

氏名・(本籍)	まき 牧	ひさ 久	え 恵
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	理博第	1 1 4 3	号
学位授与年月日	平成 2 年 1 月 24 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 Polyamines in the Cell Cycle of Synchronous Cultures of <u>Catharanthus roseus</u> Cells. (ニチニチソウ培養細胞の細胞周期におけるポリアミンの研究)		
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

### 序論

第 1 章 ニチニチソウ培養細胞の細胞増殖に対するポリアミン合成阻害剤の影響

第 2 章 ニチニチソウ培養細胞の細胞周期におけるポリアミン量及びポリアミン合成酵素の活性の変動

第 3 章 マウスのオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) cDNA を用いたニチニチソウ培養細胞の OD-CmRNA の発現量定量の試み

第 4 章 ニチニチソウ培養細胞の細胞周期に対するポリアミン合成阻害剤の影響

第 5 章 ニチニチソウ培養細胞の DNA 合成に対するポリアミン合成阻害剤の影響

結 語

# 論文内容要旨

## 序論

細胞周期が、進行する過程でどのような調節機構が、はたらくのか、これは、細胞生物学の重要な課題のひとつである。

本研究では、この課題のひとつのアプローチとして近年細胞の増殖や分化に作用することが、示唆されてきているポリアミンが、細胞周期にどのように影響を及ぼすのかを検討した。

材料としては、ニチニチソウ培養細胞を用いた。この細胞は、網野、駒嶺らにより同調培養法が、確立されており、高等植物の細胞周期の研究に適しているからである。

ポリアミンは、動物細胞、酵母細胞などの活発に分裂している組織、細胞でその量が、他に比較して非常に多く、細胞の増殖過程では、その初期、特に、分裂が始まる前の細胞中で、高いレベルが観察されている。しかし、高等植物におけるポリアミン代謝の細胞周期への作用機作については、明確にされていない。

そこで、本研究では、ニチニチソウ培養細胞中の細胞周期の進行におけるポリアミンの変動、その役割等について研究を行った。

## 第1章 ニチニチソウ培養細胞の増殖に対する ポリアミン合成阻害剤の影響

まずはじめに、ポリアミンが、ニチニチソウ培養細胞の増殖に関与しているかどうかを、確かめるためポリアミン合成阻害剤を用い細胞内ポリアミンレベルを低下させ細胞数の変化を測定した。

ポリアミンのひとつであるプトレッシン合成を触媒する酵素としてオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) とアルギニン脱炭酸酵素 (ADC) の二種類が、植物で知られている。前者に特異的な阻害剤である  $\alpha$ -Difluoromethylornithine (DFMO) と  $\alpha$ -Methylornithine ( $\alpha$ -MO), 後者には特異的な阻害剤である  $\alpha$ -Difluoromethylarginine (DFMA) を各々培地に添加したところ細胞の増殖は、すべての阻害剤で抑制された。

しかし、ポリアミンであるスペルミジン、スペルミンの合成を触媒する酵素である S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素やスペルミジン合成酵素の各阻害剤である Methylglyoxal-bis (guanylhydrazone) (MGBG) 及び、Dicyclohexylamine (DCHA) は、細胞の増殖に影響は与えなかった。

また、オルニチン脱炭酸酵素の阻害剤により増殖を、抑制された細胞にプトレッシンを添加するとその阻害は回復した。

従って、ポリアミン、少なくともプトレッシンは、ニチニチソウ培養細胞の増殖にある重要な、役割を果していることが示唆された。

## 第2章 ニチニチソウ培養細胞の細胞周期におけるポリアミン量及び ポリアミン合成酵素の活性の変動

第1章にてポリアミンが細胞の増殖に何等かの役割を果たしていることが示唆されたので、次に、ニチニチソウ培養細胞の細胞周期にポリアミンがどのように関与するのか検討するため、ニチニチソウ培養細胞系を用い細胞周期過程における細胞内ポリアミン量の変化を測定した。

また、同時に、ポリアミン合成特にプトレッシン合成を触媒するオルニチン脱炭酸酵素とアルギニン脱炭酸酵素の細胞周期中での活性の変動を測定した。

その結果、プトレッシンとスペルミジンは、S期のDNA合成の前とサイトキネシスの前で顕著に増加した。オルニチン脱炭酸酵素とアルギニン脱炭酸酵素は、上記ポリアミン量と同様に変動した。

従って、ポリアミンは、これらの酵素により、その量を調節されながら細胞周期の進行、特に、G1期からS期、G2期からM期への進行に何等かの役割を果たしていると考えられる。

## 第3章 マウスオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) cDNA を用いた ニチニチソウ培養細胞の ODCmRNA の発現量定量の試み

前章で、オルニチン脱炭酸酵素とアルギニン脱炭酸酵素が、ニチニチソウ培養細胞の細胞周期に関与している事が示唆された。植物細胞においては、プトレッシン合成にこの二種の酵素が知られているが、動物細胞においては、オルニチン脱炭酸酵素のみが、存在する。

そこでまず、動、植物に共通で細胞周期に関与していると思われるオルニチン脱炭酸酵素タンパクの細胞周期中での発現調節機構を探る試みを行った。

オルニチン脱炭酸酵素は、代謝回転が早くその不安定のため、植物では、まだ精製されていない。そこで、マウス ODCcDNA が、タバコ ODCcDNA とハイブリダイズするという報告をもとに、マウス ODCcDNA を用いて細胞周期中で、ニチニチソウ ODCmRNA の変動を調べる試みを行った。

ニチニチソウのバッチ培養法の lag,log 及び stationary phase の mRNA を調製しマウス cDNA とハイブリダイズする試みを行ったが、どれもマウス cDNA とはハイブリダイズしないことがわかった。

## 第4章 ニチニチソウ培養細胞の細胞周期に対する ポリアミン合成阻害剤の影響

第1章において、ポリアミン合成の阻害剤により細胞内ポリアミンレベルを低下させると細胞の増殖も阻害されることが示された。ポリアミンが細胞周期のどの phase の進行に関与しているのかを知るため、ポリアミン合成阻害剤を投与した時、細胞が細胞周期のどの phase に堆積しているかを DNA 含量の差によるフローサイトメトリー分析により調べた。

オルニチン脱炭酸酵素及びアルギニン脱炭酸酵素の阻害剤を用いて、細胞増殖を抑制した細胞をフローサイトメトリー分析を行った結果、2c レベルのピークが上昇し4c レベルのピークが減少する傾向にあった。このことは、G1 期から S 期への細胞周期の進行がさまたげられ、G1 期に堆積する細胞が増加したことを示している。しかし、完全に4c レベルのピークが消失しないことから G2 期にも細胞がとどまっていると考えられる。

従って、このことは、ニチニチソウの細胞周期において、G1 期あるいは、G2 期に細胞周期の進行をつかさどるコントロールポイントがあるという考えを支持している。またこのことは、第 2 章で得られた G1 期 (S 期の直前) 及び、G2 期 (M 期の前) にポリアミン量のピークが存在するという結果と一致している。

## 第 5 章 ニチニチソウ培養細胞の DNA 合成に対するポリアミン合成阻害剤の影響

第 2 章で、細胞周期におけるポリアミン量の増加が DNA 合成の前におこることからポリアミンが DNA 合成に関与していることが考えられた。

そこでまず、細胞周期中の各期の細胞に DFMO を投与し、細胞周期のどの時期にポリアミン合成がその進行に必要であるかを検討した。その結果、G1 期に DFMO を添加した時のみ細胞周期の進行が妨げられ、さらに、DNA 合成も減少した。このことは、ポリアミン合成が DNA 合成を通じて細胞周期の進行に関与していることを示唆している。次に、ポリアミン合成が細胞内のどこでおきているかを知る手がかりとして、ポリアミン合成酵素であるオルニチン脱炭酸酵素とアルギニン脱炭酸酵素の活性の細胞内の局在を細胞のクロマチンフラクシオンと、それ以外のフラクシオンに分け、各酵素の活性を測定した。その結果、オルニチン脱炭酸酵素は、クロマチンフラクシオンに、アルギニン脱炭酸酵素は、クロマチンフラクシオン以外のサイトゾリックなフラクシオンに多く存在することが明らかとなった。さらに、核の DNA 合成に対するポリアミン合成阻害剤の影響を調べた。

阻害剤と共に培養した細胞の核を単離し、その DNA 合成活性を測定したところオルニチン脱炭酸酵素の阻害剤とアルギニン脱炭酸酵素の阻害剤は、核 DNA 合成を阻害し、この阻害は、プトレッシンの投与によって回復した。しかし、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の阻害剤は、核 DNA 合成に何らの影響も与えなかった。

これらの結果からポリアミン特にプトレッシンが、核 DNA 合成の調節を通して、細胞周期の進行を調節している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、ニチニチソウ培養細胞の同調培養系を用いて、高等植物では未解明の問題であるポリアミンが細胞周期の進行にどのように関与するかを明らかにすることを目的としたものである。

まず、ポリアミンの一つのプトレッシン (PUT) の合成酵素のオルニチン脱炭酸酵素 (ODC), アルギニン脱炭酸酵素 (ADC) の阻害剤によってポリアミンの生成量は低下し、細胞の増殖は、抑制されることを明らかにした。また、ODC の阻害剤による細胞増殖の抑制は、プトレッシンの添加によって回復した。しかし、他のポリアミンであるスペルミジン (SPD), スペルミン (SPM) の合成に関与する S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素, スペルミジン合成酵素の阻害では、増殖は、抑制されなかった。これらの結果から、ポリアミン、少なくとも PUT は、ニチニチソウ培養細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが、示唆された。

次に、ニチニチソウ同調培養の細胞周期中のポリアミン量と ODC, ADC 活性を測定したところ、PUT と SPD は、G1 期 (S 期の DNA 合成の前) と G2/M 期 (サイトキネシスの前) で顕著に増加し、ODC, ADC と同様のパターンの変動を示した。従って、ポリアミンは、これらの酵素によりその量を調節されながら、細胞周期の進行、特に G1 期から S 期, G2 期から M 期への進行になんらかの役割を果たしていると考えられる。

さらに ODC の活性調節機構にアプローチするため、マウス ODC の cDNA を用いてニチニチソウ mRNA 量の変動の測定を試みたがハイブリダイズしなかったため、不成功に終わった。

次に、ポリアミン合成酵素の阻害剤で増殖を抑制したとき、細胞が、細胞周期のどの期に堆積するかをフローサイトメトリーを用いて、DNA 量を測定することにより調べた。その結果、PUT 合成酵素の阻害剤処理によって、細胞は、主に G1 期に、一部は、G2 期に堆積することがわかった。このことは、ニチニチソウの細胞周期において、G1 期あるいは G2 期に細胞周期の進行を司るコントロールポイントがあるという考えを支持し、G1 期および G2 期にポリアミン量のピークが存在するという結果とも一致している。

更にこのようなポリアミンの細胞周期進行の制御が、DNA 合成を通じて行われるかどうか確かめるために、ODC, ADC の阻害剤で前処理した細胞から核を単離し、その DNA 合成を測定した。その結果、ODC, ADC の阻害剤での前処理は、核 DNA を阻害し、この阻害は、PUT の投与によって回復した。しかし、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の阻害剤は、核 DNA 合成になんらの影響も与えなかった。

これらの結果からポリアミン、特に PUT が、核 DNA 合成の調節を通じて、ニチニチソウ細胞周期の進行を制御していることが明らかにされ、従来未解明だったポリアミンの高等植物の細胞周期進行制御機構の一部が解明された。

これらの結果は、植物生理学に於ける重要な新発見で博士論文の内容に値するものである。

以上、牧久恵提出の論文は、本人が、自立して研究活動を行うに必要な高度な研究能力と学

識を有することを示している。

よって、牧久恵提出の論文は、理学博士の学位論文として合格と認める。