

論文内容の要旨

Analyses of novel cell division factors that were identified in cultured cell lines of tobacco:
their implication in auxin-autotrophy

(タバコ懸濁培養細胞の培地中に同定された新奇細胞分裂誘導因子の解析：
それらとオーキシン独立栄養の関連性について)

清水 隆

序論

オーキシンは植物細胞の細胞分裂に必須である。このため植物培養細胞の培地にはオーキシンを加えるが、細胞増殖にオーキシンを必要としなくなる現象がニンジン培養細胞で発見され、「馴化 (habituation)」と名付けられた (R. Gautheret, 1942)。同様の現象は、その後、様々な植物種で観察された。これら馴化細胞の多くはオーキシン生産量が高くなく、そのためオーキシン信号伝達機構に変異が起こったと考えられる。この機構の解明は、オーキシン作用に関する新知見をもたらすものと予想される。

タバコ懸濁培養細胞 2B-13 は、BY-2 細胞由来の馴化細胞で、オーキシンを含まない培地でも増殖する。この 2B-13 の細胞外濾液をオーキシン飢餓により増殖を停止した BY-2 細胞に添加すると、細胞分裂を再開させる効果があることが分かった (図 1)。ところが、2B-13 細胞のオーキシン生産量は BY-2 細胞と比較して特に多いわけではなかった (表 1)。このことから、2B-13 の細胞外濾液中にはオーキシンとは異なる細胞分裂誘導因子 (Cell Division Factor : CDF) が存在すると考えられる。この CDF の同定と物質的性質の解明は、オーキシン信号伝達機構の、これまでに知られていない性質について明らかにすると期待される。

本研究では、まず CDF の生化学的性質を解明したが、CDF は塩基性糖ポリペプチドと推定された。これに基づき精製をした。更に、BY-2 の細胞外濾液にも類似の CDF が存在する事を明らかにしたが、その分子サイズは 2B-13 細胞のそれとは異なっていた。以上の結果を、オーキシン作用機構の見地から考察した。

結果と考察

(1) 細胞分裂誘導活性の生物検定

2B-13 細胞の培養は、培地中にオーキシンを添加しない以外は、BY-2 細胞と同様の条件で行った。2B-13 の細胞外濾液は、植継ぎ後 3 日目の細胞懸濁液を濾紙で濾過して得た。BY-2 細胞をオーキシン除去培地で 3 日間培養すると細胞分裂は停止するが、この細胞にオーキシンを再添加すると半同調的に細胞分裂が誘導される。そこで、細胞外濾液および精製過程で得られた画分の細胞分裂活性は、すべて、この実験系での細胞分裂誘導活性で判断した。具体的には、試料を添加してから約 12 時間後に細胞分裂指数 (Mitotic Index : MI) のピークが観察されたものを生物活性があるものとした (図 1)。

(2) CDF が持つ生化学的性質の解析

CDF は熱処理 (100℃・10 分間)、pH 変化 (pH 4~10)、凍結乾燥に対し安定であることが明らかになったので、以下の実験でこれらの操作を用いた。また、CDF は pH 8.5 以上の条件下で陰イオン交換担体 (DEAE Sephadex) と結合能を持ち、1 M NaCl を添加したバッファーで溶出したことから (図 2)、CDF の等電点は塩基性側にあると推定した。また、CDF をトリプシン処理、*N*-glycopeptidase F (GPF) 処理すると細胞分裂誘導活性が失われたことから (図 3)、CDF は糖修飾されたペプチド鎖を持ち、その存在が細胞分裂活性の維持に必要であると判断された。

(3) CDF の精製

上記の生化学的性質を基に CDF の精製戦略した (図 4)。まず、塩基性ポリペプチドを抽出するためにヒ

ドロキシアパタイトを用い、糖鎖があることを考慮してレクチン (Concanavarin A : Con A) カラムを用いた。さらに、分子サイズで分画するためにゲル濾過クロマトグラフィー (Gel Filtration Chromatography : GFC) を行った。精製の各段階において生物検定を行い、細胞分裂誘導活性を有する画分を次の段階の精製へと進めた。GFC を行った際、溶出時間を分子量既知のマーカータンパク質と比較したところ、CDF の分子サイズは、およそ 30 kDa であると推定された (図 5)。精製中のそれぞれの段階で細胞分裂誘導活性のあった画分の精製度を SDS-PAGE で確認した (図 6 A、B)。GFC 後の画分において、分子サイズ 30 kDa 付近にシングルバンドが検出されたので (図 6 B 矢印)、精製できたと判断した。

(4) BY-2 の細胞外濾液に含まれる CDF の単離精製

2B-13 細胞の CDF が、オーキシン飢餓 BY-2 の細胞分裂を誘導することから、BY-2 細胞も 2B-13 細胞と同様の CDF を分泌しているかを検討するため、BY-2 細胞の細胞外濾液が持つ細胞分裂活性を検定した。その際、培地に加えた 2,4-D の影響を除くため、生物検定にはヒドロキシアパタイトによる粗精製画分を用いた (図 7)。その結果、BY-2 の細胞外濾液にも CDF が含まれることが明らかになった。そこで、BY-2 細胞の場合も 2B-13 細胞と同様の手法で精製を試みた。GFC の際に分子量を推定したところ、BY-2 の細胞外濾液中には約 25 kDa と約 40 kDa の 2 種類の CDF が含まれ、それぞれ独立に細胞分裂誘導活性を持っていた (図 8)。GFC 後の画分において、分子サイズ 25 kDa と 40 kDa 付近にシングルバンドが検出されたので (図 9 矢印)、精製できたと判断したが、このいずれも 2B-13 細胞とは分子サイズが異なっていた。

(5) MALDI TOF MS によるアミノ酸部分配列の解析

2B-13 細胞の CDF のアミノ酸配列を推定するため、トリブシン処理した CDF を MALDI TOF MS 法で解析した (図 10)。その結果、8 個のピークから決められたペプチド断片の配列が *Gossypium gossypioides* (ワタ) の p-glycoprotein (PGP) に 96 %以上の確率で一致した。PGP は膜貫通領域と Nucleotide Binding Fold (NBF) を持ち、約 1200 アミノ酸からなる膜タンパク質で、分子内に 2 回繰り返し構造を持つ ABC トランスポーターの一種である。理論上推定された 7 つのペプチド断片の配列は、この PGP の 2 回繰り返し構造の連結部分に位置していたため、CDF は、この連結部分と類似の構造を持つと考えられる。CDF をコードする遺伝子を探査は、CDF の生物学的意味をより明確にすると予想される。

細胞増殖に関与するペプチド性分泌因子は、これまでに phyto-sulfokine やアラビノガラクトナンタンパク質などが知られているが、オーキシン非依存的に細胞分裂誘導活性を持つ因子の報告は無い。そのため、本報告の糖ペプチドは新奇物質と判断され、細胞増殖に対するオーキシンの作用機構研究に新展開をもたらすと考えられる。今後は、CDF を介した細胞分裂とオーキシンとの関わりを明らかにすることで、オーキシン作用機構研究において新局面の展開が進むと予想される。

まとめ

- (1) タバコ懸濁培養細胞 2B-13 が細胞外に分泌する細胞分裂誘導因子 (CDF) は、分子サイズ約 30 kDa の塩基性糖ポリペプチドであった。
- (2) タバコ懸濁培養細胞 BY-2 の細胞外濾液中にも 2B-13 の CDF と類似の性質を持つものの、分子サイズが異なる 2 種類の CDF が存在し、それぞれ独立に細胞分裂誘導活性を持っていた。
- (3) 2B-13 および BY-2 の細胞外濾液から、CDF を精製した。アミノ酸配列解析の結果、2B-13 の CDF は PGP の一部分と高い相同性を示した。
- (4) 今後は、BY-2 の CDF のアミノ酸解析や、3 つの糖ペプチドの関係を解明すること、それぞれの CDF をコードする遺伝子を探査などを通じて、CDF を介した細胞分裂とオーキシンとの関係を明らかにしたい。

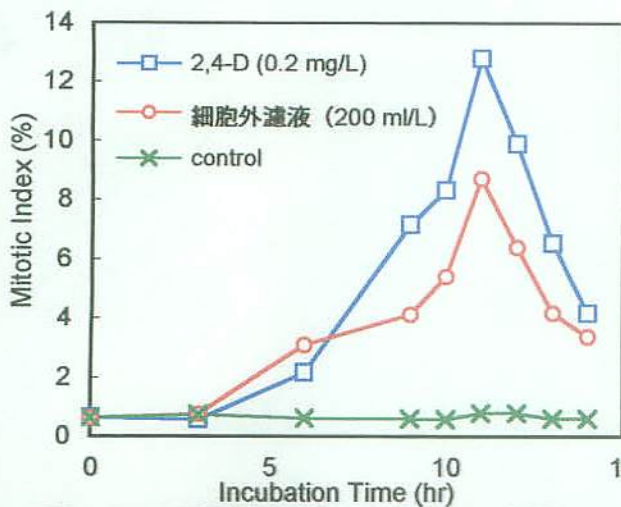


図1 2B-13の細胞外濾液によるオーキシン飢餓BY-2の細胞分裂再誘導

オーキシン欠損培地中で約60時間培養したBY-2細胞に対し、2,4-D (0.2 mg/L: □)、植継後3日目の2B-13細胞外濾液 (200 mL/L: ○) を添加したもの、及び何も添加しなかったもの (×) の細胞分裂率 (Mitotic Index) の経時変化を示す。2B-13の細胞外濾液により半同調的な細胞分裂が誘導された。

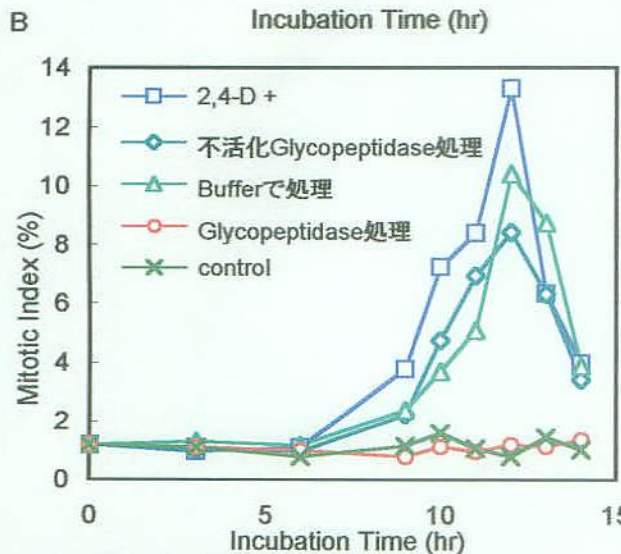
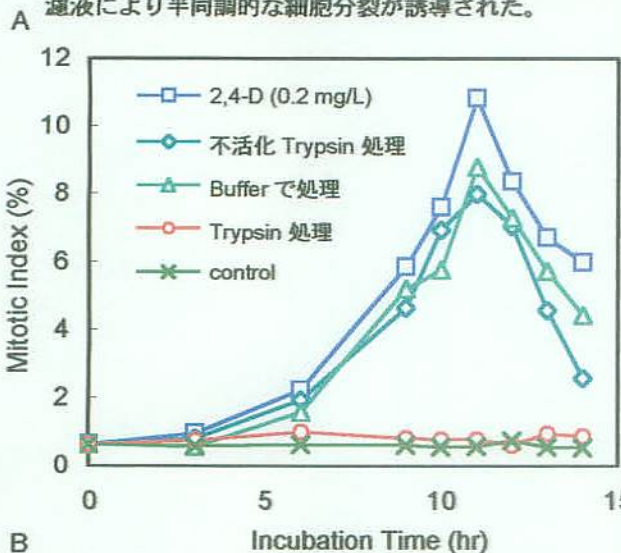


図3 細胞分裂誘導因子の分解酵素に対する感受性

2B-13の細胞外濾液を脱塩、凍結乾燥後Trypsin (A) 或はN-Glycopeptidase F (B) で処理した (○)。対照は100℃、10分で不活化した酵素で処理したもの (◇)、バッファーで処理したもの (△) を用意した。各サンプルは100℃、10分で酵素を不活化した後、生物検定した。グラフは細胞分裂率の経時変化を示す。

	細胞内 (pmol/g fr. wt.)			
	IAA	Z	ZR	ZRM
2B-13	15	219	312	27.5
BY-2	50	265	295	218

	培地中 (pmol/mL)			
	IAA	Z	ZR	ZRM
2B-13	< 1	-	-	-
BY-2	< 0.5	0.5 - 5.0	0.5 - 5.0	0.5 - 5.0

15 表1 BY-2と2B-13の細胞内及び培地中の植物ホルモン濃度
植物ホルモン濃度の定量にはGC MSを用いた。IAA: Indole-3-acetic acid, Z: Zeatin, ZR: Zeatin riboside, ZRM: Zeatin riboside monophosphate

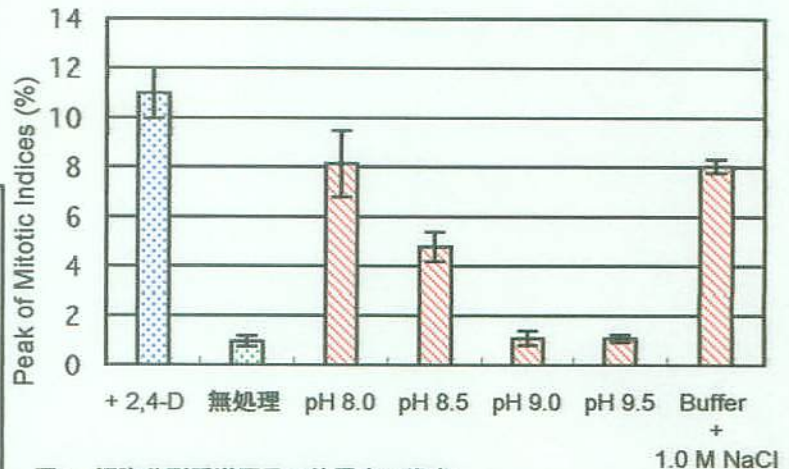


図2 細胞分裂誘導因子の等電点の推定

各pHに平衡化したDEAE Sepharoseに対し脱塩、凍結乾燥した2B-13の細胞外濾液を添加し、攪拌した。遠心分離後、上清を生物検定した。pH 9.0条件下でDEAE Sepharoseに吸着した因子は1.0 M NaClを含むバッファーで溶出し、同様に生物検定した。グラフは細胞分裂率のピークを示す。上清に細胞分裂誘導活性の見られなかったpH 9.0、9.5の条件下では、因子は負電荷を持ち、DEAE Sepharoseに吸着したと考えられるため、因子の等電点はおよそ8.5と推定された。バーは標準偏差を示す。

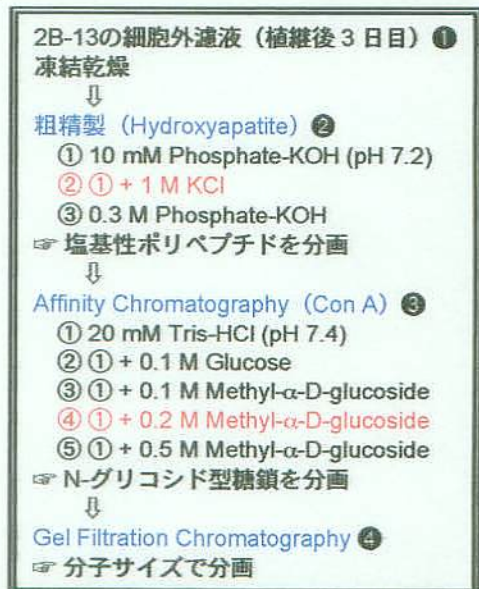


図4 細胞分裂誘導因子の精製戦略

各精製段階で細胞分裂誘導活性のあった画分を赤字で示す。

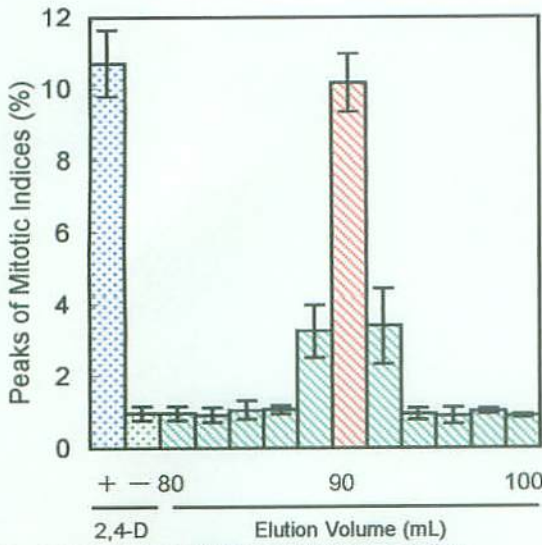


図5 GFCにおける各画分の細胞分裂誘導活性
2B-13細胞外濾液中CDFの精製結果を示す。細胞分裂誘導活性の最も高かった画分(斜線)は、分子量マーカーとの比較で、分子サイズ約30 kDaと推定された。バーは標準偏差を示す。

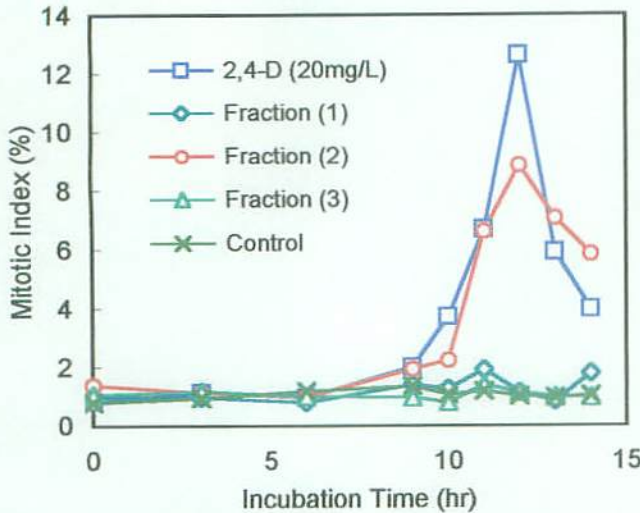


図7 BY-2細胞外濾液の細胞分裂誘導活性
BY-2の細胞外濾液は、添加した2,4-Dの影響を除くため、凍結乾燥後、ヒドロキシアパタイトによる粗精製を行った後、脱塩し、生物検定した。Fraction (1): 10 mM Phosphate-KOH (pH 7.2), Fraction (2): Buffer + 1 M KCl, Fraction (3): Buffer + 0.3 M Phosphate-KOHによる溶出画分を示す。

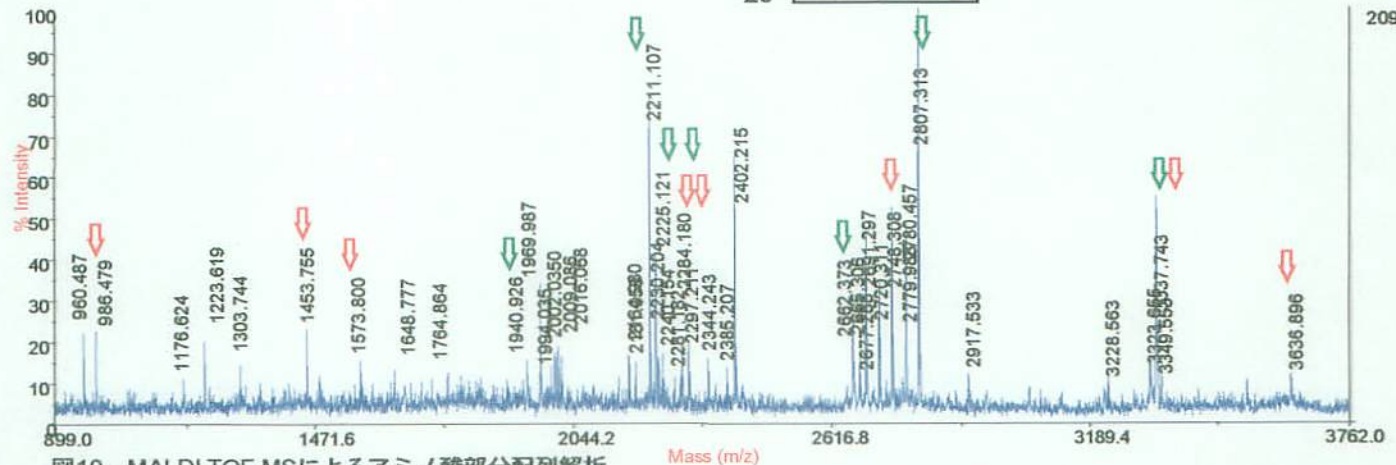


図10 MALDI TOF MSによるアミノ酸部分配列解析
トリプシンで断片化したCDFを解析した。CDF (赤)、トリプシン (緑) に相当すると考えられるピークを矢印で示す。

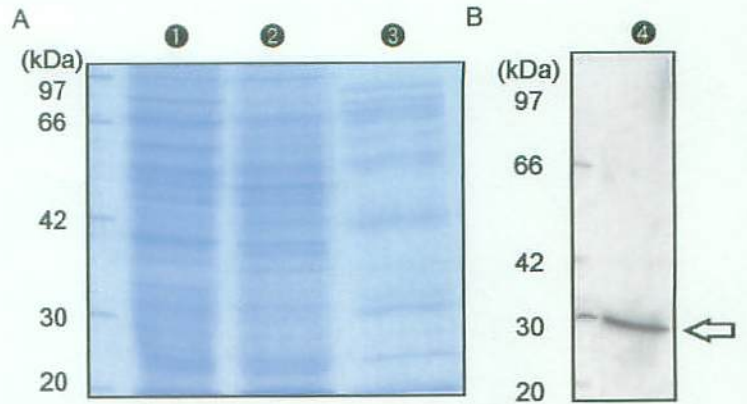


図6 精製度の確認
2B-13細胞外濾液中CDFの精製各段階において細胞分裂誘導活性を持っていた画分の精製度を、SDS-PAGEで確認した。CBB染色像(A)、及び銀染色像(B)を示す。Bでは、図6の赤で示した画分を泳動した。各レーン上の番号は、図4の各精製段階と一致する。

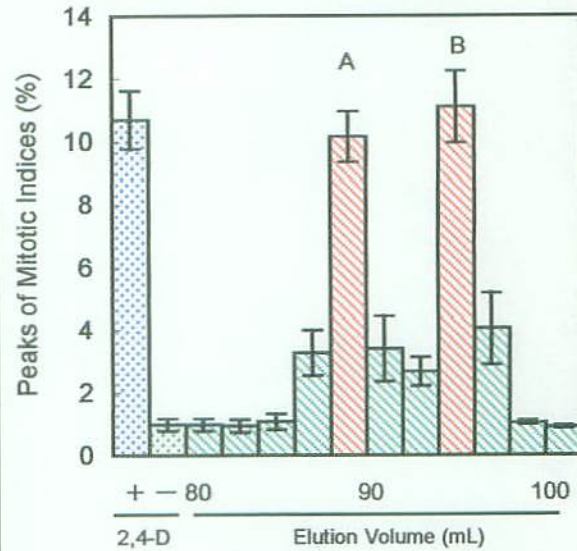


図8 GFCにおける各画分の細胞分裂誘導活性
BY-2細胞外濾液中CDFの精製結果を示す。細胞分裂誘導活性の高かった画分(斜線)は、分子量マーカーとの比較で、分子サイズ約40 kDa (A)、約25 kDa (B)と推定された。バーは標準偏差を示す。

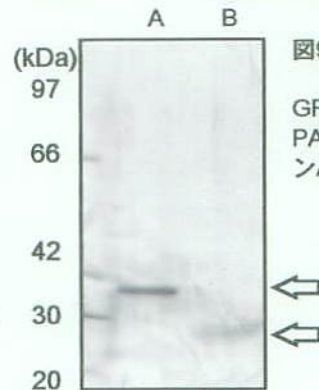


図9 精製度の確認
BY-2細胞外濾液中CDFのうち、GFC精製画分の精製度を、SDS-PAGE及び銀染色で確認した。レーンA、Bは図9の画分A、Bと同じ。