

論文内容の要旨

論文題目 : Functional analysis of cyclin D4 in *Arabidopsis thaliana*
(シロイヌナズナサイクリン D4 の機能解析)

氏名 : 河野 淳

<序論>

真核生物では、サイクリンとサイクリン依存性キナーゼ (CDK) からなるキナーゼ複合体を中心とした制御機構が、秩序立った細胞分裂を可能にしている。多細胞生物においてはこうした細胞レベルの分裂制御が不可欠だけでなく、組織内での分化状態に応じて細胞の分裂方向や分裂頻度を厳密に制御することが器官形成を継続していく上で重要である。特に高等植物は主だった形づくりが胚発生以降に行われることから、外部環境に適応した柔軟な細胞分裂の制御が要求される。こうしたことから、細胞が分裂周期に入るのか否かを決定するとされる G1/S 期の進行に關与するサイクリン D (CYCD) は、植物個体発生において重要な役割を持つと考えられる。

全ゲノム配列が明らかになったシロイヌナズナには 10 個の CYCD 遺伝子が存在し、動物と同様に Rb タンパク質をリン酸化することで S 期への進行を促すと考えられている。しかし、現在までの研究は CYCD2;1 と CYCD3;1 に関するものが主であり、その他多くの CYCD の分子機能については未知の部分が多い。そこで私は、植物の組織形成における CYCD の機能分化について明らかにする事を目的とし、サイクリン D4 (CYCD4) の解析を行った。CYCD4 は *CYCD4;1* と *CYCD4;2* の二つの遺伝子からなり、ゲノム上の存在位置からこの二つの遺伝子は重複によって生じたと考えられる。しかし、CYCD4;1 には CYCD に保存されている Rb 結合配列と PEST 配列の両者が認められるのに対し、CYCD4;2 にはそのいずれの配列も存在しない。そこで、本研究では CYCD4;2 を中心とした解析を行い、気孔形成における機能的役割について明らかにした。

< 結果と考察 >

1 . サイクリン D4;2 の分子機能の解析

まずCYCD4がサイクリンとして機能しうるか明らかにする目的で、酵母G1サイクリン欠損株DL1の相補実験を行った(図1)。その結果、CYCD4;1、CYCD4;2共にG1サイクリン欠損変異の相補能を有することが明らかとなり、CYCD4が酵母細胞においてサイクリンとして機能しうることが示された。

次に昆虫細胞の発現系を用い、CYCD4がどのタイプのCDKを活性化するのか解析した。植物には細胞周期を直接制御するCDKとしてCDKA、CDKB1、CDKB2の三種類が存在する。CYCD4;1に関しては修士課程においてCDKA;1とCDKB2;1の活性化能を有することを明らかにしており、本研究においてはCYCD4;2に関して同様の解析を行った。その結果、CYCD4;2は3種類すべてのCDKと複合体を形成するものの、CDKA;1との複合体にのみヒストンH1に対する強い活性が検出されたことから、CYCD4;2はCDKA;1の活性化能を有していることが示された。続いて、HAまたはFLAGタグをそれぞれ付加したCYCD4;1、CYCD4;2をシロイヌナズナ植物体で過剰発現させ、特異的な抗体を用いて免疫沈降したところ、沈降した複合体はCDKA;1を含むと共に、ヒストンH1に対する活性が検出された(図2)。以上の解析から、CYCD4は*in vivo*でCDKAの活性化能を有することが示された。

続いて、組織レベルでのCYCD4;2の発現部位を明らかにする目的で、CYCD4;2のプロモーター領域(約2500bp)から第2エキソン途中までの領域をGUS(β -glucuronidase)遺伝子と連結し、シロイヌナズナ植物体に導入した。その結果、茎頂、根端分裂組織ではプロモーター活性が検出されず、根の中心柱や暗所芽生えのフック、明所芽生えの胚軸で活性が検出された。これは、植物体において最も分裂が盛んであるメリステムではCYCD4;2は発現せず、ある程度分化した組織で発現することを示唆している。

2 . 気孔形成におけるサイクリン D4 の機能解析

CYCD4;2をタバコBY-2細胞で過剰発現させたところ、細胞周期進行に全く影響を与えなかった。これは、CYCD4;2が活発に増殖している細胞において主要な役割を担っていないことを示唆している。そこで、シロイヌナズナの過剰発現体やT-DNA挿入変異体の解析を行った。いずれの過剰発現体、挿入変異体とも巨視的には目立った表現型は示さなかった。また、過剰発現体においてフローサイトメーターにより核相を調べたところ野生型との違いは検出されず、CYCD4はエンドリデュプリケーションには関与しないと考えられた。シロイヌナズナのCYCD2;1過剰発現タバコではG1/S期の短縮による細胞周期の加速化が観察され(Cockcroft et al, 2000)、CYCD3;1の過剰発現ではプロイデューの低下が観察されている(Dewitte et al, 2003)。こうした結果から、植物細胞においてCYCD4は他のCYCDとはかなり異なる機能を有している可能性が予想された。

このように巨視的な表現型は観察されない一方で、CYCD4;1およびCYCD4;2の過剰発現体では胚軸上部の気孔を形成する表皮細胞列で細胞分裂が亢進していることを見出した(図3)。この細胞分裂

の亢進は成熟胚では観察されず、発芽後1日で顕著に観察された。またそれに伴って過剰発現体では胚軸の気孔数が増加し、逆に T-DNA 挿入変異体において気孔数が減少することが明らかになった(図4)。プロモーター-GUS を用いた解析では *CYCD4;2* は確かに胚軸上部において発現していたが、細胞列特異的な発現は観察されなかった。一方、本葉においても *CYCD4;1* 過剰発現体では気孔数と表皮細胞数の増加、*CYCD4;2* 過剰発現体では表皮細胞数の有意な増加が観察された。

気孔は二つの孔辺細胞からなり、原表皮細胞がメリステモイド母細胞、メリステモイドを経て孔辺細胞に分化することにより生み出される構造であり、細胞分裂がその形成に不可欠である。こうした気孔を生み出す細胞系譜 (stomatal lineage) は原表皮細胞が一種の幹細胞としての性質を獲得するところから始まる。この stomatal lineage にある細胞のマーカー遺伝子として *TOO MANY MOUTHS (TMM)* という遺伝子が知られている。先行する研究は主に本葉の気孔に関するものであったため、本研究においてまず胚軸の気孔形成における *TMM* の発現解析を行った。プロモーター-GFP を用いた経時的な観察により、メリステモイド母細胞は *TMM* を発現している細胞が分裂して生成されることが明らかになった。これは、胚軸の stomatal lineage において幹細胞の段階から *TMM* が発現していることを意味している。続いてレポーター遺伝子 GUS を用い、*CYCD4;2* 過剰発現植物体での *TMM* の発現様式を観察した。野生型、過剰発現体ともに発芽前の成熟胚の胚軸において既にパッチ状に *TMM* が発現しているが、過剰発現体では発芽後の分裂亢進によりタンデムに並んだ小型の細胞において連続した *TMM* の発現が観察された(図5)。この結果は *CYCD4* の過剰発現により、幹細胞が幹細胞を作る、いわゆる self-renewal のプロセスが活性化されたことを示している。以上の結果から、*CYCD4* が stomatal lineage における細胞分裂の正の制御因子であり、特に胚軸の気孔を生み出す幹細胞の分裂に関与していることが明らかになった(図6)。

<まとめと展望>

本研究により、*CYCD4* は CDKA と結合し活性化するサイクリン本来の機能を有すること、分裂組織における細胞分裂やエンドリデュプリケーションには関与しないこと、胚軸の気孔を生み出す幹細胞の分裂を正に制御することを示した。

今後は、気孔形成を制御する上流のシグナル伝達を踏まえた上で、*CYCD4*-CDKA 複合体の基質を探索し、その機能解析を通じて幹細胞の生成・維持機構について分子レベルで理解することが重要だと考えられる。

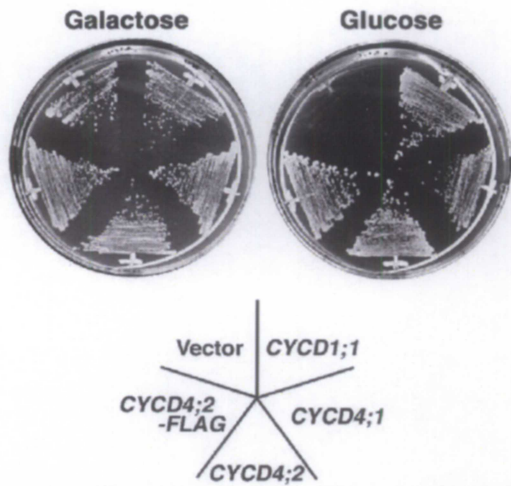


図1 出芽酵母 DL1 株 (*cln1 cln2 cln3 GAL1::CLN2*) の相補実験
シロイヌナズナ *CYCD1;1*, *CYCD4;1*, *CYCD4;2*, *CYCD4;2-FLAG* を恒常的に発現させ、ガラクトースを含む培地と含まない培地で4日間それぞれ生育させた。

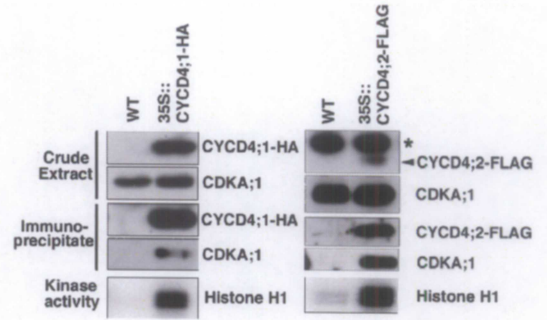


図2 *CYCD4* 過剰発現シロイヌナズナを用いた CDK-CYCD4 複合体の解析 HA タグを付加した *CYCD4;1*, FLAG タグを付加した *CYCD4;2* を 35S プロモーターにより植物体で過剰発現させ、タンパク質粗抽出液をそれぞれ抗 HA 抗体、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。免疫沈降物に関してイムノプロット解析を行うと共に、ヒストン H1 を用いたキナーゼアッセイを行った。*は抗 FLAG 抗体により認識された非特異的なシグナルを示す。

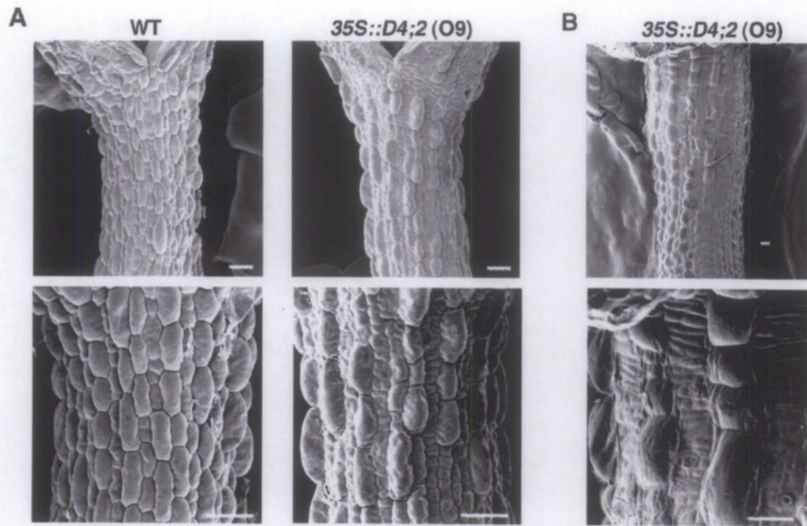


図3 *CYCD4* の過剰発現による胚軸表皮細胞の分裂亢進 *CYCD4;2* の過剰発現体 (O9) の発芽後4日目 (A)、14日目 (B) の走査型電子顕微鏡による胚軸表皮細胞像。下図は胚軸上部の拡大。スケールバー: 50 μ m

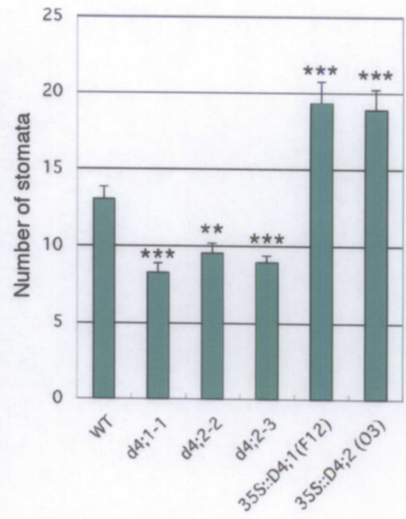


図4 *CYCD4* の過剰発現体と T-DNA 挿入変異体における胚軸気孔数 発芽後11日目の植物体を透明化処理し、胚軸縦断断面あたりの胚軸気孔数を計測した。エラーバーは標準誤差 (SE) を示す。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

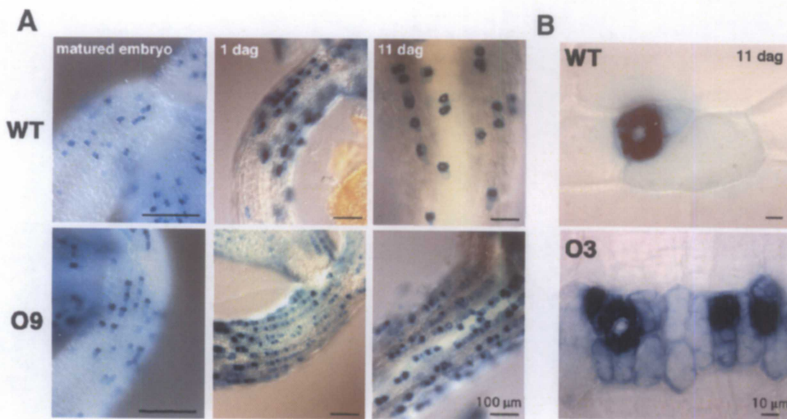


図5 *CYCD4;2* 過剰発現体における TMM の発現 A、野生型 (WT) と *CYCD4;2* 過剰発現体 (O3, O9) における TMM プロモーター-GUS の発現様式を、乾燥種子から単離した成熟胚、発芽後1日目、発芽後11日目の植物体の胚軸表皮について観察した。B、発芽後11日目の胚軸表皮の拡大図。

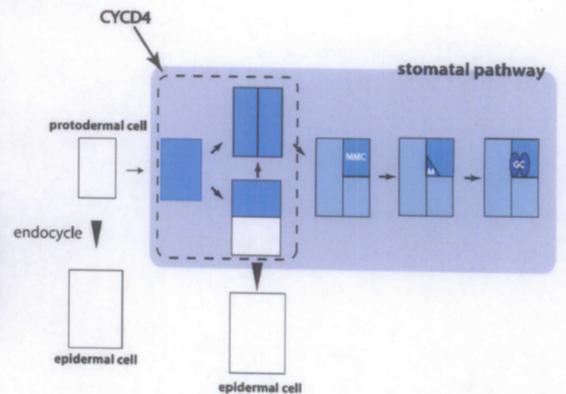


図6 胚軸における気孔形成のモデル図 TMM 発現細胞を青色で示す。*CYCD4* はメリステモイド母細胞を作る幹細胞の分裂に関与していると考えられる。