

論文内容の要旨

論文題目 Functional Analysis of CDK-activating Kinases in
Arabidopsis thaliana

(シロイヌナズナ CDK 活性化キナーゼの機能解析)

氏名 下遠野 明恵

真核生物の細胞周期の進行には、サイクリン依存性キナーゼ(cyclin-dependent kinase; CDK)が中心的な役割を担っている。植物は動物とは明らかに異なる発生様式を示し、胚発生以降に分裂組織で器官形成を行なうだけでなく、様々な環境変化に対応するために細胞分裂と分化の制御においても柔軟性が見られる。このような植物特有の分裂と分化のバランスを制御する分子メカニズムを明らかにするには、CDK の活性を上流で制御する因子の解析が重要である。そこで私は CDK をリン酸化により活性化する CDK 活性化キナーゼ(CDK-activating kinase; CAK)に着目し、機能解析を進めている。CAK は細胞周期だけでなく、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(carboxy-terminal domain; CTD)をリン酸化することで、基本転写制御にも関わっている(図 1)。植物では、イネの R2 が動物の CAK の触媒サブユニット CDK7/p40^{M015} の機能的なホモログとして同定されている。一方、シロイヌナズナでは、出芽酵母の CAK 変異株の温度感受性を抑圧する因子として、CDK7/p40^{M015} とは基質特異性も一次配列も異なる CAK1At が単離されているが、動物タイプの CAK ホモログの存在は知られていなかった。そこで、私は博士課程において、シロイヌナズナから新たに 3 種類の CAK 相同遺伝子を単離し、それらの機能解析を行なった。さらに、同一生物種が複数個の CAK を持つのは他に例がないことから、シロイヌナズナの 4 種類の CAK について機能的役割を明らかにする目的で生化学的解析を行なった。

1. シロイヌナズナの CAK 遺伝子の単離

シロイヌナズナのゲノム配列情報を基に、cDNA ライブラリーを鋳型とした PCR により、まだ単離されていなかった CAK ホモログの cDNA (CAK2At, CAK3At, CAK4At) を得た(図 2)。CAK2At と CAK3At はイネの R2 と同様に、C 末端領域に動物や酵母の CAK にはみられない 60-70 アミノ酸からなる延長配列がみられた。これら 3 種類の CAK と CAK1At に特異的なプローブを用いてノーザン解析を行なったところ、CAK1At, CAK2At, CAK4At は分裂の盛んな懸濁培養細胞で最も高い発現が観察されたのに対し、CAK3At は調べた組織全てにおいて発現量の変化は殆ど観察されなかった。

2. CAK とサイクリン H の結合性とキナーゼ活性の解析

CAK はサイクリン H と結合することにより活性化される。そこで、シロイヌナズナのサイクリン H をコードする cDNA (*CycHAt*) を単離し、出芽酵母の two-hybrid システムを用いて、4 種類の CAK との結合解析を行なった。その結果、CAK2At、CAK3At、CAK4At はいずれも *CycHAt* と結合し、中でも CAK2At と CAK4At はより強く *CycHAt* と結合することが明らかになった (図 3)。それに対して、CAK1At と *CycHAt* の間の相互作用は検出されなかった (図 3)、サイクリン H との結合性においても CAK1At は他の CAK とは異なる性質をもつことが示された。

次に、CAK2At、CAK3At、CAK4At のリン酸化活性を検討するため、生化学的な解析を行なった。まず、昆虫細胞において、FLAG タグを持つ CAK を単独、もしくはヒスチジンタグを付加した *CycHAt* と共発現させた後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した画分を用いて、GST-CDK2 または GST-CTD に対するリン酸化アッセイを行なった。その結果、CAK2At と CAK4At はいずれも、*CycHAt* との共発現により CDK2 と CTD に対するリン酸化活性の増加がみられたが、CAK2At は CDK2 を、CAK4At は CTD をより強くリン酸化する傾向が観察された (図 4)。その一方で、CAK3At による両基質に対するリン酸化活性は、*CycHAt* の有無に関わらず検出されなかった (図 4)。したがって、現在のところ、CAK3At は不活性型の CAK であると考えている。さらに、CAK2At と CAK4At に対する特異的な抗体を用いてシロイヌナズナの粗抽出液を免疫沈降し、その沈降画分を用いて CDK2 と CTD に対するリン酸化活性を測定したところ、昆虫細胞の系と同様に、CAK2At は CDK2 を、CAK4At は CTD をより強くリン酸化することが確認できた (図 5)。また、CDK2 の T-ループのスレオニン残基をアラニンに置換した変異体では、リン酸化が見られなかったことから、CAK2At と CAK4At は CDK の T-ループのスレオニン残基を特異的にリン酸化することが明らかとなった (図 5)。したがって、CAK2At と CAK4At は CDK と CTD に対する基質親和性の観点から、他生物の CAK には見られないユニークな特長をもつことが示された。

次に、出芽酵母の CAK 温度感受性変異株を用いて相補性試験を行なったところ、制限温度下では CAK1At 単独もしくは CAK2At と *CycHAt* を共発現させた細胞で抑圧活性が見られた (図 6)。しかし、CAK2At 単独の場合や、*CycHAt* の有無に関わらず CAK3At や CAK4At を発現させた場合は、抑圧活性を示さなかった (図 6)。CAK4At が抑圧活性をもたないのは、上述のように CDK に対するキナーゼ活性が CAK1At や CAK2At と比べて低いこととよく合う結果である。

3. CAK を介した CDK、CTD のリン酸化カスケードの解析

高等生物において、同一生物種で複数個の CAK が単離された例は他に報告がない。分裂酵母では、CDK7/p40^{M015} の機能的ホモログとして *Mcs6* が同定されているが、最近、*Csk1* という因子が *Mcs6* をリン酸化し活性化することが報告された。そこで、シロイヌナズナに存在する複数個の CAK の相互関係を明らかにする手掛かりとして、分裂酵母の温度感受性変異株を用いた遺伝学的解析を行なった。まず、*csk1* と *mcs6* の二重変異株にシロイヌナズナの CAK cDNA を導入したところ、*CAK1At* のみ高い抑圧活性を持つことが明らかとなった (図 7)。ところが、*Csk1* は野生型で、*Csk1* によりリン酸化されるセリン残基 (S165) をアラニンに置換した *mcs6-SALR* 変異に対しては、*CAK1At* は抑圧活性を示さなかった。したがって、分裂酵母において *CAK1At* は *Mcs6* をリン酸化し活性化する活性を有することが示された。そこで、*CAK1At* が *CAK2At*、*CAK3At*、*CAK4At* に対するリン酸化活性をもつかどうかを生化学的

法により検討した。培養細胞由来の全タンパク質を抗 CAK1At 抗体により免疫沈降し、それを酵素として用いてリン酸化アッセイを行なったところ、CAK1At は CAK2At と CAK4At をリン酸化するのに対し、CAK3At はリン酸化しないことが明らかになった (図 8)。CAK2At と CAK4At の T-ループ領域内には 2 ケ所のリン酸化部位 (セリンおよびスレオニン残基) が存在する。そこで、これらをアラニン残基に置換した変異体を用いて、CAK1At によるリン酸化部位を検討したところ、CAK2At、CAK4At とともにセリン残基よりもスレオニン残基をより強くリン酸化することが明らかとなった (図 9)。この結果は、CAK1At が、CAK2At や CAK4At の T-ループ領域をリン酸化することにより、それらの活性化に寄与している可能性を示唆している。そこで、CAK1At のリン酸化による活性レベルの変化について、CAK4At を用いて検討した。まず、FLAG タグを持つ CAK4At を昆虫細胞中で発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行ない、次にその免疫沈降物に MBP-CAK1At を加えることにより CAK4At のリン酸化反応を行なった。その後、CAK1At を洗浄除去し、残った FLAG-CAK4At を含む画分を用いて CTD に対するリン酸化活性を測定した。その結果、予め CAK1At によりリン酸化させることで CAK4At の CTD に対するキナーゼ活性が、特に CycHAAt 非存在下において著しく上昇することが明らかとなった (図 10)。以上の結果は、少なくとも CAK4At の CTD キナーゼ活性は CAK1At によるリン酸化により活性化されることを意味している。現在、CAK2At の CDK キナーゼ活性に与える影響についても解析しているところである。

結論

本研究では、シロイヌナズナに 3 種類の CDK7/p40^{M015} ホモログが存在すること、また CAK2At と CAK4At はどちらもサイクリン H と結合する一方で、CDK と CTD に対するリン酸化活性に差があることを明らかにした。このことから、シロイヌナズナでは複数の CAK が細胞周期と転写をある程度の特異性をもって制御している可能性が示唆された。また、CAK1At は CAK2At と CAK4At をリン酸化する活性を有し、さらに、CAK4At の CTD キナーゼ活性はそのリン酸化により活性化されたことから、CAK1At は CAK 活性化キナーゼ (CAK-activating kinase; CAKAK) として機能していると考えられる (図 11)。つまり、CDK や CTD をリン酸化するカスケードが複数の CAK により構成されている可能性が示唆された。

今後は、*in vivo* での CAK1At による CAK2At や CAK4At のリン酸化および活性化の分子機構を明らかにするとともに、CAK1At がどのようなシグナルを受容してこのリン酸化経路を制御しているのか、さらに詳細な解析を進めていく予定である。

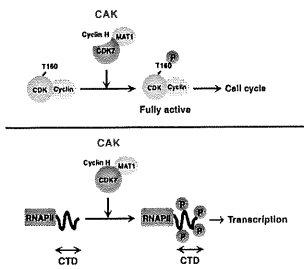


図1. CAKは細胞周期と転写を制御する。CAKはCDKのT-ループ領域のセリン/スレオニン残基をリン酸化することにより、CDKを活性化し、細胞周期を正に制御する。また、CAKは基本転写因子(TFIIH)の構成因子としてRNAポリメラーゼII(RNAPII)の最大サブユニットのC末端領域(CTD)を高度にリン酸化し転写調節にも関与する。スレオニン残基の位置番号はヒトのCDK2の場合を示した。

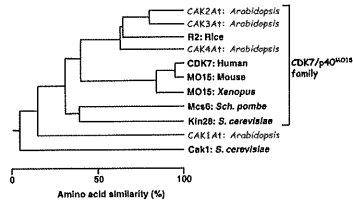


図2. シロイヌナズナと他の生物由来のCAKの系統樹。シロイヌナズナのCAKは赤色で示した。CAK1AtはCDK7/p40^{Mts}とは連続のCAKである。

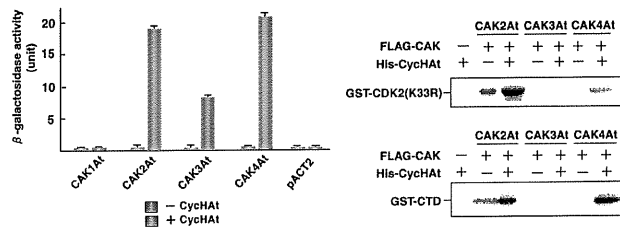


図3. 酵母のTwo-hybrid法によるシロイヌナズナのCAKとCycHAtの結合解析。GAL4タンパク質のDNA結合ドメインをCycHAtに、転写活性化ドメインをCAKにそれぞれ連結し、出芽酵母のY190株で発現させた。液体培養アッセイ法に従い、beta-galactosidase活性を測定した。値は独立に行なった3回の測定結果の平均値を示した。CycHAtを発現しないコントロールとしてベクター(pAS2-1)を導入したものを示した。

図4. CAKによるCDK及びCTDに対するリン酸化活性の解析。FLAGタグを付加したCAKとヒスチジンタグを付加したCycHAtを昆虫細胞で発現させ、抗FLAG抗体による免疫沈降画分を用いてGST-CDK2(上段)とGST-CTD(下段)に対するリン酸化アッセイを行った。

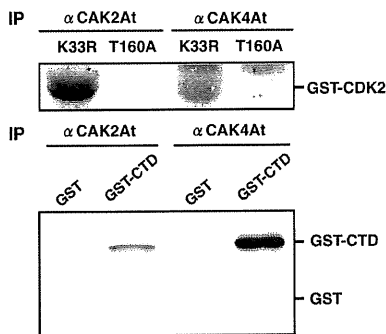


図5. CAK2At及びCAK4Atの免疫沈降物を用いたリン酸化活性の解析。シロイヌナズナの培養細胞から抽出したタンパク質を抗CAK2At及びCAK4At抗体で免疫沈降し(IP)、その沈降画分を用いてリン酸化アッセイを行った。CDK2の自己リン酸化活性を阻害する目的で、活性中心に変異を導入したもの(K33R)とT-ループのスレオニン残基に変異を導入したもの(T160A)、およびGST-CTDを基質とした。

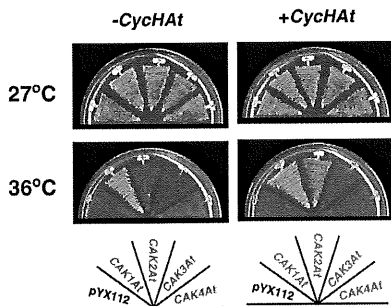


図6. シロイヌナズナのCAKによる出芽酵母のCAK温度感受性変異株の相補性試験。恒常的に発現するプロモーターにCAKとCycHAtをそれぞれ連結し、出芽酵母のCAK温度感受性変異株に導入した。得られた形質転換体は、許容温度(27°C)と制限温度(36°C)で4日間培養した。コントロールとしてベクター(pYX112)を導入したものを示した。

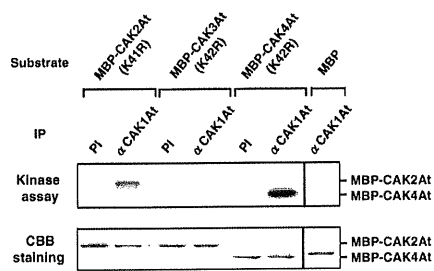


図8. CAK1AtはCAK2AtとCAK4Atをリン酸化する。シロイヌナズナの培養細胞から抽出したタンパク質を抗CAK1At抗体で免疫沈降し(IP)、その沈降画分を用いてMBP-CAK融合タンパク質を基質としたリン酸化アッセイを行った。基質の自己リン酸化活性を阻害する目的で、活性中心に変異を導入したもの(K41R)または(K42R)を用いた。コントロールとして免疫前血清(PI)による免疫沈降物を用いた。

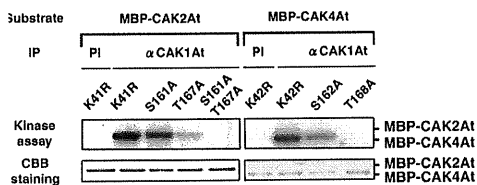


図9. CAK1AtはCAK2AtとCAK4AtのT-ループ領域のセリン・スレオニン残基をリン酸化する。シロイヌナズナの培養細胞から抽出したタンパク質を抗CAK1At抗体で免疫沈降し(IP)、その沈降画分を用いてリン酸化アッセイを行った。CAK2AtとCAK4Atで保存されているT-ループ領域の161番目または162番目のセリン残基および167番目または168番目のスレオニン残基をそれぞれアラニン残基に置換したMBP融合タンパク質を基質として用いた。コントロールとして免疫前血清(PI)による免疫沈降物を用いた。

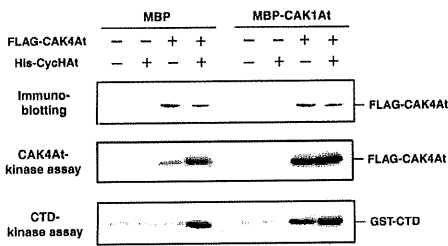


図10. CAK1AtはCAK4Atをリン酸化し活性化する。昆虫細胞の系でFLAG-CAK4AtとHis-CycHAtを発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降させた画分を用いてリン酸化アッセイを行った。イムノブロット解析により沈降画分に含まれるCAK4Atの量を確認し、MBP-CAK1Atを加えて1回目のリン酸化反応を行った。反応後にMBP-CAK1Atを洗浄除去し、GST-CTDに対するリン酸化活性を検出した。

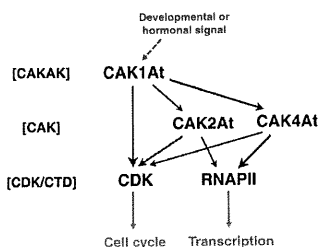


図11. シロイヌナズナのCAKを介したリン酸化カスケード。シロイヌナズナには複数個のCAKが存在し、CAK1AtがCAK2AtやCAK4Atの活性を上流で制御するCAK活性化キナーゼ(CAKAK)として機能しているものと考えられる。