博士（理　学）　木　藤　新一郎

学 位 論 文 題 名

Random cDNA sequencing and studies of genes engaged in cell cycle and signal transduction in rice (*Oryza sativa* L.)

（イネcDNAのランダムシークエンスと細胞周期及び情報伝達関与遺伝子に関する研究）

学位論文内容の要旨

生物の行なう基本的な生命活動には様々な機能蛋白質が関与し、それらは全て遺伝子によりコードされている。遺伝子操作技術の著しい進展により、それら機能タンパク質をコードする遺伝子が微生物から高等生物にいたる多くの生物から単離され、現在十万種類を越える遺伝子が各種データバンクに登録され、それらに関する数多くの研究が行なわれている。しかし植物における遺伝子の単離は遅れており、高等植物に存在すると推定される4～5万種類の遺伝子のうち、単離同定されたのは全体の１％にも及んでいない。遺伝子の側面から生命現象を解明する上で、遺伝子単離技術は非常に重要な位置を占める様になってきたが、一般に用いられている抗体や合成オリゴヌクレオチドを用いたスクリーニング法、PCRを使用する方法などではターゲットとする特定遺伝子の単離には有効であるが、多数の遺伝子を単離する方法としては限界がある。そこで本研究では、データバンクを活用して遺伝子を迅速かつ大量に単離する新たな方法を試みた。また、植物における細胞周期及び情報伝達の研究が遅れていることから、単離した遺伝子のうちそれらに関与するものの解析を行った。

【第１章】　イネは、単子葉植物の中では半数体当りのゲノムサイズ小さく、各種連鎖地図が作製され、遺伝子導入が確立されているという数多くの利点を持っている。また、古典的な遺伝学や生理学のデータが豊富に蓄積されているので、単子葉植物におけるモデル植物になり得ると考えられる。そこで本研究では、イネ培養細胞であるカルス由来のmRNAから合成したcDNAを大腸菌のpUC系ベクターに直接クローン

化し、ランダムに選択したクローンの塩基配列を部分的に決定した後、得られた情報を既知のデータバンクのものと比較する方法によりイネ遺伝子の単離を行なった。総計637クローンについて調べた結果、約1割に相当する60クローンで既知の遺伝子との相同性が確認できた。このうち53クローンはイネで初めてのもので、30クローンは植物で報告されていないものであった。検出された遺伝子は多岐にわたっていたが、エネルギー代謝に関与するものが22クローンと最も多く、続いて細胞周期や情報伝達に関与するものが13クローン、転写や翻訳などのタンパク合成に関与するものが12クローン、また高等植物での機能が未知のものをはじめ、他の機能に関与するものが13クローンあった。これらの多くが植物で単離同定されていないものであることから、本研究により得られたクローンを個別に、又は関連するクローンを総合的に研究して行くことで、植物における生命現象の解明が一層進む事が期待できる。

【第2章】 次に、第1章で同定した細胞周期に関与するクローンのうち、その進行に中心的な役割をしている *cdc2* キナーゼとS期特異的に発現するがその機能が解明されていない *cyc07* 遺伝子と相同性を示す2種類のクローンについて、全塩基配列の決定と転写産物の解析を行なった。 *cdc2* キナーゼの遺伝子と相同性を示すクローンは、アミノ酸302残基からなる 33 kDa の蛋白質をコードし、その配列中にはATP結合ドメイン、PSTAIRドメインなど *cdc2* キナーゼのアミノ酸配列に共通に保存されている特徴的なドメインが存在した。しかし以前に様々な生物から単離されている *cdc2* キナーゼとの相同性が60％以下と低く、系統樹を作成した結果、これまでに報告されている *cdc2* キナーゼとは違うタイプであると予想された。さらに転写産物の解析で、この遺伝子の発現量が幼植物体に比べカルスで高いことが明らかになった。*cyc07*は、S期特異的に発現する遺伝子としてニチニチ草で単離され、相同遺伝子の存在が酵母やラットで確認されている。本研究で単離した*cyc07*と相同性を示すクローンは、アミノ酸262残基からなる蛋白質をコードし、*cyc07*とアミノ酸で78％の相同性を示した。また転写産物の解析で、幼植物体に比べカルスでの発現量が高いことが明らかになった。

【第3章】 さらに、第1章で同定したクローンのうち情報伝達に関与することが予想される3つのクローンについて解析を行なった。一つは 14-3-3 protein で、これは動物で神経伝達物質の生合成に関与するチロシン-3-モノオキシゲナーゼ、及びトリプトファン-5-モノオキシゲナーゼのアクチベーターとして単離され、プロテイ

ンキナーゼCのインヒビターとしても機能する事が明らかになっている。最近、この遺伝子と相同性を示す遺伝子が植物からも単離され、大麦では病原菌で発現が誘導される遺伝子として、アラビドプシスではGボックスに結合するタンパク質の遺伝子として報告されている。以上のことから、14-3-3 protein は植物においても情報伝達に深く関与していることが予想される。そこで本研究では、この遺伝子の全塩基配列の決定及び転写産物の解析などを進めた。単離したクローンは、アミノ酸260残基からなる酸性タンパク質をコードし、その配列中にはCa^{2+}結合ドメイン、プロテインキナーゼCの擬基質ドメイン、さらにロイシンジッパー様の配列が存在し、3'非翻訳領域には動物で確認されているmRNAの不安定化に関与する配列ATTTAが数コピー存在した。転写産物の解析ではカルスに比べ幼植物体での発現が高いこと、さらにその発現が塩、低温などのストレスにより誘導されることが明らかになった。以上の特徴から、本遺伝子のコードするタンパク質は、ストレスなどのシグナルが伝わる情報伝達系の中に位置する転写因子であると推定できた。

本研究では、*ras* に代表される低分子量Gタンパク質をコードする2種類の遺伝子(ric1, ric2)の構造も解析し、各々アミノ酸202及び217残基からなるORFをもち、その配列中に低分子量Gタンパク質に共通に保存されているGTP/GDP結合ドメイン、GTPase活性ドメイン及び膜への結合に必要なC末のシステイン残基の存在を明らかにした。また系統樹から、両クローンが*ypt/rab*タイプに属する事が示唆された。転写産物の解析では、ric1 に比べ ric2 の発現量が低いこと、また両クローンの発現が幼植物体に比べカルスで高いことが明らかになった。さらに大腸菌で両クローンのGSTとの融合タンパク質を作成し、そのGTPase活性を測定した結果、低い活性を示した。これらのことから、両遺伝子がイネにおいて互いに機能を異にする低分子量Gタンパク質をコードしていることが明らかになった。

本研究では、ランダムシークエンスとそれに続くホモロジー解析により、植物で単離されていない多くの遺伝子を単離することに成功した。そして、細胞周期及び情報伝達に関与する5クローンについては全翻訳領域を含むクローンを単離し、その塩基配列を決定すると共に発現及びタンパク質レベルの解析を行なうことで、各遺伝子のコードするタンパク質の機能について重要な知見を得た。今後、細胞周期や情報伝達をはじめとした植物の基本的な生命活動の解明に、本研究で得られた遺伝子及び知見が役立つものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査　教 授　谷 藤 茂 行
副 査　教 授　石 川　　鐐
副 査　教 授　内 宮 博 文
（東京大学分子細胞生物学研究所）
副 査　助教授　加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

Random cDNA sequencing and studies of genes engaged in cell cycle and signal transduction in rice (*Oryza sativa* L.)

（イネcDNAのランダムシークエンスと細胞周期及び情報伝達関与遺伝子に関する研究）

遺伝子を抽出するには特定の蛋白質のmRNAを免疫沈降法等で選択してcDNAを合成し、または蛋白質の一次構造の情報に基ずいてDNAを合成し、それらを用いて核DNAのライブラリーから選び出すのが一般的手段である。然し、それには複雑な実験操作を伴い、また得られる遺伝子は一種類だけである。申請者はイネ培養細胞から調製したcDNAライブラリーの中から無作為的に多数のクローン選んで、その一部分の塩基配列を決定した。そして、その情報を遺伝子のデーターベースで検索し、多くのcDNAを同定した。即ち、イネに就いては初めて見いだされた遺伝子のクローンを53種類、また植物では未報告であったもの30種類を同定した。それらの中で、細胞増殖の制御に関与するものと、シグナル伝達に関連すると思われる5個のクローンに就いてはその全塩基配列を決め、それから推定される蛋白質の構造と機能を解析した。

ヒト、酵母、トウモロコシの<u>cdc2</u>遺伝子に相同性を示したSS224クローンは、アミノ酸302個のORFを持ち、ATP結合ドメイン、プロテインキナーゼドメイン、<u>cdc2</u>特異的ドメインを含み、それは<u>cdc2</u>ファミリーに属すると推定された。然し、他生物で報告済みの遺伝子と比較すると相同性は低く、それは系統的に特殊な位置に位すると考えられた。

ニチニチソウのＳ期特異的発現を示すcyc07に相同なイネのcDNAクローンのT151は、アミノ酸262個よりなるORFを持ち、イネの芽生えよりも増殖性を備えたカルスで発現が高いことがRNAの解析から判明した。

アミノ酸260個のORFを有し、プロティンキナーゼC偽基質ドメイン、Ca^{++}結合ドメイン、ロイシンジッパーを含むcDNAのS94は、動物のプロティンキナーゼCインヒビターに相同で、またチロキシンオキシゲナーゼなどのアクチベーターとして知られている14-3-3蛋白質にも相同であり、それがシグナル伝達系に関連する蛋白質であることが示唆された。なお、このS94遺伝子は、イネ培養細胞で、高張液処理や食塩水処理、低温などのストレスで発現が強まる事も認められ、また、ある種の14-3-3類似遺伝子の産物が遺伝子プロモーターのシス配列であるG-ボックスに結合するとの報告もあるので、イネのS94の蛋白質が転写因子である可能性の高いことが論じられた。

シグナル伝達に関連する低分子量GTP結合蛋白質に相同なクローン、ric1と ric2も同定された。それらのクローンでは、アミノ酸、それぞれ202個、217個のORF, GTP/GDP結合ドメイン、GTPase活性ドメイン、そして2個の膜結合に関連するシスティン残基が保存されていた。然し、他生物のこの蛋白質に対する相同性が、その2クローン間で可成り異なっており、低分子量GTP結合蛋白質の機能面での多様性が示唆された。 また、それらのcDNAをキメラ遺伝子とし、大腸菌内で発現させて作成した融合蛋白質を解析したところ、その蛋白質はGTPと結合し、GTPを加水分解することが証明された。

以上の研究成果はcDNAのランダムシークェンス・データーベース検索法がcDNAを大量に同定する上で有効なことを具体的に示したもので、また、イネに就いて初めての遺伝子を多数同定したこと、さらに、現在重要視されているシグナル伝達に関与する蛋白質の構造と機能について詳しく調査したことが大変意義深い点であり、高い評価を得ている。公表ずみの参考論文の質も高く、最終試験の結果も満足すべきものであった。

審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受ける充分な資格を有すと認めた。