

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成12年度博士課程入学

氏名 李 淨瓊

指導教官 堤 伸浩

論文題目 Analysis of molecular mechanisms controlling
the cell cycle in rice plants

(イネの細胞周期の制御機構に関する解析)

細胞の持つ最も基本的な機能の一つは、一個の細胞が全く同じ細胞を作る機能、すなわち細胞が分裂し増殖することである。増殖は細胞周期を基本としており、この細胞周期は、DNAを合成するS期、核分裂と細胞質分裂が起こるM期、S期とM期の間の分裂準備期にあたるG2期、M期とS期の間のG1期の4つのステージから構成されている。これらの各々のステージの移行はサイクリン依存性キナーゼ(cyclin-dependent kinase; CDK)と呼ばれるセリン・スレオニンキナーゼ群によって制御されている。植物は、細胞骨格の組織化や細胞質分裂の様式において動物や酵母とは異なる特徴をもつ、また、分化全能性に代表されるように植物独自の柔軟な細胞分裂と分化の制御機構を有している。したがって、細胞周期の制御機構においても分子機能がその成長制御において重要な役割を果たしていることが考えられる。そこで、本研究では、植物特異的なイネのBタイプCDK及びサイクリンBの機能解析を行い、それらの細胞増殖における分子機能について解析した。また転写因子E2Fにより発現制御を受ける遺伝子群について網羅的な解析を行い、細胞増殖・分化との関連性について考察した。

1. B2タイプCDKとサイクリンBによるM期の実現機構の解析

細胞周期のS-M期特異的に発現することが知られているCDKBは植物特有のCDKであるが、役割については全く解析が進んでいない。そこで、本研究ではイネのCDKBの一つであるCDKB2;1とそのサイクリンパートナーについて機能解析を行い、M期の実現機構との関連性について調べた。まず、CDKB2;1と複合体を形成するサイクリンを同定する目的で、イネの各種サイクリンを*in vitro*で転写・翻訳させ、CDKのGST融合たんぱく質を用いてpull-downアッセイを行なった。その結果、B2タイプのサイクリンであるCycB2;1とCycB2;2がCDKB2;1と結合することが明らかになった。さらに、このB2タイプのサイクリンは、AタイプのCDK(CDKA;1, CDKA;2)とは結合しないことから、これら二種類のサイクリンはCDKB2;1と特異的に結合することが示された。また、昆虫細胞を用いてCDKB2;1とサイクリンB2を発現させ、そのキナーゼ活性を調べたところ、CDKB2;1とCycB2;1(またはCycB2;2)の複合体が単量体のCDKB2;1よりも高いキナーゼ活性をもつことが明らかになった。したがって、2種類のサイクリンB2はCDKB2;1と特異的に結合しその活性を正に制御することが示された。

次にCDKB2;1およびCycB2;2のGFP融合タンパク質をタバコBY-2細胞で発現させ、M期の進行に伴う細胞内局在の変化について詳細に解析した。*CDKB2;1-GFP*、*CycB2;2-GFP*の両遺伝子はエストロゲンによって発現誘導できるpER8ベクターにクローン化し、タバコBY-2細胞に導入した。形質転換細胞はアフィディコリンにより同調化し、アフィディコリンの除去と同時にエストロゲンを添加して、分裂指数が最も高い7~9時間後(M期に相当)にGFPの蛍光を観察した。その結果、間期(G2期)とM期前期ではCDKB2;1-GFPは細胞質と核に、また、CycB2;2-GFPは核に局在した。核膜が崩壊する前中期では細胞質全体にCDKB2;1-GFPとCycB2;2-GFPの蛍光が見られ、CycB2;2-GFPは特に染色体で強い蛍光が観察された。そして、染色体が赤道面に並ぶ中期ではCDKB2;1-GFPは紡錘体と染色体に、またCycB2;2-GFPは染色体に局在していた。後期以降にはCDKB2;1-GFPはフラグモプラストと染色体に局在していたが、CycB2;2-GFPはシグナルが観察できなかった。したがって、CycB2-GFP融合タンパク質は中期以降に急速に分解すると考えられる。以上の結果から、CDKB2;1とCycB2;2はM期中期まで染色体での局在が一致することが明らかになり、これらの複合体は植物細胞のM期への移行とその進行を制御することが示唆された。

次に*CycB2;2*をグルココルチコイド依存的に過剰発現する形質転換イネを作成して、サイクリンB2の発現が細胞分裂に与える影響について調べた。形質転換イネの根の伸長速度を調べた結果、デキサメタゾン(DEX)で処理した植物では野生型やDEXで処理していない形質転換体に比べて根の伸長が速いことが明らかになった。その際、皮層細胞の長さはDEX

処理によりほとんど変化しなかったことから、細胞伸長には影響がないことが示された。前述のように *CycB2;2* は CDKA とは結合せず CDKB2;1 と特異的に複合体を形成するため、*CycB2;2* の過剰発現により CDKB2;1 が活性化され、その結果、根端分裂組織における細胞分裂が加速化したと考えられる。

2. 転写因子 E2F によって制御される遺伝子群の同定とその発現解析

動物では、転写因子 E2F が細胞周期の G1/S 期の移行において重要な役割を果していることが知られている。そこで、本研究では細胞分裂の活性化に伴う遺伝子発現の変化を解析する目的で、E2F により制御される遺伝子群の同定をおこなった。タバコの E2F 遺伝子 (*NtE2F*) をグルココルチコイド転写誘導系を用いてイネカルスに導入し、DEX 依存的に *NtE2F* を発現する系統を選抜した。懸濁培養細胞を確立し、それに 1 μ M DEX を加えて経時的に全 RNA を抽出しプルーフとして 8987 個のイネ cDNA クローンを含むアレイを使用した。その結果、約 320 個の遺伝子が *NtE2F* の発現により 2 倍以上に発現が増加し、その中には anaphase-promoting complex (APC) を調節する CDH1-D などの細胞周期遺伝子や、ホルモンシグナル伝達に関わる mitogen-activated protein などの遺伝子が含まれていることが明らかになった。

同定した遺伝子の中に NAC ドメインをもつ遺伝子が 3 種類含まれていたため、それらの遺伝子発現を個別に解析した結果、Index No. 2890 のクローンが *NtE2F* の発現に依存して転写産物量が増加することが明らかになった。そこで、この遺伝子についてイネの培養細胞における発現パターンを解析した結果、増殖が活発な 4 日から 8 日目にかけてその転写レベルが上昇することが明らかになった。また、細胞周期を G2/M 期で停止させるコルヒチン又は G1/S 期で停止させるアフィディコリンをイネ培養細胞に処理して解析した結果、この遺伝子の転写産物は G1/S 期を中心に蓄積することが明らかになった。次に、この遺伝子の分裂組織における発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析した結果、細胞分裂が活発な分裂組織周辺でその発現が観察された。これらの結果から、この遺伝子の発現は G1/S 期において直接または間接的に E2F の制御を受けている可能性が示唆された。

本研究により、植物特異的な CDKB2;1 と *CycB2* が複合体を形成し活性を持つこと、細胞周期の M 期中期まで染色体での局在が一致することが明らかになり、CDKB2;1-*CycB2* 複合体が植物細胞の M 期の実現機構に関与することが示唆された。また、*CycB2;2* を過剰発現する

形質転換イネを用いた解析から *CycB2;2* が根端分裂組織における細胞増殖を活性化させる要因となることが明らかになった。さらに転写因子 E2F の発現により発現量に変化する遺伝子の探索を行った結果、NAC ドメインをもつ遺伝子の一つが E2F により発現制御を受け、分裂組織などの細胞増殖が活発な組織で発現していることが明らかとなった。