

氏名・(本籍)	しょう じ ゆう いち 庄 司 雄 一
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	理 第 1 0 1 5 号
学位授与年月日	平 成 5 年 3 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
最終学歴	平成元年3月 東北大学大学院理学研究科 (前期2年の課程)生物学専攻修了
学位論文題目	ヒャクニチソウ単離葉肉細胞の管状要素への分化転換における DNA 修復系の研究
論文審査委員	(主査) 教 授 駒 嶺 穆 教 授 四 釜 慶 治 助 教 授 福 田 裕 穂

## 論 文 目 次

略語表

序章

文献

第1章 修復型 DNA 合成の解析

序論／材料と方法／結果／考察／文献／表／図

第2章 ポリ ADP リボース合成の解析

序論／材料と方法／結果／考察／文献／表／図

まとめと展望

謝辞

# 論文内容要旨

## 序章

分化転換はある分化形質を持つ細胞が異なる分化形質をもつ別の細胞に変化する現象であり、細胞はこの過程で既存の分化状態を抜け出し、新たな分化プログラムを展開する。このため分化転換の研究は、分化の決定、分化形質の発現とその維持といった細胞分化の重要な側面について貴重な情報を提供する。また植物細胞の分化転換を研究することは、植物細胞に特有な可塑性の高い分化の様態を理解する上でも非常に重要であると考えられる。

植物細胞の分化転換系の中で Fukuda と Komamine (1980) が確立した実験系は研究を行う上での利点を多く備えている。この実験系では、ハクニチソウの芽生えから単離した葉肉細胞をオーキシンとサイトカイニンを含んだ培地で培養することにより、同調性が高く比較的高頻度の管状要素形成を誘導することができる。また、大部分の管状要素は G1 期にある葉肉細胞が S 期を経ずに直接分化転換することによって形成される。この分化転換において、管状要素の形成に対する DNA 合成阻害剤やポリ ADP リボース合成阻害剤の作用と、分化転換過程での自発的な修復型 DNA 合成の存在とに基づいて、DNA 修復系が関与することが示唆されている。DNA 修復系の関与が事実であれば、分化転換過程でゲノムの再編成が起きている可能性も推測されるため、DNA 修復系と分化転換の関連を研究することは細胞分化の基盤を考える上で非常に重要である。しかし、例えば修復型 DNA 合成の性質、ポリ ADP リボース合成活性とオーキシンやサイトカイニンの関わりなどについて、これまでに得られた知見は断片的なものであった。そこで本研究では分化転換における DNA 修復系の関与の全体像を明らかにする目的で、修復型 DNA 合成およびポリ ADP リボース合成について、植物ホルモン、DNA 鎖切断の再結合、管状要素の形成との関連に注目して解析を行った。そして得られた結果をもとに DNA 修復系の諸事象と分化転換との因果関係について総合的に考察した。

## 第1章 修復型 DNA 合成の解析

分化誘導条件で培養したハクニチソウ単離葉肉細胞の核 DNA 合成を [<sup>3</sup>H] チミジンを投与してマイクロオートラジオグラフィを行い検討したところ、24~30時間目に修復型 DNA の、30時間目に（一部の細胞の細胞分裂に先立って起こる）S 期 DNA 複製のピークがそれぞれ認められた。この修復型 DNA 合成に関与する DNA ポリメラーゼを明らかにするため、単離核を用いて DNA 合成に対する種々の DNA 合成阻害剤の効果を調べた。培養24時間目の細胞から単離した核を用いた場合には、DNA 合成はアフィディコリン (APC)、N-エチルマレイミド、アラビノシルトシン三リン酸 (araCTP) のいずれによっても抑えられず、ジデオキシチミジン三リン酸 (ddTTP) によってのみ抑えられた。一方、培養30時間目の細胞から単離した核を用いた場合には、ddTTP および APC によってそれぞれ部分的に抑えられた。一般に ddTTP は  $\beta$  型 (核に局在する) および  $\gamma$  型 (オルガネラに局在する) DNA ポリメラーゼを阻害し、APC と

araCTP は  $\alpha$  型（核に局在する）DNA ポリメラーゼを阻害することから、分化転換過程で見られる修復型 DNA 合成を触媒する主要な DNA ポリメラーゼが  $\beta$  型であることが推察された。また、培養24時間目の細胞から調整した核抽出液中に、APC によって抑えられない DNA ポリメラーゼ活性が検出されたことから、 $\beta$  型 DNA ポリメラーゼ活性の存在が支持された。

チミジンのアナログ、プロモデオキシウリジン (BrdU) は細胞分裂にはほとんど影響を与えずに、管状要素の形成のみ著しく抑えた。この作用はチミジン添加によって打ち消されたこと、および [ $^3$ H] BrdU が主として DNA に取り込まれたことから、BrdU は DNA に取り込まれて管状要素の形成を抑えたことが予想された。培養の様々な時期に BrdU を投与し、12時間後にチミジンを添加することによって BrdU を限定した期間に作用させる実験を行ったところ、培養24~36時間目に BrdU を処理した場合にのみ管状要素の形成が著しく阻害された。APC が最も効果的に管状要素を阻害する時期も24~36時間目であることから、管状要素分化に必要な DNA 合成がこの時期に起きていることが示された。この時期はまた、オートラジオグラフィーで観察された修復型 DNA 合成が最も盛んな時期と一致することから、修復型 DNA 合成が管状要素分化に必要であることが強く示唆された。

## 第2章 ポリ ADP リボース合成の解析

ヒャクニチソウ単離葉肉細胞の分化転換において、の管要素の形成はポリ ADP リボース合成酵素の阻害剤、アミノベンズアミドとニコチンアミドによって抑えられることが知られている。より特異性が高く低濃度で有効な新しい阻害剤フェナンスリジノンを用いて再検討を行った場合にも、同様に細胞分裂はあまり影響を受けず、管状要素の形成が選択的に抑えられた。培養24時間目の細胞から単離した核を用いてポリ ADP リボース合成活性を測定したところ、これらの薬剤は管状要素形成を阻害する濃度でポリ ADP リボース合成活性を低下させた。このことから、ポリ ADP リボース合成酵素の阻害剤は確かにポリ ADP リボース合成を阻害することによって管状要素分化を抑えることが示された。

分化転換誘導条件下での培養に伴うポリ ADP リボース合成活性の経時変化を単離核系を用いて調べたところ、培養3時間目、18時間目、33時間目と時間を経るにしたがって活性は著しく上昇した。これに比べて、オーキシンやサイトカイニンを含まない（分化転換が起きない）対照培地で培養した場合には、単離核のポリ ADP リボース合成活性は明らかに低かった。また、ポリ ADP リボース合成阻害剤の修復型 DNA 合成に対する影響を調べた結果、阻害剤存在下で培養した細胞では修復型 DNA 合成のレベルが著しく低いことが明らかになった。ポリ ADP リボース合成阻害を投与した場合には DNA 鎖切断の再結合が妨げられることが示唆されているが、これらを考え合わせるとポリ ADP リボース合成を含む DNA 修復系のオーキシンとサイトカイニンによる活性化、およびこれに続く修復型 DNA 合成、DNA 鎖切断の再結合が分化転換に関与すると推論された。

## まとめと展望

本研究を通じてヒヤクニチソウ単離葉肉細胞の管状要素への分化転換には、ポリ ADP リボース合成と修復型 DNA 合成、これに続く DNA 鎖切断の再結合が関与すること、これら DNA 修復系の活性化にはオーキシシンとサイトカイニンが必要であることが示された。この DNA 修復系は、遺伝子の再配列などの DNA の一次構造の変化に関連していることが考えられる。この点を明らかにするためには、修復型 DNA 合成が起こる部位をクローニングし、この部位で何が起きているかを解析することが必要である。また、DNA 修復系の酵素を単離、精製して抗体や遺伝子を得ることにより、オーキシシンやサイトカイニンによる DNA 修復系の活性化の機構を研究することが重要である。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、ヒャクニチソウ単離葉肉細胞の管状要素への分化転換系を用い、分化転換過程で起こる DNA 修復系の諸事象を相互に関連づけ、この分化転換における DNA 修復系の全体像を明らかにすることを目的としたものである。

DNA に取り込まれて管状要素分化を阻害するプロモデオキシウリジン (BrdU) の特異な作用を利用して、分化転換に関与する DNA 合成の起こる時期を調べたところ、培養24~36時間目に細胞に BrdU を投与した場合に限って管状要素形成が著しく阻害された。この時期は修復型 DNA 合成が起こる時期とよく符合しており、管状要素分化に関連して修復型 DNA 合成が起こることが明らかになった。単離核を用いて DNA 合成に対する DNA ポリメラーゼ阻害剤の効果を調べた結果、培養24時間目の核の DNA 合成がアフィデイコリンでは余り抑えられず、ジデオキシチミジン三リン酸によって強く抑えられることが示された。このことから、ほとんどが修復型 DNA 合成と予想される培養24時間目の核 DNA 合成が主に  $\beta$ 型 DNA ポリメラーゼによって触媒されていることが示唆された。

ポリ ADP リボース合成活性は、オーキシンとサイトカイニンと共に含み分化転換が起こる D 培地で葉肉細胞を培養した場合、管状要素分化に先立って大きく上昇した。また ADP リボース合成阻害剤フェナンスリジノン (PT) はポリ ADP リボース合成を抑える濃度で管状要素形成を阻害した。これらの結果から、オーキシンとサイトカイニンの作用によって高められるポリ ADP リボース合成が管状要素分化に必要であることが明らかになった。PT を用いてポリ ADP リボース合成と修復型 DNA 合成の因果関係を調べた結果、細胞に PT を投与した場合には修復型 DNA 合成のレベルが著しく低下した。このことから、ポリ ADP リボース合成は修復型 DNA 合成に先立って起こる必要があると考えられた。

著者は以上の結果をこれまでの知見と併せて考え、次のように推論した。ヒャクニチソウ単離葉肉細胞の管状要素への分化転換過程においては、DNA 修復系の諸事象が相互に関連して起こり、この DNA 修復系の全過程が完遂しないと管状要素分化は起こらない。この DNA 修復系の過程は、最初にポリ ADP リボース合成がおこり、次に修復型 DNA 合成、これに続いて DNA 鎖切断の再結合が起こる。また、管状要素分化の誘導に必要なオーキシンとサイトカイニンの作用の一つがこれら DNA 修復系の活性化である。

ここに得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、庄司雄一提出の論文は博士(理学)の学位論文として合格と認める。