論文内容の要旨

申請者氏名 仲井智洋

真核生物の細胞周期進行には cyclin-dependent kinase (CDK)の正しい活性調節が必要で、CDK inhibitor は、その調節に重要な役割を担う阻害因子である。シロイヌナズナのゲノム上に CDK inhibitor と相同性を持つ遺伝子が 7 種類存在し、KRP 遺伝子と名付けられた。これまでシロイヌナズナ KRP の CDK との結合、cyclin/CDK のリン酸化活性の抑制が、酵母 two-hybrid 法やタンパク質の定性的解析により部分的に報告されているが、7 種類を総合的に解析した例はない。

本研究では 7 種のシロイヌナズナ KRP について、特に cyclin/CDK との相互作用、阻害能を比較解析し、*in vitro* 及び *in vivo* における KRP タンパク質の特徴を明らかにすることを目的とした。

- 1) シロイヌナズナのゲノム情報に基づき、7 種の KRP を *in vitro* 転写翻訳系で調製した。昆虫細胞発現系で調製した cyclin D2(CYCD2)/CDKA、CYCD2/CDKB との結合を調べた結果、すべての KRP は CYCD2、CDKA、CDKB 単独には結合せず、活性を示す CYCD2/CDKA と CYCD2/CDKB 複合体とのみ結合した。
- 2) CYCD2/CDKA および CYCD2/CDKB のヒストン H1 のリン酸化の阻害活性は KRP1-7 で差があり、KRP5 が最も低かった。KRP1 と KRP7 は CDKB 複合体に、より強い阻害活性を示した。
- 3) 昆虫細胞より調製した His タグ付きの CYCD2 を担体に吸着させ、シロイヌナズナ培養細胞 MM2d の対数増殖期の細胞抽出液と混合し、CYCD2 に結合する cyclin/CDK 複合体を調製した。これに KRP を加え阻害実験を行った。CYCD2-associated kinase に対する KRP の阻害活性は昆虫細胞から調製した CYCD2/CDK と同様な傾向で、KRP5 が最も低い阻害活性を示した。また、多種類の cyclin/CDK 複合体と結合する酵母の p13^{Suc1}-associated kinase に対してもすべての KRP が阻害活性を示したが、KRP1-7 の阻害の差は小さかった。
- 4) MM2d 細胞を同調化して p13^{Suc1}-associated kinase を調製したところ、時期により阻害活性が異なる KRP が認められたことから、それぞれの KRP は標的の cyclin/CDK によって阻害活性が異なる可能性が示唆された。
- 5) KRP の機能領域の解析を行った。KRP は C 末端側に相同領域がある。N 末端側を大きく欠いても阻害活性を有するが、相同領域を少しでも欠くと阻害活性を失った。相同領域に含まれる KYN(F/Y)D モチーフが阻害活性に重要で、KYYYD に代えると阻害能を失った。KRP が cyclin/CDK を阻害するためには、KYN(F/Y)D モチーフを含めた相同領域の全体が必要であると結論した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 仲井智洋

本論文は、シロイヌナズナのゲノム情報から推定される7種類の CDK inhibitor、KRP 遺伝子の機能を総合的に解析した以下の成果を述べている。KRP は真核生物の細胞周期進行の中心に位置するプロテインキナーゼ、cyclin-dependent kinase (CDK)の活性調節に必要な阻害因子である。

- 1) まず、シロイヌナズナのゲノム情報に基づき、7種の KRP を *in vitro* 転写翻訳系で調製し、一方それぞれを認識する特異抗体を取得した。
- 2) 7種の KRP タンパク質と昆虫細胞発現系で調製した cyclin D2(CYCD2)/CDKA、CYCD2/CDKB との結合を調べた結果、すべての KRP は CYCD2、CDKA、CDKB 単独には結合せず、活性を示す CYCD2/CDKA と CYCD2/CDKB 複合体とのみ結合すること示している。
- 3) 7種の KRP について、CYCD2/CDKA および CYCD2/CDKB のヒストン H1 のリン酸化の阻害活性を定量している。特に、KRP1 と KRP7 は CDKB 複合体に、強い阻害活性を示した。
- 4) 昆虫細胞より調製した His タグ付きの CYCD2 を担体に吸着させ、シロイヌナズナ培養細胞 MM2d から調製した CYCD2-associated kinase についても、KRP による阻害実験を行い、2)、3) と同様の結果が植物細胞でも起こっていることを示している。
- 5) 多種類の cyclin/CDK 複合体と結合する酵母の p13^{Suc1}-associated kinase に対してもすべての KRP が阻害活性を示したが、KRP1-7 の阻害の差は小さいこと、したがって CDK 複合体に含まれる因子により阻害に差が出ることを示唆している。また、同調化した MM2d 細胞を用い、各 KRP は標的の cyclin/CDK によって阻害活性が異なることを示唆している。
- 6) KRP の N 末端側を大きく欠失しても阻害活性があるが、C 末端側の相同領域を少しでも欠失させると阻害を失うこと、さらに、相同領域に含まれる KYN(F/Y)D モチーフを KYYVD に代えると阻害能を失うことから、KRP が cyclin/CDK を阻害するためには、KYN(F/Y)D モチーフを含めた相同領域の全体が必要であると結論している。

以上のように、本論文は7種のシロイヌナズナ KRP について初めて総合的に機能を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。