

氏名(本籍)	す だ のり こ 須 田 教 子 (埼 玉 県)		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 甲 第 4978 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Studies on the Involvement of Cytokinins in Antiproliferation and the Induction of Programmed Cell Death of Tobacco BY-2 Cells</b> (サイトカイニンによるタバコ BY-2 細胞の増殖抑制及びプログラム細胞死誘導に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	酒 井 慎 吾
副 査	筑波大学教授	理学博士	佐 藤 忍
副 査	筑波大学准教授	理学博士	野 村 港 二
副 査	筑波大学講師	博士(理学)	岩 井 宏 暁

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

植物における多くの生理機能は、植物ホルモンによって制御されている。植物ホルモンの一つであるサイトカイニンは、アデニンに側鎖の結合した構造をもつ物質であり様々な種類が存在する。サイトカイニンは主に、細胞分裂の促進など、植物の生長において促進的に作用することが知られているが、一方では根端分裂組織における細胞周期の遅延など抑制的な作用も確認されている。加えて近年、一部のサイトカイニン類がタバコやニンジン、シロイヌナズナの培養細胞に対し、増殖阻害と同時にプログラム細胞死(PCD)を誘導することが報告された。しかし、サイトカイニン類による植物細胞への細胞死誘導については、報告例が極めて少ないのが現状である。そこで本研究では、様々な種類のサイトカイニン及びサイトカイニンリポシドを用いて、培養細胞への増殖抑制及び細胞死誘導がサイトカイニン類に共通してみられるかを調べるとともに、分化した細胞にも処理を行い、培養細胞の場合と同様に細胞死が誘導されるかを検証した。また、細胞死に伴う増殖抑制に着目し、どのような機構によるかを細胞周期の観点から検証し、この増殖抑制機構が細胞死の誘導に何らかの影響を及ぼしているかを調べた。本研究により、サイトカイニン類による増殖の抑制と細胞死誘導とはそれぞれ独立した機構で制御されている可能性が示され、さらにこの時の増殖抑制機構についてはこれまで詳細な報告がなされていなかったが、その機構の一部が明らかとなったことは、本研究分野において重要な意義をもつものと考えられる。

タバコ BY-2 培養細胞に各種サイトカイニンを処理し、細胞密度の経時変化からそれぞれの増殖抑制効果を比較した。その結果、各種サイトカイニンは濃度依存的に細胞増殖を抑制することが確認された。次に、これらが全て細胞死を誘導するかについて死細胞の割合変化を経時的に調べた。その結果、全てのもので死細胞の増加がみられた。この細胞死がいずれもアポトーシスに類似した形態的变化を伴うかを確認するため、ゲノム DNA を抽出して電気泳動したところ、PCD 誘導時にみられる、一定の分子量に切断された DNA 断片が検出された。さらに、死細胞の増加に伴い、核の形態異常がみられたことから、各種サイトカイニンによる細胞死はいずれもアポトーシスに類似した現象を伴うことが確認された。加えて、BA による細胞死

誘導時には複数の caspase-like protease の活性がみられることや、ミトコンドリアを介するシグナル経路に加え別の経路が同時に関わっている可能性が示された。また、タバコの葉に処理した場合、ゲノム DNA の断片化はみられなかったことから、分化した細胞に対しては効果が弱いことが確認された。

増殖抑制と細胞死誘導の関連性について更に調べるため、まず細胞死誘導に伴う増殖抑制がどのような機構によるかを、細胞周期への影響という観点から調査した。BA を BY-2 細胞に処理し、細胞周期の進行にどのような影響がみられるか調べた結果、処理後 8 時間以内に M 期と G2 期の細胞の割合が減少したことから、BA は G1 から S 期のいずれかの時期を主に抑制すると考えられた。そこで次に、M 期で細胞周期を同調した BY-2 細胞を用いて、同調後 0 時間 (M 期) での影響を調べた。その結果、50  $\mu$ M では細胞周期が G1 期で完全に停止したことから、BA は G1 期の進行を抑制することが示された。同調後 4 時間 (G1 期) で、50  $\mu$ M BA を処理した場合も、同様に細胞周期は G1 期で停止した。次に、50  $\mu$ M BA によって G1 期での停止が起こることを確認するため、細胞周期依存的に発現する遺伝子の発現パターンへの影響を解析した。G1 期の途中から S 期をピークとして発現する 2 つの細胞周期関連遺伝子について発現パターンを調べたところ、0 時間 (M 期) で BA を処理した場合は遺伝子発現が全くみられなくなったことから、発現開始より早い時期に細胞周期が抑制されたと考えられる。このような G1 期での細胞周期抑制に伴い、細胞死誘導がどのような時期に起こるかを調べるため、0 時間 (M 期) または 4 時間 (G1 期) で 50  $\mu$ M BA を処理した場合の死細胞の増加パターンについて調べた。その結果、死細胞の増加は処理後 16 時間目からみられ、その後は経過時間に依存して死細胞の割合が増加した。この結果から、細胞死の誘導は M 期及び G1 期のどちらでも BA を受容した場合にも以降の経過時間に依存して誘導され、G1 期に入った後である一定の時点から起こるわけではないことが示された。

以上の研究から、サイトカニン及びサイトカニンリポシドはいずれも BY-2 培養細胞に対し、細胞増殖の抑制と細胞死の誘導という 2 つの異なる効果を示すことが確認された。一方、葉への顕著な細胞死誘導効果はみられず、サイトカニン類による細胞死誘導効果は細胞の分化状態によって異なるという可能性が示された。また、培養細胞における増殖抑制は、細胞周期の進行が G1 期で抑制されることが主な原因であることが明らかになった。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。