

## 論文審査の結果の要旨

氏名 下遠野 明恵

本論文は植物における細胞分裂の分子レベルでの制御機構を明らかにする目的で、シロイヌナズナの CDK 活性化キナーゼ(CAK)群の個々の因子における機能的役割について詳細な解析を行ったものである。

真核生物の細胞分裂は、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)の活性によって制御されている。シロイヌナズナのゲノムにも数多くの CDK 遺伝子が存在し、分化の時期やそれに伴う器官形成を決定する際には、転写・翻訳レベルにおいてこれらの因子が緻密に制御を受けていると考えられる。CAK はこれら CDK のリン酸化を触媒することで、これらの最大活性化に寄与すると考えられているが、植物の CAK の機能はもとより、CAK 自身の活性が上流からどのように制御されているのかという知見は得られていない。論文提出者は、植物細胞の分裂と分化における CAK の役割を明らかにする目的でシロイヌナズナの 4 種類の CAK(CAK1At~CAK4At)に着目し、生化学的・遺伝学的解析を行った。その結果、これら複数の CAK がリン酸化カスケードを形成していることを明らかにした。

本論文は 2 章で構成されており、第 1 章では、新規な CAK である CAK4At を単離し、計 4 種類の CAK 相同因子の発現解析や活性測定を網羅的に行うことで、シロイヌナズナに複数の CAK が存在することを示した。さらに、シロイヌナズナの CAK 遺伝子の発現がいずれも細胞分裂非依存的であることから、基本転写と細胞分裂の両側面を制御する他の生物種の CAK と同じ挙動を示すことを明らかにした。次に論文申請者は、植物細胞内での機能的役割を明らかにする目的で、シロイヌナズナの培養細胞の粗抽出液を用いて CAK の活性測定を行った。その結果、CAK2At と CAK4At は CAK の基質として知られる CDK2 と RNA ポリメラーゼ II の最大サブユニットの C 末端繰り返し配列 (CTD) に対し、異なる親和性を示すことを報告している。このように、本論文は高等生物において複数の CAK が存在することを初めて明らかにしただけでなく、植物における細胞周期や転写制御が、動物とは異なり基質親和性の異なる複数の CAK によって制御されていることを示唆した点においても価値が

あると考えられる。

第2章では、論文申請者は CAK 複合体の制御サブユニットとして知られるサイクリン H を単離し (At;CycH;1)、シロイヌナズナの CAK との相互作用について解析を行った。この因子は、ポプラやイネのサイクリン H との相同性が高く、機能的にも類似したタンパク質であることが推測された。酵母の Two-hybrid の系を利用した結合解析および組み換えタンパク質を用いた活性測定を行った結果、At;CycH;1 との相互作用が CAK2At と CAK4At の活性に大きく寄与していることを示した。対照的に、CAK1At の示す At;CycH;1 非依存的な CDK に対する強いリン酸化活性は、CAK1At が従来高等生物で単離されている CAK との一次構造上の差異のみならず、機能的にも異なる因子であることを意味する。実際に、生化学的な解析結果でも、それぞれの CAK が基質特異性の異なる独立したタンパク質複合体を *in vivo* で形成しており、上述の作業仮説を裏付ける結果を示した。さらに申請者は、CAK1At の免疫沈降物が CAK2At と CAK4At の活性に必要な特定残基を特異的にリン酸化することで、CAK1At が動物の CAK と近縁な CAK2At や CAK4At の活性制御に深く関わっていることを明らかにした。また *in vitro* における CAKAK アッセイの結果、CAK4At の CTD キナーゼ活性が CAK1At のリン酸化によって正に制御されることを示すと共に、分裂酵母の CAK 温度感受性変異株を用いた相補性試験の結果から、CAK1At が酵母内で CAK を活性化する CAK 活性化キナーゼ (CAKAK) として機能していることを明らかにした。

本研究は、シロイヌナズナにおける複数個の CAK の生化学的役割の相違を示しただけでなく、複数の性質の異なる CAK がリン酸化を介したカスケードを形成し、植物細胞の分裂と分化の分子機構を柔軟に制御している可能性を強く示唆した点において非常に価値があると考えられる。

なお、本論文は内宮博文博士と梅田正明博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断し、ここに博士 (理学) の学位の授与を認める。