

氏名・(本籍)	いとうまさき 伊藤正樹
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	理第1013号
学位授与年月日	平成5年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
最終学歴	平成2年3月 東北大学大学院理学研究科 (前期2年の課程)生物学専攻修了
学位論文題目	Analysis of an S-phase-specific gene during the cell in synchronous cultures of <i>Catharanthus roseus</i> cells (ニチニチソウ同調培養系における細胞周期のS期に特異的に発現する遺伝子の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 駒嶺 穆 教授 前田 靖男 助教授 福田 裕穂

論文目次

序章

- 第一章 ニチニチソウ同調培養系の細胞周期におけるS期特異的新規遺伝子, *cyc07*, の同定
- 第二章 高等植物におけるS期特異的遺伝子, *cyc07*, に相同な酵母遺伝子族の単離と解析
- 第三章 *cyc07* に相同な酵母遺伝子と酵母 MFT1 遺伝子の関係に関する解析
- 第四章 S期特異的遺伝子, *cyc07*, のプロモーターによって指令される分裂組織特異的な遺伝子発現

終章

論文内容要旨

細胞周期の進行あるいはその制御の分子機構を解明することは、現在の細胞生物学上の中心的な問題の一つである。細胞周期は、ある特定の遺伝子群の秩序ある発現のもとに進行し、またコントロールされていると考えられる。細胞周期を分子レベルで理解するためには、このような細胞周期遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子を単離同定する必要がある。そこで本研究では、高等植物の細胞周期の進行およびその制御機構を解明するための手がかりを得るためニチニチソウ同調培養系における細胞周期中で特定の時期に発現する遺伝子の単離同定を試み、高等植物における細胞周期遺伝子の探索を行うものである。

1. ニチニチソウ同調培養系における細胞周期のS期に特異的に発現する新規遺伝子の同定

高等植物における細胞周期の制御機構の解明の糸口を得るため、細胞周期の特定の時期に特異的に発現する遺伝子の単離を試みた。材料としてニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) 懸濁培養細胞を用いた。二度のリン酸飢餓処理によって誘導されるニチニチソウ同調培養系を用い、S期の細胞から poly (A)⁺ RNA を単離し、cDNA ライブラリーを作製した。このライブラリーを、differential screening することによって、S期特異的な cDNA クロンを数種類得た。これらのうち *cyc07* と名付けた遺伝子に着目して詳細に解析を行った。

cyc07 cDNA をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、mRNA レベルでの *cyc07* 遺伝子の発現様式を解析した。リン酸飢餓処理によって誘導されるニチニチソウ同調培養系における細胞周期中では、*cyc07* mRNA は、S期に特異的に認められた。また、オーキシン飢餓処理によって誘導されるニチニチソウ同調培養系においても、*cyc07* mRNA は同様にS期に特異的に蓄積していた。このように異なる方法で誘導される同調培養系の細胞周期において、同様の結果が得られたことから、S期において認められた遺伝子発現は、培地成分など操作などの人為的な効果によるものではなく、細胞周期の進行そのものに関連していると考えられる。また、DNA 合成阻害剤を用いた実験から、S期における *cyc07* の発現とS期 DNA 合成は機能的にカップルしていることが示された。

また、*cyc07* mRNA は、ニチニチソウ培養細胞のバッチ培養過程では、対数増殖期に特徴的に発現していた。ニチニチソウ植物体においては分裂組織が存在する根端部分に強い発現が認められた。このように *cyc07* 遺伝子は、培養細胞においても、インタクトな植物体においても、増殖の盛んな細胞に特異的に発現することが示された。この結果は、この遺伝子が高等植物の細胞増殖に何らかの機能を果している可能性を示唆した。

cyc07 によってコードされる mRNA のサイズは、ノーザン解析の結果から1.2kb であることがわかっており、単離した最長の cDNA 鎖長は1.1kb であった。このため単離した1.0kb の cDNA をほぼ全鎖長の cDNA であると考え、塩基配列を決定した。コードされることが予想されるポリ

ペプチドのアミノ酸配列を決定したところ、非常に塩基性アミノ酸に富むタンパク質であることが判明した。*cyc07* 遺伝子は、mRNA レベルでの発現様式が、細胞周期中で S 期に特異的であり、かつ S 期 DNA 合成と機能的に共役している点、また強い塩基性をもつタンパク質をコードしている点でヒストン遺伝子とよく類似しているが、アミノ酸配列には全く相同性は認められない。また、データベースのホモロジー検索によっても有意な相同性をもつアミノ酸配列は検出されなかった。つまりこれまでに報告されていない未知の遺伝子であった。

cyc07 に相同な遺伝子は、タバコ、イネなど調べた全ての植物種に発現が認められる。また、*cyc07* cDNA の塩基配列をもとにデータベースのホモロジー検索を行ったところ、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の SIR3 遺伝子の下流に存在する未知のオープンリーディングフレーム (ORF) と有意な相同性が認められた。従って、出芽酵母のゲノム中に、*cyc07* と相同な未知の遺伝子が存在することが判明したわけである。データベースに登録されていた SIR3 ゲノムクローンには、*cyc07* と相同なリーディングフレームに停止コドンが含まれていなかった。従って、さらに下流側に、この相同遺伝子の塩基配列続いていることが予想された。そこで、とりあえずデータベースに登録されている範囲内で、相同領域の塩基配列をアミノ酸配列に翻訳して、*cyc07* のアミノ酸配列と比較した。この結果、65%程度の高い相同性が認められた。このように、進化上かけ離れた生物種間で、高い相同性が保存されていたという事実は、この *cyc07* 遺伝子が生命現象の維持にとって非常に重要な役割を演じていることを示している。また、*cyc07* 遺伝子の発現様式とあわせて考えると、この遺伝子は、細胞周期における進化上保存された重要な機能を有していることが予想される。

2. *cyc07* 遺伝子のプロモーター領域の解析

すでに述べたように、*cyc07* 遺伝子は、細胞周期中では S 期に特異的に、培養細胞や植物体においては増殖している細胞に特異的に発現が認められた。そこで、増殖細胞に特異的に発現を誘導する機構を解明する一つの手段として、*cyc07* 遺伝子上流域のプロモーター活性を解析した。ニチニチソウのゲノムライブラリーから約 4.8kb の *cyc07* のゲノム断片をクローニングし、全塩基配列を決定した。この結果、*cyc07* 遺伝子は、7 個のエキソンから構成されていることが明らかになった。プライマー伸長法によって、*cyc07* の転写開始点を決定した。*cyc07* の転写開始点は、開始コドンのアデニンより 96塩基上流にあることが示された。第三エキソン内で、フレームを合わせて、レポーター遺伝子である β -glucuronidas (GUS) 遺伝子と融合させキメラ遺伝子を作成した。上流域を削り込むことによって、転写開始点よりも上流 2.1kb を含むクローン、および 0.6kb にまでを含むクローンの 2 種類の融合遺伝子を作成し、アグロバクテリアを用いて、シロイヌナズナに導入した。得られた形質転換体における GUS 活性を組織化学的に解析した結果、レポーター遺伝子の発現は、根端分裂組織に加え、根側の形成部位、根側の分裂組織、茎頂分裂組織、初期の腋芽など細胞分裂の盛んな組織でのみ認められた。また、*cyc07* 遺伝子上流域におけるプロモーター活性と細胞増殖との関係を直接的に解析するため、カルス増殖を誘導し

たときの GUS 活性を調べた。形質転換シロイヌナズナ植物体の茎からカルスを誘導した。NAA (naphthalene-1-acetic acid) および 2, 4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) を含む培地中でカルス誘導したときには、強い GUS 活性が検出されたが、オーキシンを加えずに培養した場合には、GUS の活性はほとんど誘導されなかった。この結果から、*cyc07* 遺伝子の上流域0.6kb の配列が、増殖の盛んな細胞に特異的な発現を指令するプロモーター活性を有していることが明らかになった。

3. *cyc07* に相同な酵母遺伝子の単離と解析

すでに述べたように、*cyc07* と相同性を有する塩基配列が出芽酵母の *SIR3* 遺伝子の下流に存在することが、データベースのホモロジー検索によって明らかにされた。しかしデータベースに登録されていた *SIR3* ゲノムクローンの約4.5kb からなる塩基配列には、*cyc07* 遺伝子と相同性をもつ ORF は部分的にしか含まれていなかったため、完全な ORF を同定するためには、新たに出芽酵母のゲノムクローンを単離する必要がある。また、ゲノムサザン解析の結果、出芽酵母における相同遺伝子は半数体ゲノム当たり 2 コピー存在していることがわかったので、それぞれのゲノムクローンを単離し、塩基配列を決定した。これらの遺伝子は、コピー間で比較すると、アミノ酸レベルで98%以上の残基が一致しており、またニチニチソウの *cyc07* と比較すると65%程度のアミノ酸が一致していた。2 コピー存在する出芽酵母の相同遺伝子のうち、*SIR3* 遺伝子の下流に存在するコピーを *PLC1*、もう片方のコピーを *PLC2* と名付けた。*PLC1*、*PLC2* はともに mRNA として発現しており、双方とも増殖の盛んな細胞に特異的に mRNA の蓄積が認められた。

出芽酵母は分子遺伝学上、非常に優れた実験材料であり、クローニングした遺伝子に対応する染色体上の遺伝子を破壊する技術 (gene disruption) が確立している。つまりクローン化した遺伝子の欠失した mutant を作製することができる。そこで、*cyc07* に相同な酵母遺伝子を破壊し、破壊株の表現系から遺伝子の機能を推定することを試みた。前述のように、*cyc07* に相同な酵母遺伝子は、半数体ゲノム当たり 2 コピー存在するが (*PLC1*、*PLC2*)、このうち片方だけを破壊すると細胞増殖速度の低下が認められた。また、2 コピー同時に破壊した細胞は全く増殖することができなかった。このように *PLC1*、*PLC2* という二つの遺伝子からなる遺伝子族は、出芽酵母の増殖にとって必須なタンパク質をコードしており、また、遺伝子のコピー数が増殖速度に大きな影響を与えることから、この遺伝子族の発現量が、細胞周期の進行にとって重要な意味をもっていることが示された。

4. MFT1 遺伝子と PLC 遺伝子族の関係について

最近、Garrett らによって、*PLC2* と全く同一の遺伝子の単離が報告された。彼らは、出芽酵母の核遺伝子 (*ATP2*) によってコードされているミトコンドリアタンパク質である F_1 ATPアーゼ β サブユニット (Atp2) の N 末端側のアミノ酸配列と、レポーター遺伝子 *lacZ* との融合ペプ

チド (Atp2-lacZ) が出芽酵母の細胞内でミトコンドリアへ輸送されることを見いだした。また, Atp2-lacZ がミトコンドリア内に輸送されることによって, 通常のミトコンドリアの機能が破壊され, 融合遺伝子の発現が誘導された細胞は, 呼吸欠損株となることが示された。そこで, このような呼吸欠損株から呼吸能を回復する変異株が単離された。融合タンパク質のミトコンドリアへの輸送に関連した遺伝子の変異株を探したわけである。こうした単離された変異株のうち *mft1* と名付けられた変異株は, Atp-lacZ の発現のもとでも呼吸できるという表現系のほかに, 細胞増殖が温度感受性(ts)となっていた。彼らは, この ts 性を相補するゲノム断片をクローニングし, *MFT1* 遺伝子と名付けた。つまり, この *MFT1* が *PLC2* と同一の遺伝子であったのである。また彼らは, *MFT1* を含むゲノム領域の欠失変異株を作製した。欠失変異株は, Atp2-lacZ の発現のもとでも呼吸能をもつ他, 30°C で増殖が遅延し, 37°C では増殖できないという ts 形質を示した。これらの表現系が *mft1* 株の表現系と一致したことから, Garrett らは *MFT1* 遺伝子を *mft1* 株の変異遺伝子と結論している。

しかし, 筆者の行った実験では *PLC2* 遺伝子の挿入変異による遺伝子破壊では ts 形質を生じないこと, また, Garrett らが作製した欠失変異株では, 欠失させたゲノム領域内に *PLC2* 遺伝子の他に, 別の ORF が部分的に含まれていること, 以上の二点から, *mft1* 株における変異遺伝子は *PLC2* ではなく, *PLC2* の下流に存在し, Garrett らの欠失変異株において欠失したゲノム領域に部分的に含まれる ORF ではないかと推論した。これを検証するため, *PLC2* の下流に存在する ORF を挿入変異によって破壊した。破壊株は, 27°C では正常に増殖したが, 37°C では増殖速度は極めて遅くなっていた。この結果により, *mft1* 株における変異遺伝子は, *PLC2* ではなく, その下流の ORF に対応する遺伝子であることを示した。また, 実際にこの ORF に由来する転写産物が存在することを明らかにした。従って本来, *MFT1* と呼ばれるべき遺伝子は, *PLC2* ではなく, その下流の遺伝子である。この *PLC2* の下流側に存在する ORF の全塩基配列を決定したが, 有意な相同性のある配列は, データベースからは見いだされなかった。

以上の実験結果から, ニチニチソウ同調培養系における細胞周期中で S 期に特異的に発現する遺伝子 *cyc07* は, 高等植物のみならず広い範囲の真核生物一般において, 細胞増殖あるいは細胞周期の進行に重要な機能を有していることが示された。また, 本研究は高等植物から同定された細胞増殖関連の遺伝子の機能を酵母を用いて解析するという手法を用いた最初の研究例であり, 今後, 高等植物の細胞周期の研究を行う上での有効な方法論を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

高等植物における細胞増殖及び細胞周期の進行に関する研究は、酵母、動物細胞を材料とした研究に比較して立ち後れているという現状がある。本論文では、ニチニチソウの同調培養系を用いた differential screening によって単離された S 期特異的遺伝子 (cyc07) を詳細に解析することにより、高等植物の細胞周期がどのような分子機構によって進行し、また制御されているのかを解明しようとしたものである。

著者は、cyc07 が同調培養系の S 期に特異的に発現することを示し、また、この遺伝子の S 期における発現が DNA 複製と機能的に共役していることを明らかにした。cyc07 の mRNA レベルでの発現を、ニチニチソウ懸濁培養細胞のバッチ培養過程、およびニチニチソウ幼植物体において解析を行い、この遺伝子の mRNA の蓄積と細胞増殖とが非常によく相関していることを明らかにした。そして、これらの実験事実から cyc07 が、高等植物の細胞増殖と極めて密接な関連を持つ遺伝子であることを示唆し、また細胞周期の進行、特に S 期の進行に何らかの機能を有する可能性を示唆した。また、著者はトランスジェニック植物を作製することにより、cyc07 遺伝子の分裂組織特異的発現が、そのプロモーター領域によって制御されていることを明らかにした。

著者は、この遺伝子(cyc07)が、これまでに機能が明らかにされているどの遺伝子とも異なる新規遺伝子であることを示した。さらに、出芽酵母がこの cyc07 に相同な遺伝子を持つことを明らかにし、実際に cyc07 に相同な酵母遺伝子をクローニングした。また、この相同遺伝子は出芽酵母の半数体ゲノム当たり 2 コピー存在していることが示され、PLC1、PLC2 と名付けられた。これら遺伝子については、塩基配列の決定がなされたが、予想されるアミノ酸配列は、ニチニチソウの cyc07 のアミノ酸配列と 60% 以上の非常に高い相同性を示した。このように進化上離れた生物種間での高い保存性から、cyc07 遺伝子が生命現象の維持にとって重要なタンパク質をコードしていることが示唆された。

次に著者は、遺伝子破壊により PLC1 および PLC2 の出芽酵母における機能の解析を行った。PLC1 あるいは PLC2 のどちらか一方が破壊された細胞では、増殖速度の低下が認められ、また PLC1 と PLC2 を同時に破壊すると細胞は増殖不能となることを示した。この実験結果から出芽酵母において、PLC1、PLC2 という二つの遺伝子からなる遺伝子族は、出芽酵母の増殖にとって必須なタンパク質をコードしていることが示され、また、遺伝子のコピー数が増殖速度に大きな影響を与えることから、この遺伝子族の発現量が細胞周期の進行を制御している可能性が示唆された。

ここに得られた結果はいずれも新知見であり、この分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、伊藤正樹提出の論文は博士(理学)の学位論文として合格と認める。