

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
研究期間： 2007-2008
課題番号： 19570032
研究課題名 (和文) 新奇高分子性細胞分裂誘導因子の機能解明
研究課題名 (英文) Characterization of a novel plant cell division factor with high molecular mass
研究代表者
長田 敏行 (NAGATA TOSHIYUKI)
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号：10012519

研究成果の概要：植物細胞を培養するとき、オーキシンの添加は不可欠であるが、オーキシン無しでも増殖する場合が知られており、ハビチュエーション(馴化)と呼ばれているが、その成立の機構については、発見以来明らかにされていない。モデル植物細胞タバコ細胞 BY-2 に由来するタバコ培養細胞 2B-13 は、オーキシン独立栄養であり、ハビチュエーションの特徴的な性質を示す。このため、BY-2 細胞と 2B-13 細胞の差異を探るうち、その原因は 2B-13 が細胞外へ分泌する糖タンパク質であると推定された。2B-13 細胞の細胞外分泌物をオーキシン欠乏で増殖を停止した BY-2 細胞に加えると、細胞分裂が誘導されるからである。そこで、本研究ではその活性成分を数種のカラムクロマトグラフィーにより精製し、MALDI/TOF/MS でその分子的同定を行ったところ、ABC トランスポーターとされる糖タンパク質の P-グリコタンパク質と同定された。しかしながら、これまで明らかにされているオーキシンの信号伝達経路とは未だ繋がらなかった。また、BY-2 細胞の分泌する同様なタンパク質も二種類同定されたが、それらとの差異の解明はなお今後に残された。但し、オーキシン欠乏で増殖停止した BY-2 細胞にオーキシンを加えると、これら糖タンパク質は細胞外に検出されるようになるので、オーキシンの信号伝達経路の一つの分岐であると推定された。これは、最近進展の著しいオーキシン信号伝達経路に更なる経路を与えるものであると判断している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物学・生理学

キーワード：ハビチュエーション、馴化、オーキシン、タバコ BY-2 細胞、P-グリコタンパク質、ABC トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

(1)ハビチュエーションとは、1942年に R. Gautheret によって発見された、植物細胞の培養に必要なオーキシンが無くとも増殖する現象であるが、それ以来、関連する論文は膨大な量に達している。しかしながら、発見されてより 65 年以上経過するのにも関わらず、その機構についてはほとんど明らかにされていない。このため、植物生理学領域で最も未解明の課題とされている。また、現在この課題に取り組む研究者も少ない。その機構解明は植物細胞の増殖の根幹の問題であるので、大変重要であると考えたことがこの課題に取り組んだ発端である。

(2)長田は、モデル植物細胞タバコ BY-2 株を樹立したが、これは、現在世界的に植物のモデル細胞となっている。BY-2 細胞に由来する 2B-13 細胞は、ハビチュエーションの性質を示すことは、1980 年代より示されている。また、それがこの細胞がオーキシンなどを過剰に生産しているためではないことも予備実験で押さえている。2B-13 細胞の細胞外タンパク質がその原因物質と考えられるという結果は、予備実験の段階で得られていた。そこで、その精製と分子的同定を第一の課題とした。また、BY-2 細胞で作られる同様な物質との関係を解明することにより、ハビチュエーションとは何かという基本的な問題に迫れると考え、研究を推進することとした。BY-2 細胞と 2B-13 細胞は遺伝的にほとんど同一と考えられるからである。

(3)モデル植物細胞 BY-2 に関しては、オーキシン飢餓にすると細胞分裂は停止する。その段階でオーキシンを加えると、半同調的な細胞分裂の誘導が出来ることは 1993 年以来確立されている。そこで、原因物質の生物活性はそれが存在する限り、オーキシン飢餓 BY-2 細胞に加えることにより、細胞分裂を誘導することでその生物活性を評価することが可能であると推定した。

2. 研究の目的

(1)研究のより根源的目的は、オーキシンは、日常的に植物の培養細胞のために用いられるが、その理由はほとんど明らかにされていないことである。また、最近オーキシンの作用機構の研究は著しく進展したが、殊、細胞分裂の関わりでは、明らかにされている点はほとんど無い。この解明にハビチュエーションは答えることが出来るであろうと期待したことももう一つの理由であった。

(2)長田により確立された、モデル植物細胞タバコ BY-2 細胞株とそれに由来するハビチュエーションの特徴を示す 2B-13 株との差異を示すことにより、その原因が解明されると考えた。その理由は、予備実験において 2B-13 細胞の分泌する糖タンパク質(CDF と名づけた)がその要因であると判明していたので、その精製と同定を第一の目的とした。

(3)BY-2 細胞の細胞外へ分泌する糖タンパク質の探索は、BY-2 細胞にも同様な CDF があることが研究の途中で見出された。しかも、その CDF は、分子サイズが 2B-13 のものと異なっていることが判明したので、その機構解明も目標とした。この物質と、2B-13 細胞の分泌する糖タンパク質との差異が問題解決の鍵となると予想されたからである。

(4)この研究により、植物細胞がその増殖になぜオーキシンが必要であるかが解明され、現在詳細に明らかにされているオーキシンの信号伝達経路との差異が明らかになると期待される。

3. 研究の方法

(1)糖タンパク質の同定が主目的であったが、存在量が極めて微量であるので精製は必ずしも容易ではなかった。まず、細胞培養濾液から活性分画を集めるのに凍結乾燥機を用いたが、20-50L と多量なため企業に依頼して大型の装置を使わせてもらって行った。多少の試行錯誤はあったが、最終的に下記のクロマトグラフィーを行うことによりその後の精製を行うことができた。即ち、ヒドロキシアパタイトカラム、アフィニティークラム、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、であり、その後 SDS-PAGE で、分子サイズ 30 kDa を示す単一なバンドまで持ち込めたので、この試料を MALDI/TOF/MS 解析に持ちこむことが出来た。後者の方法の概要は、まず、試料をトリプシンで分解し、回収し、脱塩後 MALDI/TOF/MS (Applied Biosystems 社製 4700 Proteomics Analyzer) にかけることにより行った。

(2)本研究では、CDF の生物活性を追及することが重要であるので、CDF 活性はオーキシン飢餓により分裂を停止したタバコ BY-2 細胞に加えて、細胞分裂誘導を指標として行った。このオーキシン飢餓 BY-2 細胞にオーキシンを加えて細胞分裂を誘導する方法は長田等により 1993 年以来確立されている。すなわち、定常期の細胞をオーキシンを除いた培地でよく洗い、その後三日間オーキシン除去培地で培養すると細胞分裂は完全に停止す

る。この細胞に再度オーキシシンを加えると細胞分裂は添加後およそ6時間目から上昇を始め、10時間後にピークとなり、その分裂指数の山は10-15%となる。生物活性はそれぞれオーキシシン添加に対する比率であらわされるが、活性が見られるのはオーキシシン関連物質のみであった。本研究では、各精製分画を加えて、対照であるオーキシシンを加えたものとの対比で分裂活性を判定した。従って、精製の全ての段階でその生物活性を調べることにより、次の精製へと進めた。

(3)BY-2細胞のCDFの同定は、当初難航した。というのは、BY-2細胞の細胞濾液にはオーキシシンが入っているので、それをそのままオーキシシン飢餓BY-2細胞に加えることが出来なかったからである。しかしながら、まず、予備的にヒドロキシアパタイトカラムを通過することにより培地からオーキシシンをほとんど除くことが出来た。そして、その分画を加えても、オーキシシン飢餓BY-2細胞に細胞分裂を誘導できた。そこで、2B-13細胞の濾液精製に用いた方法をほとんどそのまま適用することで精製を行うことが出来た。即ち、ヒドロキシアパタイト、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過の順序で行い、最終的にSDS-PAGEを行うことによって精製することであった。

(4)研究の中心は、糖タンパク質のタンパク質のほうであったが、糖鎖の推定の研究も行ったが、これはレクチンへの結合の性質を中心に行った。基本的にレクチンアガロスクロマトグラフィーであり、用いたレクチンは、ConA(*Canavalia ensiformis*)、LCA(*Lens culinaris*)、PCA120(*Ricinus communis*)、PNA(*Arachis hypogaea*)、WGA(*Triticum aestivum*)、PHA-E₄、PHA-L₄(いずれも*Phaseolus vulgaris*)、UEA-1(*Ulex europaeus*)であった。また、CDFのYariv試薬への結合を調べ、いわゆるアラビノガラクトタンタンパク質の性質があるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1)活性ある成分の精製は、ヒドロキシアパタイトカラム、アフィニティークラム(Con A Sepharose4B)、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー(Superdex200)の順序で行われた。Superdex200より溶出された分画の内87-89mlの分画でのみ、オーキシシン飢餓BY-2の細胞分裂誘導活性が得られた。最終的に、この分画はSDS-PAGEにおいて単一バンドとなり、しかも、その最終フラクションが生物活性を持っていることから、この物質の構造解

析を行った。なお、構造解析に供したタンパク質は、濾液50Lから出発して10⁶倍に濃縮されたと推定したが、これは存在するタンパク質量で推定した。

(2)MALDI/TOF/MS解析によって、追跡していた分子サイズ30kDaのCDFは、ABCトランスポーターの範疇に入るP-グリコタンパク質と判断した。最も類似しているのはデータベースによるとワタのP-グリコタンパク質であった。但し、これまで知られているものとは別なグループに入り、新奇物質であると推定された。

(3)CDF活性ある糖タンパク質を、BY-2細胞においても追及したところ、BY-2細胞にあっても、やはり細胞外へ分泌されるCDF活性を持つ物質があった。この精製は、2B-13細胞に適用した、ヒドロキシアパタイトカラム、アフィニティークラム(ConA Sepharose 4B)、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー(Superdex200)の順序で行うことにより得られた。ゲル濾過において二つの分画において、オーキシシン飢餓細胞に細胞分裂を誘導する活性が認められた。それぞれを、SDS-PAGEにかけたがいずれも単一なバンドとなったので、それぞれ独立に細胞分裂活性を与えていると判断された。それらの分子サイズは、2B-13細胞のものとは異なっており、25kDaと40kDaであった。

また、このP-グリコタンパク質は、オーキシシン飢餓条件では培地中に検出できず、オーキシシンを加えてから3日後に、初めて検出できた。このため、追及している物質はオーキシシン信号伝達経路の上ののっており、オーキシシンにより発現誘導され、分泌されると推定した。但し、既知のオーキシシン応答遺伝子による応答などは見られないことから、未だ知られていない新奇のオーキシシン信号伝達経路の上に載っているものと推定した。

(4)なお、BY-2細胞において、CDFは培地中に検出されたが、細胞内にも前駆体と判断される同様な分子が認められた。このため、細胞内で合成されて、分泌されるものと推定した。また、その存在量は、培地中のそれに比べて多いので今後の解析にはこちらのほうが適当であるかもしれないと判断して、その単離・同定を更に進めている。

(5)糖鎖の推定に関しては、レクチンアガロスクロマトグラフィーの結果は、ConA、LCA、RCA120、PNA、WGAに結合し、その他のレクチンであるPHA-E₄ & PHA-L₄、UEA-1には結合しなかった。その結果は、糖鎖はマンノース型か、あるいはガラクトース型であると推定された。一方、ベーターガラクトシルYariv

試薬を培養濾液に加えると CDF と反応して、沈殿することが示された。また、ベーターガラクトシル Yariv 試薬をオーキシンと共に培地に加えると、細胞分裂が抑えられた。また、このようなことは、アルファガラクトシル Yariv 試薬では認められなかった。このことから、CDF は、アラビノガラクトタンパク質の性質も持っているかと判断された。

(6) これらの結果を統合して、P-グリコタンパク質は、ハビチュエーションの指標物質となりうると判断したが、なお、その一般性などの検証は更に必要であると考え。従って、なお本研究によってもハビチュエーションとは何であるかの問いに直接的な答えを出すことは出来なかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Nagata, T.: A journey with plant cell division: Reflection at my halfway stop. Progress in Botany (in press) 2009、査読あり

② Sato, M., Tsutsumi, M., Ohtsubo, E., Nishii, K., Kuwabara, A., Nagata, T.: Temperature-dependent changes of cell shape during heterophyllous leaf formation in *Ludwigia arcuata* (Onagraceae). Planta 226, 1017-1029 (2008) 査読あり

③ Sano, T., Becker, D., Ivashikina, N., Wegner, I., Zimmermann, U., Nagata, T., Hedrich, R.: Plant cells have to gain a threshold K^+ level to re-enter cell cycle. Plant J. 50, 401-413 (2007) 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

① Nagata, T., Shimizu, T.: Understanding molecular basis of habituation. 2nd EMBO Meeting on Frontiers of Plant Science Research. Cadiz, Spain, May 6-9, 2009

② Kuwabara, A., Sato, M., Nagata, T.: Changes of cell division and elongation observed during heterophyllous leaf formation in *Ludwigia arcuata* (Onagraceae). 2nd EMBO Meeting on Frontiers of Plant Science Research. Cadiz, Spain, May 6-9, 2009

③ Nagata, T., Shimizu, T.: A P-glycoprotein as a possible marker for habituation in plant cells. 1st EMBO Meeting on Plant Mol. Biol. Ghent, Belgium, May 1-4, 2007

[図書] (計 2 件)

① Nagata, T. et al. (eds.) Molecular Genetic Approaches to Maize Improvements. (Kriz, A.L., Larkins, B.A. eds.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 63. Springer-Verlag (2008)

② Nagata, T. et al. (eds.) Rice Biology in the Genomics Era. (Hirano, H. et al. eds.) Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 62, Springer-Verlag (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 敏行 (NAGATA TOSHIYUKI)
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号 10012519