

氏名・(本籍)	おおにしなおと 大西直人
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	理博第1278号
学位授与年月日	平成4年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4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	ニチニチソウ同調培養系における細胞周期のオーキシンによる制御の研究
論文審査委員	(主査) 教授 駒嶺 穆 教授 大橋 広好 助教授 福田 裕穂

論 文 目 次

目次

略号表

序章

文献

第一章 ニチニチソウ培養細胞における2,4-D 飢餓処理による同調培養系の確立

序

材料と方法

結果

考察

文献

表

図

第二章 細胞周期中におけるオーキシンの作用時期

序

材料と方法

結果

考察

文献

表

図

第三章 2,4-D 飢餓処理による同調培養系において発現が誘導される遺伝子の単離と解析

序

材料と方法

結果

考察

文献

表

図

まとめ

図

謝辞

参考論文

論文内容要旨

序章

高等植物における様々な生理現象の中で、細胞増殖は自己複製という生命の本質ともいえるべき現象と密接に関連しており、分化と並び最も基本的な現象である。1つの細胞が2つに増加する過程は、極く基本的には細胞周期という共通の過程を経て進行することが明らかになっている。細胞周期という過程が、 G_1 期、S期(DNA合成期)、 G_2 期、M期(細胞分裂期)の4つの時期からなることは、ソラマメの根端の細胞の観察から Haward と Pelc によって1953年に提唱されたものであった。しかしその後増殖の研究は、特に生化学的分子生物学的分野で主に哺乳類及び酵母において盛んに行なわれ、高等植物ではあまり進展が見られなかった。しかし高等植物の増殖には植物ホルモンであるオーキシンの関与、細胞壁の存在など他の生物には見られない重要な側面も存在し、これらの理解が高等植物における増殖の理解には必須である。本論文は特にオーキシンの増殖、細胞周期への関与に着目し、ニチニチソウ懸濁培養細胞を用いていくつかの解析を行なったものである。

第一章 ニチニチソウ培養細胞における2,4-D 飢餓処理による同調培養系の確立

高等植物での増殖、細胞周期の研究が遅れた理由として挙げられるのが、解析に適した実験系が非常に少ない点である。オーキシンによる増殖の制御機構の解析に求められる実験系とは、第一に外生オーキシンによって増殖が完全に制御され、第二にオーキシン添加により増殖という反応のみが引き起こされるものである。さらに第三にオーキシンを投与される細胞の細胞周期上の時期が均一である必要がある。これまで報告されているオーキシンによる増殖制御系はいずれも、脱分化や傷害の作用が排除できない、または同調性が非常に低い等の問題点があり解析を困難なものにしていた。

定常期のニチニチソウ培養細胞 TN21 strain を、2,4-D を含まない新鮮な培地に植継いだところ、少なくとも植継ぎ後8日間細胞増殖が再開しないことが観察された。この細胞に対して植継ぎ後0, 2, 4日目に、培地中に、合成オーキシンである2,4-D を投与したところいずれの場合も速やかに細胞増殖が再開することから、TN21 strain は培地中の2,4-D に依存した増殖特性を持つことがわかった。2,4-D を投与される細胞の細胞周期上の時期が揃っているなら、誘導される細胞分裂は同調していることが期待される。そこでこの細胞株を用いて2,4-D による同調培養系の確立を試みた。様々な条件を検討した結果得られた同調培養系は、細胞数の変動、 $[^3H]$ -TdR の DNA 相当画分への取り込み、分裂指数のいずれも高い同調を示すものであった。また、IAA、及び NAA のいずれのオーキシンによっても増殖誘導が観察されたことから、誘導される細胞分裂はオーキシンによるものと結論された。得られた同調分裂系は、オーキシンによる同調分裂系としては最も同調性の高いものであり、また継代培養細胞を用いたことにより脱分化等の現象を排除することができた。この系はオーキシンによる増殖制御機構を

解析するのに非常に適していると考えられる。

第二章 細胞周期中におけるオーキシンの作用時期

第一章で確立された2,4-Dの飢餓及び再添加による同調培養系は、オーキシンが細胞周期のどの時期に要求されているかという基本的な問題を考える上でも興味深い対象である。現在、細胞周期の進行において、オーキシンはある特定の時期に要求されるものではないという見方が一般的である。そこで第一章でTN21 strainにおいて2,4-D飢餓により細胞がG₁期に蓄積したという結果は、定説にたいする反証となる可能性が推測される。しかしながら第一章で行なった同調化処理では定常期にある細胞を用いており、この細胞はリン酸を欠乏していることがわかっている。リン酸の欠乏によっても細胞はG₁期に蓄積するので、第一章で得られた結果からではオーキシンがG₁期に要求されていると結論づけることはできない。そこでオーキシン飢餓処理のみによって細胞周期が特定の時期に蓄積するかどうかについて解析を行なった。対数増殖期にある細胞を2,4-Dを含まない新鮮な培地に数度にわたって植継いでいくことで、2,4-D飢餓処理を施すことを試みた。その結果、3回目の植継ぎ後、細胞数の増加が停止した。この細胞に対し2,4-Dを投与したところ、投与後4時間目からDNA合成の開始が見られ、14時間目から非同調的ではあるが細胞分裂が観察された。このことは、2,4-D飢餓処理のみによっても、細胞は細胞周期中のG₁期に蓄積する傾向があることを示すものと考えられる。また、やはりG₁期にあることが既に明らかになっているリン酸を要求する時期との関連については、細胞周期中において、リン酸を要求する時期の方がオーキシンを要求する時期よりも前にある可能性が示唆された。これらの結果は、オーキシンの作用機構を考える上で、また明確な現象の乏しいG₁期を記述する上で興味深いと考えられる。

第三章 2,4-D 飢餓処理による同調培養系において発現が誘導される遺伝子の単離と解析

オーキシンによる増殖制御機構を分子レベルで解析するうえで、オーキシン添加により増殖が再開する時に発現が誘導されるような遺伝子を単離することができれば、その遺伝子の発現制御機構や他の分子との相互作用を解析することから、得られた遺伝子は非常に重要な手段となると考えられる。そこで第一章で得られた同調分裂系において、2,4-D添加時に発現が誘導される遺伝子の単離を行なった。その結果、4種類のクローンについて2,4-D添加後発現が増大することがわかり、これらをコードする遺伝子を、cyc18, 19, 20, 及び21と命名した。これら遺伝子の2,4-Dによる同調培養系での発現パターンを解析したところ、cyc18は2,4-D添加後10分で発現が増大し、2時間目でピークに達する2,4-D応答性の発現パターンを示すことがわかった。一方cyc19, 20, 21はいずれもDNA合成期と発現のピークが同時期であることがわかった。さらに植物体における発現分布を解析したところ、cyc18は植物体全体にわたって弱く発現しているが比較的下胚軸に強く、cyc19及び20は根端に強く発現していた。cyc21は全体に

弱く発現しており、特定の器官での発現の差は見られなかった。cycl8 は IAA, NAA によっても発現が誘導され、しかもその発現の程度はそれぞれのオーキシンによる増殖の誘導の程度と相関していることがわかった。塩基配列から、cycl8 はいくつかの既知の遺伝子とアミノ酸レベルで60~20%のホモロジーを持つことがわかった。ホモロジーを持つ遺伝子のうち、par A, GNT1 及び GNT35 はオーキシンによって増殖が再開する時に発現が誘導されるものであり、他の遺伝子も全てなんらかの外界からの刺激に応答するものであった。これらの知見を総合的に考察することは現時点では困難であるが、cycl8 はオーキシンによるシグナルカスケードの初期の段階に関与する遺伝子である可能性が挙げられる。一方 cycl9 はオーキシンによる同調系の他、リン酸飢餓処理による同調系及び継代培養時においてその発現が DNA 合成と相関した発現変動を示すことがわかった。植物体では根端に強く発現することと考え併せて、cycl9 は S 期もしくは増殖と関連を持つことが予想された。塩基配列から cycl9 は heat shock protein 90 (HSP90) であることがわかった。HSP90 は、他のいくつかの生物種において増殖において重要な役割を担うことが報告されているが、細胞周期の進行そのものとの関連についての報告はなく、本論文の結果は HSP90 に関する新たな知見として重要である。

まとめ

本論文では、TN21 strain を用いてこれまで困難であるとされていた外生のオーキシンによる高度の同調性を有する同調培養系の確立を成功させた。

また TN21 strain において2,4-D 飢餓処理のみによって細胞は細胞周期中の G₁期に蓄積したことから、オーキシンは G₁期の進行に要求される可能性が示された。

さらにオーキシンによる増殖制御機構を分子レベルで解析するための手段として、2,4-D 添加時に発現が誘導されるような遺伝子の単離を試みた。その結果、2,4-D 添加後発現が増大するような遺伝子を4種単離することに成功した。得られた遺伝子のうち、cycl8 はオーキシンによるシグナルカスケードの初期の段階に関与している可能性が示され、オーキシンによる増殖制御機構を解析する上で重要な遺伝子であると考えられる。cycl9 は細胞周期に依存した発現変動を示すことが示されたが、cycl9 は他の生物種で増殖において重要な機能を果たすことが推測されている heat shock protein 90 (HSP90) であることがわかった。HSP90 が細胞周期に依存した発現変動を示すという報告は今回が初めてであり、HSP90 における新たな知見として重要である。

本論文で得られた知見は細胞生物学、植物生理学の分野において重要なものであり、今後さらに解析を進めることにより増殖という根本的な現象に対する理解が深まるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、高等植物における増殖の制御においてオーキシンの関与として高等植物に特徴的な現象を、ニチニチソウ懸濁培養細胞を用いて解析したものである。

本論文ではまず第一章でニチニチソウ培養細胞 TN21 strain を用いて、外生オーキシンによる同調培養の確立を試みた。様々な条件を検討した結果得られた同調培養系は高い同調性を示すものであった。実験材料に継代培養細胞を用いたことにより、初代培養細胞を用いた時に生じる脱分化等の問題も排除され、得られた実験系はオーキシンの増殖への作用の解析に適していると考えられる。

第二章では細胞周期の進行においてオーキシンがある特定の時期に要求されるものであるかどうかについて解析を行なった。これまではオーキシンは細胞周期の特定の時期に要求されるものではないという見解が大勢をしめていたが、TN21 strain において2,4-D 飢餓処理のみによって細胞は細胞周期中の G₁期に蓄積する傾向があることが示された。この結果は、オーキシンが G₁期に要求される可能性を示すものであり、これまでの定説に対する反証として注目される。

第三章では、オーキシン添加により増殖が再開する時に発現が誘導されるような遺伝子の単離と解析を行なった。その結果、4種類のクローンについて2,4-D 添加後発現が増大することがわかりこれらのクローンをコードする遺伝子を、cyc18, 19, 20 及び21と命名した。さらに解析を進めたところ、cyc18 はオーキシンに対し非常に速い応答性を示す遺伝子であることがわかった。ホモロジー検索を行ったところ、cyc18 はいくつかの既知の遺伝子とアミノ酸レベルで60~20%のホモロジーを持つことがわかったが、それらは全てなんらかの外界からの刺激にตอบสนองするものであった。これらの結果は cyc18 はオーキシンによるシグナルカスケードの初期の段階に関与する遺伝子である可能性を示すものと考えられ、cyc18 はオーキシンによる増殖制御機構を解析する上で重要な遺伝子であると思われる。一方 cyc19 は様々な培養条件下で DNA 合成と関連した発現変動を示すこと、植物体では根端に強く発現することがわかり、S 期もしくは増殖と関連を持つことが予想された。塩基配列を決定した結果 cyc19 は heat shock protein 90 (HSP90) であることがわかった。HSP90 は、他のいくつかの生物種において増殖において重要な役割を担うことが報告されているが、細胞周期の進行そのものとの関連についての報告はなく、本論文の結果は HSP90 に関する新たな知見として重要であると考えられる。

本論文は高等植物における増殖に対するオーキシンの作用の解析を進めるにあたり、いくつかの重要な基本的知見を与えるものである。これらの結果は植物生理学における重要な新知見で博士（理学）論文の内容に値するものである。

以上大西直人提出の論文は、本人が自立して研究活動を行うの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。

よって大西直人提出の論文は、博士（理学）の学位論文として合格と認める。