

学位論文

シロイヌナズナのサイクリン A3 の機能解析

平成 18 年 3 月修士（生命科学）申請

東京大学大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

植物細胞機能制御学分野

小島祥子

< 目次 >

目次	1
----	---

要旨	4
----	---

序文	6
----	---

材料と方法	14
-------	----

植物材料

- ・ シロイヌナズナ
- ・ シロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d

培地の組成

- ・ シロイヌナズナ種子播種用寒天培地
- ・ シロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d 用液体培地
- ・ 大腸菌用培地

1 サイクリン A3 の発現解析

(1) 細胞周期におけるサイクリン A3 の遺伝子発現

- 1) 細胞同調
- 2) サンプルング、RNA 抽出および RT-PCR

(2) シロイヌナズナ懸濁培養細胞の培養日数に伴ったサイクリン A3 の発現解析

- 1) 細胞体積の測定
- 2) サンプルング、RNA 抽出および RT-PCR

(3) シロイヌナズナ懸濁培養細胞における植物ホルモンとショ糖に対する発現応答

- 1) MM2d の培養、洗浄および前培養
- 2) オーキシシン (ナフタレン酢酸)、サイトカイニン (カイネチン)、ショ糖の添加および本培養
- 3) サンプルングおよび RT-PCR

(4) 植物体におけるサイトカイニンに対する発現応答

- 1) 植物体の育成および前培養

- 2) サイトカイニン（ベンジルアミノプリン）の添加および本培養
- 3) サンプルング、RNA 抽出および RT-PCR

2 植物体におけるサイクリン A3 の機能

- (1) 茎頂分裂組織における発現部位の特定
 - 1) *in situ* hybridization プローブの作成
 - 2) 切片の作成
 - 3) ハイブリダイゼーション
- (2) サイクリン A3 過剰発現体の作成
 - 1) バイナリーベクターの作成
 - 2) 植物への感染
 - 3) 植物の育成
 - 4) 発現確認実験
- (3) 細胞内局在性と表現型の解析

結果.....32

1 サイクリン A3 の発現解析

- (1) 細胞周期におけるサイクリン A3 の遺伝子発現
- (2) シロイヌナズナ懸濁培養細胞の培養日数に伴ったサイクリン A3 の発現解析
- (3) シロイヌナズナ懸濁培養細胞における植物ホルモンとショ糖に対する発現応答
- (4) 植物体におけるサイトカイニンに対する発現応答

2 植物体におけるサイクリン A3 の機能解析

- (1) 茎頂分裂組織における発現部位の特定
- (2) GFP 融合タンパク質を用いた細胞内局在性の解析
- (3) 過剰発現体における表現型の観察

考察.....52

参考文献.....60

謝辭.....	65
---------	----

<要旨>

シロイヌナズナのサイクリン A3 の機能解析

46529 植物細胞機能制御学分野 小島祥子

細胞増殖はすべての生命体にとって最も根源的な事象である。細胞が増殖するための必須の条件は複製と分裂であり、これらは交互に繰り返す。こういった正常な増殖を可能にする周期性システムを細胞周期と呼ぶ。細胞周期は分裂期（M 期）と間期に分けられ、間期はさらに DNA 複製を行っている期間（S 期）とそれ以外の GAP 期に分けられる。すなわち細胞周期は M 期→G₁ 期→S 期→G₂ 期というように一回転する。細胞周期の主たる調節因子であるサイクリンはサイクリン依存性キナーゼ（Cyclin-dependent kinase ; CDK）の調節サブユニットであり、CDK と結合してサイクリン-CDK 複合体を構成しタンパク質キナーゼとして働く。またサイクリンは周期的に発現し分解されることによって発現量が変化するタンパク質である。サイクリンはその発現するステージによって G₁ 期サイクリンと M 期サイクリンに分けられる。植物のサイクリンは動物のサイクリンとの類似性をもとに 5 種類（サイクリン A、B、C、D、H）に大別されている。この中で主に S~M 期で発現するサイクリン A と B はさらに 3 種類（サイクリン A1、A2、A3）と 2 種類（サイクリン B1、B2）のサブクラスに分類される。また G₁/S 期で発現するサイクリン D は 4 種類（サイクリン D1、D2、D3、D4）のサブクラスに分類される。

私はシロイヌナズナ懸濁培養細胞を用いて細胞同調を行い、細胞周期におけるサイクリン A3 遺伝子の発現を調べる実験を行った。その結果、サイクリン A3;1 およびサイクリン A3;2 の転写産物が同調解除直後および 24 時間前後で蓄積する傾向を観察することができた。これは細胞周期における G₁/S 期のタイミングと一致しており、これら 2 つのサイクリン A3 遺伝子が G₁/S 期を制御する新しいサイクリンであることを示していた。次に植物ホルモンに対する発現応答性をシロイヌナズナ懸濁培養細胞と植物体両方で調べた。シロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d をカイネチン欠乏培地で 48 時間培養後、カイネチンを再添加する実験を行い、サイクリン A3 の発現を RT-PCR により調べた。その結果、サイクリン A3;1 およびサイクリン A3;2 の発現がカイネチン再添加後 1~2 時間以内に誘導されることが明らかになった（図 1）。またシロイヌナズナ幼植物にベンジルアミノプリン処理を施し、サイクリン A3 の発現を RT-PCR により調べた結果、サイクリン A3;1 およびサイクリン A3;2 の発現は 10⁻³ μM の処理からわずかな増加を示し、1 μM の処理で顕著に増加することが明らかになった（図 2）。以上の実験結果からシロイヌナズナのサイクリン A3 はサイトカイニンのシグナル伝達の下流に位置し、細胞増殖を正に制御している可能性が示された。

次にサイクリン A3 の発現部位の特定を *in situ* hybridization により行った。野生型シロイヌ

ナズナ幼植物体の茎頂分裂組織の切片を作成し、サイクリン A3;1 およびサイクリン A3;4 特異的なプローブを作成してハイブリダイゼーションを行った結果、サイクリン A3;1 およびサイクリン A3;4 とともに茎頂分裂組織や葉原基で特異的に発現していることがわかった。次に、GFP タグを付加したサイクリン A3 をシロイヌナズナ植物体で過剰発現させ、細胞内局在を調べた結果、GFP 蛍光のシグナルはサイクリン A3;1、サイクリン A3;2、サイクリン A3;4 とともに主に核で見られた。また詳細に観察すると核の内部の GFP 蛍光の輝点が見られた。次に FLAG タグを付加したサイクリン A3 の過剰発現体の表現型を観察したところ、頂芽優性が抑制されている個体やブッシュ状になる個体が見られた。

以上の結果から、本研究においてシロイヌナズナのサイクリン A3 は細胞周期において G₁/S 期を制御するサイクリンであること、およびサイトカイニンによって正に制御されていることが明らかになった。現在までに植物では G₁/S 期を制御するサイクリンとして D タイプサイクリンのみが知られていた。これに対し、動物では G₁ サイクリンはサイクリン D とサイクリン E の 2 種類が明らかになっており、G₁/S 期の調節には両者による二段階の制御が必要であると考えられている。本研究の結果からシロイヌナズナのサイクリン A3 が動物のサイクリン E のような働きをしている可能性は十分に考えられ、今後の大きな研究課題であると言える。また今後はサイクリン A3-CDK 複合体の Rb タンパク質に対するキナーゼ活性について、および CDK 以外の細胞周期調節因子との相互作用について生化学的な解析が必要であると考えられる。シロイヌナズナのサイクリン A3 のより詳細な解析を通じて、植物の複雑かつ精巧な細胞周期の調節機構がますますひもとかれ、また植物ホルモンと細胞増殖を結ぶシグナル伝達の全貌が明らかになっていくことが期待される。

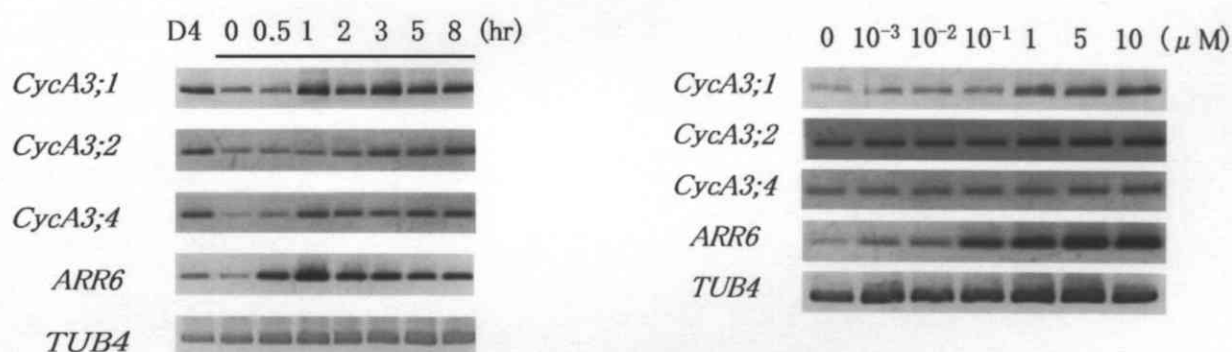


図1 シロイヌナズナ懸濁培養細胞におけるサイトカイニンに対する発現応答
継代後4日目の培養細胞をカイネチンを抜いたMS液体培地で洗浄後、同培地で48時間振盪培養した。その後、0.05mg/lカイネチンを再添加した完全培地に移してさらに培養を続け、再添加0、0.5、1、2、3、5、8時間後にサンプリングしてRNAを抽出し、RT-PCRにてCycA3の応答性を調べた。数字はカイネチン再添加後の時間を示す。D4は継代後4日目の無処理の培養細胞を示す。

図2 植物体におけるサイトカイニンに対する発現応答
発芽後13日のシロイヌナズナ幼植物体を用いてさまざまな濃度のベンジルアミノプリン処理を1時間行い、RT-PCRにてCycA3の応答性を調べた。数字はベンジルアミノプリン濃度を示す。

<序文>

細胞増殖はすべての生命体にとって最も根源的な事象である。細胞が増殖するための必須の条件は複製と分裂であり、これらは交互に繰り返す。こういった正常な増殖を可能にする周期性システムを細胞周期と呼ぶ。細胞周期はまず分裂期 (M 期) と間期に分けられる。間期はさらに DNA 複製を行っている期間 (S 期) とそれ以外の GAP 期に分けられる。S 期の前を GAP 1 (G_1 期)、後を GAP 2 (G_2 期) と呼ぶ。よって細胞周期は M 期→ G_1 期→S 期→ G_2 期というように一方向に回転する (Figure. 1)。

細胞周期の主たる調節因子であるサイクリンは周期的に発現し分解されることによって発現量に変化するたんぱく質である (Evans et al., 1983)。サイクリンは細胞周期によって発現量が大きく変化し、その発現するステージによって G_1 /S 期サイクリンと M 期サイクリンに分けられる。サイクリンはサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin-dependent kinase;

CDK) の調節サブユニットであり、CDK と結合してサイクリン-CDK 複合体を構成しタンパク質キナーゼとして働く (Doree et al., 2002)。サイクリン-CDK 複合体が完全に活性化するためには、さらに CDK 活性化キナーゼ (CDK activating kinase; CAK) による CDK のスレオニン残基 (T160) のリン酸化が必要である。サイクリンの結合と CAK による T160 のリン酸化により、CDK の活性部位を覆っている T ループが構造変化し CDK の活性中心が露出して、基質となるタンパク質をリン酸化できるようになる (Jeffrey et al., 1995)。サイクリンと CDK は構造的な特徴から多くの類似分子があるが、あるサイクリンは特定の CDK としか複合体をつくらない。

動物細胞では G_1 /S 期ではサイクリン D と E が、S~M 期にはサイクリン A と B が発現する。サイクリン D は外界からの増殖刺激を受けて G_1 期に誘導される代謝回転の速いタンパク質である (Sherr et al., 1999、Winston et al., 1999)。サイクリン D の主な機能は、 G_1 期において転写因子 E2F と結合している Rb タンパク質 (pRB) をリン酸化して pRB からの転

写因子 E2F の解離と転写活性を促すことである。サイクリン E も代謝回転の速いタンパク質で、CDK2 と結合して一過的にキナーゼの活性化を促し、DNA 複製開始因子や転写調節因子のリン酸化を介して S 期開始を律則的にコントロールする。サイクリン D 依存性キナーゼによりリン酸化された pRB がサイクリン E 依存性キナーゼによってさらにリン酸化されると、転写因子 E2F が pRB から解離して S 期開始に必要な遺伝子の発現を促すと考えられる。G₁/S 期サイクリンに比べ、M 期サイクリンに属するサイクリン A と B は比較的安定で代謝回転の遅いタンパク質分子である (Pines et al., 1999)。サイクリン A、B はともに S 期から合成が始まり、mRNA レベルに応じてタンパク量が徐々に蓄積する。サイクリン A は S 期では CDK2 と結合し S 期の DNA 複製に促進的に関与する。またサイクリン A-CDK2 を G2 期の細胞に過剰に入れると M 期に入ることからサイクリン A が M 期転移に必須であるということがわかる。サイクリン B は Cdc2 と結合して G2 期から M 期の移行期で急激に活性化する。サイクリン B-Cdc 2 複合体キナーゼ活性は M 期促進因子活性と呼ばれ、核膜崩壊、染色体凝縮、微小管形成などの M 期開始の一連の事象を引き起こす。

現在までに細胞周期の研究は酵母および動物をはじめとして精力的に進められて来た。植物の細胞周期についても酵母、動物の研究にやや遅れながらも解析が進められて来ている。興味深いことに細胞周期のシステムや調節因子はあらゆる真核生物でよく保存されており、植物のそれは酵母よりは動物のものに近いことが明らかになっている (Figure. 2)。植物のサイクリンは動物のサイクリンとの類似性をもとに 3 種類 (サイクリン A、サイクリン B、サイクリン D) に大別されている (Renaudin et al., 1996)。現在、シロイヌナズナにおいては 10 種類のサイクリン A、11 種類のサイクリン B、10 種類のサイクリン D、1 種類のサイクリン H が確認されている (Inze., 2005、Vandeele et al., 2002、Wang et al., 2004)。この中で主に S~M 期で発現するサイクリン A とサイクリン B は、さらに 3 種類 (サイクリン A1、サイクリン A2、サイクリン A3) と 2 種類 (サイクリン B1、サイクリン B2)

のサブクラスに分類される。また G_1/S 期で発現するサイクリン D は 4 種類(サイクリン D1、サイクリン D2、サイクリン D3、サイクリン D4) のサブクラスに分類される (Figure. 3)。

植物のサイクリンのいくつかについては、細胞周期中での発現が調べられている。高等植物における細胞周期依存的な発現は、主に同調培養系を用いた方法 (Setiady et al., 1995、Fuerst et al., 1996、Reichheld et al., 1996、Ito et al., 1997) と茎頂や根端などの分裂細胞を含む組織を用いた *in situ* hybridization 法 (Kouchi et al., 1995、Umeda et al., 1999) によって解析されている。また最近ではマイクロアレイによる解析の報告もある (Menges et al., 2005)。これらの報告によると、植物のサイクリン A とサイクリン B のほとんどは細胞周期に依存した転写産物レベルの変動が観察されている。唯一の例外として A2 クラスに分類されるアルファルファのサイクリン遺伝子だけは、細胞周期を通じて発現のレベルがほとんど変化しない (Meskiene et al., 1995)。個々の報告によって細胞周期中の時期に微妙な違いはあるものの、おおむね B タイプサイクリンは B1、B2 とともに G_2 期後期から M 期に (Setiady et al., 1995、Fuerst et al., 1996、Ito et al., 1997、Kouchi et al., 1995、Umeda et al., 1999、Menges et al., 2005)、A1、A2 クラスはそれよりもやや早く G_2 期にピークをもつ発現を示す (Setiady et al., 1995、Reichheld et al., 1996、Kouchi et al., 1995、Menges et al., 2005)。A3 クラスのサイクリンは最も早く G_1/S 期を中心に発現する (Ito et al., 1997、Kouchi et al., 1995、Umeda et al., 1999、Menges et al., 2005)。植物の D タイプサイクリンは動物と同様に細胞周期を通じて発現し、増殖因子により G_1 期に機能をもつと考えられている (Fuerst et al., 1996、Dahl et al., 1995、Soni et al., 1995)。

サイクリン A とサイクリン B には N 末端側に destruction box と呼ばれる 9 アミノ酸 (RXXLXXIXN) からなるドメインが存在し、ユビキチン化により M 期の後期に分解されるシグナルとなる。サイクリンの組換えタンパクを用いた解析から、実際に destruction box が細胞周期依存的なタンパク質分解に必要であることが示唆されている (Genschik et al.,

1998)。サイクリン D は N 末端領域に Rb タンパクと相互作用するために必要な LXCXE 配列を持っており、CDKA と結合して Rb タンパク質のリン酸化に関与し、G₁ 期から S 期への移行を制御している。組織におけるサイクリン A、サイクリン B 遺伝子の発現は主に分裂組織を中心に見られる。シロイヌナズナのサイクリン B1;1 遺伝子の転写産物は地上部・地下部ともに分裂組織のみで検出され、側根原基などの新たに形成される分裂組織でも細胞分裂が始まる初期段階から発現が確認されている (Ferreira et al., 1994)。

これまでに細胞周期のメインエンジンであるサイクリン-CDK 複合体の活性周期を中心として、これら調節因子自体の解析や、標的タンパクのリン酸化等の下流のイベントについての報告は多数なされている。一方で調節因子の制御といった上流のイベントに関しては比較的解析が進んでいないと言える。植物の細胞周期における細胞周期調節因子の上流の重要な制御因子のひとつとして植物ホルモンが挙げられる。最も有名で古い歴史を持つのは、オーキシンとサイトカイニンによる細胞分裂の促進作用とカルス誘導である。しかし、近年ではさまざまな植物ホルモンと細胞周期調節因子の関係についての研究がなされ、少しずつ解析が進みつつある (Pozo et al., 2005)。たとえば CDK 阻害因子である KRP (Kip-related protein) はアブシジン酸により誘導されることが示された (Wang et al., 1998)。最近ではサイトカイニンのシグナル伝達の下流にサイクリン D3 が位置することが報告された (Riou-Khamlichi et al., 1999)。この報告では、シロイヌナズナ懸濁培養細胞を用いてサイクリン D3 遺伝子がサイトカイニンにより発現誘導されることを示している。またシロイヌナズナのサイクリン D3 遺伝子を過剰発現する系統を作出し、その葉を用いてカルス誘導の際のサイトカイニン要求性を解析した。その結果、野生型では葉からカルスの誘導する際にオーキシンとサイトカイニン両方を必要とするが、サイクリン過剰発現体ではサイトカイニンがなくても同様な頻度でカルスが形成された。次に内生のサイトカイニン量が 5 倍高いシロイヌナズナ突然変異体 *amp1* におけるサイクリン遺伝子の発現が解析され、

サイクリン D2 遺伝子は野生型と比べて変化がないのに対し、サイクリン D3 遺伝子の発現量が高くなっており、生理的な条件下でサイクリン D3 遺伝子がサイトカニンに応答することが示された (Nogue et al., 2000)。

我々はシロイヌナズナ懸濁培養細胞を用いて細胞同調を行い、細胞周期におけるサイクリン A3 遺伝子の発現を調べる実験を行った。その結果、サイクリン A3;1 およびサイクリン A3;2 の転写産物が同調解除直後および 24 時間前後で蓄積する傾向を観察することができた。これは細胞周期における G₁/S 期のタイミングと一致しており、これら 2 つのサイクリン A3 遺伝子が G₁/S 期を制御する新しいサイクリンであることを示していた。次に植物ホルモンによる発現誘導の実験をシロイヌナズナ懸濁培養細胞と植物体両方で調べた。またサイクリン A3 の発現部位の特定を *in situ* hybridization により行った。さらにサイクリン A3 を過剰発現する形質転換体を作成し、サイクリン A3 の細胞内局在の特定と形質転換体の表現型の観察を行った。

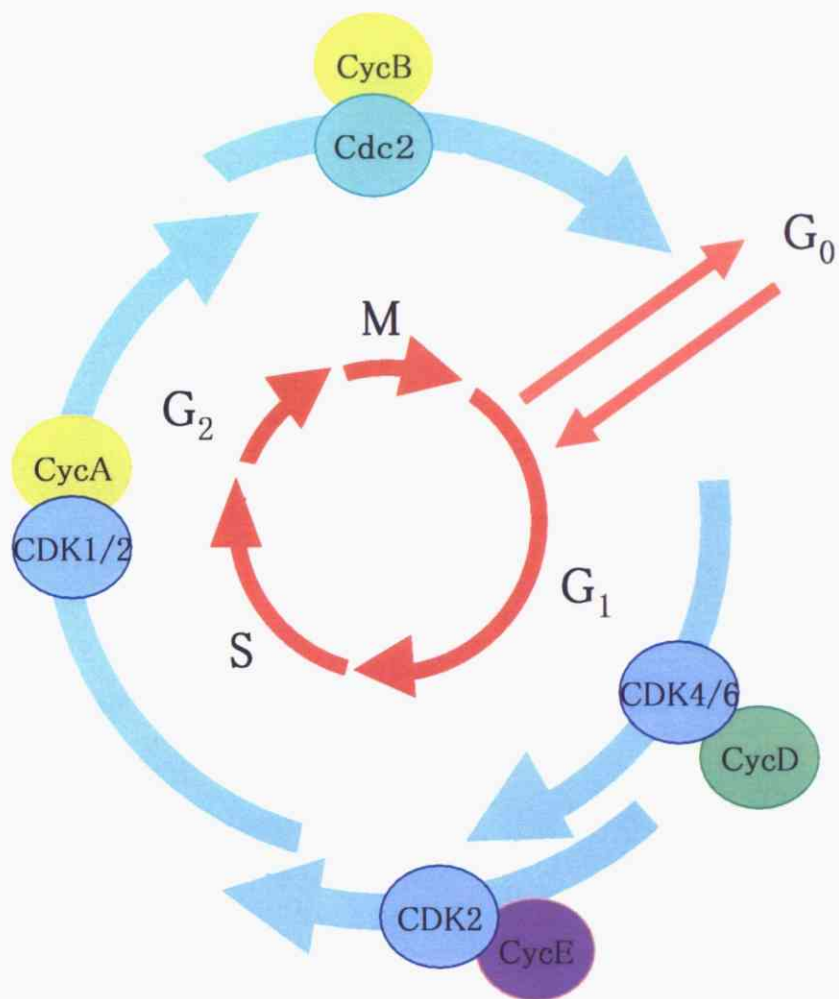


Figure.1 動物細胞における細胞周期の調節

細胞周期はまず分裂期(M期)と間期に分けられる。間期はさらにDNA複製を行っている期間(S期)とそれ以外のGAP期に分けられる。S期の前をGAP1(G₁期)、後をGAP2(G₂期)と呼ぶ。よって細胞周期はM期→G₁期→S期→G₂期というように一方向に回転する。

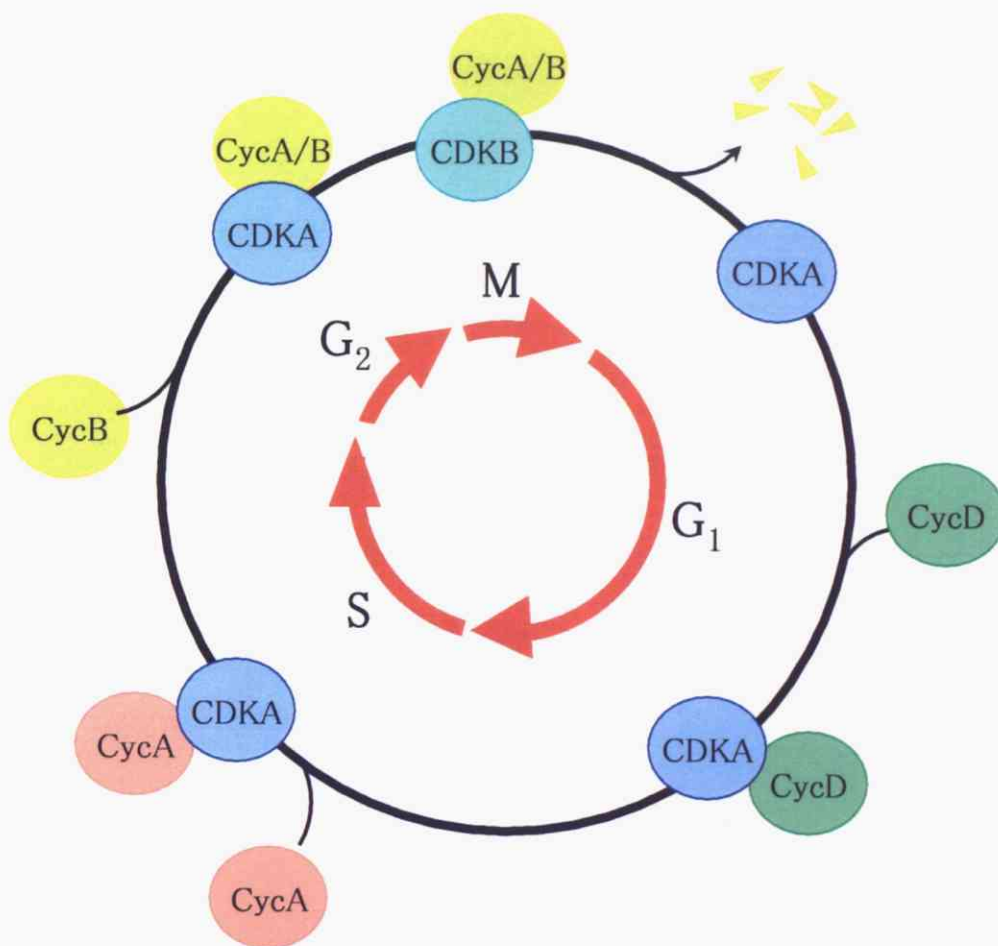


Figure.2 植物細胞における細胞周期の調節

細胞周期のシステムや調節因子はあらゆる真核生物でよく保存されており、植物のそれは動物のものに近いことが明らかになっている。植物細胞では代表的なサイクリン依存性キナーゼ (CDK) としてCDKAとCDKBの2種類があるが、このうちCDKBは植物に特異的なCDKである。CDKB遺伝子の発現は細胞周期依存的であり、G₂期からM期にかけて発現しM期の実現機構に重要な役割を担っていると考えられている。

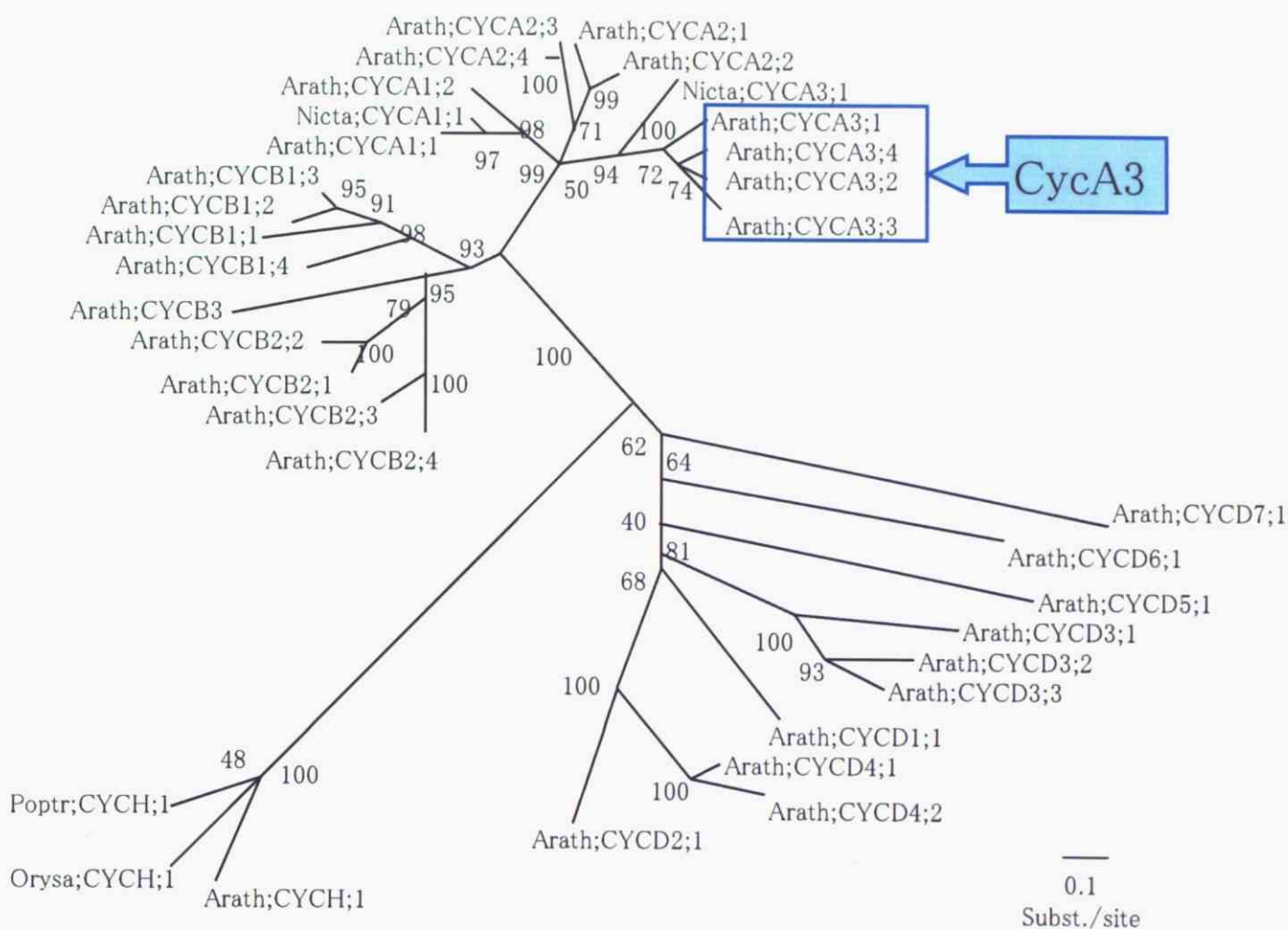


Figure.3 シロイヌナズナにおけるサイクリンの系統樹

Vendepoele et al. (The Plant Cell. 14. 903-916, 2002) から改変。植物のサイクリンは動物のサイクリンとの類似性をもとに3種類(サイクリンA、サイクリンB、サイクリンD)に大別されている。現在、シロイヌナズナにおいては10種類のサイクリンA、11種類のサイクリンB、10種類のサイクリンD、1種類のサイクリンHが確認されている。この中で主にS~M期で発現するサイクリンAとサイクリンBは、さらに3種類(サイクリンA1、サイクリンA2、サイクリンA3)と2種類(サイクリンB1、サイクリンB2)のサブクラスに分類される。またG₁/S期で発現するサイクリンDは4種類(サイクリンD1、サイクリンD2、サイクリンD3、サイクリンD4)のサブクラスに分類される。

<材料と方法>

植物材料

- ・ シロイヌナズナ

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, eco-type, Col-0) を用いた。種子播種の際は種子を 70%エタノールおよび 4% 次亜塩素酸ナトリウム滅菌液にて 5 分ずつローテーター上で振盪滅菌後、滅菌水を用いて 3 回洗浄した。その後 0.1% アガロースに懸濁して寒天培地上に播種した。播種後は実験に応じて Jiffy7 (Jiffy Products Ltd.) に植え換えた。

- ・ シロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の懸濁培養細胞 MM2d を用いた。7 日毎に 0.5 μ g/ml ナフタレン酢酸および 0.05 μ g/ml カイネチン含む液体 MS 培地 50ml に 2ml 植え継ぎ、27℃、130rpm、暗条件下で振盪培養した。

培地の組成

- ・ シロイヌナズナ種子播種用寒天培地 (MS 培地)

MS 1l あたり :

MS 無機塩類	4.6g (和光試薬)
2% ショ糖	20g
1000×MS vitamin	1 ml

1N KOH で pH5.7 に調整後、 2g ゲランガムあるいは 8g アガロースを加えてオートクレーブにて滅菌、抗生物質を添加し、プレートにて固めた。

1000×MS vitamin 100 ml あたり :

Thiamine-HCl	0.3g
Nicotinic Acid	0.5g
Pyridoxine-HCl	0.05g

抗生物質 :

ハイグロマイシン	20mg/l (終濃度)
----------	--------------

・シロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d 用液体培地

MS 1l あたり :

MS medium (ICN)	4.41g
3% ショ糖	30g

1N KOH で pH5.8 に調整後、50 ml ずつ 300 ml フラスコに分注後、オートクレーブにて滅菌、植え継ぎ直前に 植物ホルモンを添加した。

植物ホルモン :

ナフタレン酢酸(NAA)	0.5 μ g/ml (終濃度)
カイネチン	0.05 μ g/ml (終濃度)

・大腸菌用培地

LB 1l あたり :

Polypepton	10g
Yeast extract	5g
NaCl	10g

1N NaOH で pH7.0 に調整後、15g Bacto Agar を加えてオートクレーブにて滅菌、抗生物質を添加し、プレートにて固めた。

抗生物質：

ハイグロマイシン 50mg/l（終濃度）

カナマイシン 50mg/l（終濃度）

リファンピシン 100mg/l（終濃度）

実験方法

1 シロイヌナズナ懸濁細胞 MM2d を用いたサイクリン A3 の機能解析

(1) 細胞周期におけるサイクリン A3 の遺伝子発現

1) 細胞同調

継代後 7 日のシロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d を用いた。100ml × 6 本を室温で 5 分 500rpm で遠心し、得られたペレット 10ml を各々 40ml の MSS (MS + 3% ショ糖 + 0.5mg/l ナフタレン酢酸 + 0.05mg/l カイネチン) に懸濁した。これを 4 μ g/ml アフィディコリン含む MSS 培地 200ml に移し、27°C 連続暗黒条件下で 21.5 時間振盪培養した。続いて 11 の MSS で洗浄し、再び 250ml MSS に懸濁して 6 本のサンプルを併せ 1500ml にした。これを 300ml フラスコに 60ml ずつ分注して 25 本に分け、27°C 連続暗黒条件下で振盪培養し、2 時間に一本ずつ回収しサンプリングした。プロイディーはプロイディーアナライザー (Partec) を用い測定した。

2) サンプリング、RNA 抽出および RT-PCR

サンプルは液体窒素中で凍結破砕し、RNA 抽出までは -80°C で保存した。RNA 抽出は RNeasy Plant Mini Kit (50) (QIAGEN) を用いて行った。サンプリングしたサンプル 100mg に 4.5 μ l β -メルカプトエタノール含む 450 μ l RLT バッファーを加え、激しく攪拌した。サンプルを 2ml チューブにセットした QIA shredder spin column に移し 14000rpm で 2 分間遠心し上清のみを新しいチューブに移した。そこに 225 μ l のエタノールを加え、ピペッティングしたサンプルを 2ml チューブにセットした RNeasy mini column に移して 14000rpm で 15 秒遠心し濾液は捨てた。350 μ l の RW1 バッファーを RNeasy mini column に加え 14000rpm で 15 秒遠心しカラムを洗浄した。ここで RNase Free DNase Set (QIAGEN) により DNase 処理を行った。70 μ l の RDD バッファーに 10 μ l の DNase I を加えて混ぜたものを RNeasy mini column のシリカゲルカラムの部分に滴下し、室温で 15 分間酵素反応を行った。その後 350 μ l の RW1 バッファーを RNeasy mini column に加え 14000rpm で 15 秒遠心し、濾液は捨てた。RNeasy mini column

を新しい2ml チューブにセットし、500 μ l の RPE バッファーを加え 14000rpm で 15 秒遠心し、濾液は捨てた。再度 RNeasy mini column を新しい 2ml チューブにセットし、500 μ l の RPE バッファーを加え 14000rpm で 2 分間遠心し、濾液は捨てた。さらに 14000rpm で 1 分遠心し完全に RPE バッファーを除いた。RNeasy mini column を新しい 1.5ml エッペンドルフチューブにセットし RNase-free H₂O 50 μ l をシリカゲルカラムの部分に滴下し 14000rpm で 1 分間遠心、溶出し得られたサンプルを RNA サンプルとして使用した。

RT-PCR は TITANIUM™ One-Step RT-PCR Kit (BD Bioscience) を用いて、プロトコルの 1/5 量にスケールダウンして行った。まず、Master Mix として 10×One-Step Buffer 1 μ l、50×dNTP Mix 0.2 μ l、Recombinant RNase Inhibitor 0.1 μ l、Thermostabilizing Reagent 5 μ l、GC-Melt™ 2 μ l、Oligo (dT) Primer 0.2 μ l、50×RT-TITANIUM™ Taq Enzyme Mix 0.2 μ l を混合したものを作成した。この Master Mix に 0.163 μ g の RNA サンプルと 45 μ M のプライマー 2 種類を加え、合計 10 μ l になるよう RNase-free H₂O を入れ、よく混合させた。RT-PCR では *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* について調べ、コントロールとして *CDKB2* および *Tubulin β* (*TUB4*) を用いた。プライマーは *CycA3;1* については 5' -GTCGTACTCGGAGAGCTTCCAAACT-3' と 5' -CAGGCATTGTCGCTACACACTTGAA-3' を用い cDNA の開始コドンから 103 番目～513 番目の領域を増幅した。*CycA3;2* については 5' -CGATCTCTCAATCCTCTCAAATCTCAAAC-3' と 5' -GGTCAATAATAGCCACCGGAGCT-3' を用い cDNA の開始コドンから -77 番目～257 番目の領域を増幅した。*CycA3;4* については 5' -CGGAGAATCAGAACTGTGCGAGGAT-3' と 5' -GCTTCAAGCTTCTTTACGCCATTCCTC-3' を用い cDNA の開始コドンから 5 番目～1850 番目の領域を増幅した。*CDKB2* については 5' -ATGGACGAGGGAGTTATAGCAGTTTC-3' と 5' -TCAAAAACCGGTACAGTACAGTTTTGCC-3' および *Tubulin β* (*TUB4*) については 5' -CTCTGTGCATCAGCTTGTCGAAAACG-3' と 5' -CTCTGTGCATCAGCTTGTCGAAAACG-3' を用いた。これらの Reaction Mix を 50°C 60 分、94°C 5 分間反応させた後、94°C 30 秒、65°C 30 秒、68°C 1 分でサイクル反応させ、最後に 68°C で 2 分間反応させた。RT-PCR のサイクル数は *CycA3;1*

および *CycA3;4* については 25 サイクル、*CycA3;2* については 26 サイクル、*CDKB2* については 24 サイクル、*Tubulin β* (*TUB4*) については 20 サイクルで行った。反応終了後の RT-PCR 産物はアガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色し、UV トランスイルミネーターによって検出した。

(2) シロイヌナズナ懸濁培養細胞の培養日数に伴ったサイクリン A3 の発現解析

1) 細胞体積の測定

シロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2 d を 10ml 培地に懸濁したサンプルを 100ml フラスコ 33 本用意し、継代した日を第 1 日目として一日おきにフラスコ 3 本ずつについてその細胞体積を測定した。培養細胞を培地ごと 15ml ファルコンに移して遠心し上清を捨ててフラスコごとにペレットの体積を測定してその平均値で成長曲線を描いた。

2) サンプルング、RNA 抽出および RT-PCR

遠心後のペレットをサンプルングし RNA を抽出して RT-PCR を行なった。サンプルング、RT-PCR の方法については (1) 2) を参照。

RT-PCR では *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* について調べ、コントロールとして *Tubulin β* (*TUB4*) を用いた。RNA サンプル量は 0.2 μg、プライマーは *CycA3;1* については 5' -GTCGTACTCGGAGAGCTTCCAAACT-3' と 5' -CAGGCATTGTCGCTACACACTTGAA-3' を用い開始コドンから 103 番目～513 番目の領域を増幅した。*CycA3;2* については、5' -cgatctctcaatcctctctcaaactctcaaact-3' と 5' -GGTCAATAATAGCCACCGGAGCT-3' を用い開始コドンから -77 番目～257 番目の領域を増幅した。*CycA3;4* については 5' -CAGAACTGTGCGAGGATGACGAGAGCG-3' と 5' -CTCACACATCTGAGGATCAACAGATCTCG-3' を用い開始コドンから 13 番目～279 番目の領域を増幅した。および *Tubulin β* (*TUB4*) については 5' -CTCTGTGCATCAGCTTGTGCGAAAACG-3' と 5' -CTCTGTGCATCAGCTTGTGCGAAAACG-3' を用いた。ま

た RT-PCR のサイクル数は *CycA3;2*、*CycA3;4* および *Tubulin β* (*TUB4*) については 23 サイクル、*CycA3;1* については 25 サイクルで行った。

(3) シロイヌナズナ懸濁培養細胞における植物ホルモンとショ糖に対する発現応答

1) MM2d の培養、洗浄および前培養

継代後 4 日目のシロイヌナズナ懸濁培養細胞 100ml を同調に使用するガラス濾過器を使用して 2 l の MS 液体培地 (ナフタレン酢酸 (NAA)、カイネチンおよびショ糖をそれぞれ抜いたもの) で洗浄した。300ml フラスコ中にて同培地 50ml \times 2 本に洗浄した細胞を懸濁し、27°C 連続暗黒条件下で 48 時間振盪培養した。

2) オーキシシン (ナフタレン酢酸)、サイトカイニン (カイネチン)、ショ糖の添加

および本培養

前培養した細胞を、0.5mg/l ナフタレン酢酸、0.05mg/l カイネチン、3% ショ糖それぞれを再添加した完全培地に移してさらに培養を続けた。培養時間は 0、0.5、1、2、3、5、8 時間とした。

3) サンプルングおよび RT-PCR

再添加 0、0.5、1、2、3、5、8 時間後に 10ml ずつサンプルングして RNA を抽出し、RT-PCR を行った。さらに継代 4 日目の無処理の培養細胞をコントロールとしてサンプルングして RNA を抽出し、同時に RT-PCR を行った。サンプルング、RT-PCR の方法については (1) (2) を参照。

RT-PCR では *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* について調べ、コントロールとして *Tubulin β* (*TUB4*) を用いた。またサイトカイニンにより発現が誘導されることが知られている A タイプレスポンスレギュレーターの一つ *ARR6* の発現応答についても同時に解析した。RNA サン

プル量は $0.5\mu\text{g}$ 、プライマーは (2) 2) を参照。ARR6 については 5'-TCAGATCTTTGCGCGTTTGAGCTGCGAGTG-3' と 5'-ATGTCTTGAAGAAGGGGCTGAAG-3' を用い開始コドンから 184 番目の領域を増幅した。また RT-PCR のサイクル数は *CycA3;2*、*CycA3;4*、ARR6 および *Tubulin β* (*TUB4*) については 23 サイクル、*CycA3;1* については 27 サイクルで行った。

(4) 植物体におけるサイトカニンに対する発現応答

1) 植物体の育成および前培養

発芽後 13 日目の幼植物 18 個体を 100ml フラスコ内にて 40ml MS 液体培地中で 22°C 連続暗黒条件下で 24 時間振盪培養した。

2) サイトカニン (ベンジルアミノプリン) の添加および本培養

前培養した植物体サンプルを $5\mu\text{M}$ ベンジルアミノプリン、 $5\mu\text{M}$ ゼアチンおよびコントロールとして溶媒である DMSO それぞれを添加した培地に移してさらに培養を続けた。培養時間は 0、0.5、1、2、4、7、24 時間とした。またベンジルアミノプリン濃度を様々に変えて 1 時間処理し同様の実験を行った。ベンジルアミノプリン濃度は 0、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1、5、 $10\mu\text{M}$ とした。

3) サンプルング、RNA 抽出および RT-PCR

添加 0、0.5、1、2、4、7、24 時間後にサンプルングして RNA を抽出し、RT-PCR を行った。サンプルング、RT-PCR の方法については (1) 2) を参照。

RT-PCR では *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* について調べ、コントロールとして ARR6 および *Tubulin β* (*TUB4*) を用いた。RNA サンプル量は $0.5\mu\text{g}$ 、用いたプライマーは (3) 3) を参照。また RT-PCR のサイクル数は *CycA3;2*、*CycA3;4*、ARR6 および *Tubulin β* (*TUB4*) に

については 23 サイクル、*CycA3;1* については 27 サイクルで行った。

2 植物体におけるサイクリン A3 の機能

(1) 茎頂分裂組織における発現部位の特定

1) *in situ* hybridization プローブの作成

in situ hybridization のための RNA プローブを作成した。まず pBluescript II SK⁻ 上のマルチクローニングサイトの中の *Hind* III 切断部位と *Kpn* I 切断部位を各々切断し、Blunting Kination 処理をした後、Self ligation を行なった。このプラスミドベクターに PCR にて増幅した *CycA3* 断片を *EcoR* V 切断部位にアンチセンス方向にクローニングし、pBluescript II SK⁻ 上の *Bam*HI 切断部位をカットしてコンストラクトを作成した (Figure. 4)。PCR に使用したプライマーは、*CycA3;1* については 5' - ATGGCCGACGAAAAAGAGAA-3' と 5' - GTCTGAATTTAAGGTTTCGA-3' を用い開始コドンから 216 番目の領域を増幅した。*CycA3;2* については 5' - ATGACAGAGCAAGAGATCTG-3' と 5' - GGTCAATAATAGCCACCGGAGCT-3' を用い開始コドンから 257 番目の領域を増幅した。*CycA3;4* については 5' - ATGGCGGAGAATCAGAACTGTGC-3' と 5' - TCGATTCGATTAGTACGCTA-3' を用い開始コドンから 253 番目の領域を増幅した。このコンストラクションを鋳型 DNA とし、DIG RNA Labeling Kit (Roche) を用いて T7 RNA ポリメラーゼで DIG RNA ラベリング反応を行い、RNA プローブを作成した。1 μ g の鋳型 DNA と RNase-free H₂O を最終容量が 13 μ l になるように RNase-free チューブに加えた後、氷上で 10 \times 濃縮 NTP ラベリング混合液 2 μ l、10 \times 濃縮転写用バッファー 2 μ l、RNase Inhibitor 2 μ l、T7 RNA ポリメラーゼ 2 μ l を加え、おだやかに混和し手短に遠心した。ヒートブロックで 37 $^{\circ}$ C 2 時間インキュベートして反応を行なった。DNase I 2 μ l を加え、鋳型 DNA を除去し 37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした。その後、0.2M EDTA (pH8.0) を加えて反応を停止させた。

ハイブリダイゼーションを行う前に PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) を用い、同じコンストラクションを鋳型とした DNA プローブを作成して、各々の *CycA3* プローブの特異性を調べた。10×PCR 用バッファー 2.5 μ l、10×PCR DIG mix 1.25 μ l、10×濃縮 dNTP ストック溶液 1.25 μ l、10 μ M プライマー 1 + プライマー 2 各々 1 μ l、酵素ミックス 0.4 μ l、20ng/ μ l 鋳型 DNA 2.5 μ l、dH₂O 15.1 μ l をチューブに加え、PCR 反応で増幅して DNA プローブを作成した。コントロールとして同鋳型 DNA を用い、通常の PCR 反応も行った。Reaction Buffer 2.5 μ l、2.5mM dNTP 2 μ l、10 μ M プライマー 1 + プライマー 2 各々 1 μ l、Blend Taq 0.2 μ l、鋳型 DNA 2.5 μ l、dH₂O 15.8 μ l をチューブに加え、PCR 反応を行った。PCR は 95°C で 2 分間熱変性を行った後、95°C 10 秒、60°C 30 秒、72°C 2 分のサイクルを 10 サイクル、95°C 10 秒、60°C 30 秒、72°C 2 分（サイクルごとに 5 秒ずつ追加）というメニューで行った。反応終了後の PCR 産物はアガロースゲル電気泳動でコントロールの PCR 産物とバンドの位置を比較して若干上にシフトしていることを確認した。

作成した DNA プローブと、全長の *CycA3*;1、*CycA3*;2 および *CycA3*;4 断片をクローニングしたプラスミドを用いてハイブリダイゼーション実験を行い、特異性の確認をした。アガロース電気泳動により 50ng プラスミドを流したゲルを用いてメンブレン Hybond-N+ (Amersham Biosciences) に一晩ブロッティングした。その後メンブレンは 2 × SSC (0.03M Sodium Citrate, 0.3M NaCl) で 2 回洗い、ハイブリバック内にてプレハイブリダイゼーションを行った。42°C に温めたプレハイブリダイゼーション液 DIG Easy Hyb (Roche) (20ml/100cm²) で 42°C 15 ~ 30 分振盪しながらインキュベートした。DIG ラベルした DNA プローブ (5~25ng/ハイブリダイゼーション液 1 ml) は最終容量 10 μ l になるように dH₂O を加え、95°C で 5 分熱変性させてただちに氷冷した。これを 42°C に温めたハイブリダイゼーション液 (DIG Easy Hyb (Roche) 3.5~5ml/100cm²) に加え、ハイブリバック内でプレハイブリダイゼーション後のメンブレンとともに封入し 42°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンはハイブリダイゼーション後、Buffer1 (マレイン酸バッファー) (100mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl) で洗

い、Bunffer2（ブロッキング液）（Blocking Reagent stock solution（Blocking Reagent を温めながら Buffer1 で 10% (w/v) 希釈）を Buffer1 で 10 倍希釈）で 30 分インキュベートした後、ハイブリバック内で Anti-DIG -alkaline phosphatase（Roche）とともに 30 分振盪した。Anti-DIG -alkaline phosphatase は Bunffer2 で 5000 倍希釈し使用した。その後メンブレンを Buffer1 で 15 分×2 回洗い、ハイブリバック内で NBT / BCIP stock solution（Roche）とともに 30 分振盪した。NBT NBT / BCIP stock solution は Buffer3（検出バッファー）（100mM Tris-HCl（pH9.5）, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂）で希釈（NBT 100 μ l / Buffer3 5ml）し使用した。暗所で 30 分～2 時間静置し検出した後、TE で 5 分インキュベートし反応を停止した。

2) 切片の作成

発芽後 10 日目の野生型シロイヌナズナ幼植物体を用いて *in situ* hybridization を行った。植物体の根および不要な葉を切り落とし、FAA（50%エタノール、5%酢酸、3.7%ホルムアミド）固定を行った。アシストチューブに植物体および FAA を入れてふたをゆるめ、アスピレーターで 5 分×3 回植物体内の空気を抜いた。4℃で 3 時間冷やし、以下の手順で脱水を行った。4℃で 50%エタノール 30–60 分、70%エタノール 30–60 分、80%エタノール 30–60 分、90%エタノール 30–60 分、最後に 0.1%エオシン含む 95%エタノールで一晩染色脱水した。

モレキュラーシーブ処理したエタノールを用いて以下の手順でレモゾール（和光純薬）置換した。室温で 100%エタノール 30 分×2 回、100%エタノール 60 分×2 回、75%レモゾール・25%エタノール 60 分、50%レモゾール・50%エタノール 60 分、25%レモゾール・75%エタノール 60 分、100%レモゾール 60 分×2 回、最後にパラプラスチック（Oxford 社）含む 100%レモゾールで一晩置換した。62~65℃のオーブンでパラプラスチックを融かし、パラプラスチックを新たに加えた。数時間後、前もって融かしておいたパラプラスチック溶液と交換し 3–4 日間 1 日に 2 回パラプラスチックを交換した。数日後プラスチックシャーレ内でサンプルをパラプラスチックごと固めた。固める際、熱した柄付き針で方向を調節した。サンプルが動かない程度に固まったら

冷蔵庫で完全に固めた。十分に固まったらバーナーでメスを熱しながらサンプルをパラフィンごと切出し木片ブロックにマウントした。ミクロトームでパラフィンを $8\text{ }\mu\text{m}$ の厚さにスライスし APS コートしたスライドグラスに乗せ、 42°C ホットプレート上で乾燥吸着させた。

3) ハイブリダイゼーション

作成した RNA プローブと切片でハイブリダイゼーションを行った。切片を載せたスライドグラスを専用のラックに納め、ハイブリダイゼーション用ガラス容器を用いて以下の手順でハイブリダイゼーション前操作をした。尚、操作は室温、RNase-free 条件下で行った。レモゾール 10 分×2 回、100%エタノール 5 分、95%エタノール 5 分、 H_2O 5 分、 $2\times\text{SSC}$ 15 分、プロテイナーゼ K 20 分、グリシン 2 分、PBS 5 分×2 回、4%PFA 10 分、Active DEPC 15 分、 $5\times\text{SSC}$ 15 分。プロテイナーゼ K は 37°C で保温した 170ml プロテイナーゼ K バッファー (100mM Tris- HCl (pH8.0), 50mM EDTA) に使用 5 分前に $8.5\text{ }\mu\text{l}$ の 20mg/ml プロテイナーゼ K を加えた。グリシンは 170ml PBS に 340mg グリシンを溶解した。PBS (pH7.0) は (130mM NaCl, 7mM Na_2PO_4 , 3mM NaH_2PO_4)。4%PFA は電子レンジで温めておいた 153ml H_2O に 6.8g PFA と $100\text{ }\mu\text{l}$ 1N NaOH を加え 70°C に加温しながら攪拌、溶解後室温まで冷却した後 17ml $10\times\text{PBS}$ を加えた。Active DEPC は 170ml PBS に $170\text{ }\mu\text{l}$ の DEPC を加えよく攪拌した。大型タッパーに濾紙を敷き湿潤液 (50ml ホルムアミド、25ml $20\times\text{SSC}$ 、25ml dH_2O) で湿らせてヒューミッドボックスを作り、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーション液 ($500\text{ }\mu\text{l}$ ホルムアミド、 $250\text{ }\mu\text{l}$ dH_2O 、 $250\text{ }\mu\text{l}$ $20\times\text{SSC}$ 、 $4\text{ }\mu\text{l}$ 10mg/ml salmon sperm DNA) は使用前に 80°C 10 分処理後、氷上に移したものを使用した。ヒューミッドボックス内にスライドグラスを入れ、プレハイブリダイゼーション液 $300\text{ }\mu\text{l}$ /枚を添加してパラフィルムでカバーしボックスのふたをしっかりとめて 58°C 2 時間処理した。プレハイブリダイゼーション後、プレハイブリダイゼーション液と同様にハイブリダイゼーション液を作成し RNA プローブを加えた。使用した RNA プローブは *CycA3;1* および *CycA3;4* は 50ng/枚、ヒスト

ン H4 は 10ng/枚で、最終容量 10 μ l になるように dH₂O を加え、95°C で 5 分熱変性させてただちに氷冷した。これをハイブリダイゼーション液に添加した。スライドガラス上のプレハイブリダイゼーション液を捨て、プローブ含むハイブリダイゼーション液を 50 μ l/枚を添加してパラフィルムでカバーし、ボックスのふたをしっかりとめて 58°C 一晩ハイブリダイゼーション処理を行った。

ハイブリダイゼーション後、スライドガラスを専用のラックに納め、ハイブリダイゼーション用ガラス容器を用いて以下の手順で洗浄操作をした。尚、操作は特筆ない場合室温で行った。2×SSC 1 時間、0.1×SSC 65°C 1 時間、Buffer1 40°C (→室温に戻ったら 15 分)、Buffer 2 時間、Buffer1 15 分×2 回、Buffer3 5 分、NBT / BCIP solution (170ml Buffer3, 1.5ml NBT/BCIP solution)、暗所で 30 分～2 時間静置し検出した後、TE で 5 分インキュベートし反応を停止した。

(2) サイクリン A3 過剰発現体の作成

1) バイナリーベクターの作成

カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモータに GFP および FLAG タグを付加した *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* をつなぎアグロバクテリウムを用いてシロイヌナズナに遺伝子導入を行って形質転換体を作成した (Figure. 5)。

バイナリーベクターは *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* 断片をクローニングしたエントリーベクターとデスティネーションベクター (pGWB5 および pGWB11、島根大・中川博士から分与) を LR 反応させることで作成した。まず *CycA3* の cDNA 断片 (ただし終止コドンは除く) を PCR で増幅した。プライマーは *CycA3;1* については 5' - ATGGCCGACGAAAAAGAGAA-3' と 5' - CTAAATGTTGACATCTTCAA-3' を用い開始コドンから 1560 番目の領域を増幅した。*CycA3;2* については 5' - ATGACAGAGCAAGAGATCTG -3' と 5' - TCAAATGGTAACATCCTCCC-3' を用い開始コドンから 1550 番目の領域を増幅した。*CycA3;4* については 5' - ATGGCGGAGAATCAGAACTGTGC -3' と 5' -

TTACGCCATTCCTCTAATGG -3' を用い開始コドンから 1836 番目の領域を増幅した。この PCR 産物を pENTR / D (Invitrogen) へクローニングした。2.5ng/ μ l 1 μ l、Salt solution 1 μ l、dH₂O 3 μ l、TOP0 vector 1 μ l を混和し室温で 5 分インキュベートした。この反応液を One Shot TOP10 コンピテントセル (Invitrogen) にトランスフォーメーションして増やし (カナマイシン 50 μ g/ml により選択)、プラスミドを回収して pENTR / CycA3 とした。このエントリーベクターを用いて Gateway (R) LR Clonase™ Enzyme Mix (Invitrogen) により LR 反応を行った。80ng/ μ l pENTR / CycA3 1 μ l、80ng/ μ l pGWB5 あるいは pGWB11 1 μ l、5×LR clonase Reaction Buffer 1 μ l、TE 1 μ l を混和し軽く遠心後、LR clonase enzyme mix 1 μ l を加え激しく混和し遠心した。その後 25℃で 2 時間インキュベートし、proteinase K 0.5 μ l を加え 37℃で 10 分インキュベートした。できた反応液 1 μ l をコンピテントセル (DH5 α) にトランスフォーメーションして増やし (カナマイシン 50 μ g/ml とハイグロマイシン 50 μ g/ml で選択)、プラスミドを回収してバイナリーベクター pGWB5 / CycA3 あるいは pGWB11 / CycA3 とした。

2) 植物への感染

この pGWB5 / CycA3 あるいは pGWB11 / CycA3 をアグロバクテリウムに形質転換し植物に感染させた。形質転換用キュベットに氷上で融かしたコンピテントセル (GV2260) 50 μ l と 20ng/ml バイナリーベクター 5 μ l を加え、エレクトロポレーション法で形質転換した。形質転換後、菌液をファルコン内で 2ml LB 培地と併せ 30℃、200rpm で 1 時間培養した。その後菌液をリフアンピシン 100 μ g/ml、カナマイシン 25 μ g/ml を含む LB 培地にプレーティングし 30℃で一晩静置培養した。

培養した菌を用いてシングルコロニーを取得した。28℃で 2 日培養後、シングルコロニーを拾ってコロニーPCR を行いベクタープラスミドが入っているコロニーを選択した。dH₂O 50 μ l に白濁するくらい菌を入れて 94℃で 10 分溶菌した。これを通常の PCR の dH₂O の代わりに入れて PCR を行った。10×Ex Taq buffer 5 μ l、2.5mM dNTP 4 μ l、10 μ M プライマー 1+2 各々 2.5

μl 、Ex Taq $0.5\mu\text{l}$ 、溶菌液 $35.5\mu\text{l}$ をチューブに加え、PCR 反応を行った。用いたプライマーはインサートの CycA3 断片を作成するときに使用したものであった。 94°C 15 分、 55°C 2 分、 72°C 3 分のサイクルを 25~30 サイクル行った後 72°C で 7 分処理した。反応終了後の PCR 産物はアガロースゲル電気泳動で形質転換できていることを確認した。

アグロバクテリウムのコロニーから菌を少量とり、リファンピシン $100\mu\text{g/ml}$ 、カナマイシン $25\mu\text{g/ml}$ を含む LB 培地 5ml で前培養した。インキュベートは 30°C 、 200rpm で一晩行った。前培養した菌液 $125\mu\text{l}$ をリファンピシン $100\mu\text{g/ml}$ 、カナマイシン $25\mu\text{g/ml}$ を含む LB 培地 1l に移し本培養を行った。インキュベートは 27°C 、 180rpm で一晩行った。 OD_{600} で $0.7-0.9$ になるまで培養を続け、遠心管に移して 27°C 、 7000rpm で 7 分遠心した。ペレットを 5% ショ糖溶液 500ml で溶かし、silwet $250\mu\text{l}$ を加えて感染液とした。感染液にシロイヌナズナ植物体の地上部を十分浸し、ラップをかけて感染させた。この個体を T0 世代とした。

3) 植物の育成

T0 世代から種子をとり、 $20\mu\text{g/ml}$ ハイグロマイシン含む MS 培地（アガロース）上に播種して形質転換体の選抜を行った。発芽後正常に生育した個体を選抜しこの個体を T1 世代とした。T1 世代から種子をとり、 $20\mu\text{g/ml}$ ハイグロマイシン含む MS 培地（ゲランガム）上に 60 粒播種してコピー数検定による選抜を行った。発芽後正常に生育した個体としなかった個体の数の比から 1 コピーである可能性の個体を選抜しこの個体を T2 世代とした。T2 世代 12 個体から種子をとり、 $20\mu\text{g/ml}$ ハイグロマイシン含む MS 培地（ゲランガム）上に 50 粒播種してホモ・ヘテロ検定による選抜を行った。発芽後正常に生育した個体としなかった個体の数の比からホモである可能性の個体を選抜しこの個体を T3 世代とした。T3 世代を以て形質転換体の確立とした。

4) 発現確認実験

形質転換体の確立後、35S::CycA3-FLAG 過剰発現体の確認を RT-PCR により行った。サンプリ

ング、RT-PCR の方法については（１）（２）を参照。プライマーは *CycA3;1* については 5' -GTCGTACTCGGAGAGCTTCCAACT-3' と 5' -CAGGCATTGTCGCTACACACTTGAA-3' を用い開始コドンから 103 番目～513 番目の領域を増幅した。*CycA3;2* については 5' -ATGACAGAGCAAGAGATCTG-3' と 5' -GGTCAATAATAGCCACCGGAGCT-3' を用い開始コドンから 257 番目の領域を増幅した。*CycA3;4* については 5' -CAGAACTGTGCGAGGATGACGAGAGCG-3' と 5' -CTCACACATCTGAGGATCAACAGATCTCG-3' を用い開始コドンから 13 番目～279 番目の領域を増幅した。

（３）細胞内局在性と表現型の解析

確立した GFP 融合タンパク質を発現する形質転換体の種子を播種し、発芽後 10 日目の植物体の根の伸長帯をスライドグラス上にて水で封入し、蛍光顕微鏡（Zeiss）を用いて微分干渉法および蛍光観察を行った。また確立した FLAG 融合タンパク質を発現する形質転換体の種子を播種し、発芽後 7 日目～20 日目程度の植物体の表現型を観察した。

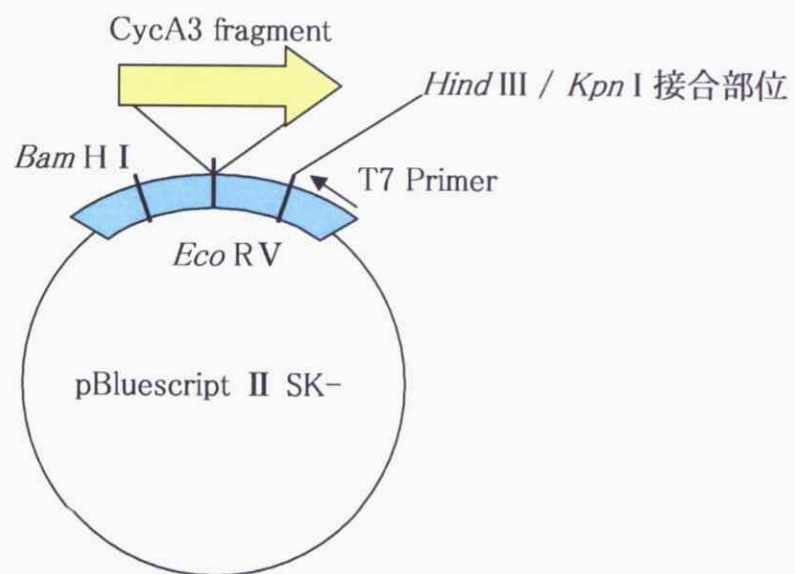
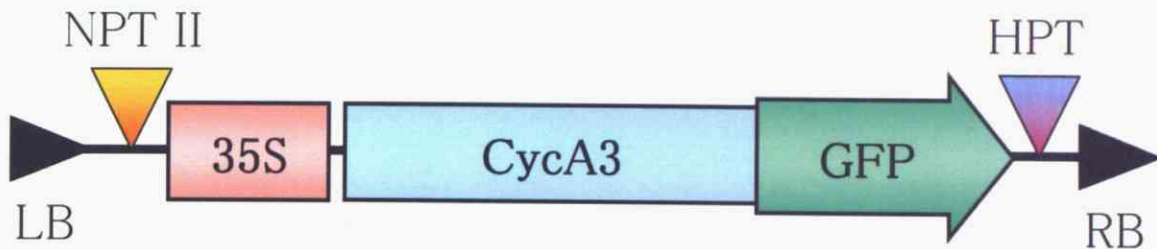


Figure.4 RNAプローブの作成

RNAプローブ作成のためのコンストラクト。

RT-PCRで増やしたCycA3断片をHind III/Kpn I 間を切断および接合したpBluescript II SK- のEcoRVサイトにクローニングし、ベクター上のBamH I をカットして作成した。これを鋳型とし、DIG RNA Labeling Kitを用いてT7 RNAポリメラーゼでDIG RNAラベリング反応を行い、RNAプローブを作成した。

35S::CycA3-GFP



35S::CycA3-FLAG

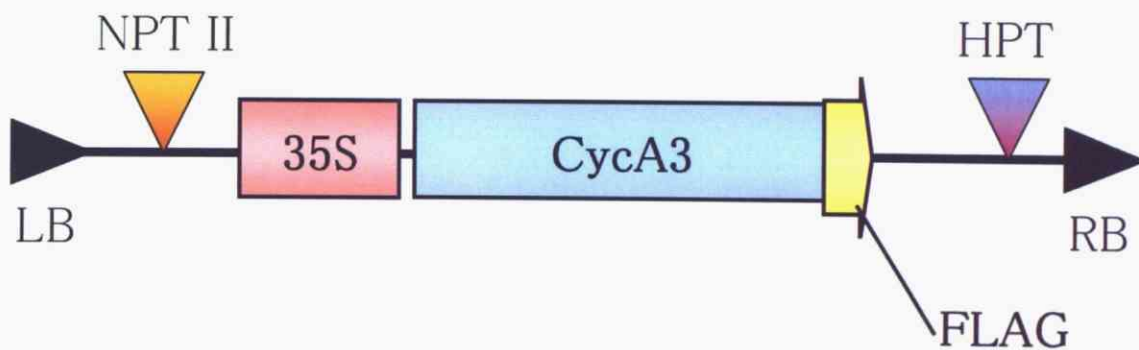


Figure.5 サイクリンA3過剰発現体の作成
 カリフラワーモザイクウイルス35SプロモータにGFPおよび
 FLAGタグを付加した *CycA3;1*、*CycA3;2*および *CycA3;4*をつ
 なぎアグロバクテリウムを用いてシロイヌナズナに遺伝子導
 入を行って形質転換体を作成した。LBはT-DNAのleft
 border、RBはT-DNAのright borderを示す。

結果

1 サイクリン A3 の発現解析

(1) 細胞周期におけるサイクリン A3 の遺伝子発現

シロイヌナズナのサイクリン A3 の細胞周期における発現パターンを調べるため、シロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d を用いてアフィディコリンによる細胞同調を行い、RT-PCR にてその発現を調べた。アフィディコリンによる細胞同調後、その解除時を 0 時間とし、2 時間おきにサンプリングした細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。4 種類のサイクリン A3 のうち、*CycA3;3* は培養細胞・植物体ともに転写産物を確認できなかった。そこで、RT-PCR では *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* について調べ、コントロールとして *CDKB2* および *Tubulin β* (*TUB4*) を用いた。

フローサイトメトリーの結果からは、アフィディコリン除去後 3、4 時間に G_2 期の細胞の顕著なピークが見られた (Figure. 6A)。このことは細胞の大部分が同調的に分裂していることを示している。RT-PCR の結果からは、 G_2 期から S 期にかけて発現する *CDKB2* 転写物が 8 時間後から増加しているのがわかる (Figure. 6B)。これはこのステージが G_2 期であることを示している。また、*CDKB2* の発現が、16 時間から減少し始めることから、アフィディコリン除去後 16 時間のポイントが M $\sim G_2$ 期へ移行するタイミングであることがわかる。

RT-PCR の結果からシロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d においては、*CycA3;1* および *CycA3;2* の発現は同調解除直後で強い発現が見られ、時間の経過とともに発現量が減少した後、24 時間前後から再び発現の増加が見られるという発現パターンが明らかになった (Figure. 6B)。これに対し、*CycA3;4* は変化のない一定の発現パターンを呈することがわかった (Figure. 6B) この結果は、サイクリン A3 の中でも *CycA3;1* と *CycA3;2* のみが G_1/S 期に発現が増大することを示している。

(2) シロイヌナズナ懸濁培養細胞の培養日数に伴ったサイクリン A3 の発現解析

細胞増殖とサイクリン A3 の発現パターンの関連性を調べるため、シロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d を用いて培養日数にともなったサイクリン A3 の発現を RT-PCR にて調べた。MM2d 細胞の増殖は継代した日を第 1 日目とし、一日おきにその細胞体積を測定することで成長曲線を描いて調べた。また一日おきにサンプリングした細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。RT-PCR では *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* について調べ、コントロールとして *Tubulin β (TUB4)* を用いた。

細胞体積測定により描いた成長曲線から、シロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d は継代後 3 日目から細胞体積が増加し始め、8 日目からその増加がほぼ停止する様子が見られた (Figure. 7A)。一方で、RT-PCR の結果から *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* とも発現のピークが 2～4 日目および 7～9 日目に見られ、5 日目前後で一過的な発現の減少が見られることがわかった (Figure. 7B)。

(3) シロイヌナズナ懸濁培養細胞における植物ホルモンとショ糖に対する発現応答

シロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d において、植物ホルモンおよびショ糖に対するサイクリン A3 の発現応答性について調べるため、以下の実験を行った。継代後 4 日目の培養細胞をナフタレン酢酸 (NAA)、カイネチンおよびショ糖をそれぞれ抜いた MS 液体培地で洗浄後、同培地で 27℃連続暗黒条件下で 48 時間振盪培養した。その後、0.5mg/l ナフタレン酢酸、0.05mg/l カイネチン、3% (w/v) ショ糖それぞれを再添加した完全培地に移してさらに培養を続けた。再添加 0、0.5、1、2、3、5、8 時間後に 10ml ずつサンプリングして RNA を抽出し、RT-PCR を行った。さらに継代 4 日目の無処理の培養細胞をコントロールとしてサンプリングして RNA を抽出し、同時に RT-PCR を行った。RT-PCR では *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* について調べ、コントロールとして *Tubulin β (TUB4)* を用いた。またサイトカイニンにより発現が誘導されることが知られている A タイプレスボンズレギ

ユレーターの一種 *ARR6* の発現応答についても同時に解析した。

RT-PCR の結果、ナフタレン酢酸およびショ糖の添加によつてはサイクリン A3 の発現に顕著な増減の変化は見られなかった (date not shown)。これに対し、カイネチンの実験では、*CycA3;1* および *CycA3;2* の発現はカイネチン除去により極端に減少し、その後再添加により 1 あるいは 2 時間前後から増加し始め、継代 4 日無処理のサンプルを明らかに上回る発現量が見られた (Figure. 8)。この発現応答は *CycA3;1* の方が 1 ~ 2 時間程度早い様子が見られたが、サイトカイニン応答因子である *ARR6* の発現がカイネチン添加後 0.5 時間で誘導されるのに比べると遅い反応であった (Figure. 8)。一方、*CycA3;4* ではカイネチン除去により発現の減少が見られるもののその後の再添加により無処理のものと同程度までにしか発現量が回復しないことが明らかになった (Figure. 8)。

(4) 植物体に対するサイトカイニンにおける発現応答

前述のシロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d を用いた発現解析で、サイトカイニンに対するサイクリン A3 の正の応答性が示唆された。そこで、次に植物体においてサイトカイニンとサイクリン A3 の関連について調べるため、シロイヌナズナ幼植物体を用いて実験を行った。発芽後 13 日目の幼植物 18 個体を MS 液体培地で 22℃連続暗黒条件下で 24 時間振盪培養した。その後、5 μ M ベンジルアミノプリン (BAP)、5 μ M ゼアチン (Zea) およびコントロールとして溶媒である DMSO それぞれを添加した培地に移してさらに培養を続けた。添加 0、0.5、1、2、4、7、24 時間後にサンプリングして RNA を抽出し、RT-PCR を行った。RT-PCR では *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* について調べ、コントロールとして *ARR6* および *Tubulin β* (*TUB4*) を用いた。

RT-PCR の結果、*CycA3;1* は 5 μ M ベンジルアミノプリン、5 μ M ゼアチン処理ともに処理後 0.5 時間から発現の増加が見られた (Figure. 9)。また、*CycA3;2* はベンジルアミノプリン処理 0.5 時間で発現の増加が見られた。*ARR6* もベンジルアミノプリン、ゼアチンともに

0.5時間の処理で発現の誘導が見られた。これに対して *CycA3;4* はベンジルアミノプリン、ゼアチンどちらの処理においても発現の変化は見とめられなかった (Figure. 9)。

さらにサイトカニンに対するサイクリン A3 の応答性について詳しく解析するために、ベンジルアミノプリン濃度を様々に変えて一時間処理し同様の実験を行った。RT-PCR の結果、*CycA3;1* および *CycA3;2* の発現は $10^{-3} \mu\text{M}$ の処理からわずかな増加が見られ、 $1 \mu\text{M}$ でさらに顕著な増加が見られた (Figure. 10)。一方、*ARR6* は $0.1 \mu\text{M}$ で明らかな発現誘導が観察された (Figure. 10)。これに対して *CycA3;4* では $10 \mu\text{M}$ ベンジルアミノプリン処理を施しても発現量の増加は見られなかった (Figure. 10)。

2 植物体におけるサイクリン A3 の機能解析

(1) 茎頂分裂組織における発現部位の特定

分裂組織におけるサイクリン A3 の発現部位を特定するために、発芽後 10 日目の野生型シロイヌナズナ幼植物体を用いて *in situ* hybridization を行った。茎頂分裂組織の切片を作成し、RNA プローブを作成してハイブリダイゼーションを行った。RNA プローブは PCR で増やした *CycA3* の C 末断片を pBluescript II SK-の *EcoRV* サイトにアンチセンス方向にクローニングし、pBluescript II SK-上の *BamHI* サイトをカットしてコンストラクトを作成した (Figure. 11)。このコンストラクションを鋳型とし、DIG RNA Labeling Kit を用いて T7 RNA ポリメラーゼで DIG RNA ラベリング反応を行い、RNA プローブを作成した。ハイブリダイゼーションを行う前に PCR DIG Probe Synthesis Kit を用い、同じコンストラクションを鋳型とした DNA プローブを作成して、各々の *CycA3* プローブの特異性を調べた。*CycA3;1*~*A3;4* の全長 cDNA を含むプラスミドを電気泳動してブロットイングし、DNA プローブでハイブリダイゼーション実験を行った結果、*CycA3;1* および *CycA3;4* プローブの特異性は確認できたが、*CycA3;2* については *CycA3;4* とも反応してし

まい特異的なプローブが得られなかった (Figure. 11)。そこでハイブリダイゼーションは *CycA3;1* および *CycA3;4* について行うことにした。コントロールとして分裂細胞で S 期特異的に発現するヒストン H4 のプローブを作成し、同時にハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後の切片を観察した結果 *CycA3;1* および *CycA3;4* は茎頂分裂組織や葉原基で一様なシグナルが確認された。また、葉の維管束でも発現が見られた (Figure. 12)。一方、ヒストン H4 はパッチ状のシグナルが茎頂分裂組織と葉原基で見られ分裂中の細胞で発現していることを確認することができた (Figure. 12)。

(2) GFP 融合タンパク質を用いた細胞内局在性の解析

シロイヌナズナの植物体におけるサイクリン A3 の機能をより詳細に解析するために形質転換植物の作成を試みた。カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモータに GFP タグを付加した *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* をつなぎアグロバクテリウムを用いてシロイヌナズナ遺伝子導入を行った。発芽後 10 日目の形質転換体 T3 世代の根の伸長帯について GFP 蛍光を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。GFP 蛍光のシグナルは、微分干渉法で観察した結果と併せると、*CycA3;1*、*CycA3;2*、*CycA3;4* とともに主に核で見られた (Figure. 13～15)。また詳細に観察すると核の内部に GFP 蛍光がパッチ状に見えるものが多数存在した (Figure. 13～15)。

(3) 過剰発現体における表現型の観察

次に、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモータに FLAG タグを付加した *CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* をつなぎアグロバクテリウムを用いてシロイヌナズナ遺伝子導入を行った。

35S::CycA3-FLAG 過剰発現体の確認を RT-PCR により行ったところ、*CycA3;1* 過剰発現

体では 11-6、14-6、56-11 のライン、*CycA3;2* 過剰発現体では 1-4、11-10、17-7、24-4 のライン、*CycA3;4* 過剰発現体では 9-1、21-1、21-9、31-3 のラインで過剰発現が確認された (Figure. 16)。

FLAG タグを付加したサイクリン A3 の過剰発現体の表現型を観察した。抽台後のステージで野生型と比べると *CycA3;1*、*CycA3;2*、*CycA3;4* の形質転換体では頂芽の成長が抑制され、代わって側芽の成長が促進している個体が見られた (Figure. 17~19)。これらの表現型を示す個体は頂芽優勢が抑制されていると考えられる。また、ブッシュ状になる個体も見られた (Figure. 17B、Figure. 18C, D)。*CycA3;1* および *CycA3;2* 過剰発現体で特にこの傾向が強いように思われた。

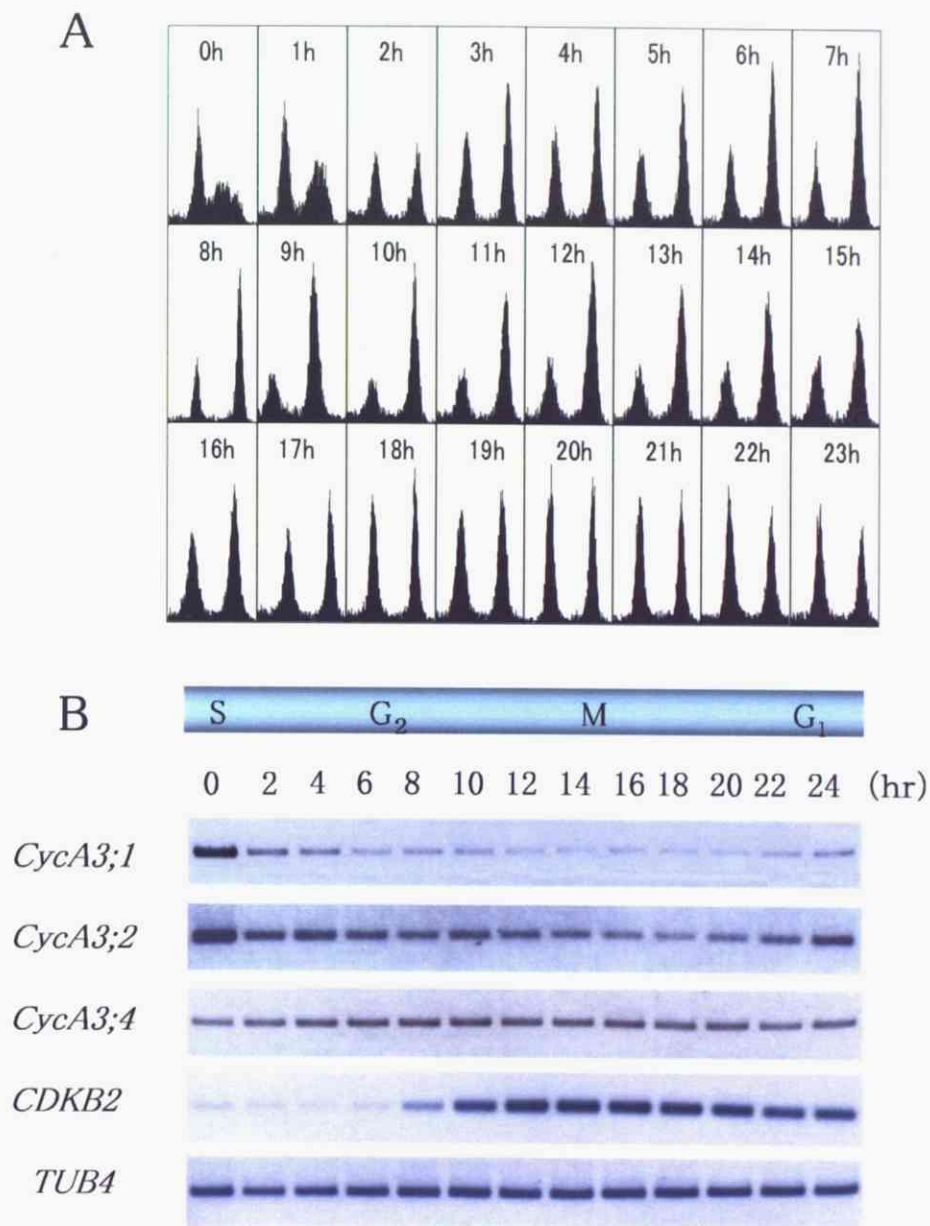


Figure.6 細胞周期におけるサイクリンA3の発現解析
 シロイヌナズナの培養細胞MM2dを用いてアフィディコリンによる細胞同調を行い、RT-PCRにより細胞周期における*CycA3*の発現パターンを調べた。G₂/M期のコントロールとして*CDKB2*を、定量コントロールとして*tubulin β* (*TUB4*)を用いた。

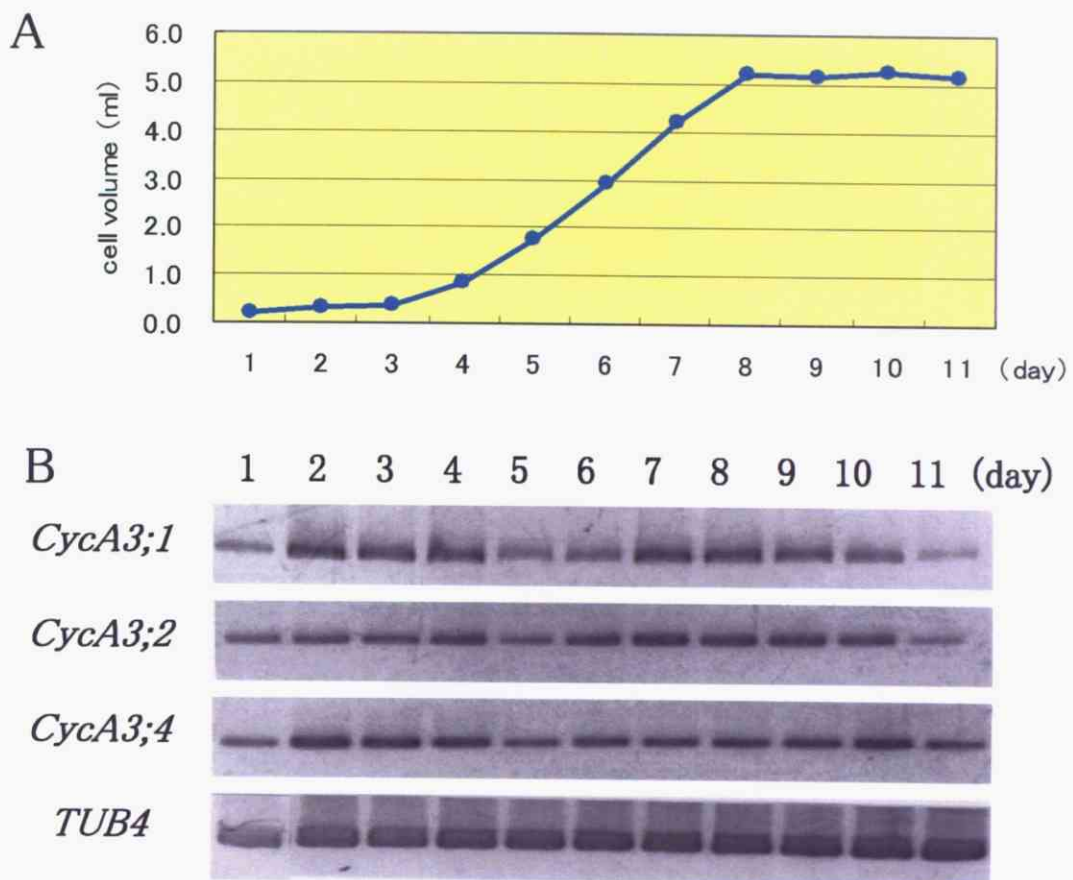


Figure.7 シロイヌナズナ懸濁培養細胞におけるサイクリンA3の発現解析
シロイヌナズナ懸濁培養細胞MM2dを用いて、培養日数に
ともなった細胞体積の変化を調べた。サイクリンA3の遺伝子発
現はRT-PCRにて調べた。数字は継代後の培養日数を示す。

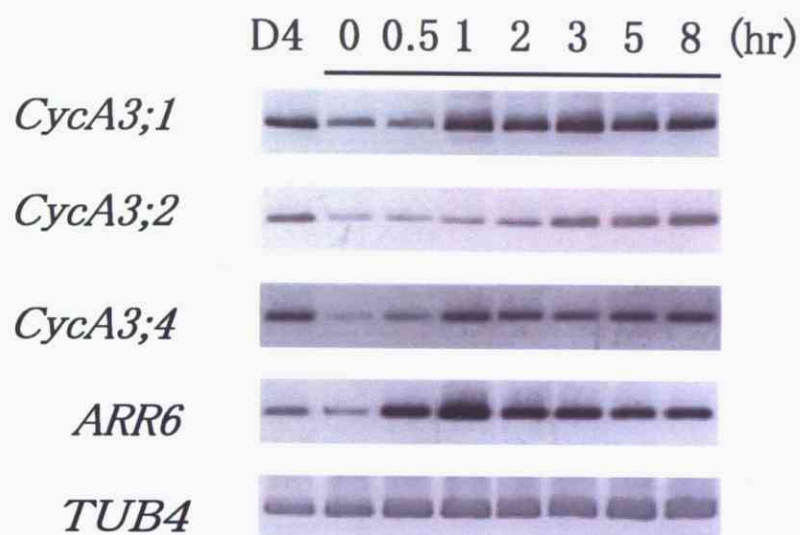


Figure.8 シロイヌナズナ懸濁培養細胞におけるサイトカイニンに対する発現応答
 継代後4日目の培養細胞をカイネチンを抜いたMS液体培地で洗浄後、培地で振盪培養した。その後、0.05mg/lカイネチンを再添加した完全培地に移してさらに培養を続け、再添加0、0.5、1、2、3、5、8時間後にサンプリングしてRNAを抽出し、RT-PCRにて*CycA3*の応答性を調べた。数字はカイネチン再添加後の時間を示す。D4は継代後4日目の無処理の培養細胞を示す。

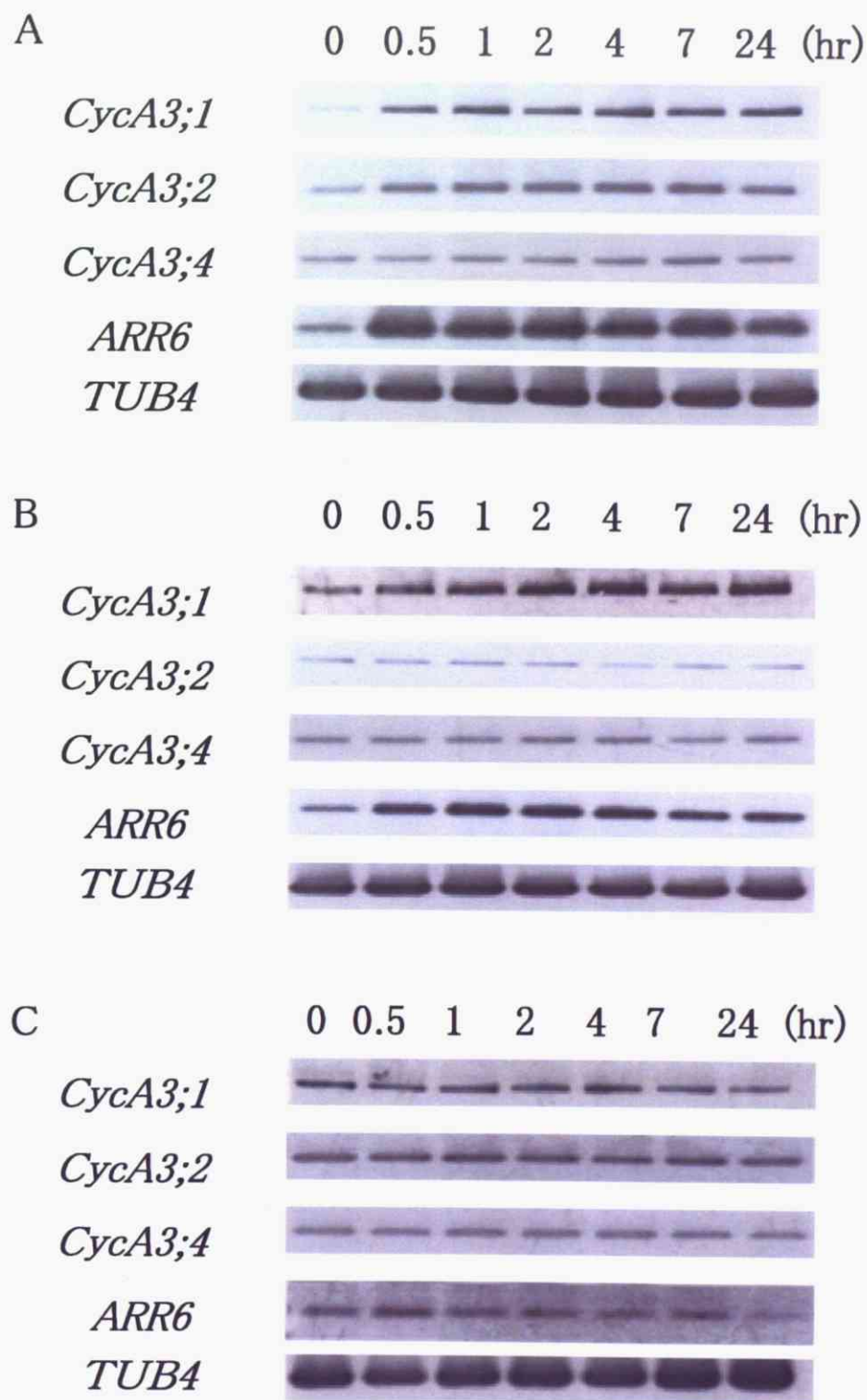


Figure.9 植物体におけるサイトカイニンに対する発現応答(1)
 発芽後13日目のシロイヌナズナ幼植物体を用いてさまざまな
 種類のサイトカイニン処理を行い、RT-PCRにて*CycA3*の応
 答性を調べた。数字はサイトカイニン処理後の時間を示す。
 (A) 5 μ M ベンジルアミノプリン処理、(B) 5 μ M ゼアチン処理、
 (C) DMSO処理

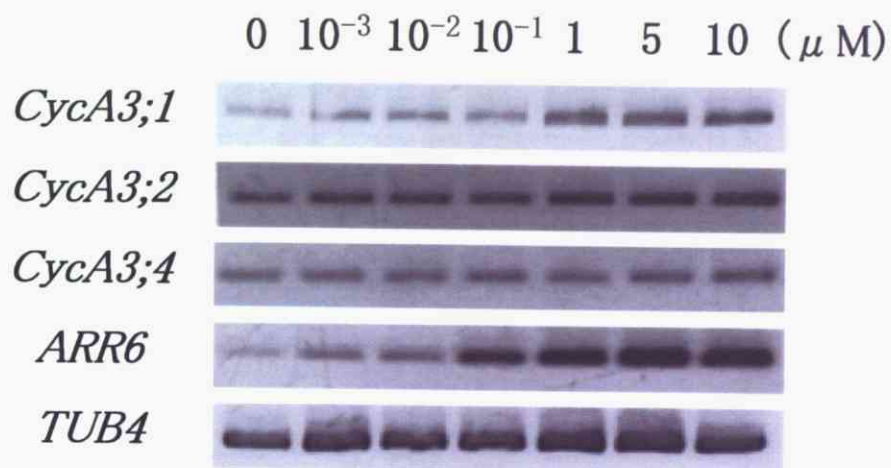


Figure.10 植物体におけるサイトカイニンに対する発現応答 (2)
 発芽後13日のシロイヌナズナ幼植物体を用いてさまざまな濃度のベンジルアミノプリン処理を1時間行い、RT-PCRにて*CycA3*の応答性を調べた。数字はベンジルアミノプリン濃度を示す。

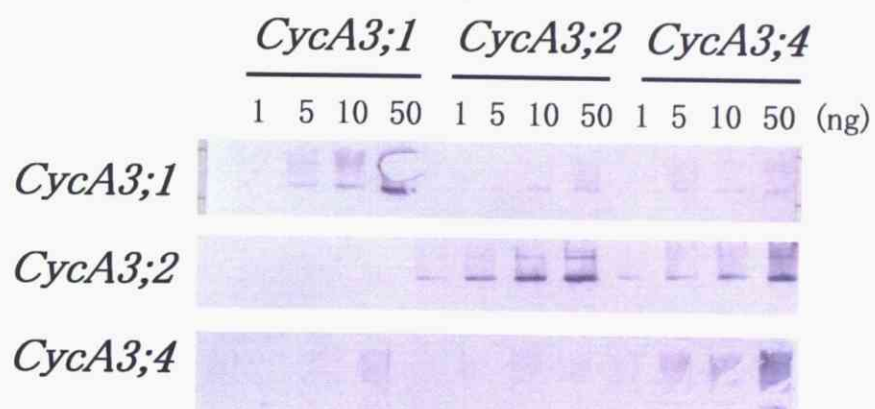


Figure.11 RNAプローブの特異性の確認
CycA3;1、*CycA3;2*、*CycA3;4*各々の全長cDNAを含むプラスミドを電気泳動・ブロッティングし、DNAプローブでハイブリダイゼーション実験を行った。数字は全長プラスミド量を示す。

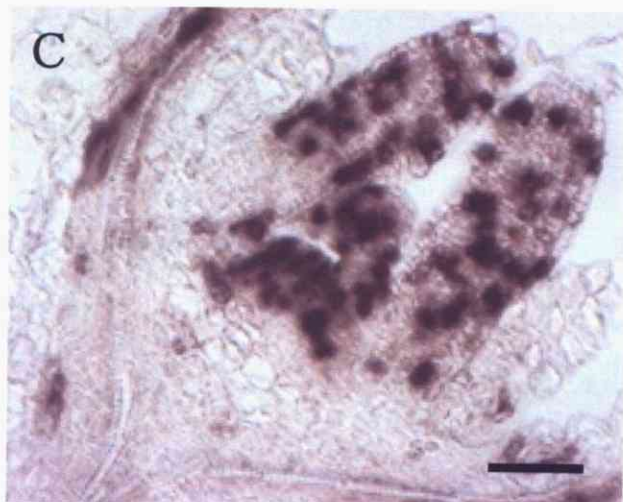
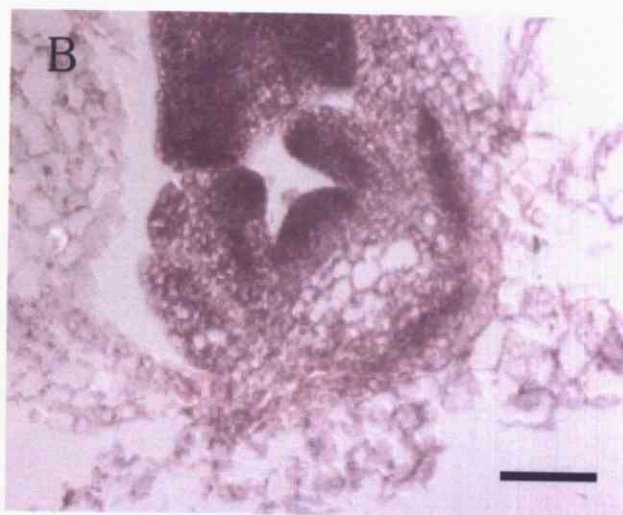
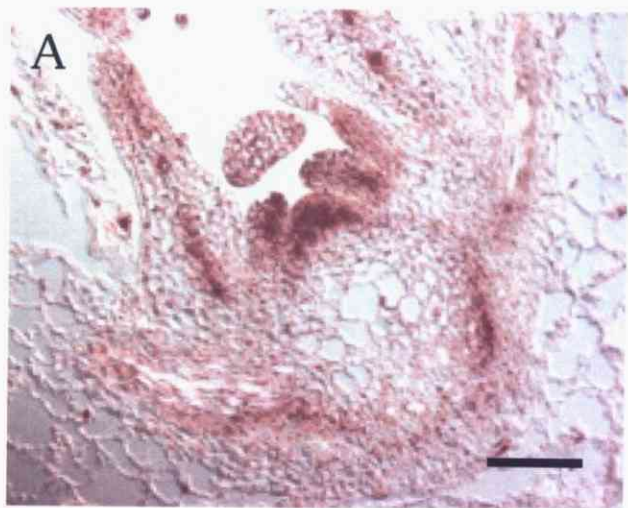


Figure.12

シュート頂におけるサイクリンA3の発現部位
in situ hybridizationにより、シロイヌナズナの
シュート頂における *CycA3* の発現部位の
特定を行った。

(A) *CycA3;1*, (B) *CycA3;4*, (C) ヒストンH4
Bar=0.1mm

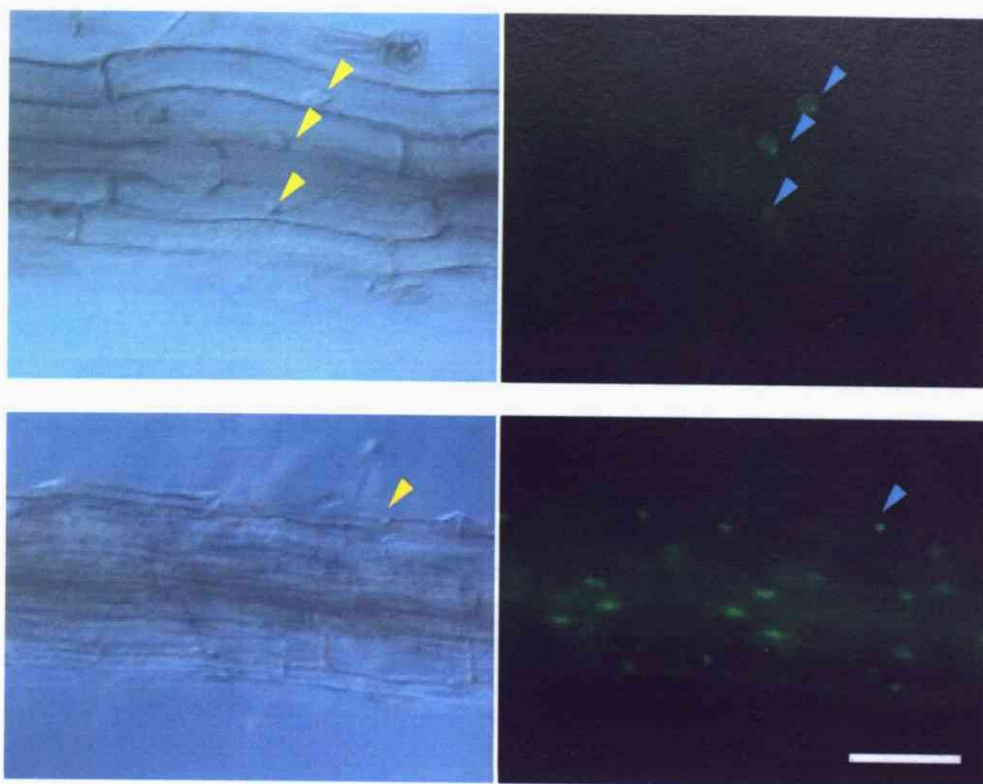


Figure.13 CytoA3;1-GFP融合タンパク質の細胞内局在
作成した形質転換体35S::CycA3;1-GFP系統の根の伸長帯
を用いて、GFP蛍光によるCycA3;1の細胞内局在を調べた。
(左列)微分干渉法による観察、(右列)蛍光顕微鏡による観
察。矢頭は核を示す。Bar=50 μ m

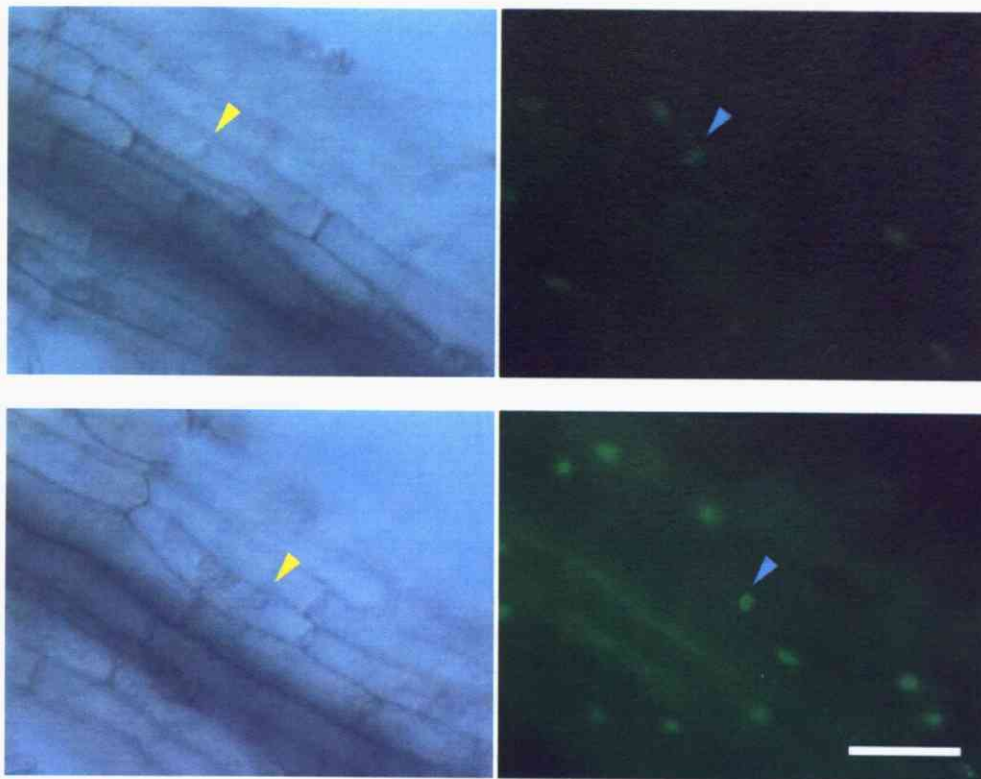


Figure.14 CyfA3;2-GFP融合タンパク質の細胞内局在
 作成した形質転換体35S::CyfA3;2-GFP系統の根の伸長帯
 を用いて、GFP蛍光によるCyfA3;2の細胞内局在を調べた。
 (左列)微分干渉法による観察、(右列)蛍光顕微鏡による観
 察。矢頭は核を示す。Bar=50 μ m

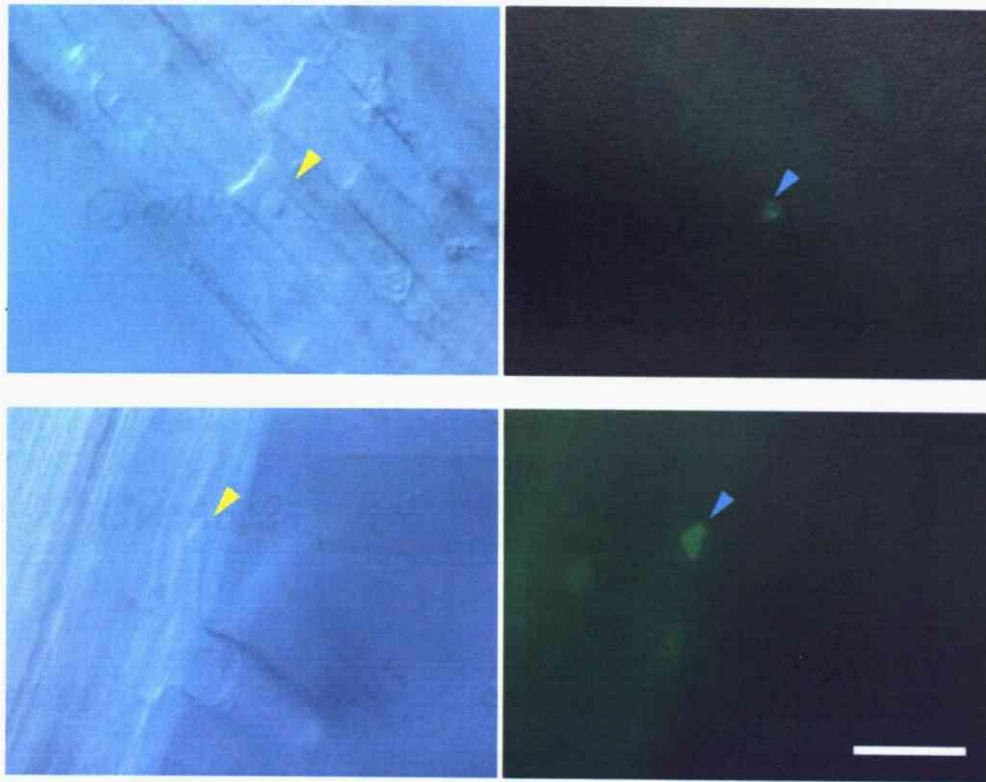


Figure.15 CycA3;4-GFP融合タンパク質の細胞内局在
作成した形質転換体35S::CycA3;4-GFP系統の根の伸長帯
を用いて、GFP蛍光によるCycA3;4の細胞内局在を調べた。
(左列)微分干渉法による観察、(右列)蛍光顕微鏡による観
察。矢頭は核を示す。Bar=50 μ m

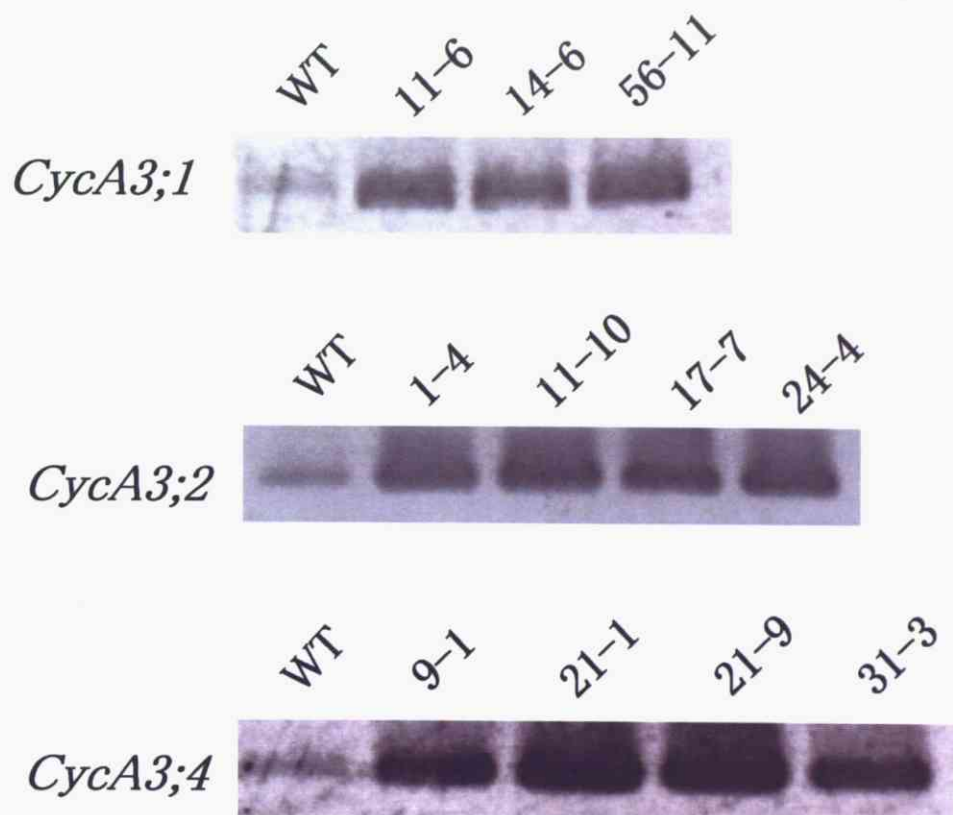


Figure.16 *CycA3*過剰発現体の発現確認
作成した35S::*CycA3*-FLAG系統の発現確認を
RT-PCRにより行った。数字は各々の系統のライン
ナンバーを示す。



Figure.17 CycA3;1-FLAG過剰発現体の表現型
作成した35S::CycA3;1-FLAG系統の表現型を観察した。(A) 野生型、(B)-(H) 35S::CycA3;1-FLAGを導入した形質転換体。それぞれ独立した系統の個体を示す。矢頭は頂芽を示す。

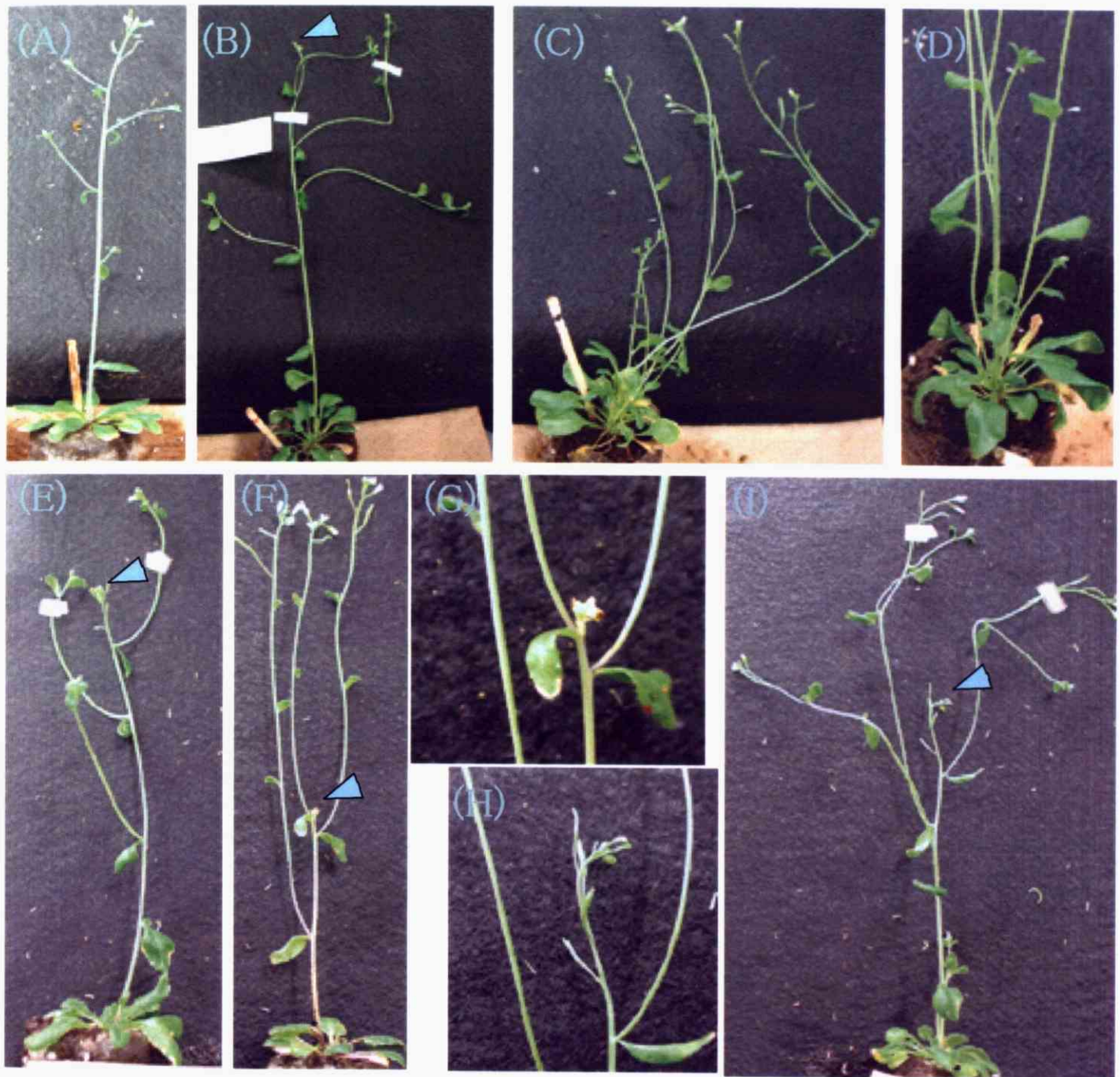


Figure.18 CycA3;2-FLAG過剰発現体の表現型
作成した35S::CycA3;2-FLAG系統の表現型を観察した。(A) 野生型、(B)-(I) 35S::CycA3;2-FLAGを導入した形質転換体。それぞれ独立した系統の個体を示す。(G)は(F)の頂芽の拡大、(H)は(I)の頂芽の拡大を示す。矢頭は頂芽を示す。



Figure.19 CycA3;4-FLAG過剰発現体の表現型
作成した35S::CycA3;4-FLAG系統の表現型を観察した。(A) 野生型、
(B)-(F) 35S::CycA3;4-FLAGを導入した形質転換体。それぞれ独立した
系統の個体を示す。矢頭は頂芽を示す。

<考察>

我々はシロイヌナズナの懸濁培養細胞 MM2d を用いてアフィディコリンによる細胞同調を行い、細胞周期におけるサイクリン A3 遺伝子の発現を調べた。その結果、*CycA3;1* および *CycA3;2* の転写産物が同調解除直後および 24 時間前後で蓄積する傾向を観察することができた。これは細胞周期における G₁/S 期のタイミングと一致しており、これら 2 つのサイクリン A3 遺伝子が G₁/S 期を制御する新しいサイクリンであることを示す結果であると言える。一方、*CycA3;4* の転写産物は細胞周期を通じて増減の変化が全く見られなかった。このことから、*CycA3;4* 遺伝子は細胞周期と無関係に働いている可能性が示唆された。

シロイヌナズナのサイクリン A および B はこれまで細胞周期において G₂/M 期を制御する M 期サイクリンであると考えられていた。しかし最近、サイクリン A3 が細胞周期移行において他の M 期サイクリンより早いタイミングで発現することが報告されている (Menges et al., 2005、Reichheld et al., 1996、Ito et al., 1997、Kouchi et al., 1995)。この細胞周期における発現のタイミングは D タイプサイクリンの 1 つであるサイクリン D4 の働くタイミングと極めて近い (Menges et al., 2005、Kono et al., 2005)。また、細胞周期移行のみならず G₀ 期からの細胞周期再突入でもサイクリン A3 はサイクリン D4 と似た発現パターンを呈するという報告もある (Menges et al., 2005)。植物では G₁/S 期を制御するサイクリンはサイクリン D が明らかになっているのみで、動物のサイクリン E のホモログは見つかっていないことから、シロイヌナズナのサイクリン A3 が G₁/S 期で働いていることは非常に興味深いと言える。

シロイヌナズナのサイクリン A3 について詳細な解析を進めるため、まずシロイヌナズナ懸濁培養細胞 MM2d を用いたいくつかの実験を行った。MM2d の培養日数にともなったサイクリン A3 の発現を RT-PCR により調べた結果、*CycA3;1*、*CycA3;2* および *CycA3;4* とも発現のピークが 2～4 日目および 7～9 日目に見られ 5 日目前後で一過的に発現の減少が見られることがわか

った。サイクリン D2 およびサイクリン D3 は培養日数を通して一様に高レベルで発現しているが、サイクリン A3 と異なり一過的にその発現が減少する様子はない (Riou-Khalichi et al., 2000)。サイクリン A3 が 2 ピーク性を呈する要因は今のところ不明である。

次に MM2d における植物ホルモンおよびショ糖に対するサイクリン A3 の応答性について調べた。ナフタレン酢酸、カイネチン、ショ糖のそれぞれの再添加実験を行い、サイクリン A3 の発現を RT-PCR により調べた結果、*CycA3;1* および *CycA3;2* の発現がカイネチン再添加後誘導されることが明らかになった。このことから、*CycA3;1* と *CycA3;2* の遺伝子発現はサイトカイニンにより正に制御されていることが示唆された。これに対して *CycA3;4* の発現はカイネチン再添加後回復するように見えるが、無処理のサンプルの発現量と同程度までにしか回復しないこと、また *ARR6* の発現の誘導と比較して反応性が弱く遅いことからカイネチンによる誘導というよりは、むしろ細胞増殖の再開に依存した発現上昇であると考えられる。

これまでにシロイヌナズナのサイクリンと植物ホルモンおよびショ糖の関係はサイクリン D において精力的に研究が進められてきた (Riou-Khalichi et al., 1999, Riou-Khalichi et al., 2000)。ショ糖はシロイヌナズナのサイクリン D2 およびサイクリン D3 の発現を誘導し、細胞周期における G₁/S 期の調節に関わっていることが明らかになっている (Riou-Khalichi et al., 2000)。また、サイクリン D3 は植物ホルモンのサイトカイニンによって発現が誘導されることが示されている (Riou-Khalichi et al., 1999)。シロイヌナズナのサイクリン A3 の発現はショ糖によって誘導されることはないが、サイトカイニンによって誘導されるということが示された。これは、サイトカイニンに対して誘導性を示すサイクリンとしてはサイクリン D3 に次いで 2 番目である。

前述したシロイヌナズナのサイクリン A3 とサイトカイニンの正の応答性についてより深く解析するため、シロイヌナズナ植物体を用いた実験を行った。シロイヌナズナの幼植物にサイトカイニン処理を施し、サイクリン A3 の発現を RT-PCR により調べた結果、*CycA3;1* はベンジ

ルアミノプリン、ゼアチン両処理により発現量が増加することがわかった。また *CycA3;2* の発現はベンジルアミノプリン処理後の増加が見られた。しかし *CycA3;4* はどちらの処理を施しても発現の誘導が起こらないことがわかった。さらにサイトカイニンに対するサイクリン A3 の応答性について詳しく解析するために、サイトカイニン濃度を様々に変えて同様の実験を行ったところ、*CycA3;1* および *CycA3;2* の発現は $10^{-3} \mu\text{M}$ の処理からわずかな増加を示し、 $1 \mu\text{M}$ の処理で顕著に増加することが明らかになった。この増加パターンは $10^{-1} \mu\text{M}$ で顕著な増加を示す *ARR6* の増加パターンと似ている。以上のことから、シロイヌナズナでは植物体においても *CycA3;1* と *CycA3;2* の遺伝子発現がサイトカイニンにより正に制御されていることがわかった。

植物体において植物ホルモンとサイクリン D3 について実験している報告もある。シロイヌナズナ植物体に $1 \mu\text{M}$ ゼアチン処理を施しサイクリン D3 の発現レベルを調べると無処理のものに比べ顕著な増加が見られた (Riou-Khalichi et al., 1999)。またサイトカイニン量が野生型に比べ5倍である *amp1* 突然変異ではサイクリン D3 発現レベルが増加しているという結果も出ている (Nogue et al., 2000)。逆にサイクリン D3 を過剰発現させる形質転換体はサイトカイニンを加えない培地上で緑化したカルスを再生する (Riou-Khalichi et al., 1999)。以上の報告と前述の実験結果からシロイヌナズナのサイクリン A3 はサイクリン D3 と同様にサイトカイニンのシグナル伝達の下流に位置し、細胞増殖を正に制御している可能性が示された。

植物体におけるサイクリン A3 の発現部位を特定するために、*in situ* hybridization を行った。野生型シロイヌナズナ幼植物体の茎頂分裂組織の切片を作成し、*CycA3;1* および *CycA3;4* 特異的なプローブを作成してハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの結果、*CycA3;1* および *CycA3;4* は茎頂分裂組織や葉原基で特異的に発現していることがわかった。*CycA3;1* および *CycA3;4* の発現はコントロールに用いたヒストン H4 のようなパッチ状のシグナルではなく、一様にシグナルが見られるものであった。これは *CycA3* の発現パターンが細胞

周期を通じてヒストン H4 のように強弱がはっきりするものではなく比較的ゆるやかに変動するものであることが原因だと考えられる。また茎頂分裂組織や葉原基のほかにも維管束部分でシグナルが見られた。これは維管束形成層の分裂組織でサイクリン A3 の発現が見られるためと考えられる。茎頂分裂組織や葉原基は細胞分裂がさかんに起こっている部位であることから、これらのサイクリン A3 が *in vivo* で細胞周期制御に直接関わっていることが示唆された。これは、シロイヌナズナのサイクリン A3 が原基形成を介して器官形成に関与していることも示唆している。

これまでも *in situ* hybridization によるサイクリンの発現部位の特定に関する報告はいくつかされている。サイクリン A およびサイクリン B 遺伝子の発現は主に分裂組織を中心に見られることが明らかにされている。シロイヌナズナのサイクリン B1;1 遺伝子の転写産物は地上部・地下部ともに分裂組織のみで検出され、側根原基などの新たに形成される分裂組織でも細胞分裂が始まる初期段階から発現が確認されている (Ferreira et al., 1994)。シロイヌナズナに限らずイネでも根端分裂組織でサイクリン A および B 遺伝子の発現が見られている (Umeda et al., 1999)。またシロイヌナズナにおいてサイクリン D3;1 の遺伝子発現は葉芽および花芽において、茎頂分裂組織、葉原基、若い展開途中の葉、前形成層、維管側組織および花芽側芽でも見られる (Dewitte et al., 2003)。さらにサイクリン D4;1 の遺伝子発現は根端分裂組織、側根原基および維管側などで見られる (Veylder et al., 1999)。本研究ではサイクリン A3 について茎頂分裂組織における発現解析しか行っていないが、発現している組織はサイクリン D3 が発現している組織とほぼ重なっていることが明らかになった。

GFP タグを付加したサイクリン A3 をシロイヌナズナ植物体で過剰発現させ、細胞内局在を調べた。その結果、GFP 蛍光のシグナルは *CycA3;1*、*CycA3;2*、*CycA3;4* ともに主に核で見られた。また詳細に観察すると核の内部の GFP 蛍光がパッチ状に見えるものが多数存在した。このことから、シロイヌナズナのサイクリン A3 は核の中でも特に核小体に局在している可能性がある

と考えられる。過去の報告ではタバコのサイクリン A3;2 が同じように核の内部でパッチ状の局在を示す例がある (Yu et al., 2003)。また、動物では核小体の形態は細胞周期の G_1/S 期にパッチ状になることも報告されている。一方でタバコのサイクリン A3;1 は核局在であるものの、パッチ状には見えないという報告がある (Criqui et al., 2001)。このことからシロイヌナズナのサイクリン A3 は、タバコではサイクリン A3;1 よりも A3;2 に近い可能性が考えられる。

FLAG を付加したサイクリン A3 の過剰発現体の表現型を観察したところ、頂芽優勢が抑制されている個体やブッシュ状になる個体が見られた。頂芽優勢とは、側芽の多くが頂芽による阻害的影響によって休止状態に置かれており枝の数や成長が制限されている現象のことを指す (Snow., 1925、Thimann et al., 1933、Skoog et al., 1934)。このような頂芽による側芽の活動抑制は、頂芽からのオーキシンによって媒介されていると理解されている。茎頂を切除すると側芽の伸長が始まるが、この現象は頂芽からのオーキシンの供給が停止した結果、根に由来するサイトカイニンが相対的に優勢になることが引き金となって起こると考えられている。これらの知見は頂芽を切除した部分にオーキシンを含む寒天片を載せると側芽の成長が抑えられること、また頂芽を切除しなくても側芽にサイトカイニンを与えると頂芽優勢がなくなり植物体がブッシュ状になることから示された (Leyser et al., 2005)。本研究で作成し観察した形質転換体はカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモータでサイクリン A3 を過剰発現させており、茎頂、側芽に関わらず、サイクリン A3 を過剰発現していると考えられる。それに関わらず、側芽の成長が促進（茎頂が抑制）されたのは、サイクリン A3 に特異的に結合して CDK 活性を制御する因子が側芽と茎頂で異なるのか、あるいは、サイクリン A3-CDK の基質の中に各分裂組織に特異的な制御因子があるのか、そのいずれかであると考えられる。

以上の結果・考察から、本研究においてシロイヌナズナのサイクリン A3 は細胞周期において G_1/S 期を制御するサイクリンであること、およびサイトカイニンによって正に制御されてい

ることが明らかになった。

現在までに、植物ホルモンが細胞分裂や細胞周期に与える実際の影響についての報告はいくつか発表されている。しかし両者を結ぶ詳しい経路については未だ明らかにされていないというのが実状である。

本研究で取り扱ったサイトカイニンは細胞分裂に必須の植物ホルモンとされている。細胞分裂は細胞周期が回転することで起こり、これはサイクリンとサイクリン依存性キナーゼ (CDK) によるものであるが、サイトカイニンはサイクリン D3 を誘導することで細胞周期の移行を制御しているという報告がある。サイクリン D3 は細胞周期の中の G_1/S 期を制御する調節因子であり、サイトカイニンはサイクリン D3 を通じて G_1/S 期の調節の一端を担っているということになる。 G_1/S 期サイクリン D3 は CDKA;1 と結合することでその活性を調節し、CDKA;1 は RB タンパク質をリン酸化する。これにより RB タンパク質から E2F が解離し、S 期制御遺伝子の転写活性化が起こって G_1/S 期の移行が起こり、細胞周期の回転が開始される。本研究ではこのサイクリン D3 と同じような働きをする可能性のあるサイクリンとしてサイクリン A3 を示した (Figure. 20)。

現在までに植物では G_1/S 期を調節するサイクリンとして D タイプサイクリンのみが知られていた。これに対し、動物では G_1 サイクリンはサイクリン D とサイクリン E の 2 種類が明らかになっている。動物の細胞周期において、Rb タンパク質が E2F との結合能を失うためには、サイクリン D/CDK4 またはサイクリン D/CDK6 によるリン酸化とサイクリン E/CDK2 によるリン酸化の二段階の制御が必要である。本研究の結果からシロイヌナズナのサイクリン A3 が動物のサイクリン E のような働きをしている可能性は十分に考えられ、今後の大きな研究課題であると言える。今後はサイクリン A3 の CDK との結合能について、また CDK 以外の細胞周期調節因子との相互作用について生化学的な解析が必要である。特に植物のサイクリン A3 と動物のサイクリン E との関連性を明らかにするため、Rb タンパク質のリン酸化におけるサイクリン A3

の機能について検討する必要がある。さらにサイトカイニン→サイクリン A3→G₁/S 期制御という作業仮説について証明するために、接ぎ木実験なども有効であるかもしれない。シロイヌナズナのサイクリン A3 のより詳細な解析を通じて、植物の複雑かつ精巧な細胞周期の調節機構がますますひもとかれて植物ホルモンと細胞増殖を結ぶシグナル伝達の全貌が明らかになっていくことが期待される。

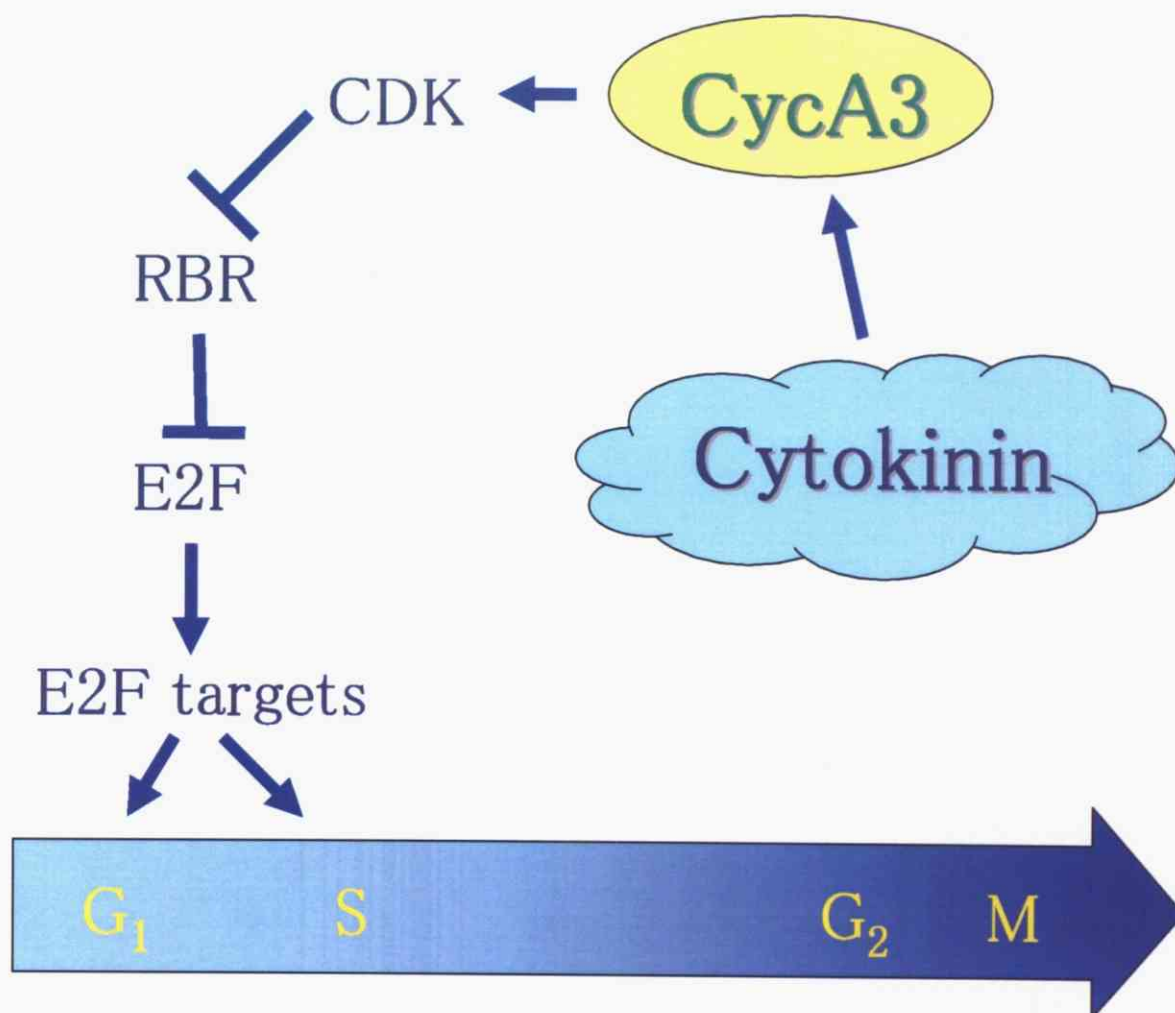


Figure.20 サイクリンA3を介したサイトカイニンによる細胞周期調節モデル
 本研究において、シロイヌナズナのサイクリンA3は細胞周期において G_1 /S期を制御するサイクリンであること、およびサイトカイニンによって正に制御されていることが明らかになった。

<参考文献>

- Boer, B.G.W., Murray, J.A.H. (2000). Triggering the cell cycle in plants. *Trends in Cell Biology*, 10, 245-250.
- Catterou, M., Dubois, F., Smets, R., Vaniet, S., Kichey, T., Onckelen, H., Sangwan-Norreel, B.S., Sangwan, R. (2002). *hcc*: an *Arabidopsis* mutant overproducing cytokinins and expressing high *in vitro* organogenic capacity. *The Plant Journal*, 30(3), 273-287.
- Chaubet-Gigot. (2000). Plant A-Type Cyclins. *Plant Molecular Biology*, 43, 659-675.
- Dahl, M., Meskiene, I., Bogre, L., Ha, D.T.C., Swoboda, I., Hubmann, R., Hirt, H., 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. *The Plant Cell*, 7, 1847-1857.
- Dewitte, W., Riou-Khamlichi, S., Scofield, S., Healy, J.M.S., Jacquard, A., Kildy, N.J., Murray, J.A.H. (2003). Altered Cell Cycle Distribution, Hyperplasia, and Inhibited Differentiation in *Arabidopsis* Caused by the D-Type Cyclin CYCD3. *The Plant Cell*, 15, 79-92.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., Hunt, T. (1983). Cyclin: A Protein Specified by Material mRNA in Sea Urchin Eggs That Is Destroyed at Each Cleavage division. *Cell*, 33, 389-396.
- Ferreira, P.C.G., Hemerly, A.S., Engler, J.A., Montagu, M., Engler, G., Inze, D. (1994). Developmental Expression of the *Arabidopsis* Cyclin Gene *cyc1At*. *The Plant Cell*, 6, 1763-1774.
- Fuerst, R.A.U.A., Soni, R., Murray, J.A.H., Lindsey, K. (1996). Modulation of Cyclin Transcript Levels in Cultured Cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 112, 1023-1033.
- Genschik, P., Criqui, M.C., Parmentier, Y., Derevier, A., Fleck, J. (1998). Cell Cycle-Dependent Proteolysis in Plants: Identification of the Destruction Box Pathway

and Metaphase Arrest Produced by the Proteasome Inhibitor MG132. *The Plant Cell*, 10, 2063-2075.

Healy, J.M.S., Menges, M., Dooman, J.H., Murray, J.A.H. (2001). The *Arabidopsis* D-type Cyclins CycD2 and CycD3 Both Interact *in Vivo* with the PSTAIRE Cyclin-dependent Kinase Cdc3a but Are Differentially Controlled. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7041-7047.

Ito, M., Criqui, M.C., Sakabe, M., Ohno, T., Hata, S., Kouchi, H., Hashimoto, J., Fukuda, H., Komamine, A., Watanabe, A. (1997). Cell-cycle-regulated transcription of A- and B-type plant cyclin genes in synchronous cultures. *The Plant Journal*, 11(5), 983-992.

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

Inze, D. (2005). When plant cells decide to divide. *Trends in Plant Science*, 6(8), 359-364.

Jung, J.H., Yun, J., Seo, Y.H., Park, C.M. (2005). Characterization of an *Arabidopsis* Gene that Mediates Cytokinin Signaling in Shoot Apical Meristem Development. *Mol. Cells*, 19(3), 342-349.

Kouchi, H., Sekine, M., Hata, S. (1995). Distinct Classes of Mitotic Cyclins Are Differentially Expressed in the Soybean Shoot Apex during the Cell Cycle. *The Plant Cell*, 7, 1143-1155.

Kono, A., Ohno, R., Umeda-Hara, C., Uchimiya, H., Umeda, M. (2005). A distinct type of cyclin D, CYCD4;2, involved in the activation of cell division in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*,

Leyser, O. (2005). The fall and rise of apical dominance. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15, 468-471.

McSteen, P., Leyser, O. (2005). Shoot Branching. *Annu. Rev. Plant Biol*, 56, 353-374.

Menges, M., Jager, S.M., Gruissem, W., Murray, J.A.H. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and

highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal*, 41, 546-566.

Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W., Murray, J.A.H. (2002). Cell Cycle-regulated Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41987-42002.

Meskiene, I., Bogre, L., Dahl, M., Pirck, M., Ha, D.T.C., Swoboda, I., Heberle-Bors, E., Ammerer, G., Hirt, H. (1995). *cycMs3*, a Novel B-type Alfalfa Cyclin Gene, Is Induced in the G₀-to-G₁ Transition of the Cell Cycle. *The Plant Cell*, 7, 759-771.

Nogue, F., Grandjean, O., Craig, S., Dennis, E., Chaudhury, A. (2000). Higher levels of cell proliferation rate and cyclin *CycD3* expression in the *Arabidopsis amp1* mutant. *Plant Growth Regulation*, 32, 275-283.

Pines, J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nature Cell Biology*, 1, E73-E79.

Pozo, J.C.d., Lopez-Matas, M. A., Ramirez-Parra, E., Guitierrez, C. (2005). Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum*, 123, 173-183.

Reichheld, J.P., Chaubet, N., Shen, W.H., Renaudin, J.P., Gigot, C. (1996). Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle in *Nicotiana tabacum* BY2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 13819-13824.

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

Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquemard, A., Murray, J.A.H. (1999). Cytokinin Activation of *Arabidopsis* Cell Division Through a D-Type Cyclin. *Science*, 283, 1541-1544.

Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M.S., Murray, J.A.H. (2000). Sugar Control of the Plant Cell Cycle: Differential Regulation of *Arabidopsis* D-type Cyclin Gene

expression. *Molecular and Cellular Biology*, 20(13), 4513-4521.

Setiady, Y.Y., Sekine, M., Hariguchi, N., Yamamoto, T., Kouchi, H., Shinmyo A. (1995). Tobacco mitotic cyclins: cloning, characterization, gene expression and functional assay. *The Plant Journal*, 8(6), 949-957

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

Skoog, F., Thimann, K.V. (1934). Further Experiments on the Inhibition of the Development of Lateral Buds by Growth Hormone. *Proc.N.A.S*, 20, 480-485.

Snow, R. (1925). The Correlative Inhibition of the Growth of Axillary Buds. *Annals of Botany*, 39, 841-859.

Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H., 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. *The Plant Cell*, 7, 85-103

Thimann, K.V., Skoog, F. (1933). Studies on the Growth Hormone of Plants. III. The Inhibiting Action of the Growth Substance on Bud Development. *Proc.N.A.S*, 19, 714-716.

Umeda, M., Iwamoto, N., Umeda-Hara, C., Yamaguchi, M., Hashimoto, J., Uchimiya, H. (1999). Molecular characterization of mitotic cyclins in rice plants. *Mol Gen Genet*, 262, 230-238.

Veyldder, L., Engler, J.A., Burssens, S., Manevski, A., Lescure, B., Montagu, M., Engler, G., Inze, D. (1999). A new D-Type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordial formation. *Planta*, 208: 453-462.

Vandepoele, K., Raes, J., Veyldder, L., Rouze, P., Rombauts, S., Inze, D. (2002). Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14, 903-916.

Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, Wei., Altman, N., dePamphilis, C.W., Ma,

H. (2004). Genome-Wide Analysis of the Cyclin Family in Arabidopsis and Comparative Phylogenetic Analysis of Plant Cyclin-Like Proteins. *Plant Physiology*, 135, 1084-1099.

Wang, Y., magnard, J.L., McCormick, S., Yang, M. (2004). Progression through Meiosis I and II in Arabidopsis Anthers Is Regulated by an A-Type Cyclin Predominately Expressed in Prophase I. *Plant Physiology*, 136, 4127-4135.

Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Onckelen, H., Schmulling, T. (2003). Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *The Plant Cell*, 15, 2532-2550.

Winston, J.T., Chu, C., Harper, J.W. (1999). *Culprits* in the degradation of cyclin E apprehended. *Genes & Development*, 13, 2751-2757.

Yu, Y., Steinmetz, A., Meyer, D., Brown, S., Shen, W.H. (2003). The Tobacco A-Type Cyclin, *Nicta:CYCA3;2*, at the Nexes of Cell Division and Differentiation. *The Plant Cell*, 15, 2763-2777.

<謝辞>

本研究を進めるにあたり、指導教官としてご指導いただきました東京大学分子細胞生物学研究所細胞機能研究分野の内宮博文教授に深く感謝いたします。

同研究分野の梅田正明助教授には本研究全般にわたり、研究の方向付けをしていただき、たくさんの議論と助言を通じてご指導いただきました。また実験面においても数々の技術と知識を授けていただきました。さらに修士論文を書くにあたりさまざまにご鞭撻いただきました。本研究をやり多きものに完成できたのもひとえに導いて下さった梅田正明助教授のおかげです。心から感謝申し上げます。

本研究の技術的な面において、大変細やかで丁寧にあらゆる実験方法を教えて下さり、また日常的な面でも支えて下さった梅田千景さんに心からお礼申し上げます。また実験の過程で技術的に助けて下さった石井真紀さんにお礼申し上げます。

同研究分野の cell cycle グループの先輩方には多くの適切なアドバイスやアイデアを与えていただき、いつも気にかけていただきました。後輩や卒研究生の面々には楽しく実験を進めるための元気をもらったり、ときに鋭い助言をもらったりしました。感謝いたします。

同研究分野の皆様には毎日の研究生活の中で、楽しく快適で充実した日々を送るために大変お世話になりました。お礼申し上げます。

最後に、いつも励まし精神的に助けてくれた友人たちに感謝いたします。また大学院での研究と生活を応援してくれ、夜遅く帰っても真剣に話を聞いて相談にのってくれた家族に深く感謝いたします。