

イチョウ培養系における

細胞分化と二次代謝発現に関する研究

井上広喜

イチョウ培養系における

細胞分化と二次代謝発現に関する研究

井上広喜

目次

第1章 序論

1-1 イチョウについて

1-1-1 イチョウ全般について

1-1-2 イチョウの薬効成分

1-2 細胞分化と細胞死について

1-2-1 動物における細胞分化と細胞死について

1-2-2 植物における細胞分化と細胞死について

1-3 本研究の目的および概略

引用文献

第2章 イチョウ培養系における分化誘導実験

2-1 緒言

2-2 各種外植体を用いた分化誘導の試み

2-3 各種培養細胞の再分化試験

2-4 総括

引用文献

第3章 イチョウ培養系におけるginkgolide類の分析

3-1 緒言

3-2 原植物におけるginkgolide類の分析

3-3 イチョウ幼植物の成長初期におけるginkgolide類の挙動について

3-4 培養細胞系におけるginkgolide類の分析

3-5 総括

引用文献

第4章 イチョウ培養細胞における細胞死と二次代謝発現に関する実験

4-1 緒言

4-2 各種細胞死誘導試薬の検討

4-3 シトシンアラビノシド、アフィディコリン添加による細胞死の観察

4-4 シトシンアラビノシド添加による細胞死誘導機構の観察 (1)

4-5 シトシンアラビノシド添加による細胞死誘導機構の観察 (2)

4-6 クロロホルム添加による細胞死および二次代謝発現誘導

4-7 硫酸銅添加による細胞死および二次代謝発現誘導

4-8 総括

引用文献

第5章 本研究の総括

-129

謝辞

投稿論文一覧

略歴

第1章 序論

1-1 イチョウについて

1-1-1 イチョウ全般について

イチョウ (*Ginkgo biloba* L.) はイチョウ綱、イチョウ科、イチョウ属に分類される雌雄異株の落葉高木で、イチョウ綱に属する唯一の生存種であると考えられる (湯浅 1981)。イチョウ以外のイチョウ綱に分類されている数種のは全て化石として見つかっているのみで、現存しているものは無い。イチョウ綱植物が地球上に出現したのは二畳紀で、ジュラ紀のはじめ、約1億8千万年前には中央アジアで現生のイチョウ属 (*Ginkgo*) と思われる植物がはじめて確認される (Rohr 1989、金井 1981)。その後ユーラシア大陸全体に分布をひろげ、白亜紀にかけて多くの化石が産出する。ついで第三紀から第四紀にかけて気候の大変動が起り、続く氷河期に至って、繁栄していたイチョウ綱植物の大部分が絶滅したものと考えられている (Major 1967)。現存するイチョウ (*G. biloba*) は、約100万年前の第四紀から氷河期にかけて現在の中国で生き延びたものが、人類の出現によって種子が食料として利用され、また、後には観賞や信仰の対象となるなどし、結果的に再び分布を世界にひろげることになったと推測されている (金井 1981)。

イチョウは日本滞在中のドイツ人植物学者、Kaempferによって1690年に発見され、ヨーロッパにはじめて紹介された。イチョウが日本に導入されたのは鎌倉時代が室町時代だろうと言われている。長らく野生状態のものは存在しないと考えられてきたが、近年では、探検家たちの報告などから中国に自生があるのではないかと考えが定着しつつある。しかし、一見自生状態と思われても、真に野生のものなのか、植栽されたものの子孫が野生化したにすぎないのかが曖昧であり、中国原産説の真偽は未だ明らかではないようである。

イチョウはその種子がカヤ属 (*Torreya*) やイヌガヤ属 (*Cephalotaxus*) の種子と類似の構造を持つとして、19世紀にはイチイ科に分類されていた。現在の分類に落ちついたのは1896年に平瀬作五郎によって胚珠中を遊泳する絨毛を持つ精子が発見され、シダ植物と針葉樹の中間体と言うべき受精機構が明らかになった後のことである (Rohr 1989)。イチョウの精子発見と同時期にソテツでも遊泳精子が発見されている。種子植物の内、被子植物とマツ類などの裸子植物では、自力で運動する能力を欠く精核があり、それは花粉管によって卵細胞に直接運ばれる。イチョウとソテツは進

化した雌性生殖器官である胚珠と、原始的な雄性生殖細胞である精子を持つ点で、下等植物と高等植物とを進化的につなぐものであると認識されている（加藤 1996）。

病虫害に対する抵抗性が極めて強く、生育旺盛で、また大気汚染にも感受性が低いことから、日本全土、中国、朝鮮はもとより欧米各地でも、イチョウは街路樹、庭園樹として広く利用されている。このような用途においては、一般に雄株が希望される。雌株は秋になると大量の種子を落とし、悪臭、汚染の原因になるとして、特に欧米では嫌われているという。イチョウが生殖を開始するのはおおそ樹齢20年以降のことであり、それ以前に性別を判定する決定的な方法も無いため、雌木であると分かっても切り倒してしまうには手遅れという状況になる。種子による繁殖では性別が決められないため、雄株を用いた挿し木、接ぎ木等による繁殖が行われている（Rohr 1989）。

イチョウの材は緻密でやや柔らかく、また狂いが少ないことから、そろばん珠、基盤、床板、まな板などに広く用いられる（湯浅 1981）。

種子はいわゆるギンナンとして、日本、中国などでは食用として利用している。漢方薬としての利用も知られており、鎮咳効果があるとされる。しかしながら、大量に摂取しすぎると中毒し、死に至ることもある。日本においては、実取り用の数品種が選別、栽培されており、特に愛知県、福岡県、大分県などが主産地として知られている。晩秋の落果を待たずに9月頃から強制的に振り落として収穫する。この時期にはまだ外皮が成熟しておらず、悪臭を発する状態になっていないため取り扱いが容易である（佐藤 1996）。晩秋に街路樹などから自然落果したものも太いに利用され、個人消費のみならず市場に出回るものもあるが、悪臭を放つ外皮を取り除くのはかなりやっかいである。

イチョウ葉の抽出物は、老人性痴呆の予防やその症状の改善、脳血管障害の改善などの効果があるとして、ヨーロッパ、特にドイツやフランスにおいて医薬品として用いられ、大きな需要がある（Sticher 1993）。ヨーロッパでは、EGb 761と名付けられたイチョウ葉抽出物が医薬品として特に有名で、イチョウ抽出物として臨床的に脳血管障害の治療に用いられたものの大多数がEGb 761であった（Smith *et al.* 1996）。EGb 761は24%のフラボノイド配糖体、6%のテルペノイドを有効成分として含むものとして規格化されており、末梢神経に対する損傷や酸欠／虚血などの条件下で、神経保護作用を持つことが報告されている（Smith *et al.* 1996）。また、各種活性酸素の除去活性が認められている（Marita *et al.* 1995、Pincemail *et al.* 1989、Diwok *et al.* 1992、Marcocci *et al.* 1994）。なお、これらの成分について

ては次項で述べる。

前述のような医薬品としての大きな需要を支えるものとして、葉の収穫を目的としたイチョウの栽培が各所で行われている。日本では茨城県、新潟県などで葉の収穫専用の栽培が試みられている（佐藤 1996）。また、アメリカでは1,200エーカー、フランスでは400エーカーといった大きな規模で、葉の収穫専用の栽培が行われている。このように得られた葉が医薬品としてのイチョウ葉抽出物の原料となっている（Camper *et al.* 1997）。

1-1-2 イチョウの薬効成分

テルペノイド

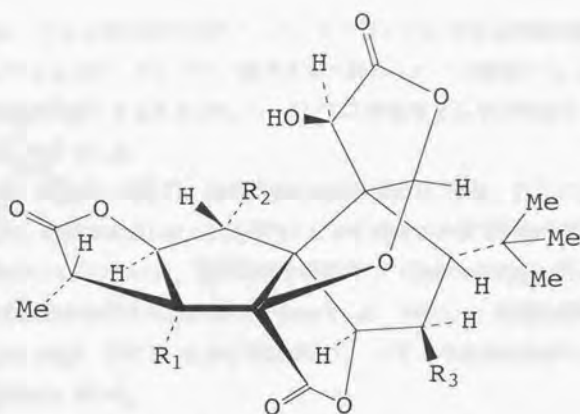
前出のEGb 761をはじめとするイチョウ葉抽出物中の薬効成分として、ginkgolide、bilobalideと命名される一群の特異なテルペンラクトンが存在する（Sticher 1993）。ginkgolideは現在、ginkgolide A、B、C、J、M（以下G-A、G-B、G-C、G-J、G-Mと記す）の5種類が知られており、いずれもよく似た構造を有している（Fig. 1-1）。

G-A、G-B、G-Cは、Nakanishi (1967)、Okabe *et al.* (1967) によりイチョウの根の表皮や葉から単離され、Sakabe *et al.* (1967)、Maruyama *et al.* (1967a,b,c)、Woods *et al.* (1967) らによって構造決定された。G-JはWeinges *et al.* (1987) により葉から単離されたもので、植物体内での含有量はG-A、G-B、G-Cより少ないとされる。G-MはWeinges *et al.* (1993) によりG-Cから人工的に合成された。

G-AからG-Jまでの4つについては、血小板活性化因子（PAF）拮抗作用を有することが確認されており、G-Bが最も活性が強く、G-Cが最も弱い。臨床的にも、G-A、G-B、G-C混合物の内服によるアトピー性喘息の抑制効果が確認されている（寺澤 1991）。

PAFはアレルギー反応の解析過程で抗原刺激によりウサギの感作好塩基球から遊離され、血小板を活性化する因子として見出された一種のホスホグリセリドである。種々の疾患モデルにおけるPAF動態の分析やPAF拮抗剤の効果から、エンドトキシンショック、アナフィラキシー、炎症などの病態におけるPAFの関与がほぼ確実視されている。また、虚血性疾患時には、虚血による組織損傷を悪化させる因子として作用する可能性が高いと考えられている（小田ら 1991）。

Scholyseek *et al.* (1997) は、G-Mも含めた5つのginkgolide、さらに



R ₁	R ₂	R ₃	ginkgolide
OH	H	H	A
OH	OH	H	B
OH	OH	OH	C
OH	H	OH	J
H	OH	OH	M

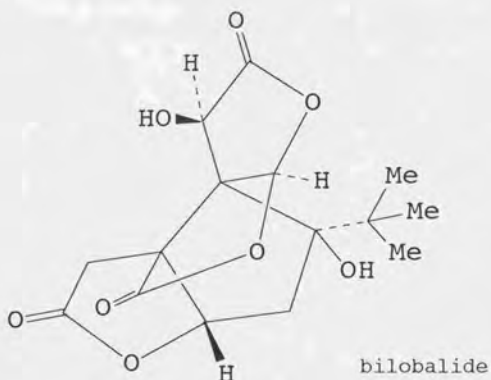


Fig. 1-1. Chemical structures of ginkgolides and bilobalide.

bilobalideの非プロトン性溶媒中でのスーパーオキシドに対する抗酸化活性について調べ、G-A以外でスーパーオキシド捕捉作用が認められたと報告した。ginkgolide類の薬効は抗PAF作用によるのみでなく、ラジカル捕捉剤としての作用にも重要な役割があると考えられている。

bilobalideは、Major (1967)、Weinges and Bähr (1969)、らによってイチヨウ葉から単離され、Nakanishi *et al.* (1971) により構造が決定された (Fig. 1-1)。抗PAF活性は認められていないが、神経保護作用を持つ (Sancesario and Kreutzberg 1986)、神経損傷の回復を促進する (Bruno *et al.* 1993)、抗酸化活性を持つ (Scholtyssek *et al.* 1997) などの報告があり、イチヨウ葉抽出物中の重要な有効成分として認識されている。

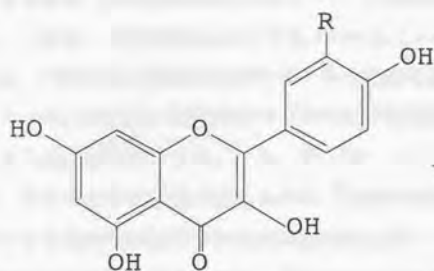
フラボノイド

イチヨウ葉抽出物中の有効成分として、上記のテルペノイドの他に数種のフラボノイド配糖体の存在が知られており、その抗酸化作用と薬効との関連が考察されている (Joyeux *et al.* 1995)。これらのフラボノイド配糖体は、アグリコンとして3つの主要な成分、kaempferol, quercetin, isorhamnetin (Fig. 1-2) からなることが明らかにされている (Hasler *et al.* 1992)。このほか、イチヨウ葉中には配糖体化されていないフラボン二量体が数種類知られており (Fig. 1-2)、イチヨウ葉抽出物の特徴とも言うべき成分であるが、薬効成分としてはあまり重要ではないとの見解が示されている (Sticher 1993)。その一方で、最近になってフラボン二量体の一つである ginkgetin に関節炎を抑える活性や、鎮痛活性が認められたとの報告がなされている (Kim *et al.* 1999)。

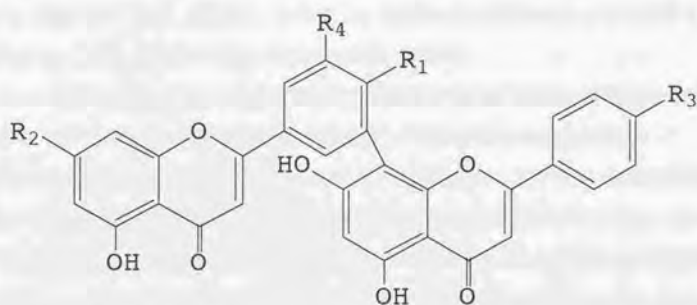
1-2 細胞分化と細胞死について

1-2-1 動物における細胞分化と細胞死について

従来、動物細胞における細胞死は、発生や形態形成時に認められ、遺伝子によって制御されるプログラム細胞死と、火傷、毒物などによって引き起こされる受動的な死であるネクローシス (壊死) とに分類されてきた。Kerr *et al.* (1972) は、細胞様態的特徴的な変化を示す一群の細胞死の形態をアポトーシスと定義し、ネクローシスと区別した。その後の研究により、アポトーシスでは、細胞の収縮、通常細胞膜内層に



R	
H	kaempferol
OH	quercetin
OCH ₃	isorhamnetin



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
H	H	H	H	amentoflavone
OCH ₃	OH	OH	H	bilobetin
OCH ₃	OCH ₃	OH	H	ginkgetin
OCH ₃	OH	OCH ₃	H	isoginkgetin
OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	sciadopitysin
OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	5'-methoxybilobetin

Fig. 1-2. Chemical structures of flavonols and biflavones from leaves of *Ginkgo biloba*.

存在する脂質 (phosphatidylserine: PS) の細胞膜外層への出現、クロマチンの核膜周辺への凝縮、細胞核DNAの分子量50kbp以上の巨大断片への断片化とヌクレオソーム単位への断片化、核自体の断片化と断片化核を含む膜に包まれた小構造体 (アポトーシス小体) の出現、細胞内オルガネラの形態保持、などが特徴的な現象として認められることが分かってきた。一方、ネクローシスではアポトーシスと対照的に細胞の溶解、オルガネラの損傷が認められる (Leist and Nicotera 1997)。アポトーシスにおいては死細胞が速やかに貪食除去されるが、ネクローシスでは細胞内容物の漏出で周囲に炎症反応を引き起こす。アポトーシス小体の形成が貪食を容易にすると考えられている (山田・大山 1994)。アポトーシスは、発生における指の形成、オタマジャクシの尻尾の喪失、などの生理学的な細胞死のみならず、多くの疾病においても認められ、また抗ガン剤、紫外線、ホルモン、抗体などの刺激によっても誘導されることが分かっている (猪原・小関 1998、太槻 1999)。

アポトーシスの制御機構は、それに関与する遺伝子の同定以降急速に解析が進んだ。分子レベルでのプログラム細胞死の研究は、1980年代後半からの線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を研究対象としたものが先行していた。その細胞死変異体を用いた遺伝学的解析から、種々の細胞死関連遺伝子が単離され、中でも *ced-9* (細胞死抑制) 及び *ced-3* (細胞死促進) という遺伝子については、後にそれぞれの遺伝子産物 CED-9、CED-3 に対する哺乳類ホモログである Bcl-2 ファミリー、Caspase ファミリーの発見につながった (後述)。また、*ced-4* と呼ばれる遺伝子の遺伝子産物 CED-4 の哺乳類ホモログが、Caspase 活性化因子として精製され、Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) と名付けられた (Zou et al. 1997)。これらの因子に関する機能的解析から、CED-3・CED-4・CED-9 複合体が線虫から哺乳類までプログラム細胞死の中心的役割を果たしているとの考えが確立されている (杉本 1997)。

Bcl-2 ファミリータンパク質として、アポトーシス抑制機能を有する Bcl-2 や Bcl-xL、促進機能を持つ Bax や Bak などが知られている。前者は通常ミトコンドリアなどのオルガネラに局在し、後者は通常細胞質に局在しているが、細胞死の刺激に伴ってリン酸化、切断などの修飾を受けてミトコンドリアに集中することが明らかにされている (清水ら 1999)。

Caspase ファミリーは、線虫の CED-3 にホモロジーのあるシステインプロテアーゼ群の総称で、哺乳動物では 14 種類が単離、同定されている (嘉藤ら 1999)。Caspase はいずれも約 20kDa と 10kDa の大小サブユニット (p20 と p10) からなり、基

質のアスパラギン酸 (Asp) -X (不特定アミノ酸) 配列間を切断する。AspからN末端側3つのアミノ酸が切断部位の認識に重要であることが分かっている。Caspaseファミリーの各分子は、いずれもその分子内にAsp-X配列を有しており、その部位の限定分解によってp20、p10相当の分子に切断され、不活性な前駆体から活性化型へと変換される (杭田 1998)。

アポトーシスの制御にミトコンドリアが大きな役割を持つことが近年明らかにされてきている。各種のアポトーシス誘導刺激により、ミトコンドリアの膜電位の低下や膜透過性の変化 (permeability transition; PT)、シトクローム c の漏出が観察されるが、この現象がアポトーシスの直接の原因であるとするモデルが提唱されている。即ち、ミトコンドリアから放出されたシトクローム c は、Apaf-1 と結合してCaspase-9 の自己プロセシングによる活性化を促し、次いで活性化Caspase-9 がCaspase-3 を活性化する。Caspase-3 はDFF (DNA fragmentation factor) と呼ばれる因子を活性化し、活性型DFFが核内に移行してDNaseを活性化し、核のDNAが分解される。さらに、ミトコンドリアからはAIF (apoptosis inducing factor) と名付けられたタンパク質が放出され、これは核に移行してクロマチン凝縮を行う、というモデルである

(Susin *et al.* 1998)。このほか、PTがアポトーシスのみでなくネクローシスにも深く関与するとの考えが提案されている。同様のアポトーシス刺激に対して、ATP含量が高いとアポトーシスが、低いとネクローシスが生じるとの実験結果から、PTが急速かつ大規模に生じた場合には細胞のATPが急速に枯渇しネクローシスが引き起こされ、PTがより穏やかな場合にはATP枯渇に先駆けて上記の各種プロテアーゼが活性化し、アポトーシスが実行されるものと考えられている (Susin *et al.* 1998, Lemasters *et al.* 1998)。

ミトコンドリアからのシトクローム c 遊離機構については、ミトコンドリア外膜の物理的な崩壊に起因するとのモデルと、特定のチャネルを利用しているとのモデルが提唱されていたが、最近シトクローム c 遊離のチャネルの同定に成功したとの報告がなされた (Shimizu *et al.* 1999)。彼等は、ミトコンドリア外膜に存在し、ミトコンドリアと細胞質間のATPや呼吸基質などの物質輸送を行うチャネルタンパク質VDAC (voltage dependent anion channel) がBaxの結合によって大きな孔を形成し、シトクローム c がそこを通過して漏出すること、一方で、Bcl-xLが結合するとVDAC孔が閉じられ、シトクローム c の通過が抑制されることを示し、Bcl-2ファミリータンパク質がVDACに直接結合し、ミトコンドリア膜電位やシトクローム c 漏出を制御しているとのモデルを提案している。

なお、脊椎動物細胞におけるプログラム細胞死の多くがアポトーシスの形態を示すこと、またここまで記したようにアポトーシスについて多くの研究がなされ機構解明が著しく進捗しつつあることなどから、「プログラム細胞死=アポトーシス」と認識されることも多く、植物でのプログラム細胞死にまでアポトーシスの呼称を適用している場合もしばしば見受けられる。しかしながら、動物細胞のプログラム細胞死でもアポトーシスの様態を示さないものがあり (Schwartz *et al.* 1993)、植物ではアポトーシスの概念は本来存在しない。アポトーシスとネクローシスが、共通の機構によって制御される可能性が示されるなど、アポトーシスの定義自体が、最近の研究の進展とともに曖昧になりつつあることも踏まえ、アポトーシスの呼称使用には注意を払う必要があると考えられる。

1-2-2 植物における細胞分化と細胞死について

植物における細胞死の現象は、発生、分化、病原体感染、老化などの際に広く観察され、これらはいずれも遺伝子により能動的に制御されるプログラム細胞死であると考えられている (Greenberg 1996)。以下に植物におけるプログラム細胞死の研究例について、現象面から五つの研究分野、即ち、1. 管状要素分化、2. 生殖、3. 老化、4. 病原体感染、5. その他、に分類してそれぞれについて記述することとした。動物でのアポトーシス研究が太く進展していることもあり、細胞死の種々の現象をアポトーシスとの類似性から論じているものが多い。

1. 管状要素分化

ヒヤクニチソウ (*Zinnia elegans*) の単離葉肉細胞が *in vitro* で道管要素に直接分化する実験系 (Fukuda and Komamine 1980a,b) を用いて種々の研究が行われている。これらの関連研究について以下に述べる。

Thelen and Northcote (1989) は、管状要素分化に伴うヌクレアーゼ活性の変動を調べ、変性DNA、未変性DNA、RNAのいずれに対しても活性を持つ分子量43kDのヌクレアーゼが、細胞の自己分解直前に誘導されることを見出し、核の分解にこのヌクレアーゼが関与する可能性を示した。また、このヌクレアーゼを部分的に精製して性質を調べ、活性発現に亜鉛イオンを要求することを明らかにした。彼等はさらに酵素のN末端配列を決定している。現在ではこのヌクレアーゼをコードするcDNAが単離され、自己分解開始の直前に、同酵素のmRNAが一過的に発現することが明らかにされている (Fukuda *et al.* 1998)。

Minami and Fukuda (1995) は、自己分解過程に関与するプロテアーゼに着目し、分子量約30kDのシステインプロテアーゼを部分的に精製した。この酵素は至適pHを5.5とすることから、液胞内もしくは液胞崩壊後の細胞質で働くものと考えられた。Minami et al. (1996) は、このプロテアーゼに対応するcDNAを単離し、自己分解開始の直前に、同酵素のmRNAが一過的な発現を示すことを明らかにした。さらに、ヒヤクニチソウ胚軸に対して、同cDNAをプローブとした*in situ*ハイブリダイゼーションを行い、道管分化が生じている箇所限定して同遺伝子が発現していることを示した。*in vivo*での道管分化過程においても同遺伝子が特異的に発現することが示唆される。

この他、内生のブラシノステロイドが道管分化過程の最終段階である細胞の自己分解過程の決定に関与する可能性が示唆されている (Fukuda et al. 1998)。

2. 生殖

生殖の種々の段階でも細胞死が観察されている。

ノルウェースプルース (*Picea abies*) の体細胞胚誘導時に、初期胚の胚柄を形成する部分の細胞核が3'-OH末端を持つDNA鎖の開裂を呈し、さらに最終的にはアポトーシス小体に類似の構造体へと断片化することが報告されている (Havel and Durzan 1996)。

トモロコシにおいては、性別の決定の際に、雌性生殖器官の原基細胞が選択的な細胞死を来して排除され、その結果として雄穂中に雄蕊が発達するという機構が知られている。DeLong et al. (1993) は、この性決定遺伝子の単離に成功し、短鎖アルコールデヒドロゲナーゼをコードすることを明らかにしているが、生体内での真の基質は不明である。

3. 老化

老化が遺伝子による制御を受けた能動的な過程であるとの認識をもとに種々の研究が行われ、老化関連遺伝子 (senescence-associated gene; SAG) と名付けられた一群の遺伝子やRNase、リボキシゲナーゼ等が、老化の制御に関与している可能性が示唆されているが、いずれも老化との直接の関連は証明されていない (Greenberg 1996)。

Grbic and Bleeker (1995) は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のエチレン非感受性変異体が野生株と比較して葉の寿命を長く保つことを示し、エチレンが

SAG遺伝子の発現に関与するとの考察を行っている。

Yen and Yang (1998) は、サトイモ科の植物数種の葉を試料として老化に伴う細胞核の変化や、ゲノムDNAの変化について調べている。老化の進行に伴って核の凝縮やDNAの断片化が認められ、アポトーシスの場合との類似性があると結論している。

4. 病原体感染

植物は、ある種の病原体の侵入を認識し、それに基づいて種々の防御反応を誘導する能力を持つ。その結果、感染部位での病原体増殖が制限される (Greenberg 1996)。このような生体防御反応の一環として過敏反応 (hypersensitive response: HR) があげられる。そもそもHRは、コムギ黒さび病の品種特異的抵抗性に伴う急激な細胞死に対して与えられた名称である (Stakman 1915)。現在では、ウィルス、細菌、菌、線虫などの侵入に対する防御反応として生じる急速な細胞死が広くHRとして扱われており、同時に誘導される多様な生化学的変化と共に病原体の感染拡大を防ぐ役割を担うものと考えられている (Heath 1998)。

種々のHR誘導系における細胞死に伴う変化が、アポトーシスとの関連から考察されているが、アポトーシスに特徴的な細胞の変化をはっきり示した例は知られていない (Heath 1998)。タバコ葉のタバコモザイクウィルスに対するHRでは、ゲノムDNAの電気泳動上でのラダーは検出できず、ランダムに低分子化したDNAが認められた (Mittler and Lam 1995)。一方、ササゲのササゲさび病菌によるHRではDNAラダーが検出されたが、アポトーシスの場合と比べて不鮮明なものだった (Ryerson and Heath 1996)。del Pozo and Lam (1998) は、タバコ葉のタバコモザイクウィルスに対する過敏反応死において、葉から抽出した粗酵素液中のCaspase様活性の上昇を検出したが、実際にCaspase様酵素が活性化しているか否かは確認されていない。

HRが種々の防御反応と共に生じることが広く知られている。このような防御反応としては、PRタンパク質 (pathogenesis-related protein) と呼ばれるキチナーゼ、グルカナーゼ等の抗病原体活性を持つタンパク質や、ファイトアレキシンの誘導、フェノール性物質の酸化、蓄積による細胞の褐変等があげられる (Heath 1998)。これらの防御反応は、HRを来す細胞のみならず、近傍の細胞にも認められる。さらに、HRによる植物体全体の病原抵抗性獲得が知られている (Kombrink and Somssich 1995)。

HRの誘導機構として、遺伝子対遺伝子説と呼ばれる機構が提唱され (Flor

1971)、その説に基づいた研究が種々行われてきた。すなわち、病原体側の非病原性 (avirulence; *avr*) 遺伝子が、その遺伝子に特異的に対応する宿主側の抵抗性 (resistance; *R*) 遺伝子に認識されることによって、宿主側植物の抵抗性が誘導されるという機構が考えられている。このような *R* 遺伝子が現在までに数種類単離されており、その大多数が細胞のシグナル伝達経路に関与するものであることが明らかにされている (Heath 1998)。

R 遺伝子の一例として、トマトの一品種が *Pseudomonas syringae* の感染に対して示す抵抗性を司る遺伝子として同定された *Pto* 遺伝子について以下に述べる。*Pto* 遺伝子は細胞質に存在するセリン/スレオニン プロテインキナーゼをコードしており、*Pto* 遺伝子産物 (*Pto*) は、バクテリアの *avr* 遺伝子産物と結合した後にある種の複数の転写因子を活性化する。活性化された転写因子が、PRタンパク質をコードする遺伝子の発現を促進することが明らかにされている (Zhou et al. 1997)。この一方で、*avr* 遺伝子産物と結合した *Pto* が上記転写因子とは別の遺伝子産物 (ある種のセリン/スレオニン プロテインキナーゼ) を活性化し、細胞死を引き起こす要因になることが示された (Zhou et al. 1995)。

HRにおける細胞死と病原体抵抗性遺伝子の活性化が別の経路で制御されていることを示す実験結果は、上記の *Pto* 遺伝子によるものの他にもいくつか報告されている (Pérez et al. 1997, Büschges et al. 1997, Hunt et al. 1997)。

HRの実行過程において、細胞外の活性酸素の急激な増加、いわゆるoxydative burstと呼ばれる現象が広く知られているが、oxydative burstが生じて細胞死が起こらないとの研究結果も報告されている (Baker and Orlandi 1995)。HRにおけるoxydative burstの役割については、活性酸素自体の抗病原体活性、細胞壁の強化、全身抵抗性発現誘導などが認められているものの、細胞死への関与については種々の実験結果の解釈が整理されておらず、一般化された見解は得られていない様である (Heath 1998, Jabs 1999)。

数種の細胞死変異体がトウモロコシ、シロイヌナズナ、オオムギ、ダイズなどで得られており、病原体が存在しない条件での疑似病斑の形成や、病原抵抗性の誘導が認められる (川崎・島本 1997)。トウモロコシの疑似病斑変異体 *Is1* を用いた解析によると、この変異は芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子の欠損によることが明らかにされており、この酵素がフェノール性の細胞死誘導物質 (サリチル酸が有力候補と考えられている) を分解することによって非感染植物でのHRを抑制している可能性が示唆されている (Gray et al. 1997)。

5. その他

上記のいずれにも属さないと思われるプログラム細胞死研究の数例を以下に取り上げた。

タバコ培養細胞に対して低温ストレスを与えると、クロマチン凝縮、DNAの規則的な断片化等のアポトーシスに特徴的とされる種々の変化が観察される (Koukalova et al. 1997)。タバコが本来寒さに弱い植物であることから、不適当な環境に対する細胞の応答として細胞死プログラムが誘導されたのだらうと彼等は考察している。

西尾ら (1998) は、カミツレ (*Matricaria chamomilla*) の培養細胞に geraniol とその関連化合物を投与し、それらの細胞死誘導能と、誘導された細胞死の特徴を調べている。彼等は geraniol, nerol, citronellol, 1-octanol が高い細胞死誘導能を持つことを見出し、同培養細胞に対して細胞死誘導能を持つ化合物の最小限の構造が、1-octanol であると結論している。誘導された細胞死の性質を調べたところ、DNAの断片化と、光合成明反応に関与する photosystem II 系のタンパク質と高い相同性を持つタンパク質の急激な分解とを伴っていることが明らかになった。ペルオキシダーゼと高い相同性を持つタンパク質の減少は遅いことが確認された。彼等はこの細胞死を外部ストレスに対する生態防御反応の一環としてとらえており、photosystem II 系のタンパク質分解に伴う葉緑体の崩壊が防御反応の初期に起こり、ペルオキシダーゼが生体防御に関わるものと考えている。

この他、シアン化合物によってタバコ葉の細胞にアポトーシス様のDNA断片化が検出されたとの報告 (Ryerson and Heath 1996)、ニンジン培養細胞の低密度培養によるアポトーシス様の細胞死誘導 (McCabe et al. 1997)、 $Pb(NO_3)_2$ によるシロイヌナズナ葉のHR様変化の誘導とファイトアレキシン蓄積 (Lummerzhim et al. 1995)、 $HgCl_2$ によるニンジン培養細胞の細胞死誘導とファイトアレキシン蓄積 (Marinelli et al. 1991) などが知られている。

1-3 本研究の目的および概略

本研究は大きく三つの部分に分けられる。第2章では *in vitro* におけるイチョウ細胞の分化誘導の試みについて述べた。イチョウを材料として過去に種々の分化誘導実験が試みられているが、成功例はほとんど知られていない。一般に、形質の優れた個体を大量増殖すること、興味の対象になりうる二次代謝物を *in vitro* で生産すること、そ

これらの二次代謝産物の生合成、代謝経路を明らかにすること、などを目的として分化誘導実験が行われている。イチョウの場合、挿し木、接ぎ木等が容易なため、一番目に上げた点の重要性は高くない。しかし、*in vitro*培養で植物体再生に成功したとの報告は過去に全く知られておらず、イチョウの分化誘導自体が研究対象として興味深いといえる。二番目、三番目は、二次代謝が分化に伴って発現する場合が多いことに基づく。均一な材料、培養条件での二次代謝研究を行うには、*in vitro*での器官分化誘導系を用いるのが好都合である。第2章においても、二次代謝研究に使用可能な分化誘導系の確立を最終的な目的として実験を行った。

第3章では、イチョウに特異的な二次代謝産物であるginkgolide類を対象とし、成木の各部位、幼植物、各種培養細胞における含有量変動等を調べた。これにより、ginkgolide類の生成と成長、分化との関連を考察した。また、培養細胞については、培養条件がginkgolide類生成にどのような影響を及ぼすかを調べた。

第4章では、植物体の分化や生存そのものにとって不可欠な事象である細胞死に着目した。動物では極めて急速な進展を示している研究分野であるが、植物での研究は未だに断片的なものが多く、現状ではかなり遅れを取っている。とりわけ、樹木は非常に多くの細胞死を包含する生物であるにも拘らず、樹木を対象とした細胞死研究に至っては極めて少ないと思われ、その種の研究例は殆ど見かけない。そこで、実験的な細胞死誘導系を確立し、樹木細胞での細胞死制御機構を解明することを目的とした実験を試みた。動物でのアポトーシス研究例を参考にしてイチョウ培養細胞に人為的に細胞死を誘導し、種々の変化を観察、定量した。アポトーシスとの類似性、相違点を中心に考察を行った。また、植物細胞での人為的な過敏反応の誘導例を参考にし、それをイチョウ培養細胞に適用した実験についても検討を行った。

- Baker CJ, Orlandi EW (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Ann Rev Phytopathol* 33: 299-321
- Bruno C, Cuppini R, Sartini T, Ambrogini P, Bombardelli E (1993) Regeneration of motor nerves in bilobalide-treated rats. *Planta Med* 59: 302-307
- Büsches R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Topsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P (1997) The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705
- Camper ND, Coker PS, Wedge DE, Keese RJ (1997) *In vitro* culture of *Ginkgo*. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 33: 125-127
- del Pozo O, Lam E (1998) Caspase and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr Biol* 8: 1129-1132
- DeLong A, Caldelon-Urrea A, Dellaporta SL (1993) Sex determination gene *TASSELSEED 2* of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion. *Cell* 74: 757-768
- Diwok M, Kuklinski B, Ernst B (1992) Superoxide dismutase activity of *Ginkgo biloba* extract. *Z Gesamte Inn Med* 47: 308-311
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Ann Rev Phytopathol* 9: 275-296
- Fukuda H, Komamine A (1980a) Establishment of an experimental system for the tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol* 65: 57-60
- Fukuda H, Komamine A (1980b) Direct evidence for cytodifferentiation to tracheary elements without intervening mitosis in a culture of single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol* 65: 61-64
- Fukuda H, Watanabe Y, Kuriyama H, Aoyagi S, Sugiyama M, Yamamoto R, Demura T, Minami A (1998) Programming of cell death during xylogenesis. *J Plant Res* 111: 253-256
- Gray J, Close PS, Briggs SP, Johal GS (1997) A novel suppressor of cell

- death in plants encoded by the *lsl1* gene of maize. Cell 98: 25-31
- Grbic V, Bleecker AB (1995) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. Plant J 8: 595-602
- Greenberg JT (1996) Programmed cell death: A way of life for plants. Proc Natl Acad Sci USA 93: 12094-12097
- Hasler A, Sticher O, Meier B (1992) Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 605: 41-48
- Havel L, Durzan DJ (1996) Apoptosis during diploid parthenogenesis and early somatic embryogenesis of norway spruce. Int J Plant Sci 157: 8-16
- Heath MC (1998) Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. Eur J Plant Pathol 104: 117-124
- Hunt MD, Delaney TP, Dietrich RA, Weymann KB, Dangl JL Ryals JA (1997) Salicylate-independent lesion formation in *Arabidopsis lsd* mutants. Mol Plant-Microb Int 10: 531-536
- Jabs T (1999) Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. Biochem Pharmacol 57: 231-245
- Joyeux M, Lobstein A, Anton R, Mortier F (1995) Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from *Ginkgo* and some flavonoids. Planta Med 61: 126-129
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239-257
- Kim HK, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP (1999) Inhibition of rat adjuvant-induced arthritis by ginkgetin, a biflavone from *Ginkgo biloba* leaves. Planta Med 65: 465-467
- Kombrink E, Somssich IE (1995) Defense responses of plants to pathogens. Advances in botanical research Vol 21: 2-33
- Koukalova B, Kovarik A, Fajkus J, Siroky J (1997) Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. FEBS Lett 414: 289-292
- Leist M, Nicotera P (1997) The shape of cell death. Biochem Biophys Res

- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crow RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1366: 177-196
- Lummerzhim M, Sandroni M, Castresana C, De Oliveila D, Van Montagu M, Roby D, Timmerman B (1995) Comparative microscopic and enzymatic characterization of the leaf necrosis induced in *Arabidopsis thaliana* by lead nitrate and by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* after foliar spray. *Plant Cell and Env* 18: 499-509
- Major RT (1967) The Ginkgo, the most ancient living tree. *Science* 157: 1270-1273
- Marcocci L, Maguire JJ, Drog-Lefaix MT, Packer L (1994) The nitric oxide scavenging property of *Ginkgo biloba* extract Egb761. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 748-755
- Marinelli F, Di-Gregorio S, Ronchi VN (1991) Phytoalexin production and cell death in elicited carrot cell suspension cultures. *Plant Sci* 77: 261-266
- Marita J, Marcocci L, Drog-Lefaix MT, Packer L (1995) Peroxylradical scavenging activity of *Ginkgo biloba* extract Egb761. *Biochem Pharmacol* 49: 1649-1655
- Maruyama M, Terahara A, Itagaki Y, Nakanishi K (1967a) The ginkgolides. I - II. *Tetrahedron Lett* 4: 299-308
- Maruyama M, Terahara A, Nakadaira Y, Woods MC, Nakanishi K (1967b) The ginkgolides. III. *Tetrahedron Lett* 4: 309-313
- Maruyama M, Terahara A, Nakadaira Y, Woods MC, Takagi Y, Nakanishi K (1967c) The ginkgolides. IV. *Tetrahedron Lett* 4: 315-319
- McCabe PF, Levine A, Meijer P-J, Tapon NA, Pennell RI (1997) A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant J* 12: 267-280
- Minami A, Demura T, Fukuda H (1996) Specific and transient expression of gene for cystein protease during tracheary element differentiation of *Zinnia* cells. *Plant Cell Physiol* 37(supple): s123, No.459

- Minami A, Fukuda H (1995) Transient and specific expression of a cystein endopeptidase during autolysis in differentiating tracheary elements from *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol* 36: 1599-1606
- Mittler R, Lam E (1995) Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. *Plant Cell* 7: 1951-1962
- Nakanishi K (1967) The ginkgolides. *Pure Appl Chem* 14: 89-113
- Nakanishi K, Habaguchi K, Nakadaira Y, Woods MC, Maruyama M (1971) Structure of bilobalide, a rare *tert*-butyl containing sesquiterpenoid related to the C20-ginkgolides. *J Am Chem Soc* 93: 3544-3546
- Okabe K, Yamada K, Yamamura S, Takada S (1967) Ginkgolides. *J Chem Soc (C)* 21: 2201-2206
- Perez V, Huet J-C, Nespoulous C, Pernollet J-C (1997) Mapping the elicitor and necrotic sites of *Phytophthora* elicitors with synthetic peptides and reporter genes controlled by tobacco defense gene promoters. *Mol Plant-Microbe Int* 10: 750-760
- Pincemail J, Dupuis M, Nasr C (1989) Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of *Ginkgo biloba* extract. *Experientia* 45: 708-712
- Rohr R (1989) Maidenhair Tree (*Ginkgo biloba* L.). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 5, Trees II*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 574-590
- Ryerson DE, Heath MC (1996) Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell* 8: 393-402
- Sakabe et al. (1967) The structure of ginkgolide A, a novel diterpenoid trilactone. *Chem Commun* : 259-261
- Sancesario G, Kreutzberg GW (1986) Stimulation of astrocytes affects cytotoxic brain edema. *Acta Neuropathol* 72: 3-14
- Scholtyssek H, Damerau W, Wessel R, Schimke I (1997) Antioxidative activity of ginkgolides against superoxide in an aprotic environment. *Chem-Biol Interact* 106: 183-190
- Schwartz LM, Smith SW, Jones MEE, Osborne BA (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA*

- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-487
- Smith PF, MacLennan K, Darlington CL (1996) The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor. *J Ethnopharmacol* 50: 131-139
- Stakman EC (1915) Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J Agric Res* 4: 193-299
- Sticher O (1993) Quality of *Ginkgo* preparations. *Planta Med* 59: 2-11
- Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (1998) Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1366:151-165
- Thelen MP, Northcote DH (1989) Identification and purification of a nuclease from *Zinnia elegans* L. A potential molecular marker for xylogenesis. *Planta* 179: 181-195
- Weinges K, Bähr W (1969) Bilobalid A, ein neues Sesquiterpen mit *tert*-Butyl-Gruppe aus den Blättern von *Ginkgo biloba*. *Liebigs Ann Chem* 724: 214-216
- Weinges K, Hepp M, Jaggy H (1987) Isolierung und Stracturaufklärung eines neuen Ginkgolids. *Liebigs Ann Chem*: 521-526
- Weinges K, Rümmler M, Schick H (1993) Herstellung von 1,10-Dihydroxy- und 1,7,10-Trihydroxy-ginkgolid aus 1,3,7,10-Tetrahydroxyginkgolid. *Liebigs Ann Chem*: 1023-1027
- Woods MC, Miura I, Nakadaira Y, Terahara A, Maruyama M, Nakanishi K (1967) The ginkgolides. V. *Tetrahedron Lett* 4: 321-326
- Yen C-H, Yang C-H (1998) Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiol* 39: 922-927
- Zhou J, Loh Y-T, Bressan RA, Martin GB (1995) The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *Cell* 83: 925-935
- Zhou J, Tang X, Martin GB (1997) The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J* 11: 3207-3218

- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413
- 猪原直弘, 小関健由 (1998) アポトーシス調節タンパク質の構造と機能, *細胞工学* 17: 875-880
- 大槻勝紀 (1999) 細胞死とは何か—その分類・意義・展望, *化学と生物* 37: 576-581
- 小田 真, 里内 清, 斎藤國彦 (1991) PAFと疾患, *蛋白質 核酸 酵素* 36: 363-369
- 加藤雅啓 (1996) イチョウの形態と系統, *プランタ* 47(9): 4-8
- 金井弘夫 (1981) イチョウと植物地理学, *植物と自然* 15(11): 17-20
- 嘉糠洋陸, 岡野栄之, 三浦正幸 (1999) Apaf-1/CED-4ファミリーによるCaspase活性化カスケード, *細胞工学* 18: 1773-1780
- 川崎 努, 島本 功 (1997) 細胞死と耐病性, “細胞工学別冊, 植物細胞工学シリーズ 8, 分子レベルから見た植物の耐病性”, 秀潤社, pp 124-130
- 杭田慶介 (1998) Caspaseノックアウトマウスの解析, *細胞工学* 17: 899-906
- 佐藤康成 (1996) “新特産シリーズ ギンナン”, 農山漁村文化協会
- 清水重臣, 成田匡志, 辻本賀英 (1999) Bcl-2ファミリーの機能ターゲットVDAC: 解明されるアポトーシス制御の分子機構, *細胞工学* 18: 1765-1772
- 杉本亜砂子 (1997) 線虫におけるプログラム細胞死の分子機構, “現代化学・増刊 35, アポトーシス研究の新展開”, 米原 伸編, 東京化学同人, pp 3-10
- 寺澤道夫 (1991) PAFアンタゴニスト, *蛋白質 核酸 酵素* 36: 379-387
- 西尾陽介, 宗綱洋人, 山上智英, 芦田嘉之, 泉 俊輔, 平田敏文 (1998) 鎖状低分子化合物によるカミツレ培養細胞のアポトーシス, 第16回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム講演要旨集, 仙台 p 96
- 山田 武, 大山ハルミ (1994) “アポトーシスの科学”, 講談社
- 湯浅 明 (1981) イチョウの植物学, *植物と自然* 15(11): 4-10

2-1 緒言

イチョウを材料とした*in vitro*での培養研究は、1950年代から近年まで種々試みられており、胚または半数体細胞（配偶体）を外植体として用いた研究例が多い（Rohr 1989）。外植体として胚を用いて、不定胚を誘導した例が知られている（Yates 1986, Laurain *et al.* 1996）。また、胚由来カルスおよびその懸濁培養細胞の成長や培地成分、植物ホルモン要求性等について詳細な研究がなされている（Carrier *et al.* 1990）。半数体細胞を用いた研究も同様の早い時期から行われている。雄性配偶体（花粉）を用いた実験では、古くはカルスの増殖が報告されている（Tulecke 1953）。近年では、未成熟花粉の培養によって不定胚が分化したとの報告がなされている（Laurain *et al.* 1993a）。雌性配偶体の場合では、カルス誘導（Laurain *et al.* 1997）、不定胚誘導（Laurain *et al.* 1993b）の例がある。上述のいずれの報告でも、得られた不定胚（様）器官の成長や、植物体再生には成功していないと思われ、続報も出されていない。

一方、体細胞を用いた場合については、*in vitro*培養自体を中心的にとりあげた形での報告は少ない（Rohr 1989）。*in vitro*でginkgolide類生成を試みた数例の報告中で、体細胞からのカルス、器官等の誘導について示されたものがある。すなわち、葉から誘導した培養細胞を用いたもの（Jeon *et al.* 1995）、根の培養を行っているもの（Huh and Staba 1993）、葉から直に根が分化したとされる状態で用いているもの（Cartayrade *et al.* 1997）、*Agrobacterium rhizogenes*による形質転換体と、成熟雌性配偶体由来のカルスを用いて培養系を確立したもの（Laurain *et al.* 1997）、等の例がある。

以上のことを踏まえ、本章では種々の外植体を用い、他の植物材料で成功した例の知られるものを参考にしつつ、不定胚をはじめとした器官分化から、植物体再生までを目指した実験を行った。また、カルス状態で維持可能な状態の細胞を用いて、器官等の再分化系確立を試みた。これにより、ginkgolide生成実験に用いる*in vitro*細胞培養系を得ることを最終的な目標とした。

2-2 各種外植体を用いた分化誘導の試み

〔緒言〕

植物細胞培養においては、Linsmaier and Skoog (1965) 培地—通例LS培地と呼んでいる—が基本培地として広く用いられている。LS培地は、タバコのカルス増殖に適した培地として開発されたMurashige and Skoog (1962) 培地と無機塩類の組成が同一であり、数多くの植物培養用培地の内で最も高濃度の窒素を含んでいる培地である。このような高濃度の培地はそのままでは器官分化研究にあまり適したものとは言えない(谷本・原田 1990a)。特に窒素源の影響は非常に大きく、トレンニア(*Torenia fournieri*)の茎切片からの不定芽原基の分化やバラのカルスからの不定芽分化は還元型窒素 NH_4NO_3 の除去により著しく促進された(谷本・原田 1990a)。しかしながら、植物種によっては逆に NH_4NO_3 の除去が不定芽分化を大きく阻害したとの報告もある(三位 1989)。不定芽分化に対しては還元型窒素は促進的に働くといわれている(谷本・原田 1990a)。有機態窒素であるアミノ酸添加による不定芽分化への影響を調べた結果によると、グルタミン酸、グルタミン、アラニン、アスパラギンなどが分化促進効果を持っていたとされる(Kamada and Harada 1979)。

2-1で記した様に、不定芽誘導の数例(Yates 1986, Laurain et al. 1993a,b, 1996)、葉から不定根を誘導したとされる例(Cartayrade et al. 1997)を除き、これまでにイチゴの*in vitro*での器官分化や植物体再生が報告されたことはないと思われる。そこで本項目に示した実験では、胚、葉柄、葉身、幼根を外植体として用い、LS培地を基本培地としてその無機成分、特に窒素成分濃度の改変、さらに種々の植物ホルモンを組み合わせる添加することによる器官分化の誘導を試みた。

〔実験〕

材料

外植体として、胚(落果後3月まで冷蔵保存した果実から摘出)、葉柄、葉身(いずれも5月に採取)、幼根を用いた。

幼根については胚をIBA (1.0ppm)含有のLS1培地(後述)において無菌培養した際に発芽、発根したものをを用いた。

外植体の調製

葉柄、葉身は表面の水洗いの後、70%エタノール水溶液に1分間、次いで1%次亜塩

素酸ナトリウム水溶液に15分間浸して滅菌処理した。これを滅菌水で3回すすぎ、葉柄は約1cmの長さ、葉身は約1.5cm四方程度に切りそろえ、植え付けに用いた。胚については、殻を取り除いた種子を同様に滅菌した後、内部の胚を無菌的に取りだして使用した。幼根は前述のように試験管内で生育した幼植物体から切り離し、長さ1cm程度に切りそろえて植え付けた。

培地の調製

基本培地として、以下に示す三種類を用いた。

1. Linsmaier&Skoog (LS) 無機塩類にイノシトール100mg/l、塩酸チアミン1.0mg/l、ショ糖30g/lを加えたもの (LS1と略す)
2. LS1から NH_4NO_3 を完全に除いたもの (LS2と略す)
3. LS1の無機塩濃度を1/2にし、グルタミンを250mg/l加えたもの (LS1/2+Qと略す)

植物ホルモンは2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、ナフタレン酢酸 (NAA)、インドール酢酸 (IAA)、インドール酪酸 (IBA)、カイネチン (K)、ベンジルアデニン (BA)を種々組み合わせて添加した。pHは5.8~6.0に調整し、オートクレーブで滅菌した。培地はすべてゲランガムを0.2%加えて固化させた。植物ホルモンの内、IAAおよびIBAは、オートクレーブ後培地が固化する前にフィルター滅菌して加えた。

培養

培養はすべて、16時間明期 (1200lux)、8時間暗期、温度26℃の条件で行った。

[結果・考察]

培養の結果はTable 2-1に示した。胚はLS1を基本培地として培養した。置床数日の内には胚全体が水を含んで膨張したようになり、表面にわずかなカルス様細胞が認められるようになるが、この細胞はそれ以上増殖することはなかった。この現象は胚以外の外植体の場合にも広く認められた。この状態の後、IAAまたはIBAを0.5~1.0ppm添加した培地では胚からの発芽が多く観察された。サイトカイニンであるBAをIBAと組み合わせて添加したが、IBAのみ添加した場合との差違は認められなかった。一方、2,4-DまたはNAAをオーキシニンとして添加し、サイトカイニンであるBAないしはKの添加と組み合わせた時には、前述のカルス様細胞とは異なる盛んに増殖するカルスが

Table 2-1. Hormonal responses of explants on modified LS media

Explants	Basal media	Plant growth regulators (mg/l)	Results*
Embryo	LS1	IAA(0.5)	G4,N1/5
	LS1	IBA(0.5)	G3,N2/5
	LS1	IBA(1.0)	G3,N2/5
	LS1	IBA(1.0)+BA(0.2)	G2,N2/4
	LS1	NAA(1.0)	C ⁺ 4,N1/5
	LS1	NAA(1.0)+BA(0.2)	C ⁺ 5/5
	LS1	NAA(2.0)+K(5.0)	C ⁺⁺ 5/5
	LS1	2,4-D(0.5)+K(0.4)	C ⁺⁺ 5/5
Petiole	LS2	NAA(1.0)+BA(1.0)	C5/5
	LS2	NAA(2.0)+BA(1.0)	C4,D1/5
	LS2	NAA(3.0)+BA(1.0)	C5/5
	LS2	NAA(1.0)	C4,D1/5
	LS2	IBA(1.0)	D5/5
	LS2	BA(1.0)	D5/5

(continued on next page)

Table 2-1. (continued)

Explants	Basal media	Plant growth regulators (mg/l)	Results*
Leaf	LS1/2+Q	NAA(1.0)+BA(0.5)	C5/5
	LS1/2+Q	NAA(0.5)+BA(0.5)	C5/5
	LS1/2+Q	NAA(1.0)	C ⁺ 5/5
	LS1/2+Q	BA(0.5)	D5/5
Root	LS1/2+Q	NAA(1.0)+BA(0.5)	C4/4
	LS1/2+Q	NAA(0.5)+BA(0.5)	C4/4
	LS1/2+Q	NAA(1.0)	C ⁺ 4/4
	LS1/2+Q	BA(0.5)	D4/4

* number of explants showing the results described below
/number of explants tested

G : germination

C⁺, C⁺⁺ : green callus formation
(subculturable; callus growth C⁺<C⁺⁺)

C : callus formation
(not subculturable; blowing or bad growth)

N : change slightly (not dead)

D : dead

得られた。不定根、不定芽等が直接分化することはなかった。NAA(2ppm)+K(5ppm)の場合、生じたカルスから続けて不定胚が分化するとの報告がなされているが(Yates 1986)、本実験で得られた細胞を観察した結果、不定胚は確認できず、全てカルスであるとするのが妥当だと思われる。ただ、この細胞は固くてもろく、ニンジン (*Daucus carota* L.) のembryogenic callusの場合(佐藤 1989)と同様、不定胚分化能の高い、もしくは一部不定胚への分化途上であると判定すべき細胞を含んだ細胞集団である可能性はあると思われた。そこで、カルスを用いた再分化実験の際にはこの細胞系を用いることとした(本章2-3に後述)。

葉柄の培養では、培地中のアンモニウムイオンが不定芽の分化に阻害的であるという報告(谷本・原田 1990a)を考慮してLS2を基本培地に用いた。LS1を用いて、一般的に用いられる植物ホルモンを組み合わせ添加して同種の実験が行われた際に、器官等の分化が全く認められなかったことも考慮した(佐藤 1990, 1992)。IBAあるいはBAのみを加えた場合、分化、カルス化のいずれも観察されなかった。NAAのみ、あるいはNAA+BAの場合にはカルス化が観察されたが継代には至らず褐変枯死した。葉身及び根の培養にはグルタミンの不定芽分化促進効果(Kamada and Harada 1979)を考慮して、LS1/2+Qを基本培地として用いた。どちらの外植体についても、BAのみでは分化、カルス化とも観察されなかった。NAAを含む培地ではいずれもカルス化が見られたが、不定芽の分化は確認できなかった。NAAとBAの両方を添加した場合には、生じたカルスは次第に褐変が激しくなり継代培養するに至らなかった。NAAのみ添加の場合に得られたカルスは、殆ど褐変せず継代可能な量にまで増殖し、数代にわたって継代培養できた。以上のことから、イチョウにおいてはカルスの誘導、成長にはオーキシンとしてNAAが含まれれば十分であり、BAが共存するとカルス褐変の原因物質がより多量に、もしくはより早期から生合成されるようになり、その結果、細胞の成長が阻害されたと考えられる。ただし、今回は外植体からの直接の分化を主目的とした実験であり、脱分化した後の細胞を維持するというのが目的ではなかったため、褐変し始めた細胞に対して特に対策を講じなかった。これは葉柄の培養時についても同様である。新鮮培地に植え継ぐなどすれば、カルスとしての維持、増殖は可能だったかもしれない。

2-3 各種培養細胞の再分化試験

〔緒言〕

前項で述べたように、イチヨウ外植体からの直接の器官分化は全く誘導されず、数種類の継代培養可能なカルスのみが得られた。そこで、得られたカルスからの再分化を目的とした実験を行うこととした。外植体からの直接の器官分化にくらべて、カルス化した細胞が再度器官を形成することはさらに困難であると予想されたが、*in vitro*での器官分化系を確立するという最終的な目標を考慮すれば、外植体からの直接の分化以上に、カルスとして維持できる細胞系からの再分化の方が重要であるといっていだらう。前項に準じ、培地の窒素成分の改変や、種々の植物ホルモン（様）物質の器官分化誘導に対する効果を調べた。

〔実験〕

材料

前項2-2の実験において、植物ホルモンとしてNAA(2ppm)+K(5ppm)を含むLS1培地上で胚から誘導し、同培地にて1ヶ月毎に数ヶ月間継代培養した緑色カルスを用いた。

培地の調製

基本培地として、前述のLS1、LS2、LS1/2を用いた。植物ホルモンとして、NAA、IAA、IBA、K、BA、ゼアチン（Z）、アブシジン酸（ABA）、ジベレリンA₃（GA）を適当な濃度で組み合わせて添加した。さらに、抗オーキシシンとしてトリヨード安息香酸（TIBA）の分化誘導効果を検討した（谷本・原田 1990b）。これらすべての培地の調製は、前項の方法に従った。なお、IAA、IBA、Z、ABA、GAについてはオートクレーブ滅菌後の培地にフィルター滅菌して添加した。

培養

各々の分化用培地にカルスの小片を移植し、16時間明期（1200lux）、8時間暗期、温度26℃の条件で培養した。約1ヶ月後に観察し、枯死していないものについては同一の培地に再び移植した。

〔結果・考察〕

この実験は主に不定芽の分化誘導を目的として行ったものであるが、器官の再分化等は全く認められず、培地毎にカルスの成長に差が見られたのみだった。基本培地の種類に拘らず、サイトカイニンのみの添加ではカルスの成長、不定芽等の器官分化のいずれに対しても全く効果が見られず、細胞は次第に褐変枯死した。さらにABA、TIBAについても今回の使用濃度では器官分化を誘導しなかった。GAは、不定芽原基で留まっている構造が生じた場合に、それを正常な不定芽にまで成長させる効果があるとされる(三位 1989)。しかしながら、今回の使用濃度では不定芽誘導の効果は認められなかった。オーキシンとして用いたNAAについては、本実験でカルスを継続して培養する際に用いている濃度(1ppm程度)と比較してかなりの低濃度

(0.05ppm)でもカルスはしばらく増殖を続けた。ただし、NAAの通常濃度の場合に比べて生育はかなり鈍くなった。これに対して、IBAをオーキシンとして用いた場合には器官分化、カルスの成長のいずれに対しても全く効果が見られなかった。このことから、この実験で用いたカルスについては、1ppm程度のNAAはその成長に対して効果的だが、IBAは濃度1ppmで添加した場合には効果がないと考えられた。ニンジン培養細胞では不定胚誘導能の高い細胞をオーキシン含有培地からオーキシンを含まない培地に移植すると不定胚が生じることは古くから知られている。それに倣ってホルモンプリーの培地に移植した場合にも不定胚が生じるようなことはなく、成長が止まって褐変してしまった。これらの培養結果については、Table 2-2にまとめた。

2-4 総括

今回の実験で調べた限りでは、通常用いられることの多い葉、胚、等の外植体、培地、植物成長調節物質等の種々の組み合わせでは、器官分化は観察されなかった。その一方でカルスの誘導はいずれの外植体でもかなり容易であり、そのまま継代培養できるものも多いことが分かった。

イチョウは強剪定に強く、また大木の移植も可能である。街路樹等でしばしば大きく切り縮められているのを目にするが、その後の芽吹きは旺盛で樹勢の回復も早い。また、萌芽直前の時期に挿し木を試みたところ、極めて容易に活着し、ほぼすべての挿し木枝から苗木が得られた。これらのことから、イチョウ植物体の分化能自体は極めて高いことが分かる。また、挿し木の発根が容易であることから、逆に脱分化がお

Table 2-2. Hormonal responses of embryo-derived calli on modified LS media.

Basal media	Plant growth regulators (mg/l)	Growth responses*	
		Callus growth	Organogenesis
LS1	BA(1.0)	D	—
LS1	K(1.0)	D	—
LS1	Z(1.0)	D	—
LS1	BA(0.5)+Z(0.5)	D	—
LS1	K(0.5)+Z(0.5)	D	—
LS1	BA(0.5)+K(0.5)+Z(0.5)	D	—
LS1	BA(0.5)+Z(0.5)+NAA(0.1)	Slow	—
LS1	K(0.5)+Z(0.5)+NAA(0.1)	Slow	—
LS1	BA(0.5)+K(0.5)+Z(0.5)+NAA(0.1)	Slow	—
LS1	IAA(1.0)	D	—
LS1	None	D	—
LS2	BA(0.4)	D	—
LS2	BA(0.4)+NAA(0.05)	Slow	—
LS2	BA(2.0)+NAA(0.2)+ABA(0.1)	D	—
LS2	BA(2.0)+NAA(0.2)+GA(0.2)	D	—
LS2	BA(2.0)+ABA(0.1)+TIBA(5.0)	D	—
LS2	BA(2.0)+GA(0.2)+TIBA(5.0)	D	—
LS2	IBA(1.0)	D	—
LS1/2	IBA(1.0)	D	—
LS1/2	None	D	—

D : dead, — : not observed

* Calli were cultured for 30 days, then transferred to the same fresh media and cultured for 30 days again.

こりやすいともいえる。原植物体でのこのような脱分化-分化の制御機構を*in vitro*でも再現できるのではないかと期待したが、実際には本実験での一般的な培地と植物ホルモンの組み合わせでは、希望した反応は全く認められなかった。今後は、現在のLS培地を基本に用いた培養法から離れるなど、新しい方法を考える必要があるだろう。

- Carrier D-J, Cosentino G, Neufeld R, Rho D, Weber M (1990) Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture. *Plant Cell Rep* 8: 635-638
- Cartayrade A, Neau E, Sohier C, Balz J-P, Carde J-P, Walter J (1997) Ginkgolide and bilobalide biosynthesis in *Ginkgo biloba*. 1: Sites of synthesis, translocation and accumulation of ginkgolides and bilobalide. *Plant Physiol Biochem* 35: 859-868
- Huh H, Staba EJ (1993) Ontogenic aspects of ginkgolide production in *Ginkgo biloba*. *Planta Med* 59: 232-239
- Jeon MH, Sung SH, Huh H, Kim YC (1995) Ginkgolide B production in cultured cells derived from *Ginkgo biloba* L. leaves. *Plant Cell Rep* 14: 501-504
- Kamada H, Harada H (1979) Influence of several growth regulators and amino acids on in vitro organogenesis of *Torenia fournieri* L. *J Exp Bot* 30: 27-36
- Laurain D, Chénieux J-C, Trémouillaux-Guiller J (1993b) Direct embryogenesis from female haploid protoplasts of *Ginkgo biloba* L., a medicinal woody species. *Plant Cell Rep* 12: 656-660
- Laurain D, Chénieux J-C, Trémouillaux-Guiller J (1996) Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Ginkgo biloba*. *Plant Cell Tissue Org Cult* 44: 19-24
- Laurain D, Trémouillaux-Guiller J, Chénieux J-C (1993a) Embryogenesis from microspores of *Ginkgo biloba* L., a medicinal woody species. *Plant Cell Rep* 12: 501-505
- Laurain D, Trémouillaux-Guiller J, Chénieux J-C, van Beek TA (1997) Production of ginkgolide and bilobalide in transformed and gametophyte derived cell cultures of *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry* 46: 127-130
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factors requirements of tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 18: 100-127
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497

- Rohr R (1989) Maidenhair Tree (*Ginkgo biloba* L.). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 5, Trees II. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 574-590
- Tulecke W (1953) A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba*. Science 117: 599-600
- Yates WF (1986) Induction of embryogenesis in embryo-derived callus of *Ginkgo biloba* L. Abstr VI Int Congr Plant Tissue Cell Cult, Univ of Minnesota, p 43
- 佐藤 忍 (1989) 不定胚形成と細胞分化. 植物細胞工学 1: 99-107
- 佐藤征嗣 (1990) 木本植物の分化に関する基礎研究. 東京大学農学部修士学位論文
- 佐藤征嗣 (1992) イチョウの分化(緑化)とフラバノール類の構造変化. 東京大学農学部修士学位論文
- 谷本静史, 原田 宏 (1990a) 培地の無機成分. 植物細胞工学 2: 731-735
- 谷本静史, 原田 宏 (1990b) ホルモン. 植物細胞工学 2: 653-658
- 三位正洋 (1989) 不定芽分化の制御. 植物細胞工学 1: 117-124

3-1 緒言

イチョウ植物体におけるginkgolide類の定量的な分析については、その多くが bilobalideと同時に進められている。1980年代以降、抽出、精製、分析手法について、多くの研究がなされ、改善が進められてきた。抽出については、有機溶媒で順次分配抽出を行うもの(Huh and Staba 1993)、複数のカラムによる精製段階を含むもの(van Beek et al. 1991)等があり、いずれもかなり煩雑ではあるが、精製度、回収率、再現性とも優れた方法が考案されている。分析手法については、ガスクロマトグラフィー(Huh and Staba 1993)、液体クロマトグラフィー(van Beek et al. 1991, Camponovo et al. 1995)、薄層クロマトグラフィー(van Beek and Lelyveld 1993)、NMR(van Beek et al. 1993)を用いたものがそれぞれ詳細に報告されており、いずれも、通常の試料の分析時に行うことが可能であると思われる。分析手法の発達に伴い、植物体内におけるginkgolide類の挙動やその生合成に関する情報が種々報告されるようになった。

van Beek and Lelyveld (1992) は、出芽から落葉までの期間を通じた葉中の ginkgolide A, B, Cとbilobalideの含有量を調べ、いずれも春から夏にかけて増加し、その後漸減することを示した。また、個体間での含有量に大きな違いがあることを見出した。Flesch et al. (1992) は、実生の幼植物を分析対象とし、発芽から三年間にわたってginkgolide類とbilobalideの含有量変化を追っている。それによると、葉、根、茎の各部分毎におけるginkgolide A, B, Cとbilobalideの合計を総テルペノイドとしてあらわした量は、葉では春から夏にかけて増加しその後減少するという、前出の報告と同様の傾向を示したとされる。根、茎での季節的変動は顕著ではなかった。葉と根それぞれの部位毎でのginkgolide Aとbilobalideの季節的変動を調べた結果、葉では両成分の季節変化が総テルペノイド量の変動と相似形を示したのに対し、根ではそのような傾向が認められなかった。これらのことから、葉における総テルペノイドの季節変化は、ginkgolide Aとbilobalide量の変動によるものであり、さらに、この含有量変動は太陽光線の増加と強い相関を持つものである、と彼等は結論している。

ginkgolide類とbilobalideの生合成関連の研究については、Nakanishi and Habaguchi (1971) がginkgolide Bがジテルペンであることを示して以来近年まで報

告がなかった。Huh and Staba (1993) は、イチヨウ幼植物を数種類のテルペノイド生合成阻害剤で処理し、各ginkgolideの含有量変動を調べており、カロテノイド生合成阻害剤が葉におけるginkgolide生成量を増加させたと報告している。Cartayrade *et al.* (1997) は、 $^{14}\text{CO}_2$ 、 $(\text{U-}^{13}\text{C})$ グルコースを用いた取り込み実験から、ginkgolide生合成においてはginkgolide Aが最初に生合成され、順次酸化されてginkgolide B、Cが生成すること、bilobalideの生成はginkgolide類より遅れること、さらにこれらのテルペノイドは専ら根で生合成され、葉に移行、蓄積することを示した。また、同グループにより、ginkgolide類とbilobalide生合成の中間体としてdehydroabietaneが生成すること、さらにdehydroabietaneからginkgolide類、bilobalideに至る反応中にはシトクロムP-450依存オキシゲナーゼが関与することが示唆されている (Neau *et al.* 1997)。

培養細胞を用いた研究例も、近年いくつか報告されている。初期には、胚由来の培養細胞を対象とし、煩雑な精製過程を経て極めて少量のginkgolide A、Bの検出に成功したとの報告がなされている (Chauret *et al.* 1991)。Jeon *et al.* (1995) は、葉由来の培養細胞における培養期間中のginkgolide B含有量の変動を調べ、培地中の窒素成分の影響を考察している。Carrier *et al.* (1996) は、葉由来の培養細胞を用いて、ginkgolide類を含めたジテルペンの生合成における初期の前駆体であるgeranylgeranylpyrophosphate (GGPP) へのisopentenylpyrophosphate (IPP) の取込みを調べた。彼等は、トリテルペンやセスキテルペンの前駆体であるfarnesylpyrophosphate (FPP) へのIPP取込みと比較した場合、GGPPへのIPP取込み量は十分の程度だったと報告している。Laurain *et al.* (1997) は *Agrobacterium rhizogenes* による形質転換体と、成熟雌性配偶体由来のカルスとを用いて懸濁細胞培養系を確立し、いずれも原植物と同程度のginkgolide類およびbilobalide含有量 (対乾燥重量) を示したと報告している。これまでに報告されたginkgolide類を生成する細胞培養系の中で最も高含有量のものであると思われる。この系が維持できれば、今後ginkgolideおよびbilobalideの生合成機構の解明が飛躍的に進むだろう。

以上述べたように、これまでの研究でginkgolide類の生合成機構や植物体の生育と同成分の関連に関する知見が徐々に蓄積されてきているが、現状では依然断片的なものである。本章においては、まず成木、幼木各種の試料での種々の部位におけるginkgolide類含有量を広く調べた結果を示した。その結果を参考にして、幼植物の発育過程でのginkgolide類含量の変動を詳細に検討し、これらに影響を与える要因について考察した。培養細胞については、第2章の実験により得られた数種類と、本研究

以前から維持、継代されている数種類を材料として調べた。

3-2 原植物におけるginkgolide類の分析

[緒言]

本項では、イチヨウ植物体の種々の部位におけるginkgolide類(ginkgolide A、B、C；以下G-A、G-B、G-Cと記す)の含有量を調べ、成長や季節による変動とginkgolide類代謝との関連を考察した。

[実験]

材料

植物試料としては以下のものを用いた。

緑葉、落葉、内樹皮、外樹皮、木部、根、胚乳、幼根、胚軸

なお、緑葉は農学部構内の複数の成木から8月に採取した。落葉は構内で11月の落葉直後に拾い集めた。根は、実生2年目の株から10月に採取した。内樹皮、外樹皮、木部は、4月下旬に同一の4年生枝部から採取した。胚乳は落果後3月まで冷蔵保存した種子から得た。幼根及び胚軸は6月の発芽直後の実生を構内で採集したものの、地下部及び地上部である。

試葉等

G-A、G-B、G-Cは、ドイツ、ハイデルベルク大学のH. Schick博士に御提供いただいた。また、G-Bについてはフナコシ株式会社から購入したものも使用した。

抽出、精製

各々の試料は凍結乾燥の後、コーヒーミルで粉末にし、Huh and Staba (1993)の方法に従って抽出、精製を行った。粉末化後抽出までの間は、蓋付き容器に移し、-20℃で密封保存した。抽出には500mg～1g程度の乾燥試料を精秤して用いた。なお、一連の精製操作によるginkgolide類の損失を調べるため、濃度既知のG-B標品水溶液を用いて同様の精製作業を行った。

分析

精製後の抽出物は各々5ml程度のメタノールに溶かした状態で、冷凍庫で密封保存した。分析時にはそこから適量を取り、メタノールを減圧留去してからトリメチルシリル (TMS) 化し、ガスクロマトグラフィー (GC) によって分析した。G-A、G-B、G-C の同定は標品との保持時間の一致と、さらに一部の試料では、ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (GC-MS) 分析でのマススペクトルの一致により行った。定量については、濃度既知のG-B標品を用いてGCチャート上での面積と量に関する検量線を作り、これを用いて各々の試料について対象ピーク的面積から量を算出した。G-A及びG-Cについても同様に検量線を作成したがG-Bの場合と大きく違わないことが分かったため、毎回の分析ではG-Bの検量線に従うものとして計算した。検量線は分析の度に作製した。分析条件等を以下に示した。

装置：島津製作所、GC-14A

TMS化剤：TRI-SIL/BSA Formula D (Pierce Chemical Co, USA),

80℃で1時間加熱して反応させた。

カラム：capillary TC-1 (0.25mm×30m)

カラム温度：285℃、注入部、検出部温度：300℃

キャリアーガス：N₂ 1.5kg/cm²、スプリット比：1:24,

検出器：FID、H₂：0.6kg/cm²、air：0.5kg/cm²

[結果・考察]

各々の試料についてG-A、G-BおよびG-Cの定量を行った結果をTable 3-1に示した。G-B 標品水溶液を用いた精製作業により、精製作業に伴う損失は10%弱であることが明らかになったが、定量結果の補正は行っていない。Table 3-1より、原植物では今回調べた全ての試料でginkgolide類の存在が確認された。各ginkgolideについてみると、緑葉ではG-A、G-Bはほとんど同量であるが、G-Cはそれらの1/5程度であった。落葉では各ginkgolideが緑葉に比べていずれもかなり減少しているが、減少量はG-Aがもっとも多く、ついでG-B、G-Cの順であった。これらの結果は、葉の老化に伴い、G-Aが最初に分解あるいは他器官に転流されることを示唆するものと考えられる。続いてG-B、G-Cが分解を受ける、または転流するものと思われる。

内樹皮、外樹皮、木部については4月に同一の枝部から採取した。新葉が展開して間もない状態であったが、内樹皮にはG-A、G-B、G-Cともかなりの量が含まれてい

Table 3-1. Ginkgolide contents ($\mu\text{g/g}$ dry weight) in various parts of ginkgo trees.

Sample	Content of ginkgolides ($\mu\text{g/g}$ dry weight)		
	G-A	G-B	G-C ^{*1}
green leaves	318	322	64.5
fallen leaves	27.2	75.5	17.3
inner bark	168	120	129
outer bark	80.2	47.3	56.9
wood	4.29	10.4	— ^{*2}
roots	1100	1060	135
albumens	8.10	123	16.8
young roots	1439	1280	239
hypocotyl	847	1270	—

^{*1}G-A, G-B, G-C = ginkgolide A, B and C, respectively

^{*2}—: trace amount

た。新葉には成熟葉とくらべてかなり少ない量のginkgolide類しか含まれないとの報告 (van Beek and Lelyfeld 1992) も考慮すると、内樹皮中に検出されたginkgolide類は新葉で生合成されたものの転流によるのではなく、形成層細胞あるいは篩部細胞において生合成されたものか、あるいは、葉において前年中に生合成されたものの蓄積、または他の器官、例えば根等で生合成され、転流、蓄積したものと考えるのが妥当であろう。外樹皮中のginkgolide類の合計量は内樹皮の場合の半分以下であったが、G-A、G-B、G-Cの量比については両サンプルで似通っていると思われた。このことは、内樹皮中に存在していたginkgolide類は、外樹皮への移行に伴う細胞死の際にあまり分解を受けないことを示唆するものと思われる。これは、葉の老化の場合と異なる。一方、木部に含まれるginkgolide類は内樹皮と比較してかなり少量だった。このことは、外樹皮の場合とは異なり、木部細胞の分化の際にはginkgolide類が細胞にほとんど保持されないこと、もしくは形成層細胞にはもともとginkgolide類が少量しか含まれていないことを示すものと考えられる。

10月に若木の根を採取して調製した試料では、ginkgolide類の総量は緑葉における量の3倍近くであることが分かった。各ginkgolideの量比は緑葉の場合と類似していた。これらのginkgolide類が根で生合成されたのか、他器官から転流してきたのかは今回の実験のみでは判断できない。

3月頃まで低温保存していた種子の胚乳部分ではG-Bのみが多く、G-A、G-Cは少ないという偏った割合であることが分かった。これらのginkgolide類が主に転流によるものとするならば、その主成分がG-Bであったことから、ginkgolide類の転流における中間体がG-Bないしはその関連化合物である可能性が考えられる。一方、胚乳の細胞自身がginkgolide類の生合成を行っており、それが胚乳中に蓄積しているという可能性もある。いずれの場合にせよ、種子における貯蔵形態としてはG-Bが安定だといつてよいだろう。ここまでの議論はイチョウ植物体内でginkgolideの転流が起こりうることを前提したものである。実際に、イチョウ植物体内でginkgolide類の輸送が大規模に行われている可能性が示されているが、輸送時の形態に関しては、ginkgolide類自体のみならず、予想される生合成中間体も含めて検出には成功していない (Cartayrade et al. 1997)。

発芽して間もない実生の幼植物体では、胚軸、根とも成木の緑葉と比べてかなり多量のginkgolide類が含まれていることが明らかとなった。幼植物におけるginkgolide類の挙動と成長との関連などについては次項の実験において詳細に検討した。

3-3 イチョウ幼植物の成長初期におけるginkgolide類の挙動について

〔緒言〕

前項の実験結果より、イチョウは胚乳に相当量のginkgolide類を蓄積すること、また発芽直後の幼植物にすでに多量のginkgolide類が含まれていることが明らかになった。そこで、本項では種子の段階から発芽成長の初期までのginkgolide類の挙動を調べ、成長との関連や、光条件をはじめとする種々の因子がginkgolide類合成に与える影響などについて考察した。

〔実験〕

材料

種子は1996年11月に東京大学農学部構内で、なるべく同一の親木由来になるように注意しながら拾い集めた。これらの種子は、すぐにginkgolide類分析用として用いるか、あるいは次年の2月および4月まで冷蔵庫にて保存した。

培養

4月まで冷蔵保存した種子を用いて、播種および試験管内での胚培養を行いそれぞれ幼植物を得た。

播種の際には用土としてパーミキュライトを使用し、パイオトロロンあるいは培養庫中にて培養した。パイオトロロンにおいては、自然光、昼間25℃、夜間20℃で管理した。また、培養庫では暗黒下、室温25℃にて管理した。数日ごとに灌水し、発芽が認められてから1ヶ月後に実生植物を採集して試料とした。

胚培養では、2-2における方法に準じて無菌的に摘出した胚を、植物ホルモンを添加しない1/2LSI培地に植え付けた。これらは16時間明期（蛍光灯、約1000lux）／8時間暗期、または暗黒下、両者とも室温25℃にて管理した。胚の大多数はいずれも置床後数日以内に発芽した。培養開始の1ヶ月後に、発芽が正常に行われたものを選んで試料とした。

試料の調製・分析

1996年11月、1997年2月および4月に、種子20個を適当に選んで胚乳と胚を分けて集めた。それぞれの試料は混合し、ginkgolide類の分析に供した。実生および胚培養による幼植物については、それぞれ明暗各培養条件下のものから20本

の植物体を適当に選び、それぞれまとめて試料とした。これらの試料は凍結乾燥し、乾燥重量を測定した。

ginkgolide類の抽出および分析は、前項3-2に記した方法と同様に行った。

[結果・考察]

Table 3-2には、それぞれの試料について、乾燥重量あたりの各ginkgolide含有量を定量した結果を示した。すべての試料についてginkgolide類が検出された。胚ではいずれの時期においても、G-Aが最も多く、G-Bがその1/3程度含まれることが分かった。G-Cは非常に微量で検出不可能だった。胚乳では時期によらずG-Bが主成分で、G-A、G-Cはかなり少なかった。実生、胚培養の幼植物とも、光の有無によらず、G-A、G-Bを生成することが明らかとなった。実生に関しては、暗所培養の場合、G-AとG-Bの含有量は殆ど等しいが、明所培養ではG-AがG-Bの2倍弱含まれていた。胚培養の幼植物については、光条件によらずG-AがG-Bよりやや多いことが分かった。G-Cは実生、胚培養の幼植物いずれについても検出できなかった。

Table 3-3では、Table 3-2の結果をもとに、G-A、G-B、G-Cの合計量を総ginkgolide量とし、試料1個あたりの量として示した。すなわち、乾燥重量あたりで表した総ginkgolide量を、乾燥重量に相当する試料の数で割った値を示した。ここで、一試料あたりの乾燥重量は試料20個の平均値である。これによると、11月の落果時から4月に至るまで、種子一個あたりのginkgolide総量（胚と胚乳での含有量の和）は大きく変動しないことが分かる。実生では、光の有無によらず両者はほぼ同量、かつ種子全体と比較して遥かに多い量が含まれることが分かった。このことは、イチョウの実生は光の有無にかかわらず、発芽の初期段階からginkgolide類を生合成することを示すものである。胚培養の幼植物でも同様に、ginkgolide類が明暗培養条件でほぼ同量検出された。この値は胚での含有量よりは多く、新たに生合成されたものと判断できるが、実生での値にくらべるとはるかに少量である。このように胚培養の幼植物で、実生よりかなり少ないginkgolideしか検出されなかったことの原因としては、胚乳からのginkgolide生合成前駆体もしくはginkgolideそのものの供給が断れたこと、あるいは胚乳を欠くことで成長が不十分になったこと等が考えられる。試験管内で高塩・糖濃度の培地を用いて培養するという特殊な環境自体がginkgolide生成に大きな影響をおよぼした可能性もあるだろう。

本項での一連の実験から、イチョウの発芽直後の幼植物におけるginkgolide類の生成には、光が重要な役割を持たないことが明らかになった。暗所培養の幼植物は完全

Table 3-2. Alteration of ginkgolide contents ($\mu\text{g/g}$ dry weight) in relation to storage period of seeds and culture condition for seedlings and plantlets.

Sample		Ginkgolide content ($\mu\text{g/g}$ d.w.) ^a		
		G-A	G-B	G-C ^d
Embryo	'96, Nov.	1290	475	— ^e
	'97, Feb.	1650	440	—
	'97, Apr.	925	338	—
Albumen	'96, Nov.	9.36	59.6	8.43
	'97, Feb.	9.03	119	15.8
	'97, Apr.	8.14	113	12.5
Seedling ^b	dark	1170	1180	—
	light ^c	1370	762	—
Plantlet ^b	dark	1250	844	—
	light ^d	1100	789	—

^a Each value is the result of extraction and assay of an aliquot of 20 samples mixed before drying.

^b G-A, G-B, G-C = ginkgolide A, B and C, respectively.

^c —: trace amount

^d Seedlings were obtained from the seeds sown in vermiculite and successively cultured for a month before harvest.

^e natural day light in a greenhouse

^f Plantlets were obtained from excised embryos *in vitro* and harvested one month after initiation of culture.

^g 1000lux of fluorescent light

Table 3-3. Alteration of total ginkgolide contents ($\mu\text{g}/\text{sample}$) in relation to storage period of seeds and culture condition for seedlings and plantlets^{a)}.

Sample		Content of total ginkgolides ^{b)} ($\mu\text{g}/\text{sample}$)
Seed	'96, Nov.	62.5
	'97, Feb.	72.8
	'97, Apr.	76.5
Embryo	'96, Nov.	10.9
	'97, Feb.	19.3
	'97, Apr.	13.4
Albumen	'96, Nov.	51.6
	'97, Feb.	53.5
	'97, Apr.	63.1
Seedling	dark	436
	light	441
Plantlet	dark	54.7
	light	51.0

^{a)} Sum of G-A, G-B and G-C in each sample group in Table 3-2, in units of $\mu\text{g}/\text{g}$ sample (dry weight), is converted to the unit of $\mu\text{g}/\text{sample}$.

^{b)} Total ginkgolide amount ($\mu\text{g}/\text{g}$ dry weight) is divided by the number of the samples equivalent to the dry weight. Here the dry weight per one sample is the mean of 20 samples.

に黄化し、全く葉が展開しない。しかし、一単位あたりのginkgolide含有量は、数枚の緑葉が展開している明所培養の場合と殆ど同じだった。このことから、ginkgolide類の生合成部位は葉のみではない、もしくは葉ではないことが示唆される。また、イチョウにおける葉緑体の分化は完全に光に依存すること (Chinn and Silverthorne 1993) を考慮すれば、イチョウ幼植物におけるginkgolide類の生合成は、葉緑体の分化と独立して行われることが明らかである。すなわち、色素体の関与を仮定した場合でも、エチオプラストなどの未分化な状態でginkgolide生合成能力を持つものと考えられる。ginkgolide類は専ら根で生合成され、葉や枝には単に蓄積するのみだとする報告 (Cartayrade *et al.* 1997) とも矛盾しないが、今回の実験のみでは葉がginkgolide生合成に無関係であるとの結論に達するのには無理がある。

以上のようにginkgolide総量で見ると、その生成と光とは深い関連がないように見えるが、実生での結果からは、光がG-AとG-Bの量比には何らかの影響をおよぼしているように思われる。ginkgolide生合成経路における各ginkgolide間の関係については、はじめにG-Aが生合成され、順次酸化されることによりG-B、G-Cが生成するという経路の存在が示されている (Cartayrade *et al.* 1997)。本実験の場合は、光によって誘導された器官あるいはオルガネラ等の分化が、各ginkgolide間の変換に影響をおよぼしたのと考えられる。逆に、暗黒下での培養という異常な環境では、G-AからG-Bへの酸化が過剰に起こったと考えるべきかもしれない。胚乳では、貯蔵の間にG-Aが減少し、より酸化の進んだG-BやG-Cが増加する傾向が認められた。それに対して、一試料あたりのginkgolide総量の変動はあまり大きくなかった。このことは、貯蔵の間に種子内部でG-Aが酸化され、G-B、G-Cへと変換される反応が起こっている可能性を示すものだろう。

3-4 培養細胞系におけるginkgolide類の分析

[緒言]

本項目では、第2章の実験により得られた数種類を含めた種々の培養細胞を材料として、それぞれのginkgolide含有量について調べた。これらの培養細胞はいずれも成長が比較的速く、一部については液体培地での培養が可能であり、さらに光による緑化のコントロールが容易である。そこで、これらの系を用いて光による緑化の影響や培養状態の相違がもたらす影響について考察した。

〔実験〕

材料

胚、葉柄及び形成層から誘導した各種のカルス、懸濁培養細胞を試料として用いた。なお、懸濁培養細胞は、LS1（2-2で既述）に2,4-D=0.5ppmとK=0.4ppmを添加した寒天培地上で胚から誘導したカルスを、三角フラスコ中の同組成の液体培地100mlに移植し、90rpmで振とう培養することによって得られたものである。

培養

すべての培養細胞は、LS1を基本培地として培養した。また、植物ホルモンのついては、2,4-D、NAA、K、BAを使用し、2,4-D=0.5ppm+K=0.4ppm（DKと略）、NAA=1ppm+BA=0.2ppm（NBと略）、NAA=2ppm+K=5ppm（NKと略）の組み合わせで用いた。カルスの培養はゲランガム0.2%によって固化させた培地上で行った。懸濁細胞は三角フラスコ中で振とう培養した。培養条件は、暗所、26.5℃、又は、明所（1500lux）、室温、のいずれかとした。なお、いずれの培養細胞も暗所では黄白色あるいは淡褐色、明所では黄緑色や緑色を呈した。

抽出、精製

原植物の場合と同様の手順によった（前項3-2参照）。

分析

基本的な方法は原植物の場合と同様に行った。ただし、成分の含有量が非常に少ない上、夾雑物によってピーク分離の不良な場合もあったため分析対象はG-Bのみとし、その同定はG-B標品との保持時間の一致のみで行った。

〔結果と考察〕

各々の試料についてG-Bの定量を行った結果をTable 3-4に示した。胚由来の培養細胞を、植物ホルモンDKを添加した培地で培養した場合、原植物と比べて非常に少ないながらもG-Bの生産が認められることが分かった。葉柄あるいは形成層由来の培養細胞は胚由来のものよりさらに含有量が少なく、検出不能な場合が多かった。光による培養細胞の緑化とG-B含有量には関連は認められなかった。

肉眼や顕微鏡による観察から、各々の培養細胞における脱分化の程度、あるいは逆に分化にどれだけ近いかの程度がまちまちであることが分かった。すなわちDK培地の

Table 3-4. Ginkgolide B contents ($\mu\text{g/g}$ dry weight)
in cultured cells of *Ginkgo biloba*.

Sample	Content of ginkgolide B ($\mu\text{g/g}$ dry weight)
Callus	
embryo/DK/light ^{*1}	2.23
embryo/DK/dark	2.83
embryo/NK/light	— ^{*2}
petiole/NB/light	1.87
petiole/NB/dark	—
cambium/NB/dark	—
Suspension culture	
embryo/DK/light	2.53
embryo/DK/dark	—

^{*1}origin/phytohormones/light condition

^{*2}— : trace amount

細胞は液体、固体培地によらず、液胞に富んでおり、それらが小集塊を形成している。明所では一様に淡緑色、暗所では黄白色を呈する。これらの細胞は脱分化がかなり進行した状態であると思われた。一方で、NK培地の細胞では細胞質に富む細胞が、固いがもろい集塊を形成している。明所ではDK培地のものに比べて緑色が濃く、一部褐色化した細胞を含んでおり、分化状態に近いものと考えられた。このような、より分化状態に近いと思われる細胞であるにも拘らず、脱分化がより進行したように思われるDK培地の細胞と比較してG-B含有量は少なかった。このように、脱分化した培養細胞において、培養条件により様々な分化状態の程度が存在するとしても、ginkgolide類生成には影響しないレベルであると考えられる。やはり完全な組織、器官の再分化誘導系を確立することが必要だろう。一方で、脱分化した状態でもginkgolide類生成がわずかだが認められたことから、高生産細胞の選抜や、種々のエリクター、生合成前駆体の添加など、脱分化状態のまま研究を続ける方向もあると考える。

3-5 総括

まず、原植物については、今回調べたあらゆる試料でginkgolide類の存在が確認された。若木の根、幼植物体とも成木の緑葉と比べてかなり多量のginkgolide類が含まれていることが明らかとなった。落葉、樹皮、木部等にも多くはないがginkgolide類が含まれていることが分かった。街路樹からの落ち葉、枝打ちによるごみ等もginkgolide類の供給源として利用可能だといってよいだろう。

発芽直後の幼植物を用いた実験から、ginkgolide類の生成には光が重要な役割を持たないことが明らかになった。暗所培養の幼植物は全く葉が展開しないが、一団体あたりのginkgolide含有量は、数枚の緑葉が展開している明所培養の場合と殆ど同じだった。このことから、ginkgolide類の生合成部位は葉のみではない、もしくは葉ではないことが示唆される。また、イチョウ幼植物におけるginkgolide類の生合成は、葉緑体の分化とは無関係に行われると考えられる。ginkgolide総量で見ると、その生成と光とは深い関連がないように見えるが、実生での結果からは、光がG-AとG-Bの量比には何らかの影響をおよぼしているように思われる。胚乳では、貯蔵の間に種子内部でG-Aが酸化され、G-BさらにG-Cへと変換される反応がおこっていることを示唆する分析結果が得られた。

培養細胞ではいずれも、原植物と比較にならない少量が検出されたにすぎなかった。緑化との関連、誘導部位の違いによる相違、培地成分の影響等についても、それを確認するに足る量は検出できなかった。

- Camponovo FF, Wolfender J-L, Maillard MP, Potterat O, Hostettmann K (1995) Evaporative light scattering and thermospray mass spectrometry: Two alternative methods for detection and quantitative liquid chromatographic determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaf extracts and phytopharmaceuticals. *Phytochem Anal* 6: 141-148
- Carrier D-J, Archambault J, van der Heijden R, Verpoorte R (1996) Formation of terpenoid products in *Ginkgo biloba* L. cultivated cells. *Plant Cell Rep* 15: 888-891
- Cartayrade A, Neau E, Sohier C, Balz J-P, Carde J-P, Walter J (1997) Ginkgolide and bilobalide biosynthesis in *Ginkgo biloba*. 1: Sites of synthesis, translocation and accumulation of ginkgolides and bilobalide. *Plant Physiol Biochem* 35: 859-868
- Chauret N, Carrier J, Mancini M, Neufeld R, Weber M, Archambault J (1991) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of ginkgolides produced by *Ginkgo biloba* cell culture. *J Chromatogr* 588: 281-287
- Chinn E, Silverthorne J (1993) Light-dependent chloroplast development and expression of a light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein gene in the gymnosperm *Ginkgo biloba*. *Plant Physiol* 103: 727-732
- Flesch V, Jacques M, Cosson L, Teng BP, Petiald V, Balz JP (1992) Relative importance of growth and light level on terpene content of *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry* 31: 1941-1945
- Huh H, Staba EJ (1993) Ontogenic aspects of ginkgolide production in *Ginkgo biloba*. *Planta Med* 59: 232-239
- Jéon MH, Sung SH, Huh H, Kim YC (1995) Ginkgolide B production in cultured cells derived from *Ginkgo biloba* L. leaves. *Plant Cell Rep* 14: 501-504
- Laurain D, Trémouillaux-Guiller J, Chénieux J-C, van Beek TA (1997) Production of ginkgolide and bilobalide in transformed and gametophyte derived cell cultures of *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry* 46: 127-130
- Nakanishi K, Habaguchi K (1971) Biosynthesis of ginkgolide B, its

diterpenoid nature, and origin of the *tert*-butyl group. J Am Chem Soc 93: 3546-3547

- Neau E, Cartayrade A, Balz J-P, Carde J-P, Walter J (1997) Ginkgolide and bilobalide biosynthesis in *Ginkgo biloba*. II: Identification of a possible intermediate compound by using inhibitors of cytochrome P-450-dependent oxygenases. Plant Physiol Biochem 35: 869-879
- van Beek TA, Lelyveld GP (1992) Concentration of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves in relation to the time of year. Planta Med 58: 413-416
- van Beek TA, Lelyveld GP (1993) Thin layer chromatography of bilobalide and ginkgolides A, B, C and J on sodium acetate impregnated silica gel. Phytochem Anal 4: 109-114
- van Beek TA, Scheeren HA, Rantio T, Melger WCh, Lelyveld GP (1991) Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytopharmaceuticals. J Chromatogr 543: 375-387
- van Beek TA, van Veldhuizen A, Lelyveld GP, Piron I, Lankhorst PP (1993) Quantitation of bilobalide and ginkgolides A, B, C and J by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy. Phytochem Anal 4: 261-268

第4章 イチョウ培養細胞における細胞死と二次代謝発現に関する実験

4-1 緒言

第1章で述べたように、管状要素分化については、これまでの研究の結果、種々の制御機構解明がなされつつある。また、病原体感染に伴う過敏反応については、病原体と宿主細胞との相互作用、防御遺伝子の発現とファイトアレキシン生成などが主に研究され、機構解明がなされつつあるが、これらの現象と同時に生じる場合の多い細胞死についてはまだ十分な情報は得られていない。その他の要因によって誘導される細胞死については、種々の研究が行われているが、情報は断片的なものである。そこで、本章においてはイチョウ培養細胞を用いて実験的な細胞死誘導系を確立し、樹木細胞での細胞死制御機構を解明することを目的とした実験を試みた。動物でのアポトーシスの研究例を参考にし、人為的に細胞死を誘導し、種々の変化を観察、定量した。また、植物細胞に対して人為的にファイトアレキシン生成を誘導する実験系

(Gutierrez *et al.* 1995, Seifert *et al.* 1993)、あるいはファイトアレキシン生成と細胞死の両者を誘導する実験系 (Marinelli *et al.* 1991) を参考とし、イチョウ培養細胞に適用した実験も行った。イチョウは種々の特異な化合物の生成能を持つ。細胞死あるいはファイトアレキシン誘導刺激により、イチョウ培養細胞がなんらかの興味深い化合物を生成する可能性は低いと思われる。そこで、抽出成分中で顕著な変化を示す物質に着目して分析を進めた。

4-2 各種細胞死誘導試薬の検討

[緒言]

ここでは、イチョウ懸濁培養細胞に各種試薬を添加して、その細胞死や二次代謝発現に対する影響を評価した。動物細胞でのアポトーシス誘導効果を参考にし、シトシンアラビノシド、アフィディコリン (DNA合成阻害剤)、コルジセピン (RNA合成阻害剤)、シクロヘキシミド (蛋白質合成阻害剤) について調べた (鶴尾ら 1997, Cotter *et al.* 1992, Koc *et al.* 1996)。

また、植物細胞でのファイトアレキシン産生促進効果および細胞死誘導効果を参考にし、クロロホルム、硫酸銅についても調べた (Gutierrez *et al.* 1995, Seifert

et al. 1993)。上記の試薬について、添加時期、量等について検討し、再現性ある細胞死誘導系の確立を目標とした。

[実験]

細胞培養

用いた懸濁培養細胞は、3-4で記したものと同一のものである。500ml容三角フラスコ中の液体培地90mlに初期細胞密度20mg/mlになるよう移植し、暗所、26.5℃の条件下、120rpmで回転振とう培養した。培養細胞は21日ごとに継代を行って維持した。試薬添加実験の際にはこの培養系の細胞を試験管中、9mlの同培地に対して初期細胞密度20mg/mlになるように移植し、暗所、26.5℃、340rpmで往復振とう培養したものをを用いた。

細胞死の判定

懸濁培養細胞を数mlとり、等量の0.025%エバンスブルーを含む培養液と混合し、数分間放置した後に顕微鏡観察した。濃染細胞を死細胞と判定し、全細胞数に対する死細胞数の割合（死細胞率：%）を算出した。添加試薬によっては、細胞質が著しく収縮して明らかに死んでいるが、濃染されていない細胞が散見される場合があった。このような場合にも死細胞として扱った。

細胞抽出成分の分析

適当量の懸濁細胞をとり、桐山ロートを用いて濾別（桐山濾紙 No.5 B）。培養液と細胞をそれぞれ回収し、細胞の湿重量を測定した。これらの細胞は凍結乾燥、粉末化の後、酢酸エチルにより抽出した。細胞部分を遠心分離あるいは濾過によって分離し、酢酸エチル相を別容器に適量移して減圧留去し、残渣をN,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) によりトリメチルシリル (TMS) 化してGCによって分析した。GCにおける試料注入量は、抽出時に用いた細胞の湿重量を基準にするか、あるいは、培養系全体に含まれる細胞重量に対する用いた細胞重量の割合を基準にするか、のいずれかによって調節した。

培養液は酢酸エチルで直接抽出し、上記同様に操作、分析に供した。

GCにおける分析条件を以下に示した。

カラム：capillary TC-1(0.25mm×30m)

カラム温度(昇温): 150°C to 300°C (10°C/min.)

300°C constant (10min.)

300°C to 315°C (15°C/min.)

315°C constant (5min.)

注入部温度: 300°C、検出部温度: 315°C

キャリアーガス: N₂ 1.5kg/cm²、スプリット比: 1:24.

検出器: FID, H₂: 0.6kg/cm², air: 0.5kg/cm²

[結果・考察]

細胞死誘導効果の検討

アフィディコリン (Aph) 15, 30 μ M, シトシンアラビノシド (ara-Cと略) 0.5, 1mM, コルジセピン (Cor) 0.01, 0.1, 1mM, シクロヘキシミド (CHX) 0.1, 0.5, 2mMを培養初期(継代3日後ないし4日後)に添加し、3日後、および7日後にエバンスブルー染色、観察した。添加時期については、ユーカリ培養細胞をAph処理して細胞周期の進行を停止させる場合、完全に対数増殖期に入った細胞に対しては効果が劣るとの報告(高山 1988)を参考にし、誘導期後期ないしは対数増殖期初期となるよう設定した。Aphは1%ジメチルスルフォキシド(DMSO)を含む水溶液として添加した。他のものは純水に溶かして使用した。いずれも濾過滅菌後に添加した。対照には、それぞれの試薬添加量に対応した量の1%DMSO水溶液または純水を添加した。

Aph, ara-C, Corとも使用濃度において細胞死誘導効果があることが分かった。いずれの試薬、濃度に対しても3日後では死細胞の目立った増加は認められなかったが、7日後には死細胞が対照細胞と比べてかなり増加しており、高濃度添加の方がより多くの死細胞が認められた。ただし、Aphでは15 μ M添加と30 μ M添加の差は小さく、15 μ Mでも十分な効果があると思われた。CHXについては2mMまで添加した場合でも、7日目までに死細胞数の大きな増加は認められず、細胞死誘導効果は低いと判断した。さらに高濃度の添加は試みなかった。

その他の添加時期については、Aphの場合前述の理由により培養後期での添加は行わなかった。ara-Cを培養期間の後期(18日目前後)に1mM添加した場合には、細胞が粘性の強い物質を分泌し、細胞と培養液との濾別が著しく困難になった。また、細胞数が多くなっているため、染色、観察時には細胞懸濁液を希釈する必要が生じた。さらに、培養期間の後期になると、試薬添加に拘らず死細胞の増加傾向が認められ

た。これらのことから、培養後期の細胞を実験系として用いるのは適当でないと思われる。移植直後の細胞に試薬添加する、あるいは予め試薬を添加した培地に移植することも考えたが、移植のショックを増幅させる可能性が高いと思われたため、これは行わなかった。以上のことから、継代後3日目ないし4日目の細胞に、Aphを15 μ Mまたはara-Cを1mM添加するのがよい実験系になりうると考え、これらについては以降の実験で詳細に検討していくこととした(4-3, 4-4, 4-5)。当面2つの実験系が得られる見込みとなったため、Corについては効果は認められたが、本研究ではそれ以上の検討は行わないこととした。

クロロホルム、硫酸銅については、Aph, ara-C, Cor, CHXの場合と異なり、培養後期に添加した。エリシター添加による二次代謝発現の研究で培養後期に添加して二次代謝物の生成が認められた例(鈴木ら 1993, Alami *et al.* 1998, Marinelli *et al.* 1991)を参考にし、添加時期を設定した。

クロロホルムの場合、0.2%, 0.4% (v/v) 添加し、2日後に細胞を観察した。0.4%ではすべての細胞が死んでいると判定されたが、0.2%での死細胞は半分程度だった。

硫酸銅の場合、1mM添加して3日後に観察した。すべての細胞において細胞質が著しく収縮して明らかに死んでいると思われたが、エバンスブルーにより染色されにくいものがあった。これは、細胞質が完全に細胞外に流出し染まるべき部分が残っていないため、あるいは細胞膜が凝縮して色素透過性が失われたためではないかと考えられる。

クロロホルム、硫酸銅添加については、後の実験でさらに検討することとした(それぞれ4-6, 4-7にて後述)。

細胞抽出成分の分析

Aph (15 μ M)、ara-C (1mM)、クロロホルム (0.4%)、硫酸銅 (1mM) (いずれも括弧内は終濃度) を添加し、数日間培養した後の細胞および培養液抽出物のGCのクロマトグラムを、Fig. 4-1からFig. 4-4に示した。

Aphについては、継代後4日目の細胞に添加した。添加0日目(死細胞率; 6%)、8日目(同; 55%, 対照は1%)の細胞抽出物のクロマトグラムを示した(Fig. 4-1)。いずれも生(湿)重量約150mgの細胞から出発して一連の抽出作業を行い、残渣に50 μ lのBSTFAを添加して反応させ、内0.4 μ lをGCに注入、分析した結果である。これより、Aph添加の場合では、細胞死に伴う酢酸エチル抽出物の変化は小さいことがわかった。対照にはないピークが保持時間2.5分前に認められるが小さいものである。

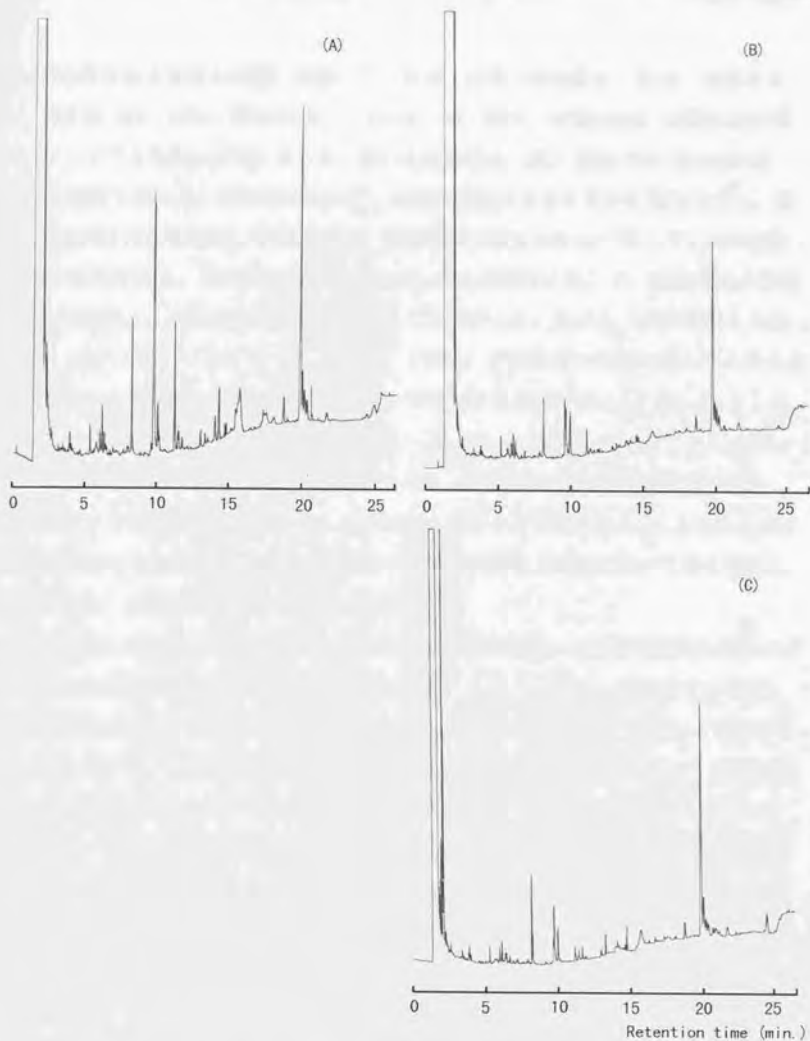


Fig. 4-1. GC-FID profiles of trimethylsilylated cell extracts obtained from cells cultured for 8 days after Aph addition and from corresponding control cells.

(A):0 day, (B):8 days control, (C):8 days Aph

ara-Cは継代後4日目の細胞に添加した。添加1日目(死細胞率:添加, 対照とも3%), 4日目(同:18%, 対照は4%), 7日目(同:69%, 対照は4%)の細胞抽出物のクロマトグラムをFig. 4-2に示した。用いた細胞は生(湿)重量で約120mgから150mgの範囲であった。これらについて、同量の酢酸エチルを用いて抽出を行い、残渣に50 μ lのBSTFAを添加してTMS化し、出発時の生重量140mgに対して1 μ lの割合になるようGCに注入、分析した結果を示した。Aph処理時と同じく、細胞死による成分の変化は少なく、新たな物質の誘導も確認できなかった。ただし、保持時間20分辺りの β -シトステロールのピーク(井上ら 1996)が細胞死の進行に伴って小さくなり、一方で20分以降の3つの小ピークがやや増大する傾向が認められた。また、8分から10分にかけての2つのやや大きいピーク(図中に番号1, 2を付した)については、ほとんど量的な変化が無いことが分かった。同時期の細胞培養液を適量とり、酢酸エチルで抽出、同様に分析したが試料の量が少なすぎたためGC上でほとんどピークを検出できなかった。なお、培養液の分析は別項目の実験において量を変更して再度行った。その結果については4-4で述べる。

ここまで示したAph、ara-Cのような細胞死誘導試薬では、いずれも細胞の酢酸エチル抽出物にあまり大きな変化は認められなかった。このことから、酢酸エチル可溶、かつ今回の条件でのGC分析が可能な新規物質が顕著に生成することは無いと結論できる。しかしながら、GC分析が実際上不可能な高分子や揮発性に乏しい物質、熱分解しやすい物質等が生成している可能性はあり、これに対しては液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた分析が有効だろう。分析条件はGCの場合より多くの組合せが考えられるため、適切な条件決定には様々な検討が必要になる。また、抽出溶媒についても酢酸エチル以外のものを検討する必要があると考えられる。

Fig. 4-3には、クロロホルムを継代後17日目の細胞に添加し、添加時点(0日目)、1日後、2日後に回収した細胞を試料として分析した結果を示した。細胞は生(湿)重量180mg前後を用い、全量を凍結乾燥、粉末化後、酢酸エチル1mlを添加し時々攪拌しながら1時間抽出した。その後、19,000gで10分間遠心し、上清400 μ lをとり酢酸エチルを減圧留去した。残渣に50 μ lのBSTFAを加えてTMS化したものをGC用サンプルとした。注入量については以下のように設定した。すなわち、(抽出に用いた細胞重量) \div (試験管1本あたりに含まれる細胞の総重量)の値が153 \div 1753の時(0日目の場合)に1 μ lを注入することとし、他のサンプルについてはこれに応じて注入量を算出した。抽出の効率が全て等しいと仮定し、培養系あたりの抽出物量をそれぞれのサンプル間で比較するためにこのような方法をとった。クロロホルム添加の

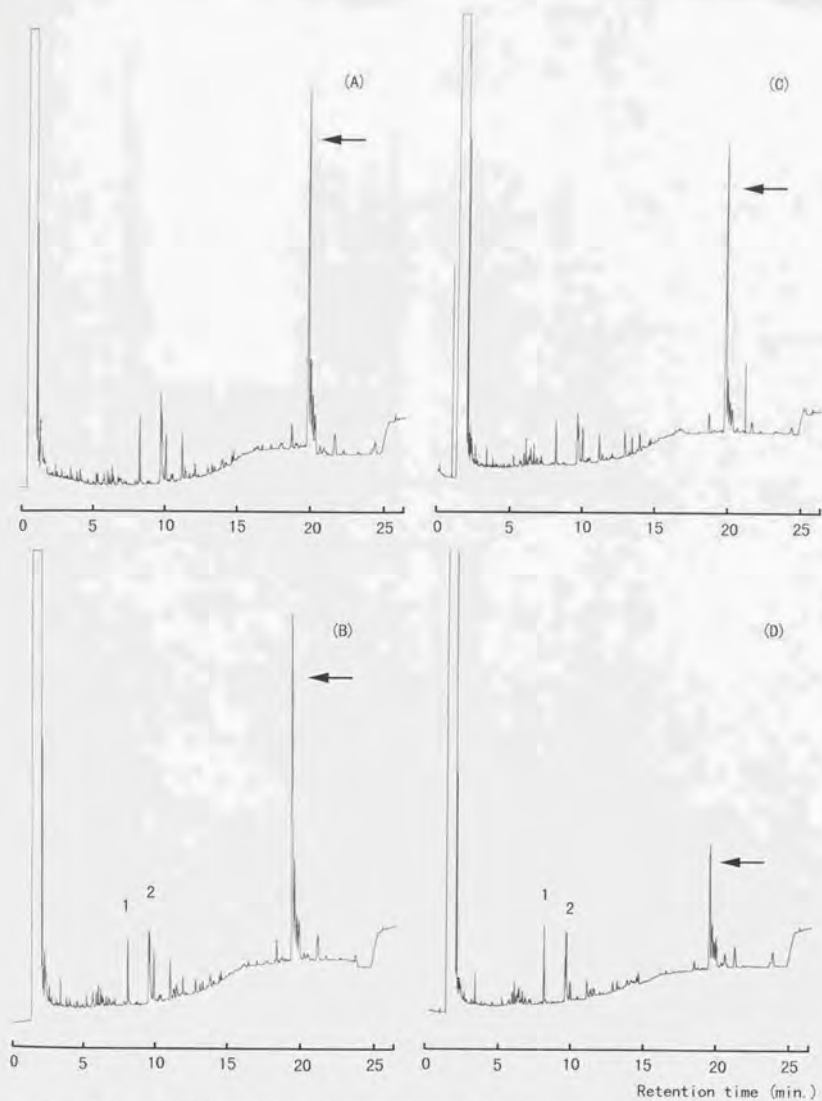


Fig. 4-2. GC-FID profiles of trimethylsilylated cell extracts obtained from cells cultured for 1,4 and 7 days after ara-C addition and from corresponding control cells.

(A), (C) and (E): 1,4 and 7 days non-treated control, respectively.

(B), (D) and (F): 1,4 and 7 days ara-C addition.

β -sitosterol peak is indicated by an arrow.

The numbers on the peaks are referred to in the text.

(continued on next page)

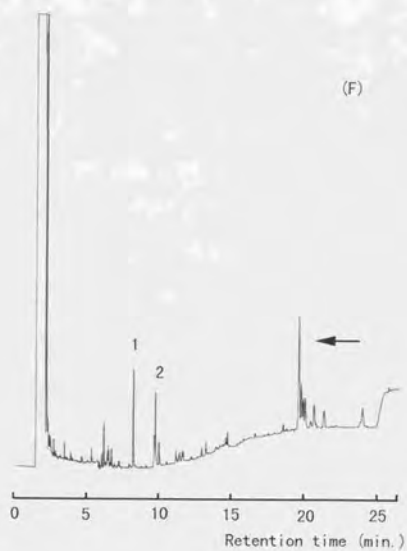
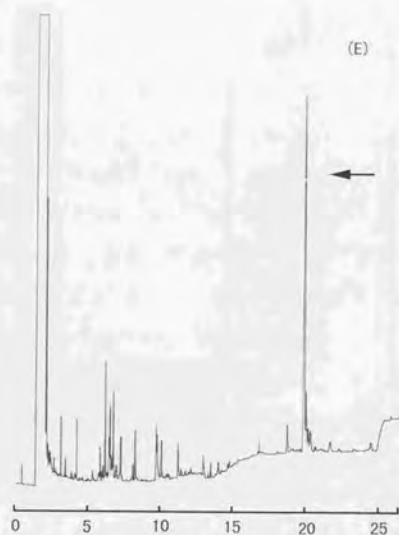


Fig. 4-2. (continued)

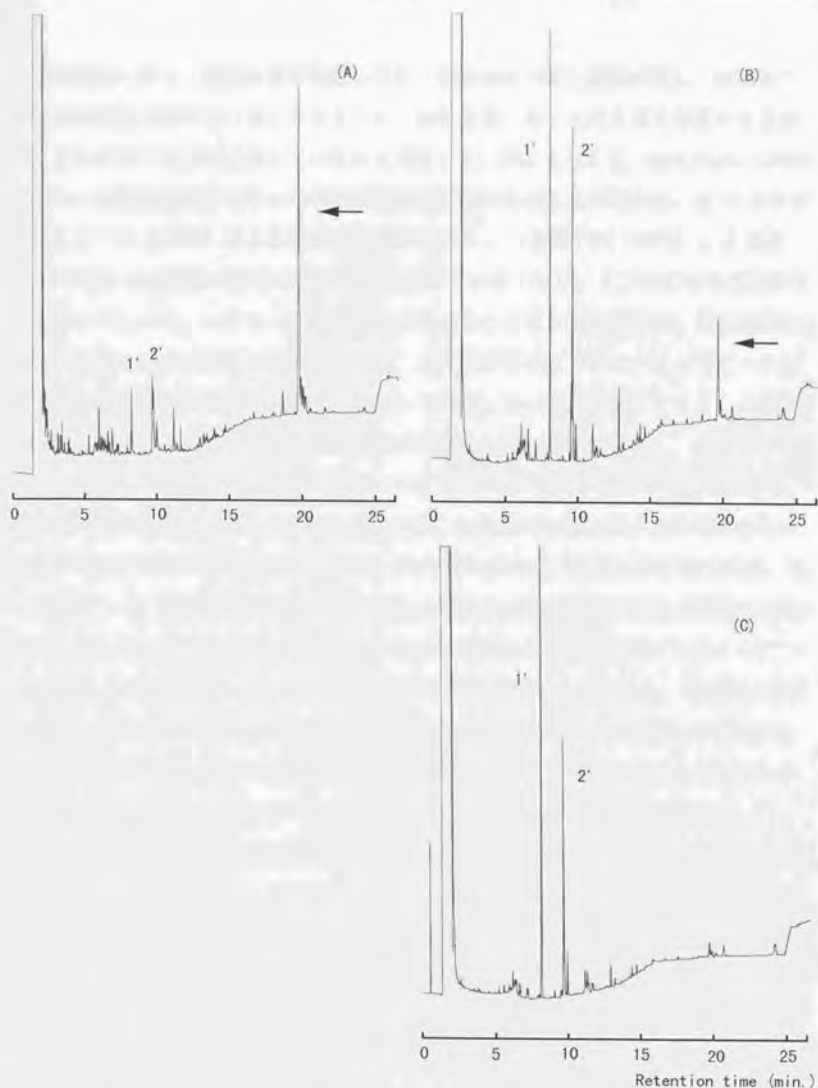


Fig. 4-3. GC-FID profiles of trimethylsilylated cell extracts obtained from control cells and chloroform-treated cells for 1 and 2 days. (A):control, (B):1 day, (C):2 days

β -sitosterol peak is indicated by an arrow.
The numbers on the peaks are referred to in the text.

系では細胞死に伴って細胞重量が急減したり、細胞回収の際に濾紙が著しく目詰まりして正確な重量が測れない場合もあるため、細胞重量に応じて注入量を変更する方法は成分変化を調べるのには適していないと判断した。Fig. 4-3より、Aphやara-Cの時と異なり、細胞死の進行に伴って成分の大きな変化があることが分かる。 β -シトステロールのピーク(矢印)は0日目(死細胞率;6%)、1日目(同;45%)、2日目(同;100%)と処理後の時間が長くなるにつれて小さくなり、2日目には殆ど検出できなくなってしまう。一方で、1'、2'と番号をふったピークの物質が、同じ時期に顕著に増加しているのが良く分かる。なお、これらの各クロマトグラム上でピーク物質が同一であるか否かは保持時間の一致のみで判断している。さらに1日目、2日目について比較してみるとピーク2'の物質が減少し、代わりにピーク1'の物質が増加しているように見える。これらの現象については、 β -シトステロール量の減少が、分解されて他物質に変換されたことによるのか、細胞外への流出によるのか、あるいは配糖体化等を受けてGCでは検出できなくなったのかを調べることが必要である。また、物質1'、2'は対照にも認められるが、処理後の増加分は新たに生合成されたものなのか、あるいは単なる分解産物なのかについて調べることが必要だと考えられる。 β -シトステロール量の減少との関連についても検討すべきだろう。培養液の分析を含めたさらに詳細な実験は別項目として行っており、結果については4-6で述べる。なお、保持時間の比較のみでの判断であるが、番号1'、2'の物質はそれぞれara-C処理時に注目したピーク番号1、2(Fig. 4-2)の物質と同一と考えられる。

Fig. 4-4には、硫酸銅を継代後18日目の細胞に添加し、2日後に回収した細胞(死細胞率;100%、対照は5%)を試料として分析した結果を示した。乾燥重量10mgの細胞を用いてクロロホルム添加時と同様に酢酸エチルによって抽出、残渣のTMS化処理を行い、GCによって分析した。クロロホルム添加の場合と同一と思われる、保持時間8分から10分にかけての2つのピークの増大が認められる。同じく β -シトステロールの減少が分かる。また、 β -シトステロールの後20分近辺と、25分近辺には、対照に無い新たなピークが認められる。なお、硫酸銅の添加実験はさらに詳細に検討し、その結果は4-7に記した。

4-3 シトシンアラビノシド、アフィディコリン添加による細胞死の観察

[緒言]

前項に記した実験より、ara-C、Aphが細胞死誘導に有効であることが分かった。そこで、これらの試薬添加による細胞死の進行と、DNA分解酵素 (DNase) 活性の変動、核DNAの変化との関連について調べた。

[実験]

培養・試薬・細胞死の判定

基本的には前項と同様の方法で行った。試薬の添加は継代4日後とし、ara-Cは1mM、Aphは15 μ Mの濃度になるようにした。対照にはそれぞれ純水あるいは1%DMSO水溶液を添加した。数日毎に細胞を回収し、以降の実験に用いる試料として適量ずつマイクロチューブに取り分け、液体窒素中で急速に凍結させ、使用時まで-80℃で保存した。同時に懸濁細胞の一部をとり、細胞死判定に用いた。エバンスブルー濃染細胞を死細胞と判断し、全細胞中における死細胞の割合を算出した。

DNase活性の測定

粗酵素液の調製

酵素の抽出はThelen and Northcote (1989) の方法を参考にし、以下のように行った。凍結保存してあった細胞に抽出用バッファーと、細胞生重量の5%相当量のポリビニルピロリドン (フェノール性物質吸着用) を加え、ポッター型ホモジナイザーを用いて氷水中でホモジナイズした。抽出バッファーは、細胞重量100mgに対して500 μ lの割合で使用した。ホモジネートはマイクロチューブに移し、15分から20分間時々緩やかに攪拌しつつ氷水中に置き、抽出が十分に行われるようにした。次いで19,000gにて4℃、10分間遠心分離し上清を粗酵素液として用いた。一部は液体窒素中で急速凍結後、-80℃で保存し以下に記す電気泳動実験に供した。抽出バッファーの組成を以下に示した。

50mM Tris-HCl (pH7.5)、2mM dithiothreitol (DTT)、0.5mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)、50 μ M leupeptin

酵素活性の測定

変性 (single stranded; ss) または未変性 (native) 高分子DNAを基質とし、それらに対する加水分解活性を調べた。1.5ml容マイクロチューブ中で、活性測定バッファー (後述) 390 μ l に粗酵素液10 μ lを添加し、45℃で20分間反応させた。氷冷した10%過塩素酸水溶液を400 μ l添加して反応を停止させ、ただちに氷水中に移して30分間放置した。その後、19,000g、0℃、10分間遠心分離し、上清400 μ lを回収、同量の純水で希釈し、分析用の試料とした。酵素反応のみを省いたブランク値を得るため、過塩素酸添加、氷冷の直後に酵素液を添加し、以降同様に操作した。試料は260 nmの吸光度を測定し、ブランクに対する吸光度の値を1分間に1.0増加させる酵素活性を1Uと定義した。活性測定バッファーの組成を以下に示した。

25mM 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH5.5)、0.6mg/ml 基質DNA、10mM MgCl₂、5mM CaCl₂

なお、DNAについてはサケ精果製のもの (和光純薬) を用いて5mg/ml程度の水溶液を作成し、そのまま基質とするか (native)、または100℃で10分間程度加熱した後氷水中で急冷し変性させて用いた (single stranded; ss)。

タンパク質の定量

上記粗酵素液20 μ lをサンプルとし、Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250を用いたタンパク質定量用キット (BIO-RAD PROTEIN ASSAY; Bio-Rad Laboratories, USA、または、プロテインアッセイCBB溶液; ナカライテスク株式会社) を使用し、キットに記載の手順に従って測定した。ウシ血清アルブミンを標準タンパク質としてタンパク質濃度を算出した。なお、粗酵素中のタンパク質量が定量可能範囲から外れる場合には適宜純水にて希釈して用いた。

電気泳動と活性染色

Thelen and Northcote (1989)、Blank et al. (1982)、の報告を参考にして以下に示す方法で行った。基質DNA (ss, native) を含有するポリアクリルアミドゲルを用いて粗酵素液の電気泳動を行い、泳動後のゲル中で酵素反応を行わせて酵素活性を検出する方法で、Activity Gel法と呼ばれるものの一種である。電気泳動は広く行われているLaemmli (1970) のバッファー系によるSDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfate=

Polyacrylamide Gel Electrophoresis) とした。

凍結保存してあった粗酵素液 (30 μ l) に3分の1量のSDS-PAGE用サンプルバッファー (後述) を加えてよく混合し、常温から徐々に加熱し、100℃に到達後さらに2分間加熱して電気泳動用サンプルとした。分離ゲルは、8cm \times 5cmのサイズの15%ポリアクリルアミドゲル (組成等の詳細は後述) とし、濃縮ゲルとして4%ポリアクリルアミドゲル (後述) を分離ゲルの上部に重層して用いた。サンプルはタンパク質5 μ g相当量を泳動した。なお、同様の前処理を施したdeoxyribonuclease I (DNase I) 50pg相当量を同時に泳動し、DNase活性および分子量の指標とした。タンパク質分子量マーカー (LMW Electrophoresis Calibration Kit; Pharmacia) はSDS-PAGE用サンプルバッファーと5% (終濃度) β -メルカプトエタノールを加え、同様に加熱処理したものを同時に泳動した。泳動は200V定電圧で行い、サンプルに加えたマーカー色素 (bromophenol blue:BPB) が分離ゲルの下部に達したところで終了した (約50分間)。

泳動終了後のゲルは濃縮ゲルを切り捨てた後、ゲル中のSDS除去および酵素の再活性化を目的とした以下の手順で処理した。

1. 25% 2-プロパノールを含む10mM Tris-HCl (pH7.5) 100ml中、30分後に一度バッファーを交換して合計1時間室温で緩やかに振盪した。
2. 2-プロパノールを含まない上記と同様のバッファー100mlを用い、同様に振盪した。

処理後のゲルは、10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、5mM CaCl₂ 100ml中で、37℃、16時間インキュベーションした。続いて、分子量マーカー部分を切り離し、これについては通常のタンパク質染色を行った。すなわち、0.25% Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250/エタノール (9容) + 水 (9容) + 酢酸 (2容) で染色し、次いでエタノール (10容) + 水 (175容) + 酢酸 (15容) にて脱色した。染色、脱色時間は適宜調整した。一方、粗酵素サンプルを泳動した活性検出用の部分は、以下の手順で染色、脱色を行った。マーカー部分、活性検出部分は共に白色光下で観察、写真記録した。

1. 0.2% Toluidine Blue O (Chroma Gesellschaft Schmidt & Co.)を含む10mM Tris-HCl (pH7.5) バッファー中で振盪しながら10分間染色。

2. Toluidine Blueを含まない同バッファー100ml中で振盪。10分後、30分後にバッファーを取り替え、合計1時間ゆっくり振盪した。

SDS-PAGEサンプルバッファー、分離ゲル、濃縮ゲルの組成を以下に示した。

SDS-PAGEサンプルバッファー：

250mM Tris-HCl (pH6.8)、4% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、40% グリセリン、0.002% bromophenol blue (BPB)

分離ゲル：

15% ポリアクリルアミド (14.6%アクリルアミド/0.4% *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド)、0.375M Tris-HCl (pH8.8)、0.1% SDS、50 μ g/ml 基質DNA (ss, native)、50 μ g/ml フィブリノーゲン (牛血漿製)

ゲルの重合促進剤として、0.05% 過硫酸アンモニウム (APS)、0.05% *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)を添加した。

濃縮ゲル：

4% ポリアクリルアミド (3.89%アクリルアミド/0.11% *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド)、0.125M Tris-HCl (pH6.8)、0.1% SDS

ゲルの重合促進剤として、0.05% APS、0.1% TEMEDを添加した。

ゲノムDNAの抽出・電気泳動

回収した細胞 (生重量で100mg程度にそろえた) を凍結乾燥、粉末化し、Kikuchi *et al.* (1998) によるイネのゲノムDNA抽出法に従ってDNAを抽出した。得られたDNAには50 μ l程度のTEバッファー (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH8.0)) を加え、冷蔵庫に置いて溶解させた。

電気泳動は0.7%アガロースと0.65% SYNERGEL (Diversified Biotech, USA) を混合して支持体とし、TAEバッファー (0.04M Tris、0.0083M 酢酸ナトリウム、0.0011M EDTA \cdot 2Na) をゲル作成および泳動用のバッファーとして用いた。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し、UVトランスイルミネーターを用いてDNAを検出、写真に記録した。

[結果・考察]

Aph処理細胞とその対照細胞から調製した粗酵素液の、ssDNaseおよびnative DNase活性の経日変化をFig. 4-5、Fig. 4-6に示した。酵素活性はタンパク質量あたりの値で示した。全細胞数に対する死細胞数の割合（死細胞率：%）の経日変化については、Aph処理を施した場合のみ併記した。なお、対照での死細胞率は4%程度で期間を通じてほぼ一定だった。Fig. 4-7には同一の粗酵素液をActivity Gel法で分析した結果を示した。同日に回収した細胞から調製したDNAの電気泳動結果については、Fig. 4-8に示した。

ara-C添加での上記と同様の項目について、Fig. 4-9、4-10（DNase活性）、Fig. 4-11（Activity Gel法）、Fig. 4-12（DNA電気泳動）にそれぞれ示した。

Fig. 4-5、4-6より、Aph添加では、3日目まで死細胞の増加は認められないが、6日目には死細胞率は30%以上に上昇することが分かる。ss、native DNase活性はともに6日目以降に急上昇し、両者類似の活性変化を示した。死細胞の増加に遅れて活性が上昇するものと考えられた。DNase活性値自体はssDNAに対する活性がnative DNAに対する活性の4倍弱であり、ssDNAをよく分解することが分かった。対照でのDNase活性はほぼ一定値で推移した。

Fig. 4-9、4-10より、ara-C添加では3日目には既に死細胞の増加が認められる。活性上昇は死細胞増加にやや遅れるようにも思われるが判然としない。ara-C添加による細胞死誘導では、1日目、2日目についても分析が必要であることが分かった。ss、native DNase活性はともに類似の活性変化を示したが、ssDNAに対する活性がnative DNAに対する活性の2、3倍であり、Aph添加の場合より基質による活性の差が小さいと思われた。これは、天然の基質を毎回調製して用いたため、基質の性質がAph添加区の分析時とは異なっており、そのため活性値に影響が生じたためだと思われる。対照でのDNase活性はss、nativeとも3日目に減少したが、その後は低水準のほぼ一定値で推移した。

細胞死誘導に伴い、ssDNase、native DNase活性がともに類似の活性上昇を示すことが明らかになったが、この活性が同種のDNaseによるものなのか、何種類のDNaseが関与しているのか、さらに細胞死の過程で新規に誘導されたものがあるのか否か、という点については、粗酵素液を直に活性測定に用いる実験では情報が得られない。そこで、電気泳動による分子量の分画と酵素活性検出を同時に行うActivity Gel法による分析を試みた。この方法では、ゲル上でのDNase活性の存在部位が、DNAが分解される結果、染色されないスポットとして検出される。Fig. 4-7、4-11にはそれぞれ

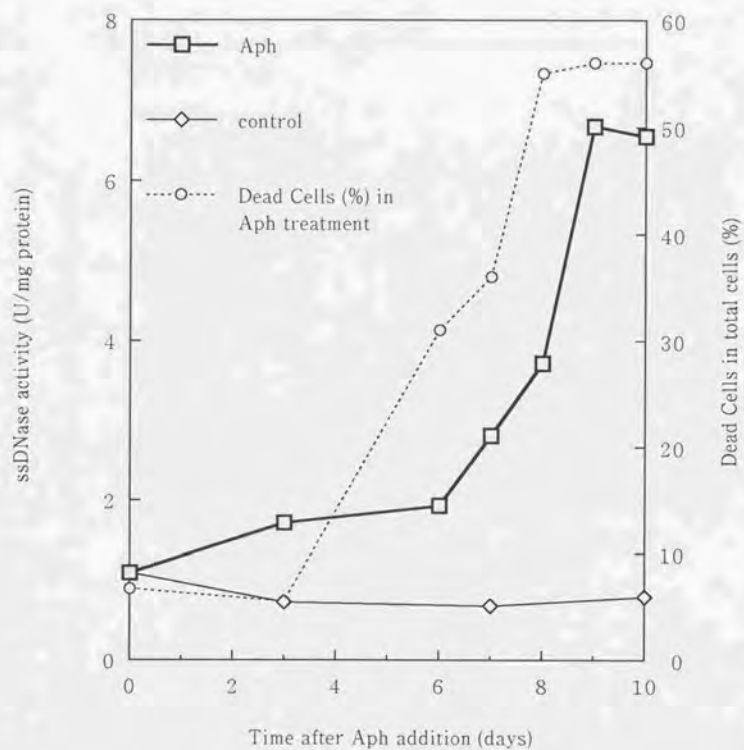


Fig. 4-5. Time course of changes in ssDNase activities after Aph addition.

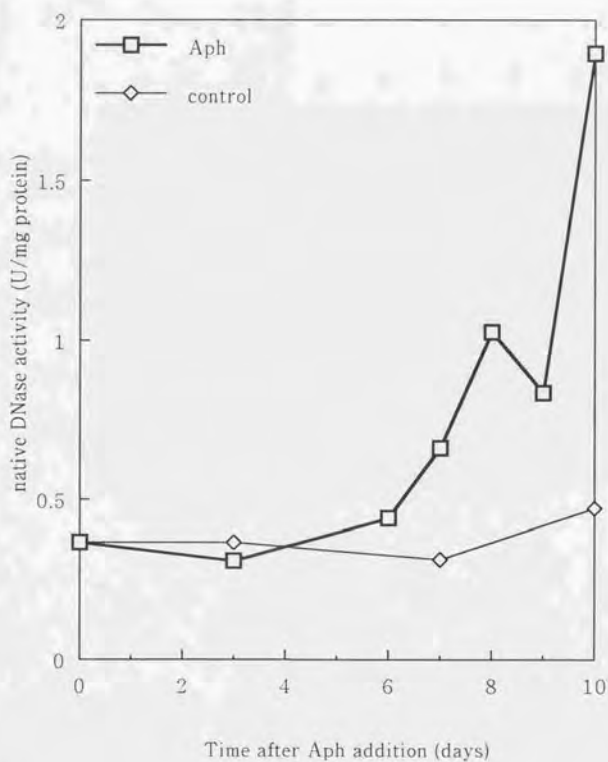


Fig. 4-6. Time course of changes in native DNase activities after Aph addition.

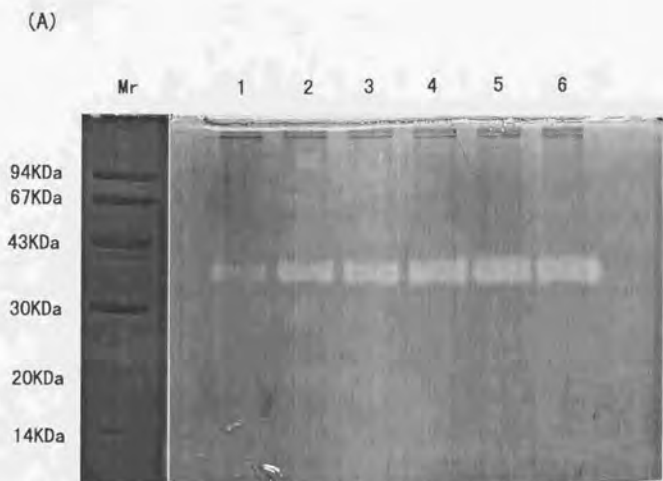


Fig. 4-7. Detection of ss and native DNase activities following SDS-PAGE. Part of the crude enzyme samples used in Fig. 4-5 and 4-6 were electrophoresed. Molecular mass (Mr) markers are given in kilodaltons.

(A): ss DNA containing gel. Lanes 1-6 contained enzyme solutions from 3,6,7,8,9 and 10 day Aph-treated cells.

(B): ss DNA containing gel. Lanes 1-3 contained enzyme solutions from 3,7 and 10 day control cells, lane 4, 10 day Aph-treated cells, and lane 5, 50pg of DNase I .

(C): native DNA containing gel. Samples were the same as in (B).

(continued on next pages)

(B)

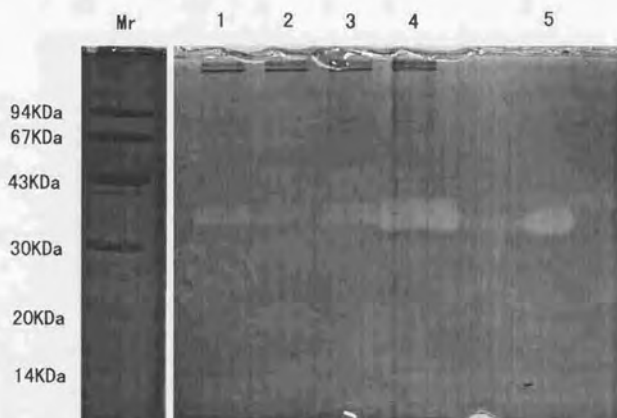


Fig. 4-7. (continued on next page)

(C)

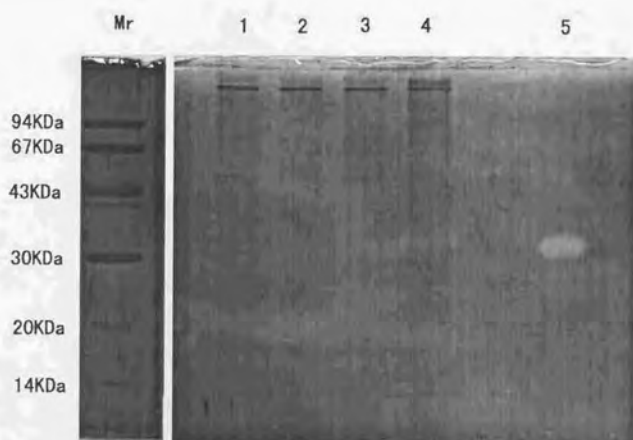


Fig. 4-7. (continued)

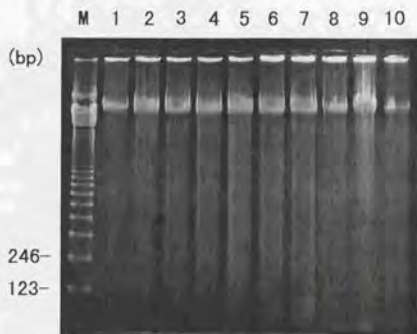


Fig. 4-8. DNA degradation during Aph-induced cell death. DNA was extracted from the cells harvested at the same time as the cells used in Fig. 4-5 and 4-6. M: 123bp DNA ladder markers.

Lanes 1-7 contained about $2\mu\text{g}$ of DNA from 0, 3, 6, 7, 8, 9 and 10 day Aph-treated cells. Lanes 8-10 contained DNA from 3, 7 and 10 day control cells.

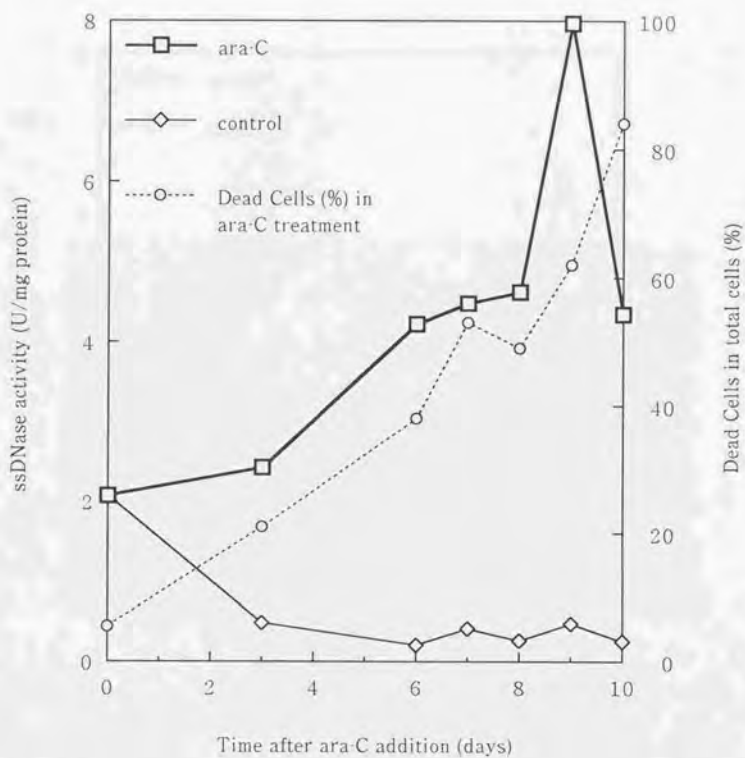


Fig. 4-9. Time course of changes in ssDNase activities after ara-C addition.

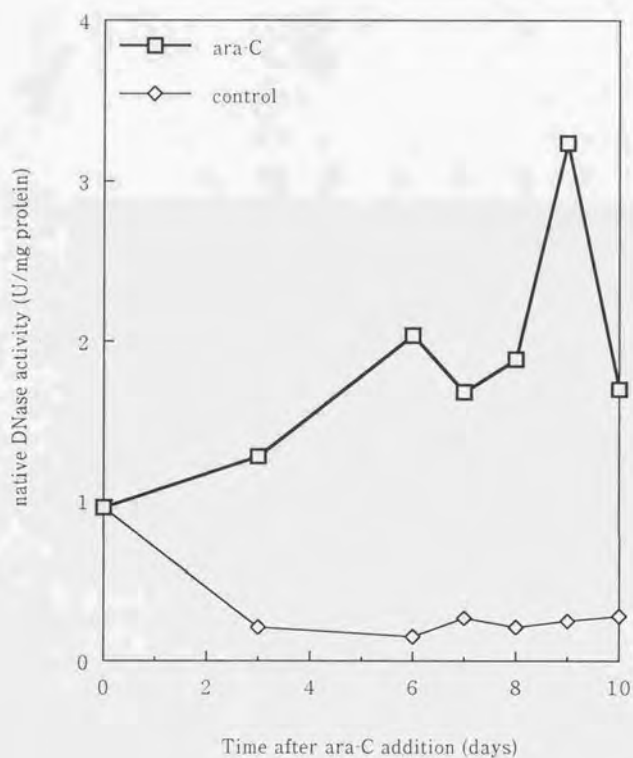


Fig. 4-10. Time course of changes in native DNase activities after ara-C addition.

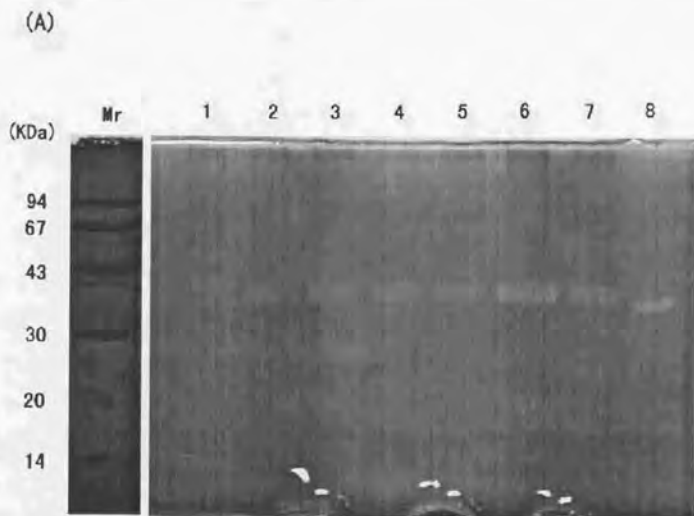


Fig. 4-11. Detection of ss and native DNase activities following SDS-PAGE. Part of the crude enzyme samples used in Fig. 4-9 and 4-10 were electrophoresed. Molecular mass (Mr) markers are given in kilodaltons.

(A): ss DNA containing gel. Lanes 1-7 contained enzyme solutions from 0,3,6,7,8,9 and 10 day ara-C-treated cells, and lane 8 contained 50pg of DNase I .

(B): native DNA containing gel. Samples were the same as in (A).

(continued on next page)

(B)

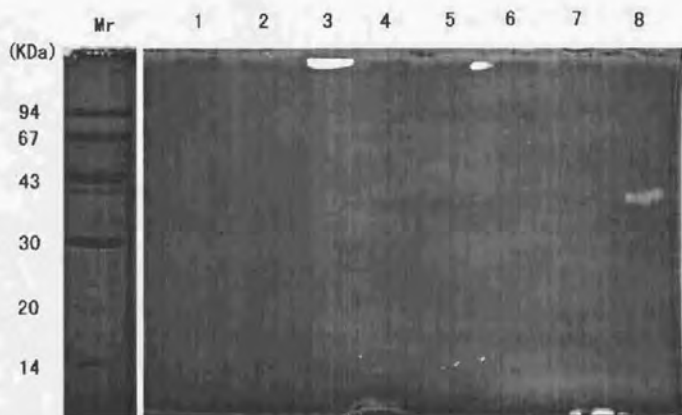


Fig. 4-11. (continued)

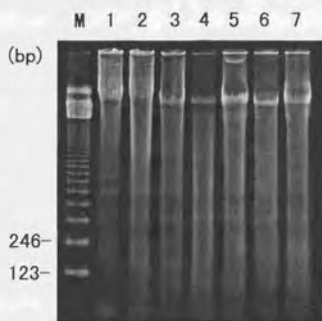


Fig. 4-12. DNA degradation during ara-C-induced cell death. DNA was extracted from the cells harvested at the same time as the cells used in Fig. 4-9 and 4-10. M: 123bp DNA ladder markers.

Lanes 1-7 contained about $2\mu\text{g}$ of DNA from 0, 3, 6, 7, 8, 9 and 10 day ara-C-treated cells.

Aph、ara-C区におけるssDNAおよびnative DNAを基質とした場合の結果を示した。ssDNAを基質とした場合、酸可溶化物定量による活性測定値と対応してゲル上での活性が検出されるように思われた。また、Aph、ara-Cの場合とも同じ位置に活性が認められた。分子量マーカー、DNase I (31kDa) のスポット位置から評価して、35kDa付近に少なくとも2つの近接した活性部位が認められるが、ゲルの他の部分には活性が全く認められなかった。同様の活性部位は対照でも弱いながら認められた。この結果により、細胞死の進行に伴うssDNase活性の上昇は、新規のDNaseの誘導によるものではないという可能性が示された。一方、native DNAを基質とした場合については、ssDNAの場合と異なり活性スポットは非常に弱く、写真に記録したが活性部位の判別は困難であった。肉眼で見た限りではssDNAの場合と同位置にスポットが認められ、ゲルの他の部分には活性部位は無いと判断した。DNase Iの活性はssDNAを用いた場合と同程度だと思われた。今回の方法で検出された粗酵素液中のDNaseはssDNAをnative DNAより効率的に分解することが分かった。

ここまでの結果からは、Aph、ara-C処理による細胞死進行に伴うDNase活性の上昇は、新規のDNase誘導によるものではなく、プロテアーゼ等の作用によって、不活性化状態にあった既存のDNaseが活性化されたと考えるのが妥当だと思われる。死細胞数の増加と活性の上昇が相似形を示すことから、このDNaseは細胞の死後、その細胞内で長時間活性を保つことが分かる。

ここまで酸可溶化物定量による活性測定法、Activity Gel法での結果を合わせて考察してきたが、これらを同一の結果として評価するのが妥当か否かについては、さらに検討の余地がある。即ち、ここでのActivity Gel法では酵素を完全に変性、失活させて電気泳動し、その後再活性化処理を施して活性を検出するという手法によっている。処理による再活性化ができない酵素が粗酵素液中に存在する可能性がある。また、単量体でない酵素が存在していた場合には、変性処理によって不可逆に失活する。さらに、活性測定の条件が両者で大きく異なる点にも問題があるだろう。酵素反応時には、ごく一般的なDNaseの二価イオン要求性を考慮して10mM MgCl₂、5mM CaCl₂の組み合わせで二価陽イオンを添加したが、この条件が適切だったとは限らない。これらの点については検討を加え、次項(4-4)で詳述する。

Fig. 4-8、4-12より、Aph処理、ara-C処理ともに細胞死の進行あるいはDNase活性の上昇に伴い、低分子化したDNAが多く検出されるようになる様子が分かる。しかし、DNase活性上昇とDNA分解の開始が対応しているか否かについての判断は困難である。ara-C処理の場合、動物細胞のアポトーシスにおいて広く知られるヌクレオソ-

ム単位のDNA断片（電気泳動ゲル上で通例DNAラダーと呼ぶ縞模様を呈する）に類似の泳動像が不鮮明ながらも認められたが、Aph処理では判然としない。また、細胞死がかなり進行した段階でもゲノムDNAに相当する高分子のDNAが全て完全に低分子化する訳ではないことが分かる。電気泳動ゲル上では大部分のDNAは処理以前と大差ない分子量を保っていると言ってよいようにも思われる。ただし、通常のDNA抽出法ではゲノムDNAは切断され、かなり低分子化してしまう。また、ここでゲノムDNA相当としている様な高分子領域の分離には特殊な電気泳動法が必要で、ここで行っている通常の電気泳動法では分離は望めない。さらに、ssDNase活性が上昇していることから、DNA 2本鎖の内の1本のみが切断されるいわゆるニックの入った状態になっている可能性が高いと思われるが、通常の電気泳動条件ではDNAは2本鎖の状態で泳動され、ニックが入っていたとしても検出できない。以上の問題点を考慮すれば、ここでの実験結果のみから高分子DNAの様態について議論するのは無理があると言うべきであろう。

各種上皮性ガン細胞にアポトーシスを誘導した場合、その初期にゲノムDNAが分子量50kbp以上の巨大断片を生じることが知られている（Oberhammer *et al.* 1993）。また、植物ではタバコ培養細胞の低温処理による細胞死において、その初期にゲノムDNAが分子量50-100kbpに断片化し、次いでラダー構造が生じてくと報告されている（Koukalova *et al.* 1997）。さらに、タバコ葉のタバコモザイクウィルスに対する過敏感反応の初期段階においても同様の巨大DNA断片が検出されている（Mittler and Lam 1997）。本実験系でも同様の初期の変化が生じているか否かについては非常に興味深いところだが、その点まで実験を進めることはできなかった。他に今回見られたようなDNAラダーが植物の細胞死誘導実験系で検出された例としては、ニンジン培養細胞のエリシター処理による細胞死の場合（Koch *et al.* 1998）、ササゲ葉のさび病菌接種による過敏感反応の場合（Ryerson and Heath 1996）、などがある。一方、タバコのタバコモザイクウィルスに対する過敏感反応においてはランダムに分解されたDNAが検出され、ラダー構造は認められなかったと報告されている（Mittler and Lam 1995）。

本項の実験では等しい生重量（もしくは湿重量）の細胞を用いて同一の手順により抽出したDNAを等量のTEバッファーに溶解し、その一部を電気泳動した。260nmの吸光度からDNAの濃度を算出し（ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のDNA溶液は260nmの吸光度が0.02となる）、泳動時には各レーンのDNA量を約 $2 \mu\text{g}$ に揃えたが、実際の泳動結果を見ると量にかなりのばらつきがあったことが分かる。タンパク質、多糖類その他の夾雑物に

よって定量が正しく行えていないことが原因と思われた。DNAのみを選択的に定量する方法を採用すれば解決するが、DNA量に応じて発色させ、紫外線吸収を測定する方法(Keck 1956)は操作がやや面倒な上に本実験で得られるような少量のサンプルには適用が難しく、また、蛍光色素による定量は簡便で精度も高いが分析機器(蛍光分光光度計)が手許に無いことから手軽に行うことは困難だという事情がある。そこで以降の実験では、より純度の高いDNAが得られると期待される抽出方法を試みた。ラダーを鮮明に検出し、かつ処理に伴う変化を定量的に観察するためには、サンプルのDNA濃度を正しく定量し、泳動に用いるDNA量を適当に調整することが必須であろう。

4-4 シトシンアラビノシド添加による細胞死誘導機構の観察 (1)

[緒言]

前項により、Aph、ara-Cによる細胞死とDNase活性の関連、ゲノムDNAの変化などについて、一定の知見が得られた。そこで、本項では分析の対象をara-Cによる細胞死誘導系に限定してさらに詳細に検討することとした。Aph、ara-C両者の系について平行して検討するのは難しいと判断し、ara-C添加の系から調べることにした。

DNase活性の測定については、前項では特に分析条件を検討していないため、種々の条件を調べる必要がある。そこで、pHおよび二価陽イオンの影響、またActivity Gel法の条件についても調べた。ここまでの実験で、同生重量の細胞を同量のバッファを用いて抽出した際の粗酵素中のタンパク質濃度が、細胞死に伴って低下する傾向がしばしば認められたこと、アポトーシスや植物細胞のプログラム細胞死で種々のプロテアーゼの活性化が知られていることなどから、この系でのプロテアーゼの関与を調べることは必須であると考えた。人工基質あるいは天然の基質を用いて細胞中のプロテアーゼ活性を評価した。細胞死に伴う細胞様態、特に核の変化に着目し、観察、記録を行った。細胞の抽出成分については、4-2の実験において劇的な変化はないとの結果が既に得られているが、本項においては培養液中の成分分析を含め、再度詳細に検討した。

[実験]

DNase活性に対するpHおよび二価陽イオンの影響

酸可溶化物定量による活性測定

継代後4日目にara-Cを1mM添加し、7日後に回収した細胞(ara-C添加、対照)を試料として粗酵素液を調製した。死細胞率はara-C処理区で60%、対照では3%だった。粗酵素液の調製は4-3に記した方法と同様に行った。調製した粗酵素液は続けて活性測定に用いるもの、タンパク質定量用のもの、下記のActivity Gel法に用いるものに分けた。Activity Gel法用のサンプルは100 μ l程度ずつチューブに分注し、液体窒素中で凍結させた後-80℃で使用時まで保存した。活性測定、タンパク質定量用については、氷水中に置き、当日中に使用した。

活性測定用のバッファーは、25mM 酢酸ナトリウム/酢酸(pH5.5)、または25mM Tris-HCl(pH7.5)とし、基質としては0.6mg/ml ss DNAを用いた。バッファー中に数種の二価陽イオン、EDTAを添加し、あるいは無添加とし、酵素活性に対する影響を調べた。バッファー中に添加した二価陽イオン等の濃度については以下に示した。

1. CaCl_2 1mM, 2. MgCl_2 1mM, 3. CaCl_2 1mM+ MgCl_2 1mM,
4. ZnSO_4 10 μ M, 5. ZnSO_4 1mM,
6. EDTA 10mM, 7. なし

酵素活性測定、活性算出の方法は、反応温度と反応時間以外は全て4-3に準じた。反応温度を37℃、反応時間を15分に変更した。

Activity Gel法

上記により調製、凍結保存した粗酵素液を以下に示す二種類のActivity Gel法で分析した。電気泳動をタンパク質変性状態で行う場合(SDS-PAGE)、変性させずに行う場合(native-PAGE)の両者を比較、検討した。

(1) SDS-PAGE

大部分は4-3に準じて行ったが、変更点が数力所あるので重複する部分も含めて再び手順を示した。凍結保存しておいた粗酵素液に3分の1量のSDS-PAGEサンプルバッファーを加えてよく混合し、常温から徐々に加熱し、100℃に到達後さらに2分間加熱して電気泳動用サンプルとした。分離ゲルは8cm \times 5cmの12%ポリアクリルアミドゲル(組成等の詳細は後述)とし、濃縮ゲルとして4%ポリアクリルアミドゲル(4-3と同一のもの)を分離ゲルの上部に重層して用いた。ara-C区、対照それぞれの粗酵素液

をレーンに交互に注入し、これら2つで1組として扱った。サンプルは1枚のゲルで3組ないし4組とし、タンパク質はいずれも5 μ g相当量を泳動した。同様の前処理を施したDNase I 100pg相当量を同時に泳動した。タンパク質分子量マーカーとして Perfect Protein Markers, 15-150kDa (Novagen, Inc., USA) を用い、5 μ l分を直接泳動した。泳動は200V定電圧で行い、サンプルに加えたマーカー色素 (BPB) が分離ゲルの下部に達したところで終了した。

泳動終了後のゲルは濃縮ゲルを切り捨てた後、以下の手順で処理した。

1. 25% 2-プロパノールを含む10mM Tris-HCl (pH7.5)、または10mM 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH5.5) 100ml中、30分後に一度バッファーを交換して合計1時間室温で緩やかに振盪した。
2. 2-プロパノールを含まない上記と同様のバッファー100mlを用い、同様に振盪した。

処理後のゲルは、上記の処理と同一のバッファー、すなわち10mM Tris-HCl (pH7.5)、または10mM 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH5.5) 100ml中で、37℃、16時間インキュベーションした。ただし、分子量マーカー部分はインキュベーションの前に切り離し、GelCode Blue Stain Reagent (Pierce Chemical Co., USA) を用いて染色した。インキュベーション用バッファーに添加する二価陽イオン、EDTA等については、本項の、酸可溶化物定量による活性測定に記した1.から7.と同様とした。ゲルを1組ごとに分離し、それぞれを各バッファー中でインキュベーションした。DNase I を泳動したレーンは分離せず、No.3のバッファー中でサンプル1組と一緒に反応させた。

インキュベーション終了後、活性検出用の部分は4-3と同様の手順で染色、脱色を行った。分子量マーカーの部分は、余分の染色液を除去するため純水中に入れ、数回水を取り替えて1時間程度ゆっくり振盪した。マーカー部分、活性検出部分は共に白色光下で観察、写真記録した。

分離ゲルの組成を以下に示した。

12% ポリアクリルアミド (11.68%アクリルアミド/0.32%N,N'-メチレンビスアクリルアミド)、0.375M Tris-HCl (pH8.8)、0.1% SDS、150 μ g/ml ss DNA、

50 μ g/ml フィブリノーゲン (牛血漿製)

ゲルの重合促進剤として、0.05% 過硫酸アンモニウム (APS)、0.05% N,N,N',N' -テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) を添加した。

(2) native-PAGE

電気泳動はDavis (1964) のバッファー系を用い、5℃から10℃程度に冷却しながら行った。分離ゲルとして、14cm \times 10cmの7.5%ポリアクリルアミドゲル (組成等の詳細は後述) を用い、濃縮ゲルとして5%ポリアクリルアミドゲル (後述) を分離ゲルの上部に重層して用いた。濃縮ゲルは蛍光灯を至近距離から照射して重合させた。試料にはnative-PAGEサンプルバッファー (後述) を加えてよく混合し、タンパク質5 μ g相当量を泳動した。サンプルは上述のSDS-PAGEの場合と同様、ara-C区、対照を交互に注入し、2つで1組とした。電気泳動は30mAの定電流でBPBがゲル下端から1cm程度に達するまで行った (約150分)。泳動終了後のゲルは、サンプル1組を含む部分ごとに切り分け、さらに濃縮ゲルを切り捨てた後、酵素反応時に用いるバッファーで平衡化させるため、10mM Tris-HCl (pH7.5)、または10mM 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH5.5) 100ml中、30分後に一度バッファーを交換して合計1時間、4℃で緩やかに振盪した。各々のバッファーに対しては、CaCl₂ 1mM、ZnSO₄ 10 μ Mを添加するか、あるいは無添加とした。

平衡化処理後、37℃に保った同一のバッファー100mlを新しく加え、37℃、90分間インキュベーションした。

酵素反応終了後のゲルはエチジウムブロマイド水溶液に30分間つけて染色し、次いで純水中に数分間置いた後UVトランスイルミネーターを用いて観察、記録した。

native-PAGEサンプルバッファー、分離ゲル、濃縮ゲルの組成を以下に示した。

native-PAGEサンプルバッファー:

250mM Tris-HCl (pH6.8)、40% グリセリン、0.002% bromophenol blue (BPB)

分離ゲル:

7.5% ポリアクリルアミド (7.3% アクリルアミド/0.2% N,N' -メチレンビスアクリルアミド)、0.375M Tris-HCl (pH8.8)、30 μ g/ml ssDNA

ゲルの重合促進剤として、0.05% APS、0.05% TEMEDを添加した。

濃縮ゲル:

5% ポリアクリルアミド (4% アクリルアミド/1% *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド), 0.0625M Tris-HCl (pH6.8)

ゲルの重合促進剤として、0.05% TEMED, 0.0005% リボフラビンを添加した。

プロテアーゼ活性の検出

合成基質を用いた方法

継代後4日目にara-Cを1mM添加し、3日間培養した細胞(死細胞率:30%, 対照は7%)を試料として粗酵素液を得た。細胞は回収後液体窒素中で凍結させ、-80℃で保存しておいたものを用いた。試料調製、分析等は、Minami and Fukuda (1995)の報告を参考にして、以下の手順で行った。

凍結細胞に50mM リン酸ナトリウム (pH 7), 1mM EDTA, 1mM DTTを含むバッファを加え、ポッター型ホモジナイザーを用いて氷水中でホモジナイズした。抽出バッファは、細胞重量100mgに対して500 μ lの割合で使用した。ホモジネートはマイクロチューブに移し、19,000gにて4℃、15分間遠心分離し上清を粗酵素液として用いた。粗酵素液は反応に用いるまで氷中に置き、調製当日中になるべく早く使うようにした。粗酵素液のタンパク質濃度は、プロテインアッセイCBB溶液(ナカライテスク株式会社)を使用し、キットに記載の手順に従って測定した。ウシ血清アルブミンを標準タンパク質としてタンパク質濃度を算出した。

酵素活性は下記の合成基質(ペプチド研究所製)に対する分解活性として検出した。同社のカタログに記されているそれぞれの基質に対応する酵素を付記した。

1. Z-Phe-Arg-MCA (Carbobenzoxy-L-Phenylalanyl-L-Arginine 4-Methyl-Coumaryl-7-Amide)
対応酵素: 血漿カリクレイン、カテプシンB、L
2. Boc-Val-Leu-Lys-MCA (t-Butoxycarbonyl-L-Valyl-L-Leucyl-L-Lysine 4-Methyl-Coumaryl-7-Amide)
対応酵素: プラスミン
3. Bz-Arg-MCA (Benzoyl-L-Arginine 4-Methyl-Coumaryl-7-Amide)
対応酵素: トリプシン

酵素反応により基質Peptidyl-NH-MCAからAMC (7-Amino-4-Methyl-

Coumarin) が遊離する。その量を測定して酵素活性を算出する。

酵素活性測定時の反応溶液組成を以下に示した。

0.1M 酢酸ナトリウム (pH 5) またはリン酸ナトリウム (pH 7) またはホウ酸ナトリウム (pH 9) , 50 μ M 基質 (10mM DMSO (dimethylsulfoxide) 溶液を調製して添加)

酵素反応はUV吸収測定用のセル中で行った。予め37℃に保温した反応溶液980 μ lに粗酵素液20 μ lを加え、370nmの吸光度を3分間測定した。2分から3分の間の吸光度変化量から1分間当りのAMC遊離量を求めた。各pHのバッファーにおいて、AMC標品を用いて370nmの吸光度とAMC濃度との関係で検量線を作り、これをもとに遊離AMC量を算出した。

酵素活性は、1分間に1 μ molのAMCを遊離する酵素量を1Uとして表示した。

カゼイン分解活性

継代後4日目にara-Cを1mM添加し、3日間培養した細胞(死細胞率; 29%, 対照は7%)を試料とした。細胞は回収後液体窒素中で凍結させ、-80℃で保存しておいたものを用いた。粗酵素液は、50mM リン酸ナトリウム (pH 7) , 1mM EDTA, 1mM DTT, 20% (v/v) グリセリン、を抽出用バッファーとし、合成基質分解活性の測定時と同様の手順によって調製した。また、粗酵素液のタンパク質濃度についても同様に測定した。

酵素活性は、基質カゼインの分解量を測定することによって算出した。分解量は、タンパク質定量用のCBB G-250を用いて反応前後のカゼイン量を定量、比較することによって求めた。すなわち、CBB G-250によって定量され得るタンパク質の分子量が約3000以上であることを利用し、反応前後でのカゼイン量を測定することで、酵素反応によって低分子化したカゼイン量が算出できるという方法である (Bickerstaff and Zhou 1993)。

酵素活性測定には、0.1M リン酸ナトリウム (pH 7) またはホウ酸ナトリウム (pH 9) , 1mg/ml カゼイン, 20% グリセリン、を反応溶液として用いた。カゼインはHammarstenグレード(和光純薬)のものをを用い、50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.9) に10mg/mlの濃度で溶解させ、100℃、10分加熱した。放冷後、ポア

サイズ0.45 μm のフィルターで濾過し、ストック溶液として冷蔵庫で保存した。ストック溶液を適宜希釈して使用した。

37℃に保温しておいた反応溶液190 μl に、粗酵素液10 μl を加えて反応させた。添加直後(0分)、30分後、60分後に、反応系から20 μl をとり、プロテインアッセイCBB溶液(粗酵素のタンパク質定量に用いたものと同じ)1mlと混合した。キットに記載の操作法に従って595nmの吸光度を測定し、CBB溶液に対する吸光度の増加からタンパク質量を算出した。ストック溶液を用いて、活性測定時と同一の各pHのバッファー20 μl 中にカゼイン20 μg 、15 μg 、10 μg が含まれるように調製したものについて、同様にCBB溶液による定量を行い、検量線を作成した。この検量線をもとに、それぞれの時間における反応系中のカゼイン量を算出し、反応に伴うカゼイン分解量を求めた。

Caspase活性の検出

継代後3日目にara-Cを1mM添加し、0、16、24、40、48、64、72、88時間後に細胞を回収して試料とした。粗酵素液の調製、活性検出法については、del Pozo and Lam (1998)、Yamashita *et al.* (1999)、Takahashi *et al.* (1997)を参考にした。酵素活性はCaspase-3、-1、-7に特異的な基質として合成された、Ac-DEVD-MCA (Acetyl-L-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Aspartic acid 4-Methyl-Coumaryl-7-Amide、ペプチド研究所製)を基質として用いて測定した。

細胞(約150mg)は液体窒素で凍結させた状態を保ちながら、乳鉢中ですりつぶして粉末化した。その後抽出バッファー(後述)150 μl を加えて全体をさらにすりつぶし、全量を1.5ml容のマイクロチューブに移した。その後水中で融解させ、20分間時々穏やかに攪拌しながら抽出した。次いで0℃、19,000gにて15分間遠心分離し、上清を粗酵素液とした。粗酵素液はマイクロチューブに移し、液体窒素で凍結させ、-80℃で保存した。分析に使用する際は解凍して用いたが、一旦解凍したものは氷中に置き、当日中に使い切るようにした。粗酵素液のタンパク質濃度は、既述の方法と同様に測定した。

酵素反応はUV吸収測定用のセル中で行った。予め30℃に保温した反応バッファー(後述)760 μl に粗酵素液40 μl を加え、370nmの吸光度を4分間測定した。3分から4分の間の吸光度変化量から1分間当りのAMC遊離量を求めた。分析時と同一のバッファーにおいて、AMC標品を用いて370nmの吸光度とAMC濃度との関係で検量線を作り、これをもとに遊離AMC量を算出した。酵素活性は、1分間に1 μmol のAMCを

遊離する酵素量をIUとして表示した。

抽出バッファー、反応バッファーの組成を以下に示した。

抽出バッファー：

100mM Hepes (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)-KOH (pH 7.5)、40% (v/v) グリセリン、100mM KCl、4mM MgCl₂、10mM EGTA (O,O'-bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid)、20mM dithiothreitol (DTT)、2mM PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride)、100 μ M leupeptin、100 μ M chymostatin、100 μ M pepstatin A、200 μ M antipain

反応バッファー：

50mM Hepes (pH 7.5)、20% (v/v) グリセリン、50mM KCl、2mM MgCl₂、5mM EGTA、5mg/ml ウシ血清アルブミン、0.1% (w/v) CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonic acid)、10mM DTT、1mM PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride)、5 μ M leupeptin、5 μ M chymostatin、5 μ M pepstatin A、10 μ M antipain、100 μ M Ac-DEVD-MCA (10mM DMSO溶液を調製して、添加)

抽出成分の分析

継代後4日目にara-Cを1mM添加し、0日目、2日目、3日目、6日目の細胞および培養液を回収して試料とした。細胞は生重量130mg程度を回収し、全量を凍結乾燥、粉末化した後酢酸エチルを1ml加えて時々攪拌しつつ2時間抽出した。細胞を除去し、酢酸エチル相500 μ lをマイクロチューブにとり、酢酸エチルを減圧留去した。残渣に50 μ lのBSTFAを添加して反応させ、内0.6 μ lをGCに注入、分析した。培養液は細胞濾別時に濾液として回収した。培養液5mlに酢酸エチル1mlを加えて数分間よく振りまぜ、800gで10分遠心分離し、酢酸エチル相を全量マイクロチューブに移した。同様の抽出を2回行い、抽出物は1つのチューブにまとめた。酢酸エチルを減圧留去し、残渣を試料とした。この残渣に30 μ lのBSTFAを添加してTMS化し、内1 μ lをGCに注入した。分析条件は全て4-2と同様に設定した。

細胞様態の観察

継代後4日目にara-Cを1mM添加し、8日間培養した細胞（死細胞率；65%、対照

は1%)を回収し、試料とした。これまで記してきたのと同様にエバンスブルーによって染色し、細胞死を検出、写真に記録した。

核の様態の観察は、以下の手順に従って行った。すなわち、細胞をエタノール/酢酸(3/1)で約1時間固定し、固定液を捨てた後新しい液体培地(培養に用いたものと同様)で数回洗浄、最終的に適量の培地に懸濁した。この細胞懸濁液に対して、Hoechst 33342 (Calbiochem-Novabiochem Corp.)を終濃度 $20\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、10分間程度染色した。UV(330nm-385nm)照射によって励起させ観察、記録した。

[結果・考察]

DNase活性に対するpHおよび二価陽イオンの影響

酸可溶化物定量法

Fig. 4-13に結果を示した。pH 5.5の方がpH 7.5より全般にやや高い活性を示した。pH 5.5では、 ZnSO_4 $10\mu\text{M}$ または無添加の場合に最も活性が高かった。 ZnSO_4 1mM 、EDTA 10mM の添加で、活性はやや阻害された。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} は活性促進効果を持たず、むしろわずかに活性は阻害された。これらの活性の阻害、促進のパターンは、ara-C区、対照で相似形を示した。

pH 7.5では、ara-C区で CaCl_2 $1\text{mM}+\text{MgCl}_2$ 1mM の添加時に最も高い活性が認められたが、 CaCl_2 1mM 、 MgCl_2 1mM 、 ZnSO_4 $10\mu\text{M}$ 、無添加での活性値と大きな差は無かった。対照では CaCl_2 1mM 添加が最も活性が高かった。この値は CaCl_2 $1\text{mM}+\text{MgCl}_2$ 1mM 、 MgCl_2 1mM 添加時とは大差なかったが、ara-C区の場合と異なり、 ZnSO_4 $10\mu\text{M}$ 、無添加の場合と比較するとかなり差があるように思われた。ara-C区、対照ともに ZnSO_4 1mM 、EDTA 10mM で活性はかなり阻害された。対照でのEDTAによる阻害が特に大きいと思われた。

以上のことから、粗酵素中のDNase活性を持つ酵素として、pH 5.5で活性が高く、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 要求性の無い酵素と、pH 7.5で活性が高く、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} によって活性化される酵素の少なくとも2つが存在していると考えられた。さらに、ara-C区では前者が、対照では後者が多くの割合を占めているのではないかと思われた。これは、対照においては Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} を含む場合には常にpH 7.5での活性がpH 5.5での活性より高く検出されるが、ara-C区においては同条件下ではpH 5.5での活性の方が高く検出されることによる。

以上の結果より、ara-C誘導細胞死に伴うDNase活性分析を酸可溶化物定量によって

pH 5.5

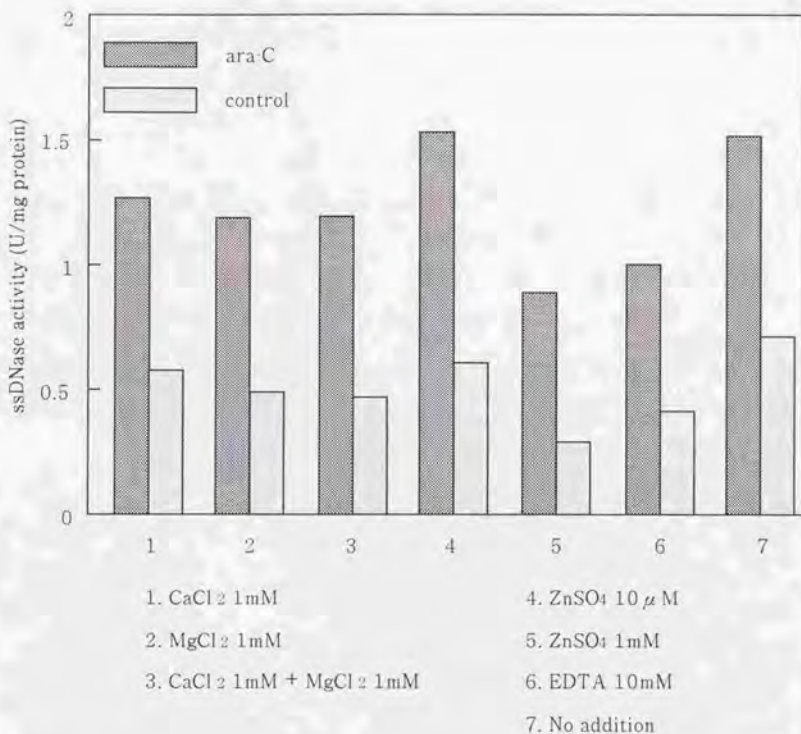


Fig. 4-13. Effect of cations and EDTA at pH 5.5 and 7.5 on the single stranded DNase activities of crude enzyme solutions from ara-C treated and control cells cultured for 7days after ara-C addition.

(continued on next page)

pH 7.5

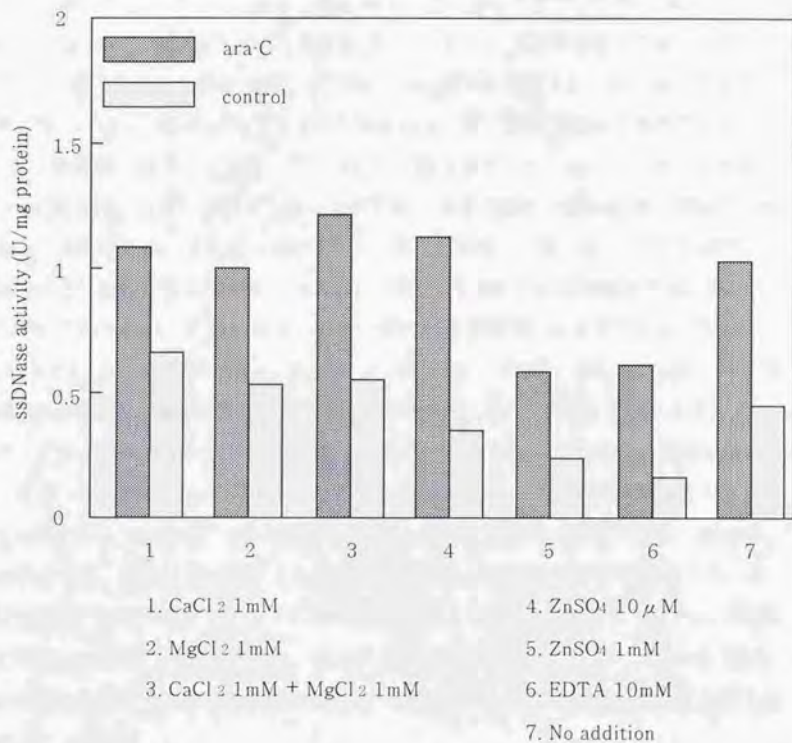


Fig. 4-13. (continued)

行う際には、pH 5.5、 ZnSO_4 10 μM 、を反応バッファーとして用いるのが適当だと考えられた。

Activity Gel 法

(1) SDS-PAGE

pH 7.5で酵素反応を行った結果を、Fig. 4-14に示した。 CaCl_2 1mM、 MgCl_2 1mM、 CaCl_2 1mM+ MgCl_2 1mM、の場合にはいずれも同程度の活性が認められた。ara-C区、対照とも同一の泳動距離（約33kDa）に活性が検出されるが、ara-C区の方が活性が高い。他の部位には活性は見られなかった。活性部位を細かく観察すると、ara-C区、対照共に少なくとも2つの連続した活性スポットからなっていることが分かる。ara-C区では、対照に比べて全体に高活性が認められるが、泳動距離の短い（高分子量側）方の活性が、より高くなっている（(C)、矢頭）。 ZnSO_4 1mM、EDTA 10mMでは全く活性が検出できなかった。 ZnSO_4 10 μM あるいは無添加では、弱いながら活性が認められた。この結果は、前述の酸可溶化物定量による結果において、ara-C区の ZnSO_4 10 μM 添加時と、 CaCl_2 1mM、 MgCl_2 1mM、 CaCl_2 1mM + MgCl_2 1mM添加時の活性がほぼ同等だったこととは一致しない。この現象については、インキュベーション時の酵素の失活によるのか、SDSによる変性、電気泳動、再活性化の過程で本来の酵素と異なる性質を帯びたためなのか、あるいは、電気泳動後にゲル上で活性を検出できる酵素が、粗酵素液中に存在している酵素の一部にすぎず、粗酵素での活性を十分に反映していないためなのか、これらのいずれにも当てはまらないのか、現状では不明である。このように、酸可溶化物定量による測定と、Activity Gel法による測定とを一律に論じることには無理があることが明らかになった。しかしながら、Activity Gel法の場合にも、細胞死に伴うDNase活性の変化がある程度は反映されているように思われた。

なお、pH 5.5で反応させた場合には活性が全く検出できなかったため、結果は示していない。これは、酸性条件下での長時間のインキュベーションにより酵素が失活したことによるものだろう。基質DNAの分解がゲル上で判別可能な状態になる以前に酵素活性が低下したものと考えられる。細胞粗酵素液の酸可溶化物定量による活性測定ではpH 5.5の方が総じて高活性を示したが、高々15分間の反応では失活の影響が表れなかったためだと思われる。

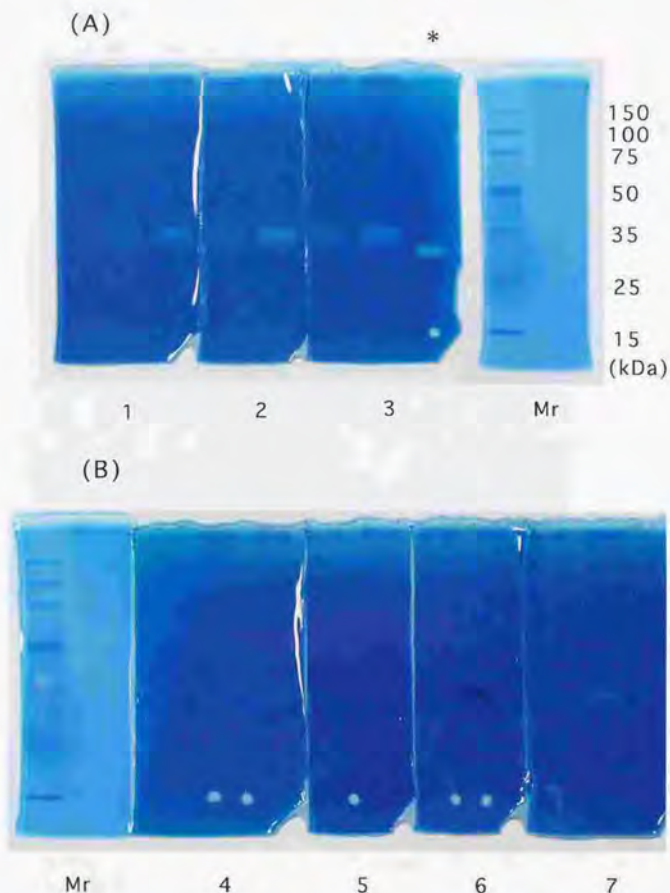


Fig. 4-14. Effect of cations and EDTA on ssDNase activities following SDS-PAGE.

(A) and (B) : The number under each separate gel represents incubation buffer number shown in the text. In each separate gel, crude protein extract obtained from control and ara-C treated cells were loaded on the left and the right lane, respectively. In gel 3, 100pg of DNase I was also loaded (lane*). Molecular mass (Mr) markers are given in kilodaltons.

(C) : The same gel as shown in (A) under magnified view. Arrowhead indicates ssDNase activity activated more intensively.

(continued on next page)

(C)

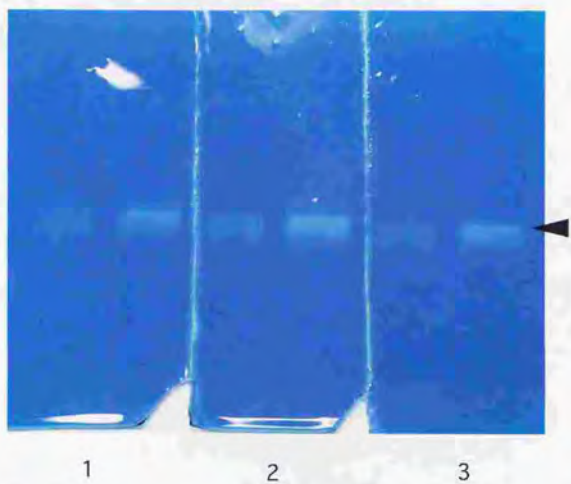


Fig. 4-14. (continued)

(2) native-PAGE

Fig. 4-15に結果を示した。活性部位はDNAの蛍光が失われ、黒く写る。pH 7.5では、いずれの組にも活性が認められ、ara-C処理区の方がより高活性を示すことが分かる。ゲルの他の部位には活性は見られなかった。CaCl₂ 1mM添加時に最も活性が高く、無添加、ZnSO₄ 10μM、の順で活性が低下するように見える。活性部位は泳動方向に沿って拡散して表れ、分離が芳しくないことが分かった。いくつかの酵素が活性部位周辺に存在するのかは判定不可能だった。pH 5.5では、活性は非常に低く検出された。二価イオンの影響は、pH 7.5の時と同様の傾向があるように思われた。低活性の原因は失活によるものと考えられる。pH 5.5でのインキュベーション時間は、4℃での平衡化60分、37℃での酵素反応90分の合計150分であるが、その間にかなり失活したことが明らかである。

以上 (1) 及び (2) より、Activity Gel法で検出可能な粗酵素中のDNaseは、酸性条件下で失活しやすく、また、Ca²⁺またはMg²⁺によって活性化、あるいは安定化される酵素であることが分かった。Activity Gel法で粗酵素液のDNase活性を測定する場合には、pH 7.5のバッファー中、Ca²⁺またはMg²⁺を添加して酵素反応を行うべきだろう。また、分離の様子から、native-PAGEによる電気泳動は不適當であると思われる。酵素が本来の状態から不可逆に変化する可能性はあるが、良好な分離を示す点を考慮して、SDS-PAGE後の活性検出が妥当だと考えられた。

分子量に基づく分画と酵素活性検出を同時に行うことが可能であるとの期待からActivity Gel法を試みたが、得られる情報はかなり限られたものになることが明らかとなった。粗酵素液中のDNaseについて詳細な情報を得るためには、カラムクロマトグラフィーによる酵素の精製が必須であると思われた。

プロテアーゼ活性の検出

合成基質分解活性

プロテアーゼ活性の測定には、基質として天然のタンパク質を用いる方法と、対象とする酵素の基質特異性を考慮して合成された人工の基質を用いる方法がある。種々のプロテアーゼに対して合成基質が多数調製、販売されており、粗酵素中の不特定の酵素を対象にした場合、その活性測定に適した合成基質を選択するのは困難である。

そこで本研究では、ヒヤクニチソウ管状要素分化系でのプロテアーゼ活性の測定 (Minami and Fukuda 1995) を参考にし、同様の基質を用いてara-C添加による

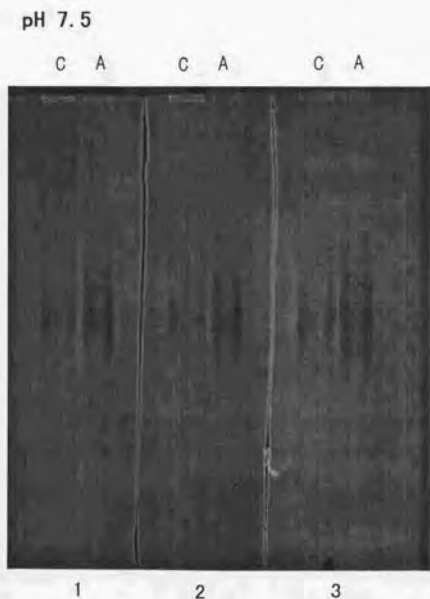


Fig. 4-15. Effect of pH and cations on ss DNase activities following native-PAGE. The same crude protein extract used in Fig. 4-13 and 4-14 were electrophoresed.

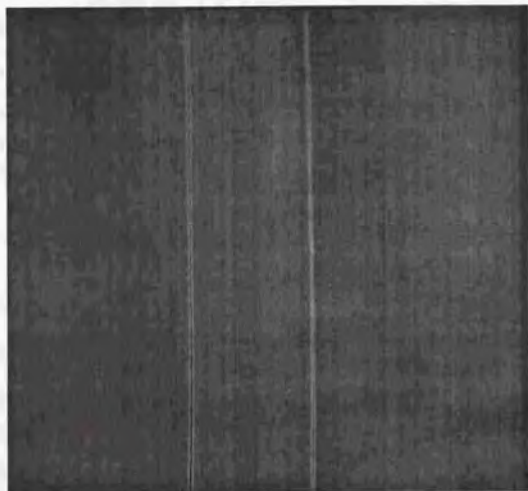
The number under each separate gel represents incubation buffer number which are as follows : 1. None, 2. ZnSO_4 10 μM , 3. CaCl_2 1mM.

In each separate gel, crude protein extract (5 μg) obtained from control (C) and ara-C (A) treated cells were electrophoresed.

(continued on next page)

pH 5.5

C A C A C A



1 2 3

Fig. 4-15. (continued)

細胞死でのプロテアーゼ活性の検出を試みた。それらの基質に対する分解活性と反応系のpHとの関連を考察した。本項目緒言で述べた粗酵素液中のタンパク質濃度が減少するという現象は、死細胞が目立ち始めるのと同時期から認められるように思われた。そこで、ara-C添加3日目の、死細胞が急増する時期の細胞を試料として選択した。

Fig. 4-16に分析結果を示した。ara-C区、対照ともに、いずれの基質に対してもpHが高くなるほど活性が高くなる傾向が認められた。また、pH 9では、どの基質に対してもara-C区が、対照に比べて高い分解活性を示すことが分かった。他のpH値では明らかな傾向は認められなかった。3つの基質それぞれに対する分解活性の値から、Bz-Arg-MCA、Z-Phe-Arg-MCAに比べ、Boc-Val-Leu-Lys-MCAは酵素との親和性がやや劣ると思われた。これらの結果から、この系におけるプロテアーゼ活性の測定は、Bz-Arg-MCA、Z-Phe-Arg-MCAの2種類を基質とし、pH 9で行うのが適当であると判断した。

カゼイン分解活性

中性から塩基性条件下でのプロテアーゼ活性を幅広く検出する目的で、カゼイン分解活性を測定した。

各pH (7, 9)、反応時間 (0分、30分、60分)、における反応溶液20 μ l中に含まれるカゼイン量の変化を、Fig. 4-17に示した。0分から30分後までは減少が認められるが、30分から60分には全く減少が見られず、むしろ値は増加していた。この原因としては、酵素が30分後までに失活した、粗酵素液中のタンパク質が自身のプロテアーゼ活性によって自己分解した、カゼインが適当な基質にならず、30分後までに分解可能な部分が全て分解された、の内のいずれか、あるいはそれらが複合したものをあげることができるだろう。30分以降の増加は分析手法の問題などから測定値がばらついたためではないかと思われる。すなわち、反応時間が長くなると共にタンパク質量が増加することはあり得ないことを前提すれば、ここで示された測定値の上で増加分に相当する程度のタンパク質量 (0.5-1 μ g程度) については定量的に論じ得ないと考えるべきだろう。全ての時間で、カゼイン量が基質として当初含まれるべき量より多いことが分かる。これは、粗酵素液中のタンパク質の存在の他、上述のような測定の感度の問題点があることによると思われる。以上のことから、カゼイン分解活性の測定については、分析手法を含めて再度検討が必要であると思われた。ただし、今回の分析結果からは、細胞死に伴うカゼイン分解活性の急激な上昇が無い

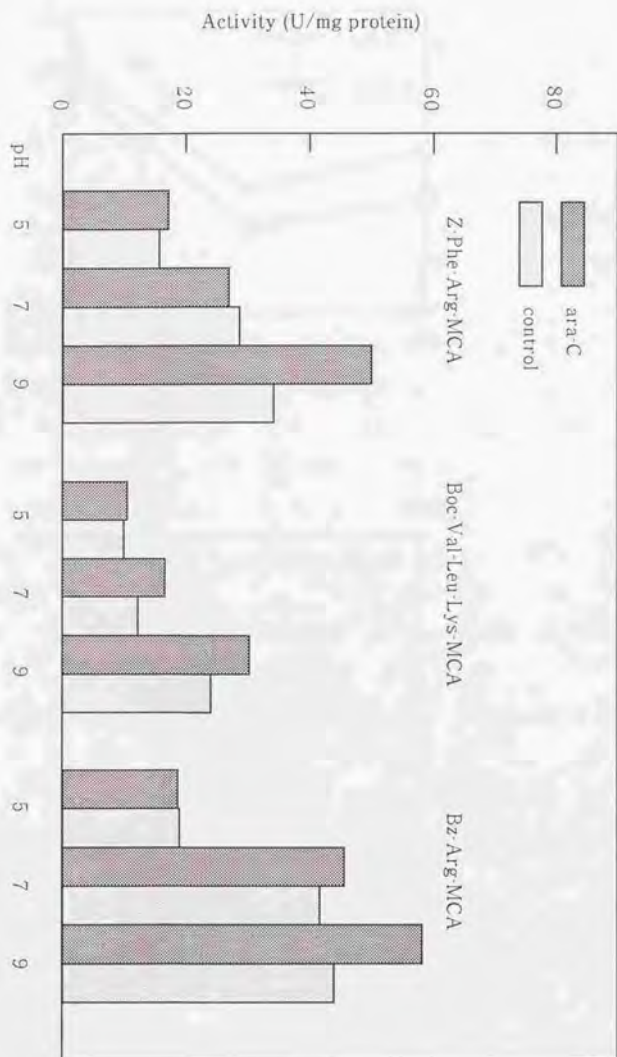


Fig. 4-16. Hydrolytic activities against peptidyl-MCA substrates in crude enzyme solutions from ara-C treated and control cells cultured for 3days after ara-C addition.

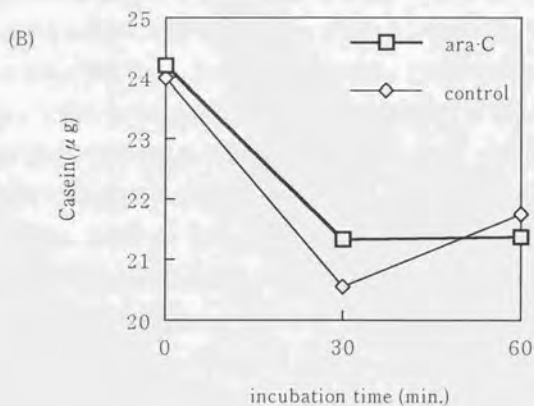
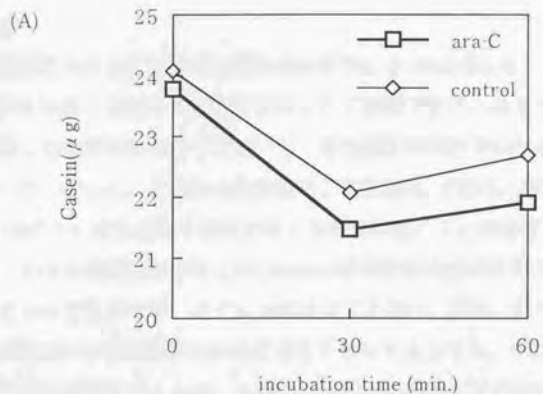


Fig. 4-17. Caseinolytic activity at pH 7 and 9. Residual casein amount (μ g) in 20μ l of reaction mixture at each time is shown.

(A): pH 7, (B): pH 9

と結論するのが妥当であろう。

Caspase活性

用いた細胞系における死細胞率の経時変化をFig. 4-18に示した。これより、細胞死誘導の初期から中期に相当する細胞を試料として回収できたと考えられる。これらの細胞から調製した粗酵素液の全てにおいて、活性測定時間内でのAMCの遊離は全く認められなかった。従って、これらの粗酵素中には基質Ac-DEVD-MCAのアスバラギン酸残基とAMCとの結合部分を加水分解する活性が無いことが確認された。これは今回の実験系における細胞死誘導時にはCaspase様の酵素活性が誘導されないという可能性を示唆するものではあるが、必ずしも断定はできない。即ち、個々の細胞において細胞死の初期にCaspase様酵素の活性化が生じていたとしても、それらが系全体で見て多数の細胞でほぼ同時に起こるか、あるいは活性化の時間にずれがあってもその活性が細胞内で長時間維持されるかのいずれかでない限り、系全体としては活性化を検出できない可能性がある。活性測定に用いた基質が適当でなかったという可能性もある。即ち、DEVD配列を認識する酵素 (=Caspase-3, -1, -7様の酵素) が存在し、生体内ではある特定の基質に対して活性を持っていたとしても、*in vitro*では基質のAMC部分を遊離させるに至らなかったという場合である。このような場合には、他種のCaspaseに対して設計された合成基質を用いて活性を測定すればCaspase様酵素の活性に応じてAMC遊離が認められる可能性があるだろう。実際、タバコ葉のタバコモザイクウイルスに対する過敏感反応死において、葉から抽出した粗酵素液中のCaspase様酵素の活性化を検出した例では、基質Ac-DEVD-MCAの分解活性は全く検出できなかったが、その一方で類似の基質Ac-YVAD-MCA (Acetyl-L-Tyrosyl-L-Valyl-L-Alanyl-L-Aspartic acid 4-Methyl-Coumaryl-7-Amide) の分解活性上昇が認められている (del Pozo and Lam 1998)。

今回用いた系において、今後さらにCaspase様酵素の関与を調べるに当たっては、直接Caspase様酵素の活性を測定する以外に、Caspase様酵素に対する特異的な阻害剤を用いて、その細胞死に対する影響を評価するのが有効な手段になると考えられる。また、既に述べたように他種のCaspaseに対して設計された基質を用いて、その分解活性を測定することにも検討の価値があると思われる。

抽出成分の分析

抽出に用いた細胞のara-C添加後の日数と死細胞率は、0日目 (4.8%)、2日目

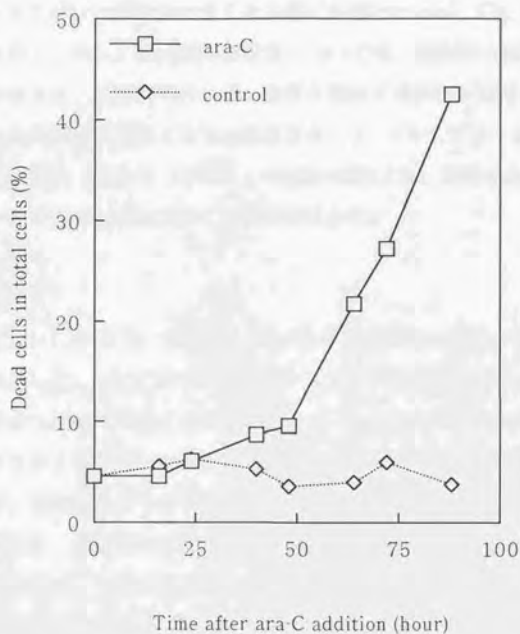


Fig. 4-18. Time course of changes in cell death (%) in ara-C treated cells after ara-C addition.

(ara-C:5.2%, 対照:3.2%, 括弧内以下同), 3日目(18.3%, 6.4%), 6日目(52%, 4.8%)であった。系全体で見て細胞死誘導初期から中期ないし後期にかけての細胞を回収できたと思われる。

Fig. 4-19にGCによる分析結果を示した。細胞抽出物については、4-2 (Fig. 4-2)で述べた8分から10分にかけての2つのピークと同一と思われるピークが、やや増加傾向を示すこと以外には、ara-C添加による変化はほとんど認められなかった。 β -シトステロールのピークがやや小さくなる様にも思われるが、Fig. 4-2で示したものは異なり、判然としない。同時期の培養液については、細胞死の進行とともに β -シトステロールが減少し、保持時間の小さい物質が増加する傾向が認められる。なお、通常の培養では培養期間の進行とともに培養液中に β -シトステロールが蓄積することが明らかになっており(井上ら 1996)、今回の実験でも、対照においては培地中の β -シトステロールが日毎に増加することが確認された。

細胞様態の観察

Fig. 4-20にエバンスブルー染色像、Hoechst 33342による核の蛍光染色像と白色光での観察像を示した。ara-C区では、エバンスブルー染色時に細胞の他に細胞由来と思われる青く染まった破片が多く認められた。エバンスブルーにより濃染される死細胞は、プロトプラストが収縮し細胞壁との間に隙間が見られる。また、細胞全体が一樣に染色されず、濃淡があるものも多く見られた。対照では細胞外の破片は殆ど見あたらなかった。また、生細胞ではプロトプラストと細胞壁との隙間は見られなかった。

Hoechst 33342は、動物細胞に用いた場合、細胞の固定が不要、つまり生細胞の染色に適すると報告されている(原口・平岡 1998)。そこで、固定を行わず細胞懸濁液に直接添加して観察したが、本研究で用いたイチョウ培養細胞では数時間放置しても生細胞の核は殆ど染まらなかった。従って細胞の固定は必須であると判断した。プロトプラストの収縮した死細胞は、(固定前の)生細胞に比べて核がより強い蛍光を発し、周囲との境界が明瞭で、また核自体が凝縮している様に思われた。このような細胞死に伴う核の変化は、葉の老化(Yen et al. 1998)、タバコ培養細胞の低温処理による細胞死(Koukalova et al. 1997)などでも報告されており、類似の変化が生じているものと思われる。核そのものが断片化しているか否かは判別できなかった。

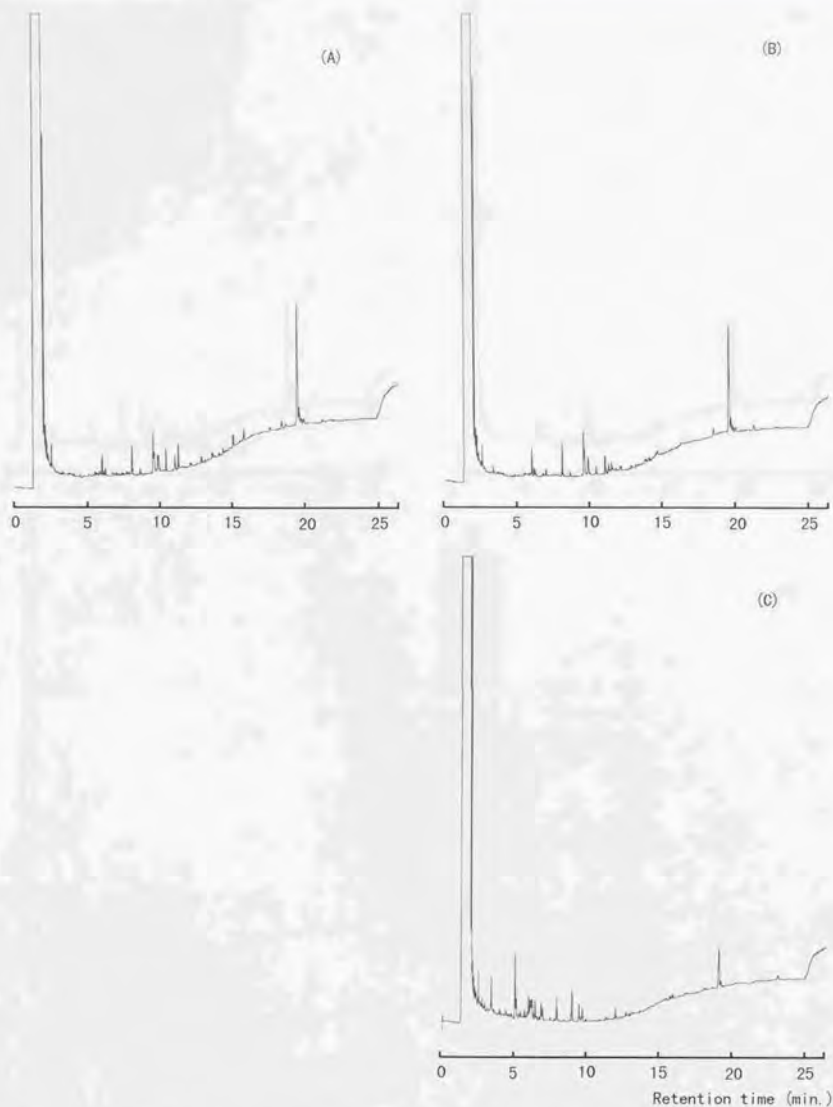


Fig. 4-19. GC-FID profiles of trimethylsilylated cell and medium extracts obtained from cultures 0, 2, 3 and 6 days after ara-C addition and corresponding control cultures.

(A), (B), (D) and (F): cell extracts of 0, 2, 3 and 6 days after ara-C addition.
 (H), (J) and (L): corresponding control cell extracts to (B), (D) and (F), respectively.
 Each lower chart represents corresponding medium extract to each upper chart.

(continued on next pages)

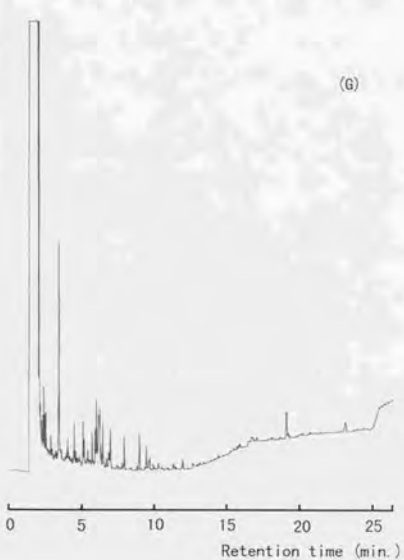
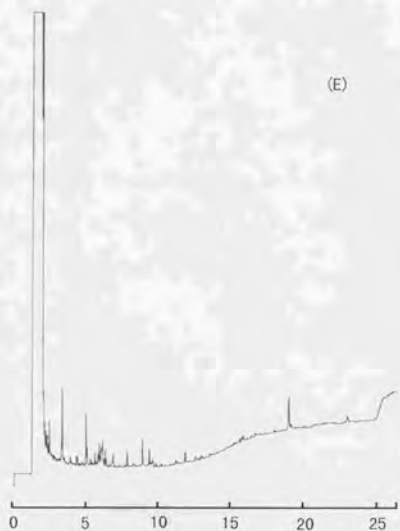
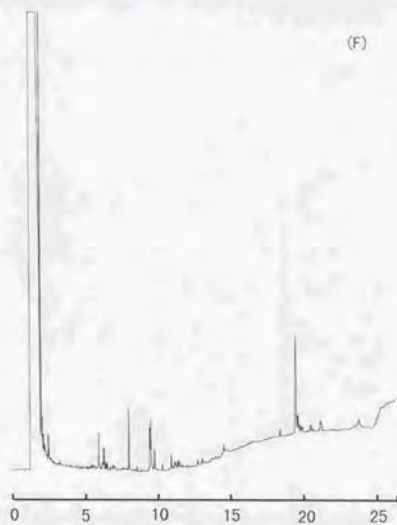


Fig. 4-19. (continued on next pages)

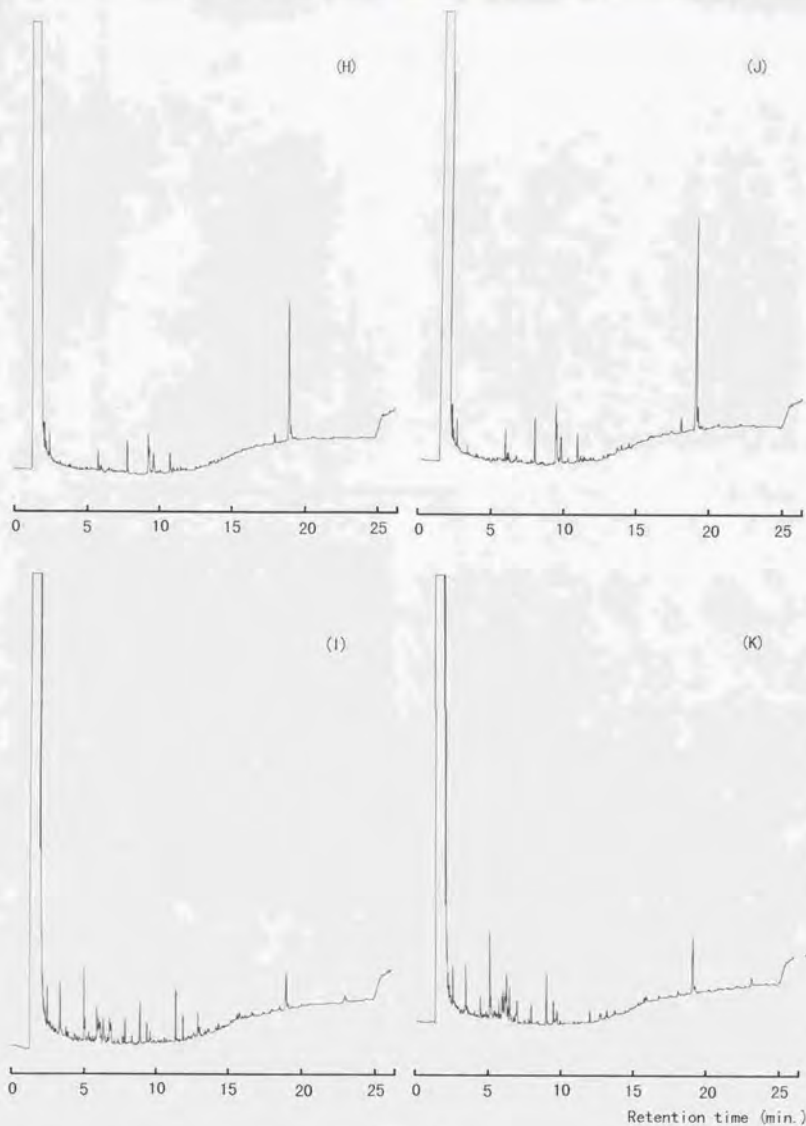


Fig. 4-19 (continued on next page)

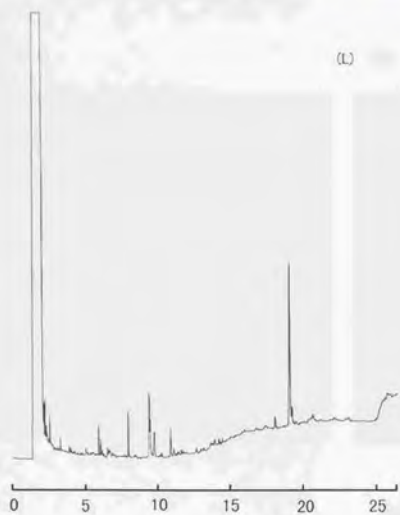


Fig. 4-19. (continued)

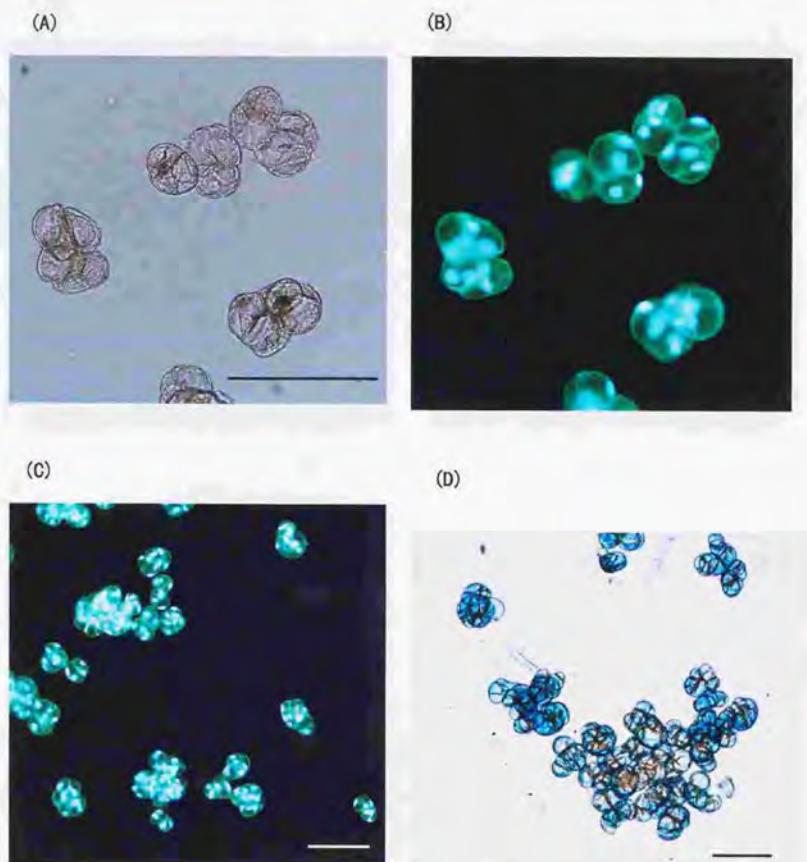
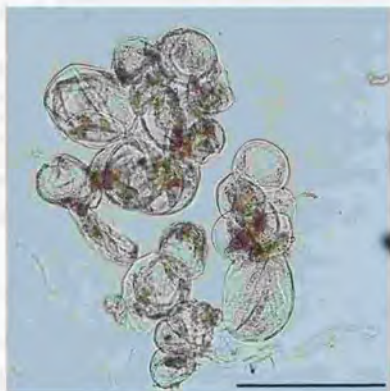


Fig. 4-20. Cell morphology and cell death detection in ara-C-induced cell death. (A) to (D): control, and (E) to (H): ara-C treated.

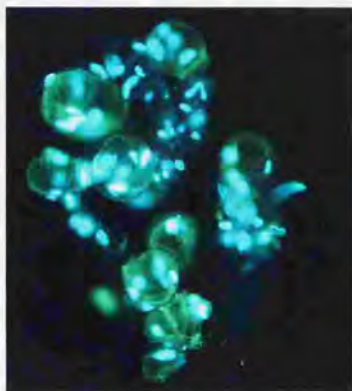
(A) and (E): Sections viewed under white light. (B) and (F): The same sections as shown in (A) and (E) with Hoechst 33342 staining viewed under UV irradiation. (C) and (G): Other sections viewed under UV irradiation. (D) and (H): Cell death detection with Evans Blue staining. Bars = 250 μ m.

(continued on next page)

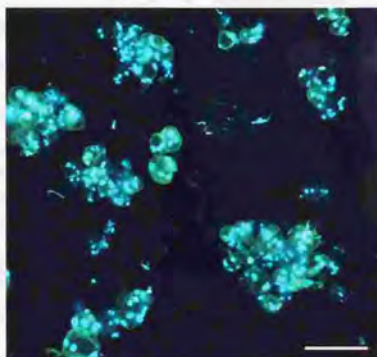
(E)



(F)



(G)



(H)

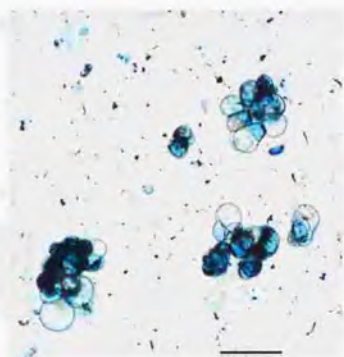


Fig. 4-20. (continued)

4-5 シトシンアラビノシド添加による細胞死誘導機構の観察 (2)

[緒言]

前項により、DNase活性、プロテアーゼ活性の適当な測定条件を決定した。そこで本項では、ara-C添加の系における細胞死の誘導、DNase活性、プロテアーゼ活性の挙動を経時的に分析し、それら相互の関連について考察した。

[実験]

DNase活性の分析

継代後3日目にara-Cを1mM添加して培養し、毎日(ただし、6日目の次は8日目に行った)細胞を回収して凍結保存した。継代時から試薬添加までの細胞も同様に回収し、試料とした。継代時も含めて作業の時刻を記録し、分析値は日にちではなく時間で示した。これは以下の項目についても同様である。

粗酵素液の調製、DNase活性の分析は4-3と同様に行った。酵素活性の測定は、10 μ M ZnSO₄を含むpH5.5のバッファー中で行った(4-4でのNo. 4と同)。反応は37℃、15分とした。粗酵素液のタンパク質濃度を測定し、タンパク質量あたりのDNase活性を示した。

Activity Gel法による分析は、基本的には4-4に記したSDS-PAGEで分離する方法に従った。ただし、基質ssDNAの濃度を50 μ g/mlに、ゲルのサイズを14cm \times 10cmに変更し、電気泳動は30mAの定電流で行った。ゲルのインキュベーションは、CaCl₂ 1mM+MgCl₂ 1mMを含むpH 7.5のバッファー中で行った(同項目のNo. 3.と同)。

プロテアーゼ活性の分析

上記と同時期に回収した細胞を用いた。4-4に記したものと同様の手順で粗酵素液の調製およびプロテアーゼ活性測定を行った。酵素活性測定は、基質としてBz-Arg-MCA、Z-Phe-Arg-MCAの2種類を用い、pH 9のバッファー中で行った。酵素反応は25℃で3分間行い、2分から3分までの1分間の遊離AMC量から、活性を算出した。粗酵素液のタンパク質濃度を測定し、タンパク質量あたりの活性を示した。

ゲノムDNAの抽出・電気泳動

上記と同時期の細胞(生重量で100mg程度にそろえた)を回収し、凍結保存した。DNA抽出用のキットであるNucleon Phytopure (Amersham Pharmacia Biotech)

を用い、添付の使用方法に従ってDNAを抽出した。得られたDNAは50 μ lのTEバッファに溶解させた。260nmの吸光度からDNA量を算出し、DNA2 μ g相当量を電気泳動に用いた。

電気泳動は0.7%アガロースと0.65% SYNERGELを混合して支持体とし、TAEバッファをゲル作成および泳動用のバッファとした。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し、UVトランスイルミネーターを用いてDNAを検出、写真に記録した。

〔結果・考察〕

DNase活性の分析

Fig. 4-21にara-C添加時と対照におけるDNase活性の経時変化を示した。Fig. 4-22、4-23には、それぞれara-C区、対照でのDNase活性と死細胞率との関連を示した。Fig. 4-21より、ara-C添加により、48時間目（2日目）以降DNase活性が急速に上昇することが分かる。Fig. 4-22の結果からは、死細胞の増加とDNase活性の上昇が同時に起こっているように思われる。

対照でのDNase活性値および死細胞率は分析期間を通じてほぼ一定の値で推移した（Fig. 4-23）。

Activity Gel法による分析では、ゲルを大きいサイズにして分離能が向上したため、これまで少なくとも2つと認識していた活性が、3つ以上からなることが分かった。ara-C処理区では、酸可溶化物定量法による活性上昇に対応して、数個の活性の内でも高分子側の活性の上昇が認められた。これは4-4で観察されたものと同様の結果といえる。対照では、活性の変化は認められなかった（Fig. 4-24）。

プロテアーゼ活性の分析

Bz-Arg-MCA、Z-Phe-Arg-MCAに対する分解活性を、Fig. 4-25、4-26にそれぞれ示した。どちらの基質に対しても、ara-C添加に伴う特筆すべき活性の変化を見出すことはできない。4-4（Fig. 4-16）ではara-C区が対照より高活性であるとの結果を得たが、今回の系で同時期に相当する細胞での活性を見ても必ずしも同様の傾向が認められるわけではなかった。活性値自体がかなり低下しているが、これは反応温度を下げたことによるものだろう。ara-C区、対照ともに各時間での分析値間のばらつきが非常に大きいように思われた。これより、粗酵素液の調製や分析操作の過程で酵素の失活が進行している可能性が考えられる。基質が不適当だったため安定に活性を測定で

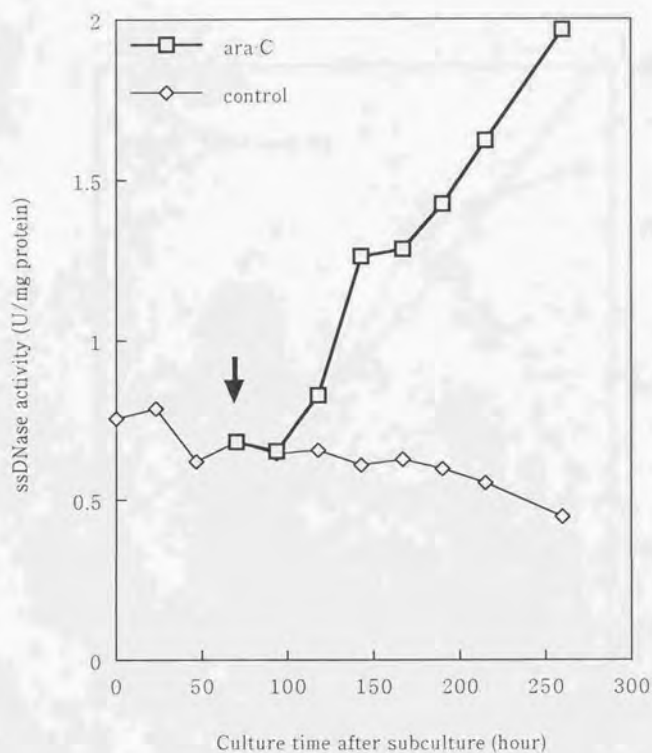


Fig. 4-21. Time course of changes in ssDNase activities during culture.

The arrow indicates the time of ara-C addition.

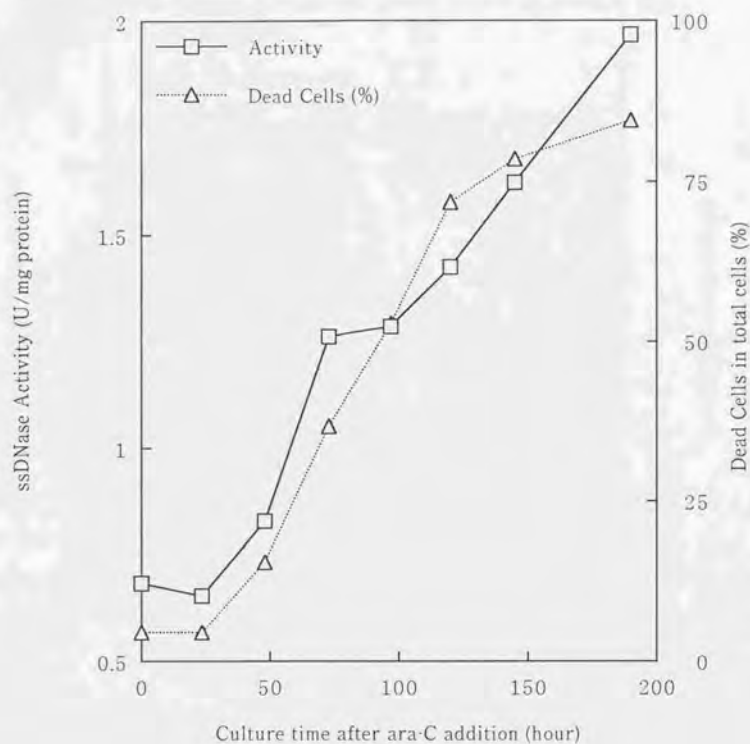


Fig. 4-22. Time course of changes in cell death (%) in ara-C treated cells after ara-C addition.

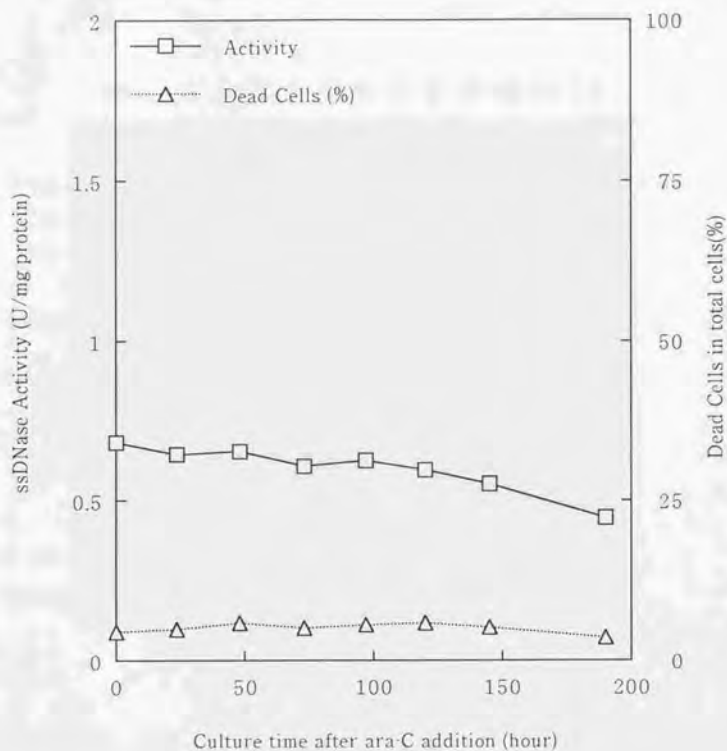


Fig. 4-23. Time course of changes in cell death (%) in control cells after ara-C addition.

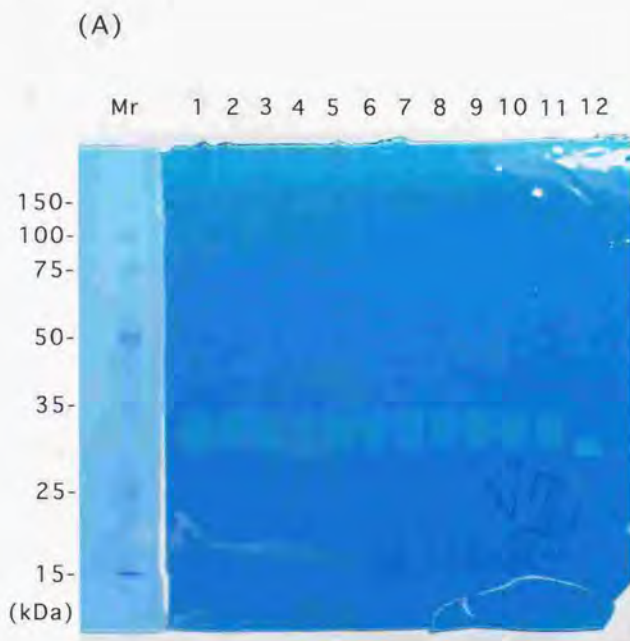


Fig. 4-24. Detection of ss DNase activities following SDS-PAGE. All the crude enzyme solutions used in Fig. 4-21 were electrophoresed.

(A) : Controls. Lanes 1-11 contained crude enzyme solutions from control cells cultured for 0-9 and 11 days after subculture. Ara-C was added at day 3. Lane 12 contained 100pg of DNase I. Molecular mass (Mr) markers are given in kilodaltons.

(B) : ara-C treated. Lanes 1-7 contained enzyme solutions from 1-6 and 8 day ara-C treated cells. Lane 8 contained 100pg of DNase I.

(continued on next page)

(B)



Fig. 4-24. (continued)

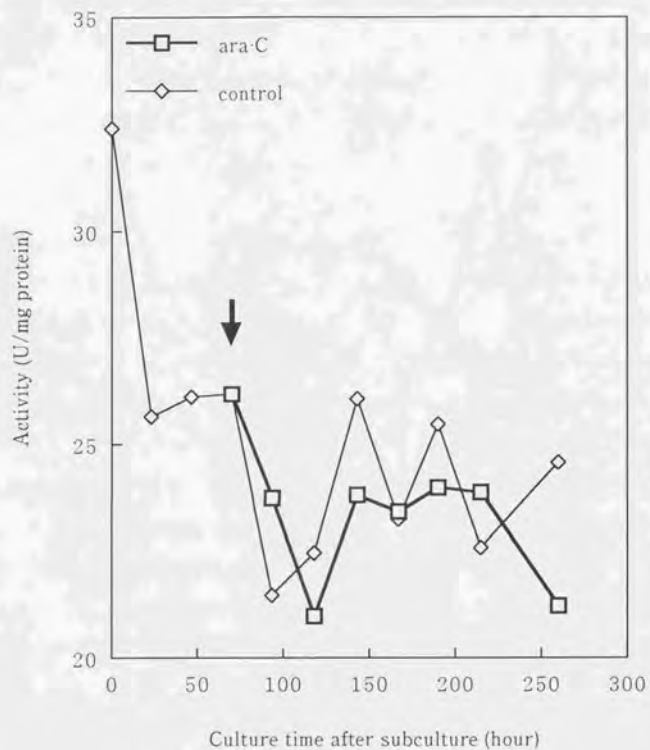


Fig. 4-25. Time course of changes in hydrolytic activities against Bz-Arg-MCA during culture. The arrow indicates the time of ara-C addition.

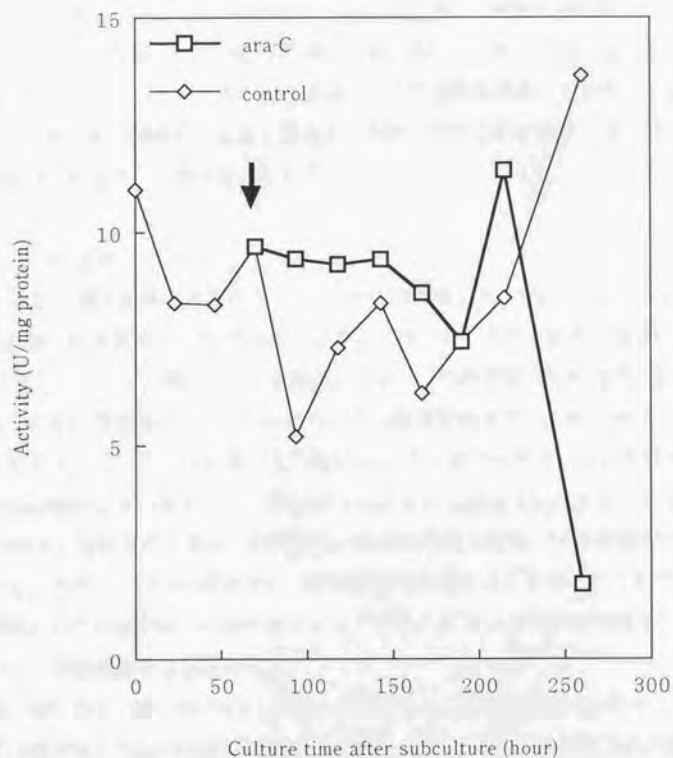


Fig. 4-26. Time course of changes in hydrolytic activities against Z-Phe-Arg-MCA during culture. The arrow indicates the time of ara-C addition.

きなかったという可能性もあろう。単に分解活性が低いために、種々の要因に由来するばらつきが大きく見えたにすぎないとも考えられる。いずれにせよ、これらの基質を用いてara-C誘導細胞死に伴うプロテアーゼ活性の変動を測定するのは不適当だったと言わざるを得ない。仮に何らかのプロテアーゼが個々の細胞で細胞死の際に誘導されるとしても、系全体として分析した場合にその活性が検出できるとは限らないことも考慮しなければならないだろう。今後は、改めて適当な基質、分析条件を検討するとともに、細胞死の段階毎に細胞を分別し、それぞれについて酵素活性の測定を行うような実験系の確立が必要だと思われる。

ゲノムDNAの様態

Fig. 4-27に電気泳動の結果を示した。ara-C処理区(B)ではレーン3(7.3時間後; 3日目)以降断片化したDNAが目立つようになる。やや不鮮明であるが、断片化DNAの部分にはラダー様パターンが認められる。この時間はDNase活性の顕著な上昇が認められる時期であるが、DNase活性はその前日からすでに上昇を始めている

(Fig. 4-21)。レーン2では断片化DNAがほとんど認められないことを考えあわせると、DNase活性上昇の結果としてDNA断片化が進行したように見える。すなわち、ゲノムDNAが、活性上昇が認められたDNaseの真の基質となっている可能性が高いと考えられる。ただし、DNase活性を持つ酵素が複数存在することが、ここまでの実験で強く示唆されているため、その中のどの分子がゲノムDNA分解に直接関与しているかについて、今後検討する必要がある。

対照(A)では、断片化DNAは基本的にはほとんど認められなかったが、レーンによって断片化したDNAをわずかながら持つものもあった。断片化DNAの部分にはara-C処理区と同様のラダー様パターンが認められた。これは、対照ではあっても、一定数の死細胞が常に存在していること、あるいはDNA抽出時に損傷を受けて断片化したこと、などが原因と思われる。また、断片化DNAの方が高分子DNAより抽出されやすいため、結果的に抽出DNA溶液中の断片化DNAの割合が大きくなり、電気泳動像として見た時に断片化したものが目立ったためとも考えられる。

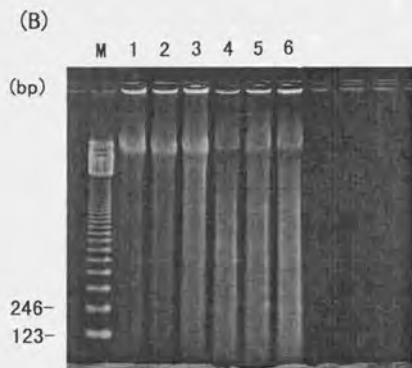
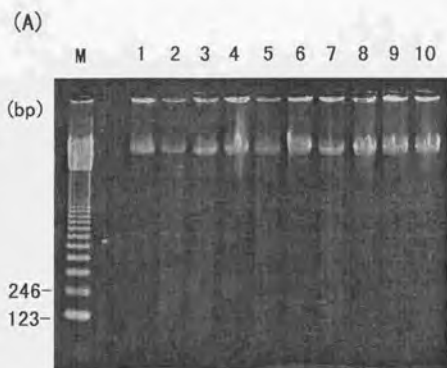


Fig. 4-27. DNA degradation during ara-C-induced cell death. DNA was extracted from the cells harvested at the same time as the cells used in Fig. 4-24. M: 123bp DNA ladder markers.

(A) : Controls. Lanes 1-10 contained about $2\mu\text{g}$ of DNA from control cells cultured for 0-9 days after subculture. Ara-C was added at day 3.

(B) : ara-C treated. Lanes 1-6 contained about $2\mu\text{g}$ of DNA from 1-6 day ara-C-treated cells.

4-6 クロロホルム添加による細胞死および二次代謝発現誘導

[緒言]

4-2の実験により、クロロホルム添加によって細胞死が誘導されると共に、細胞抽出成分に大きな変化があることが明らかになった。添加量に応じた細胞死誘導能の違いは4-2でも示しているが、そこでは抽出物の分析を行わなかった。そこで本項では、クロロホルム添加量の違いによる細胞死への影響を改めて検討することとし、さらにそれぞれの添加量に対して、細胞および培養液中の抽出成分の分析を行った。

[実験]

継代後18日目にクロロホルムを0.4%(v/v)、0.1%(v/v)添加して培養し、50時間後に細胞を回収した。同時に細胞懸濁液の一部を取ってエバンスブルーによって染色し、死細胞率を算出した。細胞は生(湿)重量150mg程度を用い、全量を凍結乾燥、粉末化した後、酢酸エチル1mlを添加し時々攪拌しながら2時間抽出した。その後細胞を濾別し、酢酸エチル相500 μ lをとり酢酸エチルを減圧留去した。残渣に50 μ lのBSTFAを加えてTMS化したものをGC用サンプルとした。注入量については以下のようにした。すなわち、(抽出に用いた細胞重量) / (試験管1本当たりに含まれる細胞の総重量) の値が163/2010の時(対照の場合)に1 μ lを注入することとし、他サンプルについてはそれに応じて注入量を算出した。

培養液は細胞濾別時に濾液として回収した。培養液5mlに酢酸エチル1mlを加えて数分間よく振りまぜ、800gで10分遠心分離し、酢酸エチル相を全量マイクロチューブに移した。同様の抽出を2回行い、抽出物は1つのチューブにまとめた。酢酸エチルを減圧留去し、残渣を試料とした。この残渣に30 μ lのBSTFAを添加して反応させ、内1 μ lをGCに注入した。なお、分析条件は全て4-2と同様に設定した。

[結果・考察]

Fig. 4-28に結果を示した。死細胞率は、0.4%添加時100%、0.1%添加時25%、無添加(対照)7%であった。0.1%添加時には25%と、かなりの割合の細胞が死んでいるにもかかわらず、培養液、細胞とも抽出物の変化は小さく、特徴的な増加、減少を示す物質は見出せなかった。0.4%添加時では、4-2で述べたのと同様に、 β -シトステロールのピークが大幅に減少すること、また、保持時間5分から10分にかけての2つのピークの物質が、同じ時期に顕著に増加しているのが良く分かる。同時期の培養液に

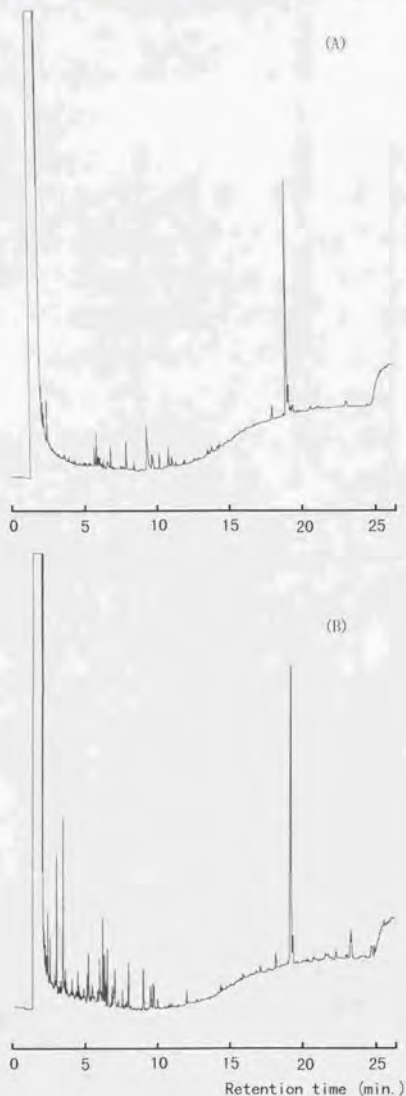


Fig. 4-28. GC-FID profiles of trimethylsilylated cell and medium extracts obtained from cultures 50 hours after chloroform addition and control cultures.

(A): control cell extract, (C) and (E): extracts from cells treated with 0.1% and 0.4% chloroform, respectively.

Each lower chart represents corresponding medium extract to each upper chart.

(continued on next page)

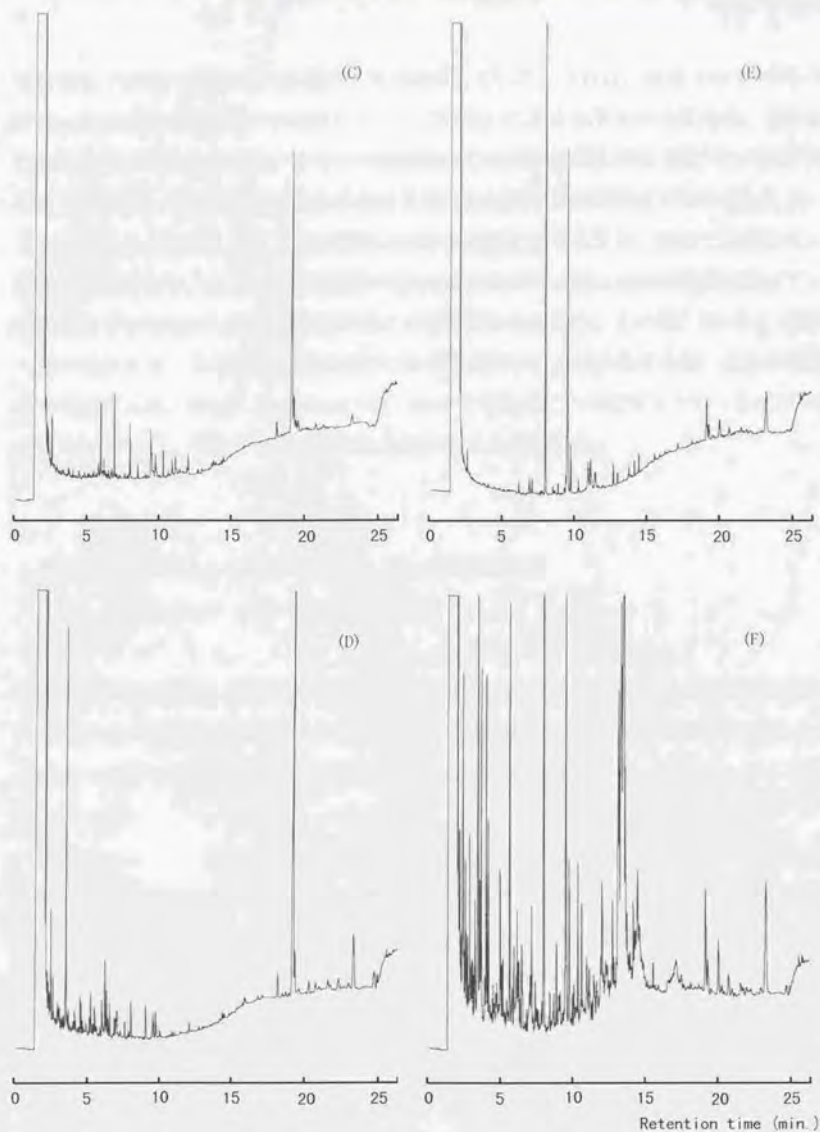


Fig. 4-28. (continued)

ついても、 β -シトステロール量はかなり減少していた。これは、細胞での β -シトステロール減少が、細胞外への流出によるのではないことを示すものと言える。分解されて他物質に変換されたか、あるいは配糖体化その他の修飾を受けてGCでは検出できなくなったか、そのいずれかによるものと考えられた。培養液中に存在していた β -シトステロールが減少したことは、細胞死の際に細胞に取り込まれ、続けて分解あるいは修飾を受けたか、あるいは、細胞から流出する酵素や、なんらかの物質によって、培養液中で分解ないしは修飾を受けたことを示すものだろう。この他、 β -シトステロールに遅れて2、3個の物質が細胞死に伴って増加することが分かるが、これは培養液で顕著だった。特に、 β -シトステロールのすぐ後のピークはコントロールには検出されないもので、今後さらに検討する価値があると思われた。

4-7 硫酸銅添加による細胞死および二次代謝発現誘導

[緒言]

4-2の実験により、硫酸銅添加によって細胞死が誘導されると共に、細胞抽出成分に大きな変化があることが明らかになった。そこで本項では、硫酸銅添加量を変化させた場合の影響を調べ、さらに培養液中の成分についても分析を行った。

[実験]

継代後18日目に硫酸銅を終濃度0.5mM、0.05mMになるように添加して培養し、約50時間後に細胞を回収した。エバンスブルー染色によって死細胞を検出した。細胞は生(湿)重量150mg程度を用い、全量を凍結乾燥、粉末化した後、酢酸エチル1mlを添加し時々攪拌しながら2時間抽出した。その後細胞を濾別し、酢酸エチル相500 μ lをとり酢酸エチルを減圧留去した。残渣に50 μ lのBSTFAを加えてTMS化したものをGC用サンプルとした。注入量については以下のように設定した。すなわち、(抽出に用いた細胞重量) / (試験管1本あたりに含まれる細胞の総重量) の値が163 / 2010の時(対照の場合)に1 μ lを注入することとし、他サンプルについてはそれに応じて注入量を算出した。

培養液の抽出、分析等は全て上記同様に行った。

[結果・考察]

Fig. 4-29に結果を示した。死細胞率は、0.5mM添加時100%、0.05mM添加時14%、無添加（対照）7%であった。前項のクロロホルム添加の場合とよく似たクロマトグラムパターンを呈し、やはり細胞死が少ない条件では抽出成分の変化はほとんど認められなかった。しかし、硫酸銅の場合、細胞、培養液ともに細胞死に伴う β -シトステロールの減少があまり顕著ではなく、これはクロロホルム添加時との相違点と言える。また、培養液での β -シトステロール後のピーク物質が、クロロホルムの場合より顕著な増加を示していた。これらがクロロホルム、硫酸銅による本質的な違いなのか否かについて、今後さらに詳細に検討することが必要であろう。

4-8 総括

イチョウ培養細胞に細胞死を誘発する試薬として、シトシンアラビノシド (ara-C)、アフィディコリン (Aph)、コルジセピンなどの抗ガン剤が有効であることが分かった。これらの試薬による細胞死は添加後2、3日目から急増することが分かった。ara-C、Aph添加の系を用い、DNase活性の経日変化を調べたところ、変性DNA、未変性DNAのいずれに対する分解活性も、細胞死増加とともに上昇することが明らかとなった。

Activity Gel法を用いた分析から、対照にも存在する既存のDNaseの活性化が認められたが、新規のDNaseの誘導は確認されなかった。ただし、Activity Gel法が粗酵素中のDNase活性を全て検出できる訳ではない可能性が示唆されたため、今後、粗酵素液の分画、精製を行ってさらに詳細に検討する必要がある。ゲノムDNAの電気泳動分析により、細胞死増加、あるいはDNase活性上昇とゲノムDNAの低分子化がほぼ同時に生じ、低分子化DNAはアポトーシスの特徴の一つとされるラダー様構造を不鮮明ながら呈することが分かった。顕微鏡観察から、死細胞はプロトプラストが収縮し、核の凝縮と染色性の上昇を示すことが明らかとなった。この現象はアポトーシスや、数例の植物細胞のプロトプラスト細胞死で報告されているものと類似性がある。

DNase以外に、諸種のプロテアーゼ活性の測定を試みたが、細胞死との関連で議論し得る結果は得られなかった。分析条件の設定も含め、さらに検討の余地がある。また、細胞死が同調的に生じているわけではないという点が、分析を困難にしている可能性もある。これはプロテアーゼに限ったことではない。即ち、仮に個々の細胞で

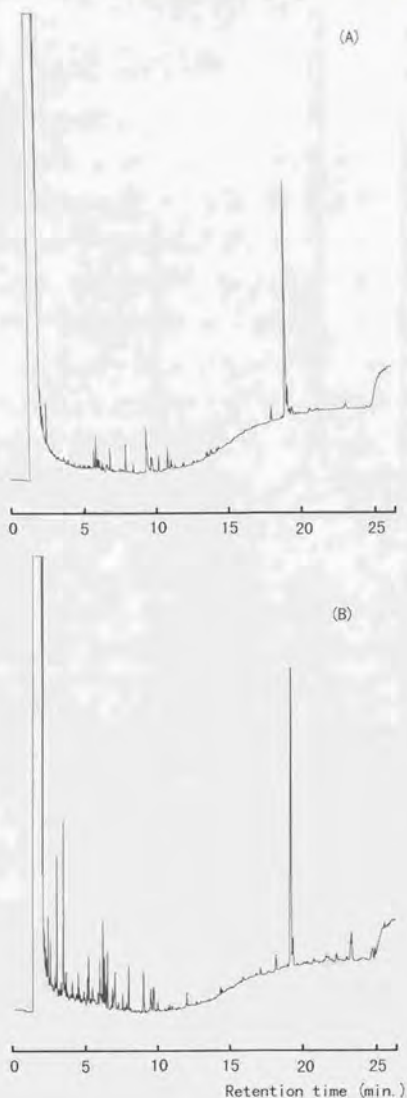


Fig. 4-29. GC-FID profiles of trimethylsilylated cell and medium extracts obtained from cultures 50 hours after CuSO_4 addition and control cultures.

(A): control cell extract, (C) and (E): extracts from cells treated with 0.05mM and 0.5mM CuSO_4 , respectively.

Each lower chart represents corresponding medium extract to each upper chart.

(continued on next page.)

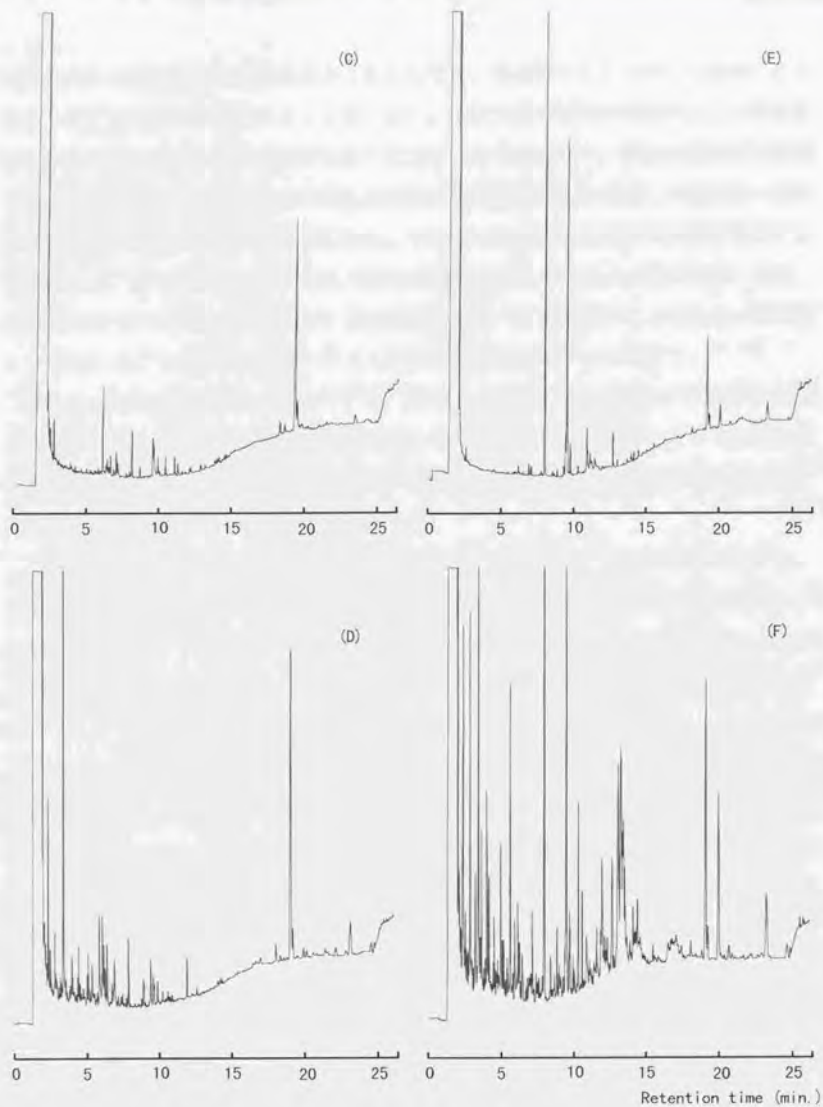


Fig. 4-29. (continued)

細胞死の際に活性化される酵素があったとしても、系全体として分析した場合にその活性が必ずしも高く検出できるとは限らない。分析対象の酵素が細胞中にどの程度安定に存在するかによって分析値が大きく左右されることになる。DNaseの場合は活性を保った状態で安定に存在していることが分析値からも明らかだが、プロテアーゼの場合にはそうではなかった可能性がある。今後は、細胞死の段階毎に細胞を分別する方法の確立、あるいは優れた同調性を持つ細胞死誘導系の確立が必要である。また、細胞死に伴うタンパク質の減少が、ある特定のタンパク質の減少によるのか、無差別に分解されることによるのかについても分析を試みる必要があるだろう。

ara-C、Aphによる細胞死においては、細胞、培養液ともに酢酸エチル抽出物のGCクロマトグラム上での顕著な変化は認められなかった。酢酸エチルによって抽出されにくい物質、あるいはGC分析に不適當な物質については、抽出溶媒を変更した上でHPLC等による分析を行う必要があるだろう。

クロロホルム、硫酸銅の添加によってもイチョウ培養細胞に細胞死が誘導された。前者で0.4%添加時、後者で0.5mM添加時に急速な細胞死が起こり、二日後には全ての細胞が死滅した。クロロホルム0.4%添加の場合、細胞及び培養液の酢酸エチル抽出物をGC分析したところ、いくつかの物質が顕著に増加し、 β -シトステロールが著しく減少することが明らかとなった。また、硫酸銅0.5mM添加時についても、同様に細胞及び培養液の酢酸エチル抽出物をGC分析したところ、細胞死に伴い、クロロホルム添加の場合とほとんど同様の物質の増減が確認された。ただし、両試薬とも、死細胞が四分の一に満たない程度の添加量ではほとんど成分に影響を与えなかった。この結果から、これらの系での成分変化は、細胞が新規に物質を生成したためではなく、むしろ細胞が急速かつ大規模に死んだ結果として生じた可能性が高いように思われた。

- Alami I, Mari S, Clérivet A (1998) A glycoprotein from *Ceratocytis fimbriata* f. sp. *platani* triggers phytoalexin synthesis in *Platanus × acerifolia* cell-suspension cultures. *Phytochemistry* 48: 771-776
- Bickerstaff GF, Zhou H (1993) Protease activity and autodigestion (autolysis) assays using Coomassie blue dye binding. *Anal Biochem* 210: 155-158
- Blank A, Sugiyama RH, Dekker CA (1982) Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels. *Anal Biochem* 120: 267-275
- Cotter TG, Glynn JM, Echeverri F, Green DR (1992) The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle. *Anticancer Res* 12: 773-779
- Davis BJ (1964) Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann New York Acad Sci* 121: 404-427
- del Pozo O, Lam E (1998) Caspase and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr Biol* 8: 1129-1132
- Gutierrez MC, Parry A, Tena M, Jorin J, Edwards R (1995) Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry* 38: 1185-1191
- Keck K (1956) An ultramicro technique for the determination of deoxypentose nucleic acid. *Arch Biochem Biophys* 63: 446-451
- Kikuchi K, Niwa Y, Yamaguchi T, Sunohara H, Hirano H, Umeda M (1998) A rapid and easy-handling procedure for isolation of DNA from rice, *Arabidopsis*, and tobacco. *Plant Biotech* 15: 45-48
- Koc Y, Urbano AG, Sweeney EB, McCaffrey R (1996) Induction of apoptosis by cordycepin in ADA-inhibited TdT-positive leukemia cells. *Leukemia* 10: 1019-1024
- Koch W, Wagner C, Seitz U (1998) Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. *Planta* 206: 523-532
- Koukalova B, Kovarik A, Fajkus J, Siroky J (1997) Chromatin fragmentation

- associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. FEBS Lett 414: 289-292
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- Marinelli F, Di-Gregorio S, Ronchi VN (1991) Phytoalexin production and cell death in elicited carrot cell suspension cultures. Plant Sci 77: 261-266
- Minami A, Fukuda H (1995) Transient and specific expression of a cysteine endopeptidase during autolysis in differentiating tracheary elements from *Zinnia* mesophyll cells. Plant Cell Physiol 36: 1599-1606
- Mittler R, Lam E (1995) Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. Plant Cell 7: 1951-1962
- Mittler R, Lam E (1997) Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. Plant Mol Biol 34: 209-221
- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M (1993) Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. EMBO J 12: 3679-3684
- Ryerson DE, Heath MC (1996) Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. Plant Cell 8: 393-402
- Seifert K, Haertling S, Porzel A, John S, Krauss G (1993) Phytoalexin accumulation in *Ornithopus sativus* as a response to elicitor treatment. Zeitschrift fuer Naturforschung Sect C Biosci 48: 550-555
- Takahashi A, Hirata H, Yonehara S, Imai Y, Lee KK, Moyer RW, Turner PC, Mesner PW, Okazaki T, Sawai H, Kishi S, Yamamoto K, Okuma M, Sasada M (1997) Affinity labeling displays the stepwise activation of ICE-related proteases by Fas, staurosporine, and CrmA-sensitive caspase-8. Oncogene 14: 2741-2752
- Thelen MP, Northcote DH (1989) Identification and purification of a nuclease from *Zinnia elegans* L.: a potential molecular marker for xylogenesis. Planta 179: 181-195

- Yamashita K, Takahashi A, Kobayashi S, Hirata H, Mesner Jr PW, Kaufmann SH, Yonehara S, Yamamoto K, Uchiyama T, Sasada M (1999) Caspases mediate tumor necrosis factor- α -induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood* 93: 674-685
- Yen C-H, Yang C-H (1998) Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiol* 39: 922-927
- 井上広喜, 鴨田重裕, 寺田珠実, 佐分義正 (1996) イチョウ培養細胞における生理活性物質について, 第5回植物細胞分子生物シンポジウム講演要旨集, 広島 p 38
- 鈴木直貴, 寺田珠実, 佐分義正 (1993) ポブラ懸濁培養細胞のペクチナーゼ添加によるトリテルペンの生成. *植物組織培養* 10: 301-302
- 高山 悟 (1988) ユーカリ培養細胞における同調培養系確立についての試み, 東京大学農学部学士學位論文
- 鶴尾 隆, 馬島哲夫, 内藤幹彦 (1997) 抗がん剤によるアポトーシスの誘導, “現代化学・増刊 35, アポトーシス研究の新展開”, 米原 伸編, 東京化学同人, pp 30-34
- 原口徳子, 平岡 泰 (1998) 生細胞のマルチカラー蛍光画像化, *細胞工学* 17: 956-965

第5章 本研究の総括

本研究において得られた結論を以下に総括した。

第2章においては、種々の外植体を用いて不定胚をはじめとした器官分化から、植物体再生までを目指した実験を行った。また、カルス状態で維持可能な状態の細胞を用いて、器官等の再分化系確立を試みた。

培養の結果、今回の実験で調べた限りでは、通常用いられることの多い葉、胚、等の外植体、培地、植物成長調節物質等の種々の組み合わせでは、器官分化を誘導することはできなかった。その一方で、カルスの誘導はいずれの外植体でもかなり容易であり、そのまま継代培養できるものも多いことが分かった。カルスの誘導、成長にはオーキシシンとしてNAAが含まれれば十分であり、BAが共存すると得られたカルスが褐変しやすい傾向が認められた。カルスからの再分化実験は主に不定芽の分化誘導を目的として行ったものであるが、器官の再分化等は全く認められず、培地毎にカルスの成長に差が見られたのみだった。今後、イチヨウの*in vitro*分化誘導をさらに検討するに当たっては、現在のLS培地を基本に用いた培養法から離れる必要性も考慮すべきだろう。

第3章においては、はじめに成木、幼木各種の試料での種々の部位におけるginkgolide類含有量を広く調べた。その結果をもとに、幼植物の発育過程でのginkgolide類含量の変動を詳細に検討し、これらに影響を与える要因について考察した。また、第2章の実験により得られた数種類を含めた種々の培養細胞を材料として、それぞれのginkgolide含有量について調べた。これらの培養細胞は成長が速く、一部液体培地での培養が可能なものもあり、さらに光による緑化のコントロールが容易である。そこで、これらの系を用いて光による緑化の影響や培養状態の相違がもたらす影響について考察した。

原植物では今回調べた全ての試料でginkgolide類の存在が確認された。葉においては、老化に伴い、G-Aが最初に分解されることを示唆する結果が得られた。4月の新葉展開期における内樹皮にはG-A、G-B、G-Cとかなりの量が含まれていた。これらのginkgolide類は新葉で生合成されたものの転流によるものではなく、形成層細胞あるいは篩部細胞自身において生合成されたものか、あるいは、前年中に葉または他の器官で生合成され、転流、蓄積したものと考えられた。また、内樹皮中に存在して

いたginkgolide類が、外樹皮への移行の際にあまり分解を受けないことを示唆する結果が得られた。一方、木部に含まれるginkgolide類は内樹皮と比較してかなり少量であることより、外樹皮の場合と異なり、木部細胞の分化の際にはginkgolide類が細胞にほとんど保持されないか、あるいは形成層細胞にはもともとginkgolide類が少量しか含まれていないことが示唆された。10月に若木の根を採取して調製した試料では、ginkgolide類の総量は緑葉における量の3倍近くであることが分かった。各ginkgolideの量比は緑葉の場合と類似していた。これらのginkgolide類が根で生合成されたのか、他器官から転流してきたのかは今回の実験のみでは判断できない。3月頃まで低温保存していた種子の胚乳部分ではG-Bのみが多く、G-A、G-Cは少ないという偏った割合であることが分かった。これらのginkgolide類はおそらく転流の結果蓄積したものと思われるが、その主成分がG-Bであったことから、ginkgolide類の転流における中間体がG-Bないしはその関連化合物である可能性も示唆される。発芽直後の幼植物では、胚軸、根とも成木の緑葉とくらべてかなり多くのginkgolide類が検出された。

発芽直後の幼植物におけるginkgolide類の挙動と成長との関連などについて検討した一連の実験から、発芽直後の幼植物におけるginkgolide類の生成には、光が重要な役割を持たないことが明らかになった。また、全く葉が展開しない暗所培養の幼植物における一個体あたりのginkgolide類の含有量は、数枚の緑葉が展開している明所培養の場合と殆ど同じだった。このことから、ginkgolide類の生合成部位は葉のみではない、もしくは葉ではないことが示唆される。ginkgolide総量で見ると、その生成と光とは深い関連がないように見えるが、各成分についてみると、光がG-AとG-Bの量比に何らかの影響をおよぼしているように思われた。

培養細胞ではいずれも、原植物と比較にならない少量が検出されたにすぎなかった。緑化との関連、誘導部位の違いによる相違、培地成分の影響等についても、それを確認するに足る量は検出できなかった。

第4章では、イチョウ培養細胞を用いて実験的な細胞死誘導系を確立し、樹木細胞での細胞死制御機構を解明することを目的とした実験を試みた。

種々の試薬の効果を調べた結果、シトシンアラビノシド、アフィディコリン、コルジセピンなどの抗ガン剤が細胞死誘導に有効であることが判明した。これらの試薬による細胞死は添加後2、3日目から急増することが分かった。シトシンアラビノシド、アフィディコリン添加の系を用い、DNase活性の経日変化を調べたところ、変性DNA、未変性DNAのいずれに対する分解活性も、細胞死増加とともに上昇することが

明らかとなった。Activity Gel法を用いた分析から、対照にも存在する既存のDNaseの活性化が認められたが、新規のDNaseの誘導は確認できなかった。ゲノムDNAの電気泳動分析により、細胞死増加、あるいはDNase活性上昇とゲノムDNAの低分子化がほぼ同時に生じ、低分子化DNAはアポトーシスの特徴の一つとされるラダー様構造を鮮明ながら呈することが分かった。顕微鏡観察から、死細胞はプロトプラストが収縮し、核の凝縮と染色性の上昇を示すことが明らかとなった。

ara-C、Aphによる細胞死においては、細胞、培養液ともに酢酸エチル抽出物のGCクロマトグラム上での顕著な変化は認められなかった。酢酸エチルによって抽出されにくい物質、あるいはGC分析に不適当な物質については、抽出溶媒を変更した上でHPLC等による分析を行う必要があると思われるが、今後の検討課題である。

クロロホルム、硫酸銅の添加によってもイチョウ培養細胞に細胞死が誘導された。上述の薬剤の場合と異なり添加量に応じて急速な細胞死が起こり、二日後までには全ての細胞が死滅した。クロロホルム添加の場合、細胞及び培養液の酢酸エチル抽出物をGC分析したところ、いくつかの物質が顕著に増加し、逆に β -シトステロールが著しく減少することが明らかとなった。また、硫酸銅添加についても、同様に細胞及び培養液の酢酸エチル抽出物をGC分析したところ、細胞死に伴い、クロロホルム添加の場合とほとんど同様の物質の増減が確認された。ただし両試薬とも、大規模な細胞死を引き起こされない程度の添加量ではほとんど抽出成分に影響を与えなかった。この結果から、これらの系での抽出成分変化は、細胞が新規に物質を生成したためではなく、むしろ細胞が急速かつ大規模に死んだ結果として生じたにすぎない可能性が高いように思われた。

謝辞

本研究を行うにあたり、様々な有益な御助言、御協力をいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻森林化学研究室の佐分義正教授に御礼申し上げます。ドイツ、ハイデルベルク大学のH. Schick博士にはginkgolide A, B, Cを御提供いただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

折に触れて適切な御助言をしてくださった鯨島正浩助教授、日常的に議論に応じてくださり、実験について直接に御指導いただいた寺田珠実助手、農学部附属演習林の鴨田重裕講師に深く感謝いたします。また、いろいろな場面で種々ご協力くださった森林化学研究室的の皆様に心より感謝いたします。

投稿論文一覧

(1) 平成8年12月

「Hormonal responses of petioles and embryos in *Ginkgo biloba* cultures」

東京大学農学部演習林報告、第96号、p.119-123

(佐藤征嗣、鴨田重裕、寺田珠実、佐分義正と共著)

(2) 平成10年10月

「Ginkgolide production in relation to organogenesis in *Ginkgo biloba*.」

Journal of Wood Science, 44巻5号、p.375-378

(鴨田重裕、寺田珠実、佐分義正と共著)

(3) 平成11年6月

「Ginkgolide production in *Ginkgo biloba* trees and cultured cells」

東京大学農学部演習林報告、第101号、p.253-258

(鴨田重裕、寺田珠実、佐分義正と共著)

略歴

学歴

平成3年3月 神奈川県立厚木高等学校卒業

平成3年4月 東京大学教養学部理科Ⅱ類入学

平成7年3月 東京大学農学部林産学科卒業

平成7年4月 東京大学大学院農学生命科学研究科林産学専攻 修士課程入学

平成9年3月 東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻 修士課程修了

平成9年4月 東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻 博士課程入学

