

前回に引き続いて、昨年私が公益社団法人日本植物学会より大賞をいただいたテーマより「モデル植物細胞系」を取り上げます。

モデル培養細胞系の確立

植物組織に由来する細胞培養系は多くの植物材料より調製され、様々な用途に用いられています。しかしながら、植物細胞に共通する現象を扱えるような、いわばモデル植物細胞とよばれるような細胞系は、意外なことにも知られていませんでした。その必要性に疑いないのは、細胞分裂に関わる遺伝子発現の変化、細胞骨格の動態など全ての細胞に共通する機構の解明のような見地があるからです。この点に関して、私が行うことができたことは、タバコ BY-2 細胞の培養系はこの目的にかなうことを示すことができたことです。その基本骨格は既に 1982 年に達成されていましたが、当初はなかなか周囲に広まりませんでした。しかし、その後この BY-2 細胞の研究は世界中に広がり、その全貌は既に 2 冊のモノグラフとなって世に出ています (Nagata *et al.* 2004, 2006)。それらの研究対象は、オルガネラ、ウイルス増殖の宿主、液胞を除いたミニプロトプラストなど実に広範囲にわたり、ここではそれらに言及する余地はありませんが、興味のある方はそれらを見ていただくとして、ここではその要点に限って紹介いたします。

同調培養系が細胞の研究に有用であることは古くから言われてきたことですが、いずれも有効なものはなく、分裂指数で 10% 以下のものすら同調と呼ばれていました。しかしながら、タバコ BY-2 細胞の高い増殖性を利用して、DNA ポリメラーゼ α の特異的阻害剤アフィディコリンを用いて達成された同調系は S 期から始まりますが、同調度が大変高く (図-1)、細胞生物学研究に有用であることを示すことができました。更に、アフィディコリンと除草剤プロピザミドを組み合わせると、これらの薬剤処理解除後、より高度な M 期から始まる同調系が得られています。ところが、当初この実験系は、他研究室では再現できないとされていたようで、再現性に云々する意見もあったやに聞いています。これは大阪大学柴岡弘郎教授の研究室が導入を希望され、手技をお教えした際に、その原因が判明しました。全く基本的なことですが、同調がかかるか、かからないかは細胞の維持状態によっており、高度な同調度が達成させられるには細胞の増殖がよくなければならないということでした。同様なことは、世界に広まっていく際にも起こり、フランス シュトラスブー

ルの植物分子生物学研究所 (IBMP) のランベール (A.-M. Lambert), ギゴ (C. Gigot) 両教授はこの点をよく理解され、熱意を持って導入努力をされたので達成され、その後世界へ広まっていきました。これが達成された時点で、私はタバコ BY-2 細胞が植物の HeLa 細胞であると述べましたが、これは多くの人々に受け入れられました (Nagata *et al.* 1992)。

その結果明らかになったことは、細胞周期の各時期において、周期に依存して発現する遺伝子群の網羅とその機能解析で、当初はイーストの突然変異株との相補で遺伝子が単離されてきたのですが、得られていた遺伝子機能の同定が可能となりました。また、細胞周期の進行に依存して特徴的な変化を示す細胞骨格 (微小管, アクチン繊維など) のダイナミクスも、初めて明らかになりました。とりわけ、植物に特徴的な表層微小管は、細胞壁のセルロース繊維の配向を決めるという点で重要ですが、その構築の機構を初めて明らかにすることが出来ましたが、その後も明らかにされ続けています。具体的内容はいずれも上記 2 冊のモノグラフに含まれていますので、参照されたいと思います。

これまで語ってこなかったこと

私のこれまでの研究から二つの話題を取り上げて紹介してきましたが、これらの研究は他研究者へも影響を与えることになりました。その中から二つの話題について、思いがけない展開と過程があることを披露したいと思います。実は、これらは一度も対外的に発言したことがありませんでしたが、その事実は知っていただくことに意義ありと感ずるようになったからです。

葉肉プロトプラスト

第一点はタバコ葉肉プロトプラストの培養に関するもので、葉肉プロトプラスでの細胞分裂誘導にはオーキシンとサイトカイニンが必要であることに関係しています。1992 年から 1998 年にかけて、ワルデン (R. Walden) 博士らは、彼の作成になるアクチベーション・タギングを用いた遺伝子同定法により得た遺伝子の変異に関するタバコ変異体を単離しました。その植物体から得た葉肉プロトプラスはオーキシンなしでも細胞分裂を開始できると発表されました。更に、この系はサイトカイニン、リポキトオリゴサッカライド、サイクリック AMP の信号伝達系にも関わるという、事実であれば、画期的な研究内容でした。ところが、その彼らの一連研究の中で、1994 年に発表されたプロトプラス培養のタイムコースのデータ (図-4, EMBO J. 13, 4712, 1994) を見たとき、

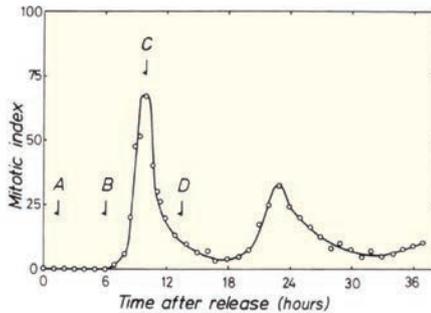


図-1 タバコ BY-2 細胞の細胞周期同調

タバコ BY-2 細胞をアフィディコリンで 24 時間処理後、アフィディコリンを洗い落とすと S 期から始まる高度な細胞周期の同調が得られる。薬剤解除後、細胞の分裂指数を追跡したものの。

私はこのデータはありえないデータであると感じました。そのころまでにプロトプラストの培養の経験は、私以上に多い人は考えられなかったことによる直感からでした。しかし、培養法が若干異なり、無菌培養している茎頂培養の材料を用いる点などから、もしかしたら事実かもしれないとも思いました。ところが、その後明らかになったことは、一連の研究は関わったテクニシャンがデータの捏造をしていたということで、一連のデータには再現性のないことが発表され (Schell *et al.* 1999), これらの論文は全て取り下げられてしまいました。このグループとは研究の交流もあったので、残念な出来事でした。この事実はどこかでは指摘しておくべきであると思いますので、ここに付け加えました。ただし、アクチベーション・タギング法が間違っていたのではないことは、その手法に従って、大阪大学柿本辰夫博士はサイトカニンの信号伝達経路のキーとなる遺伝子 *CKI* を単離していますことも付け加えます (Kakimoto 1996)。

もう一点は、植物の形質転換に関するもので、主としてタバコ BY-2 細胞に関するものですが、一部は葉の細胞にも関係しています。タバコ BY-2 細胞が根頭癌腫菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) による形質転換に感受性が高いことは研究初期より明らかになっていました。やや込み入っているのは BY-2 細胞の入手ソースと他者への譲渡に制限があったことで、この事情について詳細に述べるには大幅な紙幅を要し、ここに収めるには困難がありますが、全体の概要は既に発表してありますので、そちらを参照下さればと思います (Nagata *et al.* 2004 の第 1 章)。

ところで、根頭癌腫菌による植物細胞の形質転換は、真核細胞と原核細胞の遺伝子の授受という生物学的において大変稀な、特異的な現象です。1980 年代においては、アメリカ ワシントン大学医学部の研究グループ (E.W. Nester, M.P. Gordon 教授ら) とベルギー ゲント大学のグループ (J. Schell, M. Van Montagu 教授ら) が熾烈な競争を行っていました。なお、Schell 教授はマックス・プランク育種学研究所へ主軸を移して行きました。私は、当時両グループと研究上の交流があり、そのことから経験することになったものです。そのような背景の下、BY-2 細胞はワシントン大学へもたらされましたが、そこではステイシャル (S. Stachel) 博士が作成したトランスポゾンと大腸菌の Lac オペロンを組み合わせたプラスミド (Tn3-lacZ トランスポゾン) を用いて Ti プラスミドの病原性に関する Vir 領域の遺伝子群の同定とそれら

の機能が解明されました。その実験には BY-2 細胞が用いられ、解明の重要な材料となりました。ところが、それらの発表された論文には BY-2 細胞の名前は登場していません。その理由は細胞の譲渡に制限があったからですが、それは経緯から仕方のないことでした。ただし、よく読めばこれらの研究が BY-2 細胞を用いていることを読み取ることができますので、それらの論文から一例のみ挙げます (Stachel & Nester 1986)。

更に、一連の研究では植物細胞と根頭癌腫菌との間に物質的信号のやり取りがあることが判明していますが、これは当時大きな出来事ととらえられていました。同定された物質であるフェノール化合物誘導体アセトシリソングンの同定過程には、大変なドラマがありました。まず、上記ステイシャル博士は、彼の作成になるプラスミドを用いて、その物質の見当がついた段階で、競合関係にあったゲント大学へ移り、移動後その結果をそちらで発表しましたが、そこでは葉の細胞を用いて発表されました (Stachel *et al.* 1985)。一方、ワシントン大学グループはその事実に気付いて、やや遅れてタバコ培養細胞 (実は BY-2 細胞) を用いて、アセトシリソングンを同定し、論文を発表しました (Bolton *et al.* 1986)。この違いが科学の先取権に関わっていることは容易に読み取れるかと思います。これらの常識的には考えづらいが、実際に起こった出来事は、既に故人であるワシントン大学 Gordon 教授よりの私信でもたらされたもので、どこかで発表すべきと考えていましたが、ここに含めました。

いずれにせよ、タバコ葉肉プロトプラストの研究から 49 年、タバコ BY-2 細胞の研究から 36 年後に榮譽を受けることは幸いであつたと申します。この機会に長年封印してきたことも含めさせていただきます。

文献

- Bolton, G.W. *et al.* 1986. *Science* 282, 983-987.
- Kakimoto, T. 1996. *Science* 274, 982-985.
- Nagata, T. *et al.* 1992. *Int. Rev. Cytol.* 132, 1-30.
- Nagata, T., *et al.* 2004. *Tobacco BY-2 cells: BAF Vol. 53*, Springer Verlag.
- Nagata, T., *et al.* 2006. *Tobacco BY-2 cells: From cellular dynamics to omics. BAF Vol. 58*, Springer Verlag.
- Schell, J. *et al.* 1999. *Plant J.* 17, 461-466.
- Stachel, S.E. and E.W. Nester. 1986. *EMBO J.* 5, 1445-1454.
- Stachel, S.E. *et al.* 1985. *Nature* 318, 624-628.