

## 論文内容の要旨

論文題目：Functional analysis of CDK-activating kinase in rice plant

(イネ CDK 活性化キナーゼの機能解析)

氏 名 山 口 雅 利

### 序論

主に胚発生以降に分裂組織において器官形成を行う植物は、分裂組織において細胞分裂活性が内的・外的なシグナルを受容して柔軟かつ厳密に制御されていると考えられる。細胞分裂を制御する、細胞周期において中心的な役割を果たしているのが、サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase; CDK) である。CDK はサイクリンと結合することにより活性化されるが、植物においても動物と同様に、一つの植物種から複数の CDK 及びサイクリンが単離されている。しかし、細胞分裂の制御機構を理解するためには、細胞周期の特定の時期のみに機能する個々の CDK やサイクリンだけではなく、CDK を上流で制御し、細胞周期全体を制御する因子を解析する必要がある。そこで、本研究では CDK の T-ループ領域に存在するスレオニン残基を特異的にリン酸化することにより CDK を活性化する、CDK 活性化キナーゼ (CDK-activating kinase; CAK) に注目した(図 1)。動物や分裂酵母においては、CAK の触媒サブユニット自身も CDK の一種であり、CDK7/p40<sup>MO15</sup> と呼ばれている。イネの CDK の一つである R2 は、動物の CDK7 と高い相同性を持つことが知られていたが、その機能については不明であった。そこで私は修士過程において、イネの CDK の一つである R2 が CAK としての活性を有することを見い出した。また、R2 は何らかの相互作用因子と複合体を形成することで、活性化されることも明らかにした。動物や分裂酵母ではサイクリン H が CDK7/p40<sup>MO15</sup> と結合することが知られている。そこで、博士過程では、R2 の活性制御機構を解明する目的で、イネよりサイクリン H をコードする cDNA を単離し、R2 との相互作用について解析をした。また、イネの CAK がどのようなシグナルによって制御されているかを明らかにする目的で、R2 及びサイクリン H 遺伝子を導入した形質転換タバコを作成し、植物ホルモンに対する応答性について解析を行った。

### 結果

#### 1. イネのサイクリン H 遺伝子の単離

ポプラの EST クローン(AF092743)がヒトのサイクリン H と高い相同性を持っていたことから、このクローンをを用いてイネの cDNA ライブラリーよりスクリーニングを行った。その結果、サイクリンポッ

クスと呼ばれるサイクリンに特徴的な領域において、ヒトのサイクリン H と約 60% の類似性を持つ 330 アミノ酸残基をコードする cDNA を単離した。Renaudin ら(1996)により提唱された植物のサイクリンの命名法に基づき単離した cDNA を *Os;cycH;1* と名付けた。*Os;cycH;1* は植物で単離されているサイクリン A、B 及び D とは相同性が低く、むしろ動物や酵母のサイクリン H と高い相同性を持っていた(図 2)。*Os;cycH;1* 遺伝子はイネゲノム中に 1 コピー存在しており、あらゆる組織から転写の蓄積が検出された。

## 2. *Os;cycH;1* による R2 の活性化機構の解析

*Os;cycH;1* と R2 の相互作用を検討する目的で、まず出芽酵母の two-hybrid システムを用いて解析を行った。その結果、R2 と *Os;cycH;1* の両遺伝子を導入した細胞は、ヒスチジン欠損培地上で生育し、β-ガラクトシダーゼ活性を持っていた(図 3)。R2 または *Os;cycH;1* のみを発現する細胞ではこのようなレポーター遺伝子の発現は見られなかったことから、この 2 つの遺伝子の転写産物は、酵母内において相互作用していることが確認された。次に *Os;cycH;1* と R2 の結合の特異性を調べるために、4 種類のイネ CDK の GST 融合タンパク質と *in vitro* で [<sup>35</sup>S]メチオニンで標識した 4 種類のイネサイクリンを用いて、pull-down アッセイを行った。その結果、*Os;cycH;1* は R2 とのみ結合し、他のイネ CDK とは結合しないこと(図 4-a)、一方 R2 は *Os;cycA1;1* 及び *Os;cycB2;2* とは結合せず、*Os;cycH;1* 及び *Os;cycC;1* と結合することが明らかとなった(図 4-b)。

つづいて、*Os;cycH;1* が R2 のキナーゼ活性を制御しているか否かを検討するために、まず出芽酵母の CAK である *cak1/civ1* の温度感受性変異株を用いて R2 及び *Os;cycH;1* 遺伝子を発現させ、得られた形質転換体の表現型を観察した(図 5)。R2 のみを発現させた細胞では、制限温度である 34°C において生育が観察されたものの、より高い温度では生育することができなかった。しかし、単独で発現した場合には抑圧活性を持たない *Os;cycH;1* と R2 を共発現させた細胞では、36°C においても生育することができた。これらの結果は、酵母内において *Os;cycH;1* が R2 による抑圧活性を上昇させたことを示唆している。次に、生化学的に R2 のリン酸化活性について検討を試みた。まず、それぞれ精製した R2 の GST 融合タンパク質と FLAG を付加した *Os;cycH;1*(FLAG-CycH)を混合し、Glutathione-Sepharose により GST-R2 タンパク質を沈降させた。この沈降物を用いて各基質に対するキナーゼアッセイを行ったところ、ヒトの CDK2 及びイネの Cdc2Os1 を基質に用いた場合、GST-R2 と FLAG-CycH の両者を含むレジンでは、GST-R2 のみを含むレジンよりも強いリン酸化活性が検出された(図 6-a)。また、T-ループ領域に存在するスレオニン残基をアラニン残基に置換した各 CDK を基質に用いた場合、このリン酸化は検出されなかった。このことから *Os;cycH;1* は CDK のこのスレオニン残基に対する R2 のリン酸化活性を上昇させることが明らかになった。また、転写の開始や伸長反応に関与する RNA ポリメラーゼ II の最大サブユニットの C 末端領域に存在する繰り返し配列(C-terminal domain; CTD)も R2 の基質となるが、この場合も FLAG-CycH を加えることにより R2 のリン酸化活性が上昇した(図 6-b)。

以上の結果より、今回新たに単離した *Os;cycH;1* は、R2 と特異的に結合することにより、R2 の CDK、CTD に対するリン酸化活性を活性化することが示唆された(図 7)。

## 3. R2 及び *Os;cycH;1* を導入した形質転換タバコホルモン応答性の解析

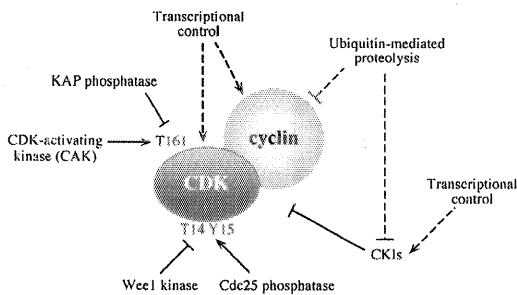
CAK の活性が植物細胞内でどのようなシグナルにより制御されているのか解析するために形質転換植物の作成を試みた。グルココルチコイド誘導性発現ベクターである pTA7001 に R2 の cDNA をクローン化し、タバコ SR1 株に導入した(図 8)。ホモ個体を選択し、R2 タンパク質の発現を確認したところ、グルココルチコイド誘導体であるデキサメタゾン(DEX)によって発現が誘導される 5 ラインを選抜した。その中で発現誘導がより強い R1-1 株を用いて、さらに *Os;cycH;1* cDNA を導入した。現在までに、R2 と *Os;cycH;1* の両遺伝子を DEX 依存的に発現するラインを 4 ライン得られている(図 9)。

これらの形質転換タバコホルモン応答性を検討するために、葉切片をサイトカイニン、オーキシンまたは両方を含む培地上で培養し、表現型を観察した(図 10)。野生型ではオーキシン(NAA)のみを含む培地上で根が誘導されるのに対し、R2 のみ及び R2 と *Os;cycH;1* の両方を導入した形質転換体では、カルスの形成が観察された。R2 のみよりも、R2 と *Os;cycH;1* の両者が発現している葉切片の方がカルスの生育が速いこと、また DEX の濃度依存的にカルス形成が誘導されることも確認された(図 11)。

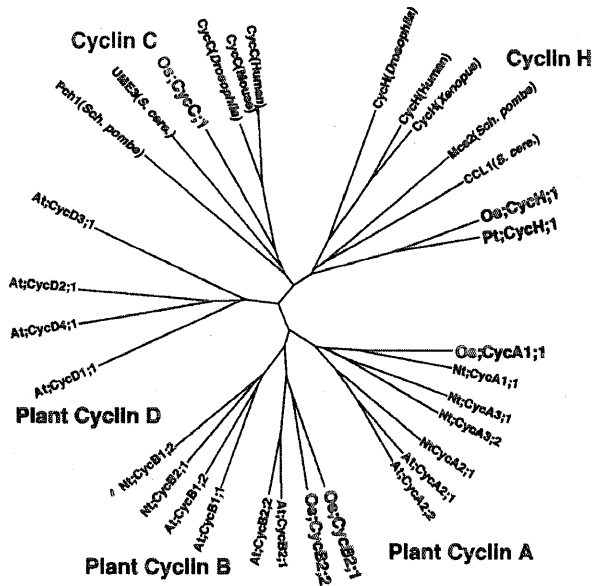
**考察**

本研究では、まずイネよりサイクリン H 遺伝子(Os;cycH;1)を単離した。Os;cycH;1 は R2 と特異的に結合することリン酸化活性を活性化することを明らかにした。これらの結果から Os;cycH;1 は細胞内において、R2 の活性型複合体の構成因子の一つとして機能していると推測される。

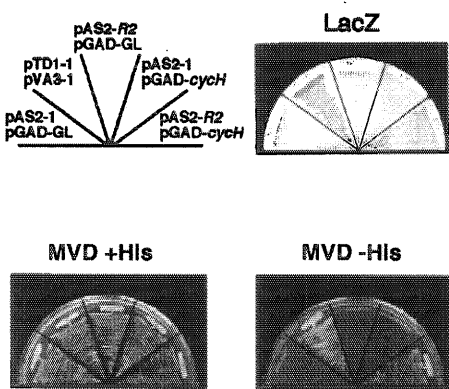
R2 及び、Os;cycH;1 を導入した形質転換タバコの葉切片をオーキシンのみ含んだ培地上で培養したところ、カルスの形成が観察された。この結果は、サイトカイニンのシグナル伝達の一部が CAK を介して細胞分裂を制御している可能性を示唆している。R2 の活性化には大きく分けて2つの制御が考えられる。すなわち、R2 もしくはサイクリン H 遺伝子の転写レベルによる制御、そして R2 のリン酸化による翻訳後の制御である。図1 2)。特に後者については、最近アラビドプシスにおいて CAK 活性化キナーゼ (CAKAK) の存在が示唆されており、イネにおいてもこのようなリン酸化カスケードが存在すると推測される。今後は、サイトカイニンによる R2、Os;cycH;1 の発現及び活性レベルの変化について詳細な解析を行い、CAK の活性化におけるサイトカイニンの役割について明らかにしていきたい。



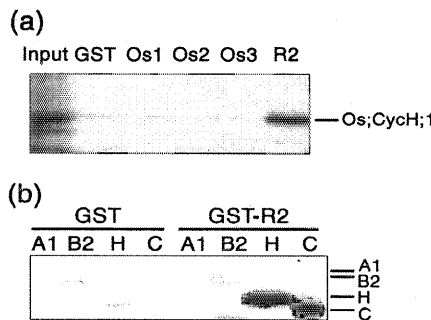
**図1** サイクリン依存性キナーゼ (CDK) の活性制御機構  
CDK は CDK 活性化キナーゼ (CAK) によって、161 番目のスレオニン残基 (T161) がリン酸化されると活性化され、Wee1 キナーゼによって T14 と Y15 がリン酸化されると、不活性化される。Cdc25 は Wee1 によってリン酸化されたアミノ酸残基を脱リン酸化することにより CDK を活性化する。アミノ酸残基の番号はヒトの Cdc2 を例にとって示してある。



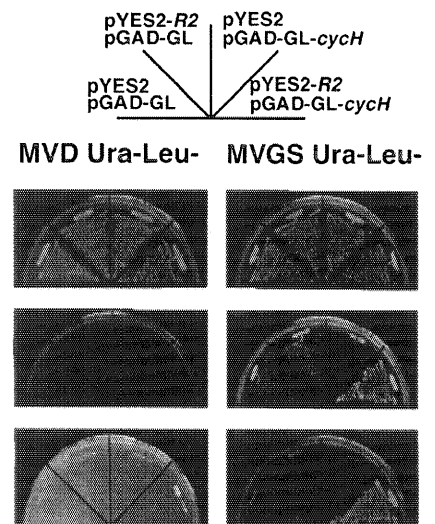
**図2** サイクリン H、サイクリン C 及び植物のサイクリンの系統樹  
イネのサイクリンを赤色で示す。



**図3** Two-hybrid 法による Os;cycH;1 と R2 の結合解析  
GAL4 タンパク質の DNA 結合ドメインを R2 に (pAS2-R2)、転写活性ドメインを Os;cycH;1 に (pGAD-cycH) それぞれ連結させた遺伝子を出芽酵母 Y190 株に導入した。形質転換体をヒスチジンを含む (+His) または含まない (-His) 最小培地で 30℃、3 日間生育させた。また、Filter-lift 法を用いて β-ガラクトシダーゼの発現を確認した (LacZ)。



**図4** pull-down 法による結合解析  
(a) [35S]メチオニンで標識した Os;cycH;1 に対して、Glutathione-Sepharose に吸着させたイネの GST-CDK 融合タンパク質をそれぞれ反応させた。レジンに吸着したタンパク質を SDS-PAGE で泳動し、オートラジオグラフィにより検出した。  
(b) [35S]メチオニンで標識したイネの各サイクリンに対して、Glutathione-Sepharose に吸着させた GST 及び、GST-R2 をそれぞれ反応させた。



**図5** Os;cycH;1 と R2 による出芽酵母の CAK 変異の抑圧活性の上昇  
ガラクトース誘導性プロモーターに R2 (pYES-R2) を、恒常的に発現するプロモーターに Os;cycH;1 (pGAD-GL-cycH) をそれぞれ連結し、出芽酵母 cak1/civ1 の温度感受性変異株 (GF2351 株) に導入した。各形質転換体をグルコース (MVD) またはガラクトース (MVGS) を含んだ最小培地に、許容温度 (27℃) 及び制限温度 (34℃、36℃) で 5 日間生育させた。

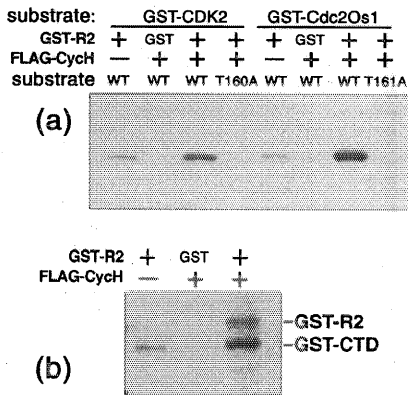


図6 *Os:CycH;1*によるR2のキナーゼ活性の上昇  
(a) GST-R2及びFLAG-CycHを図の組み合わせで混合し、Glutathione-Sepharoseで沈降させた。沈降したタンパク質を用いて、ヒトのCDK2、イネのCdc2Os1に対するキナーゼアッセイを行った。また各CDKのT-ループに存在するスレオニン残基をアラニンに置換して基質として用いた(T160A, T161A)。矢印は基質の位置を示す。  
(b) (a)と同様な処理をした後、アラビドプシスのCTDを基質としたキナーゼアッセイを行った。

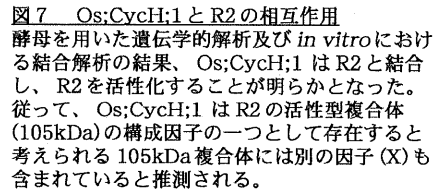


図7 *Os:CycH;1*とR2の相互作用  
酵母を用いた遺伝学的解析及び*in vitro*における結合解析の結果、*Os:CycH;1*はR2と結合し、R2を活性化することが明らかとなった。従って、*Os:CycH;1*はR2の活性化型複合体(105kDa)の構成因子の一つとして存在すると考えられる105kDa複合体には別の因子(X)も含まれていると推測される。

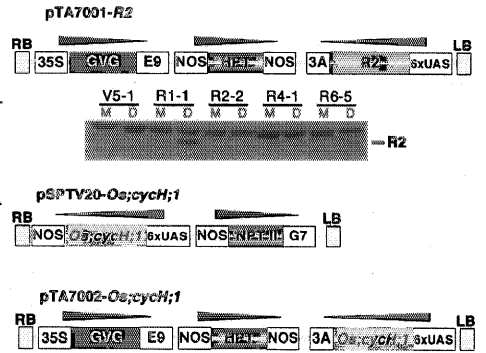


図8 形質転換タバコ作成用ベクターの構造  
GVG転写因子はグルココルチコイド(DEX)と結合することにより、シス領域と結合することができるようになる。pTA7001-R2を導入したタバコSR1株より、ホモ個体(Rライン)を選抜した。各個体のseedlingを1  $\mu$ M DEX含む培地(D)及びコントロール培地(M)で2日間生育させた後タンパク質を抽出した。抗R2抗体を用いてイムノブロット解析を行った結果、いくつかのラインにおいてDEX依存性的な発現誘導が見られた。R1-1のラインについては、GVG遺伝子を持たないpSPTV20-*Os;cycH;1*をさらに導入した。また、SR1株に、pTA7002-*Os;cycH;1*を導入した。

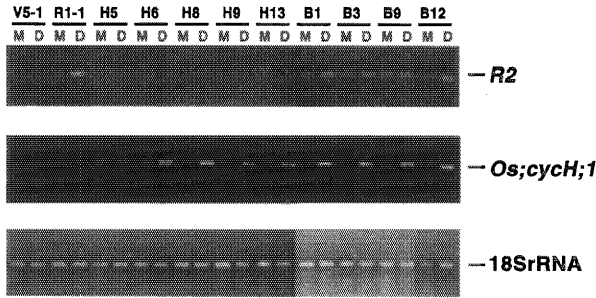


図9 形質転換体の発現解析  
ベクターのみ(V5-1)、R2(R1-1)、*Os;cycH;1*(H)及び、両遺伝子(B)を導入した形質転換体のseedlingをmock(M)もしくは1  $\mu$ M DEX(D)を含む培地に24時間移した後、RNAを抽出した。それぞれをR2及び*Os;cycH;1*、18S rRNAを特異的に増幅するプライマーを用いて、RT-PCRを行った。

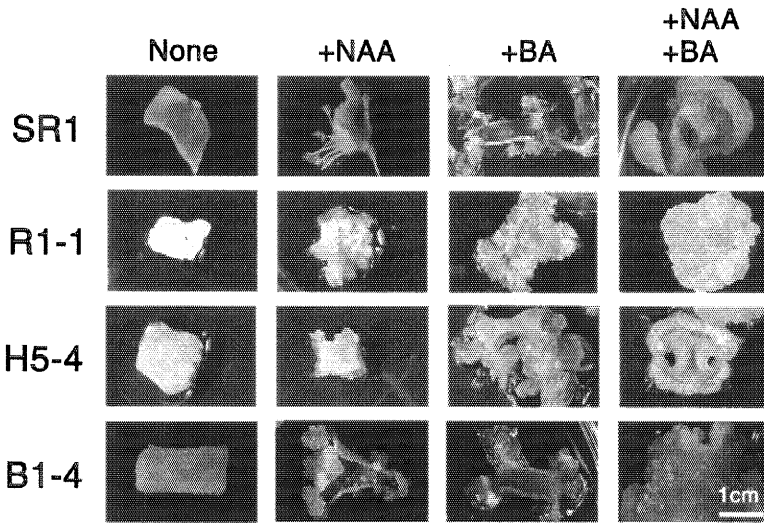


図10 野生型及び形質転換タバコを用いたリーフセクションアッセイ  
野生型(SR1)、R2(R1-1)、*Os;cycH;1*(H5-4)、または両遺伝子を導入した形質転換植物(B1-4)からリーフセクションを作成し、1  $\mu$ M DEXを含んだMS培地に2.0  $\mu$ g/ml NAAもしくは0.2  $\mu$ g/ml BAを加えたプレート上で25 $^{\circ}$ C、30日間生育させた。

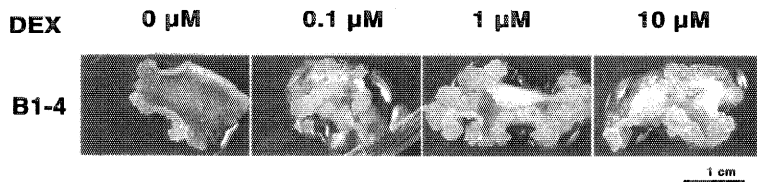


図11 オーキシン培地におけるカルス誘導とDEX依存性  
1.0  $\mu$ g/ml NAAそして各濃度のDEXを加えたプレート上に、B1-4ラインから作成したリーフセクションを30日間生育させた。

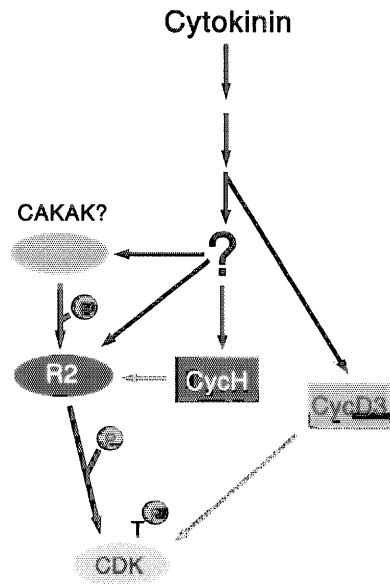


図12 サイトカイニンによるCAKの活性制御機構  
R2の活性化には大きく分けて2つの可能性がある。一つはR2または*Os;cycH;1*の転写量が増加する可能性、もう一つはCAK活性化キナーゼ(CAKAK)の活性化によりR2の活性が上昇する可能性である。サイトカイニンのシグナル伝達を実際にどのステップに受容されているかが、今後の重要な研究課題である。アラビドプシスのサイクリンD3(*At;cycD3;1*)はサイトカイニンにより転写産物量が増加するので、サイトカイニンのシグナル伝達の下流に位置すると考えられている(Riou-Khamlichi et al., 1999)。