

Studies on the effects of peptidyl plant growth factor phytosulfokine on the proliferation of carrot cultured cells

| | |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 著者 | Eun Changho |
| 内容記述 | Thesis (Ph. D. in Science)--University of Tsukuba, (B), no. 1915, 2003.3.25 Includes bibliographical references |
| 発行年 | 2003 |
| URL | http://hdl.handle.net/2241/6909 |

| | | | | |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|--------|-------|
| 氏名(国籍) | うん 殷 | ちゃん 彰 | ほ 顯 | (韓 国) |
| 学位の種類 | 博 士 (理 学) | | | |
| 学位記番号 | 博 乙 第 1915 号 | | | |
| 学位授与年月日 | 平成 15 年 3 月 25 日 | | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 | | | |
| 審査研究科 | 生物科学研究科 | | | |
| 学位論文題目 | Studies on the Effects of Peptidyl Plant Growth Factor Phytosulfokine on the Proliferation of Carrot Cultured Cells (ニンジン培養細胞の増殖に対するペプチド性植物細胞増殖因子ファイトスルフォカインの効果に関する研究) | | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 鎌 田 | 博 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 白 岩 | 善 博 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 沼 田 | 治 |
| 副査 | 筑波大学助教授 | 理学博士 | 佐 藤 | 忍 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

植物では、一般的に、植物ホルモンが細胞の増殖や分化の決定に重要な役割を果たしていることが知られているが、既知の植物ホルモンのみでは説明できない現象も多数存在している。細胞増殖に対する細胞密度効果もその1つである。低細胞密度条件下では、既知の植物ホルモンを添加しても細胞増殖は見られないが、活発に細胞増殖している培養物の培地 (CM) を低細胞密度培養時に添加すると、細胞増殖が促進される。CM中に存在する細胞増殖促進因子の単離・同定は30年以上続けられ、最近になってようやく、アスパラガス葉肉細胞培養培地から新規な因子が単離・同定され、その構造が決定された。この細胞増殖促進因子は、5アミノ酸から成るペプチド性細胞増殖促進因子であり、ファイトスルフォカイン (PSK) と名付けられた。その後、PSKは、アスパラガス以外の多様な植物種の細胞培養培地に見出され、植物に普遍的に存在する因子であることが明らかとなっていった。しかし、PSKがどのようなメカニズムで細胞の増殖を引き起こすかについては未だほとんど解明されていない。本研究では、PSKを自ら生産し、また、外部から投与したPSKによって細胞増殖が促進されることが明らかとなったニンジンの培養細胞 (non-embryogenic cells: NC) を用い、NCの細胞増殖に必須なオーキシンとPSKの相互作用を明らかにするとともに、PSKによる細胞増殖促進機構の一端を明らかにすることを目的とし、生理学的、分子生物学的解析が行われている。

まず始めに、ニンジンNCの細胞増殖に対するオーキシンの種類・濃度とPSKの関係が調べられた。オーキシンとして2,4-Dを用いた場合、高濃度処理ではPSKによる細胞増殖促進効果は見られなかったが、細胞分裂が著しく低下する低濃度処理時には、PSKによる濃度依存的な促進効果が見られた。また、オーキシンとしてNAAあるいはIAAを用いた場合、2,4-Dの場合と同様の結果が得られた。一方、オーキシン処理によってNC自身が生産・分泌するPSKの量がcompetition ELISA法によって調べられた。その結果、高濃度オーキシン処理時には、低濃度オーキシン処理時に比べ、高濃度のPSKが生産・分泌されていることが示された。さらに、オーキシン無添加培地でNCを継代培養することによって細胞内に残存するオーキシンを除き、その状態で外部投与されたPSKの効果が調べられた。その結果、オーキシンが存在しない状態ではPSKは細胞増殖促進効果を示さないことが明らかとなった。このような結果から、ニンジンNCにおいては、オーキシンによってPSKが生産・分泌され、PSKは

オーキシン存在下でのみ細胞増殖促進効果を発揮することが示された。

次に、細胞分裂周期特異的分裂阻害剤を用いた細胞分裂部分同調培養系を活用し、flowcytometry (FCM) ならびに細胞分裂関連遺伝子 (*DcCycD2*, *DcH4*, *DcCycB1*; *l*) の RT-PCR 法に発現解析により、PSK が細胞分裂周期のどの段階を促進するかが調べられた。その結果、PSK は、G1 細胞周期の進行を早めるとともに、S-G2 期の細胞周期の進行も早めることが明らかとなった。さらに、オーキシン無添加培地で継代培養することで細胞分裂休止期 (G0 期) にした NC を用い、細胞周期全般に関わっている *DcCDC2* 遺伝子の発現を指標とし、細胞周期の再開への PSK の効果が調べられた。その結果、G0 期からの細胞周期への移行、すなわち、細胞分裂の再開も PSK によって促進されることが明らかとなった。

本研究を通じ、ペプチド性植物細胞増殖因子である PSK は、植物ホルモンであるオーキシンによってその生産・分泌が引き起こされること、PSK は単独では細胞増殖を促進することはできないが、オーキシンによる細胞分裂プログラム (細胞周期の進行および休止期にある細胞の細胞周期の再開) を促進することによって細胞増殖を促進することが初めて示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、高等植物で初めて単離・同定されたペプチド性細胞増殖促進因子である PSK に関し、オーキシンによってその生産・分泌が引き起こされること、さらに、単独では細胞分裂促進効果を示さないものの、オーキシンによって引き起こされる細胞分裂プログラム全般を促進することで最終的に細胞分裂を促進することを初めて明らかにしたものであり、植物起源のペプチド性植物細胞増殖因子の作用機構の一端を世界に先駆けて明らかにした点は特に高く評価される。PSK が直接作用する細胞分裂関連因子の解明が今後の課題として残されているものの、植物細胞増殖機構の一端を明らかにした本研究は、植物細胞の分裂・分化に関する研究の今後の発展に多大な貢献をするものと強く期待される。

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。