

博士論文番号：0581019

シヨ糖飢餓による細胞周期停止に関わるシロイヌナズナ
RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1 (AtRBR1)

遺伝子の機能解析

平野 博人
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)
2008年3月14日提出

目次

1. 略語	5
2. 序論	7
3. 材料と方法	12
3-1 使用植物、菌株、プラスミド	12
3-1-1 使用植物	12
3-1-2 使用菌株	12
3-1-3 使用ベクター	12
3-2 培地、植物細胞の培養	12
3-2-1 大腸菌	12
3-2-2 植物細胞の培養	13
3-3 実験試薬、酵素	13
3-4 大腸菌コンピテントセルの調製	14
3-5 大腸菌の形質転換	14
3-6 プラスミド DNA の少量調製	14
3-7 DNA の電気泳動および DNA 断片の回収	15
3-8 塩基配列の決定	15
3-8-1 ポリメラーゼ反応	15
3-8-2 サンプルの調製	15
3-9 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	15
3-10 Western Blotting	16
3-10-1 アルカリホスファターゼ酵素発色法	16
3-10-2 ECL Plus 化学発光法	17
3-11 大腸菌発現系による組み換えタンパク質の調製	17
3-11-1 GST-tag 融合タンパク質発現用プラスミドの構築	17
3-11-2 大腸菌による GST-AtRBR1 の生産	17
3-11-3 粗抽出液から組み換えタンパク質の精製	18

3-11-4	MBP tag 融合 E2Fa のプラスミド構築と大腸菌による生産、粗抽出液から組み換えタンパク質の精製	18
3-12	抗体の作製	18
3-12-1	IgG 精製	19
3-12-2	抗体精製用アフィニティーカラムの作製	19
3-12-3	アフィニティーカラムを用いた抗体の精製	20
3-13	シロイヌナズナ MM2d 細胞の培養方法	20
3-13-1	MM2d 細胞の細胞サイズと細胞数、新鮮重量の測定	20
3-13-2	MM2d 細胞のショ糖飢餓培地への交換	20
3-14	シロイヌナズナ MM2d 細胞の粗抽出液の調製	21
3-15	粗抽出液のタンパク質濃度の定量	21
3-16	粗抽出液からの免疫沈降 (IP)	21
3-17	RNA の精製	21
3-18	RT-PCR	22
3-18-1	DNase 処理	22
3-18-2	Reverse Transcription 反応	22
3-18-3	プライマーの設計	22
3-18-4	リアルタイム PCR による定量的 RT-PCR	23
3-19	形質転換 MM2d 細胞の作製	23
3-19-1	誘導系 AtRBR1 RNAi 発現細胞のための構築	23
3-19-2	HA (ヘマグルチニン) 融合 E2Fa 発現細胞のための構築	24
3-20	アグロバクテリウム法による培養細胞の形質転換	25
3-20-1	アグロバクテリウムへのバイナリープラスミドの導入	25
3-20-2	シロイヌナズナ培養細胞 MM2d の形質転換	25
3-21	脱リン酸化処理 (CIP 処理)	25
3-22	LSC (Laser Scanning Cytometer) による DNA 含量測定	26
3-23	Partec PA を用いた DNA 含量の測定	26
3-24	ChIP 実験	26

4. 結果	28
4-1 MM2d 細胞を用いた AtRBR1 の機能解析	28
4-1-1 AtRBR1 タンパク質は G1/S 移行期で高リン酸化される	28
4-1-2 高リン酸化型 AtRBR1 は E2F と結合しない	30
4-1-3 <i>in vivo</i> において AtRBR1 と E2Fa は <i>PCNA1</i> 遺伝子のプロモーターに結合する	30
4-2 AtRBR1 の抑制系を用いた機能解析	41
4-2-1 誘導系 RNAi によって AtRBR1 を抑制した細胞の表現型	41
4-2-2 AtRBR1 の長期の抑制は G2 期での遅延を引き起こす	42
4-2-3 AtRBR1 を抑制することによりシヨ糖飢餓で G2 期停止する細胞割合が増加する	44
4-2-4 AtRBR1 の抑制によりシヨ糖飢餓においても E2F 制御遺伝子が転写活性化される	45
4-2-5 シヨ糖飢餓において AtRBR1 はプロテアソーム系で分解される	46
4-2-6 シヨ糖飢餓において E2Fa、E2Fb、E2Fc も分解される	47
5. 考察	61
5-1 MM2d 細胞を用いた AtRBR1 の機能解析	61
5-1-1 AtRBR1 は G1/S 移行期で高リン酸化され、高リン酸化型 AtRBR1 は E2F と結合できない	61
5-1-2 AtRBR1 および E2F-3HA は <i>PCNA1</i> プロモーターの E2F 結合配列を含む領域に結合して転写制御に関わっている	62
5-2 AtRBR1 の抑制系を用いた機能解析	63
5-2-1 AtRBR1 の抑制により細胞サイズが減少し、さらに G1 期の細胞停止を引き起こせなくなる	63
5-2-2 AtRBR1 はシヨ糖飢餓での G1 期停止に関わっている	65
5-2-3 AtRBR1、E2Fa-3HA はシヨ糖飢餓で分解する	67
6. 謝辞	71
7. 参考文献	72
8. 論文目録	82

1. 略語

Amp ; Ampicillin

APS ; Ammonium persulfate

BCIP ; 5-bromo-4chloro-3indyl-phosphate

BPB ; Bromophenol blue

BSA ; Bovine serum albumin

Cb ; Carbenisillin

CDC6 ; Cell division cycle 6

CDK ; Cyclin-dependent kinase

ChIP ; Chromatin immno-precipitation

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

dNTP ; deoxyribonucleoside triphosphate

DMSO ; Dimethylsulfoxide

DP ; DNA-binding heterodimerization partner protein

DTT ; Dithiothreitol

E2F ; Adenovirus E2 promoter-binding factor

EDTA ; Ethylenediaminetetraacetic acid

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

GST ; Glutathione *S*-transferase

HA ; Hemagglutinin

hER ; human estrogen reseptor

Hyg; hygromycin B

IP ; Immunoprecipitation

Km ; kanamycin

LS ; Linsmaier and Skoog medium

MBP ; Maltose-binding protein

MCM ; Minichromosome maintenance

MES ; 2- (N-morpholino) ethanesulfonic acid

NBT ; 4-nitro blur tetrazolium chloride

NP-40 ; Nonidet P-40

ORC ; Origin recognition complex

PCNA ; Proliferating cell nuclear antigen

PIPES ; piperazine-1,4-bis (2-ethanesulfonic acid)

PMSF ; Phenylmethanesulphonylfluoride

RNAi ; RNA interference

RNR ; Ribonucleotide reductase

Spec ; Spectinomycin

Tween20 ; polyoxyethylene sorbitan monolaurate

WCE ; Whole cell extract

2. 序論

植物は動物と異なり自ら動くことができないため、外部環境に柔軟に応答しながら生長している。植物は光のエネルギーを用いて炭素固定を行い、デンプンやショ糖を合成して栄養源とし、その後、合成されたデンプンやショ糖を用いて自身を生長させていく。当然、光合成が活発な状況ではショ糖、デンプンなどの炭素源が豊富に存在するため細胞分裂も盛んに起こる。しかし光条件が悪くなり光合成ができない状況になると、ショ糖、デンプンなどの炭素源が枯渇するため速やかに細胞分裂を停止させなくてはならない。

近年、このショ糖が栄養源としてだけではなく、重要なシグナル因子としてさまざまな遺伝子の発現調節に関わっていることが報告されている (Gupta and Kaur, 2005; Rolland et al., 2006)。シロイヌナズナ培養細胞を用いた解析から、細胞分裂の根幹を担っている細胞周期関連遺伝子群の転写、翻訳後の制御にショ糖が深く関わっていることが明らかとなってきた (Nicolai et al., 2006; Content et al., 2004)。近年のゲノム解析から、植物も動物と同様に細胞周期関連遺伝子を備えていることが明らかとなっているが、G1 期サイクリン (後述の植物細胞周期制御機構のまとめを参照) である CYCD3;1 や CYCD2;1 がショ糖に応答して転写誘導されることが報告されている (Riou-Khamlichi et al., 2000)。逆に、ショ糖飢餓の状況になるとプロテアソーム系によって CYCD3;1 タンパク質の急激な分解が引き起こされることが分かった (Planchais et al., 2004)。また、ショ糖飢餓におけるトランスクリプトーム解析も行われており、ショ糖飢餓になると E2F (後述のまとめ参照) が制御している DNA 複製に関連する遺伝子群の転写抑制が起こることも分かった (Content et al., 2004)。また、通常ショ糖が枯渇する増殖停止期ではほとんどの細胞が G1 期で細胞周期を停止することも分かっているが、CaMV35S プロモーターを用いた CYCD3;1 過剰発現体では増殖停止期、ショ糖飢餓時においても G1 期での細胞周期停止が起こらずに G2 期で停止する細胞が増加することも分かっている (Menges et al., 2006)。つまり、ショ糖存在下では CYCD3;1、CYCD2;1 などが合成され細胞周期を回し、ショ糖飢餓になると DNA 複製が停止し細胞周期を G1 期で停止させることで栄養源の枯渇に対応していると考えられる。これらの応答は G1 期に起こるイベントで、ショ糖などの栄養要因による細胞周期の応答は G1 期後期にある制御点が重要であると考えられる。動物ではこの制御点は restriction point または R 点と呼ばれ、栄養や細胞外増殖シグナルなどの

外部環境因子を感知して細胞が S 期に進み増殖に向かうか、または分化や静止期 (G0) へ向かうかの決定を行っている。この制御点において、Rb (retinoblastoma) タンパク質 (pRb) を介した Rb 経路がその制御の中心を担っていることが動物では分かっている。

Rb 遺伝子は動物からクローニングされた癌抑制遺伝子である (Dryja et al., 1986)。その後、植物でも Rb 遺伝子のホモログが存在することが明らかとなった。それらは Rb 関連遺伝子 (RBR) と呼ばれており、トウモロコシ、タバコ、シロイヌナズナ、イネなど様々な植物種で単離されている (Durfee et al., 2000; Lendvai et al., 2007)。これらの RBR タンパク質はリン酸化タンパク質で、全てにサイクリン依存性キナーゼ (CDK; cyclin-dependent kinase) による推定リン酸化部位があり、他のタンパク質との結合など機能的に重要なポケット領域で動物の pRb と特に高い相同性が見られる。また、動物と同様に LXCXE (アミノ酸の 1 文字表記で X は任意のアミノ酸) モチーフを持った動物癌ウイルスタンパク質、植物ウイルスタンパク質 RepA、AL1 と結合する (Grafi et al., 1996; Gordon-Kamm et al., 2002)。さらにタバコ RBR (NtRBR1) は LXCXE モチーフを持つタバコサイクリン D (NtCYCD3;3) と結合し、NtCYCD3;3/CDKA 複合体により *in vitro* でリン酸化されることも分かっている (Nakagami et al., 1999)。また、シロイヌナズナ RBR (AtRBR1) に T-DNA が挿入されたホモ接合体では、雌性配偶体の形成に異常が起こり胚発生以前に致死になることが報告された (Ebel et al., 2004)。さらに根特異的プロモーターを用いて RNAi (RNA interference) で AtRBR1 を抑制すると根端分裂組織の細胞数が増加することが分かり、AtRBR1 が分裂組織を正常に保つ役割を持つことも明らかとなっている (Wildwater et al., 2005)。また、動物 pRb は E2F ファミリーと結合することによって、転写活性を抑制することが知られている。転写抑制機構は 2 つのモデルがあり、1 つは E2F の転写活性化領域に直接結合して転写活性化を阻害するモデルで、2 つ目は pRb がヒストンの脱アセチル化に関わる因子をリクルートし、クロマチンレベルで転写を抑制するモデルである (Frolov and Dyson, 2004)。シロイヌナズナでも 3 種類の E2Fa、E2Fb、E2Fc が動物 E2F と類似した pRb との結合モチーフを持っており、*in vitro* で植物 RBR タンパク質との結合が示されている (Magyar et al., 2005)。また、トウモロコシ RBR がヒストン脱アセチル化に関わる因子と結合し、転写抑制に関わっていることも報告されている (Ausin et al., 2004)。

以上のように、pRb と RBR は類似点が多く機能的にも相同であると考えられるが、植物の細胞周期制御にどのように RBR が関わっているか

という基本的な課題において、動物と比較して依然として遅れているのが現状である。

このように植物でも動物 Rb 経路に関わる因子と相同性を示す因子が同定され、植物でも同様な RBR 経路が G1/S 移行期制御に重要な役割を果たすと推定されている。しかし、植物 RBR 経路は動物 Rb 経路の類推で議論されることが多く、その実体に関する実験的データは乏しい。本研究で私は RBR 経路の中心に位置する RBR タンパク質の機能解析を行った。解析するに当たり、ゲノム情報から *AtRBR1* 遺伝子 1 種類しか持たないシロイヌナズナを対象として実験を行うことにした。他の植物種ではゲノム中に複数の RBR 遺伝子が存在することが分かっており、シロイヌナズナを用いることによって遺伝子重複による複雑さを考えずに機能解析が可能である。また、ショ糖は主要な光合成産物の一つであることより、ショ糖の増殖制御に関する研究は非光合成組織を用いる必要があり、植物体を材料に用いる利点は少ない。一方で、細胞周期の同調培養が確立されているシロイヌナズナ培養細胞 MM2d では、ショ糖を飢餓状態にすることが容易にできる有利性を合わせ持つことから、RNAi により *AtRBR1* を抑制できる培養細胞で解析を行った。本研究ではこのような実験系を用いて、ショ糖飢餓における細胞分裂の停止に *AtRBR1* がどのように機能しているかについて解析することを目的とする。

植物細胞周期制御機構のまとめ

植物と動物では発生や形態形成などさまざまな違いがあるものの、全ての生物は細胞から成り立っているという面では共通性もある。細胞を増加する唯一の方法はすでに存在する細胞を分裂させることであり、細胞周期の調節機構は酵母から動物に至るまで高度に保存されている。真核生物の細胞周期は、核膜の崩壊や染色体の凝縮といった可視的な変化の起こる M 期と、それ以外の間期からなる。間期はさらに G1 期、S 期、G2 期に分けられ、方向性をもって細胞周期サイクルは進行する。これらのステップが一方向性に協調的に進行するために、細胞は CDK 活性の振幅をもとに駆動する精巧な発振装置を備えている。特に各ステップの周期性を確保するためには、必要な時期のみに必要な CDK が特異的に活性化されることが重要である。この CDK の活性は、サイクリンおよび CDK 阻害タンパク質の発現量、CDK のリン酸化・脱リン酸化で規定される。一般にタンパク質の細胞内発現量は合成と分解で規定されるが、基質特異的なタンパク質分解を介した量的制御による活性調節は迅速な活性のオフに適しており、さらにこれらは不可逆的な反応であるため

細胞周期進行の一方向性を規定するのに非常に有用である (Pines, 1999)。植物でも他の真核生物と同じように CDK が細胞周期の進行を司っており、特定のサイクリン/CDK 複合体がさまざまな基質をリン酸化し、G1/S 移行期には DNA 複製を開始させ、G2/M 期には有糸分裂を引き起こす準備を行う (Gutierrez, 2005)。サイクリンは基質を識別し、CDK は基質のアミノ酸配列に含まれる「(S/T) PX (K/R)」(アミノ酸の 1 文字表記で、X は任意のアミノ酸を示す) 配列中のセリンもしくはスレオニンをリン酸化する役割を担う。サイクリンは、基質内の RXL 配列と結合して基質特異性およびリン酸化の効率を高めており、CDK の基質特異性が緩い場合には、「(S/T) P」配列中のセリンまたはスレオニンをリン酸化するプロリン指向性のリン酸化酵素として機能する。

CDK 遺伝子

分裂酵母では Cdc2、出芽酵母では Cdc28 が直接的に細胞分裂に関わる CDK として機能し、パートナーであるサイクリンとの結合モチーフに含まれる PSTAIRE のアミノ酸配列が特徴的である。すべての真核生物ではこの PSTAIRE タイプの CDK を少なくとも 1 つ有しており、哺乳類では CDK1、植物では CDKA がそれに当たる。動物の CDK1 は主にサイクリン B (cyclinB) と結合し G2/M 期の移行制御に関わるが、植物の CDKA は CYCA、CYCB、および CYCD と相互作用し、植物細胞周期において中心的な役割を果たしている。

また植物には PPT(A/T)LRE の保存アミノ酸配列を持つ植物特有の CDK である B タイプ CDK (CDKB) が存在しており、その発現パターンから S 期から M 期で機能すると考えられている (Joubes et al., 2000; Inze and De Veylder, 2006)。

サイクリン遺伝子

サイクリンは CDK の活性を正に調節するサブユニットである。動物や酵母の解析から、サイクリンは配列の相同性や発現様式によって分類された様々なタイプが存在することが分かっている。植物にもこれらのサイクリンを持つことが分かっているが、他の生物種に比べ多くのサイクリンを持っている。シロイヌナズナでは A タイプサイクリン (CYCA) が 10 種類、B タイプサイクリン (CYCB) が 11 種類、D タイプサイクリン (CYCD) が 10 種類、またその他のタイプのサイクリンが 18 種類存在している (Renaudin et al., 1996; Dewitte and Murray, 2003; Wang et al., 2004)。大きく分けると CYCD は G1/S 移行期、CYCB は G2/M 移行期に働くのに対し、CYCA は広く S-M 期の細胞周期の制御に関係している

と考えられている。

また、サイクリンの分解が細胞周期制御において重要な位置を占める。他の生物種で報告されているように、植物のサイクリンもタンパク質分解による制御を受ける。CYCA および CYCB はタンパク質分解に関わる D-box (destruction box) 配列を持ち、M 期に分解される (Renaudin et al., 1996; Genschik et al., 1998)。また、CYCD3;1 もプロテアソーム依存的に分解される非常に不安定なタンパク質で、SCF サブユニットの変異体では安定化することが知られている (Lechner et al., 2002; Planchais et al., 2004)。CYCD の多くはプロリン、グルタミン酸、セリンおよびスレオニン残基に富む PEST 配列を含むことから、動物の D タイプサイクリンと同様の分解経路による制御も受けると考えられている。

E2F 遺伝子

E2F は細胞周期制御に関わる重要な転写因子である。動物の知見から、S 期に転写活性化される多くの細胞周期関連遺伝子、DNA 複製関連遺伝子のプロモーター上に E2F 結合配列 (TTT (C/G) (C/G) CGC) を持つことが知られている。動物 pRb はこの E2F と結合し、その活性を抑制する負の制御因子として機能する (Attwooll et al., 2004)。植物でも E2F ファミリー遺伝子が単離されており、シロイヌナズナでは 6 種類の E2F (E2Fa~E2Fc、DEL1~DEL3) が存在している (Gutierrez et al., 2002; Shen, 2002; Vandepoele et al., 2002)。E2Fa、E2Fb は典型的な転写活性化タイプの E2F に属し、E2Fc は転写活性化領域が短いタイプで転写活性化に寄与していない (del Pozo et al., 2002, 2006)。DEL1~DEL3 は転写活性化領域を持たず DNA 結合領域のみをタンデムに 2 つ持つ E2F で、ある特定遺伝子の転写抑制に働くと考えられている (Ramirez-Parra et al., 2004)。また、これら E2F ファミリーは動物と同じ E2F 結合配列で DNA と結合が可能であり、転写活性化タイプの E2Fa と E2Fb は一過性の発現解析により転写活性化に寄与していることが示されている (Uemukai et al., 2004; Mariconti et al., 2002)。さらに、シロイヌナズナを用いた E2Fa 過剰発現体は野生型の植物体と比較して著しい細胞数の増加、細胞サイズの減少をもたらすことが報告された (De Veylder et al., 2002; Vlieghe et al., 2003)。一方、タバコ培養細胞 BY-2 を用いた E2Fa と E2Fb の過剰発現体の解析も行われており、植物体と同様に細胞サイズの減少などが見られたが、E2Fa の過剰発現体とは大きく異なり E2Fb の過剰発現体ではオーキシン非存在下で細胞分裂が進むことが示された。通常、培養細胞の細胞増殖にはオーキシンを要求するが、E2Fb の過剰発現体ではオーキシン非依存的に細胞増殖することから、E2Fb がオーキシンシグナルの下

流に位置していることが考えられる。これを支持する結果として、オーキシン存在下では E2Fb が安定化することが分かっている (Magyar et al., 2005)。

3. 材料と方法

3-1 使用植物、菌株、プラスミド

3-1-1 使用植物

Arabidopsis thaliana (ecotype Columbia)

培養細胞 *Arabidopsis thaliana* MM2d (ecotype Landsberg)

3-1-2 使用菌株

Escherichia coli DH5 α , BL21 (codon plus)

Agrobacterium tumefaciens EHA105

3-1-3 使用ベクター

plasmid	Genotype and Characteristics
pUC118	Amp ^r , lacZ
pBluescript II SK -	Amp ^r , lacZ
pER8	Spec ^r XVE (LexA,VP16,hER) <i>Agrobacterium</i> binary vector
pGreen	Km ^r CaMV35S promoter Nos terminator <i>Agrobacterium</i> binary vector
pGEX4T-1	Amp ^r GST tag

3-2 培地、植物細胞の培養

3-2-1 大腸菌

LB 培地 (g/l)

Bacto-trypton	10
yeast extract	5
NaCl	10

平板培地には 15g/l の精製寒天末を加えた。

3-2-2 植物細胞の培養

改変 LS 培地	(mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
Na ₂ -EDTA	37.3
KNO ₃	1900
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
KH ₂ PO ₄	170
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
KI	0.83
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6 (以上 MS 無機塩)
myo-inositol	100
Thiamine-HCl	10
Prydoxal hydrochloride	1.0
Nicotinic acid	1000

上記の培地にさらに KH₂PO₄ を 270mg/ml、2,4-D を 0.2mg/l となるように加え、1N KOH で pH5.8 に調整後、300ml 三角フラスコに 95ml ずつ分注し、オートクレーブ (121℃、15 分) した (Nagata et al., 1992)。

3-3 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、東洋紡、宝酒造のものを用いた。

3-4 大腸菌コンピテントセルの調製

大腸菌のコンピテントセルは、Inoue らの方法 (Inoue et al., 1990) に従い調製した。大腸菌 DH5 α 株を LB 培地 5ml で一晚培養 (前培養) し、200ml の SOB 培養液を用いて室温 (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、遠心分離 (3000rpm、15min、4°C) して集菌し、1/3 容量 (67ml) の氷冷した TB 緩衝液に懸濁して氷中に 10 分間放置した。遠心分離 (3000rpm、15min、4°C) 後、菌を再び 16ml の氷冷した TB 緩衝液に懸濁し、7%となるように DMSO をゆっくり混ぜながら加え、氷上に 10 分間放置した。0.2ml ずつ 1.5ml エッペンドルフチューブに分注し、液体窒素で急速に凍結して -80°C で保存した。

TB 緩衝液 : 10mM PIPES、15mM CaCl₂ · 2H₂O、250mM KCl

pH を KOH で 6.7 に調整後、55mM MnCl₂ · 4H₂O を加え、ろ過滅菌して 4°C で保存した。

3-5 大腸菌の形質転換

-80°C で保存したコンピテントセルを氷中で解凍後、1~10 μ l 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 μ l の SOC 培地を加え、37°C で 1 時間振盪培養した。遠心分離後上清を 200 μ l 程度残るように捨て、それに菌体を懸濁し、適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上に塗抹し、37°C で一晚培養した。

3-6 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 (Birnboim and Doly, 1979) に従った。抗生物質を含む 2 \times YT 培地 3ml で一晚培養した菌体を遠心分離 (3000rpm、5min、4°C) により集菌した。この菌体を 200 μ l の Solution I に懸濁し、次に、400 μ l の Solution II を加え、穏やかに混ぜ、氷中に 5 分間静置した。300 μ l の Solution III を加え、よく混合し、氷中に 10 分間静置した。遠心分離 (3500rpm、5min、4°C) 後、上清を 1.5ml マイクロチューブに移し、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 (10mg/ml) を加え、37°C で 60 分消化した後、PEG 沈殿を行い TE buffer に溶解した。

Solution I : 50mM glucose、25mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA (pH 8.0)

Solution II : 0.2N NaOH、1% SDS

Solution III : 3M sodium acetate (pH5.2)

TE buffer : 10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA

3-7 DNA の電気泳動および DNA 断片の回収

TAE buffer により作製した 0.5mg/ml エチジウムブロマイドを含む 0.8%アガロースを使用した。試料に Gel-Loading buffer を 1/10 量加え、ゲルのウェルに注入した。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 : 40mM Tris-acetate、1mM EDTA

Gel-Loading buffer : 0.25% bromophenolblue、0.25% xylene cyanol、40% (w/v) glycerol

3-8 塩基配列の決定

DNA の塩基配列の決定は、Perking Elmer 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 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perking Elmer) を用いた。

3-8-1 ポリメラーゼ反応

0.2 ml マイクロチューブに鋳型 DNA と Big Dye Premix 2 μ l、プライマー 2 μ l (1.6pmol/ μ l)、滅菌水で 20 μ l に fill up した反応液を調製し、Gene Amp PCR system 9600 (Perking Elmer) 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 15 sec、60°C 4 min 30 cycle

3-8-2 サンプルの調製

ポリメラーゼ反応の終わった反応液を 1.5 ml マイクロチューブに移し、3M NaOAc (pH4.6) 2 μ l、100%エタノール 50 μ l を加えた。その後遠心分離 (15000rpm、10min) し、上清を捨て 70%エタノールで洗浄し、減圧乾燥した。Hi-Di Formamide 20 μ l によく溶解し、95°C で 5 分間加熱後、氷上で急冷し、ABI PRISM 3100 シーケンサーにて解析した。

3-9 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 (Laemmli, 1970) に従った。下記の分

離ゲルと濃縮ゲルを用いてゲルを作製した。調製した試料に等量の SDS-sample buffer を加え、95℃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 20mA）。

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

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

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

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

3-10 Western Blotting

3-10-1 アルカリホスファターゼ酵素発色法

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 50 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。ブロット後のメンブレンを 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1回洗浄後、メンブレンを1次抗体（AtRBR 抗体：1/2000）を加えた TBST で室温1時間（もしくは4℃で一晩）反応させた。

メンブレンを TBST で1分間、1回洗浄後、2次抗体を 10,000 倍に希釈されるように加えた TBST で室温 0.5 時間反応させた。TBST で5分間、3回洗浄後、アルカリホスファターゼ発色溶液（AP buffer 15ml、NBT 45μl、BCIP 35μl）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 blue tetrazolium chloride

BCIP：5-bromo-4chloro-3indyl-phosphate

3-10-2 ECL Plus 化学発光法

ブロッキングまでは、アルカリホスファターゼ酵素発光法と同様に行った。ブロッキング後のメンブレンを Blocking buffer に浸して 1 時間(または 4°C で一晚)ブロッキングを行った。そしてメンブレンを TBST で 2 分間 2 回洗浄後、メンブレンを 1 次抗体を 2,000 倍に希釈されるように加えた TBST で室温 1 時間反応させた。メンブレンを TBST で 2 分間、2 回洗浄後、2 次抗体を 7,500 倍に希釈されるように加えた TBST で室温 1 時間反応させた。TBST で 5 分間、4 回洗浄後、検出試薬で 5 分間反応させた。

TBST : 20mM Tris-HCl (pH7.6)、137mM NaCl、0.1% Tween20

Blocking buffer : 5% Skim milk in TBST

検出試薬 : 室温に戻した使用直前に A 液 : B 液を 40 : 1 の割合で混合して用いた (Amersham Biosciences、RPN 2132)。

3-11 大腸菌発現系による組み換えタンパク質の調製

3-11-1 GST-tag 融合タンパク質発現用プラスミドの構築

GST (Glutathione *S*-transferase) Gene Fusion System (Amersham Biosciences) を用いた。最初に、AtRBR1 の全長を PCR にて増幅した。このとき、5'側に *Bam*HI、3'側に *Sma*I の制限酵素認識配列を付加した。用いたプライマーは以下に示す。(プライマー配列は特に指定のない限り 5'→3'方向での表記とする)

F : GGATCCATGGAAGAAGTTCAGCCTCC

R : CCCGGGCTATGAATCTGTTGGCTCGG

この PCR 産物を pBluescript II SK- の *Eco*RV 部位 (脱リン酸化処理) に平滑末端ライゲーションした。その後、*Bam*HI と *Sma*I で切り出し、pGEX4T-1 ベクターの *Bam*HI、*Sma*I サイトに AtRBR1 を挿入した。

3-11-2 大腸菌による GST-AtRBR1 の生産

構築した発現用ベクターを *E.coli* BL21 (codon plus) 株に導入した。得られた形質転換体を 2×YT 培地 (Amp 50μg/ml) で 22°C にて振盪培養した。IPTG 誘導は行わず、一晚培養を続けた。遠心分離により菌体を回収し、PBS で 1 回洗浄した後、PBS (5ml の培養液につき 1ml) 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、TOMYSEIKO) し、遠心分離 (15,000rpm、30min、4℃)により上清を回収し、粗抽出液として-80℃で凍結保存した。

1×PBS buffer : 2.7mM KCl、1.4M NaCl、100mM Na₂HPO₄、18mM KH₂PO₄、1mM PMSF、1mM DTT、(pH 7.3)

3-11-3 粗抽出液から組み換えタンパク質の精製

Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences) を用い、カラムを作製した。基本的な操作は添付のプロトコールに従った。細胞の粗抽出液を担体の 10 倍量×3 通した。10 倍量の PBS 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。

3-11-4 MBP tag 融合 E2Fa のプラスミド構築と大腸菌による生産、粗抽出液から組み換えタンパク質の精製

E2Fa の完全長 ORF を PCR にて増幅し、その断片を pMAL-c2 ベクターの *Bam*HI、*Sal*I サイトに挿入した。その後、*E.coli* BL21 (codon plus) にベクターを導入し、その大腸菌を 18℃で培養し終濃度 0.3mM IPTG で誘導を行った。その後、添付のマニュアル (New England BioLabs) 通りに精製を行った。精製した MBP-E2Fa と MM2d 細胞 3 日目から調製した細胞抽出物 1mg をインキュベートし 4℃で一晩ローテートした。その後、MBP-E2Fa と結合するタンパク質をアミロースレジン (New England BioLabs) にて吸着させ、SDS-PAGE 用サンプルバッファーで 98℃、5 分間ボイルして抽出した。その後、ウエスタンブロットにて検出した。

MBP-E2Fa F : GGATCCATGTCCGGTGTCGTACGATC

MBP-E2Fa R : GTCGACTCATCTCGGGGTTGAGTCAA

3-12 抗体の作製

AtRBR1 に特異的な抗体を作製するため、特徴的なペプチド配列を認識するペプチド抗体を用いることにした。ペプチド抗原は以下に示す。

AtRBR1 (アミノ酸総数)	アミノ酸残基数 (position)	アミノ酸配 (ペプチド抗原)
AtRBR1 (1-1013)	14 (866-879)	VRNDRAVEANNKPE
	14 (328-341)	EKDYYDGKGELDER

これらペプチドの C 末端側に更にシステイン残基 (C) を付加し、それを介してキャリアタンパク質であるヘモシアニン (Keyhole Limpet Hemocyanin; KLH) と m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimide Ester (MBS) を用いて共有結合させた。これをウサギに免疫し、抗血清を得た。免疫抗原の合成、ウサギの免疫および採血は株式会社北海道システムサイエンスに依頼した。

3-12-1 IgG 精製

4ml の抗血清を Protein A Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences) 2ml を用いて IgG 精製を行った。方法は使用説明書に従った。平衡化したカラムに上記試料を通し、5ml の start buffer で洗浄した。溶出は 6ml の pH3 の 100mM Glycine-HCl で行った。回収チューブには 600 μ l の 1M Tris-Cl (pH9.5) を加えておいた。さらに、得られた抗体の buffer を PBS に置換し、ペプチドカラムによる精製へと備えた。

PBS : 7.4mM Na₂HPO₄、1.4mM NaH₂PO₄、150mM NaCl

3-12-2 抗体精製用アフィニティーカラムの作製

上記の濃縮した抗血清を抗原ペプチドを固定化したアフィニティーカラムを用いて精製した。NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences) を用いた。担体が 1ml になるようカラムに充填し、イソプロパノールを完全に除いた後、冷却した 10ml の 1mM HCl で洗浄した。そこに 2.0mg のペプチドを冷却した 0.5ml の Coupling Buffer に溶かして加え、pH 6.5~9.0 であることを確認した後、4°C で一晩、ローターで攪拌した。5ml の Coupling Buffer で洗浄した後、10ml の Blocking Buffer を加えて、室温で 2 時間、ローターで攪拌した。Tris buffer (pH8~9)、Wash Buffer の 2 種類の pH の異なる buffer、それぞれ 3ml で洗浄した。これを 5 回繰り返す、PBS でカラムを満たして 4°C で保存した。

Coupling Buffer : 0.2M NaHCO₃、0.5M NaCl (pH8.5)

Blocking Buffer : 0.5M Monoethanolamine (2-Aminoethanol)、0.5M NaCl (pH8.3)

Wash Buffer : 0.1M acetate、0.5M NaCl (pH4.0)

Tris Buffer : 0.1M Tris-HCl、0.5M NaCl (pH8~9)

3-12-3 アフィニティーカラムを用いた抗体の精製

上記で作製したアフィニティーカラムを 10ml の TBS で平衡化した後、上記で示した IgG 精製した抗体 (PBS に溶解) を 6ml 加えて、室温で 1 時間、ローターで攪拌した。10ml の TBS でカラムを洗浄し、0.5ml の Elution Buffer を加え、溶出液の pH が酸性に変化していないことを確認した (溶出液の pH が酸性に変化した場合は直ちに溶出液を回収した)。さらに担体と等量 2ml の Elution Buffer を加え、溶出液を回収した。溶出液はあらかじめ入れておいた 70 μ l の 1M Tris で速やかに中和した。Abs280 を測定して濃度を算出し、buffer を PBS に置換して Sodium Azide を終濃度 0.05% になるよう加えて分注して -80 $^{\circ}$ C で保存した。

TBS : 0.15M NaCl を含む 20mM Tris-Hcl (pH7.5)

Elution Buffer : 0.1M Gly-Hcl (pH3.0)

3-13 シロイヌナズナ MM2d 細胞の培養方法

Menges らの方法 (Menges et al., 2002) に従い、27 $^{\circ}$ C、暗所で回転 (130rpm) 培養した。7 日おきに 3.5ml の細胞懸濁液を 300ml 三角フラスコ中 100ml の改変 LS 培地に植え継いだ。

3-13-1 MM2d 細胞の細胞サイズと細胞数、新鮮重量の測定

CellTrics Disposable Filter 20 μ m (Partec) を用いて、細胞懸濁液から細胞と培地を分離し新鮮重量を測定した。MM2d 細胞は高密度に凝集した形態をとっているため、プロトプラスト溶液で 30 $^{\circ}$ C、1 時間処理してプロトプラスト化し、その後 Counting chamber (0.2-mm depth) にて細胞数を測定した。同様にプロトプラスト化した細胞を顕微鏡 (Nikon DIAPHOT300) 付属のカメラ (OLYMPUS PM-10AK) で撮影し、その後その画像を元に NIH ImageJ 1.36b ソフトウェアを用いて細胞サイズを解析した。

プロトプラスト溶液 : 0.1% pectolyase Y23 (kikkoman)、1% Cellulase RS (Yakult)、0.4M マンニトール (pH5.5)

3-13-2 MM2d 細胞のシヨ糖飢餓培地への交換

シヨ糖飢餓培地には 3%シヨ糖の浸透圧と等しくするためシヨ糖の代わりにマンニトールを終濃度 105mM となるように加えた。細胞懸濁液を口径 11 μ m のナイロンメッシュ (Nylon net filters; Millipore) をはさんだ濾過器 (Nalgen) にあけ培地を吸引して取り除いた。10のシヨ糖飢餓

培地を濾過器に加え、残留の培地を洗浄した。洗浄した細胞 300 ml 三角フラスコ中、95 ml のショ糖飢餓培地に移し、暗所、27°C、130 rpm で振盪培養した。移した直後を 0 時間として、経時的にサンプリングを行った。

3-14 シロイヌナズナ MM2d 細胞の粗抽出液の調製

シロイヌナズナ MM2d 細胞を約 500 μ l (wet volume)、1.5ml マイクロチューブに回収し、液体窒素により急速凍結させた後、-80°C で保存した。1ml の IP Buffer を加え、氷水中で超音波破碎 (10 秒 \times 10 回、5 秒間隔、出力 7~8、Handy Sonic model UR-10P、TOMY SEIKO) し、遠心操作 (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。

3-15 粗抽出液のタンパク質濃度の定量

Bradford の方法 (Bradford, 1976) に従った。粗抽出液 10 μ l とタンパク質定量試薬 500 μ l をキュベットに入れてよく混合し、5 分以上経ってから Abs595nm 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 G-250 50mg、特級エタノール 25ml、Phosphoric acid 50ml (85%, w/v)

最後に滅菌蒸留水で 500ml 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を再度濾紙で濾過して使用した。

3-16 粗抽出液からの免疫沈降 (IP)

1mg の粗抽出液に 2 μ g の 1 次抗体を加え、4°C で 2 時間ローテーターで穏やかに攪拌した。そこに 30 μ l の (50% IP buffer) Protein A Sepharose 4FF beads を加え、4°C、1 時間ローテーターで攪拌した。500 μ l の IP buffer で 3 回洗浄した。その後、ビーズに Sample Buffer を加えて熱処理し、適当な抗体を用いて Western 解析を行った。

IP buffer : 25 mM Tris-Cl (pH7.6)、75 mM NaCl、15 mM MgCl₂、15 mM EGTA、0.1 %NP-40

TBS : 50mM Tris-Cl (pH7.5) 、10mM MgCl₂ 、1mM EGTA

3-17 RNA の精製

一定期間培養したシロイヌナズナ MM2d 細胞を約 100 μ l(wet volume)、

1.5ml マイクロチューブに回収し、液体窒素により急速凍結させた後、 -80°C で保存した。RNeasy kit (QIAGEN) を用いて、植物細胞からの total RNA 調製用プロトコールに従い細胞から RNA の精製を行った。

3-18 RT-PCR

3-18-1 DNase 処理

抽出した total RNA $1\mu\text{g}$ に以下の試薬を混合し、milliQ 水で $20\mu\text{l}$ に fill up し、その後 37°C 、30 分処理した。その後、stop solution を $2\mu\text{l}$ 加えて反応を停止し、 65°C 、10 分間で酵素を失活させエタノール沈殿を行った。

10×DNase Buffer	2 μl
DNaseI	1 μl
RNase Inhibitor	1 μl

3-18-2 Reverse Tranacription 反応

Gene AmpR RNA PCR Core kit (Perking Elmer) を用いて行った。以下の反応液を調製し、エタノール沈殿後のペレットに加えた。

MgCl ₂ solution	4 μl
10×PCR Buffer II	2 μl
dGTP、dATP、dTTP、dCTP	各 2 μl
Oligo d (T) ₁₆	1 μl
MilliQ 水	3 μl

その後、RNA の高次構造を壊すため 65°C で 5 分間処理後、氷冷し MuLV Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor を各 $1\mu\text{l}$ ずつ加え 42°C で 30 分間保温し 99°C 、5 分間で酵素を失活させてから氷上に置き、急冷した。この溶液に $20\mu\text{l}$ の TE を加え、PCR のテンプレートとして用いた。

3-18-3 プライマーの設計

プライマーの設計には、Primer Express (Applied Biosystems) ソフトウェアを用いて、それぞれの遺伝子に特異的にアニールし、かつプライマーダイマーを形成しないように設計した。但し、*CDKB2;2*、*CYCA1;1*、*CYCB2;3* に関しては Menges らの論文の情報を参考にした (Menges et al.,2006)。プライマーの配列を以下に示した。

HistoneH4 F : CCATTCGAAGATTGGCTCGTA
HistoneH4 R : CCACGTGTCTCCTCGTAGATGA
PCNA1 F : TCTACTGCCGGTGACATTGGA
PCNA1 R : GCATCTTCCGGCTTGTCTACAG
ACT2 F : TGCACCACCTGAAAGGAAGTACA
ACT2 R : ATTTTACCTGCTGGAATGTGCTG
ACT8 F : CCACCCGAGAGGAAGTACAG
ACT8 R : TCCACATCTGCTGGAAAGTG
ORC6 F : GCTGCTGCTTTCTATTTGTGTGC
ORC6 R : CAGACTCTGATGTACCACAAACCTCA
CDC6 F : GTGTCAAGTGGTCAAGATGGATCA
CDC6 R : GGTGTTGAGGTAGAGACTGGATGG
RNR F : TCCGTTTCGATTGGATGGA
RNR R : CAAACGCGCCGTTACCATT
MCM2 F : ACGGACAAGGAGTTTCTATAGCGA
MCM2 R : CCTAAGGTGCATCCTAGCATGTG
MCM3 F : AACCTTCTGTAGAGCAATTCAGCG
MCM3 R : TCCTCATGTGCTGCCCAA
CYCA1;1 F : GGCTAAGAAGCGACCTGATG
CYCA1;1 R : TACAAGCCACACCAAGCAAC
CYCB2;3 F : TAAACCACCTGTGCATCGAC
CYCB2;3 R : ATCTCCTCCAGCATTGCTTC
CDKB2;2 F : AGCCTTCACTCTCCCAATGA
CDKB2;2 R : TCAGAGTCTCCCGCAAAGAT

3-18-4 リアルタイム PCR による定量的 RT-PCR

定量的リアルタイム PCR には 7700 Fast Real-Time PCR System と SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いた。*ACT8* の発現でテンプレート間の補正を行い標準化した。またプライマー毎に標準曲線を作成しサンプルの定量を行った。

3-19 形質転換 MM2d 細胞の作製

3-19-1 誘導系 AtRBR1 RNAi 発現細胞のための構築

エストロゲンにより誘導可能な pER8 ベクター (Zuo et al., 2000) の MCS は *XhoI* と *SpeI* しか使えないため、まず pBluescript II SK-ベクターの *XhoI*、*SpeI* サイト間に新しい MCS を挿入した。プライマー配列を

以下に示す。

RNAi-linker F :

TCGAGTCTAGAGGATCCGATATCCCCGGGAGGCCTAGATCTGTCGACA

RNAi-linker R :

CTAGTGTTCGACAGATCTAGGCCTCCCGGGGATATCGGATCCTCTAGAC

新しい MCS は以下のようになる。

『*XhoI-XbaI-BamHI-EcoRV-SmaI-StyI-BglII-SalI-SpeI*』

次に、*SmaI* サイトに GUS linker DNA を挿入した。プライマー配列を以下に示す。

GUS linker F : CTGAAGAGATGCTCGACTGG

GUS linker R : TCATTGTTTGCCTCCCTGCT

次に、RNAi 用の *AtRBR1* の配列 (N 末端 496bp) を PCR で増幅した。プライマーの配列を以下に示す。

3' *AtRBR1* F : CTCGAGTGAAATATTTATTCCTGCCG

3' *AtRBR1* R : ACTAGTCTATGAATCTGTTGGCTCGG

この PCR 産物を *XhoI*、*BamHI* 間、*BglII*、*SalI* 間 (*XhoI* と *SalI*、*BamHI* と *BglII* は切断面が同じになる) に挿入した。その後、*XhoI* と *SpeI* で切り出し pER8 ベクターに挿入した。

3-19-2 HA (ヘマグルチニン) 融合 E2Fa 発現細胞のための構築

ゲノム DNA を鋳型に、E2Fa の開始コドンから上流 1kb から終止コドンまでの領域を PCR で増幅した。このとき forward プライマーに *KpnI* サイトを reverse プライマーに *XhoI*、*BamHI* サイトを付加した。この断片を pBluescript II SK-ベクターの *EcoRV* サイトに平滑末端クローニングした。その後、*XhoI* サイトにヘマグルチニンタグを 3 つタンデムに繋げた断片を挿入した。次に *KpnI* と *BamHI* で断片を切り出し pGreen ベクターに挿入した (Hellens et al., 2000)。さらに、その下流にある *SacI*、*SacII* サイトに NOS ターミネーターを挿入した。

E2Fa F : GGTACCTTTCCGTTCTCCTTCTTTTTTTTG

E2Fa R : GGATCCTCACTCGAGTCTCGGGGTTGAGTCAAC

3-20 アグロバクテリウム法による培養細胞の形質転換

3-20-1 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℃で保存しておいた *A.tumefaciens* EHA105 株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℃で 1 時間振とう培養した。100μl および残りの菌体を適当な抗生物質を含む寒天培地にまき、30℃で 2 日間培養した。

3-20-2 シロイヌナズナ培養細胞 MM2d の形質転換

基本的には Menges と Murray の方法 (An, 1985, Menges and Murray, 2002, 2006) に従った。上記のプレートよりコロニーを単離して 3ml の液体培地に植菌し、27℃で 2 日間振盪培養した。100~200μl の培養液と 10 ml の培養 3 日目の MM2d 細胞の懸濁液をシャーレ (100mm) に加え、暗所にて 25℃で 2 日間振盪しながら (約 70rpm) 共存培養した。MM2d 細胞を 10 倍量の LS 改変培地で 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、50ml の LS 改変培地に懸濁した。これを 100ml 三角フラスコに移し、暗所にて 25℃で 2 日間振盪しながら (約 70rpm) 培養した。MM2d 細胞を 10 倍量の LS 改変培地で 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、細胞量の約 10 倍量の LS 改変培地に懸濁した。次に選択培地 (Km の場合 : 40μg/ml、Hyg の場合 10~15μg/ml、Cb : 250μg/ml) 1 プレートにつき細胞懸濁液 1ml をまいた。3~4 週間して形成されたカルスを新鮮な選択培地に移し、さらに増殖の良いものを選択した。選抜したカルスを液体培養する際にも Cb : 250μg/ml を添加した。

3-21 脱リン酸化処理 (CIP 処理)

植え継ぎ後 3 日目の培養細胞を CIP buffer にて超音波破碎した。その細胞抽出物 150μl に CIP (calf intestinal phosphatase) を 40U 加え 37℃、45 分処理した。同時に、CIP の阻害剤である EDTA を終濃度が 50mM となるように加えて同様に処理した。その後 6%アクリルアミドゲルにて SDS-PAGE を行った。

CIP buffer : 10mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、0.1% NP-40、0.14U/ml aprotinin、

1mM PMSF (pH8.0)

3-22 LSC (Laser Scanning Cytometer) による DNA 含量測定

回収した細胞懸濁液に終濃度 70%になるように軽く攪拌しながら冷エタノールを加え、-20℃で 2 時間以上インキュベートした。70%エタノールで 3 回、PBS で 3 回洗浄した後、PBS と等量の 1 % Pectolyase と、終濃度 0.1mg/ml になるように RNaseA を添加し、30℃、30~60 分間インキュベートした。PBS で洗浄した後、終濃度 50µg/ml になるように PI を添加し、暗所で 4℃、30 分間インキュベートした。その後 PBS で 3 回洗浄し、細胞をスライドガラス上にとり、カバーガラスをかけた。余分な液をキムワイプを押し当てて吸い取った後、カバーガラスの縁をマニキュアでシールした。

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

3-23 Partec PA を用いた DNA 含量の測定

凍結保存しておいた細胞をシャーレの上に取り出し、Cystain UV 植物 DNA 分析試薬 A 液 (Partec) 150µl を加えてカミソリでチョッピングした。その後、さらに 150µl の A 液を加えてピペッティングし、1 分放置した。その細胞懸濁液を CellTrics フィルター30µm (Partec) で濾過し、1200µl の植物 DNA 分析試薬 B 液を加えて Partec PA で解析した。

3-24 ChIP 実験

MM2d 細胞培養液に終濃度 1%となるようにホルマリン液を加えて室温 30 分間処理し、タンパク質と DNA をクロスリンクした。クロスリンク反応停止のため終濃度 0.1M となるようにグリシンを加えて 5 分間処理した。その後、冷却した PBS で洗浄濾過した。その後、Nuclei Lysis Buffer 中で DNA フラグメントが約 700bp になるように超音波破碎した。このクロマチン画分を Dilution Buffer で 10 倍に希釈した。そのサンプルを Protein-A Sepharose beads (50% suspension in Dilution buffer) 30µl を加え 4℃で 1 時間処理し前洗浄した。その後、各種抗体を 2µg 加えて 4℃で 2 時間以上処理した。抗 NtRBR1 抗体はタバコ NtRBR1 の C 末端領域から作製した抗体を使用した (Kawamura et al., 2006)。高親和性抗 HA 抗体は Roche から、抗 HistoneH3 抗体 (ChIP Grade) は Abcam 社から入手した。抗体処理後 Protein-A Sepharose beads 30µl 加えてさらに 4℃で 1 時間処理した。その後、数回洗浄した後、Elution Buffer 100µl で溶出した。そのサンプルを DNA-タンパク質間のクロスリンクを外し、さらに

タンパク質を除去するため proteinaseK を終濃度 6mg/ml、さらに NaCl を終濃度 200mM となるように加え 65°C で 6 時間以上処理した。その後、抽出した DNA 溶液をフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿し精製し、最後に 50 μ l の水に溶解させたものをテンプレートとした。これらのテンプレート 2 μ l を使用して PCR を行った。また、抗体処理前のサンプルを同様に脱クロスリンクし、精製したものを 200 μ l の水に溶解させて input DNA として使用した (Gendrel et al., 2002; Kodama et al., 2007)。

PBS : 7.4mM Na₂HPO₄、1.4mM NaH₂PO₄、150mM NaCl

Nuclei Lysis Buffer : 50mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA、1% SDS

Elution Buffer : 1% SDS、0.1M NaHCO₃、10mM DTT

Dilution Buffer : 1.1% Triton X-100、1.2mM EDTA、16.7mM Tris-HCl (pH8.0)、167mM NaCl

PCNA1 promoter proximal start codon F :

GGTTGTCACCGAGACAAGATTCG

PCNA1 promoter proximal start codon R : GTTCCCGCCAATGCGCTA

PCNA1 promoter distal start codon F :

AATAACGGTCTTTTATGTTTTGCTGG

PCNA1 promoter distal start codon R :

GCATTTGTTGGTTTGAGAATTTTGA

ACT8 promoter F : TCTGTGACAATGGTACTGGAATGG

ACT8 promoter R : GGTGCTCTTCAGGAGCAATACG

4. 結果

4-1 MM2d 細胞を用いた *AtRBR1* の機能解析

はじめに

これまで、*AtRBR1* の T-DNA タグラインの解析や、根やシュートで特異的に *AtRBR1* を抑制する手法を用いた表現型の解析は盛んに行われてきた。しかし、こういった植物体を用いた解析では細胞レベルで具体的に何が起きているのかを解析することが非常に難しい。特に、植物体は多くの細胞で染色体が倍加しており、2C、4C の細胞のほかに 8C、16C、32C またはそれ以上の DNA 含量を持つ細胞の集団で構成されていることが解析を難しくしている。

ここで細胞周期の解析をするにあって、こういった複雑な細胞集団の中で個々の遺伝子の働きを解析する前に、均質な細胞から構成される培養細胞を用いての解析が有効であると考えられる。特にシロイヌナズナ培養細胞 MM2d は細胞周期の同調培養が可能な細胞として確立されたもので、細胞周期の解析に非常に適している。そこで、私はこの MM2d 細胞を用いて細胞レベルで *AtRBR1* の解析をしていくことにした。

本研究ではまず *AtRBR1* の細胞周期における翻訳後レベルでの発現解析や、*AtRBR1* のリン酸化状態に着目して解析を行った。

4-1-1 *AtRBR1* タンパク質は G1/S 移行期で高リン酸化される

これまでの研究で *AtRBR1* に対する mRNA レベルの発現解析は行われていたが、*AtRBR1* の翻訳後に関する制御についてはほとんど明らかになっていない。この翻訳後制御を解析するために、*AtRBR1* に対する抗体を作製した。抗原として *AtRBR1* に由来する 2 種類のペプチドを用いてウサギに免疫することによって抗血清を得た。その抗血清を IgG 精製し、その後合成したペプチドを用いてアフィニティー精製を行い精製抗体 (抗 *AtRBR1* 抗体) とした。この抗 *AtRBR1* 抗体が、目的とする *AtRBR1* を認識するのかを確かめるために培養細胞 MM2d の細胞抽出物 (whole cell extract; WCE) と精製 GST 融合 *AtRBR1* (GST-*AtRBR1*) を用いてウエスタン解析を行った。このとき、抗体を直接ウエスタンに供するものと、GST-*AtRBR1* で前処理することによって競合させたのちにウエスタン解析に供するものの二つを用意した。その結果、GST-*AtRBR1* は大腸

菌内で不安定であり分解産物も見られたが、直接抗体を用いた方では WCE、GST-AtRBR1 どちらも推定分子量付近にバンドが確認された (AtRBR1 の推定分子量は 112kDa、GST-AtRBR1 は 138kDa)。一方で、前処理した方では GST-AtRBR1 のバンドが薄くなり、WCE では推定分子量付近のバンドが消失したため、この推定分子量付近のバンドが AtRBR1 であることが確認できた (Fig.1)。

次に細胞周期での AtRBR1 の発現を調べるため、分裂停止期の MM2d 細胞 (植え継ぎ後 7 日目) を新鮮な培地に植え継ぐことで部分同調できる細胞周期リエントリーの系を用いて解析を行った。分裂停止期の細胞はほとんどが G1 期で細胞周期を停止しているため、この実験系ではおもに G1 期から S 期の発現を見ることが可能である。そこで先ほど精製した抗 AtRBR1 抗体を用いて、AtRBR1 のタンパク質レベルでの発現を解析した (Fig.2A)。同時にそれぞれの細胞から DNA 含量を測定し、細胞周期を算出した (Fig.2B)。さらに細胞周期の進行を詳しく調べるために、定量的リアルタイム RT-PCR を用いて S 期マーカーである *HistoneH4* の発現も解析した (Fig.2C)。

まず、細胞周期の進行を見てみると、*HistoneH4* の発現が植え継ぎ後 6 時間目から上昇し、8 時間目でピークを迎えている (Fig.2C)。また Fig.2B の DNA 含量の結果も 8 時間目から S 期の細胞が増えてきているので、6 時間目から 8 時間目が G1/S 移行期 (G1 期から S 期への移行期) だと考えられる。

次に Fig.1 の抗体の確認とは異なり、Fig.2A のウエスタン解析では AtRBR1 のリン酸化状態を解析することも目的としたため、6%の低濃度アクリルアミドゲルを用いて長時間泳動することによって、AtRBR1 が位置する高分子量タンパク質の分離能を高めた。その結果、植え継ぎ後 0 時間目から 6 時間目まではシングルバンドで AtRBR1 が検出されたが、S 期の細胞が増加する 8 時間目からは高分子量側にシフトバンドが検出された (Fig.2A)。

このシフトバンドが高リン酸化型の AtRBR1 かどうかを確かめるために CIP (carf intestinal alkaline phosphatase) を用いたホスファターゼ処理を行った (Fig.3)。処理に用いたサンプルは、高分子量側にシフトバンドが見られ、タンパク質濃度も高い植え継ぎ後 3 日目の MM2d の WCE を用いた。

その結果、CIP を加えたサンプルではシフトバンドが消失し、下方のバンドが濃くなっていた。これは高リン酸化型の AtRBR1 が CIP 処理により非修飾型もしくは低リン酸化型の AtRBR1 へと変化したために、移動度が変わって下方にバンドが移ったものと考えられる。一方、CIP を

加えずに熱処理した Mock サンプルではシフトバンドに変化が見られなかった。さらに、EDTA によって CIP の活性化に必要な Mg^{2+} をキレートし、CIP の活性を阻害したサンプルではシフトバンドが残ったままであった。以上の結果から、シフトバンドは AtRBR1 が高リン酸化されたものであることが示唆された。また、このことから細胞周期リエントリーの系を用いた解析により、AtRBR1 は G1/S 移行期で高リン酸化状態となると結論された。

4-1-2 高リン酸化型 AtRBR1 は E2F と結合しない

以前の研究で AtRBR1 と E2Fb がプルダウン解析で、AtRBR1 と E2Fa ~ E2Fc が Yeast two hybrid 解析で結合することが報告されていたが (Magyar et al., 2005, Desvoyes et al., 2006)、AtRBR1 のリン酸化状態の違いによる結合の変化について調べられていなかった。そこで、高リン酸化型の AtRBR1 を含む植え継ぎ後 3 日目の MM2d の WCE と大腸菌から調製した組み換え MBP 融合 E2Fa (MBP-E2Fa) を用いてプルダウン解析を行った (Fig.4)。GST-AtRBR1 と同様に、MBP-E2Fa も大腸菌内では不安定となり分解産物と見られるバンドが検出された。プルダウン解析の結果、MBP 単独では AtRBR1 との結合は見られなかったが、MBP-E2Fa では AtRBR1 が共沈殿することから結合していることが分かり、これまでの報告と同様の結果が得られた。さらに、このとき高分子量側のシフトバンドは検出されなかったことから、MBP-E2Fa は非修飾もしくは低リン酸化の AtRBR1 とのみ結合することが分かった。

4-1-3 *in vivo* において AtRBR1 と E2Fa は PCNA1 遺伝子のプロモーターに結合する

シロイヌナズナでは *in vitro* において E2F ファミリーすべてが E2F 結合配列と結合して転写制御に関与することが報告されているが (Mariconti et al., 2002)、*in vivo* における DNA との結合解析はほとんどなされていない。また、植物 RBR が E2F 結合配列に結合するという報告も *in vitro* での報告のみである (Uemukai et al., 2005; Sozzani et al., 2006)。

ここで、私は典型的な転写活性化型 E2F である E2Fa と AtRBR1 が *in vivo* において DNA と結合し転写制御に関わっているのかどうかを解析するために、実験系として CHIP (Chromatin Immunoprecipitation) 解析を用いることにした。そこで、E2Fa と AtRBR1 を特異的に免疫沈降する抗

体が必要となった。しかし、AtRBR1 を免疫沈降するとき、AtRBR1 抗体は AtRBR1 の立体構造を認識できないためか免疫沈降できなかったことから、タバコ (*Nicotiana tabacum*) NtRBR1 の C 末端領域を抗原として作製した抗 NtRBR1 (RBR) 抗体を利用することにした。この抗 RBR 抗体が AtRBR1 を免疫沈降できるかどうか確かめるため、それぞれ抗 RBR 抗体 1 μ g、2 μ g を用いて免疫沈降した後に抗 AtRBR1 抗体で検出を行った (Fig.5A)。このとき、同時に AtRBR1 を RNAi で抑制した細胞 (後述) の WCE を用いて、同様に免疫沈降を行った。また、normal IgG はネガティブコントロールとして用いた。その結果、抗 RBR 抗体の量依存的に AtRBR1 が沈降してくることが分かった。さらに、AtRBR1 を抑制した細胞では免疫沈降産物が検出されなかったことから、AtRBR1 が特異的に沈降してくることが確認された。

次に、免疫沈降に使用できる抗 E2Fa 抗体が入手できなかったため、E2Fa の C 末端に HA タグを 3 つ連結した融合タンパク質を、自身のプロモーターで発現する形質転換体 (E2Fa-3HA) を作製した。植え継ぎ後 3 日目の E2Fa-3HA の WCE を用いて、HA タグの抗 HA 抗体を用いて免疫沈降した後にウエスタン解析により HA 抗体で検出を行った (Fig.5B)。その結果、HA 抗体で E2Fa-3HA を沈降できることが分かった。また、このとき分解産物以外に E2Fa-3HA を示した矢頭付近に複数のバンドが見えたため、この E2Fa-3HA 細胞の WCE を CIP にて脱リン酸化処理した (Fig.7)。その結果、E2Fa-3HA も AtRBR1 と同様にリン酸化を受け移動度がシフトするリン酸化型をとるものがあることが分かった。

このようにして免疫沈降に使用する抗体が用意できたため、続いて、植え継ぎ後 3 日目の E2Fa-3HA 細胞の WCE を用いて、抗 HA 抗体により *PCNA1* (Proliferating cell nuclear antigen 1) プロモーター領域に対する ChIP 解析を行った。また、AtRBR1 を免疫沈降することが可能な抗 RBR 抗体により、植え継ぎ後 3 日目の MM2d 細胞の WCE を用いて ChIP 解析を行った。*PCNA1* プロモーターには 2 箇所の E2F 結合配列 (T/A) TT (C/G) (C/G) CGC が存在しており、その 2 箇所を含む領域に設計したプライマー (primer2) とさらに上流の E2F 結合配列を含まない領域に設計したプライマー (primer1) を用いた (Fig.5C)。また、*ACT8* (Actin 8) のプロモーター領域にもプライマーを設計し、プロモーターのネガティブコントロールとして用い、免疫沈降以外同様な処理をしたサンプルを input として PCR のコントロールでプライマーの増幅確認とした。また、Histone H3 に対する抗体 (抗 H3 抗体) を用いて、実験のポジティブコントロールとし、normal IgG を用いてネガティブコントロールとした (Fig.5D)。

その結果、E2Fa、AtRBR1 を免疫沈降した産物において E2F 結合配列を含まない領域 (primer1) ではバンドが見られなかったが、E2F 結合配列を含む領域 (primer2) ではバンドが確認され、両者共に E2F 結合配列を含む DNA と結合していることが分かった。但し、植え継ぎ後 3 日目の対数増殖期に当たる細胞の WCE では抗 RBR 抗体の免疫沈降産物でのバンドが非常に弱く、結合している量としては非常に少ないことが考えられた。また、ネガティブコントロールとして用いた *ACT8* のプロモーター領域では、ポジティブコントロールとして用いた抗 H3 抗体以外でバンドは検出されなかった。

ここで、さらに AtRBR1 と *PCNA 1* プロモーターへの結合を解析するために植え継ぎ後 7 日目の増殖停止期に当たる細胞の WCE を用いて ChIP 解析を行った (Fig.6)。その結果、抗 RBR 抗体の免疫沈降産物で植え継ぎ後 3 日目よりも比較的強いバンドが得られた。さらに、AtRBR1 を抑制した細胞 (後述) の免疫沈降産物ではネガティブコントロールと大差なかったことから、野生型 MM2d 細胞で検出されたバンドは AtRBR1 の沈降に由来することを支持する結果が得られた。

以上の結果から、AtRBR1、E2Fa とともに *PCNA1* プロモーター領域の DNA と結合することによって *PCNA1* の転写制御を行うことが示唆された。

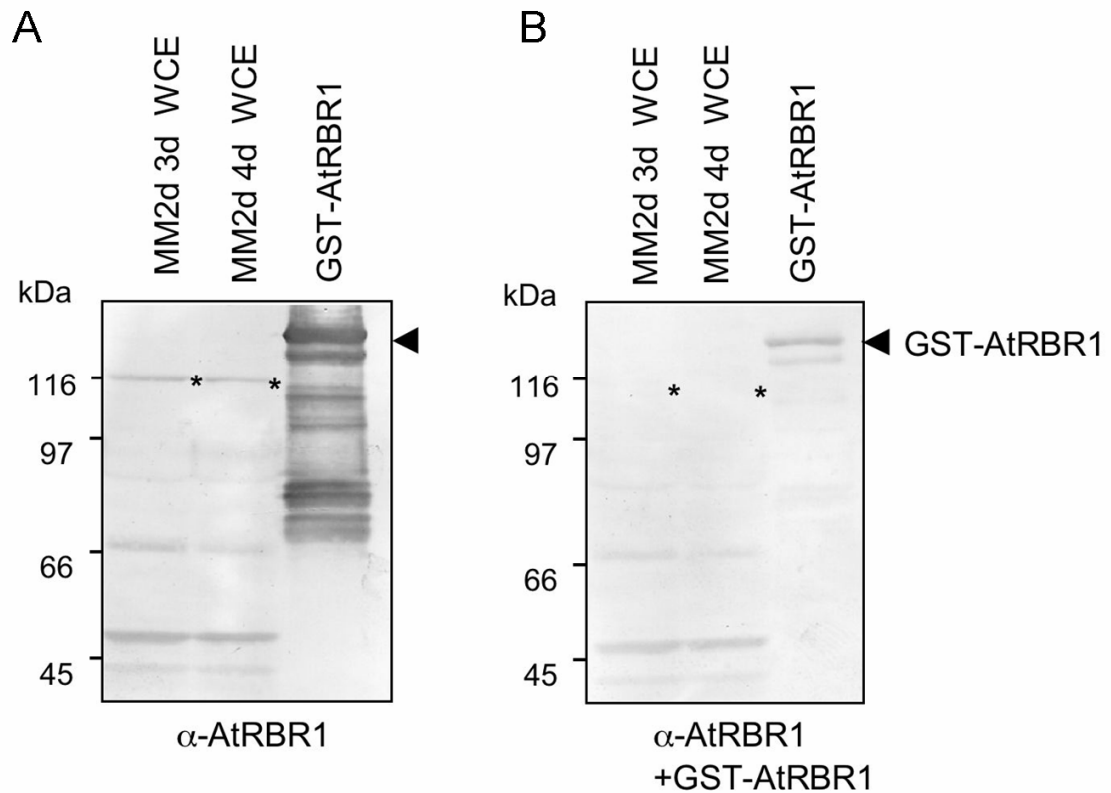


Fig.1 抗 AtRBR1 抗体の特異性確認

(A) MM2d 細胞の植え継ぎ後 3 日目または 4 日目の WCE と精製 GST-AtRBR1 を抗 AtRBR1 抗体で検出した。左のパネルは抗体を直接作用させた。GST-AtRBR1 のレーンの下方のバンドは翻訳が部分的に起こったものか、分解産物によるバンドであると思われる。矢頭は推定分子量の GST-AtRBR1 を示している。(B) 同じサンプルに、GST-AtRBR1 (約 5 μ g) と抗 AtRBR1 抗体を混ぜ合わせてからウエスタン解析を行った。星印は GST-AtRBR1 で処理した右のパネルで検出できなくなったバンドを示している。

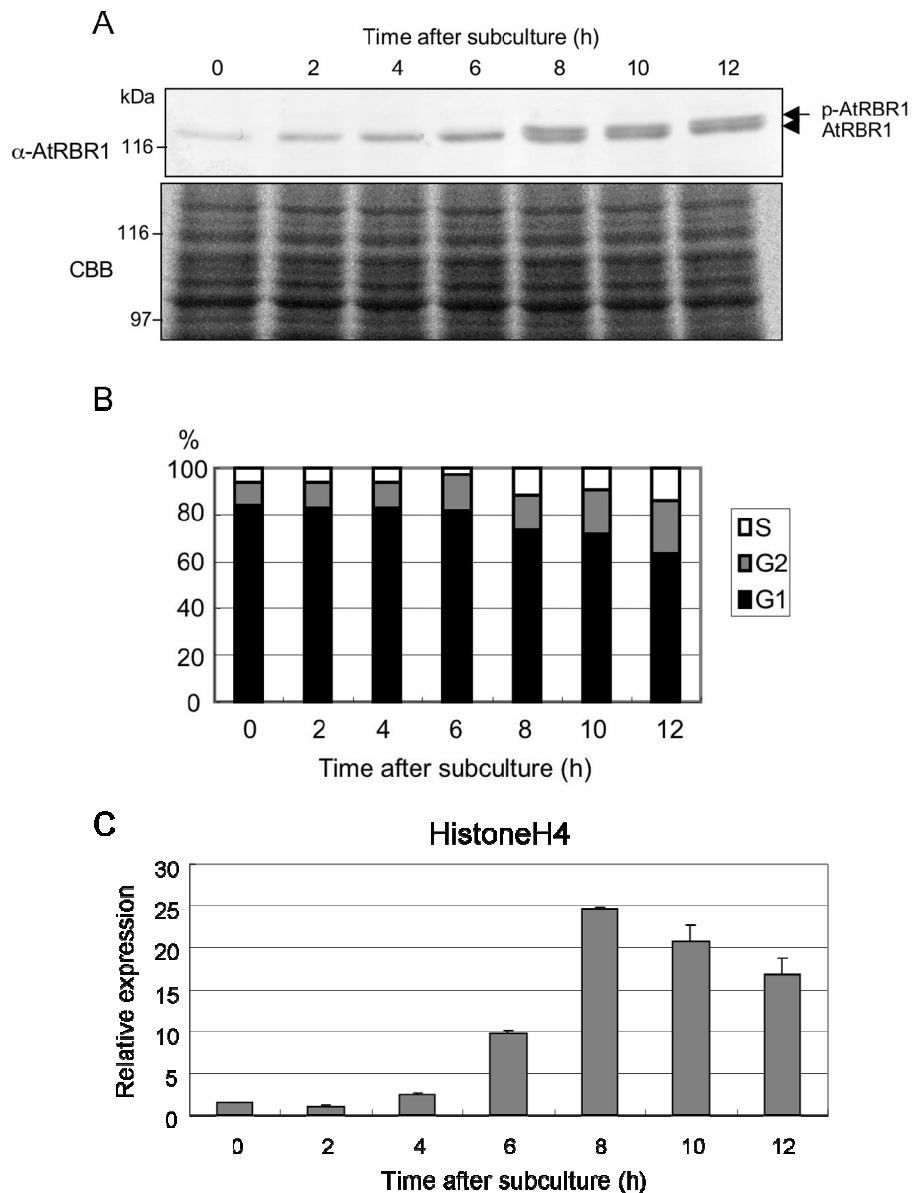


Fig.2 細胞周期リエントリーにおける AtRBR1 タンパク質の蓄積量の経時変化

増殖停止期の細胞を新鮮な培地に植え継ぎ、2 時間毎に 12 時間までサンプリングを行い、タンパク質、全 RNA の抽出、細胞周期の解析を行った。(A) 抗 AtRBR1 抗体を用いたウエスタン解析。矢印が高リン酸化されている AtRBR1 (p-AtRBR1)、矢頭が非修飾または低リン酸化された AtRBR1 を示している。(B) フローサイトメーターを用いた細胞周期解析 (白色 : S 期、灰色 : G2 期、黒色 : G1 期)。(C) S 期マーカー遺伝子 *Histone H4* の定量的リアルタイム RT-PCR 解析。*ACT8* の発現でサンプル間を標準化したときの相対値で示している。エラーバーは SD (n=3) を示している。

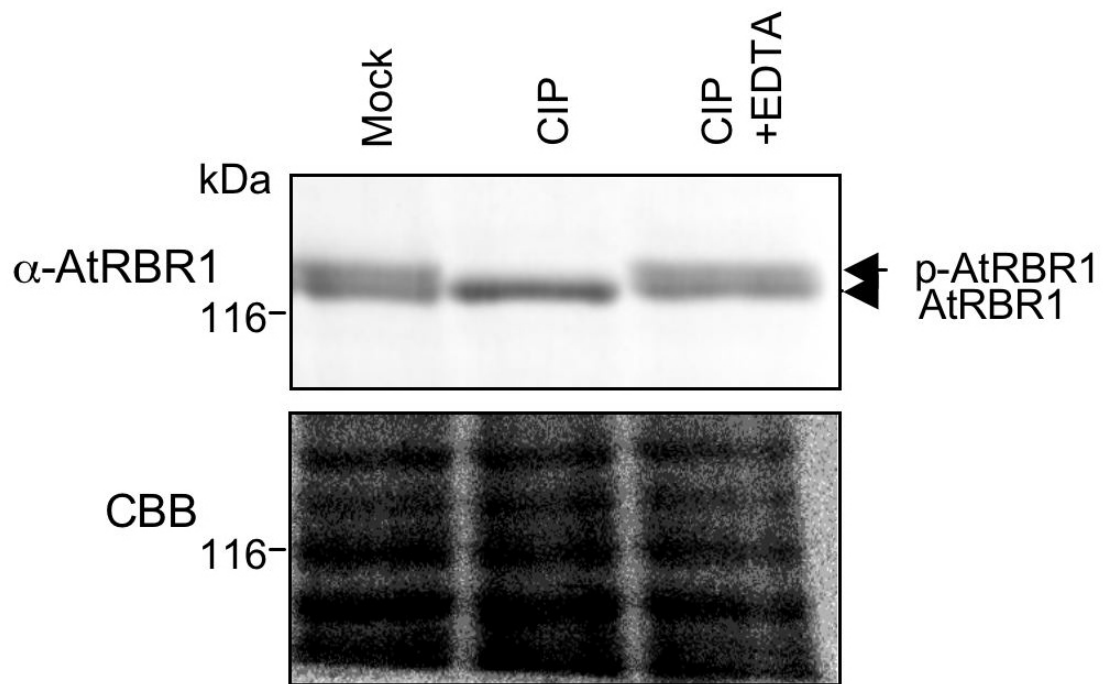


Fig.3 ホスファターゼ処理による AtRBR1 の脱リン酸化

高分子量側にシフトバンドが観察できる、植え継ぎ後 3 日目の WCE を用いて CIP (calf intestinal alkaline phosphatase) 処理を行った。左のレーンは CIP を加えず 37°C の熱処理だけ行った (Mock)。真ん中のレーンは CIP と 37°C で熱処理した。右のレーンは CIP の阻害剤である EDTA を終濃度 50mM となるように加えて 37°C で熱処理した。矢印が高分子量側の高リン酸化された AtRBR1 (p-AtRBR1) を示し、矢頭が非修飾または低リン酸化された AtRBR1 を示している。

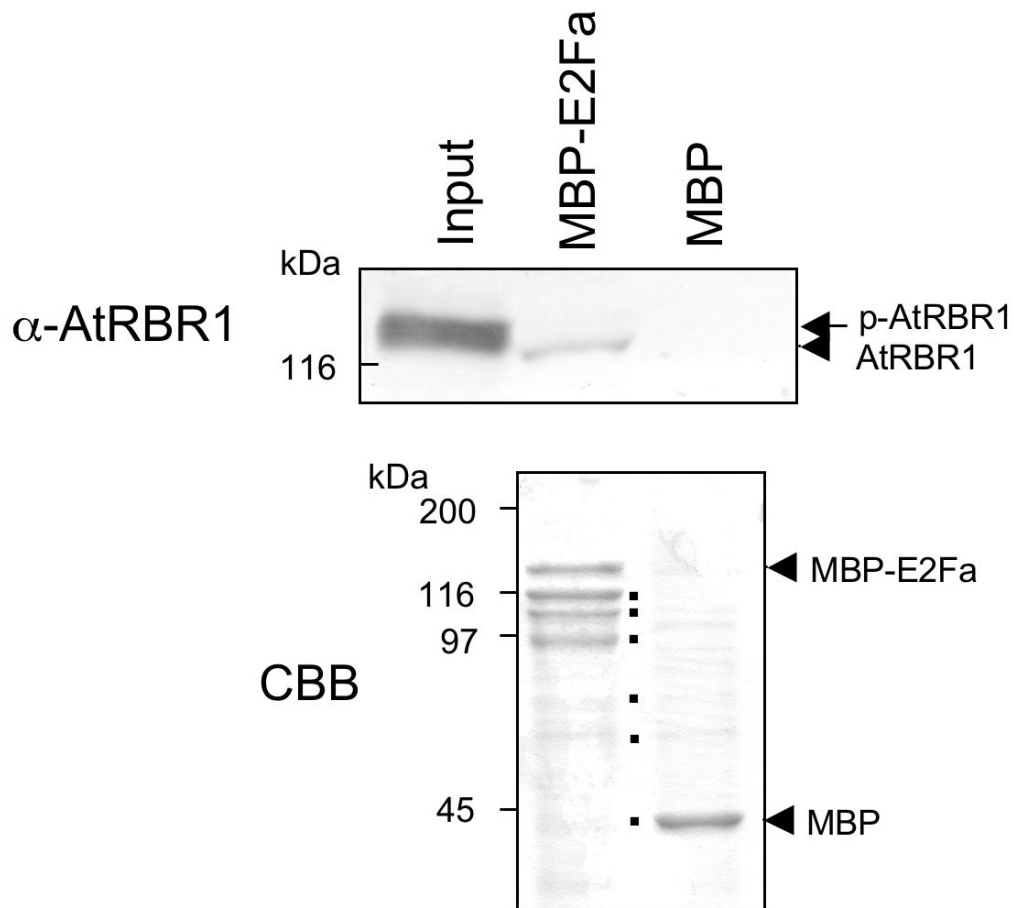


Fig.4 MBP プルダウンによる AtRBR1 と E2Fa との結合解析
 E2Fa の N 末端に MBP (maltose-binding protein) を融合した MBP-E2Fa と MBP を大腸菌で発現させて精製した。次に、植え継ぎ後 3 日目の MM2d の WCE と MBP-E2Fa、MBP を混和してアミロースレジンと結合させた。レジン洗净後、抗 AtRBR1 抗体を用いたウエスタン解析によって AtRBR1 との結合を解析した (上のパネル)。下のパネルには、レジンに結合した MBP または MBP-E2Fa を CBB 染色で確認している。ドットはおそらく MBP-E2Fa の分解産物と思われる。

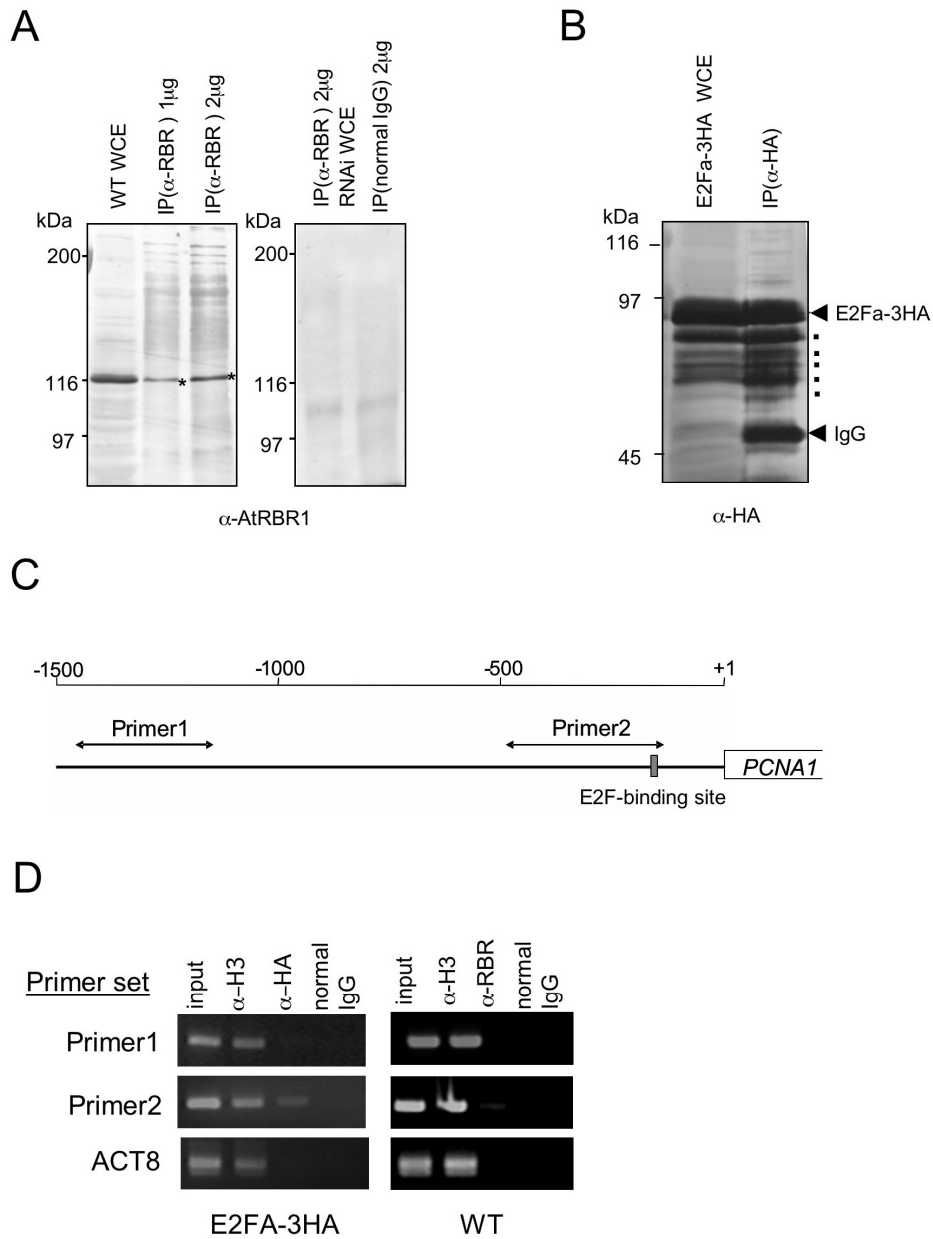


Fig.5 E2F 結合配列を持つ *PCNA1* プロモーターへの E2Fa と AtRBR1 の結合

(A) MM2d 細胞の WCE から、抗 AtRBR1 抗体 (1 or 2 μ g) を用いて AtRBR1 が免疫沈降 (IP) できるか検証した。左のパネルは野生型 (WT) MM2d 細胞で免疫沈降した後に抗 AtRBR1 抗体を用いて検出した。右のパネルは RNAi で AtRBR1 を抑制した RNAi 細胞 (後述) で行った。星印は沈降してきた産物を示している。(B) E2Fa 自身のプロモーターで E2Fa-3HA (E2Fa の C 末端に HA タグを 3 つ連結) を発現する形質転換体を作製し、抗 HA 抗体 (2 μ g) を用いて免疫沈降を行い、抗 HA 抗体でウェスタン解析した。ドットで示したものはおそらく分解産物であると思われる。(C)

PCNA1 遺伝子のプロモーター領域の模式図を示した（開始コドンの A を+1 とした）。図中に E2F 結合サイトとプライマー設定領域を示している。(D) 植え継ぎ後 3 日目の WT 細胞と E2Fa-3HA を発現する細胞を用いて ChIP 解析を行った。抗 HA 抗体は E2Fa の免疫沈降に、抗 NtRBR1 (RBR) 抗体は AtRBR1 の免疫沈降に、HisotneH3 (H3) 抗体は HistoneH3 を免疫沈降し実験のポジティブコントロールとして、normal IgG は実験のネガティブコントロールとして用いた。また、input は PCR のコントロールとして用いた。左側に用いたプライマーのセットを示している。ACT8 は *ACT8* のプロモーター領域にプライマーを設定してプライマーのネガティブコントロールとして用いた。

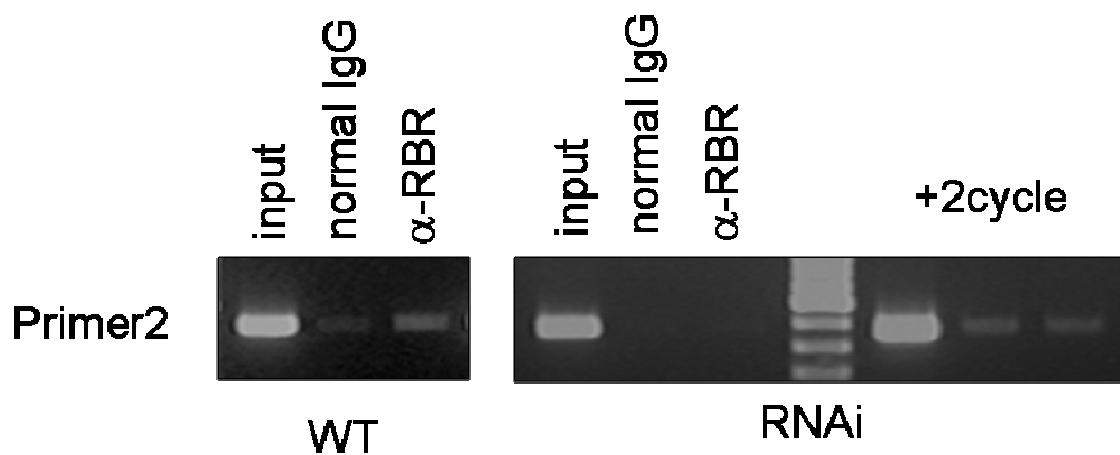


Fig.6 E2F 結合配列を持つ *PCNA1* プロモーターへの AtRBR1 の結合
 植え継ぎ後 7 日目の定常期に当たる WT 細胞と、同じく定常期の AtRBR1
 を抑制した RNAi 細胞（後述）を用いて ChIP 解析を行った。抗 NtRBR1
 （RBR）抗体は AtRBR1 の免疫沈降に、normal IgG は実験のネガティブ
 コントロールとして用いた。また、input は PCR のコントロールとして
 用いた。RNAi 細胞ではさらに PCR のサイクルを 2 サイクル増やしたも
 のも示している。Primer2 は Fig.5 と同じである。

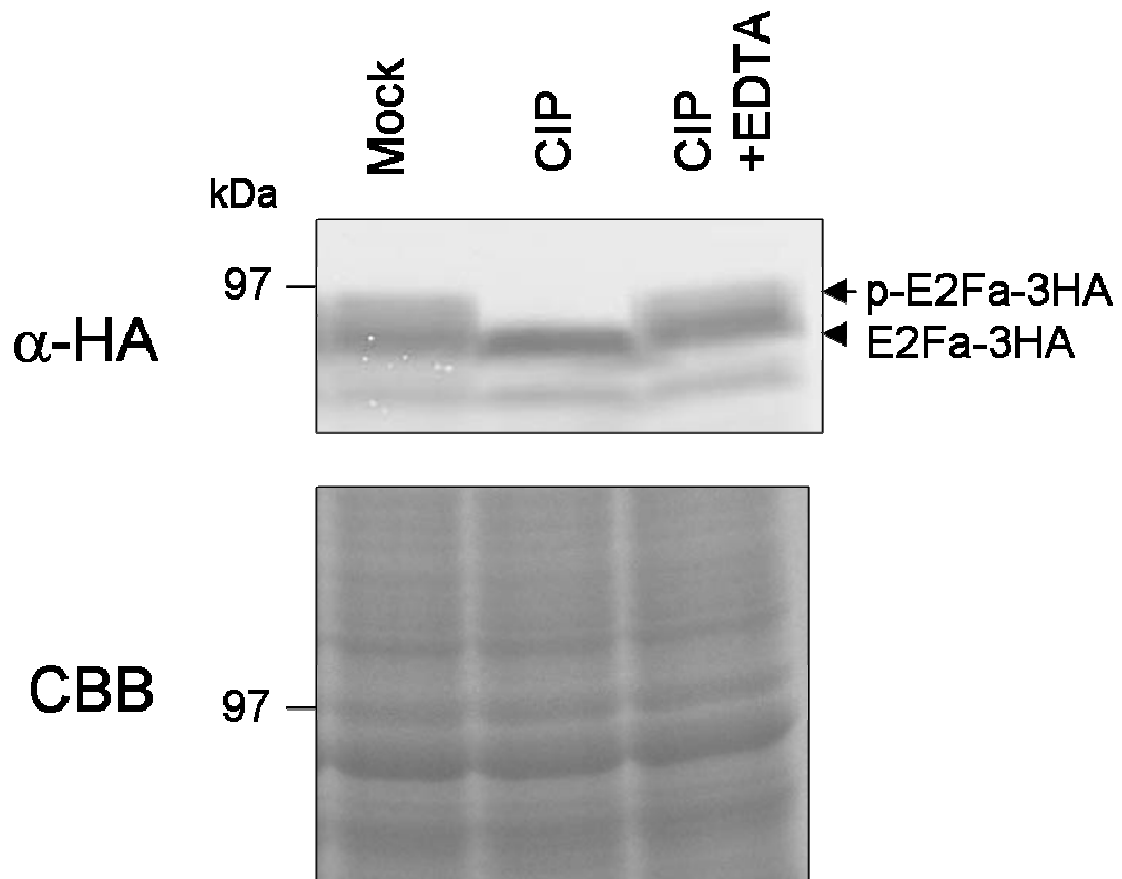


Fig.7 ホスファターゼによる E2Fa の脱リン酸化

高分子量側にバンドが認められる植え継ぎ後3日目のWCEを用いてCIP処理を行った。左のレーンはCIPを加えず37°Cの熱処理だけを行った(Mock)。真ん中のレーンはCIPを37°Cで熱処理した。右のレーンはCIPとその阻害剤であるEDTAを終濃度50mMとなるように加えて37°Cで熱処理した。矢印が高分子量側にシフトしたリン酸化されたE2Fa-3HA(p-E2Fa-3HA)を示し、矢頭がリン酸化されていないE2Fa-3HAを示している。

4-2 AtRBR1 の抑制系を用いた機能解析

はじめに

ここから、細胞レベルでの AtRBR1 の機能を解析するために、エストロゲン誘導系 RNAi を用いた *AtRBR1* の抑制を行った。誘導系を用いた理由として、1 つは構成的な *AtRBR1* の抑制は植物の発生に致命的な影響を与えることが分かっており、形質転換体が選抜できない可能性を考慮したこと。2 つ目として転写因子 E2Fb を過剰発現する培養細胞は長期間維持できないこと分かっていて、*AtRBR1* を抑制した細胞でも長期間維持できない可能性を考慮した点が挙げられる。

また誘導系には、植物はエストロゲンレセプターを持たないことと、エストロゲンが植物体の生長や培養細胞の分裂になんら影響を与えないことが報告されているエストロゲンを用いた誘導系 RNAi を採用した (Zuo et al., 2000; Magyer et al., 2005)

この系を用いて、AtRBR1 が細胞周期進行にどのように寄与しているのか、またシヨ糖飢餓における G1 期での細胞周期停止に関わっているのかを解析した。

4-2-1 誘導系 RNAi によって AtRBR1 を抑制した細胞の表現型

AtRBR1 の転写を RNAi を誘起して抑制するために、*AtRBR1* の 3' 末端から 496bp の領域をリンカーを挟んで逆方向反復配列となるようにエストロゲン誘導プロモーターの下流に組み込んだ。シロイヌナズナの遺伝子には、この配列中に 20 塩基以上相同性のあるものが *AtRBR1* 以外に存在しないため他の遺伝子への影響はないものと考えられる。次にこのベクターをアグロバクテリウム法で MM2d 細胞に導入したところ、ハイグロマイシン耐性を持つ 11 種類の独立したラインが得られた。その中から AtRBR1 を検出限界以下まで抑制できる 4 つのラインが得られ、その 4 つのラインでは細胞サイズや定常期の新鮮重量が同様に变化した。これ以降はその代表として 1 ライン (これ以降 RNAi 細胞と表記) の結果を示した (Fig.8、Fig.9)。

次により詳しく AtRBR1 の抑制レベルを調べるため、定常期の RNAi 細胞をエストロゲン含む培地と溶媒コントロールとして DMSO を含む培地に植え継いで各々 1 日おきにサンプルを回収し、ウエスタン解析を行った。その結果、誘導後 1 日目ではほとんどの AtRBR1 タンパク質が減少し、2 日目以降はタンパク質が検出されなかった (Fig.8A)。また同じ

バッチを用いて植え継ぎ後 7 日目まで、誘導をかけた細胞とコントロールの細胞の新鮮重量 (Fig.8.B) および細胞数 (Fig.8C) を測定した。ここで、MM2d 細胞は高度に凝集した細胞塊として成長するため、凝集した細胞をプロトプラスト化してほとんどが単一細胞の状態にしてから細胞数を測定した。その結果、7 日間の培養期間で DMSO コントロールと比較して細胞数は変化しないが、重量がコントロールよりも減少することが分かった。

次に、この重量の変化が細胞サイズの違いによるものであるかどうかを確認するために細胞サイズの比較を行った。ここでも、MM2d 細胞の凝集が問題となるため、細胞をプロトプラスト化してから細胞サイズを測定した。その結果、誘導をかけた細胞で細胞サイズが 2 日目から持続的に減少していくことが分かり (Fig.9A)、細胞サイズの差が顕著な 7 日目のプロトプラスト化していない細胞を蛍光色素で染色した蛍光顕微鏡像を示した (Fig.9B)。さらに、植え継ぎ後から 7 日目までのサンプルの DNA 含量を測定し、細胞周期を算出したところ大きな違いが見られた (Fig.9C)。通常、細胞が定常期をむかえるとコントロールのように 80%以上の細胞が G1 期で細胞周期を停止させ、G2 期は 20%程度の割合となる。しかし、誘導をかけた細胞では全体的に G2 期の細胞の割合が大きくなり、特に 4 日目くらいからその傾向が顕著となり、7 日目になると 80%以上の細胞が G2 期で停止していることが分かった。また、2 日目から 4 日目までを対数増殖期とし、倍加時間を測定した後に対数増殖期における各細胞周期の割合を算出した (Table 1)。まず、2 日目から 4 日目までの増加率を $N(t) = N(0) r^t$ (N: 細胞数、r: 増加率、t: 時間) の式で算出した。次に、倍加時間 (Td) を $Td = \ln 2 / \ln r$ の式で算出した。この倍加時間を元に、3 日目、4 日目の細胞周期の割合から各細胞周期の時間を算出した (Granier and Tardieu, 1998、Menges et al., 2006)。その結果、誘導をかけた細胞、コントロールともに倍加時間はほとんど変わらないが、誘導をかけた細胞ではコントロールと比較して G1 期が短く、G2 期が顕著に長い傾向が見られた。

4-2-2 AtRBR1 の長期の抑制は G2 期での遅延を引き起こす

ここまでの解析で AtRBR1 を抑制すると G1 期の細胞割合が減少し、G2 期の細胞割合が多くなることが分かった。そこで、より詳細に AtRBR1 の細胞周期への影響を調べるため、細胞周期を同調化する実験系を用いて細胞周期の推移を調べた。同調化には DNA ポリメラーゼの阻害剤であるアフィディコリンを用いて G1 後期から S 期開始の段階で細胞周期

を停止させ、その後薬剤の洗浄によって細胞周期を開始させる系を用いた。シロイヌナズナの培養細胞では MM2d が唯一同調化可能な細胞であるが、タバコ培養細胞 BY-2 ほどの同調率は得られず、M 期を過ぎた辺りからはほとんど同調しない（データ未掲載）。したがって、ここでは S 期から M 期までの期間を調べることにした。

まず、植え継ぎ時に DMSO 処理したコントロール細胞とエストロゲンで誘導処理した RNAi 細胞を 5.5 日目まで培養し、それらの細胞をアフィディコリンで 24 時間処理した。アフィディコリン洗浄後、3 時間毎に 15 時間までサンプリングを行い、細胞周期を解析した (Fig.10A)。また、同じバッチで AtRBR1 タンパク質の蓄積量をウエスタン解析で調べて、エストロゲン処理した RNAi 細胞で AtRBR1 タンパク質がほとんど検出されないことを確認した (Fig.10B)。細胞周期の解析の結果、アフィディコリン洗浄後 0 時間では両者の差は見られず、ほとんどの細胞が G1/S 移行期にあり、高い同調率が得られた。コントロール細胞ではアフィディコリン洗浄後 12 時間から 15 時間で G1 期の細胞が大きく増加し、M 期から次の周期の G1 期へと移行していたが、誘導をかけた細胞ではアフィディコリン洗浄後 12 時間と 15 時間での G1 期へと移行する細胞の割合がより少ないことが分かった。

この結果から、AtRBR1 を抑制した細胞では M 期移行が遅れていることが考えられたため、G2 期から M 期への移行に関わる遺伝子であり M 期直前に発現することが分かっている *CYCA1;1*、*CYCB2;3*、*CDKB2;2* の転写レベルを調べた (Fig.10C)。その結果、コントロールの細胞ではアフィディコリン洗浄後 12 時間でこれら遺伝子群が高い発現を示しており、多くの細胞が M 期から次の G1 期への移行することと合致していた。しかし、誘導をかけた細胞ではこれら遺伝子群の発現は見られるものの発現レベルが低く、Fig.10A で見られた M 期から次の G1 期へ移行する細胞の割合がより少ないことと一致していた。

定常期の RNAi 細胞をエストロゲン処理して AtRBR1 タンパク質が検出されなくなるまで 2 日間を要することから (Fig.8A)、Fig.10 の実験では植え継ぎ時にエストロゲン処理して解析を行った。しかし、誘導をかけた細胞では細胞サイズが大きく減少するなど (Fig.9A)、アフィディコリン処理する時の細胞の生理状態が必ずしも同じではない。そこで、RNAi 細胞を植え継ぎ後 5.5 日目まで培養し、その後アフィディコリン処理と同時にエストロゲンによる誘導を行った。アフィディコリン洗浄後、2 時間毎に 16 時間までサンプリングを行い、細胞周期を解析した (Fig.11A)。その結果、アフィディコリン洗浄後 0 時間で 70%程度の細胞が G1 期にあり、どちらかという Fig.10A の同調化よりも G1 期側で

同調していた。また、アフィディコリン洗浄後の細胞周期の進行は誘導をかけた細胞とコントロール細胞でほとんど差が見られなかった。このときエストロゲン処理した細胞でわずかに AtRBR1 タンパク質が検出されたがコントロールと比較して大きな差が見られた (Fig.11B)。しかし、AtRBR1 タンパク質レベルがこれ程減少しても、ほとんど細胞周期に影響しないことが分かった。

これらの結果から、AtRBR1 が短期間抑制されても細胞周期に影響は見られないが、AtRBR1 の抑制状態が長く続くとなんらかの理由により M 期移行に関係する遺伝子群の発現レベルが低くなり、G2 期が延長し、コントロール細胞に比べて M 期移行が遅延することが示唆された。

4-2-3 AtRBR1 を抑制することによりショ糖飢餓で G2 期停止する細胞割合が増加する

対数増殖期の細胞からショ糖を除去すると S 期進行が阻害され、G1 期で停止することが明らかとなっている (Menges and Murray 2002; Planchais et al., 2004)。したがって、G1 期に細胞周期進行の制御点があることが想定され、AtRBR1 がこの G1 期制御点でどのような影響を及ぼしているのかを調べるため、AtRBR1 を抑制した細胞がショ糖飢餓の条件下でどのように応答するかを調べた。

培養 2 日目の誘導をかけた細胞とコントロール細胞をそれぞれ 0%、0.3%、3%ショ糖を含む新鮮な培地で洗浄後に各培地に移し換え、12 時間毎にサンプリングして細胞周期 (Fig.12A) と細胞数 (Fig.12B) を調べた。誘導 2 日目で AtRBR1 が検出不可能なレベルになるため (Fig.8A) 2 日目の細胞を用いたが、Fig.9C の結果から分かるように植え継ぎ後 2 日目でコントロールと誘導をかけた細胞で細胞周期の分布に違いが見られ、この実験でも培地交換後 0 時間目で両者は同じ割合ではない。したがって、この実験では最終的な細胞周期の割合ではなく細胞周期の変化率に着目した。細胞数の計測データから、3%ショ糖存在下では細胞分裂が続いており 36 時間後でも細胞が増殖し続けた。0.3%ショ糖存在下では 24 時間後までは増殖を続けるがそれ以降はほぼ分裂が停止した。一方、0%ショ糖の場合は培地交換後から全く細胞数の増加が見られず、細胞分裂が停止していることが分かった。このときの細胞周期の変動を見てみると、増殖が活発な 3%ショ糖存在下では誘導をかけた細胞、コントロール細胞ともにほとんど細胞周期の割合に変化はなかった。0.3%ショ糖存在下において、コントロール細胞では 36 時間後に G1 期の細胞が比較的蓄積しており、逆に誘導をかけた細胞では G1 期細胞の割合が

減少し G2 期細胞の割合が多くなっていった。さらに 0%シヨ糖において、コントロール細胞では S 期細胞がほとんど見られなくなり、12 時間以降ほとんど細胞周期の割合が変動せず、G1、G2 期でともに細胞周期が停止していることが分かった。これに対して誘導をかけた細胞では、培地交換後 12 時間で G1 期の細胞が顕著に減少し G2 期の細胞が蓄積していた。これらの結果から、シヨ糖飢餓において、AtRBR1 を抑制した細胞では G1 期の制御点が機能せずに S 期に移行し、G2 期まで細胞周期が進行することが示唆された。

4-2-4 AtRBR1 の抑制によりシヨ糖飢餓においても E2F 制御遺伝子が転写活性化される

シロイヌナズナ培養細胞を用いたシヨ糖飢餓におけるトランスクリプトーム解析によって、DNA 複製に関わる遺伝子群が転写抑制されることが報告されている (Content et al., 2004)。これら DNA 複製に関わる遺伝子群のプロモーター上には E2F 結合配列が存在していることが明らかとなっている。実際、DNA ポリメラーゼ δ の補助因子でありスライディングクランプとも呼ばれる PCNA (Egelkroust et al., 2002)、DNA 複製開始を制御する複製開始複合体 (replicative complex : RC) の形成に関わる ORC (Origin recognition complex) ファミリー (Diaz-Trivino et al., 2005)、CDC6 (Cell division cycle 6) (Castellano et al., 2001)、MCM (Minichromosome maintenance) ファミリー (Stevens et al., 2002)、細胞内の dNTP 合成に関わる RNR (Ribonucleotide reductase) (Chaboute et al., 2000; 2002) などは植物においても詳細な研究がなされており、植物 E2F によって転写活性化されることが明らかとなっている。シヨ糖飢餓においてはこれらの DNA 複製に関わる遺伝子群の転写を速やかに抑制し、細胞周期を停止させることが重要だと考えられる。

ここで Fig.11 の結果から、AtRBR1 を抑制したときにシヨ糖飢餓においても G1 期から G2 期への細胞周期の進行が観察されたので、シヨ糖飢餓における E2F 制御遺伝子群の発現を解析することにした。発現解析には定量的リアルタイム RT-PCR を用い、構成的に発現している *ACT8* を用いてテンプレート間の補正を行った。その結果、3%シヨ糖存在下で誘導をかけた細胞と非誘導細胞の発現を比較すると、誘導をかけた細胞ではコントロール細胞よりもこれら遺伝子群の発現が全体的に上昇しており、特に *RNR* では高い発現上昇が確認され E2F 制御遺伝子が転写活性化していることが分かった (Fig.13)。次に、0.3%シヨ糖存在下で発現を比較したところ、コントロール細胞では *PCNA1* や *ORC6*、*RNR* は培地

交換後 36 時間後には発現が減少するのに対して、誘導をかけた細胞では 36 時間後に若干の減少は見られるものの、ほとんど発現が減少せずに高い発現レベルを維持していることが分った。また、*CDC6* や *MCM2*、*MCM3* もコントロール細胞において 36 時間後にやや発現が減少したが、誘導した細胞ではコントロールよりも高い発現レベルを維持していた。最後に、0%シヨ糖では培地交換後 12 時間でこれら遺伝子群の発現が急激に減少したが、誘導をかけた細胞では高い発現レベルを維持していた。しかし、*PCNA1* や *ORC6*、*RNR* では誘導をかけた細胞においても発現が段階的に減少してくことが分った。一方、比較対照として用いた *ACT2* はシヨ糖濃度に関わらず、誘導をかけた細胞とコントロール細胞で特に大きな発現の変動は見られなかった。

これらの結果から、シヨ糖飢餓において *AtRBR1* を抑制しても DNA 複製に関わる遺伝子群の転写を抑制することができないために、G1 期から S 期へと細胞周期が進行することが考えられた。

4-2-5 シヨ糖飢餓において *AtRBR1* はプロテアソーム系で分解される

これまでの結果から、シヨ糖飢餓において *AtRBR1* が DNA 複製に関わる遺伝子群の転写抑制に寄与することが示唆されたが、実際にどのような機構で転写抑制を行っているのかが分かっていない。そこで、まずシヨ糖飢餓において *AtRBR1* タンパク質がどの程度存在しているのかを解析することにした。

Fig.10 の実験で用いた細胞と同じ細胞からタンパク質を抽出し、*AtRBR1* の発現を調べた (Fig.14)。その結果、当然のことながら誘導をかけた細胞では *AtRBR1* は検出されなかった。一方、コントロール細胞において 3%シヨ糖存在下では *AtRBR1* は 36 時間後まで同程度に存在していたが、0.3%シヨ糖存在下では培地交換して 24、36 時間後に *AtRBR1* の減少が見られた。さらに、0%シヨ糖では培地交換後 12 時間で *AtRBR1* が検出できなくなった。ローディングコントロールとして示した CBB 染色では主要なバンドは変化がないため、*AtRBR1* が特異的に減少していると考えられる。シヨ糖飢餓においても *AtRBR1* 遺伝子の発現は特に大きな減少は見られないため (Fig.13)、おそらく翻訳後制御を受けているものと考えられる。

ここで、細胞周期に関わる因子の多くがプロテアソーム系による分解を受けることが知られており、*AtRBR1* もプロテアソーム系によって分解されるかを解析した。植え継ぎ後 3 日目の野生型 MM2d 細胞をシヨ糖

飢餓培地に交換し、その後プロテアソーム阻害剤である MG132 を加えたもの、コントロールとして DMSO を加えたものを用意した。その後、4 時間毎に 24 時間までサンプリングし AtRBR1 タンパク質の蓄積量を比較した (Fig.15)。その結果、Fig.14 の結果と同様に 3%ショ糖存在下では AtRBR1 は 24 時間後まで同程度蓄積したが、0%ショ糖では 12 時間後には大部分が分解し 16 時間以降ほとんど検出されなかった。一方で、プロテアソーム阻害剤である MG132 を加えたものでは培地交換後 20 時間でも AtRBR1 が検出され、明らかに分解が遅延していることが分かった。コントロールとして用いた DMSO では AtRBR1 の分解の遅延は起こっていなかった。

以上の結果から、AtRBR1 はショ糖飢餓においてプロテアソーム系によって分解を受けることが強く示唆された。

4-2-6 ショ糖飢餓において E2Fa、E2Fb、E2Fc も分解される

ショ糖飢餓において AtRBR1 がプロテアソーム系によって分解を受けることが示唆された。一方、ショ糖飢餓で AtRBR1 が分解するにも関わらず、E2F により制御される DNA 複製に関わる遺伝子群の転写抑制が起っていた。したがって、AtRBR1 が存在しない状況でどのようにして E2F 制御遺伝子の発現が抑制されるかが次の問題となる。そこで、ショ糖飢餓における E2F タンパク質の蓄積量の変動を調べることにした。

E2Fa、E2Fb、E2Fc の C 末端に HA タグを 3 つ連結した融合タンパク質を、自身のプロモーターで発現する形質転換体 (E2Fa-3HA、E2Fb-3HA、E2Fc-3HA) を作製した。次にそれぞれの細胞を植え継ぎ後 2 日目まで培養し、3%および 0%のショ糖を含む培地に交換した。その後、12 時間毎に 36 時間までサンプルを回収し、それぞれのタンパク質の発現を解析した (Fig.16)。その結果、E2Fa-3HA、E2Fb-3HA、E2Fc-3HA とともに 0%ショ糖に培地交換すると分解することが分かった。E2Fa-3HA は培地交換後 12 時間、E2Fb-3HA は 24 時間、E2Fc-3HA は 36 時間で検出限界レベルまで分解した。また、E2Fb-3HA、E2Fc-3HA のウエスタン解析の結果のコントラストを上げることで、培地交換 24 時間後または 36 時間後のサンプルで高分子量側に星印で示したバンドが現れることが分かった。

次に、プロテアソーム系による分解なのかどうかを確かめるため、植え継ぎ後 3 日目のそれぞれの細胞をショ糖飢餓培地に交換し、その後プロテアソーム阻害剤である MG132 を加えたもの、コントロールとして DMSO を加えたものを用意した。その後、12 時間毎に 24 時間までサン

プリンティングし各 E2F の量を比較した (Fig.17)。その結果、コントロールでは E2Fa が培地交換後 12 時間、E2Fb、E2Fc が 24 時間で分解したが、MG132 を加えたサンプルでは E2Fa は 12 時間でもタンパク質が検出され、E2Fb、E2Fc も 24 時間までタンパク質を検出することができた。

以上の結果から、E2Fa、E2Fb、E2Fc はショ糖飢餓によってプロテアソーム系によって分解を受けることが強く示唆された。

Condition	Doubling time (h)	Percentage of cells in cell cycle phase (%)			Duration of each phase (h)		
		G1	S	G2	G1	S	G2
		DMSO (コントロール)	18.8	52.6 ^a	9.5 ^a	37.9 ^a	9.9 ^a
Estrogen (誘導)	17.6	30.8 ^a	18.7 ^a	50.5 ^a	5.4 ^a	3.3 ^a	8.9 ^a
DMSO (コントロール)	18.8	66.3 ^b	9.5 ^b	24.2 ^b	12.5 ^b	1.8 ^b	4.6 ^b
Estrogen (誘導)	17.6	31.0 ^b	7.1 ^b	61.9 ^b	5.4 ^b	1.3 ^b	10.9 ^b

Table 1. *AtRBRI* の RNAi を誘導した細胞 (Estrogen) とコントロール細胞 (DMSO) の対数増殖期での倍加時間と細胞周期の時間
対数増殖期に当たる植え継ぎ後2日目から4日目の細胞から倍加時間を算出した。フローサイトメーターを用いて3日目と4日目の細胞周期の割合から、倍加時間を元にそれぞれの細胞周期の時間を算出した。^aを付加したものは3日目細胞から計算した値、^bを付加したものは4日目から計算した値を示している (Granier and Tardieu, 1998; Menges et al., 2006)。

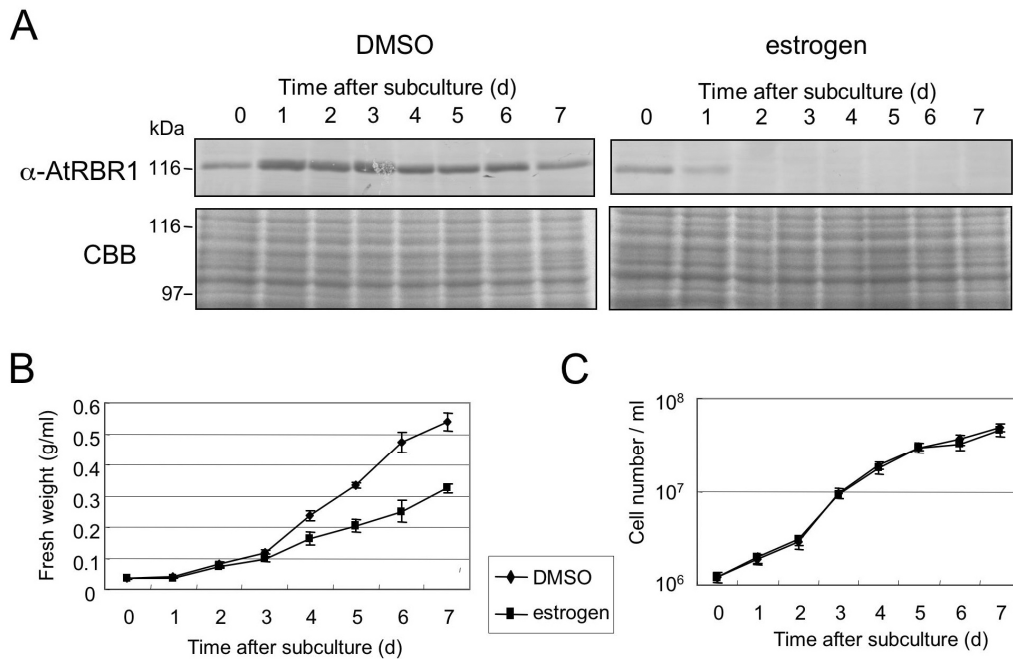


Fig.8 AtRBR1 を抑制した時の新鮮重量および細胞数

エストロゲン誘導系 RNAi で AtRBR1 を抑制可能な形質転換体を作製した。植え継ぎ時にエストロゲンで誘導をかけたもの (estrogen) と溶媒コントロールである DMSO を加えたもの (DMSO) を 1 日毎に 7 日目までサンプリングした。(A) それぞれのサンプルで抗 AtRBR1 抗体を用いたウエスタン解析。(B) 新鮮重量の測定。(C) 細胞数の測定。細胞をプロトプラスト化し、凝集した細胞を単細胞化してから細胞数を測定した。菱形が DMSO 細胞、四角が estrogen 処理した細胞を示し、エラーバーは SD (n=3) を示している (B、C)。

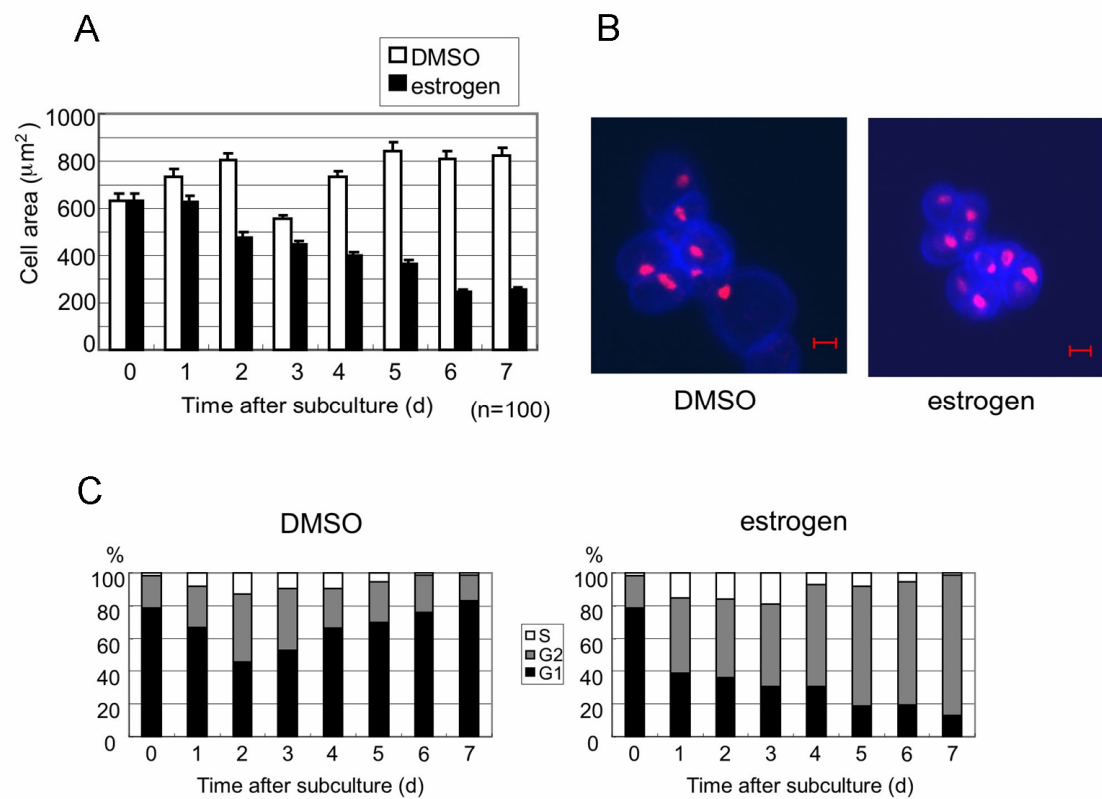


Fig.9 AtRBR1 を抑制した時の細胞面積および細胞周期の解析
 Fig.8 と同様に植え継ぎ時にエストロゲンで誘導をかけたもの (estrogen) と溶媒コントロールである DMSO を加えたもの (DMSO) を 1 日毎に 7 日目までサンプリングした。(A) 細胞をプロトプラスト化し、凝集した細胞を単細胞化してから細胞面積を測定した。エラーバーは SE (n=100) を示している。白色が DMSO 細胞で黒色が estrogen 処理した細胞を示している。(B) 培養 7 日目の DMSO、estrogen 処理した細胞を propidium iodide (PI) と Calcofluor で染色した。赤色が PI で核を染色しており、青色が Calcofluor で細胞壁を染色している。スケールバーは $10\mu\text{m}$ を示している。(C) それぞれの細胞からフローサイトメーターを用いて細胞周期を解析した (白色 : S 期、灰色 : G2 期、黒色 : G1 期)。

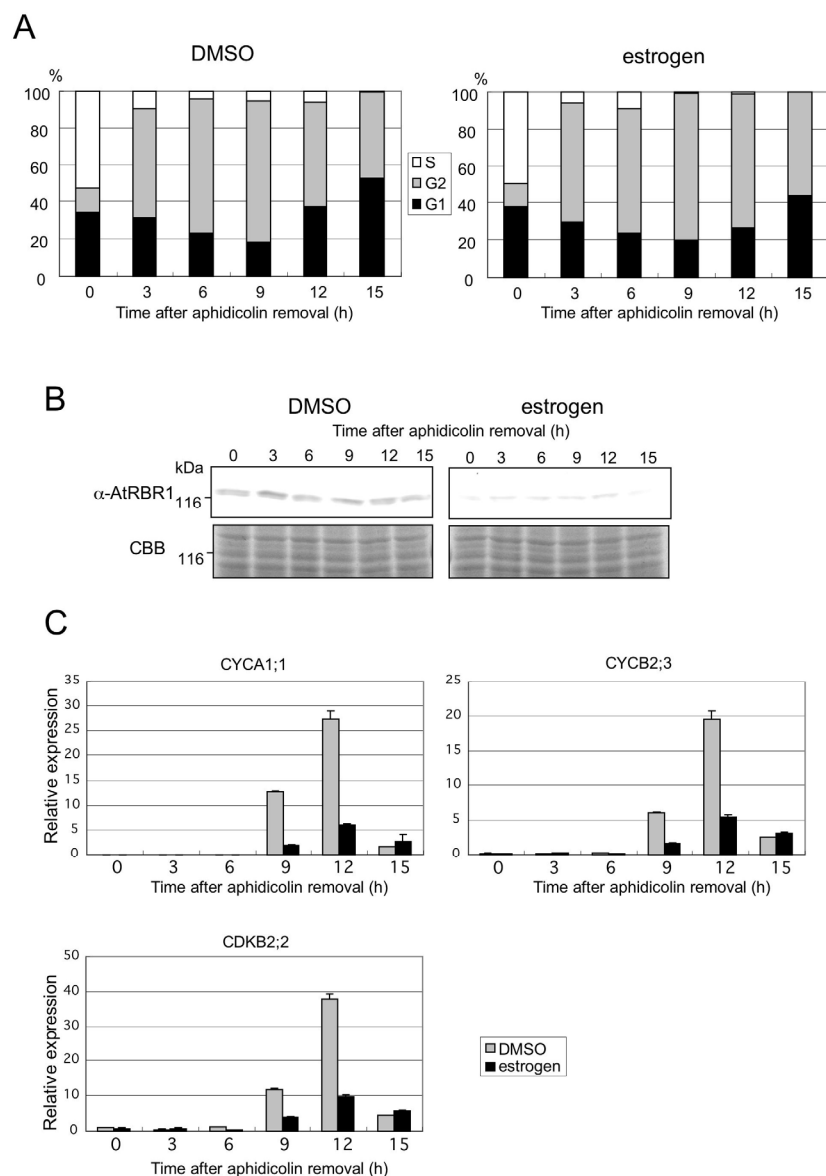


Fig.10 AtRBR1 の抑制が細胞周期に与える影響①

植え継ぎ時からエストロゲンで誘導処理を行って 5.5 日目まで培養し、その細胞をアフィディコリンによって G1/S 期で同調化したときの細胞周期の変動を解析した。アフィディコリン洗浄後 3 時間毎に 15 時間までサンプリングを行った。(A) フローサイトメーターによる細胞周期を解析した (白色 : S 期、灰色 : G2 期、黒色 : G1 期)。(B) 抗 AtRBR1 抗体を用いてウエスタン解析 (上のパネル) を行い、ローディングコントロールとしての CBB 染色を行った (下のパネル)。(C) G2/M 期マーカー遺伝子を定量的リアルタイム RT-PCR で解析した。ACT8 の発現でサンプル間を標準化したときの相対値で示している。エラーバーは SD (n=3) を示している。(灰色 : DMSO コントロールの発現、黒色 : エストロゲンによって誘導をかけた細胞の発現)

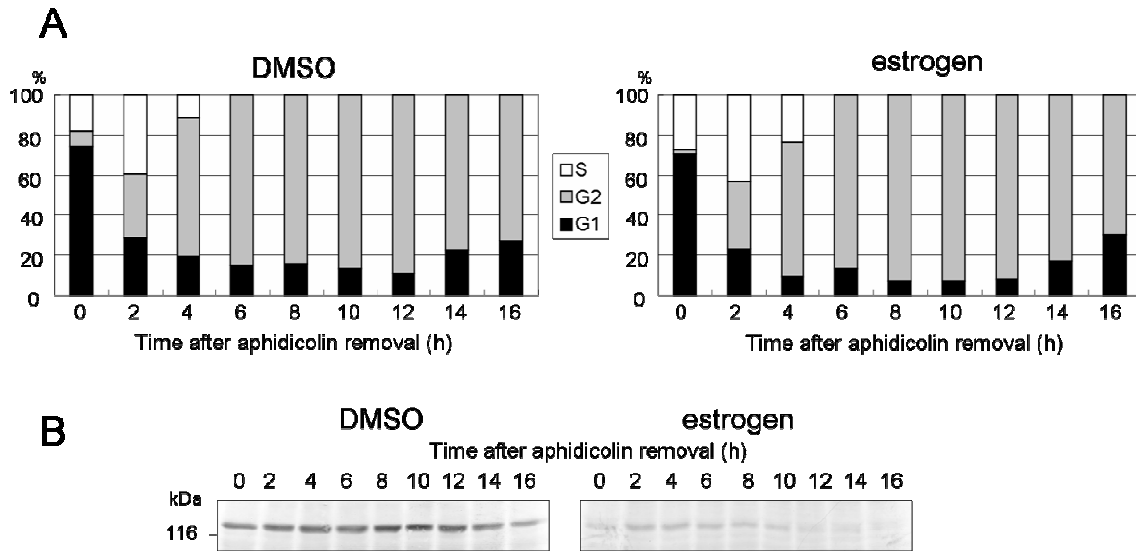


Fig.11 AtRBR1 の抑制が細胞周期に与える影響②

5.5 日目まで通常の培養を行い、アフィディコリンによる同調化処理とエストロゲン誘導処理を同時に行って、AtRBR1 を抑制したときの細胞周期の変動を解析した。アフィディコリン洗浄後 2 時間毎に 16 時間までサンプリングを行った。

(A) フローサイトメーターによる細胞周期解析 (白色 : S 期、灰色 : G2 期、黒色 : G1 期)。(B) DMSO と estrogen 処理した細胞を用いた抗 AtRBR1 抗体によるウエスタン解析。

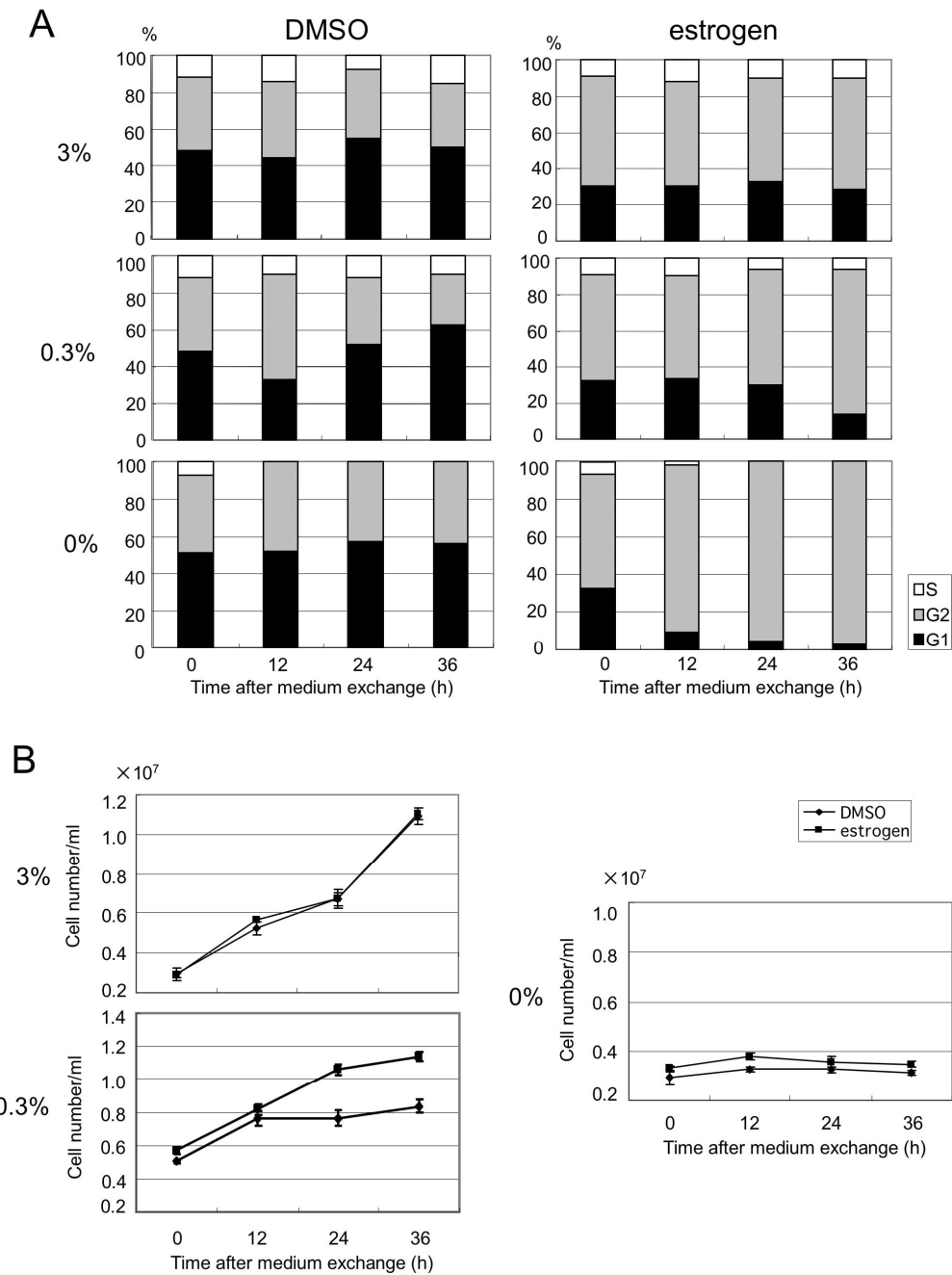


Fig.12 ショ糖飢餓における AtRBR1 を抑制した細胞の細胞周期の変動
 植え継ぎ時からエストロゲンで誘導処理を行い、AtRBR1 がほぼ検出で
 きなくなる 2 日目まで培養し、その細胞をそれぞれ 3%、0.3%、0%のシ
 ョ糖を含む培地に交換した（図の左側にショ糖濃度を示した）。その後
 12 時間毎に 36 時間までサンプリングを行った。（A）フローサイトメー
 ターによる細胞周期解析（白色：S 期、灰色：G2 期、黒色：G1 期）。（B）
 細胞数の経時変化。エラーバーは SD (n=3) を示している。

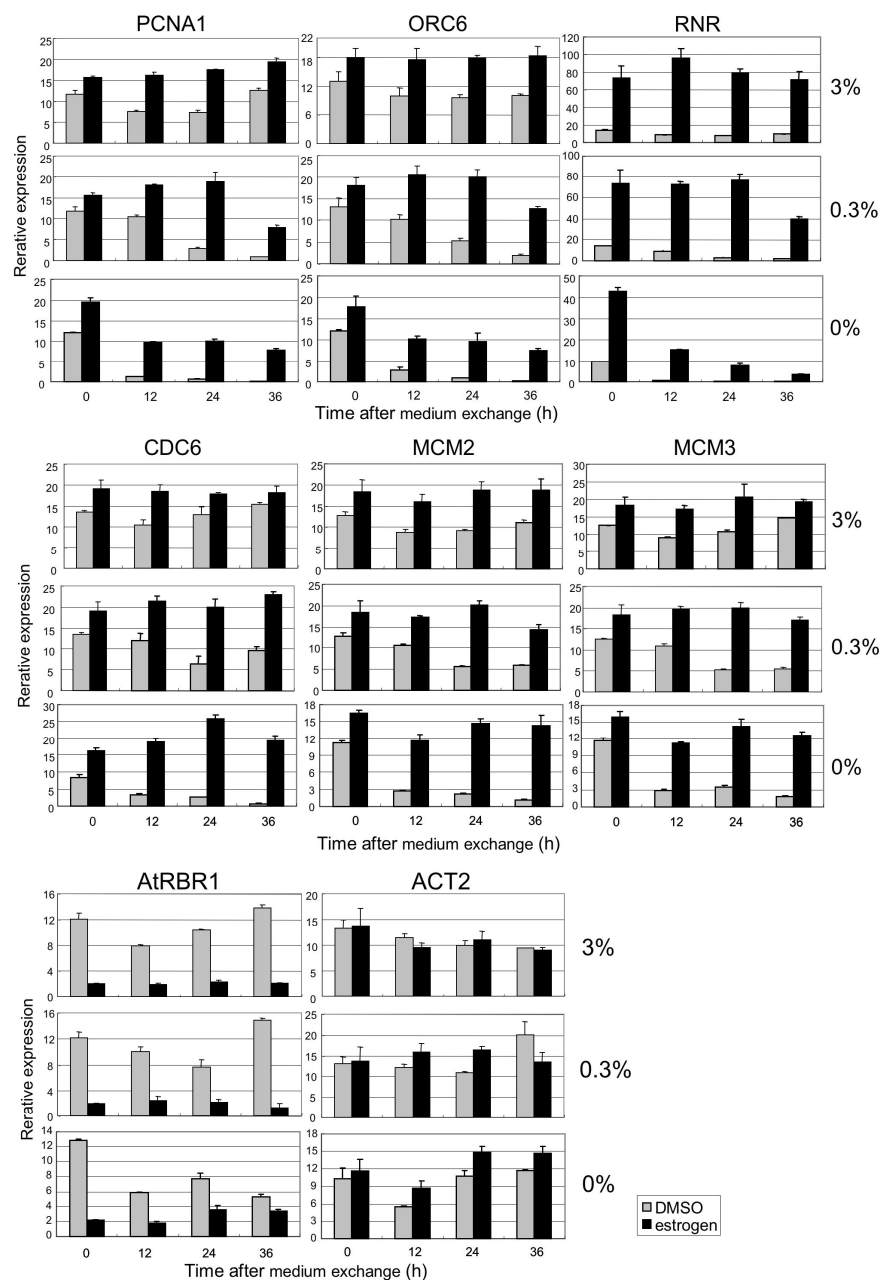


Fig.13 ショ糖飢餓における AtRBR1 を抑制した細胞の E2F 制御遺伝子の発現解析

Fig.11 で用いた細胞と同じバッチの細胞から全 RNA を抽出し、定量的リアルタイム RT-PCR を行い、E2F 制御遺伝子の発現を解析した (灰色: DMSO コントロールの発現、黒色: エストロゲンによって誘導をかけた細胞の発現)。ACT8 の発現でサンプル間を標準化したときの相対値で示し、エラーバーは SD (n=3) を示している。

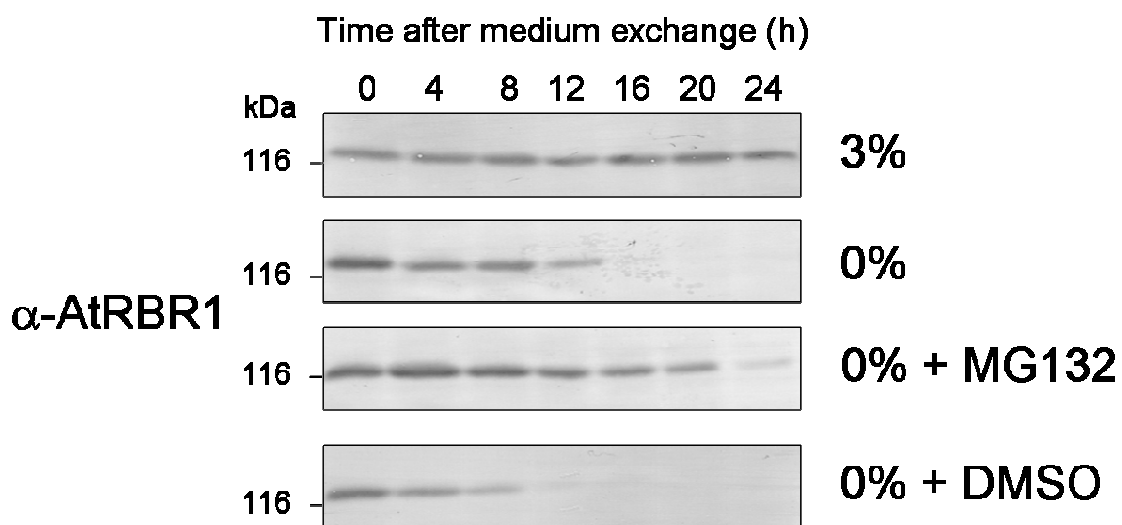


Fig.15 ショ糖飢餓におけるプロテアソーム阻害剤 MG132 を加えたときの AtRBR1 タンパク質の蓄積量の経時変化

植え継ぎ後 3 日目の細胞を 3%、0% のショ糖を含む培地、0% のショ糖培地にプロテアソーム阻害剤である MG132 を終濃度 $100\mu\text{M}$ となるように加えた培地、溶媒コントロールとして 0% ショ糖培地に DMSO を加えた培地にそれぞれ置換し、4 時間毎に 24 時間までサンプリングを行った。その後、抗 AtRBR1 抗体を用いてウエスタン解析を行った。

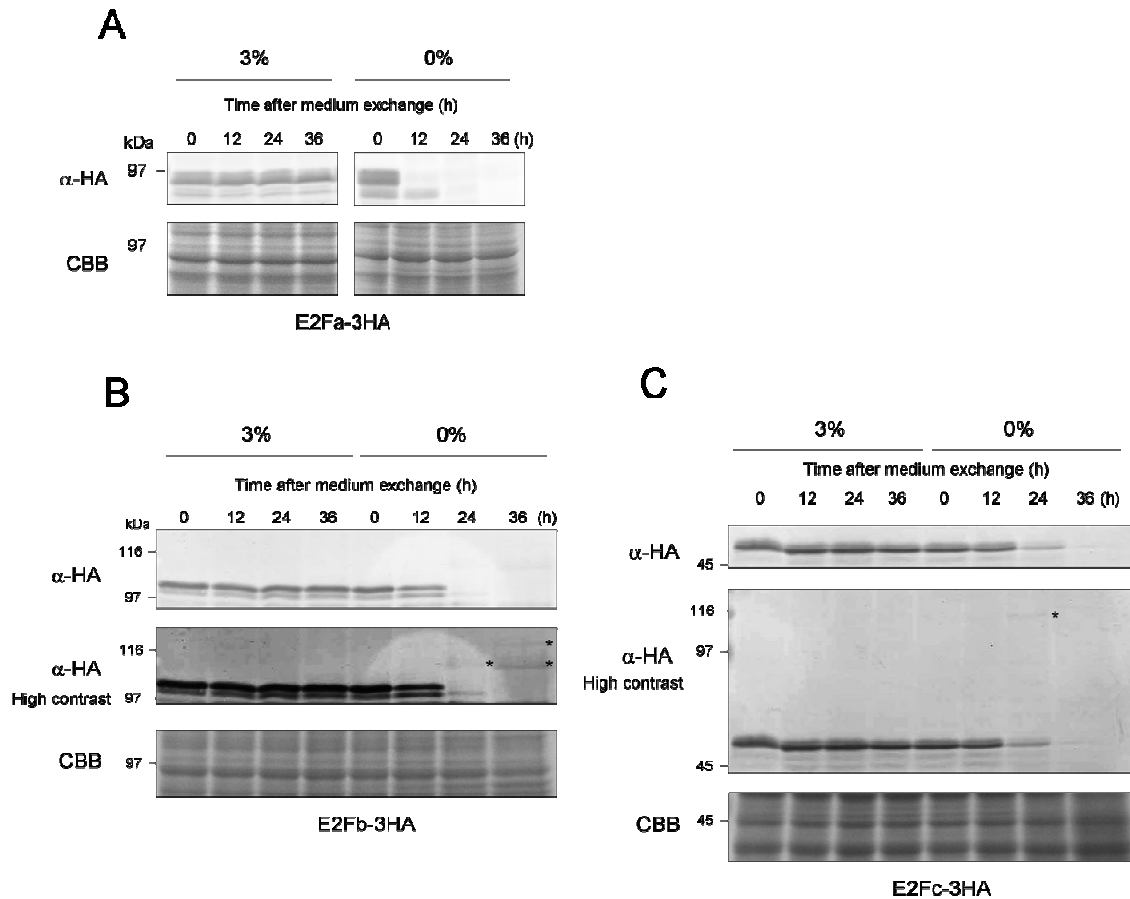


Fig.16 ショ糖飢餓における E2Fa-3HA、E2Fb-3HA、E2Fc-3HA タンパク質の蓄積量の経時変化

シロイヌナズナゲノムから *E2Fa*、*E2Fb*、*E2Fc* 遺伝子の開始コドンの 1kb 上流のプロモーター領域から終止コドンまでを単離し、pGreen ベクターの NOS ターミネーターの上流に挿入した。次に、それぞれの C 末端に HA を 3 つ連結させたタグを挿入し、そのベクターを MM2d 細胞に導入することで形質転換体を得た。それぞれの細胞を植え継ぎ後 2 日目まで培養し、3%、0%のショ糖を含む培地に交換した。その後、12 時間毎に 36 時間までサンプリングし抗 HA 抗体を用いてウエスタン解析を行った。また同時にローディングコントロールとして CBB 染色を示している。

(A) E2Fa-3HA 細胞の解析。(B) E2Fb-3HA 細胞の解析。コントラストを上げた図にある星印は、高分子量側に検出されたバンドを示している。

(C) E2Fc-3HA 細胞の解析。コントラストを上げた図にある星印は、高分子量側に検出されたバンドを示している。

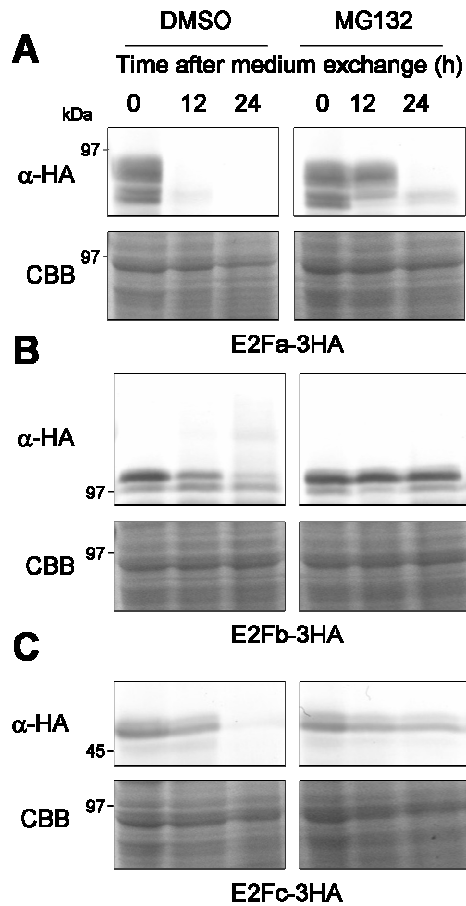


Fig.17 ショ糖飢餓でプロテアソーム阻害剤 MG132 を加えたときの E2F の発現

植え継ぎ後 3 日目の細胞をショ糖を含まない培地に交換し、溶媒コントロールとして DMSO を加えたもの（左のパネル）、プロテアソーム阻害剤である MG132 を終濃度 100 μ M を加えたもの（右のパネル）を用意した。それぞれ 12 時間毎に 24 時間までサンプリングを行った。その後、HA 抗体を用いてウエスタン解析を行った。CBB はローディングコントロールとして示している。

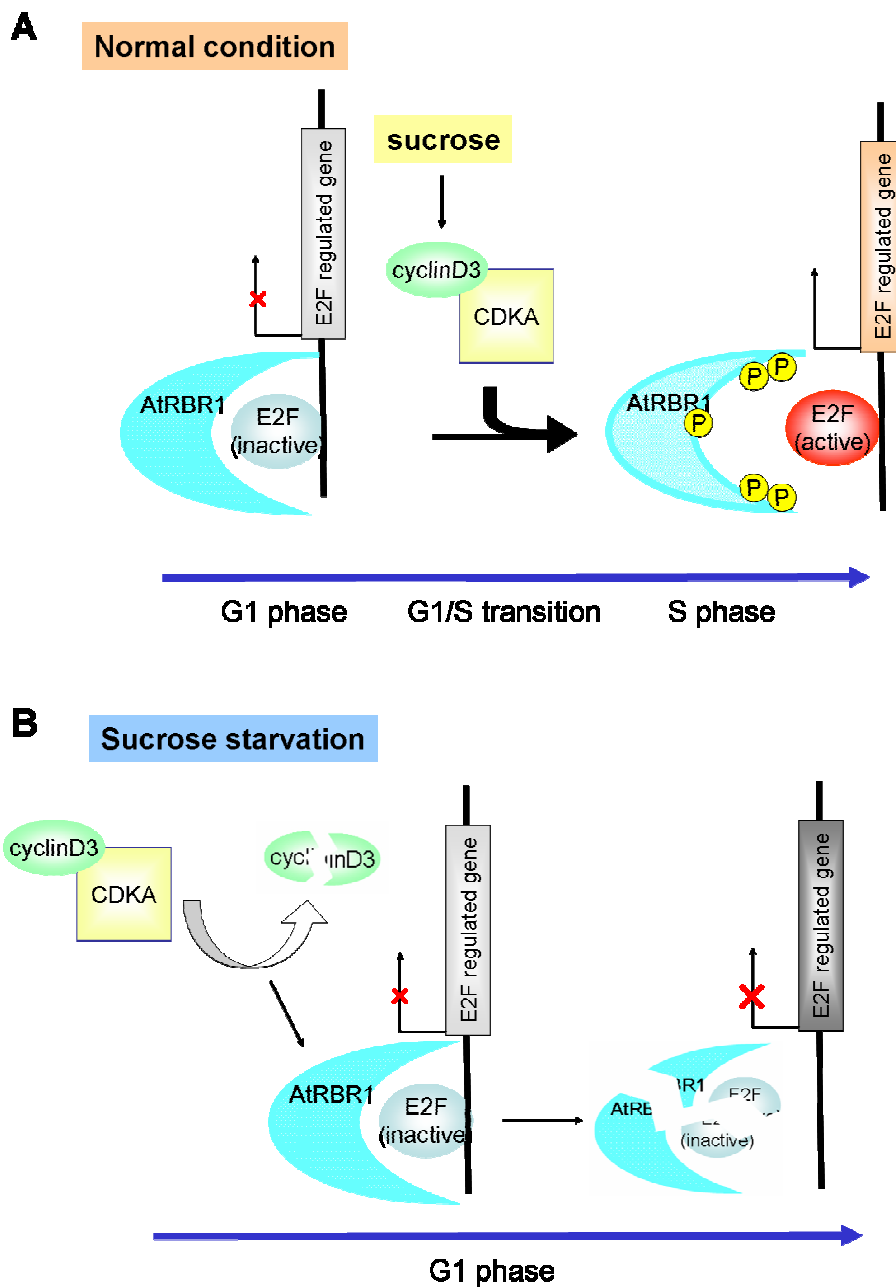


Fig.18 シロイヌナズナの G1/S 期制御機構のモデル図

(A) 通常の培養条件下における G1/S 期制御機構。(B) ショ糖飢餓の条件下における G1/S 期制御機構。cyclinD3 の分解によって AtRBR1 のリン酸化が起こらず、E2F 活性を抑制し E2F 制御遺伝子の転写を抑制する。その後、AtRBR1、E2F とともに分解し、転写を完全に抑制し休止期へ入る。詳細は考察を参照。

5. 考察

5-1 MM2d 細胞を用いた AtRBR1 の機能解析

5-1-1 AtRBR1 は G1/S 移行期で高リン酸化され、高リン酸化型 AtRBR1 は E2F と結合できない

CDK によるリン酸化は基本的には基質となるタンパク質のプロリン残基の直前のセリンまたはスレオニン残基で起こる (Holmes and Solomon, 1996)。この条件に適合する推定 CDK リン酸化サイトは AtRBR1 では 16 箇所存在するが、*in vivo* での翻訳後修飾についてはほとんど研究が進んでいない。本研究ではまず翻訳後修飾を含めた AtRBR1 の発現解析を行うため、MM2d 細胞の WCE を 6% のアクリルアミドゲルを用いて泳動時間を長くするという改良を行い、高分子量側の分離能を上げてウエスタン解析を行った。その結果、特異的な抗 AtRBR1 抗体で検出される早く移動する (低分子量) バンドと遅く移動する (高分子量) バンドが見られることが分かり、この WCE をホスファターゼ処理したところ、移動度の遅いバンドが消失して早く移動するバンドのみが検出された (Fig.3)。動物の知見を合わせて考えると、移動の遅いバンドが高リン酸化型 AtRBR1 で、早く移動するバンドが非修飾もしくは低リン酸化型 AtRBR1 であることが強く示唆された。但し、16 箇所存在する推定 CDK リン酸化サイトの中で、何個以上のサイトがリン酸化されると高分子量側にシフトするかは実験を行っていないので今回の実験からは分からなかった。また、細胞周期リエントリーの実験系によって細胞周期を部分同調したところ、G1 期では早く移動するバンドのみ認められたが、G1 期から S 期へと移行するときに移動度の遅い高リン酸化型の AtRBR1 が見られることが分かった。これまで細胞周期における植物 RBR のリン酸化状態に言及した報告はされておらず、今回初めて RBR の細胞周期におけるリン酸化状態を明らかにすることができた。

さらに、このリン酸化の違いによって E2Fa との結合が変化するかも同時に調べたところ、高リン酸化された AtRBR1 は E2Fa と結合できず、非修飾もしくは低リン酸化型の AtRBR1 とのみ結合することが分かった (Fig.4)。

以上の結果から、AtRBR1 が G1/S 移行期でリン酸化され、E2Fa との結合がリン酸化によって制御されていることから、AtRBR1 も動物の pRb

と同様の機構で制御を受けることが示唆された。したがって、この E2F/RBR 経路は進化の過程で高度に保存され、G1/S 期移行の制御に重要な役割を果たす制御系であることが示唆された。

5-1-2 AtRBR1 および E2F-3HA は *PCNA1* プロモーターの E2F 結合配列を含む領域に結合して転写制御に関わっている

これまでの報告で、*in vitro* のゲルシフト解析で大腸菌から調製した組換え E2F が E2F 結合配列と結合することが数例報告されている (Uemukai et al., 2005、Kosugi and Ohashi 2002、Desvoyes et al., 2006)。しかし、*in vivo* における E2F と DNA との結合はほとんど解析されておらず、AtRBR1 に至っては未だ報告がなかった。

本研究では、E2F 結合配列をプロモーター上に持つことが知られている *PCNA1* 遺伝子のプロモーター領域を対象に、ChIP 解析を行うことにより *in vivo* で、これらのタンパク質が結合しているかを調べた。まず、E2Fa-3HA 細胞から抗 HA 抗体で免疫沈降が可能かを調べたが、分解産物以外に E2Fa-3HA を示した矢頭の上側に複数のバンドが見られた (Fig.5B)。さらに、この E2Fa-3HA 細胞の WCE を CIP で脱リン酸化処理したところ、E2Fa-3HA も AtRBR1 と同様にリン酸化を受け高分子量側にシフトするバンドを生じることが分かった (Fig.7)。植物の E2F がリン酸化を受けることを示した報告はないが、E2Fa には推定 CDK リン酸化サイトが 5 箇所存在する。一方、動物 E2F はリン酸化を受けることによって DNA との結合能が低下し、さらに pRb との結合を促進していることが報告されている (Kitagawa et al., 1995、Peeper et al., 1995)。植物においても動物と同様のメカニズムによる制御機構が存在しているのかもしれない。

次に ChIP 解析の結果、対数増殖期の細胞において E2Fa-3HA や AtRBR1 が *PCNA1* プロモーターの E2F 結合配列を含む領域でのみ結合していることが確認された (Fig.5D)。但し、E2F-3HA は比較的是っきりとしたバンドが検出されたが、AtRBR1 ではバンドが弱かった。各抗体の免疫沈降する能力に差があるために量的な議論は難しいが、一つの可能性として、対数増殖期の細胞を用いたことから S 期に進行する細胞が多く、E2Fa のような転写因子は比較的多くのもものが DNA と結合して転写を活性化することが考えられる。一方、抑制因子として機能する非修飾または低リン酸化した AtRBR1 は、S 期では DNA と結合する割合が低くなるのかもしれない。

次に、増殖停止期の細胞を用いて ChIP 解析により AtRBR1 の結合状

態を調べたところ、対数増殖期の細胞と比較してより強いバンドが得られた (Fig.6)。植え継ぎ 7 日目では 3 日目と比べて AtRBR1 タンパク質の蓄積量がむしろ減少する (Fig.8A)。したがって、増殖停止期では積極的な転写抑制を行うために DNA と結合する AtRBR1 の割合が多くなった可能性が考えられる。

5-2 AtRBR1 の抑制系を用いた機能解析

5-2-1 AtRBR1 の抑制により細胞サイズが減少し、さらに G1 期の細胞停止を引き起こせなくなる

次に、誘導系 RNAi を用いて AtRBR1 を抑制する形質転換培養細胞を作製し、細胞内における AtRBR1 の機能を解析した。作製した培養細胞は AtRBR1 をタンパク質レベルで検出限界以下まで抑制することが確認された (Fig.8A)。さらに、AtRBR1 を抑制したまま培養を続けると細胞サイズが減少していくことが分かった (Fig.9A、B)。これまでにタバコ (*Nicotiana benthamiana*) *NbRBR1* を抑制した植物体の解析によって *NbRBR1* を抑制すると細胞サイズが減少することが報告されており (Park et al., 2005)、本研究の結果と一致する。同様に、クラミドモナスの Rb ホモログである *mat3* の変異体でも細胞サイズの減少が報告されている (Umen and Goodenough, 2001)。また、AtRBR1 が結合して転写抑制するターゲットである E2Fa/DPa 過剰発現体でも細胞サイズの減少が示されている (De Veylder et al., 2002)。これらの結果をまとめると、通常増殖を行っている細胞では、細胞周期進行において RBR は E2F の活性を適切に調節することで、細胞サイズの制御を行っていて、細胞サイズがあるサイズ以下に減少しない制御に関与することが考えられる。

次に、AtRBR1 を抑制したときの DNA 含量を解析したところ、培養を続けるにしたがって G1 期の細胞が減少し、G2 期の細胞が蓄積してくることが分かった (Fig.9C)。特に、通常なら 80%以上の細胞が G1 期で停止する増殖停止期 (培養 7 日目) において、AtRBR1 を抑制した細胞では 20%程度の細胞しか G1 期で停止していなかった。このことは AtRBR1 が G1/S 移行期の進行を制御する重要な因子であることを示唆する。同様に、増殖停止期で G1 期停止に異常が起こる例として CYCD3;1 の過剰発現体がある (Menges et al., 2006)。CYCD3;1 の過剰発現体では増殖停止期で 50%程度の細胞が G1 期で停止し、40%程度の細胞が G2 期で停止する。また同じ CYCD ファミリーに属する CYCD2;1 の過剰発現体でそのような現象は認められなかったことから、この現象は CYCD3;1 特異

的であると考えられるが、他の CYCD3 ファミリーに属するものでも同様な効果が見られるかは報告がない。

次に、AtRBR1 を抑制した細胞における細胞周期の各周期の時間を算出したところ、G1 期の時間が短く G2 期の時間が延長していることが分かった (Table 1)。さらに詳細に細胞周期の進行を調べるために細胞周期同調化実験を行った。最初に植え継ぎ時からエストロゲン誘導処理を行い、5.5 日目まで培養を続けた細胞を同調化処理した。ここで注目しておくことは誘導処理を 5.5 日間続けているため、同調化処理の時点で AtRBR1 タンパク質は検出されず (Fig.8A)、細胞サイズがコントロール細胞よりも小さくなっていることである (Fig.9A)。解析の結果、AtRBR1 を抑制した細胞では G2/M 期マーカー遺伝子群の発現が減少しており、M 期移行が遅延していることが分かった (Fig.10A, C)。同様に CYCD3;1 の過剰発現体でもこれらマーカー遺伝子の発現が減少し、G2 期の延長が見られている。この原因はまだよく分かっていないが、おそらく G2/M 期移行の時に機能するサイクリン/CDK のキナーゼ活性が十分上昇せず、M 期に移行できないために G2 期が延長したと考えられる。AtRBR1 を抑制した細胞と CYCD3;1 の過剰発現体で同じ機構により M 期移行の遅延が起こるのかを解明する上で、G2/M 期のサイクリン/CDK のキナーゼ活性の制御に着目する必要があるだろう。

続いて、誘導系の特徴を生かして植え継ぎ後 5.5 日目まで通常に培養し、同調化処理と同時に誘導をかけて AtRBR1 を抑制し、同調化処理の時点で細胞サイズが同じ条件で細胞周期を比較した (Fig.11)。その結果、細胞サイズの条件を揃えた場合、AtRBR1 が完全に消失しないことを考慮する必要はあるが、コントロール細胞と比較して M 期移行が遅延することはなかった。つまり、AtRBR1 の抑制が直接 M 期移行を遅延させているわけではないと考えられる。

以上二つの同調化の実験をまとめると、AtRBR1 の抑制は直接 G2 期の延長を引き起こすわけではないが、ある程度長い期間抑制した場合、細胞を拡大させるのに重要な時期である G1 期が短くなり細胞サイズの減少を引き起こす。そして、分裂に必要な最低限のサイズを維持するため G1 期の代わりに G2 期を延長させたのではないかと推察される。同様に、動物細胞でも cyclinD1 もしくは cyclinE の過剰発現体において細胞サイズの減少や G1 期が短縮することが分かっている (Quelle et al., 1993; Resnitzky et al., 1994)。さらに、これらの過剰発現体では細胞周期全体の時間は正常細胞とほとんど変わらずに G2 期が延長する現象が起こることが分かっており、おそらく G1 期が短縮した補償作用で G2 期が延長すると考えられている。この補償作用の分子機構は明らかではないが、

AtRBR1 を抑制した細胞や CYCD3;1 の過剰発現体で見られる G2 期の延長でも、動物の補償作用に類似した効果が働いているのかもしれない。

また、CYCD3;1 の過剰発現体と AtRBR1 を抑制した細胞で表現型に共通する部分が多かったことから、これら 2 つの因子は非常に密接な関係にあることが考えられる。これまでタバコ CYCD3;3/CDKA が NtRBR1 を *in vitro* でリン酸化し、CYCD3;3/CDKA 複合体が G1 期から S 期に NtRBR1 をリン酸化することが示されているが (Nakagami et al., 1999; 2002)、本研究の結果は AtRBR1 が CYCD3;1 の下流で機能していることをさらに強く支持し、植物でも CYCD/RBR/E2F 経路が細胞増殖に重要な役割を担うと考えられる。

5-2-2 AtRBR1 はシヨ糖飢餓での G1 期停止に関わっている

シロイヌナズナの *CYCD* 遺伝子である *CYCD2;1* や *CYCD3;1* は、シヨ糖のような外部因子によって発現制御を受けることが報告されている。また *CYCD3;1* は植物ホルモンであるサイトカイニンやブラシノステロイドによっても転写誘導されることが知られている (Riou-Khamlichi et al., 1999; Hu et al., 2000)。また、*CYCD3;1* は非常に不安定なタンパク質であり、シヨ糖飢餓に応答してプロテアソーム系によって短時間で分解を受けることが分かっている (Healy et al., 2001; Planchais et al., 2004)。このように、*CYCD3;1* は転写レベルだけでなく翻訳後レベルでも厳密な制御を受けている。この *CYCD3;1* を過剰発現するとシヨ糖飢餓における G1 期停止が部分的に起こらなくなり、一部の細胞が G2 期まで進むことが報告されている (Menges et al., 2006)。本来ならシヨ糖飢餓において *CYCD3;1* が分解されることによって G1/S 移行期に関与する CDKA のキナーゼ活性が低下するが、*CYCD3;1* の過剰発現によってキナーゼ活性が低下しなかったと考えられる。その結果、シヨ糖飢餓においても基質をリン酸化し、G1 期から S 期へと細胞周期を進行させ、G2 期で停止する細胞が増加したと推察される。ここで、G1/S 移行期で *CYCD3;1*/CDKA 複合体がリン酸化する標的の基質として AtRBR1 が考えられた。そこで、AtRBR1 を抑制したときにシヨ糖飢餓で G1 期の細胞周期停止が機能するかどうかを調べた。

AtRBR1 を抑制した細胞を、3%シヨ糖を含む培地、0.3%シヨ糖培地、シヨ糖飢餓培地に置換し、12 時間毎に 36 時間後まで DNA 含量を測定して細胞周期を算出した (Fig.12A)。その結果、コントロール細胞では 3% のとき 36 時間後まで細胞数は増加し続け、細胞周期に大きな変化はなかった。0.3%では 24 時間後には細胞数の増加は見られなくなり、36 時

間後に比較的 G1 期の細胞が多かった。また、シヨ糖飢餓では 36 時間後でも細胞数が増加せず、細胞周期はほとんど変化しなかった。つまり、シヨ糖飢餓では G1、G2 期でともに細胞周期が停止することが分かった。一方 AtRBR1 を抑制した細胞では、3% のとき細胞周期に大きな変化はなかったが、0.3% では 36 時間後にコントロールとは逆に G1 期の細胞が減少することが分かった。また、シヨ糖飢餓では 12 時間後で顕著に G1 期の細胞が減少することが分かり、36 時間後にはほとんど G1 期の細胞が見られなかった。したがって、シヨ糖飢餓では G1、G2 期で共に細胞周期が停止するが、AtRBR1 を抑制した細胞では G1 期での細胞周期停止が機能せず G2 期まで細胞周期が進行することが分かった。本研究では、シヨ糖飢餓により G1 期とともに G2 期でも細胞周期が停止する現象が見られたが、おそらく G2 期にあるチェックポイント機構によって細胞周期が停止したものと考えられる。G2/M 期を制御する重要なタンパク質として CYCB ファミリーがあるが、このうち 2 種類の CYCB がシヨ糖飢餓において転写抑制を受けることが報告され、G2 期停止との関係が示唆される (Content et al., 2004)。しかし、シヨ糖飢餓において G2 期でどのようなタンパク質レベルでの制御がチェックポイント機構に参与するかは全く分かっておらず、今後の解析が待たれる。また、動物のマウス胚繊維芽細胞での解析により、pRb ファミリー遺伝子 (pRb, p107, p130) 3 種類をノックアウトして表現型を調べた報告がある (Sage et al., 2000)。この中で、pRb ファミリーのうちの 1 種類もしくは 2 種類の組み合わせで抑制しても細胞増殖に特に大きな影響は出なかったが、3 種類すべてを抑制した場合に正常な細胞よりも活発に細胞増殖することが示されている。さらに、この 3 種類すべてを抑制した細胞を血清飢餓状態で培養すると 7 割以上の細胞がアポトーシスを起こして死滅し、生き残った 3 割の細胞では S 期に移行することが分かったが、G2 期で停止することはなかった。本研究で用いた RNAi 細胞では、AtRBR1 を抑制したときシヨ糖飢餓により少なくとも 36 時間では死細胞がほとんど見られず、また G2 期で停止するなど、動物の栄養飢餓の制御機構と植物の栄養飢餓の制御機構ではかなり異なることが示唆された。

次に、これまでの報告からシヨ糖飢餓では G1/S 移行期に周期特異的に発現する遺伝子の転写が速やかに抑制されることが報告されている (Content et al., 2004)。このため、通常シヨ糖飢餓での S 期移行は起こらないと考えられる。ここで、シヨ糖飢餓において AtRBR1 を抑制した細胞で、G1/S 移行期に発現する遺伝子の転写がどのようになっているのかを解析した (Fig.13)。特に G1/S 移行期に発現する遺伝子の中でもプロモーター上に E2F 結合配列を持ち、E2F によって転写活性化すると

考えられている 6 種類の遺伝子について調べた。その結果、*PCNA1* や *ORC6*、*RNR* は 0%、0.3% ショ糖存在下でコントロールの細胞では発現が減少するのに対して、誘導をかけた細胞では高い発現を示していた。しかし、誘導をかけた細胞においてもこれらの遺伝子の発現が減少してることが分かった。つまり、最初の頃は *AtRBR1* が抑制されたことによって *E2F* が常に活性化状態となりこれらの遺伝子の転写が上昇しているが、時間が経過するにつれ何らかの原因で転写レベルは減少していくことが考えられた。

また、*CDC6* や *MCM2*、*MCM3* も 0% ショ糖においてコントロールの細胞では発現が減少したが、誘導をかけた細胞では高い発現レベルを維持していた (Fig.13)。しかし、*PCNA1* や *ORC6*、*RNR* とは異なり時間が経過しても発現レベルはそれ程大きく低下しなかった。以上の結果から、前者の 3 遺伝子と後者の 3 遺伝子にはそれぞれ異なった発現制御機構が関与していると考えられた。

以上の結果をまとめると、個々の遺伝子によって発現レベルは異なっていたが、誘導をかけた細胞ではショ糖飢餓でもこれら 6 種類の遺伝子の転写活性が高かった。このため、*AtRBR1* を抑制した細胞ではショ糖飢餓においても S 期に移行し、Fig.12 の実験で示したように G2 期まで細胞周期を進めたと考えられた。つまり、*AtRBR1* はショ糖飢餓における G1/S 移行期に発現する遺伝子の転写抑制に寄与し、ショ糖飢餓によって引き起こされる G1 期停止に関与していると結論された。

5-2-3 *AtRBR1*、*E2Fa-3HA* はショ糖飢餓で分解する

Fig.14 で *AtRBR1* はショ糖飢餓培地に置換後 12 時間で分解することが分かった。さらに 0.3% ショ糖を含む培地に置換したときも 36 時間後にはタンパク質量が減少していることが分かった。このときの mRNA レベルの *AtRBR1* の発現はほとんど変化がないことから (Fig.13)、おそらく翻訳後の分解によるものだと考えられる。ここで、プロテアソーム阻害剤である MG132 を加えて *AtRBR1* タンパク質の蓄積量を見たところ、MG132 を加えた細胞では顕著に分解が抑制されていた (Fig.15)。以上の結果から、*AtRBR1* はショ糖飢餓においてプロテアソーム系によって分解を受けることが強く示唆された。しかし、Fig.13 の結果からショ糖飢餓では G1/S 移行期に発現する遺伝子が転写抑制されることが分かっており、*AtRBR1* がその転写抑制に関わると考えられる。したがって、*E2F* が存在している状況で *AtRBR1* が分解されるにも関わらず、*E2F* 制御遺伝子の転写抑制がどのようにして起こっているのかが問題になる。そこ

で、シヨ糖飢餓における E2F タンパク質の蓄積量を解析することにした。

シヨ糖飢餓での E2Fa-3HA、E2Fb-3HA、E2Fc-3HA の発現を見たところ、E2Fa-3HA は 0%シヨ糖培地に交換後 12 時間、E2Fb-3HA、E2Fc-3HA は 24 時間で AtRBR1 と同様にそれぞれの E2F も分解されていることが分かった (Fig.16A、B、C)。E2Fa、E2Fb に関する報告は無いが、E2Fc はプロテアソーム系によって分解されるという報告があり (del Pozo et al., 2002)、Fig.16B、C で検出時間を長くした場合に高分子量側に見られたバンドはユビキチン化された E2F タンパク質かもしれない。次に Fig.17 でプロテアソーム阻害剤である MG132 を加えて培養したところ、これら E2F の分解が遅延することが分かった。以上の結果から、E2F もシヨ糖飢餓でプロテアソーム系によって分解することが強く示唆された。また、個々の E2F で分解に要する時間が異なることも分かった。E2Fa は比較的培地交換後早い時間に分解が起こり、E2Fb、E2Fc は E2Fa と比べて分解が遅いことが分かった。E2Fa、E2Fb は転写活性化型の E2F だと考えられており、シヨ糖飢餓における G1/S 移行期に発現する遺伝子の転写抑制の一因として、E2Fa と E2Fb の分解が関与していることが示唆された。

また、*PCNA1* や *ORC6*、*RNR* は AtRBR1 を抑制してもシヨ糖飢餓で転写抑制が見られたことから、E2Fa もしくは E2Fb が分解することによって転写抑制が起こっていると考えられる。しかし、シヨ糖飢餓で AtRBR1 を抑制したときに *CDC6* や *MCM2*、*MCM3* は転写が高いレベルで維持されていた。さらに、コントロールで *PCNA1* や *ORC6*、*RNR* はほぼ完全に転写抑制されていたが、*CDC6* や *MCM2*、*MCM3* はシヨ糖飢餓において完全な転写抑制には至っていない。個々の遺伝子の転写活性化の詳細については分かっていないことが多く議論することが難しいが、*PCNA1* や *ORC6*、*RNR* は比較的分解の早い E2Fa によって転写活性化されるが、*CDC6* や *MCM2*、*MCM3* は分解の遅い E2Fb によって転写活性化されるのかもしれない。

最後に、動物の G1/S 期制御機構と植物の G1/S 期制御機構の違いを考察する。まず、動物では増殖因子の刺激によって *cyclinD* が転写、翻訳され CDK4 または CDK6 と結合して活性化する。さらに、*cyclinE* も *cyclinD* の後に続いて転写、翻訳され CDK2 と結合して活性化する。それらの *cyclinD*/CDK、*cyclinE*/CDK 複合体が E2F と結合している Rb ファミリータンパク質 (pRb、p107、p130) をリン酸化し、E2F を解離させる。その後 E2F が活性化状態となり E2F 制御遺伝子群の転写活性化を経て S 期へと進行する。次に、増殖因子の刺激が無い (血清飢餓の) 場合、*cyclinD* はカルパインプロテアーゼによって分解を受けるので CDK の活

性化は起こらない (Choi et al., 1997)。その結果、Rb ファミリータンパク質はリン酸化されず E2F と解離せず不活性型の複合体を維持することとなる。このとき、Rb ファミリータンパク質は安定に存在しており分解することはない。また、体内のほとんどの組織で発現しており、分化した細胞においても発現している (Jiang et al., 1997)。つまり、分化してほとんど細胞分裂をしない細胞においても常に発現し、その増殖停止と分化を制御していると考えられる。pRb による E2F の転写抑制機構としては、pRb が E2F に結合してその転写活性化領域をマスクすること、pRb がヒストン脱アセチル化酵素やポリコームグループなどの転写抑制に関する因子をリクルートする足場として機能することが明らかとなっている (Frolov and Dyson, 2004)。

次に、本研究から明らかとなった新たな知見を加えた上で、植物 (シロイヌナズナ) の G1/S 移行期の制御モデル図を示した (Fig.18)。通常の培養条件下では、ショ糖によって CYCD3;1 が転写活性化され CDKA と複合体を形成して活性な状態となっている。その CYCD3;1/CDKA 複合体が AtRBR1 をリン酸化することによって E2F が解離し活性な状態となる。転写活性化型の E2F は、E2F が制御する S 期移行に必要な遺伝子群を転写活性化して S 期への進行を促していると考えられる。本研究により E2Fa と AtRBR1 の結合に AtRBR1 のリン酸化制御が機能すること、および G1/S 移行期に高リン酸化された AtRBR1 が蓄積してくることが明らかになり、植物 E2F の活性化制御機構の一旦を実験的に証明することができた。次にショ糖飢餓の条件下では、まず CYCD3;1 がプロテアソーム系によって分解を受け、複合体を形成する CDKA の活性を減少させる。CDKA 活性が減少すると AtRBR1 のリン酸化が低下して E2F との解離が起こらなくなる。AtRBR1 には動物 pRb との機能的な共通性が多く見られることより、AtRBR1 と E2F ファミリーとの制御システムには、動物の pRb による E2F の転写抑制機構と類似した機構が作用している可能性が高い。すなわち、AtRBR1 が E2F と結合することにより E2F の転写活性化領域をマスクすることによって E2F の活性を抑制したり、AtRBR1 がヒストンの脱アセチル化に関連する因子をリクルートすることによってクロマチンレベルでの転写抑制が起こると考えられる。したがって、ショ糖飢餓の比較的初期の時期では、動物の制御システムと同様な機構が働いていると考えられるが、ある程度の時期を経過すると、AtRBR1 と E2F が共に分解することによって、E2F 制御遺伝子の転写を抑制する新しい機構が存在する可能性を本研究により示唆することができた。

動物において近年 pRb がユビキチン化またはユビキチン非依存的にプ

ロテアソーム系によって分解されるという報告が出てきている (Sdek et al., 2005、Uchida et al., 2005)。まだ、詳細な機構は分かっていないが、通常の細胞周期のサイクルにおいて、pRb がタンパク質分解を受けることによって S 期への移行が促進されると想定されている。したがって、ショ糖飢餓による増殖停止期での AtRBR1 と E2F の分解は植物特有の機構であると考えられた。今後、このような制御機構が培養細胞のみならず植物体でも機能していることを検証すると共に、AtRBR1 と E2F の分解の制御機構の詳細な解析が期待される。

6. 謝辞

本研究を終えるにあたり、懇篤なるご指導を賜りました新名惇彦教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の具体的な内容についてご指導およびご助言を賜りました関根政実先生に厚く御礼申し上げます。また、実験を遂行するにあたり吉田和哉先生、加藤晃先生、仲山英樹先生には、適切なご助言をいただきました。深くお礼申し上げます。

適切な助言をいただいた上、フローサイトメーターの使用なども快諾してくださった本学の梅田正明教授に謹んで感謝申し上げます。

Cell Cycle Team の先輩方には実験の指導など本当にお世話になりました、特に原島洋文氏には実験のみならず多岐に渡りお世話になりました。また、私の研究に対し多大な援助をしてくださった技術補佐員の川島庸子氏、懇切なご指導を賜りました中部大学の岩川秀和博士に厚くお礼申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり大変お世話になりました植物代謝調節学講座の皆様にご心より感謝申し上げます。

7. 参考文献

- An G** (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 79 : 568-570
- Attwooll C, Lazzerini-Denchi E, Helin K** (2004) The E2F family : specific functions and overlapping interests. *EMBO J* 23 : 4709-4716
- Ausin I, Alonso-Blanco C, Jarillo JA, Ruiz-Garcia L, Martinez-Zapater JM** (2004) Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat Genet* 36 : 162-166
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7 : 1513-1523
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248-254
- Castellano MM, del Pozo JC, Ramirez-Parra E, Brown S, Gutierrez C** (2001) Expression and stability of *Arabidopsis CDC6* are associated with endoreplication. *Plant Cell* 13 : 2671-2686
- Chaboute ME, Clement B, Sekine M, Philipps G, Chaubet-Gigot N** (2000) Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotide reductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *Plant Cell* 12 : 1987-2000
- Chaboute ME, Clement B, Philipps G** (2002) S phase and meristem-specific expression of the tobacco *RNR1b* gene is mediated by an E2F element located in the 5' leader sequence. *J Biol Chem* 277 : 17845-17851

Choi YH, Lee SJ, Nguyen P, Jang JS, Lee J, Wu ML, Takano E, Maki M, Henkart PA, Trepel JB (1997) Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J Biol Chem* 272: 28479-28484

Coffman JA (2004) Cell cycle development. *Dev Cell* 6 : 321-327

Contento AL, Kim SJ, Bassham DC (2004). Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to Suc starvation. *Plant Physiol* 135 : 2330-2347

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

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

Desvoyes B, Ramirez-Parra E, Xie Q, Chua NH, Gutierrez C (2006) Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during *Arabidopsis* leaf development. *Plant Physiol* 140 : 67-80

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

Diaz-Trivino S, del Mar Castellano M, de la Paz Sanchez M, Ramirez-Parra E, Desvoyes B, Gutierrez C (2005) The genes encoding *Arabidopsis* ORC subunits are E2F targets and the two ORC1 genes are differently expressed in proliferating and endoreplicating cells. *Nucleic Acids Res*,33 : 5404-5414

Dryja TP, Rapaport JM, Joyce JM, Petersen RA (1986) Molecular detection of deletions involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7391-7394

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

Egelkroun EM, Mariconti L, Settlege SB, Cella R, Robertson D, Hanley-Bowdoin L (2002) Two E2F elements regulate the proliferating cell nuclear antigen promoter differently during leaf development. *Plant Cell* 14 : 3225-3236

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

Gendrel AV, Lippman Z, Yordan C, Colot V, Martienssen RA (2002) Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene *DDM1*. *Science* 297 : 1871-1873

Genschik P, Criqui MC, Parmentier Y, Derevier A, Fleck J (1998) Cell cycle -dependent proteolysis in plants. identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. *Plant Cell* 10: 2063-2076

Gordon-Kamm W, Dilkes BP, Lowe K, Hoerster G, Sun X, Ross M, Church L, Bunde C, Farrell J, Hill P, Maddock S, Snyder J, Sykes L, Li Z, Woo YM, Bidney D, Larkins BA (2002) Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 11975-11980

Grafi G, Burnett RJ, Helentjaris T, Larkins BA, DeCaprio JA, Sellers WR,

Kaelin WG (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family : involvement in endoreduplication. Proc Natl Acad Sci USA 93 : 8962-8967

Granier C, Tardieu F (1998) Spatial and temporal analyses of expansion and cell cycle in sunflower leaves. A common pattern of development for all zones of a leaf and different leaves of a plant. Plant Physiol 116: 991-1001

Gupta AK, Kaur N (2005) Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. J Biosci 30: 761-776

Gutierrez C, Ramirez-Parra E, Castellano MM, del Pozo JC (2002) G(1) to S transition : more than a cell cycle engine switch. Curr Opin Plant Biol 5 : 480-486

Gutierrez C (2005) Coupling cell proliferation and development in plants. Nat Cell Biol 7 : 535-541

Healy JM, Menges M, Doonan JH, Murray JAH (2001) The *Arabidopsis* D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact *in vivo* with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. J Biol Chem 276 : 7041-7047

Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Beans S, Mullineaux PM (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Plant Mol Biol 42 : 819-832.

Holmes JK, Solomon MJ (1996) A predictive scale for evaluating cyclin-dependent kinase substrates. A comparison of p34cdc2 and p33cdk2. J Biol Chem 271: 25240-25246

Hu Y, Bao F, Li J (2000) Promotive effect of brassinosteroids on cell division

involves a distinct *CycD3*-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant J* 24 : 693-701

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

Inze D, De Veylder L (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Ann Rev Genet* 40 : 77-105

Jiang Z, Zacksenhaus E, Gallie BL, Phillips RA (1997) The retinoblastoma gene family is differentially expressed during embryogenesis. *Oncogene* 14: 1789-1797

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

Kawamura K, Kato K, Shinmyo A, Sekine M (2006) Tobacco RETINOBLASTOMA-RELATED protein is phosphorylated by different types of cyclin-dependent kinases during the cell cycle. *Plant Biotechnol* 23 : 467-473

Kitagawa M, Higashi H, Suzuki-Takahashi I, Segawa K, Hanks SK, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A (1995) Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene* 10: 229-236

Kodama Y, Nagaya S, Shinmyo A, Kato K (2007) Mapping and characterization of DNase I hypersensitive sites in *Arabidopsis* chromatin. *Plant Cell Physiol* 48 : 459-470

Kosugi S, Ohashi Y (2002) Interaction of *Arabidopsis* E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant*

Physiol 128 : 833–843

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

Lechner E, Xie D, Grava S, Pigaglio E, Planchais S, Murray JA, Parmentier Y, Mutterer J, Dubreucq B, Shen WH, Genschik P (2002) The AtRbx1 protein is part of plant SCF complexes, and its down-regulation causes severe growth and developmental defects. *J Biol Chem* 277: 50069-50080

Magyar Z, De Veylder L, Atanassova A, Bako L, Inze D, Bogre L (2005) The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell* 17 : 2527-2541

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

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

Menges M, Samland AK, Planchais S, Murray JAH (2006) The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18 : 893-906

Menges M, Murray JAH (2006) Synchronization, transformation, and cryopreservation of suspension-cultured cells. *Methods Mol Biol* 323 : 45-61

Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S (1992) Tobacco BY-2 cell line as the “Hela ” cell in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol* 132 : 1-30

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

Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, 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

Nicolai M, Roncato MA, Canoy AS, Rouquie D, Sarda X, Freyssinet G, Robaglia C (2006) Large-scale analysis of mRNA translation states during sucrose starvation in arabidopsis cells identifies cell proliferation and chromatin structure as targets of translational control. Plant Physiol 141: 663-673

Park JA, Ahn JW, Kim YK, Kim SJ, Kim JK, Kim WT, Pai HS (2005) Retinoblastoma protein regulates cell proliferation, differentiation, and endoreduplication in plants. Plant J 42 : 153-163

Peeper DS, Keblusek P, Helin K, Toebes M, van der Eb AJ, Zantema A (1995) Phosphorylation of a specific cdk site in E2F-1 affects its electrophoretic mobility and promotes pRB-binding in vitro. Oncogene 10: 39-48

Pines J (1999) Four-dimensional control of the cell cycle. Nat Cell Biol 1;E73-79

Planchais S, Samland AK, Murray JAH (2004) Differential stability of *Arabidopsis* D-type cyclins : CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. Plant J 38 : 616-625

Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Barsagi D, Roussel MF, Sherr CJ (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G(1) phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 7 : 1559–1571

Ramirez-Parra E, Lopez-Matas MA, Frundt C, Gutierrez C (2004) Role of an atypical E2F transcription factor in the control of *Arabidopsis* cell growth and differentiation. *Plant Cell* 16 : 2350–2363

Renaudin JP, Doonan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inze D, Jacobs T, Kouchi H, Rouze P, Sauter M, Savoure A, Sorrell DA, Sundaresan V, Murray JA (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol Biol* 32: 1003-1018

Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI (1994) Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 14 : 1669-1679

Riou-Khamlich C, Huntley R, Jacquard A, Murray JAH (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283 : 1541-1544

Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JM, Murray JAH (2000) Sugar control of the plant cell cycle : differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol* 20 : 4513-4521

Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants : conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57 : 675-709

Sage J, Mulligan GJ, Attardi LD, Miller A, Chen S, Williams B,

Theodorou E, Jacks T (2000) Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev* 14: 3037-3050

Sdek P, Ying H, Chang DL, Qiu W, Zheng H, Touitou R, Allday MJ, Xiao ZX (2005) MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein. *Mol Cell* 20: 699-708

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

Sozzani R, Maggio C, Varotto S, Canova S, Bergonioux C, Albani D, Cella R (2006) Interplay between *Arabidopsis* activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development. *Plant Physiol* 140 : 1355–1366

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

Uchida C, Miwa S, Kitagawa K, Hattori T, Isobe T, Otani S, Oda T, Sugimura H, Kamijo T, Ookawa K, Yasuda H, Kitagawa M (2005) Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J* 24: 160-169

Uemukai K, Iwakawa H, Kosugi S, de Jager, S, Kato K, Kondorosi E, Murray JAH, Ito M, Shinmyo A, Sekine M (2005) Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein : cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Mol Biol* 57 : 83-100

- Umen JG, Goodenough UW** (2001) Control of cell division by a retinoblastoma protein homolog in *Chlamydomonas*. *Genes Dev* 15 : 1652-1661
- Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouze P, Rombauts S, Inze D** (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14 : 903-916
- Vlieghe K, Vuylsteke M, Florquin K, Rombauts S, Maes S, Ormenese S, Van Hummelen P, Van de Peer Y, Inze D, De Veylder L** (2003) Microarray analysis of E2Fa-DPa-overexpressing plants uncovers a cross-talking genetic network between DNA replication and nitrogen assimilation. *J Cell Sci* 116 : 4249-4259
- Wang G, Kong H, Sun Y, Zhang X, Zhang W, Altman N, DePamphilis CW, 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.
- Wildwater M, Campilho A, Perez-Perez JM, Heidstra R, Blilou I, Korthout H, Chatterjee J, Mariconti L, Gruijsem W, Scheres B** (2005) The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell* 123 : 1337-1349
- Zuo J, Niu QW, Chua NH** (2000) Technical advance : An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* 24 : 265-273

8. 論文目録

学位論文の主たる部分を公表した論文
(題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

Arabidopsis RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1 is involved in G1 phase cell cycle arrest caused by sucrose starvation.

Hiroto Hirano, Hirofumi Harashima, Atsuhiko Shinmyo and Masami Sekine

Plant Molecular Biology, Volume 66, Number 3 (2008)