報告番号 甲第 3831 号

高等植物の細胞増殖因子に関する生物有機化学的研究

平成９年９月１日

名古屋大学大学院　生命農学研究科　農芸化学専攻
生理活性物質化学講座
松林　嘉克

名古屋大学図書
和 1276463

目　次

序　論		1
第１章	生物検定法の確立	5
第２章	細胞増殖因子の化学的性質と精製	12
第３章	細胞増殖因子の構造と合成	23
第４章	Phytosulfokine-αの化学合成と構造活性相関	32
第５章	Phytosulfokine-αを用いたアスパラガス細胞の超低密度培養	42
第６章	細胞増殖誘導過程におけるPhytosulfokine-αと植物ホルモンとの生理的関連	49
第７章	Phytosulfokine-α結合部位の解析	56
総合考察		68
謝　辞		74
引用文献		75
報文目録		
参考論文目録		

略語

6-BA	6-benzyladenine
Boc	*t*-butoxycarbonyl
Bzl	benzyl
CM	conditioned medium
DMF	dimethylformamide
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
MS	Murashige-Skoog
NAA	α-naphtaleneacetic acid
PSK-α	phytosulfokine-α
t-Bu	*t*-butyl
TFA	trifluoroacetic acid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trt	triphenylmethyl

序論

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を持っている．この分化全能性（totipotency）と呼ばれる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作製する技術は，すでに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．植物が潜在的に持っているこの能力を十分に引き出すためには，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ンとサイトカイニンを含む培地に移して培養することが必要であるが，これら2種類の植物ホルモンの濃度や比率を変化させることによって，培養組織の再分化の方向性，すなわち根や芽のいずれに分化するかを決定づけることもできる．これら再分化の際には，細胞の“初期化”，すなわち脱分化の過程を伴うことが一般的であり，脱分化によって生じたカルスと呼ばれる細胞群は，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．

このように，植物細胞の増殖および分化の過程は，人為的にかなりの部分をコントロールすることが可能になってきているが，実は現在においても未だ解明されていない植物生理学上重要な現象がいくつか知られている．そのひとつに，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事実があげられる．そのため，例えば遺伝子導入した少数の遊離細胞から植物体を再生させる際などには，nurse cellsと呼ばれる“看護”用の細胞とともに培養を行なうことで，全体としての細胞密度を高める工夫が必要である．それでは，なぜ植物細胞は低密度では増殖できなくなってしまうのであろうか？この問いに対しては，いくつかの実験的事実から次のようなモデルが考えられている．すなわち，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いう概念である．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“古い”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，この本体を明らかにしようとする研究はこれまでにもいくつか試みられてきた．

1960年代に行われたStuartとStreetらの研究は，この増殖因子を化学的に明らかにしよ

うとした最初の試みである（1）．彼らは，シカモアカエデ（*Acer pseudoplatanus*）の培養細胞に対し，そのCMが細胞増殖促進効果を持つことを示し，この効果は15種類のアミノ酸の混合物と，未知の揮発性成分が原因であると結論づけた．一方，Bayleyらはダイズ(*Glycine max* L.）の細胞を用いてCMの効果を検討した結果，培地中のアンモニアが活性物質であると推定し（2），また，SargentとKingもダイズの培養細胞由来CMの精製を試みた結果から，アンモニアとプリン類縁化合物が細胞増殖促進因子であると推測している（3）．しかし，これらの研究は，ある程度物質の性質がわかった段階でアミノ酸，アンモニウムなどの化合物を推定し，それらを培地に添加してその細胞増殖促進効果を調べるものであり，生物検定による活性を指標としてCMを分画していくという，天然物化学的手法を用いた物質の精製は行われていないこと，また，これらの研究が行なわれた当時は培地組成の検討がまだ不十分なものであったことなどから，CM中に含まれる細胞増殖に関与するすべての因子を明らかにしたとは考えられない．

その後，1980年代に入り，BellincampiとMurpurgoは，ニンジンの培養細胞を生物検定に用いることにより，CM中に含まれる細胞増殖因子（conditioning factor）の化学的性質について検討した（4）．彼らは，一定の大きさの細胞塊を篩でふりわけて集め，これを低密度でシャーレにプレーティングした後サンプルを与え，20日後にコロニー形成率を観察するという方法で活性を検出した．その結果，増殖因子は凍結乾燥や酸・塩基，および熱処理（100℃ 15 min）に対して比較的安定で，ゲルろ過により分子量約700の水溶性物質であると推定している．しかし，この生物検定法では，活性区におけるコロニー形成率が1～2%にすぎず，活性物質の検出感度に問題があったために，増殖因子の精製・単離には至らなかった．その後，彼らは，細胞培養時の初期細胞密度を高くすることによって得られる細胞増殖促進効果は，低密度の細胞培養液にCMを加えることだけでは完全に再現されないことを根拠に，増殖因子は単一物質ではなく第2の因子として非常に不安定な物質が存在しており，CM中にすべての活性物質が分解されずに存在することはないと報告している（5）．

一方，SomersとBirnbergらは，トウモロコシの培養細胞由来のプロトプラストをシャーレにプレーティングし，各種サンプルを添加して培養開始後8～10日目のコロニー形成率を観察することによって活性物質の検出を行う生物検定系を確立した(6)．翌年にはマイクロプレートを用いることで，この系全体を小型化して増殖因子の単離を試み，その化学的性質についてさらに検討を行った（7）．その結果，活性物質はpH5では安定で，pH2以下8以上では失活し，溶媒分画では水層側に回収されること，また逆相カラムや活性炭に吸着されないこと，加えて，限外ろ過およびゲルろ過を行い，分子量約1200であることなどが示された．彼らは，これらの結果をもとに増殖因子の本体はオリゴサッカライドであろうと推定している．

同じ頃，Schroerらは，低細胞密度では死滅してしまう細胞にCMを与えるとその生存期間を延長させることが出来るという効果から，CM中に含まれ細胞の生存率を向上させる物質を，viability factor（VF）としてその単離を試みた（8）．彼らは，タバコとニンジンの培養細胞を用いてその化学的性質を検討し，これまで報告されてきた植物細胞増殖因子の性質との比較を行ったが，その結果，VFは多くの性質において類似しており，また種々の酵素処理の結果からVFにはグリコシド結合が存在することを推定している．その後，彼らは，活性物質がオリゴサッカライドであるという前提のもとで数種のレクチンカラムに対するVFの親和性を検討した結果から，その化学構造をある程度推定している（9）．また，TeasdaleとRichardsはマツ（*Pinus radiata*）の培養細胞の重量増加を指標に細胞増殖因子の性質を検討し，活性物質は分子量1000以下で，活性炭に吸着され，比較的熱に安定（80℃，1 h）な非ペプチド性の物質であることを示した（10）．彼らは，これらの結果を考え合わせて，因子の本体はおそらくオリゴサッカライドであろうと推定した．

これらの研究から判断して，CM中に細胞増殖因子が存在することは間違いなく，それは水溶性で分子量は数百から千数百程度の物質であることも確かであると考えられる．しかし，微量分析技術の発達した現在において，これほどまでにその存在が明らかにされているにも関わらず，植物細胞増殖因子の単離に成功したという報告は未だ無い．

近年の分子生物学の急速な進歩により，植物育種の分野では様々な有用遺伝子を比較的自由に植物細胞に導入することができるようになった．植物細胞に対する外来遺伝子の導入法だけでも，土壌細菌であるアグロバクテリウム（*Agrobacterium tumefaciens*）のTiプラスミドベクターによる方法，ポリエチレングリコール法，エレクトロポレーション（electroporation）法，マイクロプロジェクタイル（microprojectile）法など，目的に応じて多くの方法が存在する．しかしながら、現在でも特定の遺伝子導入細胞のみを選抜して単細胞培養するような場合には，フィーダーレイヤー法などの保護培養に頼らざるを得ないのが実情であり，この点に関しては基本的に1970年代以降全く進歩していないと言っても過言ではない．従って，もしこの増殖因子を単離し，その構造を明らかにすることができれば，新しい細胞増殖制御物質の発見であるのみならず，化学合成した増殖因子を用いることにより植物細胞培養の効率化に大きな貢献をすることが期待される．

本論文第1章では，この増殖因子の本体を解明することを第一の目的として，まず簡便かつ迅速な生物検定法の確立を目指し検討を重ねた結果，アスパラガス（*Asparagus officinalis* L.）葉肉細胞を用いて極めて高い感度を持つ系を確立したことを述べる．次に，第2章および第3章では，この系を用い，多くの精製条件の詳細な検討を経て，アスパラガス葉肉細胞由来のCMから極めて低濃度で細胞増殖を誘導する硫酸化ペンタペプチドを単離し，その構造を決定する

ことに初めて成功したことを述べる．第4章では，phytosulfokine-α（PSK-α）と名付けたこのペプチドの化学合成法の確立を行ない，さらに12種類の類縁体を用いてPSK-α構造活性相関について検討した結果を述べる．第5章では，化学合成したPSK-αを用いて，アスパラガス細胞の超低密度培養を試み，320 cells/ml程度の初期細胞密度でも細胞分裂の誘導およびカルス形成に成功したことを述べる．また，この過程で，アスパラガス細胞の超低密度培養には，培地からアンモニウムイオンを除いておくことが重要であることも明らかとなった．第6章では，PSK-αと既知の植物ホルモンであるNAAおよび6-BAが，どのように相互作用して細胞増殖を誘導するのかを明らかにする第一段階として，蛍光色素とデンシトメーターを用いてDNA複製に及ぼすそれぞれの物質の影響を解析した．そして，最後に第7章では，ラジオラベルしたPSK-αを用いてバインディングアッセイを行ない，細胞膜上にPSK-α結合部位が存在することを見出し，その結合定数および特異性を明らかにしたことを述べる．

本研究で得られた結果は，植物細胞の細胞増殖に，従来知られていなかった全く新しい因子が関与していることを示しており，植物生理学の分野に新たな分野を切り開く端緒となることを期待したい．

第１章　生物検定法の確立

【緒言】

天然から生理活性物質を精製，単離することを目的として研究を行なう際に，その成否を分けるのは，迅速かつ簡便で検出感度の高い生物検定法を確立できるか否かにあると言っても過言ではない．植物細胞増殖因子の存在が，すでに1970年代に指摘されていたにもかかわらず，未だにその単離に成功した例がないのも，適切な生物検定法が存在しなかったためである．

本研究では，まず植物細胞増殖因子の精製，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，いくつかの予備実験を繰り返した．その過程において，アスパラガス葉状茎の葉肉細胞由来単細胞を利用して細胞増殖の研究を行なったJullienの報告（11）に着目し，数回の追実験を行なったが，細胞破砕液中に含まれていたとされる細胞増殖促進因子の活性を検出することはできなかった．しかし，アスパラガス葉肉細胞由来単細胞を液体培養する際に，細胞破砕液ではなく少量のCMを添加すると，著しく細胞増殖が促進されることが見いだされ，この系をもとにして新規生物検定法の確立を行なうことが可能であると考えられた．

本章では，まずアスパラガス葉肉細胞由来単細胞を植物材料として，培養時の初期細胞密度が細胞増殖に及ぼす効果，および培地へのCMの添加が細胞増殖に及ぼす効果について詳細に検討を加え，細胞増殖因子に対し高い反応性を示す新規生物検定法の確立を行なった．

【材料および方法】

1，植物材料

アスパラガス（*Asparagus officinalis* L. cv. Mary Washington 500W、タキイ種苗）の種子を，クレハ培養土（呉羽化学工業）を入れた育苗用ポット（直径9 cm）に播種後，人工気象室（小糸工業）内で育成した．人工気象室内の照度は葉面で20,000 Lux，日長は1日16時間明期8時間暗期，温度は25℃，湿度は約80％とした．種子は通常播種後約3週間で発芽し，播種後6週目までに3本程度の芽条を生じるので，随時直径21 cmの植木鉢に移植した．実験には，播種後9週間以降の株から採集した葉状茎を用いた．

2，葉肉細胞由来単細胞の調製

長さ約10 cmのアスパラガス葉状茎を、生物検定には1本、CMの調製には200 mlあたり4本使用した．採集した葉状茎は、70％エタノールに30秒間浸漬後、10倍希釈アンチホルミンに100 mlあたり2滴のTween 20を加えた溶液中で10分間滅菌し、さらに滅菌蒸留水で3回洗浄した．次に、クリーンベンチ内にてガラス製ホモジェナイザー（10 ml, 岩城硝子）を用い、滅菌蒸留水中で葉状茎を破砕後、破砕液を37 μmのステンレス製メッシュ（飯田製作所）で濾過し、濾液を遠心分離（100 x *g*, 3 min, Kubota KS-5000）することにより遊離単細胞を沈澱させた．沈澱した遊離単細胞は再度滅菌蒸留水に懸濁させ、遠心分離後に上清を除去する操作を3回繰り返し、完全に夾雑物を除いた．

3，培地の調製

培地組成は、Paulらがアスパラガス葉肉細胞由来単細胞の液体培養に用いた組成を参考にした（12）（Table 1）．液体培地は、使用直前に保存液を目的濃度の4倍濃度となるように蒸留水で希釈して調製し、1.0 N KOHでpH 5.8とした後、滅菌フィルター（ADVANTEC DISMIC-25CS 0.20 μm）を用いて濾過滅菌した．

4，Conditioned medium（CM）の採取

遊離単細胞懸濁液を、ビュルケルチュルク血球計算盤（日本臨床器械工業）を用いて、約5.0 × 10^5 cells/mlとなるように調製し、その50 mlと2倍濃度の液体培地50 mlの合計100 mlを300 mlの三角フラスコに加え、シリコセンをかぶせて、暗黒下、28℃、120 rpmの条件で振盪培養（TAITEC BR-300L）した．細胞が急激に増殖を始める培養開始10日目に、吸引濾過（ADVANTEC No.2）によりCMを回収し、-20℃で凍結保存した．

Table 1. Composition of the culture medium for asparagus mesophyll cells.

Macroelements (mg/l)		Microelements (mg/l)		Organic constituents	
KNO_3	950	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8	*myo*-Inositol	100 mg/l
NH_4NO_3	825	$EDTA \cdot 2Na \cdot 2H_2O$	37.3	Thiamine HCl	1.0 mg/l
KH_2PO_4	85	$MnSO_4 \cdot H_2O$	16.9	L-Glutamine	1.0 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	220	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	185	H_3BO_3	6.2	NAA	1.0 mg/l
		$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	BA	0.3 mg/l
		$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25		
		KI	0.83	Sucrose	10 g/l
		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	Mannitol	30 g/l

5，細胞の培養

細胞培養には24穴のマイクロプレート（IWAKI 3820-024）を用いた．マイクロプレートの1wellあたり，あらかじめ目的とする細胞密度の2倍密度となるように調製した細胞懸濁液250 μl，4倍濃度の液体培地125 μl，滅菌蒸留水125 μl，または濾過滅菌（ADVANTEC DISMIC-13CP 0.20 μm）後希釈したCM 125 μlを加えよく撹拌し，蒸散防止のためビニルテープでシールドした後，暗黒下，25℃，120 rpmの条件で振盪培養（TAITEC BR-300L）した．

6，細胞の観察

100倍の倒立顕微鏡（OLYMPUS CK2）下で，視野内に存在する生存細胞数（コロニー形成細胞を含む），死細胞数，およびコロニー形成細胞数を1 wellごとにカウントし，3 wells以上の観察結果をもとにして，以下の計算式に従いコロニー形成率（細胞分裂率），および細胞生存率を算出した．この場合のコロニーとは，2細胞以上に分裂した細胞塊のことを指し，1個の葉肉細胞に由来する細胞塊を1コロニーと定義した．従って，コロニー形成率（細胞分裂率）とは，もともと単細胞として存在していた葉肉細胞のうち，細胞分裂を開始しコロニーを形成した細胞の割合を意味する．また，生存細胞と死細胞の区別には，原形質分離の有無を基準とした．

$C(\%)=a/b \times 100$

C:コロニー形成率（細胞分裂率）　a:コロニー形成細胞数　b:生存細胞数

$L(\%)=(b/(b+d)) \times 100$

L:細胞生存率　b:生存細胞数　d:死細胞数

【結果および考察】

1，生物検定系の確立

CM中に含まれる増殖因子の検出には，従来，培養細胞由来のプロトプラストを利用することが多かったが，本研究ではアスパラガス葉肉細胞由来単細胞を実験材料として用いた．この細胞はセルラーゼなどの酵素を用いることなく，機械的にホモジェナイズするだけで遊離されるため，調製が簡便かつ生存率も高いという特徴を持つ．また，細胞の振盪培養にマイクロプレートを用いることで系を小型化し，一度に多くのサンプルを検定することを可能にしている．本研究で用いる生物検定系の概略をFig. 1に示した．コロニー形成率（細胞分裂率）は，倒立顕微鏡下で分裂細胞数を数えることで算出した．この場合，マイクロプレートの底に沈んだ細胞を，そのまま倒立顕微鏡で観察するので，連続して経時的な細胞の観察が可能である．

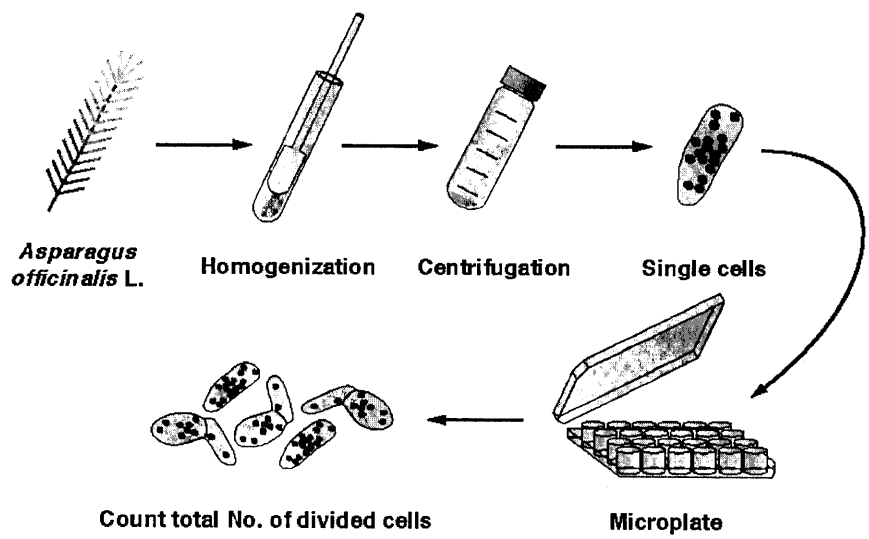


Fig. 1. Isolation of single cells and method of bioassay. Single cells were liberated from these cladodes by homogenization in a glass homogenizer containing sterile water. The homogenate was filtered through a 37 μm stainless mesh, then the filtrate was centrifuged at 100 x *g* for 3 min. The precipitated single cells were suspended in sterilized water, and dispensed into 24-well microplates at a volume of 250 μl per well. Culture medium (125 μl) prepared at four-fold concentration and various sample solutions (125 μl) were sterilized by filtration then gently added to the cell suspension in each well. The plates were sealed with Parafilm to avoid evaporation of the medium then incubated in the dark at 25°C with continuous rotary shaking at 120 rpm. Mitogenic activity and cell viability were determined on the 6th day of culture by counting the number of nondivided cells, dead cells, and colonies (division into two or more cells) under an inverted microscope.

2，初期細胞密度が細胞分裂率に及ぼす効果

アスパラガス葉肉細胞由来単細胞を，初期細胞密度 5.0×10^5 cells/ml，2.5×10^5 cells/ml，1.3×10^5 cells/ml，6.3×10^4 cells/ml、3.1×10^4 cells/ml，1.6×10^4 cells/ml の6段階において液体培養し，培養開始1日目および3日目以降10日目までの毎日観察を行なった結果，細胞分裂率は培養開始時の初期細胞密度に完全に依存した（Fig. 2）．すなわち，1.3×10^5 cells/ml以上の高細胞密度では細胞は活発に増殖し，培養開始7日目には細胞分裂率は80％に達したが，6.3×10^4 cells/ml以下の細胞密度においては初期細胞密度が低くなるに従い急激に細胞分裂率が低下した．特に、3.1×10^4 cells/ml以下の初期細胞密度では、10日間

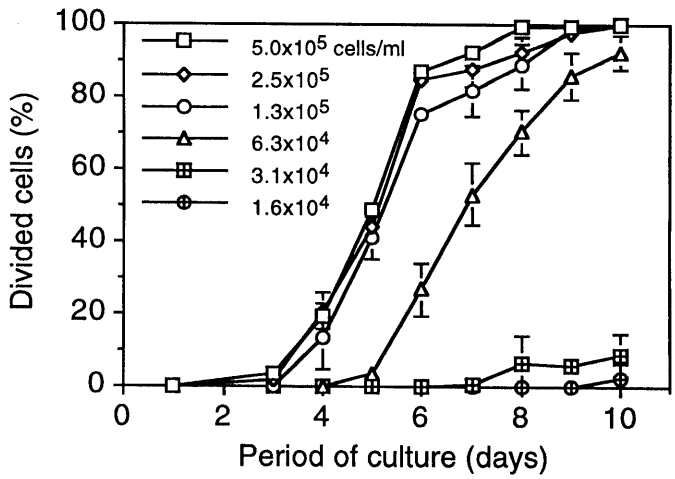


Fig. 2. Effects of the initial cell densities on cell proliferation. Single cells were suspended in liquid medium, dispensed into 24-well culture plates at a final volume of 500 μl per well, and incubated at 25°C with shaking at 120 rpm. The mitotic activity for each well was calculated by dividing the total number of colonies (division into two or more cells) by the total number of living cells.

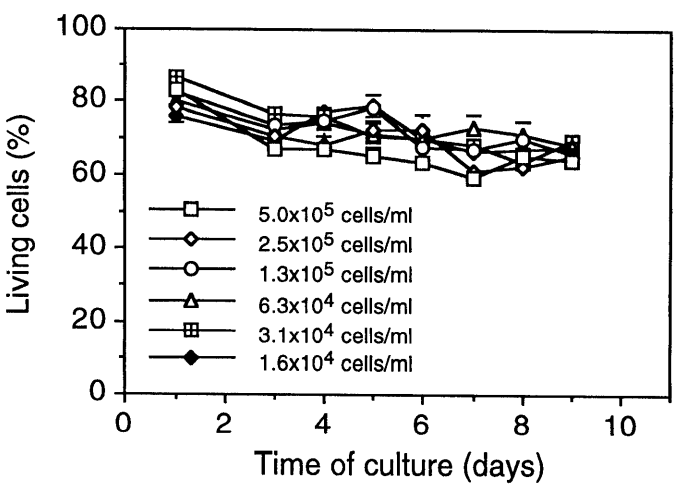


Fig. 3. Effect of initial cell density on cell viability. Origin of the cells and culture condition were identical with Fig. 2.

以上培養を続けてもほとんど細胞分裂することはなかった．一方、培養開始後の細胞生存率は、初期細胞密度には全く依存せず，培養開始７日目においても70％程度の高い値を示した（Fig. 3）．このように，アスパラガス葉肉細胞由来単細胞は細胞増殖の際、極めて厳密かつ明確な初期細胞密度依存性を示すことから，細胞増殖因子の研究に適切な材料であると考えられる．

３，CMが細胞分裂率に及ぼす効果

Fig. 2に示された結果から，細胞分裂が比較的起こりにくい細胞密度であると考えられる 4.0×10^4 cells/mlの細胞培養液中に，CMを最終濃度12.5％，6.3％，3.1％，1.6％となるように添加し培養した．その結果，CMの濃度依存的に著しいコロニー形成率の増加が観察された（Fig. 4）．この実験における活性区，および対照区の細胞の写真をFig. 5に示した．培養開始７日目の時点で比較すると，CMを12.5％添加した場合が最もコロニー形成率が高く，それ以下あるいはそれ以上の濃度域ではコロニー形成率は低下した（図には示していないが，CMを25.0％与えた場合，培養開始後7日目におけるコロニー形成率は，23.5％に低下した）．高濃度のCMを与えると、かえって細胞増殖が阻害されるという事実から，CM中には細胞増殖因子だけでなく細胞増殖を阻害する物質が含まれている可能性が示唆されるが，CM中には培地由来の無機塩類も含まれているため，単純な比較はできない．これらの結果から，初期細胞密度4.0×10^4 cells/mlの細胞培養液中に，CMを最終濃度12.5％添加することで，極めて効率良く細胞増殖因子を検出できることが明らかとなった．この生物検定系の最低検出感度はCMに換算して1.6％であり，ニンジンやトウモロコシなどの継代培養細胞株を利用した従来

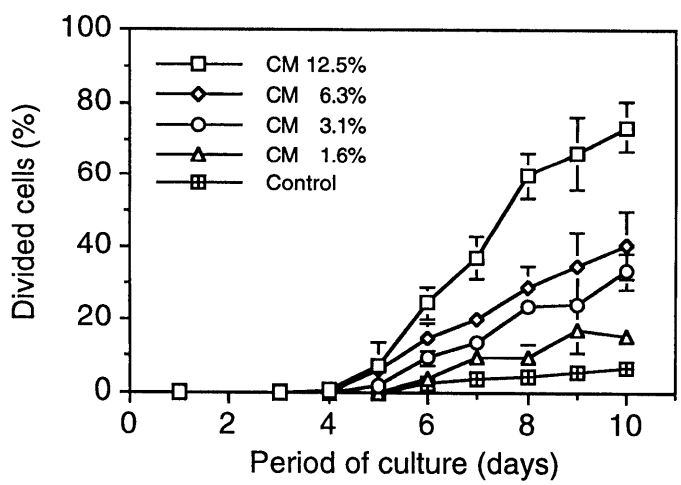


Fig. 4. Effects of CM concentrations on cell proliferation. Single cells were incubated in the liquid medium at a density of 4.0 x 10^4 cells/ml in the presence of various concentrations of CM.

の生物検定系に比べ10倍以上高く、活性の検出に要する日数も5～7日程度と比較的短い．また、マイクロプレート中で生物検定を行なうため，1回の検定に必要なサンプル量はCMに換算して62.5 μlと極めて少なく、以後この系を用いてCM中に含まれる細胞増殖因子の精製、単離を行なっていくことにした．

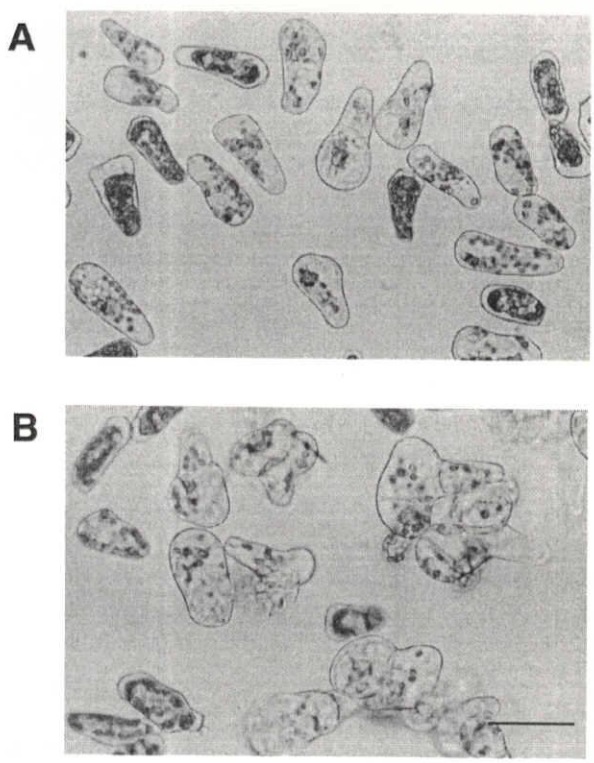


Fig. 5. Micrographs of the asparagus mesophyll cells. (A) cells cultured without CM, showing only undivided cells. (B) cells cultured with 12.5% of CM, showing many divided cells. The initial cell density was 4.0 x 10^4 cells/ml. Cells were observed after 8 days of culture. Bar = 50 μm.

第２章　細胞増殖因子の化学的性質と精製

【緒言】

植物の細胞増殖因子の化学的性質については，1980年代後半において，いくつかの研究が報告されているが，水溶性で分子量が数百から千数百であるということ以外は，一致した結果が得られていないのが現状である．このことから、細胞増殖因子が単一の物質であると考えること自体に疑問を抱く研究者も多く，再現性に優れた生物検定法を用いて細胞増殖因子の化学的性質を明らかにし，これらの問題を解決することが望まれている．また，天然有機化合物の精製，単離，構造決定を行なうにあたって，その化学的性質をあらかじめ明らかにしておくことは，精製法を確立する際に参考となるだけでなく，構造決定の段階においても重要な情報を与えることが多い．

本章では，前章において確立された新規生物検定法を用いて、まずアスパラガスにおける細胞増殖因子の化学的性質について詳細な検討を加えた．また、各培養日数におけるCM中の細胞増殖促進活性を比較することにより、最も適切なCMの採取時期を決定した．その結果、細胞増殖因子はCM中に確実に存在し、各種のカラムによる精製に耐え得る程度の化学的安定性を持つことが確認されたため，DEAE Sephadexカラムや，Bio-Gel P-2カラムを中心として，CMから細胞増殖因子を効率良く精製するための系の確立を行い，増殖因子の単離を目指した．

【材料および方法】

1，生物検定法

第1章の方法に従い，アスパラガス葉状茎から無菌的に遊離させた葉肉細胞由来の単細胞を，ビュルケルチュルク血球計算盤を用いて目的とする密度の2倍の密度である8.0×10^4 cells/mlとなるように滅菌蒸留水に懸濁した．液体培地は，Table 1に示した組成の4倍濃度となるように調製し，1.0 N KOHでpH 5.8とした後，滅菌フィルターを用いて濾過滅菌した．生物検定には24穴のマイクロプレートを用い，1 wellに対し2倍密度の細胞懸濁液を250 μl，4倍濃度に調製した液体培地を125 μl，希釈したCMまたは各種サンプルを125 μl加え，蒸散防止のためビニルテープでシールドした後，暗黒下、25℃、120 rpmの条件で振盪培養した．培養開始後6～7日目に第1章の方法にしたがって細胞分裂率を算出し，対照区と比較することで細胞増殖因子の検出を行なった．活性区の細胞分裂率（mitogenic activity）は，生物検定に用いたアスパラガス葉状茎の生理状態により変動することがあるが，どの実験においても対照区との間に有意な差が観察された．

2，各培養日数における培養上清中の細胞増殖促進活性の比較

遊離単細胞懸濁液を，ビュルケルチュルク血球計算盤を用いて，約5.0×10^5 cells/mlとなるように調製し，その100mlと2倍濃度の液体培地100 mlの合計200 mlを500 mlの三角フラスコに加え，シリコセンをかぶせて，暗黒下，25℃、120 rpmの条件で振盪培養した。培養開始後2，4，6，8，10，12，14，16，18日目に細胞培養液を10mlずつ抜き取り，遠心分離（500 x *g*，3 min）により培養上清（CM）と培養細胞を得た．培養細胞は再び蒸留水に懸濁し，遠心分離する操作を2回繰り返すことにより培地成分を完全に除いた後，遠心エバポレーター（50℃，3 h）で水分を蒸発させ，細胞乾燥重量を測定した．各培養日数におけるCMは，最終濃度12.5%にて生物検定を行ない，細胞増殖促進活性を測定した．

3，細胞増殖因子の熱安定性

培養10日目に採取したCM 1.5 mlを蒸留水で2倍希釈し，沸騰水浴中で10分間加熱後直ちに氷冷し，生物検定を行なった．

4，透析による活性物質の分子量の推定

5.0 mlのCMを、分画分子量1,000の透析チューブ（Spectra/Por 7 MWCO: 1,000）または，分画分子量3,500の透析チューブ（Spectra/Por 7 MWCO: 3,500）に注入し，両端を

クローサーで閉じた後，500 mlの蒸留水中でスターラーで撹拌しながら4℃において12時間透析した．透析内液は、蒸留水で希釈して10 mlとし，透析外液はエバポレーターで濃縮して10 mlとした後、それぞれ生物検定を行なった．

5，イオン交換樹脂に対する吸脱着実験

DEAE Sephadex A-25 (Pharmacia) 0.8 gを500 mM Tris-HCl Buffer pH 7.4 50 ml中，室温で膨潤（24時間）させた後，20 mMの同緩衝液に懸濁しカラムに充填した（1.2 × 3.5 cm, 4.0 ml)．CM 10 mlを凍結乾燥し，10 mlの同緩衝液に溶解した後，カラム上に添加し，同緩衝液20 ml，250 mM KClを含む同緩衝液20 ml，500 mM KClを含む同緩衝液20 ml，1,000 mM KClを含む同緩衝液20 mlで順次溶出（流速15 ml/h）した．次に，各溶出画分を10 mlに濃縮して透析チューブ（Spectra/Por 7 MWCO: 1,000）に注入し，両端をクローサーで閉じた後，3,000 mlの蒸留水中で4℃において24時間透析することにより脱塩を行なった．透析内液を濃縮して10 mlとし，各画分について生物検定を行なった．

同様に，CM Sephadex C-25 0.8 gを500 mM KH_2PO_4-KOH Buffer pH 6.0 50 ml中，室温で膨潤（24時間）させた後，20 mMの同緩衝液に懸濁しカラムに充填した（1.2 × 3.5 cm， 4.0 ml)．CM 10 mlを凍結乾燥し，10 mlの同緩衝液に溶解した後カラム上に添加し，同緩衝液20 mlおよび250 mM KClを含む同緩衝液20 mlで溶出（流速15 ml/h）した．透析により脱塩後，各画分について生物検定を行なった．

6、各種加水分解酵素による活性物質の失活試験

非特異的ペプチド分解酵素であるPronase E (Sigma) 3.0 mgを、20m M KH_2PO_4-KOH Buffer pH 7.5 3.0 mlに溶解し、セルロースアセテートフィルター（ADVANTEC DISMIC-13CP 0.20 μm）で不溶物を濾過して酵素溶液とした。酵素溶液のうち1.0 mlは、沸騰水浴中で10分間加熱することにより失活させ、失活酵素液とした。試験管に同緩衝液を0.9 ml、CMまたは蒸留水を1.0 ml、酵素溶液または失活酵素液または同緩衝液を0.1 ml、それぞれ加え、恒温振盪器（TAITEC, Personal-11）を用い37℃、170 rpmにおいて3時間振盪した。酵素反応後、反応液を0.1 N HNO_3でpH 5.8とし、沸騰水浴中で10分間加熱後直ちに氷冷することにより酵素を失活させた後、生物検定を行なった。

同様に、数種類の糖鎖の加水分解酵素混合物であるGlycosidases "Mixed"（生化学工業）3.0 mgを、20 mM Glutamic acid-KOH Buffer pH 4.0 3.0 mlに溶解し、セルロースアセテートフィルターで不溶物を濾過して酵素溶液とした。酵素溶液のうち1.0 mlは、沸騰水浴中で10分間加熱することにより失活させ、失活酵素液とした。試験管に同緩衝液を0.9 ml、CM

または蒸留水を1.0 ml、酵素溶液または失活酵素液または同緩衝液を0.1 ml、それぞれ加え、恒温振盪器を用い37℃、170 rpmにおいて3時間振盪した。酵素反応後、反応液を0.1 N KOHでpH 5.8とし、沸騰水浴中で10分間加熱後直ちに氷冷することにより酵素を失活させた後、生物検定を行なった。

7，アスパラガス細胞の大量培養およびConditioned medium (CM)の採取

遊離単細胞懸濁液を、ビュルケルチュルク血球計算盤を用いて、約5.0×10^5 cells/mlとなるように調製し、その100 mlと2倍濃度の液体培地100 mlの合計200 mlを500 mlの三角フラスコに入れ、シリコセンをかぶせて、暗黒下、28℃、120 rpmの条件で振蕩培養した。この際、バクテリアの繁殖を防止するためにアンピシリンを最終濃度10 ppmで培地に添加した。培養開始後10日目に、吸引濾過（ADVANTEC No.2）によりCMを回収し、-30℃で凍結保存した。

8，ゲル濾過クロマトグラフィーによる活性物質の分子量の推定

Bio-Gel P-4 Fine (Bio-Rad) 20 gを、20 mM KH_2PO_4-KOH Buffer pH 5.8 200 ml中、室温で膨潤（24時間）させ、脱気後、カラムに充填し（1.7 × 38 cm)、充填後さらに500 mlの同緩衝液を通液することにより、カラムベッドを安定させた．次に、CM 5.0 mlを凍結乾燥し、1.0 mlの同緩衝液に溶解した後、カラム上に添加し、同緩衝液で溶出（流速15 ml/h）した．紫外検出器（JASCO, 875-UV）を用いてUV 220 nmにおける吸収を記録するとともに、フラクションコレクターにより溶出液を5.0 mlずつ分画し、そのまま生物検定を行なった．

また、Bio-Gel P-2 Extra Fine 20 gを同緩衝液200 ml中で膨潤後，カラムに充填し(1.7 × 37 cm)、同様の実験を行なった．この際，Vitamin B_{12}の溶出位置と活性物質の溶出位置を比較することで活性物質の分子量の推定を行なった．

同様に、Sephadex G-15 (Pharmacia) 30 gを同緩衝液200 ml中で膨潤後，カラムに充填し（1.7 × 37 cm)，CMの分画および生物検定を行なった．

9，細胞増殖因子の大量精製

前述の方法によって採取されたCM中には、培地成分として大量のmannitol, sucroseおよび無機塩類が含まれているため、精製の初期段階にこれらを除去する必要がある．通常、精製の第1段階には逆相担体が繁用されるが、細胞増殖因子は比較的極性が高く、オープンカラム用の逆相担体にはほとんど保持されないため、ここではイオン交換担体を利用することにし

た.

DEAE Sephadex A-25 15.0 g を 500 mM Tris-HCl Buffer pH 7.4 150 ml 中、室温で膨潤（24時間）させた後、20 mMの同緩衝液に懸濁しカラムに充填した（2.5×19 cm, 90 ml）. 次に、CM 600 ml をエバポレーターにより 200 ml に濃縮後、Tris を最終濃度 20 mM となるように加え、6N HCl で pH 7.4 としてカラム上に添加し、同緩衝液 200 ml、250 mM KCl を含む同緩衝液 200 ml、500 mM KCl を含む同緩衝液 200 ml、750 mM KCl を含む同緩衝液 200 ml、1,000 mM KCl を含む同緩衝液 200 ml、1,250 mM KCl を含む同緩衝液 200 ml、1,500 mM KCl を含む同緩衝液 200 ml で順次溶出した. この際、UV220 nm における吸収を記録した. 次に、各溶出画分をエバポレーターにより濃縮し、透析チューブ（Spectra/Por 7 MWCO: 1,000）に注入し、両端をクローサーで閉じた後、1,500 ml の蒸留水中で 4℃において 8 時間の透析を 3 回繰り返すことにより脱塩を行なった. 透析内液をエバポレーターにより濃縮して 50 ml とし、その一部を用いて生物検定を行なった.

次に，活性画分である DEAE Sephadex A-25 column 1,000 mM および 1,250 mM KCl 溶出画分を凍結乾燥後 1.0 ml の緩衝液（20 mM KH_2PO_4-KOH Buffer pH 5.8）に溶解し，同緩衝液で十分に平衡化した Bio-Gel P-2 Extra Fine column (1.7 × 37 cm) を用いて分画した. この際、紫外検出器を用いて UV 220 nm における吸収を記録した. 溶出液をフラクションコレクターにより 5.0 ml ずつ分画し、その一部を用いて生物検定を行なった.

さらに，活性画分である Bio-Gel P-2 column 40-45 ml溶出画分を凍結乾燥後、0.1% TFA を含む 10% CH_3CN 200 μl に溶解し、HPLC システム（JASCO）に接続した Develosil ODS-HG-5 column（4.6 × 250 mm, Nomura chemical）にインジェクト後、0.1% TFA を含む 10% CH_3CN で溶出（1.0 ml/min）した. 紫外検出器（JASCO, UV-970）を用い UV220 nm における吸収を記録するとともに、溶出液を 2.0 分ごとに分画し、凍結乾燥後、5.0 ml の蒸留水に溶解してその一部を生物検定に用いた.

【結果および考察】

1，各培養日数におけるCM中の細胞増殖促進活性の比較

アスパラガス遊離単細胞は培養開始後4日目から分裂を開始し，6日目より12日目まで対数増殖を示した．対数増殖期における細胞の倍加時間（doubling time）は，72時間であった．一方，各培養日数におけるCM中の細胞増殖促進活性は，細胞分裂が始まる以前の培養開始4日目まではほとんど検出できず，細胞が分裂を開始する6日目以降から増加し，対数増殖期の中間である培養開始10日目に最大となった．また，12日目以降は再び減少した（Fig. 6）．この結果から，以後の実験には培養開始10日目に採取したCMを用いることにした．

2，細胞増殖因子の化学的性質

CMを沸騰水浴中で10分間加熱した場合には，活性の大部分は保持された．また，細胞増殖因子は，分画分子量1,000の透析膜であるSpectra/Por 7 MWCO: 1,000を，ほとんど透過しなかった．一方，分画分子量3,500の透析膜であるSpectra/Por 7 MWCO: 3,500を用いた実験では，細胞増殖因子のかなりの部分が膜を透過した（Table 2）．したがって，細胞増殖因子の分子量は1,000以上3,500以下であることが推定された．イオン交換樹脂に対する吸脱着実験では，細胞増殖因子はDEAE Sephadex A-25に極めて強く吸着され，1,000 mM

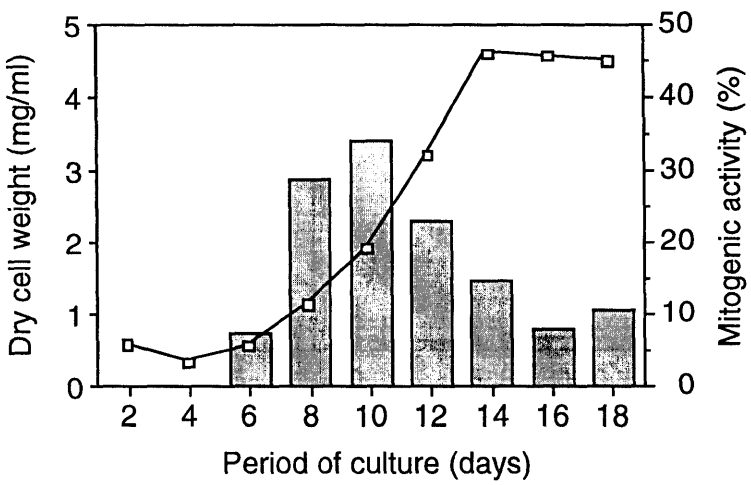


Fig. 6. Cell growth curve and mitogenic activity of CM on each culture stage. Single cells were suspended in culture medium at a density of 2.5 x 10^5 cells/ml and were cultured at 25°C with shaking at 120 rpm. Ten milliliters of the cell suspension was collected every other day from the suspension cultures. Mitogenic activity of CM obtained at each growth stage (right scale) was correlated with the growth kinetics of suspension cells (left scale).

のKClによって溶出された．一方，CM Sephadex C-25 には細胞増殖因子は全く吸着されず，20 mM KH_2PO_4-KOH Buffer によって溶出された．この結果から、細胞増殖因子は酸性物質であることが明らかとなった．各種加水分解酵素による活性物質の失活試験においては，ペプチド分解酵素である Pronase E を作用させることにより活性物質は完全に失活した．したがって，細胞増殖因子は分子内にペプチド構造を持っており，この部分が活性の発現に重要であることが強く示唆された．一方、糖鎖の加水分解酵素混合物である Glycosidases "Mixed" を作用させた場合には，細胞増殖因子の活性は保持された．これらの結果は，さらに２回の追

Table 2. Characterization of the growth factor. Aliquots of asparagus CM were treated under various conditions described as "Materials and Methods" and analyzed for their activities.

Treatments		Mitogenic activity (%)
Heat	100°C, 10 min	24.6 ± 4.7
Dialysis	MWCO 1000 (retentate)	31.2 ± 12.9
	MWCO 3500 (retentate)	11.4 ± 8.1
Ion exchange columns	CM Sephadex C-25	Not retained
	DEAE Sephadex A-25	Eluted with 1000 mM KCl
Enzymatic digestion	Pronase E	2.6 ± 2.0
	Glycosidase mixture	29.1 ± 3.1

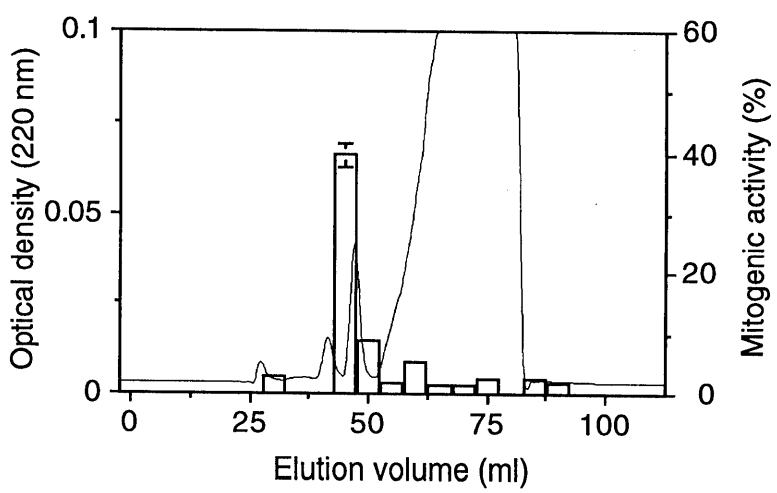


Fig. 7. Gel permeation chromatogram of Bio-Gel P-2 Extra Fine and mitogenic activity of each fraction. Bio-Gel P-2 Extra Fine column (1.7 x 37 cm) was equilibrated with 20 mM KH_2PO_4-KOH buffer pH 5.8. Five ml of CM was lyophilized, dissolved in 1.0 ml of equilibration buffer, applied to the column, and eluted with the equilibration buffer. Five ml fractions were collected and assayed without dilution.

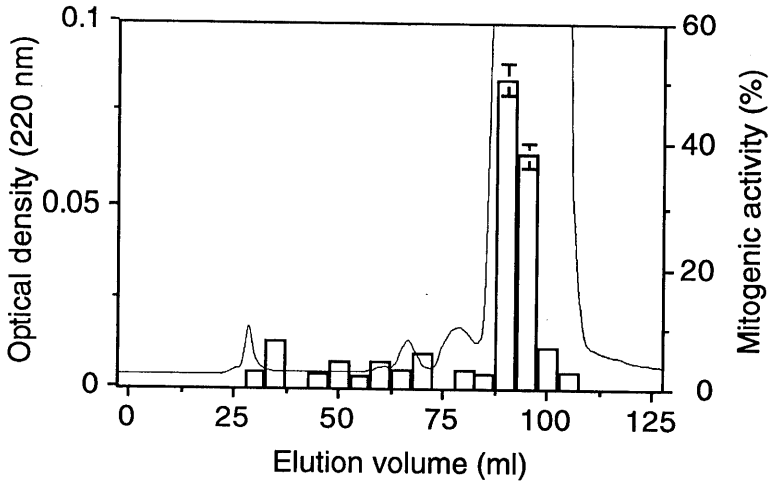


Fig. 8. Gel permeation chromatogram of Bio-Gel P-4 Fine and mitogenic activity of each fraction. Bio-Gel P-4 Fine column (1.7 x 37 cm) was equilibrated with 20 mM KH_2PO_4-KOH buffer pH 5.8. Five ml of CM was lyophilized, dissolved in 1.0ml of equilibration buffer, applied to the column, and eluted with the equilibration buffer. Five ml fractions were collected and assayed without dilution.

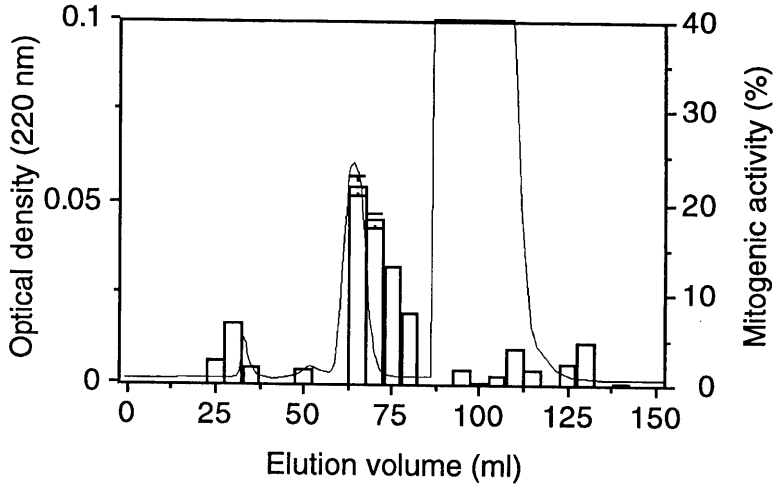


Fig. 9. Gel permeation chromatogram of Sephadex G-15 and mitogenic activity of each fraction. Sephadex G-15 column (1.7 x 37 cm) was equilibrated with 20 mM KH_2PO_4-KOH buffer pH 5.8. Five ml of CM was lyophilized, dissolved in 1.0 ml of equilibration buffer, applied to the column, and eluted with the equilibration buffer. Five ml fractions were collected and assayed without dilution.

実験によっても確認された.

一方，Bio-Gel P-2 Extra Fine カラムによる分画では，細胞増殖因子はCMに含まれる多くの低分子化合物から効率良く分離して溶出され（Fig. 7），その溶出位置は分子量マーカーであるVitamin B_{12}の溶出位置とほぼ一致した．担体に対する吸着効果があるため，Bio-Gel P-4 Fine カラムから推定される細胞増殖因子の分子量と（Fig. 8），Bio-Gel P-2 Extra Fine

カラムから推定される分子量とは若干の違いがあるが，より分離が良好であったBio-Gel P-2 Extra Fine カラムの結果から推定すれば，細胞増殖因子の分子量は1,000程度と考えられる．別のゲルろ過担体として，Sephadex G-15を用いて同様の実験を行なったが，担体に対する増殖因子の吸着効果が比較的強いためかテーリングが認められ，よい分離を得られなかった（Fig. 9）.

3，細胞増殖因子の大量精製

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判明したため，陰イオン交換担体とゲルろ過，および逆相カラムを用いたHPLCシステムによる系を確立した（Fig. 10A, 10B, 10C）．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かな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，ゲルろ過によりサイズ分画を行なうと，活性物質は溶出液量40-45 mlの画分に集中して回収された．そして，最終的に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，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2μgおよび10μgであることが推定された．この推定値をもとに計算すると活性の回収率は3段階の精製で約10%，精製倍率は約10^7倍が達成されたことになる．

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（Fig. 11）．2種類の活性物質が単離されたため，これらが互いに相乗的効果を示す可能性についても検討したが，特にそのような傾向は認められなかった．これらの物質の化学構造については，次章で述べることにする．

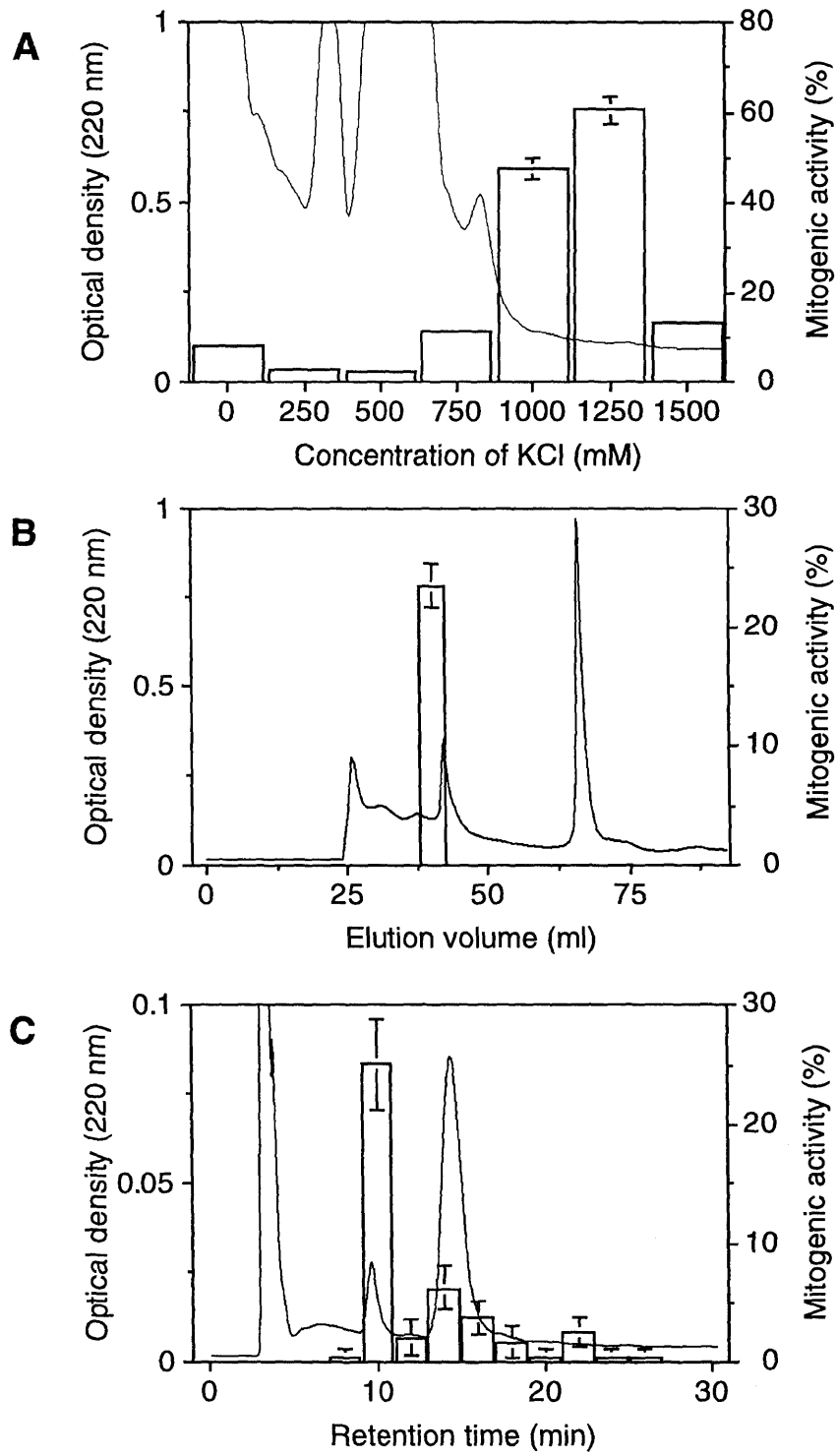


Fig. 10. Purification procedure of the growth factors. (A) Six hundred milliliters of CM was concentrated to 300 ml, adjusted to pH 7.4, and then applied to a DEAE Sephadex A-25 column. The column was washed with 200 ml of equilibration buffer, and fractions were eluted successively with 200 ml of the buffer containing 250, 500, 750, 1000, or 1250 mM KCl. (B) Desalted active fractions recovered from the DEAE Sephadex column were lyophilized and chromatographed on a Bio-Gel P-2 extra fine column. Fractions were eluted with the buffer, and absorbance was monitored at UV 220 nm (left scale). Mitogenic activity (right scale) was determined after 6 days of culture. (C) Active fraction recovered from the Bio-Gel column was chromatographed on a Develosil ODS-HG-5 column. The two active peaks eluted at 9.6 and 14.5 min were collected and analyzed for amino acid sequences.

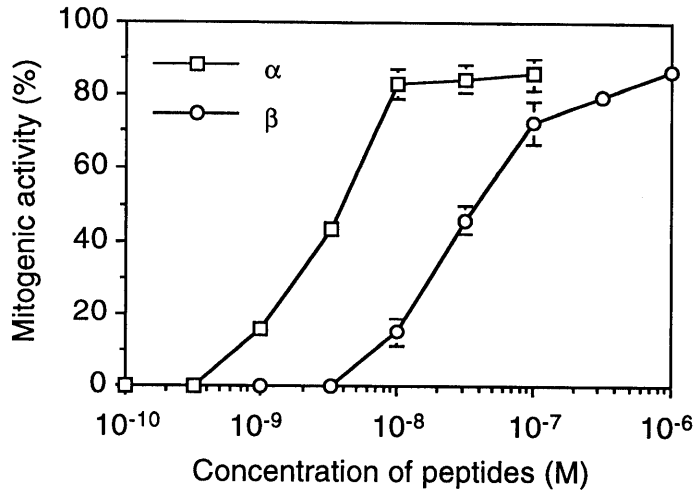


Fig. 11. Mitogenic activities of the purified growth factor α and β. Single cells of asparagus were cultured at a cell density of 4.0 x 10^4 cells/ml in the liquid medium containing various concentrations of α and β.

第３章　細胞増殖因子の構造と合成

【緒言】

ここまでの研究において，この増殖因子がペプチド性物質であることは，エンドペプチダーゼ処理によってCMの細胞増殖活性が完全に失われることから予想されている．そこで，本章では前章で単離された２種類の活性物質αとβの化学構造を，ペプチドシークエンサーおよびFAB-MSを中心とした機器分析により決定し，最終的に合成によりその構造を確認するまでを述べる．

【材料および方法】

1，アミノ酸配列解析

細胞増殖因子のアミノ酸配列決定は，気相においてEdman分解した後，逆相系のHPLCカラム（Applied Biosystems Brownlee C-18）により分離するアミノ酸シークエンサー（Applied Biosystems ; model 476A）を用いた．Develosil ODS-5 columnの精製によって得られた活性画分の半量をそれぞれ約0.5 mlに濃縮した後，あらかじめ濃硝酸・濃塩酸混合液（1：1）に3時間浸漬して洗浄したマイクロバイアル（Wheaton 986297）に移し，遠心エバポレーターを用いて30 μlまで濃縮して試料とした．これらをアミノ酸シークエンサーにかけ，アミノ酸配列の解析を行なった．

2，質量分析

FAB-MS (JEOL DX-705L) を用い，ネガティブイオンモードにおいて分析を行なった．活性画分の残り半量をアミノ酸配列解析の場合と同様に1.0 μlまで濃縮した後，ステンレスターゲットに滴下し，1.0 μlのグリセロールと混合後，チルドプローブを用いてm/z 50～1,000 の範囲のイオンについて分析を行なった．

3，ペプチドの合成

増殖因子αおよびβは，固相合成によって得られたペプチドを，arylsulfotransferaseを用いて酵素的に硫酸化することにより合成した．Arylsulfotransferaseは，富山薬科大学の小橋恭一先生および，富士薬品工業（株）の森川忠則博士からご供与いただいた．まず，Fmoc-Gln (Trt)樹脂を用いて，ペプチド自動合成機（Applid Bisystems Model 433A）により*Fastmoc*法で保護ペプチド を合成し，レジンを分離後，2.5% ethaneditiol 存在下95% aq.TFA (5.0 ml) により室温で120分反応させることにより脱保護およびペプチド鎖の樹脂からの切断を行なった．このペプチドを氷冷したエーテル30 ml中で沈殿させ，蒸留水2.0 mlに溶解した後，Develosil ODS-10 column (20 × 250 mm, Nomura chemical) を用いて0.1% TFAを含む15% CH_3CNの単一溶媒で溶出し（流速20 ml/min)，目的とするペプチド(Tyr-Ile-Tyr-Thr-Gln) を得た．次に，10 mlの0.1 M glycine-NaOHバッファー (pH 8.6) に，最終濃度1 mM の*p*-nitrophenyl sulfate，0.2 mMの合成ペプチド，1.0 U/mlのarylsulfotransferase，および，25 mMの$MgCl_2$を加え，37℃において24時間反応を行なった．反応後，溶液を濃縮し，Develosil ODS-5 column (4.6 × 250 mm, Nomura chemical) を用いて0.1% TFAを含む10% CH_3CNの単一溶媒で溶出し(流速1.0 ml/min)，目的とする

ペプチド（Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln）を得た.

【結果および考察】

1，増殖因子の化学構造

増殖因子αおよびβをペプチドシークエンサーで分析し，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(Fig. 12, 13)．しかし，この構造だけではこれらの物質の強い酸性度を説明することはできず，またペプチドシークエンサ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

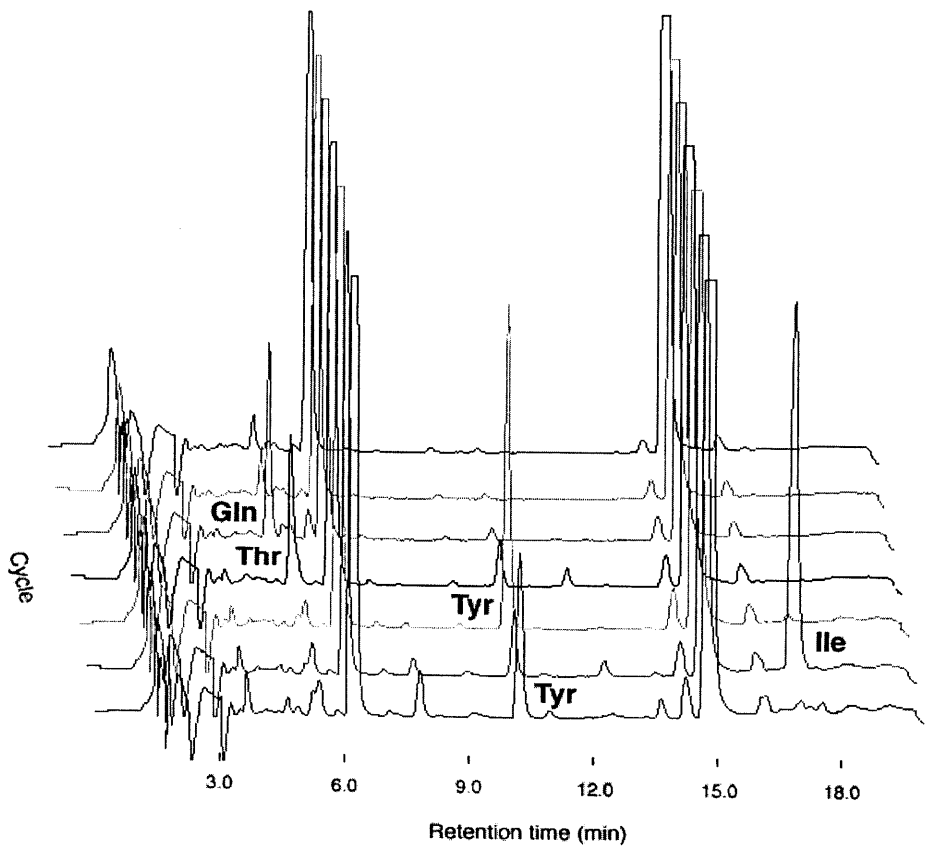


Fig. 12. Amino acid sequence analysis of the growth factor α. Amino acid sequence was determined by the Edman degradation with a gas-phase sequencer (Applied Biosystems model 476A, Foster City, CA). Phenylthiohydantoin derivatives of amino acids obtained at each cycle of the Edman degradation were determined by reversed phase HPLC on ABI Brownlee C-18.

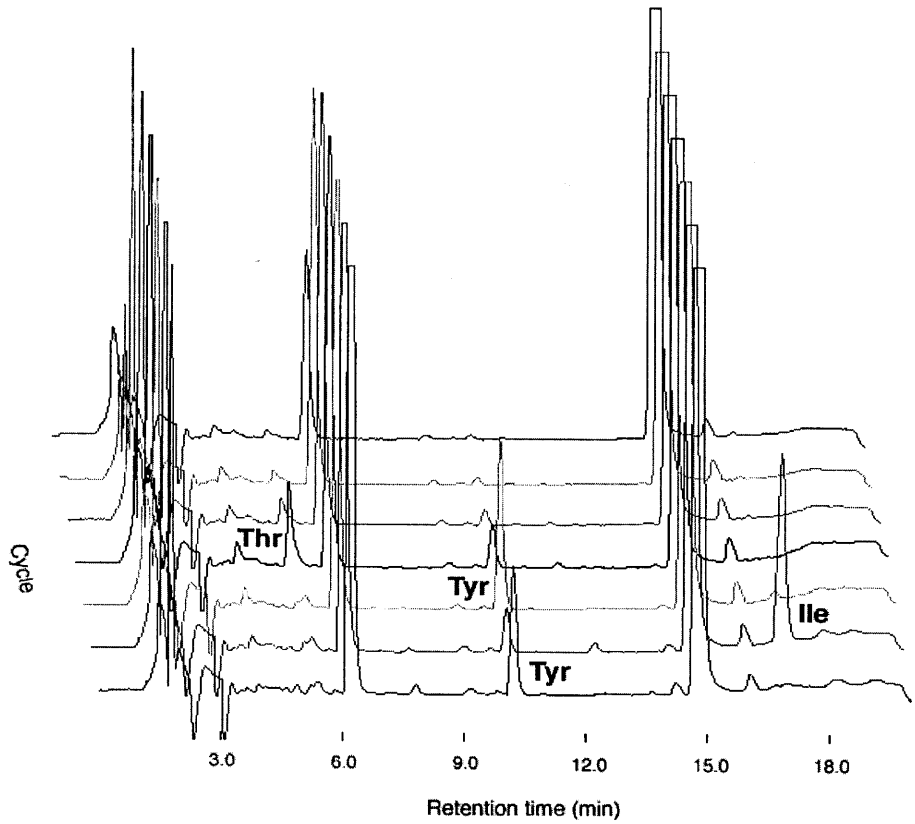


Fig. 13. Amino acid sequence analysis of the growth factor β. Amino acid sequence was determined by the Edman degradation with a gas-phase sequencer (Applied Biosystems model 476A, Foster City, CA). Phenylthiohydantoin derivatives of amino acids obtained at each cycle of the Edman degradation were determined by reversed phase HPLC on ABI Brownlee C-18.

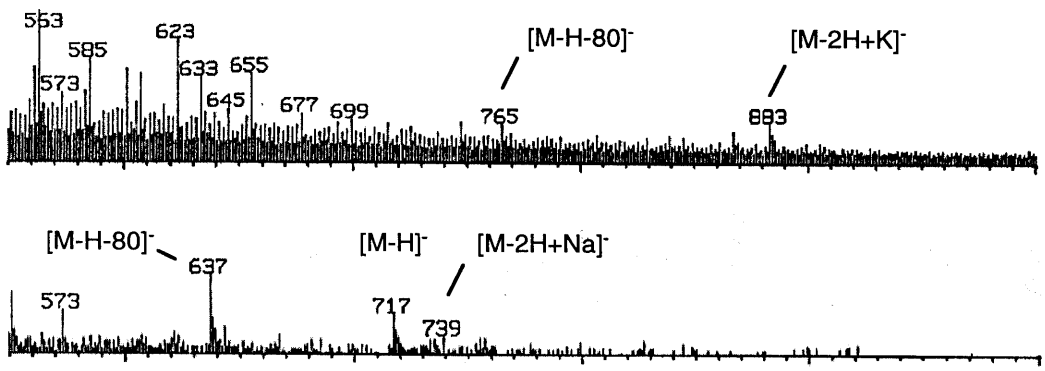


Fig. 14. FAB-MS (-) spectrum of the growth factor α and β. Fast atom bombardment mass spectra were obtained by adding 1 μg of peptide in distilled water (1.0 μl) to glycerol (1.0 μl) on a stainless prove, followed by bombardment with 6 kv Xe fast atom on a mass spectrometer.

が判明した（Fig. 14）．このことから，増殖因子αおよびβは修飾ペプチドであると考えられた．そこで，ペプチドシークエ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．チロシン硫酸エステルを含むオリゴペプチドやタンパク質は，ほ乳類の消化管ホルモン（13，14）など，20数種が単離されており，分泌型ペプチドおよびタンパクの翻訳後修飾のひとつの例として知られている（15）．これらの硫酸化ペプチドの特徴としては，その強い酸性のため，イオン交換樹脂の一つであるDEAE Sephadexに極めて強く保持されること(16, 17)，また，硫酸化化合物一般の特徴として，ネガティブモードのFAB-MSにおいて$[M-H-80]^-$の強いフラグメントイオンが観察されることなどが報告されている（18）．さらに，この硫酸基はTFAなどの酸性条件下では容易に加水分解されるため，ペプチドシークエンサーを用いた場合，硫酸化チロシンは単なるチロシンとして検出されることも知られている（19）．

今回単離された増殖因子αおよびβは，いずれも硫酸化ペプチド特有のこれらの化学的特徴を満たしていることから，化学的に硫酸基を導入したペプチドを合成し，天然由来のサンプルと比較することでそれらの構造の確認を行なうことにした．硫酸基の導入法についてはいくつかの方法が知られているが，ここでは．アリルスルフォトランスフェラーゼを用いて酵素的に硫酸化することにより合成した．アリルスルフォトランスフェラーゼは，フェノール性化合物の硫酸エステル基から，硫酸基を他のフェノール性化合物の水酸基に転移させる反応を触媒する酵素である（20）．実際の操作としては，ペプチドシンセサイザーにより合成した未修飾ペプチドを緩衝液に溶解し，酵素と硫酸基のドナーである*p*-nitrophenyl sulfateを加えて24時間反応後，HPLCで硫酸化ペプチドを分取することにより，硫酸基の導入を行なった．モノ硫酸化物は容易に生成するが，目的とするジ硫酸化物は比較的合成されにくい傾向があり，収率は17％前後であった（Fig. 15）．

この方法によって合成した硫酸化ペプチドTyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-GlnおよびTyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thrは，質量分析（Fig. 16）．ペプチドシークエンサー，およびHPLC分析（Fig. 17）のいずれにおいても天然サンプルであるαおよびβ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い一致を示した（Fig. 18）．以上の結果より，αおよびβの構造はTyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-GlnおよびTyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thrであることが確認されたことから，これらのペプチドを”硫酸基を持った植物細胞増殖因子”の意味でphytosulfokine-αおよびβ（PSK-αおよびβ）と名付けることにした．PSK-αのシークエンスはわずかアミノ酸5残基であり，DNA上では15塩基対であることから，プロテインシークエンスおよびDNAシークエンスの

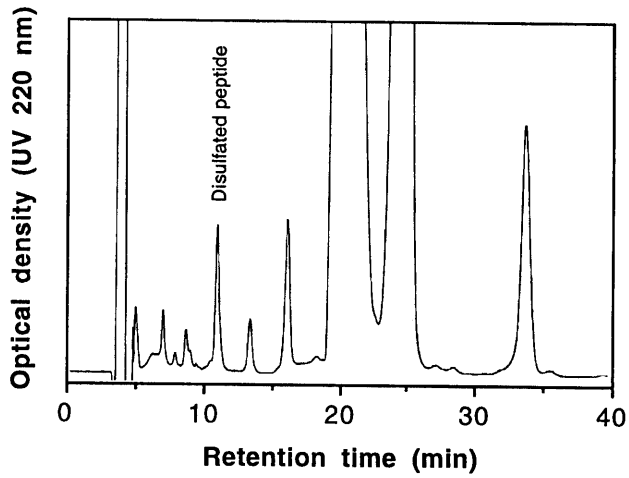


Fig. 15. HPLC purification of sulfated peptides. The reaction mixture was chromatographed on a Develosil ODS-5 column (4.6 x 250 mm) by an isocratic elution of 10% acetonitrile containing 0.1% TFA at a flow rate of of 1.0 ml/min with monitoring the absorbance at UV 220 nm. The peak eluted at 10.9 min was identified as disulfated peptide. Unsulfated peptide was eluted at 33.8 min.

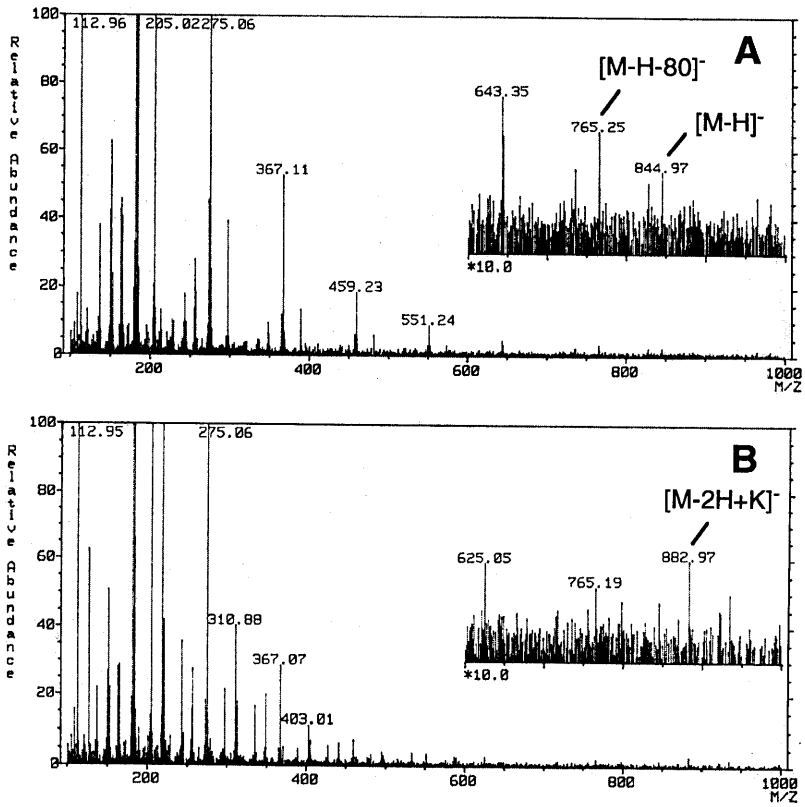


Fig. 16. FAB-MS (-) spectra of the synthetic sulfated peptide, Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln. Fast atom bombardment mass spectra were obtained by adding 1 μg of peptide in distilled water (A) or 0.1 N KI (B) to glycerol on a stainless prove, followed by bombardment with 6 kv Xe fast atom on a mass spectrometer.

データーベースにおいて，多くの相同配列が見出されることが予想されたが，意外にも検出されたのは数種のタンパク質のみであった．しかし，データーベースに登録されているのはこれらのタンパク質の一次配列のみであり，硫酸化修飾の有無は不明であるため，特に重要な情報は得られていない．

過去の報告によれば，conditioning factor あるいは conditioned medium factor とも呼

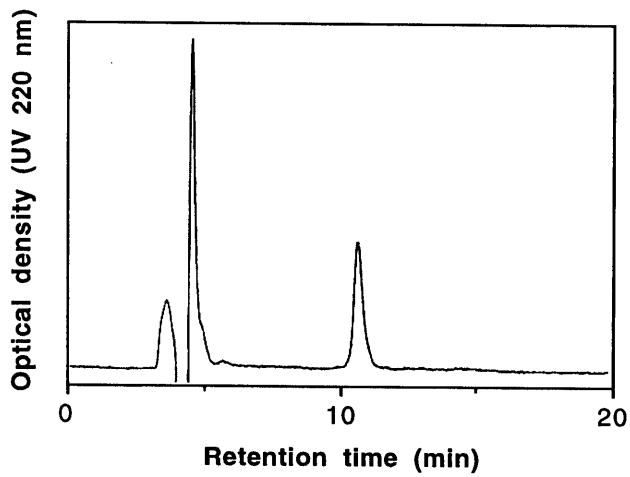


Fig. 17. Co-chromatogram of natural α and synthetic peptide, Tyr(SO3H)-Ile-Tyr(SO3H)-Thr-Gln. The mixture of natural and synthetic peptides were chromatographed on a Develosil ODS-5 column (4.6 x 250 mm) by an isocratic elution of 10% acetonitrile containing 0.1% TFA at a flow rate of 1.0 ml/min with monitoring the absorbance at UV 220 nm. Both peptides were eluted at the same retention time (10.7 min) and showed a symmetrical one peak.

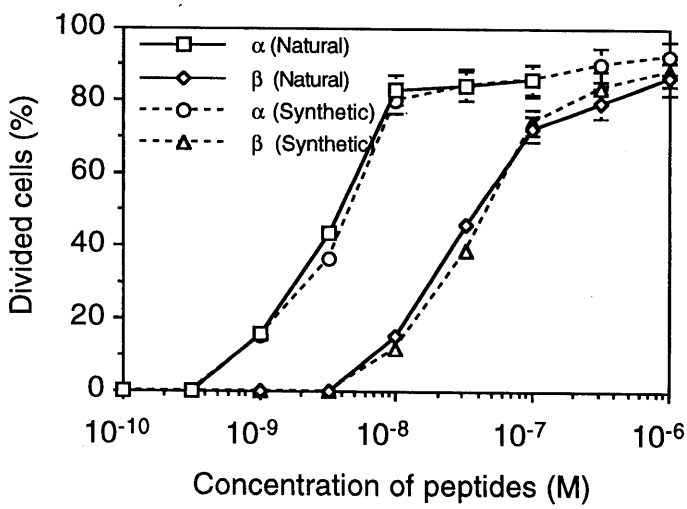


Fig. 18. Dose-response curve for mitogenic activities of natural α (open square), natural β (open lozenge), synthetic α (open circle), synthetic β (open triangle). Mesophyll cells of asparagus were incubated under various concentrations of peptides. Mitogenic activities were determined on the 6th day of culture.

ばれる植物細胞増殖因子の本体は，その高い親水性などからオリゴサッカライドであると推定されてきた（7，10）．しかし，本章において明らかとなった植物細胞増殖因子の構造は，意外にもオリゴサッカライドではなく硫酸化オリゴペプチドであったことから，改めて過去の推論について検討してみる必要がある．

まず考えられる一つの可能性としては，過去の文献における化学構造の推定が誤りであることが挙げられる．例えば，部分精製した活性フラクションにおけるUV吸収の有無や，酵素消化による活性の消失の有無だけで構造を推定している文献もあるが，活性物質が微量なことや市販酵素の純度を考慮すると，化学的根拠としては確実性に欠ける面がある．これらの推定の背景には，エリシターやnod-factorなどのようなオリゴサッカライドが，植物において重要な生理活性を示すという事実が少なからず影響しているように思われる．

また別の可能性として，PSK-α以外にもオリゴサッカライド様の活性物質が存在しているという考え方もできる．実際に，植物細胞の培養時における生存率の向上に分枝構造を持ったオリゴサッカライドと推定される物質が関与しているという報告がなされており（9），PSK-αとの関連に興味が持たれる．また，CMを添加することによって細胞増殖は促進されるが，その効果は細胞密度を高めた場合に比べてかなり限定的であることから，細胞が生産する増殖因子が本質的に複数の物質であり，そのいくつかは極めて不安定なために，CM中にはほとんど残っていないとする仮説もある（5）．

現在のところ真実がどちらであるのかは不明であるが，植物生理学的には非常に興味のある点であり，このことに関しては第5章においても別の観点から議論したい．

第４章　Phytosulfokine- αの化学合成と構造活性相関

【緒言】

前章までにおいて，植物細胞増殖因子の構造がチロシン硫酸エステルを持つペンタペプチドであることを明らかにした．phytosulfokine- α（PSK- α）と名付けられたこのペプチドの合成については，当初，酵素的硫酸基導入法を用いて行なったが，この方法は簡便である反面，大量合成や種々の類縁体の合成には不向きでもある．そこで，本章においては，まず化学的な硫酸基導入法を用いてPSK- αを合成するルートを確立するとともに，11種類のPSK- α類縁体を合成し，その構造活性相関について検討した．

【材料および方法】

1，硫酸化ペプチドの固相合成

Fmoc-Tyr(*t*-Bu), Fmoc-Ile, Fmoc-Thr(*t*-Bu), Fmoc-Gln, Fmoc-Gly, Boc-Ile, および Boc-Tyr(OH)は, Peptide Instituteから購入した. Boc-Tyr(*t*-Bu)は, Advanced Chemtech (Louisville, KY)から，Fmoc-Tyr(OH)は，NOVA Biochemicals. から購入した．Preloaded 4-hydroxymethyl-phenoxymethyl (HMP)レジン, すなわちFmoc-Gln(*Trt*) resin, Fmoc-Thr(*t*-Bu) resin, Fmoc-Gly resin，およびFmoc-Cys(*Trt*) resin は，Applied Biosystems (Foster City，CA)より購入した．以下に，PSK- αの合成の場合を例に述べる．Applied Biosystems社の 433A型ペプチド合成機を用いて，*Fastmoc* chemistry (0.25 mmol scale) に従い，Fmoc-Gln(*Trt*)レジンを固相として順次ペプチド鎖を構築し，部分保護ペプチド-レジン Fmoc-Ile-Tyr(OH)-Thr(*t*-Bu)-Gln(*Trt*)-Linker-Regin を合成した．最後のN末端残基のみは，脱保護を容易にするためにBoc保護アミノ酸を用い，同様に*Fastmoc* chemistry によって導入することにより部分保護ペプチド-レジンBoc-Tyr(OH)-Ile-Tyr(OH)-Thr(*t*-Bu)-Gln(*Trt*)-Linker-Regin を得た.

次に，50 μ mol（約100 mg）の部分保護ペプチド-レジンBoc-Tyr(OH)-Ile-Tyr(OH)-Thr(*t*-Bu)-Gln(*Trt*)-Linker-Regin を，1.5 ml の DMF-pyridine (4:1) に懸濁し，ここに dimethylformamide-sulfur trioxide complex (DMF-SO_3) (Fuluka, 225 mg, 30 equiv.)を加え，室温において16時間以上撹拌した．硫酸化された部分保護ペプチド-レジンを濾過によって回収し，蒸留水で洗浄し未反応の DMF-SO_3 complex を除去した後，2.5% (v/v)の ethanedithiol (EDT)を含む95% TFA 5.0 ml に加え，室温で30分間（30分を越えてはならない）撹拌し，レジンからの切り出しと脱保護を行った．反応の停止は，反応溶液中に30 ml の氷冷したジエチルエーテルを加えることにより行い，1,000 x *g*において3分間遠心してペプチドおよびレジンを沈殿させ回収した．沈殿を減圧下で乾燥後（3分程度），1.0% NH_4OH (2.0 ml）に溶解してフィルター濾過によりレジンを除去し，HPLC を用いて精製した．精製は，Develosil ODS-10 column（20 x 250 mm, Nomura chemical）を用い，0.1%酢酸アンモニウムを含む8.0%アセトニトリルを溶出液として流速20 ml/min において行なった.

[Tyr^1(OH)]PSK- α, [Tyr^3(OH)]PSK- αなどの部分硫酸化PSK- α類縁体の場合は，ペプチド-レジンを構築する際，側鎖無保護のチロシンを用いる代わりに側鎖水酸基が *t*-Bu 保護のチロシンを導入することで合成した.

2，硫酸化ペプチドの液相合成

PSK-α類縁体のうち，[1-3] PSK-αおよび [1-2] PSK-αについては，固相合成を行なう利点がないので液相法によって合成した．以下に，代表して [1-3] PSK-αの合成法を記す．

（1）Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OBzl

Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH (230 mg, 0.5 mmol)，および dimethylaminopyridine (6.1 mg, 0.05 mmol), benzyl alcohol (62.5 μl, 0.6 mmol)を，2.0 ml のジクロロメタンに溶解し，氷冷下において1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide HCl (EDC) (115.2 mg, 0.6 mmol)を加え 2 時間撹拌後，室温でさらに 6 時間撹拌した．反応溶液に30 mlの酢酸エチルおよび30 mlの蒸留水を加え分配操作により，水溶性のカルボジイミドを除去後，有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水し，減圧下濃縮乾固して目的物を得た．

（2）Fmoc-Ile-Tyr(*t*-Bu)-OBzl

上記で得た Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OBzl（未精製，約 0.45 mmol）を 5.0 ml のジクロロメタンに溶解し，4-(aminomethyl)piperidine (1.5 ml)を加えて室温において 1 時間撹拌し，Fmoc 基の脱保護を行なった．反応溶液を 50 ml のジクロロメタンで希釈し，50 ml の蒸留水および 50 ml の 100 mM KH_2PO_4-KOH (pH 5.4)で 3 回洗浄後，有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水し，減圧下濃縮乾固してH_2N-Tyr(*t*-Bu)-OBzlを得た．ここに3.0 mlのDMFおよびFmoc-Ile-OH（194 mg, 0.55 mmol）を加え溶解後，氷冷下において triethylamine（70 μl, 0.5 mmol）および diethylphosphorocyanidate（83 μl, 0.55 mmol）を加え 2 時間撹拌後，室温でさらに 6 時間撹拌した．反応溶液に 30 ml の酢酸エチルおよび 30 ml の蒸留水を加え分配操作後，有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水し，減圧下濃縮乾固して目的物を得た．

（3）Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-Ile-Tyr(*t*-Bu)-OBzl

上記で得た Fmoc-Ile-Tyr(*t*-Bu)-OBzl（未精製，約 0.4 mmol）の Fmoc 基を脱保護した後，同様に Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH (253 mg, 0.55 mmol)とカップリングし目的物である Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-Ile-Tyr(*t*-Bu)-OBzl (TLC Rf = 0.67, hexane : ethyl acetate = 1 : 1)を得た．

（4）Fmoc-Tyr(OH)-Ile-Tyr(OH)-OBzl

上記で得た Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-Ile-Tyr(*t*-Bu)-OBzl（未精製，約 0.35 mmol）を 5.0 ml の trifluoroacetic acid に溶解し，室温において 1 時間撹拌後，減圧下濃縮乾固し，シリカゲルカラムクロマトグラフィー (chloroform : acetone = 10 : 3) で精製後，目的物である Fmoc-Tyr(OH)-Ile-Tyr(OH)-OBzl を得た．収量 205.5 mg（収率 53.3%，4 steps).

（5）Fmoc-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-OBzl

1.2 ml の DMF と 0.3 ml の pyridine 混合液に，Fmoc-Tyr(OH)-Ile-Tyr(OH)-OBzl（38

mg, 0.05 mmol）を溶解し，DMF-SO_3 complex（153 mg, 1.0 mmol）を加え，室温において16時間以上撹拌した．反応液を減圧下濃縮乾固した後10mlの蒸留水に溶解し，アンモニア水でpH 10に調整後，10mlの水飽和ブタノールで抽出した．ブタノール層を減圧下濃縮乾固し目的物を得た．

（6）H_2N-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-OH（[1-3]PSK-α）

上記で得たFmoc-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-OBzl（未精製，約0.04 mmol）を10 mlのメタノールに溶解し，2滴の酢酸と10% paradium-charcol (10 mg)を加えて，室温において水素雰囲気下8時間撹拌した．反応液を濾過してparadium-charcolを除去した後，減圧下濃縮乾固しBzl基の脱保護体を得た．次に，未精製の脱保護体を3.0 mlのジメチルホルムアミドに溶解し，3.0 mlのピペリジンを加え室温において2時間撹拌し，Fmoc基の脱保護を行なった．反応液を減圧下濃縮しHPLCで精製して目的物を得た．精製は，Develosil ODS-10 (20 x 250 mm）カラムを用い，0.1％酢酸アンモニウムを含む10％アセトニトリルを溶出液として，流速15 ml/min において行なった．収量12.72 mg（収率41.2%，3 steps).

[1-2] PSK-αについても，Fmoc-Ile-OBzlを出発原料として，同様の方法によって合成した．Fmoc-Tyr(OH)-Ile-OBzlまで収量237.8 mg（収率78.5%，3 steps)．Tyr(SO_3H)-Ile-OHまで収量19.5 mg（収率95.5%，3 steps).

3，質量分析

FAB-MSを用い，ネガティブイオンモードにおいて分析を行なった．マトリクスとしてはチオグリセロールを用い，ステンレスチルドプローブを用いてm/z 50～1,000 の範囲のイオンについて分析を行なった．

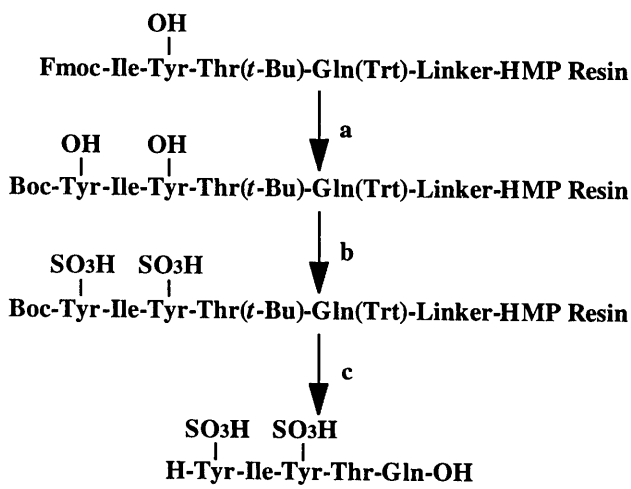
4，細胞増殖活性の評価

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，それぞれの類縁体について10^{-10} Mから10^{-6} Mまでの濃度域において増殖誘導活性を測定し，50％の細胞に分裂を誘導する濃度をED_{50}値として類縁体の活性を評価した．

【結果および考察】

1，PSK-α類縁体の化学合成

PSK-αおよびその類縁体は，固相合成を併用した新規合成法を用いて比較的高収率（20%前後）で合成することが可能であることが示された（Scheme 1）．PSK-αの場合を例にすると，N末端を除くアミノ酸をABI 433A ペプチドシンセサイザーの*Fastmoc*ケミストリーで順次カップリングし（使用するアミノ酸はFmoc保護），最後にN末端アミノ酸をBoc保護の状態でペプチドシンセサイザーの*Fastmoc*ケミストリーを用いて縮合した．ここでBocアミノ酸を用いるのは最終段階の脱保護を1段階で行なうためである．次に，得られた部分保護ペプチド－レジンを弱塩基性条件下で硫酸化し，最後にTFAで脱保護を行なった．チロシンの硫酸エステルは酸性条件下では比較的不安定であるため，脱保護の条件は室温で３０分とし，ペプチドをエーテルで沈殿させた後，すぐにアンモニア水で中和することで硫酸基の加水分解を最小限に抑えた．この方法の利点はペプチドの固相合成の利点を最大限に取り入れたことにより，最終的な脱保護まで精製の必要がないことと，目的の硫酸化ペプチドを得るまでに２日間程度しか要しないことである．当初，この合成法はチロシンの側鎖水酸基を無保護のままカップリングに用いるため，多様な縮合物が合成されて収率が低下することを予想したが，分析の結果，検出されたのは硫酸基の導入位置が異なる副生成物のみであり，この点は特に問題



Scheme 1. The outline of the synthetic approach to PSK-α. a) Successive coupling of the Boc amino acid with the peptide chain constructed on the HMP resin using peptide synthesizer. b) Sulfation of Tyr with 20 eqiv. of DMF-SO_3 in DMF-pyridine (4 : 1). c) Final deprotection and cleavage from the resin conducted with 95% aqueous TFA in the presence of 2.5% of EDT.

とはならないことが判明した（Fig. 19）．合成したペプチドは，ネガティブモードのFAB-MSによって分子量を確認した（Fig. 20, 21）．

2，PSK-α類縁体の細胞増殖誘導活性

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，ED_{50}値を指標にPSK-αおよびその類縁体の活性を比較した．PSK-αおよびその11種類の類縁体の構造および活性をTable 3に，それらのうちの4種類の類縁体のdose-response curveをFig. 22に示した．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(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)であることを示している．念のため，全く活性を示さなかった[1-2]PSK-αおよび[2-5]PSK-αについては，PSK-αに対するアンタゴニスト活性の有無を検討したが，PSK-αの100倍量を培地に添加しても全く細胞増殖阻害活性は見出されなかった．

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．

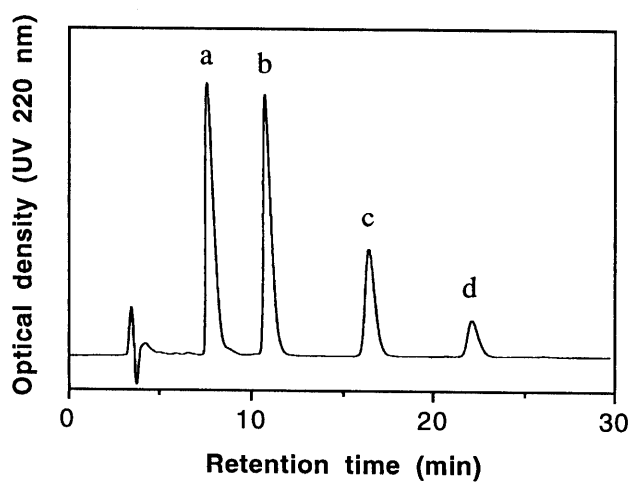


Fig. 19. HPLC purification of cleaved peptides. The cleaved crude products were chromatographed on a Develosil ODS-10 column (20 x 250 mm) by an isocratic elution of 8% acetonitrile containing 0.1% ammonium acetate at a flow rate of 20 ml/min with monitoring the absorbance at UV 220 nm. The peak eluted at 7.9 min (a) was identified as PSK-α, and the two peaks eluted at 11.1 min (b) and 16.7 min (c) were identified as monosulfates from the FAB-MS experiments. Unsulfated peptide was eluted at 22.4 min (d).

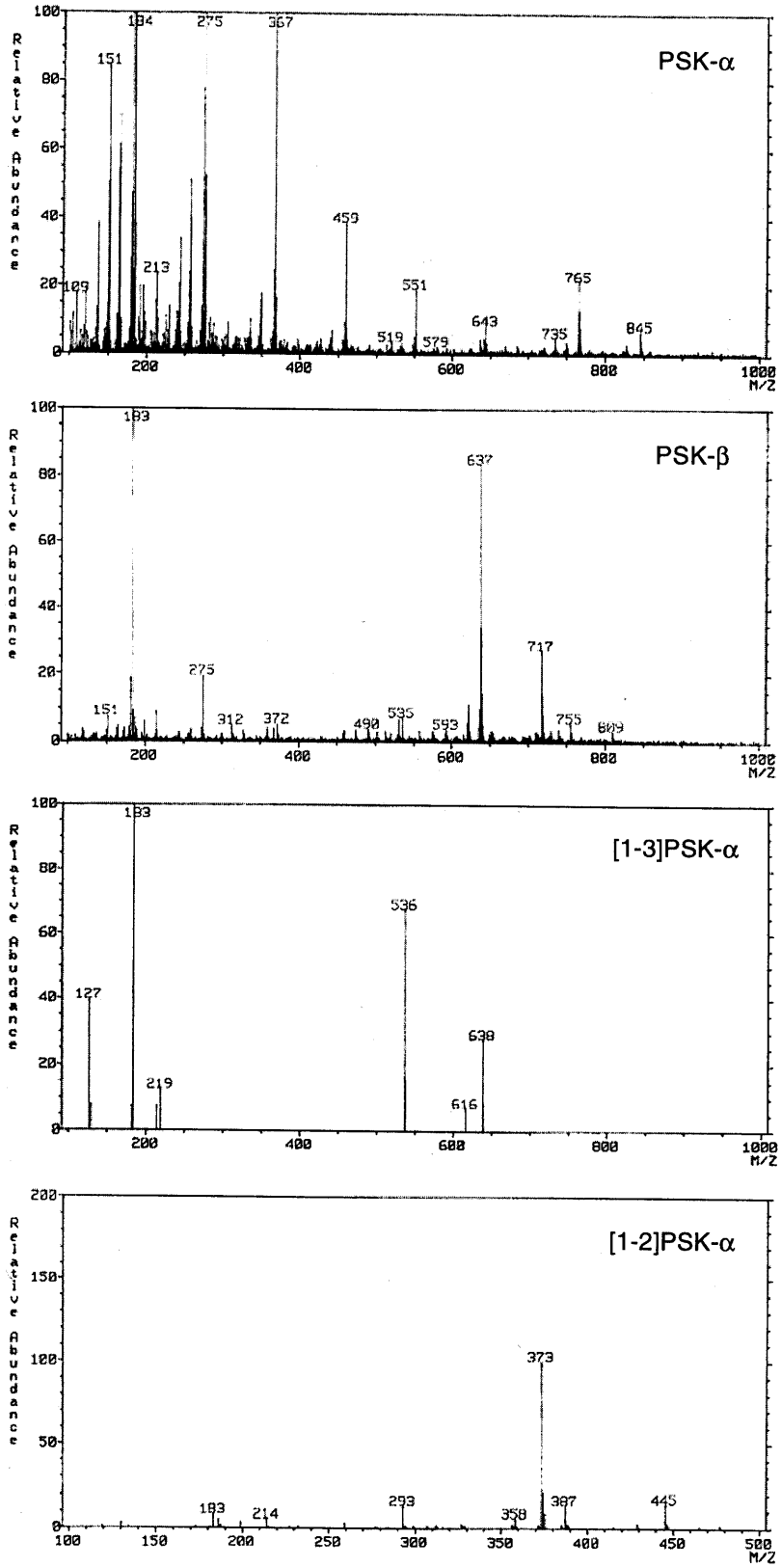


Fig. 20. FAB-MS (-) spectrum of synthesized PSK-α analogs. Fast atom bombardment mass spectra were obtained by adding 10 μg of peptide in distilled water (1.0 μl) to thioglycerol (1.0 μl) on a stainless prove, followed by bombardment with 6 kv Xe fast atom on a mass spectrometer.

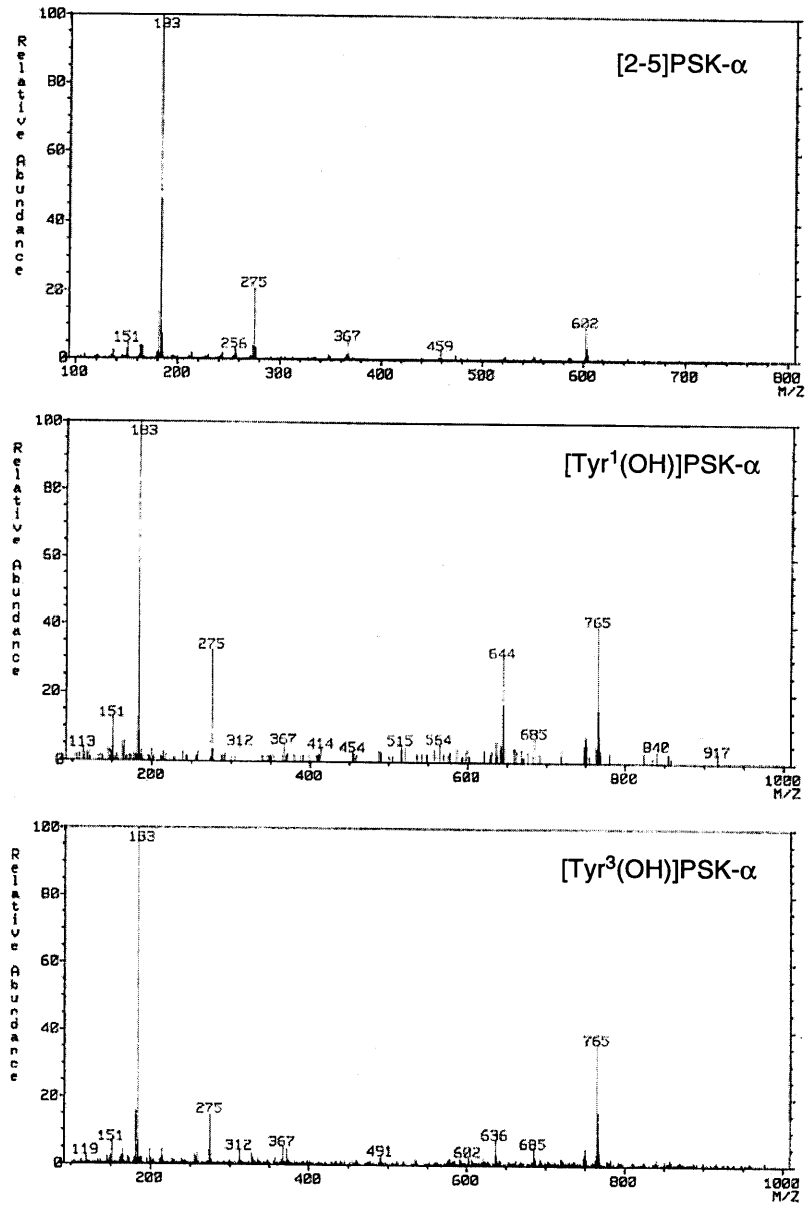


Fig. 21. FAB-MS (-) spectrum of synthesized PSK-α analogs. Fast atom bombardment mass spectra were obtained by adding 10 μg of peptide in distilled water (1.0 μl) to thioglycerol (1.0 μl) on a stainless prove, followed by bombardment with 6 kv Xe fast atom on a mass spectrometer.

Table 3. Mitogenic activities of PSK-α analogs. Mesophyll cells of asparagus were incubated in the presence of each PSK-α analog. Mitogenic activities were determined on the 6th day of culture and ED_{50} value was defined as the concentration of the compound required for 50% cell division.

Name	PSK-α analogs	ED_{50} (nM)	Relative activity
PSK-α	Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln	4	100
PSK-β	Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr	50	8
[1-3]PSK-α	Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)	20	20
[1-2]PSK-α	Tyr(SO_3H)-Ile	>1000	<0.1
[2-5]PSK-α	Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln	>1000	<0.1
[*C*-(Gly)$_3$]PSK-α	Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-Gly-Gly-Gly	100	4
[*N*-(Gly)$_3$]PSK-α	Gly-Gly-Gly-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln	500	0.8
[Tyr^3(OH)]PSK-α	Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(OH)-Thr-Gln	100	4
[Tyr^1(OH)]PSK-α	Tyr(OH)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln	700	0.6
[Tyr(OH)]PSK-α	Tyr(OH)-Ile-Tyr(OH)-Thr-Gln	>1000	<0.1
[Val]PSK-α	Tyr(SO_3H)-Val-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln	100	4
[Ser]PSK-α	Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Ser-Gln	200	2

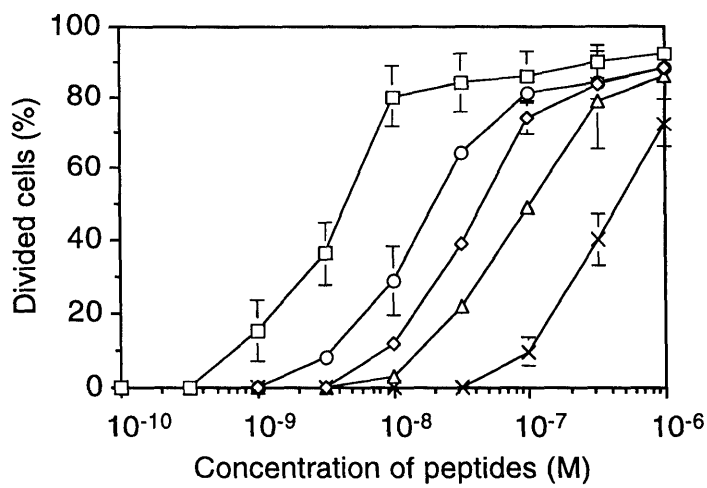


Fig. 22. Dose-response curve for mitogenic activities of PSK-α (open square), PSK-β (open lozenge), [1-3]PSK-α (open circle), [*C*-(Gly)$_3$]PSK-α (open triangle), [*N*-(Gly)$_3$]PSK-α (cross). Mesophyll cells of asparagus were incubated under various concentrations of each PSK-α analog. Mitogenic activities were determined on the 6th day of culture.

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，かなり活性が低下し，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末端側で行なわれていることを示唆している．

このように，PSK-αのペプチド鎖の長さを変化させるとその活性は大きく変化するが，Fig. 22に示すように，そのdose response curveは，2個ある硫酸化チロシンのいずれかが除去されない限り，ほぼ同様の傾斜と最大活性値（約80%）を与えた．構造活性相関の基本的概念では，生理活性分子はその分子内における機能によりmessage portionとaddress portionとに分けられる．そして，dose response curveにおける最大活性値の変化はmessage portionが構造的に破壊されたことを意味し，その傾斜やED_{50}値の変化はaddress portionの構造変化であることが指摘されている（20）．従って，PSK-αにおけるmessage portionは分子全体に存在するのではなく，2個の硫酸基を含むN末端側のトリペプチドすなわちTyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)に限定されていることが強く示唆された．

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，Tyr^3の硫酸基を欠除させたペプチド[Tyr^3(OH)]PSK-αは，ED_{50}値が100 nMであり，PSK-αの4%の活性を保持していたが，Tyr^1の硫酸基を欠除させたペプチド[Tyr^1(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，Tyr^3に比べTyr^1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．

最後に，PSK-αの第2残基および第4残基に含まれるIleおよびThr残基を，ValおよびSerに置換した類縁体についても，その活性を比較したが，いずれの場合もPSK-αに比較して1/20程度の活性しか保持していなかった．このことは，これら2個のアミノ酸が単なるスペーサーとして存在しているのではなく，PSK-αの活性を維持する上で重要な役割を果たしていることを示している．

本章においては，ペプチド合成機による固相合成を併用したPSK-αの化学合成法およびPSK-αの構造活性相関について述べた．この合成法の最大の利点は，PSK-αおよびその類縁体の化学合成を，総収率11-52%程度と比較的高収率で得ることができる点と，ペプチド鎖の構築から硫酸化，脱保護までを含めて2日間程度で合成を完了できることである．一方，欠点としては，コストがやや高いことと，市販のレジンには保護基が導入されているため，C末端に硫酸化アミノ酸を持つペプチドを合成することができないことなどがある．しかし，少量の生理活性ペプチドを合成する場合には，この手法は従来の液相合成法に比較して格段に有利であり，PSK-αの合成だけでなく他の硫酸化ペプチドの化学合成に広く応用できるであろう．

第５章　Phytosulfokine- αを用いたアスパラガス細胞の超低密度培養

～Phytosulfokine- αの増殖誘導効果に与えるammonium-nitrate ratioの影響～

【緒言】

緒論にも述べたが，これまでトランスジェニック細胞などのように全体数が限られている細胞からカルス形成を行なったり，植物体を再生させたりするような場合には，ナースカルチャー（看護培養）を行なうことが不可欠であったが，植物細胞増殖因子の構造が決定されたことで，ナースセル（看護細胞）の代わりにPSK- αを用いて植物細胞の低密度細胞が可能になりつつある．しかし，植物細胞が低細胞密度で増殖できなくなるという現象には，個々の細胞が生産する増殖因子の他にも，培地中の無機イオンのバランスやpHの変化が相互に関連しているという報告がある．例えば，ニチニチソウの培養細胞は，必須栄養素であるリン酸の吸収に対するフィードバック機構がないため，培地中のリン酸が枯渇するまで無制限に取り込んでしまう性質がある．そのため，低細胞密度で培養する際にはリン酸を制限しておかないと，過剰に取り込んだリン酸の影響で増殖が抑制されてしまう（22）．また，窒素源についても，植物種によってその代謝には差があり，アンモニウムイオンが増殖に促進的に作用するものや（23），逆に阻害的効果を示すものがある（24）．

実際，アスパラガス葉肉細胞においても，植物細胞の培養に広く用いられているMS培地を用いた場合では，10^3 cells/mlのオーダーまで細胞密度を低くすると，あまりPSK- αの増殖誘導効果が認められないことが見出された．そこで予備的な実験ながら培地中の種々のイオン濃度を個々に変化させ，その影響を観察したところ，アンモニウムイオンが低細胞密度における細胞増殖に大きな影響を与えていることが明らかとなった．しかし，実際の細胞培養時における培地中のイオン濃度の変化は複雑なため，それらの影響を総合的に検討することは困難であり，またPSK- αの生理的機能および作用機作を明らかにするという本来の目的からはやや離れることにもなる．しかしながら，PSK- αを用いることで，植物細胞の低密度細胞が可能になるならば，トランスジェニック植物の育成など基礎研究の分野のみならず産業的にも大きな前進となると考えられる．以上のことをふまえながら，本章では，培地中の種々のイオンのうち特に窒素源の化学的形態すなわちammonium-nitrate ratioのみに着目し，それらが低細胞密度培養時における細胞増殖にどのような影響を与えるかについて検討した．

【材料および方法】

1，培地組成および細胞の培養

基本的な培地組成は，第1章で述べたものと同じ組成を用い，特に断わらない限り，PSK-αを3.2 x 10^{-8} Mの濃度で添加した．この培地は，窒素源としてKNO_3とNH_4NO_3を含んでおり，アンモニアと硝酸イオンとの比率（ammonium-nitrate ratio）は，10：20 (mM)である．アスパラガス葉肉細胞の調製および培養法は，これまで用いてきた24-wellのマイクロプレートの代わりに48-wellのマイクロプレートを用いた以外は，第1章で述べた方法と同様に行なった．

アスパラガス細胞の増殖に対するammonium-nitrate ratioの影響を検討する実験では，培地に含まれるKNO_3とNH_4NO_3の量比を調節することで，イオンの比率を変化させた．カリウムイオンの濃度は，KClを用いて常に一定値（32 mM）に保った．細胞培養は振盪下で行ない，培養開始後6日目に，顕微鏡下で細胞分裂率を計数した．カルス形成を行なわせる場合には，そのまま2週間目まで振盪培養（120 rpm, 25℃, dark）を続け，さらにその後2週間静置培養（25℃, dark）を行なった．培地のpH変化を測定する場合には，100-mlの細胞懸濁液を300-mlの三角フラスコ中1.0 x 10^4 cells/mlの密度で振盪培養(120 rpm, 25℃, dark)し，培養開始後6日目に，濾過によって培地を回収後，測定に用いた．

アスパラガス細胞のPSK-αに対する感受性（competence）を検討する実験では，ammonium-nitrate ratioを0：30および10：20 mMに調節したPSK-α非添加培地で細胞を培養し，培養開始後0, 24, 48, 72, または96時間後に，5.0 μlのPSK-α溶液を最終濃度3.2 x 10^{-8} Mとなるように添加し，24時間ごとに細胞分裂を観察した．初期細胞密度は0：30 mM培地では1.0 x 10^4 cells/ml，10：20 mM培地では3.2 x 10^4 cells/mlに調節した．

【結果および考察】

1，アスパラガス葉肉細胞の細胞分裂に与えるammonium-nitrate ratioの影響

培地中のNH_4NO_3とKNO_3の量比を調節することによって，ammonium-nitrate ratioを種々変化させ，細胞分裂に与える影響を検討した（Fig. 23）．これまでの実験に用いてきた改変MS培地におけるammonium-nitrate ratioは，10：20 (mM)であるが，アンモニウムイオンの比率を高めて15：15とした場合には，細胞分裂はすべての細胞密度域において著しく阻害され，1.0 x 10^4 cells/ml以上の細胞密度でPSK-αによる増殖誘導がわずかに観察されたのみであった（Fig. 23A）．Ammonium-nitrate ratioを10：20とした場合には，5.6 x 10^4 cells/ml以上の細胞密度においてはPSK-αの非存在下でも細胞増殖が観察されたが，それ以下の密度ではPSK-αの存在下でのみ細胞増殖が誘導された．しかし，PSK-αの存在下においても，1.0 x 10^4 cells/ml以下の細胞密度ではほとんど細胞増殖は観察されなかった（Fig. 23B）．その一方で，アンモニウムイオンの比率を低くした培地では，PSK-αの存在下における低密度での細胞増殖が著しく改善された（Fig. 23C, D）．特に，ammonium-nitrate ratioを0：30とした場合には，初期細胞密度が3.2 x 10^3 cells/mlの場合でも，培養開始後6日目に70％程度の細胞分裂が観察された．また，培養開始後4週間目には，低率ながら3.2 x 10^2 cells/mlの超低細胞密度（160 initial cells/well）においても，肉眼で観察可能な100から150細胞からなるカルスが形成された（Fig. 24A-C）．逆に，初期細胞密度5.6 x 10^3 cells/ml以下の場合，PSK-αの非存在下ではすべての細胞が4週間以内に死滅したことから，PSK-αは細胞の増殖だけでなく生存にも重要な役割を果たしていることが示唆された．

このように，培地のammonium-nitrate ratioによって，低細胞密度域での細胞増殖が大きな影響を受けることが明らかとなったが，培地のイオン比を変化させると，培養後の培地のpHが変化し，間接的に細胞増殖に対し影響を与えるという報告がある（25）．これは，例えばアンモニウムイオンを細胞が吸収すると，細胞内のイオン的中性を保持するために同じカチオンであるプロトンを放出するため，結果的に培地のpHが低下するためである．この観点から，我々の実験系においても培地のpH変化を測定，比較したが，ammonium-nitrate ratioに関わらず培養開始後6日目の段階ではpH5.60から5.64の範囲であり，特に差はなかった．従って低密度のアスパラガス細胞の増殖が培地中のammonium-nitrate ratioによって影響を受けるのは，培地のpH変化によるものではないことが考えられる．

これらの結果において特筆すべきことは，アスパラガス細胞の場合，3.2 x 10^2 cells/ml程度の超低細胞密度（約100 viable cells/well）においても，PSK-α添加完全合成培地を用いることで，保護培養法によることなく分裂，増殖，およびカルス形成が可能であることが示さ

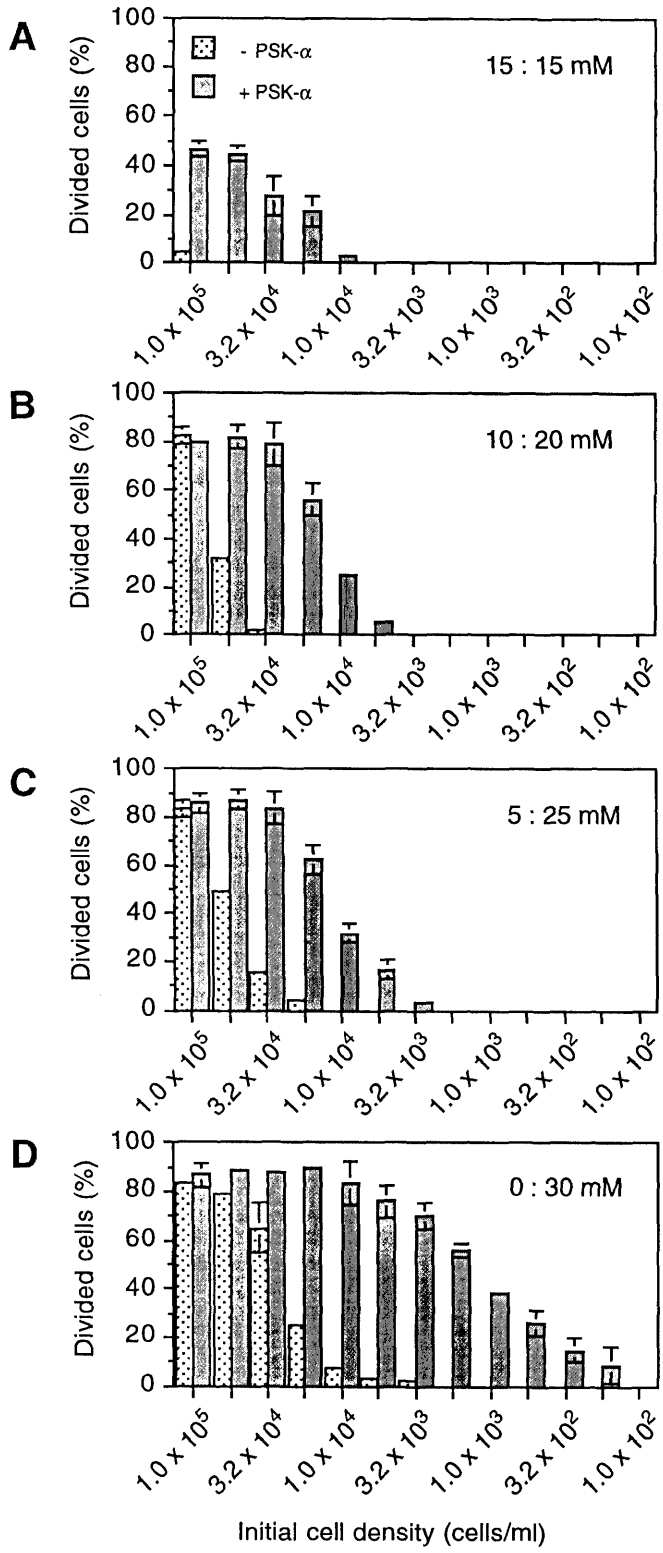


Fig. 23. Effects of ammonium-nitrate ratio on asparagus cell division. Isolated mesophyll cells of asparagus were cultured for 6 days in various media in which the ammonium-nitrate ratio was adjusted to 15 : 15 (A), 10 : 20 (B), 5 : 25 (C), or 0 : 30 mM (D) with or without PSK-α.

れたことである．後に第７章において述べるが，PSK-αはアスパラガス細胞以外にもイネ細胞に対して増殖活性を持つなど，かなり植物界において普遍性のあることが明らかとなってきており，トランスジェニック細胞からの植物体再分化などに貢献することが期待される．しかしその一方でFig. 23Dに示したように，ammonium-nitrate ratioを0 : 30とし，PSK-αを添加した培地を用いても，10^2 cells/ml以下の細胞密度では細胞増殖は観察されないという事実から，まだ他にも超低細胞密度培養時において必須の因子または培地条件があることが示唆された．実際，培地のコンディショニングの過程に，複数の物質が関与している可能性を示

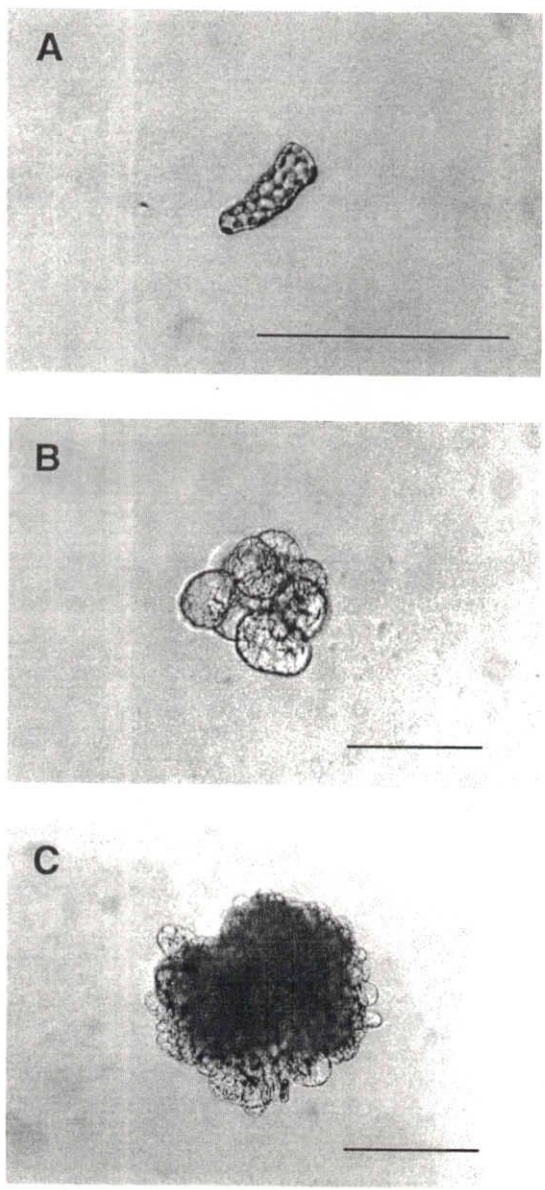


Fig. 24. Various stages of microcallus formation from a single asparagus mesophyll cell cultured at an initial cell density of 3.2 x 10^2 cells/ml in the 0 : 30 medium. (A) A single mesophyll cell immediately after isolation. (B) A colony consisting of 9 cells observed after 2 weeks of culture. (C) A microcallus formed after 4 weeks of culture. Bar = 100 μm.

した実験も報告されており(5), PSK-αの発見を機にそのさらなる解明を行なっていきたい.

2, アスパラガス細胞のPSK-αに対する感受性の維持とammonium-nitrate ratioの関連

先の実験においてアスパラガス細胞の低細胞密度培養時には, 培地からアンモニウムイオンを除くことでPSK-αに対する応答性が改善されることが示された. そこで, 次に培地のアンモニウム:硝酸イオン比とアスパラガス細胞のPSK-αに対する感受性の維持との関係について検討を行なった.

まず, アスパラガス細胞のPSK-αに対する感受性が, どのくらいの時間維持されているかを調べるために, ammonium-nitrate ratioが0 : 30または10: 20の培地を用いて細胞を前

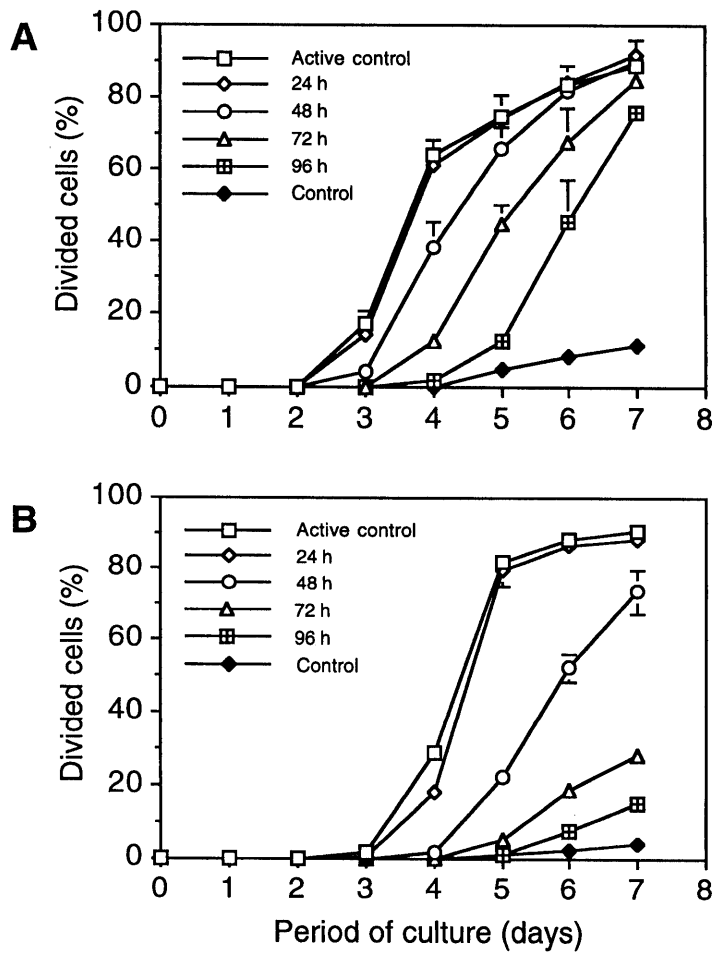


Fig. 25. Retention of competence for cell division. Freshly isolated mesophyll cells were precultured in the 0 : 30 (A) or 10: 20 media (B) without PSK-α (control), and then PSK-α was added after 0 (active control), 24, 48, 72, or 96 h from the beginning of preculture. Initial cell densities were adjusted to 1.0 x 10^4 cells/ml in the 0 : 30 medium and to 3.2 x 10^4 cells/ml in the 10 : 20 medium. The proportion of dividing cells was scored every 24 h.

培養し，培養開始後から0，24，48，72，または96時間後にPSK-αを与えた後，経時的に細胞分裂を観察した．その結果，0：30の培地では3.2 x 10^3 cells/mlの初期細胞密度において，少なくとも96時間の間，細胞はPSK-αに対する感受性を失うことなく維持され，24時間ごとに計測した増殖曲線はすべてアクティブコントロールに比べ同様の傾きと最大活性を示した（Fig. 25A）．興味深いのは，PSK-αを0時間後と24時間後に与えた場合，増殖が開始し50％の細胞が分裂するのに必要な時間がPSK-α添加後88および64時間であったのに対し，48，72，または96時間後にPSK-αを与えた場合には，50から55時間程度であったことである．このことは，単離直後のアスパラガス葉肉細胞は，おそらく機械的な傷害あるいは急激な環境の変化などにより，PSK-αに対する感受性が低いことを意味していると考えられる．対照的に，10: 20培地を用い，3.2 x 10^4 cells/mlの初期密度で細胞を培養した場合は，細胞は急激にPSK-αに対する感受性を失ってしまい，培養開始後48時間よりも後にPSK-αを与えた場合には，細胞分裂率は低率にとどまった．

このような感受性の低下の原因としては，培地環境によってPSK-α特異的受容体の維持または生合成が阻害される可能性や，細胞内の生理的環境が変化することにより，PSK-αの増殖刺激が細胞内に伝達されても実際に細胞分裂に必要な遺伝子群を活性化できないことなどが考えられる．興味深いことに，10 mMまでの濃度でアンモニウムイオンが存在しても，1.0 x 10^5 cells/mlの細胞密度で培養した場合には細胞分裂は阻害されないことから，低細胞密度時にのみ観察される分裂阻害は，おそらくアンモニウムイオンの吸収と代謝のアンバランスが原因ではないかと考えられる．実際，アンモニウムイオンは硝酸イオンよりも先に吸収されることや（25），アンモニウムイオン非含有の培地は細胞増殖を促進するという結果（23）なども報告されている．従って，アンモニウムイオンの吸収に関わる調節機構はあまりよくわかっていないものの，その吸収と代謝のバランスは，アスパラガス葉肉細胞初代培養系における培地のコンディショニングの過程に重要な役割を果たしていることが強く示唆される．

第6章　細胞増殖誘導過程におけるphytosulfokine-αと植物ホルモンとの生理的関連

【緒言】

植物細胞の*in vitro*での増殖には，オーキシンやサイトカイニンなどの植物ホルモンが必須であることは周知の通りであるが，低細胞密度域ではこれらに加えてPSK-αの存在が必要となることはすでに述べた．逆に，高細胞密度域においては特にPSK-αを人為的に与えなくても増殖が誘導されるのは，細胞自身が生産するPSK-αが培地中に十分量存在するためであると考えられる．ここで新たな疑問として生じてくるのは，オーキシンやサイトカイニンはPSK-αと生理学的にどのような関係にあるのか，すなわち，PSK-αの生産にのみ必要なのか，あるいは活性の発現にも必須であるのかということである．そしてこの点を明らかにすることは，PSK-αの生理的役割を解明する第一歩であるばかりでなく，未だに謎の部分が多い植物ホルモンの作用機構を知る上で，多くの情報を与えるかもしれない．

本章では，まず細胞増殖誘導過程においてPSK-αと植物ホルモンとがどのように相互作用しているかを調べる第一段階として，アスパラガス葉肉細胞を，PSK-α，NAA，BAのうち任意の2種類の物質の存在下で培養し，一定時間後に残りの1種類の物質を添加した場合に，その前後で細胞分裂に必須の過程であるDNA複製がどのように影響を受けるかを，DNA特異的結合蛍光色素と蛍光顕微鏡を用いて解析した．

【材料および方法】

1，培地組成および細胞の培養

基本的な培地組成は，低細胞密度域におけるPSK-αに対する感受性を高めるため，第1章で述べたPaulらの組成からNH_4NO_3を除いたものを用いた．この場合，培地のアンモニアと硝酸イオンとの比率は，0：10（mM）である．また，PSK-αは3.2×10^{-8} M，NAAは1.0 ppm，BAは0.3 ppmの最終濃度でそれぞれ用いた．上記の3種類の物質のうち任意の2種類を添加した培地200 mlにアスパラガス細胞を初期細胞密度3.2×10^3 cells/mlで懸濁し，500-mlの三角フラスコ中で前培養を行なった．培養開始から48時間後に細胞懸濁液を100 mlずつ300-mlの三角フラスコ2本に分注し，片方にのみ残りの1種類の物質を添加した後，両方の細胞懸濁液をさらに3日間培養した．この間24時間ごとにそれぞれの培養液15-40 mlを無菌的に抜き取り，遠心（3,000 rpm, 5.0 min）して細胞を集め，すぐに細胞固定液（エタノール：酢酸＝3：1）中で4℃，30 min固定後，70%エタノールで洗浄し，70%エタノール中4℃において保存した．この細胞を，観察直前に染色液（2.0 μg/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in 25 mM Tris-HCl (pH 7.0), 10 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA)に懸濁し，室温で30分放置後，そのままプレパラート上に広げ，カバーグラスをかけてから蛍光顕微鏡（Olympus BX60 + BX-FLA）を用いて各細胞のDNA量を測定した．DNA量の定量には，デンシトメーター（Hamamatsu photonics ARGUS-20）を使用し，各サンプルについて100個の細胞を測定した．

【結果および考察】

1，PSK-α，NAA，および6-BAがアスパラガス葉肉細胞の細胞周期に及ぼす影響

アスパラガスは，2倍体（2n）の植物であり，またその葉肉細胞はG_0/G_1期で増殖を停止していることが知られている（12）．もし増殖刺激により細胞周期が回り出すと，DNA複製が開始し核内のDNA量が2倍（4n）になるため，DNA結合性蛍光色素の蛍光強度の変化を指標にして，細胞増殖の初期段階を解析することができる．この手法の利点は，細胞増殖を細胞板の形成という形態的変化でなく，DNAの複製という，より本質的な観点から解析できる点にある．植物種によっては，核が染色されにくかったり，細胞質が強く染色されDNAの定量に影響を及ぼすことがあるが，アスパラガス葉肉細胞の場合は比較的良好に染色され，細胞質のバックグラウンドも問題となるレベルではなかった（Fig. 26）．

前章でも述べたように，アスパラガス葉肉細胞は細胞単離直後においてはPSK-αに対して迅速に反応しないため，NAAおよび6-BAのみの存在下（-P+N+B medium），低細胞密度で48時間前培養した後に培地にPSK-αを与え（+P+N+B medium），24時間おきに採取した細胞についてその細胞周期を解析した．その結果，PSK-αを与えない対照区では，PSK-αを与えてから72時間後（培養開始から120時間後）においてもDNA量の増加は認められず，細胞はG_0/G_1期に停止したままであったが，PSK-αを与えた実験区では投与後48時間以内にDNA複製が開始し，投与72時間後には約40%の細胞がG_2またはM期に移行したことが確認された（Fig. 27）．従って，低細胞密度においては，アスパラガス細胞はPSK-αが存在しない限り分裂サイクルに入らないことが改めて確認された．

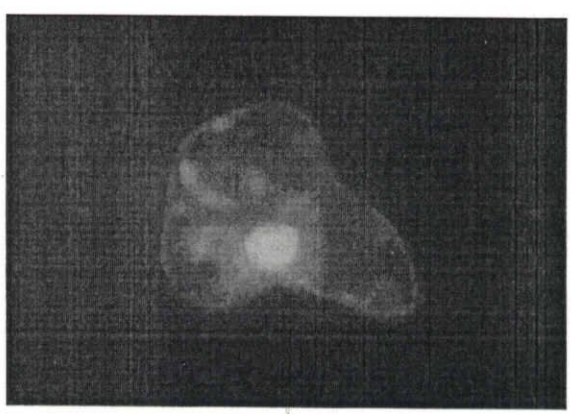


Fig. 26. Fluorograph of asparagus mesophyll cell. Asparagus cells cultured in +N+B-P medium for 48 h and in +N+B+P medium for additional 72 h were fixed with ethanol-acetic acid and stained with DAPI. Microscopic image was obtained with fluoromicroscope and digital image analyzer.

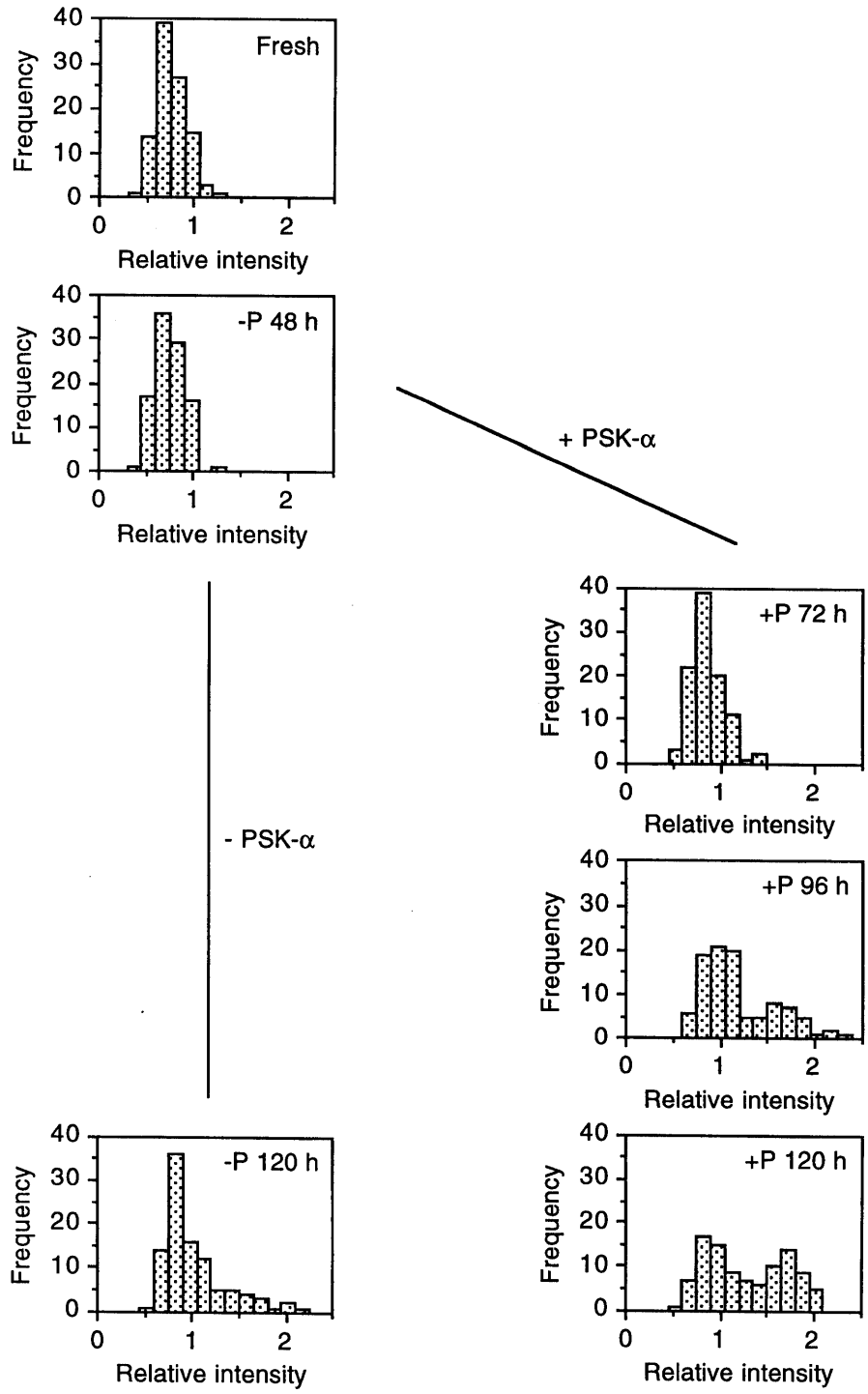


Fig. 27. Frequency distribution of microdensitometry mesurements of DAPI stained asparagus cells. Asparagus cells were cultured in +N+B-P medium for 48 h and in +N+B+P medium for further 72 h. Cells were harvested and stained at the indicated time. Intensity of staining was measured by a digital image analyzer.

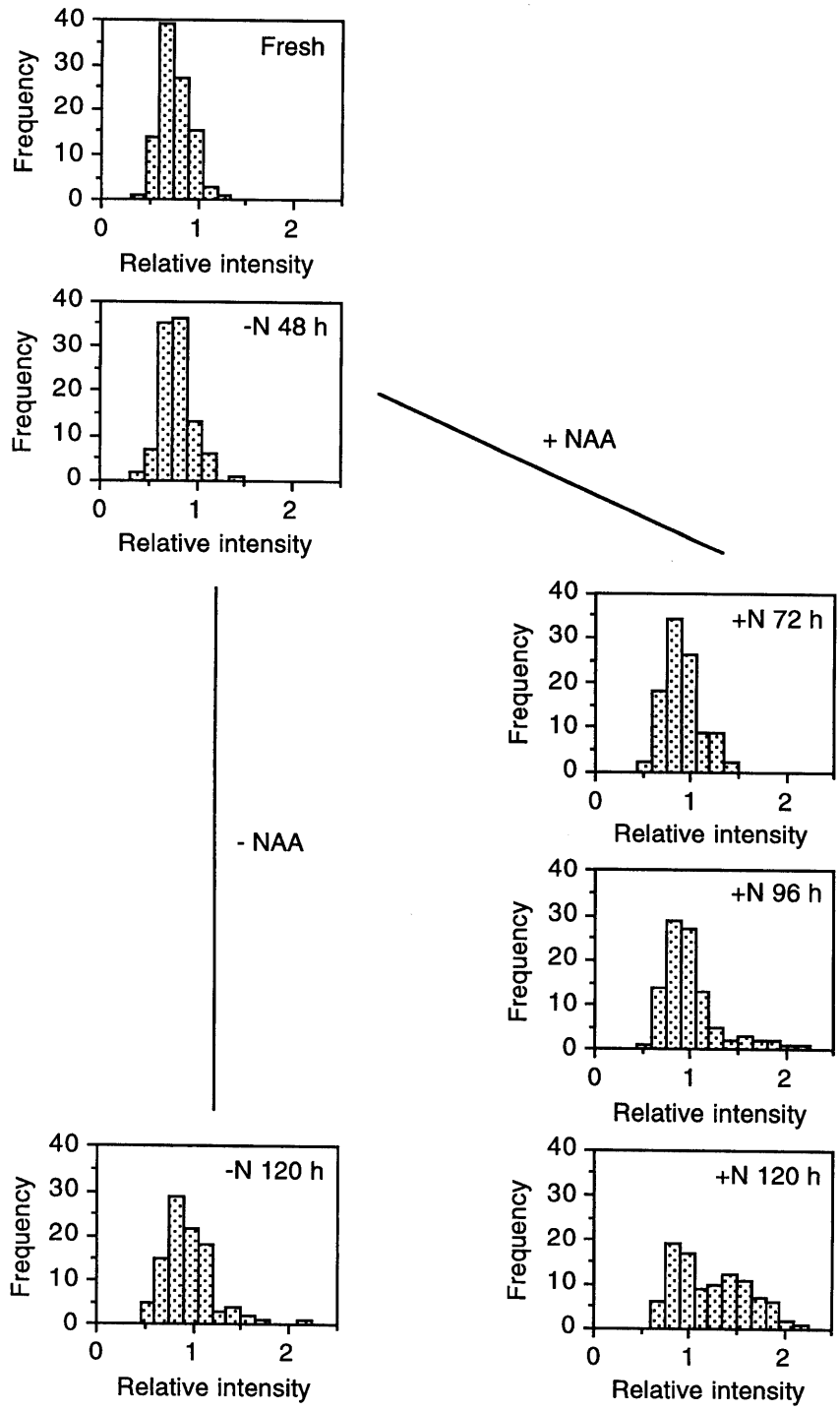


Fig. 28. Frequency distribution of microdensitometry mesurements of DAPI stained asparagus cells. Asparagus cells were cultured in -N+B+P medium for 48 h and in +N+B+P medium for further 72 h. Cells were harvested and stained at the indicated time. Intensity of staining was measured by a digital image analyzer.

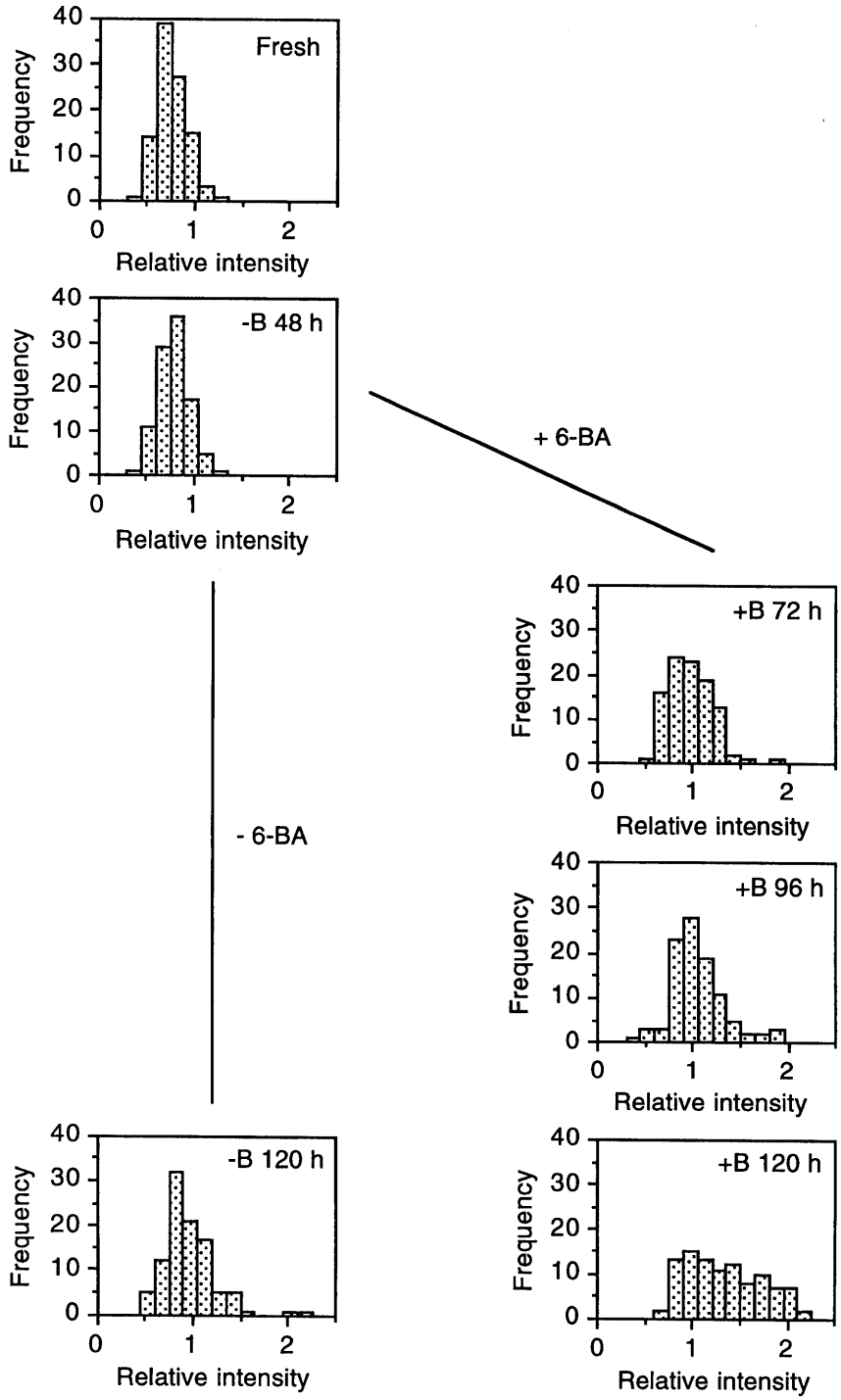


Fig. 29. Frequency distribution of microdensitometry mesurements of DAPI stained asparagus cells. Asparagus cells were cultured in +N-B+P medium for 48 h and in +N+B+P medium for further 72 h. Cells were harvested and stained at the indicated time. Intensity of staining was measured by a digital image analyzer.

同様に，PSK-αおよび6-BAのみの存在下（+P-N+B medium），低細胞密度で48時間前培養した後に培地にNAAを与え（+P+N+B medium），24時間おきに採取した細胞について細胞周期の変化を解析したところ，NAAを与えない対照区では，NAAを与えてから72時間後（培養開始から120時間後）においてもDNA量の増加は認められず，細胞はG_0/G_1期に停止したままであったが，NAAを与えた実験区では投与72時間後にはDNAの複製が認められた（Fig. 28）．6-BAについて検討した結果もほぼ同様であり，PSK-α，NAA，および6-BAがすべて存在した場合のみDNAの複製が行なわれた（Fig. 29）．

これらの結果から，低細胞密度におけるアスパラガス細胞の分裂には，PSK-α，NAA，および6-BAが共に培地中に存在することが必須であり，これらの物質のうちの一つでも欠けると，細胞分裂の第一段階であるDNA複製が起こらないことが明らかとなった．つまり，本実験で得られた結果は，これまでNAA，およびBAの存在だけで誘導されると考えれていた植物細胞の分裂，増殖に関して，PSK-αが不可欠の因子として重要な役割を担っていることを改めて示している．

このように複数の因子が共同して細胞増殖を誘導する例は，動物細胞においてはいくつか知られていたが，詳しい解析の結果から増殖因子にはG_0期からG_1期への移行を促進する因子と，G_1期からS期へ導く因子とがあることが明らかにされている（27）．前者はcompetent factorと呼ばれ，platelet-derived growth factor，fibroblast growth factorなどがこれに相当する．また後者はprogression factorと呼ばれ，somatomedin，insulin，epidermal growth factorなどが知られている．現段階では，植物細胞におけるPSK-α，NAA，および6-BAがcompetent factorとprogression factorのどちらに属するのか，あるいはどちらにも属さないのかは不明であるが，細胞周期の観点からこれらの因子の役割をさらに解析することで，PSK-αの作用機構を明らかにしていきたい．

第7章　Phytosulfokine-α結合部位の解析

【緒言】

植物細胞に限らず細胞は細胞膜によって外界と遮断されているが，細胞外からの物質的刺激は細胞膜上に存在する各種の特異的受容体によって感知され，2次的な信号伝達系を介して細胞内に伝達されることが多い．PSK-αもその高い親水性から考えて細胞膜を透過して直接標的分子に作用するとは考えにくいため，細胞表層，特に細胞膜上に受容体が存在する可能性が高い．そこで，ラジオアイソトープラベルしたPSK-αを新たに合成し，細胞そのものに対するバインディングアッセイを試みることにした．バインディングアッセイに用いる細胞としては，その後のレセプター分子の精製のことを考慮すれば，均質でしかも大量調製が可能であることが望ましいため，これまで用いてきたアスパラガス葉肉細胞の他にイネ培養細胞株のOc株を用いて実験を行なうことにした．イネOc株は増殖速度が比較的速く，しかも増殖因子の生産能力が高いことが経験的に知られていることから，トランスジェニック細胞の増殖，再分化を促進する際の保護培養にしばしばnurse cellsとして利用されてきた細胞株である（28）．我々が植物細胞増殖因子の研究を進めるうちに，Oc株由来のCM中にも，アスパラガス葉肉細胞に対し増殖誘導活性を示す因子が含まれていることが見いだされたため，本研究室の高木らがこれを精製して構造解析した結果PSK-αおよびPSK-βそのものであることが明らかとなった（29）（Fig. 30）．また，PSK-αおよびPSK-βが，Oc株由来のプロトプラストに対し強い増殖促進活性を持つことも確認された（Fig. 31）．これらの事実から，PSK-αがアスパラガスだけでなくイネにも存在し，実際に増殖因子として作用していることが確認されたため，PSK-αによって引き起こされる細胞内の種々の生理学的変化を研究する上で，イネ培養細胞株のOc株をモデル植物として利用することが可能であると考えられる．

バインディングアッセイには，リガンドであるPSK-αにラベルを導入することが前提となるが，多くの予備実験の結果，PSK-αにおいて最も重要な官能基である硫酸基に，ラジオアイソトープとして^{35}Sを導入する化学合成経路を確立した．得られた[^{35}S]PSK-αを用い，アスパラガス葉肉細胞およびイネ培養細胞Oc株に対しバインディングアッセイを行なったところ，どちらの細胞においても細胞表面への有意な結合が観察されたが，興味深いことに細胞あたりの[^{35}S]PSK-α結合量はOc株の方がアスパラガス葉肉細胞に対するものよりも10倍以上多かったため，PSK-α受容体の詳細な解析はOc株を用いて行なうことにした．

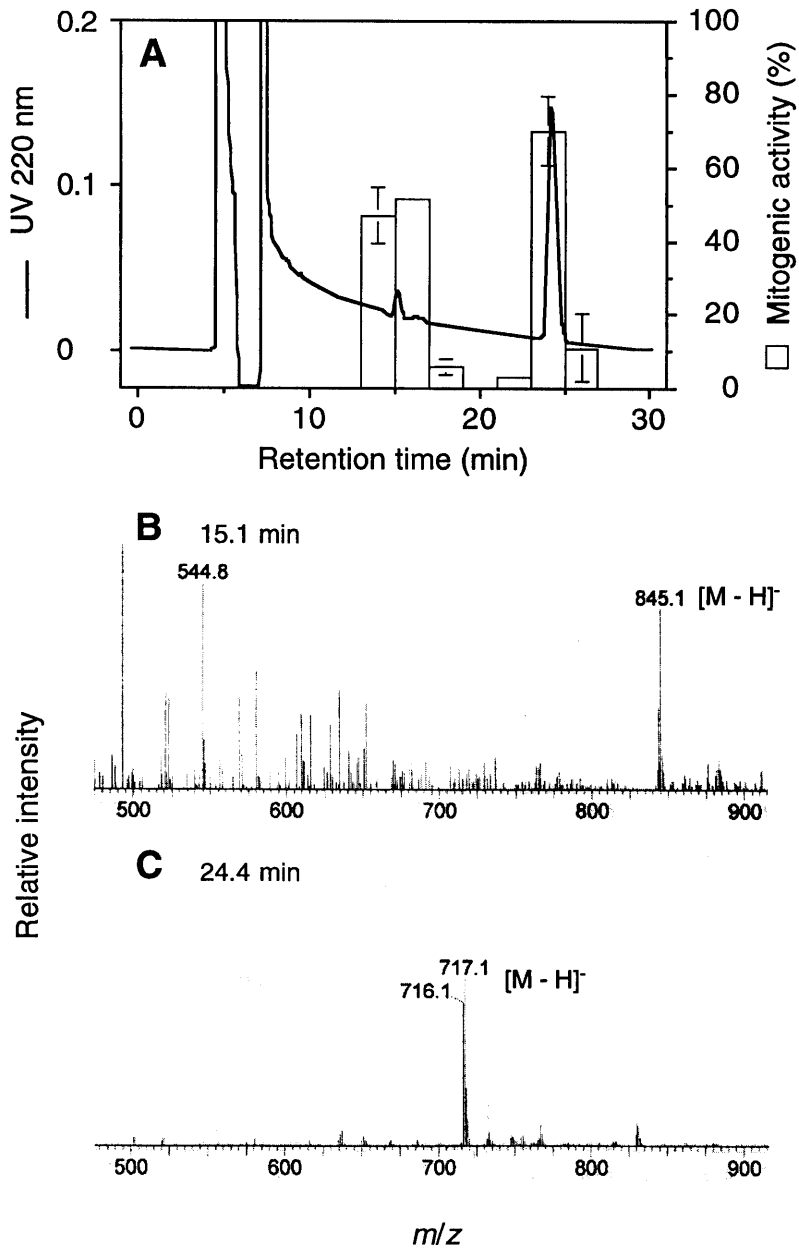


Fig. 30. HPLC profile and LC/MS spectra of the active principles. (A) Active fractions eluted from Bio-Gel P-2 column were dissolved in 200 µl of 0.1% TFA and separated on a reverse-phase column (Develosil ODS-5 (4.6 x 250 mm)) with 12% acetonitrile containing 0.1% TFA at 0.5 ml/min. (B) Mass spectra were obtained using a Fisons VG platform quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization, interfaced to a HPLC system. The HPLC eluate was split 1:9 so that 50 µl/min flowed to the mass spectrometer during separation.

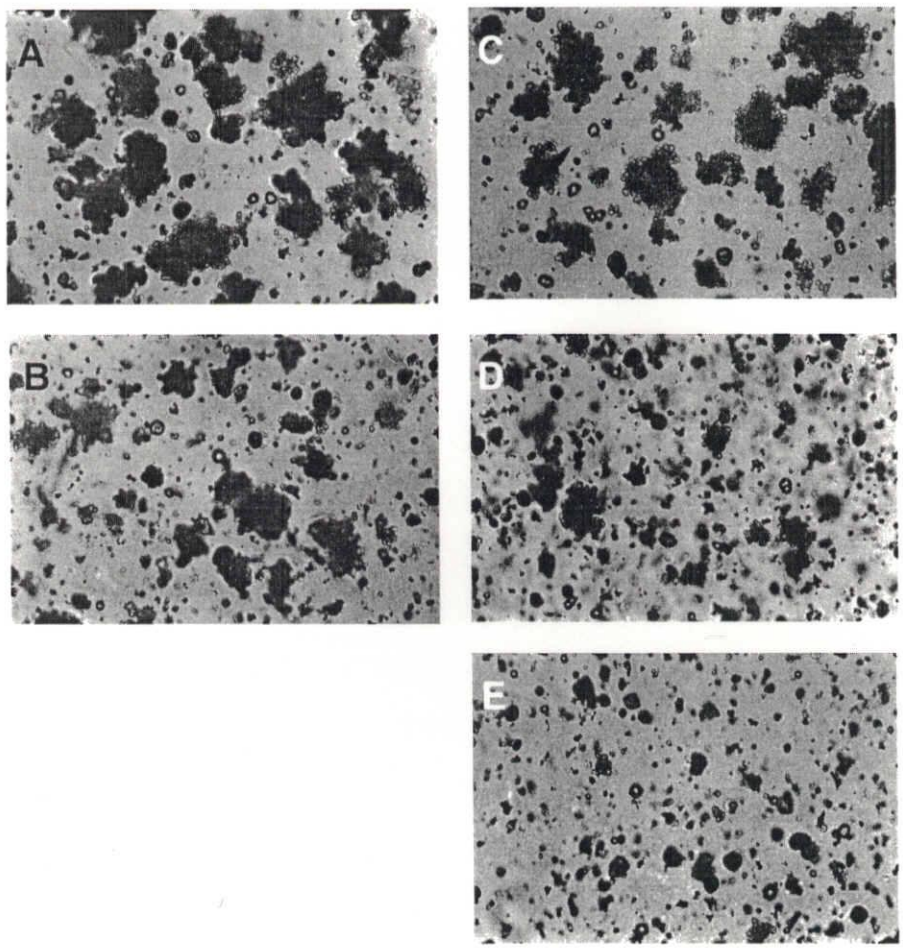


Fig. 31. Micrographs of microcalli derived from rice protoplasts. Rice protoplasts were plated in thin layers of agarose (0.4%) in a Petri dish at a density of 1.0×10^5 cells/ml. Agarose beds were then cut into 4 pieces, transferred to MS liquid medium containing 1.0 mg/l of 2,4-dichrolophenoxyacetic acid in the presence or absence of PSKs, and incubated at 25°C without shaking. After 4 weeks, total numbers of colonies (≥200 μm diameter) were scored under an inverted microscope. Colony formation frequency was as follows; 66.8 ± 7.5% (PSK-α, 1.0×10^{-6} M (A)), 39.4 ± 2.1% (PSK-α, 1.0×10^{-8} M (B)), 48.4 ± 3.0% (PSK-β, 1.0×10^{-6} M (C)), 16.4 ± 0.8% (PSK-β, 1.0×10^{-8} M (D)), 13.7 ± 2.3% (control (E)).

【材料および方法】

1，細胞の継代培養

イネ（*Oryza sativa* L. 5924）の細胞培養株Ocは，東京大学の庄野邦彦教授よりご恵与頂いた．継代培養は，14日おきに細胞培養液から，細胞を駒込ピペットを用いて10ml pcv程度を抜き取り，これを2,4-D 1.0 mg/lを含むMS培地200 mlの入った500 mlの三角フラスコに懸濁してシリコセンでふたをし，暗黒下25℃，120 rpmの条件下で振盪培養することにより行なった．

2，[^{35}S]PSK-αの合成

部分保護ペプチド－レジン，Boc-Tyr(OH)-Ile-Tyr(OH)-Thr(*t*-Bu)-Gln(*Trt*)-Linker-Resinは，第4章において述べた固相合成法によって合成した．New England Neucleaより購入した[^{35}S]sulfuric acid solution (800 MBq, 1,500 Ci/mmol, 1.0 ml)は，水溶液となっているためそのままでは合成に用いることができない．そこで，ゴム製キャップ付属のマイクロバイアル（Wheaton 986297）に移し，密栓した後，汚染防止のため活性炭を詰めた2.0 mlのシリンジをバイアルに刺し，シリンジを介して減圧下濃縮乾固後，1.3 μlのcold H_2SO_4を加えて2.0 Ci/mmolに調製した．次に，DMF-pyridine (4:1, 0.5 ml)に，部分保護ペプチド－レジン(5.0 μ mol)を懸濁し，1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide （EDC）(10 mg)を加えた後，[^{35}S]sulfuric acidの入ったバイアルに移し，室温で5日間撹拌した．5日後，反応溶液に1.3 μlのcold H_2SO_4を加えてさらに2日間撹拌を続けた．反応後，部分保護ペプチド－レジンをピペットマンチップで作ったミニカラムに回収し，1.0 mlの蒸留水で洗浄後，別のバイアルに移し，1.0 mlのTFAを加えて，室温において撹拌し，脱保護及びレジンからの切り出しを行なった．30分後，反応液を氷冷した10 mlのジエチルエーテルに加え，良く混合した後，遠心（1,000 rpm, 3.0 min）によってペプチドを回収した．沈殿したペプチドを，すぐに1.0% NH_4OH (1.0 ml) に溶解し，その遠心上清 (1,000 rpm, 3.0 min) をHPLCで精製することにより，[^{35}S]PSK-αを得た．精製は，Develosil ODS-UG-5 column（8.0 x 250 mm）を用い，0.1％酢酸アンモニウムを含む10%アセトニトリルを溶出溶媒として，流速2.0 ml/minにおいて行なった．保持時間12分程度の画分に溶出される[^{35}S]PSK-αを15 mlのファルコンチューブに回収後，凍結乾燥することにより，60 μg（収率1.4%）の[^{35}S]PSK-αを，比活性1.0 Ci/mmolで得た．

3，イネ細胞 subcellular 画分の調製

継代培養10日目のイネOc株懸濁細胞液600 mlから濾過（Advantec No. 2）によって細胞を回収し，約100 gの新鮮細胞を得た．この細胞を，150 mlの緩衝液（25 mM Tris-HCl, pH 7.0, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM dithiothreitol, 2.0 mM leupeptin, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 250 mM sucrose）に懸濁し，4℃においてブレンダーを用いて破砕（25,000 rpm, 5.0 min）した．得られたスラリーを2重のミラクロスで濾過後，濾液を順次遠心した（1,000 x *g*, 8,000 x *g*, 13,000 x *g*, 40,000 x *g*.）．それぞれの遠心操作で得られた沈殿を，ガラスホモジェナイザーを用いて5.0 mlの懸濁バッファー（10 mM MES, pH 5.8, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM sucrose）に懸濁し，イネ細胞 subcellular 画分とした．

4，バインディングアッセイ

イネOc株の懸濁細胞を用いたバインディングアッセイには，継代培養１０日目のイネ細胞を用いた．懸濁細胞を500 μmのステンレスメッシュで濾過し（クラスターが多い場合は，スパーテルの背を使って軽く押しつぶす），大きなクラスターを除いた後，遠心操作（100 x *g*, 3 min）によって細胞を回収し，アッセイバッファー（10 mM MES, 10 mM $MgCl_2$, 3% Mannitol, pH 5.8）に懸濁した．４℃で１時間静置後，細胞をアッセイバッファーで２回洗浄し，再びアッセイバッファーに懸濁して実験に用いた．アスパラガス葉肉細胞を用いたバインディングアッセイには，第１章で述べた方法にしたがって単離した細胞を，そのままアッセイバッファーに懸濁して用いた．

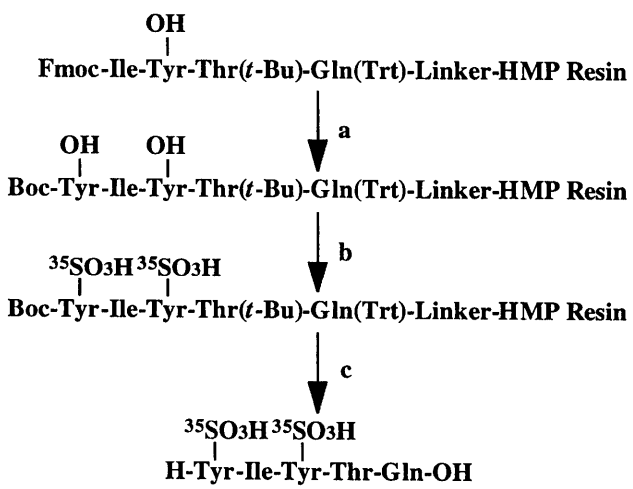
標準的なアッセイの場合は，15 mlのファルコンチューブに入れた5.0 mlの細胞懸濁液（イネの場合，0.5 ml packed cells (約2×10^6 cells) per 5.0 ml buffer，アスパラガスの場合，2×10^6 cells per 5.0 ml buffer）に，[^{35}S]PSK-αを最終濃度3.2×10^{-8} M（約2×10^5 cpm）となるように加え，80 rpmで水平振盪しながら４℃において４時間インキュベートした．非特異的結合量を測定する場合には，[^{35}S]PSK-αの100倍量の非ラベルPSK-αの存在下インキュベートを行なった．インキュベート後，細胞をガラス繊維濾紙（Advantec GC 50）で濾過し，5.0 mlのアッセイバッファーで２回洗浄（20秒以内）後，細胞を5.0 mlのシンチレーションカクテル（Amersham NCS-II）を入れたシンチレーションバイアルに移し，30分放置後，シンチレーションカウンター（Beckman LS-6500）を用いて結合した[^{35}S]PSK-αの量を測定した．アスパラガス細胞を用いた場合は，シンチレーションカクテルと混合する前に，10%アンチホルミンを2.0 ml加え30分間脱色し，さらに2.0 mlの50 mMチオ硫酸ナトリウムでアンチホルミンを分解する操作を行なった．

5，イネOc株由来のsubcellular画分を用いたバインディングアッセイの場合は，エッペンドルフチューブに入れた400 μlのsubcellular画分懸濁液に，最終濃度3.2 x 10^{-8} Mの[^{35}S]PSK-αを加え，氷上で4時間インキュベートした．非特異的結合量を測定する場合には，[^{35}S]PSK-αの100倍量（3.2 x 10^{-6} M）の非ラベルPSK-αの存在下インキュベートを行なった．次に，この懸濁液をエッペンドルフチューブに入れた0.5 M sucroseを含む1.0 mlのアッセイバッファー上に重層し，超遠心（86,000 x *g*, 5.0 min, 4℃）によってsubcellular画分を沈殿させ，リガンドと分離した．上清を慎重に除去した後，沈殿を500 μlの蒸留水に懸濁し，5.0 mlのシンチレーションカクテルを入れたシンチレーションバイアルに加え，30分放置後，シンチレーションカウンター（Beckman LS-6500）を用いて結合した[^{35}S]PSK-αの量を測定した．各subcellular画分に含まれる総タンパク質量は，bovine serum albuminを基準としてBradford法によって比色定量した（30）．

【結果および考察】

1, [^{35}S]PSK- αの化学合成

バインディングアッセイを行なうには, 高い比活性でラベルしたリガンドの調製が不可欠であるが, ペプチド性増殖因子の標識に多用される^{125}Iラベルは, チロシン残基が硫酸化されているPSK- αの場合, 芳香環オルト位への導入は化学的に不可能である. PSK- αは, 比較的低分子のペプチドであるため, 化学構造を変化させずに標識化するべきであり, また, 結果の信頼性の面では, 標識化する原子は活性の発現に不可欠の部位である方が望ましい. そこで本研究においては, PSK- αの活性の発現に必須の官能基である硫酸エステル部位に^{35}Sを導入し, ラベルを行なうことにした. 硫酸基導入のための試薬には, 前章で述べたように通常DMF-SO_3が用いられることが多いが, DMF-[^{35}S]SO_3は市販されておらず, 合成も困難であるため, 市販されている[^{35}S]sulfuric acidを利用して合成系路を確立することを試みた. 種々の検討の結果, 以下のような合成法を確立した (Scheme 2). この系で問題となったのは, 市販されている[^{35}S]sulfuric acidが水溶液となっているため, 減圧濃縮を行なわなければならない点であったが, 活性炭入りシリンジを介して減圧することで, 汚染をすることなく[^{35}S] sulfuric acidを濃縮することができた. 含有されている[^{35}S]sulfuric acidは体積にしてせいぜい1 nl程度であるので, 非ラベル濃硫酸を用いて希釈し, 化学合成に使用できうる量 (1.3



Scheme 2. The outline of the synthetic approach to PSK-α. a) Successive coupling of the Boc amino acid with the peptide chain constructed on the HMP resin using peptide synthesizer. b) Sulfation of Tyr with 20 eqiv. of [^{35}S]H_2SO_4 and EDC in DMF-pyridine (4 : 1). c) Final deprotection and cleavage from the resin conducted with 95% aqueous TFA.

μl) にした後，DMF-pyridine 中でEDCを縮合剤として用いて硫酸エステル化を行なった．比活性を高めるため，加えた非ラベル濃硫酸の量をできるだけ少量としたため，得られた[^{35}S]PSK-αの収率は低かったが，数百回のバインディングアッセイに使用できる程度の量を確保することができた．[^{35}S]PSK-αの比活性は，1.0 Ci/mmolであり，バインディングアッセイには，概ね利用可能であった．

2，細胞表面への[^{35}S]PSK-αの結合

まず，これまで実験に用いてきたアスパラガス葉肉細胞と，PSK-αを生産することが新たに判明したイネOc株懸濁細胞を用いて，細胞表面への[^{35}S]PSK-αの結合を解析した（Table 4）．その結果，32 nMの[^{35}S]PSK-α存在下でインキュベーションを行なった場合，アスパラガス細胞（10^7個）に対しては，50 cpm（50 fmol）程度の結合しか検出できなかったが，イネ細胞（10^7個）に対しては632 cpm（630 fmol）の有意な結合が観察された．従って，以後の実験には，イネOc株懸濁細胞を用いることにした．

次に，イネOc株懸濁細胞に対する[^{35}S]PSK-αの結合を，経時的に測定したところ，特異的結合量は時間とともに増加し，インキュベーションを開始してから240分後に600 cpm前後でほぼ一定となった（Fig. 32A）．ただし，総結合量と非特異的結合量は，240分後以降も緩やかに増加を続けた．一方，[^{35}S]PSK-αの存在下インキュベーションを開始してから240分後に，100倍量の非ラベルPSK-αを添加し，[^{35}S]PSK-αの解離曲線を測定したところ，非ラベルPSK-αの添加後60分間は急激な解離が観察され，その後も，3時間近くにわたって緩やかな解離が認められた（Fig. 32B）．従って，この結合は，可逆的であるということが確認された．また，インキュベーションを，種々の濃度の非ラベルPSK-αを共存させて行なった場合には，[^{35}S]PSK-αの特異的結合は，非ラベルPSK-αの濃度が高くなるにしたがって

Table 4. Binding of [^{35}S]PSK-α to asparagus mesophyll cells and rice suspension cells. Cell suspension in assay buffer containing 3.2 x 10^{-8} M [^{35}S]PSK-α (≈ 2 x 10^5 cpm) were incubated for 4 h with shaking at 80 rpm at 4°C in the absence or presence of 100-fold excess of unlabeled PSK-α. After incubation, the reaction mixture was filtered through a glass fiber filter and the cells were washed twice with the buffer. Radioactivity of bound [^{35}S]PSK-α was determined with a liquid scintillation counter in a 5.0 ml of scintillation cocktail.

Cells	Total binding (cpm)	Nonspecific binding (cpm)	Specific binding (cpm)
Asparagus mesophyll cells	317	267	50
Rice (Oc) suspension cells	1536	904	632

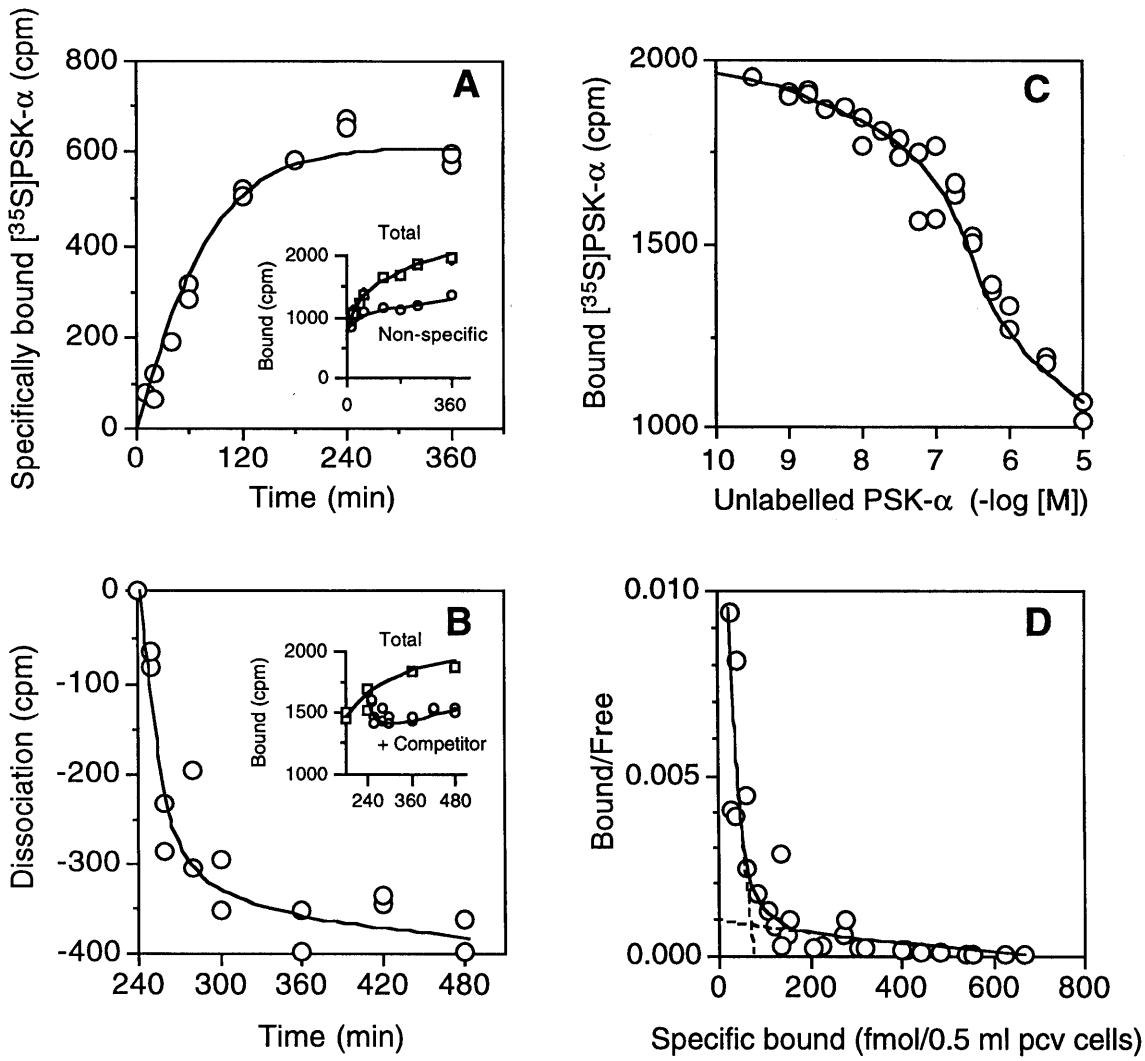


Fig. 32. (A) Specific binding of [^{35}S]PSK-α to rice suspension cells as a function of incubation time. Rice cells were incubated at 4°C in the presence of 32 nM [^{35}S]PSK-α and radioactivity of bound [^{35}S]PSK-α was determined at the indicated time. Specific [^{35}S]PSK-α binding is the binding displaceable by excess (100-fold) unlabeled ligand, obtained from total binding minus nonspecific binding (inset). (B) Kinetics of [^{35}S]PSK-α dissociation after addition of 3.2 μM of unlabeled PSK-α. Dissociation was started 240 min after initial incubation with [^{35}S]PSK-α by the addition of 3.2 μM of unlabeled PSK-α. Total binding curve after addition of the competitor was shown in inset. (C) Competitive displacement of [^{35}S]PSK-α by unlabeled PSK-α. Rice cells were incubated for 240 min at 4°C in the presence of unlabeled PSK-α at the indicated concentrations. (D) Scatchard plot of specifically bound [^{35}S]PSK-α. Non specific binding was subtracted from each value in Fig. 32C, and the resulting data were used for the Scatchard plot.

低下し，10^{-5} M付近でほぼ一定となった(Fig. 32C)．このFig. 32Cのデータをスキャッチャードプロットにより解析すると，Fig. 32Dに示すようにcurvi-linearな曲線が得られた．このことは，イネOc株懸濁細胞の細胞表面にあると考えられる[^{35}S]PSK-α結合部位は，結合定数の異なるものが2種類存在することを意味している．曲線に含まれる2つの直線の傾きと，それらのx切片から，高親和性型の結合部位の結合定数は1 x 10^{-9} Mであり，その数は1 x 10^{4} sites/cell，低親和性型の結合定数は1 x 10^{-7} Mであり，その数は1 x 10^{5} sites/cell程度であると計算された．

3，[^{35}S]PSK-αの結合の特異性

これまでの結果から，イネOc株懸濁細胞の細胞表面には[^{35}S]PSK-α結合部位が存在することが明らかとなったが，この結合部位が真に生物学的に意味のあるものかを評価するためには，その結合の特異性を確認する必要がある．そこで，先に合成した数種類のPSK-α類縁体を用いて，コンペティション実験を行なった．その結果，PSK-α類縁体のうち，チロシンの側鎖が2個とも硫酸化されたもののみが[^{35}S]PSK-αの結合を阻害し，活性を持たないPSK-α類縁体は全く[^{35}S]PSK-αとコンペティションしない，すなわち，生物活性と結合活性の間に非常に高い相関関係があることが確認された (Table 5)．従って，この実験系で検出されて

Table 5. Competitive displacement of [^{35}S]PSK-α by various PSK-α analogs. Rice cells were incubated with 32 nM of [^{35}S]PSK-α in the presence of 3.2 μM of various synthetic PSK-α analogs or 1.0 mg/l of NAA and 6-BA. After 240 min, cells were collected by filtration and analyzed for radioactivities. Abbreviations are as follows: [1-3]PSK-α; Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H), [2-5]PSK-α; Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln, [1-2]PSK-α; Tyr(SO_3H)-Ile, [OH]PSK-α; Tyr(OH)-Ile-Tyr(OH)-Thr-Gln.

Competitors	Bound [^{35}S]PSK-α (relative value)	Mitogenic activity (ED_{50}) (nM)
PSK-α	0.0	4
PSK-β	58.2	50
[1-3]PSK-α	26.2	20
[2-5]PSK-α	118.1	>1000
[1-2]PSK-α	103.6	>1000
[OH]PSK-α	97.6	>1000
NAA	114.5	-
6-BA	102.2	-
Control	100.0	-

いるPSK-α結合部位は，PSK-αの刺激を細胞内部に伝達し，細胞増殖に関連する様々な生理学的反応を引き起こすPSK-α特異的受容体またはその一部である可能性が高い．

また，Table 5に示したように既知の植物ホルモンであるNAAや6-BAは，全く[^{35}S]PSK-αの結合を阻害することはなく，PSK-αとその受容体によって形成される信号伝達系路は，既知の植物ホルモンの関与する信号伝達系路とは，少なくとも受容体が刺激を受ける段階では，独立した経路であると考えられる．

4，PSK-α結合部位は細胞膜に存在するか？

ほ乳類等の動物では，ペプチド性増殖因子は数多く知られており，その受容体は通常細胞膜上に存在することが知られている（31，32）．しかし，これまでの結果では，PSK-α結合部位が細胞表面に存在することは確認されたが，それが細胞膜上に存在するかどうかは不明である．そこで，イネOc株懸濁細胞を破砕後，超遠心することによって種々のsubcellular画分を調製し，各画分に対する[^{35}S]PSK-αの結合を測定した（Table 6）．その結果，[^{35}S]PSK-αは，主として13,000 x gおよび40,000 x gの画分に対して高い親和性を示し，1.0 mgタンパク質あたり40から60 fmol程度の特異的結合が観察された．超遠心による段階分画法では純粋な膜画分を得ることはできないが，植物細胞の細胞膜は主として13,000 x gから40,000 x gの画分に濃縮されることが報告されている（33）．従って，イネOc株懸濁細胞に存在するPSK-α結合部位は，細胞膜に局在することが強く示唆される．また，この画分に検出された結合部位が，結合定数において2種類に分けられる受容体のうち，いずれであるかについてはこの結果からだけでは判断できないが，バインディングアッセイにおける非結合リガンドの除

Table 6. Binding of [^{35}S]PSK-α to various centrifugation fractions of rice cell membranes. Rice cell homogenate was filtered and successively centrifuged at various forces. The membrane pellets were suspended in binding buffer and aliquots (400 μl) of membrane suspensions were incubated with 32 nM of [^{35}S]PSK-α for 240 min at 4°C in the absence or presence of 100-fold excess of unlabeled PSK-α. After incubation, the reaction mixture was overlaid onto 1.0 ml of binding buffer containing 0.5 M sucrose and centrifuged at 86,000 x *g* for 5.0 min at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet was analyzed for radioactivities.

Centrifugation force	Total protein/assay (mg)	Specific binding of [^{35}S]PSK-α (fmol)	Specific binding /mg protein (fmol)
1,000 x *g*, 10 min	10.2	19.1	1.9
8,000 x *g*, 15 min	8.8	114.0	13.0
13,000 x *g*, 15 min	1.8	80.5	44.7
40,000 x *g*, 30 min	1.5	90.1	60.1

去操作に超遠心法（86,000 x g, 5.0 min, 4℃）を用いている本実験では，解離の速い低親和性結合部位はほとんど検出されない可能性もあると考えられる．

本章においてはPSK-αの特異的受容体について解析してきたが，イネOc株の場合それが細胞表面，おそらくは細胞膜上に存在し，細胞内へPSK-αの刺激を伝達していることは間違いないであろう．しかし，親和性の異なる２種類の結合部位がそれぞれどのような役割を担っているかは，現在のところ全く不明である．また，結合部位がイネOc株懸濁細胞においては細胞あたり 1×10^5 sites/cell 程度も存在するのに対し，アスパラガス葉肉細胞ではその１０分の１程度しか観察されなかったことが何を意味するのかについても興味が持たれる．一般的に単子葉植物の細胞は，双子葉植物の細胞に比べ増殖速度が遅いことが多いが，イネOc株懸濁細胞は例外的に増殖能力が高いことが知られており，トランスジェニック細胞の再分化の際などにナースセルとしてしばしば用いられる細胞である．このOc株の増殖能力の高さは，ひとつにはPSK-αを比較的多量に生産するためであると考えられるが(29)，今回明らかとなったPSK-α受容体の数の多さとの間にも，何らかの因果関係があるのかもしれない．

植物細胞は，低細胞密度で培養を行なうとその増殖が抑制されてしまうという事実は古くから知られており，またCM中にその抑制を解除する増殖因子が含まれていることも，既に1970年代初頭から明らかとなっていた．しかし，その物質すなわち植物細胞増殖因子の本体を明らかにしようとする試みは長らく成功せず，我々が1996年にアスパラガス葉肉細胞由来のCMから単離したphytosulfokine-α（PSK-α）が最初の例となった．この際にとったアプローチは，オーキシンとサイトカイニンの存在下でも増殖できない初期密度で細胞を培養し，ここにCMを与えた場合に観察される細胞増殖を指標に活性物質を精製するという天然物化学的なものである．したがって，単独で活性を示す物質である限り必ず生物検定において検出されるため，PSK-αがCMに含まれる主要な細胞増殖因子であると結論づけることができる．そしてもう一つ重要なことは，PSK-αがユリ科植物であるアスパラガス細胞だけではなく，イネ科の植物であるイネ細胞によっても生産され，また同時にその細胞の増殖を強く促進する作用を持つということである．この事実は，PSK-αが決して種特異的な因子ではなく，植物界においてかなり普遍性を持っている可能性を示しており，今後その生理学的解析を行なうに十分値する生理活性物質であると言えるであろう．

CM中から細胞増殖因子が見出された例は，動物細胞においてはcolony stimulating factor（34）やT-cell growth factor（35），transforming growth factor（36）など10種類程度が知られており，今後もまだ未知の増殖因子が発見される可能性があると考えられている．これらの因子には，同種あるいは異種の細胞同士を近接させて培養した場合に観察される細胞間相互作用（例えばある種の形態変化など）がきっかけとなって発見されたものも少なくない．例えばNGFは，マウス肉腫180または37の組織片をニワトリ胚知覚神経節と近接培養すると，神経節から組織片に向かって無数の神経線維の伸長が観察されたことが，その後の詳細な研究の端緒となっている（37）．

ところで，意外に知られていないが，植物の場合においても，このような細胞間相互作用が観察される例が細胞増殖以外にもいくつか報告されている．そのひとつにヒャクニチソウ葉肉細胞における仮導管の形成がある．アスパラガスの場合と同様に機械的に遊離させたヒャクニチソウ葉肉細胞は，オーキシンとサイトカイニンの存在下において比較的短期間に仮導管細胞へと分化するが，10^4 cells/ml以下の細胞密度では分化率が著しく低下することが知られている（38）．この場合，仮導管への分化は細胞分裂を伴わずに進行することが証明されていることから，低細胞密度時における分化率の低下は細胞増殖が抑制されることによって2次的に引き起こされた結果ではない．また，ニンジンにおける不定胚形成系においても密度効果が報告

されており，低密度では不定胚形成率が低下することが知られている（39）．ただし，この際の変化率は細胞増殖や仮導管の形成の場合のように劇的なものではない．これまで，このような細胞分化はオーキシンやサイトカイニンの生理作用と関連づけて論じられてきたが，これらの植物ホルモンが存在しても密度効果が認められるという事実は，まだ他にも細胞が未知の因子を生産し，それが細胞分化に深く関与していることを示唆している．

さて，PSK-αの単離によってCMに含まれる増殖因子が“何であるか”については結論が出されたが，同時に，PSK-αが“どのように”細胞増殖を誘導するのかという重要な問題が提起された．この点については数多くのアプローチが考えられるが，本研究ではまずオーキシンやサイトカイニンとPSK-αとがどのように相互作用して細胞増殖を誘導するのかを解明するための第1段階として，これら3種類の因子が個別あるいは複数で投与された場合に，細胞増殖の第一段階であるDNA複製が行なわれるかどうかを検討した．その結果，第6章に述べたように，低密度域における細胞増殖は3種類の因子のうちどれか一つでも欠けてしまうと誘導されないことが示され，これらの因子の共存が細胞増殖に必須であることが示された．このことは，細胞増殖には不可欠であるにもかかわらず，オーキシンやサイトカイニンによっては全く活性化されないある種の信号伝達系をPSK-αが活性化していることを強く示唆しており，この系を明らかにすることは今後PSK-αの作用機構を解明する上で極めて重要な意味を持つと考えられる．

80年後半から，既知の植物ホルモンとは異なるいくつかの植物生理活性物質，例えばelicitorに総称されるオリゴサッカライド（40）やsystemin（41），nod factor（42）などが発見され，それぞれの作用機構が盛んに研究されるようになったが，これらの因子は，高い親水性のために細胞膜を通過することができないという点で既知の植物ホルモンと化学的に大きく異なる．そしてこのことは，細胞表層に特異的受容体が存在することを強く示唆するため，細胞そのものや膜画分を用いて数多くのバインディングアッセイや，リガンドの架橋実験が行なわれた結果，それぞれの因子に特異的な結合部位が存在することが明らかとなってきている（43-46）．中でも，elicitorについては最近細胞膜上に存在する特異的結合タンパクが単離，クローニングされ，その構造が明らかとなったが，免疫化学的に細胞膜上に存在することが示されているにも関わらず，そのアミノ酸シークエンスから推定する限り，明確な膜貫通部位が見いだされていない（47）．しかし，この結合タンパクのエリシターに対するK_dは3.6 nMとかなり高い値を示し，レセプターの候補になりうると考えられる．Systeminの場合は，SBP40と名付けられた結合タンパクが架橋実験により同定され，その機能の解析が進められているが，このタンパクはsystemin切断活性を保持しており，プロテアーゼの一種でもあると考えられている（45）．またnod factorに関しては，バインディングアッセイの結果からK_dが1.6 nM

程度の特異的受容体が存在することが明らかとなっているが，興味深いことにこの結合活性は細胞膜画分よりもやや密度の高い画分に見いだされることが報告されている（46）.

PSK-αの関与する初期信号伝達系の解明にも，その特異的結合部位の解析が不可欠であると考えられるが，第7章において述べたように，イネ懸濁培養株（Oc）の細胞表層には高親和性と低親和性の2種類の結合部位が存在することが確認された．高親和性型の結合部位のK_dは1.0 nMとかなり高い値を示しており，PSK-αが生物活性を示す最低濃度が1.0 nMであることから考えてレセプターの有力候補となりうるのではないだろうか．その一方，低親和性結合部位は，高親和性のものに比べて数が約10倍も多く存在しているが，親和性は100分の1程度しか示さないことから，実際にどのような生理学的意味を持つのかは現在のところ不明である.

動物細胞においては，キナーゼカスケードの発見など細胞内信号伝達系の解明が，EGFに代表されるペプチド性細胞増殖因子の発見と，それに引き続くレセプタータンパクの解析に端を発していることはよく知られているが，現在までに分かっている実験的事実から，細胞膜上に存在する種々のレセプター分子をそれらの刺激伝達機構の観点から分類すると次のようになる（Table 7）．最も古くから研究され，細胞増殖に重要な増殖因子であるepidermal growth factor（EGF）やplatelet-derived growth factor（PDGF），insulinなどのレセプターは1カ所の膜貫通部位を持ち，細胞内のチロシンキナーゼ部位が増殖因子の刺激に反応して自己リン酸化を起こすことが知られている（48，49）．これに対しTGF-βファミリーと呼ばれる一連の増殖因子に対するレセプターの場合は，セリン・スレオニン型キナーゼ活性を持っている（50）．また，ボンベシンやエンドセリンなどの低分子ペプチド性増殖因子のレセプターはキナーゼ活性を保持していない場合が多いが，G-proteinを介してホスホリパーゼCなどのセカンドメッセンジャーを活性化することにより，細胞内に刺激が伝達されることが明らかにされている（51）．植物細胞の場合は，特定のリガンドに対するレセプターの解析が遅れていたため，細胞内信号伝達系路の起点にあたるレセプターの細胞内ドメインがどのような構造をしているのか長い間不明であったが，近年植物ホルモンの一つであるエチレンのレセプターと考え

Table 7. Classification of the receptors for various peptidal growth factors.

Growth factors	Receptor type
Insulin, EGF, PDGF, *etc.*	Tyrosine kinase
TGF-β family	Serine/Threonine kinase
Bombesin and endothelin family	G-protein coupled receptor

られるタンパク質の構造が遺伝学的方法により解明され，ヒスチジンキナーゼ活性を持つ two-component system であることが明らかにされた（52）．Two-component system は微生物の環境応答系において見出されている信号伝達機構であるが（53），このような系が生物種を越えて保存されていることは注目に値する．

ところで，チロシン残基が硫酸エステル化された構造を持つペプチドやタンパクが生理活性を持つ例は，植物界ではPSK-αが最初であるが，動物界ではガストリンやCCK-8をはじめとして約30種類が既に知られている．そのうちの主なものをTable 8に示すが，これらに共通するのは，すべて細胞外分泌型のペプチドやタンパクである点であり，トランスゴルジネットワークを経由する間に硫酸化およびプロセッシングを受けるものと考えられている．このよ

Table 8. Tyrosine-sulfated proteins and peptides.

Protein and peptide	Origin
α-2-antiplasmin	human
α-fetoprotein	human
α-2-macroglobulin	rat
caerulein	frog
cholecystokinin (CCK)	dog, human, pig
complement C4	human, mouse
dermatan sulfate	human
entactin/nidogen	mouse
factor X	cow
fibronectin	hamster, human, rat
gastrin	various mammals
hirudin	leech
leucosulfakinin	cockroach
[Leu]enkephalin	various mammals
phyllokinin	frog
secretogranin I	cow, rat
S-protein/vitronectin	human
SG70	volvox
yolk protein 1	fruitfly

うなチロシン残基特異的な硫酸化には，前駆体タンパク質にある種のシグナル配列が存在していることが予想されるため，硫酸化チロシン残基の前後のアミノ酸配列について相同性の有無が検討された．その結果，酸性アミノ酸が比較的多く存在する傾向が見いだされているが(54)，シグナル配列と考えられる保存配列は現在のところ特に確認されていない．また，タンパクリン酸化が細胞内信号伝達系において可逆的なスイッチの役割を果たすことが知られているのに対し，硫酸化は基本的に非可逆的であると考えられており，その本質的役割は現在でもよく分かっていない．しかし，硫酸エステル化されたチロシン残基に隣接したアミノ酸がプロテアーゼによるペプチド結合の分解に対して抵抗性を示す例が知られており（16)，硫酸化という翻訳後修飾は，細胞外において機能するタンパクやペプチドを，細胞外に存在する酵素による分解から保護する働きをしているのかもしれない．

チロシンの硫酸化がこれまであまり見いだされていない理由のひとつに，プロテインシークエンサーのエドマン分解に用いられるTFAの酸性条件下では，硫酸化チロシンの硫酸基が完全に加水分解されてしまい未修飾のチロシンとして検出されてしまうことが挙げられる(19)．このため，プロテインシークエンサーで部分配列を解析し，クローニングによってタンパクの全長を決定するという現在の手法では，硫酸化修飾の有無を知ることはできない．この点は，シークエンサー上でブランクとして検出されるリン酸化アミノ酸や糖鎖付加アミノ酸の場合と大きく異なる．したがって，年々登録数が増加し続けているプロテインデーターベースにも，硫酸化修飾を受けていることが知られないまま登録されているものがいくつか存在する可能性があるということを考慮すべきであろう．

最近，体細胞クローンによるクローン羊の誕生がマスコミで話題になったが，植物の世界では数十年も前から体細胞クローンの作出が当たり前のこととして行なわれてきた．動物組織は一度分化してしまうとその状態を維持するのに必要な遺伝子以外は完全に休眠してしまい，容易に再活性化されないが，植物組織の場合はオーキシンとサイトカイニンを含む培地に移すことで未分化の細胞塊の状態に戻り，その後これらのホルモンの組成を変化させると初期発生に必要な遺伝子群が再活性化され，不定芽や不定根を再分化したり，あるいは不定胚を経て直接植物体を形成する性質を持っている．このような植物の分化全能性を発揮させるのに必須な過程のひとつが細胞の脱分化及びカルス増殖であるが，これまでに得られた実験的事実からPSK-αがこれらの過程に深く関わっている可能性は極めて高い．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．実際に，予備的実験ではあるが，抗PSK-αモノクローナル抗体を高細胞密度培養液に加えて培養すると，たとえオーキシ

ンとサイトカイニンが存在しても，細胞増殖がかなり抑制されることが確認されている．現在，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，特異的レセプター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．

謝辞

本テーマを頂くとともに，本研究の遂行，論文作成において終始適切な御指導を賜りました，生理活性物質化学講座の坂神洋次教授に深く感謝の意を表します。先生のご配慮により，極めて良い環境の中で研究を行なうことができました.

イネの培養細胞株（Oc）をご恵与いただいた，東京大学教養学部の庄野邦彦先生および，アリルスルフォトランスフェラーゼをご恵与いただいた，富山薬科大学の小橋恭一先生，富士薬品工業（株）の森川忠則博士に深謝いたします．イネOc株は，PSK-α結合部位の解析において不可欠の植物材料であるとともに，現在進めているクローニングの仕事にも極めて有益な情報を与えてくれました．アリルスルフォトランスフェラーゼは，PSK-αの構造確認の際に重要な役割を果たしました．この酵素を用いて合成した硫酸化ペプチドが，細胞増殖誘導活性を持つことが確認された日のことは今でも強く印象に残っています.

また，適切なる御助言、御指導を賜りました小鹿　一先生並びに、原　修先生（現千葉大学薬学部），羽鳥　真先生、浅野友世技官に深く感謝いたします。小鹿　一先生には，有機化学的見地から有益な御助言を頂きました．原　修先生には，PSK-α類縁体の化学合成系を確立する際に，有機合成化学的見地から適切な御指導をして頂くとともに，千葉大学に移られるまでの間，研究全般にわたり数々の議論につきあって頂きました．羽鳥　真先生には，4年生で研究室に配属となって以来6年間にわたって，公私ともにお世話になり，楽しい研究生活を送ることができました．浅野友世技官にも，6年間にわたってお世話になりました.

さらに，研究を進行するにあたって有益な御助言を頂いた，名古屋大学農学部生物化学講座の中村研三先生，松岡　健先生，筑波大学生物科学系の鎌田　博先生，佐藤　忍先生に感謝いたします.

最後に，研究の遂行に協力していただいた共同研究者の方々（高木麗子さん（第7章），花井秀俊君（第4章））および，名古屋大学農学部技官の北村繁幸氏（質量分析機），名古屋大学農学部生体高分子学講座の森山龍一先生（ペプチドシークエンサー），生理活性物質化学講座，生物化学講座，アイソトープ総合センターの皆様に深く感謝いたします.

なお，本研究は日本学術振興会特別研究員制度および生物系特定産業技術研究推進機構から補助を受けて行なわれました．関係諸氏に感謝いたします.

松林　嘉克

引用文献

(1) Stuart, R. & Street, H. E. (1969) *J. Exp. Bot.* 20, 556-571.

(2) Bayley, J. M., King, J. & Gamborg, O. L. (1972) *Planta* 105, 25-32.

(3) Sargent, P. A. & King, J. (1974) *Can. J. Bot.* 52, 1747-1755.

(4) Bellincampi, D. & Morpurgo, G. (1987) *Plant Sci.* 51, 83-91.

(5) Bellincampi, D. & Morpurgo, G. (1989) *Plant Sci.* 65, 125-130.

(6) Somers, D. A., Birnberg, P. R., Petersen, W. L. & Brenner, M. L. (1987) *Plant Sci.* 53, 249-256.

(7) Birnberg, P. R., Somers, D. A. & Brenner, M. L. (1988) *J. Plant Physiol.* 132, 316-321.

(8) Schroer, R., Gartner, F., Steinbrenner, B., Knoop, B. & Beiderbeck, R. (1989) *J. Plant physiol.* 135, 422-427.

(9) Schroder, R. & Knoop, B. (1995) *J. Plant physiol.* 146, 139-147.

(10) Teasdale, R. D. & Richards, D. K. (1991) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26, 53-59.

(11) Julien, M. (1973) *Z. Pflanzenphysiol.* 69, 129-141.

(12) Paul, E., Harikrishna, K., Fioroni, O. & Draper, J. (1989) *Plant sci.* 65, 111-117.

(13) Gregory, H., Hardy, P. M., Jones, D. S., Kenner, G. W. & Sheppard, R. (1964) *Nature* 204, 931-933.

(14) Mutt, V. & Jorpes, J. E. (1968) *Eur. J. Biochem.* 6, 156-162.

(15) Huttner, W. B. (1982) *Nature* 299, 273-276.

(16) Anastasi, A., Erspamer, V. & Endean, R. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 57-68.

(17) Ondetti, M. A., Pluscec, J., Sabo, E. F., Sheehan, J. T. & Williams, N. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* 92, 195-199.

(18) Dell, A., Rogers, M. E. & Thomas-Oates, J. E. (1988) *Carbohydr. Res.* 179, 7-19.

(19) Nachman, R. J., Holman, G. M., Haddon, W. F. & Ling, N. (1986) *Science* 234, 71-73.

(20) Muramatsu, R., Nukui, E., Sukesada, A., Misawa, S., Komatsu, Y., Okayama, T., Wada, K., Morikawa, T., Hayashi, H. & Kobashi, K. (1994) *Eur. J. Biochem.* 223, 243-248.

(21) Hayes, T. K. & Keeley, L. L. (1990) *J. Comp. Physiol.* 160(B), 187-194.

(22) Sakano, K., Matsumoto, M., Yazaki, Y., Kiyota, S. & Okihara, K. (1995) *Plant Sci.* 107, 117-124.

(23) Murashige, T. & Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant* 15, 473-497.

(24) Padgett, P. E. & Leonard, R. T. (1993) *Plant Physiol.* 101, 141-146.

(25) Kirkby, E. A. & Mengel, K. (1967) *Plant Physiol.* 42, 6-14.

(26) Kurz, W. G. W. & Constabel, F. (1985) *CRC Crit Rev Biotechnol.* 2, 105-118.

(27) Scher, C. D., Shepard, R. C., Antoniades, H. N. & Stiles, C. D. (1979) *Biochem. Biophys. Acta.* 560, 217-241.

(28) Baba, A., Hasazawa, S. & Shono, K. (1986) *Plant Cell Physiol.* 27, 463-472.

(29) 高木麗子 (1996) 名古屋大学農学部, 生命農学研究科, 修士論文.

(30) Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

(31) Carpenter, G., Lembach, K. J., Morrison, M. M. & Cohen, S. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4297-4304.

(32) Glenn, K., Bowen-Pope, D. F. & Ross, R. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 5172-5176.

(33) Leonard, R. T. & VanDerWoude, W. J. (1976) *Plant Physiol.* 57, 105-114.

(34) Burgess, A., Camakaris, J. & Metcalf, D. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 1998-2003.

(35) Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. & Gallo, R. C. (1976) *Science* 193, 1007-1008.

(36) Todaro, G. J., DeLarco, J. E. & Fryling, C. M. (1982) *Federation Proc.* 41, 2996-3003.

(37) Levi-Montalcini, R., Meyer, H. & Hamburger, V. (1954) *Cancer Res.* 14, 49-57.

(38) Fukuda, H. & Komamine, A. (1980) *Plant Physiol.* 65, 57-60.

(39) Hari, V. (1980) *Z. Pflanzenphysiol.* 96, 227-231.

(40) Dixon, R. A. & Lamb, C. J. (1990) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 339-367.

(41) Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. & Ryan, C. A. (1991) *Science* 253, 895-898.

(42) Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J. C. & Denarie, J. (1990) *Nature* 344, 781-784.

(43) Schmidt, W. E. & Ebel, J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4117-4121.

(44) Yoshikawa, M., Keen, N. T. & Wang, M. C. (1983) *Plant Physiol.* 73, 497-506.

(45) Schaller, A & Ryan, C. A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11802-11806.

(46) Bono, J. J., Riond, J., Nicolaou, K. C., Bockovich, N. J., Estevez, V. A., Cullimore,

J. V. & Ranjeva, R. (1995) *Plant J.* 7, 253-560.

(47) Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N. & Ishida, I. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1029-1034.

(48) Gozes, I. & Littauer, U. Z. (1978) *Nature* 23, 409-413.

(49) Petruzzelli, L., Herrera, R. & Rosen, O. M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3327-3331.

(50) Atfi, A., Lepage, K., Allard, P., Chapdelaine, A. & Chevalier S. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12110-12114.

(51) Feldman, R. I., Wu, J. M., Jenson, J. C. & Mann E. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 17364-17372.

(52) Hua, J., Chang, C., Sun, Q. & Meyerowitz, E. M. (1995) *Science* 269, 1712-1714.

(53) Burg, M. B., Kwon, E. D. & Kultz, D. (1996) *FASEB J.* 10, 1598-1606.

(54) Lee, R. W. & Huttner, W. B. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11326-11334.

報文目録

(1) Matsubayashi, Y. & Sakagami, Y.
Phytosulfokine – Sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 7623–7627 (1996)

(2) Matsubayashi, Y., Hanai, H., Hara, O. & Sakagami, Y.
Active fragments and analogs of the plant growth factor, phytosulfokine: Structure–activity relationships.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 225, 209–214 (1996)

(3) Matsubayashi, Y. & Sakagami, Y.
Effects of the medium ammonium–nitrate ratio on competence for asparagus cell division induced by phytosulfokine– α .
Plant Cell Rep. in press. (1997)

(4) Matsubayashi, Y., Takagi, L. & Sakagami, Y.
Phytosulfokine– α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells via specific high and low affinity binding sites.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. acceptable with a minor revision. (1997)