

タバコサイクリンDの機能解析

2000年

中神 弘史

目次

緒論	1
第1章 タバコサイクリンDの特徴付けおよび <i>in vitro</i> 機能解析	
1-1 緒言	4
1-2 実験材料および方法	10
1-3 結果	28
1-3-1 タバコサイクリンD 遺伝子の細胞周期に伴う発現量の解析	
1-3-2 タバコサイクリンD (NtcycD3-1) とタバコ Rb タンパク質 (NtRb1) の <i>in vitro</i> 結合解析	
1-3-3 タバコサイクリンD (NtcycD3) とタバコ CDK (Ntcdc2a, Ntcdc2b) の <i>in vitro</i> 結合解析	
1-3-4 タバコサイクリンD/CDK 複合体 (NtcycD3/Ntcdc2) のキナーゼ活性の検出	
1-3-5 昆虫細胞内でのタバコサイクリンD/CDK 複合体 (NtcycD3-1/Ntcdc2a) の活性化の解析	
1-3-6 タバコサイクリンD/CDK 複合体 (NtcycD3-1/Ntcdc2a) の推定リン酸化部位がキナーゼ活性に及ぼす影響の解析	
1-3-7 シロイヌナズナ由来の CAK (Cak1At) によるタバコサイクリンD/CDK 複合体 (NtcycD3-1/Ntcdc2a) の活性化の解析	
1-4 考察	40
1-5 小括	48
第2章 タバコ培養細胞 BY-2 を用いたタバコサイクリンDの <i>in vivo</i> 機能解析	
2-1 緒言	50
2-2 実験材料および方法	50
2-3 結果	56
2-3-1 抗 NtcycD3-1 ペプチド抗体の特異性の解析	
2-3-2 タバコ培養細胞 BY-2 内での NtcycD3-1 と CDK-a の複合体形成の解析	
2-3-3 NtcycD3-1/CDK 複合体のキナーゼ活性の細胞周期特異性の解析	
2-3-4 タバコサイクリンDの GFP 融合タンパク質を構成的に発現させた形質転換体 BY-2 細胞を用いた解析	
2-3-5 GFP 融合タンパク質を用いたタバコサイクリンDの細胞内局在性の解析	
2-4 考察	65
2-5 小括	73
総括	75
参考文献	77
論文目録	83
謝辞	84

緒 論

高等植物の形態形成は動物とは著しく異なった様相を呈している。動物では発生段階で既に各細胞が進む方向性が決定され、その時点で個体を構成する器官の数や位置が厳密に制御されているが、高等植物では主だった形作りが胚発生以降に行われ、生育環境に柔軟に対応して生育過程で常に器官が形成される。高等植物の器官が形成される端緒は茎頂や根端等の狭い領域に局在する分裂組織（メリステム）と呼ばれる分裂活性の高い細胞群に発しており、分裂組織で作られた未分化細胞は植物体内での置かれた位置からの信号（細胞相互の信号）、環境からの信号、植物ホルモンなどの信号を受け取って特定の細胞へと分化し、組織そして器官を形成する。このような興味深い植物形態形成の機構を明らかにすべく、これまでに様々な角度から研究が取り組まれてきた。高等植物に限らず多細胞生物の器官形成の過程では、細胞分裂の頻度と方向、細胞成長の量と方向が巧みに制御されていることより、形態形成の素過程である細胞分裂および細胞成長、言い換えれば細胞周期の進行がどのように制御されているかを知ることが多細胞生物の形態形成の機構を知る上で非常に重要な要素である。高等植物に特徴的な形態形成の機構の全容を明らかにするためには細胞周期制御機構の解明も最重要課題の1つと考えるが、高等植物における細胞周期制御に関する研究は動物や酵母での研究と比べて著しく遅れを取っている。

真核生物の細胞周期は、DNA合成準備期（G1期; gap 1）、DNA合成期（S期; synthesis）、分裂準備期（G2期; gap 2）、および有糸分裂期（M期; mitotic）の4つのステージからなり、G1→S→G2→M→G1と秩序正しく進行する。細胞周期の進行方向および開始・停止の制御は、各種チェックポイント機構の働きにより厳密に守られており、動物と酵母を用いた研究により、サイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼ（cyclin-dependent kinase; CDK）が細胞周期の進行調節の中心的な役割を果たすことが示された（図1A）。動物と酵母でサイクリン/CDKが関与する機構が高度に保存されていることより、真核生物の細胞周期制御には共通の機構が存在するという認識が強くなっているが、動物と酵母では相違点も多く認められており、中でも重要な違いがG1期後期に存在するチェックポイントで見出されている。動物におけるそのチェックポイントはRポイント（restriction point）と呼ばれ、酵母には存在しないRb（retinoblastoma）タンパク質がE2F転写因子を介してG1/S移行期を制御している¹⁾²⁾。一方、酵母でのチェックポイントはスタート（START）と呼ばれており、分裂酵母でE2Fに対応すると考えられる転写因子Cdc10³⁾⁴⁾の存在が認められているが、Rbタンパク質に相当する因子は見つかっておらず、G1/S移行期において動物とは異なった制御が行われていると考えられている。このような違いが認められるG1期は外部環境や増殖因子などの多様な細胞外シグナルが作用する唯一の時期であり、G1期に細胞の増殖・分化等への方向性が決定されていることより、G1期制御因子群が細胞の運命を握る鍵となっていると考えられてきている。動物ではG1サイクリンであるサイクリンDが、発現量が細胞外シグナルにより制御されることが知られており、増殖因子の最終的な標的の1つとして細胞の運命を決定する上で極めて重要な位置を占める役者であるとされている⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。こ

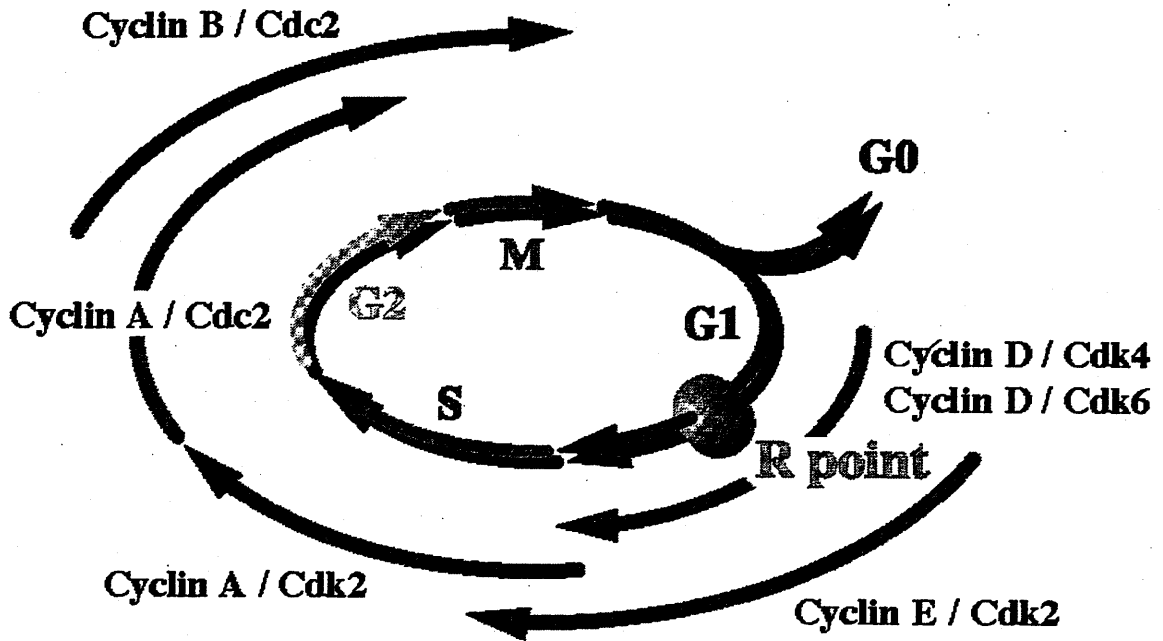
のサイクリン D は CDK4 および CDK6 の調節サブユニットとして機能し、活性化したサイクリン D/CDK4,6 複合体は Rb タンパク質のリン酸化を介して細胞周期を G1 期から S 期へと移行させる^{9) 10) 11) 12)}。Rb タンパク質は G1 期初期から中期にかけて低リン酸化状態にあり、E2F と結合してその活性を負に制御しているが、サイクリン/CDK 複合体によるリン酸化を受けると E2F から解離する。その結果、E2F による S 期進行に必要な遺伝子群の転写が活性化され、細胞周期は G1 期から S 期へと移行する (図 1B)。

高等植物においてもサイクリンおよび CDK のホモログが続々と単離されてきており、高等植物の細胞周期制御機構も基本的には動物や酵母などの他の真核生物と同様であるとの認識が強まっている^{13) 14) 15) 16) 17) 18)}。形態形成との関わりにおいて重要と考えられる G1/S 移行期の制御に関しては、*Zea mays* (トウモロコシ) より Rb 類似遺伝子 (*ZmRb1*)^{19) 20)}、*Triticum monococcum* (コムギ) より E2F 類似遺伝子 (*TmE2F*)²¹⁾ が単離されたことにより、基本的には動物での機構と類似しているとの考えが強まってきているが、その実態は全く明らかにされていないと言っても過言ではない。ただし、このような状況証拠と動物での研究成果を踏まえると、サイクリン D に相当する因子が高等植物において外部環境や植物ホルモンなどの細胞外シグナルを仲介し、G1/S 移行期を制御することにより細胞の増殖・分化等への方向性を決定付け、ひいては高等植物の形態形成を制御する重要な役割を担っている可能性が十分考えられ、高等植物で数多く見出されてきているサイクリン D のホモログ (以下サイクリン D と略称する) の役割に非常に興味を持たれる。

このような背景の下、植物形態形成と密接に繋がっていると考えられる G1/S 移行制御機構の解明を目的として、高等植物におけるサイクリン D の機能解析を博士後期課程の研究課題として選択した。本研究では形態形成の基盤となる細胞周期制御の分子機構の解明を目標に掲げ、目に映る形態形成との関連性に迫る解析は行っていないが、本研究の方向性および重要性を支持すべく、1999 年に *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) でサイクリン D の 1 種を強制発現させると葉からのカルス形成誘導に植物ホルモンであるサイトカイニンが必要でなくなるという報告がなされ²²⁾、サイクリン D が高等植物において細胞外シグナルから形態形成に至るシグナル経路の中で重要な位置を占めていることが示された^{23) 24)}。

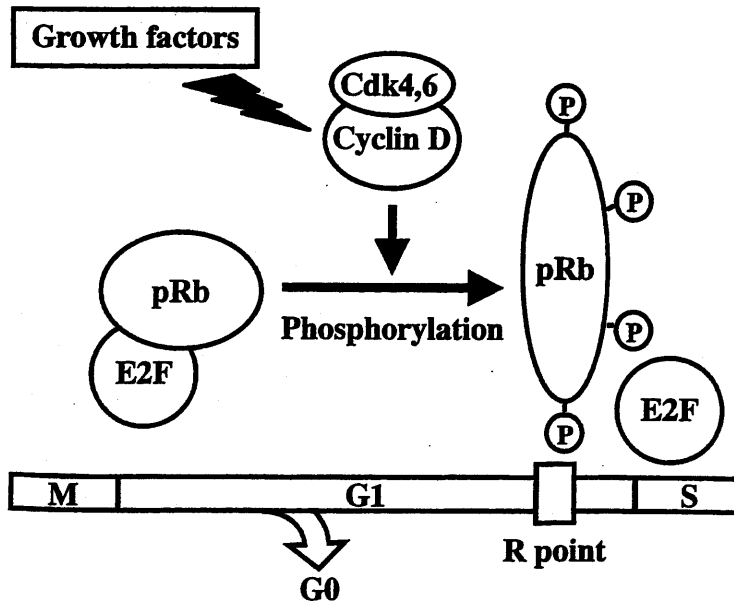
私達の研究グループは、モデル植物の 1 つであり、培養細胞で高度な同調培養系が確立されていることより、細胞周期研究に最適であるタバコを植物材料として選択し、植物形態形成機構の解明を念頭に置いて、細胞周期制御機構の解析を進めてきた。その中でサイクリン A (*Ntcyc25*)²⁵⁾、サイクリン B (*Ntcyc27*, *Ntcyc29*)²⁵⁾、サイクリン D (*NtcycD3-1*, *NtcycD3-2a*, *NtcycD3-2b*, *NtcycD3-3*)、*Cdc2* (*Ntcdc2a*)²⁶⁾、Rb (*NtRb1*)²⁷⁾ そして E2F (*NtE2F1*)²⁸⁾ に相当する遺伝子をタバコより単離した。そこで本研究ではタバコから単離した 4 種類のサイクリン D を実験材料とし、高等植物における細胞周期制御機構の解明に着手した。博士後期課程の研究を通じて、1) サイクリン D の分子レベルでの解析、2) タバコ培養細胞 BY-2 を用いたサイクリン D の *in vivo* における解析、という 2 つのアプローチを中心に高等植物におけるサイクリン D の機能解析を行い、高等植物の細胞周期制御機構の一端を明らかにした。その成果を本論文で以下報告する。

(A) Cell cycle control in mammalian cells



(B) Character of mammalian cyclinD

Control of the G1/S transition



- Transcript levels remain constant during the cell cycle
- Transcription is absolutely dependent on the presence of serum growth factors.
- Bind directly to pRb via the LXCXE motif

図1 動物における細胞周期制御機構

(A) サイクリン/CDK複合体が機能している細胞周期の時期を示した。

(B) 動物のサイクリンDの特徴を示した。

第1章 タバコサイクリンDの特徴付けおよび *in vitro* 機能解析

1-1 緒言

高等植物においてサイクリンD遺伝子のホモログ (*CycD*) は、まず1995年に *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)²⁹⁾ と *Medicago sativa* (アルファルファ)³⁰⁾ から酵母のG1サイクリン欠損株を相補する遺伝子として単離された。続いて *CycD* をプローブとしたcDNAライブラリーのスクリーニングにより、*Antirrhinum majus* (キンギョソウ)、*Helianthus tuberosus* (ヒマワリ)、*Nicotiana tabacum* (タバコ)³¹⁾ そして *Chenopodium rubrum* (アカザ)³²⁾ より相次いで単離された。現在のところ高等植物のサイクリンDは、動物におけるサイクリンDの分類(D1、D2、D3)とは独立して、シロイヌナズナで単離された遺伝子の推定アミノ酸配列を基に大きく3種類(D1、D2、D3)に分類されている^{13) 31)} (図2)。高等植物のサイクリンDの命名の仕方は植物種の略式の表記の後にD1~D3の分類を示す方法(例: *Arath;CycD1* (シロイヌナズナのサイクリンD1))が主流となっている。

動物のサイクリンDの代表的な特徴としては、1) 発現量の調節が増殖因子にのみ依存しておりmRNAの蓄積量は細胞周期を通じて一定である、2) LXCXE配列(各英文字がアミノ酸の1文字表記に相当し、Xはいずれのアミノ酸でも良いことを示す)を介してRbタンパク質と物理的に結合する^{12) 33)}、という2点が挙げられる。高等植物由来の全てのサイクリンDにはRbタンパク質との結合モチーフとされているLXCXE配列が保存されており、*Arath;CycD1,2,3* (シロイヌナズナ)は*ZmRb1* (トウモロコシ由来のRbタンパク質のホモログ) および*HuRb* (ヒト由来のRbタンパク質) と結合することが *in vitro* の結合試験で示された³⁴⁾。また、*Arath;CycD3* は新たに *Zea mays* (トウモロコシ) から単離されたRb類似遺伝子 (*RRB1*) の遺伝子産物とも結合することが *in vitro* の結合試験および酵母のTwo-hybrid法を用いて示された³⁵⁾。更に *Arath;CycD3* はシロイヌナズナより単離されたCDK阻害因子 (*ICK1; interactor of Cdc2 kinase*) とも結合することが *in vitro* の結合試験および酵母のTwo-hybrid法を用いて示された³⁶⁾。発現様式に関しては、シロイヌナズナの培養細胞を用いた解析により、*Arath;CycD2* は動物のサイクリンDと同様に細胞周期を通じてmRNAの蓄積量が一定であるのに対し、*Arath;CycD3* はG1期後期からS期初期にかけてmRNAの蓄積量が増加し、その後は維持されることが示された³⁷⁾。アルファルファでも同様な結果が得られており、*Medsa;CycD3;1* (アルファルファ) のmRNAの蓄積量はG1/S移行期に増加する³⁰⁾。また、*Arath;CycD2* および1999年にシロイヌナズナより新たに単離されたサイクリンD遺伝子のホモログである *Arath;CycD4* はショ糖により発現が誘導され、*Arath;CycD3* は植物ホルモンであるサイトカイニンにより発現が誘導されることが分かった^{29) 38)}。更に1999年に *Arath;CycD3* を構成的に高発現している形質転換シロイヌナズナの葉からのカルス形成の誘導には、サイトカイニンが必要とされなくなることが報告され、高等植物においてもサイクリンDが細胞外からのシグナルを受け取り、細胞増殖を制御する役割

を果たしていることが示された²²⁾。また、タバコ培養細胞 BY-2 を用いた解析からは、*Nicta;CycD3;2* (タバコ) の mRNA の蓄積量は細胞周期を通じて一定であるが、*Nicta;CycD2* および *Nicta;CycD3;1* の mRNA の蓄積量は M 期に最大になることが明らかになった³¹⁾。このことは動物では G1 サイクリンとされているサイクリン D が高等植物では M 期においても機能している可能性を示唆するもので、非常に興味深い結果である。

サイクリンは CDK と協調して働くことにより初めてその機能を発揮する。動物ではサイクリン D は CDK4 および CDK6、サイクリン E は CDK2、サイクリン A は CDK2 および Cdc2 (CDK1)、サイクリン B は Cdc2 と複合体を形成し、CDK を活性化させる。一方、分裂酵母では CDK は Cdc2 のみであり、出芽酵母も CDK として Cdc28 しか有しておらず、酵母では各種のサイクリンは 1 種類の CDK と複合体を形成し、その活性を制御している。

高等植物ではサイクリンのホモログとしてはサイクリン A、サイクリン B そしてサイクリン D が単離されている¹³⁾ (表 1)。CDK のホモログとしては Cdc2 または CDK2 との相同性が高いものが多数単離されており、現時点では大きく a-type、b-type (b-type は更に b1 と b2 のサブタイプに分類される) そしてそれ以外のものに分類されている¹³⁾

(表 1)。CDK-a (a-type) は他の真核生物の Cdc2 または CDK2 に相当するものと考えられており、動物および分裂酵母の Cdc2 に存在する PSTAIRE 配列 (各英文字がアミノ酸の 1 文字表記に相当しており、サイクリンとの結合に関与している) が保存されている。発現量が細胞周期を通じて一定であることも動物および酵母の Cdc2 と同様である。CDK-b (b-type) には PSTAIRE 配列が保存されておらず、PPTALRE あるいは PPTTLRE となっており、S 期から G2 期もしくは G2 期から M 期に発現が認められ、高等植物特有の CDK と考えられている。その他の CDK については解析が進んでおらず、どのような特徴を有しているかは不明である。このように高等植物から多様なサイクリンおよび CDK が単離されているのにもかかわらず、高等植物では肝心のサイクリンと CDK との組み合わせは未だ明らかとなっておらず、その解明が最大の課題の 1 つとなっている。

サイクリンが細胞周期の特定の時期に細胞内の必要な場所でパートナーとなる CDK を活性化させる機構は、複合体の形成という単純なステップのみでは説明できない。特にサイクリン D は発現レベルが細胞周期を通じて一定であるにも関わらず、CDK との複合体が G1/S 移行期に特異的に核内で活性化されることより、サイクリン D もしくはサイクリン D/CDK 複合体がタンパク質レベルで何らかの制御を受けていると考えるのが妥当である。事実、動物および酵母において各種サイクリンおよびサイクリン/CDK 複合体はリン酸化・脱リン酸化により様々な制御を受けていることが明らかになってきた。ヒトのサイクリン D1 では、3 箇所の推定リン酸化部位が存在するが、その中で 156 番目と 286 番目のスレオニン残基についての解析が進んでいる (図 3)。156 番目のスレオニン残基は CDK 活性化キナーゼ (CDK-activating kinase; CAK) によるサイクリン D1/CDK4 複合体の活性化、286 番目のスレオニン残基はタンパク質の安定性に関与しており、またいずれも細胞内局在性にも関わっていることが示された^{39) 40) 41)}。ヒトのサイクリン D1 の 156 番目のスレオニン残基は CDK4 と複合体を形成することにより自己

リン酸化を受けて、その後 CAK により CDK4 の 172 番目のスレオニン残基がリン酸化され、活性化型の複合体になることが明らかになった^{42) 43)}。また 156 番目のスレオニン残基をリン酸化を受けないアミノ酸に置換した変異体は細胞質に留まり、核へと移行しなくなることが示された。286 番目のスレオニン残基はリン酸化されると、ユビキチン分解系により分解が促進されることが知られており、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 β (GSK-3 β) によってリン酸化されることが示された。286 番目のスレオニン残基をリン酸化を受けないアミノ酸に置換した変異体は、156 番目のスレオニン残基の変異体とは逆に細胞質へは移行せず、核に留まることが明らかになった。

高等植物のサイクリン D のアミノ酸配列を比較すると、動物のサイクリン D1 の 156 番目および 286 番目のスレオニン残基に相当するリン酸化部位が高度に保存されている (第 1 章の図 10 を参照のこと)。上記の CDK4 と同様に Cdc2 は 161 番目のスレオニン残基が CAK によりリン酸化され、活性型になることが分かっているが、このスレオニン残基も高等植物の CDK において高度に保存されている。このことより高等植物におけるサイクリン D/CDK 複合体の活性化にも動物同様の機構が保存されていると考えられる。1998 年には高等植物から CAK 類似遺伝子が *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ: *Cak1A*)⁴⁴⁾ より単離され、また同年に 1991 年に *Oryza sativa* (イネ: R2) より単離された CDK 類似遺伝子が CAK として同定された⁴⁵⁾。更に 1999 年に Cdc2 の活性を負に制御する Wee1 の類似遺伝子が *Zea mays* (トウモロコシ: *ZmWee1*) より単離された⁴⁶⁾。動物において Wee1 は Cdc2 の 14 番目のスレオニン残基もしくは 15 番目のチロシン残基をリン酸化することにより、そのキナーゼ活性を不活性化するキナーゼ群の 1 つである。このリン酸化部位も高等植物の CDK において高度に保存されていることより、リン酸化による負の制御機構も保存されていると考えられる。

私達の研究グループはこれまでにタバコより 4 種類のサイクリン D 類似遺伝子を単離した。*NtcycD3-1* は、シロイヌナズナのサイクリン D 類似遺伝子を参考にしてプライマーを合成し、タバコ培養細胞 BY-2 の全 RNA を用いて RT-PCR を行い、得られた DNA 断片をプローブとしてタバコ培養細胞 BY-2 の cDNA ライブラリーのスクリーニングを行って単離された。*NtcycD3-2a* および *NtcycD3-2b* は、*NtcycD3-1* の全長をプローブとして、タバコ茎頂組織由来の cDNA ライブラリーのスクリーニングを行って単離された。*NtcycD3-3* は、*NtcycD3-1* の一部をプローブとして、タバコ培養細胞 BY-2 の cDNA ライブラリーのスクリーニングを行って単離された。シロイヌナズナのサイクリン D の推定アミノ酸配列に基づいた分類法に従えば、タバコより単離された 4 種類のサイクリン D は構造上全て D3-type に分類された。中でも *NtcycD3-2a* と *NtcycD3-2b* の相同性は極めて高く、塩基およびアミノ酸レベルで 90 % 以上の相同性を示した。また、*NtcycD3-2b* は Sorrell らが単離した *Nicta;CycD3;1* と同一のものであった³¹⁾。いずれも Rb タンパク質との結合に関与する LXCXE 配列および CDK との結合に関与するサイクリンボックスが保存されていた。ただし *NtcycD3-3* では LXCXE 配列のグルタミン酸 (E) が同じ酸性アミノ酸であるアスパラギン酸 (D) に置換されていた。

本章では、タバコサイクリン D の細胞周期に伴う発現様式の解析、組み換えタンパク質を用いた *in vitro* の機能解析で得られた成果を示す。組み換えタンパク質を用いた解

析では結合解析によりパートナーと成り得る CDK を同定し、サイクリン D/CDK 複合体のキナーゼ活性の検出を行った。更にサイクリン D に保存されているリン酸化部位の機能を解析した。

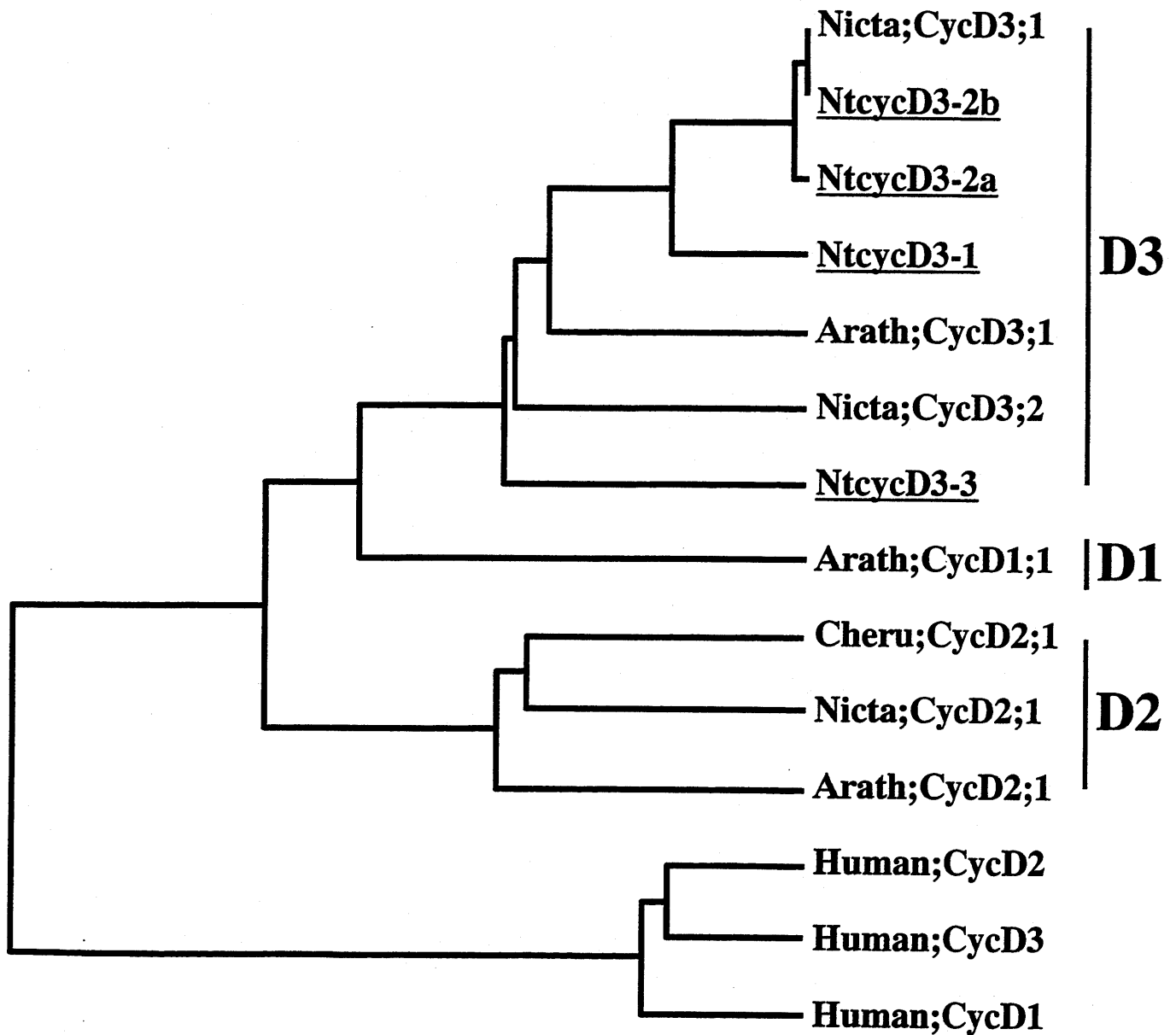


図2 高等植物由来のサイクリンDの系統樹

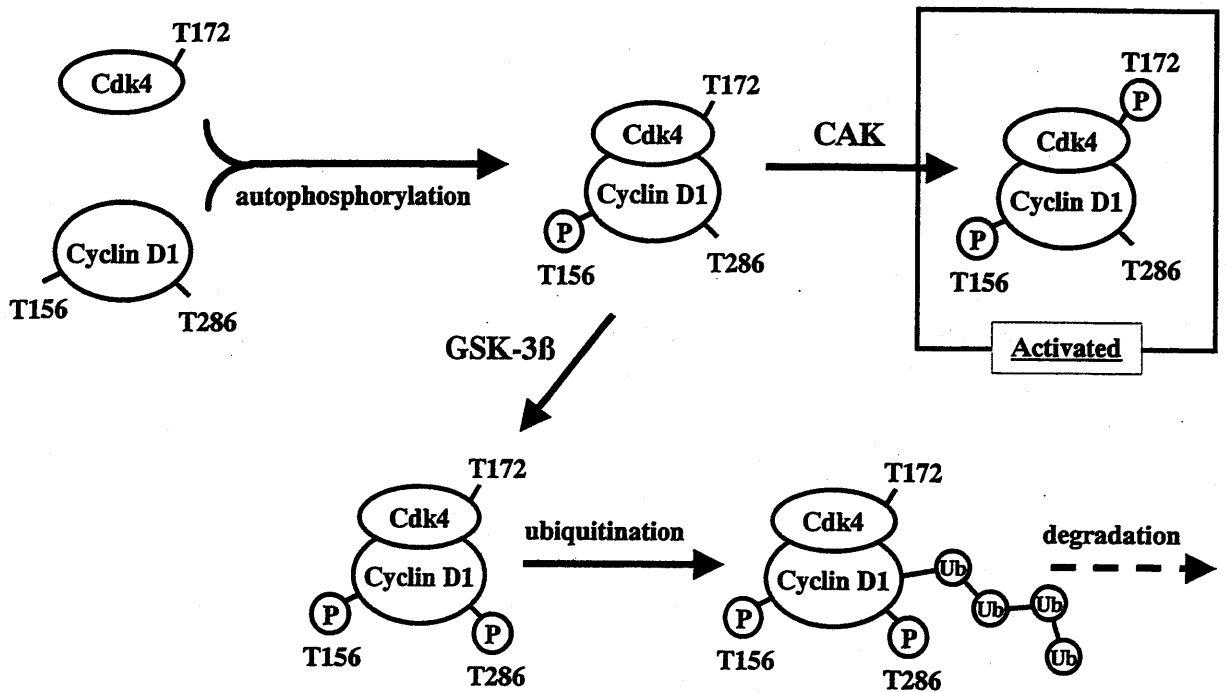
本論文で研究対象としたタバコ由来のサイクリンDを下線で示した。Nictaは*Nicotiana tabacum* (タバコ)、Arathは*Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)、Cheruは*Chenopodium rubrum* (アカザ)、Humanはヒトを示した。

表1 高等植物由来の細胞周期関連因子

Class of cell cycle gene	Species	Characteristics
CDKs		
CDK-a (PSTAIRE)	Widely identified	Involved in G1/S and G2/M
CDK-b1 (PPTALRE)	<i>A. thaliana</i> , <i>A. majus</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>M. Sativa</i>	Expressed S to M
CDK-b2 (PPTTLRE)	<i>A. thaliana</i> , <i>A. majus</i> , <i>O. Sativa</i> , <i>M. Sativa</i>	Probably expressed G2 and M only
CAK	<i>O. Sativa</i> , <i>A. thaliana</i>	Activates CDKs by T-loop phosphorylation
CHED-like	<i>A. thaliana</i> , <i>M. sativa</i>	Associated with differentiation? Not cell cycle regulated
Cyclins		
CycA1	<i>Z. mays</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>O. sativa</i>	
CycA2	<i>A. thaliana</i> , <i>Z. mays</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>M. sativa</i>	Expressed from S to M
CycA3	<i>C. roseus</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>A. majus</i>	
CycB1	<i>A. thaliana</i>	Expressed at G2/M transition
CycB2	<i>M. sativa</i>	Expressed at G2/M transition
CycD1	<i>A. thaliana</i> , <i>A. majus</i> , <i>H. tuberosus</i>	
CycD2	<i>A. thaliana</i> , <i>N. tabacum</i>	Involved in G1/S, sucrose induced
CycD3	Widely identified	Involved in G1/S, <i>Arabidopsis</i> CycD3;1 is induced by cytokinin in cells and <i>Arabidopsis</i> plants Several sub-groups exist with different induction characteristics
CycD4	<i>A. thaliana</i>	Sucrose induced
Others		
Rb	<i>Z. mays</i> , <i>N. tabacum</i>	Involved in G1/S, phosphorylated by CDK-a/CycD3 kinase <i>in vitro</i>
E2F	Wheat, <i>M. sativa</i> , <i>N. tabacum</i>	Up-regulated in early S phase, expressed in proliferating cultured cells and differentiated tissues Binds, and is probably inactivated by, Rb
CKI	<i>A. thaliana</i>	ICK1 binds both CDK-a and CycD3, and is induced on abscisic acid treatment, further CKI genes exist
Cks1	<i>A. thaliana</i>	Role in both mitotic and endoreduplication cycles
Msi1	<i>A. thaliana</i> , <i>L. esculentum</i>	Rb binding protein, possibly part of histone deacetylase complexes, may be involved in G1/S

(Current Opinion in Plant Biology (1999) ¹³⁾ より抜粋)

(A) Role of the phosphorylation sites in mammalian cyclinD1



(B) The subcellular localization mechanism of mammalian cyclin D1/cdk4 complex

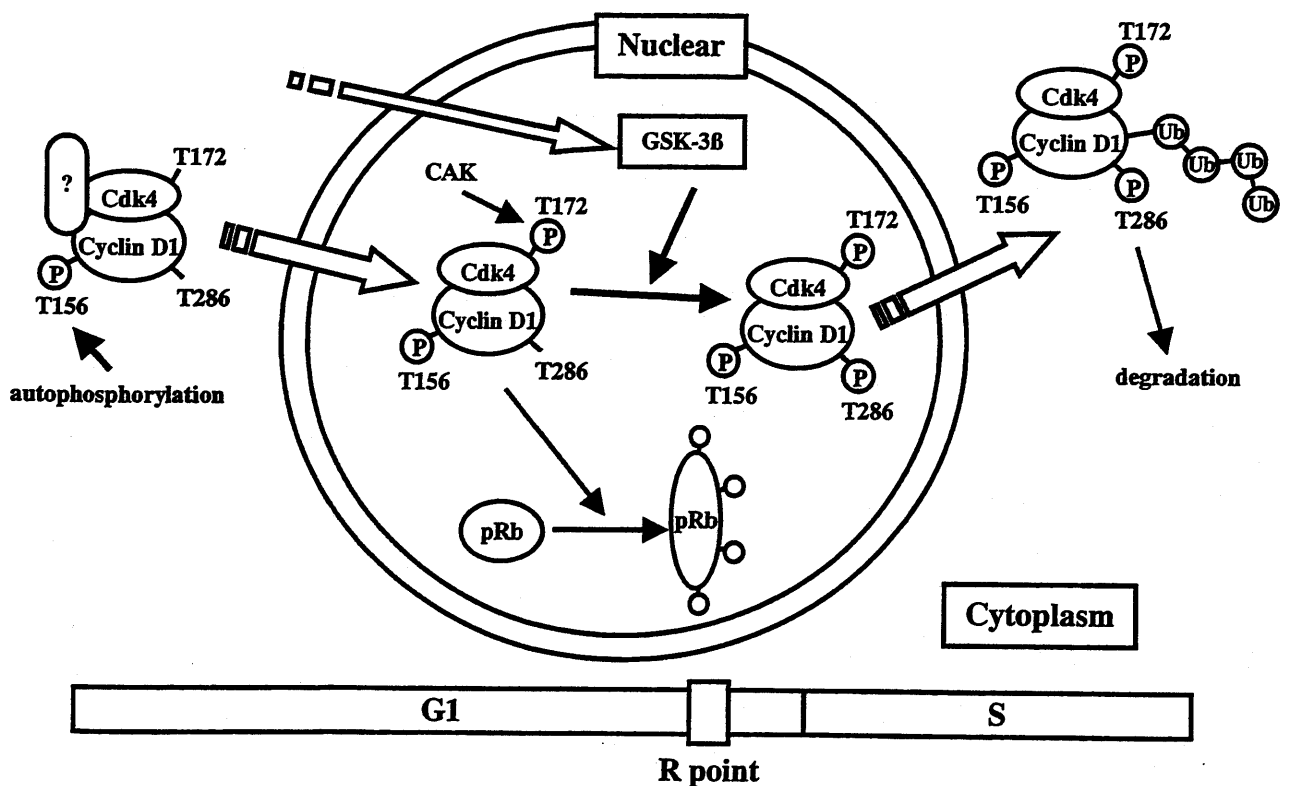


図3 ヒトのサイクリンD1のリン酸化部位の機能
 (A) リン酸化とCDKとの複合体の活性化の関係を示した。
 (B) リン酸化と細胞内局在性の関係を示した。

1-2 実験材料および方法

1-2-1 タバコ培養細胞 BY-2 の基本培養法および同調法

基本培養法

95 ml の改変 LS 培地を 300 ml のマイヤーフラスコに入れ、27℃、暗所で振盪（130 rpm）培養した。7 日置きに 2 ml の細胞懸濁液を新たな培地に植え継いだ。

・改変 LS 培地 (mg/L)

NH ₄ NO ₃	1,650	Na ₂ -EDTA	37.3
KNO ₃	1,900	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	(以上 MS 無機塩)	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370		
KH ₂ PO ₄	370	<i>myo</i> -Inositol	100
H ₃ BO ₃	6.2	Thiamine-HCl	10
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	Prydoxal Hydrochloride	1.0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	Nicotinic Acid	1,000
KI	0.83	2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid	0.2
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	Sucrose	30,000
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025		

KOH で pH5.8 に調整後、オートクレーブ（121℃、15 分）して用いた。
プレートにする場合は 3 g/L のゲランガムを加えた。

一段階同調法

培養 7 日目の細胞懸濁液 15 ml を 95 ml の培地に移し、Aphidicolin を終濃度 5 μM (29.5 mM を 18 μl) 添加し、24 時間培養した。培養液を吸引濾過器にあけて培地を捨て、3% Sucrose を濾過器一杯に加え、コマゴメピペットで細胞を懸濁して洗浄した。この操作を 3% Sucrose を 2 L 使いきるまで繰り返し、Aphidicolin を取り除いた。細胞を 95 ml の培地に懸濁して 15 ml まで濃縮し、95 ml の培地に移し、27℃、暗所で振盪培養した。以上の洗浄操作は 15 分程度で終わらせた。洗浄後、0 時間から 11 時間までサンプリングを行い、全 RNA 回収用に遠心操作（15,000 rpm、30 秒間、室温）により 500 μl ベッド量の細胞を 2 ml のマイクロチューブに回収し、液体窒素により急速凍結させた後、-80℃で保存した。また同時に適量の細胞をスライドガラスに取り、キムワイブを用いて余分な水分を取り除き、オルセイン染色液を滴下して細胞核を染色した。カバーガラスをかけ、顕微鏡で 1,000 個以上の細胞の核を観察して M 期にある細胞数を計測し、Mitotic Index を求めた。

・Aphidicolin (和光)

10 mg/ml (29.5 mM) Dimethyl Sulfoxide (DMSO) sol., 遮光冷蔵保存

・オルセイン染色液

1% (v/w) Orcein、遮光室温保存

Orcein	100 mg
Propionic Acid	5 ml
Lactic Acid	5 ml

二段階同調法

上記の一段階同調法の Aphidicolin の洗浄操作まで同様に行い、95 ml の培地に移した後、5 時間培養した。そこに Propyzamide を終濃度 3 μ M (6 mM を 55 μ l) で添加し、さらに 4 時間培養した。Aphidicolin の場合と同様に Propyzamide を取り除き、同様に培地に移し、サンプリングを終了するまで培養した。サンプリングおよび Mitotic Index の測定も一段階同調法と同様に行った。

・ Propyzamide (和光)

6 mM DMSO sol.、遮光冷蔵保存

1-2-2 RT-PCR

タバコ培養細胞 BY-2 から全 RNA の調製

AGPC (Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform) 法を用いた。-80 $^{\circ}$ C で保存しておいた培養細胞 (2 ml のマイクロチューブに 500 μ l ベッド量) に 500 μ l の Denaturing Solution を加え、細胞が融解する前に速やかに、氷上で細胞を超音波破碎 (10 秒 \times 10 回、5 秒間隔、出力 7~8、Handy Sonic model UR-10P、TOMY SEIKO) した。50 μ l の 2 M 酢酸ナトリウムを加え、よく混合した。500 μ l の平衡化酸性フェノールを加え、よく混合した。100 μ l の CIA を加え、よく混合し、氷上で 15 分間インキュベートした。遠心分離 (15,000 rpm、20 分間、4 $^{\circ}$ C) し、上清を別のマイクロチューブ (2 ml) に移し、イソプロピルアルコールを等量加え、室温で 10 分間インキュベートした。遠心分離 (15,000 rpm、10 分間、室温) により、核酸を沈殿させた。沈殿を 300 μ l の Denaturing Solution に溶解し、別のマイクロチューブ (1.5 ml) に移し、イソプロピルアルコールを等量 (300 μ l) 加え、-20 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。遠心分離 (15,000 rpm、10 分間、4 $^{\circ}$ C) により、核酸を沈殿させた。得られた沈殿に 1 ml の 75% エタノールを加え、ボルテックスミキサーで混合後、室温で 10~15 分間インキュベートした。遠心分離 (15,000 rpm、5 分間、4 $^{\circ}$ C) をした後、上清を除き、沈殿を減圧乾固 (完全に乾固させない) し、100 μ l の DEPC 水に溶解し、-80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

・ Denaturing Solution

Guanidine Thiocyanate (GTC)	4 M
Sodium Citrate (pH 7.0)	25 mM
2-Mercaptoethanol (2-ME)	0.1 M
Sodium N-lauroyl Sarcosine (Sarcosyl)	0.5 %

- Chloroform / Isoamyl Alcohol (CIA)

Chloroform : Isoamyl Alcohol (3-methyl-1-butanol) = 24 : 1

- DEPC (Diethyl Pyrocarboxylate) 水

蒸留水に終濃度が 0.1 % となるように Diethyl Pyrocarboxylate を加えよく攪拌した後、2 時間以上静置し 40~60 分間オートクレーブした。

cDNA の合成 (逆転写反応)

Gene Amp RNA PCR Core Kit (PERKIN ELMER) を使い、そのプロトコールに従い cDNA の合成を行った。1.5 ml のマイクロチューブに下記の組成で試薬等を加え、混合した。42 °C で 15 分間インキュベートした後、99 °C で 5 分間熱変性させて反応を止め、5 分間氷冷した。

10 × PCR Buffer	2 μl
MgCl ₂ Solution	4 μl
dGTP、dATP、dTTP、dCTP	各 2 μl
RNase Inhibitor	1 μl
Reverse Transcriptase	1 μl
Oligo d (T) 16	1 μl
Total RNA (Sample)	1 μg
<u>Sterile Distilled Water</u>	
計	20 μl

PCR 反応

200 μl の PCR 用マイクロチューブに氷上にて下記の組成で試薬等を加え、混合した。まず Actin について PCR 反応を行い、Actin の量が一定となるようにテンプレートの cDNA 量を調製した。

rTaq DNA Polymerase (5 U/μl)	0.25 μl
10 × PCR Buffer	5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2.5 μl
dNTP (2 mM each)	5 μl
Template (上記の cDNA)	1 μl
Primer 1	0.5 μl
Primer 2	0.5 μl
<u>dH₂O</u>	35.25 μl
計	50 μl

以上の反応液を Mastercycler Gradient (ependorf) で PCR 反応させた。反応条件および用いたプライマーは以下に示す。

各遺伝子を増幅する PCR 条件

• Actin

反応条件

94 °C	2分	1 cycle
94 °C	30秒、50 °C 30秒、72 °C 1分	28~30 cycles
72 °C	5分	1 cycle
4 °C		

プライマー

Tobacco Actin-S : 5'-CCTCTTAACCCGAAGGCTAA-3' (331→)

Tobacco Actin-AS : 5'-GAAGGTTGGAAAAGGACTTC-3' (←800)

• Histone H3

反応条件

94 °C	2分	1 cycle
94 °C	30秒、55 °C 30秒、72 °C 1分	23~25 cycles
72 °C	5分	1 cycle
4 °C		

プライマー

Histone H3-S : 5'-ATCTACTGGAGGCAAGGCTC-3' (80→)

Histone H3-AS : 5'-CAGTATGCCACAGCCATTC-3' (←583)

• Ntcyc25

反応条件

94 °C	2分	1 cycle
94 °C	30秒、50 °C 30秒、72 °C 1分	35~37 cycles
72 °C	5分	1 cycle
4 °C		

プライマー

Ntcyc25-S : 5'-CGATGACGTCTAATTCGTCG-3' (59→)

Ntcyc25-AS : 5'-GTTGGCAGAACTGAGGAAGC-3' (←263)

• Ntcyc29

反応条件

94 °C	2分	1 cycle
94 °C	30秒、55 °C 30秒、72 °C 1分	28~30 cycles
72 °C	5分	1 cycle
4 °C		

プライマー

Ntcyc29-S : 5'-TCTATGCTGCTCGACACACC-3' (1019→)

Ntcyc29-AS : 5'-CACTTGATGATGATGCAGC-3' (←1255)

• NtcycD3-1

反応条件

94 °C	2分	1 cycle
94 °C	30秒、50 °C 30秒、72 °C 1分	35~37 cycles
72 °C	5分	1 cycle
4 °C		

プライマー

NtcycD3-1-S : 5'-TGAGAGAATTCTTCTTTTGGTC-3' (651→)

NtcycD3-1-AS : 5'-CTAAATGTTCCCTGAATTAACG-3' (←1316)

• NtcycD3-2a

反応条件

94 °C	2分	1 cycle
94 °C	30秒、51 °C 30秒、72 °C 1分	35~37 cycles
72 °C	5分	1 cycle
4 °C		

プライマー

NtcycD3-2a-S : 5'-GCAAATATGAGAATCCAAGTAG-3' (908→)

NtcycD3-2a-AS : 5'-CTTTGCTTTCCAGTAGTAGAC-3' (←1322)

• NtcycD3-2b

反応条件

94 °C	2分	1 cycle
94 °C	30秒、55.7 °C 30秒、72 °C 1分	35~37 cycles
72 °C	5分	1 cycle
4 °C		

プライマー

NtcycD3-2b-S : 5'-ACGCAAATATGAGAATCCTAGTCA-3' (918→)

NtcycD3-2b-AS : 5'-TCTATCTCTGCTTTCCAGTA-3' (←1347)

• NtcycD3-3

反応条件

94 °C	2分	1 cycle
94 °C	30秒、56 °C 30秒、72 °C 1分	28~30 cycles
72 °C	5分	1 cycle
4 °C		

プライマー

NtcycD3-3-S : 5'-TGAGAGGGTGCTTCTATCCAC-3' (636→)

NtcycD3-3-AS : 5'-CATGGTCTTCTCGACCTTCG-3' (←1103)

1-2-3 推定リン酸化部位への変異の導入

NtcycD3-1 の 191 番目のスレオニン残基をアラニン残基、グルタミン酸残基、セリン残基に、296 番目と 300 番目のセリン残基をアラニン残基に変異した遺伝子を以下のよう
に作製した。また Ntcdc2a の 14 番目のスレオニン残基をアラニン残基に、15 番目の
チロシン残基をフェニルアラニン残基に、161 番目のスレオニン残基をアラニン残基に
変異した遺伝子を以下のよう
に作製した。プラスミドにクローニングされた遺伝子に対
し、プライマーを互いに逆方向に、Tail-to-Tail に接するように設計した。この際、プラ
イマーを変異を加えたいアミノ酸残基の位置に設定し、目的のアミノ酸残基に置換され
るように一部ミスマッチなプライマーを設計した。この様に設計したプライマーを用い
てPCR を行い、5'側遺伝子断片-プラスミド-3'側遺伝子断片が直鎖上に並んだ産物を増
幅し、セルフライゲーションすることにより、変異が加わった遺伝子を含むプラスミド
を得た。それぞれの変異に用いたプライマーは以下に示す。

PCR 反応は Ex Taq (TAKARA) を使用し、増幅された DNA の末端の平坦化およびリ
ン酸化は Blunting Kination Ligation Kit (TAKARA) を用いて行った。

PCR 反応条件

94 °C	5分	1 cycle
94 °C	1分、50 °C 1分、72 °C 4分	30 cycles
72 °C	7分	1 cycle
4 °C		

• NtcycD3-1 (T191A)

プライマー

NtcycD3-1 (T191A) -S : 5'-TGAATCCTGTGGCGCCACTTTCAT-3' (560→)

NtcycD3-1 (T191) -AS : 5'-TCCTCCACTTTAAAGAGGACAATA-3' (←559)

• NtcycD3-1 (T191E)

プライマー

NtcycD3-1 (T191E) -S : 5'-TGAATCCTGTGGAGCCACTTTTCAT-3' (560→)

NtcycD3-1 (T191) -AS : 5'-TCCTCCACTTTAAAGAGGACAATA-3' (←559)

• NtcycD3-1 (T191S)

プライマー

NtcycD3-1 (T191S) -S : 5'-TGAATCCTGTGTCGCCACTTTTCAT-3' (560→)

NtcycD3-1 (T191) -AS : 5'-TCCTCCACTTTAAAGAGGACAATA-3' (←559)

• NtcycD3-1 (S296A,S300A)

プライマー

NtcycD3-1 (S296A,S300A) -S :

5'-CAAGTATGAGGCGCCAATAAATGCGCCAAGTGCTG-3' (876→)

NtcycD3-1 (S296,S300) -AS : 5'-CGCTTGTGTGAAATAGAGTTGTAA-3' (←875)

• NtcycD3-1 (T191A,S296A,S300A)

NtcycD3-1 (T191A) をテンプレートとして用い、NtcycD3-1 (S296A,S300A) 用のプライマーで更に変異を加えた。

• Ntcdc2a (T14A)

プライマー

Ntcdc2a (T14A) -S : 5'-GCATACGGTGTAGTGTACAAGGCT-3' (40→)

Ntcdc2a (T14,Y15) -AS : 5'-TCCTTCCCCAATCTTCTCAACTTT-3' (←39)

• Ntcdc2a (Y15F)

プライマー

Ntcdc2a (Y15F) -S : 5'-ACATTCGGTGTAGTGTACAAGGCT-3' (40→)

Ntcdc2a (T14,Y15) -AS : 5'-TCCTTCCCCAATCTTCTCAACTTT-3' (←39)

• Ntcdc2a (T161A)

プライマー

Ntcdc2a (T161A) -S : 5'-GCTCATGAGGTGGTGACATTGTGG-3' (481→)

Ntcdc2a (T161) -AS : 5'-GAAAGTTCTGACAGGAATACCAAA-3' (←480)

1-2-4 Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) 細胞の維持

使用細胞株

本学バイオサイエンス研究科細胞増殖学講座の加藤順也助教授より分与していただいた。本細胞株は未分化の細胞であり、通常は球状の形態をとり、接着性を有している。通常は5分程度で細胞はシャーレに接着するが、この程度の時間で接着しない場合は細胞の状態が良くない。また、培養条件によっては他の接着性の細胞の様にマクロファージ状の形態をとり、シャーレに接着する細胞が増加するが、この様な状態も好ましくなく、初期の細胞形態を維持するように注意した。細胞濃度は $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ cells/mlで維持するのが好ましい。細胞濃度が低い分にはあまり問題はないが、飽和状態には絶対しないように留意した。倍加時間は約24時間であり、通常は3～4日置きに細胞数を約1/10に希釈した。

試薬

- Grace's Insect Medium Supplemented (1 ×)
Gibco BRL、冷蔵保存
- Fetal Bovine Serum (FBS)
大日本製薬、分注して冷凍保存（非働化せずに使用）
- Gentamicin Reagent Solution (10 mg/ml)
Gibco BRL、常温保存

培養条件

- 培地
500 ml のグレース昆虫用培地（サプリメント入り）に FBS を 50 ml、Gentamicin を 2.5 ml 添加したもの
- 培養容器
Coming Costar の細胞培養ディッシュ
培養液の量は 100 mm ϕ の場合で約 10 ml、60 mm ϕ の場合で約 5 ml
スピナーフラスコ
60 rpm で攪拌培養
- 培養温度 27 °C

継代培養（シャーレ）

古い培地を取り除き、新鮮な培地を加え、ピペッティングにより細胞をシャーレからはがした。細胞濃度が適当になるように希釈し、新たなシャーレにまいた。パラフィルムで封をして、再び27°Cのインキュベーターで培養した。

凍結保存

対数増殖期の細胞を回収し、氷上にて DMSO を 10 % 添加した FBS に懸濁させた。こ

の際、細胞濃度は 4×10^6 以上にした。凍結用チューブに細胞懸濁液を分注した。-20℃で1時間インキュベートした後、-80℃で一晩インキュベートした。最後に、液体窒素中にて保存した。

1-2-5 バキュロウィルス発現系による組み換えタンパク質の調製

Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems (Gibco BRL) を用いた。

組み換えドナープラスミドの構築

pFastBac1 のマルチクローニングサイト (MCS) に発現させたい遺伝子を挿入した。N 末端側に His-tag を付加する場合はリーディングフレームが合うようにして pFastBacHTa,b,c いずれかの MCS に目的の遺伝子を挿入した。

相同組み換え (組換えドナープラスミドの挿入遺伝子のバクミドへの相同組み換え)

-80℃で保存しておいた大腸菌 DH10Bac コンピテントセル (200 μ l) を氷上で解凍後、1ng の組み換えドナープラスミドを加え、30分間インキュベートした。42℃で45秒間、熱ショックを加えた後、氷上で2分間インキュベートした。これに800 μ l の SOC 培地を加え、37℃で1時間、振盪培養した。菌体を選択寒天培地にまき、24時間以上、37℃で培養した。

・選択培地

以下の抗生物質および試薬を含む LB 寒天 (1.5%) 培地を用いた

Kanamycin	50 μ g/ml
Gentamicin	7 μ g/ml
Tetracycline	10 μ g/ml
X-gal	100 μ g/ml
IPTG	40 μ g/ml

組み換えバクミドの調製

上記の培地上に生育してきたコロニーの青白の区別が明らかになった時点で白色の大きなコロニーを選択して3mlのLB培地(上記の選択培地に含まれる3種の抗生物質を含む)に植菌し、37℃で一晩、振盪培養した。菌体を遠心分離により回収し、300 μ l の Solution I に懸濁させた。300 μ l の Solution II を加え、穏やかに混ぜ、室温で5分間インキュベートした。300 μ l の Solution III を加え、穏やかに混ぜ、氷上で5分間インキュベートした。遠心 (15,000 rpm、10分間、4℃) 後、上清を別のチューブに移し、フェノール/クロロホルム抽出を行った。800 μ l のイソプロパノールを加え、穏やかに混ぜ、氷上で5分間インキュベートした。遠心 (15,000 rpm、15分間、室温) 後、上清を除き、500 μ l の70%エタノールで沈殿を洗浄した。沈殿を乾燥させた後、40 μ l の TE に溶解させた。バクミドはサイズが大きいため、以上の操作の混合過程においてボルテックスは使用せず、チューブの転倒程度にとどめた。

- Solution I
15 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 10 mM EDTA, 100 μ g/ml RNase A
- Solution II
0.2 N NaOH, 1 % SDS
- Solution III
3 M Potassium Acetate (pH 5.5)

Sf9 細胞への組換えバクミドの導入および組み換えウィルスの調製

対数増殖期の Sf9 細胞を 60 mm ϕ のシャーレに 3×10^6 個まき、27 $^{\circ}$ C で細胞をシャーレに接着させた。その間に 5 μ l の組換えバクミド (上記調製分) を、10 μ l のリポフェクチン試薬 (Lipofectin Reagent, 1 mg/ml, Gibco BRL) 、400 μ l の FBS 無添加の培養液 (Gentamicin のみを添加し、FBS 抜きのもの) と混合し、室温で 15 分間以上インキュベートした。細胞を FBS 無添加の培養液で 2 回洗浄し、1.1 ml の FBS 無添加の培養液および上記調製の混合物を加えた。この際、細胞が乾燥しないように培養液がシャーレ一面に広がるように注意した。27 $^{\circ}$ C で一晩培養した後、上清を除き、培養液で 1 回洗浄し、5 ml の培養液を加え、更に 27 $^{\circ}$ C で 3 ~ 4 日間培養した。遠心分離により細胞を除き、上清を組み換えウィルス液 A として回収し、4 $^{\circ}$ C で遮光保存した。

組み換えウィルスの増幅

対数増殖期の Sf9 細胞を 100 mm ϕ のシャーレに 6×10^6 個まき、27 $^{\circ}$ C で細胞をシャーレに接着させた。上清を除き、5 ml の新鮮な培養液と 5 ml の組み換えウィルス液 A を加え、27 $^{\circ}$ C で 3 ~ 4 日間培養した。遠心分離により細胞を除き、上清を組み換えウィルス液 B として回収し、4 $^{\circ}$ C で遮光保存した。

次いで対数増殖期の Sf9 細胞を 100 mm ϕ のシャーレに 6×10^6 個まき、27 $^{\circ}$ C で細胞をシャーレに接着させた。上清を除き、7 ml の新鮮な培養液と 3 ml の組み換えウィルス液 B を加え、27 $^{\circ}$ C で 3 ~ 4 日間培養した。遠心分離により細胞を除き、上清を組み換えウィルス液 C として回収し、4 $^{\circ}$ C で遮光保存 (6 カ月は保存可能) した。

タンパク質の発現および粗抽出液の調製

対数増殖期の Sf9 細胞を 100 mm ϕ のシャーレに 6×10^6 個まき、27 $^{\circ}$ C で細胞をシャーレに接着させた。上清を除き、9.5 ml の新鮮な培養液と 500 μ l の増幅した組み換えウィルス液を加え、27 $^{\circ}$ C で 4 日間培養した。遠心分離により細胞を回収し、Kinase Buffer で 1 回洗浄した後、500 μ l の Kinase Buffer (または精製時に用いる適当な緩衝液) に細胞を懸濁させた。氷上で超音波破碎 (10 秒 \times 10 回、5 秒間隔、出力 7 ~ 8、Handy Sonic model UR-10P、TOMY SEIKO) し、遠心操作 (15,000 rpm、30 分間、4 $^{\circ}$ C) により上清を回収し、粗抽出液として -80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

• Kinase Buffer

Tris-HCl (pH 7.5)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
EGTA	1 mM
Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)	1 mM
Dithiothreitol (DTT)	1 mM
NaF	10 mM
β-Glycerophosphate	25 mM
Sodium Orthovanadate	2 mM

組み換えタンパク質発現用のドナープラスミドの構築

• His-NtcycD3-1

pFastBacHTb の *Bam*H I-*Sal*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *NtcycD3-1* 全長の 5' 末端側に *Bam*H I 認識配列を、3' 末端側に *Sal*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pFastBacHTb に *Bam*H I-*Sal*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

NtcycD3-1-s : 5'-GGATCCATGGGAATACAACACAATGAG-3'

NtcycD3-1-as : 5'-GTCGACTTAGCGAGGGCTGCCAACA-3'

• His-NtcycD3-1 (mutant)

His-NtcycD3-1 と同様に行った。

• Flag-NtcycD3-1

この組み換えタンパク質を発現させる組み換えウィルスの調製のみ Linearized BaculoGold DNA (Pharminggen) を用いるシステムを利用した。そのために、最終的に pVL1392 の MCS に *Flag-NtcycD3-1* を挿入した。

まず N 末端側に Flag-tag を付加するために pFLAG-1 (EASTMAN KODAK) の MCS に *NtcycD3-1* をリーディングフレームが合うようにして挿入した。pFLAG-1 の *Hind* III-*Xba*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *NtcycD3-1* 全長の 5' 末端側に *Hind* III 認識配列を、3' 末端側に *Xba*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pFLAG-1 に *Hind* III-*Xba*I 断片を組み変えた。次に pVL1392 の *Bgl* II-*Xba*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *Flag-NtcycD3-1* 全長の 5' 末端側に *Bgl* II 認識配列を、3' 末端側に *Xba*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pVL1392 に *Bgl* II-*Xba*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

NtcycD3-1-s : 5'-AAGCTTATGGGAATACAACACAATGA-3'

NtcycD3-1-as : 5'-TCTAGATTAGCGAGGGCTGCCAAC-3'

Flag-NtcycD3-1-s : 5'-AGATCTATGGACTACAAGGATGACGATG-3'

NtcycD3-1-as : 5'-TCTAGATTAGCGAGGGCTGCCAAC-3'

• His-NtcycD3-2a

pFastBacHTb の *Bam*H I-*Sal*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *NtcycD3-2a* 全長の 5' 末端側に *Bam*H I 認識配列を、3' 末端側に *Sal*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pFastBacHTb に *Bam*H I-*Sal*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

NtcycD3-2a-s : 5'-GGATCCATGGCAATAGAAAACAATGAG-3'

NtcycD3-2a-as : 5'-GTCGACTTAATGAGGACTGCCAAC-3'

• His-NtcycD3-2b

pFastBacHTb の *Bam*H I-*Sal*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *NtcycD3-2b* 全長の 5' 末端側に *Bam*H I 認識配列を、3' 末端側に *Sal*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pFastBacHTb に *Bam*H I-*Sal*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

NtcycD3-2b-s : 5'-GGATCCATGGCAATAGAACACAATGAG-3'

NtcycD3-2b-as : 5'-GTCGACTTAATGAGGACTACCAACAGC-3'

• His-NtcycD3-3

pFastBacHTb の *Bam*H I-*Sal*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *NtcycD3-3* 全長の 5' 末端側に *Bam*H I 認識配列を、3' 末端側に *Sal*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pFastBacHTb に *Bam*H I-*Sal*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

NtcycD3-3-s : 5'-GGATCCATGGCTCACCATCACAATCAA-3'

NtcycD3-3-as : 5'-GTCGACCTACGTTTGTGTTCTAATC-3'

• His-Ntcyc25

pFastBacHTb の *Bam*H I-*Sal*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *Ntcyc25* 全長の 5' 末端側に *Bam*H I 認識配列を、3' 末端側に *Sal*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pFastBacHTb に *Bam*H I-*Sal*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

Ntcyc25-s : 5'-GGATCCATGGCGACGACCCAGAATA-3'

Ntcyc25-as : 5'-GTCGACTTAGCAGCTTATGTTCTGG-3'

• His-Ntcyc27

pFastBacHTa の *Sal*I-*Not*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *Ntcyc27* 全長の 5' 末端側に *Sal*I 認識配列を、3' 末端側に *Not*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pFastBacHTa に *Sal*I-*Not*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

Ntcyc27-s : 5'-GTCGACCGATGAGGCATGCAAATA-3'

Ntcyc27-as : 5'-GCGGCCGCTTAGAACAGTGATTGGAC-3'

• His-Ntcyc29

pFastBacHTb の *Bam*H I-*Sal*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *Ntcyc29* 全長の 5' 末端側に *Bam*H I 認識配列を、3' 末端側に *Sal*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pFastBacHTb に *Bam*H I-*Sal*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

Ntcyc29-s : 5'-GGATCCATGGCTTCAAGAATCGTTCT-3'

Ntcyc29-as : 5'-GTCGACTTAAGTCATCTTCCTAGTAG-3'

• His-Ntcdc2a

pFastBac HTa の *Bgl* II-*Sal*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *Ntcdc2a* 全長の 5' 末端側に *Bgl* II 認識配列を、3' 末端側に *Sal*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pFastBacHTa に *Bgl* II-*Sal*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

Ntcdc2a-s : 5'-AGATCTGGATGGACCAGTATGAAAAAGT-3'

Ntcdc2a-as : 5'-GTCGACTCACGGAACATACCCAAT-3'

• Flag-Ntcdc2a

まず N 末端側に Flag-tag を付加するために pFLAG-1 (EASTMAN KODAK) の MCS に *Ntcdc2a* をリーディングフレームが合うようにして挿入した。pFLAG-1 の *Xba*I-*Xho*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *Ntcdc2a* 全長の 5' 末端側に *Xba*I 認識配列を、3' 末端側に *Xho*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pFLAG-1 に *Xba*I-*Xho*I 断片を組み変えた。次に pFastBacI の *Not*I-*Xho*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *Flag-Ntcdc2a* 全長の 5' 末端側に *Not*I 認識配列を、3' 末端側に *Xho*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサ

ブクローニングし、塩基配列を確認した後、pFastBac1 に *NotI-XhoI* 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

Ntcdc2a-s : 5'-TCTAGAATGGACCAGTATGAAAAAG-3'

Ntcdc2a-as : 5'-CTCGAGTCACGGAACATACCCAATA-3'

Flag-Ntcdc2a-s : 5'-GCGGCCGCATGGACTACAAGGACGACGAT-3'

Ntcdc2a-as : 5'-CTCGAGTCACGGAACATACCCAATA-3'

• Flag-Ntcdc2a (mutant)

Flag-Ntcdc2a と同様に行った。

• Flag-Ntcdc2b

上記の Flag-Ntcdc2a 発現用のドナープラスミド上の *Ntcdc2a* を *Ntcdc2b* と入れ替えた。*XbaI-XhoI* 制限酵素処理で *Ntcdc2a* を切り出し、そこに *Ntcdc2b* を挿入するため、PCR 法を用いて *Ntcdc2b* 全長の 5' 末端側に *XbaI* 認識配列を、3' 末端側に *XhoI* 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK- にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、*XbaI-XhoI* 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

Ntcdc2b-s : 5'-TCTAGAATGGAGAAATACGAGAAATTGG-3'

Ntcdc2b-as : 5'-CTCGAGTCAGAATTGCGACTTGTCCAAGC-3'

1-2-6 大腸菌発現系による組み換えタンパク質の調製

発現用ベクターの構築

N 末端側に Glutathione S-transferase (GST) を付加する場合はリーディングフレームが合うようにして pGEX5X-2 または pGEX4T-1 の MCS に目的の遺伝子を挿入した。N 末端側に His-tag を付加する場合はリーディングフレームが合うようにして pET-15b の MCS に目的の遺伝子を挿入した。

大腸菌 (BL21 (DE3) pLysS 株) によるタンパク質生産

構築した発現用ベクターを BL21 株に導入した。得られた形質転換体を LB 培地 (Ampicillin 50 µg/ml, Chloramphenicol 35 µg/ml) で 37 °C にて振とう培養した。OD₆₀₀ = 0.4 まで増殖させた後、Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 0.1 mM になるように添加し、18 °C で一晩振とう培養した。遠心分離により菌体を回収し、Kinase Buffer1 回洗浄した後、10 倍量の Kinase Buffer に菌体を懸濁させた。氷上で超音波破碎 (10 秒 × 10 回、5 秒間隔、出力 7~8、Handy Sonic model UR-10P, TOMY SEIKO) し、遠心操作 (15,000 rpm、30 分間、4 °C) により上清を回収し、粗抽出液として -80 °C で

凍結保存した。

各組み換えタンパク質の発現用ベクターの構築

・ GST-NtRb1 (374-961)

pGEX5X-2 の *Bam*H I-*Sal*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *NtRb1* (1120-2883) の 5' 末端側に *Bam*H I 認識配列を、3' 末端側に *Sal*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pGEX5X-2 に *Bam*H I-*Sal*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

NtRb1 (374-961) -s : 5'-GGATCCTTGCAATGGCTTCCCCAGC-3' (1120→)

NtRb1 (374-961) -as : 5'-GTCGACTAAGACTCAGGCTGCTCAGT-3' (←2883)

・ GST-NtRb1 (823-961)

pGEX4T-1 の *Bam*H I-*Sal*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *NtRb1* (2467-2883) の 5' 末端側に *Bam*H I 認識配列を、3' 末端側に *Sal*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pGEX4T-1 に *Bam*H I-*Sal*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

NtRb1 (823-961) -s : 5'-GGATCCGAGCTTGCACCTGCTGGA-3' (2467→)

NtRb1 (823-961) -as : 5'-GTCGACTAAGACTCAGGCTGCTCAGT-3' (←2883)

・ His-NtcycD3-1

pET-15b の *Nde*I-*Bam*H I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *NtcycD3-1* 全長の 5' 末端側に *Nde*I 認識配列を、3' 末端側に *Bam*H I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pET-15b に *Nde*I-*Bam*H I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

NtcycD3-1-s : 5'-CATATGATGGAAATGCCCAAGAAGAATCAC-3'

NtcycD3-1-as : 5'-GGATCCTTAGCGAGGGCTGCCAACAG-3'

・ His-NtcycD3-1 (mutant)

His-NtcycD3-1 と同様に行った。

・ GST-Ntcdc2a

pGEX4T-1 の *Sal*I-*Not*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *Ntcdc2a* 全長の 5' 末端側に *Sal*I 認識配列を、3' 末端側に *Not*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK-にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pGEX4T-1 に *Sal*I-*Not*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

Ntcdc2a-s : 5'-GTCGACAGATGGACCAGTATGAAA-3'

Ntcdc2a-as : 5'-GCGGCCGCTCACGGAACATACCCAAT-3'

• GST-Ntcdc2a (mutant)

GST-Ntcdc2a と同様に行った。

1-2-7 粗抽出液から組み換えタンパク質の精製

• GST 融合タンパク質

Glutathion-Sepharose 4B beads (Pharmacia) を充填したカラムに GST 融合タンパク質を発現させた菌体の粗抽出液を担体の 10 倍量 (v/v) 加え、4℃で 1 時間インキュベートした。ビーズの 10 倍容量の Kinase Buffer で 3 回洗浄した後、担体と等量の 10 mM Glutathion (reduced form) で 5 回溶出した。また、担体に吸着させたまま使用する場合は、同様に洗浄操作まで行い、担体と等量の Kinase Buffer に懸濁させた。

• His-tag 融合タンパク質

TALON Metal Affinity Resin (Clontech) または His-Bind Resin (Novagen) を用い、カラムを作製した。基本的な操作は各プロトコールに従った。それぞれの担体用の抽出用緩衝液を用いて破碎した菌体および細胞の粗抽出液を担体の 10 倍量、3 回通した。10 倍量の各洗浄用緩衝液で 3 回洗浄した後、担体と等量の各溶出用緩衝液で 5 回溶出した。

• Flag-tag 融合タンパク質

Anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma) を充填したカラムに Flag-tag 融合タンパク質を発現させた細胞の粗抽出液を担体の 10 倍量、3 回通した。担体の 10 倍量の Kinase Buffer で 3 回洗浄した後、担体と等量の Elution Buffer I で 5 回溶出した。溶出液は 1/20 量の 1 M Tris で速やかに中和した。

• Elution Buffer I

0.1 % Triton X-100 を含む 0.1 M Gly-HCl (pH2.5)

1-2-8 *In vitro* 結合試験

• Ntcdc3-1 と Rb タンパク質の結合試験

FLAG-Ntcdc3-1 を発現している昆虫細胞の粗抽出液と GST-NtRb1 (374-961) を発現している大腸菌の粗抽出液を混合し、4℃で 1 時間、ローテーターで攪拌した。混合液を Anti-FLAG M2 Affinity Gel を充填したカラムに 3 回通し、担体の 10 倍量の Kinase Buffer で 3 回洗浄した後、担体と等量の Elution Buffer I を 3 回通し、吸着した FLAG-Ntcdc3-1 を溶出した。溶出液は 1/20 量の 1 M Tris で速やかに中和した。10 % ゲルで SDS-PAGE を行い、抗 NtRb1 (654-671) 抗体を用いた Western 解析により溶出液

中の NtRb1 を検出した。

・サイクリンと CDK の結合試験

His-tag を付加したサイクリンと Flag-cdc2 を共発現している昆虫細胞の粗抽出液を Anti-FLAG M2 Affinity Gel を充填したカラムに 3 回通し、担体の 10 倍量の Kinase Buffer で 3 回洗浄した後、担体と等量の Elution Buffer I を 3 回通し、吸着した Flag-cdc2 を溶出した。溶出液は 1/20 量の 1 M Tris で速やかに中和した。10 %ゲルで SDS-PAGE を行い、抗 His-tag 抗体 (Santa Cruz) を用いた Western 解析により溶出液中のサイクリンを検出した。

1-2-9 サイクリン/CDK 複合体のキナーゼ活性の検出

各タンパク質を発現させた昆虫細胞の粗抽出液または精製画分を試料として用い、以下の組成で反応させた。最後に試料を添加して反応を開始させ、30 °C で 10 分間インキュベートした。4 × SB を加えて反応を停止し、95 °C で 2 分間熱変性させた。適当な濃度のゲルで SDS-PAGE を行い、リン酸化された基質をオートラジオグラフィーで検出した。ビーズに吸着させたものを基質とした場合は、反応後 100 μl の Kinase Buffer で 3 回洗浄した後、4 × SB で処理し、その後は同様に行った。

・ 4 × SB

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	20 ml
SDS	8.0 g
Glycerol	40 ml
Bromophenol Blue (BPB)	20 mg
2-Mercaptoethanol	20 ml
dH ₂ O	
計	100 ml

・ Histone H1

試料	1 μl
Histone H1 (10 μg/μl)	0.5 μl
[γ- ³² P]ATP (4,500 Ci/mmol, ICN)	0.25 μl
50 mM ATP, 100 mM MgCl ₂	1 μl
Kinase Buffer	7.25 μl
計	10 μl

SDS-PAGE は 15 %ゲルを使用した。

・ GST-pRb (Glutathion-Sepharose 4B beads に吸着させたもの)

試料	3 μ l
GST-Rb (GST-NtRb1 (374-961) , GST-HuRb)	20 μ l
[γ - ³² P]ATP (4,500 Ci/mmmole, ICN)	0.75 μ l
50 mM ATP, 100 mM MgCl ₂	3 μ l
<u>Kinase Buffer</u>	<u>3.25 μl</u>
計	30 μ l

SDS-PAGE は 7.5 %ゲルを使用した。

・ GST-NtRb1 (823-961) (溶出・精製画分)

試料	1 μ l
GST-NtRb1 (823-961)	2 μ l
[γ - ³² P]ATP (4,500 Ci/mmmole, ICN)	0.25 μ l
50 mM ATP, 100 mM MgCl ₂	1 μ l
<u>Kinase Buffer</u>	<u>5.75 μl</u>
計	10 μ l

SDS-PAGE は 10 %ゲルを使用した。

1-2-10 CAK 活性の検出

東京大学分子細胞生物学研究所細胞機能分野の梅田正明氏より分与していただいたシロイヌナズナ由来の CAK (Cak1At) を用いた⁴⁴⁾。N 末端側に His-tag を付加したものをバキュロウィルス発現系を用いて調製した。

His-Cak1At を発現させた昆虫細胞の粗抽出液を試料として用い、以下の組成で反応させた。最後に試料を添加して反応を開始させ、23℃で1時間インキュベートした。

試料	1 μ l
GST-NtCycD3-1	1 μ l
GST-Ntcdc2a	1 μ l
50 mM ATP, 100 mM MgCl ₂	1 μ l
<u>Kinase Buffer</u>	<u>4 μl</u>
計	8 μ l

1時間インキュベートした後、さらに下記の組成の混合物を添加し、30℃で30分間インキュベートした。4×SBを加えて反応を停止し、95℃で2分間熱変性させた。15%ゲルで SDS-PAGE を行い、リン酸化された Histone H1 をオートラジオグラフィーで検出した。

Histone H1 (10 µg/µl)	0.5 µl
[γ- ³² P]ATP (4,500 Ci/mmol, ICN)	0.25 µl
Kinase Buffer	1.25 µl
計	2 µl

1-3 結果

1-3-1 タバコサイクリン D 遺伝子の細胞周期に伴う発現量の解析

動物細胞ではサイクリン A およびサイクリン B の発現量は細胞周期に依存して変化するが、サイクリン D の発現量は細胞周期を通じて一定である。一方、高等植物より単離されたサイクリン D 類似遺伝子の中には細胞周期の特定の時期に発現量が変化するものが存在する^{30) 31) 37)}。そこで、タバコより単離した 4 種類のサイクリン D 遺伝子の細胞周期に伴う発現の特異性を解析した。

同調化させたタバコ培養細胞 BY-2 を材料として用い、RT-PCR 法により mRNA の蓄積量を解析した。細胞を DNA ポリメラーゼ α の阻害剤であるアフィディコリンで処理することで S 期初期に同調させ、洗浄操作によりアフィディコリンを除去した後、経時的に同調化した細胞を回収した。同調化の程度は、オルセイン染色液で核を染色して M 期の細胞数を計測し、その割合を Mitotic Index として示した (図 4A)。細胞からの全 RNA の調製は AGPC 法を用いた。4 種類のサイクリン D 遺伝子、特に *NtcycD3-2a* と *NtcycD3-2b* の相同性は 90 % 以上もあることより、Northern 法により各遺伝子の mRNA を分離して検出することが困難であるため、mRNA の検出には RT-PCR 法を用いた。プライマーは約 500 bp の DNA 断片が増幅されるように設計した。各プライマーセットにより目的の遺伝子が特異的に増幅されたことは、増幅された DNA 断片をサブクローニングし、シーケンスを行うことにより確認した。

アクチン遺伝子を内部標準としてテンプレート量を揃え、各遺伝子断片の増幅に最適なアニーリング温度およびサイクル数を決定した。PCR 反応が飽和していないことを確認するため、サイクル数を 2 回増加した結果も示した。既に細胞周期に伴う発現様式が分かっているヒストン H3 遺伝子⁴⁷⁾、タバコサイクリン A 遺伝子 (*Ntcyc25*)²⁵⁾ そしてタバコサイクリン B 遺伝子 (*Ntcyc29*)²⁵⁾ を遺伝子マーカーとして用いた。ヒストン H3 遺伝子は S 期、*Ntcyc25* は S 期から M 期、そして *Ntcyc29* は G2/M 期に発現する。

図 4B に示すように、*NtcycD3-1* と *NtcycD3-3* の発現量は細胞周期を通じて一定であった。それに対し、*NtcycD3-2a* と *NtcycD3-2b* は細胞周期に依存して mRNA の蓄積量が変化した。*NtcycD3-2a* は 1 時間目に mRNA の蓄積が認められ、3~5 時間目に減少し、その後再び mRNA の蓄積量が増加した。このことより *NtcycD3-2a* は M 期から S 期にかけて発現することが示唆された。*NtcycD3-2b* の mRNA の蓄積は Mitotic Index が増加し始める 5 時間目より認められ、7~9 時間目に mRNA の蓄積量が最大になり、その後減少した。*NtcycD3-2b* の発現様式は *Ntcyc29* のものと類似しており、Mitotic Index と照らし合わせても、*NtcycD3-2b* は G2/M 期に発現することが示唆された。

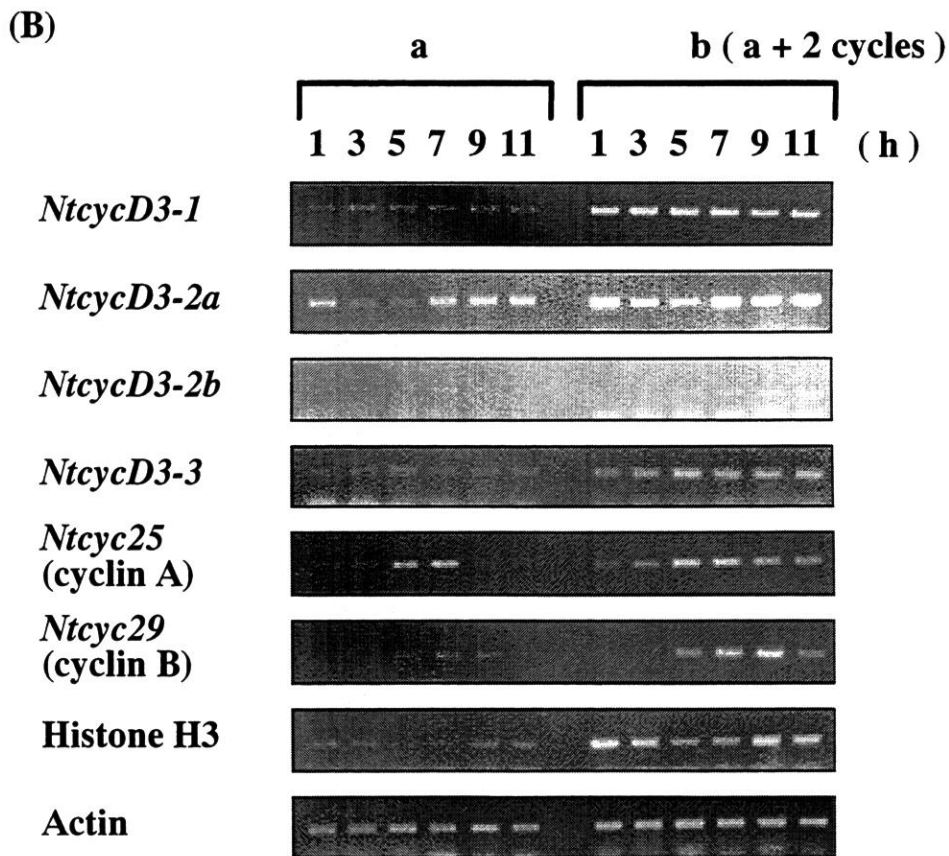
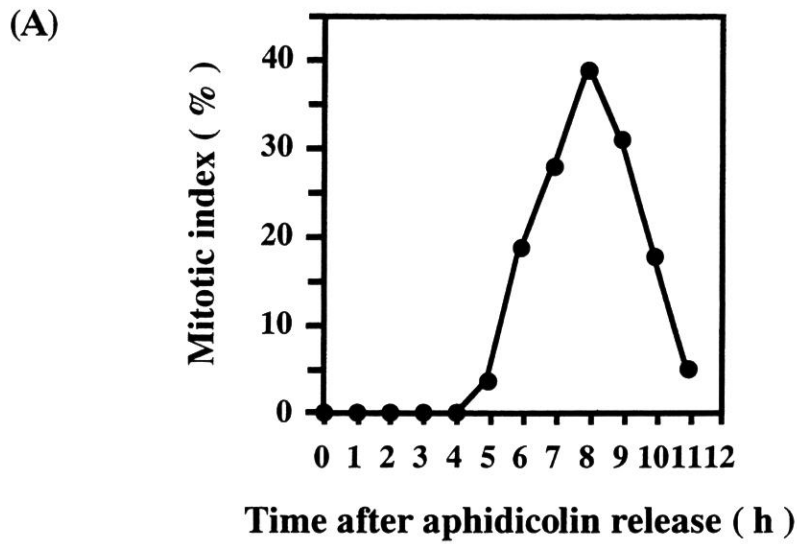


図4 タバコサイクリン遺伝子の細胞周期に伴う発現様式

(A) Mitotic index : タバコ培養細胞BY-2を細胞周期の進行をS期で阻害するアフィディコリンで処理し、洗浄除去後の経時的なM期の細胞の割合の変化を示した。

(B) RT-PCR : 同調化させた細胞より全RNAを調製し、RT-PCR法により各遺伝子の転写産物を検出した。bのレーンはPCRのサイクル数をaより2回増やした結果を示した。

1-3-2 タバコサイクリン D (NtcycD3-1) とタバコ Rb タンパク質 (NtRb1) の *in vitro* 結合解析

動物のサイクリンの中でサイクリン D のみが LXCXE 配列を介して Rb タンパク質のポケット領域と結合することが知られている^{12) 33)}。タバコのサイクリン D にもこの配列が保存されていることより、タバコより単離した Rb タンパク質のホモログ (NtRb1) と結合するかを組み換えタンパク質を用いて解析した。

NtcycD3-1 は N 末端側に Flag-tag を付加したものをバキュロウィルス発現系を用いて調製し、NtRb1 はポケット領域を含む C 末端側領域 (374-961 アミノ酸) の N 末端側に GST を融合させたものを大腸菌発現系を用いて調製した。それぞれのタンパク質を発現している細胞の粗抽出液を混合し、Flag-tag に対する抗体カラムにかけた。カラムにかけた混合液および溶出画分について抗 NtRb1 (654-671) 抗体を用いて Western 解析を行い、GST-NtRb1 を検出した。対照として非組み換え体ウィルスを感染させた細胞の粗抽出液を用いて同様に実験を行った。

図 5 に示すように、Flag-NtcycD3-1 を発現している抽出液と混合した場合にのみ溶出画分に GST-NtRb1 の存在が確認され、GST-NtRb1 が Flag-NtcycD3-1 と共に溶出されていることが分かった。このことよりタバコサイクリン D (NtcycD3-1) とタバコ Rb タンパク質 (NtRb1) が結合することが示唆された。

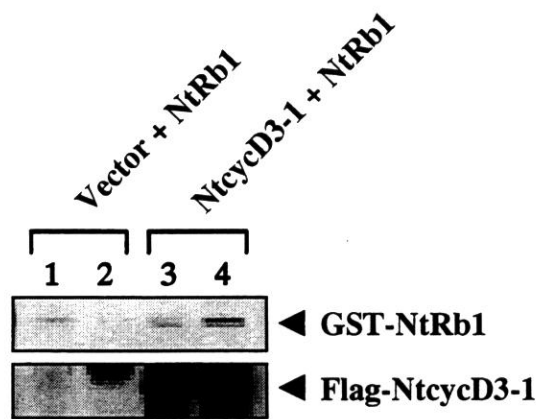


図5 NtcycD3-1とタバコRbタンパク質 (NtRb1) の *in vitro* 結合解析

GST-NtRb1を発現させた大腸菌の粗抽出液とFlag-NtcycD3-1を発現させた昆虫細胞の粗抽出液 (レーン3、4) またはベクターウィルスを感染させた昆虫細胞の粗抽出液 (レーン1、2) を混合し、Flag-tagに対する抗体カラムにかけた。カラムにかけた混合物 (レーン1、3) とカラムからの溶出画分 (レーン2、4) についてGST-NtRb1とFlag-NtcycD3-1をそれぞれ抗NtRb1抗体と抗Flag抗体を用いたWestern解析により検出した。

1-3-3 タバコサイクリン D (NtcycD3) とタバコ CDK (Ntcdc2a、Ntcdc2b) の *in vitro* 結合解析

高等植物より多種のサイクリンおよび CDK の類似遺伝子が単離されているが、いずれのサイクリンおよび CDK が複合体を形成するかは明らかにされていない。そこでタバコサイクリン D およびタバコ CDK をバキュロウィルス発現系を用いて共発現させ、昆虫細胞 (Sf9 細胞) 内で複合体を形成するか解析した。

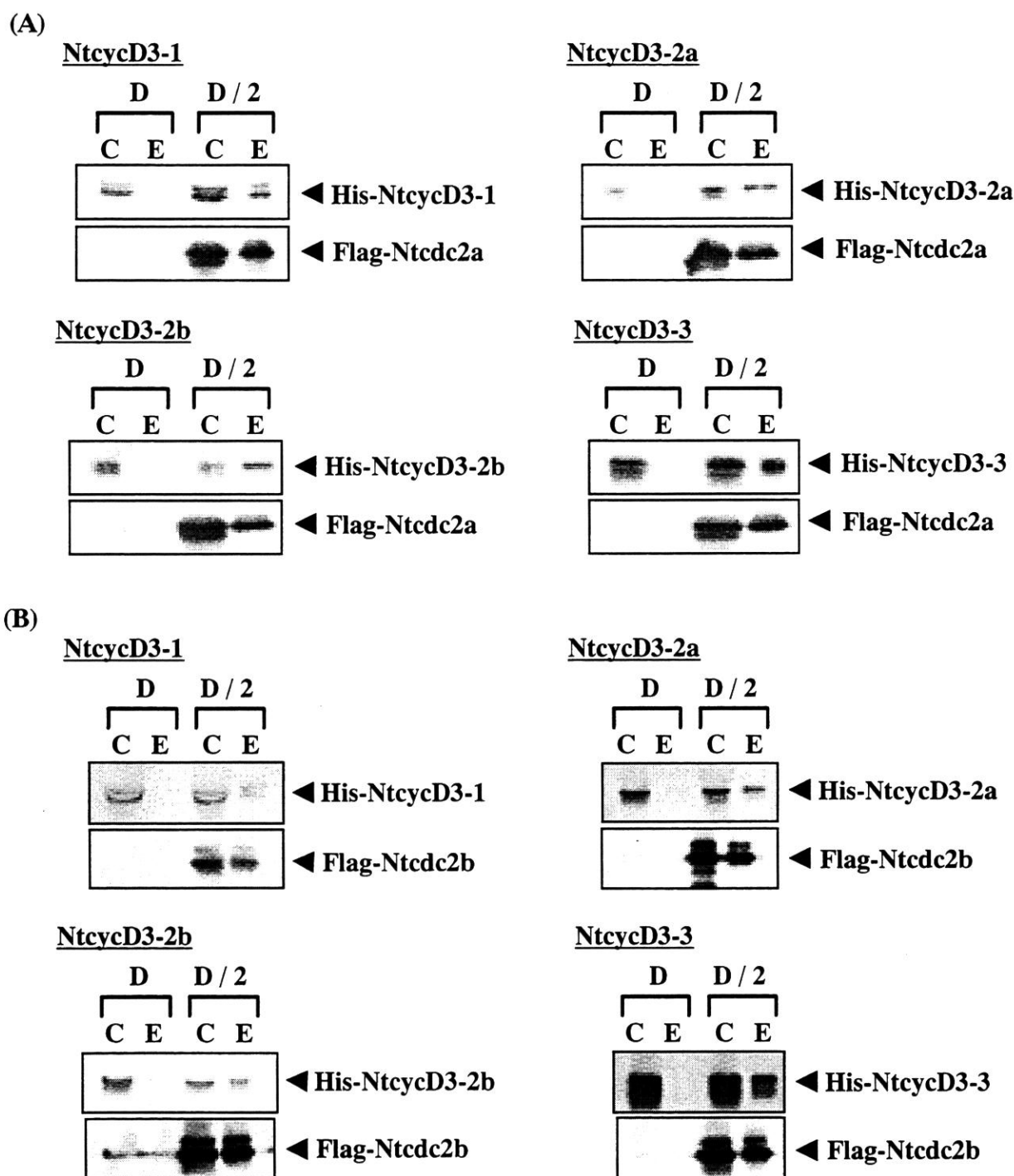


図6 タバコサイクリンD (NtcycD) とタバコCDK (Ntcdc2a, Ntcdc2b) の *in vitro* 結合解析
 (A) タバコサイクリンDとNtcdc2aの結合解析：昆虫細胞にHis-NtcycDとFlag-Ntcdc2aを共発現させ、Flag-tagに対する抗体カラムにかけた。粗抽出液 (C) とカラムからの溶出画分 (E) についてHis-NtcycDとFlag-Ntcdc2aをそれぞれ抗His抗体と抗Flag抗体を用いたWestern解析により検出した。対照としてHis-NtcycDを単独で発現させた細胞を用いて同様に行った。DのレーンはHis-NtcycDを単独で発現させた場合の結果を示し、D/2のレーンはHis-NtcycDとFlag-Ntcdc2aを共発現させた場合の結果を示す。

(B) タバコサイクリンDとNtcdc2bの結合解析：Aと同様である。

4種類のタバコサイクリンDはN末端側に His-tag を付加した組み換えタンパク質、2種類のタバコCDKはN末端側に Flag-tag を付加した組み換えタンパク質を昆虫細胞に発現させた。His-NtcycD3 と Flag-Ntcdc2 を共発現させた細胞の粗抽出液を Flag-tag に対する抗体カラムにかけ、粗抽出液および溶出画分について Western 解析を行い、抗 His 抗体を用いて His-NtcycD3 を検出した。対照として His-NtcycD3 を単独で発現させた細胞の粗抽出液を用いて同様に実験を行った。

図6に示すように、いずれの組み合わせにおいても、Flag-Ntcdc2 を共発現させた場合にのみ溶出画分に His-NtcycD3 が確認され、His-NtcycD3 が Flag-Ntcdc2 と共に溶出されていることが分かった。このことより4種類全てのタバコサイクリンDは2種類のタバコCDK (Ntcdc2a, Ntcdc2b) のいずれとも昆虫細胞内で複合体を形成することが示唆された。

1-3-4 タバコサイクリンD/CDK複合体 (NtcycD3/Ntcdc2) のキナーゼ活性の検出

4種類のタバコサイクリンDと2種類のタバコCDKは昆虫細胞内で複合体を形成することが分かった。そこで、これらの複合体がキナーゼ活性を有するか解析した。動物のサイクリンA,B/CDK複合体および酵母のサイクリン/CDK複合体の良い基質と成り得る Histone H1、動物のサイクリンD/CDK4,6の主たる基質と考えられる Rb タンパク質、そしてタバコ Rb タンパク質 (GST-NtRb1) を基質として用いた。動物の Rb タンパク質としてはヒト由来の Rb タンパク質の GST 融合タンパク質 (GST-HuRb) を大腸菌発現系を用いて調製したものを使用した。キナーゼ活性の測定は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用い、放射ラベルされたリン酸基の基質への取り込みにより検出した。

まず Flag-NtcycD3-1/His-Ntcdc2a 複合体のキナーゼ活性を解析した。図7Aに示すように、Flag-NtcycD3-1 または His-Ntcdc2a を単独で発現させた昆虫細胞の粗抽出液はキナーゼ活性を示さなかったのに対して、Flag-NtcycD3-1 と His-Ntcdc2a を共発現させたものは GST-NtRb1 (374-961)、GST-HuRb そして Histone H1 に対してキナーゼ活性を示した。一方、ヒトのサイクリンD1/CDK4複合体はこれまでの知見通り GST-HuRb に対してキナーゼ活性を示し、Histone H1 に対してキナーゼ活性を示さなかった^{9) 11) 12)}。また GST-NtRb1 (374-961) に対してもキナーゼ活性を示さなかった。

バキュロウィルス発現系では外来タンパク質を一定期間昆虫細胞内で強制的に発現させるため、Flag-NtcycD3-1/His-Ntcdc2a 複合体が昆虫細胞内のキナーゼを活性化している可能性が考えられる。そのため、His-tag および Flag-tag に対するアフィニティーカラムで精製したサンプルを用いて GST-NtRb1 に対するキナーゼ活性を解析した。その結果、精製サンプルを用いても NtcycD3-1/Ntcdc2a 複合体は GST-NtRb1 (374-961) と Histone H1 に対してキナーゼ活性を示した (図7B)。

残り3種類のタバコサイクリンD (NtcycD3-2a, NtcycD3-2b, NtcycD3-3) についても同様の解析を行った。ここではサイクリンDに His-tag、そして Ntcdc2a に Flag-tag を付加したものを用いた。いずれのタバコサイクリンD/Ntcdc2a 複合体も GST-NtRb1 (374-961)、GST-HuRb そして Histone H1 に対してキナーゼ活性を示した (図8A)。

次に Ntcdc2b との複合体のキナーゼ活性を解析した。いずれのタバコサイクリン

D/Ntcdc2b 複合体も GST-NtRb1 (374-961)、GST-HuRb そして Histone H1 に対してキナーゼ活性を示さなかった (図 8B)。

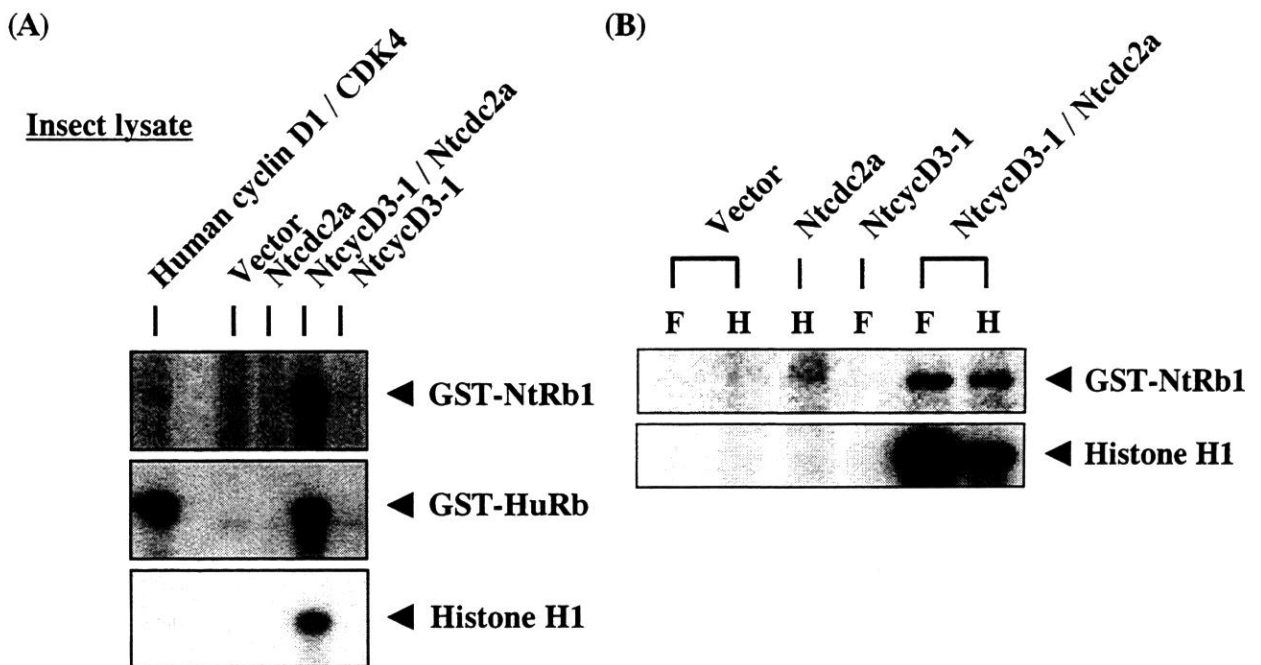


図7 NtcycD3-1/Ntcdc2a複合体のキナーゼ活性の検出

(A) 各組み換えタンパク質を発現させた昆虫細胞の粗抽出液を用いて放射ラベルしたリン酸基の取り込みによりNtRb1、HuRb、Histone H1に対するキナーゼ活性を検出した。Vectorは非組み換え体ウィルスを感染させた細胞の粗抽出液を示し、ネガティブコントロールとして用いた。/は2種類のタンパク質を共発現させたことを示す。NtcycD3-1にはFlag-tagを付加しており、Ntcdc2aにはHis-tagを付加している。

(B) アフィニティーカラムを用いて精製した組み換えタンパク質を用いてキナーゼ活性を検出した。HはHis-tagに対するアフィニティーカラムで精製したサンプルを用いたことを示し、FはFlag-tagに対するアフィニティーカラムで精製したサンプルを用いたことを示す。Vectorは非組み換え体ウィルスを感染させた細胞の粗抽出液から同様にアフィニティーカラムを用いて調製したサンプルを示し、ネガティブコントロールとして用いた。NtcycD3-1とNtcdc2aにはそれぞれFlag-tagとHis-tagが付加してあり、対応するアフィニティーカラムで精製した。NtcycD3-1/Ntcdc2a複合体は共発現させた細胞から2種類のアフィニティーカラムを用いて複合体として精製した。

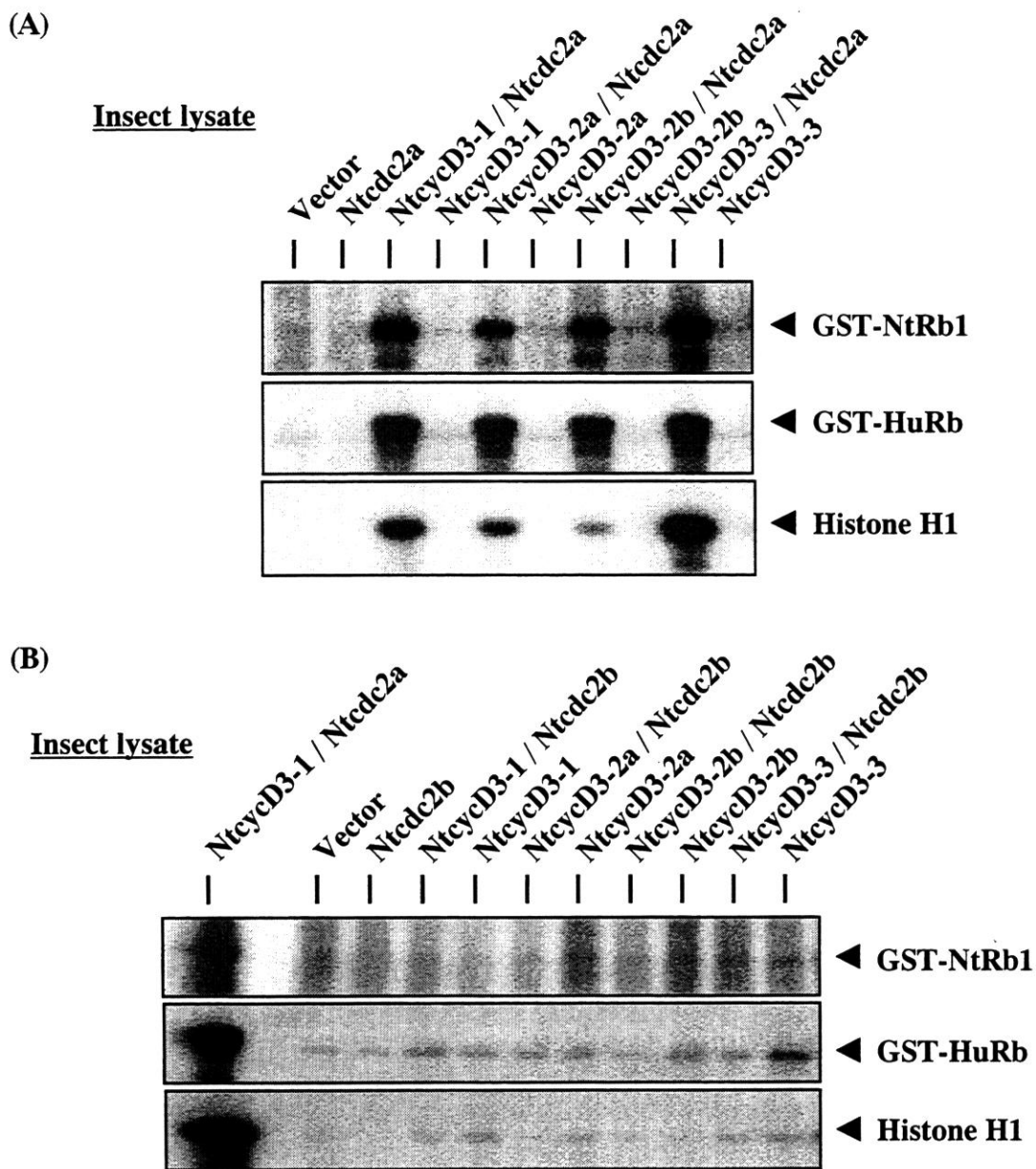


図8 タバコサイクリンD/CDK複合体のキナーゼ活性の検出

(A) Ntcdc2aとの複合体のキナーゼ活性：各組み換えタンパク質を発現させた昆虫細胞の粗抽出液を用いて放射ラベルしたリン酸基の取り込みによりNtRb1、HuRb、Histone H1に対するキナーゼ活性を検出した。Vectorは非組み換え体ウィルスを感染させた細胞の粗抽出液を示し、ネガティブコントロールとして用いた。//は2種類のタンパク質を共発現させたことを示す。

(B) Ntcdc2bとの複合体のキナーゼ活性：Aと同様に行った。

1-3-5 昆虫細胞内でのタバコサイクリン D/CDK 複合体 (NtcycD3-1/Ntcdc2a) の活性化の解析

動物および酵母のサイクリンと CDK は大腸菌発現系で調製し、混合してもキナーゼ活性は示さず、バキュロウィルス発現系を用いてサイクリンと CDK を共発現させるとキナーゼ活性を示す^{42) 43)}。動物および酵母において CDK の活性化にはサイクリンとの複合体の形成のみでは不十分であり、CDK 活性化キナーゼ (CDK-activating kinase; CAK) によりサイクリン/CDK 複合体の CDK がリン酸化される必要があり、バキュロウィルス発現系を用いた場合は昆虫細胞内の CAK がサイクリン/CDK 複合体を活性化することが明らかになっている。このような理由によりバキュロウィルス発現系を選択して上記の実験を行ってきた。そこで His-NtcycD3-1/Flag-Ntcdc2a 複合体も他の真核生物由来のサイクリン/CDK 複合体と同様に昆虫細胞内で活性化の制御を受けているか解析した。

His-NtcycD3-1 および Flag-Ntcdc2a をそれぞれ単独で発現させて精製した。精製物を混合して Histone H1 キナーゼ活性を解析した結果、活性は認められなかった (図 9)。このことよりタバコサイクリン D/CDK 複合体 (NtcycD3-1/Ntcdc2a) が昆虫細胞内で活性化されていることが示唆された。

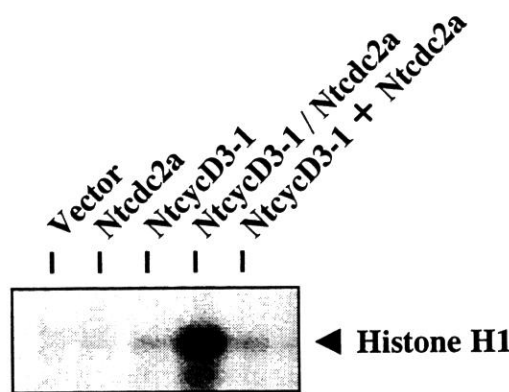


図9 昆虫細胞内におけるNtcycD3-1/Ntcdc2a複合体の活性化の解析

NtcycD3-1とNtcdc2aを昆虫細胞に単独で発現させ、精製したサンプルを混合し、Histone H1キナーゼ活性を示すか解析した。NtcycD3-1とNtcdc2aにはそれぞれHis-tagとFlag-tagを付加しており、それぞれのタグに対するアフィニティーカラムを用いて精製した。/はNtcycD3-1とNtcdc2aを共発現させ、昆虫細胞内で形成した複合体を精製したことを示す。+は単独で発現させたNtcycD3-1とNtcdc2aを精製後、混合したことを示す。

1-3-6 タバコサイクリン D/CDK 複合体 (NtcycD3-1/Ntcdc2a) の推定リン酸化部位がキナーゼ活性に及ぼす影響の解析

ヒトのサイクリン D1/CDK4 複合体の活性化にはサイクリン D1 と CDK4 に存在するそれぞれ 1 か所のリン酸化部位が関わっている (図 3)。まずサイクリン D1 の 156 番目のスレオニン残基が CDK4 と複合体を形成することにより自己リン酸化を受ける。次に CAK がサイクリン D1 のリン酸化を認識して CDK4 をリン酸化する。言い換えれば、サイクリン D1 の 156 番目のスレオニン残基がリン酸化されないと最終的にサイクリン D1/CDK4 複合体は活性化されない³⁹⁾。NtcycD3-1/Ntcdc2a 複合体が昆虫細胞内で活性化されることより、高等植物のサイクリン/CDK 複合体の活性化にも CAK が関与する機構が保存されていることが予想される。

(A)		T156		
Arath;CycD1;1	LSVLDWRLRSV	TP	FDFISFFAYKIDPSGTF LGFFISHATEIILSNIKEAS	223
Cheru;CycD2;1	LSTLKWRMQSV	TP	FSFIDYFLYKLS	226
Nicta;CycD2;1	LSTLKWRMQAY	TP	YTFIDYFMRKMN	214
Arath;CycD2;1	VTTLNWRLQAL	TP	FSFIDYFVDKIS	215
Nicta;CycD3;1	LSSLKWRMNPV	TP	LSFLDHIIRRLGLRNNIHWFLRRCENLLLSIMADCR	244
NtcycD3-2b	LSSLKWRMNPV	TP	LSFLDHIIRRLGLRNNIHWFLRRCENLLLSIMADCR	244
NtcycD3-2a	LSSLKWRMNPV	TP	LSFLDHIIRRLGLKNNVHWFLRRCESLLLSIMADCR	240
NtcycD3-1	LSSLKWRMNPV	TP	LSFVDHIIRRLGLKSHIHWFLKQCERILLVADCR	229
Arath;CycD3;1	LSTLEWKMHLI	TP	ISFVDHIIRRLGLKNAHWDFLNKCHRLLLSVSDSR	228
Nicta;CycD3;2	LSTLKWKMPV	TP	LSFIDHIMRRFGFMTNLHDLFRR CERLILGIITDSR	232
NtcycD3-3	LSTLKWKMPV	TP	FSFLDYFSRRLGFNNHICCELLRRCERVLLSTITDCR	224
(B)		T286		
Arath;CycD1;1	LNTPT	KV	IAKL—RVSVRASSTLTRPSDE—SSS	314
Cheru;CycD2;1	ASTSVP—Q	SP	IGVLDASACLSY—KSDDTSTPS—GSCGN	348
Nicta;CycD2;1	AASLVP—Q	SP	IGVLEAAACLSY—KSGDERTVGS—CTT	332
Arath;CycD2;1	AVRAVP—A	SP	VGVLEA—TCLSY—RSEE—RTVES—CTN	339
Nicta;CycD3;1	YENPS—H	SP	SGVID—PIYSSSESSNDSWDLESTSS—YFP	343
NtcycD3-2b	YENPS—H	SP	SGVID—PIYSSSESSNDSWDLESTSS—YFP	343
NtcycD3-2a	YENPS—S	SP	SGVID—PIYSSSESSNDSWDLESTSS—YFP	339
NtcycD3-1	YESPI—N	SP	SAVID—TFYSSSENSNESWDLQTSSSIPSTYSPRDQFLP	338
Arath;CycD3;1	SHDSSSLN	SP	SCVIDANPFNSDESSNDSWSASSCNPTSSSSP—QQQP	348
Nicta;CycD3;2	HQSVP—G	SP	SGVID—AYFSCDSSNDSWSVASSISS—PEP	338
NtcycD3-3	SIGALP—G	SP	VGVMD—VSFSSDSSDSSWAVASSVSST—PEP	328

図10 高等植物由来のサイクリンDに保存されている推定リン酸化部位

(A) ヒトのサイクリンD1の156番目のスレオニン残基に相当する推定リン酸化部位：推定リン酸化部位を四角で囲い、本論文で変異を加えたアミノ酸を下線で示した。Nictaはタバコ、Arathはシロイヌナズナ、Cheruはアカザを示した。

(B) ヒトのサイクリンD1の286番目のスレオニン残基に相当する推定リン酸化部位：Aと同様に示した。NtcycD3-1には2か所の推定リン酸化部位が存在していた。

タバコそして他の高等植物から単離されたサイクリン D にはヒトのサイクリン D1 の 156 番目のスレオニン残基に相当する推定リン酸化部位が高度に保存されていた (図 10A)³⁹⁾。そこで NtcycD3-1 の推定リン酸化部位である 191 番目のスレオニン残基を他のアミノ酸に置換した変異体を作製し、キナーゼ活性に及ぼす影響を解析した。まずスレオニン残基をリン酸化を受けないアミノ酸の代表として通常用いられているアラニン残基 (T191A) とグルタミン酸残基 (T191E) に置換した変異体を作製した。また、CDK はセリン残基またはスレオニン残基を特異的にリン酸化することから、スレオニン残基と同様に自己リン酸化されると考えられるセリン残基 (T191S) に置換した変異体も作製し、アミノ酸変異により大きく立体構造が変化していないことを検証する対照とした。

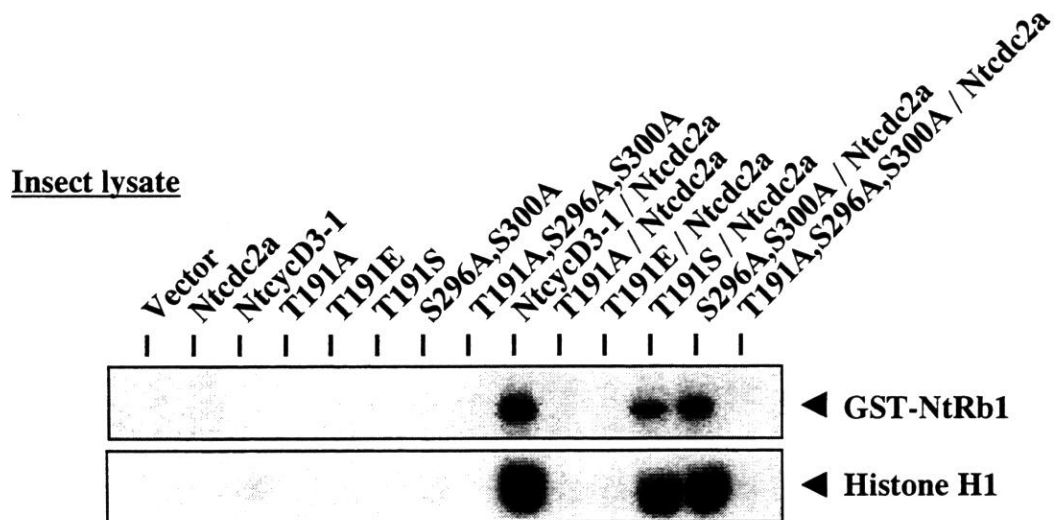
ヒトのサイクリン D1 において細胞内局在性および安定性に寄与している 286 番目のスレオニン残基に相当する推定リン酸化部位も高度に保存されていた (図 10B)^{40) 41)}。そこで、ヒトのサイクリン D1 の 286 番目のスレオニン残基に相当する NtcycD3-1 の 296 番目および 300 番目のセリン残基をアラニン残基に置換した変異体 (S296A, S300A)、そして 191 番目のスレオニン残基と 296 番目および 300 番目のセリン残基を全てアラニン残基に置換した変異体 (T191A, S296A, S300A) を作製した。

図 11A に示すように、His-NtcycD3-1 (T191A)、His-NtcycD3-1 (T191E) そして His-NtcycD3-1 (T191A, S296A, S300A) をそれぞれ Flag-Ntcdc2a と共発現させた細胞の粗抽出液はキナーゼ活性を示さなかった。それに対し、スレオニン残基と同様にリン酸化されると考えられるセリン残基に置換した変異体 (T191S) と Flag-Ntcdc2a を共発現させたものはキナーゼ活性を示した。実験に用いた粗抽出液中の NtcycD3-1 とその変異体のタンパク質量が同程度であることは Western 解析で確認した。しかし、この結果では変異体 (T191A、T191E、T191A, S296A, S300A) が Ntcdc2a との複合体形成能を失い、キナーゼ活性を示さない可能性が残される。そこで NtcycD3-1 (T191A) と Ntcdc2a が昆虫細胞内で複合体を形成しているか確認した。前述の結合解析と同様にアフィニティークラムを用いた実験を行った結果、NtcycD3-1 (T191A) は Ntcdc2a と複合体を形成していることが分かった (図 11C)。このことより NtcycD3-1 の 191 番目のスレオニン残基のリン酸化が NtcycD3-1/Ntcdc2a 複合体の活性化に必要であることが示唆された。

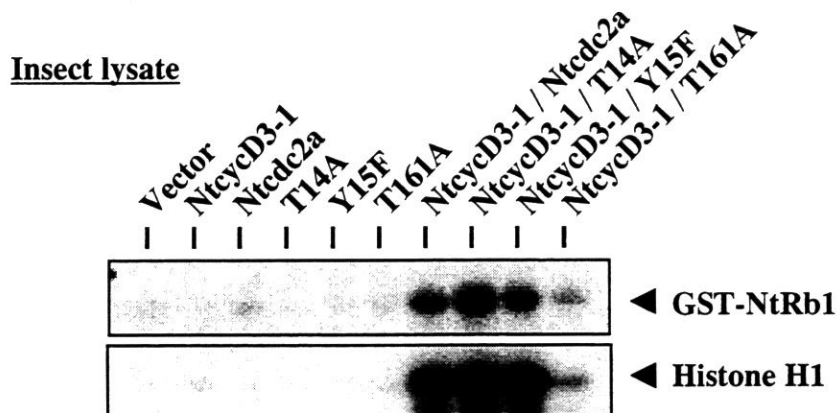
CAK による CDK の推定リン酸化部位も高等植物の CDK に高度に保存されている。そこで、Ntcdc2a の推定リン酸化部位である 161 番目のスレオニン残基をアラニン残基に置換した変異体 (T161A) を作製し、キナーゼ活性に及ぼす影響を解析した。また、動物および酵母においてリン酸化により活性が負に制御されることが分かっている 14 番目のスレオニン残基と 15 番目のチロシン残基をそれぞれアラニン残基 (T14A) とフェニルアラニン残基 (Y15F) に置換した変異体を作製した。

図 11B に示すように、His-NtcycD3-1 と Flag-Ntcdc2a (T161A) を共発現させた粗抽出液はキナーゼ活性を示さず、その他の変異体 (T14A、Y15F) ではキナーゼ活性を示した。実験に用いた粗抽出液中の Ntcdc2a とその変異体のタンパク質量が同程度であることは Western 解析で確認した。このことより Ntcdc2a の 161 番目のスレオニン残基のリン酸化が NtcycD3-1/Ntcdc2a 複合体の活性化に必要であることが示唆された。

(A)



(B)



(C)

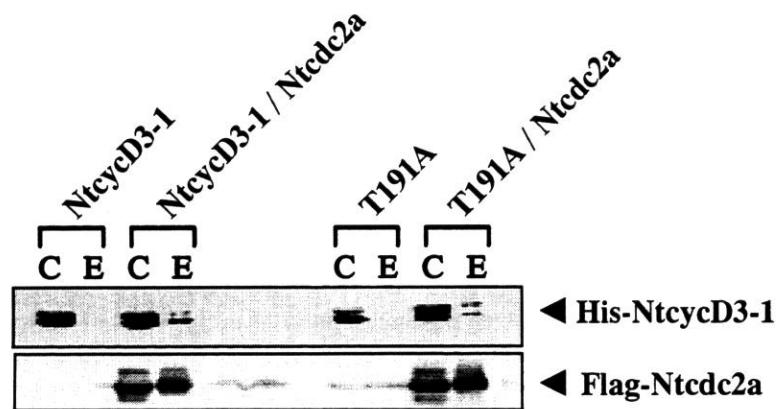


図11 推定リン酸化部位のアミノ酸置換変異体を用いた解析

(A) NtcycD3-1のリン酸化部位がキナーゼ活性に及ぼす影響の解析：各組み換えタンパク質を発現させた昆虫細胞の粗抽出液を用いて放射ラベルしたリン酸基の取り込みによりNtRb1、Histone H1に対するキナーゼ活性を検出した。各変異体の表記は例えばNtcycD3-1 (T191A)をT191Aと省略して示した。

(B) Ntcdc2aのリン酸化部位がキナーゼ活性に及ぼす影響の解析：Aと同様である。

(C) NtcycD3-1 (T191A)とNtcdc2aの結合解析：昆虫細胞にHis-NtcycD3-1 (T191A)とFlag-Ntcdc2aを共発現させ、Flag-tagに対する抗体カラムにかけた。粗抽出液 (C)とカラムからの溶出画分 (E)についてHis-NtcycD3-1 (T191A)とFlag-Ntcdc2aをそれぞれ抗His抗体と抗Flag抗体を用いたWestern解析により検出した。対照としてNtcycD3-1 (T191A)を単独で発現させた細胞を用いて同様に行った。

1-3-7 シロイヌナズナ由来の CAK (Cak1At) によるタバコサイクリン D/CDK 複合体 (NtcycD3-1/Ntcdc2a) の活性化の解析

高等植物ではシロイヌナズナとイネから CAK 類似遺伝子が単離されている^{44) 45)}。そこで、シロイヌナズナの CAK (Cak1At) が NtcycD3-1/Ntcdc2a 複合体を活性化できるか解析した。Cak1At は N 末端側に His-tag を付加したものをバキュロウィルス発現系を用いて調製した。NtcycD3-1 と Ntcdc2a は N 末端側に GST を融合させたものを大腸菌発現系を用いて調製した。

図 12 に示すように、GST-NtcycD3-1/GST-Ntcdc2a 複合体を Cak1At を発現している昆虫細胞の粗抽出液で処理した場合のみ Histone H1 に対してキナーゼ活性が認められた。このことより NtcycD3-1/Ntcdc2a 複合体が Cak1At によって活性化されることが示唆された。また GST-NtcycD3-1 (T191A) /GST-Ntcdc2a 複合体は活性化されなかったことより、Cak1At による活性化に NtcycD3-1 の 191 番目のスレオニン残基のリン酸化が必要であることが示唆された。

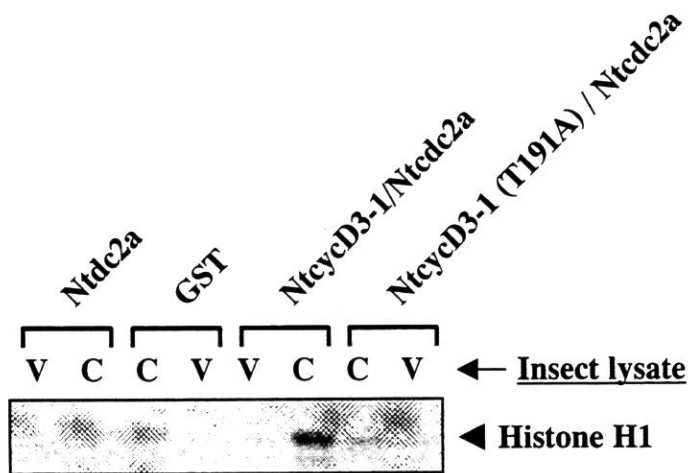


図12 シロイヌナズナ由来のCAK (Cak1At) によるNtcycD3-1/Ntcdc2a 複合体の活性化

大腸菌発現系を用いて調製した GST-NtcycD3-1/GST-Ntcdc2a複合体をCak1Atを発現させた昆虫細胞の粗抽出液 (C) または非組み換え体ウィルスを感染させた細胞の粗抽出液 (V) で処理した後、Histone H1に対するキナーゼ活性を検出した。

1-4 考 察

高等植物から単離されたサイクリンはアミノ酸配列をもとにサイクリンA、サイクリンBそしてサイクリンDのいずれかに分類されている¹⁵⁾ (表1)。この分類は動物のサイクリンを指標に行われており、動物ではサイクリンAとサイクリンBはM期サイクリン、サイクリンDはG1サイクリンとして細胞周期の進行を制御している。アミノ酸配列による分類にも関わらず、高等植物のサイクリンAとサイクリンBの発現の細胞周期特異性は動物細胞の場合とほぼ同様であることが示され、機能的にも類似していることが推察された。しかし、サイクリンDに分類されたものの中には動物のサイクリンDと異なった性質を示すものが認められ始めており、この分類法に基づく高等植物のサイクリンDが動物のサイクリンDに相当するものであるかは疑問である。動物に存在する種々のG1およびM期サイクリンの中でサイクリンDは大きく2つの特徴を有している。1つはG1/S移行期に特異的にCDK4またはCDK6と活性型の複合体を形成するが、その発現量は細胞周期に依存せず、増殖因子でのみ発現が誘導されることである^{5) 6) 7) 8)}。もう1つはLXCXE配列を介してRbタンパク質と物理的に結合することができ、サイクリンD/CDK複合体がRbタンパク質を良い基質とすることである^{12) 33)}。そこで本章では最初に、この2点に着目して私達が単離した4種類のタバコサイクリンDの特徴付けを行った。

高等植物由来のサイクリンDは発現様式により3つのタイプに分類できる

タバコ培養細胞BY-2をDNA合成阻害剤を用いてS期初期に集積させ、S期からM期にかけてのタバコサイクリンDの発現様式の周期特異性を解析した結果、*NtcycD3-1*と*NtcycD3-3*のmRNAの蓄積量は細胞周期に依存して変化せず、一定であった(図4)。これは動物のサイクリンDの発現様式と同じであり、Sorrellらがタバコから単離した*Nicta;CycD3;2*そしてシロイヌナズナの*Arath;CycD2;1*と*Arath;CycD3;1*も同様な発現様式を示した^{31) 37)}。動物のサイクリンDの発現は細胞周期には依存しないが増殖因子により誘導され、細胞の増殖が停止しているG0期の細胞に血清刺激を行い、細胞増殖を開始させるとDNA合成に先だってサイクリンDの発現が誘導されることが知られている。そこで高等植物においても、動物細胞での方法に準じ、貧栄養状態にあり増殖が停止している培養細胞を新鮮な培地に移した後の発現量の変化がタバコ、シロイヌナズナそしてアルファルファで解析され、*Nicta;CycD3;2* (タバコ)、*Arath;CycD3;1* (シロイヌナズナ)そして*Medsa;CycD3;1* (アルファルファ)の発現量がS期に誘導されるHistone H3, H4遺伝子より早い時期に増加することが報告された^{30) 31) 37)}。また、シロイヌナズナの*Arath;CycD2;1*と*Arath;CycD4;1*は炭素源であるショ糖により発現が誘導され、*Arath;CycD3;1*は植物ホルモンであるサイトカイニンにより発現が誘導されることが示された^{29) 38)}。

一方、*NtcycD3-2a*と*NtcycD3-2b*のmRNAの蓄積量は細胞周期に依存して変化した(図4)。*NtcycD3-2b*のmRNAの蓄積量はG2/M移行期に最大になった。*NtcycD3-2b*はSorrellらが単離した*Nicta;CycD3;1*と同一の遺伝子であり、Sorrellらもタバコ培養細胞

BY-2 を用いた Northern 解析により同じ結果を示している³¹⁾。また Sorrell らは *Nicta;CycD2;1* も mRNA の蓄積量が G2/M 移行期に最大になると報告している³¹⁾。一方 *NtcycD3-2a* の mRNA の蓄積量は S 期後期から M 期初期にかけて減少した。以上の解析では M 期から次の S 期までの発現量に関する情報が得られない。そこで細胞分裂阻害剤を用いて M 期に集積させて同調化した細胞を用い、M 期から S 期にかけて *NtcycD3-2a* の mRNA の蓄積量を解析した。予備的な実験結果のためデータは示さないが、M 期に mRNA の蓄積が認められ、その後 mRNA の蓄積量は減少し、G1/S 移行期に再び増加した。つまり *NtcycD3-2a* の mRNA の蓄積量は G1/S 移行期と G2/M 移行期の 2 つの時期に増加することが示唆された。他の高等植物由来のサイクリン D ではアルファアルファの *Medsa;CycD3;1* が同様な発現様式を示すことが報告されている³⁰⁾。

発現様式の解析で得られた知見を総合すると、高等植物のサイクリン D は大きく 3 つのタイプに分類できる。1) 発現量が細胞周期に依存せず植物ホルモンや栄養素により発現が誘導される A-type (*NtcycD3-1*, *NtcycD3-3*, *Nicta;CycD3;2*, *Arath;CycD2;1*, *Arath;CycD3;1*)、2) G2/M 移行期に mRNA の蓄積量が増加する B-type (*NtcycD3-2b*, *Nicta;CycD2;1*)、3) G1/S および G2/M 移行期に mRNA の蓄積量が増加する C-type (*NtcycD3-2a*, *Medsa;CycD3;1*)、である (本論文において仮にタイプを命名した)。A-type のサイクリン D は動物のサイクリン D と同様の働きを担い、細胞外シグナルのセンサーとして機能することにより、細胞が分裂もしくは細胞増殖を停止して分化・老化等の細胞応答へと向かうのを決定していると考えられる。A-type である *Arath;CycD3* をシロイヌナズナで構成的に発現させると、葉からのカルス形成の誘導には、植物ホルモンであるサイトカイニンが必要とされなくなることが報告された²²⁾。これは高等植物においてもサイクリン D が細胞外からのシグナルを受け取り、細胞増殖を制御する役割を果たしていることを示す非常に興味深い結果である。高等植物に特有な B-type および C-type の機能に関する結果を示す報告は未だなく、その役割を推察するのは困難であるが、動物における知見をもとに次のようなことが考えられる。動物細胞では細胞周期が G1 期から S 期へと移行するには Rb タンパク質がサイクリン D/CDK4,6 複合体によりリン酸化される必要があり、サイクリン D1/CDK4,6 複合体は G1 期後期に特異的に活性化される。Rb タンパク質はその後速やかに脱リン酸化されるわけではなく、M 期後期まで高リン酸化状態で保たれており、S 期に移行した後の細胞に Rb タンパク質を強制発現させると細胞は G2 期から M 期へと移行しなくなることが示され、G2/M 移行期にも Rb タンパク質に対するキナーゼ活性が必要であることが分かっている⁴⁸⁾。サイクリン A,B/CDK 複合体も *in vitro* の再構成系では Rb タンパク質に対するキナーゼ活性を示すことより、サイクリン A,B/CDK 複合体がこの役割を担っていることも考えられるが、サイクリン D3/CDK4 複合体の活性も G2 期から M 期への移行に必要であることが示された⁴⁹⁾。従って、高等植物での Rb タンパク質の機能は未だ不明であるが、B-type のサイクリン D は動物のサイクリン D3 のように G2/M 移行期において、Rb タンパク質をリン酸化する活性を有する複合体を形成して細胞周期の進行を制御している可能性がある。C-type のサイクリン D も G2/M 期においては B-type のものと同様の役割を果たしているかもしれない。動物に存在するもう一つの G1 サイクリンであるサイクリン E は、

サイクリン D/CDK4,6 複合体が活性化された結果、発現が誘導されて CDK2 と複合体を形成し、Rb タンパク質をより高度にリン酸化することにより細胞周期を G1 期から S 期へと移行させる^{50) 51)}。C-type のサイクリン D は G1/S 移行期においては A-type のサイクリン D/CDK 複合体によりその発現が制御され、動物のサイクリン E のように細胞周期の進行の制御に関与していることが考えられる。また、Rb タンパク質には多数のリン酸化部位が存在し、動物細胞ではサイクリン D/CDK4,6 複合体とサイクリン E/CDK2 複合体により異なる部位がリン酸化され、Rb タンパク質の機能 (histone deacetylase との結合能、E2F との結合能) が段階的に細かく制御されることが報告されていることより⁵²⁾、高等植物のサイクリン D はそれぞれのタイプで Rb タンパク質に対するリン酸化の特異性が異なり、各々が Rb タンパク質の異なる機能を制御している可能性も考えられる。

本研究では主に S 期から M 期にかけての発現様式の周期特異性しか解析を行っておらず、不明な点を多く残している。しかし他の高等植物で得られた知見とあわせることにより、高等植物のサイクリン D は大きく 3 つのタイプに分類できるものと考えた。私達が単離した 4 種類のタバコサイクリン D には分類した全てのタイプが含まれていることより、各遺伝子のプロモーターを取得して詳細な発現解析を行うことにより、高等植物においてサイクリン D が細胞周期進行のいずれの時期の制御を担っているのか、どのような細胞外シグナルを感知して細胞の増殖・分化等の方向性を決定するか等が総合的に明らかになると考えられ、早急な解析が望まれる。

高等植物においてもサイクリン D は Rb タンパク質と結合する

組み換えタンパク質を用いて A-type のタバコサイクリン D である NtcycD3-1 とタバコから単離した Rb タンパク質 (NtRb1) の結合解析を行った。NtcycD3-1 は全長の N 末端側に Flag-tag を付加したもの、NtRb1 はポケット領域を含む C 末端側領域 (374-961 アミノ酸) の N 末端側に GST を融合させたものを用いて実験を行った結果、NtcycD3-1 と NtRb1 は結合することが分かった (図 5)。これまでに Ach らが酵母の Two-hybrid 法を用いた解析によりシロイヌナズナのサイクリン D (Arath;CycD3;1) がトウモロコシの Rb タンパク質 (RRB1) およびヒトの Rb タンパク質と結合することを報告した³⁵⁾。Arath;CycD3;1 と RRB1 の結合よりは弱いもののシロイヌナズナのサイクリン B (Arath;CycB1;1) も RRB1 と結合することが示された。また、組み換えタンパク質を用いた *in vitro* の結合解析によっても、Arath;CycD3;1 が RRB1 と結合することが示された。Huntley らもシロイヌナズナの 3 種類のサイクリン D (Arath;CycD1;1、Arath;CycD2;1、Arath;CycD3;1) がトウモロコシの Rb タンパク質 (ZmRb1) およびヒトの Rb タンパク質と結合することを *in vitro* の結合解析により示した³⁴⁾。本論文には結果は示していないが、私達は酵母の Two-hybrid 法を用いた結合解析によっても NtcycD3-1 と NtRb1 が結合することを確認した²⁷⁾。タバコサイクリン A (Ntcyc27) も弱いながら NtRb1 と結合することが分かった。また、私達が単離した 4 種類のタバコサイクリン D の中で NtcycD3-3 だけは Rb タンパク質との結合に必要とされている LXCXE 配列が正確に保存されておらず、グルタミン酸 (E) が同じ酸性アミノ酸であるアスパラギン酸 (D) に

置換した LXCXD になっていたが、酵母の Reverse two-hybrid 法を用いた解析により NtcycD3-3 が NtcycD3-1 と同様に NtRb1 と結合することが分かった。LXCXE 配列と Rb タンパク質のポケット領域の相互作用については、ヒトの Rb タンパク質とヒトパピローマウィルスの LXCXE 配列を含む部分配列を材料とした結晶構造解析により詳細に調べられており、A および B ポケット領域に存在する cyclin-fold (five-helix structural motif) 構造が LXCXE 配列との結合に重要であり、B ポケット領域が LXCXE 配列と結合し、A ポケット領域がそれを安定化させていることが分かっている⁵³⁾。しかし、NtRb1 の B ポケット領域は他の Rb タンパク質より短く、LXCXE 配列との結合に重要とされている構造の一部 ($\alpha 15$ から $\beta 1$ に相当する領域) が存在しないことがアミノ酸配列をもとに予測され、タバコではサイクリン D と Rb タンパク質との結合には、ヒトで重要とされている B ポケット領域に存在する全ての構造が必要ではないことが示唆された。しかし、このことが LXCXE 配列を有するタンパク質とポケット領域を有するタンパク質との相互作用において普遍的な現象であるかは分からない。既に Ach や Huntley らによって高等植物でもサイクリン D と Rb タンパク質が結合することは示唆されていたが、いずれも異なる生物種由来の因子を用いて解析を行っており、同じ植物 (タバコ) 由来の因子を用いてサイクリン D と Rb タンパク質が結合することを示したのは本論文が初めてである。高等植物でもサイクリン D が Rb タンパク質と結合することが分かったことより、高等植物のサイクリン D/CDK 複合体も Rb タンパク質を良い基質に出来ると考えられた。

なお、本研究では NtcycD3-2a や NtcycD3-2b についての解析を行っていないが、いずれも LXCXE 配列を有していることより、NtcycD3-2a と NtcycD3-2b も Rb タンパク質と結合すると考えられる。しかし、高等植物に特有のサイクリン D と考えられる NtcycD3-2a と NtcycD3-2b が、NtcycD3-1 と同様に Rb タンパク質と相互作用するかは非常に興味深く、今後詳細な解析が望まれる。

高等植物ではサイクリン D は a-type の CDK と活性のある複合体を形成する

高等植物からはサイクリン D の他に M 期サイクリンであるサイクリン A、サイクリン B に分類されるものが数多く単離されている¹³⁾。CDK も続々と単離されており、CDK-a、CDK-b1 そして CDK-b2 の 3 種類に大きく分類されている (表 1)¹³⁾。CDK-a には動物および分裂酵母の Cdc2 に存在するサイクリンとの結合に関与している PSTAIRE 配列が保存されており、細胞周期に伴う発現様式も動物および分裂酵母の Cdc2 と同様で細胞周期を通じて一定である¹⁵⁾。興味深いことに CDK-b1 および CDK-b2 は高等植物でのみ見出されている種類の CDK である^{13) 15) 54) 55) 56) 57)}。CDK-b1 の特徴は PSTAIRE 配列が PPTALRE になっており、S 期から M 期にかけて発現する。CDK-b2 は PSTAIRE 配列が PPTTLRE になっており、G2/M 期に発現すると考えられている。タバコからは CDK-a に属する Ntcdc2a と CDK-b1 に属する Ntcdc2b の 2 種類が単離されている^{13) 26)}。このような状況にも関わらず、高等植物ではいずれのサイクリンと CDK が活性のある複合体を形成するか分かっていない。そこで *in vitro* の再構成系でタバコのサイクリン D/CDK 複合体のキナーゼ活性の検出を試みた。

動物のサイクリン/CDK 複合体の研究において活性のある複合体の調製に成功しているバキュロウィルス発現系を用いてタバコのサイクリンおよび CDK の調製を行った。バキュロウィルス発現系は、複数のタンパク質を同時に発現させて複合体を再構成でき、リン酸化等の点で動物細胞と同様のタンパク質修飾が起こるといった利点を有している。サイクリンと CDK を昆虫細胞に共発現した結果、4 種類のタバコサイクリン D は全て Ntcdc2a と Ntcdc2b のいずれとも複合体を形成した (図 6)。そこでこれらの複合体を用い、タバコの Rb タンパク質 (NtRb1)、Histone H1 そしてヒトの Rb タンパク質 (HuRb) に対するキナーゼ活性を放射ラベルしたリン酸基の取り込みにより解析した。実験系の確認も含めて、HuRb に対してはキナーゼ活性を示すが Histone H1 に対してはキナーゼ活性を示さないヒトのサイクリン D1/CDK4 複合体も用いた^{9) 11) 12)}。その結果、4 種類のタバコサイクリン D と Ntcdc2a の複合体は全て NtRb1、Histone H1 そして HuRb に対してキナーゼ活性を示した (図 8A)。この結果は高等植物由来のサイクリンと CDK の組み合わせを初めて明らかにしたことになり、その意義は非常に大きいと考えられる。動物のサイクリン D は CDK4 または CDK6 とのみ複合体を形成し、Cdc2 とは活性のある複合体を形成できないが、タバコではサイクリン D は動物および分裂酵母の Cdc2 に相当すると考えられる a-type の CDK と複合体を形成してキナーゼ活性を示すことが分かった。Veylder らは酵母の Two-hybrid 法を用いた解析によりシロイヌナズナのサイクリン D (Arath;CycD1;1 と Arath;CycD4;1) がシロイヌナズナの a-type の CDK と結合することを示した^{38) 39)}。このことより高等植物では普遍的にサイクリン D は a-type の CDK と複合体を形成することが考えられた。一方、Ntcdc2b との複合体は全てキナーゼ活性を示さなかった (図 8B)。また、同条件下でヒトのサイクリン D1/CDK4 複合体は HuRb に対してのみキナーゼ活性を示した (図 7A)。タバコのサイクリン D/CDK 複合体がタバコとヒトの Rb タンパク質の両者に対してキナーゼ活性を示したのに対して、ヒトのサイクリン D/CDK 複合体はヒトの Rb タンパク質に対してのみキナーゼ活性を示したのは非常に興味深い。このことはタバコのサイクリン D/CDK 複合体がタバコの Rb タンパク質に対する基質特異性を有していることを示唆している。換言すれば、NtRb1、Histone H1 および HuRb の全てに対してキナーゼ活性を示したことは、タバコのサイクリン D/CDK 複合体の特定の基質に対する特異性がヒトのサイクリン D/CDK 複合体と比較して低いとも言える。Huntley らは同様の系を用いて動物のサイクリン D/CDK4 複合体、サイクリン E/CDK2 複合体そしてサイクリン A/CDK2 複合体のトウモロコシの Rb タンパク質 (ZmRb1) に対するキナーゼ活性を解析しており、3 種類の動物のサイクリン/CDK 複合体が全てヒトまたはトウモロコシの Rb タンパク質に対して同程度にキナーゼ活性を有するという結果を示した³⁴⁾。前述したように LXCXE 配列を有するタンパク質 (この場合はサイクリン D) と Rb タンパク質との結合にはポケット領域の構造が重要である。NtRb1 (タバコ)、ZmRb1 (トウモロコシ) そして HuRb1 (ヒト) の3者の中で NtRb1 のみが B ポケット領域に存在する構造の一部が保存されていない。この違いがヒトのサイクリン D/CDK4 複合体の NtRb1 と ZmRb1 に対する基質特異性の差として表れた可能性がある。

タバコサイクリン D と Ntcdc2b の複合体がキナーゼ活性を示さなかったのには次の 4

つの原因が考えられる。1) Rb タンパク質または Histone H1 を基質に出来ない、2) サイクリン D とは活性のある複合体を形成できない、3) パキユロウィルス発現系では形成された複合体が活性化されない、4) 実験系に不備があった、ことである。まず 1) の可能性については、同じ b-type (サブタイプは異なるが) の Cdc2MsF (CDK-b2 に属するアルファルファの CDK) が Histone H1 に対してキナーゼ活性を示すこと⁵⁵⁾、また本論文において結果は示さないが、抗 Ntcdc2b 抗体を用いたタバコ培養細胞 BY-2 の粗抽出液からの免疫沈降物が Histone H1 キナーゼ活性を示したことより否定される。パキユロウィルス発現系を用いて調製した Ntcdc2b の大きさが推定分子量程度であったことや、実験に用いたコンストラクトの塩基配列の確認も行っていることより 4) の可能性は低いと思われる。b-type の CDK は S~M 期または G2/M 期に mRNA の蓄積が認められることより、その時期に機能すると考えられるサイクリン A またはサイクリン B と活性のある複合体を形成する可能性は高いと思われ、2) の可能性は十分考えられる。ただしデータは示さないが、Ntcyc25 (タバコサイクリン A) は Ntcdc2b と複合体を形成したがキナーゼ活性を示さなかった。現在、他のタバコサイクリン A (Ntcyc27) とタバコサイクリン B (Ntcyc29) についても解析を試みている。私達が単離したものと異なるサイクリン D がタバコより単離されていることや³¹⁾、未だ単離されていないサイクリンが存在する可能性を考えると断言は出来ないが、Ntcyc27 と Ntcyc29 のいずれもが Ntcdc2b と活性のある複合体を形成できなかった場合は、3) の可能性が残る。後述するが、タバコサイクリン D と Ntcdc2a の複合体は昆虫細胞内の活性化因子により活性化されることが分かり、更に高等植物にもサイクリン/CDK 複合体を活性化する制御機構が存在することが示唆された。このことよりサイクリン/Ntcdc2b 複合体も何らかの活性制御を受けていると考えられるが、Ntcdc2b は高等植物に特有の CDK であることから、昆虫細胞、言い換えれば動物細胞の活性化因子により活性化されず、パキユロウィルス発現系を用いても活性のある複合体を調製できなかった可能性が高い。

何にせよ、ここで特記すべき点は、活性のある複合体を形成できるサイクリンと CDK の組み合わせを高等植物において初めて同定したことにある。しかも、動物細胞ではサイクリン D と複合体を形成できないタイプの CDK とタバコサイクリン D は複合体を形成し、キナーゼ活性を示すことを明らかにした。さらに Rb タンパク質に対するキナーゼ活性を検出したことも高等植物において初めてであり、高等植物でも Rb タンパク質がサイクリン/CDK 複合体によるリン酸化により活性が制御され、細胞周期の調節に関与している可能性が示された。このことより、Rb タンパク質が関与する G1/S 移行期の制御機構は動物と高等植物が進化上分岐する以前から存在することが示唆された。この機構は動物と高等植物というかけ離れた生物界で保存されており、しかもサイクリン D と Rb タンパク質はゲノム解析が完了した酵母には存在しないことより、多細胞生物の細胞周期制御機構において非常に重要な機構であることが示唆される。

高等植物由来のサイクリン D/CDK 複合体の活性にはリン酸化が関与している

キナーゼ活性を解析するためのタンパク質の調製法としてパキユロウィルス発現系を選択したのは、リン酸化等の点で動物細胞と同様のタンパク質修飾が起こるという利点

を有しているからであると前述したが、実際にこの方法を用いて調製した動物のサイクリン/CDK 複合体は昆虫細胞の CDK 活性化キナーゼ (CDK-activating kinase; CAK) によりリン酸化を受けて活性化されていることが分かっている^{42) 43)}。ヒトのサイクリン D1/CDK4 複合体は2段階のリン酸化の過程を経て活性化される(図 3A)。まずサイクリン D1 の 156 番目のスレオニン残基が CDK4 と複合体を形成することにより自己リン酸化を受け、次に CAK がサイクリン D1 のリン酸化を認識して CDK4 の 172 番目のスレオニン残基をリン酸化する³⁹⁾。高等植物のサイクリン D および CDK のアミノ酸配列を比較すると両者共に活性化に寄与していると考えられる推定リン酸化部位が高度に保存されていた(図 10)。そこでタバコのサイクリン D/CDK 複合体も同様に昆虫細胞内で活性化されるのか解析した。本研究では、発現様式とアミノ酸配列の情報をもとに動物のサイクリン D に機能的に最も近いと考えられる NtcycD3-1 を代表として選択し、NtcycD3-1/Ntcdc2a 複合体の活性化機構の解析を行った。

最初にタバコのサイクリン D および CDK をそれぞれ単独で発現させたものを混合してキナーゼ活性を解析した。その結果、単独で発現させたサイクリンと CDK の混合物はキナーゼ活性を示さず、タバコのサイクリン D/CDK 複合体が昆虫細胞内で活性化されていることが分かった(図 9)。そこでタバコのサイクリン D/CDK 複合体の活性化にもリン酸化による制御が関与しているかを、推定リン酸化部位のアミノ酸置換変異体を作製し、それらを用いてキナーゼ活性を検討することにより解析した。NtcycD3-1 についてはヒトのサイクリン D1 の 156 番目のスレオニン残基に相当する 191 番目のスレオニン残基をリン酸化を受けないアラニン残基 (T191A) とグルタミン酸残基 (T191E) に置換した変異体と、CDK がセリン残基またはスレオニン残基を特異的にリン酸化することよりスレオニン残基と同様にリン酸化されると考えられるセリン残基 (T191S) に置換した変異体を作製した^{27) 39)}。更にヒトのサイクリン D1 で安定性と局在性に関与している 286 番目のスレオニン残基に相当する 296 番目および 300 番目のセリン残基をアラニン残基に置換した変異体 (S296A, S300A)、そして 191 番目のスレオニン残基と 296 番目および 300 番目のセリン残基を全てアラニン残基に置換した変異体 (T191A, S296A, S300A) を作製した^{40) 41)}。Ntcdc2a については CAK による推定リン酸化部位である 161 番目のスレオニン残基をアラニン残基に置換した変異体 (T161A) と動物および酵母においてリン酸化により活性が負に制御されることが分かっている 14 番目のスレオニン残基と 15 番目のチロシン残基をそれぞれアラニン残基 (T14A) とフェニルアラニン残基 (Y15F) に置換した変異体を作製した²⁶⁾。NtcycD3-1 の 191 番目のスレオニン残基をリン酸化を受けないアラニン残基またはグルタミン酸残基に置換した変異体を用いると Ntcdc2a との複合体のキナーゼ活性が消失した(図 11A)。NtcycD3-1 (T191A) に関しては NtcycD3-1 と同様に Ntcdc2a と複合体を形成できることを確認した(図 11C)。そして Ntcdc2a の 161 番目のスレオニン残基をリン酸化を受けないアラニン残基に置換した変異体と NtcycD3-1 の複合体もキナーゼ活性を示さなかった(図 11B)。これに対し、他の変異体の複合体がキナーゼ活性を示すこと、更に活性を示さない変異体も複合体を形成できることより、アミノ酸置換によりタンパク質の構造が大きく変化し、その結果、活性が消失したという可能性は極めて低い。つまり NtcycD3-1

の191番目のスレオニン残基と Ntcdc2a の161番目のスレオニン残基のリン酸化が Ntcdc3-1/Ntcdc2a 複合体の活性化に必要であると言える。データは示さないが、放射ラベルしたリン酸基の取り込み実験で Ntcdc2a が Ntcdc3-1 を基質にしてリン酸化するという結果が得られている。これらの結果を総合するとタバコのサイクリン D/CDK 複合体も他の真核生物のサイクリン/CDK 複合体と同様にリン酸化により活性が制御されており、まずサイクリン D が複合体を形成した CDK によりリン酸化され、次にそれを認識して CAK により CDK がリン酸化され、最終的な活性化型になると考えられる。更に、このことより高等植物にも CAK が関与するサイクリン D/CDK 複合体の活性制御機構が保存されていると考えられる。

高等植物由来のサイクリン/CDK 複合体も CAK により活性化される

リン酸化部位の変異体を用いた解析と他の真核生物の研究で得られた知見により、タバコのサイクリン D/CDK 複合体が昆虫細胞内で CAK が関与する活性制御を受けていることが予測できたが、これだけでは高等植物に CAK によるサイクリン/CDK 複合体の活性制御機構が保存されているかの証明にはならない。そこで高等植物で単離されている CAK のホモログを用いてタバコのサイクリン D/CDK 複合体が活性化されるか解析を行った。これまでに高等植物ではシロイヌナズナとイネから CAK のホモログが単離されている。シロイヌナズナの CAK のホモログ (Cak1At) は梅田らにより出芽酵母の CAK (*cak1/civ1*) 温度感受性変異株を相補する遺伝子として単離された⁴⁴⁾。Cak1At と動物および酵母の CAK との相同性は ATP 結合部位 (ATP-binding site)、活性部位 (active site)、リン酸化制御部位 (phosphoregulatory site) を含むキナーゼ活性領域 (kinase domain) でのみ認められ、それ以外の配列は大きく異なっていたが、分裂酵母の CAK (*mcs6/crk1/mop1*) 温度感受性変異株を相補し、抗 Cak1At 抗体を用いたシロイヌナズナの培養細胞からの免疫沈降物はヒトの CDK2 の CAK によりリン酸化を受ける160番目のスレオニン残基をリン酸化し、ヒトのサイクリン B/CDK2 複合体を活性化することが示された。イネの CAK のホモログと考えられる R2 遺伝子は1991年に畑らにより分裂酵母の *cdc2* 遺伝子のホモログとして単離された⁵⁹⁾。当時はその機能は不明であったが、動物の CAK (p40^{MOL5}/CDK7) との相同性が極めて高いことに着目し、1998年に山口らにより出芽酵母の CAK (*cak1/civ1*) 温度感受性変異株を相補すること、抗 R2 抗体を用いたイネの培養細胞からの免疫沈降物がヒトの CDK2 の160番目のスレオニン残基をリン酸化すること、更にイネの CDK である Cdc2Os1 (CDK-a に分類される) の161番目のスレオニン残基をリン酸化することが示され、R2 が CAK のホモログであることが示唆された⁴⁵⁾。ただし R2 がサイクリン/CDK 複合体を活性化するという結果は示されていない。動物や分裂酵母の CAK は CDK 以外に、RNA ポリメラーゼ II の大サブユニットの C 末端領域 (carboxyl-terminal domain; CTD) に対するキナーゼ活性を有しており、転写調節にも関与している。一方、出芽酵母では CAK 活性を有する因子 (Cak1/Civ1) と CTD キナーゼ活性を有する因子 (Kin28) が別個に存在する。R2 はシロイヌナズナの CTD に対してもキナーゼ活性を示したが、Cak1At は CTD キナーゼ活性を示さなかった。R2 をプローブとした Southern 解析により、シロイヌナズナのゲノム上には R2 のホ

モログが存在しないことが示唆され、シロイヌナズナでは出芽酵母と同様に CAK 活性と CTD キナーゼ活性が分かれて制御されていると考えられ、シロイヌナズナとイネでの差は双子葉植物と単子葉植物の違いによるものではないかと推察されている。

このような状況を踏まえて、タバコも双子葉植物であることより、シロイヌナズナの CAK (Cak1At) を用い、タバコのサイクリン D/CDK 複合体 (NtcycD3-1/Ntcdc2a) を活性化できるか解析した。大腸菌発現系で調製したキナーゼ活性を有さない NtcycD3-1/Ntcdc2a 複合体をバキュロウィルス発現系で調製した Cak1At で処理した結果、Histone H1 活性が認められた (図 12)。今後 CDK が CAK によりリン酸化されているのか等のより詳細な検討を行う必要がある、またイネで単離されたタイプの CAK も双子葉植物のサイクリン/CDK 複合体を活性化するか興味を持たれるが、少なくともタバコのサイクリン D/CDK 複合体がシロイヌナズナの CAK で活性化されることが分かり、高等植物にも CAK によるサイクリン/CDK 複合体の活性制御機構が保存されていることが強く示唆された。

1-5 小 括

4 種類のタバコサイクリン D の細胞周期に伴う発現様式を解析したところ、3 つの異なるタイプの発現様式を示した。NtcycD3-1 と NtcycD3-3 の mRNA の蓄積量は細胞周期を通じて一定であり、動物のサイクリン D と同様であった。NtcycD3-2a の mRNA の蓄積量は G1/S および G2/M 移行期に上昇した。NtcycD3-2b の mRNA の蓄積量は G2/M 移行期に上昇した。NtcycD3-2a と NtcycD3-2b の発現様式は高等植物のサイクリン D に特有のものであった。高等植物で単離されている他のサイクリン D の発現様式もこれらのいずれかに属することより、高等植物のサイクリン D は機能的に 3 つのタイプに分類されることが考えられた。本論文の結論は、今後サイクリン D の機能的な解析の進展により動物の分類とは異なる高等植物独自の分類法が提案される可能性を提示すると共に、高等植物のサイクリン D は独自の細胞周期制御機構を反映して動物のサイクリン D にはない機能を獲得している可能性を示唆している。

動物のサイクリン D は LXCXE 配列を介して Rb タンパク質と結合する。タバコサイクリン D に LXCXE 配列が保存されていることより、タバコ Rb タンパク質 (NtRb1) との結合解析を行った結果、タバコでもサイクリン D と Rb タンパク質が結合することが分かった。このことより高等植物のサイクリン D に動物のサイクリン D の機能が基本的には保存されていることが考えられた。

高等植物からサイクリンはサイクリン A、サイクリン B そしてサイクリン D に分類されるものが単離されており、CDK は動物および分裂酵母の Cdc2 に相当すると考えられる CDK-a、そして高等植物でのみ確認されているタイプである CDK-b1 と CDK-b2 に分類されるものが単離されているが、本研究を開始した段階で、どのサイクリンと CDK の組み合わせが活性のある複合体を形成できるかは全く分かっていなかった。タバコでは CDK-a に属する Ntcdc2a と CDK-b1 に属する Ntcdc2b が単離されており、タバ

コサイクリン D がこの 2 種類のタバコ CDK と活性のある複合体を形成できるか、*in vitro* の再構成系で解析した。パキユロウィルス発現系を用いてタバコサイクリン D とタバコ CDK を共発現させたところ、4 種類のタバコサイクリン D はいずれも Ntcdc2a または Ntcdc2b と複合体を昆虫細胞内で形成した。この内、Ntcdc2a との複合体は全てタバコ Rb タンパク質 (NrRb1)、ヒト Rb タンパク質 (HuRb) そして Histone H1 に対してキナーゼ活性を示した。一方、Ntcdc2b との複合体のキナーゼ活性は検出できなかった。この結果は高等植物由来のサイクリンと CDK の組み合わせを初めて明らかにしたことになり、その意義は非常に大きいと考えられる。動物のサイクリン D は CDK4,6 とのみ活性のある複合体を形成し、Cdc2 とは活性のある複合体を形成できないが、タバコサイクリン D は Cdc2 タイプの CDK と活性のある複合体を形成できることが分かった。高等植物では上記の 3 タイプの CDK しか単離されておらず、最終的な結論はシロイヌナズナのゲノム解析の完了を待たねばならないが、CDK4,6 に相当する CDK は存在しないと推定され、高等植物ではサイクリン D は Cdc2 タイプの CDK と活性のある複合体を形成することが考えられた。また Rb タンパク質に対するキナーゼ活性が検出できたことより、高等植物にもサイクリン D/CDK 複合体と Rb タンパク質が関与する G1/S 移行期の制御機構が保存されていることが考えられた。

動物のサイクリン D または CDK に存在する活性に関与するリン酸化部位が高等植物のサイクリン D または CDK にも高度に保存されている。推定リン酸化部位のアミノ酸置換変異体を用いて解析を行ったところ、タバコのサイクリン D/CDK 複合体の活性化にもリン酸化が必要であることが分かった。高等植物ではシロイヌナズナとイネから CAK のホモログが単離されており、同じ双子葉植物であるシロイヌナズナの CAK (Cak1At) を用いて処理したところ、不活性なタバコのサイクリン D/CDK 複合体が活性化された。この結果は高等植物にも CAK によるサイクリン/CDK 複合体の活性制御機構が保存されていることを強く示唆していると考えられた。

第2章 タバコ培養細胞 BY-2 を用いたタバコサイクリン D の *in vivo* 機能解析

2-1 緒言

第1章において組み換えタンパク質を用いた *in vitro* の解析により、タバコのサイクリン D が a-type の CDK (Ntcdc2a) と複合体を形成し、キナーゼ活性を示すことを明らかにした。しかし *in vitro* の実験のみでは植物体、植物細胞内での機能を論じることは出来ない。本章では、タバコ培養細胞 BY-2 を材料として *in vivo* でサイクリン D が CDK-a と複合体を形成しているか解析し、A-type のサイクリン D (NtcycD3-1) と CDK の複合体が示すキナーゼ活性の細胞周期特異性の解析を行った。更に緑色蛍光を発する GFP (green fluorescent protein)⁶⁰⁾ を融合させたタンパク質をタバコ培養細胞 BY-2 に構成的に発現させ、細胞内局在性の解析を行った。

2-2 実験材料および方法

2-2-1 抗体の作製

・ NtRb1

NtRb1 の N 末端側から 15 アミノ酸残基 (MVELNNCSNSEENG) のペプチドを抗原とした。このペプチドの C 末端側に更にシステイン残基 (C) を付加し、それを介してキャリアタンパク質であるヘモシアニン (Keyhole Limpet Hemocyanin; KLH) と *m*-Maleimidobenzoyl-*N*-Hydroxysuccinimide Ester (MBS) を用いて共有結合させた。これをウサギに免疫し、抗血清を得た。免疫抗原の合成は株式会社不二家、ウサギの免疫および採血は株式会社パナフォーム・ラボラトリーズに依頼した。

NtRb1 のコドン 654-671 に相当する 18 アミノ酸残基 (NLAPNGQIGDIRSPKKVC) のペプチドを抗原として用い、同様に抗血清を得た。

・ NtcycD3-1

NtcycD3-1 の N 末端側から 13 アミノ酸残基 (MGIQHNEHNQDQT) のペプチドを抗原とし、NtRb1 の場合と同様に行った。

・ Ntcyc25

Ntcyc25 の N 末端側から 14 アミノ酸残基 (MATTONRRSSVSSA) のペプチドを抗原とし、NtRb1 の場合と同様に行った。

Ntcyc25 の 107-120 アミノ酸に相当する 14 アミノ酸残基 (AIPKITAIPATC) を抗原とし、NtRb1 の場合と同様に行った。

2-2-2 抗体精製用アフィニティーカラムの作製

上記の抗体を抗原ペプチドを固定化したアフィニティーカラムを用いて精製した。その方法を以下に示した。0.2 g の 2-Fluoro-1-Methyl-Pyridinium Toluene-4-Sulfonate (FMP) Activated Cellulofine (生化学工業) を dH₂O で膨潤させ、カラムに充填した。余分な dH₂O は流し去り、そこに 1.5 mg のペプチドを Coupling Buffer に溶かして加え、更に 6 ml の Coupling Buffer を加えて、4℃で一晩、ローテーターで攪拌した。5 ml の Coupling Buffer そして 20 ml の Blocking Buffer で洗浄した後、10 ml の Blocking Buffer を加えて、室温で3時間、ローテーターで攪拌した。15 ml の dH₂O、15 ml の Elution Buffer II、15 ml の dH₂O、15 ml の Wash Buffer、15 ml の dH₂O で順に洗浄した。最後に Sodium Azide を終濃度 5 mM 加えた dH₂O でカラムを満たし、4℃で保存した。

- Coupling Buffer

50 mM Na₂CO₃-NaHCO₃ Buffer (pH 8.5)

- Blocking Buffer

0.1 M Monoethanolamine (2-Aminoethanol) を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

- Elution Buffer II

0.1 M Gly-HCl (pH 2.5)

- Wash Buffer

1 M NaCl、1% Triton X-100 を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)

2-2-3 アフィニティーカラムを用いた抗体の精製

上記で作製したアフィニティーカラムに 10 ml の抗血清を 3 回通した。10 ml の TBS、30 ml の Wash Buffer、30 ml の TBS、10 ml の 0.15 M NaCl で順に洗浄した。担体の 1/2 量の Elution Buffer II を加え、溶出液の pH が酸性に変化していないことを確認した（溶出液の pH が酸性に変化した場合は直ちに溶出液を回収した）。担体と等量の Elution Buffer II を加え、溶出液を回収した。さらに 1 ml の Elution Buffer II で溶出した。溶出液は 1/20 量の 1 M Tris で速やかに中和した。Abs.280 を測定して濃度を算出し、分注して -20℃で保存した。

- TBS

0.15 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH7.5)

2-2-4 抗体カラムの作製

Protein A Sepharose 4FF beads (Pharmacia) を 100 μl ベッド量、カラムに充填した。TBS でバッファー置換した後、上記で精製した抗体を 200 μg 分加え、室温で 2 時間インキュベートした。1 ml の Sodium Borate で 2 回洗浄し、終濃度 20 mM になるように Dimethylpimelimidate (DMP) を溶かした 1 ml の Sodium Borate を加え、室温で 1 時間インキュベートした。1 ml の 0.2 M エタノールアミンで洗浄し、再び 1 ml の 0.2 M エタノールアミンを加え、室温で 2 時間インキュベートした。PBS で洗浄した後、Thimerosal を

終濃度 0.01 % 加えた PBS でカラムを満たし、4 °C で保存した。

- Sodium Borate

0.2 M KCl を含む 0.2 M H₃BO₃-NaOH (pH 9.0)

- 0.2 M エタノールアミン

0.2 M Ethanolamine-HCl (pH 8.0)

- PBS

Na₂HPO₄ 7.4 mM

NaH₂PO₄ 1.4 mM

NaCl 150 mM

2-2-5 GFP 融合タンパク質発現用バイナリープラスミドの構築

静岡県立大学植物細胞工学研究室の丹羽康夫氏より分与していただいた pTH-2 (pUC18 の *Hind* III-*Eco* R I 部位に CaMV35S pro-sGFP (S65T) -Nos ter が挿入されているプラスミド) を用いた。まず sGFP (S65T) (synthetic GFP S65T mutant) の 5' 側上流に存在する *Sal* I-*Nco* I 部位の間に新たに *Stu* I と *Kpn* I による認識配列をオリゴヌクレオチドを合成して付加した。その後、*Hind* III-*Eco* R I 断片を切り出し、pBI121 の *Hind* III-*Eco* R I 部位に挿入した。このプラスミドを pBI121-GFP と名付ける。タンパク質の C 末端側に GFP が融合するように sGFP (S65T) の 5' 側上流の *Sal* I-*Kpn* I 部位に目的の遺伝子を終止コドンを除き、リーディングフレームが合うようにして挿入した。新たに付加した認識配列を以下に示す。

5'-GTCGAC AGGCCT GGTACCGGGGCCATGG-3'

Sal I *Stu* I *Kpn* I *Nco* I

- NtcycD3-1-GFP

pBI121-GFP の *Sal* I-*Kpn* I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて終止コドンを除く *NtcycD3-1* 全長の 5' 末端側に *Sal* I 認識配列を、3' 末端側に *Kpn* I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK- にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pBI121-GFP に *Sal* I-*Kpn* I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

NtcycD3-1-s : 5'-GTCGACATGGGAATACAACACAATGAG-3'

NtcycD3-1-as : 5'-GGTACCGCGAGGGCTGCCAACAGCATA-3'

- NtcycD3-1-GFP (mutant)

NtcycD3-1 と同様に行った。

- NtcycD3-2a-GFP

pBI121-GFP の *Sal* I-*Kpn* I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて終止コドンを除く *NtcycD3-2a* 全長の 5' 末端側に *Sal* I 認識配列を、3' 末端側に *Kpn* I 認識配列を付加した。

増幅された DNA 断片を SK- にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pBI121-GFP に *Sal*I-*Kpn*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

NtcycD3-2a-s : 5'-GTCGACATGGCAATAGAAAACAATGAG-3'

NtcycD3-2a-as : 5'-GGTACCATGAGGACTGCCAACAGCTTC-3'

• NtcycD3-2b-GFP

pBI121-GFP の *Sal*I-*Kpn*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて終止コドンを除く *NtcycD3-2b* 全長の 5' 末端側に *Sal*I 認識配列を、3' 末端側に *Kpn*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK- にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pBI121-GFP に *Sal*I-*Kpn*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

NtcycD3-2b-s : 5'-GTCGACATGGCAATAGAACACAATGAG-3'

NtcycD3-2b-as : 5'-GGTACCATGAGGACTACCAACAGCTTC-3'

• NtcycD3-3-GFP

pBI121-GFP の *Sal*I-*Kpn*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて終止コドンを除く *NtcycD3-1* 全長の 5' 末端側に *Sal*I 認識配列を、3' 末端側に *Kpn*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を SK- にサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pBI121-GFP に *Sal*I-*Kpn*I 断片を組み変えた。PCR に用いたプライマーは以下に示す。

プライマー

NtcycD3-3-s : 5'-GTCGACATGGCTCACCATCACAATCAA-3'

NtcycD3-3-as : 5'-GGTACCCGTTTGTGTTCTAATCTTCTT-3'

2-2-6 タバコ培養細胞 BY-2 の形質転換 (GFP 融合タンパク質の発現)

アグロバクテリウムへのバイナリープラスミドの導入

-80 °C で保存しておいた *Agrobacterium* EHA105 コンピテントセル (40 µl) を氷上で解凍後、上記のバイナリープラスミドを 1 µl 加え、エレクトロポレーション法 (25 µFD, 1.8 kV, 200 ohm : 1 mm cubette) を用いて導入した。速やかに 1 ml の SOC 培地を加え、30 °C で 1 時間、振とう培養した。100 µl および残りの菌体を固形選択培地 (Kanamycin : 100 µg/ml) にまき、30 °C で 2 日間培養した。

タバコ培養細胞 BY-2 の形質転換

上記のプレートよりコロニーを単離して 10 ml の液体培地に植菌し、遮光して 28 °C で 2 日間、振盪培養した。100 ~ 200 µl の培養液と 10 ml の培養 3 日目の BY-2 細胞の懸濁液をシャーレ (100 mm φ) に加え、暗所にて 25 °C で 2 日間、静置で共存培養した。BY-2 細胞を 10 倍量の滅菌水で 5 回洗浄してアグロバクテリウムを除き (低速 (700

rpm) で遠心して BY-2 細胞のみを沈殿させ、上清を捨てた。) 、固形選択培地 (Kanamycin : 100 $\mu\text{g/ml}$, Carbenicillin : 250 $\mu\text{g/ml}$) に細胞をまいた。3 ~ 4 週間して形成されたカルスを新鮮な固形選択培地に移し、さらに増殖の良いものを選択した。形質転換体の GFP 融合タンパク質の発現を蛍光顕微鏡観察により確認し、発現が認められたものを液体培養に移した。液体培地にも Kanamycin および Carbenicillin を添加し続けた。

2-2-7 タバコ培養細胞 BY-2 からの免疫沈降

タバコ培養細胞 BY-2 の粗抽出液の調製

植え継ぎ後、培養 4 日目の BY-2 細胞を約 500 μl ベッド量、2 ml のマイクロチューブに回収し、液体窒素により急速凍結させた後、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。1 ml の IP Buffer を加え、氷上で超音波破碎 (10 秒 \times 10 回、5 秒間隔、出力 7 ~ 8、Handy Sonic model UR-10P、TOMY SEIKO) し、遠心操作 (15,000 rpm、30 分間、4 $^{\circ}\text{C}$) により上清を回収し、粗抽出液として -80 $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。粗抽出液のタンパク質濃度は Bradford 法 (Bovine Serum Albumin (BSA) を標準品として検量線を描いた) を用いて測定した。

• IP Buffer

Tris-HCl (pH 7.6)	25 mM
NaCl	75 mM
MgCl ₂	15 mM
EGTA	15 mM
NP-40	0.1 %
Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)	1 mM
Leupeptin	10 $\mu\text{g/ml}$
N-Tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone (TPCK)	50 $\mu\text{g/ml}$
Pepstatin A	5 $\mu\text{g/ml}$
Aprotinin	10 $\mu\text{g/ml}$
Antipain	5 $\mu\text{g/ml}$
Trypsin Inhibitor From Soybean	10 $\mu\text{g/ml}$
Benzamidine	0.1 mM
NaF	10 mM
β -Glycerophosphate	25 mM
Sodium Orthovanadate	2 mM

免疫沈降 (Immunoprecipitation; IP)

300 μg の粗抽出液に 4 μg の 1 次抗体を加え、氷上で 2 時間インキュベートした。そこに 20 μl (50 % IP Buffer) の Protein A Sepharose 4FF beads を加え、氷上で 1 時間インキュベートした。200 μl の IP Buffer で 3 回、200 μl の Kinase Buffer で 3 回洗浄した。IP 産物を確認したい場合は、ビーズを等量 (10 μl) の 4 \times SB で処理し、適当な抗体を用

いて Western 解析を行った。IP 産物をキナーゼ活性試験に用いる場合はビーズに 1/2 量 (10 μ l) の Kinase Buffer を加え、4 $^{\circ}$ C で保存した。

p13-Agarose beads (CALBIOCHEM) を用いた場合は 300 μ g の粗抽出液に 20 μ l 加え、氷上で 2 時間インキュベートした。その後の洗浄操作からは同様に行った。

抗体カラムを用いた IP/Western (サイクリンと CDK-a の *in vivo* 結合解析)

2.5 mg の粗抽出液に 50 μ l ベッド量の Protein A Sepharose 4FF beads を加え、4 $^{\circ}$ C で 30 分間、前処理した。Protein A Sepharose 4FF beads を除いた抽出液を 50 μ l ベッド量の担体を充填した抗体カラムに加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。500 μ l の IP Buffer で 3 回、500 μ l の 150 mM NaCl で 1 回洗浄した後、50 μ l の Elution Buffer I を 3 回通し、吸着したタンパク質を溶出した。溶出液は 2.5 μ l の 1 M Tris で速やかに中和した。10 % ゲルで SDS-PAGE を行い、抗 PSTAIRE 抗体 (Santa Cruz) を用いた Western 解析により溶出液中の CDK-a 関連タンパク質を検出した。

IP 試料を用いたキナーゼ活性の検出

組み換えタンパク質を用いたキナーゼ活性の検出と基本的には同様に行った。IP 試料にそれ以外の反応液を添加して反応を開始させ、30 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。4 \times SB を加えて反応を停止し、95 $^{\circ}$ C で 2 分間熱変性させた。15%ゲルで SDS-PAGE を行い、リン酸化された基質をオートラジオグラフィで検出した。反応液の組成は以下に示す。

• Histone H1

IP 試料 (Beads : 50 % Kinase Buffer)	15 μ l
Histone H1 (10 μ g/ μ l)	0.25 μ l
[γ - 32 P]ATP (4,500 Ci/mmol, ICN)	0.25 μ l
<u>Kinase Buffer</u>	<u>4.5 μl</u>
計	20 μ l

• GST-NtRb1 (823-961)

IP 試料 (Beads : 50 % Kinase Buffer)	15 μ l
GST-NtRb1 (約 1 μ g/ μ l)	2 μ l
[γ - 32 P]ATP (4,500 Ci/mmol, ICN)	0.25 μ l
<u>Kinase Buffer</u>	<u>2.75 μl</u>
計	20 μ l

キナーゼ活性の定量

イメージングプレートを用いて感光し、バイオイメージングアナライザーBAS2000により画像を読み込んだ。得られた画像よりバンドの濃さを MacBAS V2.52 を用いて定量した。

2-2-8 Laser Scanning Cytometer による DNA 含量測定用サンプルの調製

回収した細胞懸濁液に終濃度 70 % になるように軽く攪拌しながら冷エタノールを加え、-20 °C で 2 時間以上インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、終濃度 0.1 mg/ml になるように RNase を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。さらに終濃度 50 µg/ml になるように PI を添加し、30 分間インキュベートした。その後 PBS で 3 回洗浄し、細胞をスライドガラス上にとり、カバーガラスをかけた。余分な液を吸い取った後、カバーガラスの縁をマニキュアでシールした。洗浄操作を行う際、細胞が変形するのを避けるために遠心操作は行わず、細胞が自然に沈降するのを待った。

・ PI (Propidium Iodide)

5 mg/ml PBS sol.、遮光冷凍保存

2-3 結果

2-3-1 抗 NtcycD3-1 ペプチド抗体の特異性の解析

バキュロウイルス発現系により調製した組み換えタンパク質を用い、ペプチドを抗原として作製した各種抗体の特異性を検討した。各種サイクリンは N 末端側に His-tag を付加し、Ntcdc2a,b は N 末端側に Flag-tag を付加したものをバキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞に発現させ、その粗抽出液を用いて Western 解析を行った。対照として Ntcyc25 と異なるタバコサイクリン A である Ntcyc27 およびタバコサイクリン B である Ntcyc29 を発現させた細胞の粗抽出液も用いた。

図 13A に示すように、抗 NtcycD3-1 ペプチド (1-13) 抗体は NtcycD3-1 を特異的に認識することが分かった。抗 Ntcyc25 ペプチド (1-14, 107-120) 抗体も Ntcyc25 (タバコサイクリン A) を特異的に認識することが分かった。また市販の抗 PSTAIRE 抗体は Ntcdc2b をほとんど認識せず、Ntcdc2a を特異的に認識した (図 13B)。このことより抗 PSTAIRE 抗体は a-type の CDK (CDK-a) に対する特異性が高いことが示唆された。そこで、これらの抗体を以下の実験に用いた。

2-3-2 タバコ培養細胞 BY-2 内での NtcycD3-1 と CDK-a の複合体形成の解析

組み換えタンパク質を用いた *in vitro* の結合解析によりタバコのサイクリン D は CDK-a と活性のある複合体を形成できることが分かった。そこで植物細胞内で NtcycD3-1 が CDK-a と複合体を形成しているかを解析した。タバコ培養細胞 BY-2 の粗抽出液を種々抗体を用いて免疫沈降し、Western 解析により複合体の形成を解析した。抗 NtcycD3-1 抗体、抗 Ntcyc25 抗体そして対照として抗 PSTAIRE 抗体、Normal Rabbit IgG、抗 NtRb1 抗体を用いて免疫沈降を行った。抗 PSTAIRE 抗体を用いて Western 解析を行い、免疫沈降物中の CDK-a を検出した。

図 14 に示すように、抗 PSTAIRE 抗体を用いた免疫沈降物中には約 34 kDa の位置に濃いバンド、それより移動度の小さい位置に 2 本の薄いバンドが認められた。抗 NtcycD3-1 抗体と抗 Ntcyc25 抗体を用いた免疫沈降物中に約 34 kDa (Ntcdc2a の推定分子

量) の位置にバンドが認められたが、対照として用いた Normal Rabbit IgG と抗 NtRb1 抗体を用いた免疫沈降物中にはこの位置にバンドは認められなかった。このことより NtcycD3-1 と Ntcyc25 はタバコ培養細胞 BY-2 内で CDK-a と複合体を形成していることが示唆された。

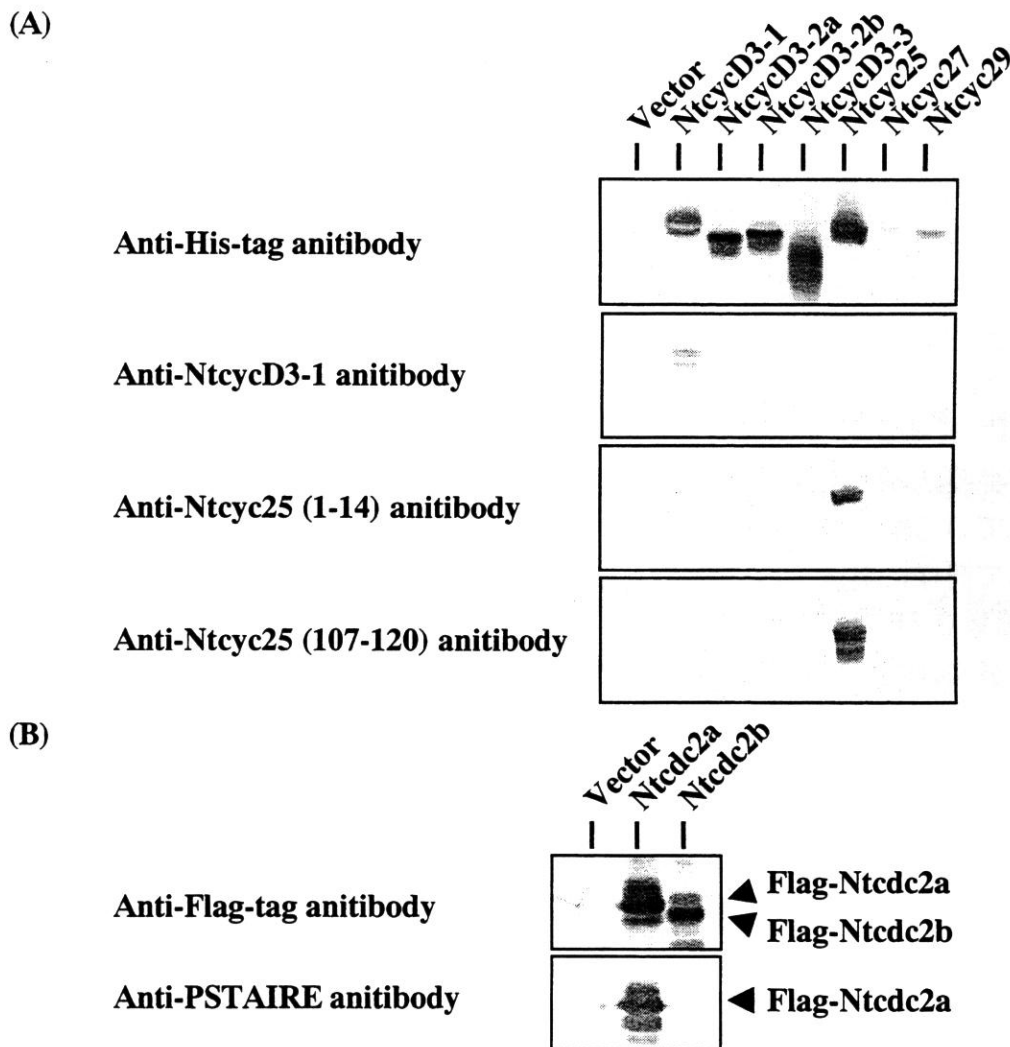


図13 抗体の特異性

(A) 作製した抗体の各種サイクリンに対する特異性：His-tagを付加したタバコ由来の各種サイクリンを昆虫細胞で発現させ、その粗抽出液をSDS-PAGEに供し、図の左に記した抗体を用いてWestern解析を行った。

(B) 市販の抗PSTAIRES抗体のCDKに対する特異性：Flag-tagを付加したタバコ由来の2種類のCDKを昆虫細胞で発現させ、その粗抽出液をSDS-PAGEに供し、図の左に記した抗体を用いてWestern解析を行った。

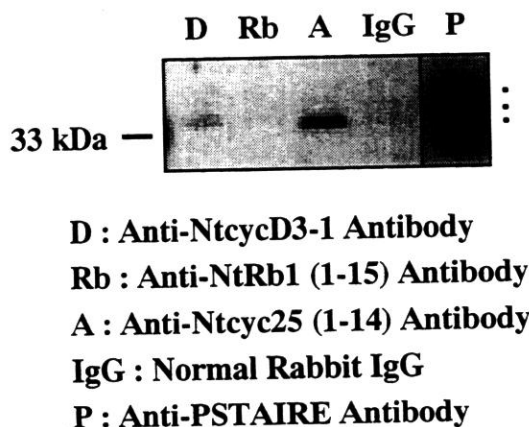


図14 タバコ培養細胞BY-2内でのNtcycD3-1とCDK-aの複合体形成の解析

各レーンに示してある抗体を結合させたアフィニティーカラムにタバコ培養細胞BY-2の粗抽出液を通し、カラムからの溶出画分について抗PSTAIRES抗体を用いてWestern解析を行った。図の右に示した点は抗PSTAIRES抗体で検出された3本のバンドの位置を示す。

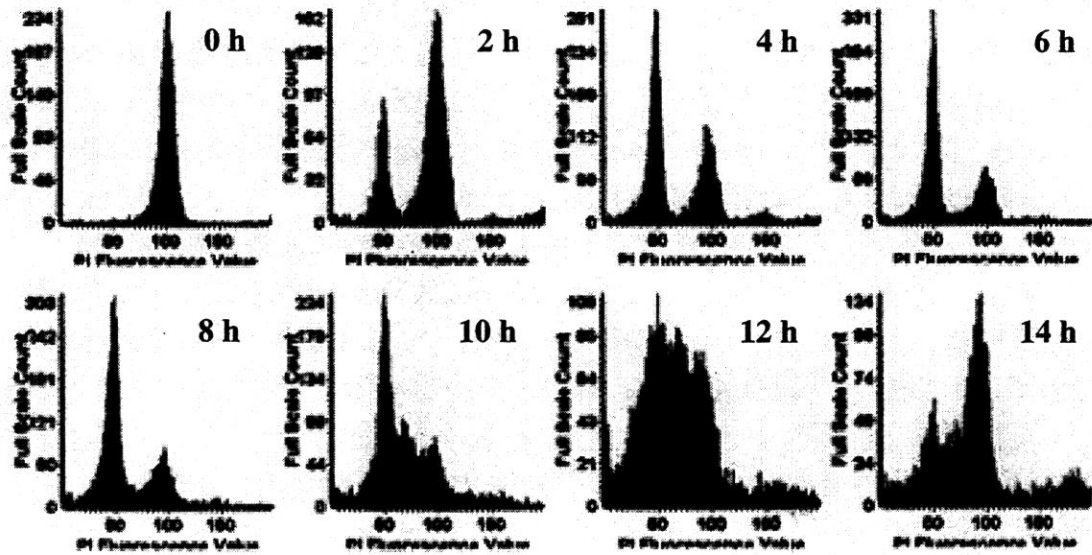
2-3-3 NtcycD3-1/CDK 複合体のキナーゼ活性の細胞周期特異性の解析

動物のサイクリンDの発現様式は細胞周期に依存せず、mRNAの蓄積量は細胞周期を通じて一定であるが、サイクリンD/CDK4,6のRbタンパク質に対するキナーゼ活性はG1/S移行期に一過的に上昇する。そこでNtcycD3-1/CDK複合体のキナーゼ活性の細胞周期特異性を解析した。タバコ培養細胞BY-2の同調培養を行い、経時的に細胞を回収して材料として用いた。細胞の粗抽出液を免疫沈降し、Histone H1とGST-NtRb1(823-961)を基質としてキナーゼ活性を検出した。抗NtcycD3-1抗体と抗Ntcyc25抗体を用いて免疫沈降を行った。また、サイクリン/CDK1,2複合体と特異的に結合することが知られている酵母のp13^{sup1}タンパク質をアガロースと結合させたアフィニティービーズを用いて同様に実験を行った。

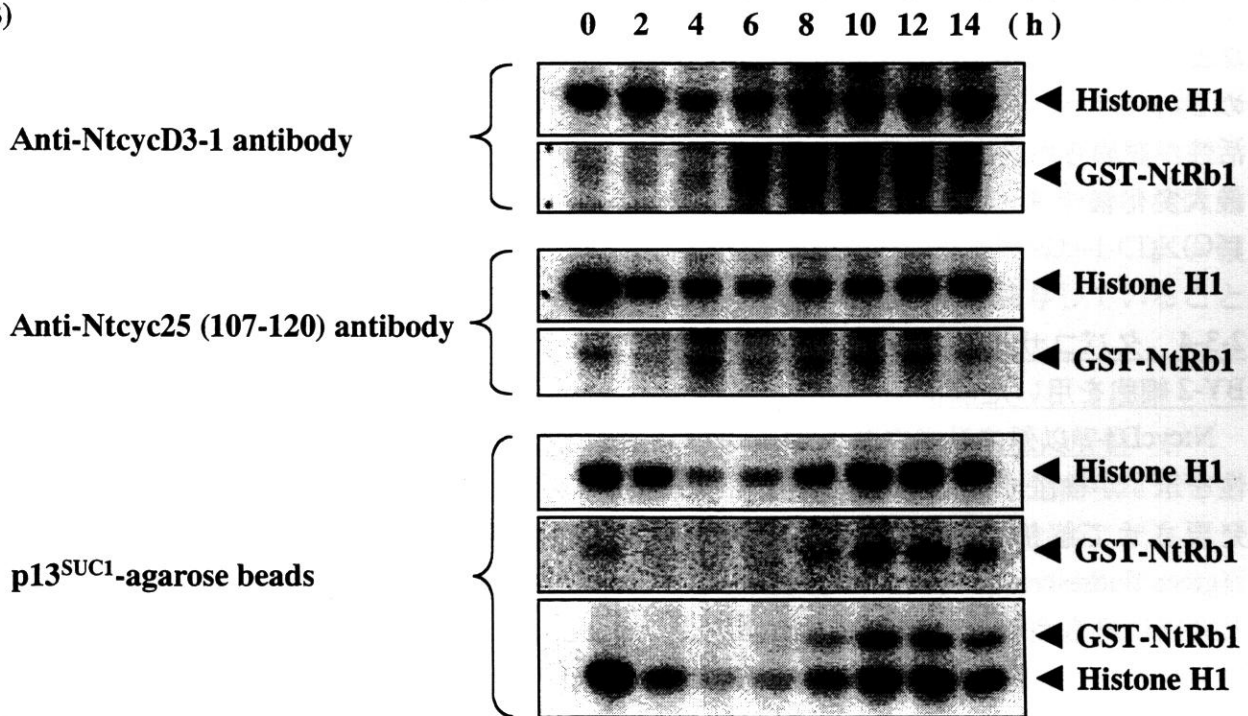
BY-2細胞をDNAポリメラーゼα阻害剤であるアフィディコリンを用いてS期に集積させた後に洗浄し、さらに微小管の重合阻害剤であるプロピザマイドで処理してM期に集積させた。再び洗浄した後、同調化した細胞を2時間おきに回収した。回収した各時間の細胞のDNA量をLaser Scanning Cytometerを用いて解析した。得られたDNAヒストグラムを図15Aに示した。0時間にはG2/M期の細胞のみが認められ、6時間目までG1期の細胞が増加してG2/M期の細胞が減少した。8時間目からS期の細胞が増加し始め、12時間目にS期の細胞の割合が最大になった。14時間目にはG2/M期の細胞の割合が最大になった。

まずp13^{sup1}アフィニティービーズを用いて、植物細胞内に存在すると考えられる多くの組み合わせのサイクリン/CDK1,2類似複合体のキナーゼ活性の細胞周期に伴う変化を解析した(図15B)。Histone H1を基質とした場合、0時間に強いキナーゼ活性が認められ、一度減少した後、10~12時間目に再び強い活性が認められ、14時間目にはわずかに減少した。NtRb1を基質とした場合は8時間目から活性が認められ、10~12時間目に強い活性を示し、14時間目には減少したが、0時間にも8時間目程度の活性が認められた。Histone H1とNtRb1を基質として同時に加えると、NtRb1に対するキナーゼ活性は8~14時間目の活性に変化は認められなかったが、0時間での活性が認められなくなった。一方、Histone H1に対するキナーゼ活性はNtRb1キナーゼ活性が認められる8~14

(A)



(B)



(C)

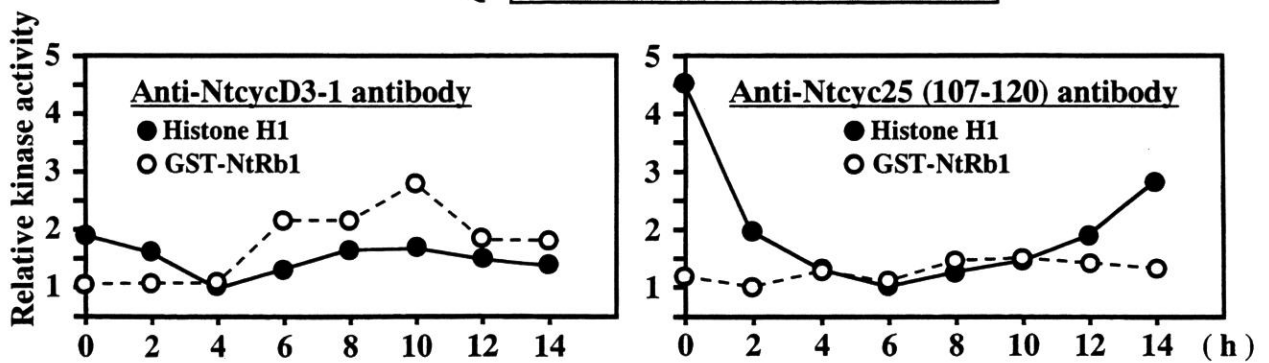


図15 サイクリン/CDK複合体が示すキナーゼ活性の細胞周期特異性

(A) 同調化させたタバコ培養細胞BY-2の各時間のDNAヒストグラム：LSCを用いて解析した。

(B) キナーゼ活性：同調化させたBY-2細胞からサイクリン/CDK複合体を免疫沈降またはアフィニティー精製し、Histone H1とNtRb1に対するキナーゼ活性を検出した。

(C) キナーゼ活性の相対値：Bのバンドの濃さを定量して相対値として示した。

時間目で減少した。このことより 0 時間では Histone H1 に対する基質特異性の高いサイクリン/CDK 複合体が活性化され、8~14 時間目には NtRb1 に対する基質特異性の高いサイクリン/CDK 複合体が活性化されていることが分かった。つまりタバコ培養細胞 BY-2 では G2/M 期には Histone H1 キナーゼ活性が、そして G1/S 期には NtRb1 キナーゼ活性が特異的に上昇することが示唆された。

抗 NtcycD3-1 抗体による免疫沈降物を用いて NtcycD3-1/CDK 複合体のキナーゼ活性を解析した結果、Histone H1 キナーゼ活性は p13-Agarose beads を用いた場合と同様な変化を示したが、その変化の幅は 2 倍弱程度であった (図 15B,C)。NtRb1 に対するキナーゼ活性は 0~4 時間目までほとんど認められず、その値を 1 とすると 6~10 時間目に活性が 2~3 倍に上昇し、12~14 時間目には 2 倍弱程度に減少した (図 15B,C)。このことより NtRb1 キナーゼ活性が G1/S 期に上昇することが示唆された。

抗 Ntcyc25 抗体による免疫沈降物を用いて Ntcyc25/CDK 複合体のキナーゼ活性を解析した結果、NtRb1 に対するキナーゼ活性はほとんど認められなかった (図 15B)。僅かな差を定量してみたところ、1.5 倍弱程度の変動幅で細胞周期に伴う特徴的な変化は認められなかった (図 15C)。一方、Histone H1 キナーゼ活性は 0 時間目に強いキナーゼ活性が認められ、6 時間目まで減少した後、14 時間目まで上昇した (図 15B)。活性の最大変化幅は 4~5 倍程度認められ、G2/M 期に活性が上昇することが示唆された (図 15C)。

2-3-4 タバコサイクリン D の GFP 融合タンパク質を構成的に発現させた形質転換体 BY-2 細胞を用いた解析

NtcycD3-1 以外のサイクリン D も植物細胞内で CDK-a と複合体を形成してキナーゼ活性を示すか検証するために、標識したサイクリン D をタバコ培養細胞 BY-2 に構成的に発現させて解析を行った。以下の細胞内局在性の解析にも使用できるように GFP (green fluorescent protein)⁶⁰⁾ を標識タンパク質として選択し、タバコサイクリン D の C 末端側に融合させた。CaMV (cauliflower mosaic virus) 35S プロモーターの下流に GFP 融合タンパク質をコードする遺伝子を連結し、アグロバクテリウム感染法を用いてタバコ培養細胞 BY-2 を形質転換した。得られた形質転換体を液体培養に移した後、増殖期の細胞を回収して実験材料とした。NtcycD3-1-GFP、NtcycD3-2a-GFP、NtcycD3-2b-GFP、NtcycD3-3-GFP および対照として GFP を発現している形質転換体を作出した。更に NtcycD3-1 の変異体である NtcycD3-1 (T191A)、NtcycD3-1 (S296A,S300A) そして NtcycD3-1 (T191A,S296A,S300A) の GFP 融合タンパク質を発現している形質転換体を作出した。

各形質転換体 BY-2 細胞の粗抽出液を材料として抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物中のサイクリンと CDK-a をそれぞれ抗 GFP 抗体と抗 PSTAIRE 抗体を用いた Western 解析により検出した (図 16B,C)。NtcycD3-1-GFP、NtcycD3-2a-GFP、NtcycD3-2b-GFP および NtcycD3-3-GFP を発現している細胞からの免疫沈降物中には、抗 PSTAIRE 抗体を用いて約 34 kDa の位置にバンドが認められた。対照である GFP のみを発現させた細胞からの免疫沈降物中にはこの位置にバンドは認められなかった。こ

のことより NtcycD3-1-GFP、NtcycD3-2a-GFP、NtcycD3-2b-GFP そして NtcycD3-3-GFP は全てタバコ培養細胞 BY-2 内で CDK-a と複合体を形成することが示唆された。抗 GFP 抗体を用いて Western 解析を行ったところ、免疫沈降物中の NtcycD3-1-GFP と NtcycD3-2a-GFP の量は同程度であったが、NtcycD3-2a-GFP を含む免疫沈降物の方が CDK-a の量が少なかった。また、NtcycD3-2b-GFP と NtcycD3-3-GFP の量は NtcycD3-1-GFP より多かったが、CDK-a の量は同程度であった。次に上記の Western 解析に使用したのと同じ免疫沈降物を用いて Histone H1 キナーゼ活性を検出した (図 16A)。その結果、NtcycD3-1-GFP、NtcycD3-2b-GFP そして NtcycD3-3-GFP を含む免疫沈降物で活性が認められ、NtcycD3-2a-GFP を含む免疫沈降物ではほとんど認められなかった。また、NtcycD3-1-GFP を含む免疫沈降物が最も強い活性を示し、NtcycD3-2b-GFP そして NtcycD3-3-GFP を含む免疫沈降物の順に活性が弱くなった。

NtcycD3-1 の変異体である NtcycD3-1 (T191A)、NtcycD3-1 (S296A,S300A) そして NtcycD3-1 (T191A,S296A,S300A) についても同様に解析を行った。その結果、各サイクリンとも複合体を形成している CDK-a の量は同程度であった (図 16B)。Histone H1 キナーゼ活性は *in vitro* の解析 (第 1 章を参照のこと) と同様な結果が得られ、NtcycD3-1-GFP と NtcycD3-1 (S296A,S300A) -GFP を含む免疫沈降物で活性が認められ、NtcycD3-1 (T191A) -GFP と NtcycD3-1 (T191A,S296A,S300A) -GFP を含む免疫沈降物の活性は著しく減少した (図 16A)。このことより植物細胞内でも NtcycD3-1/CDK-a 複合体の活性化に NtcycD3-1 の 191 番目のスレオニン残基のリン酸化が関与していることが示唆された。

2-3-5 GFP 融合タンパク質を用いたタバコサイクリン D の細胞内局在性の解析

動物のサイクリン D は G1/S 移行期に特異的に核に局在化することが知られている (図 3B)⁶¹⁾。前述のリン酸化部位の変異体を用いた解析において述べたが、ヒトのサイクリン D1 の細胞内局在性には 2 カ所のリン酸化部位が関与している。CAK による活性化に関与しているヒトのサイクリン D1 の 156 番目のスレオニン残基は細胞質から核への移行にも関与している。このリン酸化部位に変異を加えると、CDK との複合体が活性化されなくなるだけではなく、サイクリン D1 は核へと移行できなくなり、細胞質に留まる³⁹⁾。一方、286 番目のスレオニン残基は核から細胞質への移行に関与しており、このリン酸化部位に変異を加えると、核から細胞質へ移行できなくなり、核に留まることになる⁴¹⁾。そこでタバコのサイクリン D もリン酸化により細胞内局在性が制御されているのか解析を行った。

GFP は特定の励起波長を照射すると緑色蛍光を発するため、生細胞を試料として蛍光顕微鏡により GFP 融合タンパク質の細胞内局在性を観察できる⁶⁰⁾。上記の形質転換体を用いた解析の結果、サイクリン D は GFP を融合させても CDK-a と複合体を形成してキナーゼ活性を示すことが分かり、GFP 融合サイクリン D はサイクリン D の基本的な機能は保持していると考えられた。そこで GFP 融合サイクリン D を発現させた形質転換体 BY-2 を用い、GFP の蛍光観察によりサイクリン D の細胞内局在性を観察した。

GFP のみを発現させた細胞では核と細胞質の両方で蛍光が観察できた。それに対し、

NtcycD3-1-GFP を発現させた形質転換体では多くの細胞で核において蛍光が観察された (図 17-1)。NtcycD3-1-GFP の変異体である NtcycD3-1 (T191A) -GFP と NtcycD3-1 (T191A,S296A,S300A) -GFP を発現させた形質転換体では細胞質で蛍光が観察され、NtcycD3-1 (S296A,S300A) を発現させた形質転換体では核で蛍光が観察された (図 17-2)。つまり 191 番目のスレオニン残基がリン酸化されないように変異を加えると、核に局在化せず、細胞質に留まることが分かった。このことより NtcycD3-1 は核に局在化することが分かり、191 番目のスレオニン残基のリン酸化が細胞質から核への移行に関与していることが示唆された。

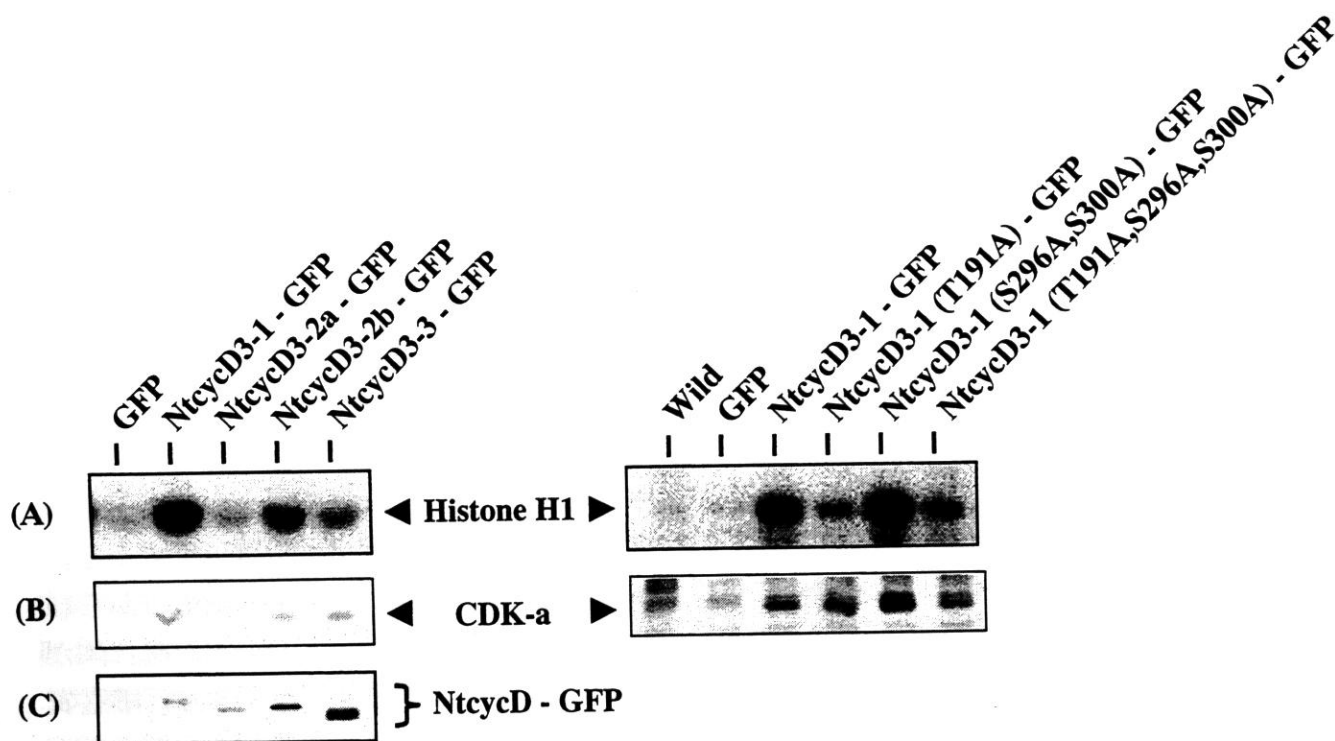


図16 GFP融合サイクリンDの*in vivo*における機能解析

(A) 免疫沈降物を用いたキナーゼ活性の検出：各レーンに示したタンパク質を発現している形質転換体BY-2細胞の粗抽出液から抗GFP抗体を用いて免疫沈降を行い、その免疫沈降物を用いて放射ラベルしたリン酸基の取り込みによりHistone H1キナーゼ活性を検出した。Wildは非形質転換体BY-2細胞を示す。

(B) GFP融合サイクリンDとCDK-aの複合体形成の解析：Aで用いた免疫沈降物について抗PSTAIRES抗体を用いてWestern解析を行った。

(C) GFP融合サイクリンDの検出：Aで用いた免疫沈降物について抗GFP抗体を用いてWestern解析を行った。

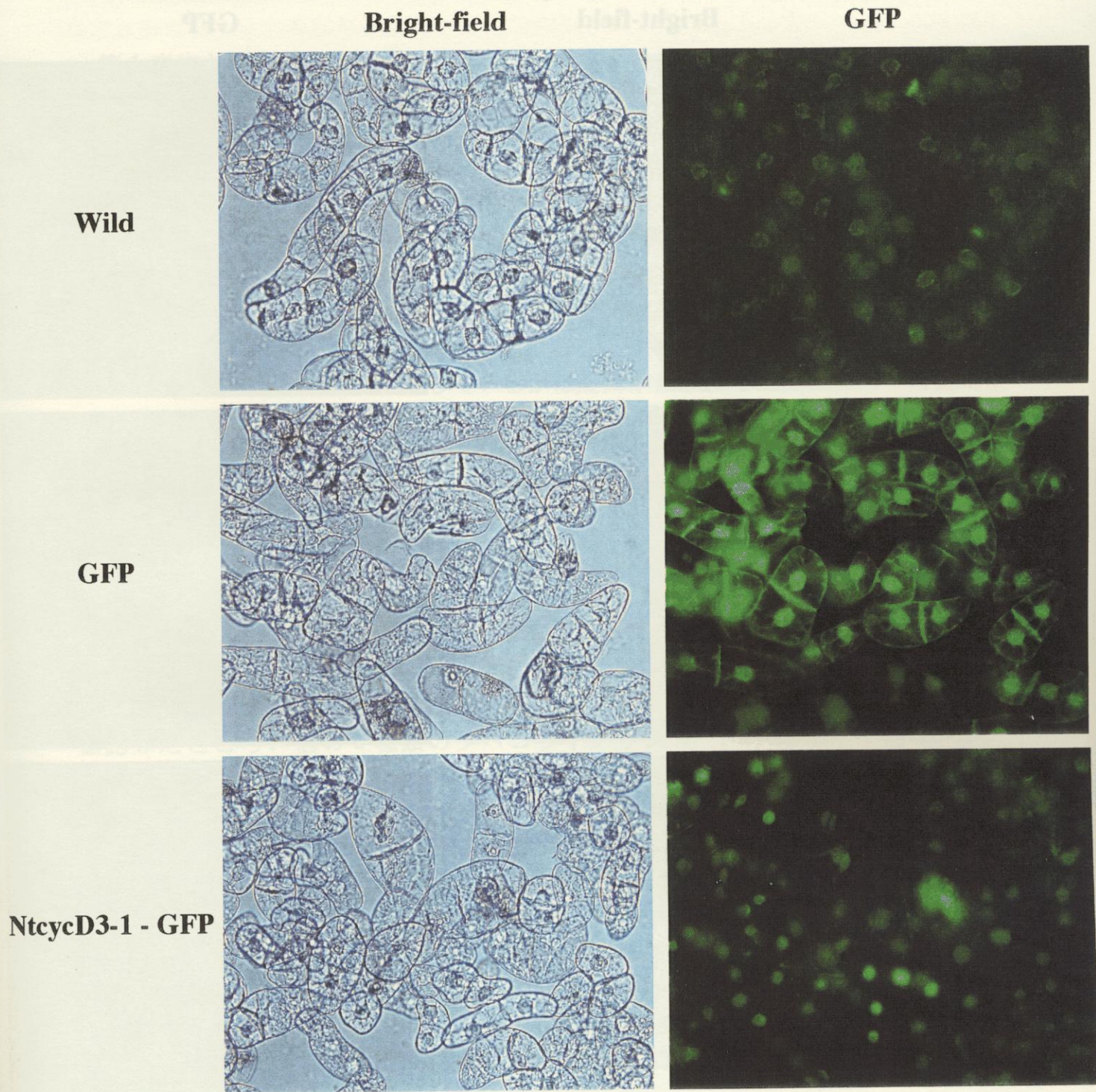


図17-1 タバコサイクリンDの細胞内局在性の解析

図の左に示したGFP融合サイクリンDを構成的に発現している形質転換体BY-2細胞の顕微鏡観察を行った。Bright-fieldは明視野での観察像を示し、GFPは青色励起光下でのGFPが発する蛍光観察像を示した。WildはGFPを発現していない非形質転換体BY-2細胞を示し、GFPはGFPを単独で発現させた形質転換体を示した。

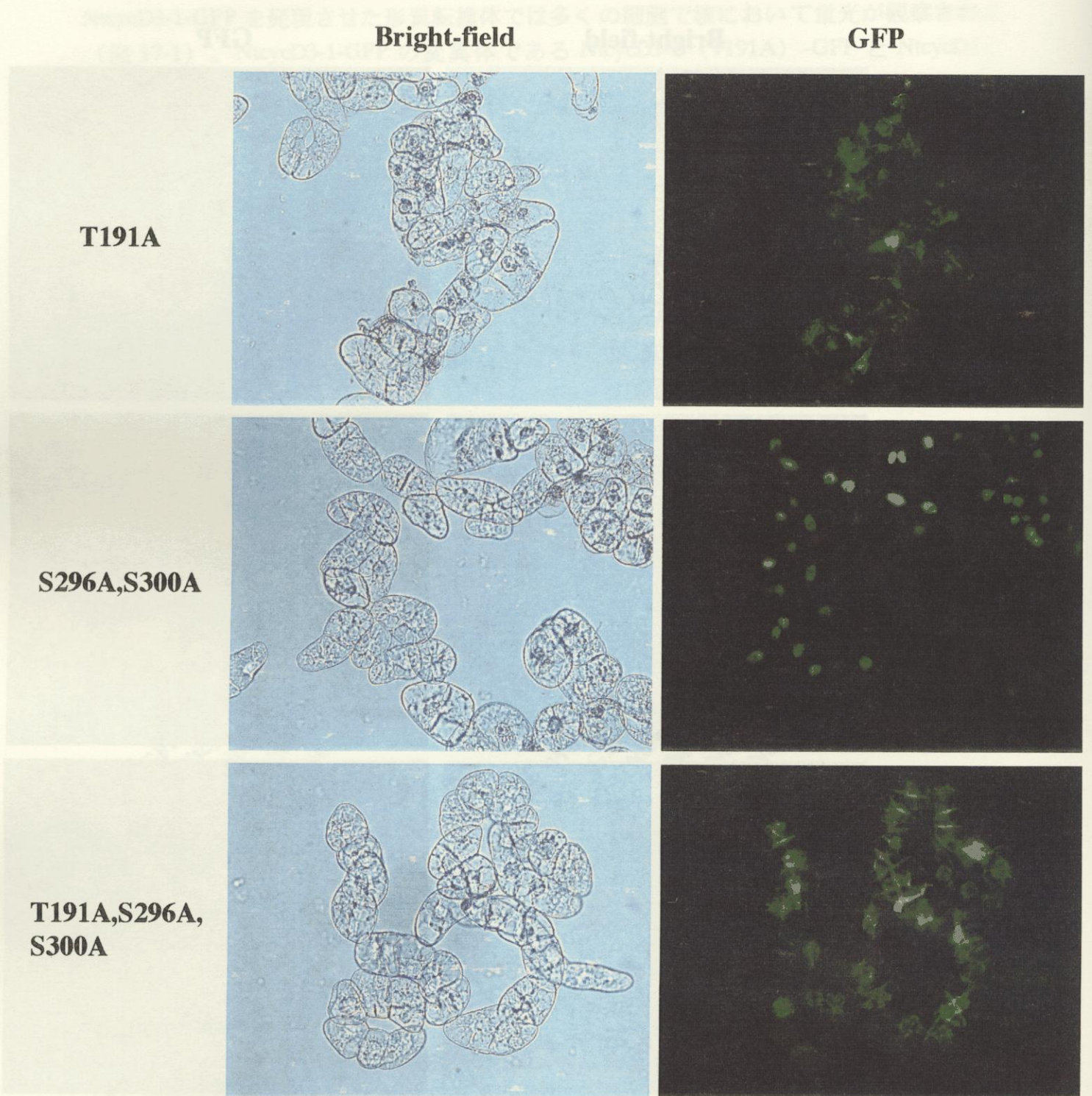


図17-2 タバコサイクリンDの細胞内局在性の解析

図の左に示したGFP融合サイクリンDを構成的に発現している形質転換体BY-2細胞の顕微鏡観察を行った。Bright-fieldは明視野での観察像を示し、GFPは青色励起光下でのGFPが発する蛍光観察像を示した。NtcycD3-1-GFPの各変異体の表記は例えばNtcycD3-1 (T191A) - GFPをT191Aと省略して示した。

2-4 考 察

第1章においてタバコサイクリンDは *in vitro* で a-type の CDK (CDK-a) である Ntcdc2a と活性のある複合体を形成することが分かった。また、活性は示さなかったものの *in vitro* で b1-type の CDK である Ntcdc2b と複合体を形成し、*in vivo* ではこれらの複合体が活性を有している可能性が残された。高等植物から CDK はシロイヌナズナで4種類、アルファルファでは6種類単離されている¹³⁾。このように植物細胞内には多種の CDK が存在し、少なくとも3つのタイプ (CDK-a, CDK-b1, CDK-b2; 第1章を参照のこと) に分類されている。今のところタバコからは a-type の Ntcdc2a と b1-type の Ntcdc2b の2種類の CDK しか単離されていないが、タバコにも更に異なる CDK が存在すると考えられる。これらのことを考慮すると、サイクリンDが *in vivo* においても CDK-a と複合体を形成し、機能しているかは疑問が残る。そこで、タバコ培養細胞 BY-2 を材料にして植物細胞内でもサイクリンDが CDK-a と複合体を形成しているか解析した。本章では動物のサイクリンDと最も性質が類似している A-type のサイクリンD (第1章の考察を参照のこと) である NtcycD3-1 を中心に解析を行った。

植物細胞内でサイクリンDは a-type の CDK と複合体を形成する

まず *in vivo* の解析に用いる抗 NtcycD3-1 抗体を作製した。他のタバコサイクリンDとの相同性が低い N 末端側から 13 アミノ酸残基のペプチドを抗原として抗血清を調製し、抗原ペプチドを結合させたアフィニティーカラムを用いて抗体を精製した。得られた抗体の特異性をバキュロウィルス発現系により調製した組み換えタンパク質を用いて確認したところ、他の3種類のタバコサイクリンD (NtcycD3-2a, NtcycD3-2b, NtcycD3-3)、2種類のタバコサイクリンA (Ntcyc25, Ntcyc27) そして1種類のタバコサイクリンB (Ntcyc29) とは結合せず、NtcycD3-1のみを特異的に認識することが分かった (図13A)。同様にして調製した2種類の抗 Ntcyc25 抗体も Ntcyc25のみを特異的に認識することが分かった (図13A)。残念ながら、これらの抗体を用いた Western 解析により細胞粗抽出液中の NtcycD3-1 または Ntcyc25 を検出することは出来なかった。また、PSTAIRES 配列が保存されていることが CDK-a の特徴の1つであることより¹³⁾、市販の抗 PSTAIRES 抗体が CDK-a を特異的に認識するか解析した (図13B)。その結果、a-type の Ntcdc2a を良く認識し、b1-type の Ntcdc2b とはほとんど結合しないことが分かり、抗 PSTAIRES 抗体は CDK-a に対する特異性が高いことが示唆され、CDK-a の検出に抗 PSTAIRES 抗体を用いることにした。

抗 PSTAIRES 抗体を用いて免疫沈降を行い、同抗体で Western 解析を行ったところ、3本のバンドが検出された (図14)。主なバンドが約 34 kDa の位置に認められ、それより移動度が小さい位置に2本の薄いバンドが認められた。このことより以下の3つの可能性が考えられた。

- 1) タバコに抗 PSTAIRES 抗体で認識される少なくとも3種類の CDK-a が存在する。
- 2) リン酸化等の修飾により移動度が変化し、同一の CDK が複数のバンドとして認められた。

3) PSTAIRE 配列が完全に保存されていない CDK-b を抗 PSTAIRE 抗体が認識した。アルファルファ、イネ、キンギョソウ、ダイズでは2種類の CDK-a の存在が認められている^{15) 16)}。そして、アルファルファの培養細胞の粗抽出液を材料に抗 PSTAIRE 抗体を用いて Western 解析を行うと、3本のバンドが検出されることが知られている⁶²⁾。これら3種類のタンパク質は陰イオン交換体である DEAE-Sepharose との結合能が異なり、3本のバンドの移動度は Potato acid phosphatase で処理しても、変化しないことが示された⁶²⁾。アルファルファでの知見を参考にすると1)の可能性が一番高いと思われる。しかし BY-2 細胞から粗抽出液を調製する際、脱リン酸化酵素阻害剤を加えずに処理すると移動度の小さいバンドが減少する傾向が認められた。このことより2)の可能性も十分考えられる。3)の可能性も否定はできないが、Ntcdc2a と Ntcdc2b に対する抗 PSTAIRE 抗体の特異性の差を考慮すると、2本の薄いバンドは a-type 以外の CDK であるかもしれないが、少なくとも主要なバンドである約 34 kDa のタンパク質は CDK-a であると考えられる。

抗 PSTAIRE 抗体でタバコ培養細胞 BY-2 内の CDK を検出できることが分かったので、抗 Ntcdc3-1 抗体を用いて免疫沈降を行い、CDK が共沈されているか抗 PSTAIRE 抗体を用いて調べた。その結果、Ntcdc3-1 が PSTAIRE 抗体で認識される約 34 kDa の CDK と複合体を形成していることが分かり、Ntcdc3-1 は植物細胞内でも a-type の CDK と複合体を形成し、機能していることが示唆された(図 14)。この結果は植物細胞内に実際に存在するサイクリン/CDK 複合体の実体を初めて明らかにしたのと同時に、*in vitro* での解析結果が必ずしも組み換えタンパク質を用いたことによる人工的な産物ではなく *in vivo* での現象を適切に反映していることも示唆しており、非常に重要な意味を持つものと考えられる。抗 Ntcdc25 抗体を用いた解析によりサイクリン A である Ntcdc25 も PSTAIRE 抗体で認識される約 34 kDa の CDK と複合体を形成していることが分かり、植物細胞内で Ntcdc3-1 が複合体を形成している CDK と同じ CDK と複合体を形成していることが示唆された(図 14)。また第 1 章にてデータは示さなかったが、*in vitro* で Ntcdc25 はタバコサイクリン D と同様に Ntcdc2a と複合体を形成し、NtRb1 と Histone H1 に対してキナーゼ活性を示した。酵母では G1 サイクリンと M 期サイクリンのいずれも同一の CDK と複合体を形成し、細胞周期の各時期の進行を制御している。つまり酵母ではサイクリンが有する機能およびそれを制御する機構が、細胞周期制御機構において極めて重要な位置を占めていると考えられる。一方、動物細胞では G1 サイクリンであるサイクリン D は CDK4,6 と複合体を形成し、サイクリン E は CDK2 と複合体を形成する。そして M 期サイクリンであるサイクリン A は CDK1,2 と複合体を形成し、サイクリン B は CDK1 複合体を形成する。動物ではサイクリン/CDK 複合体が示す活性の特異性が CDK にも依存していることが知られており、サイクリン単独としての機能も重要ではあるが、複合体としての制御が細胞周期制御機構においてより大きな意味を持っていると考えられる。G1 サイクリンと考えられる A-type のサイクリン D と M 期サイクリンであるサイクリン A が同一の CDK と複合体を形成していることを示唆した本研究の結果は、高等植物におけるサイクリンの位置付けが動物より酵母のものに近いことを示唆している。高等植物ではサイクリンの多様性が細胞周期の柔軟かつ厳密な制御

において重要な要素になっていると考えられ、それ故に高等植物に特異的なサイクリン D が多数存在するものと思われる。ただし前述したように高等植物からは酵母の CDK に相当するもの以外に高等植物に特有な CDK が単離されており、サイクリンと CDK は共に動物とは異なる高等植物独自の機能を獲得してきたことが示唆される。これまでの知見ではその主だった違いがサイクリン D と CDK-b に集約されており、この2つの役者が高等植物の細胞周期制御機構を知る上で鍵となっている可能性が考えられる。

高等植物においても G1/S 移行期に Rb タンパク質に対するキナーゼ活性が上昇する

動物細胞ではサイクリン D の mRNA の蓄積量が細胞周期を通じて一定であるにも関わらず、サイクリン D/CDK4,6 複合体は G1 期後期に特異的に活性化され、Rb タンパク質をリン酸化することを介して細胞周期を S 期へと移行させる。そこで動物のサイクリン D と発現様式が同じ A-type のサイクリン D である Ntcdc3-1 と CDK の複合体が示す活性の細胞周期特異性を解析した。タバコ培養細胞 BY-2 を微小管の重合阻害剤を用いて M 期に同調化し、M 期から S 期にかけての NtRb1 および Histone H1 に対するキナーゼ活性を検出した (図 15A)。

Ntcdc3-1/CDK 複合体の活性をみる前に、まず p13^{SUC1} アフィニティービーズを用いて解析を行った。p13^{SUC1} は分裂酵母由来のタンパク質で酵母においてサイクリン/CDK 複合体と結合することが分かっている。また動物の CDK1 (Cdc2) そして CDK2 とも結合することが知られており、細胞周期の研究分野でサイクリン/CDK1,2 複合体を精製するのに広く用いられている⁽⁶³⁾。高等植物で単離されている CDK はいずれも CDK1 あるいは CDK2 との相同性が最も高い。そこで p13^{SUC1} アフィニティービーズを用いることにより高等植物のサイクリン/CDK1,2 類似複合体を全体的に精製でき、植物細胞内の総合的なキナーゼ活性が捉えられると考えた。p13^{SUC1} アフィニティービーズと結合するサイクリン/CDK 複合体の Histone H1 に対するキナーゼ活性をみたところ、G2/M 期と G1 期後期から S 期に活性が上昇することが分かった (図 15B)。S 期の細胞が減少し、G2/M 期の細胞が増加している 14 時間目に Histone H1 キナーゼ活性が低下したのは、S 期から G2/M 期にかけて一旦活性が低下するためであると考えられる。アルファルファの培養細胞で p13^{SUC1} アフィニティービーズを用いた同様な実験が行われており、S 期に Histone H1 キナーゼ活性が認められ、一度低下した後に G2/M 期に再びキナーゼ活性が上昇することが報告されている^{(62) (64)}。本実験結果とアルファルファでの知見を併せると、高等植物では G1/S 移行期と G2/M 移行期に Histone H1 キナーゼ活性が上昇すると考えられる。次に、NtRb1 に対するキナーゼ活性をみたところ、0 時間での活性が相対的に低かったが、Histone H1 を基質にした場合と同様の結果が得られた。この結果より以下の3つの可能性が考えられた。

- 1) G1/S 移行期と G2/M 移行期の両時期において同程度に Histone H1 キナーゼ活性と NtRb1 キナーゼ活性の両活性が必要である。
- 2) 実際は両移行期において必要とされている活性化の程度は異なるが、Histone H1 または NtRb1 のいずれかを特異的にリン酸化するキナーゼ群が p13^{SUC1} アフィニティービーズと結合しないため両移行期のキナーゼ活性の特異性に差が認められなかった。

3) p13^{SUC1} アフィニティーピースと結合している両移行期のキナーゼ群の基質特異性は異なるが、活性をみる際に基質を単独で用いたため差が認められなかった。タバコのサイクリン/CDK 複合体は *in vitro* の解析より Histone H1 と NtRb1 のいずれも基質に出来ることより、特定の基質に対する特異性が低いことが考えられた (第1章を参照のこと)。実際はサイクリンと CDK の組み合わせにより Histone H1 および NtRb1 に対する基質特異性は異なっているが、基質が単独で存在する場合、両基質を同様にリン酸化してしまうかもしれない。事実、動物での研究において Rb タンパク質または Histone H1 を単独で基質として用いると、抗サイクリン D1 抗体を用いたマウスの骨髄細胞からの免疫沈降物はいずれに対してもキナーゼ活性を示すが、両基質を同時に加えると Rb タンパク質を特異的にリン酸化することが知られている⁶⁾。そこで Histone H1 と NtRb1 を同時に基質として加え、それぞれに対するキナーゼ活性を検出することにより、3) の可能性について検討を行った (図 15B)。その結果、非常に興味深いことに NtRb1 に対するキナーゼ活性は G1/S 期にのみ認められ、G2/M 期に認められていた活性は消失した。一方、Histone H1 キナーゼ活性は G2/M 期には特に変化は認められなかったが、NtRb1 キナーゼ活性が認められた G1/S 移行期において著しく減少した。このことより G1/S 移行期と G2/M 移行期においてそれぞれ NtRb1 キナーゼ活性と Histone H1 キナーゼ活性が特異的に活性化されることが分かった。高等植物において *in vivo* の Rb タンパク質に対するキナーゼ活性を検出したことは本研究が最初であり画期的な成果である。更に Rb タンパク質に対するキナーゼ活性が G1/S 移行期に特異的に上昇することを示した本結果は、動物細胞の G1/S 移行期の制御機構と同様に高等植物においても Rb タンパク質のリン酸化が G1 期から S 期への移行に関与していることを強く示唆しており、非常に大事な意味を持っていると思われる。なお、この実験で基質として用いた NtRb1 はポケット領域を含まない C 末端領域のみであり、13 カ所存在する推定リン酸化部位の内 6 個しか有していない。動物では各サイクリン/CDK 複合体による Rb タンパク質のリン酸化部位が異なると考えられていることより、NtRb1 の全長を基質として用いれば、今回と異なった結果が得られるかもしれない。動物細胞で G1/S 移行期における Rb タンパク質の制御機構が詳細に解析されており、まずサイクリン D/CDK4,6 複合体により C 末端領域がリン酸化されることが重要であることが明らかにされた⁵²⁾。このことを考慮すると C 末端領域のみを用いた結果ではあるが G1/S 移行期の制御に限定して論じるには十分であると思われる。言い換えれば高等植物でも G1/S 移行期において Rb タンパク質の少なくとも C 末端領域がリン酸化されることが示唆された。G1/S 移行期と G2/M 移行期におけるキナーゼ活性の特異性に差が認められたものの、p13^{SUC1} アフィニティーピースが植物細胞内の全てのサイクリン/CDK 複合体と結合しているかは不明である。この実験のみでは植物細胞内の総合的なキナーゼ活性の変動を捉えているとは言えないが、細胞周期の 2 つの重要な制御時期で p13^{SUC1} アフィニティーピースと結合するキナーゼ群が異なる制御を受けていることを示唆した意義は大きい。

次に p13^{SUC1} アフィニティーピースを用いた解析で使用したのと同じ細胞粗抽出液を材料にして、NtCycD3-1/CDK 複合体のキナーゼ活性の検出を試みた。抗 NtCycD3-1 抗体の力価が低い、あるいは植物細胞内の NtCycD3-1 の存在量が少ないこと等の原因による

と考えられるが、 $p13^{SUC1}$ アフィニティービーズを用いた解析のように顕著なキナーゼ活性の変動を捉えることは困難であり、Histone H1 と NtRb1 を同時に基質として加えてそれぞれの活性の変動をみることは出来なかった。しかし基質を単独で加えた実験により、活性の変化の傾向をある程度みることが出来た (図 15B)。活性の強さはバンドの濃さを定量し、相対値として数値化した (図 15C)。Histone H1 キナーゼ活性は最高で 2 倍弱程度の変化幅であったものの G2/M 期と G1/S 期に活性が上昇するような傾向が認められ、 $p13^{SUC1}$ アフィニティービーズを用いた場合と同様な変化を示した。一方、NtRb1 に対するキナーゼ活性は G1/S 期に 2~3 倍に上昇した。 $p13^{SUC1}$ アフィニティービーズを用いた解析では 8 時間目より NtRb1 キナーゼ活性の上昇が認められたのに対して、NtcycD3-1/CDK 複合体の活性は 6 時間目から上昇することが分かった。DNA ヒストグラムをみてみると S 期の細胞は同調後 8 時間目より増加していることより、NtcycD3-1/CDK 複合体は明らかに S 期に移行する前の G1 期後期に活性化されていると思われる。第 1 章の考察において、G1 期から S 期への移行過程においてまず A-type のサイクリン D/CDK 複合体が Rb タンパク質をリン酸化し、その結果、動物のサイクリン E に相当すると考えられる C-type のサイクリン D の発現が誘導されて CDK と複合体を形成し、更に Rb タンパク質をリン酸化するのではないかと推察した。C-type のサイクリン D/CDK 複合体あるいはその他のサイクリン/CDK 複合体の解析を待たないと明らかなことは言えないが、 $p13^{SUC1}$ アフィニティービーズによる活性を植物細胞内の総合的な活性であると仮定すると、NtcycD3-1/CDK 複合体の NtRb1 キナーゼ活性が植物細胞内の総合的な NtRb1 キナーゼ活性の上昇に先だって上昇することを示したこの結果は、A-type のサイクリン D/CDK 複合体が動物細胞におけるサイクリン D/CDK4,6 と同様な役割を担い、A-type のサイクリン D が G1 期から S 期への移行においてセンサーとして機能しているという考えを支持していると思われ、非常に興味深い。

更にサイクリン A である Ntcyc25 と CDK の複合体が示す活性の細胞周期特異性を解析したところ、G2/M 期に Histone H1 キナーゼ活性が上昇した (図 15B)。Histone H1 キナーゼ活性の変化は 4~5 倍も認められ、明らかに G2/M 期に特異的に活性化されていることが分かったが、NtRb1 キナーゼ活性はほとんど検出できなかった。わずかに確認できるバンドを定量してみたところ、1.5 倍弱程度の変化しか認められず、2 回行った実験で特徴的な傾向は確認できなかった (図 15C)。このことより Ntcyc25/CDK 複合体は Histone H1 に対する基質特異性が高く、NtRb1 をリン酸化しないと考えられた。Ntcyc25 は *in vitro* の解析では Ntcdc2a と複合体を形成して NtRb1 に対してもキナーゼ活性を示した。Histone H1 との基質特異性の差はあるかもしれないが、NtRb1 を基質として単独で加えればキナーゼ活性が検出できると思われる。しかし *in vivo* では NtRb1 キナーゼ活性を示さなかったことは非常に興味深い現象である。

- 1) Ntcyc25 が *in vivo* では Ntcdc2a 以外の Histone H1 キナーゼ活性を特異的に示す CDK と優先的に複合体を形成している。
 - 2) 複合体が修飾を受け基質特異性が変化した。
 - 3) 基質特異性を規定する因子と相互作用している。
- などの原因が考えられ、今後の詳細な解析が望まれる。

高等植物由来の A-type のサイクリン D の核への局在化にはリン酸化が関与している

A-type のサイクリン D である NtcycD3-1 が動物のサイクリン D と同様に G1/S 移行期に機能していることが示唆された。繰り返しになるが、A-type のサイクリン D と動物のサイクリン D は発現レベルで細胞周期に伴う制御を受けていない。ではサイクリン D はどのようにして G1/S 移行期に特異的にその機能を発揮しているのであろう。動物のサイクリン D は主に以下の 3 つの制御を受けていることが明らかにされている⁶⁶⁾。

- 1) 活性化因子または阻害因子との相互作用^{67) 68) 69)}
- 2) 細胞内局在性の変化^{39) 41) 69) 70) 71)} (図 3B)
- 3) タンパク質の安定性の制御^{40) 41) 72)} (図 3)

動物の CDK 阻害因子 (CDK inhibitor; CKI) は主に 2 つのグループに分類されている。G1/S 移行期に関与している CDK4,6 のみと特異的に結合する INK4 (inhibitor of CDK4) ファミリーとサイクリン A,E,D/CDK 複合体と結合する Cip/Kip (CDK-interacting protein) ファミリーである。現在これらの CKI はサイクリン/CDK 複合体の活性を正と負の両方向に複雑に制御していることが明らかになりつつあり、G1/S 移行期の制御に重要な役割を果たしていることが示唆されている⁶⁷⁾。高等植物でも CKI 類似遺伝子がシロイヌナズナ (*ICK1*) から単離されている。ICK1 は酵母の Two-hybrid 法および *in vitro* の結合解析によりシロイヌナズナの CDK-a (*cdc2aAt*) そして A-type のサイクリン D (*Arath;CycD3;1*) と結合することが示された³⁶⁾。更にシロイヌナズナから p13^{SUC1} アフィニティービーズを用いて精製したキナーゼ群の Histone H1 キナーゼを阻害することが示され、CDK 阻害因子として機能していることが示唆された。またアルファルファで S 期の細胞から p13^{SUC1} アフィニティービーズを用いて精製したキナーゼ群の Histone H1 キナーゼ活性が、CDK-a の C 末端側 16 アミノ酸を認識する抗体を加えることにより活性化されるという報告があり、CDK-a の C 末端領域に活性を制御する因子が相互作用している可能性が考えられている⁶²⁾。これらの知見より高等植物でも A-type のサイクリン D が CDK 阻害因子等により細胞周期に依存した制御を受けている可能性が予想される。

さて、サイクリン D/CDK 複合体の標的が Rb タンパク質であることを考慮すると、サイクリン D/CDK 複合体は Rb タンパク質をリン酸化する時期に核内に存在する必要がある。既に動物のサイクリン D は G1/S 移行期に特異的に核に局在化することが知られており⁶¹⁾、ヒトのサイクリン D1 の細胞内局在性の制御には 2 カ所のリン酸化部位が関与していることが分かっている^{39) 41)}。サイクリン D には核局在化シグナル配列が存在しないことより、リン酸化を認識する細胞内因子が存在し、その因子により核内外に運ばれると考えられている。CKI が核内への移行にも関与しているとの報告もあるが³⁹⁾、まだ統一的なモデルは提唱されていない。第 1 章のサイクリン D/CDK 複合体の活性化機構の解析において少し触れたが、156 番目のスレオニン残基と 286 番目のスレオニン残基の 2 カ所のリン酸化部位が細胞内局在性に関わっている (図 3B)。156 番目のスレオニン残基のリン酸化は CAK による活性化に必要であると共に細胞質から核への移行にも必要であり³⁹⁾、286 番目のスレオニン残基のリン酸化は核から細胞質への移行に必

要とされている⁴¹⁾。また 286 番目のスレオニン残基はタンパク質の安定性にも寄与しており、リン酸化されるとユビキチン系による分解が促進されることが知られている⁴⁰⁾。156 番目のスレオニン残基は CDK と複合体を形成することにより自己リン酸化を受け³⁹⁾、286 番目のスレオニン残基は GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β) によりリン酸化されることが分かっている⁴¹⁾。第 1 章において述べたように高等植物のサイクリン D には、これら 2 カ所のリン酸化部位が高度に保存されている。156 番目のスレオニン残基に相当するリン酸化部位に関しては *in vitro* の解析により機能的にも保存されていることが示唆され、CAK が関与する機能は保存されていることが分かり、その他の機能も保存されている可能性が十分考えられた。そこで、緑色の蛍光を外来の基質を投与せずに発光するため生細胞での観察が可能である GFP (green fluorescent protein) を C 末端側に融合させたタバコサイクリン D を発現する形質転換体 BY-2 細胞を作出し、タバコサイクリン D の細胞内局在性を解析することにした。GFP 融合タバコサイクリン D は CaMV (cauliflower mosaic virus) 35S プロモーター下で構成的に発現させた。4 種類のタバコサイクリン D と Ntcdc3-1 の 3 種類のアミノ酸置換変異体 (T191A, S296A, S300A, T191A, S296A, S300A; 第 1 章を参照のこと) を発現させた形質転換体を作成して解析を行った。

ヒトのサイクリン B1 は GFP を融合させても CDK1 との結合能および CDK1 との複合体のキナーゼ活性、そして細胞内局在性に变化を与えないことが知られている⁷³⁾。しかし GFP の分子量は約 27 kDa もあり、融合タンパク質にすることによりサイクリン D の本来の機能が保持されていない可能性が考えられる。そこでまず CDK と複合体を形成しているか、またその複合体がキナーゼ活性を示すか解析を行うことにより、基本的な機能を保持しているか確認した。CDK との複合体形成の解析は抗 GFP 抗体と抗 PSTAIRE 抗体を用い、上記の *in vivo* の解析と同様に行った。その結果、Ntcdc3-1 は C 末端側に GFP を融合させても *in vivo* で a-type の CDK と複合体を形成することが分かった (図 16B)。また GFP 融合タンパク質を強制的に高発現させた系ではあるものの、他のタバコサイクリン D (Ntcdc3-2a, Ntcdc3-2b, Ntcdc3-3) も *in vivo* で a-type の CDK と複合体を形成することが示唆された。次にこれらの Histone H1 キナーゼ活性をみたところ、Ntcdc3-1-GFP/CDK 複合体、Ntcdc3-2b-GFP/CDK 複合体および Ntcdc3-3-GFP/CDK 複合体は活性を示した (図 16A)。このことより Ntcdc3-1、Ntcdc3-2b および Ntcdc3-3 は C 末端側に GFP を融合させても基本的には従来保持している機能に影響が無いと判断した。Ntcdc3-2a-GFP/CDK 複合体の Histone H1 キナーゼ活性が検出できなかった原因が GFP を融合させた影響であるかは分からない。それは以下の 3 つの可能性が考えられるからである。

- 1) 実験系の検出感度の問題により活性が検出できなかった。
- 2) Histone H1 を *in vivo* では良い基質としない。
- 3) 同調化していない細胞集団を材料として用いたため不活性型の複合体が主に存在しており活性が認められなかった。

Ntcdc3-1 の変異体に関しては Ntcdc3-1 と同様に *in vivo* で CDK と複合体を形成することが分かった。それら変異体の複合体の Histone H1 キナーゼ活性は *in vitro* の解析と

同様な結果が得られ、191番目のスレオニン残基がリン酸化されない変異体では Histone H1 キナーゼ活性が著しく減少し、植物細胞内でも191番目のスレオニン残基のリン酸化が複合体の最終的な活性化に必要であると結論した。このことより高等植物に CAK による活性化機構が保存されていることが更に強く示唆された。

GFP を融合させてもサイクリン D の機能に基本的には影響が無いことが分かったので蛍光顕微鏡を用いて細胞内局在性を解析した。その結果、NtcycD3-1-GFP を発現させた形質転換体の多くの細胞で核に緑色蛍光が観察され、NtcycD3-1 は核に局在化することが分かった (図 17-1)。ただし残念ながらサイクリン D を発現させた形質転換体では詳細な解析に耐え得る高率的な同調化が出来なかったため、細胞周期の特定の時期に NtcycD3-1-GFP が核に局在化するかは分からなかった。次に NtcycD3-1-GFP の変異体を用いた解析により、191番目のスレオニン残基のリン酸化が核への局在化に必要であることが分かった (図 17-2)。この結果のみでは細胞質から核への移行が妨げられたのか、もしくは核から積極的に細胞質へと輸送されるような機構が働いているのかは分からないが、動物での知見を参考にするると前者の可能性が極めて高いと考えられ、高等植物にもリン酸化によりサイクリン D の細胞内局在性を制御する機構が保存されていることが示唆された。今回の解析ではあえて NtcycD3-1 は核に局在化すると表現したが、リン酸化による細胞内局在性の制御機構が保存されていることが示唆されたことより、タバコの A-type のサイクリン D も動物のサイクリン D と同様に細胞周期の各時期において細胞内局在性が変化している可能性は十分考えられる。現段階では生細胞を用いて核と GFP を同時に観察することに成功していないが、今後、同調化せずに細胞周期の時期を特定できる LSC の最大の利点を生かして、個々の細胞が細胞周期のどの時期にあるのかを解析し、細胞周期の時期と細胞内局在性を対応させた詳細な解析を行うことが望まれる。その結果を待たねば明らかなことは言えないが、A-type のサイクリン D である NtcycD3-1/CDK 複合体を G1/S 移行期に特異的に活性化させる機構の 1 つとして細胞内局在性による制御が行われている可能性が高い。なお、NtcycD3-2a、NtcycD3-2b そして NtcycD3-3 についても解析を進めているが、現時点では明らかなことは言えず、本論文では結果を割愛した。

最後に

本研究では動物のサイクリン D に機能的に最も近いと推定される NtcycD3-1 を中心に解析を行ったため、必然的に動物で得られている知見を踏襲する結果が得られたと解釈することもできる。今後、高等植物に特有と考えられる NtcycD3-2a や NtcycD3-2b で同様な実験を行うことにより、高等植物独自の現象が明白になることが期待される。すなわち、G2/M 期で生成した NtcycD3-2a や NtcycD3-2b が直ちに核に局在化するのか、それらのサイクリン D の細胞内局在性にリン酸化が関与するのか、核局在化の機構は G1/S 期と G2/M 期で同じであるか等、高等植物を用いなければ解明できない多くの重要な研究課題が残されていることを最後に付け加えたい。

2-6 小 括

タバコサイクリン D は *in vitro* で a-type の CDK (CDK-a) と複合体を形成してキナーゼ活性を示すことが明らかになった。そこでタバコサイクリン D が *in vivo* でも CDK-a と複合体を形成しているかをタバコ培養細胞 BY-2 を材料にして解析を行った。A-type のサイクリン D である NtcycD3-1 とサイクリン A である Ntcyc25 を特異的に認識する抗体を作製して免疫沈降法により解析した結果、NtcycD3-1 と Ntcyc25 は *in vivo* で抗 PSTAIRE 抗体で認識される約 34 kDa の CDK-a と複合体を形成していることが分かった。更に GFP を融合させたサイクリン D を強制的に高発現させた形質転換体 BY-2 細胞を作出して解析を行った結果、他の 3 種類のサイクリン D (NtcycD3-2a, NtcycD3-2b, NtcycD3-3) も約 34 kDa の CDK-a と複合体を形成していることが示唆された。この結果は *in vitro* の解析結果が *in vivo* の事象を反映していることを示唆すると共に植物細胞内に実在するサイクリン/CDK 複合体を初めて明らかにしたことになる。同時に高等植物では G1 サイクリンと M 期サイクリンに分類される多種類のサイクリンが植物細胞内で同じ CDK と複合体を形成していることが示唆された。

サイクリン/CDK 複合体は細胞周期特異的に活性化され、細胞周期の秩序正しい進行を制御している。植物細胞内の多様なサイクリン/CDK 複合体と結合できると思われる p13^{SUC1} アフィニティービーズを用い、同調化したタバコ培養細胞 BY-2 のキナーゼ活性を解析したところ、G1/S 移行期に NtRb1 キナーゼ活性が上昇し、G2/M 移行期に Histone H1 キナーゼ活性が上昇することが分かった。このことは高等植物において *in vivo* の Rb タンパク質キナーゼ活性を初めて検出したことになり、更に G1/S 移行期に Rb タンパク質キナーゼ活性が必要とされることを示唆しており、非常に重要な意味合いを持つ結果である。本結果より高等植物の G1/S 移行期の制御機構においても動物細胞のものと同様に Rb タンパク質のリン酸化過程が関与していることが強く示唆された。

NtcycD3-1/CDK 複合体の活性を解析したところ、NtRb1 キナーゼ活性が G1/S 移行期に上昇することが示唆された。しかも p13^{SUC1} アフィニティービーズによる NtRb1 キナーゼ活性より先に上昇することが分かった。このことより A-type のサイクリン D/CDK 複合体が動物のサイクリン D/CDK4,6 と同様な役割を果たしていることが強く示唆された。次に Ntcyc25/CDK 複合体についても解析したところ、Histone H1 キナーゼ活性が G2/M 移行期に上昇することが分かった。また組み換えタンパク質を用いた *in vitro* の解析では NtcycD3-1/Ntcdc2a 複合体と Ntcyc25/Ntcdc2a 複合体はいずれも Histone H1 と NtRb1 に対してキナーゼ活性を示したが、NtcycD3-1 と Ntcyc25 が *in vivo* で形成している複合体は基質特異性を有していることが示唆され、サイクリン/CDK 複合体が *in vivo* ではより高度な制御を受けていることが考えられた。

NtcycD3-1/CDK 複合体が細胞周期に依存した制御を受けていることが示唆された。同様な制御を受けていると考えられる動物細胞のサイクリン D の制御機構の要素の 1 つに細胞周期特異的な細胞内局在性の変化が挙げられている。そこでタバコサイクリン D の細胞内局在性の解析を行うことにした。蛍光を発することで生細胞での観察が可能である GFP を融合させたサイクリン D を構成的に高発現する形質転換体 BY-2 細胞を作出

して解析した。まず抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降法により *in vivo* で CDK-a と複合体を形成すること、更に Histone H1 キナーゼ活性を示すことが分かった。このことより GFP を融合させることでサイクリン D の基本的な機能に影響を与えないことが示唆された。第 1 章の *in vitro* の解析で活性化に関与していることが示唆された推定リン酸化部位のアミノ酸置換変異体についても解析を行ったところ、*in vitro* と同様な結果が得られ *in vivo* でも CDK との複合体の活性化にリン酸化が必要であることが分かった。このことより高等植物に CAK によるリン酸化を介したサイクリン/CDK 複合体の活性制御機構が保存されていることが更に強く示唆された。GFP の蛍光により細胞内局在性を観察したところ、NtcycD3-1 は多くの細胞で核に局在化していることが分かり、CAK による活性化に必要であるリン酸化が細胞内局在性にも関与していることが示唆された。この結果は高等植物にもリン酸化によるサイクリン D の細胞内局在性を制御する機構が保存されていることを示唆すると共に NtcycD3-1/CDK 複合体の細胞周期特異的な制御に細胞内局在性が関与している可能性を示した。

総 括

高等植物における細胞周期に関する研究は、その研究対象となる植物種が多岐に渡っていることにも起因して未だ断片的な成果しか得られていない。本論文で研究対象として選択したサイクリンDに関して言えば、高等植物からは私達が単離したものを含めて計17種類のサイクリンDがシロイヌナズナ、アルファルファ、キンギョソウ、ヒマワリ、アカザそしてタバコから単離されており、その分類はシロイヌナズナのサイクリンDのアミノ酸配列をもとに行われている。この分類法に従えばタバコから単離された6種類のサイクリンDの内、5種類はD3-type、1種類がD2-typeに分類されることになり、これまでの数少ない知見をもとにしても、構造による分類とその性質に全く相関性が認められず、高等植物における多様なサイクリンDの全容を捉えることが出来ていないのが現状である。これはサイクリンDに限らず、多くの植物種で得られた知見を総合して高等植物における普遍的な制御機構を推し量ることは現時点では非常に困難であり、1つの植物種で網羅的に研究を進める必要性が考えられる。そこで本研究では、1) 培養細胞で高度な同調培養系が確立されている、2) 双子葉のモデル植物の1つで多くの情報が得られる、3) 前者2つの利点により多くの細胞周期関連遺伝子が単離されていることにより細胞周期の研究に最適であると考えられるタバコを植物材料として選択し、同時に4種類のサイクリンD (NtcycD3-1, NtcycD3-2a, NtcycD3-2b, NtcycD3-3) の解析を行うことにより、高等植物における多様なサイクリンDの基本的な特質の解明を試みた。

第1章では、第一に細胞周期に伴う発現様式の解析を行い、発現様式の特徴より高等植物のサイクリンDが機能的に3つのタイプに分類できる可能性を提示した。1) 発現様式が細胞周期に依存せず、動物のサイクリンDと同様に細胞外シグナルのセンサーとして機能するA-type (NtcycD3-1, NtcycD3-3)、2) G2/M期にmRNAの蓄積量が増加し、G2/M移行期を制御しているB-type (NtcycD3-2b)、3) G1/SそしてG2/M移行期にmRNAの蓄積量が増加し、動物のサイクリンEのように他のサイクリン/CDK複合体による効果を増強するC-type (NtcycD3-2a) の3つである。第二に組み換えタンパク質を用いた解析を行い、4種類のサイクリンDが全てCDK-aに分類されるタバコ由来のCDK (Ntcdc2a) と活性のある複合体を形成できることを明らかにした。これらの複合体はタバコ由来のRbタンパク質のホモログ (NtRb1) とHistone H1に対してキナーゼ活性を示した。第三に推定リン酸化部位のアミノ酸置換変異体を用いた解析により、NtcycD3-1/Ntcdc2a複合体の活性化にリン酸化が必要であることが分かり、シロイヌナズナ由来のCAK (Cak1At) により活性化されることを示した。

第2章では、タバコ培養細胞BY-2を材料として用いて *in vivo* の解析を行った。第一に各サイクリンに特異的な抗体を用いた免疫沈降法によりNtcycD3-1とサイクリンA (Ntcyc25) が植物細胞内でCDK-aと複合体を形成していることを示唆した。残り3種類のサイクリンDもCDK-aと複合体を形成することを形質転換体BY-2細胞を用いた解析により示唆した。第二にキナーゼ活性の細胞周期特異性の解析を行った。p13^{SUC1}アフィニティービーズを用いた解析により、高等植物ではG1/S移行期にRbタンパク質に対

するキナーゼ活性が上昇し、G2/M移行期には Histone H1 キナーゼ活性が上昇することを示唆した。また Ntcdc3-1/CDK 複合体の NtRb1 キナーゼ活性は G1/S 期に上昇し、Ntcdc25/CDK 複合体の Histone H1 キナーゼ活性は G2/M 期に上昇することを示唆した。第三に GFP 融合タンパク質を発現する形質転換体 BY-2 細胞を作出し、サイクリン D の細胞内局在性の解析を行った。推定リン酸化部位のアミノ酸置換変異体を用いた解析により、*in vivo* においても Ntcdc3-1/CDK 複合体の活性化にはリン酸化が必要であることを示唆し、更に活性化に必要であるリン酸化部位が細胞内局在性にも関与していることを示唆した。

以上、本研究を通じて多くの新しい知見が得られ、高等植物におけるサイクリン D の特徴付けに留まらず、高等植物における細胞周期制御機構に関する幾つかの重要な知見が得られた。特に次の2つの点において画期的な成果を示した。

- 1) 活性のある複合体を形成できるサイクリンと CDK の組み合わせを高等植物において初めて明らかにした。
- 2) 高等植物で初めて Rb タンパク質に対するキナーゼ活性を検出した。

本研究で得られた知見を総合することにより、高等植物のサイクリン D は以下の特徴を有し、細胞周期を制御していると結論した。高等植物のサイクリン D は機能的に3つのタイプ (A, B, C) に分類でき、G1/S または G2/M 移行期のいずれかにおいて細胞周期の進行を制御している。3つのタイプのサイクリン D はいずれも CDK-a と複合体を形成してそのキナーゼ活性を制御するが、中でも A-type のサイクリン D は G1 期後期に CDK-a と活性のある複合体を形成し、Rb タンパク質をリン酸化することにより細胞周期を S 期へと移行させる。A-type のサイクリン D はリン酸化により細胞内局在性および活性が制御されており、G1/S 移行期に特異的に活性のある複合体を形成する。

2000 年にはシロイヌナズナの全ゲノム配列が決定されることにより、高等植物 (特に双子葉植物) における細胞周期を制御している遺伝子群の全容が明らかにされ、動物や酵母等の他の真核生物との違いが遺伝子レベルで浮き彫りにされるであろう。本論文はそれに先駆け、高等植物の細胞周期の研究において最大の課題となっていた、1) 植物細胞内でどのような組み合わせのサイクリン/CDK 複合体が機能しているのか、2) G1/S 移行期に Rb タンパク質が関与する制御機構が存在するのか、という2つの問いに対する答えを直接的あるいは間接的に示すことを通じて、高等植物と他の真核生物の細胞周期制御機構との相違点あるいは共通点を明確に提示した。この成果は高等植物の細胞周期の研究分野において道標的な役割を果たし、今後の進展に多大な貢献をするものと確信する。

参考文献

- 1) Robert A. Weinberg (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81, 323-330
- 2) Nicholas Dyson (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.*, 12, 2245-2262
- 3) Simon Whitehall, Peter Stacey, Keren Dawson, and Nic Jones (1999) Cell cycle-regulated transcription in fission yeast: Cdc10-Res protein interactions during the cell cycle and domains required for regulated transcription. *Mol. Biol. Cell*, 10 (11), 3705-3715
- 4) Tahara S., Tanaka K., Yuasa Y., and Okayama H. (1998) Functional domains of rep2, a transcriptional activator subunit for Res2-Cdc10, controlling the cell cycle "start". *Mol. Biol. Cell*, 9 (6), 1577-88
- 5) Sherr C.J. (1995) Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 107 (2), 181-186
- 6) Sherr C.J. (1995) D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.*, 20 (5), 187-190
- 7) Sherr C.J. (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 79 (4), 551-555
- 8) Sherr C.J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 73(6), 1059-1065
- 9) Hitoshi Matsushime, Mark E. Ewen, David K. Storm, Jun-ya Kato, Steven K. Hanks, Martin F. Roussel, and Charles J. Sherr (1992) Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK-B}/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell*, 71, 323-334
- 10) Matthew Meyerson and Ed Harlow (1994) Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.*, 14 (3), 2077-2086
- 11) Jun-ya Kato, Hitoshi Matsushime, Scott W. Hiebert, Mark E. Ewen, and Charles J. Sherr (1993) Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.*, 7, 331-342
- 12) Mark E. Ewen, Hayla K. Sluss, Charles J. Sherr, and David M. Livingston (1993) Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell*, 73, 487-497
- 13) Racheal P. Huntley and James A.H. Murray (1999) The plant cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 440-446
- 14) Dirk Inze, Crisanto Gutierrez, and Nam-Hai Chua (1999) Trends in plant cell cycle research. *Plant Cell*, 11, 1-4
- 15) Vladimir Mironov, Lieven De Veylder, Marc Van Montagu, and Dirk Inze (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants - The nexus. *Plant Cell*, 11, 509-521
- 16) Sylvia Burssens, Marc Van Montagu, and Dirk Inze (1998) The cell cycle in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.*, 36 (1-2), 9-19
- 17) Crisanto Gutierrez (1998) The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 492-497
- 18) John Doonan and Pierre Fobert (1997) Conserved and novel regulators of the plant cell cycle.

- Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 824-830
- 19) Qi Xie, Andress P. Sanz-Burgos, Gregory J. Hanson and Crisanto Gutierrez (1996)
Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins.
EMBO J., 15 (18), 4900-4908
 - 20) Gideon Grafi, Ronald J. Burnett, Tim Helentjaris, Brian A. Larkins, James A. De Caprio,
William R. Sellers, and William G. Kaelin, Jr. (1996) A maize cDNA encoding a member of
the retinoblastoma protein family: Involvement in endoreduplication.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 8962-8967
 - 21) Elena Ramirez-Parra, Qi Xie, Maria Beatrice Boniotti, and Crisanto Gutierrez (1999)
The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved
features with animal G1/S regulators. *Nucl. Acids Res.*, 27 (17), 3527-3533
 - 22) Catherine Riou-Khamlichi, Rachael Huntley, Annie Jacquard, James A.H. Murray (1999)
Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin.
Science, 283, 1541-1544
 - 23) Markus Frank and Thomas Schumling (1999) Cytokinin cycles cells.
Trends Plant Sci., 4 (7), 243-244
 - 24) Ingrid B D'Agostino and Joseph J Kieber (1999) Molecular mechanism of cytokinin action.
Curr. Opin. Plant Biol., 2, 359-364
 - 25) Yulius Yulianto Setiady, Masami Sekine, Norimitsu Haraguchi, Takuo Yamamoto,
Hiroshi Kouchi, and Atsuhiko Shinmyo (1995) Tobacco mitotic cyclins:
cloning, characterization, gene expression and functional assay. *Plant J.*, 8 (6), 949-957
 - 26) Yulius Yulianto Setiady, Masami Sekine, Norimitsu Haraguchi, Hiroshi Kouchi,
and Atsuhiko Shinmyo (1996) Molecular cloning and characterization of a cDNA clone that
encodes a cdc2 homolog from *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiol.*, 37 (3), 369-376
 - 27) Hirofumi Nakagami, Masami Sekine, Hiroko Murakami, and Atsuhiko Shinmyo (1999)
Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase
complex with Cdc2/cyclin D *in vitro*. *Plant J.*, 18 (3), 243-252
 - 28) Masami Sekine, Masaki Ito, Kenji Uemukai, Yoshio Maeda, Hirofumi Nakagami,
and Atsuhiko Shinmyo (1999) Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants.
FEBS Lettts., 460, 117-122
 - 29) Rajeev Soni, Jeremy P. Carmichael, Zahid H. Shah, and James A.H. Murray (1995)
A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and
containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell*, 7, 85-103
 - 30) Marlis Dahl, Irute Meskiene, Laszlo Bogre, Dang Thi Cam Ha, Ines Swoboda,
Rainer Hubmann, Heribert Hirt, and Erwin Heberle-Bors (1995) The D-type alfalfa cyclin
gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of
the cell cycle. *Plant Cell*, 7, 1847-1857
 - 31) David A. Sorrell, Bruno Combettes, Nicole Chaubet-Gigot, Claude Gigot,
and James A.H. Muray (1999) Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant

- levels of transcripts in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.*, 119, 343-351
- 32) Andreas Renz, Michelle D. Fountain, and Erwin Beck (1997) Nucleotide sequence of a cDNA encoding a D-type cyclin from a photoautotrophic cell suspension culture of *Chenopodium rubrum* (L.). *Plant Physiol.*, 113, 1004
- 33) Steven F. Dowdy, Philip W. Hinds, Kenway Louie, Steven I. Reed, Andrew Arnold, and Robert A. Weinberg (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*, 73, 499-511
- 34) Rachael Huntley, Sandra Healy, Donna Freeman, Paul Lavender, Sarah de Jager, Judith Greenwood, Joe Makker, Edward Walker, Mark Jackman, Qi Xie, Andrew J. Bannister, Tony Kouzarides, Crisanto Gutierrez, John H. Doonan, and James A.H. Murray (1998) The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol. Biol.*, 37, 155-169
- 35) Robert A. Ach, Tim Durfee, Ann B. Miller, Patti Taranto, Linda Hanley-Bowdoin, Patricia C. Zambryski, and Wilhelm Gruissem (1997) *RRB1* and *RRB2* encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 5077-5086
- 36) Hong Wang, Qungang Qi, Peter Schorr, Adrian J. Cutler, William L. Crosby, and Larry C. Fowke (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.*, 15 (4), 501-510
- 37) Roderic A. U. A. Fuerst, Rajeev Soni, James A.H. Murray, and Keith Lindsey (1996) Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 112, 1023-1033
- 38) Lieven De Veylder, Janice de Almeida Engler, Sylvia Bursens, Alexandra Manevski, Bernard Lescure, Marc Van Montague, Gilbert Engler, and Dirk Inze (1999) A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta*, 208, 453-462
- 39) J. Alan Diehl and Charles J. Sherr (1997) A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 17 (12), 7362-7374
- 40) J. Alan Diehl, Frederique Zindy, and Charles J. Sherr (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.*, 11, 957-972
- 41) J. Alan Diehl, Mangeng Cheng, Martine F. Roussel, and Charles J. Sherr (1998) Glycogen synthase kinase-3b regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.*, 12, 3499-3511
- 42) Jun-ya Kato, Masaaki Matsuoka, David K. Strom, and Charles J. Sherr (1994) Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase.

- Mol. Cell. Biol.*, 14 (4), 2713-2721
- 43) Masaaki Matsuoka, Jun-ya Kato, Robert P. Fisher, David O. Morgan, and Charles J. Sherr (1994) Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 14 (11), 7265-7275
 - 44) Masaaki Umeda, Rishikesh P. Bhalerao, Jeff Schell, Hirofumi Uchimiya, and Csaba Koncz (1998) A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5021-5026
 - 45) Masatoshi Yamaguchi, Masaaki Umeda, and Hirofumi Uchimiya (1998) A rice homolog of Cdk7/MO15 phosphorylates both cyclin-dependent protein kinases and the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Plant J.*, 16 (5), 613-619
 - 46) Yuejin Sun, Brian P. Dilkes, Chunsheng Zhang, Ricardo A. Dante, Newton P. Carneiro, Keith S. Lowe, Rudolf Jung, William J. Gordon-Kamm, and Brian A Larkins (1999) Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4180-4185
 - 47) Jean-Philippe Reichheld, Seiji Sonobe, Bernadette Clement, Nicole Chaubet, and Claude Gigot (1995) Cell cycle-regulated histone gene expression in synchronized plant cells. *Plant J.*, 7 (2), 245-252
 - 48) Karantza V., Maroo A., Fay D., and Sedivy J.M. (1993) Overproduction of Rb protein after the G1/S boundary causes G2 arrest. *Mol. Cell. Biol.*, 13 (11), 6640-6652
 - 49) Brian G. Gabrielli, Boris Sarcevic, Joanne Sinnamon, Graeme Walker, Mariana Castellano, Xue-Qing Wang (1999) A cyclin D-Cdk4 activity required for G2 phase cell cycle progression is inhibited in ultraviolet radiation-induced G2 phase delay. *J. Biol. Chem.*, 274 (20), 13961-13969
 - 50) Motoaki Ohtsubo, Anne M. Theodoras, Jill Schumacher, James M. Roberts, and Michele Pagano (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell Biol.*, 15 (5), 2612-2624
 - 51) Yan Geng, Wendy Whoriskey, Mary Y. Park, Roderick T. Bronson, Rene H. Medema, Tiansen Li, Robert A. Weinberg, and Piotr Sicinski (1999) Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell*, 97, 767-777
 - 52) J. William Harbour, Robin X. Luo, Angeline Dei Santi, Antonio A. Postigo, and Douglas C. Dean (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, 98, 859-869
 - 53) Lee J.-O., Russo A.A., and Pavletich N.P. (1998) Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature*, 391, 859-865
 - 54) Forbert P.R., Gaudin V., Lunness P., Coen E.S., Doonan J.H. (1996) Distinct classes of cdc2-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell*, 8, 1465-1476
 - 55) Zoltan Magyar, Tamas Meszaros, Pal Miskolczi, Maria Deak, Attila Feher, Spencer Brown, Eva Kondorosi, Alekos Athanasiadis, Sandor Pongor, Metin Bilgin, Laszlo Bako,

- Csaba Koncz, and Denes Dudits (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell*, 9, 223-235
- 56) Masaaki Umeda, Chikage Umeda-Hara, Masatoshi Yamaguchi, Junji Hashimoto, and Hirofumi Uchimiya (1999) Differential expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants. *Plant Physiol.*, 119, 31-40
- 57) Takeshi Yoshizumi, Noriko Nagata, Hiroaki Shimada, and Minami Matsui (1996) An Arabidopsis cell cycle-dependent kinase related gene, *CDC2b*, plays a role in regulating seedling growth in darkness. *Plant Cell*, 11, 1883-1895
- 58) De Veylder, Segers G., Glab N., Van Montagu M., and Inze D. (1997) Identification of proteins interacting with the *Arabidopsis* Cdc2aAt protein. *J. Exp. Bot.*, 48, 2113-2114
- 59) Hata S. (1991) cDNA cloning of a novel cdc2+/CDC28-related protein kinase from rice. *FEBS Letts.*, 279, 149-152
- 60) Yasuo Niwa, Takanori Hirano, Kohki Yoshimoto, Masanori Shimizu, and Hirokazu Kobayashi (1999) Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *Plant J.*, 18 (4), 455-463
- 61) Veronique Baldin, Jiri Lukas, Maria Jesus Marcote, Michele Pagano, and Giulio Draetta (1993) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.*, 7, 812-821
- 62) Laszlo Bogre, Karin Zwerger, Irute Meskiene, Pavla Binarova, Vilmos Csizmadia, Christian Planck, Ernst Wagner, Heribert Hirt, and Erwin Heberle-Bors (1997) The cdc2Ms kinase is differently regulated in the cytoplasm and in the nucleus. *Plant Physiol.*, 113, 841-852
- 63) Bourne Y., Watson M.H., Hickey M.J., Holmes W., Rocque W., Reed S.I., and Tainer J.A. (1996) Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell*, 84 (6), 863-874
- 64) Zoltan Magyar, Laszlo Bako, Laszlo Bogre, Damla Dedeoglu, Tamas Kapros, and Denes Dudits (1993) Active *cdc2* genes and cell cycle phase-specific *cdc2*-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells. *Plant J.*, 4 (1), 151-161
- 65) Hitoshi Matsushime, Dawn E. Quelle, Sheila A. Shurtleff, Masabumi Shibuya, Charles J. Sherr, and Jun-ya Kato (1994) D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.*, 14 (3), 2066-2076
- 66) James M. Roberts (1999) Evolving ideas about cyclins. *Cell*, 98, 129-132
- 67) Charles J. Sherr and James M. Roberts (1998) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*, 13, 1501-1512
- 68) Masataka Sugimoto, Takeshi Nakamura, Naoko Ohtani, Lynne Hampson, Ian N. Hampson, Akira Shimamoto, Yasuhiro Furuichi, Ko Okumura, Shinichiro Niwa, Yoichi Taya, and Eiji Hara (1999) Regulation of CDK4 activity by novel CDK4-binding protein, p34^{SEI-1}. *Genes Dev.*, 13, 3027-3033
- 69) Marta Taules, Eulalia Rius, Daniel Talaya, Antonia Lopez-Girona, Oriol Bachs,

and Neus Agell (1998) Calmodulin is essential for cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) activity and nuclear accumulation of cyclin D1-Cdk4 during G1.

J. Biol. Chem., 273 (50), 33279-33286

70) Jennifer K. Hood and Pamela A. Silver (1999) In or out? Regulating nuclear transport.

Curr. Opin. Cell Biol., 11, 241-247

71) Jing Yang and Sally Kornbluth (1999) All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol.*, 9, 207-210

72) Deanna M. Koepp, J. Wade Harper, and Stephen J. Elledge (1999) How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, 97, 431-434

73) Anja Hagting, Christina Karlsson, Paul Clute, Mark Jackman, and Jonathon Pines (1998) MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J.*, 17 (14), 4127-4138

論文目録

主論文

Hirofumi Nakagami, Masami Sekine, Hiroko Murakami, and Atsuhiko Shinmyo (1999)
Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D *in vitro*. *Plant J.*, 18 (3), 243-252

Hirofumi Nakagami, Masami Sekine, Kazue Kawamura, Chinatsu Amano, Keiko Sugisaka, and Atsuhiko Shinmyo
Kinase activity of cdc2/cyclinD complexes to retinoblastoma-related protein is activated at the G1/S transition in tobacco. in preparation

参考論文

Masami Sekine, Masaki Ito, Kenji Uemukai, Yoshio Maeda, Hirofumi Nakagami, and Atsuhiko Shinmyo (1999)
Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lettts.*, 460, 117-122

謝 辞

本研究の遂行にあたり快適な研究の場を与えて戴き、御指導を賜りました新名惇彦教授に謹んで感謝の意を表します。

今後の研究人生の土台となる本研究課題を提示して戴き、未熟な私を温かい目で一から直接指導して戴いた関根政実助手に心より御礼申し上げます。また、終始有益な御助言を戴きました吉田和哉助教授ならびに加藤晃助手に深く感謝致します。

組み換えタンパク質を用いたキナーゼ活性の解析を行うにあたり、Sf9細胞、ヒトサイクリンD1/CDK4複合体およびヒトRbタンパク質を御提供して戴くとともに有益な御助言を賜りました加藤順也助教授（本学バイオサイエンス研究科細胞増殖学講座）ならびに細胞増殖学講座の諸氏に感謝致します。また、シロイヌナズナ由来のCAK (Cak1At) を御提供して戴くとともに有益な御助言を賜りました梅田正明助教授（東京大学分子細胞生物学研究所細胞機能分野）に感謝致します。

共同研究者として本研究に多大に貢献して戴いた河村和恵修士、杉坂恵子氏に感謝します。また、本研究に御協力戴きました村上浩子修士、天野千夏修士、野村耕司修士、前田佳男修士ならびに植物代謝調節学講座の諸氏に感謝します。さらに、実験を補佐して戴くとともに研究の場に明るい雰囲気をもたらして下さった三原加寿代氏に深く感謝致します。

研究生活を送るにあたり良き友として心の支えとなってくれた鎌田春彦氏に感謝します。

最後に長き研究生活を温かく見守り、援助してくれた理解ある父ならびに母に心から感謝します。

ここに記させて戴いた方々は当然のことながら、割愛させて戴いた多くの方々の様々なかたちの協力のもとに本論文をまとめ上げることが出来ました。皆様方も御存知かと思いますが、性格上、直接本人に対して素直に感謝の意を示すことは得意としません。紙面上のみの挨拶で誠に失礼かと思いますが、本当にありがとうございました。嘘偽り無く心から感謝しています。今後とも深く関わり合う方々、また逆にお互いの人生が交差する機会が少なくなる方々、様々だと思いますが、皆様方が良き人生を歩まれることをお祈りします。