

【論文内容の要旨】

申請者氏名 中 神 弘 史

【研究題目】 タバコサイクリンDの機能解析

【要 旨】

本論文では、タバコから単離した4種類のサイクリンD (*NtcycD3-1*, *NtcycD3-2a*, *NtcycD3-2b*, *NtcycD3-3*) の、細胞周期制御に関する重要な幾つかの因子との相互作用について詳細に検討した結果を記載した。

第1章では、タバコのサイクリンDの特徴付けおよび*in vitro*機能解析の結果を述べた。*NtcycD3-1*と*NtcycD3-3*のmRNA量はタバコ培養細胞の細胞周期を通じて一定であるが、*NtcycD3-2a*のmRNA量はG1/SおよびG2/M期に、*NtcycD3-2b*のそれはG2/M期に上昇した。この変動は高等植物のサイクリンDに特有のものであった。

タバコサイクリンDには、pRbとの結合に必要なLXCXE配列が保存されているが、タバコでもサイクリンDはタバコpRbと結合した。タバコのCDK (aおよびb) とサイクリンD遺伝子を、昆虫細胞内で発現させた。4種のサイクリンDはいずれもCDKaおよびCDKbと複合体を形成した。サイクリンD/CDKaはタバコpRb、ヒトpRbそしてヒストンH1に対してキナーゼ活性を示したが、CDKbとの複合体はキナーゼ活性がなかった。

次に、シロイヌナズナ由来のCAK (CDK-activating kinase) のホモログ (Cak1At) を用いて不活性なタバコのサイクリンD/CDK複合体を処理したところ、複合体はリン酸化により活性化された。

第2章では、タバコサイクリンDの*in vivo*での機能解析について記載した。タバコ培養細胞抽出液を*NtcycD3-1*と*Ntcyc25* (サイクリンA) に対する抗体で免疫沈降した結果、いずれも*in vivo*で抗PSTAIRES抗体で認識されるCDK-aと複合体を形成した。GFP融合サイクリンDを高発現させた形質転換タバコ培養細胞でも、他のサイクリンD (*NtcycD3-2a*, *NtcycD3-2b*, *NtcycD3-3*) もCDK-aと複合体を形成した。

植物細胞内の多様なサイクリン/CDK複合体と結合できるp13SUC1アフィニティービーズを用い、同調化したタバコ培養細胞のキナーゼ活性を解析した。G1/S期にNtRb1キナーゼ活性、G2/M期にヒストンH1キナーゼ活性が上昇した。*NtcycD3-1*/CDKのNtRb1キナーゼ活性はG1/S期に、*Ntcyc25*/CDKのヒストンH1キナーゼ活性はG2/M期に上昇した。

サイクリンDの細胞内局在性を、GFP融合サイクリンDを発現させた形質転換体を用いて解析した結果、*NtcycD3-1*は多くの細胞で核に局在化しており、CDKとの複合体のリン酸化が核への局在化にも関与していることが示唆された。

以上、高等植物における細胞周期制御機構に関する幾つかの重要な知見を得た。特に次の2点は画期的な成果である。1) 活性のある複合体を形成できるサイクリンとCDKの組み合わせを、高等植物において初めて明らかにした。2) 高等植物で初めてRbタンパク質に対するキナーゼ活性を検出した。

【論文審査結果の要旨】

高等生物の細胞増殖はG1/S/G2/M期を周期的に繰り返しているが、この周期の進行はプロテインキナーゼであるCDKと調節サブユニットである各種サイクリンにより制御されている。高等植物の細胞周期制御は不明な点が多く、本論文では、タバコから単離した4種類のサイクリンD遺伝子 (*NtcycD3-1*、*NtcycD3-2a*、*NtcycD3-2b*、*NtcycD3-3*) の、細胞周期制御に関する重要な幾つかの因子との相互作用について詳細に検討し、多くの新しい知見を得ている。

1) タバコのサイクリンDの特徴付けおよび*in vitro*機能解析を行い、*NtcycD3-1*と*NtcycD3-3*のmRNA量はタバコ培養細胞の細胞周期を通じて一定であるが、*NtcycD3-2a*のmRNA量はG1/SおよびG2/M期に、*NtcycD3-2b*のそれはG2/M期に上昇し、この変動が高等植物のサイクリンDに特有であることを示した。

2) タバコサイクリンDにはpRbとの結合に必要なLXCXE配列が保存されているが、*in vitro*で、これがタバコpRbと結合した。タバコのCDK (*a*および*b*) とサイクリンD遺伝子を、昆虫細胞内で発現させ、4種のサイクリンDがいずれもCDKaおよびCDKbと複合体を形成することを示した。サイクリンD/CDKaはタバコpRb、ヒトpRbそしてヒストンH1に対してキナーゼ活性を持つことを示した。

3) シロイヌナズナ由来のCAK (CDK-activating kinase) のホモログ (Cak1At) を用いて不活性なタバコのサイクリンD/CDK複合体を処理し、複合体はリン酸化により活性化されることを明らかにしている。

4) タバコ培養細胞抽出液を*NtcycD3-1*と*Ntcyc25* (サイクリンA) に対する抗体で免疫沈降した結果、いずれも*in vivo*で抗PSTAIR抗体で認識されるCDK-aと複合体を形成していることを明らかにしている。GFP融合サイクリンDを高発現させた形質転換タバコ培養細胞を用い、他のサイクリンDもCDK-aと複合体を形成することを示した。

5) 植物細胞内の多様なサイクリン/CDK複合体と結合できるp13SUC1アフィニティービーズを用い、同調化したタバコ培養細胞のキナーゼ活性を解析し、G1/S期にNtRb1キナーゼ活性、G2/M期にヒストン H1キナーゼ活性が上昇すること、*NtcycD3-1/CDK*はNtRb1キナーゼ活性がG1/S期に、*Ntcyc25/CDK*はヒストン H1キナーゼ活性がG2/M期に上昇することを明らかにした。

6) サイクリンDの細胞内局在性をGFP融合サイクリンDを発現させた形質転換体を用いて解析した結果、*NtcycD3-1*は多くの細胞で核に局在化しており、CDKとの複合体のリン酸化が核への局在化にも関与していることを示唆した。

以上、本論文は、高等植物における細胞周期制御機構に関する、幾つかの重要な知見を得ているが、特に次の2点、1) 活性のある複合体を形成できるサイクリンとCDKの組み合わせを、高等植物において初めて明らかにした、2) 高等植物で初めてRbタンパク質に対するキナーゼ活性を検出した、は画期的な成果である。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) 学位論文として価値あるものと認めた。