

はじめに

植物細胞は、各種の機能を持った細胞へと分化した後でも、それらの細胞を適切な条件下で培養することにより、再分化を行ない最終的に完全な植物体を再生する能力、分化全能性 (totipotency) を持っている。この植物特有の性質を利用し、親と全く同一の遺伝子を持つクローン植物を再生する技術は多くの植物種において確立されており、優良品種の大量生産など産業的にも重要な地位を占めるにいたっている。通常、無菌的に取り出した植物組織を無機塩類やビタミン、糖類などの有機成分の他、植物ホルモンであるオーキシシンとサイトカイニンを含む培地に移して培養し、脱分化により生じるカルスを誘導するのが一般的である。カルスは、植物ホルモンを添加した培地で継代培養することにより未分化状態を維持したまま半永久的に増殖を続けることができるため、細胞生理などの研究や遺伝子導入の材料として広く利用されている。

組織培養のように細胞集団として培養すると活発に分裂、増殖することができる植物細胞ではあるが、細胞を酵素処理や機械的な方法で遊離させ単細胞として培養すると、一般的に 10^4 cells/ml以下の細胞密度では著しく増殖が抑制されてしまうことが知られている。液体培地などに移された植物細胞は細胞外に未知の増殖因子を分泌し、その因子の細胞外濃度がある一定値を越えると細胞分裂を開始することができると考えられる。従って、細胞が低密度の場合は増殖因子が必要濃度に達するのに時間がかかったり、あるいは、培地中で分解される速度の方が速くなってしまいうため、細胞増殖が抑制されることになる。実際、一度培養に使った馴化培地すなわちconditioned medium (CM) 中には細胞増殖を促進する因子が含まれていることが知られており、1960年代後半からこの本体を明らかにしようとする研究が世界各国でいくつか試みられてきた。我々もこの増殖因子に興味を持ち、天然物化学的手法を用いて研究を行ってきた数少ないグループのひとつである。我々は培養系を確立し現象そのものを確認することから研究を始め、1996年にCMに含まれる活性本体を単離することに初めて成功した。構造解析してみると、この因子はペプチド性物質であることが判明し、動物細胞にのみ見出されてきた種々のペプチド性グロースファクターが植物にも存在することを示した最初の例となった(1)。

1. Phytosulfokine- α の発見

筆者らは植物細胞増殖因子の研究を始めるにあたって、まず増殖因子の精製、単離研究に耐え得る生物検定法を確立することを目的として、過去の研究を参考にしながらいくつかの予備実験を繰り返した。当時我々が注目したのは、アスパラガス葉状茎 (いわゆる葉の部分) 由来の葉肉細胞を利用して細胞増殖の研究を行なったJullienの報告 (2) であった。我々はアスパラガスを栽培し、その葉肉細胞をJullienが使った培地をその後の文献を参考にして改良した結果、

再現性良く細胞は分裂し、確かに低細胞密度では細胞分裂が起こらないことも確認された。そこで高細胞密度で増殖しているアスパラガス細胞培養液由来のCMを、低細胞密度培養に加えてみたところ、培養開始8日目において対照区では5%に満たない細胞分裂率が、12.5%のCMの添加で60%にまで促進された。

この結果を出発点として、我々はアスパラガス細胞培養液由来のCMから、アスパラガス葉肉細胞の細胞分裂を誘導する増殖因子の精製を開始した。カラムクロマトグラフィーや酵素処理実験などの予備実験の結果から、増殖因子は比較的極性の高い酸性ペプチドであることが予想された。精製の過程について以下に概略を述べる。第一段階のDEAE Sephadex A-25カラムでは、活性物質はその強い酸性のためにより高塩濃度の画分に回収されたが、CM中に含まれる多くの物質はこの画分以前に溶出されており、極めて効率の良い精製を行なうことができた。さらに得られた活性画分を透析により脱塩した後、ゲルろ過カラムによりサイズ分画を行なうと、活性物質は極めてシャープに分画され、最終的に逆相系のHPLCシステムによる精製を行なった結果、2種類の活性物質 α および β を単一物質として得ることに成功した。この段階では、得られた増殖因子の量は極めて微量であり、当時はその重量を測定することはできなかったが、後に合成した標品を用い、HPLC上でのUV220 nmにおける吸収を比較した結果、それぞれの収量は600 mlのCMから2 μ gおよび10 μ gであることが推定された。単離された活性物質 α は、わずか10 nMの濃度で80%以上のアスパラガス細胞に細胞分裂を誘導する活性を示したが、 β は α の約10分の1程度の活性であった。

こうして増殖因子の単離には成功したが主たる因子 α および β の収量は極微量であり、サンプルを半量に分けそれぞれをシーケンサーとFAB-MSの測定に用いることにした。まず増殖因子 α および β をペプチドシーケンサーで分析し、その配列を解析したところ、 α はTyr-Ile-Tyr-Thr-Gln、 β はTyr-Ile-Tyr-Thrのアミノ酸配列を持つことが明らかとなった。しかし、この構造だけではこれらのペプチドの強い酸性度を説明することはできず、またペプチドシンセサイザーを用いて合成したこれらのペプチドには、細胞増殖活性は見いだされなかった。

そこで、ネガティブモードのFAB-MSによる質量分析を行なった結果、 α の分子量は846、 β の分子量は718であることが示され、実際の分子量はアミノ酸配列から計算できる分子量(α の計算値は686、 β の計算値は558)よりもそれぞれ160ずつ大きいことが判明した。そこで、ペプチドシーケンサーで検出できなかった分子量160の強い酸性基に該当する構造を、文献等で検索した結果、分子内に2個存在するチロシンの側鎖が硫酸エステル化されている可能性が推定された。構造を推定したペプチドTyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Glnを合成したところ、質量分析、ペプチドシーケンサー、およびHPLC分析のいずれにおいても天然サンプルである α と同一のスペクトルまたは挙動を示した。さらに、生物活性においても合成ペプチドは天然サンプルと非常によく一致を示した。以上の結果より、 α の構造はTyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Glnであることが確認されたことから、このペプチドを“硫酸基を持った植物細胞増殖因子”の意味でphytosulfokine- α (PSK- α)と名付けることにした。増殖因子 β についても同様の方法論で構造確認を行ない、PSK- α のC末端のGln残基が欠落したテトラペプチドであることが明らかとなった。現在のところ我々は β は α の酵素的分解物であろうと考えている。

2. Phytosulfokine- α 類縁体の合成と、構造活性相関

我々はPSK- α の構造活性相関についても検討を行なった(3). 増殖誘導活性の評価には前述のアスパラガス葉肉細胞を用いた生物検定法を用い、ED₅₀値を指標に活性を比較している。まず、PSK- α の分子内においてどの部分が最も活性に重要であるかを知るために、PSK- α のC末端のアミノ酸を順次欠落させたペプチドを合成し、その活性を比較すると、PSK- α の活性を100%とした場合PSK- β が8%、[1-3]PSK- α が20%であったが、[1-2]PSK- α では0.1%以下であった。同様に、N末端側のチロシン残基を欠落させた[2-5]PSK- α の活性はPSK- α の0.1%以下であった。このことは、PSK- α の分子内において活性を発現するために必要な最小単位は、[1-3]PSK- α すなわちTyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)であることを示している。次に、PSK- α のN末端あるいはC末端のどちら側が活性発現により重要であるかを調べるため、末端に3個のグリシンスペーサーを導入したものを合成し、それらの活性を比較した。その結果、C末端側にグリシンスペーサーを導入した[C-(Gly)₃]PSK- α は、PSK- α の4%の活性を保持していたのに対し、N末端側にグリシンスペーサーを導入した[N-(Gly)₃]PSK- α は、PSK- α の0.8%の活性を持つに過ぎなかった。このことは、PSK- α とその特異的受容体との結合が、主にN末端側であることを示唆している。

一方、分子内に2個存在する硫酸基が活性の発現に必須であることはすでに判明しているが、個々の硫酸基が活性の発現にどのように関わっているかについても検討した。その結果、Tyr³の硫酸基を欠除させたペプチド[Tyr³(OH)]PSK- α は、ED₅₀値が100 nMであり、PSK- α の4%の活性を保持していたが、Tyr¹の硫酸基を欠除させたペプチド[Tyr¹(OH)]PSK- α は、PSK- α の0.6%の活性を保持しているに過ぎなかった。従って、Tyr³に比べTyr¹の硫酸基の方が、増殖誘導活性に寄与している割合がより高いことが明らかとなった。

3. Phytosulfokine- α の植物界における普遍性

植物細胞間のcross-feeding効果に関する研究からは、概して分類学上近縁の植物間においては、細胞増殖因子が共通の物質である可能性が高いと考えられるが、この因子が植物界において普遍的に存在するか否かは定かではない。

それでは、植物界におけるPSK- α の普遍性はどうなのであろうか？我々は、研究開始当初からこの点には非常に興味を持っており、アスパラガス葉肉細胞を利用した生物検定系に、いろいろな植物培養細胞由来のCMを与えてそれらの効果を検討してきた。その結果、顕著な増殖効果を示したのはイネおよびトウモロコシ由来のCMであり、タバコのBY-2細胞由来のCMなどは全く活性を示さなかった。この結果を受けて、イネおよびトウモロコシ由来のCMに含まれる増殖因子を精製し、構造を決定したところ、結局PSK- α そのものであることが確認された(4)。またPSK- α がそれらの細胞由来のプロトプラストに対して増殖効果を示すことも確認されたことから、PSK- α がイネおよびトウモロコシにおいても細胞増殖因子として機能していることが明らかとなった。またPSKに対する抗体を作成し、ELISAによりランおよびグラジオラスのCMにもPSKが存在することが示唆された。したがって、PSK- α は種特異的なものではなく、科を越えた普遍性を持っている物質であると結論できる。

4. Phytosulfokine- α の特異的な結合部位

哺乳動物のペプチド性グロースファクターにおいては、細胞膜表面に特異的なレセプターが存在することが知られている。Phytosulfokine- α も分子の極性の高さから考えて、細胞膜を通過することは考えにくく、特異的なレセプターの存在が考えられる。そこでPhytosulfokine- α のSにアイソトープを導入したラベル化合物を合成して、アスパラガスの細胞とイネOc株細胞に対して結合実験を行った。両細胞とも結合能を示したが、イネOc株はアスパラガスの細胞の10倍以上の値を示した。そこで以後の結合実験は、Oc細胞を用いることにした。その結果結合部位はPSKに特異的であり、しかもスキッチャードプロットから親和性の異なる2つの結合部位が存在することが明らかになった。また細胞を破壊して遠心機により分画した後、各画分に対する結合実験をした結果、結合部位は細胞膜成分に富んだ画分に分布することが明らかになった(4)。この結合部位は、一般的なレセプターとしての必要条件を満たしていることから、我々はこの結合部位をPSKのレセプターと考えており、細胞膜からの可溶化について検討している。

おわりに

PSK- α は低密度で培養された植物細胞の増殖を誘導する因子として単離されたが、逆に言えば、高密度で細胞が増殖するのは、オーキシンとサイトカイニンの存在下において、細胞自身によって生産されたPSK- α がオートクリン的に増殖を誘導するからであると考えられる。PSK- α の生理学的意義の解明はまだ始まったばかりであるが、PSK- α が植物細胞の分裂、増殖に直接関与している細胞外情報伝達物質であることは間違いなく、レセプター遺伝子のクローニングやアンチセンスDNAを導入した形質転換植物体の作製などを経て、その作用機構を明らかにしていくことが今後の課題である。哺乳動物のグロースファクターは培養細胞のみならず個体における細胞にでも重要な機能を果たしていることが明らかになり、またそのレセプターと癌遺伝子の関係などからこの分野の研究が注目を集め発展してきている。このことから本物質がインタクトの植物においてどのよな部位でどんな機能を担っているかを明らかにすることは今後の大きな課題である。

本研究は生研機構よりの研究費によって行われました。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) Y. Matsubayashi and Y. Sakagami
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 7623-7627 (1996)
- 2) M. Julien
Z. Pflanzenphysiol. 69, 129-141 (1973)
- 3) Y. Matsubayashi and Y. Sakagami
Biochem. Biophys. Res. Commun., 225, 209-214 (1996)
- 4) Y. Matsubayashi, L. Takagi, and Y. Sakagami
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13357-13362 (1997)