

論文内容の要旨

申請者氏名 上 向 健 司

真核生物に高度に保存されている PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 遺伝子は G1/S 期に特異的に発現し、プロモーター上に E2F 結合配列が存在する。動物では G1/S 期特異的発現遺伝子は E2F 転写因子ファミリーにより正に、pRB により負に制御される。植物でも関連する因子は単離されているが、G1/S 期特異的に発現する遺伝子の発現制御の直接的な証明はない。本研究では、タバコの PCNA (*NtPCNA*) プロモーターの発現制御の分子機構について、タバコ BY-2 細胞を用いて解析した。

NtPCNA プロモーターの E2F 結合配列に変異を入れたプロモーターと *luciferase* (*luc*) の融合遺伝子を導入した BY-2 細胞を作製し、aphidicolin と propyzamide を用いた二段階同調および増殖再開によって細胞周期を同調化させた。経時的に *luc* の発現を RT-PCR により解析した結果、どの細胞でも *luc* は S 期マーカーである *histoneH4* より先行して発現し、G1/S 期に特異的であった。2ヶ所の E2F 結合配列のいずれに変異を入れても発現レベルが大きく下がっていたが、発現パターンは G1/S 期に特異的であった。E2F 結合配列は G1/S 期における発現レベルの上昇に作用し、細胞周期特異的な発現は他の因子により制御されることが示唆された。

NtPCNA プロモーターと G1/S 期制御因子との *in vitro* および *in vivo* 結合解析を行った。まず、NtE2F とタバコ DP (NtDP) は *in vitro* で結合することを確認した。プロモーターの 2 カ所の E2F 結合配列をそれぞれ含むオリゴ DNA を合成し、NtE2F、NtDP との結合をゲルシフト解析で調べた。どちらの DNA にも NtE2F、NtDP は単独では結合せず、両者の存在下で結合した。次に、*NtPCNA* プロモーター/*luc* 融合遺伝子、NtE2F、NtDP を BY-2 細胞に共導入し、*luc* の一過性発現による *in vivo* 解析を行った。その結果、NtE2F と NtDP は単独では転写活性化が見られず、共導入により活性化された。この転写活性はタバコの pRB (*NtRBR1*) の共導入により量依存的に抑制され、サイクリン D (NtcycD) により、抑制が解除された。しかし、サイクリン A や B では解除されなかった。以上のことから NtcycD は CDK と複合体を形成して NtRBR1 をリン酸化することによって、NtRBR1 と NtE2F との結合を解除することが示唆された。

NtE2F、NtDP、NtRBR1 がタンパク質複合体として E2F 結合配列に結合するか解析するため、*NtPCNA* プロモーターの 2 カ所の E2F 結合配列の DNA 断片を放射能ラベルしたプローブと *in vitro* 転写翻訳系で合成した 3 種のタンパク質との結合を調べた。その結果、タンパク質のどれか 1 つが欠けた場合や、両方の E2F 結合配列に変異を導入した DNA 断片では結合せず、3 タンパク質が複合体を形成して E2F 結合配列を有する DNA 断片と結合することが示された。

以上の結果は、G1/S 制御の分子制御機構を植物において初めて証明したものである。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 上 向 健 司

本論文は、真核生物に高度に保存されている G1/S 期の転写制御の pRB 経路が植物においても成立するか否かの分子機構を、タバコの代表的な G1/S 期特異的発現遺伝子 *NtPCNA* のプロモーターについて解析したものである。

1) *NtPCNA* プロモーターの E2F 結合配列に変異を入れたプロモーターと *luciferase* (*luc*) の融合遺伝子を導入したタバコ BY-2 細胞を aphidicolin と propyzamide を用いて細胞周期を同調化させた。経時的に *luc* の発現を RT-PCR により解析している。その結果、どの細胞でも *luc* は S 期マーカーである *histoneH4* より先行して G1/S 期に特異的に発現すること、2ヶ所の E2F 結合配列のいずれに変異を入れても発現が顕著に低下するが、発現パターンは変化しないことを示し、E2F 結合配列は G1/S 期における発現レベルの上昇に作用し、細胞周期特異的な発現は他の因子により制御されると結論した。

次いで、pRB 経路の種々の転写因子の作用を *in vitro*、*in vivo* で解析し、次のような興味深い結果を得ている。

2) NtE2F とタバコ DP (NtDP) は *in vitro* で結合する。

3) ゲルシフト解析において、プロモーターの 2 カ所の E2F 結合配列をそれぞれ含むオリゴ DNA に対し、NtE2F、NtDP は単独では結合せず、両者の存在下で結合する。

4) *NtPCNA* プロモーター/*luc* 融合遺伝子、*NtE2F*、*NtDP* を BY-2 細胞に共導入し、*luc* の一過性発現解析を行った結果、NtE2F と NtDP は単独では転写を活性化せず、共導入により活性化した。この活性化はタバコの pRB (*NtRBR1*) の共導入により量依存的に抑制され、サイクリン D (NtcycD) により、抑制が解除された。しかし、サイクリン A や B では解除されなかった。以上のことから NtcycD が CDK と複合体を形成して NtRBR1 をリン酸化することにより、NtRBR1 と NtE2F との結合を解除する動物の系が植物においても成り立つ。

5) *NtPCNA* プロモーターの 2 カ所の E2F 結合配列の DNA 断片を放射能ラベルしたプローブと *in vitro* 転写翻訳系で合成した NtE2F、NtDP、NtRBR1 との結合を調べた結果、3 タンパク質が揃わなければ DNA 断片には結合しない。また、E2F 結合配列が変異しても結合しない。

以上は、G1/S 制御の分子制御機構を植物において初めて証明した価値ある知見であり、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。