

## 論文内容の要旨

申請者氏名 原 島 洋 文

植物の細胞周期制御は A タイプサイクリン依存性キナーゼ (CDKA) が中心的な役割を果たすが、その活性化機構の知見は乏しい。本論文では、タバコ培養細胞 BY-2 を主対象に、細胞分裂と分化の接点として重要な G1/S 移行期に焦点を当て、CDKA の活性化機構を解析した結果を述べる。

- 1) 静止期のタバコ培養細胞 BY-2 を新鮮培地に植え継ぐと、CDKA タンパク質の蓄積量の増加と並行して p13<sup>suc1</sup> により精製したキナーゼの活性が上昇した。一方、オーキシンを除いた培地では、CDKA の蓄積量および活性は上昇せず、細胞伸長が観察された。ショ糖を除いた場合には CDKA の蓄積量、活性の上昇が認められなかった。以上の結果は、細胞分裂が正常に起こるには、ある閾値以上まで CDKA 活性の上昇が必要であることを示している。BY-2 細胞の CDKA 複合体をゲルろ過により分画した。オーキシンを除くと、正常に増殖している細胞で活性を示した高分子画分が減少することから、オーキシンは活性型の CDKA 複合体の形成にも重要であると思われる。
- 2) 同調培養による誘導発現において、G1/S 移行期に CDKA の Thr-161 のリン酸化とキナーゼ活性が上昇した。dominant-negative 型の D146N 変異体を誘導的に高発現させると、細胞分裂が停止したが、Thr-161 がリン酸化されない T161A 変異体の高発現では細胞分裂に影響はなかった。各 CDKA と CYCD3;3 との結合解析から、CDKA (D146N) の dominant-negative 効果は、内生の CDKA よりも CYCD3;3 などのサイクリンと CDKA (D146N) との高い親和性により引き起こされ、CDKA (T161A) は安定な複合体を形成できないために影響が出ないことが示唆された。
- 3) Thr-161 のリン酸化の生理的機能を、シロイヌナズナ CDKA の機能欠損型変異体の花粉形成能について解析した。CDKA (T161A)、またはリン酸化と同様の性質を持つ CDKA (T161E) を *cdka* 変異体に導入すると、正常な花粉形成を前者は相補しないが、後者は相補したことから、CDKA の機能には CDKA の Thr-161 のリン酸化が必須であると結論した。

以上、CDKA の活性化機構に関して、オーキシンが活性型 CDKA 複合体の形成に関与すること、CDKA の活性化は T-161 のリン酸化が必須であること、T-161 のリン酸化はサイクリンとの複合体の安定性ではなく、複合体形成後の活性化に関与すること、など、新規な知見が得られた。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 原 島 洋 文

本論文では、植物の細胞周期制御に中心的な役割を果たす、A タイプサイクリン依存性キナーゼ (CDKA) の活性化機構を、タバコ培養細胞 BY-2 の分裂増殖過程およびシロイヌナズナの花粉成熟過程を対象に解析した結果を述べている。

1) 静止期のタバコ培養細胞 BY-2 を新鮮培地に植え継ぐと、CDKA タンパク質の蓄積量の増加と並行してキナーゼの活性が上昇する。一方、オーキシンを除くと、CDKA の蓄積量および活性は上昇せず、細胞伸長が起こる。ショ糖を除いた場合には CDKA の蓄積量、活性の上昇が認められない。これらのことは、細胞分裂が正常に起こるには、ある閾値以上まで CDKA 活性の上昇が必要であることを示している。BY-2 細胞の CDKA 複合体をゲルろ過により分画し、オーキシン不在では、正常に増殖している細胞で活性を示した高分子画分が減少することから、オーキシンは活性型の CDKA 複合体の形成にも重要であると結論している。

2) BY-2 の長所である同調培養系を用いて CDKA を誘導発現させると、G1/S 移行期に CDKA の Thr-161 のリン酸化が起こり、キナーゼ活性が上昇することを見出している。 dominant-negative 型の D146N 変異体を誘導高発現させると、細胞分裂が停止するが、Thr-161 がリン酸化されない T161A 変異体では細胞分裂に影響がないという興味ある結果を得ている。そこで、各 CDKA と CYCD3;3 との結合解析を詳細に行い、CDKA (D146N) の dominant-negative 効果は、内生の CDKA よりも CYCD3;3 などのサイクリンと CDKA (D146N) との高い親和性により引き起こされ、CDKA (T161A) は安定な複合体を形成できないためであるという結論を得ている。

3) Thr-161 のリン酸化の生理的機能を、さらにシロイヌナズナ CDKA の機能欠損型変異体の花粉形成能について解析している。 CDKA (T161A) またはリン酸化と同様の性質を持つ CDKA (T161E) を *cdka* 変異体に導入したところ、正常な花粉形成を CDKA (T161A) は相補しないが、CDKA (T161E) は相補するという明解な結果を得、CDKA の機能には CDKA の Thr-161 のリン酸化が必須であると結論している。

以上のように、本論文はオーキシンが活性型 CDKA 複合体の形成に関ること、CDKA の活性化は T-161 のリン酸化が必須であること、T-161 のリン酸化はサイクリンとの複合体の安定性ではなく、複合体形成後の活性化に関与することなど、新規な知見を与え、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。