

## タバコ BY-2 細胞を用いた植物オートファジーの解析

井上悠子<sup>1</sup>, 高塚千広<sup>2</sup>, 森安裕二<sup>1</sup>

<sup>1</sup>埼玉大学大学院理工学研究科 〒338-8570 さいたま市桜区下大久保 255

<sup>2</sup>東海大学短期大学部 〒420-8511 静岡市葵区宮前町 101 番地

Inoue-Aono Y<sup>1</sup>, Takatsuka C<sup>2</sup>, Moriyasu Y<sup>1</sup>

### The analysis of plant autophagy using tobacco BY-2 cells

Key words: autophagy, BY-2 cell, E-64c, 3-methyladenine, vacuole

<sup>1</sup>Graduate School of Science and Engineering, Saitama University,  
255 Shimo-Okubo, Sakura-ku, Saitama-shi, Saitama, 338-8570, Japan.

<sup>2</sup>Tokai University Junior College, 101 Miyamae-cho, Aoi-ku,  
Shizuoka-shi, Shizuoka, 420-8511, Japan.

DOI: 10.24480/bsj-review.9a3.00129

#### 1. はじめに

BY-2 細胞は, *Nicotiana tabacum* の品種であるブライトイエロー2号に由来する培養細胞である。BY-2 細胞は, 新しい液体培地に植え継いで4日目には対数増殖期となり, 1週間ほどで定常期になる。比較的均一の細胞集団として増殖し, 液体培地を置換することによって細胞のおかれた栄養条件を変えることや, 阻害剤を添加してその影響を解析することが容易である。そのため, 私たちはBY-2細胞を材料として, 生化学的および形態学的手法を中心とした植物オートファジーの解析を行ってきた。

本稿では, これまでに私たちが報告してきたオートファジーによるタンパク質分解およびリン脂質分解, オートファジー経路, 液胞形成に関わる新奇のオートファジーについて紹介する。

#### 2. BY-2 細胞のショ糖飢餓処理と細胞構成成分の分解

BY-2 細胞において, 細胞構成成分の自己分解を誘導するために, ショ糖欠乏培地に細胞を移す方法が用いられている。BY-2 細胞は, 3%のショ糖と植物ホルモンである2,4-Dを含むムラシゲスクグ液体培地中で維持されている。植え継ぎ4日目の対数増殖期のBY-2細胞を遠心により沈殿させて上清を捨て, ショ糖を含まない液体培地で懸濁して再度遠心する。同様に上清をのぞいて, ショ糖を含まない液体培地でBY-2細胞を懸濁すると, 細胞培養液中からショ糖をほぼ完全にのぞくことができる。培地中のショ糖をのぞくことで, BY-2細胞内のショ糖も直ちに枯渇することが分かっている(未発表)。ショ糖飢餓処理をしたのち, タンパク質やリン脂質などの細胞構成成分の分解について調べた。

##### 2-1. タンパク質分解

BY-2細胞をショ糖飢餓条件下におくと, 細胞内の正味のタンパク質量は2日間で50%にまで減少した(Moriyasu and Ohsumi 1996)。その際, 細胞の生重量はほとんど変化が起らなかった。また1日間のショ糖飢餓に応答して, 細胞内のシステインプロテアーゼの活性が顕著に上がった。BY-2細胞をショ糖飢餓処理した際に, システインプロテアーゼの阻害剤である

E-64c を最終濃度 10  $\mu\text{M}$  で加えると、システインプロテアーゼ活性の上昇と正味のタンパク質の減少が抑えられた。これらのことは、BY-2 細胞ではショ糖の欠乏に応答して、活性が高まったシステインプロテアーゼによって、正味のタンパク質のダイナミックな分解が起こることを示している。それではこのタンパク質の自己分解は、BY-2 細胞のどこで行われているのであろうか。出芽酵母では、栄養飢餓条件下においてセリンプロテアーゼの阻害剤である PMSF を添加してプロテアーゼ活性を阻害すると、液胞内に細胞構成成分を含む顆粒が蓄積することが報告されている(Takeshige et al. 1992)。液胞は、植物において分解コンパートメントとしての役割を果たしているが、BY-2 細胞におけるタンパク質分解は、液胞で行われているのであろうか。

## 2-2. オートリソソーム

ショ糖飢餓処理をして E-64c を加えた BY-2 細胞を 1 日間培養したのち、光学顕微鏡下で観察を行うと、主に核の周辺の細胞質に顆粒状の構造が多数蓄積するのが観察された。この顆粒構造がタンパク質分解に関わる構造であることを確かめるため、組織化学染色を行うと、顆粒状の構造内部には酸性ホスファターゼが存在することが明らかになった。またこの顆粒状構造は、キナクリンによって強く染色された。キナクリンは細胞内の酸性のコンパートメントに蓄積し強い蛍光を発することが知られている。これらのことは、蓄積する顆粒は内部が酸性であり、酸性ホスファターゼを含んだリソソーム様の構造であることを示唆している。さらに電子顕微鏡を用いてこの構造を観察すると、内部に電子密度の高い構造が含まれていることが分かった。これらは分解途上の細胞小器官であり、このことから、このリソソーム様の構造は、オートファジーの結果として生じた“オートリソソーム”であると考えられた。すなわち、BY-2 細胞では、ショ糖飢餓に応答したタンパク質の分解が、オートリソソームで行われていることが示された。

オートリソソームの分解コンパートメントとしての性質をより確かにするため、酸性ホスファターゼの活性をマーカーとして、オートリソソームの単離を行なった (Takatsuka et al. 2011)。植え継ぎ 4 日目の BY-2 細胞にショ糖飢餓処理をして、E-64c を加えたものと溶媒コントロールをそれぞれ 1 日間培養したのち、酵素処理によって細胞壁を取り除いてプロトプラスト化した。プロトプラストをゆるやかに破碎して、パーコールの密度勾配を利用した細胞分画法によって分画した。各画分の酵素活性を E-64c を加えたものと加えていないものとで比較すると、E-64c を加えた場合のみ得られる酸性ホスファターゼ活性のピークがあった。この酸性ホスファターゼ活性はオートリソソームに由来するものであると考えられた。そこでこのオートリソソームに由来すると思われる画分をさらに解析すると、液胞型プロトン ATPase やプロテアーゼが存在することが分かった。オートリソソーム膜上に液胞型プロトン ATPase が存在するという考察は、オートリソソームの内部が酸性であるというキナクリン染色の結果を支持するが、液胞型プロトン ATPase がオートリソソームの内包物に含まれている可能性もあり、膜上に存在するという証拠はまだ得られていない。しかしオートリソソームは、その内部に酸性ホスファターゼやプロテアーゼを持っていることから、分解コンパートメントとしての役割を担っていることが明らかになった。

また、オートリソソームの成り立ちをさらに解析するため、FM4-64 による膜の蛍光染色を行った(Yano et al. 2004)。植え継ぎ 4 日目の BY-2 細胞にショ糖飢餓処理をして、E-64c を加えたものと溶媒コントロールをそれぞれ培養した。1 日後、それぞれの培養液に FM4-64 を

加えた。添加した直後に観察を行うと、細胞膜のみが蛍光で染色されていた。1日間、26℃で培養したのち観察を行うと、E-64cを加えたものではオートリソソームの膜上にFM4-64の蛍光が観察され、液胞膜への蛍光の移行は見られなかった。一方で、溶媒コントロールでは液胞膜にFM4-64の蛍光が移行しているのが観察された。このことは、エンドサイトーシスによる細胞膜から液胞膜への移動の途中にオートリソソームが存在し、細胞膜からオートリソソームへの膜の移行が起こっていることを示している。

次に液胞膜をFM4-64で染色した解析を行なった。植え継ぎ3日目のBY-2細胞にFM4-64を加えて0℃で30分間培養し、細胞膜を蛍光染色した。0℃で冷やしたまま遠心を行い、細胞を沈殿させて上清を捨て、FM4-64を含まない培地で懸濁することで細胞培養液中からFM4-64をのぞいた。その後、26℃で1日間培養し、液胞膜のみがFM4-64でラベルされたBY-2細胞を得た。この細胞にショ糖飢餓処理をして、E-64cを加えたものと溶媒コントロールとをそれぞれ1日間、26℃で培養した。興味深いことに、ショ糖飢餓処理を行う前には液胞膜に存在していたFM4-64の蛍光は、E-64c存在下で現れるオートリソソームの膜に移行していることが明らかになった。さらに液胞膜タンパク質であるGamma-VM23やAtVam3にGFPを結合したタンパク質を発現する株を用いて実験を行った。結合タンパク質を発現したBY-2細胞をショ糖飢餓処理し、10μM E-64cを添加すると、液胞膜に局在していたGFP蛍光がオートリソソーム膜に移行した。これらの結果は、オートリソソーム膜には、細胞膜および液胞膜からの供給があることを示しており、オートリソソームの起源を明らかにする上で重要な知見であると考えられる。

### 2-3. リン脂質分解

ショ糖飢餓条件下において、主要なリン脂質のひとつであるホスファチジルコリンの分解が起こり、分解産物であるホスホリルコリンの蓄積が起こることがカエデの培養細胞を用いた研究により報告された(Aubert et al. 1996)。そこでBY-2細胞を用いて同様の実験を行なった。植え継ぎ4日目のBY-2細胞をショ糖飢餓処理して2日間培養すると、正味のリン脂質の量は約50%にまで減少することが分かった(Inoue and Moriyasu 2006)。またホスファチジルコリンが70%近く減少し、同時にその分解産物であるホスホリルコリンの蓄積が起こった。このダイナミックなリン脂質分解がオートファジーの経路を介しているかどうかを調べるため、オートファジーの阻害剤である3-methyladenine (3-MA)を用いた。

3-MAは、哺乳動物においてオートファジーの阻害剤として見出された(Seglen and Gordon 1982)。その後、BY-2細胞においてもオートファジーを阻害することが確かめられた(Takatsuka et al. 2004)。植え継ぎ4日目のBY-2細胞にショ糖飢餓処理をして、最終濃度5mMの3-MAを加えたものと加えないものをそれぞれ1日間培養し、タンパク質量を測定すると、3-MAを加えたものでは正味のタンパク質分解が阻害された。また、ショ糖飢餓処理をしたBY-2細胞に、3-MAとE-64cを加えて1日間培養しても、オートリソソームの蓄積が起らなかった。このことは、3-MAの添加はBY-2細胞のオートファジーを阻害することを示している。

そこで、植え継ぎ4日目のBY-2細胞をショ糖飢餓処理して、3-MAを加えたものと加えていないものをそれぞれ2日間培養してリン脂質量を測定した。ショ糖飢餓にตอบสนองして起こるリン脂質の減少に対し、3-MAを加えても影響は見られなかった。そこで正味のリン脂質の分解機構を明らかにするため、リン脂質を蛍光標識する実験を行なった。BY-2細胞に、蛍光

標識した脂肪酸(BODIPY-FA)を取り込ませると、細胞内の膜リン脂質を蛍光標識することができる(Inoue and Moriyasu 2006)。リン脂質を蛍光標識した細胞をシヨ糖飢餓処理したのち観察すると、シヨ糖飢餓1日間で蛍光が液胞内に移行することが分かった。シヨ糖飢餓処理と同時に3-MAを加えてもこの挙動に変化は見られなかった。このことは、リン脂質分解には液胞が関わっている可能性を示唆しているが、液胞への輸送経路はマクロオートファジーとは異なる経路を介していることを示唆しており、その分解機構については明らかではない。

### 3. BY-2 細胞のオートファジー経路

これまでに述べたように、BY-2細胞のマクロオートファジー経路は出芽酵母のマクロオートファジー経路と異なる点が存在する。BY-2細胞のマクロオートファジー経路の模式図を図1に示した。マクロオートファジーは大きく分けると、1)遊離の膜構造が伸長して細胞構成成分を包み込み、二重膜構造を持つオートファゴソームが形成される、2)リソソーム・液胞とオートファゴソームが融合する、3)構成成分を分解する、の3つのプロセスから成っている。出芽酵母では2)のプロセスにおいて、オートファゴソームの外膜と液胞膜が融合し、内膜に細胞構成成分が包まれたオートファジックボディが液胞内に放出される(Takeshige et al. 1992)。しかし、BY-2細胞では、マクロオートファジー経路においてオートファゴソームと液胞膜の融合は起こらず、まず液胞外で一重膜構造を持つオートリソソームとなり、その後、オートリソソームと液胞の融合が起こる。オートリソソームがどのようにして分解酵素を獲得しているのかはまだ明らかではないが、液胞からの膜輸送が確認できることから、分解酵素の小包輸送が行われている可能性もあるのではないかと考えられる。

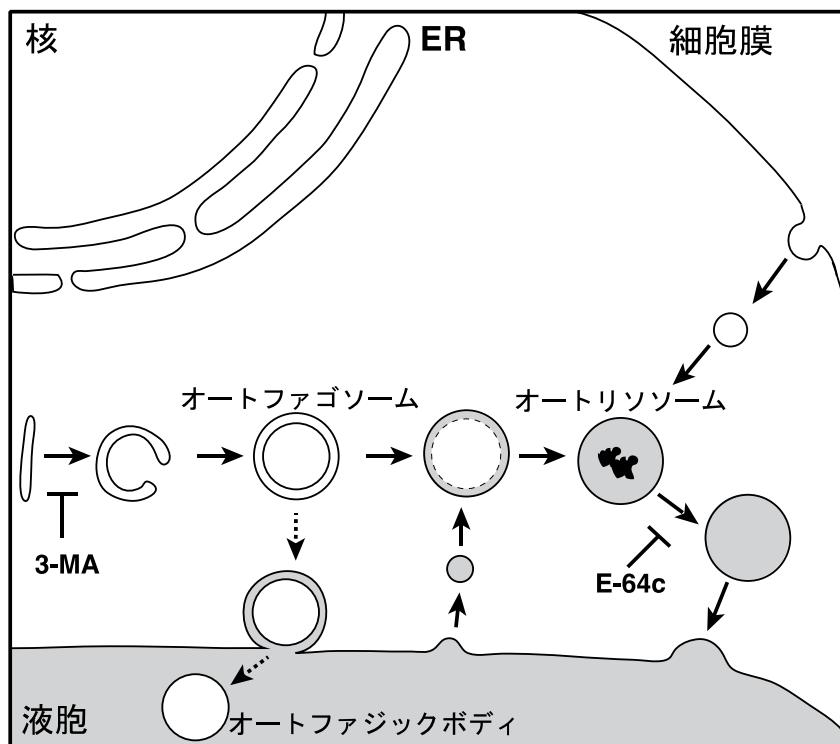


図1. BY-2細胞のマクロオートファジー経路

### 4. 液胞形成とオートファジー

これまでの章で述べてきたのは主にマクロオートファジーについてであるが、この章では

マクロオートファジー以外のオートファジーと液胞形成の関わりについて述べる。

植物細胞の液胞は、分解や貯蔵の役割を担うオルガネラである。分裂直後の植物細胞には液胞は存在せず、細胞が成長するのに伴って液胞がその体積を増して、細胞が成熟する頃には細胞体積の9割を占める巨大なオルガネラとなる。しかし液胞を持たない分裂直後の細胞において、液胞が何を起源としてどのように形成されるのかについては十分に理解されていない。

これまでに、トウダイグサ科の植物の根の細胞においてゴルジ体由来のチューブ状の構造同士で融合が起こって、その内側に封入された細胞質が分解され、最初の液胞になるという報告がなされている(Marty, 1978)。さらにアマの種皮細胞において、ER由来の平らな膜構造に封入された細胞質が分解され、液胞ができるという報告もある (Amelunxen et al. 1984)。これらはいずれも電子顕微鏡を用いた観察によって得られた知見である。またシロイヌナズナを用いた研究で、液胞の前駆体構造はER由来であるという報告もある(Viottie et al. 2013)。いずれの場合も、細胞質成分の自己分解を伴って液胞が形成されるということが報告されているので、広義のオートファジーによって液胞が形成されるということが出来る。しかしながら、マクロオートファジーに関わる遺伝子群の欠損株がシロイヌナズナなどで得られているが、これらの株は野生株と同様に液胞を形成できていることから、液胞形成に関わるオートファジーはマクロオートファジーとは区別して考えなければならない。

液胞形成に関わるオートファジーの詳細な機構についてはほとんど明らかになっていないことから、私たちはBY-2細胞を用いて液胞形成モデルを作成し、液胞形成機構の解析を行った(Yano et al. 2007)。BY-2細胞を、酵素処理によって細胞壁を取り除いてプロトプラスト化し、超遠心によって液胞を取り去ったミニプロトプラストを作成した。液胞を持たないミニプロトプラストは、1日間の培養で液胞を持つプロトプラストに戻った。この過程を詳細に調べることによって、液胞形成の過程を明らかにしようと試みた。植え継ぎ5日目のBY-2細胞からミニプロトプラストを調製して培養し、経時的に観察を行なった。培養1時間でニュートラルレッドによって染色される酸性の顆粒が細胞質に蓄積し始め、顆粒が次第に数を増して集まり、液胞が形成された。ミニプロトプラストを培養する際にE-64cを加えると、出来上がった液胞内に細胞構成成分の未分解物が蓄積することが電子顕微鏡で観察された。このことは、液胞の形成過程には自らの構成成分の分解を伴っていることを示唆している。さらに、E-64cを加える同時にマクロオートファジーの阻害剤である3-MAを加えても、液胞内における未分解物の蓄積および液胞の形成は阻害されなかった。すなわち液胞形成過程で起こるオートファジーは、マクロオートファジーとは異なる経路であると言える。しかしながら、オートファゴソームに局在することが知られているタンパク質Atg8とGFPの融合タンパク質を発現させたBY-2細胞株からミニプロトプラストを調製して培養を行うと、Atg8-GFPの蛍光が形成過程の液胞内に局在することが分かった(未発表)。このことは、液胞形成過程にマクロオートファジーは必須ではないが、その過程に何らかの関わりがあることを示唆しており、今後、解析を進めていく予定である。

## 5. おわりに

遺伝子のノックアウト技術の発達とともに、オートファジー研究に用いられる植物材料も実に多様になり、新たな知見が多く得られることが期待される。しかしながら本稿にも述べたように、一細胞における形態的な解析や定量解析に向いているBY-2細胞では、オートフ

ァジーの基本的な機能に関する解析が比較的行いやすく、これを材料として明らかにできる多くの疑問が残されていると感じる。

## 6. 引用文献

- Amelunxen, F. and Heinze, U. 1984. Zur Entwicklung der vacuole in Testa-Zellen des Leinsamens. *Eur J. Cell Biol.*, 35: 343-354.
- Aubert, S., Gout, E., Bligny, R., Marty-Mazars, D., Barrieu, F., Alabouvette, J., Marty, F. and Douce, R. 1996. Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by supply of mitochondria with respiratory substrates. *J. Cell Biol.*, 133: 1251-1263.
- Inoue, Y. and Moriyasu, Y. 2006. Autophagy is not a main contributor to the degradation of phospholipids in tobacco cells cultured under sucrose starvation conditions. *Plant Cell Physiol.* 47(4): 471-480.
- Inoue, Y. and Moriyasu, Y. 2006. Degradation of membrane phospholipids in plant cells cultured in sucrose-free medium. *Autophagy.* 2(3): 244-246.
- Marty, F. 1978. Cytochemical studies on GERL, provacuoles, and vacuoles in root meristematic cells of Euphorbia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 75: 852-856.
- Moriyasu, Y. and Ohsumi, Y. 1996. Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiol.* 111: 1233-1241.
- Seglen, P. O. and Gordon, P. B. 1982. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 79: 1889-1892.
- Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y. 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 119: 301-311.
- Takatsuka, C., Inoue, Y., Higuchi, T., Hillmer, S., Robinson, D. G. and Moriyasu, Y. 2011. Autophagy in tobacco BY-2 cells cultured under sucrose starvation conditions: Isolation of the autolysosome and its characterization. *Plant Cell Physiol.* 52(12): 2074-2087.
- Takatsuka, C., Inoue, Y., Matsuoka, K. and Moriyasu, Y. 2004. 3-Methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions. *Plant Cell Physiol.* 45(3): 265-274.
- Viotti, C., Krüger, F., Krebs, M., Neubert, C., Fink, F., Lupanga, U., Scheuring, D., Boutté, Y., Frescatada-Rosa, M., Wolfenstetter, S., Sauer, N., Hillmer, S., Grebe, M. and Schumacher, K. 2013. The endoplasmic reticulum is the main membrane source for biogenesis of the lytic vacuole in Arabidopsis. *Plant Cell.* 25(9): 3434-3449.
- Yano, K., Hattori, M. and Moriyasu, Y. 2007. A novel type of autophagy occurs together with vacuole genesis in miniprotoplasts prepared from tobacco culture cells. *Autophagy.* 3: 215-221.
- Yano, K., Matsui, S., Tsuchiya, T., Maeshima, M., Kutsuna, N., Hasezawa, S., and Moriyasu, Y. 2004. Contribution of the plasma membrane and central vacuole in the formation of autolysosomes in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 45(7): 951-957.