

## 論文内容の要旨

申請者氏名 河村 和 恵

サイクリン D は真核細胞の細胞周期の G1/S 期移行を制御する重要な因子で、G1 期にサイクリン依存性キナーゼ(CDK)と複合体を形成し、CDK を活性化する。これが細胞周期を負に制御する Rb をリン酸化し、E2F の転写活性化を促進し、S 期へ移行させる。

本研究では、主に2つの相同性の高いタバコサイクリンD3遺伝子(*cycD3;1a*, *cycD3;1b*)を対象として、それらの機能分担の解析を行った。まずタバコ(*Nicotiana tabacum*)の祖先種を用いた解析から両者は異なる親株に由来するオルソログであった。タバコ培養細胞BY-2を同調化してRT-PCR法により発現解析した結果、両者はほぼ同様にG2期からM期に発現することが分かった。またどちらもmRNAとタンパク質の蓄積パターンが対応せず、タンパク質は周期を通じてほぼ一定であった。同調化したBY-2細胞を用いて各抗体で免疫沈降を行い、ヒストンH1とタバコRbを基質にCDK/CycD3複合体のキナーゼ活性を検出した。ヒストンH1に対する活性はG1/S期とG2/M期の両方で上昇したが、Rbキナーゼ活性はG1後期からS期に上昇した。*CycD3;1b*はヒストンH1とRbに同程度のキナーゼ活性を示すのに対し、*CycD3;1a*はヒストンH1を優先的にリン酸化し、両者で機能的な違いがあった。

次に細胞周期制御因子との *in vitro* の相互作用を解析した。他のサイクリンD3(*cycD3;3*)と合わせてタバコ CDK(CDKA, CDKB1)、CDK インヒビター(NtKIS1a)、Rb(NtRb1)に対して pull-down 解析を行った結果、3種サイクリンD3がすべての制御因子と結合し、CDKAのみならず CDKB1とも結合することが判明した。CDKB1は植物特有のCDKでG2/M期制御に関与することから、3種サイクリンD3がCDKB1と複合体を形成してG2/M期を制御する可能性が示唆された。また3種サイクリンD3の2アミノ酸をアラニンに置換したKEA変異体はCDKAとの結合が著しく低下したが、CDKB1との結合は変わらなかった。そこでGST融合サイクリンD3をBY-2細胞の抽出液と混合し、再構成したCDKとの複合体をpull-downにより精製する実験系を確立した。回収されたCDKをwestern解析したところ、野生型サイクリンD3ではCDKAとCDKB1が検出されたが、KEA変異体ではCDKB1のみが検出された。ヒストンH1とRbに対するキナーゼ活性は*CycD3;3*のKEA変異体以外で検出され、*CycD3;3*とCDKB1は不活性の複合体で、*CycD3;3*はCDKAのみと、*CycD3;1a*と*CycD3;1b*はCDKA及びCDKB1とキナーゼ活性を示す複合体を形成することが強く示唆された。

最後に一過性発現解析によりPCNA遺伝子の転写がE2F/DPと*CycD3;3*を導入することにより濃度依存的に促進され、導入Rbにより抑制されなかった。驚くことに*CycD3;3*のKEA変異体でもPCNA遺伝子の転写活性化が見られ、この活性化はE2F結合配列に依存した。*CycD3;3*のKEA変異体ではキナーゼ活性が検出されず、CDK活性に依存しないサイクリンD3による新規の転写活性化機構が推定された。本研究により、周期依存的に発現する*CycD3;1a*と*CycD3;1b*は、機能的な違いはあるが、CDKA及びCDKB1と活性複合体を形成してG1/S期とG2/M期を共に制御することが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 河村 和 恵

真核細胞の細胞周期の G1/S 期移行を制御するサイクリン D は G1 期にサイクリン依存性キナーゼ (CDK) と複合体を形成し、CDK を活性化する。この複合体が細胞周期を負に制御する Rb をリン酸化し、E2F の転写活性化を促進し、S 期へ移行させる。

本論文では、主に2つの相同性の高いタバコサイクリンD3遺伝子 (*cycD3;1a*, *cycD3;1b*) を対象として、それらの機能分担の解析、以下のことを明らかにしている。

- 1) タバコ (*Nicotiana tabacum*) の *cycD3;1a* と *cycD3;1b* は異なる親株に由来する。
- 2) タバコ培養細胞BY-2を同調化してRT-PCR法により発現解析し、両者ともG2期からM期に発現するが、タンパク質は周期を通じてほぼ一定である。
- 3) 同調化BY-2細胞から各抗体でCDK/CycD3複合体を免疫沈降させ、ヒストンH1とタバコRbに対するキナーゼ活性を検出した。H1に対する活性はG1/S、G2/M両期で上昇したが、Rbキナーゼ活性はG1後期からS期に上昇した。*CycD3;1b* はH1とRbに同程度のキナーゼ活性を示すのに対し、*CycD3;1a* はH1を優先的にリン酸化し、両者で機能的違いを認めた。
- 4) サイクリン D3 (*CycD3;1a*, *1b*, *3*) と細胞周期制御因子との相互作用を *in vitro* で解析した。タバコ CDK (CDKA, CDKB1)、CDK インヒビター (NtKIS1a)、Rb (NtRb1) に対して pull-down 解析を行い、3 種サイクリンがすべての制御因子と結合し、CDKB1 とも結合することを初めて明らかにした。CDKB1 は植物特有の CDK で G2/M 期制御に関与することから、3 種サイクリン D3 が CDKB1 と複合体を形成して G2/M 期を制御する可能性を示唆した。3 種サイクリンの 2 アミノ酸をアラニンに置換した変異体は CDKA との結合が著しく低下したが、CDKB1 との結合は変わらないという新知見を得た。
- 5) GST 融合サイクリン D3 を BY-2 細胞抽出液と混合し、再構成した CDK との複合体を pull-down により精製する実験系を確立し、ヒストン H1 と Rb に対するキナーゼ活性の検出を試みた。*CycD3;1a* と *CycD3;1b* は CDKA、CDKB1 両者と、*CycD3;3* は CDKA とキナーゼ活性を示す複合体を形成し、*CycD3;3*/CDKB1 は不活性型複合体であること初めて示した。*CycD3;1a*, *1b* の変異体でも CDKB1 とは活性型複合体を形成することは新たな発見である。
- 6) 一過性発現解析により *PCNA* 遺伝子の転写が E2F/DP と *CycD3;3* の導入により濃度依存的に促進された。*CycD3;3* 変異体でも *PCNA* の転写活性化が起こることは意外な発見であり、この活性化は E2F 結合配列に依存した。*CycD3;3* 変異体ではキナーゼ活性が検出されず、CDK 活性に依存しないサイクリン D3 による新規の転写活性化機構が想定される。

以上のように、本論文は周期依存的に発現する *CycD3;1a* と *CycD3;1b* は機能的な違いはあるが、CDKA および CDKB1 と活性複合体を形成して G1/S 期と G2/M 期を共に制御するという、植物の細胞周期制御に新たな知見を得たもので、学術上貢献するところが大きい。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。