

博士論文

タバコ PCNA プロモーターの
G1/S 期における発現制御機構の解析

2005 年

上向 健司

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科
植物代謝調節学講座
(新名 惇彦 教授)

目次

凡例	5
緒言	6～ 15
研究の意義	6
植物の生長と細胞増殖	6
酵母・動物における細胞周期の研究	6
G1/S 期制御機構	7
E2F, DP, pRB ファミリー	7
E2F のターゲット遺伝子	8
PCNA に関して	9
植物の細胞周期	9
植物の E2F, DP, RBR に関して	9
植物 E2F のターゲット DNA 配列	12
本研究の目的	12
第 1 章 G1/S 期におけるタバコ PCNA プロモーターの発現解析	 16～38
1-1 序論	16
1-2 実験材料および方法	19
1-2-1 タバコ培養細胞の培養	19
1-2-2 タバコ培養細胞の形質転換	19
1-2-2-1 形質転換	19
1-2-2-2 同調培養法	20
1-2-2-3 増殖再開法	20
1-2-3 全 RNA の抽出および RT-PCR	20
1-2-3-1 全 RNA の抽出	20
1-2-3-2 RT-PCR	20

1-3 結果	23
1-3-1 細胞周期同調化細胞における NtPCNA プロモーターの発現解析	23
1-3-2 同調化細胞における NtPCNA プロモーター発現 E2F 結合配列の 関連性	23
1-3-3 増殖再開に伴う NtPCNA プロモーターの発現解析	25
1-3-4 増殖再開に伴う NtPCNA プロモーター発現と E2F 結合配列の 関連性	25
1-4 考察	34
1-5 小括	37

第 2 章 タバコ PCNA プロモーターの発現制御機構

38～69

2-1 序論	38
2-2 実験材料および方法	40
2-2-1 タバコ培養細胞の培養	40
2-2-2 タバコ培養細胞 BY-2 を用いた一過性発現実験	40
2-2-2-1 導入プラスミドの構築	40
2-2-2-2 プロトプラストの調製およびエレクトロポレーション による DNA の導入	41
2-2-2-3 プロトプラストからの全 RNA の抽出	42
2-2-2-4 RT-PCR	42
2-2-2-5 プライマーの設計	43
2-2-3 組み換えタンパク質の調製	44
2-2-4 <i>In vitro</i> 結合解析	44
2-2-5 ゲルシフト解析 (Electrophoretic Mobility Shift Assays: EMSAs)	45
2-2-6 DNA-タンパク質の結合解析	46
2-3 結果	47
2-3-1 NtPCNA プロモーター機能への E2F 結合配列の影響	47
2-3-2 NtE2F と NtDP の結合解析	47
2-3-3 NtE2F/NtDP と DNA の結合解析	48
2-3-4 NtE2F の DNA 結合における NtDP の影響	49

2-3-5	NtPCNA プロモーターの転写活性化における NtDP の影響	49
2-3-6	NtE2F/NtDP と E2F 結合配列との相互作用	49
2-3-7	NtE2F と NtRBR1 の結合解析	50
2-3-8	NtRBR1 による NtE2F/NtDP の転写活性化能の抑制	50
2-3-9	NtRBR1 の転写活性化抑制のサイクリン D による抑制	51
2-3-10	NtE2F/NtDP/ NtRBR1 複合体と DNA の結合解析	51
2-3-11	NtE2F/NtDP/ NtRBR1 複合体と E2F 結合配列の結合特性	52
2-3-12	イネ PCNA(OsPCNA)プロモーターを用いた解析	52
2-4	考察	66
2-5	小括	70
	総括	71
	参考文献	73
	論文目録	84
	謝辞	85

凡例

本論文中に以下の略号を用いた。

ATP ; adenosine triphosphate

BPB ; bromophenol blue

C 末端 ;カルボキシ末端

CaMV ; califlower mosaic virus

CHAPS ; 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

Cb ; carbenicilin

cDNA ; complementary DNA

2,4-D ; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

DEPC ; Diethyl pyrocarbonate

DNA ; deoxyribonucleic acid

dNTP ; deoxyribonucleoside triphosphate

DTT ; dithiothreitol

EDTA ; ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA ; ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-tetraacetic acid

HEPES ; 2-[4-(2-hydroxyethyl) -1-piperaziny] ethanesulfonic acid

Km ; kanamycin

LS ; Linsmaier and Skoog

MES ; 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid

MS ; Murashige and Skoog

N 末端 ; アミノ末端

Nos ; nopaline synthase

NP-40 ; Nonidet P-40

PCR ; polymerase chain reaction

PMSF ; Phenylmethanesulfonyl fluoride

RNA ; ribonucleic acid

RNase A ; ribonuclease A

RT ; reverse transcriptase

SDS ; sodium dodecyl sulfate

Tris ; Tris (hydroxymethyl) aminomethane

緒言

研究の意義

18 世紀後半の産業革命以降、人々は大量生産・大量消費の文化を実現し、物質的な豊かさを手に入れた。それに伴い世界人口も急激な増加を示すようになった。産業革命以前は 10 億人に満たなかった世界人口は、20 世紀には 16 億人から 60 億人と約 4 倍に増え、現在の世界人口は 64 億人に達した。こうした人口増加がもたらす影響として最も深刻なのはエネルギー問題、とりわけ食糧の不足である。これまでの化学肥料の使用による農作物の増産も限界に達し、森林伐採による耕地の拡大も二酸化炭素による地球温暖化が問題視されていることを考慮すると困難が予想され、単位面積あたりの収穫量をさらに上げる必要がある。このような背景から食糧・エネルギーを植物に求める傾向はますます顕著になり、遺伝子組み換え植物の開発に限らず、植物の持つ能力を理解しようとする植物科学への期待は大きい。

植物科学の大きな役割の 1 つとして食糧増産および植物バイオマス生産が挙げられる。これらを達成する戦略として、病虫害・干ばつなどのストレスに対する防御および耐性の付与、作物自体の生産性の向上といった研究が盛んである。しかし、食糧増産および植物バイオマス生産における基本単位は植物細胞であることを考えると、「植物細胞がいかにして増えるのか」について解明することは、最も本質的かつ重要な問題であるといえる。

植物の生長と細胞増殖

高等植物では細胞の増殖は茎頂と根端の分裂組織(メリステム)に見られる。分裂組織には高い分裂能を有した細胞群が局在しており、分裂によって生じた新しい細胞は既存の細胞に積み上げられていく。茎頂の分裂組織では葉や花などの器官原基が、個体の発生を通して次々に形成されていくことで、地上部の形態が形成される。分裂組織での高い分裂能と積み上げ方式によって、植物体は原理的には半永久的に大きくなることができる。その細胞増殖の場である分裂組織では、細胞周期という規則性に従って分裂が繰り返されている。

酵母・動物における細胞周期の研究

細胞が分裂によって増殖することは最も基本的な営みである。細胞が分裂する過程には、ゲノム DNA を複製し、染色体が娘細胞に均等に配分された後、細胞質が分裂するというイベントが規則正しく繰り返される。このサイクルは「細胞周期」と呼ばれる。真核生物の場合、細胞周期は G1(gap1)期 → S (synthesis)期 → G2 (gap2)期 → M(mitosis)期 → G1 期へと規則正しく進行し、逆向きに進むことはない。その中でも G1 期から S 期への移行期(G1/S 期)は重要で、G1 期に増殖因子など細胞外からのシグナルに応答し、G1 後期には、細胞が DNA 複製(細胞分

裂)に向かうか、細胞周期からはずれて、静止期 (quiescent state; G0 期)に入って休止状態になるかの決定が行われる。その決定が行われる制御点は酵母ではスタート(START)、哺乳動物細胞では R 点(restriction point)と呼ばれる(Pardee, 1989, Sherr, 1996)。一旦 R 点を越えた細胞は、途中でサイクルを抜け出すことはできず、S 期、G2 期、M 期とサイクルが遂行される。このように G1/S 期は増殖と分化の接点として重要な意味を持つ。

G1/S 期制御機構

G1 期から S 期の進行は、DNA 合成・複製など S 期に必須の遺伝子が転写されることによって実行される。その転写活性化を行い、S 期進行への原動力となるのが E2F ファミリーである。E2F(adenovirus E2 promoter-binding factor)は、1986 年にアデノウィルス E2 遺伝子のプロモーターに結合する転写活性化因子として発見された(Kovesdi *et al.*, 1986)。E2F は DP(DNA-binding heterodimerization partner protein)とヘテロ二量体を形成して S 期関連因子遺伝子群のプロモーターの転写を活性化し、RB タンパク質(retinoblastoma tumor suppressor protein ; pRB)ファミリーによって転写活性が抑制されることがわかり、E2F と pRB による制御系の存在が明らかになった(Nevins, 1992; Weinberg, 1995)。

G1 後期ではそれまで低リン酸化状態にあった pRB ファミリータンパク質は、サイクリン D/CDK4, 6 とそれに続いてサイクリン E/CDK2 によりリン酸化されて高リン酸化状態となる。高リン酸化状態となった pRB ファミリータンパク質は E2F との結合能を失い、遊離された E2F は S 期の進行に必須の遺伝子群の転写を活性化して、細胞周期は G1 期から S 期へと進行させるというモデルが一般的に受け入れられている(Sherr, 1996; Taya, 1997)(図 1)。このような G1 サイクリン/CDK から pRB のリン酸化を経て、遊離された E2F による S 期関連遺伝子の転写活性化といった一連の制御経路は pRB 経路 (Nevins, 2001)といわれ、p53 が関与するシグナル経路と共に、動物の G1/S 期を制御する中心的な増殖シグナルネットワークを形成する。pRB 経路は多細胞生物にのみ存在する機構と考えられてきたが、つい最近、出芽酵母でも Whi5 が G1/S 期の転写因子 SBF/MBF を抑制し、その抑制は CDK によるリン酸によって解除されることが判明し、真核単細胞生物でも pRB 経路に類似した機構が存在することが明らかとなった(Costanzo *et al.*, 2004; de Bruin *et al.*, 2004)。

E2F, DP, pRB ファミリー

これまでにヒトにおいて E2F ファミリーは 7 種類(E2F1~E2F7)、DP ファミリーは 2 種類(DP1, DP2)、pRB ファミリーは 3 種類(pRB, p107, p130)が報告されている。E2F ファミリーの構造上の特徴としていくつかの機能領域が特定されている(図 2)。まず全てに保存性が高い DNA 結合領域が存在し、TTT(C/G)(C/G)CGC をコアとする配列に結合する。E2F1~6 には DP 結合領域があり、E2F1~5 には C 末端側に転写活性化領域と pRB 結合配列が存在する。E2F1~5 は転写活性化

領域を持つが E2F6 は転写活性化領域を持たず、リプレッサーとして機能すると考えられている(Dyson, 1998)。最近 DNA 結合領域のみしか持たない E2F7 が単離され(de Bruin *et al.*, 2003; Di Stefano *et al.*, 2003)、DP に依存しない E2F 単独による新たな抑制機構の存在に関わるものと考えられている。

一方、pRB ファミリーの構造的特徴は、A,B のポケット領域を有することである。pRB ファミリーは多数の因子と結合してそれらの機能を制御するが、その多くはポケット領域を介して結合する。E2F もポケット領域を介して結合し、pRB が結合することによりその転写活性化能を抑制し、細胞周期の S 期への進行を抑えることで細胞増殖を抑制する。

最近になって、E2F ファミリーは構造および pRB ファミリー(pRB, p107, p130)との相互作用の特性と機能的な特徴から、E2F1~3 と、E2F4,5 のサブファミリーに分類されるようになった。E2F1~3 は pRB とのみ結合し、E2F4 は p107 と p130 に主に結合して pRB とも弱く結合し、E2F5 は p130 とのみ結合する。E2F1~3 は S 期進行に関与していると考えられており、activating E2Fs と呼ばれる。これに対し、E2F4,5 は主に細胞質に存在し、核移行時には p130 と複合体を形成し、G1(G0) 期停止に重要な役割を果たすことから、repressive E2Fs と呼ばれている(Muller *et al.*, 1997; Verona *et al.*, 1997; Trimarchi and Lees, 2002; Attwooll *et al.*, 2004)。ゲルシフト解析または ChIP (Chromatin immuno-precipitation)解析により、E2F 制御遺伝子のプロモーター領域に結合するこれら E2F ファミリーが、細胞周期によりダイナミックに変動することが明らかになってきた(Takahashi *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2000; Rayman *et al.*, 2002)。すなわち、G0 期から G1 初期には主に E2F4/p107, p130 が結合するが、G1 後期以降 E2F1~3 が結合して転写を活性化するようになる。E2F1~3/pRB は G1 期のある特定の時期または一部の E2F 制御遺伝子に作用する。一方、E2F6 は転写活性化領域を持たず、サイレンシングに関わるポリコムグループ(Polycomb Group; PcG)の因子群と結合して転写を抑制し(Trimarchi and Lees, 2002)、G0 期に機能することが示唆されているが(Ogawa *et al.*, 2002)、すべての細胞周期で発現していることから他の役割も推定されている(Attwooll *et al.*, 2004)。E2F7 は増殖時期により転写レベルで制御され、過剰発現により G1 期停止が起こるが、興味深いことに、一部の E2F 制御遺伝子のプロモーター領域にしか結合しないことが報告されている(Di Stefano *et al.*, 2003)。

E2F のターゲット遺伝子

E2F が転写活性化を行うターゲットとして、サイクリン E、サイクリン A、cdc2、cdk2 など細胞周期進行に関与する遺伝子や、DNA ポリメラーゼ α (pol α)、デヒドロ葉酸リダクターゼ(DHFR)、チミジンキナーゼ(TK)など DNA 合成・複製に関与する遺伝子が精力的に研究されている(Yamaguchi *et al.*, 1995; Sherr, 1996; Dyson, 1998)。ヒトの細胞を用いたマイクロアレイ解析により、直接的または間接的にせよ、E2F/DP に応答する遺伝子が非常に多いことが判明し、この中には G1/S 期制御遺伝子の他に、G2/M 期制御に関与する遺伝子も数多く含まれており、

E2F は今までの予想を越えてより広範囲の遺伝子制御を行っていることが報告されている(Ishida *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2001)。

PCNA に関して

数多い E2F のターゲットの中で、増殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen; PCNA)遺伝子の産物は非常に多機能なタンパク質として知られる。最初、膠原病患者の血清中に存在する細胞核抗原として見出された PCNA は、その後の研究から DNA ポリメラーゼ δ の活性促進因子として DNA 複製に深く関与することがわかった。その他にも DNA 修復、クロマチンの会合にも関与することがわかっており、サイクリン D と相互作用することも示されているが、その生理機能はわかっていない(Tsurimoto, 1999, Maga and Hubscher, 2003)。

まだ不明なことも多いが、PCNA が G1/S 期の主要なイベントに対して幅広く関わる重要な因子であることを示す知見が蓄積されつつある。

植物の細胞周期

植物の E2F, DP, RBR に関して

植物においても pRB 経路に関する因子のホモログが見ついていることから、植物の G1/S 期の制御に E2F や pRB が重要な役割を果たしていると考えられている(Gutierrez, 1998; Shen, 2002)。pRB ホモログは植物では RB-related protein(RBR) と呼ばれ、トウモロコシ(*Zea maize*; *ZmRBR1*, *ZmRBR2a,b*)(Grafi *et al.*, 1996, An *et al.*, 1997)、タバコ(*Nicotiana tabacum*, *NtRBR1*)(Nakagami *et al.*, 1999)、クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*, *mat3*)(Umen *et al.*, 2001)、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*, *AtRBR1*)(Kong *et al.*, 2000; Ebel *et al.*, 2004)から単離されている。これらの遺伝子には A および B ポケット領域と N 末端領域が高度に保存され、CDK によるリン酸化部位も保存されている。N 末端領域の機能は不明な点が多いが、植物病原菌により誘起される全身獲得抵抗性遺伝子の発現を負に制御する *SN1* と部分的な相同性を持っている(Li *et al.*, 1999)。トウモロコシでは胚乳が形成される際に生じる核内倍加(endoreduplication)に伴って、高リン酸化された RBR タンパク質が増加することが示された(Grafi *et al.*, 1996)。また、トウモロコシの葉の発達段階で RBR タンパク質の蓄積量が変化し、分裂している細胞が集中する基部よりも分化した細胞が多い先端部分で多いことが報告された(Huntley *et al.*, 1998)。最近、シロイヌナズナの *AtRBR1* に T-DNA が挿入されたホモ接合体では配偶体形成に異常が起こり、胚発生以前に致死になることが報告された(Ebel *et al.*, 2004)。成熟未受精変異体の配偶体は有糸分裂を停止できず、胚嚢で過剰な核数の増加が見られる。受精後に内乳となる中心細胞核は、*fertilization-independent seed(fis)*変異体とよく似た自律的な内乳発生を開始する。したがって、*AtRBR1* は配偶子形成中における細胞周期の制御と自律的な内乳発生の抑制において、これまで知られていなかった新たな機能を持つことが示唆された。

植物の E2F 遺伝子のホモログは、これまでにニンジン(*Daucus carota*;

DcE2F(Albani *et al.*, 2000), コムギ(*Triticum monococcum*; *TmE2F*)(Ramirez-Parra *et al.*, 1999), タバコ(*Nicotiana tabacum*; *NtE2F*)(Sekine *et al.*, 1999), イネ(*Oryza sativa*; *OsE2F*)(Kosugi and Ohashi, 2002a)など多くの植物で単離されている。ゲノム解析が完了しているシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)では、ゲノム中に E2F 遺伝子は 6 種(*AtE2F1-3*, *AtE2L1-3*), DP 遺伝子は 2 種類(*AtDPA,b*)存在することが推定され、それら全ての遺伝子が単離されている(Albani *et al.*, 2000; Magyar *et al.*, 2000; de Jager *et al.*, 2001; Kosugi and Ohashi, 2002a)。植物の E2F ファミリーは種類が多く、研究しているグループも多いため、名称については統一されていないのが現状である(表 1)。

シロイヌナズナ E2F の構造的特徴としては、*AtE2F1*~*3* は動物の E2F と類似しており、DNA 結合領域および DP との結合領域を持つ。*AtE2F1* と *AtE2F3* は転写活性化領域と pRBR 結合配列を持ち、転写を活性化して細胞周期の進行に関与するが、*AtE2F2* は動物の E2F6 のように、転写活性化領域と RBR タンパク質との結合配列を持たず、転写を抑制するリプレッサーの役割を担うと考えられている(Kosugi and Ohashi, 2002a)。*AtE2L1-3* は DNA 結合領域のみが二つ並んだ構造を持ち、その他の機能ドメインはないと考えられており、*AtDPA,b* と結合せずに単量体で DNA に結合することから、リプレッサーとして機能すると推測された(Kosugi and Ohashi, 2002b; Mariconti *et al.*, 2002)。すなわち、*AtE2F1* と *AtE2F3* は転写を活性化するアクチベーターとして機能するが、それ以外はリプレッサーとして機能することが構造上の特徴から推察される。実際、Rossignol ら(2002)はシロイヌナズナ培養細胞由来のプロトプラストを用いた一過性発現解析により、*AtE2F1* と *AtE2F3* が *AtDPA* と協調して転写活性化することを示した。さらに、シロイヌナズナの葉由来のプロトプラストに *AtE2F3* を導入すると、G1 期に停止していた細胞の約 67%が S 期に移行することを見出した。動物でも休止期の細胞に E2F1~3 を導入すると S 期への移行が観察されており(Johnson *et al.*, 1993; Lukas *et al.*, 1996)、*AtE2F3* が G1/S 期移行を律速していることが示唆された。

表 1 シロイヌナズナ E2F の名称対応表

本研究	Kosugi and Ohashi (2002a)	Magyar <i>et al.</i> (2000)	de Jager <i>et al.</i> (2001)	
<i>AtE2F1</i>	<i>AtE2F1</i>	<i>AtE2Fb</i>	<i>AtE2F1</i>	
<i>AtE2F2</i>	<i>AtE2F2</i>	<i>AtE2Fc</i>	<i>AtE2F2</i>	
<i>AtE2F3</i>	<i>AtE2F3</i>	<i>AtE2Fa</i>	<i>AtE2F3</i>	
	Kosugi and Ohashi (2002b)	Magyar <i>et al.</i> (2000)	de Jager <i>et al.</i> (2001)	Vandepoele <i>et al.</i> (2002)
<i>AtE2L1</i>	<i>AtE2L1</i>	<i>AtE2Fd</i>	<i>AtELP3</i>	<i>DEL2</i>
<i>AtE2L2</i>	<i>AtE2L2</i>	<i>AtE2Fe</i>	<i>AtELP2</i>	<i>DEL1</i>
<i>AtE2L3</i>	<i>AtE2L3</i>	<i>AtE2Ff</i>	<i>AtELP1</i>	<i>DEL3</i>

現在用いられているシロイヌナズナ E2F の名称について対応関係を示した。同じ行に記載され

ているのは同一の遺伝子である。本論文では、Kosugi and Ohashi(2002a)および Kosugi and Ohashi(2002b)の命名法に従っている。

さらに、AtE2F3 を高発現するシロイヌナズナ植物体では、野生型に比べて細胞の大きさが半分程度に小さくなるが、細胞数が 3 倍程増えることにより、全体的な葉のサイズは野生型よりも大きくなることが報告された(De Veylder *et al.*, 2002)。しかし、AtE2F3 と AtDPA を共に高発現するシロイヌナズナ植物体では、表現型が強くなり、葉が湾曲して発達の途中で成長が停止することが示された。この植物体では分化すべき組織でも過剰な細胞分裂が見られたことから、AtE2F3/AtDPA が発生過程で秩序正しい場所と時期で抑制されることが正常組織の分化に必要で、細胞分裂と分化のバランスが植物の形態形成には不可欠であることを示唆した。同様な現象はサイクリン D を過剰に発現するシロイヌナズナ植物体でも観察されている(Dewitte *et al.*, 2003)。また、AtE2F3 と AtDPA を共に高発現させたタバコでも同様な表現型が観察され、表現型の強い系統では葉が湾曲し、成長が著しく遅くなり、開花以前または開花している最中に 15~20cm の高さで成長が止まり枯死する(Kosugi and Ohashi, 2003)。成熟した葉で核の倍加が見られ、S 期に発現する遺伝子の転写レベルが上昇しているが、M 期遺伝子には影響がないことから、AtE2F3 と AtDPA を過剰に発現しているタバコ植物体では S 期に進行する細胞が多くなるが、M 期への進行が滞るため、核内倍加が促進されると結論された。

一方、AtE2F2 はユビキチン-プロテアソーム系により分解されるが、E3 ユビキチンリガーゼ SCF 中の AtCUL1 の RUB1 修飾化ができない *axr1* 変異体で AtE2F2 タンパク質の蓄積が上昇することが示された(del Pozo *et al.*, 2002)。面白いことに、AtE2F2 タンパク質の分解は光によって制御され、暗黒下で生育させた芽生えを光条件下におくと、速やかに分解される。AtE2F2 を高発現するシロイヌナズナ植物体では細胞分裂に負の影響を及ぼし、細胞数は減少するが個々の細胞は大きくなることが観察されている。また AtE2L3 を高発現するシロイヌナズナ植物体では、暗黒下で生育させた胚軸の長さが短くなり、表皮細胞の長さが短くなることが示された(Ramirez-Parra *et al.*, 2004)。この植物体では核の倍加は起こっておらず、細胞周期マーカーの発現も野生型と変わらなかったが、細胞壁の生合成系の遺伝子の発現に異常が見られ、それらの遺伝子のプロモーター領域に AtE2L3 が結合することが ChIP 解析により示された。したがって、AtE2L3 はそれら細胞壁の合成系の遺伝子の発現を介して胚軸の伸長を制御する可能性が示唆された。これに対し、AtE2L2 を高発現させたシロイヌナズナ植物体では野生型に比べて細胞分裂速度が遅くなり、核が多倍加している細胞の割合が減少していることが観察された(Vlieghe *et al.*, 2005)。これを確かめるため、AtE2F3 と AtDPA を共に高発現するシロイヌナズナ植物体と交配して三重変異体を作製した。この三重変異体では、AtE2F3 と AtDPA の過剰発現による異常な細胞分裂の促進は抑えられなかったが、核が多倍加している細胞の割合は AtE2L2 単独の高発現で見

られた効果と同様に減少したことより、AtE2L2 は核内倍加を抑制する新奇の制御因子であると結論された。

このように、植物においても動物と同様な pRB 経路が G1/S 期制御に重要であることが予想されたが、実際植物でもサイクリン D/CDKA が G1/S 期に pRBR をリン酸化することが示された(Boniotti and Gutierrez, 2001; Nakagami *et al.*, 2002)。したがって、サイクリン D/CDKA により RBR がリン酸化されることで E2F との結合が解除され、遊離の E2F/DP により S 期制御遺伝子の転写が活性化される機構の存在が推定された。しかし、植物の E2F/RBR が酵母または動物細胞で E2F の転写活性化を抑制するという知見はあるが(Huntley *et al.*, 1998)、植物細胞で E2F と RBR の関連を解析した報告はない。

植物 E2F のターゲット DNA 配列

すでに述べたように、動物では PCNA は G1/S 期において重要な役割を果たすことが示されており、植物においても研究が進められている。ニチニチソウ、タバコ、イネで PCNA プロモーターの単離・解析が進められており、これまでのところ、PCNA 遺伝子は G1/S 期に特異的に発現を示すこと(Kodama *et al.*, 1991; Sekine *et al.*, 1999, Kawamura *et al.*, 2004)、PCNA プロモーター上に動物の E2F 結合配列に類似したシス配列が 2 カ所存在し、その結合配列に変異を導入するとプロモーターの転写活性は低下すること、植物体では分裂している細胞が多い組織で発現し、葉の発達が進むと発現が低下することが示されている(Kosugi and Ohashi, 2002a)。タバコの葉を用いた解析では、PCNA プロモーターは成熟葉で発現しないが、RBR タンパク質と結合するウイルス由来の AL1 タンパク質が作用すると PCNA の発現が誘導されることが報告されており、植物の PCNA プロモーター制御に RBR が関与する可能性が示されている(Egelkroust *et al.*, 2002)。

しかし、これらのデータは PCNA プロモーターの G1/S 期特異的な発現と E2F/RBR との関連性については解明されておらず、E2F/RBR による PCNA プロモーターの制御を示唆しつつも、E2F/RBR がプロモーターの制御を直接行っているかについては言及されていない。

本研究の目的

動物の細胞周期の G1/S 期に見られる重要なイベントの多くに関与する PCNA は、植物細胞の G1/S 期においても重要な役割を果たしていることが予想される。植物の PCNA プロモーターにも E2F 結合配列が存在しており、G1/S 期に特異的に発現することが判明し、周期特異的な活性化には、植物細胞ではまだ機能することが確認されていない E2F/RBR を中心とする制御系が深く関与していることが予想される。そこで本研究では、その細胞周期特異的な発現制御機構を理解するために、同調培養系が確立されているタバコ BY-2 細胞を用いて、*NtPCNA* プロモーターの E2F 結合配列と細胞周期制御因子が *NtPCNA* の発現制御にどのように関わるかについて解析を試み、植物細胞周期の G1 期から S 期への移行の原

動力となる転写制御機構について新たな知見を得ることを目的としている。

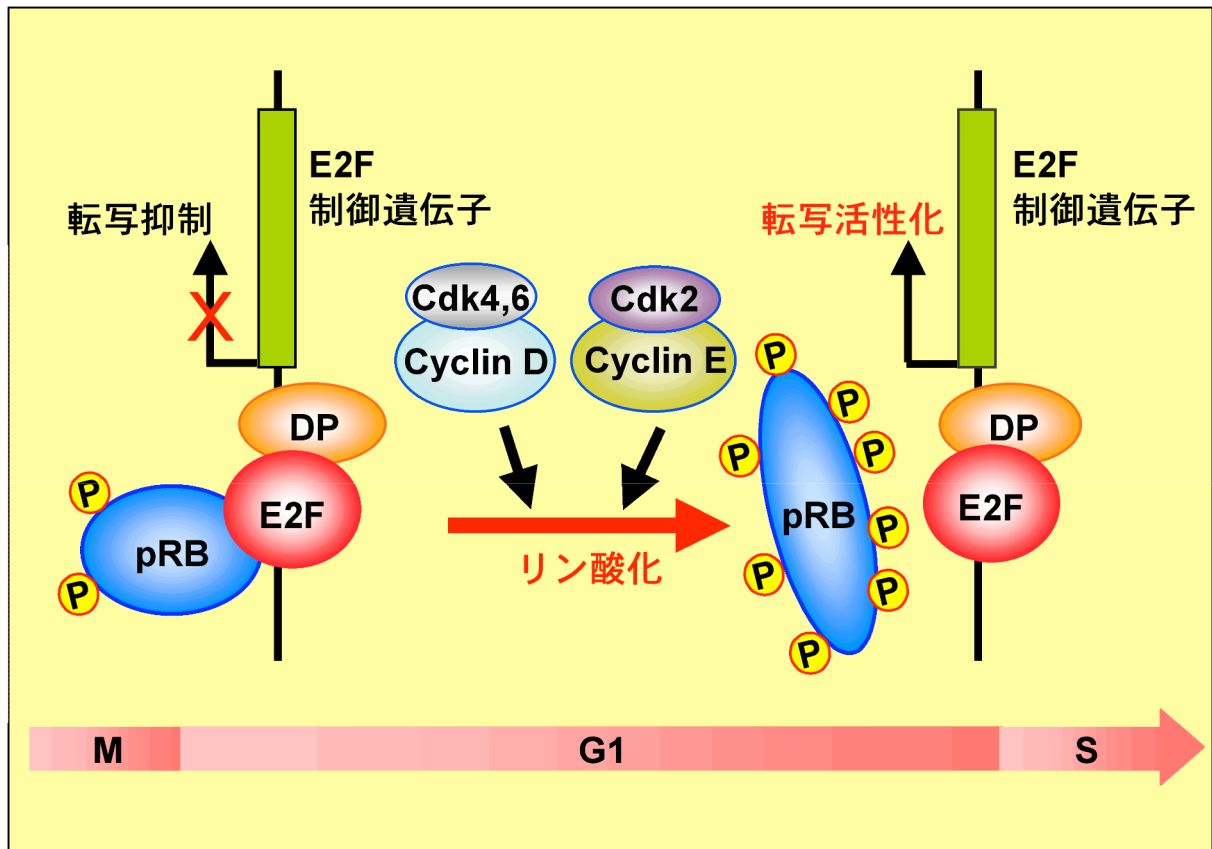


図 1: 動物細胞におけるG1/S期制御機構のモデル図

G1期からS期にかけての制御にRBタンパク質(pRB)が重要な働きを担うことが知られている。pRBはG1期後期までは低リン酸化状態にあり、E2F/DP複合体の働きを抑制しているが、G1期後期にサイクリンD/CDK4,6およびサイクリンE/CDK2複合体によってリン酸化されると高リン酸化状態となり、E2Fとの結合能が失われる。pRBによって抑制されていたE2F/DP複合体は遊離されてS期関連遺伝子の転写を活性化する。S期関連因子の発現が誘導されることで細胞周期はG1期からS期へと進行していく。

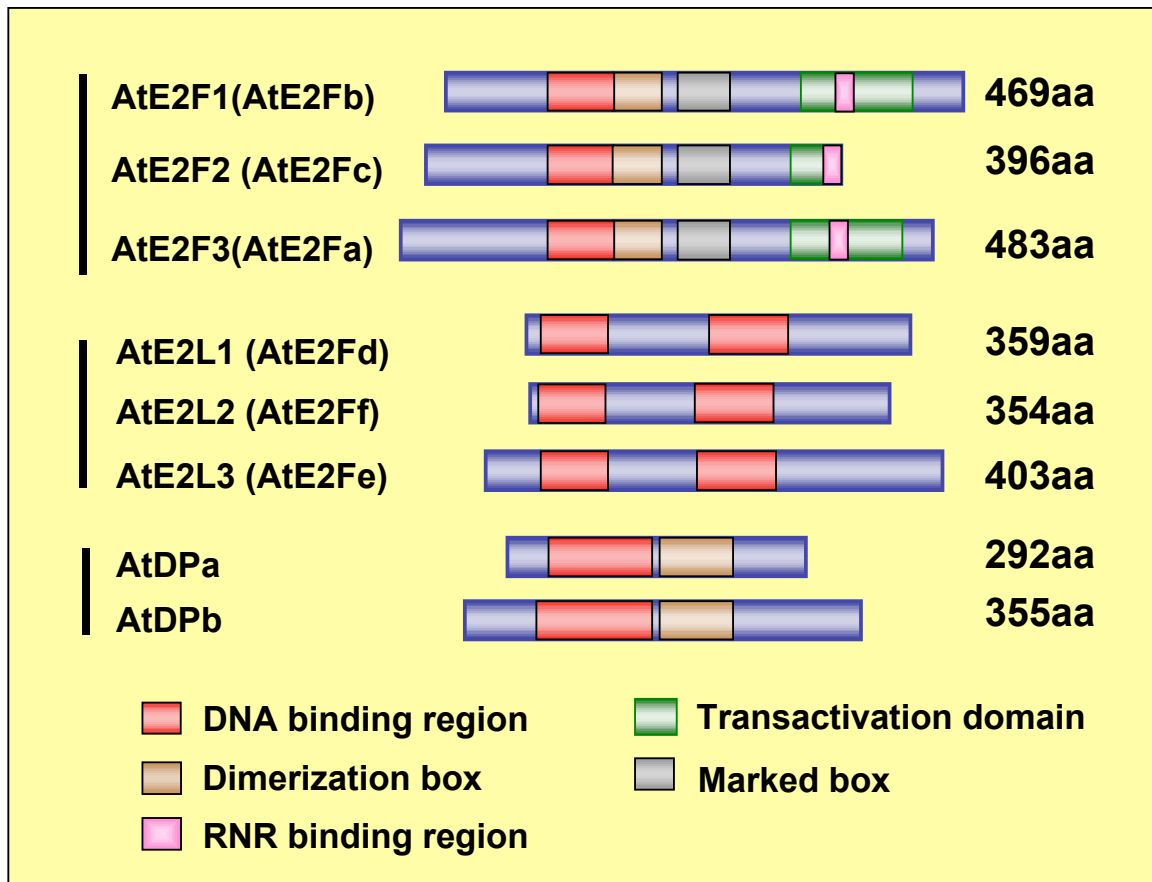


図 2: シロイヌナズナのE2F, DPの構造

これまでにシロイヌナズナから単離されているE2F/DPファミリーの構造的特徴を示した。AtE2F1, 2, 3は動物のE2Fの構造的特徴と類似しており、DNA結合領域、二量体形成領域、Marked boxが高度に保存されており、特にDNA結合領域はファミリーを通して高度に保存されている。AtE2F1, 3はC末端側に転写活性化領域とRBR結合領域が存在するが、AtE2F2はC末端側が短縮されている。AtE2L1, 2, 3はDNA結合領域が2カ所存在するが転写活性化領域など他の保存領域は見られない。右の数字はコードするタンパク質の全アミノ酸数を示す。

第 1 章

G1/S 期におけるタバコ *PCNA* プロモーターの発現解析

1-1 序論

PCNA (proliferating cell nuclear antigen)は、真核生物を通じて高度に保存されており、酵母や動物細胞での研究から、細胞周期の G1/S 期において様々なイベントに関わることが知られている。その機能の重要性から、植物においても精力的に解析が進められている。植物では最初にイネ・ダイズ・タバコのゲノム中にラットの *PCNA* と相同配列を有する遺伝子が存在することが示された(Suzuka *et al.*, 1989)。その後、イネ・ダイズ(Suzuka *et al.*, 1991)、ニチニチソウ(Kodama *et al.*, 1991)、ニンジン(Hata *et al.*, 1992)、トウモロコシ(Lopez *et al.* 1997)からの単離が次々と報告された。いずれもアミノ酸レベルでは高い相同性があり、植物界に広く保存されていることが示唆された。

大腸菌で大量発現させた組み換えイネ *PCNA* は、ヒトの DNA ポリメラーゼ δ による DNA 伸長反応の processivity を上昇させることが確認されている(Matsumoto *et al.*, 1994)。このことは、植物の *PCNA* はアミノ酸配列だけでなく、DNA 複製に関する機能も保存されていることを示している。

植物の *PCNA* 遺伝子の発現は若い葉、茎頂、根などの特にメリステムを含む分裂が盛んな組織に限定され、成熟葉といった増殖が停止した器官では、ほとんど発現は認められない(Kosugi *et al.*, 1991)。さらに、イネ *PCNA* タンパク質は分裂組織には存在するが、非分裂細胞や分化した組織では存在しないことが示されている(Daidoji *et al.*, 1992; Nagar *et al.*, 1995)。このことは *PCNA* の機能は分裂期特異的であることを示唆している。

植物の *PCNA* 遺伝子の細胞周期における発現は、ニチニチソウ(Kodama *et al.*, 1991)とタバコ(Sekine *et al.*, 1999)の解析から、G1/S 期に特異的な発現を示すことが報告されている。さらにプロモーター配列の詳細な解析の結果、動物 E2F の結合配列 TTT(C/G)(C/G)CGC の類似配列がイネ・タバコの *PCNA* プロモーター上に各々2カ所(イネ: re2f1 [GCGGGAAA], re2f2 [TTTCCCC], タバコ te2f1 [GCGGGAAA], te2f2 [ATTCCCGC])見出している。それらの E2F 結合配列にシロイヌナズナやイネの E2F タンパク質が、シロイヌナズナの DP タンパク質依存的に結合することが *in vitro* のゲルシフト解析により示され、E2F 結合配列に変異を導入した解析により、培養細胞や葉の発達段階における *PCNA* プロモーターの発現に影響を及ぼすことが示されている。これらのことから *PCNA* プロモーターの活性に E2F による制御が関与すること示唆された(Egelkroun *et al.*, 2001; Kosugi and Ohashi, 2002a)。

PCNA 遺伝子以外にも推定 E2F 結合配列を持つ遺伝子は多数見つかっており、そのほとんどが DNA 合成、DNA 複製、細胞周期制御、DNA 修復に関連する遺伝子のプロモーター上に存在することがわかっている(Kosugi and Ohashi, 2002a; Ramirez-Parra *et al.*, 2003)。しかも、実際に *CDC6* (cell division cycle), *RNR2* (ribonucleotide reductase), *MCM3*(mini-chromosome maintenance)のプロモーター上に存在する E2F 結合配列には植物の E2F タンパク質が結合することが示されている(Chaboute *et al.*, 2000; Castellano *et al.*, 2001; de Jager *et al.*, 2001; Stevens *et al.*, 2002)

E2F 結合配列が植物にとってどのくらい影響するかを推定するには、どのような遺伝子が E2F 結合配列を保持しているかを調べるのが有効である。公開されているシロイヌナズナのゲノム情報(Arabidopsis Genome Initiative, 2000)を解析した結果、プロモーター領域に E2F 結合配列を有する遺伝子はゲノム中におよそ 180 個存在すると推定され、それらの遺伝子の多くは G1/S 期に発現のピークを示すことが判明している(Ramirez-Parra *et al.*, 2003)。このことから植物細胞においても E2F 結合配列は G1/S 期制御に必須の役割を担っていることが予想される。ニチニチソウおよびタバコの *PCNA* プロモーターで形質転換した植物細胞を用いた解析では、*PCNA* プロモーターは G1/S 期特異的な発現を示すことが確認されている(Kodama *et al.*, 1991; Sekine *et al.*, 1999)。しかし、E2F 結合配列と周期特異的な発現の関連性についてはまだ知見がほとんどない。

そこで第 1 章では、G1/S 期における *NtPCNA* プロモーターの発現制御と E2F 結合配列との関連性について解析を行うことにした。さらに本章では、*NtPCNA* のプロモーター上に存在する 2 カ所の E2F 結合配列(*te2f1*, *te2f2*)についてそれぞれの役割についても解析を行った。*PCNA* プロモーター上の E2F はそれぞれ働きが異なる例はいくつか示されている。例えば、ショウジョウバエの *PCNA* プロモーターの解析では、2 カ所存在する E2F 結合配列のうち、上流側の結合配列の方がプロモーター活性に対する貢献度がより大きいことが示されている(Yamaguchi *et al.*, 1995)。植物においてもタバコ植物体を用いた解析で、*PCNA* 上に 2 カ所存在する E2F 結合配列のうち下流側の結合配列は成熟葉において抑制的に働き、上流側の結合配列は若い葉において下流側の抑制を乗り越えてプロモーターを活性化するモデルが提示されている(Egelkrout *et al.*, 2002)。このような傾向は *PCNA* 以外のプロモーターでも見られる。例えばタバコの *RNR2* プロモーターでは 2 つ存在する E2F 結合配列は S 期における *PCNA* の活性化には必要であるが、そのうち 1 つは S 期以外では抑制的に働くことが示されている。他にもシロイヌナズナの *MCM3* プロモーターでは 2 つ存在する E2F 結合配列のうち 1 つはメリステムの発現に必要であるが、もう 1 つは G2 期の培養細胞で抑制的に働くことが示されている(Stevens *et al.*, 2002)。これらの知見から *NtPCNA* プロモーター上に存在する 2 カ所の E2F 結合配列も G1/S 期における転写活性化において違う役割を担っている可能性が考えられる。

これらの解析を通して G1/S 期における *NtPCNA* の転写活性化において、E2F

結合配列の必要性とそれぞれの具体的な役割について解析し、G1/S 期における *NtPCNA* プロモーター制御機構についてより詳細な知見を得ることを目的とした。

1-2 実験材料および方法

1-2-1 タバコ培養細胞の培養

タバコ培養細胞(*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2; BY-2)は、300ml のマイヤーフラスコに 0.2 mg/l 2,4-D を含む改変 LS 培地にを 95ml 入れ、27°C、暗所下にて 130rpm の速度で攪拌して培養した(BR-3000; TAITEC, Saitama)。細胞の継代培養は 7 日ごとに定常期に達した細胞を新しい培地へ 2ml 植え継いだ。

1-2-2 タバコ培養細胞の形質転換

1-2-2-1 形質転換

形質転換に用いる構築はバイナリーベクター pBI121(Clontech, Palo Alto, CA)をベースに作製した。*luciferase* (ATG に *NcoI* 認識配列を含む)の DNA 断片の 5'末端側に *BamHI* 認識配列、3'末端側に *SacI* 認識配列を付加するために PCR を行った。テンプレートには p35-luc プラスミドを用いた。得られた PCR 産物を pBluescript SK の *EcoRV* 部位にサブクローニングし、配列を確認後、pBI221 の *BamHI-SalI* 部位に組み換えた。次に一過性発現用レポータープラスミドに含まれる *NtPCNA* プロモーター配列(*te2f1*, *tMe2f1*, *tMe2f2*, *tMe2f3*)を *PstI* と *NcoI* 処理して得られた DNA 断片を、前述の pBI121-luc の *PstI-NcoI* 部位に組み換えた。

得られた形質転換用のプラスミドを *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株にエレクトロポレーションシステム Gene Pluser Xcell (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)を用いて導入した。-80°Cで保存した EHA105 株のコンピテントセル(40 μ l)を氷上で解凍後、上記のバイナリープラスミドを 1 μ l 加え、エレクトロポレーション法(25 μ F, 2.4kV, 200 Ω ; 1mm キュベット)で導入した。形質転換した菌株を選択培地(LB 培地、Km: 100 μ l/ml)で選択した。

BY-2 細胞の形質転換は基本的には An ら(1985)の方法に従った。100~200 μ l のアグロバクテリウム培養液と 10ml の培養 3 日目の BY-2 細胞の懸濁液をシャーレ(100mm ϕ)に入れて、暗所にて 25°Cで 2 日間、静置で共存培養した。その後 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、低速遠心(700rpm)で BY-2 細胞を沈殿させ、上清を捨てた。次に選択培地(MS 寒天培地、Km: 50 μ l/ml、Cb:250 μ g/ml)に細胞をまき、3~4 週間して形成されたカルスを新鮮な選択培地に移し、得られた形質転換 BY-2 細胞のうち増殖の良好な数クローンを選択し、改変 LS 液体培地に移して通常の BY-2 細胞の培養条件で培養した。なお、細胞の継代培養は 7 日ごとに定常期に達した細胞を新しい培地へ 5ml 植え継いだ。

1-2-2-2 同調培養法

基本的には Nagata ら(1992)の方法に従った。培養 7 日目の細胞懸濁液 15ml を 95ml の培地に移し、アフィディコリンを終濃度 5mg/L になるように添加し、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て、新しい LS 培地を濾過器に加え、駒込ピペットで細胞を懸濁して洗浄した。この操作を LS 培地 2L を使い切るまで繰り返し、アフィディコリンを取り除いた。細胞を 95ml の LS 培地に懸濁して 15ml まで濃縮し、別の 95ml の LS 培地に移し、27°C、暗所で振とう培養した。以上の洗浄操作を 15 分以内で終わらせた。アフィディコリン除去後、6 時間培養し、そこにプロピザマイドを終濃度 1.6mg/L になるように添加し、さらに 4 時間培養した。アフィディコリンの時と同様にプロピザマイドを除去し、同様に LS 培地に移しサンプリング終了まで培養した。サンプリングは、全 RNA 回収用、および LUC 活性測定用に分け、培養液約 1.5ml を 1.5ml エッペンチューブに取り、遠心(1000rpm, 4°C, 5min)して上清を除いてから、液体窒素で凍結させた。凍結サンプルは-80°Cで保存した。

1-2-2-3 増殖再開法

増殖再開(re-entry)は、培養 7 日目の定常期に達した形質転換 BY-2 細胞を 10 ml 取り、90ml の新しい改変 LS 培地に植え継いで、通常の培養条件で培養した。各時間に細胞の一部を回収してサンプリングを行った。

1-2-3 全 RNA の抽出および RT-PCR

1-2-3-1 全 RNA の抽出

全 RNA は RNA 精製キット(RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN)を用いて調製した。方法はキット付属のプロトコールに従った。ゲノム DNA の混入を除くため、得られた全 RNA を DNase I (RNase free, Roche Diagnostics)で処理し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、沈殿を DEPC 水に溶かしたものを全 RNA サンプルとした。

全 RNA サンプルは Gene Amp RNA PCR Core Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems)を用いて逆転写反応させて cDNA を合成した。方法はキット付属のプロトコールに従った。

1-2-3-2 RT-PCR

合成した cDNA を用いて、以下のような条件で RT-PCR を行った。

反応液組成

10x PCR buffer	2.5μl
2mM dNTP	2.5
25mM MgCl ₂	1.25μl
template	0.05~0.5μl cDNA
primer (forward)	0.25μl
primer (Reverse)	0.25μl
<hr/>	
fill up with DW	total 25μl

反応条件

変性	94℃	2 min	
	↓		
変性	94℃	30 sec	← 25~30 サイクル
アニーリング	50℃~65℃	30 sec	
伸長	72℃	1 min	
	↓		
伸長	72℃	5 min	

増幅遺伝子	アニーリング温度	サイクル数
Actin	50 °C	28
luc	65 °C	25
PCNA	56 °C	25
histon H4	56 °C	25
NtE2F	56 °C	28
NtDP	58 °C	30

鋳型である cDNA の濃度を補正するため、*Actin* 遺伝子を基準として PCR 反応を行い、その結果をもとに鋳型量を調整した。PCR 反応後、1%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウム染色後、UV 照射下で写真を撮影した。

プライマーの設計

各遺伝子の特異的プライマーは以下のように設計した。

Actin

Actin probe-1(Fw) 5'- CCTCTTAACCCGAAGGCTAA -3'
Actin probe-1(Rev) 5'- GAAGGTTGGAAAAGGACTTC -3'

Luciferase

LUC probe-1(Fw) 5'- GGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAG -3'
LUC probe-1(Rev) 5'- GATGTTGGGGTGTGGAGCAAGATG -3'

PCNA

NtPCNA probe-2(Fw) 5'- CATCGAAAATGTTGGAATTACGGC -3'
NtPCNA probe-2(Rev) 5'- GAACGCAGAAACATAAAATTAAGG -3'

histone H4

histon H4 probe(Fw) 5'- AGGTTCTGAGAGACAACATCCAAGG -3'
histon H4 probe(Rev) 5'- GTAAAGAGTCCTTCCTTGCCTCTTG -3'

NtE2F

NtE2F-RT-S

5' - CCATGCCTTCAACATCAGG -3'

NtE2F-RT-AS

5' - ATACCGAGAACAAGCATCGC -3'

NtDP

NtDP probe-2(Fw)

5' - GGTAGAGGACTCAGACAGTTTA -3'

NtDP probe-2(Rev)

5' - GATATTTCCACTTCGACTGTAGC -3'

1-3 結果

1-3-1 細胞周期同調化細胞における *NtPCNA* プロモーターの発現解析

ニチニチソウ、タバコ、イネの *PCNA* プロモーターは G1 期から S 期にかけて発現することが知られている(Kodama *et al.*, 1991; Sekine *et al.*, 1999, Kawamura *et al.*, 2004)。植物 *PCNA* の細胞周期依存的な発現と E2F 結合配列との関連性を調べるために形質転換 BY-2 細胞を作製した。アグロバクテリウム法を用いて *NtPCNA* プロモーターと *luciferase(luc)* の融合遺伝子を BY-2 細胞の染色体に導入した。導入したプロモーター/*luc* は、野生型プロモーター/*luc* (te2f-*luc*)と変異プロモーター/*luc* (tMe2f1-*luc*, tMe2f2-*luc*, tMe2f3-*luc*)の合計 4 種類である。得られた形質転換 BY-2 細胞を改変 LS 液体培地で培養した。

形質転換 BY-2 細胞をそれぞれアフィディコリンとプロピザマイドで二段階同調化処理し、プロピザマイド除去直後を 0 時間として、改変 LS 培地で培養 14 時間まで経時的に 4 種類の細胞を回収した。同調化の評価は LSC(Laser Scanning Cytometer)による DNA ヒストグラム解析にて確認した(図 3)。

まず回収した細胞を破碎し、LUC の比活性を測定することにより、*NtPCNA* プロモーターの発現量の変動を簡易的にモニターできるかを検討した。te2f-*luc* の培養細胞について調べた結果を図 4 に示す。te2f-*luc* 細胞による LUC 比活性は、プロピザマイド除去後から一貫して高い活性が認められたが、同調化処理によって細胞の大半が G1 期から S 期へ移行する過程でも LUC の活性に変動が認められなかった。同じ te2f-*luc* で形質転換した別の細胞株についても同様な実験を行ったが、LUC 活性のレベルに違いが見られたものの LUC 活性の変動は同様であった。したがって、LUC 活性による *NtPCNA* プロモーターの周期依存的な発現を調べることはできないと結論し、*NtPCNA* プロモーターの発現量の活性を RT-PCR により転写レベルで調べることにした。

1-3-2 同調化細胞における *NtPCNA* プロモーター発現と E2F 結合配列の関連性

NtPCNA プロモーターの活性の細胞周期依存性について RT-PCR により詳細に調べた。この解析での目的は 2 つある。1 つは導入した *NtPCNA* プロモーター(te2f, tMe2f1, tMe2f2, tMe2f3)の活性は細胞周期の進行に伴って変動するのか、E2F 結合配列に変異を導入したプロモーターでは発現パターンは変化するかについて調べるため、もう 1 つは *NtPCNA* プロモーターと NtE2F や NtDP などの関連因子との発現パターンの相関性について調べるためである。

4 種類の細胞(te2f-*luc*(WT), tMe2f1-*luc*(m1), tMe2f2-*luc*(m2), tMe2f3-*luc*(m3))を同調化し、経時的に回収した細胞から全 RNA を調製し、逆転写酵素で PCR 反応の鋳型となる cDNA を合成した。cDNA の量は、構成的に発現している *Actin* で標準化した(図 5)。さらに細胞周期に伴う発現パターンを調べるために、内在性の

S 期マーカーとして S 期特異的に発現する *histoneH4* の発現も併せて調べた(図 5)。

まず始めに *te2f-luc(WT)* について RT-PCR による発現解析を行った。その結果、*te2f-luc(WT)* 細胞において、*luc* 遺伝子の転写量は時間経過に伴って変動が見られ、細胞周期の進行と連動していることがわかった。一方、LUC 活性は変動が見られなかった(図 4)ことから、G1/S 期の発現制御は転写レベルで行われていると予想された。

続いて、E2F 結合配列の機能を調べるために変異プロモーター/*luc* の細胞 (*tMe2f1-luc(m1)*, *tMe2f2-luc(m2)*, *tMe2f3-luc(m3)*) についても RT-PCR による発現解析を行った。その結果、全体的な傾向としては、変異型プロモーター/*luc* の細胞では、*luc* 遺伝子の発現レベルが減少しているものの、時間経過に伴う *luc* の発現の変動は全ての細胞で認められた。細胞間での違いを比較してみると *tMe2f2-luc(m2)* 細胞において *luc* 遺伝子の発現パターンが遅れているが、*histoneH4* など他の内在性遺伝子の発現も遅れていることから、E2F 結合配列に起因するものではないと思われる。

各遺伝子についての RT-PCR の結果を以下に述べる。*histoneH4* の発現パターンは、*te2f-luc(WT)*, *tMe2f1-luc(m1)*, *tMe2f3-luc(m3)* の各細胞においては 3~4 時間目に mRNA の蓄積が認められ、8~10 時間目に転写レベルが最大となり、その後は減衰傾向にあった。これに対し *tMe2f2-luc(m2)* 細胞では、5~6 時間目に mRNA の蓄積が認められ、14 時間まで転写レベルは上昇傾向にあった。このことから *tMe2f2-luc(m2)* 細胞だけが他の 3 種類の細胞周期の進行とは約 2 時間遅れていることが示唆された。また *histoneH4* の発現パターンから、*te2f-luc(WT)*, *tMe2f1-luc(m1)*, *tMe2f3-luc(m3)* の各細胞では 8 時間目頃に S 期のピークに達することがわかった。これは *te2f-luc(WT)* の細胞における DNA ヒストグラムの解析結果とも一致した(図 3)。*tMe2f2-luc(m2)* 細胞では、*histoneH4* の発現は、*luc* の発現と同様に 2 時間ほど遅れて 10 時間目前後に S 期のピークに達した。したがって、*tMe2f2-luc(m2)* で見られた各遺伝子の発現パターンの遅延は、使用した細胞株間の同調化の進行の違いに起因するものと考えられる。

内在性 *PCNA* の発現パターンは、*te2f-luc(WT)*, *tMe2f1-luc(m1)*, *tMe2f3-luc(m3)* では、2~3 時間目から mRNA の蓄積が認められ、6~7 時間目に転写レベルが最大となった。*luc* と *histoneH4* の発現と同様に、*tMe2f2-luc(m2)* 細胞のみ発現パターンに約 2 時間の遅れが認められた。いずれにしても *PCNA* の発現パターンは、*histoneH4* よりもわずかに早い発現パターンを示した。このことからタバコの内在性 *PCNA* は G1 期後期から S 期にかけて転写レベルが上昇することが判明し、ニチニチソウやイネで報告されている結果とも一致していた。

luc の発現パターンは、*tMe2f2-luc(m2)* 以外では、内在性 *PCNA* の発現パターンよりわずかに早く、1~2 時間目から mRNA の蓄積が認められ、5~6 時間目に転写レベルがピークに達した。7 時間目以降は減衰傾向にあり、14 時間目には検出されなかった。この結果は、本研究で用いている *NtPCNA* プロモーター配列(翻訳開始点より上流 317bp)が、G1/S 期における *NtPCNA* の発現制御を行うのに充

分な領域であることを示している。一方、*luc* の発現レベルは、各細胞株で異なっているが、*te2f-luc*(WT)細胞以外では転写レベルの減少が認められた。注目すべきこととして、両方の E2F 結合配列に変異が入っている *tMe2f3-luc*(m3)の細胞においても、発現レベルは他の 3 種類の細胞株とは異なるが、周期的な発現パターンが認められた(図 5)。これらの結果から *NtPCNA* プロモーター上の E2F 結合配列は、G1/S 移行期における転写活性化には必須であり、2 つの結合配列が協調的に作用することが示唆された。

NtE2F の発現パターンは、*tMe2f2-luc*(m2)細胞以外では、内在性 *PCNA* のパターンよりわずかに早く、1~2 時間目から mRNA の蓄積が認められた。一方、*tMe2f2-luc*(m2)細胞では他と同様に発現パターンに約 2 時間の遅れが認められた。*NtDP* の発現パターンには周期性は見られず一定の転写レベルを示した。このことから、*NtDP* が周期を通じて一定の発現をしているのに対し、*NtE2F* が G1 後期から S 期にかけて発現することにより、*NtPCNA* の転写が活性化される時間的な制御機構の存在が示唆された。

1-3-3 増殖再開に伴う *NtPCNA* プロモーターの発現解析

同調化した細胞で見られた G1/S 期に伴う *NtPCNA* の発現が、増殖再開の条件でも見られるかを調べた。培養 7 日目の定常期にある細胞を新しい LS 培地に植え継ぎ、増殖再開(re-entry)させることで細胞周期の部分同調化を行った。増殖再開した時点を 0 時間とし、16 時間後まで 4 種類の細胞を経時的に回収した。

回収した細胞を破砕し、同調培養と同様に LUC の比活性を測定した。図 6 に示すように *te2f-luc*(WT)細胞では増殖再開 4 時間目から LUC 活性の上昇が認められた。増殖再開 8 時間から 12 時間後に顕著な上昇が見られ、12 時間後に活性が最大となった。E2F 結合配列間での違いについて比較したところ、*te2f-luc*(WT)細胞では一貫して他の 3 種類の細胞より高い活性を示した。変異プロモーター間で比較すると、*tMe2f1-luc*(m1)細胞が他の *tMe2f2-luc*(m2)、*tMe2f2-luc*(m3)に比べて活性が高かった。

tMe2f1-luc(m1)細胞は 2 つの E2F 結合配列のうち下流側に存在する *te2f2* がそのまま残っていることから、G1/S 期の制御においては *te2f2* の方が転写活性に対する貢献度が高い傾向が見られた。

1-3-4 増殖再開に伴う *NtPCNA* プロモーター発現と E2F 結合配列 の関連性

上述した同調化細胞を用いた実験と同様に、4 種類の *NtPCNA-luc* の形質転換 BY-2 細胞について、増殖再開後から経時的に回収した細胞の全 RNA を回収し、以下の遺伝子の転写レベルを調べるために RT-PCR を行った。

図 7 に示すとおり、*Actin* の増幅バンドから、PCR 反応の鋳型となる cDNA の量はほぼ揃っていることが確認された。*histoneH4* の発現は増殖再開後 3 時間目から mRNA の蓄積が認められ、12 時間目に発現レベルのピークを迎え、12 時間目以降は減少する傾向であった。*histoneH4* の発現パターンは 4 種類の細胞につ

いて同様であったことから、4種類の細胞とも周期性がほぼ同じで、S期は増殖再開後約3時間目から始まると推定される。

内在性の *NtPCNA* の発現レベルは、増殖再開後2時間目から mRNA の蓄積が認められ、8時間目にピークに達し、12時間頃から減少傾向にあった。注目すべきは、内在性の *NtPCNA* の発現レベルは *histoneH4* より早い時期に上昇することである。このことから、内在性の *NtPCNA* の発現は G1 期後期から S 期にかけて起こると推測され、同調化した *te2f-luc* 細胞での結果と一致していた(図 5)。

一方、導入した *NtPCNA* プロモーターの発現は *luc* を特異的に増幅するプライマーを用いて解析を行った。予想したとおり、*luc* の発現は形質転換細胞株の種類によって異なっていた。*te2f-luc*(WT)の細胞において、導入した *luc* の転写レベルは、増殖再開後2時間目から発現が認められ、8時間目にピークに達し、12時間目以後は減少傾向にあった。このことから、導入した *NtPCNA* プロモーターの活性化パターンは、内在性の *NtPCNA* プロモーターとほぼ同じであることがわかった。

NtE2F の発現パターンは増殖再開後2時間目から RNA の蓄積が認めれ、8時間目にピークに達し、以後は減衰傾向にあった。*NtE2F* の発現パターンは、内在性の *NtPCNA* よりわずかに早く進行していたが、*NtDP* の発現パターンは一定であった。

このことから、導入した *NtPCNA* プロモーターの発現パターンは、内在性の *NtPCNA* プロモーターとほぼ同じであることがわかった。*NtE2F* の発現レベルは増殖再開後2時間目から発現が認めれ、8時間目にピークに達し、以後は減衰傾向にあった。*NtE2F* の発現パターンは、内在性の *NtPCNA* よりわずかに早く進行していたが、*NtDP* の発現パターンは一定であった。

形質転換細胞株間で比較すると、*luc* の転写レベルでは、*te2f-luc*(WT)が最も高く、*tMe2f1-luc*(m1)、*tMe2f2-luc*(m2)、*tMe2f2-luc*(m3)では mRNA の蓄積量が著しく減少しており、RT-PCR において *te2f-luc*(WT)と同じサイクル数では PCR 産物を確認することは困難であった。そこで、サイクル数を増加させた結果、*tMe2f1-luc*(m1)は2サイクルの追加により明確なバンドが検出されたのに対し、*tMe2f2-luc*(m2)、*tMe2f2-luc*(m3)では、5サイクル追加しないとバンドが検出されなかった。このことから、*tMe2f2-luc*(m2)、*tMe2f2-luc*(m3)に比べて、*tMe2f1-luc*(m1)の細胞では *luc* の転写量が多いことが判明した。次に形質転換細胞株間で転写パターンを比較すると、全ての細胞で同様な転写パターンが認められ、両方の E2F 結合配列に変異が入っている *tMe2f2-luc*(m3)細胞でも G1/S 期に発現が上昇する転写パターンは維持されていた。

このように形質転換細胞間の比較の結果は、同調化細胞で得られた結果と対応すると結論した(図 5)。

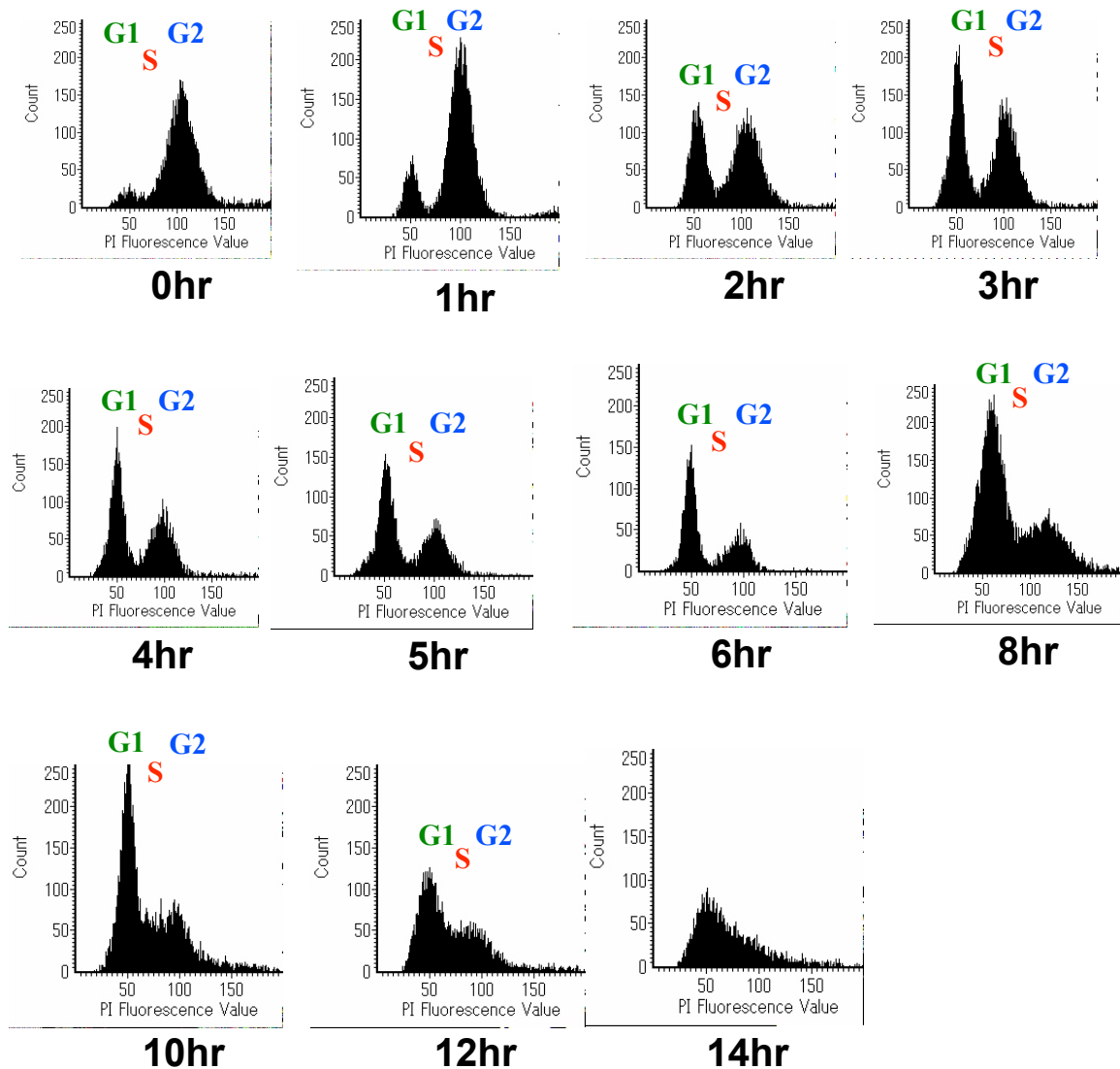


図 3: 同調化した形質転換細胞のDNAヒストグラム解析

野生型の*NtPCNA*プロモーターを導入した形質転換BY-2細胞のte2f-luc(WT)細胞を二段階同調化処理し、薬剤除去後に新しいLS培地にて培養した。薬剤除去した時点をも0時間として経時的に細胞を回収後、PIで染色し、DNAヒストグラム解析を行った結果を示す。

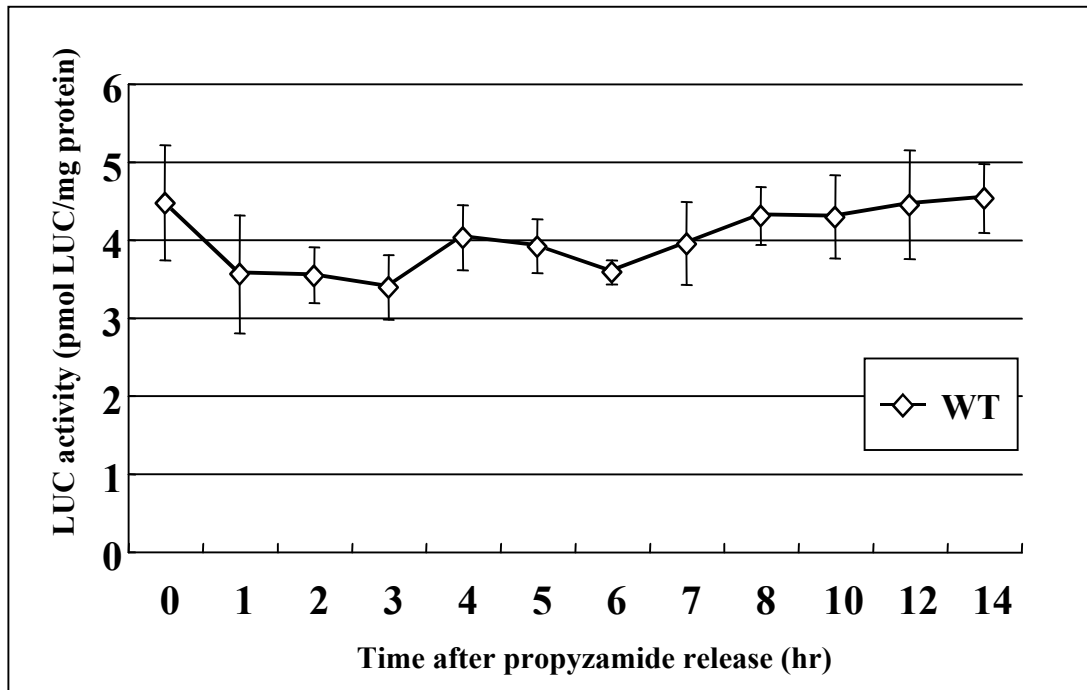


図 4: 増殖再開期におけるLUC活性の変化

二段階同調したte2f-luc(WT)細胞におけるLUC活性。薬剤除去後から経時的に回収した細胞を破砕してタンパク質粗抽出液を調製し、LUC活性を測定した。0時間目から14時間目までのte2f-luc細胞におけるLUC活性の経時変化を示す。±S.D.は標準偏差を示す。n=3。

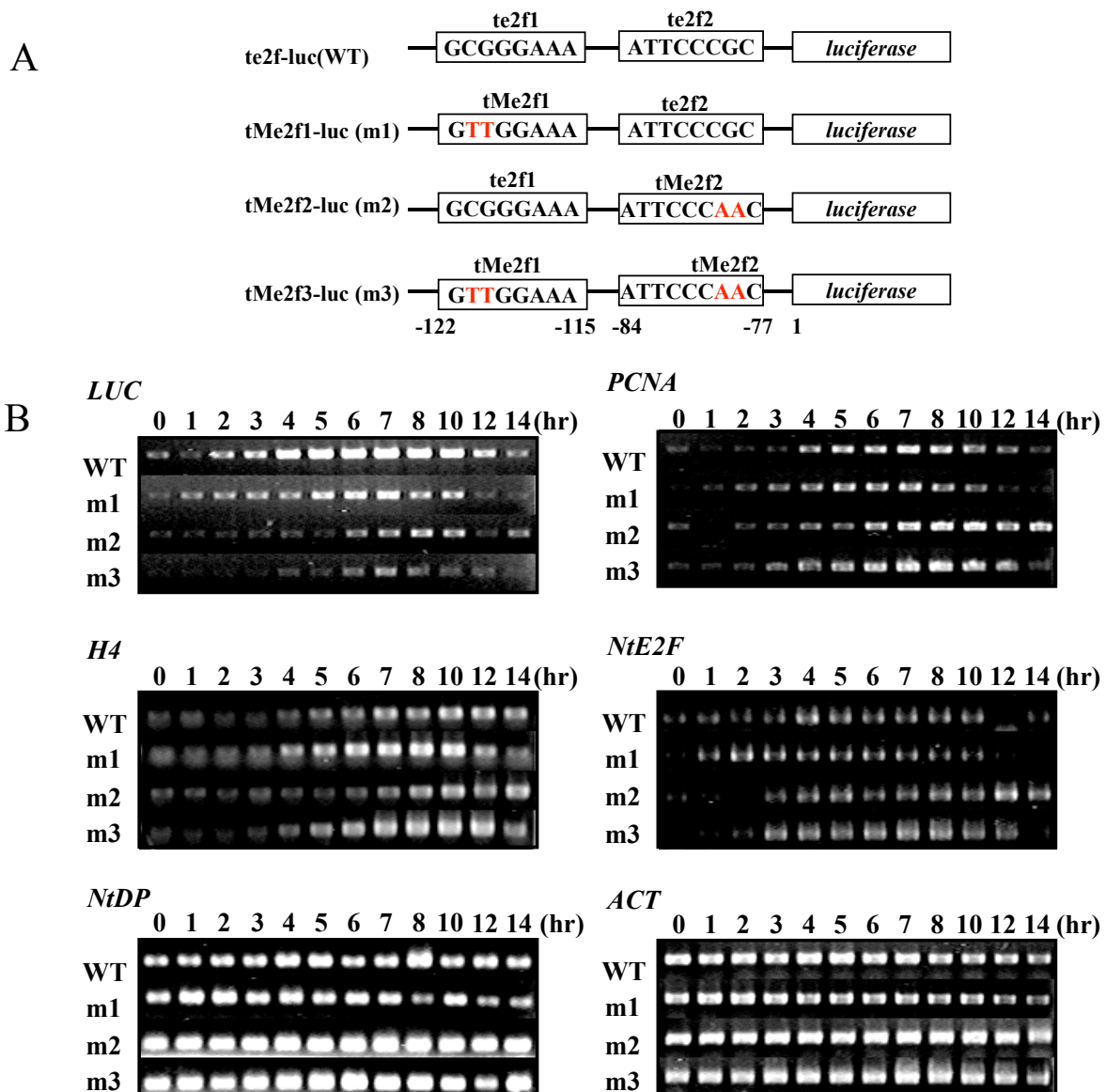


図 5： 同調化細胞における*NiPCNA*プロモーターおよび細胞周期制御因子の転写レベルの解析

(A) 導入した*NiPCNA*プロモーターの模式図。赤字は塩基置換変異が導入されていることを示す。E2F結合サイトの下の数字は翻訳開始点を1としたときの塩基数を表す。(B) RT-PCRによる転写産物量の経時変化。同調化処理した *te2f-luc*(WT), *tMe2f1-luc*(m1), *tMe2f2-luc*(m2), *tMe2f3-luc*(m3)の各細胞 について薬剤除去した時点を0時間として、経時的に細胞を回収した。回収した細胞から全RNAを調製し、RT-PCRを行った結果を示す。鑄型量は構成的な発現を示す*Actin*(*ACT*)の結果をもとに調整した。*LUC*は導入した*NiPCNA*プロモーターの転写産物を示し、*PCNA*は内在性の*PCNA*プロモーターからの転写産物を示す。*histone H4*(*H4*)はS期の発現マーカーとして用いた。

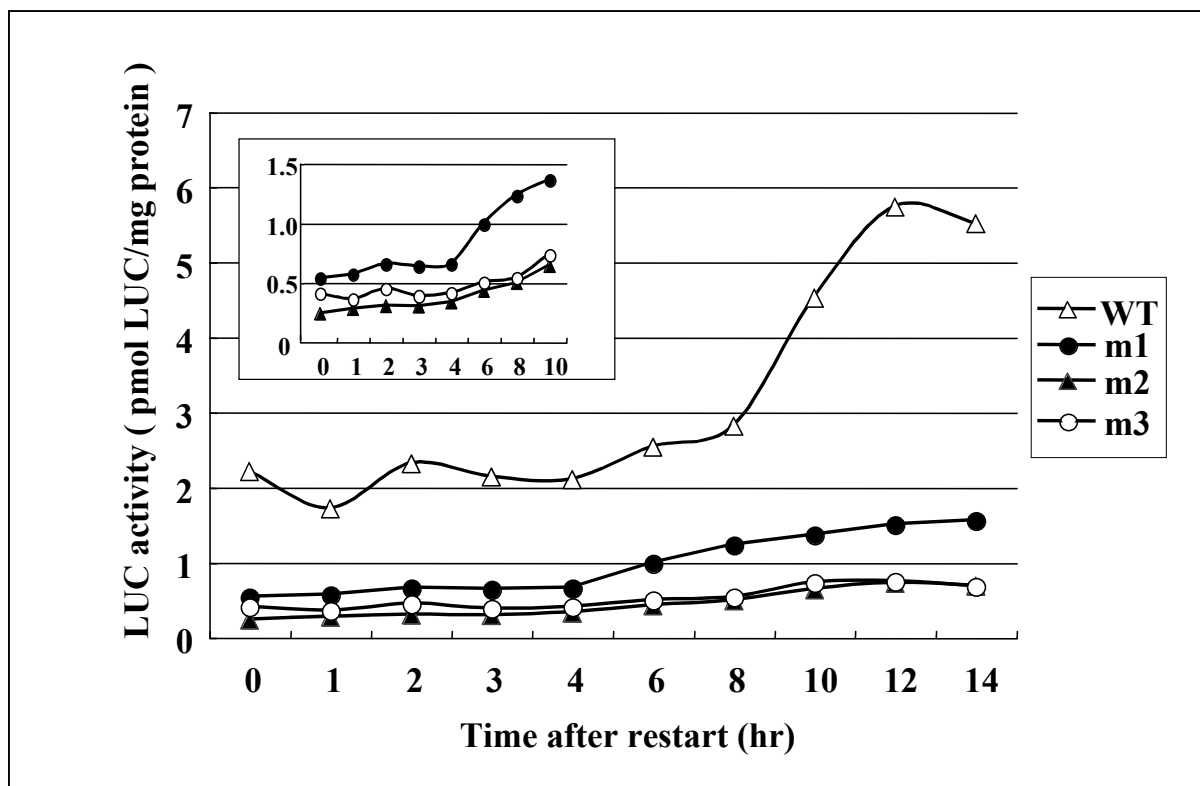
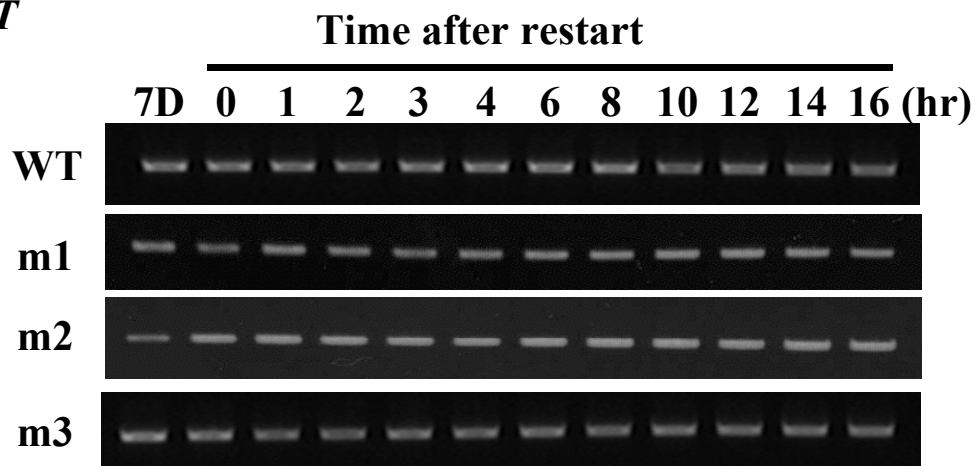


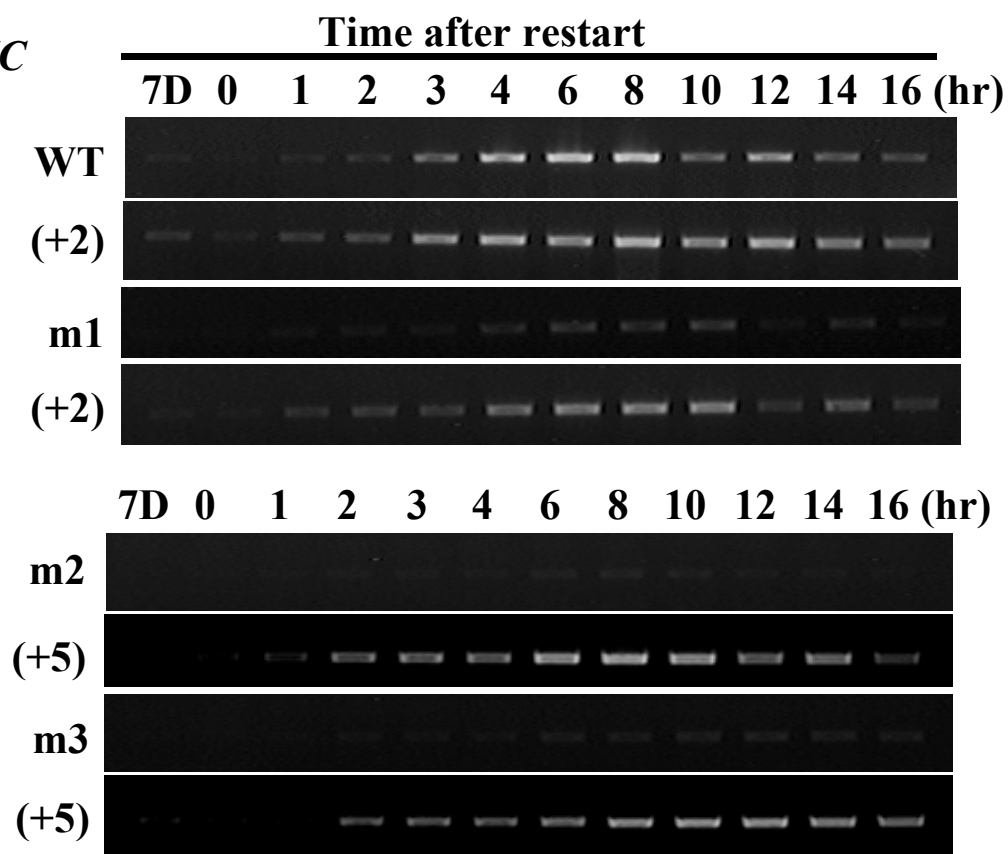
図 6： 増殖再開期におけるLUC活性の変化

野生型と変異型の*NtPCNA*プロモーターを導入した4種類の形質転換BY-2細胞におけるLUC活性。te2f-luc(WT), tMe2f1-luc(m1), tMe2f2-luc(m2), tMe2f3-luc(m3)を定常期まで培養し、新しい培地へ移して一斉に増殖再開させることで周期の同調化を行った。植え継いだ時点として経時的に細胞を回収し、細胞を破砕して粗抽出液を調製し、LUC活性を測定した。0時間目から14時間目までのLUC活性の経時変化を示す。LUC活性が低い変異型の0時間から10時間目までの経時変化を挿入図に示した。

ACT



LUC



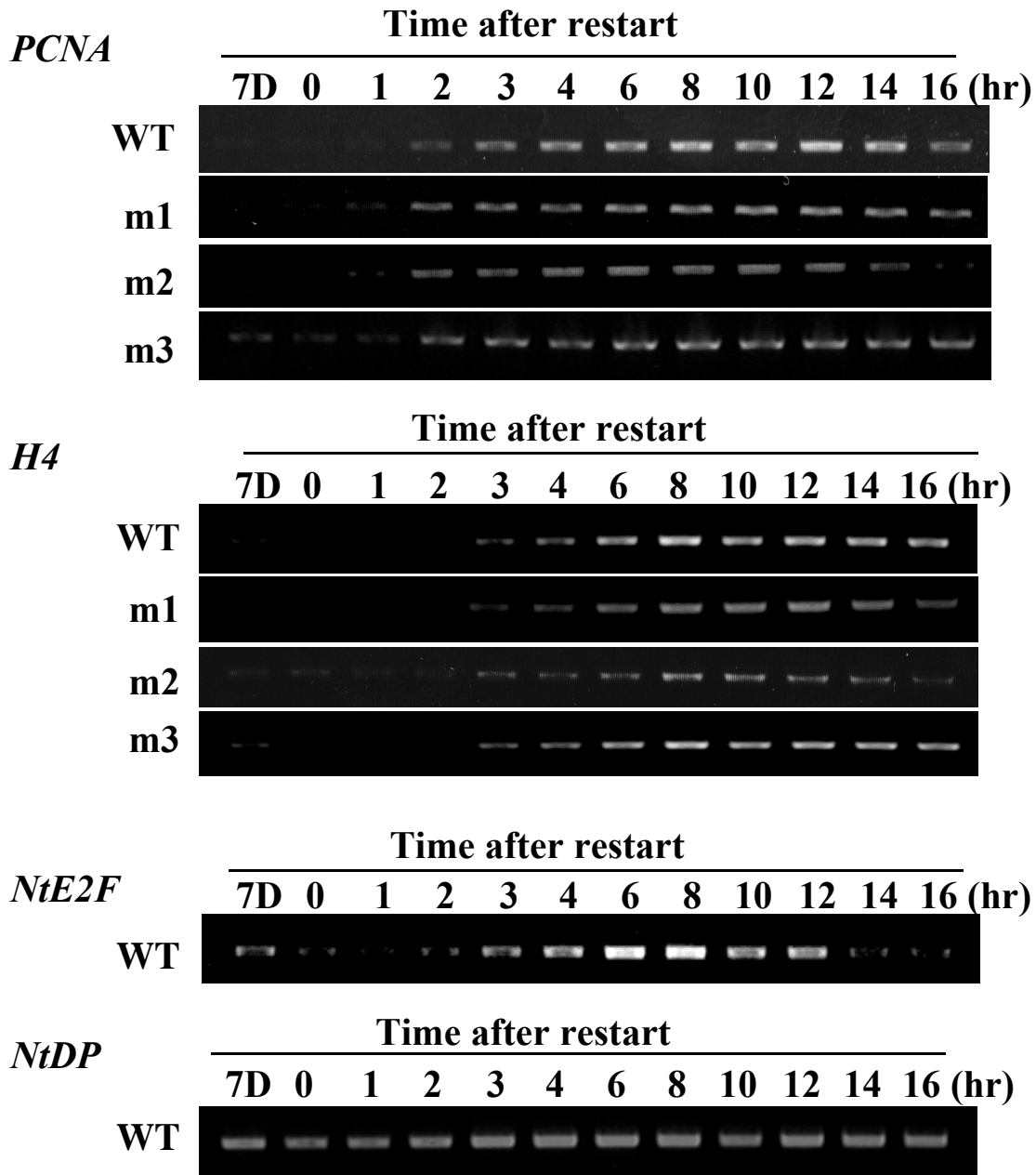


図 7: 増殖再開期における *NtPCNA* プロモーターおよび細胞周期制御因子の転写レベルの解析

RT-PCRによる転写産物量の経時変化。増殖再開させた *te2f-luc*(WT), *tMe2f1-luc*(m1), *tMe2f2-luc*(m2), *tMe2f3-luc*(m3) を用いて、植え継いだ時点を0時間として経時的に細胞を回収した。回収した細胞から全RNAを調製し、RT-PCRを行った結果を示す。鋳型量は構成的な発現を示す *Actin (ACT)* の結果をもとに調整した。*LUC* は導入した *NtPCNA* プロモーターからの転写産物を示し、*PCNA* は内在性の転写産物を示す。*LUC* ではサイクル数を2サイクル(+2)または5サイクル(+5)増やした条件での結果も併せて示す。*histone H4(H4)* はS期発現マーカーとして用いた。*NtE2F*, *NtDP* は *te2f-luc*(WT) 細胞での *NtE2F* と *NtDP* の転写産物量を示す。

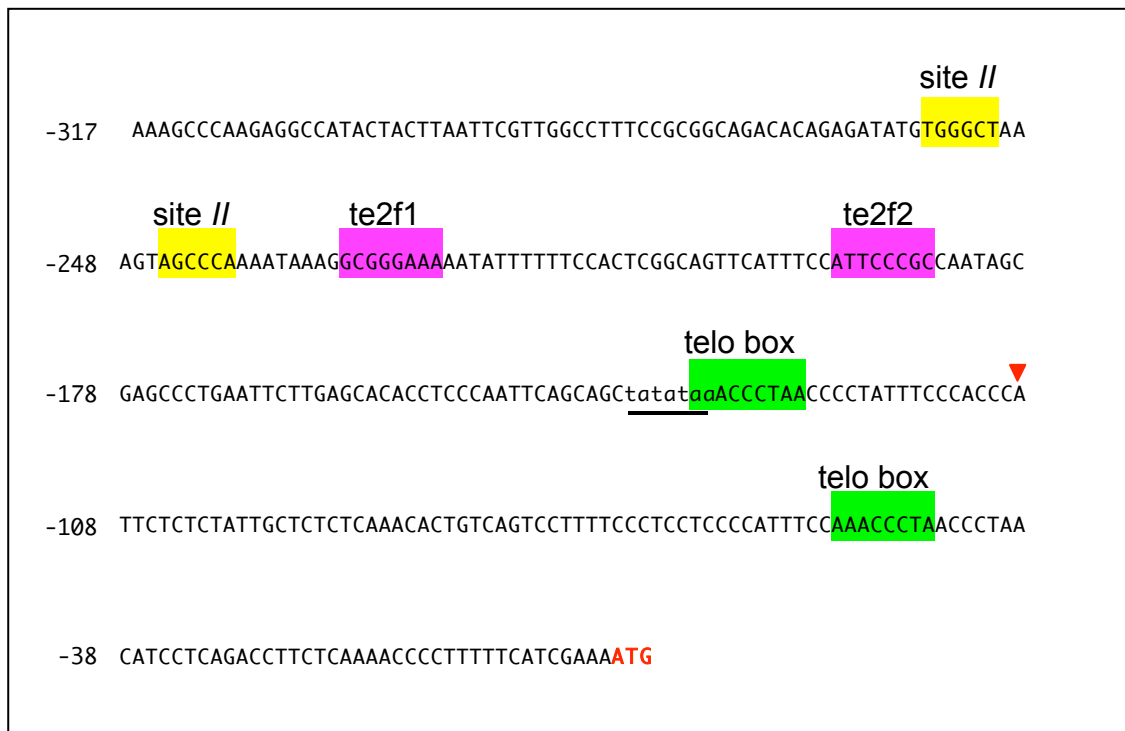


図 8: *NtPCNA*プロモーターのシス配列

本研究に用いた*NtPCNA*プロモーター領域の配列と細胞周期特異的発現に関与すると予想されるシス配列を示した。左側の数字は翻訳開始点を1とした時の塩基数を示す。赤文字は開始コドンを示す。小文字はTATA配列、▼は推定される転写開始点を示す。

1-4 考察

G1/S 期における *NtPCNA* の発現と E2F 結合配列との関連性を調べるため、同調化した細胞と増殖再開期の細胞における *NtPCNA* の発現解析を行った。

te2f-luc(WT)の細胞では、増殖再開期に G1/S 期の進行に伴った LUC 活性の上昇が検出された(図 6)。それに対して、同調化細胞では、細胞周期が G1/S 期へと進行しているにも関わらず、LUC 活性は変動を示さなかった(図 4)。同時に回収した細胞で RT-PCR によって *NtPCNA* の転写レベルの経時変化を調べてみると、転写産物量は周期的な変動を示した。すなわち増殖再開期の細胞でも LUC 活性の変動が検出されたが、同調化細胞では *NtPCNA* の発現レベルの変動は、転写レベルでのみ検出され、翻訳レベルとタンパク質の安定性を総合的に評価する LUC 活性では検出されなかったことになる。二段階同調では、DNA ポリメラーゼ阻害剤であるアフィディコリンの添加によって、複製阻害が起ったことによる影響が考えられる。しかし、プロピザマイド洗浄後には細胞周期が正常に進行しており、明確な理由はわからない。いずれにしても、翻訳レベルで起こったことであれば 5'-UTR が関係することになり、二段階同調と増殖再開で *NtPCNA* の翻訳過程の違いを検証することが望まれる。

また、同調化した細胞と増殖再開期の細胞において、*NtPCNA* プロモーターは G1 期から S 期にかけて発現レベルの上昇が認められ、E2F 結合配列に変異を導入した形質転換細胞間での発現パターンも対応する結果が得られた(図 5, 図 7)。したがって、2 つの異なる同調系を用いて同様な結果が得られたことになり、本研究の結果の信頼性と再現性を保証すると考えられる。

NtPCNA プロモーターに 2 カ所存在する E2F 結合配列において、上流側の te2f1 と下流側の te2f2 のどちらかに変異を入れた tMe2f1-luc(m1)または tMe2f2-luc(m2)細胞では、te2f-luc(WT)細胞に比べて転写レベルが著しく減少した。さらに両方の E2F 結合配列に変異を入れた tMe2f3-luc(m3)細胞では、増殖再開時に tMe2f2-luc(m2)とほぼ同程度の転写レベルで(図 7)、二段階同調では最も低い転写レベルであった(図 5)。このことから E2F 結合配列は、*NtPCNA* 遺伝子の細胞周期依存的な発現パターンの制御には必須ではないが、正常なプロモーター活性には 2 つの E2F 結合配列(te2f1, te2f2)の両方が必要であると推測される。*NtPCNA* と同じように E2F 結合配列が 2 つ存在し、G1/S 期に特異的な発現を示すタバコの *RNR2* プロモーターの解析では、プロモーターが活性化する S 期には 2 つの E2F 結合配列を必要とするが、両方の E2F 結合配列に変異を入れた場合でも転写レベルがかなり減少するものの転写が無くなることはないことが報告され(Chaboute *et al.*, 2000)、*NtPCNA* プロモーターと類似した結果が得られている。しかし、S 期以外の時期では下流の E2F 結合配列が抑制的に作用することから、*NtPCNA* プロモーターとは異なる結果も得られている。S 期には両方の E2F 結合配列が協調的に作用し、E2F 結合配列が機能しなくても転写が無くならないことは、E2F によ

り制御を受けるプロモーターに共通の特徴かも知れない。

発現パターンに注目してみると、tMe2f1-luc(m1), tMe2f2-luc(m2), tMe2f3-luc(m3)を導入した細胞では、転写レベルは減少していたが、G1/S 期進行に伴う発現は保たれていた。驚いたことに、両方の E2F 結合配列に変異を入れた tMe2f3-luc(m3)細胞においても周期的な発現パターンは失われていなかったが、増殖再開では他の 3 種類の細胞株よりも遅れて mRNA の蓄積が始まり(図 7)、二段階同調では発現の立ち上がりが遅くてかつ早く減少し(図 5)、発現パターンが異なることが示された。これは実験に使用した *NtPCNA* のプロモーター領域(翻訳開始点より上流 317bp)に、発現パターンを制御する領域が E2F 結合配列以外に存在することを示唆する。イネ *PCNA*(*OsPCNA*)プロモーターには site *Ila*, site *Iib* とよばれる分裂組織での発現を制御するシス配列が存在し、そこには PCF1 と PCF2 という bHLH 型の転写因子が結合することが報告されている(Kosugi and Ohashi,1997)。PCF1 と PCF2 は、TCP ファミリーと呼ばれる植物に広く存在する転写因子ファミリーに属する(Cubas *et al.*, 1999)。さらに、telo box (AAACCCTAA)と呼ばれるシス配列が *RNR* や *PCNA* などの G1/S 期に発現が上昇する遺伝子に存在し、AtPur α という転写因子が結合することが示されている(Tremousaygue *et al.*, 1999)。シロイヌナズナの *AtPCNA-2* プロモーターには site *II* と telo box が存在し、その両方に変異を入れると分裂組織での発現が見られなくなることが報告された(Tremousaygue *et al.*, 2003)。site *II* には At-TCP20 という転写因子が結合し、At-TCP20 と AtPur α が結合することから、site *II* と telo box が協調的に機能して分裂組織での発現を制御する機構が提示された。本研究で使用した *NtPCNA* プロモーター領域にも telo box が 2 カ所存在し、site *II* に類似した配列も 2 つ存在する(図 8)ことより、E2F 結合配列以外のシス配列としてこのような配列が細胞周期依存的な発現制御に関与する可能性が考えられる。したがって、今後 5'側および 3'側から *NtPCNA* プロモーターを欠失させたり、部分的に変異を導入するなどの手法により、E2F 結合配列以外に G1/S 期の発現に関与する領域(配列)を限定する必要がある。

2 カ所の E2F 結合配列(te2f1, te2f2)の間で *NtPCNA* プロモーターに与える影響を調べるため、tMe2f1-luc(m1)と tMe2f2-luc(m2)で比較したところ、同調化細胞と増殖再開期の細胞において転写レベルは tMe2f1-luc(m1)の方が高いことが示された(図 5, 図 7)。tMe2f1-luc(m1)細胞では下流の te2f2 が機能しているため、te2f2 を介して高いレベルの転写が誘導されたことになる。これに対し、一過性発現解析では、逆に te2f1 の方が転写レベルが高い傾向を示した(図 3)。さらに、タバコの葉では、te2f2 が抑制的に作用し、TGMV による感染が起こると、上流の te2f1 が te2f2 による抑制を解除するモデルが提示されている(Egelkroun *et al.*, 2002)。

このように、E2F 結合配列に変異を導入した実験系では、一見矛盾するような結果が得られている。しかし、シロイヌナズナには 6 種類の *E2F* 遺伝子が存在し、他の転写因子との相互作用を含めてそれらの遺伝子ファミリーに役割分担がある可能性が高く、ほとんどの細胞が分化している成熟葉とほとんどの細胞が増

殖過程にある BY-2 細胞では、相互作用する転写因子が異なる可能性がある。動物では、E2F ファミリー間の役割分担は他の因子との相互作用によって行われているという知見が蓄積しつつある。例えば、E2F3 とのみ相互作用する TFE3 転写因子が同定され、E2F3 と TFE3 が協調的にあるサブタイプの E2F 制御遺伝子を制御することが報告されている(Giangrande *et al.*, 2003)。また、E2F2 と E2F3 とのみ相互作用する RYBP は、YY1 転写因子と相互作用し、YY1 と E2F 両方の結合配列が存在する *cdc6* プロモーターへ E2F2 と E2F3 を積極的にリクルートすることが提唱されている(Schlisio *et al.*, 2002)。この他にも、Sp1(Karlseder *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996)や NF-Y(van Ginkel *et al.*, 1997)といった因子との協調的な制御も報告されており、E2F 結合配列を介した発現制御機構はまだ未解明のことが多く残されていると予想される。

今後の研究としては、ChIP 解析などにより、*in vivo* 条件で E2F 結合配列間での結合に違いがあるかを調べる必要がある。ChIP 解析では転写因子などが結合する DNA 領域の特定に威力を発揮するが、隣接した数百 bp 程度の短い領域を区別するのは技術的に難しい。しかし、E2F 結合配列に変異を導入した形質転換 BY-2 細胞を用いれば、内在性の遺伝子と区別して導入したプロモーター領域に特異的なプライマーが設定できるため、2 つの E2F 結合配列を明確に区別することが可能で、どちらの配列に結合しやすい、または 2 つの E2F 結合配列の必要性を解析することができるだろう。また、ゲノム解析が進行しているシロイヌナズナでは、E2F/DP ファミリーすべての因子の配列が同定されており、最近では MM2d といった同調化の効率の高い培養細胞も確立されている(Menges and Murray, 2002)。したがって、このような解析には MM2d 細胞が適していると考えられ、MM2d 細胞を使った ChIP 解析については実験系の開発を進めているところである(森平、修士論文, 2004)。この実験系が確立されれば、細胞周期のどの時期にどの E2F ファミリーが PCNA プロモーターおよび他の E2F 制御プロモーターに結合しているかについて、詳細に調べることができると期待される。

1-5 小括

第 1 章では G1/S 期における *NtPCNA* プロモーターの発現と E2F 結合配列の関連性について解析を行った。te2f-luc(WT), tMe2f1-luc(m1), tMe2f2-luc(m2), tMe2f3-luc(m3)を導入した形質転換 BY-2 細胞を作製し、アフィディコリンとプロピザマイドを用いた二段階同調および増殖再開によって細胞周期を同調化させた。経時的に細胞を回収し、それぞれの細胞における *luc* の発現解析を行った。

その結果、転写レベルでは *luc* の発現は、S 期のマーカーである *histoneH4* よりやや早く発現レベルの上昇が始まっており、G1/S 期に特異的な発現が認められた。片方の E2F 結合配列に変異の入った tMe2f1-luc(m1)と tMe2f2-luc(m2)を導入した細胞では発現レベルは下がっていたが、発現パターンは te2f-luc(WT)を導入した細胞と同様に G1/S 期に上昇を示す傾向が認められた。さらに両方の E2F 結合配列が変異した tMe2f3-luc(m3)を導入した細胞においても G1/S 期に上昇を示す発現パターンを示した。

このことから G1/S 期の細胞において *NtPCNA* プロモーターの E2F 結合配列は発現レベルの上昇に作用し、細胞周期特異的な発現パターンには他の転写因子による制御が関与する可能性が示唆された。なお、2 カ所の E2F 結合配列の間では te2f2 がより強い影響を示す傾向が見られたが、大きな違いは確認されず、*NtPCNA* プロモーターの G1/S 期における制御には te2f1 と te2f2 の両方が必要で、両者が協調的に機能すると結論した。

第2章

タバコ *PCNA* プロモーターの発現制御機構

2-1 序論

第1章では、*NtPCNA* プロモーター上の E2F 結合配列は、G1/S 期における発現レベルの上昇に作用し、*NtPCNA* プロモーターが十分に機能するには2つの結合配列 *te2f1* と *te2f2* の両方が必要であることを示した。その一方で、両方の E2F 結合サイトに変異を導入しても G1/S 期に発現が上昇する発現パターンが見られたことより、*NtPCNA* 遺伝子の発現の周期性に E2F 結合配列が関与しない可能性も考えられた。それでは、E2F 結合配列は *NtPCNA* プロモーター制御にどのように関わっているのだろうか。この問題について検討するため、E2F 結合配列の機能についてさらに解析を行った。

植物の *PCNA* 遺伝子の発現制御について E2F 以外に植物の pRB ホモログである pRBR の関与を示唆する興味深い知見がある。動物細胞ではアデノウイルスやパピローマウイルスなどの DNA 腫瘍ウイルスが感染すると、E1A や E7 といったウイルス由来のタンパク質によって pRB と E2F の結合が阻害され、pRB/E2F による S 期進行抑制が破綻し、宿主細胞は癌化へと進む。最近、植物細胞を宿主とするウイルスにも類似した戦略をとるものが報告された。ジェミニウイルス属に分類される TGMV (tomato golden mosaic virus) は、宿主である植物細胞の DNA 複製装置を利用してローリングサークル方式で自らのゲノムの複製を行う (Gutierrez, 1999)。ウイルス感染が起こっていない植物体では、成熟葉での *PCNA* タンパク質の蓄積は見られないが、TGMV に感染した植物体では、成熟葉において *PCNA* タンパク質の蓄積が認められた (Nagar *et al.*, 1995)。さらに TGMV が感染した成熟葉での *PCNA* タンパク質の蓄積は *PCNA* 転写レベルの上昇に起因し、E2F 結合配列を変異させると TGMV 感染による *PCNA* プロモーターの転写は起こらなくなり (Egelkrout *et al.*, 2001)、TGMV の複製に必須なタンパク質である AL1 が pRBR タンパク質と相互作用することが示された (Ach *et al.*, 1997a, Kong *et al.*, 2000)。これらの知見から TGMV 感染による成熟葉での *PCNA* タンパク質の蓄積は、ウイルス由来の AL1 タンパク質が pRBR と結合することで、E2F による *PCNA* 遺伝子の転写活性化に対する抑制が効かなくなったことに起因すると考えられる。

以上の知見は、植物の *PCNA* 遺伝子の発現制御には E2F と pRBR が重要な役割を担うことを示唆している。しかし、細胞周期の時間軸の中で *PCNA* 遺伝子の発現制御に E2F や pRBR がどのように機能しているかはわかっていない。また植物の E2F/pRBR が酵母または動物細胞内で E2F の転写活性化能を抑制する

という知見はあるが(Huntley *et al.*, 1998)、植物細胞内で E2F と pRBR の関連を解析した報告はない。

本章では、タバコ細胞内での *NtPCNA* プロモーターの発現制御に E2F と pRBR が制御系として機能するのかを調べることを目的としている。当研究室ではこれまでにタバコの *E2F(NtE2F)*, *DP(NtDP)*, *RBR(NtRBR1)* 遺伝子の単離に成功しており、これらの因子をタバコ培養細胞 BY-2 で一過的に発現させて、*NtPCNA* の転写活性を検出する実験系を構築し、サイクリンの共導入による影響も解析した。また、*PCNA* プロモーターにおける E2F と pRBR による制御系の一般性を検討するため、イネ *PCNA* プロモーターを用いた解析も併せて行った。

2-2 実験材料および方法

2-2-1 タバコ培養細胞の培養

1-2-1 と同じ

2-2-2 タバコ培養細胞 BY-2 を用いた一過性発現実験

2-2-2-1 導入プラスミドの構築

一過性発現用の導入プラスミド BA221 ベクターは、植物細胞一過性発現用ベクター pBI221(Clontech, Palo Alto, CA)に制限酵素部位を追加した pBI221SKN を作製し、さらに pBI221SKN から *GUS* 遺伝子を取り除いて制限酵素部位を追加した。この改良により CaMV35S プロモーターと Nos ターミネーターの間に多数の制限酵素部位が存在し、今回の研究に使用する cDNA をカセット式に組み込むことが出来るように設計した。

以下のような制限酵素部位を含む二本鎖オリゴ DNA を作製し、pBI221 の *SstI* 部位に組み込んだ。オリゴ DNA の配列は以下に示す。オリゴ DNA を二本鎖にするために各々 100pmol/μl を等量ずつ混合し、97°C にて 5 分間加熱後、室温にて一晩静置してアニーリングさせた。

SKN adaptor (Fw)

5'- CGTCGACGGTACCGCGGCCGCGAGCT -3'

SKN adaptor (Rev)

5'- CGCGGCCGCGGTACCGTCGACGAGCT -3'

オリゴ DNA 挿入後、シーケンスの解析を行って挿入方向を確認し、pBI221SKN とした。さらに BA221 を作製するために、同様に以下のオリゴ DNA を 100pmol/μl で等量ずつ混合し、97°C にて 5 分間加熱し、室温にて一晩静置してアニーリングさせた。得られた二本鎖オリゴ DNA を pBI221SKN の *BamHI-SalI* 部位に組み込んだ。

Adapt oligo (Fw)

5'- GATCCCTCGAGACTAGTGATATCG -3'

Adapt oligo (Rev)

5'- TCGACGATATCACTAGTCTCGAGG -3'

エフェクター遺伝子を BA221 の *SpeI-SalI* 部位に挿入するため、PCR 法を用いて *NtE2F* と *NtDP* の 5'末側に *SpeI* 認識配列、3'末側に *SalI* 認識配列を付加した。得られた DNA 断片を pBluescript SK⁻の *EcoRV* 部位にサブクローニングし、配列を確認後、BA221 の *SpeI-SalI* 部位に組み換えた。同様に BA221 の *BamHI-SalI*

部位に挿入するため、PCR 法を用いて *NtRBR1* の 5'末側に *Bam*HI 認識配列、3'末側に *Sal*I 認識配列を付加した。得られた DNA 断片は BA221 の *Bam*HI-*Sal*I 部位に組み換えた。

レポーター遺伝子に *NtPCNA* プロモーター領域を挿入するため、PCR を行って DNA 断片の 5'末端側に *Pst*I 認識部位、3'末端側に *Nco*I 認識部位を付けた。鋳型の *NtPCNA* promoter (te2f, tMe2f1, tMe2f2, tMe2f3)、および *OsPCNA* promoter は慶応大学 小杉俊一 助教授より分与していただいた(Kosugi and Ohashi, 2002a)。

プライマーは以下の通りである。

Pst-PCNA(Fw)

5'- GCTGCAGAAAGCCCAAGAGGCCATAC -3'

PCNA-Nco (Rev)

5'- GCCATGGTTTCGATGAAAAAGGGGTTTTG -3'

得られた DNA 断片を pBluescript SK⁻の *Eco*RV 部位にサブクローニングし、配列を確認後、p35S-luc の *Pst*I-*Nco*I 部位に組み換えて CaMV35S プロモーターを *NtPCNA* プロモーターに置換した。p35S-luc は横浜国立大学の平塚和之 教授から分与していただいた(Millar *et al.*, 1992)。

2-2-2-2 プロトプラストの調製およびエレクトロポレーションによる DNA の導入

基本的には Dansako ら(2003)の方法に従った。改変 LS 培地で 4 日間培養した BY-2 細胞をプロトプラスト化酵素液(0.1% Pectolyase Y23 [Kikkoman, Chiba], 1% Cellulase RS [Yakult Honsha, Tokyo], 0.4M Mannitol, pH5.5)で 30℃、2 時間処理後、0.4M Mannitol で 2 回、エレクトロポレーションバッファー(5mM MES, 70mM KCl, 0.3M Mannitol, pH5.8)で 1 回洗浄して酵素を除いた。1.5x10⁶ 個の細胞を 0.5 ml のエレクトロポレーションバッファーに懸濁し、エレクトロポレーション用のプロトプラストとした。調製したプロトプラストと導入するプラスミド DNA を混和し、エレクトロポレーションシステム Gene Pluser Xcell (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)を用い、4mm キュベット、200V, 250ms, 400μF の条件でプラスミド DNA を導入した。5ml のプロトプラスト用培地(改変 LS 培地[但し Sucrose 10g/l], 0.4M Mannitol)を加え、60mm のシャーレに移した。27℃、暗所下にて 15 時間静置培養した。15 時間後、全細胞を回収し、遠心分離にて培地を除いた後、液体窒素で凍結させ、-80℃にて保存した。

プロトプラストを回収し、0.5ml の GUS(β -glucuronidase)/LUC(luciferase) buffer (0.1M sodium phosphate buffer[pH 7.8], 2mM EDTA, 5% glycerol, 2mM DTT)を加え、氷水中で超音波発生機(UR-20P; Tomy Seiko, Tokyo)を用いて、出力 7~8 で 20 秒破碎、10 秒氷冷を 3 回繰り返して、細胞を破碎した。遠心分離(12,000xg, 10min, 4℃)し、得られた上清を粗酵素液とした。

全タンパク量の測定は、Bradford (1976)に従った。濃度既知の BSA を用いて作製した検量線から全タンパク量を求めた。

GUS 活性の測定は、基本的に Jefferson ら(1987)に従った。蛍光/吸光マルチプレートリーダー(SPECTRA Fluor; Tecan, Salzburg, Austria)を用いて、励起波長 365nm、蛍光波長 455nm で反応生成物 4-Methyl-Umbelliferone (4MU)の蛍光強度を 1 分間隔で 30 分間測定した。得られた蛍光強度の増加曲線と既知濃度の標準物質 4MU を用いて作製した検量線から、1 分間あたりの 4MU の平均増加量を求めた。GUS 比活性は pmol 4MU/min/mg protein として算出した。

ルシフェラーゼ(Luc)の活性は、ルシフェラーゼアッセイシステム(Picagene; Toyo Ink, Tokyo)を用いて測定した。光子の検出にはルミノメーター(Lumat LB 9501; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)を用いた。粗酵素中のルシフェラーゼ濃度はキットに付属の濃度既知の精製ルシフェラーゼの RLU(Relative Light Unit)を基に検量線を作製し、ルシフェラーゼ濃度を決定した。Luc 比活性は pmol Luc/mg protein とした。

Luc/GUS の相対活性は、Luc と GUS それぞれの比活性より算出し、pmol Luc/pmol 4MU/min とした。

2-2-2-3 プロトプラストからの全 RNA の抽出

全 RNA は RNA 精製キット(RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて調製した。方法はキット付属のプロトコールに従った。ゲノム DNA の混入を防ぐため、得られた全 RNA を DNase I (RNase free, Roche Diagnostics, Tokyo)で処理し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、沈殿を DEPC 水に溶かしたものを全 RNA サンプルとした。

全 RNA サンプルは Gene Amp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, USA) を用いて逆転写反応させて cDNA を合成した。方法はキット付属のプロトコールに従った。

2-2-2-4 RT-PCR

合成した cDNA を用いて、以下のような条件で RT-PCR を行った。

反応液組成

10x PCR buffer	2.5 μ l
2mM dNTP	2.5
25mM MgCl ₂	1.25 μ l
template	0.05~0.5 μ l cDNA
primer (forward)	0.25 μ l
primer (Reverse)	0.25 μ l
fill up with DW	total 25 μ l

反応条件

変性	94°C	2 min	
	↓		
変性	94°C	30 sec	← 32~35 サイクル
アニーリング	68°C	30 sec	
伸長	72°C	1 min	
	↓		
伸長	72°C	5 min	

増幅遺伝子	アニーリング温度	サイクル数
GUS	68 °C	32
NtE2F	68 °C	32
NtDP	68 °C	32
NtRBR1	68 °C	35

導入効率の違いに起因する cDNA 濃度の違いを補正するため、GUS 遺伝子を基準として PCR 反応を行い、その結果をもとに鋳型量を調整した。PCR 反応後、1%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウム染色後、UV 照射下で写真を撮影した。

2-2-2-5 プライマーの設計

各遺伝子の特異的プライマーは以下のように設計した。導入遺伝子と内在性の遺伝子を区別するために、構造領域から BA221 ベクターにかけて増幅されるように設計した。

GUS

GUS(RT1)-Fw 5'- TGGGGCCAACCTCCTACCGTAC -3'
GUS(RT2)-Rev 5'- AGTGCAGCCCGGCTAACGTATC -3'

NtE2F

NtE2F(tRT1)-Fw 5'- GTGTGTGCGCAGATGTTGGTACTTC -3'
p35-TerR 5'-ATCATCGCAAGACCGGCAAC -3'

NtDP

NtDP(tRT1)-Fw 5'- TGCATTTCTGACTTCAACAGCACACC -3'
p35-TerR 5'-ATCATCGCAAGACCGGCAAC -3'

NtRBR1

NtRb-RT1(Fw) 5'- GCCATCCTTGGATGCAATTGCAATGCAC -3'
pBI221-3'UTR(Rev) 5'-AACGATCGGGGAAATTCGAGC -3'

2-2-3 組み換えタンパク質の調製

NtE2F と NtDP タンパク質は、TNT-coupled reticulocyte lysate system (Promega, Madison, WI)を用いた *in vitro* 転写翻訳系によって作製した。NtE2F, NtDP の cDNA は PCR 法によって 5'側に *SpeI*, 3'側に *SalI* を付加し、これら DNA 断片を pSP4 ベクターの *SpeI* / *XhoI* 部位に挿入した。pSP4 ベクターは、*in vitro* 転写翻訳用ベクターである pSPUTK (Stratagene, La Jolla, CA)を改変したもので、*NcoI* から始まる翻訳のフレームを合わせ、MCS の制限酵素部位を変える目的で *NcoI*-*KpnI* 部位にオリゴ DNA をアニーリングさせた DNA 断片を挿入した構築である。

pUTK(short)-Fw

5'- CATGGCGACTAGTCTCGAGGGTAC -3'

pUTK(Short)-Rev

5'- CCTCGAGACTAGTGGC -3'

In vitro 転写翻訳系の反応は付属のプロトコールに従い、NtE2F, NtDP タンパク質をそれぞれ合成した。タンパク質を放射能標識する場合は、反応系に[³⁵S]-メチオニン (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) (740kBq)を加えた。

NtRBR1(ABC)タンパク質は、NtRBR1 の 374-961 アミノ酸領域の N 末端側に GST タグを融合させた組み換えタンパク質である。方法は基本的には Nakagami ら (1999)と同じで、大腸菌発現系で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーで精製した精製タンパク質を用いた。NtRBR1(374-961 アミノ酸) をコードする cDNA 断片を pGEX4T-1(Amersham Bioscience)の *BamHI*-*SalI* 部位にクローニングしたプラスミドを、大腸菌 BL21(DE) pLysS 株(Novagen, Madison, WI)に導入した。得られた形質転換体を SB 培地、37°Cで O.D.600=0.6 まで増殖させた後、IPTG を終濃度 0.1M になるように添加し、さらに 18°Cで 6 時間タンパク質発現を誘導した。

培養懸濁液から遠心で回収された菌体を、Lysis buffer (PBS, 1mM DTT, 1mM DTT, 0.1% CHAPS)で懸濁し、氷上で超音波破碎した後、遠心 (36000rpm, 4°C, 1 時間)して得られた上清を粗抽出液とした。粗抽出液は Glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences)を充填したカラムを用いて、付属のプロトコールに従い精製した。

2-2-4 *In vitro* 結合解析

NtE2F タンパク質は、*in vitro* 転写翻訳系を用いて合成した。GST, GST-NtRBR1 (374-961) タンパク質は、大腸菌発現系で生産し、Glutathione-Sepharose

4B(Amersham Biosciences)を充填したカラムで精製した標品を用いた。それぞれのタンパク質を ELB buffer (HEPES [pH7.0], 250mM NaCl, 0.1% NP40, 1M DTT, 100mM PMSF) と混合し、ELB buffer で平衡化した Glutathione-Sepharose 4B(Amersham Biosciences)担体 (bed vol. 20 μ l)と混合し、室温で1時間回転攪拌した。混合液を担体の10倍量のELBバッファーで3回洗浄した後、担体と等量のサンプルバッファー (0.5M Tris-HCl [pH 6.8], 10% SDS, 0.86M 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.01% BPB) に懸濁し、95°C, 5分間加熱してから氷上に置いた。10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で展開後、乾燥させたゲルをBAS2500(Fuji Film, Tokyo)を用いて解析した。

2-2-5 ゲルシフト解析 (Electrophoretic Mobility Shift Assays: EMSAs)

プローブには、以下のオリゴヌクレオチド DNA を1セットずつアニールさせた二本鎖 DNA を用いた。

te2f1(Fw) 5'- CCAAAATAAAGGCGGGAAAAATATTTTTTC -3'

te2f1(Rev) 5'- GAAAAAATATTTTTCCCGCCTTTATTTTGG -3'

te2f2(Fw) 5'- AGTTCATTTCCATTCCCGCCAATAGCGAGC -3'

te2f2(Rev) 5'- GCTCGCTATTGGCGGGAATGGAAATGAACT -3'

tMe2f1 (Fw) 5'- CCAAAATAAAGGTTGGAAAAATATTTTTTC -3'

tMe2f1(Rev) 5'- GAAAAAATATTTTTCCAACCTTTATTTTGG -3'

tMe2f2(Fw) 5'- AGTTCATTTCCATTCCAACCAATAGCGAGC -3'

tMe2f2(Rev) 5'- GCTCGCTATTGGTTGGAATGGAAATGAACT -3'

オリゴヌクレオチドは [γ -³²P]ATP(Amersham Biosciences) (925KBq) と T4-polynucleotide kinase(Toyobo, Osaka)を用いて 5'末端を標識した。NtE2F, NtDP タンパク質は *in vitro* 転写翻訳系で合成した。

結合反応は、EMSA バッファー(20mM HEPES [pH7.8], 40mM KCl, 1mM EGTA, 0.1% NP-40, 10% glycerol, 1mM PMSF, 1mM DTT, 50 μ g/ml denatured salmon sperm DNA)中に、各タンパク質と ³²P 標識したオリゴヌクレオチド DNA プローブ 1pmol を混合し、15 μ l の反応系を調製した。競合実験には 50pmol, 200pmol の非標識のオリゴヌクレオチドを反応系に加えた。反応は室温で 30 分間インキュベーションし、その後サンプルを4%ポリアクリルアミドゲル, 0.25x TBE, 4°C, 300V の条件で 40 分間電気泳動を行った。乾燥させたゲルは BAS2500(Fuji Film,Tokyo)を用いて解析を行った。

2-2-6 DNA-タンパク質の結合解析

DNA プローブは、*NtPCNA* プロモーター上の E2F 結合配列周辺を以下のプライマーを用いて PCR で増幅した。

NtPCNA short (Fw) 5'- TCGAGCAGACACAGAGATATGTGGGCTAAA -3'

NtPCNA short (Rev) 5'- AGCTTAGCTGCTGAATTGGGAGGTGTGCTC -3'

テンプレートには *NtPCNA* プロモーター(te2f, tMe2f1, tMe2f2, tMe2f3)-luc のレポーター遺伝子用プラスミドを使用した。得られた PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動後、UV-トランスイルミネーターでバンドを確認しながらバンドを切り出した。DNA 断片は Min Elute Gel Extraction Kit (QIAGEN QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて精製した。精製方法は付属のプロトコールに従った。精製した DNA 断片を [γ -³²P]-ATP (Amersham Biosciences) (925KBq) と T4-polynucleotide kinase (Toyobo, Osaka) を用いて末端を標識した。

NtE2F, NtDP タンパク質は、*in vitro* 転写翻訳系を用いて合成した。GST, GST-NtRBR1 (ABC) タンパク質は、大腸菌発現系で生産し、Glutashion-Sepharose 4B カラム(Amersham Biosciences)で精製した標品を用いた。

結合反応は、EMSA バッファー(20mM HEPES [pH7.8], 40mM KCl, 1mM EGTA, 0.1% NP-40, 10% glycerol, 1mM PMSF, 1mM DTT, 50 μ g/ml denatured salmon sperm DNA)中に、各タンパク質と DNA プローブ 1 μ l を混合し、15 μ l の反応系を調製した。室温で 30 分間インキュベーションした後、サンプルを EMSA バッファーで平衡化した Glutashion-Sepharose 4B(Amersham Biosciences)担体 (bed vol. 20 μ l) と混合し、室温で 1 時間回転攪拌した。混合液を担体の 10 倍量の EMSA バッファーで 3 回洗浄した。担体と等量のサンプルバッファー(0.5M Tris-HCl [pH 6.8], 10% SDS, 0.86M 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.01% BPB)に懸濁し、95 $^{\circ}$ C, 5 分間加熱してから氷上に置いた。4%ポリアクリルアミドゲル, 0.25x TBE, 室温, 300V の条件で 40 分間電気泳動を行った。乾燥させたゲルは BAS2500(Fuji Film,Tokyo)を用いて解析を行った。

2-3 結果

2-3-1 *NtPCNA* プロモーター機能への E2F 結合配列の影響

これまでにタバコの *NtPCNA* プロモーター上に推定 E2F 結合配列が 2 カ所 (te2f1, te2f2) 存在することが示されている (Kosugi and Ohashi, 2002a)。 *NtPCNA* プロモーターの転写活性化における 2 つの E2F 結合配列の必要性を調べるために、E2F 結合配列に変異を導入したレポーター遺伝子を使って一過性発現解析を行った。まず *NtPCNA* プロモーターが機能する際に E2F 結合配列が必要かを調べるために、プロトプラスト化した BY-2 細胞にレポーター遺伝子のみを導入した。レポーター遺伝子は *NtPCNA* プロモーターと *luciferase(luc)* の融合遺伝子で、実験に供した *NtPCNA* プロモーターは、野生型 (te2f-luc) と変異型 (tMe2f1-luc, tMe2f2-luc, tMe2f3-luc) の 4 種類である。LUC の比活性で各プロモーターに連結したレポーターからの転写量を評価した。te2fw-luc で検出された LUC 活性を 100 として各レポーター遺伝子で検出された LUC 活性の相対値を示した (図 9)。変異プロモーターで検出された転写活性は、野生型に比べて減少が見られた。このことから *NtPCNA* プロモーターの転写には E2F 結合配列が重要な役割を果たすことが示唆された。注目すべきは 2 つ存在する E2F 結合配列を両方変異したレポーター遺伝子 (te2f3-luc) において約 50% に LUC 活性が減少したことである。このことから、E2F 結合配列が 2 つとも失われた場合でも低いレベルで転写されており、 *NtPCNA* プロモーターの転写は E2F 結合配列だけに制御されていないことが示唆された。

片方の E2F 結合配列のみに変異を導入した te2f1-luc と te2f2-luc について比較したところ、上流に存在する te2f1 に変異を導入したレポーター遺伝子 te2f1-luc において転写活性は顕著に減少したのに対し、te2f2 を変異させたレポーター遺伝子 te2f2-luc は転写活性の減少幅はわずかであった。このことから BY-2 細胞内では *NtPCNA* プロモーター上に存在する 2 カ所の E2F 結合配列のうち、上流に存在する te2f1 の方が転写に与える影響が大きいことが示唆された。いずれにせよ、 *NtPCNA* プロモーターの転写において E2F 結合配列が重要な役割を果たすことが判明した。

2-3-2 NtE2F と NtDP の結合解析

動物の E2F と DP はヘテロダイマーを形成して機能することが知られている (Bandara *et al.*, 1993; Helin *et al.*, 1993; Huber *et al.*, 1993)。植物でもシロイヌナズナの AtE2F1-3 は AtDPa, AtDPb の共在下で、E2F 結合配列と結合することがゲルシフト解析で示されている (Kosugi and Ohashi, 2002a; Mariconti *et al.*, 2002)。またイネ OsE2F とシロイヌナズナ AtDPa のように植物種の異なる E2F と DP でも同様な結果が報告されている (Kosugi and Ohashi, 2002a)。先の実験で示したように *NtPCNA* プロモーターの発現に重要な役割を果たす E2F 結合配列に結合する因子と

してタバコの E2F(NtE2F)と DP(NtDP)が推定される。当研究室において NtE2F (Sekine *et al.*, 1999)と NtDP (Uemukai *et al.*, in press)のクローニングに成功していることを受けて(図 10)、NtPCNA プロモーターの機能に対する NtE2F/NtDP の役割について解析を行った。まず始めに、NtE2F と NtDP が結合するか確認を行った。NtE2F タンパク質は *in vitro* 転写翻訳系を用いて合成した。合成の際に ³⁵S-メチオニンを用いて放射能ラベルを行った。一方で、NtDP タンパク質は N 末端側に GST を融合した組み換えタンパク質を大腸菌のタンパク質発現系を利用して作製した。それぞれのタンパク質が合成されていることを確認した後、両者を混合し、グルタチオンセファロースビーズで GST-NtDP タンパク質を回収した。回収したサンプルを SDS-PAGE にかけて、オートラジオグラムにより放射能ラベルした NtE2F タンパク質のシグナルを検出した。図 11 に示すように、GST と NtE2F を混合したものではシグナルが検出できなかったのに対し、GST-NtDP と NtE2F の組み合わせではシグナルが検出された。

この結果から、NtDP と NtE2F は *in vitro* 条件で結合することが確認され、両者がヘテロダイマーを形成することが可能であることが判明した。

2-3-3 NtE2F/NtDP と DNA の結合解析

NtPCNA プロモーターの制御に NtE2F や NtDP が関わっていることを調べるには、NtPCNA プロモーターに E2F および NtDP が結合するかを解析する必要がある。そこで、NtPCNA プロモーター上の推定 E2F 結合配列(te2f1, te2f2)をプローブとしたゲルシフト解析を行った。

プローブは NtPCNA プロモーター上の推定 E2F 結合配列周辺の 30bp の合成オリゴ DNA を合成し、2 本鎖 DNA をアニーリングさせた後、5'末端を ³²P-ATP で放射能ラベルしたものをを用いた。さらに 2 つの配列(te2f1, te2f2)それぞれに変異を導入したプローブ(tMe2f1, tMe2f2)も作製し、ゲルシフト解析に用いた。競合反応には、プローブの 50 倍、200 倍量のオリゴ DNA(プローブに用いたものと同じ)を放射能ラベルせずに反応系に加えた。NtE2F と NtDP タンパク質は *in vitro* 転写翻訳系で合成した。

ゲルシフト解析の結果、te2f1 と te2f2 両方の結合配列について NtE2F 単独および NtDP 単独の場合、シフトバンドは得られなかったが、NtE2F と NtDP の共存下では明確なシフトバンドが認められた(図 12)。NtE2F と NtDP を *in vitro* 転写翻訳系で合成する際に、ベクターのみを反応させたものをゲルシフト解析の対照にした。対照においてもわずかにシフトバンドが見られ、ウサギ網状赤血球に由来する転写因子がわずかに結合した可能性が考えられるが、NtE2F/NtDP で見られるシフトバンドの方が明らかに強いシグナルが見られた。さらに同じ条件でも変異プローブ(tMe2f1, tMe2f2)を用いた場合にはシフトバンドを得ることはなかった。競合実験においては野生型の競合オリゴ DNA を加えた場合は量依存的にシフトバンドの消失が見られたが、変異させた競合オリゴ DNA を加えた場合はシフトバンドの消失は認められなかった(図 12)。

これらの結果から、*NtPCNA* プロモーターに対して NtE2F は NtDP と共に結合し、その結合はプロモーター上に存在する 2 カ所の E2F 結合配列に特異的に結合することが結論された。

2-3-4 NtE2F の DNA 結合における NtDP の影響

動物の解析では、DP は E2F と DNA の結合安定性や E2F の核局在性に関与することが示されている(Helin *et al.*, 1993)。そこで NtDP について NtE2F と DNA との結合にどのような影響があるかをゲルシフトアッセイにより解析した。NtE2F タンパク質量が一定の条件下で、NtDP タンパク量を変動させてシフトバンドのシグナル強度を指標にして DNA との結合性の変化を調べた。

その結果、図 13A に示すとおり、NtDP が存在しない条件下ではシフトバンドが認められなかったが、NtDP タンパク質を加えた条件では NtDP の量依存的にシフトバンドのシグナルが強くなることが認められた。解析はプロモーター上に存在する 2 カ所の E2F 結合配列について行ったが、両方とも同様の傾向を示した。

このことから、NtDP は NtE2F と DNA との結合安定性に寄与することが示唆された。

2-3-5 *NtPCNA* プロモーターの転写活性化における NtDP の影響

先のゲルシフト解析によって、NtE2F と NtDP が *NtPCNA* プロモーター上の E2F 結合配列に結合することが判明し、NtDP は NtE2F と DNA の結合の安定性に働くことが示唆された。しかし、この DNA-タンパク質間の結合が、植物細胞内での *NtPCNA* プロモーターの活性に反映されるかどうか、あるいは NtE2F と NtDP の両方の存在を必要とするのかを調べるために、一過性発現解析 (transient assay) を行った。図 13B では、プロトプラスト化した BY-2 細胞にレポーター遺伝子である *te2fw-luc* のみを導入して得られた LUC/GUS 活性を「1」とし、NtE2F や NtDP などを共導入して得られた LUC/GUS 活性を相対値で示した。

NtE2F と NtDP をそれぞれ単独で導入した場合、*NtPCNA* プロモーターに対する転写活性化能は認められなかった。しかし、NtE2F と NtDP を共導入したところ、LUC/GUS 活性は最大で 2.5 倍程度の上昇が認められ、*NtPCNA* プロモーターに対する転写活性化能が示された。さらに NtDP の量の増加に伴って、転写活性化能が上昇し、NtE2F による転写活性化能は NtDP 依存的であることが確認された。

このことから *NtPCNA* プロモーターは BY-2 細胞内において NtE2F によって転写活性化され、その活性化には NtDP が必要であることが示された。

2-3-6 NtE2F/NtDP と E2F 結合配列との相互作用

NtPCNA プロモーターに対する NtE2F と NtDP による転写活性化が E2F 結合配列に依存するかを調べるために、2-3-5 と同様の実験を、変異プロモーター/レポ

ーター遺伝子(tMe2f1-luc, tMe2f2-luc, tMe2f3-luc)を用いて行った。プロトプラスト化した BY-2 細胞に NtE2F と NtDP、および両方の E2F 結合配列に変異を入れたレポーター遺伝子 tMe2f3-luc を導入して得られた LUC/GUS 活性を 1 とし、te2f-luc, tMe2f1-luc, tMe2f2-luc のそれぞれで得られた LUC/GUS 活性を相対値で示した。その結果、te2f-luc で得られた LUC/GUS 活性は tMe2f3-luc に比べて約 2.5 倍と明確な活性上昇が認められたが、tMe2f1-luc, tMe2f2-luc では LUC/GUS 活性の上昇は約 1.2 倍程度とわずかであった(図 14)。

このことから NtE2F と NtDP による *NtPCNA* プロモーターの転写活性化には、2 つの E2F 結合配列のうち 1 つでも変異すると大幅な活性減少につながり、完全な転写活性化には 2 カ所の E2F 結合配列の両方が必要であることが示された。

2-3-7 NtE2F と NtRBR1 の結合解析

当研究室においてすでに *NtRBR1* 遺伝子がクローニングされている(Nakagami *et al.*, 1999)。そこで NtRBR1 が *NtPCNA* プロモーターの制御に関わるかを調べるために、NtE2F と NtRBR1 が結合するかを確認した。NtE2F タンパク質は *in vitro* 転写翻訳系を用いて合成した。合成の際 ³⁵S-メチオニンを用いて放射能ラベルを行った。一方、NtRBR1 タンパク質は、全長のタンパク質の合成が難しいことから、動物での知見(Lee *et al.*, 1987)を参考にして、E2F との結合に必要とされる A ポケットおよび B ポケットと呼ばれる領域と C 末領域を含む断片(以下、NtRBR1 (ABC)と表記)を作製し、その N 末端側に GST タグを付けた組み換えタンパク質を大腸菌のタンパク質発現系を利用して作製した。それぞれのタンパク質が合成されていることを確認した後、両者を混合し、グルタチオンセファロースビーズで GST および GST-NtRBR1(ABC) タンパク質を回収した。回収したサンプルを SDS-PAGE にかき、オートラジオグラムでラベルされた NtE2F タンパク質のシグナルの検出を行った。図 15 に示すように、対照の GST のみではシグナルが検出できなかったのに対し、GST-NtRBR1(ABC)ではシグナルが検出された。

このことから、NtRBR1 と NtE2F は *in vitro* で結合することが確認された。

2-3-8 NtRBR1 による NtE2F/NtDP の転写活性化能の抑制

NtRBR1 の機能として NtE2F/NtDP による転写活性化の抑制が予想される。先の一過性発現解析から、BY-2 細胞内において NtE2F/NtDP は *NtPCNA* プロモーターの転写を活性化することがわかった。そこで *NtPCNA* プロモーターの転写活性化に NtRBR1 が影響するかを調べるために、同様に一過性発現実験を行った。図 16A では、プロトプラスト化した BY-2 細胞にレポーター遺伝子である te2fwt-luc を導入して得られた LUC/GUS 値を 1 とし、*NtE2F*、*NtDP*、*NtRBR1* の各発現ベクター(p221-NtE2F, p221-NtDP, p221-NtRBR1)を共導入して得られた LUC/GUS 活性を相対値で示した。図 13B と同様に、*NtPCNA* プロモーターは NtE2F と NtDP を単独で導入した場合には転写活性化が認められなかったが、p221-NtE2F と p221-NtDP を共導入することによって、LUC/GUS 活性で約 2.5 倍の上昇が認め

られた。さらに p221-NtRBR1 を共導入すると LUC/GUS 活性の低下が認められ(図 16A)、p221-NtRBR1 の量を変えて共導入すると、量依存的に LUC/GUS 値の低下が見られた(データ未掲載)。p221-NtRBR1 を単独で導入した場合、対照と比較して活性の低下が見られたが、これは内在性の NtE2F/NtDP による *NtPCNA* プロモーターの転写活性化が抑制されたためと予想される。これらのことから、*NtPCNA* プロモーターは NtE2F/NtDP によって転写活性化されるが、NtRBR1 によって抑制されることが示唆された。

しかし、上記のデータでは、NtRBR1 によって NtE2F/NtDP の転写活性化が抑制された可能性以外に、複数の種類の発現ベクターを導入したことによって、各導入遺伝子の発現が転写レベルで阻害された可能性も考えられる。その可能性を排除するために、一過性発現解析のサンプルを用いて RT-PCR を行って、各導入遺伝子の転写量に違いがないかを調べた(図 16B)。導入効率を補正するために共導入している *GUS* 遺伝子で cDNA の量を標準化した条件において、p221-NtE2F、p221-NtDP、p221-NtRBR1 を単独で導入した場合でも、共導入した場合でも、全ての遺伝子がほぼ同じレベルで発現していることが確認された。

2-3-9 NtRBR1 の転写活性化抑制のサイクリン D による抑制

動物での知見から、pRB は G1 サイクリン(サイクリン D,E)によってリン酸化されると、E2F に対する抑制能が解除されると考えられている(Weinberg, 1995; Dyson, 1998)。植物細胞においても NtRBR1 タンパク質が NtCycD3;3 によってリン酸化されることが示されている(Nakagami *et al.*, 1999, 2002)。そこで植物細胞内でタバコサイクリン NtCycD と NtRBR1 を共発現させた場合、NtE2F/NtDP による *NtPCNA* プロモーターの転写活性化能はどのように変化するのか調べた。図 17 は、図 16 と同様にレポーター遺伝子のみを導入して得られた LUC/GUS 値を 1 とし、p221-NtE2F、p221-NtDP、p221-NtRBR1 および各種サイクリンを共導入して得られた LUC/GUS の相対値で示した。図 16 の結果と一致して、p221-NtE2F と p221-NtDP を共導入することで転写活性化を示す *NtPCNA* プロモーターは、p221-NtRBR1 を共導入すると転写活性化が抑制された。その条件でさらに p221-NtCycD を導入すると転写活性の回復が認められた。しかし M 期サイクリンであるサイクリン A(p221-NtCycA)、サイクリン B(p221-NtCycB)を共導入しても、転写活性の回復は認められなかった。

このように、NtRBR1 によって抑制された NtE2F の転写活性化は NtCycD によって解除されるが、NtCycA および NtCycB では解除されないことから、導入した NtCycD が CDK と複合体を形成し、NtCycD/CDK によるリン酸化によって NtRBR1 が不活性化され、*NtPCNA* プロモーターの転写が回復することが示唆された。

2-3-10 NtE2F/NtDP/ NtRBR1 複合体と DNA の結合解析

NtE2F、NtDP、NtRBR1 による *NtPCNA* プロモーターの制御についてより詳細に解析するために、3 種のタンパク質が同時に DNA に結合することが可能かを

調べた。前述のゲルシフト解析により、*NtPCNA* プロモーター上の E2F 結合配列に NtE2F/NtDP が結合することを示した(図 12, 図 13A)。この実験系にさらに NtRBR1 タンパク質を加えてスーパーシフトするバンドの検出を試みたが、検出には至らなかった。図 15 で示したとおり、NtE2F と NtRBR1 の結合はあまり強くないことから、常法によりスーパーシフトするバンドを検出するのは困難であると予想される。そこで実験方法を変更し、タンパク質を pull-down して DNA を検出することを試みた。GST、GST-NtRBR1(ABC)、および *in vitro* 転写翻訳系で合成した NtE2F と NtDP の各タンパク質を組み合わせて結合反応を行い、タンパク質複合体が E2F 結合配列を含む DNA プローブと結合できるかを解析した。DNA 断片は、*NtPCNA* プロモーター(野生型)の E2F 結合配列周辺領域を PCR で増幅し、³²P-ATP で放射能ラベルした。図 18 に示すとおり、GST-NtRBR1(ABC) と NtE2F、NtDP の 3 種類のタンパク質が全て存在する条件でのみシグナルが検出された。同じ条件でも変異型の E2F 結合配列を含む DNA プローブではシグナルが検出されず、シグナルの検出は E2F 結合配列を含む DNA プローブを反応系に加えた条件に限定されていた。

以上の結果から、*NtPCNA* プロモーターにおいて NtE2F、NtDP、NtRBR1 は 3 量体を形成して結合し得ることが示され、*NtPCNA* プロモーターの発現は NtE2F/NtDP/NtRBR1 複合体が E2F 結合配列を介して制御する可能性が示唆された。

2-3-11 NtE2F/NtDP/ NtRBR1 複合体と E2F 結合配列の結合特性

NtE2F/NtDP/NtRBR1 タンパク質複合体が E2F 結合配列を通して *NtPCNA* プロモーターに結合することが可能であることが判明した。そこで 2 カ所存在する E2F 結合配列の間で結合様式に違いがあるかを同様に調べた。図 19 に示すとおり、2 つの結合配列の両方に変異を導入した DNA プローブ(m3)に比べて、野生型(WT)の DNA プローブでは明瞭なシグナルが検出された。また上流側の E2F 結合配列(te2f1)に変異を導入した DNA プローブ(m1)ではほとんどシグナルが検出されず、結合配列を持たない (m3)と同じレベルのシグナル強度であった。一方、下流側の E2F 結合配列(te2f2)に変異を導入した DNA プローブ(m2)では、WT ほど強くはないが、明瞭なシグナルが検出された。

このことから NtE2F/NtDP/NtRBR1 タンパク質複合体が *NtPCNA* プロモーターに安定に結合するには、te2f1 と te2f2 の両方の E2F 結合配列が必要であること、下流側の te2f2 より上流側の te2f1 により安定して結合する傾向があることが示唆された。

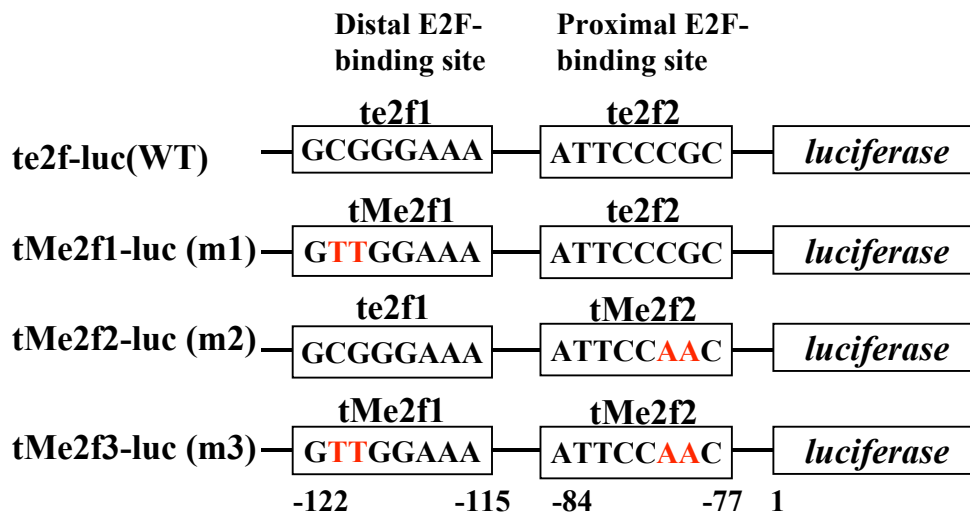
2-3-12 イネ *PCNA*(*OsPCNA*)プロモーターを用いた解析

これまでの一過性発現実験では、*PCNA* プロモーター、*E2F*、*DP*、*RBR* は全てタバコ由来の遺伝子を用いて解析を行ってきた。双子葉植物であるタバコの *PCNA* プロモーターの発現制御機構が単子葉植物であるイネの *PCNA* プロモータ

ーでも機能するかを調べるために、これまでと同様の実験をイネ(*Oryza sativa*)の *PCNA*(*OsPCNA*)プロモーターを用いて解析を行った。*OsPCNA* 遺伝子も G1/S 期に発現が上昇することは確認されている(Kawamura *et al.*, 2004)。実験に使用した *OsPCNA* プロモーターは *NtPCNA* プロモーターと同様に E2F 結合配列を 2 カ所持っている(Kosugi and Ohashi, 2002a)。しかし両者の配列は E2F 結合配列を除いては相同性がほとんどない(図 20A)。プロトプラスト化した BY-2 細胞を用いて、*OsPCNA* プロモーター(約 1.5kb)に *luc* 遺伝子を連結したレポーター遺伝子(*re2f-luc*)とタバコ由来の細胞周期制御因子を共導入した。その結果、*OsPCNA* プロモーターは NtE2F/NtDP によって転写活性化されたが、さらに NtRBR1 を共導入すると NtE2F/NtDP による転写活性化能は抑制された。NtRBR1 による抑制は、NtcycD を共導入することによってキャンセルされたが、NtcycA や NtcycB を共導入しても変化しなかった (図 20B)。

この結果は *NtPCNA* プロモーターの結果と一致しており、*E2F*、*DP*、*RBR* による *PCNA* プロモーターの制御は単子葉植物でも機能していることが示唆された。

A



B

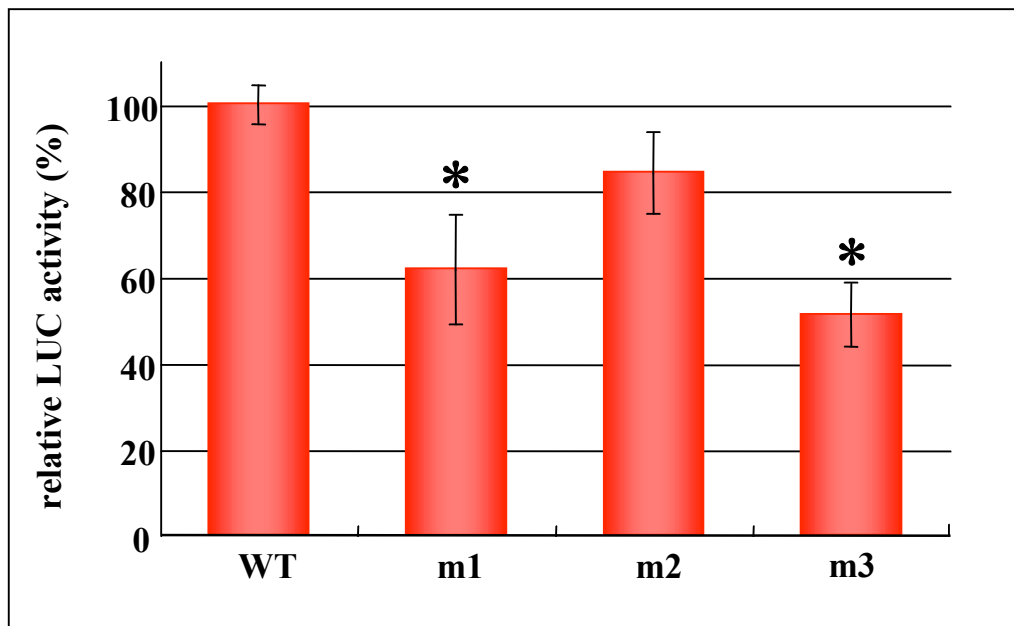


図 9 : *NiPCNA* プロモーター発現におけるE2F結合配列の影響

(A)実験に用いた*NiPCNA* レポーター遺伝子の模式図。赤字は塩基置換変異が導入されていることを示す。下の数字は翻訳開始点を1としたときの塩基数を表す。

(B)一過性発現実験の結果。プロトプラスト化したBY-2に各種レポーター遺伝子(*te2f-luc*, *tMe2f1-luc*, *tMe2f2-luc*, *tMe2f3-luc*)の各1種類ずつを導入した。培養後、細胞を回収して粗抽出液を調製し、LUC比活性を測定した。LUC活性は、野性型レポーター遺伝子(*te2f-luc*)を導入したときの値を100%とした相対値で示した。±S.D.は標準偏差を示し、*は野性型に対する有意性を示す。n=3, * :P<0.05。

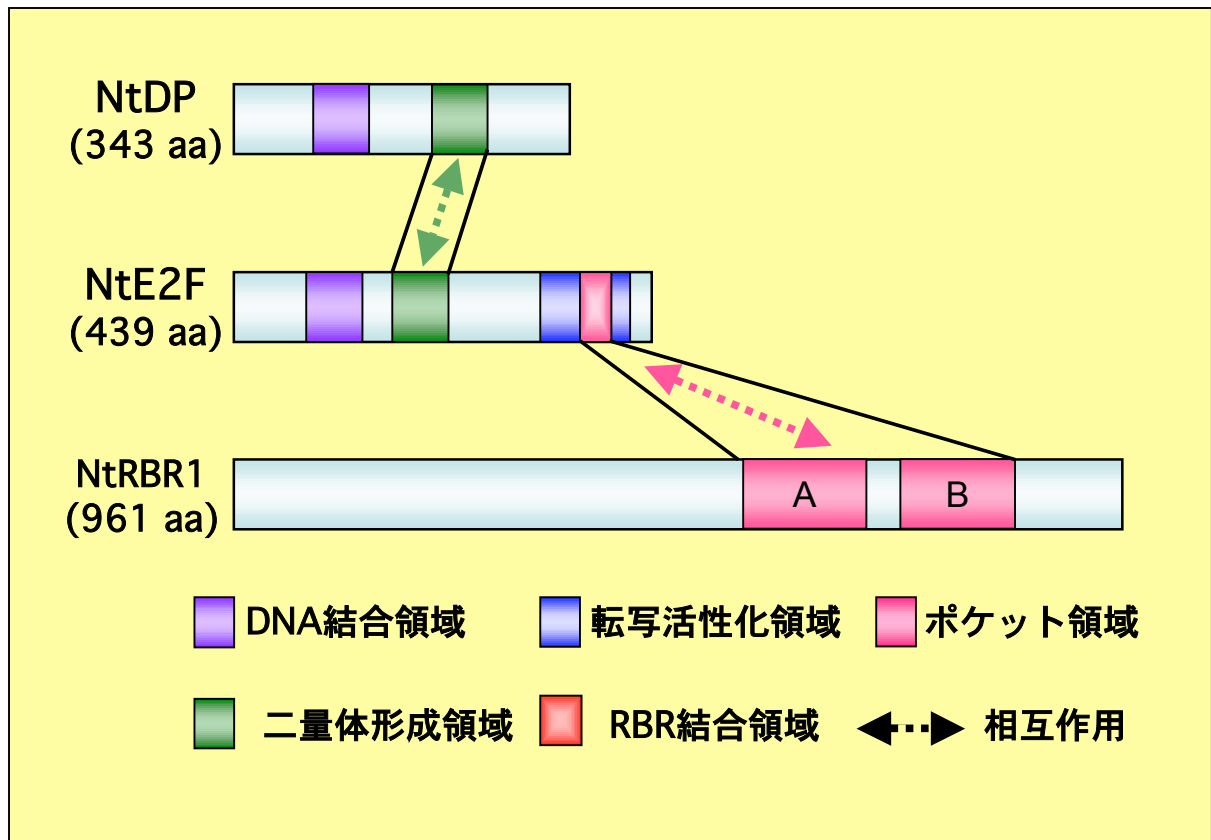


図 10：タバコE2F, DP, RBRの構造

本研究に用いたタバコE2F, DP, RBRのについて推定される構造的特徴を示した。これら遺伝子は全て本研究室で単離されたものである。NtE2Fには、DNA結合領域、DPとの二量体形成領域、転写活性化領域が存在し、転写活性領域内にRBR結合領域が存在する。NtDPには、DNA結合領域とE2Fとの二量体形成領域が存在する。タバコのRb関連遺伝子NtRBR1にはAポケット、Bポケットと呼ばれる領域が存在し、この領域がサイクリンDやE2Fとの結合に重要であることが推定されている。

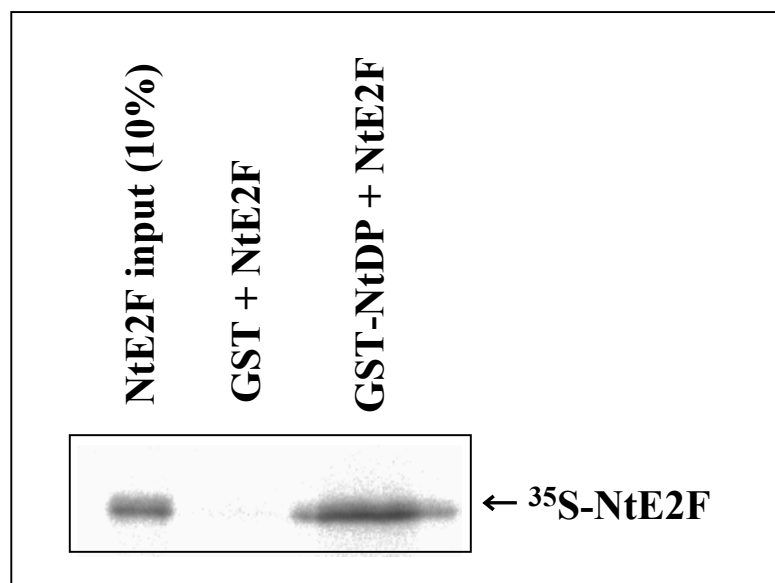


図 11 : NtE2FとNtDPとの結合解析

NtE2Fタンパク質は、*in vitro*合成系で合成する際に[³⁵S]-メチオニンを取り込ませて標識した。NtE2Fタンパク質と精製したGSTおよびGST-NtDPタンパク質を混合した後、グルタチオンセファロースビーズと結合させて沈殿、回収した。回収したタンパク質はオートラジオグラムを行って標識NtE2Fタンパク質のシグナルを検出した。左端のレーンには結合反応に用いた標識NtE2Fタンパク質の10%量をアプライした。

A

te2f-1 CCAAATAAAG GCGGGAAA AATATTTTTTC
tMe2f-1 CCAAATAAAG GTTGGAAA AATATTTTTTC
te2f-2 AGTTCATTTC ATTCCCGC CAATAGCGAGC
tMe2f-2 AGTTCATTTC ATTCCAAC CAATAGCGAGC

B

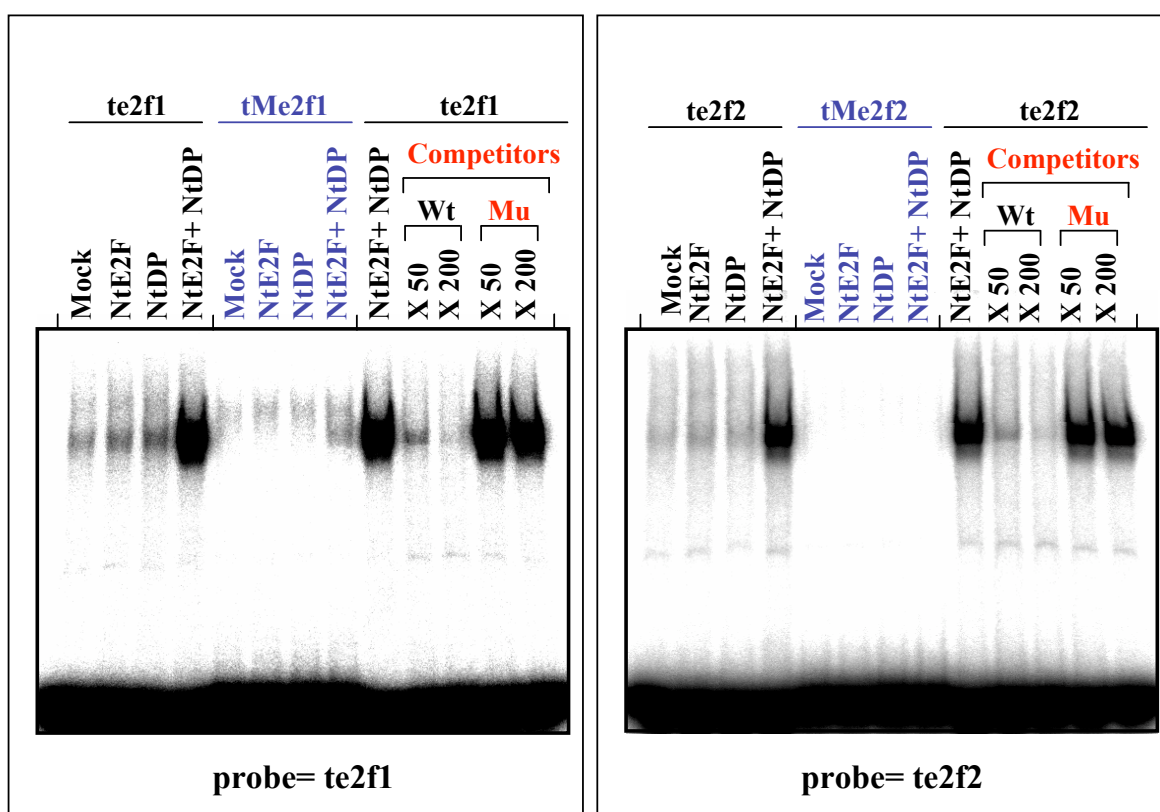


図 12: E2F 結合配列に対するNtE2F/NtDP の結合解析

(A)実験で使用したDNA配列。E2F結合配列を下線で示し、置換した塩基は四角で囲って示した。

(B)ゲルシフト解析(EMSA)の結果。 *in vitro* 転写・翻訳系で合成したNtE2FとNtDPのタンパク質を用いた。プローブには*NtPCNA*プロモーター上の2カ所のE2F結合配列(te2f1, te2f2)の野生型および変異オリゴDNAをそれぞれ [γ - 32 P]ATP標識して用いた。競合反応には野生型および変異型のオリゴDNAを標識せずに50倍(X 50)と200倍(X 200)の濃度で反応系に加えた。Mockは*in vitro* 転写・翻訳系にベクターのみを入れて反応に供した。

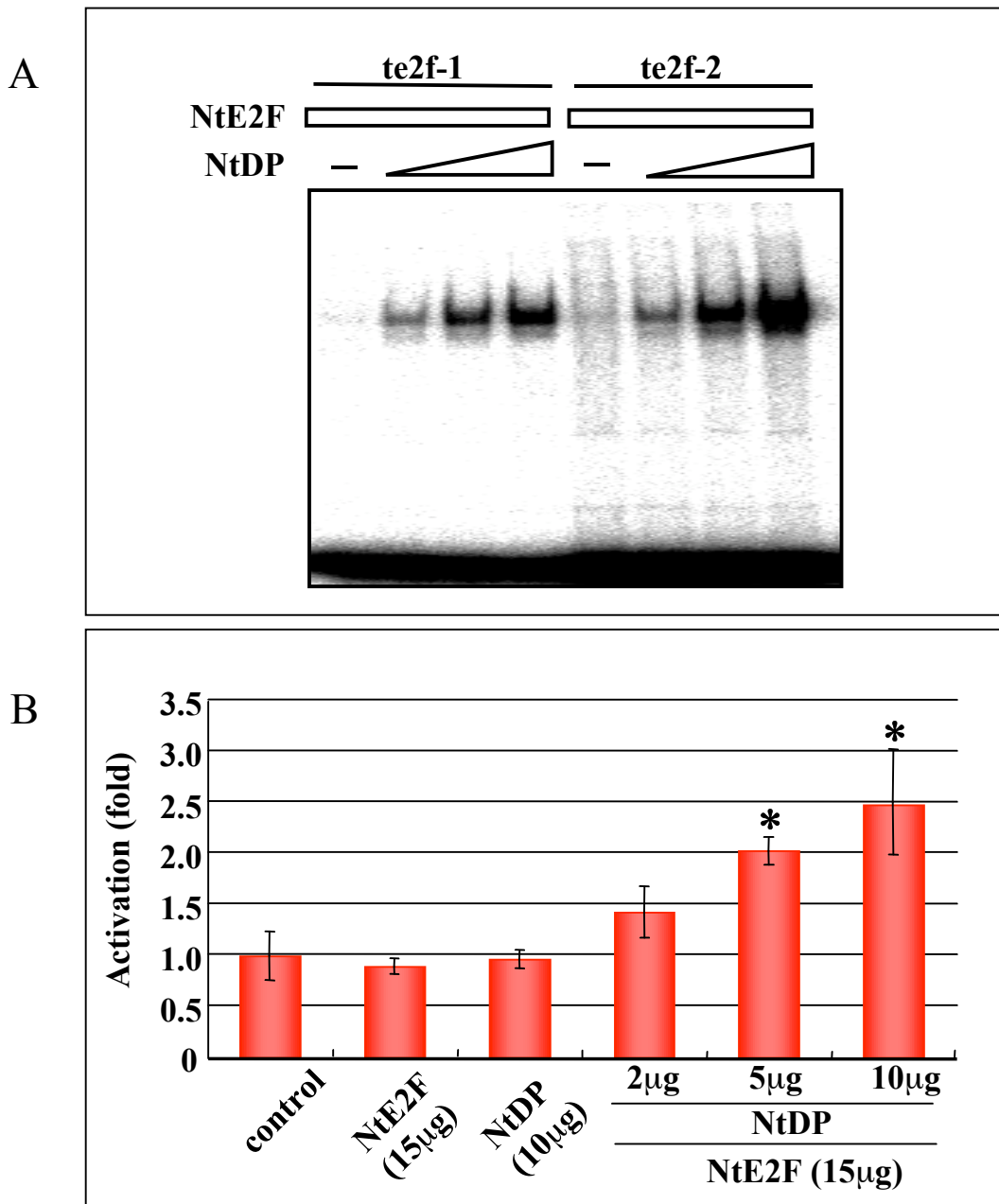
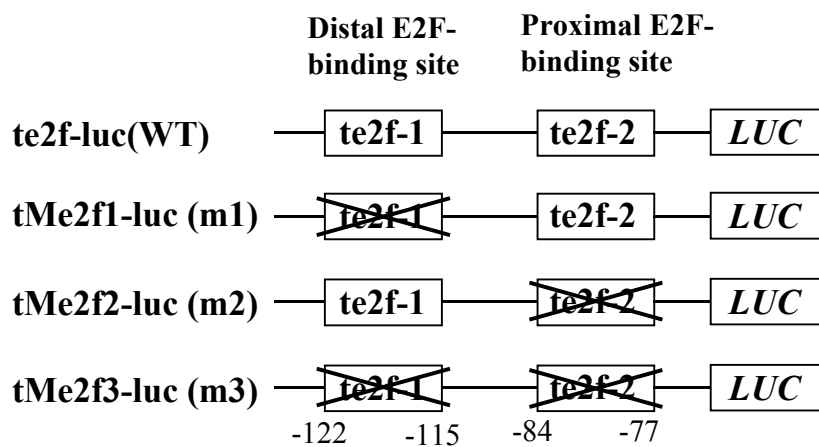


図 13: NtE2Fによる*NtPCNA*プロモーター転写活性化におけるNtDPの必要性

(A) *in vitro* 転写・翻訳系で合成したNtE2FとNtDPのタンパク質を用いたゲルシフト解析の結果。プローブには*NtPCNA*プロモーター上の2カ所のE2F結合配列(te2f1, te2f2)のオリゴDNAをそれぞれ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で標識して用いた。NtE2Fタンパク質量を一定にし、NtDPタンパク質量を変化させた。(B) NtE2FとNtDPを共導入した一過性発現実験。プロトプラスト化したBY-2にレポーター遺伝子(te2f-luc)、内部標準(TS221)に加え、エフェクター遺伝子(pBA221-NtE2F, pBA221-NtDP)をそれぞれ示すDNA量で共導入した。培養後、細胞を回収して粗抽出液を調製し、LUCとGUSの活性を測定した。得られたLUC活性値をGUS活性値で補正してLUC/GUS値を算出した。LUC/GUS値はレポーターと内部標準だけを導入したときの値を1とした相対値で示した。

±S.D.は標準偏差を示し、*は対照に対する有意性を示す。n=3, *: P<0.05。

A



B

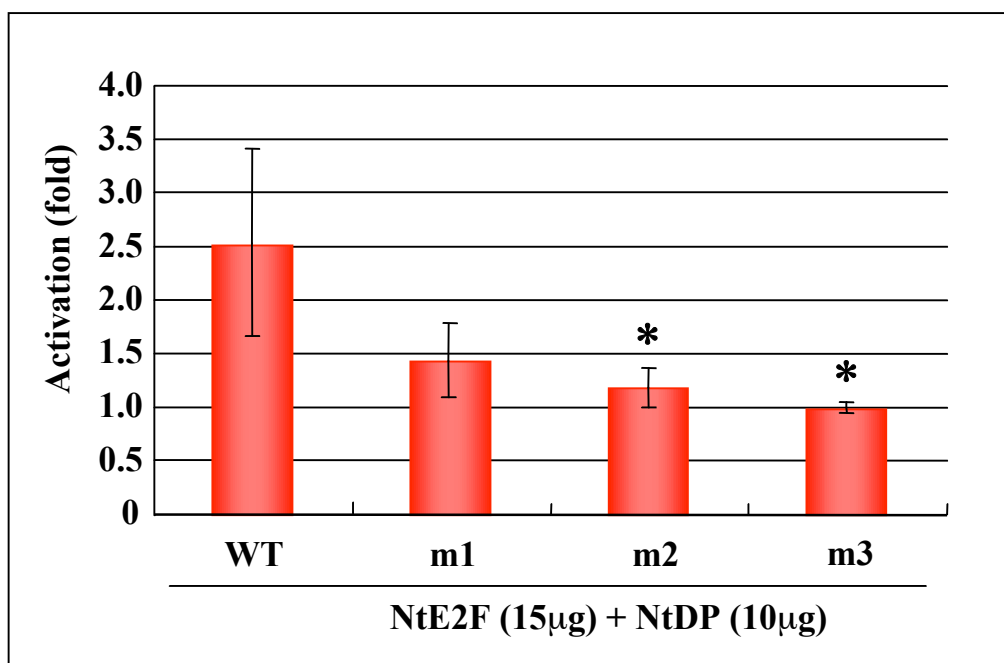


図. 14: NtE2F/NtDPによるE2F結合配列を介した*NiPCNA* プロモーターの転写活性化
 (A)実験に用いた*NiPCNA* レポーター遺伝子の模式図。X印は塩基置換変異が導入されていることを示す。下の数字は翻訳開始点を1としたときの塩基数を示す。
 (B)プロトプラスト化したBY-2に一定量のエフェクター遺伝子(pBA221-NtE2F, pBA221-NtDP)と、各種レポーター遺伝子(te2f-luc, tMe2f1-luc, tMe2f2-luc, tMe2f3-luc)のうち1種類を共導入した。培養後、細胞を回収して粗抽出液を調製し、LUC比活性を測定した。LUC活性は、全てのE2F結合配列に変異を入れたレポーター遺伝子(tMe2f3-luc)を導入したときの値を1とした相対値で示した。±S.D.は標準偏差を示し、*は野性型に対する有意性を示す。n=3, *: P<0.05。

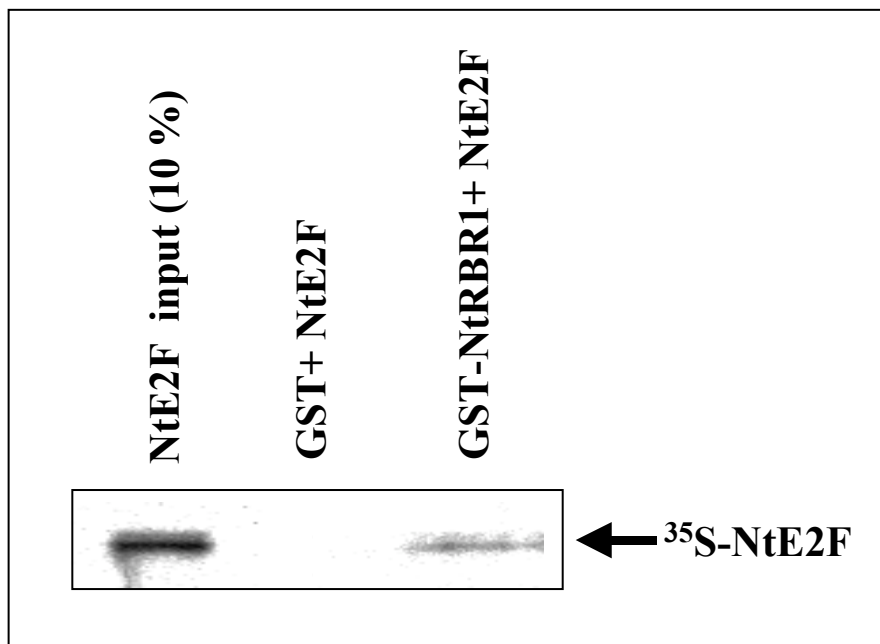


図 15: NtE2FとNtRBR1との結合解析

NtE2Fタンパク質は、*in vitro*合成系で合成する際に ^{35}S -メチオニンを取り込ませて標識した。NtE2Fタンパク質と精製したGSTおよびGST-NtRBR1(ABC)タンパク質を反応させた後、グルタチオンセファロースビーズに結合させて沈殿、回収した。回収したタンパク質はオートラジオグラムを行ってNtE2Fタンパク質のシグナルを検出した。左端のレーンには結合反応に用いた標識NtE2Fタンパク質の10%量をアプライした。

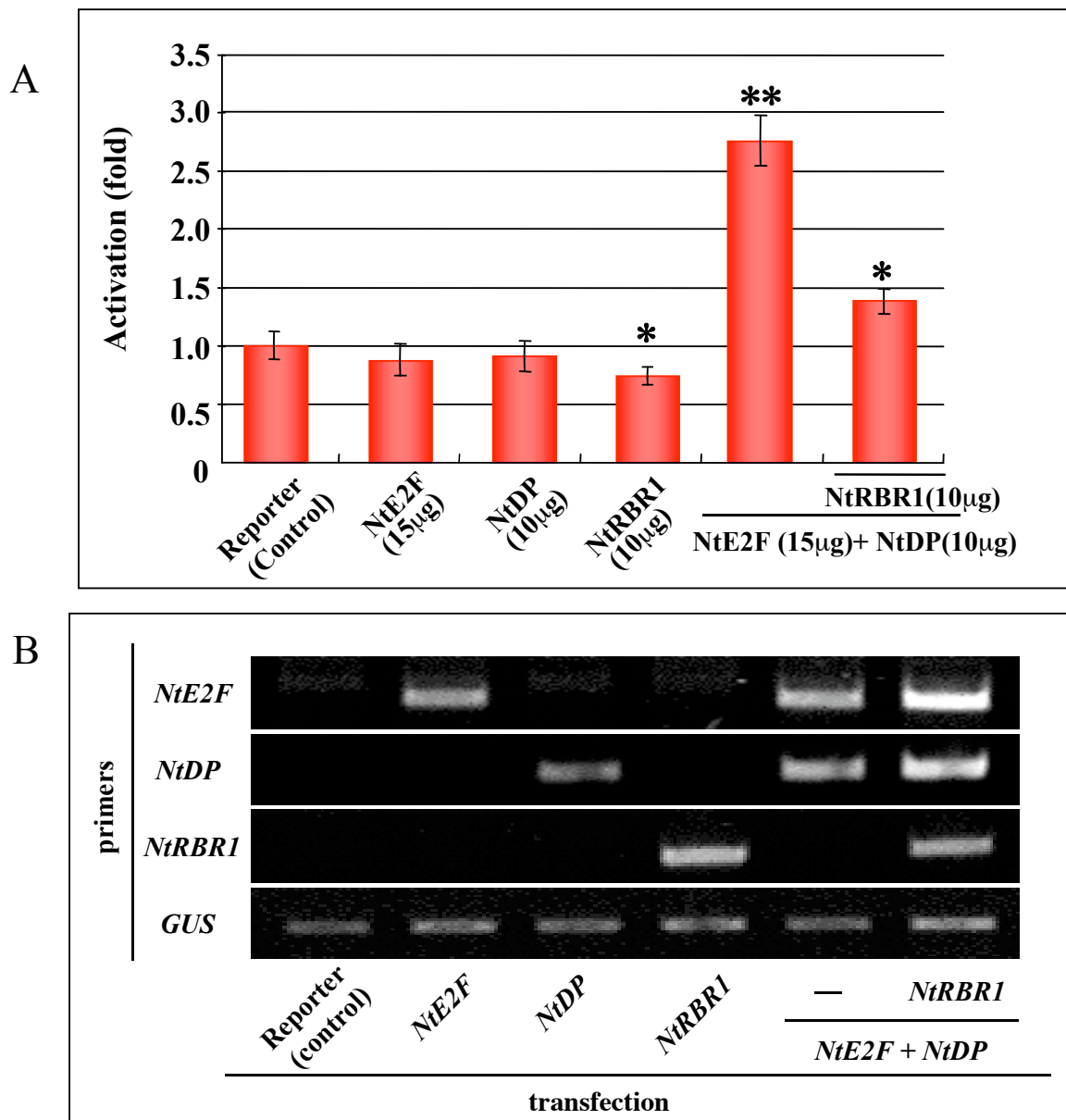


図 16: NtRBR1によるNtE2F/NtDPの転写活性化の抑制

- (A) NtE2F、NtDPに加えてNtRBR1を共導入した一過性発現実験。プロトプラスト化したBY-2にレポーター遺伝子(*te2f-luc*)、内部標準(*TS221*)、エフェクター遺伝子(*pBA221-NtE2F*, *pBA221-NtDP*, *pBA-NtRBR1*)をそれぞれに示すDNA量で共導入した。培養後、細胞を回収して粗抽出液を調製し、LUCとGUSの活性を測定した。LUC/GUS値はレポーターと内部標準だけを導入したときの値を1とした相対値で示した。±S.D.は標準偏差を示し、*,**は対照に対する有意性を示す。
n=3,**:P<0.01,*: P<0.05。
- (B) 一過性発現実験で導入した遺伝子の発現レベルを調べたRT-PCRの結果。*GUS*の発現により導入効率を標準化し、各プライマーは導入遺伝子だけを特異的に認識するように設計した。

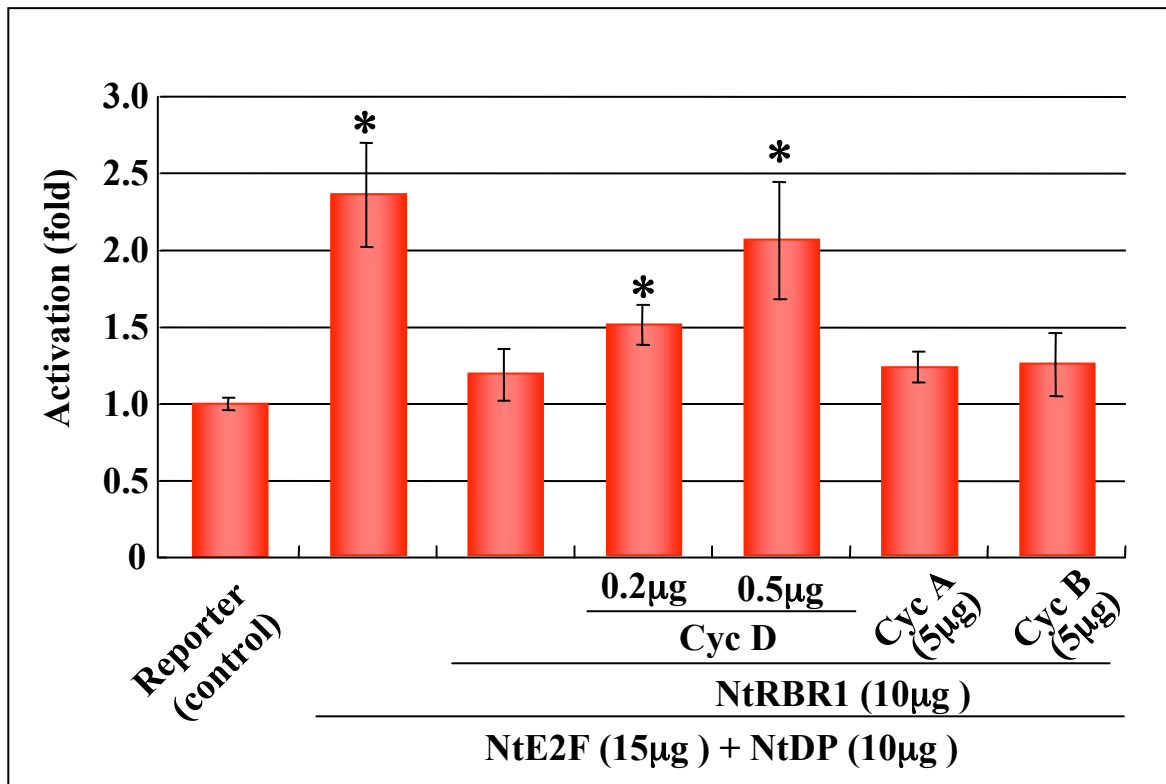
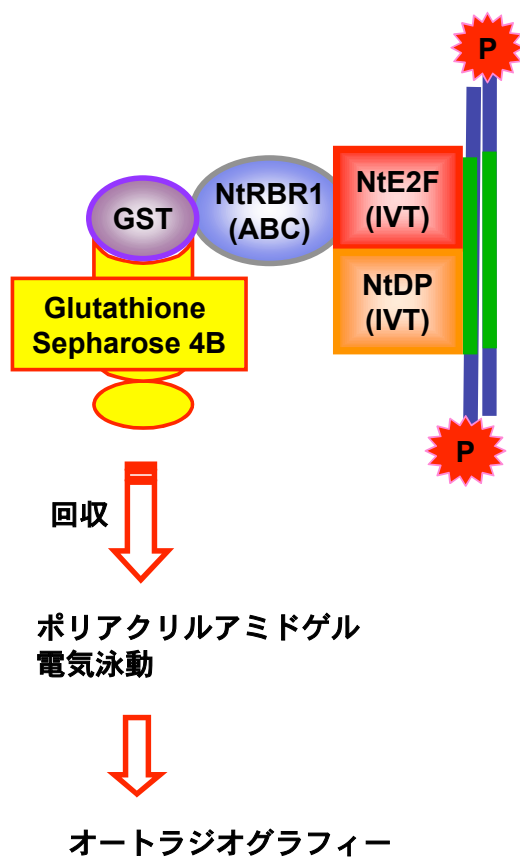


図 17: NtRBR1の転写抑制効果に対するサイクリンの影響

NtE2F、NtDP、NtRBR1に加えてタバコのサイクリンを共導入した一過性発現実験。BY-2細胞のプロトプラストにレポーター遺伝子(te2f-luc)、内部標準(TS221)、エフェクター遺伝子(pBA221-NtE2F, pBA221-NtDP, pBA-NtRBR1)をそれぞれ示すDNA量で共導入した。NtE2F/NtDP/NtRBR1に加えて各種サイクリン発現遺伝子(pBI221-NtcycD, pBI221-NtcycA, pBI221-NtcycB)のうち1種類を共導入した。培養後、細胞を回収して粗抽出液を調製し、LUCとGUSの活性を測定した。LUC/GUS値はレポーターと内部標準だけを導入したときの値を1とした相対値で示した。±S.D.は標準偏差を示し、*は対照に対する有意性を示す。n=3, *: P<0.05。

A



B

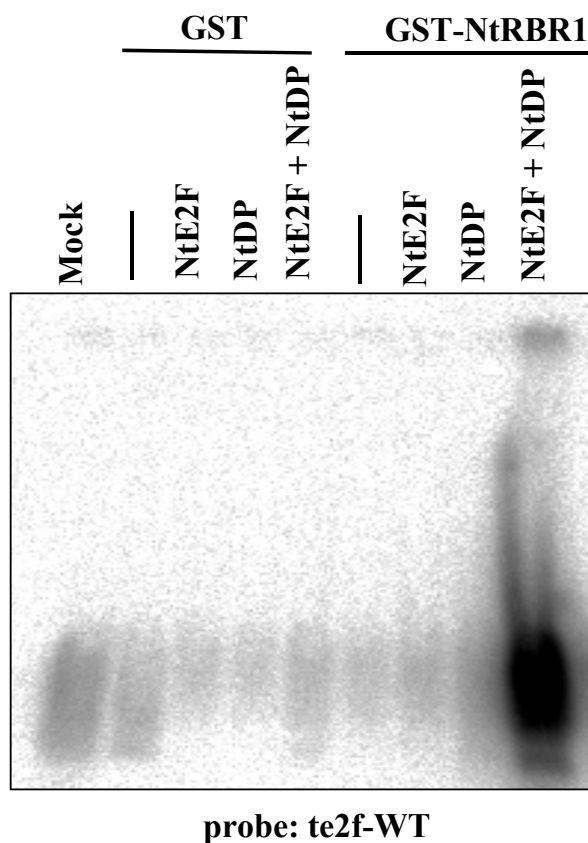
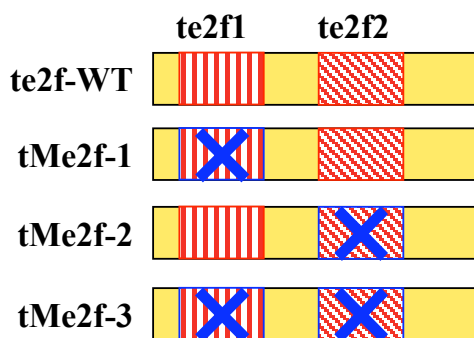
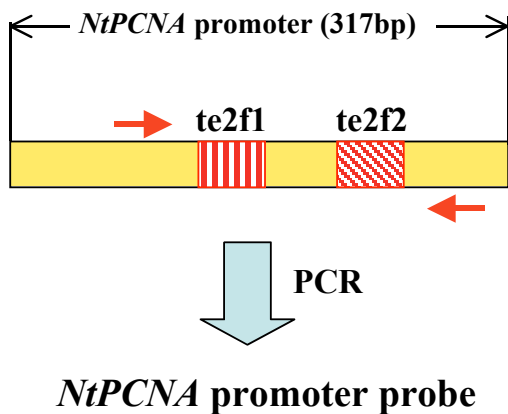


図 18: E2F結合配列に対するNtE2F, NtDP, NtRBR1の結合解析

(A) 実験系の模式図。DNAプローブには*NtPCNA*プロモーターのE2F結合配列周辺領域をPCRで増幅させ、得られたDNA断片を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で標識したものを用いた。DNAプローブと*in vitro*翻訳系で合成したNtE2F、NtDPおよびGST-NtRBR1(ABC)またはGST(Mock)と結合させた。GST-NtRBR1(ABC)またはGSTにはグルタチオンセファロースビーズを結合させ、ビーズを洗浄後に沈殿させて、結合タンパク質を回収した。結合タンパク質サンプルを変性後、4%ポリアクリルアミドゲルで泳動し、オートラジオグラムで沈殿したタンパク質複合体にDNAプローブのシグナルが含まれるか調べた。

(B) 野生型E2F結合配列を有するte2f-WTにおける)結合解析の結果。DNAプローブには野生型の*NtPCNA*プロモーターのE2F結合配列周辺領域のPCR産物(te2f-WT)を用いた。

A



B

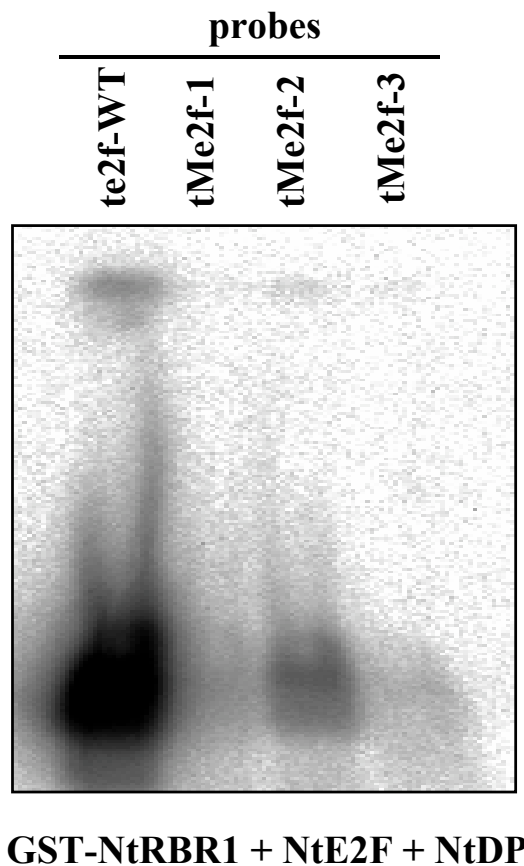
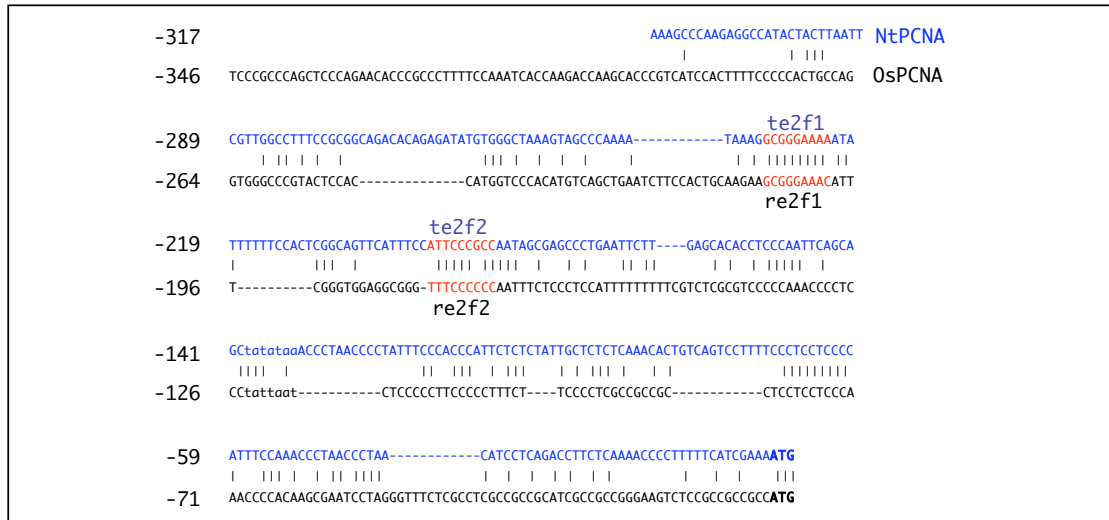


図 19: NtE2F/NtDP/NtRBR1と*NtPCNA*プロモーターの結合における E2F結合配列の役割
 (A) 実験に使用したDNAプローブの模式図。矢印はPCRに用いたプライマーの位置を表し、
 X印は変異が導入されていることを示す。(B) E2F結合サイトに変異を入れた影響。E2F結
 合配列に変異を導入したDNAプローブを用いて、図 1-9と同様な解析を行った。

A



B

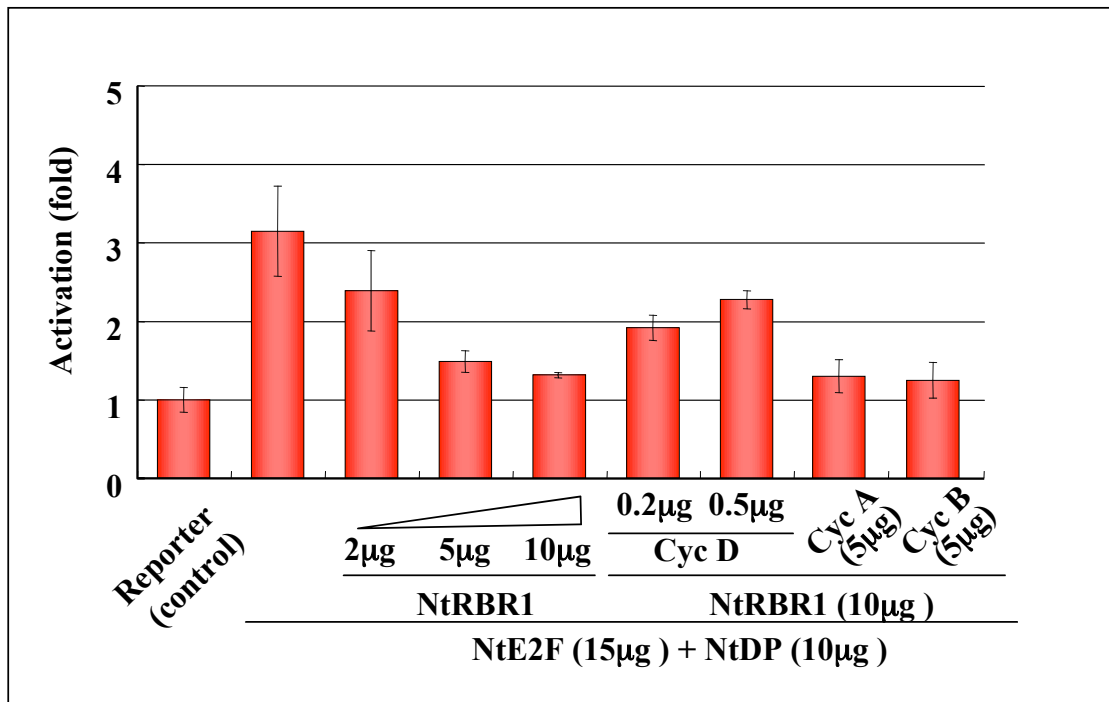


図 20: イネPCNA (*OsPCNA*)プロモーターを用いた一過性発現実験

(A) タバコとイネのPCNAプロモーター配列の比較。タバコは青、イネは黒で示す。それぞれのE2F結合配列は赤で示した。小文字はTATA配列を示す。右側の数字は翻訳開始点を1とした時の塩基数を示す。(B) *OsPCNA*プロモーターを用いた一過性発現実験の結果。BY-2細胞のプロトプラストに*OsPCNA*レポーター遺伝子(re2f-luc)、内部標準(TS221)、エフェクター遺伝子(pBA221-NtE2F, pBA221-NtDP, pBA-NtRBR1)をそれぞれ示すDNA量で共導入した。サイクリンは、NtRBR1の発現遺伝子10 µgの条件下で、さらにサイクリン発現遺伝子(pBI221-NtcycD, pBI221-NtcycA, pBI221-NtcycB)のうち1種類を共導入した。培養後、細胞を回収し、粗抽出液を調製し、LUCとGUSの活性を測定した。LUC/GUS値はレポーターと内部標準だけを導入したときの値を1とした相対値で示した。±S.D.は標準偏差を示す。n=3。

2-4 考察

第 2 章では、E2F 結合配列に作用すると想定される因子に着目して、主に一過性発現系により各因子の機能解析を行った。

一過的発現系において *NtPCNA* プロモーターの発現に E2F 結合配列がどのくらい影響するのかを解析するために、*te2f-luc*, *tMe2f1-luc*, *tMe2f2-luc*, *tMe2f3-luc* を BY-2 細胞内で一過的に発現させたところ、E2F 結合配列が *NtPCNA* プロモーターの転写活性に影響を与えることが示された(図 9)。すなわち、*tMe2f1-luc* と *tMe2f3-luc* では LUC 活性の減少が認められたが、*tMe2f2-luc* では野生型の *te2f-luc* と有意な差は見られなかった。プロトプラストを調製した培養 4 日目の BY-2 細胞では、下流の E2F 結合配列である *te2f2* は *NtPCNA* プロモーターの転写活性に大きな寄与をせず、内在性の *NtE2F/NtDP* の影響を受けにくい可能性が考えられる。培養 4 日目の BY-2 細胞では、G1 期の細胞が 5~6 割と多く、G2/M 期の細胞が 2~3 割で、残りが S 期の細胞からなる。15 時間程度培養した細胞を解析に用いたが、BY-2 細胞ではプロトプラストにした場合、細胞が分裂するまでに通常 2~3 日要する。これはプロトプラストでは細胞壁が無いいため、細胞壁を再生するまで分裂できないため、15 時間培養すると G1 期の細胞の割合が減少して、G2 期の細胞の割合が増加すると予想される。*NtPCNA* プロモーターは G1 後期から S 期まで高い転写レベルを維持するが、その後は減衰することから、最初の数時間は内在性の *NtE2F/NtDP* による転写活性化の影響を受けるが、それ以降はあまり影響を受けなくなると推定される。第 1 章で述べたとおり、形質転換 BY-2 細胞では逆に *te2f2* の方が影響が小さい結果が得られており、E2F 結合配列に作用する転写因子は由来する器官や細胞の状態により大きく異なることが示唆された。これは動物と同様な他の転写因子との相互作用により説明することは可能だが(Schlisio *et al.*, 2002; Giangrande *et al.*, 2003)、植物では E2F と相互作用する転写因子はまだほとんど単離されていない。興味深いことに、*NtPCNA* プロモーターには *telo box* が存在する(図 8)。*telo box* に結合する *AtPur α* が *AtE2F3* と結合し、シロイヌナズナの葉由来のプロトプラストを用いた一過性発現解析により、*AtPur α* を共導入することによって *AtE2F3* による転写活性化を促進することが示された(Rossignol *et al.*, 2002)。したがって、今後は *AtPur α* や *site II* に結合する TCP ファミリーの転写因子との関連性についても検討していかなければならない。いずれにしても、これらの実験から少なくとも E2F 結合配列が *NtPCNA* プロモーターの発現に影響を及ぼすことが明らかになった。*PCNA* プロモーター上の 2 カ所の E2F 結合配列の作用が異なることは、ショウジョウバエ(Yamaguchi *et al.*, 1995)やタバコの葉(Egelkrout *et al.*, 2002)でも報告されている。

次に E2F 結合配列に相互作用する因子としてタバコ E2F(*NtE2F*)が予想され、当研究室で単離された *NtE2F* (Sekine *et al.*, 1999)と *NtDP* (Uemukai *et al.*, in press)を用いて解析を行った(図 10)。その結果、*NtE2F* は *NtPCNA* プロモーターの E2F

結合配列に特異的に結合すること、その結合は NtDP 依存的にあることがわかった(図 12, 図 13A)。さらに一過性発現実験では NtE2F/NtDP が E2F 結合配列を介して *NtPCNA* プロモーターの転写を活性化することを示したが、これも NtDP 依存的であった(図 13B)。すでに酵母 Gal4 の DNA 結合ドメインと融合した NtE2F は、標的となるレポーター遺伝子に対して、ヒト E2F1 と同程度の転写活性化を有することが判明している(Sekine *et al.*, 1999)ことから、NtE2F が転写を活性化する機能を持ち、NtDP は DNA との結合安定性に寄与することで NtE2F/NtDP による転写活性化が可能となると考えられる。シロイヌナズナの AtE2F1~3 は AtDPa または AtDPb により E2F 結合配列に強く結合する。GFP タンパク質を融合させた一過性発現解析により、AtE2F1 と AtE2F3 単独では核に移行できず、AtDPa に依存して核に移行することが示されている(Kosugi and Ohashi, 2002c)。面白いことに AtE2F2 では AtDPa が共存しても核移行が観察されなかった。動物では E2F1~3 は単独でも核移行するが、E2F4,5 は p107 や p130、または DP2 と結合して初めて核移行するようになる(Magae *et al.*, 1996; Gaubatz *et al.*, 2001)。したがって、AtE2F2 は動物と同様に RBR タンパク質と結合して核移行するようになるのかも知れない。いずれにしても、植物でも E2F/DP タンパク質は細胞内局在性によっても空間的に制御されている可能性が高く、NtE2F/NtDP に関してもこの観点から解析することが必要だろう。

また、NtE2F/NtDP による *NtPCNA* プロモーターの転写活性化は NtRBR1 の共導入により抑制されることを示した(図 16A)。ここでは数種類の発現ベクターを共導入したことによって、各導入遺伝子の発現量が減少した可能性が考えられたが、導入遺伝子の発現量を RT-PCR で調べることで排除された(図 16B)。さらに NtE2F と NtRBR1 の結合も確認され(図 15)、タバコ細胞内において NtE2F/NtDP による *NtPCNA* プロモーターの転写活性化能が NtRBR1 によって抑制されることが示唆された。これまでに、E2F 結合配列をタンデムに繋いだレポーター遺伝子とともに、トウモロコシ RBR(ZmRb1)をヒト由来の U2OS 培養細胞に導入して E2F の転写活性の抑制を検出した報告がある(Huntley *et al.*, 1998)。これに対して本研究で用いている実験系は、タバコ BY-2 細胞に全てタバコ由来の因子を導入しており、*NtPCNA* プロモーター上の E2F 結合配列を介した転写活性化を直接証明している点で意義深い。

一方、NtE2F/NtDP/NtRBR1 に加え、タバコサイクリン D(NtcycD)、サイクリン A(NtcycA)、サイクリン B(NtcycB)を共導入したところ、NtcycD を導入した条件でのみ NtRBR1 による NtE2F/NtDP 活性の抑制が解除されて転写活性化が回復した(図 17)。NtRBR1 と NtcycD3;3 との結合、および NtcycD3;3/CDKA 複合体が NtRBR1 の C 末端領域をリン酸化することはすでに示されている(Nakagami *et al.*, 1999)ことから、動物の pRB 経路のように、サイクリン D→RBR→E2F/DP という制御経路が植物にも存在することが示唆された。これとは対照的に、NtcycA および NtcycB を導入した場合には NtRBR1 による抑制は解除されず、転写活性化は回復しなかった(図 17)。サイクリンは主に機能する時期から G1 サイクリン

と M 期サイクリンに分類され、NtcycD は G1 サイクリン、NtcycA と NtcycB は M 期サイクリンに分類される(De Veylder *et al.*, 2003)。本研究の実験結果は、サイクリンのタイプの違いが反映されたものと考えられる。最近、G2/M 期に特異的な発現を示す遺伝子(サイクリン B など)の転写活性化因子である c-Myb-like は、サイクリン/CDK によりリン酸化されることで活性化するが、NtcycD では活性化されず、NtcycA と NtcycB によって活性化されることが、一過性発現解析により報告(Araki *et al.*, 2004)され、サイクリンが機能する時期の違いに起因する結果と解釈されている。本研究で使用したサイクリンは Araki らと同じもので、彼らの結果は NtcycA と NtcycB が一過性発現解析で機能することを支持する。したがって、導入したすべてのサイクリンは CDK と複合体を形成して機能するが、NtcycD/CDK のみが NtRBR1 をリン酸化し、NtRBR1 と NtE2F との結合が解除されて、NtE2F/NtDP が *NtPCNA* プロモーターを転写活性化することが示唆される。

NtE2F/NtDP/NtRBR1 タンパク質と DNA との結合実験によって、それらのタンパク質複合体が *NtPCNA* プロモーターの E2F 結合配列に結合することが示された(図 18)。これは NtRBR1 による NtE2F/NtDP の転写活性化の抑制は、NtE2F と結合して NtE2F/NtDP 複合体の形成を阻害したためではなく、プロモーター上で NtE2F/NtDP/NtRBR1 を形成することで転写を阻害する機構である可能性を示唆するものである。

動物の知見では、pRB の転写抑制機構として次の 2 つが提唱されている(Frolov and Dyson, 2004)。1 つは pRB が E2F の転写活性化ドメインに直接結合して基本転写因子群との相互作用を阻害する。もう 1 つは pRB が E2F と結合するとヒストンデアセチラーゼ(HDAC)や SUV39H1 などのヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMTase)といったクロマチン制御関連因子がリクルートされ、クロマチンレベルで転写抑制が制御される機構である。本章で示した NtE2F/NtDP/NtRBR1 による *NtPCNA* プロモーターの制御には E2F 結合配列が必要であり、*NtPCNA* プロモーターは E2F 結合配列を介して NtRBR1 によって抑制される。植物では一過性にプラスミド DNA を導入した際に、ヌクレオソーム構造を取らない可能性が指摘されている(Meiera *et al.*, 1997)。したがって、後者のクロマチン制御関連因子がリクルートされる機構ではヒストンの修飾を伴うためヌクレオソーム構造が必須であり、少なくとも一過性発現系では、前者の E2F の転写活性化ドメインへの直接的な結合による抑制が想定される。

しかし、最近、後者の機構も機能することを示唆する興味深い知見が蓄積しつつある。動物では HDAC は RbAp48 と呼ばれる因子を介して pRB と結合することが知られているが、植物からも RbAp48 と Suv39H1 のホモログが単離され、RbAp48 はヒトおよびトウモロコシの RBR と結合することが示された(Ach *et al.*, 1997b, Rossi *et al.*, 2001)。もし、植物細胞内においても E2F 結合部位に NtE2F/NtDP/NtRBR1 複合体が結合するとしたら、HDAC などのクロマチン制御関連因子がそれらの複合体にリクルートされて発現制御に関わる可能性が十分考えられる。それを証明するには、本研究で用いた *te2f-luc* や *tMe2f1*, *tMe2f2*, *tMe2f3*

のような形質転換細胞に HDAC の阻害剤である Tricostatin A(TSA)を作用させて、*luc* の転写レベルがどのように変化するかを調べる系を確立することが有効であると思われる。

NtE2F/NtDP/NtRBR1 複合体が *NtPCNA* プロモーター上の E2F 結合配列に結合する際、2つの E2F 結合配列間で違いが見られた(図 19)。この複合体は上流の *te2f1* により強く結合する傾向があったが、野生型 (WT)のシグナルの強さとの差が大きいことから、2つの E2F 結合配列が協調して NtE2F/NtDP/NtRBR1 複合体の結合に関わっている可能性が高い。しかし、この実験は *in vitro* 条件で、今後は ChIP 解析などにより、*in vivo* 条件で NtE2F/NtDP/NtRBR1 複合体が E2F 結合配列間での結合に違いがあるかを調べる必要があると考えられる。

最後に、本研究で得られた知見の一般性を検証するために、イネの *PCNA(OsPCNA)* プロモーターを用いた解析を行った。その結果、タバコ *PCNA(NtPCNA)* プロモーターで得られた結果と同様に、*OsPCNA* プロモーターも NtE2F/NtDP によって活性化され、NtRBR1 によって抑制されるが、NtcycD によって抑制が解除される結果が得られた(図 20B)。このことから双子葉植物と単子葉植物の両方で動物の pRB 経路のような制御経路が機能することが示唆された。興味深いのは、ここで用いた一過性発現系はイネとタバコの混合系であるが、*OsPCNA* プロモーターの方が NtE2F/NtDP による転写活性化の割合が高く、NtRBR1 による抑制もより明確に得られたことである。この理由として、実験で用いた *NtPCNA* プロモーターはタバコが 317 bp であったのに対し、*OsPCNA* では約 1.5kb と長く、*OsPCNA* プロモーターの上流領域からの影響を受けたことが考えられる。他の理由として、*NtPCNA* プロモーターとは E2F 結合配列付近しか似ていない(図 20A)ことから、E2F 以外の内在性の転写因子の影響を受けにくかったことが考えられる。第 1 章で議論したように、*OsPCNA* プロモーターには site *Ila*, site *Iib* とよばれる分裂組織での発現を制御するシス配列が存在し、そこには PCF1 と PCF2 という TCP ファミリーに属する転写因子が結合する (Kosugi and Ohashi,1997)。*NtPCNA* プロモーターには *telo box* と site *II* に類似した配列が存在する(図 8)が、これらのシス配列に変異を導入して、本研究で用いた E2F 結合配列の変異と組み合わせた解析により、*NtPCNA* プロモーターの細胞周期依存的な発現制御機構がより詳細に解明されるものと考えられる。

2-5 小括

第 2 章では、*NtPCNA* プロモーターの発現がどのような機構によって制御されるかについて解析を行った。*NtPCNA* プロモーターには E2F 結合配列が存在することから、その制御には NtE2F や NtDP の関与が予想された。そこで NtE2F や NtDP が *NtPCNA* プロモーターに対してどのような相互作用を示すのか調べた。その結果、NtE2F は NtDP と複合体を形成して *NtPCNA* プロモーターの E2F 結合配列に結合することが示された。さらに *NtPCNA* プロモーターをレポーターに用いた一過性発現系によって *NtPCNA* は NtE2F/NtDP によって転写が活性化されることが判明した。NtE2F/NtDP に加えて NtRBR1 を共発現させたところ、NtE2F/NtDP による *NtPCNA* プロモーターの転写活性は抑制され、NtRBR1 による抑制はプロモーター上の E2F 結合配列を介して起こることが判明した。さらに NtE2F, NtDP, NtRBR1 に加えて NtcycD を共発現させると、NtRBR1 による抑制能はキャンセルされて転写活性化能が回復したが、NtcycA および NtcycB を共発現させても NtRBR1 の抑制能を乗り越えることはできなかった。

これらの知見から、*NtPCNA* プロモーターの発現は、NtE2F/NtDP/NtRBR1 複合体によって制御され、その制御には 2 カ所の E2F 結合配列が必要であることが判明した。さらに NtRBR1 による転写活性化抑制は NtcycD によって解除されたことから、NtcycD→NtRBR1→NtE2F/NtDP に至る pRBR を中心とした制御の経路が植物(双子葉植物・単子葉植物)細胞においても機能していることが示唆された。

総括

植物の細胞増殖機構について新たな知見を得ることを目的に、細胞周期の中で増殖と分化の接点として重要な G1/S 期に転写が活性化される *NtPCNA* プロモーターの発現制御機構の解析を行った。

植物の *PCNA* プロモーターの発現解析に関していくつかの報告はあるが、*PCNA* プロモーターが最も機能する細胞周期 G1/S 期に着目した解析は本研究が初めてである。解析は細胞周期の同調培養系が確立されているタバコ BY-2 細胞を用い、*NtPCNA* プロモーターおよび相互作用すると考えられる因子もすべてタバコ由来のものを用いた。イネ E2F とシロイヌナズナ DP の組み合わせなど、これまでは複数種の植物由来の因子を用いた解析例が多い中で、本研究は全ての実験材料をタバコに統一することにより、実際に近い解析系を構築できた点は大きな特徴である。

本研究で得られた主な知見を以下に挙げる。

- *NtPCNA* プロモーター上の 2 カ所の E2F 結合配列が協調的に機能することで転写活性化能が維持され、1 つでも変異を入れると G1/S 期における転写活性化能は大きく損なわれる。
- G1/S 期の細胞において *NtPCNA* プロモーター上の E2F 結合配列は転写レベルの上昇に機能し、細胞周期特異的な発現パターンには他の転写因子も関与する可能性が示唆された。
- *NtPCNA* プロモーターは、タバコ BY-2 細胞内において NtE2F/NtDP によって転写活性化され、NtRBR1 によって抑制される。
- NtE2F/NtDP/NtRBR1 による *NtPCNA* プロモーターの制御には E2F 結合配列が必要である。
- NtRBR1 による転写活性化抑制は、NtcycD の共発現によってキャンセルされるが、NtcycA と NtcycB を共発現させても NtRBR1 の抑制能を解除することはできない。

これらの知見は、植物細胞においても RBR タンパク質による制御機構が機能しており、E2F 結合配列上の NtE2F/NtDP に NtRBR1 が結合することによる転写活性化の抑制と、サイトカニンやショ糖などの増殖シグナルに応答した NtcycD による NtRBR1 の転写抑制の解除に関与することで、G1/S 期特異的な遺伝子発現をより繊細な制御を担うことが予想される。

本研究では解析対象として *NtPCNA* プロモーターを取り上げたが、E2F 応答性の遺伝子は植物にも数多く存在する。その中には窒素同化に関連する遺伝子も含まれ、AtE2Fa/AtDPa の高発現体では、これらの遺伝子の発現上昇が認められて

いる(Ramirez-Parra *et al.*, 2003)。これら植物に特徴的な遺伝子の発現制御に E2F がどのように関わるのか興味を持たれる。E2F に応答する遺伝子の多さもさることながら、シロイヌナズナのゲノムには E2F 遺伝子が 6 種類コードされており、中には DNA 結合ドメインしか持たないものもある。したがって、細胞周期のどの時期にどの E2F が機能しているのか、あるいはどの応答遺伝子にどの E2F が働いているかなど、これらの E2F の使い分けについても解析が進めば、さらに興味深い知見を得ることができると考えられる。

今後、植物における細胞周期制御および遺伝子発現の研究がさらなる発展を遂げることを切に願う。

参考文献

Ach, R. A., Durfee, T., Miller, A. B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L., Zambryski, P. C., and Grussem, W. (1997a). *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.

Ach, R. A., Taranto, P., and Grussem, W. (1997b). A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals. *Plant Cell* 9, 1595-1606.

Albani, D., Mariconti, L., Ricagno, S., Pitto, L., Moroni, C., Helin, K., and Cella, R. (2000). *DcE2F*, a functional plant E2F-like transcriptional activator from *Daucus carota*. *J Biol Chem* 275, 19258-19267.

An, G. (1985). High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 79, 568-570.

Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.

Araki, S., Ito, M., Soyano, T., Nishihama, R., and Machida, Y. (2004). Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *J Biol Chem* 279, 32979-32988.

Attwooll, C., Denchi, E. L., and Helin, K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J* 23, 4709-4716.

Bandara, L.R., Buck, V.M., Zamanian, M., Johnston, L.H., La Thangue, N.B. (1993). Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J* 12, 4317-4324.

Boniotti, M. B., and Gutierrez, C. (2001). A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J* 28, 341-350.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Castellano, M. M., del Pozo, J. C., Ramirez-Parra, E., Brown, S., and Gutierrez, C. (2001). Expression and stability of *Arabidopsis CDC6* are associated with endoreplication. *Plant Cell* 13, 2671-2686.

Chaboute, M. E., Clement, B., Sekine, M., Philipps, G., and Chaubet-Gigot, N. (2000). Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotide reductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *Plant Cell* 12, 1987-2000.

Costanzo, M., Nishikawa, J. L., Tang, X., Millman, J. S., Schub, O., Breitkreuz, K., Dewar, D., Rupes, I., Andrews, B., and Tyers, M. (2004). CDK activity antagonizes *Whi5*, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell* 117, 899-913.

Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., and Coen, E. (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J* 18, 215-222.

Daidoji, H., Takasaki, Y., and Nakane, P. K. (1992). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) in plant proliferating cells: immunohistochemical and quantitative analysis using autoantibody and murine monoclonal antibodies to PCNA. *Cell Biochem Funct* 10, 123-132.

Dansako, T., Kato, K., Satoh, J., Sekine, M., Yoshida, K., and Shinmyo, A. (2003). 5'-UTR of the *HSP18.2* gene contributes to efficient translation in plant cells. *J Biosci Bioeng* 95, 52-58.

de Bruin, R.A., McDonald, W.H., Kalashnikova, T.I., Yates, J., and Wittenberg, C. (2004). *Cln3* activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor *Whi5*. *Cell*. 2004 Jun 25;117(7):887-98.

de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R., and Leone, G. (2003). Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* 278, 42041-42049.

de Jager, S. M., and Murray, J. A. (1999). Retinoblastoma proteins in plants. *Plant Mol Biol* 41, 295-299.

del Pozo JC, Boniotti MB, Gutierrez C. (2002). *Arabidopsis E2Fc* functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* 14, 3057-3071.

De Veylder, L., Joubes, J., and Inze, D.(2003). Plant cell cycle transitions. *Curr Opin Plant Biol* 6, 536-543.

De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., de Almeida Engler, J., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van Der Schueren, E., Jacqmard, A., Engler, G., and Inze, D.(2002). Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J* 21, 1360-1368.

Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J.M/, Jacqmard, A., Kilby, N.J., and Murray, J.A. (2003). Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* 15, 79-92.

Di Stefano, L., Jensen, M. R., and Helin, K. (2003). E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J* 22, 6289-6298.

Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-2262.

Ebel, C., Mariconti, L., and Gruissem, W. (2004). Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature* 429, 776-780.

Egelkrout, E. M., Mariconti, L., Settlage, S. B., Cella, R., Robertson, D., and Hanley-Bowdoin, L. (2002). Two E2F elements regulate the proliferating cell nuclear antigen promoter differently during leaf development. *Plant Cell* 14, 3225-3236.

Egelkrout, E. M., Robertson, D., and Hanley-Bowdoin, L. (2001). Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* 13, 1437-1452.

Frolov, M. V., and Dyson, N. J. (2004). Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci* 117, 2173-2181.

Gaubatz, S., Lees, J.A., Lindeman, G.J., and Livingston, D.M. (2001). E2F4 is exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner. *Mol Cell Biol* 21, 1384-1392.

Giangrande, P. H., Hallstrom, T. C., Tunyaplin, C., Calame, K., and Nevins, J. R. (2003). Identification of E-box factor TFE3 as a functional partner for the E2F3 transcription factor. *Mol Cell Biol* 23, 3707-3720.

Grafi, G., Burnett, R. J., Helentjaris, T., Larkins, B. A., DeCaprio, J. A., Sellers, W. R., and Kaelin, W. G., Jr. (1996). A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8962-8967.

Gutierrez, C.(1999). Geminivirus DNA replication. *Cell Mol Life Sci* 56, 313-329.

Gutierrez C. (1998). The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. *Curr Opin Plant Biol* 1, 492-497.

Hata, S., Kouchi, H., Tanaka, Y., Minami, E., Matsumoto, T., Suzuka, I., and Hashimoto, J. (1992). Identification of carrot cDNA clones encoding a second putative proliferating cell-nuclear antigen, DNA polymerase delta auxiliary protein. *Eur J Biochem* 203, 367-371.

Helin, K., Wu, C. L., Fattaey, A. R., Lees, J. A., Dynlacht, B. D., Ngwu, C., and Harlow, E. (1993). Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev* 7, 1850-1861.

Huber, H.E., Edwards, G., Goodhart, P.J., Patrick, D.R., Huang, P.S., Ivey-Hoyle, M., Barnett, S.F., Oliff, A., and Heimbrook, D.C. (1993). Transcription factor E2F binds DNA as a heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3525-3529.

Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makker, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., *et al.* (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.

Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., and Nevins, J. R. (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* 21, 4684-4699.

Jefferson, R. A., Bevan, M., and Kavanagh, T. (1987). The use of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants. *Biochem Soc Trans* 15, 17-18.

Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D., and Nevins, J.R. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 365, 349-352.

Karlseder, J., Rotheneder, H., and Wintersberger, E. (1996). Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol Cell Biol* 16, 1659-1667.

Kawamura, K., Uemukai, K., Kosugi, S., Kato, K., Ito, M., Shinmyo, A., and Sekine M. (2004). An E2F-regulated reporter construct is transcriptionally activated following the transient expression of cyclin D in plants. *Plant Biotech* 21, 289-293

Kodama, H., Ito, M., Ohnishi, N., Suzuka, I., and Komamine, A. (1991). Molecular cloning of the gene for plant proliferating-cell nuclear antigen and expression of this gene during the cell cycle in synchronized cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Eur J Biochem* 197, 495-503.

Kong, L. J., Orozco, B. M., Roe, J. L., Nagar, S., Ou, S., Feiler, H. S., Durfee, T., Miller, A. B., Grussem, W., Robertson, D., and Hanley-Bowdoin, L. (2000). A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J* 19, 3485-3495.

Kosugi, S., and Ohashi, Y. (2003). Constitutive E2F expression in tobacco plants exhibits altered cell cycle control and morphological change in a cell type-specific manner. *Plant Physiol* 132, 2012-2022.

Kosugi, S., and Ohashi, Y. (2002a). E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen promoters. *Plant J* 29, 45-59.

Kosugi, S., and Ohashi, Y. (2002b). E2Fs, E2F-like repressors of *Arabidopsis* that bind to E2F sites in a monomeric form. *J Biol Chem* 277, 16553-16558.

Kosugi, S., and Ohashi, Y. (2002c). Interaction of the *Arabidopsis* E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiol* 128, 833-843.

Kosugi, S., and Ohashi, Y. (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to *cis* elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* 9, 1607-1619.

Kosugi, S., Suzuka, I., Ohashi, Y., Murakami, T., and Arai, Y. (1991). Upstream sequences of rice proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene mediate expression of PCNA-GUS chimeric gene in meristems of transgenic tobacco plants. *Nucleic Acids Res* 19, 1571-1576.

Kovesdi, I., Reichel, R., and Nevins, J. R. (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* 45, 219-228.

Lee, W. H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L. J., Shew, J. Y., and Lee, E. Y. (1987). Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235, 1394-1399.

Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y., and Dong, X. (1999). Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell* 98, 329-339.

Lin, S. Y., Black, A. R., Kostic, D., Pajovic, S., Hoover, C. N., and Azizkhan, J. C. (1996). Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction. *Mol Cell Biol* 16, 1668-1675.

Lopez, I., Khan, S., Vazquez, J., and Hussey, P. J. (1997). The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene family in *Zea mays* is composed of two members that have similar expression programmes. *Biochim Biophys Acta* 1353, 1-6.

Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J., and Helin, K. (1996). Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol* 16, 1047-1057.

Maga, G., and Hubscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116, 3051-3060.

Magae, J., Wu, C.L., Illenye, S., Harlow, E., and Heintz, N.H. (1996). Nuclear localization of DP and E2F transcription factors by heterodimeric partners and retinoblastoma protein family members. *J Cell Sci* 109, 1717-1726.

Magyar, Z., Atanassova, A., De Veylder, L., Rombauts, S., and Inze, D. (2000). Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 486, 79-87.

Mariconti, L., Pellegrini, B., Cantoni, R., Stevens, R., Bergounioux, C., Cella, R., and Albani, D. (2002). The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *J Biol Chem* 277, 9911-9919.

Matsumoto, T., Hata, S., Suzuka, I., and Hashimoto, J. (1994). Expression of functional proliferating-cell nuclear antigen from rice (*Oryza sativa*) in *Escherichia coli*. Activity in association with human DNA polymerase delta. *Eur J Biochem* 223, 179-187.

Meiera, I., Groinga, B., Michalowskib, S., and Spikerb, S. (1997). The tomato *RBCS3A* promoter requires integration into the chromatin for correct organ-specific regulation. *FEBS Lett* 415, 91-95.

Menges, M., and Murray, J.A.H. (2002). Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J* 30, 203-212.

Millar, A. J., Short, S. R., Chua, N. H., and Kay, S. A. (1992). A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* 4, 1075-1087.

Muller, H., Bracken, A. P., Vernell, R., Moroni, M. C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J. D., and Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15, 267-285.

Muller, H., Moroni, M. C., Vigo, E., Petersen, B. O., Bartek, J., and Helin, K. (1997). Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol Cell Biol* 17, 5508-5520.

森平 奈津子、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、平成15年度修士論文「シロイヌナズナE2Fファミリーの制御遺伝子プロモーターに対する結合特性の解析」

- Nagar, S., Pedersen, T. J., Carrick, K. M., Hanley-Bowdoin, L., and Robertson, D. (1995). A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7, 705-719.
- Nagata, T., Nemoto, Y., and Hasezawa, S. (1992). Tobacco BY-2 cell line as the “Hela ” cell in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol* 132, 1-30.
- Nakagami, H., Kawamura, K., Sugisaka, K., Sekine, M., and Shinmyo, A. (2002). Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* 14, 1847-1857.
- Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H., and Shinmyo, A. (1999). Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J* 18, 243-252.
- Nevins, J. R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258, 424-429.
- Nevins, J. R. (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* 10, 699-703.
- Ramirez-Parra, E., Lopez-Matas, M.A., Frundt, C., and Gutierrez, C. (2004). Role of an atypical E2F transcription factor in the control of *Arabidopsis* cell growth and differentiation. *Plant Cell* 16, 2350-2363.
- Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M., and Nakatani, Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296, 1132-1136.
- Pardee, A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-608.
- Ramirez-Parra, E., Lopez-Matas, M.A., Frundt, C., and Gutierrez, C. (2004). Role of an atypical E2F transcription factor in the control of *Arabidopsis* cell growth and differentiation. *Plant Cell* 16, 2350-2363.
- Ramirez-Parra, E., Frundt, C., and Gutierrez, C. (2003). A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J* 33, 801-811.

Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M. B., and Gutierrez, C. (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Res* 27, 3527-3533.

Rayman, J.B., Takahashi, Y., Indjeian, V.B., Dannenberg, J.H., Catchpole, S., Watson, R.J., te Riele, H., and Dynlacht, B.D. (2002). E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* 16, 933-947.

Rossi, V., Varotto, S., Locatelli, S., Lanzaova, C., Lauria, M., Zanotti, E., Hartings, H., and Motto, M. (2001). The maize WD-repeat gene *ZmRbAp1* encodes a member of the MSI/RbAp sub-family and is differentially expressed during endosperm development. *Mol Genet Genomics* 265, 576-584.

Rossignol, P., Stevens, R., Perennes, C., Jasinski, S., Cella, R., Tremousaygue, D., and Bergounioux, C. (2002). AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce *Arabidopsis* leaf cells to re-enter S phase. *Mol Genet Genomics* 266, 995-1003.

Schlisio, S., Halperin, T., Vidal, M., and Nevins, J. R. (2002). Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function. *EMBO J* 21, 5775-5786.

Sekine, M., Ito, M., Uemukai, K., Maeda, Y., Nakagami, H., and Shinmyo, A. (1999). Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett* 460, 117-122.

Shen, W.H. (2002). The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends Plant Sci* 7, 505-511.

Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.

Stevens, R., Mariconti, L., Rossignol, P., Perennes, C., Cella, R., and Bergounioux, C. (2002). Two E2F sites in the *Arabidopsis MCM3* promoter have different roles in cell cycle activation and meristematic expression. *J Biol Chem* 277, 32978-32984.

Suzuka, I., Hata, S., Matsuoka, M., Kosugi, S., and Hashimoto, J. (1991). Highly conserved structure of proliferating cell nuclear antigen (DNA polymerase delta auxiliary protein) gene in plants. *Eur J Biochem* 195, 571-575.

Suzuka, I., Daidoji, H., Matsuoka, M., Kadowaki, K., Takasaki, Y., Nakane, P. K., and Moriuchi, T. (1989). Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase delta auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3189-3193.

Takahashi, Y., Rayman, J., and Dynlacht, B. (2000). Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* 14, 804-816.

Taya, Y. (1997). RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem Sci* 22, 14-17.

Tremousaygue, D., Garnier, L., Bardet, C., Dabos, P., Herve, C., and Lescure, B. (2003). Internal telomeric repeats and 'TCP domain' protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J* 33, 957-966.

Tremousaygue, D., Manevski, A., Bardet, C., Lescure, N., and Lescure, B. (1999). Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems. *Plant J* 20, 553-561.

Trimarchi, J. M., and Lees, J. A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 11-20.

Tsurimoto, T. (1999). PCNA binding proteins. *Front Biosci* 4, D849-858.

Uemukai, K., Iwakawa, H., Kosugi, S., de Jager, S., Kato, K., Kondorosi, E., Murray, J.A., Ito, M., Shinmyo, A., and Sekine, M. (in press). Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein; cyclin D expression overcomes this repressor activity.

Umen, J. G., and Goodenough, U. W. (2001). Control of cell division by a retinoblastoma protein homolog in *Chlamydomonas*. *Genes Dev* 15, 1652-1661.

van Ginkel, P.R., Hsiao, K.M., Schjerven, H., and Farnham, P.J. (1997). E2F-mediated growth regulation requires transcription factor cooperation. *J Biol Chem* 272, 18367-18374.

Verona, R., Moberg, K., Estes, S., Starz, M., Vernon, J. P., and Lees, J. A. (1997). E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol Cell Biol* 17, 7268-7282.

Vlieghe, K, Boudolf, V, Beemster, GT, Maes, S, Magyar, Z, Atanassova, A, de Almeida Engler, J, De Groot, R, Inze, D, and De Veylder L. (2005). The DP-E2F-like Gene *DELI* Controls the Endocycle in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 15, 59-63.

Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-30.

Wells, J., Boyd, K., Fry, C., Bartley, S., and Farnham, P. (2000). Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells. *Mol Cell Biol* 20, 5797-5807.

Yamaguchi, M., Hayashi, Y., and Matsukage, A. (1995). Essential role of E2F recognition sites in regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene promoter during *Drosophila* development. *J Biol Chem* 270, 25159-25165.

論文目録

学位論文の主たる部分を公表した論文

(題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma related protein; cyclin D expression overcomes this repressor activity.

Uemukai, K., Iwakawa, H., Kosugi, S., de Jager, S., Kato, K., Kondorosi, E., Murray, J.A., Ito, M., Shinmyo, A., and Sekine, M.

Plant Molecular Biology (in press)

参考論文

(題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

An E2F regulated reporter construct is transcriptionally activated following the transient expression of cyclin D in plants.

Kawamura, K., **Uemukai, K.**, Kosugi, S., Kato, K., Ito M., Shinmyo, A., and Sekine, M
Plant Biotechnology 21(4), 289-293 (2004)

Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants.

Sekine, M., Ito, M., **Uemukai, K.**, Maeda, Y., Nakagami, H., and Shinmyo, A.

FEBS Lett. **460**, 117-22. (1999)

謝辞

本研究を遂行するにあたって、新名惇彦 教授には懇切丁寧なご指導と、非常に有益な討論を賜り厚く御礼申し上げます。また日頃の研究活動においても暖かく見守り、時には励ましの言葉をかけていただいたき、心より感謝いたします。関根政実 助手には、実験の組み立て方から、研究への取り組み方、論文作製の指導等、直接の指導を賜り、感謝の気持ちでいっぱいです。ここに厚く御礼申し上げます。吉田和哉 助教授、加藤 晃 助手、仲山英樹 助手、田中雅恵 秘書には、本研究に関する非常に有意義な助言に加え、研究環境の整備などへのご尽力に対し心より御礼申し上げます。同じチームで一緒に研究をしてきた岩川秀和 博士、河村和恵 博士、仲井智洋 氏、原島洋文 氏、森平奈津子 氏、平野博人 氏には日々の研究活動において大変お世話になりました。ありがとうございました。また、ここには全員の名前を記すことができませんでしたが、植物代謝調節学講座の学生、技術補佐員および関係者のみなさまには様々なご協力いただきましたことに深く感謝いたします。

最後になりましたが、私の大学院進学の希望を受け入れ、様々な形でご援助くださった両親、妹に心から感謝します。

平成 17 年 1 月 31 日 上向健司