

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650091

研究課題名(和文)シダ植物におけるstandard cell lineの確立と細胞分裂機構の解析

研究課題名(英文)Establishment of standard cell line in fern plant for the analysis of cell proliferation

研究代表者

馳澤 盛一郎(Hasezawa, Seiichiro)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：40172902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シダ植物に着目して懸濁培養細胞系を作成し、分裂増殖の解析に適したstandard cell lineの確立を目指した。胞子から無菌的に育成したリチャードミスワビを様々なホルモン濃度のゲランガム培地や寒天培地に移植してカルスを誘導した。生長のよいカルスをもとに懸濁培養細胞を作成し、LS液体培地の振盪培養で安定に成長する細胞株を確立した。これを用いてプロトプラストの単離を行った。プロトプラストはセルラーゼRSおよびペクトリアーゼY23を用いることで単離でき、その後の培養も可能となった。これはシダ植物では稀有な研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the fern plant to make the suspension culture for establishing the standard cell line suitable for analysis of the proliferation. The spores of *Ceratopteris richardii* were aseptically germinated and transplanted to the gellan gum medium and agar medium of various hormone levels to induce callus. From some good-growing calluses, the suspension cultures were established. The cell lines were stably maintained in a LS liquid medium. Further, the protoplasts were isolated using Cellulase RS and Pectolyase Y23, and then were subsequently cultured. This is a rare study result in fern plants.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：培養細胞 シダ植物 プロトプラスト

### 1. 研究開始当初の背景

陸上にはコケ植物、シダ植物、裸子植物、被子植物など多様な形態と増殖様式を持った植物群が存在している。過去にはゲノム解読が終了したシロイヌナズナをはじめとする被子植物以外には遺伝子工学を用いた研究ができる実験材料が無く、形態形成や増殖に関する遺伝子の進化などを調べるのが困難であった。その後、コケ植物のヒメツリガネゴケやゼニゴケではゲノム解析とともに遺伝子操作ができるような実験系が多数確立されてきており、様々な遺伝子の研究も進んでいる。しかし、コケ植物と被子植物の中間に位置するシダ植物は全般的にゲノムサイズが大きいこともあって、ゲノムプロジェクトからも敬遠されてきた。そこで、基生研の長谷部、西山らは、国内外の共同研究チームを糾合し、シダ植物の一種でゲノム解読を行った。彼らは、ゲノムの大きさが極めて小さいイヌカタヒバを用いて、シダ植物のゲノム解読に初めて成功し (Banks, Nishiyama, Hasebe et al. Science 2011)、リチャードミズワラビ (シダ類) の解析も進めている。一方、我々は過去にモデル細胞としてタバコ BY-2 細胞を確立したが、これは高等植物の培養細胞としては極めて高い増殖能を持つ細胞株で、動物の HeLa 細胞に比肩する植物の細胞生物学的研究の standard cell line となっている。また、各種培養細胞および植物体を実験材料とし、独自の細胞周期同調・分化誘導系などを用いて、植物細胞の形態形成・環境応答における細胞骨格や液胞の可視化解析に取り組んできた。さらに、新たな画像解析ツールの考案、実装を独自に研究、開発を行ってきた。

### 2. 研究の目的

陸上には多様な形態・生理を持った植物群が生存している。しかし、被子植物やコケ植物のごく一部を除いては世界標準の実験細胞株 (standard cell line) が確立されておらず、細胞生物学的研究のみならず分子生物学的研究に適した細胞実験系は極めて限定されている。シダ植物もその例に漏れず、研究に使用可能な細胞実験系が見当たらないのが現状である。ポストゲノム研究が標榜されて久しい今日において、細胞レベルの現象を総括的に追及することは急務であり、本申請研究は、未だ standard cell line が確立されていないシダ植物において、細胞学的および分子生物学的な解析を行うのに適した懸濁培養細胞系を確立し、それを基にした細胞分裂様式の比較解析を行うことで、植物が進化の過程で獲得してきた増殖システムに迫ろうとするものである。本申請研究ではリチャードミズワラビおよびイヌカタヒバの2種のシダ植物に着目し、その standard cell line を確立し、細胞生物学的さらには分子生物学的に解析可能な利便性の高い実験観察系を作成することで、被子植物やコケ植物との分

裂増殖と比較解析を行い、細胞分裂様式の進化に迫ることを目的とする。また、これらの cell line の確立により植物の細胞・分子・生化学への多大な波及効果が期待される。

### 3. 研究の方法

一つの生物現象を解明するには、細胞生物学、分子生物学および生化学的な手法を駆使して研究を進展させていくことが必要となる。そのためにはまず、解析を行うのに適した実験系を確立することが重要である。懸濁培養細胞 (suspension culture) は利便性、安定性などから有用な材料と考えられるが、そのためには均一で増殖の速い優秀な細胞株を作成する必要がある。本申請研究では2種のシダ植物から培養細胞株を誘導し、上記の特性を備えた優れた standard cell line に育成すべく、様々な培養条件を検討する。使用に耐える cell line が確立した段階で、細胞増殖の研究のために細胞周期の同調培養系やプロトプラストの単離・培養法の開発を進め、細胞核 (染色体)、細胞骨格、分裂装置、細胞板など、細胞分裂に伴う諸現象の実験観察を進める。薬剤や物理的刺激による細胞分裂への影響を観るモデル系の検討も行う。さらに、これらの細胞現象を定量評価するための画像クラスタリング等の手法を用いた評価と画像定量解析のツール開発を行う。

### 4. 研究成果

本研究課題は、未だ standard cell line が確立されていないシダ植物において、細胞学的および分子生物学的な解析を行うのに適した懸濁培養細胞系を確立し、それを基にした細胞分裂様式の比較解析を行うことで、植物が進化の過程で獲得してきた増殖システムに迫ろうとするものである。本研究課題では、シダ植物のリチャードミズワラビ (シダ類) とイヌカタヒバ (小葉類) に着目し、それぞれの植物種において懸濁培養細胞系を作成し、分裂増殖の解析に適した standard cell line の確立を目指した。25年度は、cell line (懸濁培養細胞株) の確立を進めた。胞子から無菌的に育成したりチャードミズワラビの切片を様々なホルモン濃度のゲランガム培地や寒天培地に移植し、カルス誘導を試み、成功した。具体的にはリチャードミズワラビのカルス化に際し、培地組成を検討したところ、{ 1/2 ムラシゲ-スクーグ培地、2% スクロース、2 mg/L 6-ベンジルアミノプリン、7 g/L ゲランガム (pH 5.8) } が適していた。以降、本培地をカルス誘導培地と表記する。滅菌した胞子 (図 1A) を、カルス誘導培地にて連続光条件 (24 時間明期、23 ) で 2 ヶ月半培養した。培養した細胞塊のうち薄橙色の部分新しいカルス誘導培地に移し、シャーレをアルミホイルにより遮光して 2 ヶ月培養した (図 1B)。

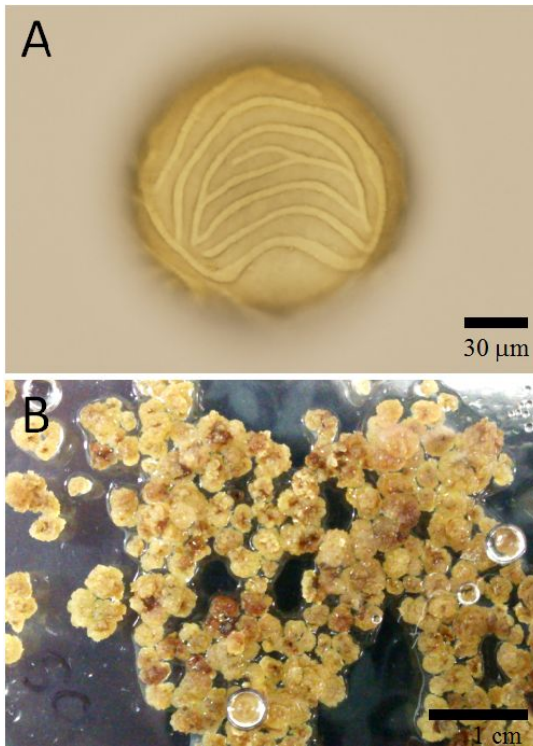


図 1A: リチャードミズワラビの孢子、B: 誘導に成功したカルス

生長のよいカルスをもとに懸濁培養細胞を作出し、LS 液体培地の入ったフラスコへの定期的な移植でシェーカーでの振盪培養が安定したところで、なるべく小さな細胞集団 (fine culture) の選抜を繰り返し、懸濁培養細胞株の cell line を確立した (図 2A)。なお、イヌカタヒバは〔1/5 ムラシゲ-スクーグ培地、7 g/L ゲランガム (pH 5.8)〕培地で無菌培養に成功しているが、リチャードミズワラビの方が有望であり、これ以降はそちらに絞って研究を進めることにした。

続いて 26 年度には、上記のリチャードミズワラビの cell line を用いて細胞分裂様式の比較解析のデータ取得のための実験観察に必要となる画像技術を BY-2 などの細胞を用いて整えてきた。これら最新のイメージング画像定量技術を用いることで、シダ植物でも細胞生物学、分子生物学、進化学などの各方面の研究が飛躍的に進展することが期待される。さらに、cell line (懸濁培養細胞株) が確立したリチャードミズワラビの培養細胞を用いて検討を進めた。懸濁培養細胞は LS 液体培地 95ml の入ったフラスコへの毎週 10ml の移植でシェーカーでの振盪培養を安定させた。この cell line を用いてプロトプラストの単離を行った。最終的に、プロトプラストはセルラーゼ RS 1%、ペクトリアーゼ Y23 0.1% の条件で安定的に単離でき、その後の培養も可能となった (図 2B)。これはシダ植物では稀有な成果であると言える。一方、細胞現象を定量評価するための画像クラスタリング等の手法を用いた評価と画像定量解析のツール開発も多数行った。

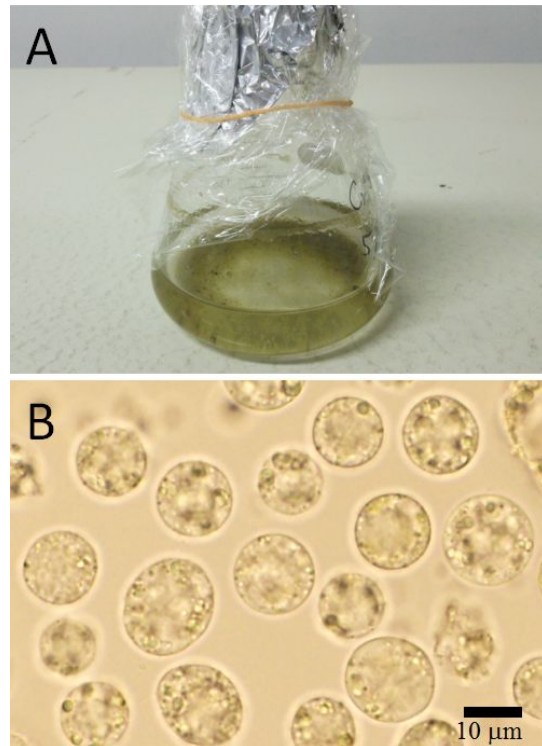


図 2A: リチャードミズワラビの懸濁培養細胞、B: 単離されたプロトプラスト

## 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 5 件)

Kojo KH, Yasuhara H, Hasezawa S: Time-sequential observation of spindle and hragmoplast orientation in BY-2 cells with altered corticalactin microfilament patterning. *Plant Signal Behav.*, 査読有, 9, 2014, e29579 DOI: 10.4161/psb.29579

Hasegawa J, Higaki T, Hamamura Y, Kurihara D, Kutsuna N, Higashiyama T, Hasezawa S, Matsunaga S: Increase in invaginated vacuolar membrane structure caused by plant cell expansion by genotoxic stress induced by DNA double-strand breaks. *Cytologia* 79, 2014, 467-474, DOI: 10.1508/cytologia.79.467

Higaki T, Kutsuna N, Hasezawa S: CARTA-based semi-automatic detection of stomatal regions on an Arabidopsis cotyledon surface. *Plant Morphology* 26, 2014, 9-12, DOI: なし

Kariya K, Demiral T, Sasaki T, Tsuchiya Y, Turkan I, Sano T, Hasezawa S, Yamamoto, Y: A novel mechanism of aluminium-induced cell death involving vacuolar processing enzyme and vacuolar collapse in tobacco cell line BY-2. *Journal of*

Inorganic Biochemistry 128, 2013, 196-201 DOI: org/10.1016/j.jinorgbio.2013.07.001

Sano T, Hayashi T, Kutsuna N, Nagata T, Hasezawa, S: Role of actin microfilaments in phragmoplast guidance to the cortical division zone. Current Topics in Plant Biology 13 ,2013, 87-94 DOI:なし

〔学会発表〕(計 4 件)

朽名夏磨, 馳澤盛一郎: ランダム森を用いた顕微鏡画像からのフェノーム解析システムの開発、第 56 回日本植物生理学会年会(東京) 2015 年 3 月 16 日

長谷川淳子, 桧垣匠, 朽名夏磨, 坂本卓也, 綿引雅昭, 馳澤盛一郎, 松永幸大: DNA 損傷ストレスにおけるオーキシンの機能解析、第 78 回日本植物学会(東京) 2014 年 9 月 12 日

湖城恵, 桧垣匠, 朽名夏磨, 馳澤盛一郎: 画像処理技術を用いた表層アクチン繊維の動態解析、日本植物学会年会(札幌) 2013 年 9 月 15 日

高橋真哉, 遠藤真咲, 朽名夏磨, 馳澤盛一郎: タバコ BY-2 培養細胞を用いた UV-B による細胞増殖阻害メカニズムの解析、日本植物学会年会(札幌) 2013 年 9 月 15 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://hasezawa.ib.k.u-tokyo.ac.jp/zp/hlab>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馳澤 盛一郎 (Hasezawa, Seiichiro)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・

教授

研究者番号: 40172902

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: