



# 高等植物 *Arabidopsis thaliana* における mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードの同定とその意義

松岡, 大介

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2008-11-20

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2543

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002543>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博 士 論 文

高等植物 *Arabidopsis thaliana* における  
mitogen-activated protein kinase (MAPK)  
カスケードの同定とその意義

平成14年1月

神戸大学大学院自然科学研究科

松岡 大介

## 目次

	頁
要旨	1
第1章 緒論	4
第2章 材料と方法	6
第1節 植物材料（コマツナ）及びその生育方法	6
第2節 大腸菌株と培地6	
第3節 RT-PCR 法を用いたプロテインキナーゼ遺伝子断片の同定	7
第4節 プラークハイブリダイゼーション法を用いたシロイヌナズナ cDNA ライブラリーからのスクリーニング	16
第5節 発現ベクターの構築	19
第6節 大腸菌での発現及び精製	21
第7節 タンパク質の濃度の決定	22
第8節 SDS ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）	22
第9節 大腸菌で発現させた wild type GST-AtMEK1 及び mutant type GST-AtMEK1の活性測定	24
第10節 イムノプロット	24
第11節 GST-ATMPK3 及び GST-ATMPK4 の自己リン酸化酵素活性測定	26
第12節 シロイヌナズナの生育及びストレス処理	26
第13節 シロイヌナズナからのタンパク質抽出	27
第14節 AtMEK1 特異抗体の作製	27
第15節 AtMEK1 抗体の特異性の検討	27
第16節 植物組織より抽出した AtMEK1 の活性測定	27
第3章 結果	29
第1節 コマツナ cDNA からのプロテインキナーゼ遺伝子断片の単離	29
第2節 シロイヌナズナ MAPKK 相同遺伝子（AtMEK1）の全長クローニング	29
第3節 AtMEK1 発現タンパク質を用いた活性化機構の解析	31
第4節 植物細胞における AtMEK1 の活性化	33
第4章 考察	35
第1節 PCR 増幅プロテインキナーゼ断片について	35
第2節 AtMEK1 の活性化機構について	36

第3節	植物のMAPK に対するリン酸化と植物型 MAPKK の活性化について	37
第4節	ATMPK3 と ATMPK4 の活性化機構の相違点について	37
第5節	ストレス処理による AtMEK1 の活性化について	38
第6節	植物の MAPK カスケード研究の現状及び今後の指針	38
第7節	総合考察	40
図表		41
参考文献		63
掲載論文		69
謝辞		70

## 要旨

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードは全ての真核生物において高度に保存され、細胞の増殖やストレス応答において細胞外からの情報を細胞内に伝える細胞内情報伝達で重要な役割を果たしている。このカスケードは3種類のプロテインキナーゼ、MAPK、MAPK kinase (MAPKK)、MAPKK kinase (MAPKKK) により構成され、それぞれのプロテインキナーゼには多様な分子種が存在している。動物や酵母のMAPKは活性化ループに存在するTxY配列のトレオニン及びチロシン残基の両方をその上流キナーゼであるMAPKKによりリン酸化され活性化を受ける。またこのTxY配列は動物や酵母の全てのMAPK分子において保存されている。MAPKK自身もまたキナーゼサブドメインVII~VIIIに存在するSxxxS/T配列の2カ所のセリン残基及びセリン又はトレオニン残基を上流プロテインキナーゼであるMAPKKKによりリン酸化され活性化される。

植物におけるMAPKカスケードの研究は様々な植物ホルモンあるいは細胞外からの環境シグナルの伝達における役割について研究されてきた。また近年シロイヌナズナにおいてもMAPK、MAPKK、MAPKKKにそれぞれ相当する遺伝子が同定された。シロイヌナズナのMAPKであるATMPK4及びATMPK6は低温、接触、乾燥、傷害、高塩やエリシターなど様々なストレス刺激により活性化することが報告されている。またATMPK3及びATMPK6はエリシター処理や酸化ストレスにより活性化することが報告されている。さらにATMPK4欠失植物体ではサリチル酸レベルの上昇や防御遺伝子の恒常的な発現が報告された。植物のMAPKも動物や酵母のMAPKと同様に活性化ループのTxY配列が保存されており、これらのアミノ酸残基がリン酸化を受けることがATMPK4及びATMPK6について確認されている。

それに対し植物のMAPKKは動物や酵母のMAPKKにおいて保存されているSxxxS/T配列とは異なりS/TxxxxxS/T配列が保存されている。シロイヌナズナのMAPKKであるATMKK2はTxxxxxTという保存配列を有しているが、このスレオニン残基をリン酸化されないアミノ酸残基であるアラニン残基に置換した変異体はMAPKKが欠失した酵母を機能相補できないことが報告されている。おそらく植物のMAPKKの活性化にはこれらのセリン及びスレオニン残基のリン酸化が必要であると考えられる。またオーキシン処理したシロイヌナズナから抽出したタンパク質にはシロイヌナズナMAPKであるATMPK2をリン酸化する酵素活性が認められ、植物細胞内のMAPKKが刺激により活性化することが報告された。しかし植物のMAPKKの活性化機構及びその機能については不明な点が多い。

そこで本研究においてまずシロイヌナズナより同定したMAPKK (AtMEK1) の活性化機構について検討した。AtMEK1はその活性化に必要な保存配列においてT(218)xS(220)xxxS(224)という動物型及び植物型の両者に適合する配列を有していた。そこで、これらのトレオニン及びセリン残基の活性化における役割を大腸菌内でglutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質として発現させたAtMEK1を用いて解析した。これらの植物型及び動物型に相当するセリン及びスレオニン残基を2カ所

グルタミン酸残基に置換した変異体酵素 (T218E/S224E、S220E/S224E) は SDS 電気泳動において移動度が減少し、上方にバンドシフトした。さらにこれらの変異体酵素は不活性型 GST-ATMPK4 (GST-ATMPK4KN) に対し高いリン酸化酵素活性を示した。このことはリン酸化共通配列のそれぞれのセリン及びスレオニン残基のリン酸化が AtMEK1 の活性化に必要であることを示唆している。224 番目のセリン残基のみをグルタミン酸残基に置換した変異体酵素 (S224E) は高い酵素活性を示し、ATP とインキュベートすることによりバンドシフトした。また S224E 変異体にさらに218番目のスレオニン残基をリン酸化されないアラニン残基に置換した変異体酵素 (T218A/S224E) は活性が消失し、S224E に220番目のセリン残基をアラニン残基に置換した変異体 (S220A/S224E) の酵素活性が高かったことから、218番目のスレオニン残基は224番目のセリン残基とともに AtMEK1 活性化において必要であることが明らかとなった。224番目のセリン残基を上流酵素である MAPKKK によりリン酸化された AtMEK1 は218番目のスレオニン残基を自己リン酸化し活性化する能力を持つことが示唆された。また2カ所グルタミン酸残基に置換した変異体酵素 (T218E/S224E、S220E/S224E) について、T218E/S224E は ATMPK4 特異的に強いリン酸化酵素活性を示したが、S220E/S224E は ATMPK4 だけでなく ATMPK3 に対してもリン酸化酵素活性を示した。

また GST-ATMPK4KN は GST-AtMEK1 によりその活性化ループのスレオニン及びチロシン残基をリン酸化されたが、このリン酸化により ATMPK4 が活性化するかを myelin basic protein (MBP) を基質としてその酵素活性を測定することにより検討した。GST-ATMPK4KN を効率良くリン酸化した T218E/S224E 及び S220E/S224E と反応させることにより GST-ATMPK4 は高い MBP リン酸化酵素活性を示した。またその時の GST-ATMPK4 は抗活性化型 MAPK 抗体により認識されることから、GST-ATMPK4 は GST-AtMEK1 によりその活性化ループのリン酸化を受け、活性化することが明らかとなった。

植物細胞内に存在する MAPKK の活性はこれまで報告されておらず、本研究ではじめて AtMEK1 特異抗体 (anti-AtMEK1CT) を用いて細胞内に存在する MAPKK を同定し、その酵素活性を測定した。発芽後3~4週間のシロイヌナズナ植物体を用いて、各組織における AtMEK1 タンパク質発現の解析および活性の測定を行った。シロイヌナズナ各組織より抽出したタンパク質を anti-AtMEK1CT で免疫沈降し、イムノブロットした結果及び免疫沈降物を GST-ATMPK4KN を基質として活性測定した結果、AtMEK1 は根において特に発現が多く花や若い葉および芽生えにおいて発現が確認されたが、ロゼット葉や茎生葉においてはほとんど見られなかった。またその酵素活性はそのタンパク質量に比例して検出された。また一番活性の強かった根のサンプルを用いて基質特異性を検討した。その結果植物細胞中の AtMEK1 も大腸菌内で発現させた GST-AtMEK1 と同様に ATMPK3 より ATMPK4 を効率良くリン酸化した。次に様々なストレス処理による AtMEK1 の活性化を検討した。傷害、低温、乾燥及び高塩ストレス処理した芽生えよりタンパク質を抽出し、anti-AtMEK1CT を用いて免疫沈降し、その活性を GST-ATMPK4KN を基質に測定した。また免疫沈降物を anti-AtMEK1 でイムノブロッ

トした結果、タンパク質量の変化はすべての処理において観察されなかった。AtMEK1は傷害ストレスにより、急激な一過的活性化が処理後5分から30分の間に検出された。低温ストレスによっては刺激5分後から徐々に活性化しその活性は持続された。乾燥ストレスについては処理後30分にその活性のピークが観察され、塩ストレスを与えた場合緩やかな活性の上昇が60~120分にかけて検出された。またコントロールとして同様の時間水中に浸した芽生えからタンパク質を抽出し、その活性を測定した結果、AtMEK1のタンパク質量及び活性の変化は見られなかった。それぞれの刺激によってAtMEK1の活性化の時間や強さが異なったが、これはAtMEK1の活性化が複数の経路を通じて制御されていることを示唆している。つまり傷害や低温などその活性化が強く急激におこった刺激には直接活性化を受けるが、高塩のようにその活性化が遅く緩やかだった刺激はいったん別の伝達経路を経由してからAtMEK1に情報が伝達されている可能性がある。今後AtMEK1の上流因子について詳しく検証していく必要がある。

最近シロイヌナズナにおいて全ゲノム配列が決定され、またシロイヌナズナを中心に環境応答や環境ストレスに対する感受性や耐性が異なる突然変異体が多数分離されている。これらの情報をもとにそれぞれの遺伝子がどのようなストレス応答において機能するかが明らかとなっていくと予想される。しかしこれらの遺伝子は単独で機能するわけではなくそれぞれが複雑に関係し合い植物細胞内で機能すると考えられる。プロテインキナーゼについても今後どのようなストレス応答に関与しているかということだけでなく、植物細胞における局在や基質タンパク質の同定を行っていくことが重要である。このような研究により植物のストレス応答機構の全容が明らかにされ、またストレス耐性植物の作出につながることを強く期待する。

## 第1章 緒論

生物を取り巻く自然環境は絶えず変化している。動物はこれらの環境の変化を感知し環境ストレスのない場所に逃避することにより厳しい環境変化を避けることができる。しかし移動に自由がない植物はこれらの環境の変化から逃げることができず、したがって厳しい環境の変化に応答し適応しなければならない。つまり植物は外部の環境ストレスに対抗し、生理的レベルあるいは細胞レベルでも応答し、生存するための機能を進化の過程で獲得してきたと考えられる。

種々の外部環境の変化は細胞膜あるいは細胞内のレセプターやセンサーによって受け止められる。さらに細胞内に伝えられたシグナルにより、植物ホルモンなどの生理活性物質の生成が誘導され、2 次的な応答制御が行われる。このようにして伝えられたシグナルは特定の細胞あるいは特定の遺伝子に作用し、細胞あるいは組織を生理生化学的に変化させ、最終的に環境の変化やストレスに応答していると考えられる (Fig. 1)。このようなシグナル伝達においてタンパク質のリン酸化は重要な役割を演じていることが知られている。このタンパク質のリン酸化を触媒するのがプロテインキナーゼである。プロテインキナーゼがその基質タンパク質をリン酸化することにより、基質タンパク質の構造が変化しその機能が発揮されたり、抑制されたりする。またプロテインキナーゼ自身にもその活性をリン酸化により制御されているものが存在する。

植物において様々な環境ストレス応答に関与する報告がなされているプロテインキナーゼの代表的なものとして mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードを構成するプロテインキナーゼ、SNF1 関連プロテインキナーゼ及びカルシウム依存性プロテインキナーゼが挙げられる (Hardie, 1999)。

MAPK カスケードは酵母から動物及び植物に至る全ての真核生物において高度に保存され、細胞の増殖やストレス応答において細胞外からの情報を細胞内に伝える細胞内情報伝達で重要な役割を果たしている。このカスケードは 3 種類のプロテインキナーゼ、MAPK、MAPK kinase (MAPKK)、MAPKK kinase (MAPKKK) により構成され、それぞれのプロテインキナーゼには多様な分子種が存在している。動物や酵母の MAPK カスケードについては特に研究が進んでおり、その細胞内での役割について様々な知見が得られている (Nishida and Gotoh, 1993; Ahn, 1993; Marshall, 1995; Seger and Krebs, 1995; Waskiewicz and Cooper, 1995)。動物や酵母の MAPK は活性化ループに存在する TxY 配列のトレオニン及びチロシン残基の両方をその上流キナーゼである MAPKK によりリン酸化され活性化を受ける。またこの TxY 配列は動物や酵母の全ての MAPK 分子において保存されている。MAPKK 自身もまたキナーゼサブドメイン VII~VIII に存在する SxxxS/T 配列の2カ所のセリン残基及びセリン又はトレオニン残基を上流プロテインキナーゼである MAPKKK によりリン酸化され活性化される。またこれらの2カ所のセリン及びトレオニン残基を酸性アミノ酸に置換した変異体酵素は恒常的に活性化し (Cowley et al., 1994; Mousour et al., 1994)、この活性型酵素を用いて下流因子の解析が行われ、その結果 MAPKK 及び MAPK について特異的な組み合わせが解析され、それぞれの経路により多様な情報伝達が行われていることが明らかになりつつある。

植物における MAPK カスケードの研究は様々な植物ホルモンあるいは細胞外からの環境シグナルの伝達における役割について研究されてきた (Nishihama et al., 1995; Mizoguchi et al., 1997; Jonak et al., 1999)。また近年シロイヌナズナにおいても MAPK (Mizoguchi et al., 1993; Mizoguchi et al., 1994)、MAPKK (Jouannic et al., 1996; Morris et al., 1997; Ichimura et al., 1998a)、MAPKKK (Kieber et al., 1993; Mizoguchi et al., 1996; Nishihama et al., 1997) にそれぞれ相当する遺伝子が同定された。シロイヌナズナの MAPK である ATMPK4 及び ATMPK6 は低温、接触、乾燥、傷害、高塩やエリシターなど様々なストレス刺激により活性化することが報告されている (Ichimura et al., 2000; Desikan et al., 2001)。また ATMPK3 及び ATMPK6 はエリシター処理や酸化ストレスにより活性化することが報告されている (Nühse et al., 2000; Kovtun et al., 2000)。さらに ATMPK4 欠失植物体ではサリチル酸レベルの上昇や防御遺伝子の恒常的な発現が報告された (Petersen et al., 2000)。植物の MAPK も動物や酵母の MAPK と同様に活性化ループの TxY 配列が保存されており、これらのアミノ酸残基がリン酸化を受けることが ATMPK4 (Ichimura et al., 2000) 及び ATMPK6 (Nühse et al., 2000) について確認されている。

それに対し植物の MAPKK は動物や酵母の MAPKK において保存されている SxxxS/T 配列とは異なり S/TxxxxxS/T 配列が保存されている。シロイヌナズナの MAPKK である ATMKK2 は TxxxxxT という保存配列を有しているが、このトレオニン残基をリン酸化されないアミノ酸残基であるアラニン残基に置換した変異体は MAPKK が欠失した酵母を機能相補できないことが報告されている (Ichimura et al., 1998b)。おそらく植物の MAPKK の活性化にはこれらのセリン及びトレオニン残基のリン酸化が必要であると考えられる。またオーキシン処理したシロイヌナズナから抽出したタンパク質にはシロイヌナズナ MAPK である ATMPK2 をリン酸化する酵素活性が認められ、植物細胞内の MAPKK が刺激により活性化することが報告された (Mizoguchi et al., 1994)。しかし植物の MAPKK の活性化機構及びその機能については不明な点が多い。

そこで本研究においてまずシロイヌナズナより同定した MAPKK (AtMEK1) の活性化機構について検討した。AtMEK1 はその活性化に必要な保存配列において T(218)xS(220)xxxS(224) という動物型及び植物型の両者に適合する配列を有していた。そこで、これらのトレオニン及びセリン残基の活性化における役割を大腸菌内で glutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質として発現させた AtMEK1 を用いて解析した。また植物細胞内に存在する MAPKK の活性はこれまで報告されておらず、本研究ではじめて AtMEK1 特異抗体を用いて細胞内に存在する MAPKK を同定し、その酵素活性を測定した。さらにストレス処理による本酵素の活性化についても検討した。本博士論文では以上の研究成果を詳述する。第1章は緒論、第2章は材料と方法、第3章は結果及び第4章は考察について記載するものである。

## 第2章 材料と方法

### 第1節 植物材料（コマツナ）及びその生育方法

本実験で試料として使用したコマツナ (*Brassica campestris* L.) 種子及び培養液に使用した大塚ハウス1号、大塚ハウス2号は、それぞれタキイ種苗株式会社及び大塚化学株式会社より購入した。またその生育は以下の通りに行った。

コマツナ種子を十分湿らせたバーミキュライト上に播種し、暗所、25℃で発芽させた。発芽後、以下に示す培養液を用いて培養した。使用した培養液は、予め HCl で pH 5.8 に調製し、培養中はエアポンプによる通気を行った。

培養液：	130	ppm	窒素全量
	11.5	ppm	アンモニア態窒素
	116.5	ppm	硝酸態窒素
	110	ppm	P <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
	202.5	ppm	K <sub>2</sub> O
	115	ppm	CaO
	30	ppm	MgO
	0.75	ppm	MnO
	0.75	ppm	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	1.35	ppm	Fe
	0.015	ppm	Cu
	0.045	ppm	Zn
	0.015	ppm	Mo

核酸調製用試料として使用したコマツナは、14 時間明期 - 10 時間暗期、25℃で Nippon Medical&Chemical Instruments Co., Ltd. 製の System Biotron を使用して培養し、播種後 3 週間、暗期後 5 時間のものを使用した。

### 第2節 大腸菌株と培地

使用した大腸菌株とその遺伝子型は以下の通りである。尚、JM109 は宝酒造株式会社より購入した。XL I- Blue MRF' Strain、SOLR™ Strain は Stratagene 社より購入した。

JM109 : *recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ( lac-proAB ) /F' [traD36, proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15 ]*

XL I- Blue MRF' Strain : *Δ( mcrA )183, Δ( mcrCB-hsdSMR-mrr )173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F', proAB, lacI<sup>q</sup>, lacZ ΔM15: :Tn10 ( Tet<sup>r</sup> ) ]*

SOLR™ Strain : e14<sup>-</sup> ( *McrA*<sup>-</sup> ),  $\Delta$  ( *mcrCB-hsdSMR-mrr* )171, *sbcC*, *recB*, *recJ*, *uvrC*, *umuC*: : Tn5 ( *Kan<sup>r</sup>* )*lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endA1*,  $\lambda^R$  [ *F'*, *proAB*, *lacI<sup>q</sup>*, *lacZ*,  $\Delta$ M15 ]  
Su ( nonsuppressing )

使用した培地とその調製法を以下に示す。Bacto-tryptone、Bacto-yeast extract は Difco 社製のものをを用いた。

LB 培地 :   1%   Bacto-tryptone  
          0.5% Bacto-yeast extract  
          0.6% NaCl

必要に応じてアンピシリン (最終濃度 50  $\mu$ g /ml) を加えたもの (LB 培地 (Amp<sup>+</sup>) )、IPTG (最終濃度 48  $\mu$ g /ml) 及び X-gal (最終濃度 40  $\mu$ g / ml)、アンピシリンを加えたもの (LB 培地 (Amp<sup>+</sup>、IPTG<sup>+</sup>、X-gal<sup>+</sup>) ) も使用した。またカナマイシン (最終濃度 50  $\mu$ g /ml) を加えたもの (LB 培地 (Kan<sup>+</sup>) )、テトラサイクリン (最終濃度 12.5  $\mu$ g /ml) を加えたもの (LB 培地 (Tet<sup>+</sup>) ) も使用した。ただしアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリンはオートクレーブ滅菌後、室温に戻した後加えた。また、寒天培地にする場合には 1.5% agar を加えた。

### 第3節 RT-PCR 法を用いたプロテインキナーゼ遺伝子断片の同定

#### 第1項 コマツナ mRNA の調製

##### 1. 総 RNA の調製

コマツナの総 RNA の調製は、Pharmacia 社の RNA Extraction Kit を用い、Pharmacia 社のプロトコールに基づき、以下の方法で行った。また試料ホモジネート調製に用いたテフロン-ガラスホモジナイザーは Omega Electric 社製の SM-3 を使用した。

1) 第1節の条件で栽培した播種後 3 週間、暗期後 5 時間のコマツナの本葉 10 g を液体窒素で凍らせつつ、乾熱滅菌した乳鉢中で 18 ml の 5.5 M Guanidinium thiocyanate solution を加え、十分に白色粉末状にした。

Guanidinium thiocyanate solution (pH 7.0) :

5.5 M   Guanidinium thiocyanate  
25 mM   Sodium citrate  
0.2 M   2-Mercaptoethanol  
0.5%    Sodium lauryl sarcosine

2) 5000  $\times$  g、15 $^{\circ}$ Cで 20 分間遠心分離後、透明な溶解液をホモジナイザーに通し、Cesium trifluoro acetate (CsTFA) solution の上に重層した後、Beckman 社の SW-28 ローターを用いて 25,000 rpm、15 $^{\circ}$ Cで 24 時間遠心分離した。

3) 滅菌した TE buffer 250  $\mu$ l を加え、ピペッティングを繰り返してチューブの底の RNA ペレットを溶かした。

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

4) RNA 液をボルテックス混和で完全に溶解した後、65℃ で 10 分間加熱し、再びボルテックス混和した。

5) 1/10 量の 3 M Sodium acetate (pH 5.5) を加えた後、2.5 倍量の Ethanol を加え、-80℃ で保存した (Ethanol 沈殿)。

この時点で 1.1 mg の総 RNA が回収された。

## 2. mRNA の精製

コマツナの mRNA の精製は、Pharmacia 社の mRNA Purification Kit を用い、Pharmacia 社のプロトコールに基づき、以下の方法で行った。

1) Oligo (dT) - cellulose を懸濁させたスパンカラムに High-salt buffer 1 ml を加えゲルを洗浄し、更に 1 ml 加えて洗浄を繰り返した。

High-salt buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)  
1 mM EDTA  
0.5 M NaCl

2) 第3節第1項1.で調製した総 RNA を TE buffer 1 ml に溶解し 65℃ で 5 分間加熱した後、試料を氷上に置き、0.2 ml の Sample buffer を加え、静かに混合した。

Sample buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)  
1 mM EDTA  
3 M NaCl

3) 試料をカラム中の Oligo (dT) - cellulose に添加した。

4) 0.25 ml の High-salt buffer をカラムに通し、2 分間かけて洗浄し、再び 0.25 ml 加えこのステップを繰り返した。

5) 同様に、0.25 ml の Low - salt buffer を加えてカラムを 3 回洗浄した。

Low-salt buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)  
1 mM EDTA  
0.1 M NaCl

6) 結合している mRNA を溶出するため、あらかじめ 65℃ に温めた Elution buffer 0.25 ml でカラムを 2 分間かけて洗浄し、溶出液を微量遠心チューブに集め、これを 4 回繰り返した。

Elution buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)  
1 mM EDTA

- 7) 再度カラムクロマトグラフィーを行い精製度を高めた。
- 8) この mRNA 溶液に1/10 量の 3 M Sodium acetate (pH 5.5)、2.5 倍量の Ethanol を加え -80 °C で保存した。なお、1.1 mg の総 RNA から 100 µg の mRNA が回収された。

## 第2項 PCR プライマーの設計

核酸配列データベース及びタンパク質データベースによる相同性検索をもとに、既知のセリン/トレオニンプロテインキナーゼ遺伝子のアミノ酸配列のアライメントを作成し、セリン/トレオニンプロテインキナーゼ遺伝子の保存領域を確認した。

PCR プライマーの調製は宝酒造社に依頼し購入した。尚、16I、17I、18I にはイノシン (I) を挿入した。

### フォワードプライマー

- 11' : 5'-(GA)GT(TCAG)(TC)T(TCAG)GG(TCAG)AA(AG)GG-3'
- 15 : 5'-(AG)(TC)(TCAG)(TC)T(TCAG)AA(AG)AA(AG)GA-3'
- 15I : 5'-(AG)(TC)I(TC)TIAA(AG)AA(AG)GA-3'
- 16 : 5'-(AG)A(TC)GA(TCAG)GA(TCAG)(AG)T(TCAG)GA-3'
- 16I : 5'-(AG)A(TC)GAIGAI(AG)TIGA-3'
- 17 : 5'-T(TA)(TC)TT(TC)G(TC)(TCAG)ATGGA(TCAG)T-3'
- 18 : 5'-GG(TCAG)GG(TCAG)GA(TC)(TC)T(TCAG)ATG-3'
- 18I : 5'-GGIGGIGA(TC)(TC)TIATG-3'
- 19 : 5'-TT(TC)TA(TC)GC(TCAG)GC(TCAG)GA(AG)(AG)T-3'
- 31' : 5'-T(TG)(TCG)TG(TC)(TG)(CAG)(TC)CA(TC)TG(TC)GG-3'
- U1 : 5'-GG(TCAG)AA(AG)GG(TCAG)AA(TC)TT(TC)GG(TCAG)AA-3'
- U2 : 5'-AT(TCA)AA(AG)GT(TCAG)(TC)T(TCAG)AA(AG)AA(AG)GA-3'

### リバースプライマー

- 21' : 5'-A(TAG)(TCAG)G(TCA)CCACCA(AG)TC(TCAG)AC-3'
- 23' : 5'-A(TC)(AG)TT(AG)TC(TCAG)A(AG)(TC)TT(TCAG)A-3'
- 26 : 5'-GG(TCAG)GT(TCAG)CC(AG)CA(AG)AA(TCAG)GT-3'
- 27 : 5'-AT(TC)TC(TCAG)GG(TCAG)GC(TCAG)AT(AG)(TA)A-3'
- 28 : 5'-TC(TCAG)TC(TC)TC(AG)T(TC)(TCAG)TC(TCAG)(CG)C-3'
- D1 : 5'-GCCAT(AG)AA(TC)TC(TCAG)GG(TCAG)GT(TCAG)CC(AG)CA-3'
- D2 : 5'-AC(TCAG)CC(AG)AA(TCAG)GCCCACCA(AG)TC(TCAG)AC-3'

## 第3項 RT-PCR

### 1. 1 st Strand cDNA の合成

1 st Strand cDNA の合成は、Perkin Elmer 社の GeneAmp RNA PCR Kit を使用した。

- 1) Ethanal 沈殿で得られた mRNA の沈殿を 0.5 µg/µl になるように H<sub>2</sub>O に溶解した。
- 2) 以下の反応液を準備した。

5 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Tris-HCl ( pH 8.3 )  
50 mM KCl  
10 mM dATP  
10 mM dCTP  
10 mM dGTP  
10 mM dTTP  
20 units RNase inhibitor  
50 units Reverse Transcriptase  
2.5 μM リバースプライマー  
1 μM Oligo d (T)<sub>16</sub>  
0.5 μM Random Hexamers  
1 μg mRNA

反応系は 20 μl とした。

3) 以下の温度条件で合成した。

Step 1 42 °C 120 分  
Step 2 99 °C 5 分  
Step 3 4 °C 5 分 以上

4) 合成終了後 cDNA を含む反応液は次の PCR にそのまま利用した。

## 2. PCR の条件

1) 以下に標準的な反応液の組成を示す。

8 mM Tris-HCl (pH 8.3)  
40 mM KCl  
1.7 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.0008% Gelatin  
100 μM dATP  
100 μM dCTP  
100 μM dGTP  
100 μM dTTP  
2 μM フォワードプライマー  
2 μM リバースプライマー

上記の反応液に鋳型として第3節第3項1.で合成したコマツナ cDNA を含む反応液 20 μl を加え、全体で 99.5 μl とし、ミネラルオイルを 100 μl 重層した。

2) 以下に温度条件を示す。尚、反応は、TaKaRa Taq DNA ポリメラーゼを Step1 の 94℃ 直前の 85℃ で 2.5 units (0.5 µl) 添加するホットスタート法を用いて開始した。

Step 1	94℃	5 分
Step 2	94℃ (Denature)	1 分 30 秒
Step 3	46℃ (Annealing)	1 分 30 秒
Step 4	72℃ (Extension)	2 分
Step 5	94℃ (Denature)	1 分 30 秒
Step 6	53℃ (Annealing)	1 分 30 秒
Step 7	72℃ (Extension)	2 分
Step 8	72℃	10 分
Step 9	4℃	5 分 以上

Step 2 から Step 4 を 5 サイクル、Step 5 から Step 7 を 30 サイクルおこなった。

#### 第4項 アガロースゲル電気泳動

制限酵素断片および PCR 産物の解析、回収のためにアガロースゲル電気泳動を行った。泳動に用いたアガロース濃度は、分離する DNA 断片の大きさに応じて調節した (1 ~ 2%)。

1) 必要量のアガロースを 1 × TAE に加え、電子レンジで加熱し溶解させゲル作製器に流し込み固化させた。

1 × TAE : 40 mM Tris-acetate (pH 7.8)  
1 mM EDTA (pH 8.0)

2) 分離する DNA 試料にあらかじめ 1/5 倍量の 6 × Dye 溶液を加えてから、泳動を行った。

6 × Dye 溶液 : 0.25% Bromophenol blue  
0.25% Xylencyanol  
40% Sucrose

3) 泳動終了後、ゲルを 2 µg/ml の Ethidium Bromide 溶液に 20 分間浸し、紫外光下で DNA の泳動パターンを確認した。

#### 第5項 アガロースゲルからの DNA 断片の回収

紫外光下で必要な部分を切り出した後、宝酒造社の SUPREC™-01 を用いたフィルター濾過法により DNA 断片を回収した。回収操作は添付の説明書に基づいて行った。

- 1) 目的の DNA 断片を含むゲルを切り出し SUPREC™-01 に入れ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で 30 分間凍結させた後、解凍し遠心分離した。
- 2) TE buffer を 200  $\mu\text{l}$  加え遠心分離し、フィルターを取り外した後、Butanol 濃縮した。
- 3) Ethanal 沈殿を行った後、TE buffer 20  $\mu\text{l}$  に溶解した。

#### 第6項 PCR 増幅 DNA 断片の平滑末端化

回収された PCR 増幅 DNA 断片の突出末端の平滑化及びリン酸化にはそれぞれ宝酒造より購入した T4 DNA Polymerase、T4 polynucleotide kinase を用いた。以下にその操作方法を示す。

- 1) マイクロ遠心チューブに突出末端インサートDNA (0.1 pmol 以上) と 1  $\mu\text{l}$  の T4 DNA polymerase buffer 及び0.1% BSAを混合し  $\text{H}_2\text{O}$  で 9  $\mu\text{l}$  にメスアップした。
- 2) DNA の末端のアニーリングを防ぐため、 $70^{\circ}\text{C}$  で 5 分間保温した後、 $37^{\circ}\text{C}$  の恒温槽に移した。
- 3) T4 DNA Polymerase を 1  $\mu\text{l}$  加え、ピペッティングにより穏やかに混和し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 5 分間保温した。
- 4) TE buffer 100  $\mu\text{l}$  加えた後、ボルテックスで激しく攪拌し、氷水中に置いた。
- 5) TE buffer で飽和させた Phenol と Chloroform の 1 : 1 混合液で抽出を行った (Phenol/Chloroform 抽出) 後、Chloroform 抽出、Ethanal 沈殿を行った後、TE buffer 20  $\mu\text{l}$  に溶解した。
- 6) T4 Polynucleotide kinase (10 units/ $\mu\text{l}$ ) を 2  $\mu\text{l}$ 、100 mM ATP を 1  $\mu\text{l}$ 、T4 Polynucleotide kinase buffer を 10  $\mu\text{l}$  加え、 $\text{H}_2\text{O}$  で 100  $\mu\text{l}$  にし  $37^{\circ}\text{C}$  で 2 時間保温した。

T4 Polynucleotide kinase buffer	: 500 mM	Tris-HCl (pH 7.6)
	100 mM	$\text{MgCl}_2$
	50 mM	DTT
	1 mM	EDTA

- 7) Phenol/Chloroform 抽出を 2 回、Ethanal 沈殿を行った後、TE buffer 20  $\mu\text{l}$  に溶解しベクターとの連結 (ライゲーション) 反応に用いた。

#### 第7項 プラスミドベクターの調製

- 1) プラスミドベクター (pUC 18) 10  $\mu\text{g}$  に *Sma* I 1  $\mu\text{l}$ 、 $10 \times$  T buffer 10  $\mu\text{l}$ 、0.1% BSA 10  $\mu\text{l}$  を加え、 $\text{H}_2\text{O}$  で 100  $\mu\text{l}$  にし、 $30^{\circ}\text{C}$  で 3 時間反応後、Ethanal 沈殿を行い、TE buffer 100  $\mu\text{l}$  に溶解した。

10 × T buffer : 330 mM Tris-acetate (pH 7.9)  
100 mM Magnesium acetate  
5 mM DTT  
660 mM Potassium acetate

2) ライゲーションにおけるベクターの再結合（セルフライゲーション）を抑えるため、子牛腸由来のアルカリフォスファターゼ（CIAP）1.5  $\mu$ l、10 × CIAP buffer 30  $\mu$ l を加えた後、H<sub>2</sub>O で 300  $\mu$ l にし、37℃で 30 分間、次いで 56℃で 15 分間反応させ、脱リン酸化した。

10 × CIAP buffer : 500 mM Tris-HCl (pH 9.0)  
10 mM MgCl<sub>2</sub>

3) Phenol/Chloroform 抽出を 2 回、Ethanol 沈殿を行った後、TE buffer 100  $\mu$ l に溶解し、脱リン酸化ベクターとして以下の操作に用いた。

#### 第8項 ライゲーション

ライゲーション反応には、宝酒造社の DNA Ligation Kit Ver. 2 を用いた。第3節第6項で調製した PCR 増幅 DNA 断片 3  $\mu$ l と第3節第7項で調製した脱リン酸化ベクター 1.5  $\mu$ l、及び Solution I 4.5  $\mu$ l を混合し、16℃で一晩保温した。

#### 第9項 コンピテントセルの調製

- 1) 大腸菌 (JM109) を 5 ml の LB 培地に植菌し、37℃で一晩振盪培養した。
- 2) 培養液 3 ml を 300 ml の LB 培地に移し、O.D.650 が 0.6 になるまで 37℃で振盪培養した。
- 3) 培養液を 30 分間氷水中に置いた後、4℃で遠心集菌した。
- 4) 沈殿を 25 ml の氷冷した 50 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液に懸濁し、60 分間氷水中に静置した。
- 5) 4℃で遠心集菌後、沈殿を 5 ml の氷冷した 50 mM CaCl<sub>2</sub> /20% Glycerol に懸濁した。
- 6) 160  $\mu$ l ずつ分注し、直ちに -80℃冷凍庫で保存した。

#### 第10項 トランスフォーメーション

1) 第3節第8項で調製したライゲーション溶液 20  $\mu$ l に第3節第9項で調製したコンピテントセル（凍結保存した場合は氷上で融解させたもの）160  $\mu$ l、10 × TCM buffer 20  $\mu$ l を混和し、氷中に 20 分間静置する。

10 × TCM buffer : 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)  
100 mM CaCl<sub>2</sub>  
100 mM MgCl<sub>2</sub>

- 2) 42°Cで 90 秒間熱ショックをかけた後氷上で10 分間静置した。
- 3) LB プレート培地 (Amp<sup>+</sup>, IPTG<sup>+</sup>, X-gal<sup>+</sup>) 上に培養液を広げ 37°Cで一晩培養後、ホワイトコロニーを選択した。

#### 第11項 プラスミド DNA の小規模迅速調製

- 1) 大腸菌単一コロニーを 3 ml の LB 培地 (Amp<sup>+</sup>) に植菌し、37°Cで一晩振盪培養した。
- 2) 培養液を 12,000 rpm、4°C、2 分間遠心分離し、集菌した。
- 3) 沈殿を100 µl の Solution I に懸濁した。

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

- 4) 200 µl の Solution II を加え穏やかに攪拌し 5 分間氷上に静置した。

Solution II :    0.2 N NaOH  
                   1 %    SDS

- 5) 150 µl の Solution III を加えて攪拌し 5 分間氷上に静置した。

Solution III :    5 M Potassium acetate        60 ml  
                   Acetic acid                        11.5 ml  
                   H<sub>2</sub>O    to 100 ml

- 6) 15,000 rpm、4°C、10 分間遠心分離した。
- 7) 上清をPhenol/Chloroform 抽出し、水層を回収した。
- 8) 2 倍量の氷冷 Ethanal を加えて、Ethanal 沈殿を行った。
- 9) 沈殿を 20 µg/ml の RNase を含む H<sub>2</sub>O 100 µl に溶解した。
- 10) RNase 処理した DNA 溶液 100 µl に 20% PEG /2.5 M NaCl 120 µl を加え、氷上に 1 時間放置した。
- 11) 15,000 rpm、4°Cで 15 分間遠心分離し、沈殿を 70% Ethanal で 2 回洗浄した。
- 12) 沈殿を最後に H<sub>2</sub>O 30 µl に溶解した。

#### 第12項 インサート DNA の確認

ベクターに組み込まれた PCR 断片が実際に目的の大きさとして挿入されているか Sma I 部位の両側の部位を認識する制限酵素で二重切断し確認した。

- 1) 調製されたプラスミド DNA 溶液 2 µl に、EcoR I 及び Pst I をそれぞれ 1 µl ずつ加え、10 × H buffer を 2 µl 加えた後、H<sub>2</sub>O で 20 µl にした。

10 × H buffer : 500 mM Tris-HCl (pH 7.5)  
 100 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM DTT  
 1000 mM NaCl

2) 37°C で 3 時間反応後、アガロースゲル電気泳動に供した。

### 第13項 塩基配列の決定

塩基配列の決定は ABI 社の DNA Sequencer 373A を利用して Dye terminator 法により決定した。決定は DNA Sequencer 373A の説明書に基づいて行った。

1) 鋳型の DNA 0.9 μg とプライマー 3.2 pmol を混合し、H<sub>2</sub>O により10μl にした。プライマーには M13 のユニバーサルプライマーである宝酒造社の M4 プライマーまたは、RV プライマーを利用した。

2) DNA 混合液に ABI 社の DNA Sequence Reaction stock solution (Dye terminator) 10 μl を加えた。

Reaction stock solution :	Dye Deoxy <sup>TM</sup> A Terminator	1 μl
	Dye Deoxy <sup>TM</sup> T Terminator	1 μl
	Dye Deoxy <sup>TM</sup> G Terminator	1 μl
	Dye Deoxy <sup>TM</sup> C Terminator	1 μl
5 × Terminator Ammonium Cycle Sequencing Buffer		4 μl
	dNTP mix	1 μl
	<i>Ampli</i> Taq (8 U / μl)	0.5 μl

5 × Terminator Ammonium Cycle Sequencing Buffer :

400 mM	Tris-HCl (pH 9.0)
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
100 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

3) 以下の条件で PCR を行った。

Step 1	96°C	30 秒
Step 2	50°C	15 秒
Step 3	60°C	4 分

これを 25 サイクル行った。

4) PCR 反応液に H<sub>2</sub>O 80 μl を加え、Ethanal 沈殿を行った。

5) 得られた沈殿を 4 μl または 6 μl のFormamide/EDTA (5:1) 溶液に懸濁し、90°C で 2 分間加熱した後、氷上にて急冷した。

6) これを Long Ranger Gel 電気泳動にかけて塩基配列を決定した。尚、Running buffer には 1 × TBE を用いた。

Long Ranger Gel :	Long Ranger	8.4 ml
	Urea	40 g
	10 × TBE	8 ml
	10% APS	300 μl
	TEMED	30 μl
	H <sub>2</sub> O	to 80 ml

10 × TBE :	Tris Base	108 g
	Boric Acid	27.5 g
	EDTA	7.4 g
	H <sub>2</sub> O	to 1 l

第4節 プラークハイブリダイゼーション法を用いたシロイヌナズナ cDNA ライブラリーからのスクリーニング

#### 第1項 プローブの作製

第3節で得られたプロテインキナーゼ相同遺伝子断片 (PK-3) を pUC 18 に挿入したものを *EcoRI* と *Pst I* で二重切断し、増幅断片を切り出した後、[α-<sup>32</sup>P] dCTP で標識したものをプローブとして利用した。DNA 断片の標識は、宝酒造社の DNA Labeling Kit Ver.2 を用いて行った (ランダムプライミング法)。以下にその方法を示す。

- 1) 鋳型 DNA 25 ng に Random Primer 2 μl を加え、H<sub>2</sub>O で 5 μl にメスアップし、95 °C で 3 分間加熱後、水中で急冷し 5 分間放置した。
- 2) 10×Buffer、dNTP Mixture を各 2.5 μl、[α-<sup>32</sup>P] dCTP を 5 μl 加えて、H<sub>2</sub>O で 24 μl にした。
- 3) Klenow Fragment 1μl を加え、37°C で 10 分間保温した後、65°C で 5 分間保温した。
- 4) 反応液を Pharmacia 社の NICK<sup>TM</sup> カラムにアプライし、プローブの精製を行った。

#### 第2項 プラークハイブリダイゼーション

スクリーニングに使用したシロイヌナズナ cDNA ライブラリーは Stratagene 社より購入した。以下にその方法を示す。

- 1) 5 × 10<sup>4</sup> pfu のファージと宿主大腸菌 (XL I - Blue MRF', O.D.<sub>600</sub> = 0.5) を混合し、37°C で 30 分間保温した。
- 2) 1) に 50°C の LB soft agar (0.7% agar) を 4 ml 加えて直ちに 90 mm プレート (LB プレート) 上へまき、全体に広げた。
- 3) アガロースが固まってから、37 °C で一晩培養した。
- 4) soft agar がはがれるのを防ぐため、プレートを 4°C に 1 時間以上放置して冷やした後、プレートの上にニトロセルロース膜を静かにのせた。

- 5) 5 分間放置し、針で膜から agar を突き刺して印をつけ、プレートには穴の位置にインクで印をつけた。ニトロセルロース膜を静かにはがし、ファージのついた面を上にして 5 分程度乾燥させた。同様にして 1 枚のプレートから 2 枚の膜を作製した。
- 6) ファージのついたニトロセルロース膜を変性溶液に 5 分間つけた。このアルカリ処理によりファージ DNA が変性して膜に結合するようになる。

変性溶液：0.2 M NaOH  
1.5 M NaCl

- 7) 中和液に 5 分間つけた後、ニトロセルロース膜を乾燥させ、80℃ で 2 時間加熱し、DNA を膜に固定した。

中和液： 0.4 M Tris-HCl ( pH 7.6 )  
1.5 M NaCl

- 8) DNA を転写したニトロセルロース膜を以下に示すプレハイブリダイゼーション溶液中で、42℃ で 2 時間保温した (プレハイブリダイゼーション)。

プレハイブリダイゼーション溶液：  
50% Formamide  
100 µg/ml Salmon Sperm DNA  
0.1% SDS  
5 ×SSPE (pH 7.4)  
5 ×Denhardt's 液

ただし Salmon Sperm DNA は 10 mg/ml の保存溶液から必要量を取り、2倍量の Salmon Sperm DNA を含まないプレハイブリダイゼーション溶液で希釈した後、100℃ で 5 分間加熱し、氷上で急冷してから加えた。

20 × SSPE (pH 7.4) :  
3 M NaCl  
173 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O  
25 mM EDTA

50 × Denhardt's 液 :  
1% Bovine serum albumin  
1% Polyvinylpyrrolidone  
1% Ficoll

9) 第4節第1項で調製したプローブを 95℃ で 3 分間加熱し、氷上で急冷して変性させた。

10) ニトロセルロース膜と共に保温してあったプレハイブリダイゼーション溶液を捨て、ハイブリダイゼーション溶液に入れ替え、変性プローブを加えた後、12 時間以上 42℃ で保温した (ハイブリダイゼーション)。

11) ハイブリダイゼーション溶液を捨て、ニトロセルロース膜を最初 2 × SSC (0.1% SDS) 中で室温、30 分間振盪し、続いて 1 × SSC (0.05% SDS) 中で 55℃、30 分間、0.5 × SSC (0.025% SDS) 中で 60℃、30 分間振盪し、最後に 0.25 × SSC (0.01% SDS) 中で 65℃、30 分間振盪し洗浄した。

20 × SSC (pH 7.0) :

333 mM NaCl

333 mM Sodium citrate

12) ニトロセルロース膜を濾紙の上で風乾後、オートラジオグラフィー用カセットに入れ暗室で X 線フィルムと重ね、-80℃ で 3 日間オートラジオグラフィーを行いシグナルを検出した。

13) シグナルが得られれば、プレートの対応部分をパスツールピペットを用いて培地ごと回収し、SM Buffer 1 ml に懸濁しクロロホルム一滴を加え、4℃ で 2 時間以上転倒混和した。

14) 再度感染させプレートにまき、DNA をニトロセルロース膜にプロットさせハイブリダイゼーションを行い、最終的に単一プラークを回収した。

### 第3項 pBluescript ファージミドの切り出しと形質転換

宿主大腸菌 (XLI · Blue MRF') にファージ溶液と ExAssist™ Helper Phage を感染させることによって、Uni-ZAP XR Vector からインサートDNA を含む pBluescript ファージミドを切り出し、SOLR Strain へ形質転換する。

1) 微量遠心チューブに 200 μl の XLI · Blue MRF' (O.D.<sub>600</sub>=1.0)、250 μl のファージ溶液 (> 1 × 10<sup>5</sup> phage particles)、1 μl の ExAssist™ Helper Phage (> 1 × 10<sup>6</sup> pfu/μl) を加え混和し、37℃ で 15 分間保温した。

2) 3 ml の LB 培地を加え、37℃ で 3 時間振盪培養した後、70℃ 20 分間熱処理し、1,000 × g で 15 分間遠心した。上清を別の滅菌チューブに移した。

3) 2 本の微量遠心チューブに SOLR (O.D.<sub>600</sub>=1.0) を 200 μl ずつ分注し、2) で得られたファージ上清を 1 本のチューブには 100 μl、もう 1 本のチューブには 10 μl 加えた。

4) 37℃ で 15 分間保温し、それぞれのチューブから 200 μl を LB (Amp<sup>+</sup>) プレートにまき、37℃ で一晩培養してコロニーを形成させた。

#### 第4項 塩基配列の決定

種々のインサート cDNA は pBluescript ファージミドの *EcoRI/XhoI* 部位に挿入されているので、第4項3.で得られたシングルコロニーをLB (Amp<sup>+</sup>) 培地に植菌し 第3節第11項と同様の方法で調製した pBluescript ファージミドを、*EcoRI/XhoI* で消化した後インサート cDNA の長さを確認し、第3項13.と同様に塩基配列の決定を行い、MAPKK 相同遺伝子 (AtMEK1) 全長を得た。

#### 第5節 発現ベクターの構築

##### 第1項 wild type GST-AtMEK1 発現ベクター

第4節第4項で得られた AtMEK1 遺伝子全長を鋳型として以下に示すプライマーを用いて PCR を行い、終止コドンを含む ORF 領域を Pharmacia 社より購入した glutathione S-transferase (GST) 融合発現用ベクター (pGEX4T3) に導入した。以下その方法を示す。

プライマー：

MGSTUP: 5' - GAAAGTCGACATGAACAGAGGAAGCTTATG - 3'

MGSTDOWN: 5' - GTTTGCGGCCCGCCTAGTTAGCAAGTGGGGGAA - 3'

プライマーにはそれぞれ *Sal I* 及び *Not I* 認識配列を導入し PCR 後制限酵素処理を行い電気泳動をし、ゲルから切り出した後、同様の制限酵素処理を行い第3節第7項と同様に脱リン酸化処理を行った pGEX4T3 とライゲーションし、大腸菌 JM109 株にトランスフォーメーションした。得られたコロニーからプラスミドを調製し、シークエンスにより AtMEK1 遺伝子の導入を確認した。

##### 第2項 Site-directed mutagenesis による mutant type GST-AtMEK1 発現ベクターの構築

第1項で得られた発現ベクターを鋳型に Stratagene 社より購入した Exsite<sup>TM</sup> PCR-Based Site-Directed Mutagenesis kit を用い、キットに添付されたプロトコールに基づいて行った。以下にその方法を示す。

プライマー：

anti-sense primer

AtMEK1 (225-232) 5' - TTCGTGGGCACATACCCTTATATG - 3'

sense primers

T218E 5' - AGAATTAGCAAGACTACTTTCGCTTGTCAA - 3'

T218E/S224E 5' - CTCATTAGCAAGACTACTTTCGCTTGTCAA - 3'

S220E 5' - AGAATTAGCAAGCTCACTTGTGCTTGTCAA - 3'

S220E/S224E 5' - CTCATTAGCAAGCTCACTTGTGCTTGTCAA - 3'

S224E 5' - CTCATTAGCAAGACTACTTGTGCTTGTCAA - 3'

T218A/S224E 5' - CTCATTAGCAAGACTACTTGTGCTTGTCAA - 3'

S220A/S224E 5' - CTCATTAGCAAGAGCACTTGTGCTTGTCAA - 3'

1) 以下の反応液を調製する。

反応液

template DNA	0.5 pmol
10×Reaction Buffer	2.5 μl
25 mM dNTP's mixture	1 μl
10 pmol/μl anti-sense primer	1.5 μl
10 pmol/μl each sense primer	1.5 μl

H<sub>2</sub>O で24 μlにする。

2) 反応液に1μlの Exsite™ DNA polymerase blend を加え、ミネラルオイルを重層し、以下に示す条件で反応させた。

Step 1     94°C 4 min  
Step 2     48°C 2 min  
Step 3     72°C 6 min

Step 4     94°C 1 min  
Step 5     50°C 2 min  
Step 6     72°C 6 min

Step 7     72°C 5 min  
Step 8     4°C

Step 4-6 を10サイクル行った。

3) 反応液に1 μlの Dpn I 及び0.5 μlの cloned-Pfu DNA polymerase を加え、37°Cで 2 時間、72°Cで 30分 反応させ、鋳型DNA の消化及び PCR 断片の平滑末端化を行った。

4) 反応液をEthanol 沈殿し、5 μl の H<sub>2</sub>O に溶解し等量の Ligation Solution I を加え、16°Cで1時間以上反応させた後、大腸菌 JM109 株にトランスフォーメーションした。得られたコロニーからプラスミドを調製し、シーケンスにより変異の導入を確認した。

第3項 シロイヌナズナ MAPK、ATMPK3 及び ATMPK4 のクローニング及び発現ベクターの構築

発現させたAtMEK1 タンパク質の活性測定用の基質としてシロイヌナズナのMAPK である ATMPK3 及び ATMPK4 (Mizoguchi et al., 1993) をクローニングし GST 融合タンパク質として発現させるため第4節第1項と同様に発現ベクターに導入した。またそれぞれの ATP 結合領域のリジン残基をアルギニン残基に置換した不活性型変異体を第2項と同様の方法で構築した。以下にクローニング及び変異体作製のために使用したプライマーを示す。

ATMPK3 クローニング用プライマー

ATMPK3UP:            5' - GAAAGAATTCATGAACACCGCGGTGGC - 3'

ATMPK3DOWN: 5' - GTTTCTCGAGCTAACCGTATGTTGGATT - 3'

ATMPK3 kinase negative mutant 作製用プライマー

anti-sense primer

ATMPK3 (69-76) 5' - ATAGCTAATGCTTTTGATAATCAT - 3'

sense primer

ATMPK3 (K67R) 5' - CTCCTCATCGCTACTAGCTCGTTCGTCTC - 3'

ATMPK4 クローニング用プライマー

ATMPK4UP: 5' - GAAAGAAATTCATGTCGGCGGAGAGTTGT - 3'

ATMPK4DOWN: 5' - GTTTCTCGAGTCACACTGATCTTGAGG - 3'

ATMPK4 kinase negative mutant 作製用プライマー

anti-sense primer

ATMPK4 (74-81) 5' - ATTGGTAATGCTTTTGACAATAAT - 3'

sense primer

ATMPK4 (K72R) 5' - CTCCTGATAGCTACCTCCTCTCCAGTCTC - 3'

ATMPK3 及び ATMPK4 のクローニングはシロイヌナズナ cDNA ライブラリーを鋳型に PCR を行いそれぞれの増幅断片を制限酵素処理を行い、Pharmacia 社より購入した発現用ベクター (pGEX4T1) に導入しシーケンスにより確認した。

## 第6節 大腸菌での発現及び精製

### 第1項 大腸菌での発現

- 1) 発現ベクターを含む大腸菌を3 mlのLB培地 (Amp<sup>+</sup>) で一晩培養した (前培養)。
- 2) 300 mlのLB培地 (Amp<sup>+</sup>) に前培養液を3 mlずつ加え37℃で約2時間振盪培養し、O.D<sub>600</sub> = 0.3 になったところで氷中に5分間置き培地を完全に冷やした。
- 3) 最終濃度 0.1 mMになるように IPTG を加え、22℃で約20時間培養した。
- 4) Beckman社製のJLA-10.500 rotorを用い、6,000 rpm、4℃で10分間遠心分離し集菌した。
- 5) 上清を除き、菌体を氷冷したphosphate-buffered saline (PBS) で懸濁し、50 mlのコロニングチューブにまとめ、3,500 rpm、4℃で10分間遠心分離した。

PBS :

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2.9g
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2g
H <sub>2</sub> O	to 1 l

- 6) 上清を除き、菌体を-80℃で一晩置いた。

## 第2項 GST融合タンパク質の精製

発現タンパク質は Glutathione とのアフィニティーを利用して精製した。以下にその方法を示す。

- 1) 菌体に氷冷したPBSを 5 ml加え、さらに 10 mg/mlのphenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) を最終濃度 1 mM になるように加えた。
- 2) 氷水中でチューブを日やしながら、超音波処理を30 秒間、4 回繰り返し行い、細胞表層膜を破砕した。
- 3) 20% Triton X-100 を最終濃度 0.5% になるように加え、微量遠心チューブに分注し、15,000rpm、4℃ で 10 分間遠心分離した。
- 4) 上清を15 mlのコーティングチューブにまとめた。
- 5) 上清にあらかじめPBSで平衡化した50  $\mu$ l の Glutathione Sepharose 4B (50% スラリー) を加え、4℃ で 1 時間以上ロータリーシェーカーを用いて攪拌した。
- 6) 1,500 rpm、4℃ で数秒間遠心分離し上清を除いた。
- 7) 回収したレジンに0.5% Triton X-100 を含むPBS (T-PBS) で懸濁し、微量遠心チューブに移した。
- 8) 5,000rpm、4℃で 10 秒間遠心分離し上清を除いた。
- 9) レジンにT-PBSで 3 回洗浄し、さらに PBS で 2 回洗浄した。
- 10) 0.5 mlのelution bufferで溶出した。

elution buffer :

50mM Tris-HCl (pH9.5)

16mM glutathione (reduced form)

## 第7節 タンパク質の濃度の決定

タンパク質の濃度はBradfordの方法に基づく Bio-Rad 社の Protein Assay を用いて行った。以下にその方法を示す。

H<sub>2</sub>O で4倍に希釈した Dye Reagent Concentrate を試料 20  $\mu$ l に対して1.0 ml 加えてよく混合し、室温で 5 分以上反応させ、595nm の吸光度を測定した。BSA を基準とした検量線により、濃度を決定した。

## 第8節 SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、80 × 1 × 90mm のゲルを用いてLaemmliの方法に従って行った (Laemmli, 1970)。以下に、3 枚分の10% のゲル、3 ×SDS sample buffer、running buffer、Coomassie brilliant blue (CBB) staining solution、CBB destaining solution の組成を示す。

Separating gel (10%) :

30% acrylamide-0.8% bis acrylamide          6 ml

1.5M Tris-HCl (pH8.8)	4.5 ml
10% SDS	80 $\mu$ l
10%APS	40 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7.32 ml

Stacking gel :

30% acrylamide-0.8% bis acrylamide	1.2 ml
0.5M Tris-HCl (pH6.8)	2.0 ml
10%SDS	80 $\mu$ l
10%APS	48 $\mu$ l
TEMED	13 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	4.8ml

3  $\times$  SDS sample buffer :

188mM Tris-HCl (pH6.8)	
6% SDS	
30% glycerol	
0.01% BPB	
15% 2-ME	

running buffer :

25mM Tris-base	
190mM glycine	
0.1% SDS	

CBB staining solution :

0.1% CBB	
50% methanol	
10% acetic acid	

CBB destaining solution :

15% methanol	
10% acetic acid	

試料に2分の1量の3  $\times$  SDS sample bufferを加え、3分間煮沸してタンパク質を変性させ、ゲル一枚につき30 mAの定電流で泳動した。染色操作は CBB staining solution にゲルを浸して室温で10分間震盪することにより、脱色操作は CBB destaining solution を用いて室温で2時間震盪することにより行った。また、脱色後は、アトー株式会社の

ゲルドライヤー (RAPIDRY-MINI) により乾燥させた。

## 第9節 大腸菌で発現させた wild type GST-AtMEK1 及び mutant type GST-AtMEK1の活性測定

### 第1項 自己リン酸化

Wild type GST-AtMEK1 及び mutant GST-AtMEK1 100 ng をそれぞれ以下に示す反応液中で30℃ 20 分間インキュベートし、反応液の1/2量の SDS サンプル buffer を添加することにより反応を停止し、SDS-PAGE を行い、CBB 染色後、富士写真フイルム株式会社製のバイオイメージングアナライザー BAS 2000 を使用してオートラジオグラフを作成した。

kinase reaction buffer :

50 mM	Tris-HCl pH 7.5
20 mM	MgCl <sub>2</sub>
2 mM	MnCl <sub>2</sub>
50 μM	ATP
37 kBq	[γ- <sup>32</sup> P]ATP

また同様の反応を [γ-<sup>32</sup>P]ATP なしで行い、Upstate Biotechnology 社より購入した抗リン酸化チロシン特異抗体 (4G10) でイムノプロットを行い、チロシンリン酸化酵素活性を測定した。

### 第2項 シロイヌナズナ MAPK に対するリン酸化及びリン酸化された MAPK の活性測定

Wild type GST-AtMEK1 及び mutant GST-AtMEK1 (50 ng) と MAPK 不活性型変異体である GST-ATMPK3KN 及び GST-ATMPK4KN (1 μg) をそれぞれ第1と同様に kinase reaction buffer 中で30℃ 20 分間インキュベートし、活性を測定した。また AtMEK1 によりリン酸化された ATMPK3 及び ATMPK4 の活性を測定するため、wild type GST-ATMPK3 または GST-ATMPK4 (1 μg) と MBP (5 μg) を同様に kinase reaction buffer 中で 30℃ 20 分間インキュベートし MBP に対する MAPK 活性を測定した。また同様の反応を [γ-<sup>32</sup>P]ATP なしで行い、抗リン酸化チロシン特異抗体 (4G10) あるいは Cell Signaling 社より購入した抗活性型 MAPK 特異抗体でイムノプロットを行い、MAPK リン酸化状態を解析した。

## 第10節 イムノプロット

1) Millipore 社より購入した PVDF membrane (Immobilon P membrane) をゲルの大きさに切り、100% Methanol に 20 秒浸した後、Blotting buffer 中で 5 分間以上浸透した。

Blotting buffer :

100 mM	Tris
192 mM	Glycine
20%	Methanol

2) SDS-PAGE 後、ゲルから membrane への転写を行った。陰極側から Blotting buffer に浸した濾紙を3枚、ゲル、membrane、さらに Blotting buffer に浸した濾紙を3枚の順に重ね、電圧のリミットを 25 V に設定し、ゲル1枚あたり 200 mA の定電流で 1.5 時間通電した。

3) 転写後 membrane を 1% BSA を加えた T-TBS buffer 中で室温で 1 時間震盪し、ブロッキングした。

T-TBS buffer :

150 mM	NaCl
20 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
0.05%	Tween 20

4) 一次抗体を 1% BSA を加えた T-TBS buffer で以下のようにそれぞれの抗体に合わせて希釈し、4℃ で一晩反応させた。

- ・抗リン酸化チロシン特異抗体 (anti-phosphotyrosine-specific mouse monoclonal antibody, 4G10) : 1 µg/ml
- ・抗活性化型 MAPK 特異抗体 (anti-Phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204) - specific rabbit polyclonal antibody, anti-active MAPK) : 1/1000 希釈
- ・anti-AtMEK1CT rabbit polyclonal antiserum : 1/250 希釈

5) T-TBS buffer で membrane を3回洗浄した後、二次抗体として T-TBS buffer で 1/2500 希釈した Promega 社製の Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit (or anti-mouse) IgG を添加し、室温で1時間以上反応させた。

6) 反応後、T-TBS buffer で 3 回洗浄し、さらに 100 mM Tris-HCl (pH 9.5) で1回洗浄し発色液に浸し発色した。十分な発色が得られた後、H<sub>2</sub>O で洗浄して反応を停止させた。

発色液 :

100 mM	Tris-HCl (pH 9.5)
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
100 mM	NaCl
0.15 mg/ml	Nitro blue tetrazolium
0.1 mg/ml	BCIP

## 第11節 GST-ATMPK3 及び GST-ATMPK4 の自己リン酸化酵素活性測定

### 第1項 自己リン酸化

wild type または kinase negative GST-ATMPK3 及び GST-ATMPK4 0.5 µg をそれぞれ [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP を除く第9項1.で示した kinase reaction buffer 中で20分間 30°C で反応させた。反応を SDS サンプルバッファーを添加することにより停止し、SDS-PAGE を行い、抗リン酸化チロシン特異抗体及び抗活性化型 MAPK 特異抗体を一次抗体としてイムノブロットを行い活性を測定した。

### 第2項 GST-ATMPK3 の脱リン酸化

- 1) wild type GST-ATMPK3 (0.5 µg) を calf intestine alkaline phosphatase (20 U) と alkaline phosphatase reaction buffer 中で 37°C で 30 分間反応させ、脱リン酸化した。
- 2) 反応後、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で 1/200 に希釈した anti-GST-specific rabbit polyclonal antibody を加え、4°C で 30 分転倒混和した。
- 3) PBS で洗浄後1/2に希釈した protein A-Sepharose (20 µl) を加え、さらに 4°C で 30 分転倒混和した。
- 4) レジンを遠心分離により回収し、氷冷した 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で 3 回洗浄後、第11節第1項と同様に自己リン酸化反応させた。

## 第12節 シロイヌナズナの生育及びストレス処理

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は Columbia ecotype を使用し、その栽培には Gibco 社より購入した Gamborg's B-5 培地を使用した。またその生育方法は以下に示す通り行った。

シロイヌナズナの無菌種子を0.8%の agar を加えた Gamborg's B-5 培地に播種し、4°C で2晩低温処理した後、22°C、16 時間明期・8 時間暗期で培養して発芽させた。発芽後それぞれ3 日後、7 日後をサンプルとして用いた。シロイヌナズナ各組織のサンプルは、発芽2 週間後の植物体をパーライトとバーミキュライト (1 : 1 の割合で混合) を入れたポットに植えかえ、さらにその後2 週間生育させたものを用いた。

ストレス処理は発芽後7日目の芽生えを、プレートから引き抜いた際のストレスの影響をなくすため、処理前に1日水に浸けたものを使用した。以下に示すようにそれぞれのストレス処理を行った。

傷害ストレス： 芽生えを水に浸した状態でピンセットで軽く2回つまみ、そのまま植物培養器中に置いた。

低温ストレス： 芽生えを 4°C の水に移しかえることにより処理を始め、そのまま4°C でインキュベートした。

乾燥ストレス： 芽生えをペーパータオルの上に移し、そのまま植物培養器中に置いた。

塩ストレス： 芽生えを 300 mM NaCl 溶液に移し、そのまま植物培養器中に置いた。

コントロールとしてそのまま水に浸したものを同様に、そのまま植物培養器中に置いた。

各処理時間ごとにサンプルを液体窒素に浸し、-80℃で保存した。

### 第13節 シロイヌナズナからのタンパク質抽出

- 1) 保存しておいたシロイヌナズナサンプル (0.5 g) を液体窒素中で粉砕した。
- 2) 以下に示す抽出バッファを 3 ml 加え、さらに粉砕した。

抽出バッファ：

100 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM	EDTA
1%	Triton X-100
150 mM	NaCl
1 mM	PMSF
1 µg/ml	leupeptin
10 mM	2-mercaptoethanol

- 3) すりつぶしたサンプルを1.5 ml 容チューブに分けて移し、15,000 rpm 4℃ 15 分遠心分離し、上清を回収した。
- 4) 回収した上清をタンパク抽出液とし、第7項と同様にタンパク質濃度の定量を行った。

### 第14節 AtMEK1 特異抗体の作製

AtMEK1 のカルボキシル末端側の配列をもとに、合成ペプチドを作製し特異抗体の作製を行った。抗体は神戸大学理学部生物学科 深見 泰夫 先生ならびに神戸大学遺伝子実験センター 佐藤 賢一 先生に作製していただいた (Fukami et al., 1993)。以下抗原に用いた合成ペプチドのアミノ酸配列を示す。

Cys-Ser-Ala-Tyr-Phe-Thr-Asp-Gly-Ser-Leu-Ile-Pro-Pro-Leu-Ala-Asn

以下この抗体をanti-AtMEK1CT とする。

### 第15節 AtMEK1 抗体の特異性の検討

シロイヌナズナ芽生えより抽出した粗タンパク質 (1 mg) を 1/500 希釈した anti-AtMEK1CT または免疫前血清と 4℃ で 1 時間インキュベートし、PBS で洗浄後 1/2 希釈した protein A-Sepharose (20 µl) を加え、さらに 4℃ で 30 分インキュベートした。遠心により回収したレジンを氷冷したタンパク抽出バッファで 3 回洗浄した後、SDS-PAGE を行い、anti-AtMEK1CT または過剰量の GST-AtMEK1 と反応させた anti-AtMEK1CT を一次抗体としてイムノブロットし抗体の特異性を検討した。

### 第16節 植物組織より抽出した AtMEK1 の活性測定

- 1) シロイヌナズナ各組織及びストレス処理した芽生えより抽出した粗タンパク質 (1 mg) を anti-AtMEK1CT を用いて免疫沈降した。
- 2) 免疫沈降物を kinase-negative GST-ATMPK4 (1 µg) と kinase reaction buffer 中で 30℃ 30 分間反応させた。
- 3) 反応後、SDS-PAGE を行い、CBB 染色後バイオイメージングアナライザー

BAS2000 を用いてオートラジオグラフを作成した。

4) また反応に用いた免疫沈降物を anti-AtMEK1CT を一次抗体にしてイムノブロットし、各組織及びストレス処理した芽生え中の AtMEK1 タンパク量を解析した。

### 第3章 結果

#### 第1節 コマツナ cDNA からのプロテインキナーゼ遺伝子断片の単離

真核生物のプロテインキナーゼ触媒領域は、約 250~300 残基のアミノ酸から成る。この触媒領域はすべてのプロテインキナーゼスーパーファミリーでよく保存された 11 個のサブドメインから構成される (Hanks and Quinn, 1991)。この領域において特によく保存された領域のアミノ酸配列に対応するプライマーを作製し、これらのプライマーを種々の組み合わせで用いコマツナ mRNA を鋳型に RT-PCR を行った。作製したプライマーと得られた増幅断片のその触媒領域における位置を Fig. 2 に示した。得られた PCR 産物の塩基配列を決定し、予想されるアミノ酸配列を推定した。キナーゼサブドメイン VIb 内にみられる H/Y-R-D-L-K 配列及び、サブドメイン VII 内にみられる D-F/Y-G 配列、サブドメイン VIII 内にみられる A-P-E 配列といったキナーゼ特有の配列が確認されたプロテインキナーゼの部分構造を保持している 8 断片を得た。以降この 8 断片を PK-1 ~ 8 と呼ぶことにする。PK-1 ~ 8 の塩基配列、アミノ酸配列を核酸配列データベース及びタンパク質データベースによる相同性検索の結果得られたプロテインキナーゼとその相同性を Table 1 に示した。

PK-1 は、シロイヌナズナ由来のアブシジン酸誘導プロテインキナーゼ (ABAPK) とアミノ酸配列で 97.1%、核酸配列で 90.5% の相同性が認められた。PK-2 は、シロイヌナズナ由来の atpk1 (S6K) とアミノ酸配列で 96.5%、核酸配列で 88.9% の相同性が認められた。PK-3 は、ヒト由来の MAPKK とアミノ酸配列で 52.5%、核酸配列で 61.4% の相同性が認められた。PK-4 は、シロイヌナズナ由来の PVPK ホモログ とアミノ酸配列で 94.4%、核酸配列で 88.9% の相同性が認められた。PK-5 は、カビ由来の PKC とアミノ酸配列で 95.3%、核酸配列で 80.6% の相同性が認められた。PK-6 は、タバコ由来の NTPKTL7 とアミノ酸配列で 63.5%、核酸配列で 66.2% の相同性が認められた。PK-7 は、小麦由来の WPK4 とアミノ酸配列で 71.9%、核酸配列で 74.6% の相同性が認められた。PK-8 は、シロイヌナズナ由来の ATPK10 とアミノ酸配列で 63.4%、核酸配列で 65.2% の相同性が認められた。

次に、PCR 増幅遺伝子断片のその共通領域におけるアライメントを作成し、そのアライメントに基づくクラスター分析を行った結果を Fig. 2 に示した。これらの結果より、PK-1 ~ 8 は PK-1, 7, 8 からなるグループ、PK-2, 4, 5, 6 からなるグループと PK-3 からなるグループに大きく分けられることが判った。

#### 第2節 シロイヌナズナ MAPKK 相同遺伝子 (AtMEK1) の全長クローニング

MAPKK 相同遺伝子断片である PK-3 (Fig. 3) をプローブとしてシロイヌナズナ cDNA ライブラリーからのプラークハイブリダイゼーション法を用いたスクリーニングを行った。その結果、1st スクリーニングで 8 個の陽性クローンを得、3rd スクリーニングでそのシングルプラークを得た。次に、得られた陽性クローンの塩基配列の解析を試みた。この cDNA ライブラリーはヘルパーファージと同時に宿主菌に感染させることにより  $\lambda$ ZAP ベクターから挿入 cDNA 断片を含む形で pBluescript ファージミドが切

り出せるように設計されている。従って、得られた 8 個の陽性クローンより pBluescript ファージミドを回収した。また cDNA 断片は pBluescript ファージミドの *EcoR* I / *Xho* I サイトに挿入されているので、ファージミド DNA を *EcoR* I / *Xho* I で二重消化し、アガロース電気泳動に供した。その結果、PK-3 をプローブとしたスクリーニングにより 4 種類の挿入 cDNA 断片 (1.4, 0.9, 0.8, 0.7 kbp) を持つファージミド DNA が得られた (データ省略)。さらに 4 種類のクローンについて塩基配列の解析を行った。その結果その 4 種類のクローンはすべて同一の塩基配列を有しており (データ省略)、今後の解析は 1.4 kbp の挿入 cDNA 断片を持つクローンについて行った。Fig. 4 にこのクローンの塩基配列、並びに予想されるアミノ酸配列を示した。挿入 cDNA 断片は 1352 塩基からなり、翻訳開始点は 23 番目の塩基で、1085 番目の塩基に終始コドンが見られた。

データベースによる相同性検索の結果得られた代表的な MAPKK との触媒領域におけるアミノ酸配列のアライメントを作成した (Fig. 5)。その結果このクローンは MAPKK ファミリー内で保存されているキナーゼサブドメイン I 内の G-x-G-x-x-G-x-V 配列、II 内の A-x-K-x-I 配列、V 内の E-x-x-D-x-G-S-L 配列、VIa 内の G-L 配列、VIb 内の H-R-D-x-K-P-S-N-x-L-x-N 配列、VII 内の D-F-G-x-S-x-x-L 配列、VIII 内の V-G-T-x-x-Y-M-S-P-E-R 配列、IX 内の D-x-W-S-x-G 配列等をすべて含んでいることから MAPKK 相同遺伝子であることが示された。またデータベース上に同一の配列を持つ MAPKK 遺伝子が登録されていなかったため、新規な MAPKK であると考えられ、nMAPKK という名称で GenBank データベースに登録した (Ac. No. AB004796)。しかしその後同一のアミノ酸配列を持つ MAPKK が AtMEK1 (Morris et al., 1997) という名称で登録されていた (Ac. No. AF000977) ことが明らかとなったため、AtMEK1 という名称で今後この MAPKK を記すことにする。

Table. 2 に核酸配列データベース及びタンパク質配列による相同性検索の結果得られた代表的な MAPKK との触媒領域における相同性の数値をまとめた。相同性検索の結果、AtMEK1 はシロイヌナズナ由来の ATMAP2KAL (Jouannic et al., 1996)、タバコ由来の TOBNPK2 (Shibata et al., 1995)、出芽酵母由来の SCSTE7 (Taegue et al., 1986)、ラット由来の RATMEK1 (Wu et al., 1993)、アフリカツメガエル由来の XELMAPKK (Kosako et al., 1993) とアミノ酸配列でそれぞれ 44.0%、44.5%、36.5%、46.6%、47.1%、塩基配列でそれぞれ 51.5%、54.9%、50.3%、53.5%、51.1% の相同性が認められた。

Fig. 6 に AtMEK1 のアミノ酸配列に基づいて行った系統解析の結果を示した。AtMEK1 及び上記の MAPKK に加えて、最近のゲノム解析により明らかとなったシロイヌナズナの MAPKK および他の植物種で報告された MAPKK (Hardin and Woiniak, 1998; Kiegerl et al., 2000; Yang et al., 2001) を加えて系統解析を行った。その結果、植物の MAPKK は 4 つのサブファミリーに分類された (それぞれ A~D とした)。AtMEK1 はそのうち B のサブファミリーに属することが明らかになった (Fig. 7)。

### 第3節 AtMEK1 発現タンパク質を用いた活性化機構の解析

Fig. 8 に MAP キナーゼカスケードの活性化機構について動物や酵母において明らかとなっている知見を模式的に示した。MAPKK は様々な刺激により活性化した上流酵素である MAPKKK によりリン酸化され活性化し、その下流酵素である MAPK のチロシンおよびトレオニン残基を特異的にリン酸化し活性化することが明らかとされている。さらに MAPKK の活性化に必要とされるリン酸化部位についても動物や酵母においてはキナーゼサブドメイン VII ~ VIII にかけての SxxxS/T 配列のセリン及びセリン又はトレオニン残基の両方をリン酸化されて活性化することが知られている。またこの配列が存在するキナーゼサブドメイン VII ~ VIII にかけての DFG-SPE 領域はすべての MAPKK において高い相同性を有している。そこでこの領域のアミノ酸配列のアライメントを作成し Fig. 9 に示した。動物や酵母の MAPKK とは異なり、植物の MAPKK のリン酸化共通配列は S/TxxxxS/T という配列を有していた。そこでこれらのセリンおよびトレオニン残基が MAPKK 活性化に対しどのように影響するかを検討した。

#### 第1項 アミノ酸置換した変異型 AtMEK1 の作製及び大腸菌を用いた発現

AtMEK1 はリン酸化共通配列において動物型及び植物型の両者に適合する T(218)xS(220)xxxS(224) というユニークな配列を有していた。これらのセリン及びトレオニン残基をそれぞれまたは2ヵ所を酸性アミノ酸残基であるグルタミン酸残基に置換した変異体を作成した (Fig. 10A)。これらの変異体及び野生型の AtMEK1 を GST 融合タンパク質として大腸菌内で発現しグルタチオンセファロースビーズを用いて精製し、SDS-PAGE を行った結果を Fig. 10B に示した。野生型及び1ヵ所のセリン又はトレオニン残基を置換した変異体は分子量約 62 kDa のところにタンパク質のバンドが確認されたがそれぞれ2ヵ所をグルタミン酸残基に置換した変異体 (T218E/S224E、S220E/S224E) は SDS-PAGE における移動度が少なくなり上方にバンドシフトした。また218又は220以外のセリン又はトレオニン残基と224番目のセリン残基の両方を置換した変異体は野生型と同じ移動度を示した (データ省略)。

#### 第2項 AtMEK1 発現タンパク質の自己リン酸化酵素活性測定

野生型及び変異体 GST-AtMEK1 発現タンパク質の自己リン酸化酵素活性を検討した結果を Fig. 11 に示した。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP を用いて活性を測定した場合、224番目のセリン残基のみをグルタミン酸残基に置換した変異体において高い酵素活性 (約2倍) が検出された。また220番目のセリン残基を置換した S220E は活性が低下したが、それ以外についてはほとんど差が見られなかった。同様の反応を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP なしで行い、自己リン酸化活性を抗リン酸化チロシン残基特異抗体 (4G10) を用いて検出した結果、2ヵ所のセリン及びトレオニン残基を置換した変異体 (T218E/S224E、S220E/S224E) について高いチロシンリン酸化酵素活性が検出された。また S220E/S224E 及び S224E の変異体は上方にシフトしたバンドが検出され、2本のバンドが見られた。さらに反応後のサンプルを CBB 染色した結果、S224E 変異体は2ヵ所を置換した変異体と同じ位置にバンドが検出され、自己リン酸化により活性化しバンドシフトしたものであることが

推測された。

### 第3項 AtMEK1 発現タンパク質の MAPK に対するリン酸化酵素活性測定

野生型及び変異体 GST-AtMEK1 発現タンパク質の MAPK に対するリン酸化酵素活性を検討するため、基質として用いる MAPK を次のように決定した。AtMEK1 はシロイヌナズナの MAPK である ATMPK4 と特異的に結合することが知られており (Mizoguchi et al., 1998; Ichimura et al., 1998b) AtMEK1 酵素活性を測定する基質として ATMPK4 を、またそのリン酸化の基質特異性を検討するため、シロイヌナズナにおいてこれまでに報告されている MAPK を系統解析した結果 (Fig. 12) ATMPK4 と比較的近縁ではあるが別のグループに属することが明らかとなった ATMPK3 をコントロールの基質とした。

活性測定する際 MAPK の自己リン酸化の影響を除くため、ATMPK3 及び ATMPK4 の ATP 結合領域のリジン残基をアルギニン残基に置換した変異体を作製し、AtMEK1 と同様に GST 融合タンパク質として発現させ (GST-ATMPK3KN、GST-ATMPK4KN) 基質として用いた。

活性測定の結果を Fig. 13 に示した。野生型 GST-AtMEK1 は GST-ATMPK4KN をリン酸化し、218番目のトレオニン残基をグルタミン酸残基に置換した変異体 (T218E)、及び220番目のセリン残基を置換した変異体 (S220E) は野生型と同程度の活性を示した。また2カ所のトレオニン及びセリン残基をグルタミン酸残基に置換した変異体 (T218E/S224E、S220E/S224E) は高い酵素活性を示した。またこの MAPK に対するリン酸化は抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) 及び活性型 MAPK 特異抗体を用いた解析により、MAPK の活性化ループのトレオニン及びチロシン残基を特異的にリン酸化することが明らかとなった。別のタイプの MAPK である ATMPK3 を基質として同様の解析を行った結果、AtMEK1 は ATMPK3 より ATMPK4 を効率良くリン酸化した。GST-ATMPK4KN を基質として活性測定した場合同等の活性を示した T218E/S224E、S220E/S224E は GST-ATMPK3KN を基質とした場合、T218E/S224E はほとんどリン酸化しなかったが、S220E/S224E はリン酸化したことからこれら2つの変異体は異なった基質特異性を有していた。また、224番目のセリン残基のみを置換した変異体 (S224E) は、GST-ATMPK4KN に対して2カ所のトレオニン及びセリン残基を置換した変異体と同等の活性を示した。つまり224番目のセリン残基のリン酸化は AtMEK1 の活性化において必須であることが明らかとなった。しかしながら、S224E は自己リン酸化酵素活性が他の変異体よりも高く、また ATP と反応後上方にバンドシフトすることから、218番目のトレオニンまたは220番目のセリン残基を自己リン酸化した結果 GST-ATMPK4KN に対して高い酵素活性を示した可能性が考えられる。

そこで S224E に対し218番目のトレオニンまたは220番目のセリン残基をリン酸化されないアミノ酸残基であるアラニン残基に置換した変異体 (T218A/S224E、S220A/S224E) を作製し、その酵素活性を測定した (Fig. 14)。その結果、S220A/S224E は高い酵素活性が検出されたが、T218A/S224E は活性が消失した。つまり、AtMEK1 の活性化にとって218番目のトレオニン残基と224番目のセリン残基の

リン酸化が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

#### 第4項 野生型 GST-ATMPK4 の活性に対する GST-AtMEK1 の影響

GST-ATMPK4KN は GST-AtMEK1 によりその活性化ループのトレオニン及びチロシン残基をリン酸化されたが、このリン酸化により ATMPK4 が活性化するかを MBP を基質として活性を測定することにより検討した (Fig. 15)。

大腸菌内で発現させた野生型 GST-ATMPK4 は単独でチロシンリン酸化が検出されたが、抗活性化型 MAPK 抗体では検出されなかった。また MBP リン酸化は検出されたが、その活性は低く GST-ATMPK4KN を効率良くリン酸化した T218E/S224E 及び S220E/S224E と反応させることにより高い MBP リン酸化酵素活性を示した。またその時の GST-ATMPK4 は抗活性化型 MAPK 抗体により認識されることから、GST-ATMPK4 は GST-AtMEK1 によりその活性化ループのリン酸化を受け、活性化することが明らかとなった。また GST-ATMPK4KN に対し高い酵素活性を示した S224E は GST-ATMPK4 を活性化はするが2カ所を置換した変異体ほど高い MBP リン酸化酵素活性は検出されなかった。これは MBP 又は GST-ATMPK4 が存在すると S224E は自己リン酸化による活性化が弱くなることが原因であると推測される。

GST-ATMPK3 はその活性に対して GST-AtMEK1 の影響はなく高い MBP リン酸化活性が検出された。また GST-ATMPK3 単独で活性化型 MAPK 特異抗体により認識されたことから、大腸菌内で発現させた GST-ATMPK3 は大腸菌内で活性化されていたか、あるいは自己リン酸化により活性化する能力を持っているかということが考えられた。そこで、GST-ATMPK3 及び GST-ATMPK3KN を ATP 存在下または非存在下で反応させ抗リン酸化チロシン特異抗体および抗活性化型 MAPK 特異抗体でイムノブロットした。その結果、GST-ATMPK3 は ATP とインキュベートすることによりその自己リン酸化が亢進し、GST-ATMPK3KN では ATP の存在とは関係なくリン酸化が検出されなかったことから、GST-ATMPK3 は大腸菌内で自己リン酸化により活性化し、さらに ATP とインキュベートすることによりその活性化が増強されることが明らかとなった (Fig. 16A)。そのことをさらに詳しく検証するため、精製した GST-ATMPK3 をいったん脱リン酸化し、その後再び ATP とインキュベートした。その結果脱リン酸化した GST-ATMPK3 も自己リン酸化により活性化ループのトレオニン及びチロシン残基の両方をリン酸化した (Fig. 16B)。つまり GST-ATMPK3 は自己リン酸化により活性化ループのトレオニン及びチロシン残基の両方をリン酸化し活性化する能力を有することが明らかとなった。また GST-ATMPK4 ではチロシンリン酸化は検出されたが (Fig. 16A)、活性化型 MAPK 抗体では検出されなかったことからこのチロシン残基は活性化ループとは別の場所に存在することが示唆された。

### 第4節 植物細胞における AtMEK1 の活性化

#### 第1項 AtMEK1 特異抗体の作製

AtMEK1 の C 末端のアミノ酸配列をもとに作製した合成ペプチドを抗原としてウサギを免役し抗血清を得た。この抗血清を anti-AtMEK1CT と呼ぶ。この抗体の特異性を

検討するためシロイヌナズナ芽生えより抽出したタンパク質を anti-AtMEK1CT を用いて免疫沈降及びイムノブロットを行った。その結果、約40kDa のところに一本のバンドが検出され、イムノブロットを行う前に GST-AtMEK1 と反応させた anti-AtMEK1CT でイムノブロットを行うとバンドが消失し、また免疫前血清を用いて同様に免疫沈降操作を行ったものにもバンドが検出されないことから、この抗体が AtMEK1 を特異的に認識し、免疫沈降及びイムノブロットできることが確認された (Fig. 17A)。

### 第2項 AtMEK1 のシロイヌナズナ各組織における発現

発芽後3~4週間のシロイヌナズナ植物体を用いて、各組織における AtMEK1 タンパク質発現の解析および活性の測定を行った。

シロイヌナズナ各組織より抽出したタンパク質を anti-AtMEK1CT で免疫沈降し、イムノブロットした結果及び免疫沈降物を GST-ATMPK4KN を基質として活性測定した結果を Fig. 17B に示した。AtMEK1 は根において特に発現が多く花や若い葉および芽生えにおいて発現が確認されたが、ロゼット葉や茎生葉においてはほとんど見られなかった。また酵素活性はそのタンパク質量に比例して検出された。また一番活性の強かった根のサンプルを用いて基質特異性を検討した。その結果植物細胞中の AtMEK1 も大腸菌内で発現させた GST-AtMEK1 と同様に ATMPK3 より ATMPK4 を効率良くリン酸化した (Fig. 17C)。

### 第3項 ストレス処理による AtMEK1 の活性化

様々なストレス処理による AtMEK1 の活性化を検討した (Fig. 18)。傷害、低温、乾燥、高塩ストレスでそれぞれの時間処理した芽生えよりタンパク質を抽出し、anti-AtMEK1CT を用いて免疫沈降し、その活性を GST-ATMPK4KN を基質に測定した。また免疫沈降物を anti-AtMEK1 でイムノブロットした結果、タンパク質量の変化はすべての処理において観察されなかった。AtMEK1 は傷害ストレスにより、急激な一過的活性化が処理後5分から30分の間に検出された。低温ストレスによっては刺激5分後から徐々に活性化しその活性は持続された。乾燥ストレスにおいては処理後30分にその活性のピークが観察され、塩ストレスを与えた場合緩やかな活性の上昇が60~120分にかけて検出された。またコントロールとして同様の時間水中に浸した芽生えからタンパク質を抽出し、その活性を測定した結果、AtMEK1 のタンパク質量及び活性の変化は認められなかった。

## 第4章 考察

### 第1節 PCR 増幅プロテインキナーゼ断片について

高等植物コマツナ mRNA を用いて行った RT-PCR により、プロテインキナーゼの触媒領域の一部をコードすると予想される増幅遺伝子断片が 8 種類 (PK-1~8) 得られた。そしてこれらの遺伝子断片の塩基配列を決定し、データベースによる相同性検索を行った結果それぞれ相同性の高いプロテインキナーゼが得られた。さらに得られた遺伝子断片の共通部分におけるアライメントを作成し、また共通部分におけるクラスター解析を行った。その結果、PK-1~8 は PK-1、7、8 からなるグループ、PK-2、4、5、6 からなるグループ、PK-3 に大きく分かれた。

PK-1、7、8 からなるグループは SNF1 関連プロテインキナーゼファミリーに属すると考えられる。SNF1 関連プロテインキナーゼは酵母から動物、植物に至る全ての真核生物において保存され、環境ストレス応答において細胞内の代謝反応をリン酸化により調節する役割を持つことが示唆されておりストレス応答において重要な役割を果たすと考えられている (Hardie et al., 1998)。SNF1 関連プロテインキナーゼは酵母の SNF1、動物の AMPK、植物の SnRK で構成されている。SNF1 や AMPK は AMP 濃度の上昇により活性化することが知られている (Hardie et al., 1998; Kemp et al., 1999)。酵母の SNF1 はグルコース濃度の低下により活性化し、通常グルコースにより転写が抑制されている遺伝子の転写を促進し、栄養飢餓に耐えることが知られている。また動物の AMPK は脂質の代謝を行う酵素をリン酸化により制御している。

植物の SnRK は動物や酵母とは異なりさらに SnRK1、2、3のグループに分類される (Halford and Hardie, 1998)。その中でも SnRK1 に属するシロイヌナズナの AKIN $\alpha$ 1 (Bouly et al., 1999)、AKIN10 (Ferrando et al., 2001)、タバコの NPK5 (Muranaka et al., 1994) ライ麦の RKIN1 (Alderson et al., 1991) についてはその解析が進んでおり、SNF1 や AMPK の同一機能遺伝子であると考えられている。つまり植物の SnRK1 グループは植物細胞中においても糖や脂質の代謝調節において重要な役割を持つと考えられている。それに対し SnRK2、3 に分類されるプロテインキナーゼについては、小麦の WPK4 が光やサイトカニン処理により転写誘導され、栄養により抑制されること (Sano and Youssefian, 1994) やシロイヌナズナ SOS2 がカルシウム結合タンパク質である SOS3/AtCBL4 と結合し、塩ストレス応答において機能することが報告されている (Liu et al., 2000; Halfer et al., 2000) がその詳細については不明である。当研究において PK-8 をプローブとしたスクリーニングにより SnRK3 に属する新規な SNF1 関連プロテインキナーゼ (ATSRPK1) を同定し、ATSRPK1 の遺伝子転写が低温や高塩及び ABA 処理により誘導されることを明らかにしている。

PK-2、4、5、6 からなるグループは、AGC グループに属するグループであると考えられる。AGC グループには、環状ヌクレオチド依存性プロテインキナーゼ (PKA、PKG) ファミリー、カルシウム/リン脂質依存性プロテインキナーゼ (PKC)、S6K ファミリー、PVPK1 ファミリー等が属するが、高等植物からは PKA、PKG、PKC についてはその相同遺伝子の報告はなく、その存在を示唆する報告がされているだけである

(Ichikawa et al., 1997; Nanmori et al., 1994)。PK-2 と高い相同性を示したシロイヌナズナ由来の atpk1 は、S6K ファミリーに属したその相同遺伝子 (atpk2) も同定されており、これらのプロテインキナーゼはシロイヌナズナより部分精製したりボゾームタンパク質をリン酸化することが報告されている (Zhang et al., 1994a; 1994b)。また、atpk2 遺伝子の転写産物量は低温により増加することも報告されている (Mizoguchi et al., 1995)。PK-4 と高い相同性を示したシロイヌナズナ由来の PVPK ホモログ遺伝子 (ATPK64) は PVPK1 ファミリーに属している。PVPK1 は高等植物で最初に報告されたプロテインキナーゼ遺伝子であり (Lowton et al., 1989)、そのアミノ酸配列上の特徴はキナーゼサブドメイン VII と VIII の間に 70 ~ 90 残基の挿入配列が存在することである。このファミリーは高等植物において普遍的に存在していることから、重要な機能をもっていることが考えられるがその挿入配列の機能も含め、その生理機能は不明である。PK-5 はカビ由来の PKC と高い相同性を示した。PKC は酵母からヒトに至る真核生物において広くその存在が確認されているカルシウム/リン脂質依存性のセリン/トレオニンプロテインキナーゼであり、高等動物において様々な研究がなされ、様々な生理機能が示唆されている。しかしながら前述のように、高等植物においては相同性遺伝子は報告されておらず、PK-5 は高等植物における新規なプロテインキナーゼである可能性が高く全塩基配列の決定をはじめとしたさらなる解析が必要である。PK-6 と高い相同性を示したタバコ由来の NTPKTL7 は、その触媒領域の配列より AGC グループに属すると考えられるがその機能については不明である。しかしながら、PVPK1 ファミリーと同様にキナーゼサブドメイン VII と VIII の間に約 40 アミノ酸残基からなる挿入配列が存在し、その配列も含め重要な機能を果たしていることが予想される。従って、PK-6 についても同様にさらなる解析が必要とされる。

## 第2節 AtMEK1 の活性化機構について

AtMEK1 はその活性化に必要とされる保存配列において T(218)xS(220)xxxS(224) という植物型 (S/TxxxxxS/T) 及び動物型 (SxxxS/T) の両者に適合する配列を有している。これらの植物型及び動物型に相当するセリン及びトレオニン残基を2ヵ所グルタミン酸残基に置換した変異体酵素 (T218E/S224E、S220E/S224E) は SDS 電気泳動において移動度が減少し、上方にバンドシフトした。さらにこれらの変異体酵素は高い活性を示した。このことはリン酸化共通配列のそれぞれのセリン及びトレオニン残基のリン酸化が AtMEK1 の活性化に必要であることを示唆している。また 224 番目のセリン残基のみをグルタミン酸残基に置換した変異体酵素 (S224E) は高い酵素活性を示し、ATP とインキュベートすることによりバンドシフトした。また S224E 変異体にさらに 218番目のトレオニン残基をリン酸化されないアラニン残基に置換した変異体酵素 (T218A/S224E) は活性が消失し、S224E に 220番目のセリン残基をアラニン残基に置換した変異体 (S220A/S224E) の酵素活性が高かったことから、218番目のトレオニン残基は 224番目のセリン残基とともに AtMEK1 活性化において必要であることが明らかとなった。つまり 224番目のセリン残基を上流酵素である MAPKKK によりリン酸化された AtMEK1 は 218番目のトレオニン残基を自己リン酸化し活性化する能力を持

つことが示された。しかしながら直接のリン酸化による活性化は検討しておらず、今後の更なる研究が必要である。また2カ所グルタミン酸残基に置換した変異体酵素 (T218E/S224E、S220E/S224E) において、T218E/S224E は ATMPK4 のみに対し強いリン酸化酵素活性を示したが、S220E/S224E は ATMPK4 だけでなく ATMPK3 に対してもリン酸化酵素活性を示した。これらの2つの変異体が異なった基質特異性を持つことが明らかとなったが、植物細胞中においてもこのように動物型、植物型のそれぞれの位置をリン酸化された AtMEK1 がその基質を変化することがあれば非常に興味深い。

### 第3節 植物のMAPK に対するリン酸化と植物型 MAPKK の活性化について

大腸菌内で発現した野生型 AtMEK1 が ATMPK4 のトレオニン残基をリン酸化することがこれまでに報告されていたが (Huang et al., 2000)、本研究において2カ所のトレオニン及びセリン残基をグルタミン酸残基に置換した変異体酵素が ATMPK4 の活性化ループのトレオニン及びチロシン残基の両方をリン酸化し活性化することを明らかにした。また alfalfa のMAPK である SIMK は大腸菌で発現させた野生型の SIMKK により活性化ループのトレオニン及びチロシン残基の両方をリン酸化されることが報告された (Kiegerl et al., 2000)。SIMKK はシロイヌナズナの ATMKK4 及び ATMAP2KAL/ATMKK5 (Ichimura et al., 1998a) の相同遺伝子であるが、これらのMAPKK は AtMEK1 の220番目のセリン残基に相当する場所が酸性アミノ酸であるアスパラギン酸になっている。つまり、AtMEK1 の S220E 変異体酵素が ATMPK4 のトレオニン及びチロシン残基の両方を弱いながらもリン酸化したことと同様に SIMK のトレオニン及びチロシン残基をリン酸化したと考えられる。このことから推察すると TxDxxxS というリン酸化共通配列をもつ MAPKK は AtMEK1 の224番目のセリン残基に相当するセリン残基のリン酸化のみで活性化が得られると考えられる。しかし最近このタイプの MAPKK であるタバコ NtMEK2 がリン酸化共通配列のトレオニン及びセリン残基をアスパラギン酸残基に置換することにより活性化することが報告された (Yang et al., 2001)。また別のタイプの MAPKK ではあるが、トマトの tMEK2 も同様に2カ所のセリン及びトレオニン残基をアスパラギン酸に置換することにより活性化することが報告された (Xing et al., 2001)。しかし AtMEK1 同様直接のリン酸化は確認されておらず今後これらの上流に位置する MAPKKK の同定及び MAPKKK によるリン酸化について検証していく必要がある。

### 第4節 ATMPK3 と ATMPK4 の活性化機構の相違点について

シロイヌナズナの MAPK である ATMPK4 は活性化ループのトレオニン及びチロシン残基の両方を AtMEK1 によりリン酸化され活性化することを明らかにした。また植物細胞中の ATMPK4 はその転写レベル、タンパク質レベルの変化を伴わず、低温や乾燥、傷害ストレスにより活性化することが報告されている (Ichimura et al., 2000)。それに対して ATMPK3 はその転写量が低温や高塩、接触刺激により増大すること (Mizoguchi et al., 1996) や、また ATMPK3 のタバコホモログである WIPK の転写

も傷害や病害菌感染により誘導されることが報告されている (Seo et al., 1995)。また本研究により、大腸菌内で発現させた ATMPK3 が自己リン酸化により活性化することが示された。植物の MAPK は活性化ループのトレオニン及びチロシン残基の MAPKK によるリン酸化や自己リン酸化及び転写調節など様々な活性化機構を持つと考えられる。

#### 第5節 ストレス処理による AtMEK1 の活性化について

AtMEK1 は傷害や低温、乾燥、高塩ストレスにより活性化することを明らかにした。また各ストレス処理によりタンパク質量は変化しないことからその活性化は翻訳後修飾つまり上流酵素によるリン酸化によって活性化していることが示唆された。また AtMEK1 の活性化に伴いその下流因子である ATMPK4 も活性化していることが予想されるが、これまでに報告されている ATMPK4 の活性化パターン (Ichimura et al., 2000) と本研究により明らかにした AtMEK1 の活性化パターンがほぼ一致することからも明らかである。それぞれの刺激によって AtMEK1 の活性化の時間や強さが異なったが、これは AtMEK1 の活性化が複数の経路を通じて制御されていることを示唆している。つまり傷害や低温などその活性化が強く急激におこった刺激には直接活性化を受けるが、高塩のようにその活性化が遅く緩やかだった刺激はいったん別の伝達経路を経由してから AtMEK1 に情報が伝達されている可能性がある。今後 AtMEK1 の上流因子について詳しく検証していく必要がある。また AtMEK1 の活性型あるいは不活性型の変異体を植物体に導入しこの AtMEK1 経路の下流因子の同定を行い、植物細胞における役割を明らかにしていくことが今後の課題である。

#### 第6節 植物の MAPK カスケード研究の現状及び今後の指針

最近シロイヌナズナ全ゲノム配列が明らかにされ、シロイヌナズナにおける MAPK カスケード構成プロテインキナーゼの同定がなされた (Zhang and Klessig, 2001)。その結果、MAPK 相同遺伝子は約 20 種類、MAPKK 相同遺伝子は 10 種類、MAPKKK 相同遺伝子はファミリー内の相同性が低いため確定はできないが 10 種類以上存在することが明らかとなった。

植物の MAPK はその相同性に基づく系統解析により、I~VI の 6 つのグループに分類された (Zhang and Klessig, 2001)。それぞれのグループについてその特徴を記す。グループ I はシロイヌナズナの ATMPK3 タバコの WIPK に代表される MAPK が属し、傷害や様々なストレスによりその転写及び活性が増強されるグループである。グループ II はシロイヌナズナ ATMPK6 タバコ SIPK に代表される MAPK でストレス刺激においてその転写量及びタンパク質量の変化を伴わず、上流 MAPKK によりリン酸化され活性化されるグループである。グループ III はシロイヌナズナ ATMPK4 が属し、通常状態において防御遺伝子の発現を抑制しており全身抵抗性の獲得にも関与することが示唆されている (Petersen et al., 2000)。しかし接触や傷害ストレスによっても活性化することが報告されており (Ichimura et al., 2000) その機能については不明な点が多い。グループ IV はシロイヌナズナでは ATMPK1、2、7 が属するが、その機能についてはほとんど分かっていない。しかしサイトカイニンやオーキシンといった植物ホルモンの情報伝達

に参与している可能性が示唆されている (Mizoguchi et al., 1994)。グループ V はシロイヌナズナでは ATMPK8、9 また alfalfa の MsTDY1 やイネの OsBWMK1 などが属している。このグループの MAPK の特徴として、その活性化ループの保存配列が TDY 配列になっていることが挙げられ、またその機能については傷害やエリシター処理によりその転写が誘導されるものも報告されている (Schoenbeck et al., 1999; He et al., 1999)。グループ VI についてはシロイヌナズナゲノムにおいてのみ同定されておりその機能については全く不明である。以上まとめると植物のストレス応答に参与するグループが I、II、III、IV の 4 グループあり残り 2 つのグループ (IV、VI) については不明な点が多いが、おそらく細胞増殖に関係していると推測される。

MAPKK はシロイヌナズナに10種類存在するが他の植物種においてはまだ報告は少ない。系統解析を行った結果、植物の MAPKK は A~D の 4 つに分類された (Fig. 7)。それぞれのグループについてその特徴を記す。グループ A はシロイヌナズナ ATMKK3 (Ichimura et al., 1998a) 及びタバコ NPK2 (Shibata et al., 1995) が属するがその機能については不明である。しかし系統解析により動物の MEK1 に近縁であることが示され、細胞の増殖に参与している可能性が示唆され、その下流に位置する MAPK の候補としてはグループ IV、VI が考えられる。グループ B はシロイヌナズナ AtMEK1、ATMKK2 (Ichimura et al., 1998a) が属するが本研究でも明らかにした通り MAPK のグループ III の上流 MAPKK である。本研究において AtMEK1 は傷害や低温、乾燥、高塩ストレス情報伝達関与することを明らかにした。また ATMKK2 は酵母の MAPKK を欠損させ塩感受性にした酵母を機能相補により復帰させることが報告されている (Ichimura et al., 1998b)。グループ C はシロイヌナズナ ATMKK4、ATMAP2KAL/ATMKK5 (Ichimura et al., 1998a)、及び alfalfa SIMKK (Kiegerl et al., 2000)、タバコ NtMEK2 (Yang et al., 2001) が属するがこのグループは MAPK グループ I、II の上流に位置すると考えられ、様々なストレス応答に関係するグループである。グループ D はシロイヌナズナゲノム解析においてのみ同定されているため、その機能については報告がない。

MAPKKK についてはこれまでにその機能が報告されているものとして、エチレン情報伝達で機能することが明らかとされているシロイヌナズナの CTR1 (Kieber et al., 1993)、MAPKK グループ D の上流であると考えられているシロイヌナズナの ANP1、2、3 (Kovtun et al., 2000) タバコの NPK1 (Nishihama et al., 2001)、AtMEK1 と相互作用することが知られている ATMEKK1 (Mizoguchi et al., 1997)、及びその下流因子は同定されていないが防御遺伝子を恒常的に発現抑制する EDR1 (Frye et al., 2001) が挙げられる。

これらの MAPK、MAPKK、MAPKKK についてそのカスケードの形成が示唆されているものは ATMEKK1・AtMEK1/ATMKK2・ATMPK4 経路だけである (Ichimura et al., 1998b; Mizoguchi et al. 1998)。またこれまでの報告を総合すると ANP1/2/3・ATMKK4/ATMAP2KAL (ATMKK5)・ATMPK3/6 というカスケードを構成することが予想される。今後さらに様々な刺激に対するそれぞれの MAPK カスケードが明らかにされていくと思われる。またこれらのカスケード間のクロストークについても検証して

いく必要がある。しかしながらこれまで様々な刺激の受容から MAPK カスケードに入る経路についてはその報告はなく、MAPK の植物細胞内の基質についても同定されていない。今後これらの分子を同定していくことが植物の情報伝達の解明につながると考えられる。

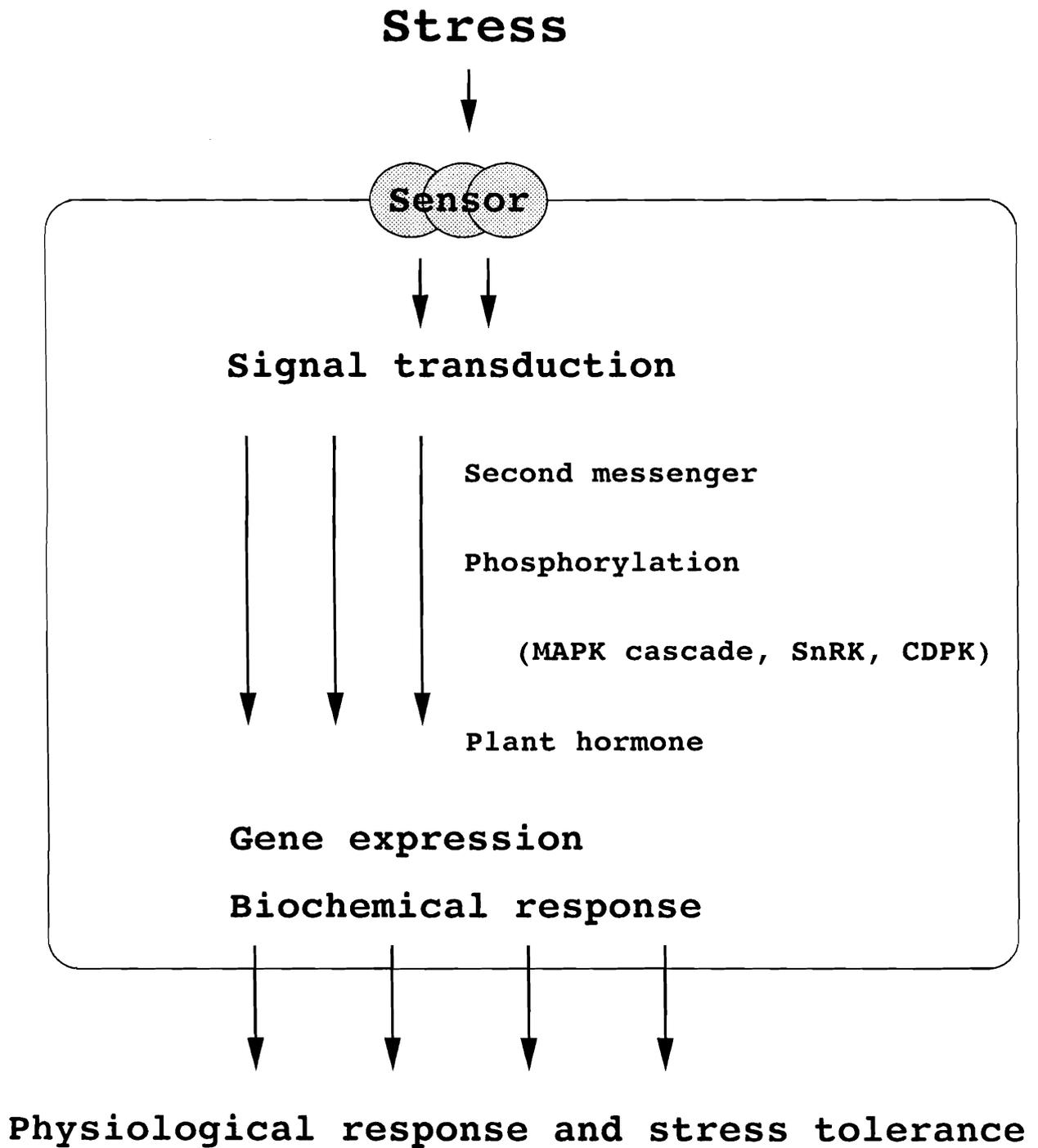
#### 第7節 総合考察

本研究により、MAPK カスケードを構成する AtMEK1 についてその活性化機構及び傷害、低温、乾燥、及び高塩ストレスによる活性化について新たな知見が得られた。

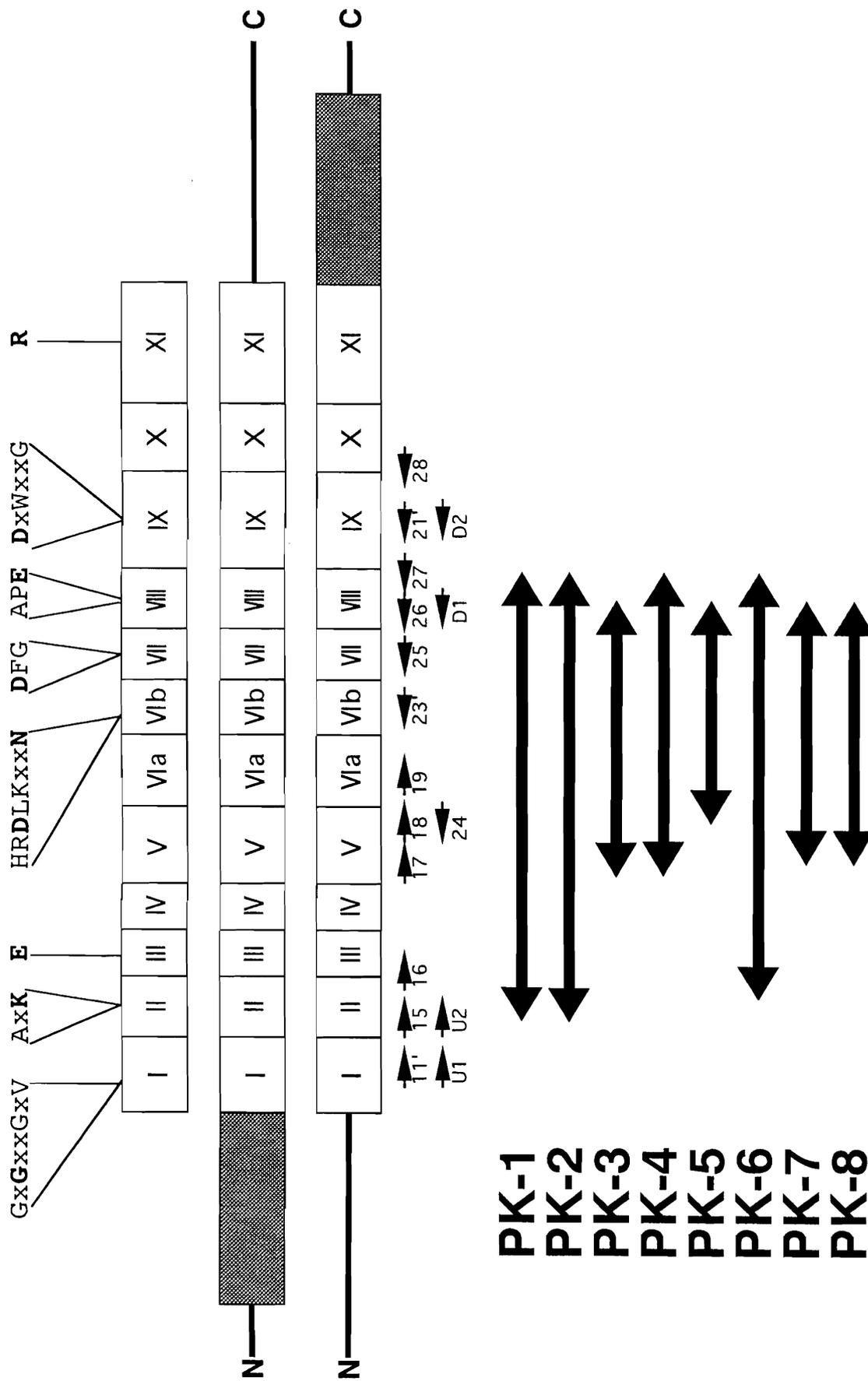
最近シロイヌナズナにおいて全ゲノム配列が決定され、またシロイヌナズナを中心に環境応答や環境ストレスに対する感受性や耐性が異なる突然変異体が多数分離されている。これらの情報をもとにそれぞれの遺伝子がどのようなストレス応答において機能するかが明らかとなっていくと予想される。しかしこれらの遺伝子は単独で機能するわけではなくそれぞれが複雑に関係しあい植物細胞において機能していると考えられる。プロテインキナーゼについても今後どのようなストレス応答に関与しているかということだけでなく、植物細胞における局在や基質タンパク質の同定を行っていくことが重要である。このような研究により植物のストレス応答機構の全容が明らかにされ、またストレス耐性植物の作出につながることを強く期待する。

## 图表

- Figure 1 Stress signaling in plant
- Figure 2 The positions of PCR primers and amplified genes in the catalytic domain of the protein kinase family
- Table 1 Homology (%) of the PCR-amplified gene fragments encoding the catalytic domain of the protein kinase
- Figure 3 Phylogenic tree of the PCR-amplified gene fragments inferred from the amino acid sequence alignments
- Figure 4 The nucleotide and amino acid sequences of the PCR-amplified kinase gene (PK-3) [A] and the alignment with MAPKK, that shows the highest homology with PK-3 [B]
- Figure 5 The nucleotide and deduced amino acid sequences of AtMEK1
- Figure 6 The amino acid sequence alignment in the catalytic domain of AtMEK1 and several MAPKKs
- Table 2 Homology (%) of AtMEK1 to other MAPKKs in the catalytic domain
- Figure 7 Phylogenic analysis of MAPKKs
- Figure 8 MAP kinase cascade
- Figure 9 Comparison of the amino acid sequences in the activation loop of MAPKKs from various species
- Figure 10 Construction of the GST-AtMEK1 mutants and expression in *E. coli*
- Figure 11 Autophosphorylation activity of the GST-AtMEK1 mutants
- Figure 12 Phylogenic analysis of plant MAPKs
- Figure 13 *In vitro* phosphorylation of the kinase-negative GST-ATMPK4 and GST-ATMPK3 by the GST-AtMEK1 mutants
- Figure 14 The role of Thr-218 and Ser-220 on the protein kinase activity of AtMEK1
- Figure 15 Effects of incubation with the GST-AtMEK1 mutants on the protein kinase activity of GST-ATMPKs
- Figure 16 The autophosphorylating activity of GST-ATMPKs
- Figure 17 Expression of the AtMEK1 protein in *Arabidopsis* organs
- Figure 18 Stress-induced activation of AtMEK1 in *Arabidopsis* seedlings
- Figure 19 Various MAPK cascades and their roles in plant



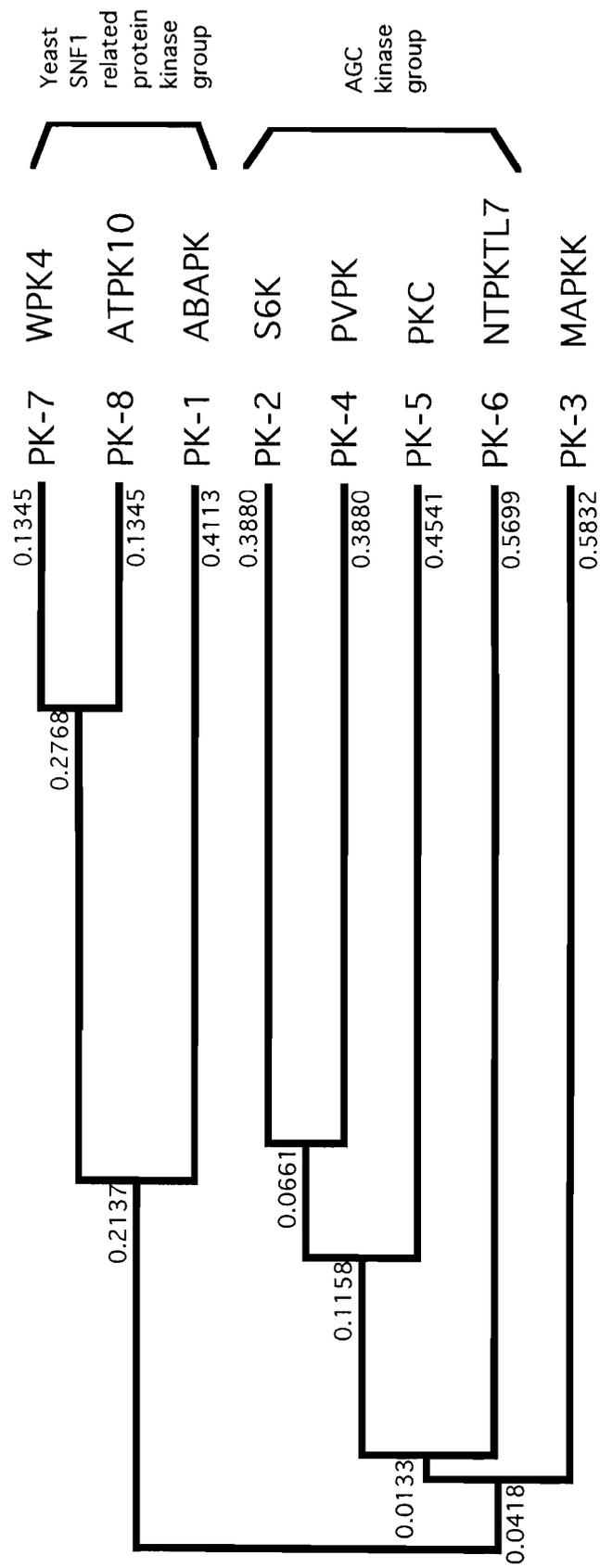
**Figure 1 Stress signaling in plant**



**Figure 2** The positions of PCR primers and amplified genes in the catalytic domain of the protein kinase family

**Table 1 Homology (%) of the PCR-amplified gene fragments encoding the catalytic domain of the protein kinase**

<b>PCR-amplified gene</b>	<b>protein kinase</b>	<b>homology (%)</b> [ amino acid ] [ nucleic acid ]
<b>PK-1</b>	<i>A. thaliana</i> ABAPK	90.5 97.1
<b>PK-2</b>	<i>A. thaliana</i> S6K (atpk1)	96.5 88.9
<b>PK-3</b>	<i>H. sapiens</i> MEK2	53.5 61.4
<b>PK-4</b>	<i>A. thaliana</i> PVPKlike	94.4 88.9
<b>PK-5</b>	<i>T. reesei</i> PKC	95.3 80.6
<b>PK-6</b>	<i>N. tabacum</i> NTPKTL7	66.2 63.9
<b>PK-7</b>	<i>T. aestivum</i> wpk4	71.9 74.6
<b>PK-8</b>	<i>A. thaliana</i> atpk10	65.2 63.9



**Figure 3 Phylogenetic tree of the PCR-amplified gene fragments inferred from the amino acid sequence alignments**



2 :	TTT GAT CTC CAA AAA CCA GAC ATG AAC AGA GGA AGC TTA TGC CCT AAT CCC ATC TGT CTC CCT CCT CTT GAG CAA TCC ATC TCC AAA TTC	91
1 :	M N R G S L C P N P I C L P P L E Q S I S K F	23
92 :	TTA ACA CAG AGT GGA ACG TTT AAA GAT GGA GAT CTT CGA GTG AAC AAA GAT GGA ATC CAG ACC GTG TCT CTG TCC GAA CCA GGA GCT CCA	181
24 :	L T Q S G T F K D G D L R V N K D G I Q T V S L S E P G A P	53
182 :	CCT CCT ATT GAG CCA TTG GAC AAC CAA TTG AGT TTG GCA GAT TTA GAA GTG ATC AAA GTC ATT GGC AAA GGA AGT AGT GGT AAT GTC CAG	271
54 :	P P I E P L D N Q L S L A D L E V I K V I G K G S S G N V Q	83
272 :	TTG GTC AAA CAC AAA CTC ACT CAA CAG TTT TTC GCT CTT AAG GTC ATT CAA TTG AAC ACA GAA GAA TCA ACA TGT CGG GCG ATT TCT CAG	361
84 :	L V K H K L T Q Q F F A L K V I Q L N T E E S T C R A I S Q	113
362 :	GAG CTG AGA ATA AAC TTG AGC TCG CAA TGT CCA TAT ATT GTC TCA TGT TAT CAA TCT TTC TAC CAC AAC GGT CTT GTT TCA ATC ATA TTG	451
114 :	E L R I N L S S Q C P Y L V S C Y Q S F Y H N G L V S I I L	143
452 :	GAA TTC ATG GAT GGT GGA TCC CTT GCA GAC TTG TTA AAG AAA GTC GGA AAA GTT CCT GAA AAC ATG CTA TCT GCC ATC TGC AAG CGA GTT	541
144 :	E F M D G G S L A D L L K K V G K V P E N M L S A I C K R V	173
542 :	CTT CGA GGT CTT TGT TAT ATT CAT CAT GAG AGG CGA ATC ATT CAT CGG GAC TTA AAG CCT TCT AAC TTG CTA ATC AAT CAT AGA GGT GAA	631
174 :	L R G L C Y I H H E R R I I H R D L K P S N L L I N H R G E	203
632 :	GTC AAA ATC ACA GAC TTT GGT GTC AGC AAG ATC TTG ACA AGC ACA AGT AGT CTT GCT AAT TCT TTC GTG GGC ACA TAC CCT TAT ATG TCT	721
204 :	V K I T D F G V S K I L T S T S S L A N S F V G T Y P Y M S	233
722 :	CCA GAG AGA ATC AGC GGG AGT TTG TAC AGT AAC AAG AGC GAT ATT TGG AGC TTG GGA CTG GTT TTG CTC GAA TGT GCA ACG GGT AAA TTC	811
234 :	P E R I S G S L Y S N K S D I W S L G L V L L E C A T G K F	263
812 :	CCG TAT ACT CCT CCA GAA CAC AAG AAA GGA TGG AGT AGC GTG TAC GAG CTT GTG GAC GCC ATT GTT GAA AAC CCG CCT CCT TGT GCA CCT	901
264 :	P Y T P P E H K K G W S S V Y E L V D A I V E N P P P C A P	293
902 :	TCC AAT CTC TTT TCT CCA GAG TTT TGC TCC TTC ATC TCG CAA TGT GTA CAA AAA GAT CCA AGG GAC AGA AAA TCA GCA AAG GAG CTT CTG	991
294 :	S N L F S P E F C S F I S Q C V Q K D P R D R K S A K E L L	323
992 :	GAA CAC AAG TTC GTA AAG ATG TTT GAA GAT TCG GAT ACA AAT CTC TCG GCT TAC TTC ACC GAC GCA GGA TCT TTG ATT CCC CCA CTT GCT	1081
324 :	E H K F V K M F E D S D T N L S A Y F T D A G S L I P P L A	353
1082 :	AAC TAG AAC CGA GTT TGA ACA ATC TTT TAA CCT CCA AGT TAT TAT TTC ATA TCC ACT AGA AGA GAT TTT ATG AAA GAT AAA TTT ACG AGA	1171
354 :	N *	354
1172 :	TGT TAT GAC TTA AGA GAC TTG TCT ACA AAA TTT GAT TTA ATG TGT GTA CTT TTC ACA TCA CTA TTA TAA ACA CAA CTA TCA TCA GTT ATG	1261
1262 :	TTT CTC TGC TAG TGG TGG ATA TAC TTA TAT AGT AGT TCA TAT CAT TAT ACA CAT TTT GTT TTG TAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA	1351
1352 :	A	

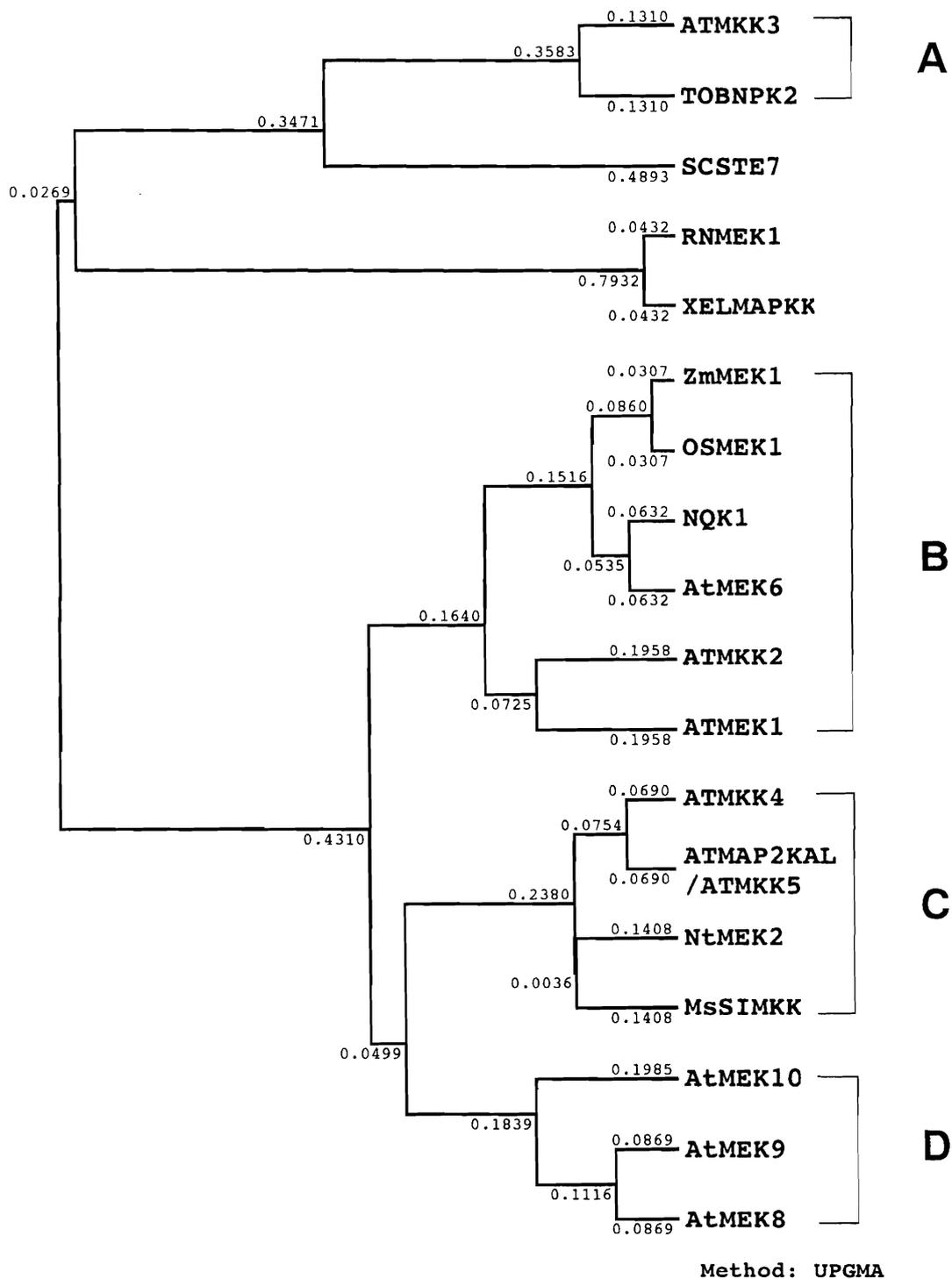
-47-

**Figure 5 The nucleotide and deduced amino acid sequences of AtMEK1**



**Table 2 Homology (%) of AtMEK1 to other MAPKKs in the catalytic domain**

MAPKK	homology (%)	
	[ amino acid ]	[ nucleic acid ]
ATMAP2KAL	44.0	51.5
TOBNPK2	44.5	54.9
SCSTE7	36.5	50.3
RNMEK1	46.6	53.5
XELMAPKK	47.1	51.1



**Figure 7 Phylogenetic analysis of MAPKs**

Plant MAPKs are classified into four different subfamilies (A - D) based on the analysis of their amino acid sequences.

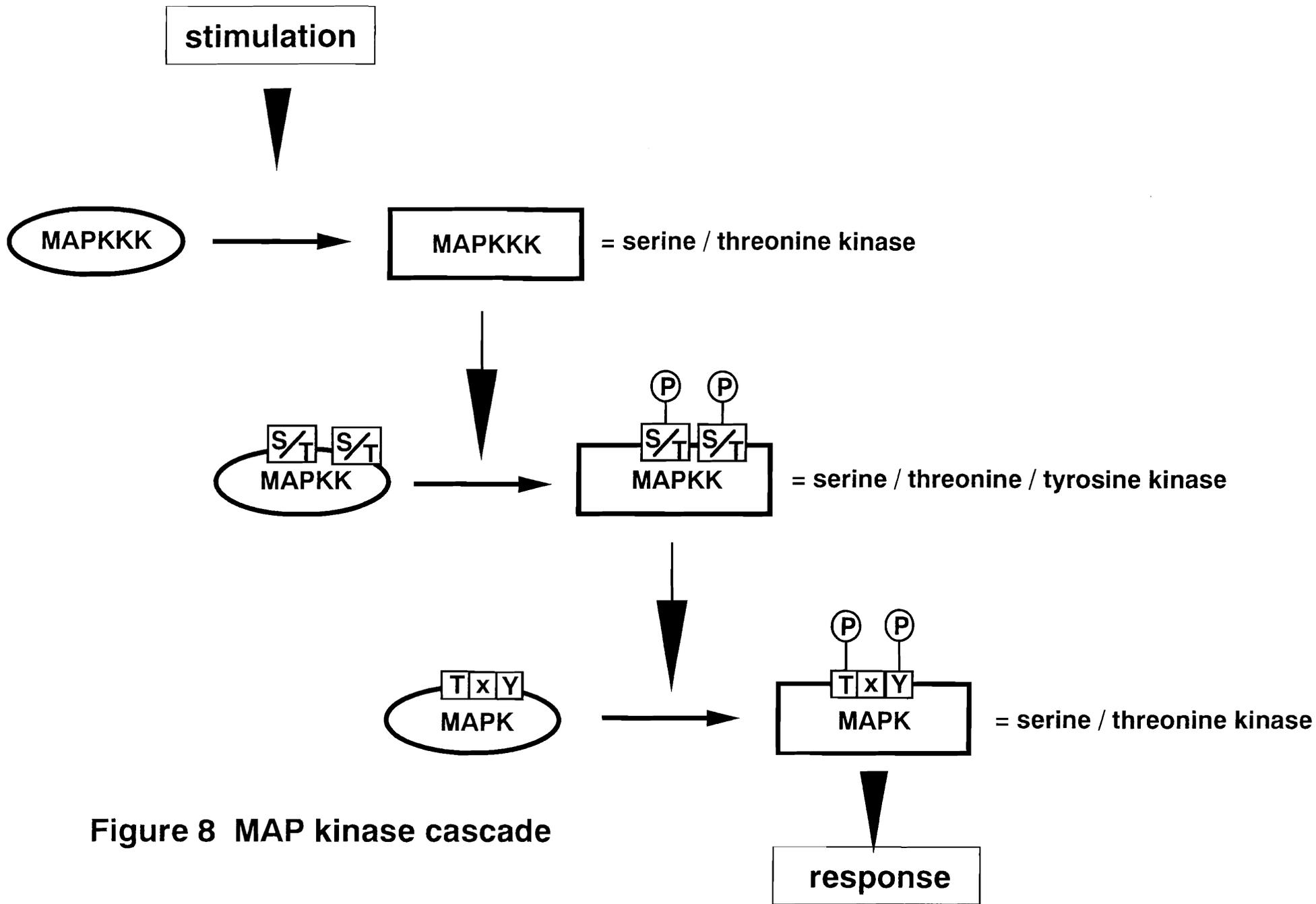


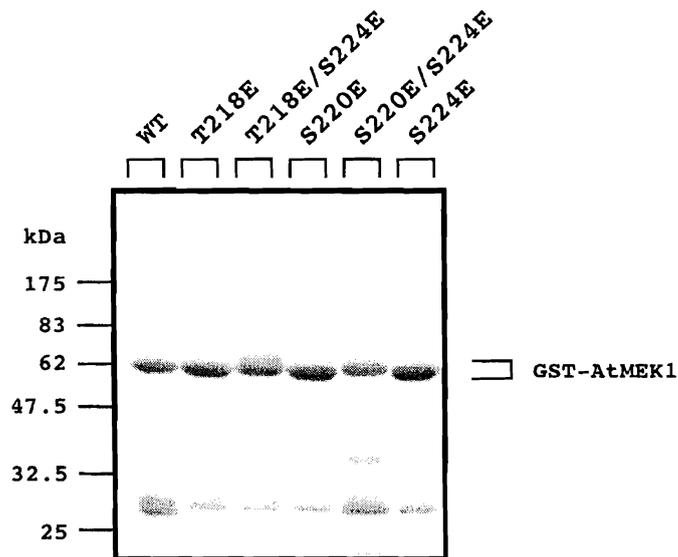
Figure 8 MAP kinase cascade



A

	218220	224
	▼	▼
WT	LT <b>ST</b> SSLANS	
T218E	LT <b>SE</b> SSLANS	
T218E/S224E	LT <b>SE</b> SSLANE	
S220E	LT <b>ST</b> SELANS	
S220E/S224E	LT <b>ST</b> SELANE	
S224E	LT <b>ST</b> SSLANE	

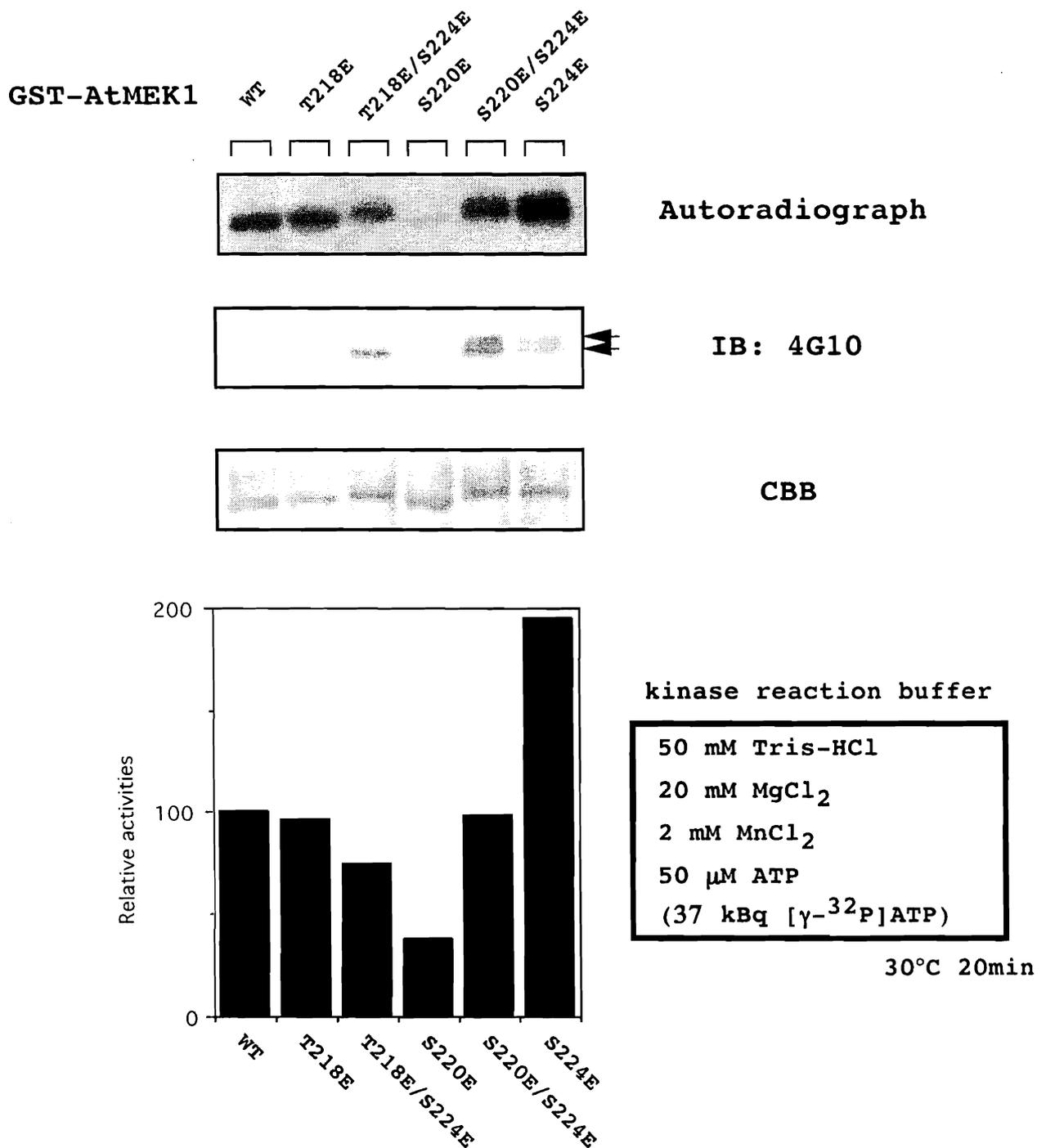
B



## Figure 10 Construction of the GST-AtMEK1 mutants and expression in *E. coli*

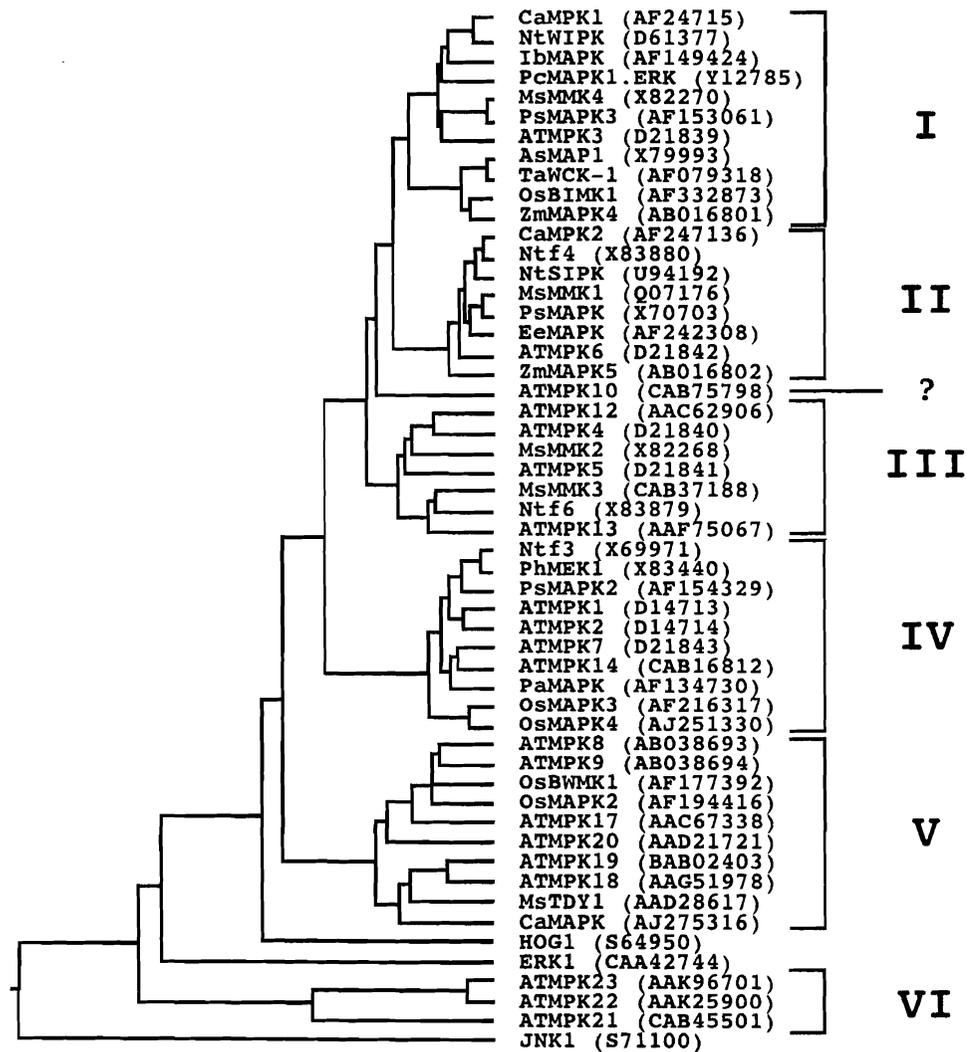
(A) Constructs of the GST-AtMEK1 mutants. The Glu residues replacing the Ser and Thr residues in the activation loop of AtMEK1 are shown in bold face. Figures above the sequences denote the amino acid residue numbers of AtMEK1.

(B) Purification of the GST-AtMEK1 mutant proteins from *E. coli*. The GST-fusion proteins produced in *E. coli* were purified by the affinity chromatography on glutathione-Sepharose. Each protein (2  $\mu$ g) was separated on SDS-PAGE, and was stained with Coomassie brilliant blue. The positions of the molecular weight marker proteins and the GST-AtMEK1 proteins are indicated. WT, the wild type GST-AtMEK1.



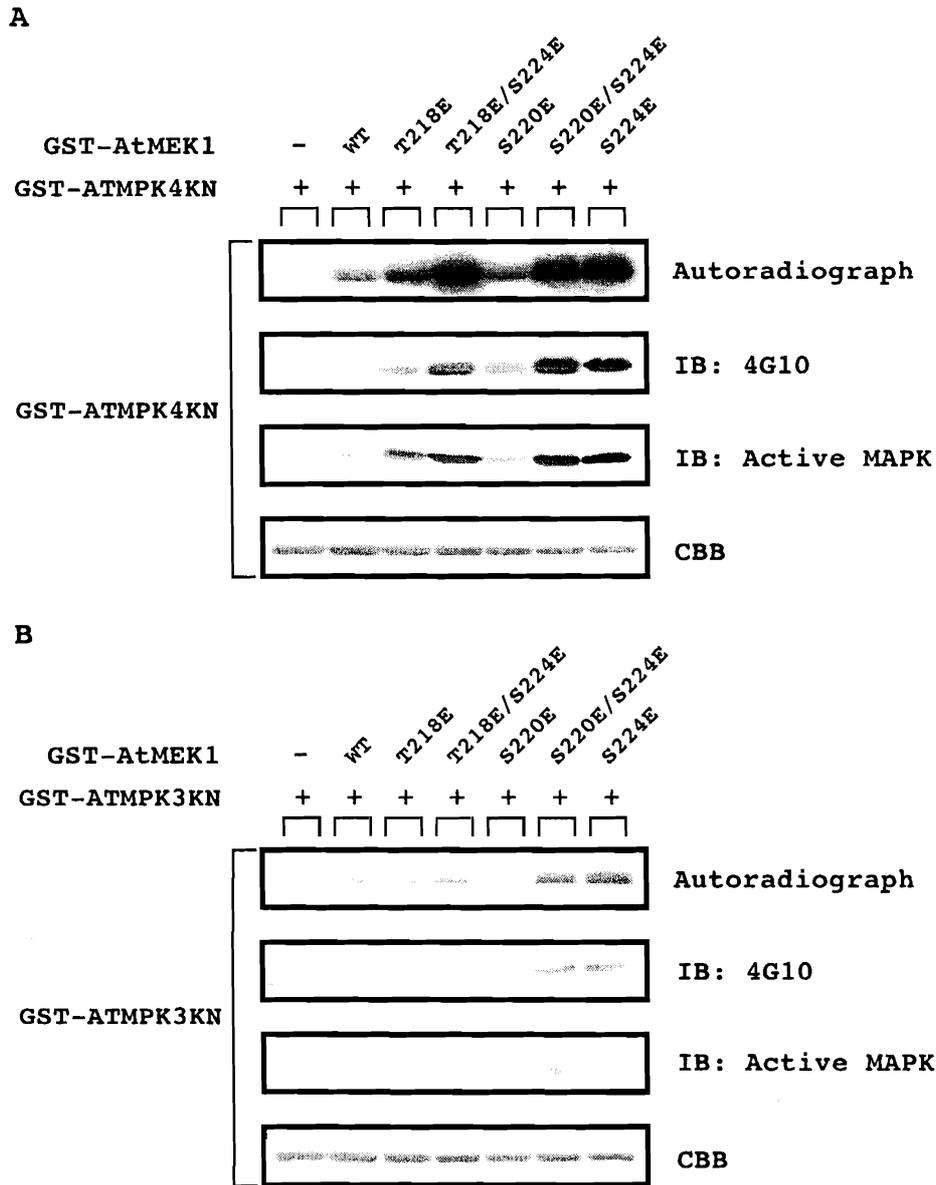
**Figure11 Autophosphorylation activity of the GST-AtMEK1 mutants**

The purified GST-AtMEK and its mutants were subjected to autophosphorylation, and aliquots of the samples were separated on SDS-PAGE followed by autoradiography (Autoradiograph), immunoblot analysis using the anti-phosphotyrosine antibody (4G10), and protein staining with Coomassie brilliant blue (CBB). Autophosphorylated bands were quantified by a Bioimaging analyzer and shown as the relative values when the wild type GST-AtMEK1 activity was adjusted to 100.



**Figure 12 Phylogenetic analysis of plant MAPKs**

Plant MAPKs are classified into six different subfamilies based on an analysis of the amino acid sequences.

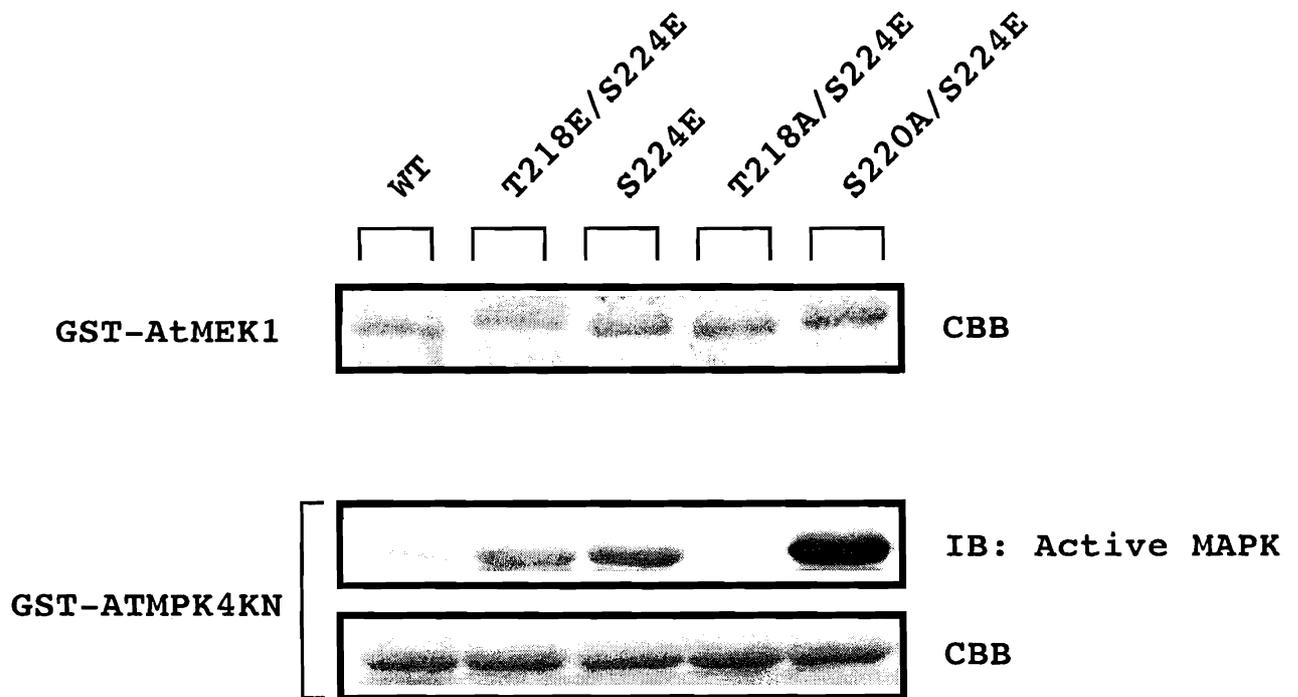


**Figure 13** *In vitro* phosphorylation of the kinase-negative GST-ATMPK4 and GST-ATMPK3 by the GST-AtMEK1 mutants

(A) Phosphorylation of GST-ATMPK4KN.

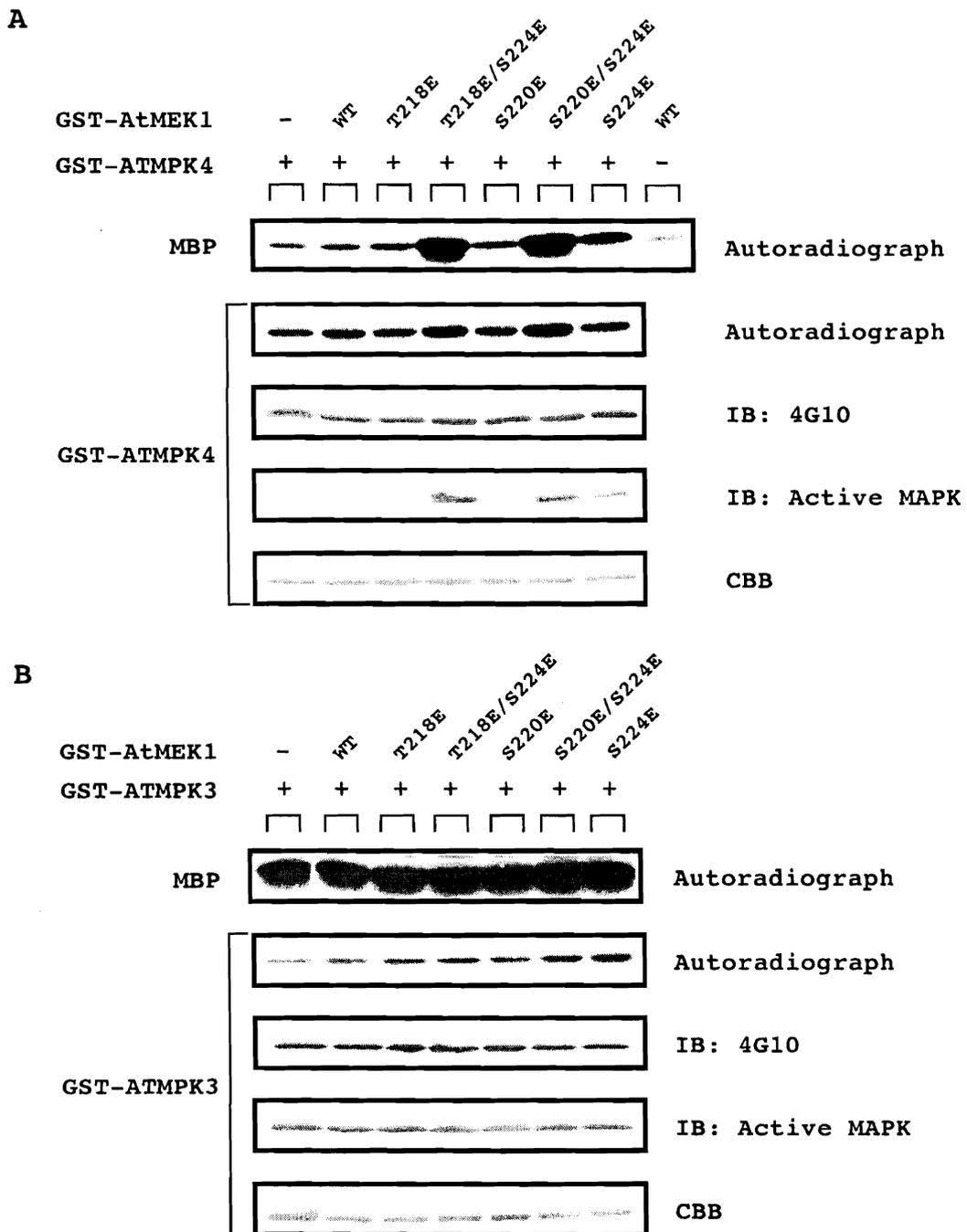
(B) Phosphorylation of GST-ATMPK3KN.

GST-ATMPK4KN and GST-ATMPK3KN were incubated with the wild type GST-AtMEK1 or each GST-AtMEK1 mutant protein in the kinase reaction mixture, and aliquots of the samples were separated on SDS-PAGE and subjected to autoradiography (Autoradiograph), immunoblot analysis (IB) using the anti-phosphotyrosine (4G10) and anti-active MAPK (Active MAPK) antibodies, and protein staining with Coomassie brilliant blue (CBB). (-), without AtMEK1; and WT, the wild type GST-AtMEK1.



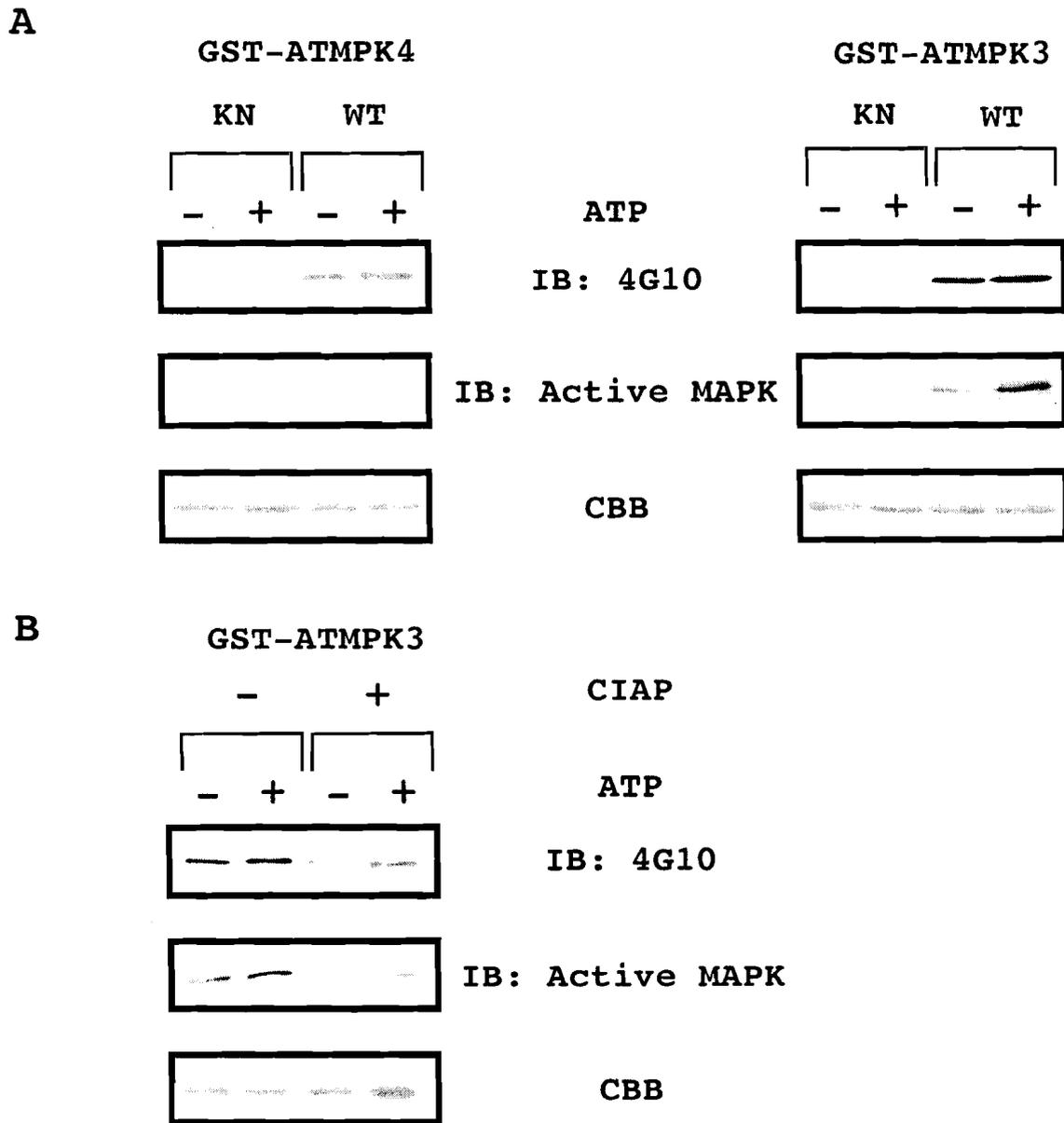
**Figure 14 The role of Thr-218 and Ser-220 on the protein kinase activity of AtMEK1**

The wild type GST-AtMEK1 and each GST-AtMEK1 mutant protein (1  $\mu$ g) were separated on SDS-PAGE, and stained with Coomassie brilliant blue (CBB) (top panel). GST-ATMPK4KN was incubated with the wild type GST-AtMEK1 or each GST-AtMEK1 mutant protein in the kinase reaction mixture, and aliquots of the samples were separated on SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis (IB) using the anti-active MAPK antibody (Active MAPK) (middle panel), and protein staining with Coomassie brilliant blue (bottom panel).



**Figure 15 Effects of incubation with the GST-AtMEK1 mutants on the protein kinase activity of GST-ATMPKs**

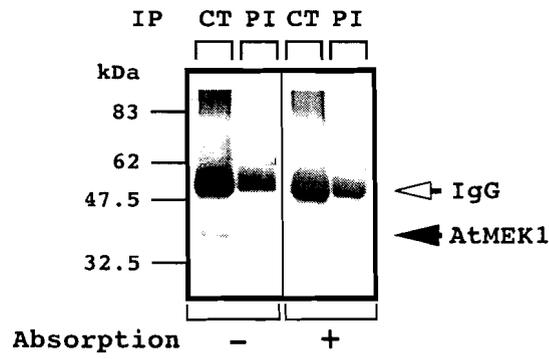
(A) Activity and phosphorylation of GST-ATMPK4. (B) Activity and phosphorylation of GST-ATMPK3. GST-ATMPK4 and GST-ATMPK3 were incubated with the wild type GST-AtMEK1 or each GST-AtMEK1 mutant protein in the kinase reaction mixture containing myelin basic proteins (MBP), and aliquots of the samples were separated on SDS-PAGE and subjected to autoradiography (Autoradiograph), immunoblot analysis (IB) using the anti-phosphotyrosine (4G10) and anti-active MAPK (Active MAPK) antibodies, and protein staining with Coomassie brilliant blue (CBB). (-), without AtMEK1; and WT, the wild type GST-AtMEK1.



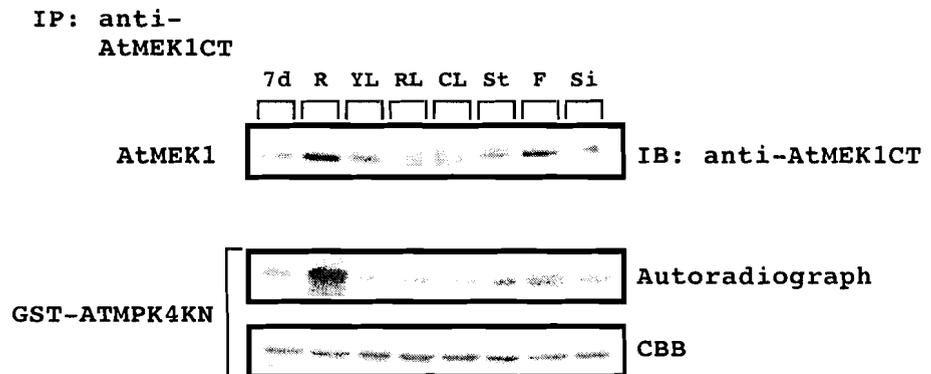
**Figure 16 The autophosphorylating activity of GST-ATMPKs**

(A) Autophosphorylation of GST-ATMPK4 and GST-ATMPK3. GST-ATMPK4 and GST-ATMPK3 were incubated in the kinase reaction mixture in the presence or absence of ATP. Aliquots of the samples were separated on SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis (IB) using the anti-phosphotyrosine (4G10) and anti-active MAPK (Active MAPK) antibodies, and protein staining with Coomassie brilliant blue (CBB). KN, the kinase-negative GST-ATMPK; and WT, the wild type GST-ATMPK. (B) Effect of the phosphatase treatment on the GST-ATMPK3 activity. GST-ATMPK3 was incubated with or without calf intestine alkaline phosphatase (CIAP), and was immunoprecipitated with the anti-GST antibody. The immunoprecipitates were incubated in the kinase reaction mixture in the presence or absence of ATP. Aliquots of the samples were separated on SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis and protein staining as in (A).

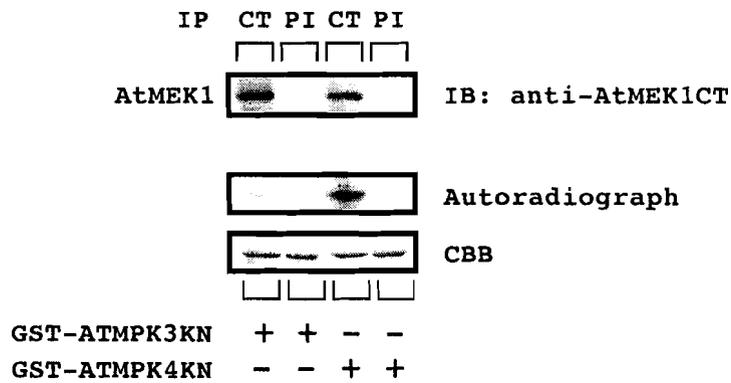
A



B

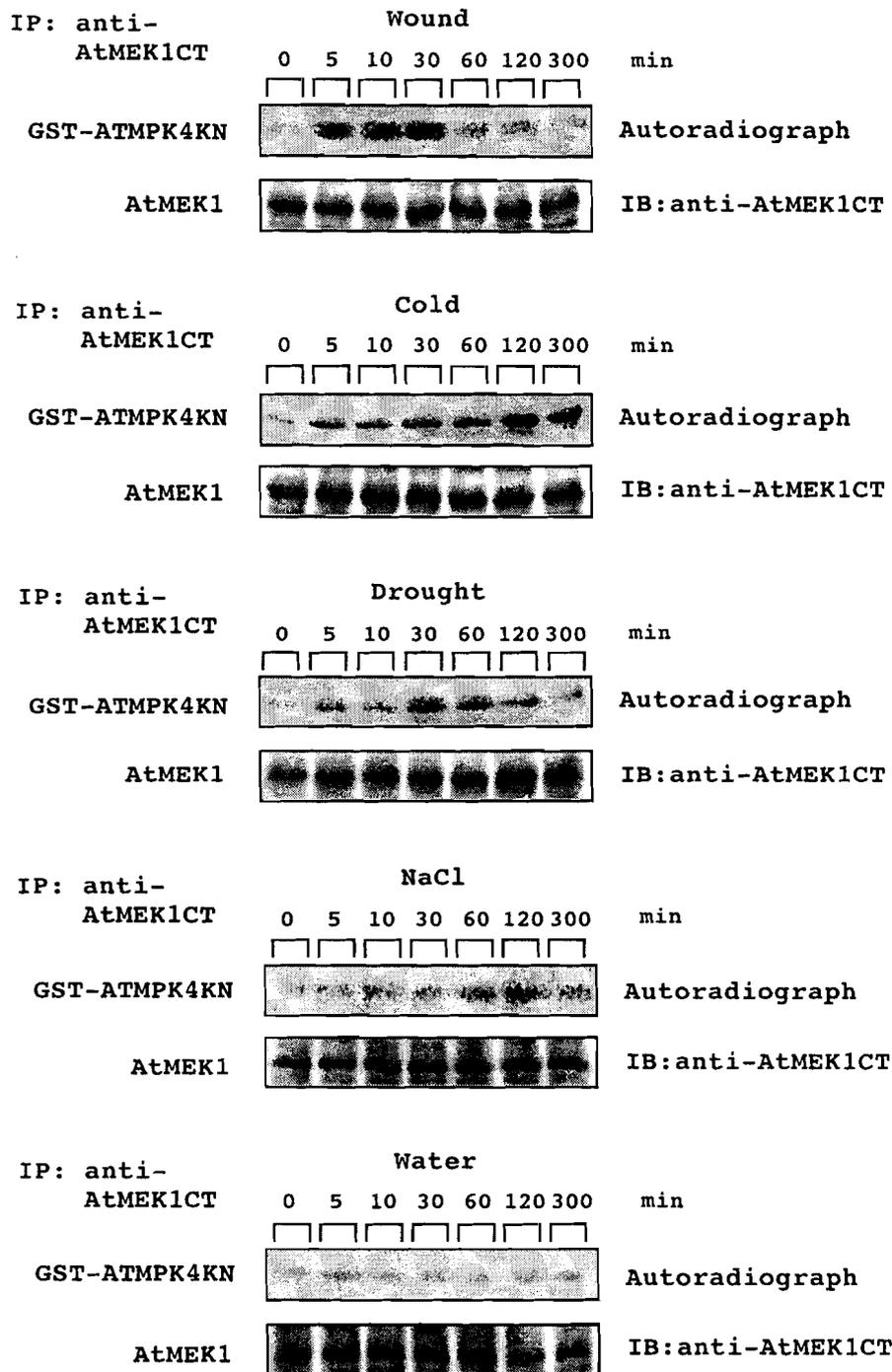


C



**Figure 17 Expression of the AtMEK1 protein in *Arabidopsis* organs**

- (A) The specificity of the anti-AtMEK1CT antibody.  
 (B) Immunoblot and the protein kinase activity of AtMEK1.  
 7d, seventh-day seedling; R, roots; YL, young leaves; RL, rosette leaves;  
 CL, cauline leaves; St, stems; F, flowers; and Si, siliques.  
 (C) The substrate specificity of AtMEK1.



**Figure 18 Stress-induced activation of AtMEK1 in *Arabidopsis* seedlings**

AtMEK1 was immunoprecipitated (IP) from *Arabidopsis* seventh-day seedlings treated with either wounding, cold, drought, NaCl, or water for indicated time. Aliquots of the immunoprecipitates were incubated in the kinase reaction mixture containing GST-ATMPK4KN. After the phosphorylation reaction, the samples were separated on SDS-PAGE and subjected to autoradiography (Autoradiograph). Immunoblot analysis of the immunoprecipitates was carried out by using the anti-AtMEK1CT antibody (IB).

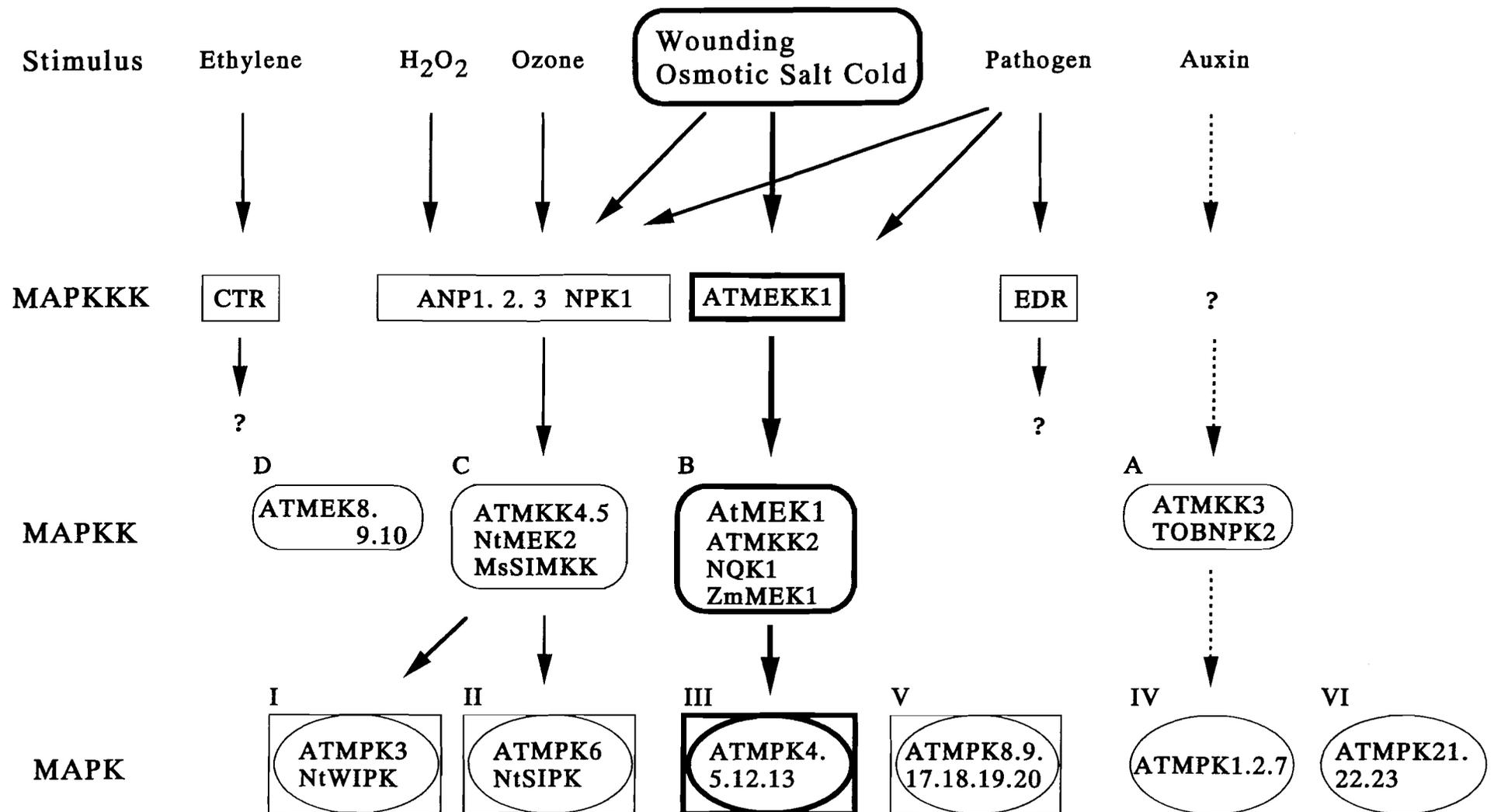


Figure 19 Various MAPK cascades and their roles in plant

## 参考文献

- Ahn, A.G. (1993) The MAP kinase cascade. Discovery of a new signal transduction pathway. *Mol. Cell Biochem.* **127/128**, 201-209.
- Alderson, A., Sabelli, P.A., Dickinson, J.R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Shewry, P.R. and Halford, N.G. (1991) Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by plant protein kinase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8602-8605.
- Bouly, J.-P., Gissot, L., Lessard, P., Kreis, M. and Thomas, M. (1999) *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKIN $\alpha$ 1, an SNF1-like protein kinase. *Plant J.* **18**, 541-550.
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. and Marshall, C.J. (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*, **77**, 841-852.
- Desikan, R., Hancock, T.J., Icimura, K., Shinozaki, K. and Neill, S.T. (2001) Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol.* **126**, 1579-1587.
- Ferrando, A., Koncz-Kálmán, Z., Farrás, R., Tiburcio, A., Schell, J. and Koncz, C. (2001) Detection of in vivo protein interactions between Snf1-related kinase subunits with intron-tagged epitope-labelling in plants cells. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3685-3693.
- Fukami, Y., Sato, K.-I., Ikeda, K., Kamisango, K., Koizumi, K. and Matsuno, T. (1993) Evidence for autoinhibitory regulation of the c-src gene product. *J. Biol. Chem.* **268**, 1132-1140.
- Halford, N.G. and Hardie, D.G. (1998) SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol. Biol.* **37**, 735-748.
- Halfter, U., Ishitani, M. and Zhu, J.-K. (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3735-3740.

- Hanks, S.K. and Quinn, A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* **200**, 38-62.
- Hardie, D.G., Carling, D. and Carlson, M. (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: Metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 821-855.
- Hardie, D.G. (1999) Plant protein serine/threonine kinase: classification and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 97-131.
- Hardin, S.C. and Woiniak, S.M. (1998) Molecular cloning and characterization of maize ZmMEK1, a protein kinase with catalytic domain homologous to mitogen- and stress-activated protein kinase kinase. *Planta*, **206**, 577-584.
- Huang, Y., Li, H., Gupta, R., Morris, P.C., Luan, S. and Kieber, J.J. (2000) ATMPK4, an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated *in vitro* by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiol.* **122**, 1301-1310.
- Ichikawa, T., Suzuki, Y., Czaja, I., Schommer, C., Lebnick, A., Schell, J. and Walden, R. (1997) Identification and role of adenylyl cyclase in auxin signalling in higher plants. *Nature*, **390**, 698-701.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Hayashida, N., Seki, M. and Shinozaki, K. (1998a) Molecular cloning and characterization of three cDNAs encoding putative mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKs) in *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* **5**, 341-348.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Morris, P., Giraudat, J., Matsumoto, K. and Shinozaki, K. (1998b) Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 532-543.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T. and Shinozaki, K., (2000) Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* **24**, 1-13.
- Jonak, C., Ligterink, W. and Hirt, H. (1999) MAP kinase in plant signal transduction. *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 204-213.

- Jouannic, S., Hamal, A., Keris, M. and Henry, Y. (1996) Molecular cloning of an *Arabidopsis thaliana* MAP kinase kinase-related cDNA (Accession No. Y07694) (PGR 96-098). *Plant Physiol.* **112**, 1397.
- Kemp, B.E., Mitchelhill, K.I., Stapleton, D., Michell, B.J., Chen, Z.P. and Witters, L.A. (1999) Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 22-25.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A. and Ecker, J.R. (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, **72**, 427-441.
- Kiegerl, S., Cardinale, F., Siligan, C., Gross, A., Baudouin, E., Liwosz, A., Eklöf, S., Till, S., Bögre, L., Hirt, H. and Meskiene, I. (2000) SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell*, **12**, 2247-2258.
- Kosako, H., Nishida, E. and Gotoh, Y. (1993) cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeasts to vertebrates. *EMBO J.* **12**, 787-794.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G. and Sheen, J. (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2940-2945.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lawton, M.A., Yamamoto, R.T., Hanks, S.K. and Lamb, C.J. (1989) *Proc. Natl. Acad. USA*, **86**, 3140.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C. S. and Zhu, J.-K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3730-3734.
- Mansour, S.J., Matten, W.T., Hermann, A.S., Candia, J.M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G.F. and Ahn, N.G. (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*, **265**, 966-970.

- Marshall, C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, **80**, 179-185.
- Mizoguchi, T., Gotoh, Y., Nishida, E., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Iwasaki, T., Kamada, H. and Shinozaki, K. (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J.* **5**, 111-122.
- Mizoguchi, T., Hayashida, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kamada, H. and Shinozaki, K. (1993) ATMPKs: a gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **336**, 440-444.
- Mizoguchi, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Harada, H., and Shinozaki, K. (1995) Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **358**, 199-204.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., Irie, K., Morris, P., Giraudat, J., Matsumoto, K. and Shinozaki, K. (1998) Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS Lett.* **437**, 56-60.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K. and Shinozaki, K. (1997) Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). *Trends Biotechnol.* **15**, 15-19.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K. and Shinozaki, K. (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 765-769.
- Morris, P.C., Guerrier, D., Leung, J. and Giraudat, J. (1997) Cloning and characterization of MEK1, an *Arabidopsis* gene encoding a homologue of MAP kinase kinase. *Plant Mol. Biol.* **35**, 1057-1064.
- Muranaka, T., Banno, H. and Machida, Y. (1994) Characterization of tobacco protein kinase NPK5, a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 that constitutively activates expression of the glucose-repressible SUC2 gene for a secreted invertase of *S. cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2958-2965.

- Nanmori, T., Taguchi, W., Kinugasa, M., Oji, Y., Sahara, S., Fukami, Y. and Kikkawa, U. (1994) Purification and characterization of protein kinase C from a higher plant, *Brassica campestris* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 311-318.
- Nishida, E. and Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* **4**, 128-131.
- Nishihama, R., Banno, H., Kawahara, E., Irie, K. and Machida, Y. (1997) Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of *Arabidopsis* ANP1 that is related to mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAPKKKs). *Plant J.* **12**, 39-48.
- Nishihama, R., Banno, H., Shibata, W., Hirano, K., Nakashima, M., Usami, S. and Machida, Y. (1995) Plant homologues of components of MAPK (mitogen activated protein kinase) signal pathways in yeast and animal cells. *Plant Cell Physiol.* **36**, 749-757.
- Nishihama, R., Ishikawa, M., Araki, S., Soyano, T., Asada, T. and Machida, Y. (2001) The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes Dev.* **15**, 352-363.
- Nühse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H. and Boller, T. (2000) Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK6. *J. Biol. Chem.* **275**, 7521-7526.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B. and Mundy, J. (2000) *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, **103**, 1111-1120.
- Sano, H. and Youssefian, S. (1994) Light and nutritional regulation of transcript encoding a wheat protein kinase homolog is mediated by cytokinins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2582-2586.
- Seeger, R. and Krebs, E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735.
- Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H. and Ohashi, Y. (1995) Tobacco MAP kinase: A possible mediator in wound signal transduction pathways, *Science*, **270**, 1988-1992.

- Shibata, W., Banno, H., Ito, Y., Hirano, K., Irie, K., Usami, S., Machida, C. and Machida, Y. (1995) A tobacco protein kinase, NPK2, has a domain homologous to a domain found in activator of mitogen-activated protein kinases (MAPKKs). *Mol. Gen. Genet.* **246**, 401-410.
- Teague, M.A., Chaleff, D.T. and Errede, B. (1986) Nucleotide sequence of the yeast regulatory gene STE7 predicts a protein homologous to protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7371-7375.
- Waskiewicz, A.J. and Cooper, J.A. (1995) Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 798-805.
- Wu, J., Harrison, J.K., Vincent, L.A., Haystead, C., Haystead, T.A.J., Michel, D.F., Lynch, K.R. and Sturgill, T.W. (1993) Molecular structure of a protein-tyrosine/threonine kinase activating p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase: MAP kinase kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 173-177.
- Yang, K.-Y., Liu, Y. and Zhang, S. (2001) Activation of mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 741-746.
- Xing, T., Malik, K., Martin, T., and Miki, B.L. (2001) Activation of tomato PR and wound-related genes by a mutagenized tomato MAP kinase kinase through divergent pathways. *Plant Mol. Biol.* **46**, 109-120.
- Zhang, S.-H., Broome, M.A., Lawton, M.A., Hunter, T., Lamb, C.J. (1994) atpk1, a novel ribosomal protein kinase gene from Arabidopsis. II. Functional and biochemical analysis of the encoded protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 17593-17599.
- Zhang, S.-H., Lawton, M.A., Hunter, T., and Lamb, C.J. (1994) atpk1, a novel ribosomal protein kinase gene from Arabidopsis. I. Isolation, characterization, and expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 17586-17592.
- Zhang, S., and Klessig, D.F. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trend Plant Sci.* **6**, 520-527.

## 掲載論文

Daisuke Matsuoka, Takashi Nanmori, Ken-ichi Sato, Yasuo Fukami, Ushio Kikkawa, and Takeshi Yasuda

Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, *in vitro* and *in vivo*: Analysis of active mutants expressed in *Escherichia coli* and generation of the active form in stress response in seedlings.

*The Plant Journal*, (in press)

## 謝辞

本研究を遂行及びまとめるにあたり、多くの御助言、御指導を賜りました神戸大学農学部 南森隆司先生に謹んで感謝の意を表します。また実験の場を提供して頂き、多くの御助言、激励を頂きました神戸大学バイオシグナル研究センター 吉川 潮先生に心より御礼申し上げます。更に本論文の審査をして頂くとともに御指導を賜りました神戸大学農学部 安田武司先生深く感謝致します。

本論文の審査をして頂きました神戸大学遺伝子実験センター 大川秀郎先生、神戸大学バイオシグナル研究センター 小野功貴先生に深く感謝致します。

抗体の作製をして頂くとともに、多くの御助言を賜りました神戸大学理学部 深見泰夫先生、神戸大学遺伝子実験センター 佐藤賢一先生に厚く御礼申し上げます。

多くの御助言、励ましを頂きました神戸大学バイオシグナル研究センター 小西博昭先生、松崎秀紀先生、山本利義先生、神戸大学遺伝子実験センター 岩崎哲史氏に深く感謝致します。また多くの協力を頂きました神戸大学バイオシグナル研究センター 地代淳子さん、共に研究を行ってきた南森研究室の皆さま、熱帯植物学研究室の皆さまに御礼申し上げます。

最後にこれまで様々な面で支えて頂いた両親、兄妹、恋人、友人に深く感謝致します。

平成14年1月  
松岡 大介