

論文内容の要旨

申請者氏名 平野博人

植物の細胞周期制御において、G1 期から S 期への進行はショ糖による刺激が必須であると考えられているが、詳細な機構は不明である。動物では G1/S 期の制御に E2F 転写因子を制御する RB (retinoblastoma) 経路が重要な役割を担っているが、植物にも RB 関連遺伝子 (*RBR*) が存在する。

本研究では、シロイヌナズナのゲノム中に 1 種類しかない *RBR* (*AtRBR1*) 遺伝子を中心に、ショ糖飢餓における細胞周期停止の分子機構の解析を行った。

増殖停止期のシロイヌナズナ培養細胞 MM2d (ほとんどの細胞が G1 期) を新鮮培地に植え継ぎ増殖を再開させる同調化を行い、G1 期から S 期へ移行時の *AtRBR1* の修飾状態を、作製した *AtRBR1* 特異抗体を用いて Western 解析により調べた。その結果、G1/S 移行期で高リン酸化状態の *AtRBR1* が増加した。異なるリン酸化状態の *AtRBR1* が共存する細胞抽出物を用いて MBP 融合 E2Fa に対する pull-down 実験から、高リン酸化型 *AtRBR1* は E2Fa と結合できないことを示した。*RBR* は *in vitro* において CDK の基質となることが分かっていたが、*in vivo* における翻訳後レベルでの修飾状態と機能を初めて明らかにした。

AtRBR1 の RNAi の DEX 誘導発現系を作成した。DNA ポリメラーゼ α 阻害剤のアフィディコリンで細胞を G1/S 期で同調化し、DNA 含量と G2/M 期マーカー遺伝子の発現を経時的に調べた。*AtRBR1* 発現を抑制すると G1 期で細胞周期が停止せず、G2 期の細胞の割合が増加したが、M 期移行は遅延した。G1 期の短縮と G2 期の延長により、細胞の倍加時間は変わらなかった。なお、細胞のサイズは小さくなった。

AtRBR1 抑制細胞をショ糖飢餓培地に植え換え、経時的に DNA 含量を測定した結果、経時的に G1 期の細胞が顕著に減少し、24 時間後には G1 期の細胞はほとんどなくなった。*AtRBR1* 発現を抑制しない対照細胞では、ショ糖飢餓培地で 36 時間後でも細胞数が増加せず、G1 期で停止している細胞が多かった。以上の結果から、通常ショ糖飢餓では G1 期で細胞周期が停止するが、*AtRBR1* を抑制した細胞では G1 期で停止せず、G2 期まで細胞周期が進行すると結論した。

プロモーター上に E2Fa 結合配列を持ち、E2Fa によって転写活性化される 6 遺伝子の発現挙動を調べた。*AtRBR1* を抑制しない細胞では、ショ糖飢餓でこれら遺伝子の転写は速やかに抑制されたが、抑制した細胞では転写が抑制されず、転写活性は高いまま維持されていた。これは *AtRBR1* の抑制により E2Fa の活性が抑制されなかった結果、ショ糖飢餓でも S 期に移行し、G2 期まで細胞周期を進行できると結論した。

以上、ショ糖飢餓での G1/S 移行期に対する *AtRBR1* の役割を初めて明らかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 平野博人

本論文は、植物の細胞周期制御において、G1 期から S 期移行の重要な因子であるシヨ糖と周期制御遺伝子の挙動について、シロイヌナズナ培養細胞 MM2d を用いて分子生化学的解析を行い、明解な結論を得ている。

- 1) G1 期にある増殖停止期の MM2d 細胞を新鮮培地に植え継ぎ、増殖を再開させる同調培養において、G1/S 期へ移行時の AtRBR1 の修飾状態を調べている。まず、AtRBR1 特異抗体を作製している。Western 解析の結果、G1/S 移行期で高リン酸化状態の AtRBR1 が増加することを明解に示した。異なるリン酸化状態の AtRBR1 が存在する細胞抽出物と MBP 融合 E2Fa を混ぜ、pull-down 実験の結果、高リン酸化型 AtRBR1 は E2Fa と結合できないことを示しているが、これは *in vivo* での最初の知見である。
- 2) 次に、DEX 誘導系を用いて、AtRBR1 の RNAi の発現を制御できる優れた系を作成している。アフィディコリンで G1/S 期に同調化した細胞の増殖を再開させた時、*AtRBR1* を抑制すると G1 期で停止せず、G2 期に移行するが、M 期移行は遅延した結果、細胞のサイズは小さくなり、倍加時間は変化しなかったことを示している。
- 3) シヨ糖飢餓培地に *AtRBR1* 抑制細胞を植え換え、経時的に DNA 含量を測定した結果、G1 期の細胞が顕著に減少し、24 時間後にはほとんど消失した。*AtRBR1* を抑制しない対照細胞は、シヨ糖飢餓培地では 36 時間後でも多数の細胞が G1 期にあった。以上の結果から、通常シヨ糖飢餓では G1 期で細胞周期が停止するが、*AtRBR1* 抑制細胞では G1 期で停止せず、G2 期まで細胞周期が進行すると結論している。
- 4) S 期進行に必須の転写活性化因子、E2Fa により発現誘導される 6 遺伝子を選び、AtRBR1、シヨ糖の発現への影響を調べている。*AtRBR1* を抑制しない細胞では、シヨ糖飢餓でこれら遺伝子の転写は速やかに抑制されるが、*AtRBR1* 抑制細胞では転写活性は高いまま維持された。*AtRBR1* を抑制すると E2Fa の転写活性化能が抑制されない結果、シヨ糖飢餓でも S 期に移行し、G2 期まで細胞周期を進行し、小サイズの細胞が増加すると結論している。

以上、本論文はシヨ糖飢餓での G1/S 移行期における AtRBR1 の役割を初めて分子レベルで明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。