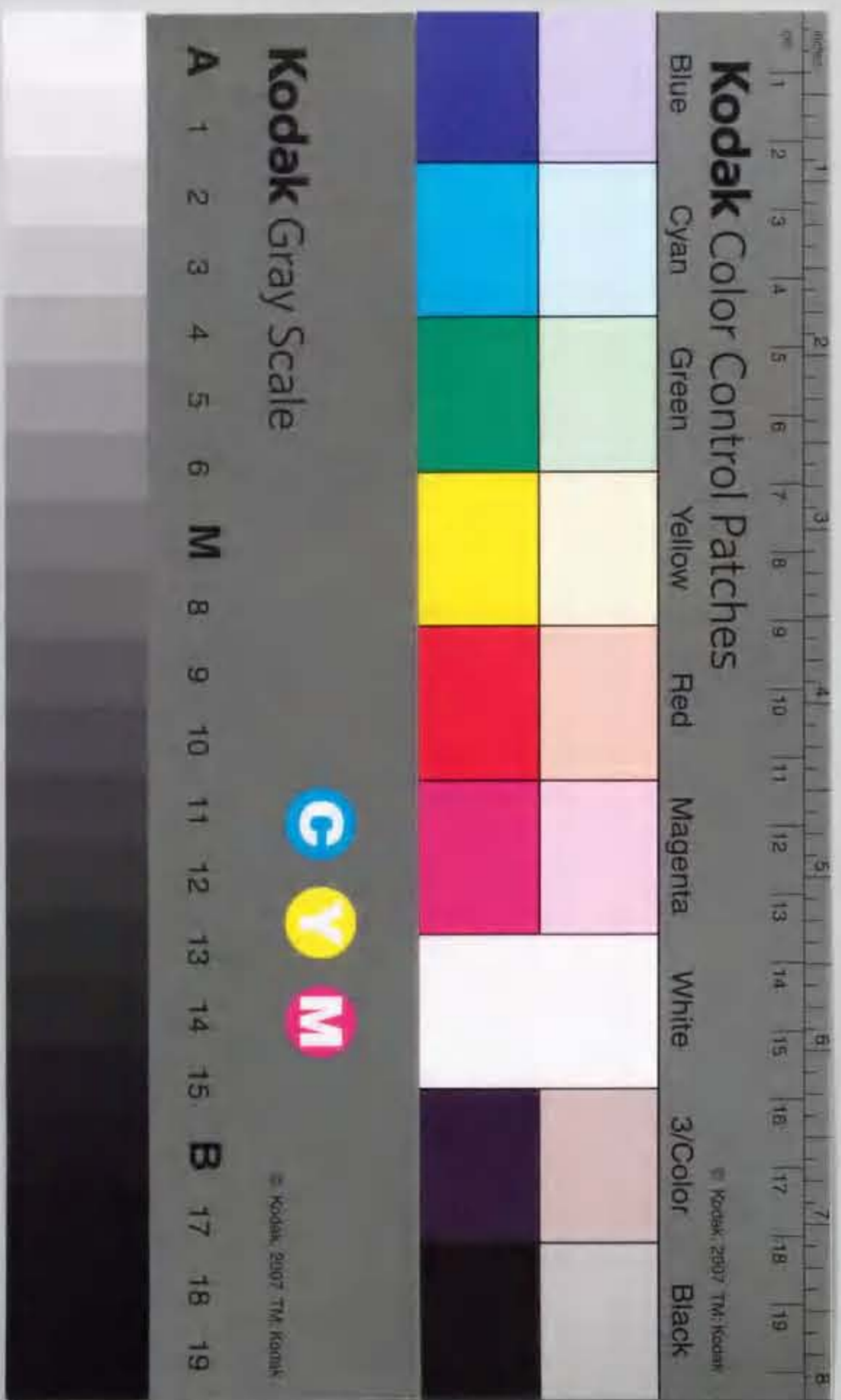


タバコのサイトカイニン結合蛋白質  
に関する研究

名古屋大学大学院理学研究科

(遺伝子実験施設)

三井真一



報告番号 甲第 2854 号

①

タバコのサイトカイニン結合蛋白質  
に関する研究

名古屋大学大学院理学研究科

(遺伝子実験施設)

三井 真一

## 目 次

	ページ
第一章 序 論 .....	5
第二章 実 験 方 法	
1. 材料と試薬 .....	17
2. 方法 .....	18
第三章 実 験 結 果	
第一節 タバコの葉緑体翻訳系に及ぼすサイトカイニンの影響 .....	27
第二節 タバコのサイトカイニン結合蛋白質複合体の精製と性質	
1. サイトカイニン結合蛋白質複合体の精製 .....	29
2. サイトカイニン結合蛋白質複合体の性質 .....	36
第三節 サイトカイニン結合蛋白質複合体の57 kDaサブユニットの 構造と発現	
1. 57 kDaサブユニットをコードする cDNAのクローン化と塩基配列の決定 .....	42
2. 57 kDaサブユニット遺伝子の構造 .....	45
3. 57 kDaサブユニットの推定構造 .....	47
4. サイトカイニン結合蛋白質複合体の S-アデノシル-L-ホモシステインヒドロラーゼ活性 .....	51
5. 57 kDaサブユニット遺伝子の発現レベル .....	53

第四章 考 察

1. 葉緑体の蛋白質合成に及ぼすサイトカイニンの影響 ..... 55

2. サイトカイニン結合蛋白質複合体  
    CBP130の精製と性質について ..... 56

3. 57 kDaサブユニットの構造について ..... 58

4. サイトカイニン結合蛋白質複合体CBP130の機能について --- 59

要 約 ..... 67

謝 辞 ..... 68

引用文献 ..... 69

省略記号

本論文に用いた省略記号は以下の通りである。

BA : Benzyl adenine

CBP : Cytokinin binding protein

CBB : Coomassie brilliant blue

BCIP : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

BSA : Bovine serum albumin

cdNA : Complementary DNA

DEAE : Diethylaminoethyl

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA : Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

HEPES : N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]

IPTG : Isopropyl- $\beta$ -thiogalactoside

LHCP : Light harvesting chlorophyll a/b binding protein

NBT : Nitro blue tetrazolium chloride

PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis

PBS : Phosphate buffered saline

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

PVDF : Polyvinylidenedifluoride

PVP : Polyvinylpyrrolidone

RubisCO : Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase

SAH : S-adenosyl-L-homocysteine

SAM : S-adenosyl-L-methionine

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SSC : Standard saline citrate

TBST : Tris buffered saline contained tween 20

TCA : Trichloroacetic acid

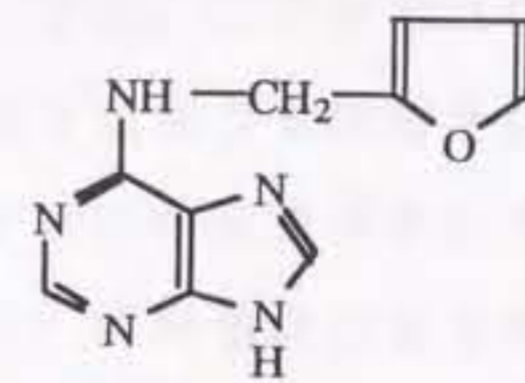
Tris : 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

植物ホルモンは、植物の生長と分化に深く関与していることが知られているが、その分子レベルでの作用機構、特に情報伝達における分子機構はほとんど明らかにされていない。植物ホルモンは、サイトカイニン、オーキシン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン、ブラシノステロイドの6種類がよく知られているが、これらが単独であるいは互いに協調してあらゆる組織に作用して様々な生理現象を引き起こす。このことは、数多くの情報伝達物質を持つ動物とは異なる情報伝達系が植物には存在する可能性を示している。

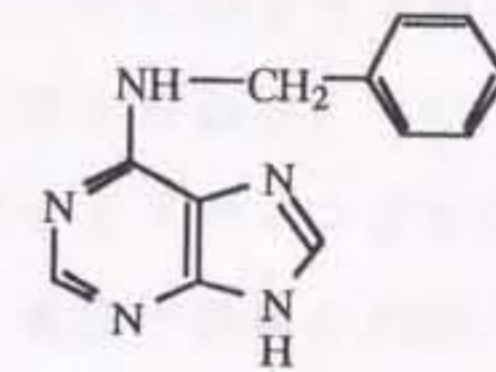
サイトカイニンは植物ホルモンの一種で、植物細胞の分裂を促進する物質として発見された。1955年、MillerらはDNAを高圧釜で処理することによりタバコの髓細胞の分裂を促進する物質を得ることに成功し、この物質をカイネチンと命名した。その後発見された一連のカイネチン様活性を持つ物質はサイトカイニンと名付けられた (Skoog et al., 1965)。1963年にLethamがトウモロコシ (*Zea mays*) の穀粒より単離したサイトカイニンをゼアチン (zeatin) と名付け、天然サイトカイニンの存在が確認された。その後、ゼアチンは様々な植物のあらゆる組織から発見され、その普遍性が確認された (Bearder, 1980 のレビュー参照)。

こうして発見されたサイトカイニンは、アデニンの6位の窒素に炭素骨格をもつ低分子物質であるが (図1)、1970年にSkoogとArmstrongはアデニン環を持たないジフェニルウレアや8-アザプリンにもサイトカイニン活性があることを示した。一般的にサイトカイニンの生物活性の測定はオーキシン含有培地上でのタバコの髓組織のカルス形成能を測定することにより行うが、彼らはサイトカイニンの構造と生物活性との関係について報告している。6位の窒素の側鎖の構造は生物活性を保持するうえで重要で炭素原子の数は5個が最適であり、二重結合が含まれているものが高い生物活性を示す。例えば、側鎖を持たないジヒドロキシゼアチンはゼアチンの1/10程度の活性しか持たないし、糖鎖のついたヌクレオシドになると活性が抑制される。また、ゼアチンの二重結合のステレオ異性体も重要でトランス型の方が強い活性を示す (Hall and Srivastava, 1968)。

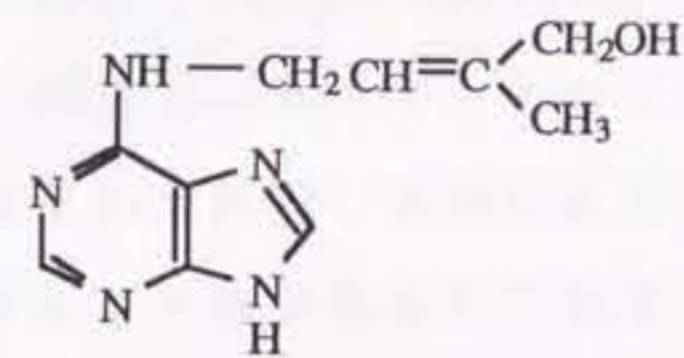




カイネチン



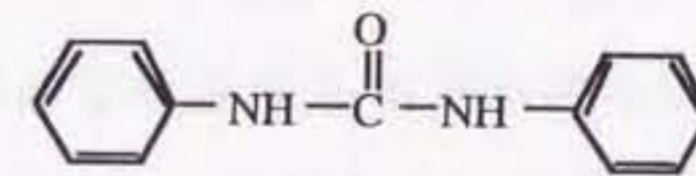
ベンジルアデニン



ゼアチン



イソペンテニルアデノシン



ジフェニルウレア

図1. サイトカイニンの構造

しかし、生物活性にはサイトカイニンの特定の置換基が必要なわけではなく、電荷、極性を含めた高次構造によって活性の強さが決まると考えられている (Skoog and Armstrong, 1970)。また、Skoogらは(1967)サイトカイニンの生物活性に及ぼす置換基の強さを調べ、ベンジル基>フルフリル基=フェニル基>シクロヘキシル基であると報告している。このように多様な側鎖構造を持つサイトカイニンが存在することから、この側鎖は直接レセプター等に結合するのではなく、サイトカイニンが作用する際の方向性を決めていると考えられる。

ゼアチンとその後発見された第二の天然サイトカイニンであるイソペンテニルアデノシンは、高等植物をはじめ哺乳動物、菌類や細菌のtRNA上に存在していることが明かにされた (Bearder, 1980 のレビュー参照)。特にシステイン、ロイシン、フェニルアラニン、セリン、トリプトファンおよびチロシンtRNAのアンチコドンに隣接して存在していた (Armstrong *et al.*, 1969; Peterkofsky and Jesensky, 1969)。このことから、サイトカイニンがtRNA機能を調節することによりその生物活性を示すという仮説が提唱された。しかし、このイソペンテニルアデノシンは、直接tRNA中に取り込まれるのではなく、既にtRNA中に存在しているアデニンがアルキル化されて生じることが示された (Chen and Hall, 1969)。従って、サイトカイニンがtRNAに作用してその生物活性を示すとは考えにくい。

サイトカイニンはオーキシン存在下で細胞分裂を促進する分子として見いだされ、核DNAの合成を促進する知見も得られているが (Houssa *et al.*, 1990; Momotani *et al.*, 1990)、そのほかにも様々な生物活性を持つことが明かにされている。サイトカイニン濃度がオーキシン濃度より高いと芽の形成が促進され、逆にオーキシン濃度の方が高くなると根の形成が誘導される (Skoog and Miller, 1957)。さらに、サイトカイニンは側芽の成長を促進するなど植物の形態形成に深く関与している (Zeroni and Hall, 1980; Davies, 1987; Kaminek, 1992)。

このようにサイトカイニンは多様な生理的役割を果たしているが、その作用機構を解析するためにサイトカイニンによってその発現が制御される蛋白質や遺伝子の同定が進められている。ChenとLeisnerは(1985)、切除したカボチャの子葉をベンジルアデニン(BA)処理した後、抽出した蛋白質を二次元展開して解析した結果、BA処理により発現が誘導される蛋白質と抑制される蛋白質とがあることを見いだした。また、彼らはBAの濃度依存的にヒドロキシビルビン酸還元酵素の発現が誘導さ

れてくると報告している。さらに、切除したカボチャの子葉をサイトカイニンで処理すると RNAポリメラーゼ I の活性が上昇し、rRNA の合成が促進されると報告されている (Ananiev *et al.*, 1987)。サイトカイニンにより発現誘導される遺伝子のクローン化も行われている。Memelink らは (1987)、アグロバクテリアのサイトカイニン合成酵素を導入し内性サイトカイニン量を増大させたタバコの組換え体を作成し、この植物体に特異的に発現量が増加する mRNA の cDNA をクローン化した。得られた 5 クローンの塩基配列から、4 クローンはイクステンシン (extensin)、キチナーゼ (chitinase)、PR-1、PR-1 様蛋白質といった植物の防御関連蛋白質をコードしていた。サイトカイニンを含まない培地で培養した正常なタバコの茎にカイネチンを添加するとこれらの mRNA の発現が促進された。培養細胞を用いてサイトカイニンにより発現調節される遺伝子の同定も試みられている。サイトカイニンを含まない培地でダイズの培養細胞を懸濁培養後、ゼアチンを添加することにより発現量が増加する mRNA の cDNA を探索したところ、ゼアチンを加えて 4 時間後までに 2~20 倍に発現量が増加した 20 クローンが単離された (Crowell *et al.*, 1990)。これらのほとんどは今までに発表されている塩基配列とは相同性を示さないが、オーキシンの添加によっても発現が誘導されることやダイズの植物体では主に分裂組織で発現されていることから、細胞分裂に必要な蛋白質をコードしていると思われる。実際にこれらのうちの 2 クローンは細胞分裂に必要な蛋白質を合成するのに必須であるリボソームの大サブユニットを構成する蛋白質をコードしていることが示されている。

サイトカイニンにより発現が誘導される遺伝子だけではなく、その発現が抑制されるものも報告されている。タバコの培養細胞ではオーキシン含有培地で培養すると 33 kDa の蛋白質が多量に合成されるが、これにサイトカイニンを添加するとその合成が抑制される (Eichholz *et al.*, 1983)。タバコの培養細胞ではサイトカイニンあるいはオーキシン単独存在下で細菌などの感染に対する防御に関与している酵素であるキチナーゼ (endochitinase) やグルカナーゼ (endo-1,3- $\beta$ -glucanase) の発現が促進されるが、両者が存在するとこれらの発現が著しく抑制される。タバコの植物体ではキチナーゼは根で最も多量に発現しており、茎の先端に向かうにつれて発現量が低下することから、根で合成されるサイトカイニンと茎頂で合成されるオーキシンの濃度勾配のバランスによりキチナーゼの発現が調節されているらしい (Shinshi *et al.*, 1987)。

サイトカイニンには葉に作用してクロロフィル合成を促進して葉緑体の発達を促進し (Sugiura, 1963; Seyer and Lescure, 1984; Davies, 1987)、また、葉緑体におけるクロロフィルの分解を抑制することにより葉の老化を抑制することが知られている (Goldthwaite, 1987)。蛋白質合成については、サイトカイニンは切除したタバコの葉に見られる蛋白質合成能の低下を抑制することが古くから報告されている (Sugiura *et al.*, 1962)。近年になってサイトカイニンが発現誘導するいくつかの葉緑体蛋白質が同定された。Lerbs らは (1984)、キュウリの子葉を用いてリブローズニリン酸カルボキシラーゼ (RubisCo) 蛋白質及び大小それぞれのサブユニットをコードする mRNA の発現量が BA 処理により増加すると報告している。彼らはサイトカイニンによる RubisCo の蓄積はサブユニットの mRNA の転写促進による結果と結論している。タバコの培養細胞でも培地にカイネチンを添加することで RubisCo の小サブユニットやクロロフィル a/b 結合蛋白質 (LHCP) の mRNA が蓄積すると報告されている (Abdelghani *et al.*, 1991)。また、コケでもサイトカイニン処理による RubisCo の大サブユニットの mRNA の蓄積が報告されている (Reski *et al.*, 1991)。これらに対して、ウキクサでは暗所で培養した後 BA 含有培地で培養すると RubisCo や LHCP 蛋白質の合成が促進されるが、これらをコードする mRNA 量の変化が認められないことから、サイトカイニンによるこれらの蛋白質の発現調節は主に転写後の調節によるものと考えられている (Flores and Tobin, 1986, 1988)。これらの葉緑体蛋白質は光照射によっても発現誘導されるが、サイトカイニンはこの光による誘導を促進すると報告されている (Lerbs *et al.*, 1984; Flores and Tobin, 1986, 1988; Chen, 1989; Abdelghani *et al.*, 1991; Reski *et al.*, 1991)。このサイトカイニンと光による発現調節は葉緑体蛋白質だけでなく、オオムギでは硝酸還元酵素をコードする mRNA の転写がサイトカイニン処理と白色光照射により数倍に促進されると報告されている (Lu *et al.*, 1990)。しかし、これらの遺伝子のほとんどはサイトカイニン処理してから発現誘導されるまでの時間が数日間と長く、サイトカイニンによって直接引き起こされる応答反応である可能性は低いと考えられている。

動物ホルモンの作用機構と同様に植物ホルモンもレセプターを介して作用していると考えられる (Libbenga and Mennes, 1987; King, 1988; Chen, 1989)。植物ホルモンの作用機構を解明するうえでそのレセプターを同定することが重要で、その候補としてサイトカイニン結合蛋白質の単離・精製が行われている。現在までに最

もよく性質が調べられているサイトカイニン結合蛋白質はコムギ種子より単離されたCBF-1である (Fox and Erion, 1975)。CBF-1は、 $K_d = 5 \times 10^{-7}$  MとBAに対して高親和性を示すサイトカイニン結合蛋白質としてコムギ胚から単離され、コムギ胚の80Sリボソーム1分子当りに1分子のCBF-1が結合することが示された (Erion and Fox, 1981)。その後、Brinegarらが (1985)、コムギの胚乳からもCBF-1を単離し、54 kDaの蛋白質の3量体であることを示した。また、彼らは抗CBF-1抗体を製作してコムギ種子の成熟過程から発芽の過程におけるCBF-1の消長を解析した。その結果、CBF-1は受粉後2~3週目にかけて急激に合成され4週目には合成が終了することや発芽の過程では1日目より急激に分解され3日目にはほぼ消失することを明らかにした。このようなCBF-1の発現パターンとCBF-1はコムギ胚中の可溶性蛋白質の9%と多量に存在していることから、彼らは、CBF-1はコムギ種子中の貯蔵蛋白質で完熟種子中にサイトカイニンを保持する役割を果たしていると結論した。さらに、Brinegarらは (1988)、フォトアフィニティーラベル法を応用してCBF-1のサイトカイニン結合部位のアミノ酸配列を決定した。彼らは、2-azido- $N^6$ -[ $^{14}C$ ]BAを合成し、これを基質としてCBF-1と反応させた後、紫外線照射によって[ $^{14}C$ ]BAをCBF-1上に固定した。このCBF-1をトリプシンとプロテアーゼV8により消化して生じるペプチドのうち[ $^{14}C$ ]BAでラベルされたもののアミノ酸配列をエドマン分析法およびマススペクトル法を用いて決定した。その結果、[ $^{14}C$ ]BAはA-F-L-Q-P-S-H-H-D-A-D-Eの12残基からなるペプチドの8残基目のヒスチジンに結合していることが示された。これはサイトカイニン結合部位のアミノ酸配列を決定した最初の報告であるが、上述のようにCBF-1はサイトカイニンレセプターではなく、CBF-1についての研究はその後ほとんどなされていない。また、他のグループによってもコムギ胚よりサイトカイニン結合蛋白質が単離されているが (Polya and Davis, 1978; Moore, 1979)、分子量やサイトカイニンに対する $K_d$ 値より、CBF-1と同一の蛋白質であると考えられている。

双子葉植物ではタバコ (*Nicotiana tabacum* var. Bright Yellow) を用いてサイトカイニン結合蛋白質の研究が行われている。竹上と吉田は (1975)、タバコの緑葉からサイトカイニン結合蛋白質をBA結合セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。この蛋白質は分子量4,000で、アミノ酸分析の結果から35残基からなるペプチドであることが示された (Yoshida and Takegami,

1977)。このサイトカイニン結合蛋白質のBAに対するKd値は $4 \times 10^{-6}$  M とさほど低くないが、リボソームの40Sサブユニットに特異的に結合する性質が注目される (Takegami and Yoshida, 1977)。40Sサブユニットへの結合は $10^{-6}$  M BAの存在下で約3倍促進され、至適条件下で40Sサブユニット1分子当りに2~3分子のサイトカイニン結合蛋白質が結合する。この蛋白質に関する研究はその後行われていないが、最近タバコの緑葉から別のサイトカイニン結合蛋白質がゼアチンを結合したセファロースを用いて精製された (Momotani and Tsuji, 1992)。この蛋白質は、分子量31,000でBAに対するKd値が $1.1 \times 10^{-7}$  M とさきの蛋白質とは異なるものである。また、彼らは分子量の異なるもう一つのサイトカイニン結合蛋白質の存在も確認しており、タバコの緑葉中にはサイトカイニン結合蛋白質が数種類存在していると考えられる。

また、タバコの培養細胞からもいくつかのサイトカイニン結合蛋白質が精製されている。Chenらは (1980)、タバコ培養細胞の抽出液をイソペンテニルアデノシンを結合させたセファロースカラムにかけることにより、分子量123,000と8,500の2種類のサイトカイニン結合蛋白質を精製した。彼らは、低分子量のサイトカイニン結合蛋白質について解析を行い、この蛋白質はサイトカイニン結合部位を2ヶ所持ち、それぞれのKd値は $8.8 \times 10^{-8}$  M、 $3.2 \times 10^{-6}$  Mであると報告している。一方、Hamaguchiらは (1985)、蛍光で標識された抗サイトカイニン剤に対する結合能を指標にしてタバコの培養細胞から2種類のサイトカイニン結合蛋白質を単離した。各蛋白質の分子量は32,000及び9,400 でそれぞれCBPI、CBPIIと名付けられた。CBPI、CBPIIのカイネチンに対するKd値はそれぞれ $2.0 \times 10^{-8}$  M、 $1.2 \times 10^{-6}$  M と算出されている。残念ながら、これらのサイトカイニン結合蛋白質に関する続報は出されておらず、その生理的機能は不明のままである。

先に述べた報告の多くはサイトカイニンを結合させたアフィニティーカラムを用いてサイトカイニン結合蛋白質の精製が行われているが、抗体を用いてサイトカイニン結合蛋白質を単離した報告もなされている (Kulaeva *et al.*, 1990)。彼らは抗BA抗体に対する抗イデオタイプ抗体を作製し、この抗体を結合させた抗体カラムにオオムギの子葉の抽出液を添加した。その結果、28-30 kDa の蛋白質が特異的に結合し、この蛋白質は12,000倍まで精製された。この蛋白質を *in vitro* のrRNA転写系に添加するとBA存在下でrRNA合成が約2.5倍促進されたことから、このサイトカ

イニン結合蛋白質はレセプターとして機能している可能性が示唆されている。

また、Romanov らは(1990)、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過及び疎水性カラムクロマトグラフィーを行ってトウモロコシの子葉から45 kDaのサイトカイニン結合蛋白質を精製している。この蛋白質はサイトカイニン結合部位を2ヶ所持ち、ゼアチンに対してそれぞれのKd値が $1.15 \times 10^{-8}$  M、 $2.4 \times 10^{-7}$  Mと高親和性を示す。この蛋白質のゼアチンへの結合がATP やアデニンによって阻害される点が他のサイトカイニン結合蛋白質と異なっている。

このようにサイトカイニン結合蛋白質に関する研究は、各植物からサイトカイニン結合蛋白質を単離・精製して、その結合特性について解析するにとどまっておき、一次構造の解析もCBF-1のサイトカイニン結合部位についての報告以外はなされていない。従って、現在までに報告されているサイトカイニン結合蛋白質の機能については結合特性に関するデータのみで類推している状況である。また、各サイトカイニン結合蛋白質を比較検討するには、その分子量とサイトカイニンに対する結合特性を主に比較することになる。しかしながら、各蛋白質の結合特性を測定している *in vitro* の条件はまちまちで、結合特性のみから生理的役割を推察することは困難であり、各蛋白質を単純に比較できるものではない。仮にサイトカイニン結合蛋白質の一次構造が明らかになれば、その機能を類推したり他のサイトカイニン結合蛋白質の構造との比較解析することが可能となる。さらに、サイトカイニン結合蛋白質のcDNAをクローン化することができれば、組換え植物体を作成するなどして *in vivo* で機能解析が可能となる。こうしたことから、分子生物学的手法を用いてサイトカイニン結合蛋白質のcDNAをクローン化し、その構造を解析することによってサイトカイニン結合蛋白質に関する研究、さらにはサイトカイニンの作用機構に関する研究が大きく進展すると期待される。また、先に述べたようにサイトカイニンは葉緑体蛋白質の合成やクロロフィル合成を調節しているため、サイトカイニンの作用機構を研究することにより細胞質と葉緑体との相互作用を理解するきっかけとなる考えられる。このようにサイトカイニン結合蛋白質の構造を解析する意義は極めて大きいと考え、本研究を行うことにした。

本研究の第一の目的はサイトカイニン結合蛋白質の構造を明らかにすることにあるが、本研究によって細胞質と葉緑体との相互作用に関する理解が深まることが期待できる。よって、当研究室で葉緑体ゲノムの全配列を決定し、RNAの転写地図が詳細に作製されているタバコ (*Nicotiana tabacum* 及び *Nicotiana glauca*) の緑葉を材料として用いた。本研究では、単離した無傷葉緑体を用いた *in organello* 翻訳系を用いてタバコの緑葉をサイトカイニン処理することにより葉緑体の蛋白質合成能の低下が抑制されることを再確認した後、サイトカイニンレセプターの候補としてサイトカイニン結合蛋白質複合体の精製を行った。上述したように既にタバコの緑葉から数種類のサイトカイニン結合蛋白質が単離されているが、いずれもサイトカイニンを結合したアフィニティーカラムを用いているので本研究ではアフィニティーカラムを用いずにサイトカイニン結合蛋白質を単離することにした。さらに、単離したサイトカイニン結合蛋白質のサブユニットである57 kDaのサブユニットをコードするcDNAを単離して一次構造を決定し、この構造および発現形式からこの蛋白質の機能について考察したものである。

タバコの緑葉より調製した無傷葉緑体をサイトカイニン処理した後、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンを含む緩衝液中で *in organello* 翻訳を行っても翻訳活性及び翻訳産物について変化は認められなかった。しかし、切除して一晩暗所に放置した葉より調製した無傷葉緑体を用いた場合に認められた翻訳能の低下がサイトカイニン処理によって抑制されることが示された。これらの結果は、サイトカイニンによる葉緑体への情報伝達には細胞質または細胞膜に存在するサイトカイニンレセプターが必要であることを示唆している。このサイトカイニンレセプターの候補として細胞質中に最も多量に存在するサイトカイニン結合活性について精製を行うことにした。

DEAEセルロースカラム、Mono Q、Phenyl Superose、Superose 12を用いたカラムクロマトグラフィーを行うことにより、タバコの緑葉の粗抽出液から130 kDaのサイトカイニン結合蛋白質複合体 (CBP130) を約700倍まで精製することができた。CBP130のBAに対する結合部位は2ヶ所存在し、そのKd値は $2.1 \times 10^{-6}$  M、 $1.6 \times 10^{-4}$  Mであった。また、CBP130のBAへの結合はアデニン、ATP やゼアチンによって阻害され、分子量等を考え合わせると今までに報告されていないサイトカイニン結合蛋白質であると考えられる。



CBP130をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) によって分析すると57 kDaと36 kDaの2種類のサブユニットから構成されていることが示された。57 kDaサブユニット (CBP57) に対する抗体を作製し、ゲル濾過での溶出パターンをウェスタンブロット分析法により解析した結果、CBP57とCBP130のサイトカニン結合活性の溶出パターンは一致した。これにより、CBP57がCBP130のサブユニットでサイトカニンとの結合に関与していることが確認されたので、CBP57をコードするcDNAのクローン化を行うことにした。cDNAのクローン化に必要なプローブを作製するために、CBP57のアミノ末端のアミノ酸配列の決定を試みたが、ブロックされており決定に至らなかった。そこで、CBP57をLysyl endopeptidaseで消化して生じるペプチドのアミノ酸配列を決定することにした。決定した3種類のペプチドのアミノ酸配列のうち1種類はヒト、ラット及び細胞性粘菌のS-アデノシル-L-ホモシステイン (SAH) ハイドロラーゼと有意な相同性を示したが、他の2種類については有意な相同性を示す蛋白質は見いだされなかった。

CBP57がタバコのSAHハイドロラーゼであるかを確認するために、SAHハイドロラーゼと相同性を示さなかったペプチドのアミノ酸配列をもとに合成したオリゴヌクレオチドをプローブとしてCBP57 cDNAをクローン化した。クローン化したcDNAは2種類存在したが、これらの塩基配列から推定されるアミノ酸配列はいずれも先に決定したペプチドのアミノ酸配列を含んでいた。よって、これらのcDNAはCBP57をコードしていることが確認され、それぞれがコードするポリペプチドをCBP57AおよびCBP57Bと名付けた。CBP57AとCBP57Bのアミノ酸配列を比較すると97%の相同性を示し異なる14残基のうち13残基が良く似たアミノ酸による置換であり、これを加えるとほぼ100%の相同性を示した。また、CBP57のアミノ酸配列にはコムギのサイトカニン結合蛋白質CBF-1のサイトカニン結合部位に見られるアミノ酸配列は認められず、CBP57はCBF-1とは異なる蛋白質であることが示唆された。

CBP57Aのアミノ酸配列を用いて蛋白質データベースを検索したところ、ヒト、ラット、細胞性粘菌のSAHハイドロラーゼと高い相同性を示したが (58%、58%、56%)、その他には有意な相同性を示す蛋白質は認められなかった。SAHハイドロラーゼはSAHの濃度を調節することにより各種のメチル基転移反応を調節していると考えられている。しかし、これらのSAHハイドロラーゼのアミノ酸配列と比較すると、CBP57には41アミノ酸からなる特有の配列が挿入されていた。最近cDNAと遺伝子が

クローン化されたバセリと *Rhodobacter* の SAH 水素化酵素にはこの挿入配列が存在することから (Kawalleck *et al.*, 1992; Sganga *et al.*, 1992)、この配列は光合成生物に特有な配列と考えられる。また、CBP57 には SAH 水素化酵素活性に必要な 2 箇所のシステイン残基が保存されているほか (Gomi *et al.*, 1986)、NAD<sup>+</sup> 結合部位に見られる G-X-G-X-X-G 配列も保存されていた (Wierenga and Hol, 1983)。

SAH 水素化酵素活性の保持に重要なアミノ酸残基が保存されていることから、CBP57 は実際にこの酵素活性を持つと予想される。そこで、精製した CBP130 を用いてサブユニットである CBP57 の酵素活性について検討した。ゲル濾過により分離した画分に含まれる SAH 水素化酵素活性を測定したところ、サイトカイニン結合活性が存在する画分にのみ酵素活性が検出された。また、CBP57 がこの画分にのみ存在していることがウェスタンブロット分析法により示されたが、CBP130 複合体を形成しているときより CBP57 が単体で存在している時の方が高い比活性を持つと示唆された。これらのことからサイトカイニンは CBP57 の持つ SAH 水素化酵素活性を調節していると考えられる。

SAH 水素化酵素は SAH をアデノシンとホモシステインに可逆的に分解する酵素として知られている。また、SAH は、S-アデノシルメチオニン (SAM) を基質とするメチル基転移反応の反応産物でこの反応を拮抗的に阻害する。このことから、この酵素は細胞内の SAM と SAH の濃度比 (SAM/SAH) を変化させることによって各種のメチル化を調節していると考えられている (Hohman *et al.*, 1985)。*Rhodobacter* の SAH 水素化酵素遺伝子を不活化すると SAM/SAH が変化してメチル基転移反応が阻害されてバクテリオクロフィル合成が抑制されると報告されている (Sganga *et al.*, 1992)。高等植物ではクロフィル合成系のメチル基転移反応は葉緑体内で行われており、上述したようにサイトカイニンが葉緑体におけるクロフィル合成を促進することを考え合わせると興味深い。すなわち、サイトカイニンは CBP130 に結合してそのサブユニットである CBP57 の SAH 水素化酵素活性を調節することにより細胞内の SAM/SAH を変化させ、結果として葉緑体内のクロフィル合成を調節している可能性が示唆される。

また、高等植物で DNA のメチル化が遺伝子発現の調節に関与しているという報告や (Weber *et al.*, 1990; Girod and Zryd, 1991; Sorensen, 1992)、メチル化されている葉緑体蛋白質について報告がなされている (Niemi *et al.*, 1990)。その

中には *rbcL* などサイトカイニンによって発現調節されている遺伝子も含まれている (Reski *et al.*, 1991)。上述したようにサイトカイニンは様々な遺伝子の発現を調節しているが、これらはサイトカイニン処理後一定の時間が必要で即時的な反応ではないことから、サイトカイニンによるメチル化/脱メチル化を介した間接的な発現調節を示唆している。

以上のように本研究は、タバコの緑葉より精製したサイトカイニン結合蛋白質複合体のサブユニットの一次構造を明らかにすることにより、単離されたサイトカイニン結合蛋白質複合体の生理的機能を推察したものである。本研究によって今まで単離・精製に終わっていたサイトカイニン結合蛋白質の研究や葉緑体と細胞質との相互作用について示唆的な結果を得られたことは意義深いと考える。しかしながら、CBP130のもう一つのサブユニットの構造解析やCBP130の生理的機能の検証など解決すべき課題は数多く残されている。また、タバコの緑葉に存在する他のサイトカイニン結合蛋白質の機能の解明などサイトカイニンの作用機構の解明にはより一層の研究が必要とされている。

## 1. 材料と試薬

In organello翻訳に用いた葉緑体は、無傷葉緑体の調製が容易な Nicotiana tabacum (var. Bright Yellow 4)の葉の長さが10 cm 以下の若い葉を用い、サイトカイニン結合蛋白質の精製及びcDNAの解析には二倍体である Nicotiana glauca の葉の長さ20 cm以下の新鮮葉を用いた。いずれの植物体も温室または植物育成器で栽培したものを用いた。

試薬類は、和光純薬工業、半井化学薬品、あるいはシグマ社製の特級および生化学用の純度のものを使用した。DEAE Cellulose (DE52) はワットマン社のものを使用し、パーコール、Mono Q HR 5/5、Phenyl Superose HR 5/5、Superose 12 HR 10/30、Sephadex G-25 はファルマシア社より購入した。Lysyl endopeptidaseは和光純薬工業のものを用いた。制限酵素、その他の酵素類 (T4 DNA polymerase、DNA ligation kit、Taq polymerase、Exonuclease III、Mung bean nuclease、Klenow fragment、T4 polynucleotide kinase、Alkaline phosphatase) は宝酒造、東洋紡、ベーリンガーマンハイム社より購入した。Sequenase Ver.2はU. S. Biochemical社のもを東洋紡より購入した。アイソトープ標識化合物は、アマシャムジャパン社より購入した。

サイトカイニン類 (BA、ベンジルアデニンリボシド、ゼアチン、ゼアチンリボシド、カイネチン、イソペンテニルアデノシン) は和光純薬工業より購入し、0.1 M となるように1 N NaOHに溶解し、-20° Cで保存した。

## 2. 方法

### (1) *In organello* 翻訳

20枚程の切除したばかりのタバコの緑葉を100 mLの $10^{-4}$ M BAの入った200 mLのビーカーに立て暗所で18時間放置した。この緑葉より小保方の方法(1987)に従い無傷葉緑体を調製した。BA処理したタバコの葉を水道水で洗浄し、1 cm角程に刻んだ後、葉緑体抽出緩衝液(50 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 0.3 M Mannitol, 2 mM EDTA, 5 mM 2-Mercaptoethanol)中で、ポリトロン(キネマティカ社)を用いて氷冷下で破碎した。破碎は葉緑体の破壊を最小限に抑えるためにフルスピードで5秒間の破碎を3回繰り返した。抽出液を4重のガーゼで濾過した後、 $3,000 \times g$ で1分間遠心して得られた沈澱を3 mLの上記緩衝液に懸濁し、これを34 mLの10~80%のパーコール密度勾配を形成した葉緑体抽出緩衝液に重層し、ブレーキをかけずに $8,000 \times g$ 、30分間遠心した。この遠心操作によって葉緑体は2本のバンドを形成するが、下層のバンドが無傷葉緑体なのでこれを回収した。これを50 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、0.32 M Mannitol、2 mM EDTAよりなる緩衝液で5倍ほどに希釈し、再度遠心沈澱させ無傷葉緑体として用いた。これを適量の翻訳緩衝液(50 mM HEPES-KOH, pH 8.3, 330 mM Sorbitol, 0.2 mM  $MgCl_2$ , 1 mM 2-Mercaptoethanol)に懸濁して663 nmの吸光度を測定し、あらかじめ作成しておいた検量線によりクロロフィル濃度を算出した。以上の操作はすべて $0^\circ C \sim 4^\circ C$ で行った。

50  $\mu g$ クロロフィル量の無傷葉緑体を150  $\mu L$ の翻訳緩衝液に懸濁し、無色透明の滅菌チューブに入れる。これに370 kBq [ $^{35}S$ ]-Methionine (50.6 TBq/ $\mu mol$ )を加えて蛍光灯の下10 cm、 $25^\circ C$ で時々攪拌しながら反応させた。[ $^{35}S$ ]-Methionineの取り込みは40分間の反応で最大に達したので、以後の反応時間は40分とした。反応後、反応液の一部(10  $\mu L$ )を採取し、これを5 mLの20%TCAに添加し30分間氷冷した。これをガラスフィルターによって濾過しフィルターを完全に乾燥させた後、液体シンチレーションカウンターにより酸不溶性画分に取り込まれた標識メチオニン量を翻訳活性として測定し、SDS-PAGEによって翻訳産物を分析した。

## (2) サイトカイニン結合蛋白質の精製

以下の操作は、すべて  $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$  で行った。

*N. sylvestris* の新鮮葉 600 g に対し、1.8 L の抽出緩衝液 (75 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 20 mM 2-Mercaptoethanol, 100  $\mu\text{M}$  PMSF, 3.3 % (W/V) Polyclar AT) を加え、ポリトロンを用いてフルスピードで1分間程の処理により完全に破碎した。抽出液を4重のガーゼで濾過した濾液を10,000  $\times$  g で20分間遠心し、上清に80 %飽和となるように硫酸アンモニウムを加えて  $4^{\circ}\text{C}$  で1時間以上攪拌した。これを10,000  $\times$  g で20分間遠心して沈澱を回収した (硫酸沈澱)。

硫酸沈澱した蛋白質を100  $\mu\text{M}$  PMSFを含む適当量のDEAE緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 1 mM DTT) に溶解し、この緩衝液に対して透析した。この蛋白質溶液 (蛋白質量 3,000 mg) をDEAEセルロースカラム (2.5  $\times$  30 cm) に自然落下により添加し、60 mL/hrの流速でカラムの3倍容量のDEAE緩衝液で洗浄した後、0.1 M NaClを含むDEAE緩衝液を5倍容量流して溶出してくる画分を回収した。

この溶出液を硫酸沈澱しできるだけ少量のDEAE緩衝液に再度溶解し、脱塩用ミニカラム (Ampure<sup>TM</sup> SA、アマシャム社) を用いたゲル濾過によって脱塩した。これをポアサイズ0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過した後、1 mL/minの流速でMono Q HR 5/5カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーを行った。3 mLのDEAE緩衝液で洗浄し、さらに3 mLの0.1 M NaClを含むDEAE緩衝液で洗浄した後、15 mLで0.1~0.7 M NaClの直線的濃度勾配をかけて溶出を行った。溶出液は0.5 mLづつ分画し活性を含む画分 (フラクション番号32、33) を回収、硫酸沈澱した。DEAEセルロースカラムクロマトグラフィーにより得られた蛋白質量 (330 mg) に比してMono Q HR 5/5カラムは蛋白質の結合容量が小さい (20 mg) ののでこの操作は15回に分けて行った。

Mono Q画分の硫酸沈澱を1.5 M 硫酸アンモニウムを含むフェニル緩衝液 (50 mM リン酸緩衝液 pH6.2, 1 mM DTT) に溶解し、ポアサイズ0.45  $\mu\text{m}$  のニトロセルロースフィルターで濾過後、Phenyl Superose HR 5/5を用いたカラムクロマトグラフィーを行った。流速は0.5 mL/minとし7.5 mLの先の緩衝液で洗浄した後、5 mLで硫酸アンモニウム濃度を1.0 Mまで直線的に低下させ、その後さらに17.5 mLで1.0 ~ 0 Mに硫酸アンモニウム濃度を直線的勾配をかけることによって溶出を行った。硫酸アンモニウム濃度が1.0 Mまで蛋白質は溶出されてこなかったため、この後の溶

出液を1 mLずつ分画して活性をもつ画分（フラクション番号15~17）を回収し、キャリアーとして1.5 mgのダイズ・トリブシンインヒビターを加えて、硫酸沈澱した。

Phenyl Superoseカラムクロマトグラフィーによる画分の硫酸沈澱を100 mM NaClを含むDEAE緩衝液に溶解し、Superose 12 HR 10/30によるゲル濾過を行った。流速は0.3 mL/minとし0.6 mLずつ分画して活性画分（フラクション番号20）を最終精製標品とした。

なお、蛋白質の定量は、BSA 溶液を標準液としてBradford法(1976)を応用したバイオラッド社の蛋白質定量キットを用いて行った。

### (3) サイトカイニン結合活性の測定

サイトカイニン結合活性の測定は竹上と吉田の方法(1975)に従った。0.1~10 mgの蛋白質と 9.25 kBq [ $^{14}$ C]-BA (2.0 GBq/μmol, 3.7 MBq/mL)を1 mLのDEAE 緩衝液中で混合し、室温で2時間反応させた。反応後、Sephadex G-25によるゲル濾過を行い、遊離のBAを除去した。DEAE緩衝液中で膨潤させた4 mLのSephadex G-25をプラスチックピペットに充填した。プラスチックピペットは10 mLの使い捨てのものを用い、あらかじめ脱脂綿を先端に詰め半分に切って使用した。これに反応液を重層して自然落下で溶出し0.5 mLずつ分画した。排除体積に溶出される画分の放射活性をReady Cup (ベックマン社)を用いて液体シンチレーションカウンターで測定した。

スキッチャード分析を行う際は、精製した280 μg CBP130 に $9.25 \times 10^{-8}$ ~ $3.70 \times 10^{-4}$  M [ $^{14}$ C]-BA を加えて反応を行い、上記のように放射活性を測定し結合したBA量を算出した。

### (4) S-アデノシル-L-ホモシステインヒドロラーゼ活性の測定

S-アデノシル-L-ホモシステイン (S-adenosyl-L-homocysteine, SAH) ヒドロラーゼ活性の測定はPoultonとButtの方法(1976)に従い以下のようにおこなった。

(i) SAHシンターゼ活性

約100  $\mu\text{g}$ の蛋白質と4.63 kBq [ $^{14}\text{C}$ ]-Adenosine (1.85 GBq/ $\mu\text{mol}$ , 1.85 MBq/ $\mu\text{L}$ )、最終濃度10 mMのL-HomocysteineをDEAE緩衝液 50  $\mu\text{L}$ 中で混合し、37°Cで20分間、反応させた。50% TCAを10  $\mu\text{L}$ 加えて反応を停止し、氷上で30分間放置した。14,000 rpm、10分間の遠心で得られる上清のうち、5  $\mu\text{L}$ を長さ10 cmの薄層プレート (KODAK クロマトグラムシート microcrystalline cellulose absorbent with fluorescent indicator) の下端から1 cmの位置にスポットした。これをアセトン/蒸留水 = 5/2 を少量入れたスライドガラスの染色壺に立てかけ、蓋をして溶媒がプレートの上部に達するまで展開した。プレートを取り出し風乾した後、UV照射によって検出されるSAHのスポットを掻き取り含まれる放射活性を液体シンチレーションカウンターによって測定した。

(ii) SAHヒドロラーゼ活性

DEAE緩衝液中に、約100  $\mu\text{g}$ の蛋白質と0.19 kBq [ $^{14}\text{C}$ ]-SAH (3.7 MBq/ $\mu\text{mol}$ , 4.8 kBq/ $\mu\text{L}$ )を混和し、37°Cで30分間反応させた。反応後、シンターゼ活性と同様に薄層クロマトグラフィーで展開し、Adenosineのスポットに含まれる放射活性を測定した。

(5) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

蛋白質の電気泳動は Laemmli (1972) の方法を改変して行った。サンプルに2倍濃度のサンプルバッファー (1× : 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 3% SDS, 3% 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 0.002% Bromophenolblue) を等量加え沸騰水中で3分間加熱した。サンプルを0.1% SDSを含む12.5%ポリアクリルアミドゲル (厚さ1 mm、長さ約15 cm) にのせ、スタッキングゲル中は30 V、分離ゲル中は120 V でBromophenolblueがゲルの下端にくるまで泳動した。

また、酵素処理によって生じたペプチドの泳動は、7.5 M Urea、0.1% SDS を含む16~22%ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いて先と同様の条件で行った。

蛋白質を染色する場合は銀染色キット (第一化学工業) を用いて説明書に従って行い、PVDF膜にプロットする場合は方法(6)に従いただちに行った。サイズマー



カーはPhosphorylase b (94 kDa)、Albumin (67 kDa)、Ovalbumin (43 kDa)、Carbonic anhydrase (30 kDa)、Trypsin inhibitor (20 kDa)を使用した。または、Myoglobin I and II (14.6 kDa)、Myoglobin II (6.4 kDa)、Myoglobin III (2.6 kDa)を用いた。

#### (6) 蛋白質のプロットニング

使用したPVDF膜(イモビロン、ミリポア社)はMethanolに30秒程浸し、次にプロット用緩衝液(25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % Methanol, 0.05 % SDS)に浸し5分以上振盪し平衡化しておいた。泳動したゲルにPVDF膜を重ねて泳動槽(バイオラッド社)にセットする。泳動槽にプロット用緩衝液を満し4°C、60 Vで2時間泳動した後、膜をCoomassie brilliant blue (CBB)で染色し70 % Methanolで脱色した。アミノ酸配列の決定に用いる場合、膜は蒸留水で洗浄、風乾して使用するまで-20°Cで保存した。

#### (7) Lysyl endopeptidaseによる蛋白質の消化

PVDF膜にプロットしCBB染色した蛋白質のうち目的のバンドを切り出し、PVDF膜1 cm<sup>2</sup>当り0.2 mLの溶出液(50 mM Tris-HCl, pH9.5, 1 % Triton X-100, 2 % SDS)を加え、室温で30分間攪拌した。膜を取り出した後、溶出液に3倍量のアセトンを加え-20°Cに2時間以上放置した。これを13,000 × g, 20分間遠心して得られた沈澱(アセトン沈澱)を70 % Ethanolで洗浄し、乾固させた後、20 μLのLysyl endopeptidase緩衝液(10 mM Tris-HCl, pH9.0, 0.1 % SDS)に溶解した。CBB染色で染色される1バンド当りの蛋白質量を100 pmolとしてこれに1 pmol(30 ng, 酵素/基質 = 1/100 mol)のLysyl endopeptidaseを加え、30°Cで適当時間消化した。予備実験の結果、3時間の反応で産生されるペプチドが変化しなくなったが、ペプチドの回収率を少しでも上げるために反応時間は5時間とした。この反応産物を電気泳動、PVDF膜へプロットした後、一部をアミノ酸配列の決定に用いた。

#### (8) アミノ酸配列の決定

ペプチド末端のアミノ酸配列の決定は、Matsudaira (1987) の方法に従い、PVDF膜にプロットした蛋白質を気相プロテインシーケンサー (470A-120A、アプライドバイオシステムズ社) を用いて解析した。

#### (9) 抗CBP57抗体の作製、及びウェスタンブロット分析

SDS-PAGE後、PVDF膜にプロットしたCBP57を方法(7)に従いCBP57蛋白質を回収した。回収したCBP57を0.1% SDSを含む50 mM Tris-HCl, pH7.5に0.1~0.2 mg/mLとなるように溶解し抗原として用いた。免疫は、(株)医学生物学研究所(名古屋)に依頼し、ニュージーランド白ウサギを用いて1週間毎に10 µgのCBP57を4回投与することによって行われた。得られた抗血清からプロテインA結合カラム (Ampure™ SA column、アマシャム社) を用い説明書に従ってIg Gを精製した。およそ40 mgの血清蛋白質から7~9 mgのIg Gが得られた。さらにこのIg G画分を硫酸沈澱した後PBS緩衝液 (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 29 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) に溶解、透析した。これをPBS緩衝液で平衡化した1 mLのE. coliライセートカラム (5 Prime→3 Prime, Inc., ペンシルベニア) にかけて非吸着画分を回収し、抗CBP57抗体として用いた。5 mgのIg G画分より約3 mgの抗CBP57抗体が得られた。

抗CBP57抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った (Harlow and Lane, 1988)。蛋白質をプロットしたPVDF膜を1% BSAを含むTBST (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) に30分間浸して振盪した。これをTBSTで1 µg/mLに希釈した抗CBP57抗体に浸し振盪しながら30分間反応させた。次にTBSTで5分間の振盪洗浄を3回行った後、アマシャムの説明書に従って希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ウサギIg G抗体 (アマシャム社) と30分間反応させた。先程と同様の洗浄後、10 mLの発色液 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) に基質として66 µL Nitro blue tetrazolium chloride (NBT), 33 µL 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) を加え、これにPVDF膜を浸して発色を行った。

#### (10) 57 kDaサブユニットcDNAのクローン化

決定したアミノ酸配列に対応する合成オリゴヌクレオチドを合成し、T4 polynucleotide kinaseを用いて5'末端を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で標識してプローブとした。オリゴヌクレオチドはイノシン、GTウォブルを応用して出来るだけ種類が少なくなるように設計し、47 mer, 64 mix (5' TTI GTG TCI GGG AAI ACG CAI C(G/T)G TC I GT(T/C) TGI GG(T/C) TT(G/T) ATI GT(G/T) AT 3')のオリゴヌクレオチドをDNA合成機(381A、アプライドバイオシステムズ社)で合成した(図10)。

*N. sylvestris*の幼若体全体から調製したポリ(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型として $\lambda$ gt10をベクターとしたcDNAライブラリー(北海道大学、小保方博士より譲渡された)に対し、さきのプローブを用いてブランクハイブリダイゼーションを行った。直径84 mmのシャーレ20枚に6,000 pfu/plateとなるようにファージを撒き、37°Cで一晩保温した。形成してきたブランクをナイロンフィルター(Hybond-N、アマシャム社)に移し取り、変性液(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)に1~5分間、中和液(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.0)に5分間、2 × SSC(1 × : 0.15 M NaCl, 0.015 M Sodium citrate)に1~2分間浸した後風乾した。これをハイブリダイゼーションバッグに入れハイブリダイゼーション溶液(5 × SSPE(1 × : 0.18 M NaCl, 10mM Sodium phosphate, pH 7.7, 1 mM EDTA), 5 × デンハルト溶液(50 × : 1 % Ficoll, 1 % Polyvinylpyrrolidone (PVP), 1 % BSA), 0.5 % SDS)中で $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cpm/mLとなるようにプローブを加えて60°C、12時間反応させた後、60°C、5 × SSPE, 0.1 % SDSにて3回洗浄した。洗浄したフィルターを用いてオートラジオグラフィーを行って陽性のクローンを選別回収し、再びプレートに撒いて同様にブランクハイブリダイゼーションを行った。このブランクハイブリダイゼーションを3回行った結果、最終的に20個の陽性クローンを得ることができた。

#### (11) DNAの塩基配列の決定

Sambrookらに従い(1989)、得られたクローンをプラスミドにサブクローン化した後、塩基配列の決定を行った。 $\lambda$ gt 10中に挿入されたcDNAを制限酵素EcoRIで切り出し、pBluescript KS+にサブクローニングした。これをExonuclease IIIとMung

bean nucleaseを用いたデレーション法でデレーションミュータントを作製した後、一本鎖DNAを調製した。この一本鎖DNAの塩基配列をSequenase Ver.2 (United States Biochemical Co.)を用いたダイデオキシ・ターミネーション法によって決定した。決定した配列は、GENETYXソフトウェアプログラム(ソフトウェア開発株式会社)を用いてパーソナルコンピュータPC-98シリーズ(日本電気株式会社)上で解析した。

#### (12) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは、アマシャム社の説明書に従って行なった。

ノーザンブロットハイブリダイゼーションの場合、ホルムアミドを含む1.2%アガロースゲルで10  $\mu$ gのRNAを分画した。これを20  $\times$  SSCを用いてナイロンフィルター(Hybond-N、アマシャム社)にキャピラリーブロットした。

サザンブロットハイブリダイゼーションの場合は、制限酵素で切断した10  $\mu$ gのDNAを1%アガロースゲル電気泳動で分画し、変性液(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)に30分間浸し、中和液(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.2, 1 mM EDTA)に15分間づつ2回浸した後、ナイロンフィルターにブロットした。サイズマーカーとして $\lambda$  DNAを制限酵素SlyIで消化したものを用いた。

いずれの場合もプローブはTCB1のコード領域(ポジション475-1858)をランダムプライマー法で標識したもの(4  $\times$  10<sup>8</sup> cpm/ $\mu$ g)を用いて約1.0  $\times$  10<sup>6</sup> cpm/mLとなるように加えた。ハイブリダイゼーションは、5  $\times$  SSPE、5  $\times$  デンハルト溶液、0.5% SDS中で65°Cで12時間行なった。洗浄は、65°C、2  $\times$  SSC、0.1% SDSで行なった後、さらに室温で0.1  $\times$  SSC、0.1% SDSで行なった。

#### (13) 大腸菌によるタバコサイトカイニン結合蛋白質の発現

pBluescript KS+ にサブクローニングされたクローン(pBTCB1-1)から、コード領域を含む断片(ポジション475-1858)をPCR法で増幅した。プライマーとして5' CAT GGC TCT ATT AGT CGA GAA AAC CAC C 3'と5' CGC GAC AAT GTT GTT CTC CT C TGT 3'を用い、PCRの条件は94°C、1分、55°C、1分、72°C、1分を25サイ

クルとした。得られたDNA断片の5'末端をT4 polynucleotide kinaseによってリン酸化した。

プラスミドベクター pKK233-2 (Amann and Brosius, 1985) を制限酵素NcoIで切断し、Mung bean nucleaseによって平滑末端化した後、*E. coli* alkaline phosphataseにより5'末端を脱リン酸化した。このベクターに先の断片を連結しpKTCB-1を作製した。

pKTCB-1 によって形質転換した*E. coli* JM109株をアンピシリンを含む2 × YT培地で対数増殖期まで培養し、1 mMになるようにIsopropyl- $\beta$ -thiogalactoside (IPTG) を加えてさらに数時間培養した。3,000 × gで5分間の遠心により集菌し、DEAE緩衝液 (p.19参照) で洗浄した後、1 mLのDEAE緩衝液中に懸濁して超音波破碎によって抽出液を得た。超音波破碎は菌の懸濁液の色が変化するまで (2~3秒間) 行った。この抽出液を13,000 × g、5分間の遠心によって得られる上清 (蛋白質濃度約10 mg/mL) に含まれるサイトカニン結合能と酵素活性を直ちに方法 (3) 及び (4) に従って測定した。

## 第一節 タバコの葉緑体翻訳系に及ぼすサイトカイニンの影響

タバコの葉緑体自体のサイトカイニンに対する応答性を無傷葉緑体を用いた *in organello* 翻訳系を使って調べた。 $10^{-4}$ ~ $10^{-8}$  Mの各種サイトカイニン（ベンジルアデニン(BA)、ゼアチン、ゼアチンリボシド、図1参照)を単独で翻訳系に加えてみたが、標識アミノ酸の取り込みや、SDS-PAGEで分析した限りでは翻訳産物に変化はみられなかった。また、翻訳系に $10^{-4}$ ~ $10^{-8}$  Mのカイネチン、イソペンテニルアデノシン、ベンジルアデニンリボシドの混合液を単独で、または $10^{-4}$  Mのインドール酢酸と共に翻訳系に加えても何ら変化は認められず、葉緑体単独ではサイトカイニンに対する応答性は確認できなかった。

そこで、サイトカイニン処理したタバコの緑葉より調製した葉緑体を用いてサイトカイニンに対する応答性を調べてみた。BAは蒸留水に対して難溶性であるため、1 N NaOHに0.1 Mとなるように溶解したものを1,000倍に希釈して用いたので(BA濃度は $10^{-4}$  M)、対照実験は1 mM NaOHを用いて行った。切除したタバコの葉を1 mM NaOHにつけて18時間暗所においた後、無傷葉緑体を調製して *in organello* 翻訳を行うと、切除後直ちに調製した葉緑体を用いた時に比べ、標識アミノ酸の取り込み量が70%ほどに低下した。切除した葉を暗所で18時間 $10^{-4}$  M BAを含む1 mM NaOHで処理すると翻訳活性の低下はほとんどみられなかった(図2)。SDS-PAGEで翻訳産物を分析したところ、こうした翻訳活性の変化には特定の翻訳産物の増加や減少は伴っていなかった。

以上のことから、1)少なくともタバコの緑葉には外から加えたサイトカイニンに対するなんらかの反応機構が存在し、サイトカイニンレセプターが存在すること、2)サイトカイニンによる刺激が葉緑体に伝達される経路がタバコの緑葉中に存在することの二点が示唆された。

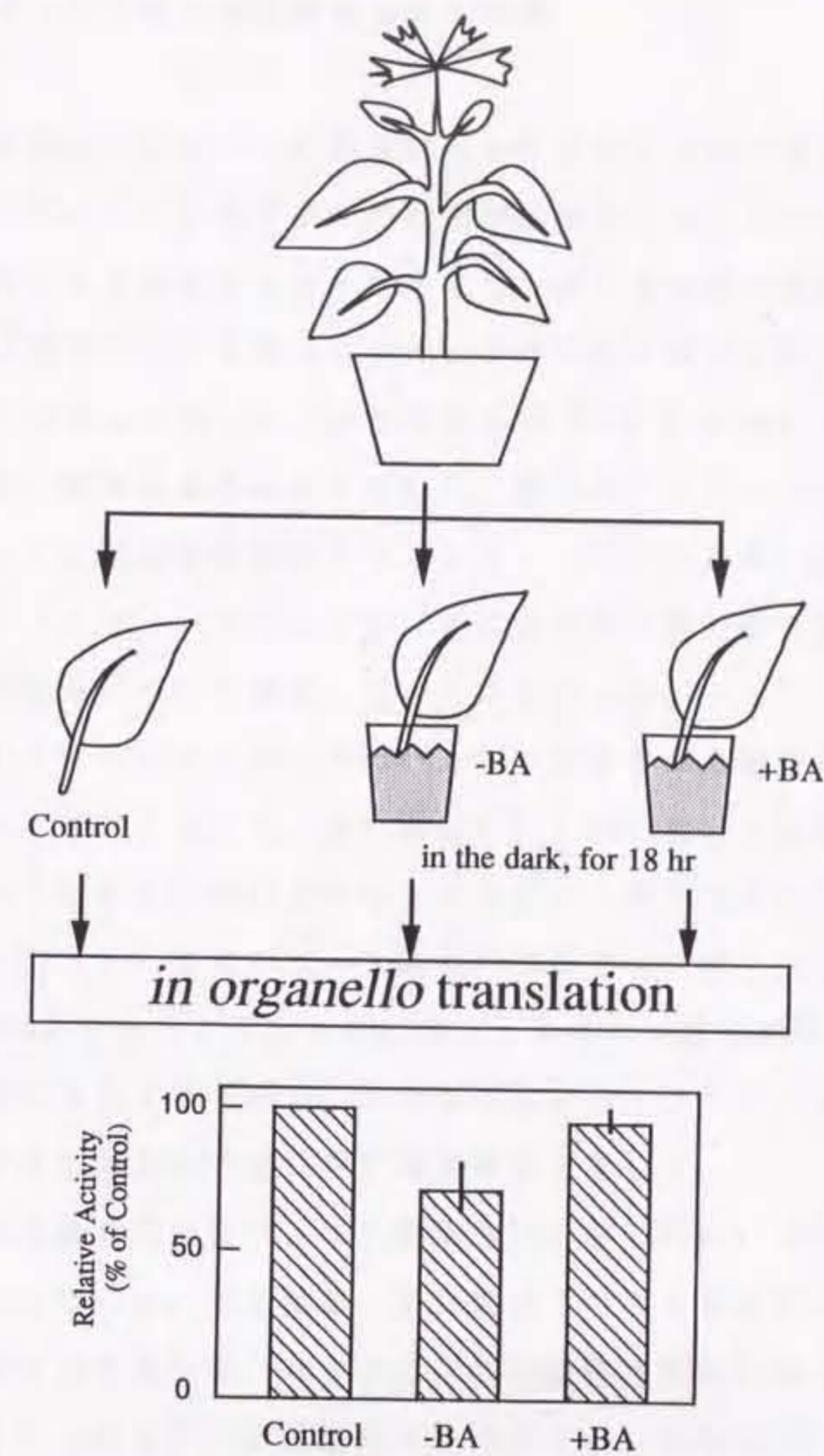


図2. *In organello*翻訳系に及ぼすサイトカイニンの影響  
 切除したタバコ (*N. tabacum* var. Bright Yellow 4) の葉を  $10^{-4}$  M BA を含む 1 mM NaOH、または BA を含まない 1 mM NaOH 中に 18 時間静置した後、無傷葉緑体を調製し *in organello* 翻訳を行った。対照として切除後ただちに調製した無傷葉緑体を用い、この  $[^{35}\text{S}]$ -メチオニンの取り込み量を 100 % とした相対値を表した。

1. サイトカイニン結合蛋白質複合体の精製

第一節で述べたようにタバコの緑葉にはサイトカイニンに対する応答性があることから、サイトカイニンレセプターの存在が示唆された。このレセプターの候補として生体内で最も多く存在するサイトカイニン結合蛋白質の精製を試みた。タバコの緑葉の粗抽出液をDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーにかけたところ、粗抽出液に含まれるサイトカイニン結合活性の85%が0.1 M NaClで溶出されたので、この画分を回収し精製を進めることにした。現在までにタバコの葉より精製されているサイトカイニン結合蛋白質はアフィニティーカラムを用いて精製されているので、今回はアフィニティーカラムを用いずに各精製段階で最も多くサイトカイニン結合活性を含む画分について精製していくこととした。

0.1 M NaClによりDEAEセルロースカラムから溶出された画分をMono Qカラムクロマトグラフィーにかけたところ、蛋白質は0.2 M NaCl付近に肩を持つ0.3 M NaClを中心としたピークと0.6 M NaClを中心とするピークの2つのピークを持つ溶出パターンを示した(図3)。後者のピークはSDS-PAGEでリブローズニリン酸カルボキシラーゼ(RubisCo)であると同定した。サイトカイニン結合活性は主に0.3 M NaCl付近を中心に溶出されてきたので、これを回収した(フラクション番号32と33)。このステップが最も効果的で約12倍に精製度が上昇した。

回収した画分を硫酸沈澱後フェニル緩衝液に溶解しPhenyl Superoseカラムクロマトグラフィーを行った。その結果、蛋白質は三つの大きなピークを持った複雑なパターンで溶出されてきたが、サイトカイニン結合活性は0.16 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を中心にはピークがみられ(図4)、この画分(フラクション番号15~17)を回収した。回収した画分は、蛋白質濃度が0.3 mg/mLと薄かったのでキャリアーとして蛋白質濃度が0.5 mg/mLとなるようにダイズ・トリプシンインヒビターを加えて硫酸沈澱により濃縮した。



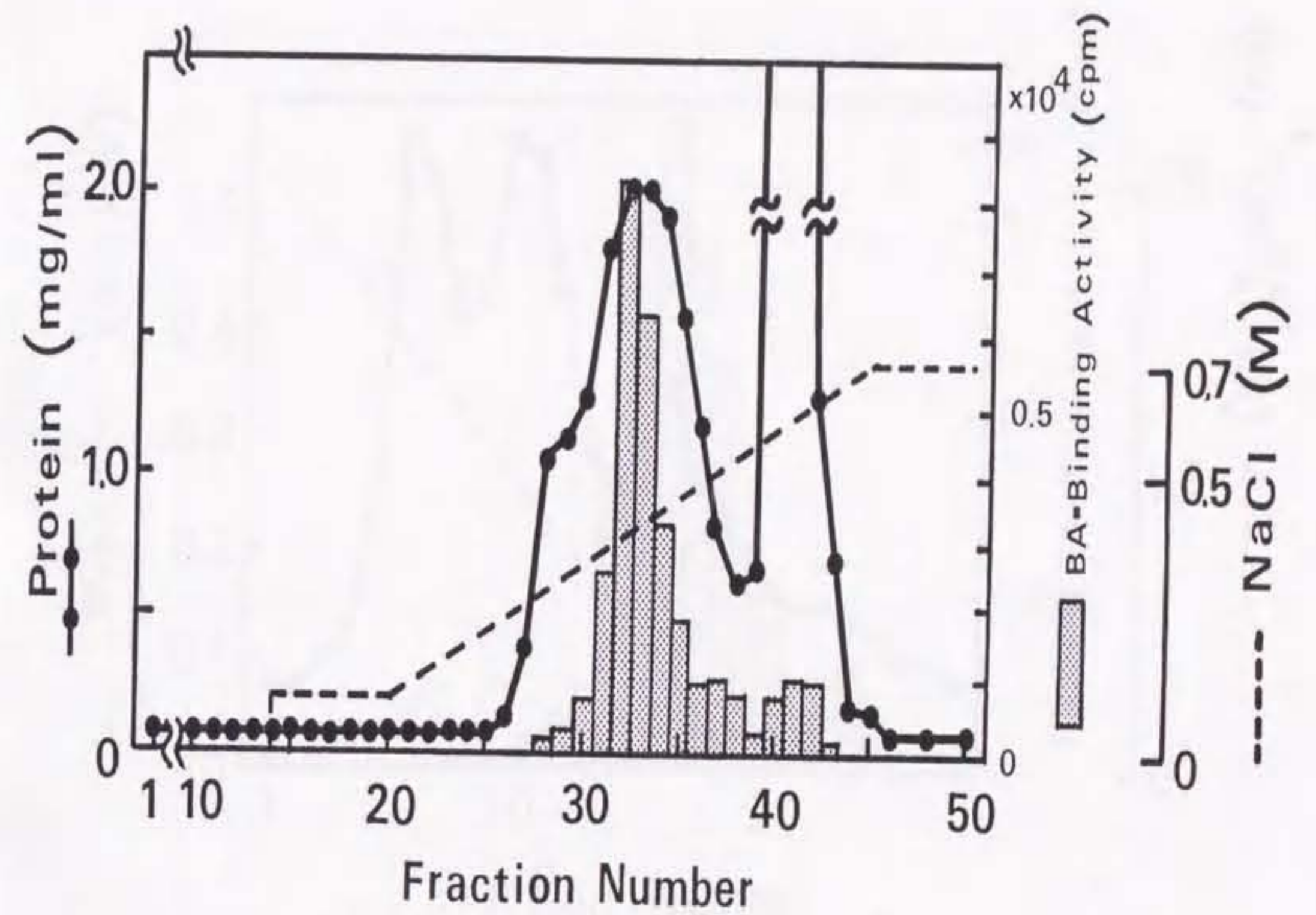


図3. Mono Q HR 5/5 カラムクロマトグラフィーによるサイトカニン結合活性の分画パターン  
 吸着蛋白質を 15 mLで0.1~0.7 M NaClの濃度勾配(点線)で溶出し、0.5 mLずつ分画回収した。実線は蛋白質濃度を表し、影をつけたボックスはBA結合活性を表す。

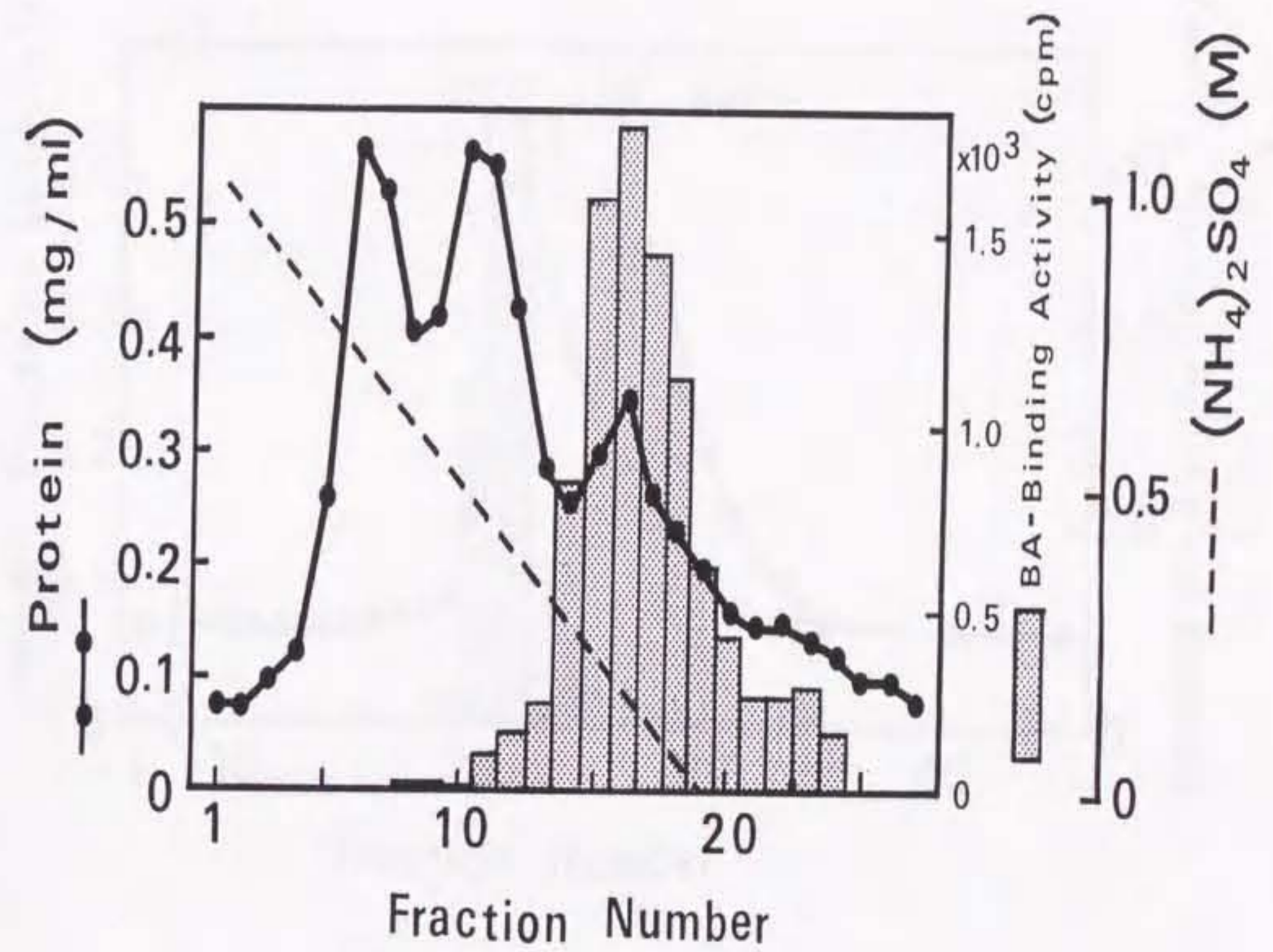


図4. Phenyl Superose HR 5/5カラムクロマトグラフィーによるサイトカイニン結合活性の分画パターン

吸着蛋白質を1.5~1.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5 mL)の濃度勾配で溶出後、1.0~0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (17.5 mL)の濃度勾配(点線)で再溶出した。分画の回収は、蛋白質の溶出されはじめる1.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 以降1 mLずつ行った。実線は蛋白質濃度を表し、影をつけたボックスはBA結合活性を表す。

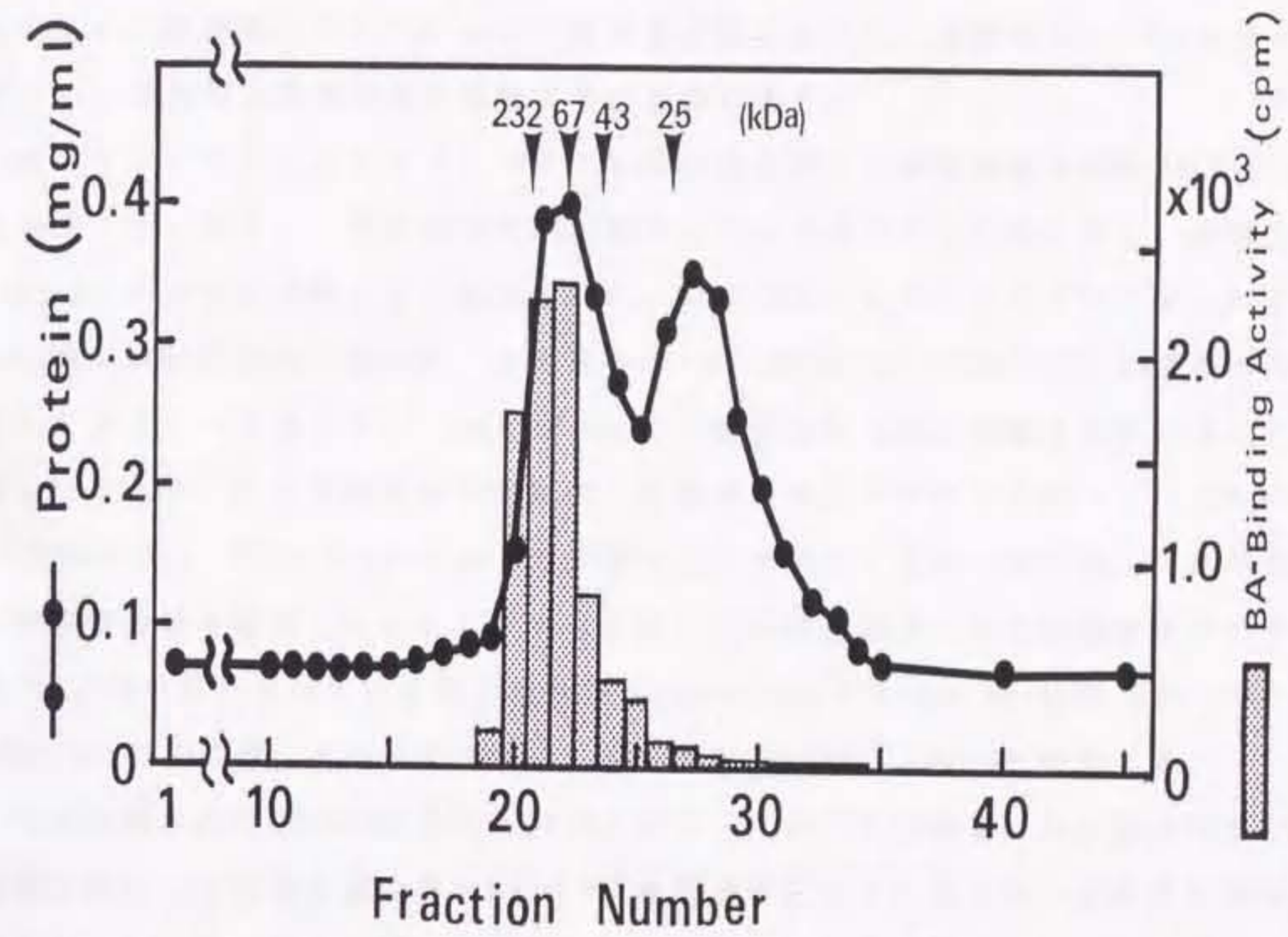


図5. Superose 12 HR 10/30カラムクロマトグラフィーによるサイトカニン結合蛋白質複合体のゲル濾過の分画パターン  
 ダイズ・トリプシンインヒビターを含むPhenyl Superose画分200 $\mu$ lをSuperose 12 HR 10/30に添加した。溶出は0.1 M NaClを含むDEAE緩衝液を用いて流速0.3 mL/hrで行い、0.6 mLづつ分画した。分子量マーカーは、Bovine catalase (232 kDa)、Albumin (67 kDa)、Hen egg ovalbumin (43 kDa)、Bovine chymotrypsinogen A (25 kDa)を用いた。実線は蛋白質濃度を表し、影をつけたボックスはBA結合活性を表す。

Phenyl Superose 画分をDEAE緩衝液に溶解し Superose 12カラムクロマトグラフィーによるゲル濾過を行った。サイトカイニン結合活性は130 kDa をピークに溶出されたが(フラクション番号20~23、図5)、含まれる蛋白質の種類が少ないフラクション番号20を回収した。20 kDaを中心とした蛋白質のピークはキャリアーとして添加したトリブシンインヒビターである。上記の方法でサイトカイニン結合蛋白質は、回収率1.1%で約700倍まで精製することができた(表1)。結果として、およそ600 g の新鮮葉から3,000 mgの可溶性蛋白質を抽出し、最終的に45  $\mu$ gのサイトカイニン結合蛋白質複合体を単離することができた。

各ステップで得られたサイトカイニン結合活性画分と最終標品をSDS-PAGEによって分析した(図6)。粗抽出液とDEAE画分とはあまり大きな差はなく、両者ともRubisCoが主な蛋白質として認められた。Mono Qカラムクロマトグラフィーにより、RubisCoはほぼ完全に除かれ、その後のPhenyl SuperoseとSuperose 12カラムクロマトグラフィーを通じて57 kDaと36 kDaの2種類の蛋白質が濃縮されていることが明らかになった。この2種類の蛋白質は、各種のカラムクロマトグラフィー(Mono P、BA Sepharose、Blue Sepharose)で分離することができなかつたので、これらの蛋白質は複合体を形成していると考えられた。ゲル濾過によってこの複合体の分子量は130,000と測定されているので複合体をCytokinin Binding Protein 130(CBP130)と名付け、そのサブユニットをそれぞれCBP57、CBP36と命名した。

今回単離されたCBP130以外にもDEAEセルロースカラムに吸着しない画分やタバコ培養細胞BY-2の可溶性蛋白質でMono S吸着画分等にサイトカイニン結合活性が検出された。このことから、タバコのサイトカイニン結合蛋白質は、CBP130以外にも数種類存在していることが示唆される。

表1 サイトカイニン結合蛋白質複合体の精製

Step	Total Protein <sup>a</sup>	Total Activity <sup>b</sup>	Specific Activity	Purification	Yield
	mg	cpm	cpm/mg	-fold	%
Crude	3,000	9.3 x 10 <sup>4</sup>	30	1	100
DEAE	330	1.7 x 10 <sup>5</sup>	520	17	180 <sup>c</sup>
Mono Q	30	1.9 x 10 <sup>5</sup>	6.2 x 10 <sup>3</sup>	207	204 <sup>c</sup>
Phenyl Superose	0.9	3.0 x 10 <sup>3</sup>	3.3 x 10 <sup>3</sup>	110	3.2
Superose 12	0.045	1.0 x 10 <sup>3</sup>	2.2 x 10 <sup>4</sup>	730	1.1

- \* a : 蛋白質の定量は、BSA溶液を標準液としてBradford法(1976)を応用したバイオラッド社の蛋白質定量キットを用いて行った。
- \* b : BA結合活性の定量は、9.25 kBq [<sup>14</sup>C]-BAと混合し、室温で2時間反応させた後、ゲル濾過を行って蛋白質と共に溶出される画分に含まれる放射活性を測定した。詳しい条件は「第二章 実験方法」を参照。
- \* c : イオン交換クロマトグラフィーにより粗抽出液中に含まれるインヒビターが除かれたために、total activityが粗抽出液よりも多くなり回収率が100%を越えた。

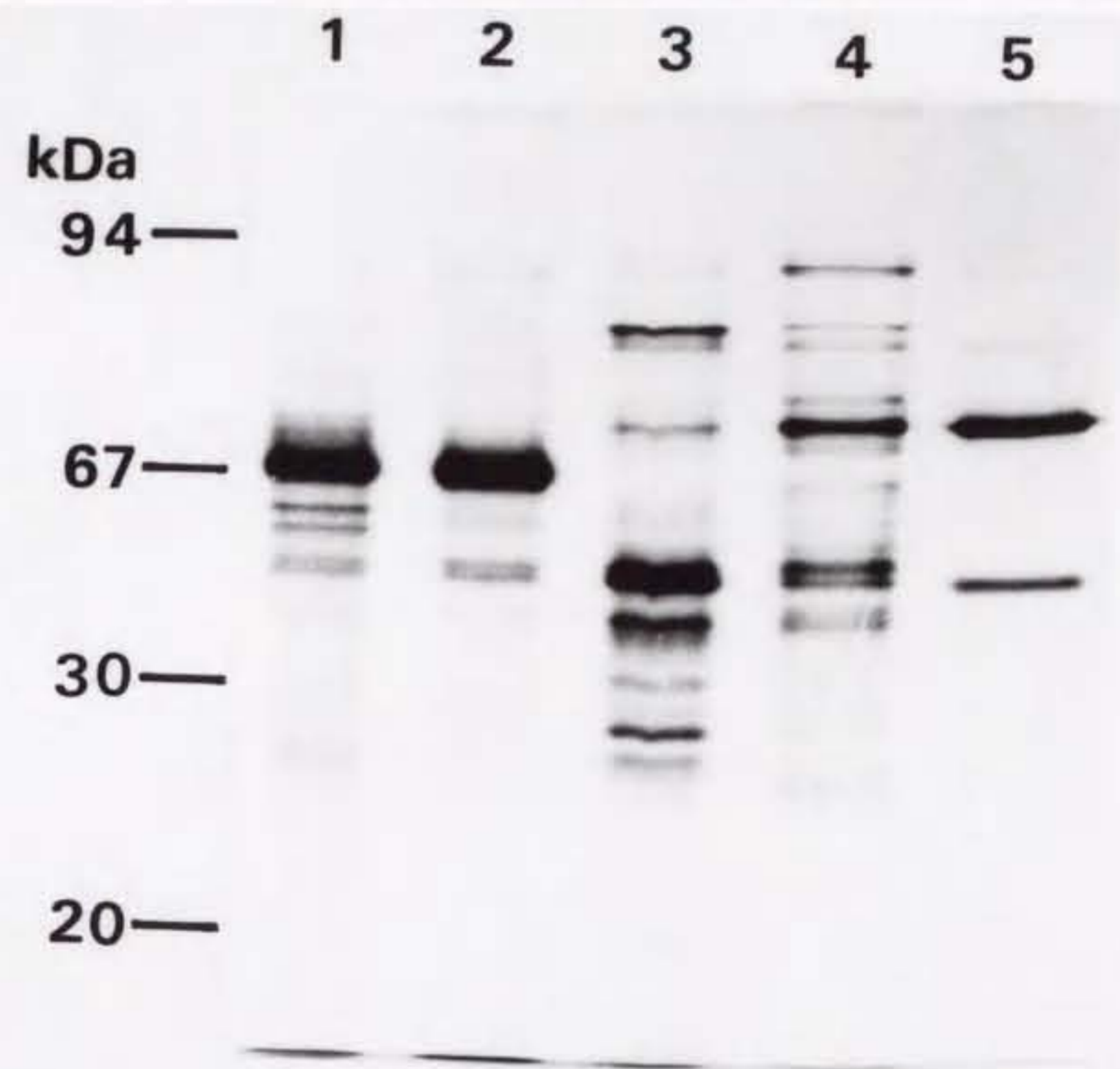


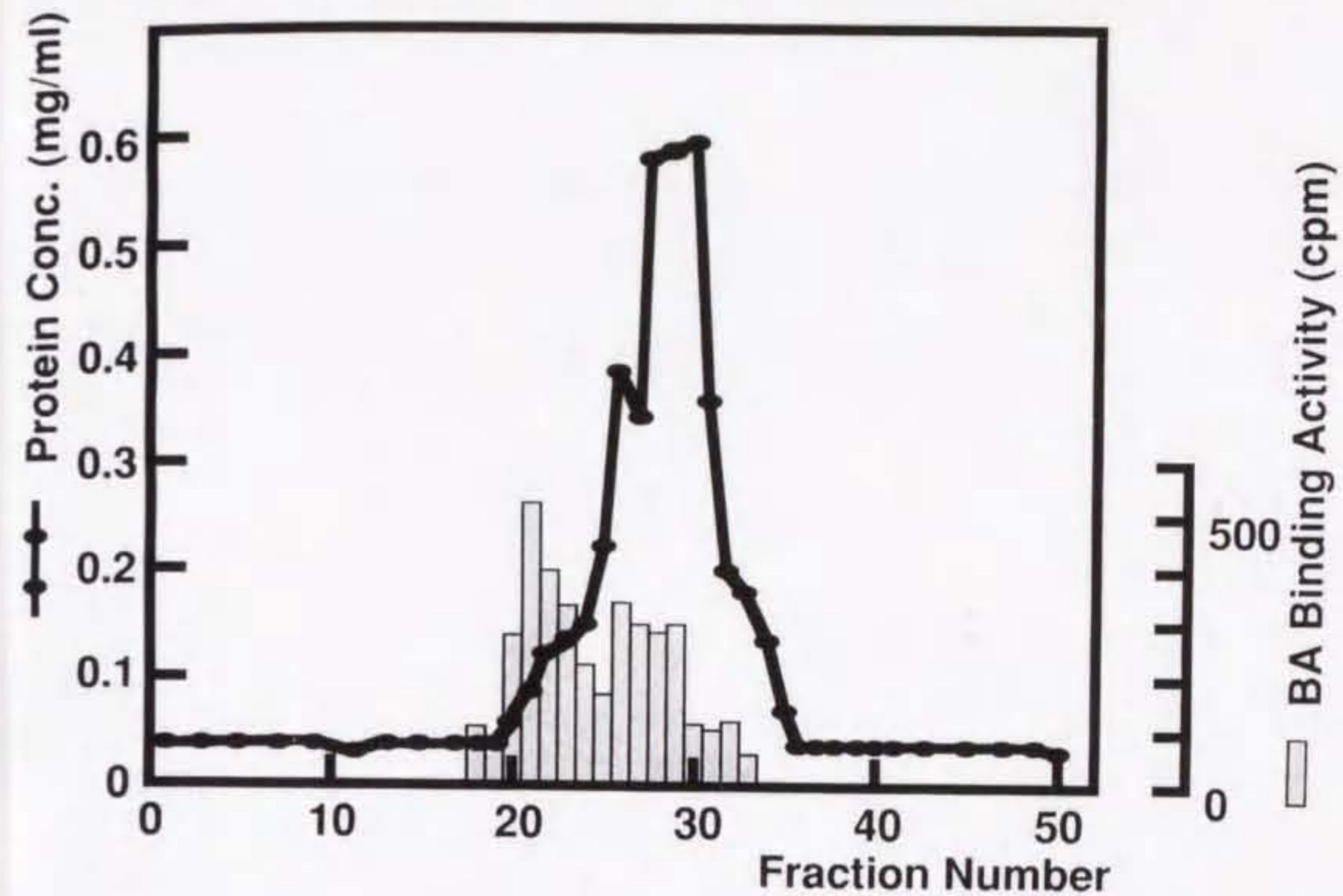
図6. 各精製段階におけるサイトカニン結合画分のSDS-PAGEによる分析  
 蛋白質を0.1% SDSを含む12.5%アクリルアミドゲルで電気泳動し銀染色を行った。  
 1: 粗抽出画分 2  $\mu$ g、2: DEAEセルロース画分 2  $\mu$ g、3: Mono Q画分 1  $\mu$ g、  
 4: Phenyl Superose画分 1  $\mu$ g、5: Superose 12画分 0.5  $\mu$ g。サイズマーカー  
 として、Phosphorylase b (94 kDa)、Albumin (67 kDa)、Ovalbumin (43 kDa)、  
 Carbonic anhydrase (30 kDa)、Trypsin inhibitor (20 kDa) を用いた。

## 2. サイトカニン結合蛋白質複合体の性質

### (1) サイトカニン結合蛋白質複合体のサイトカニン結合能

CBP130とサブユニットであるCBP57との関係を検証するために、CBP57に対する抗体を作成し、これを用いてCBP57とサイトカニン結合活性のゲル濾過の溶出パターンを比較解析した。Superose 12によるゲル濾過ではサイトカニン結合活性は130 kDa をピークにフラクション番号20より24にかけて溶出された(図7)。このフラクションについて抗CBP57抗体を用いてウェスタンブロット分析を行ったところ、サイトカニン結合活性と同様にフラクション番号21をピークに20から24にかけてCBP57が検出された(図7)。このことは、CBP130はCBP57をサブユニットに持ち、サイトカニン結合活性を持つことを支持する。

CBP130の結合特異性を調べるために、BAとの結合に対して各種アデニン誘導体による結合阻害実験を行った(表2)。CBP130のBAへの結合は、インドール酢酸ではほとんど、3',5'-cAMPではさほど阻害されないが、アデニンやATPやゼアチンによって阻害された。特に、天然サイトカニンであるゼアチンにより著しくBAへの結合が阻害されたことは、CBP130が生体内でサイトカニンと相互作用をしている可能性を強く示唆している。また、 $9.25 \times 10^{-6} \sim 3.70 \times 10^{-4}$  MのBAを反応系に加えて結合したBA量を求めてScatchard(1949)分析を行い、CBP130のBAに対する親和性を測定した(図8)。その結果、CBP130にはBA結合部位が2ヶ所存在し、それぞれのBAに対するKd値は $2.1 \times 10^{-5}$  M(高親和性)、 $1.6 \times 10^{-4}$  M(低親和性)と算出された。また、CBP130一分子当りに結合するBA数を計算したところ高親和性が1/2個、低親和性が1個であった。



**Fraction Number**

• • 20 • • • • 25 • • • • 30 • •

図7. Superose 12 HR 10/30カラムによるCBP57 とBA結合活性の溶出パターン  
 Phenyl Superose画分を用いてSuperose 12 によるゲル濾過を行い、各フラクション  
 についてBA結合活性の測定とウェスタンブロット分析を行った。上図：200 μLの  
 Phenyl Superose画分を添加し、0.1 M NaClを含むDEAE緩衝液中で0.3 mL/hrの流速  
 で溶出を行った。実線は蛋白質濃度を表し、影をつけたボックスはBA結合活性を表  
 す。下図：フラクション10 uL を12.5 %ポリアクリルアミドゲルによるSDS-PAGEを  
 行いPVDF膜にブロットした後、抗CBP57抗体を用いてCBP57を検出した。



表 2. CBP130のサイトカイニン結合能  
に対する各種アデニン誘導体の影響

Substance	% activity
None	100
$10^{-4}$ M Zeatin	17.6
$10^{-4}$ M Adenine	36.5
$10^{-4}$ M ATP	40.3
$10^{-4}$ M 3',5'-cAMP	67.3
$10^{-4}$ M IAA	97.8

約10 mgの蛋白質を含むDAEAセルロース画分を用いてサイトカイニン結合能を測定した。 $[^{14}\text{C}]$ -BAとの反応の際に最終濃度 $10^{-4}$  Mとなるように各種のアデニン誘導体を加えた。室温で2時間反応させた後Sephdex G-25を用いたゲル濾過を行って蛋白質画分に含まれる放射活性を測定した。アデニン誘導体未添加のものの結合活性を100 %とした相対活性値を示す。

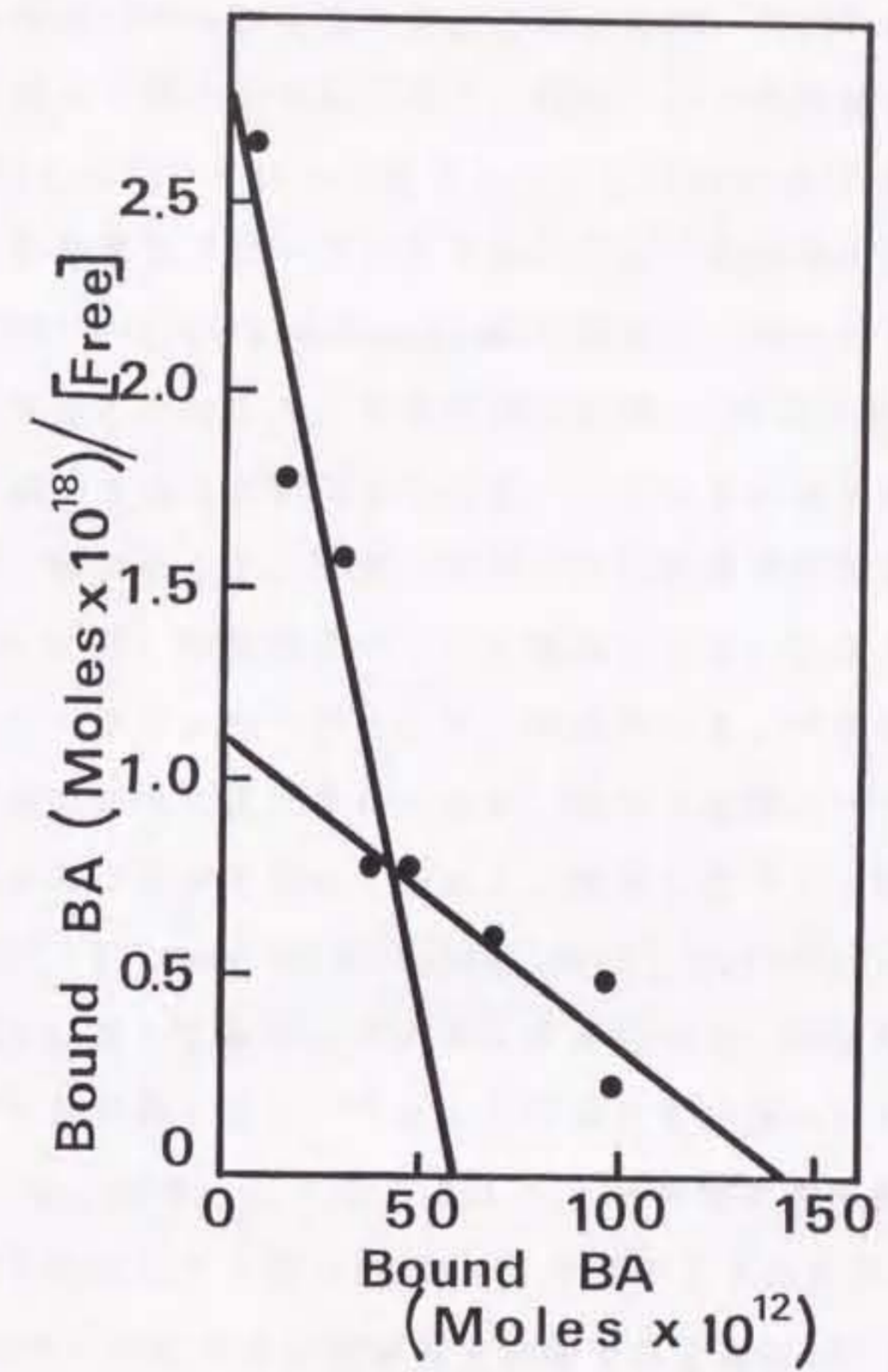


図8. CBP130のスキヤッチャード分析

14  $\mu\text{g}$  CBP130と $9.25 \times 10^{-6} \sim 3.70 \times 10^{-4}$  M [<sup>14</sup>C]-BA とを混合し室温で2時間反応させた。これをSephadex G-25を用いたゲル濾過にかけ、蛋白質とともに溶出される放射活性を測定した。測定値をもとに結合したBA量(横軸)に対して結合BA量/遊離BA濃度(縦軸)をプロットし、Scatchard (1949)に従ってKd値を算出した。

CBP130の機能を推測するためには各サブユニットの一次構造を解析する必要がある。先に述べたようにCBP57はゲル濾過でサイトカニン結合活性と同様に130 kDaをピークとする溶出パターンを示した。このことは、CBP57がCBP130のサブユニットであることを強く示唆するものであり、CBP57の一次構造の解析を進めていくことにした。CBP57のcDNAをクローン化するためにCBP57のN-末端のアミノ酸配列の決定を試みたが、N-末端はブロックされておりアミノ酸配列の決定にはいたらなかった。そこで、CBP57をLysyl endopeptidaseで消化し、得られるペプチド断片のアミノ酸配列を決定することにした。予備実験の結果、CBP57の消化反応は37°Cで3時間の反応でほぼ完了することが示されたが、ペプチドの回収率を少しでも上げるために反応時間を5時間とした。生成したペプチドを尿素を含むSDS-PAGEで展開し銀染色を行うと12~4 kDaの数本のバンドが検出された。これらの一部についてアミノ酸配列を気相プロテインシーケンサーで決定した。ペプチド1については混合物でアミノ酸配列の決定に及ばなかったが、他の3種類のペプチドについてはアミノ酸配列を決定することができた(図9)。決定したアミノ酸配列について蛋白質データベースNBRF (Release 32.0, March, 1992)及びSWISS-PROT (Release 21.0, February, 1992)に対してホモロジーサーチを行った。決定した3種類のアミノ酸配列のうちペプチド2が、ヒト、ラット及び細胞性粘菌のS-アデノシル-L-ホモシステイン(SAH)ヒドロラーゼ(EC 3.3.1.1.)と有意な相同性(それぞれ76.9%、76.9%、84.6%)を示した(図13参照)。ペプチド3の配列は、8残基と短いながらもSAHヒドロラーゼのアミノ酸配列と比較するとほぼ100%の相同性を示した。しかし、ペプチド4の配列についてはSAHヒドロラーゼとは50%程の低い相同性しか認められなかった。以上のことから、CBP57はタバコのSAHヒドロラーゼである可能性が示唆されるが、CBP57について活性部位のシステイン残基やNAD<sup>+</sup>結合配列など酵素活性に必要な配列や相同性の低いC-末端に関する情報が得られていない。このため、CBP57 cDNAをクローン化してその全一次構造を明らかにすることにした。(近年、パセリのSAHヒドロラーゼのcDNAがクローン化されたが(Kawalleck *et al.*, 1992)、このアミノ酸配列と比較するといずれのペプチドの配列も100%の相同性を示す。)

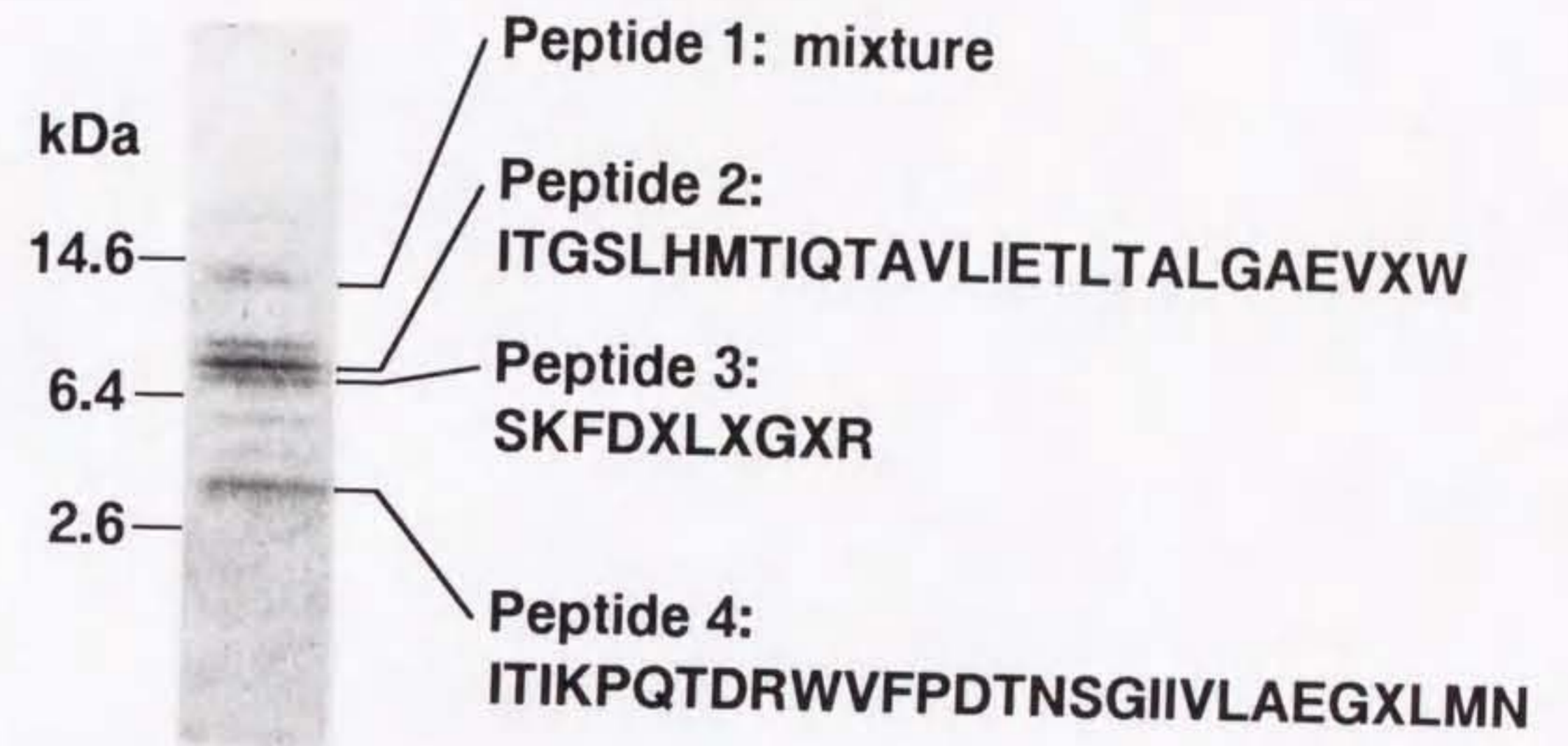


図9. CBP57 由来ペプチドのアミノ酸配列

CBP57 をLysyl endopeptidaseで37°Cで5時間消化後、7.5 M尿素を含む16~22%ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いたSDS-PAGEにより分画した。回収したペプチドの一部についてアミノ酸配列の決定を行った。各ペプチドについて得られたアミノ酸配列を右に示す。サイズマーカーは、Myoglobin I and II (14.6 kDa)、Myoglobin II (6.4 kDa)、Myoglobin III (2.6 kDa) を用いた。

### 第三節 サイトカニン結合蛋白質複合体の57 kDaサブユニットの構造と発現

#### 1. 57 kDaサブユニットをコードするcDNAのクローン化と塩基配列の決定

CBP57がヒト、ラット及び細胞性粘菌のSAHヒドロラーゼと相同な酵素かどうかを確認するために、CBP57をコードするcDNAのクローン化とその塩基配列の決定を行った。SAHヒドロラーゼと相同性が低く、しかも最も長くアミノ酸配列を決定したペプチド4のアミノ酸配列をもとにオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドの合成は極力種類を少なくするためにGTウオブルやイノシンを利用して47merで64種類の混合物を合成した(図10)。これをプローブに *N. sylvestris* 幼若体全体から得たポリ(A)<sup>+</sup>RNA由来のcDNAをλgt10に挿入したcDNAライブラリーを検索した。1.1 × 10<sup>5</sup>クローンに対し3回検索を行ったところ20個の陽性クローンが得られた。λgt10のクローニングサイトの配列をプライマーにして得られたクローンの挿入配列をPCRによって増幅し、1.2%アガロースゲル電気泳動により挿入DNAの長さを測定したところ、最長の挿入DNAは2.1 kbで、最小は0.35 kbであることが示された。アミノ酸の平均分子量を110と仮定すると、57 kDaの蛋白質は約520残基のアミノ酸からなると予想される。このことからCBP57をコードするmRNAは1.6 kb以上であると予想されたので、得られた20個のクローンのうち1.6 kb以上の4クローンについてEcoRIとBamHIについて制限酵素地図の作製を行った。その結果、これらのクローンはその末端のEcoRIサイトの有無によって2クローンづつ2つのグループに分類することができた。それぞれのうちで最長の挿入DNAの塩基配列を決定することにし、EcoRIサイトが無いものをλTCB1、あるものをλTCB2と名付けた。λTCB1、λTCB2の挿入DNAをプラスミドベクターpBluescript KS+にサブクローニングしたpBTCB1とpBTCB2を用いて挿入DNAの塩基配列を決定した。その結果、pBTCB1の挿入配列は2120 bp、pBTCB2のそれは1930 bpからなり、両者の相同性は81%であることが明らかになった(図11)。また、これらのクローンは3'末端にポリ(A)が見られるが、典型的なポリ(A)シグナルは見られずポリ(A)の上流20 bp付近にAATCAA (pBTCB1)とAATCCA (pBTCB2)のポリ(A)シグナル様配列が存在していた。

ペプチド4のアミノ酸配列及び予想される mRNA

1		5		10		15												
I	T	I	K	P	Q	T	D	R	C	V	F	P	D	T	N	S		
5'	AUU	ACU	AUU	AAA	CCU	CAA	ACU	GAU	CGU	UGU	GUU	UUU	CCU	GAU	ACU	AAU	UCU	3'
	..C	..C	..C	..G	..C	..G	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	
	..A	..A	..A	..A	..A	..A	..A	..A	..A	..A	..A	..A	..A	..A	..A	..A	..A	
		..G		..G		..G		..G		..G		..G		..G		..G		..G
														A.A				AGU
														..G				..C

合成オリゴヌクレオチド

3' TAG TGI TAG TTT GGI GTT TGI CTG GCI ACG CAI AAG GGI CTG TGI TT 5'  
 T T C C T

図10. オリゴヌクレオチドプローブの設計

上段には決定したペプチド4のアミノ酸配列と対応するコドンを示し、下段に作製した合成オリゴヌクレオチドプローブを示す。予想される mRNA の配列で・は上段と同じ塩基を表す。また、プローブの配列でIはイノシンを表し、2段になっている塩基はこの2種類の混合物であることを表す。ペプチドのアミノ酸配列の10番目のアミノ酸残基はシステインとしたが、再度アミノ酸配列を決定したところトリプトファンであることを確認した。

TCB1 TTTTCTCCAGTAACAACTTAAGATAAAGAGATGATCAAGCATTCACTGATAAGTAAATAACAAACAGTAGAAACAGATACTAGTCTCTGTATCTTGATGCAAAATTCACAGC 120  
TCB2 CAGCAAAACTAATACTCTGTAACTCTTAAAGACAGCAATCTGATATCAAAACTTAATCAACCATCAAAACGGAATCTCAAACTATCAAAAGGCTCTCTACAGATAGCATTAG 240

TCB1 CAGCACTTGCAATCCTAGGCCACAGATCAAGCACACTCTCTCTCTTAAATCCCTTGAAGAAGAAAAAGCCCTCAAAATCTCATCTCAAAACCAAAAATTTCTTGATAC 360  
TCB2 A T C T C G T C T G T G T G G C G T G C G C G G C C A G T C

TCB1 CCCTCGACCGATGCTCTATAGTCGAGAAACCACTCTGCGCCGGAGTCAAGGTCAAGGACATGCTCAGGCCGATTTGGCCGGCTCGAAATCGAGCTGGCCGAAGTTGAATG 480  
TCB2 A C T G A T - T G A C C T T A C T C G G A G A T G C C A G A C T - A G A G A G T A A - A G - - - - - A G

TCB1 TGGTCTCATGGCTTGTGTACTGAATTTGGCCCTCACAACCATTTAAAGGTGTAAATTAAGTACTGGATCTTTACATNGACCACTCAAACTGCAGTTTGAATGAACCTTATGCTT 600  
TCB2 T G C C T G G C C C G T C C C G T C C T C A C

TCB1 GGTGCTGAAGTTAGATGGTGTCTGTGAACATCTCTCACTCAAGATCAAGCCGCTGCTGCCATTGCACGTGACAGCCGCGCTGCTGCCGGAAGGGTGAGACTTGCAGGAGTA 720  
TCB2 A C C C C T T C G C T C C A G T C G T G G A

TCB1 CTGGTGGTCACTGAGAGGGCCACTTGGCTGGGTCAGGAGGGTGGGCTGACTGATGTCGATGATGGTGGTGTGCTACACTCTTGAATCATGAGGCTGTTAAGGCAAGAAAGAT 840  
TCB2 T A C C C C C T A C T T T T A A A T G A A

TCB1 TGCTAAGAATGGGACAATCCAGATCCTAATCCACCGAATAGCTGAGTTCAGCTGTGCTACTATATTAAGGAAAGTTAAGAACTGATCCTTTAAGTATACTAAGATGAAGGA 960  
TCB2 A T C T A T A A G T T T G C G G A A C

TCB1 AAGACTCGTGGTGTCTGAGGAACACTCACTGGTGTAAAGAGGCTTATCAGATGCAAGCTAATGGAACTTTCCTTTCCCGGCTAATTAATGTTAACTGCTGTATCCAGAGCA 1080  
TCB2 G T T T A C A T T

TCB1 GTTTGACAACTTTGACCGAATGCCGCCACTCACTGCCCGATGCTCATGAGGGTAATGATGTTATGATGAAAGAAAGGTTGCCCTGTGTCGGGTTATGGAGATGTCGAAAGGGATG 1200  
TCB2 T T A G C T T

TCB1 TGCTGCTGCCTTGAACAAAGCCGGTGGCCGTGTGATGCTGACCCGAGATTGACCCGATCTGTGCTCCAGCTACCATGGAAGGCTCCCAAGTCTTACTCTTGGAGCACTTGTCTG 1320  
TCB2 G T A C T T A A T G C C T C A

TCB1 TGTGATATCTTTGTCAACCAACCGGTAAACAGGACATATCATGTTGACCAATGAGGAAAGTAAACAAATGCCATTGTTGCAACATTGGTCACTTTGACAAACAAATCGACAT 1440  
TCB2 C T C A C C C T C T

TCB1 GCTCGGTCTGAGACTACCTCGGTGTCAGAGGATCAATTAAGCCCTAAACTGACAGATGGTCTTCCCTGACACCCACAGTGGCACTATTGTTTGGCCGAGGGTCTGCTCATGA 1560  
TCB2 T T A G C C G T C C T C A

TCB1 CTGGGATGTCACCTGGAACCCCAAGTTTGTGATGCTGCTTCTTCACTAACCAGTCAATGGCCAACTCGAGTTGGAATGGAAGAGCAGTGGTAAATGATGAGAAAGGTTA 1680  
TCB2 C C C C T G G C C C

TCB1 CGTCTTGCCAAAACACTCGACGAGAGGTTGCTGCACTTCATCTTGAAGCTCGGAGCCAACTTCAAACTTCCAAAGGATCAAGCTGACTACATGAGGCTACCACTTGAAGGTC 1800  
TCB2 G T T C C A G C T G T T

TCB1 TTACAAGGCTGCTCACTACAGGTAAGTGAACACAGAGGAGAACAACTTGTGCGGCAATGATTGTTGCAATTAATTAATTTGTTAGGATACTAGTATTGGAATATTG 1920  
TCB2 C A A A A C T A C T A T C G G A T G C A C T T C T T A A

TCB1 TGGTGAATATTTGGGAGGAAAGTGGCAATGTTGCTGCAAGAGATATGCTTATTCAAGTAAGACCAGATGTTGAAATAGATTGAGTATGTTGGTGGTGGTATGATATTG 2040  
TCB2 G - - T T G T A T A T A T C A C T G A T G A T G A C A

TCB1 AGTAAGTAAATCCATTTGCTTTGGTGTATGATTTGTTCAAGAAATCAAGCAACTTTTCCTTAA (2120 bp)  
TCB2 -C GTG TG GTGC A-CGG CA TT G TCATTAAGTGTGCTTTAATCGGTTTAAATCCACTCGATGTTGGTGA (1930 bp)

図11. TCB1とTCB2の挿入DNAの塩基配列の比較

TCB2の配列中のTCB1と同じ塩基は省略し、ギャップは-で表す。また、TCB2のみに存在する塩基は下段に表示した。TCB1の最初から3番目までのATGとTCB2の最初の開始コドン、及び終止コドンをボックスで囲み、ポリ(A)シグナル様配列を下線で示す。

## 2. 57 kDaサブユニット遺伝子の構成

2種類のcDNAクローンが得られたことは、CBP57 遺伝子はハプロイドゲノム当たり2コピー以上存在することを意味している。そこで、TCB1のコード領域（ポジション475-1858）をプローブにしてタバコ（*N. sylvestris*）のゲノムDNAに対してサザンハイブリダイゼーションを行った。使用した制限酵素（*Pvu*II、*Hind*III、*Bam*HI）に関わりなく1～3本のバンドしか検出されなかった（図12）。*Hind*IIIで切断したものについては濃いバンドが認められるが、TCB1、TCB2ともコード領域に*Hind*IIIサイトが存在することから、いくつかのバンドが重なったために濃くなったと思われる。サザンハイブリダイゼーションの結果は、CBP57 遺伝子はマルチジーンファミリーを構成せずハプロイドゲノム当たり2～3コピーしか存在しないことを示唆している。



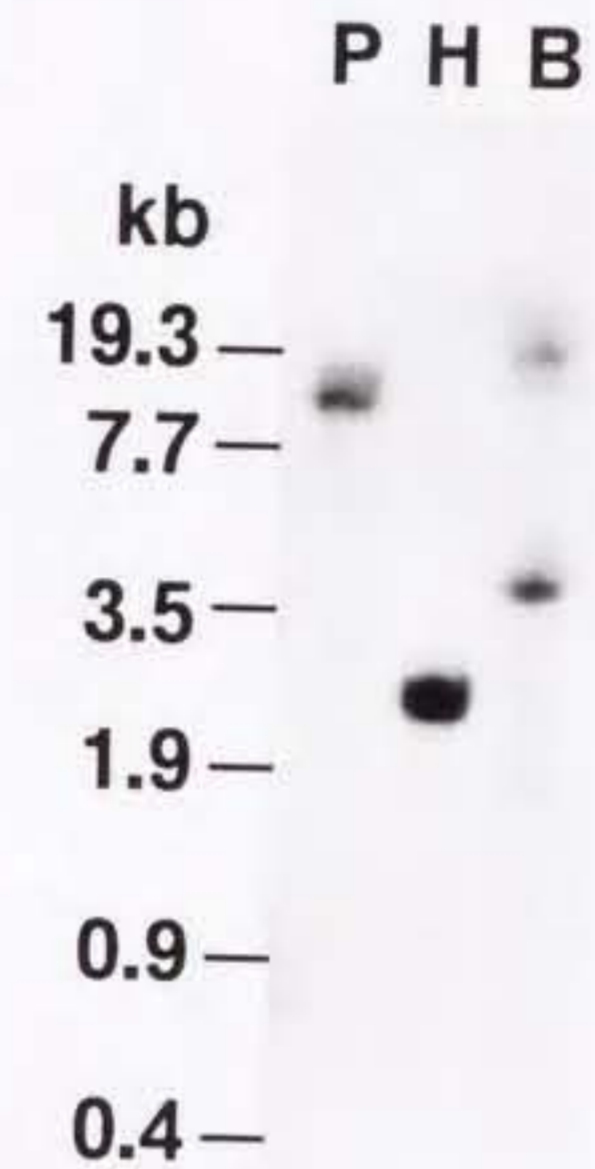


図12. CBP57 遺伝子のゲノミックサザンハイブリダイゼーションのパターン  
 タバコ (*N. glauca*) のゲノムDNA 10  $\mu$ g を制限酵素 *Pvu*II (P)、*Hind*III  
 (H) 及び *Bam*HI (B) で切断して1%アガロースゲル電気泳動で分画した後、ナイ  
 ロンフィルターにプロットした。これをTCB1のコード領域 (ポジション475-1858)  
 をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。サイズマーカーは  $\lambda$  DNAを制  
 限酵素 *Sty*Iで消化したものをを用いた。

得られたTCB1、TCB2の挿入DNAの塩基配列をもとにコードされている蛋白質のアミノ酸配列を予想した(図13)。予想したアミノ酸配列は、いずれも先に決定したCBP57由来の3種類のペプチドのアミノ酸配列を含んでおり、CBP57をコードしていることが確認された。そこで、TCB1、TCB2にコードされる蛋白質をそれぞれCBP57A、CBP57Bと名付けた。また、TCB1中の最長のリーディングフレーム(RF)は485残基から成るが、TCB2のものは450残基である。TCB1の第3番目のATGから翻訳するとちょうど450残基の蛋白質をコードすることになる。精製したCBP57のSDS-PAGEやタバコの葉中の全可溶性蛋白質に対して抗CBP57抗体を用いたウェスタンブロット分析でCBP57の多様性は見られないことから(図6及び図16B参照)、TCB1とTCB2共に同一の翻訳開始点を持つかどちらか一方の発現量が著しく少ないと考えられる。

塩基配列からCBP57Aは、最長の翻訳産物でも485アミノ酸より成り分子量はおおよそ53,000と予想される。精製したCBP57はSDS-PAGEにより分子量57,000と測定されているので何らかの修飾を受けている可能性がある。CBP57Aは4ヶ所にN-グリコシル化を受けることが可能な部位(N-X-T/S)を持ち(Neuberger *et al.*, 1972)、その内219残基目と230残基目のものはCBP57Bにも共通している。先に述べたようにCBP57AとCBP57Bとで分子量に差が見られないことから、糖鎖による修飾があるとするればこの部位である可能性が高い。

CBP57AとCBP57Bのアミノ酸配列を比較してみると(図13)、異なるアミノ酸は14アミノ酸のみで(相同性97%)、異なるアミノ酸の内13残基はよく似たアミノ酸による置換であり、これも加えると相同性はほぼ100%となる。しかし、Brinegarら(1988)が報告しているコムギのサイトカイニン結合蛋白質CBF-1のサイトカイニン結合部位に見られるアミノ酸配列(A-F-L-Q-P-S-H-H-D-A-D-E)は見いだされず、CBP57はCBF-1とは異なるサイトカイニン結合蛋白質であることが示唆される。

また、KyteとDoolittleの方法(1982)に従ってハイドロパシープロットを行ったところ、疎水性に富む領域は見られず可溶性蛋白質であることが示唆された(図14)。このことは、CBP130がタバコの葉の可溶性画分から精製された結果とよく一致する。

第二節で述べたようにLysyl endopeptidase処理により得られるCBP57由来のペプチドのうちの一つが、他の生物のSAHヒドロラーゼ高い相同性を示した。CBP57がSAHヒドロラーゼであることを確認するために、CBP57Aのアミノ酸配列を用いて蛋白質データベースNBRF (Release 32.0, March, 1992)、SWISS-PLOT (Release 21.0, February, 1992) に対してホモロジーサーチを行った。CBP57は、ヒト、ラットおよび細胞性粘菌のSAHヒドロラーゼと高い相同性(58%、58%、56%)を示したが、これら以外には有意な相同性を示すアミノ酸配列は見いだされなかった。CBP57をこれらのアミノ酸配列と比較すると全体的に高い相同性を示すが(図13)、CBP57は他のSAHヒドロラーゼとは異なり150残基目のグリシンから190残基目のロイシンまでにCBP57特有の41残基の配列が見いだされた。この配列は、最近cDNAと遺伝子がクローン化されたパセリや*Rhodobacter*のSAHヒドロラーゼにも見られることから(Kawalleck *et al.*, 1992; Sganga *et al.*, 1992)、光合成生物に特有の配列であると考えられる。また、CBP57AとCBP57Bとで異なる14アミノ酸の内8アミノ酸がこの領域に集中していることから、この領域がCBP57AとCBP57Bの生理的役割の違いを反映している可能性がある。CBP57の263残基目から294残基目までにはNAD<sup>+</sup>結合部位に特徴的なG-X-G-X-X-G配列(Wierenga and Hol, 1983)が保存されている。また、SAHヒドロラーゼの活性部位に見られる2ヶ所のシステイン残基は86残基目と120残基目に保存されている(Gomi *et al.*, 1986)。これらの配列は他のSAHヒドロラーゼと同じ領域に保存されており、CBP57が実際にSAHヒドロラーゼ活性を持つ可能性を示唆している。

CBP57A MALLVEKTTTS GREYKVKDMS QADPGRLEIE LAEVEMPGLM ACRTEFGPSQ PFKGAKITGS LHMIIQTAVL 70  
 CBP57B  
 Parsley ...S...AA .....L.....L.....S.....  
 Rhodobacter MAD- ---.I...IK L.E...K.LD I..T.....E.....L...R.A...  
 Human .SD KLP...A.IG L.AW..KAL. I..N.....RM.ERYS..K L...R.A.C .....VE....  
 Rat AD K.P...A.IG L.AW..KALD I..N.....RM.EMYS.A.K L...R.A.C .....VE....  
 Slime mold .T K.H...K.I. L.AW.....I.AN.....TL.KKY...IL...R.A.C .....  
 Nematode MAQ. KPA...A.IK L.....K..I .....N.....M.SKY....L...R.A.C .....  
 Trypanosome MAD- ---.I..L.EW..KA...N.....EL.R.V....L.....A.C .....V.....

IETLTALGAE VRWCSCNIFS TQDHAAAAIA RDSAAVFAWK GETLQEYWWC TERALDWGPG GPDPLIVDDG 140  
 .....R.....  
 .....C.....D.....  
 ...K...D...A.....AGGTP...V...E...AY...DKIFQF...E...TCNM.L...  
 ...VT...Q.S.....N.....KAGIP.Y...DE...L...I.QT.YF-KD...PLNM.L...  
 ...V...S.....KAGIP.Y...DE...L...I.QT.HF-KD...PLNM.L...  
 .....Q.Q.S.....Q.....ATGVP.Y...EE...N...V.QTIVF-QD...PLNM.L...  
 .....Q.S.....QTGVP.Y...DE...E...I.QTIVFKD...QPLNM.L...  
 ...K...D...S.....N.....KAGVP...DE...E...IAQTVKGGSD...GLFNM.L...

GDATLLIHEG VKAEFEPAKNG TIPDPNSTD NAEFQLVLT I KESLKTDP L KYTKMKERLV GVSEETTTGV 210  
 .....Y..S..KL...S.....RDG.....  
 .....YK.S..A...A...I..S..RDG..S..M..H...D.....  
 ...Y..LL..ARV.AGETDLI AT.TSEDEV CLFN.IKRM VES-----G WF.QQRAAIK .....  
 ..L.N...T-----PQLLPGIR .I.....  
 ..L.N...T-----HPQLLSGIR .I.....  
 ..L.T.V.------PQFLAGIK .I...H..  
 ..L.N.V.A-----PQYLAGIR .L..  
 ..L.N.VID-----HHPVLVPKIF .I.....

(peptide 3)  
 KRLYQMANG TLLFPAINVN DSVTKSKFDN LYGCRHSLPD GLMRATDVM I ACQVALVAGY GDVVGKCAAA 280  
 .....I.....  
 H...DLHKK. L.P.....K...KE..V..IR...M...V.C...S.S  
 HN..K.M...I.KV.....E..I..IK.....V.....Q.  
 HN..K.M...I.KV.....E..I..IK.....V.....Q.  
 HN..K.FKE. K.KV.....E..I..IK.....V.....Q.  
 HN.AK.L.K. D.KV.....I.E...IK...L...V.....S.S  
 .N..KRLSK. N.PMC.....E..V..MK.....TCC.C.....

LKQAGARVIV TEIDPICALQ ATMEGLQVLT LEDVVSVDVI FVITITGNKDI IMVDHMRKMK NNAIVCNIGH 350  
 .....P.....E.....SD.....  
 M.....P.....E.....SD.....  
 .RG...K...V...A.D.FE.VV...A.A...I...N..V RIE...E. DM...G...  
 .RGF...I...N...A...YE.T. MDEACQEGN...CI...LGR.FEQ...DD...  
 .RGF...I...N...A...YE.T. MDEACKEGN...CV...LGR.FEQ...DD...  
 .SKM...L...N...C.D.Y.IV. M.TAAPLSN...CR...VRGE.FAV...ED...  
 .AF.S...V...N...A...YE.T...EAAPKAN. I...C...VTGK.FELF...D...V...  
 .RAF...V...V...S...Y..AL V...MA.AH...D...TSE.FPH.R DD.....

(peptide 4)  
 FDNEIDMLGL ETYPGVKRIT IKPQDRWVF PDTNSGIIVL AEGRLMNLGC ATGHPSFVMS CSFTNQVIAQ 420  
 .....P.....GR...I.....  
 .....QVAA. KN---H.WTN .D.V.MIEM .SGAR-.L. S...L..N .....A...L..  
 ..V...VKW. NE-NA.EKVN ...V.YRL KNGRR-.L. ....V...M.....N...M..  
 ..V...VKW. NE-NA.EKVN ...V.YLL KNGHR-.L. ....V...M.....N...M..  
 ..C...VAW. NA-NA..KD. V...V.YTL ANGVH-.L. ....V...G.....N..C..TL..  
 ..C...VKW. N.-NAT.KD. ...V.YTL KNGRH-V.L. ....V...N.....L..  
 ..T..QVGW. -ANAKEHVE ...V.YTM ENGRH-.L. .K...V...S.....N.....L..

LELWNE-KSSG KYEKVVYVLP KHLDEKVAAL HLGKLGAKLT KLSKDQADYI SVPVEGPKYP AHYRY (485 aa)  
 ...K...T.....R.....P.... (450 aa)  
 I...TK---GA E.QPG. I..S.....R...K.I.V...T.RP...E...G.T...F.S D.... (485 aa)  
 I...TH---PD .PVG.HF..K...A.EA .....NV...TEK..Q.L GMSCD..F..D.... (463 aa)  
 I...TH---PD .PVG.HF..K...A.EA .....NV...TEK..Q.L GM.IN..F..D.... (432 aa)  
 IA..TK---TE E.PLG.HL..I..E..R...DQ.....T.TEK.SE.L .....A...V D.... (431 aa)  
 V...TKFGTFQ E.KLGL...T...E..Y...AQ..V...DE..S.L G...A...D.... (430 aa)  
 I...SNG.YPR GDKAGVFF..A.....AHV.....TPK..E..NC..N..F..D.... (437 aa)  
 RDN

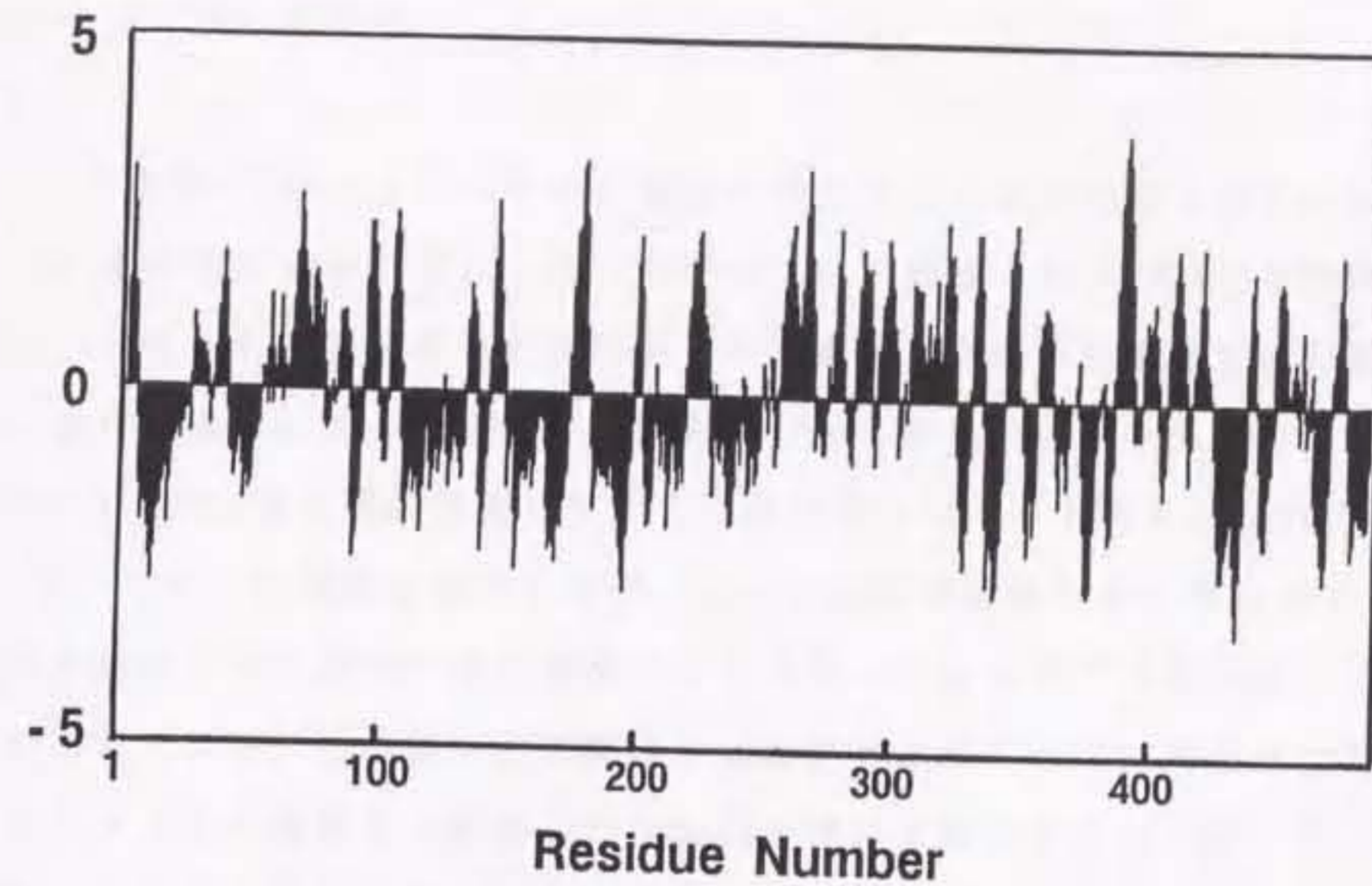


図14. CBP57Aのハイドロパシープロット図

CBP57Aのハイドロパシープロットは、GENETYX ソフトウェアプログラムを用いてウィンドウ数5で行った (Kyte and Doolittle, 1982)。+は疎水性を示し、-は親水性を示す。

(前頁)

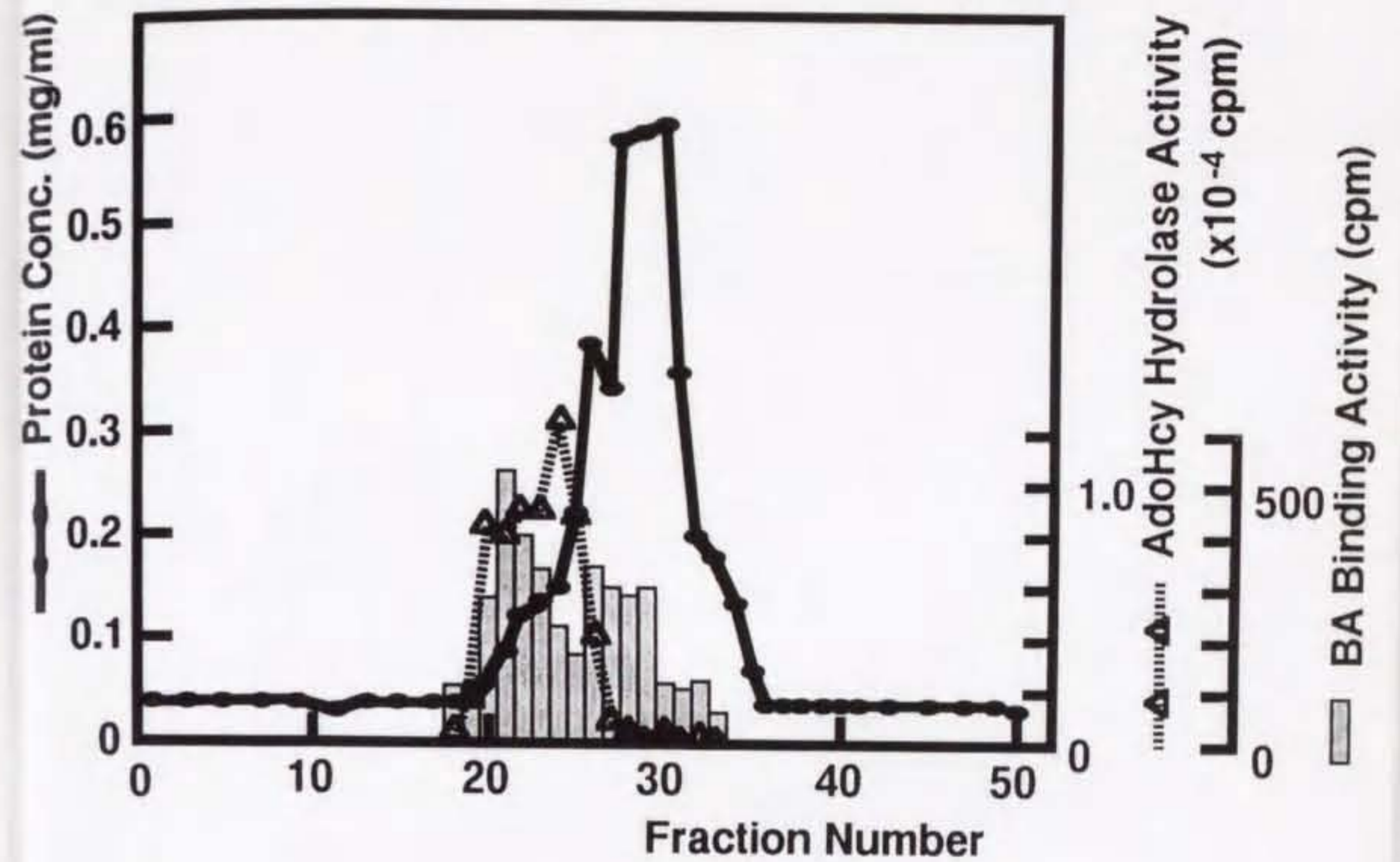
図13. CBP57 と SAHハイドロラーゼのアミノ酸配列の比較

配列が決定されているパセリ (Kawalleck *et al.*, 1992)、*Rhodobacter* (Sganga *et al.*, 1992)、ヒト (Coulter-Karis and Hershfield, 1989)、ラット (Ogawa *et al.*, 1987)、細胞性粘菌 (Kasir *et al.*, 1988)、線虫 (GenBank, accession No. M64306) トリパノゾーマ (Henderson and Ullman, 1992) のSAHハイドロラーゼのアミノ酸配列と比較した。CBP57Aと同じアミノ酸は・で表し、ギャップは-で表す。本研究でプロテインシーケンサーで決定したペプチドの配列 (図9参照) は下線で示し、酵素活性に必要な2ヶ所の活性システインを三角で示す。NAD<sup>+</sup>結合部位を枠で囲い、その中の保存されているグリシン残基を\*で示す。糖鎖によって修飾可能なアスパラギンを矢印で示す。

#### 4. サイトカイニン結合蛋白質複合体のS-アデノシル-L-ホモシステイン ハイドロラーゼ活性

CBP57が実際にSAHハイドロラーゼ活性を持つかどうかを検討するために、大腸菌にCBP57を発現させることにした。TCB1のコード領域(475-1858)を発現ベクターpKK233-2に挿入して大腸菌を形質転換した。集菌した形質転換菌をDEAE緩衝液中に懸濁し超音波破碎によって抽出液を得た。ウェスタンブロット分析の結果、この抽出液中にはCBP57蛋白質が発現していた。抽出液中のサイトカイニン結合活性及びSAHハイドロラーゼ活性を測定したが、いずれの活性も検出されなかった。これは大腸菌内で産生されたCBP57は不溶性のインクルージョンボディを形成して不活性な状態であるためか、蛋白質への翻訳後の修飾がなされていないためだと考えられる。

そこでタバコの緑葉より精製したCBP130を用いて検討することにした。精製の最終段階であるゲル濾過によって分画された画分についてBA結合活性及び酵素活性を測定し、さらにウェスタンブロット分析法によって各画分に含まれるCBP57を検出した。図15に示すように酵素活性はCBP57の存在する画分に認められたが、ウェスタンブロット分析によって検出されるCBP57量はフラクション番号21に最も多く、その後フラクション番号26にかけて徐々に減少していた。従って、CBP57当りの比活性はCBP130複合体を形成している高分子量画分(フラクション番号20~22)よりCBP57モノマーである低分子量画分(フラクション番号24~26)のほうがより高くなる傾向が示された。BA結合活性については、先に述べたようにCBP57と同様に130 kDa(フラクション番号21)をピークとする溶出挙動を示した。この結果は、CBP57はモノマーで存在している場合に高いSAHハイドロラーゼ活性を有しており、サイトカイニン結合能を持つ複合体CBP130を形成した状態では酵素活性が低下する可能性を示唆している。



Fraction Number

• • 20 • • • 25 • • • 30 • •

図15. Superose 12 HR 10/30カラムによるSAHヒドロラーゼの分画のパターン  
0.1 M NaClを含むDEAE緩衝液中で0.3 mL/minの流速で分画を行った。0.6 mLづつフ  
ラクションを回収し、含まれるサイトカニン結合活性と SAHヒドロラーゼ活性  
を測定した。また、回収した画分の10  $\mu$ Lを12.5 %ポリアクリルアミドゲルを用い  
たSDS-PAGEにより分画後、抗CBP57 抗体によってウェスタンブロット分析を行った。  
実線は蛋白質濃度、点線は SAHヒドロラーゼ活性を示し、影をつけたボックスは  
BA結合活性を表す。

サイトカイニン植物の様々な組織で生理活性を示すことから、そのレセプターはあらゆる組織に発現していると考えられる。そこでCBP57の発現レベルをタバコの根、葉及びタバコ培養細胞BY-2を用いてノーザンブロット分析ならびにウェスタンブロット分析法によって調べた。ノーザンブロット分析によってCBP57 mRNAはタバコの細胞質18S rRNA (1.8 kb)と28S rRNA (5 kb)の間に検出された(図16A)。このことはクローン化したCBP57のコード領域を含むcDNAの長さが2120 bp、1930bpである(図11)ことと一致する。転写産物の蓄積量は根で最も多く、次いで培養細胞、葉の順で検出された。プローブはTCB1のコード領域(ポジション475-1858)を用いているためにCBP57A mRNAとCBP57B mRNAを区別できないので、各組織における両者のmRNAの蓄積量の差は不明である。

ウェスタンブロット分析の結果、CBP57蛋白質は根、葉、培養細胞のいずれの組織においても57 kDaに検出された(図16B)。用いた抗体はポリクローナル抗体でCBP57AとCBP57Bの両者を検出するが、両者の分子量による違いは検出されなかった(p.47参照)。TCB1とTCB2とで最長のRFの長さが異なっていたが、ウェスタンブロット分析による結果からどちらか一方の翻訳産物が著しく少ないか、両者は同じ長さのRF(450コドン)を持つと考えられる。CBP57蛋白質の蓄積量は、CBP57 mRNAと同様に根で最も多く葉の約10倍量のCBP57蛋白質が検出され、培養細胞では葉のおよそ2倍のCBP57が検出された。このことは、CBP57の発現調節は主にRNAレベルで行われていることを示している。



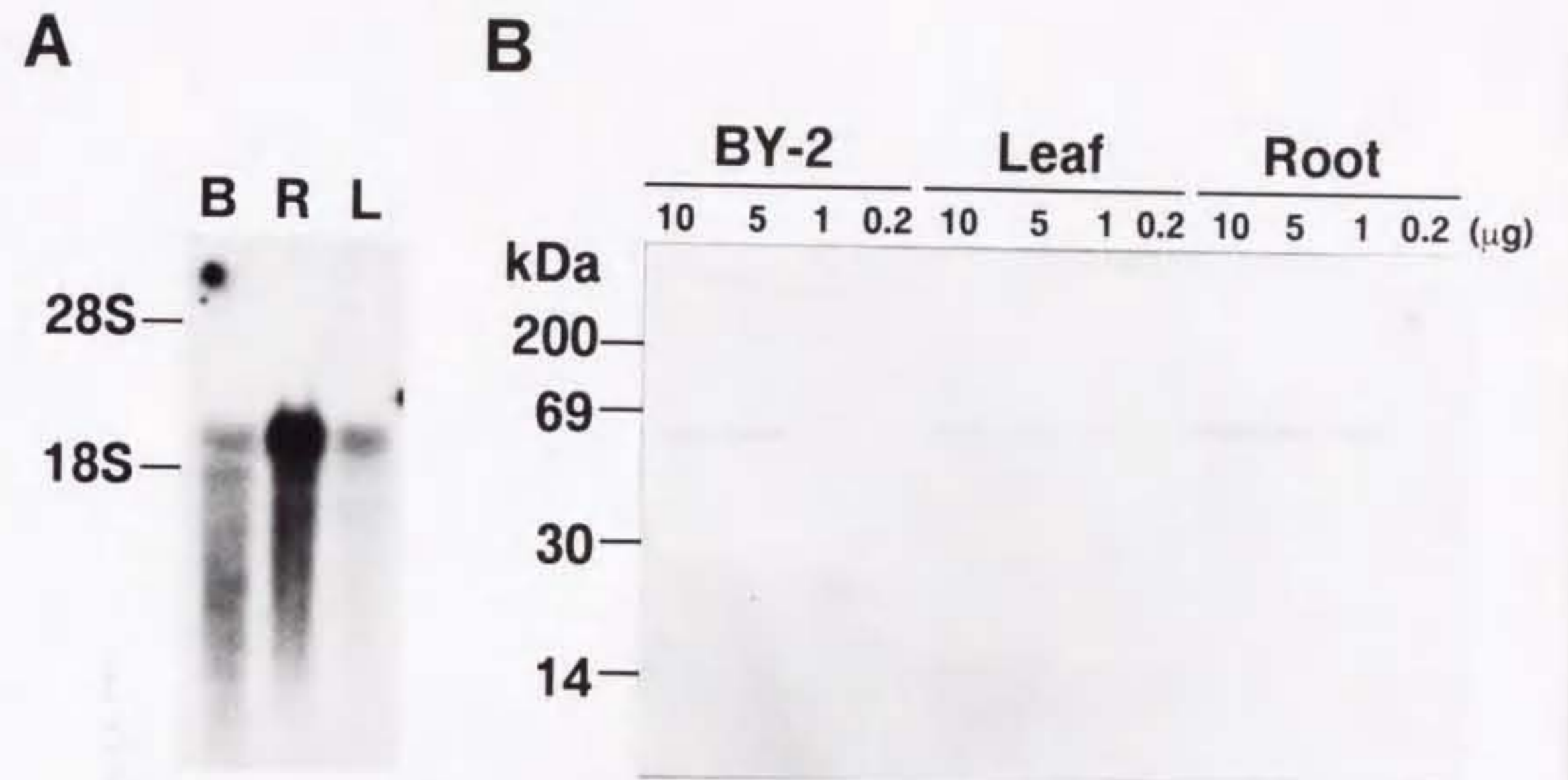


図16. CBP57とそのmRNAのノーザン及びウェスタンブロット分析

A: ノーザンブロット分析。タバコ (*N. glauca*) の葉 (L)、根 (R)、タバコ培養細胞BY-2 (B) より抽出した全RNA 10  $\mu$ gをホルムアミドを含む1.2% アガロースゲル電気泳動で分画した。プローブにはTCB1のコード領域 (ポジション475-1858) を用い65°Cで12時間ハイブリダイゼーションを行った後、0.1  $\times$  SSC, 0.1% SDSで洗浄を行った。タバコの細胞質の18S rRNA (1.8 kb)と28S rRNA (5 kb)をサイズマーカーとして用いた。B: ウェスタンブロット分析。BY-2、タバコの葉及び根より抽出した10~0.2  $\mu$ gの可溶性蛋白質を0.1% SDSを含む12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて泳動した。これをPVDFフィルターにブロット後、抗CBP57抗体を用いて検出した。サイズマーカーは、Myosin (200 kDa)、BSA (69 kDa)、Carbonic anhydrase (30 kDa)、Lysozyme (14 kDa)を用いた。

1. 葉緑体の蛋白質合成に及ぼすサイトカイニンの影響

葉においてサイトカイニンは様々な蛋白質やRNAの合成を促進することが知られている (Sugiura *et al.*, 1962; Lerbs *et al.*, 1984; Flores and Tobin, 1986, 1988; Memelink *et al.*, 1987; Momotani *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1990)。葉緑体蛋白質についてはLHCPやRubisCo 小サブユニットなどの核ゲノムにコードされている葉緑体蛋白質のmRNA蓄積量がサイトカイニン処理によって増加することが知られている。Lerbsらは、切除したカボチャの子葉をサイトカイニン処理することによりRubisCo 大小サブユニットのmRNAおよび蛋白質量が増加すると報告している。そこで、葉緑体単独でサイトカイニン応答性を持つかどうかをin organello翻訳系を用いて調べることにした。

その結果、葉緑体単独では各種のサイトカイニンに対する応答性は認められなかった。しかし、切除したタバコの緑葉をサイトカイニン処理することにより老化による葉緑体の蛋白質合成能の低下を抑制することが示された(図2)。このサイトカイニンによる老化抑制の効果は、SDS-PAGEで分析する限り、特定の翻訳産物の増減によるものではなかった。

以上のことから、サイトカイニンは葉緑体の発達を促進したり老化に伴う葉緑体の蛋白質合成の衰退を抑制するが、サイトカイニンレセプターが存在するとすれば、葉緑体中ではなく細胞質あるいは細胞膜上に存在していることを示唆している。また、サイトカイニンのもたらした情報は葉緑体に伝達されていることも示しており、サイトカイニンレセプターを起点とする細胞内の情報伝達系を解明することにより細胞質-オルガネラ間の相互作用を理解する糸口になると思われる。そこで、タバコの緑葉よりサイトカイニンレセプターの候補としてサイトカイニン結合蛋白質の単離を行い、この構造解析を行うことにした。

## 2. サイトカイニン結合蛋白質複合体CBP130の精製と性質について

現在までに様々な植物からサイトカイニン結合蛋白質が単離・精製されているが (Takegami and Yoshida, 1975; Polya and Davis, 1978; Moore, 1979; Chen *et al.*, 1980; Erion and Fox, 1981; Hamaguchi *et al.*, 1985; Kulaeva *et al.*, 1990; Romanov *et al.*, 1990; Momotani and Tsuji, 1992)、これらの多くはサイトカイニンを結合させたアフィニティーカラムを用いて精製が行なわれている。アフィニティーカラムは、酵素やレセプターを精製する際に簡便で特異性の高い方法であるが、たとえ生体内で多量に存在していても *in vitro* で結合能の低いものは精製されないという危険性を伴う。また、サイトカイニンは難溶性の化合物なので強アルカリや有機溶媒を用いるような厳しい条件でカラムに結合した蛋白質を溶出しなければならない。このために溶出される蛋白質は非特異的に吸着したものを含んでいたり、変性していたりする可能性がある。実際にCBP130をBA-Sepharoseに吸着させた場合、0.1 M KOH または 2 M KCl で多数の非特異的に吸着した蛋白質と共にCBP130は溶出された。こうしたことから、CBP130の精製はアフィニティーカラムを用いずに各精製段階でサイトカイニン結合活性をゲル濾過法で測定し、最もサイトカイニン結合活性の多く含まれる画分について精製を進めて行くことにした。しかし、今回精製を進めてきた画分以外にもサイトカイニン結合活性を持つ成分 (例えばDEAEセルロースの非吸着画分等) が認められていること、さらにタバコの緑葉から分子量の異なるサイトカイニン結合蛋白質が精製されていることから (Takegami and Yoshida, 1975; Momotani and Tsuji, 1992)、タバコの緑葉におけるサイトカイニン結合蛋白質は一種類ではないことが示唆される。

精製したサイトカイニン結合蛋白質複合体CBP130は今までに知られていないもので、CBP36とCBP57という二種類の蛋白質から成る複合体であった。Romanov らは (1990) 我々と同様にイオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水性カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過を行ってトウモロコシの子葉から45 kDaのサイトカイニン結合蛋白質を精製した。この蛋白質は二つのサイトカイニン結合部位を持ち、アデニンやATP によってサイトカイニンとの結合が阻害されるなどCBP130と良く似た性質を持つ。分子量が45,000とCBP130と異なるが、彼らは精製の初期段階でゲル濾過を行い45 kDaの画分を回収しているために複合体を回収できなかった可能性がある。

しかし、ゼアチンに対するKd値が $11.5 \times 10^{-9}$  MとCBP130と比べ高い親和性を持つ点が異なっている。

ErionとFox (1981) は、コムギの種子より精製したサイトカイニン結合蛋白質 CBF-1 がCBP130のように54 kDaのサブユニットの三量体からなる複合体であることを報告している。しかし、このCBF-1 蛋白質及びBA結合活性は発芽後3日目までに著しく低下し4日目には消失することから、コムギの乾燥種子中にサイトカイニンを保持しておく蛋白質だと考えられている (Brinegar et al., 1985)。CBP130のサブユニットであるCBP57 は、タバコの葉以外に根及び培養細胞中にも存在していることから (図16A、B)、CBF-1 とは異なった重要な働きをしていると考えられる。サイトカイニンはあらゆる組織に作用することから、そのレセプターは様々な組織で発現していると考えられる。様々な組織で発現しているCBP130の発現パターンは、このサイトカイニン結合蛋白質複合体がサイトカイニンレセプターである必要条件の一つを満たしていると考えられる。

CBP130のBAへの結合はアデニンやATP によって阻害されたが (表2)、このことは次に示すいずれかの可能性を示唆している。i) BAはCBP130にさほど強く結合していないためにこれらのアデニン誘導体がBAと拮抗した。ii) CBP130にはBA結合サイト以外にアデニン誘導体と結合する領域を持ち、アデニン誘導体と結合することによってBAとの結合能が低下するような立体構造の変化が生じた。CBP130のサイトカイニン結合能がアデニン誘導体によって拮抗阻害を受けるならば、CBP130はBAのアデニル基を認識していると考えられる。ところが、CBP130のサイトカイニン結合能はアデニンやATPで阻害されるが、cAMPではさほど阻害されなかった。この事実は、後者の可能性が強いことを示唆していると思われる (後述)。

タバコの緑葉の可溶性画分をDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーにかけると粗抽出液中に含まれているサイトカイニン結合活性のうち約85%が0.1 M NaClによって溶出されてきた。その後に行ったクロマトグラフィーでサイトカイニン結合活性はシングルピークとして溶出されてCBP130が単離されたことから、CBP130はタバコの緑葉中に最も多量に含まれているサイトカイニン結合蛋白質であると考えられる。

Scatchard分析では、CBP130のBAとの解離定数は、 $2.1 \times 10^{-5}$  Mと算出された (図8)。この値は他のサイトカイニン結合蛋白質と比較すると低いように思われ

るかもしれない。しかし、一般的に組織中のサイトカニン含量は100-1,000 pmol/gすなわち $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6}$  Mとされており (King, 1988; Smigocki and Owens, 1988; Munoz *et al.*, 1990)、 $2.1 \times 10^{-6}$  Mはそれ程低い値とは考えられない。また、この値は *in vitro*での値であって必ずしも *in vivo*での機能を反映しているとは言い切れない。CBP130がサイトカニンレセプターである可能性を検証するためには、組換え植物体や培養細胞にCBP130を過剰発現させた *in vivo*系などを用いていく必要があると思われる。

### 3. 57 kDaサブユニットの構造について

CBP130は、CBP57とCBP36の二つのサブユニットからなり、その機能を考察する上でサブユニットの構造を知ることが大きな手がかりとなる。これら二つのサブユニットのうち、CBP57はSuperose 12によるゲル濾過でサイトカニン結合能と同様の溶出パターンを示した (図7)。このことからCBP57はサイトカニン結合能に必要なサブユニットと考え、CBP57についてcDNAをクローン化し、構造解析を行うことにした。

得られたcDNAクローンは2種類存在したが、これらがコードするアミノ酸配列はいずれも先に決定したペプチドの配列を含んでおり、CBP57をコードしていることが明らかにされた。

予想されるCBP57のアミノ酸配列を用いて蛋白質データベースをホモロジーサーチした結果、CBP57はヒト、ラット、細胞性粘菌のSAHヒドロラーゼ (図13)と有意な相同性を持つことが示された。CBP57には、活性部位中の2ヶ所のシステイン残基 (86及び120残基目) やNAD<sup>+</sup>結合部位の共通配列 (G-X-G-X-X-G、269残基目~274残基目) が保存されているので、CBP57はSAHヒドロラーゼ活性を保持していると考えられた。精製したCBP130をゲル濾過にかけて各フラクションに含まれる酵素活性を測定し、ウェスタンブロット分析によりCBP57の存在を調べた。その結果、CBP57が存在するフラクションのみにSAHヒドロラーゼ活性が存在し (図15)、CBP57がSAHヒドロラーゼ活性を持つことが確認された。また、ウェスタンブロット分析の結果からCBP57モノマーの酵素活性の比活性がCBP130複合体を形成した時

より高いことが示唆された。このことから、CBP57はサイトカイニン結合能を持つCBP130複合体を形成することによりその酵素活性が調節されていると考えられる。

CBP57は実際にSAHヒドロラーゼ活性を保持しており、これに必要な配列を持っているが、その他にCBP57特有の41残基からなる配列(150残基目のグリシン~190残基目のロイシン)が挿入されていた。最近、バセリとRhodobacterのSAHヒドロラーゼcDNAと遺伝子がクローン化され(Kawalleck *et al.*, 1992; Sganga *et al.*, 1992)、これらにも同様の配列が挿入されていることから、この挿入配列は光合成生物に特有に見られるものと考えられる。

CBP57には、Brinegarら(1988)がコムギのサイトカイニン結合蛋白質CBF-1で報告しているサイトカイニン結合部位の配列(A-F-L-Q-P-S-H-H-D-A-D-E)は認められない。CBP57のサイトカイニン結合部位は定かではないが、可能性として以下のことが考えられる。i) サイトカイニンはNAD<sup>+</sup>結合部位に結合する。Hohmanら(1985)は細胞性粘菌のSAHヒドロラーゼについて、この部位にcAMPが結合することにより酵素活性を抑制すると報告している。ii) サイトカイニンとSAHでは、アデニル基が共通しているので、基質であるSAHと拮抗して活性部位に結合する。しかしながら、CBP130の酵素活性測定系に10<sup>-4</sup> Mゼアチンを加えて2時間反応してもほとんど効果が見られなかったことから、この可能性は低いと思われる。iii) 最後にサイトカイニンはCBP130のもう一つのサブユニットであるCBP36に結合するという考え方がある。サイトカイニン結合部位の決定には、CBP57の欠失変異体を作製して機能ドメインを解析するとともにCBP36の構造を解析していく必要があると思われる。

#### 4. サイトカイニン結合蛋白質複合体CBP130の機能について

CBP130のサブユニットであるCBP57は、SAHヒドロラーゼと相同性を示し(図13)実際にCBP130画分には本酵素活性が存在していた(図15)。SAHヒドロラーゼは、真核生物に存在する酵素でSAHを可逆的にアデノシンとホモシステインに分解する活性を持つ(図17B)。SAHは、メチルトランスフェラーゼによるS-アデノシルメチオニン(SAM)のメチル基転移反応によって生じる反応産物でメチルトランスフェラーゼによるメチル基転移反応を拮抗的に阻害する(図17A)。このことからこの

酵素は生体中のSAMとSAHの濃度比 (SAM/SAH) を調節することによってSAMによるメチル化を制御していると考えられている。また、この酵素はマウスの肝臓、ヒトのリンパ球、胎盤において主要なcAMP及びアデノシン結合蛋白質で (Hershfield and Kredich, 1978, Saebo and Ueland, 1978)、cAMPや2'-デオキシアデノシンはこの酵素活性を可逆的に阻害することが知られており (Ogawa *et al.*, 1987)、cAMPによるメチル化の制御機構の存在が示唆されている。植物ではルピナスの種子の成熟から発芽にいたる過程において絶えずその酵素活性が存在しており (Guranowski and Pawelkiewicz, 1978)、植物でもこの酵素は重要な役割を果たしていると考えられる。

一方、サイトカイニンは細胞分裂の促進、葉緑体の発達促進、老化抑制、分化誘導など非常に多様な生理的機能を持つことが知られている (Davies, 1987; Zeroni and Hall, 1980)。葉においてはサイトカイニンがクロロフィル合成を促進することが知られている (Sugiura, 1963; Seyer and Lescure, 1984; Davies, 1987)。最近Sgangaらは (1992)、*Rhodobacter*のSAHヒドロラーゼ遺伝子を不活化するとSAM/SAHが変化することによりバクテリオクロロフィル合成が抑制される現象を報告している。この現象について彼らはSAM/SAHが低下したためにバクテリオクロロフィル合成系のメチル基転移反応が阻害されたためだと説明している。高等植物におけるクロロフィル合成系は、バクテリオクロロフィル合成系と同様にメチル基転移酵素 S-アデノシル-L-メチオニン: マグネシウムプロトポルフィリンメチルトランスフェラーゼ (EC 2.1.1.11) によるメチル基転移反応を経る (図18)。この反応は高等植物の葉緑体内で行われるので、細胞内のSAM/SAHを変化させることにより葉緑体内でのクロロフィル合成を調節できると考えられる。CBP130は細胞質に存在していると考えられるので、サイトカイニンは直接葉緑体に作用しなくてもCBP130を介してSAH濃度を変化させることにより葉緑体に情報を伝達してクロロフィル合成の調節を行っていると考えられることができる。

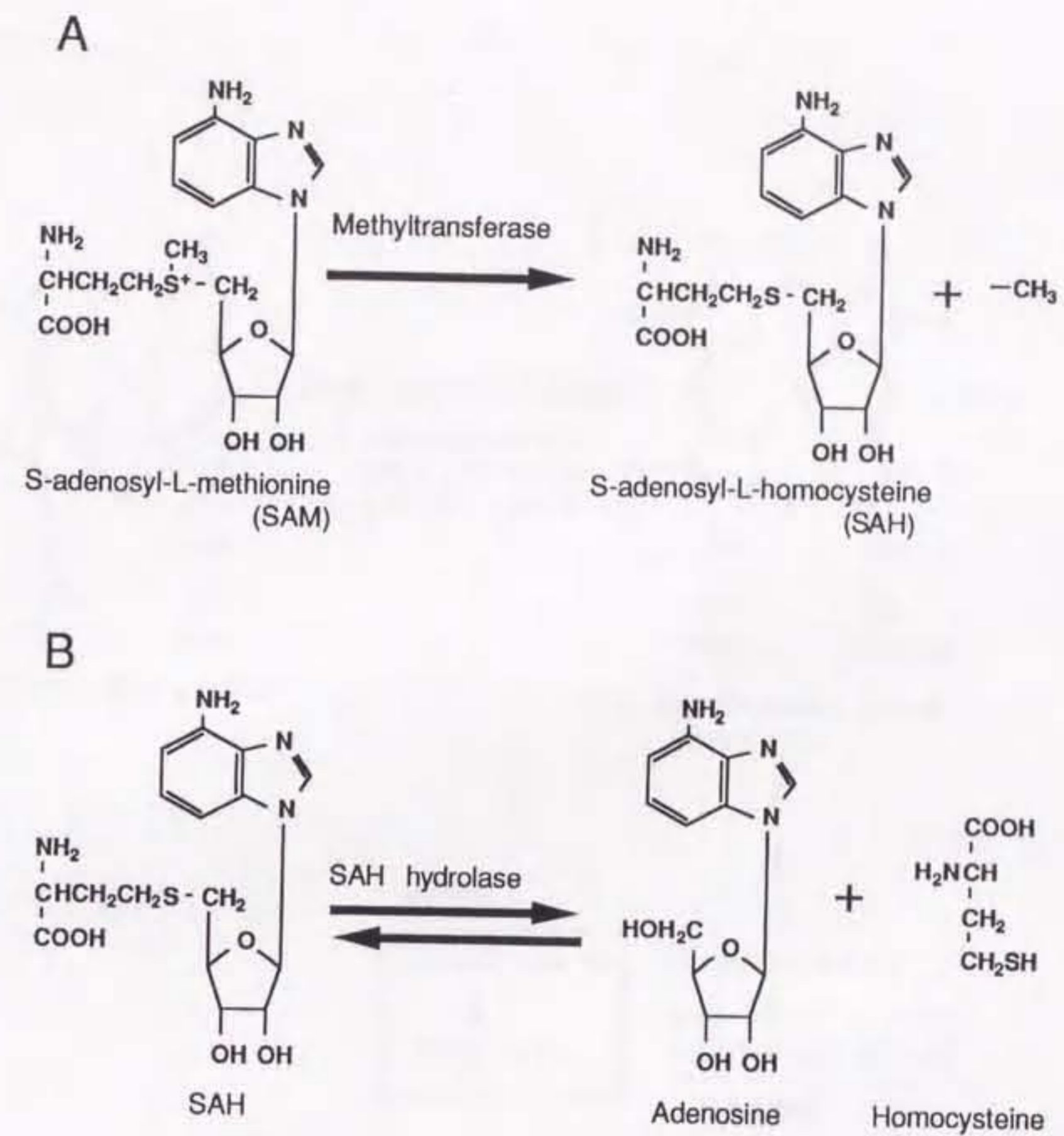


図17. SAHヒドロラーゼの触媒する反応

メチル基転移酵素によって蛋白質あるいはDNAなどがメチル化される際に副産物としてSAHが生じる(A)。SAHヒドロラーゼは、これを可逆的にアデノシンとホモシステインに加水分解する(B)。SAHはメチル基転移反応を阻害するため、SAHヒドロラーゼはメチル基転移反応を間接的に調節することになる。



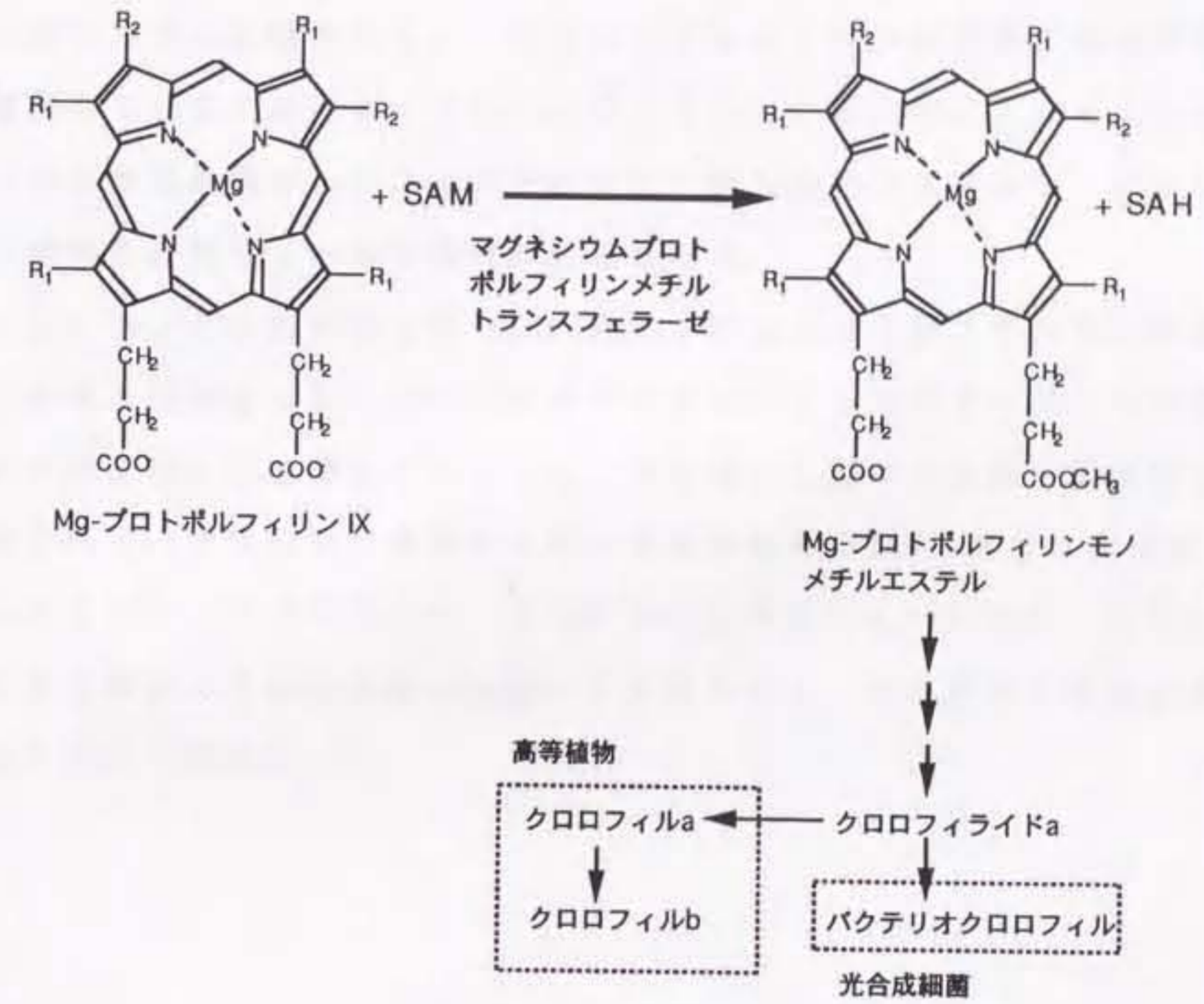


図18. クロロフィル合成系におけるメチル基転移反応

S-アデノシル-L-メチオニン：マグネシウムプロトポルフィリンメチルトランスフェラーゼ（EC 2.1.1.11）によってMg-プロトポルフィリンIXがメチル化される。その後いくつかの反応を経て光合成細菌ではバクテリオクロロフィルが、植物ではクロロフィルが合成される。

また、広範囲にわたるサイトカイニンの作用機構を解明するために、サイトカイニンによって発現誘導される遺伝子の探索が行われている。その結果、RubisCO や LHCP等の葉緑体蛋白質や細胞壁に含まれ細胞の伸長を制御する蛋白質イクステンシン (extensin)、微生物の侵入や傷害等に対する防御に関連するキチナーゼやPR-1蛋白質などがサイトカイニンによって発現誘導されることが明らかになったが (Flores and Tobin, 1986, 1988; Memelink *et al.*, 1987; Shinshi *et al.*, 1987; Abdelghani *et al.*, 1991)、これらの発現はサイトカイニンによる刺激から1日以上経った後に誘導される。このためサイトカイニンが直接これらの遺伝子の発現を制御しているとは考えにくい。こうしたことから、サイトカイニンは直接個々の遺伝子の発現を調節しているのではなく、何らかの二次メッセンジャーを介して遺伝子発現を調節している可能性が示唆される。

サイトカイニンとの結合能を持つCBP130のサブユニットがメチル化の調節酵素であることを考え合わせると、CBP130がサイトカイニンレセプターとしての役割を担い、メチル基転移反応を調節することにより生理的に様々な反応を引き起こす可能性が示唆される。すなわち、各種のメチル基転移酵素のSAHに対する感受性は1,000倍以上異なるので、サイトカイニンとCBP130により生じるSAM/SAHの変化によって遺伝子や蛋白質がメチル化あるいは脱メチル化されて、その発現や機能が調節されると考えられる (図19)。

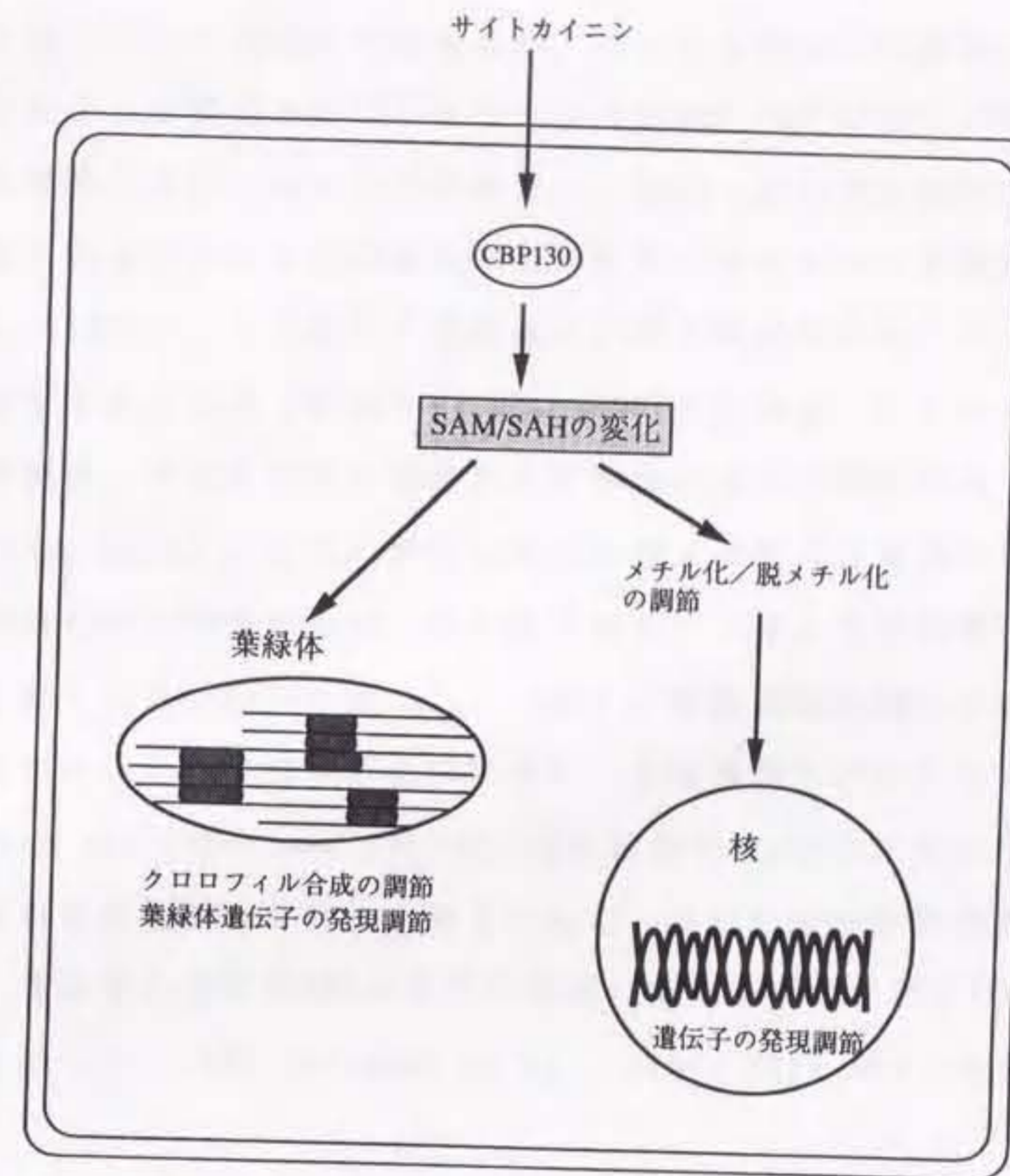


図19. CBP130を介したサイトカイニンの作用モデル

サイトカイニンによりCBP130のSAHヒドロラーゼ活性が変動し、細胞内のSAM/SAHが変化する。これに伴い葉緑体ではメチル基転移反応を介するクロロフィル合成が調節され、核内では蛋白質やDNAのメチル化/脱メチル化が起こり様々な遺伝子の発現が調節される。

また、以下に述べるようなDNAや蛋白質のメチル化の重要性からもサイトカニンがSAHを介してメチル基転移反応を調節している可能性は興味深い。

DNAや蛋白質のメチル化はあらゆる生物で知られており、植物でもメチル化に関していくつかの報告がなされている。アカカブではサイトカニンとオーキシンの濃度比によって $\beta$ シアニン含量が変化するが、この $\beta$ シアニン代謝系に働く酵素の発現はメチル化によって調節されているらしい (Girod and Zryd, 1991)。サイトカニン感受性葉緑体を持つコケの変異株では、rbclのmRNAの発現がサイトカニンによって誘導されるが、このrbcl遺伝子はメチル化されていると報告されている (Reski et al., 1991)。この他にも葉緑体内の蛋白質が特異的にメチル化されているという報告もされている (Niemi et al., 1990)。最近、オオムギのB-ホルデイン遺伝子の発現は、プロモーター部位のメチル化によって調節されていると報告された (Sorensen, 1992)。また、トランスジェニックタバコを用いた実験では、導入した $\beta$ -glucuronidase遺伝子がメチル化されることによりその発現が抑制されることが示唆されている (Weber et al., 1990)。動物細胞のDNAでは、全シトシン中の3~6%がメチル化されているのに対し、高等植物では30%にも及ぶということから (Wagner and Capesius, 1981)、高等植物ではDNAのメチル化が遺伝子発現の調節に重要な役割を担っていると考えられる。さらに動物細胞や細菌でもDNAのメチル化が、遺伝子の発現やDNAの複製を制御していることを示す報告が行われている (Seyfert et al., 1990; Paroush et al., 1990; Boye and Lobner-Olesen, 1990)。

蛋白質のメチル化も生理的な役割を担っている。Perez-Salaら (1991)は、網膜の棒状細胞 (Rod outer segment, ROS) 中に存在するG蛋白質の一種であるトランスデュシン (Transducin,  $T\gamma$ ) をはじめとする一連のG蛋白質がメチル化/脱メチル化されると報告している。さらにこれらの蛋白質のメチル化はSAH存在下で阻害され、これにROSの膜画分を加えると脱メチル化が生じたことから、視覚細胞の情報伝達においてSAHを介したメチル化調節によるシグナル伝達機構の存在が示唆されている。また、大腸菌など走化性を示す細菌では走化性分子の結合/解離によってケモレセプター (Chemoreceptor) がメチル化/脱メチル化されて遊走する方向が決められることが知られている (Springer et al., 1979; Alam et al., 1989)。

本研究によって、サイトカニン結合蛋白質複合体CBP130がタバコの緑葉から精製され、そのサブユニットの一つCBP57がSAHヒドロラーゼであることを明らかにした。この事実と遺伝子の発現調節や細胞内情報伝達に対するメチル化の重要性を示唆する多くの報告、サイトカニンによる即時的な反応が見つかからないことから、サイトカニンは、CBP130を介して間接的にメチル化を調節することにより多様な生理作用を引き起こしている可能性を示唆した。今後、サイトカニンとCBP130の生理的役割との関連をさらに明らかにするために、ゲル濾過や抗CBP57抗体を用いた免疫沈降法によりCBP130複合体の安定性に対するサイトカニンの影響を調べたり、キネティックな酵素活性の測定を行ってサイトカニンのSAHヒドロラーゼ活性に及ぼす影響を調べることで、CBP57の欠失変異体を作製してサイトカニン結合部位を同定していくことなどが必要である。また、抗CBP57抗体を用いてCBP130の細胞内の局在性を免疫組織学的に明らかにし、CBP57を大量発現するタバコの組換え植物体を作製して今までに報告されているサイトカニン合成遺伝子を多量発現させたタバコの組換え体の形態と比較することによってCBP130の生理的役割を明らかにすることができると思われる。さらに、もう一方のサブユニットであるCBP36についてもcDNAをクローン化してその構造を解析していくことにより、サイトカニンの作用機構に関する知見が深められると考えられる。

無傷葉緑体を用いた *in organello* 翻訳を行ってタバコの緑葉のサイトカイニンに対する応答性を確認した。タバコの緑葉を切除して一晩暗所に放置した後無傷葉緑体を調製して *in organello* 翻訳を行ったところ、切除後直ちに調製した無傷葉緑体を用いた場合に比べ翻訳活性が70%ほどに低下した。暗所に放置する際に $10^{-4}$  MのBAを添加しておくこと翻訳活性の低下は認められなかった。このことと直接翻訳系にサイトカイニンを加えても効果が見られなかったことからタバコの緑葉の細胞質または細胞膜でのサイトカイニンレセプターの存在が示唆された。

タバコの緑葉中のサイトカイニンレセプターの候補としてサイトカイニン結合蛋白質複合体の精製を行った。DEAEセルロース、Mono Q、Phenyl Superose、Superose 12によるカラムクロマトグラフィーにより130 kDaのサイトカイニン結合蛋白質複合体を700倍に精製し、CBP130と名付けた。CBP130はBA結合部位を2ヶ所持ち、それぞれのKd値は $2.1 \times 10^{-5}$  M、 $1.6 \times 10^{-4}$  Mであった。また、CBP130のBAへの結合はゼアチン、アデニンやATPによって阻害された。

SDS-PAGEによりCBP130は57 kDa (CBP57) と36 kDa (CBP36) の2種類の蛋白質から成る複合体であることを示した。CBP57をLysyl endopeptidaseで消化して生じるペプチドのアミノ酸配列を決定し、これをもとに作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いてCBP57をコードするcDNAをクローン化した。決定した塩基配列とサザンブロット分析からCBP57遺伝子はタバコのハプロイドゲノム当り2~3コピー存在することが示唆された。

塩基配列から予想されるCBP57のアミノ酸配列は光合成生物に特有な41アミノ酸からなる挿入配列が存在していたが、メチル基転移反応の調節酵素であるSAHヒドロラーゼと高い相同性を示した。実際にゲル濾過により分画したCBP130画分に本酵素活性が存在しており、CBP130複合体を形成するとCBP57単独で存在するときより高い比活性を保持する傾向が見られた。また、ノーザン及びウェスタンブロット分析法によりタバコの根、葉及び培養細胞でのCBP57の発現を確認した。

以上の結果から、CBP130はメチル基転移反応の調節酵素をサブユニットに持つサイトカイニンレセプターで、サイトカイニンの生理作用の一部はメチル基転移反応を調節することにより生じている可能性について考察した。

## 謝 辞

本研究を行うにあたって終始絶え間ない御指導を賜った名古屋大学遺伝子実験施設 杉浦 昌弘教授、杉田 護助教授に感謝致します。タバコのcDNAライブラリーを譲渡下さった北海道大学 小保方 潤一助教授とペプチド断片の分離に関して貴重な御助言を下さいました理化学研究所 池内 昌彦博士に御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり有意義な議論を行って下さいました若杉 達也博士、松林 徹博士に感謝し、名古屋大学在学中にお世話になりました名古屋大学遺伝子実験施設の皆様にお礼申し上げます。

名古屋大学在学中、奨学金を供与下さいました三井植物バイオ研究所に感謝致します。

引 用 文 献

- Abdelghani, M. O., Suty, L., Chen, J. N., Renaudin, J.-P.  
and de la Serve, B. T. (1991) *Plant Sci.*, **77**, 29-40.
- Alam, M., Lebert, M., Oesterhelt, D. and Hazelbauer, G. L. (1989)  
*EMBO J.*, **8**, 631-639.
- Amann, E. and Brosius, J. (1985) *Gene*, **40**, 183-190.
- Ananiev, E. D., Karagyozev, L. K. and Karanov, E. N. (1987)  
*Planta*, **170**, 370-378.
- Armstrong, D. J., Burrows, W. J., Skoog, F., Roy, K. L. and Soll,  
D. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 834-841.
- Bearder, J. R. (1980) In MacMillan, J. (ed.), *Encyclopedia of  
Plant Physiology*. Springer-Verlag, Berlin, **Vol. 9**, pp.9-112.
- Boye, E. and Lobner-Olesen, A. (1990) *Cell*, **62**, 981-989.
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brinegar, A. C., Stevens, A. and Fox, J. E. (1985) *Plant  
Physiol.*, **79**, 706-710.
- Brinegar, A. C., Cooper, G., Stevens, A., Hauer, C. R.,  
Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Fox, J. E. (1988) *Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA*, **85**, 5927-5931.
- Chen, C.-M. (1989) In Kung, S.-D. and Arntzen, C. J. (ed.), *Plant  
Biotechnology*. Butterworths, Boston, pp.245-256.
- Chen, C.-M. and Hall, R. H. (1969) *Phytochem.*, **8**, 1687-1695.
- Chen, C.-M. and Leisner, S. M. (1985) *Plant Physiol.*, **77**, 99-103.
- Chen, C.-M., Melitz, D. K., Petschow, B. and Eckert, R. L. (1980)  
*Eur. J. Biochem.*, **108**, 379-387.
- Coulter-Karis, D. E. and Hershfield, M. S. (1989) *Ann. Hum.  
Genet.*, **53**, 169-175.



- Crowell, D. N., Kadlecek, A. T., John, M. C. and Amasino, R. M.  
(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8815-8819.
- Davies, P. J. (1987) In Davies, P. J. (ed.), *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp.1-11.
- Eichholz, R., Harper, J., Felix, G. and Meins, F., Jr. (1983)  
*Planta*, **158**, 410-415.
- Erion, J. L. and Fox, J. E. (1981) *Plant Physiol.*, **67**, 156-162.
- Flores, S. and Tobin, E. M. (1986) *Planta*, **168**, 340-349.
- Flores, S. and Tobin, E. M. (1988) *Plant Mol. Biol.*, **11**, 409-415.
- Fox, J. E. and Erion, J. L. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 694-700.
- Girod, P. A. and Zryd, J. P. (1991) *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **25**, 1-12.
- Goldthwaite, J. J. (1987) In Davies, P. J. (ed.) *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp.553-573.
- Gomi, T. Ogawa, H. and Fujioka, M. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 13422-13425.
- Guranowski, A. and Pawelkiewicz, J. (1978) *Planta*, **139**, 245-247.
- de la Haba, G. and Cantoni, G. L. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 603-608.
- Hall, R. H. and Strivastava, B. I. S. (1968) *Life Sci.*, **7**, 7-13.
- Hamaguchi, N., Iwamura, H. and Fujita, T. (1985) *Eur. J. Biochem.*, **153**, 565-572.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

- Henderson, D. M. and Ullman, B. (1992) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **53**, 169-184.
- Hershfield, M. S. and Kredich, N. M. (1978) *Science*, **202**, 757-760.
- Hohman, R. J., Guitton, M. C. and Veron, M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4578-4581.
- Houssa, C., Jacquard, A. and Bernier, G. (1990) *Planta*, **181**, 324-326.
- Kaminek, M. (1992) *TIBTECH.*, **10**, 159-164.
- Kawalleck, P., Plesch, G., Hahlbrock, K. and Somssich, I. E. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4713-4717.
- King, P. J. (1988) *Trends in Genetics*, **4**, 157-162.
- Kasir, J., Aksamit, R. R., Backlund, P. S., Jr. and Cantoni, G. L. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 359-364.
- Kulaeva, O. N., Karavaiko, N. N., Moshkov, I. E., Selivankina, S. Yu. and Novikova, G. V. (1990) *FEBS Lett.*, **261**, 410-412.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
- Lerbs, S., Lerbs, W., Klyachko, N. L., Romanko, E. G., Kulaeva, O. N., Wollgiehn, R. and Parthier, B. (1984) *Planta*, **162**, 289-298.
- Letham, D. S. (1963) *Life Sci.*, **8**, 569-573.
- Libbenga, K. R. and Mennes, A. M. (1987) In Davies, P. J. (ed.), *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp.194-221.
- Lu, J.-L., Ertl, J. R. and Chen, C.-M. (1990) *Plant Mol. Biol.*, **14**, 585-594.
- Matsudaira, P. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 10035-10038.

- Memelink, J., Hoge, J. H. C. and Schilperoort, R. A. (1987) *EMBO J.*, **6**, 3579-3583.
- Miller, C. O., Skoog, F., von Saltza, M. H. and Strong, F. M. (1955) *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1329.
- Momotani, E., Kinoshita, I., Yokomura, E.-I. and Tsuiji, H. (1990) *Plant Cell Physiol.*, **31**, 621-625.
- Momotani, E. and Tsuji, H. (1992) *Plant Cell Physiol.*, **33**, 407-412.
- Moore, F. H. III (1979) *Plant Physiol.*, **64**, 594-599.
- Munoz, J. L., Martin, L., Nicolas, G. and Villalobos, N. (1990) *Plant Physiol.*, **93**, 1011-1016.
- Neuberger, A., Gottschalk, A., Marshall, R. D. and Spiro, R. G. (1972) In Gottschalk, A. (ed.), *The Glycoproteins : their Composition, Structure, and Function*. Elsevier, Amsterdam, pp. 450-490.
- Niemi, K. J., Adler, J. and Selman, B. R. (1990) *Plant Physiol.*, **93**, 1235-1240.
- Obokata, J. (1987) *Plant Physiol.* **84**, 535-540.
- Ogawa, H., Gomi, T., Mueckler, M. M., Fujioka, M., Backlund, P. S., Jr., Aksamit, R. R., Unson, C. G. and Cantoni, G. L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 719-723.
- Paroush, Z., Keshet, I., Yisraeli, J. and Cedar, H. (1990) *Cell*, **63**, 1229-1237.
- Perez-Sala, D., Tan, E. W., Canada, F. J. and Rando, R. R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3043-3046.
- Peterkofsky, A. and Jesensky, C. (1969) *Biochem.*, **8**, 3798-3809.
- Polya, G. M. and Davis, A. W. (1978) *Planta*, **139**, 139-147.

- Poulton, J. E. and Butt, V. S. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 135-142.
- Reski, R., Wehe, M., Hadeler, B., Marienfeld, J. R. and Abel, W. O. (1991) *J. Plant Physiol.*, **138**, 236-243.
- Romanov, G. A., Taran, V. Ya. and Venis, M. A. (1990) *J. Plant Physiol.*, **136**, 208-212.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Saebo, J. and Ueland, P. M. (1978) *FEBS Lett.*, **96**, 125-128.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Scatchard, G. (1949) *Ann. NY. Acad. Sci.*, **51**, 660-672.
- Seyer, P. and Lescure, A. M. (1984) *Plant Sci. Lett.*, **36**, 59-66.
- Seyfert, V. L., MacMahon, S. B., Glenn, W. D., Yellen, A. J., Sukhatme, V. P., Cao, X. and Monroe, J. G. (1990) *Science*, **250**, 797-800.
- Sganga, M. W., Aksamit, R. R., Cantoni, G. L. and Bauer, C. E. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6328-6332.
- Shinshi, H., Mohnen, D. and Meins, F., Jr. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 89-93.
- Skoog, F. and Armstrong, D. J. (1970) *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 359-384.
- Skoog, F., Hamzi, H. Q., Szweykowska, A. M., Leonard, N. J., Carraway, K. L., Fujii, T., Helgeson, J. and Loeppky, R. N. (1967) *Phytochem.*, **6**, 1169-1192.
- Skoog, F. and Miller, C. O. (1957) *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11**, 118-131.

- Skoog, F., Strong, F. M. and Miller, C. O. (1965) *Science*, **148**, 532-533.
- Smigocki, A. C. and Owens, L. D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5131-5135.
- Sorensen, M. B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4119-4123.
- Springer, M. S., Goy, M. F. and Adler, J. (1979) *Nature*, **264**, 577-580.
- Sugiura, M. (1963) *Bot. Mag. Tokyo*, **76**, 309-310.
- Sugiura, M., Umemura, K. and Oota, Y. (1962) *Physiol. Plant.*, **15**, 457-464.
- Takegami, T. and Yoshida, K. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 782-789.
- Takegami, T. and Yoshida, K. (1977) *Plant Cell Physiol.*, **18**, 337-346.
- Yoshida, K. and Takegami, T. (1977) *J. Biochem.*, **81**, 791-799.
- Wagner, I. and Capesius, I. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.*, **654**, 52-56.
- Weber, H., Ziechmann, C. and Graessmann, A. (1990) *EMBO J.*, **9**, 4409-4415.
- Wierenga, R. K. and Hol, W. G. J. (1983) *Nature*, **302**, 842-844.
- Zeroni, M. and Hall, M. A. (1980) In MacMillan, J. (ed.), *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer-Verlag, Berlin, **Vol. 9**, pp.511-586.

