

氏名・(本籍)	すぎ 杉	やま 山	むね 宗	たか 隆
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理博第	1090	号	
学位授与年月日	昭和63年	3月	25日	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻			
学位論文題目	Studies on DNA Synthesis in the Differentiation to Tracheary Elements from Isolated Mesophyll Cells of <u>Zinnia elegans</u> (ヒャクニチソウ単離葉肉細胞の Tracheary Element 分化における DNA 合成の研究)			
論文審査委員	(主査) 教授 駒 嶺 穆 教授 小 西 和 彦 助教授 和 田 俊 司			

論 文 目 次

Contents	
List of Abbreviations	
Aknowledgement	
Preface	
References	
Chapter 1	
Physiological analysis by use of 5-fluorodeoxyuridine	
Summary	
Introduction	
Materials and Methods	

Results	
Discussion	
References	
Tables	
Figures	
Chapter 2	
Physiological analysis by use of aphidicolin	
Summary	
Introduction	
Materials and Methods	
Results	
Discussion	
References	
Table	
Figures	
Chapter 3	
Cytological analysis by microautoradiography	
Summary	
Introduction	
Materials and Methods	
Results	
Discussion	
References	
Table	
Figures	
Chapter 4	
Biochemical analysis by equilibrium sedimentation	
Summary	
Introduction	
Materials and Methods	
Results	
Discussion	
References	
Figures	
Concluding Remarks	

References

Figure

Abstract in Japanese

論文内容要旨

導管および仮導管の細胞, tracheary element は, 二次細胞壁肥厚, リグニンの沈着, 細胞内容物の消失の各段階を経て形成される。二次壁肥厚によって網状・螺旋状・環状等きわめて特徴的な模様が現れるため, tracheary element は光学顕微鏡下で容易に判別できる。Tracheary element はまた, 器内培養において成長調節物質を制御することによりその分化を誘導できる。これらの研究上の利点から, tracheary element 分化は高等植物の細胞分化のモデルとして調べられてきた。

Fukuda と Komamine は, 細胞周期と細胞分化との関連を, ヒャクニチソウ (*Zinnia elegans*) の単離葉肉細胞からの tracheary element 分化において詳しく検討し, 分化は細胞周期とは独立しており, G1 期にある細胞が S 期の DNA 複製を経ることなく分化するという結論を得た。ところが, この tracheary element 分化は, 異なる作用部位を持つと予想される 5 種の DNA 合成阻害剤, 即ち 5-フルオロウラシル, 5-フルオロデオキシウリジン (FdU), アフィディコリン (APC), アラビノシルシトシン, マイトマイシン C によって阻止され, S 期の DNA 複製ではない特別な DNA 合成が分化に必要であると考えられた。本研究は, ヒャクニチソウ単離葉肉細胞の tracheary element 分化過程において, この分化に関与すると想定された DNA 合成について, 存在を実証すると共に, その特性を明らかにし, DNA レベルでの細胞分化の制御機構に関する手がかりを得ることを目的としたものである。

第 1 章 5-フルオロデオキシウリジンを用いた生理学的解析

これまで, FdU はチミジル酸合成酵素阻害によりチミンヌクレオチド供給を断つ結果, DNA 合成停止を引き起こし, tracheary element 分化を阻止すると解釈されていた。しかし, チミジンによる FdU の分化阻害効果の打破が競合的であること, ウリジンによっても FdU の効果はある程度打ち消せることから, 核酸への取り込みを介する新たな作用機作が示唆された。さらに, [^3H] FdU を用いたトレーサー実験により, FdU の RNA および DNA への取り込み, そのチミジンとウリジンによる吸収レベルでの抑制が示された。本実験系では FdU がタンパク合成にほとんど影響しないことが知られているので, FdU が RNA へ取り込まれ遺伝子発現全般が抑えられる結果として分化が阻害されるとは考えにくく, DNA への取り込みが分化阻害の主因であると判断された。

FdU の DNA への取り込みはチミジンによって抑えられるので, FdU の tracheary element 分化に対する作用が DNA への取り込みを介するという前提に立つと, FdU 添加後チミジン添加までの限定された期間内に分化に必要な DNA 合成があったときにのみ分化が影響を受けると予想される。FdU とチミジンを順次投与する実験では, FdU の添加が 36 h (h は培養開始後の時間) 以前でありチミジンの添加が 4 h 以後であった場合に, tracheary element 分化は 50% 以上阻害された。tracheary element 形成に必須な成長調節物質[ここではサイトカイニンとして

ベンジルアデニン (BA) とオーキシンとしてナフタレン酢酸 (NAA)] を加える前に FdU で前処理を行った場合にも、分化は強く阻害された。これらの結果に基づいて、分化に必要な DNA 合成は4 h 以降36 h (二次壁肥厚の約24時間前) にかけて起きること、またその開始には BA および NAA を要求せず、おそらくは細胞の単離が誘導刺激となっていることが推測された。

第2章 アフィディコリンを用いた生理学的解析

核に局在する α 型 DNA ポリメラーゼの特異的阻害剤、APC を経時的に投与したところ、36 h 以前に加えた場合に、tracheary element 分化は50%以上阻害された。逆に培養開始時に添加した APC を経時的に洗浄除去する実験では、24 h 以内に除去すればほとんど分化に影響がみられないが、除去が30 h 以降になるとはっきりした分化の遅延が観察された。以上の結果から、tracheary element 分化に α 型ポリメラーゼが決定的な役割を果たす時期は24 h 以後36 h までと推測された。これは FdU の効果をもとに推測した DNA 合成の時期と一致しない。また、APC 存在下での FdU 処理によって分化が阻害されたことから、APC 存在下でも分化に必要な DNA 合成はある程度進行しうると思われる。これらの結果は、 α 型ポリメラーゼのほかに、APC 非感受性の核内 DNA 合成酵素である β 型ポリメラーゼの関与を仮定すれば説明できる。

[^3H]チミジンの酸不溶性成分への取り込みを、全細胞と核について、それぞれ APC 感受性にも着目して、培養時間を追って調べた。その結果、主として (分化に関係なく分裂している一部の細胞の) S 期 DNA 複製からなると思われる核 DNA 合成の APC による選択的阻害が確認されたほか、培養初期に活発な APC 非感受性の核外 DNA 合成が見いだされた。さらに細胞分画を行い、この核外 DNA 合成が葉緑体のものであることが示された。

第3章 ミクロオートラジオグラフィーによる細胞学的解析

オルガネラの塗沫標本を用いた定量的なミクロオートラジオグラフィーを行った結果、tracheary element 形成に先立つ時期に、多くに核において、DNアーゼ感受性の微量の [^3H]チミジンの取り込みを見いだした。これは、S 期のゲノム全体の複製とは異なる特別な DNA 合成を反映したものと解釈された。この DNA 合成は培養のごく初期には既に始まっていたが、BA と NAA は DNA 合成開始には関与せず、その活性化を担っているように思われた。この DNA 合成は、FdU によってある程度抑制されることが示された。また、少なくとも見かけ上は APC 非感受性であった。これらの性質は、FdU や APC の効果から推測された tracheary element 分化に必要な DNA 合成の特性とよく一致し、ミクロオートラジオグラフィーで見いだされた特別な DNA 合成が分化に必要であると判断された。

第4章 平衡密度勾配遠心による生化学的解析

Tracheary element 分化過程において、 $[^3\text{H}]$ チミジンと5-プロモデオキシウリジンによる放射能・密度二重標識を施した DNA を、平衡密度勾配遠心を行って分析した。培養開始から12時間標識した核 DNA では、元来の浮遊密度の画分に放射能の明らかなピークが見られ、修復型 DNA 合成の起きていることが認められた。マイクロオートラジオグラフィーによれば、この時期には S 期核は存在せず、核では微量の特別な DNA 合成のみが起きているはずであるので、第3章で見いだした特別な DNA 合成は修復型であると判定された。これは、著者の知る限りでは、細胞分化過程において修復型 DNA 合成の存在を直接に示した最初の例である。

以上の結果を総括して、著者は、ヒヤクニチソウ単離葉肉細胞の tracheary element 分化における DNA 合成に関して、次のような仮説を提出する。 α 型および β 型 DNA ポリメラーゼが共に触媒する、修復型 DNA 合成が分化に重要な役割を果たす。この DNA 合成は、細胞の単離によって誘導され、オーキシンとサイトカイニンによって活性化される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒヤクニチソウ単離葉肉細胞の tracheary element 分化に関与する DNA 合成について、存在を実証するとともにその諸特性を明らかにし、細胞分化の機構の一端を解明することを目的としたものである。

本研究では、まず DNA 合成阻害剤としてしられる 2 種の薬剤、5-フルオロデオキシウリジンとアフィディコリンの tracheary element 分化に対する効果を詳細に検討した。その結果、フルオロデオキシウリジンについては、DNA への取り込みを介して分化に影響するという新しい作用機作が示された。また、分化に必要な DNA 合成が培養開始後約 4 時間目に始まり、36 時間目に終ること、サイトカニン・オーキシンを投与しなくても起こること、アフィディコリンに影響されるにも拘わらず、アフィディコリン存在下でも進行し得ることが推論された。さらに、この DNA 合成には、 α 型及び β 型 DNA ポリメラーゼの両方が関与していることが予想された。

次にオルガネラ塗沫標本を用いて定量的なマイクロオートラジオグラフィーを行い S 期 DNA 複製とは異なる微量の特別な核 DNA 合成を見出した。この DNA 合成の性質は、先に推論した tracheary element 分化に必要な DNA 合成の諸特性とよく一致した。従って、この微量の核 DNA 合成が分化に必要であると判断された。

最後に、平衡密度勾配遠心による生化学的解析をおこない³H-チミジンと5-プロモデオキシウリジンによる放射能密度二重標識によって分化に関与する DNA 合成が半保存的複製ではなく、修復型合成であることを示した。

以上のことを総合して、ヒヤクニチソウ単離葉肉細胞の Tracheary element 分化における DNA 合成に関して、 α 型および β 型 DNA ポリメラーゼが共に触媒する、修復型 DNA 合成が分化に重要な役割を果たし、この DNA 合成は細胞を単離することによって誘導され、オーキシンとサイトカニンによって活性化されるという新しい仮説を提出している。

分化に修復型 DNA 合成が関与しているという結果は動植物を問わず新知見であり、他の得られた知見とも合わせ、細胞分化機構の本質に迫るもので、博士論文の内容に価するものである。

以上杉山宗隆提出の論文は、本人が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することをしめしている。よって杉山宗隆提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。