

論文審査の結果の要旨

氏名 山口 雅利

本論文は植物における細胞分裂の活性化機構を明らかにする目的で、イネの CDK 活性化キナーゼ(CDK-activating kinase; CAK)である R2 の活性制御機構について詳細に解析を行っている。サイクリン依存性キナーゼ(Cyclin-dependent kinase; CDK)は、細胞周期の制御機構において中心的な役割を果たしており、様々な因子と相互作用することで活性が制御されていることが知られている。論文提出者は修士過程において、イネの CDK の一つである R2 が、他の CDK をリン酸化することで活性化させる CAK としての活性を有すること、またこの R2 は複合体を形成することで CAK 活性を有することを明らかにしている。

本論文は 2 章よりなり、第 1 章ではイネよりサイクリン H をコードする cDNA (*Os;cycH;1*) を単離し、R2 との相互作用について解析を行っている。この *Os;cycH;1* は、これまで植物で単離されていた A 及び B、D クラスのサイクリンとは配列上の相同性は低く、むしろ動物や分裂酵母のサイクリン H と高い相同性を持っていた。本論文ではまず、酵母の two-hybrid システムを用いて解析を行い、*Os;cycH;1* と R2 が酵母内において相互作用することを見い出している。また、イネより単離されている他の CDK およびサイクリンを用いて、*in vitro* pull down アッセイを行ったところ、*Os;cycH;1* は R2 とのみ特異的に結合し、他の CDK とは結合しないこと、また R2 についてもサイクリンとの結合に特異性を持つことが見い出された。

次に、本論文では *Os;cycH;1* が R2 のキナーゼ活性を制御しているか検討を行っている。まず、出芽酵母の温度感受性を示す CAK 変異株において *Os;cycH;1* および R2 を発現させたところ、*Os;cycH;1* が R2 の抑圧活性を上昇させることが見い出された。また、生化学的手法を用いて R2 のキナーゼ活性について解析を行っている。論文提出者は R2 の基質としてこれまでに、ヒトの CDK2、イネの CDK の一つ Cdc2Os1、そしてアラビドプシスの 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 (CTD) を同定しており、本論文では *Os;cycH;1* が各基質に対する R2 のリン酸化活性をそれぞれ上昇させることを明らかにしている。従って、*Os;cycH;1* はイネ細胞中において R2 の複合体の構成因子の一つとして存在し、R2 の活性化させる働きを持つものと推定された。植物では、どの CDK とサイクリンが結合するか殆ど明かにされておらず、本章の結果は CAK の制御機構について解析しただけでなく、植物における新たな CDK/サイクリン複合体を同定した点において

も価値があると考えられる。

第 2 章では、CAK の活性が植物細胞内において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、*R2*、*Os;cycH;1* もしくは両者を導入した形質転換植物体を作成している。本論文では、グルコルチコイド誘導性ベクターに *R2* および *Os;cycH;1* をクローン化し、タバコ SR1 株に導入しており、論文提出者は、グルコルチコイド誘導体であるデキサメタゾン(DEX)を処理することにより、導入した遺伝子が発現することを確認している。本論文では、これらの形質転換体の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、表現型を観察している。その結果、野生型およびベクターのみを導入した形質転換体では、オーキシンを (NAA) のみを含む培地上で根が誘導されるのに対し、*R2* を導入した形質転換体ではカルスの形成が観察された。このカルスの形成は DEX の濃度依存的に誘導されること、また *R2* のみ発現している葉切片よりも *R2* と *Os;cycH;1* を共発現している葉切片においてカルスの生育がより速い傾向にあることが見いだされた。これらの結果は、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。

本研究は、*R2* と特異的に相互作用し活性化させる因子を同定するとともに、サイトカイニンのシグナル伝達によっても活性が制御されている可能性を見い出している。これらの成果は、CDK を上流で制御する CAK の活性化機構の存在を見い出した点で、植物が持つ柔軟かつ厳密な細胞分裂の制御機構の解明に向けて重要な知見であると判断する。したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。

尚、本論文は梅田正明博士と内宮博文博士、また第 2 章については山村三郎博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。