

## ユーカリ細胞培養系におけるポリアミンと 増殖との関係(Ⅱ)\*

—ポリアミンと細胞分裂—

寺田 珠実\*\*・高山 悟\*\*・佐分義正\*\*

### Polyamines in Relation to Growth in Cell Suspension Cultures of *Eucalyptus polybractea* (Ⅱ)

—Polyamines and cell division—

Tamami TERADA\*\*, Satoru TAKAYAMA\*\* and Yoshimasa SABURI\*\*

#### I. 緒 言

細胞周期の概念はソラマメの根端組織細胞を用いた研究で提唱され<sup>1)</sup>, 一般に間(G<sub>1</sub>)期, DNA合成(S)期, 間(G<sub>2</sub>)期, 分裂(M)期として表現される。増殖中の正常な細胞は細胞周期のサイクルをくり返すが, 栄養不足や増殖因子の欠乏, 細胞過密などが原因となってG<sub>1</sub>期で増殖力を保持したまま増殖を停止することがある。このような状態は静止(G<sub>0</sub>)期<sup>2)</sup>と呼ばれ, G<sub>1</sub>期と区別されている。最近, 細胞増殖過程におけるG<sub>1</sub>期, G<sub>2</sub>期の意義<sup>3)</sup>, ならびに分化誘導におけるG<sub>1</sub>期, G<sub>0</sub>期の意義<sup>4)</sup>が酵母や動物細胞を中心に活発に研究されている。動物細胞ではとくにガン細胞についての研究から細胞増殖に重要な役割を果たすものとしてポリアミンが注目されてきた。増殖のさかんな細胞ではポリアミン生成活性が高く<sup>5)</sup>, G<sub>0</sub>期の細胞が再び細胞周期を進行させるときポリアミン生成活性が急激に上昇する<sup>6)</sup>などポリアミンが細胞周期と密接な関わりを持っていることが明らかになってきた。

原植物において細胞分裂は生長点または形成層の細胞に限られるが, 培養細胞では多くの細胞が分裂, 増殖を繰り返している。従って細胞培養技術を高等植物, ことに草本植物よりも生長が遅いとされる木本植物の大量培養に活用するためには, まず細胞増殖機構を解析しなければならない。また培養細胞を有用物質生産に活用するためには細胞周期と関連づけた二次代謝活性の解析が必要である。しかし, 通常の植物細胞培養では各細胞の周期が揃っていないので細胞周期に関わる実験系を組むためにはすぐれた同調培養系の確立が重要課題である。

本研究では木本植物培養細胞の増殖を細胞分裂の面から解析した。前報でユーカリ培養細胞にポリアミン生合成阻害剤を投与すると増殖が阻害されること, そこにポリアミンを投与すると生重量レベルでの増殖が回復することが明らかになった。そこで本報では, ポリアミン生合成阻害剤を用いた同調培養系の確立を目指して細胞分裂とポリアミンの関係を検討した。

\* 本研究の一部は文部省科学研究費(奨励A: 02760098)によった。

\*\* 東京大学農学部林産学科

Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo.

## II. 材料と方法

### 1. 培養細胞の継代

細胞の培養及び継代は前報<sup>7)</sup>の通り行った。LINSMAIER and SKOOG 液体培地<sup>8)</sup>にショ糖 (3%), 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (0.5 mg/l), カイネチン (0.5 mg/l) を加えて, pH 6 に調整し 90 ml ずつ 500 ml 容のフラスコに分注した。高圧滅菌した後, ユーカリ (*Eucalyptus polybractea*) 培養細胞を初期密度が生重量 (*fw*) で 7~8 mg/ml になるように移植した。継代は 12 日毎に行った。

### 2. 細胞分裂の確認

#### 2.1 細胞数の計数

塩化カルシウム (1 mM) を添加したマンニトール水溶液 (1.2 M) 中で, セルラーゼ “オノヅカ” R-10 (ヤクルト本社) (4%), ドリセルラーゼ (協和発酵) (4%), マセロチーム R-10 (ヤクルト本社) (2%) を混合し, その上澄み液を粗酵素液とした。この粗酵素液 2 ml と細胞培養液 2 ml とを混合し 50 ml 容三角フラスコ中, 30°C, 90 回/分で往復振とう処理して調製したプロトプラストを血球計数盤上で顕微鏡で観察しながら計数した。

#### 2.2 DNA の定量

細胞からの DNA 抽出には Ogur-Rosen 法<sup>9)</sup>を用いた。培養細胞約 300 mg (*fw*) を氷冷エタノール中で粉碎し, 70% エタノールで遠心管に流し込み, 3000 rpm, 10 分間遠心分離した。沈殿物を 0.1% 過塩素酸を含む 70% エタノールで洗浄したあと, エタノール-エーテル (3:1) 混液を加えて懸濁させ, 湯浴中で 3 分間沸騰させた。遠心分離により上澄みを捨て, 沈殿をエタノール-エーテル混液で 2 回洗い, 次に氷冷 2 N 過塩素酸で 2 回洗った。洗浄後の沈殿は 1 N 過塩素酸 5 ml に懸濁し 4°C で 24 時間放置した。遠心分離後, 沈殿に 1 N 過塩素酸 3 ml を加えて 70°C, 70 分間加熱した。冷却後, 不溶性ポリビニルピロリドン約 100 mg くわえて懸濁させてから遠心分離し, 上澄みを比色定量に供した。

DNA 定量にはインドール法<sup>10)</sup> (Keck の変法<sup>11)</sup>) を用いた。DNA 含有上澄み液 1 ml に 0.06% インドール試薬と 2 N 塩酸を加えて 10 分間加熱した。冷却後, 酢酸アミル 2 ml による抽出操作を 3 回繰り返すことによって夾雑物を除去した後, 水層の 490 nm の吸光度を分光光度計で測定した。

### 3. ポリアミンの定量

細胞からポリアミン抽出と定量は前報<sup>7)</sup>の通りに行った。

### 4. 薬剤添加

メチルグリオキザル ビス-(グアニルヒドラゾン) (MGBG), スペルミジン (Spd), スペルミン (Spm) はいずれも水溶液 (pH 6) として滅菌フィルターを通して培地に添加した。アフィディコリン (和光純薬) は微量のジメチルスルホキシドに完全に溶解させたのちに水溶液として無菌的に培地に添加した。また, 3 日間細胞培養して得た培地と新鮮培地とを混合 (3:2) して調製したコンディション培地で数回細胞を洗浄することによりアフィディコリンの除去を行った。

III. 結果と考察

1. MGBG による同調培養系確立の試み

MGBG は、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の拮抗阻害剤である<sup>11)</sup>。MGBG の添加によりユーカリ培養細胞の生重量増加が完全に抑制されること、Spd と Spm の添加で増殖が回復することをすでに報告した<sup>7)</sup>。今回はまず細胞数と DNA 量を測定しながら MGBG と Spd, Spm の添加条件を検討した。細胞移植後 2 日間はプロトプラストの生成率が非常に悪いので、MGBG は継代後 3 日目に添加した。MGBG 濃度が 1 mM 以上の時生重量の増加は著しく阻害され、細胞数と DNA 量も 2 日目以降の増加が止まった (図-1)。MGBG 添加により細胞分裂も停止したと思われる。なお MGBG を 2 mM にした場合には 4 日目までに細胞は褐変して枯死した。そこで以後の実験は MGBG を 1 mM 添加するという条件下で行った。ポリアミン添加時期は、細胞分裂がより確実に停止している方が好ましいので、阻害剤添加の 2 日後すなわち細胞継代後 5 日目として以下の実験を行った。また添加したポリアミンの組み合わせから Spd と Spm の効果の相違を検討した。

MGBG で増殖を抑制後 Spd, Spm いずれを添加した場合でも生重量は徐々に増加した。このとき DNA 量は一両日中に急激に増加したが、細胞数はそれより 1~2 日遅れて増加することが判明した (図-2)。MGBG 添加で停止していた細胞分裂を、ポリアミンが再び分裂過程へ進行させたものと考えられる。またこのとき DNA 量の増加が先行し、そのあと細胞数が増加してきたことから、MGBG により細胞周期は S 期、もしくは S 期以前に停止したと思われる。さらに MGBG での分裂停止に 2 日を要したことを考え合わせると、MGBG はおそらく G<sub>1</sub>/S 期付近で細胞周期を停止させるが、S 期を既に通過した細胞に対しては細胞周期をそのまま進行させ、次の S 期に来たとき停止させるものと考えられる。

MGBG を添加した後、Spd (1 mM) または Spm (1 mM) を加えて培養した細胞中のポリアミン

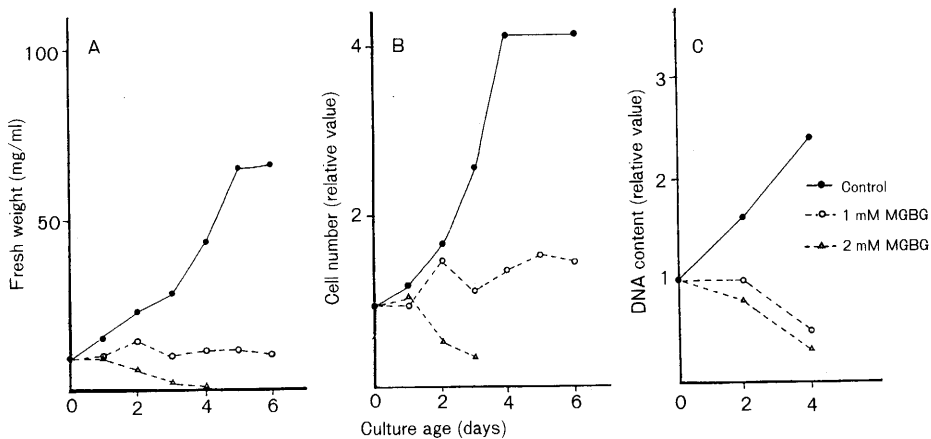


図-1 MGBG 投与後の細胞の増殖 (生重量 (A), 細胞数 (B), DNA 量 (C) の変化)

Fig. 1. Effect of addition of MGBG on cell growth. (Changes in fresh weight (A), cell number (B), and DNA content (C) after MGBG treatment.)

The cells were precultured for 3 days without addition of MGBG. MGBG was added at day 0.

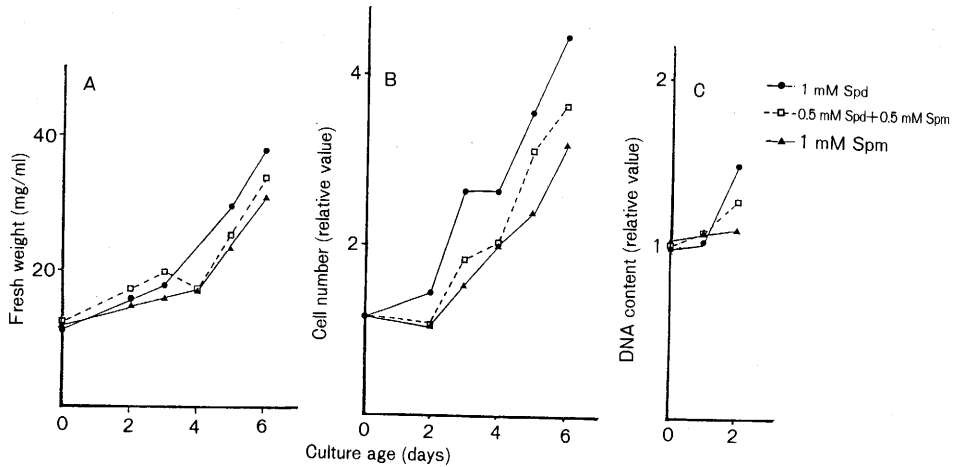


図-2 ポリアミン添加後の細胞の増殖 (生重量(A), 細胞数(B), DNA量(C)の変化)

Fig. 2. Effect of addition of polyamines on cell growth. (Changes in fresh weight (A), cell number (B), and DNA content (C) after treatment of polyamines.) The cells were precultured for 3 days without any agents and then for 2 days in MGBG. Polyamines were added at day 0.

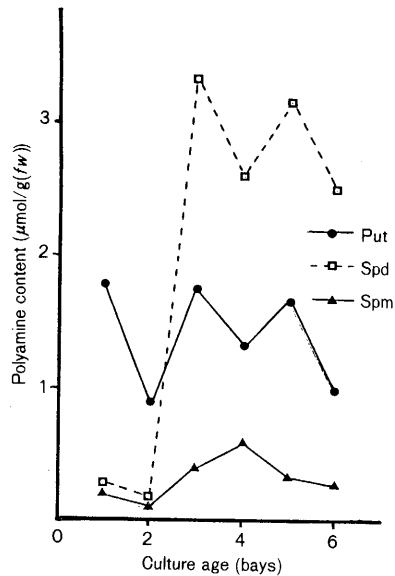


図-3 MGBG 添加後, Spd を加えた時のポリ  
アミン量の変化

Fig. 3. Effect of addition of Spd on polyamines contents after MGBG treatment. Cells were precultured 3 days. MGBG was added at day 0 and Spd was added at day 2.

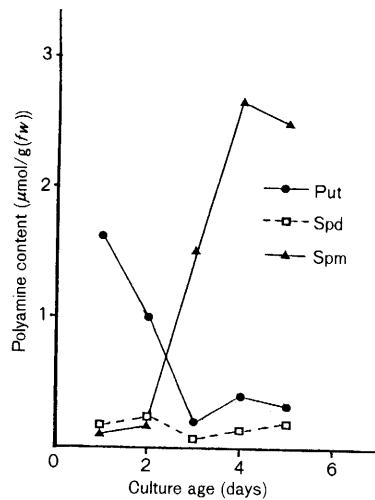


図-4 MGBG 添加後, Spm を加えた時のポリ  
アミン量の変化

Fig. 4. Effect of addition of Spm on polyamines contents after MGBG treatment. Cells were precultured 3 days. MGBG was added at day 0 and Spm was added at day 2.

量の変化を図-3と図-4に示した。ユーカリ培養細胞からはプトレスシン(Put), Spd, Spm, の3種の脂肪族ポリアミンが検出された<sup>7)</sup>のだが, MGBGの添加によりSpdとSpm生成は抑制され, それにともなって増殖が停止し, Put量も減少した。Spdを添加すると, すぐにPutが増加し, それに続いてSpmも増加してきたが, Spmを添加した場合は他のポリアミンの顕著な変化は観察されなかった。生重量, 細胞数, DNA量, ポリアミン量のいずれの結果からもMGBGによる増殖阻害の回復にはSpmよりもSpdの方が有効であることも明らかになった。Spdの方が細胞内への取り込みの効率がよいという可能性も考えられ, ユーカリ培養細胞においてSpdはより増殖に重要な因子であると思われる。

植物培養細胞を用いた細胞周期の同調は, 栄養飢餓<sup>13)</sup>やDNA合成阻害剤の添加<sup>14)</sup>などで試みられてきたが, 同調化は低く, 細胞分裂以外の阻害作用を伴うことが多かった。DNAポリメラーゼの特異的阻害剤であるアフィディコリンを使用することにより同調化が著しく改良されてきた<sup>15, 16)</sup>ものの同調系の確立には至っていない。今回, MGBGの添加により細胞周期がG<sub>1</sub>/S期で停止した原因は不明であるが, MGBGは細胞周期制御剤になり得るものと考えられ, Spdを増殖の回復のために使用すれば同調培養系の確立も可能性があるものと思われる。

2. アフィディコリン添加とポリアミン

継代時にアフィディコリン(5 mg/l)を添加して培養した場合, 細胞中のポリアミンはほとんど検出されなかった(図-5)。継代後2日目にアフィディコリンを添加すると, DNA量だけでなく生重量はすぐに, 細胞数も添加後3日目からは増加しなくなった。そこでアフィディコリン添加の3日後すなわち継代後5日目にコンディション培地でアフィディコリンを洗浄し, さらに培養を続けたところ, 洗浄して2日後に細胞数が急激に増加した(図-6)。このときそれに先だってポリアミン類, とくにPutが増加したことがわかった(図-7)。以上のことから細胞分裂にポ

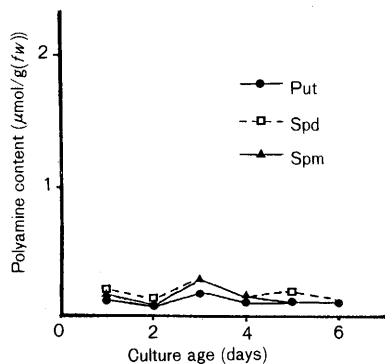


図-5 アフィディコリンを添加した時のポリアミン量の変化

Fig. 5. Effect of addition of aphidicolin on polyamines contents.

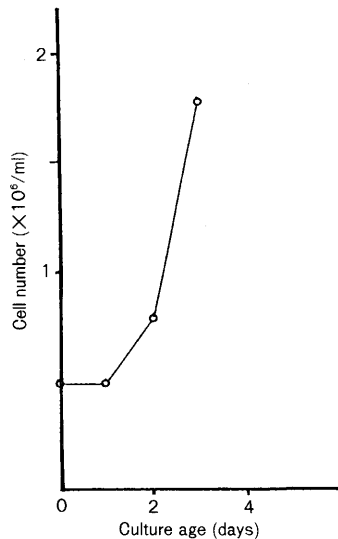


図-6 アフィディコリン除去後の細胞数の変化

Fig. 6. Change in cell number after removal of aphidicolin.

Cells were precultured for 2 days without any agents and then for 3 days in aphidicolin. Aphidicolin was removed at day 0.

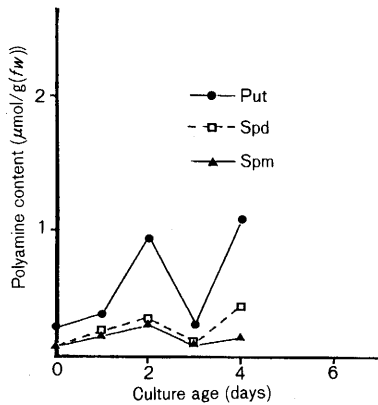


図-7 アフィディコリン除去後のポリアミン量の変化

Fig. 7. Change in polyamines contents after removal of aphidicolin.

Cells were precultured for 2 days without any agents and for 3 days in aphidicolin. Aphidicolin was removed at day 0.

ミン量の増加が観察されたことから、細胞分裂へのポリアミンの関与が示唆された。

キーワード: ユーカリ, 細胞分裂, S 期, MGBG, Spd

#### 引用文献

- 1) HOWARD, A. and PELC, S. R.: *Exp. Cell Res.*, **2**, 178, 1951.
- 2) TODARO, G. J., LAZAR, K. and GREEN, H.: *Cell Comp. Physiol.*, **66**, 325, 1965.
- 3) 吉田 稔・別府輝彦: 蛋白質 核酸 酵素, **34**(9), 1069, 1989.
- 4) 井出利憲: 生化学, **54**(4), 255, 1985.
- 5) MORRES, D. R. and FILLINGAME, R. A.: *Annu. Rev. Biochem.*, **43**, 303, 1974.
- 6) 井出利憲: 蛋白質 核酸 酵素, **34**(9), 1097, 1989.
- 7) 寺田珠実・相良順子・福嶋康史・佐分義正: “ユーカリ細胞培養系におけるポリアミンと増殖との関係 (I)”, 演習林報告 **88**: 149-155, 1992.
- 8) LINSMAIER, F. M. and SKOOG, F.: *Physiol. Plant*, **61**, 199, 1976.
- 9) OGUR, M. and ROSEN, G.: *Arch. Biochem.*, **25**, 262, 1950.
- 10) CEROTTI, G.: *J. Biol.*, **188**, 297, 1952.
- 11) KECK, K.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **63**, 446, 1956.
- 12) FLORES, H. E. and GALSTON, A. W.: *Science*, **217**, 1259, 1982.
- 13) AMINO, S., FUJIMURA, T. and KOMAMINE, A.: *Physiol. Plant*, **59**, 393, 1983.
- 14) ERIKSSON, T.: *Physiol. Plant*, **19**, 900, 1966.
- 15) NAGATA, T., OKADA, K. and TAKEBE, I.: *Plant Cell Rep.*, **1**, 250, 1982.
- 16) NISHINARI, N. and SHONO, K.: *Plant Cell Physiol.*, **27**(1), 147, 1986.

(1992年4月30日受理)

リアミンが何らかの役割を果たしていると思われる。MGBGを用いた実験も合わせて考えるとポリアミンの細胞周期における作用点はS期付近ではないかと想像される。

#### 要 旨

MGBGを添加して生重量, 細胞数, DNA量いずれの増加も抑制したユーカリ培養細胞にSpdあるいはSpmを添加すると, まずDNA量が急激に増加し, 1~2日遅れて細胞数が増加した。またSpmよりもSpdの方が増殖回復に有効であった。MGBGの添加により細胞周期のS期付近で停止したユーカリの細胞分裂が, Spdの添加で再び進行したものと考えられ, この方法で同調培養系の確立も可能性があるものと思われる。細胞分裂(S期)制御剤のアフィディコリンを用いた場合, アフィディコリンを解除すると細胞数の増加に先立ちポリア

### Summary

Addition of Spd or Spm to a medium containing MGBG, which reduced the cell growth (*fw*, cell number, DNA content) of *Eucalyptus polybractea* cultured cells, could restore the DNA content first, and cell number 1-2 days later. Spd was more effective for restoration from growth inhibition than Spm. Cell division was arrested in the neighborhood of the S phase of the cell cycle by MGBG and Spd operated the cell cycle again. Therefore, synchronous cultures may be established using MGBG in combination with Spd. In the case of the treatment of cell division (S phase) regulator (aphidicolin), after removal of the block, levels of polyamines increased prior to the increase of cell number. These results suggest that polyamines correlate to cell division.

**Key words:** *Eucalyptus polybractea*, cell division, S phase, MGBG, Spd