

修士論文要旨

2006年(平成18年)3月修了

先端生命科学専攻

小島祥子

46529

シロイヌナズナのサイクリン A3 の機能解析

キーワード

細胞周期、サイクリン、サイトカイニン、シロイヌナズナ、形態形成

指導教官

内宮博文教授

梅田正明助教授

<要旨>

シロイヌナズナのサイクリン A3 の機能解析

46529 植物細胞機能制御学分野 小島祥子

細胞増殖はすべての生命体にとって最も根源的な事象である。細胞が増殖するための必須の条件は複製と分裂であり、これらは交互に繰り返す。こういった正常な増殖を可能にする周期性システムを細胞周期と呼ぶ。細胞周期は分裂期（M期）と間期に分けられ、間期はさらにDNA複製を行っている期間（S期）とそれ以外のGAP期に分けられる。すなわち細胞周期はM期 G₁期 S期 G₂期というように一回転する。細胞周期の主たる調節因子であるサイクリンはサイクリン依存性キナーゼ（Cyclin-dependent kinase ; CDK）の調節サブユニットであり、CDKと結合してサイクリン - CDK複合体を構成しタンパク質キナーゼとして働く。またサイクリンは周期的に発現し分解されることによって発現量が変化するタンパク質である。サイクリンはその発現するステージによってG₁期サイクリンとM期サイクリンに分けられる。植物のサイクリンは動物のサイクリンとの類似性をもとに 5 種類（サイクリンA、B、C、D）に大別されている。この中で主にS~M期で発現するサイクリンAとBはさらに 3 種類（サイクリンA1、A2、A3）と 2 種類（サイクリンB1、B2）のサブクラスに分類される。またG₁/S期で発現するサイクリンDは 4 種類（サイクリンD1、D2、D3、D4）のサブクラスに分類される。

私はシロイヌナズナ懸濁培養細胞を用いて細胞同調を行い、細胞周期におけるサイクリンA3 遺伝子の発現を調べる実験を行った。その結果、サイクリンA3;1 およびサイクリンA3;2 の転写産物が同調解除直後および 24 時間前後で蓄積する傾向を観察することができた。これは細胞周期におけるG₁/S期のタイミングと一致しており、これら 2 つのサイクリンA3 遺伝子がG₁/S期を制御する新しいサイクリンであることを示していた。次に植物ホルモンに対する発現応答性をシロイヌナズナ懸濁培養細胞と植物体両方で調べた。シロイヌナズナ懸濁培養細胞MM2dをカイネチン欠乏培地で 48 時間培養後、カイネチンを再添加する実験を行い、サイクリンA3 の発現をRT-PCRにより調べた。その結果、サイクリンA3;1 およびサイクリンA3;2 の発現がカイネチン再添加後 1~2 時間以内に誘導されることが明らかになった（図 1）。またシロイヌナズナ幼植物にベンジルアミノプリン処理を施し、サイクリンA3 の発現をRT-PCRにより調べた結果、サイクリンA3;1 およびサイクリンA3;2 の発現は 10⁻³ μMの処理からわずかな増加を示し、1 μMの処理で顕著に増加することが明らかになった（図 2）。以上の実験結果からシロイヌナズナのサイクリンA3 はサイトカイニンのシグナル伝達の下流に位置し、細胞増殖を正に制御している可能性が示された。

次にサイクリン A3 の発現部位の特定を *in situ* hybridization により行った。野生型シロイヌナズナ幼植物体の茎頂分裂組織の切片を作成し、サイクリン A3;1 およびサイクリン A3;4 特異的

なプローブを作成してハイブリダイゼーションを行った結果、サイクリン A3;1 およびサイクリン A3;4 とともに茎頂分裂組織や葉原基で特異的に発現していることがわかった。次に、GFP タグを付加したサイクリン A3 をシロイヌナズナ植物体で過剰発現させ、細胞内局在を調べた結果、GFP 蛍光のシグナルはサイクリン A3;1、サイクリン A3;2、サイクリン A3;4 とともに主に核で見られた。また詳細に観察すると核の内部の GFP 蛍光の輝点が見られた。次に FLAG タグを付加したサイクリン A3 の過剰発現体の表現型を観察したところ、頂芽優性が抑制されている個体やブッシュ状になる個体が見られた。

以上の結果から、本研究においてシロイヌナズナのサイクリンA3 は細胞周期においてG₁/S期を制御するサイクリンであること、およびサイトカニンによって正に制御されていることが明らかになった。現在までに植物ではG₁/S期を制御するサイクリンとしてDタイプサイクリンのみが知られていた。これに対し、動物ではG₁サイクリンはサイクリンDとサイクリンEの 2 種類が明らかになっており、G₁/S期の調節には両者による二段階の制御が必要であると考えられている。本研究の結果からシロイヌナズナのサイクリンA3 が動物のサイクリンEのような働きをしている可能性は十分に考えられ、今後の大きな研究課題であると言える。また今後はサイクリンA3 - CDK複合体のRbタンパク質に対するキナーゼ活性について、およびCDK以外の細胞周期調節因子との相互作用について生化学的な解析が必要であると考えられる。シロイヌナズナのサイクリンA3 のより詳細な解析を通じて、植物の複雑かつ精巧な細胞周期の調節機構がますますひもとかれ、また植物ホルモンと細胞増殖を結ぶシグナル伝達の全貌が明らかになっていくことが期待される。

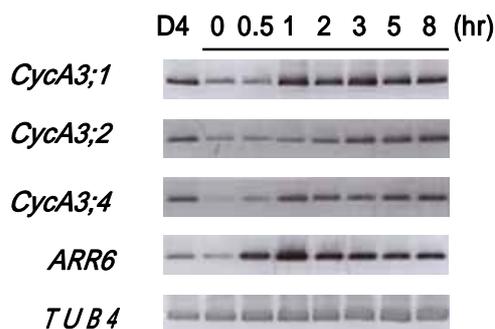


図1 シロイヌナズナ懸濁培養細胞におけるサイトカニンに対する発現応答
 継代後4日目の培養細胞をカイネチンを抜いたMS液体培地で洗浄後、同培地で48時間振盪培養した。その後、0.05mg/lカイネチンを再添加した完全培地に移してさらに培養を続け、再添加0、0.5、1、2、3、5、8時間後にサンプリングしてRNAを抽出し、RT-PCRにてCycA3の応答性を調べた。数字はカイネチン再添加後の時間を示す。D4は継代後4日目の無処理の培養細胞を示す。

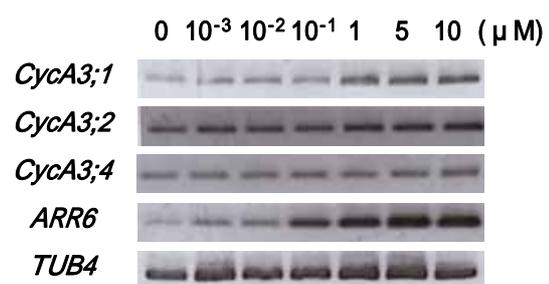


図2 植物体におけるサイトカニンに対する発現応答
 発芽後13日のシロイヌナズナ幼植物体を用いてさまざまな濃度のベンジルアミノプリン処理を1時間行い、RT-PCRにてCycA3の応答性を調べた。数字はベンジルアミノプリン濃度を示す。