

第二章 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞におけるベタシアニン合成に対する細胞増殖阻害の影響

序 論

材料と方法

結 果

考 察

文 献

表

図

第三章 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞におけるチロシン水酸化酵素の活性変動

序 論

材料と方法

結果と考察

文 献

表

図

まとめと展望

謝 辞

論文内容要旨

序論

二次代謝産物の一種であるベタシアニンは芳香族アミノ酸の一つであるチロシンを前駆体として3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA) を経て生成される赤色色素である。一般に二次代謝は細胞増殖の停止した後に代謝産物の蓄積が観察され、二次代謝産物の生成は細胞増殖と背反的な関係にあるとされている。しかし、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞においてベタシアニンは細胞増殖の盛んな時期にその蓄積の増加が観察され、ベタシアニン生成と細胞増殖との間には正の相関がある事が示唆されている。本研究は、二次代謝と細胞増殖との連関機構の解明を目指して、細胞増殖と背反的な一般的な二次代謝産物の蓄積パターンとは異なり、例外的な蓄積パターンを示すベタシアニンに注目し、ベタシアニン生成と細胞増殖との連関機構を解き明かすことを試みたものである。

第一章 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞における細胞増殖とベタシアニン合成活性の変動

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞において、ベタシアニン蓄積量の著しい増加が、細胞増殖の盛んな培養4日目に見られ、ベタシアニン生成と細胞増殖との間に正の相関がある事が示唆された。第一章では、ベタシアニン生成、蓄積と細胞増殖との関係を解析する第一歩として、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞の培養過程におけるベタシアニン蓄積パターンに注目し、ベタシアニンがどのような機構でこのような蓄積パターンをとるのか解析した。ベタシアニン蓄積を制御する要因として、前駆体の内生量とそれ以後の合成活性を考えて、ベタシアニンの前駆体であるチロシンの内生量の培養過程での変動を調べ、チロシン以後のベタシアニン合成活性の変動をトレーサー実験によって調べた。

まず培養過程における細胞内チロシン量の変動を調べたところ、培養開始直後に低下がみられ、培養4日目までは細胞内チロシン量は低いレベルであったが、その後細胞内チロシン量は増大していた。ベタシアニン蓄積の著しい増加は、培養開始後4日目に見られる事からベタシアニン蓄積は細胞内チロシン量によってのみ制御されている事はないと考えられる。また、培養各時期(誘導期(培養1日目)、対数増殖期(培養3日目)及び定常期(培養7日目))に培地中にチロシン(0.5mM)を投与し、それぞれ1日間培養した後にベタシアニン蓄積量を測定したところ、対数増殖期に添加した場合がチロシン添加によるベタシアニン蓄積量の増加量が最も高かった。この結果から、チロシン以後のベタシアニン合成活性は対数増殖期に高くなっている事が予想された。

次に培養期間において、細胞増殖に変動にともないベタシアニン合成活性の変動を、 $[^{14}\text{C}]$ チロシンを用いたトレーサー実験によって調べた。その結果ベタシアニン合成活性は、培養2日目では低く、その直後著しく上昇し、培養4日目に最大となり、細胞増殖の停止する定常期に低下することが明らかとなり、細胞増殖の変動と対応してベタシアニン合成活性も変動してい

ることが示唆された。更にベタシアニン合成活性の低下する定常期（培養8日目）と培養4日目の細胞で [^{14}C] DOPA を用いてトレーサー実験を行ったところ、 [^{14}C] DOPA からベタシアニンへの放射活性の取り込みは、培養4日目の細胞と培養8日目の細胞とでは大きな差はなかった。このことから細胞増殖の停止に伴うベタシアニン合成活性の低下は、主にチロシンが DOPA に転換される段階の合成活性の低下によるものと推察された。

第二章 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞におけるベタシアニン合成に対する細胞増殖阻害の影響

DNA 合成阻害剤と微小管重合阻害剤を用いて人為的に細胞増殖を停止させて、その時のベタシアニン蓄積及びベタシアニン合成を調べ、さらにベタシアニン合成系のうち、どの段階が細胞増殖と密接に関連しているかを調べた。作用機作の異なる4種類の DNA 合成阻害剤（アフィディコリン (APC)、フルオロデオキシウリジン、アラビノシルシトシン、ハイドロキシウレア）及び2種類の微小管重合阻害剤（コルヒチン、プロピズアミド）の処理によって、細胞増殖の停止とともに、ベタシアニン蓄積の低下が見られた。阻害剤で処理した細胞に [^{14}C] チロシンを投与してトレーサー実験を行った結果、APC 処理後24時間目、プロピズアミド処理後12時間目にベタシアニンへの放射活性の取り込みの明かな低下がみられた。ベタシアニン合成への抑制効果の現れる時期が APC 処理とプロピズアミド処理とで異なっていたことと、両阻害剤の作用点の違いから、ベタシアニン合成の活性化は細胞周期中で M 期後半もしくは G1 期と関連していることが予想された。更に、阻害剤で処理された細胞においても、過剰の DOPA を投与するとベタシアニンの蓄積が見られること、また [^{14}C] DOPA からベタシアニンへの放射活性の取り込みは阻害剤処理によって [^{14}C] チロシンからベタシアニンへの取り込みほど抑制されていなかったことから、増殖停止によって起こるベタシアニン合成の抑制はチロシンからの DOPA への変換（チロシンの水酸化）の活性が低下するためであることが示唆された。

第三章 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞におけるチロシン水酸化酵素の活性変動

第一章及び第二章において、チロシンが DOPA に変換される反応が細胞増殖と深く関連している事が示唆された。第三章ではこの反応を触媒する酵素（チロシン水酸化酵素）の、*in vitro* での活性測定を試み、増殖が盛んな細胞と増殖が停止した細胞でその活性を比較した。植物では、*in vitro* でチロシン水酸化酵素の活性を測定できた例は数少なく、この酵素は、まだ解明の進んでいない酵素である。ヨウシュヤマゴボウ培養細胞において、その活性は通常の抽出法で調製した抽出液中にはみいだされなかったが、高塩濃度の緩衝液（0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.1M リン酸緩衝液）を用いる事によってチロシン水酸化酵素の活性測定に成功した。そこで、培養2日目、4日目及び8日目でチロシン水酸化酵素活性を測定しそれらの活性を比較したところ、4日目の細胞でその活性が最も高かった。また APC やプロピズアミド処理を施す事によってチロシン水酸化酵素の活性は低下していた。これらの結果は、第一章、第二章で行った

in vivo でのトレーサー実験の結果と一致し、増殖の停止した細胞ではチロシン水酸化酵素の活性が低下していることが示された。

まとめと展望

以上の結果から、細胞増殖とベタシアニン蓄積との関係は、細胞増殖と連関しているベタシアニン合成活性の変動で説明することができた。更にベタシアニン合成系のなかでチロシンが DOPA に変換される反応（チロシン水酸化）の活性が細胞増殖と連関していることが明らかとなり、ベタシアニン生成と細胞増殖との関係はチロシン水酸化酵素の活性と細胞増殖との関係に置き換えることができた。

今後の課題として、チロシン水酸化酵素について、単離、精製を行って酵素レベルでの解析を進め、さらにはその遺伝子をクローニングし遺伝子レベルでの解析を行う事によって、この酵素の活性がどの段階で細胞増殖に関連しているかを明らかにすることが挙げられる。また細胞増殖のいかなる事象がチロシン水酸化活性に影響を及ぼし、ベタシアニン生成を制御しているか解析する事がもう一つの大きな課題である。そして細胞増殖と背反的な関係にある、他の二次代謝の場合と比較考察することによって、二次代謝系全般について細胞増殖との連関機構の概要を明らかにできると思われる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞を用いて細胞増殖とベタシアニン生成との関連機構の解明を目的としたものである。

一般に二次代謝は細胞増殖の停止した後にその蓄積が観察され、二次代謝産物の生成は細胞増殖と背反的な関係にあるとされている。しかし、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞においてベタシアニンは細胞増殖の盛んな対数増殖期にその蓄積の増加が観察され、ベタシアニン生成と細胞増殖との間には正の相関がある事が示唆された。またチロシンからベタシアニンへの合成活性、特にチロシンから DOPA に至る段階の合成活性が対数増殖期に上昇することが、トレーサー実験の結果から明らかとなり、ベタシアニンは合成の段階でも細胞増殖と正の相関がある事が示された。

DNA 合成阻害剤と微小管重合阻害剤を用いて人為的に細胞増殖を停止させたところ、全ての阻害剤処理でベタシアニン蓄積の低下が見られた。この時、チロシン以降のベタシアニン合成は著しく抑制されているものの、DOPA 以降のベタシアニン合成は、さほど抑制されておらず、増殖停止によって起こるベタシアニン合成の抑制はチロシンから DOPA への変換(チロシンの水酸化)の活性が低下するためであることがトレーサー実験の結果から示唆された。

細胞増殖と深く関連していると考えられるチロシン水酸化酵素の *in vitro* での活性測定を試みた。その結果、高塩濃度の緩衝液を用いる事によってチロシン水酸化酵素の活性測定に成功した。そしてその活性は培養期間中で細胞増殖の盛んな対数増殖期の細胞で最も高かった。また阻害剤処理を施す事によってチロシン水酸化酵素の活性は低下していた。これらの結果は、トレーサー実験の結果と一致し、増殖停止時に、チロシン水酸化酵素の活性が低下していることが示された。

以上の結果より、細胞増殖とベタシアニン蓄積との関係は、細胞増殖とチロシン水酸化酵素活性との関係に置き換えられた。

これらの結果は、植物生理学における新知見で博士論文の内容に値するものである。

以上、平野博史提出の論文は、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事を示している。

よって、平野博史の提出論文は、理学博士の学位論文として合格と認める。