氏　　名　今井久美子（いまい くみこ）
学位(専攻分野)　博　士（理　学）
学位記番号　理　博　第3060号
学位授与の日付　平成18年3月23日
学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻　理学研究科生物科学専攻
学位論文題目　シロイヌナズナ AtCYCA2;3の機能解析

論文調査委員　（主査）教授 岡　穆宏　教授 森　和俊　教授 七田芳則

論文内容の要旨

植物細胞は，細胞分裂による増殖の段階から細胞分化の段階に進むと，活発な代謝や細胞の形態形成などを行う前に，しばしば有糸分裂を経ずにDNA複製を繰り返し，染色体のDNA含量を増やすことが知られている。この現象をendoreduplicationと称し，endocycleとよばれる特殊な細胞周期から構成される。この現象は栄養貯蔵細胞や特殊な形態を持つ細胞で起こることが多いが，葉・茎・根などの一般的な器官の細胞でも認められ，植物細胞分化の大きな特徴の一つとなっている。endoreduplicationは通常の有糸分裂を伴う細胞周期，すなわちG1期-S期-G2期-M期からなる制御機構の一部分を用いて進行すると想像されるが，その開始・終了制御の分子機構の詳細は解明されていない。特に，endoreduplicationの終了制御についてはほとんど不明で，これは植物がどのようにして各細胞のploidyを適正に保つかという問題に置き換え得る重要な課題である。

シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）においてendoreduplicationを行う細胞例として，トライコームと呼ばれる葉表面の毛状細胞がある。これは葉表層の前駆巨大細胞から分化し，2回の分枝を経て3本角の形態を示す。この間に核では4回のendoreduplicationが起こり32Cとなる。これまでに，シロイヌナズナのCdc2オルソログAtCDKA;1が発生中のトライコームで強く発現していることが報告されていたが，トライコーム分化過程における機能は不明であった。本研究では，AtCDKA;1がサイクリンと複合体を形成して機能すると仮定し，まずパートナーのサイクリン分子種を同定し，当該サイクリン遺伝子の欠損変異株を単離するとともに，過剰発現形質転換株を作成し，それらの表現型を解析し，AtCDKA;1複合体とendoreduplication制御との関係を明らかにしたものである。

まず，トライコーム形成時に強く発現しているサイクリン分子種を探索し，A2グループに属するAtCYCA2;3が，分裂組織同様に強く発現していることを見いだした。このサイクリンの発現量は，トライコーム形成過程のステージ1～6のうち，ステージ3（endoreduplicationが終了し，最初の分枝形成が起こる）の途中から発現し始め，ステージ4（2回目以降の分枝が起こるが分枝先端はまだ尖っていない）で最大になり，その後トライコーム細胞成熟とともに低下した。このサイクリンの発現時期に呼応してAtCDKA;1が核に局在した。CDKは核移行シグナルをもたず，サイクリン複合体として活性化されて核移行すると思われるが，AtCDKA;1とAtCYCA2;3とがin vivoで実際に複合体を形成していることを免疫沈降法で確認した。

AtCYCA2;3（あるいはAtCDKA;1との複合体）とendoreduplicationとの関係を調べるためにAtCYCA2;3欠損null変異シロイヌナズナを2株単離した（AtCDKA;1欠損変異は致死になるため利用できない）。両変異株の成長速度および形態は一見，野生株のそれらと区別できない程度に正常であったが，トライコームの細胞核が野生株より大きく（ploidyが高い），また分枝数が若干多い，という二つの傾向が認められた。変異株のploidyをより正確に測定するために，子葉，本葉，根（AtCYCA2;3プロモーター活性が高い組織）それぞれ由来の細胞群のploidyをフローサイトメトリーで解析した。各組織由来の細胞間で程度の差はあるが，全てploidy分布が野生株より高い方へシフトした。さらに，植物個体の成

長に沿って本葉第一葉の ploidy 変化を追うと，変異株では各 endocycle への突入が徐々に早まり，野生型との差が時間を追って広がったが，endoreduplication が起こらない 2C 細胞の全細胞に対する割合は両者で差が認められなかった。これらの実験結果は，AtCYCA2;3 が endocycle の開始には影響せず，終了制御に関与していることを示している。一方，暗所で発芽させた胚軸（もやし状；endoreduplication は起こるが AtCYCA2;3 プロモーター活性が低い組織）を用いて同様の ploidy 解析を行うと，変異株と野生株とで差が見られない。すなわち，AtCYCA2;3 欠損株における ploidy の上昇は，元来 AtCYCA2;3 が発現しており endoreduplication が起こる組織で顕著に表れる。逆に AtCYCA2;3 を過剰に発現させると，発現量に応じて ploidy の低下が認められ，endocycle の継続が阻害されるようである。AtCYCA2;3 に安定化変異（タンパク質の半減期が長くなる）を導入すると ploidy の低下効果を強めた。これらの結果から，AtCYCA2;3 は細胞内に存在する分子数に依存して endocycle の継続を阻害し，植物体において ploidy を適正レベルに調節する主要な制御因子として働いていると結論した。

以上のように申請論文は，これまで詳細が不明であった endoreduplication の終了制御に，AtCYCA2;3（多分 AtCDKA;1 との複合体として機能）が重要な役割を果たしていることを明らかにしたもので，通常の細胞周期制御の研究にも光明をもたらすものである。

なお，主論文の基礎となる論文 1 編は，申請論文の研究成果の一部を共著者とともに公表したものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞分裂は G1 期-S 期-G2 期-M 期の 4 段階の時期からなる細胞周期を経て進行する。各時期が正確に進行するように，各時期から次の時期への移行は厳密に制御されている。ほとんど全ての細胞はこの細胞周期を経て増殖するが，ある種の細胞は有糸分裂（M 期）を経ずに DNA 複製を繰り返し，染色体の DNA 含量を増やすことが知られている。この現象を endoreduplication と称し，endocycle とよばれる特殊な細胞周期から構成される。高等動物では endoreduplication が起こる例は少ないが，植物では細胞分裂による増殖の段階から細胞分化の段階に進むと，活発な代謝や細胞の形態形成などを行う前にしばしば endoreduplication が起こる。また，葉・茎・根などの一般的な器官の細胞でも endoreduplication が認められ，植物細胞分化の特徴の一つとなっている。しかし endoreduplication の開始・終了制御の分子機構はほとんど理解されておらず，これは植物がどのようにして各細胞の ploidy を適正に保つかという問題に置き換え得る重要な課題である。

シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）において endoreduplication を行う細胞例として，トライコームと呼ばれる葉表面の毛状細胞がある。これは葉表層の前駆巨大細胞から分化し，2 回の分枝を経て 3 本角の形態を示す。この間に核では 4 回の endoreduplication が起こり 32C となる。シロイヌナズナの分裂組織で強く発現する AtCDKA;1（酵母 Cdc2 のオルソログ）が発生中のトライコーム（細胞分裂しない）でも強く発現することが知られていたが，トライコーム分化過程における機能は不明であった。本申請論文では，AtCDKA;1 がサイクリンと複合体を形成して機能しているはずであると仮定し，まずパートナーのサイクリン分子種を同定し，当該サイクリン遺伝子の欠損変異株を単離するとともに，過剰発現形質転換株を作成し，それらの表現型を解析した。その結果，パートナーのサイクリン（多分 AtCDKA;1 複合体として機能する）が endoreduplication 制御，特にその終了制御に関わっていることを明らかにしたものである。

AtCDKA;1 のパートナーはトライコーム形成時に強く発現していると期待されるので，そのようなサイクリン分子種を探索し，A2 グループに属する AtCYCA2;3 を同定した。このサイクリンの発現量は，トライコーム形成過程のステージ 1～6 のうち，ステージ 3 の途中から発現し始め，ステージ 4 で最大になり，その後トライコーム細胞成熟とともに低下した。ステージ 3 は endoreduplication が終了し，最初の分枝形成が起こる時期に相当し，ステージ 4 は 2 回目以降の分枝が起こる時期で，生じた分枝はまだ成熟していない。したがって AtCYCA2;3 発現開始時は endoreduplication の終了前後に対応していることになる。この AtCYCA2;3 の発現時期に呼応して AtCDKA;1 が核に局在した。CDK は核移行シグナルをもたず，サイクリン複合体として活性化されて核移行すると思われるが，AtCDKA;1 と AtCYCA2;3 とが in vivo で実際に複合体を形成していることを免疫沈降法で確認した。これは植物細胞内で CDK-サイクリン複合体の構成分子種と分化過程の関連が明らかにされた数少ない例である。

AtCYCA2;3（あるいは AtCDKA;1 との複合体）と endoreduplication との関係を調べるために AtCYCA2;3 欠損 null

変異の単離（AtCDKA;1 欠損変異は致死になるため単離できない）と過剰発現形質転換植物の構築を行った。欠損変異株の成長速度および形態は一見，野生株のそれらと区別できない程度に正常であったが，トライコームの細胞核が野生株より大きく（ploidy が高い），また分枝数が若干多い，という二つの特徴が認められた。変異株の ploidy をより正確に測定するために，子葉，本葉，根（AtCYCA2;3 プロモーター活性が高い組織）それぞれ由来の細胞群をフローサイトメトリーで解析した。各組織由来の細胞間で程度の差はあるが，全て ploidy 分布が野生株より高い方へシフトした。この変異の ploidy 制御への影響をより詳しく調べるために，植物個体の成長に沿って本葉第一葉の ploidy 変化を追うと，変異株では各 endocycle への突入が徐々に早まり，野生型との差が時間を追って広がったが，endoreduplication が起こらなかった 2C 細胞の全細胞に対する割合は両者で差が認められなかった。これらの実験結果は，AtCYCA2;3 が endocycle の開始には影響せず，終了制御に関与していることを示している。一方，暗所で発芽させた胚軸（もやし状; endoreduplication は起こるが AtCYCA2;3 プロモーター活性が低い組織）を用いて同様の ploidy 解析を行うと，変異株と野生株とで差が見られない。すなわち，AtCYCA2;3 欠損株における ploidy の上昇は，元来 AtCYCA2;3 が発現しており endoreduplication が起こる組織で顕著に表れる。したがって，暗所で発芽した胚軸の endoreduplication の制御は他のサイクリン分子種が関わっていることが伺える。欠損株とは逆に AtCYCA2;3 を過剰に発現させると，発現量に応じて ploidy の低下が認められ，endocycle の継続が阻害されるようである。AtCYCA2;3 に安定化変異（タンパク質の半減期が長くなる）を導入すると ploidy の低下効果が一層強くなることから，AtCYCA2;3 の細胞内分子数に依存して endocycle の終了あるいは継続阻害が起こり，AtCYCA2;3 が植物体において ploidy を適正レベルに調節する主要な制御因子として働いていると結論した

ここで得られた研究成果は，サイクリン AtCYCA2;3 が，おそらく AtCDKA;1 との複合体として，植物細胞における endoreduplication の終了を正に制御する重要な因子であることを世界に先がけて明らかにしたもので，通常の細胞周期制御の研究方向にも一石を投じるもので高く評価される。よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお，主論文に報告されている研究業績を中心とし，これに関連した研究分野について試問を行った結果，合格と認めた。