



# 論文内容要旨

細胞周期は、増殖、発生、分化の基礎をなすもので、その進行機構の解明は真核生物の理解にとって最も基本的な問題の一つである。植物細胞は、分化全能性や、無限増殖能を有していること、植物ホルモンにより増殖が制御されていることなどの特徴を有している。しかしこれらの植物細胞に特徴的な機能に重要な役割を果たしている細胞周期の進行とその制御機構に関する研究は、未だほとんどなされていない現状である。Amino et al. (1983)によって、ニチニチソウ培養細胞を用いて、二度のリン酸飢餓処理による同調培養系が確立され、高等植物の細胞周期を、生化学的、および分子生物学的に解析できる可能性が開かれた。博士課程前期において、筆者はニチニチソウ同調培養系を用いて、細胞周期各期におけるタンパクのプールサイズの変化、タンパク合成速度の変化、および mRNA 種の構成の変化について研究を進め、細胞周期の各期で特異的な遺伝子発現が生じていることを明らかにした。本論文においては高等植物の細胞周期の分子生物学的機構の解明を目的として、ニチニチソウ同調培養細胞系を用いて、細胞周期に依存して発現する遺伝子の単離と解析を行なった。すなわち、a)細胞周期の特定の周期に特異的に発現する mRNA 種の他に、周期特異的ではないが活発に分裂している細胞に特徴的に発現する mRNA 種が存在することを示し、b)細胞周期、特に S 期に特異的に発現する cDNA を differential screening によりクローニングして、それらの cDNA の細胞周期、および増殖過程での発現を詳しく解析した。c)次に機能の明らかな遺伝子として、動物細胞で DNA ポリメラーゼの補助因子として同定された proliferating-cell nuclear antigen (PCNA)に対する cDNA をニチニチソウ cDNA ライブラリーからクローニングし、この PCNA 遺伝子は S 期特異的に発現することなどの諸点を明らかにした。

## 材料と方法

ニチニチソウ (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) の懸濁培養細胞は、1969年、協和発酵東京研究所において茎より得たもので、A および B strain の 2 系統が継代維持されている。培養は、3% (W/V) ショ糖、 $2.2 \times 10^{-6}M$  2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)を含む Murashige-Skoog の培地 (MS 培地) で、7日ごとに継代して維持されている。オーキシン飢餓、再添加による同調的な細胞分裂を誘導する系においては、ニチニチソウ (*Catharanthus roseus* (L.) cv. Little-Pinky) 懸濁培養細胞、TN21 strain を用いた。この strain は当研究室において、薬より得たもので、3% (W/V) ショ糖、 $4.4 \times 10^{-6}M$  2,4-D を含む MS 培地で、7日ごとに継代し維持されている。二度のリン酸飢餓処理による同調培養系の誘導は、Amino et al. (1983) の方法に従って、B strain の細胞を用いて行なった。オーキシン飢餓、再添加による同調培養系の誘導は、以下に述べる方法で行なった。植継ぎ後、10日目の TN21 strain の細胞をオーキシンを含まない MS 培地に移植し、2日間培養した後、培地中に直接最終濃度が  $4.4 \times 10^{-6}M$  になるように 2,4-D を添加すると同調的な細胞分裂が誘導される。本研究ではこのよう

にして誘導した同調培養系を用いて細胞周期中での遺伝子発現について解析した。

## 結果と考察

### 1. ニチニチソウ培養細胞の細胞増殖に伴って発現する mRNA 種の同定

二度のリン酸飢餓処理による同調培養系の細胞周期において、各期におけるタンパクおよび mRNA の発現の変化について、一部については調べられている (Kodama et al. 1989)。さらに周期特異的ではなくとも増殖活性をもった細胞に特異的な遺伝子が発現していることも考えられる。そこで増殖を停止した細胞で発現している mRNA 種と増殖過程にある細胞におけるそれとを比較した。増殖を停止した細胞として、リン酸、ショ糖、もしくは窒素源といった各培地成分の飢餓処理を行なった細胞と定常期の細胞を、また増殖過程にある細胞として対数増殖期の細胞と同調培養系の細胞を用意した。各細胞から poly(A)<sup>+</sup>RNA を単離し、コムギ胚芽無細胞翻訳系により *in vitro* で [<sup>35</sup>S] methionine 存在下でポリペプチドに翻訳し二次元電気泳動後、フルオログラフィーにより検出して mRNA の構成を調べた。その結果、増殖を停止した細胞ではその発現が抑えられ増殖の盛んな細胞で多く発現する mRNA 種が 2 種類検出された。これらの mRNA の翻訳産物の分子量は 53, および 60 kilo-dalton であった。これらの mRNA は同調培養系における細胞周期中では量的な変動は示さなかったが、その発現は増殖が誘導されるのに伴うものであることが示唆された。

### 2. ニチニチソウ同調培養系の細胞周期における G<sub>1</sub>/S 期で発現する遺伝子の同定

今までの研究で、ニチニチソウ培養細胞において周期特異的に発現する mRNA 種、および増殖活性を有した細胞に特徴的に発現すると考えられる mRNA 種を固定した。細胞周期における遺伝子発現をさらに詳しく調べるためには、これらの mRNA 種に対応するような cDNA を単離する必要がある。そこで遺伝子の発現量の差に基づいて cDNA をクローニングする differential screening 法を用いて、細胞周期においてその発現が変動するような cDNA の単離を試みた。二度のリン酸飢餓処理により同調させた S 期の細胞から poly(A)<sup>+</sup>RNA を単離し、λgt11 をベクターとして cDNA ライブラリーを作成した。この cDNA ライブラリーに対し、S 期の細胞から得た poly(A)<sup>+</sup>RNA から調製した cDNA と、cytokinesis 期もしくはリン酸飢餓処理状態にあり細胞分裂を停止している細胞から単離した poly(A)<sup>+</sup>RNA から調製した cDNA をプローブとして、differential screening を行なった。その結果、最終的に 4 つのクローンを得た (pCYCO1, pCYCO2, pCYCO6, pCYCO7)。得られた cDNA がコードする mRNA の細胞周期中での発現をノーザンブロットハイブリダイゼーションにより調べると、CYCO2 はリン酸飢餓状態の細胞で強く発現し、リン酸添加後、細胞が G<sub>1</sub> 期を進行すると CYCO2 mRNA 量は急速に減少する。リン酸添加後、8-10 時間後の G<sub>1</sub>/S 期に CYCO2 mRNA 量は著しく増加した。CYCO7 mRNA はリン酸飢餓状態の細胞ではほとんど検出されない。リン酸添加後も G<sub>1</sub> 期では増加せず、8-10 時間後の G<sub>1</sub>/S 期に CYCO7 mRNA 量は急速に増加しピークとなった。CYCO2 mRNA, CYCO7 mRNA とともに、リン酸添加後、14-16 時間後、すなわち S 期間を

過ぎるとその量が急速に減少した。このことはこれらの2つさのクローン, CYCO2, CYCO7 は, G<sub>1</sub>/S 期でその発現量が最大となることを示している。バッチ培養過程においては, CYCO2mRNA 量は植継ぎ後 5 - 6 日目の late logarithmic phase で, CYCO7mRNA 量は植継ぎ後 3 - 4 日目の mid-logarithmic phase でそれぞれ最大となった。さらに, ショ糖, 窒素飢餓処理によって増殖を停止した細胞においては, CYCO2mRNA 量, CYCO7mRNA 量ともに S 期の細胞での発現量と比較して減少していた。当研究室で CYCO2 および CYCO7 の塩基配列が明らかにされたが両クローンともに既知の遺伝子とは異なる塩基配列を有していることがわかった。一方, CYCO1 および CYCO6 の塩基配列はともにイネ 25S ribosomal RNA と 90% 以上の高いホモロジーを有しており, ribosomal RNA をコードしているものと考えられた。CYCO2mRNA 量, CYCO7mRNA 量ともに G<sub>1</sub>/S 期に最大となるので, これらのクローンが G<sub>1</sub> 期から S 期への進行, もしくは DNA 複製に対して重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

### 3. proliferating-cell-nuclear antigen (PCNA) 遺伝子のクローニングとニチニチソウ同調培養系の細胞周期における発現の解析

高等植物の細胞周期を分子生物学的に解析するためのプローブとして, 動物細胞において DNA ポリメラーゼ  $\delta$  の補助因子として同定されている PCNA 遺伝子を用いた。イネゲノム PCNA 遺伝子をプローブとして, ニチニチソウ PCNA cDNA を単離した。得られた cDNA の塩基配列を決定した結果, ニチニチソウ PCNA は 268 個のアミノ酸からなり, 分子量は 29765 dalton と推定された。ニチニチソウ PCNA のアミノ酸配列をヒト PCNA のアミノ酸配列と比較すると, 保存的置換を含めた場合, 85% のホモロジーを有していた。二度のリン酸飢餓処理による同調培養系, およびオーキシン飢餓, 再添加による同調培養系において, ニチニチソウ PCNA mRNA は S 期特異的に発現することが示された。バッチ培養過程においては, 植継ぎ後 3 - 4 日目の mid-logarithmic phase で最も多く PCNA mRNA が検出された。G<sub>1</sub> 期にアフジコリンを添加して DNA 合成を阻害しても, PCNA mRNA の発現は誘導された。しかし S 期にアフジコリンを添加して DNA 合成を阻害すると, PCNA mRNA の S 期での急速な量的増加は抑制された。このことは PCNA mRNA の発現の誘導は DNA 合成と独立に生じるが, S 期での PCNA mRNA 量の増加には正常な DNA 合成が必要であることを示している。以上のようにニチニチソウ PCNA は, ヒト PCNA と高いホモロジーを有しており, S 期特異的に発現することから, 高等植物の PCNA も動物細胞を用いた研究から示唆されているように, 恐らくは DNA ポリメラーゼ  $\delta$  の活性を調節することにより DNA 複製に関与していることが示唆された。

以上の実験結果から, 高等植物細胞の細胞周期において特定の遺伝子が細胞周期特異的に発現することを初めて明らかにすることができ, その結果, 高等植物の細胞周期の分子機構を解明するための端緒が開かれた。

献 Amino, S., Fujimura, T. and Komamine, A. (1983) Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of Catharanthus roseus. . . . Physiol. Plant. 59, 393-396

Kodama, H., Kawakami, N., Watanabe, A. and Kodama, A. (1989) Phase-specific polypeptides and ploy(A)<sup>+</sup>RNAs during the cell cycle in synchronous cultures of Catharanthus roseus cells. . . . Plant Physiol. 89, 910-917

## 論文審査の結果の要旨

本論文はニチニチソウ懸濁培養細胞の同調培養系を用い、高等植物の細胞周期の進行とその制御に関わる遺伝子の発現について明らかにすることを目的としたものである。

本論文では、本論文提出者の研究室において確立された同調培養系を用いて細胞周期における遺伝子の発現の変化について、二次元電気泳動法を用いて調べた。その結果、細胞周期の特定の時期に発現する mRNA が存在する他に、細胞周期の各期ではその量は変わらないが、増殖を停止した細胞では量的にかなり減少するか、もしくは全く検出できない mRNA が存在することを明らかにし、細胞周期の各期、および増殖中の細胞にそれぞれ特異的な遺伝子発現が存在することを示唆した。

次に本論文では、細胞周期の特定の時期に発現する mRNA に対応する cDNA の単離に成功している。同調培養過程の S 期にある細胞から、 $\lambda$ gt11 をベクターとして調製した cDNA ライブラリーに対し、differential screening を行ない、4 種類の cDNA を単離した。(pCYC01, 02, 06, 07)。CYC 02 は、リン酸飢餓処理により G<sub>1</sub> 期に停止した細胞と、および G<sub>1</sub>/S 期の細胞で発現し、CYC 07 は G<sub>1</sub>/S 期の細胞に特異的に発現することが明らかとなった。バッチ培養過程、および増殖停止状態にある細胞での発現を調べた結果、CYC 02, 07 とともに細胞の増殖に深く関わる遺伝子であることが明らかになった。本論文提出者の研究室において単離された cDNA の塩基配列を決定した結果、CYC 02, 07 は既に報告されているタンパク質とは相同性がなく、初めて報告された遺伝子であった。CYC 01, 06 は ribosomal RNA に対する cDNA であった。

この論文の最後の章では、動物細胞において DNA ポリメラーゼ  $\delta$  の補助因子として同定されている proliferating cell nuclear antigen (PCNA) に対して、ニチニチソウ S 期 cDNA ライブラリーから、PCNA の cDNA を単離している。得られた cDNA の塩基配列を決定した結果、植物と動物の PCNA 遺伝子のアミノ酸配列は保存的置換を含めた場合、85% の相同性を持つことが明らかになった。さらに植物の PCNA 遺伝子は S 期特異的に発現することを明らかにした。

本論文では、高等植物の細胞周期中の遺伝子発現について分子生物学解析を行った数少ない報告である。

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

以上児玉浩明提出の論文は、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、児玉浩明提出の論文は、理学博士の学位論文として合格と認める。