

論文の内容の要旨

論文題目 Local intercellular communication involved in tracheary element differentiation of zinnia mesophyll cells

(ヒャクニチソウ管状要素分化に関与する局所的な細胞間相互作用の解析)

氏名 本瀬宏康

序

維管束は篩部と木部からなる組織系であり、養分や水分の通道、シグナルの伝達、植物体の機械的な支持といった重要な機能を果たしている。このような維管束の機能が円滑に行われるためには、維管束を構成する細胞が連続した形で適切な場所に分化する必要があり、細胞間の相互作用を介した精巧な位置決定機構が維管束分化を制御していると思われる。しかし、維管束の位置決定機構については、普遍的な理解が得られていないのが現状である。この理由として、維管束分化を直接制御しているであろう細胞間相互作用を検出することの困難さが第一に挙げられる。そこで私は、ヒャクニチソウ単離葉肉細胞からの *in vitro* 管状要素分化を用いることでこの問題の解決を図り、管状要素分化の位置決定機構を細胞間相互作用の面から明らかにすることを最終目標として研究を行った。

修士課程においてはまず、細胞間相互作用を定量的に解析するため、細胞をアガロースゲルに包埋して培養する方法を2種類(シート培養法とビーズ培養法)開発した。シート培養法とは、単離葉肉細胞を厚さ 200 μm の薄いアガロースゲルシートに包埋して二次元的に培養する方法であり、ビーズ培養法とは、単離葉肉細胞を 10 μl の半球状アガロースゲルビーズに包埋し、これを液体培地中で培養する方法である。そして、これらの培養法を用いて、管状要素分化を促進または誘導する局所的な細胞間相互作用が存在すること、この細胞間相互作用が 25 kD 以上の高分子の分泌性因子(修士論文では分化因子と呼んだ)によって担われていることを突き止めた。博士課程においては、上記の2種類の培養法を駆使して分化因子の特性を詳しく解析し、その実体の解明を目指した。

結果と考察

1. 分化因子の特性解析

まず、シート培養法の変形であるサンドイッチ培養法を用いて、分化因子の特性解析を行った。この方法では、単独で培養しても管状要素分化が殆ど起こらない低密度シートと、管状要素分化が比較的高頻度で起こる高密度シートの2種類のシートを用いる。低密度シートを高密度シートと貼り合わせると、高密度シートからの分化因子の供給により低密度シートでも管状要素分化が誘導される。このとき両シート間に透析膜や酵素を固定したアガロースゲルシートを挟み、低密度シートにおける管状要素分化への影響を調べるのがサンドイッチ培養法である(図1)。ここではプロナーゼ E およびトリプシンの分化因子に対する作用を知る目的で実験を行った。プロナーゼ E を固定化したシートを挟んだ場合には、低密度シートでの管状要素分化および細胞分裂が阻害された(図2)。一方、トリプシン固定化シートを挟むと、低密度シートでの分化が特異的に抑制され、細胞分裂は抑制されなかった(図3)。これらの結果から、分化因子はトリプシンで分解されるタンパク質性物質であり、このほかに細胞分裂に必要なプロナーゼ E 感受性・トリプシン耐性の因子が存在することが示された。これを受けて、細胞分裂には関与せず管状要素分化のみを誘導または促進する高分子のタンパク質性分泌因子として、分化因子を再定義すると共に、その xylogenic な活性に因んで、xylogen と改称することにした。なお細胞分裂に関わる因子の候補としては、Matsubayashi ら(1998, 1999)により管状要素分化と細胞分裂の両方に必要なことが示されている硫酸化ペンタペプチド phytosulfokine- α が挙げられる。phytosulfokine- α はプロナーゼ E により分解され失活するが、トリプシンでは分解されず、上記の結果とよく合致する。

次に、サンドイッチ培養法を用いて xylogen が管状要素分化に必要な時期を推定した。この際に、高密度シートからの xylogen の供給が、分画分子量 25 kD の透析膜を 2 種類のシート間に挟むことで遮断され、300 kD の透析膜を挟んだ場合には遮断されないこと(図 1)を利用した。第一の実験では、培養の様々な時期に高密度シートに重ねた 25 kD の透析膜上から別的高密度シートに重ねた 300 kD の透析膜上に低密度シートを移動し、移動後にはのみ低密度側の細胞が十分な xylogen 供給を受けられるようにした(図 4)。培養 36 時間目に移動すると低密度シートにおける分化がわずかに抑制され、培養 48 時間目以降の移動では強く抑制された。このことは、xylogen が遅くとも 36 時間目から必要であることを示している。第二の実験では逆に、培養の様々な時期に 300 kD の透析膜上から 25 kD の透析膜上に低密度シートを移動した(図 5)。培養 60 時間目以前に移動した場合には低密度シートでは分化が殆ど起こらなかったが、培養 72 時間目以降に移動すると分化が観察された。この結果から、xylogen は 60 時間目までは必要であることがわかった。2 つの実験を総合すると、xylogen は少なくとも培養 36 時間目から 60 時間目にかけて機能していると推定された。ヒャクニチソウ葉肉細胞の管状要素への分化転換は葉肉細胞が脱分化する段階(ステージ 1)、分化能が限定されて管状要素前駆細胞となる段階(ステージ 2)、管状要素としての分化形質が発現する段階(ステージ 3)の 3 つに区分される(Fukuda 1997)。今回 xylogen が働くと推定された時期は、このうちステージ 2 に相当し、xylogen が分化能限定化に関与することを示唆する。

2. Xylogen バイオアッセイ系の確立と xylogen の単離

シート培養やサンドイッチ培養は、細胞間相互作用の生理学的な解析には適しているが、xylogen を単離・精製するためのバイオアッセイ系には向いていない。そこで、xylogen 活性をモニターできるバイオアッセイ系をビーズ培養を用いて開発した(図 6)。ビーズ培養では管状要素分化率がビーズ内の細胞密度(局所的な細胞密度)に強く依存し、高密度ビーズと共存させて培養容器内の平均細胞密度(全体の細胞密度)を高く保っても、 5×10^4 cells/ml 以下の低密度ビーズでは管状要素分化が抑制される。このような低密度ビーズでの分化抑制は、xylogen の不足によるものとみなしてよい。管状要素分化を誘導した細胞懸濁培養から培地上清すなわち conditioned medium(CM)を回収し、高密度ビーズと低密度ビーズの共培養系に添加したところ低密度ビーズでの分化率が増大した(図 7)。これは、CM 中の Xylogen 活性が低密度ビーズにおける分化率の増大を指標に検出されたことを意味しており、高密度ビーズ・低密度ビーズの共培養系が xylogen のバイオアッセイに有効であることが示された。CM を分画分子量 5kD の限外濾過膜で高分子画分と低分子画分に分けて添加した場合には、xylogen 活性は高分子画分のみ検出された(図 7, 8)。

Xylogen 活性の変動と管状要素分化との関連性を明らかにするため、分化誘導条件の細胞懸濁培養(D 培養)と分化非誘導条件のコントロール培養(Cp 培養)から、様々な時期に CM の高分子画分を回収し、xylogen 活性について検討した(図 9)。Xylogen 活性は D 培養において管状要素分化と関連して増加した。一方、Cp 培養では xylogen 活性は検出されず、かえって分化を阻害する活性が検出され、高分子の分化阻害因子が培地に蓄積することが示唆された。細胞分裂に対しては、D 培養の高分子画分はほとんど影響を与えなかったが、Cp 培養の高分子画分は促進効果を示した。しかし、この促進効果は、Cp 培養の高分子画分が分化を阻害し、分裂可能な非管状要素細胞を増加させたことによる二次的なものと思われる。

Xylogen の熱に対する安定性を調べるために、xylogen 活性を持つ CM の高分子画分を 10 分間煮沸して残存活性を調べた。その結果、xylogen は 10 分間煮沸してもほとんど失活せず、高温でも安定な物質であることがわかった(図 10)。CM の高分子画分をプロナーゼ E やトリプシンで処理した場合には、ほとんどの xylogen 活性が消失した(図 11)。変性したプロナーゼはこの様な効果をもたらさず、xylogen がタンパク質性であることが確認できた。

Xylogen の分離・精製のため、培地中の高分子を種々のレクチン-アガロースカラムで分画した(図 12)。Xylogen 活性は、RCA(ヒマ種子レクチン)、PNA(ピーナツレクチン)、Con A(タチナタマメレクチン)に結合した画分に検出され、その他のレクチンに結合した画分には検出されなかった。これらのレクチンの糖に対する結合特異性から、xylogen はガラクトースやマンノースを含む糖鎖を持つと推測された。さらに、レクチンカラムで分画された画分を SDS-PAGE により分離した(図 13)。Xylogen 活性が認められた画分には 75 kD 以上の分子量を持つスマア-なバンドが共通して存在していたが、このバンドは活性のない結合画分には検出されなかった。この高分子のスマア-なバンドは、arabinogalactan protein (AGP)の泳動パターンによく似ており、xylogen が AGP である可能性が浮上した。

Xylogen が AGP である可能性について検討するため、AGP と特異的に相互作用して複合体を形成する β -glucosyl Yariv 試薬を用いて培地中の AGP を単離した(図 14)。AGP 画分の添加は低密度ビーズにおける分化率を増大させた。この結果はある種の AGP が xylogen 活性を持つことを示している。AGP 画分に含まれる糖タンパク質は 100 kD 以上の分子量を持つスマア-なバンドとして観察された(図 15)。

細胞懸濁培養において培地に含まれる AGP の経時変化を調べた(図 16)。分化を誘導した細胞懸濁培養(D)とコントロール培養(Cp)から、培養の様々な時期に培地中のタンパク質を回収し、SDS-PAGE で分離後ニトロセルロース膜に転写し、AGP を β -glucosyl Yariv 試薬で染色した。分化誘導条件では、AGP は 36 時間目から蓄積が認められ、管状要素分化に伴って 72 時間目まで増加した。コントロール培養では 72 時間目にわずかな AGP の蓄積が見られた。この結果は、xylogen が分化誘導条件で蓄積することと合致し、xylogen が AGP 様の分子であることを支持した。

まとめ

本研究の結果を総合すると、ヒャクニチソウ *in vitro* 管状要素分化系において局所的な細胞間相互作用を担う xylogen の性質について、以下のようにまとめることができる。

1. Xylogen はステージ 2 で機能し、脱分化細胞が管状要素前駆細胞に分化する過程を正に制御している。
2. Xylogen は、細胞外に分泌される約 100 kD 以上の AGP 様糖タンパク質で、ガラクトースとマンノースを側鎖に持つ。
3. Xylogen は、管状要素分化に伴って細胞外に蓄積する。

このうち 1 と 3 から、xylogen の濃度増加が細胞を管状要素分化経路に引き込み、分化経路に引き込まれた細胞がさらに xylogen を産生するという正のフィードバックループが想定される。このようなループが実際に機能しているならば、維管束の位置決定機構においてきわめて重要な役割を担っていると考えられ、その検証は今後の研究の最重要課題である。

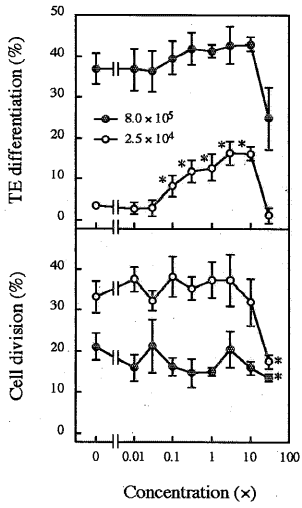


図8. 高分子画分のXylogen 活性の濃度応答曲線。72 時間目の細胞懸濁培養から CM の高分子画分を調製し、高密度ビーズと低密度ビーズを共培養する際に、様々な濃度で添加した。高密度ビーズ (●) と低密度ビーズ (○) における分化率と分裂率を72時間目に測定した。全体の細胞密度は 2.2×10^4 cells ml^{-1} である。横軸に示した濃度は元の培地の濃度を1としたときの相対値で示した。各値は3サンプルの平均、バーは標準偏差を示している。濃度0における値に対して有意な差を示す値は*でマークした(危険率5%のt検定)。

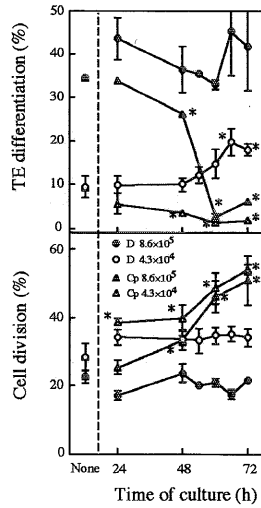


図9. 細胞懸濁培養における Xylogen 活性の変化。分化を誘導した細胞懸濁培養 (D:○, ●) とコントロール培養 (Cp: △, ▲) から、横軸に示したような培養の様々な時期に CM の高分子画分を調製し、元の培地の濃度の3倍に濃縮して、高密度ビーズと低密度ビーズを共培養する際に添加した。全体の細胞密度は 2.4×10^4 cells ml^{-1} である。高密度ビーズ (●, ▲) と低密度ビーズ (○, △) における分化率と分裂率を培養72時間目に計測した。各値は3サンプルの平均、バーは標準偏差を示している。無添加の対照条件における値(左端)に対して有意な差を示す値は*でマークした(危険率5%のt検定)。

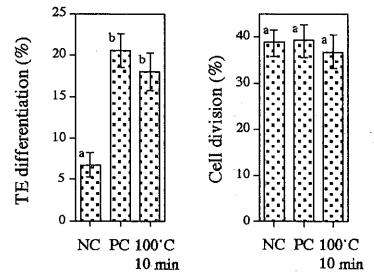


図10. Xylogen 活性に対する熱処理の効果。培養72時間目の細胞懸濁培養から CM の高分子画分を調製し、10分間 100°C で熱処理後、高密度ビーズ (8.3×10^5 cells ml^{-1}) と低密度ビーズ (2.3×10^4 cells ml^{-1}) の共培養系に添加した。全体の細胞密度は 2.3×10^4 cells ml^{-1} である。添加した高分子画分の濃度は元の培地の3倍である。NCは無添加のネガティブコントロール、PCは無処理の高分子画分を添加したポジティブコントロールを示す。簡略化のため低密度ビーズにおける72時間目の分化率と分裂率のみを示した。高密度ビーズの分化率、分裂率はいずれの処理によってもほとんど影響を受けなかった。各値は3サンプルの平均、バーは標準偏差を示している。異なる文字でマークされた値は、危険率5%のt検定において有意な差を示したものの。

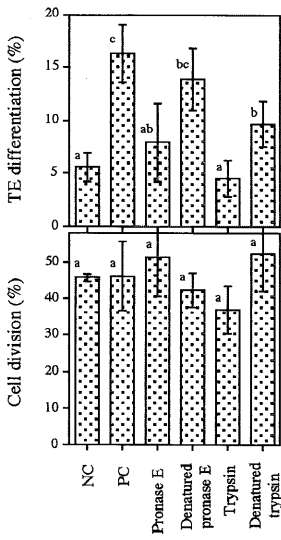


図11. Xylogen 活性に対するプロテアーゼの効果。培養72時間目の細胞懸濁培養からCMの高分子画分を調製し、 $50 \mu g ml^{-1}$ の pronase E、熱変性した pronase E、trypsin、熱変性した trypsin をそれぞれ加え、30°C で3時間インキュベートした後、高密度ビーズ (8.0×10^5 cells ml^{-1}) と低密度ビーズ (2.5×10^4 cells ml^{-1}) を共培養する際に添加した。全体の細胞密度は 2.2×10^4 cells ml^{-1} である。また、添加した高分子画分の濃度は元の培地の3倍である。NCは無添加のネガティブコントロール、PCは無処理の高分子画分を添加したポジティブコントロールを示す。簡略化のため低密度ビーズにおける72時間目の分化率と分裂率のみを示した。高密度ビーズの分化率、分裂率はいずれの処理によってもほとんど影響を受けなかった。各値は3サンプルの平均、バーは標準偏差を示している。異なる文字でマークされた値は、危険率5%のt検定において有意な差を示したものの。

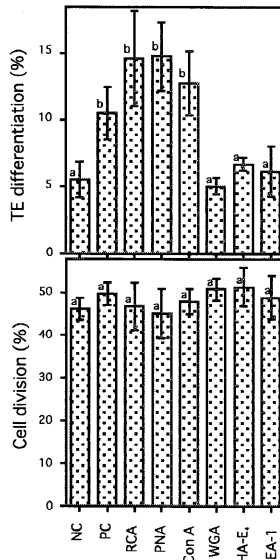


図12. レクチン結合画分のxylogen 活性。72時間目の細胞懸濁培養から CM の高分子画分を調製し、種々のレクチン-アガロースカラムを用いて結合画分と非結合画分に分けた。全体の細胞密度が 8.0×10^5 cells ml^{-1} になるように高密度ビーズ (9.0×10^5 cells ml^{-1}) と低密度ビーズ (3.0×10^4 cells ml^{-1}) を共培養する際、レクチン結合画分を元の培地の3倍の濃度で添加した。簡略化のため低密度ビーズにおける72時間目の分化率と分裂率のみを示した。高密度ビーズの分化率、分裂率はいずれの処理によってもほとんど影響を受けなかった。各値は3サンプルの平均、バーは標準偏差を示している。異なる文字でマークされた値は、危険率5%のt検定において有意な差を示したものの。

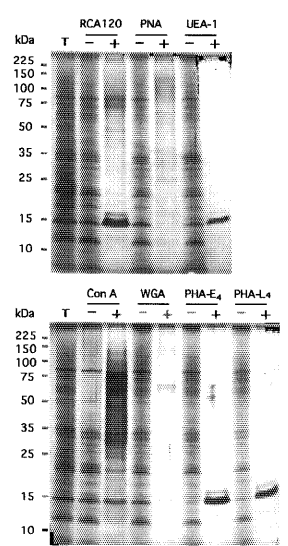


図13. レクチン結合画分・非結合画分のSDS-PAGE解析。72時間目の細胞懸濁培養からCMの高分子画分を調製し、種々のレクチン-アガロースカラムを用いて結合画分(+)と非結合画分(-)に分けた。これらの画分をSDS-PAGEで分離し、泳動後のゲルを銀染色した。Tはレクチンカラムで分画する前の高分子画分を示している。

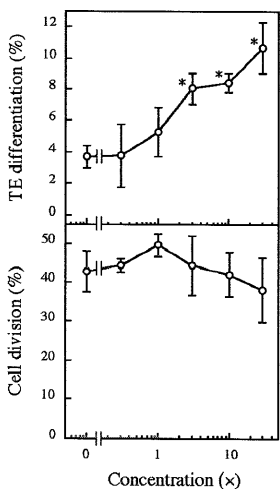


図14. AGP 画分の xylogen 活性。72時間目の懸濁細胞培養から調製した CM の高分子画分から β -glucosyl Yariv 試薬を用いて AGP を単離した。全体の細胞密度が 2.5×10^4 cells ml^{-1} になるように高密度ビーズ (9.0×10^5 cells ml^{-1}) と低密度ビーズ (3.0×10^4 cells ml^{-1}) を共培養する際、AGP 画分を様々な濃度で添加した。横軸は、元の培地における濃度を1としたときの濃縮度を示している。簡略化のため低密度ビーズにおける72時間目の分化率と分裂率のみを示した。高密度ビーズの分化率、分裂率はいずれの処理によってもほとんど影響を受けなかった。各値は3サンプルの平均、バーは標準偏差を示している。*でマークされた値は、危険率5%のt検定において有意な差を示したものの。

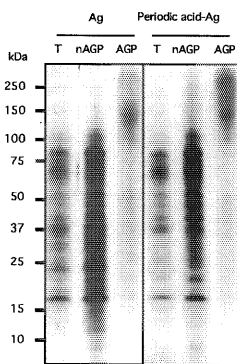


図15. AGP画分のSDS-PAGE解析。72時間目の懸濁細胞培養から調製したCMの高分子画分を、 β -glucosyl Yariv 試薬を用いて非AGP画分(nAGP)とAGP画分(AGP)に分けた。これらの画分と無処理の高分子画分(T)を SDS-PAGE で分離し、泳動後のゲルに含まれるタンパク質を銀染色、糖を過ヨウ素酸-銀染色で検出した。

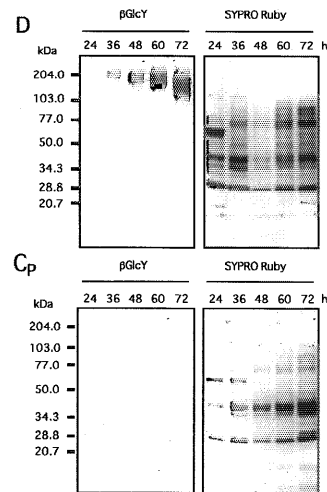


図16. 細胞懸濁培養の CM に含まれる AGP の泳動プロファイルの経時変化。分化を誘導した細胞懸濁培養 (D) とコントロール培養 (Cp) から、CM の高分子画分を各レーンの上に示したような培養の様々な時期に調製し、SDS-PAGE で分離後ニトロセルロース膜に転写し、AGP を β -glucosyl Yariv 試薬で、タンパク質を SYPRO Ruby で染色した。