

論文審査の結果の要旨

氏名 宮沢 豊

本論文は3章からなり、第1章ではタバコ培養細胞 BY-2 のアミロプラスト分化過程におけるオーキシン、サイトカイニンの効果と遺伝子発現の関係、第2章では糖代謝を触媒する酵素遺伝子群のアミロプラスト分化過程における発現制御の解析、第3章ではアミロプラスト分化過程における細胞質とオルガネラの遺伝子発現の寄与について述べられている。

本論文では組織の分化という情報を排除したタバコ培養細胞 BY-2 のアミロプラスト誘導系を用いて、いまだ明らかにされていない、分裂組織様の細胞がデンプン貯蔵細胞に分化する過程を、細胞の増殖、細胞内デンプン蓄積量、ショ糖取り込みからデンプン合成に至る糖代謝に関わる遺伝子群の発現を指標に、分子細胞生理学的に解析している。

第1章

オーキシン除去によるデンプン貯蔵細胞分化過程は、デンプン蓄積と同時に細胞増殖の抑制が起こる。オーキシン除去によって、分裂組織様の細胞が細胞周期をどの段階で停止してデンプン貯蔵細胞に分化しているのかを解析するために、オーキシン含有培地(D)オーキシン除去培地(F)、オーキシン除去、サイトカイニン含有培地(B)の3種類の培地において培養した細胞の核相を顕微鏡装置で解析した。その結果、デンプン蓄積の起こるF、B両培地においてG1期の細胞が蓄積していることが明らかになった。このことは、BY-2細胞が細胞周期をG1期で停止してデンプン貯蔵細胞に分化していることを示している。また、電子顕微鏡観察を行った結果、F、B培地に植え継ぎ後48時間のうちにアミロプラストが形成されることが見出された。

次にオーキシンとサイトカイニンの効果を遺伝子発現のレベルでモニターするためにデンプン合成に直接関与すると考えられる3つの遺伝子、ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), Granule-bound starch synthase (GBSS), Starch branching enzyme (SBE), についてそれぞれのcDNA

を単離し、RNA-gel blot により解析した。その結果、デンプン蓄積量と各遺伝子の転写産物蓄積量が相関していることが見出された。さらに、デンプン合成における律速酵素をコードする AGPase の発現のオーキシン、サイトカイニンに対する応答性を RNA-gel blot により解析した結果、転写産物蓄積量がオーキシンにより減少し、サイトカイニンにより増加することが明らかになった。このことは、デンプン合成に直接関わる遺伝子群の発現がオーキシン、サイトカイニンにより制御され、デンプン蓄積量に反映されていると考えられた。

第2章

第1章では、デンプン合成に直接関わる遺伝子群を解析したが、デンプン合成に至る糖代謝の経路の一部は、アミロプラスト分化を行わない分裂組織様細胞においても必須の役割を持つ。そこで、分裂組織様の細胞がデンプン貯蔵細胞に分化していく過程で代謝経路のどのステップに関わる遺伝子の発現が重要な役割をもっているのかを調べた。Sucrose transporter (SUT), sucrose synthase (SUSY), invertase, UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase), cytosolic phosphoglucomutase (CPGM), hexokinase, glucose-6-phosphate translocator (GPT), plastidic phosphoglucomutase (PPGM) をコードする cDNA を単離し、半定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果、SUT, SUSY, GPT, PPGM はデンプン貯蔵細胞分化過程で特異的に発現量を増大させていた一方で、invertase, UGPase, CPGM, hexokinase, の発現量は、分裂組織様細胞とデンプン貯蔵細胞において差は認められなかった。このことから、BY-2 細胞は細胞増殖過程では、invertase → hexokinase → CPGM → UGPase の経路を用いてショ糖の代謝を行っており、デンプン貯蔵細胞分化過程においては、SUT → SUSY → UGPase → CPGM → GPT → PPGM の経路が誘導されてデンプンの蓄積に寄与していることが示唆された。

第3章

デンプン蓄積の場である色素体と、同化した糖からエネルギーを生み出す場のミトコンドリアは、独自のゲノム、独自の遺伝子発現系を有している。一方、これまでに知られているデンプン合成に関

与する遺伝子群は、全て細胞核にコードされている。そこで、細胞質とオルガネラのタンパク質合成のデンプン蓄積に対する寄与を、オルガネラにおけるタンパク質合成阻害剤(クロラムフェニコール)と、細胞質におけるタンパク質合成阻害剤(シクロヘキシミド)を用いて解析した。その結果、両阻害剤とも、デンプン蓄積を阻害したが、クロラムフェニコールは、デンプン合成に必須の AGPase の発現を阻害しなかった。その一方で、シクロヘキシミドは、AGPase, GBSS の発現を阻害した一方で、SBE の発現は阻害しなかった。このことは、①オルガネラにおけるタンパク質合成は、細胞核コードのデンプン合成に関わる遺伝子発現と独立してデンプン蓄積をコントロールすること、②アミロプラスト分化誘導系において、SBE は AGPase, GBSS とは異なる機構でその転写産物の蓄積量が制御されていること、③AGPase, GBSS の発現には *de novo* 合成されるタンパク質を必要とすることを示唆している。

本論文提出者は、タバコ培養細胞 BY-2 を用いて分裂組織様細胞がデンプン貯蔵細胞分化する過程を分子細胞生理学的に解析し、デンプン合成に直接関わる遺伝子の発現がオーキシンによって抑制され、サイトカイニンによって促進されることを明らかにした。これは、デンプン合成に関わる遺伝子がオーキシン、サイトカイニンによって制御を受けることを示した最初の報告である。また、培地中のショ糖からデンプンに至る各ステップを触媒する酵素遺伝子の発現の解析により、デンプン貯蔵細胞にともない、遺伝子発現が活性化される経路があることを明らかにした。さらに、デンプン合成に関与する遺伝子の発現は、アミロプラスト分化過程で *de novo* に合成されるタンパク質を必要とする場合としない場合があることを見出した。

これらの成果は、複雑でいまだ解明の進んでいないデンプン貯蔵細胞分化を、単純化した系を用いて再現し、解析、検証を行ったものとして高く評価されている。したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。