

学 位 論 文 題 名

Control of the growth limitation in protozoan
Tetrahymena

(原生動物テトラヒメナの増殖制御機構の研究)

学位論文内容の要旨

本研究は、原生動物テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) の増殖調節機構、特に富栄養環境下での増殖停止機構の解明と増殖停止に応じた細胞内の変化を調べた。十分に増殖可能な条件下にある細胞集団が、物理的な制限によるものではなく、自発的に増殖を停止している現象は広く種を超えて見られる。しかしこの現象の解明は、飢餓による増殖停止のしくみの研究が盛んに行われているのに比べて、あまり進んでいない。テトラヒメナにおいても、分泌性の増殖を活性化する因子や、DNA及びRNA合成を活性化するポリペプチドなどの細胞増殖の促進に関する研究は盛んに行われているが、増殖停止に関する研究は殆ど行われていない。

私は増殖曲線の定常期に到達したテトラヒメナを用いて、容易で且つ高率に同調分裂を誘導する方法を見い出した。さらに、定常期のテトラヒメナは、飢餓、酸欠、有害な老廃物の蓄積などの培養環境の変化によって増殖が停止するのではなく、自らが培養液中に細胞周期をG1期で停止させる因子を放出して積極的に増殖を停止していることを明かにした。

増殖曲線の定常期に達したテトラヒメナを、新鮮な培養液に移して培養すると、2時間後に約80%の細胞がいっせいに分裂することが分かった。この同調分裂は株に非特異的に誘導されるが、増殖曲線の他の時期の細胞では誘導されなかった。さらにこの同調分裂は、定常期の細胞を栄養分を含まないバッファーに移して培養しても、2時間後に約40%誘導され、3時間後には細胞密度も2倍に上昇した。以上の結果は、定常期の細胞は飢餓により分裂を抑制されているのではなく、外液に存在する細胞増殖を阻害する因子によって細胞周期の進行が特定の時期で停止し、その阻害因子除去による細胞周期停止の解除が、同調分裂誘導の原因であることを示している。そこで、定常期の細胞周期がどの時期で停止しているのかを調べるために、定常期の細胞を新しい培養液に懸濁してから同調分裂が誘導されるまでの大核と小核のDNA量の変化を顕微分光測光法で測定したところ、同調分裂が誘導されるまでの間に倍増し、分裂終了後にはほぼ半減することが分かった。この結果は、定常期細胞の細胞周期がG1期で停止していることを示している。

さらに、定常期細胞のG1期停止の原因について検討を行った。その結果、定常期細胞のG1期停止の原因は、老廃物であるアンモニアの蓄積、培養液のpHの上昇、酸欠、細胞密度の上昇ではなく、テトラヒメナがその細胞周期をG1期で停止させる因子を外液に放出しているためであることが明かになった。この因子は、5,000ダルトン以下の分子量で、100℃、10分の熱処理でも活性が失われなかった。

次に、このG1期停止因子が、細胞周期各期の細胞にどのような影響を与えるのか、またどのようにして細胞周期をG1期で停止させるのかを調べた。上記のように、定常期のテトラヒメナは細胞周期をG1期で停止している。そのため、新しい培養液に懸濁後は、殆どの細胞の細胞周期が同調して進行するはずである。そこで、定常期細胞を一定時間新しい培養液で培養して細胞周期を進行させ、その後再びG1期停止因子を含む定常期の培養上清に懸濁して、G1期停止因子が細胞周期のどの時期の進行を停止させるかを調べた。その結果、定常期培養上清に存在するG1期停止因子は、G1期の細胞のS期への移行を阻止するが、分裂期やG2期の細胞の細胞周期の進行には無影響であることが明かになった。

また、テトラヒメナは接合準備期 (initiation期) においても、接合に必要な因子を外液に放出し、細胞周期をG1期で停止していることが知られている。そこで、定常期と接合準備期のG1期停止は、同じ因子によって誘発されているのかどうかを調べるために、initiationが行われた細胞外液に定常期の細胞を懸濁したところ、懸濁後2時間目に同調分裂が誘導され、G1期停止は解除された。この結果は、定常期で誘発されるG1期停止と接合準備期に引き起こされるG1期停止が、それぞれ別の因子によって行われている可能性を示唆している。

以上のように、テトラヒメナは富栄養環境下で積極的に細胞周期をG1期で停止させる因子を放出して増殖の制御を行っているが、この因子によって、細胞内ではどのような変化が生じているのかを調べるために、この因子によって活性化される遺伝子の単離を試みた。テトラヒメナのRNA合成量は、増殖が進行するにつれて減少することが知られている。従って、定常期に転写量が増大する遺伝子の中に、G1期停止因子の影響を受けて遺伝子発現を活性化した遺伝子が含まれていると考えられる。そこで、定常期で転写量が増大する遺伝子 (cDNA) のひとつを単離して解析を行ったところ、対数増殖期の細胞にG1期停止因子を与えると、その遺伝子の発現が促進されることが確認された。全長約1.2kbpのこの遺伝子の塩基配列を解析したところ、予測されたアミノ酸配列の約70%が、よく保存された12個の酸性アミノ酸の繰り返しで占められた特徴的な構造をしていた。またこの繰り返し配列について、既存のタンパク質のデータベースと類似性検索を行ったところ、繰り返し配列の一部がマウスの神経細胞の軸索で多量に発現している微小管結合タンパク質 (MAP1B) の微小管結合モチーフに非常に類似していることが分かった。そこで、この遺伝子が発現するタンパク質の挙動を調べるために、繰り返し配列に相当する合成ペプチドを作成して抗原とし、モノクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて間接蛍光抗体法で細胞を観察すると、抗原は繊毛の長軸に沿って点在していること、さらに基底小体にも存在していることが分かった。そこで、繊毛内での抗原の局在性を免疫プロット法で調べたところ、抗原は軸糸分画及び繊毛を界面活性剤で抽出した軸糸以外の分画の両方に存在していることが分かった。これらのことから、この遺伝子産物は、繊毛の微小管と関連して存在し、多量体を形成してアクソネームと繊毛膜を連結する機能を持つタンパク質である可能性が示唆された。

さらに、このcDNAをプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションにより、この遺伝子は別種のテトラヒメナ (*T. pyriformis*) やゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) には存在しないことが分かったが、間接蛍光抗体法では同じ抗原決定基を持つタンパク質がそれらの繊毛に存在することが明かになり、一次構造は異なるが、同じ機能を持つタンパク質の普遍的な存在が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 片 桐 千 明

副 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 助 教 授 山 下 正 兼

副 査 教 授 藤 島 政 博

(山口大学大学院理学研究科)

学 位 論 文 題 名

Control of the growth limitation in protozoan *Tetrahymena*

(原生動物テトラヒメナの増殖制御機構の研究)

細胞の増殖機構の研究は、この現象が単に生物の遺伝的継承をもたらす基本的な手段であるがゆえに重要であるのみならず、細胞のがん化や分化機構の解明のためにも必須の情報を提供する。しかしこのテーマの研究を押し進めるためには、どのような生物種あるいはタイプの細胞を用いるのであれ、増殖を任意に制御できる実験系の開発が前提となり、近年真核細胞に普遍的な細胞周期調節因子としてのMPF (M-phase promoting factor) に関する分子的解明が活発に展開されつつあるのも、M期を誘導するための優れた実験系が背景にあってのことである。同様の意味で、細胞周期を一般に細胞の「生活期」とされるG1期に保つ機構があるとすれば、その維持機構の解明は極めて重要な意義をもつが、そのための適当な実験系はこれまで存在しなかった。堀 麻希提出の学位論文は、原生動物テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) を用いて増殖の定常期にある細胞に高率で同調分裂を誘導することに成功し、その成功の原因の追求から、それが細胞周期をG1期に停止させるしくみに基づいていることを明らかにすることを通じて、細胞増殖制御機構解明のための新しい実験系としてこれを提起したものである。

申請者の第一の貢献は、増殖曲線の定常期にあるテトラヒメナを新鮮な培養液に移すと80%という高い同調率で分裂を開始することを見出した点にある。この簡単な分裂誘導法は、これまでテトラヒメナ、ゾウリムシなどで知られている熱処理 (heat-shock) や飢餓による方法とは同調率の高さにおいて格段の差があるのみならず、栄養を含ま

ないバッファー液に移しても誘導されること、および細胞周期のG1期にある細胞に特異的にもたらされるという意味で、従来知られている見かけ上類似した分裂誘導法とは本質的に異なる新しさをもつものと位置づけられる。申請者の第二の貢献は、上記条件下でのG1期停止が細胞から分泌される耐熱性の低分子物質（G1停止因子）によりもたらされることを証明した点にあり、さらに付随する実験から申請者の扱っているG1期停止が従来報告されている接合準備期における同停止とは異なる機構に基づくものであることを示しているのは興味深い。さて、ここで見出された増殖停止がもし積極的なG1期維持機構に基づくものであるとすれば、増殖の定常期に限って転写が増強される遺伝子が存在する可能性がある。この観点から申請者は意欲的に上記停止因子の存在下で発現が増大する遺伝子（cDNA）のひとつを単離し、その塩基配列の解析およびそれに基づいて作成した抗体を用いた解析から、それが繊毛の微小管関連蛋白質であることを明らかにしている。

この研究で見出された同調分裂を誘導する方法は、その手続き上の簡単さおよび同調率の高さにおいて、増殖制御機構のみならずその他の多様な現象の研究にテトラヒメナを実験モデルとして用いている多くの研究者にとって極めて利用価値の大きいものとして、高く評価される。増殖制御機構の観点では、増殖の単なる抑制ではなくG1期に積極的にとどめる機構を提唱する申請者の研究は、その機構が可能性として含む適応的な意義の大きさから注目に値するものである。その意味で、申請者が見出したG1停止因子の分子の実体、およびそれにより発現誘導される遺伝子のさらなる同定と機能の解明が期待されるが、本研究はその方向に向けて今後展開される研究の基礎を提供するものとして広く利用されるであろう。申請者に対する最終試験は、平成9年1月28日に多数の大学院担当教官の出席のもとに論文の口頭発表と質疑応答の形で行われ、満足すべき結果であった。したがって審査員一同は、申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認める。