

学 位 論 文 題 名

STUDIES ON CIRCADIAN REGULATION
OF CELL DIVISION CYCLE IN *EUGLENA*.

(*Euglena* における細胞周期の概日制御に関する研究)

学位論文内容の要旨

近年、細胞周期進行の調節は分子生物学の分野において最も注目される現象として集中的に研究されてきている。細胞周期は、生物が生命を維持し個体を次世代に存続させるための最も基本的な事象で、次の4つの位相から構成されていることが良く知られている。それらは、分裂後成長期(G1期)→DNA複製期(S期)→分裂前成長期(G2期)→細胞分裂期(M期)→分裂後成長期(G1期)の順で循環する。この細胞周期の進行の調節は、セルサイクルエンジンと呼ばれるサイクリン/CDK複合体によって行われており、サイクリン-CDK複合体の周期的な会合、活性化、そして分解が細胞周期を駆動する中心的な事象となっている。

セルサイクルエンジンの制御は、フィードバック制御の一例であるチェックポイントコントロールという概念によって説明されている。細胞の成長の不十分さ、細胞にとって好ましくない環境、またはDNAの複製の未完成などを伝達する細胞内外からのシグナルによって、細胞周期はG1期終了間際やM期に入る直前のG2期などに停止する。その停止ポイントをチェックポイントと呼ぶ。

細胞周期とは別にもう一つの重要な周期現象がある。これは概日リズムと呼ばれる。概日リズムは、恒常環境条件下(外部から時刻を知らせる因子が無い状態)において、自律的に(内因的に)振動する約24時間の周期現象であり、微生物から脊椎動物において、多くの生命現象が概日リズムを示すことが明らかになっている。いくつかの例をあげると、ヒトの行動、ショウジョウバエの行動や羽化、時計遺伝子の発現、軟体動物アメフラシの目における活動電位、赤パンカビの分生子形成、ウキクサのグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼの活性、そしてユーグレナの細胞分裂タイミングなどである。

本研究は、これら生命活動に非常に重要な細胞周期と概日リズムの関係を明らかにすることを目的とした。

細胞分裂の概日制御は、1958年にSweeneyとHastingsによって海産性渦鞭毛藻類 *Gonyaulax* の細胞分裂が内因性の概日時計によって制御されていることが発見されて以来、原核生物のシアノバクテリアからヒトの細胞まで多くの生物において発見されている。最も広範囲な研究がユーグレナを用いて行われてきている。

現在まで、この細胞周期の概日制御に関しては「24時間明暗周期による藻類の同調分裂のメカニズムに、概日リズムが関与しているか」という論点が概日リズム学派と反概日リズム学派の間に存在して来た。明暗周期への細胞周期の同調に関して、反概日リズム学派は、G1期に存在する光依存性の生長過程が、暗期に停止し明期にのみ進行することによって、分裂が24時間明暗周期に同調すると主張する。言いかえると、光は藻類が生長するための光合成のみに必要とされるということである。これに対し、概日リズム学派は、24時間明暗周期の光は2重の機能を持っていると考える。一つは、藻類生長のための光合

成であり、もう一つは、細胞分裂タイミングの概日リズムをエントレインメント（同調）させる機能である。しかし、この同調分裂に関する具体的なメカニズムは明らかになっていない。

本研究は、概日リズム学派としてこの論争点を解決するために、24 時間明暗周期に同調する *Euglena* の細胞周期に対する光の効果に注目して行われた。具体的には、Edmunds の結果に対する疑問を解くことによってその解答を得ることとした。Edmunds は、24 時間明暗周期（LD14,10）で同調培養された *Euglena* は、明期を 14 時間から 8 時間に短縮しても全ての細胞の DNA 複製は完了出来るが、細胞分裂は生じない事を明らかにした。そして、その未完了の細胞周期は、6 時間の明期を与えられることによって、細胞分裂を生じる事を示した。では、6 時間の明期は、細胞分裂に必要なタンパク質を合成するためや、エネルギーを供給するために必要だったのか？それとも、細胞分裂のタイミングを概日リズムに合わせるために必要だったのか？これが本研究において、細胞周期に対する光効果を明らかにするための問題点である。

25℃、3.7klux の連続光で非同調分裂している細胞が 24 時間明暗サイクル(LD14,10)に晒されることによって細胞分裂は、24 時間明暗周期に同調したリズムを示した。その同調培養を不規則な光スケジュールに置いた。培養中、細胞数は 2 時間ごとに計測され、細胞総数が追跡された。14 時間明期を、8 時間に短縮した時、連続暗期中で細胞集団は増殖を停止した。暗期中の培養における細胞分布は DNA フローサイトメータ (FACS) によって解析された。細胞は G1/S, G2+M 期に存在していた。このことは、G1/S、S/G2+M、G2+M/G1 の移行に光依存性細胞周期チェックポイントがあることを示している。

次に、様々な長さの暗期に置いた後、6 時間の光を照射した（以下これを 6 時間光中断という）。この 6 時間光中断は、概日リズムの主観的夜明け、主観的真昼、主観的黄昏、主観的真夜中の 4 つの時間帯に行われた。光中断は細胞集団の増殖を再開させ、特に主観的黄昏の時、細胞増加率は最大値を示した。しかし、光中断が主観的夜明けの時、細胞増加は生じなかった。光中断による細胞増加率は、主観的黄昏にピークを、主観的夜明けにトローフを持つサーカディアンリズムを示した。

このとき、G1/S、S/G2+M、G2+M/G1 の移行にかかわる 3 つの光依存性チェックポイントは、主観的黄昏にもっとも効果的に促進された。ゆえに、光依存性チェックポイントはサーカディアン依存性光反応性を持つことが明らかになった。

本研究は、光刺激があれば細胞分裂は、いつでも生じるのではなく、時刻特異的に起こることを明らかにした。このことは、概日時計が細胞周期進行における光反応性に関して Gate circuit として働いていることを示唆し、細胞周期のフィードバック制御の一例として、チェックポイントコントロールの他に、新たにサーカディアンゲートコントロールという概念を提案した。また、同調メカニズム解明の基礎となる「細胞周期と光信号伝達系（時計情報伝達経路を含む）の共役点の発見」ともいえるこの結果によって、反概日リズム学派の伝統的な仮説を覆すことになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 岸 皓 彦

副 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 助教授 伊 藤 悦 朗

副 査 助教授 後 藤 健 (帯広畜産大学)

学 位 論 文 題 名

STUDIES ON CIRCADIAN REGULATION OF CELL DIVISION CYCLE IN *EUGLENA*.

(*Euglena* における細胞周期の概日制御に関する研究)

細胞分裂は生物が個体を次世代に存続させるために行なう重要な過程である。細胞周期は一般に次の4つの段階を経て進行することが解っている：分裂後成長期 (G1 期) → DNA 複製期 (S 期) → 分裂前成長期 (G2 期) → 細胞分裂期 (M 期) → 分裂後成長期 (G1 期)。この細胞周期の進行は、サイクリン/CDK 複合体の周期的な会合、活性化、あるいは分解によって行われている。さらに、各段階が次の段階へ進むのに十分な条件を満たしているかどうかは、各々の段階の最終期にチェックされていると考えられている (チェックポイントの存在)。一方、生物には別にもう一つの重要な周期現象があると考えられている。これは概日リズムと呼ばれ、外部から時刻を知らせる因子が無い状態において、内因的に約 24 時間の周期で振動する現象である。これは生物がこの地球上で進化する過程において獲得された性質であると考えられる。

本研究は、これら生命活動に非常に重要な二つの周期現象すなわち細胞周期と概日リズムの関係を明らかにすることを目的としたものである。このために、ユーグレナをさまざまな外的条件下で培養した。とくに光照射条件を変えて細胞周期の進行を調べた。また DNA フローサイトメータ (FACS) を用いて、細胞集団が各時間ごとに細胞周期のどの段階にいるかも詳細に検討した。

第1章では、現在までになされて来た細胞分裂の概日制御に関する研究について述べられている。1958年に Sweeney と Hastings によって海産性渦鞭毛藻類 *Gonyaulax* の細胞分裂が内因性の概日時計によって制御されていることが発見されて以来、原核生物のシアノバクテリアからヒトの細胞まで多くの生物において広範囲な研究が行われてきている。特に、24 時間明暗周期による藻類の同調分

の同調分裂のメカニズムに、概日リズムが関与している否かという論点が未解決の問題として存在することが指摘されている。

第2においては1時間ごとの明暗周期において培養し、概日リズムが発現することを確認した状況において、どこにチェックポイントが存在するかを調べた。その結果、G1期からS期およびG2期/M期からG1期において、概日リズムによる制御が働いていることを明らかにした。これは、細胞周期に概日リズムによる制御が働くことを証明した初めての例である。3章においては、24時間明暗周期による藻類の同調分裂のメカニズムに、果たして概日リズムが関与している否かという問題に挑戦している。この論争点を解決するために、まず、25℃、3.7kluxの連続光で非同調分裂している細胞を24時間明暗サイクル(LD14,10)に環境を変えることによって、細胞分裂が24時間明暗周期に同調したリズムを示した。さらにその同調培養を不規則な光スケジュールに置いた。すなわち、14時間明期を8時間に短縮した時、連続暗期中で細胞集団は増殖を停止した。暗期中の培養における細胞分布はDNAフローサイトメータ(FACS)によって解析された。その結果、細胞はG1,S,G2+M期に存在していた。つまりG1/S、S/G2+M、G2+M/G1の移行に光依存性細胞周期チェックポイントがあることがわかった。次に、様々な長さの暗期に置いた後に6時間の光を照射した(光中断の作用)。この6時間光中断は、概日リズムの主観的夜明け、主観的真昼、主観的黄昏、主観的真夜中の4つの時間帯に行われた。その結果、主観的黄昏時の光中断によって細胞増加率は最大値を示した。一方、主観的夜明けの光中断では細胞増加は全く生じなかった。さらに注目すべきことに光中断による細胞増加率は、主観的黄昏にピークを、主観的夜明けにトローフを持つ概日リズムを示した。

以上のように本研究によって、細胞分裂は光刺激があればいつでも起こるのではなく、時刻特異的に起こることを明らかにした。このことは、概日時計が細胞周期進行における光反応性に関してチェックポイントの役割を果たしていることを示している。この事実は、光合成を行なう生物一般にも普遍化される可能性があり、概日リズムを有する光信号伝達系の存在を暗示するものとして植物生理学上の画期的な発見といえる。

本研究の成果は植物生理学分野の雑誌に投稿され、原著論文として公表される予定である。よって著者は、北海道大学(理学)の学位を授与される資格あるものと認められた。