



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。



【367】

氏名・(本籍) 松岡 大介 (京都府)

博士の専攻分野の名称 博士 (農学)

学位記番号 博い第56号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成14年3月31日

【学位論文題目】

高等植物 *Arabidopsis thaliana* における

MAPK カスケードの同定とその意義

審査委員

主査 教授 大川 秀郎

教授 小野 功貴 教授 安田 武司

助教授 南森 隆司

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 ATPMK4 及び ATPMK6 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 ATPMK3 及び ATPMK6 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 ATPMK4 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 ATPMK4 及び ATPMK6 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 ATPMK2 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 ATPMK4 特異的に強いリン酸化酵素活性を示したが、S220E/S224E は ATPMK4 だけでなく ATPMK3 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 ATPMK4 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、イムノプ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、ロゼット葉や莖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 ATPMK3 より ATPMK4 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

(氏名: 松岡 大介 NO. 3)

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。

氏名	松岡 大介		
論文題目	高等植物 <i>Arabidopsis thaliana</i> における MAPK カスケードの同定とその意義		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	大川 秀郎
	副査	教授	小野 功貴
	副査	教授	安田 武司
	副査	助教授	南森 隆司
副査			
要 旨			
<p>概要 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, MAPKK, 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、ファミリーを形成している。動物や酵母のMAPKは活性化ループに存在するTXY配列のスレオニン及びチロシン残基の両方をその上流キナーゼ(MAPKK)によりリン酸化され活性化する。またこのTXY配列は全ての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ス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する。植物におけるMAPKカスケードは種々の植物ホルモンあるいは細胞外からの刺激の伝達における役割について研究されてきた。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。一般に、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/TxxxxS/Tという配列が保存されている。ところが、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)という動物型とも植物型ともとれる配列を有していた。そこで、これらのス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の活性化に必要な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。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、基質特異性が高かったが、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。</p>			

氏名 松岡 大介

また、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。かくして、AtMEK1 の関与する MAPK カスケードの生化学的同定がなされた。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 活性型 MAPKK を同定した。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、高塩ストレスをそれぞれの時間与え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 でイムノプロットした結果、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。以上のように、本研究は高等植物シロイヌナズナの MAPK カスケード系を生化学的に最初に同定し、かつ、その植物細胞内でのストレス応答時の活性化の意義を研究したものであり、シグナル伝達機能を改変することによるストレス耐性植物作出の可能性について重要な知見をえたものとして価値ある集積であると認める

よって、学位申請者の松岡 大介は、博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。