

新規 GT ボックス結合タンパク質の特徴付け

村田 純

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物遺伝子機能学講座

(橋本 隆 教授)

平成14年1月8日提出

目次

はじめに	---	4
1. 新規 GT ボックス結合タンパク質の単離と <i>in vitro</i> 解析		
序論		--12
材料と方法		--13
結果	シロイヌナズナからの GT-1 類似遺伝子の単離	--22
	GT-4 及び GT-5 のアミノ酸一次配列	--22
	GT-4 及び GT-5 の DNA 結合特異性	--23
	GT-4 及び GT-5 の転写活性化能	--24
	GT-4 及び GT-5 の mRNA 発現様式	--24
	GT-4 及び GT-5 と GFP との融合タンパク質の細胞内局在	--25
	GT ボックス結合タンパク質のリン酸化	--26
	リン酸化と DNA 結合活性	--27
考察	GT-4 及び GT-5 は新規な GT-1 類似タンパク質である	--28
	GT-4 及び GT-5 は GT1-box へ配列特異的に結合する	--28
	GT-4 及び GT-5 の転写活性化能	--30
	GT ボックス結合タンパク質の発現特異性	--30
	GT-4、GT-5 は核局在性を示す	--31
	GT-4、GT-5 はリン酸化される	--32
	リン酸化修飾による DNA 結合活性の制御	--33
第 2 章 <i>in vivo</i> における GT ボックス結合タンパク質の性状解析		
第 1 節 GT-1 の細胞内局在を規定するアミノ酸配列の同定		
序論		--53
材料と方法		--54

結果	GT-1 欠失変異体と GFP との融合タンパク質の細胞内局在	--56
	GT-1 アラニン置換体と GFP との融合タンパク質の細胞内局在	--57
	BC1 と GFP との融合タンパク質の細胞内局在	--57
考察	GT-1 は新規な核移行シグナルを有する	--58
第2節 <i>in vivo</i> における GT ボックス結合タンパク質の結合配列		
序論		--66
材料と方法		--68
結果	抗 GT-4 抗体、抗 GT-5 抗体の認識特異性	--74
	TIP 法の特異性の評価 (1)	--74
	TIP 法の特異性の評価 (2)	--75
	GT ボックス結合タンパク質の新規 <i>in vivo</i> 結合配列の同定	--76
	<i>GER3</i> mRNA の発現特異性	--77
	<i>GER3</i> プロモーター断片を用いたゲルシフトアッセイ	--78
考察	TIP 法は <i>in vivo</i> 結合配列の探索に有効である	--79
	<i>CAB1</i> 、 <i>CAB2</i> プロモーターへの <i>in vivo</i> 結合プロファイル	--79
	GT-1 の新規 <i>in vivo</i> 結合配列	--80
	TIP 法の可能性	--80
まとめと展望		--92
謝辞		--95
参考文献		--96

-はじめに-

植物は光、温度、病原体、植物ホルモンなどから受ける刺激をシグナルとして感知し、これらに応答して遺伝子発現を制御する機構を備えている。植物は一般に動物と異なり、発芽し生長をはじめたのちは移動できない。従って植物は種の保存のために固有の遺伝子発現制御メカニズムを獲得した可能性も考えられる。植物の遺伝子の多くが転写の段階で発現制御されることから、転写制御因子の性状を解析することは学術的に、また応用技術的に重要な意義がある。特に光は植物の生存にとって最も重要な環境因子であるため、光応答性の転写制御機構を明らかにする試みが当初から行われてきた。ひとつは遺伝学的なアプローチで、光環境への応答変異株のスクリーニングと原因遺伝子の単離が試みられた。その結果 *Phytochrome*、*Cryptochrome* などの光受容体を起点とし、cGMP 及び Ca^{2+} をセカンドメッセンジャーとする光シグナル伝達経路、およびこれに関与する因子群の存在が明らかになった (Chamovitz and Deng, 1996; Chory et al., 1996; Mustilli and Bowler, 1997) [図 1]。しかし近年まで植物の光合成関連遺伝子の発現制御に直接関与する転写制御因子の突然変異体は単離されていなかったため、光応答性遺伝子のプロモーター解析による光応答性の転写に関わるシス因子の同定、続いてそのシス因子へ結合する転写制御の単離・同定が試みられた。

核にコードされる代表的な光合成関連遺伝子である *RBCS* (*ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit*) や *CAB* (*chlorophyll a/b binding protein*) は光に応答して顕著に発現量が増大すること、mRNA の蓄積量が高く、解析が容易であったことなどから、早くからプロモーター解析がおこなわれた (Bedbrook et al., 1980; Gilmartin et al., 1990)。エンドウ *RBCS-3A* プロモーター配列と *CAT* (*chloramphenicol acetyl transferase*) との融合遺伝子を導入した形質転換タバコの解析、或いは S1 ヌクレアーゼプロテクション法による解析から、BoxII 配列 (GT1-box)、及びこれと相同性を有する複数の配列が *RBCS* の光応答性の転写に必要なことを見出された (Kuhlemeier et al., 1987, 1988; Lam and Chua, 1990)。続いて GT1-box を 4 つ連結した 4 量体を、植物において恒常的なプロモーター活性を示す *CaMV* (*Cauliflower mosaic virus*) 35S プロモーターの転写開始点上流-90 を含む領域の上流に接続した結果、明瞭な光応答性を獲得した (Lam and Chua, 1990) [図 2a]。以上の一連の loss-of-function 実験、gain-of-function 実験の結果から、GT1-box は光応答性の遺伝子発現に必要な LRE (light-responsive element) であると結論づけられた。他方、オオムギ *PHYA* 遺伝子のプロモーター領域に、GT1-box が同定されたのと同様の loss-of function 実験から GT1-box と類似する塩基配列を有する光応答性シス因子、GT2-box、GT3-box が見出

された (Dehesh et al., 1990) [図 2b]。GT2-box、GT3-box は暗条件下での *PHYA* 遺伝子発現抑制に関与する。この点で、*RBCS* の明条件下での発現上昇に関与する GT1-box と機能的に異なる光応答性シス因子であると位置づけられている。以上の GT1-box、GT2-box、GT3-box のコア配列はわずか 1、2 塩基異なるだけであり、これらはまとめて GT ボックスと総称される。GT ボックスは高等植物において多重遺伝子族を構成する *RBCS* や *CAB* 遺伝子のプロモーター領域に共通して見出されることから、GT ボックスを介した転写制御は光応答性の遺伝子発現に広く保存されていると考えられた。

これと平行して、以上に示した GT ボックスへの結合活性が核抽出液を用いて解析された。GT1-box に対する DNA 結合活性 (GT-1 活性) は初め、エンドウ核抽出液から見出された (Green et al., 1987)。続いて GT1-box へ塩基置換導入した結果、GT1-box のコア配列が 5'-GGTTAA-3' であることも明らかになった (Green et al., 1988)。その後エンドウ *RBCS-3A* 以外の他の光応答性遺伝子のプロモーター領域を用いたゲルシフトアッセイにおいても GT-1 活性と類似した DNA 結合活性が見出された (Stockhaus et al., 1987; Schindler and Cashmore, 1990)。

GT-1 をコードする cDNA は GT1-box をプローブにしたサウスウェスタンスクリーニングにより単離され、シロイヌナズナ相同遺伝子も同定された (Perisic and Lam, 1992; Gilmartin et al., 1992; Hiratsuka et al., 1994)。GT-1mRNA の発現は光応答性を示さないため、GT-1 は光に対する初期応答性の転写への関与が示唆された (Gilmartin et al., 1992)。組み換えタンパク質を用いたゲルシフトアッセイにより GT-1 は種々の GT ボックスへ配列特異的に結合することが示され、GT-1 活性を有することが確認され、また分子解剖実験から DNA 結合部位が決定された (Hiratsuka et al., 1994)。さらに DNA 結合部位中の 3 つの α -ヘリックス構造をプロリン置換の導入により順次破壊した GT-1 タンパク質によるゲルシフトアッセイにより、N 末端から数えて 2 番目、及び 3 番目の α -ヘリックスが DNA 結合に不可欠であることが示された (Hiratsuka et al., 1994)。Trihelix と称されるこの構造は植物以外の他の種の転写制御因子には見出されないことから、植物固有の DNA 結合ドメイン構造であることが示唆された。また GT-1 は転写活性化能を持つことも示された (Le Gourrierc et al., 1999)。以上に加えて GT-1 は C 末端領域を介してホモ多量体を形成しうること、DNA 結合部位を含む N 末端側の約半分の領域が GT-1 の核局在に十分なことが明らかになった (Hiratsuka et al., 1994)。しかし GT-1 にはタンパク質間相互作用に関連する、あるいは核移行に関与する既知のモチーフは見出されなかった。

以上の GT-1 に関する知見とは別に、GT-1 と類似した DNA 結合タンパク質である GT-2 に関しても多くの報告がある。GT-2 はオオムギ *PHYA* プロモーターに見出さ

れた光応答性シス因子、GT2-box および GT3-box へ結合する活性で、GT-2 をコードする cDNA がまずイネから、次いでシロイヌナズナから単離された (Dehesh et al., 1990; Kuhn et al., 1993)。GT-2 の mRNA 発現には異なる光質 (赤色光/近赤外光) に対する明瞭な光応答性はないが、暗条件で培養した芽生えに白色光を照射した場合に光応答性を示す。GT-2 は Trihelix を二つ有する点で、GT-1 とは構造的に異なる[図 3]。GT-2 の N 末端側と C 末端側の Trihelix では GT ボックスへの結合特異性が若干異なり、N 末端側の DNA 結合部位は GT3-box、C 末端側のものは GT2-box への結合活性が最も強い (Dehesh et al., 1992)。また GT-2 はアグロバクテリウムの VirD2 に見出された、典型的な二分節型の NLS (Nuclear localization signal) を有する (Dehesh et al., 1995)。さらに GT-2 は *PHYA* プロモーターの転写を活性化するため、GT-2 は転写活性化因子であることが示唆された (Ni et al., 1996)。

GT-1 と GT-2 は互いに構造的に類似した DNA 結合タンパク質ではある。GT ボックス結合タンパク質は、Trihelix 構造を一つ有する GT-1 タイプと、二つ有する GT-2 タイプの大きく 2 つのサブファミリーを構成すると考えられてきた (Hiratsuka et al., 1994; Nagano, 2000)。また GT ボックス結合タンパク質はタバコやシロイヌナズナ、イネなどから単離されており、単子葉植物、双子葉植物に広く保存された転写制御因子であると予想された。しかしながら、GT-1 と GT-2 とで DNA 結合特異性が異なる (GT-1 は GT1-box へ最も強く結合し、GT-2 は GT2-box、GT3-box へ強く結合する) こと、GT-2 の結合配列 GT2-box、GT3-box は暗誘導性、GT-1 の結合配列 GT1-box は明誘導性を示す点で機能的に異なるシス因子であることから、転写制御因子 GT-1 と GT-2 との機能的な関連性は低いと考えられた (Nagano et al., 2001)。

その他 GT-1、GT-2 以外に報告された GT ボックス結合タンパク質として GTL1、GTL2、DF1 がある (Smalle et al., 1998; Nagano et al., 2001)。GTL1 は GT-2 と相同性が高いこと、長角果での mRNA の蓄積量が多いことなどが報告されているが、DNA 結合特異性や転写活性化能などタンパク質レベルの解析は報告がない。DF1 はエンドウ *pra2* プロモーターの暗誘導性のシス配列、DE1 (5'-TACAGT-3') へ結合するトランス因子で、GT-2 に類似したアミノ酸配列を有する。しかし DF1 に関しては DNA 結合特異性以外に報告がない。

転写制御因子が転写活性化能を発揮するためには DNA との結合が重要な条件となる。GT-1 についても、その活性調節メカニズムの解明が試みられた。GT-1 は mRNA 発現に光応答性がないため (Gilmartin et al., 1992)、GT-1 の転写活性化能は自身の転写後に調節されると予想された。一方トマト *phytochrome* 機能欠損株 *aurea* の細胞に Ca^{2+} イオン及び Calmodulin (CaM) を注入したマイクロインジェクション実験から、*CAB* プロモーターや GT1-box へ到る光シグナル伝達経路への Ca^{2+} イオン及び CaM

の関与が予想された (Bowler et al., 1994; Wu et al., 1996)。さらに CaM 依存的なキナーゼ、CaMKII の予想リン酸化配列 K/R-X-X-S/T が GT-1 には複数箇所存在し、そのうち T133 を CaMKII によってリン酸化されると GT-1 の DNA 結合活性が上昇することが示された (Marechal et al., 1999)。従って GT-1 の DNA 結合活性が Ca^{2+} /CaM 依存的なリン酸化によって調節されると考えられた。リン酸化修飾とは別に、他のタンパク質との相互作用により GT-1 の DNA 結合活性が調節される可能性についても検討された。GT-1 の DNA 結合活性は基本転写因子群のコンポーネントの1つで転写活性化に関与する TFIIA と協調的に DNA へ結合する (Le Gourrierec et al., 1999)。しかし酵母 two-hybrid システムあるいは *in vitro* での結合実験は行われていないため、GT-1 と TFIIA の相互作用についてはあくまで間接的に示唆されたに過ぎない。一方 GT-2 は AT-rich 配列結合因子 HMG-I/Y と相互作用し、DNA 結合活性が上昇することが示された (Martinez-Garcia and Quail, 1999)。

以上に述べたとおり、GT-1 は光応答性の転写制御に関与する転写制御因子であることが示唆される。しかし GT-1 は逆遺伝学的手法で単離されたこと、変異体が未だに報告されていないことから、*in vivo* での機能について直接的な証明はない。一方、シロイヌナズナゲノムには GT-2 タイプの GT-1 類似遺伝子が少なくとも 4 遺伝子 (GT-2、GTL1、GTL2、GT-3a) 存在する。これらの因子の発現には器官特異性が見出されることから、GT-2 タイプの GT ボックス結合タンパク質は器官特異的な転写制御機構に関与する可能性が示唆される。ところが GT-1 タイプの GT ボックス結合タンパク質は GT-1 以外に報告されていない。そこで本研究は GT ボックス結合タンパク質群による転写調節機構の理解に向けて、第 1 章では GT-1 と相同性を有する新規遺伝子 GT-4 並びに GT-5 のクローニング、DNA 結合特異性、転写活性化能、核局在性について調査し、転写制御因子としての特徴付けをおこなった。続いて、リン酸化と DNA 結合活性との関連を調査し、GT-5 の DNA 結合活性がリン酸化修飾により負に制御されることを明らかにした。第 2 章においては免疫沈降法を利用して、これまで試みられていなかった *in vivo* 結合配列の同定をおこなった。またこれとは別に、未同定だった GT-1 の核移行に必要な領域のを決定した。

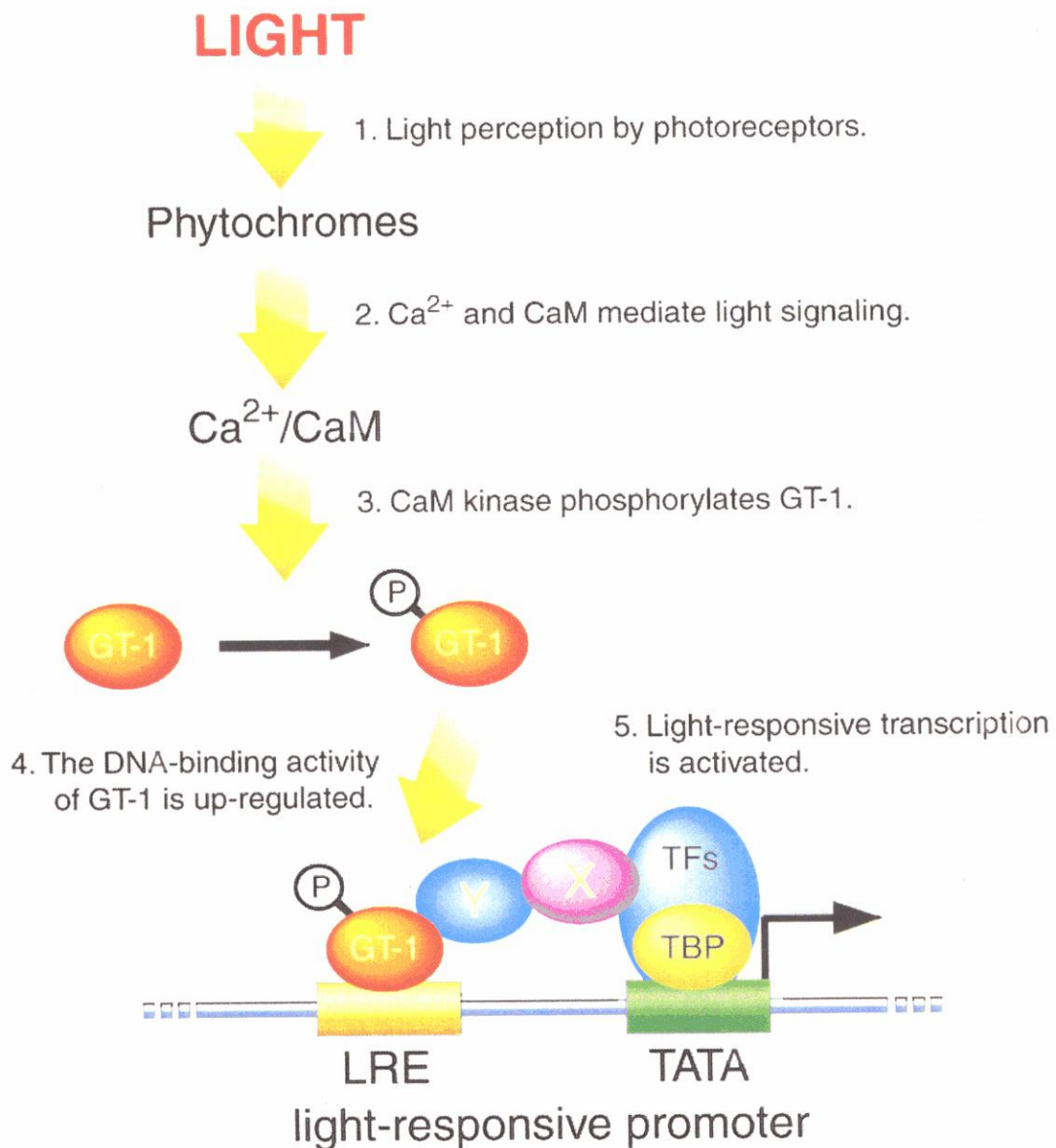


図1 光シグナル伝達経路のモデル

植物は外界からの光シグナルを感知し、これに応答するためのシグナル伝達機構を備えている。光シグナル伝達経路の末端には、光応答性遺伝子のプロモーター中に見出される LRE (光応答性シス因子) と、LRE へ結合する転写制御因子が存在する。このモデルでは光シグナリングに参与する転写制御因子を代表して、GT-1 とした。GT-1 は直接、或いは未知の因子 (X、Y) を介して基本転写因子群を TATA ボックスへ誘導・結合させ、転写活性を上昇させると考えられている。

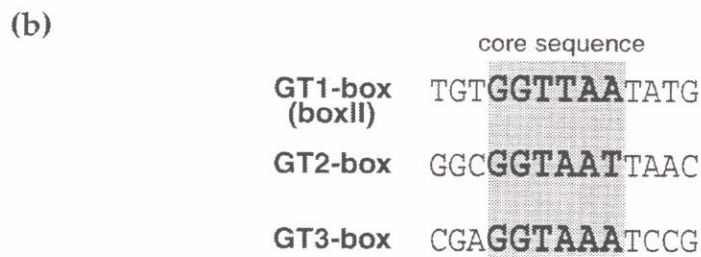
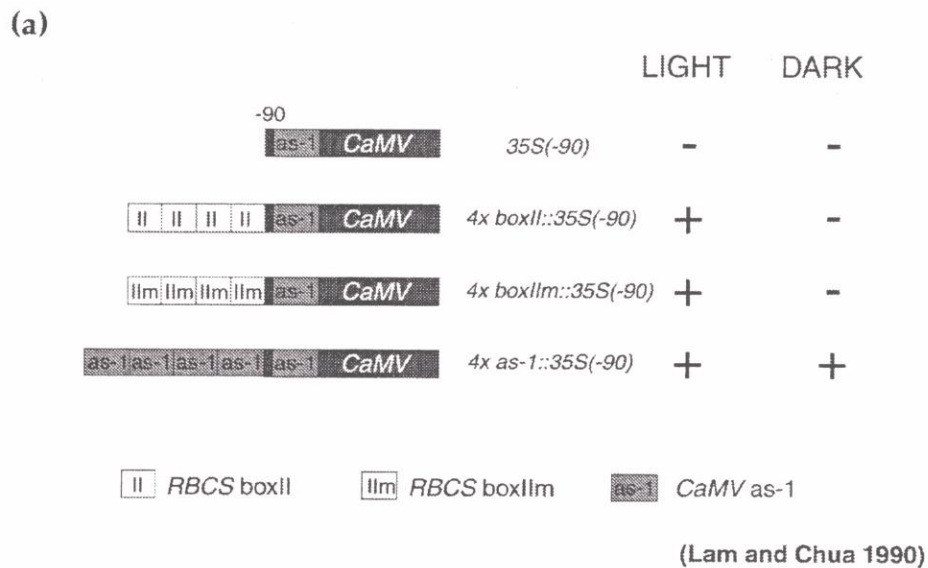


図2 boxII 配列は光応答性シス因子である

(a) エンドウ *RBCS-3A* プロモーター断片の光応答性について調べた結果をまとめた。エンドウ *RBCS-3A* プロモーター-166~-50 の領域は、構成的な発現を示す *CaMV35S-46* に光応答性を付与した (Kuhlemeier et al., 1988)。エンドウ *RBCS-3A* プロモーター-166~-46 の領域に見出される boxII 配列を 4 つ連結した 4 量体を *CaMV35S-46* へ接続したコンストラクトは光応答性は示さなかったが、*CaMV35S-90* へ接続したコンストラクトは光応答性を獲得した (Lam and Chua, 1990)。*CaMV35S-90*、あるいは *CaMV35S-90* の上流へ as-14 量体を接続したコンストラクトは光応答性を示さない。従って boxII 配列は光応答性の転写制御に必要なシス因子であることが示された。(b) 代表的な GT ボックスのコア配列を示した。GT1-box、GT2-box、GT3-box のコア配列は互いに 1~2 塩基異なる。

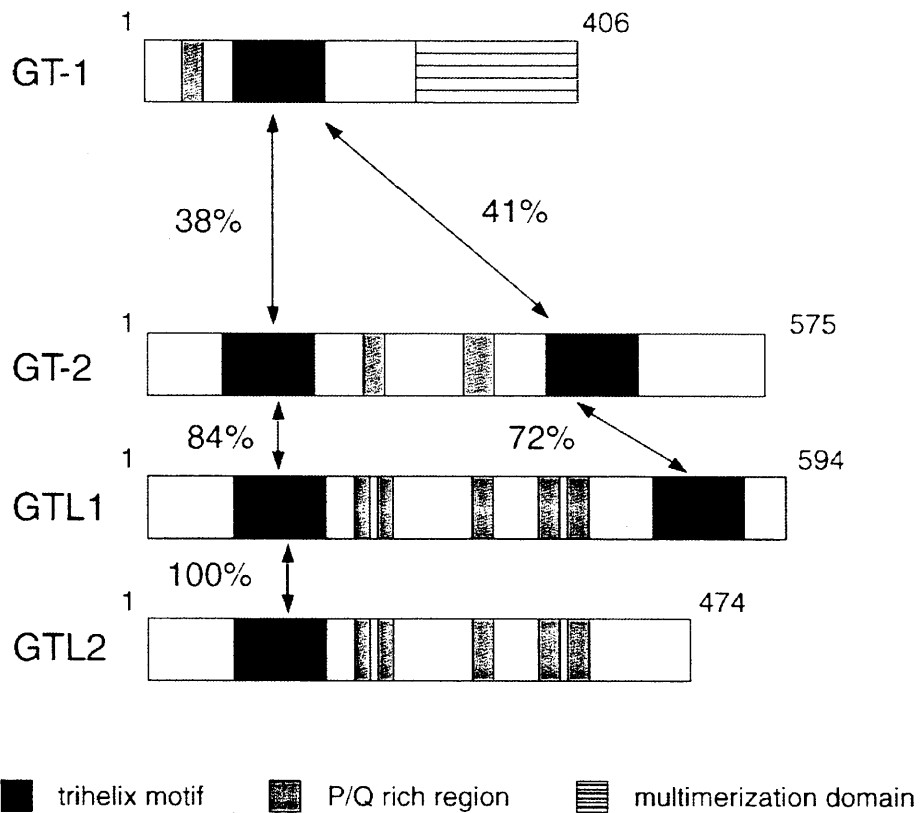


図3 既知のシロイヌナズナ GT ボックス結合タンパク質群

cDNA のクローニングが報告された、シロイヌナズナ GT ボックス結合タンパク質群を示す。GT ボックス結合タンパク質は Trihelix と称される、helix-helix-turn-helix 型の DNA 結合部位を持つ。Trihelix の数により大きく 2 つのサブファミリー、GT-1 タイプと GT-2 タイプとに分類され、GT-1 は Trihelix をひとつ、GT-2、GTL1 はふたつ有する (Kuhn et al., 1993; Hiratsuka et al., 1994; Smalle et al., 1998)。GTL2 は GTL1 と全く同一のアミノ酸配列を示すが、染色体上の別の座位に位置する (Smalle et al., 1998)。GT-1 と GT-2 とは Trihelix においてアミノ酸レベルで約 40% の相同性を示す一方、GT-2 タイプ間での Trihelix における相同性は比較的高く、70% 以上である。GT-1 及び GT-2 に関しては DNA 結合活性や転写活性化能、核移行活性について報告されているが、GTL1、GTL2 については、mRNA 発現が確認されているものの、DNA 結合活性などのタンパク質レベルの性状解析はされていない。

1. 新規 GT ボックス結合タンパク質の単離と *in vitro* 解析

序論

転写制御は数多くのタンパク質が複合体を形成しておこなわれる。これらのタンパク質のうち、転写制御因子の多くは大きく3つの特徴（DNA結合活性、核局在活性、転写活性制御能）を示す。従ってこれらの特徴は、あるタンパク質が転写制御因子であるための必要条件とも考えられる。植物固有のDNA結合モチーフ、Trihelixを有するGTボックス結合タンパク質群はGT-1がTrihelix構造を1つ、GT-2、GTL1、GTL2が2つを有することから大きく2つのサブファミリーに分類されてきた（Hiratsuka et al., 1994; Nagano, 2000）[図3]。GTボックス結合タンパク質群の特徴付けをおこなう上で、類似遺伝子の探索と解析は欠かせない。そこで本研究ではシロイヌナズナ新規GTボックス結合タンパク質をクローニングし、それらの遺伝子産物が転写制御因子としての特性を有するかをDNA結合特異性、転写活性化能及び核局在活性を指標に調査した。

一方、GT-1自身のmRNA発現に光応答性、器官特異性が認められないことからGT-1のDNA結合活性が転写後に調節される可能性が示唆されていた（Gilmartin et al., 1992）。また、GT-1結合配列であるGT1-boxへ到る光シグナル伝達経路へ Ca^{2+} 及びCaMが関与すること（Neuhaus et al., 1993; Bowler et al., 1994; Wu et al., 1996）、GT-1にCaMKII（CaM Kinase II）の予想標的配列K/R-X-X-S/Tが複数見出されること、CaMKII予想リン酸化部位へのアミノ酸置換を導入したGT-1変異体のDNA結合活性が上昇することなど（Marechal et al., 1999）から、 Ca^{2+} /CaM依存的キナーゼによるGT-1のDNA結合活性制御機構の存在が示唆された。そこで新規GT-1類似タンパク質についても Ca^{2+} /CaM依存的キナーゼによりリン酸化される可能性について検討し、さらにリン酸化修飾とDNA結合活性制御との関連を調べ、GT-1との比較を試みた。

材料と方法

1. 試薬

実験にあたり使用した制限酵素、DNA リガーゼなどの DNA 修飾酵素は (株) 宝酒造、(株) 東洋紡績から購入した。X 線フィルムは (株) 富士フィルムの RX-U を使用した。生化学試薬は (株) ナカライテスク及び (株) 和光純薬から購入した。

使用したキット

QIAGEN plasmid kit (QIAGEN 社)

SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech 社)

RNA PCR kit (AMV) Ver. 2.0 (宝酒造)

Alk Phos Direct (Amersham Pharmacia Biotech 社)

DNA Blunting kit (宝酒造)

DNA Ligation kit Ver. 2 (宝酒造)

Riboprobe *in vitro* transcription kit (Promega 社)

TNT Rabbit Reticulocyte Lysate (Promega 社)

ABI PRISM Dye Primer kit (Perkin Elmer 社)

ABI PRISM Dye Terminator kit (Perkin Elmer 社)

Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega 社)

Random Primer DNA Labeling kit (宝酒造)

LA PCR *in vitro* Mutagenesis kit (宝酒造)

Alk Phos Direct (Amersham Pharmacia Biotech 社)

2. 培地・緩衝液

LB 培地：1 % Bacto Tripton, 0.5 % Yeast Extract, 1 % NaCl 必要に応じて 20mg/l tetracycline、50mg/l ampicillin を加えた。また寒天培地の作成には、15g/l の Agar を加えた。

F 培地 (1 litre あたり)：1×MS salts (4.3g) , 1000×ビタミンストック溶液 [100mg inositol (stock 100mg/ml) , 1.0mg thiamine (stock 1.0mg/ml) , 0.5mg nicotinic acid (stock 0.5mg/ml) , 0.5mg pyridoxine (stock 0.5mg/ml) , 0.5g MES, pH 5.7 with 1N KOH, 8g Agar] Agar は必要に応じて 15g 加えて 1.5 %寒天培地を作成した。

<CTAB 法>

シロイヌナズナ植物体からのゲノム DNA の精製には CTAB 法を採用した。

2 % CTAB solution: 100 mM Tris-HCl (pH8.0) , 20 mM EDTA (pH8.0) , 1.4 M NaCl,
2 % CTAB

1 % CTAB solution: 50 mM Tris-HCl (pH8.0) , 10 mM EDTA (pH8.0) , 1 % CTAB

<ボイル法>

STET: 8 % sucrose, 50 mM Tris-HCl (pH8.0) , 50 mM EDTA (pH8.0) , 5 % Triton
X-100

<組換えタンパク質の発現・精製>

超音波破碎用緩衝液: 50 mM Na-phosphate (pH8.0) , 300 mM NaCl

洗浄用緩衝液: 50 mM Na-Phosphate, 300 mM NaCl, 10 % glycerol, pH6.0

溶出用緩衝液: 50 mM Na-Phosphate, 300 mM NaCl, 0.2 M Imidazol, 10 % glycerol,
pH6.0

<リン酸化解析>

CaMKII 用緩衝液: 25 mM HEPES-KOH (pH7.5) , 5 mM Mg (CH₃COO)₂, 0.1 mM
EGTA, 0.05 mM DTT, 1.5 mM CaCl₂

CKII 用緩衝液: 50 mM Tris-HCl (pH8.0) , 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl

1×SDS サンプルバッファー: 125 mM Tris-HCl (pH6.8), 360 mM β-mercaptoethanol,
1.5 % SDS, 7.5 % glycerol, 0.5 % bromophenol blue

<パーティクルボンバードメント>

500 μg/ml diameter: 1.6 μm gold particle, 50 % glycerol

<ゲルシフトアッセイ>

NEB:透析緩衝液: 20 mM HEPES-KOH (pH7.8) , 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM
DTT, 0.2 mM PMSF, 10 % glycerol

<その他>

そのほか、各キットに添付されたバッファーを使用した。

3. 菌株

サブクローニング用の宿主として大腸菌 XL1-Blue 株 (Stratagene 社) と DH5 α 株 (東洋紡績) を適宜使用した。組換えタンパク質発現用の宿主としては、BL21 (DE3) pLysS を用いた。

4. ベクタープラスミド

プラスミドはサブクローニング用に主に pBluescript (Stratagene 社) を、PCR 産物の TA クローニング用には pT7Blue (Novagen 社) を使用した。大腸菌における組換えタンパク質の発現ベクターには pET15b および pET30b (Novagen 社) を用いた。Dual Luciferase Reporter Assay に用いたコンストラクトは基本的に pUC19 由来の pBI221-luc+ (Matsuo et al., 2001) を基に構築した。プラスミドの精製には必要に応じて QIAGEN plasmid kit (QIAGEN 社) とボイル法に拠った。ボイル法では LB 培地 3ml で終夜培養した大腸菌を 1.5ml チューブに集菌し、180 μ l の STET 中に懸濁した。そこへ 20 μ l の 5mg/ml lysozyme を加え、45 秒間煮沸したのち、15 分間 15000rpm にて遠心した。上澄に 200 μ l の 2-propanol を加え、イソプロパノール沈澱をおこなった。

5. 植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は *Columbia* 株を使用した。植物は特に記載しない限り長日条件 (16hr light/8hr dark)、23°C にて培養した。

6. オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチドは全て (株) サウディー・テクノロジーに合成依頼した。精製は OPC 精製を指定した。オリゴヌクレオチドの塩基配列は、本章において適宜記載した。

7. 塩基配列決定

塩基配列の決定は、ABIPRISM Dye Primer kit、ABIPRISM Dye Terminator kit (共に Perkin Elmer 社) を適宜使用し、サイクルシーケンサー ABI373 (Applied Bio Industries 社) にておこなった。ゲル版は 48cm を使用し、シャークコームは 24 レーンのもの と 36 レーンのものを適宜使用した。ゲルの作製にあたっては Long Ranger (FMC Bio Products 社) を用い、ゲルの終濃度は 5.25 % Long Ranger、8.3 M Urea、1×TBE とした。電気泳動は 2800V、40mA、42W で 17 時間おこなった。

8. 5' RACE 及び 3' RACE 法

PCR 反応は全て、GeneAmp PCR Systems 9600 及び、GeneAmp PCR Systems 2400 (共に Perkin Elmer 社) を使用した。シロイヌナズナ花芽より精製した全 RNA を鋳型に、SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech 社) を用いて GT-4 並びに GT-5 の全長 cDNA を取得した。実験手順は全て添付されたプロトコルに従った。用いた遺伝子特異的プライマーを以下に示す。全長 GT-4 cDNA の取得には、60976C1.1 及び 60976C1.2、全長 GT-5 cDNA の取得には 26625C1.1 及び 26625C1.2 をプライマーとして用いた。以下に、プライマーの配列を示す。

60976C1.1, 5'-GGAATCAACTTTAGCAGATGG-3'

60976C1.2, 5'-CGTCTTGTGCCCATGTCTCTGC-3'

26625C1.1, 5'-GGAATCAACTTTAGCAGATGG-3'

26625C1.2, 5'-CGTCTTGTGCCCATGTCTCTGC-3'

9. RT-PCR

シロイヌナズナ花、花芽、葉、莖、根各器官から Rneasy Plant (QIAGEN 社) を用いて全 RNA を抽出したのち、DNase I にて混入したゲノミック DNA を分解処理した。続いて Oligo dT Adapter Primer をプライマーとして全 RNA を逆転写し、1st strand cDNA を合成した。これを鋳型として遺伝子特異的プライマーを用いて PCR をおこなった。遺伝子特異的プライマーを以下に示す。PCR 反応条件は、熱変性 94°C 30 秒、アニール 57°C 30 秒、伸長反応 72°C 30 秒を 1 サイクルとして 25 サイクルとした。EF-1 α 及び CAB1 に関しては 20 サイクルとした。PCR 反応産物は 1.5 % アガロースゲルにて電気泳動した。続いて増幅した DNA 断片を Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech 社) へ転写し、Alk Phos Direct (Amersham Pharmacia Biotech 社) によりサザンブロット解析をおこなった。プローブは各々の遺伝子の cDNA 断片を鋳型にして、RT-PCR で各々の遺伝子に対して用いたオリゴヌクレオチドを使用した。PCR 増幅

したハイブリダイゼーションの条件などは添付の説明書に拠った。

GT ボックス結合タンパク質の光応答性発現の解析では、暗黒化で 3 日間培養したシロイヌナズナ芽生えに白色光を照射し、0、1、3、6、12 時間後に、経時的にサンプリングし、これらを出発材料とした。また、2 週間培養したシロイヌナズナを暗条件に移し、12 時間あるいは 24 時間後に葉を採取し、出発材料とした。用いた遺伝子特異的プライマーを以下に示す。

GT-1dN68 5'-GGTCTAGAGACCATGGGAGAAAGCAGTGGAGAAGAT-3'

JM001 5'-AGACGCCTTTCAAGGTTTAAGG-3'

60976N1.1 5'-CCTCGGAGAAAGCAGTG-3'

GT-4RT1 5'-AAGACCATCATGATCAAGCTCC-3'

60976N1.1 5'-CCTCGGAGAAAGCAGTG-3'

GT-4RT1 5'-AAGACCATCATGATCAAGCTCC-3'

26625N1.1 5'-AAGACCATCATGATCAAGCTCC-3'

GT-5RT1 5'-AAGACCATCATGATCAAGCTCC-3'

F-EF1a 5'-TCGAGACCACCAAGTACTACTGC-3'

R-EF1a 5'-ATCATACCAGTCTCAACACGTCC-3'

10. 組換えタンパク質の発現・精製

本章のゲルシフトアッセイに用いた組換えタンパク質は一部を除き、GT-1、GT-4 についてはウサギ網状赤血球由来の抽出液中で、GT-5 については大腸菌で発現させた。図 17 及び 18 で示したリン酸化実験の場合は GT-1、GT-4、GT-5 の全ての組換えタンパク質を大腸菌で発現させた（後述する）。GT-4 cDNA の ORF をプライマー、GT-4N1、GT-4C1 を用いて PCR により増幅し、得られた増幅断片の 5'末端を制限酵素 *NcoI* にて処理した。用いたプライマーの配列を以下に示す。

GT-4P1 5'-CAGCCATGTTTGTTCCTCGATAACAACAATCCTT-3'

GT-4P2 5'-CAGCGCTCGAGTCAAACCTCTCTCAGACATGTCC-3'

増幅断片の平滑末端化処理をおこなったのち、3'末端を制限酵素 *XhoI* にて処理した。これらの cDNA 断片を、制限酵素 *SmaI* および *XhoI* にて処理した pBluescript II KS へ挿入し、pBSIIKSGT-4 を作製した。GT-1 組換えタンパク質の発現には pBSIIKSGT-1 を用いた (Hiratsuka et al, 1994)。以上のプラスミドを鋳型として、Riboprobe *in vitro*

transcription kit (Promega 社) により添付のプロトコルに従って mRNA を合成した。続いて Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega 社) により、添付のプロトコルに従って、 $[^{35}\text{S}]\text{Met}$ 存在下、組換えタンパク質を合成した。組換えタンパク質の発現の確認は、サンプルを SDS-PAGE にて展開し、ゲルを乾燥させた後、X 線フィルムを感光させておこなった。

GT-5 組換えタンパク質の発現・精製は QIAexpress System (QIAGEN 社) に従い、以下に記す方法にておこなった。GT-5 の ORF をプライマー GT-5N1、GT-5C1 を用いて PCR により増幅し、得られた増幅断片の 5'末端、3'末端を制限酵素 *NcoI* ならびに *XhoI* にて処理した。これらを制限酵素 *NcoI* ならびに *XhoI* にて処理した発現ベクター pET30b (Novagen 社) のマルチクローニングサイトへ挿入し、組換えタンパク質発現用コンストラクト pET30bGT-5 を作製した。pET30bGT-5 を用いて大腸菌 BL21 (DE3) pLysS を形質転換し、単一コロニーを選抜後、 $50\ \mu\text{g/ml}$ kanamycin を含む 3mlLB 培地にて 37°C において終夜培養した。1ml の終夜培養液を 50mlLB 培地へ加え、 37°C において一時間培養した後、1 mM IPTG により組換えタンパク質の発現誘導をおこなった。本培養液の OD600 が約 0.5 となった時点で培養を終了し、菌体回収ののち超音波破碎用緩衝液に再懸濁し、超音波破碎をおこなった。破碎後遠心分離をおこなって上澄を回収し、超音波破碎用緩衝液にて平衡化した Ni^{2+} -NTA 担体 (QIAGEN 社) を充填したカラムに供した。洗浄用緩衝液による洗浄後、溶出用緩衝液により GT-5 組換えタンパク質を溶出し、ゲルシフトアッセイに供した。

GT-5N1, 5'- GATACCATGGATGGACATCAGCATCATCA-3'

GT-5C1, 5'- GTGCTCGAGGGAACCATCTCTAGTAAG-3'

リン酸化実験で用いた組換えタンパク質は全て大腸菌 BL21 (DE3) pLysS において発現させた。GT-1 組換えタンパク質は pET15bGT-1 (Marechal et al., 1999) を用いて大腸菌において発現させた。GT-4 組換えタンパク質の大腸菌での発現用コンストラクト、pET30bGT-4 並びに pET30bdNGT-4 は以下に示す手順で作製した。GT-4 の ORF をプライマー GT-4P1、GT-4P2 を用いて PCR により増幅し、得られた増幅断片の 5'末端、3'末端を制限酵素 *NcoI* ならびに *XhoI* にて処理した。これらを制限酵素 *NcoI* ならびに *XhoI* にて処理した発現ベクター pET30b のマルチクローニングサイトへ挿入し、pET30bGT-4 を作製した。ところが全長の GT-5 組換えタンパク質の発現誘導が困難であったため、pET30b、及び GT-4cDNA 中にそれぞれ一カ所ずつ制限酵素部位を有する制限酵素 *BglII* にて処理し、同一プラスミド内で自己ライゲーションして N 末端側 24 残基を欠失させたコンストラクト、pET30bdNGT-4 を作製し、これ

を組換えタンパク質の発現誘導に供した。pET30bGT-4 を用いて大腸菌での発現誘導を試みたが、組換えタンパク質の発現誘導が困難であった。以上の組換えタンパク質の精製は精製は QIAexpress System (QIAGEN 社) に拠った。

11. ゲルシフトアッセイ

DNA プローブの標識は以下の手順にておこなった。GT1-box を 4 つ連結したオリゴヌクレオチドの 5'末端、3'末端を制限酵素 *Hind*III 及び *Xho*I にて処理し、反応溶液 50 μ l 中で 1U Klenow fragment、0.5 μ M [α -³²P] dCTP、20 μ M dATP、20 μ M dTTP、20 μ M dCTP 存在下で 37°C において 45 分間反応させた。反応後、Sephadex G-50 spin column (Amersham Pharmacia Biotech 社) にて分離・精製し、余剰の [α -³²P] dCTP、その他の基質を除去した。標識効率はチェレンコフ光を測定し、おおよそ 50000 cpm/ng DNA 以上であることを確認した。

ゲルシフトアッセイは、以下の条件にておこなった。NEB を緩衝液とする反応溶液中に最終濃度が 100ng/ μ l dI-dC、1 mM DTT、20 μ g/ml antipain、1 μ g/ml leupeptin となるよう各々の試薬を混ぜ、2.5 μ l の GT-1 及び GT-4 組換えタンパク質を合成したウサギ網状赤血球由来の抽出液を混合し、最後に [α -³²P] dCTP で標識した DNA プローブ 0.2ng を加えて反応液の総容量を 12 μ l とした。GT-5 の場合は、大腸菌にて作製・精製した組換えタンパク質 0.5 μ g を反応液に加えた。また、これに適宜コンペティター DNA として、 [α -³²P] dCTP で標識した DNA プローブを加える前に、各図に示した量の未標識の DNA 断片を加えた。室温にて 30 分間静置したのち、1×TE、1 %アガロースゲル中で、ペリスタポンプで緩衝液を循環させながら定電圧 100V にて電気泳動した。ゲルを乾燥させたのち、X 線フィルムを感光させた。

12. Electroporation

BY-2 細胞の培養、プロトプラスト化及びエレクトロポレーションは kosugi らの方法に拠った (Kosugi et al., 1990)。エレクトロポレーションには Gene Pulsar Electroporator (Bio-Rad 社) を用いた。エフェクタープラスミド 0.8 μ g、レポータープラスミド 10 μ g、内部標準プラスミド 1 μ g を同時に BY-2 プロトプラストに導入した。導入するプラスミドの合計量は pBI221 (Clontech 社) を適宜加えて調整した。プロトプラストを 26°C にて 17 時間培養したのちルシフェラーゼ活性を測定した。

13. Dual Luciferase 法

Dual Luciferase 法は Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) を用い、実験手順は添付のプロトコルに従った。ルシフェラーゼの発光の検出にはルミノメーター (model LB9501; Berthold 社) を用いた。

14. リン酸化反応

GT-1、GT-4、GT-5 組換えタンパク質のリン酸化反応は以下に記す実験手順にておこなった。CKII によるリン酸化反応は、CKII 用緩衝液に各々の組換えタンパク質 1 μ g、1 mM ATP、0.5 μ Ci [γ - 32 P] ATP を加え、反応液の総体積 20 μ l の条件で、室温にて 30 分静置した。CaMKII によるリン酸化反応もほぼ同様に、CaMKII 用緩衝液に各々の組換えタンパク質 1 μ g、1 mM ATP、0.5 μ Ci [γ - 32 P]ATP を加え、反応液の総体積 20 μ l の条件で、室温にて 30 分静置した。リン酸化反応後、氷冷した 20 μ l の

20 % trichloroacetic acid を加えてリン酸化反応を停止させ、30 分間表情に静置したのち遠心分離により得られた沈澱を -20°C に冷やした acetone にて 2 回洗浄した。この沈澱を 20 μ l の 1 \times SDS サンプルバッファーに溶解し、このうち 7 μ l を 12.5 % アクリルアミドゲルにて展開した。電気泳動終了後、ゲルを乾燥させ、X 線フィルムを感光させた。

リン酸化反応に引き続きゲルシフトアッセイをおこなう場合には、リン酸化反応液中に 0.5 μ Ci [γ - 32 P] ATP を加えず、未標識の 1 mM ATP のみを加えた。ゲルシフトアッセイは、NEB を緩衝液とする反応溶液中に最終濃度が 100ng/ μ l dI-dC、1 mM DTT、20 μ g/ml antipain、1 μ g/ml leupeptin となるよう各々の試薬を混ぜ、GT-1、GT-4、GT-5 組換えタンパク質 100ng を含むリン酸化反応後の溶液 2 μ l を混合し、最後に [α - 32 P] dCTP で標識した DNA プロブ 0.2ng を加えて反応液の総容量を 12 μ l とした。また、これに適宜コンペティター DNA として、[α - 32 P] dCTP で標識した DNA プロブを加える前に、各図に示した量の未標識の DNA 断片を加えた。室温にて 30 分間静置したのち、1 \times TE、1 %アガロースゲル中で、ペリスタポンプで緩衝液を循環させながら定電圧 100V にて電気泳動した。ゲルを乾燥させたのち、X 線フィルムを感光させた。

15. GT-4 及び GT-5 と GFP との融合タンパク質発現用ベクターの構築

GT-4 及び GT-5 組換えタンパク質発現用コンストラクト、pET30bGT-4 並びに

pET30bGT-5 を制限酵素 *NcoI* にて処理し、平滑末端化したのち制限酵素 *XhoI* 処理した。1%アガロースゲル電気泳動にてベクター断片と分離し、electro elution にて GT-4、GT-5 それぞれの cDNA 断片を回収した。これとは別に GFP 融合タンパク質作成用ベクター pGFP(GA)5II を制限酵素 *NaeI* にて処理した後制限酵素 *SaII* 処理した。1%アガロースゲル電気泳動ののち、electro elution によりベクター断片を回収した。続いて GT-4、GT-5cDNA 断片を上記ベクター断片へサブクローニングした。

16. 遺伝子銃による遺伝子導入

GT-1 の細胞内局在を調べるため、Model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System (Bio-Rad 社) を用いてタマネギ表皮細胞へそれぞれの実験で用いるプラスミドを導入した。十分に懸濁した金粒子 $25\mu\text{l}$ をとり、 $1.5\mu\text{g/ml}$ の DNA 溶液を $4\mu\text{l}$ 加えた。次に 2.5 M CaCl_2 $25\mu\text{l}$ を混合し、 0.1 M spermidine $10\mu\text{l}$ を加えて激しく懸濁した。1分間静置したのち、軽く遠心して上澄を除き、70% EtOH による洗浄、続いて 100% EtOH による洗浄をおこなった。これを $30\mu\text{l}$ の 100% EtOH に溶解し、 $6\mu\text{l}$ を disk に滴下した。15分間風乾したのち、遺伝子銃へ disk をセットした。このとき用いた金粒子は直径 $1.6\mu\text{m}$ 、ヘリウムガスの気圧は 1100psi に設定した。タマネギの表皮細胞に融合タンパク質を導入する場合、タマネギの鱗片を適当な大きさに切り、蒸留水で湿らせたキムワイブを敷いたプレートに内側を上に向けて置いた。導入するプラスミド DNA は全て QIAGEN plasmid kit (QIAGEN 社) により精製した。

17. GFP 蛍光の観察

タマネギ表皮細胞へ遺伝子銃を用いて各種プラスミドを導入したタマネギ表皮細胞をはぎ取り、スライドガラス上で DAPI 染色をおこなった。蛍光顕微鏡はオリンパス BH-2 を使用し、475nm の励起光を照射して GFP 融合タンパク質の蛍光を観察した。写真撮影には (株) 富士フィルムのカラーネガフィルム (Super G 400) を用いた。接眼レンズは 10 倍、対物レンズは主に 10 倍を使用し、露光時間は適宜調節した。タマネギ表皮細胞における GFP 融合タンパク質の細胞内局在は、遺伝子導入後 6 時間後に観察した。

結果

シロイヌナズナからの GT-1 類似遺伝子の単離

GT-1 の Trihelix 領域と高い相同性を示すシロイヌナズナゲノミック DNA 配列、B60976 及び B26625 を見出したため、この領域の全長 cDNA 配列を 3'RACE 及び 5'RACE 法により取得することを試みた。鋳型には 10 日間試験管において培養したシロイヌナズナ植物体から抽出した全 RNA を DNase I 処理し、Oligo-dT プライマーを使用して AMV 由来の逆転写酵素により逆転写した cDNA を用いた。

B60976、B26625 各々の 5'末端側、3'末端側領域を含む cDNA 断片の増幅を試みた結果各々の cDNA 断片を取得し、B60976 由来の cDNA を GT-4、B26625 由来の cDNA を GT-5 と命名した[図 4a、b]。以上の実験により単離した 2 つの cDNA において予想される翻訳開始コドン上流の 5'-UTR 領域には同一フレーム上に終始コドンが出現するため、両 cDNA はほぼ全長であると判断された。報告されている他の GT ボックス結合タンパク質との、N 末端側領域における予想アミノ酸配列の比較からも、GT-4、GT-5 cDNA は共に全長であると予想された。

GT-4 及び GT-5 のアミノ酸一次配列

GT-4cDNA、及び GT-5cDNA はそれぞれ 1404bp、1174bp で、予想される ORF は GT-4 は 372 アミノ酸、GT-5 は 289 アミノ酸をコードしていた[図 4a、b]。これらのアミノ酸配列は AtGT-1 と高い相同性を有し、特に GT-4 は Trihelix 領域においてアミノ酸レベルで約 80 %の相同性を示した。一方 GT-5 は Trihelix 領域において AtGT-1、GT-2 の双方と約 40 %の相同性を有することから、GT-5 は GT-1 タイプ、あるいは GT-2 タイプのいずれにも属さない、新規なサブファミリーを構成すると考えられた。GT-4 及び GT-5 には Trihelix 領域以外にもプロリン、グルタミンに富む領域、酸性アミノ酸に富む領域などが GT-1 との間で保存されていた[図 5a、b、c]。

一方で、GT-5 の C 末端領域はタンパク質間相互作用に関与する機能ドメインである coiled-coil 構造をとることがアミノ酸の 2 次構造を予測するプログラム、COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) により予想された。coiled-coil 構造を有する GT ボックス結合タンパク質は報告例がなく、GT-5 が最初の例である。GT-1、GT-4 及び GT-5 の C 末端領域における Helical Wheel Projection による構造比較でも、GT-5 のみが親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸との分布が顕著に別れていた[図 6]。これは疎水性アミノ酸に富む領域を介してタンパク質間相互作用に関与する、

典型的な coiled-coil 構造のアミノ酸の分布である (Burkhard et al., 2001)。

GT-1 と類似した GT-2 には典型的な二分節型の NLS が見出されており、GTL1、GTL2 など他の GT-2 タイプにおいてもその配列は保存されている。しかし GT-4 及び GT-5 には二分節型の NLS をはじめ、既知の NLS と相同性を示す配列は見出されなかった [図 5a]。

GT-4 及び GT-5 の DNA 結合特異性

GT-1 及び GT-2 は DNA 結合活性を有し、それぞれ GT1-box、GT2-box へ配列特異的に結合する。そこで本研究により単離した新規 GT-1 類似遺伝子産物、GT-4 及び GT-5 に関してもこれらの組換えタンパク質を用い、GT1-box をプローブとしてゲルシフトアッセイをおこなった。GT-5 については発現ベクター pET30b 及び宿主大腸菌 BL21 (DE3) pLysS を用いた組換えタンパク質発現系を利用して組換えタンパク質の発現誘導をおこない、ゲルシフトアッセイに供した。他方 GT-4 は発現ベクター pET30b 及び宿主大腸菌 BL21 (DE3) pLysS を用いた組換えタンパク質発現系により発現誘導を試みた。しかし全長の組換えタンパク質は発現させることが困難だったため、ウサギ網状赤血球抽出液による *in vitro* 翻訳系による組換えタンパク質を供した [図 7a]。

GT1-box をプローブにして、GT-4、GT-5 各々の組換えタンパク質の GT1-box への結合特異性を調べた結果、GT-4 は GT1-box プローブへ結合すること、またこの結合は GT1-box 自身をコンペティターとして加えることにより阻害されることが明らかになった。さらに GT1-box のコア配列の 2 塩基に置換を導入した GT1m-box をコンペティターは、GT1-box—GT-4 タンパク質複合体の形成を阻害しなかった [図 7b]。GT-5 について同様の実験をおこなったところ、GT-5 組換えタンパク質も GT1-box への結合活性を示した。GT1-box プローブと GT-5 タンパク質の複合体は GT1-box 自身をコンペティターとして用いた場合に消失し、GT1m-box をコンペティターとして用いた場合にはシフトバンドのシグナル強度は変化しなかった [図 7c]。以上の結果から、GT-4、GT-5 は共に GT1-box へ塩基配列特異的に結合することが示された。

続いて GT-4、GT-5 の種々の GT ボックスへの DNA 結合特異性を調べるため、GT1-box をプローブとし、*PHYA* プロモーターなどに見出され、GT1-box と類似したコア配列を持つ GT2-box 及び GT3-box をコンペティターに用いた競合実験をおこなった [図 8、9、10]。その結果、各種 GT ボックスへの結合特異性は、GT-1 は GT1-box>GT2-box>GT3-box、GT-4 は GT1-box>GT2-box>GT3-box、GT-5 は GT1-box>GT3-box>GT2-box となった [表 1]。従って GT-4、GT-5 は GT-1 と同じく GT1-box への結合活性が最も強く、他の GT ボックスへの結合活性が比較的低いことが見出

された。以上の結果から、GT-4、GT-5 は構造的に GT-1 と相同性を有するだけでなく、各種 GT ボックスへの結合特異性もおおよそ類似することが明らかになった。

より詳細に GT-4 及び GT-5 の DNA 結合特異性を GT-1 と比較するため GT1-box に2塩基ずつ塩基置換を導入した一連の GT1-box 変異体である A103、A104、GT1m-box、A106、A107、A108 をプローブに用いて競合実験をおこなった[図 11a、b、c、d]。その結果、GT-1、GT-4、及び GT-5 の間では DNA 結合に要求される配列に顕著な差は見出されず、GT1m-box をプローブに用いた場合にシフトバンドのシグナル強度が最も低かった。また A106、A107 をプローブに用いた場合も GT1m-box に次いでシフトバンドのシグナル強度が低かった。従って GT-4、GT-5 の GT1-box に対する結合配列要求性は GT-1 と類似すると考えられた。

GT-4 及び GT-5 の転写活性化能

各種 GT ボックスの下流に CaMV35S 最小プロモーターおよびルシフェラーゼを接続したプラスミドをレポーター、全長 CaMV35S プロモーター下流に各種 GT ボックス結合タンパク質を接続したプラスミドをエフェクターとして用い、これらをタバコ培養細胞 BY-2 へエレクトロポレーションにより導入してルシフェラーゼ活性を指標に GT-1、GT-4、GT-5 の転写活性化能を比較を試みた。遺伝子導入効率のサンプル間の差異を補正するため、内部標準には全長 CaMV35S プロモーター下流にウミシイタケルシフェラーゼを配したプラスミドを用意した。

35S 最小プロモーターのみをルシフェラーゼ上流に接続した場合、GT-1 タンパク質を共発現させてもレポーター活性に顕著な変動はなかった。この 35S 最小プロモーターの結果と比較して、GT-1 タンパク質を共発現させた結果、約2倍の転写活性化が観察された[図 12]。さらに、GT1-box のみを competitor として同時に導入し、同 competitor による *in vivo* における競合阻害の効果を調べた結果、competitor のない場合に比べてルシフェラーゼ活性が抑制され、GT-1 タンパク質をエフェクターとして導入しない場合と同程度の活性を示した[図 12]。

次に GT1-box レポーターに対して各種 GT ボックス結合タンパク質をエフェクターとして、エフェクター間の転写活性化能の比較をおこなった。GT-4 をエフェクターとした場合は、GT-1 をエフェクターに用いた場合と同程度の転写活性化が誘導された。一方、GT-5 エフェクターを用いた場合は明瞭な転写活性化は観察されなかった[図 13]。

GT-4 及び GT-5 の mRNA 発現様式

シロイヌナズナ花、花芽、葉、莖、根、長角果、各器官から精製した全 RNA を鋳型に用いて低サイクルの半定量的 RT-PCR、およびサザンブロット解析をおこない、GT-1、GT-4 及び GT-5 の mRNA の発現器官特異性を調査した[図 14a]。本研究で示す RT-PCR は前後 3 サイクルでサンプル間のシグナル強度の相対的な差に変動がないことを確認した。その結果、GT-4mRNA は調査した全ての器官において発現が確認され、顕著な組織特異性は認められなかった。一方 GT-1mRNA の発現は長角果において、GT-5mRNA の発現は花芽で、それぞれ低かった。これまでは GT-1mRNA の花、長角果における発現は調査されておらず、器官特異性は見出されていなかった。以上の結果から GT-1、GT-4、GT-5 の mRNA 発現の器官特異性が異なることが明らかになった。

GT-1 は光応答性シス配列へ結合する転写制御因子である。GT-1 の発現は顕著な光応答性を示さない。そこで GT-4 及び GT-5 に関しても、これらが光シグナルに対する初発の応答に関与する可能性について調べた。具体的には 3 日間暗条件で培養したシロイヌナズナ芽生えに対して白色光を照射し、3、6、12 時間後における各種 GT ボックス結合タンパク質の経時的な遺伝子発現量の変動を RT-PCR により調査した。実験をより定量的におこなうため、低サイクルの PCR ののち、アガロースゲル電気泳動により分離した増幅断片をメンブレンへブロットし、各々の遺伝子に対応する cDNA をプローブに用いてサザンブロット解析をおこなった[図 14b]。PCR は前後 3 サイクルでサンプル間のシグナル強度の相対的な差に変動がないことを確認した。その結果、GT-5 の発現は GT-1 と同様に顕著な光応答性を示さなかった。他方 GT-4mRNA の発現は光応答性を示し、白色光を照射した後 3 時間経過した時点から mRNA の蓄積が確認され、白色光照射後 6 時間から 12 時間で蓄積量が飽和した。

GT-4mRNA の発現が芽生えにおいて光応答性を示すことから、GT-4mRNA の発現が概日リズムに制御される可能性についておおまかに調査した。具体的には播種後 2 週間培養したシロイヌナズナを 12 時間暗処理し、葉における GT-4mRNA の発現量を RT-PCR により GT-1 及び GT-5 と比較した[図 14c]。その結果 GT-4mRNA の発現量には顕著な変化は観察されなかった。GT-1 または GT-5 についても同様に、光条件の変化に伴う発現量の変動は見出されなかった。

GT-4 及び GT-5 と GFP との融合タンパク質の細胞内局在

GT-4、GT-5 の細胞内における局在を調べるため、GFP (Green Fluorescent Protein) と全長の GT-4、GT-5 との融合タンパク質を遺伝子銃を用いてタマネギの表皮細胞へ導入し、一過的に発現させた。遺伝子導入してから 6 時間ののちに蛍光顕微鏡により GFP 蛍光を観察した結果、GFP 蛍光は明瞭に核に局在し、細胞質においては GFP

蛍光はほとんど観察されなかった[図 15]。一方、GFP のみを導入した場合には、GFP 蛍光は核のみならず細胞全体から観察された。このことから GT-4 及び GT-5 タンパク質は核に局在することが示唆された。

GT ボックス結合タンパク質のリン酸化

本研究で単離した新規 GT ボックス結合タンパク質 GT-4 及び GT-5 には GT-1 と同様に CaMKII の予想リン酸化部位が複数箇所見出される[図 16]。GT-4 の CaMKII による予想リン酸化部位を GT-1 と比較すると、それらの位置、配列はおおよそ保存されている。一方、GT-5 の CaMKII による予想リン酸化部位は GT-1 における位置とは一致せず、CaMKII による予想リン酸化部位の数は GT-1 が 6 箇所、GT-5 は 4 箇所であった。

そこでまず始めに GT-4、GT-5 がリン酸化修飾を受ける可能性について検討した。リン酸化反応の対照には GT-1 組換えタンパク質を用いた。具体的には大腸菌において発現させた GT-1、GT-4、GT-5 それぞれの組換えタンパク質と、CaMKII の標品タンパク質とを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下で混合し、SDS-PAGE により展開した。その結果、CaMKII は GT-1 に加えて GT-5 の組換えタンパク質をリン酸化することを見出した[図 17b]。このリン酸化は CaMKII 阻害剤である KN-93 により阻害されたため、GT-5 は CaMKII によって特異的にリン酸化されたと判断された。一方、GT-4 については CaMKII による明瞭なリン酸化は検出されなかった。

一方、GT-1、GT-4、GT-5 には CKII (Casein kinase II) による予想リン酸化部位も複数存在する[図 16]。CKII の予想リン酸化部位の共通配列は S/T-X-X-E/D であり、CaMKII とは異なる。CKII によるリン酸化は、概日リズムとの関連が指摘される CCA1 (circadian clock-associated 1) の DNA 結合活性を上昇させること (Sugano et al., 1998)、また GBF1 (G-box binding factor 1) の DNA 結合活性を可逆的に制御しうる (Klimczak et al., 1995)。GT-1 は CKII によりリン酸化されるため (Marechal et al., 1999)、GT-4、GT-5 についても CKII によるリン酸化修飾を受ける可能性について調べた。その結果 CKII は GT-4、GT-5 いずれもリン酸化しうるということが明らかになった[図 17a]。

リン酸化と DNA 結合活性

続いて CaMKII によるリン酸化修飾と DNA 結合活性との関連を調べるため、リン酸化処理した組換えタンパク質を用いてゲルシフトアッセイをおこなった。CKII によるリン酸化は GT-1 の DNA 結合活性に顕著な影響を与えないため (Marechal et al., 1999)、対照として CKII によってリン酸化処理したタンパク質を用いてゲルシフト

アッセイをおこなった。その結果、GT-4 は CaMKII によるリン酸化処理により DNA 結合活性が上昇すること、この DNA 結合活性の変化は CaMKII 特異的な阻害剤、KN-93 の添加により阻害されることが示された[図 18a]。また、CKII によるリン酸化は GT-4 の DNA 結合活性に顕著な変化を与えなかった[図 18b]。一方、GT-5 は予想に反して CaMKII、CKII いずれのキナーゼによるリン酸化を受けても DNA 結合活性が低下した。リン酸化修飾による GT-5 の DNA 結合活性の低下は、CaMKII、CKII それぞれに対する阻害剤により抑制された。

考察

GT-4 及び GT-5 は新規な GT-1 類似タンパク質である

GT-4、GT-5 は GT ボックス結合タンパク質間で保存された DNA 結合部位、Trihelix 構造を 1 つ有する。GT-4 は GT-1 に対して DNA 結合領域において 81 %、全長同士でも約 70 % の相同性を示すことから、これまでに報告された GT ボックス結合タンパク質のなかで GT-1 と最も高い相同性を有することが明らかになった。分子系統樹から、GT-4 は GT-1 と共に GT-1 サブタイプを構成することも判明した。一方 GT-5 は DNA 結合領域における GT-1 との相同性が 51 % と比較的低いこと、また GT-2 など他の GT ボックス結合タンパク質との相同性も同様に低いことから、GT-1 タイプ、GT-2 タイプには分類されない、新規なサブファミリーを構成することが明らかになった[図 5b、c]。

GT-1 の C 末端側にはホモ多量体化に関与する領域が同定されているが、この領域に既知のタンパク質間相互作用に関わる構造は見出されない (Hiratsuka et al., 1994)。GT-4 は GT-1 と全長にわたって高い相同性を示し、C 末端側においてもアミノ酸レベルで約 80 % の相同性を有するため、GT-4 も GT-1 と同様にこの領域を介してホモ多量体化する可能性もある。一方、GT-5 の C 末端側は顕著な coiled-coil 構造をとることが予測される[図 6]。従って GT-5 はこの coiled-coil 構造を介してホモ多量体、あるいは他のタンパク質と相互作用することが示唆される。

GT-4、GT-5 は、他の GT ボックス結合タンパク質と類似したプロリン、グルタミンに富む領域を有する。このプロリン、グルタミンに富む領域は様々な転写制御因子において転写活性化との関連が示唆されており、おそらく GT ボックス結合タンパク質を介した転写活性化に関連する他のタンパク質との相互作用に関与すると考えられる。

GT-4 及び GT-5 は GT1-box へ配列特異的に結合する

ゲルシフトアッセイの結果から、GT-4、GT-5 は共に GT1-box への配列特異的な結合能を有することが明らかになった。GT1-box は *RBCS* あるいは *CAB* などの光応答性発現に必要な光応答性シス因子である。GT1-box と類似し、*PHYA* プロモーターなどに存在する GT2-box 及び GT3-box への結合様式を競合実験により比較した結果、GT-4、GT-5 共に GT1-box への結合活性と比較して GT2-box あるいは GT3-box への結合は弱いことが明らかになった。本研究で明らかになった GT-4、GT-5 の DNA 結

合特異性は GT-1 のものと類似していた。このことから、GT-4 及び GT-5 は GT-1 と類似した DNA 結合特異性を有することが明らかになった。

GT-4-GT1-box 複合体、及び GT-5-GT1-box 複合体によるシフトバンドは複数得られた。GT-4 及び GT-5 組み換えタンパク質が SDS-PAGE において単一のバンドを与えることから、複数のシフトバンドがこれらの分解産物に由来するものとは考えにくい。これはむしろ GT-4、GT-5 がホモ多量体を形成して DNA と結合する可能性、あるいは GT1-box を 4 つ連結した人工的な DNA プローブへ結合する GT-4、GT-5 タンパク質の数が単一でない可能性が考えられる。翻って、おそらくタンパク質の大きさと関連すると思われるが、GT-1 と GT-4、GT-5 とは多量体を構成して DNA へ結合する場合に要求するシス配列間の距離が異なる可能性も考えられる。また、GT-4 組み換えタンパク質を用いた競合実験において、コンペティターによる競合阻害の度合いは泳動度の遅いシフトバンドのほうが泳動度の早いシフトバンドと比較して低かった。このことから GT-4 のホモ多量体と DNA との複合体は単量体 GT-4 と DNA との複合体よりも安定である可能性が高いと予想される。これはホモ多量体化により DNA 結合活性が上昇する GT-1 に関する知見とも一致する (Hiratsuka et al., 1994)。

GT ボックス結合タンパク質はシロイヌナズナ、タバコ、イネなどから単離されており、なかでもシロイヌナズナから GT-4、GT-5 を含めて最も多い 7 つの遺伝子 (GT-1、GT-2、GT-3a、GT-4、GT-5、GTL1、GTL2) が同定されている。ところがこれらのうち、DNA 結合特異性に関する報告は GT-1 と GT-2 のみであった (Hiratsuka et al., 1994; Dehesh et al., 1992)。イネ GT-2 は DNA 結合部位である Trihelix を 2 つ有し、それらが最も強く結合する DNA 配列は N 末端側の Trihelix は GT3-box、C 末端側のものは GT2-box である。本研究でクローニングした GT-4、GT-5 の DNA 結合特異性は、GT2-box へ最も強く結合するイネ GT-2 のものとは異なる。GT-4 及び GT-5 は GT-1 と同一の結合配列特異性を有するため、GT-1、GT-4、GT-5 の転写制御機構における役割分担に興味を持たれる。

GT-1 と構造的に同じサブファミリーに属する GT-4 が DNA 結合特異性において GT-1 と類似することは想像されたが、新規なサブファミリーを構成する GT-5 の DNA 結合特異性は GT-1 タイプとも、GT-2 タイプとも異なることが予想された。しかし本研究で得られた結果から、GT-5 も GT-1、GT-4 と酷似した DNA 結合特異性を有することが明らかになった。このことから、DNA 結合特異性について現在未同定な GT-3a、GTL1、GTL2 などについてもアミノ酸配列の相同性のみで DNA 結合特異性を予想することは困難であり、詳細にそれらの DNA 結合特異性を解析する必要があると考えられる。

GT-1、GT-4 並びに GT-5 の転写活性化能

転写制御はシス配列とトランス因子の結合を介して ON/OFF が決定される。シス配列の多くは上流から欠失させた一連のプロモーター断片とレポーターとの融合遺伝子を用いてレポーター活性を指標に同定されたため、転写に正に働く、あるいは負に働くことが明らかになっている。GT-4、GT-5 は GT-1 と同様に、光応答性の転写に正に働くシス配列 GT1-box へ結合する。GT-1、GT-4、GT-5 による転写制御メカニズムを明らかにするためには、これらのタンパク質が転写促進能、あるいは転写抑制能のいずれを有するかを調査する必要がある。そこで GT-4 及び GT-5 について転写活性化能を調べ、既に転写促進能を有することが示されている (Le Gourrierec et al., 1999) GT-1 との比較をおこなった。

まず GT1-box 下流に CaMV 最小プロモーターを接続したレポーターに対して GT-1 エフェクターを同時に導入した。その結果 GT-1 エフェクターの存在下ではレポーター活性が約 2 倍になった。この転写活性化は、GT1-box 断片のみをさらに導入した場合に抑制された。このことから、GT-1 が GT1-box を介した転写活性化に寄与することが確認された。

続いて GT-4、GT-5 をエフェクターに用い、エフェクター間の転写活性化能の比較を試みた。GT-4 エフェクターを用いた場合、レポーターのみの場合に比べて約 2 倍の転写活性化が誘導された。この転写活性化は GT-1 と比較して若干低いものの有為な転写活性化と判断された。一方、GT-5 エフェクターを用いた場合には明瞭なレポーター活性の変動は観察されなかった。従って、GT-4 は GT-1 と同様に転写活性化能を有するが、GT-5 は顕著な転写活性化能を示さないことが明らかになった。GT-5 に関しては、単独では転写活性化能を持たない可能性、さらに GT-1 や GT-4 と同一のシス配列へ結合することによって競合的に転写を抑制する可能性も示唆される。

同一遺伝子ファミリーに属する転写制御因子に転写活性化能を有する因子と転写抑制活性を有する因子とが存在する例として、エチレン応答性の転写制御に関与する ERF ファミリーが挙げられる (Fujimoto et al., 2000; Ohta et al., 2001)。GT ボックス結合タンパク質や ERF のように、転写活性化に関与する因子と転写抑制化に関与する因子と持つ転写制御因子ファミリーの存在は、一群の転写制御因子による転写調節機構を考える上で興味深い。

GT ボックス結合タンパク質の発現特異性

GT-1、GT-4、GT-5 の発現器官特異性の調査結果から、GT-4mRNA は花、花芽、葉、莖、根、長角果、調査した全ての器官において蓄積が確認された。一方、GT-1mRNA

の蓄積量が長角果で低いことが明らかになった。GT-4 はシロイヌナズナ全ゲノム中で GT-1 と最も相同性が高い遺伝子産物であり[図 35]、DNA 結合特異性も GT-1 と類似するため、長角果では GT-1 の機能を GT-4 が補完することも予想される。また GT-5mRNA の蓄積量は花芽において低いことも判明した。従って花芽では GT-1 或いは GT-4 が優先的に GT1-box へ結合することも想定される。GT-1 とは異なる GT1-box 結合活性がタバコの根から精製した核抽出液中に見出されること (Villain et al., 1996) と併せて、GT ボックス結合タンパク質群による器官特異的な調節機構の存在を示唆すると考えられる。

光応答性発現を示す GT ボックス結合タンパク質はこれまで報告がない。しかし本研究において単離した GT-4 の mRNA 発現量はシロイヌナズナ芽生えにおいて白色光に応答して増大することが明らかになった。GT-4mRNA 蓄積量の光に応答した経時変化は、標的遺伝子の 1 つと予想される *CAB1* のものと類似する。従って GT-4 は暗黒下で培養したシロイヌナズナ芽生えにおける *CAB1* の転写誘導に直接関与する可能性は低く、*CAB1* の発現量を最大値まで引き上げる役割を担う、あるいは GT-4 は 2 次的な段階の光応答性転写制御に関与する可能性が考えられる。GT-1 の自身の発現は光条件によって影響を受けず恒常的に発現する。そのため GT-1 と GT-4 は構造的に類似した転写制御因子であるものの、発生初期の光シグナル伝達経路において GT-1 は GT-4 に比べて上流に位置することも示唆された。

一方、播種後 2 週間経過したシロイヌナズナを 12 あるいは 24 時間暗処理し、葉における各々の GT ボックス結合タンパク質の発現を調査した結果、GT-1、GT-4、GT-5 の mRNA の蓄積量は暗処理によって顕著な影響を受けないことが明らかになった[図 14c]。このことから GT-4 の発現様式は細胞の分化の進行と関連して調節される可能性も考えられる。以上の結果から、成熟した光合成装置を有する器官においては GT ボックス結合タンパク質は光条件によらず恒常的に発現することが示唆された。

GT-4、GT-5 は核局在性を示す

GT-4、GT-5 が転写制御因子として機能するためには、核局在性を有することが必要条件の 1 つである。GT-4 及び GT-5 と GFP との融合タンパク質はタマネギ表皮細胞において核局在性を示した。従って GT-4、GT-5 は共に核タンパク質であることが示唆された。

GT-4、GT-5 が核タンパク質であるならば、核移行シグナル (NLS) を有することが予想される。ところが GT-4、GT-5 には既知の NLS は見出されない。GT-1 類似タンパク質、GT-2 には典型的な二分節型の NLS が同定されているため、GT ボックス

結合タンパク質は異なるサブファミリー間でそれぞれに特徴的な NLS を持つことが予想される。GT-1 タイプ、また GT-3a タイプの GT ボックス結合タンパク質の核移行活性を規定するアミノ酸配列を同定し、NLS の構造、あるいは核移行活性を GT-2 タイプと比較することが必要であろう。

GT-4、GT-5 はリン酸化される

この 10 年ほどの間に数多くのキナーゼ遺伝子が植物から単離された。その中には動物などで既に報告されている MAP kinase、receptor kinase、CDCK (cell division controlling kinase) と類似する機能・構造を有するセリン/スレオニンキナーゼが多く含まれていた。一方で植物固有の CDPK (calcium-dependent protein kinase) や CCaMK (chimeric Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase) などの Ca^{2+} 依存的キナーゼも見出された (Mohr et al., 1987; Baeuerle et al., 1989; Raychaudhuri et al., 1989; Meshi and Iwabuchi, 1995; Patil et al., 1995; Liu et al., 1998)。一方で、転写制御因子の DNA 結合活性がリン酸化により制御される例が多く報告されている (Takase et al., 1991; Ciceri et al., 1997; Droge-Laser et al., 1997; Sugano et al., 1998)。GT-1 の DNA 結合活性とリン酸化修飾との関連では、CaMKII によるリン酸化修飾を受けて DNA 結合活性が上昇することが明らかになっている (Marechal et al., 1999)。そこで本研究では新規 GT-1 類似タンパク質、GT-4、GT-5 について CaMKII によるリン酸化修飾の可能性について検討した。

CaMKII 及び CKII 標品による GT-4、GT-5 組換えタンパク質のリン酸化実験から、GT-4 は CKII によりリン酸化されることが明らかになった。GT-4 はアミノ酸配列の相同性が GT-1 と高いことから GT-1 と同様に CaMKII によりリン酸化されると予想されたが、CaMKII キナーゼ標品による GT-4 のリン酸化は検出限界以下であった。GT-1、GT-5 の場合と同様に GT-4 のリン酸化を試みた際にも自己リン酸化能を有する CaMKII の自己リン酸化によるシグナルが観察されるため、GT-4 のリン酸化が検出されなかった原因がキナーゼの失活や分解は考えにくい。従って GT-4 は CaMKII にはリン酸化されない可能性がある。一方、GT-5 は CaMKII によってリン酸化された。GT-5 は GT-1 と同じく GT1-box へ結合する [図 10]。従って GT-5 も GT-1 と同様に、 Ca^{2+} /CaM 依存的なシグナル伝達経路の支配下にある可能性が示唆された。

本実験を開始する段階では高等植物において CaM 依存的キナーゼが同定されていなかったため、入手が可能なラット脳由来の CaMKII alpha subunit を用いて GT-4、GT-5 組換えタンパク質のリン酸化実験をおこなった。最近シロイヌナズナから CaM 遺伝子が同定され (Lu et al., 2001)、ラット CaMKII とシロイヌナズナ CaMKII とは全長

同士ではアミノ酸レベルで約 30 %の相同性しかないものの、キナーゼ部位では約 50 %の相同性を示す。また活性中心は完全に保存されている。ラット CaMKII とシロイヌナズナ CaMKII の基質特異性が異なる可能性もあるが、シロイヌナズナ CaMKII について予想アミノ酸配列しか報告されていないため、基質特異性の比較は現段階では困難である。今後はシロイヌナズナ由来の CaMKII を用いて GT-1、GT-4、GT-5 をリン酸化する可能性について詳細に検討する必要がある。

リン酸化修飾による DNA 結合活性の制御

GT-1 は CaMKII 及び CKII のいずれによってもリン酸化されるが、DNA 結合活性は CaMKII によるリン酸化を受けた場合のみ顕著に上昇する。GT-1 の DNA 結合活性の変動に最も影響を与える CaMKII 予想リン酸化部位、T133 は DNA 結合部位である Trihelix 構造のほぼ中央に位置する (Marechal et al., 1999)。この GT-1 T133 は周辺の配列を含めて GT-4 においても高度に保存されている。このことから GT-4 リン酸化による DNA 結合活性制御機構は GT-1 と類似すると予想された。しかし CaMKII によるリン酸化実験の結果、GT-4 のリン酸化を検出できなかった。また GT-4 の CaMKII によるリン酸化に伴う DNA 結合活性の変動も観察されなかった。従って GT-4 の場合、DNA 結合活性とリン酸化との関連性は低いと考えられる。

他方、GT-5 は CaMKII、CKII いずれのキナーゼ標品によってもリン酸化され、また DNA 結合活性が著しく低下した。従って GT-5 は GT-1 や GT-4 とは反対に、リン酸化修飾を受けて DNA 結合活性が低下することが示唆された。GT-1 と GT-5 とのリン酸化部位の保存性が低いこと、また CaMKII 及び CKII のどちらのキナーゼによるリン酸化が GT-5 の DNA 結合活性に影響を与えるかが不明瞭であることから、今後は GT-5 の DNA 結合活性制御に関連するリン酸化部位を決定する必要がある。

このように同じ遺伝子ファミリーに属する転写制御因子のなかに DNA 結合活性がリン酸化により上昇する因子と低下する因子が存在する、つまり相反する制御を受ける因子が存在する例は殆ど報告されていない。転写制御因子の転写活性化能は、自身の DNA 結合活性と不可分の関係にあると予想される。GT-5 の DNA 結合活性が CaMKII により主に制御される場合、Ca²⁺/CaM を介したシグナル伝達経路が活性化されると GT-1 は DNA 結合活性が上昇して転写を誘導すること、逆に GT-5 は高リン酸化状態では DNA 結合活性が低く、積極的に転写量の調節に関与しないと予想された。これとは反対に、リン酸化レベルが低い場合には GT-1 の DNA 結合能は低く、プロモーターから遊離している一方、GT-5 の DNA 結合活性は上昇し、プロモーターへ結合すると予想される。また GT-5 には顕著な転写活性化能は見出されない

ことから、GT-5 は GT-1 による転写活性化を阻害する可能性が示唆された[図 19]。一方、GT-5 の DNA 結合活性が主に CKII により制御されると仮定するならば、GT-5 はリン酸化により必ずしも GT-1 と相反する制御を受けるとは限らない。

本章の実験結果から、新規に同定した GT-1 類似タンパク質、GT-4 は GT-1 とほぼ同一の DNA 結合特異性を有し、核局在性を示し、GT-1 と同程度の転写活性化能を有することが明らかになった。これら GT-4 タンパク質の性状は GT-4 が転写制御因子として機能しうることを示すものである。GT-4 と GT-1 はタンパク質の性状の多くの部分と同じであることから、互いに機能的に重複する転写制御因子であると考えられる。しかし GT-4 の発現器官特異性や芽生えでの発現光応答性が GT-1 と異なることから、GT-1、GT-4 がそれぞれ特異的に関与する転写反応が存在する可能性もある。一方、GT-5 は GT-1 とほぼ同一の DNA 結合特異性を有し、核局在性を示すものの、顕著な転写活性化能を持たない。しかし GT-5 は GT-1 とは反対に、リン酸化修飾を受けると DNA 結合活性が低下することが明らかになったため、GT-1 あるいは GT-4 による転写活性化を競合的に阻害することで結果的に転写を抑制しうる因子であることが示唆された。

GT ボックス結合タンパク質群による転写制御メカニズムの解明には、GT-5 の DNA 結合活性を制御するリン酸化部位を同定する、また two-hybrid スクリーニングなどによって GT ボックス結合タンパク質とリン酸化するキナーゼや、転写制御メカニズムに関与する他の因子の単離・同定することが有効であろう。

(a)

```
tttgcaataataaagaactcaagcgccttttatsttaactcttgcacatcttctgtatctctctcttcttcttgggagaaacATGTTTGTTCGGATA 100
M F V S D N 6
ACAACAATCCITTCACGGGACATAAACAATGATGATGCGGATGTTAGATCAAAACGGAGTCTACAGCCACACCAGATCATCTCGGAGAAAGCAGTGGAGG 200
N N F S R D I N M M I G D V T S N G D L Q P H Q I I L G E S S G G 39
AGAGGATCATGATCATCAAAGCAACCAGAAACGACGACGACATGGGCAAGAGCAAGACTCGAACCTTANTCTCATTACGGAGAAATGCAAAAT 300
K D H E I I K A P K K R A E T W A Q E E T E T L I S L K R E E N D N 72
CTTTCAACACTCCAAATCAAACAACATCTCTGGGACAGATTCTTAAGAANAATGAGAGAGAAAGGTTTGTATCGATCACCATCTATGTGTACGGACA 400
E F N T S R S N K H L W E C I S K K M R E K G S D R S G F S M C T D R 106
ACTGGAGAACATATGAAAGACTTAAAGAACTAAGCAACATGAAGATAAAGCAACAATGGAGGATCAACGAAGATGCTTATACAAATGAGATTGA 500
W R N I L K E F K E R A F Q H E D K A T S G G S T R K M S Y Y N F I E 139
AGATATTTTCAGAGAAAGAAAGAAAGTGGCATTCTATAAGAGTCTCTACTACTACACCATCTCTGCTAAAGTTGATTCCTTATGCAATTTTACA 600
D I P R E R K K K V A P Y K S P A T T T T F S S A K V D S P M Q P T 172
GATAAGGTTTGAAGATACGTATTTCAATTTACATCTGTGAGACTAATGGCAGGCCAACGCTAAATCTTGAACCGAGCTTATCATGATGCTCT 700
D K G F E D T G I S F T S V E A N G R P T L N L E T E L D H D G L P 206
CTCTCCCATCTGCTGCTGATCCATCAAGCAATGGAGTTCTCTCTGGAATTGGAGAGACACCCCTGAAATGGCCTTATGATGGTCAACCATTTGCTGG 800
L P I A A D P I T A N G V F P P W N N R D T P G N G V D G Q P F A G 239
GAGGATCATACCGTGAATTTGGAGATTACACAAGCAGACTGGGATTGATGGTACTGCTGAAGCAATTAAGGAGCTATCAGATCCCGCTTATGATTG 900
I I I T V K F G D Y T R R V G I D G T A E A I R B A I R S A F R L 272
AGAACAAGCAGACTTTTGGCTAGAAGATGAAGAACAGTTTATCGCTCTCTTGACCGAGACATGCCCTTAAAGAACTATATACTCCGCATTTGATGAG 1000
R T R R A F W L E D E E Q V I R S L D E D M P L G M Y I L R I D E G 306
GGATAGCCGTTAGAGTGTGCCATATGATGAATCTGATCCGTTACCGATCCATCAAGAGGAGAAGATATTCTACCGAAGAAAGATTACCGAGATTTCT 1100
I A V R C H Y D E S D P L P V H Q E K K I F Y T E E D Y R D F L 339
GGTCCGACGAGATGGACATGTCTGAGAGATTGAGCGGTTTCAAAACATAGACAATTAAGCAGGCTCAATCCGGTCTTATACAGAGGAATGAGA 1200
A R R G W T C L R E F D A F Q N I D N M D E L Q S G R L Y R G M R 372
tggagaaacggttactacagaaggctagaagaaaccttttattcttcacgtaacataaataagcttttttgaacaaaatacttttatcttcaatg 1300
actgtacatatagacctcttttgacatgcatgtgatccagaggatctgatctgtttatggagaatctaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1400
aaa 1403
```

(b)

```
tgctttagagatgctttgggtgatttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt 100
M D G H Q H H H L H 10
ACCAGCTTCAATATCTCAACAAGCATCATCTTACTACTCAATCGCAACGCCGAAATAGCCTCTCCGGTAGCTGTTGGGAGTAGGTTTCCACAGTGGAG 200
Q L Q Y L N K H H L H T Q S Q T P E I A S P V A V G D R F P Q W S 43
CGTGGAGAGACAAAGACTTGAAGGATAAGAGGAGACTAGATCAACTTTCTATGGAGACAAACGGACAAAGCTTCTTTGGGAAGTATCTCTAAC 300
V S E E T K E L I G I R G E E D Q T F H S T E R R N E L L N E V I S N 76
AAGATGAGACAAAGCTTTCTCGTAGCCCTGAACGATGCAAGTGAAGTGAAGAACCTCGTCACTCGTTTTAAGGATGTGAGACAATGGAGGAG 400
K M R E F E F P P S P E Q C K C K K K N L Y T R F K G C E T M E A E 110
AGACAGCGAGACAACAGTTCCCTTTTATGATGATGCAAAATATATTACCACTAGAAATGAGAGAAATGCTATGGGCTGAATCCGAGGGAGGAGAG 500
T A R Q Q P P F Y D D M Q N I F T T R M Q R M L W A E S E G G G C 143
GGGAACAAGCGGGCAGCGAGAAAGAGAGAGATTTCTCAGATGAGAAAGAGAGAAATGTGAATGAAGAGCTAGTAGATGTGAGCAACGCCAATAAAT 600
G T S G A A R K K E Y S S D E E E E N V N E E L V D V S N D P K I 176
CTAATCCCAAAAGCACTTCAAAAGAACCAAAAGCCGCTAGTAAATAGTAGTAATAGCAATAATGGTAAAGAGAGTGTGGAGAGCTTTATGAGAC 700
L N P K K N I A K K R K G G S N S N S N N G V R E V L E E F M R H 210
ATCAAGTGAAGTGGAGAGGAGTGGAGAGAGGATGGAGGCTAGGAGCAAGGAAAGAGCAGAGAAAGAAAGAAATGGAGAGGAGAGATGGAGGAGCT 800
Q V R M E S E W R E E W E A R E E K E R A E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E 243
TGAAGAGAGAGCTTGCATGGACCGGATCTGGCGGATAGAGAGGAGCAACCGCCGTCGAGAGGAGATGAGAGCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 900
E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E E 276
AATGCAATCTCTCAAGCTTACAGAGATGGTTCCCTCAaactctttgtcagcttttgcttaacctaataacttgctcttatatgctgttttgggtg 942
E A L L K K I Y E D S I * 289
tagtgtaggatcaatatttgggggggaaagtaatactcagggcaaacctcaacactcaatatttgatgtatgtagacacatttgagcttttagtgag 1100
gcttttagtaatttatcatcccacattattcttccattttacatttggcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1174
```

図4 GT-4 及び GT-5 の cDNA 配列

5'-UTR、3'-UTR を含む、GT-4 (a) 及び GT-5 (b) の cDNA 配列を示す。GT-4cDNA は 1404bp、GT-5cDNA は 1174bp で、それぞれ 372 アミノ酸残基、及び 289 アミノ酸残基をコードすると予想された。下線部は転写活性化との関連が示唆される、プロリン、グルタミンに富む領域を、白抜き部分は DNA 結合部位である Trihelix 領域を表す。GT-5 の灰色部分は coiled-coil 領域を示す。

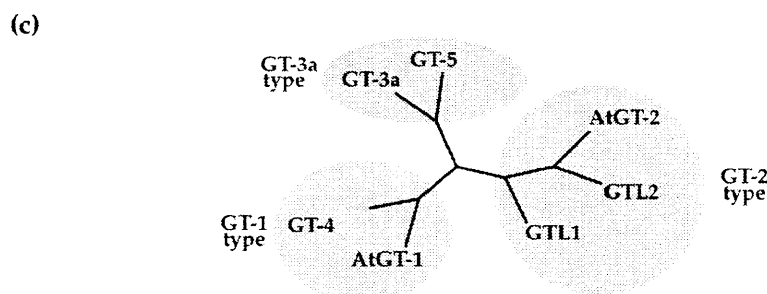
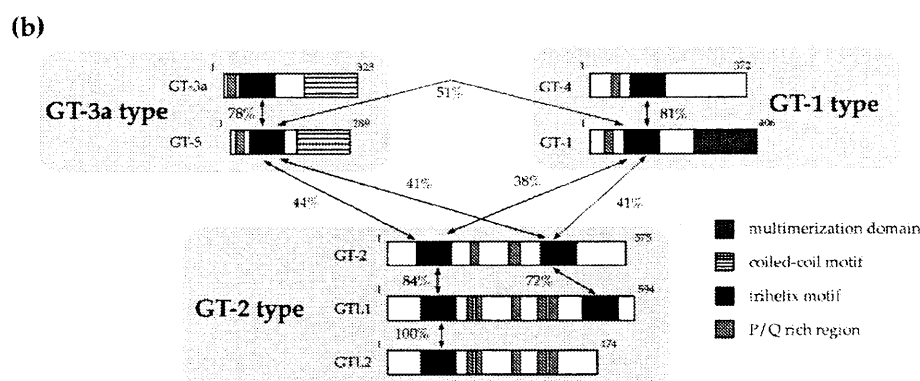
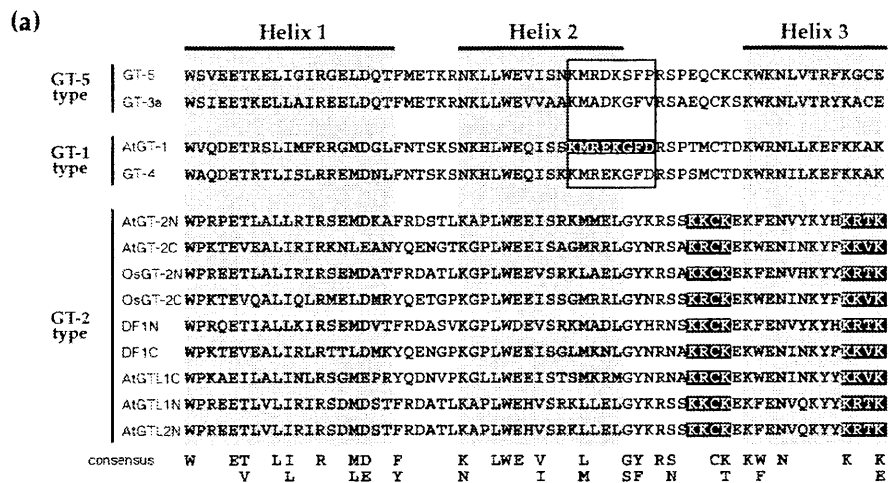


図5 GT-4、GT-5と既知のGTボックス結合タンパク質の比較

(a) Trihelix 領域における GT-4、GT-5 と既知の GT ボックス結合タンパク質とのアライメントを示す。共通配列を下に記した。(b、c) シロイヌナズナ GT ボックス結合タンパク質の構造比較及び分子系統樹を示す。GT-4 及び GT-5 は共に Trihelix を 1 つだけ有し、GT-4 は GT-1 タイプ、GT-5 は新規なサブファミリーを構成する。GT-2 に見出された NLS (黒で囲んだ部分) は GT-2 タイプ間でのみ保存されている。(c) GT-4 は GT-1 タイプ、GT-5 は新規なサブファミリーを構成することがわかる。上図に示したアミノ酸配列: AtGT-1 (Hiratsuka et al., 1994)、AtGT-2 (Kuhn et al., 1993)、OsGT-2 (Dehesh et al., 1990)、DF1 (Nagano et al., 2001)、AtGTL1、AtGTL2 (Smalle et al., 1999)、GT-3a (Lu et al., 2001)。

Helical wheel projection:

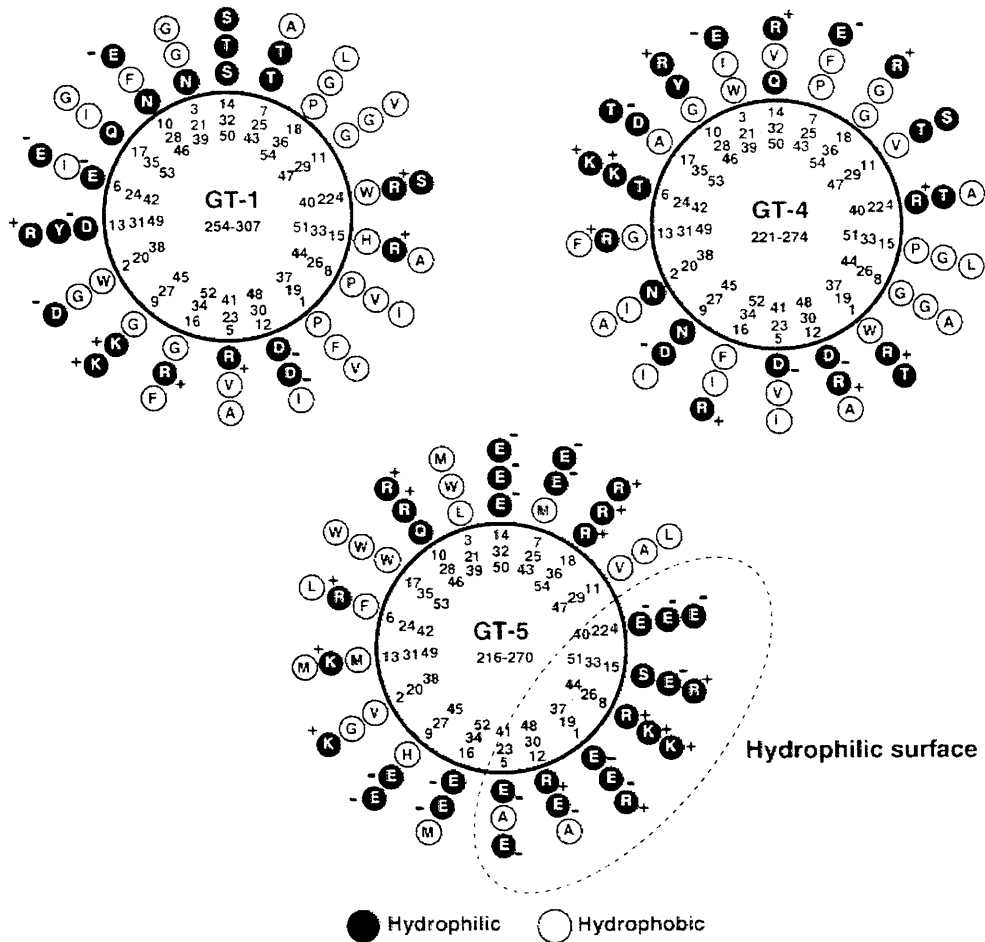


図6 GT-5はcoiled-coil構造を有する

GT-1、GT-4 及び GT-5 の C 末端側の約 50 残基の領域の高次構造を Helical wheel projection により検討した結果、GT-5は親水性アミノ酸が片側に偏って分布しており、coiled-coil 構造を有することが明らかになった（破線で囲んだ部分）。一方、GT-1 や GT-4 においては類似したアミノ酸分布はみられない。

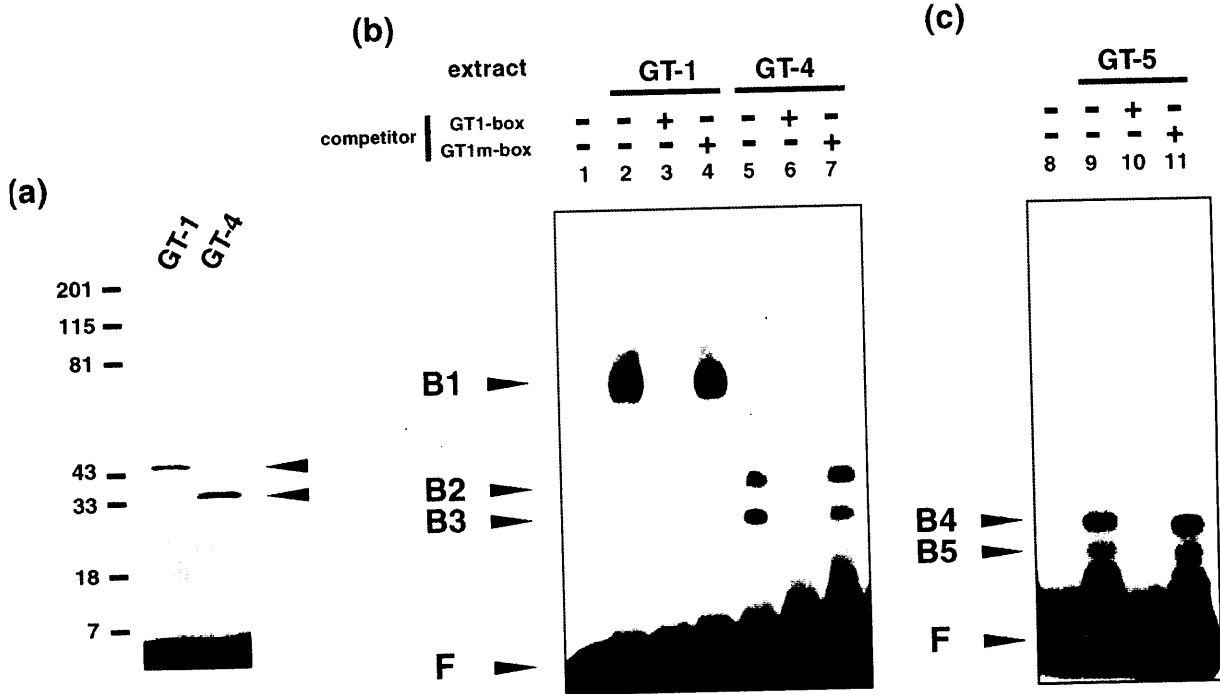


図7 GT-4 及び GT-5 は GT1-box へ結合する

組換えタンパク質を用いて GT-4 及び GT-5 の DNA 結合特異性を調べた。DNA プロープには GT1-box 4 量体を用いた。(a) ウサギ網状赤血球抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系により [³⁵S]-Met 存在下で GT-1 及び GT-4 組換えタンパク質を発現させた。10%SDS-PAGE にて展開し、組換えタンパク質の発現を確認した (矢印)。(b) GT-1、GT-4 組換えタンパク質を用いたゲルシフトアッセイ。前述の *in vitro* 翻訳系により発現させた GT-4 組換えタンパク質は GT-1 と同様に配列特異的に GT1-box へ結合した。(c) 大腸菌において発現させた GT-5 組換えタンパク質を利用して同様のゲルシフトアッセイをおこなった。その結果 GT-5 も GT1-box への配列特異的な結合活性を示した。本研究では、プローブ DNA は 0.2ng、コンペティター DNA は 1ng あるいは 10ng、1%アガロースゲル、TE 緩衝液の条件でゲルシフトアッセイをおこなった。(B1, GT-1-probe DNA complex; B2, B3, GT-4- probe DNA complex; B4, B5, GT-5-probe DNA complex; F, Free probe)

	GT-1	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
competitor	GT1-box	-	-	×5	×50	-	-	-	-	-	-	-	-
	GT2-box	-	-	-	-	-	-	×5	×50	-	-	-	-
	GT3-box	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	×5	×50
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

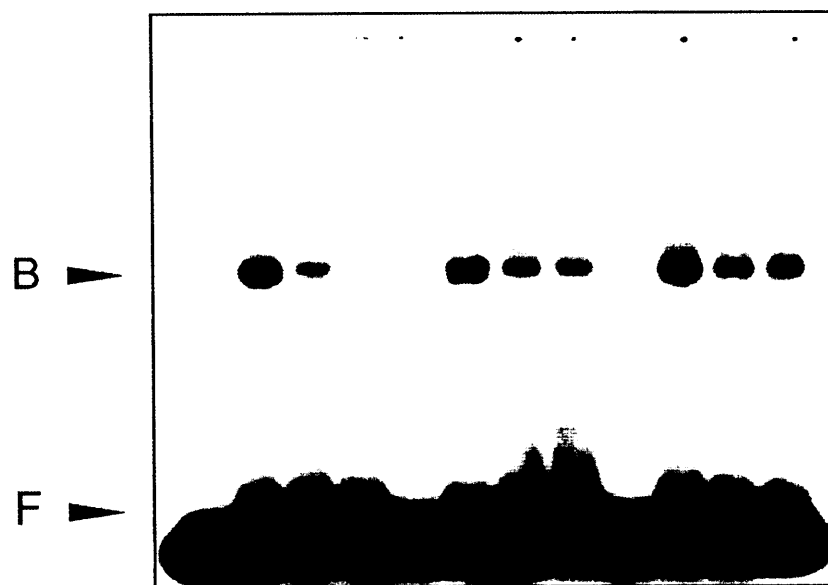


図8 種々のGTボックスに対するGT-1組換えタンパク質の結合様式

DNAプローブにGT1-box 4量体を用い、未標識のGT1-box、GT2-box、GT3-boxをコンペティターとしてプローブの5倍量、50倍量加えて、これらGTボックスに対するGT-1組換えタンパク質の結合特異性を調べた。GT-1タンパク質は大腸菌において発現させ、精製した。GT1-box自身をコンペティターに用いた場合にシフトバンドのシグナル強度が最も低減した(lane 3、4とlane 7、8及びlane 11、12との比較)。

(B, GT-1-probe DNA complex; F, Free probe)

	GT-4	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
competitor	GT1-box	-	-	5	50	-	-	-	-	-	-	-	-
	GT2-box	-	-	-	-	-	-	5	50	-	-	-	-
	GT3-box	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	50
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

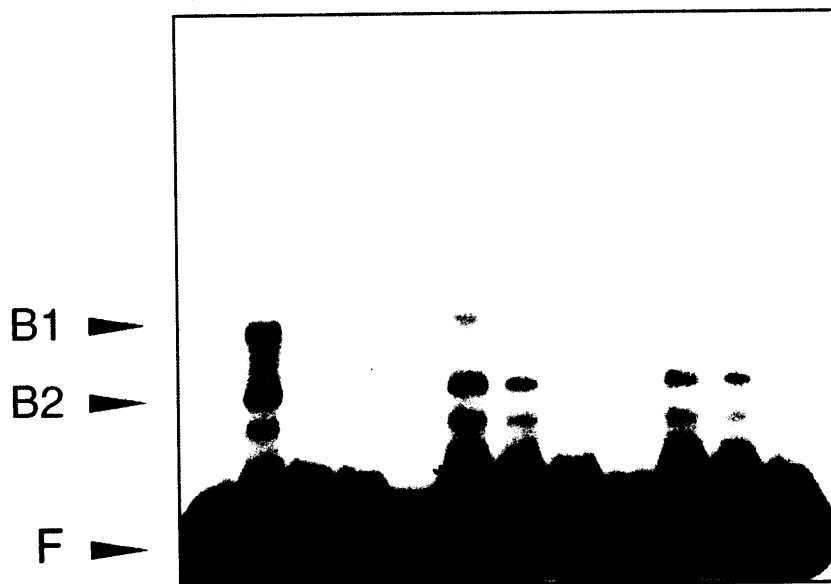


図9 種々の GT ボックスに対する GT-4 組換えタンパク質の結合様式

DNA プローブに GT1-box 4 量体を用い、未標識の GT1-box、GT2-box、GT3-box をコンペティターとしてプローブの 5 倍量、50 倍量加えて、これら GT ボックスに対する GT-4 組換えタンパク質の結合特異性を調べた。GT-4 タンパク質は *in vitro* 翻訳系により発現させた。GT1-box 自身をコンペティターに用いた場合にシフトバンドのシグナル強度が最も低減した (lane 3、4 と lane 7、8 及び lane 11、12 との比較)。(B1, B2, GT-4- probe DNA complex; F, Free probe)

	GT-5	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
competitor	GT1-box	-	-	×5	×50	-	-	-	-	-	-	-	-
	GT2-box	-	-	-	-	-	-	×5	×50	-	-	-	-
	GT3-box	-	-	-	-	-	-	-	-	-	×5	×50	-
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

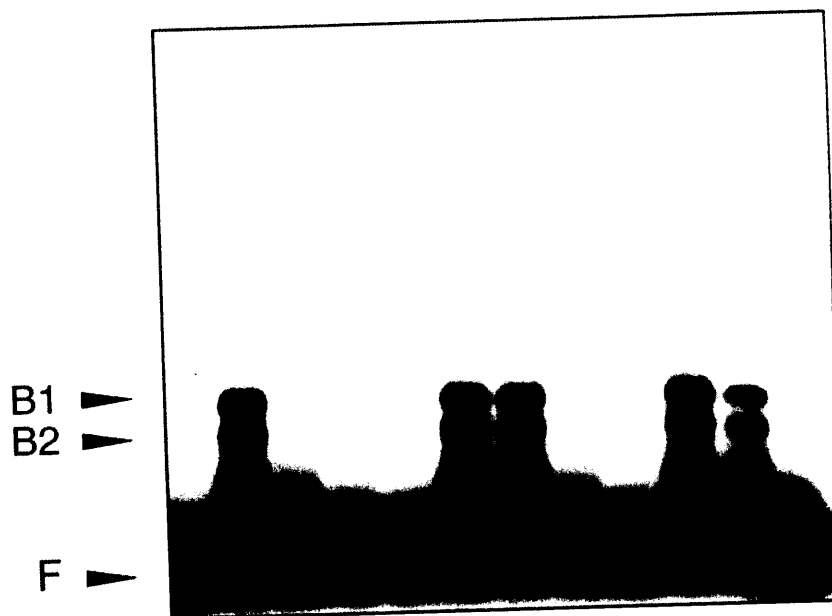


図 10 種々の GT ボックスに対する GT-5 組換えタンパク質の結合様式

DNA プローブに GT1-box 4 量体を用い、未標識の GT1-box、GT2-box、GT3-box をコンペティターとしてプローブの 5 倍量、50 倍量加えて、これら GT ボックスに対する GT-5 組換えタンパク質の結合特異性を調べた。GT-5 タンパク質は大腸菌において発現させ、精製した。GT1-box 自身をコンペティターに用いた場合にシフトバンドのシグナル強度が最も低減した (lane 3、4 と lane 7、8 及び lane 11、12 との比較)。
B1, B2, GT-5- probe DNA complex; F, Free probe)

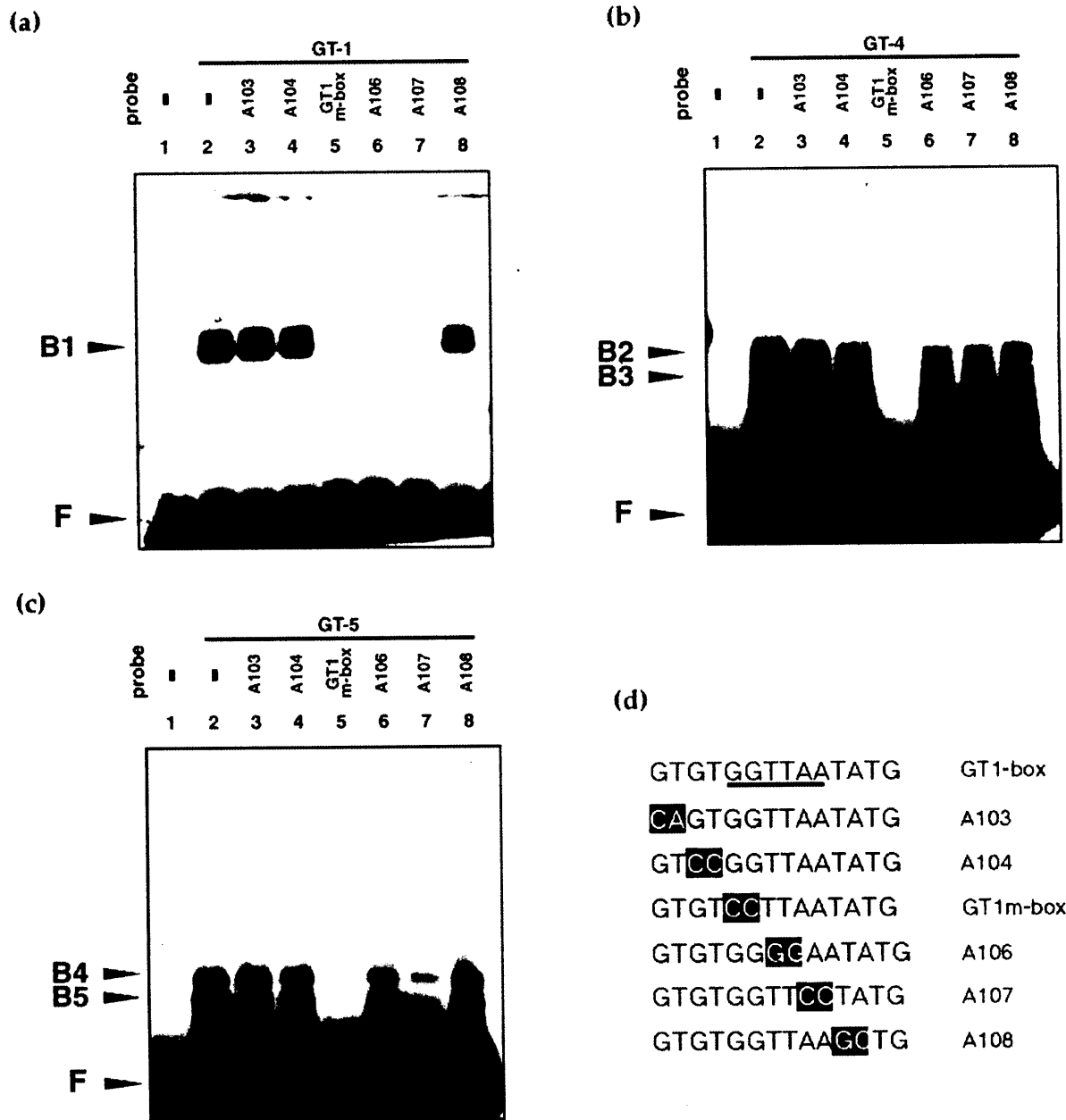


図 11 GT-4、GT-5 の結合コア配列は GT-1 と同一である

(a, b, c) GT-4、GT-5 の結合配列要求性を GT-1 と比較した。(d) GT-1 タンパク質の結合コア配列は GGTTAA である (下線部)。コア配列の最初の GG に塩基置換を導入した GT1m-box プローブが、GT-1 タンパク質との結合が最も弱い。GT-4、GT-5 についても GT-1 と同様の結合配列要求性を示したため、GT-4、GT-5 の GT1-box への結合におけるコア配列は GT-1 と同一であることが示唆された。GT-1、GT-5 組換えタンパク質は大腸菌において、GT-4 組換えタンパク質は *in vitro* 翻訳系により発現させた。(B1, GT-1-probe DNA complex; B2, B3, GT-4- probe DNA complex; B4, B5, GT-5-probe DNA complex; F, Free probe)

	Profiles of DNA-binding affinity
GT-4	GT1-box > GT2-box > GT3-box
GT-5	GT1-box > GT3-box > GT2-box
GT-1	GT1-box > GT2-box > GT3-box
GT-2	GT2-box > GT3-box > GT1-box

表1 各種 GT ボックスへの結合特異性の比較

図 8～図 10 の結果をまとめた。GT-4、GT-5 の GT1-box、GT2-box、GT3-box への結合特異性の順序は共に GT-1 とほぼ同一であった。GT-4、GT-5 いずれも GT1-box への結合特異性が最も高い点で、GT-2 の DNA 結合特異性とは異なる。GT-5 はアミノ酸配列上、GT-1 タイプ、GT-2 タイプいずれにも含まれない、新規なサブタイプに属するが、GT-5 の DNA 結合特異性は GT-1 と類似する。

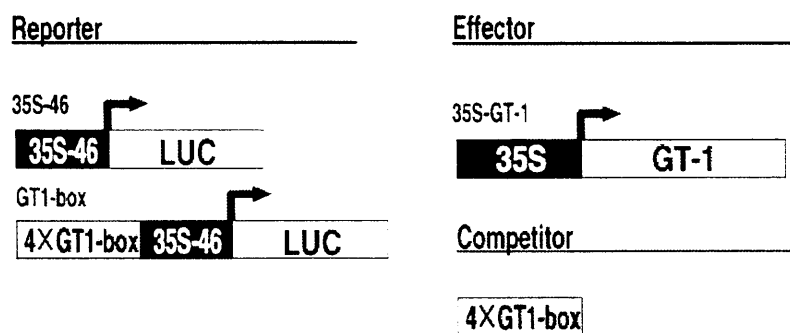
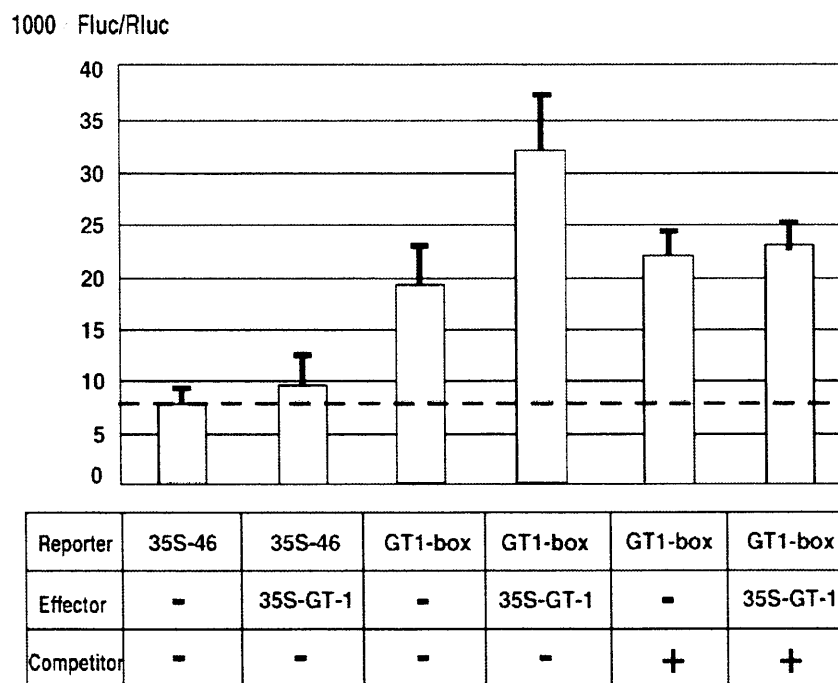
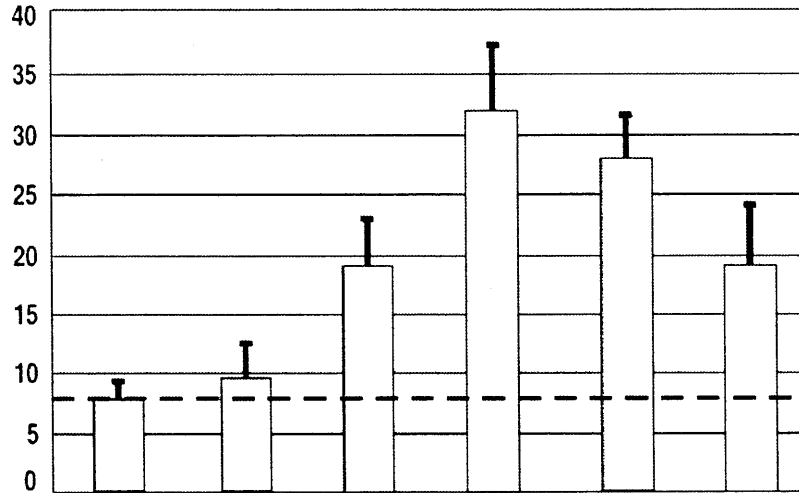


図 12 GT-1 の転写活性化能

BY-2 プロトプラストに各種エフェクタープラスミド、レポータープラスミドをエレクトロポレーションにより導入し、一過的に発現させた。エフェクタープラスミドの転写活性化能をレポーターであるルシフェラーゼの発光により測定した。内部標準には、CaMV 35S プロモーター下流にウミシイタケ由来のルシフェラーゼを連結したものをを用いた。コンペティターとして GT1-box 4 量体断片をモル数換算でレポータープラスミドの 50 倍量加えた場合のレポーター活性の変動を調べた。

1000 · Fluc/Rluc



Reporter	35S-46	35S-46	GT1-box	GT1-box	GT1-box	GT1-box
Effector	-	35S-GT-1	-	35S-GT-1	35S-GT-4	35S-GT-5

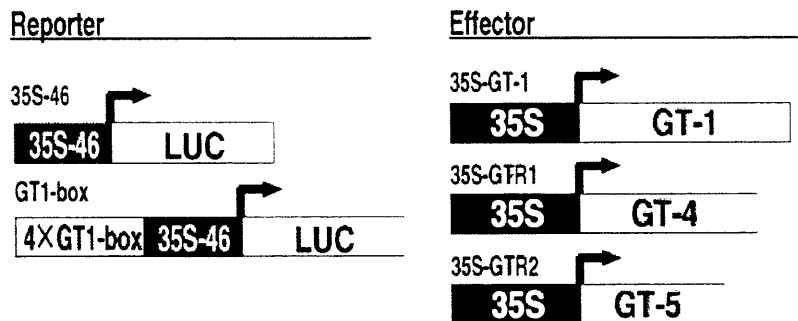


図 13 GT-4 及び GT-5 の転写活性化能

BY-2 プロトプラストにエフェクターとして *CaMV35S* プロモーター下流に GT-4 または GT-5 を接続したプラスミドを、またレポーターとして GT1-box 4 量体下流に *CaMV35S* 最小プロモーター及び luciferase を接続したプラスミドをエレクトロポレーションにより導入し、一過的に発現させた。実験は 3 回おこない、標準偏差を算出した。

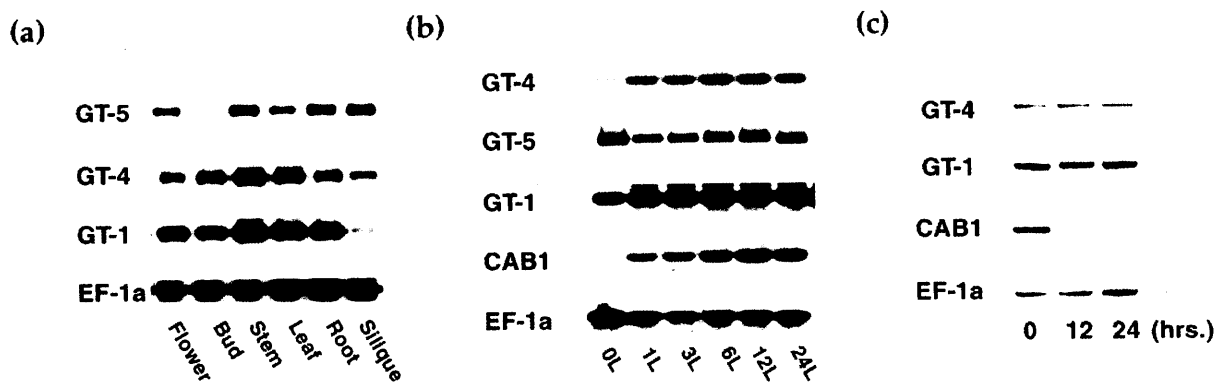


図 14 GT-4 及び GT-5mRNA の発現特異性

GT-4 及び GT-5mRNA の発現特異性を PCR サザンブロット解析により調べた。EF-1a をコントロールに用いた。(a) GT-4 mRNA の蓄積は花、花芽、葉、茎、根、長角果、調べた全ての器官において確認された。一方、GT-1 の長角果における発現、及び GT-5 の花芽における発現は低かった。(b) 暗黒化で 3 日間培養したシロイヌナズナ芽生えに白色光を照射し、GT-1、GT-4、GT-5 の光応答性について PCR サザンブロット解析により調べた。その結果、GT-4 の発現は光応答性を示すことが明らかになった。GT-1、GT-5 は光条件に左右されず、構成的に発現していた。(c) 播種後 2 週間培養したシロイヌナズナを 12 あるいは 24 時間暗条件下におき、葉における GT-4mRNA の発現量を RT-PCR により GT-1 と比較した。

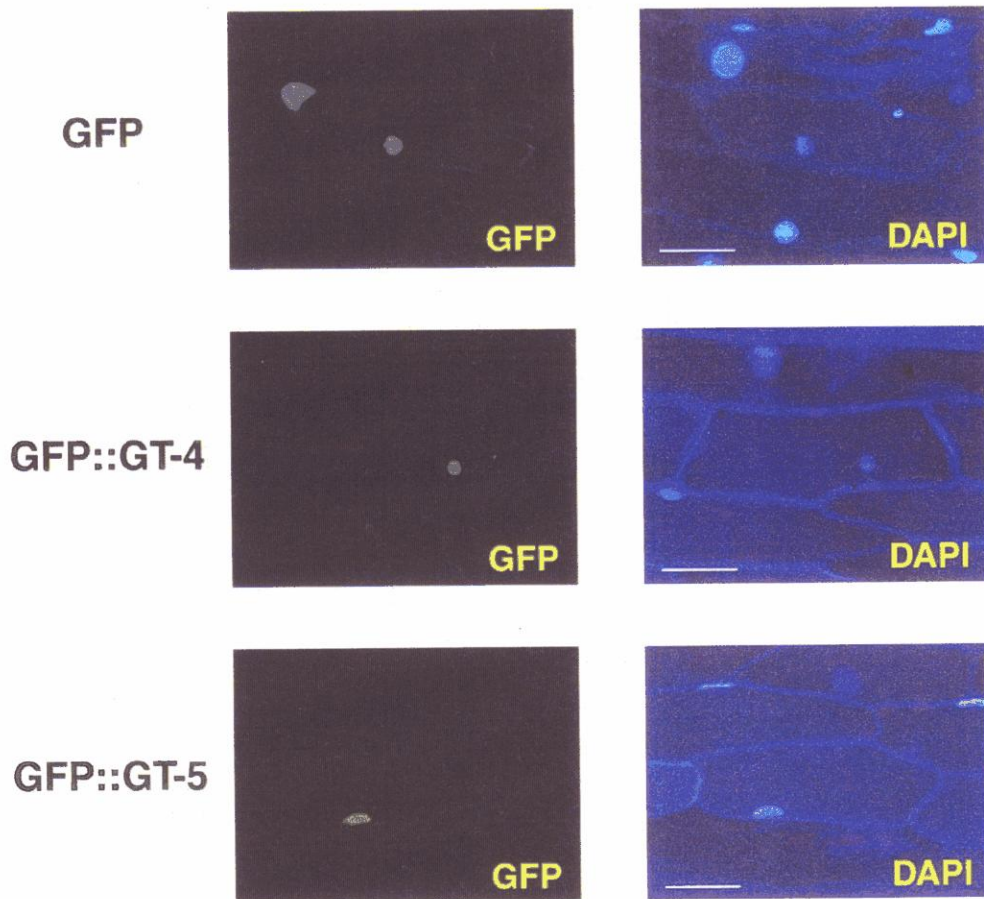


図 15 GT-4、GT-5 と GFP との融合タンパク質は核に局在する

タマネギの表皮細胞に GT-4 及び GT-5 と GFP との融合タンパク質を遺伝子銃により導入・発現させ、遺伝子導入後 6 時間において GFP 蛍光の細胞内局在を蛍光顕微鏡により観察した。GFP のみを発現させた場合、GFP 蛍光は核並びに細胞質に GFP 蛍光が認められる。白線は $200\mu\text{m}$ 。

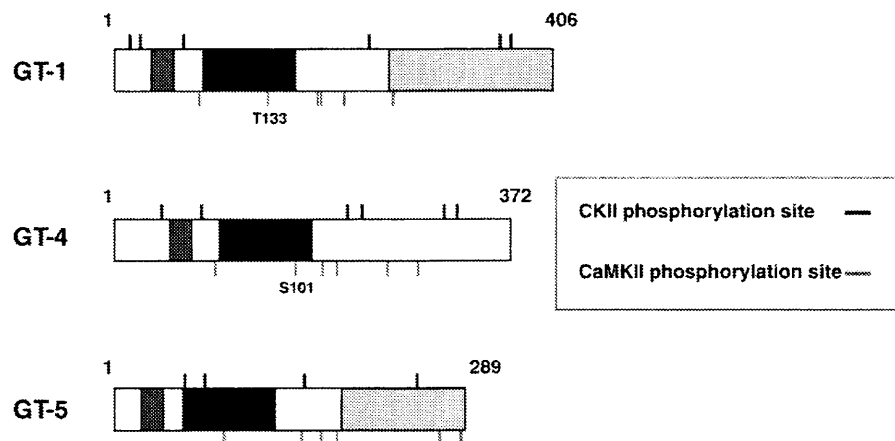


図 16 GT-1、GT-4 及び GT-5 の予想リン酸化部位

GT-4、GT-5 には GT-1 と同様に CKII の予想リン酸化配列 (S/T-X-X-E/D)、及び CaMKII の予想リン酸化配列 (K/R-X-X-S/T) が複数見出される。GT-4 は GT-1 との相同性が GT-54 に比べて高く、リン酸化部位もおおよそ保存されている。GT-1 において DNA 結合活性に最も影響を与えるリン酸化部位である T133 は GT-4 にも保存されている。一方、GT-5 の予想リン酸化部位の位置や配列は GT-1 や GT-4 とは異なる。

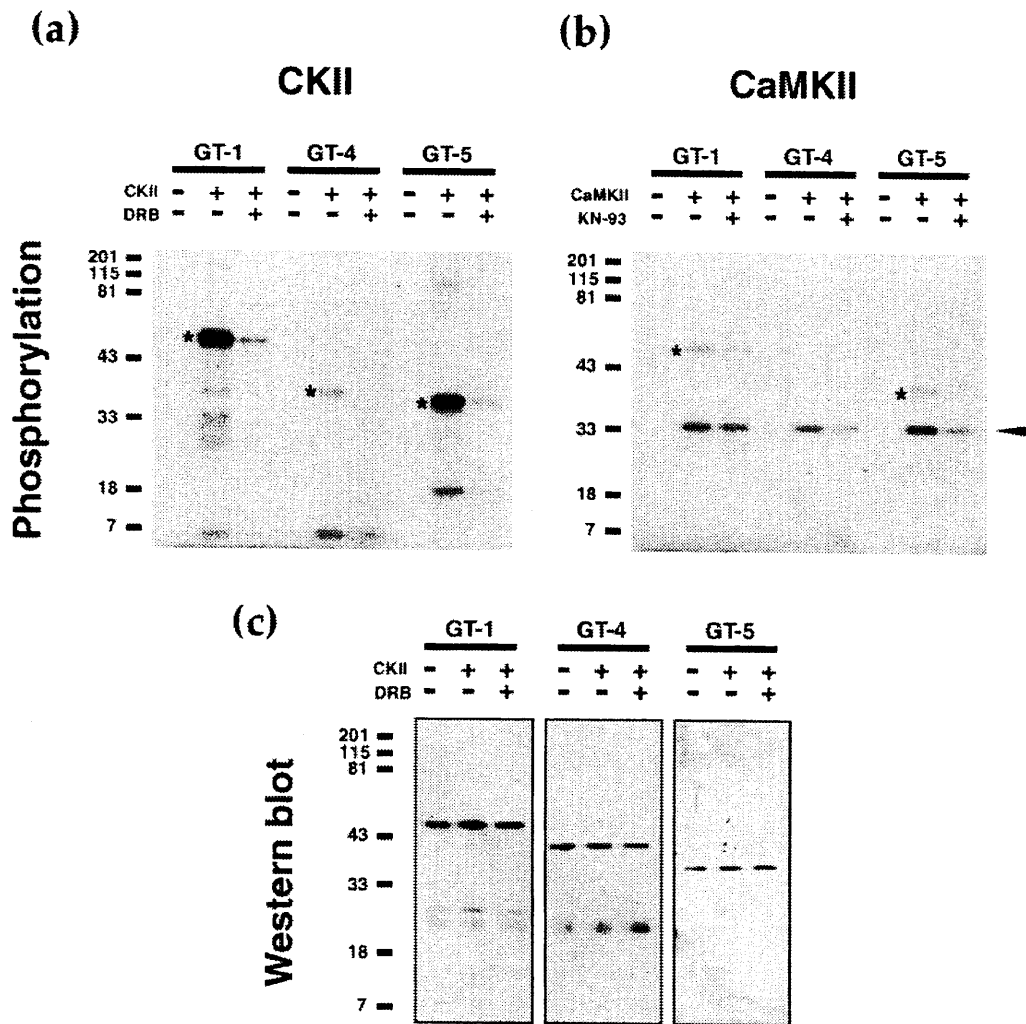
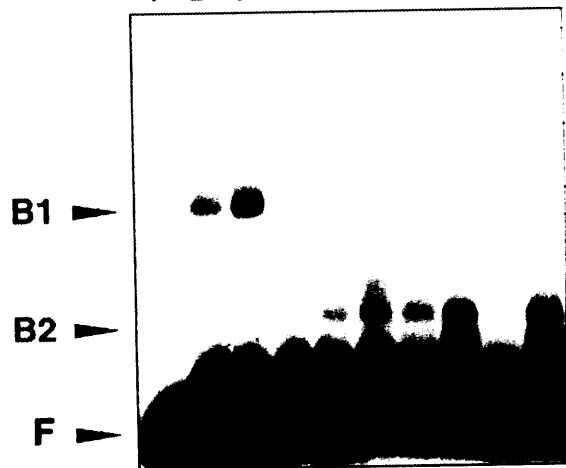


図 17 GT-4 及び GT-5 はリン酸化される

GT-1、GT-4、GT-5 各々の組換えタンパク質と CKII あるいは CaMKII を γ - 32 P ATP 存在下で混合、SDS-PAGE にて展開し GT-1、GT-4、GT-5 組換えタンパク質への ATP の取り込みを検出した。GT-1、GT-5 は CKII、CaMKII いずれによってもリン酸化されうる。GT-4 は CKII によりリン酸化されたが、CaMKII によるリン酸化は検出されなかった。リン酸化されたタンパク質のシグナルを*で、自己リン酸化した CaMKII を矢印で示す。(c) 各々の組換えタンパク質が等量存在することをウェスタンブロット解析により確認した。ここでは全ての組換えタンパク質を大腸菌において発現させ、精製した。

(a)

	GT-1				GT-4			GT-5		
CaMKII	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
KN-93	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



(b)

	GT-1				GT-4			GT-5		
CK2	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
DRB	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

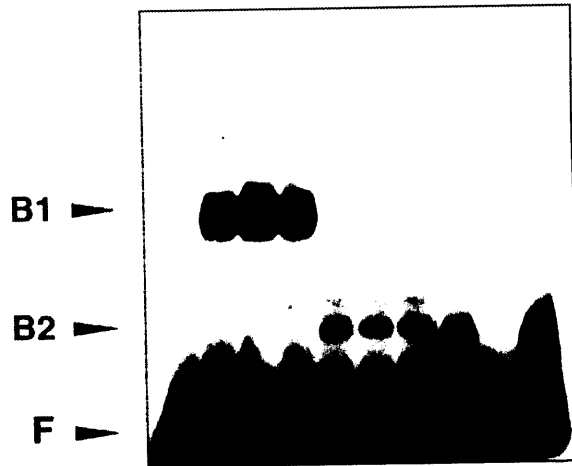


図 18 CaMKII によるリン酸化は GT-5 の DNA 結合活性を低下させる

GT-1 の DNA 結合活性は CaMKII によるリン酸化を受けて活性化されるが (a)、CKII によるリン酸化の影響は受けない (b)。GT-4 は、CaMKII によるリン酸化処理の結果、DNA 結合活性にほとんど変化がなかった (a)。また CKII によるリン酸化を受けても DNA 結合活性に顕著な変動は見出されなかった (b)。GT-5 は GT-1 とは逆に、CaMKII、CKII いずれによるリン酸化を受けても DNA 結合活性が低下した。ここでは全ての組換えタンパク質を大腸菌において発現させ、精製した。

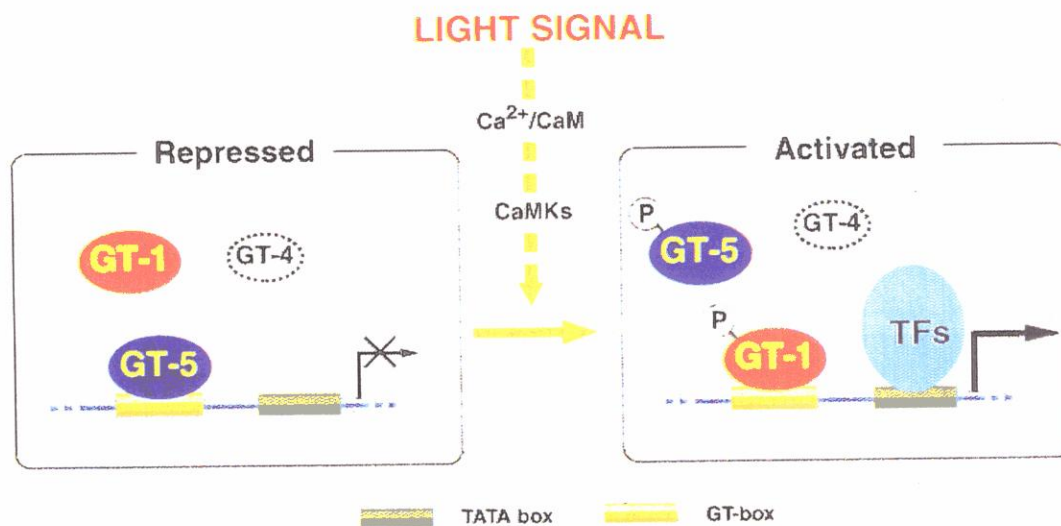


図 19 GT-1、GT-4 及び GT-5 による転写制御モデル

本研究により単離・解析した GT-4、GT-5 に関する結果と GT-1 に関する知見を総合して、GT-1、GT-4、GT-5 による光応答性遺伝子の転写制御メカニズムをモデルに示した。GT-1、GT-4、GT-5 の DNA 結合特異性は互いに類似している。GT-5 の DNA 結合活性を主に CaMKII が制御すると仮定した場合、GT-1 および GT-5 が低いリン酸化状態にあると、GT-5 が GT1-box へ結合する。GT-5 は顕著な転写活性化能を有さないため、転写活性は低い状態にある。光シグナル伝達経路が活性化され、CaMK のキナーゼ活性が上昇すると GT-1、GT-5 はリン酸化修飾を受け、GT-1 の DNA 結合活性は上昇し、GT-5 の DNA 結合活性は逆に低下する。その結果、GT-5 が GT1-box から解離し、代わりに GT-1 が結合し、プロモーターの転写活性が上昇する。GT-4 に関しては *in vivo* での挙動について不明な点が多く、点線で示した。

2. *in vivo* における GT ボックス結合タンパク質の性状解析

第1節 GT-1の細胞内局在を規定するアミノ酸配列の同定

序論

GT-1、GT-4、GT-5とGFPとの融合タンパク質が核局在性を示すため、GT-1、GT-4、GT-5は核タンパク質であることが予想される。核局在に必要なとされるNLSの構造をGTボックスタンパク質群のアミノ酸配列中から探索すると、GT-2には典型的な二分節型のNLSが同定されており、他のGT-2タイプのGTボックス結合タンパク質にも高度に類似した配列が存在する。ところがGT-1タイプのGT-1、GT-4には既知のNLSと相同性を示すアミノ酸配列は見出されず、核移行に必要な領域は未同定である(Hiratsuka et al., 1994; Dehesh et al., 1995)。そこでGT-1を材料に、GT-1タイプの核局在に必要な領域の同定を試みた。

材料と方法

試薬、培地・バッファー、菌株、オリゴヌクレオチド、塩基配列決定、遺伝子銃による遺伝子導入、GFP 蛍光の観察は第 1 章に準ずる。

1. 植物材料

タマネギは市販のものを用いた。

2. プラスミド構築

GT-1 の欠失変異体及びアラニン置換体の作製は PCR によりおこなった。GT-1 の N 末端側から順次欠失させた変異体の作製のために用いたプライマーを以下に示す。

JM001 5'-AGACGCCTTTCAAGGTTTAAGG-3'

GT-1dN68 5'-GGTCTAGAGACCATGGGAGAAAGCAGTGGAGAAGAT-3'

GT-1dN102 5'-CCTCTAGAGACCATGGATGGTTATTCAATACATCC-3'

GT-1dN129 5'-GGTCTAGAGACCATGGATCGATCTCCGACTATGTG-3'

GT-1dN153 5'-GGTCTAGAGACCATGGATAGAGGAAATGGATCGG-3'

GT-1 欠失変異体の作製にあたって合成依頼したオリゴヌクレオチドは、翻訳開始の効率を上げるため、Kozak 配列 (5'-RCCACC-3') を開始コドンのすぐ上流に配した。GT-1 欠失変異体の C 末端側にレポーター遺伝子として GFP (S65T) を融合した。コンストラクションの成否の評価は制限酵素処理及びシーケンシングに拠った。

GT-1 の塩基性アミノ酸へのアラニン置換の導入には、LA PCR *in vitro* Mutagenesis kit (宝酒造) を使用した。GT-1 に 4 つ存在する、塩基性アミノ酸に富む領域中央部分のアルギニンをアラニンに置換するべく設計したオリゴヌクレオチドと 35S-LA、35S-mut01 と NOS-LA により 1st PCR をおこなった。次にこれら 2 つの PCR 産物をそれぞれ煮沸し 1 時間かけて緩やかに 37℃ まで冷却しアニールさせることで heteroduplex を形成させた。35S-LA と NOS-LA をプライマーとして伸長反応をおこない、制限酵素処理によって目的の変異を導入したクローンを選抜した。用いたプライマーを以下に示す。

NOS-LA 5'-GATCTAGTAACATAGATGACACCGCGCGCG-3'
35S-LA 5'-GGTCCCCAGATTAGCCTTTTCAATTTTCAGAAAG-3'
35S-mut01 5'-GAGAACACGGGGGACTCTACAGGATCTCGAG-3'
GT1m1-1 5'-CATGTCTCCGCTCGTGCCTTTGGTGCTTTAAC-3'
GT1m2-1 5' -CAAACCCTTTTTCTGCCATCTTAGACGAAATC-3'

GT-1 の核移行に必要な、塩基性アミノ酸に富む領域を PCR により増幅し、GFP と接続した。具体的には下に示したオリゴヌクレオチドを混合し、煮沸により熱変性させたのち、2 時間かけて室温へ移行させてアニールさせた。制限酵素 *XhoI* 及び *PstI* により消化したのち、制限酵素 *XhoI* 及び *PstI* にて消化した pGFP(GA)5II へサブクローニングした。

BC1L-N 5' -GGCTGCAGTCGACGGAAGATGAGAGAAAAAGGGTTTGATCG-3'
BC1L-C 5' -GGCTCGAGCTCATCGATCAAACCCTTTTTCTCTCATCTTCC-3'

結果

GT-1 欠失変異体と GFP との融合タンパク質の細胞内局在

GT-1 の核局在活性に N 末端から 215 アミノ酸残基の領域が十分であることは GUS (β -glucuronidase) をレポーターに用いた実験で示されていた (Hiratsuka et al., 1994)。しかし GT-1 には既知の NLS と相同性を有する配列は見出されなかった。そこで GT-1 の核局在に必要な領域を同定するため、以下の実験をおこなった。GT-1 の N 末端側から 215 アミノ酸残基の断片を順次 N 末端から欠失させた変異体の C 末端側に GFP (Green Fluorescent Protein) を接続した融合タンパク質をタマネギ表皮細胞において一過的に発現させ、細胞内局在を調べた[図 20、21]。GFP 蛍光の観察は、融合タンパク質導入後 6 時間経過した時点でおこなった場合に各コンストラクト間の細胞内局在の差が最も観察しやすかった。融合タンパク質の細胞内局在は、GFP の蛍光を与える全細胞数に対する百分率 (n=100) によって評価した。

本研究ではレポーターとして GFP を採用したため、まず GT-1 の N 末端側 1-215 残基の領域 (GT-1(1-215)) が核局在に十分であることを GFP を用いて追試した。その結果 GFP のみのコンストラクト (GFP) においては核及び細胞質を含む細胞全体から GFP 蛍光が観察されたのに対して、GT-1 の N 末端から 215 アミノ酸残基の領域と GFP との融合タンパク質 (GT-1(1-215)::GFP) は核に局在した (72%) [図 20、21]。従って GT-1(1-215)が GT-1 の核局在に十分であることが再確認された。また、GT-1(1-215)の N 末端から 62 及び 102 アミノ酸残基を欠いた GT-1 欠失変異体と GFP の融合タンパク質 (dN68GT-1::GFP、dN102GT-1::GFP) も概ね核に局在した (それぞれ 79%、63%)。しかし N 末端から 129 及び 153 アミノ酸残基を欠失した GT-1 欠失変異体と GFP との融合タンパク質 (dN129GT-1::GFP、dN153GT-1::GFP) は、形質転換した殆どの細胞において GFP 蛍光が細胞全体から観察された (それぞれ 3%、1%) [図 21]。以上の結果から、GT-1 の核局在に必要な領域は GT-1 の N 末端から 102-129 アミノ酸残基の範囲に存在することが明らかになった。この領域には GT-1 に存在する、塩基性アミノ酸に富む領域 (Basic Cluster: BC) のうちの 1 つ、N 末端から数えて 2 番目の BC (BC1) [図 22a]が含まれていた。一般に NLS はリジン、アルギニンなど塩基性アミノ酸に富むアミノ酸配列とされる (Yamamoto and Deng 1999)。従って本研究で見出された、BC1 を含む配列は GT-1 の NLS として機能することが予想された。

GT-1 アラニン置換変異体と GFP との融合タンパク質の細胞内局在

次に BC 中の塩基性アミノ酸を電荷的に中性なアラニンに置換して NLS としての機能を欠失させ、GT-1 の核局在活性における BC1 の必要性を調査した。具体的には BC1 のアルギニン (Arg-124) をアラニンに置換した GFP::BC1mGT-1、及び対照として BC2[図 22a]中のアルギニン (Arg-81) をアラニンに置換した GFP::BC2mGT-1 を作成し、これらの融合タンパク質のタマネギ表皮細胞における細胞内局在を観察した。その結果 GFP::BC1mGT-1 を導入した場合、概ね細胞全体から観察された[図 22b]。一方 GFP::BC2mGT-1 では GT-1(1-215)::GFP 由来の GFP 蛍光と顕著な差は見出されず、共に核に局在していた。従って Arg-124 が GT-1 の核移行に必須であることが明らかになった。

BC1 と GFP との融合タンパク質の細胞内局在

続いて BC1 のみを GFP に接続したコンストラクト GFP::BC1 を作成し、融合タンパク質をタマネギ表皮細胞において一過的に発現させ、GFP へ核移行活性を付与するかについて調べた。遺伝子導入方法などは全て GT-1 欠失変異体と GFP との融合タンパク質の細胞内局在を調査した実験と同条件でおこなった。その結果、GFP::BC1 を導入した細胞由来の GFP 蛍光は 20 % (n=300) の細胞において核局在性を示した。一方 GFP のみの場合には、GFP 蛍光は 2 % (n=300) の細胞においてのみ核に局在していた。従って BC1 は GFP に対して 10 倍の核移行活性を付与することが示された[図 23]。

以上の実験から、BC1 は GT-1 の核局在に必要なかつ十分なアミノ酸配列であることが明らかになった。BC1 のアミノ酸配列は KMREKGF D である。この 8 アミノ酸残基のうち 3 番目のアルギニン (Arg-124) は GT-1 の核移行に必須である。BC1 は既知の NLS とは相同性を示さないため、新規な構造の NLS であると考えられた。

考察

GT-1 は新規な核移行シグナルを有する

核タンパク質の核—細胞質間輸送の特異性は主に核タンパク質が有する NLS と、それを認識し結合する importin α により決定される (Herold et al., 1998)。NLS はタンパク質の核局在に必要な塩基性アミノ酸に富むクラスター構造をとり、*Agrobacterium* VirD2 において初めて見出された (Howard et al., 1992)。当初報告された NLS の構造は VirD2 に見出された二分節型が殆どであったが、次第に NLS の構造が非常に多岐にわたることが明らかになった。現在では NLS は、SV40 T-ag (Simian Virus 40 large T-antigen) に見られる単分節型、VirD2 にみられる二分節型、MATa に見出された塩基性アミノ酸及び疎水性アミノ酸に富む型の 3 つに分類される (Hall et al., 1984; Kalderon et al., 1984; Howard et al., 1992; Tinland et al., 1992; Raikhel 1992; Yamamoto and Deng 1999) [図 25]。NLS を持つタンパク質は importin α に認識されて結合し、続いて importin β と共に PTC (pore targeting complex) を形成し核へと輸送される (Gorlich et al., 1995)。高等植物の importin α はシロイヌナズナから 4 種類 (Hicks et al., 1996; Ballas and Citovsky, 1997; Smith et al., 1997; Nemeth et al., 1998)、イネからは 3 種類 (Iwasaki et al., 1998; Shoji et al., 1998; Jian et al., 2001) 報告された。イネの importin α の場合、各型の NLS に対する結合特異性や発現の組織特異性、光応答性が異なることから、importin α がタンパク質の核輸送制御を担う可能性が示唆された (Shoji et al., 1998; Jiang et al., 2001)。

本章での一連の実験結果から、GT-1 の Trihelix 構造ほぼ中央部分に位置する BC1 (KMREKGFDF) が GT-1 の核局在に必要な十分であることが明らかになった。この配列は Opaque2、TGA-1a、R など植物の他の転写制御因子が有する NLS (van der Krol and Chua, 1991; Varagona et al. 1992; Shieh et al., 1993) と相同性を示さず、新規な NLS であると結論づけられた [図 24a]。この新規な NLS は GT-4 及び GT-5 においても高度に保存されており、GT-4 においては同一の配列が、GT-5 においては 75 % の類似性 (6 残基/8 残基) を有する配列が見出される [図 24b]。GT-4、GT-5 は GT-2 に見出された二分節型の NLS (Dehesh et al., 1995) を持たないため、GT-4、GT-5 の核局在にもこの新規な NLS が関連することが示唆された。このようなサブタイプ間の NLS 構造の相違は、核移行様式・シグナル応答性の相違を示唆すると考えられる。

最近データベース上に登録された GT-3a は GT-5 Trihelix 領域で 78 % の相同性を示す。しかし発現組織特異性や DNA 結合特異性などが未報告であるため性状の詳細は

不明である。興味深いことに、GT-3a には GT-1、GT-4、GT-5 間で保存された NLS は見出されない。そのかわりに GT-3a は本研究により人工的にアラニン置換を導入した、核移行活性のない GT-1 の NLS と同一の配列を有する。従って GT-3a は核局在性を示さない可能性も考えられる。

一方、核タンパク質の核移行にリン酸化が関与する可能性が指摘されている。SV40 T-ag の核移行活性には NLS 近傍のアミノ酸残基のリン酸化が必須である。SV40 T-ag は NLS に隣接した部位を cdk/cdc2 によりリン酸化されると核移行を阻害され、NLS 近傍の別の部位を CKII (Casein Kinase II) によりリン酸化されると核移行が促進される (Jans and Hubner, 1996)。動物の核タンパク質の核移行関連因子は植物においても機能することから、核移行活性制御機構は広い生物種間で保存されていることが推察される。本節において GT-1 の Trihelix 領域に見出した新規な NLS には、GT-1 の DNA 結合活性に最も影響を及ぼすリン酸化部位 (Marechal et al., 1999) が隣接して存在する [図 24b]。GT-4 にもこの領域の予想リン酸化部位、並びに NLS の位置関係は保存されている。従って GT-1 及び GT-4 の核移行活性も SV40 T-ag と類似した機構を介して制御される可能性も示唆される。

核タンパク質は必ずしも常に核に局在するとは限らない。核タンパク質の核内での機能発現を調節する手段の 1 つとして、核-細胞質間輸送メカニズムの存在が酵母、哺乳動物、植物など様々な生物種で明らかになってきた (Smith and Raikhel, 1999; Vasu and Forbes, 2001)。このシステムは新規なタンパク質合成を必要としないため、環境変化への迅速な応答を可能にすると考えられている。植物の転写関連タンパク質で、暗条件下でも明条件と同様の芽生えの表現形を示す変異体 *cop1* の原因遺伝子産物 COP1 は光条件の変化に伴って細胞内局在が制御され、暗条件では核に、明条件では細胞質に局在する (von Arnim and Deng, 1994)。COP1 の NLS に関しては、典型的な二分節型の NLS を有すること [図 24a、25]、COP1 の NLS への結合特異性の高い importin α 分子種の同定などが報告されている (Jiang et al., 2001)。従って COP1 と同じく二分節型の NLS を有する GT-2 タイプの GT ボックス結合タンパク質についても光条件によってその細胞内局在が制御される可能性も考えられる。GT ボックス結合タンパク質の転写制御メカニズムと核移行活性制御との関連については、GT-1 に見出された NLS に特異的に結合する importin α の同定や、細胞内局在が環境の変化に伴って制御される可能性についてより詳細な解析が必要である。

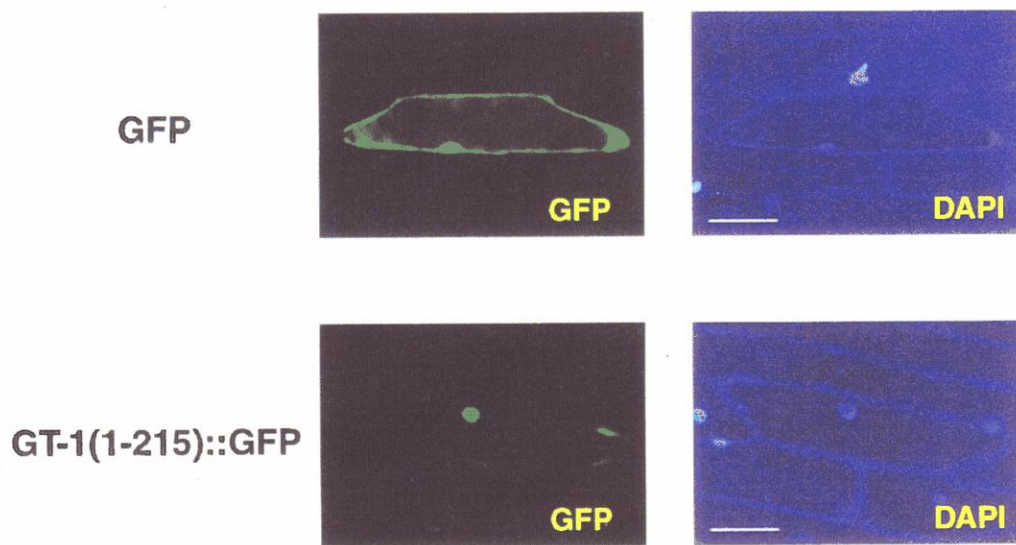


図 20 GT-1 の N 末端側領域には核局在活性がある

GT-1 の N 末端から 215 アミノ酸残基の領域は GT-1 の核移行に十分であることが GUS との融合タンパク質で確認されている (Hiratsuka et al., 1994)。本研究ではレポーター遺伝子として生細胞で観察可能な GFP を採用したため、GT-1 の N 末端 215 アミノ酸残基の領域へ融合させるタンパク質を GFP に置き換えてタマネギの表皮細胞において一過的に発現させ、追試をおこなった。白線は $200\mu\text{m}$ 。

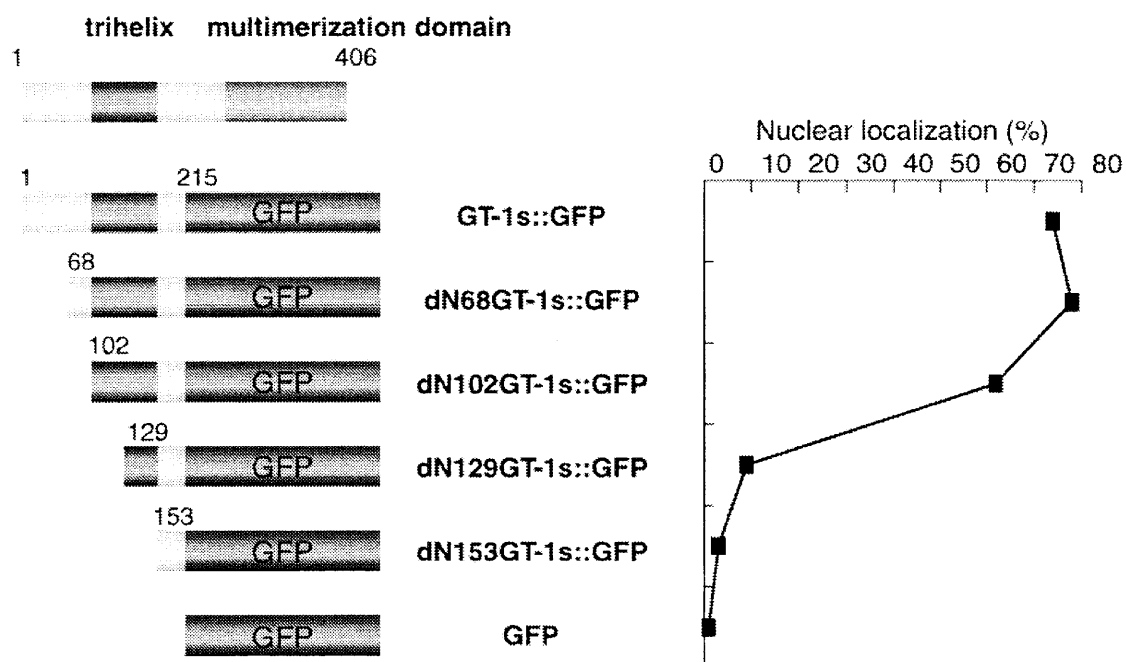


図 21 GT-1 の核局在には Trihelix 内の 27 残基が必要である

GT-1(1-215)の N 末端側から順次欠失させた変異体と GFP との融合タンパク質のタマネギ表皮細胞における細胞内局在を調べ、GT-1 の核局在活性に必要な領域の同定を試みた。N 末端から 129 アミノ酸残基まで欠失させた変異体では 90%の細胞で GFP 蛍光が細胞全体から観察された (n=100)。

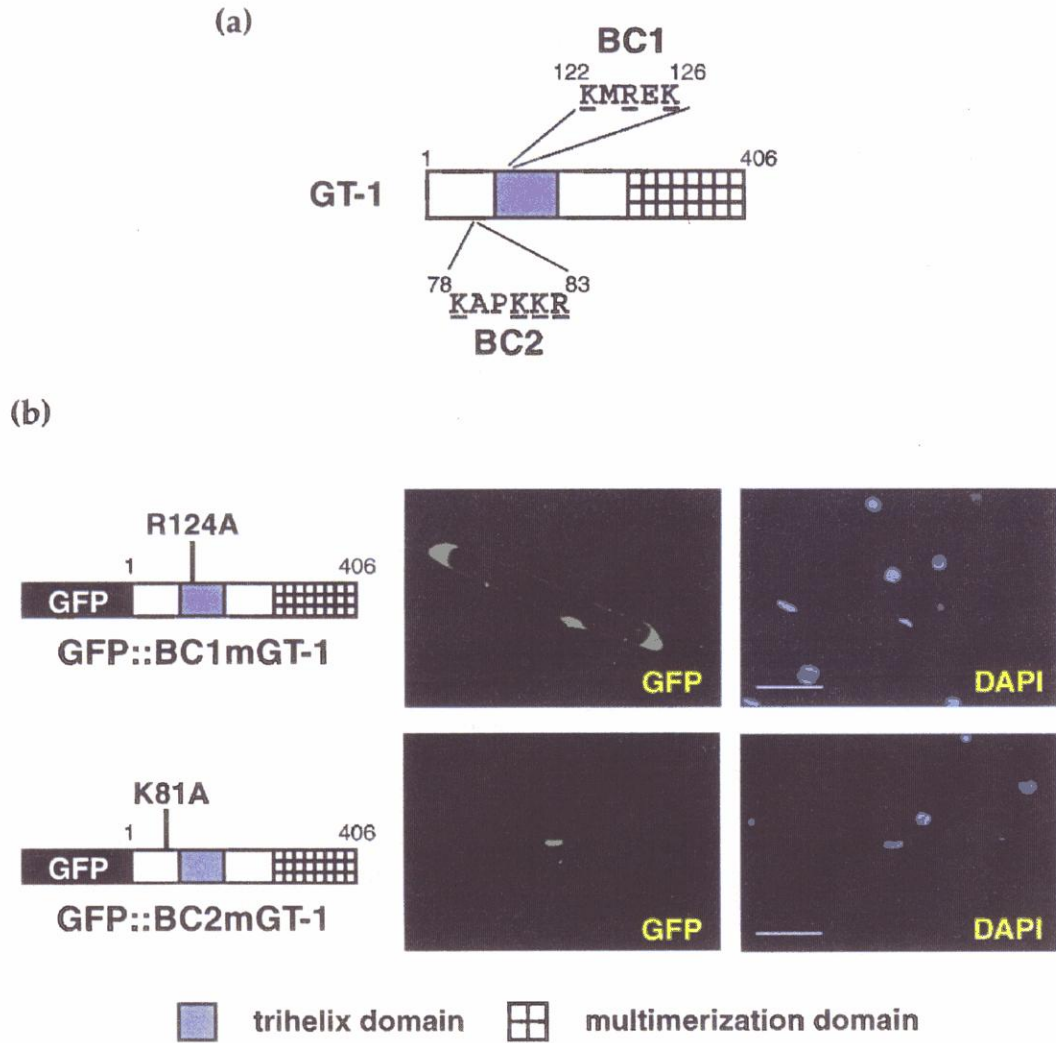


図 22 GT-1 の R124 は GT-1 の核局在に必要なである

(a) GT-1 に見出される、2つの塩基性アミノ酸に富む領域をそれぞれ basic cluster 1 及び 2 (BC1、BC2) と名付けた。塩基性アミノ酸には下線を付した。(b) BC1 及び BC2 の塩基性アミノ酸にアラニン置換を導入した GT-1 変異体と GFP との融合タンパク質のタマネギ表皮細胞における細胞内局在を調べた。白線は 200 μ m。

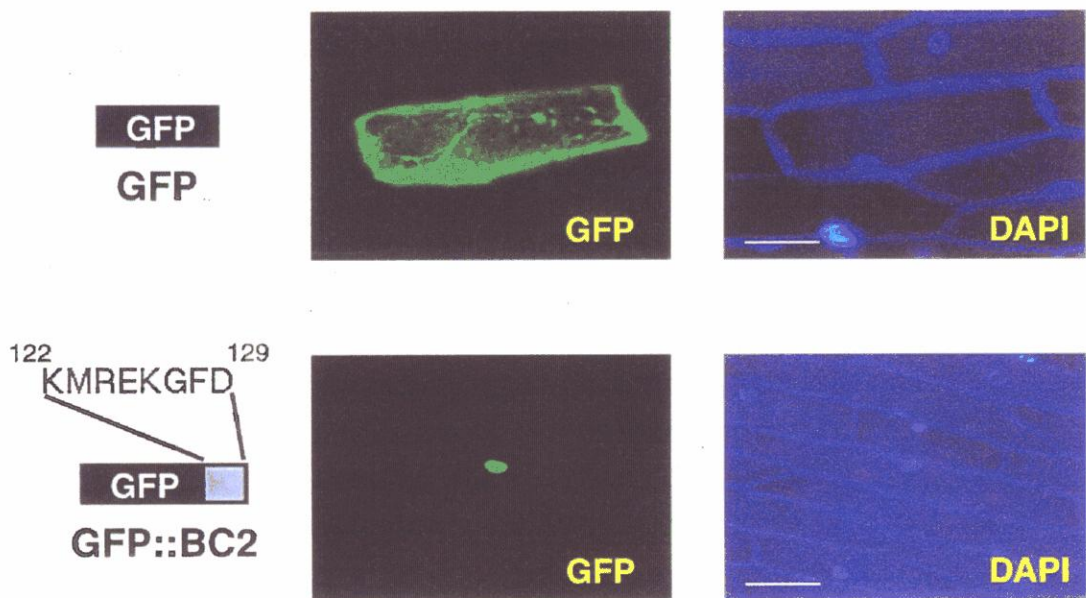


図 23 KMREKGFDF なる配列は GT-1 の核局在に十分である

BC2 を含む領域 (KMREKGFDF) のみを GFP へ接続し、融合タンパク質がタマネギ表皮細胞において核局在活性を獲得するか調べた。GFP 蛍光の細胞内局在は約 300 個の細胞について観察した。導入したそれぞれのコンストラクトについて、代表的な写真を示した。白線は $200\mu\text{m}$ 。

		<u>Helix 2</u>	<u>Helix 3</u>
GT-3a type	GT-5	NKLLWEV ISNKMRDKSF PRSPEQCKCKWKNLVTRFKGCE	
	GT-3a	NKLLWEV VAAKMADKGF VRSAEQCKSKWKNLVTRYKACE	
GT-1 type	AtGT-1	NKHLWEQ ISSKMREKGFDR <u>SPT</u> [*] MCTDKWRNLLKEFKKAK	
	GT-4	NKHLWEQ ISSKMREKGFDR <u>SPT</u> [*] MCTDKWRNILKEFKKAK	
GT-2 type	AtGT-2N	KAPLWEEISRKMMELGYKRSS KKCK EKFENVYKYH KRTK	
	AtGT-2C	KGPLWEEISAGMRRLGYNRSA KRCK EKWENINKYF KKVK	
	OsGT-2N	KGPLWEEVSRKLAELGYKRSA KKCK EKFENVHKYY KRTK	
	OsGT-2C	KGPLWEEISSGMRRRLGYNRSS KRCK EKWENINKYF KKVK	
	DF1N	KGPLWDEVSRKMADLGYHRNS KKCK EKFENVYKYH KRTK	
	DF1C	KGPLWEEISGLMKNLGYNRNA KRCK EKWENINKYF KKVK	
	AtGTL1C	KGLLWEEIISTSMKRMGYNRNA KRCK EKWENINKYY KKVK	
	AtGTL1N	KAPLWEHVSRKLLLELGYKRSS KKCK EKFENVQKYY KRTK	
AtGTL2N	KAPLWEHVSRKLLLELGYKRSS KKCK EKFENVQKYY KRTK		
consensus		K LWE V L GY RS CK KW N K K	
		N I M SF N T F E	

図 24 GT ボックス結合タンパク質の NLS 構造の比較

GT-2に見出された NLS と、本研究により明らかになった GT-1 の NLS のアミノ酸配列を、NLS 周辺の Trihelix 領域の配列と併せて比較した。GT-2 タイプのタンパク質は DNA 結合部位を二つ有するため、それらのうち N 末端側の Trihelix にはタンパク質名の最後に N を、C 末端側の Trihelix にはタンパク質名の最後に C を付した。GT-1 の NLS を青で囲み、GT-2 の NLS を赤で囲んだ。GT-2 の NLS と類似した配列は他の GT-2 タイプにも保存されている。一方、GT-1 の NLS は GT-1 タイプ、GT-3a タイプの 2 つのサブファミリーにまたがって存在することが示唆される。GT-1 タイプの NLS に隣接する CaMKII 予想リン酸化部位を * で示した。上図に示したアミノ酸配列：AtGT-1 (Hiratsuka et al., 1994)、AtGT-2 (Kuhn et al., 1993)、OsGT-2 (Dehesh et al., 1990)、DF1 (Nagano et al., 2001)、AtGTL1 (Smalle et al., 1999)、AtGTL2 (Smalle et al., 1999)、GT-3a (Lu et al., 2001)。

NLS type	protein	NLS sequence
GT1-NLS	GT-1	122 129 K MREK G FD
T-NLS	R	419 428 MSE R KK R EKL
R-NLS	R	598 610 M <u>I</u> SE <u>A</u> L <u>R</u> K <u>A</u> I <u>G</u> K R
O2-NLS	Opaque2	228 248 R KK R ES N RESARR S RY R K
	GT-2	145 162 K K C KE K FENVH K YY K RT K
		536 553 K R C KE K WENIN K Y F K K V K
COP1	294 314 R KK R I H AQ F N D L Q EC Y L Q K R R	

図 25 植物の他の転写関連因子の NLS との比較

既知の NLS の構造は SV-40 T-ag に代表される単分節型 (T-NLS) (Shieh et al., 1993)、maize R protein に代表される塩基性アミノ酸及び疎水性アミノ酸に富む型 (R-NLS) (Shieh et al., 1993)、maize Opaque 2 に代表される二分節型 (O2-NLS) (Varagona et al. 1992) の大きく三つのタイプに分類される (Yamamoto and Deng 1999)。GT-2 (Dehesh et al., 1995)、および COP1 (von Arnim and Deng, 1994) に見出された NLS は共に O2-NLS と高い相同性を示す。本研究により GT-1 に見出された GT1-NLS は、これらの NLS と比較して塩基性アミノ酸の分布が T-NLS と類似するものの、アミノ酸配列は異なる。塩基性アミノ酸を太字で、R-NLS 中の疎水性アミノ酸は下線を引いて示した。

第2節 *in vivo*におけるGTボックス結合タンパク質の結合配列

序論

転写制御メカニズムに関する研究はシス配列の同定、転写制御因子のクローニングと分子解剖、*in vitro*での転写活性測定や変異体、形質転換体を用いた解析などがおこなわれてきた。しかしGTボックス結合タンパク質のように、転写制御因子が複数種のシス配列に結合する場合 (Hiratsuka et al., 1994; Nagano et al., 2001)、また他のシス配列との距離や配置が重要な場合があり (Puente et al., 1996; Chattopadhyay et al., 1998)、*in vivo*の結合配列をシス配列側からのアプローチにのみ依存して同定することは困難である。近年になって、ChIP/TIP (Chromatin immunoprecipitation/transcription factor immunoprecipitation assay) 法が特に酵母において盛んにおこなわれ、*in vivo*での転写制御の動態をトランス因子側から解析できるようになってきた。

TIP法はChIP法から派生した実験手法である。当初ChIP法は、染色体構造遺伝子がセントロメアなど染色体の特定の領域に結合することを示すために用いられた (Saitoh et al., 1997)。ChIP法の実験手順は生体内のDNA-転写制御因子複合体の固定、特異抗体を用いた免疫沈降、(定量的)PCRによる検出から成る。TIP法により、*in vivo*において転写制御因子が染色体のどこへ(位置情報)どのタイミングで(時間情報)結合するかを検出できる。従ってTIP法を用いることで転写制御因子のDNA結合プロファイルの時間あるいはシグナル依存的な変動を解析することが可能である。理論的には新規な結合配列の同定が可能であること、また直接DNAと結合しない因子の解析にも利用できることから、*in vivo* footprinting に比べて汎用性も高い。

TIP法による転写制御因子の*in vivo*でのDNA結合様式の解析は酵母において進んでおり、以下に代表的な報告例を挙げる。**HM lociの転写抑制機構**: テロメア近傍にコードされ、酵母の性決定に関与する *HMRa*、*HML α* の転写は抑制されている。この転写抑制が *SIR3* を含む複合体とテロメア領域との直接の結合を介すること、また *SIR3* の発現量と *SIR3* の結合する範囲に相関があることが示された (Hecht et al., 1996)。**細胞周期と *HO* 遺伝子発現**: 出芽酵母 *HO* 遺伝子は *MATa/ α* 遺伝子座に二重鎖切断を施すエンドヌクレアーゼをコードし酵母の性決定に重要であると共に、酵母の転写制御メカニズム研究の代表的な材料である。*HO* 遺伝子プロモーターへ配列特異的に結合する転写制御関連因子が複数明らかになっており、これらが細胞周期依存的にプロモーターへリクルートされる順序が見出された (Cosma et al., 1999)。

また、HO プロモーター領域においてヒストンのアセチル化が G1 期に起こることも報告されている (Krebs et al., 1999)。基本転写因子群の2つの転写モード：酵母において TBP と TAFs の存在比が TAF 依存的プロモーターと TAF 非依存的プロモーターとで異なることを見出した (Li et al., 2000; Kuras et al., 2000)。さらに、熱ショックを与えると TBP の転写モードが変化し、TAFs/TBP 比率が大きくなる傾向にあることも明らかになった。

本章ではまず GT-4、GT-5 に対する特異抗体を作製し、抗体の認識特異性を確認した。続いてこれらの抗体を用いてシロイヌナズナ *CAB1*、*CAB2* 両遺伝子のプロモーター領域への GT-1、GT-4、GT-5 の結合様式を TIP 法により解析した。また、TIP 法により得られたゲノミック DNA 断片を、アガロースビーズに固定した組換え GT-1 タンパク質を用いて精製し、プラスミドライブラリ化してランダムに選抜した 36 クローンについて塩基配列決定をおこなった。その結果、GT-1 結合配列をプロモーターに有する新規遺伝子、*GER3* を同定した。

材料と方法

試薬、培地、菌株、植物材料、塩基配列決定、RT-PCR の実験方法は特に記載しない限り第 1 章に準ずる。

1. 緩衝液

<核タンパク質粗抽出>

緩衝液 A: 10 mM HEPES-KOH (pH7.8), 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 250 mM sucrose, 0.5 % Triton X-100

低塩濃度緩衝液: 20 mM HEPES-KOH (pH7.8), 20 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 25 % glycerol

高塩濃度緩衝液: 20 mM HEPES-KOH (pH7.8), 1.6 M KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 25 % glycerol

透析緩衝液: 20 mM HEPES-KOH (pH7.8), 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 10 % glycerol

<TIP 法>

固定液: 2 % paraformaldehyde, 10 mM sodium phosphate, 100 mM NaCl

M0 buffer: 10 mM sodium phosphate, 100 mM NaCl

HS · BSA: 1 M Tris-HCl (pH7.6), 5 M NaCl, 10 % NP-40, 200 mM PMSF, 3mg/ml 1mg/ml BSA

FA-lysis 緩衝液: 50 mM HEPES-KOH (pH7.5), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.1 % sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 20 μg/ml antipain, 1 μg/ml leupeptin

FA-lysis · NaCl 緩衝液: 50 mM HEPES-KOH (pH7.5), 140 mM NaCl, 500 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.1 % sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 20 μg/ml antipain, 1 μg/ml leupeptin

洗浄液: 10 mM Tris-HCl (pH8.0) , 0.25 M LiCl, 0.5 % NP-40, 0.5 % sodium deoxycholate, 1 mM EDTA

溶出用緩衝液: 1 % SDS, 50 mM NaHCO₃

<最適結合配列の同定>

NEB:透析緩衝液: 20 mM HEPES-KOH (pH7.8) , 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 10 % glycerol

その他 Ni²⁺-NTA アガロース担体の平衡化、洗浄、溶出に用いた緩衝液は全て QIAexpress System (QIAGEN 社) に従った。

2. 抗血清の作製

抗 GT-4 抗血清、抗 GT-5 抗血清作製のための抗原タンパク質の精製は QIAexpress System (QIAGEN 社) に従い、第 1 章に準じた操作をおこなった。組換えタンパク質の精製に用いた緩衝液には全てプロテアーゼ阻害剤の混合タブレット、Complete Mini EDTA-free (Roche 社) を 1 粒/25ml 加えた。pET30bdNGT-4 及び pET30bGT-5 を用いて大腸菌 BL21 (DE3) pLysS を形質転換し、単一コロニーを選抜後、50 µg/ml kanamycin を含む 3mlLB 培地にて 37°C において終夜培養した。1ml の終夜培養液を 50mlLB 培地へ加え、37°C において一時間培養した後、1 mM IPTG により組換えタンパク質の発現誘導をおこなった。本培養液の OD600 が約 0.5 となった時点で培養を終了し、菌体回収のち超音波破碎用緩衝液に再懸濁し、超音波破碎をおこなった。破碎後遠心分離をおこなって上澄を回収し、超音波破碎用緩衝液にて平衡化した Ni²⁺-NTA 担体 (QIAGEN 社) を充填したカラムに供した。洗浄液 A による洗浄後、0.3 M imidazol を含む溶出緩衝液により組換え GT-4 タンパク質、及び組換え GT-5 タンパク質を溶出した。10 %SDS-PAGE によりタンパク質を展開し、CBB 染色及び S-tag ウェスタンブロット解析により組換えタンパク質の発現・精製を確認した。この後スケールを 10 倍にして同様の実験操作をおこない、抗血清の作製のための抗原タンパク質溶液とした。マウス抗血清の作製は (株) 宝酒造に依頼した。

3. 核タンパク質の粗抽出

核タンパク質の粗抽出は、以下に記す手順にておこなった。シロイヌナズナ緑葉

500mg を液体窒素存在下、乳鉢にて破碎し、粉末を 5ml 緩衝液 A に溶解した。Miracloth (Calbiochem 社) により濾過し、Miracloth を通過した沈澱を 2ml 緩衝液 A にて洗浄した。この沈澱を 50 μ l 低塩濃度緩衝液に溶解したのち、50 μ l 高塩濃度緩衝液を加え、4 $^{\circ}$ Cにおいて 30 分間攪拌した。遠心分離ののち、得られた上澄を 4 $^{\circ}$ Cにおいて 500ml 透析緩衝液に対して Slide-A-Lyzer (Pierce 社) を用いて 2 時間透析した。続いて遠心分離をおこない、上澄を -80 $^{\circ}$ Cにて保存し、核粗抽出液とした。

4. TIP 法

TIP 法は 1.植物組織の固定、2.核粗抽出液の精製、3.免疫沈降、4.PCR の 4 つのステップからなる。ここでは植物組織の固定、及び免疫沈降以降の実験操作について記す。まず 3 週間長日条件で培養したシロイヌナズナを暗条件あるいは明条件下に 12 時間おき、緑葉 10g を採取した。これを 300ml の固定液へ浸し、脱気したのち 4 $^{\circ}$ Cにて緩やかに 2 時間攪拌した。金属網にて植物組織をすくい、500ml の M0 buffer に移して緩やかに攪拌し、パラホルムアルデヒドを洗浄した。この洗浄は 3 回繰り返した。固定した組織から抽出した核画分を超音波処理し、ゲノミック DNA を切断した。免疫沈降には抗 GT-1 抗血清、抗 GT-4 抗血清、抗 GT-5 抗血清、及び免疫前のマウス抗血清を用いた。続いて核画分 20 μ l に HSBSA200 μ l、Protein A-sepharose 担体を 10 μ l 加え、4 $^{\circ}$ Cにて終夜攪拌した。これとは別に、各々の抗血清 5 μ l に HS · BSA200 μ l、Protein A-sepharose 10 μ l 加え、4 $^{\circ}$ Cにて 2 時間攪拌し、担体へ抗体を吸着させた。担体による吸収を終えた核画分を遠心分離し、得られた上澄を抗体を吸着させた担体に加え、4 $^{\circ}$ Cにて 4 時間攪拌し、抗原抗体反応をおこなった。回収した担体を FA-lysis 緩衝液、FA-lysis · NaCl 緩衝液、洗浄液、1 \times TE にて順次担体を洗浄した。溶出用緩衝液により担体からのゲノミック DNA-タンパク質複合体の溶出をおこない、10 μ l/ml proteinase K によりゲノミック DNA と架橋されたタンパク質を分解した。続いて熱処理を 65 $^{\circ}$ Cにて 6 時間おこない、脱架橋した後、フェノール抽出、エタノール沈澱をおこない、20 μ l の TE 緩衝液に溶かした。このゲノミック DNA 溶液 1 μ l を鋳型に、CAB1、CAB2 プロモーターを増幅するオリゴヌクレオチドをプライマーとした PCR をおこなった。DNA ポリメラーゼには Ex Taq (宝酒造) を用いた。PCR の反応条件は、熱変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒、アニール 55 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 30 秒を 1 サイクルとして EtBr 染色では検出限界以下である 25 サイクルとした。1 \times TAE、1.5%アガロースゲルにて PCR 反応を終えたサンプルを展開し、Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech 社) へ転写後、Alk Phos Direct System (Amersham Pharmacia Biotech 社) にてサザンブロット解析をおこなった。用いたオリゴヌクレオチドを以下に示す。

CAB1pro_01 5'-CATGACTCGTGATTATGGAGCTG-3'
CAB1pro_02 5'-GTTCTTATGTTTTATCTCTAGCCAAG-3'
CAB1pro_03 5'-CCATTAACCACGTAAGCAAAC-3'
CAB1pro_04 5'-TAAGGTTGAGTAGTGCAGCAC-3'
CAB1pro_05 5'-CTCGCACTTCGCAGATTCG-3'
CAB1pro_06 5'-CATAAGAACAAAGTAGATAAAAAC-3'
CAB2pro_01 5'-GCGAATAAATAAGTTTGTTCAAAAGG-3'
CAB2pro_02 5'-AGTAAAACGTCAAAGTTTTAA-3'
CAB2pro_03 5'-AGTGGCTCATAACTTGTGGTC-3'
CAB2pro_04 5'-ATTAAAACGGTTCGATAGTGTTGG-3'
CAB2pro_05 5'-GAATACTTCAACGGTTACACTTAC-3'
CAB2pro_06 5'-AATAATCTCATGAATTATGTGATATCAC-3'

5. TIP 法により得た DNA 断片のライブラリ化

超音波処理したゲノミック DNA 断片の末端は様々な形状をとると予想されるため、TIP 法により得たゲノミック DNA 溶液 10 μ l を T4 DNA polymerase により平滑末端化処理した。続いて *EcoRI-NotI-BamHI* Adapter (株) 宝酒造をライゲーションし、Sephadex G-50 spin column (Amersham Pharmacia Biotech 社) により過剰のアダプターを除去した。続いて *EcoRI* 処理、及び脱リン酸化処理した pBluescript ヘサブクローニングした。ライブラリの挿入配列の平均鎖長は約 300bp であった。

6. ドットプロット解析

GT-1、GT-4 及び GT-5 に対する抗血清を用いた TIP 法により濃縮した、12 時間暗条件においたシロイヌナズナ緑葉由来のゲノミック DNA のプラスミドライブラリ、及び 12 時間明条件においたシロイヌナズナ緑葉由来のゲノミック DNA のプラスミドライブラリ、合計 6 種類のライブラリのインサート配列を制限酵素処理により切り出し、1 μ g を Hybond-N+へ滴下した。プローブにはシロイヌナズナ *CAB1* プロモーターの開始コドン上流 704bp、及び *CAB2* プロモーターの開始コドン上流 733bp をそれぞれ用い、Alk Phos Direct System (Amersham Pharmacia Biotech 社) にてサザンブロット解析をおこなった。シグナル強度の定量は Mac BAS V2.52 (株) 富士フィルムにておこなった。

7. 最適結合配列の同定

明条件下に 12 時間おいたシロイヌナズナ緑葉から抗 GT-1 抗血清を用いて精製したゲノミック DNA 断片を pBluescript へサブクローニングしたプラスミドライブラリ 0.1ng を鋳型にして M13 Reverse primer 及び M13 -20 primer を用いて PCR を行い、挿入配列の増幅をおこなった。PCR の反応条件は 94°C 30sec、55°C 30sec、72°C 30sec を 1 サイクルとし、25 サイクルおこなった。PCR 反応には Ex Taq (株) 宝酒造を用いた。得られた増幅断片を Sephadex G-50 spin column (Amersham Pharmacia Biotech 社) にて精製し、プライマーを除去した。

大腸菌 BL21 (DE3) pLysS にて産製した GT-1 組換えタンパク質 (第 1 章を参照) 1 μ g を Ni²⁺-NTA Agarose に固定し、NEB 緩衝液 (第 1 章参照) 中で 5 μ g の poly dI-dC 存在下、PCR により増幅したゲノミック DNA 断片 50ng を混合し、500 μ l とした。室温にて 30 分間緩やかに攪拌したのち、1mlNEB にて 4 回洗浄し、溶出用緩衝液 (第 1 章参照) にて GT-1 組換えタンパク質と DNA 断片との複合体を溶出した。続いてフェノール抽出、エタノール沈澱をおこない、TE10 μ l に溶解した。このうち 2 μ l を鋳型にして 94°C 30sec、55°C 30sec、72°C 30sec を 1 サイクルとして 10 サイクルの PCR をおこなった。以上の実験を 4 回繰り返して得られたゲノミック DNA 断片を pT7Blue (Novagen 社) へサブクローニングし、36 クローンに関して塩基配列決定をおこなった。

8. ゲルシフトアッセイ

プローブにはシロイヌナズナ *GER3* プロモーターの開始コドン、及びそこから上流に位置する GT1-box コア配列を含む 141bp の領域を用いた。オリゴヌクレオチド GER3pro03 及び GER3pro02 を用いてこの領域を PCR 増幅した後に制限酵素 *HindIII*、*NcoI* にて処理し、1U Klenow fragment、[α -³²P]dCTP、1 mM dATP、1 mM dTTP、1 mM dCTP 存在下で 37°C において 45 分間反応させた。反応後、1 %アガロースゲルにて分離・精製し、余剰な [α -³²P]dCTP、その他の基質を除去した。その他の実験条件などは第 1 章に準じた。

GER3pro02, 5'-GTCCATGGTTCTTTAGAATGTT-3'

GER3pro03, 5'-GGCAAGCTTCCTCTAGATTGCTTCAAG-3'

9. RT-PCR

GER3 の mRNA 発現の器官特異性を確認するため、RT-PCR をおこなった。鋳型は第 1 章に準じて用意した。PCR 反応は 94℃ 30sec、57℃ 30sec、72℃ 30sec を 1 サイクルとし、25 サイクルおこなった。用いたオリゴヌクレオチドは以下に示す。その他の実験条件は第 1 章に準じた。

GER3-1, 5'-CAATGGCCTTGGCGTATCTG-3'

GER3-2, 5'-ACAATGAAACTAAGAGAAGC-3'

結果

抗 GT-4 抗体、及び抗 GT-5 抗体の認識特異性

TIP 法をおこなうために、まず GT-1、GT-4、GT-5 に対する特異抗体を作製し、抗体の認識特異性を調査した。抗 GT-1 抗体は pET15bGT-1 を用いて Hiratsuka らによって作製された。本研究で作製した抗 GT-4 抗体はいずれのロットも認識特異性が低く GT-1 組換えタンパク質を交叉認識した。そこで大腸菌タンパク質に対する抗体を吸着させたセファロース (フナコシ: Immobilized E. coli Lysate)、及び メンブレンへブロットした GT-4 組換えタンパク質によるアフィニティー精製をおこない、GT-1 組換えタンパク質を交叉認識しない抗 GT-4 抗体を得た[図 26]。

一方、GT-5 の 5 ロットの抗体の認識特異性について調べたところ、#2、#4、#5 の 3 つのロットは GT-5 組み換えタンパク質を特異的に認識したが、他の 2 ロットは GT-5 組み換えタンパク質に対する力価が低く、western blot 解析では認識特異性の確認が困難であった (データ未発表)。本研究では #3 に対して、Immobilized E. coli Lysate (株) フナコシによりアフィニティー精製したものをを用いた。この抗 GT-5 抗体は、GT-1 及び GT-4 組換えタンパク質を交叉認識しなかった[図 26]。

TIP 法の特異性の評価 (1)

TIP 法は主に Ito らの報告に拠ったが (Ito et al., 1997)、固定法、あるいは免疫沈降画分の洗浄はそれぞれ Solomon ら、Strahl-Bolsinger らに拠った (Solomon and Varshavsky, 1985; Strahl-Bolsinger et al., 1997)。実験手順を図 27 に示す。本研究でおこなう TIP 法は植物における前例に乏しいため、まず TIP 法の検出感度、認識特異性について評価をおこなった。長日条件で 3 週間培養したシロイヌナズナを暗所あるいは明所で 12 時間培養し、それぞれの光条件の葉を TIP 法の材料とした。GT-1、GT-4、GT-5 に対する抗血清を用いた免疫沈降によって得られたゲノミック DNA に対して、*in vitro* において GT-1 が配列特異的に結合するシロイヌナズナ CAB2 プロモーター (Hiratsuka et al., 1994) 断片をプローブに用いてドットブロット解析をおこない、TIP 法による濃縮過程の調査を試みた[図 28a]。比較のため、CAB2 と多重遺伝子族を形成する CAB1 のプロモーターについても調べた。コントロールには TIP 法を経ずに精製したゲノミック DNA を用いた。その結果、明条件、暗条件いずれにおいても TIP 法により得られたゲノミック DNA 由来のシグナルの平均強度 (CAB1 プローブでは 533、CAB2 プローブでは 1160) はコントロールのシグナルの平均強

度 (83) に比べて約 10 倍となっており、*CAB1*、*CAB2* 遺伝子プロモーター断片が選択的に濃縮されたことを確認した[図 28b]。さらに、*CAB1* プロモーターにおいて GT-1 並びに GT-4 に対する抗血清を用いた免疫沈降画分由来のシグナル強度は、明条件と暗条件で比較すると明条件のほうが約 2 倍強かった。一方抗 GT-5 抗血清を用いた免疫沈降画分由来のシグナル強度は暗条件において明条件と比較して約 9 倍高かった。他方、*CAB2* プロモーターでは抗 GT-1 抗血清を用いた免疫沈降画分由来のシグナル強度は明条件では暗条件の約 4 倍高いこと、一方で抗 GT-4 抗血清及び抗 GT-5 抗血清を用いた免疫沈降画分由来のシグナル強度は暗条件では明条件に比べてそれぞれ約 3 倍、約 11 倍高いことが明らかになった。

TIP 法の特異性の評価 (2)

続いて GT-1、GT-4、GT-5 の *CAB1*、*CAB2* プロモーターへの *in vivo* 結合プロファイルをさらに詳細に解析するため、各々のプロモーターを 3 つの領域 (TATA ボックスから最も遠い領域を region 1、最も近い領域を region 3 とした) に分類し[図 30a]、TIP 法により濃縮したゲノミック DNA 断片を鋳型とする PCR-サザンブロット解析をおこなった。長日条件で 2 週間培養したのち 12 時間暗黒下あるいは白色光下においてシロイヌナズナ緑葉をパラホルムアルデヒドにより固定した。それぞれのサンプルから精製した核祖抽出液に対して GT-1、GT-4、GT-5 各々に対する抗血清を用いて免疫沈降し、得られた沈降画分より精製したゲノミック DNA を鋳型として、*CAB1*、及び *CAB2* プロモーターを特異的に増幅するプライマーにより PCR-Southern 解析をおこなった[図 29、30]。その結果 *CAB2* プロモーターの各領域を増幅する PCR-southern 解析では、抗 GT-1 抗血清を用いた免疫沈降画分には白色光下では region 3 のみが、暗黒下では region 1 のみが検出された。抗 GT-4 抗血清を用いた免疫沈降画分からは白色光下、暗黒下いずれの場合においても増幅された領域は無かった。また、抗 GT-5 抗血清を用いた免疫沈降画分からは、白色光下、暗黒下いずれの場合も、region 1、2、3 全ての領域が増幅された。一方 *CAB1* プロモーターの場合、抗 GT-1 抗血清を用いた免疫沈降画分には白色光下では region 2、region 3、暗黒下では region 2 の断片のみが検出された。抗 GT-4 抗血清を用いた免疫沈降画分には白色光下では region 1、region 2 の断片が検出されたが、暗黒下ではいずれの領域も増幅されなかった。また、抗 GT-5 抗血清を用いた免疫沈降画分からは、白色光下では region 3 のみが、暗黒下では region 1 及び region 3 の断片が増幅された。以上の実験結果から、GT-1、GT-4、GT-5 はそれぞれ特異的な結合プロファイルを示すことが明らかになった。

GT ボックス結合タンパク質の新規 *in vivo* 結合配列の同定

次に GT-1 の CAB1、CAB2 以外の *in vivo* での結合配列を探索するため、2 週間長日条件で培養したのち 12 時間暗化处理もしくは 12 時間白色光を照射したシロイヌナズナ緑葉を用いて TIP 法によりゲノミック DNA 断片を濃縮した。得られたゲノミック DNA 断片を平滑末端化し、EcoRI-NofI-BamHI アダプターをライゲーションした。これを、EcoRI 処理後、末端を脱リン酸化した pBluescript へサブクローニングした。作製したプラスミドライブラリからランダムに選択した 100 クローンのインサートの塩基配列を決定し、シロイヌナズナゲノム配列データベースに対して検索をおこなった。その結果、既知のシロイヌナズナゲノム配列と相同性を示す断片は含まれておらず、未知の配列、あるいは繰り返し配列であった（データ未発表）。未知配列は超音波破碎、平滑末端化ののちライゲーションをおこなったためにできた人工配列である可能性も考えられた。従ってこの段階のライブラリの精製度は、無作為にクローンを選抜して塩基配列を決定するには不十分であることが明らかになった。

そこで *in vivo* 結合配列をさらに精製するために、GT-1 組換えタンパク質と混合して結合 DNA 配列を含む DNA 断片を選択的に結合させ、溶出するサイクルを繰り返す操作をおこなった。具体的にはベクタープライマーを用いた PCR により増幅した挿入配列を Ni²⁺-NTA アガロースへ結合させた GT-1 組換えタンパク質と混合し、組換えタンパク質と結合する断片を溶出した。これを 1 サイクルとして 4 サイクルおこない、組換えタンパク質と結合する DNA 断片を選択的に濃縮した。こののち TA ベクター pT7Blue (Novagen 社) へサブクローニングし、無作為に選択した 36 クローンの塩基配列決定をおこなった。その結果、36 クローンのうち 17 クローンが GER3 (*germin-like protein 3*) 遺伝子のプロモーター配列、1 クローンが DET1 (*de-etiolated 1*) 遺伝子断片であった。残りの 18 クローンはシロイヌナズナゲノム配列と有為な相同性を示さなかった。DET1 遺伝子断片には既知の GT ボックス様配列は見出されないこと、第 2 エクソン領域であったことから、本研究では *in vivo* 結合配列の候補からは除外した。本研究で得られた GER3 プロモーター断片に存在する GT ボックスは、転写開始点上流-55~-60 の領域の GT1-box コア配列 (5'-GGTTAA-3') のみであった。この GT1-box コア配列は隣接する塩基配列も GT1-box と相同性が高いため、GT-1 の *in vivo* 結合配列である可能性が高いと判断された[図 31]。

GER3mRNA の発現特異性

シロイヌナズナ GER3 遺伝子の発現特異性については既に Staiger らにより詳しく

報告されている (Staiger et al., 1999)。GER3 プロモーターと GUS の融合遺伝子の発現解析から、GER3 は概日性の発現を示すことが明らかになっている。長日条件で培養したシロイヌナズナでは、GER3 は“夕方” (zeitgeber time [zt]12-zt16) に mRNA 発現のピークを示し、この発現周期性は恒常的な明条件に植物体を移しても保たれる (Staiger et al., 1999)。

本研究のシロイヌナズナ栽培条件での GER3mRNA の発現様式を確認するため、低サイクルの RT-PCR により調査した。その結果 GER3mRNA は葉、茎、根、長角果で発現することが明らかになった[図 32]。

GER3 プロモーター断片を用いたゲルシフトアッセイ

続いて GT1-box を含む長さ約 130bp の GER3 プロモーター断片をプローブに、GT-1、GT-4、GT-5 各々の組換えタンパク質を用いてゲルシフトアッセイをおこない、GER3 プロモーター断片への GT-1 の結合を *in vitro* において確認することを試みた。コンペティターには GT1-box、GT2-box、GT3-box、GT1m-box を使用した。その結果、GT-1 は GER3 プロモーター断片へ結合すること、この結合は GT1-box をはじめとする各種 GT ボックスコンペティターにより阻害されること、一方 GT1m-box コンペティターによっては阻害されないことが明らかになった[図 33]。従って GT-1 は GER3 プロモーターへ配列特異的に結合することが示唆された。プローブに用いた領域に GT ボックスは一つしか見出されない (転写開始点上流-60~-55) ため、GT-1 はここへ結合すると予想された。

考察

TIP 法は *in vivo* 結合配列の探索に有効である

TIP 法の検出特異性は抗体の認識特異性に大きく依存する。酵母の場合は、遺伝子破壊、遺伝子挿入が比較的容易であるため、目的遺伝子がコードするタンパク質に対する特異抗体を作製せずとも MYC あるいは FLAG など、抗体が市販されている外来遺伝子を利用することができる。しかし植物など、遺伝子破壊、遺伝子挿入が困難な材料を用いる場合には、特異抗体を作製する必要がある、作製した特異抗体が類似する他のタンパク質を交叉認識しないことが必要となる。本研究ではまず GT-1、GT-4、GT-5 に対する抗血清が互いの組換えタンパク質を交叉認識しないことを確認した[図 26]。

TIP 法を用いることによって GT-1、GT-4、GT-5 の *in vivo* 結合配列が約 10 倍濃縮されることが明らかになった。この濃縮の度合いは、異なる光条件下での GT-1、GT-4、GT-5 の *CAB1*、*CAB2* プロモーターへの結合プロファイルを少なくともドットプロット解析で検出可能なレベルであった。さらに暗条件と比較して明条件下での結合が *CAB1* プロモーターの場合 GT-1、GT-4 は約 2 倍、GT-5 は逆に 1/9 倍であったこと、また *CAB2* プロモーターの場合 GT-1 は約 3 倍、GT-4、GT-5 はそれぞれ 1/5 倍、1/11 倍であったことから、GT-1、GT-4、GT-5 は光条件の変動に伴い、DNA への結合プロファイルが変化することが明らかになった。*CAB1*、*CAB2* いずれのプロモーターにおいても明条件下で GT-1 は結合が促進され、逆に GT-5 は抑制される。明条件下で光シグナル伝達経路が活性化された場合に GT-1 と GT-5 が類似した機構を介してリン酸化されるならば、以上の結果は明条件下で GT-1 がリン酸化され、DNA 結合活性が上昇すること (Marechal et al., 1999)、及び GT-5 の DNA 結合活性がリン酸化に伴って低下すること[図 18a]と考え併せても矛盾がない。このことから GT-1、GT-5 の *CAB1*、*CAB2* プロモーターへの結合活性が相反する制御を受けることが *in vivo* においても示唆された。一方、GT-4 は *CAB1* プロモーターへの結合活性は暗条件下と比べて明条件下では約 2 倍上昇していたが、*CAB2* プロモーターに対する結合活性は約 30 %に低下していた。従って GT-4 の *in vivo* における *CAB1*、*CAB2* プロモーターへの結合活性が互いに異なる機構により制御される可能性が考えられる。

CAB1、*CAB2* プロモーターへの *in vivo* 結合プロファイル

GT-1 は *CAB1*、*CAB2* プロモーターの CGF-1/GT-1 結合配列を含む region 3 へ明条件下でのみ結合する。CGF-1/GT-1 結合配列はシロイヌナズナ *CAB2* が Phytochrome 及び生物時計依存的に発現するために必要十分なシス配列である (Anderson et al., 1994)。このシス配列への核抽出液中の DNA 結合活性 CGF-1 の DNA 結合特異性は GT-1 と極めて類似することから、*CAB2* の転写制御への GT-1 の関与が予想された (Teakle and Kay., 1995)。CGF-1/GT-1 結合部位へ変異導入した *CAB2* プロモーター支配下のルシフェラーゼ活性の赤色光のパルス照射後の変動は *phyAphyB* 二重変異体のものと極めて類似しており、発現量の低下や周期性の異常だけでなくパルス照射後の最初のピーク (acute response) が顕著に低下していた (Anderson et al., 1997)。従って CGF-1/GT-1 結合配列が時計機構への光シグナル入力系に関与することが示唆された。一方、*CAB1* プロモーターにも CGF-1/GT-1 結合配列と高い相同性を示す配列が見出されるため[図 30b]、*CAB1* においても *CAB2* と類似した発現制御メカニズムが存在する可能性がある。

核抽出液中の GT-1 活性には GT-1 以外の他の GT-1 類似タンパク質が含まれている可能性がある。従って前述した *CAB2::luc* の発現解析、あるいは GT-1 組換えタンパク質を用いたゲルシフトアッセイのみで GT-1 が *CAB2* プロモーターへ結合することは確定できなかった。本研究で採用した TIP 法により、*in vivo* において GT-1 タンパク質が *CAB1*、*CAB2* プロモーターの CGF-1/GT-1 結合配列を含む領域に明条件下でのみ結合することが初めて示された。

また GT-4 は *CAB1* プロモーターの region 1 及び 2 へ、明条件下でのみ結合する。GT-4 は転写活性化能を有するため[図 13]、*CAB1* の光依存的な転写促進に貢献している可能性が高い。しかし GT-4 は GT-1 とは異なり、*CAB1* プロモーターの region 3 へ結合せず、また *CAB2* プロモーターには region 1、region 2、region 3 いずれの領域への結合も検出されなかった。*in vivo* において GT-1 と GT-4 の DNA 結合プロファイルが異なることは、GT-1、GT-4 の DNA 結合活性が他のタンパク質との相互作用やクロマチン構造の変換などによって異なる制御を受ける可能性を示唆する。この結果は抗 GT-4 抗体を用いた免疫沈降画分で *CAB1* プロモーター断片が濃縮されたドットプロット解析の結果と矛盾するが、抗 GT-4 抗体による免疫沈降画分には抗 GT-1 抗体による免疫沈降画分と比較して繰り返し配列が多く含まれる可能性も考えられる。

一方 GT-5 は、*CAB1* プロモーターの region 1、*CAB2* プロモーターの region 1、2 において明条件下での結合が暗条件下での結合と比較して低い。これは GT-5 が転写抑制因子であるとの予想[図 19]と矛盾しない。他方、GT-5 は明条件、暗条件のいずれにおいても *CAB1*、*CAB2* プロモーターの region 3 へ結合する[図 29、30]。これは転写活性化能を有する GT-1 と顕著な転写活性化能を示さない GT-5 が明条件下で共に

region 3 へ結合することを意味する。シロイヌナズナ緑葉において細胞種特異的な *CAB1*、*CAB2* プロモーターの転写制御機構が存在する可能性も考えられるため、今後は葉肉細胞プロトプラストなど特定の細胞種を実験材料に用いる必要があるだろう。

GT-1 の新規 *in vivo* 結合配列

最近になって植物においても TIP 法による *in vivo* 結合様式の解析例が報告されたが (Johnson et al., 2001; Zhang et al., 2001)。しかし本研究のように、*in vitro* でも示唆されていなかった新規 *in vivo* 結合配列を決定した例は殆どない。*GER3* は大きなファミリーを構成する germin-like protein (GLPs) のひとつで、細胞外マトリックスにオリゴマーとして蓄積しプロテアーゼや界面活性剤への耐性を有する maize germin と相同性を有する。germin は遺伝子名が示す通り当初は発芽時期の種子における発現・機能が注目された。しかし過酸化水素を産生する oxalate oxidase 活性を示すことから、カビやウイルスへのストレス応答との関連も示唆される (Membre et al., 2000)。一方、GLP についてはタンパク質の機能に関する知見に乏しく、詳細は不明である。シロイヌナズナでは GLP は少なくとも 12 遺伝子が同定された (Carter et al., 1998)。*GER3* タンパク質は細胞壁あるいは細胞外マトリックスに蓄積するが、oxalate oxidase 活性は見出されない (Membre et al., 1997)。しかし *GER3* (germin-like protein 3) の発現は概日リズムを刻み、夕方に発現のピークを示すことから (Staiger et al., 1999)、*GER3* の発現が光条件依存的事であることは確かである。*GER3* プロモーターのより詳細な解析をおこない、GT-1 の結合と *GER3* 遺伝子発現との関連を明らかにする必要がある。

本研究では *GER3* 遺伝子プロモーター断片が最も多く単離されたが、これは生体内の GT-1 の DNA 結合プロファイルを反映しているとは考えにくい。光合成関連遺伝子のプロモーター断片などが得られなかった原因として、本研究における GT-1 組換えタンパク質の *GER3* プロモーター断片に対する結合特異性が他のプロモーター断片と比較して非常に高かった可能性が考えられる。*GER3* プロモーターは GT1-box コア配列と同一の塩基配列を有している。このコア配列は 6 塩基対 (GGTTAA) であるため、約 4kb に 1 カ所の確立でゲノム配列中に見出される計算になる。しかし *in vivo* では他のシス配列との間隔や配置が転写活性に重要であり、たとえ同一の塩基配列を有するシス配列であっても転写制御因子の結合アフィニティーが異なる可能性があること (Puente et al., 1996; Chattopadhyay et al., 1998)、GT-1 が TFIIA 及び TBP と協調的に DNA へ結合すること (Le Gourrierec et al., 1999) から、*in vivo* における GT-1 の DNA 結合活性は他の転写制御因子との相互作用によっても制御される可能

性がある。従って GT-1 の *in vivo* 結合配列は *in silico* で予想される数よりも低いと考えられる。

TIP 法の可能性

光応答性遺伝子のプロモーター中に見出されたシス因子へ結合する因子として単離されてきた経緯上、GT ボックス結合タンパク質の標的遺伝子の候補として取り上げられた遺伝子の殆どが *RBCS*、*CAB*、*PHYA* に代表される光シグナル伝達関連遺伝子であった。しかし高等植物のプロモーター解析が様々な遺伝子においておこなわれたこと、またシロイヌナズナゲノムプロジェクトが進展したことにより、近年では膨大な数のシス配列が塩基配列の相同性を基準に同定されている。その結果、GT ボックス様の配列が光応答性遺伝子のみならず、様々な遺伝子のプロモーター領域に見出されてきた (Zhou, 1999) [図 34]。

病原応答性のタバコ *PR-1a* (*pathogenesis-related 1a*) のプロモーター中に存在する GT ボックス様配列へ GT-1 が配列特異的に結合することが報告されている (Buchel et al., 1996)。花粉特異的なトマト *LAT52* (*late anther tomato 52*) の組織特異性を決定するシス因子、52/56 box の塩基配列は GT ボックスと高い相同性を示し、GT-1 様の結合活性が検出された (Eyal et al., 1995)。ニチニチソウの TIA (*terpenoid indole alkaloid*) の合成に必須な一連の酵素群、*TDC* (*tryptophan decarboxylase*)、*STR* (*strictosidine synthase*)、のプロモーター領域に GT-1 結合配列が見出され、GT-1 の結合が確認された (Ouwerkerk et al., 1999; Pasquali et al., 1999)。

以上の知見から、GT ボックス結合タンパク質群は単に光応答性遺伝子の転写を制御しているだけでなく、機能的に多岐にわたる遺伝子の発現調節に関与することが予想される。しかしこのことは逆に光や病原、ホルモンなどに応答したシグナル伝達経路が互いに複雑に交叉している結果である可能性も考えられる。GT ボックスのコア配列が *redundancy* に富むことも、様々な遺伝子のプロモーター内に見出される理由の1つと考えられる。GT1-box、GT2-box、GT3-box 間でもそれぞれのコア配列は若干異なるため、GT ボックスが一つの遺伝子のプロモーター内に存在する確立は比較的高いと予想される。さらに哺乳動物の下垂体の分化に関連する転写制御因子 Pit-1 の結合配列における 2 塩基のスペーサー配列の有無が細胞種特異的な遺伝子発現制御に重要であるとされる (Scully et al., 2000)。従って塩基配列上の類似性のみからシス因子の機能を推定することは困難であることが予想される。前述した、GT-1 結合配列が見出された様々な遺伝子プロモーターに関しても、*in vivo* での結合プロファイルを TIP 法により調査する必要がある。

これまでの考察から、所謂ゲノムプロジェクトが終了し全ゲノム配列の検索が可能となったシロイヌナズナにおいても、GT ボックスを介した転写制御メカニズムの解明を、類似する DNA 配列のデータベース上での探索、またプロモーター解析などシス因子側からのアプローチにのみ依存して進めることは極めて困難であると推察される。TIP 法は、免疫沈降画分から精製したゲノミック DNA をライブラリー化して塩基配列決定をおこなう、あるいは DNA マクロアレイを併用することにより、トランス因子側から網羅的に *in vivo* での結合配列を同定することが可能である。従って TIP 法は今後、多くの転写制御因子の機能解析における有力なアプローチの1つとなるだろう。

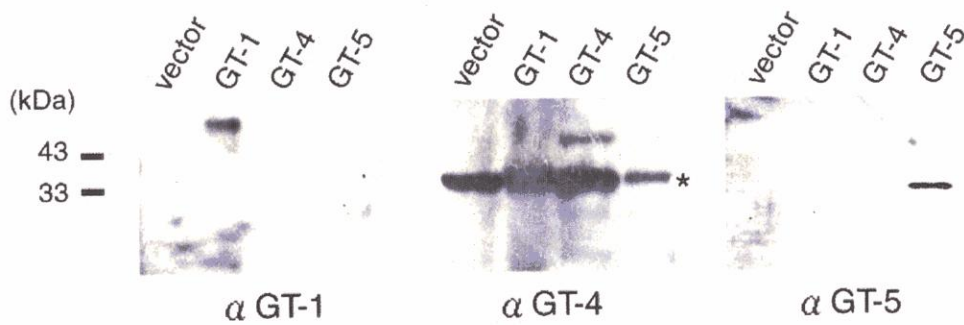


図 26 GT-1、GT-4 及び GT-5 に対する抗血清の認識特異性

大腸菌において発現させた GT-1、GT-4 及び GT-5 組換えタンパク質に対する抗 GT-1、GT-4、GT-5 抗血清の認識特異性を調べた。GT-1、GT-4、GT-5 各々の組換えタンパク質を 10% SDS-PAGE にて展開し、Hybond-PVDF (Amersham Pharmacia Biotech 社) へ転写した。GT-1、GT-4、GT-5 に対する抗血清を用いたウェスタンブロット解析の結果を図に示す。*は非特異的シグナルを示す。

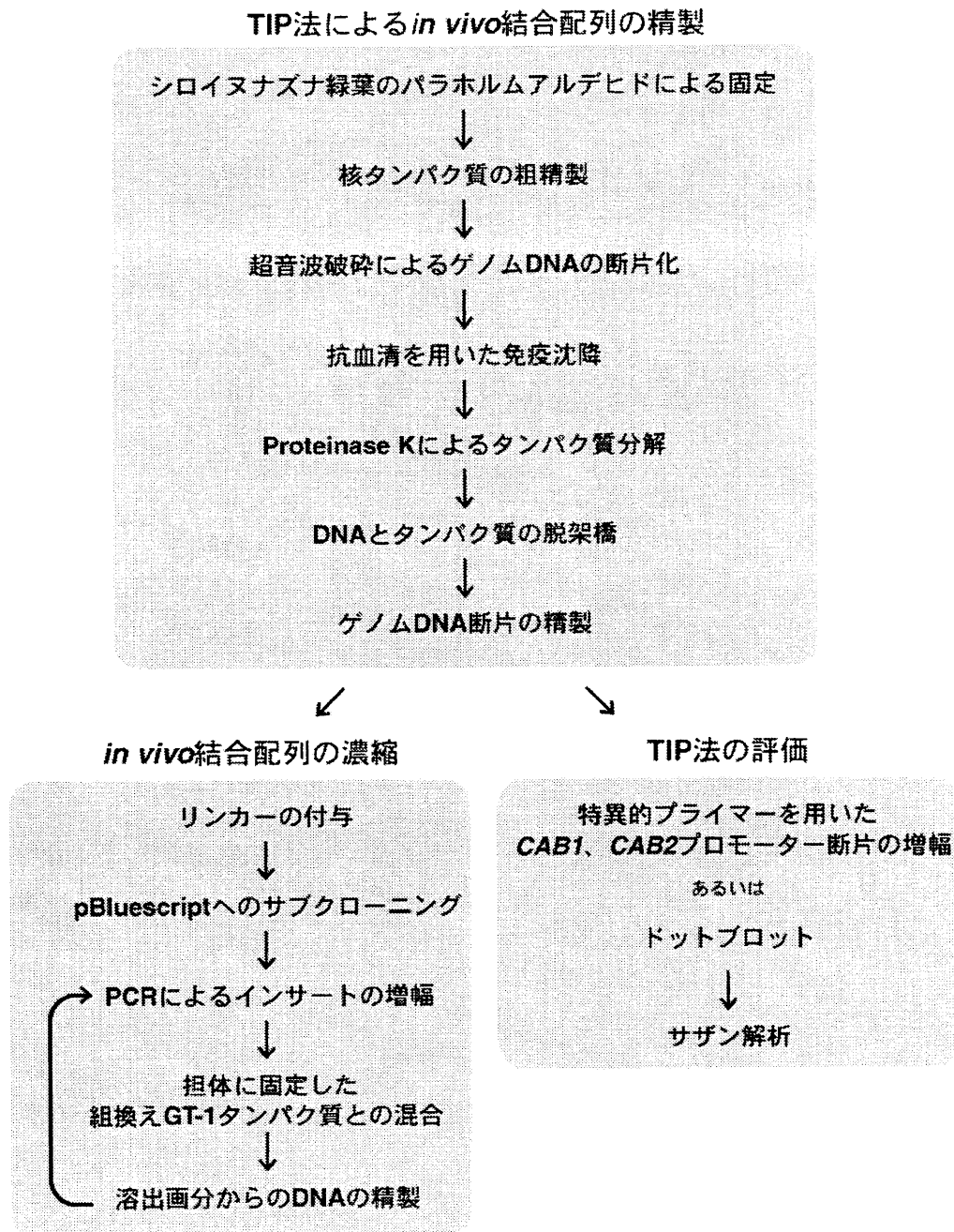
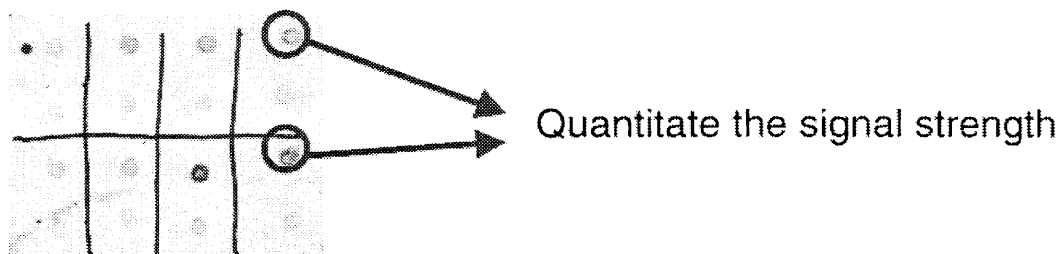


図 27 TIP 法の実験手順

TIP 法の実験手順を大まかに示した。植物体をパラホルムアルデヒドで固定し、ゲノミック DNA とタンパク質を架橋し、超音波破碎してゲノミック DNA を断片化した後に GT-1、GT-4、GT-5 に対する抗血清を用いて免疫沈降する。このとき GT-1、GT-4、GT-5 それぞれのタンパク質と共に、結合したゲノミック DNA 断片も共沈する。これを精製し、以降の実験に用いた。

(a)



(b)

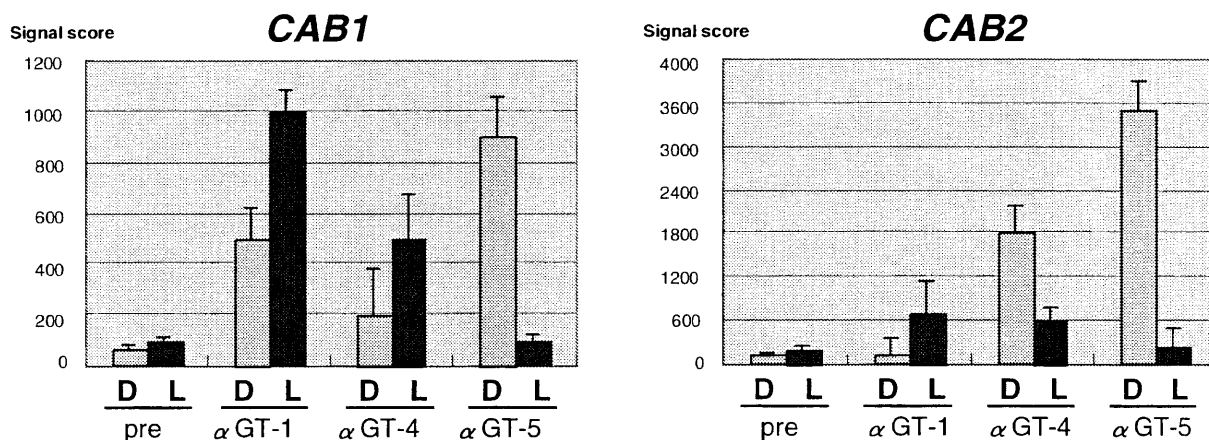


図 28 TIP 法による *CAB1*、*CAB2* プロモーター断片の濃縮過程

TIP 法による GT-1、GT-4、GT-5 の *in vivo* 結合配列の濃縮過程を調べるため、*CAB1*、*CAB2* プロモーター断片をプローブに用いてドットブロット解析をおこなった。(a) 長日条件で 3 週間培養したシロイヌナズナの緑葉を 12 時間暗条件においたものを dark (D)、明条件においたものを light (L) とし、これらを出発材料に用いて、GT-1、GT-4、GT-5 に対する抗血清による TIP 法をおこなった。得られたゲノミック DNA 断片をメンブレンへ滴下し、ドットブロット解析に供した。(b) 定量したシグナル強度をグラフに示した。実験は 3 回繰り返し、標準偏差を算出した。

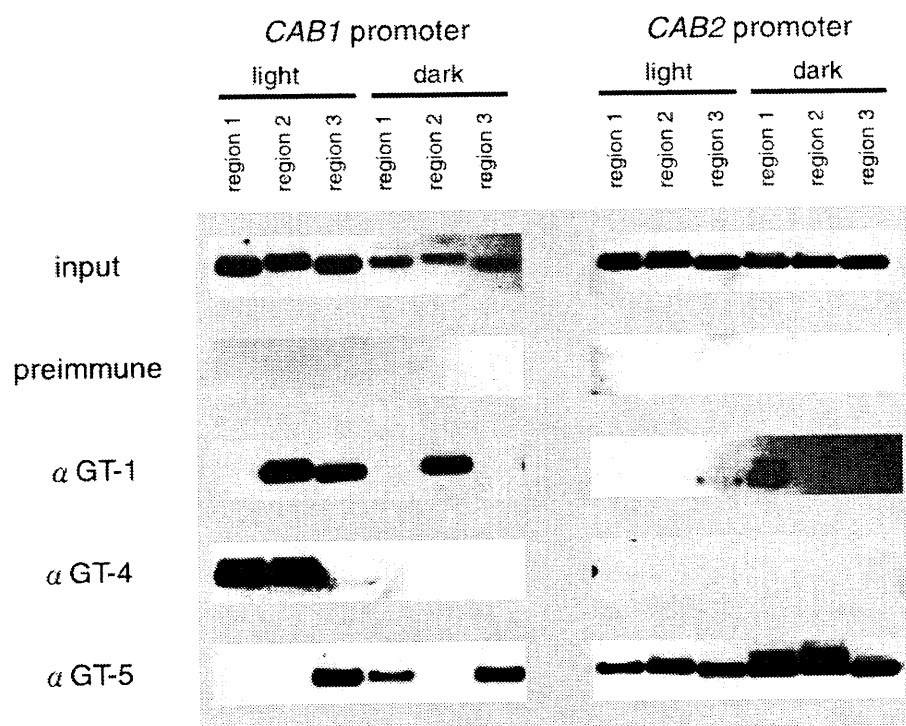
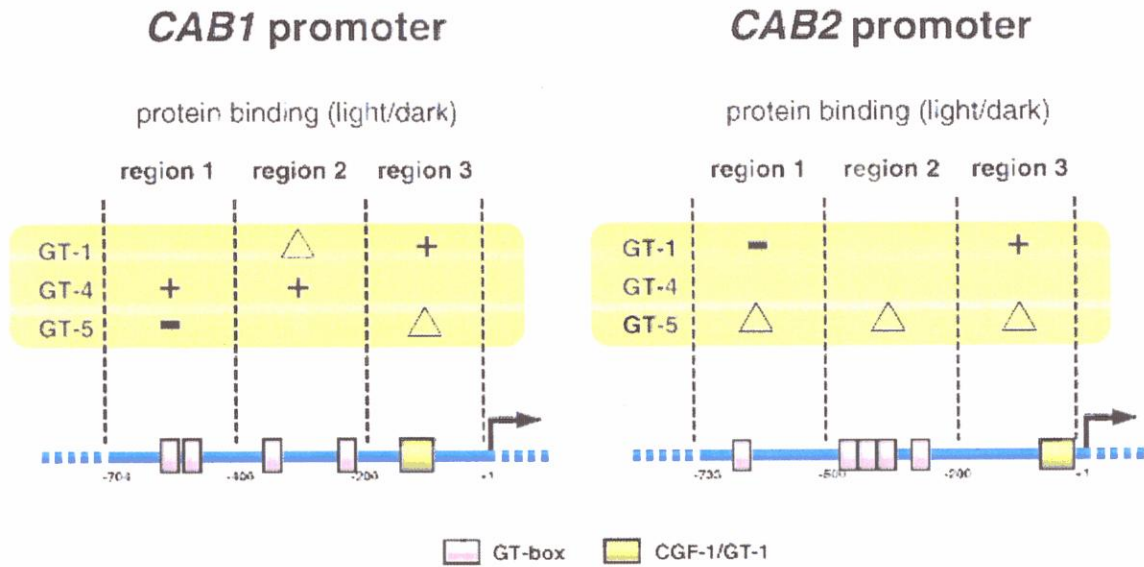


図 29 CAB1、CAB2 プロモーターへの *in vivo* 結合プロファイル (1)

GT-1、GT-4、GT-5 それぞれに対する抗血清を用いた TIP 法により得たゲノミック DNA 断片を鋳型にして、約 700bp の CAB1、CAB2 プロモーターの region 1~3 (最も転写開始点に遠い領域を region 1、最も近い領域を region 3 とした) の各領域を増幅するオリゴヌクレオチドをプライマーに用いた PCR をおこなった。ネガティブコントロールとして免疫前の血清を用いた。また、免疫沈降前の画分を PCR 反応のコントロールとした。

(a)



(b)

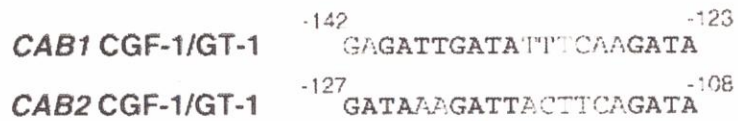


図 30 CAB1、CAB2 プロモーターへの *in vivo* 結合プロファイル (2)

(a) 図 29 で示した、CAB1、CAB2 プロモーターへの GT-1、GT-4 及び GT-5 の *in vivo* 結合プロファイルを模式図にした。それぞれのプロモーターの region 1~3 の各領域への結合プロファイルが光条件と正の相関にある場合（明条件で結合し、暗条件で解離する）を“+”で、逆の相関にある場合を“-”で表した。また、明条件、暗条件のどちらでも結合を検出した場合を“△”で表した。いずれの光条件でも結合が検出されなかった場合は記号は記入していない。(b) CAB1 プロモーターに見出される CGF1-/GT-1 様配列。CAB1 では転写開始点が決定されていないため、開始コドンからの距離を記した。CAB2 CGF-1/GT-1 配列への核タンパク質の結合に必要な GATA 配列 (Teakle and Kay., 1995) を太字で示した。

```

ATTTGACAT GAATTCATT CTCTTGAT AAAGGTGACT TCCTAACTTT -321
TAAACTGTA CTTAAAGTAA GAGAGAATA TTPCCACTGA AGGATTGAAA

GGATAAACT CFAAAAGTTT GAATGCAACA GGGTGATTAG TTTTACACTT -271
CCTATTTTGA GATTTTCAA CTTACGTTGT CCCACTAATC AAAATGTGAA

GTGGCCAGTA GAATAAACT TTCTTAAGCA TTTTTTACAT CTTATTGAAA -221
CACCGGTCAT CTTATTTTGA AAGAATTCGT AAAAAATGTA GAATAACTTT

ACGAACCATT TATCACCATT CTCGGAACT GACAAAAATC TCTGACATGA -171
TGCTTGGTAA ATAGTGGTAA GAGCCTTGA CTGTTTTTAG AGACTGTACT

AGCCCCATCA AGCCATGTGG GGTTTTTCCC ACGTACGTAC ACCCAAAGTT -121
TCGGGGTAGT TCGGTACACC CCAAAAAGGG TGCATGCATG TGGGTTCAA

CACATGCATG CAATGCTAAA AAAATAAGAT GCCTCTAGAT TGCTTCAAGA -71
GTGTACGTAC GTTACGATT TTTTATTCTA CCGAGATCTA ACGAGTTTCT

GT1-box core putative TATA box
CCATCCTCAC GTTAAACCATA TCAATATCTT CTCAGTCTCT ATATAACCA -21
GGTAGGAGTG CAATTGGTAT AGTTATAGAA GAGTCAGAGA TATATTGGT

GACTGCCTCT CTTTCTGCCT CATAACTTCA ACAAAGCTC TTATCTATAA +29
CTGACGGAGA GAAAGACGGA GTATTGAAGT TGTTCGAG AATAGATATT

putative first Met
AACATTCTAA AGAAAAATG +49
TTGTAAGATT TCTTTTAC

```

図 31 新たに同定した GT-1 の *in vivo* 結合プロモーター、*GER3*

GT-1 の *in vivo* 結合プロモーターを同定するため、明条件の緑葉を出発材料にして、抗 GT-1 抗血清を用いた TIP 法により濃縮したゲノミック DNA 断片をさらに精製した。具体的には Ni²⁺-NTA アガロースへ吸着させた GT-1 組換えタンパク質と混合、洗浄し、溶出、PCR 増幅するサイクルを 4 サイクル繰り返した。得られたゲノミック DNA をプラスミドベクター pT7Blue へ挿入し、無作為に抽出した 36 クローンについて塩基配列決定をおこなった。塩基配列決定したクローンのうち 47% (17/36) が *GER3* プロモーター断片であった。本研究で得たゲノミック DNA 断片を実線で示した。この領域に存在する GT ボックスは GT1-box コア配列 (転写開始点上流-60~-55) のみであった。破線はゲルシフトアッセイのプロープに用いた領域を指す。

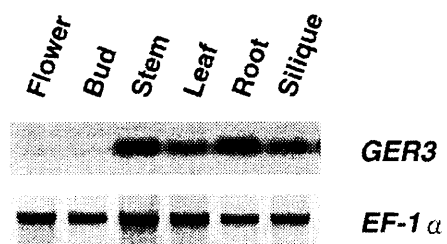
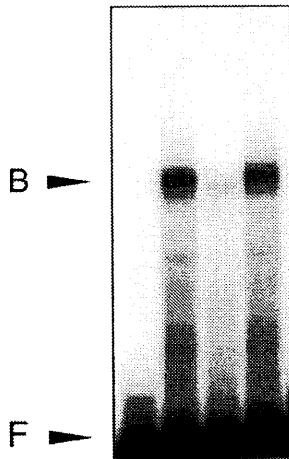


図 32 *GER3* の発現解析

GER3 の器官特異性を RT-PCR により調べた。*GER3* は 26 サイクル、*EF-1α* は 22 サイクルの PCR 反応をおこない、1.2% アガロースゲルにて電気泳動した。EtBr 染色したアガロースゲルの写真の階調を反転した。

(a)

GT-1 protein		-	+	+	+
competitor	GT1-box	-	-	+	-
	GT1m-box	-	-	-	+
		1	2	3	4



(b)

GT-1 protein		-	+	+	+	+	+	+	+	+	
competitor	GT1-box	-	-	×5×50	-	-	-	-	-	-	
	GT2-box	-	-	-	-	×5×50	-	-	-	-	
	GT3-box	-	-	-	-	-	-	-	×5×50	-	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

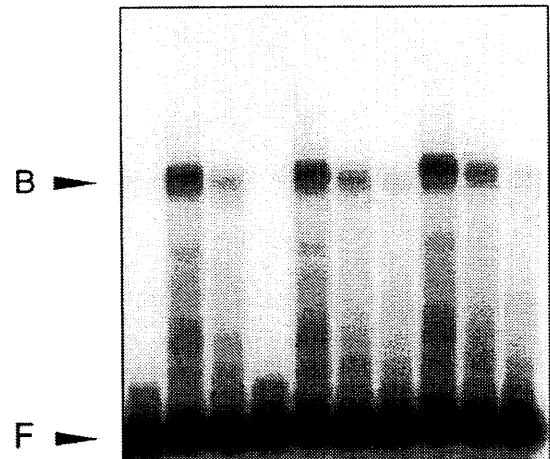
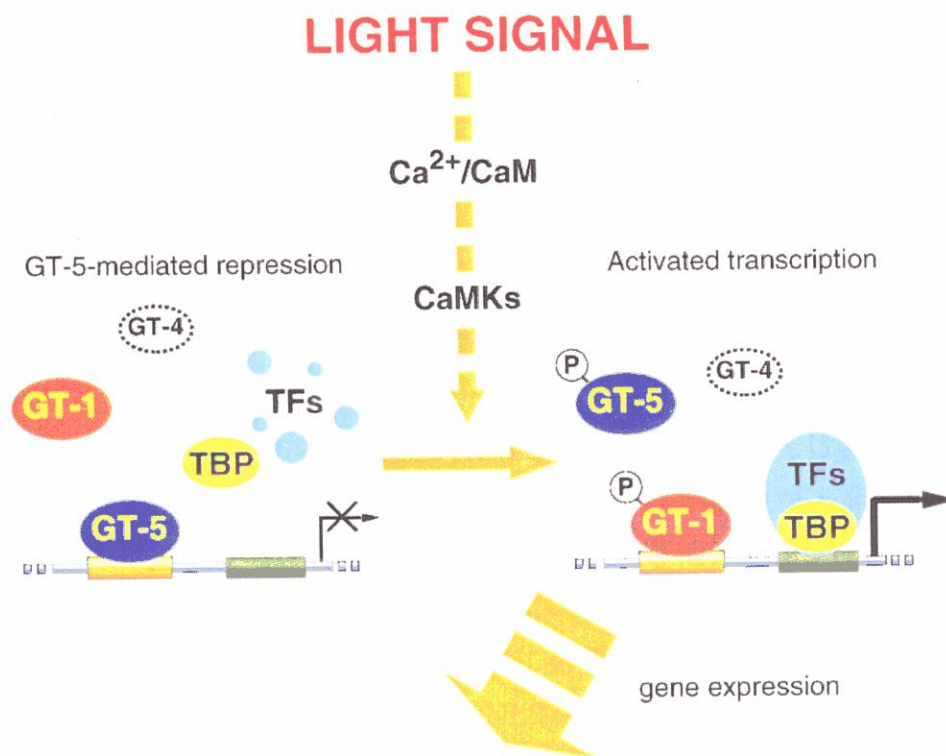


図 33 *GER3* プロモーター断片をプローブにしたゲルシフトアッセイ

GER3 遺伝子プロモーター断片をプローブに用いたゲルシフトアッセイをおこなった。コンペティター DNA として未標識の GT1-box および GT1m-box をプローブの 50 倍量加えて、*GER3* プロモーター断片に対する GT-1 組換えタンパク質の結合活性を調べた。(b) コンペティター DNA として未標識の GT1-box、GT2-box、GT3-box をプローブの 5 倍量、及び 50 倍量加えて *GER3* プロモーター断片に対する GT-1 組換えタンパク質の結合特異性を調べた。GT1-box をコンペティターに用いた場合にシフトバンドのシグナル強度が最も低減した (lane 4)。GT-1 組換えタンパク質は *in vitro* 翻訳系により発現させた。*GER3* プローブ 0.2ng、コンペティター DNA 10ng、1% アガロースゲル、TE 緩衝液の条件でゲルシフトアッセイをおこなった。B はシフトバンド、F は過剰のプローブ DNA を示す。



Chloroplast function	<i>CAB, RBCS</i>
Pathogenesis-related	<i>PR-1a, Tdc, STR</i>
Other function	<i>GER3, LAT52</i>

図 34 GT-1、GT-4 及び GT-5 による転写制御モデル

図 22 で示したモデルに加えて、GT-1 が結合するプロモーターを有する代表的な遺伝子を記した。赤字は本研究により *in vivo* での結合を検出したプロモーターを指す。それ以外の遺伝子は組換えタンパク質あるいは核抽出液を用いたゲルシフトアッセイにより結合が確認されている。GT-1 は光合成関連遺伝子 (*CAB*、*RBCS*) (Gilmartin et al., 1992; Hiratsuka et al., 1994; Teakle and Kay; 1995) に限らず、病原・防御関連遺伝子 (*PR-1a*、*Tdc*、*STR*) (Buchel et al., 1996; Ouwerkerk et al., 1999b; Pasquali et al., 1999)、あるいは花粉特異的遺伝子 (*LAT52*) (Eyal et al., 1995) など、様々な遺伝子のプロモーターに結合する。GT-4、GT-5 の DNA 結合特異性は GT-1 と類似するため、これらも上述した遺伝子の転写制御に関与する可能性がある。GT-4 に関しては *in vitro* でのリン酸化を確認できていないため、点線で示した。

-まとめと展望-

本研究は、GT ボックス結合タンパク質群の光応答性の転写制御機構における役割を明らかにすることを目的とした。

まず GT ボックス結合タンパク質群の全体像を知るために、GT-1 類似遺伝子の単離を試みた。第 1 章では新規な GT-1 類似因子、GT-4、GT-5 をコードする cDNA を単離し、GT-4 及び GT-5 が GT-1 と同様に Trihelix 構造を有し、類似した DNA 結合特異性を持ち、核に局在することを明らかにした。以上の結果から GT-4 は GT-1 に類した転写活性化因子である可能性が示唆された。一方 GT-5 は顕著な転写活性化能を示さないこと、リン酸化を受けて GT-1 の DNA 結合活性が上昇するのとは逆に、GT-5 は低下することから、GT-1 や GT-4 による転写活性化を抑制する可能性が示唆された。続いて第 2 章では、GT-1 の Trihelix 構造ほぼ中央部分に KMREK なる、塩基性アミノ酸に富む領域が GT-1 の核局在に必要十分であることを明らかにした。この配列は GT-2 の NLS をはじめ既知の NLS とは相同性を示さない新規な NLS であり、GT-4 及び GT-5 においても高度に保存されていた。従って GT-1、GT-4、GT-5 の核局在にはこの新規な NLS が関連することを見出した。第 3 章では GT-1、GT-4、GT-5 の CAB 遺伝子プロモーターへの *in vivo* 結合プロファイルの解析、並びに新規 *in vivo* 結合配列の同定をおこなった。その結果 GT-1 の新規 *in vivo* 結合配列として GER3 プロモーターを見出した。シロイヌナズナ germin-like protein の機能には不明な点が多いが、本研究により GT-1 が発芽や過酸化水素発生系に関与することが初めて示唆された。

GT ボックス結合タンパク質を介した転写制御メカニズムには未だに不明な点が多い。まず、GT ボックス結合タンパク質が単独で基本転写制御因子群をプロモーター上へ誘導するのか、あるいは他のタンパク質を介するのかについて現段階では詳細な報告がない。従って酵母 two-hybrid スクリーニングなどによる相互作用因子の探索が必要と考えられる。

一方、Trihelix 構造に類した DNA 結合ドメインの構造解析はこれまで報告がない。従って Trihelix と DNA との結合様式を理解する上で、Trihelix 構造の結晶構造解析も不可欠であろう。GT-1 組換えタンパク質は分解しやすいことが結晶構造解析のおこなわれていない理由の 1 つであった。新規 GT-1 類似タンパク質のうちには結晶構造解析が可能なものもあろう。

シロイヌナズナゲノムプロジェクトの完了に伴って、シロイヌナズナ全ゲノム中に GT-1 類似遺伝子が 16 遺伝子存在することが明らかになった[図 35]。検索結果によっては 28 遺伝子とする報告もある (Riechmann et al., 2000)。GT ボックス結合タ

ンパク質群を構成する遺伝子数は、傷害応答性の転写制御に関連する WRKY 群 (72 遺伝子) やエチレン関連の転写制御因子 AP2/ERF 群 (124 遺伝子)、bZIP ファミリー (81 遺伝子)、Myb ファミリー (190 遺伝子)、bHLH ファミリー (139 遺伝子) など植物の他の転写制御因子と比較して少ない (Riechmann et al., 2000)。従って分子進化学的にも GT ボックス結合タンパク質の性状に興味を持たれる。

GT ボックスのコア配列は比較的 redundancy に富むため、ゲノム中に数多く存在すると予想される。従って本研究で見出した *GER3* 以外にも未同定な結合配列が存在する可能性がある。今後は TIP 法とゲノムアレイを組み合わせた新規結合配列のスクリーニングなどが有効であろう。従来のシス配列からのアプローチのみでは困難だった *in vivo* 結合配列のゲノムレベルでの解析が可能のため、GT ボックス結合タンパク質による転写制御メカニズムがより明らかになると考えられる。

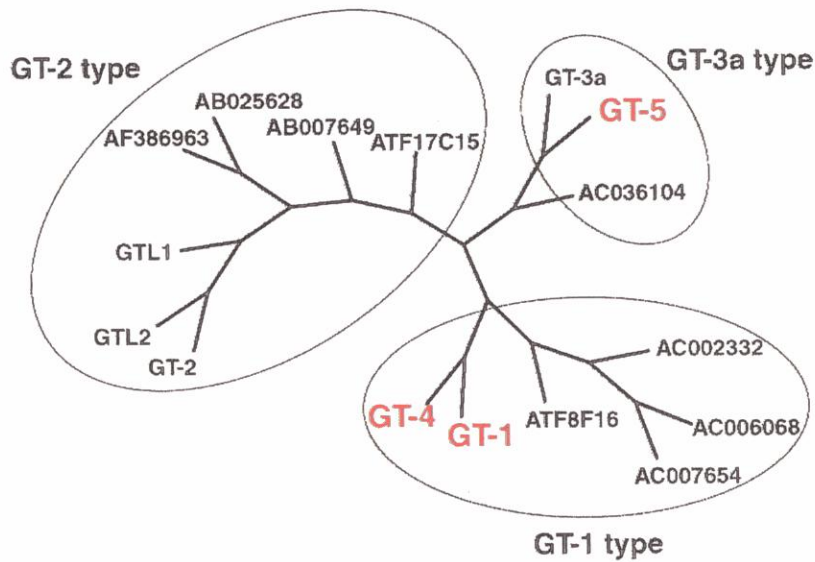


図 35 シロイヌナズナゲノムに見出される GT-1 類似遺伝子

シロイヌナズナゲノム DNA 配列のデータベースに対して GT-1 と相同性を示す遺伝子を探索した。本研究でクローニングした GT-4、GT-5 並びに主に対照として用いた GT-1 を赤字で示す。シロイヌナズナゲノムには GT-1 類似遺伝子は GT-1 を含めて 16 遺伝子存在する。GT-1、GT-2、GT-3a、GT-4、GT-5、GTL1、GTL2 以外は Gen Bank の accession number を記した。

-謝辞-

本研究をおこなうにあたり、懇切丁寧なご指導を頂いた奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物遺伝子機能学講座の橋本隆教授、高瀬尚文博士、中嶋敬二博士、庄司翼博士に心から厚く御礼申し上げます。また本学名誉教授で、本研究室の前教授、堀田康雄先生にも折に触れご指導頂き、深く感謝いたします。本研究室の前助教授で、横浜国立大学環境情報研究院環境遺伝子工学分野教授の平塚和之先生には何から何までお世話になり、心から感謝いたします。さらに、本研究室で出会えた素晴らしい諸先輩、同期、後輩、実験補助、秘書の方々に心より御礼申し上げます。最後に、わたくしの研究活動を支えてくれた妻、住美に感謝します。

-参考文献-

Anderson, S.L., Teakle, G.R., Martino-Catt, S.J., and Kay, S.A. (1994). Circadian clock- and phytochrome-regulated transcription is conferred by a 78bp *cis*-acting domain of the *Arabidopsis CAB2* promoter. *Plant J.* 6, 457-470.

Anderson, S.L., Somers, D.E., Millar, A.J., Hanson, K., Chory, J., and Kay, S.A. (1997). Attenuation of phytochrome A and B signaling pathways by the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 9, 1727-1743.

Baeuerle, P.A., Lenardo, M., Pierce, J.M., and Baltimore, D. (1989). Phorbol ester-induced activation of the NF- κ B transcription factor involves dissociation of an apparently cytoplasmic NF- κ B/inhibitor complex. *Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.* 53, 789-798.

Ballas, N., and Citovsky, V. (1997). Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 10723-10728.

Bedbrook, J.R., Coen, D.M., and Beaton, A.R. (1980). Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding the precursor to the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit. *Nature* 287, 692-697.

Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H., and Chua, N.-H. (1994). Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* 77, 73-81.

Buchel, A.S., Molenkamp, R., Bol, J.F., and Linthorst, H.J. (1996). The *PR-1a* promoter contains a number of elements that bind GT-1-like nuclear factors with different affinity. *Plant Mol. Biol.* 30, 493-504.

Burkhard, P., Stetefeld, J., and Strelkov, S.V. (2001). Coiled coiles: a highly versatile protein folding motif. *Trends. Cell Biol.* 11, 82-88.

Carter, C., Graham, R.A., and Thornburg, R. (1998). *Arabidopsis thaliana* contains a large family of germin-like proteins: characterization of cDNA and genomic sequences encoding 12 unique family members. *Plant Mol. Biol.* 38, 929-943.

Chamovitz, D.A., and Deng, X.-W., (1996). Light signaling in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 455-478.

Chattopadhyay, S., Puente, P., Deng, X.-W., and Wei, N. (1998). Combinatorial interaction of light-responsive elements plays a critical role in determining the response characteristics of light-regulated promoters in *Arabidopsis*. *Plant J.* 15, 69-77.

Chory, J., Chatterjee, M., Cook, R.K., Elich, T., Fankhauser, C., Li, J., Nagpal, P., Neff, M., Pepper, A., Poole, D., Reed, J., and Vitart, V. (1996). From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12066-12071.

Ciceri, P., Gianazza, E., Lazzari, B., Lippoli, G., Genga, A., Hoscheck, G., Schmidt, R. J., and Viotti, A. (1997). Phosphorylation of Opaque2 changes diurnally and impacts its DNA binding activity. *Plant Cell* 9, 97-108.

Cosma, M.P., Tanaka, T., and Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97, 299-311.

Dehesh, K., Bruce, W.B., and Quail, P.H. (1990). A trans-acting factor that binds to a GT-motif in a phytochrome gene promoter. *Science* 250, 1397-1399.

Dehesh, K., Hung, H., Tepperman, J.M., and Quail, P.H. (1992). GT-2: a transcription factor with twin autonomous DNA-binding domains of closely related but different target sequence specificity. *EMBO J.* 11, 4131-4144.

Dehesh, K., Smith, L.G., Tepperman, J.M., and Quail, P.H. (1995). Twin autonomous bipartite nuclear localization signals direct nuclear import of GT-2. *Plant J.* 8, 25-36.

Droge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W.P., Halkier, B.A., Loake, G.J., Doerner, P., Dixon, R.A., and Lamb, C.J. (1997). Rapid stimulation of soybean protein kinase which phosphorylates a novel b21P DNA binding protein, G/HBF-1 during the induction of early transcription dependent defenses. *EMBO J.* 16, 726-738.

Eyal, Y., Curie, C., and McCormick, S. (1995). Pollen specificity elements reside in 30 bp of the proximal promoters of two pollen-expressed genes. *Plant Cell* 7, 373-384.

Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M. (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* 12, 393-404.

Gilmartin, P.M., Salokin, L., Memelink, J., and Chua, N.-H. (1990). Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell* 2, 369-378.

Gilmartin, P.M., Memelink, J., Hiratsuka, K., Kay, S.A., and Chua, N.-H. (1992). Characterization of a gene encoding a DNA binding protein with specificity for a light-responsive element. *Plant Cell* 4, 839-849.

Gorlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R.A., Hartmann, E., and Prehn, S. (1995). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.* 5, 383-392.

Green, P. J., Kay, S.A., and Chua N.-H. (1987). Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the *rbcS-3A* gene. *EMBO J.* 6, 2543-2549.

Green, P.J., Yong, M.-H., Cuzzo, M., Kano-Murakami, Y., Silverstein, P., and Chua, N.-H. (1988). Binding site requirements for pea nuclear protein factor GT-1 correlate with sequence required for light-dependent transcriptional activation of the *rbcS-3A* gene. *EMBO J.* 7, 4035-4044.

Hall, M.N., Hereford, L., and Herskowitz, I. (1984). Targeting of *E. coli* beta-galactosidase to the nucleus in yeast. *Cell* 36, 1057-1065.

Hecht, A., Strahl-Bolsinger S., and Grunstein M. (1996). Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* 383, 92-96.

Herold, A., Truant, R., Wiegand, H., and Cullen, B.R. (1998). Determination of the functional domain organization of the importin alpha nuclear import factor. *J. Cell Biol.* 143, 309-318.

Hicks, G.R., Smith, H.M., Lobreaux, S., and Raikhel, N.V. (1996). Nuclear import in permeabilized protoplasts from higher plants has unique features. *Plant Cell* 8, 1337-1352.

Hiratsuka, K., Wu, X., Fukuzawa, H., and Chua, N.-H. (1994). Molecular dissection of GT-1 from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6, 1805-1813.

Howard, E.A., Zupan, J.R., Citovsky, V., and Zambryski, P. (1992). The VirD2 protein of *A. tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. *Cell* 68, 109-118.

Ito, T., Takahashi, N., Shimura, Y., and Okada, K. (1997). A serine/threonine protein kinase gene isolated by an in vivo binding procedure using the *Arabidopsis* floral homeotic gene product, AGAMOUS. *Plant Cell Physiol.* 38, 248-258.

Iwasaki, T., Matsuki, R., Shoji, K., Sanmiya, K., Miyao, M., and Yamamoto, N. (1998). A novel class of importin α from rice, a component involved in the process of nuclear protein transport. *FEBS Lett.* 428, 259-262.

Jans, D.A., and Hubner, S. (1996). Regulation of protein transport to the nucleus: central role in phosphorylation. *Physiol. Rev.* 76, 651-685.

Jiang, C.J., Shoji, K., Matsuki, R., Baba, A., Inagaki, N., Ban, H., Iwasaki, T., Imamoto, N., Yoneda, Y., Deng, X.-W., and Yamamoto, N. (2001). Molecular cloning of a novel importin α homologue from rice, by which constitutive photomorphogenic 1 (COP1) nuclear localization signal (NLS)-protein is preferentially nuclear imported. *J. Biol. Chem.* 276, 9322-9329.

Johnson, C., Boden, E., Desai, M., Pascuzzi, P., and Arais, J. (2001). *In vivo* target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *Plant J.* 28, 237-243.

Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., and Smith, A.E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.

Klimczak, L.J., Collinge, M.A., Farini, D., Giuliano, G., Walker, J.C., and Cashmore, A.R.

(1995). Reconstitution of *Arabidopsis* casein kinase II from recombinant subunits and phosphorylation of transcription factor GBF1. *Plant Cell* 7, 105-115.

Kosugi, S., Ohashi, Y., Nakajima, K. and Arai, Y. (1990). An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Science* 70, 133-140.

Krebs, J.E., Kuo, M.-H., David Allis, C., and Peterson, C.L. (1999). Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast *HO* gene. *Genes Dev.* 13, 1412-1421.

Kuhlemeier, C., Fluhr, R., Green, P.J., and Chua, N.-H. (1987). Sequences in the pea *rbcS-3A* gene have homology to constitutive mammalian enhancers but function as negative regulatory elements. *Genes Dev.* 1, 247-255.

Kuhlemeier, C., Cuzzo, M., Green, P.J., Goyvaerts, E., Ward, K. and Chua, N.-H. (1988). Localization and conditional redundancy of regulatory elements in *rbcS-3A*, a pea gene encoding the small subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4662-4666.

Kuhn, R.M., Caspar, T., Dehesh, K., and Quail, P.H. (1993). DNA binding factor GT-2 from *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 23, 337-348.

Kuras, L., Kosa, P., Mencia, M., and Struhl, K. (2000). TAF-containing and TAF-independent forms of transcriptionally active TBP in vivo. *Science* 288, 1244-1248.

Lam, E., and Chua, N.-H. (1990). GT-1 binding site confers light-responsive expression in transgenic tobacco. *Science* 248, 471-474.

Le Gourrierc, J., Li, Y.F., and Zhou, D.X. (1999). Transcriptional activation by *Arabidopsis* GT-1 may be through interaction with TFIIA-TBP-TATA complex. *Plant J.* 18, 663-668.

Li, X.-Y., Bhaumik, S.R., and Green, M.R. (2000). Distinct classes of yeast promoters revealed by differential TAF recruitment. *Science* 288, 1242-1244.

Liu, Z., Xia, M., and Poovaiah, B.W. (1998). Chimeric calcium/calmodulin-dependent protein

kinase in tobacco: differential regulation by calmodulin isoforms. *Plant Mol. Biol.* 38, 889-897.

Lu, Y.-T., Liang, S.-P., and Xie, Q.-G. (2001). Direct submission to the database.

Marechal, E., Hiratsuka, K., Delgado, J., Nairn, A., Qin, J., Chait, B.T., and Chua, N.-H. (1999). Modulation of GT-1 DNA-binding activity by calcium-dependent phosphorylation. *Plant Mol. Biol.* 40, 373-386.

Martinez-Garcia, J.F., and Quail, P.H. (1999). The HMG-I/Y protein PF1 stimulates binding of the transcriptional activator GT-2 to the *PHYA* gene promoter. *Plant J.* 18, 173-183.

Matsuo, N., Minami, M., Maeda, T., and Hiratsuka, K. (2001). Dual luciferase assay for monitoring transient gene expression in higher plants. *Plant Biotech.* 18, 71-75.

Membre, N., Berna, A., Neutelings, G., David, A., David, H., Staiger, D., Saez, Vasquez, J., Raynal, M., Delseny, M., and Bernier, F. (1997). cDNA sequence, genomic organization and differential expression of three *Arabidopsis* genes for germin/oxalate oxidase-like proteins. *Plant Mol. Biol.* 35, 459-469.

Membre, N., Bernier, F., Staiger, D., and Berna, A. (2000). *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. *Planta* 211, 345-354.

Meshi, T., and Iwabuchi, M. (1995). Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol.* 36, 1405-1420.

Mohr, J., Stillman, B., and Giuzman, Y. (1987). Regulation of *SV40* DNA replication by phosphorylation of T-antigen. *EMBO J.* 6, 153-160.

Mustilli, A.C., and Bowler, C. (1997). Turning in to the signals controlling photoregulated gene expression in plants. *EMBO J.* 16, 5801-5806.

Nagano, Y. (2000). Several features of the GT-factor trihelix domain resemble those of the Myb DNA-binding domain. *Plant Physiol.* 124, 491-493.

Nagano, Y., Inaba, T., Furuhashi, H., and Sasaki, Y. (2001). Trihelix DNA-binding protein with specificities for two distinct *cis*-elements: both important for light down-regulated and dark-inducible gene expression in higher plants. *J. Biol. Chem.* 276, 22238-22243.

Nemeth, K., Salchert, K., Putnoky, P., Bhalerao, R., Koncz-Kalman, Z., Stankovic-Stangeland, B., Bako, L., Mathur, J., okresz, L., Stabel, S., Geigenberger, P., Stitt, M., Redei, G.P., Schell, J., and Koncz, C. (1998). Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 12, 3059-3073.

Neuhaus, G., Bowler, C., Kern, R., and Chua, N.-H. (1993). Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* 73, 937-952.

Ni, M., Dehesh, K., Tepperman, J.M., and Quail, P.H. (1996). GT-2: In vivo transcriptional activation activity and definition of novel twin DNA binding domains with reciprocal target sequence selectivity. *Plant Cell* 8, 1041-1059.

Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M. (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* 13, 1959-1968.

Ouwerkerk, P.B., Trimborn, T.O., Hilliou, F., and Memelink, J. (1999). Nuclear factors GT-1 and 3AF1 interact with multiple sequences within the promoter of the *Tdc* gene from Madagascar periwinkle: GT-1 is involved in UV light-induced expression. *Mol. Gen. Genet.* 261, 610-622.

Pasquali, G., Erven, A.S., Ouwerkerk, P.B., Menke, F.L., and Memelink, J. (1999). The promoter of the strictosidine synthase gene from periwinkle confers elicitor-inducible expression in transgenic tobacco and binds nuclear factors GT-1 and GBF. *Plant Mol. Biol.* 39, 1299-1310.

Patil, S., Takezawa, D., and Poovaiah, B.W. (1995). Chimeric plant calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene with a neural visinin-like calcium-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4897-4901.

Perisic, O., and Lam, E. (1992). A tobacco DNA binding protein that interacts with a light-

responsive boxII element. *Plant Cell* 4, 831-838.

Puente, P., Wei, N., and Deng, X.-W. (1996). Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 15, 3732-3743.

Raikhel, N.V. (1992). Nuclear targeting in plants. *Plant Physiol.* 100, 1627-1632.

Raychaudhuri, P., Bagchi, S., and Nevins, J.R. (1989). DNA binding activity of the adenovirus induced E4F transcription factor is regulated by phosphorylation. *Genes Dev.* 3, 620-627.

Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehali, D., Sherman, B.K., and Yu, G.-L. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290, 2105-2110.

Saitoh, S., Takahashi, K., and Yanagida, M. (1997). Mis6, a fission yeast inner centromere protein, acts during G1/S and forms specialized chromatin required for equal segregation. *Cell* 90, 131-143.

Schindler, U., and Cashmore, A.R. (1990). Photoregulated gene expression may involve ubiquitous DNA binding proteins. *EMBO J.* 11, 3415-3427.

Scully, K.M., Jacobson, E.M., Jepsen, K., Lunnyak, V., Viadiu, H., Carriere, C., Rose, D.W., Hooshmand, F., Aggarwal, A.K., and Rosenfeld, M.G. (2000). Allosteric effects of Pit-1 DNA sites on long-term repression in cell type specification. *Science* 290, 1127-1131.

Shieh, M.W., Wessler, S.R., and Raikhel, N.V. (1993). Nuclear targeting of the maize R protein requires two nuclear localization sequences. *Plant Physiol.* 101, 353-361.

Shoji, K., Iwasaki, T., Matsuki, R., Miyao, M., and Yamamoto, N. (1998). Cloning a cDNA encoding an importin- α and down-regulation of the gene by light in rice leaves. *Gene* 212, 279-286.

Smalle, J., Kurepa, J., Haegman, M., Gielen, J., Van Montagu, M., and Straeten, D.V. (1998). The trihelix DNA-binding motif in higher plants is not restricted to the transcription factors GT-1 and GT-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3318-3322.

Smith, H.M., Hicks, G.R., and Raikhel, N.V. (1997). Importin a from *Arabidopsis thaliana* is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. *Plant Physiol.* 114, 411-417.

Smith, H.M., and Raikhel, N.V. (1999). Protein targeting to the nuclear pore. What can we learn from plants? *Plant Physiol.* 119, 1157-1163.

Solomon, M.J., and Varshavsky, A. (1985). Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: A probe for *in vivo* chromatin structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6470-6474.

Staiger, D., Apel, K., and Trepp, G. (1999). The *Atger3* promoter confers circadian clock-regulated transcription with peak expression at the beginning of the night. *Plant Mol. Biol.* 40, 873-882.

Stockhaus, J., Eckes, P., Blau, A., Shell, J., and Willmitzer, L. (1987). Organ-specific and dosage-dependent expression of a leaf/stem specific gene from potato after tagging and transfer into potato and tobacco plants.

Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K., and Grunstein, M. (1997). SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev.* 11, 83-93.

Sugano, S., Andronis, C., Green, R.M., Wang, Z.-Y., and Tobin, E.M. (1998). Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the *Arabidopsis* circadian clock-associated 1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11020-11025.

Takase, H., Tabata, T., Mikami, K., and Iwabuchi, M. (1991). Partial purification and characterization of two transcriptional factors for *cis*-acting elements, ACGTCA of wheat histone genes. *Plant Cell Physiol.* 32, 1195-1203.

Teakle, G.R., and Kay, S.A. (1995). The GATA-binding protein CGF-1 is closely related to GT-1. *Plant Mol. Biol.* 29, 1253-1266.

Tinland, B., Koukolikova-Nicola, Z., Hall, M.N., and Hohn, B. (1992). The T-DNA-linked VirD2 protein contains two distinct functional nuclear localization signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7442-7446.

van der Krol A.R., and Chua, N.-H. (1991). The basic domain of plant B-ZIP proteins facilitates import of a reporter protein into plant nuclei. *Plant Cell* 3, 667-675.

Varagona, M.J., Schmidt, R.J., and Raikhel, N.V. (1992). Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein opaque-2. *Plant Cell* 4, 1213-1227.

Vasu, S.K., and Forbes, D.J. (2001). Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 363-375.

Villain, P., Mache, R., and Zhou, D.X. (1996). The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. *J. Biol. Chem.* 271, 32593-32598.

von Arnim, A.G., and Deng, X.-W. (1994). Light inactivation of Arabidopsis photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* 79, 1035-1045.

Wu, Y., Hiratsuka, K., Neuhaus, G., and Chua, N.-H. (1996). Calcium and cGMP target distinct phytochrome-responsive elements. *Plant J.* 10, 1149-1154.

Yamamoto, N., and Deng, X.-W. (1999). Protein nucleocytoplasmic transport and its light regulation in plants. *Genes Cells* 4, 489-500.

Zhang, L., Eggers-Schumacher, G., Schoffl, F., and Prandl, R. (2001). Analysis of heat-shock transcription factor-DNA binding in *Arabidopsis* suspension cultures by UV laser crosslinking. *Plant J.* 28, 217-223.

Zhou, D.X. (1999). Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and

GT-factors. Trends. Plant Sci. 4, 210-214.