

博士論文番号：

シロイヌナズナ CDK inhibitor の機能解析

仲井 智洋

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18年3月17日提出

目次

略記	5
緒言	6
第一章 KRP とサイクリン/CDK のタンパク質間相互作用の解析	13
1-1 序論	13
1-2 実験材料および方法	15
1-2-1 使用植物、昆虫細胞、菌株、プラスミド	15
1-2-2 培地	15
1-2-3 実験試薬、酵素	17
1-2-4 プラスミド DNA の少量調製	17
1-2-5 DNA の電気泳動および DNA 断片の回収	18
1-2-6 大腸菌の形質転換	18
1-2-7 塩基配列の決定	19
1-2-8 大腸菌発現系による KRP タンパク質の調製	19
1-2-9 昆虫細胞発現系によるサイクリンおよび CDK タンパク質の調製	21
1-2-10 精製タンパク質サンプルの定量	25
1-2-11 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	26
1-2-12 Coomassie brilliant blue (CBB)R-250 によるタンパク質染色	26
1-2-13 Western blotting	26
1-2-14 <i>In vitro</i> 転写翻訳系による KRP タンパク質の合成	27
1-2-15 <i>In vitro</i> 結合試験	29
1-2-16 ヒストン H1 リン酸化実験系	29
1-3. 結果	31
1-3-1 CYCD2/CDKA と CYCD2/CDKB の調製	31
1-3-2 KRP とサイクリン/CDK の結合解析	32
1-3-3 KRP によるサイクリン/CDK の阻害	33
1-4. 考察	36
第二章 生細胞由来サイクリン/CDK 複合体に対する KRP の阻害	39
2-1 序論	39

2-2	実験材料および方法	42
2-2-1	シロイヌナズナ培養細胞 MM2d の培養	42
2-2-2	シロイヌナズナ MM2d 細胞の粗抽出液の調製	42
2-2-3	免疫沈降サンプルの調製とキナーゼ活性の解析	43
2-2-4	CYCD2-,CYCD3-,CDKA-,CDKB-associated kinase の調製	44
2-2-5	p13 ^{Suc1} -associated kinase の調製	44
2-2-6	MM2d 培養細胞の同調化	45
2-2-7	Laser Scanning Cytometer による DNA ヒストグラムの解析	45
2-2-8	KRP 抗体の作製	45
2-2-9	KRP2 強制発現 MM2d 細胞の作製	46
2-3.	結果	48
2-3-1	培養細胞からのサイクリン/CDK サンプルの調製	48
2-3-2	培養細胞より調製したキナーゼ複合体の KRP による阻害	50
2-3-3	細胞周期に伴う KRP タンパク質の発現解析	51
2-3-4	p13 ^{Suc1} -associated kinase の細胞周期変動と KRP による阻害	52
2-3-5	KRP2 を強制発現した MM2d 細胞の解析	53
2-4.	考察	55
第三章 KRP の機能領域の解析		59
3-1	序論	59
3-2	実験材料および方法	62
3-2-1	KRP3 由来ペプチドによるリン酸化阻害実験	62
3-2-2	KRP3 由来ペプチドのリン酸化実験	62
3-2-3	KRP7YY タンパク質の作製	63
3-2-4	ゲルろ過カラムを用いた結合解析	63
3-2-5	KRP 高発現植物体の作製	64
3-2-6	KRP7YY 高発現植物体における遺伝子発現の解析	64
3-2-7	欠損型および変異型 KRP タンパク質の阻害能の解析	67
3-3	結果	74
3-3-1	KRP3 由来ペプチドを用いた機能領域の探索	74

3-3-2	KRP7YY タンパク質の機能解析	75
3-3-3	KRP7YY 高発現植物体の解析	78
3-3-4	欠損型および変異型 KRP の阻害能	81
3-4.	考察	84
	総括	88
	謝辞	90
	参考文献	91

略記

BSA ; bovine serum albumin
CaMV ; cauliflower mosaic virus
cDNA ; complementary DNA
DEPC ; diethyl pyrocarboxylate
DMSO ; dimethylsulfoxide
DNA ; deoxyribonucleic acid
DNaseI ; deoxyribonuclease I
dNTP ; deoxyribonucleoside triphosphate
DTT ; dithiothreitol
EDTA ; ethylene-diamine-tetraacetic acid
EGTA ; ethylene glycol bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
GST ; Glutathione *S*-transferase
IgG ; immunoglobulin G
kDa ; kilodalton
LS ; Linsmaier and Skoog medium
mRNA ; messenger RNA
NP-40 ; Nonidet P40
PBS ; phosphate buffered saline
PCR ; polymerase chain reaction
PI ; propidium iodide
PIPES ; Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PMSF ; phenyl methyl sulfonyl fluoride
RNA ; ribonucleic acid
RNase A ; ribonuclease A
RT ; reverse transcriptase
SB ; sample buffer
SDS ; sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE ; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
Tris ; Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Triton-X 100 ; polyoxy chethylene (10)p-t-octylphenyl ether
X-Gal ; 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galactopyranoside

緒言

高等生物が個体として形成されるためには、基本単位である細胞によって全ての生命活動が調節、維持されねばならず、生物が増殖して成長するためには、個々の細胞が増殖と分化を繰り返すことが必要となる。細胞は細胞からしか生まれず、細胞の増殖は細胞分裂によってのみ行われる。真核生物の細胞が分裂する際には、2つの娘細胞に遺伝情報および細胞小器官などを通常均等に分配する必要があるため、核と細胞質で進行する DNA と細胞小器官の正確な倍加と分配が相互に協調して行われなくてはならない。この複雑な過程を正確に行うために、細胞は細胞周期と呼ばれる一連の過程に従って分裂する。

真核生物の細胞周期は間期(interphase)と分裂期(M期; mitosis)からなり、間期はさらに G1 期(gap1)、DNA 合成期(S 期; DNA synthesis)、G2 期(gap2)に分けられることで計 4 つのステージから成り立つ。視覚的に細胞が 2 つに分かれるのは分裂期であり、DNA が染色体へと凝集して核の分裂が起こり、遺伝情報の分配と共役して細胞質分裂が開始して細胞内小器官などの細胞構成成分が分配され、新たな 2 つの細胞ができることとなる。間期は見た目にはほとんど変化がなく、分裂に伴う細胞構成成分の分配に備える期間であると言える。細胞が増殖刺激を受けて G1 期へ入ると DNA 合成の準備が開始され、これが完了すると S 期に進行して DNA の複製が行われる。複製が終了すると G2 期に入り、細胞分裂の準備を行う。DNA 複製の完了と分裂の準備が確認されると細胞周期は間期を終えた段階となり、以後分裂期に進行した細胞は分裂して再び G1 期に戻ることでなる。この細胞周期は常に G1→S→G2→M の順序で進行し、全ての真核生物の細胞分裂に共通な過程である。各ステージの終了と次のステージへの準備状況を検証して進行の是非を決定し、秩序正しい順序を保ちながら次のステージへ進行または停止するために、細胞周期を厳密に制御する各種チェックポイント機構が存在する。

細胞周期制御の分子機構に関して動物や酵母を材料とした研究から非常に多くの知見が蓄積してきており、酵母の cell-division-cycle (cdc) 突然変異株から cdc2 と呼ばれる因子が 1970 年に単離されたことを始まりとして(Hartwell et al., 1970)、これまでに数々の細胞周期関連因子が同定されている。サイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼ(cyclin-dependent kinase ; CDK)が、細胞周期制御における中心的な役割を担う。サイクリンおよび CDK はそれぞれ多種存在し、それぞれが特異的に複合体を形成して各時期に特異的なチェックポイント制御を分担している。サイクリン/CDK のキナーゼ活性は、CDK の特定のアミノ酸残基が CDK activating kinase (CAK)等の修飾酵素によってリン酸化や脱リン酸化を受けることにより調節される。CDK inhibitor (CKI)もサイクリン/CDK のキナーゼ活性を制御する働きを持つ細胞周期調

節因子であるが、一連のリン酸修飾酵素群とは異なる機構で作用し、直接サイクリン/CDK 複合体に結合することで、そのキナーゼ活性を一般的には抑制する。他にも細胞周期制御に関わる因子として、retinoblastoma tumour suppressor protein (Rb) family や E2 promoter-binding factor (E2F) family 等が知られている(野島 2000)(Fig. 1)。

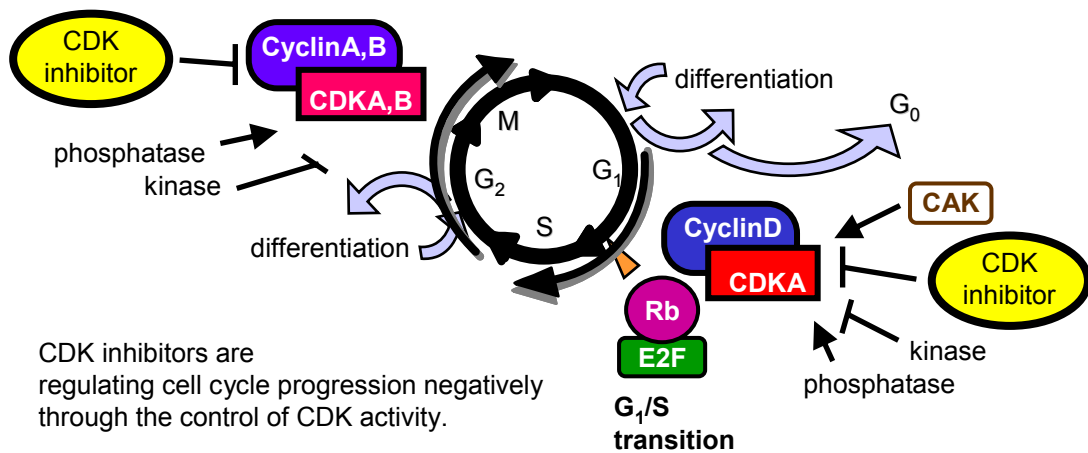


Fig. 1 植物の細胞周期制御モデル

細胞周期は G₁ 期→S 期→G₂ 期→M 期の順に進行する。CDK の活性制御にはサイクリン (CYC)をはじめとした多くの因子が関与しており、CDK inhibitor は基本的には CDK 活性の抑制に働く。

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おり、細胞周期の監視機構であるチェックポイントは、主に G₁/S 期と G₂/M 期の 2 箇所にある。動物では G₁/S 期移行に R 点(restriction point)と呼ばれる制御点があり、細胞分裂と細胞分化の決定を制御している。周期の進行には逐次的なサイクリン/CDK 複合体の形成、活性化、サイクリンの分解が正しく行われる必要があり、この活性制御には、サイクリンタンパク質の細胞内局在性、各種 CKI や外部増殖シグナルによる活性制御等、いろいろな要因が影響を及ぼしている。細胞は環境によって分化、減数分裂、アポトーシスなどへ進むシグナルを受け取ることもあるが、それらの異なる細胞運命への分岐点もチェックポイント前に存在すると考えられている。そのため、チェックポイントを含めた細胞周期の制御が細胞の運命を決定する鍵と考えられ、癌研究とも密接に関連して近年詳細な解析が行われている。哺乳動物の細胞周期においてチェックポイントが破綻すると細胞は癌化へと向かう。

事実、細胞周期調節因子の Rb タンパク質は癌抑制遺伝子としてよく知られている。Rb タンパク質は S 期の開始に必要な転写因子である E2F と直接結合し、その働きを抑制することにより、細胞周期を G₁ 期に止める働きを持っている。Rb タンパク質は増殖停止期や G₁ 期初期にはリン酸化されておらず、E2F に結合する活性を持っているが、G₁ 中期から後期にかけてサイクリン/CDK によりリン酸化を受けると活性を失い、E2F と結合することができなくなり、細胞周期が S 期へと進行する。

哺乳動物の場合、現在までに9つのCDKが報告されている。そのうちRbのリン酸化に関与しているのはCDK4、CDK6およびCDK2で、まずG1期中期にCDK4とCDK6がサイクリンDと結合し活性化され、さらにG1後期にCDK2がサイクリンEと結合して活性化され、これらのCDKキナーゼによってRbタンパク質が逐次的にリン酸化される。このRbを中心としたチェックポイント調節機構はRb-pathwayと呼ばれ、このpathwayに異常が生じるとG1/S期における細胞周期の調節が効かなくなり、細胞は常に増殖を続けることとなる。しかし、実際にはRb-pathwayでのチェックポイントが破綻した細胞は制御不能な細胞とみなされて細胞死により選択的に除外される機構が存在し、それだけで癌化することはない。Rb-pathwayに異常をきたした細胞では、癌抑制遺伝子として最も有名なp53を中心としたp53-pathwayと呼ばれる制御機構が働き、アポトーシスが誘導される。Rb-pathwayとp53-pathwayとの両方に異常が生じた場合にのみ、細胞が永久増殖能を獲得し、癌細胞へと変化していく。癌の原因となる異常には、サイクリンDやCDK4の過剰発現や、Rb遺伝子そのものの失活などが報告されているが、最も多く異常が見つかっているのはCKIの一つであるp16^{INK4a}遺伝子である。CKIはp53とともに細胞周期チェックポイントにおいて、サイクリン/CDK複合体の活性を調節する因子として注目を集め、細胞周期の負の制御因子、または癌抑制遺伝子として、特に癌治療の立場から研究が進められている(杉本ら 1999; Sherr, 1996)。

動物のCKIは構造的に2つのグループに分類され、CIP/KIP (CDK interacting protein / kinase inhibitory protein) family 及びINK4(Inhibitors of CDK4) family として知られている。CIP/KIP family はp21^{Cip1}、p27^{Kip1}、p57^{Kip2}からなり、N末端領域にCDK阻害領域と呼ばれる相同性の高い領域を持つことが大きな構造的特徴で、広範囲のサイクリン/CDK複合体に結合することでキナーゼ活性を抑制するのと並行して、CAKによるCDKのリン酸化をブロックすることにより間接的にもCDKの活性を抑える。また、これらのC末端領域は各々に特徴的な配列が存在し、阻害因子以外の多様な機能が推測されている。INK4 family はp15^{INK4b}、p16^{INK4a}、p18^{INK4c}、p19^{INK4d}からなり、分子構造のほとんどがアンキリンリピートと呼ばれるタンパク質分子間の結合に作用すると考えられている反復アミノ酸配列からできており、いずれも既知のCDKのうちCDK4またはCDK6と選択的に結合することによりサイクリンD/CDK4,6の活性を特異的に阻害する(Fig. 2)。哺乳動物細胞で最初に発見されたp21^{Cip1}は老化にもなって発現が増加する(Noda et al., 1994)一方で、DNA損傷のシグナルを受けたp53による転写誘導によって多くのサイクリン/CDK複合体に対して阻害作用を持ち(el-Deiry et al., 1993)、DNA障害の際のDNA修復に関与する。また、p21^{Cip1}はサイクリンD/CDK4複合体の活性を抑制するだけでなく、複合体の会合と核への局在を促進することにより、キナーゼ活性を活性化することも明らかとなっ

た(LaBaer et al., 1997)。p27^{Kip1} は 7 種ある CKI の中でも特に細胞増殖制御に重要な役割を果たしていると考えられるようになってきた。個体発生における細胞分化や細胞癌化の抑制、さらにアポトーシスを制御しているという報告もある(Nakayama et al., 1996, Kiyokawa et al., 1996)。p27^{Kip1} はサイクリン E/CDK2 の阻害因子である一方で、サイクリン E/CDK2 の基質にもなり、p27^{Kip1} の C 末端側にある 187 番目のスレオニン残基(Thr187)がリン酸化を受ける。p27^{Kip1} の mRNA 量は細胞周期を通して一定であるが、タンパク質はサイクリン E/CDK2 によるリン酸化をシグナルとしてユビキチン経路による分解へと誘導され、タンパク質量が周期的に変動することとなる(Sheaff et al., 1997)。CIP/KIP family の機能解明が進むにつれ、これらの因子が細胞周期制御の中で演じる役割が単純なものではないことが明らかになってきた。p21^{Cip1} や p27^{Kip1} のタンパク質は、サイクリン/CDK 複合体に対して化学量論的に 1 対 1 の割合で結合し(LaBaer et al., 1997)、サイクリン/CDK の酵素活性をほぼ完全に抑制するという報告があるが、あるサイクリン/CDK は p21^{Cip1} や p27^{Kip1} と複合体を形成している状態でもキナーゼ活性を保持しているという報告(Zhang et al., 1994)や、CIP/KIP family がサイクリンと CDK の会合を促進する作用を持つという報告(LaBaer et al., 1997)があるなど、これらの CKI が備える機能的な側面は驚くほど多様であると言える。発見当初、細胞周期を負に制御する因子だと考えられた CKI の作用は、単純に CDK の活性を抑制するだけでなく、他の細胞周期調節因子とともに複雑な制御ネットワークを形成することが明らかになりつつあり、細胞周期制御においてきわめて重要な因子として知られるようになった(大坪ら 1999, Sherr et al., 1999)。

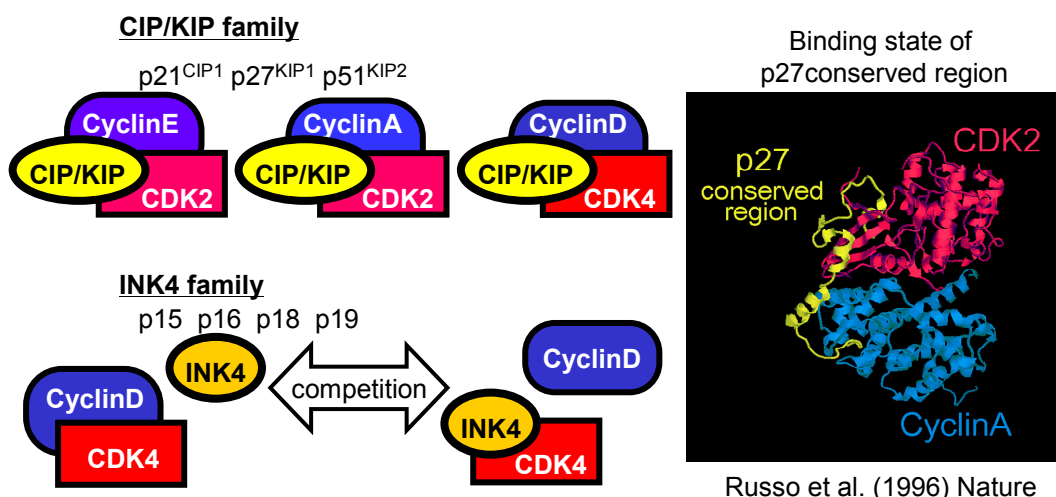


Fig. 2 動物の CDK inhibitor

動物には CIP/KIP family と INK4 family の 2 種類の CDK inhibitor があり、CIP/KIP family が多種類のサイクリン/CDK 複合体に結合して活性を制御するのに対して、INK4 family は特定の CDK に結合し、特異的に阻害する(左図)。p27 の保存領域のペプチドはサイクリン/CDK 複合体にまたがるように結合してキナーゼ活性部位を塞ぐ。

植物においても、種々のサイクリン(Soni et al., 1995, De Veylder et al., 1999)、CDK(Hirayama et al., 1991, Imajuku et al., 1992)、CKI(Wang et al., 1998)、CAK(Sauter 1997)、Rb(Huntley et al., 1998, Nakagami et al., 1999)そしてE2F(Sekine et al., 1999, Ramirez-Parra et al., 1999)のホモログが次々と単離されてきた。Rb と E2F は全ゲノム解析が完了した酵母には存在せず、動物ではG1期制御にきわめて重要なRb-pathwayに関わる制御遺伝子であることから、植物でもこの経路が植物のG1期制御に重要な役割を果たすことが示唆されているが、現時点では断片的な知見しか得られていない(De Veylder et al., 2003, Dewitte and Murray, 2003, Inze, 2005)。植物においてCDKも多く単離されており、主なものはCDKA、CDKBに分類されている。CDKAは動物および酵母のcdc2と同様にサイクリンとの結合部位であるPSTAIRE配列を保持し、細胞周期に伴う発現様式も細胞周期を通じて一定である。一方CDKBは植物でのみ見られるCDKで、PSTAIRE配列がnon-PSTAIREタイプのPPTALREあるいはPPTTLREになっており、主にG2期からM期に発現する周期性を示すことが明らかになっている。さらに、ゲノム解析が終了したシロイヌナズナでもサイクリンEのホモログは発見されず、動物ではサイクリンDと並んでサイクリンEもG1/S移行期制御に重要な役割を果たすことから、動物と異なった植物特有のG1チェックポイント制御の可能性も示唆されている(Fig. 3)。

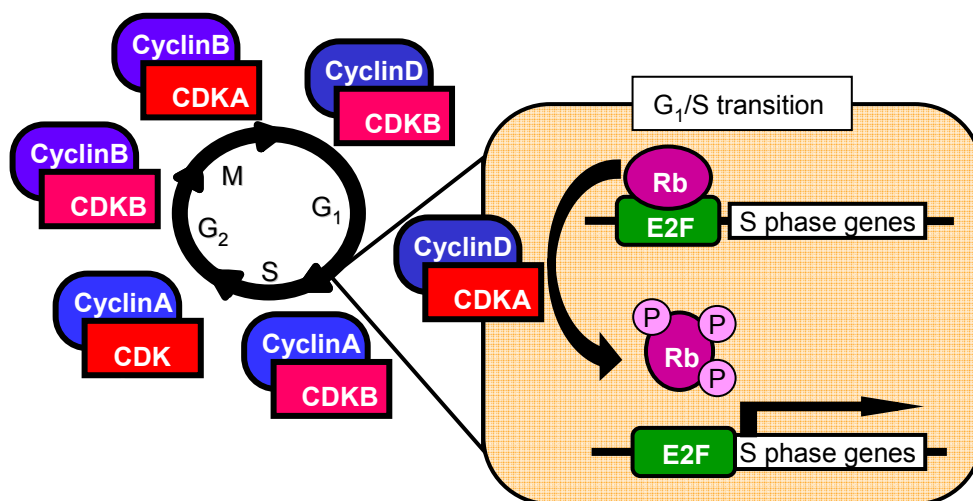


Fig.3 多様なサイクリン/CDKによる細胞周期の制御

細胞周期の進行には、様々なサイクリン/CDK複合体の活性制御が必要とされる。植物でもG1期からS期への移行にはRb-pathwayの機構が働き、サイクリンD/CDKAがRbをリン酸化するとRbがE2Fから遊離し、活性化したE2F転写因子がS期進行に必要な遺伝子群の転写を活性化する。

植物のCKI遺伝子は、シロイヌナズナではゲノム情報から少なくとも7種類のものが存在すると考えられており、interactor of Cdc2 kinase (ICK)またはKip-related protein (KRP)と呼ばれている。他の植物種ではタバコ、エンドウ、イネ、トウモロコシ、トマトでホモログが同定されている(Wang et al., 2000, Lui 2000, De Veylder et al., 2001, Jasinski et al., 2002, Coelho et al., 2005, Bisbis et al., 2006) (Fig. 4)。

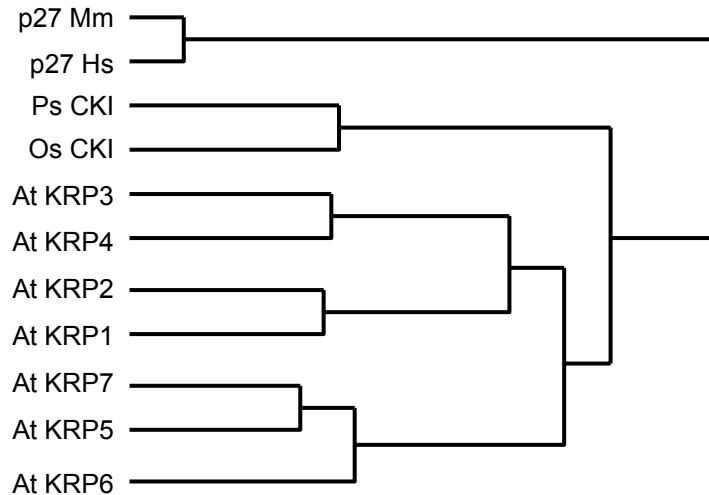


Fig. 4 CDK inhibitor の系統樹

Mm は *Mus musculus* (マウス)、Hs は *Homo sapiens* (ヒト)、Ps は *Pisum sativum* (エンドウ)、Os は *Oryza sativa* (イネ)、At は *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)を示した。系統樹はC末端領域を用いて遺伝子解析ソフト(Geneworks)により作成した。

シロイヌナズナの7種類のKRP遺伝子は動物のp27^{Kip1}と最も高い相同性を持つが、その相同性はCDK阻害領域に限られ全体の相同性は低い。また、p27^{Kip1}がN末端側にCDK阻害領域を持つのに対して、7種全てのKRPはC末端側に相同領域があり、構造的にも異なっている。KRPのなかにはN末端側に、PEST配列、核移行シグナル、リン酸化部位といった特徴的な構造を持つものもあり、細胞周期制御においてKRPの果たす役割には多様性があることが予想されるが、現在のところC末端側の構造についての知見は得られていない(Fig. 5)。KRP遺伝子はシロイヌナズナの器官においてmRNAの発現様式に違いがみられ、KRP1はアブシジン酸(ABA)によって発現が誘導されることが示されている(Wang et al., 1998)。他の細胞周期制御因子との相互作用は酵母 two-hybrid 法を用いて解析されており、これまでに調べられた限りでは、7種のKRPはDタイプのサイクリンと結合するが、CDKBとは結合せず、CDKAとは7種のうちKRP5を除く6種が結合する結果となっている(Wang et al., 1998, De Veylder et al., 2001)。タンパク質レベルの解析では、*in vitro*のアッセイ系においてKRP1とKRP2がヒストンH1に対するキナーゼ活性を抑制することが報告されている(Wang et al., 1998, Lui et al., 2000)。

これまでに、シロイヌナズナでKRP1やKRP2を高発現する遺伝子組み換え植物体が解析されており、共に植物体の成長が著しく阻害され、根や葉、花卉やがくなど、ほとんどの器官が矮化するほか、形態にも変化が現れ、特に葉では特徴的なノコギリ様の形態が観察されている。KRP高発現植物体では細胞の数が少なくなるが、compensate 機構と呼ばれる補償作用により個々の細胞が大きくなっている(Wang et al., 2000, 2003, De Veylder et al., 2001, Zhou et al., 2002, 2003a, 2003b, Tsukaya, 2003)。おそらくKRPが細胞周期の進行を抑制して細胞分裂を滞らせたために細胞レベルで影響を及

ぼし、最終的に植物体の形態形成に顕著な変化が現れたものと考えられている。

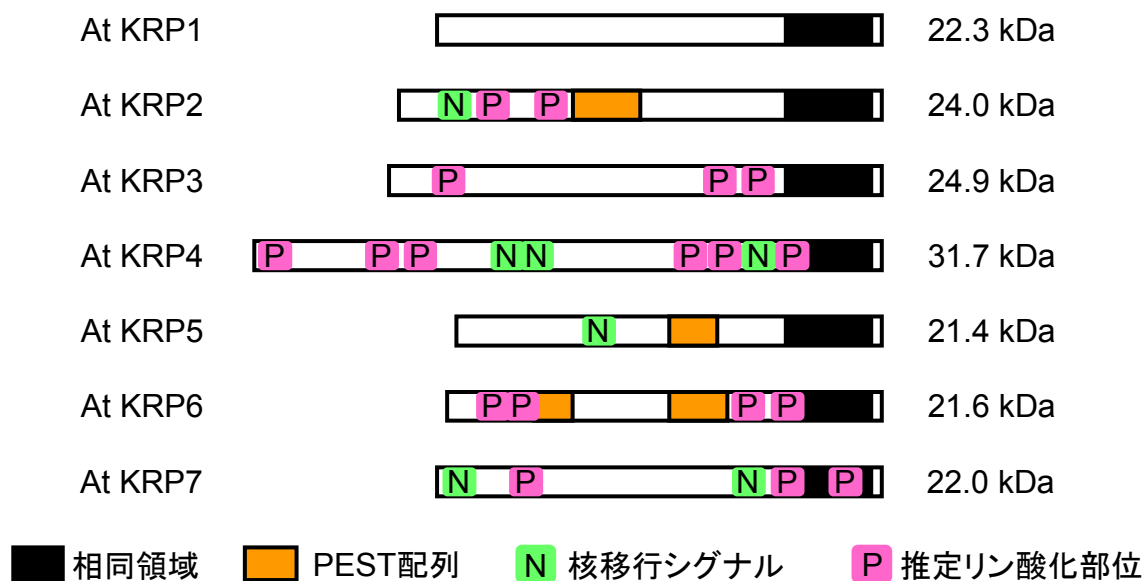


Fig. 5 シロイヌナズナ CDK inhibitor の一次構造

シロイヌナズナ KRP の一次構造の特徴を示した。黒いボックスは相同領域、オレンジのボックスは PEST 配列、N は核移行シグナル、P は CDK 推定リン酸化部位を示す。右に推定分子量を記した。

動物では CKI が細胞周期制御のみならず、発生分化や形態形成にも重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。植物では胚発生以後、主に茎と根の先端にある分裂組織から葉や側根などの器官が形成されるが、分裂組織における細胞分裂と細胞分化の調節機構は解明され始めたばかりである。CKI の機能解明は、このような植物独自の現象についての問題の解明にアプローチできる可能性を持つものと予想される。しかし、モデル植物として最も広く研究され、ゲノムの解読が終了したシロイヌナズナにおいても、CKI の特徴付けがなされているのは未だ一部にすぎず、例えば、どのサイクリン/CDK のキナーゼ活性を特異的に阻害するかなど、解明されていない点が多い。そこで本研究では、7 種のシロイヌナズナ KRP についての機能を解析し、特徴付けを行うことを目的とした。

第一章 KRP とサイクリン/CDK のタンパク質間相互作用の解析

1-1 序論

真核生物全般に CDK は細胞周期制御の主役である。酵母では 1 種類の CDK が細胞周期の進行を制御するのに対して、多細胞生物には複数種の CDK が存在し、それぞれに特有な働きをすることで細胞周期と協調して成長を制御する。A-type の CDK は酵母から真核生物を通して保存されており、分裂酵母では *cdc2*、出芽酵母では *cdc28*、哺乳動物では CDK1 として知られている(Pines, 1995)。A-type の CDK はサイクリン結合領域に PSTAIRE モチーフを有し、G1/S 期および G2/M 期両方のチェックポイントに機能する。動物や植物には数種の CDK ファミリーがあるが、B-type の CDK ファミリーは植物独自のもので、主に G2/M 期の進行に機能すると考えられている。B-type の CDK はモチーフのアミノ酸配列により PPTALRE を持つ CDKB1 と PPTTLRE を持つ CDKB2 の 2 つのサブグループに分類されており、シロイヌナズナには 1 種の A-type CDK (Arath;CDKA;1)と 4 種の B-type CDK (Arath;CDKB1;1、Arath;CDKB1;2、Arath;CDKB2;1、Arath;CDKB2;2)がコードされ、ゲノム解析により C-、D-、E-、F-、G-type までの CDK が分類されている(Vandepoele et al., 2002, Menges et al., 2005)。また、A-type の CDK は酵母の *cdc2/cdc28* 変異株の温度感受性を相補できるのに対し、B-type CDK は相補できないことから、両者は機能的にも使い分けされていると考えられている。植物では「植物種名; クラス名 (CDKA~CDKG); クローン番号」による表記法が提案されているが(Joubes et al., 2000)、本論文ではシロイヌナズナのみを材料として扱うため、以降シロイヌナズナの場合には植物種名を省略して表記する。

一方、サイクリンは CDK の制御サブユニットとして機能する。植物のサイクリンは、動物のサイクリンとの類似性をもとに主に 3 種類(CYCA、CYCB、CYCD)に大別され、このなかで主に S~M 期に発現する CYCA と CYCB は、さらにそれぞれ 3 種類(CYCA1、CYCA2、CYCA3)と 2 種類(CYCB1、CYCB2)のサブクラスに分類されている。また、ゲノム解析によりシロイヌナズナには 50 種類のサイクリン遺伝子が存在し、機能の多様性が推定されている(Vandepoele et al., 2002, Wang et al., 2004, Menges et al., 2005)。CDK と同様に、サイクリンについても「植物種名; クラス名(CYCA~CYCU); クローン番号」による表記法が提案されているが(Renaudin et al., 1996)、本論文では CDK と同様に表記する。

これまでの酵母 two-hybrid 法を用いた結合解析によると、D-type のサイクリン (CYCD)とは 7 種全ての KRP が結合し、CDKA には KRP1-4 が結合するが、KRP5-7 は明確な結果が得られておらず、植物に特有な CDKB との結合は全ての場合で検出

されていない(Wang et al.,2002, De Veylder et al., 2001)。KRP1 と KRP2 については、タンパク質の定性的な解析が行われ、サイクリン/CDK のリン酸化活性を抑制することが示されたが(Wang et al.,1998, Lui et al., 2000)、これまでの KRP タンパク質に関する知見はいずれも断片的なものにとどまっており、KRP の阻害機構や、多様な種類が存在するサイクリン/CDK に対する阻害の特異性、細胞周期以外の役割など解明されていない問題は多く残されている。第一章では 7 種のシロイヌナズナ KRP について、サイクリン/CDK との相互作用に焦点を当てて生化学的に比較解析し、*in vitro* における KRP タンパク質の特徴を解明することを目的とした。

1-2 実験材料および方法

1-2-1 使用植物、昆虫細胞、菌株、プラスミド

1-2-1-1 使用植物

シロイヌナズナ

Arabidopsis thaliana, Columbia (Col-0)

シロイヌナズナ培養細胞

Arabidopsis thaliana, Lansberg erecta, MM2d

1-2-1-2 昆虫細胞

ヨウトガ培養細胞

Spodoptera frugiperda, Sf9

1-2-1-3 使用菌株、プラスミド

Strains and plasmids Genotype, characteristics

Host strains

Escherichia coli

DH5 α

deoR,
endA1, gyrA96, hsdR17(rk-mk+), recA1, relA1,
supE44, thi-1, Δ (lacZYA-argF)U169, ϕ 80lacZ Δ
M15, F-, λ -

BL21(DE3)pLysS

F-, ompT, hsdSB(rB- mB-), dcm, Tetr, gal (DE3),
[pLysS Cam^r]

BL21-codonPlus(DE3)-RIL

F-, ompT-, hsdSB(rB- mB-), dcm+, Tetr, gal λ
(DE3), endA, Hte[argU ileY leuW Cam^r]

DH10BAC

F-, mcrA, D(mrr- hsdRMS- mcrBC), ϕ
80dlacZDM15 Δ lacX74, deoR, recA1, araD139 Δ
(ala,leu)7697, galU, galK, λ -, rpsL, nupG/b
MON14272/pMON7124

Plasmids

pBluescriptII SK-

Amp^r, lacZ

pSPUTK

Amp^r, lacZ

pGEX4T-1

Amp^r, lacIq
Glutathione S-transferase

pFASTBAC HTb

Amp^r, Gm^r, SV40polyA, Tn7L, Tn7R

1-2-2 培地

1-2-2-1 大腸菌

a) LB 培地 : Bacto-trypton 10 g/l、Yeast extract 5 g/l、NaCl 10 g/l
平板培地には 15 g/l の精製寒天末を加えた。必要に応じて、Ampicillin 100 mg/l、Kanamycin 100 mg/l を加えた。

b) SOC 培地 : Bacto-trypton 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、濾過滅菌した 1 M MgSO₄、1 M MgCl₂、2 M Glucose を 1l に対して 10 ml ずつ加えた。

c) 2×YT 培地 : Bacto-tryptone 16 g/l、Yeast extract 10 g/l、NaCl 5 g/l
必要に応じて、Ampicillin 100 mg/l、Kanamycin 100 mg/l を加えた。

1-2-2-2 昆虫細胞

Sf9 細胞の維持培地

Grace's Insect Medium Supplemented (1 ×) にフィルター滅菌した FBS を 50ml、抗生物質ゲンタマイシンを 2.5ml 添加したものをを用いた。遮光、冷蔵保存。

Grace's Insect Medium Supplemented (1 ×) Invitrogene、冷蔵保存

Fetal Bovine Serum (FBS) 大日本製薬、

分注して冷凍保存(非働化せずに使用)

Gentamicin Reagent Solution (10 mg/ml) Invitrogene、常温保存

バクミド調製用選択 LB 培地

以下の抗生物質および試薬を含む LB 寒天(1.5%)培地を用いた

Kanamycin	50 mg/l
Gentamicin	7 mg/l
Tetracycline	10 mg/l
X-gal	100 mg/l
IPTG	40 mg/l

1-2-2-3 植物

改変 Linsmaier and Skoog (LS) 基本培地

Major-elements

NH ₄ NO ₃	1650 mg/l
KNO ₃	1900 mg/l

	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440 mg/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370 mg/l
	KH ₂ PO ₄	370 mg/l
Micro-elements	H ₃ BO ₃	6.2 mg/l
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.3 mg/l
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6 mg/l
	KI	0.83 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25 mg/l
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025 mg/l
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025 mg/l
Fe-EDTA	Na ₂ -EDTA	37.3 mg/l
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8 mg/l
Sucrose		30g/l
Vitamins	Myo-inositol	100 mg/l
	Thiamine-HCl	10 mg/l
Hormone	2,4-D	0.2 mg/l

1N KOH で pH 5.8 に調整後、プレートにする場合は
3 g/l のゲランガムを加えた。

1-2-3 実験試薬、酵素

試薬は特に指定のない限り、和光純薬工業、ナカライテスク、シグマのものを用いた。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 のものをそれぞれの説明書に従って使用した。

1-2-4 プラスミド DNA の少量調製

大腸菌からのプラスミド少量調製は、Birnboim と Doly のアルカリ抽出法に従った(Birnboim and Doly 1979)。抗生物質を含む 2×YT 培地 3 ml で 1 晩培養した菌体を遠心分離(3000 rpm, 5 min, 4°C)により集菌した。この菌体を 200 μl の Solution I に懸濁し、次に、400 μl の Solution II を加え、穏やかに混ぜ、氷中に 5 分間静置した。300 μl の Solution III を加え、よく混合し、氷中に 10 分間静置した。遠心(3500 rpm, 5 min, 4°C)後、上清を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、フェノール/クロロホ

ルム抽出、エタノール沈殿を行い、TE buffer に溶解した。また、必要に応じて、RNaseA(10 mg/ml)を加え、37°Cで30分消化した後、PEG沈殿を行いTE buffer に溶解した。

Solution I : 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

Solution II : 0.2 N NaOH, 1% SDS

Solution III : 3 M sodium acetate (pH 5.2)

TE buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)

1-2-5 DNAの電気泳動およびDNA断片の回収

TAE bufferにより作製した0.5 mg/ml エチジウムブロマイドを含む1.0%アガロースを使用した。試料にGel-Loading bufferを1/10量加え、ゲルのスロットに注入した。泳動装置はMupid-2(コスモ・バイオ)を用い、定電圧50Vまたは100Vで行った。泳動後、ゲルをトランスイルミネーター上で観察した。

TAE buffer: 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA

Gel-Loadingbuffer: 0.25% bromophenolblue, 0.25% xylene cyanol,
40% (W/V) glycerol

アガロースゲルからのDNA断片の回収はPrep-A-Gene DNA Purification Kit(Bio Rad)を用いて行った。目的断片を含むアガロースゲルを1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、3倍量のBinding bufferを加え、55°Cで完全にゲルを溶解した。これに10 µlのMatrixを加えてよく混合し室温で10分間放置した。軽く遠心分離後、上清を捨て、400 µlのBinding bufferで2度、Wash bufferで3度沈殿を洗浄した。減圧乾固させた後、この沈殿を10 µlのTE bufferに懸濁し、55°Cで5分から10分間加熱後遠心分離し、上清を別の1.5 ml エッペンドルフチューブに移した。再度10 µlのTE bufferで溶出し、計20 µlのDNA溶液を得た。

1-2-6 大腸菌の形質転換

1-2-6-1 コンピテントセルの調製(Inoue et al. 1990)

大腸菌DH5αをLB培地5 mlで一晩培養(前培養)し、200 mlのSOB培養液により室温(25 - 30°C)でOD600が0.4~0.8になるまで培養した。培養液を氷中で冷却した後、遠心(3000 rpm, 15 min, 4°C)して集菌し、1/3容(67 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)後、菌を再び16 mlの氷冷したTB緩衝液に懸濁し、7%となるようにDMSO(dimethylsulfoxide)をゆっくり混ぜながら加え、氷上に10分間放置した。0.2 mlずつ1.5 ml エッペンドルフチューブに分注し、液体窒素で急激に凍結して-80°Cで保存した。

TB 緩衝液 : 10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂·2H₂O, 250 mM KCl
KOH で pH6.7 に合わせた後、55 mM MnCl₂·4H₂O を加え、ろ過滅菌して 4°C で保存した。

1-2-6-2 形質転換

-80°C で保存したコンピテントセルを氷中で解凍後、1~20 µl の DNA 溶液を加え、氷中に 30 分以上放置した。42°C に 45~60 秒間置き、直ちに氷中に戻した。800 µl の SOC 培地を加え、37°C で 30 分間振とう培養した。遠心分離後上清を 200 µl の SOC 培地に菌体を懸濁し、適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上に広げ、37°C で一晩培養した。

1-2-7 塩基配列の決定

DNA の塩基配列の決定は、Applied Biosystems 社の DNA シーケンシングキットを用い、そのプロトコールに従った。キットは dRhodamine Dye Terminator Cycle Sequenceing Ready Reaction Kit または BigDye Terminator Cycle Sequenceing Ready Reaction Kit を用いた。

1-2-7-1 ポリメラーゼ反応

0.2ml マイクロチューブに鋳型 DNA と Terminator Ready Reaction Mix 6 µl、プライマー 2 µl(1.6pmol)、滅菌水で 15 µl に fill up した反応液を調製し、Gene Amp PCR system 9600(Applied Biosystems)で PCR 反応させた。反応条件は以下の通りである。

96°C 1 min 1cycle

96°C 10 sec、50°C 5 sec、60°C 4min 25cycle

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 のマイクロチューブに移し、3M NaOAc(pH4.6)1.5 µl、100%エタノール 33 µl を加え、氷上に 10 分間放置した。その後遠心分離(15000rpm,20min,4°C)し、上清を捨て 70%エタノールで洗浄し、減圧乾燥した。TSR(Template Suppression Reagent, Applied Biosystems)12 µl によく溶解し、95°C で 5 分間加熱後、氷上で急冷し、気泡が入らないように注意しながら専用のサンプルチューブに移し、セプタを取り付けた。専用サンプルトレーにサンプルチューブを並べ、シーケンサーにセットした。

1-2-8 大腸菌発現系による KRP タンパク質の調製

1-2-8-1 Glutathione S-transferase (GST)融合タンパク質発現用プラスミドの構築

N 末端側に GST を付加するために、リーディングフレームが合うようにして pGEX4T-1(Amersham Biosciences)の MCS に KRP1~7 を挿入した。

pGEX4T-1 の *Bam*HI-*Xho*I もしくは *Bam*HI-*Spe*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて KRP 全長の 5'末端側に *Bam*HI 認識配列を、3'末端側に *Xho*I 認識配列もしくは *Spe*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、pGEX4T-1 に *Bam*HI-*Xho*I もしくは *Bam*HI-*Spe*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP1; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGGTGAGAAAATATAG-3'

5'-CTCGAGTCACTCTAACTTTACCCATTCG-3'

KRP2; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGGCGGCGGTTAGGAGAAG-3'

5'-CTCGAGTCATGGATTCAATTTAACCC-3'

KRP3; *Bam*HI-*Sal*I

5'-GGATCCATGGGGAAATACATGAAGAAATC-3'

5'-GTCGACTCATGGTTTACTTGCACCC-3'

KRP4; *Bam*HI-*Sal*I

5'-GGATCCATGGGGAAATACATAAG-3'

5'-GTCGACCTAATCATCTACCTTCGTCC-3'

KRP5; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGGGAAAATACATTAAG-3'

5'-CTCGAGTCATGGCATCACTTTGACCC-3'

KRP6; *Bam*HI-*Sal*I

5'-GGATCCATGGCGGCGGTTAGGAGAAG-3'

5'-GTCGACTTAAAGTCGATCCCACTTG-3'

KRP7; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGAGCGAAACAAAACCC-3'

5'-CTCGAGCTAAGGTTTCAGACTAACCC-3'

1-2-8-2 GST 融合タンパク質の生産

BL21(DE3)pLysS 株もしくは BL21-codonPlus(DE3)-RIL 株に構築した発現用ベクターを導入した。得られた形質転換体を LB 培地 (Ampicillin 50 µg/ml, Chloramphenicol 35 µg/ml) で 37 °C にて振とう培養した。OD₆₀₀ = 0.4~0.6 まで増殖さ

せた後、Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside(IPTG)を終濃度 0.01~0.1 mM になるように添加し、18 °Cで一晩振とう培養した。遠心分離により菌体を回収し、1×PBS Buffer で1回洗浄した後、10倍量の1×PBS Buffer に菌体を懸濁させた。氷上で超音波破碎(10秒 × 10回、5秒間隔、出力7 ~ 8、Handy Sonic model UR-10P、TOMY SEIKO)し、遠心分離(15,000 rpm、30分間、4 °C)により上清を回収し、0.45 μ mのフィルターを通して粗抽出液とした。

1×PBS buffer: 2.7mM KCl, 1.4M NaCl, 100mM Na₂HPO₄, 18mM KH₂PO₄, 1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF), 1 mM Dithiothreitol (DTT), pH7.3

1-2-8-3 GST 融合タンパク質の精製

Glutathion-Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences)を充填したカラムに GST 融合タンパク質を発現させた菌体の粗抽出液を担体の10倍量(v/v)加え、4 °Cで1時間インキュベートした。ビーズの10倍容量の1×PBS Buffer で3回洗浄した後、溶出溶液をビーズの当倍量加えて溶出画分を得た。溶出を5度繰り返して得られた各溶出画分を SDS-PAGE と CBB 染色により確認し、目的タンパク質の純度の高い画分を TBS buffer で透析して精製溶液とし、-80 °Cで凍結保存した。

溶出溶液: 50mM Tris-HCl, 10mM 還元型グルタチオン、 pH8.0
TBS buffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 1 mM EGTA, pH7.5

1-2-9 昆虫細胞発現系によるサイクリンおよび CDK タンパク質の調製

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

1-2-9-1 昆虫細胞

(1)使用細胞株 Sf9

通常は5分程度で細胞はシャーレに接着するが、この程度の時間で接着しない場合は細胞の状態が悪くなく、初期の細胞形態を維持するように注意した。細胞濃度は $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml で維持するのが好ましい。細胞濃度が低い分にはあまり問題はないが、飽和状態にしないように留意した。倍加時間は約24時間であり、通常は3~4日置きに細胞数を約1/10に希釈した。

(2)培養条件

・培養容器

細胞培養ディッシュ(Corning Costar)

培養液の量は ϕ 100mmの場合で約10 ml、 ϕ 60mmの場合で約5 ml

スピナーフラスコ

60 rpm で攪拌培養

・培養温度 27 °C

(3)継代培養(シャーレ)

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

(4)凍結保存

対数増殖期の細胞を回収し、氷上にて DMSO を 10 % 添加した FBS に懸濁させた。この際、細胞濃度は 4×10^6 以上にした。凍結用チューブに細胞懸濁液を分注した。-20 °C で 1 時間インキュベートした後、-80 °C で一晩インキュベートした。最後に、液体窒素中にて保存した。

1-2-9-2 組み換えドナープラスミドの構築

シロイヌナズナ CDKA(CDKA;1)、CYCD2(CYCD2;1)、CYCD3(CYCD3;1)、CYCB(CYCB1;1、CYCB2;1)の N 末端側に His タグを付加するため、リーディングフレームが合うようにして pFastBacHTb (Invitrogene) の MCS に目的の遺伝子を挿入した。なお、CDKB(CDKB2;1)は東京大学の梅田正明助教授より分与して頂いたものを使用した。

CDKA(CDKA;1)を pFastBacHTb の *NcoI-NotI* 部位に挿入するため、PCR 法を用いて全長の CDKA;1 の 5'末端側に *NcoI* 認識配列を、3'末端側に *NotI* 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、pFastBacHTb に *NcoI-NotI* 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

CDKA(CDKA;1); *NcoI-NotI*

5'-GCATGGATGGATCAGTACGAGAAAGTTGAG-3'

5'-GCGGCCGCTTATGCCTTTCTAAGGCATGCC-3'

CYCD2(CYCD2;1)を pFastBacHTb の *BamHI-XhoI* 部位に挿入するため、PCR 法を用いて全長の CYCD2;1 の 5'末端側に *BamHI* 認識配列を、3'末端側に *XhoI* 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、pFastBacHTb に *BamHI-XhoI* 断片を組み換えた。PCR には以下

に示した配列のプライマーを用いた。

CYCD2(CYCD2;1); *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGGCTGAGAATCTTGCTTGTGG-3'

5'-CTCGAGTCATTGTTTTCTCCTCCTCTTG-3'

CYCD3(CYCD3;1)を pFastBacHTb の *Eco*RI-*Sa*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて全長の CYCD3;1 の 5'末端側に *Eco*RI 認識配列を、3'末端側に *Sa*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、pFastBacHTb に *Eco*RI-*Sa*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

CYCD3(CYCD3;1); *Eco*RI-*Sa*I

5'-GAATTCATGGCGATTCGGAAGGAGGAAG-3'

5'-GTCGACTTATGGAGTGGCTACGATTGCC-3'

CYCB1;1 を pFastBacHTb の *Bam*HI-*Sa*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて全長の CYCB1;1 の 5'末端側に *Bam*HI 認識配列を、3'末端側に *Sa*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、pFastBacHTb に *Bam*HI-*Sa*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

CYCB1;1; *Bam*HI-*Sa*I

5'-GGATCCATGATGACTTCTCGTTCGATTG-3'

5'-GTCGACCTAAGCAGATTCAGTTCCG-3'

CYCB2;1 を pFastBacHTb の *Bam*HI-*Xho*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて CYCB2;1 全長の 5'末端側に *Bam*HI 認識配列を、3'末端側に *Xho*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、pFastBacHTb に *Bam*HI-*Xho*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

CYCB2;1; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGGTTAATCCAGAGGAGAAC-3'

5'-CTCGAGTTAGTGAGAATCTGACACAAG-3'

1-2-9-3 相同組み換え

(1)大腸菌への形質転換

-80 °Cで保存しておいた大腸菌 DH10Bac コンピテントセル(200 μl)を氷上で解凍

後、1 ng の組み換えドナープラスミドを加え、30 分間インキュベートした。42 °C で 45 秒間、熱ショックを加えた後、氷上で 2 分間インキュベートした。これに 800 μ l の SOC 培地を加え、37 °C で 1 時間、振とう培養した。菌体を選択寒天培地にまき、24 時間以上 37 °C で培養した。

(2)組み換えバクミドの調製

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

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

(3)Sf9 細胞への組換えバクミドの導入および組み換えウィルスの調製

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

(4)組み換えウィルスの増幅

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

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

1-2-9-4 タンパク質の発現粗抽出液の調製

対数増殖期の Sf9 細胞を ϕ 100mm のシャーレに 6×10^6 個まき、27 °C で細胞をシャーレに接着させた。上清を除き、9.5 ml の新鮮な培養液と 500 μ l の増幅した組み換えウィルス液を加え、27 °C で 4 日間培養した。遠心分離により細胞を回収し、His-binding Buffer で 1 回洗浄した後、500 μ l の His-binding Buffer に細胞を懸濁させた。氷上で超音波破碎(10 秒 \times 10 回、5 秒間隔、出力 7 ~ 8、Handy Sonic model UR-10P、TOMY SEIKO)し、遠心分離(15,000 rpm、30 分間、4 °C)により上清を回収し、0.45 μ m のフィルターを通して粗抽出液とした。

His-binding Buffer: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, 1mM PMSF, pH 7.9

1-2-9-5 His タグ融合タンパク質の精製

TALON Metal Affinity Resin(Clontech)または His-bind-resin(Novagen)を用い、カラムを作製した。基本的な操作は各プロトコールに従った。それぞれの担体用の抽出用緩衝液を用いて破碎した菌体および細胞の粗抽出液を担体の 10 倍量を 3 回通した。10 倍量の各洗浄用緩衝液で 3 回洗浄した後、担体と等量の各溶出用緩衝液で 5 回溶出した。得られた溶出サンプルを TBS buffer で透析して精製溶液として-80 °C で凍結保存した。

1-2-10 精製タンパク質サンプルの定量

1-2-10-1 精製溶液のタンパク質濃度の定量

Bradford の方法に従った。1/10 倍希釈した粗酵素液 50 μ l とタンパク質定量試薬 2 ml をキュベットに入れてよく混合し、5 分以上経ってから Abs 595nm を測定した。Bovine Serum Albumin(BSA)を用いて検量線を作成し、これよりサンプルのタンパク

質濃度を求めた。

タンパク質定量試薬: Coomassie Brilliant Blue 50 mg, 95% Ethanol 25 ml,
85% (w/v) Phosphoric acid 50 ml

滅菌蒸留水で 500 ml にメスアップし、濾紙(Toyo No.2)で 2 回濾過した。
さらに使用直前に必要量のみ再度濾紙で 2 回濾過して使用した。

1-2-10-2 CBB 染色による目的タンパク質の定量

測定サンプルと BSA とを同時に SDS-PAGE した。CBB 染色によりタンパク質染色されたゲルの画像から、各バンドの染色強度を決定した。BSA のバンドを用いて検量線を作成し、これよりサンプル中の目的タンパク質濃度を求めた。

1-2-11 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、Laemmli の方法に従った(Laemmli, 1970)。下記の分離ゲルと濃縮ゲルを用いてゲルを作製した。2-15-2 で調製した試料に等量の SDS-sample buffer を加え、95°C で 2 分間熱変性させた試料をゲルにアプライした。電気泳動は恒温式ミニゲルスラブ電気泳動装置(日本エイドー社)を用い、SDS-running buffer 中で行った(定電流 20 mA)。

分離用ゲル : 375 mM Tris-HCl pH8.8, 10% Acrylamide, 0.1% SDS
(適当量の APS と TEMED で重合)

濃縮用ゲル : 125 mM Tris-HCl pH6.8, 5% Acrylamide, 0.1% SDS
(適当量の APS と TEMED で重合)

SDS-sample buffer : 100 mM Tris-HCl pH6.8, 12% 2-Mercaptoethanol, 4% SDS,
20% glycerol, 0.2% BPB

10×SDS-running buffer : 0.25 M Tris, 1.92 M glycine, 1% SDS

1-2-12 Coomassie brilliant blue (CBB) R-250 によるタンパク質染色

SDS-PAGE 後のゲルを CBB 染色液に浸し 1 時間穏やかに振とうした。CBB 染色液を捨て、ゲルを CBB 脱色液に浸して、バンド以外の部分が透明になるまで穏やかに振とうした。

CBB 染色液: 45% Methanol , 10% Acetic Acid , 0.1% (w/v)CBBR-250

CBB 脱色液: 45% Methanol , 10% Acetic Acid

1-2-13 Western blotting

SDS-PAGE 後のゲルを Transfer buffer 中で 15 分間平衡化した後、エレクトロトランスファー装置(日本エイドー、NA-1512)を用いて Transfer buffer 中で 1mA/cm² の定電流にて 45 分間通電し、タンパク質をメンブレン(Bio-Rad、PVDF)上にブロットした。ブロッティング後のメンブレンを TBST で洗い、次に Blocking buffer に浸して

1時間(または4℃で一晩)ブロッキングを行った。そしてメンブレンを Blocking buffer で5分間3回洗浄後、メンブレンを1次抗体を加えた Blocking buffer で室温1時間反応させた。メンブレンを Blocking buffer で5分間3回洗浄後、2次抗体および Blocking buffer で室温1時間反応させた。TBST で5分間3回洗浄後、アルカリフォスファターゼ発色溶液(AP buffer 15ml, NBT 100 μ l, BCIP 50 μ l)に浸し1~15分間反応させ、最後にメンブレンを蒸留水で洗浄した。

Transfer buffer : 48mM Tris-HCl (pH8.3), 39mM Glycine, 20% methanol
TBST : 25mM Tris-HCl (pH8.0), 137mM NaCl, 2.7mM KCL, 0.05% Tween20
Blocking buffer : 3% Skim milk in TBST
AP buffer: 100mM Tris-HCL (pH9.5), 100mM KCL, 0.05% Tween20
NBT : 4-nitro blur tetrazolium chloride
BCIP : 5-bromo-4chloro-3 indyl-phosphate

1-2-14 *In vitro* 転写翻訳系による KRP タンパク質の合成

TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)を用いた。

1-2-14-1 *In vitro* 転写翻訳系 KRP 合成用プラスミドの構築

In vitro 転写翻訳系の発現ベクターとして、pSPUTK ベクター(Stratagene)を用いた。まず pSPUTK ベクターの SP6 プロモーター/UTK 下流の *SpeI* と *BamHI* サイトに HA の配列を3回タンデムに挿入したベクターを作製した。

当研究室の松井が作製した 3×HA(HA タグ配列を3つタンデムに並べたもの)を pSPUTK の *SpeI*-*BamHI* 部位に挿入するため、PCR 法を用いて 3×HA の 5'末端側に *SpeI* 認識配列を、3'末端側に *BamHI* 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、pSPUTK に *SpeI*-*BamHI* 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

3×HA; *SpeI*-*BamHI*

5'-ACTAGTGGTTACCCATACGACGTCCC-3'

5'-GGATCCACCGGCGTAGTCTGGCACG-3'

KRP1 は *BamHI* と *EcoRI*、KRP2、KRP5、KRP7 は *BamHI* と *XhoI*、KRP3、KRP4、KRP6 は *BamHI* と *SaI* のサイトに挿入し、3×HA とリーディングフレームを合わせて各 KRP の cDNA が連結するようにした。PCR 法を用いて全長の KRP の 5'末端側に *BamHI* 認識配列を、3'末端側に *EcoRI* 認識配列、*XhoI* 認識配列、*SaI* 認識配列をそれぞれ付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、3×HA の挿入された pSPUTK に *BamHI*-*EcoRI* 断片、*BamHI*-*XhoI* 断片もしくは *BamHI*-*SpeI* 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配

列のプライマーを用いた。得られたプラスミドの濃度を 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように調製した。

KRP1; *Bam*H1-*Eco*RI

5'-GGATCCATGGTGAGAAAATATAG-3'

5'-GAATTCTAACTTTACCCATTCG-3'

KRP2; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGGCGGCGGTTAGGAGAAG-3'

5'-CTCGAGTCATGGATTCAATTTAACCC-3'

KRP3; *Bam*HI-*Sal*I

5'-GGATCCATGGGGAAATACATGAAGAAATC-3'

5'-GTCGACTCATGGTTTACTTGCACCC-3'

KRP4; *Bam*HI-*Sal*I

5'-GGATCCATGGGGAAATACATAAG-3'

5'-GTCGACCTAATCATCTACCTTCGTCC-3'

KRP5; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGGGAAAATACATTAAG-3'

5'-CTCGAGTCATGGCATCACTTTGACCC-3'

KRP6; *Bam*HI-*Sal*I

5'-GGATCCATGGCGGCGGTTAGGAGAAG-3'

5'-GTCGACTTAAAGTCGATCCCACTTG-3'

KRP7; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGAGCGAAACAAAACCC-3'

5'-CTCGAGCTAAGGTTTCAGACTAACCC-3'

1-2-14-2 *In vitro* 転写翻訳系によるタンパク質の合成

以下の反応溶液を調製し、30°Cで90分間インキュベートした。

TNT Rabbit Reticulocyte Lysate :	5μl
TNT Reaction Buffer :	0.4μl
TNT RNA Polymerase (SP6) :	0.2 μl
Amino Acid Mixture, Minus Methionine	0.2 μl
Amino Acid Mixture, Minus Leucine	0.2 μl
Amino Acid Mixture, Minus Cysteine	0.2 μl
RNasein Ribonuclease Inhibitor (40u/ml) :	0.2 μl
DNA template (0.2μg/μl)	2 μl
Nuclease-Free Water	1.6 μl

合成されたタンパク質は抗 HA 抗体の western blotting により確認し、-80℃で保存した。

1-2-15 *In vitro* 結合試験

3×HA-KRP タンパク質 10 μl と His-tag を付加した CYCD2、CDKA、CDKB あるいは CYCD2/CDKA 複合体、CYCD2/CDKB2 複合体 30 μl とを TALON binding Buffer 500μl 中で混合し、前もって平衡化した TALON Metal Affinity Resin 50μl と共に 4℃で 1 時間穏やかに攪拌した。1ml の TALON binding Buffer で 2 回洗浄した後、100 μl の TALON Elute Buffer で溶出した。溶出溶液に 4 × SB を加えて 95 °C で 2 分間熱変性させた。15%ゲルで SDS-PAGE を行い、溶出溶液に含まれる 3×HA-KRP タンパク質を抗 HA 抗体の western blotting により検出した。

TALON binding Buffer: 50mM Sodium Phosphate, 300mM NaCl, 0.1% Triton-X100, 0.01% BSA, pH7.0

TALON Elute Buffer : 50mM Sodium Phosphate, 300mM NaCl, 150mM imidazole, pH7.0

1-2-16 ヒストン H1 リン酸化実験系

昆虫細胞発現系から調製した CYCD2/CDK 複合体の精製溶液を試料として用い、以下の組成で反応させた。最後に試料を添加して反応を開始させ、30 °C で 30 分間インキュベートした。4 × SB を加えて反応を停止し、95 °C で 2 分間熱変性させた。15%ゲルで SDS-PAGE を行い、リン酸化されたヒストン H1 タンパク質をオートラジオグラフィーで検出した。

4 × SB

1 M Tris-HCl(pH 6.8) :	20 ml
SDS:	8.0 g
Glycerol :	40 ml
Bromophenol Blue(BPB) :	20 mg
β -Mercaptoethanol :	20 μl

filled up 100ml with dH₂O

反応溶液

試料	5 μ l
ヒストン H1(10 mg/ml)	0.25 μ l
[γ - ³² P]ATP (4,500 Ci/mmol, ICN)	0.25 μ l
Kinase Buffer	14.5 μ l
計	20 μ l

Kinase Buffer : 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl, 1mM EGTA, pH7.5

1-2-16-1 KRP タンパク質によるリン酸化阻害活性の解析

ヒストン H1 リン酸化実験系の CYCD2/CDK 複合体の精製溶液に大腸菌発現系から調製した KRP タンパク質精製溶液を適当量添加し、Kinase Buffer を必要な量加えて試料とした。試料にそれ以外の反応液を添加して反応を開始させ、30°Cで 30 分間インキュベートした。4×Sample Buffer を加えて反応を停止させ 95°Cで 2 分間熱変性させた。15%ゲルで SDS-PAGE を行い、リン酸化されたヒストン H1 タンパク質をオートラジオグラフィーで検出した。反応液の組成は以下に示す。

反応溶液

試料	15 μ l
ヒストン H1(10 mg/ml)	0.25 μ l
[γ - ³² P]ATP (4,500 Ci/mmol, ICN)	0.25 μ l
Kinase Buffer	4.5 μ l
計	20 μ l

1-2-16-2 キナーゼ活性の検出

イメージングプレートを用いて感光し、バイオイメージングアナライザー BAS2500(富士フィルム)により画像を読み込んだ。

1-3 結果

1-3-1 CYCD2/CDKA と CYCD2/CDKB の調製

7種類の KRP タンパク質の特徴を調べるにあたり、結合および阻害の対象として CYCD2/CDKA および CYCD2/CDKB を調製した。昆虫細胞発現系を用いてシロイヌナズナの CYCB(CYCB1;1、CYCB2;1)、CYCD2(CYCD2;1)、CYCD3(CYCD3;1)、CDKA(CDKA;1)、CDKB(CDKB2;1)に His タグを付加した His-CYCB1、His-CYCB2、His-CYCD2、His-CYCD3、His-CDKA、His-CDKB をそれぞれ作製し、His タグに対するアフィニティー担体である His-bind-resin を用いて各タンパク質の単体を精製した。昆虫細胞内でタバコ由来の CYCD3 と CDKA を共発現すると、リン酸化活性を備えたタンパク質複合体が得られたとの当研究室の中神の知見にしたがい(Nakagami et al., 1999, 2002, 中神, 博士論文 2000)、シロイヌナズナの各サイクリンと CDKA もしくは CDKB を共発現することで活性型複合タンパク質が得られると考えた。様々な実験条件を検討した結果、CYCD2 と CDKA または CDKB でのみ十分なリン酸化活性を示す複合体が調製された。そこで CYCD2 と CDKA、CDKB のウイルス懸濁液量を調節して昆虫細胞に感染させることで各タンパク質が共に十分量発現する条件を採用した。共発現したタンパク質を His-bind-resin を用いて精製し、活性型の CYCD2 と CDKA の複合体(CYCD2/CDKA)および CYCD2 と CDKB の複合体(CYCD2/CDKB)のタンパク質を得た。CYCD2 と CDKA の単体を精製後に混合したものの(CYCD2+CDKA) および CYCD2 と CDKB を混合したサンプル(CYCD2+CDKB)についても以下のように解析し、サンプルの特徴づけを行った。まず抗 His 抗体による western blotting を行い各サンプルに含まれる His 標識タンパク質の存在量を調べた。複合体に関しては CYCD2 および CDKA または CDKB の量比が多少異なるものの、それぞれのサンプルについて十分量の目的タンパク質が含まれると判断した。次に、ヒストン H1 を基質としてリン酸化実験を行い各サンプルのリン酸化活性を検定した。その結果期待されたとおり、CYCD2、CDKA、CDKB 各単体および CYCD2+CDKA、CYCD2+CDKB の混合サンプルは活性を示さず、CYCD2/CDKA と CYCD2/CDKB はリン酸化活性を示した(Fig. 6)。これは CYCD2 と CDKA または CDKB を昆虫細胞で共発現することにより、昆虫細胞由来の CAK がシロイヌナズナ CYCD2/CDKA または CYCD2/CDKB 複合体に作用して活性化されたのに対し、単純に混合したものでは活性を示さなかったと考えられる(Nakagami et al., 1999, 2002, 中神, 博士論文 2000)。同量のサンプルを用いたところ、CYCD2/CDKB よりも CYCD2/CDKA の方が強いリン酸化シグナルを示し、*in vitro* の実験系においてヒストン H1 に対するリン酸化活性は CDKB よりも CDKA の方が強いことが示唆された。両者のサンプル量を調整してリン酸化シグナルで定量化し

たところ、CYCD2/CDKA の 2.5 倍量の CYCD2/CDKB が同程度のリン酸化活性を示すことが分かった。そこで次に CYCD2/CDKA と CYCD2/CDKB のリン酸化活性を比較するために、CDK 阻害剤である Roscovitine を反応系に添加してリン酸化実験を行ったところ、CYCD2/CDKA と CYCD2/CDKB は Roscovitine により阻害されることが確認されたが、CYCD2/CDKB よりも CYCD2/CDKA に対して若干強く阻害作用を示すことが分かった(Fig. 6)。

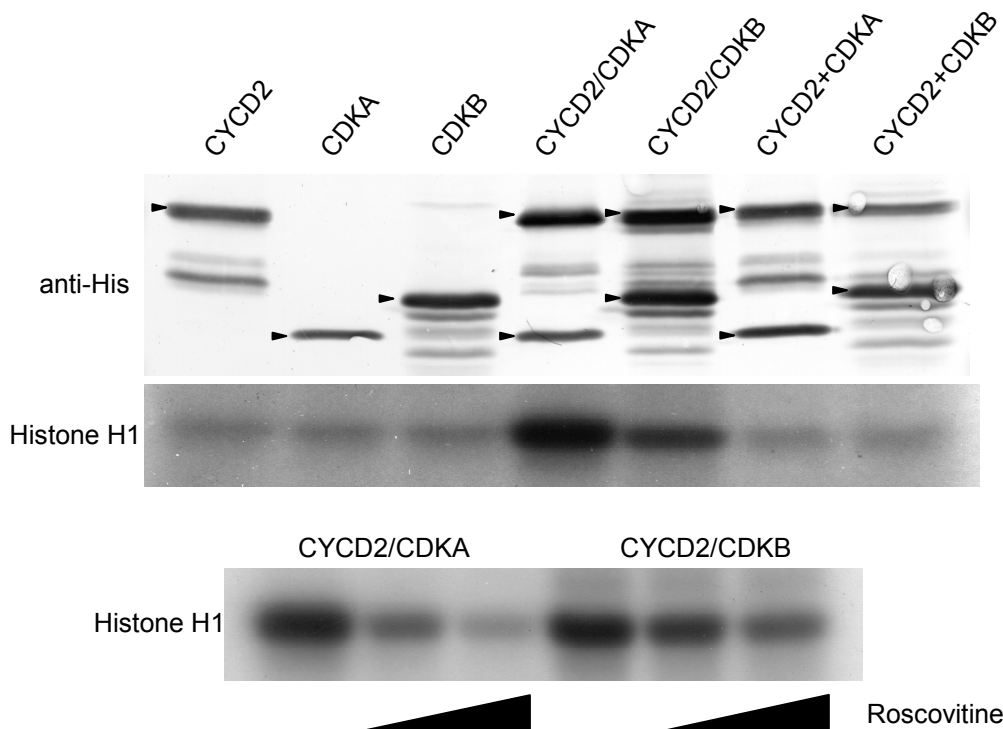


Fig. 6 CYCD2,CDKA,CDKB 単量体と CYCD2/CDKA,CYCD2/CDKB 複合体のリン酸化活性
各タンパク質サンプルの抗 His 抗体による western blot の結果を上段に、ヒストン H1 を基質としたリン酸化実験の結果を中段に示した。矢印は全長と推定される各タンパク質を示す。下段では、CYCD2/CDKB を CYCD2/CDKA の 2.5 倍量用いてリン酸化実験を行い、Roscovitine を各 0、0.05、0.5 μ g 加えた場合の結果を示した。

1-3-2 KRP とサイクリン/CDK の結合解析

KRP のサイクリンや CDK に対する結合解析はこれまで主に酵母 two-hybrid 法を用いて行われ、7 種の KRP は D-type のサイクリン(CYCD1、CYCD2、CYCD3)と結合するが CDKB(CDKB1;1)とは結合せず、KRP1-4 は CDKA と結合するという結果が得られている(Wang et al.,2002, De Veylder et al., 2001)。KRP5-7 と CDKA との結合に関しては判断が分かれており、はっきりとした結論は得られていない。また、この方法では酵母由来の内因子に目的タンパク質の挙動が影響される可能性も考えられる。より厳密に KRP タンパク質自体の結合特性を知るために、*in vitro* 転写翻訳系を用いて作製した 3 \times HA-KRP(HA タグを 3 個タンデムに付加した KRP)タンパク質の結合を、1-3-1 と同様に昆虫細胞発現系から調製した CYCD2、CDKA、CDKB

の各サンプルを対象として pull-down により解析した。3×HA-KRP1 から 3×HA-KRP7 の 7 種のタンパク質を含む *in vitro* 転写翻訳系の lysate を His タグに対するアフィニティー担体である TALON metal affinity resin および His-CYCD2、His-CDKA、His-CDKB と共に混合し、充分洗浄した後に担体からの溶出を行った。溶出画分に含まれる 3×HA-KRP タンパク質を抗 HA 抗体による western blotting により検出して CYCD2、CDKA、CDKB タンパク質との結合を評価した。その結果、全ての KRP は CYCD2 や CDKA、CDKB 単独のタンパク質に対して結合せず、活性型の CYCD2/CDKA および CYCD2/CDKB 複合体とのみ結合が認められた。また、リン酸化活性を持たない CYCD2+CDKA と CYCD2+CDKB のサンプルに対しては、CYCD2、CDKA、CDKB のタンパク質を十分量用いても結合シグナルは認められなかった(Fig. 7)。これにより、これまでの結合様式の理解から進み、KRP は単量体もしくは非活性型のサイクリンや CDK よりも、活性型のサイクリン/CDK 複合体に対してより強く結合することが明らかになった。

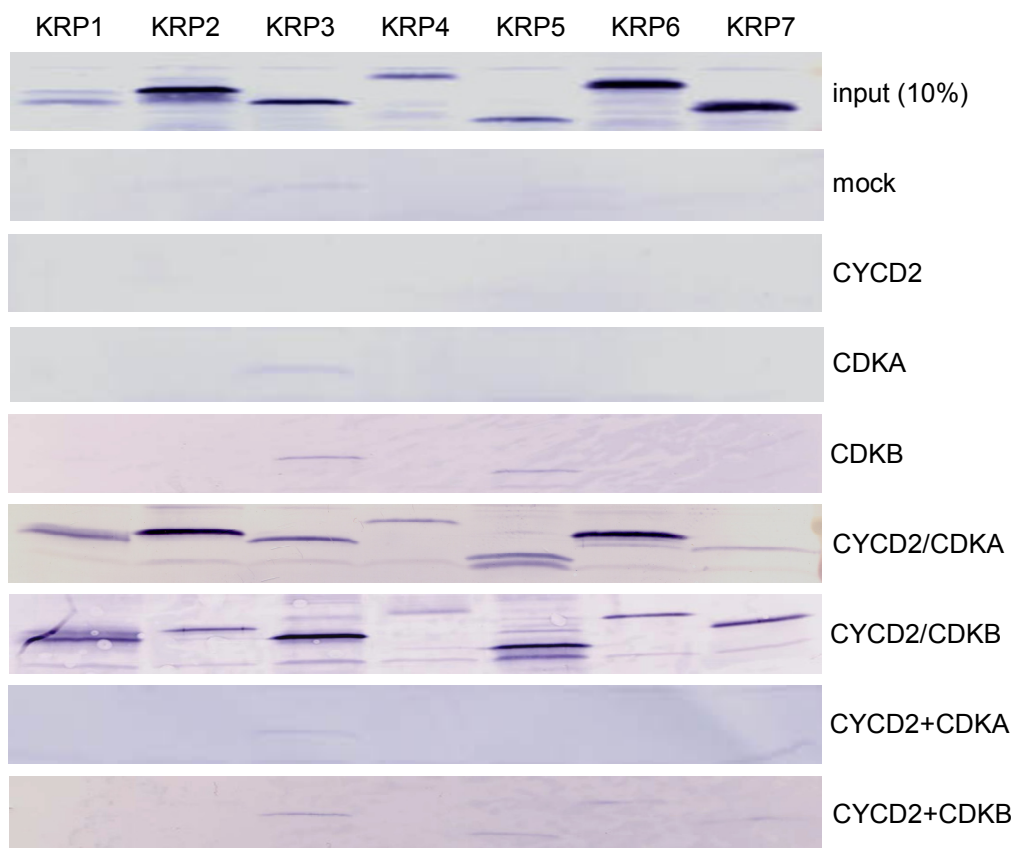


Fig. 7 KRP と CYCD2,CDKA,CDKB との結合解析

His-CYCD2,His-CDKA,His-CDKB による 3HA-KRP の pull-down 実験を行い、溶出画分に含まれる 3HA-KRP を抗 HA 抗体による western blot により検出した。Pull-down 実験に用いた 10%量の lysate を最上段に示した(input)。二段目には His-CYCD2,-CDKA,-CDKB タンパク質を加えずに行ったものを mock として示した。

1-3-3 KRP によるサイクリン/CDK の阻害

KRP は 7 種類あるが、これまでのところ KRP1 と KRP2 の阻害活性のみが確認されているものの、7 種類の阻害能に関して詳細な解析は行われておらず、またそれぞれの阻害活性を比較したという報告はない(Wang et al.,1998, Lui et al., 2000)。そこで、7 種の KRP タンパク質について、それぞれが持つサイクリン/CDK の阻害活性を比較した。まず十分量の精製 KRP タンパク質を得るために大腸菌によるタンパク質の生産を行った。GST タンパク質および N 末端側に GST タグを付加した KRP1-KRP7 タンパク質を大腸菌内で発現させ、Glutathione Sepharose 4B 担体を用いて精製した(Fig. 8)。その結果、KRP1-KRP7 の推定分子量は KRP4 を除いてほとんど変わらないが(緒言 Fig. 5)、今回の精製では GST-KRP5 が最も低い位置にバンドが検出された。しかし、*in vitro* 転写翻訳系で調製した 3HA-KRP5 も他に比べて明らかに低い位置にバンドが検出されたことより(Fig. 7)、GST-KRP5 は SDS-PAGE では見かけ上低い位置にあるものの全長のタンパク質であると推定した。SDS-PAGE および CBB 染色により精製タンパク質の純度と濃度を確認し、同量の GST-KRP タンパク質をリン酸化反応系に加えることで KRP1-KRP7 の阻害活性を比較検討した。1-3-1 の結果より CYCD2/CDKB は CYCD2/CDKA の 2.5 倍量を用い、KRP を加えない状態で両者が同程度のリン酸化活性を示すようにした。1、2、5、10pmol の GST および GST-KRP を反応系に加えて阻害実験を行ったところ、KRP は全て量依存的に CYCD2/CDKA と CYCD2/CDKB を阻害したが、KRP1-KRP7 の阻害活性には差があり、KRP5 は阻害活性が低いことが示された。

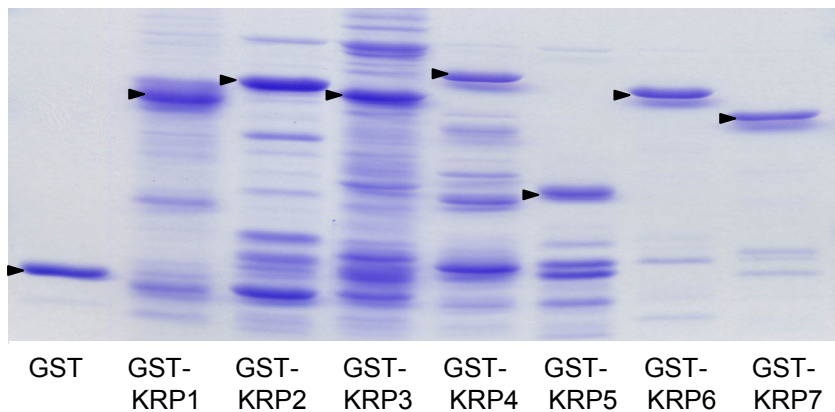


Fig. 8 GST-KRP タンパク質の精製

精製した各タンパク質を SDS-PAGE により展開し、CBB 染色した。矢印は推定される全長の各タンパク質を示す。

また、CYCD2/CDKA 複合体と CYCD2/CDKB 複合体に対する作用にも差があり、特に KRP1 と KRP7 は CYCD2/CDKB 複合体に対してより強い阻害活性を示す結果が得られた(Fig. 9)。これらの結果から、7 種の KRP タンパク質は CDK 複合体にそれぞれ特有の選択性を示す特徴があり、特有のサイクリン/CDK 複合体を標的とし

ている可能性が示唆された。

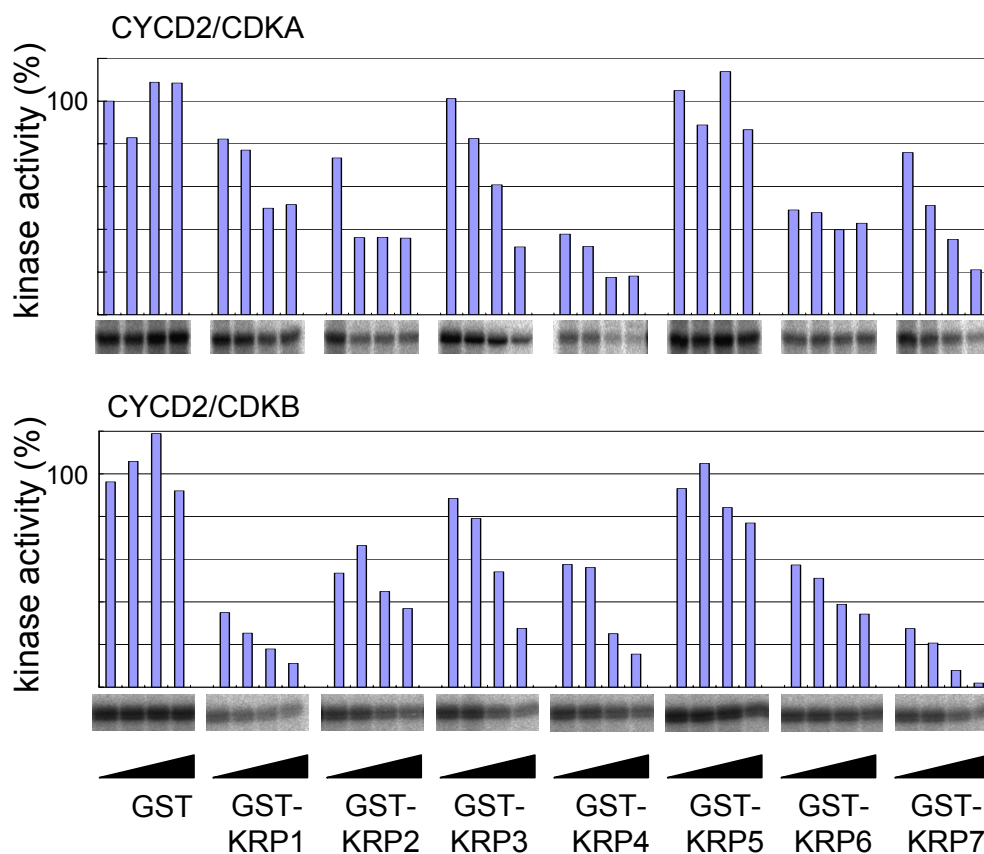


Fig. 9 KRPによるCYCD2/CDKAおよびCYCD2/CDKBの阻害
 GSTおよびGST-KRPの各タンパク質を1,2,5,10pmolリン酸化反応系に加えた。リン酸化されたヒストンH1のシグナルをBAS analyzerにより定量し、グラフ化して示した。

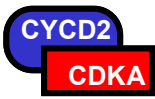
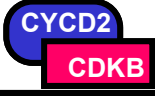
1-4 考察

7種の KRP の CKI としてのタンパク質の性質をサイクリン/CDK との相互作用に焦点を当てて解析した。昆虫細胞内で発現した活性型および不活性型の CYCD2、CDKA、CDKB 組み換えタンパク質を対象とすることで、特定のサイクリン/CDK に対する KRP タンパク質の作用を知ることができるのみならず、KRP1-KRP7 タンパク質を並列的に解析することで7種のタンパク質の性質を同一条件下で比較できると考えた。

全ての KRP は単量体の CYCD2、CDKA、CDKB と結合せず、活性型の CYCD2/CDKA および CYCD2/CDKB 複合体とのみ結合が認められた(Fig. 7)。これまでの研究においては、KRP と単量体の CDKB1;1 は結合しないという結果が示されるにとどまっており、他の CDKB やサイクリン/CDKB 複合体との結合解析は報告されていない。本研究の実験条件では、CDKB はもとより CYCD2 や CDKA に関しても単量体との結合は検出されなかったが、新たに CDKB 複合体に KRP タンパク質が結合する性質を持つことを示す結果となった。これまで KRP のサイクリンや CDK に対する結合解析は主に酵母 two-hybrid 法を用いて行われ、7種の KRP は D-type サイクリンと結合するが、CDKB とは結合せず、KRP1-4 は CDKA と結合する結果が得られている(Wang et al., 1998, De Veylder et al., 2001)。しかし、この方法では酵母由来の内因子に目的タンパク質の挙動が影響される可能性が考えられる。実際シロイヌナズナの CDKA は酵母の *cdc2/cdc28* 温度感受性変異株を相補できることから(Ferreira et al., 1991, Hirayama et al., 1991)、酵母内で CDKA と酵母由来のサイクリンが活性を示す複合体を形成すると考えられる。一方、CDKB は *cdc2/cdc28* 変異株を相補できないことより(Imajuku et al., 1992)、たとえ CDKB が酵母サイクリンと複合体を形成しても不活性であることが示唆される。したがって、活性型の CDKA と酵母サイクリンの複合体に KRP が結合し、不活性型の CDKB との複合体に KRP が結合しない、従来の酵母 two-hybrid 法を用いた解析と本研究の解析結果は一致すると考えられる。

最近 KRP2 の CDKA;1 と CDKB1;1 に対する結合と阻害について解析され、*in vivo* と *in vitro* において KRP2 は CDKA;1 に優先的に作用し、CDKB1;1 には作用しないことが報告された(Verkest et al., 2005)。またシロイヌナズナの CYCD4;1 は CDKB2;1 を bait とした酵母 two-hybrid 法により単離され、昆虫細胞内で共発現したタンパク質はヒストン H1 に対して活性型の複合体を形成することが示された(Kono et al., 2003)。これに対して、イネでは CDKB(CDKB2;1)が B-type のサイクリン(CYCB2;1, CYCB2;2)に特異的に結合して活性を持つことが示され(Lee et al., 2003)、シロイヌナズナにおいても *in vivo* では D-type とは別のサイクリンをパートナーとしている可能

性が高い。したがって、少なくとも昆虫細胞発現系により調製した CDKB は D-type サイクリンと活性型の複合体を形成するが、*in vivo* では B-type のサイクリンなどと活性型の複合体を形成するため、*in vivo* から調製したサイクリン/CDKB 複合体に対して KRP が阻害活性を示さない可能性が示唆される。本研究では、昆虫細胞発現系によりシロイヌナズナの CDKB と CYCB(CYCB1;1, CYCB2;1)の調製を行ったが、活性を示さなかったため、KRP が CYCB/CDKB 複合体に結合して阻害するかは解析できなかった。いずれにしても、CYCD2+CDKA や CYCD2+CDKB の混合サンプルに対しては結合が示されず、活性型の CYCD2/CDKA や CYCD2/CDKB の複合体に結合したことから、KRP タンパク質はターゲットとなるサイクリン/CDK がリン酸化活性を有する場合により強く結合する性質を持つことが示唆された。

binding	KRP1	KRP2	KRP3	KRP4	KRP5	KRP6	KRP7
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

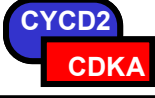
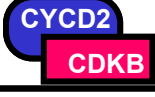
inhibition	KRP1	KRP2	KRP3	KRP4	KRP5	KRP6	KRP7
	+++	+++	+++	++++	+	+++	+++
	+++	+++	+++	++++	+	+++	++++

Fig. 10 CYCD2/CDKA および CYCD2/CDKB に対する KRP の結合と阻害
上段に結合解析、下段に阻害解析の結果を示した。

酵母や動物の CDK の活性化機構に関する研究により、CDK は N 末端葉と C 末端葉の 2 つの葉構造からなり、キナーゼ活性中心(ATP 結合触媒部位)は N 末端葉と C 末端葉の狭窄部にあることが明らかになった。CDK の活性中心は T-ループと呼ばれる保存スレオニン(T160)を含むモチーフ(CDK の 150~170 番目付近のアミノ酸配列)で覆われていて、CDK 単独では活性化が起こらない。サイクリンが CDK と複合体を形成すると、T-ループ内の T160 が露出し、CDK 活性化キナーゼ(CAK)が T160 をリン酸化する。T160 のリン酸化により T ループが折れ曲がって ATP 結合部位の覆いが取れ、ATP を基質に転移できる構造に変わり CDK が活性化する(Jeffrey et al., 1995)。シロイヌナズナの CDKA は *in vitro* および *in vivo* において D-type サイクリンと結合し、CAK による T ループのリン酸化などの適切な修飾を受けることで活性を示すようになる。植物の CDK の結晶構造解析は報告されていないが、酵母や動

物の CDK と同様な構造を取っているとすると、KRP は活性型のサイクリン/CDK に強く結合することから(Fig. 7)、T-ループ内の T160 のリン酸化による構造変化が KRP の結合に大きく影響していると考えられる。

KRP1-KRP7 は C 末端側に保存領域が存在するが、それ以外の領域は類似性が低い。本研究では、7 種のタンパク質の性質を同一条件下で比較し、活性型の CYCD2/CDKA および CYCD2/CDKB 複合体とのみ同程度の結合が認められた(Fig. 7)。一方、KRP1~KRP7 の阻害活性には差があり、KRP5 は阻害活性が低く、KRP1 と KRP7 は CYCD2/CDKB 複合体に対してより強い阻害活性を示す結果が得られた(Fig. 9)。各 KRP と CYCD2/CDKA および CYCD2/CDKB 複合体との結合と阻害活性に相関性が見られる場合もあるが、必ずしも相関性があるわけではない。したがって、各 KRP と CYCD2/CDKA および CYCD2/CDKB 複合体との結合の安定性のみが阻害に寄与するわけではなく、KRP の結合により CDK の ATP 結合触媒部位周辺に与える立体構造の変化が CDK 活性の阻害に関与することが示唆される。また、KRP は量依存的にサイクリン/CDK 活性を阻害するが、CYCD2/CDKB 複合体に対する KRP1 と KRP7 の場合を除いて、KRP の量を増やしても最大でも 20%程度の活性を保持することが分かった(Fig. 9)。KRP を最大量加えると、サイクリン/CDK 複合体に対して過剰量の KRP が存在することから、各サイクリン/CDK 複合体に KRP が 1 分子結合してもある程度の残存活性を示すことが示唆される(第三章考察)。

本研究の実験結果から、KRP タンパク質は CYCD2/CDKA に加えて CYCD2/CDKB を阻害することが明らかになったが、KRP が *in vivo* の B-type の CDK に生理的な作用を及ぼすかは議論の余地が残る。しかし、異なる特定のサイクリン/CDK キナーゼに対する KRP タンパク質の特徴づけと、構造的に限られた領域のみを共通とする KRP ファミリーがそれぞれに特有のサイクリン/CDK 複合体を標的としている可能性を示唆した意義は大きいと考えられる(Fig. 10)。

第二章 生細胞由来サイクリン/CDK 複合体に対する KRP の阻害

2-1 序論

細胞周期の制御因子群には、転写や翻訳の機構に制御される発現量の調節以外に、他の因子との結合やタンパク質の局在・修飾・分解といった多様な活性調節を受けるものが多く見られる。酵母および動物において各種のサイクリン/CDK 複合体はリン酸化・脱リン酸化により様々なタンパク質レベルでの活性調節を受けることが知られている。ヒトの cyclin D1 では 156 番目と 286 番目のスレオニン残基がリン酸化修飾による活性調節のターゲットであり、活性化、細胞内局在、タンパク質分解に関与することが知られている。156 番目のスレオニン残基は CDK4 と複合体を形成すると自己リン酸化され、その後 CAK により CDK4 の 172 番目のスレオニン残基がリン酸化されて活性型 cyclin D1/CDK4 複合体となる。286 番目のスレオニン残基のリン酸化はユビキチン標識のシグナルとなり、プロテアソーム系によってタンパク質分解を受けることとなる。KRP は大腸菌発現系からの組み換えタンパク質が阻害活性を示すことから、タンパク質自身に阻害能を保持しており、CDK の阻害に特別な修飾を必要としないと考えられる。一方で、阻害の標的となるサイクリン/CDK 複合体は多種の異なるタイプが存在する上に活性調節を受けることにより細胞内では多様な存在状態が考えられる。第一章の結果より KRP タンパク質はサイクリン/CDK の活性型と非活性型とで異なった結合特性を示しており、KRP の働きを知る上で、標的となるサイクリン/CDK の存在量や細胞内局在および修飾状態を知ることは重要だと思われる。これまでの知見では KRP による CDK 活性の阻害の強さは存在量に比例すると考えられており、本研究における *in vitro* の阻害実験でも濃度依存的に阻害することが示された。細胞内において KRP の濃度が変化すると、CDK の活性強度を柔軟かつ可逆的に変え、細胞周期および細胞の運命決定に重大な影響を与えると思われる。

多細胞生物の細胞は、発達段階によって細胞周期のパターンが異なる。基本的には、分裂組織細胞に代表されるような未分化で若い細胞では典型的な G1-S-G2-M と進む細胞周期が進行し、M 期での有糸分裂によって細胞数を増やす。細胞が成長して分裂活性が衰えてくると、細胞周期の完全な停止を待たず並行して分化が始まり、多くの植物細胞では細胞周期のパターンが有糸分裂型から核内倍化型へと移行する。核内倍化は M 期での細胞分裂を伴わずに細胞周期の S 期(および G1 期、G2 期)が進行して染色体の複製が起こる現象で、その結果ひとつの細胞内で染色体が 2 倍になり、核内倍化(endoreplication)が繰り返し起こればさらに倍化することとなる。成長が進んで完全に分化を終えた細胞の細胞周期は G0 期に入って、細胞周期は停止状

態に入ると考えられる。有糸分裂型から核内倍化型への移行もしくは核内倍化型の細胞周期の停止には、当然、細胞周期調節因子の働きが密接に関与しており、基本的にはサイクリン/CDK の活性調節が大きな意味を持つと考えられが、CKI によるサイクリン/CDK 活性の抑制効果が CKI の濃度依存的であり、細胞の分裂活性が段階的に減少することから、細胞が分裂から分化へと向かう過程で CKI の担う役割は重要であると考えられる。事実、KRP も発見当初から核内倍化現象に関与することが報告されており、植物細胞の発達における KRP の発現量が、細胞の大きさや数に加えて細胞の倍数性に影響することが明らかになった。最初に、KRP を過剰発現したシロイヌナズナ植物体では、核内倍化の周期進行が抑制されて、野生型よりも倍数性の低い細胞が多くなることが報告され(De Veylder et al., 2001 ; Zhou et al., 2002)、タバコの KRP ホモログである *NtKIS1* の過剰発現体でも同様の現象が観察された(Jasinski et al., 2002)。しかし、その後 KRP2 を強制発現したシロイヌナズナ植物体でも、発現レベルが低く弱い表現型を示すものは倍数性の高い細胞が多くなるという、逆の現象が起こることが報告された(Verkest et al., 2005)。他の生物種でも、核内倍化の過程に CKI がポジティブな役割を持つ例が示されている。ヒトの UT-7 巨核球細胞では核の倍数体化の直前に p21 が活性化されることが示され(Kikuchi et al., 1997)、ヒトの Rb 欠損細胞で p21 や p27 を過剰発現した場合も核内倍化を促すという現象が報告された(Bates et al., 1998 ; Niculescu et al., 1998 ; Chang et al., 2000)。また、p27 の分解因子を不活性化したマウスの肝細胞は DNA の倍数体化が起こるという報告がある(Nakayama et al., 2000)。最近、トウモロコシの KRP ホモログ(*Zeama;KRPI,2*) が単離され、これらの組み換えタンパク質が CYCA1;3 と CYCD5;1 抗体で免疫沈降したもののキナーゼ活性を阻害するが、CYCB1;3 抗体によるものは阻害しないことや、*Zeama;KRPI* を過剰発現したトウモロコシのカルスでは核内倍化が促進されると報告された(Coelho et al., 2005)。細胞周期のひとつの様式である核内倍化現象において、CKI が特定のサイクリン/CDK を標的として阻害することや、また自身の濃度によって CDK 活性の微妙な調節を行うことで、細胞の運命決定に寄与しているのではないかと思われる。

7 種の KRP は発現様式がそれぞれに特有で、植物体の器官によって発現量が異なり、また植物体の発達段階によっても変化する(De veylder et al., 2001 ; Lui et al., 2000)。シロイヌナズナの茎頂における KRP の発現を *in situ hybridization* 法を用いて解析した例では、KRP の発現は 3 種類の様式があるとしており、*KRPI,2* と *KRP4,5* および *KRP3,6,7* が、それぞれ別のグループに分けられている(Ormenese et al., 2004)。また細胞周期を通じた発現解析が同調化したシロイヌナズナ培養細胞を用いて行われ、KRP による発現様式の違いが報告されており、*KRPI* と *KRP2* が G0 期もしくは G1 期に高発現するという結果が示されている(Menges et al., 2002,2005)。いずれの場

合からも、*KRP* の発現はそれぞれに特有であることが認められ、生体内において少なくともある程度は異なる働きを担っていると予想されるが、これらは mRNA レベルでの発現解析にとどまっており、生体内での内在性の *KRP* タンパク質の量的な解析は現在のところ行われていない。

しかし、*KRP* は翻訳後のタンパク質が機能を発揮し、その存在量と効果が関係することから、本来の *KRP* の働きを理解するにはタンパク質レベルでの細胞内の挙動を追うことが必要である。第二章では、より生体内に近い環境で *KRP* の性質を調べるために、シロイヌナズナの培養細胞からサイクリン/*CDK* 複合体を調製して *KRP* による阻害実験を行った。また、細胞周期のタイムスケールで *KRP* タンパク質の挙動を調べることにより、単純に *KRP* が働く期間を知るだけでなく、標的となる *CDK* 複合体の種類や、その活性制御における役割に関して知見が得られるものと考えられる。そこで、培養細胞の同調化を行って *KRP* タンパク質の変動を解析すると共に、細胞周期の特定の時期の細胞から調製された *CDK* 複合体に対して各 *KRP* の阻害作用を調べることにした。

2-2 実験材料および方法

2-2-1 シロイヌナズナ培養細胞 MM2d の培養

300 ml のマイヤーフラスコに改変 LS 培地(第一章 1-2-2-3)を 95 ml 入れ、25-27°C、攪拌速度 130 rpm、暗所下で培養を行った。そして、7 日毎に定常期に達した細胞を駒込めピペットで 3 ml 新しい培地に植え継いだ。

2-2-2 シロイヌナズナ MM2d 細胞の粗抽出液の調製

2-2-2-1 細胞の破碎

植え継ぎ後、培養 3 日目の MM2d 細胞約 3ml を 15ml チューブに回収し、6ml の IP Buffer を加え、氷上で超音波破碎(10 秒×18 回、10 秒間隔、出力 3、ASTRASON MODEL XL2020、和研薬株式会社)し、遠心操作(15000rpm、30 分、4°C)により上清を回収し、粗抽出液として-80°Cで凍結保存した。

IP Buffer

Tris-HCl	25mM
NaCl	75mM
MgCl ₂	15mM
EGTA	15mM
NP-40	0.1%
Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)	1mM
Leupeptin	10mg/ml
N-Tosyl-L-PhenylalanineChloromethyl Ketone (TPCK)	50mg/ml
Pepstatin A	5mg/ml
Aprotinin	10mg/ml
Antipain	5mg/ml
Soybean Trypsin Inhibitor	10mg/ml
Benzamidine	0.1mM
NaF	10mM
β -Glycerophosphate	25mM
Sodium Orthovanadate	2mM

2-2-2-2 粗抽出液のタンパク質濃度の定量

Bradford の方法に従った。1/10 倍希釈した粗酵素液 50 μ l とタンパク質定量試薬 2ml をキュベットに入れてよく混合し、5分以上経ってから Abs 595nm を測定した。Bovine Serum Albumin(BSA)を用いて検量線を作成し、これよりサンプルのタンパク質濃度を求めた。

タンパク質定量試薬: Coomassie Brilliant Blue 50 mg, 95% Ethanol 25 ml,
85% (w/v) Phosphoric acid 50 ml
滅菌蒸留水で 500 ml にメスアップし、濾紙(Toyo No.2)で 2 回濾過した。

さらに使用直前に必要量のみ再度濾紙で 2 回濾過して使用した。

2-2-3 免疫沈降サンプルの調製とキナーゼ活性の解析

2-2-3-1 CDKA、CYCD2、CYCD3 抗体の作製

CDKA、CYCD2、CYCD3 について、それぞれ以下に示した 2 種類の抗原ペプチドを用いてウサギポリクローナル抗体を作製した。2 種類の抗原ペプチドを NHS-activated Sepharose (Amersham Biosciences) にカップリングさせ、アフィニティカラムを作製した。抗血清をまず Protein A Sepharose beads で IgG 精製した後、アフィニティカラムにより精製して各精製抗体を得た。抗体濃度を吸光度(O.D.280)の測定により確認し、分注して-80°Cで保存した。

CDKA

CKHMDSTPDFSKDLH (89-102 a.a.)

EHDTSRILEAC (283-293 a.a.)

CYCD2

CLSEDRIKEMLVREI (62-75 a.a.)

EKTMRENKRVIHC (359-371 a.a.)

CYCD3

CSSKKRKSHDS (295-304 a.a.)

CRGAEENEKKKPIH (354-367 a.a.)

2-2-3-2 粗抽出液からの免疫沈降(IP)

300 μ l の粗抽出液に 4 μ l の一次抗体を加え、氷上で 2 時間インキュベートした。そこに 20 μ l の(50% IP buffer)の Protein A Sepharose 4FF beads を加え、氷上で 1 時間放置した。200 μ l の IP Buffer で 3 回、200 μ l の Kinase Buffer で 3 回洗浄した。IP 産物を確認する場合は、ビーズを等量(10 μ l)の 4 \times Sample Buffer で処理し、適当な抗体を用いて Western 解析を行った。IP 産物をキナーゼ活性試験に用いる場合はビーズに 1/2 量(10 μ l)の Kinase Buffer を加え、4°Cで保存した。

Kinase Buffer: 50mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM EGTA

2-2-3-2 IP 試料を用いたキナーゼ活性の解析

IP 試料にそれ以外の反応液を添加して反応を開始させ、30°Cで30分間放置した。4×Sample Bufferを加えて反応を停止させ95°Cで2分間熱変性させた。15%ゲルでSDS-PAGEを行い、リン酸化された基質をオートラジオグラフィーで検出した。反応液の組成は以下に示す。

IP 試料(Beads : 50% kinase Buffer)	15 μ l
ヒストン H1(10mg/ml)	0.25 μ l
[γ - ³² P] ATP (4,500 Ci/mmole, ICN)	0.25 μ l
Kinase Buffer	4.5 μ l
計	20 μ l

2-2-3-3 キナーゼ活性の検出

イメージングプレートを用いて感光し、バイオイメージングアナライザーBAS2000(富士フィルム)により画像を読み込んだ。

2-2-4 CYCD2-,CYCD3-,CDKA-,CDKB-associated kinase の調製

昆虫細胞発現系により調製した His-CYCD2、His-CYCD3、His-CDKA、His-CDKB (各プラスミドの構築は 1-2-9-2 を参照)をそれぞれ His-bind-buffer で平衡化した His-bind-resin に加え、4°Cで1時間インキュベートした後、培養3日目のMM2d細胞抽出液(2mg)を加え、さらに4°Cで2時間穏やかに振とうした。His-bind-bufferで1度、TBS bufferで3度洗浄し、分注してサンプルとし、4°CでTBS buffer中に保存した。

His-bind-buffer	20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 1mM imidazole, pH7.9
TBS buffer:	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 1 mM EGTA, pH7.5

2-2-5 p13^{Suc1}-associated kinase の調製

当研修室の原島により作製された GST 融合 p13^{Suc1} タンパク質を固定した Glutathion-Sepharose 4B beads に培養3日目もしくは4日目のMM2d細胞抽出液(2mg)を加え、4°Cで2時間穏やかに振とうした。PBS bufferで1度、TBS bufferで3度洗浄し、分注してサンプルとし、4°CでTBS buffer中に保存した。

2-2-6 MM2d 培養細胞の同調化

2-2-6-1 re-entry 法を用いた同調化(Menges and Murray, 2002)

培養 7 日目の定常期に達した MM2d 細胞 10ml を 90ml の新しい改変 LS 培地に植え継ぎ、この時点をも 0 時間として通常の培養条件で re-entry を開始した。

2-2-6-2 Aphidicolin を用いた同調化

Menges と Murray の方法(Menges and Murray, 2002)を改良した。培養 7 日目の MM2d 細胞懸濁液 15ml を 95ml の新しい改変 LS 培地に植え継ぎ、Aphidicolin を終濃度 5mg/l となるように加えて、通常の培養条件で 24 時間振とう培養した。細胞懸濁液を吸引ろ過器へ移し、洗浄用の改変 LS 培地(2l)で細胞を懸濁してから吸引ろ過で培地を捨てることを繰り返して、Aphidicolin を取り除いた。洗浄後の細胞を新たに 95ml の改変 LS 培地へと移し、この時点をも 0 時間として通常の培養条件で同調化を開始した。

Aphidicolin stock 10mg/ml DMSO 和光純薬

2-2-7 Laser Scanning Cytometer による DNA ヒストグラムの解析

氷冷エタノール 700 μ l の入った 1.5ml チューブに MM2d 細胞懸濁液を 300 μ l 加えて攪拌し、-20 $^{\circ}$ C で 2 時間以上放置した。PBS で 3 回洗浄後、Pectolyase Y-23 (近畿ヤクルト; 終濃度 0.5%)を加え 30 $^{\circ}$ C で 30 分間処理し、PBS で洗浄後 RNase(終濃度 0.2mg/ml)および PI(終濃度 50 μ g/ml)を加えてさらに 30 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートした。その後 PBS で 3 回洗浄した後、細胞をスライドガラス上に乗せ、カバーガラスをかけた。余分な水分を除いた後、マニキュアで封印した。DNA 含有量は Laser Scanning Cytometer (オリンパス、LSC101)を用いて 10,000 個以上の細胞から測定した。

PBS: Na₂PO₄ 7.4mM, NaH₂PO₄ 1.4mM, NaCl 150mM

PI (Propidium Iodide) 5mg/ml PBS sol., 遮光冷凍保存

2-2-8 KRP 抗体の作製

以下に示した KRP1~KRP7 の抗原ペプチドを用いてウサギポリクローナル抗体を作製した。抗原ペプチドを NHS-activated Sepharose (Amersham Biosciences)にカップリングさせ、アフィニティカラムを作製した。抗血清をまず Protein A Sepharose beads で IgG 精製した後、アフィニティカラムにより精製して各精製抗体を得た。抗体濃度を吸光度(O.D.280)の測定により確認し、分注して-80 $^{\circ}$ C で保存した。

KRP1 MVRKYRKAKGIVEAC (1-14 a.a.)

KRP2 MAAVRRRERDVVEEC (1-14 a.a.)

KRP3	MEVSKATAPSPGVRC (17-30 a.a.)
KRP4	GESSIALMDVVSPS (27-40 a.a.)
KRP5	KDKSHPPALGFRTR (17-30 a.a.)
KRP6	MSERKRELAEESS (1-14 a.a.)
KRP7	MSETKPKRDSEYEG (1-14 a.a.)

2-2-9 KRP2 強制発現 MM2d 細胞の作製

2-2-9-1 GFP 融合 KRP2 発現用バイナリープラスミド

CaMV35S::GFP-KRP2 は、バイナリーベクター pGREEN0029(Hellens et al., 2000)の *CaMV35S* プロモーター下流に GFP を挿入した後に、*CaMV35S* プロモーターと GFP の間に KRP2 全長を挿入して作製した。GFP の N 末端側にはリンカーとしてグリシン残基を 3 個並べた配列を付加し、これを pGREEN0029 の *XbaI-NotI* 部位に挿入するため、PCR 法を用いて GFP の 5'末端側に *XbaI* 認識配列およびグリシン残基 3 個の配列を、3'末端側に *NotI* 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、pGREEN0029 に *XbaI-NotI* 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

GFP; *XbaI-NotI*

5'-TCTAGAGGCGGCGGCATGGTGAGCAAGGGC-3'
5'-GCGGCCGCTTTACTTGTACAGCTCGTCC-3'

次に KRP2 を *XhoI-SpeI* 部位に挿入するため、PCR 法を用いて KRP2 の 5'末端側に *XhoI* 認識配列を、3'末端側に *SpeI* 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、GFP の配列を先に挿入しておいた pGREEN0029 に *XhoI-SpeI* 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP2; *XhoI-SpeI*

5'-CTCGAGATGGCGGCGGTTAGGAGAAG-3'
5'-ACTAGTGCATGGATTCAATTAACCC-3'

2-2-9-2 アグロバクテリウムへのバイナリープラスミドの導入

-80°Cで保存しておいた *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株(Hood et al., 1993)のコンピテントセル(40μl)を氷上で解凍後、上記のバイナリープラスミドを 1μl 加え、エレクトロポレーション法(25μFD,1.8kV,200Ω :1mm キュベット)を用いて導入した。速やかに 1ml の SOC 培地を加え、30°Cで 1 時間振とう培養した。100μl および残り

の菌体を固定選択培地(Kanamycin : 100 μ g/ml)にまき、30 $^{\circ}$ Cで2日間培養した。

2-2-9-3 シロイヌナズナ培養細胞の形質転換

Menges と Murray の方法(Menges and Murray, 2004)を改良した。上記のプレートよりコロニーを単離して 10ml の液体培地に植菌し、28 $^{\circ}$ Cで2日間振とう培養した。100~200 μ l の培養液と 10ml の培養3日目の MM2d 細胞の懸濁液をシャーレ(100mm ϕ)に加え、暗所にて 25 $^{\circ}$ Cで2日間ゆっくり振とうしながら共存培養した。MM2d 細胞を約 30ml の改変 LS 培地で5回洗浄してアグロバクテリウムを除き、低速遠心(700rpm)で MM2d 細胞のみを沈殿させ、上清を捨てた。沈殿した細胞を 30ml の改変 LS 培地に懸濁し、さらに2日間振とう培養した。2日後同様に MM2d 細胞を10倍量の滅菌水で5回洗浄してアグロバクテリウムを除き、低速遠心(700rpm)で MM2d 細胞のみを沈殿させ、上清を捨てた。次に固定選択培地(Kanamycin : 100 μ g/ml、Carbenisillin :250 μ g/ml)に細胞をまいた。3~4週間して形成されたカルスを新鮮な固定選択培地(Kanamycin : 100 μ g/ml、Carbenisillin :250 μ g/ml)に移し、増殖するカルスを選択した。形質転換体の GFP 融合タンパク質の発現を蛍光顕微鏡観察により確認し、蛍光の確認できたものを液体培養に移した。

2-2-9-4 GFP 蛍光観察

MM2d 細胞懸濁液約 20 μ l をスライドガラス上にスポットし、カバーガラスを被せてマニキュアで固定した後、蛍光顕微鏡で観察した。

2-3 結果

2-3-1 培養細胞からのサイクリン/CDK サンプルの調製

生体内に近い状態のサイクリン/CDK 複合体を調製するために、シロイヌナズナ培養細胞 MM2d の細胞抽出液から抗体を用いた方法を試みた。初めに、シロイヌナズナの CDKA(CDKA;1),CYCD2(CYCD2;1),CYCD3(CYCD3;1)のペプチド抗体を作製し、各抗体の検討を行った。昆虫細胞より調製した His-CYCD2 と His-CYCD3/His-CDKA および培養 3 日目と 7 日目の MM2d 細胞抽出液に対して western blotting を行ったところ、昆虫細胞からの組み換えタンパク質に対しては各抗体のシグナルが認められたが、MM2d の細胞抽出液に対しては、CDKA 抗体と CYCD2 抗体のみで有意なシグナルが認められ、CYCD3 抗体ではシグナルは認められなかった(Fig. 11)。次に各抗体を用いて免疫沈降法により MM2d 細胞抽出液からサイクリン/CDK サンプルを調製してリン酸化実験を行ったが、全ての場合に若干のキナーゼ活性しか示さなかった。また、リン酸化実験系に Roscovitine および GST-KRP を添加しても明確な阻害効果は認められず、今回作製した抗体の免疫沈降による各サンプルは阻害実験に十分なキナーゼ活性を有していないと判断した(data not shown)。

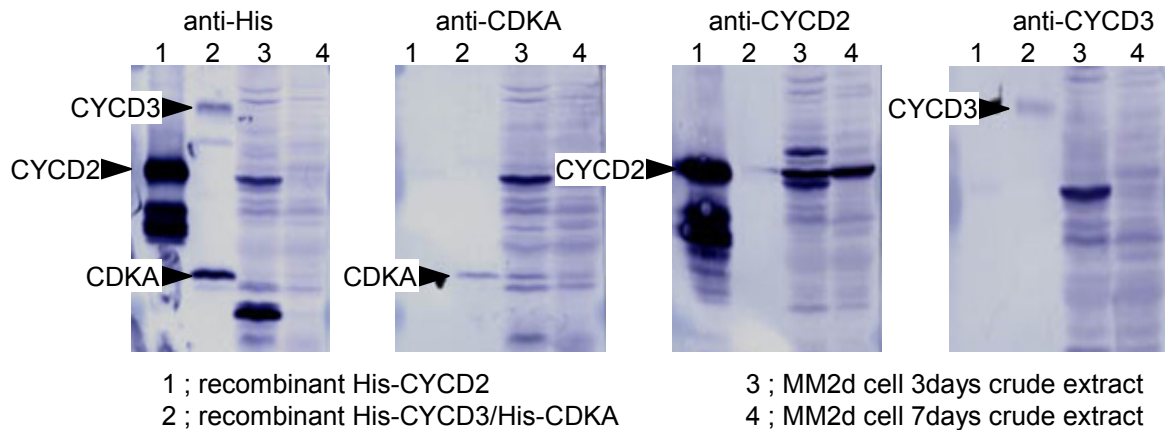


Fig. 11 抗 CDKA、抗 CYCD2、抗 CYCD3 抗体の検討

昆虫細胞発現系から調製した His-CYCD2 タンパク質(lane 1)、His-CYCD3/His-CDKA タンパク質(lane 2)、3 日目(lane 3)および 7 日目(lane 4)の MM2d 細胞抽出液を SDS-PAGE し、メンブレンへと転写して、同様のメンブレンを 4 枚作製した。抗 His 抗体により lane 1 と 2 の His タグを付加した CYCD2 と CYCD3 および CDKA を検出してポジティブコントロールとし、抗 CDKA 抗体、抗 CYCD2 抗体、抗 CYCD3 抗体で western blot を行った。各抗体のタンパク質のシグナルを矢印で示した。

次に、当研究室の河村により報告されている再構成系を用いて活性型のサイクリン/CDK 複合体の調製を行った(Kawamura et al., 2006, 河村, 博士論文 2004)。すなわち、昆虫細胞発現系により調製した His-CYCD2、His-CYCD3、His-CDKA、His-CDKB をそれぞれ His-bind-resin に吸着させた後、resin を培養 3 日目の MM2d 細胞抽出液

と混合することで、各タンパク質に結合する複合体を調製した。ヒストン H1 を基質としてリン酸化実験を行ったところ、His-CYCD3、His-CDKA、His-CDKB により回収したサンプルは活性が弱かったが、His-CYCD2 により回収したサンプルは特に強い活性を示したため(Fig. 12)、これを CYCD2-associated kinase として、以下の KRP による阻害実験に供した。

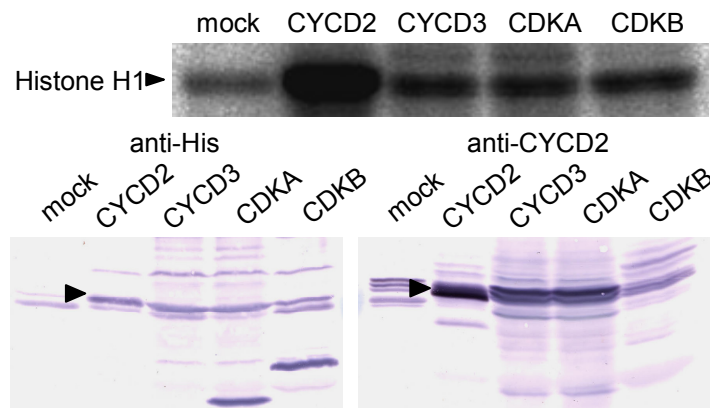


Fig. 12 His-CYCD2、His-CYCD3、His-CDKA、His-CDKB-associated kinase の調製
 上段に各サンプルのリン酸化シグナルを示す。mock は組み換えタンパク質を発現していない昆虫細胞の抽出液とプレインキュベートした His-bibd-resin に MM2d 細胞抽出液を混合したサンプルで、ネガティブコントロールとして用いた。下段では各サンプルを抗 His 抗体及び抗 CYCD2 抗体により検出した。矢印は CYCD2 のシグナルを示す。

また、酵母由来の $p13^{Suc1}$ タンパク質は、動物および植物のサイクリン/CDK 複合体とも結合することが知られており、生体内からのサイクリン/CDK 複合体の調製に広く用いられている。そこで GST タグを付加した $p13^{Suc1}$ タンパク質を用いて、MM2d 細胞からサイクリン/CDK サンプルの調製を行った。Glutathion-Sepharose 4B beads に GST- $p13^{Suc1}$ を固定し、培養 3 日目と 4 日目の MM2d 細胞抽出液を混合してサンプルを調製した。ヒストン H1 を基質としてリン酸化実験を行った結果、培養 3 日目の細胞抽出液を用いた場合の方がより強いキナーゼ活性を示したことから(Fig. 13)、これを $p13^{Suc1}$ -associated kinase として以下の KRP による阻害実験に供した。

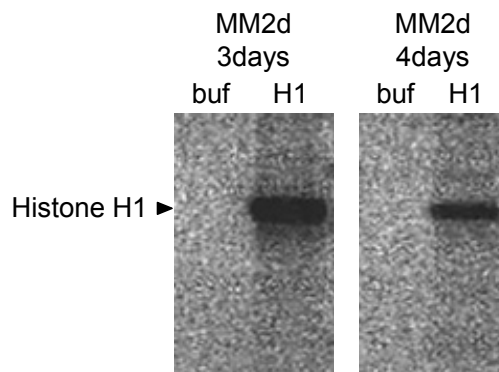


Fig. 13 p13^{Suc1}-associated kinase の調製

MM2d 細胞の培養 3 日目と 4 日目の細胞抽出液を p13^{Suc1} タンパク質と混合し各サンプルを調製した。buf は基質を加えずに行ったネガティブコントロールで、非特異な基質タンパク質がサンプルに含まれないことを確認した。H1 はヒストン H1 を基質として加えた。

2-3-2 培養細胞より調製したキナーゼ複合体の KRP による阻害

2-3-1 で調製した CYCD2-associated kinase と p13^{Suc1}-associated kinase に対して KRP による阻害実験を行った(Fig. 14)。CYCD2-associated kinase の場合、KRP の阻害効果は昆虫細胞から調製した CYCD2/CDKA または CYCD2/CDKB を用いたときと同様な傾向で、1-3-2 のデータを反映する結果が得られた。また、p13^{Suc1}-associated kinase に対して阻害作用を調べたところ、全ての KRP は阻害活性を示したが、CYCD2-associated kinase に対する場合と異なり、KRP1 から KRP7 の阻害の差が小さかった。培養細胞から調製した CYCD2 複合体に対する阻害活性が昆虫細胞系と同様な結果が得られ、CYCD2- と p13^{Suc1}-associated kinase に対する阻害活性が異なることから、それぞれの KRP は標的のサイクリン/CDK によって阻害活性が異なることが示唆された。

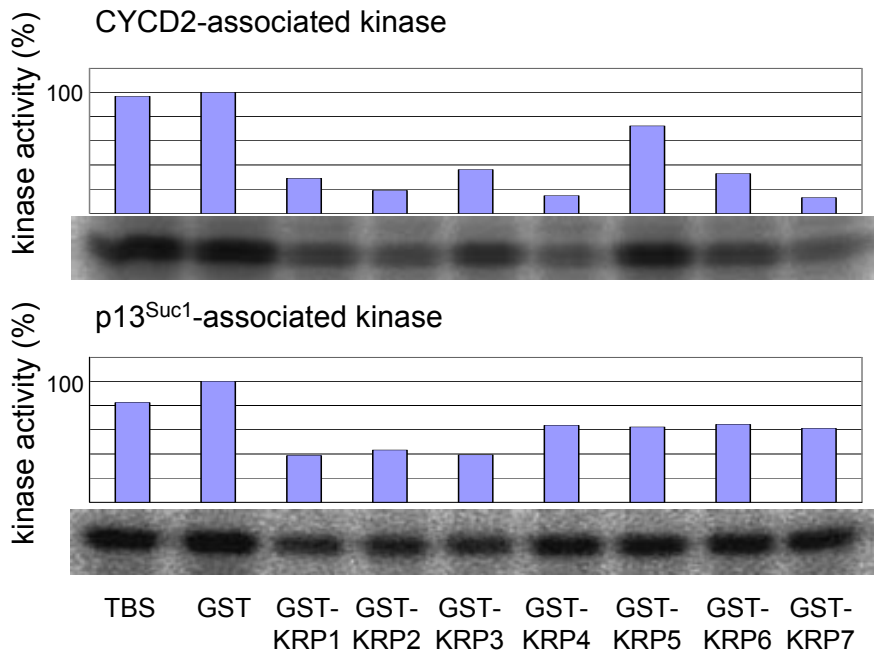


Fig. 14 CYCD2-associated kinase 及び p13^{Suc1}-associated kinase に対する KRP の阻害
各 associated kinase に同量(10pmol)の GST もしくは GST-KRP を加え、得られたリン酸化シグナルの強度をグラフ化して示した。

2-3-3 細胞周期に伴う KRP タンパク質の発現解析

細胞周期の進行に伴い、サイクリンを始めとした多くの細胞周期制御因子がタンパク質レベルでの発現制御を受ける。一方 KRP はタンパク質がサイクリン/CDK 複合体に結合して阻害作用を及ぼすと考えられているが、現在のところ RNA レベルでの発現解析が行われるにとどまっている。そこで、7種の KRP にそれぞれ特異的な領域のペプチドをエピトープとした抗 KRP 抗体を作製し、KRP タンパク質の細胞周期進行に伴う発現解析を行った。抗 KRP 抗体は、それぞれの組み換えタンパク質を用いた western blotting により、抗原タンパク質を認識すること、および cross reaction しないことを確認している(data not shown)。培養細胞の同調化は MM2d の re-entry の系を用いて行った(Riou-Khamlichi et al., 2000, Menges and Murray, 2002)。すなわち、培養7日目の MM2d 細胞を新たな培地に植え継ぎ、1時間ごとに細胞を回収してヒストグラムを解析すると、最初 G1 期の細胞集団の割合が減少し、12時間で G2/M 期の細胞量が最大になり、再び減少する細胞周期の変動が認められた(Fig. 15)。植え継ぎ後3時間毎に細胞抽出液を調製し、抗 PSTAIRE 抗体および抗 KRP 抗体を用いて western blotting を行った。その結果 KRP5 と KRP6 抗体では有意なシグナルを検出できなかったが、KRP3, KRP 4, KRP 7 タンパク質は S 期以降に少しずつ増加し、KRP1, KRP 2 タンパク質は周期を通じてほぼ一定の蓄積であることが分かった。なお、組み換えタンパク質を用いた western blotting の場合には各 KRP 抗体のシグナル強度はそれほど変わらなかったが、細胞抽出液の KRP2 のシグナルは他の

KRP と比べて明らかに強く、KRP2 タンパク質は他のものよりも安定で、細胞内の蓄積量が多い可能性が示唆された。

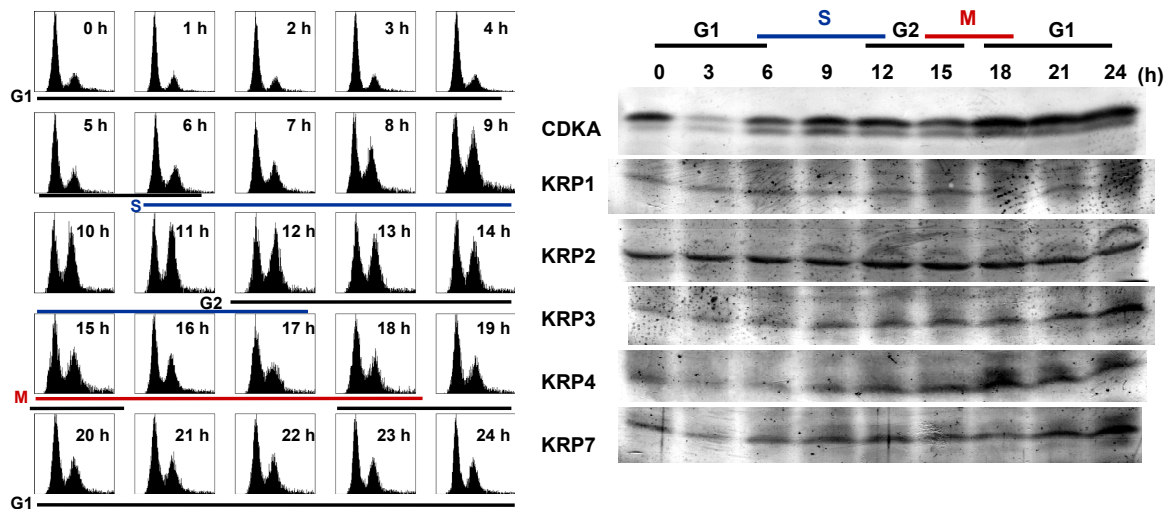


Fig. 15 re-start した MM2d 細胞における KRP タンパク質の発現解析
 植え継ぎ後 7 日目の MM2d 細胞を新たな培地に植え継いで 1 時間毎に細胞を回収した。
 ヒストグラムとおよその細胞周期を左側に示した。各 KRP 抗体を用いた western blot 解析
 の結果を右側に示した。KRP5 と KRP6 は検出されなかった。

2-3-4 p13^{Suc1}-associated kinase の細胞周期変動と KRP による阻害

まず報告されている MM2d の同調化の実験条件を検討して(Menges and Murray, 2002)、Aphidicolin を用いて安定した同調細胞が得られる実験系を確立した。同調後 1 時間毎の細胞を回収してヒストグラムを解析することで、同調化の確認を行ったところ re-entry の系に比べてより多くの細胞集団が同調して周期が進行することが示された(Fig. 16)。2 時間毎に p13^{Suc1}-associated kinase を調製し、各サンプルのヒストン H1 に対するキナーゼ活性を解析したところ、周期による活性の変動が認められた。

同調化したサンプルが得られたので、特定の時期のサイクリン/CDK 複合体に対する KRP の阻害活性を測定するために、0 時間(S 期)と 8 時間(G2/M 期)の細胞を回収して、各細胞から p13^{Suc1}-associated kinase を調製した。0 時間と 8 時間の p13^{Suc1}-associated kinase を用いてヒストン H1 を基質とするリン酸化実験系に供したところ、十分なリン酸化活性を検出することができたので、GST-KRP を添加して阻害活性を解析した。その結果、KRP1,2,3 は 0 時間と 8 時間の両方の p13^{Suc1}-associated kinase を阻害したが、KRP4, KRP 5, KRP 6 は阻害がほとんど認められず、KRP7 は 0 時間のものには影響しなかったが 8 時間のサンプルに対しては阻害作用を示し(Fig. 17)、KRP の阻害能が時期によって変動する可能性を示した。

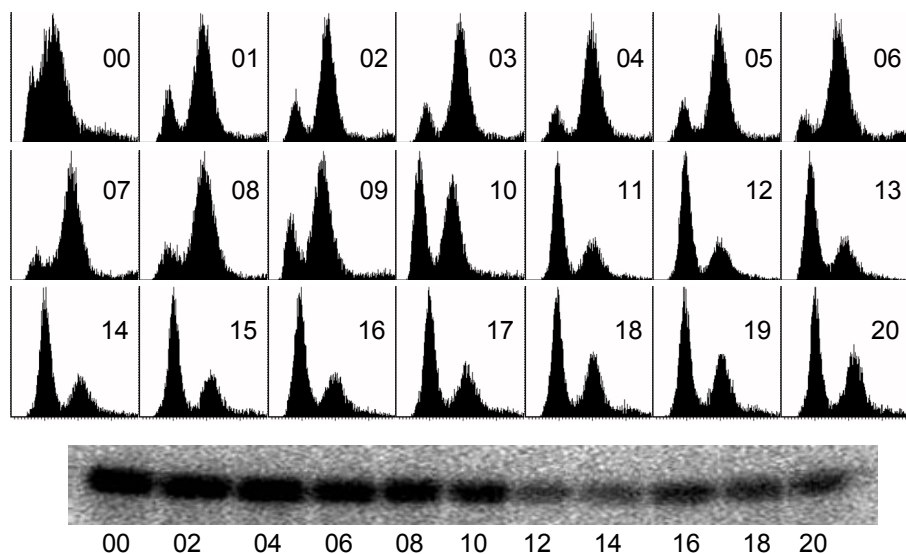


Fig. 16 MM2d 細胞の同調化と細胞周期の変動に伴う p13^{Suc1}-associated kinase の活性変化
 培養 5 日目の MM2d 細胞の培地中に Aphidicolin を加えて 24 時間培養し、細胞を G1 期で停止させた。Aphidicolin を洗浄後 0 時間から 20 時間まで(数字)の細胞を回収し、各細胞のヒストグラムにより細胞周期の同調化を確認した(上段)。各細胞抽出液から p13^{Suc1}-associated kinase を調製し、ヒストン H1 に対するリン酸化活性を検出した(下段)。

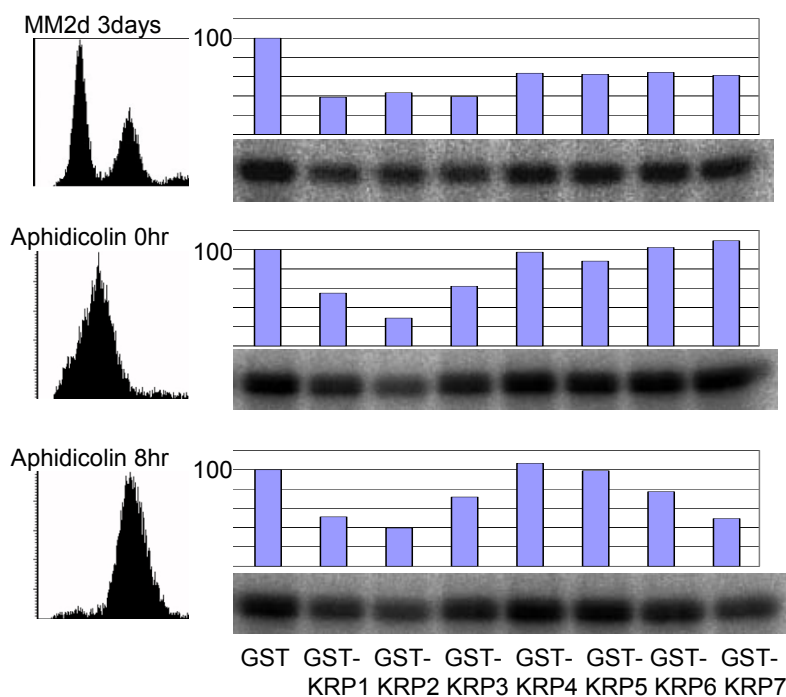


Fig. 17 同調化した MM2d 細胞から調製した p13^{Suc1}-associated kinase に対する KRP の阻害
 Aphidicolin による同調後 0 時間と 8 時間の細胞から p13^{Suc1}-associated kinase を調製し、リン酸化実験系に GST または GST-KRP を同量(10pmol)加えた。同調化していない MM2d 細胞から調製した p13^{Suc1}-associated kinase を用いたものをコントロールとして上段に示した。左に各細胞のヒストグラムを、右にリン酸化シグナルおよび定量化したグラフを示した。

2-3-5 KRP2 を強制発現した MM2d 細胞の解析

KRP を強制発現した植物体では、少なくとも特定の器官および発達段階において

細胞周期が野生型のものよりも遅れて進行し、矮化や形態形成の異常といった表現型を示す(Wang et al.,2000, De Veylder et al., 2001, Zhou et al., 2002)。培養細胞 MM2d では容易に成長速度や細胞周期が解析でき、細胞周期の同調化が行えるため、KRP の蓄積による細胞周期への影響がより直接的に解析できると考えた。そこで、GFP を付加した KRP2 を 35S プロモーターにより MM2d 細胞内で強制発現する形質転換体を作成した。薬剤耐性マーカーによる選抜に加え、GFP の蛍光を直接観察することで細胞株の選抜を行い、GFP-KRP2 を高発現していると思われるいくつかの細胞株を得た。GFP の蛍光シグナルが強い細胞株に関して、野生型 MM2d 細胞との細胞増殖速度の比較を行ったが、有意な差は認められなかった(data not shown)。培養 5 日目の細胞を回収してヒストグラムを比較した場合には、GFP-KRP2 を発現する細胞株は 4C の細胞数の割合が少しだけ多くなっていた(Fig. 18)。しかし、得られた形質転換細胞株では、KRP2 の発現量が細胞周期の顕著な遅延を伴うレベルには達せず、一部の細胞が核内倍化型の周期へと転換している可能性も考えられたが、細胞周期における KRP2 の働きを明確に示すには表現型が弱く、これ以上の解析は困難と判断した。

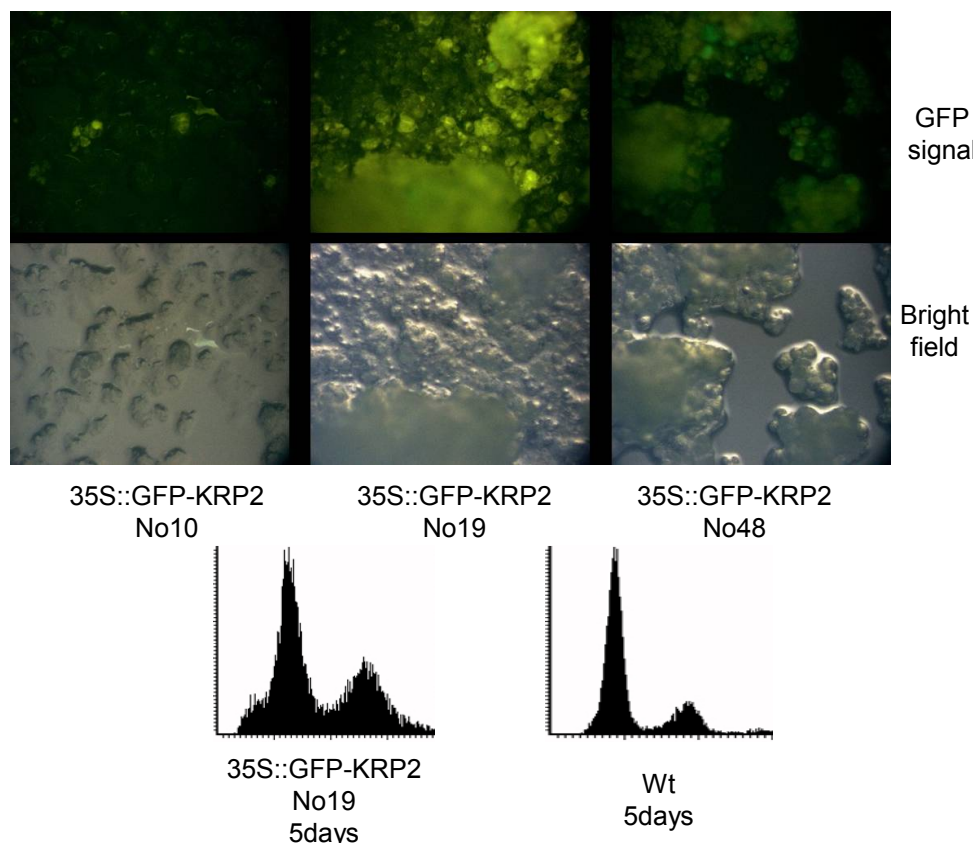



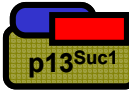
Fig. 18 GFP-KRP2 を強制発現した MM2d 細胞

MM2d 細胞で GFP-KRP2 を発現する数種の細胞株を作成した。GFP シグナルが確認できた MM2d 細胞株(No19)と野生型の MM2d 細胞(Wt)の植え継ぎ 5 日目の細胞のヒストグラムを下段に示した。

2-4 考察

KRP タンパク質の生体内での働きを知るために、シロイヌナズナ培養細胞を用いて実験を行った。最初にペプチド抗体を作製して免疫沈降法によるサイクリン/CDK 複合体の調製を試みたが、おそらく各ペプチド抗体の力価が弱く、十分量のサイクリン/CDK 複合体を回収できなかつたと判断した。そこで、次に再構成系によりサイクリン/CDK 複合体の調製を行った。再構成系では酵母 two-hybrid 系の bait と同様に結合するタンパク質を釣り上げるにより、活性状態の複合体を再構成することを意図した方法で、原因はよく分からないものの今回は CYCD2 のみが活性を示した。このように培養細胞から調製した CYCD2-associated kinase に対しても、昆虫細胞から調製した CYCD2/CDK を用いたときと同様に、KRP1-7 が細胞内の CYCD2/CDK 複合体を阻害し、その効果が各 KRP に特有であることが示唆された (Fig. 14)。一方、p13^{Suc1}-associated kinase に対する阻害作用は CYCD2-associated kinase に対する場合と異なっていた (Fig. 14)。p13^{Suc1} はこれまで様々な生物からのサイクリン/CDK 複合体の調製に用いられているが、もともと分裂酵母由来のタンパク質で、CDK subunit / suppressor of cdc2 (CKS/Suc) と呼ばれる細胞周期制御因子の遺伝子ファミリーに属する。CKS 遺伝子は真核生物に高度に保存されており、9~18kDa 程の小さなタンパク質をコードしている (Pines 1996)。CKS タンパク質自体は酵素としての活性を持たないが、CDK を初めとする様々な細胞周期制御因子に結合することから、構造安定化のためのアクセサリタンパク質もしくは足場としての役割を担うものとして考えられている。いずれにしても、細胞周期の進行には CKS も必要で、キナーゼ複合体調節因子の相互作用への関与、CDK 複合体と Cdc25 脱リン酸化酵素との相互修飾作用の促進、M 期進行時にサイクリンの分解を引き起こす anaphase-promoting complex (APC) への結合など、様々な側面から関連する現象の研究が進展し、CKS は細胞周期のイベントにおいて、また作用する因子においても、幅広い役割を担う細胞周期制御因子であると考えられる。シロイヌナズナにも 2 種の CKS ホモログ (CKS1,2) があり、CKS1 は CDKA および CDKB への結合が酵母 two-hybrid 法により検出されているが (Wang et al., 2002, De Veylder et al., 2001)、今回用いた分裂酵母由来の p13^{Suc1} がシロイヌナズナの CDK 群に対してどのような結合特異性を示すかは不明であり、植物独自の B-type の CDK に対する結合は定かではないが、基本的に A-type の CDK に結合するという特性はこれまでに動物や酵母を材料に多く報告されており、広く受け入れられている。このことから、細胞増殖期にある植物細胞から調製した p13^{Suc1}-associated kinase には、複数種のサイクリン/CDK 複合体が含まれていると考えられ、これに対する KRP の阻害効果が CYCD2 と複合体を形成する CDK とは明らかに違っていたことから (Fig. 14)、標的となるサ

イクリン/CDK の種類はそれぞれの KRP に特有であることが示唆された(Fig. 19)。また KRP5 は昆虫細胞発現系で調製した CYCD2/CDK 複合体をほとんど阻害しなかったが(第一章 Fig. 9)、p13^{Suc1}-associated kinase に対しては、KRP4,6,7 と同程度の阻害効果を示したことから(Fig. 14)、KRP5 が細胞内においては CYCD2/CDK 複合体以外のサイクリン/CDK を標的としている可能性が示唆された。さらに、KRP5 が阻害作用を示し、KRP の CDK 阻害活性には C 末端側の保存領域が必要であることから(第三章 Fig. 31)、本研究で作製した GST-KRP5 は C 末端側までの全長を保持するタンパク質である(第一章 Fig. 8)ことが支持された。

associated kinase	KRP1	KRP2	KRP3	KRP4	KRP5	KRP6	KRP7
	+++	++	++	+++	+	++	+++
	++	++	++	+	+	+	+

同調化	KRP1	KRP2	KRP3	KRP4	KRP5	KRP6	KRP7
0h	++	+++	++	-	-	-	-
8h	++	++	+	-	-	+	++

Fig. 19 培養細胞より調製したキナーゼに対する KRP の阻害
 上段に CYCD2-と p13^{SUC1}-associated kinase に対する阻害解析の結果を、下段に同調化 0 時間目と 8 時間目の細胞より調製した p13^{SUC1}-associated kinase に対する阻害解析の結果を示した。

動物の p27^{Kip1} は標的タンパク質によって異なった相互作用をすることが知られており、ミンクの肺細胞での誘導発現系を使った研究では、高発現された p27^{Kip1} が CDK2 をほぼ完全に阻害したのに対して、CDK4 や CDK6 とは結合しながらも、そのリン酸化活性は保持されていた(Blain et al., 1997)。In vitro の実験でも、p27^{Kip1}/cyclin A/CDK2 三量体はリン酸化活性を示さないが、p27^{Kip1}/cyclin D2/CDK4 は活性を持つことが確かめられ、p27^{Kip1} の阻害活性が相手によって異なることが示された。一方、同じ CIP/KIP ファミリーに属する p21^{Cip1} は、cyclin A/CDK2 と cyclin D2/CDK4 に対して同程度の阻害活性を示した(Blain et al., 1997)。また、CAK による CDK の活性化に対する CKI の影響が調べられ、p21^{Cip1}、p27^{Kip1}、p57^{Kip2} および INK4 ファミリーの p16^{INK4a} と p18^{INK4c} が、p40^{MO15} と呼ばれる CAK による CDK のリン酸化を抑制するが、Cak1p によるリン酸化には影響せず、かつ CKI は p40^{MO15} のリン酸化活性自体を抑制するものではないと報告されている(Kaldis et al., 1998)。これは

タンパク質の相互作用の強さが異なることが原因だと考えられ、CDK に対する CKI の親和性が p40^{MO15} の作用よりも強いが、Cak1p の作用を妨げるほどではないと考えられる。CKI のサイクリン/CDK に対する結合様式は 2 つのファミリーで異なり、CIP/KIP ファミリーはリン酸化される T-ループの構造に直接的に干渉すると考えられるが、INK4 ファミリーは T-ループから離れた部位に結合するので、間接的な構造変化によって p40^{MO15} の作用を防ぐことが考えられた。これらの CKI は活性化後の CDK 複合体の阻害に働くが、さらに早い段階では CAK による活性化以前のサイクリン/CDK にも結合し、標的 CDK のリン酸化修飾にも影響していると言える。本研究では、既に CAK などによる修飾を受けて活性化されたサイクリン/CDK 複合体に対して KRP を作用させているため、サイクリン/CDK 複合体の形成促進作用や CAK による CDK の活性化の阻害作用を KRP が併せ持つかは分からない。但し、第一章の結果より、KRP のサイクリンまたは CDK の単体への結合は活性型のサイクリン/CDKA 複合体に比べて明らかに弱いことから(第一章 Fig. 7)、KRP タンパク質自体にはサイクリン/CDK 複合体の形成促進作用は無いか非常に弱いことが示唆される。

細胞周期の進行に伴い、サイクリン/CDK の種類や量および活性レベルが変化するが、その中で KRP の働きを知るために、培養細胞の同調化を行って KRP タンパク質の挙動を調べた。KRP のペプチド抗体を用いたタンパク質蓄積量の経時変化の解析では、KRP3,4,7 タンパク質が S 期以降に少しずつ増加するのに対して、KRP1,2 タンパク質量は周期を通じて一定で、re-entry の同調法による解析では、KRP3,4,7 のタンパク質と mRNA の発現は同じようなパターンを示すのに対し、KRP1,2 は G0/G1 期に mRNA の発現ピークがみられてそれ以降は減少することから(Menges and Murray, 2002, Menges et al., 2005)、mRNA とタンパク質レベルは一致せず、タンパク質が一定のレベルを保つ機構の存在が考えられる。いずれにしても、re-entry による同調では、全ての時期に少なくとも KRP1,2,3,4,7 タンパク質が存在し、細胞周期の進行に伴って急激に減少することはない。一方、細胞周期の進行には特定のサイクリン/CDKA およびサイクリン/CDKB の活性が周期特異的に上昇する必要があり、KRP が常に存在してもそれらのサイクリン/CDK 活性が周期特異的に上昇するためには、次のようなシナリオが推定される。KRP1,2,3 は同調化後 0 時間と 8 時間の p13^{Suc1}-associated kinase に対して同程度に強い阻害活性を示すが、その他の KRP は 8 時間後の KRP7 を除き非常に弱い阻害活性しか示さない(Fig. 17)。したがって、サイクリン/CDK の活性化に伴い、阻害作用の弱い KRP と強い KRP が競合して結合することになり、阻害作用の弱い KRP が先にサイクリン/CDK 複合体に結合すると、阻害作用の強い KRP が結合できなくなると考えられる。また、植物細胞内ではサイクリン/CDK の活性化に伴って KRP がサイクリン/CDK 以外の細胞内因子とよ

り強く結合するようなことが起きれば、結果的にサイクリン/CDK の活性化を阻害しない可能性が考えられる。あるいは、KRP がサイクリン/CDK に結合してもその複合体はある程度活性を示し、KRP はサイクリン/CDK を部分的に抑制することに機能する可能性も考えられる。これらの可能性を検討するためには、植物細胞内における KRP の存在状態を解析し、どの程度の割合でサイクリン/CDK に結合し、それが周期によりどのように変動するかを今後調べる必要がある。

第二章の結果により、p13^{Suc1}-associated kinase に対する KRP の阻害能が細胞周期の時期によって変動する可能性が示唆された。これまでの植物分野の細胞周期研究では、細胞周期の時期により KRP の阻害作用が違うことは認識されておらず、本研究により初めて実験的な証拠が提示された(Fig. 19)。今後 p13^{Suc1}-associated kinase に含まれるサイクリン/CDK の種類やそれぞれの量または KRP が結合する複合体の状態の周期変動を解析することによって、各 KRP の生理機能が明らかになると考えられる。

第三章 KRP の機能領域の解析

3-1 序論

シロイヌナズナ KRP は名前の通り動物の CIP/KIP ファミリーとの相同的な領域を持つという構造的な特徴から *in silico* 解析により同定された(De Veylder et al., 2001)。しかし、KRP1 は最初酵母 two-hybrid 法により CDKA と相互作用する ICK1 として同定され、酵母 two-hybrid 法による CDKA と CYCD3 に対する結合解析が行われ、どちらに対する相互作用にも C 末端側の CIP/KIP ファミリーとの相同領域が必要なことが示され、全長 191 アミノ酸のうち少なくとも N 末端側の 108 アミノ酸を欠いても結合が観察された(Wang et al., 1998)。また KRP2(ICK2)においても同様の結果が得られたことから、N 末端側の領域は CDK やサイクリンとの相互作用に影響しないと予想された(Lui et al., 2000)。一方で、*in vivo* においては N 末端側の構造が生理的な機能を持つ可能性が指摘されている。KRP1 の C 末端側の相同領域のみを高発現した植物体では全長を高発現したものよりも顕著に表現型が現れており、植物体内でのタンパク質の安定性が増すと考えられ、また、KRP1 の N 末端側を欠失すると核局在が弱まるのに対して C 末端側を欠いて CDK の阻害能を失ったものは核にとどまることから、N 末端側の構造が細胞内局在に関与する可能性が報告された(Zhou et al., 2003a)。KRP1 をトライコームに異所的に高発現した場合には、トライコームの形態異常と DNA 含有量の減少および細胞死への誘導が観察されたが、この現象も KRP1 の C 末端側の相同領域依存的に起こり、N 末端側の欠失が現象を促進すると報告された(Schnittger et al., 2003)。これらの知見から、KRP の一次構造に関しては、C 末端側の相同領域がサイクリン/CDK と相互作用して阻害に働く部位であり、N 末端側はその機能を調節するための機構を備えていると考えられている。

動物の CIP/KIP ファミリーは、p27^{Kip1} を初めとして、一次構造の見地からも機能領域の研究が進んでいる。阻害機構に関しての分子化学的なアプローチのひとつは、X 線結晶構造解析による p27^{Kip1} の阻害領域のペプチドと cyclin A/CDK2 との結合状態の解析で、p27^{Kip1} の場合には N 末端側の保存領域に存在し、その中に cyclin A に結合する領域と CDK2 に結合する領域が含まれていて、保存領域全体が cyclin A/CDK2 複合体にまたがるように結合することが示された(Russo et al., 1996)。おもしろいことに p21^{Cip1} および p27^{Kip1} は単独で存在している場合とサイクリン/CDK 複合体に結合している場合とで、保存領域の三次元構造が変化しており、保存領域には構造的な柔軟性を備えることが示され、この特徴がサイクリン/CDK に対する相互作用に影響を与える可能性が示された(Kriwacki et al., 1996, Bienkiewicz et al., 2002)。その後、CIP/KIP ファミリーの保存領域が domain 1 - linker helix - domain 2

といった共通の構造を備えており、domain 1 はサイクリン側へ、domain 2 は CDK 側へ結合するとの想定に基づいて、p27^{Kip1} のペプチドを用いた熱力学的な解析が行われ、domain 1 と domain 2 の相互作用の強さがそれぞれ非依存的であることが示された。すなわち、まず domain 1 がサイクリン側を認識し、linker helix 構造部分が折りたたまれた後に domain 2 が CDK 側へと巻きつく挙動をとることが提唱された (Lacy et al., 2004)。さらに、神経細胞の可塑性に関与し基本的には細胞周期には関与しない p25/CDK5 というサイクリン/CDK に類似した複合体に対して p27^{Kip1} は相互作用せず、この原因が p27^{Kip1} の相同領域の domain 1 が p25 側(サイクリン側)を認識できないためであると考えられ、CIP/KIP ファミリーのサイクリン/CDK に対する標的選択性が domain 1 のサイクリン側の認識特異性に依存する可能性が示唆されている (Lacy et al., 2005)。但し、植物の CKI の保存領域内において CIP/KIP ファミリーと相同性を持つ領域は一部分に限られ、domain 1 - linker helix - domain 2 の構造と照合すると、植物の CKI は domain 2 側の領域しか備えておらず、linker helix および domain 1 にあたる領域では植物の CKI の間で独自の相同性を有している (Fig. 20)。

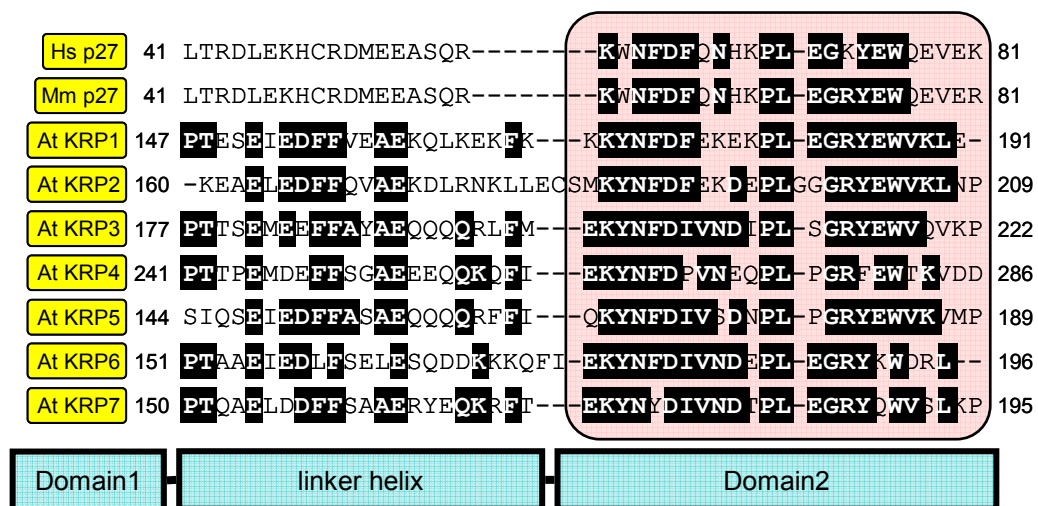


Fig. 20 p27^{KIP1} と KRP の相同領域の一次配列
 KRP の保存領域内には p27^{KIP1} の domain2 に相当する領域のみがあり、p27^{KIP1} の domain1 と linker helix にあたる領域では KRP 独自の相同性を持つ。各配列の左右にアミノ酸番号を示した。

さらに、相同性領域以外の領域が CKI の機能調節に働く事例は CIP/KIP ファミリーの研究から報告されており、たとえば p27^{Kip1} タンパク質自体の量的な調節には CDK 活性の非阻害領域に位置する 187 番目のスレオニン残基のリン酸化修飾が鍵となる。p27^{Kip1} の mRNA は細胞周期を通じて一定量の蓄積が見られるが、タンパク質の蓄積量はユビキチン-プロテアソーム系の積極的な分解によって大きく変動する。おもしろいことにこの p27^{Kip1} の分解は阻害作用の標的でもある cyclin E/CDK2 による T187 のリン酸化が引き金になって起こり、S-phase kinase-associating protein2

(Skp2)によるユビキチン化の促進(Carrano et al., 1999, Sutterluty et al., 1999)と、Jun activation domain-binding protein1 (Jab1)の働きによる核から細胞質への輸送(Tomoda et al., 1999, 2002)を経て分解調節を受けることとなる。植物のCKIにおいても、KRP2の過剰発現植物体の解析から、KRP2がCDKB1;1(およびCDKA;1)によりリン酸化を受け、そのリン酸化が引き金となってKRP2のプロテアソーム系による分解が進むといったモデルが提唱されている(Verkest et al., 2005)。また、動物ではCIP/KIPファミリーはアクチンの動態や細胞遊走に関与する可能性が示されるなど(Denicourt et al., 2004)、保存領域によるCDK活性の制御の他にもCKIが核の外において細胞周期以外の働きを持つことが示唆されてきており、構造的には動物のCKIと一見無関係であるKRPのN末端側の領域の存在意義は非常に興味深い。

KRPのC末端側の保存領域がCDK活性の阻害作用を担うことは推察されているが、アミノ酸レベルでの解析はこれまで行われておらず、KRPの機能と一次構造の関与についての詳細は現在のところ不明である。C末端側の相同領域をより細分化して解析する必要があるのみならず、N末端側にみられる特徴的な配列が阻害能に影響を及ぼす可能性を調べることは、KRPが働く機構と生理的な役割を考察する上で意義深いものと考えられる。そこで、第三章ではKRPの一次配列を検討して、アミノ酸領域の欠損や変異を施したKRP変異体タンパク質を用いて、*in vitro* および *in vivo* におけるKRPの生理機能に関する構造領域の解析を行った。

3-2 実験材料および方法

3-2-1 KRP3 由来ペプチドによるリン酸化阻害実験

KRP3 のほぼ全アミノ酸配列をカバーする 10 種類の合成ペプチドを作製し、昆虫細胞発現系により調製した CYCD2/CDKA 複合体のキナーゼ活性に対する阻害効果を検討した。それぞれのペプチドを Kinase Buffer に溶解し、500 μM の原液を調製した後、CYCD2/CDKA を用いたヒストン H1 リン酸化実験系にペプチド溶液を必要な量加えて試料とした。試料に他の反応液を添加して反応を開始させ、30°C で 30 分間インキュベートした。4×Sample Buffer を加えて反応を停止させ 95°C で 2 分間熱変性させた。15%ゲルで SDS-PAGE を行い、リン酸化されたヒストン H1 タンパク質をオートラジオグラフィーで検出した。

peptide

number	sequence	position
1	Biotin-MEVSKATAPSPGVRTRAAKTLALKR-OH	17-41
2	Biotin-LALKRLNSSAADSALPNDSSCYLQL-OH	37-61
3	Biotin-CYLQLRSRRLEKPSLIEPKQPPRV-OH	57-81
4	Biotin-QPPRVHRSGIKESGSRVDSVNSV-OH	77-101
5	Biotin-PVAQSSNEDECDFDNFV-OH	102-117
6	Biotin-SVQVSCGENSLGFESRHSTRESTPCN-OH	118-143
7	Biotin-STPCNFVEDMEIMVTPGSSSTRSMCRA-OH	139-164
8	Biotin-SMCRATKEYTREQDNVIPTTSEMEEF-OH	160-185
9	Biotin-EMEEFFAYAEQQQQLFMKYNFDIV-OH	181-206
10	Biotin-FMEKYNFDIVNDIPLSGRYEWWQVKP-OH	197-222

3-2-2 KRP3 由来ペプチドのリン酸化実験

CYCD2/CDKA を用いたリン酸化実験系をヒストン H1 を加えずに行い、基質としてペプチド溶液を加えた。試料に他の反応液を添加して反応を開始させ、30°C で 45 分間インキュベートした。4×Sample Buffer を加えて反応を停止させ 95°C で 2 分間熱変性させた。18%ゲルで SDS-PAGE を行い、リン酸化されたペプチドをオートラジオグラフィーで検出した。

反応溶液

Peptide (500 μM)	10 μl
CYCD2/CDKA	2 μl
[γ - ^{32}P]ATP (4,500 Ci/mmol, ICN)	0.25 μl
Kinase Buffer	7.75 μl
計	20 μl

3-2-3 KRP7YY タンパク質の作製

3-2-3-1 GST 融合タンパク質の作製

KRP7YY は KRP7 のサブクローニングの際に意図せずに得られた。KRP7 の 523 番目のアデニン塩基がチミン塩基に置換していたものが得られ、タンパク質では 175 番目のアスパラギン残基がチロシン残基へと置き換わることが分かった。これを pGEX4T-1 の *Bam*HI-*Xho*I 部位に挿入するため、PCR 法を用いて全長の KRP7YY の 5'末端側に *Bam*HI 認識配列を、3'末端側に *Xho*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、pGEX4T-1 に *Bam*HI-*Xho*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP7; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGAGCGAAACAAAACCC-3'

5'-CTCGAGCTAAGGTTTCAGACTAACCC-3'

GST-KRP7YY タンパク質の生産は大腸菌発現系を用いて GST-KRP7 と同様に行った(第一章 1-2-8-2 および 1-2-8-3)。

3-2-3-2 精製および GST の切断

第一章で作製した GST-KRP1~GST-KRP7 と GST-KRP7YY タンパク質から、GST タグの切断を行った。Glutathion-Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences)を充填したカラムに GST 融合タンパク質を発現させた菌体の粗抽出液を担体の 10 倍量(v/v) 加え、4 °Cで1時間インキュベートした。ビーズの 10 倍容量の 1×PBS Buffer で3回洗浄した後、担体と等量の Thrombin 溶液を加え、4°Cで一晩おだやかに攪拌し、GST と KRP との切断処理を行った。GST と担体を結合したまま、Thrombin 溶液を回収し、TBS buffer で透析して精製溶液として-80 °Cで凍結保存した。

Thrombin 溶液: 1×PBS Buffer に 10unit/ml の Thrombin Protease (Amersham Biosciences)を加えた。

TBS buffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 1 mM EGTA, pH7.5

3-2-4 ゲルろ過カラムを用いた結合解析

ゲルろ過の Superdex 75 10/300 GL カラムを FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) 装置(Amersham Biosciences)につないでシステムを構築した。精製した KRP2、KRP6、KRP7YY タンパク質と昆虫細胞から調製した His-CYCD2/His-CDKA を 4°Cで 2 時間プレインキュベートし、アプライの直前に

0.22 μ m のフィルターを通して混合サンプルとした。TBS buffer でカラムを平衡化した後、混合サンプルをアプライし、流速 0.5ml/min で TBS buffer を送液した。排出液の吸光度(O.D.280)をモニターしてタンパク質が溶出し始める前の時点から 0.5ml ずつ画分を回収し、画分番号を 1 から順番につけた。画分 10 から画分 36 を SDS-PAGE し、抗 His 抗体、抗 KRP2 抗体、抗 KRP6 抗体、抗 KRP7 抗体で western blotting して、各画分に含まれる目的タンパク質を検出した。

3-2-5 KRP 高発現植物体の作製

KRP 高発現植物体は当研究室の岩川により作製されたものを用いた。GFP タグを融合した KRP2 と KRP7YY(KRP2-GFP, KRP7YY-GFP)および N 末端側を欠損した KRP2(KRP2 Δ N-GFP)と KRP7YY(KRP7YY Δ N-GFP)を *CaMV35S* プロモーターにより高発現するコンストラクトを作製し、シロイヌナズナ植物体の形質転換を行った。

3-2-5-1 GFP 融合 KRP 発現用バイナリープラスミド

CaMV35S::KRP2-GFP、*CaMV35S::KRP7YY-GFP* および *CaMV35S::KRP2 Δ N-GFP* と *CaMV35S::KRP7YY Δ N-GFP* を、バイナリーベクター pGREEN0029 の MCS ヘフ レームが合うように挿入した。KRP2 Δ N は KRP2 の 120 番目から C 末端(209 番目) までアミノ酸配列に相当し、KRP7YY Δ N は KRP7YY の 102 番目から C 末端(195 番目)までのアミノ酸配列に相当する。

3-2-5-2 シロイヌナズナ植物体の形質転換

上記のバイナリープラスミドを用いてアグロバクテリウムを用いた減圧湿潤法 (大門ら 2005)によりシロイヌナズナ植物体 (*Arabidopsis thaliana*, Columbia (Col-0)) の形質転換を行った。

3-2-5-3 GFP 蛍光観察

発芽後 7 日程度生育した形質転換植物体をシャーレ(100mm ϕ)に置き、暗所にて 蛍光顕微鏡で観察した。

3-2-6 KRP7YY 高発現植物体における遺伝子発現の解析

3-2-6-1 シロイヌナズナ植物体からの RNA の精製

発芽から 7 日程度経過したシロイヌナズナ幼植物体から RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN)を用いて、total RNA 調製用プロトコールに従い全 RNA の精製を行った。ゲノム DNA の混入を防ぐため得られた全 RNA を DNaseI (RNase free, Roche

Diagnostics)で処理し、フェノール、クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、沈殿を DEPC 水に溶解した。

3-2-6-2 RT-PCR

(1)Reverse Tranacription 反応

得られた全 RNA を使用して Gene Amp RNA PCR Core kit (Applied Biosystems)による逆転写反応を行い、cDNA サンプルを調製した。方法は付属のプロトコールに従い、以下のように行った。

1.5ml チューブに total RNA (2 μ g)と以下の試薬を混合し、DEPC 処理水で 20 μ l に fill up した。

MgCl ₂ solution	1 μ l
10 \times PCR Buffer II	2 μ l
dGTP , dATP , dTTP , dCTP	各 2 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l
Reverse Transcriptase	1 μ l
Oligo d(T) ₁₆	1 μ l

42 $^{\circ}$ Cで 15 分間保温し 99 $^{\circ}$ C、5 分間で酵素を失活させてから氷上に置き、急冷した。この溶液の 0.5 \sim 2 μ l を PCR のテンプレートとして用いた。

(2)プライマーの設計

RT-PCR に用いたプライマーは、それぞれの遺伝子に特異的にアニールするように設計した。プライマーの配列を以下に示した。

GFP

センス : 5'-ATGGTGAGCAAGGGCGA-3'
アンチセンス : 5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3'

KRP7

センス : 5'-GGCTCGAGATGAGCGAAACAAAACCCAA-3'
アンチセンス : 5'-GGACTAGTCTAAGGTTTCAGACTAACC-3'

STM

センス : 5'-ATGGAGAGTGGTTCCAACAG-3'

アンチセンス : 5'-TCAAAGCATGGTGGAGGAGA-3'

BP

センス : 5'-ATGGAAGAATACCAGCATGAC-3'

アンチセンス : 5'-TTATGGACCGAGACGATAAG-3'

KNAT2

センス : 5'-ATGGATAGAATGTGTGGTTTCC-3'

アンチセンス : 5'-TTACTCGGTAAAGAATGTTTCATTAG-3'

KNAT6

センス : 5'-ATGGATGGAATGTACAATTTCCATTC-3'

アンチセンス : 5'-TCATTCCTCGGTAAAGAATGATC-3'

ACT2

センス : 5'-ATGGCTGAGGCTGATGATAT-3'

アンチセンス : 5'-TTAGAAACATTTTCTGTGAACGATTC-3'

(3) PCR 条件

組成

TOYOBO Taq polymerase (5U/μl)	0.125μl
10×PCR Buffer	2.5μl
2mM dNTPs	2.5μl
Templete	1.0μl
Primer I	0.25μl
Primer II	0.25μl
25mM MgCl ₂	1.25μl
filled up 25μl	with dH ₂ O

反応条件

変性	94°C	2 min
	94°C	30sec
アニーリング	50°C	30sec
	15-46 cycles	
伸長	72°C	1 min
	72°C	5 min

	アニーリング温度	サイクル数
<i>GFP</i>	50°C	15cycles
<i>KRP7</i>	50°C	30cycles
<i>STM</i>	50°C	44cycles
<i>BP</i>	50°C	44cycles
<i>KNAT2</i>	50°C	42cycles
<i>KNAT6</i>	50°C	46cycles
<i>ACT2</i>	50°C	26cycles

3-2-7 欠損型および変異型 KRP タンパク質の阻害能の解析

3-2-7-1 欠損型および変異型 KRP タンパク質の作製

第一章で用いた *in vitro* 転写翻訳系のタンパク質発現用プラスミドをもとに、以下のような変異型および欠損型 KRP の構築を行った。

- KRP7YY ; KRP7 の 175 番目のアスパラギン残基をチロシン残基に置換
- KRP2N57 : 2-56 アミノ酸を欠損
- KRP2N120 : 2-119 アミノ酸を欠損
- KRP2N154 : 2-153 アミノ酸を欠損
- KRP2m1 : 194-209 アミノ酸を欠損
- KRP2m2 : 178-209 アミノ酸を欠損
- KRP2m3 : 154-209 アミノ酸を欠損
- KRP27m ; KRP2: 1-153 と KRP7: 145-195 の融合
- KRP27C ; KRP2: 1-119 と KRP7: 104-195 の融合
- KRP72m ; KRP7: 1-144 と KRP2: 154-209 の融合
- KRP72C ; KRP7: 1-103 と KRP2: 120-209 の融合
- KRP2(S41A) ; KRP2 の 41 番目のセリン残基をアラニン残基に置換

KRP2(S73A) ; KRP2 の 73 番目にセリン残基をアラニン残基に置換
KRP2(DSA) ; KRP2 の 41 番目と 73 番目のセリン残基をアラニン残基に置換
KRP7(NF) ; KRP7 の 176 番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換

KRP7YY は PCR 法を用いて全長の KRP7YY の 5'末端側に *Bam*HI 認識配列を、3'末端側に *Xho*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、3×HA の挿入された pSPUTK に *Bam*HI-*Xho*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP7YY; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGAGCGAAACAAAACCC-3'

5'-CTCGAGCTAAGGTTTCAGACTAACCC-3'

KRP2N57 は KRP2 の 169 番目から終始コドン(630 番目)までの塩基配列に対し、PCR 法を用いて 5'末端側に *Bam*HI 認識配列および ATG 配列を、3'末端側に *Xho*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、3×HA の挿入された pSPUTK に *Bam*HI-*Xho*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP2N57; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGTCAGCAGGAGCGTCGGAG-3'

5'-CTCGAGTCATGGATTCAATTTAACCC-3'

KRP2N120 は KRP2 の 358 番目から終始コドン(630 番目)までの塩基配列に対し、PCR 法を用いて 5'末端側に *Bam*HI 認識配列および ATG 配列を、3'末端側に *Xho*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、3×HA の挿入された pSPUTK に *Bam*HI-*Xho*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP2N120; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGACGTCGTGGATTTACGATG-3'

5'-CTCGAGTCATGGATTCAATTTAACCC-3'

KRP2N154 は KRP2 の 460 番目から終始コドン(630 番目)までの塩基配列に対し、PCR 法を用いて 5'末端側に *Bam*HI 認識配列および ATG 配列を、3'末端側に *Xho*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、3×HA の挿入された pSPUTK に *Bam*HI-*Xho*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP2N460; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGAAGAGTCTCCATGAGACGGTG-3'

5'-CTCGAGTCATGGATTCAATTTAACCC-3'

KRP2m1 は KRP2 の開始コドンから 579 番目までの塩基配列に対し、PCR 法を用いて 5'末端側に *Bam*HI 認識配列を、3'末端側に終始コドンおよび *Xho*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、3×HA の挿入された pSPUTK に *Bam*HI-*Xho*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP2m1; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGGCGGCGGTTAGGAGAAG-3'

5'-CTCGAGTCATTTCTCGAAATCGAAG-3'

KRP2m2 は KRP2 の開始コドンから 531 番目までの塩基配列に対し、PCR 法を用いて 5'末端側に *Bam*HI 認識配列を、3'末端側に終始コドンおよび *Xho*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、3×HA の挿入された pSPUTK に *Bam*HI-*Xho*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP2m2; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGGCGGCGGTTAGGAGAAG-3'

5'-CTCGAGTCACCGAAGATCTTTCTCCGCC-3'

KRP2m3 は KRP2 の開始コドンから 459 番目までの塩基配列に対し、PCR 法を用いて 5'末端側に *Bam*HI 認識配列を、3'末端側に終始コドンおよび *Xho*I 認識配列を付加した。増幅された DNA 断片を pBluescriptII SK-にサブクローニングして塩基配列を確認した後、3×HA の挿入された pSPUTK に *Bam*HI-*Xho*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP2m3; *Bam*HI-*Xho*I

5'-GGATCCATGGCGGCGGTTAGGAGAAG-3'

5'-CTCGAGTCACCTTAACCTGCGGCGAGACTC-3'

KRP27m は、KRP2 の開始コドンから 459 番目までの塩基配列の 5'末端側に *Bam*HI 認識配列を付加して 3'末端側には何も付加しない断片と、KRP7 の 433 番目から終始コドンまでの塩基配列の 5'末端側には何も付加せず 3'末端側に *Xho*I 認識配列を

付加した断片を、それぞれ PCR 法により増幅した。増幅された 2 種の DNA 断片を pBluescriptII SK-の *Bam*HI-*Xho*I 部位に同時にサブクローニングして塩基配列を確認した後、3×HA の挿入された pSPUTK に *Bam*HI-*Xho*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP2; *Bam*HI-459

5'-GGATCCATGGCGGCGGTTAGGAGAAG-3'

5'-CCTTAACCTGCGGCGAGACTCTAC-3'

KRP7; 433-*Xho*I

5'-AAGATGGAAAAATCACCGACGCAGGC-3'

5'-CTCGAGCTAAGGTTTCAGACTAACCC-3'

KRP27C は、KRP2 の開始コドンから 357 番目までの塩基配列の 5'末端側に *Bam*HI 認識配列を付加して 3'末端側には何も付加しない断片と、KRP7 の 310 番目から終始コドンまでの塩基配列の 5'末端側には何も付加せず 3'末端側に *Xho*I 認識配列を付加した断片を、それぞれ PCR 法により増幅した。増幅された 2 種の DNA 断片を pBluescriptII SK-の *Bam*HI-*Xho*I 部位に同時にサブクローニングして塩基配列を確認した後、3×HA の挿入された pSPUTK に *Bam*HI-*Xho*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP2; *Bam*HI-357

5'-GGATCCATGGCGGCGGTTAGGAGAAG-3'

5'-TTCTGTTTCACGATCGTCACCG-3'

KRP7; 310-*Xho*I

5'-ACGTTACTCACCAACAATTCAGG-3'

5'-CTCGAGCTAAGGTTTCAGACTAACCC-3'

KRP72m は、KRP7 の開始コドンから 432 番目までの塩基配列の 5'末端側に *Bam*HI 認識配列を付加して 3'末端側には何も付加しない断片と、KRP2 の 460 番目から終始コドンまでの塩基配列の 5'末端側には何も付加せず 3'末端側に *Xho*I 認識配列を付加した断片を、それぞれ PCR 法により増幅した。増幅された 2 種の DNA 断片を pBluescriptII SK-の *Bam*HI-*Xho*I 部位に同時にサブクローニングして塩基配列を確認した後、3×HA の挿入された pSPUTK に *Bam*HI-*Xho*I 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP7; *Bam*HI-432

5'-GGATCCATGAGCGAAACAAAACCC-3'

5'-CTTCTTCTTCTCCGTCTTTCTCTG-3'

KRP2; 460-*XhoI*

5'-AAGAGTCTCCATGAGACGGTG-3'

5'-CTCGAGTCATGGATTCAATTTAACCC-3'

KRP72C は、KRP7 の開始コドンから 309 番目までの塩基配列の 5'末端側に *BamHI* 認識配列を付加して 3'末端側には何も付加しない断片と、KRP2 の 358 番目から終始コドンまでの塩基配列の 5'末端側には何も付加せず 3'末端側に *XhoI* 認識配列を付加した断片を、それぞれ PCR 法により増幅した。増幅された 2 種の DNA 断片を pBluescriptII SK-の *BamHI-XhoI* 部位に同時にサブクローニングして塩基配列を確認した後、3×HA の挿入された pSPUTK に *BamHI-XhoI* 断片を組み換えた。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP7; *BamHI*-309

5'-GGATCCATGAGCGAAACAAAACCC-3'

5'-TGAGATTTCTGGTTTCGGAGATTTC-3'

KRP2; 358-*XhoI*

5'-ACGTCGTGGATTTACGATGATTTG-3'

5'-CTCGAGTCATGGATTCAATTTAACCC-3'

KRP2(S41A)は、3HA-KRP2 の入った pSPUTK ベクターをテンプレートとして作製した。121-123 番目の TCT 塩基配列(41 番目のセリン)を、GCG 塩基配列(アラニン)に置換した 5'末端を持つプライマーを用いて PCR を行い、テンプレート全体を増幅した。増幅された DNA 断片をセルフライゲーションすることでポイントミューテーションを施した。得られた pSPUTK プラスミドの塩基配列は直接シーケンスして確認した。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP2(S41A);

5'-GCGCCGTGTGTACAGGCGACGAATCGCGG-3'

5'-CAGAATTATCCTAGATTCCACTAAATCCAC-3'

KRP2(S73A)は、3HA-KRP2 の入った pSPUTK ベクターをテンプレートとして作製した。217-219 番目の TCT 塩基配列(73 番目のセリン)を、GCG 塩基配列(アラニン)に置換した 5'末端を持つプライマーを用いて PCR を行い、テンプレート全体を増幅した。増幅された DNA 断片をセルフライゲーションすることでポイントミューテーションを施した。得られた pSPUTK プラスミドの塩基配列は直接シーケンスして確認した。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP2(S73A);

5'-GCGCCTCCGGTTGAAGAACAGTGTCAAATC-3'

5'-ATCTCGCCGTCGTACTATAACAACACTCG-3'

KRP2(DSA)は、3HA-KRP2(S41A)の入った pSPUTK ベクターをテンプレートとして作製した。KRP2(S73A)作製時と同じプライマーを使用し、増幅された DNA 断片をセルフライゲーションすることでポイントミューテーションを施した。得られた pSPUTK プラスミドの塩基配列は直接シーケンスして確認した。

KRP7(NF)は、3HA-KRP7YY の入った pSPUTK ベクターをテンプレートとして作製した。523-528 番目の TACTAC 塩基配列(175 番目と 175 番目のチロシン)を、AACTTC 塩基配列(アスパラギン-フェニルアラニン)に置換した形の 5'末端を持つプライマーを用いて PCR を行い、テンプレート全体を増幅した。増幅された DNA 断片をセルフライゲーションすることでポイントミューテーションを施した。得られた pSPUTK プラスミドの塩基配列は直接シーケンスして確認した。PCR には以下に示した配列のプライマーを用いた。

KRP7(NF);

5'-AACTTCGACATCGTCAATGATACGCCGC-3'

5'-GTACTTTTCTGTGAATCGTTTCTGTTCG-3'

得られたプラスミドの濃度を 0.2 µg/µl となるように調製し、*in vitro* 転写翻訳系によりタンパク質を合成した。合成されたタンパク質は抗 HA 抗体の western blotting により確認して、-80°Cで保存した。

3-2-7-2 欠損型および変異型 KRP タンパク質の阻害実験

ヒストン H1 リン酸化実験系の CYCD2/CDK 複合体の精製溶液に、上記のように作製した欠損型および変異型 KRP タンパク質の *in vitro* 転写翻訳産物をそのまま適当量添加し、Kinase Buffer を必要な量加えて試料とした。それ以外の反応液を添加して反応を開始させ、30°Cで 30 分間インキュベートした。4×Sample Buffer を加えて反応を停止させ 95°Cで 2 分間熱変性させた。15%ゲルで SDS-PAGE を行い、リン酸化されたヒストン H1 タンパク質をオートラジオグラフィーで検出した。反応液の組成は以下に示す。

反応溶液

CYCD2/CDK	2 μ l
<i>in vitro</i> 転写翻訳産物	2 μ l
ヒストン H1(10 mg/ml)	0.25 μ l
[γ - ³² P]ATP (4,500 Ci/mmole, ICN)	0.25 μ l
Kinase Buffer	10.5 μ l
計	15 μ l

3-3 結果

3-3-1 KRP3 由来ペプチドを用いた機能領域の探索

細胞周期制御因子への結合やCDK活性の阻害作用のようなKRPが持つ機能が、どのようなアミノ酸配列に起因しているのかを検討するために、KRP3のアミノ酸配列情報より10種類のペプチドを作製した(Fig. 21)。10種類のペプチドをリン酸化実験系に用いて、昆虫細胞発現系により調製したCYCD2/CDKAに対する阻害活性を測定したところ、C末端側の相同領域に対応するペプチド9および10がCYCD2/CDKAを阻害することが分かった(Fig. 22)。逆に、N末端側のペプチド2および中央領域からC末端側のペプチド5,6,7,8を加えた実験では、CYCD2/CDKAが活性化される結果となった。

KRP3 はサイクリン/CDK 複合体の標的となりうるセリン-プロリン(SP)およびスレオニン-プロリン(TP)のアミノ酸配列を含み、27番目のセリンと140番目と153番目のスレオニンがリン酸化される可能性がある(緒言 Fig. 5)。今回作製したペプチドでは、この配列がペプチド1に1ヶ所、ペプチド6に1カ所、ペプチド7に2カ所存在する(Fig. 21)。KRP3由来の各ペプチドを上記と同様にリン酸化実験系に加えたところ、ペプチド1、6および7がCYCD2/CDKAによって逆にリン酸化されることが示され(Fig. 23)、KRP3がCYCD2/CDKA複合体の基質となりうる可能性が示唆された。なお、ペプチド2,3,4はCYCD2/CDKAにより非特異的に弱くリン酸化されたと考えられる (Fig. 23)。

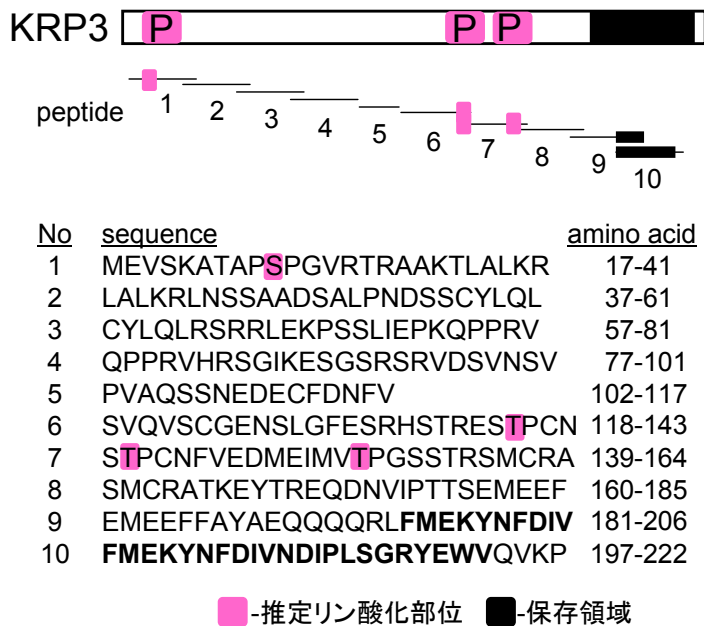


Fig. 21 KRP3 由来ペプチドの概略図
KRP 由来ペプチド no.1 から no.10 のアミノ酸配列を示した。

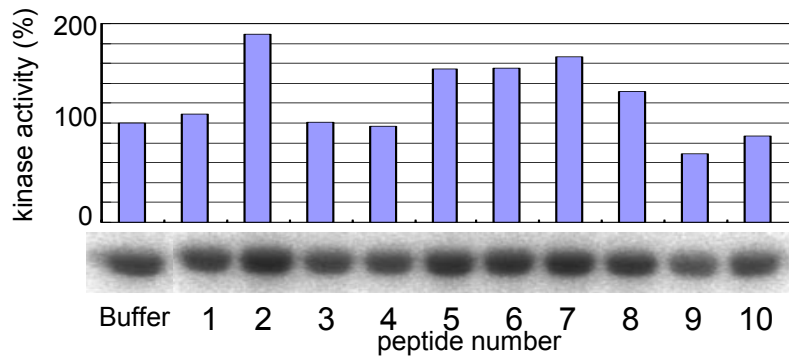


Fig. 22 CYCD2/CDKA に対する KRP3 由来ペプチドの影響
 KRP 由来ペプチド no.1 から no.10 を CYCD2/CDKA リン酸化実験系に添加した。ペプチドを加えず同量の Buffer を加えた場合の活性を 100%としたグラフを示した。

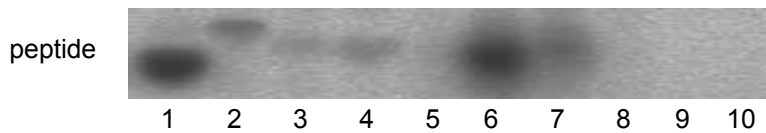


Fig. 23 CYCD2/CDKA による KRP3 由来ペプチドのリン酸化
 KRP 由来ペプチド no.1 から no.10 を基質として CYCD2/CDKA によるリン酸化実験を行った。

3-3-2 KRP7YY タンパク質の機能解析

KRP の CKI としての機能は保存領域である C 末端側のアミノ酸配列に起因すると考えられる。KRP の保存領域をアミノ酸レベルで比較すると、KRP1~KRP6 の KYNFD 配列および KRP7 の KYNVD 配列は最も高い相同性を保持している配列のひとつであることが分かり、これを KYNF/YD モチーフと呼ぶこととした(Fig. 24)。初めにこのモチーフに着目して、KRP7 の KYNVD 配列のアスパラギン残基をチロシン残基に置き換えて、KYYYD モチーフを持つ KRP7 変異体(KRP7YY)タンパク質を作製した。

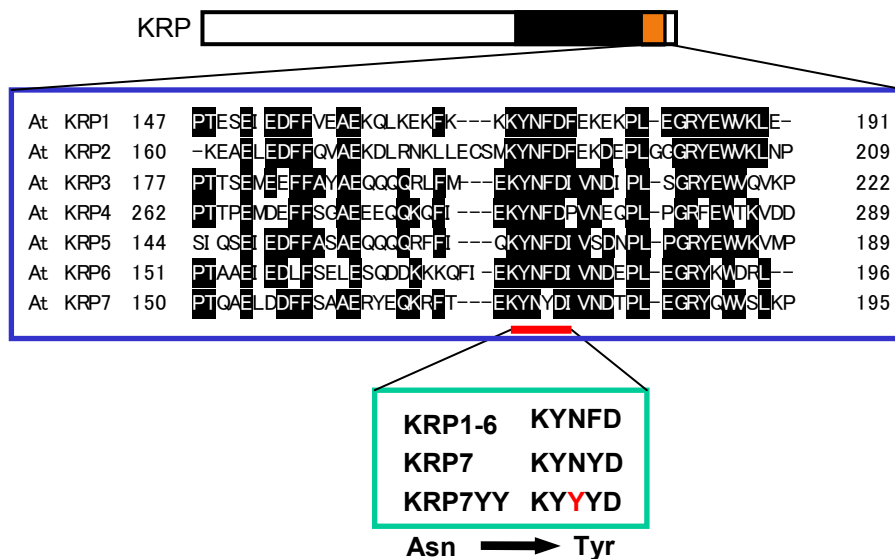


Fig. 24 KRP7YY の作製

KRP の保存領域に含まれる KYNF/YD モチーフに着目し、KRP7 の KYNID のアスパラギン残基をチロシン残基に置き換えた KRP7YY 変異体を作製した。

第一章と同様に、大腸菌を用いた発現系により GST タグを融合した KRP1~KRP7 および KRP7YY を作製し、GST 融合タンパク質を GST アフィニティー担体に結合させ、Thrombin プロテアーゼにより KRP タンパク質から GST タグを切り離すことにより KRP タンパク質を精製した結果、KRP2, KRP6 および KRP7YY のみで可溶化した精製タンパク質が得られた。他の KRP では最適な Thrombin プロテアーゼによる切り離しの条件が見つからず、不十分な精製タンパク質しか得られなかったため、ここでは KRP2、KRP6 および KRP7YY を使用した。各タンパク質の純度と濃度を SDS-PAGE により確認した後、CYCD2/CDKA 複合体のヒストン H1 に対するリン酸化実験系に各精製タンパク質を同量ずつ加え、阻害活性を評価した。その結果、KRP2 と KRP6 は GST 融合タンパク質を用いた場合と同様に(第一章 Fig. 9)、量依存的に CYCD2/CDKA 複合体のリン酸化活性を阻害したが、KRP7YY による阻害は認められなかった(Fig. 25)。また、CYCD2/CDKA 複合体と等モル程度(1.0~2.0pmol)の KRP2 と KRP6 をリン酸化実験系に加えても 30~60%程の残存活性が見られた。以上の結果から、KRP7YY は KYNF/YD モチーフにのみ変異が導入されており、立体構造に及ぼす影響は分からないが、KRP の阻害作用には KYNF/YD モチーフが必要で、KRP7YY タンパク質は阻害活性を有しないことが分かった。

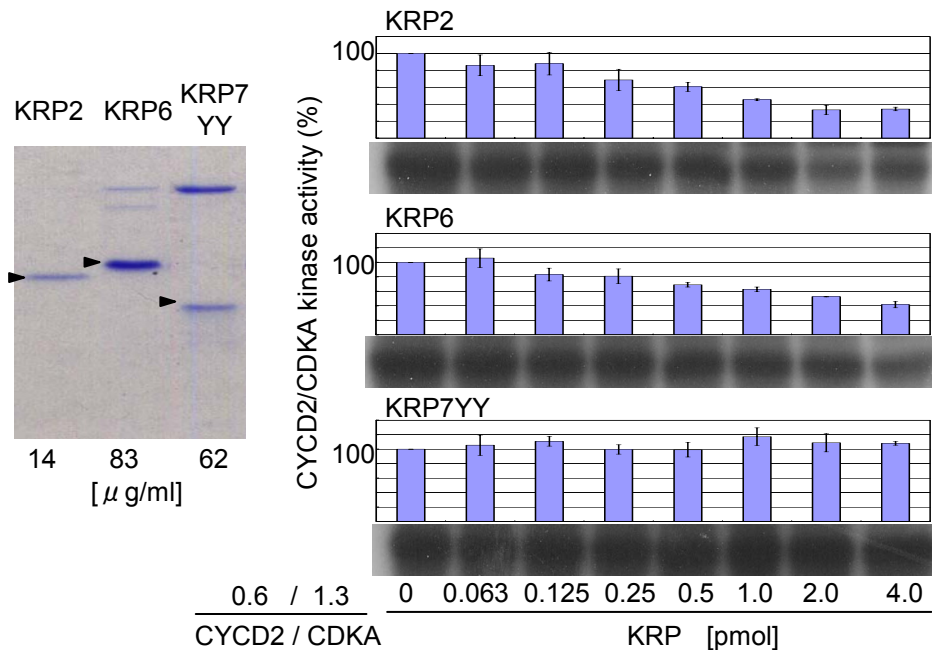


Fig. 25 KRP2, KRP6, KRP7YY タンパク質による CYCD2/CDKA の阻害

KRP2, KRP6, KRP7YY タンパク質は、SDS-PAGE 後に CBB 染色を行い、目的タンパク質の純度および濃度を確認した(左図)。HistoneH1 を基質とした CYCD2(0.6pmol) / CDKA(1.3pmol)のリン酸化反応系に各タンパク質を 0 から 4pmol 加えた場合のリン酸化シグナルをグラフ化して示した(右図)。

ついで、CDK 活性の阻害能を欠損した KRP7YY の CYCD2/CDKA に対する結合を解析した。但し、ここでは第一章のように pull-down による解析ではなく、KRP タンパク質から GST タグを切り離すことに成功したことから、より直接的なタンパク質間相互作用の解析を行うことを目的としてゲルろ過を用いた結合解析を行った。昆虫細胞により発現した His-CYCD2/His-CDKA に精製した KRP2, KRP6, KRP7YY を混合した後ゲルろ過カラムにより分画し、その後 SDS-PAGE で展開して各タンパク質を抗 His 抗体および KRP2, KRP6, KRP7 抗体により検出した(Fig. 26)。高分子量側の 16-20 番の画分には CDKA が検出され、この画分に KRP2 と KRP6 が検出されたが、KRP7YY は検出されなかった。16 番と 18 番の画分に CYCD2 は明確には認められず、これらの画分に含まれる複合体の構成因子を確認する必要があるが、少なくとも KRP2 と KRP6 が直接 CDKA を含む複合体に結合することが証明された。また、KRP2 と KRP6 では分画される画分が量的に異なり(KRP2 では画分 16、KRP6 では画分 18 が最も多い)、KRP2 と KRP6 が結合する CYCD2/CDKA 複合体の構成因子が異なることが示唆された。しかし、各 KRP の単量体と CYCD2 および CDKA の単量体とは分子量が近いことから、今回使用したゲルろ過カラムでは分離できず、単量体に関する KRP との結合は解析できなかった。いずれにしても、活性型の CYCD2/CDKA 複合体に対しては阻害能を持つ KRP2 と KRP6 が結合し、阻害能を失った KRP7YY は結合しなかったことから、KRP は活性型のサイクリン/CDK 複合体に結合して阻害能を発揮することが示唆され、KRP7YY が阻害能と結合能を同時

に失っていることが明らかとなった。

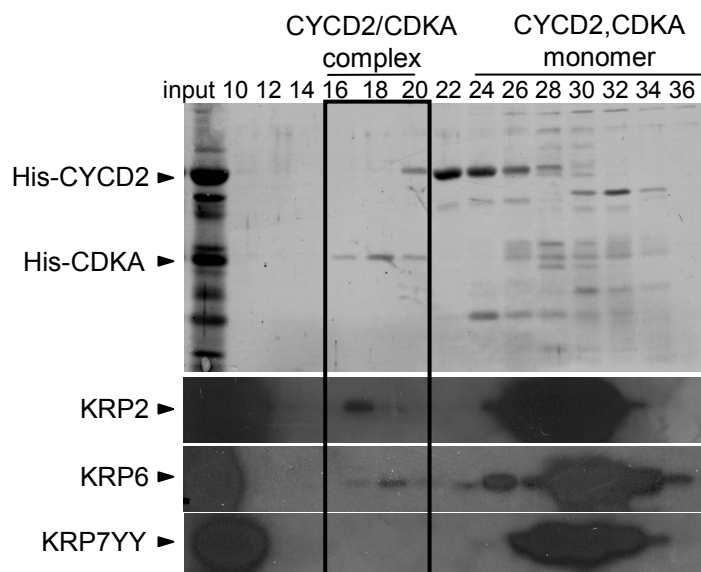


Fig. 26 KRP2、KRP6、KRP7YY と CYCD2/CDKA のゲルろ過による結合解析
 KRP2、KRP6、KRP7YY と CYCD2/CDKA の混合サンプルをゲルろ過分画し、ゲルろ過前のサンプル(input)および画分 10 から画分 36 を SDS-PAGE し供した。その後、抗 His、KRP2、KRP6、KRP7 抗体で western blot した。ボックスは複合体の画分を示す。

3-3-3 KRP7YY 高発現植物体の解析

植物体における KRP の生理機能を解析するために、GFP タグを融合した KRP2 と KRP7YY(KRP2-GFP, KRP7YY-GFP)および N 末端側を欠損した KRP2(KRP2 Δ N-GFP)と KRP7YY(KRP7YY Δ N-GFP)を CaMV35S プロモーターにより強制発現するコンストラクトを作製し、シロイヌナズナ植物体の形質転換を行った(Fig. 27)。GFP のみを導入した形質転換体をコントロールとして、得られた形質転換体の GFP 蛍光を検出して各タンパク質の発現を観察したところ、すべての形質転換体で GFP の蛍光が認められたが、KRP7YY-GFP と KRP7YY Δ N-GFP の形質転換体は他のものよりも GFP 蛍光が弱く、蓄積タンパク質量が少ないことが示唆された(Fig. 27)。

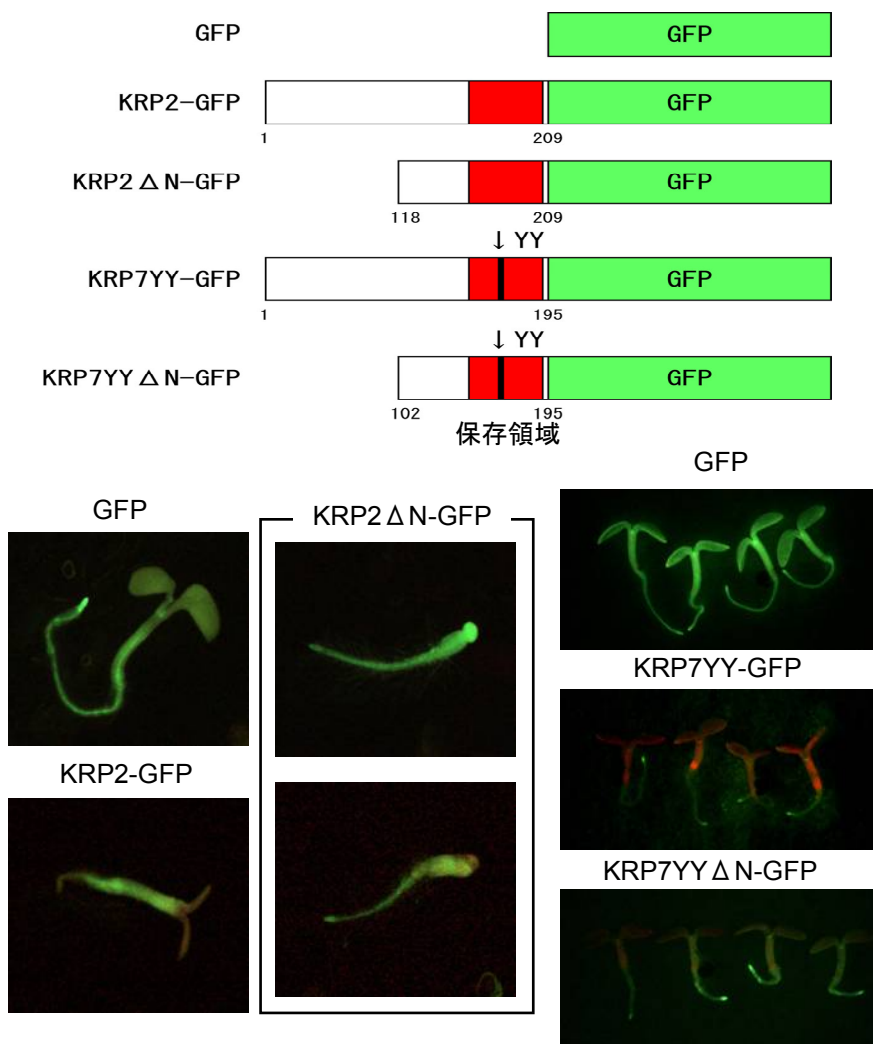


Fig. 27 GFP 融合型 KRP2 および KRP7YY の強制発現植物体
 形質転換に用いたコンストラクトの概略を上段に示した。得られた植物体の発芽後 7 日の GFP 蛍光の写真を下段に示した。KRP7YY-GFP と KRP7YY Δ N-GFP の形質転換体は GFP 蛍光が弱く、子葉と胚軸に自家蛍光が見られた。

そこで、GFP コントロールおよび KRP7YY-GFP と KRP7YY Δ N-GFP の転写産物の発現量を RT-PCR により解析したところ、KRP7 遺伝子の mRNA 蓄積量は KRP7YY-GFP と KRP7YY Δ N-GFP の形質転換体で GFP コントロールよりも増加しており、GFP の mRNA 蓄積量は同程度であった(Fig. 28)。また、これらの植物体をプロテアソーム分解系の阻害剤である MG132 で処理して蛍光を観察したところ、MG132 処理した場合には GFP コントロールには影響が見られなかったが、KRP7YY-GFP と KRP7YY Δ N-GFP では微弱ながらもシグナルが多少強く観察され、蓄積量が増加する可能性が示唆された(Fig. 28)。この結果から、形質転換植物体で KRP7YY-GFP と KRP7YY Δ N-GFP タンパク質がプロテアソーム系により積極的に分解されていることが推測され、KRP7 が植物体においてプロテアソーム系を通じたタンパク質分解調節を受けている可能性を示唆する。

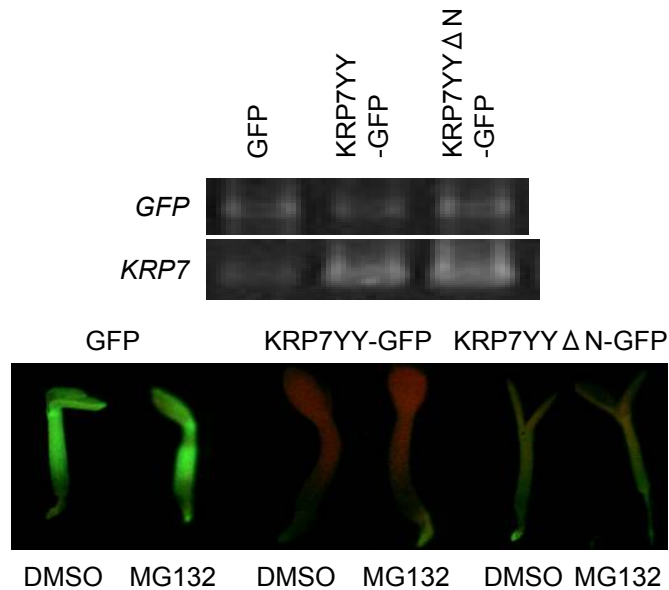


Fig. 28 KRP7YYGFP および KRP7YY ΔN-GFP の強制発現植物体
RT-PCR により *GFP* と *KRP7* の転写産物の発現を確認した(上段)。各幼植物体を DMSO
もしくは MG132 で処理し、それぞれの蛍光を観察した。

それぞれの植物体を同時に発芽処理すると、KRP2-GFP と KRP2 ΔN-GFP の形質転換体は幼植物の時点で成長の遅延が見られたが、KRP7YY-GFP と KRP7YY ΔN-GFP の形質転換体では GFP のみを発現した植物体と同程度の成長が観察された (data not shown)。さらに KRP2-GFP と KRP2 ΔN-GFP の形質転換体は発芽後 7 日程度で子葉が開く前に成長が停止し、その後も成長せずに致死となったが、これは KRP2-GFP と KRP2 ΔN-GFP タンパク質の CDK 阻害作用によって細胞周期の進行が妨げられ、成長に深刻な影響を及ぼしたためと考えられる。KRP7YY-GFP と KRP7YY ΔN-GFP 形質転換体の成長には GFP コントロールと比べて遅延が見られなかったものの、興味深いことに葉には *KRP* 高発現植物体に特徴的なギザギザになる形態変化が見られた。そこで、この現象が現れる発達段階での葉の形態形成に関与していると予想される *SHOOT MERISTEMLESS*(*STM*)および class I *KNOTTED1-like homeobox*(*KNOX*)遺伝子群に属する *KNOTTED-like from Arabidopsis thaliana* (*KNAT*)の KRP7YY-GFP と KRP7YY ΔN-GFP 形質転換体における発現を解析した。その結果 *STM*、*KNAT1*(*BREVIPEDICELLUS* ; *BP* とも呼ばれる)、*KNAT2* の転写産物量は GFP のみを発現する植物体と変わらなかったが、*KNAT6* の発現が KRP7YY-GFP と KRP7YY ΔN-GFP 形質転換体において顕著に上昇していた(Fig. 29)。このことから、CDK 阻害活性を失った KRP7YY-GFP と KRP7YY ΔN-GFP タンパク質の蓄積により、成長速度には影響しないが、形態形成に関する遺伝子の制御には影響を及ぼしていると考えられた。

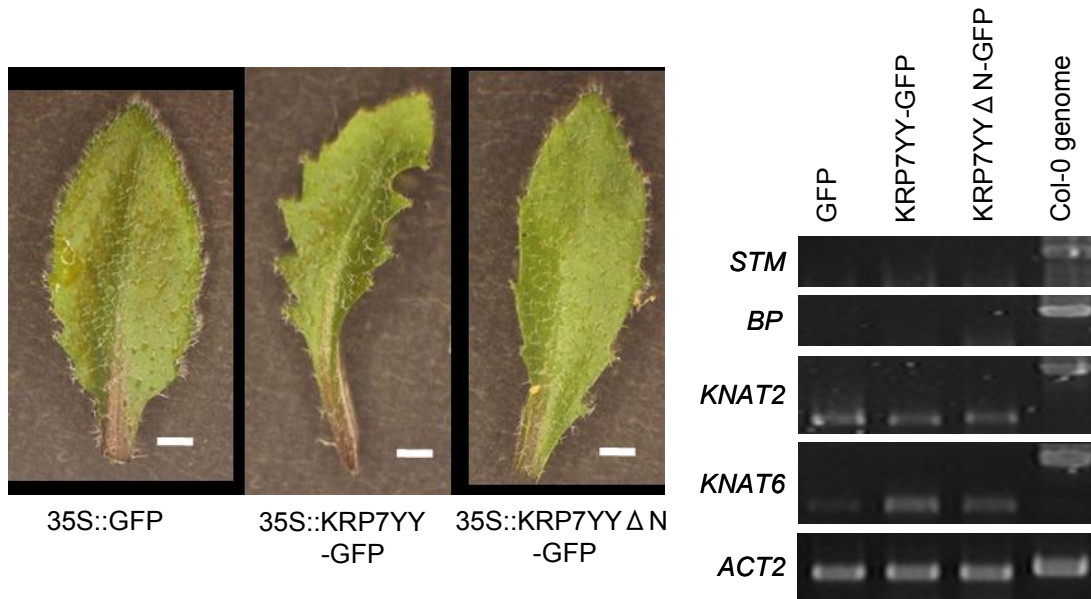


Fig. 29 KRP7YY-GFP および KRP7YY Δ N-GFP 高発現植物体の葉の形態と形態形成制御遺伝子の発現

35S::GFP、35S::KRP7YY-GFP、35S::KRP7YY Δ N-GFP の葉の写真を示した。35S::KRP7YY-GFP と 35S::KRP7YY Δ N-GFP の葉は切れ込みが深くなっている。エラーバーは 5mm。右図では各植物体における *STM*, *BP*(*KNAT1*), *KNAT2*, *KNAT6* および *ACT2* の転写産物の発現を RT-PCR により確認した。野生型植物のゲノムをコントロールテンプレートとして用いた (Col-0 genome)。

3-3-4 欠損型および変異型 KRP の阻害能

以上の結果より、KRP の CDK 活性の阻害作用には、C 末端側の相同領域、その中でも KYNF/YD モチーフが重要であると考えられるが、保存領域以外の N 末端側に存在する特徴的な配列の役割や保存領域内で必要とされるアミノ酸についての知見は得られていない。そこで、KRP2 および KRP7YY をもとに欠損型および変異型 KRP を作製して、阻害作用に関わる一次構造の解析を行った。*In vitro* 転写翻訳系のタンパク質発現系に、変異型および欠損型 KRP の N 末端側に 3×HA タグを付加した以下の構築を行った。まず、N 末端側を欠損した KRP2(N57: 2-56 アミノ酸を欠損、N120: 2-119 アミノ酸を欠損、N154: 2-153 アミノ酸を欠損)と KRP2 の C 末端側の保存領域を欠損したもの(m1: 194-209 アミノ酸を欠損、m2: 178-209 アミノ酸を欠損、m3: 154-209 アミノ酸を欠損)と、KRP2 と KRP7YY の C 末端側と N 末端側を入れ換えた KRP27m(KRP2: 1-153 と KRP7: 145-195 の融合)、KRP27C(KRP2: 1-119 と KRP7: 104-195 の融合)、KRP72m(KRP7: 1-144 と KRP2: 154-209 の融合)、KRP72C(KRP7: 1-103 と KRP2: 120-209 の融合)キメラ体を作製した。KRP2 には 41 番目と 73 番目にセリン-プロリン配列の推定リン酸化部位があり、このセリンをリン酸化されないアラニンにそれぞれ置換して非リン酸化型とした KRP2(S41A)と(S73A)、および両方のセリンをアラニンとした KRP2(DSA)を作製した。KYNF/YD モチーフは、KRP1-6 が KYNFD 型であるのに対して KRP7 は唯一 KYNFD 型であり、これを他のものと同じ KYNFD とした KRP7(NF)も作製した(Fig. 30)。

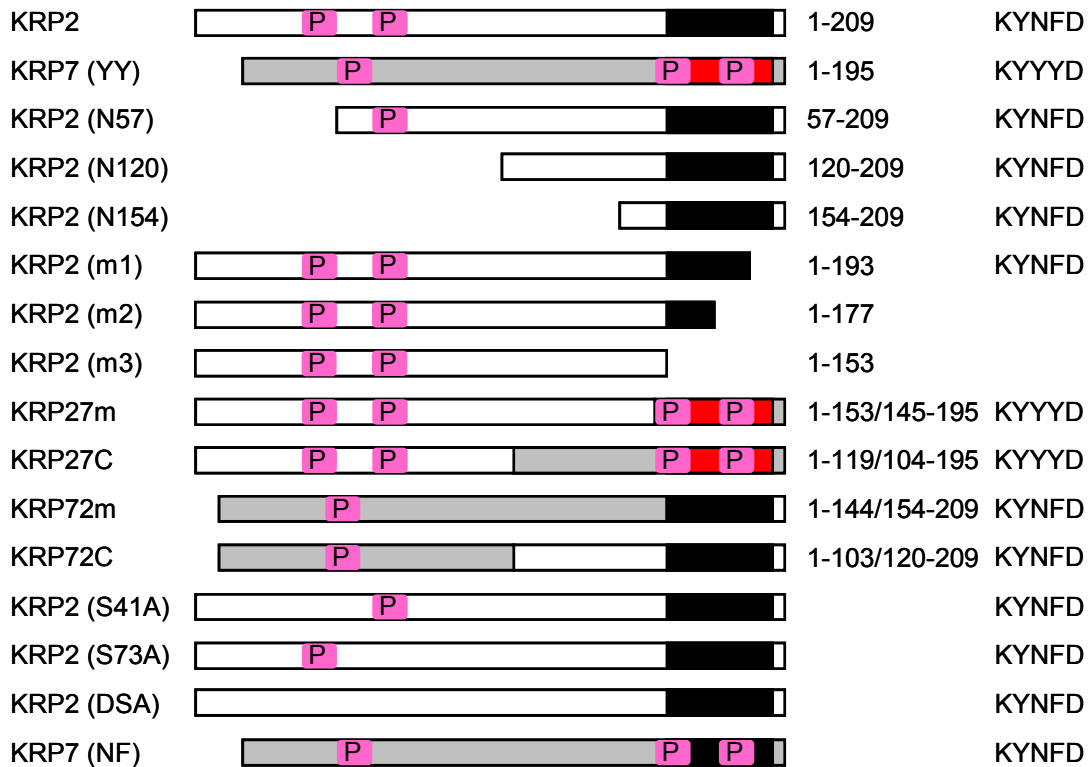


Fig. 30 欠損型および変異型 KRP の一次構造

左からクローン名、概略図、アミノ酸残基数、KYNF/YD モチーフの配列を示した。KRP2(N57)から KRP2(m3)は KRP2 の N 末端側もしくは C 末端側を欠損しており、KRP27m から KRP72C は KRP2 と KRP7YY とのキメラ体である。KRP2(S41A)、(S73A)、(DSA)は推定リン酸化部位を置換しており、KRP7(NF)は KRP7 のモチーフを KYNFD としている。白いボックスは KRP2 の配列、灰色のボックスは KRP7 の配列、黒いボックスは KRP2 の CDK 阻害領域、赤いボックスは KRP7YY の CDK 阻害領域、P は CDK 推定リン酸化部位を示す。

これらの構築プラスミドを *in vitro* 転写翻訳系を用いてタンパク質を調製し、抗 HA 抗体による western blot でタンパク質を確認した後、*in vitro* 転写翻訳産物を直接 CYCD2/CDKA リン酸化実験系に添加することで阻害活性の検定を行った(Fig. 31)。その結果、末端欠損型の KRP2 タンパク質では、N 末端側を欠いても相同領域の全体が保持されている N57、N120、N154 は阻害活性を保持したが、相同領域を一部でも失った m1、m2、m3 は阻害能を示さなかった。また、KYNF/YD モチーフを有する KRP72m と KRP72C および KRP7(NF)は阻害能を示したが、KYYYY 型の KRP27m、KRP27C および KRP7(YY)は阻害能を失っていた。非リン酸化型 KRP2 の S41A、S73A、DSA はいずれも阻害活性を示した(Fig. 31)。これらの結果から、KRP のサイクリン/CDK に対する阻害作用には、リン酸化部位や N 末端側の構造は直接的には影響しないことが示唆され、KYNF/YD モチーフおよび相同領域の全体が必要であることが示唆された。

Western blotting anti-HA

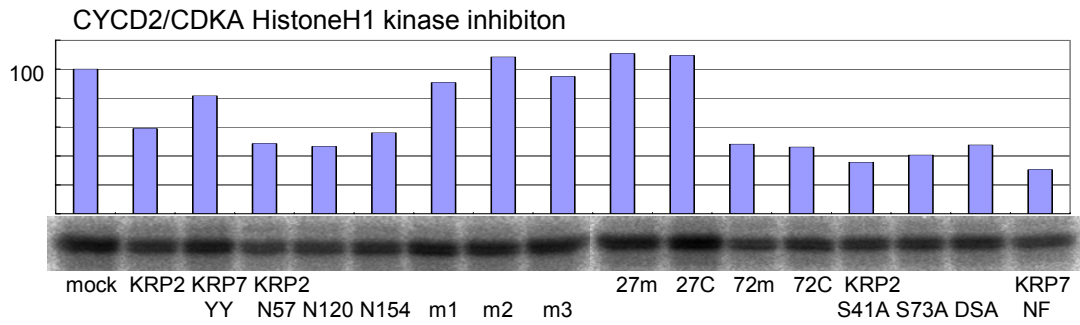
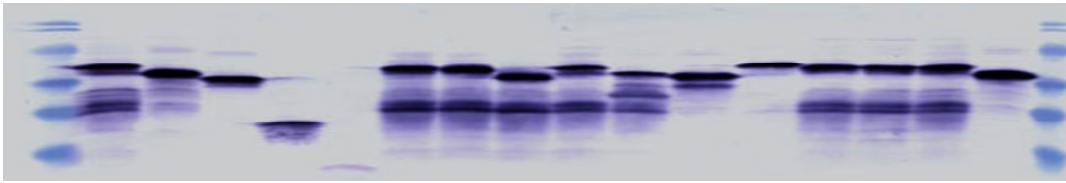


Fig. 31 欠損型および変異型 KRP による CYCD2/CDKA の阻害
 作製した KRP タンパク質の抗 HA 抗体による western blot を上段に示した。これらを CYCD2/CDKA のリン酸化反応系に添加した場合のリン酸化シグナルをグラフ化して下段に示した。mock はタンパク質合成プラスミドを加えずに反応を行った *in vitro* 転写翻訳系の溶液で、ネガティブコントロールとして用いた。

3-4 考察

KRP の生理的機能がどの領域の一次構造に起因するかを知るために、部位欠損および変異型の KRP 変異体を用いた解析を行った。従来の *KRPI* を高発現する植物体の解析では、C 末端側の相同領域のみを高発現した方が全長を高発現したものよりも顕著に表現型が現れると報告され(Zhou et al., 2003a)、N 末端側の配列が KRP タンパク質の安定性などの生理的な調節に働いている可能性を論じている。しかし、高生産されたタンパク質の定量を行っていないことや、一種類の欠損変異体しか比較対象としていないなど、完全な証明に至っていない印象を受ける。一方、本研究の結果でも、N 末端側の構造は直接 CDK 活性の阻害作用に影響しなかったが、推定リン酸化部位を持つ KRP が実際にサイクリン/CDK の基質となり得ることが示唆され(Fig. 23)、N 末端側に多く存在する推定リン酸化部位などの特徴的な配列(緒言 Fig. 5)が生理的な役割を有する可能性が考えられる(Fig. 32)。今回は KRP のリン酸化に関して、予め作製していた KRP3 由来のペプチドを用いたため、native なタンパク質を用いたより詳細な解析が必要であるが、今後これらの変異体を高発現する植物体を用いた解析により、これらのモチーフの生理的な機能が明らかになるだろう。

今回作製した KYNF/YD モチーフの変異体である KRP7YY タンパク質は CYCD2/CDKA に対する結合および阻害作用のみを限定的に失っていると考えられ、KRP とサイクリン/CDK との相互作用の機構を考える上で特に有用である。KRP7YY および C 末端側の相同領域を一部でも欠損した KRP は阻害活性を示さず(Fig. 31)、KRP7YY は活性型の CYCD2/CDKA 複合体に結合しないことから(Fig. 26)、KRP のサイクリン/CDK に対する相互作用は、結合と阻害が相関する機構であることが示唆された。つまり KRP7YY は少なくとも活性型の CYCD2/CDKA 複合体に結合できないために CDK 活性を阻害できない。これは動物の CIP/KIP ファミリーで考えられている阻害機構とも一致し、CIP/KIP 型の CKI との共通性が示唆される。一方で、KRP7YY は CDK 阻害活性を失っているにも関わらず、植物体内で高蓄積することにより葉の形態異常が認められたことから(Fig. 29)、形態形成に与える KRP の作用には CDK 阻害作用が関与しないことが強く示唆された。ひとつの可能性としては、他の KRP タンパク質に対してドミナント的な影響が現れ、KRP ファミリーの CDK 阻害活性制御に間接的に働いたことが考えられる。しかし、KRP7YY-GFP と KRP7YY Δ N-GFP を高発現する植物体において、植物体のサイズが GFP コントロールと変わらず成長の阻害は観察されず、しかも *KNAT6* 遺伝子の発現が顕著に上昇していたことから、これらが細胞周期制御とは無関係に、形態形成に関する遺伝子の発現制御に影響したと考えられる(Fig. 32)。 *KNAT6* 遺伝子は、シロイヌナズナの

KNOX 遺伝子群に属し、*STM* 遺伝子、*KNAT1*(*BP*)遺伝子、*KNAT2* 遺伝子とともに class I ファミリーに数えられ、これらは植物の葉原基の形成において主要な役割を担う (Reiser et al., 2000)。 *KNOX*-class I ファミリーは花序分裂組織やシュート頂分裂組織 (shoot apical meristem ; SAM)を含む領域で特異的に発現しており、SAM の周辺部 (peripheral zone ; PZ)の葉原基予定領域(P0)で葉原基形成の惹起に先立って *STM* と *KNAT1* の mRNA が消失する。一方 *BP* を CaMV35S プロモーター支配下で強制発現したシロイヌナズナ植物体は形態に特徴的な表現型を示すことが古くから注目を集め(Chuck et al., 1996., Lincoln et al., 1994)、*KNOX* 遺伝子の機能解明が進展した。さらに *ASYMMETRIC LEAVES1,2* (*ASI,2*)や *BLADE ON PETIOLE1* (*BOPI*)などが *KNOX* 遺伝子群の調節因子として形態形成の制御に働くことが示され(Byrne et al., 2000, Ori et al., 2000, Semiarti et al., 2001, Ha et al., 2003,2004)、植物の形態形成における遺伝子発現の調節が非常に複雑なネットワークにより制御されていることが分かってきた。植物体においてこれらの遺伝子の発現を変化させると葉の形態に異常が見られるものが多く、*KRP* の高発現植物体で葉がギザギザになる表現型と類似した形態異常が観察されている。今回 *KRP7*YY-GFP を高発現した植物体において *KNAT6* 遺伝子の発現上昇が認められたことは、*KRP* が形態形成制御遺伝子の発現に影響を与えることを示す初めての結果であり、*KRP* の形態形成への作用が細胞周期制御に非依存的であることを示唆することとなった。近年、植物の *KNOX* 遺伝子群と植物ホルモンや細胞周期制御因子との相互調節機構の解析が進められつつあるが(Harrar et al., 2003, Rosin et al., 2003, Mele et al., 2003, Doerner, 2003, Jung et al., 2005)、これらの遺伝子群の発現は環境要因にも大きく影響を受け、多くの遺伝子が複雑な相互調節ネットワークを形成している。植物の成長過程において、*KRP* は細胞周期制御遺伝子としてのみならず形態形成制御遺伝子としての役割を担うことが示唆され、*KRP* の機能解析の進展により細胞周期と形態形成の関連性が明らかになることが期待される。

KRP の C 末端側の相同領域と、これに含まれる *KYNF/YD* モチーフに着目し、*KRP2* と *KRP7* を用いて欠損型および変異型の *KRP* 変異体を作製して、*CDK* 活性の阻害作用に関与する *KRP* の一次構造の解析を行った(Fig. 30)。今回は *in vitro* 転写翻訳系を用いることによって、より多くの *KRP* 変異体の解析が可能となったが、最終的には精製されたタンパク質を用いた解析が必要となるため、大腸菌で発現させた組み換えタンパク質の精製に成功している中で(Fig. 25)、*KRP2* と *KRP7* を用いることにした。*KRP2* を段階的に欠損した変異体では、N 末端側を大きく欠いても相同領域全体が保持されているものは阻害活性を有するが、相同領域を少しでも失ったものは阻害能を示さなかった。また、*KYNF/YD* モチーフを *KYYYYD* としたものは全て阻害能を失っていた(Fig. 31)。これにより、*KRP* が *CDK* 活性を阻害するためには、*KYNF/YD* モチーフを含めた相同領域の全体が必要であり、逆に、N 末端側の

構造は直接的には阻害作用に影響しないことが示唆された(Fig. 32)。しかし、KRPのC末端側の一次構造を比較すると、7種のKRP全てに保存されているアミノ酸は10個以上あり、KYNF/YDモチーフと同様にこれらのアミノ酸配列が阻害活性に寄与する可能性は非常に高いと考えられる。また、p27^{Kip1}の保存領域の解析ではdomain 1 - linker helix - domain 2の構造が重要と考えられているが(Lacy et al., 2004)、KRPにも共通なdomain 2の構造に加えて、植物のCKIに特有な相同領域の二次構造が重要である可能性も考えられる。

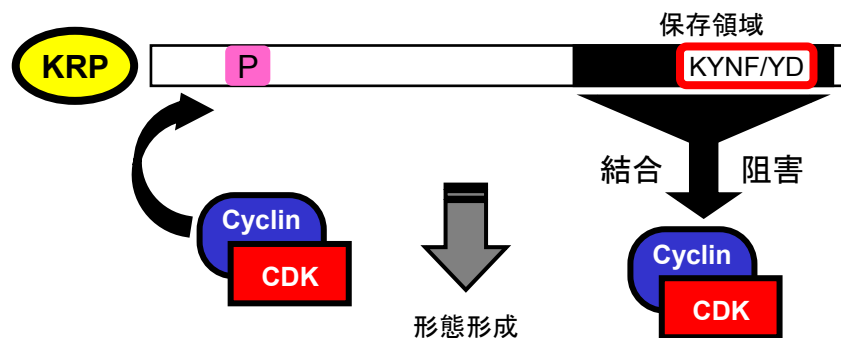


Fig. 32 KRPの機能領域の働き

KRPはいくつかの働きを担う領域を別々に備えていると考えられる。サイクリン/CDKへの結合および阻害の働きはKYNF/YDモチーフを含む保存領域が担っている。推定リン酸化部位はサイクリン/CDKにリン酸化される可能性があり、保存領域以外の領域が形態形成制御遺伝子の発現調節に関与すると思われる。

CIP/KIPファミリーのサイクリン/CDKに対する阻害は、基本的にサイクリン/CDK/CKIの複合体の形成によりなされると考えられており、本研究でもKRPの結合と阻害が相関することを示唆する結果が得られた(Fig. 25, Fig. 26)。一方で、CYCD2/CDKA複合体のリン酸化阻害実験では、約0.6pmolのCYCD2と約1.3pmolのCDKAが存在する反応系にKRP2およびKRP6を4pmol加えた場合にも40%程の残存活性が認められた(Fig. 25)。CYCD2/CDKAサンプル中において実際に存在するサイクリン単量体とCDK単量体およびCYCD2/CDKA複合体のモル比は分からないが、少なくとも活性を示すためには複合体を形成している必要がある。したがって、反応系におけるKRPは活性型CYCD2/CDKA複合体のモル数に対して大量であると考えることができ、それにもかかわらず活性が認められたことより、少なくともKRPタンパク質単独ではCYCD2/CDKA複合体に1分子以上結合してもリン酸化活性を完全に抑制できないか、溶液中でKRPとCYCD2/CDKA複合体が安定な三量体を形成せずにそれぞれ単独で存在する平衡状態をとると考えられる。今後、サイクリン/CDK/KRPの三量体のみを回収してこれら三量体が活性を持つ可能性の検討や、三者の相互作用の安定性についての動力的な解析により、KRPの結合および阻害の機構について理解が進むと期待される。本研究において、KRPタンパク質の相互作用がサイクリンやCDK単量体に対して弱く複合体に対して強いことが示唆され(第一章 Fig. 7)、KRPの動力的な挙動を知る上で意義深い知見が得られたと

共に、KRP の性質としてサイクリン/CDK 複合体の形成促進作用を持つ可能性は低いことが示唆された(第二章考察)。但し、生体内では KRP が他の因子と共に複合体形成などに働いている可能性は残されており、例えば広く細胞周期因子に作用する CKS が KRP のタンパク質間相互作用に関与している可能性は十分考えられる。CKS ファミリーに共通する機能として APC ubiquitin ligation complex を介した CDK 複合体の分解制御が知られているが、ヒト CKS1 は p27^{KIP1} が分解される時の SCF (Skp-Cullin-Fbox protein)-ubiquitin ligation complex へのターゲティングに機能することが示され(Ganoth et al., 2001)、CKS タンパク質の立体構造解析から得られた知見を基に p27^{KIP1} のユビキチン化における CKS1 の構造部位の働きを調べた報告では、各因子の結合により立体構造の変化が起こり、CKS1-CDK2-p27^{KIP1}-Skp2 の結合特性が変化することが明らかになった(Sitry et al., 2002, Seeliger et al., 2003)。p27^{KIP1} は CDK2(cyclin E/CDK2)に相互作用してリン酸化されることが引き金となり、CKS1(CKS1/Skp2)との結合およびそれに続くユビキチン化が促進される。本研究で *CaMV35S::KRP7YY-GFP* 形質転換植物体にプロテアソーム阻害剤(MG132)を作用させた実験では、微弱な GFP 蛍光の増強が認められる結果となった(Fig. 28)。CDK(および CKS)との相互作用機能を欠く KRP7YY は、植物体においてユビキチン化の標的となるためのシグナルを受けられずにプロテアソーム系の分解を受けない可能性があり、今回のようにプロテアソーム阻害剤でタンパク質分解を阻害した場合は、影響が現れにくかったことが考えられる。これまでのところ、KRP と CKS との相互作用についての解析は行われていないが、上記のような酵母や動物の知見および、KRP のユビキチン-プロテアソーム系による分解調節を示唆する結果(Verkest et al., 2005)から、シロイヌナズナにおいても CKS が KRP の機能調節に関与している可能性は高いと考えられる。結合と阻害の機能を欠く KRP7YY タンパク質の植物体内における挙動の解析は、これらの機構に関わる相互作用についても新たな知見を与えるものと期待する。

総括

細胞周期の研究分野では、遺伝学的研究の容易性や癌研究との関連性から、酵母や動物を材料とした解析が盛んに進められ、数々の細胞周期関連遺伝子の単離や機能解析を経て、真核生物の細胞周期制御機構の概要が明らかになるようとしている。細胞周期制御において中心的な役割を果たすサイクリン/CDK 複合体の活性は、サイクリンの合成や分解、CDK の修飾や阻害因子など、多くの要因が関与する複雑な制御ネットワークによって厳密に制御されている。その中でも、多様な機能を有することが明らかとなってきた CKI は、現在、研究対象として最も注目を集める細胞内因子のひとつである。高等植物における細胞周期に関する研究は、現在までに酵母や動物の細胞周期制御因子のホモログが整備されつつあり、研究の進展は著しいが、未だ断片的な成果しか得られておらず、細胞周期の複雑な制御ネットワークを理解するために解決されるべき課題は多く残されている。動物の CKI が細胞周期制御因子としてのみならず細胞死や発生・分化にも重要な働きを担う因子として、細胞の運命決定に関与する遺伝子であることから、植物の CKI 遺伝子に関しても、動物とは大きく異なる特徴を持つ植物において CKI がどのような生理機能を担っているかを理解することは、細胞周期や形態形成に関して植物に特有な現象を理解する上でも重要である。

酵母や動物の CKI はサイクリンおよび CDK に直接結合してそのリン酸化活性を阻害するタンパク質性の因子として定義されている。シロイヌナズナのゲノム上に既知の CKI と相同性を示す CKI 遺伝子はこれまで KRP1-7 のみが同定され、これらは全て動物の p27^{Kip1} と最も高い相同性を示すため CIP/KIP タイプの CKI であると考えられ、シロイヌナズナには INK4 タイプの CKI は同定されていない。また、動物において代表的な癌抑制遺伝子である p53 と相同性を示す遺伝子が植物に存在しないことから、植物の細胞周期制御は動物とは明らかに異なる機構を備えていると言える。動物では G1/S 期に cyclin D と cyclin E が協調して Rb タンパク質を順次リン酸化し S 期への進行を促進することが知られるが、植物には cyclin E ホモログや cyclin D のパートナーである CDK4,6 のホモログが無く、CDK4,6 に対して cyclin D と結合を競合する INK4 タイプの CKI も存在しない。この事実は、酵母や動物に比べて、植物の CKI 遺伝子が機能的により広範囲に及ぶ役割を担うものであることが予想され、かつ柔軟な環境適応能を有する植物細胞の運命決定において CKI が植物に特有の機能を備える可能性は十分に考えられる。シロイヌナズナの *SIAMESE(SIM)* 変異体ではトライコームが野生型のように 1 細胞からなる倍数体(約 20~32C)とは異なり、核内倍化が減少して多細胞からなる(Walker et al., 2000)。最近 *SIM* 遺伝子が単離され、約 14kDa のタンパク質をコードする 4 つの遺伝子ファミリー

一を構成し、KRP と限定的に相同性を示すことが明らかになり、G2/M 期制御に関与すると推定されている(Speckhart et al., 2005)。SIM 遺伝子は植物に広く存在し、動物には相同性を示す遺伝子が無いことから、今後植物に特有な現象を理解する上で重要な研究材料を提供することになると考えられる。また SIM 変異体のようにシロイヌナズナ変異体を用いた解析から、ゲノム解析では同定されていなかった遺伝子で、既知の細胞周期制御遺伝子と限定的に相同性を示す遺伝子やまったく新規の細胞周期制御遺伝子が同定される可能性も示唆している。

本研究を通じてシロイヌナズナの CDK inhibitor である KRP に関して多くの新しい知見が得られ、特に以下の点において顕著な成果をあげた。1) KRP タンパク質の性質を解析して細胞周期制御因子の位置づけとなる基礎的な知見を提供することとどまらず、KRP の相互作用がそれぞれに特有で、かつ標的サイクリン/CDK の種類によっても異なることを示した。2) *In vivo* から調製したサイクリン/CDK に対する KRP の阻害活性を解析し、生体内での KRP の相互作用が、細胞周期に伴って変動するサイクリン/CDK の種類や状態に影響されることを示唆した。3) KRP の機能領域についてアミノ酸配列の解析を行い、阻害には相同領域が必要十分であることを示すとともに、阻害活性に重要なモチーフ(KYNF/YD)を初めて明らかにした。4) KRP が形態形成制御遺伝子の発現に影響を与えることを初めて示し、KRP の形態形成への作用が細胞周期制御に非依存的であることを示唆した。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました新名 惇彦 教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始丁寧で根気強い御指導と数多くの有益な御助言を賜りました関根 政実 助教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を進める上で、研究の心構えなどを含め、終始有意義な御指導、御助言を賜りました吉田 和哉 助教授、加藤 晃 助手、仲山 英樹 助手に心より感謝申し上げます。

本研究に関して惜しみない御協力、適切な御助言を頂きました東京大学の梅田 正明 助教授、名古屋大学の伊藤 正樹 助教授、ウィーン大学の中神 弘史 博士に深く感謝いたします。

共に植物の細胞周期に関する研究を行いながら、非常に有益な御助言ならびに御指導を頂き、日々様々な面で大変お世話になりました岩川 秀和 博士、上向 健司 博士、河村 和恵 博士、原島 洋文 氏、平野 博人 氏に心より感謝いたします。

日々の研究に多方面からの御協力を頂きました松井 健史 博士、市川 雄彦 氏、志澤 暢子 氏はじめ、植物代謝調節学講座の皆様に感謝いたします。

最後に、精神的ならびに経済的に支えて頂いた、両親と家族に感謝します。

参考文献

Bates, S., Ryan, K. M., Phillips, A. C., and Vousden, K. H. (1998). Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression. *Oncogene* 17, 1691-1703.

Bienkiewicz, E. A., Adkins, J. N., and Lumb, K. J. (2002). Functional consequences of preorganized helical structure in the intrinsically disordered cell-cycle inhibitor p27(Kip1). *Biochemistry* 41, 752-759.

Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Bisbis, B., Delmas, F., Joubes, J., Sicard, A., Hernould, M., Inze, D., Mouras, A., and Chevalier, C. (2006). Cyclin-dependent kinase inhibitors regulate the CDK/cyclin complex activities in endoreduplicating cells of developing tomato fruit. *J Biol Chem.* (in press)

Blain, S. W., Montalvo, E., and Massague, J. (1997). Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J Biol Chem* 272, 25863-25872.

Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R. A. (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* 408, 967-971.

Carrano, A. C., Eytan, E., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1, 193-199.

Chang, B. D., Broude, E. V., Fang, J., Kalinichenko, T. V., Abdryashitov, R., Poole, J. C., and Roninson, I. B. (2000). p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells. *Oncogene* 19, 2165-2170.

Chuck, G., Lincoln, C., and Hake, S. (1996). KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8, 1277-1289.

Coelho, C. M., Dante, R. A., Sabelli, P. A., Sun, Y., Dilkes, B. P., Gordon-Kamm, W. J., and Larkins, B. A. (2005). Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication. *Plant Physiol* 138, 2323-2336.

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

De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., and Inze, D. (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1653-1668.

De Veylder, L., de Almeida Engler, J., Burssens, S., Manevski, A., Lescure, B., Van Montagu, M., Engler, G., and Inze, D. (1999). A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta* 208, 453-462.

Denicourt, C., and Dowdy, S. F. (2004). Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev* 18, 851-855.

Dewitte, W., and Murray, J. A. (2003). The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* 54, 235-264.

Doerner, P. (2003). Plant meristems: a merry-go-round of signals. *Curr Biol* 13, R368-374.

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.

Ferreira, P. C., Hemerly, A. S., Villarroel, R., Van Montagu, M., and Inze, D. (1991). The *Arabidopsis* functional homolog of the p34cdc2 protein kinase. *Plant Cell* 3, 531-540.

Ganoth, D., Bornstein, G., Ko, T. K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M., and Hershko, A. (2001). The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol* 3, 321-324.

Gloghini, A., Gaidano, G., Larocca, L. M., Pierconti, F., Cingolani, A., Dal Maso, L., Capello, D., Franceschi, S., Tirelli, U., Libra, M., et al. (2002). Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in AIDS-related diffuse large-cell lymphomas is associated with Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Am J Pathol* 161, 163-171.

Ha, C. M., Jun, J. H., Nam, H. G., and Fletcher, J. C. (2004). *BLADE-ON-PETIOLE1* encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45, 1361-1370.

Ha, C. M., Kim, G. T., Kim, B. C., Jun, J. H., Soh, M. S., Ueno, Y., Machida, Y., Tsukaya, H., and Nam, H. G. (2003). The *BLADE-ON-PETIOLE 1* gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in *Arabidopsis*. *Development* 130, 161-172.

Harrar, Y., Bellec, Y., Bellini, C., and Faure, J. D. (2003). Hormonal control of cell proliferation requires *PASTICCINO* genes. *Plant Physiol* 132, 1217-1227.

Hartwell, L. H., Culotti, J., and Reid, B. (1970). Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66, 352-359.

Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S., Mullineaux, P. M. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 42, 819-832.

Hirayama, T., Imajuku, Y., Anai, T., Matsui, M., and Oka, A. (1991). Identification of two cell-cycle-controlling *cdc2* gene homologs in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 105, 159-165.

Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S., and Hoekema, A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2:208-218.

Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makker, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., et al. (1998). The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol* 37, 155-169.

Imajuku, Y., Hirayama, T., Endoh, H., and Oka, A. (1992). Exon-intron organization of the *Arabidopsis thaliana* protein kinase genes CDC2a and CDC2b. *FEBS Lett* 304, 73-77.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Inze, D. (2005). Green light for the cell cycle. *EMBO J* 24, 657-662.

Inze, D., Gutierrez, C., and Chua, N. H. (1999). Trends in plant cell cycle research. *Plant Cell* 11, 991-994.

Jasinski, S., Perennes, C., Bergounioux, C., and Glab, N. (2002). Comparative molecular and functional analyses of the tobacco cyclin-dependent kinase inhibitor NtKIS1a and its spliced variant NtKIS1b. *Plant Physiol* 130, 1871-1882.

Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. and Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320.

Joubes, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inze, D., Umeda, M. and Renaudin, J. P. (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol Biol* 43, 607-620.

Jung, J. H., Yun, J., Seo, Y. H., and Park, C. M. (2005). Characterization of an *Arabidopsis* gene that mediates cytokinin signaling in shoot apical meristem development. *Mol Cells* 19, 342-349.

Kaldis, P., Russo, A. A., Chou, H. S., Pavletich, N. P., and Solomon, M. J. (1998). Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol Biol Cell* 9, 2545-2560.

Kawamura, K., Murray, J. A., Shinmyo, A. and Sekine, M. (2006). Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase *in vitro*. *Plant Mol Biol* (in press).

Kikuchi, J., Furukawa, Y., Iwase, S., Terui, Y., Nakamura, M., Kitagawa, S., Kitagawa, M., Komatsu, N., and Miura, Y. (1997). Polyploidization and functional maturation are two distinct processes during megakaryocytic differentiation: involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in polyploidization. *Blood* 89, 3980-3990.

Kiyokawa, H., Kineman, R. D., Manova-Todorova, K. O., Soares, V. C., Hoffman, E. S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A. C., Frohman, L. A., and Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85, 721-732.

Kono, A., Umeda-Hara, C., Lee, J., Ito, M., Uchimiya, H., and Umeda, M. (2003). *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiol* 132, 1315-1321.

Kriwacki, R. W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S. I., and Wright, P. E. (1996). Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11504-11509.

LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11, 847-862.

Lacy, E. R., Wang, Y., Post, J., Nourse, A., Webb, W., Mapelli, M., Musacchio, A., Siuzdak, G., and Kriwacki, R. W. (2005). Molecular basis for the specificity of p27 toward cyclin-dependent kinases that regulate cell division. *J Mol Biol* 349, 764-773.

Lacy, E. R., Filippov, I., Lewis, W. S., Otieno, S., Xiao, L., Weiss, S., Hengst, L., and Kriwacki, R. W. (2004). p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding. *Nat Struct Mol Biol* 11, 358-364.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lee, J., Das, A., Yamaguchi, M., Hashimoto, J., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., and Umeda, M. (2003). Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase. *Plant J* 34, 417-425.

Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K., and Hake, S. (1994). A knotted1-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* 6, 1859-1876.

Lui, H., Wang, H., Delong, C., Fowke, L. C., Crosby, W. L., and Fobert, P. R. (2000). The *Arabidopsis* Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro. *Plant J* 21, 379-385.

Mele, G., Ori, N., Sato, Y., and Hake, S. (2003). The knotted1-like homeobox gene *BREVIPEDICELLUS* regulates cell differentiation by modulating metabolic pathways. *Genes Dev* 17, 2088-2093.

Menges, M., de Jager, S. M., Gruijsem, W., and Murray, J. A. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* 41, 546-566.

Menges, M., and Murray, J. A. (2004). Cryopreservation of transformed and wild-type *Arabidopsis* and tobacco cell suspension cultures. *Plant J* 37, 635-644.

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

Nakagami, H., Kawamura, K., Sugisaka, K., Sekine, M., and Shinmyo, A. (2002). Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* 14, 1847-1857.

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

Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N., et al. (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J* 19, 2069-2081.

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., and Loh, D. Y. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85, 707-720.

Niculescu, A. B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S. I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 18, 629-643.

Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211, 90-98.

Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J. L., and Hake, S. (2000). Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* 127, 5523-5532.

Ormenese, S., de Almeida Engler, J., De Groot, R., De Veylder, L., Inze, D., and Jacquard, A. (2004). Analysis of the spatial expression pattern of seven Kip related proteins (KRPs) in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot (Lond)* 93, 575-580.

Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 308, 697-711.

Pines, J. (1996). Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr Biol* 6, 1399-1402.

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

Reiser, L., Sanchez-Baracaldo, P., and Hake, S. (2000). Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of *knox* homeobox genes. *Plant Mol Biol* 42, 151-166.

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., Sundaesan, 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.

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.

Rosin, F. M., Hart, J. K., Horner, H. T., Davies, P. J., and Hannapel, D. J. (2003). Overexpression of a knotted-like homeobox gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation. *Plant Physiol* 132, 106-117.

Ruggiero, B., Koiwa, H., Manabe, Y., Quist, T. M., Inan, G., Saccardo, F., Joly, R. J., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., and Maggio, A. (2004). Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *stol/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136, 3134-3147.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-331.

Sauter, M. (1997). Differential expression of a CAK (cdc2-activating kinase)-like protein kinase, cyclins and cdc2 genes from rice during the cell cycle and in response to gibberellin. *Plant J* 11, 181-190.

Schnittger, A., Weinl, C., Bouyer, D., Schobinger, U., and Hulskamp, M. (2003). Misexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1/KRP1 in single-celled *Arabidopsis* trichomes reduces endoreduplication and cell size and induces cell death. *Plant Cell* 15, 303-315.

Seeliger, M. A., Breward, S. E., Friedler, A., Schon, O., and Itzhaki, L. S. (2003). Cooperative organization in a macromolecular complex. *Nat Struct Biol* 10, 718-724.

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

Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C., and Machida, Y. (2001). The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* 128, 1771-1783.

Sheaff, R. J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J. M., and Clurman, B. E. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* 11, 1464-1478.

Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.

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

Sitry, D., Seeliger, M. A., Ko, T. K., Ganoth, D., Breward, S. E., Itzhaki, L. S., Pagano, M., and Hershko, A. (2002). Three different binding sites of Cks1 are required for p27-ubiquitin ligation. *J Biol Chem* 277, 42233-42240.

Sivakolundu, S. G., Bashford, D., and Kriwacki, R. W. (2005). Disordered p27Kip1 exhibits intrinsic structure resembling the Cdk2/cyclin A-bound conformation. *J Mol Biol* 353, 1118-1128.

Soni, R., Carmichael, J. P., Shah, Z. H., and Murray, J. A. (1995). A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7, 85-103.

Speckhart, M., Brown, M., Kirik, V., Hulskamp, M., Inze, D., De Veylder, L., Walker, J., Gwin, T., Churchman, J. and Larkin, J. (2005). Characterization of *SIAMESE*, a putative cell cycle regulator involved in endoreplication. 16th International Conference on Arabidopsis Research, Madison, USA, Abstract #123.

Sutterluty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Muller, U., and Krek, W. (1999). p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* 1, 207-214.

Tomoda, K., Kubota, Y., Arata, Y., Mori, S., Maeda, M., Tanaka, T., Yoshida, M., Yoneda-Kato, N., and Kato, J. Y. (2002). The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem* 277, 2302-2310.

Tomoda, K., Kubota, Y., and Kato, J. (1999). Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature* 398, 160-165.

Tsukaya, H. (2003). Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol.* 6, 57-62.

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.

Verkest, A., Manes, C. L., Vercruyse, 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.

Walker, J. D., Oppenheimer, D. C., Concienne, J. and Larkin, J. C. (2000). *SIAMESE*, a gene controlling the endoreduplication cell cycle in *Arabidopsis thaliana* trichomes. *Development*. 127, 3931-3940.

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., Zhou, Y., Gilmer, S., Cleary, A., John, P., Whitwill, S., and Fowke, L. (2003). Modifying plant growth and development using the CDK inhibitor ICK1. *Cell Biol Int* 27, 297-299.

Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S., and Fowke, L. C. (2000). Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J* 24, 613-623.

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.

Weinl, C., Marquardt, S., Kuijt, S. J., Nowack, M. K., Jakoby, M. J., Hulskamp, M., and Schnittger, A. (2005). Novel functions of plant cyclin-dependent kinase inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis. *Plant Cell* 17, 1704-1722.

Zhang, H., Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 8, 1750-1758.

Zhou, Y., Li, G., Brandizzi, F., Fowke, L. C., and Wang, H. (2003a). The plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 has distinct functional domains for *in vivo* kinase inhibition, protein instability and nuclear localization. *Plant J* 35, 476-489.

Zhou, Y., Wang, H., Gilmer, S., Whitwill, S., and Fowke, L. C. (2003b). Effects of co-expressing the plant CDK inhibitor ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216, 604-613.

Zhou, Y., Wang, H., Gilmer, S., Whitwill, S., Keller, W., and Fowke, L. C. (2002). Control of petal and pollen development by the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 in transgenic *Brassica* plants. *Planta* 215, 248-257.

大坪素秋, 三井薫, 大塚哲. (1999) 細胞周期と癌(実験医学増刊,17-5: 羊土社) ; pp.86-91

河村和恵, 博士論文 (2004) タバコサイクリン D3 遺伝子の機能解析. 奈良先端科学技術大学院大学

杉本昌隆, 原英二. (1999) 細胞周期と癌(実験医学増刊,17-5: 羊土社) ; pp.80-85

大門靖史, 阿部光知, 荒木崇. (2005) 改訂 3 版モデル植物の実験プロトコール (細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 21) ; pp.149-154

中神弘史, 博士論文 (2000) タバコサイクリン D3 の機能解析. 奈良先端科学技術大学院大学

野島博, (2000) 新細胞周期のはなし(実験医学バイオサイエンス BS-32: 羊土社) ; pp.12-16