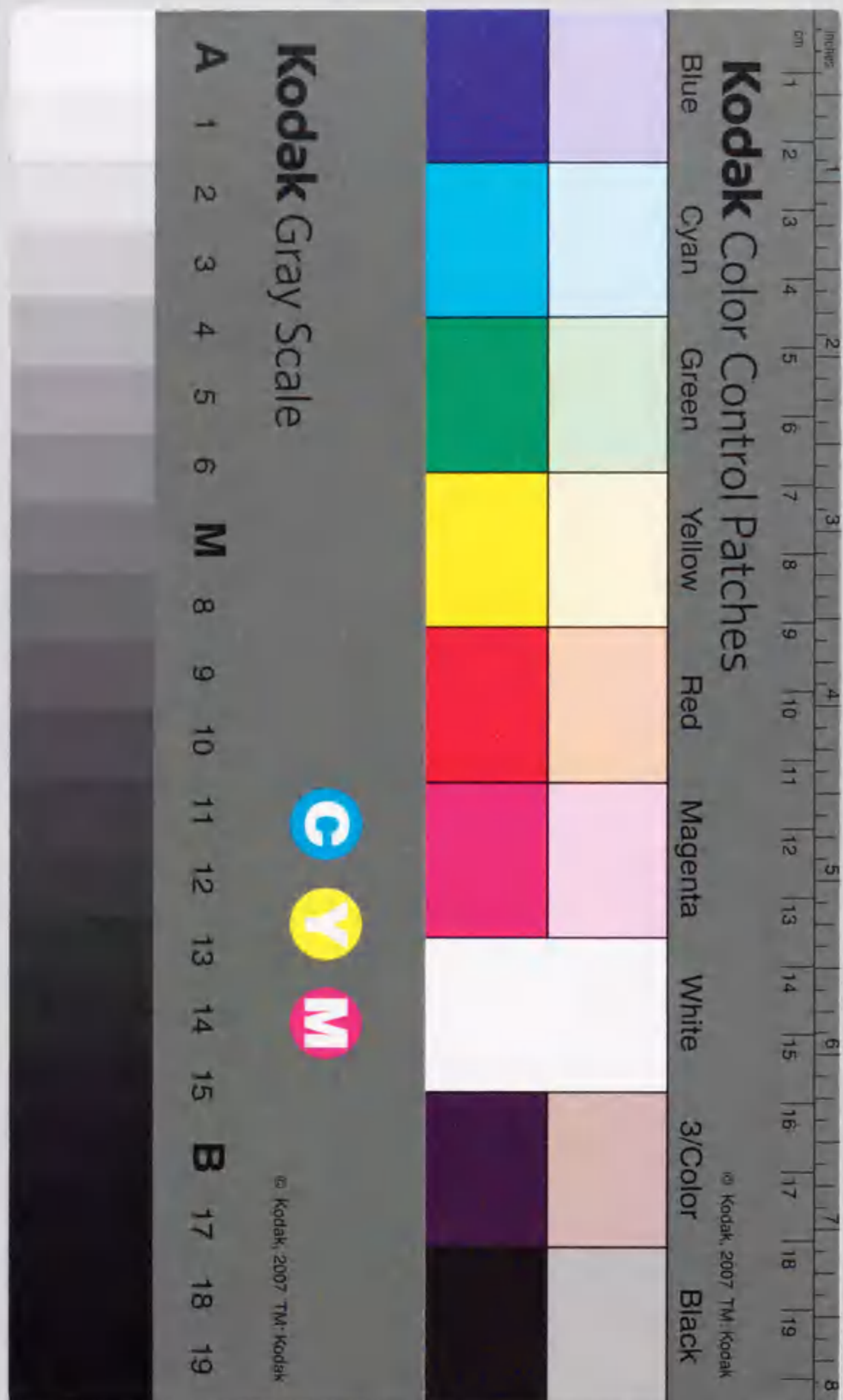


細胞周期制御を観点とする
頂芽優勢の分子機構に関する研究

志水 佐江



①

報告番号 甲 第 4157 号

細胞周期制御を観点とする
頂芽優勢の分子機構に関する研究

名古屋大学大学院生命農学研究科
博士論文

1998年 10月 提出

生化学制御専攻

志水佐江

目次

第一章	序論	1
第二章	細胞周期の各時期に特異的な遺伝子発現をマーカーとして用いたアラスカエンドウの腋芽の細胞周期に関する解析	
	緒言	12
	材料と方法	16
	結果と考察	19
第三章	アラスカエンドウの癌抑制遺伝子 (<i>PSRB1</i>) の cDNA の単離と、腋芽におけるその機能解析	
	緒言	33
	材料と方法	37
	結果	41
	考察	51
第四章	腋芽の休眠から成長への移行期における細胞周期の制御因子 (<i>Cdc2</i> 、 <i>CycB1</i> 、 <i>CycD3</i> 、 <i>PCNA</i>) のタンパク質レベルでの解析	
	緒言	54
	材料と方法	57
	結果	61
	考察	69
第五章	総合考察	72
	参考文献	80
	謝辞	89
	主論文目録	90
	参考論文目録	91

略号

BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
bp	base pair
BPB	bromo phenol blue
BSA	bovine serum albumin
CAK	Cdc2-activating kinase
CDK	cyclin-dependent kinase
cDNA	complementary DNA
CKI	cyclin-dependent kinase inhibitor
CTAB	hexadecyltrimethyl-ammonium bromide
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	deoxyribonucleic acid
DMF	N, N'-dimethylformamide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FMP	2-fluoro-1-methylpyridinium toluene-4-sulfonate
GST	glutathione S-transferase
IgG	immunoglobulin G
MBS	m-maleimidobenzoyl-N-hydrosuccinimide ester
MPF	M-phase-promoting factor
mRNA	messenger RNA
NBT	nitro blue tetrazolium
NP-40	Nonident P40
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction

PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
poly(A) ⁺ RNA	polyadenylate RNA
RB	retinoblastoma tumor suppressor gene
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-PCR
SDS	sodium dodecylsulfate
SV 40	simian virus 40
TGMV	tomato golden mosaic virus
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
Trx	thioredoxin

そのほか DNA の塩基及び、アミノ酸について、1 文字略号を用いた。

第一章

序論

1) はじめに

植物は、頂芽が優先的に成長し、頂芽によって腋芽の成長が抑制されており、この現象は頂芽優勢と呼ばれている (Phillips 1975)。風や、動物による捕食などにより、頂芽が傷害を受けたり、切除されると、腋芽 (多くは、切除部位に近い腋芽) の休眠が解除され、直ちに腋芽が頂芽に代わって成長を開始する (図 1 参照)。従ってこの現象は、植物が本来個体の生存手段として持っている機能であると考えられる。

頂芽優勢の強さは、植物種によって異なり、植物体の全形を決定していると言っても過言ではない。例えば、頂芽優勢の強いヒマワリやセイタカアワダチソウ、スギは真っ直ぐに伸び、全体として縦長な形をしているが、頂芽優勢の弱いトマトやシソ、ウメは枝が盛んに伸びて、こんもりとした形をしている。また、同一の植物種においても、その発達段階によって頂芽優勢の強さは変動する。例えば、前述したようにトマトは頂芽優勢が弱く、頂芽が存在しても腋芽が盛んに伸びてくる。しかし、発芽後本葉が数枚展開した頃は、腋芽は十分に分化しておらず頂芽優勢が強く、頂芽を切除しない限り腋芽は伸びてこない。一般的に植物体が若い時には頂芽の成長活性は高く、頂芽優勢も強いが、成長が進むにつれて頂芽の成長活性は低下し、頂芽優勢も弱くなり、分枝が起こりやすい。言い換えるならば頂芽優勢は、植物の発達段階に特有な植物全体の形態形成にも、大きな影響を与えるとも考えることができる。以上のように、頂芽優勢という現象は、植物の発生分化のプログラムや、環境要因の影響を常に受けて調節されており、その分子機構に興味を持たれる。

さらに、頂芽優勢の現象は、農業的にも、園芸植物の観賞価値、作物の収量、作業 (剪定、収穫など) の省力化などと深く関わり重要な問題である (Cline 1991)。例えば、菊に一輪咲きとスプレー咲きがあるように、園芸植物の鑑賞的価値は枝分かれの有無・多少によって多様化する。また、果樹では低木で多枝性である方が果実が多

く、収穫も容易になる。逆に、トマトなどの栽培では、果実が多くなり過ぎ品質が低下しないように、腋芽を切り取り分枝を減らす芽つみという作業が必要である。このように農業的にも、植物独自の現象の一つである頂芽優勢の調節機構の解明は、重要な研究である。

2) 頂芽優勢と植物ホルモン

頂芽優勢の現象は、古くから知られており、現在に至るまで、様々な解析が行われてきた。その中に、植物ホルモンを中心とする古典的な植物生理学的な視点により、オーキシシン、サイトカイニンを中心とする外部からの植物ホルモン投与による効果を解析した膨大な研究がある。その結果、頂芽優勢は、頂芽から供給されるオーキシシンによる成長抑制（阻害源切除の実験により、腋芽の成長抑制に最も有効なのは、茎頂部分ではなく、展開中の若い葉である）と、（主に）根から供給されるサイトカイニンによる成長促進作用とのバランスによって維持される現象であると考えられている（Sachs and Thimann 1967）。さらに、近年、*Agrobacterium* 遺伝子を導入し、細胞内のオーキシシン、サイトカイニン濃度を高めた形質転換植物を用いた研究（Medford et al. 1989, Romano et al. 1991）や、頂芽優勢の崩れた突然変異体（Tucker 1979, Lincoln et al. 1990, Chaudhury et al. 1993, Beveridge et al. 1997）と野生型との接木実験も報告され（Beveridge et al. 1994, Napoli 1996）、このような研究からも、頂芽優勢と植物ホルモンとの関わりが確かめられた。しかし、これまでの研究では、外部からの植物ホルモンの過剰投与による効果を解析している例が多く、頂芽優勢と直接関係のない現象をとらえる危険性を持ち合わせていた。さらにつけ加えるならば、植物ホルモンに観点を置いた研究は、投与したホルモンやホルモンの阻害剤によってどのような変化が起きたのか、あるいは組織内のホルモン量がどのように変化したのかといったことが主であった。オーキシシンやサイトカイニンがどのように作用したために、どの分子がどのように働いて、腋芽の休眠が打破されたのかといった分子機構の解明が頂芽優勢に関しては、全く行われていないのが現状である（Cline 1994）。オーキシシンやエチレンといった植物ホルモンがどのような遺伝子を誘導するか、あるいはエチレンをレセプターが受け取り、そのシグナルをどのように伝達するのかというような研究は、

以前に比べるとはるかに多くのことが分かってきた。しかし、全貌が明らかになったとは到底言いがたく、それらの知見に基づいて頂芽優勢の分子機構を明らかにすることは困難である。頂芽優勢と植物ホルモンが密接な関係にあることに疑問の余地はないが、本研究では視点を変え、植物ホルモンに捕らわれない観点から、解析を試みようとするものである。

休眠中の腋芽細胞とは、どういったものなのかと、既知の生命現象に照らし合わせて考えてみると、腋芽の細胞分裂が抑制されている状態と考えられる。すなわち、休眠中の腋芽は、細胞周期が抑制されている。しかし、いったん頂芽が切除されると、直ちに、腋芽は細胞分裂による成長を開始する。そこで、本研究は、腋芽の細胞分裂、細胞周期の調節という観点から解析を進め、そのことを通して頂芽優勢の分子機構の解明を試みようとしたものである。

3) 細胞周期の制御機構

細胞周期は、DNA 合成期の S 期、有糸分裂期の M 期、その間のギャップといわれる G1、G2 期の 4 つの時期に分けられる (図 2) (Alberts et al. 1994)。G1 チェックポイントと、G2 チェックポイントは、細胞周期の進行状態と、細胞の成長、栄養要求性、他の細胞からのシグナル、下流の調節の完了などを協調的に制御するために必要とされる主要な機構である。その中枢は、ヘテロダイマーで構成される kinase family が、規則正しく活性化される分子機構である (図 3)。そのヘテロダイマーの第 1 の要素は cyclin-dependent kinase (CDK) family であり、セリンとスレオニン残基のリン酸化を介して下流の過程を誘導する。第 2 の要素は cyclin family であり、CDK の活性化タンパク質である。特定の CDK と結合し、CDK が適切な標的タンパク質をリン酸化する能力を調節する。cyclin family は細胞周期のある時期に特異的に発現するように、合成と分解が調節されている。cyclin/CDK 複合体の周期的な会合、活性化、分解は、秩序立った細胞周期の調節機構の要をなしている。

近年、細胞周期の制御機構の解析は、癌研究と合流し著しく発達した (Norbury and Nurse 1992, King et al. 1994, Nurse 1994)。動物細胞は、発生分化のプログラムや、環境要因に応じて、G1 期で細胞周期の進行や抑制を調節する (Sherr and Roberts

1995)。図4に現在までに明らかにされた動物細胞のG1期における細胞周期の制御機構の一部の模式図を示す。正の制御タンパク質 (cyclin、CDK など) 以外にも、負の制御タンパク質 (癌抑制遺伝子産物など) が存在し、各タンパク質間の相互作用や、リン酸化などによる活性の制御により、細胞周期の進行と抑制は調節される。例えば、外部からの刺激に応答し、CDK inhibitor (CKI) である p21 は、cyclin/CDK 複合体や、PCNA (DNA polymerase δ の活性補助因子) と結合し、その結果、G1/S 期進行を抑制する。retinoblastoma tumor suppressor gene (RB) は、そのリン酸化状態により、G1/S 期進行を調節する。これらの制御タンパク質 (cyclinD、p21、RB など) の異常は、数々の腫瘍形成を引き起こす原因になることが知られている。

4) 植物の細胞周期の制御機構

植物の細胞周期の研究には、一般的に植物培養細胞を用いた研究があり、細胞分裂という視点からは、茎頂や根端、側根の分裂組織や不定芽、不定根を扱った研究がある。近年、動物の細胞周期の制御タンパク質のホモログ (例えば、cyclin、CDK、CKI、PCNA、RB など) が、植物からも単離された。さらに、その発現様式や、酵素活性が解析され、酵母や動物の機能的なカウンターパートであることが示された (Hemerly et al. 1992、Fobert et al. 1994、Jacobs 1995、Wang et al. 1997、Suzaka et al. 1989、Shen et al. 1994)。すなわち植物の細胞周期は、少なくとも一部は、動物の制御タンパク質と構造的に類似性のあるタンパク質や、似たような分子機構により調節されていることが明らかになってきた。

一方、このような細胞周期の制御機構の共通性にも関わらず、成長や分化において、植物の細胞分裂の調節は、他の真核生物とその性格が異なる (Staiger and Doonan 1993、Jacobs 1997)。例えば、植物の細胞分裂は、器官形成に伴い連続的に起こり、植物の全体の大きさ (細胞の数と大きさ) は、環境により劇的に変化する。また、このことは、植物の形態形成にとっても、重要な役割を果たす。植物は、付加的な成長を正常な発生分化のパターンに組み入れることができる (Hemerly et al. 1995)。例えば Doerner et al. は、*cdc2* プロモーターによる mitotic cyclin の異所的発現の結果、根の成長は速くなったが、形態的には異常ではなかった (Doerner et al. 1996) と報告している。一方、

動物では、付加的な成長の多くは、正常な発生分化をせず腫瘍を形成する。植物細胞は、一般的に動物細胞よりも容易に分化後も脱分化し、再び細胞分裂を開始する能力を持つ。植物はホルモンの組み合わせにより、成長や器官分化（すなわち、細胞分裂と細胞分化）を大きく変化させる。このように、植物の細胞分裂は、植物全体の成長や分化において重要な役割を果たし、さらに環境要因などの影響に対して、高い適応性や柔軟性を備えている。以上のことより、植物は、動物とは異なる植物独自の制御機構により細胞分裂を調節していることが考えられる（図5参照）。

現在、植物において、細胞周期の個々の制御タンパク質に関する知見は、徐々に蓄積されてきたが、各制御タンパク質間のネットワークはほとんど解明されていない。さらには、植物における発生分化のプログラムや、環境要因に応じた細胞分裂のパターンを制御する細胞周期の調節機構は、全く解明されていない（Meyeroowitz 1997）。本研究は、具体的には、腋芽の細胞周期の制御機構を解析することになるが、基本的な細胞周期の制御機構を明らかにすることが目的ではなく、この解析を通して、頂芽から受け取る腋芽細胞の分裂抑制と、頂芽切除による分裂抑制の解除機構を明らかにして、頂芽優勢の分子機構を解明しようとするものである。ここが、他の分裂組織や培養細胞を対象とした細胞周期の研究と基本的に異なる点である。

第二章では、休眠中の腋芽（以下、休眠腋芽と呼ぶ）の細胞周期の状態に関して解析した。まず、アラスカエンドウより、細胞周期の各時期に特異的に発現する遺伝子（PCNA、CycB1 [cyclinB]、CycD3 [cyclinD]、cdc2、histoneH4）の各 cDNA を単離した。これらの cDNA をプローブとして、頂芽切除前後の腋芽における各遺伝子の発現様式を解析することにより、休眠腋芽の細胞周期が、どこで抑制されているのかについて検討した。さらに、PCNA cDNA をプローブとした *in situ* hybridization による組織学的手法を用いて、頂芽切除による細胞分裂のシグナルが、腋芽内をどのように伝達されるのかについて検討した。

第三章では、動物細胞の細胞周期の抑制機構の中で、最も重要な働きをする retinoblastoma tumor suppressor gene (RB) に注目し、エンドウの RB ホモログが、腋芽の細胞周期の制御機構に関与する可能性について検討した。エンドウより、RB ホモログと思われる cDNA (PSRB1) を単離し、PSRB1 の機能をアミノ酸配列の一次構造

解析及び、yeast two-hybrid system を用いた解析により推測した。さらに、PSRB1 に対する特異抗体を調製し、この抗体を用いることにより、腋芽の休眠から成長への移行期における PSRB1 のタンパク質量及び、リン酸化状態の変化の検出に成功した。これらの結果より、休眠腋芽の細胞周期の抑制機構における PSRB1 の役割について考察した。

第四章では、休眠腋芽及び、成長を始めた腋芽（以下、成長腋芽と呼ぶ）における各制御タンパク質量の変化及び、各制御タンパク質間の相互作用の変化について検討した。各タンパク質（PCNA、CycB1、CycD3、Cdc2）の特異抗体を用いて、頂芽切除前後の腋芽における各タンパク質量を解析した。次に、休眠及び成長腋芽における、PCNA と CycD3 の会合状態に関して解析を行った。これらの結果より、腋芽の細胞周期の制御機構に関して考察した。

Faint, illegible text on the left page of the notebook, likely bleed-through from the reverse side.



Figure. 1 Apical dominance.

left : The terminal bud grows predominantly, and the growth of the axillary buds is suppressed.

right : After decapitation, the axillary buds grow out.

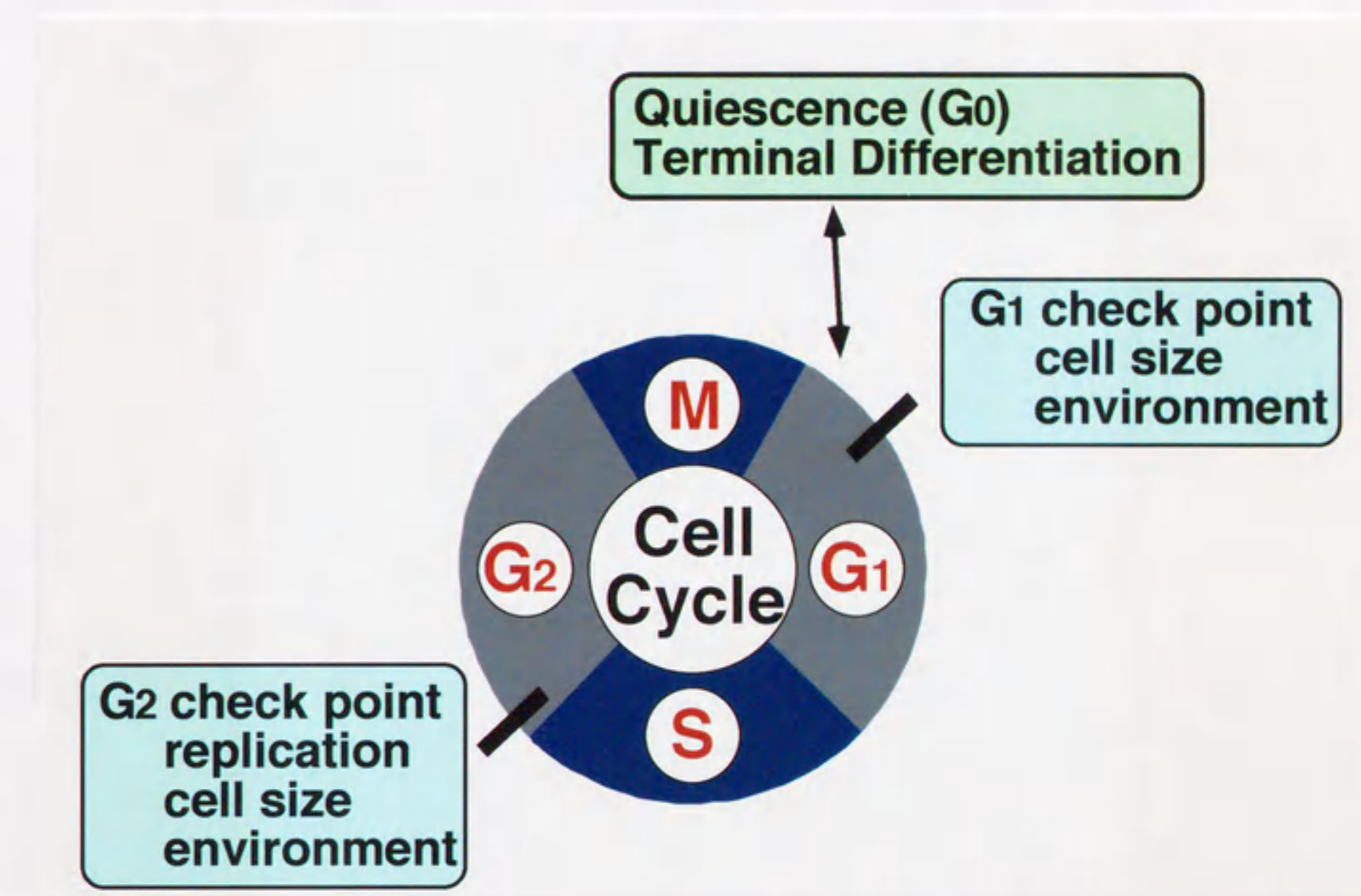


Figure. 2 The four successive phases, and G1 and G2 checkpoints. The standard eucaryotic cell cycle is divided into 4 phases. Feedback from downstream processes and signals from the environment can prevent the control system from passing through G1 and G2 checkpoints.

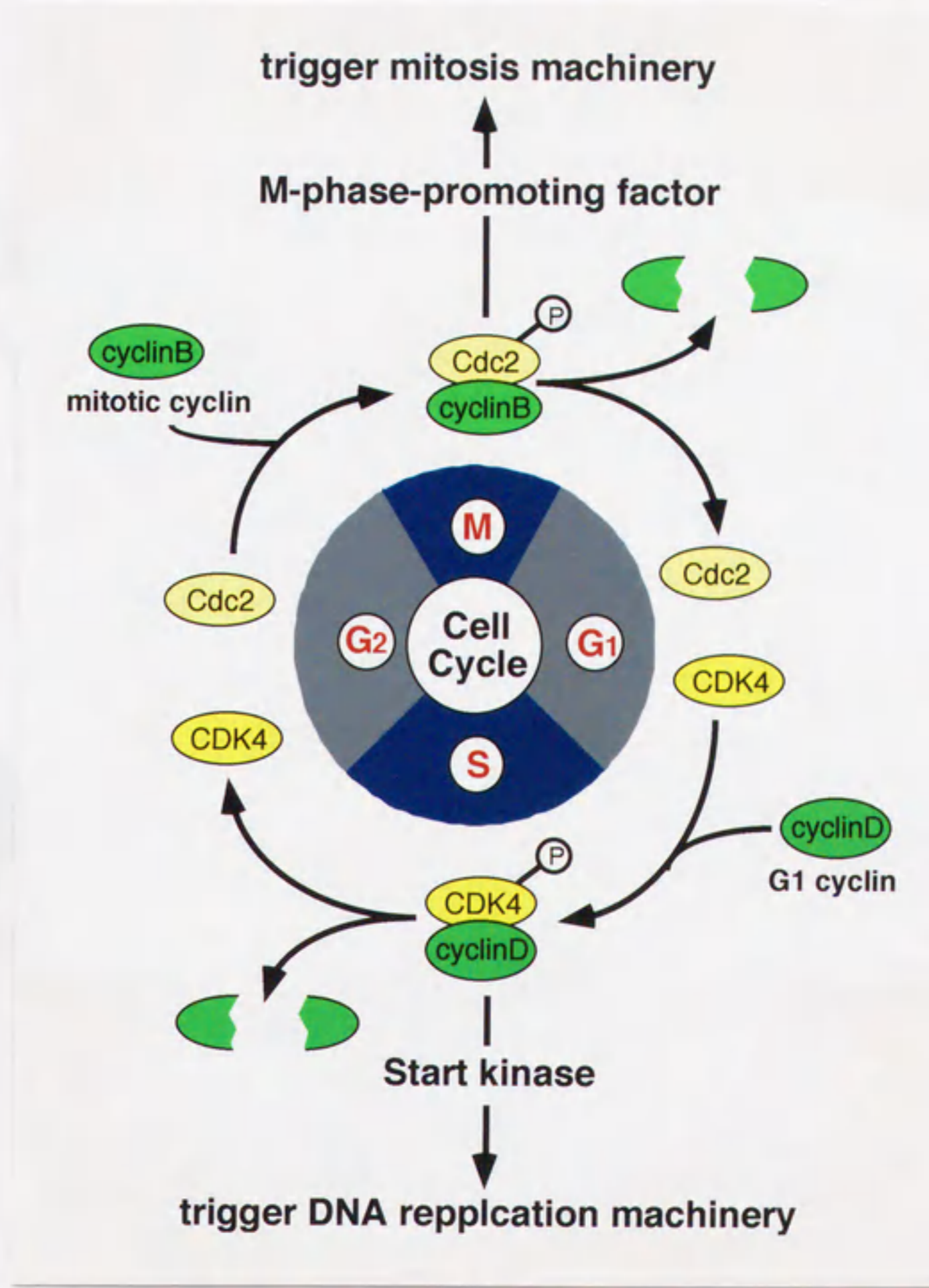


Figure. 3 The core of the cell cycle control system.
 Each CDK associates with different cyclins to trigger the different downstream processes of the cell cycle. The CDK activity is terminated by cyclin degradation.

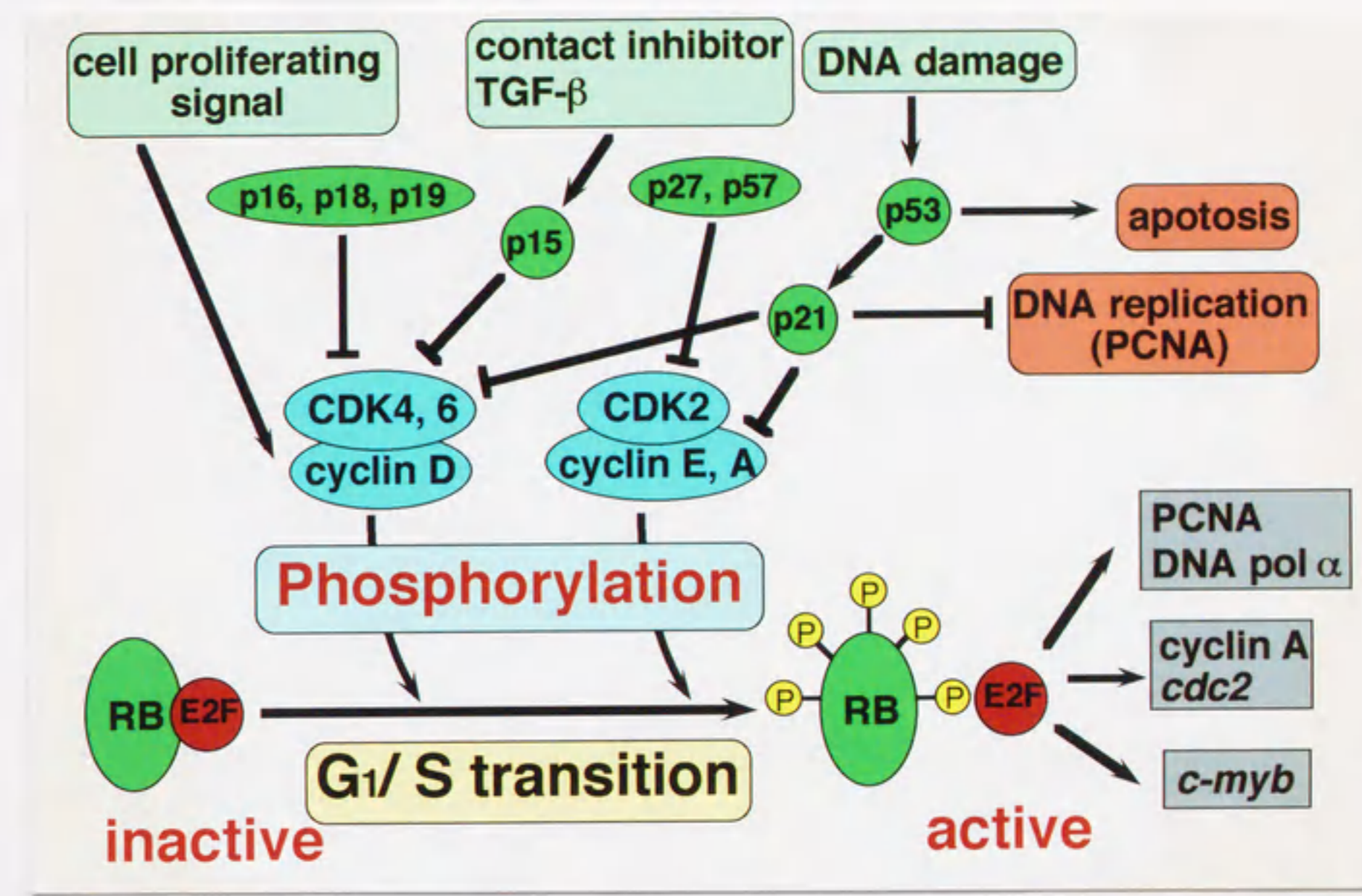


Figure. 4 Positive and negative regulators of G1 progression in mammals.

The proteins showed green (e. g. RB, p21, and p53) are among negative regulators of the cell cycle. The proteins showed blue (cyclins and CDKs) are among positive regulators of the cell cycle. These proteins control the arrest and progression of the cell cycle during the G1 phase in response to environmental signals and developmental programs.

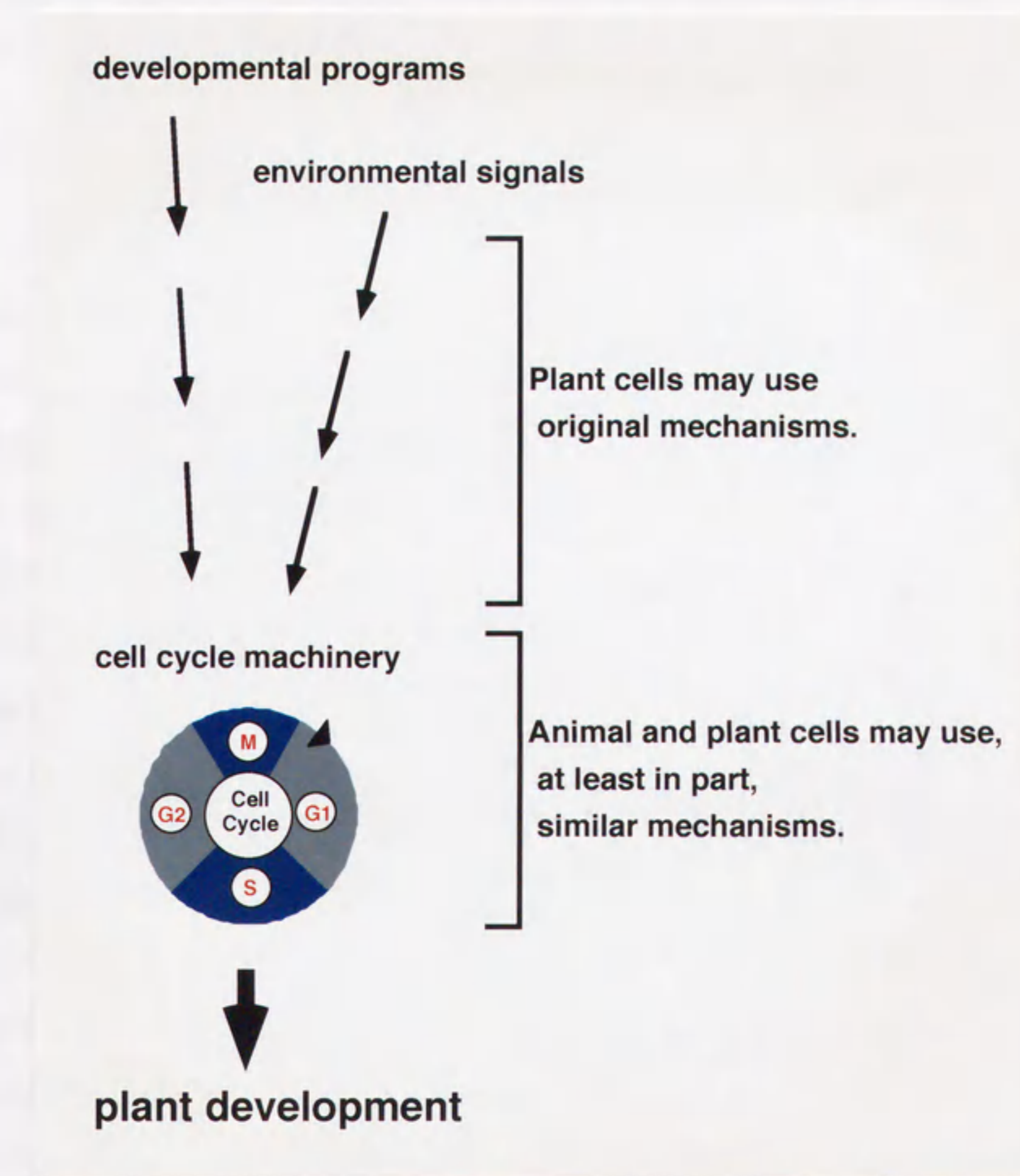


Figure. 5 Cell cycle control in response to developmental programs and environmental signals.

Although the general cell cycle control is remarkably similar in plant and animal cells, it is conceivable that novel and distinctive molecular mechanisms have evolved in plants as a result of unique growth properties, developmental patterns, or environmental signals.

第二章

細胞周期の各時期に特異的な遺伝子発現をマーカーとして用いたアラスカエンドウの腋芽の細胞周期に関する解析

緒言

従来、頂芽優勢の解除後の事象を理解するために、頂芽切除後の腋芽の組織学的解析が行われてきた。主に、頂芽切除後の腋芽全体の長さの変化と、腋芽細胞の細胞分裂の速度が調べられた。多くの報告では、頂芽切除後、12時間以内に腋芽の伸長成長が始まることが示された。例えば、エンドウでは腋芽の伸長成長は、頂芽切除6時間後に始まる (Wardlaw and Mortimer 1970)。また頂芽切除後、最初に腋芽の茎頂付近の葉が伸長し、その後に腋芽の節間の伸長が始まることがエンドウで示され

(Rubinstein and Nagao 1976)、同様の現象は、インゲンマメでも観察された (Yeang and Hillman 1981)。さらに、頂芽切除後の腋芽の伸長成長の開始と、細胞分裂の開始との関係も解析された。腋芽が十分に分化していない植物 (例えば、ムラサキツユクサ) では、頂芽切除後、腋芽の細胞分裂が起こり、その後、腋芽の伸長成長が始まる (Naylor 1958)。一方、腋芽が十分に分化した植物 (例えば、インゲンマメ) では、6時間後に伸長成長が始まり、12時間後に有糸分裂活性が増加することが示された (Rubinstein and Nagao 1976)。このような植物種における違いは、腋芽の分化の成熟度に依存すると推測されている (Martin 1987)。

本研究は、まずアラスカエンドウの休眠腋芽は、どの段階で細胞周期が抑制されているのかを解析し、さらに、頂芽切除後、腋芽の細胞分裂が、腋芽のどの部位から開始するのかを組織学的に検討した。細胞周期の各時期に特異的に発現する遺伝子をマーカーとして用い、頂芽切除後の腋芽における各 mRNA の増加のパターンを解析した。本研究で用いたマーカー遺伝子 (*cdc2*, *cyclinB*, *cyclinD*, *histoneH4*, *PCNA*) の細胞周期の各時期での発現様式の模式図を、図6に示す。

細胞周期の調節機構は、CDK と cyclin から構成される kinase family の働きによって

制御される (図3参照)。この cyclin/CDK 複合体の、周期的な会合、活性化、分解が、細胞周期の調節機構の要をなしている。例えば、mitotic cyclin である cyclinB は、late G2 期から蓄積が始まり、Cdc2 と結合して M-phase-promoting factor (MPF) を形成する。その後 MPF は、他の酵素 (Cdc2-activating kinase (CAK)) による 161 番目のスレオニンのリン酸化と、15 番目のチロシンの脱リン酸化を受け、活性型になり、下流の過程 (有糸分裂) を誘導する。late M 期になると cyclinB は分解され、MPF の不活性化が始まり、細胞はサイクルを終了させる。すなわち、細胞周期の進行においては、cyclinB が late G2-M 期に発現するように、その合成と分解とが調節されることが重要な点である。一方、cdc2 の発現は、細胞周期に依存せず、分裂している細胞において恒常的に存在する (Martinez et al. 1992)。

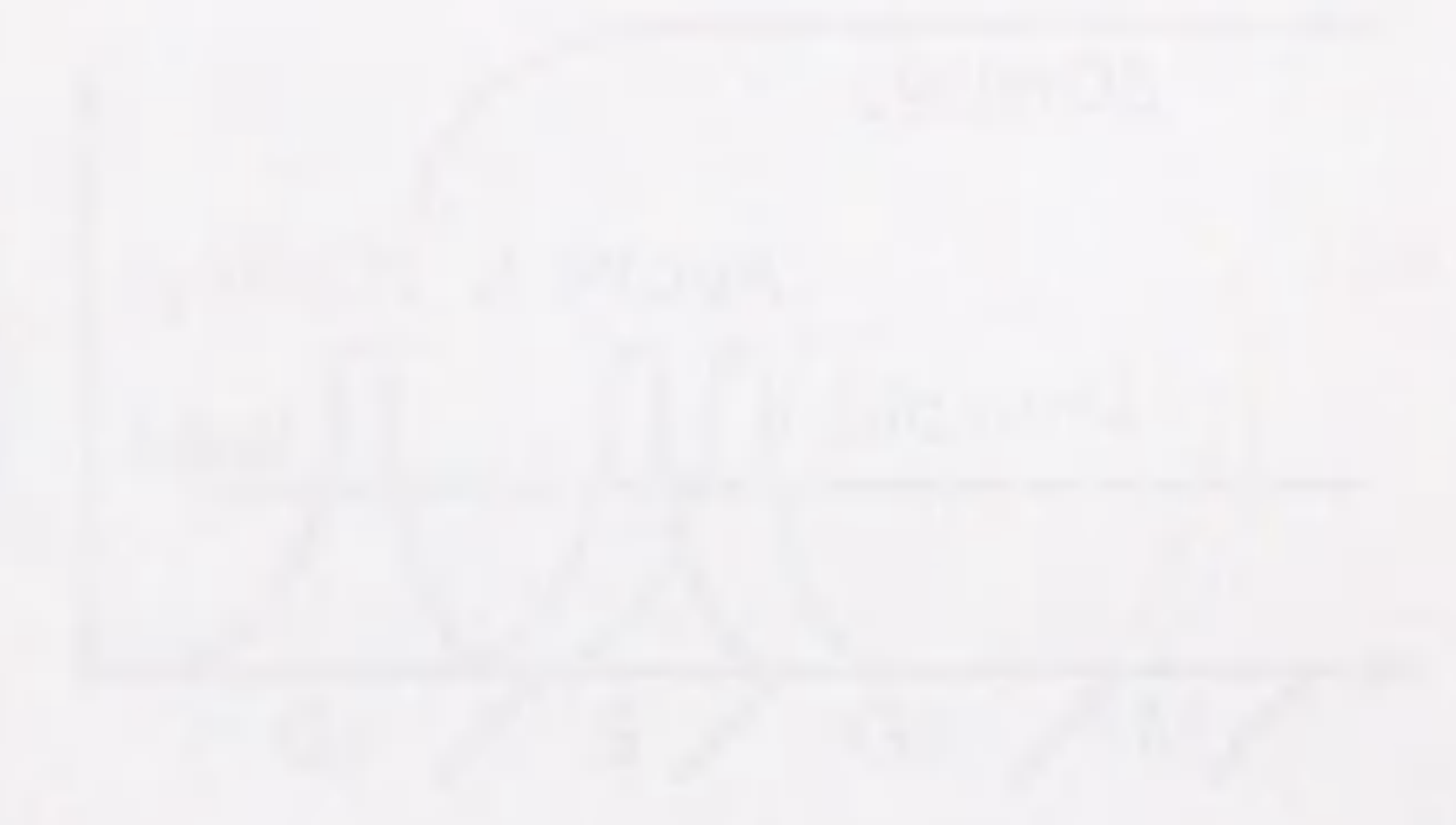
proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は、S 期に特異的に発現する遺伝子の一つである。自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus) の患者の血清中にある抗体と反応する細胞核内抗原として発見された (Miyachi et al. 1978)。その後、DNA polymerase δ の活性補助因子としての機能が明らかになった (Prelich et al. 1987)。PCNA mRNA は、late G1-S 期に特異的に発現し、PCNA タンパク質は、S 期に核へ移行する (Bravo and Celis 1980, Bravo and MacDonald-Bravo 1985, Almendral et al. 1987)。植物の PCNA ホモログも単離され (Suzuka et al. 1989)、同調培養細胞を用いた解析の結果、動物の場合と同様に、PCNA mRNA は、late G1-S 期に特異的に発現することが明らかになった (Kodama et al. 1991)。

動物細胞では、G1 cyclin である cyclinD の機能は、細胞の外部環境 (増殖シグナル) を細胞周期の制御機構に伝えるセンサーであると考えられている (Sherr 1993)。cyclinD mRNA のレベルは、血清中の成長因子に依存しており、early G1 期から蓄積が始まる。植物の cyclinD は、G1 cyclin 欠損株の酵母を相補する cDNA として、Arabidopsis、アルファルファから単離された (Soni et al. 1995, Dahl et al. 1995)。同調培養細胞を用いて、Arabidopsis cyclin δ の細胞周期における発現様式が解析された。培地中のオーキシンを枯渇させると、培養細胞の細胞周期は G1 期で抑制される。その後、培地にオーキシンを再添加すると、培養細胞の同調的に細胞周期は G1 期から S 期に進行していく。その G1/S 期移行期に、Arabidopsis の cyclin δ 3 mRNA が誘導されることが示

Figure 1. Northern blot analysis of PCNA, cyclin B, cyclin D, and cdc2 mRNA levels in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during cell cycle progression. The blot shows the relative expression levels of these genes in different cell cycle stages: G1, S, G2, and M. PCNA and cyclin B show high expression in the S and G2 phases, while cyclin D and cdc2 show high expression in the G1 and M phases, respectively. The expression levels are normalized to the housekeeping gene actin.

された (Fuerst et al. 1996)。

本章では、アラスカエンドウを材料とし、細胞周期の各時期に特異的に発現する遺伝子である PCNA、cyclinB、cyclinD、cdc2 の各 cDNA の単離について述べた。次に、頂芽切除前後の腋芽における各 cDNA (PCNA、cyclinB、cyclinD、cdc2、histoneH4) の発現解析により、休眠腋芽の細胞周期の状態について考察を行った。さらに、PCNA cDNA をプローブとした *in situ* hybridization による組織学的手法により、頂芽切除による細胞分裂の開始シグナルが、腋芽内をどのように伝達様式されるのかについて考察した。



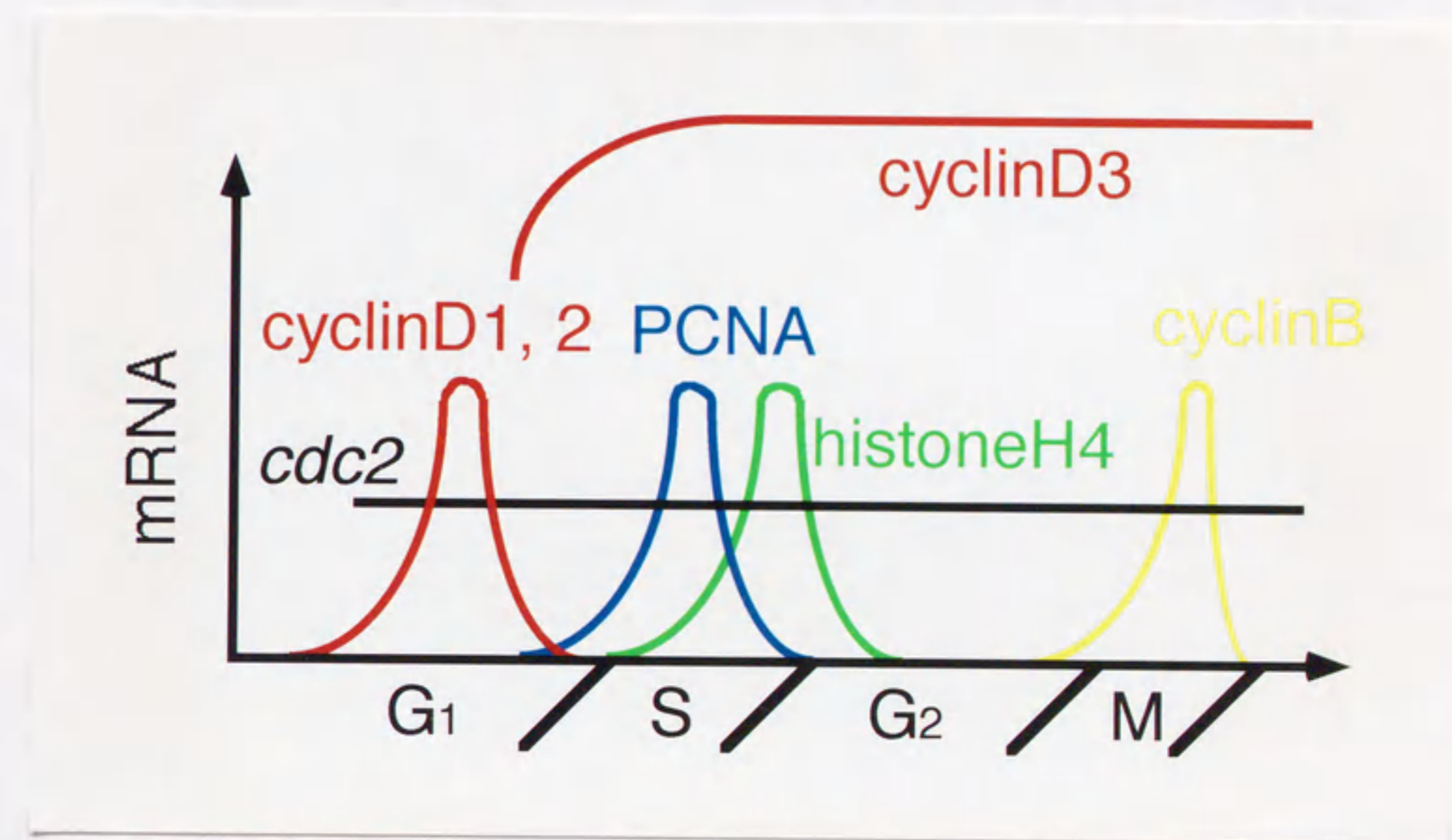


Figure. 6 Expression patterns of cell cycle-related genes.

Each cell cycle-related gene is expressed in the specific phase of the cell cycle.

cyclinD : G1/S phases. PCNA : late G1/S phases. histoneH4 : S phase. cyclinB : late

G2/M phases. *cdc2* : proliferating cell.

1) 植物材料の調製

実験材料として、アラスカエンドウ (*Pisum sativum* L. cv. Alaska) を用いた。アラスカエンドウ種子を、25℃の流水中で24時間吸水させた後、湿ったロックファイバー上に播種した。22-25℃、明所18時間、暗所6時間の周期で、7日間生育させたエンドウの第2節の腋芽を解析に用いた。頂芽切除の処理は、第2節より1cm上部の部位を切除することにより行った。茎頂は先端から3mmの部分、根端は先端から5mmの部分それぞれ用いた。

2) cDNA ライブラリーの作成

エンドウの腋芽1.5gから、SDS-phenol法により核酸を抽出した (Sambrook et al. 1989)。得られた核酸画分からLiCl沈殿法により全RNA4.4mgを回収した。oligo(dT)-cellulose Type 2 (Collaborative Research) 及び、oligotex-dT30 (TAKARA) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、全RNAから、poly(A)⁺RNAを調製した。Mori et al. (1991) によるベクター・プライマー法に準じて、cDNAライブラリーを作成した。

3) cDNA の単離

PCNA、cyclinB、cyclinDは、既に報告があるアミノ酸配列に基づき、以下に示す縮重プライマーを合成した。*cdc2*は、エンドウの部分的なcDNAの報告 (Feiler and Jacobs 1990) に基づき、以下に示すプライマーを合成した。

PCNA

センス：5'-TG(T/C)GC(N)GG(N)AA(T/C)GA(N)GA(T/C)AT(T/C/A)AT(T/C/A)AC-3'

アンチセンス：5'-CAT(N)TC(N)GC(T/G/A)AT(T/C)TT(G/A)TA(T/C)TC(N)AC(N)AC-3'

cyclinB

センス：5'-ATG(C/A)G(N)GC(N)AT(T/C/A)(T/C)T(N)GT(N)GA(T/C)TGG-3'

アンチセンス：5'-GG(N)GG(G/A)TA(N)AT(T/C)TC(T/C)TC(G/A)TA(T/C)TT-3'

cyclinD

センス：5'-GT(N)(T/G/A)(C/G)(N)TG(T/C)(T/C)T(N)(T/A)(C/G)(N)(T/C)T(N)GC-3'

アンチセンス：5'-TG(T/G/A)AT(N)GT(T/C)TT(N)GC(T/C)TC(G/A) AA-3'

cdc2

センス：5'-GTGGTTTATAAGGCTCGTGAC-3'

アンチセンス：5'-GTGTGTAATGTTCTGACAGG-3'

ただし、Nは、G、A、T、Cを表す。根端あるいは、茎頂の全RNAから合成したcDNAを鋳型とし、上記のプライマーを用いてRT-PCR反応を行った。PCR産物（PCNA 492bp、cyclinB 185bp、cyclinD 108bp、*cdc2* 420bp）をBSII TSK-プラスミドベクター（Ichihara and Kurosawa 1993）にクローニングし、その塩基配列を決定した。目的の塩基配列を含むPCR産物をランダムプライマー法で³²P標識し、これをプローブとして、根端あるいは、茎頂のライブラリーからcDNAをスクリーニングした。50% formamide、6xSSPE（1xSSPE：0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄ [pH7.4]、1mM EDTA）、0.5% SDS、100μg/ml 変性サケ精巢DNA、5% Irish cream liqueur（BAILEY's）からなる溶液を用い、42℃、16時間以上の条件でhybridizationを行った。2xSSPE+0.1% SDSで、室温、30分間、さらに、2回の65℃、30分間の洗浄を行った。Fuji Imaging Plateに適切な時間露出し、BAS2000 imaging analyzer（Fuji Film Co.）で、シグナルを検出した。

4) 塩基配列の決定

PCR産物とcDNAの塩基配列の決定を、dideoxy chain termination法を用いて自動蛍光DNA sequencer（model LIC-4000, LICOR）により行った。なお、両鎖の塩基配列を決定した。

5) ノーザン解析

ホルムアムデヒドアガロースゲルに全RNAを電気泳動し、Hybond N+（Amersham）に転写した。プローブとして、ランダムプライマー法により³²P標識したcDNAを用いた。hybridization及び、洗浄の条件は、スクリーニングで用いた条件と同様にして

行った。

6) *in situ* hybridization

以下に述べる 4 点を除き、基本的に Kouchi et al. (1995) の方法に準じて行った。スライドガラスは、3-aminopropyltriethoxysilane コートスライドガラス (Matsunami Glass Ind., Ltd.) を使用した。二重染色は、抗 digoxigenin 抗体及び、抗 fluorescein 抗体を 1:500 希釈濃度で用いた。DAPI 染色は、最後のエタノール洗浄後、0.5 μ g/ml DAPI (Sigma) による染色を 30 分間行った後、水で洗浄し、風乾させ、グリセロールによるマウントを行った。

1) エンドウ PCNA、cyclinB、cyclinD、cdc2cDNA の単離

エンドウの PCNA cDNA の単離を行った。エンドウ根端から調製した cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、5 個の陽性クローンを得た。最もインサートが長いクローンの全塩基配列を決定した結果、全長は 948bp であり、アミノ酸 266 残基のタンパク質をコードしていることが推測された (AB008186)。その推定アミノ酸配列をイネ、ヒト、酵母から単離された各 PCNA と比較解析した結果、89%、65%、55% の identity をそれぞれ示した (図 7A)。この結果より、このクローンは、エンドウ PCNA であり、また、全翻訳領域を含む完全長であると判断した。

エンドウの cyclinB cDNA の単離を行った。エンドウ茎頂から調製した cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、1 個の陽性クローンを得た。このクローンの全塩基配列を決定した結果、全長は 880bp であり、アミノ酸 236 残基のタンパク質をコードしていることが推測された (AB008189)。この推定アミノ酸配列は、ダイズ *cyc5Gm* (Hata et al. 1991) と最も高い類似性を示した。cyclin 遺伝子は、CDK との結合に必要とされる保存領域 (cyclin box) を有する。ダイズ、Arabidopsis、Xenopus から単離された各 cyclinB との cyclin box 領域内での比較解析の結果、82%、60%、42% の identity をそれぞれ示した (図 7B)。この結果より、このクローンは、エンドウ cyclinB であると判断した。そこで、Renaudin et al. (1996) による命名法を用いて、CycB1 グループに分類し、Pissa;CycB1;2 と名付けた (以下 *CycB1* と略す)。

エンドウの cyclinD cDNA の単離を行った。cyclinB と同様の方法でスクリーニングした結果、4 個の陽性クローンを得た。最もインサートが長いクローンの全塩基配列を決定した結果、全長 1,656bp、アミノ酸 384 残基のタンパク質をコードしていることが推測された (AB008188)。この推定アミノ酸配列は、アルファルファの *cycMs4* (Dahl et al. 1995) と最も高い類似性を示した。アルファルファ、Arabidopsis、ヒトから単離された cyclinD との cyclin box 領域内での比較解析の結果、92%、73%、31% の identity をそれぞれ示した (図 7C)。この結果より、このクローンは、エンドウ cyclinD であり、また、全翻訳領域を含む完全長であると判断した。そこで、Renaudin et al.

(1996) による命名法を用いて、CycD3 グループに分類し、Pissa:CycD3₁ と名付けた (以下 CycD3 と略す)。CycD3 の N 末端には、retinoblastoma tumor suppressor gene (RB) との、結合に必要とされる LXCXE motif が保存した。この点に関しては、第三章で後述する。

エンドウの *cdc2* cDNA の単離を行った。エンドウ茎頂から調製した cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、全翻訳領域を含む完全長であると思われる cDNA を得た (AB008187)。また、この cDNA は、cyclin との結合に必要とされる PSTAIRE motif を含んでいた (Jacobs 1995)。

2) エンドウ PCNA、CycB1 遺伝子の *in situ* hybridization による発現解析

植物細胞において、PCNA、cyclinB 遺伝子は、late G1-S 期、late G2-M 期に特異的に発現する (Kodama et al. 1991、Hemerly et al. 1992)。一方、植物の cyclin 遺伝子は、その推定アミノ酸配列による cyclin の分類のみでは、正確に細胞周期における発現様式を推測することはできないといわれている (Hata et al. 1991、Ferreira et al. 1994)。そこで、得られた CycB1 の細胞周期における発現様式を確認するために、エンドウの茎頂分裂組織で、CycB1 cDNA プローブを用いた *in situ* hybridization を行った。その典型的な *in situ* hybridization の結果を図 8 に示す。

図 8A から D は、*in situ* hybridization 後、DAPI 染色を行い、PCNA あるいは、CycB1 の mRNA が発現する細胞と、M 期の細胞とを同時に検出した結果である。図 8A、C は蛍光視野、図 8B、D は明視野による観察結果を示す。図 8A、B は PCNA cDNA プローブ、図 8C、D は CycB1 cDNA プローブを用いた結果である。PCNA mRNA は、間期 (G1、S、G2 期のいずれかの時期) の細胞のみに検出され、M 期の細胞には全く検出されなかった (図 8A、B)。この結果は、PCNA mRNA の発現が、late G1-S 期に特異的であることとよく一致する。一方、CycB1 mRNA は、M 期の細胞すべてと、一部の間期の細胞に検出された (図 8C、D)。この結果は、CycB1 mRNA が、M 期に特異的に発現することに加えて、少なくとも一部の間期にも発現することを示す。また、どちらのセンスプローブともシグナルは検出されなかった (データは示さない)。図 8E、F は、PCNA cDNA プローブ (濃紫色) と、CycB1 cDNA プローブ (赤色) と

の二重染色 *in situ* hybridization の結果を示す。各シグナルは、同じ細胞から検出されることはなく、これらの2つのプローブを用いれば細胞を完全に染め分けることができることが分かった。この結果より、*CycB1* mRNA を発現している間期の細胞は、PCNA mRNA が発現する時期 (G1 期及び、S 期) の細胞ではなく、G2 期の細胞であると考えられる。以上の *in situ* hybridization による解析結果より、*CycB1* mRNA は、late G2-M 期に特異的に発現することが示された。

3) 頂芽切除前後の腋芽における各遺伝子 (*PCNA*, *CycB1*, *CycD3*, *cdc2*, *histoneH4*) の発現様式

エンドウの第2節の腋芽は、頂芽が切除されるまで、細胞分裂・細胞伸長を伴った成長を開始しない。そこで、休眠腋芽の細胞周期が、どの時期で抑制されているのかについて検討した。各遺伝子の発現様式は、細胞周期の各時期に特異的である (図6参照)。前述したように、PCNA mRNA は late G1-S 期、*CycB1* mRNA は late G2-M 期に特異的に発現する。典型的な PSTAIRE motif を有する *cdc2* は、細胞周期のある時期に特異的ではないが、分裂している細胞に特異的に発現することが知られている

(Martinez et al. 1992)。Arabidopsis cyclin δ 3 の mRNA は、G1/S 期移行期に誘導される (Fuerst et al. 1996)、*histoneH4* mRNA は S 期に特異的に誘導されることが示されている (Schümperli 1986)。以上の遺伝子の cDNA をプローブとし、頂芽切除後に経時的に採取した腋芽を用いて、ノーザン解析を行った。その結果を図9Aに示し、さらに、得られたシグナルを定量した結果を図9Bに示す。休眠腋芽の mRNA の発現量はどの遺伝子ともに、頂芽切除後と比較して極めて低い (図9A、0時間後)。しかし、頂芽切除により腋芽の成長が誘導されると、各 mRNA は著しく増加することが分かった。さらに、その増加するタイミングは、各遺伝子により異なっており3つのグループに分けられた。第1グループは PCNA、*cdc2*、*CycD3* であり、頂芽切除4時間後に mRNA が著しく増加を始めた。第2グループは *histoneH4* であり、10時間後に mRNA の増加が検出され始めた。第3グループは *CycB1* であり、14時間後に mRNA の増加が検出され始めた。以上の結果を言い換えるならば、頂芽切除後に、PCNA (late G1-S 期)、*histoneH4* (S 期)、*CycB1* (late G2-M 期) の順に mRNA の発現の増加が検出さ

れたことになる。このことは、多くの腋芽は細胞周期が、G1期で抑制されていることを示し、頂芽切除後、多くの細胞は同時に細胞周期が進行することが示唆された。もし、多くの休眠腋芽の細胞周期が、G2期で抑制されているなら、頂芽切除後、*CycB1* mRNAの増加が他の遺伝子のmRNAよりも最初に検出されると考えられるからである(図6参照)。

Devitt and Stafstrom (1995) は、休眠腋芽の細胞は、mid-G1、G1/S boundary、near the S/G2 boundary の3点で、細胞周期が抑制されていることを報告している。そこで、*CycB1* cDNA プローブを用いた *in situ* hybridization による解析を行い、この点を確認した。その結果、*CycB1* のシグナルは、休眠腋芽では検出されず、頂芽切除4時間後に、腋芽の数個の細胞に検出され始め、頂芽切除16時間後に腋芽の多くの細胞でシグナルが検出された(データは示さない)。従って、休眠腋芽では細胞周期がG2期で抑制されている細胞は、G1期で抑制されている細胞よりも極めて少なく、全体として無視できると判断した。

4) 腋芽間における休眠と成長のサイクル

エンドウの腋芽は、1つの節に大小4つの腋芽が分化した状態で存在している(図10、Stafstrom and Sussex (1988) より転記)。ここでは、一番大きい腋芽を主芽、その次に大きい腋芽を副芽と呼ぶ。頂芽を切除すると、主芽と副芽は共に成長を開始するが、次第に主芽が優先的に成長し、副芽の成長を抑制する。この時期に各mRNAの発現がどのようになっているかをノーザン法により解析した。その結果を図11に示す。図11A、Dは、PCNA、*CycB1* cDNAのプローブを用い、頂芽切除後の主芽と副芽におけるPCNAと、*CycB1* mRNAの発現を検出した結果である(前述、図9)。次に、頂芽切除後、2から5日までのノーザン解析の結果を図11B、Eに示す。両mRNAとも、主芽では頂芽切除5日目まで検出された。しかし、両mRNAともに、副芽では3日目まで検出されたが、4日目以降は検出されなくなった。この結果は、副芽が再び、休眠状態に入ったことを示している。つまり、主芽が頂芽の性質を獲得し、その結果、副芽より優先的に成長を始め、副芽の成長を抑制していることが考えられる。そこで、頂芽切除5日後に、成長している主芽を切除し、その後の副芽における各mRNAの

発現様式について解析を行った。その結果、PCNA mRNA は、主芽切除 4 時間後から検出され、CycB1 mRNA は主芽切除 14 時間後から著しく検出され始めた (図 11C、F)。この 2 つの発現様式は、最初に頂芽を切除したときと同じタイミングである。以上の結果は、頂芽切除により主芽と共に成長を始めた副芽が、その後、主芽の影響により、成長が抑制され (休眠)、多くの細胞の細胞周期が、再び G1 期で抑制されたことを示唆する。さらに、CycD3、cdc2 に関しても同様の結果が得られた (データは示さない)。

以上の結果より、腋芽の多くの細胞は、細胞周期が G1 期において抑制され、頂芽切除後、同時に腋芽の細胞周期が進行していくことが明らかになった。さらに、複数の腋芽間において、成長と休眠のサイクルが繰り返されることが示された。

5) PCNA cDNA を用いた組織化学的解析

頂芽切除による細胞分裂の開始シグナルは、腋芽をどのように伝わるのだろうか。PCNA cDNA を用いた *in situ* hybridization による頂芽切除前後の腋芽での PCNA の発現様式の解析により、腋芽のどこから細胞分裂が開始するのかを検討した。典型的な結果を図 12 に示す。休眠腋芽では、PCNA のシグナルは検出されないが (図 12A)、頂芽切除 4 時間後に著しく増加した (図 12B)。PCNA のシグナルは、腋芽の茎頂分裂組織のみではなく、若い葉原器、前形成層にも多く検出され、そのシグナルの頻度と強度は、PCNA cDNA をプローブとしたノーザン解析の結果と一致した。そこで、幾つかの切片を解析したが、いずれの場合にも、PCNA のシグナルは腋芽全体から検出され、例えば、腋芽の基部から上部にかけて PCNA の発現が徐々にみられるような切片は得られなかった。この結果は、CycB1 cDNA プローブを用いた場合でも同様であった (データは示さない)。以上の結果は、おそらく、頂芽切除による細胞分裂の開始シグナルが、腋芽の全細胞に素早く拡散されるか、伝達されるからだと考えられ、休眠中の腋芽細胞は、このような細胞分裂の開始シグナルに素早く反応する能力を備えていると思われる。

本章では、腋芽の細胞周期の調節機構の解明に当たり、まず、休眠腋芽が、どの段

[Faint, illegible text on the left page]

階で細胞周期が抑制されているのかを解析した。その結果、多くの休眠中の腋芽細胞は G1 期で抑制されおり、頂芽切除により、多くの細胞は同時に細胞周期が進行することを明らかにした。一方、動物において、発生分化のプログラムや環境に応じた細胞周期は、G1 期で調節されている。そこで次章では、動物細胞において細胞周期の抑制機能を持つ RB タンパク質に注目し、休眠腋芽において、エンドウの RB ホモログが、G1 期での細胞周期の抑制機構に関与する可能性について検討した。



[Faint, illegible text on the right page]

(A)

```
pea      MLELRLVQGS LLKKVLESIK ELVNDANFDC SSTGFSLOAM DSSHVALVAL
rice     MLELRLVQGS LLKKVLEAIR ELVTDANFDC SSTGFSLOAM DSSHVALVAL
human    MFEARLVQGS ILKKVLEAIK DLINACWDI  SSSGVNLOSM DSSHVALVQL
yeast    MLEARFQQA  LLKKLLDAIK  ELVTDANFDC  NDNGISLOAM DSSHVALVSM

pea      LLRSEGFHY  RCDRNLSMGM NLNNMAKMLK CAGNDDIITI KADDGSDTVT
rice     LLRSEGFHY  RCDRNLSMGM NLNNMAKMLR CAGNDDIITI KADDGSDTVT
human    TLRSEGFDTY RCDRNLAGV  NLTSMKILK  CAGNEDIITL RAEDNADTLA
yeast    LIKSDGFEPY RCDRNIALGI NLNALSIVLR  CAGNEDLVTL KAEDTPEVLN

pea      FMFESPTQDK ISDFEMKLM  IDSEHLGIPE AEYHAIVRMP SAEFARICKD
rice     FMFESPNQDK IADFEMKLM  IDSEHLGIPD SEYQAIVRMP SSEFSRICKD
human    LVFEAPNQEK VSDYEMKLM  LDVEQLGIPE QEYSCVVKMP SGEFARICRD
yeast    LVFESEKNDR ISDYDVKLM  IDOEHGIPD  IEYDATITMP AAEFORITRD

pea      LSSIGDTVVI AVSKEGVKFS TKGDIGSANI VCRONTTVDK PEEATVIEMN
rice     LSSIGDTVLI SVTKEGVKFS TAGDICTANI VCRONKTVDK PEDATIIEMQ
human    LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGNGNI KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN
yeast    LLTLDSDVTI NASKEGVRF  CKGDIGNGST TLKQHTDLSQ QDQSIETSLT

pea      EPVALQFALR YMNSFTKATP LSSSVTISLS NELPVVVEYK IAEMGYVRFY
rice     EPVSLTFALR YMNSFTKASP LSEQVTISLS SELPVVVEYK IAEMGYTRFY
human    EPVLTALFALR YLNFFTKATP LSSVTLSMS  ADVPLVVEYK IADMGHLKYY
yeast    QAVTLTFLSK YLAQFTKATP LATRVLSMS  NDVPLLVEYK M-ESGELRFY

pea      LAPTIEEDEE ETKPQA
rice     LAPKIEEDEE MKS---
human    LAPKIEDEEG S-----
yeast    LAPKIGEEDE E-----
```

Figure. 7 Comparison of deduced amino acid sequences of pea cDNA clones with selected homologous sequences.

(A) Alignment of PCNA clones from pea (AB008186), rice (X54046), human (M15796), and yeast (X16676).

(B) Alignment of cyclin box of cyclinB clones from pea (AB008189), soybean (X62820), Arabidopsis (X62279), and Xenopus (J03166).

(C) Alignment of cyclin box of cyclinD clones from pea (AB008188), Alfalfa (X88864), Arabidopsis (X83371), and human (X59798).

Dashes indicate gaps introduced to maximize alignment. Identical amino acid residues are represented as white-on-black letters.

(B)

pea MRAILIDWLV DVHTKFELSP EALYLTINI I DRFLAISLVS RRELQLVGIS
soybean MRAILVDWLI DVHTKFELSL ETLYLTINI I DRFLAVKTVP RRELQLVGIS
Arabidopsis MRLILVEWLI DVHVRFELNP ETFYLTVNI L DRFLSVKVPV RKELQLVGLS
Xenopus MRAILIDWLV QVQMKFRLLO ETMFMVGLI I DRFLQEHVPV KNQLQLVGVT

pea AMLMAS--KY EEIWPPEVND FVCLSDRAYT HEQILIMEKT ILGKLEWTLT
soybean AMLMAS--KY EEIWPPEVND FVCLSDRAYT HEHILTMEKT IINKLEWTLT
Arabidopsis ALLMSA--KY EEIWPQVED LVDIADHAYS HKQILVMEKT ILSTLEWYLT
Xenopus AMFLAAFTKY EEMYPPEIGD FTFVTDHTYT KAQIRDMEMK IIRVLKFAIG

pea VPTPEVFLVR FLKAASVSLP SSDLALENMA HFLSELGMMH YATL-MYSPS
soybean VPTPLVFLVR FIKA-SV--P --DQELDNMA HFLSELGMMN YATL-MYQPS
Arabidopsis VPTHYVFLAR FIKA-SI--- -ADEKMENMV HYLAEVGVMH YDTMIMFSPS
Xenopus RPLPLHFLRR ASKIGEV-FT TAEQ--HSLA KYLMELVMVD YD-MVHFTPS

pea MMAAAVYAA RCTLNKSPVW
soybean MVAASAVLAA RCTLNKAPFW
Arabidopsis MVAASAIYAA RSSLRQVPIW
Xenopus QIAAASSCLS LKILNAGD-W

(C)

pea PRREAVQWML KVNAYHAFSP LTATLAVTYF DRFLITFHFO KDKPWMIQLV
alfalfa PRREAVEWML KVNAYHGFS A LTATLAVNYL DRFLLSFHFO KEKPWMIQLV
Arabidopsis DRKEAVGWIL RVNAYHGFST LAAVLAI TYL DRFICSYSLQ RDKPWMLQLV
human MRKIVATWML EVCEEQKCEE EVFPLAMNYL DRFL--SLE PVKKSRLQLL

pea AVTCI--SLA AKVEETQVPL LLDLQVQDTK YVFEAKTIQR MELLILSTLK
alfalfa AVTCIFTSLA AKVEETQVPL LLDLQVQDTK YVFEAKTIQR MELLILSTLK
Arabidopsis SVAECL--SLA AKVEETQVPL LLDFQVEETK YVFEAKTIQR MELLILSTLE
human GATCMF--VA SKMKET-IPL TAEKLCIYTD NSIRPEELLQ MELLLVNKLK

pea WKMHPVTP
alfalfa WKMHPVTT
Arabidopsis WKMHLITP
human WNLAAMTP

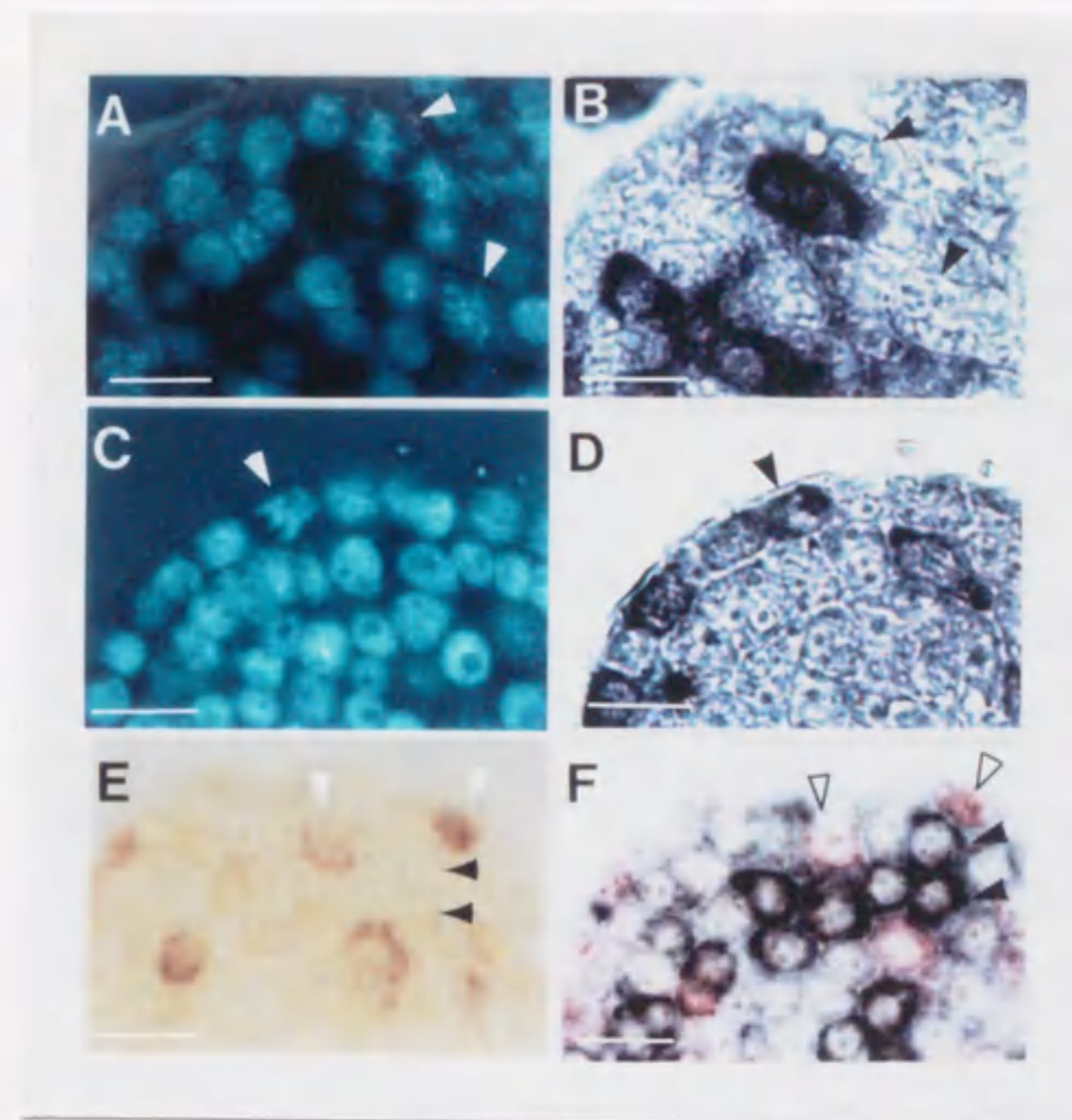


Figure. 8 *In situ* hybridization of longitudinal sections of shoot apices probed with PCNA and *CycB1*.

(A) and (B) Paraffin-embedded section of shoot apex was hybridized with digoxigenin-labeled antisense PCNA probe. The section was counterstained with DAPI and viewed with fluorescence (A) and bright field (B). Mitotic cells are marked with arrowheads.

(C) and (D) Paraffin-embedded section of shoot apex was hybridized with digoxigenin-labeled antisense *CycB1* probe. The section was counterstained with DAPI and viewed with fluorescence (C) and bright field (D). Mitotic cells are marked with arrowheads.

(E) and (F) Double labeling of shoot apex for *CycB1* (red) and PCNA (black). The section in (E) was photographed after detection of the digoxigenin-labeled *CycB1* probe. The section in (F) is the same as that in (E) and photographed after detection of the fluorescein-labeled PCNA probe. White and black arrowheads indicate cells labeled only with the *CycB1* and PCNA probes, respectively. The sense strand control hybridization gave no signal. Scale bar is 15 μ m.

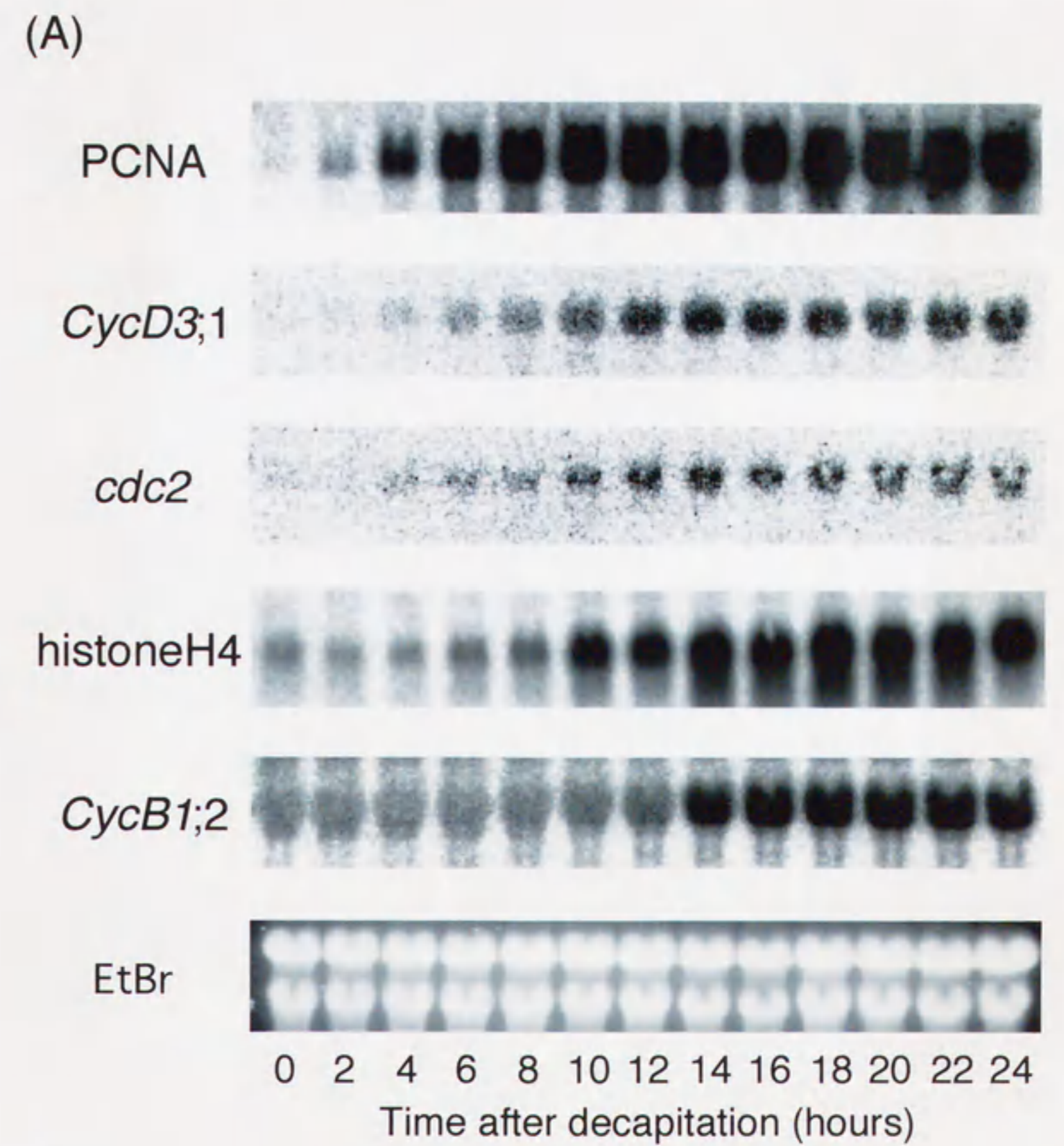
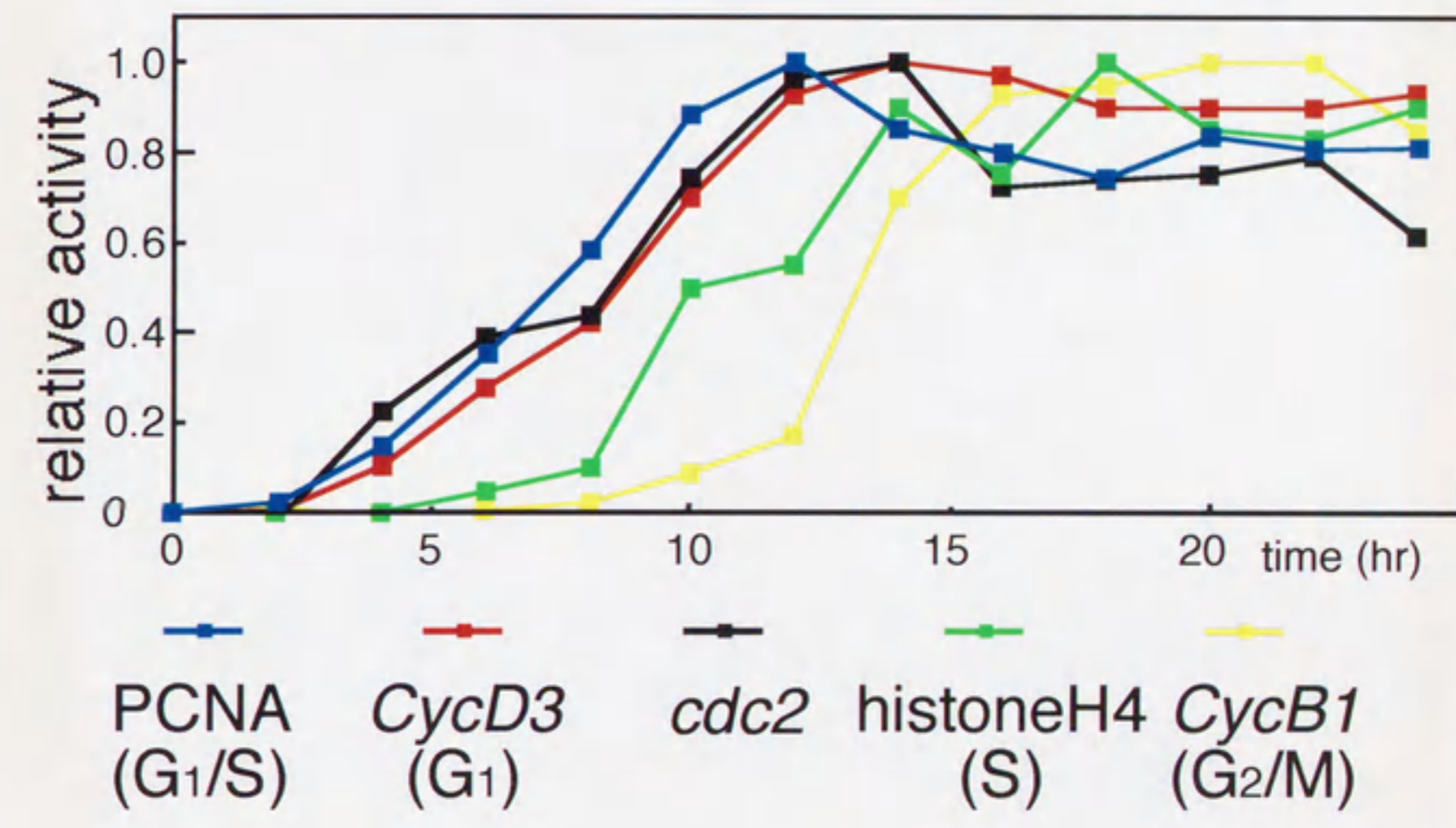


Figure. 9 Northern blot analyses of total RNA isolated from axillary buds of pea before and after decapitation.

(A) Axillary buds were collected at two-hour intervals after decapitation. Total RNA (10 μ g) was electrophoresed on 1% agarose gels, and blotted onto Hybond N+ membranes. Five membranes separately prepared were hybridized with the cDNA of PCNA, *cdc2*, *CycD3*, histoneH4, and *CycB1*. The bottom panel shows the ethidium bromide (EtBr)-stained RNA gel.

(B) The hybridization signal was quantified by a Fuji BAS2000 Imaging Analyzer. The strongest signal was arbitrarily designated 1.0.



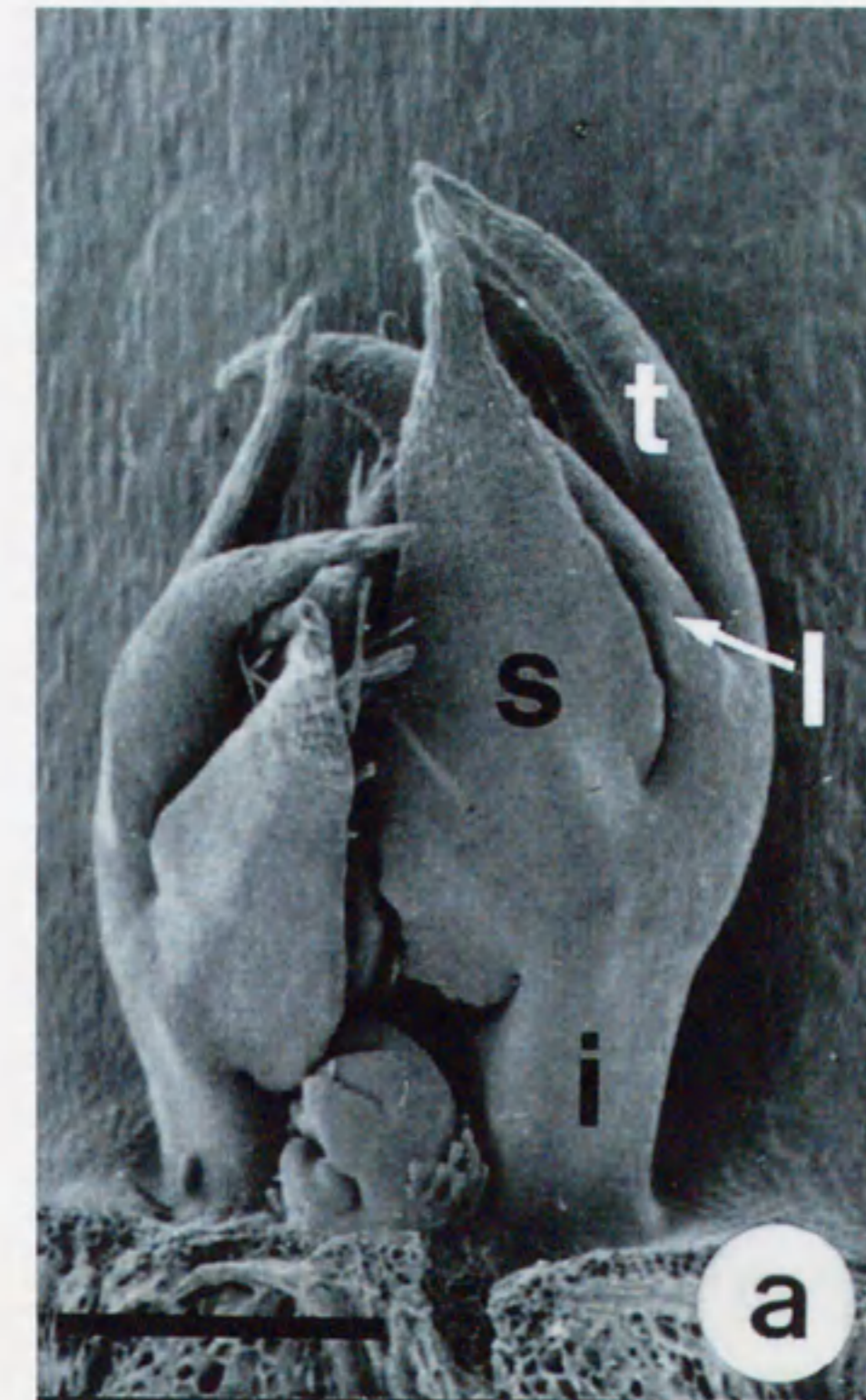


Figure. 10 Scanning electromicrographs of axillary buds at the second node of pea plants.

i, basal internode; s, stipule; l, leaflet; t, tendril. Scale bar is 0.5mm.

From **Stafstrom, J.P. and Sussex, I.M.** (1988) Patterns of protein synthesis in dormant and growing vegetative buds of pea. *Planta* **176**, 497-505.

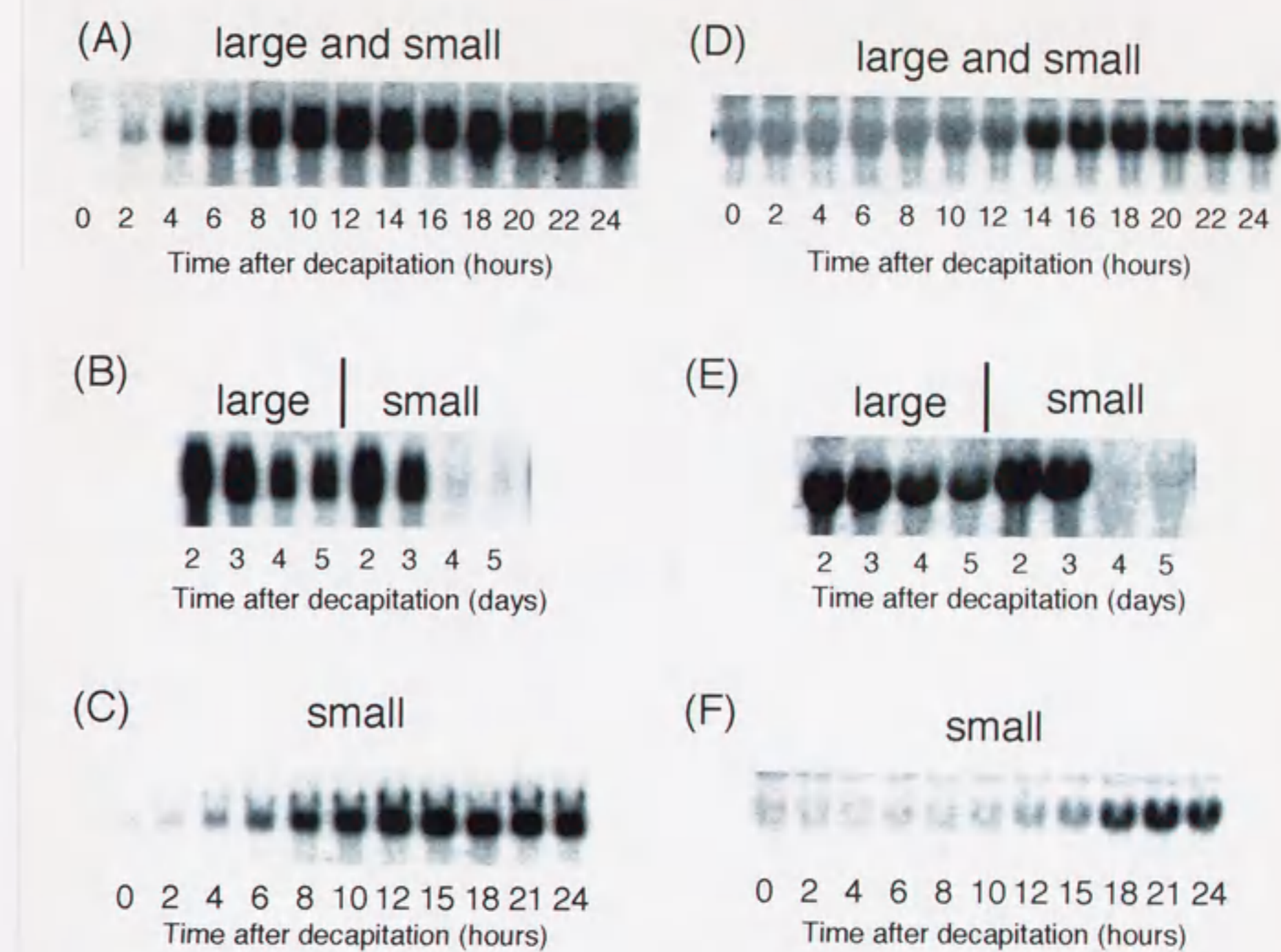


Figure. 11 Northern blot analyses of total RNA isolated from large and small buds before and after decapitation

(A) and (D) Total RNA extracted from total axillary buds (both large and small buds) at the indicated times after decapitating the main stem. RNA (10 μ g) was electrophoresed on 1% agarose gels, and blotted onto Hybond N+ membranes. The membranes were probed with the PCNA cDNA (A) and *CycB1* cDNA (D).

(B) and (E) Total RNA extracted separately from large and small buds at the indicated times after decapitating the main stem. RNA (10 μ g) was electrophoresed on 1% agarose gels, and blotted onto Hybond N+ membranes. The membranes were probed with the PCNA cDNA (B) and *CycB1* cDNA (E).

(C) and (F) Total RNA extracted from the small bud at the indicated times after removal of the large bud at 5 days. RNA (10 μ g) was electrophoresed on 1% agarose gels, and blotted onto Hybond N+ membranes. The membranes were probed with the PCNA cDNA (C) and *CycB1* cDNA (F).

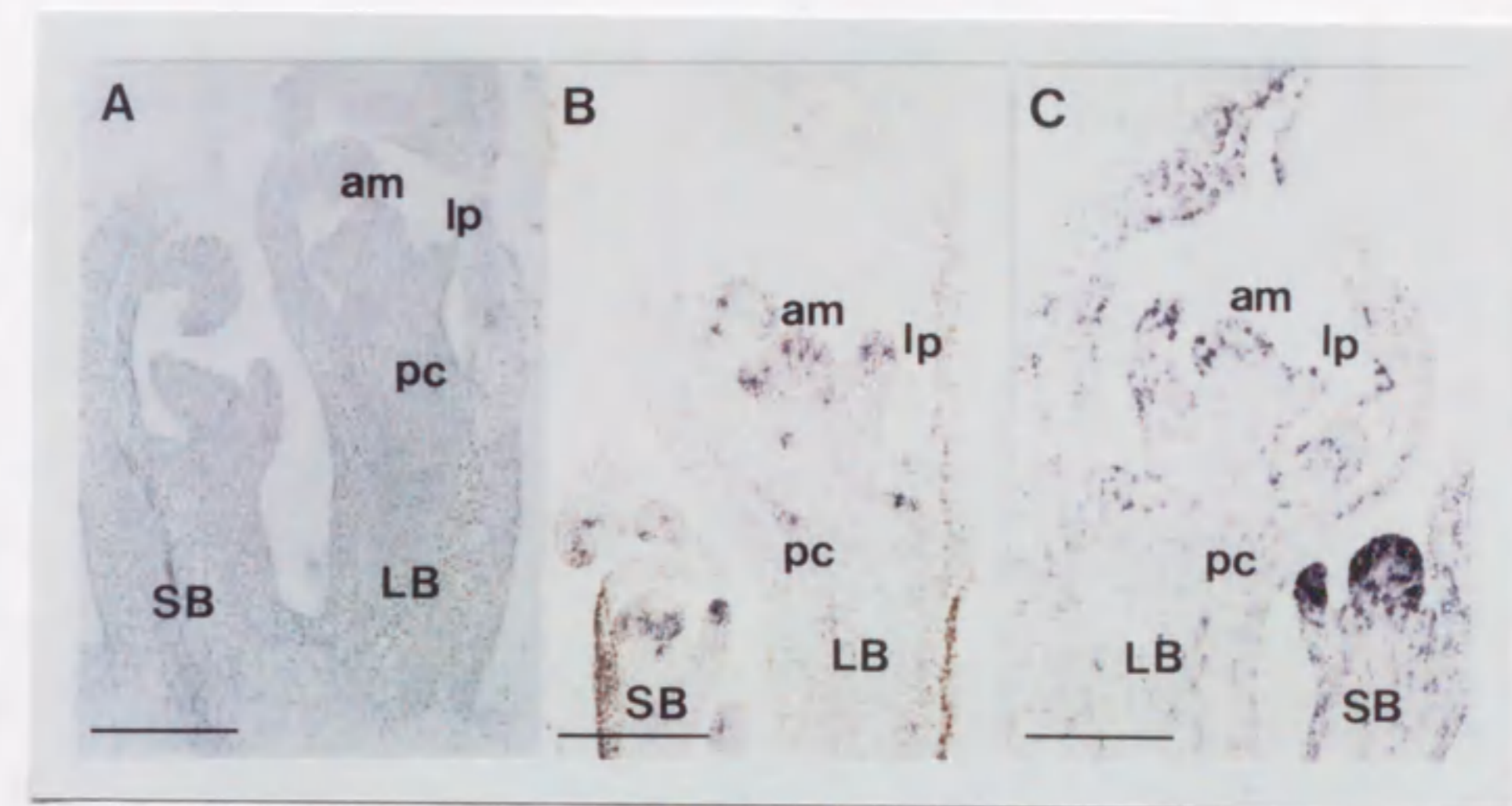


Figure. 12 *In situ* hybridization of longitudinal sections of axillary buds probed with PCNA before and after decapitation.

Axillary buds were fixed at 0hour (A), 4hours (B), and 16hours (C) after decapitation. Paraffin-embedded sections of axillary buds were hybridized with digoxigenin-labeled antisense PCNA probe. am, apical meristem; LB, large bud; lp, leaf primordium; pc, procambium; SB, small bud. Scale bar is 200 μ m.

第三章

アラスカエンドウの癌抑制遺伝子 (*PSRB1*) の cDNA の単離と、腋芽におけるその機能解析

緒言

前章で述べたように、休眠腋芽の細胞周期は G1 期で抑制され、頂芽切除後、多くの腋芽細胞は同時に細胞周期が進行することが明らかになった。動物では、環境要因や、発生分化のプログラムに応じて、細胞周期の進行と抑制は G1 期で調節されている。この過程は、正の制御タンパク質及び、負の制御タンパク質により調節されている。その中で、最も重要な制御因子の 1 つに retinoblastoma tumor suppressor gene (RB) がある (Weinberg 1995, Bartek et al. 1996, Dyson 1998)。そこで RB タンパク質に注目し、エンドウの RB ホモログが、休眠腋芽において、G1 期での細胞周期の抑制機構に参与する可能性について検討した。

RB 遺伝子は、網膜芽細胞腫 (retinoblastoma) の原因遺伝子としてクローニングされた癌抑制遺伝子であり (Lee et al. 1987)、体細胞の核に局在し、普遍的に発現する約 110kDa のリン酸化タンパク質をコードしている。ヒト RB タンパク質は、遺伝子ファミリー (RB、p107、p130) を形成しており、いずれのタンパク質も、G1 期での細胞周期の抑制や、成長抑制の機能を有する (Ewen et al. 1991, Hannon et al. 1993)。図 13 に、RB family による細胞周期の制御機構の模式図を示す。低リン酸化状態の RB family は、転写因子である E2F family と結合して、その機能の阻害により、細胞周期を G1 期で抑制する。一方、数種類の cyclin/CDK 複合体により高リン酸化状態になった RB family は、E2F family を解離する。E2F family は、特異的な塩基配列に結合することにより、癌原遺伝子 (*c-myb*)、細胞周期の制御タンパク質 (*cdc2*、*cyclinA*)、DNA 複製の制御タンパク質 (dihydrofolate reductase、thymidine kinase、DNA polymerase α) などの転写を活性化する。その結果、DNA 合成が開始し、細胞は S 期へ進行する。RB family は、ポケット A、B 領域と、共通のシステイン残基を保存しており、これら

の領域により他のタンパク質との相互作用が可能になる (Hu et al. 1990、Kaye et al. 1990)。

哺乳類 DNA 腫瘍ウイルス由来の癌遺伝子産物 (例えば、simian virus 40 [SV 40] large-T antigen や、adenovirus E1A protein) は、RB family と結合する。この結合により、RB family はリン酸化を受けなくても高リン酸化された場合と同様に、E2F family を解離してしまい、細胞は S 期へ進行すると考えられている。癌遺伝子産物の RB family への結合は、癌遺伝子産物に存在する Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE) motif を介する。また、LXCXE motif は、RB family と結合する cyclinD にも存在する。

RB タンパク質の欠損や点変異により、網膜芽細胞種 (retinoblastoma)、骨肉腫 (osteosarcoma)、肺小細胞癌 (small-cell lung cancer)、膀胱癌 (bladder cancer) などの腫瘍が引き起こされるが、RB タンパク質の異常原因による腫瘍はこれらに限定されている。RB ノックアウトマウスは致死であるが、その胚発生は比較的後期の段階まで進行した (Clarke et al. 1992、Jackes et al. 1992)。この RB ノックアウトマウスの胚の死亡原因は、細胞周期の異常な進行ではなく、血管や神経系の異常な分化であった。これらのことは、RB タンパク質が、細胞周期の抑制機構にのみ関与するのではなく、細胞分化の決定や、その分化の維持にも機能していることを示唆している。

RB 遺伝子は網膜芽細胞種の原因遺伝子として発見された経緯から、植物での存在が明らかになっていなかったが、1994 年に Shen et al. がトウモロコシの EST ライブラリーの中から RB ホモログであると思われる配列を報告した (Shen et al. 1994)。その配列を基にトウモロコシの RB 遺伝子が単離され、その機能が解析された (Grafi et al. 1996、Xie et al. 1996、Ach et al. 1997、Huntley et al. 1998)。その結果、植物の RB ホモログも、哺乳類の RB family と同様の機能を有している可能性が示された。しかし、植物の成長や、植物の発生分化における RB ホモログの機能に関してはほとんど知見が得られていない。

本研究ではアラスカエンドウより、RB ホモログのクローン化を試み、エンドウの RB ホモログである cDNA (*PSRB1*) の単離に成功した。これは植物では、2 番目の報告である。次に、*PSRB1* の機能を、アミノ酸配列の一次構造解析及び、yeast two-hybrid system を用いた解析により推測した。さらに、*PSRB1* に対する特異抗体を調製し、こ

The text on the left page is extremely faint and illegible. It appears to be a continuation of a scientific discussion, possibly related to the topic of the right page.

の抗体を用いることにより、腋芽の休眠から成長への移行期における PSRB1 のタンパク質量及び、リン酸化状態の変化の検出を行った。植物で RB がリン酸化される過程を検出したのは世界で初めての結果である。これらの結果より、休眠腋芽の細胞周期の抑制機構における PSRB1 の役割について考察した。



The text at the bottom of the right page is also very faint and illegible. It likely contains a conclusion or a reference to the diagram above.

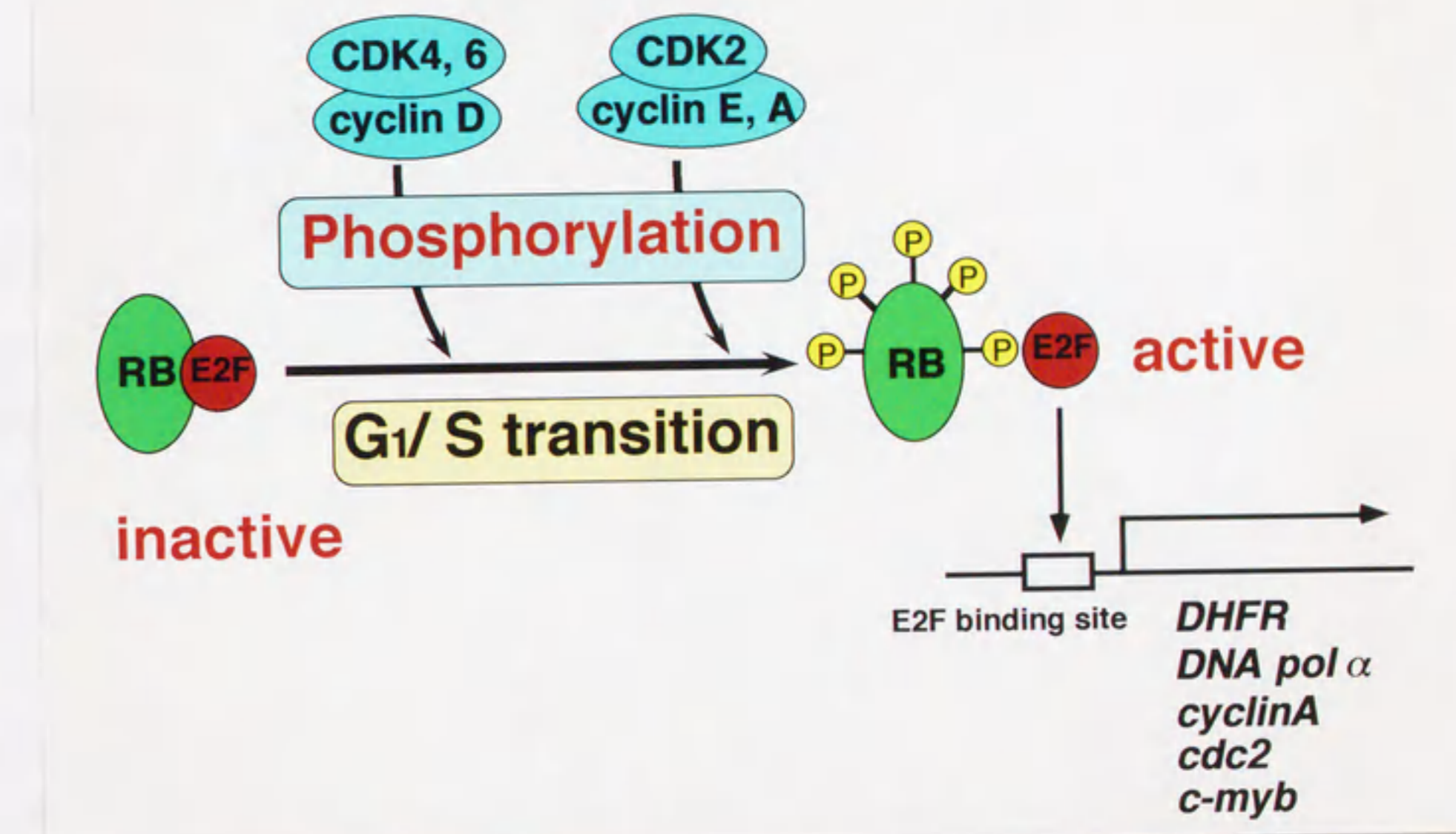


Figure. 13 Actions of the RB family proteins.

RB family proteins control the arrest and progression of the cell cycle during the G1 phase. Hypophosphorylated RB family proteins binds to, and holds inactive, gene regulatory proteins (transcriptional factor E2F) that stimulate transcription of target genes (e.g. *c-myc*) required for cell proliferation. Hyperphosphorylated RB family proteins detaches, releasing the stimulatory proteins that active proliferation.

1) エンドウの RB cDNA の単離

既に報告がある RB family のアミノ酸配列に基づき、以下に示す縮重プライマーを合成した。

センス：5'-TT(T/C)TT(T/C)AA(T/C)CGNCA(T/C)AT(T/C/A)GA(T/C)CA-3'

アンチセンス：5'-AC(T/C)TC(G/A)TT(G/A)TA(G/A)AANGT(T/G/A)AT(T/G/A)AT-3'

ただし、N は、G、A、T、C を表す。茎頂の全 RNA から合成した cDNA を鋳型とし、上記のプライマーを用いて、RT-PCR 反応を行った。PCR 産物 (237bp) を BSII TSK-プラスミドベクターにクローニングし、PCR 産物の塩基配列を決定した。目的の塩基配列を含む PCR 産物を ³²P 標識しプローブとして用いた。休眠腋芽から調製した poly(A)⁺RNA より、説明書に準じて、HybriZAP-2.1 Two-Hybrid cDNA Gigapack Cloning Kit (Stratagene) を用い、cDNA ライブラリーを作成した。約 1x10⁶ ファージを用い、スクリーニングを行った。スクリーニング以下は、第二章で述べた方法に準じて行った。

2) Yeast two-hybrid system

説明書に従い、Mathcmaker Two Hybrid System (Clontech) を用いた。

3) ノーザン解析及び、サザン解析

ノーザン解析のニトロセルロース膜の調製までは、第二章で述べた方法に準じて行った。0.25M NaH₂PO₄ [pH 7.2]、0.25M NaCl、7% SDS、10% Dextran Sulfate (Pharmacia)、1% polyvinylpyrrolidone K30 からなる溶液を用い、65℃、16 時間以上で hybridization を行った。2xSSPE+0.1% SDS で、50℃、15 分間、2 回の洗浄を行った。増感紙を使用して X 線フィルム (XAR-5, Kodak) に、-80℃で感光させた。

エンドウのゲノムを、CTAB 法により抽出し、EtBr-CsCl 法で精製した。50µg のゲノムを各制限酵素 (TAKARA) で消化し、エタノール沈殿の後、アガロースゲルに電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。hybridization 以下は、第二章で述べたノー

ザン解析の方法に準じて行った。

4) 抗 PSRB1 抗体の作成

基本的に立木の方法 (1997) に準じて行った。PSRB1 cDNA を pET32a ベクター (Novagen) に導入した。このプラスミドを用いて、*E.coli* BL21(DE3)pLys[F-ompT hsdSB(rB-mB-)gal dcm(DE3)pLysS(CmR)] を形質転換し、PSRB1 を Trx-PSRB1 融合タンパク質として発現させた。この融合タンパク質を TALON Metal Affinity Resin (CLONTECH) カラムを用いてアフィニティー精製し、SDS-PAGE による分離後、目的とするバンドを切り出し抗原とした。破碎したゲルを GERBU アジュバント (GERBU Biotechnik) を用いてマウスに免疫した。

5) タンパク質抽出液の調製

組織に重量の約 2 倍体積の氷冷した抽出緩衝液 A (20mM Tris-HCl [pH 8.0], 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% [w/w] NP-40, 1mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄) とアルミナを加え、乳鉢で磨砕しタンパク質を抽出した。磨砕液をエッペンドルフチューブに移し、15,000rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離を行い、不溶性画分を除去し、タンパク質抽出液とした。なお、タンパク質の定量には、Lowry の方法に準じた DC Protein Assay (BIO-RAD) を用い、検量線にはガンマグロブリンを使用した。

6) ウェスタン解析

タンパク質濃度が、各レーン 30 μ g になるようにタンパク質抽出液を調製し、2xSB (20mM Tris-HCl [pH 6.8], 40% glycerol, 2% SDS, 2% β -mercaptoethanol, BPB) を加えて、SDS-PAGE により分離を行った (7.5% 分離ゲル濃度)。泳動後、ゲルをプロット緩衝液 (0.1M Tris, 0.192M glycine, 20% methanol, 0.1% SDS) に浸した後、セミドライプロット装置 (BIO-RAD) を用いて 2mA/cm² で、電氣的にニトロセルロース膜 (BA-S 85, Schleicher & Schuell) に転写した。次に、TBST (50mM Tris-HCl [pH 8.0], 150mM NaCl, 0.05% Tween 20) +5% skim milk で、1 時間のブロッキング反応を行っ

た。TBST+5% skim milk で、1:10,000 希釈した抗 PSRB1 抗体を、室温、1 時間振とうしながら反応させ、TBST で洗浄した。その後、TBST+5% skim milk で、1:10,000 希釈した Horseradish peroxidase 標識した二次抗体（ヤギ抗マウス IgG 抗体）（BIO-RAD）を、室温、1 時間振とうしながら反応させた。TBST で洗浄後、説明書に準じて、SuperSignal ULTRA（Pierce）を基質として、X 線フィルムを用いてシグナルを検出した。

7) 免疫沈降

頂芽切除後、単離の 1 時間前に、 $10\mu\text{Ci}$ の無機リン（Phosphorus-32, Amersham）を腋芽に塗布した。10 個の腋芽をエッペンドルフチューブ中に集め、 $240\mu\text{l}$ の氷冷した抽出緩衝液 A とアルミナを加え、ペレットミキサー（Treff Lab）を用い、タンパク質を抽出した。15,000rpm、 4°C 、10 分間遠心分離を行い、不溶性画分を除去した。上清に preimmune serum $5\mu\text{l}$ を加え、氷中、1 時間静置し、抽出緩衝液 A+1mg/ml BSA で、予め洗浄した Protein A Sepharose 4 Fast Flow（Pharmacia） $40\mu\text{l}$ （50% [v/v]）を加え、回転させながら、 4°C 、30 分間反応させた。15,000rpm、 4°C 、10 分間遠心分離することにより、非特異的結合性のタンパク質を除去した。次に、抗 PSRB1 抗体 $5\mu\text{l}$ を加え、氷中、1 時間静置し、前述の洗浄した Protein A Sepharose 4 Fast Flow $40\mu\text{l}$ を加え、回転させながら、 4°C 、30 分間反応させた。15,000rpm、 4°C 、10 分間遠心分離により、形成された免疫複合体を回収し、その後、抽出緩衝液 A+1 mg/ml BSA で、3 回洗浄した。2xSB に懸濁し、SDS-PAGE により分離を行った（7.5% 分離ゲル濃度）。ゲル乾燥の後、Fuji Imaging Plate に適当な時間露出し、BAS2000 Imaging Analyzer でシグナルを検出した。

8) 分子量マーカー

SDS-PAGE の分子量マーカーは、「第一」・III（第一化学薬品）を用いた。マーカーの構成タンパク質及びその分子量は以下の通りである。
フォスフォリラーゼ b (97,400)、ウシ血清アルブミン (66,267)、アルドラーゼ (42,400)、

カルボニックアンヒドラーゼ (30,000)、トリプシンインヒビター (20,100)、リゾチーム (14,400)

プレステインマーカーは、Prestained SDS-PAGE Standards, Low 及び、High (BIO-RAD) を用いた。マーカーの構成タンパク質及びその分子量は以下の通りである。

Low: フォスホリラーゼ b (106,400)、ウシ血清アルブミン (80,000)、オボアルブミン (49,500)、カルボニックアンヒドラーゼ (32,500)、ダイズトリプシンインヒビター (18,500)

High: ミオシン (205,000)、 β -ガラクトシダーゼ (116,500)、ウシ血清アルブミン (80,000)、オボアルブミン (49,500)

1) エンドウ RB cDNA (*PSRB1*) の単離

エンドウの茎頂の全 RNA から合成した cDNA を鋳型とし、RT-PCR 反応を行った結果、目的の塩基配列を含む PCR 産物を得た。そこで、この PCR 産物をプローブとして、休眠腋芽から調製したエンドウの cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、14 個の陽性クローンを得た。その中で、cDNA インサートの最も長いクローン (全長 3,540bp) を以下の解析に用いた。このクローンの全塩基配列を決定した結果、アミノ酸 1,026 残基、分子量 114,470 のタンパク質 (*PSRB1* と名付けた) をコードしていることが推測された (AB012024)。*PSRB1* cDNA の全塩基配列及び、それから推定されるアミノ酸配列を図 14 に示す。予想される開始メチオニン残基と同じ読みとり枠の上流にストップコドン (TAG) が存在するので、*PSRB1* cDNA は、全翻訳領域を含む完全長であると判断した。

推定される *PSRB1* のアミノ酸配列と、他の生物の RB family との比較解析の結果、RB family の機能にとって重要である 3 つの保存領域が、*PSRB1* にも見出された。16 個の CDKs による推定リン酸化部位 (セリン-プロリンもしくは、スレオニン-プロリン)、798 番目のシステイン残基 (ヒト RB タンパク質では、706 番目)、ポケット A、B 領域である。推定リン酸化部位は RB family の活性に、またシステイン残基とポケット A、B 領域は、他のタンパク質との相互作用にそれぞれ不可欠である。ポケット A、B 領域におけるアミノ酸配列の比較解析の結果を図 15 に示す。トウモロコシ ZmRb-1 のアミノ酸配列と比較すると、全長では、43% の identity、71% の similarity、ポケット A、B 領域内では 61% の identity、90% の similarity を示した。ヒト RB family である RB、p107、p130 タンパク質と比較すると、ポケット A、B 領域内で、それぞれ 68%、72%、71% の similarity を示し、高度にアミノ酸配列が保存されていた。さらに、ヒト以外の RB family、例えば、Drosophila、Xenopus、ニワトリ、ネズミ、ラットなどでも同様にアミノ酸配列が保存されていた。以上の結果より、*PSRB1* は、RB family のホモログであると判断した。

次に、エンドウの *PSRB1* のコピー数を検討した (図 16)。その結果、*PSRB1* は、

1ゲノムあたり、1コピーであると推測された。また、メジャーなバンドの他に、マイナーなバンドも幾つか検出されたので、PSRB1は、哺乳類のRBタンパク質のように遺伝子ファミリーを形成している可能性も示唆された。

2) 植物の cyclinD 及び、哺乳動物の癌遺伝子産物との相互作用の解析

PSRB1が、哺乳類のホモログと同じ機能を有する可能性について検討を行った。哺乳類のRB familyは、様々なウィルスタンパク質や、細胞内タンパク質、例えば、SV 40 large-T antigen や、cyclinD と直接的に相互作用することが知られている。そこで、yeast two-hybrid system を用いて、PSRB1 とタンパク質 (CycD3、SV 40 large-T antigen、Cdc2) との相互作用について解析した。第二章で述べたように、エンドウの CycD3 は、RB family との結合に必要とされる LXCXE motif を N 末端に含む。解析するタンパク質をコードする遺伝子を GAL4 DNA 結合領域、あるいは、GAL4 活性化領域の下流に融合させてプラスミドを作成した。これらのプラスミドを *GALI-lacZ* レポーター遺伝子を含む *Saccharomyces cerevisiae* Y187 株に導入し、形質転換株を作成した。形質転換操作を独立して3回行い、各形質転換株の β -galactosidase 活性を測定し、その平均値を求めた (表1)。その結果、PSRB1 は植物の cyclinD だけではなく、哺乳類の DNA 腫瘍ウイルスの癌遺伝子産物の一種である SV 40 large-T antigen と結合することが分かった。一方、PSRB1 はエンドウの Cdc2 とは結合せず、また、PSRB1 のみではレポーター遺伝子を活性化しないことを確認した。

3) エンドウにおける PSRB1 遺伝子の発現解析

哺乳類では、RB family の mRNA は、すべての組織に存在することが知られている (Bernards et al. 1989)。そこで、エンドウにおける PSRB1 mRNA の発現様式をノーザン法により解析した。その結果、約 3.6kb の転写産物が、解析したすべての組織から検出された (図17)。最も発現量が多い組織は、頂芽切除 15 時間後の腋芽と、播種後 7 日目の実生であり、これらは共に成長が速く、活発に細胞が分裂する組織である。また、PSRB1 mRNA は葉のように、細胞が分裂しておらず、分化した組織にも検出された。哺乳類の RB family も同様に成人の腎臓や脳のように分化した組織で発

現していることが報告されている (Lee et al. 1987)。

4) 休眠から成長への移行期の PSRB1 のタンパク質量及び、リン酸化の検出

RB family の活性は、そのリン酸化状態により制御される。そこで、腋芽の休眠から成長への移行期における PSRB1 タンパク質量の変化と、そのリン酸化状態について解析し、腋芽における PSRB1 の機能について検討を行った。Trx-PSRB1 融合タンパク質を抗原として、抗 PSRB1 抗体を調製し解析に用いた。その結果、抗 PSRB1 抗体は、約 120kDa の単一のポリペプチドと反応し、このサイズは、計算上の PSRB1 の分子量と一致したので、このポリペプチドを PSRB1 タンパク質であると判断した(図 18A)。PSRB1 タンパク質は、休眠及び、成長腋芽ともに検出され、腋芽の休眠から成長への移行期において、PSRB1 タンパク量は一定に維持されていた。

次に、無機リンを腋芽に取り込ませた後、抗 PSRB1 抗体で免疫沈降を行い、PSRB1 のリン酸化状態について解析を行った(図 18B)。その結果、休眠腋芽では、PSRB1 はリン酸化されないが、頂芽切除 2 時間後からリン酸化されることが分かった。また、そのリン酸化のシグナルはわずかに増加しているように見える。以上の結果は、腋芽の状態(休眠状態と成長状態)に対応して、PSRB1 のリン酸化状態が変化することを示している。また、preimmune serum では、このリン酸化されたポリペプチドは検出されなかった(図 18B、レーン 5)。

GTTCTCAATTTTACAAGGTTATTCCTTTCCTGTCACAAATCACCCACTTCCTGCTGATAGGGTTTTCCTCAGATCTGTGTAATAGGGTTCTTTCATGAGCTTCCAGC 120
 M S L P A 5
 TGAAGCGATATGGAGATACCAAACTCTGTTGTAATGCTCGACAATGCTGACCAGCTCAGTTGGTTTCTGTGAGTCTTCCAAAGATGAGCTACCATGGATGAAAAGCTGTAA 240
 E T D M E D T K P S V V M V D N G D Q A Q F R F A E F S K N E L A L D E K S C K 45
 AGAAGCAATGGATCTGTTGGGAACCAACATCTTCTGCTGGCAATGTTTGTCAATGGGAAATGGAAACGACAGAAAGACGGGAGGTAAGTGGTTTCTTATTTACTCTAT 360
 E A M D L F G E T K H L L V A N V L S M G R G T T E E A E R N M F A F I L Y S I 85
 CAGAATCTGTCAGAAAATGAAGATTCAGAAGACGAGATGAGAATACCGCTCTTCCCTGTGGCAATATGAGAACAACCAACTTTATATTCGAGAATTTTCAAAGACT 480
 K K L A Q K N E E I Q K D E I E N T G L T L C R I L R A A K L N I A E F F K E L 125
 TCCTCAATTTGTGTAAGGCGGTTCCAAATTTAAACAATCTATATGCGCCGGATGGGAACAAGCTTGAAGCAGAGGAGATGCAATCAATCTATTCATCTGAAGATCTTAGCAA 600
 F Q F V V K A G P I L S N L Y G P D W E N K L E A K E M H A N T I H L K I L S K 165
 GTATATAGCGGCTATTTGAAAGTTCCTGCTGCACTGATGCAATGTTGAAAATTAATCATCTGTACCAATCGGTGATCTGAATCATCATCGCTTGGATGCTTCTTGGC 720
 Y Y K R V F E E F V S T D A N V E M N S E V I N R V S E Y H R F G W L L F L A 205
 TCTTCGTATCAATGCTTCAACCTTCAAAGACTGGTGACCTGACCAATGTTAAATTTCTATCTGGCAATCCAAATATTCATGCTCGGCTCGTTCGGAATTCACACTCA 840
 L R V H A F S R F K D L V T C T N G L I S I L A I L I I H V P A R F R S F M I H 245
 CGACTCTCAAGCTTGTAAAGAAAGTCCCAATGTTGGACCTCCCTGCTCACTATGCAACTTGTATTAACACTCAGAAAGCAATGGAAGAAACATGAGCAACAACCAACT 960
 E S S R F V K K S A N G V D L L A S L C N L Y N T S E D E L R K T I E Q A N N L 285
 AGTAGCAGATATATGAAGAAAGCACTTGGCACTGGATCGAACTGAAAACCTAGAGAAATTTGACCGAGATGTTAACCTATTTAAAGATCTGATGGAGAACTATCTCT 1080
 V A D I L K K K P C L A S E C E I E N L E N F D R D G L T Y F K D L M E E S S L 325
 GCGTCTAGTTGAGTGTCTGGAATGATACCATGACATGCTCCCAACTGGTGAAGCTTATGCAATACGAGGATGACATGCTGTTAGCTTCAAGGATCTTCS 1200
 P S S L S V L E N D Y D H M T R N N G E L D E R L F I N E D D S L L A S G S L S 365
 CAGAGTCTGTCTCAGCAGAGGTGTAAAGAAAATGATCTGATGAGCGCTTACTAAAATGATACAAAGTCCACTTCAACCCCACTCTCTCTCATCCTAACTGCAAGT 1320
 R G S V S A G G V K R K I D L M T E E P T M I T S P L E P H R S P A S H A N G I 405
 TCGAATGTCACAACTCAATGATTCCTGCAACCCCTGTAAGCAAGCAATGACTAGCCAAAGTGGCTTCTGCTGCTACTTCCTCCACTTCCTCAAGCCCTCACAAAGCTTGAAGC 1440
 P S S A Z P M I A A T P V S T A M T F A K M L R T V I E P L P S K F S Q E L E R 445
 ATCTTGACATGCTGACAGAGTATCAAACTGATGATACAGCAGAGCAAGATATATGCAAGCAATATTCCTCAATAGTCCCTGGTGACCGAGTGTAACTGAGAGCTGCA 1560
 F L T S C D K D I T S D V I R R A Q I I L Q A I F P S E P L G D R C V T G S L Q 485
 AAGTCTAACCTCATGGACAACATATGGCCGGAACAAAGAGATAGAAAGCACTGAACTTATCTTATAGTACTTGCAACAATGTGCAAGAGCAAGACTCAATCTGCAACT 1680
 S A N L M D N I W A E Q R R L E A L K L Y R V L A T M C R A E A Q I L G N N L 525
 AACTCCTGCTACTAATGAGAGGTTCCATAAGTGTATGCTGGCTGTTCTGCAACTAGTCCCTGCTACTCAAGAAGTAAAGATGTTGTTCCTGCTGCTACTAGAGCGGACTGG 1800
 T S L L T N E R F H R C M L A C S A E L V L A T H K T V E M L F P A V L E R T G 565
 AATTAAGCTTGTGATCTTCAAGGATAGAAAATCATAGATACAGAAAGATCTTCCCAAGAAATGAGCGGCACTTAAATCATGTGAGGAAAGCACTTTGGAGAGCTTGT 1920
 I T A F D L S K V I E S F I R Y E E S L P R E L R R H L N S L E E R L L E S L V 605
 ATGGAAAAGGTTCTTCAAATGATCATGGCACTCCTAGACCGCCCTCTCTGTGGAAATCAATCGCTTGTCTGTGGCTGCAACCAAGCAATCATGATGAAATCCCAAT 2040
 M E K G S S M Y N S L A V A R P A L I S V E I N R L G L L A E F M R S L D E I A M 645
 GGATTAATCTCTTGTGAGGATGGCTGCTGCTGCTTCTCTCCTAAGCCCGCAAGCTTGTGCAATCAAAAGGGAGCTTGTGCAAAAGCGCTGTGACAGCAATCGAA 2160
 D I N F S C G G L P P V P S L P K P F E F P M S A Q N G D P R E P K R P C T E H R N 685
 TGTGTGGCGAACGAAATCTTCTACCTCACCGGTGAAAGACCGGCTTCTTCACTAAGCACTTAAGCTCAAACTCTCCCACTCTTGTGCAATCACTATGCAATCTGCAAT 2280
 V L A E R N S F T S E V K D R L L H L S N L K S K L L P P P L Q S A F A E P T K 725
 GCCAATCCAAGTGGTGAGGAAACATGTGAGAACTGGTATCAGTGTCTTTTATGCAAGATGTCAATGGGCACTCAGAAATAGCGGATGTTGAAAAGGCTACAATATC 2400
 F N P G G G G E T C A E T G I S V F F S K I V X L G A V K I S G M V E R L Q L S 765
 TCAGCAGATAGGGAATGATGATCTGCTTCCAGCGAATCCATAATCAATGGACATCACTTCTCTCAAGCCCAATGCAAAATCACTGCTGCTCTACGGATGCTGAAA 2520
 Q Q I R E N V Y C L F Q R I L N Q M T S L P F N R H I D I L C P F L G V A R 805
 GATATCAAACTGAACTTAACTTTAGGAGATTAATACAACTACAGAAAGCAACCAATGCAAAAGAGTGTTCGCGCTATTTGTTGACTGCTCATCTGCAAGCTTAAAG 2640
 I S Q L N L T F R E I I Y N Y R K Q P Q C K P E V F R S V F V D W S S A R R N G 845
 ATCATCAAAACAAAGACAGGACGAGGACATGATATCATTTCAATTTCAATGAGTTCATCCCTCTGTAAAGCACTGTTGTGAAAATGGCCCTGGGCAACTACGAG 2760
 S C K Q R T G Q E N I D I S F Y N E V F I P S V K P L L V E I G P G G A T Y R 885
 AATGACCGAATACCTGAGCTAACAAAGATGACGGCATTAGCTCAATGTCAGGATCTCAATATACCTTCTCCAGCTTCCGAGCTATGACACTTAAAGAGCTGCTG 2880
 N D R I P E A N N K N D G H L A Q C P G E R I E E F P S L P D M S E P K K V S A 925
 AACACAAATGCTATGTTCTCCTAATAGATCATCCAGATGGATGCTCAATTTCACTAAGCTTCAAGCTATACCAAGCTATACCAAGCTATACCAAGCTATACCAAGCT 3000
 T H N V Y V S E L R S S K M D A L I S H S S K S Y A C V G E S T H A Y Q S P S 965
 AAGACCTCACCCATAACAAATCGATTAAGCGCAACCGGAAGTAAAGGAACCTCTCAATTCGATGATGCTGTTGGCTTGTGACGACTCTATGGTAAACAGCTCTA 3120
 K D L T A I N N R L N G N R K V R G P L N F D D V D V G L V S D S M V A N S L Y 1005
 TCTGAGAACGGAGTCCGCACTCATAGTGCACTGAAATGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACT 3240
 L Q N G S S A S S G A P L K S E Q P D S * 1026
 TACTGCTTAAATGATTTTGAAGAGGCTGTGACGAGCGGAGATGATAGAAAAGCTGCTCAACCTTCTGATCTTCTGATATCGTAAAGCTTTAGTAAATTTAGG 3360
 TCTTCTGAGTAACTCAACAAATAAATGTTTCTCTTCTAGCTTAAACCAAAATGATCATTTTAAAAGGAAAGTGAAGTGAAGATGATGCTGAGAAATAGCTATACCA 3480
 ATGTTAACTGTTCTAACTAAATAAATAAATAAATAA 3519

Figure. 14 Nucleotide sequence of pea *PSRB1* cDNA (AB012024) and its deduced amino acid sequence.
 Boxes indicate domains conserved between pea and mammalian RB family proteins. Potential CDK-phosphorylation sites (Ser-Pro or Thr-Pro) are underlined. Arrows indicate the oligonucleotide primers used for RT-PCR. The circle marks the putative conserved cysteine residue corresponding to Cys 706 of human RB protein.

(A)

```

pea-RB      TPVSTAMTTAKWLRVVISLSPKPSQLEBFLASCCRQDTSVIRRAQII 465
maize-RB   TPVTSAMTTAKWLRVVISLSPKPSKLEDFLSSCRDPTAVTBRVETIV 323
human-RB   TPVFTAMTTAKWLRVVISLSPKPSQLEBFLASCCRQDTSVIRRAQII 412
human-107 TPVASTQSVSRVQSIVAGKQVAPSDQLINIFSCQKRPENIMVILKSI 427
human-130 TPVSTATHLSLRVIMLTGVRNAPSEKLEVLRITQSRDPTAVIANRILEM 458

pea-RB      LAIFPSSPLGRVWTGSLQSANLMDNIWAQRLEAKLYYRVLATMCR 515
maize-RB   LEAIFPSSSANGVYSGLNCAAFDTPWAEARVVEAKLYYRVLEAICR 373
human-RB   GYIFPKKFAK---AVG---GC-VG---GSDRHLGVRLYYRVVLSLAK 462
human-107 GYIFPKKFAK---AVG---GC-VG---GSDRHLGVRLYYRVVLSLAK 477
human-130 FYISGHE---PDEDFSNCKE---ASKHFRFABMLYYRVLESVIE 508

pea-RB      AEAQLSANNLTSLLNERFHRCVACSAELVLATHKTVI----- 555
maize-RB   AELQNSNANLTPLLNERFHRCVACSAELVLATHKTVI----- 414
human-RB   SBERRSICVFSKLLNDNIFHSLACALVWVATYSRSVQNLDSGTDL 512
human-107 QETRLHGMDMSVLEQDIFHRSVACCLVWVTFAYSSPRT----- 517
human-130 QEQRLGDMVLSGLEQDAFHRSVACCLVWVTFAYSSPRT----- 548

pea-RB      LFPVLEERTYITAFDLSKVIESFIRVBSLPRELRRHLNLEERLLESIV 605
maize-RB   MFPVLEERTYITAFDLSKVIESFIRVBSLPRELRRHLNLEERLLESIV 464
human-RB   SFPVLEERTYITAFDLSKVIESFIRVBSLPRELRRHLNLEERLLESIV 562
human-107 -FPVLEERTYITAFDLSKVIESFIRVBSLPRELRRHLNLEERLLESIV 567
human-130 -FPVLEERTYITAFDLSKVIESFIRVBSLPRELRRHLNLEERLLESIV 598

pea-RB      WEKGSLLYNSLVARFAL 623
maize-RB   WEKGSLLYNSLVARFAL 482
human-RB   WLSDSLFDLIKQSKDRE 580
human-107 WSHDSARWEALVGSANKV 585
human-130 WKPESFWEKIRDNERV 616

```

(B)

```

pea-RB      GGSEICAEFTGISVFFSKIKKLAVRIKGMVERLQISQCHRENVVLFQR 778
maize-RB   GGNEKCADVTIHIFFSKIKKLAIRIRNLCERVQCVVE-CT-ERVNVVRFKQ 633
human-RB   QTQKELKSTSLFVYKVVPLAVLPLNDICERLSEHPLEHIIWTLFQH 686
human-107 SIVRKRKTSLSLAFYKVVPLAVLPLNDICERLSEHPLEHIIWTLFQH 826
human-130 SSVRKRKTSLSLAFYKVVPLAVLPLNDICERLSEHPLEHIIWTLFQH 874

pea-RB      ILNQVLSLFFNRHIDQILCCFYGVAKISQNLTFREIIVNVRKQPCCKE 828
maize-RB   ILNQVLSLFFNRHIDQILCCFYGVAKVQLELTFREIIVNVRKQPCCKE 683
human-RB   TLQNEVELMRDRHIDQILCCFYGVAKISQNLTFREIIVNVRKQPCCKE 736
human-107 TLVNSPLMKDRHIDQILCCFYGVAKVTKERTFQELMKSYRNQPCANS 876
human-130 SIIQQLMMDRHRHIDQILCCFYGVAKVTKEDKSEQNMRCYRNQPCARS 924

pea-RB      EVFRSVFVDSARRN----- 825
maize-RB   EVFRSVFVDSARRN----- 674
human-RB   EVFRSVFVDSARRN----- 719
human-107 EVFRSVFVDSARRN----- 897
human-130 EVFRSVFVDSARRN----- 972

pea-RB      -----GCKRRTGCEHDIISFYNEVFIPVKEILLV 875
maize-RB   -----GVLVSR-----EVGHIIFYNEVFIPVKEILLV 724
human-RB   -----EEEDSILIFYNVVFVKEILLV 769
human-107 EDATKTPDCSSGPKV-----EERSDILIFYNVVFVKEILLV 947
human-130 LPVPQSSAPPTEIRLTGANSMDMEEEERGDHIFYNVVFVKEILLV 1022

```

Figure. 15 Comparison of deduced amino acid sequences of pea *PSRB1* with selected homologous sequences.

(A) Alignment of domain A of the RB family proteins from pea, maize (X98923), and human (X98923, L14812, and X76061).
 (B) Alignment of domain B of the RB family proteins from pea, maize, and human. Dashes indicate gaps introduced to maximize alignment. Identical amino acid residues are represented as white-on-black letters.



Figure. 16 Genomic southern blot analysis of *PSRB1* in pea plant. Genomic DNA (50µg) of pea was digested with the restriction enzymes indicated on the top of each lane, and probed with the *PSRB1* cDNA labeled with ³²P-dCTP. Molecular length markers are given on the left. B; *Bam*HI, EI; *Eco*RI, EV; *Eco*RV, H; *Hind*III.

Table 1 PSRB1 binding in the two-hybrid assay

plasmid ^a	β -galactosidase activity ^b
<i>PSRB1</i>	0.11
<i>PSRB1</i> +SV 40 large-T antigen	13.9
<i>PSRB1</i> +Pissa; <i>CycD3</i> ;1	31.5
<i>PSRB1</i> + <i>cdc2</i>	0.16

a) *S. cerevisiae* Y187 was transformed with the indicated plasmids.

b) 1 unit of β -galactosidase is defined as the amount which hydrolyzes 1 mmol of o-nitrophenylgalactoside to o-nitrophenol and D-galactose per min.

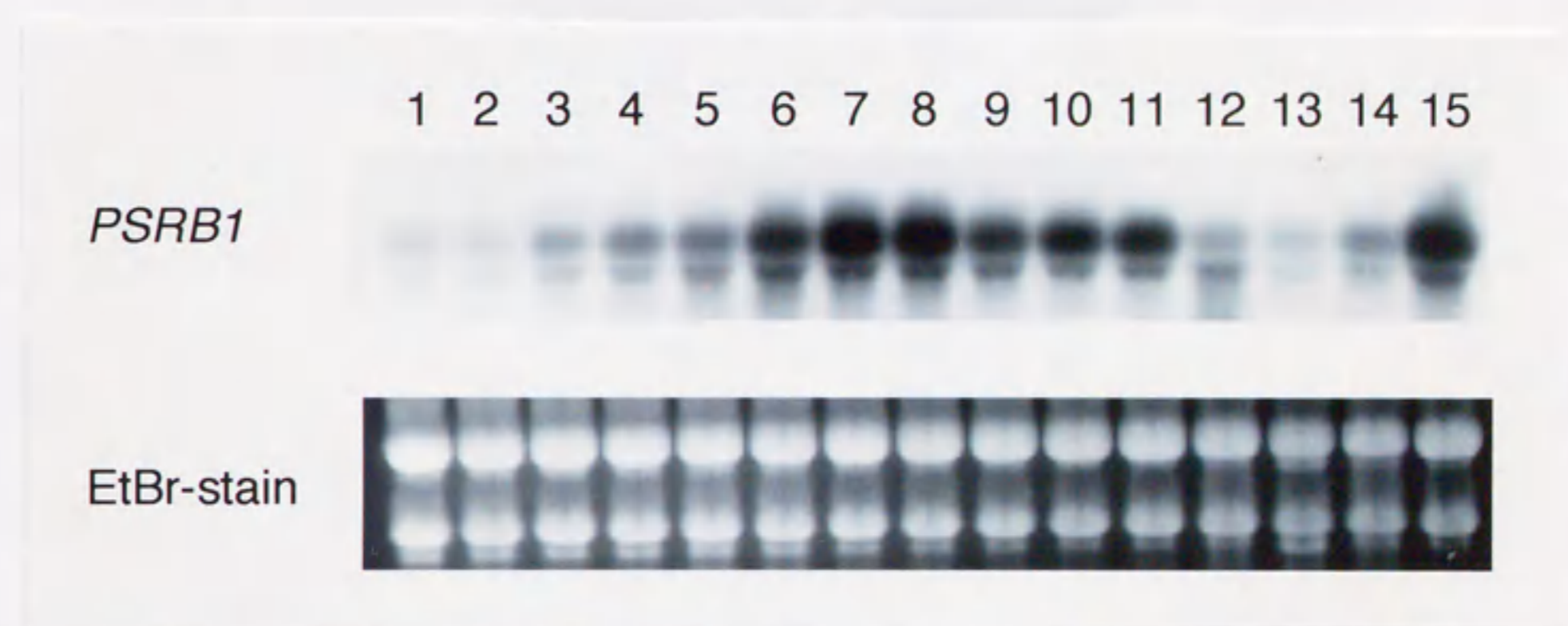


Figure. 17 Northern blot analysis of *PSRB1* in pea plant.

Total RNA (10 μ g) was electrophoresed on a 1% agarose gel, and blotted onto a Hybond N+ membrane. The membrane was probed with the *PSRB1* cDNA labeled with 32 P-dCTP. RNA from axillary buds was extracted at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 24hours after decapitation (lanes 1 to 11, respectively); lane 12, shoot apex; lane 13, leaflet; lane 14, root; lane 15, 7-day-old seedling. The bottom panel shows the etidium bromide (EtBr)-stained RNA gel.

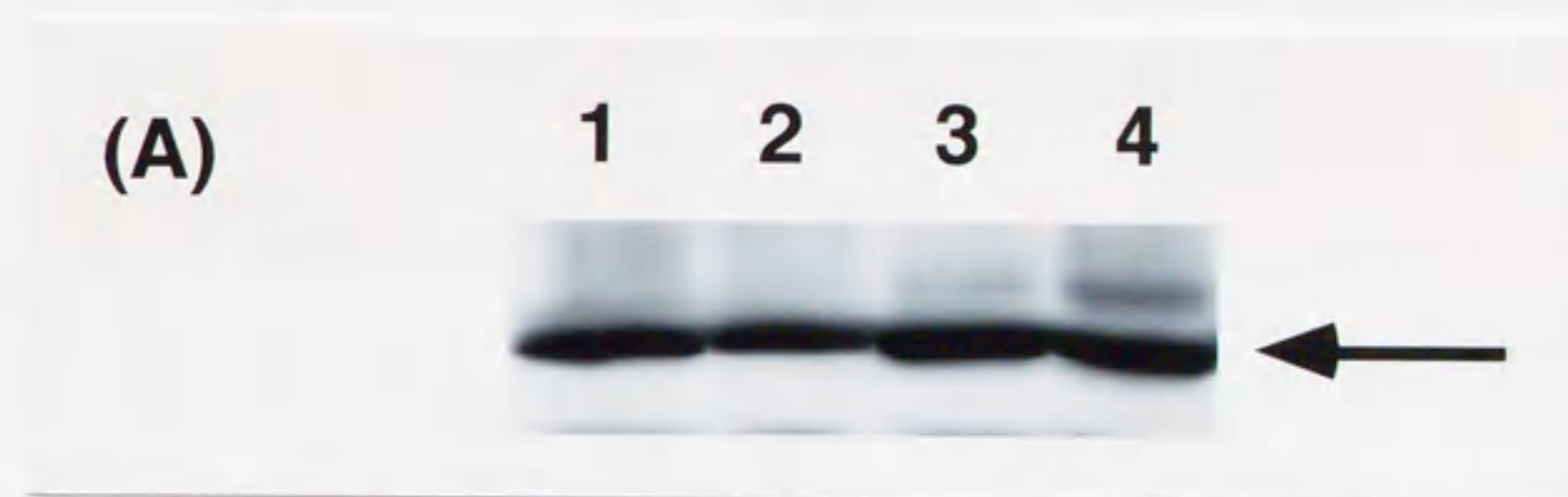
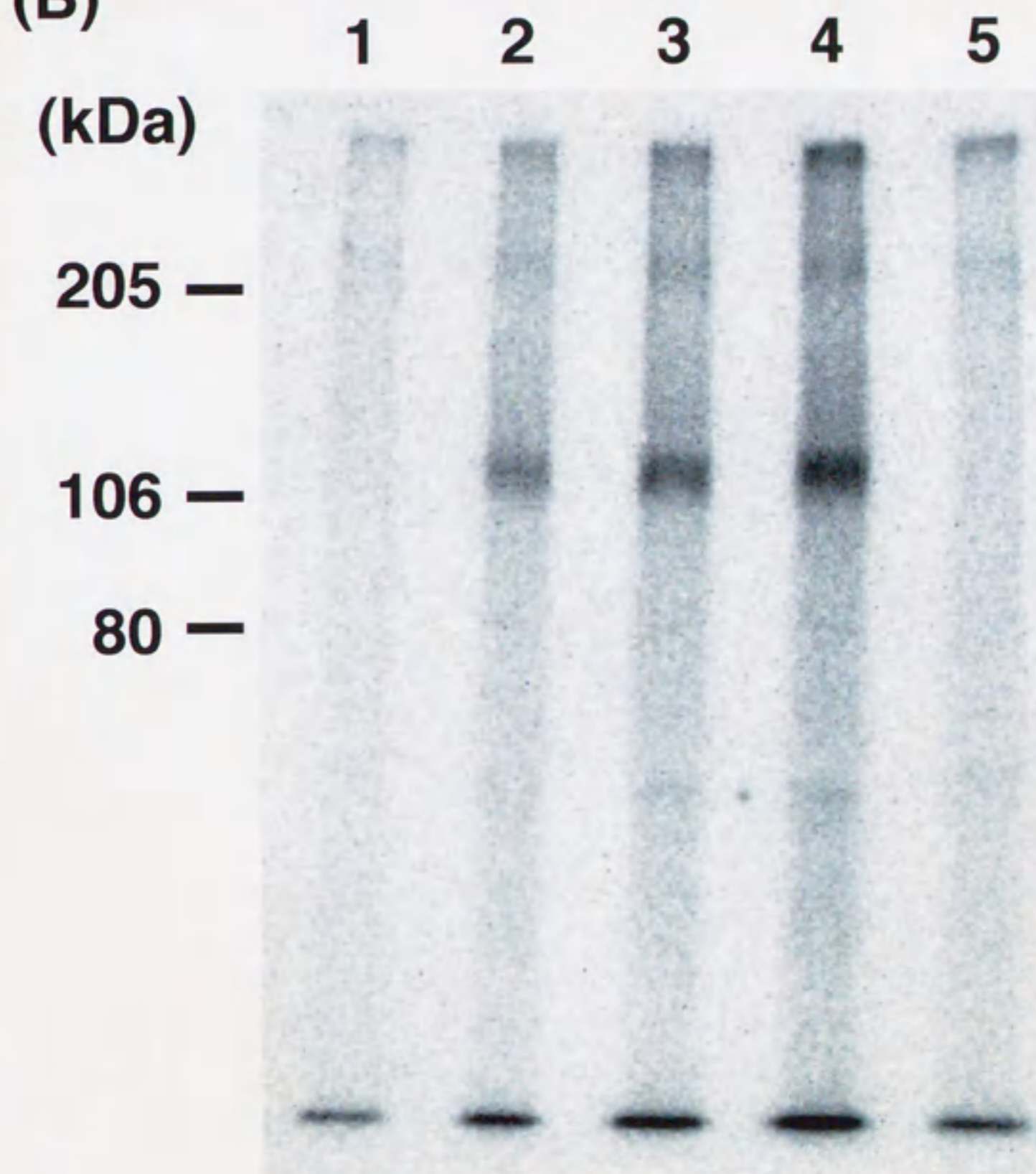


Figure. 18 Protein level and phosphorylation state of PSRB1 in axillary buds during the dormancy-to-growth transition.

(A) Proteins in axillary buds were extracted at 0, 2, 4, 24hours after decapitation (lanes 1 to 4, respectively). The crude extracts (30µg) were separated by SDS-PAGE, and blotted onto a nitrocellulose membrane. Bands in the membrane were detected by immunoblotting with the anti-PSRB1 antibody.

(B) Phosphorus-32 was applied to axillary buds 1hour before isolation, and incorporated *in vivo*. Proteins were extracted from the axillary buds, which were isolated at 0, 2, 4, 24, 24hours after decapitation (lanes 1 to 5, respectively). The proteins were immunoprecipitated with the anti-PSRB1 antibody (lanes 1 to 4) and preimmune serum (lane 5), and separated by SDS-PAGE. The dried gel was used to expose a Fuji Imaging Plate. The image was visualized with a BAS2000 Imaging Analyzer (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan). Molecular mass markers are indicated at the left.

(B)



考察

哺乳類の RB family は、高度に保存された領域を含んでいる。ポケット A、B 領域、CDKs によるリン酸化部位、システイン残基である。様々な腫瘍から単離された不活性型の RB タンパク質は、これらの領域にのみ異常が検出されるので、これらの領域は、RB family の活性に重要であることが考えられている (Huang et al. 1990)。PSRB1 のアミノ酸配列の比較解析の結果、PSRB1 はこれらの領域が高度に保存されていることが明らかになった。進化的に離れている生物種においても、これらの領域が高度に保存されていることより、RB family の重要性がより強調された。PSRB1 は植物の cyclinD のみでなく、哺乳類の DNA ウィルスの癌遺伝子産物とも強く結合することが yeast two-hybrid system を用いた解析により明らかになった (表 1)。最近、トウモロコシの ZmRb-1 が、ヒトや *Drosophila* の E2F と結合し、さらにヒト E2F による転写活性化を阻害することが示された (Huntley et al. 1998)。また、ZmRb-1 あるいは p130 (ヒト RB family) をコードするプラスミドの導入により、geminivirus の DNA 複製の活性が減少した (Xie et al. 1996)。以上の結果より、植物と動物では、RB family による G1 期での細胞周期の制御機構が類似していることが示唆された。また、PSRB1 と SV40 large T-antigen が強く結合したことに関して別の見方もできる。すなわち、この結果は SV40 large T-antigen を bait にして、two-hybrid system によるスクリーニングを行えば、植物から PSRB1 以外の RB family が単離できることを意味しており、今後の研究に有効な戦略となると期待できる。

哺乳類の RB family のように、PSRB1 も植物の cyclinD と強く結合をした (表 1)。このエンドウの CycD3 は、ヒト cyclinD のホモログである。ヒト cyclinD は、CDK4、CDK6 の制御サブユニットであり、その N 末端の LXCXE motif により、RB タンパク質と結合する。cyclinD/CDK 複合体は、G1 期での細胞周期の進行に不可欠である RB タンパク質のリン酸化反応を触媒する機能を有している。植物と動物において、RB family と cyclinD との相互作用が保存されていることと、PSRB1 も CDKs による推定リン酸化部位が高度に保存されていることが明らかになった。これらの結果より、PSRB1 も哺乳類の RB family のように、cyclinD/CDK によりリン酸化されることが推

測される。最近、上述の仮定を支持する結果が報告されている。トウモロコシの内乳の分化は、有糸分裂をせずに、DNA複製が何度も繰り返される。すなわち、内乳細胞の細胞周期はG1期とS期とを繰り返す。その時、トウモロコシのZmRb-1が、リン酸化されていることが示された (Grafi et al. 1996)。さらに、*in vitro*において、ヒト cyclinD/CDK4 複合体により、ZmRb-1 がリン酸化されることが示された (Huntley et al. 1998)。植物の cyclin (Fobert et al. 1996)、CDK (Hashimoto et al. 1992)、Cdc2-activated kinase (CAK) (Magyar et al. 1997) などが、クローニングされているが、これらの中には、植物ホルモンである、オーキシシン、サイトカイニン、ジベレリンなどにより、発現様式が変化したり、kinase 活性が調節される CDKs や cyclin が存在する (Miao et al. 1993, Soni et al. 1995, Sauter 1997)。以上の点を考え合わせると、植物ホルモンによる制御を受けた cyclin/CDK 複合体により、PSRB1 の活性は調節されている可能性がある。

動物細胞において、RB family が、細胞周期の制御機構に関与しているばかりでなく、血管や神経系の細胞分化の誘導やその分化の維持に関与している知見が得られている (Clarke et al. 1992)。最近、トウモロコシの葉の分化の過程で、ZmRb-1 は分化の決定された細胞で強く発現していることが報告され、分化の維持に関与していることが示された (Huntley et al. 1998)。動物と植物の RB family は共に、細胞の分化を制御する機能を有することが考えられる。PSRB1 mRNA は、哺乳類 RB family のように、解析した全ての組織に発現が検出された (図 17)。細胞が分化して分裂が起きていない組織での PSRB1 の機能は、細胞周期の進行を G1 期で抑制する。あるいは、細胞の分化を維持する働きであると考えられる。一方、細胞が活発に分裂が起きている組織では、PSRB1 の機能は、細胞分裂の抑制というよりも、細胞の分化の決定に関与していると考えられる。休眠腋芽での PSRB1 は、細胞周期の抑制と細胞分化の抑制に関与していることが推測される。

腋芽において、休眠から成長への移行期に、PSRB1 mRNA の蓄積量が増加しても、PSRB1 タンパク質の蓄積量には変化がなく、一定量に維持されていた (図 18)。植物の kinase の中には、タンパク質のレベルと mRNA のレベルとが、必ずしも一致しない例が幾つか報告されている (Bögge et al. 1997)。この分子機構は、新規のタンパ

ク質の合成の阻害か、タンパク質の安定化の変化によるタンパク質の合成・分解の代謝回転の変化によることが考えられる。また、第四章で後述するが、PCNA も PSRB1 と同様の挙動を示した。

PSRB1 は休眠腋芽では、リン酸化されなかったが、成長腋芽では、頂芽切除 2 時間後にはそのリン酸化が検出された。また、S 期に特異的な転写の活性化は、頂芽切除 4 時間後に開始することが分かっている（第二章図 9 参照）。この結果は、PSRB1 が cyclin/CDK 複合体にリン酸化された後に、S 期に特異的な転写の活性化が起きていることを示唆しており、休眠から成長への移行の分子機構は、動物で見られるような制御機構により調節されていることが考えられる。哺乳類の RB family の活性は、cyclin/CDK 複合体により調節されている。そこで、次章では、腋芽の休眠から成長への移行期において、RB family の活性化調節タンパク質である cyclin や CDK を含む幾つかの細胞周期の制御タンパク質 (CycD3、CycB1、Cdc2、PCNA) のタンパク質レベルでの解析を行った。

第四章

腋芽の休眠から成長への移行期における細胞周期の制御因子 (Cdc2、CycB1、CycD3、PCNA) のタンパク質レベルでの解析

緒言

前章までに、エンドウの休眠腋芽は、G1 期において、細胞周期が抑制されていることが明らかになった。さらに、エンドウの RB のホモログ (PSRB1) が、休眠腋芽の細胞周期の抑制機構に関与する可能性が示された。このことより、エンドウの腋芽の細胞周期は、動物と類似の調節機構により制御されることが考えられる。

動物細胞では、細胞周期の進行と抑制は、発生分化のプログラムや、環境要因に応じて、G1 期で調節される (Sherr 1994)。この過程には、様々な正の制御タンパク質や、負の制御タンパク質が関与する (図 4 参照)。第一章で述べたように、細胞周期の進行には、cyclin/CDK 複合体が中心的な役割を果たす。この cyclin/CDK 複合体による下流の制御タンパク質 (RB タンパク質など) のリン酸化の結果、抑制されていた細胞周期が進行する。CDK は、セリン、スレオニン残基をリン酸化するタンパク質キナーゼであるが、それ自身だけでは活性を持たず、調節サブユニットである cyclin との結合及び、Cdc2-activated kinase (CAK) によるリン酸化がその活性に不可欠である。その他にさらに、cyclin/CDK 複合体は、CDK inhibitor (CKI) による負の制御も受ける。現在までに、様々な CKI (p15、p16、p18、p19、p21、p27、p57 など) が単離され、その制御機構の解明が精力的に行われてきた。例えば、外部からの刺激により、癌遺伝子産物の p53 が転写因子として働き、p21 を直接的に誘導する (図 19)。正常細胞では、p21 は cyclinD、CDK、PCNA と会合し、4 量体を形成する。PCNA は、DNA polymerase δ の活性補助因子であり、DNA 複製の必須なタンパク質である。p21 は CDK の kinase 活性と、DNA 複製との両方を阻害することにより、細胞周期の進行を G1 期で抑制する。一方、多くの癌細胞では、p21 の発現は減少しており、p21、cyclinD、CDK、PCNA の 4 量体は形成されない。その結果、cyclin/CDK 複合体及び PCNA は、

活性化状態で細胞内に存在し、細胞周期の進行のシグナルが伝達され、細胞分裂が制御なしで起こるといふ分子機構が明らかにされている (Xiong et al. 1992)。

本章では、腋芽の休眠から成長への移行期に引き起こされる細胞周期の制御タンパク質のタンパク質レベルでの変化に関して解析を行った。まず、抗 PCNA、CycB、CycD 抗体を調製した。これらの抗体及び抗 PSTAIRE 抗体を用いて、腋芽の休眠から成長への移行期における各タンパク質量の変化を検出した。抗 PCNA 抗体カラム及び、抗 CycD3 抗体カラムを用い、休眠腋芽と成長腋芽を比較し、PCNA と CycD3 の相互作用の変化を検出した。その結果に基づき、エンドウの腋芽の細胞周期の抑制機構に関して考察を行った。

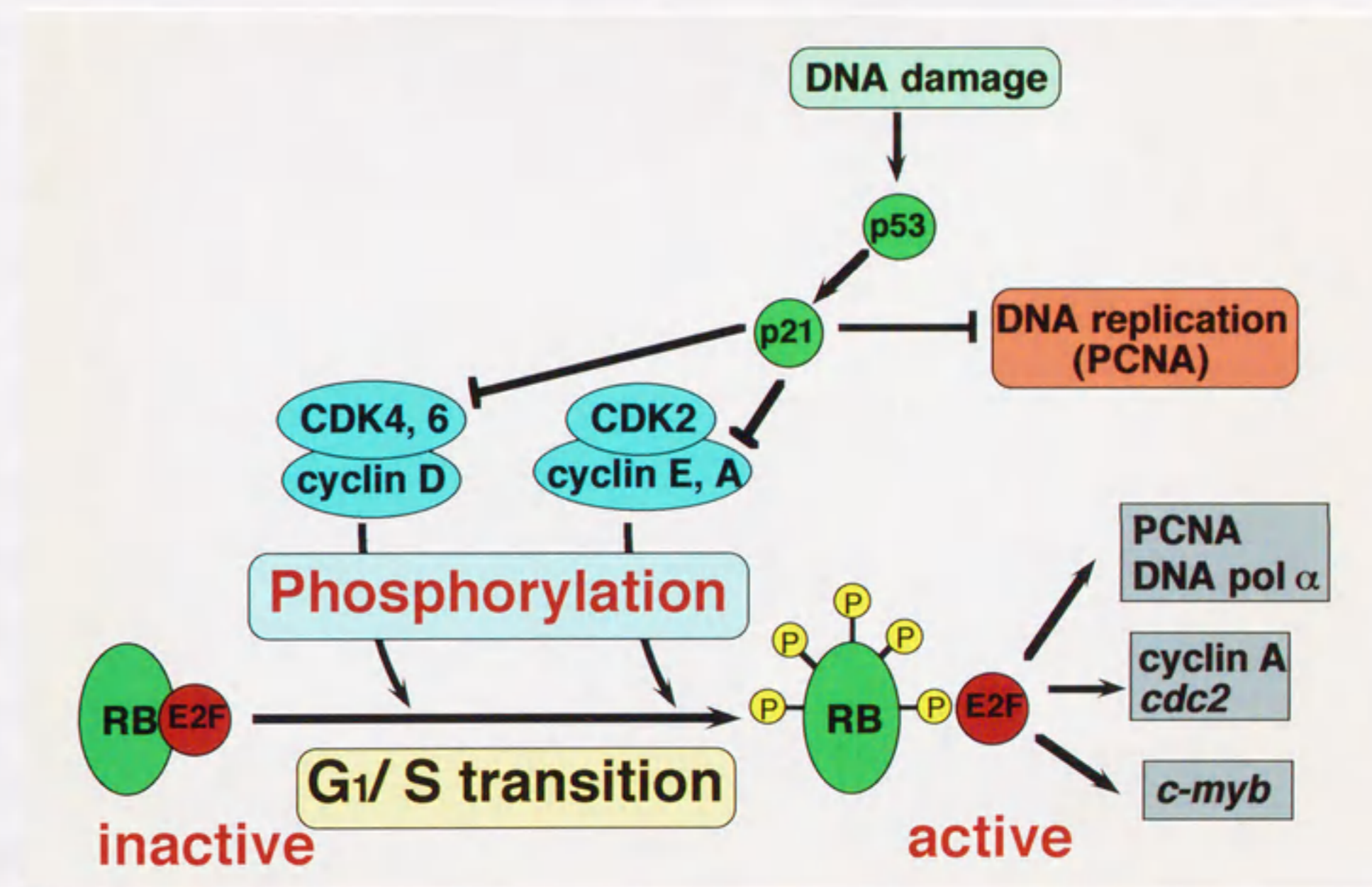


Figure. 19 In mammalian cells, p21 inhibits the G1 progression. In normal cells, p21, a CDK inhibitor, binds to cyclin/CDK kinases and PCNA, and forms quaternary complexes. p21 inhibits the activities of cyclin/CDK and DNA replication, and the cells are arrested at the G1 phase in the cell cycle.

1) 抗 PCNA、CycB1、CycD3 抗体の調製

抗 PCNA 抗体の調製については、基本的に立木の方法(1997)に準じて行った。PCNA cDNA を pGEX4T-1 ベクター (Pharmacia) に導入した。このプラスミドを用いて、*E.coli* BL21(DE3)pLys[F-ompT hsdSB(rB-mB-)gal dcm(DE3)pLysS(CmR)] を形質転換し、PCNA を GST-PCNA 融合タンパク質として発現させた。この融合タンパク質を glutathione-Sepharose 4B (Pharmacia) カラムを用いて、アフィニティー精製し、SDS-PAGE による分離後、目的とするバンドを切り出し、抗原として multiple intradermal injection 法 (Vaitukaitis 1981) により、ウサギを免疫した。

抗 PSTAIRE 抗体は、Cdc2 (PSTAIRE) rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。

抗 CycB1 抗体及び、抗 CycD3 抗体の調製は、以下に示す合成ペプチドを用いた。

CycB1 : CSASGSGKLGKGVYKKYADPQKG

CycD3 : CDEEKLEEEQED、CYNAIVEVTNENNYG、CLATASATTS

BSA を 0.2M NaH₂PO₄ (pH 7.0) に溶解させ、予め DMF に溶解させた MBS (Pierce) を徐々に添加し、MBS 修飾-BSA を調製した。これを予め 0.1M NaH₂PO₄ (pH 6.0) で平衡化した Sephadex G-25 (NAP 25, Pharmacia) カラムに供し未反応物を除去した。精製 BSA-MBS 1mg に対し、合成ペプチド 1mg を添加し、1M K₂HPO₄ (pH 7.0) を用いて中和した。回転させながら、4°C、12 時間反応させた。これを抗原として、ウサギを免疫して抗血清を得た。

2) 抗 CycB1、CycD3 抗体の精製

抗 CycB1 抗体及び抗 CycD3 抗体は、抗原に用いた合成ペプチドをリガンドとしたカラムクロマトグラフィーにより精製した。

抗原カラムの調製は以下のように行った。50mM NaH₂PO₄ (pH 8.0) で平衡化した FMP cellulofine 0.15g (生化学工業) に、合成ペプチド 500µg を加え、回転させながら室温で、12 時間反応させた。カラムをブロッキング緩衝液 (50mM Tris-HCl [pH 8.0]、

0.1M monoethanolamine) で洗浄後、室温で6時間ブロッキング反応を行った。続いて、カラムを溶出緩衝液 (0.1M glycine-HCl [pH 2.5])、洗浄緩衝液 (20mM Tris-HCl [pH 7.5]、1M NaCl、1% TritonX-100)、TBS (20mM Tris-HCl [pH 7.5]、0.15M NaCl) で洗浄した。

各抗原カラムを用いた抗体の精製は以下のようにして行った。予め0.45 μ mのフィルター濾過した血清 3ml を抗原カラムに供し、回転させながら、4 $^{\circ}$ Cで12時間反応させた。カラムをTBS、洗浄緩衝液で洗浄した後、溶出緩衝液で抗体の溶出を行った。溶出画分を、直ちに1M Trisで中和した。

アフィニティー精製を行った抗体の特異性を、competition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法 (Ausubel et al. 1987) で確認した。

3) Yeast two-hybrid system

説明書に従い、Matchmaker Two Hybrid System (Clontech) を用いた。

4) ウェスタン解析

以下の3点を除いて、ブロッキング反応まで、第三章の方法に準じて行った。タンパク質抽出緩衝液 B: 50mM Tris-HCl (pH 8.0)、200mM LiCl、1mM EDTA、0.1% TritonX-100、10% (w/v) glycerol。各レーンのタンパク質濃度: 10 μ g。分離ゲル濃度: 10%。

抗PCNA抗体を1:500希釈濃度、抗PSTAIRES抗体を1:1,000希釈濃度で用いた。精製した抗CycB1抗体及び抗CycD3抗体は、1 μ g/mlに調製して用いた。PCNA、CycB1、Cdc2の検出の場合、アルカリフォスファターゼ標識した二次抗体(ヤギ抗ウサギIgG抗体)(Cappel)を1:500希釈濃度で使用した。発色緩衝液(100mM Tris-HCl [pH9.5]、100mM NaCl、5mM MgCl₂)で洗浄後、50 μ g/ml BCIP、150 μ g/ml NBTを含む発色緩衝液中で発色させた。CycD3の検出の場合、Horseradish peroxidase 標識した二次抗体(ヤギ抗ウサギIgG抗体)(BIO-RAD)を1:10,000希釈濃度で反応させた。TBSTで洗浄後、ECL system (Amersham) を用いてX線フィルムに適切な時間露光してシグナルを検出した。

5) グリセロール密度勾配遠心法

50 個の腋芽に、氷冷したタンパク質抽出緩衝液 C (50mM Tris-HCl [pH 7.5]、150mM NaCl、20mM EDTA、0.5% NP-40、10% [w/v] glycerol、1mM dithiothreitol、2mM PMSF) 200 μ l とアルミナを加え、乳鉢で磨砕しタンパク質を抽出した。磨砕液をエッペンドルフチューブに移し、15,000rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離を行い、不溶性画分を除去し、タンパク質抽出液とした。タンパク質抽出液 100 μ l を緩衝液 C を含む 10%-40% (w/v) グリセロール密度勾配溶液 (3.6ml) に重層した。TLN-100 ローター (Beckman) を用いて、100,000rpm、4 $^{\circ}$ C、3 時間遠心分離を行った。遠心後、32 本に分画し、奇数の画分を SDS-PAGE により分離し (分離ゲル濃度 10%)、抗 PCNA 抗体により PCNA タンパク質を検出した。

6) イムノアフィニティーカラムクロマトグラフィー

抗 PCNA 抗体カラムの調製のために、抗 PCNA 抗血清 8ml を以下の実験に使用した。IgG の精製、濃縮のため、予め PBS (140mM NaCl、2.7mM KCl、81mM Na₂HPO₄、1.6mM KH₂PO₄) で平衡化した protein A Sepharose 4FF (Pharmacia) カラムに供した。IgG を 0.1M glycine-HCl (pH 3.0) により溶出し、直ちに 1M Tris で中和した。予めカップリング緩衝液 (0.1M NaHCO₃、0.5M NaCl [pH 8.3]) で平衡化した Sephadex G-25 (PD-10 Column, Pharmacia) に供し、緩衝液を交換した。説明書に従い HiTrap NHS 活性化カラム (Pharmacia) に IgG 10mg を固定した。抗 CycD3 抗体カラムの調製のために、アフィニティー精製した 3 種類の抗 CycD3 抗体を各 1mg を合わせ、計 IgG 3mg を使用した。前述と同様にして、HiTrap NHS 活性化カラムに固定した。

腋芽 1g に、氷冷した結合緩衝液 (50mM Tris-HCl [pH 7.5]、150mM NaCl、20mM EDTA、0.5% NP-40、1mM PMSF) 2ml とアルミナを加え、乳鉢で磨砕しタンパク質を抽出した。磨砕液をエッペンドルフチューブに移し、15,000rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離を行い、上清をサンプルアップ C02-LG (MILLIPORE) に移し、10,000rpm、4 $^{\circ}$ C、15 分間遠心して、不溶性画分を除去した。タンパク質抽出液を抗体カラムに供し、結合緩衝液で洗浄後、0.1M glycine-HCl (pH 3.0) により溶出を行った。溶出画分を、直ちに 1M Tris

で中和した。SDS-PAGE により分離し (分離ゲル濃度 10%)、抗 PCNA、CycB1、CycD3、PSTAIRE 抗体を用いて、各タンパク質の検出を行った。

結果

1) エンドウの PCNA、Cdc2、CycB1、CycD3 タンパク質の検出

腋芽の休眠から成長への移行期における細胞周期の制御因子 (PCNA、Cdc2、CycB1、CycD3) のタンパク質レベルでの解析を行うために、各タンパク質に対する特異抗体を調製した。図 20 に、その特異抗体を用いたエンドウ茎頂における、各タンパク質の検出結果を示す。抗 PCNA 抗体は、36kDa の単一のポリペプチドと反応した。このサイズは、他の植物で検出される PCNA のサイズと一致した (Suzuka et al. 1989)。Cdc2 タンパク質は、cyclin との結合に必要とされる PSTAIRE 配列が保存されている。この保存領域を認識する抗 PSTAIRE 抗体は、34、35、37、39kDa のタンパク質と反応した。Cdc2 は、非同調的な細胞分裂を繰り返している組織では、Cdc2 タンパク質のリン酸化状態の違いにより、このような多様性を示すことが知られている (Morla et al. 1989)。抗 CycB1 抗体は、50kDa のタンパク質と反応した。一方、いずれの抗 CycD3 抗体も、粗タンパク質抽出液では CycD3 を検出することはできなかった (データは示さない)。

2) 休眠から成長への移行期における mRNA 量とタンパク質量の変化

PCNA、CycB1、cdc2 の各 mRNA 量とタンパク質量の変化とを比較した。その結果を図 21 に示す。いずれの mRNA も休眠腋芽では、その発現量が少なかった。しかし、頂芽切除後各 mRNA は著しく増加した (第二章参照)。一方、PCNA タンパク質は、休眠、成長両腋芽から検出された。さらに頂芽切除後、PCNA mRNA 量が、著しく増加したにも関わらず、タンパク質量は一定量に維持されていた。また、Cdc2、CycB1 タンパク質は、休眠腋芽では検出できず、頂芽切除後、タンパク質量の増加がみられ、タンパク質の変動様式は、mRNA の変動様式と一致した。

3) 休眠腋芽における PCNA タンパク質の会合状態の検出

休眠腋芽に存在する PCNA タンパク質の役割を検討するために、グリセロール密度勾配遠心法を用いて、休眠腋芽中で PCNA タンパク質が、どのような会合状態にある

か解析した。グリセロール密度勾配遠心法により、休眠、成長腋芽のタンパク質抽出液を分離分画後、各画分を SDS-PAGE により分離し、抗 PCNA 抗体を用いて PCNA タンパク質を検出した。その結果を図 22 に示す。図 22A では、休眠腋芽のタンパク質の抽出後に SDS を加え、タンパク質を変性させた後、グリセロール密度勾配遠心法による分離を行った。図 22C、E は、それぞれ休眠、成長腋芽のタンパク質を非変性状態で、分離したものである。図 22B、D、F に、図 22A、C、E のシグナルを定量し、グラフ化した結果を示す。試料を SDS により変性した場合、PCNA は 25 番目の画分に沈降した。この画分は分量マーカーの沈降結果から約 40kDa のタンパク質が沈降すると推測され、PCNA が単量体の場合の位置と一致している。一方、非変性状態で分離を行った結果、休眠腋芽中の PCNA は 13 番目の画分に、成長腋芽の PCNA はそれよりも軽い 15 番目の画分にそれぞれ沈降した。このことは、腋芽細胞の中では PCNA が単量体ではなく多量体、あるいは他のタンパク質と会合して、複合体を形成していることを示唆している。さらに沈降速度の違いから、少なくとも休眠腋芽と成長腋芽の PCNA は異なる会合状態にあることが明らかとなり、休眠腋芽中の PCNA の方が、成長腋芽中の PCNA よりも、より大きな複合体を形成している可能性が示された。

4) 休眠、成長腋芽における PCNA、CycD3 の相互作用の検出

動物細胞では、PCNA は cyclinD と結合することが知られているおり、このことは *in vitro* でも確認されている (Matsuoka et al. 1994)。PCNA と cyclinD とが複合体を形成している間は、それぞれのタンパク質は不活性型であり、細胞周期は G1 期で抑制される。この複合体が解離すると、それぞれのタンパク質は活性型になり、下流の制御タンパク質に細胞周期の進行のシグナルを伝える。従って、この複合体の形成は、G1 期での細胞周期の抑制機構の重要な要素であるといえる。グリセロール密度勾配遠心法による解析により、休眠腋芽の PCNA と成長腋芽の PCNA が異なる会合状態にあることが明らかになった。そこで、休眠腋芽と成長腋芽とを比較しながら、PCNA と、cyclinD が複合体を形成している可能性について解析した。

まず最初に、yeast two-hybrid system を用いて (第三章参照)、植物の PCNA と植物

の CycD3 間の相互作用を確認した。yeast two-hybrid system による解析の結果、エンドウ PCNA は、エンドウ Cdc2 とは相互作用しなかったが、エンドウ PCNA とエンドウ CycD3 とは、相互作用をすることが明らかになった (図 23)。

そこで、抗 PCNA 抗体カラムと、抗 CycD3 抗体カラムを調製し、これらを用いてエンドウの腋芽における PCNA と CycD3 との相互作用を解析した。休眠腋芽及び、成長腋芽からタンパク質をそれぞれ抽出し、各カラムに供した。各カラムからの溶出液を用いて、抗 PCNA、CycD3、CycB1、PSTAIRES 抗体により、タンパク質の検出を行い、タンパク質間の相互作用を解析した (図 24)。

抗 PCNA 抗体カラムの溶出液を抗 PCNA 抗体で検出した結果、休眠腋芽、成長腋芽ともに PCNA が検出され (図 24、レーン 1、2)、抗 PCNA 抗体カラムが正常に機能していることを確認した。同様に、抗 CycD3 抗体カラムの溶出液を 3 種類の抗 CycD3 抗体で検出した場合も、単一の 45kDa のポリペプチドが検出された (図 24、レーン 17、18、21、22、25、26)。このポリペプチドのサイズは、CycD3 の予想される分子量と一致する点に加えて、3 種類の異なるペプチドに対する抗 CycD3 抗体で同じ結果が得られたことより、このポリペプチドを CycD3 であると判断した。これらの結果より、抗 CycD3 抗体カラムが正常に機能していることを確認するとともに、CycD3 が休眠腋芽、成長腋芽の細胞内に存在することが明らかになった。

次に抗 CycD3 抗体カラムの溶出液を抗 PCNA 抗体で検出した結果、休眠腋芽のタンパク質抽出液からは PCNA が検出されたが、成長腋芽のタンパク質抽出液からは検出されなかった (図 24、レーン 3、4)。このことは、休眠腋芽中では PCNA と CycD3 が複合体を形成しているが、成長腋芽中では解離していることを示唆している。逆に、抗 PCNA 抗体カラム溶出液を抗 CycD3 抗体によって検出した場合も、休眠腋芽のタンパク質抽出液からは CycD3 が検出されたが、成長腋芽のタンパク質抽出液からは検出されないという同様の結果が得られた (図 24、レーン 15、16、19、20、23、24)。一方、抗 PSTAIRES、CycB1 抗体を用いた場合は、いずれの溶出液中からも Cdc2 (図 24、レーン 6-9)、CycB1 (図 24、レーン 11-14) を検出できなかった。また、80kDa 以上のバンドに関しては、2 次抗体のみの反応で検出されたので (図 24、レーン 27-30)、これらは非特異的反応の結果であると判断した。

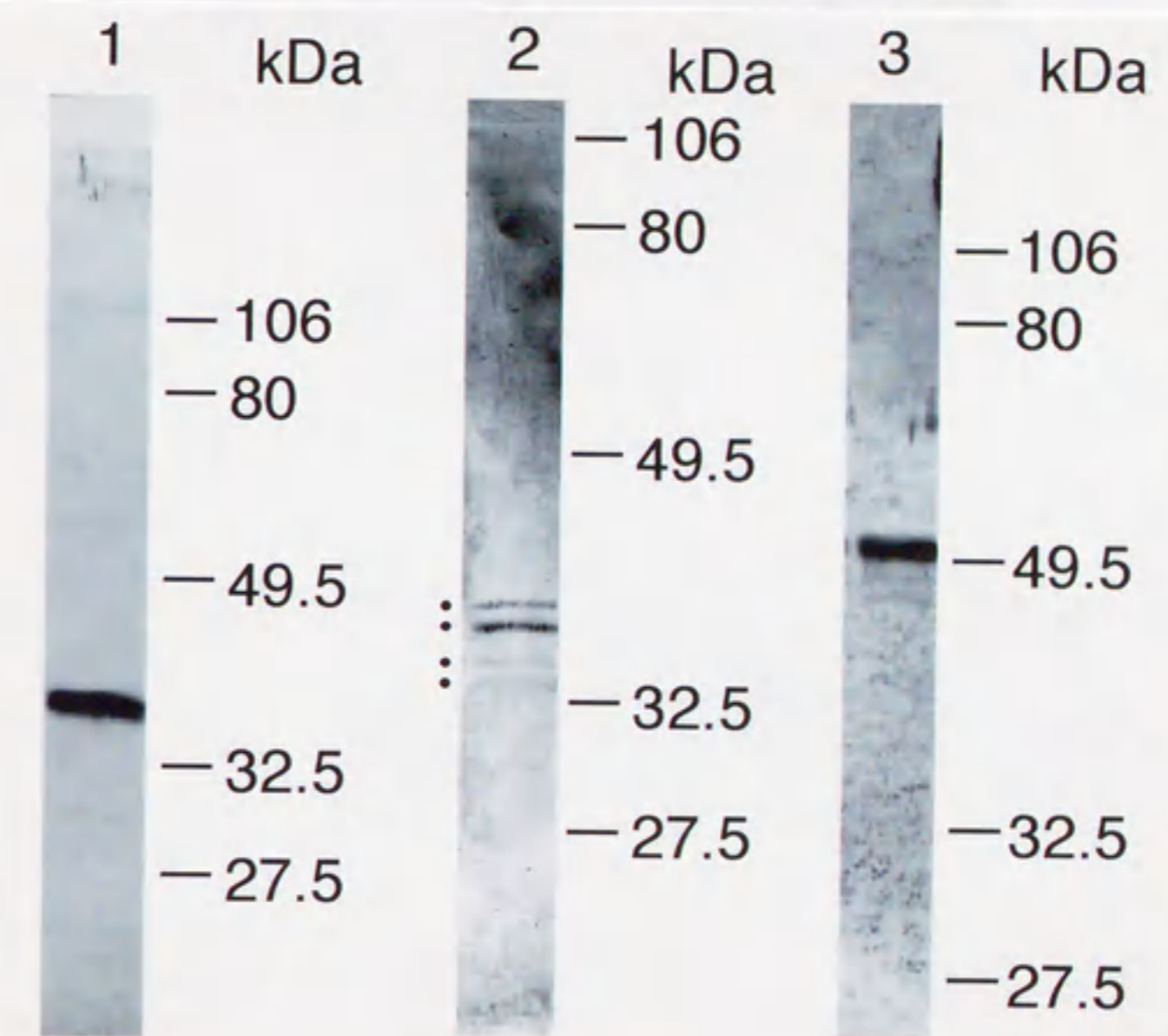


Figure. 20 Immunochemical detection of PCNA, Cdc2, and CycB1 proteins in pea shoot apex.

Protein extracts (10 μ g) prepared from pea shoot apices were detected by immunoblotting with the anti-PCNA antibody (lane 1), anti-PSTAIRE antibody (lane 2), and anti-CycB1 antibody (lane 3). Dots on the left of lane 2 indicate the locations of the four separated 34, 35, 37, and 39kDa forms. Molecular mass markers are indicated at the right of each lane.

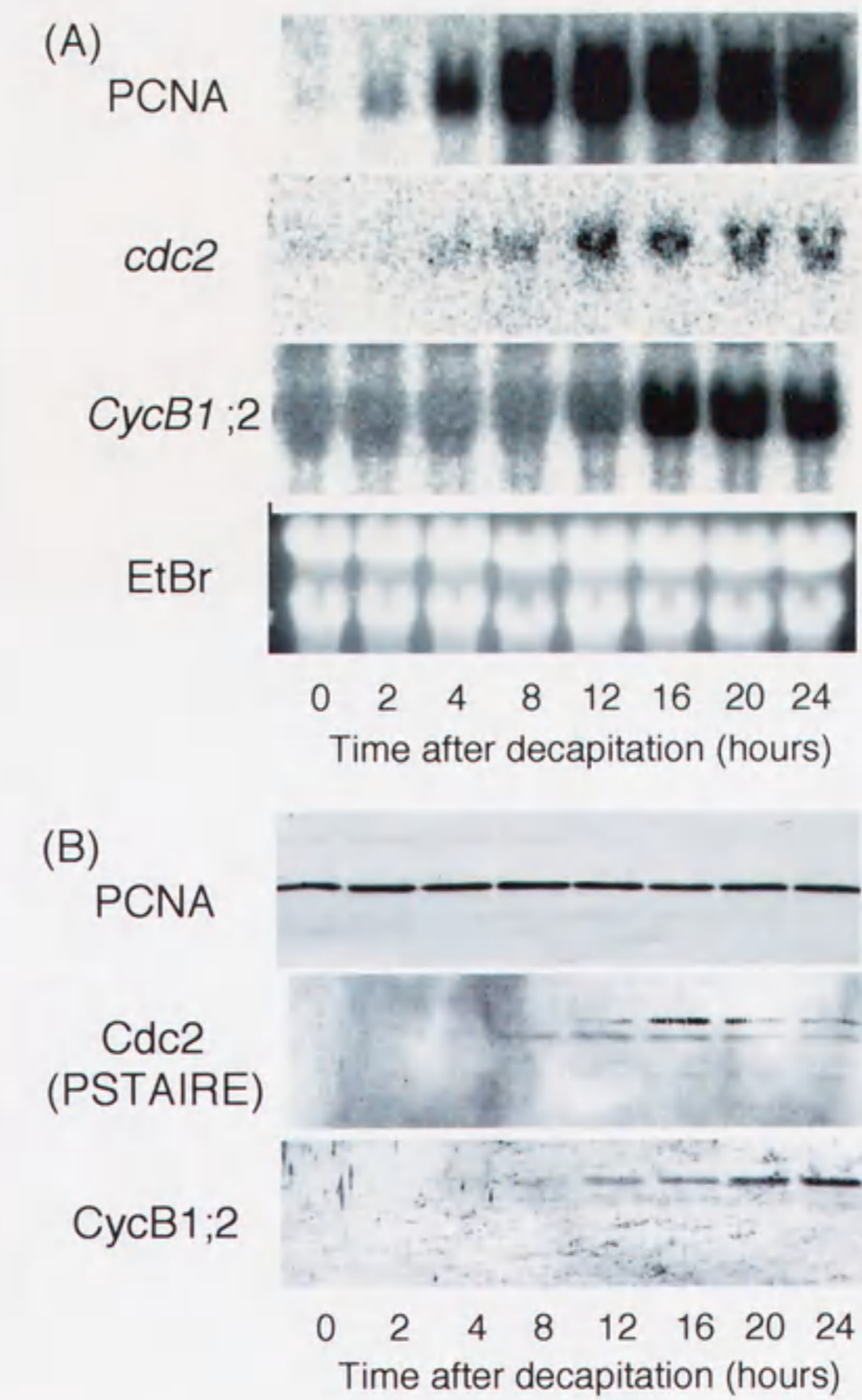


Figure. 21 mRNA and protein levels of PCNA, *cdc2*, and *CycB1* genes during the dormancy-to-growth transition in axillary buds.

(A) Total RNA extracted from axillary buds at the indicated times after decapitation. RNA (10 μ g) was electrophoresed on a 1% agarose gel, and blotted onto a Hybond N+ membrane. Three membranes separately prepared were hybridized with the cDNAs of PCNA, *cdc2*, and *CycB1*. The bottom panel shows the ethidium bromide (EtBr)-stained RNA gel.

(B) Crude proteins extracted from axillary buds at the indicated times after decapitation. The protein (10 μ g) was separated by SDS-PAGE, and blotted onto nitrocellulose membranes. Three membranes separately prepared were detected by immunoblotting with the anti-PCNA antibody, anti-PSTAIRES antibody, and anti-*CycB1* antibody.

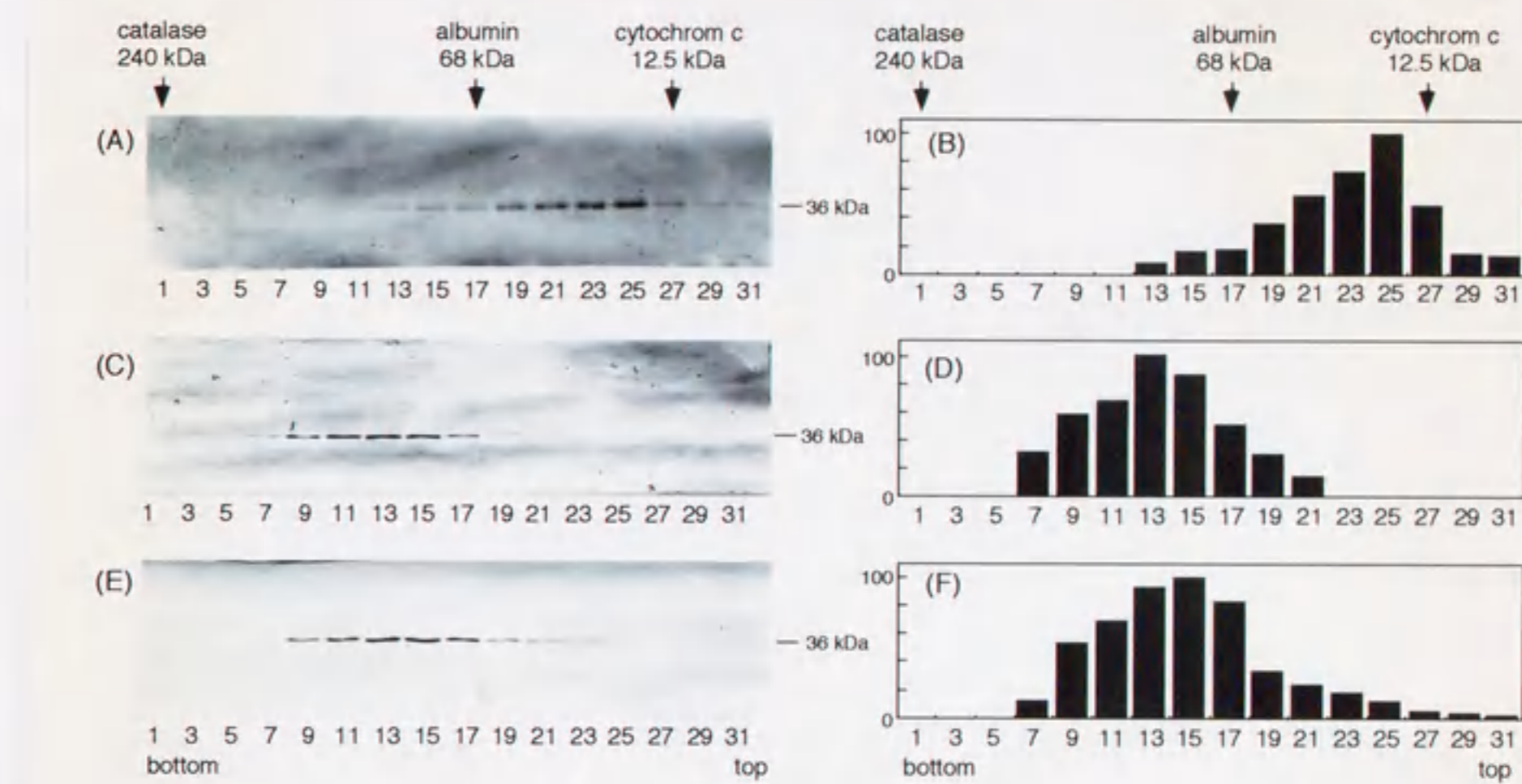


Figure. 22 Analyses of complexes containing PCNA in pea axillary buds by glycerol gradient sedimentation.

(A) Protein extracts were prepared from dormant buds, denatured with SDS, and separated in 10-40% (w/v) glycerol gradient.

(C) Protein extracts were prepared from dormant buds, and separated in 10-40% (w/v) glycerol gradient.

(E) Protein extracts were prepared from growing buds after decapitation, and separated in 10-40% (w/v) glycerol gradient.

Proteins in every odd fractions (out of 32 per gradient) were separated by SDS-PAGE, and detected by immunoblotting with the anti-PCNA antibody. The fraction numbers are shown below each gel. Sedimentation positions of the marker proteins, catalase (240kDa), bovine serum albumin (68kDa), and cytochrome c (12.5kDa) are indicated in (A) and (B).

(B), (D), and (F) Quantification of the signals in (A), (C), and (E), respectively by densitometer (Atto, Japan). The strongest signal was arbitrarily designated 100%.

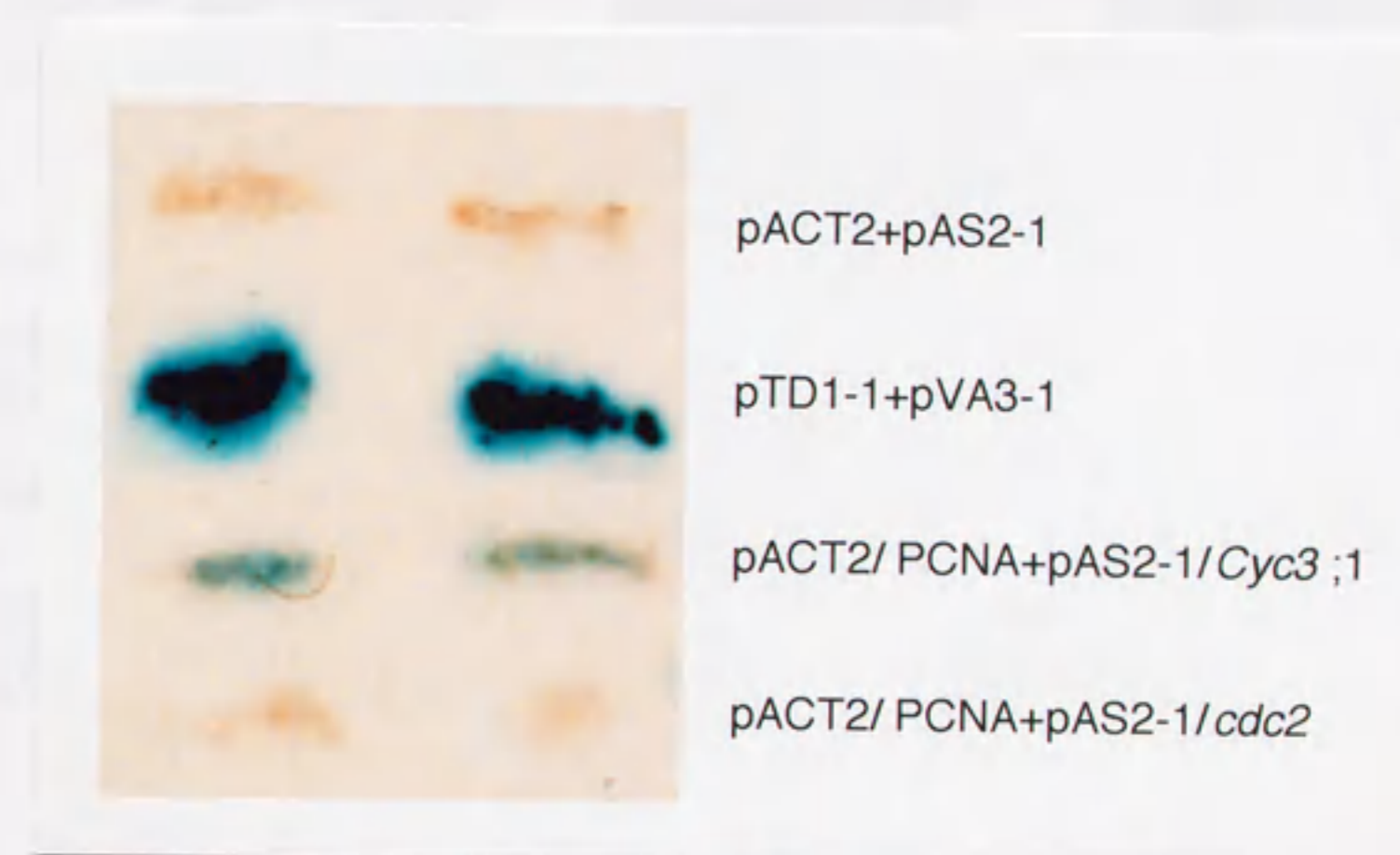


Figure. 23 Interaction between PCNA and CycD3 in a yeast two-hybrid system.

S. cerevisiae Y187 was transformed with the indicated plasmids. pAS2-1 encodes the GAL4 DNA-binding domain. pACT2 encodes the GAL4 activation domain. pVA3-1 encodes the DNA-binding-domain/murine p53 protein. pTD1-1 encodes the activation domain/SV40 large T-antigen protein. pACT2/PCNA encodes the activation domain/PCNA protein. pAS2-1/*CycD3* encodes the DNA-binding-domain/*CycD3* protein. pAS2-1/*cdc2* encodes the DNA-binding-domain/*Cdc2* protein. Two independent transformants were streaked on a filter and β -galactosidase activity was assayed.

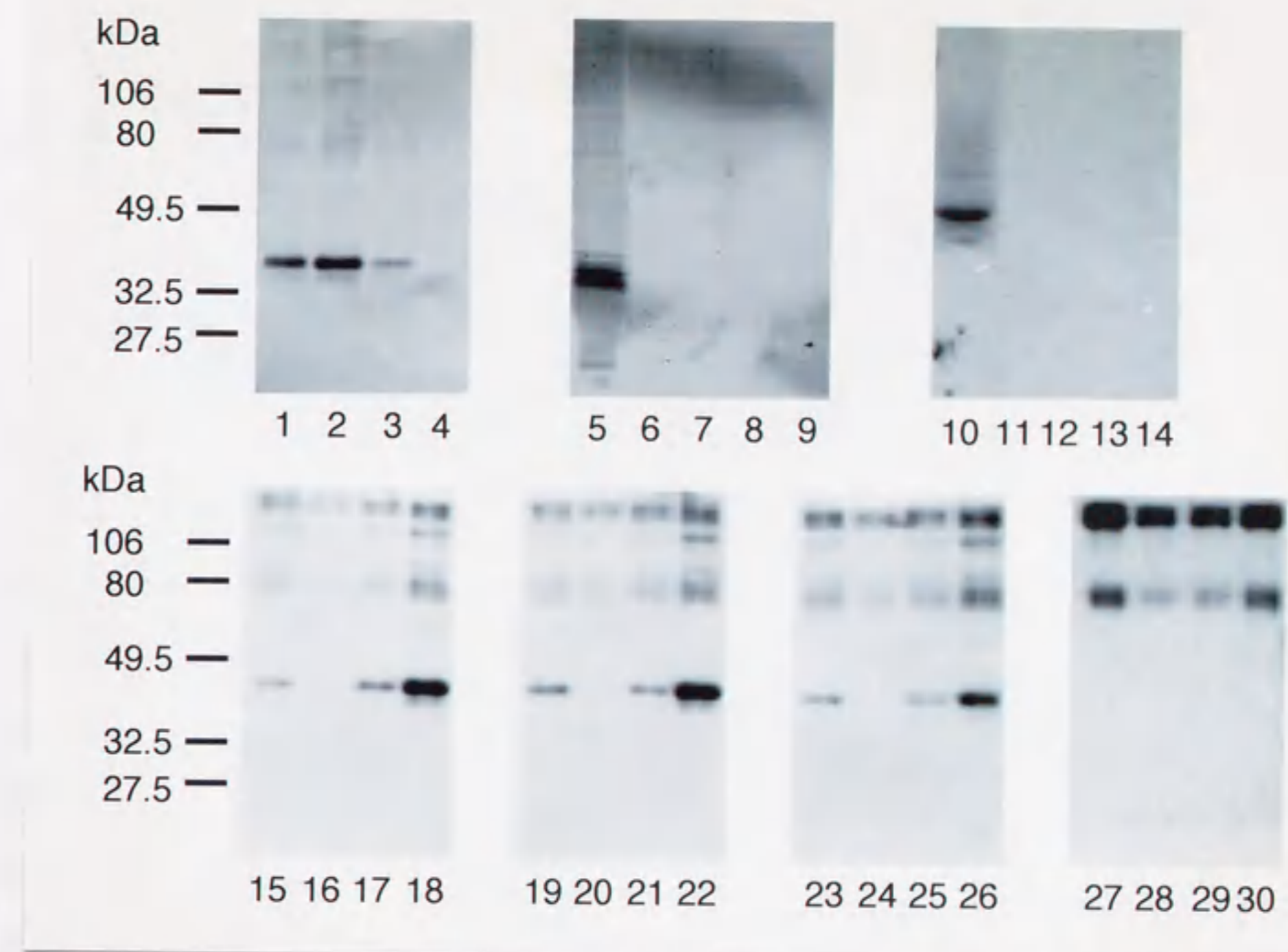


Figure. 24 Specific association of PCNA with CycD3 during dormancy.

Crude extracts prepared from dormant buds or growing buds were applied to anti-PCNA and anti-CycD3 immunoaffinity columns. After the columns were washed, the eluates from the immunoaffinity columns were probed with anti-PCNA antibody (lanes 1 to 4), anti-PSTAIRE antibody (lanes 5 to 9), anti-CycB1 antibody (lanes 10 to 14), anti-CycD3 antibodies (lanes 15 to 26), and the secondary antibody alone (lanes 27 to 30). Three anti-CycD3 antibodies were prepared from three synthetic peptides. Molecular mass markers are indicated at left. Lanes 1, 2, 6, 7, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, and 28; eluate from anti-PCNA immunoaffinity column. Lanes 3, 4, 8, 9, 13, 14, 17, 18, 21, 22, 25, 26, 29, and 30; eluate from anti-CycD3 immunoaffinity column. Lanes 5 and 10; crude extracts prepared from the growing buds for positive control. Lanes 1, 3, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, and 29; dormant buds. Lanes 2, 4, 7, 9, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, and 30; growing buds at 24hours after decapitation.

考察

PCNA は休眠腋芽では mRNA が検出されないにも関わらず、タンパク質が検出され、安定な状態に保たれていると考えられる。既に第二章で明らかにしたように、休眠腋芽は細胞周期が G1 期で抑制されているが、G0 期と G1 期を区別する場合、PCNA タンパク質が存在しているか否かで判断することができるといわれている (Wilmot et al. 1997)。完全に展開した葉は、最も典型的な G0 期の組織とみなせるが、事実、葉からは PCNA タンパク質を検出することはできなかった (データは示さない)。このことから休眠腋芽の細胞周期が G1 期で抑制されていることを裏付けることができると考えられる。安定に存在できる機構としては、後述するように他のタンパク質と複合体を形成しているからかもしれない。さらに、休眠から成長への移行期には、PCNA mRNA の蓄積量が増加しても、PCNA タンパク質の蓄積量には変化がなく、一定量に維持されていた。また、第三章でも述べたが、PSRB1 も同様な変化を示し、休眠から成長への移行期に、PSRB1 mRNA の蓄積量が増加しても、PSRB1 タンパク質の蓄積量には変化がなく、一定量に維持されていた (図 17、18 参照)。このタンパク質を一定に保つ分子機構については現在のところ明確な解釈はないが、休眠が打破され細胞周期が回り出すと、PCNA も PSRB1 も活発に働きだし、おそらく、合成され、機能を果たすと分解されるというように、タンパク質の代謝回転が速くなり、蓄積しないために一定量に保たれるのではないだろうか。この点を明らかにするためには、それぞれの代謝回転がどのように変化するか調べる必要があり、今後の課題である。

抗 PSTAIRE 抗体は、34、35、37、39kDa のポリペプチドと反応した。Cdc2 は、現在までに研究された全ての系において、リン酸化を受けるタンパク質であることが明らかになっている (Morla et al. 1989)。従って、今回検出された多様性は、Cdc2 の異なるリン酸化状態に起因すると考えられる。また、別の可能性としては、抗 PSTAIRE 抗体は、Cdc2 の保存領域の配列 (Pro-Ser-Ala-Ile-Arg-Glu) を認識するため、エンドウの別の Cdc2 様タンパク質を検出している可能性もある。Cdc2 のホモログは多くの植物において単離され (例えば、Arabidopsis、トウモロコシ、イネ、ダイズ)、遺伝子

ファミリーを形成していることが明らかになってきた (Jacobs 1995)。エンドウにおいても、2種類の Cdc2 様タンパク質が既に報告されている (Feiler and Jacobs 1990、1991)。

エンドウの *CycB1* と *Arabidopsis* の *cyc1At* 遺伝子は、植物 cyclin の中で *CycB1* グループに分類される。*cyc1At* mRNA の発現は、有糸分裂活性と一致することが知られている (Ferreira et al. 18994) ので、*CycB1* の mRNA とタンパク質が休眠腋芽では検出されず、頂芽切除後の成長腋芽において、mRNA、タンパク質共に著しく増加したという結果は矛盾がない。

cyclin タンパク質は、その N 末端近傍に PEST 配列 (cyclin の場合、destruction box と呼ばれている) が存在しており、ユビキチン分解系を介して分解され、タンパク質の安定性が比較的低いことが知られている (Reed 1991)。しかし、最近、哺乳動物の cyclinE、CDK2、p27 で構成される複合体は、ユビキチン分解系のプロテオソームによって分解されず、単独では不安定な cyclinE も、複合体を形成している場合は細胞内で安定に存在することが報告された (Vlach et al. 1997)。エンドウの *CycD3* も、PEST 配列が存在するので、細胞内には比較的不安定な状態で存在すると考えられる。しかし今回、*CycD3* mRNA が検出されない休眠腋芽にも、*CycD3* タンパク質が存在していた (図 9、24)。これはおそらく、前述の哺乳動物の例のように、休眠腋芽中では、*CycD3* タンパク質が他のタンパク質 (少なくとも PCNA タンパク質) と結合することにより、分解が抑制されていると考えられ、同様な理由で PCNA タンパク質も mRNA が検出されないにも関わらず、安定に存在するのであろう。

PCNA の機能についても考えてみよう。PCNA mRNA は、S 期にその発現量が最大に達する。PCNA タンパク質は増殖細胞には存在するが、分裂していない細胞や最終的な分化が進んだ細胞には存在しない (Daidoji et al. 1992)。すなわち、DNA 複製活性と PCNA タンパク質とは密接な関係にある。一方、休眠腋芽では、DNA 複製は起きていない (Nagao and Rubinstein 1976) ことに加えて、第二章で前述したように、休眠腋芽の細胞の多くは細胞周期が G1 期において抑制されている。それにも関わらず、PCNA タンパク質が、休眠腋芽においても検出された (図 21)。この休眠腋芽に存在する PCNA は、本来の DNA polymerase δ の活性化補助因子として機能しているのでは

なく、細胞周期の制御機構に別の活性を有して機能する可能性が考えられる。近年、動物の PCNA が、多くのタンパク質と相互作用し、様々な細胞内の重要な現象に機能していることが報告されている (Jönsson and Hübscher 1997, Cox 1997)。例えば、細胞周期の制御、DNA 複製、核酸修復、複製後の修復、塩基置換の修復、アポトーシスの機構などが挙げられる。植物の PCNA も様々な機能を有し、細胞周期を調節することが考えられるが、具体的な知見はこれまでのところなく、今後の研究を待たなくてはならない。

抗 CycD3 抗体を用いて、エンドウ茎頂の粗タンパク質抽出液から、CycD3 タンパク質を検出することはできなかった。おそらく、この結果は、CycD3 タンパク質の細胞内での含量が低く、かつそれを検出するだけの抗体価が3種類の抗 CycD3 抗体になかったためと考えられる。しかし、抗 CycD3 抗体カラムを用いて、CycD3 タンパク質を濃縮した場合は、CycD3 タンパク質を検出することができた。このことにより、CycD3 が休眠腋芽にも成長腋芽にも存在することを示すことができた。

近年、Arabidopsis から yeast two-hybrid system を用いて、Cdc2 と相互作用するタンパク質として CKI がクローニングされた (Wang et al. 1997)。機能解析の結果、Cdc2 kinase 活性を阻害し、cyclin δ 3 と結合することが示された (Wang et al. 1997, 1998)。またヘテロな系であるが、ヒト p21 がエンドウ PCNA と結合することが示され、さらに p21 の結合領域を詳細に解析したところ、ヒト PCNA との結合に必要なとされている領域と同一であった (Ball and Lane 1996)。これらの知見に加え、本研究により、エンドウ PCNA と CycD3 が結合することも明らかになった。これらの結果はすべて、植物も動物も、G1 期における細胞周期の制御機構が類似することを示唆している。さらに、本研究では、抗体カラムクロマトグラフィーによる解析の結果、休眠腋芽に特異的に、PCNA と CycD3 が会合し、成長腋芽ではこの複合体が解離していることが明らかになった。従って、エンドウにおける腋芽の休眠と成長の細胞周期の調節機構は、動物における外部環境や発生分化のプログラムに応答した細胞周期の調節機構と類似しており、このことは CycD3/PCNA、さらには未同定の CDK、CKI をも含めた複合体の会合、解離が腋芽の細胞周期制御の重要な機構であることを強く示唆している。

第五章

総合考察

本研究は、腋芽の細胞周期の制御機構の解析に基づき、頂芽優勢の分子機構を明らかにすることを目的としている。頂芽が無傷の状態の時には、腋芽は成長せずに休眠しているが、頂芽が切除されることにより、腋芽は細胞伸長と細胞分裂を伴って成長を開始する。細胞分裂は細胞周期に従って進行し、細胞周期は多くの制御タンパク質によって調節を受ける。従って、頂芽切除に伴う細胞周期の制御タンパク質群の挙動を解析することにより、頂芽から受け取る腋芽細胞の分裂抑制機構と、頂芽切除による分裂抑制の解除機構を明らかにすることができると考えた。本研究はこのように、これまで行われてきた植物ホルモンを介した解析と異なる観点から、頂芽優勢の分子機構の解明を目指すものである。また、植物の細胞周期という点から見ても、発生分化のプログラムや環境要因に応答した細胞周期の調節機構の解明を目指すものであり、従来の同調培養細胞を扱った研究とは一線を画するものである。

アラスカエンドウを用いた解析の結果、以下の点を明らかにすることができた。

1. 休眠中の腋芽の細胞周期は、G1期で抑制されており、頂芽切除後、多くの腋芽細胞の細胞周期が同時に進行する。
2. 動物で細胞周期を抑制する機能が知られているRBタンパク質のエンドウホモログ(PSRB1)を単離した。
3. PSRB1は腋芽が休眠から成長に移行する際に直ちにリン酸化されるが、タンパク質量は一定量に維持され、リン酸化状態のみが変化する。
4. 休眠腋芽ではPCNAとCycD3とは複合体を形成しているが、成長腋芽では、PCNA/CycD3複合体が解離している。

これらの結果をもとに、腋芽の細胞周期の調節機構から、頂芽優勢の分子機構に関して考察する。

まず第一に、植物ホルモンと細胞周期の関連について考えてみたい。植物ホルモンが、植物の形態形成や、生育過程での生理的変化や環境応答反応を調節していること

は、過去多くの研究から明らかである。頂芽優勢に関しても、腋芽の成長は、頂芽から供給されるオーキシンによる成長抑制作用と、根から供給されるサイトカイニンによる成長促進作用とのバランスによって調節されると考えられている (Ali and Fletcher 1970、Tamas 1995)。そこで、細胞周期関連遺伝子である PCNA を用いて、植物ホルモンと細胞周期から見た頂芽優勢との関係を示す実験を行った。実験は、頂芽を除去する部位 (これまでのすべての実験は、第2節の上、1cm のところから頂芽部分を除去した。) を変化させ、頂芽切除後の腋芽における PCNA mRNA の発現を解析した (図 25)。頂芽切除後、PCNA mRNA 量の増加が検出される時間は、切除部位が第1節から上部 1cm では2時間後、2cm では4時間後、4cm では6時間後であり、6cm では少なくとも6時間後まで、PCNA mRNA の顕著な増加は検出されなかった。すなわち、この結果は、頂芽切除の部位が、腋芽から2cm 離れると、PCNA mRNA の発現が2時間遅れることを示す。従来解析により、オーキシンの輸送速度は、1時間当たり約1cm といわれている (Dolan 1998) ので、図 25 の結果は、オーキシンの輸送と細胞周期に関連があることを示唆している。これはおそらく、頂芽切除により、頂芽から供給される成長抑制作用を有するオーキシンが、時間と共に腋芽において枯渇するため、腋芽の休眠が解除され、細胞周期が回りだしたと推測できる。言い換えるならば、オーキシンによって、腋芽の細胞周期が抑制され、オーキシンの減少によって、腋芽が休眠から成長へと移行する可能性が考えられる。

動物の cyclinD は、細胞分裂の開始シグナルと細胞周期の進行のスイッチとして働いていると見なすことができる。細胞が増殖シグナル (例えば、血清中の増殖因子) を受け取ると、直ちに cyclinD が誘導され、CDK との結合により CDK が活性型になる。活性型 CDK が下流の制御タンパク質をリン酸化することにより、細胞分裂の開始シグナルが伝達される。すなわち、cyclinD のタンパク質量によって、細胞増殖が調節されているといえる。最近、植物の cyclinD が、動物の cyclinD と同様の機能する有する可能性が報告された (Soni et al. 1995)。植物培養細胞を用いた実験では、*Arabidopsis* の cyclin δ 3 mRNA (CycD3 グループ) が、サイトカイニンの添加により誘導され、この誘導はオーキシンの添加により打ち消された。この結果は、腋芽の成長がオーキシンにより抑制され、サイトカイニンにより誘導されるという従来解析結

果と同様の傾向である。今後は、このような観点からの細胞周期の調節機構の解析により、植物ホルモン制御による頂芽優勢の分子機構が明らかになっていくことを期待したい。

RB 遺伝子は、retinoblastoma の原因遺伝子として単離され、G1 期で細胞周期を抑制する機能を有する。RB ノックアウトマウスを用いた解析や、RB 変異体を用いた解析により、RB family は、細胞周期の制御ばかりではなく、細胞の発生分化に大きく関与することが示された。単細胞の酵母と多細胞の動物との細胞周期の調節機構を比較すると、どちらも cyclin/CDK 複合体の働きにより細胞周期は調節されるが、酵母には RB タンパク質は存在しない。この点も、RB タンパク質の機能は、ただ単に G1 期の細胞周期の抑制というよりもむしろ、細胞分化と細胞周期との接点で働くことを強く示唆している。RB タンパク質は、脊椎動物、昆虫 (Du et al. 1996)、植物からも単離された。これらの RB タンパク質間のアミノ酸配列や、他のタンパク質 (例えば、cyclinD や、SV40 large-T antigen) との相互作用が保存されていることより、進化の過程において、RB タンパク質は共通の機能を保持していることが示唆された。第三章では、エンドウの RB ホモログを単離し、そのリン酸化状態により、腋芽の休眠と成長が調節されている可能性を示した。PSRB1 タンパク質は、休眠腋芽の細胞周期をただ抑制しているだけではなく、細胞の分化をも抑制している可能性がある。

第四章では、休眠腋芽に特異的に、CycD3/PCNA 複合体が検出され、成長腋芽では、この複合体は解離していた。その役割について考察したい。植物の PCNA は、細胞分裂開始のシグナルを受け取り、そのシグナルを細胞周期の進行へと伝達する役割を担っていることを示唆する結果が得られている (Nagar et al. 1995)。geminivirus tomato golden mosaic virus (TGMV) による細胞増殖の機構は、動物における DNA virus による細胞増殖の機構と同様であり、植物の RB タンパク質に TGMV 由来のタンパク質が結合することにより、細胞分裂が開始する。一方、分化した葉には PCNA は存在しないが、TGMV が感染すると直ちに PCNA が誘導される。すなわち、細胞分裂に先立ち、細胞内に PCNA タンパク質が必要であることが示唆されている。また、前述したが、植物の cyclinD も細胞周期の進行に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。このように細胞分裂の初期の段階に必要とされる CycD3 や PCNA は、頂芽切除など

による細胞分裂の開始シグナルを受け取った後、素早く腋芽の細胞分裂が開始されるために、休眠腋芽中に予め準備されていると推測できる。

動物の CDK は、PSTAIRE 配列を有するグループ (Cdc2-type: 例えば、Cdc2) と PSTAIRE 配列を有さないグループ (non-Cdc2-type: 例えば、CDK4、CDK6) に分けられる。動物では、細胞周期が休止している細胞では、cyclinD は CDK や、p21 と結合しており (Xiong et al. 1992)、動物の cyclinD と結合する CDK は、non-Cdc2-type の CDK4 や CDK6 である。これらを考慮すると、休眠腋芽中の CycD3 も PCNA とだけではなく、そのパートナーである CDK とも結合していることが推測される。第四章では、Cdc2-type の CDK を認識する抗 PSTAIRE 抗体を用いた解析により、休眠腋芽のタンパク質抽出液中には、Cdc2 は存在せず (図 20)、さらに、抗 CycD3 抗体カラムを用いた解析により、休眠腋芽内の CycD3/PCNA 複合体には Cdc2 が含まれていないことが明らかになった (図 24)。一方、上述の動物での例を考慮すると、休眠腋芽内の CycD3/PCNA 複合体に、CDK が含まれていないのではなく、CycD3 と相互作用する CDK は、non-Cdc2-type であるため、抗 PSTAIRE 抗体では、CycD3/PCNA 複合体中の CDK を検出できなかったと推測できる。植物においても Cdc2-type の他に、non-Cdc2-type の CDK の存在が明らかになってきている (Fobert et al. 1996, Magyar et al. 1997)。今後、CycD3/PCNA 複合体に含まれる CDK に関しては、CycD3 を bait とした yeast two-hybrid system を用いることにより単離することができると思われる。

図 26 に、本研究により、得られた知見に基づき、細胞周期の制御機構を観点とする頂芽優勢の分子機構のモデルを示す。休眠、腋芽は細胞周期が G1 期で抑制されている。この時、PCNA と CycD3 とは複合体を形成し、各タンパク質は、不活性型である。一方、PSRB1 は、低リン酸化状態であり、転写因子と結合している。しかし、頂芽が切除されると、PCNA と CycD3 の複合体は解離し、各タンパク質は活性型になる。PCNA は、おそらく、DNA polymerase δ と結合し、DNA 複製が開始される。CycD3/CDK は PSRB1 をリン酸化し、その結果、PSRB1 から転写因子が解離し、S 期に特異的な転写が活性化される。このようにして、腋芽の細胞周期は、G1 期抑制から S 期へ進行していく。この仮定においては、PCNA/CycD3 及び、未同定の CDK、CKI 複合体の会合、解離が腋芽の細胞周期制御の鍵となっている。エンドウの休眠から成長への移

行の分子機構は、動物細胞で見られるような制御機構により調節されている可能性が、本研究により初めて明らかにされた。

今後は、休眠腋芽に特異的な複合体の未同定因子 CDK、CKI の単離や、さらに、この複合体が頂芽切除により、どのような細胞分裂の開始シグナルを受け取っているのかを明らかにしていくことにより、頂芽優勢の分子機構が解明されることが期待される。

(A)

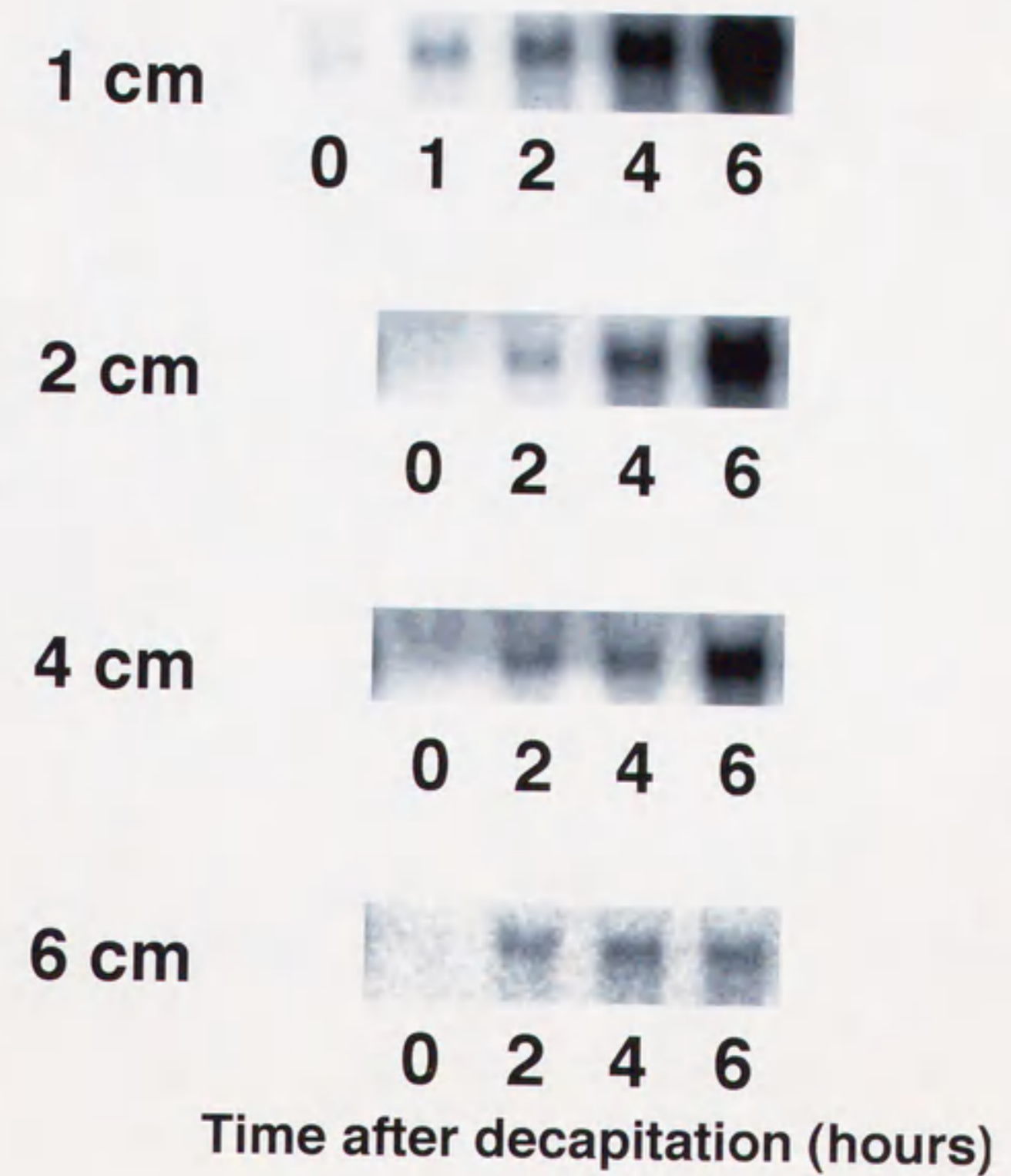
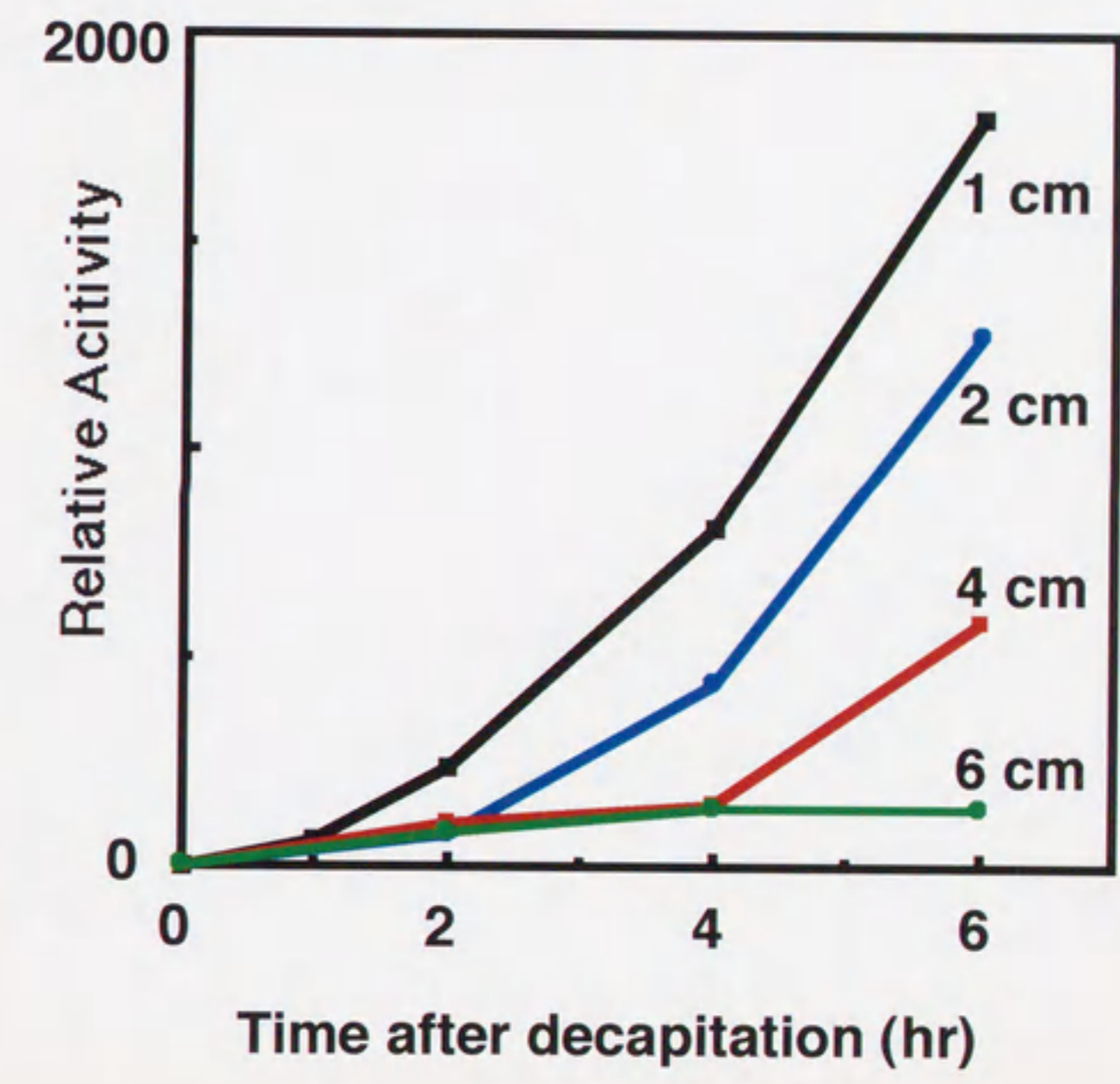


Figure. 25 Northern blot analyses of PCNA on decapitated pea plants with various internodes.

- (A) Terminal buds were removed at the indicated length from the axillary buds. Total RNA extracted from the axillary buds at the indicated times after decapitation. RNA (10 μ g) was electrophoresed on a 1% agarose gel, and blotted onto a Hybond N+ membrane. The membrane was probed with the PCNA cDNA.
- (B) The hybridization signal was quantified by a Fuji BAS2000 Imaging Analyzer.

(B)



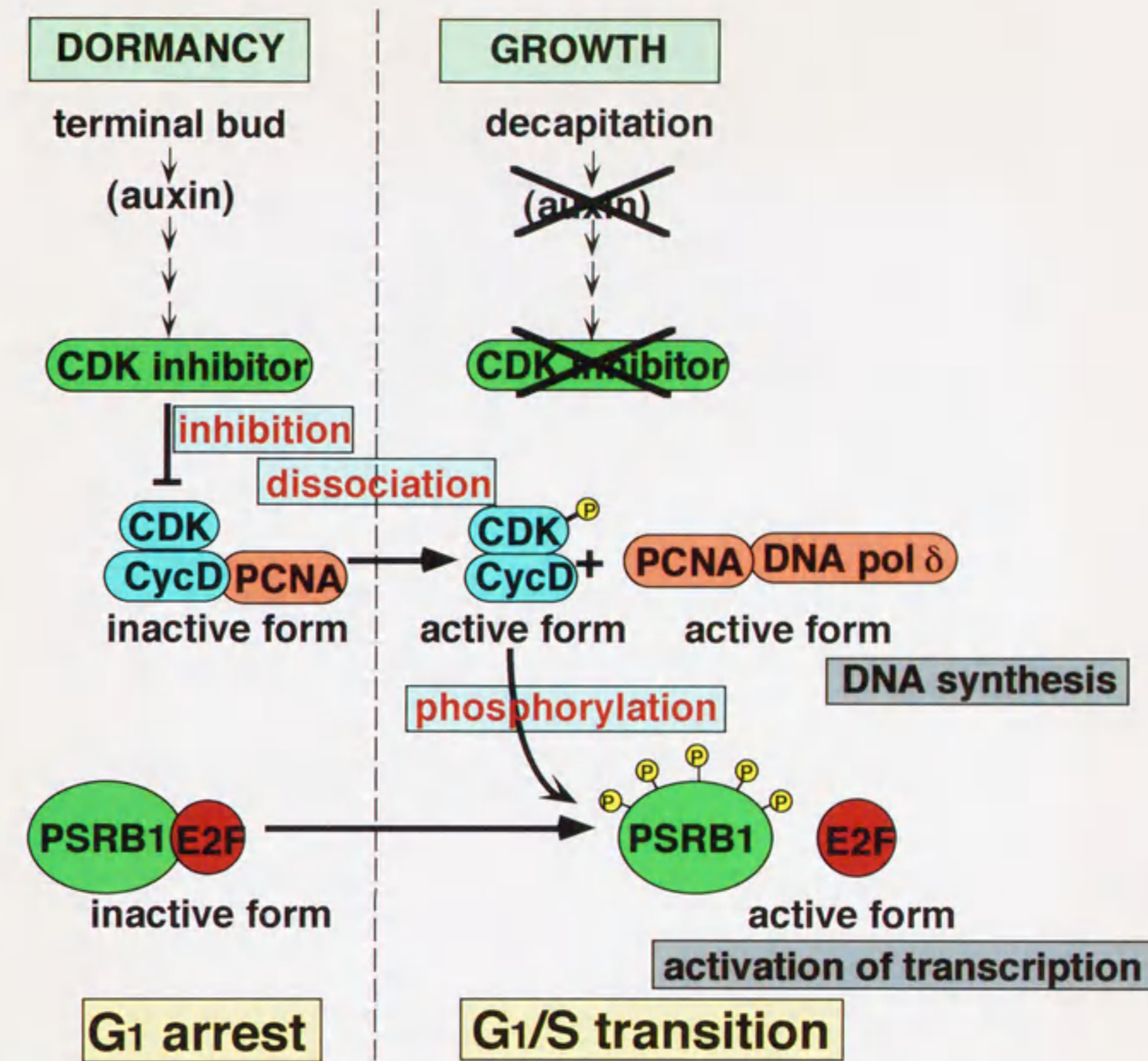


Figure. 26 Proposed model for involvement of the molecular mechanisms of cell cycle control that are involved in apical dominance. During dormancy, cells in axillary buds are arrested at the G1 phase in the cell cycle. At this time, the CycD3/PCNA complex is formed, and each factor is in an inactive form. Hypophosphorylated PSRB1 binds to the E2F protein. However, decapitation promotes the dissociation of the CycD3/PCNA complex, and the activation of each factor. PCNA probably interacts with DNA polymerase δ , and DNA replication begins. The CycD3/CDK complex phosphorylates PSRB1. PSRB1 releases the E2F protein, and the S-phase-specific transcription occurs. Therefore, the cells exit the G1 phase and enter the S phase, that is the state of the axillary buds transits from dormancy to growth.

参考文献

- Ach, R.A., Durfee, T., Miller, A.B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L., Zambryski, P.C., and Griesem, W.** (1997) *RRB1* and *RRB2* encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5077-5086.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.** (1994) *Molecular biology of the cell*, 4th ed. Garland Publishing, New York, NY.
- Ali A., and Fletcher, R.A.** (1970) Hormonal regulation of apical dominance in soybeans. *Can. J. Bot.* **48**, 1989-1994.
- Almendral, J.M., Huebsch, D., Blundell, P.A., MacDonald-Bravo, H., and Bravo, R.** (1987) Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: Homology with DNA-binding proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 1575-1579.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K.** (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Ball, K.L., and Lane, D.P.** (1996) Human and plant proliferating-cell nuclear antigen have a highly conserved binding site for the p53-inducible gene product p21^{WAF1}. *Eur. J. Biochem.* **237**, 854-861.
- Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J.** (1996) The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 805-814.
- Bernards, R., Schackleford, G.M., Gerber, M.R., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Scharf, M., Bogenmann, E., Rapaport, J.M., McGee, T., Dryja, T.P., and Weinberg, R.A.** (1989) Structure and expression of the murine retinoblastoma gene and characterization of its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6474-6478.
- Beveridge, C.A., Ross, J.J., and Murfet, I.C.** (1994) Branching mutant *rms-2* in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* **104**, 953-959.
- Beveridge, C.A., Murfet, I.C., Kerhoas, L., Sotta, B., Miginiac, E., and Rameau, C.** (1997) The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. *Plant J.* **11**, 339-345.

- Bögre, L., Ligterink, W., Meskiene, I., Barker, P.J., Heberle-Bors, E., Huskisson, N.S., and Hirt, H.** (1997) Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell* **9**, 75-83.
- Bravo, R., and Celis, J.E.** (1980) A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J. Cell Biol.* **84**, 795-802.
- Bravo, R., and MacDonald-Bravo, H.** (1985) Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO J.* **4**, 655-661.
- Chaudhury, A.M., Letham, S., Craig, S., and Dennis, E.S.** (1993) *amp1*-a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant J.* **4**, 907-916.
- Clarke, A.R., Maandag, E.R., van Roon, M., van der Lugt, N.M.T., van der Valk, M., Hooper, M.L., Berns, A., and te Riele, H.** (1992) Requirement for a functional *Rb-1* gene in murine development. *Nature* **359**, 328-330.
- Cline, M.G.** (1991) Apical dominance. *Bot. Rev.* **57**, 318-358.
- Cline, M.G.** (1994) The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiol. Plant.* **90**, 230-237.
- Cox, L.S.** (1997) Who binds wins: competition for PCNA rings out cell-cycle changes. *Trends Cell Biol.* **7**, 493-498.
- Dahl, M., Meskiene, I., Bögre, L., Cam Ha, D.T., Swoboda, I., Hubmann, R., Hirt, H., and Heberle-Bors, E.** (1995) The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. *Plant Cell* **7**, 1847-1857.
- Daidoji, H., Takasaki, Y., and Nakane, P.K.** (1992) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) in plant proliferating cells: immunohistochemical and quantitative analysis using autoantibody and murine monoclonal antibodies to PCNA. *Cell Biochem. Funct.* **10**, 123-132.
- Devitt, M.L., and Stafstrom, J.P.** (1995) Cell cycle regulation during growth-dormancy cycles in pea axillary buds. *Plant Mol. Biol.* **29**, 255-265.
- Doerner, P., Jørgensen, J.-E., You, R., Steppuhn, J., and Lamb, C.** (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**, 520-

- Dolan L.** (1998) Pointing roots in the right direction: the role of auxin transport in response to gravity. *Genes Dev.* **15**, 2091-2095.
- Du, W., Vidal, M., Xie, J.-E., and Dyson, N.** (1996) RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in *Drosophila*. *Genes Dev.* **10**, 1206-1218.
- Dyson, N.** (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**, 2245-2262.
- Ewen, M.E., Xing, Y., Lawrence, J.B., and Livingston, D.M.** (1991) Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* **66**, 1155-1164.
- Feiler, H.S., and Jacobs, T.W.** (1990) Cell division in higher plants: A *cdc2* gene, its 34-kDa product, and histone H1 kinase activity in pea. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 5397-5401.
- Feiler, H.S., and Jacobs, T.W.** (1991) Cloning of the pea *cdc2* homologue by efficient immunological screening of PCR products. *Plant Mol. Biol.* **17**, 321-333.
- Ferreira, P., Hemerly, A., Engler, J.D., Bergounioux, C., Bursens, S., Van Montagu, M., Engler, G., and Inzé, D.** (1994) Three discrete classes of *Arabidopsis* cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11313-11317.
- Fobert, P.R., Coen, E.S., Murphy, G.J.P., and Doonan, J.H.** (1994) Patterns of cell division revealed by transcriptional regulation of genes during the cell cycle in plants. *EMBO J.* **13**, 616-624.
- Fobert, P.R., Gaudin, V., Lunness, P., Coen, E.S., and Doonan, J.H.** (1996) Distinct classes of *cdc2*-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* **8**, 1465-1476.
- Fuerst, R.A.U.A., Soni, R., Murray, J.A.H., and Lindsey, K.** (1996) Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **112**, 1023-1033.
- Grafi, G., Burnett, R.J., Helentjaris, T., Larkins, B.A., DeCaprio, J.A., Sellers, W.R., and Kaelin, W.G.Jr.** (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: Involvement in endoreduplication.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 8962-8967.

- Hannon, G.J., Demetrick, D., and Beach, D.** (1993) Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins. *Genes Dev.* **7**, 2378-2391.
- Hashimoto, J., Hirabayashi, T., Hayano, Y., Hata, S., Ohashi, Y., Suzuka, I., Utsugi, T., Toh-E, A., and Kikuchi, Y.** (1992) Isolation and characterization of cDNA clones encoding *cdc2* homologues from *Oryza sativa*: a functional homologue and cognate variants. *Mol. Gen. Genet.* **233**, 10-16.
- Hata, S., Kouchi, H., Suzuka, I., and Ishii, T.** (1991) Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins. *EMBO J.* **10**, 2681-2688.
- Hemerly, A., Bergounioux, C., Montagu, M.V., Inzé, D., and Ferreira, P.** (1992) Genes regulating the plant cell cycle: Isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3295-3299.
- Hemerly, A., de Almeida Engler, J., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D., and Ferreira, P.** (1995) Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J.* **14**, 3925-3936.
- Hu, Q., Dyson, N., and Harlow, E.** (1990) The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T antigen are common sites for mutations. *EMBO J.* **9**, 1147-1155.
- Huang, S., Wang, N.-P., Tseng, B.Y., Lee, W.-H., and Lee, E.H.-H.P.** (1990) Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen. *EMBO J.* **9**, 1815-1822.
- Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Geenwood, J., Makker, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., Bannister, A.J., Kouzarides, T., Gutierrez, C., Doonan, J.H., and Murray, J.A.H.** (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.
- Ichihara, Y., and Kurosawa, Y.** (1993) Construction of new T vectors for direct cloning of PCR products. *Gene* **130**, 153-154.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A., and Weinberg, R.A.** (1992) Effects of an *Rb* mutation in the mouse. *Nature* **359**,

295-300.

Jacobs, T.W. (1995) Cell cycle control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 317-339.

Jacobs, T. (1997) Why do plant cells divide? *Plant Cell* **9**, 1021-1029.

Jønsson, Z.O., and Hübscher, U. (1997) Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *BioEssays* **19**, 967-975.

Kaye, F.J., Kratzke, R.A., Gerster, J.L., and Horowitz, J.M. (1990) A single amino acid substitution results in a retinoblastoma protein defective in phosphorylation and oncoprotein binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6922-6926.

King, R.W., Jackson, P.K., and Kirschner, M.W. (1994) Mitosis in transition. *Cell* **79**, 563-571.

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

Kouchi, H., Sekine, M., and Hata, S. (1995) Distinct classes of mitotic cyclins are differentially expressed in the soybean shoot apex during the cell cycle. *Plant Cell* **7**, 1143-1155.

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

Lincoln, C., Britton, J.H., and Estelle, M. (1990) Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 1071-1080.

Magyar, Z., Mészáros, T., Miskolczi, P., Deák, M., Fehér, A., Brown, S., Kondrosi, É., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bakó, L., Koncz, C., and Dudits, D. (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**, 223-235.

Martin, G.C. (1987) Apical dominance. *HortScience* **22**, 824-833.

Martinez, M.C., Jørgensen, J.-E., Lawton, M.A., Lamb, C.J., and Doerner, P.W. (1992) Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity

and cell proliferation during plant development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 7360-7364.

Matsuoka, S., Yamaguchi, M., and Matsukage, A. (1994) D-type cyclin-binding regions of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **269**, 11030-11036.

Medford, J.I., Horgan, R., El-Sawi, Z., and Klee, H.J. (1989) Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *Plant Cell* **1**, 403-413.

Meyerowitz, E.M. (1997) Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* **88**, 299-308.

Miao, G., Hong, Z., and Verma, D.P.S. (1993) Two functional soybean genes encoding p34^{cdc2} protein kinases are regulated by different plant developmental pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 943-947.

Miyachi, K., Fritzler, M.J., and Tan, E.M. (1978) Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.* **121**, 2228-2234.

Mori, H., Takeda-Yoshikawa, Y., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (1991) Pumpkin malate synthase: cloning and sequencing of the cDNA and Northern blot analysis. *Eur. J. Biochem.* **197**, 331-336.

Morla, A.O., Draetta, G., Beach, D., and Wang, J.Y.J. (1989) Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. *Cell* **58**, 193-203.

Nagao, M.A., and Rubinstein, B. (1976) Early events associated with lateral bud growth of *Pisum sativum* L. *Bot. Gaz.* **137**, 39-44.

Napoli, C. (1996) Highly branched phenotype of the *Petunia dad1-1* mutant is reversed by grafting. *Plant Physiol.* **111**, 27-37.

Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowdoin, L., and Robertson, D. (1995) A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* **7**, 705-719.

Naylor, J.M. (1958) Control of nuclear processes by auxin in axillary buds of *Tradescantia paludosa*. *Can. J. Bot.* **36**, 221-232.

Norbury, C., and Nurse, P. (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 441-470.

- Nurse, P.** (1994) Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* **79**, 547-550.
- Phillips, I.D.J.** (1975) Apical dominance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**, 341-367.
- Prelich, G., Tan, C., Kostura, M., Mathews, M.B., So, A.G., Downey, K.M., and Stillman, B.** (1987) Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature* **326**, 517-520.
- Reed, S.I.** (1991) G1-specific cyclins: In search of an S-phase-promoting factor. *Trends. Genet.* **7**, 95-99.
- Renaudin, J.-P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouzé, P., Sauter, M., Savouré, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V., and Murray, J.A.H.** (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol. Biol.* **32**, 1003-1018.
- Romano, C.P., Hein, M.B., and Klee, H.J.** (1991) Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes Dev.* **5**, 438-446.
- Rubinstein, B., and Nagao, M.A.** (1976) Lateral bud outgrowth and its control by the apex. *Bot. Rev.* **42**, 82-113.
- Sachs, T., and Thimann, K.V.** (1967) The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *Am. J. Bot.* **54**, 134-144.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 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.
- Schümperli, D.** (1986) Cell-cycle regulation of histone gene expression. *Cell* **45**, 471-472.
- Shen, B., Carneiro, N., Torres-Jerez, I., Stevenson, B., McCreery, T., Helentjaris, T., Baysdorfer, C., Almira, E., Ferl, R.J., Habben, J.E., Larkins, B.** (1994) Partial sequencing and mapping of clones from two maize cDNA libraries. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1085-1101.

- Sherr, C.J.** (1993) Mammalian G1-cyclins. *Cell* **73**, 1059-1065.
- Sherr, C.J.** (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**, 551-555.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M.** (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149-1163.
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H., and Murray, J.A.H.** (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.
- Stafstrom, J.P., and Sussex, I.M.** (1988) Patterns of protein synthesis in dormant and growing vegetative buds of pea. *Planta* **176**, 497-505.
- Staiger, C., and Doonan, J.** (1993) Cell division in plants. *Cur. Opin. Cell Biol.* **5**, 226-231.
- Suzuka, I., Daidoji, H., Matuoka, M., Kadowaki, K., Takasaki, Y., Nakane, P.K., and Moriuchi, T.** (1989) Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase δ auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 3189-3193.
- Tamas, I.A.** (1995) Hormonal regulation of apical dominance. In: Davies, P.J. (ed) Plant hormones. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 133-143.
- 立木美保 (1997) ACC 合成酵素アイソザイムに関する研究。名古屋大学大学院、農学研究科。修士論文。
- Tucker, D.J.** (1979) Apical dominance in the tomato: some further observations on isogenic lines showing varying degrees of side-shoot development. *Ann. Bot.* **43**, 571-577.
- Vaitukaitis, J.L.** (1981) Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injections. *Methods Enzymol.* **73**, 46-52.
- Vlach, J., Hennecke, S., and Amati, B.** (1997) Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.* **16**, 5334-5344.
- Wang, H., Fowke, L.C., and Crosby, W.L.** (1997) A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature* **386**, 451-452.

- 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.
- Wardlaw, L.F., and Mortimer, D.C.** (1970) Carbohydrate movement in pea plants in relation to axillary bud growth and vascular development. *Can. J. Bot.* **48**, 229-237.
- Weinberg, R.A.** (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H.S.** (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-813.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Hannon, G.J., and Gutiérrez, C.** (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* **15**, 4900-4908.
- Xiong, Y., Zhang, H., and Beach, D.** (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**, 505-514.
- Yeang, H.Y., and Hillman J.R.** (1981) Internodal extension in the first trifoliate leaf axillary bud of *Phaseolus vulgaris* L. following shoot decapitation. *Ann. Bot.* **48**, 25-32.

謝辞

本研究を遂行するにあたり終始親身な御指導と御鞭撻を頂きました森仁志先生に心から感謝いたします。また、終始適切な御助言、御指導を頂きました佐々木幸子先生、永野幸生先生、木崎暁子博士に厚く御礼を申し上げます。さらに、日常不断の御助言と激励を頂きました上口（田中）美弥子博士、円由香さん、立木美保さん、稲葉丈人さん、蒲田浩一郎さん、井戸富美子さんをはじめとする生化学制御の皆様我心から感謝いたします。最後に、いつも温かく見守ってくれた私の両親と佐藤豊博士に心から深く御礼を申し上げます。

主要論文目録

Sae Shimizu and Hitoshi Mori (1998) Analysis of cycles of dormancy and growth in pea axillary buds based on mRNA accumulation patterns of cell cycle-related genes. *Plant and Cell Physiology* **39**, 255-262.

Sae Shimizu and Hitoshi Mori (1998) Changes in protein interactions of cell cycle-related genes during the dormancy-to-growth transition in pea axillary buds. *Plant and Cell Physiology* in press.

Sae Shimizu and Hitoshi Mori (1998) *PSRB1* encodes a pea retinoblastoma-related protein that is phosphorylated in axillary buds during the dormancy-to-growth transition. submitted.