が別にあつたり、ある遺伝子の働きが失われると、他の遺伝子はその働きを補完する現象が起こるためかもしれない。それを避けるためにはメタカスパーゼ遺伝子の多重突然変異体を用いた解析が有効であるが、AtMC4~7 は染色体上にタンデムに配置しており、多重突然変異体の作成が極めて難しい。ジーンターゲットイングが可能なヒメツリガ

ネゴケや、Type II メタカスパーゼ遺伝子が2つしかないブドウを用いた研究はこの問題を解決できるかもしれない。カスパーゼの研究では各カスパーゼに特異的な阻害剤の投与実験が広く用いられている。各メタカスパーゼに特異的な阻害剤の開発が必要である。

メタカスパーゼによる情報伝達の上流、下流については、ほとんどわかっていない。「プロテアーゼの機能を解明」することは、プロテアーゼの生理的な基質を明らかにすることに他ならない。植物メタカスパーゼの基質として、唯一つ同定された TSN がカスパーゼの基質でもあったことは動植物の PCD の理解に大きなインパクトを与えた。網羅的なデグラドーム解析により、メタカスパーゼの基質が発見されることが期待される。カスパーゼ経路ではカスパーゼ以外の因子が数多く明らかになっているに対し、メタカスパーゼ経路では全くわかっていない。PCD に導くシグナルがどのように受容され、変換されて、メタカスパーゼの活性化に結びつくのか? メタカスパーゼに相互作用する因子の同定がその解明の第一歩となろう。

1 3. 参考文献

1. Sulston, J. E. & Horvitz, H. R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **56**, 110–156 (1977).
2. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641–52 (1993).
3. Van Doorn, W. G. *et al.* Morphological classification of plant cell deaths. *Cell death and differentiation* **18**, 1241–6 (2011).
4. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796–815 (2000).
5. Uren, a G. *et al.* Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular cell* **6**, 961–7 (2000).
6. Jiang, Q., Qin, S. & Wu, Q.-Y. Genome-wide comparative analysis of metacaspases in unicellular and filamentous cyanobacteria. *BMC genomics* **11**, 198 (2010).
7. Tsiatsiani, L. *et al.* Metacaspases. *Cell death and differentiation* **18**, 1279–88 (2011).
8. Vercammen, D. *et al.* Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *The Journal of biological chemistry* **279**, 45329–36 (2004).
9. Watanabe, N. & Lam, E. Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. *The Journal of biological chemistry* **280**, 14691–9 (2005).
10. Bozhkov, P. V. *et al.* Cysteine protease mclI-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14463–8 (2005).
11. Vercammen, D., Declercq, W., Vandenaabeele, P. & Van Breusegem, F. Are metacaspases caspases? *The Journal of cell biology* **179**, 375–80 (2007).
12. Madeo, F. *et al.* Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *The Journal of cell biology* **145**, 757–67 (1999).
13. Lefevre, S. *et al.* The yeast metacaspase is implicated in oxidative stress response in frataxin-deficient cells. *FEBS letters* **586**, 143–8 (2012).

14. Lee, R. E. C., Puente, L. G., Kaern, M. & Megeney, L. a A non-death role of the yeast metacaspase: Yca1p alters cell cycle dynamics. *PLoS one* **3**, e2956 (2008).
15. Lee, R. E. C., Brunette, S., Puente, L. G. & Megeney, L. A. Metacaspase Yca1 is required for clearance of insoluble protein aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 13348–53 (2010).
16. He, R. *et al.* Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry* **283**, 774–83 (2008).
17. Hoerberichts, F. A., Ten Have, A. & Woltering, E. J. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in Botrytis cinerea-infected leaves. *Planta* **217**, 517–22 (2003).
18. Watanabe, N. & Lam, E. Arabidopsis metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **66**, 969–82 (2011).
19. Dangl, J. L. Pièce de Résistance: novel classes of plant disease resistance genes. *Cell* **80**, 363–6 (1995).
20. Dietrich, R. a, Richberg, M. H., Schmidt, R., Dean, C. & Dangl, J. L. A novel zinc finger protein is encoded by the Arabidopsis LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* **88**, 685–94 (1997).
21. Coll, N. S. *et al.* Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science (New York, N.Y.)* **330**, 1393–7 (2010).
22. Mateo, A. *et al.* LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant physiology* **136**, 2818–30 (2004).
23. Huang, X., Li, Y., Zhang, X., Zuo, J. & Yang, S. The Arabidopsis LSD1 gene plays an important role in the regulation of low temperature-dependent cell death. *The New phytologist* **187**, 301–12 (2010).
24. Mühlenbock, P., Plaszczyca, M., Plaszczyca, M., Mellerowicz, E. & Karpinski, S. Lysigenous aerenchyma formation in Arabidopsis is controlled by LESION SIMULATING DISEASE1. *The Plant cell* **19**, 3819–30 (2007).
25. Suarez, M. F. *et al.* Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Current biology: CB* **14**, R339–40 (2004).
26. Vercammen, D. *et al.* Type II Metacaspases Atmc4 and Atmc9 of Arabidopsis thaliana Cleave Substrates after Arginine and Lysine *. **279**, 45329–45336 (2004).
27. Vercammen, D. *et al.* Serpin1 of Arabidopsis thaliana is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *Journal of molecular biology* **364**, 625–36 (2006).
28. Belenghi, B. *et al.* Metacaspase activity of Arabidopsis thaliana is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *The Journal of biological chemistry* **282**, 1352–8 (2007).
29. Fukuda, H. XYLOGENESIS: INITIATION, PROGRESSION, AND CELL DEATH. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **47**, 299–325 (1996).
30. Demura, T. *et al.* Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 15794–9 (2002).

31. Pyo, H., Demura, T. & Fukuda, H. TERE; a novel cis-element responsible for a coordinated expression of genes related to programmed cell death and secondary wall formation during differentiation of tracheary elements. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **51**, 955–65 (2007).
32. Kubo, M. *et al.* Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. 1855–1860 (2005).doi:10.1101/gad.1331305.GENES
33. Ohashi-Ito, K., Oda, Y. & Fukuda, H. Arabidopsis VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 directly regulates the genes that govern programmed cell death and secondary wall formation during xylem differentiation. *The Plant cell* **22**, 3461–73 (2010).
34. Yamaguchi, M. *et al.* VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 effectively induce transdifferentiation into xylem vessel elements under control of an induction system. *Plant physiology* **153**, 906–14 (2010).
35. Sundström, J. F. *et al.* Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome. *Nature cell biology* **11**, 1347–54 (2009).
36. Silva, a *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a specific substrate of yeast metacaspase. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 2044–9 (2011).
37. Watanabe, N. & Lam, E. Calcium-dependent activation and autolysis of Arabidopsis metacaspase 2d. *The Journal of biological chemistry* **286**, 10027–40 (2011).

