

タバコ懸濁培養細胞のオーキシン独立な細胞分裂を誘導する 新奇糖タンパク質 (NtXYL1) の発現および機能解析

上地, 泰廣 / Uechi, Yasuhiro

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

58

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2017-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00014375>

タバコ懸濁培養細胞のオーキシン独立な細胞分裂を誘導する 新奇糖タンパク質 (NtXYL1) の発現および機能解析

Elucidation of the function of a novel glycoprotein (NtXYL1)
that induces auxin-independent cell division of tobacco suspension cell lines

上地泰廣

Yasuhiro Uechi

指導教員 佐野俊夫

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻植物医科学領域修士課程

For plant cell growth, it is generally necessary to supply factors that induce cell division such as auxin. However, it is known that cell proliferation becomes possible without the addition of auxin to the medium during the continuous cell culture. This phenomenon that physiologically adapts to changes in the environment is called habituation. In tobacco cell lines, that could proliferate without auxin was isolated in which a glycoprotein named NtXYL1 was thought to be involved.

In this study, to investigate the involvement of NtXYL1 in the auxin-independent cell proliferation, gene expression of *NtXYL1* was examined during cell proliferation and the *NtXYL1*-overexpressing cell lines were prepared. As I found that several overexpressing lines could grow on the medium with a reduced auxin concentration, NtXYL1 was considered to be involved in the auxin-independent cell proliferation. Although gene expression of *NtXYL1* was auxin-independent, the relationship between the induction of cell division by auxin and the function of NtXYL1 was discussed.

Key Words: auxin, cell division, glycoprotein, NtXYL1

1. 緒言

植物細胞を増殖させるためには一般的にオーキシンなどの細胞分裂を誘導する因子を継続的に供給する必要がある。しかし、培養を続けているうちに培地にオーキシンを添加せずとも増殖が可能になる例が知られており、このように環境の変化に対して生理的に順応する現象は馴化と呼ばれている¹。タバコ培養細胞 BY-2 はタバコ胚軸由来する培養細胞株であり、増殖にオーキシンを必要とするが、培養を続けているうちに増殖にオーキシンを必要としない培養株 (2B-13 株) が単離されている。

タバコ BY-2 細胞をオーキシンを欠損した培地中で培養すると増殖が停止し、オーキシンを再添加すると増殖が再開するが、オーキシンの代わりにタバコ 2B-13 株の培養液や BY-2 細胞抽出液を添加することでも増殖が誘導されることが見出された²。そこで、2B-13 株の培養液や BY-2 細胞抽出液には何らかの細胞分裂誘導因子が含まれると考えられ、分画と増殖検定を繰り返した結果、糖タンパク質の一種に細胞分裂誘導活性があることが示された。アミノ酸配列を決定した結果、この糖タンパク質は糖鎖修飾酵素 β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase (XYL) と相同性が高かったことから NtXYL1 と名付けられた²。シロイヌナズナにおいても相同遺伝子 *AtXYL3* および *AtXYL4* が存在し^{3,4}、それらのプロモーター領域にはオーキシン関連遺伝子特異的配列 (ARF binding motifs: TGTCTC) が存在することから、タバコ *NtXYL1* 遺伝子もオーキシンによる発現誘導調節を受ける可能性が考えられる。

先行研究において、*NtXYL1* を強発現させた形質転換 BY-2 細胞はオーキシンを通常の 1/10 量まで減少させた培地上でも増殖を維持することが見いだされた (長崎, 2014)。そのため *NtXYL1* はオーキシンによる細胞分裂誘導に関与すると考えられた。そこで、本研究では *NtXYL1* を強発現させた BY-2 細胞における *NtXYL1* の発現を定量し、細胞分裂と発現量の関係を解析した。そして、オーキシンを欠損した培地中で培養した BY-2 細胞における *NtXYL1* の発現を定量し、オーキシンによる発現量の変化を解析した。また、*NtXYL1* の上流配列を単離し、オーキシン特異的配列を探索した。これらの結果から、オーキシンによる細胞分裂誘導と *NtXYL1* との関係を検討した。

2. 実験方法

①細胞培養条件

タバコ BY-2 細胞はオーキシンを含む改変リンスマイヤー・スクーグ培地 (L 培地) で 1 週間ごとに継代した。いっぽう、オーキシン非依存株 2B-13 はオーキシンを加えない培地 (D 培地) で継代した。

②*NtXYL1* のプロモーター領域の単離

まず、タバコ BY-2 細胞からゲノム DNA を DNA 抽出キット (Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit, FAVORGEN) を用いて抽出した。*NtXYL1* プロモーター領域の単離には RightWalk Kit (ベックス) を用いた。抽出したゲノム DNA を 4 種類の制限酵素 (*Bam*H I, *Bgl* II, *Spe* I, *Xba* I) でそれぞれ切断し、キット付属のアダプター-DNA を結合させ、ゲノム断片ライブラリを作成した。*NtXYL1* の cDNA 塩基配

列を基に *NtXYL1* 特異的なプライマーを設計し、アダプター配列に相当するプライマーとの組み合わせで PCR を行った。さらに、*NtXYL1* との特異性を高めるために、それぞれの配列の内側にもプライマーを設計し Nested PCR を行った。得られた PCR 産物はクローニング用 T-ベクター pMD20 (タカラ) に組み込み、PCR 産物の塩基配列を決定した。また、シロイヌナズナ DNA 中のプロモーター配列は、Arabidopsis Gene Regulatory Information Server (AGRIS オハイオ州立大学) を用いて解析した。

③ *NtXYL1* 強発現 BY-2 細胞の作出

バイナリーベクター pGWB8 に *NtXYL1* を、対照として *GFP* 遺伝子をそれぞれ挿入したプラスミドを作成した。pGWB8 はカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター領域を持つ、発現ベクターである。これらのプラスミドをアグロバクテリウム (LBA4404 株) に導入したのち、BY-2 細胞の形質転換をした。

④ *NtXYL1* 遺伝子の発現解析

タバコ培養細胞、およびタバコ培養細胞カルの RNA は RNA 抽出キット (Plant Total RNA Extraction Mini Kit ,FAVORGEN) を用いて抽出し、逆転写酵素 (ReverTraAce, TOYOBO) を用いて cDNA を合成した。発現量解析は Real-time PCR 法を用い、*NtXYL1* 遺伝子以外に、細胞分裂の指標としてサイクリン遺伝子 *NtCycB* を、内在性コントロールにはコビキチン遺伝子 *NtUBII* を用いた。

3. 結果

植え継ぎ後 3 日目の BY-2 細胞、オーキシンを含まない培地で培養した BY-2 細胞、および 2B-13 細胞における *NtCycB* と *NtXYL1* の発現量を調べた (図 1)。その結果、*NtXYL1* の発現量は BY-2 細胞に比べて、オーキシンを含まない条件 (BY-D)、および 2B-13 細胞で増加していた。いっぽう、サイクリン遺伝子 *NtCycB* の発現量は、BY-D 条件、2B-13 細胞、ともに減少していた。

次に、BY-2 細胞におけるオーキシン添加による *NtXYL1* 遺伝子発現量変化を調べた。オーキシンを含まない培地で 3 日間培養した BY-2 細胞にオーキシンを再添加したところ、添加 60 分後にはサイクリン遺伝子 *NtCycB* の発現量が増加した。しかし、*NtXYL1* の発現はオーキシン添加により誘導が見られなかった (図 2)。

次に、*NtXYL1* の上流領域を探索した。タバコ BY-2 ゲノム断片ライブラリから *NtXYL1* 配列特異的プライマーを用いて PCR を行ない、シークエンスをした結果、1028bp の *NtXYL1* 遺伝子上流領域を同定できた。*NtXYL1* 遺伝子と相同なシロイヌナズナの *AtXYL3* と *AtXYL4* では、プロモーター領域の中にオーキシン関連遺伝子特異的配列 (ARF binding motifs : TGTCTC) が *AtXYL3* は上流 380,744,2062bp に、*AtXYL4* は上流 525,666,2624bp にそれぞれ 3ヶ所ずつ確認された。しかし、得られた *NtXYL1* 遺伝子上流領域中にはオーキシン関連遺伝子特異的配列である TGTCTC と同じ、あるいは似た配列は、現在までのところ見いだされなかった。

最後に、*NtXYL1* の強発現が細胞分裂の誘導に関わるかどうかを調べるために、*NtXYL1* を 35S プロモーターで発現するタバコ BY-2 カルスを作出し、9 系統のカルス (XYL1-2 ~10) を得た。100mg 程度のカルスを固形培地上に置き、1 週間培養を行った結果、オーキシンである 2,4-D を含まない培地上でいずれのカルスも同等に成長維持をした (図 2, 表 1)。また、成長率 (1 週間後の生重量/測定時の生重量) が 2,4-D を含む通常量と比べ、2,4-D を含まない培地上で培養したカルスの方が高い傾向にある。だが、2,3 週間培養をすると XYL1-3 および XYL1-9 で褐変化が見られ、成長

停止している。

そこで、2,4-D を含まない培地で 1 週間培養した *NtXYL1* カルスにおける *NtXYL1* および *NtCycB* サイクリン遺伝子発現量を調べたところ、*NtXYL1* カルスの *NtCycB* の発現量が高い傾向にあり、また *NtXYL1* の発現量も高い傾向にある。

4. 考察

本実験では、タバコ培養細胞から単離された *NtXYL1* がオーキシンに対する馴化の一因ではないかと考え、*NtXYL1* の遺伝子発現と *NtXYL1* 遺伝子を強発現したカルの表現型を解析した。その結果、オーキシンを含まない培地で増殖できる 2B-13 細胞では *NtXYL1* 遺伝子発現量が増えており、また *NtXYL1* 遺伝子を強発現した一部のカルスはオーキシンを含まない培地上での増殖が見られたことから、*NtXYL1* が細胞分裂の誘導に関わる可能性が考えられる。だが、2,4-D を含まない培地上で 2,3 週間培養すると褐変化する系統があることから *NtXYL1* カルスの成長維持は一過的なものである。馴化現象の継続には *NtXYL1* の過剰発現では不十分であり、おそらくオーキシンが介在する他の機能発現が必要であると考えられる。オーキシン添加により *NtXYL1* 遺伝子の発現が誘導され、*NtXYL1* タンパク質が機能することで細胞分裂が誘導される、という図式は考えやすいが、発現解析により *NtXYL1* はオーキシンを含まない状況で発現量が増加し、また *NtXYL1* 上流領域に明確なオーキシン関連遺伝子特異的配列が見つからなかったことから、オーキシンの有無と *NtXYL1* の機能との関係は現在のところ説明できない。

シロイヌナズナで同定された *AtXYL3* はアラビノースおよびキシロースの分解活性を示し、*AtXYL3* を欠く個体は種子発芽に遅れが見られたことから、XYL タンパク質は細胞壁多糖類成分の組換えを通して何らかの植物成長に関わっていると考えられる³。いっぽう、オーキシンも細胞壁のゆるみを引き起こすことで細胞成長に関わることが提唱されていることから、タバコ細胞においても *NtXYL1* が細胞壁成分の組換えを通して、増殖に関わっていると考えている。

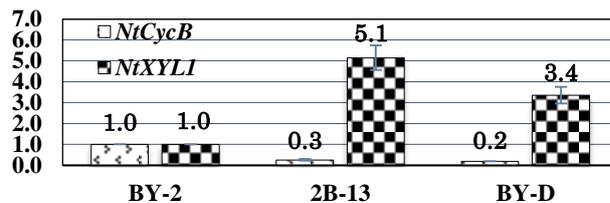


図 1. 植え継ぎ後 3 日目のタバコ培養細胞における *NtXYL1* 遺伝子の発現量。タバコ培養細胞 BY-2 (BY-2)、オーキシン非依存株 2B-13 (2B-13)、BY-2 細胞をオーキシンを含まない培地で 3 日間培養したもの (BY-D) の結果を表す。データは 5 回の実験の平均値と標準誤差を表す。

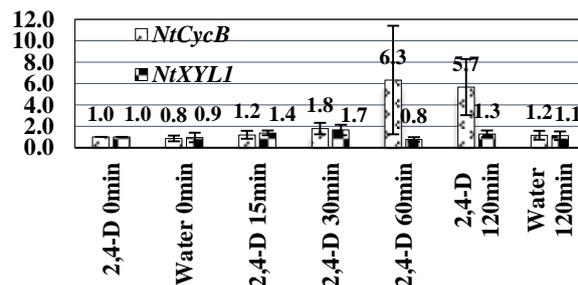


図 2. 2,4-D 添加による *NtXYLI* 遺伝子発現量の継時的変化. 2,4-D 添加後に BY-2 細胞を経時的に回収し, *NtXYLI* および *NtCycB* 発現量を調べた. 値は 5 回の実験の平均値と標準誤差を表す.

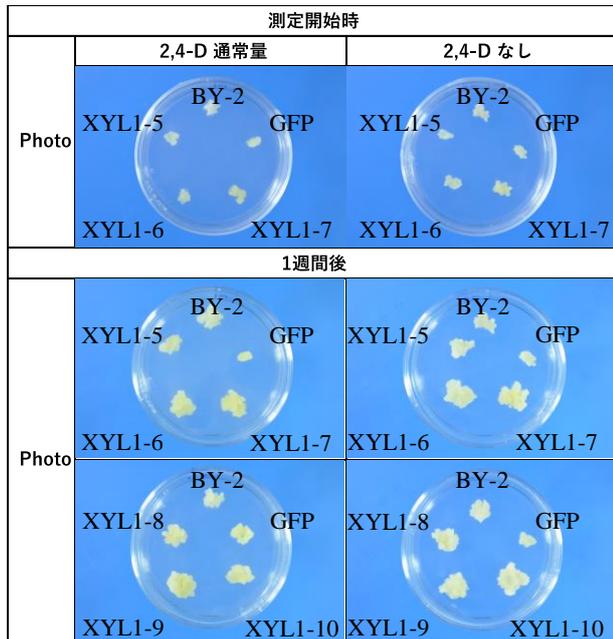


図 3. *NtXYLI* 形質転換カルの表現型. 100 mg 程度のカルスを, 2,4-D を含まない培地上で 1 週間培養した結果を示す.

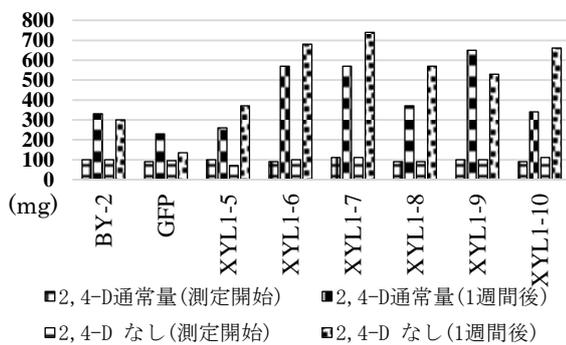


図 4. 2,4-D を通常量含む培地, 2,4-D を含まない培地で 1 週間培養した *NtXYLI* 強発現カルの生重量の結果を示す.

表 1. 1 週間培養した *NtXYLI* 強発現カルの成長率の比較

| | 成長率(1週間後/測定開始) | |
|---------|----------------|----------|
| | 2,4-D 通常量 | 2,4-D なし |
| BY-2 | 3.3 | 3.0 |
| GFP | 2.6 | 1.4 |
| XYLI-5 | 2.6 | 5.3 |
| XYLI-6 | 6.3 | 6.8 |
| XYLI-7 | 5.2 | 6.7 |
| XYLI-8 | 4.1 | 6.3 |
| XYLI-9 | 6.5 | 5.3 |
| XYLI-10 | 3.8 | 6.0 |

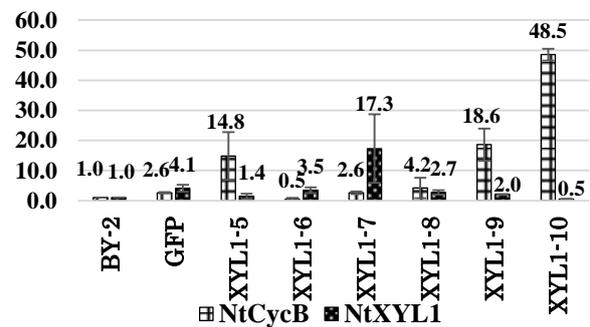


図 5. 2,4-D を含まない培地で 1 週間培養した *NtXYLI* 強発現カルの遺伝子発現量. 2,4-D を含まない培地で 1 週間培養したカルの *NtXYLI* および *NtCycB* 発現量を調べた. 値は 3 回の実験の平均値と標準誤差を表す.

4. 謝辞

丁寧なご指導、ご鞭撻をいただきました、同大学兼任講師 清水隆博士に厚く御礼を申し上げます。

5. 参考文献

1. Bins A. and Meins F. JR. (1973)
2. Shimizu T. et al. (2006)
3. Minic Z. et al. (2006)
4. Minic Z. et al. (2004)