

論文内容の要旨

Studies on extracellular molecules involved in xylem development

(木部分化に関与する細胞外分子の研究)

伊藤 康子

序論

高等植物で発達した維管束は、水や栄養素の通路になる組織である。維管束組織は多種類の細胞からなる組織であるが、個々の細胞が分化運命を獲得する機構については不明な点が多い。植物の細胞分化は基本的には位置依存的で、維管束の細胞分化過程においても細胞の間で情報因子のやりとりが行われていることが予想される。

ヒヤクニチソウ木部細胞分化系では、単離した葉肉細胞をオーキシシンとサイトカイニンの存在下で培養することによって、管状要素(TE)分化が同調的に起こる。維管束分化に関する遺伝子の発現解析から、ヒヤクニチソウ木部細胞分化系では TE だけではなく他の木部細胞も分化することが示されている。分化は単細胞で起こることから、分化情報のやり取りは、細胞外、すなわち培地を通じて行われると考えられた。そのため、培養液を用いて様々な細胞の間で起こるアポプラスティックな情報伝達や物質供給の現象を解析することが可能である。

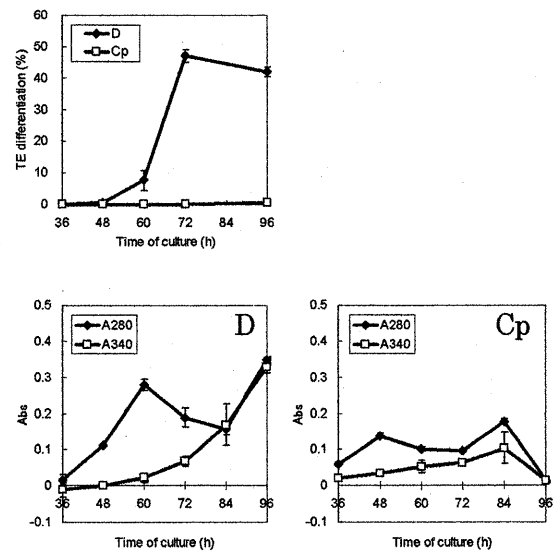
私は、木部分化に関与する細胞外因子を明らかにするために、ヒヤクニチソウ分化系の培養液中に含まれる分子について解析することにした。そして、解析の結果、1. 培地中に蓄積する TE のリグニン化に必要なリグニン前駆体、2. オーキシシンのみで培養したコンディション培地に存在する TE 分化の抑制因子 TDIF (TE differentiation inhibitory factor) 、の TE 分化への関与について明らかにすることができた。

結果と考察

1. 木部分化に伴う細胞外へのリグニン前駆体の分泌

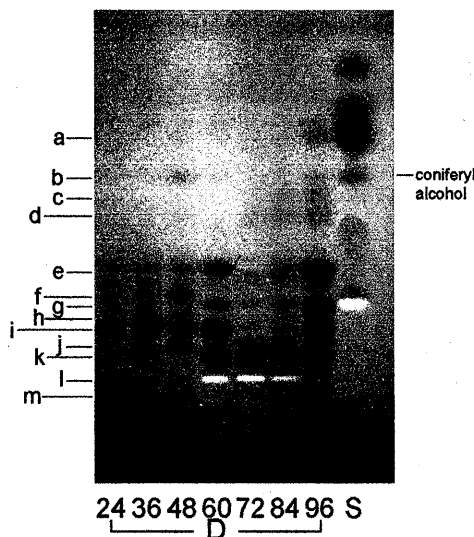
木部分化誘導培地 (D 培地) でヒヤクニチソウ葉肉細胞を培養すると約40%の細胞が同調的に TE へと分化する。また、残りの細胞の一部は木部柔細胞に分化していることが他の研究者らによって報告されている。私は D 培地で木部が分化するのに伴い培地中で増減する物質を探するために、まず培地の紫外線吸収スペクトルを測定したところ、TE 分化が始まる48時間目から 280 nm と 340 nm の吸収ピークが増加した。一方で、TE 分化がほとんど起こらない Cp 培地では、培地の紫外線吸収度は顕著に増加しなかった。そのため、培地中に紫外線吸収物質が蓄積する現象は木部分化特異的なものであることがわかった (図 1)。

図 1



培地中のタンパク質とフェノール化合物を定量したところ、紫外線吸収の増加はフェノール化合物の増加によるものと予想されたので、紫外線吸収物質の構成を調べるために逆相薄層クロマトグラフィーで解析した。その結果、コニフェリルアルコールに類似した物質を含むD培地特異的な a ~ n のバンドが検出された (図 2)。

図 2



培養 84 時間目に phenylalanine ammonia-lyase (PAL) の阻害剤 L- α -aminooxy- β -phenylpropionic acid (AOPP) を与えると 1 以外の物質は培地中に蓄積されなくなったため、これらはフェニルプロパノイドと考えられた。さらに、培養液に AOPP を与えると TE のリグニン化が阻害されるが、60% メタノール抽出液を AOPP と共に培養細胞に供給するとリグニン化が回復した。このことはフェニルプロパノイドの一部はリグニン前駆体であると考えられる。

培地中への紫外線吸収物質の蓄積はほとんどの TE が細胞質を失った84時間目以降も増加し続けたため、これらの物質は TE 以外の細胞に由来することが考えられた。84 時間目に小胞分泌の阻害剤である brefeldin A (BFA) を添加すると、1 以外の紫外線吸収物質の培地中への蓄積が阻害されたため、TE 以外の生細胞が小胞輸送機構を使って積極的に細胞外に分泌していることが示唆された。

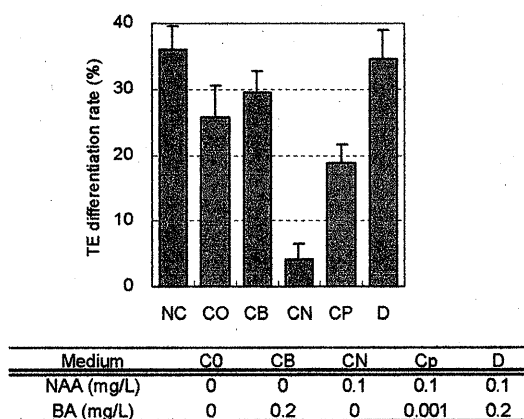
ウニコナゾールでブラシノステロイド合成を阻害すると TE 分化が抑制されるが、さらにブラシノライドを添加すると回復する。この時の紫外線吸収物質の培地への蓄積パターンを調べた結果、ウニコナゾールを与えて TE 分化が抑制されても、紫外線吸収物質は増加し続けた。この結果は、リグニン前駆体を含めた紫外線吸収物質の分泌はブラシノステロイドにより影響されないことを示している。

2. TE 分化抑制因子 (TDIF)

ヒヤクニチソウ TE 分化系では、約40%の葉肉細胞が TE に分化すると、それ以上の細胞は TE に分化しなくなる。また、植物ホルモンのサイトカイニン濃度が0または0.001 mg/L と減少した培地において、維管束分化のマーカ遺伝子はある程度発現するものの、その発現量はほとんど増加しないか減少する。これらの結果は、ある種の分化抑制因子が木部細胞分化に関与している可能性を示唆している。そこで私は TE 分化の抑制因子を探索することにした。

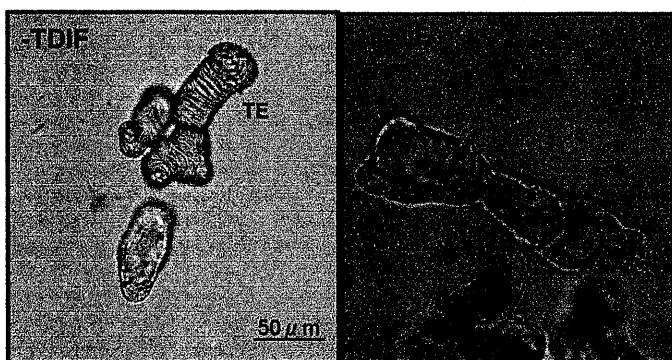
まず、様々な画分をバイオアッセイしたところ、20% メタノール抽出画分に阻害活性が見つかった。次に異なる植物ホルモン組成の培地で細胞を72時間培養し、その培地(コンディション培地)の 20% メタノール画分の阻害活性を調べた(図3)。D培地のコンディション培地は TE 分化を抑制する効果は無いか、あるいは低かった。一方でヒヤクニチソウの培養系で用いられている4種類のコントロール培地で培養した時のコンディション培地に含まれる TE 分化抑制活性を調べると、オーキシンのみで培養する CN 条件で強い TE 分化抑制活性が見られた。また、ホルモンフリー、サイトカイニンのみで培養したコンディション培地中の TE 分化抑制活性は低かった。

図 3



D 培地と CN 培地で抑制活性の経時変化を比較すると、CN 培地では36時間目から活性が見られて、培養時間が長くなるほど蓄積した。D 培地では60時間目から活性が見られたが、CN 培地と比較して弱かった。そこで、この CN 培地に含まれる TE 分化抑制因子を TDIF (TE differentiation inhibitory factor) と呼ぶことにした。D 培地で72時間培養したコンディション培地の高分子画分には TDIF を打ち消して TE 分化を回復させる活性があった。そのため、D 培地では TDIF と回復因子とのバランスで TE 分化が起こることが予想された。

図 4



TDIF を D 培地に0時間目に与えると、TE 分化は抑制されるが、細胞分裂はむしろ促進された(図4)。したがって、この TDIF は細胞活性の低下因子ではなく、TE 分化に関連する抑制因子であると考えられた。そこで、TDIF による管状要素分化の阻害様式を調べた。TDIF は培養36時間目までに与えると TE 分化の阻害効果が見られ、また、TDIF によって TE の分化が抑制されるとき、

WGA-FITC で染色されるような二次壁肥厚の開始が抑制された。次に、TE 分化各ステージのマーカ遺伝子の発現を RNA ゲルブロット解析で調べた。TED3, TED4, CAD1 のような未成熟な木部で発現する遺伝子は TDIF 存在下でも、ほぼコントロールと同様に発現した。TE 分化特異的な遺伝子 ZCP4 は

コントロールと比較して発現が抑制されていた。これらのことから、TDIF は未成熟な木部から TE へ分化する過程を阻害すると考えられた。

次に TDIF の性質を解析した。pronase E で処理すると抑制活性が失われ、ゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量は 1000 から 3000 Da と見積もられたことから、TDIF はペプチドであると予想された。HPLC により最終的に2つの抑制活性画分が得られた。

まとめと展望

本研究では、木部分化に関わる細胞外分子を解析した結果、

- 1) ヒヤクニチソウ TE 分化系には TE の他にリグニン前駆体を分泌する細胞が存在し、その細胞は小胞輸送を使って細胞外にリグニン前駆体を分泌している。
- 2) ブラシノステロイドは TE 分化には必須であるが、リグニン前駆体の分泌には必要ではない。
- 3) オーキシンのみで培養したコンディション培地には TE 分化を抑制するペプチド因子(TDIF)が存在する。
- 4) TDIF は未成熟な木部から TE へ分化する過程を阻害するが、細胞分裂は阻害しない。
- 5) TE 分化誘導をしたコンディション培地には TDIF の効果を打ち消す活性がある。

ことを明らかにした。

培地を介したリグニン前駆体の供給については以下のように考えられた。リグニン前駆体は二次壁肥厚に先立って、未成熟な木部細胞から分泌される。一部の細胞が管状要素に分化して二次壁肥厚が始まると、細胞外に蓄積した前駆体は二次壁上にあるペルオキシダーゼやラッカーゼによって重合され、二次壁のリグニン沈着が始まる。管状要素が自己分解により細胞質を失った後は、管状要素に分化しなかった細胞が前駆体を分泌し続けて培地を介して管状要素の二次壁に供給されるため、二次壁のリグニン化がさらに進む。

TDIF はオーキシン存在下で発現誘導され、培地中に分泌される。これにより管状要素分化が抑制される。一方で、オーキシン、サイトカイニンの両方の作用で葉肉細胞が管状要素分化に向かう時には、TDIF が培地中に蓄積するだけでなく、その効果を打ち消すような因子も同時に細胞外に蓄積するため、管状要素分化が促進される。

今後は TDIF の単離とその遺伝子の同定が第一に必要なことになる。これにより、TDIF の *in situ* での機能を明らかにできると考えている。