

所属 (主指導教員)	植物代謝調節学講座 (新名惇彦教授)		
氏名	原島 洋文	提出	平成18年12月25日
題目	植物細胞周期制御因子 A タイプサイクリン依存性キナーゼの活性化機構の解析		

【背景および目的】

多細胞生物の正常な発生には、細胞の分裂とそれぞれの器官への分化が協調する必要がある。植物の形態形成は動物のそれとは異なり、胚発生以降に行われる。植物の細胞分裂は茎頂や根端にあるメリステムと呼ばれる分裂組織に限られ、メリステムにおける細胞分裂はさまざまな内的あるいは外的な要因によって時間的空間的に制御されている。これらのシグナルは最終的に細胞周期制御因子に伝えられ、細胞分裂と分化の方向性が決定されると考えられる。植物においては A タイプサイクリン依存性キナーゼ (CDKA) が細胞周期制御の中心的な役割を果たすが、細胞分裂に先立って CDKA がどのように活性化されるかについては未だに知見が乏しい。一般に CDK の活性化にはサイクリンとの結合を必要とし、サイクリンの合成や分解により活性が制御される。その他にも阻害因子(CDK inhibitor: CKI)やリン酸化によっても CDK 活性は制御され、周期性が生み出されている。植物細胞においても CKI として KRP (Kip-related protein)が、CDK のリン酸化を担う因子として Wee1 キナーゼや CAK (CDK-activating kinase)のホモログが同定されている。この内 CAK は CDK の T-loop 領域に保存されたスレオニン残基のリン酸化を介して CDK を活性化する。本研究では、主に細胞分裂と分化の接点として重要な G1/S 移行期に焦点を当て、CDKA の活性化機構の解明を目的とした。

【結果と考察】

第 1 章では、オーキシンが細胞周期に及ぼす影響を検討し、オーキシンが活性型サイクリン/CDKA 複合体の形成に関与することを示した。静止期にあるタバコ培養細胞 BY-2 を新鮮な培地に植え継ぐと、CDKA タンパク質の蓄積量の増加と並行して p13^{suc1} により精製したキナーゼの活性が上昇した。一方でオーキシンを除いた培地に植え継ぐと、CDKA の蓄積量および活性はコントロールほど上昇せず、細胞の伸長が観察された。また、ショ糖を除いた培地に植え継いだ場合には CDKA の蓄積量はほとんど変化せず、活性の上昇も認められなかった。これらのことは、細胞分裂が正常に起こるにはある閾値以上まで CDKA 活性が上昇する必要があることを示しており、以前の報告と一致する。また、静止期あるいは継代 10 時間後の BY-2 細胞のタンパク質粗抽出液をゲルろ過カラムにより分画すると、静止期にある細胞においても CDKA は~200 kDa 付近をピークに検出されることから、単量体としてではなくサイクリン以外にも何らかの因子と複合体を形成していることが示

唆された。同様にオーキシンを除いた培地に継代した BY-2 細胞の粗抽出液を分画すると、CDKA はコントロールや静止期の細胞とは異なる分布を示し、コントロールで活性を示した高分子の画分は減少していた。このことから、オーキシンは活性型の CDKA 複合体の形成にも重要な役割を果たすことが示唆された。

第 2 章では、植物 CDKA の T-loop 内に存在する 161 番目のスレオニン残基(Thr-161)のリン酸化がそのキナーゼ活性に必須であることを示した。アフィディコリン/プロピザミドを用いた二段階同調法により BY-2 細胞を M 期に同調して細胞周期の進行を解析すると、p13^{suc1}により精製したキナーゼの活性と並行して CDKA の Thr-161 のリン酸化の G1/S 移行期における上昇が western blot により認められた。また GFP タンパク質を融合した dominant-negative 型の CDKA 変異体 (D146N) を BY-2 細胞内で誘導的に高発現させると、オーキシンを含む培地でも細胞分裂が停止した後、細胞の伸長が認められたが、Thr-161 をリン酸化されないアラニンに置換した CDKA 変異体 (T161A) を高発現させた場合には細胞分裂に影響はなかった。しかし、GFP 抗体によるそれぞれの変異 CDKA の免疫沈降産物は、ヒストン H1 に対するキナーゼ活性を示さないことから、両者とも不活性な複合体を形成していることが示唆された。そこで、*in vitro* における結合解析を行うと、CDKA(D146N)-GFP は野生型の CDKA(WT)-GFP よりもサイクリン D3;3 (CYCD3;3) と強く結合するが、CDKA(T161A)-GFP は結合が弱いことを見出した。したがって、CDKA(D146N)-GFP を誘導発現させた場合にみられる dominant-negative 効果は、内生の CDKA よりも CYCD3;3 などのサイクリンとの高い親和性により引き起こされ、CDKA(T161A)-GFP は安定な複合体を形成できないために影響が出ないことが示唆された。さらに Thr-161 のリン酸化の生理的機能について解析するため、シロイヌナズナで唯一の CDKA である CDKA;1 の機能欠損型変異体、*cdka;1-1* を用いた。シロイヌナズナの雄性配偶体である花粉は 3 細胞性で、減数分裂後、花粉の発芽前に 2 回の細胞分裂を行い、1 個の栄養細胞と 2 個の精細胞となる。一方、*cdka;1-1* 変異体の花粉は 2 細胞からなる。これは減数分裂後の 2 回目の細胞分裂である第 2 花粉分裂 (PMII) が起こらず、雄原細胞が 1 個の精細胞になるためと考えられる。本研究では CDKA;1 の Thr-161 をアラニンに置換した CDKA;1(T161A)、あるいはリン酸化と同様の性質を持つグルタミン酸に置換した CDKA;1(T161E)を *cdka;1-1* 変異体に導入し、PMII の不全を相補するか解析した。その結果、CDKA;1(T161A)は相補しないのに対して、CDKA;1(T161E)は PMII の不全を相補し、成熟花粉は 3 細胞となった。このことから、少なくとも PMII の進行には CDKA;1 の Thr-161 がリン酸化されることが必要であると示唆された。

本研究を通して、CDKA の活性化機構に関して次のことを明らかにした。1)オーキシンが活性型 CDKA 複合体の形成に関与すること、2)植物細胞の細胞周期における CDKA の活性とその T-loop 領域のリン酸化状態が相関すること、3)CDKA の T-161 のリン酸化はサイクリンとの複合体の安定性ではなく、複合体形成後の活性化に関与すること、4)シロイヌナズナの雄性配偶体形成の過程で CDKA の T-loop 領域のリン酸化が必要なこと、を示した。

博士論文番号：0381029

植物細胞周期制御因子 A タイプサイクリン依存性キナーゼの
活性化機構の解析

原島 洋文

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)

平成 19 年 3 月 16 日提出

目次

略語	4
緒言	6
第 1 章 オーキシンが細胞周期に及ぼす影響の解析	18
1-1 序論	18
1-2 材料と方法	20
1-3 結果	29
1-3-1 オーキシンあるいはショ糖欠乏が細胞分裂に及ぼす影響	29
1-3-2 CDKA の生長段階に依存した蓄積	29
1-3-3 re-entry 法による細胞周期の解析	31
1-3-4 p13 ^{suc1} タンパク質による CDKA の精製	32
1-3-5 BY-2 細胞の増殖再開時に CDKA タンパク質量と p13 ^{suc1} 結合キナーゼの活性が上昇する	34
1-3-6 オーキシン欠乏における CDKA 複合体の質的な変化	35
1-4 考察	39
第 2 章 CDKA のリン酸化による活性制御機構の解析	45
2-1 序論	45
2-2 材料と方法	47
2-3 結果	61
2-3-1 リン酸化抗体の特異性の検討	61
2-3-2 re-entry におけるタバコ CDKA タンパク質の活性化	61
2-3-3 同調系における CDKA の挙動	63
2-3-4 NtRBR1 はプロテアソーム依存的に分解される	63
2-3-5 CDKA の T161A 変異は活性を示さない	65
2-3-6 CDKA の Thr-161 のリン酸化は CYCD3;3/CDKA 複合体の活性化に関与する	68
2-3-7 タバコ CAK 遺伝子の単離	73
2-3-8 <i>Arath</i> ;CDKA;1 の Thr-161 のリン酸化は PMII の進行に必要である	75

2-3-9 <i>cdka;I⁻</i> , CDKA;1(T161E)-GFP は不稔となる	76
2-4 考察	78
謝辞	85
参考文献	86

略語

本論文中に以下の略語を用いた.

2,4-D : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

2-ME : 2-mercaptoethanol

BPB : Bromophenol blue

BSA : bovine serum albumin

CaMV : cauliflower mosaic virus

CDS : coding sequence

cDNA : complementary DNA

cks : Cdc28 kinase subunit

CNBr : cyanogen bromide

DEPC : Diethyl pyrocarbonate

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DTT : dithiothreitol

EDTA : Ethylene diamine tetraacetic acid

EGTA : Ethylene glycol tetracetic acid

FBS : fetal bovine serum

GFP : green fluorescent protein

GST : glutathione S-transferase

GUS : β -glucuronidase

IgG : immunoglobulin G

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

kbp : kilo base pair

kDa : kilo dalton

LS : Linsmaier & Skoog

MBP : maltose binding protein

MCS : multiple cloning site

mRNA : messenger RNA

NaOAc : sodium acetate

NP-40 : Nonidet P40

PBS : phosphate buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

PI : propidium iodide

Rnase A : ribonuclease A

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

suc : suppressor of cell cycle block

TBS : Tris buffered saline

Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

Triton X-100 : polyoxy ethylene mono p-tert-octylphenylether

Tween 20 : polyoxyethylene sorbitan monolaurate

X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

緒言

多細胞生物の発生が正常に進行するには、細胞の分裂とそれぞれの器官への分化が協調する必要がある。植物細胞の周りを取り囲む強固な細胞壁は構造を支持すると同時に細胞の運動性を制限してしまう。このため、植物の発生において細胞分裂は大きな役割を担う。植物の形態形成は動物のそれとは異なり、主に胚発生以降に行われる。根や茎、葉や花と言った新しい器官は細胞分裂後の細胞生長と分化により生じる。植物の細胞分裂は茎頂や根端にあるメリステムと呼ばれる分裂組織に限られ、メリステムにおける細胞分裂はさまざまな内的あるいは外的な要因によって時間的空間的に制御されている。これらのシグナルは最終的に細胞周期制御因子に伝えられ、細胞分裂と分化の方向性が決定されると考えられる(Gutierrez, 2005)。

植物と動物ではさまざまな違いがあるものの、すべての生物は細胞から成り立っているという面では同じである。細胞を増やす唯一の方法は、すでに存在する細胞を分裂させることであり、細胞周期の調節機構は酵母から動物に至るまで高度に保存されている。真核生物の細胞周期は、核膜の崩壊や染色体の凝縮といった可視的な変化の起こる分裂期 (M 期: Mitosis) と、それ以外の間期 (interphase) からなる。間期はさらに G1 期 (Gap1), S 期 (Synthesis: DNA 合成期), G2 期 (Gap2) に分けられ、4 相の細胞周期が M→G1→S→G2→M というように一方向のサイクルで進行する。他の真核生物と同じようにサイクリン依存性キナーゼ (CDK; cyclin-dependent kinase) が植物の細胞周期の進行を司っており、特定のサイクリン/CDK 複合体がさまざまな基質をリン酸化し、G1/S 期には DNA 複製を、G2/M 期には有糸分裂を引き起こす。サイクリンは基質を識別し、CDK は基質中のある特定のプロリンに続くセリンあるいはスレオニン残基をリン酸化する役割を担う。

分裂酵母では Cdc2, 出芽酵母では Cdc28 だけが直接的に細胞分裂に関わる CDK として機能し、パートナーであるサイクリンとの結合モチーフに含まれる PSTAIRE のアミノ酸配列が特徴的である。すべての真核生物ではこの PSTAIRE タイプの CDK を少なくとも 1 つ有しており、哺乳類では CDK1/Cdc2, 植物では CDKA/Cdc2a がそれである。動物の CDK1 は主にサイクリン B (cyclin B) と結合し G2/M 期の移行制御に関わるが、植物の CDKA は CYCA, CYCB, および CYCD と相互作用し G1/S 期および G2/M 期において中心的な役割を果たす (Fig.1)。ここで植物における CDK とサイクリンの命名法について整理しておく。CDK では「植物種名; クラス名 (CDKA~CDKG); クローン番号」による表記法が (Joubes et al., 2000), サイクリンにおいても同様に「植物種名; クラス名 (CYCA~CYCH); クローン番号」による表記法が提案されている (Renaudin et al., 1996)。動物では CDK4 および CDK6 が cyclin D と相互作用し、G1/S 期制御を行うが、植物では CDK4, CDK6 の orthologue は存在せず、CDKA が G1/S 期の制御を行っている。これに対して、S-M 期には PPT(A/T)LRE の保存アミノ酸配列を持つ植物独自の CDK(CDKB/Cdc2b)などの複数の CDK が関与

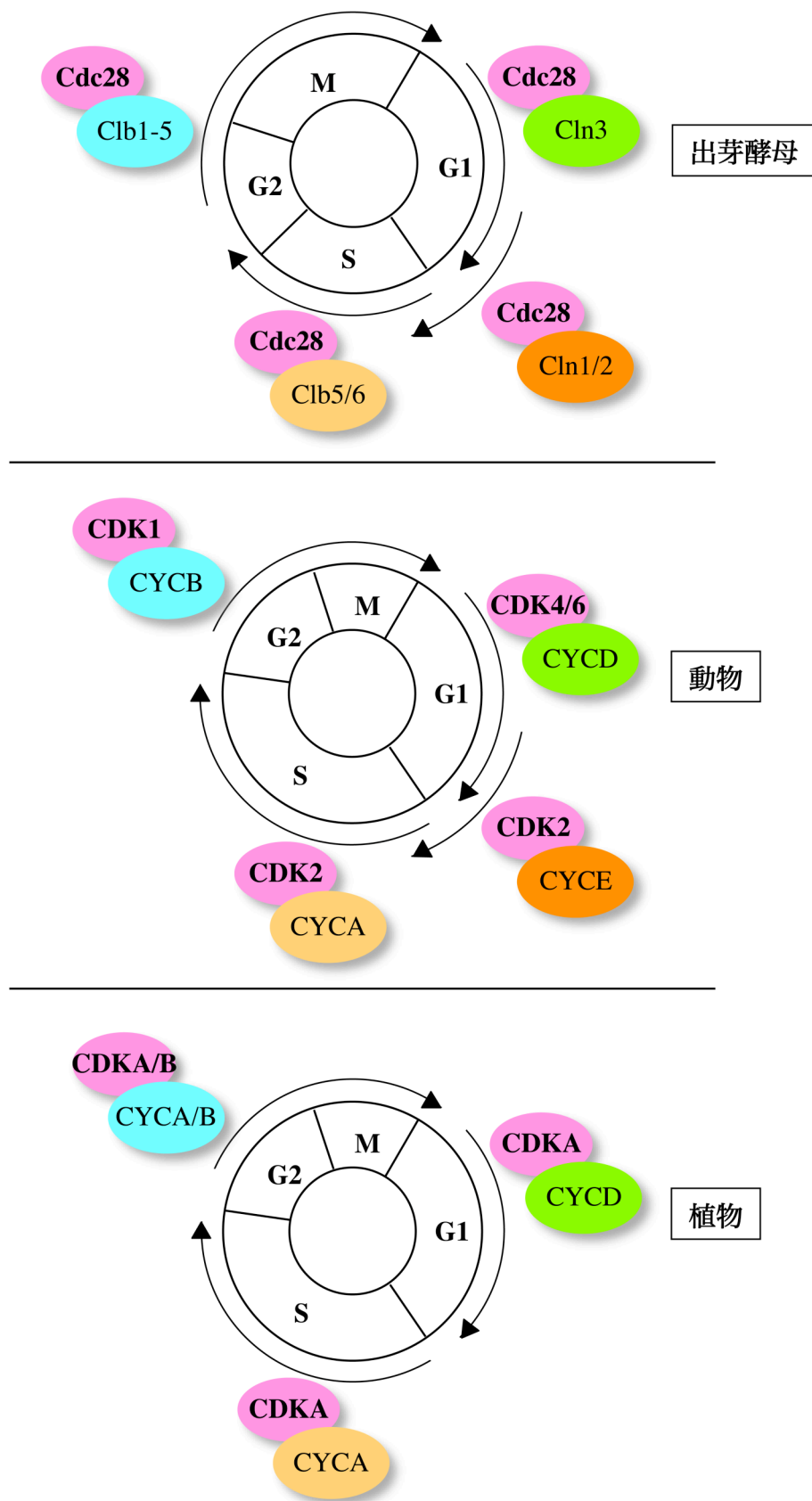


Fig.1 分裂酵母，動物および植物の各細胞周期におけるサイクリン/CDK の組み合わせ
 分裂酵母，動物および植物の細胞周期を制御する主なサイクリン/CDK の組み合わせを示した。酵母

では1つのCDKが、動物および植物では複数のCDKがそれぞれのサイクリンと結合することにより各ステージの移行を制御しているが、植物特有のCDKの存在など、異なる面もある。

表1. シロイヌナズナにおけるCDKの分類

クラス	遺伝子名	サイクリン結合モチーフ
A-type	Arath;CDKA;1	PSTAIRE
B1-type	Arath;CDKB1;1	PPTALRE
	Arath;CDKB1;2	PPTALRE
B2-type	Arath;CDKB2;1	PPTTLRE
	Arath;CDKB2;1	PSTTLRE
C-type	Arath;CDKC;1	PITAIRES
	Arath;CDKC;2	PITAIRES
D-type	Arath;CDKD;1	NVTALRE
	Arath;CDKD;2	NFTALRE
	Arath;CDKD;3	NITALRE
E-type	Arath;CDKE;1	SPTAIRE
F-type	Arath;CDKF;1	YQSAFRE
G-type	Arath;CDKG;1	PLTSLRE
	Arath;CDKG;2	PLTSLRE

している。CDKBはCDKB1, CDKB2の2つのサブグループからなり、シロイヌナズナではCDKB1にはArath;CDKB1;1, Arath;CDKB1;2が、CDKB2にはArath;CDKB2;1, Arath;CDKB2;2が存在する。また15種類のCDK関連遺伝子(CKL; CDK-like)としてCKL1~CKL15が同定されているが、その生理機能に関しては不明の点が多い。CDKBのmRNAおよびタンパク質の蓄積量は細胞周期により制御されている(Fobert et al., 1996; Magyar et al., 1997)。CDKB1はS期からM期にかけて発現がみられるが、CDKB2はG2/M期に一過的に発現がみられる。このようなG2/M期特異的な発現を制御する遺伝子のプロモーター領域にはMSA(M phase-specific activator)とよばれるシスエレメントを持つものがあり、そこに結合する3種類のmyb転写因子が同定されている(Ito et al., 2001)。これらのmyb転写因子は、活性化因子または抑制因子として機能し、CYCA/CDKまたはCYCB/CDK複合体によりリン酸化されることで転写活性が制御されることが示されている(Araki et al., 2004)。また、CDKBタンパク質の蓄積はそれらのmRNAの蓄積に対応しており、CDKBの活性はM期にピークとなる。このように、複数のCDKがそれ

ぞれのサイクリンと結合することにより各ステージの移行を制御している。シロイヌナズナで同定されている CDK を表 1 にまとめた。

一般に CDK の活性化にはサイクリンとの結合を必要とし、サイクリンの合成や分解により活性が制御される。その他にも阻害因子の結合や CDK 自身がリン酸化を受けることによっても活性は制御され、周期性が生み出されている (Fig.2)。タンパク質レベルの活性制御機構は、さまざまなシグナルに応答して細胞周期をコントロールする上で重要な意味を持つ。CDK/サイクリン複合体は、CDK の T-loop と呼ばれる領域中に存在するスレオニン残基のリン酸化により活性化される。実際、CYCB/Cdc2 複合体である MPF (M-phase promoting factor) の活性化のためには、T-loop に保存されたスレオニン残基 (Cdc2 の場合は 161 番目のスレオニン残基: Thr161) のリン酸化が必要である (Sherr and Roberts, 1999)。このリン酸化は CAK (CDK activating kinase) によって触媒される (Solomon, 1993; Peter and Herskowitz, 1994)。これにより CDK は構造変化を起こし、基質を認識できるようになる。CAK はそれ自身がサイクリン/CDK 複合体のひとつであり、動物では CYCH/CDK7/MAT1 の三量体からなる。その発現量や活性は周期を通じてほぼ一定であることから、細胞周期特異的な CDK 活性化制御において CAK は律速因子ではないと考えられている。T-loop のスレオニン残基のリン酸化レベルはその CDK の機能する時期とほぼ一致して変動することから、KAP (CDK-associated phosphatase) (Poon and Hunter, 1995) や PP2C (type 2C protein phosphatase) (Cheng et al., 1999; De Smedt et al., 2002) など、このスレオニン残基特異的なホスファターゼの存在が示唆されている。シロイヌナズナでは、CDKD および CDKF のクラスからなる 4 つの CAK 遺伝子が同定されている (Umeda et al., 2005)。CDKD は Arath;CDKD;1- Arath;CDKD;3 まで存在し、動物の MAT1 に相当する因子は同定されていないものの、CYCH と複合体を形成して動物の CAK と同様の機能を示すが、Arath;CDKF;1 は植物に特異的で *in vitro* においては単量体としても機能する。また、サイクリン/Cdc2 複合体の活性は、Cdc2 のアミノ末端の ATP 結合領域内に保存されている Thr-14 と Tyr-15 のリン酸化により抑制される。特にチロシン残基はほぼ全種の CDK に保存され、抑制的リン酸化の主要な標的となっている。そのリン酸化を担うのは Wee1 キナーゼである。ヒトではこのファミリーとして Wee1 と Myt1 が同定されており、Wee1 がチロシンを、Myt1 がチロシンとスレオニンをリン酸化する。さらに Wee1 の上流には Wee1 を特異的にリン酸化することで Wee1 のキナーゼ活性を負に制御するセリン/スレオニン/チロシントタンパク質キナーゼの Nim1 (Cdr1) が存在する。Wee1/Myt1 による抑制的リン酸化はチロシン・スレオニン残基の両方に特異的な Cdc25 ホスファターゼにより脱リン酸化され、Cdc2 は活性型に変換される。Cdc25 は G2/M 期のチェックポイントに関与し、DNA 損傷などのセンサーとして機能している。CDKA の Tyr-15 をリン酸化すると考えられる植物の Wee1 キナーゼはシロイヌナズナやトウモロコシで同定されているが (Sun et al., 1999; Sorrell et al., 2002)、現在までにシロイヌナズナで

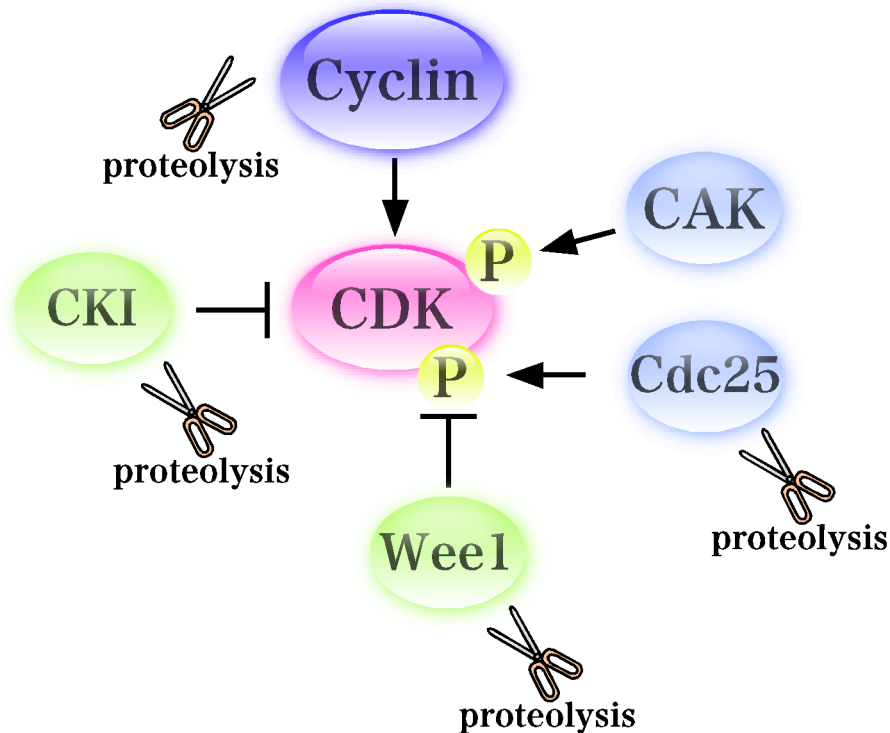


Fig.2 CDK の活性制御機構

CDK の活性化にはサイクリンの結合と CAK によるリン酸化が必要である。CDK 阻害因子(CKI)の結合あるいは Wee1 によるリン酸化によって CDK 活性は抑制される。抑制的リン酸化は Cdc25 によって脱リン酸化される。また、それぞれの CDK 活性調節因子はユビキチン-プロテアソーム経路により分解による制御を受ける。

は CDC25 に対して明確な相同性を示す遺伝子は同定されていない (Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。ヒトの CDC25 に対する構造的な相同性を持つシロイヌナズナの CDC25 タンパク質は、シロイヌナズナから精製された CDKA 複合体のキナーゼ活性を上昇させる (Landrieu et al., 2004)。しかし、この CDC25 様のチロシン脱リン酸化酵素はヒ酸塩還元促進に寄与しているとの報告もあり、未だその機能は明確ではない (Bleeker et al., 2006)。一方、チロシンホスファターゼ様ファミリータンパク質をコードするシロイヌナズナ PASTICCINO2 (PAS2) は実際にはホスファターゼ活性を示さず、リン酸化された Arath;CDKA;1 の Tyr-15 を保護して Arath;CDKA;1 のキナーゼ活性を低く維持する。したがって、PAS2 の欠損は Arath;CDKA;1 の脱リン酸化と細胞分裂の促進を起こすことになり、植物特有な制御系が明らかにされた (Da Costa et al., 2006)。

さらにサイクリン/CDK 複合体の活性は多重に制御され、CDK インヒビター (CKI: CDK inhibitor) によっても制御される。CKI は、サイクリン/CDK 複合体に直接結合して CDK 活性を阻害するタンパク質の総称で、現在までに動物では CDK 特異性の低い Cip/Kip ファミリー (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) と cyclin D/CDK4・CDK6 に特異的

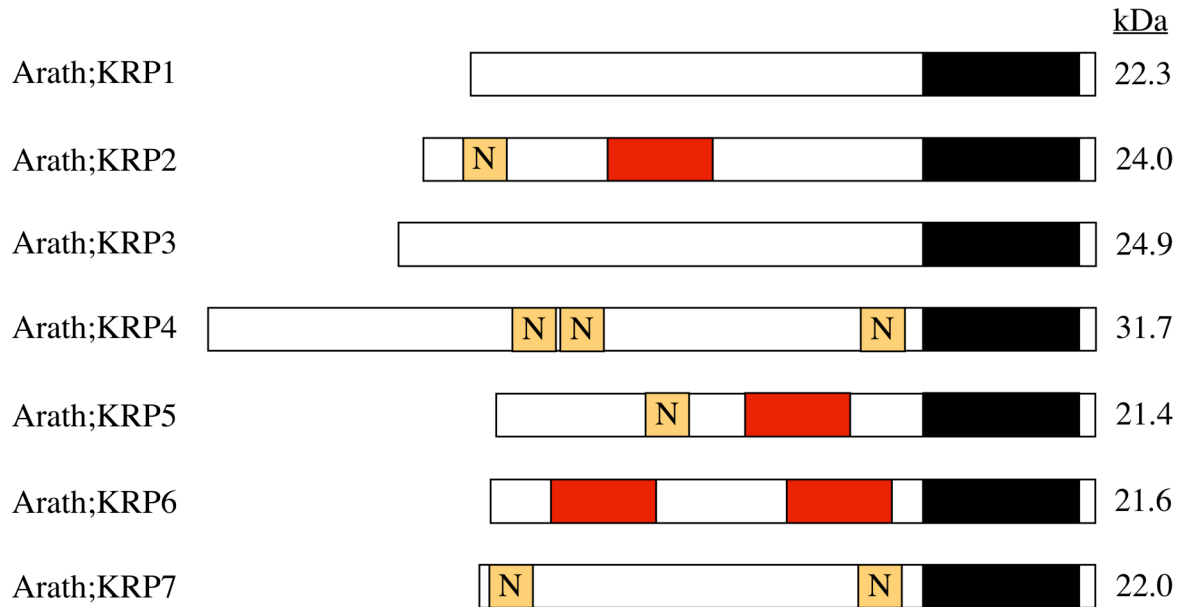


Fig.3 シロイヌナズナの CDK 阻害因子 KRP の模式図

シロイヌナズナ KRP の一次構造の特徴を示した。動物の p27^{Kip1} との相同領域を黒、PEST 配列を赤で示した。N は核移行シグナルを示す。P27^{Kip1} との相同性は CDK 阻害領域に限られ、全体としての相同性は低い。

な INK4 ファミリー (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}) が知られており、細胞または組織により作用する CKI が異なっている。INK4 ファミリーは主に G1/S 期における CDK2, CDK4, CDK6 の活性制御に関与しており、さまざまな増殖抑制シグナルによって発現を制御されている。シロイヌナズナで CKI は 7 種類単離されており、p27^{Kip1} との相同性から KRP (Kip-related protein; KRP1-KRP7) または ICK (interactors of cdc2 kinase) と名付けられている (Fig.3)。*in vitro* の解析より全ての KRP が CYCD2/CDKA と結合するが、その阻害効果は異なる (Nakai et al., 2006)。KRP1 はストレス応答性ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) によって誘導される (Wang et al., 1998)。また、葉の発生において ICK2/KRP2 は M 期における CDKA の活性を阻害することで、endoreduplication の開始を制御している (Verkest et al., 2005)。植物体でのそれぞれの機能はまだ不明の点が多い。このようにサイクリン/CDK 複合体の活性は、リン酸化によるカスケードを中心に、さまざまな因子との相互作用により厳密に制御されている (Pines, 1999)。また、植物に特異的な CDK 阻害因子として、SIAMESE (SIM) が報告されている (Churchman et al., 2006)。SIM は核に局在する 14 kDa のタンパク質で、サイクリン結合モチーフおよび ICK/KRP 中に存在するモチーフを持ち、CYCD と CDKA;1 に結合する。SIM の過剰発現は成長速度の低下、細胞のサイズの拡大および endoreduplication を引き起こし、有糸分裂と核内倍加の移行に重要な機能を担っていると考えられている。

植物もまた配列の相同性や発現様式によって分類されたさまざまなタイプのサイクリンを有している(Renaudin et al., 1996; Oakenfull et al., 2002; Vandepoele et al., 2002; Wang et al., 2004; Gutierrez, 2005). 他の生物種に比べ, 植物は多くのサイクリンを有する. シロイヌナズナではゲノムサイズが小さいにも関わらず少なくとも 32 種類のサイクリンが存在する. 動物のサイクリンとの機能的な相同性から命名されており, CYCA は 10 種, CYCB は 11 種, CYCD は 10 種, CYCH は 1 種よりなる (表 2). さらに 17 種類のサイクリン関連遺伝子があり, それぞれ, C, P, L, T タイプに分類されている(Renaudin et al., 1996; Wang et al., 2004). 大きく分けると, CYCD は G1/S 期, CYCB は G2/M 期に働くのに対し, CYCA は広く S-M 期の細胞周期制御に関与している(Mironov et al., 1999; Potuschak and Doerner, 2001). D タイプサイクリンは細胞の外的要因あるいは発生・分化のシグナルと細胞周期とを結ぶ仲介因子として考えられており, CYCA と CYCB は細胞周期依存的な発現を示すのに対して, CYCD の発現はショ糖や植物ホルモンに依存している(Oakenfull et al., 2002; Dewitte and Murray, 2003; Gutierrez, 2005). 10 種類の CYCD は CYCD1 から CYCD7 のサブグループに分類され, その内 CYCD3 は 3 種, CYCD4 は 2 種存在する(Vandepoele et al., 2002). CDKA に結合するサイクリンを考えると, シロイヌナズナの知見から CYCD2 および CYCD3 が *Arath;CDKA;1* と結合し, 活性型複合体を形成する(Healy et al., 2001). G1 期サイクリンである *CYCD2 (Arath;CYCD2;1)* はショ糖により転写誘導され, *CYCD3 (Arath;CYCD3;1)* はショ糖およびサイトカイニンによりその発現量が制御されることが報告されており(Riou-Khamlichi et al., 1999; Riou-Khamlichi et al., 2000), *CYCD2* タンパク質は細胞が増殖を停止した状態でも安定に存在するが, CDKA とは複合体を形成せず, 低いキナーゼ活性の状態を維持している. 現在のところ, ショ糖の添加により *CYCD2* が CDKA と複合体を形成して活性化する機構は未解明の状態である. 動物では CDKA の orthologue である CDK1 (*Cdc2*) は cyclin D と結合せず, 異なるタイプの CDK (CDK4 あるいは CDK6) が複合体を形成する. *CYCD1* もまた CDKA と結合し, G1/S 期と S 期から G2 期の進行を促進することによってタバコ BY-2 細胞の細胞周期を速める(Koroleva et al., 2004). 近年, *Arath;CDKA;1* は *Arath;CYCA2;3* と結合して核内に存在し, 核内倍加における核相の制御に働いていることが報告された(Imai et al., 2006). 酵母 two-hybrid 解析では, CDKA は *Medicago sativa* 由来の A2 タイプのサイクリンと結合する報告がある(Roudier et al., 2000).

タンパク質分解も細胞周期制御において重要な位置を占める. 他の生物種でも報告されているように, 植物のサイクリンもタンパク質分解による制御を受ける. CYCA および CYCB はタンパク質分解に関わる D-box (destruction box)配列を持つ(Renaudin et al., 1996; Genschik et al., 1998). タバコ *Nicta;CYCB1;1* は細胞周期依存的にプロテアソーム経路により分解される(Criqui et al., 2000). また, シロイヌナズナ *Arath;CYCD3;1* もプロテアソーム依存的に分解される非常に不安定なタン

表2. シロイヌナズナにおけるサイクリンの分類

クラス	遺伝子名	モチーフ ^a
A1	Arath;CYCA1;1	LVEVxEEY
	Arath;CYCA1;2	LVEVxEEY
A2	Arath;CYCA2;1	LVEVxEEY
	Arath;CYCA2;2	LVEVxEEY
	Arath;CYCA2;3	LVEVxEEY
	Arath;CYCA2;4	LVEVxEEY
A3	Arath;CYCA3;1	LVEVxEEY
	Arath;CYCA3;2	LVEVxEEY
	Arath;CYCA3;3	LVEVxEEY
	Arath;CYCA3;4	LVEVxEEY
B1	Arath;CYCB1;1	HxRF
	Arath;CYCB1;2	HxRF
	Arath;CYCB1;3	HxRF
	Arath;CYCB1;4	HxRF
	Arath;CYCB1;5	
B2	Arath;CYCB2;1	HxRF
	Arath;CYCB2;2	HxRF
	Arath;CYCB2;3	HxRF
	Arath;CYCB2;4	HxRF
	Arath;CYCB2;5	
B3	Arath;CYCB3;1	HxRF
D1	Arath;CYCD1;1	LxCxE
D2	Arath;CYCD2;1	LxCxE
D3	Arath;CYCD3;1	LxCxE
	Arath;CYCD3;2	LxCxE
	Arath;CYCD3;3	LxCxE
D4	Arath;CYCD4;1	LxCxE
	Arath;CYCD4;2	no LxCxE
D5	Arath;CYCD5;1	LFLCxE
D6	Arath;CYCD6;1	no LxCxE
D7	Arath;CYCD7;1	LxCxE
H	Arath;CYCH;1	

^aHxRF: CYCB に特徴的な配列, LxCxE: RBR との結合配列, LVEVxEEY: CYCA に特徴的な配列.

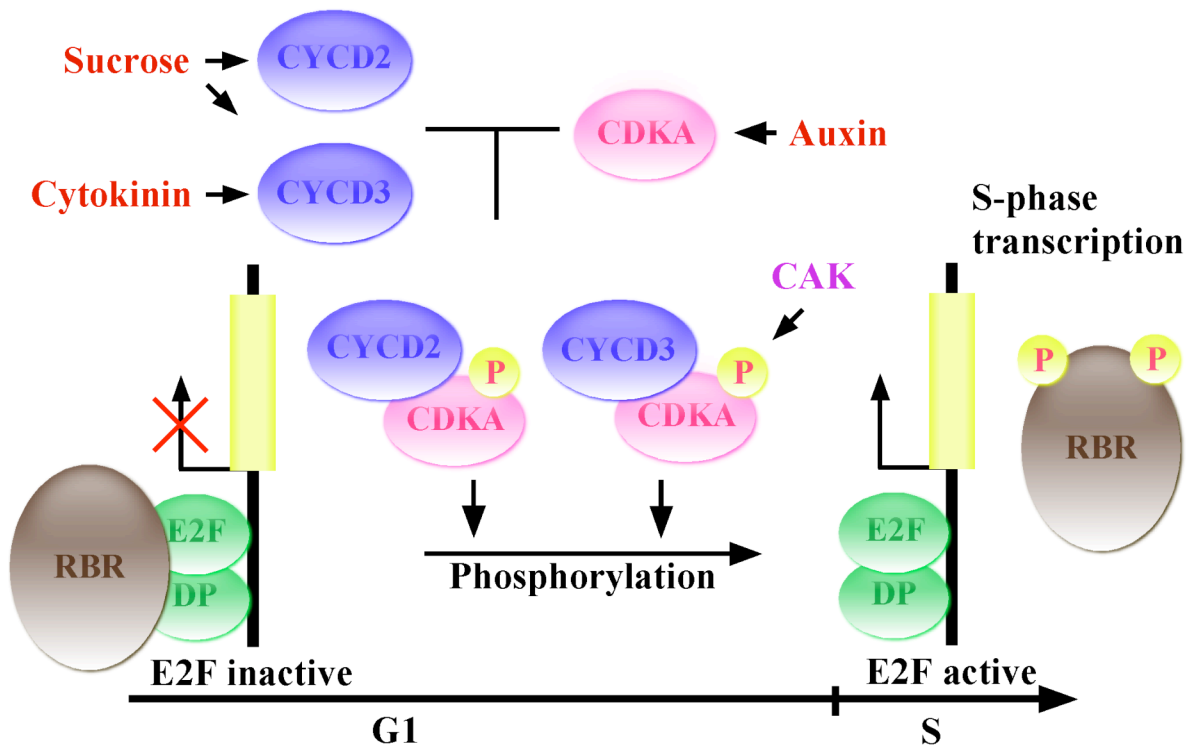


Fig.4 植物の G1/S 期細胞周期制御機構

植物の G1/S 期制御のモデル図を示した. CYCD2 および CYCD3 はショ糖あるいはサイトカイニンにより誘導され, CDKA と複合体を形成する. 転写因子である E2F と DP はヘテロ二量体を形成して S 期制御遺伝子群のプロモーター上に結合しているが, G1 期初期では RBR が結合してその活性を抑制している. CYCD/CDKA 複合体により RBR はリン酸化されると, E2F より解離し細胞周期は S 期に進行する.

パク質で, SCF サブユニットの変異体では安定化している(Lechner et al., 2002; Planchais et al., 2004). CYCD の多くはプロリン, グルタミン酸, セリンおよびスレオニン残基に富む PEST 配列を含むことから, 動物の D タイプサイクリンと同様の分解経路による制御を受けると考えられている. この他に ICK2/KRP2 も 26S プロテアソームを介して分解される(del Pozo et al., 2002; Verkest et al., 2005).

植物における細胞分裂の開始は, 動物の G1/S 期の制御と強く相関があると考えられている (Fig.4). 動物の G1/S 期制御では, E2F (adenovirus E2 promoter-binding factor) と DP (DNA-binding heterodimerization partner protein) のヘテロ二量体が DNA 合成関連因子などの S 期特異的に機能する遺伝子群の転写を活性化することが S 期への進行に必須である. pRb (retinoblastoma protein) は G1 期初期から中期にかけて低リン酸化状態にあり, E2F/DP 複合体に結合し, その転写活性を負に制御している. G1 後期に cyclin D/CDK4 または cyclin D/CDK6 複合体によりリン酸化され, さらに cyclin E/CDK2 複合体によるリン酸化を受けると pRb は E2F/DP 複合体より解離する. その結果, E2F/DP 複合体による S 期進行に必須な遺伝子群の転写

が活性化され、細胞周期は G1 期から S 期へと移行する。このような cyclin D から pRb を介して E2F/DP に至る経路は Rb 経路と呼ばれ、G1/S 期制御の中心に位置する。シロイヌナズナでは、サイクリンや CDK および KRP などはそれぞれ複数存在するのに対して、pRb 関連遺伝子 (RBR; Rb-related protein) は 1 つだけしかない。RBR も pRb と同様に E2F との結合に関与する A/B pocket ドメインを有する。CYCD はそのアミノ末端側に存在する LxCxE モチーフを介して RBR に結合する。RBR にも複数の推定リン酸化部位が存在するが、細胞周期に応じたリン酸化あるいは脱リン酸化の制御に関して、初期段階としての報告はあるが(Kawamura et al., 2006)、詳細な解析はなされていない。シロイヌナズナの RBR 欠損株は不稔性で配偶体致死となる。これは受精前の雌性配偶体での有糸分裂を停止できないためで、その結果、胚嚢では過剰な核分裂がみられる。さらにこの時、受精後胚乳となる中央細胞核は自律的に胚乳へと分化する。すなわち、RBR は未受精の雌性配偶体の発達を抑制する働きを持つ(Ebel et al., 2004)。また、根の幹細胞維持にも働き、その分化を抑制している(Wildwater et al., 2005)。

シロイヌナズナは 6 つの E2F (E2Fa, E2Fb, E2Fc, E2Fd/DEL2, E2Fe/DEL1, E2Ff/DEL3) と 2 つの DP (Dpa, DPb) を持つ(Shen, 2002) (Fig.5)。E2Fa と E2Fb は転写活性因子として機能し、これらを Dpa と過剰発現させると細胞分裂を促進する(De Veylder et al., 2002; Magyar et al., 2005)。これに対し、E2Fc は transactivation ドメインを欠き、E2F 応答遺伝子の抑制因子として機能し、その過剰発現は細胞分裂を阻害する(del Pozo et al., 2002)。E2Fc はまた 26S プロテアソームを介して分解される光に依存したタンパク質レベルでの制御を受ける(del Pozo et al., 2002)。E2F と DP はそれぞれ 1 つの DNA 結合ドメインしか持たないため、標的配列への結合にはヘテロ二量体化する必要がある。しかし、E2Fd/DEL2, E2Fe/DEL1, E2Ff/DEL3 は 2 つの DNA 結合ドメインを有するため、DP 非依存的に単量体として標的配列へ結合できるが、一方で E2F/DEL は transactivation ドメインを持たないことから、転写抑制因子として機能すると考えられている(Mariconti et al., 2002)。また、RBR との結合モチーフを持たないことから、その制御が RBR に依存しないことも特徴である。植物で同定されている主要な細胞周期制御因子を表 3 にまとめた。

本研究において第 1 章では、植物ホルモンであるオーキシンが細胞周期に及ぼす影響を解析した。第 2 章では、植物 CDKA の細胞周期におけるリン酸化の役割について解析した。

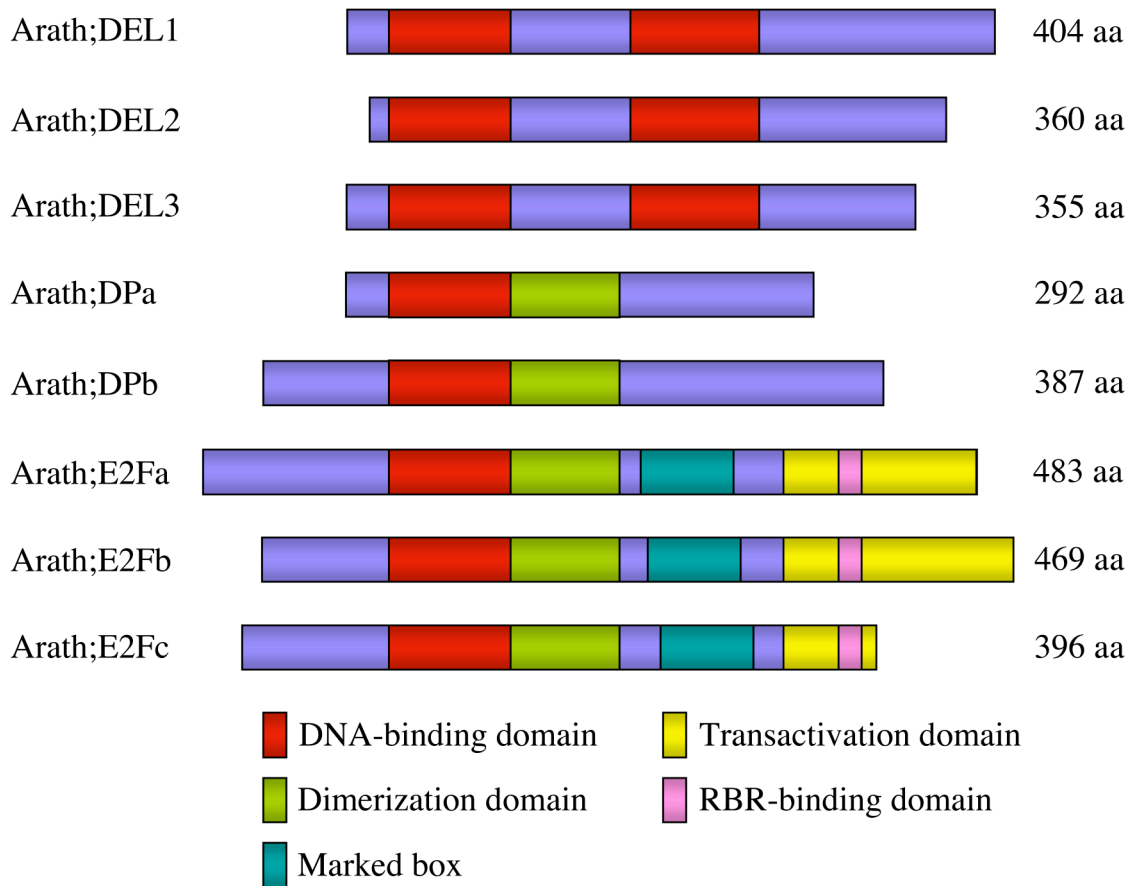


Fig.5 シロイヌナズナの E2F ファミリータンパク質の模式図

シロイヌナズナ E2F および DP の一次構造の特徴を示した。保存されたドメインの違いから、8つのシロイヌナズナ E2F ファミリータンパク質はそれぞれ E2F, DP および DEL に分類されている。

表 3. 植物における主要な細胞周期制御因子

制御因子	遺伝子名 ^a	機能
CDK	Arath;CDKA;1~Arath;CDKG;2	サイクリンと複合体を形成する触媒サブユニットで, キナーゼ活性を示す.
CYC	Arath;CYCA1;1~Arath;CYCH;1	CDK と複合体を形成する調節サブユニット.
KRP/ICK	Arath;KRP1~Arath;KRP7 または ICK1~ICK7	サイクリン/CDK 複合体に結合して活性を阻害する.
RBR	Arath;Rb	転写因子 E2F に結合して転写活性を抑制する.
E2F/DEL	E2Fa, E2Fb, E2Fc, E2Fd/DEL2, E2Fe/DEL1, E2Ff/DEL3	DP とヘテロ二量体を形成し, 主に G1/S 期の制御遺伝子の転写を制御する.
DP	Dpa, DPb	E2F とヘテロ二量体を形成し, 主に G1/S 期の制御遺伝子の転写を制御する.
WEE1	Arath;WEE1	CDK をリン酸化して活性を抑制する.
CDC25	Arath;CDC25	CDK を脱リン酸化して活性化化する.
PAS2	PASTICCINO2	CDK のリン酸化された Tyr-15 を保護して, その活性を低く維持する.
SIM	SIAMESE	植物特異的な CDK 阻害因子で, 有糸分裂と核内倍加の移行を制御する.
CAK	Arath;CDKD;1 ~ Arath;CDKD;3, Arath;CDKF;1	CDKD は CYCH と複合体を形成し, CDKF は単独で CDK をリン酸化して活性化する.
Myb	MYB3R1~MYB3R5	G2/M 期特異的遺伝子の転写を制御する転写因子.

^aシロイヌナズナの遺伝子を代表として表記した.

第 1 章 オーキシンが細胞周期に及ぼす影響の解析

1-1 序論

真核生物の細胞周期は、セリン/スレオニンタンパク質キナーゼの一種である CDK とその調節因子であるサイクリンによって制御されている(Pines, 1999). 植物においては A-type と B-type の CDK が直接的に細胞周期制御を担っている(Joubes et al., 2000). CDKA はサイクリンとの結合領域に PSTAIRE モチーフを持ち, 細胞周期を通じて発現がみられる. CDKB はサイクリンとの結合モチーフ配列 PPT(A/T)LRE を基準に CDKB1, CDKB2 の 2 つのタイプに分けられる. CDKB は植物特異的であり, G2 期にその発現が認められる. *CDKB* と異なり, *CDKA* は酵母の *cdc2/cdc28* 温度感受性変異体を相補することから, *cdc2/CDC28* の機能的な homologue であると考えられている. CDKB は CDK 阻害因子のリン酸化を介して endoreduplication の制御にも重要な働きをしていると予測されている. KRP はリン酸化を受けると, CDKA との結合が阻害され, プロテアソーム経路により分解される(Verkest et al., 2005).

植物は周囲の環境に柔軟に応答して生長や発達の度合いを調節しており, 多くの植物細胞は栄養の欠乏や分化シグナルに応答して, 細胞周期が G1 期で停止する. また, 温度, 二酸化炭素濃度, 光条件などの変化に応答して, 主に G1 期が長くなることから, 細胞周期への移行制御は G1 期に決定されると考えられる. 植物の生長と発生は主に植物ホルモンにより制御されている. D タイプサイクリンは細胞の外的要因あるいは発生・分化のシグナルと細胞周期とを結ぶ仲介因子として考えられており, その発現はショ糖や植物ホルモンに依存しており(Oakenfull et al., 2002; Dewitte and Murray, 2003; Gutierrez, 2005), 増殖シグナルの標的の一つとして細胞の運命を決定する上で極めて重要な位置を占める. オーキシンは天然あるいは合成の植物ホルモンの一群で, 細胞の成長と分裂に深く関与する(Woodward and Bartel, 2005). 天然のオーキシンはもっぱら IAA で, トリプトファンまたは非トリプトファンを經由して生じた単純な構造の化合物であり, 重力屈性や葉の脱離, 果実の発達など多くの発生過程にも影響する. オーキシン早期誘導性の遺伝子は主に GH3 ファミリー, SAUR (small auxin upregulated RNAs) ファミリー, Aux/IAA (auxin/indole-3-acetic acid) ファミリーに分類され, それらのプロモーター上には AuxRE (auxin-response element)が存在する(Hagen and Guilfoyle, 2002). この内オーキシンのシグナル伝達において中心的な役割を担う Aux/IAA 遺伝子は, オーキシン処理後に素早く発現が誘導される. Aux/IAA 転写調節因子のオーキシン依存的な分解に関する研究は進んでいる. オーキシンは直接 TIR1 に結合することで, SCF^{TIR1} ユビキチンリガーゼと Aux/IAA タンパク質との会合を制御しており, オーキシン受容体として機能すると考えられている(Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005). TIR1 はそ

のアミノ酸配列に Skp1 (suppressor of kinetochore protein 1) と相互作用する F-box モチーフを有する F-box タンパク質で、SCF 複合体を形成する。SCF は Skp1, Cullin, F-box タンパク質の頭文字をとったもので、Cullin と二量体を形成する Rbx1 を加えた四量体で E3 ユビキチンリガーゼ複合体を構成している。シロイヌナズナでは F-box タンパク質が約 700 種類存在し、他の生物種に比べ非常に多いことから、植物におけるタンパク質分解による制御の普遍的な存在が示唆されている。Aux/IAA タンパク質は ARF とヘテロ二量体を形成してオーキシン誘導性遺伝子のプロモーター上に存在し、それらの転写を抑制している。オーキシンは Aux/IAA タンパク質の分解を促進することで ARF による転写が活性化される。オーキシンが細胞分裂と細胞の生長さらには分化の過程でどのように作用しているのか、その分子機構は未解明な部分が多い。培養細胞や葉の外植片では低濃度のオーキシンにより細胞の伸長が、比較的高濃度のオーキシンにより細胞分裂が促進される (Bhalerao and Bennett, 2003)。このようなオーキシン濃度の違いを細胞はどのように感知し、分裂あるいは伸長するのか？ニンジンの懸濁細胞でオーキシンを欠乏させると、G1 で細胞周期が停止し (Nishi et al., 1977)、細胞が伸長すること (Lloyd et al., 1980) が報告されているが、現時点ではオーキシンのシグナルがどのように細胞周期制御系に伝わり、細胞分裂に向かうかの知見が乏しい。転写因子である E2F は高等真核生物の細胞周期制御において重要な要素の一つであるが (Attwooll et al., 2004)、Magyar らは BY-2 細胞においてシロイヌナズナの *AtE2Fb* を過剰発現させ、細胞周期の進行が速くなること、オーキシンの添加なしでも細胞分裂を促すことを報告した (Magyar et al., 2005)。シロイヌナズナの *Arath;CDKA;1* は、オーキシンにより転写レベルで誘導されるが (Hemerly et al., 1993)、前述のように CDKA 複合体の活性化には翻訳後のリン酸化や他の制御因子との相互作用など多重の制御が関与する (Rossi and Varotto, 2002)。

本研究ではオーキシンが細胞周期制御系に与える影響を解析するため、タバコ由来の BY-2 細胞を実験に用いることにした。BY-2 細胞の増殖には S 期に先行して、CDKA の活性化が必須であるが (Sorrell et al., 2001)、CDKA の活性制御機構は現時点でもほとんど解明されていない。CDKA は増殖期にある BY-2 細胞で優先的に発現しているものの、mRNA の蓄積量に明確な周期変化はない。また、同調培養系を用いた研究より、CDKA タンパク質の蓄積量が周期を通じて一定であるのに対して、ヒストン H1 に対するキナーゼ活性は G1/S 期と G2/M 期に 2 つのピークをもつ周期変動を示す報告があり (Nakagami et al., 2002)、サイクリン/CDKA 複合体のタンパク質レベルでの制御が示唆される。われわれの研究グループではすでにタバコより CYCD, CDKA, E2F, RBR などの遺伝子を単離しており、BY-2 細胞はアフィディコリン/プロピザミド処理により高度な同調化が可能であることから (Nagata et al., 1992)、細胞周期研究を行う上で有利である。また培地へのホルモンの添加は合成オーキシンである 2,4-D のみであることも本研究において BY-2 細胞を用いる利点である。

1-2 材料と方法

1-2-1 使用植物

研究材料に、タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2; BY-2) を用いた。

1-2-2 使用菌株

遺伝子構築を行う際の大腸菌宿主として、*Escherichia coli* DH5 α (F, Φ 80*dlacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*)を使用した。組み換えタンパク質を発現させる際の大腸菌宿主として、BL21(DE3)pLysS (*E. coli* B, F, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(rB-mB⁻), *gal*, λ (DE3)[pLysS, Cam])またはTB1 (F⁻, *ara*, Δ (*lac-proAB*), [Φ 80*dlac* Δ (*lacZ*)M15], *rpsL*(StrR), *thi*, *hsdR*)を用いた。

1-2-3 実験試薬, 酵素

試薬は特に指定の無い限り、和光純薬工業、ナカライテスク、Sigma のものを用いた。制限酵素および修飾酵素は、東洋紡、宝酒造、ニッポンジーン、NEB のものを使用した。

1-2-4 大腸菌の形質転換

1-2-4-1 コンピテントセルの作製

大腸菌 DH5 α 株を 2 ml の LB 培地 (Bacto-trypton 10 g/l, Yeast extract 5 g/l, NaCl 10 g/l) で 37°C にて一晩培養し, 200 ml の SOB 培養液 (Bacto-tryptone 20 g/l, Yeast extract 5 g/l, NaCl 0.584 g/l, KCl 0.186 g/l オートクレーブ後, 別にオートクレーブ滅菌した 2 M Mg 溶液 (1 M MgSO₄, 1 M MgCl₂) を 1 l に対して 10 ml を使用直前に加えた) を用いて 25°C で OD₆₀₀ が 0.6 になるまで培養した。培養液を氷中で 10 分間冷却した後, 遠心 (3000 rpm, 15 min, 4°C ; TLA-10,500 ローター (Beckman)) して集菌し, 70 ml の氷冷した TB 緩衝液に懸濁して氷中に 10 分間放置した。遠心 (3000 rpm, 15 min, 4°C ; TLA-10,500 ローター) 後, 菌を再び 32 ml の氷冷した TB 緩衝液に懸濁し, 2.4 ml の DMSO を混ぜながらゆっくりと加え, 氷上に 10 分間放置した。100 μ l ずつ 1.5 ml エッペンドルフチューブに分注し, 液体窒素で急速に凍結して -80°C で保存した。

- TB 緩衝液: 10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂·2H₂O, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂·4H₂O, pH 6.7

1-2-4-2 5分法

抗生物質がアンピシリン，クロラムフェニコールの時に行った．-80°Cに保存したコンピテントセルを氷中で解凍後，10 µl 以下の DNA 溶液を加え，氷中に5分放置した．100 µl を適当な抗生物質を含む LB 寒天培地（1.5%(w/v) 寒天末）上に塗抹し，37°Cで1晩培養した．アンピシリンは100 mg/l，クロラムフェニコールは35 mg/l の割合でを加えた．

1-2-4-3 通常法

抗生物質がカナマイシン，スペクチノマイシンの時に行った．-80°Cに保存したコンピテントセルを氷中で解凍後，10 µl 以下の DNA 溶液を加え，氷中に30分放置した．42°Cに60秒間置き，直ちに氷中に戻し5分間置いた．900 µl の LB 培地を加え，37°Cで1時間振とう培養した．100 µl を適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上に塗抹し，37°Cで1晩培養した．カナマイシンは50 mg/l，スペクチノマイシンは100 mg/l の割合でを加えた．

1-2-5 プラスミド DNA の少量調製

プラスミド精製用キット，Mag Extractor（東洋紡）を使用した．方法はキットに添付のプロトコールに従った．大腸菌は2 ml の 2×YT 培地（Bacto-tryptone 16 g/l，Yeast extract 10 g/l，NaCl 5 g/l）中で培養したものをを用いた．

1-2-6 DNA の電気泳動および DNA 断片の回収

0.5 mg/ml エチジウムブロマイドを含む0.8%アガロースを使用した．試料に1xとなるように6xLoading buffer を加えた．泳動装置はMupid-α（アドバンス）を用い，TAE buffer（40 mM Tris-acetate，1 mM EDTA）中，定電圧100Vで泳動を行った．

アガロースゲルからの DNA 断片の回収は MinElute gel Extraction Kit（Qiagen）を用いて行った．方法はキットに添付のプロトコールに従った．

・6xGel-Loadingbuffer: 0.3%(w/v) Orange G, 15%(w/v) Ficol(R) PM400, 10mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH7.5

1-2-7 塩基配列の決定

DNA の塩基配列の決定は，BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）および ABI PRISM 3100 シーケンサー（Applied Biosystems）を用いた．

1-2-7-1 ポリメラーゼ反応

0.2 ml マイクロチューブに150 ngの鋳型プラスミドDNA，1 µl の Ready Reaction

Premix, 3.5 μ l の BigDye Sequencing Buffer, 1 μ l の 1.6 pmol プライマー, 13.5 μ l の滅菌水を加え, 全量を 20 μ l として反応を行った. PCR は GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて行った. 反応条件を以下に示す.

・ (95°C, 5 min)x1 cycle, (95°C, 10 sec, 50°C, 10 sec, 60°C, 4 min)x25 cycles, 4°C

1-2-7-2 サンプルの調製

ポリメラーゼ反応の終わった反応液を 1.5 ml マイクロチューブに移し, 2 μ l の 3 M NaOAc, pH5.3, 50 μ l の 100%エタノールを加え, 攪拌後遮光して室温に 15 分間放置した. その後遠心分離 (15000 rpm, 20 min, 4°C) し, 沈殿を 100 μ l の 70% エタノールで洗浄した後, 減圧乾燥した. 20 μ l の Hi-Dye Formamide に溶解し, ABI PRISM 3100 シーケンサーにて泳動した.

1-2-8 タバコ培養細胞 BY-2 の維持

BY-2 細胞は, 改変 LS 培地 (modified Linsmaier & Skoog medium) (MS 無機塩, 3%ショ糖, 0.2 mg/ml 2,4-D, 1 mg/l チアミン塩酸塩, 100 mg/l ミオイノシトール, pH 5.8) 中, 暗所, 27°C, 130 rpm で振とう培養し (BR-3000, Taitec), 一週間ごとに培養液の 2 ml を 300 ml の三角フラスコに入れた 95 ml の新鮮な培地に植え継いだ.

1-2-9 オーキシンあるいはショ糖欠乏培地への継代

培養 7 日目の細胞懸濁液を口径 11 μ m のナイロンメッシュ (Nylon net filters; Millipore) をはさんだ濾過器 (Nalgen) にあけ培地を吸引して取り除いた. 400 ml の新しい改変 LS 培地を濾過器に加え, 駒込ピペットを用いて 25 回ピペッティングした後, 培地を吸引して除いた. この操作を 5 回繰り返して, 2 l の 2,4-D およびショ糖を含まない改変 LS 培地を使って細胞を洗った. 洗浄した細胞 6 g を 300 ml 三角フラスコ中, 95 ml の新鮮な改変 LS 培地あるいは 2,4-D を含まない改変 LS 培地あるいはショ糖を含まない改変 LS 培地に移し, 暗所, 27°C, 130 rpm で振とう培養した. 細胞は 50 ml チューブ中に取り, 少量の培地に懸濁してそれぞれのフラスコに移した. 移した直後を 0 時間として, 経時的にサンプリングを行った.

培養 2 日目の細胞懸濁液 10 本を上記の通り洗浄した後, 洗浄した細胞 5 g を 300 ml 三角フラスコ中, 95 ml の 2,4-D を含まない改変 LS 培地 2 本に移し, 暗所, 27°C, 130 rpm で 1 日振とう培養した. 洗浄操作を同様に行い, 洗浄した細胞 5 g を 300 ml 三角フラスコ中, 95 ml の新鮮な改変 LS 培地あるいは 2,4-D を含まない改変 LS 培地に移し, 暗所, 27°C, 130 rpm で振とう培養した.

1-2-10 細胞数および新鮮重量の測定

1-2-10-1 細胞数の測定

先端を切断した 1 ml 用のチップを用いて、250 μ l の培養液を 750 μ l の 4x プロトプラスト化液に加え、37°C で 1 時間消化した後、血球計算盤で細胞数を数えた。

・4x プロトプラスト化液；1.33%(w/v) cellulase Onozuka RS (Yakult Honsha) , 0.13%(w/v) pectolyase Y-23 (Kikkoman) , 0.53 M Mannitol, pH 5.5

1-2-10-2 新鮮重量の測定

先端を切断した 1 ml 用のチップを用いて、1 ml の培養液をあらかじめ重さを計量した CellTrics Disposable Filter (20 μ m ; Partec) に移し、1.5 ml マイクロチューブにのせ、室温で 2,000 rpm, 1 分間遠心して培地を除き、Filter の重さを量り細胞の重さを求めた。

1-2-11 Mitotic Index の測定

Mitotic index (MI) は細胞をオルセイン染色液 (1%(w/v) Orcein, 50%(v/v) Propionic Acid, 50%(v/v) Lactic Acid) に浸し、核を染色することで求めた。三角フラスコを静置し、底に沈んだ細胞を 50 μ l 取り、1.5 ml のマイクロチューブに入れた 150 μ l のオルセイン染色液に加え、1 分間マイクロチューブミキサー (Tomy) を用いて攪拌した。その後室温で 1 日静置し、核を染色した。顕微鏡を用いておよそ 500 個の細胞を数え、その内の M 期にある細胞の割合を MI とした。

1-2-12 Laser Scanning Cytometer による DNA 含量の測定

三角フラスコを静置し、底に沈んだ細胞 300 μ l を 1.5 ml のマイクロチューブに取り、-20°C で冷却しておいたエタノールを 700 μ l 加え、マイクロチューブミキサーにより 1 分間攪拌した後、-20°C で保存した。

1 日以上 -20°C に置いたサンプルを 0.1%(w/v) Triton X-100 を含む PBS で 3 回洗浄し、終濃度 0.1 mg/ml となるように RNase A (Sigma) を添加し、37°C で 30 分間静置した。さらに終濃度 50 μ g/ml となるように PI (Sigma) を添加し、4°C で 30 分間静置した。その後、0.1% トリトン X-100 を含む PBS で 3 回洗浄し、細胞をスライドガラス (Matsunami) 上に取り、カバーガラス (Matsunami) をかぶせた。キムワイプ (クレシア) で余分な水分を吸い取った後、カバーガラスの縁をマニキュアで塞いだ。

DNA 含量は LSC101 (Olympus) を用いて測定し、付属ソフト WinCyte を用いて解析した。

1-2-13 RNA プロッティング

1-2-13-1 BY-2 細胞からの全 RNA の抽出

三角フラスコを静置し、底に沈んだ細胞 300 μ l を 1.5 ml のマイクロチューブに取り、室温で 2,000 rpm, 1 分間遠心し、上清を除去した。ただちに液体窒素中に移し

凍結させ、-80°Cで保存した。

全 RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて調製した。-80°Cに保存したサンプルを液体窒素中に移し、破碎が終わるまでは溶かさないように留意した。2-ME を添加した Buffer RLT を 450 μ l 加え氷水中で超音波破碎した。以降は付属のプロトコールに従った。

1-2-13-2 電気泳動

精製した全 RNA を 1.5%アガロース-16%ホルムアルデヒドゲルで分離した。39.5 ml の DEPC 処理水に 0.75 g の Seakem GTG Agarose (Cambrex)を加え、電子レンジで加温し溶解させた後、8 ml のホルマリン、2.5 ml の 20xMOPS buffer (0.4 M MOPS, 100 mM Sodium acetate, 10 mM EDTA pH 7.0)を加えて混合し、ゲルを作製した。6 μ l 中に 3.5 μ g となるように RNase フリー-H₂O で精製 RNA を希釈し、10 μ l のホルムミド、3 μ l のホルマリン、1 μ l の 20xMOPS buffer、1 μ l のエチジウムブロミド (500 μ g/ml) と混合し、70°Cで 10 分間加熱後、水中に移し急冷した。2 μ l の RNA loading buffer (50%(v/v) glycerol, 1 mM EDTA, 0.3%(w/v) BPB)を添加し、1xMOPS buffer 中で、100 V で電気泳動した。泳動層は Mupid-2plus (アドバンス)を用いた。泳動後、エチジウムブロミド染色像をトランスイルミネーター (Atto) を用いて撮影した。

1-2-13-3 メンブランの作製

20xSSC (standard saline citrate; 3 M NaCl, 0.3 M sodium acetate, pH 7.0)を用い、泳動後の RNA をナイロンメンブラン (Hybond-N⁺; GE Healthcare) に転写した。転写は約 16 時間行い、紫外線照射により RNA をメンブランに固定した。紫外線照射には Funa-UV-Linker FS-800 (フナコシ)を用いた。

1-2-13-4 DNA プローブの準備

プローブには以下の遺伝子の cDNA 全長を用いた。 *Nicta;CYCD3;3* (Accession: AB015222), *Nicta;CDKA;3* (Accession: D50738), *Nicta;CDKB1;1* (Accession: AF289465), Histone H4 (シロイヌナズナ, Accession: M17132)。

Histone H4 (H4A748)

Histone H4 は pBS ベクターの *SalI-SpeI* 部位に挿入するため、TH81 を鋳型に PCR を用いて H4A748 全長の 5'末端に *SalI* 認識配列が、3'末端に *SpeI* 認識配列が付加されるように増幅した。増幅された DNA を *SalI* と *SpeI* で消化し、pBS の *SalI-SpeI* 部位に入れ換えた。塩基配列が正確であることはシーケンス反応を行い確認した。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

H4A748-SalI_s; 5'- CCGTCGACATGTCGGGTCGTGGAAAGGGA -3'

H4A748-SpeI_as; 5'- CCACTAGTTTAACCACCGAATCCGTAAAG -3'

1-2-13-5 DNA プローブの RI 標識

プローブの RI 標識には BcaBEST Labeling Kit (宝酒造)を用いた。10 µg/µl の DNA を 3 µl と 1 µl の Random Primer を混合し、95°C で 3 分間加熱後、水中に移し急冷した。次に、3 µl の dH₂O, 10xbuffer と dNTP mixture をそれぞれ 1.25 µl ずつ、0.5 µl の BcaBEST DNA Polymerase, 2.5 µl の α-³²P dCTP (925 kBq; GE Healthcare)を加え、55°C で 30 分間保温した。37.5 µl の dH₂O を加え、全量を ProbeQuant G-50 マイクロカラム (GE Healthcare) に添加し 3,000 rpm で 2 分間の遠心を行い、ろ液を 95°C で 3 分間加熱後、水中に移して急冷しプローブとした。

1-2-13-6 ハイブリダイゼーション

メンブランをハイブリダイゼーションバックに入れ、60°C に温めたハイブリダイゼーション buffer (5xSSPE, 5xDenhardt's reagent, 0.5%(w/v) SDS, 20 µg/ml salmon sperm DNA) 25 ml とともに 60°C で 1.5 時間ほどプレハイブリダイゼーションを行った。新しい buffer に換え、これに RI 標識したプローブを加え、60°C で約 18 時間ハイブリダイゼーションを行った。メンブランの洗浄は、0.1% SDS を含む 2xSSC 中にて室温で 3 分間を 2 回、新しい溶液に換えて 60°C で 30 分間行った後、0.1% SDS を含む 1xSSC 中にて 60°C で 10 分間行った。増感紙 (Hi-Screen B-2; 富士フィルム) をはさみ-80°C で X 線フィルム (富士フィルム) を感光させた後に現像した。Histone H4 は 1 日、その他は 3.5 日感光させた。

- ・ 20x SSPE (3 M NaCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM EDTA, pH 7.4)
- ・ 50x Denhardt's reagent (1% (w/v) Ficoll 400, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 1% (w/v) BSA)

1-2-14 BY-2 細胞からのタンパク質粗抽出液の調製

三角フラスコを静置し、底に沈んだ細胞 1.4 ml を 1.5 ml のマイクロチューブに取り、室温で 2,000 rpm, 1 分間遠心した後上清を除去した。ただちに液体窒素中に移し凍結させ、-80°C で保存した。

complete, EDTA-free (Roche), 1 mM NaF, 1 mM β-Glycerophosphate, 1 mM Sodium orthovanadate を含む 700 µl の IP buffer (25 mM Tris-HCl, 75 mM NaCl, 15 mM MgCl₂, 15 mM EGTA, 0.1% NP-40, pH 7.5)を加え、氷水中で超音波破碎した。破碎は超音波破碎機 (Handy Sonic model-UR-10P, Tomy) の出力を 8 に合わせ 10 秒間行い、5 秒間隔で 10 回繰り返した。破碎後、10,000×g, 4°C, 30 分で遠心を行い、得られた上清をさらに 100,000×g, 4°C, 1 時間 (Beckman TLA-100.3 ロ

ーター) で遠心を行い、得られた上清を粗抽出液とした。

1-2-15 粗抽出液のタンパク質濃度の測定

粗抽出液のタンパク質濃度は Bradford 法(Bradford, 1976)により測定した。検量線の作成には BSA (ナカライテスク) を用いた。

- ・タンパク質定量試薬 (0.01%(w/v) Coomassie Brilliant Blue, 5%(v/v) Ethanol, 8.5%(w/v) Phosphoric acid)

1-2-16 BY-2 細胞タンパク質粗抽出液のゲルろ過精製

口径 11 μm のナイロンメッシュをはさんだ濾過器にあげ細胞を回収し、50 ml の遠沈管に移し、液体窒素中にて凍結させ、 -80°C で保存した。

液体窒素にて冷却した乳鉢および乳棒を用いて保存した細胞を粉末状になるまで破碎した。サンプル量 (生重量 g) に対して等量 (ml) の IP buffer を加え、50 ml の遠沈管に移し、 4°C にて 4,000g で 10 分間遠心した。その後、超音波破碎し、 4°C にて 100,000g で 1 時間遠心し、上清を再び同条件にて遠心して、タンパク質粗抽出液とした。これを Ultra-15 (Millipore) を用いて濃縮し、それぞれ 10 mg/ml の濃度に合わせた。ゲルろ過カラムにアプライする前に 800 μl を 100,000g で 1 時間遠心した後、0.2 μm のフィルターに通し、ゲルろ過用サンプルとした。カラムにはこの内 200 μl を apply した。

ゲルろ過カラムはの空カラム (Tricorn 10/300 Column; GE Healthcare) に付属のプロトコールに従い Superdex 200 pg (GE Healthcare) を詰めて用いた。これを FPLC System (GE Healthcare) に連結した。流速 0.3 ml/min にて 500 μl ずつろ液を回収した。

Protein blot 解析用には、各画分の 150 μl に対し、600 μl の冷却したアセトンを加え、攪拌後、 -20°C にて 1 日以上保存したものを 10,000g にて 4°C で 15 分間遠心し、上清を除去し、マイクロチューブの蓋を開けたまま氷上で 10 分間放置した後、

1x となるように dH_2O で希釈した sample buffer (62.5 mM Tris-Cl, 10%(v/v) Glycerol, 2% SDS, 5% 2-ME, 0.025% BPB, pH 6.8) を 10 μl 加え、3 分間攪拌し、沈殿を溶解させ、 95°C で 3 分間加熱し、SDS-PAGE 用サンプルとした。キナーゼ反応用には、各画分の 150 μl を液体窒素中にて凍結させ、 -80°C で保存したものを用いた。

1-2-17 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、Laemmli の方法 (1970) に従った。 95°C で 3 分間加熱し、泳動用試料とした。電気泳動は恒温式ミニゲルスラブ電気泳動装置 (日本エイドー) を使用し、SDS-running buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1%(w/v) SDS) 中に行っ

た。泳動条件は定電流 25 mA で、色素の先頭がゲル端から 5 mm 上に来るまで泳動した。ゲルろ過画分の電気泳動にはナイアガラ電気泳動装置（日本エイドー）を使用した。

1-2-18 Protein blot 解析

泳動後のゲル，ろ紙（3MM Chr; Whatman），メンブラン（Hybond-P; GE Healthcare）を transfer buffer（48 mM Tris-Cl, 39 mM Glycine, 20%(v/v) methanol)中で 10 分間振とうさせた後，平板型転写装置セミドライタイプ（日本エイドー）を使用し，1 mA/cm²メンブランの定電流で 72 分間の条件でタンパク質をメンブランに転写した。転写後，blocking buffer（5%(w/v) skim milk を含む TBST（50 mM Tris-Cl, 137 mM NaCl, 0.1%(v/v) Tween 20, pH 7.6)）中にて室温で 1 時間振とうした。TBST で室温 2 分間を 2 回にてメンブランを洗浄し，一次抗体を添加した TBST 中にて室温で 1 時間振とうした。TBST で室温 2 分間を 2 回にてメンブランを洗浄し，二次抗体を添加した TBST 中にて室温で 1 時間振とうした。TBST で室温 5 分間を 3 回にてメンブランを洗浄した後，シグナルの検出を行った。検出には ECL Plus Western Blotting Detection Reagents を用いた。ルミノイメージアナライザー（LAS-3000; 富士フィルム）あるいは X 線フィルム（富士フィルム）を感光させることでシグナルを検出した。

reprobing は検出したメンブランを TBST 中にて一晩以上 4°C で保存した後に行った。60°C に温めた stripping buffer（62.5 mM Tris-Cl, 2% SDS, 100 mM 2-ME, pH 6.7）にメンブランを入れ，60°C で 30 分間振とうした。TBST で室温 10 分間を 2 回にてメンブランを洗浄し，blocking 操作より同様に行った。

- ・一次抗体; Cdc2 (PSTAIRE) (Santa Cruz), 2,000 倍希釈
- ・二次抗体; ECL Peroxidase labelled anti-rabbit antibody (GE Healthcare), 10,000 倍希釈

1-2-19 粗抽出液からの p13^{sucl} による精製

1-2-19-1 p13^{sucl} タンパク質の調製

p13^{sucl} を発現する大腸菌は梅田教授より分与を受けた。100 µg/l のアンピシリンを含む 2xYT 培地 10 ml に p13^{sucl} を発現する大腸菌をグリセロールストックより植菌し，37°C で一晩前培養を行った。3 l バッフル付き三角フラスコに入れた 1 l の 100 µg/l のアンピシリンを含む 2xYT 培地に前培養液を全量植菌し，37°C で 6 時間培養を行った。氷中に 10 分間静置した後，4,000×g にて 4°C で 15 分間の遠心（JLA-10,500 ローター; Beckman）を行い集菌して 100 ml の buffer 1（50 mM Tris-Cl, 2 mM EDTA, pH 8.0）に懸濁した。再び 4,000×g にて 4°C で 15 分間遠心し集菌して 50 ml の buffer 1 に再懸濁し，そのまま -20°C で一晩保存した。氷水中で解凍し，超音波破碎を行った。破碎は Astrason（第一化学）の出力を 3 に合わせ 10 秒間行い，10 秒

間隔で10回繰り返した。破碎後、1/50量の10%(w/v) Triton X-100を添加し、4°Cで20分間混合した。12,000 rpmにて4°Cで40分間遠心し上清を回収した。上清に対して30-50%硫酸分画を行い、沈殿をbuffer 2 (20 mM Tris-Cl, 2 mM EDTA, pH 8.0)に溶解した。70°Cで、3分間保温し、12,000 rpmにて4°Cで20分間遠心し(JA-20ローター; Beckman), 上清をbuffer 2に透析した。HiTrap DEAE FF (5 ml 容量; GE Healthcare) に apply し, buffer 3 (1 M NaClを含むbuffer 2)にて溶出した(流速2.5 ml/min, 0~100 %buffer 3, 20 カラム容量)。溶出画分をさらに Superose 12 HR 10/30 (GE Healthcare) に apply し coupling buffer (0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3)により溶出し(流速0.5 ml/min), 精製 p13^{suc1} タンパク質とした。

1-2-19-2 p13^{suc1}-Sephacrose ビーズの作製

0.3 g CNBr-activated Sepharose 4B (GE Healthcare)を冷やした1 mM HClに懸濁しエコノパックカラム (Bio-Rad) に充填した。60 ml の1 mM HClをカラムに通し洗浄した。洗浄操作は15分以内に終わらせた。栓をして coupling buffer に溶解した p13^{suc1} タンパク質を加え、蓋をして室温で1時間混合した。5 ml の coupling buffer で洗浄した後、5 ml の blocking buffer (0.1 M Tris-Cl, pH 8.0)中にて室温で2時間静置した。5 ml の wash buffer (0.1 M NaOAc, 0.5 M NaCl, pH 4.0)と coupling buffer で順番に洗浄した。この操作を3回繰り返した。bufferをPBSに置換した後、0.05%(w/v) NaN₃を含むPBSに50% slurryとなるように懸濁した。p13^{suc1} は2.5 mg/1 ml Sepharose 4Bの割合で結合させた。

1-2-19-3 p13^{suc1}-Sephacrose ビーズによるアフィニティー精製

300 µgの粗抽出液に20 µlの50% slurry p13^{suc1}-Sephacrose ビーズを加え、4°Cで一晩転倒混和した。4°Cで10,000×g, 30秒間遠心した後、上清を除き、300 µlのIP bufferで3回、さらに300 µlのkinase buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 7.5)で3回ビーズを洗浄し、最後に上清を完全に除去した。western 解析用のサンプルにはIP bufferで1xの濃度にしたsample bufferを加え、95°Cで3分間加熱した。キナーゼ反応用のサンプルには10 µlのkinase bufferを加えた。

1-2-20 キナーゼ反応

1-2-20-1 基質の調製

基質には市販のHistone H1 (Calbiochem)および調製したGST-NtRBR1Cを用いた。

GST-NtRBR1CはpGEX-4T-1ベクターの*Bam*HI-*Sal*I部位に挿入するため、PCRを用いてNtRBR1のカルボキシ末端領域(2467-2883; 全長2883 bp)の5'末端に

*Bam*HI 認識配列を, 3'末端に *Sa*II 認識配列を付加した. 増幅された DNA を *Bam*HI と *Sa*II で消化し, pGEX-4T-1 の *Bam*HI-*Sa*II 部位に入れ換えた. 塩基配列が正確であることはシーケンス反応を行い確認した. PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す.

NtRBR1C-*Bam*HI-s; 5'-CCGGATCCGAGCTTGCACCTGCTGGAAAT-3'

NtRBR1-*Sa*II-as; 5'-CCGTCGACCTAAGACTCAGGCTGCTCAGT-3'

大腸菌からの GST 融合タンパク質の精製は, 第 2 章に従った.

1-2-20-2 キナーゼ反応

kinase buffer を加えて 50% slurry とした試料を 15 μ l 取り, 92.5 kBq [γ ³²P]ATP, 2.5 μ g Histone H1 あるいは 2 μ g GST- NtRBR1C を含む kinase buffer を 5 μ l 加え, 30°C で 30 分間保温した. 5 μ l の sample バッファーを加え, 95°C で 3 分間加熱した. 12.5% の SDS-PAGE ゲルで泳動した後, CBB 染色を行い, 脱色液中で一晩振とうした. ゲルドライヤー (モデル 583; Bio-Rad) を用いてゲルを乾燥させ, BAS あるいはオートラジオグラフィーによりシグナルを検出した.

1-3 結果

1-3-1 オーキシンあるいはショ糖欠乏が細胞分裂に及ぼす影響

BY-2 細胞を改変 LS 培地, オーキシンを含まない改変 LS 培地, ショ糖を含まない改変 LS 培地それぞれに植え継ぎ, 細胞数および新鮮重量を測定した (Fig.6). 1 日後にはコントロール培地において細胞数が 2 倍近くまで増加したが, オーキシンあるいはショ糖を除いた培地ではわずかに増加しただけであった. ショ糖欠乏の培地では新鮮重量についても同様にわずかな増加であったが, オーキシンを除いた培地では 2 倍程度にまで増加した. したがって, ショ糖欠乏においては細胞の生長が停止したのに対して, オーキシン欠乏においては細胞が大きくなり新鮮重量が増加したと言える. これらのことは, BY-2 細胞の分裂にはオーキシンとショ糖の両方が必要とする以前の報告と一致する (Hartig and Beck, 2006).

1-3-2 CDKA の生長段階に依存した蓄積

BY-2 細胞の植え継ぎ後の生長段階と CDKA タンパク質の蓄積量との関係を調べるため, 継代 7 日目の細胞を新しい培地に植え継ぎ, 次の継代まで 1 日おきにサンプリングを行った. このときの細胞数と新鮮重量の変化を Fig.7A に示した. 細胞数も新鮮重量もほぼ同様の曲線を示した. CDKA は PSTAIRE 抗体により検出した (1-3-4 と Fig.9A を参照). CDKA は対数増殖期に高蓄積するが, 静止期に入ると速やかに減

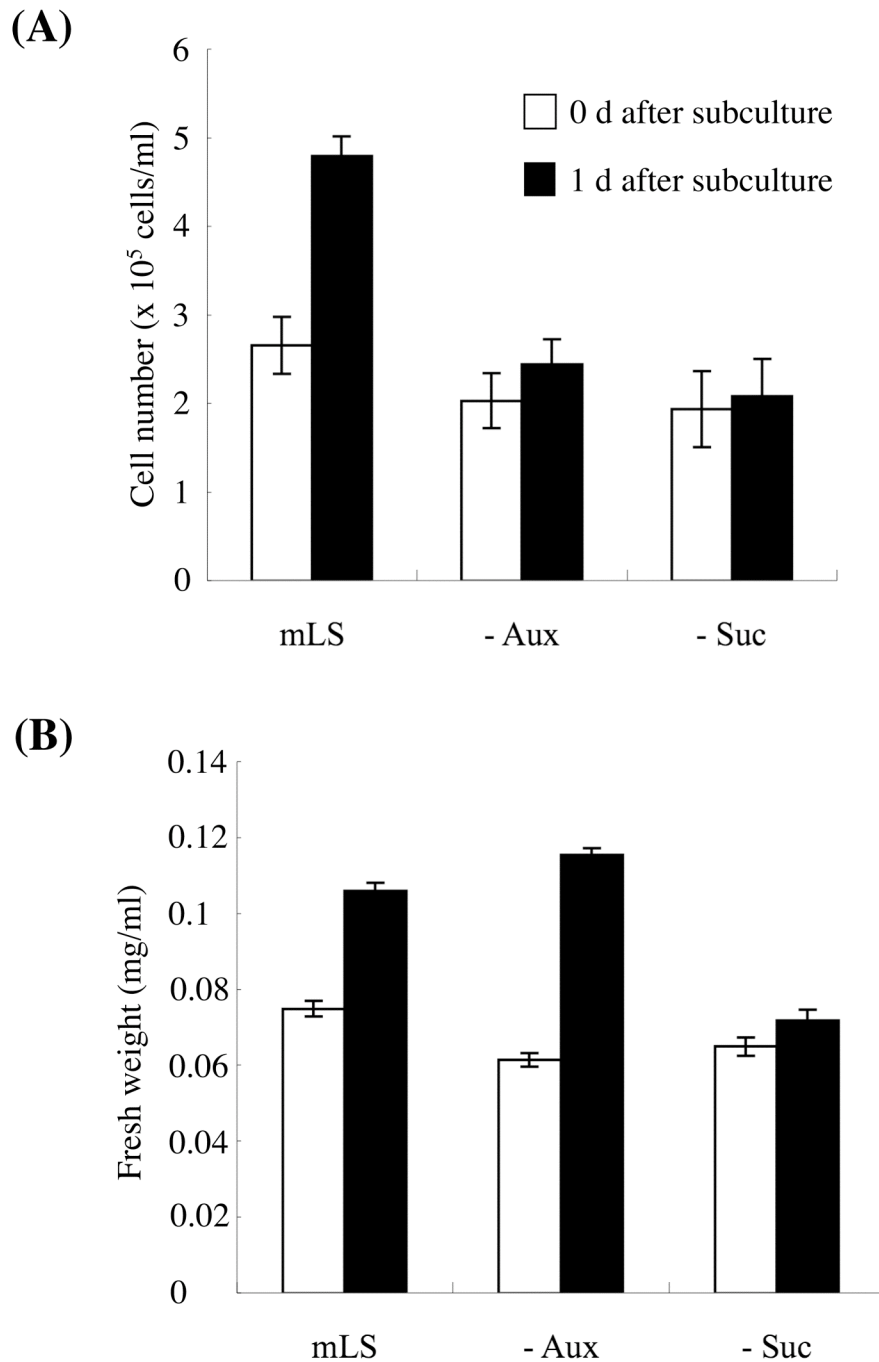


Fig.6 オーキシンおよびショ糖欠乏培地における細胞分裂の停止

(A). 培養7日目のBY-2細胞を各培地に継代した際の0日および1日後の細胞数. mLS: コントロール培地 (改変LS培地). - Aux: オーキシン欠乏mLS. - Suc: ショ糖欠乏mLS. 値は3回の平均を示し, エラーバーは標準誤差.

(B). 培養7日目のBY-2細胞を各培地に継代した際の0日および1日後の新鮮重量. 他は(A)と同じ.

少した (Fig.7B). これらのことからBY-2細胞においてCDKAの蓄積は生長段階依存的であると示唆された.

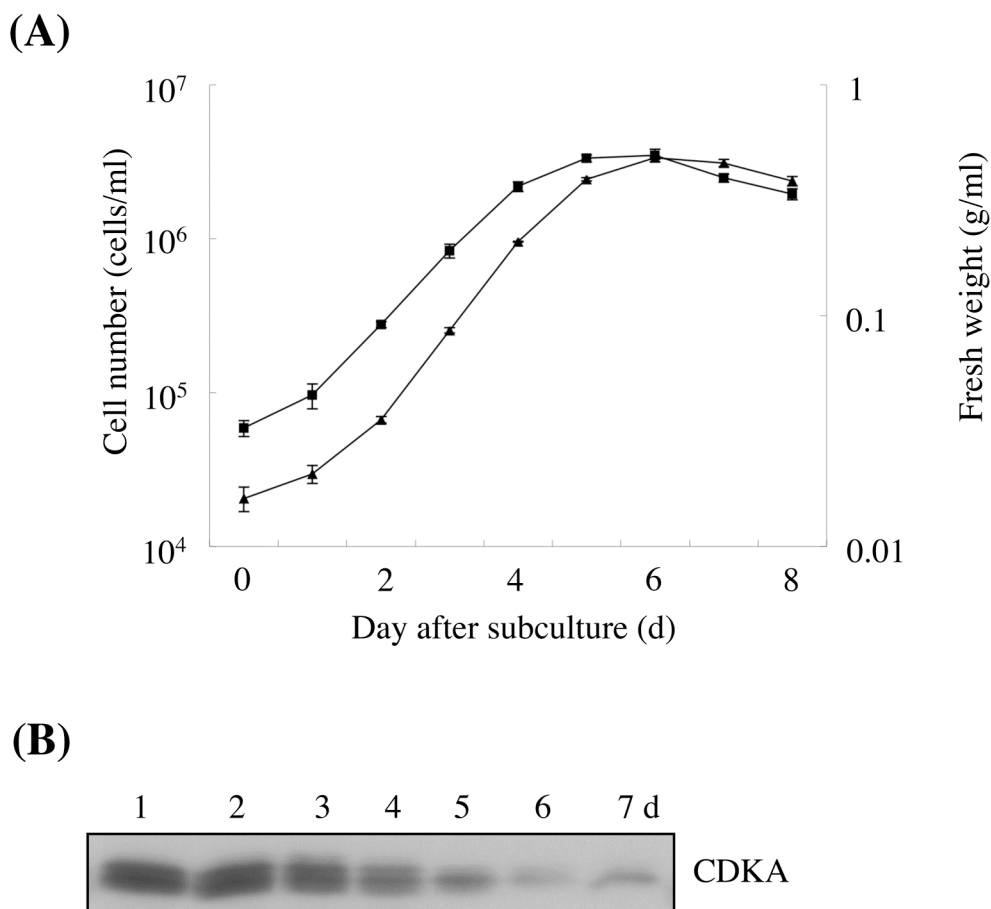


Fig.7 BY-2 細胞の生長曲線と CDKA の蓄積量

(A). タバコ BY-2 細胞の生長曲線. 培養 7 日目の BY-2 細胞を新鮮な培地に継代し, 1 日おきに細胞数および新鮮重量を測定した. 細胞数は■で, 新鮮重量は▲で示した. 値は 3 回の平均を示し, エラーバーは標準誤差.

(B). (A)に示したそれぞれの日ごとに粗抽出液を調製した. 各レーン 30 μ g の total protein を泳動し, PSTAIRE 抗体により western blot を行った.

1-3-3 re-entry 法による細胞周期の解析

G1/S 期の細胞増殖制御に焦点をあてるため, 細胞周期再移行「re-entry」の系を用いた. これは継代 7 日目の細胞を新鮮な培地に移すことで再び細胞周期へ移行させる実験系で, 継代後の細胞周期の進行は LSC を用いて DNA 含量を測定することで解析した. その結果, 培養 7 日目の細胞のほとんどが静止期あるいは G1 期に位置していることが示唆された. 植え継ぎ後, 6~8 時間ころから S 期の細胞が認められ, 経時的にその割合は増加した. 18 時間後には G2 期の細胞の割合が多くなった (Fig.8A). このことはある程度と同調率をもって 6~8 時間の間に細胞が S 期に進行することを示している. このとき, オーキシンを除いた培地に植え継ぐと, 明確な遅延はあるも

の細胞周期の進行は観察されたのに対して、ショ糖を除いた場合は細胞周期の進行はほとんどみられなかった。この結果と一致して、Mitotic Index (MI)はコントロール培地に植え継いだ細胞では18~24時間の間で最大になるのに対し、オーキシンを除いた培地に継代した細胞ではコントロールほど上昇せず、ショ糖を除いた場合にはMIの上昇はみられなかった (Fig.8B)。

re-entry 時の細胞周期の進行を遺伝子発現においても確認するため、細胞周期関連遺伝子の mRNA の蓄積量を解析した (Fig.8C)。ここでは、*Nicta;CDKA;3*, *Nicta;CDKB1;1*, *Nicta;CYCD3;3* を用いたが、以下では特に断らない限りそれぞれ *CDKA*, *CDKB*, *CYCD3;3* と省略して表記する。*Histone H4* を S 期のマーカーとして用いた。コントロール培地において、*Histone H4* の発現は 6~8 時間の間に速やかに上昇した。以前の報告にもあるように、*CDKA* の発現に目立った変化はないが、*CDKB* の発現は S 期まで非常に低く抑えられており、S 期から M 期を通して蓄積がみられた (Sorrell et al., 2001)。しかし、オーキシンを欠乏させた場合は、*Histone H4*, *CDKB* の発現ともに明確な遅延が起こり、その発現量もコントロール培地よりも低くなっていた。ショ糖を欠乏させた場合には、コントロールと比べ非常にわずかな発現がみられた。さらに、*CDKA*, *CYCD3;3* の発現量は全ての培地に植え継いだ場合で目立った変化はなかった (Fig.8C)。

1-3-4 p13^{suc1} タンパク質による CDKA の精製

酵母の p13^{suc1} タンパク質は動物の CDK1, CDK2 および CDK3 に結合し、CDK4, CDK5 または MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase) には結合しない (Meyerson et al., 1992; Alonso et al., 2000)。シロイヌナズナの粗抽出液から調製した p13^{suc1} 結合タンパク質は CTD をリン酸化するが、ヒト CDK2 は基質とせず、*Arath;CDKF;1* には結合しない (Umeda et al., 1998)。また、酵母 two-hybrid 法により *Arath;CDKA;1* に結合する因子として同定された p13^{suc1} のシロイヌナズナにおける homologue である *Cks1At* は *Arath;CDKA;1* および *Arath;CDKB1;1* に結合するが、p13^{suc1} タンパク質は主に *Arath;CDKA;1* に結合するなど、植物の各 CDK に対しても親和性が異なる (De Veylder et al., 1997)。そこでタバコ CDKA の精製に p13^{suc1} タンパク質を用いるため、その特異性を検討した。まず、タバコ CDKA および CDKB 抗体の精製を行った。現在までのところタバコ CDKA は 4 種類、CDKB は 2 種類がデータベースに登録されており、抗体の交叉の検討には当研究室で単離した *Nicta;CDKA;3* および *Nicta;CDKB1;1* を用いた。それぞれに GST タンパク質を付加し大腸菌により発現させた。GST 抗体による検出では両者でほぼ同量のタンパク質の泳動が確認できた (Fig.9A)。サイクリンとの結合モチーフである PSTAIRE 配列に対する抗体は特異的に CDKA を認識した。精製した CDKA および CDKB のポリクローナル抗体、CDKA のモノクローナル抗体はそれぞれを特異的に認識した。次に BY-2 細胞粗抽出液から p13^{suc1} 結合タンパク質を調製し、western blot 解析に供した。タ

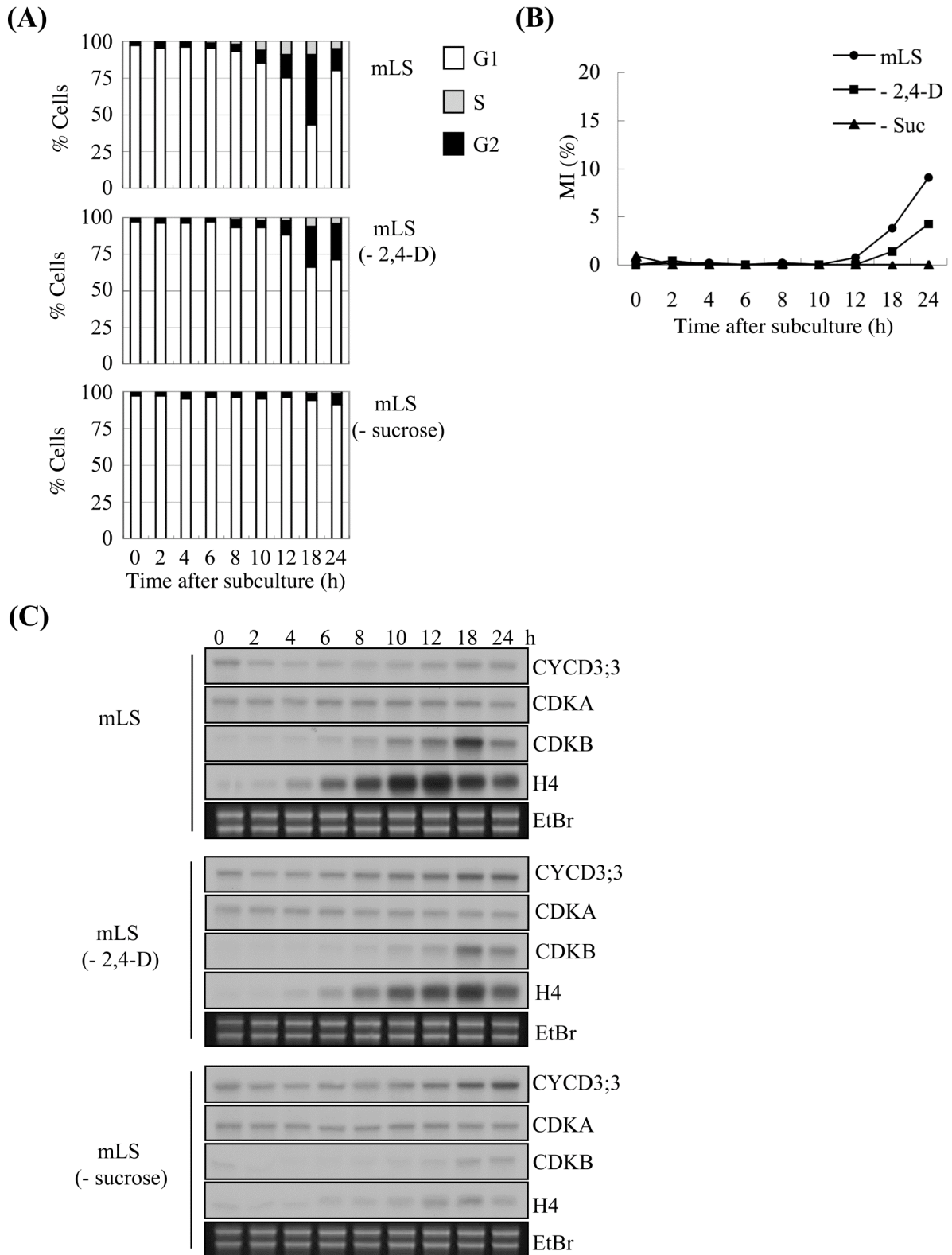


Fig.8 re-entry 後の細胞周期の変遷

(A). 培養7日目のBY-2細胞を各培地に継代した後の細胞周期の変遷をLSCにより解析した. それぞれ 1.2×10^3 の細胞を解析した. mLS: コントロール培地 (改変LS培地). mLS(-2,4-D): オーキシン欠乏 mLS. mLS(-sucrose): ショ糖欠乏 mLS. G1期の割合を白, S期の割合を灰色, G2期の割合を黒で示した.

(B). 各培地に継代した後の各時間における MI を示した. mLS: コントロール培地 (改変 LS 培地) を ● で, - 2,4-D: オーキシン欠乏 mLS を ■ で, - Suc: ショ糖欠乏 mLS を ▲ で示した.

(C). 細胞周期制御遺伝子の RNA blot 解析. 各培地に継代した後にそれぞれの時間より RNA を抽出し, *CYCD3;3*, *CDKA*, *CDKB*, *Histone H4* をプローブに RNA blot を行った. それぞれのカラムの下には EtBr 染色像を示した. 各レーンには 3.5 μ g の total RNA を泳動した.

バコ CDKA および CDKB に対する特異抗体で検出したところ, p13^{suc1} 結合タンパク質は CDKA に対して強い親和性を持つことが示唆された (Fig.9B). しかし, 作製した抗体を用いた免疫沈降物のキナーゼ活性が効率よく検出できなかったため, 本研究では CDKA 活性の検出に精製に p13^{suc1} で精製したタンパク質を用いることとした.

1-3-5 BY-2 細胞の増殖再開時に CDKA タンパク質量と p13^{suc1} 結合キナーゼの活性が上昇する

このとき, 各時間より細胞粗抽出液を調製し, PSTAIRE 抗体を用いた western 解析により CDKA の蓄積量を解析したところ, re-entry 時に CDKA タンパク質の蓄積量の増加が認められた (Fig.10A). CDKA タンパク質は細胞周期を通じて一定に存在すると報告されているが (Porceddu et al., 2001; Koroleva et al., 2004), この実験系においては時間の経過とともに徐々にその蓄積量が増加していることがわかった. オーキシンおよびショ糖を除いた培地に継代した場合には, コントロール培地ほどの CDKA の蓄積は認められなかった. PSTAIRE 抗体により複数のバンドが検出されているが, これは CDKA のリン酸化状態の違いであると考えられる (第二章).

主に CDKA と結合すると考えられる酵母の p13^{suc1} タンパク質を用いて (Fig.9B), p13^{suc1} 結合キナーゼの Histone H1 および GST-NtRBR1C に対するキナーゼ活性を解析した (Fig.10B). 両方の基質に対するキナーゼ活性はコントロール培地では, 6 時間ころから速やかな上昇がみられたものの, GST-NtRBR1C に対する活性は 12 時間目でピークを迎えるのに対して, Histone H1 に対する活性は広がりを見せ 12~18 時間にピークがあり, 24 時間目では徐々に減少していた. これに対して, オーキシン欠乏培地に継代した細胞の場合は, わずかな活性の上昇がみられ, ショ糖欠乏培地の場合はほとんど活性がみられなかった. これらのことから, BY-2 細胞の p13^{suc1} 結合キナーゼの活性が最大になるには, オーキシンとショ糖の両方が必要であると示唆される.

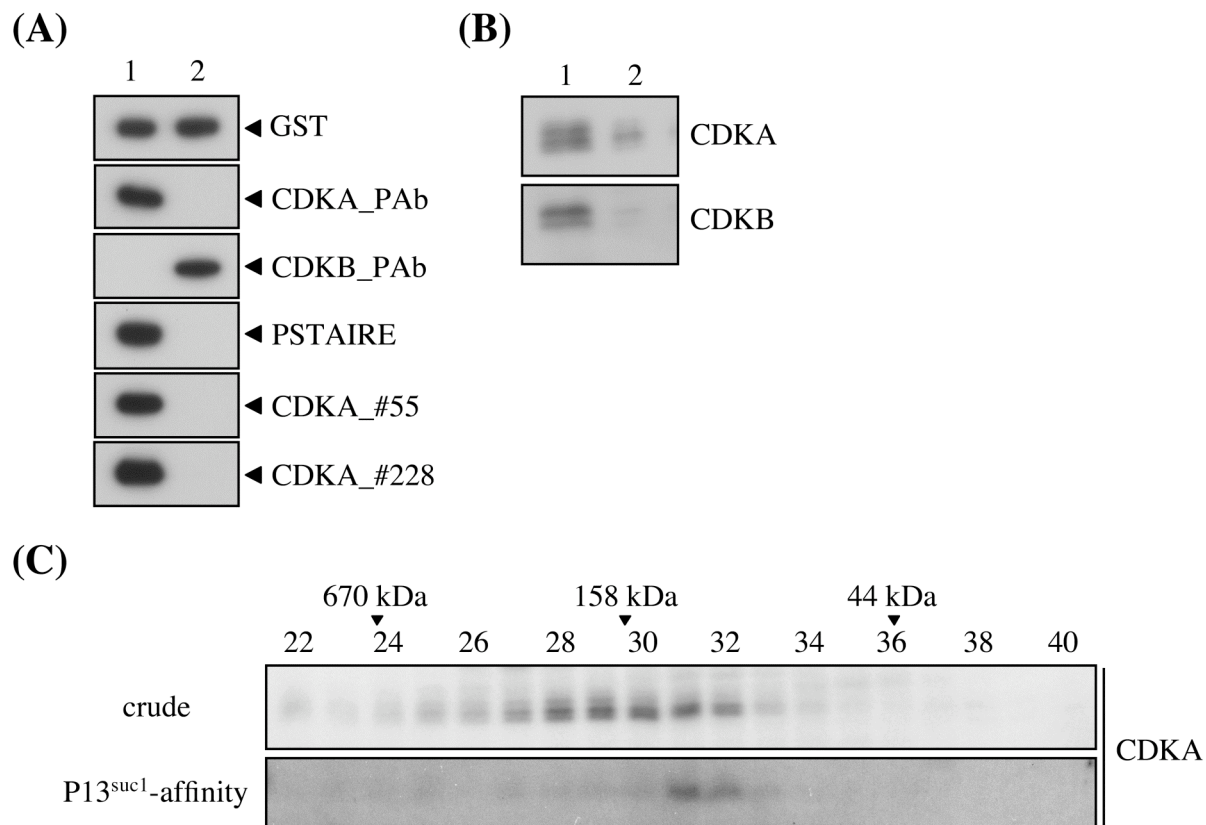


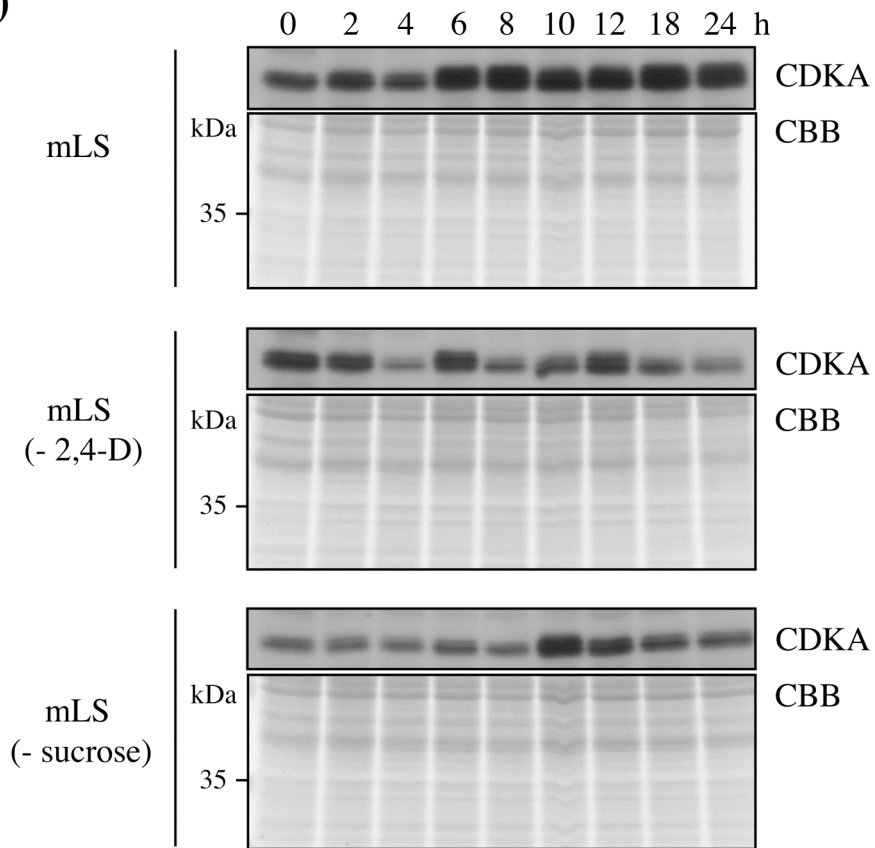
Fig.9 p13^{suc1} の CDKA に対する強い親和性

(A). タバコ CDKA および CDKB 抗体の特異性の検討. 大腸菌より調製した GST-CDKA (レーン 1), GST-CDKB (レーン 2) を SDS-PAGE 後, それぞれの抗体にて western blot を行った. GST: GST 抗体. CDKA_PAb: CDKA ポリクローナル抗体. CDKB_PAb: CDKB ポリクローナル抗体. PSTAIRE: PISTAIRE 抗体. CDKA_#55: CDKA モノクローナル抗体 clone 55. CDKA_#228: CDKA モノクローナル抗体 clone 228.

(B). p13^{suc1} の CDKA および CDKB に対する親和性の検討. 培養 3.5 日目の BY-2 細胞の total protein (300 μ g) から p13^{suc1} 結合タンパク質を調製し, SDS-PAGE 後, それぞれの抗体にて western blot を行った. 1: input の 1/10 量を泳動した. 2: p13^{suc1} 結合タンパク質.

(C). mLs における re-entry10 時間後の細胞よりタンパク質粗抽出液を調製し, ゲルろ過カラムにより分画した. 1: 各画分を SDS-PAGE 後, PSTAIRE 抗体にて western blot を行った. 2: 各画分から p13^{suc1} 結合タンパク質を調製し, SDS-PAGE 後, PSTAIRE 抗体にて western blot を行った. 標準タンパク質の位置をパネル上部に示した.

(A)



(B)

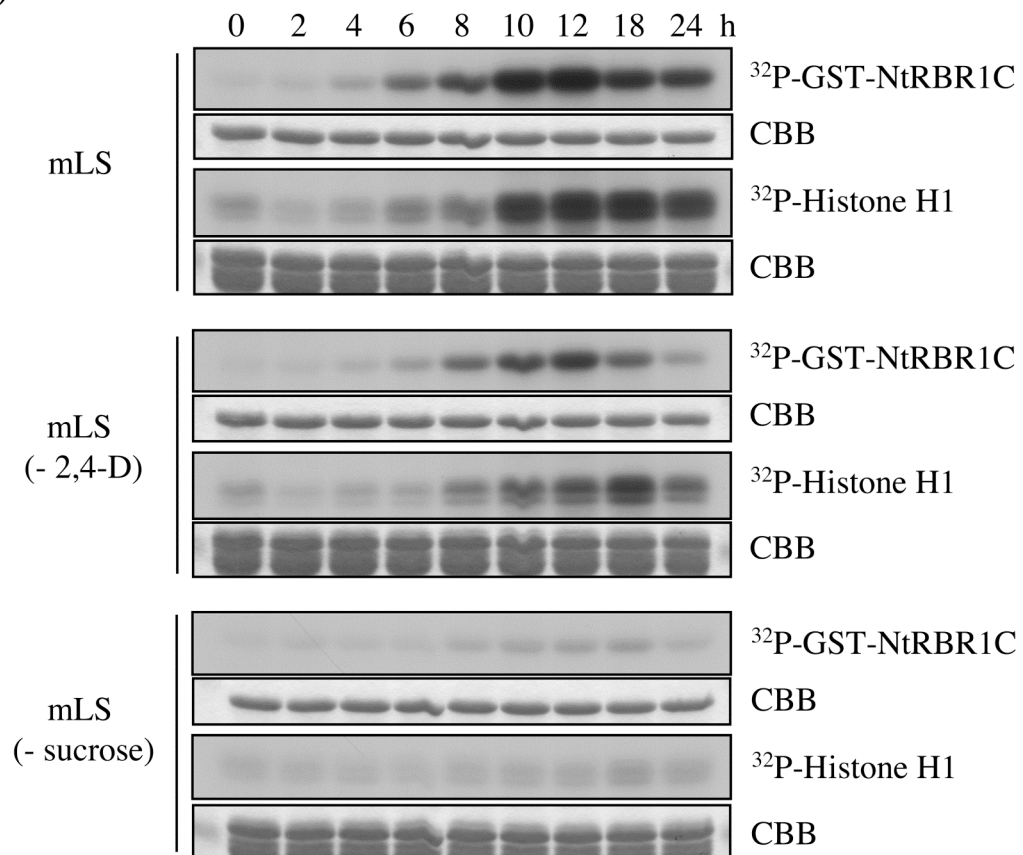


Fig.10 re-entry 後の CDKA の蓄積量と p13^{suc1} 結合キナーゼの活性

(A). 各培地に継代した後に粗抽出液を調製した. 各レーン 30 µg の total protein を泳動し, PSTAIRE 抗体により western blot を行った. SDS-PAGE ゲルの CBB 染色像も同時に示した. mLS: コントロール培地 (改変 LS 培地). mLS(- 2,4-D): オーキシン欠乏 mLS. mLS(- sucrose): ショ糖欠乏 mLS.
(B). 各培地に継代した後に粗抽出液を調製した. それぞれ 300 µg の total protein から p13^{suc1} 結合キナーゼを調製し, Histone H1 および NtRBR1C に対するキナーゼ活性を測定した. 基質の CBB 染色像を同時に示した. 他は(A)と同じ.

1-3-6 オーキシン欠乏における CDKA 複合体の質的な変化

CDKA 複合体の生化学的な解析をさらに深めるため, 静止期にある細胞あるいは re-entry 後 10 時間の細胞の粗抽出液をゲルろ過カラムにより分画し, PSTAIRE 抗体により各画分の CDKA を検出した (Fig.11A). それぞれの細胞で CDKA の含有量は異なるものの, 両者とも ~200 kDa 付近をピークに類似した分布で検出され, 静止期の細胞においても CDKA は何らかの因子と複合体を形成していることが示唆された. ところが, オーキシン欠乏培地に継代した細胞の粗抽出液を同様にゲルろ過カラムにより分画すると, 静止期およびコントロール培地でみられた ~200 kDa 付近の高分子量側のピークが消失した. これらの結果からオーキシンが活性型 CDKA 複合体の形成に必要であると示唆される.

次に, 活性のピークがどの画分にあるかを調べるため, 各画分から p13^{suc1} 結合キナーゼを調製し, GST-NtRBR1C および Histone H1 に対する活性をみた (Fig.11B). GST-NtRBR1C に対する p13^{suc1} 結合キナーゼの活性が ~100 kDa 付近をピークに存在し, Histone H1 に対する活性のピークは ~100 kDa 付近をピークにやや広がりをもって存在した. これは, p13^{suc1} 結合キナーゼの活性のピークがサイクリン/CDKA 複合体に相当する画分にあることを示している.

培養 7 日目の BY-2 細胞はもともとの CDKA の蓄積量が少なく, また, 複合的なストレスを受けている可能性がある. そこで, それらの影響を排除するため, 培養 2 日目の細胞を用いて再現性を検討した (Fig.12). 出発材料を 2 日目の細胞に変えてもオーキシンを除くと CDKA の分布に変化が認められ, オーキシンが CDKA の複合体形成に関与することが強く示唆された.

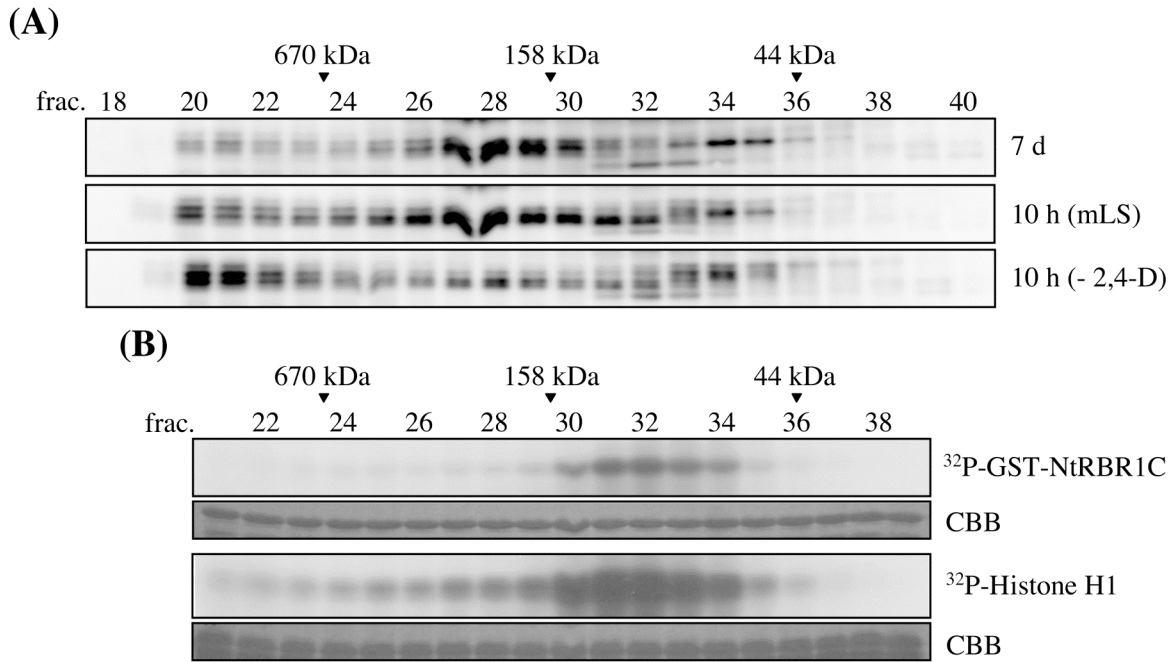


Fig.11 BY-2 細胞における p13^{suc1} 結合キナーゼの活性を有する複合体のゲルろ過分画

(A). 各細胞における CDKA の分布. それぞれの細胞よりタンパク質粗抽出液を調製し, ゲルろ過カラムにより分画した. 各画分を SDS-PAGE 後, PSTAIRE 抗体により western blot を行った. 標準タンパク質の位置をパネル上部に示した. 7d: 培養 7 日目細胞, 10h (mLS): 培養 7 日目の細胞を mLS (コントロール培地)に継代後 10 時間, 10h (-2,4-D): 培養 7 日目の細胞をオーキシシン欠乏 mLS に継代後 10 時間.

(B). (A)の 10h (mLS)における p13^{suc1} 結合キナーゼの活性分布. 各画分から p13^{suc1} 結合キナーゼを調製し, Histone H1 および NtRBR1C に対するキナーゼ活性を測定した. 基質の CBB 染色像を同時に示した. 標準タンパク質の位置をパネル上部に示した.

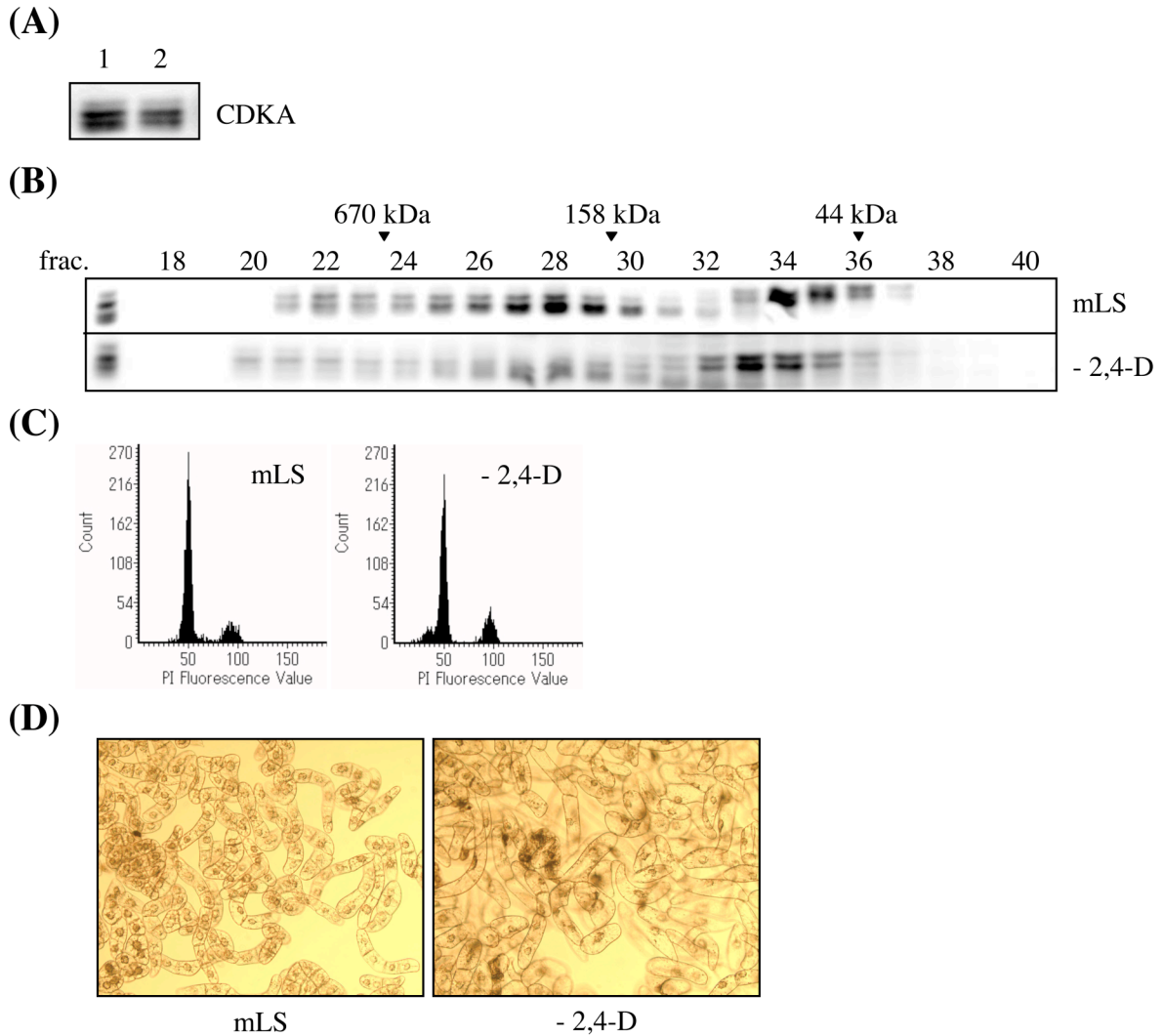


Fig.12 オーキシン欠乏による CDKA 複合体の質的变化

- (A). 各細胞における CDKA の分布. それぞれの細胞よりタンパク質粗抽出液を調製し, ゲルろ過カラムにより分画した. 各画分を SDS-PAGE 後, CDKA モノクローナル抗体により western blot を行った. 標準タンパク質の位置をパネル上部に示した. in: input (分画に用いたタンパク量の約 2%). mLS: 培養 7 日目の細胞をコントロール培地 (改変 LS 培地) に継代後 1 日. - 2,4-D: 培養 7 日目の細胞をオーキシン欠乏 mLS に継代後 1 日.
- (B). 各培地に継代した後の細胞周期を LSC により解析した. それぞれ 2.5×10^3 個の細胞を解析した.
- (C). 各培地に継代した後の細胞の光学顕微鏡像.

1-4 考察

この章では, BY-2 細胞における $p13^{suc1}$ 結合キナーゼの活性が有意に上昇するためには, オーキシンとショ糖の両方が必要であることを示した. さらに, オーキシン欠乏培地に継代した細胞の粗抽出液をゲルろ過カラムにより分画したところ, CDKA 複

合体の分布が変化したことから、オーキシンは活性型 CDKA 複合体の形成に必要であると示唆された。

コントロール培地, オーキシン欠乏培地, ショ糖欠乏培地それぞれに静止期の BY-2 細胞を継代して経時的に粗抽出液を調製し, CDKA の蓄積量および p13^{suc1} 結合キナーゼの活性を解析した. この「re-entry」の実験系では, 6 時間後ころから S 期にある細胞集団が認められ (Fig.8A), 以前の報告と同様に, ある程度と同調率をもって細胞が S 期に進行していることが確かめられた(Sorrell et al., 1999). LSC による DNA 含量の解析では, 倍数化による影響があるため MI の経時変化も調べた (Fig.8B). その結果, コントロール培地に継代したときに最も MI が高く, MI のピークは植え継ぎ後 18 時間から 24 時間の間にあると思われる. また, CDKA の蓄積量は顕著に増加するが, オーキシンあるいはショ糖欠乏培地ではそれぞれ徐々に増加あるいはほとんど増加がみられなかった (Fig.10A). *CDKA* および *CYCD3;3* の mRNA はどの培地に細胞を継代した場合も顕著な変化はなかったことから (Fig.8C), BY-2 細胞ではこれらの遺伝子の転写物はオーキシンやショ糖により制御されず, コントロール培地での CDKA の蓄積量の増加は転写後制御により起こっていると考えられる. シロイヌナズナの *Arath;CDKA;1* 上に AuxRE (auxin-response elements) 様の配列が存在することや(Chung and Parish, 1995), *Arath;CDKA;1* のプロモーターに GUS を連結したコンストラクトを導入した植物体の解析より, サイトカイニンおよびオーキシンにより誘導されるとする報告もある(Hemerly et al., 1993). しかし, 今回 BY-2 細胞においては *CDKA* の発現量にオーキシンおよびショ糖の影響はみられなかった (Fig.8C). シロイヌナズナの培養細胞を用いた解析においてもオーキシンおよびサイトカイニンによる *Arath;CDKA;1* の発現量に変化が認められないことから (Richard et al., 2002), 増殖が活発である培養細胞の特性として, *CDKA* の発現を常に高いレベルで維持しているのかもしれない. さらに *CDKA* タンパク質の蓄積量は BY-2 細胞が静止期に入ると速やかに減少することを見出した (Fig.7B). これと一致して, タバコの *CDKA* は対数増殖期に高発現しているが, 静止期に入るとその転写産物の蓄積量は減少する(Sorrell et al., 2001). したがって, 培養 7 日目の BY-2 細胞では, *CDKA* タンパク質の蓄積量が減少しているために, re-entry 時に対数増殖期のレベルまで増加することは考えやすい. シロイヌナズナの培養細胞では, *Arath;CYCD3;1* タンパク質は静止期になると速やかに消失するが, それに対して *Arath;CYCD2;1* は一定に存在している. しかしながら, 静止期には *Arath;CYCD2;1* 結合キナーゼの活性はなく, おそらく *Arath;CDKA;1* と複合体を形成していない (Healy et al., 2001). さらに, *Arath;CDKA;1* の発現は細胞が分裂していることを反映しているというよりは, むしろ分裂可能な状態にあることを反映している (Hemerly et al., 1993). 今回用いた *CYCD3;3* のプローブではサザン解析を行っていないため, タバコの他の *CYCD3* 遺伝子も検出している可能性を完全に否定できないが, シグナルが一定に検出されていることから (Fig.8C), おそらく *CYCD3;3*

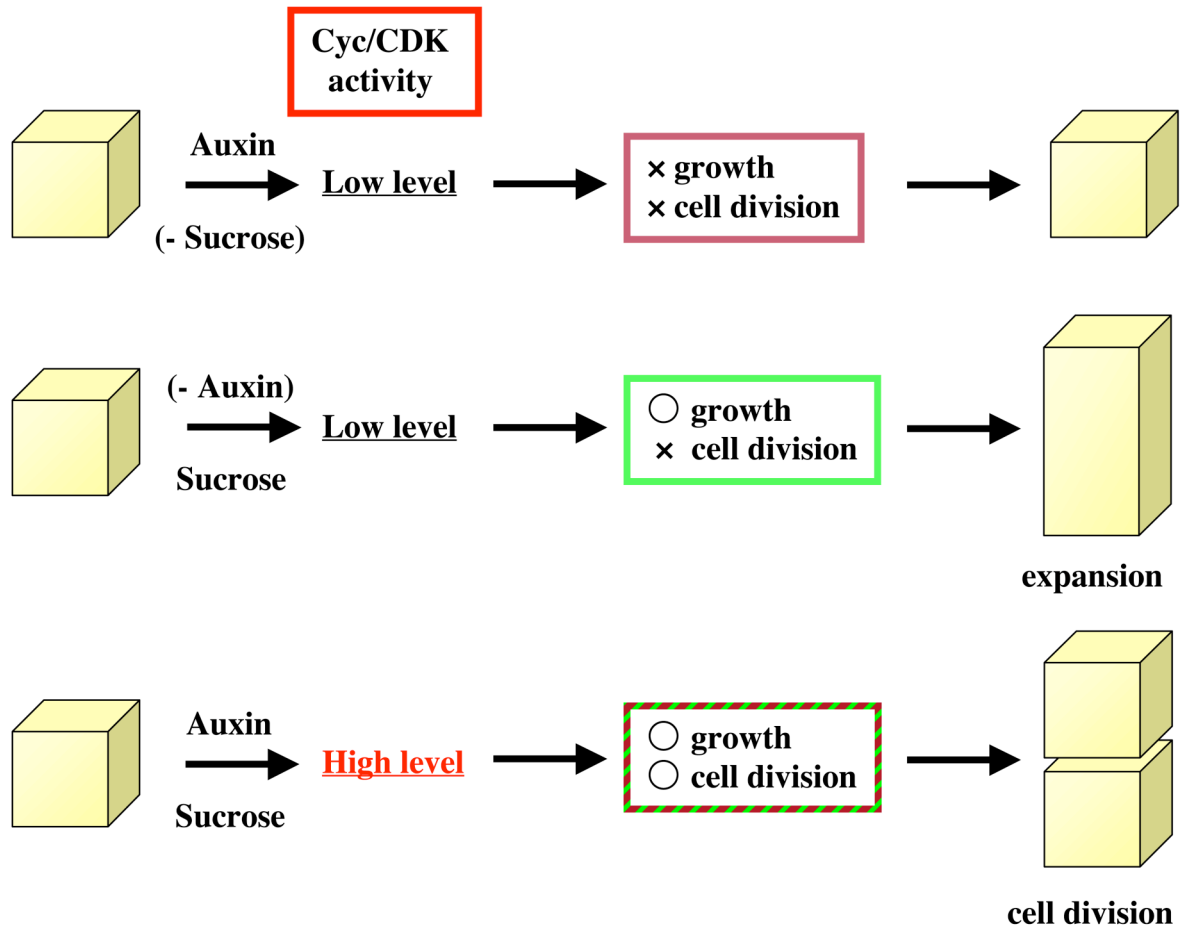


Fig.13 BY-2 細胞におけるオーキシンおよびショ糖が細胞分裂に及ぼす影響

BY-2 細胞の正常な分裂には、オーキシンおよびショ糖の存在下で、CDKA 活性が高度に上昇する必要がある。

mRNA の蓄積量を反映していると考えられる。本研究では、タバコ CDKA の蓄積量はその転写量が一定であるにも関わらず増加することを見出した。このことから、オーキシンおよびショ糖の存在下で静止期の BY-2 細胞が細胞周期に re-entry する際、CDKA タンパク質量が転写後制御を受ける新規の機構の存在が示唆される。

CDKA の蓄積量と相関して、コントロール培地において p13^{suc1} 結合キナーゼの活性が速やかに上昇した (Fig.10A, B)。それに対し、オーキシンおよびショ糖欠乏培地においては、徐々にかあるいはほとんど活性が上昇しなかった。オーキシンの種類により取り込み時と排出時においてキャリアーの寄与率が異なる報告があり (Delbarre et al., 1996), 本研究ではオーキシンとして 2,4-D を用いていることから、オーキシン欠乏培地でみられた活性のわずかな上昇は細胞内に残存する 2,4-D による影響も考えられる。BY-2 細胞の CDKA 活性と細胞分裂の関係を Fig.13 に模式的に示した。

分裂酵母の p13^{suc1} タンパク質は CDK と基質の相互作用を仲介する動物の CKS (cyclin-dependent kinase subunit)(Endicott and Nurse, 1995)の orthologue で、活性型 CDK 複合体の精製に広く用いられている。suc1 および cks1 遺伝子はそれぞれ分裂酵母、出芽酵母の cdc2/CDC28 の温度感受性変異株を抑制するものとして同定された(Hayles et al., 1986; Hadwiger et al., 1989)。ヒト CksHs1 は CDK2 の活性部位やサイクリン結合部位からは離れた位置に直接に結合する(Bourne et al., 1996)。シロイヌナズナの培養細胞から調製した p13^{suc1} 結合キナーゼ中に CDKA が含まれることが報告されている(Stals et al., 2000)。これらを総合して、本研究で明らかになった静止期の BY-2 細胞をコントロール培地に継代した際の p13^{suc1} 結合キナーゼの活性化の一因は、CDKA の蓄積量の増加によるものと示唆される。CDKA 特異抗体の作製を試みたところ、western blot では CDKA を特異的に認識する抗体が得られた。しかし、これによる免疫沈降産物には活性のある複合体が含まれていなかった。サイクリンとの結合モチーフである PSTAIRE 配列に結合する抗体も活性型 CDKA に結合しないことから(Hutchins et al., 2004)、今回作製したモノクローナル抗体は CDKA の中のサイクリンあるいは基質との結合を妨げる部位を認識している可能性がある。したがって、CDKA 特異的なキナーゼ活性を解析することはできなかつたため、p13^{suc1} 結合キナーゼによる解析を行った。

さらに CDKA 複合体の解析を進めると、タバコ RBR タンパク質およびウシ由来の Histone H1 に対する p13^{suc1} 結合キナーゼの活性はゲルろ過溶出画分の ~100 kDa 付近をピークに存在した。Porceddu らは、特異抗体を用いてタバコ CDKA の Histone H1 に対する活性が ~200 kDa 付近をピークに存在すると報告しており、本研究での結果と異なる(Porceddu et al., 2001)。本研究で用いた p13^{suc1} タンパク質は ~100 kDa 付近の CDKA と優先的に結合することから (Fig.9C)、p13^{suc1} 結合キナーゼを用いた解析法では本来の CDKA の活性の分布を反映していない可能性があるが、用いた細胞の状態や精製法などの違いも結果の相違をもたらしているのかもしれない。しかし、第 2 章で示したように、GFP タンパク質を融合した CDKA を発現させた BY-2 細胞の粗抽出液を同様にゲルろ過分画後、GFP 抗体を用いて免疫沈降を行いタバコ RBR タンパク質およびウシ由来の Histone H1 に対する活性をみると、GFP タンパク質の大きさを加えた程度高分子側に移行した位置に活性のピークはみられたが、より高分子側でも低い活性があることがわかった (Fig.18F)。したがって、今回用いた基質に対しては、高分子側に存在する CDKA 複合体は低い活性しか持たないのかもしれない。一方で、本研究では CDKA がどのサイクリンと複合体を形成しているかを特定することはできなかつた。第 2 章の Fig.14 で使用した CYCD3;3 に対するポリクローナル抗体では、BY-2 細胞の粗抽出液を用いた western 解析で非特異的に検出されるシグナルも多く、CYCD3;3 を判別するのが困難であったため、今回新たに CYCD3;3 に対するモノクローナル抗体を作製した。しかし、今回作製したモノクローナル抗体では昆虫細胞発現系により調製した組み換え CYCD3;3 タンパク質を用い

た western 解析では検出可能だが (第 2 章, Fig.21), BY-2 細胞の粗抽出液を用いた western 解析では CYCD3;3 とされるシグナルを検出することはできなかった. 原因としては, 内生の CYCD3;3 の発現量が低いなどが考えられる. また, 活性のある画分の大きさから CDKA 複合体にはサイクリン以外の因子の存在も示唆される. CKS がその候補の一つにあげられるが, DNA 合成の際に働く PCNA (proliferating cell nuclear antigen)も CDKA や D タイプサイクリンと複合体を形成する(de la Paz Sanchez et al., 2002). これら複合体は Histone H1 とトウモロコシの RBR タンパク質に対して活性を示す. さらに CDKA は翻訳開始因子である eIF4A と相互作用し, eIF4e の免疫沈降物は Histone H1 に対して活性があり, CDK 特異的な阻害剤である roscovitine に感受性を示す(Hutchins et al., 2004).

静止期および細胞周期をまわっている細胞においてゲルろ過画分における CDKA の分布が相同であったことは, 静止期においても CDKA は複合体を形成していることを示唆する. 興味深いことに, 静止期の BY-2 細胞をオーキシン欠乏培地に継代すると CDKA のピーク画分が消失した. この現象は培養 2 日目の BY-2 細胞を出発材料としたときも観察された (Fig.12). ただしこの場合, オーキシン欠乏培地にて 1 日間の培養をはさまないと, 細胞の伸長がみられず, ゲルろ過画分における CDKA の分布も変わらなかった. これは, 培養 2 日目の細胞では, 細胞内に残存するオーキシンが静止期の細胞よりも多いためと考えられる. 24 時間後の DNA 含量をみると, オーキシン欠乏培地では若干 4C の細胞の割合が多くなっていて, 以前の報告にもあるように endoreduplication を起こして倍数化した細胞が増加しているのかもしれないが(Quelo et al., 2002), ほとんどの細胞の DNA 含量が 2C を示していることから, オーキシン欠乏時の細胞の伸長はすべてが endoreduplication によるものとは言えない. 一般的に細胞のサイズと DNA 含量の間には正の相関があるが(Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003), 今回観察された現象では相関性がみられないと考えられる. また, オーキシン欠乏培地での re-entry 後 24 時間の細胞でも 4C の DNA 含量を持つ細胞の割合がコントロール培地のものより多いが, こちらは *CDKB* の発現が認められることから, 単純に一度目の細胞周期の G2 期にある細胞が検出されているものと考えられる (Fig.8). 培地よりオーキシンを除く実験系では, 残存するオーキシン量により結果が左右されることが予想されることから, Yokonolide B のようなオーキシン活性を阻害するような薬剤を利用した方が良いかもしれない(Hayashi et al., 2003). オーキシン欠乏培地で観察された CDKA 複合体の質的な変化は, オーキシンがその複合体形成に必要であることを示唆する. オーキシン添加後にオーキシン輸送阻害剤により同調的に活性化される側根を誘導する実験系が確立されており, Himanen らはマイクロアレイ解析に供した(Himanen et al., 2004). オーキシンシグナルの認識と応答は G1/S 移行期に特異的な遺伝子の誘導とタンパク質翻訳装置の活性化を引き起こす. 細胞周期を活性化する遺伝子は未だ同定されていないが, 本研究によりオーキシンは *CDKA* の発現を誘導するだけでなく, サイクリン/CDKA 複合

体の形成を促進し、活性化を促すこと。それによって RBR のような標的タンパク質をリン酸化し、活性型 E2F 転写因子が G1 期から S 期へと細胞周期を進行させることが示唆された。今後は、オーキシンが活性型サイクリン/CDKA 複合体の形成に関与することを直接的に示すことが課題である。オーキシンの有無で CDKA タンパク質量にはほとんど変化がなかったことから、パートナーとなるサイクリンの状態に興味を持たれるが、内生のサイクリンを検出するための適した抗体が得られなかったことから、CYCD3;3 に GFP タンパク質を融合し、BY-2 細胞に導入した。現在形質転換体を選抜中であるが、この株を用いることにより、オーキシンの有無による CDCD3;3 を含む複合体の質的变化、あるいは CDKA との相互作用の検討などより詳細な解析が期待できる。植物体においてはオーキシンに対する反応は地上部と地下部で異なるが、それぞれの組織でのオーキシン早期誘導性遺伝子による遺伝子発現調節だけでなく、オーキシンがより直接的にサイクリン/CDK の活性を制御するのか大変興味深い。オーキシンのシグナル伝達の阻害剤や変異体を用いた解析を組み合わせることにより、このような活性型サイクリン/CDKA の会合を制御する調節機構の解明が期待できる。

第2章 CDKA のリン酸化による活性制御機構の解析

2-1 序論

Cdc2 に代表されるセリン/スレオニンキナーゼは真核生物の細胞周期の重要な調節因子で(Pines, 1995), 植物では数タイプの CDK が存在するが, その中でも主に CDKA と CDKB が細胞周期制御を行う. PSTAIRE モチーフをもつ CDKA は細胞周期を通して働き, すべてのタイプのサイクリンと結合する. 転写とタンパク質の蓄積量は細胞周期を通して一定である. しかし, キナーゼ活性は G1-S 期と G2-M 期に 2 つのピークを持つことがタバコやシロイヌナズナで報告されている(Mironov et al., 1999). シロイヌナズナのゲノム解析より, 1 つの CDKA と 4 つの CDKB タンパク質が報告されている(Vandepoele et al., 2002). CDKA は酵母の *cdc2/cdc28* 変異体を相補するが CDKB は相補できない. CDKB は細胞周期依存的な発現を示し, G2 期に一番活性をもつ植物に特異的な CDK で(Oakenfull et al., 2002; Gutierrez, 2005), 発現時期から 2 つのグループに分類される. CDKB1 は PPTALRE の保存配列を持ち, S 期から M 期にかけて発現が見られる. CDKB2 は P(S/P)TTLRE の配列を持ち, G2 期から M 期に発現する.

シロイヌナズナに唯一存在する CDKA である *Arath;CDKA;1* の過剰発現体は表現型に変化は現れないが, dominant-negative 型の *Arath;CDKA;1* をタバコ植物体において過剰発現させると, すべての組織で細胞分裂の割合が低下し小さくなる(Hemerly et al., 1995). これに対して, dominant-negative 型の *Arath;CDKB1;1* の過剰発現体は, 気孔の発生に障害が現れる(Boudolf et al., 2004). 異常が生じた気孔細胞は, G2 期停止を起こしていることから CDKB は G2/M 期の進行に特異的な影響を与え, CDKA は植物の細胞周期進行における主要な因子であることが示唆される. 植物細胞では動物細胞のように細胞膜の狭窄による細胞質分裂ができない. そこで植物細胞独自の細胞骨格構造である preprophase band (PPB) と phragmoplast を発達させ 2 つの娘細胞を形成する(Vantard et al., 2000; Azimzadeh et al., 2001). GFP タンパク質を融合した CDKA の解析から, CDKA は PPB が消失する前に一過的に PPB に局在することが示唆されている(Weingartner et al., 2001).

CDK の活性化には調節サブユニットであるサイクリンとの結合が必要であるが, CDK サブユニット自体のリン酸化によっても広く制御されている. CAK による CDK の T-loop に保存されたスレオニン残基のリン酸化により活性化される(Umeda et al., 2005). シロイヌナズナにおいてはこれまでに *Arath;CDKD;1- Arath;CDKD;3* および *Arath;CDKF;1* の異なる 2 クラスの CAK が同定されており, *Arath;CDKF;1* は主に CDK のリン酸化を, *Arath;CDKD;2* は主に RNA polymerase II の largest subunit の CTD (carboxy-terminal domain) のリン酸化を行っていると考えられている

(Shimotohno et al., 2006). また, CDK の活性は ATP 結合部位のリン酸化によって負にも制御され, Wee1 や Myt1 キナーゼがこのリン酸化を行う(Dunphy, 1994). これら ATP 結合部位のリン酸化は特異的に働く CDC25 ホスファターゼにより脱リン酸化される. この脱リン酸化は G2/M 期チェックポイントで起こり, 結果 CDK が活性化し M 期が開始される. これら活性, 不活性に働く修飾は細胞周期の進行を協調的に制御するために CDK の活性を調節している(Pines, 1995).

本研究室では, *cdc2Nt1*(Setiady et al., 1996) (*Nicta;CDKA;3*; 以下 *CDKA* と表記する) (Joubes et al., 2000) と 2 つの *CDKB* 遺伝子 (*Nicta;CDKB1;1*, *Nicta;CDKB1;2*; 以下総称して *CDKB1* と表記する) (Sorrell et al., 2001) を単離している. これら *CDKA* と *CDKB1* の細胞周期での発現様式は異なっている. *CDKA* 結合キナーゼの Histone H1 に対する活性のピークは S 期と M 期にあるが, *CDKA* の転写産物およびタンパク質の蓄積量は周期を通じてほぼ変化がない. 一方, *CDKB1* の転写産物は S 期から M 期にかけて蓄積し, *CDKB1* 結合キナーゼは G2/M 移行期の活性を示す. 昆虫細胞発現系より調製したタバコ CYCD3;3/*CDKA* 複合体はタバコ RBR タンパク質 (NtRBR1) のカルボキシ末端ドメインをリン酸化する(Nakagami et al., 1999). さらに, 同調化した BY-2 細胞の粗抽出液からの CYCD3;3 抗体による免疫沈降物は G1 から S 期に NtRBR1 に対して活性を示した(Nakagami et al., 2002). シロイヌナズナ *Arath;CDKA;1* および *Arath;CYCD2;1* を含む複合体もまた RBR タンパク質に対して活性を示す(Boniotti and Gutierrez, 2001).

近年, *Arath;CDKA;1* の遺伝子の T-DNA 挿入変異体の解析により, *CDKA* は受精前の雄性配偶子形成に必須の機能を持つことが報告された(Iwakawa et al., 2006; Nowack et al., 2006). 植物の生活環は多細胞性の一俵体世代である配偶体と多細胞性の二俵体世代である孢子体を繰り返す(McCormick, 1993, 2004; Yadegari and Drews, 2004; Ma, 2005). 顕花植物の葯の中では, 花粉母細胞の減数分裂によって 4 つの半数性細胞 (花粉四分子) が形成された後, これらの細胞は解離して最終的に花粉粒へと分化する花粉小孢子となる. 減数分裂後, 小孢子の核は細胞の一端に移動し, その特定の位置で最初の半数性の体細胞分裂 (第 1 花粉分裂 (pollen mitosis I; PMI)) を行う. この不等細胞分裂によって大小 2 つの細胞ができるが, その後の運命には違いがある. 大きな細胞は栄養細胞で, 分裂は停止する. 小さな細胞は雄原細胞となるが, やがて栄養細胞質中に遊離し体細胞分裂 (第 2 花粉分裂 (pollen mitosis II; PMII)) によって 2 個の精細胞となる. PMII の時期は植物種によって大きく異なっており, 約 70% の種は花粉が発芽した後に花粉管中で行われ, 残りの約 30% は発芽前の花粉中で行われる. 開花時に雄原細胞と栄養細胞からなる花粉を 2 細胞性花粉, 2 個の精細胞と栄養細胞からなる花粉を 3 細胞性花粉といい, シロイヌナズナは後者に属する. 成熟花粉は葯から雌ずいの柱頭へ受粉すると, 花粉管を伸ばし, 2 つの精細胞は雌性配偶体へと移動する. 精細胞が胚珠へ到達すると, 片方は一俵体の卵と受精し二俵体の胚となり, もう片方は二俵体の中央細胞と受精して三俵体の胚乳となる. この過程

は重複受精と呼ばれ、被子植物の生殖の大きな特徴の一つである(Friedman, 1999; Faure et al., 2003; Weterings and Russell, 2004).

2-2 材料と方法

特に断りのないものは第1章の方法に従った。

2-2-1 植物材料と生育条件

形質転換に用いた *Arabidopsis thaliana* の野生型 (ecotype: Columbia 0) は 23°C に空調を設定した温室で、長日条件 (明期 16 時間, 暗期 8 時間) で生育させた。土はメトロミックス 350 (Sun Gro) を用い 1 鉢につき数粒のくみあい化成 13 号 (宇部化成肥料) を施した。鉢の上部にはピューラックス (オーヤラックス) を希釈した液に浸し消毒した寒冷紗を被せ、輪ゴムで止めた。20 粒ほどの種を寒冷紗の隙間に播き、発芽後に 1 鉢につき 10 個体程度になるように間引いた。毎日灌水を行い、1 週間ごとに 1,000 倍希釈したハイポネックス (ハイポネックスジャパン) を与えた。

2-2-2 タバコ培養細胞の二段階同調

同調化は基本的に長田らの方法(Nagata and Kumagai, 1999)に従った。培養 7 日目の細胞懸濁液 10 ml を 300 ml の三角フラスコに入れた 5 mg/l のアフィディコリンを含む 95 ml の新鮮な改変 LS 培地に植え継ぎ、暗所、27°C、130 rpm で 24 時間培養した。培養液を口径 11 μ m のナイロンメッシュ (Nylon net filters; Millipore) をはさんだ濾過器 (Nalgen) にあげ培地を吸引して取り除いた。250 ml の新しい改変 LS 培地を濾過器に加え、駒込ピペットを用いて 20 回ピペッティングした後、培地を吸引して除いた。この操作を 4 回繰り返し、1 l の改変 LS 培地を使って細胞を洗った。洗浄した細胞を 95 ml の新鮮な改変 LS 培地に懸濁してフラスコに移し、再び暗所、27°C、130 rpm で振とう培養した。5 時間後に終濃度が 3 μ M となるように培養液にプロピザミドを添加し、さらに 4 時間培養した。アフィディコリンの時と同様に 1 l の改変 LS 培地により細胞を洗浄し、新しい 95 ml の改変 LS 培地に再懸濁して、再び暗所、27°C、130 rpm で振とう培養した。移した直後を 0 時間として、経時的にサンプリングを行った。

2-2-3 MG-132 処理

二段階同調を行い、プロピザミド除去 4 時間後に培養液を 45 ml ずつに分け、一方に 10 mM MG-132 (Peptide) 溶液を、他方に溶媒の DMSO のみを 450 μ l ずつ加えた。

2-2-4 各組み換えタンパク質の発現と精製

2-2-4-1 MBP 融合タンパク質の発現と精製

MBP および MBP 融合タンパク質の発現と精製には pMAL Protein Fusion and Purification System (NEB)を用い、キットのマニュアルに従った。構築した発現ベクターは TB1 に導入し、IPTG による誘導は 0.3 mM で行った。

2-2-4-2 GST 融合タンパク質の発現と精製

GST 融合タンパク質の精製には Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare)を用いた。融合タンパク質の発現および精製は resin に付属のマニュアルに従った。構築した発現ベクターは BL21(DE3)pLysS に導入し、IPTG による誘導は 0.1 mM で行った。

2-2-4-3 各組み換えタンパク質の発現ベクターの構築

Nicta;CDKA;3 の 807 番目のグアニンがシトシンに置換していたが、指定するアミノ酸残基に変化がなかったのものでそのまま用いた。

MBP-*Nicta;CDKA;3*

pMAL-c2X ベクターの *XmnI-PstI* 部位に挿入するため、PCR を用いて *Nicta;CDKA;3* 全長の開始コドンからのプライマーと 3'末端に *PstI* 認識配列を付加したプライマーで増幅した。増幅された DNA を *PstI* で消化し、pMAL-c2X の *XmnI-PstI* 部位に入れ換えた。塩基配列が正確であることをシーケンス反応を行い確認した。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

Nicta;CDKA;3-s; 5'-ATGGACCAGTATGAAAAAGTTGAGAAGATT-3'

Nicta;CDKA;3-PstI-as; 5'-GGTGGTCTGCAGTCACGGAACATACCCAAT-3'

MBP-*Nicta;CDKB1;1*

MBP-*Nicta;CDKA;3* と同様に作製した。開始コドンの 112 塩基下流の ATG からのプライマーと 3'末端に *PstI* 認識配列を付加したプライマーで増幅した。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

Nicta;CDKB-s; 5'-ATGGACGAAGAAGGGATTCCACCCACTGC-3'

Nicta;CDKB-PstI-as; 5'-GGTGGTCTGCAGTCAGAATTGCGACTTGTC-3'

MBP-*Nicta;CycD3;3*

pMAL-c2X ベクターの *XmnI-SalI* 部位に挿入するため、PCR を用いて *Nicta;CycD3;3* 全長の 5'末端に *BsaI* 認識配列を、3'末端に *SalI* 認識配列を付加した。増幅された DNA を pUC118 にサブクローニングし、塩基配列が正確であることを確認した。得られた pUC118*Nicta;CycD3;3*(*BsaI-SalI*)を *BsaI* で消化し、Klenow によ

り末端 DNA の平滑化を行った後, *SaII* で消化し, pMAL-c2X の *XmnI-SaII* 部位に組み換えた. PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す.

Nicta;CycD3;3-BsaI-s; 5'-GTTGGTCTCGATGGGAATACAACACAATGA-3'
Nicta;CycD3;3-SaII-as; 5'-GTTGTCGACTTAGCGAGGGCTGC-3'

MBP-Nicta;CycD2;1

MBP-Nicta;CycD3;3 と同様に作製した. PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す.

Nicta;CycD2;1-BsaI-s; 5'-GTTGGTCTCGATGGCAGCTGATAACATTTA-3'
Nicta;CycD2;1-SaII-as; 5'-GTTGTCGACTCACAACCTTTTCTGAAGTCC-3'

GST-Nicta;CDKA;3

pGEX-4T-1 ベクターの *BamHI-SaII* 部位に挿入するため, PCR を用いて *Nicta;CDKA;3* 全長の 5'末端に *BglII* 認識配列を, 3'末端に *SaII* 認識配列を付加した. 増幅された DNA を *BglII* と *SaII* で消化し, pGEX-4T-1 の *BamHI-SaII* 部位に組み換えた. 塩基配列が正確であることをシーケンス反応を行い確認した. PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す.

Nicta;CDKA;3-BglII-s; 5'-CCAGATCTATGGACCAGTATGAAAAAGTT-3'
Nicta;CDKA;3-SaII-as; 5'-CCGTCGACTCACGGAACATACCCAAT-3'

GST-Nicta;CDKB1;1

pGEX-4T-1 ベクターの *BamHI-SaII* 部位に挿入するため, PCR を用いて *Nicta;CDKB1;1* 全長の 5'末端に *BamHI* 認識配列を, 3'末端に *SaII* 認識配列を付加した. 増幅された DNA を *BamHI* と *SaII* で消化し, pGEX-4T-1 の *BamHI-SaII* 部位に組み換えた. 塩基配列が正確であることをシーケンス反応を行い確認した. PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す.

Nicta;CDKB1;1-BamHI-s; 5'-CCGGATCCATGGAGAAATACGAGAAATTG-3'
Nicta;CDKB1;1-SaII-as; 5'-CCGTCGACTCAGAATTGCGACTTGTCCAA-3'

2-2-6 抗体の作製

2-2-6-1 各抗体の準備

CDKA モノクローナル抗体

Nicta;CDKA;3 に対するモノクローナル抗体は MBP-Nicta;CDKA;3 を抗原にして倉敷紡績に依頼して作製した. 対照に MBP-Nicta;CDKB1;1 を用いた. ハイブリドーマ培養上清を用いた western 解析により, MBP-Nicta;CDKA;3 を特異的に認識するラインを選抜した. さらに腹水を得た.

CDKA および CDKB ポリクローナル抗体

タバコ CDKA および CDKB に対するポリクローナル抗体は天野が作製した抗血清から精製した(Amano, 2000).

CYCD3;3 モノクローナル抗体

抗原に MBP-Nicta;CycD3;3 を用い、対照に MBP-Nicta;CycD2;1 を用いて、抗 Nicta;CDKA;3 モノクローナル抗体と同様に作製した。

2-2-6-2 腹水および抗血清からの IgG 精製

マウス腹水 1.5 ml を等量の PBS で希釈し、0.45 μ m のフィルターでろ過した。PBS で平衡化した 1 ml 容量の HiTrap Protein G HP (GE Healthcare) にろ過した腹水を 2 ml 通した後、10 ml の PBS を通して洗浄した。溶出は 0.1 M Glycin-HCl, pH 2.7 を 1 ml ずつ 5 回通して行い、コレクションチューブにはあらかじめ 200 μ l の 1 M Tris-Cl, pH 9.0 を加えておいた。OD₂₈₀ nm の吸光と SDS-PAGE 後 CBB 染色により抗体が溶出されている画分を調べ、回収した。PD-10 カラム (GE Healthcare) を用いて溶媒を PBS に置換し、Ultra-4 (Millipore) で濃縮し、精製抗体とした。

ウサギの抗血清からの IgG 精製は 1 ml 容量の HiTrap rProtein A FF (GE Healthcare) を用いて同様に行った。

2-2-6-3 タバコ CDKB 抗体の精製

タバコ CDKB を特異的に認識する抗体を得るため、CDKA を認識する抗体を除去した。CNBr-activated Sepharose 4B に GST-CDKA タンパク質をカップリングさせ、ポリプレップエンブティカラム (Bio-Rad) に充填し、1 ml 容量の GST-CDKA カラムを作製した。GST-CDKA は 0.7 mg/1 ml sepharose 4B の割合でカップリングさせた。これに IgG 精製した CDKB 抗血清 (1.6 mg/ml) の 1 ml を 6 回繰り返し通し、素通り画分を CDKB 抗体として回収した。

2-2-6-4 抗体のペルオキシダーゼ標識

CYCD3;3 抗体のペルオキシダーゼ標識には Peroxidase Labelling Kit- NH₂ (Dojindo Molecular Technologies) を用いた。IgG 精製した 100 μ g の CYCD3;3 抗体を用いてキットのマニュアルに従い標識した。

2-2-7 形質転換 BY-2 細胞の作製

2-2-7-1 バイナリープラスミドの構築

中神が作製した pBI121-GFP ベクター(Nakagami et al., 2002)より、PCR を用い

て新たに付加された制限酵素認識配列を含む sGFP(S65T)部分を増幅し、pUC19 の *SaII-EcoRI* 部位にサブクローニングし、pUC19-GFP を作製した。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

pBI121-GFP_s; 5'-GTCGACAGGCCTGGTACCGGGGCCATGGT-3'

pBI121-GFP_as; 5'-GGAATTCAGTACTTTACTTGTACAGCTCG-3'

Nicta;CDKA;3_WT-GFP

まず *Nicta;CDKA;3* の全長のカルボキシ末端側に GFP タンパク質を融合するため、*Nicta;CDKA;3* の終止コドンを除き、pUC19-GFP ベクターに挿入した。PCR を用いて *Nicta;CDKA;3* 全長の 5'末端に *SaII* 認識配列を、終止コドンを除いた 3'末端に *KpnI* 認識配列を付加した。増幅された DNA を pUC118 にサブクローニングし、*SaII* と *KpnI* で消化し、pUC19-GFP の *SaII-KpnI* 部位と入れ換え、pUC19-Nicta;CDKA;3_WT-GFP を得た。これを *SaII* と *SpeI* で消化し、得られた DNA 断片を pER8 の *XhoI-SpeI* 部位と入れ換えた。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

Nicta;CDKA;3-SaII-s; 5'-GTCGACATGGACCAGTATGAAAAAGTTG-3'

Nicta;CDKA;3-KpnI-as; 5'-GGTACCCGGAACATACCCAATATCCTTG-3'

Nicta;CDKA;3_D146N-GFP

Nicta;CDKA;3_WT-GFP と同様に行った。

Nicta;CDKA;3_T161A-GFP

Nicta;CDKA;3_WT-GFP と同様に行った。

GFP

pUC19-GFP を *SaII* と *SpeI* で消化し、得られた DNA 断片を pER8 の *XhoI-SpeI* 部位に入れ換えた。

2-2-7-2 アグロバクテリウムへのバイナリープラスミドの導入

Agrobacterium tumefaciense は EHA105 株を用いた。コンピテントセルに 2 mm キュベット (Bio-Rad) を用いてエレクトロポレーション法により 25 μ F, 2.5 kV, 400 Ω の条件でバイナリープラスミドを導入した。1 ml の LB 培地を加え、28°C で 1 時間振とう培養し、100 μ g/ml のスペクチノマイシンを含む LB プレート (1.5% Agar) に塗抹し、28°C で 2 日間培養した。シングルコロニーからグリセロールストックを作製し、-80°C で保存した。

2-2-7-3 タバコ培養細胞 BY-2 の形質転換

まず、アグロバクテリウムの前培養を行った。グリセロールストックを少量かき取り、100 µg/ml のスペクチノマイシンを含む LB 培地 1 ml に植菌し、28°C で 2 日間振とう培養した。本培養は前培養した培養液 3 µl をスペクチノマイシンを含む LB 培地 3 ml に植菌し、28°C で 18~24 時間培養した。培養 3 日目の BY-2 細胞懸濁液 4 ml を 10 cm シャーレに取り、本培養した培養液を 100 µl 加えた後、シャーレ全体に広げた。周りをサージカルテープ (Micropore; 3M) で巻き、暗所にて 25°C で 40~時間共存培養した。このとき、培地が片寄らないように平らな場所に静置した。BY-2 細胞を 15 ml チューブに移した後、室温、1,000 rpm で 1 分間遠心 (LC-121, TS-7, 7 バケット, Tomy) し細胞を沈め、上清を除いた。続いて 10 ml の改変 LS 培地を加えて転倒混和し、室温、1,000 rpm で 1 分間遠心し細胞を沈め、上清を除いた。この操作を 5 回繰り返した。最後に 7.5 ml の改変 LS 培地を加え、転倒混和し 2 ml を 50 µg/ml のハイグロマイシン、250 µg/ml カルベニシリンを含む固形改変 LS 培地 (0.3%(w/v)ゲランガム) に播き、全体に広げ、余分な液はピペットマンで吸い取った。シャーレの周りはサージカルテープで巻き、暗所にて 25°C で培養した。形成されたカルス? を新しい固形選択培地に移し、さらに培養を続けた。

2-2-7-4 GFP 融合タンパク質を誘導発現する BY-2 細胞の選抜

固形選択培地で維持していた形質転換候補 BY-2 細胞の一部を 4 µg/ml β -estradiol (Sigma), 50 µg/ml のハイグロマイシン、250 µg/ml カルベニシリンを含む固形改変 LS 培地 (0.3%(w/v)ゲランガム) に移し、暗所にて 25°C で 18 時間以上培養した。蛍光顕微鏡によりほとんど全ての細胞で GFP の発現が認められたラインを選抜し、固形選択培地で継代した。液体培養をする際は、50 µg/ml のハイグロマイシン、250 µg/ml カルベニシリンを含む改変 LS 培地に移し、徐々に抗生物質の濃度を下げた培地に継代し、最終的に抗生物質を含まない改変 LS 培地で培養した。培養条件は野生型の BY-2 細胞と同様にした。

2-2-7-5 GFP 融合タンパク質の誘導発現

培養液に終濃度 4 µg/ml となるように DMSO に溶解した β -estradiol を添加した。

2-2-8 粗抽出液からの免疫沈降

300 µg の粗抽出液に 20 µl の 50% slurry nProtein A Sepharose 4 Fast Flow を加え、4°C で 1 時間転倒混和した。遠心しビーズを除き、ろ液に 4 µg の GFP 抗体を加え、4°C で 1 時間転倒混和した。さらに 20 µl の 50% slurry nProtein A Sepharose 4 Fast Flow を加え、4°C で一晩転倒混和した。4°C で 10,000 g, 30 秒間遠心した後、上清を除き、300 µl の IP buffer で 3 回、さらに 300 µl の kinase buffer で 3 回ビーズを洗浄し、最後に上清を完全に除去した。western 解析用のサンプルには IP buffer

で x1 にした sample バッファーを加え、95°C で 3 分間加熱した。キナーゼ反応用のサンプルには 10 μ l の kinase buffer を加えた。

2-2-9 MBP 融合サイクリンを用いた結合試験

植え継ぎ 3 日目の細胞に終濃度が 4 μ M となるように β -estradiol を添加した後さらに 1 日培養し、細胞を回収した。それぞれの細胞よりタンパク質を抽出し結合試験に供した。各 GFP 融合タンパク質を含む総タンパク量 300 μ g の BY-2 の粗抽出液に 1 μ g の MBP, MBP-Nicta;CycD3;3, MBP-Nicta;CycD2;1 タンパク質をそれぞれ加え、4°C で 1 時間回転混和した。IP buffer で平衡化した amylose resin を加え、4°C で 6 時間混和した。IP buffer で 3 回洗浄を行った後、1 \times SB を加えて、95°C で 3 分間加熱し、SDS-PAGE 用のサンプルとした。10% SDS-PAGE ゲルで泳動した後、PSTAIR 抗体による western 解析を行い MBP 融合タンパク質に結合した CDKA を検出した。

2-2-10 Sf9 細胞を用いた組み換えタンパク質の調製

Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen) を用いた。

2-2-10-1 昆虫細胞 Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) の維持

Sf9 細胞は浮遊培養によって維持した。培地は 10% FBS (Fetal Bovine Serum; Japna Bioserum), 50 μ g/ml ゲンタマイシンを添加した GIM (Grace's Insect Medium Supplemented (1x); Invitrogen) を用いた。浮遊培養には 125 ml 容量のスピナーフラスコを用いて暗所で 27°C, 60 rpm で 3 日あるいは 4 日培養した。継代は細胞懸濁液を 30 ml 程残して取り除き再び 125 ml となるように新しい培地を加えて同条件で培養した。

2-2-10-2 変異 Nicta;CDKA;3 の準備

FLAG タグを付加した Nicta;CDKA;3 を元に PCR により変異を導入した。

pBSFLAG-Nicta;CDKA;3_WT

まず Nicta;CDKA;3 の N 末端側に FLAG タグを付加するために pFLAG-1 (Eastman Kodak) の MCS に挿入した。PCR を用いて Nicta;CDKA;3 全長の 5' 末端に XbaI 認識配列を、3' 末端に XhoI 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBS SK-1 にサブクローニングし、塩基配列が正確であることを確認した後、pFLAG-1 に XbaI-XhoI 断片を組み換え pFLAG-Nicta;CDKA;3_WT を得た。さらに、PCR を用いて FLAG-Nicta;CDKA;3_WT 全長の 5' 末端に XhoI 認識配列を、3' 末端に SpeI 認識配列を付加し、増幅された DNA 断片を pBS SK-ベクターの XhoI-SpeI 部位に挿

入し、得られた pBSFLAG-Nicta;CDKA;3_WT の塩基配列が正しいことを確認した。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

Nicta;CDKA;3-XbaI-s; 5'-TCTAGAATGGACCAGTATGAAAAAG-3'

Nicta;CDKA;3-XhoI-as; 5'-CTCGAGTCACGGAACATACCAATA-3'

FLAG-XhoI-s; 5'-CTCGAGATGGACTACAAGGACGACGAT-3'

Nicta;CDKA;3-SpeI-as; 5'-CCACTAGTTCACGGAACATACCCAATA-3'

pBSFLAG-Nicta;CDKA;3_D146N

Nicta;CDKA;3 の 146 番目のアスパラギン酸残基がアスパラギン残基に置換された変異遺伝子は、pBSFLAG-Nicta;CDKA;3_WT を元に PCR により変異を導入し作製した。プライマーは変異を加えたいアミノ酸残基の位置に、互いに逆方向に、tail-to-tail に接するように設定し、目的のアミノ酸残基に置換されるように一部 mismatches 塩基配列を含むプライマーを設計した。PCR には Phusion DNA polymerase (Finnzymes) を使用し、増幅された DNA のセルフライゲーションには Blunting Kination Ligation Kit (宝酒造) を使用した。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。変異アミノ酸を指定する 3 塩基を下線で示した。

Nicta;CDKA;3_D146N-forward;

5'-TGCAAAACTTTGGGCTAGCTAGAGCATTTG-3'

Nicta;CDKA;3_D146-reverse; 5'-AGCTTTAAAGCATTTGTACGTCGATC-3'

pBSFLAG-Nicta;CDKA;3_T161A

Nicta;CDKA;3 の 161 番目のスレオニン残基がアラニン残基に置換された変異遺伝子の作製は、pBSFLAG-Nicta;CDKA;3_D146N と同様に行った。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。変異アミノ酸を指定する 3 塩基を下線で示した。

Nicta;CDKA;3_T161A-forward; 5'-GCTCATGAGGTGGTGACATTGTGG-3'

Nicta;CDKA;3_T161-reverse; 5'-GAAAGTTCTGACAGGAATACCAAAA-3'

pBSFLAG-Nicta;CDKA;3_T161E

Nicta;CDKA;3 の 161 番目のスレオニン残基がグルタミン酸残基に置換された変異遺伝子の作製は、pBSFLAG-Nicta;CDKA;3_D146N と同様に行った。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。変異アミノ酸を指定する 3 塩基を下線で示した。

Nicta;CDKA;3_T161E-forward; 5'-GAGCATGAGGTGGTGACATTGTGG-3'

Nicta;CDKA;3_T161-reverse; 5'-GAAAGTTCTGACAGGAATACCAAAA-3'

pBSFLAG-Nicta;CDKA;3_K33R

Nicta;CDKA;3 の 33 番目のリジン残基がアルギニン残基に置換された変異遺伝子の作製は、pBSFLAG-Nicta;CDKA;3_D146N と同様に行った。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。変異アミノ酸を指定する 3 塩基を下線で示した。

Nicta;CDKA;3_K33R-forward; 5'-AGGAAAATAAGGCTGGAGCAGGAA-3'
Nicta;CDKA;3_K33-reverse; 5'-CAGCGCAATTGTTTCATTAGTTAC-3'

2-2-10-3 ドナーベクターの構築

各 FLAG- Nicta;CDKA;3

各 pBSFLAG-Nicta;CDKA;3 の *XhoI-SpeI* 断片を pFastBac1 ベクターの *SaII-SpeI* 部位にそれぞれ組み換えた。シーケンスを読み、目的位置に FLAG-Nicta;CDKA;3 が挿入されていることを確認した。

His-Nicta;CycD3;3

pFastBac HT B ベクターの *BamHI-SaII* 部位に挿入するため、PCR を用いて *Nicta;CycD3;3* 全長の 5'末端に *BamHI* 認識配列を、3'末端に *SaII* 認識配列を付加した。増幅された DNA を pBS SK-の *BamHI-SaII* 部位にサブクローニングし、塩基配列が正確であることを確認した後、*BamHI* と *SaII* で消化し、pFastBac HT B の *BamHI-SaII* 部位に入れ換えた。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

Nicta;CycD3;3-s; 5'-GGATCCATGGGAATACAACACAATGAG-3'
Nicta;CycD3;3-as; 5'-GTCGACTTAGCGAGGGCTGCCAACA-3'

2-2-10-4 組み換えバクミド DNA の調製

大腸菌 DH10Bac コンピテントセルに構築したドナーベクター 1 ng をキットのマニュアルに従いにより導入し、50 µg/ml のカナマイシン、7 µg/ml のゲンタマイシン、10 µg/ml のテトラサイクリン、40 µg/ml の IPTG、40 µg/ml の X-gal を含む LB プレート (1.5% 寒天末) に播き 37°C で 24 時間培養し、白色のコロニーを形成した大腸菌を選抜した。選抜した大腸菌を 50 µg/ml のカナマイシン、7 µg/ml のゲンタマイシン、10 µg/ml のテトラサイクリンを含む LB 培地で培養し、キットのマニュアルに従いバクミド DNA を抽出した。バクミド DNA がトランスポジションを起こしているかはバクミド DNA を鋳型とした PCR により確認した。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

トランスポジション確認用プライマー

M13 Forward (-40); 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'
M13 Reverse; 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

2-2-10-5 組み換えウイルスの調製

培養 3~4 日の Sf9 細胞を 35 mm のシャーレ (Corning) に 1×10^6 個播き, 室温で 40 分放置し細胞を接着させた. その間に 5 μ l のバクミド DNA, 10 μ l の LIPOFECTIN Reagent (Invitrogene) それぞれを 100 μ l の GIM と混合し, さらにこれらを混ぜ合わせて室温で 20 分放置した. シャーレより培地を除き, 新たに 800 μ l の GIM と上記のバクミド DNA 混合液を加え, 27°C で 5 時間培養した. 培地を除き, 10% FBS, 50 μ g/ml ゲンタマイシンを添加した GIM を 2 ml 加え, さらに 3 日間培養した. 細胞をスクレーパー (Iwaki) で剥がし培養液ごと 15 ml チューブに移して, 室温で 3,000 rpm, 5 分間遠心を行い, その上清を P1 ウイルス液として回収し, 遮光し 4°C で保存した.

2-2-10-6 組み換えウイルスの増幅

培養 3~4 日の Sf9 細胞を 60 mm のシャーレ (Corning) に 3×10^6 個播き, 室温で 40 分放置し細胞を接着させた. シャーレより培地を除き, 10% FBS, 50 μ g/ml ゲンタマイシンを添加した GIM を 5 ml 加え, P1 ウイルス液を 500 μ l 添加し, 27°C で 3 日間培養した. 培養上清を 15 ml チューブに移し, 室温で 3,000 rpm, 5 分間遠心を行い, その上清を P2 ウイルス液として回収し, 遮光し 4°C で保存した. 同時に細胞を回収し, 十分な発現が認められないものに関しては, 上記の操作を繰り返し, ウイルスを増幅した.

2-2-10-7 組み換えタンパク質の調製

培養 3~4 日の Sf9 細胞を 60 mm のシャーレに 3×10^6 個播き, 室温で 40 分放置し細胞を接着させた. シャーレより培地を除き, 10% FBS, 50 μ g/ml ゲンタマイシンを添加した GIM を 5 ml 加え, 各々のウイルス液を 100 μ l ずつ添加した. 27°C で 60 時間培養した. スクレーパーにより細胞をシャーレより剥がし培養液ごと 15 ml 遠沈管に移し, 室温で 3,000 rpm, 5 分間の遠心にて細胞を回収した. 1 ml の TBS for FLAG (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7.5) に細胞を懸濁し, 1.5 ml マイクロチューブに移し, 500xg, 4°C にて 5 分間遠心を行い, 上清を除去後, 液体窒素にて凍結後, -80°C で保存した.

2-2-11 無菌条件下における種子の播種

シロイヌナズナの種子を 1.5 ml マイクロチューブに取り, 精製水を 1 ml 加え 30 分間吸水させた. この時, どの種子も均一に吸水できるようにボルテックスにより攪拌し, チビタン (Tomy) で軽く遠心して種子を沈ませた. 30 分経過した後, 水を除き, 70% エタノールを 1 ml 加え, ボルテックスにより攪拌した後, 1 分間静置し, 種子を沈めた. エタノールを除いた後, 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 5.0%) を 5 倍に希釈した溶液を加えボルテックスにより攪拌し, チビタンで軽く遠

心して種子を沈ませ、7分間静置し滅菌処理をした。以降は、クリーンベンチ内で操作を行った。高温では種子が傷むので、クリーンベンチ内ではガズバーナーの火の使用を最小限にとどめた。次亜塩素酸ナトリウム溶液を除き、滅菌水を1 ml 加え、ボルテックスにより攪拌した。この時、攪拌は念入りに10秒ほど行った。チビタンで軽く遠心して種子を沈めた後、滅菌水を取り除いた。この操作を6回繰り返した。1 ml の0.1%寒天水を加え、1 ml 容量のピペットマンで種子を吸い出し、選択培地に播種した。選択培地の上にはあらかじめ2 ml の0.1%寒天水を加えておき、シャーレを傾けて種子が培地上に均一に散らばるようにした。シャーレのフタを開けてクリーンベンチ内で30分間放置し、培地表面の余分な水分をとばした。播種後はシャーレの蓋をし、周りにサージカルテープを巻いた。4°C、暗所で2日間低温処理を施し、22~23°C、4,000 lux 程度で16時間明期、8時間暗期の条件で生育させた。

2-2-12 形質転換シロイヌナズナの作製

2-2-12-1 *Arath;CDKA;1* プロモーターのクローニング

導入遺伝子を *Arath;CDKA;1* プロモーターの支配下で発現させるため、pG35S(Iwakawa et al., 2006)のCaMV 35S プロモーター領域と *Arath;CDKA;1* のプロモーター領域を入れ換えた。まず、*Arath;CDKA;1* 遺伝子を含む6.3 kbp のゲノム断片がクローニングされたプラスミド pGgCDKA(Iwakawa et al., 2006)からPCRにより *Arath;CDKA;1* のプロモーター領域を増幅した。プライマーは5'末端に *KpnI* 認識配列が、3'末端に *Apal* 認識配列が付加されるようにを設計した。増幅されたDNAを *KpnI* と *Apal* で消化した後、pBSの *KpnI*-*Apal* 部位にサブクローニングし、pBSCDKA;1pro を得た。塩基配列が正確であることをシーケンス反応を行い確認した。pBSCDKA;1pro を *KpnI* と *NotI* で消化し、*Arath;CDKA;1* プロモーター断片をpG35Sの *KpnI*-*NotI* 部位と入れ換え、pGCDKA;1pro を得た。PCRに用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

CDKA_proF_KpnI; 5'-GGGGTACCGTCAGGACTTACGACCCAAT-3'

CDKA_proR_Apal; 5'-GGGGGCCCTTTCTCGTACTGCATTAATAAG-3'

2-2-12-2 *Arath;CDKA;1* のCDSの単離

無菌的に栽培した播種後10日目の実生から調製したcDNAからPCRにより *Arath;CDKA;1* のCDSを増幅した。プライマーは5'末端に *XhoI* 認識配列が、3'末端に *SpeI* 認識配列が付加されるようにを設計した。増幅されたDNAを *XhoI* と *SpeI* で消化した後、pBSの *XhoI*-*SpeI* 部位にサブクローニングし、pBSCDKA;1 を得た。塩基配列が正確であることをシーケンス反応を行い確認した。PCRに用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

CDKA_F_XhoI; 5'-CCCTCGAGATGGATCAGTACGAGAAAGTTG-3'

CDKA_R_SpeI; 5'-CCACTAGTCTAAGGCATGCCTCCAAGAT-3'

2-2-12-3 変異の導入

Arath;CDKA;1_T161A

Arath;CDKA;1 の 161 番目のスレオニン残基がアラニン残基に置換された変異遺伝子の作製は、pBSCDKA;1 を鋳型に pBSFLAG-Nicta;CDKA;3_D146N と同様に行った。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

T161A_mF; 5'-GCTCATGAGGTTGTTACTCTC-3'

T161A_R; 5'-AAATGTCCTGACAGGGATACC-3'

Arath;CDKA;1_T161E

Arath;CDKA;1 の 161 番目のスレオニン残基がグルタミン酸残基に置換された変異遺伝子の作製は、Arath;CDKA;1_T161A と同様に行った。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

T161E_mF; 5'-GAGCATGAGGTTGTTACTCTC-3'

T161A_R; 5'-AAATGTCCTGACAGGGATACC-3'

Arath;CDKA;1_D146N

Arath;CDKA;1 の 146 番目のアスパラギン酸残基がアスパラギン残基に置換された変異遺伝子の作製は、Arath;CDKA;1_T161A と同様に行った。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

D146N_mF; 5'-AATTTTGGACTGGCCAGAGC-3'

D146N_R; 5'-AGCAAGCTTCAGTGAGTTTGTG-3'

2-2-12-4 バイナリープラスミドの構築

Arath;CDKA;1_WT-GFP

まず Arath;CDKA;1_T161A の全長のカルボキシ末端に sGFP(S65T)タンパク質を融合した。岩川が作製したプラスミド pGgCDKA-GFP と pBSCDKA;1 を *SphI* で消化し、CDKA;1 のカルボキシ末端に方向が合うように GFP 断片を挿入し、pBSCDKA;1-GFP を得た。続いて pBSCDKA;1-GFP を *XhoI* と *SpeI* で消化し、pGCDKA;1pro の *XhoI-SpeI* 部位に挿入した。

Arath;CDKA;1_T161A-GFP

Arath;CDKA;1_WT-GFP と同様に作製した。

Arath;CDKA;1_T161E-GFP

Arath;CDKA;1_WT-GFP と同様に作製した。

Arath;CDKA;1_D146N-GFP

Arath;CDKA;1_WT-GFP と同様に作製した。

2-2-12-5 アグロバクテリウムへのバイナリープラスミドの導入

2-2-7-2 に従い, *Agrobacterium tumefaciense* EHA105 株にバイナリープラスミドを導入した。この時, pSoup も同時に導入した。

2-2-12-6 シロイヌナズナ植物体の形質転換

シロイヌナズナ植物体の形質転換には減圧浸潤法(Bechtold and Pelletier, 1998)を用いた。

2-2-12-7 かけあわせによる変異 CDKA;1 遺伝子の導入

cdka;1-1/CDKA;1 植物体を雌親に, 各変異 *CDKA;1* の T1 植物体を雄親にしてかけあわせを行い, *cdka;1-1* 植物体に変異 *CDKA;1* を導入した。

2-2-13 植物体からの DNA 抽出

本葉を 1.5 ml マイクロチューブの蓋ほどの大きさに切り取り, ホモジナイザーペッスル (Kontes) を用いてマイクロチューブ中ですり潰した。400 μ l の抽出バッファー (200 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 250 mM NaCl, pH 7.5) を加え, さらに葉の原形がなくなるまですり潰した。130 μ l の Potassium solution (3 M potassium, 5 M acetate) を加え, マイクロチューブミキサーで 30 秒間攪拌した。室温で 15,000 rpm, 3 分間遠心し, 上清 450 μ l を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した。以降は, Mag Extractor -Plasmid - (東洋紡) に含まれる試薬を用いた。500 μ l の吸着液, 30 μ l の磁性ビーズ II を加え, マイクロチューブミキサーで 1 分間攪拌した。マグネット でビーズを分離し, 上清を除いた。720 μ l の 70%エタノールを加え, マイクロチューブミキサーで 30 秒間攪拌し, マグネット でビーズを分離し, 上清を除いた。この操作をもう一度繰り返し, 500 μ l のエタノールを加えて同じ操作を行った。ビーズを減圧乾燥機で乾燥させ, 120 μ l の溶出液を加えた。マイクロチューブミキサーで 1 分間攪拌し, 室温で 10,000 rpm, 3 分間遠心した後, マグネット でビーズを分離し, 上清を 100 μ l 回収して DNA 抽出液とした。

2-2-14 遺伝子型の解析

cdka;1-1 変異体は以下のプライマーを用いて, 植物体から抽出した DNA を鋳型に PCR により選抜した(Iwakawa et al., 2006)。

SALK_106806LP; 5'-TTTGGCTGGCTGCATTCCTTA-3'

SALK_106809RP; 5'-CGCCGGCTCTTGATGACTTTA-3'

SALK_LBb1; 5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'

導入した T-DNA の確認には以下のプライマーを用いて、植物体から抽出した DNA を鋳型に PCR により選抜した。

T7 promoter primer; 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

CDKA_Gen0765R; 5'-GTGAGATTTGATTTGGGGGT-3'

2-2-15 NtCAK の単離

2-2-15-1 NtCAK の単離

1-2-13-1 に従い培養 3 日目の BY-2 細胞より抽出した全 RNA から SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて 5'-RACE-Ready 1st ストランド cDNA を合成した。方法はキットに添付されたプロトコールに従った。1st ストランド cDNA を鋳型に Ex taq (宝酒造) を用いて PCR を行った。プライマーは上島(Ueshima, 1996) が単離した Ntcak2 の配列を参照し、UTR 上に設計した。得られた RCR 産物を Blunting Kination Ligation Kit を用いて pUC118 にサブクローニングし、8 クローンのシーケンスを読み NtCAK の配列を決定した。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

Ntcak2_s1; 5'-TACCACTGAAACAGATGCAA-3'

Ntcak2_as1; 5'-CAATACAGCAACCCTCATCC-3'

2-2-15-2 NtCAK-EGFP を発現する BY-2 細胞の作製

まず NtCAK のカルボキシ末端側に EGFP タンパク質を融合するためのベクターを作製した。PCR を用いて EGFP 全長の 5'末端に *Sma*I 認識配列を、3'末端に *Spe*I 認識配列を付加した。増幅された DNA を *Sma*I と *Spe*I で消化し、pBS の *Sma*I-*Spe*I 部位と入れ換え、pBSEGFP を得た。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

EGFP_s-*Sma*I; 5'-GTCGACAGGCCTGGTACCGGGGCCATGGT-3'

GFP_as-*Spe*I; 5'-GGAATTCAGTACTTTACTTGTACAGCTCG-3'

次に NtCAK の終止コドンを除き pBSEGFP に挿入した。PCR を用いて NtCAK 全長の 5'末端に *Xho*I 認識配列を、終止コドンを除いた 3'末端に Gly リンカーが付加されるような DNA 配列を付加した。PCR には Phusion DNA polymerase を用いた。増幅された DNA を *Xho*I で消化し、pBSEGFP の *Xho*I-*Sma*I 部位と入れ換え、pBS-NtCAK-EGFP を得た。これを *Xho*I と *Spe*I で消化し、得られた DNA 断片を pG35S の *Xho*I-*Spe*I 部位と入れ換えた。PCR に用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

Xho-NtCAK_s;

5'-GGTGGTCTCGAGATGACAGAAGTAGACAATTTATTGAC-3'

NtCAK-G-link_as; 5'-ACCGCCTCCTTCCTCTTCGGGTTGGAATT-3'

2-2-12-5 に従い、アグロバクテリウムヘバイナリープラスミドを導入した。

2-3 結果

2-3-1 リン酸化抗体の特異性の検討

酵母や動物において CDK の活性化は多段階で制御されていることが知られており、リン酸化による活性制御もそのひとつである。CDK の活性化には T-loop 内に保存されたスレオニン残基の CAK によるリン酸化を必要とする(Pines, 1995)。植物においては、これまでに CDKD, CDKF の異なる 2 クラスの CAK が同定されているが(Umeda et al., 2005)、細胞周期における CDK のスレオニン残基のリン酸化状態は調べられていない。タバコ CDKA の T-loop 内のスレオニン残基のリン酸化状態を解析するために、ヒト Cdc2 の 161 番目のスレオニン残基のリン酸化を特異的に認識する抗体を用いることにした。ヒト Cdc2 はタバコ CDKA の homologue であり、T-loop のアミノ酸配列の保存性は高い (Fig.14A)。まず、昆虫細胞発現系を用いてタバコ CDKA に対する Phospho-Thr161 Cdc2 抗体の特異性を検討した。FLAG タグを付加した野生型 CDKA および 161 番目のスレオニン残基をリン酸化されないアラニンに置換した CDKA(T161A)をサイクリンと昆虫細胞で共発現させ、この抗体で検出した。われわれの研究グループでは、タバコ CDKA と CYCD3;3 を昆虫細胞内で共発現させると、NtRBR1C および Histone H1 に対して活性を持つことを報告している(Nakagami et al., 2002)。動物の CDK4 の報告と合わせて考えると(Kato et al., 1994)、FLAG タグを付加した CDKA は CYCD3;3 と共発現させた際に昆虫細胞内でリン酸化を受けることが予想される。FLAG タグに対する抗体を用いて野生型および CDKA T161A を検出すると、両者ともほぼ同程度発現していた (Fig.14B)。野生型 CDKA では 35 kDa 付近を主にして二本のバンドがみられ、CDKA(T161A)では一本検出された。それに対して Phospho-Thr161 Cdc2 抗体では、野生型のレーンの移動度の速い CDKA のみが検出され、タバコ CDKA のリン酸化された 161 番目のスレオニン残基を特異的に認識することが示唆された。

2-3-2 re-entry におけるタバコ CDKA タンパク質の活性化

re-entry の系において Phospho-Thr161 Cdc2 抗体を用いて western 解析を行った。静止期にある BY-2 細胞を新しい培地に継代後、10 時間ころから 161 番目のスレオニン残基のリン酸化が強く検出され始め、25 時間まで徐々に上昇していった (Fig. 14C)。一方、ヒト Cdc2 のリン酸化チロシンに対する抗体 (Phospho-Tyr15 Cdc2 抗体(Da Costa et al., 2006; De Schutter et al., 2007)) を用いてタバコ CDKA のリン

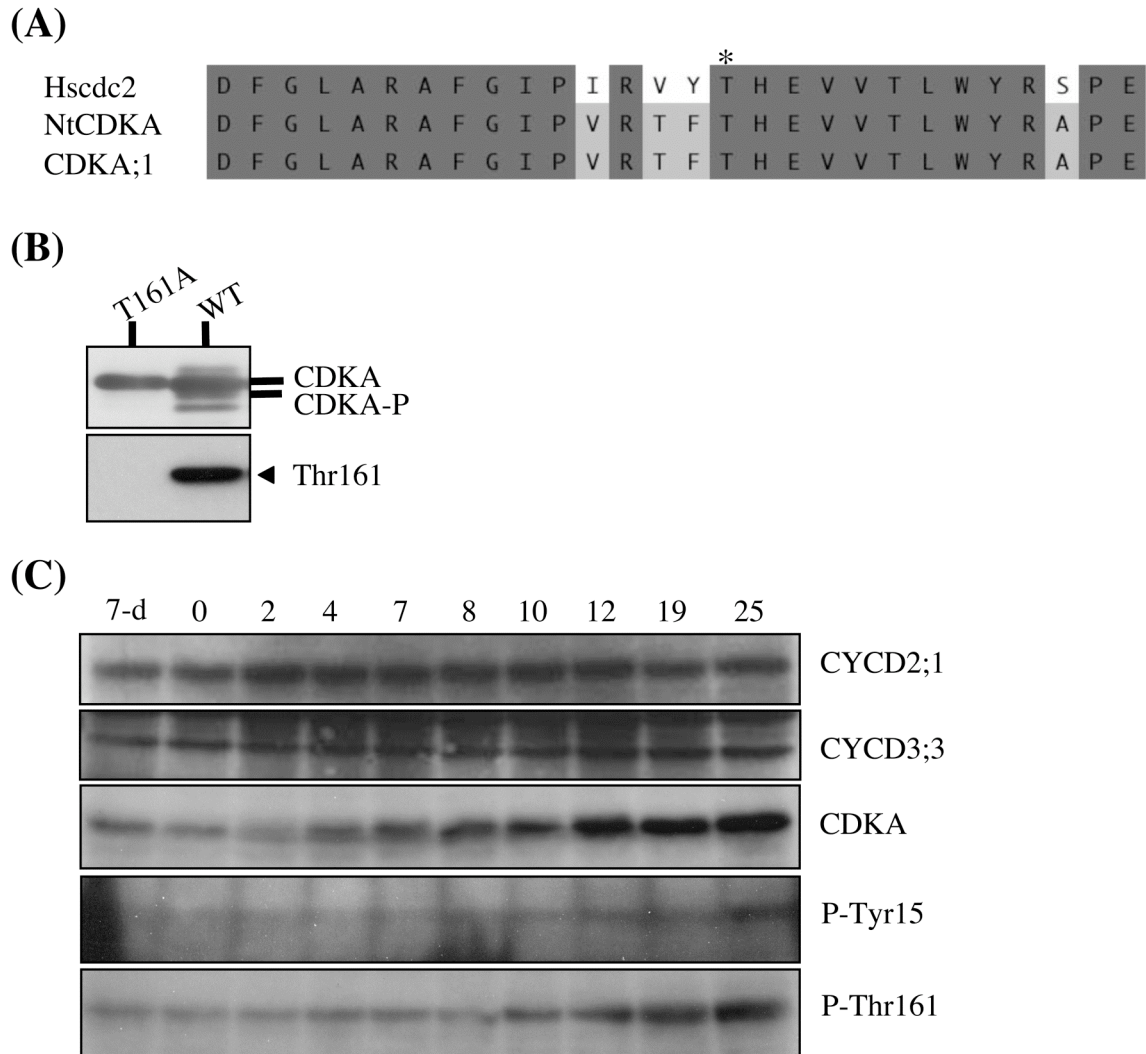


Fig.14 re-entry 後の CKDA の Thr-161 のリン酸化

(A). T-loop 領域におけるアミノ酸配列の相同性. ヒト Cdc2 (GenBank accession number M68520), タバコ CDKA (D50738), シロイヌナズナ CDKA;1 (CAB87903)の T-loop 領域のアミノ酸配列を比較した. *はリン酸化部位.

(B). 昆虫細胞発現系において FLAG-CDKA(WT)あるいは FLAG-CDKA(T161A)を His-CYCD3;3 と共発現させ, 各抗体による western blot 解析に供した. 上部: PSTAIRE 抗体, 下部: Phospho-Thr161 Cdc2 抗体.

(C). 培養 7 日目の BY-2 細胞を各培地に継代した後に粗抽出液を調製した. 各レーン 30 μ g の total protein を泳動し, それぞれの抗体により western blot を行った. CYCD2;1: Nicta;CycD2;1 抗体. CYCD3;3: Nicta;CycD3;3 抗体. CDKA: PSTAIRE 抗体. P-Tyr15: Phospho-Tyr15 Cdc2 抗体. PThr161: Phospho-Thr161 Cdc2 抗体.

酸化の度合いを解析すると, 15 番目のチロシン残基のリン酸化は 19~25 時間後にわずかに検出された. したがって, CDKA の 161 番目のスレオニン残基のリン酸化は

p13^{suc1} 結合キナーゼの活性と並行あるいは先立って上昇しており、第 1 章で示した CDKA タンパク質の蓄積量の上昇の他に (Fig.10A), CDKA のリン酸化の上昇も p13^{suc1} 結合キナーゼの活性化に寄与していることを示唆する。また、タバコ CYCD2;1, CYCD3;3 は re-entry の系においてほとんど蓄積量に変化を示さなかった (Fig.14C)。

2-3-3 同調系における CDKA の挙動

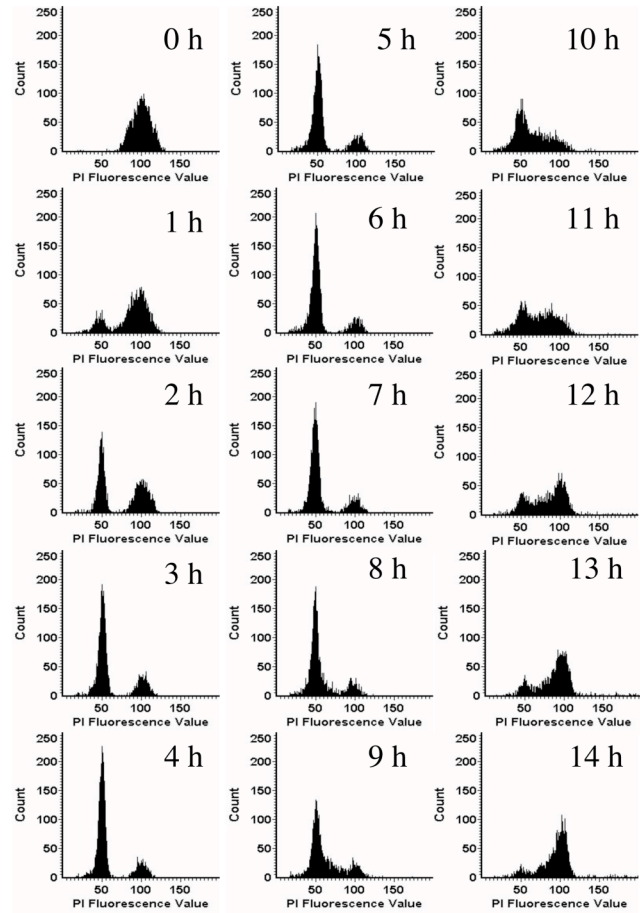
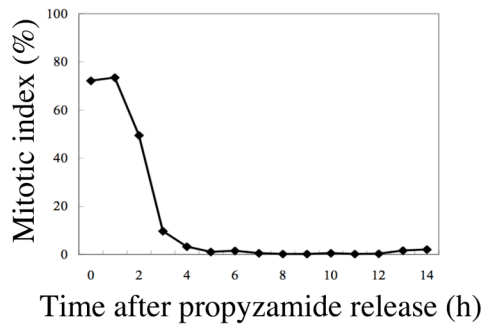
re-entry の系以外で、より詳細に CDKA の活性制御機構を解析するため、高度な同調化が可能な一段階および二段階同調法を用いた (Nagata et al., 1992)。まず、プロピザミドにより細胞周期を M 期に同調し、その後の CDKA の蓄積量、p13^{suc1} 結合キナーゼの活性および CDKA のリン酸化状態を解析した。プロピザミド除去後の細胞周期の進行を LSC 解析によりモニターした (Fig.15A)。また MI は 74%ほどで、高度に同調されていることがわかる (Fig.15A)。re-entry の系では CDKA の蓄積量が徐々に増加したが、二段階同調系ではほぼ一定であった (Fig.15C)。さらに 161 番目のスレオニン残基がリン酸化された CDKA の蓄積量は、re-entry の系では継代後徐々に増加したのに対して、二段階同調系ではプロピザミド除去後急激に減少し、8 時間で再び上昇し、また 10~12 時間の間に減少した。re-entry の系に比べ二段階同調系の同調率が高いことがこれらの違いの主な原因であると考えられる。15 番目のチロシン残基のリン酸化は薬剤除去後すぐに顕著に検出され、M 期のピークを迎える前に減少した。さらに Phospho-Thr161 Cdc2 抗体では 0~2 時間後に 2 本のバンドが検出された (Fig.15C)。上側のバンドは 161 番目のスレオニン残基以外にもリン酸化されたアミノ酸を含む CDKA か、他のタンパク質を検出しているものと考えられるが、さらに解析が必要である。いずれにせよ、p13^{suc1} 結合キナーゼの活性が S 期開始前に速やかに上昇し、p13^{suc1} 結合キナーゼの活性化に CDKA の 161 番目のスレオニン残基のリン酸化が関与していると示唆される。

次に、アフィディコリンを用いて細胞を S 期に同調し、同様の解析を行った (Fig.16)。p13^{suc1} 結合キナーゼの Histone H1 に対する活性は G2 期にわずかに低下した (Fig.16B)。二段階同調系でも G2 期に p13^{suc1} 結合キナーゼの Histone H1 に対する活性が低下しており結果が一致する。15 番目のチロシン残基のリン酸化は一段階同調系においても薬剤除去後すぐに顕著に検出された。これに対して 161 番目のスレオニン残基がリン酸化された CDKA の蓄積量は、ほぼ一定に検出された。

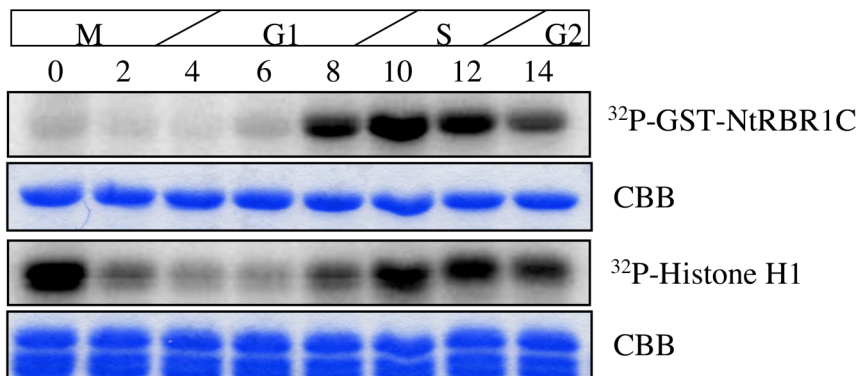
2-3-4 NtRBR1 はプロテアソーム依存的に分解される

二段階同調系において CDKB および NtRBR1 抗体により western 解析を行うと、両者の蓄積量に細胞周期による変動がみられた (Fig.15C)。PESTfind

(A)



(B)



(C)

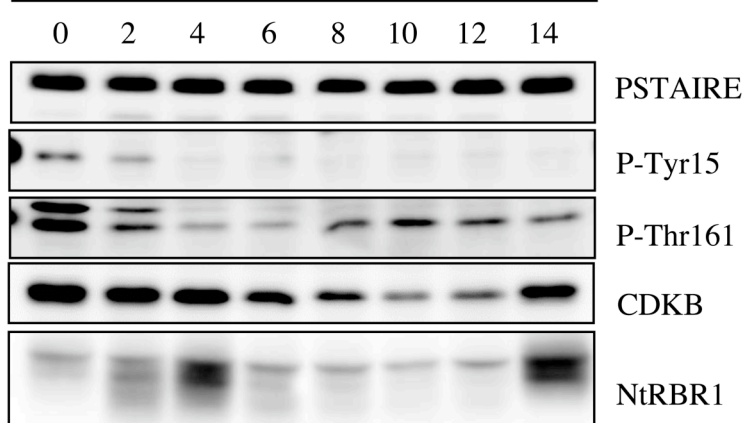


Fig.15 二段階同調系における CKDA の Thr-161 のリン酸化

(A). プロピザミド除去後の MI (左) および DNA 含量ヒストグラム (右). MI は 500 個, DNA 含量は 3×10^3 個の細胞から測定した.

(B). 2 時間毎に回収した細胞からタンパク質粗抽出液を調製した. それぞれ 300 μg の total protein から p13^{suc1} 結合キナーゼを調製し, Histone H1 および NtRBR1C に対するキナーゼ活性を測定した.

(C). 2 時間毎に回収した細胞からタンパク質粗抽出液を調製した. 各レーン 30 μg の total protein を泳動し, それぞれの抗体により western blot を行った. PSTAIRE: PSTAIRE 抗体. P-Tyr15: Phospho-Tyr15 Cdc2 抗体. PThr161: Phospho-Thr161 Cdc2 抗体.

(<https://embl.bcc.univie.ac.at/content/view/21/45/>) による解析では Nicta;CDKB1;1, NtRBR1 共に有意な PEST 配列は検出されなかったが (data not shown), 周期的な変動を示すことからプロテアソーム系による分解の可能性を検討した. プロピザミド除去後 4 時間の細胞 (Fig.17A) にプロテアソーム阻害剤である MG-132 を添加し, 4 および 6 時間後に細胞を回収し western 解析を行うと, CDKB の蓄積量の増加がみられた (Fig.17B). また, NtRBR1 の場合は, CDKB よりも早く蓄積量の減少がみられるため (Fig.15C), MG-132 添加後 2 および 4 時間後に細胞を回収し western 解析を行った. その結果, NtRBR1 の蓄積量の顕著な増加がみられた (Fig.17C). これらのことは CDKB および NtRBR1 がプロテアソーム依存的に分解されることを示唆する.

2-3-5 CDKA の T161A 変異は活性を示さない

シロイヌナズナ *Arath;CDKA;1* の dominant-negative 変異体を過剰発現させると, 細胞分裂が阻害され, 胚に異常が現れる (Hemerly et al., 2000). またその発現量が高いと植物体の再生ができなくなる (Hemerly et al., 1995). 本研究において, タバコ CDKA の 161 番目のスレオニン残基のリン酸化が p13^{suc1} 結合キナーゼの活性化と並行して上昇したことから, T161A 変異も BY-2 細胞の増殖に dominant-negative 効果を持つかを検討した. スレオニン残基をリン酸化されないアラニンに置換し, GFP タンパク質を付加した CDKA (CDKA(T161A)-GFP) を β -estradiol 誘導性プロモーターの下流に連結し, BY-2 細胞に導入した. コントロールとして, 野生型の CDKA (CDKA(WT)-GFP) および 146 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した dominant-negative 型の CDKA (CDKA(D146N)-GFP) を誘導発現する BY-2 細胞も作製した. 各々でハイグロマイシン耐性を持ち, なおかつ GFP の発現が認められる 20~30 ラインを得た. 4 μM β -estradiol 存在下で, ほぼすべての細胞が GFP を誘導発現する 4 ラインをそれぞれから選抜し, 液体培地に移し以降の解析に用いた. それぞれのラインから同様の結果が得られたため 1 ラインずつの結果を示す.

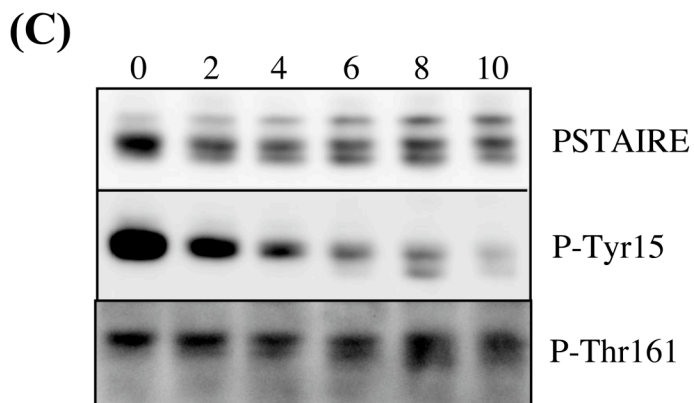
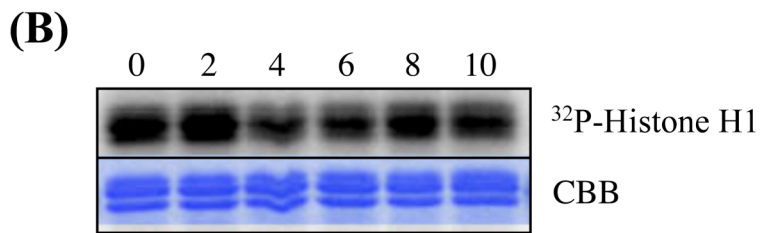
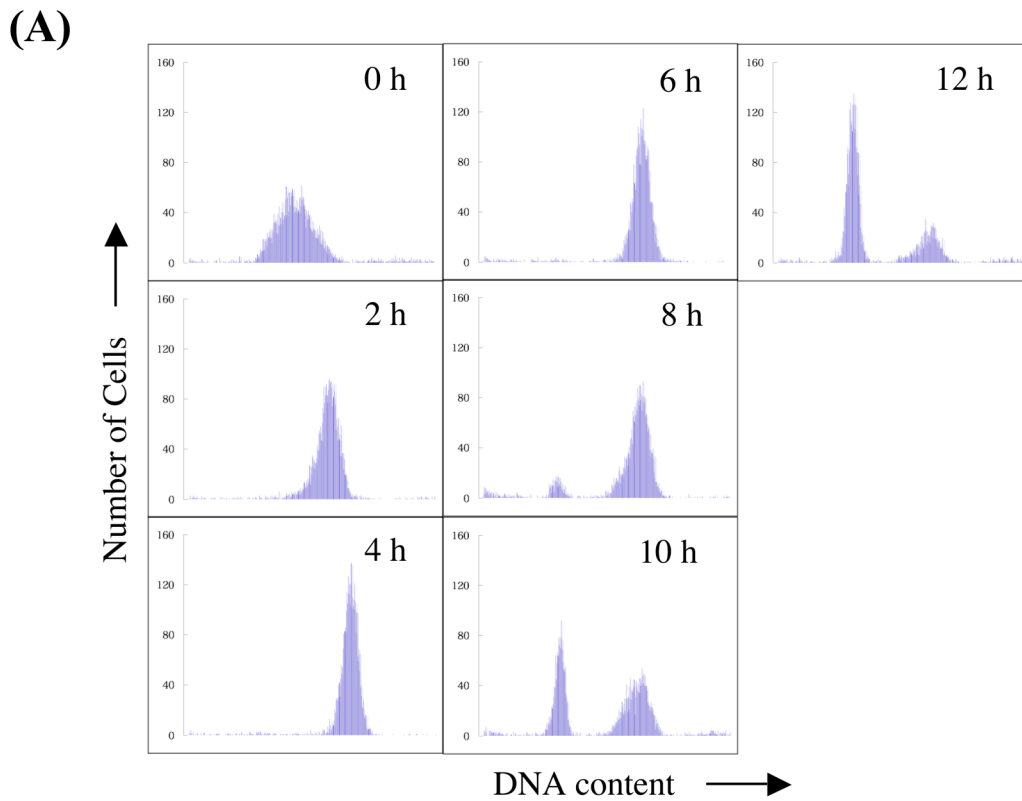


Fig.16 一段階同調系における CKDA の Thr-161 のリン酸化

(A). アフィディコリン除去後の DNA 含量ヒストグラム. 4×10^3 個の細胞から測定した.

(B). 2 時間毎に回収した細胞からタンパク質粗抽出液を調製した. それぞれ 300 μ g の total protein から p13^{suc1} 結合キナーゼを調製し, Histone H1 に対するキナーゼ活性を測定した.

(C). 2 時間毎に回収した細胞からタンパク質粗抽出液を調製した. 各レーン 30 μ g の total protein を泳動し, それぞれの抗体により western blot を行った. PSTAIRE: PSTAIRE 抗体. P-Tyr15: Phospho-Tyr15 Cdc2 抗体. PThr161: Phospho-Thr161 Cdc2 抗体.

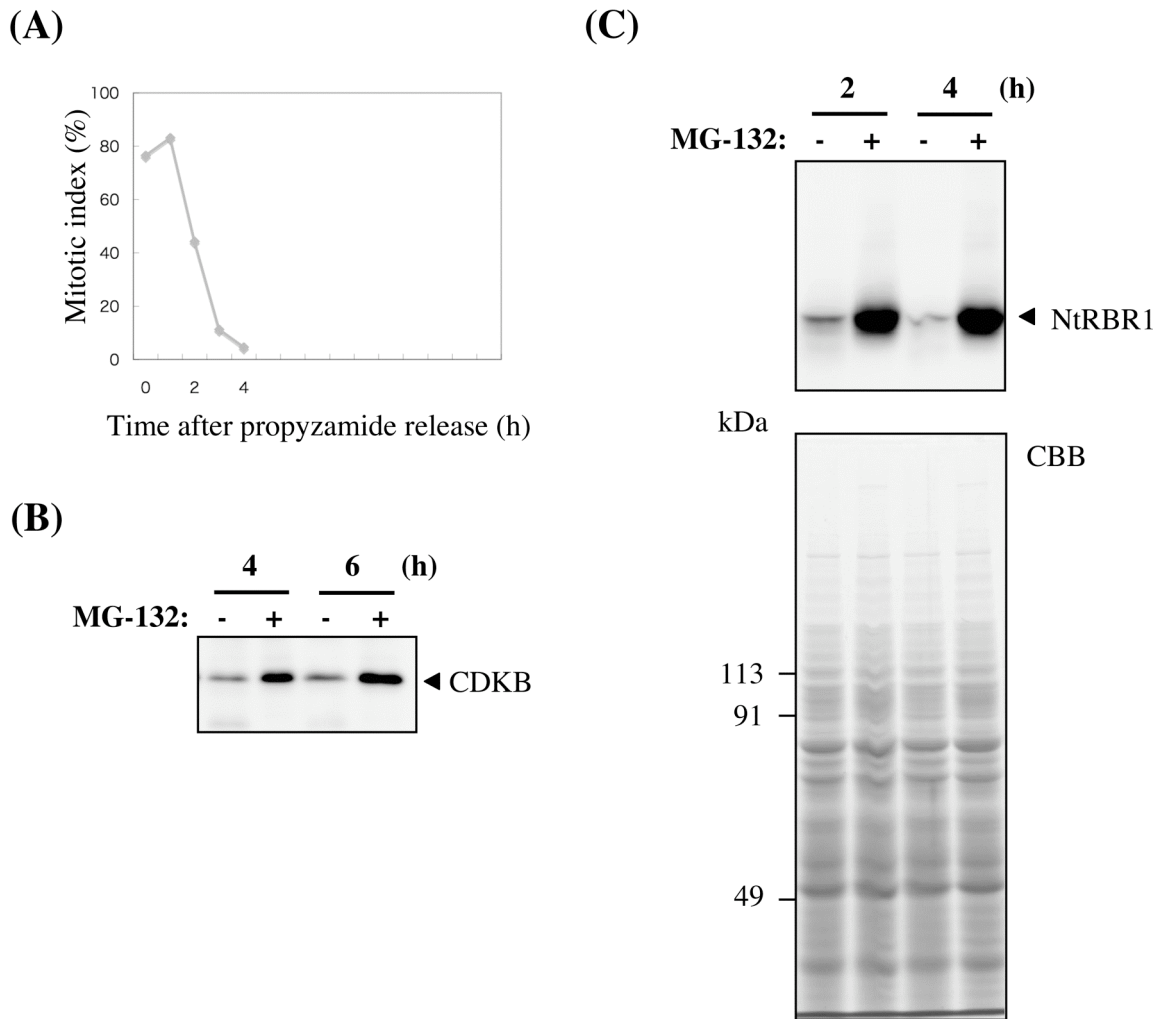


Fig.17 MG-132 処理における NtRBR1 タンパク質の蓄積

(A). プロピザミド除去後の MI. それぞれ 500 個の細胞を数えた.

(B). プロピザミド除去 4 時間後に、培養液を 2 つにわけ、片方には MG-132 (+) を他方には DMSO (-) を添加した. 添加後 4 時間、6 時間で回収した細胞からタンパク質粗抽出液を調製した. 各レーン 30 μ g の total protein を泳動し、CDKB 抗体を用いて western blot を行った.

(C). (B) と同様. MG-132 添加後 2 時間、4 時間で回収した細胞からタンパク質粗抽出液を調製した. 各レーン 30 μ g の total protein を泳動し、NtRBR1 抗体を用いて western blot を行った (上部). SDS-PAGE ゲルの CBB 染色像も同時に示した (下部).

他のグループから報告があるように、CDKA(D146N)-GFP の発現を誘導するとオーキシンを含む通常の培地で培養しても細胞周期の進行が停止し細胞の伸長が観察された(Hemerly et al., 1995; Joubes et al., 2004) (Fig.18A). これに対し、CDKA(T161A)-GFP の発現を誘導しても細胞の生長に影響はなく、CDKA(WT)-GFP の発現を誘導した場合と差がなかった. これら誘導 CDKA-GFP タンパク質の蓄積量

を調べるため GFP 抗体により western 解析を行うと、それぞれ十分量の蓄積が確認でき、CDKA(WT)-GFP が他のものよりも多く蓄積していたのに対して、CDKA(D146N)-GFP の蓄積量は CDKA(T161A)-GFP よりもわずかに低かった (Fig.18B). 誘導した CDKA-GFP を GFP 抗体により免疫沈降後、同様に western 解析を行うと粗抽出液での結果と一致した (Fig.18B). これら GFP 抗体による免疫沈降物の Histone H1 に対するキナーゼ活性を解析したところ、CDKA(WT)-GFP 結合キナーゼでのみ活性が認められ、コントロールとして用いた GFP のみを発現させた細胞の場合と同様に CDKA(D146N)-GFP および CDKA(T161A)-GFP 結合キナーゼでは活性が認められなかった (Fig.18C). 次に細胞全体の CDKA 活性を解析するため、各細胞粗抽出液中の p13^{sucl} 結合キナーゼの Histone H1 に対する活性を解析した (Fig.18D). CDKA(WT)-GFP を発現した BY-2 細胞では p13^{sucl} 結合キナーゼの活性が強く検出されたが、CDKA(D146N)-GFP を発現した細胞では大きな活性の低下がみられた。それに対して CDKA(T161A)-GFP では活性の低下は認められなかった。これらの結果は β -estradiol の添加によりそれぞれの CDKA-GFP の発現を誘導した後の BY-2 細胞の増殖に及ぼした影響と一致し、CDKA(T161A)-GFP は活性型の複合体を形成しないが、この変異 CDKA を過剰発現させても BY-2 細胞の生育に dominant-negative の効果を与えないことを示唆する。

導入した CDKA-GFP 複合体の生化学的な性質をさらに解析するため、それぞれの CDKA-GFP を発現させた BY-2 細胞粗抽出液をゲルろ過カラムにより分画し、各画分を GFP 抗体を用いた western 解析に供した (Fig.18E). カラムにアプライした粗抽出液に含まれる元々の各 CDKA-GFP の量は異なるものの、だいたい 40~670 kDa の位置に広がりをもってそれぞれの GFP 融合タンパク質が検出された。次に各画分の GFP 抗体による免疫沈降物を用いて、NtRBR1 および Histone H1 に対するキナーゼ活性を調べた (Fig.18F). NtRBR1C, Histone H1 に対する活性はサイクリン/CDKA-GFP 複合体に相当するおよそ 120 kDa 付近の画分をピークに検出されたが、Histone H1 に対する活性は全体に広がりを持っていた。

2-3-6 CDKA の Thr-161 のリン酸化は CYCD3;3/CDKA 複合体の活性化に 関与する

BY-2 細胞内での CDKA(D146N)-GFP の過剰発現は、dominant-negative の効果を示したが、CDKA(T161A)-GFP では細胞の生育に影響を与えないことを LSC による DNA ヒストグラム解析により確認した (Fig.19). CDKA(D146N)-GFP では誘導発現によりほとんどの細胞で周期が進行せず G1 期の細胞の割合が高いが、CDKA(T161A)-GFP ではコントロールと同様に細胞周期が進行していた。これは CDKA(D146N)-GFP が内生のサイクリンと積極的に結合するために細胞全体の CDKA キナーゼ活性が低下して細胞周期が停止するのに対し、CDKA(T161A)-GFP

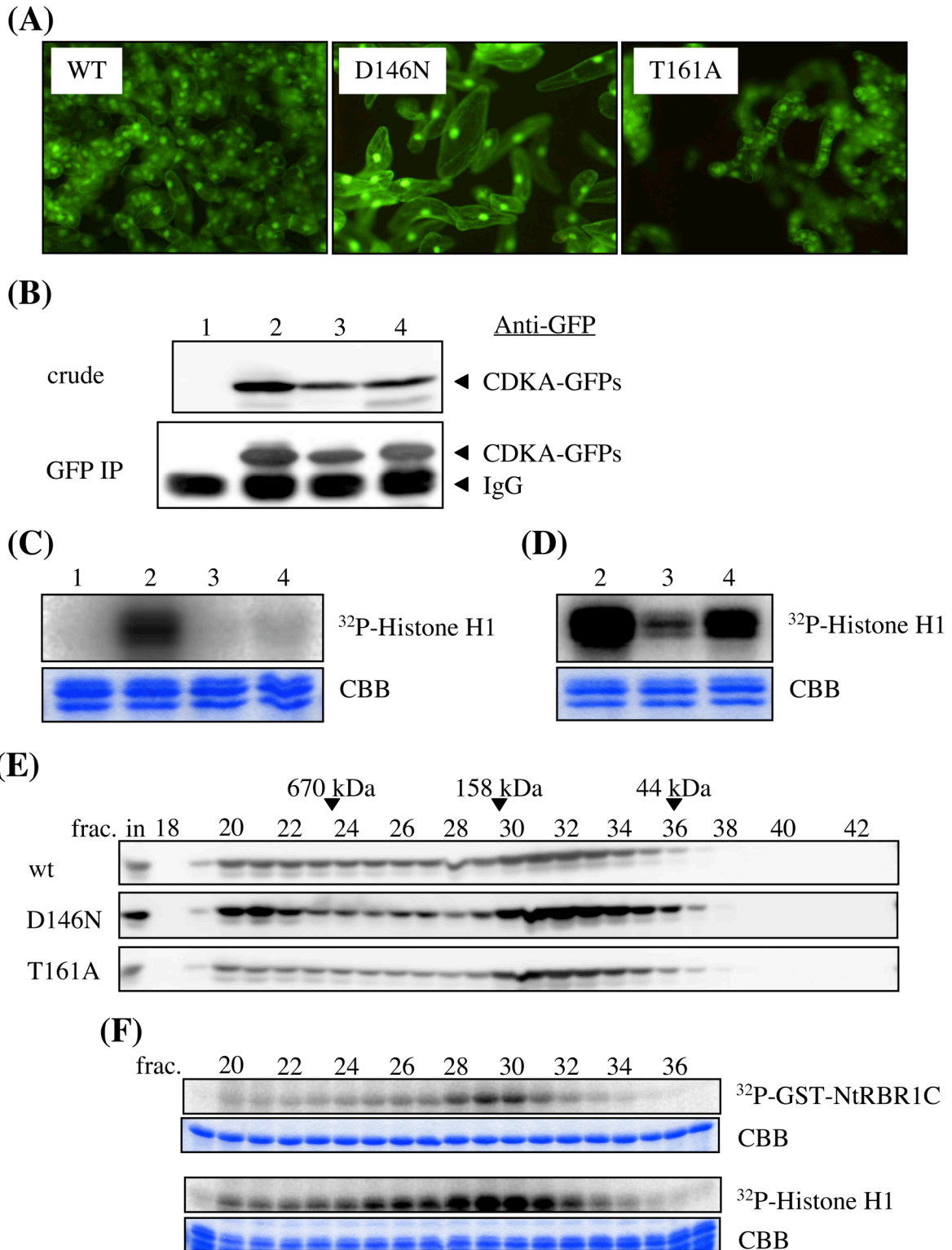


Fig.18 BY-2細胞における CDKA-GFP タンパク質の誘導発現

(A). 4 μ M β -estradiol 添加 3 日後の蛍光顕微鏡像. WT: CDKA(WT)-GFP. D146N: CDKA(D146N)-GFP. T161A: CDKA(T161A)-GFP.

(B). 4 μ M β -estradiol 添加 1 日後の細胞からタンパク質粗抽出液を調製した. (上部) 各レーン 30 μ g の total protein を泳動し, GFP 抗体により western blot を行った. (下部) それぞれ 300 μ g の total protein から GFP 抗体により免疫沈降を行い, 同抗体にて検出した. 1: GFP. 2: CDKA(WT)-GFP.

3: CDKA(D146N)-GFP. 4: CDKA(T161A)-GFP.

(C). それぞれ 300 μ g の total protein から GFP 抗体により免疫沈降を行い, Histone H1 に対するキナーゼ活性を測定した (上部). 基質の CBB 染色像を同時に示した (下部). 各レーンは(A)に示した通り.

(D). それぞれ 300 μ g の total protein から p13^{sup1} 結合キナーゼを調製し, Histone H1 に対するキナーゼ活性を測定した (上部). 基質の CBB 染色像を同時に示した (下部). 各レーンは(A)に示した通り.

(E). 各細胞における CDKA-GFP の分布. それぞれの細胞よりタンパク質粗抽出液を調製し, ゲルろ過カラムにより分画した. 各画分を SDS-PAGE 後, GFP 抗体により western blot を行った. 標準タンパク質の位置をパネル上部に示した. in: input (分画に用いたタンパク量の約 1.5%). 各パネルは(A)に示した通り.

(F). (E)の CDKA(WT)-GFP におけるキナーゼの活性の分布. 各画分から調製した GFP 免疫沈降物における Histone H1 および NtRBR1 に対するキナーゼ活性を測定した. 基質の CBB 染色像を同時に示した. 標準タンパク質の位置を上部に示した.

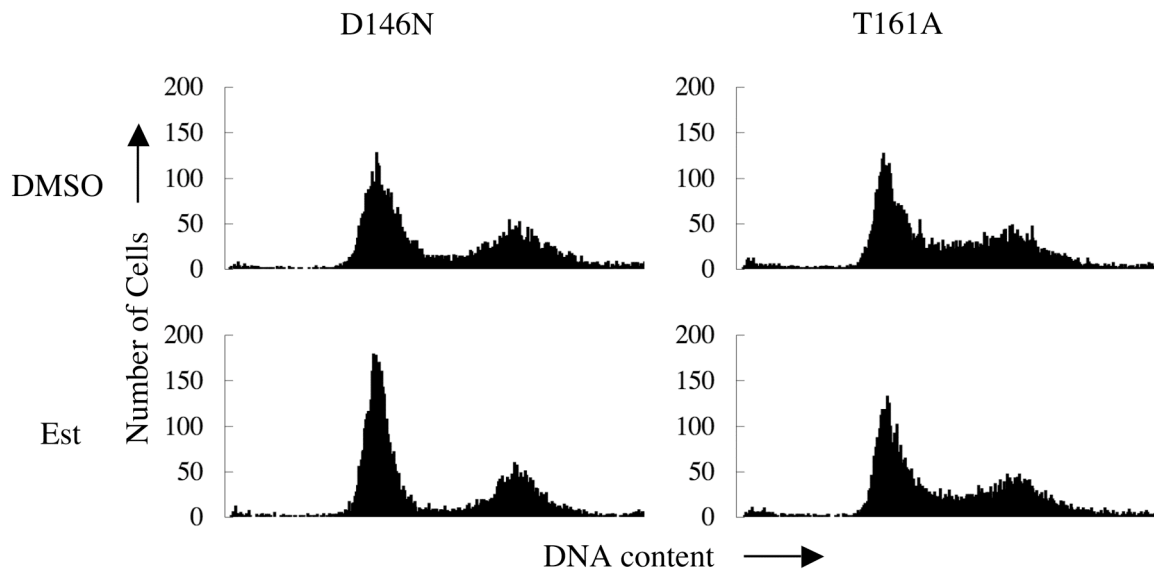


Fig.19 変異 CDKA を誘導発現する BY-2 細胞の DNA 含量

培養 7 日目の形質転換 BY-2 細胞を各培地に継代した際の 11 時間後の DNA 含量を LSC により解析した. それぞれ 7×10^3 個の細胞を測定した. 上部: DMSO 添加 mL. 下部: 4 μ M β -estradiol 添加 mL. D146N: CDKA(D146N)-GFP (左). T161A: CDKA(T161A)-GFP (右).

はサイクリンと結合しないか親和性が弱いために dominant-negative に影響が出ないと予想される. そこで, CDKA(T161A)-GFP がサイクリンと結合するかを調べるため, *in vitro* 結合試験を行った. MBP (maltose-binding protein)をアミノ末端側に融

合したタバコ CYCD2;1 (MBP-CYCD2;1)および CYCD3;3 (MBP-CYCD3;3)を大腸菌で発現させ調製した (Fig.20A). 各 CDKA-GFP タンパク質を誘導した BY-2 細胞粗抽出液と調製した MBP 融合サイクリンとを混合し, amylose resin を用いて pull-down assay を行った. MBP 融合サイクリンに結合した各 CDKA-GFP は PSTAIRE 抗体による western blot により解析した. 今回の実験条件ではすべての CDKA-GFP タンパク質は MBP-CYCD2;1 にほぼ同程度結合した (Fig.20B レーン 4). これに対して, MBP-CYCD3;3 に対する親和性は異なり (Fig.19B レーン 3), CDKA(WT)-GFP に比べ CDKA(D146N)-GFP は強く, 逆に CDKA(T161A)-GFP は若干弱いことが示唆された (Fig.20B). したがって, CDKA(T161A)-GFP はサイクリンと結合するものの, CDKA(WT)-GFP と比べて MBP-CYCD3;3 に対する親和性が相対的に異なることを意味する. このことは BY-2 細胞内で CDKA(T161A)-GFP を過剰発現しても内生の CDKA と少なくとも CYCD3;3 を含むある種のサイクリンとの結合を妨げないため, 細胞の生育に影響を与えない当初の予想が正しいことを示唆する. さらに, CDKA(D146N)-GFP は CDKA(WT)-GFP よりもずっと MBP-CYCD3;3 に対して親和性が強いので, BY-2 細胞内で CDKA(D146N)-GFP を過剰発現すると, おそらく内生の CYCD3;3 を含むサイクリンと不活性な複合体を形成するために dominant-negative 効果をもたらすと考えられる.

次にタバコ CDKA の Thr-161 のリン酸化がサイクリンとの結合ではなく, サイクリン/CDKA 複合体の活性化に寄与しているかを検証するため, 昆虫細胞発現系を用いて各変異 CDKA と CYCD3;3 を共発現させ, FLAG M2 beads を用いて免疫沈降を行いそれぞれのキナーゼ活性を測定した (Fig.21). アミノ末端側に His タグを付加した CYCD3;3 (His-CYCD3;3)とアミノ末端側に FLAG タグを付加した各変異 CDKA (FLAG-CDKA)それぞれを単独で発現させたものでは, 何も感染させていないコントロール細胞と同様に活性を示さなかった. 発現させた各変異 FLAG-CDKA を FLAG 抗体で検出すると, どれもほぼ一様に発現しており FLAG-CDKA は昆虫細胞内で安定に存在していることが示唆される. 一方, His-CYCD3;3 に関しては発現量に差があり, それぞれで感染させたバキュロウイルスの量は同じであるにも関わらず, 単独で発現させたものよりも FLAG-CDKA と共発現させたものの方が, 単独のものよりも高い発現量を示した. His-CYCD3;3 は昆虫細胞内で不安定なタンパク質で, おそらく FLAG-CDKA と結合することで安定化しているものと思われる.

His-CYCD3;3 と共発現させた FLAG-CDKA(WT)は Histone H1 に対して活性を示したが, T-loop 領域に変異を持つ FLAG-CDKA(T161A)は, キナーゼドメインに変異を持つ FLAG-CDKA(D146N)および, ATP 結合ドメインに変異を持つ FLAG-CDKA(K33R)と同様に活性を示さなかった (Fig.21). このことは Thr-161 のリン酸化が活性に必要であることを示唆する. また, Thr-161 のリン酸化を模倣するようにこのアミノ酸残基をグルタミン酸に置換した FLAG-CDKA(T161E)でも Histone H1 に対する活性を示したことからこの仮説は支持される.

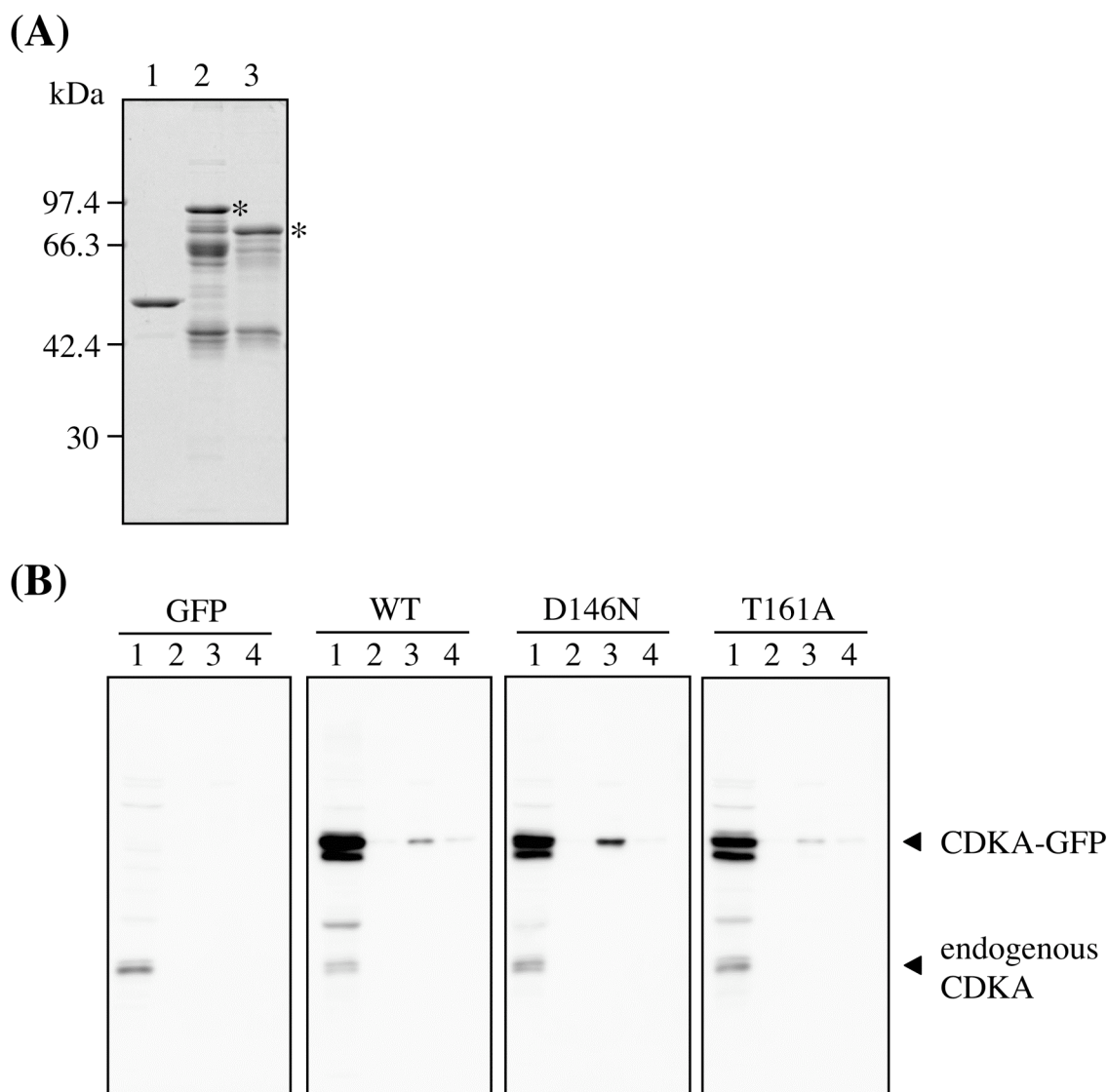


Fig.20 CDKA-GFP の *in vitro* 結合解析

(A). 大腸菌でそれぞれの組み換えタンパク質を発現させ、amylose resin で精製した。それぞれ 1 μ g を SDS-PAGE に供し、CBB 染色を行った。左にマーカータンパク質の位置を示した。*は目的タンパク質。1: MBP, 2: MBP-CYCD2;1, 3: MBP-CYCD3;3.

(B). CDKA-GFP を発現する BY-2 細胞のタンパク質粗抽出液と各 MBP 融合サイクリンを混合し、amylose resin により精製した後、PSTAIR 抗体により western blot を行った。GFP: GFP, WT: CDKA(WT)-GFP, D146N: CDKA(D146N)-GFP, T161A: CDKA(T161A)-GFP, 1: input の 1/10 量を泳動した。2: MBP, 3: MBP-CYCD3;3, 4: MBP-CYCD2;1.

FLAG-CDKA(T161A)および FLAG-CDKA(T161E)に結合した His-CYCD3;3 はほぼ等量であることから、FLAG-CDKA の Thr-161 のリン酸化は His-CYCD3;3 と結合よりはむしろ複合体形成後の活性化に関与していることが示唆される。さらに、*in vitro* 結合試験の結果と一致して、FLAG-CDKA(D146N)には FLAG-CDKA(WT)よりも多く

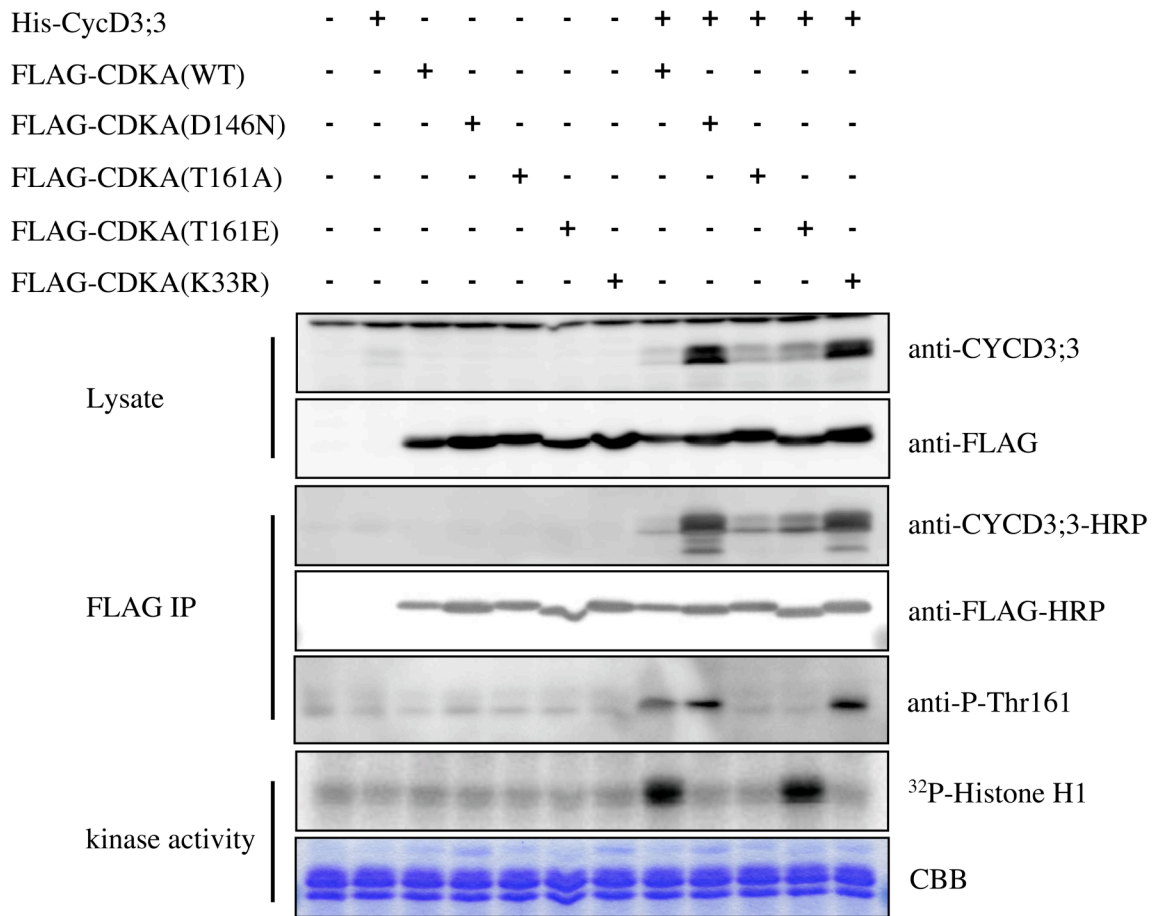


Fig.21 昆虫細胞発現系によるタバコ CYCD3/CDKA の活性

(Lysate). 昆虫細胞粗抽出液の western blot 解析. 各組み換えタンパク質を発現させ (+), CYCD3;3 モノクローナル抗体 (anti-CYCD3;3), FLAG M2 抗体 (anti-FLAG) を用いて western blot を行った.

(FLAG IP). FLAG 抗体による免疫沈降後の western blot 解析. 各組み換えタンパク質を発現させた昆虫細胞粗抽出液から, FLAG M2 beads を用いて免疫沈降を行い, HRP 標識 CYCD3;3 抗体 (anti-CYCD3;3-HRP), HRP 標識 FLAG 抗体 (anti-FLAG-HRP), Phospho-Thr161 Cdc2 抗体 (P-Thr161) を用いて western blot を行った.

(kinase activity). FLAG 抗体による免疫沈降物のキナーゼ活性. 各組み換えタンパク質を発現させた昆虫細胞粗抽出液から, FLAG M2 beads を用いて免疫沈降を行い, Histone H1 に対するキナーゼ活性を測定した. 基質の CBB 染色像を同時に示した.

の His-CYCD3;3 が結合していた.

2-3-7 タバコ CAK 遺伝子の単離

タバコ CAK 遺伝子の単離を行った. シロイヌナズナにおいては CAK のサブユニッ

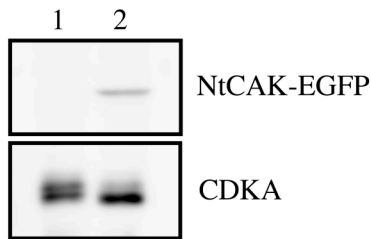
トとして Arath;CDKD;1-3, および Arath;CDKF;1 の4種類が報告されている (Umeda et al., 2005). 今回単離したタバコの CAK (以後, NtCAK と表記する) は D タイプの CDK と相同性があり, それぞれ Arath;CDKD;1 が 71%, Arath;CDKD;2 が 60%, Arath;CDKD;3 が 71%であった (Fig.22A).

次に, カルボキシ末端側に EGFP タンパク質を付加した NtCAK (NtCAK-EGFP) を CaMV 35S プロモーターの支配下に置き, BY-2 細胞で構成的に発現させた (Fig.22B). 蛍光顕微鏡により EGFP の蛍光を観察すると, 核に局在が観られた (Fig.22C). GFP 抗体により NtCAK-EGFP を免疫沈降し, タバコの CDKA およびシロイヌナズナの CTD を基質に CAK 活性を測定したが, どちらに対しても活性は認められなかった (data not shown).

(A)

	ATP-binding site	
CDKD;1	M-E----QPKKVADRYLKREVLGQGTYGVVFKATDTKNGETVAIKKIRLKGKEKEGVNFTA	55
CDKD;2	MSKSGDNQP--V--DRYLRRQILGEGTYGVVFKATDTKTGKTVAVKKIRLGNQKEGVNFTA	57
CDKD;3	MPE----QPKKVADRYLKQEVLGQGTYGVVFKATDTKTEQTVAIKKIRLKGQREGVNITA	56
NtCAK	MTEVDNLLTKKVADRYLKREVLGEGTYGVVFKATDTKSGQTVAIKKIRLKGQKEGVNFTA	60
CDKD;1	LREIKLLKELKHPHIIELIDAFPHKENLHIVFEFMETDLEAVIRDRNLYLSPGDVKSYLQ	115
CDKD;2	LREIKLLKELNHPHIVELIDAFPHDGSLLHLVFEYMQTDLEAVIRDRNIFLSPGDIKSYML	117
CDKD;3	LREIKMLKELKHPHIIILLIDAFPHKENLHLVFEFMETDLEAVIRDSNIFLSPADIKSYLL	116
NtCAK	LREIKLLKELKDPHVIELIDAFPHKENLHLVFEFMETDLEAVIRDRNIFLSPADIKSYIQ	120
	Kinase active-site	
CDKD;1	MI LKGL EYCHGKWLHRDMKPNLLIGPNQOLKLADFG LARIFGSPGRKFTHQVFARWYR	175
CDKD;2	MTL KGLAYCHKKWLHRDMKPNLLIGENGLKLADFG LARLFGSPNRRFTHQVFATWYR	177
CDKD;3	MT F KGLAYCHDKWLHRDMKPNLLIGVDGOLKLADFG LARIFGSPNRKFTHQVFARWYR	176
NtCAK	MTL KGLAFCHKKYVLRDMKPNLLIGPKGOLKLADFG LARLFGSPDRRFTHQVFARWYR	180
CDKD;1	APELLFGAKQYDGAVDVWAAAGCIFAELLRRPFLQGNSDIDQLSKIFAAGFTP KADQWPD	235
CDKD;2	APELLFGSRQYAGVDVWAAAGCIFAELLRRPFLPGSTEIDQLGKIFQAFGTPVPSQWSD	237
CDKD;3	APELLFGAKQYGAAVDVWAVACIFAELLRRPFLQGNSDIDQLSKIFAAGFTP KADQWPD	236
NtCAK	APELLFGAKQYGPVDVWAAACIFAELLRRPFLQGNSDIDQLGKIFAAGFTP KPSQWAD	240
CDKD;1	MI CLPDYVEYQFVPAPSLRSLLPVTS E DALDLLSKMFTYDPKSRISIQQALKHRYFTSAP	295
CDKD;2	MI YLPDYMEFSYTPAPPLRTIFPMASDDALDLLAKMFIYDPRQRTIQQALDHRYSFSSSP	297
CDKD;3	LTKLPDYVEYQFVPAPSLRSLFPVSSDALDLLSKMFTYDPKARISIQQALEHRYFTSAP	296
NtCAK	MVYLPDYVEYQYVPGQPLKTLFPTATE DALDLLSKMFSYDPKARISIQQALEHRYFS SGP	300
CDKD;1	SPTDPLKLEPRVSKQDA--KSSDSKLEAIK--VLSPAHKFRVM-PDRCKSGNGFKDQS	349
CDKD;2	SPTPEPKLQIPASKGDALEPKASEQNHGNSPAVLSPPGKMRRVMGPE-GFT	348
CDKD;3	APTDPAKLEPKVPKQDG--KSSYGKHEAIT--VQSPPRKLRVM-PEGRVDSL-KSH-	348
NtCAK	LPTEPVLLRPRPPKRESANPRVSDFNRSR-GEVVLSPPRKSRVMPPQREGFEANMRPEKM	359
CDKD;1	VDMRQASHDGCAPMSLDFTTILAERPNNRPTITTSADRSHLKRKLDLEFL	398
CDKD;3	VDK-----DQQAPMSLDFTTILAERPNNRPTITTSADRSHLKRKLDLEFQ	391
NtCAK	DDHGNAGERSEQVPMSLDFSVFGMRPPTTRPTITTSADRSHLKRKLDLEFQPEEE	412

(B)



(C)

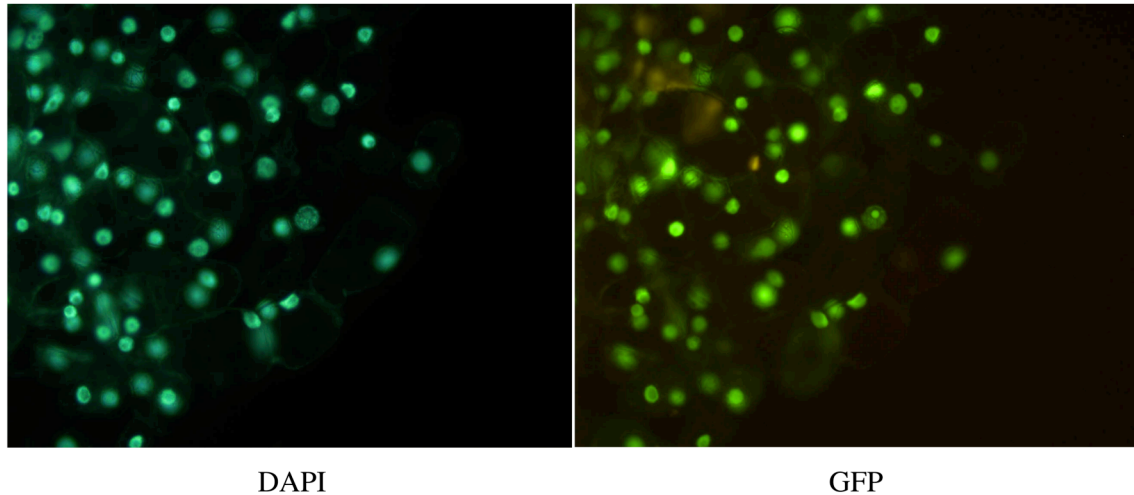


Fig.22 タバコの CAK の単離

(A). シロイヌナズナ CDKD と NtCAK のアミノ酸配列の比較. -はギャップを示している. それぞれで 75%以上の相同性を示すアミノ酸残基は白字で示した. *は T-loop 内の推定リン酸化部位.

(B). 継代 3 日目の野生型および NtCAK-EGFP を発現する BY-2 細胞よりタンパク質粗抽出液を調製した. それぞれ 30 μ g の total protein を泳動し, 各抗体により western blot を行った. NtCAK-EGFP: GFP 抗体. CDKA: PSTAIRE 抗体.

(C). NtCAK-EGFP を発現する BY-2 細胞の蛍光顕微鏡像.

2-3-8 *Arath;CDKA;1* の Thr-161 のリン酸化は PMII の進行に必要である

BY-2 細胞における CDKA(T161A)-GFP の過剰発現は dominant-negative の効果を示さなかったことから (Fig.18A, Fig.19), 細胞生長における CDKA の Thr-161 のリン酸化の役割を見出すことができなかった. シロイヌナズナの CDKA は *Arath;CDKA;1* のみで, 最近その機能欠損変異株 (*cdka;1-1*) の解析が報告された (Iwakawa et al., 2006; Nowack et al., 2006). シロイヌナズナの雄性配偶体である花粉粒は 3 細胞性で, 減数分裂後, 花粉の発芽前に 2 回の体細胞分裂を行い, 1 個の栄養細胞と 1 個の雄原細胞が分裂して 2 個の精細胞となる. 一方, *cdka;1-1* 変異体の花粉は 2 細胞からなる. これは減数分裂後の 2 回目の体細胞分裂である第 2 花粉分裂 (PMII) が起こらず, 雄原細胞が分裂せずに精様細胞として残るためと考えられる.

さらに *cdka;1-1* の異常花粉は重複受精とその後の胚発生にも影響を及ぼす。そこで生体内における Thr-161 のリン酸化の役割を解析するため、シロイヌナズナ *cdka;1-1* 変異体を用いた相補性試験を行った。

GFP タンパク質を融合した各変異 CDKA;1 (CDKA;1-GFP) を *Arath;CDKA;1* プロモーターの下流に連結し、アグロバクテリウムを介して野生型のシロイヌナズナに導入した。カナマイシンにより選抜を行い得られた各 CDKA;1-GFP^{+/+} の植物体を雄側に、*cdka;1-1* 変異体のヘテロ個体 (*cdka;1^{+/-}*) を雌側にしてかけあわせを行い、得られた次代から *cdka;1-1* 変異を持ち、かつ CDKA;1 のトランスジーンが導入されたものを genome PCR により選抜した。*cdka;1^{+/-}* 変異体は雄性遺伝に変異が生じることから、それら植物体から成熟花粉を回収して DAPI 染色を行い、正常花粉と異常花粉の割合を比較した (表 4)。野生型の Col-0 個体の花粉粒のほとんどすべてが 3 細胞からなり、*cdka;1^{+/-}* 変異体では正常花粉と 2 細胞花粉の割合がほぼ 1:1 となり以前の報告と一致した (Iwakawa et al., 2006)。*cdka;1^{+/-}* 変異体に CDKA;1(WT)-GFP を導入した植物体では、およそ 25% の割合で 3 細胞性の花粉に回復したことから、CDKA;1(WT)-GFP は PMII において機能的に働くことを示唆する。さらに Thr-161 リン酸化変異 CDKA;1 を用いて同様に相補性試験を行った。CDKA;1(T161E)-GFP の導入は CDKA;1(WT)-GFP の結果と同様に *cdka;1-1* 変異体を相補したのに対して、CDKA;1(T161A)-GFP は相補しなかったことから、シロイヌナズナ CDKA;1 の Thr-161 のリン酸化は、PMII の進行に必須であると示唆された。

表 4. *cdka;1^{+/-}* 変異体相補性試験における 2 細胞性および 3 細胞性花粉粒の割合

Parental genotype	Tricellular ^a	Bicellular ^a	No. examined
<i>CDKA^{+/+}</i>	982 (97.6)	24 (2.4)	1006
<i>cdka;1^{+/-}</i>	597 (58.5)	424 (41.5)	1021
<i>cdka;1^{+/-}, WT-GFP^{+/b}</i>	616 (71.6)	244 (28.4)	860
<i>cdka;1^{+/-}, T161A-GFP^{+/b}</i>	540 (52.8)	482 (47.2)	1022
<i>cdka;1^{+/-}, T161E-GFP^{+/b}</i>	768 (75.0)	256 (25.0)	1024

^a括弧内の数字はそれぞれのタイプの花粉粒の割合を示す。

^bWT は野生型 *CDKA;1*, T161A は *CDKA;1(T161A)*, T161E は *CDKA;1(T161E)*を示す。

2-3-9 *cdka;1^{+/-}*, CDKA;1(T161E)-GFP は不稔となる

cdka;1^{+/-}, *CDKA;1(T161E)-GFP* の植物体を自家受精させ、*cdka;1^{+/-}*, *CDKA;1(T161E)-GFP* の個体を選抜した (Fig.23A)。*cdka;1^{+/-}* への *CDKA;1(T161E)-GFP* の導入は PMII の異常を相補したのに対して、*cdka;1^{+/-}* の遺伝的背景における *CDKA;1(T161E)-GFP* の発現では、鞘が生長せず不稔となった。花器

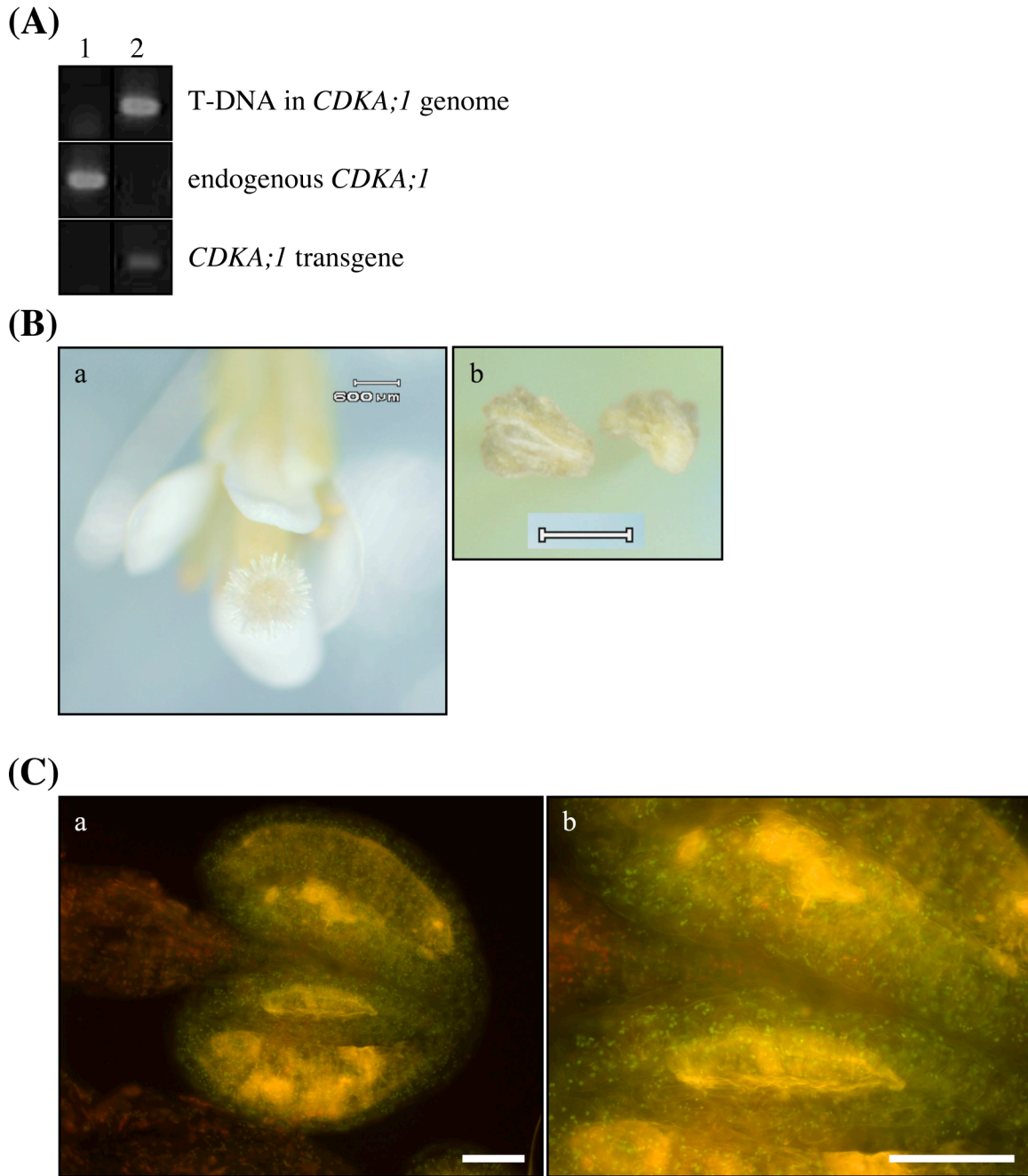


Fig.23 *cdka;1⁻*, *CDKA;1(T161E)-GFP* 植物体の表現型

(A). 遺伝子型の検討. それぞれの植物体の葉から DNA を抽出し, 各プライマーの組み合わせにより PCR を行った. 1: 野生型. 2: *cdka;1⁻*, *CDKA;1(T161E)-GFP*.

(B). *cdka;1⁻*, *CDKA;1(T161E)-GFP* 個体の実体顕微鏡像. a: 花. b: 雄しべ. バーは 600 μm .

(C). *cdka;1⁻*, *CDKA;1(T161E)-GFP* 個体の葯の蛍光顕微鏡像.

官を観察すると, 展開した花の柱頭に花粉が付着しておらず, 雄ずいからも花粉粒の放出がなかった (Fig.23B). 雄ずいの蛍光観察では, 細胞の核に GFP の蛍光が観られた (Fig.23C).

2-4 考察

初めに CDK をコードする遺伝子 (*cdc2*) が同定されたのは、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) (Lorincz and Reed, 1984)で、遺伝学的な解析から、*cdc2* 遺伝子産物 ($p34^{cdc2}$ と表記されることもある) は DNA 合成の誘導と有糸分裂の開始に必須であることが示された。一方、酵母に対して高等動物では、多種の CDK が細胞周期のそれぞれの時期に関与している (Pines, 1995)。植物の CDKA はサイクリン結合モチーフである PSTAIRE からなるアミノ酸配列が保存されており、細胞周期を通じて機能し酵母の CDK と類似性が高い (Oakenfull et al., 2002; Gutierrez, 2005)。しかし、CDKA が細胞分裂に先立ってどのように活性化されているかについての分子機構は不明な点が多い。本研究ではまず、簡易的な同調が可能なることから静止期にある細胞の細胞周期への再移行をモニターする re-entry の系を用いた。タバコ CYCD2;1, CYCD3;3 のタンパク量はほぼ一定であったのに対して、第 1 章でも示した通り、静止期の細胞を新鮮な培地に継代すると、CDKA の蓄積量は徐々に増加した (Fig.14C)。第 1 章の結果よりも顕著な増加が認められるように見えるが (Fig.10A)、継代した元の静止期にある細胞の状態によるものと考えられる。この実験系において複数の実験を行ったが、CDKA の蓄積量は増加するものの、その割合にはある程度の差がみられた。しかし、 $p13^{suc1}$ 結合キナーゼの活性の上昇にはどの場合にも再現性が認められた。

本研究では各種の抗体を使用するため、western blot に用いる数種類の blocking 剤を試したが、Blocking agent での結果が一番良好であったことより、リン酸化抗体での検出には Blocking agent が添付されている ECL Advance (GE Healthcare) を用いることにした。re-entry の系では、 $p13^{suc1}$ 結合キナーゼの活性と並行して Thr-161 がリン酸化された CDKA の蓄積量が増加した (Fig.14C)。植物の CAK は CDKD, CDKF の 2 クラスが報告されているが (Umeda et al., 2005)、細胞周期における CDK の T-loop のリン酸化の度合いを経時的に解析した報告は植物ではない。本研究での結果はおそらく CAK による CDKA の Thr-161 のリン酸化が G1/S 移行期に上昇することを示唆する。今後、細胞周期における CAK の活性化あるいはこのスレオニン残基特異的なホスファターゼの解析が待たれる。シロイヌナズナの Arath;CDKD;1 は CDK に対しても CTD に対しても活性を示さない (Shimotohno et al., 2004) ことが報告されており、今回単離した NtCAK も Arath;CDKD;1 と高い相同性を示すことから活性を持たないものかもしれない (Fig.23)。したがって、本研究ではタバコにおける CAK と CDKA の活性化の相関を見出すことはできなかった。動物では、ニワトリ Cdc2 の Thr-161 は S 期から M 期までリン酸化を受けるが、G1 期ではリン酸化されていない (Krek and Nigg, 1992)。したがって、タバコ CDKA の Thr-161 のリン酸化はニワトリ Cdc2 の挙動と同様に推移することが示唆された (Fig.15C)。また、一段階同調系においてアフィディコリン除去後 10 時間の細胞で、 $p13^{suc1}$ 結合キナーゼの活性お

よび CDKA の Thr-161 のリン酸化の度合いの低下がみられなかった (Fig.16B, C). DNA ヒストグラム見ると細胞周期はほぼ G1 期に移行していると思われるが, MI など測定して同調率を確認する必要がある. いずれにしても, p13^{suc1} 結合キナーゼの活性と CDKA の Thr-161 のリン酸化に相関がみられた. ただし, それぞれの CDK で T-loop 領域の相同性が高いことから, 今回用いたリン酸化特異抗体が BY-2 細胞粗抽出液において CDKA の T-loop のリン酸化だけを認識しているのか確認する必要がある. しかし, 本研究では活性型 CDKB を調製する実験系の確立ができなかったため, 用いたリン酸化特異抗体が CDKB を含む他のタイプの CDK の T-loop のリン酸化を検出している可能性については検討できなかった. 今後, CDKA 特異抗体にて免疫沈降後, リン酸化特異抗体で検出するなどして, CDKA のみの活性型リン酸化を示す必要がある.

一方, Phospho-cdc2 (Tyr15)抗体では継代後 19 時間で初めてわずかにシグナルが検出され, 25 時間では多少の増加がみられた (Fig.14C). Thr-161 がリン酸化された CDKA の蓄積量が re-entry 後 25 時間では高いレベルを維持したままだが, Tyr-15 がリン酸化された CDKA が増加したためにその時間での p13^{suc1} 結合キナーゼの活性の低下を招いているのかもしれない. あるいは, タバコ KIS1(Jasinski et al., 2002a; Jasinski et al., 2002b)のような CDK 阻害因子の関与, 複合体中のサイクリンの質的な変化なども考えられ, 原因を特定するにはさらに解析が必要である. 二段階同調系ではプロミザミド除去後 0 時間に Tyr-15 のリン酸化が検出され, その後消失した (Fig.15C). MI の値が高いときに Tyr-15 リン酸化 CDKA が蓄積していることは M 期の進行中に CDKA の活性を抑制する役割があるのかもしれない. あるいは, 一段階同調系におけるアフィディコリン除去後の細胞粗抽出液においても Tyr-15 リン酸化 CDKA の強いシグナルが検出されたことから (Fig.15C, Fig.16C), 同調操作によるストレスによって Tyr-15 のリン酸化が誘導されているのかもしれない. これを支持するように, DNA ストレスが起こると DNA 修復系の遺伝子と *WEE1* の発現が誘導され, CDKA の Tyr-15 のリン酸化が起こり, 細胞周期が G2 期で停止するモデルがつい最近報告された(De Schutter et al., 2007).

二段階同調 0 時間での p13^{suc1} 結合キナーゼの活性は Histone H1 に対してのみにあり, NtRBR1C に対してはみられなかった. これはサイクリン/CDKA の組み合わせによって基質特異性が異なり, この時期に CDKA に結合しているサイクリンが NtRBR1C を認識できないためと考えられる. あるいは, 今回基質としている NtRBR1 のカルボキシ末端ドメインがリン酸化されないだけで NtRBR1 の他のリン酸化部位はリン酸化され得るかもしれない. その意味では NtRBR1 の全長を基質として用いるのが望ましいが, 現在のところ収量よく精製できていないため, 安定して精製できるカルボキシ末端ドメインを用いた, NtRBR1 抗体での western 解析では複数のバンドが検出された. これはリン酸化によるバンドシフトと考えられる. G1/S 移行のモデルでは G1 初期に RBR は低リン酸化状態にあり, E2F に結合して活性を負に制御し

ていると考えられている (Fig.4). その時期に相当するプロピザミド除去後 4 時間の細胞では低リン酸化状態にあると思われる移動度の速いシグナルが多く検出されておりモデルと一致する. 今後, 細胞周期および MG-132 処理による mRNA の蓄積量の変化を確認する必要があるが, MG-132 処理により NtRBR1 タンパク質の蓄積量が増加したことから, NtRBR1 が高リン酸化されることが引き金となりプロテアソームにより分解されることが示唆された (Fig.17C). 動物では G1/S 期にリン酸化された pRb は M/G1 期に PP1 ホスファターゼにより脱リン酸化され, 転写を抑制する活性型の pRb に戻る (Ludlow et al., 1993; Nelson et al., 1997). 最近, pRb はリン酸化による活性制御以外にも, pRb とともに動物では最もよく知られた癌抑制遺伝子である p53 の分解制御に関与する *Mdm2* が高発現した場合や活性化した場合に, 分解による制御を受け細胞の癌化が促進されることが報告された (Uchida et al., 2005). 本研究では NtRBR1 のユビキチン化については検討していないが, 細胞周期で RBR が分解による制御を受けることは, 癌細胞的な増殖を示す培養細胞に特異的な現象か, あるいは植物細胞にのみ共通した細胞周期制御機構なのか興味深い. また, CDKB の蓄積量にも周期性がみられた (Fig.15C). シロイヌナズナの CDKB2 は有意な PEST 配列を持ち, プロテアソームを介して分解される (Adachi et al., 2006). B タイプ CDK には CDKB1 と CDKB2 のサブタイプがあり, 今回用いた CDKB 抗体はこれら 2 つを区別していないため, 両方かあるいはどちらのタイプの CDKB が分解を受けているのかはわからないが, タバコでも同様な現象が認められたことは, 植物に特有な CDKB がプロテアソームによる分解制御を受ける可能性が一般化されることを示唆する.

動物や酵母で, *cdc2* の dominant 変異アリルを発現させると, 完全な細胞周期の停止が起こる (Mendenhall et al., 1988; van den Heuvel and Harlow, 1993). CDKA の 146 番目のアスパラギン酸 (Asp-146) に相当するアミノ酸は全てのタンパクキナーゼで保存されており, ヒト CDK の三次元構造解析の結果から Asp-146 はコファクター ATP (Mg^{2+} ATP) の結合に必須であることが報告されており (De Bondt et al., 1993), このアミノ酸残基は Mg^{2+} をキレートし, このアミノ酸に変異が入ると ATP の γ 位のリン酸を基質に移行できなくなり CDK 活性が失われる. シロイヌナズナの dominant-negative 型 *Arath;CDKA;1* (CDKA;1.D146N) を過剰発現させると, この遺伝子の発現量が高いほどシロイヌナズナ植物体の再生能が失われる (Hemerly et al., 1995). この CDKA;1.D146N を過剰発現するタバコ植物体を得られるのは, タバコ細胞内ではシロイヌナズナ CDKA;1.D146N と内生の CDKA 制御因子との親和性が低いと考えられる. また, T161A 変異を含むニワトリの *cdc2* 遺伝子を野生型の分裂酵母に導入すると細胞周期停止が起こることから (Krek et al., 1992), タバコ CDKA(T161A)-GFP を構成的に発現する BY-2 細胞は作出できないことが予想された. そこで, 形質転換体の作製が困難であると予想される致死遺伝子の解析などに有効な化学物質誘導性プロモーターの利用を検討した. この場合, 薬剤を処理した場合でのみ導入遺伝子の発現がみられ, その薬剤自体が植物の生育に無害であるものが良い.

今までにテトラサイクリン誘導性の *Triple-Op* プロモーター、デキサメタゾン誘導性のプロモーター、エストロゲン誘導性のプロモーターなどが報告されている (De Veylder et al., 2000; Zuo et al., 2000). テトラサイクリンによる誘導なしに分裂細胞で *Triple-Op* プロモーター活性が認められる問題点があることから、本研究では β -estradiol 誘導性の XVE システムを採用した。

CDKA(D146N)-GFP の誘導は以前の報告と一致して、通常の濃度のオーキシンとショ糖の存在下においても細胞の伸長と細胞分裂の停止がみられた (Fig.18A). これに対し、CDKA(T161A)-GFP は CDKA(WT)-GFP を誘導した場合と同じく表現型に変化が現れなかった. それぞれの誘導 CDKA-GFP を GFP 抗体により免疫沈降し Histone H1 に対する活性を評価した結果、CDKA(WT)-GFP のみで活性が検出された (Fig.18C). さらに、内生の CDKA を含めた活性を調べるため、それぞれの CDKA-GFP を誘導発現後の細胞粗抽出液を用いて p13^{suc1} 結合キナーゼの Histone H1 に対する活性をみると、CDKA(WT)-GFP を発現させた細胞では強い活性が認められたが、CDKA(D146N)-GFP では著しく活性が低下していた (Fig.17D). 異なるラインではほとんど活性が検出できないものもあった (data not shown). 驚くべきことに、CDKA(T161A)-GFP を誘導発現させても内生の CDKA を含めた活性は高く維持され、ゲルろ過クロマトグラフィーによる結果でも、3者で同様の分布を示していた (Fig.18E). これらのことは BY-2 細胞内で発現させた CDKA(T161A)-GFP は不活性なキナーゼ複合体しか形成できず、かつ dominant-negative の効果がないことを示唆している。

動物で報告されている Speedy/Ringo (Karaiskou et al., 2001) のようなキナーゼ活性を抑制する因子の存在は、T161A-GFP 複合体自体の活性がないことから考えにくい. そこで CDKA(T161A)-GFP がサイクリンと結合できない可能性を検証するため、*in vitro* 結合解析を行ったところ、すべての CDKA-GFP タンパク質が MBP-CYCD2;1 および MBP-CYCD3;3 と結合可能であることがわかった (Fig.20B). しかし、MBP-CYCD3;3 に対する親和性がそれぞれの CDKA-GFP によって異なり、CDKA(T161A)-GFP を発現させても dominant-negative 効果を示さないのは、内生の CDKA とサイクリンの結合においてあまり競合しないためであると考えられる. さらに、CDKA(D146N)-GFP は CDKA(WT)-GFP よりも MBP-CYCD3;3 に対して強い親和性を示したことから、BY-2 細胞で発現させた際の dominant-negative 効果は内生の CYCD3;3 に対して CDKA よりも CDKA(D146N)-GFP の方が強い親和性があるためと示唆される. タバコ CYCD3;3 は CDKA と複合体を形成して、G1 期から S 期に強く NtRBR1 をリン酸化し、高発現した BY-2 細胞では G1 期の短縮が認められ、G1/S 移行期の律速因子であることが示唆されている (Nakagami et al., 2002).

分裂酵母 p34^{cdc2} の Thr-161 の変異は *in vitro* あるいは酵母の *cdc2* 機能欠損株においてキナーゼ活性を示さないことから、このアミノ酸残基のリン酸化は p34^{cdc2} の活性に必須である (Solomon et al., 1992). さらに T-loop に保存されたこのスレオニン

残基のリン酸化はサイクリン，CDK の組み合わせによってはその複合体の安定性に関与する(Norbury et al., 1991). しかし精製タンパク質を用いた解析より，ヒトのサイクリン/CDK 複合体 (CDK1/cyclin B, CDK2/cyclin A, CDK2/cyclin E) は Thr-161 のリン酸化や他の細胞性因子を必要としない(Kato et al., 1994; Desai et al., 1995). さらに，*in vitro*における p34^{cdc2}の活性化過程の解析から，Thr-161 のリン酸化はサイクリンとの結合後に起こると報告されている(Desai et al., 1992).

そこで，Thr-161 のリン酸化が CDKA の活性化に関与しているかを昆虫細胞発現系においても解析した (Fig.21). CYCD3;3 には His タグを付加したが，何も感染させていない昆虫細胞粗抽出液においても His タグに対する抗体を処理すると His-CYCD3;3 と同じ位置にバンドが検出されたため，マウスを免疫して作製した CYCD3;3 に対するモノクローナル抗体を使用した. さらにこの抗体に HRP 標識をして FLAG M2 beads での免疫沈降後にマウスの IgG にシグナルが重なるのを避けた. FLAG-CDKA(WT)と His-CYCD3;3 を共発現させると Histone H1 に対して活性を持つが，FLAG-CDKA(D146N), FLAG-CDKA(K33R)は His-CYCD3;3 との共発現においてもキナーゼ活性は検出できなかった (Fig.21). 一方，dominant-negative 効果を示さなかった変異を有する FLAG-CDKA(T161A)と His-CYCD3;3 の共発現は活性を示さず，やはり Thr-161 のリン酸化は CDKA のキナーゼ活性に必須であることを示している. さらにリン酸化を模倣した FLAG-CDKA(T161E)と His-CYCD3;3 を共発現させると，Histone H1 に対して活性を示した. FLAG 抗体で免疫沈降後のリン酸化特異抗体に western 解析において FLAG-CDKA(T161E)が検出されないことから，この抗体がタバコ CDKA の Thr-161 のリン酸化を特異的に認識していることが示唆される. 分裂酵母を用いた以前の報告では，CDKA の Thr-161 に相当する T167E 変異を有する p34^{cdc2} 結合キナーゼの *in vitro* における活性は検出されていない (Gould et al., 1991; Gould et al., 1998). FLAG-CDKA(T161A) と FLAG-CDKA(T161E)は同程度の His-CYCD3;3 を結合していることから，CDKA の Thr-161 のリン酸化はサイクリンとの安定な結合に関与していないことが示唆される (Fig.21). また *in vitro* 結合試験においても CDKA(WT)-GFP と CDKA(T161A)-GFP は MBP-CYCD3;3 との親和性に大きな差はみられなかったが，BY-2細胞において CDKA(T161A)-GFP を発現させた場合に dominant-negative の効果を示さなかった (Fig.18A). 1つの可能性として，BY-2細胞に導入した変異型の CDKA には GFP タンパク質を融合しているために，内生の CDKA と比較するとサイクリンに対する親和性が大きく低下しているためかもしれない.

BY-2細胞では CDKA(T161A)-GFP を発現させても dominant-negative の効果がみられなかったため，CDKA の Thr-161 のリン酸化が植物の細胞周期の進行にどのように関わるかを解析することができなかった. そこで，内生 CDKA のない状態で T161A 変異を加えた CDKA を解析することを考え，シロイヌナズナの *Arath;CDKA;1* 欠損変異株の相補性試験を行った. *cdka;1-1* は *Arath;CDKA;1* のゲノム領域の導入

により相補される(Iwakawa et al., 2006). しかし, この *cdka;1-1* を相補するゲノム断片へ部位特異的に変異を導入することは困難であったので, cDNA に変異を導入しそれを自身の *Arath;CDKA;1* プロモーターに連結した. プロモーターとして用いた領域は-2297 から第2 エキシソンの始めまでとした. *CDKA;1(WT)-GFP* をヘテロで導入した *cdka;1^{+/+}* 個体の花粉は期待値通りに3細胞性の花粉となり, 用いたコンストラクトが機能することが示唆された (表3). 一方 *CDKA;1(T161A)-GFP* の導入は雄性配偶体の形成異常を相補しなかったことから, シロイヌナズナ *Arath;CDKA;1* の Thr-161 のリン酸化は PMII に必須であることが示唆された. さらに, おそらく CAK によって制御される *Arath;CDKA;1* の Thr-161 のリン酸化が, 雄原細胞の分裂開始前の律速となることが示唆される.

昆虫細胞発現系における解析と一致して, *CDKA;1(T161E)-GFP* の *cdka;1-1* への導入は *CDKA;1(WT)-GFP* と同様に *cdka;1-1* 変異を相補した (Table 1.). このことは, シロイヌナズナ細胞内においても *CDKA;1(T161E)-GFP* はサイクリンと結合して活性をもつ複合体を形成し, 内生 *Arath;CDKA;1* の機能を相補したと考えられる. T167E 変異を有する分裂酵母の p34^{cdc2} は *in vitro* においてキナーゼ活性を示さないものの, *in vivo* においては M 期への進行を促進する. しかし, タンパク質分解に必要な APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) を活性化できないため M 期中期から終期への移行を促進することができない (Gould et al., 1991; Lorca et al., 1992). さらに, 野生型 *cdc2* の遺伝的背景における T167E 変異 p34^{cdc2} の過剰発現は細胞の伸長と細胞分裂の停止を引き起こす. Thr-167 のリン酸化はホスファターゼにより脱リン酸化されるが, Glu-167 に置換した変異体では脱リン酸化は起こらない. したがって, これらのことは Thr-167 の脱リン酸化が M 期脱出に必要である可能性を示唆する. 分裂酵母の p34^{cdc2} の T167E に相当する出芽酵母の T169E 変異を有する Cdc28 の解析では, M 期脱出に影響はないが, 次の S 期に入ることができない. つまり T-loop に保存されたスレオニン残基の脱リン酸化は細胞分裂の進行か停止かを決定する START の通過 (Lim et al., 1996) に必須であると言える. 本研究で *CDKA;1(T161E)-GFP* の *cdka;1^{+/+}* 個体への導入により *cdka;1-1* 変異を相補したことから, 分裂酵母や出芽酵母とは異なり, *Arath;CDKA;1* の Thr-161 の脱リン酸化は PMII における M 期と G1/S チェックポイントには必須ではないと示唆された. しかし, 自家受精した次世代で得られた *cdka;1^{+/+}* の遺伝的背景での *CDKA;1(T161E)-GFP* の発現は不稔性を示した. 少なくとも雄性不稔となるが, 野生型の花粉をかけあわせることにより雌性配偶体に異常はないか検討する必要がある. *cdka;1^{+/+}* 個体での *CDKA;1(T161E)-GFP* 発現は PMII の異常を相補したことから, *cdka;1^{+/+}* の遺伝的背景において不稔になったことは, おそらく PMII 以前に異常が起こることを示唆している. 今後, 組織科学的な手法を用いた解析を行う必要がある.

本研究において, 新たに得られた知見を加えた植物の G1/S 期移行のモデル図を示した (Fig.24). オーキシンは *CDKA* の発現を誘導するだけでなく, サイクリン/*CDKA*

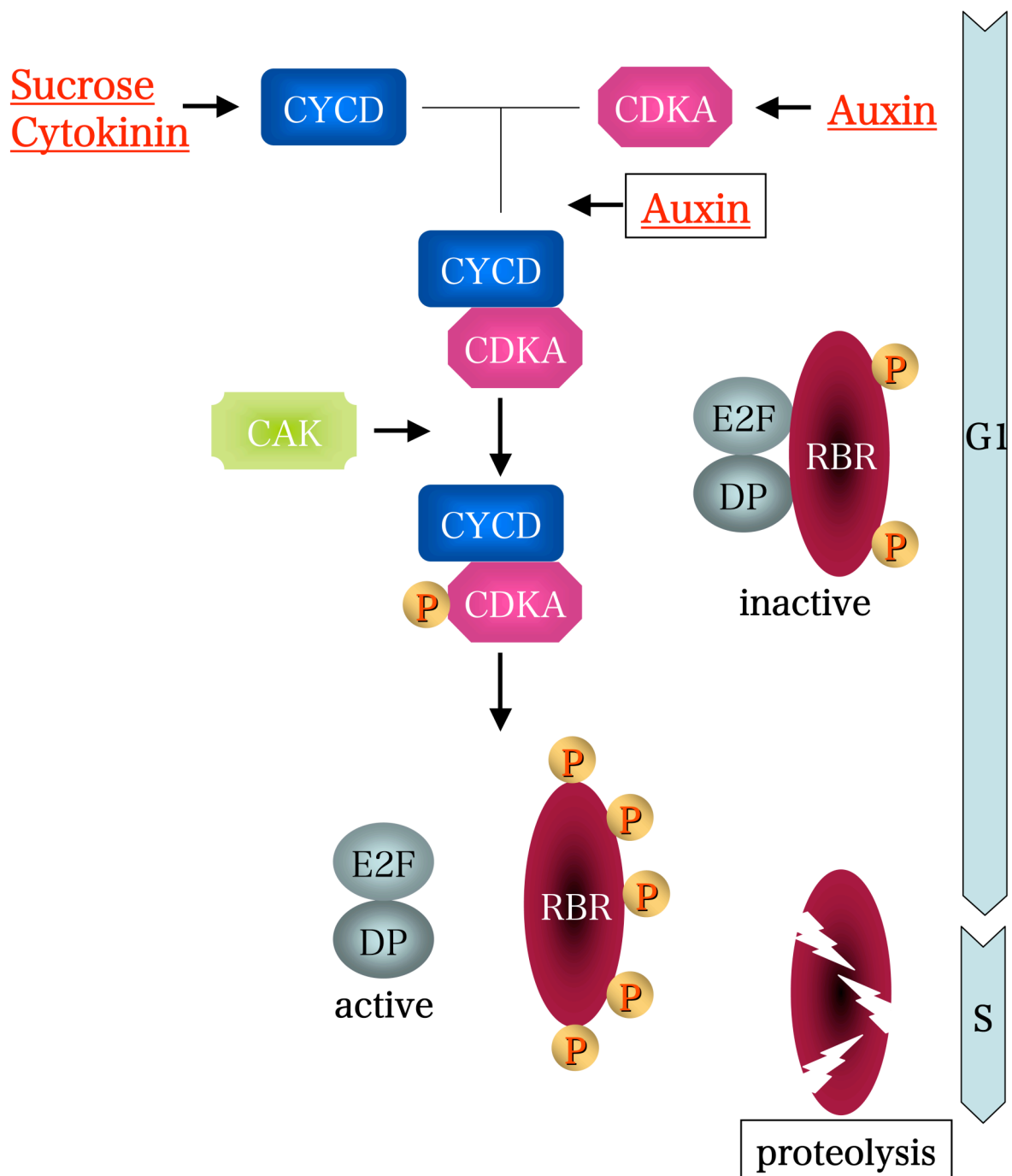


Fig.24 植物の G1/S 期制御機構のモデル図

の複合体形成にも寄与する。CAK によってもたらされる CDKA の Thr-161 のリン酸化は CDKA の活性化に必須で、活性化したサイクリン/CDKA は RBR をリン酸化し、E2F/DP 複合体による S 期遺伝子群の転写が活性化する。リン酸化された RBR はプロテアソーム経路により分解される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇篤なるご指導を賜りました新名惇彦教授に心より御礼申し上げます。石川県立大学の関根政実助教授には具体的な内容について直接のご指導を賜るとともに研究に対する姿勢を学びました、深く感謝申し上げます。

また、実験を遂行するにあたり有益なご助言を頂きました当研究室の吉田和也助教授、加藤晃助手、仲山英樹助手に感謝申し上げます。秘書の田中雅恵さんには事務面で大変お世話になりましたことを感謝いたします。

p13^{suc1}を発現する大腸菌の分与、ならびに適切な助言をいただいた本学の梅田正明教授に謹んで感謝申し上げます。シロイヌナズナ *cdka;1^{+/+}* の解析でご助言を頂きました中部大学の岩川秀和博士に感謝いたします。また、RNA blot の実験でご助言を頂きました本学の長屋進吾博士に感謝いたします。Laser scanning cytometer の使用方法をご指導下さいましたオリンパス株式会社の皆様にお礼申し上げます。

Cell Cycle グループの先輩として河村和恵博士には懇切なご指導を賜りました。心より感謝申し上げますと共に、今後のご活躍をお祈り申し上げます。実験のみならず多岐に渡りお世話になりました上向健司博士、袴田昌代氏、仲井智洋博士、平野博人氏に厚くお礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり大変お世話になりました植物代謝調節学講座の皆様我心より感謝申し上げます。皆様と植物代謝調節学講座のさらなる発展を心よりお祈り申し上げます。

最後に両親には経済的に惜しみない援助を頂きました。ここに感謝の意を表します。どうもありがとうございました。

参考文献

- Adachi, S., Uchimiya, H., and Umeda, M.** (2006). Expression of B2-Type Cyclin-Dependent Kinase is Controlled by Protein Degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **47**, 1683-1686.
- Alonso, D.O., Alm, E., and Daggett, V.** (2000). Characterization of the unfolding pathway of the cell-cycle protein p13^{suc1} by molecular dynamics simulations: implications for domain swapping. *Structure* **8**, 101-110.
- Amano, C.** (2000). タバコ b-type cdc2 の機能解析. 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文.
- 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., Lazzerini Denchi, E., and Helin, K.** (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J* **23**, 4709-4716.
- Azimzadeh, J., Traas, J., and Pastuglia, M.** (2001). Molecular aspects of microtubule dynamics in plants. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 513-519.
- Bechtold, N., and Pelletier, G.** (1998). In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* **82**, 259-266.
- Bhalerao, R.P., and Bennett, M.J.** (2003). The case for morphogens in plants. *Nat Cell Biol* **5**, 939-943.
- Bleeker, P.M., Hakvoort, H.W., Blik, M., Souer, E., and Schat, H.** (2006). Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *Plant J* **45**, 917-929.
- 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.
- Boudolf, V., Barroco, R., Engler Jde, A., Verkest, A., Beeckman, T., Naudts, M., Inze, D., and De Veylder, L.** (2004). B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 945-955.
- Bourne, Y., Watson, M.H., Hickey, M.J., Holmes, W., Rocque, W.,**

- Reed, S.I., and Tainer, J.A. (1996). Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* **84**, 863-874.
- 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.
- Cheng, A., Ross, K.E., Kaldis, P., and Solomon, M.J. (1999). Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev* **13**, 2946-2957.
- Chung, S.K., and Parish, R.W. (1995). Studies on the promoter of the *Arabidopsis thaliana cdc2a* gene. *FEBS Lett* **362**, 215-219.
- Churchman, M.L., Brown, M.L., Kato, N., Kirik, V., Hulskamp, M., Inze, D., De Veylder, L., Walker, J.D., Zheng, Z., Oppenheimer, D.G., Gwin, T., Churchman, J., and Larkin, J.C. (2006). SIAMESE, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **18**, 3145-3157.
- Criqui, M.C., Parmentier, Y., Derevier, A., Shen, W.H., Dong, A., and Genschik, P. (2000). Cell cycle-dependent proteolysis and ectopic overexpression of cyclin B1 in tobacco BY2 cells. *Plant J* **24**, 763-773.
- Da Costa, M., Bach, L., Landrieu, I., Bellec, Y., Catrice, O., Brown, S., De Veylder, L., Lippens, G., Inze, D., and Faure, J.D. (2006). *Arabidopsis PASTICCINO2* is an antiphosphatase involved in regulation of cyclin-dependent kinase A. *Plant Cell* **18**, 1426-1437.
- De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O., and Kim, S.H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363**, 595-602.
- de la Paz Sanchez, M., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutierrez, C., and Vazquez-Ramo, J.M. (2002). PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol Biol* **50**, 167-175.
- De Schutter, K., Joubes, J., Cools, T., Verkest, A., Corellou, F., Babiychuk, E., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Kushnir, S., Inze, D., and De Veylder, L. (2007). *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell*. in press
- De Smedt, V., Poulhe, R., Cayla, X., Dessauge, F., Karaiskou, A., Jesus, C., and Ozon, R. (2002). Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in *Xenopus*

- oocytes. *J Biol Chem* **277**, 28592-28600.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Van Montagu, M., and Inze, D.** (2000). Increased leakiness of the tetracycline-inducible Triple-Op promoter in dividing cells renders it unsuitable for high inducible levels of a dominant negative CDC2aAt gene. *J Exp Bot* **51**, 1647-1653.
- De Veylder, L., Segers, G., Glab, N., Casteels, P., Van Montagu, M., and Inze, D.** (1997). The Arabidopsis Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Lett* **412**, 446-452.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., de Almeida Engler, J., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van Der Schueren, E., Jacquard, 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.
- del Pozo, J.C., Boniotti, M.B., and Gutierrez, C.** (2002). *Arabidopsis* E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF^{AISKP2} pathway in response to light. *Plant Cell* **14**, 3057-3071.
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V., and Guern, J.** (1996). Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* **198**, 532-541.
- Desai, D., Gu, Y., and Morgan, D.O.** (1992). Activation of human cyclin-dependent kinases *in vitro*. *Mol Biol Cell* **3**, 571-582.
- Desai, D., Wessling, H.C., Fisher, R.P., and Morgan, D.O.** (1995). Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. *Mol Cell Biol* **15**, 345-350.
- Dewitte, W., and Murray, J.A.** (2003). The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 235-264.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M.** (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441-445.
- Dunphy, W.G.** (1994). The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol* **4**, 202-207.
- Ebel, C., Mariconti, L., and Gruissem, W.** (2004). Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature* **429**, 776-780.
- Endicott, J.A., and Nurse, P.** (1995). The cell cycle and *sucl*: from structure to function? *Structure* **3**, 321-325.
- Faure, J.E., Rusche, M.L., Thomas, A., Keim, P., Dumas, C.,**

- Mogensen, H.L., Rougier, M., and Chaboud, A.** (2003). Double fertilization in maize: the two male gametes from a pollen grain have the ability to fuse with egg cells. *Plant J* **33**, 1051-1062.
- Fobert, P.R., Gaudin, V., Lunness, P., Coen, E.S., and Doonan, J.H.** (1996). Distinct classes of *cdc2*-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* **8**, 1465-1476.
- Friedman, W.E.** (1999). Expression of the cell cycle in sperm of *Arabidopsis*: implications for understanding patterns of gametogenesis and fertilization in plants and other eukaryotes. *Development* **126**, 1065-1075.
- Genschik, P., Criqui, M.C., Parmentier, Y., Derevier, A., and Fleck, J.** (1998). Cell cycle-dependent proteolysis in plants: Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. *Plant Cell* **10**, 2063-2076.
- Gould, K.L., Feoktistova, A., and Fleig, U.** (1998). A phosphorylation site mutant of *Schizosaccharomyces pombe cdc2p* fails to promote the metaphase to anaphase transition. *Mol Gen Genet* **259**, 437-448.
- Gould, K.L., Moreno, S., Owen, D.J., Sazer, S., and Nurse, P.** (1991). Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe p34cdc2* function. *EMBO J* **10**, 3297-3309.
- Gutierrez, C.** (2005). Coupling cell proliferation and development in plants. *Nat Cell Biol* **7**, 535-541.
- Hadwiger, J.A., Wittenberg, C., Mendenhall, M.D., and Reed, S.I.** (1989). The *Saccharomyces cerevisiae CKS1* gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe sucl⁺* gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex. *Mol Cell Biol* **9**, 2034-2041.
- Hagen, G., and Guilfoyle, T.** (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* **49**, 373-385.
- Hartig, K., and Beck, E.** (2006). Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biol (Stuttg)* **8**, 389-396.
- Hayashi, K., Jones, A.M., Ogino, K., Yamazoe, A., Oono, Y., Inoguchi, M., Kondo, H., and Nozaki, H.** (2003). Yokonolide B, a novel inhibitor of auxin action, blocks degradation of AUX/IAA factors. *J Biol Chem* **278**, 23797-23806.
- Hayles, J., Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P.** (1986). The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *sucl* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol Gen Genet* **202**, 291-293.
- Healy, J.M., Menges, M., Doonan, J.H., and Murray, J.A.** (2001). The

- Arabidopsis* D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J Biol Chem* **276**, 7041-7047.
- Hemerly, A., Engler Jde, A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Engler, G., Inze, D., and Ferreira, P. (1995). Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J* **14**, 3925-3936.
- Hemerly, A.S., Ferreira, P.C., Van Montagu, M., Engler, G., and Inze, D. (2000). Cell division events are essential for embryo patterning and morphogenesis: studies on dominant-negative *cdc2aAt* mutants of *arabidopsis*. *Plant J* **23**, 123-130.
- Hemerly, A.S., Ferreira, P., de Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G., and Inze, D. (1993). *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**, 1711-1723.
- Himanen, K., Vuylsteke, M., Vanneste, S., Vercruyse, S., Boucheron, E., Alard, P., Chriqui, D., Van Montagu, M., Inze, D., and Beeckman, T. (2004). Transcript profiling of early lateral root initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 5146-5151.
- Hutchins, A.P., Roberts, G.R., Lloyd, C.W., and Doonan, J.H. (2004). *In vivo* interaction between CDKA and eIF4A: a possible mechanism linking translation and cell proliferation. *FEBS Lett* **556**, 91-94.
- Imai, K.K., Ohashi, Y., Tsuge, T., Yoshizumi, T., Matsui, M., Oka, A., and Aoyama, T. (2006). The A-type cyclin CYCA2;3 is a key regulator of ploidy levels in *Arabidopsis* endoreduplication. *Plant Cell* **18**, 382-396.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H., and Watanabe, A. (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* **13**, 1891-1905.
- Iwakawa, H., Shinmyo, A., and Sekine, M. (2006). *Arabidopsis* CDKA;1, a *cdc2* homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. *Plant J* **45**, 819-831.
- Jasinski, S., Perennes, C., Bergounioux, C., and Glab, N. (2002a). Comparative molecular and functional analyses of the tobacco cyclin-dependent kinase inhibitor NtKIS1a and its spliced variant NtKIS1b. *Plant Physiol* **130**, 1871-1882.
- Jasinski, S., Riou-Khamlichi, C., Roche, O., Perennes, C., Bergounioux, C., and Glab, N. (2002b). The CDK inhibitor NtKIS1a is

- involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3;1-overexpressing plants. *J Cell Sci* **115**, 973-982.
- Joubes, J., De Schutter, K., Verkest, A., Inze, D., and De Veylder, L. (2004). Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures. *Plant J* **37**, 889-896.
- Joubes, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inze, D., Umeda, M., and Renaudi, J.P. (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol Biol* **43**, 607-620.
- Karaiskou, A., Perez, L.H., Ferby, I., Ozon, R., Jesus, C., and Nebreda, A.R. (2001). Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins. *J Biol Chem* **276**, 36028-36034.
- Kato, J.Y., Matsuoka, M., Strom, D.K., and Sherr, C.J. (1994). Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol* **14**, 2713-2721.
- Kawamura, K., Kato, K., Shinmyo, A., and Sekine, M. (2006). Tobacco RETINOBLASTOMA-RELATED protein is phosphorylated by different types of cyclin-dependent kinases during the cell cycle. *Plant Biotechnology* **23**, 467-473.
- Kepinski, S., and Leyser, O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 446-451.
- Koroleva, O.A., Tomlinson, M., Parinyapong, P., Sakvarelidze, L., Leader, D., Shaw, P., and Doonan, J.H. (2004). CycD1, a putative G1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 phases. *Plant Cell* **16**, 2364-2379.
- Krek, W., and Nigg, E.A. (1992). Cell cycle regulation of vertebrate p34cdc2 activity: identification of Thr161 as an essential *in vivo* phosphorylation site. *New Biol* **4**, 323-329.
- Krek, W., Marks, J., Schmitz, N., Nigg, E.A., and Simanis, V. (1992). Vertebrate p34cdc2 phosphorylation site mutants: effects upon cell cycle progression in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **102** (Pt1), 43-53.
- Landrieu, I., da Costa, M., De Veylder, L., Dewitte, F., Vandepoele, K., Hassan, S., Wieruszkeski, J.M., Corellou, F., Faure, J.D., Van Montagu, M., Inze, D., and Lippens, G. (2004). A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in *Arabidopsis thaliana*.

- Proc Natl Acad Sci USA **101**, 13380-13385.
- Lechner, E., Xie, D., Grava, S., Pigaglio, E., Planchais, S., Murray, J.A., Parmentier, Y., Mutterer, J., Dubreucq, B., Shen, W.H., and Genschik, P.** (2002). The AtRbx1 protein is part of plant SCF complexes, and its down-regulation causes severe growth and developmental defects. *J Biol Chem* **277**, 50069-50080.
- Lim, H.H., Loy, C.J., Zaman, S., and Surana, U.** (1996). Dephosphorylation of threonine 169 of Cdc28 is not required for exit from mitosis but may be necessary for start in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**, 4573-4583.
- Lloyd, C.W., Lowe, S.B., and Peace, G.W.** (1980). The mode of action of 2,4-D in counteracting the elongation of carrot cells grown in culture. *J Cell Sci* **45**, 257-268.
- Lorca, T., Labbe, J.C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J.P., Cavadore, J.C., Le Bouffant, F., and Doree, M.** (1992). Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *EMBO J* **11**, 2381-2390.
- Lorincz, A.T., and Reed, S.I.** (1984). Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene *CDC28* and vertebrate oncogenes. *Nature* **307**, 183-185.
- Ludlow, J.W., Glendening, C.L., Livingston, D.M., and DeCarprio, J.A.** (1993). Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* **13**, 367-372.
- Ma, H.** (2005). Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 393-434.
- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bako, L., Inze, D., and Bogre, L.** (2005). The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell* **17**, 2527-2541.
- Magyar, Z., Meszaros, T., Miskolczi, P., Deak, M., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bako, L., Koncz, C., and Dudits, D.** (1997). Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**, 223-235.
- 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.

- McCormick, S.** (1993). Male Gametophyte Development. *Plant Cell* **5**, 1265-1275.
- McCormick, S.** (2004). Control of male gametophyte development. *Plant Cell* **16 Suppl**, S142-153.
- Mendenhall, M.D., Richardson, H.E., and Reed, S.I.** (1988). Dominant negative protein kinase mutations that confer a G1 arrest phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 4426-4430.
- Meyerson, M., Enders, G.H., Wu, C.L., Su, L.K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E., and Tsai, L.H.** (1992). A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J* **11**, 2909-2917.
- Mironov, V.V., De Veylder, L., Van Montagu, M., and Inze, D.** (1999). Cyclin-dependent kinases and cell division in plants - the nexus. *Plant Cell* **11**, 509-522.
- Nagata, T., and Kumagai, F.** (1999). Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Methods Cell Sci* **21**, 123-127.
- Nagata, T., Nemoto, Y., and Hasezawa, S.** (1992). Tobacco BY-2 cell-line as the HeLa-cell in the cell biology of higher-plants. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology* **132**, 1-30.
- 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.
- 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.
- Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A., and Sekine, M.** (2006). *Arabidopsis* KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Lett* **580**, 336-340.
- Nelson, D.A., Krucher, N.A., and Ludlow, J.W.** (1997). High molecular weight protein phosphatase type 1 dephosphorylates the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* **272**, 4528-4535.
- Nishi, A., Kato, K., Takahashi, M., and Yoshida, R.** (1977). Partial synchronization of carrot cell-culture by auxin deprivation. *Physiologia Plantarum* **39**, 9-12.

- Norbury, C., Blow, J., and Nurse, P. (1991). Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J* **10**, 3321-3329.
- Nowack, M.K., Grini, P.E., Jakoby, M.J., Lafos, M., Koncz, C., and Schnittger, A. (2006). A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis. *Nat Genet* **38**, 63-67.
- Oakenfull, E.A., Riou-Khamlichi, C., and Murray, J.A. (2002). Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**, 749-760.
- Peter, M., and Herskowitz, I. (1994). Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* **79**, 181-184.
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* **308 (Pt3)**, 697-711.
- Pines, J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* **1**, E73-79.
- Planchais, S., Samland, A.K., and Murray, J.A. (2004). Differential stability of *Arabidopsis* D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J* **38**, 616-625.
- Poon, R.Y., and Hunter, T. (1995). Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* **270**, 90-93.
- Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J.P., Segers, G., De Veylder, L., Barroco, R.P., Casteels, P., Van Montagu, M., Inze, D., and Mironov, V. (2001). A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J Biol Chem* **276**, 36354-36360.
- Potuschak, T., and Doerner, P. (2001). Cell cycle controls: genome-wide analysis in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 501-506.
- Quelo, A.H., Bryant, J.A., and Verbelen, J.P. (2002). Endoreduplication is not inhibited but induced by aphidicolin in cultured cells of tobacco. *J Exp Bot* **53**, 669-675.
- Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inze, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savoure, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V., and Murray, J.A. (1996). Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol Biol* **32**, 1003-1018.

- Richard, C., Lescot, M., Inze, D., and De Veylder, L. (2002). Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **69**, 167-176.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A., and Murray, J.A. (1999). Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-1544.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M., and Murray, J.A. (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol* **20**, 4513-4521.
- Rossi, V., and Varotto, S. (2002). Insights into the G1/S transition in plants. *Planta* **215**, 345-356.
- Roudier, F., Fedorova, E., Gyorgyey, J., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2000). Cell cycle function of a *Medicago sativa* A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein. *Plant J* **23**, 73-83.
- Setiady, Y.Y., Sekine, M., Hariguchi, N., Kouchi, H., and Shinmyo, A. (1996). Molecular cloning and characterization of a cDNA clone that encodes a Cdc2 homolog from *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiol* **37**, 369-376.
- Shen, W.H. (2002). The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends Plant Sci* **7**, 505-511.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-1512.
- Shimotohno, A., Umeda-Hara, C., Bisova, K., Uchimiya, H., and Umeda, M. (2004). The plant-specific kinase CDKF;1 is involved in activating phosphorylation of cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2954-2966.
- Shimotohno, A., Ohno, R., Bisova, K., Sakaguchi, N., Huang, J., Koncz, C., Uchimiya, H., and Umeda, M. (2006). Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis*. *Plant J* **47**, 701-710.
- Solomon, M.J. (1993). Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 180-186.
- Solomon, M.J., Lee, T., and Kirschner, M.W. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell* **3**, 13-27.

- Sorrell, D.A., Combettes, B., Chaubet-Gigot, N., Gigot, C., and Murray, J.A. (1999). Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiol* **119**, 343-352.
- Sorrell, D.A., Marchbank, A., McMahon, K., Dickinson, J.R., Rogers, H.J., and Francis, D. (2002). A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**, 518-522.
- Sorrell, D.A., Menges, M., Healy, J.M., Deveaux, Y., Amano, C., Su, Y., Nakagami, H., Shinmyo, A., Doonan, J.H., Sekine, M., and Murray, J.A. (2001). Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar bright yellow-2 cells. *Plant Physiol* **126**, 1214-1223.
- Stals, H., Casteels, P., Van Montagu, M., and Inze, D. (2000). Regulation of cyclin-dependent kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **43**, 583-593.
- Sugimoto-Shirasu, K., and Roberts, K. (2003). "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 544-553.
- Sun, Y., Dilkes, B.P., Zhang, C., Dante, R.A., Carneiro, N.P., Lowe, K.S., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J., and Larkins, B.A. (1999). Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 4180-4185.
- Uchida, C., Miwa, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Isobe, T., Otani, S., Oda, T., Sugimura, H., Kamijo, T., Ookawa, K., Yasuda, H., and Kitagawa, M. (2005). Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J* **24**, 160-169.
- Ueshima, K. (1996). タバコ cdc2 キナーゼ活性化酵素触媒サブユニット遺伝子の単離と発現解析. 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文.
- Umeda, M., Shimotohno, A., and Yamaguchi, M. (2005). Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. *Plant Cell Physiol* **46**, 1437-1442.
- Umeda, M., Bhalerao, R.P., Schell, J., Uchimiya, H., and Koncz, C. (1998). A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5021-5026.
- van den Heuvel, S., and Harlow, E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**, 2050-2054.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S., and Inze, D. (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 903-916.

- Vantard, M., Cowling, R., and Delichere, C. (2000). Cell cycle regulation of the microtubular cytoskeleton. *Plant Mol Biol* **43**, 691-703.
- Verkest, A., Manes, C.L., Vercruyssen, S., Maes, S., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Genschik, P., Kuiper, M., Inze, D., and De Veylder, L. (2005). The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *Plant Cell* **17**, 1723-1736.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., DePamphilis, C.W., and Ma, H. (2004). Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* **135**, 1084-1099.
- Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L., and Fowke, L.C. (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J* **15**, 501-510.
- Weingartner, M., Binarova, P., Drykova, D., Schweighofer, A., David, J.P., Heberle-Bors, E., Doonan, J., and Bogre, L. (2001). Dynamic recruitment of Cdc2 to specific microtubule structures during mitosis. *Plant Cell* **13**, 1929-1943.
- Weterings, K., and Russell, S.D. (2004). Experimental analysis of the fertilization process. *Plant Cell* **16 Suppl**, S107-118.
- Wildwater, M., Campilho, A., Perez-Perez, J.M., Heidstra, R., Blilou, I., Korthout, H., Chatterjee, J., Mariconti, L., Grissem, W., and Scheres, B. (2005). The *RETINOBLASTOMA-RELATED* gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell* **123**, 1337-1349.
- Woodward, A.W., and Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot (Lond)* **95**, 707-735.
- Yadegari, R., and Drews, G.N. (2004). Female gametophyte development. *Plant Cell* **16 Suppl**, S133-141.
- Zuo, J., Niu, Q.W., and Chua, N.H. (2000). Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* **24**, 265-273.