



シロイヌナズナタンパク質リン酸化酵素MEKK1による 環境応答シグナリングに関する研究

古谷, 朋之

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2014-03-25

(Date of Publication)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6026号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006026>

※ 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

シロイヌナズナタンパク質リン酸化酵素 MEKK1 による
環境応答シグナリングに関する研究

平成 26 年 2 月

神戸大学大学院農学研究科

古谷 朋之

目次

目次	i
図表リスト.....	vi
要旨	1
略語説明	4
総合緒論	5
第 1 章 MEKK1 タンパク質の機能解析	16
1A. 緒論	17
1B. 材料と方法	20
1B.1. 大腸菌発現ベクターの構築	
1B.1.1. インサート断片の作製	
1B.1.2. アガロースゲル電気泳動	
1B.1.3. インサート断片の制限酵素処理	
1B.1.4. アガロースゲルからの DNA 断片の回収	
1B.1.5. ベクターの調製	
1B.1.6. ライゲーション	
1B.1.7. 大腸菌への形質転換	
1B.1.8. コンピテントセルの調製	
1B.1.9. プラスミド抽出	
1B.1.10. シークエンス	
1B.1.11. 部分欠損変異体 ($\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ 、KD、1-166、1-332) の作製	
1B.1.12. 不活性型変異体 (KN、KDKN) の作製	
1B.1.13. チロシン変異型 (Y38F、Y84F、Y204F、Y323F) の作製	
1B.2. GST融合タンパク質の発現、精製及び、定量	
1B.2.1. 大腸菌での発現	
1B.2.2. GST融合タンパク質の精製	
1B.2.3. タンパク質の定量	
1B.2.4. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	

1B.2.5. CBB染色	
1B.3. イムノブロット	
1B.4. タンパク質脱リン酸化処理	
1B.5. リン酸化酵素活性測定	
1B.6. Two-hybrid用ベクターの構築	
1B.7. 酵母の形質転換および His ⁻ 選択培地による相互作用の確認	
1C. 結果	50
1C.1. 大腸菌発現 GST-MEKK1 タンパク質の特徴	
1C.2. GST-MEKK1 の MAPKK に対するリン酸化酵素活性	
1C.3. MEKK1 と MAPKK の相互作用	
1C.4. MEKK1 の N 末端領域によるリン酸化酵素活性の阻害	
1C.5. GST-MEKK1 のリン酸化アミノ酸残基	
1C.6. GST-MEKK1 のチロシンリン酸化	
1C.7. チロシン変異型 MEKK1 と MAPKK との相互作用	
1D. 考察	70
1D.1. 大腸菌発現 GST-MEKK1 タンパク質のリン酸化修飾	
1D.2. MEKK1 の基質選択性	
1D.3. MEKK1 のリン酸化酵素活性制御における N 末端領域の役割	
1D.4. MEKK1 のチロシンリン酸化の役割	
第 2 章 MEKK1 を介した低温シグナル伝達経路	76
2A. 緒論	77
2B. 材料と方法	80
2B.1. シロイヌナズナの栽培	
2B.2. シロイヌナズナ低温処理	
2B.3. 植物細胞抽出液の調製	
2B.4. 免疫沈降	
2B.5. イムノブロット	
2B.6. 大腸菌発現ベクターの構築	
2B.7. GST融合タンパク質の発現、精製及び、定量	
2B.8. リン酸化酵素活性測定	

2B.8.1. 免疫沈降したMEKK1及びMPK4のリン酸化酵素活性測定	
2B.8.2. 植物細胞抽出液のリン酸化酵素活性測定	
2B.8.3. GST-CRLK1のリン酸化酵素活性測定	
2C. 結果	87
2C.1 低温シグナリングにおける MEKK1 の活性化	
2C.2. 低温における Ca ²⁺ シグナリングを介した MEKK1 のリン酸化	
2C.3. CRLK1 による MEKK1 のリン酸化	
2D. 考察	96
2D.1. 低温シグナリングにおける MEKK1 を介した MAPK カスケードの役割	
2D.2. 低温シグナリングにおける MEKK1 の活性制御機構	
2D.3. 低温シグナリングにおける MEKK1 上流経路	
第3章 低温感受における細胞膜流動性の役割	99
3A. 結論	100
3B. 材料と方法	102
3B.1. シロイヌナズナ実生の DMSO および Benzyl Alcohol 処理	
3B.2. リン酸化酵素活性測定	
3B.2.1. 植物細胞抽出液のリン酸化酵素活性測定	
3B.2.2. 免疫沈降したMPK4のリン酸化酵素活性測定	
3B.3. イムノプロット	
3B.4. 凍結耐性測定	
3C. 結果	104
3C.1. 低温における細胞膜流動性の低下を介した MEKK1 のリン酸化	
3C.2. 低温における細胞膜流動性の低下を介した MPK4 の活性化	
3C.3. 細胞膜流動性の低下による凍結耐性の獲得	
3D. 考察	112
3D.1. 低温における細胞膜流動性の低下を介した MEKK1-MKK2-MPK4 カスケードの活性化	
3D.2. シロイヌナズナの低温馴化における細胞膜流動性低下の役割	
第4章 3xFLAG-MEKK1過剰発現植物の作製	115

4A. 結論	116
4B. 材料と方法	117
4B.1. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の作製	
4B.1.1. 3xFLAG-MEKK1 発現ベクターの作製	
4B.1.2. Three-way mating 法による形質転換アグロバクテリウムの作製	
4B.1.3. 形質転換用の植物の栽培方法	
4B.1.4. アグロバクテリウム懸濁液の準備	
4B.1.5. 減圧湿潤法による感染	
4B.1.6. 形質転換体の選抜	
4B.2. ゲノム DNA 精製およびゲノム PCR	
4B.3. RT-PCR による遺伝子発現解析	
4B.3.1. total RNA 抽出	
4B.3.2. RNA の濃度定量及び純度検定	
4B.3.3. 1st strand cDNA の合成	
4B.3.4. PCR による遺伝子発現解析	
4B.4. イムノブロットによるタンパク質の発現解析	
4B.5. トランスジェニック植物の成長パターン解析	
4B.6. 凍結耐性	
4C. 結果	130
4C.1. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現シロイヌナズナの作製	
4C.2. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物における MEKK1 遺伝子発現解析	
4C.3. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物における 3xFLAG-MEKK1 タンパク質 発現解析	
4C.4. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の形態	
4C.5. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の凍結耐性	
4D. 考察	140
4D.1. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の特徴	
4D.2. MEKK1 タンパク質の量的制御	
総合考察	143
環境応答における MEKK1 を介したシグナル伝達	143
今後の展望	144

引用文献	146
論文目録	158
参考論文	159
謝辞	160

図表リスト

Fig. 1 植物の環境応答	9
Fig. 2 MAPK カスケード	10
Fig. 3 植物の MAPKKK の分類	11
Fig. 4 MEKK1、MKK1/MKK2、MPK4 遺伝子欠損植物の表現形	12
Fig. 5 MEKK1 下流 MAPKK、MKK1 及び MKK2 のストレスによる活性化	13
Fig. 6 これまでに報告されている MEKK1 シグナル伝達経路	14
Fig. 7 本研究の概略図	15
Fig. 8 MEKK1 のドメイン構造とアミノ酸配列	19
Fig. 9 GST 融合タンパク質発現用ベクター-pGEX のベクターマップ	25
Fig. 10 GST 融合タンパク質の発現及び精製	35
Fig. 11 酵母 Two-hybrid 用ベクター-pAD のベクターマップ	44
Fig. 12 酵母 Two-hybrid 用ベクター-pBD のベクターマップ	45
Fig. 13 酵母 Two-hybrid 法について	49
Fig. 14 大腸菌発現系で調製した GST 融合 MEKK1 タンパク質の模式図	51
Fig. 15 大腸菌発現系で調製した GST-MEKK1 タンパク質	52
Fig. 16 GST-MEKK1 の脱リン酸化処理	53
Fig. 17 植物 MAPKK の分類	55
Fig. 18 大腸菌発現系により調製した GST-MEKK1 KD による MAPKK への リン酸化酵素活性測定	56
Fig. 19 大腸菌発現系により調製した GST-MEKK1 のリン酸化酵素活性測定	57
Fig. 20 MEKK1 と MAPKK の酵母 Two-hybrid 法による相互作用の解析	59
Fig. 21 MEKK1 との相互作用における MKK1 及び MKK2 のリン酸化状態の影響	60
Fig. 22 N 末端領域存在下における MEKK1 KD のリン酸化酵素活性測定	62
Fig. 23 N 末端領域存在量と MEKK1 KD のリン酸化酵素活性	63
Fig. 24 GST-MEKK1 のリン酸化修飾	65
Fig. 25 チロシン変異型 MEKK1 タンパク質の模式図	67
Fig. 26 チロシン変異型 GST-MEKK1 のリン酸化修飾	68
Fig. 27 チロシン変異型 GST-MEKK1 のリン酸化酵素活性測定	68
Fig. 28 チロシン変異型 MEKK1 と MKK1 及び MKK2 との相互作用解析	69
Fig. 29 低温処理シロイヌナズナ芽生えから免疫沈降した MEKK1 の	

リン酸化酵素活性測定	88
Fig. 30 低温処理シロイヌナズナ芽生えから免疫沈降した MPK4 の リン酸化酵素活性測定	89
Fig. 31 低温処理シロイヌナズナ芽生え由来細胞抽出液による MEKK へのリン酸化 ..	90
Fig. 32 低温処理シロイヌナズナ芽生え由来細胞抽出液による MKK へのリン酸化 ..	92
Fig. 33 CRLK1 のドメイン構造	94
Fig. 34 大腸菌発現系により調製した CRLK1 による MEKK へのリン酸化	95
Fig. 35 アルファルファプロトプラストを用いた細胞膜流動性の測定	101
Fig. 36 細胞膜硬化剤 DMSO 処理シロイヌナズナ芽生え由来細胞抽出液による MEKK1 及び MKK のリン酸化	105
Fig. 37 細胞膜流動化剤 Benzyl Alcohol 処理シロイヌナズナ芽生え由来 タンパク質抽出液による MEKK1 及び MKK のリン酸化	106
Fig. 38 細胞膜硬化剤 DMSO 処理シロイヌナズナ芽生えから免疫沈降した MPK4 のリン酸化酵素活性測定	108
Fig. 39 細胞膜流動化剤 Benzyl Alcohol 処理シロイヌナズナ芽生えから免疫沈降した MPK4 のリン酸化酵素活性測定	109
Fig. 40 細胞膜硬化剤及び細胞膜流動化剤による凍結耐性への影響	111
Fig. 41 低温における MEKK1 を介したシグナル伝達経路のモデル図	114
Fig. 42 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の作製に用いた発現ベクター	118
Fig. 43 ゲノム PCR 及び RT-PCR に用いたプライマー	123
Fig. 44 ゲノム PCR による 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の遺伝子導入の確認	131
Fig. 45 3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物における MEKK1 遺伝子の発現解析 ..	132
Fig. 46 3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物における MEKK1 遺伝子の発現解析	132
Fig. 47 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物における 3xFLAG-MEKK1 タンパク質 の発現解析	134
Fig. 48 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の形態	136
Fig. 49 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の成長解析	137
Fig. 50 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の凍結耐性	139

要旨

温暖化、砂漠化、オゾン層の破壊等による地球規模の環境悪化、世界各地で起こっている異常気象等、地球環境問題は農業に多大な被害を及ぼしており、植物の劣悪な環境に対する耐性機構の究明は重要な課題である。植物は、温度、湿度、光、土壌成分などの環境の変化に応じてストレス応答遺伝子の発現や植物ホルモン等の生理活性物質の生成などを行うことで環境への適応を試みる。その際に、環境変化の受容から応答に至るまでを繋ぐ役割を担っているのが細胞内シグナル伝達機能であり、その経路や分子メカニズムの解明はストレス耐性植物の作出の観点からも重要である。それらの機能の中でも MAPK、MAPKK、MAPKKK という三種類のタンパク質リン酸化酵素によって構成される MAPK カスケードは様々な細胞機能の制御に関わるシグナル伝達系として知られている。本研究の対象であるシロイヌナズナの MEKK1 は MAPKKK の一つであり、相互作用解析などから、MAPKK である MKK1 及び MKK2 を下流因子とすると考えられている。MKK1 が傷害や病害ストレスにより活性化すること、MKK2 が低温や高塩ストレスにより活性化することから、これらのシグナルが MEKK1 を介して、MKK1 又は MKK2 へ選択的に伝達されると考えられているが、それぞれのシグナルが MEKK1 に至るまでの上流伝達経路や MEKK1 の活性制御および基質選択のメカニズムに関する知見はほとんどない。また、低温などの環境ストレス下にある植物体内での MEKK1 活性の検出もほとんどなされていない。

そこで本研究では、MEKK1 の活性制御機構や MEKK1 を介した低温シグナル伝達経路、さらに低温感受メカニズムの解明を試みている。第 1 章では、大腸菌発現系により様々なコンストラクトの MEKK1 タンパク質を調製し、そのリン酸化酵素活を測定することで活性制御や基質選択のメカニズムを調べている。第 2 章では、MEKK1 の関与が示唆されている低温馴化に着目し、低温処理シロイヌナズナにおける MEKK1 の活性制御やシグナル伝達経路について検討を行っている。特に Ca^{2+} シグナリングや MEKK1 のリン酸化に着目し上流シグナル伝達経路の特定を試みている。第 3 章では細胞膜流動性変化による低温感知の仕組みについて調査している。さらに第 4 章では MEKK1 を過剰発現するシロイヌナズナを作製し、ストレス耐性植物としての有用性を検証する目的で、MEKK1 過剰発現植物の特徴や凍結耐性を調査している。

各章の内容の詳細について記載する。

第 1 章では、大腸菌発現系により MEKK1 タンパク質を調製し、その酵素機能について論述する。MEKK1 はその C 末端側に触媒領域であるキナーゼドメインを持っているが、N 末

端側領域については特徴的なドメイン構造を持たず、その機能は未知である。大腸菌発現系により調製したMEKK1のキナーゼドメインはA-groupのMAPKKであるMKK1、MKK2、MKK6をリン酸化した。しかし、全長のMEKK1はMKK1のみを弱くリン酸化し、N末端領域はリン酸化酵素活性を抑制する役割を持つことがわかった。さらにN末端領域による活性抑制の程度が基質MAPKKにより異なっていたことから、N末端領域が活性制御だけでなく基質の選択にも関与することが示唆された。また、研究の過程で、MEKK1はセリン/スレオニンキナーゼであるにも関わらず、大腸菌発現系により調製したMEKK1タンパク質はセリン、スレオニン残基の自己リン酸化だけでなく、チロシン残基の自己リン酸化修飾能を持つことがわかった。このリン酸化チロシン残基はN末端領域に存在し、204番目のチロシン残基が主なリン酸化サイトであった。また、この204番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したMEKK1はMKK1に対するリン酸化酵素活性が低下し、このリン酸化チロシン残基が活性制御に影響することが示唆された。このことから、MEKK1の活性制御や基質選択においてN末端領域が重要な役割を持つことが指摘される。

第2章では低温馴化過程におけるMEKK1経路について詳述する。低温処理したシロイヌナズナ実生から抗MEKK1抗体を用いて免疫沈降した内在性MEKK1が低温処理依存的に活性化し、MKK2を選択的にリン酸化することを示した。また、低温処理したシロイヌナズナ実生より得た細胞抽出液によりMEKK1がリン酸化されること、及びこのリン酸化がCa²⁺キレーターであるEGTA前処理により抑制されることを明らかにした。近年、calcium/calmodulin (Ca²⁺/CaM)によって活性制御される膜結合型レセプターキナーゼであるCRLK1 (Ca²⁺/CaM-regulating receptor-like kinase)が凍結耐性の獲得に関与し、さらにCRLK1がMEKK1と相互作用することが報告された。そこで、大腸菌発現系によりCRLK1を調製し、そのリン酸化酵素活性を測定したところ、MEKK1に対するリン酸化酵素活性が検出された。そこで、低温処理によりCRLK1が活性化し、これがMEKK1の上流因子である可能性が指摘された。

第3章では第2章の結果を踏まえて、細胞膜流動性変化低温感知の仕組みについて調査した。シロイヌナズナ実生を細胞膜硬化剤DMSOで処理したところ低温処理と同様にMEKK1に対するリン酸化活性が検出され、また下流因子であるMPK4の活性化も見られた。反対に、低温処理において見られるMEKK1へのリン酸化活性やMPK4の活性化が細胞膜流動化剤であるBenzyl Alcoholによる前処理で抑制された。さらに、シロイヌナズナをDMSO処理することで、4℃による低温馴化した場合と同様の凍結耐性を示したが、Benzyl Alcohol存在下で低温馴化処理を行ったシロイヌナズナは凍結耐性を示さなかった。これらの結果より、低温による細胞膜流動性の低下を介して、Ca²⁺/CaM-CRLK1-MEKK1-MKK2-MPK4/6の経路が活

性化され、凍結耐性の向上に寄与することが示唆された。

第4章は、MEKK1の過剰発現植物の作成について検討した。完全長のMEKK1の配列を導入したMEKK1 Full過剰発現植物と、アミノ酸置換により不活化したMEKK1 KN過剰発現植物を作製した。MEKK1 Full過剰発現植物とMEKK1 KN過剰発現植物のいずれにおいても導入遺伝子が過剰発現していたにもかかわらず、MEKK1 Full過剰発現植物では導入遺伝子由来のMEKK1タンパク質が検出されなかった。一方、MEKK1 KN過剰発現植物ではMEKK1 KNタンパク質が検出された。そこで活性を持つMEKK1 Fullタンパク質は分解されている可能性が考えられ、植物細胞内で、MEKK1のリン酸化酵素活性を識別し、MEKK1タンパク質の量を負に調節する機構の存在が示唆された。MEKK1 Full過剰発現植物及びMEKK1 KN過剰発現植物は、通常の生育環境において、野性型と比較して形態や生育速度、大きさにおいてほとんど違いが検出されず、また、凍結耐性も野性型と同様であった。MEKK1 Full過剰発現植物の形質に差異が認められなかったのは、MEKK1 Fullタンパク質が検出されなかったこととの関連性が考察される。

本研究により、MEKK1のN末端領域がその活性制御や基質の選択において重要な役割を持つことが示された。さらに低温シグナリングにおいてMEKK1がリン酸化されること、またその上流経路に細胞膜流動性の低下、Ca²⁺シグナリングが存在し、CRLK1がMEKK1の上流リン酸化酵素の候補であることを示唆した。過剰発現体を用いた研究によりMEKK1タンパク質が量的制御を受けること、その制御にリン酸化酵素活性が影響することがわかった。

略語説明

APS	ammonium peroxodisulfate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphatase <i>p</i> -toluidine salt
BPB	bromophenol blue
CBB	coomassie brilliant blue
cDNA	complementary DNA
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
DTT	dithiothreitol
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
GST	glutathione S-transferase
IPTG	isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside
LiAc	lithium acetate
MBP	myelin basic protein
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
rpm	revolution per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
2-Me	2-mercaptoethanol

総合緒論

近年、温暖化、砂漠化、オゾン層の破壊等による地球規模の環境悪化、世界各地で起こっている異常気象等、地球環境問題は農業に多大な被害を及ぼしている。近い将来、食糧の安定的な供給に向けて生産性の高い作物や乾燥地帯、塩類集積地等の劣悪な環境でも生育可能な耐性植物の開発は重要な課題である。ゲノムプロジェクトにより植物ゲノムの全塩基配列が解読されてきている現在、イネやシロイヌナズナといったモデル植物を用いてこれら環境ストレスに対する耐性機構の解明は分子レベルで多数行われており、このような研究から得られた知見は、有用な植物の作製に貢献する可能性を持っている。

植物は、温度、湿度、光、土壌成分などの環境変化に晒されて生育しており、特異的なセンサーで感受した情報によりストレス応答遺伝子の転写調節や植物ホルモン等の生理活性物質の生成誘導などの細胞反応を行なうことで環境への適応を試みる。その際に、重要な役割を担っているのが、シグナルの受容から細胞機能の変化に至るまでを繋ぐ細胞内シグナル伝達である。植物は環境に応じたシグナル伝達を行なうことで、環境応答を制御している。シグナル伝達経路は Ca^{2+} や活性酸素種、タンパク質リン酸化酵素、転写因子など様々な構成要素により形成されており (Xiong *et al.* 2002; Torres 2010; Harper & Harmon 2005)、Mitogen-Activated protein kinase (MAPK) カスケードと呼ばれるシグナル伝達経路も環境応答において重要な役割を担っていることが知られている (Nakagami *et al.* 2005; Colcombet & Hirt 2008) (Fig. 1)。

MAPK カスケードは、MAPK、MAPK kinase (MAPKK)、MAPKK kinase (MAPKKK) という三種類のプロテインキナーゼによって構成される真核生物で保存されたシグナル伝達系である (Fig. 2) (Avruch 2007; Chen *et al.* 2007)。MAPK カスケードにおいて、最上流に位置する MAPKKK の活性化は、一般的に MAPKKK kinase (MAPKKKK) 等によるリン酸化や低分子 G タンパク質、スキャホールドタンパク質などのタンパク質相互作用、またはそれらを複合的に受けることによって起こると考えられている (Cuevas *et al.* 2007)。MAPKKK はその下流に位置する MAPKK の活性化ループにあるセリン及びトレオニン残基をリン酸化することにより MAPKK を活性化する。活性化された MAPKK は MAPK の活性化ループ内に存在するスレオニン及びチロシン残基のリン酸化を行うことで MAPK を活性化しシグナルを伝達する。このように標的レセプターから MAPK カスケードに伝達されたシグナルは更にその下流因子に伝達され、細胞の機能を制御すると考えられている。

MAPK カスケードの研究は、これまで、動物や酵母など多くの生物種で進められており、ホルモン、分裂促進因子、増殖因子、環境ストレスなど幅広いシグナル伝達に関与することが

報告されている (Strniskva *et al.* 2002; Chen *et al.* 2007)。植物では、病原菌や傷害等の生物的ストレス、塩濃度、乾燥、温度、重金属等の非生物的ストレス、植物ホルモンなど多岐にわたる細胞内シグナル伝達に MAPK カスケードが関係することが示唆されている (Nakagami *et al.* 2005)。モデル植物であるシロイヌナズナゲノムにおいて、MAPKKK は 80 種、MAPKK は 10 種、MAPK は 20 種の相同遺伝子が知られており (Ichimura *et al.* 2002; Jonak *et al.* 2002; Colcombet & Hirt 2008)、様々なシグナル伝達系において、任意の組み合わせで MAPK カスケードを構築し、ストレスシグナルに応じた応答反応を誘導すると考えられている (Lee *et al.* 2008; Andreasson & Ellis 2010)。しかしながら、各ストレスシグナルが MAPK カスケードに伝達される経路や、各シグナル伝達経路における MAPK カスケードの構成等に関して、部分的な報告は行われているが (Nakagami *et al.* 2005)、未だに研究の余地が多く残されている。

特に巨大な遺伝子ファミリーを形成する MAPKKK については、その活性制御機構も含め、機能がまだ解明されていないものが多い。シロイヌナズナにおいて、キナーゼドメインのアミノ酸配列の相同性に基づいた分析により、60 種の MAPKKK が同定されており、そのうちの 60 種は 48 種類の Raf タイプ、12 種類の MEKK タイプの 2 つに大きく分類することができることが知られている (Fig. 3) (Ichimura *et al.* 2002)。更なる分析の結果、MEKK タイプに 9 種類加えた 21 種類からなる MEKK サブファミリーが構成され、新たなサブファミリーとして 11 種類の ZIK サブファミリーが同定された。これらの解析より MAPKKK は計 80 種類同定され、48 種類の Raf サブファミリー、11 種類の ZIK サブファミリー、21 種類の MEKK サブファミリーの 3 つのサブファミリーに分類された。現在この 3 つのサブファミリーへの分類が一般的に用いられている (Jonak *et al.* 2002; Champion *et al.* 2004; Colcombet & Hirt 2008; Menges *et al.* 2008)。

Raf サブファミリーの MAPKKK である CTR1 は、エチレンのシグナル伝達系において、エチレン受容体 ETR1 と複合体を形成し働くことが知られており (Kinber *et al.* 1993; Gao *et al.* 2003)、MKK9-MPK3/6 の経路を負に制御していると考えられている (Yoo *et al.* 2008)。また、病原菌、エチレン等のシグナル伝達に EDR1 が関係していること (Tang *et al.* 2005)、高塩ストレスの耐性に At1g73660 が関係していること (Gao & Xiang 2008) が報告されている。当研究室においても、MAP3K δ 4 が生育や花茎の枝分かれに関与することや (Sasayama *et al.* 2011)、MAP3K δ 4 が ABA により発現誘導され、その過剰発現植物がと高塩耐性を示すことを報告してきた (Shitamichi *et al.* 2013)。しかしながら、Raf サブファミリーには MEKK サブファミリーや ZIK サブファミリーと比較して多くの MAPKKK が属しているにも関わらずその多くの MAPKKK の機能は未知であるものが多い。

ZIK サブファミリーは、with no lysine kinase ファミリーとも呼ばれている (Menges *et al.*

2008)。WNK1 (ZIK4) は概日リズムに関わるタンパク質 APR3 をリン酸化すること (Murakami-Kojima *et al.* 2002)、また、WNK8 (ZIK6) が G タンパク質と相互作用し、7 回膜貫通タンパク質 RGS1 をリン酸化することが報告されており (Urano *et al.* 2012)、一般的な MAPKKK と異なった機能を持っていることが示唆される。

MEKK サブファミリーの ANP1 は酸化ストレス時に ANP1-MPK3/MPK6 の MAPK カスケードとして働くことが示唆されている (Kovtun *et al.* 2000)。また、ANP1、ANP2 及び ANP3 は ANP1/ANP3-MKK6-MPK4 の経路で細胞質分裂を制御していることや (Takahashi *et al.* 2010)、発生や分化を制御することが報告されている (Krysan *et al.* 2002)。その他、MAP3K ϵ 1 は細胞周期調節に関わり細胞分裂を正に制御すること (Jouannic *et al.* 2001)、YODA は胚や気孔の形成などの成長過程で働くことや (Lukowitz *et al.* 2004; Bergmann *et al.* 2004)、気孔の発生制御において、YODA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 の経路を構成することが報告されている (Wang *et al.* 2007)。

MEKK1 は、MEKK サブファミリーの代表的な MAPKKK であり、これまで様々な研究が行われてきている。まず、MEKK1 は、傷害、高塩、低温といったストレスで転写量が増加する MAPKKK として同定され、これらのストレスシグナル伝達に関係することが示唆された (Mizoguchi *et al.* 1996)。また、MEKK1 は酵母 Two-hybrid 法において MAPKK の MKK1 及び MKK2 と相互作用することが報告されている (Ichimura *et al.* 1998; Mizoguchi *et al.* 1998)。MEKK1 遺伝子欠損植物は著しい矮小の形質を示し、細胞に H₂O₂ を蓄積した状態となる。そして矮小の表現形は高温条件下での生育により回復する (Ichimura *et al.* 2006; Nakagami *et al.* 2006)。また病原菌感染時に見られる MPK4 の活性化が MEKK1 遺伝子欠損植物では見られないこと (Suarez *et al.* 2007)や、MEKK1 遺伝子欠損植物と MPK4 遺伝子欠損植物との形態的特長の類似 (Su *et al.* 2007)から、MEKK1 と MPK4 の関係が報告された。さらに、MKK1、MKK2 の二重遺伝子欠損植物も MEKK1 及び MPK4 の遺伝子欠損植物と類似した矮小の表現型を示すことから (Qui *et al.* 2008) (Fig. 4)、MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 の一連のカスケードが構成されていると考えられている。このカスケードにおいて、MKK1、MKK2 のそれぞれ単一の遺伝子欠損植物では表現型に変化が見られないことから、MKK1 及び MKK2 は機能重複して働いていることが考えられている。しかしながら、ストレスシグナル伝達において、傷害及び病害ストレス処理により MKK1 が活性化される一方 (Matsuoka *et al.* 2002; Teige *et al.* 2004)、MKK2 は低温及び高塩ストレスで活性化され MPK4 のリン酸化をすることが報告されており (Teige *et al.* 2004) (Fig. 5)、傷害ストレスにおける、MEKK1-MKK1-MPK4 経路 (Matsuoka *et al.* 2002; Hadiarto *et al.* 2006)、病害ストレスによる MEKK1-MEK1-MPK4 (Meszaros *et al.* 2006) の経路、また、低温、塩ストレスで、MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6 (Teige *et al.* 2004) の経路が示唆され

ている。このことから、それぞれのストレス下において MEKK1 は MKK1 及び MKK2 に選択的にシグナルを伝達し、MAPK カスケードを制御していると考えられている。

MEKK1 にストレスシグナルを伝達する上流経路としては、病原菌のフラジェリン由来のペプチドである flg22 のレセプターとして FLS2 が示唆されている (Asai *et al.* 2002)。しかしながら、FLS2 から MEKK1 へのシグナル伝達機構に関する報告はない。また、その他のストレス伝達における MEKK1 上流経路の報告は未だにない。MEKK1 以外の MAPKKK の上流経路に関しても報告は限られている。これまでの研究より、細胞質分裂の制御において働く ANP1/ANP3-MKK6-MPK4 経路の上流因子としてキネシン様タンパク質 HINKEL が ANP1/ANP3 に相互作用し、そのカスケードを活性化すること (Takahashi *et al.* 2010)、気孔の発生及び分化に関わる YODA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 経路の上流として、レセプター TMM 及びレセプターキナーゼ ER-family が関係していることが示唆されている (Wang *et al.* 2007)。

これまでの研究報告をまとめ、MEKK1 を含むカスケードにおけるストレス下での経路図を Fig. 6 に示した。これらの研究から MEKK1 は傷害、病害、低温、高塩等のストレスシグナル経路に関わっており、それらのストレスに応じてリン酸化酵素活性を調節することで、傷害、病害ストレス時には下流 MAPKK である MKK1 を、低温、高塩ストレスでは MKK2 を選択的に活性化し、シグナルを伝達していると考えられる。しかしながら、MEKK1 にストレスシグナルを伝達する上流経路及び因子や、MEKK1 のリン酸化酵素活性の制御機構及び下流 MAPKK の選択機構に関する知見はほとんどない。

そこで本研究では、MEKK1 の活性制御メカニズムや MEKK1 を介したシグナル伝達経路の解明を試み、これらの知見をもとに MEKK1 の機能を利用したストレス耐性植物の作出を目指した。第 1 章では、大腸菌発現系により様々なコンストラクトの MEKK1 タンパク質を調製し、そのリン酸化酵素活性を測定することで活性制御や基質選択のメカニズムを調べた。第 2 章では、MEKK1 の関与が示唆されている低温馴化に着目し、低温処理シロイヌナズナにおける MEKK1 の活性制御やシグナル伝達経路について検討を行った。特に Ca^{2+} シグナリングに着目し上流シグナル伝達経路の特定を試みた。その結果をふまえ、第 3 章では、細胞膜流動性変化による低温感受の仕組みについて調査した。さらに第 4 章では MEKK1 を過剰発現するシロイヌナズナを作製した。ストレス耐性植物としての有用性を検証するため、MEKK1 過剰発現植物の特徴や凍結耐性を調べた (Fig. 7)。

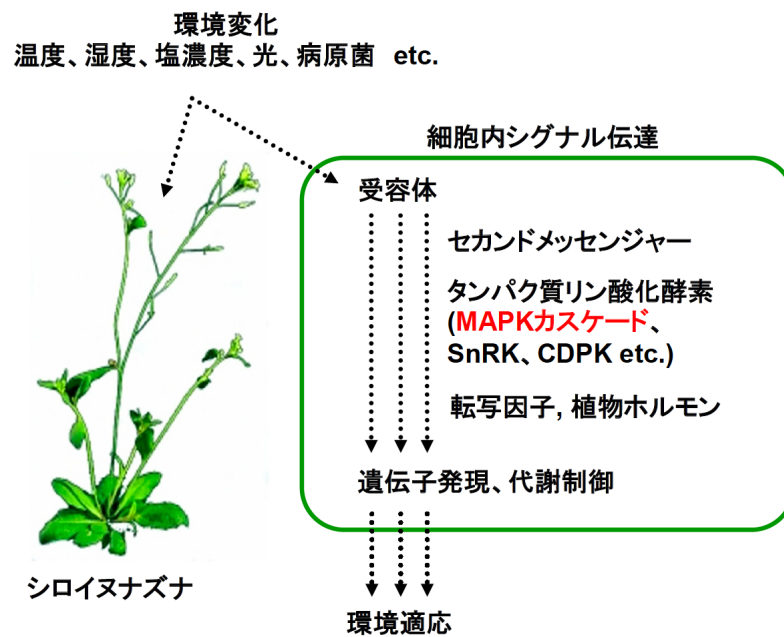


Fig. 1 植物の環境応答

環境変化を感受した植物は、細胞内でシグナル伝達経路を形成し、遺伝子発現、酵素活性の調整することで外部環境への適応を試みる。そのような、細胞内シグナル伝達経路の1つに Mitogen-Activated protein kinase (MAPK)カスケードが知られている。

環境変化、ホルモン、分裂促進因子、増殖因子など

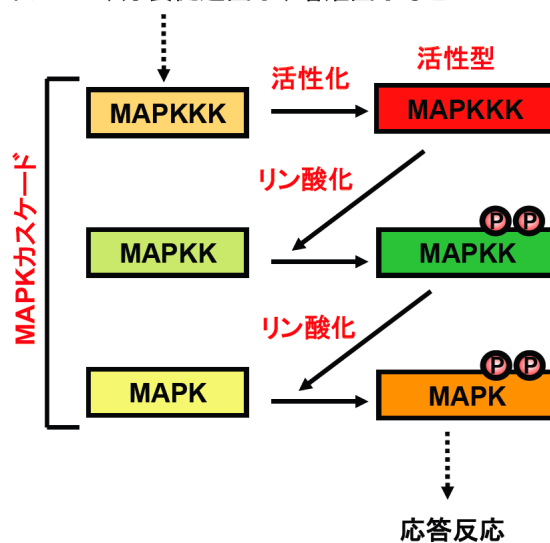
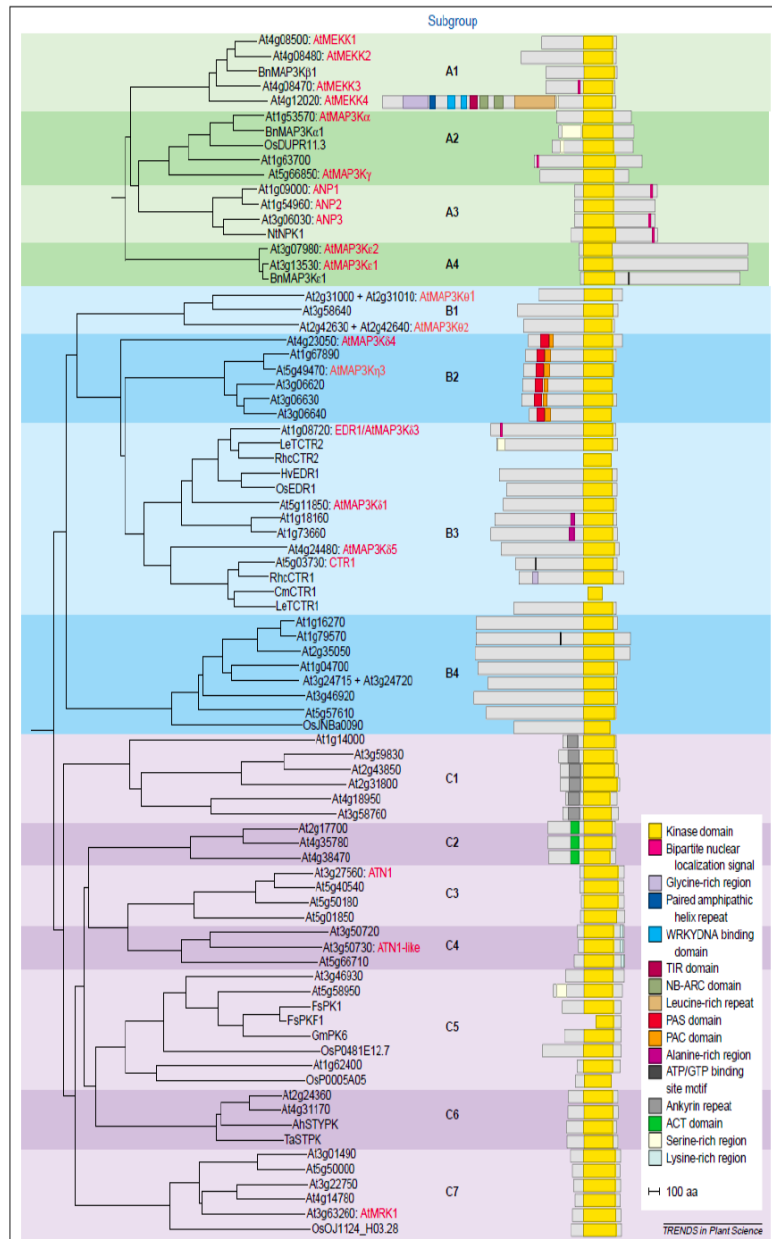


Fig. 2 MAPK カスケード

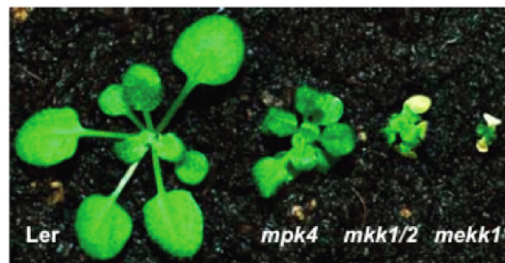
MAPK カスケードは上流から MAPKKK, MAPKK, MAPK の 3 種のリン酸化酵素で構成され、細胞の増殖やストレス応答において重要な役割を果たすことが知られている。一般的な MAPK カスケードの活性化機構を示した。シグナルに伴い MAPK カスケードの最上流に位置する MAPKKK が活性化し、その基質である下流の MAPKK をリン酸化し活性化する。さらに活性化した MAPKK が同様にその下流の MAPK をリン酸化し活性化する。リン酸化を受けた MAPK は活性化し、その信号は転写因子などの応答系へ伝えられる。



(Ichimura et al. 2002)

Fig. 3 植物の MAPKKK の分類

シロイヌナズナをはじめとした様々な植物で同定されている MAPKKK をそのアミノ酸配列により系統的に分類した図を Ichimura et al. 2002 より引用した。キナーゼドメインなどそれぞれの MAPKKK が持つ特徴的なタンパク質モチーフについて紹介している。A グループ (A1-A4) が MEKK タイプ、B (B1-B4) 及び C グループ (C1-C4) に属するものが Raf タイプの MAPKKK である。本研究の対象である MEKK1 は A1 サブグループに属している。



(Qiu *et al.* 2008)

Fig. 4 MEKK1、MKK1/MKK2、MPK4 遺伝子欠損植物の表現形

MEKK1 及びその下流因子として報告がある MKK1/MKK2、MPK4 の遺伝子欠損植物の写真を Qui *et al.* 2008 より引用した。写真の左より *Ler* : ランズバーグ種野生型、*mpk4* : MPK4 遺伝子欠損植物、*mkk1/mkk2* : MKK1/MKK2 遺伝子欠損植物、*mekk1* : MEKK1 遺伝子欠損植物のシロイヌナズナ幼植物体の表現形を示している。

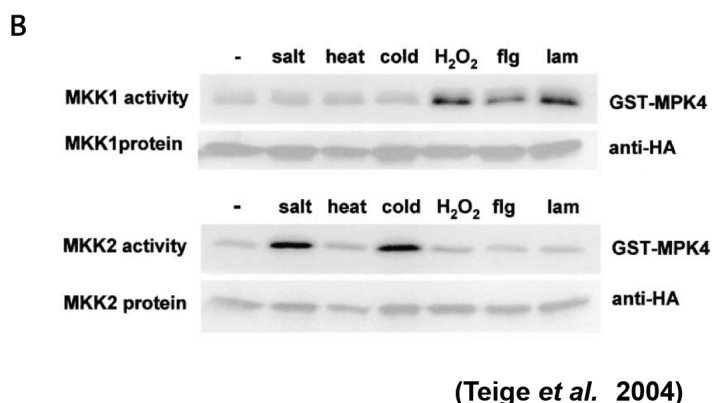
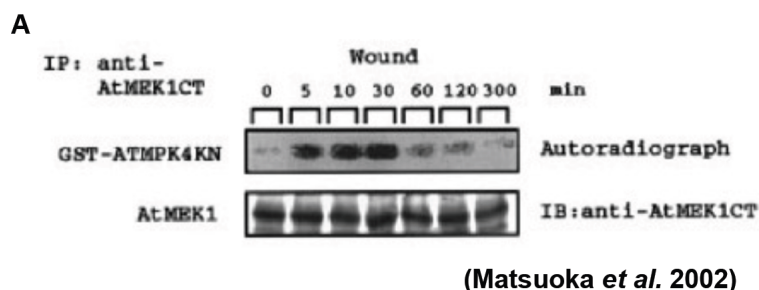


Fig. 5 MEKK1 下流 MAPKK、MKK1 及び MKK2 のストレスによる活性化

(A) シロイヌナズナの芽生えを傷害処理し、0、5、10、30、60、120、300 分後の細胞抽出液から MEK1 (MKK1) 特異抗体により免疫沈降し、不活性型の GST-MPK4 を基質としてリン酸化酵素活性測定を行なった結果を Matsuoka *et al.* 2002 より引用した。基質に対するリン酸化酵素活性が Autoradiograph に、免疫沈降された MKK1 タンパク質が IB: AtMEK1 CT で示されている。内在性の MKK1 が傷害ストレスにより一過的に活性化することを示された。

(B) HA タグ融合 MKK1 及び MKK2 をシロイヌナズナプロトプラストにおいて発現させ、10 分間、Salt (200 mM NaCl)、heat (37°C)、cold (0°C)、H₂O₂ (2 mM)、flg (10 nM flagellin)、lam (10 g/ml laminarin) の各ストレスに晒した。ストレス処理後、HA タグ抗体で免疫沈降し、不活性型の GST-MPK4 を基質として行なったリン酸化酵素活性測定の結果を Teige *et al.* 2004 より引用した。基質に対するリン酸化酵素活性が GST-MPK4 に、免疫沈降された MKK1 及び MKK2 タンパク質が anti-HA に示されている。MKK1 は H₂O₂、flg により活性化される。一方、MKK2 は Salt、cold により活性化し、MPK4 をリン酸化することが示された。

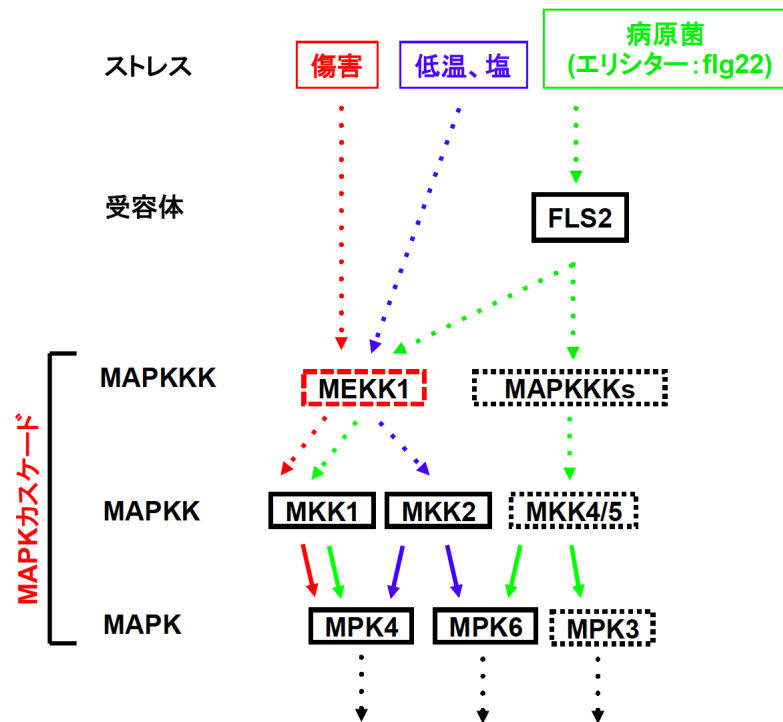


Fig. 6 これまでに報告されている MEKK1 シグナル伝達経路

傷害 (赤色)、低温及び高塩 (青色)、病原菌関連 (緑色) のストレス情報伝達を示している。それぞれのタンパク質間で直接的な関係が報告されているものを実線で、複数の因子が介在する可能性があるものを破線で示した。

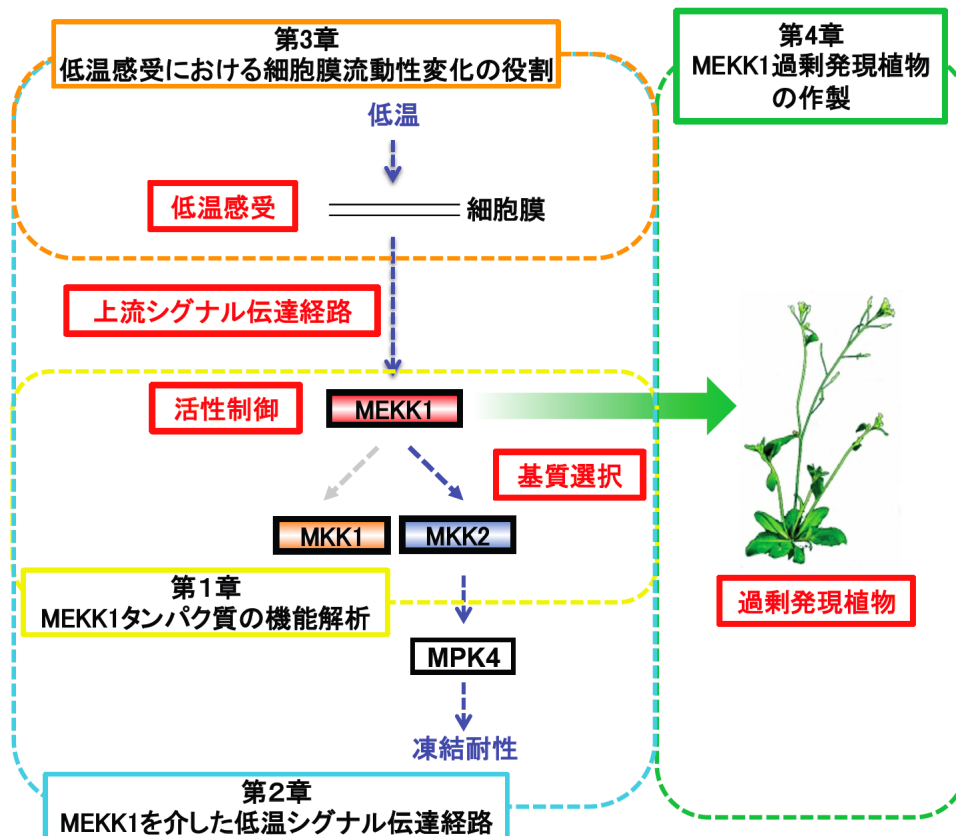


Fig. 7 本研究の概略図

第1章では MEKK1 の活性制御や基質選択のメカニズムをタンパク質としての機能に着目し解析した (黄色)。第2章では低温における MEKK1 の上流シグナル伝達経路や活性制御、基質選択の機構について検討した (青色)。第3章では MEKK1 を介した低温シグナル伝達における細胞膜流動性変化の低温感受への関与について検証した (橙色)。第4章では MEKK1 過剰発現植物の作製を行い、その成長や凍結耐性について検証した (緑色)。

第 1 章

MEKK1 タンパク質の機能解析

1A. 緒論

シロイヌナズナ MAPKKK の一つ MEKK1 は、これまで、酵母 Two-hybrid 法による相互作用の解析により、シロイヌナズナの MAPKK である MKK1 及び MKK2 をシグナル伝達の下流因子として持つこと (Ichimura *et al.* 1998; Mizoguchi *et al.* 1998)、また、遺伝子欠損突然変異体を用いた解析等により、病害応答等のストレス応答シグナル伝達に関与することが報告されている (Ichimura *et al.* 2006; Nakagami *et al.* 2006; Suarez *et al.* 2007; Qui *et al.* 2008)。さらに下流 MAPKK である MKK1 が傷害や病害ストレスにより活性化すること (Matsuoka *et al.* 2002; Teige *et al.* 2004)、同様に、MKK2 が低温や高塩ストレスにより活性化することから (Teige *et al.* 2004)、Fig. 6 に示したように、傷害ストレスにおいて MEKK1-MKK1-MPK4 経路 (Matsuoka *et al.* 2002; Hadiarto *et al.* 2006)、病害ストレスにより、MEKK1-MEK1-MPK4 (Meszaros *et al.* 2006) の経路、また、低温、高塩ストレスで、MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6 (Teige *et al.* 2004) の経路を構成することが示唆されている。これらの報告から、様々なストレスシグナルが MEKK1 を介して、MKK1 又は MKK2 へ選択的に伝達されると考えられているが、その上流シグナルの MEKK1 への伝達経路及びリン酸化酵素活性の制御や基質とされる MAPKK の選択の機構に関する知見はほとんどない。

MEKK1 タンパク質は 608 アミノ酸残基より構成されており、その C 末端側に位置する 333 番目から 587 番目のアミノ酸残基の領域に触媒領域であるキナーゼドメインを有することから、セリン/スレオニンタンパク質リン酸化酵素として機能すると考えられている。一方、キナーゼドメイン以外の N 末端側領域についてはこれまでに報告されているような特徴的なドメイン構造は持たず、その機能は未知である (Fig. 8)。

また、MEKK1 のリン酸化酵素活性を測定した報告は少なく、MEKK1、MKK2 と MPK4 もしくは MPK6 を一時的に発現させたプロトプラストから MPK4、MPK6 を免疫沈降し、モデル基質 MBP に対するリン酸化酵素活性を測定したところ、MEKK1 存在下で MPK4、MPK6 のいずれもリン酸化酵素活性が上昇すること (Teige *et al.* 2004)、過酸化水素処理した MEKK1 発現プロトプラストから免疫沈降した MEKK1 が MBP に対するリン酸化酵素活性を有すること (Nakagami *et al.* 2006) などの研究から、MEKK1 が MAPK カスケードを活性化することやリン酸化酵素としての機能を持つことが示唆されている。しかしながら、MEKK1 から MAPKK への直接的なリン酸化は、当研究室の Hadiarto らが傷害ストレス下で MEKK1 から MKK1 へのリン酸化を測定した報告に限られている (Hadiarto *et al.* 2006)。

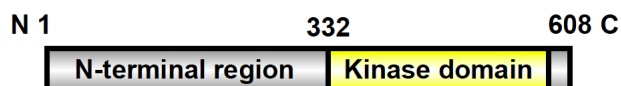
このように、MEKK1 のリン酸化酵素活性に着目した研究は少なく、ストレスシグナル伝達

においてリン酸化酵素活性がどのように制御され下流に伝達されているのか、またリン酸化の対象であると考えられる下流 MAPKK の選択はどのような機構によって行なわれているのかはわかっていない。

動物や酵母などを用いた研究より、MAPKKK のリン酸化酵素活性は、リン酸化などの翻訳後修飾やタンパク質間相互作用などによって制御されるメカニズムが一般的に知られており、その際にキナーゼドメイン以外の領域が活性制御において重要な役割を担う例も報告されている (Chen *et al.* 2007; Cuevas *et al.* 2007)。

本章では、MEKK1 の活性制御や基質選択の機構の解明を目的として、大腸菌発現系により、GST 融合タンパク質として MEKK1 タンパク質を調製し、そのリン酸化酵素活性を測定した。特に、これまで機能の未知な N 末端領域に着目し、MEKK1 の活性制御や基質の選択における役割について検証した。また、相互作用の観点から MEKK1 の基質の選択機構を調べるため、酵母 Two-hybrid 法を用いて、MEKK1 と MAPKK との相互作用を解析した。また研究過程で検出された MEKK1 のチロシンリン酸化についても報告する。

A



B

```

1 MDRILARMKK STGRRGGDKN ITPVRRLEER DAARNINYDA ASCSSSSAED LSVSTSSLMT
61 RSLFPEPTS FRIGGGVEM DRIYRSLGVS GPDDLAIKFD AWEACKRSS SDVVNRFKSF
121 DLDKVRDQDL SEEGPSGVVV GSDSMNHKVQ GQDLSEAGPS GGIVTELSEI GNLIPTVDRL
181 VADGVVENRR VMERTPTIVK SKGYLVPNNV VAVGVGVGGG IKGLRPPVLK PPPAMKRPI
241 DHRGSSWDFL THFAPSETVK RPSSSSSSSE DGCDEEEGKE EEAEAEEMGA RFIQLGDTAD
301 ETCSTTNEG DSSSTVSNIS PIYPDGGAI TSWQKGQLLRGSFGSVYEG ISGDGFFAV
361 KEVSLDQGS QAQECIQQL GEIKLLSQLQ HQNIYRVRT AKDGSNLYIF LELVTQGSLL
421 KLYQRYQLRD SVVSLYTRQI LDGLKYLHDK GFIHRDIKCA NILVDANGAV KLADFGAKV
481 SKFNDIKSK GTPFWMAPEV INRKDSGYS SPADIWSLGC TVLEMCTGQI PYSDLPEVQA
541 LFRIGRGTLP EVPDTLSLDA RLFILKCLKV NPEERPTAAE LLNHFPVRRP LPSVSGGGSG
601 SASPIIRR

```

Fig. 8 MEKK1 のドメイン構造とアミノ酸配列

MEKK1 のドメイン構造 (A) 及びアミノ酸配列 (B) を示した。MEKK1 は全長 608 アミノ酸残基で構成されており、C 末端領域に位置する黄色で示した 333 番目から 587 番目のアミノ酸残基の領域がセリン/スレオニンリン酸化酵素活性を持つ触媒領域とされるキナーゼドメイン (kinase domain) である。キナーゼドメイン以外の 1 番目から 332 番目のアミノ酸残基を N 末端領域とした。PlantP (<http://plantsp.genomics.purdue.edu>) データベース上で紹介されている機能領域をそれぞれ Protein kinase ATP-binding region signature を青字で、Serine/Threonine protein kinases active-site signature を橙字で示した。MEKK1 の C 末端配列 (赤波線) を基に作製した合成ペプチドをウサギに免疫し、抗 MEKK1 特異抗体を作製した。

1B. 材料と方法

1B.1. 大腸菌発現ベクターの構築

GST-MEKK1タンパク質を調製するための大腸菌発現用ベクターを作製した。作製したベクターについて以下に記した。pGEX-MEKK1 Fullの作製を1B.1.1.~1B.1.10.に、pGEX-MEKK1 Δ 83、 Δ 166、KD、1-166、1-332の作製を1B.1.11.に、pGEX-MEKK1 KN、KDKNの作製を1B.1.12.に、pGEX-MEKK1 Y38F、Y84F、Y204F、Y323Fの作製を1B.1.13にそれぞれ記した。

名前	MEKK1 の領域	アミノ酸置換
pGEX-MEKK1 Full	1-608	なし
pGEX-MEKK1 Δ 83	84-608	なし
pGEX-MEKK1 Δ 166	167-608	なし
pGEX-MEKK1 KD	333-608	なし
pGEX-MEKK1 1-166	1-166	なし
pGEX-MEKK1 1-332	1-332	なし
pGEX-MEKK1 KN	1-608	361 番目のリジン残基をアルギニンに置換
pGEX-MEKK1 KDKN	333-608	361 番目のリジン残基をアルギニンに置換
pGEX-MEKK1 Y38F	1-608	38 番目のチロシン残基を フェニルアラニンに置換
pGEX-MEKK1 Y84F	1-608	84 番目のチロシン残基を フェニルアラニンに置換
pGEX-MEKK1 Y204F	1-608	204 番目のチロシン残基を フェニルアラニンに置換
pGEX-MEKK1 Y323F	1-608	323 番目のチロシン残基を フェニルアラニンに置換

1B.1.1. インサート断片の作製

MEKK1 をコードする遺伝子を含むインサート断片の作製を行った。

•インサート断片は、2 週間生育したシロイヌナズナの実生より得た cDNA (本研究室に保存されていたもの) を鋳型とした PCR により増幅した。PCR 反応は遺伝子増幅装置 PC-700 型 (アステック社) を用いて行った。PCR に用いたプライマーの合成は TAKARA 社、あるいは Invitrogen 社、日清紡株式会社に委託し購入した。

•プライマーの配列を以下に示した。

	Primer name	sequence (5' → 3')
MEKK1 Full	MEKK1- <i>Eco</i> R I Forward	gaaagaattcatggacaggattctagct
	MEKK1- <i>Xho</i> I Reverse	gtttctcgagtcacacgagagaaggggagatg

•氷上で以下の反応液を調製した。

反応液:	10 x Pfu Ultra HF Reaction buffer	5 μ l
	2 mM dNTP mixture	4 μ l
	鋳型 cDNA	0.5 μ l
	フォワードプライマー	1 μ l
	リバースプライマー	1 μ l
	Pfu Ultra DNA polymerase	1 μ l
	イオン交換滅菌水	up to 50 μ l

•以下の条件でPCRを行った。

Step 1	94°C	30 秒
Step 2	60°C	30 秒
Step 3	72°C	2 分

Step 4	72°C	10 分
Step 5	4°C	—

•Step 1～3を30サイクル行った。

1B.1.2. アガロースゲル電気泳動

•PCR 産物の確認のためにアガロースゲル電気泳動を行った。PCR 反応液 5 μ lを 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、予想されるサイズにバンドが見られることを確認した。

•Seakem GTG agarose (Cambrex Bio Science Rockland社) もしくはAgarose S (ニッポンジーン社) を終濃度1～2%になるよう1 x TAE bufferに加えて溶解させ、ゲル作製器に流し込み室温で固化させた。ゲルからDNA断片を回収する場合にSeakem GTG agaroseを、それ以外の場合にAgarose Sを使用した。

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

•分離する試料にあらかじめ1/10倍量の10 x Loading bufferを加えてから泳動を行った。

10 x Loading buffer: 1% SDS
 50% Glycerol
 0.05% Bromophenol blue

•泳動終了後、ゲルをEthidium Bromide溶液 (終濃度 2 μ g/ml) に10分間浸し、紫外光下でDNAの泳動パターンを確認した。

1B.1.3. インサート断片の制限酵素処理

•1B.1.1.の PCR 産物をフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行ない、イオン交換滅菌水に溶解した。

•以下の反応液を調製した。制限酵素は、1B.1.1.に示したプライマー配列に含まれる制限酵素サイトに対応するものを用いた。

1B.1.1.の PCR 産物	30 μ l
10 x digestion buffer	10 μ l
制限酵素 A	2 μ l
制限酵素 B	2 μ l
イオン交換滅菌水	up to 100 μ l

- 上記の反応液を 37°Cで一晩インキュベートした。

1B.1.4. アガロースゲルからの DNA 断片の回収

1B.1.3.制限酵素処理後のインサート DNA をアガロースゲル電気泳動で回収する。アガロースゲルからの DNA 断片の回収には Freeze 'N Squeeze™ DNA Gel Extraction Spin Columns (Bio Rad 社) を用いた。

- 1B.1.2.と同様にアガロース電気泳動後、紫外光によって発光したバンドを切り出し、スピんカラムに移した。
- 20°Cでゲルを凍結させ、室温で融解させた。
- 13,000 g、3 分間の遠心分離によりろ過する。ろ液を回収した。
- ろ液を 100 μ l にメスアップし、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行った。
- 70%エタノールで洗浄し、よく乾燥させてから 30 μ l のイオン交換滅菌水に溶かした。

1B.1.5. ベクターの調製

調製した DNA を挿入する発現用プラスミドベクターとし pGEX-6P-1 Vector (GE ヘルスケア社) を使用した(Fig. 9)。

•制限酵素処理

以下の反応液を調製した。制限酵素は、1B.1.1.に示した各種インサート作成用プライマー配列に含まれる制限酵素サイトに対応するものを用いた。また、digestion Buffer は各制限酵素に合わせて、添付のものを用いた。

プラスミド	10 μ l
10 x digestion buffer	10 or 15 μ l
制限酵素 A	2 μ l
制限酵素 B	2 μ l
イオン交換滅菌水	up to 100 μ l

•37°Cで一晩インキュベートした。

•フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、89 μ l のイオン交換滅菌水に溶解させた。

•CIAP1 μ l (TAKARA 社) 、10 x CIAP buffer 10 μ l を加えた後、56°Cで 30 分間反応させ脱リン酸化した。

10 x CIAP buffer : 500 mM Tris-HCl (pH 9.0)
 10 mM MgCl₂

•フェノール/クロロホルム抽出を2回、エタノール沈殿を行った後、25 μ l のイオン交換滅菌水に溶解させ、脱リン酸化ベクターとして以下の操作に用いた。

pGEX-6P-1 (27-4597-01)

PreScission Protease
 Leu Glu Val Leu Phe Gln⁺Gly Pro⁺ Leu Gly Ser Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His
 CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT
 Arg Asp
 CGT GAC TGA CTG ACG
 Stop codons

*Bam*H I *Eco*R I *Sma*I *Sal*I *Xho*I *Not*I

pGEX-4T-1 (27-4580-01)

Thrombin
 Leu Val Pro Arg⁺Gly Ser⁺Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp
 CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT CGT GAC TGA
 Stop codons

*Bam*H I *Eco*R I *Sma*I *Sal*I *Xho*I *Not*I

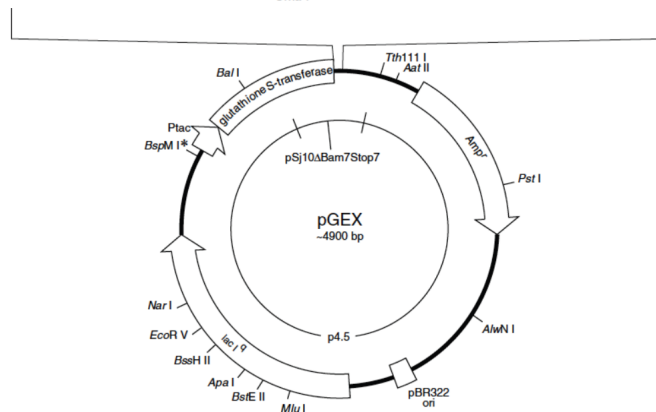


Fig. 9 GST 融合タンパク質発現用ベクターpGEX のベクターマップ

pGEX ベクター (pGEX-6P-1 及び pGEX-4T-1) のマルチクローニングサイトを利用して MEKK1 や基質として用いた MAPKK の遺伝子を導入し、大腸菌内で GST 融合タンパク質として発現させた。それぞれの GST 融合タンパク質の発現は IPTG により誘導される。

1B.1.6. ライゲーション

ライゲーション反応には、DNA Ligation Kit Ver.2.1 (TAKARA 社) を用いた。1B.1.4.で作製したインサート DNA 断片 1 μ l、1B.1.5.で作製した脱リン酸化ベクター 1 μ l、Ligation Solution I 2 μ l を混合し、16°Cで2時間インキュベートした。

1B.1.7. 大腸菌への形質転換

形質転換に用いた大腸菌株の遺伝子型を以下に記した。

Strain	Genotype
DH5a	F ⁻ , ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>

- 1B.1.6.のライゲーション反応液 4 μ l に、大腸菌 (DH5a) コンピテントセルを 50 μ l 加え、氷上で 30 分インキュベートした。
- 42°Cで 90 秒間置き、再び氷上で 5 分間インキュベートした。
- LB (Amp⁺) に撒き、37°Cで一晩静地培養した。

LB 培地:	Bacto-tryptone (DIFCO 社製)	10 g
	Bacto-yeast extract (DIFCO 社製)	5 g
	NaCl	6 g
	Agar	15 g
	イオン交換水	1 l

アンピシリン (終濃度 100 μ g/ml) を加えたものを LB (Amp⁺) として使用した。ただし抗生物質はオートクレーブ後加えた。液体培地として使用する際は、Agar を除いて作製した。

1B.1.8. コンピテントセルの調製

コンピテントセルの調製は塩化ルビジウム法で行なった。

- 大腸菌 (DH5α) をLB培地3 mlに植菌し、37°Cで一晩震盪培養した。
- LB培地50 mlに前培養液500 μlを加え、37°Cで約2時間震盪培養し、氷上で冷却した。
- 3,600 rpm、4°Cで5分間遠心分離し、集菌した。
- 菌体に氷冷した Tfb I 20 ml を加え氷上で懸濁した。

Tfb I	KOAc	0.59 g
	RbCl	2.42 g
	CaCl ₂	0.294 g
	MnCl ₂	1.98 g
	Glycerol	30 ml
	イオン交換水	150 ml

酢酸でpH5.8に調整しイオン交換水で200 mlにメスアップした。その後、フィルター濾過を行った。

- 氷上で5分間インキュベートした。
- 3,600 rpm、4°Cで5分間遠心分離し、集菌した。
- 菌体に氷冷した Tfb II 2 ml を加え氷上で懸濁した。

Tfb II	MOPS	0.209 g
	CaCl ₂	1.103 g
	RbCl	0.121 g
	Glycerol	15 ml
	イオン交換水	90 ml

KOHでpH6.5に調整しイオン交換水で100 mlにメスアップした。その後、フィルター濾過を行った。

- 氷上で15分間インキュベートした。
- 100 μl ずつ分注し、液体窒素で凍結後、-80°Cで保存した。

1B.1.9. プラスミド抽出

形質転換を確認するために、得られたコロニーを培養してプラスミド抽出を行った。

•1B.1.7.において生育したコロニーを、3 ml の LB (Amp⁺) 液体培地に取り、37°Cで一晩震盪培養した。

•遠心分離により沈殿を得、そこに 150 μ l の Solution I を加えてタッピングにより完全に懸濁した。

Solution I: 100 mM Tris-HCl (pH8.0)
 10 mM EDTA (pH8.0)

•150 μ l の Solution II を加え、ゆっくりと混合した。

Solution II: 1 M NaOH
 5.3% (w/v) SDS

•150 μ l の Solution III を加え、ゆっくりと混合した。

Solution III: 3 M Potassium
 5 M Acetate solution

•フェノール/クロロホルム処理を施し、エタノール沈殿により沈殿を得た。

•100 μ l のイオン交換滅菌水に沈殿を溶かし、1 mg/ml の RNase A を 2 μ l 加えて、37°Cで 30 分間インキュベートした。

•再びフェノール/クロロホルム処理とエタノール沈殿を行い、100 μ l のイオン交換滅菌水に溶解後、120 μ l の 20% PEG・2.5 M NaCl を加えて混合し、氷上で 1 時間インキュベートした。

•15,000 rpm、4°Cで 30 分間遠心分離し、沈殿を得た。

•沈殿を 70%エタノールで 2 回洗浄し、よく乾燥させてから 20 μ l のイオン交換滅菌水に溶かした。

•その後プラスミドを制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動を行い、ベクターにインサートが挿入されているかを確認した。

1B.1.10. シーケンス

インサートの挿入を確認後、その塩基配列の確認を行った。

調製したプラスミドの濃度及び純度を分光光度計により測定し、その濃度に基づいて反応液を調製し、以下のシーケンス用 PCR 反応を行った。

反応液:	5 x dilution buffer	1.75 μ l
	鋳型 DNA	0.5~1 μ g
	プライマー (1.6 pmol/ μ l)	1 μ l
	premix	0.5 μ l
	イオン交換滅菌水	up to 10 μ l

Step 1 96°C 30 秒

Step 2 50°C 15 秒

Step 3 60°C 4 分

Step 4 4°C —

•Step 1~3 を 35 サイクル行った。

•反応終了後、PCR 産物をエッペンに移し、エタノール沈殿により沈殿を得た。

•さらに 250 μ l の 70%エタノールで洗浄し、よく乾燥させてから 15 μ l の formamide に溶解した。その後、95°C で 3 分間インキュベートし、即座に氷上へ移した。

•AnalyzerABI3100 DNA sequence analyzer (Applied Biosystem 社) によって塩基配列を確認した。

1B.1.11. 部分欠損変異体 (Δ 83、 Δ 166、KD、1-166、1-332) の作製

MEKK1 の N 末端領域を欠損した MEKK1 Δ 83、MEKK1 Δ 166、MEKK1 KD をコードする遺伝子を含む各プラスミドおよび MEKK1 の N 末端領域をコードする遺伝子を含むプラスミドの作製を行った。

•各インサート調製のための PCR の template は pGEX-MEKK1 Full のプラスミドを用い、

1B.1.1.と同様の方法で行った。

•以下にプライマーの配列を示す。

	Primer name	sequence (5' → 3')
MEKK1 Δ83	MEKK1 Δ83- <i>Bam</i> H I Forward	gaaaggatccatcggctctcttgggtttctgg
	MEKK1- <i>Sal</i> I Reverse	gttgtcgactcatctacggagaaggggagatg
MEKK1 Δ166	MEKK1 Δ166- <i>Bam</i> H I Forward	gaaaggatccttgagtgagattggaatttaac
	MEKK1- <i>Sal</i> I Reverse	gttgtcgactcatctacggagaaggggagatg
MEKK1 KD	MEKK1 KD- <i>Eco</i> R I Forward	gaaagaattcatgtggcaaaagggcaacttg
	MEKK1- <i>Sal</i> I Reverse	gttgtcgactcatctacggagaaggggagatg
MEKK1 1-166	MEKK1- <i>Eco</i> R I Forward	gaaagaattcatggacaggattctagct
	MEKK1 1-166- <i>Xho</i> I Reverse	gtttctcgagttactcagtaacaattccacc
MEKK1 1-332	MEKK1- <i>Eco</i> R I Forward	gaaagaattcatggacaggattctagct
	MEKK1 1-332- <i>Sal</i> I Reverse	gttgtcgacttaagacggtatgatagctcc

- 各インサート断片は、PCR産物をそれぞれ制限酵素処理によって調製した。
- 制限酵素は、プライマー配列に含まれる制限酵素サイトに対応するものを用いた。
- 調製したインサート断片を挿入する発現用プラスミドベクターとし pGEX-4T-1 Vector (GEヘルスケア社) を使用した(Fig. 9)。
- ベクターの作成は、1B.1.1.~1B.1.10.と同様の方法で行なった。

1B.1.12. 不活性型変異体 (KN、KDKN) の作製

MEKK1 の 361 番目の Lys 残基を Arg 残基に置換した MEKK1 KN 及び MEKK1 KDKN をコードする遺伝子を含む各プラスミドの作製を行った。

•以下にプライマーの配列を示す。

	Primer name	sequence (5' → 3')
MEKK1 KN, KDKN	MEKK1-K361R Forward	ttctttgctgtcaggggaagtttcactt
	MEKK1-K362R Forward	aagtgaaacttcctgacagcaaagaa

•また、PCRのtemplateはpGEX-MEKK1 Full (pGEX-MEKK1 KN用)、pGEX-MEKK1 KD (pGEX-MEKK1 KDKN用) のプラスミドをそれぞれ用いた。

反応液:	10 X Pfu Ultra HF Reaction buffer	5 μ l
	2 mM dNTP mixture	4 μ l
	鋳型 DNA	0.5 μ l
	フォワードプライマー (100 pmol/ μ l)	1 μ l
	リバースプライマー (100 pmol/ μ l)	1 μ l
	Pfu Ultra DNA polymerase	1 μ l
	イオン交換滅菌水	up to 50 μ l

•以下の条件でPCRを行った。

Step 1	94°C	1 分
Step 2	50°C	1 分
Step 3	72°C	10 分
Step 4	72°C	10 分
Step 5	4°C	—

Step 1~3を30サイクル行った。

- 反応終了後、反応液50 μ lにDpn Iを1 μ l添加した。
- フェノール/クロロホルム処理を施し、エタノール沈殿により沈殿を得た。
- 7.5 μ lのイオン交換滅菌水に沈殿を溶かし、大腸菌 (DH5 α) コンピテントセルを50 μ l加え、氷上で30分インキュベートした。

•42°Cで90秒間置き、再び氷上で5分間インキュベートした。

•LB (Amp⁺) に撒き、37°Cで静地培養した。

•1B.1.9.と同様にプラスミド抽出を行った。

•その後、シーケンスを行い、変異が挿入されているかを確認した。

1B.1.13. チロシン変異型 (Y38F、Y84F、Y204F、Y323F) の作製

MEKK1のそれぞれ38、84、204、323番目のTyr残基をPhe残基に置換したY38F、Y84F、Y204F、Y323Fをコードする遺伝子を含む各プラスミドの作製を行った。

以下にプライマーの配列を示す。

	Primer name	sequence (5' → 3')
MEKK1 Y38F	MEKK1 Y38F Forward	aggaatatcaatttcgacgcgacttca
	MEKK1 Y38F Reverse	tgaagctgcgctcgaaattgatattcct
MEKK1 Y84F	MEKK1 Y84F Forward	atggatcggattttcggctcttgggt
	MEKK1 Y84F Reverse	aaccaagagaccgaaaaatccgatccat
MEKK1 Y204F	MEKK1 Y204F Forward	aagtcgaaagggtttctgtaccaa
	MEKK1 Y204F Reverse	aatttggtacaagaaacccttcgactt
MEKK1 Y323F	MEKK1 Y323F Forward	acttcgcctatcttccagatggagga
	MEKK1 Y323F Reverse	atcctccatctggaaagataggcgaagt

•PCRのtemplateはpGEX-MEKK1 Fullのプラスミドを用いた。

•作成は、1B.1.12.と同様の方法で行なった。

1B.2. GST融合タンパク質の発現、精製及び、定量

リン酸化酵素活性測定等の実験に用いるGST融合タンパク質を、大腸菌内で発現、精製した (Fig. 10)。GST融合タンパク質として、GST-MEKK1 Full、 Δ 83、 Δ 166、KD、KN、KDKN、1-166、1-332、Y38F、Y84F、Y204F、Y323F、また、リン酸化酵素活性測定の基質として用いたGST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN、GST-MKK4 KN、GST-MKK5 KN、GST-MKK3、GST-MKK7、GST-MKK8、GST-MKK9 KN、GST-MKK10を調製した。各種GST-MEKK1タンパク質の調製には、1B.1.で作成した各種pGEX-MEKK1プラスミドを用いた。GST-MAPKKタンパク質の調製には当研究室において保存されていた各種pGEX-MAPKKプラスミドを用いた。

1B.2.1. 大腸菌での発現

GST 融合タンパク質の発現に使用した大腸菌株 JM109 Strain (TAKARA 社) の遺伝子型は以下のとおりである。

Strain	Genotype
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, $\Delta(lac-proAB)/F'$[<i>traD36, proAB⁺, lacI^f, lacZ</i>ÄM15]</i>

- 発現ベクターを大腸菌 (JM109) に形質転換した。形質転換は1B.1.8.と同様の方法で行なった。
- 形質転換した大腸菌 (JM109) を0.5% Glucoseを含むLB (Amp⁺) 培地3 mlに植菌し、37°Cで一晩震盪培養した (前培養)。
- 0.5% Glucoseを含むLB (Amp⁺) 培地300 mlに前培養液3 mlを加え、37°Cで約2時間震盪培養し、OD₆₀₀=0.3になったところで約1時間かけ20°Cに温度を下げた。
- 最終濃度0.1 mMになるようにIPTGを加え、20°Cで約18時間震盪培養した。
- 6,000 rpm、4°Cで3分間遠心分離し、集菌した。
- 上清を除き、菌体を氷冷したPBSで懸濁し、6,000 rpm、4°Cで3分間遠心分離し、集菌した。

PBS:	NaCl	8.0 g
	KCl	0.2 g
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9 g
	KH ₂ HPO ₄	0.2 g
	イオン交換水	up to 1 l

- 上清を除き、菌体を-80°Cで保存した。

1B.2.2. GST融合タンパク質の精製

発現タンパク質はグルタチオンとのアフィニティーを利用して精製した (Fig. 10)。

- 1B.2.1.の菌体に5 mlの氷冷したPBSと、10 mg/mlのPMSFを最終濃度1 mMになるように加えた。
- 氷上で冷却しながら、超音波処理を30秒間隔で3回行い細胞を破碎した。
- 20% Triton X-100を最終濃度0.5%になるように加え、エッペンドルフチューブに分注し、15,000 rpm、4°Cで30分間遠心分離した。
- 上清を15 mlのコニカルチューブにまとめ、あらかじめPBSで平衡化した600 µlの Glutathione Sepharose 4B (50%スラリー) を加え、4°Cで1時間以上、ローテーターを用いて攪拌した。
- 3,300 rpm、4°Cで1分間遠心分離し、上清を除いた。
- 回収したレジンを0.5% Triton X-100を含むPBS (PBS-T) で懸濁し、エッペンドルフチューブに移した。
- 10,000 rpm、4°Cで1分間遠心分離し、上清を除いた。
- レジンをさらにPBS-Tで1回、PBSで2回、溶出前bufferで1回洗浄した。
- 500 µlの溶出bufferを加え、4°Cで2時間以上、ローテーターを用いて攪拌、溶出した。

溶出前 buffer:	100 mM NaCl
	50 mM Tris-HCl (pH7.5)

溶出 buffer: 100 mM NaCl
 50 mM Tris-HCl (pH9.5)
 16 mM Glutathione (reduced form)

pHが中性であることを確認した。

•10,000 rpm、4°Cで1分間遠心分離し、上清を得た。

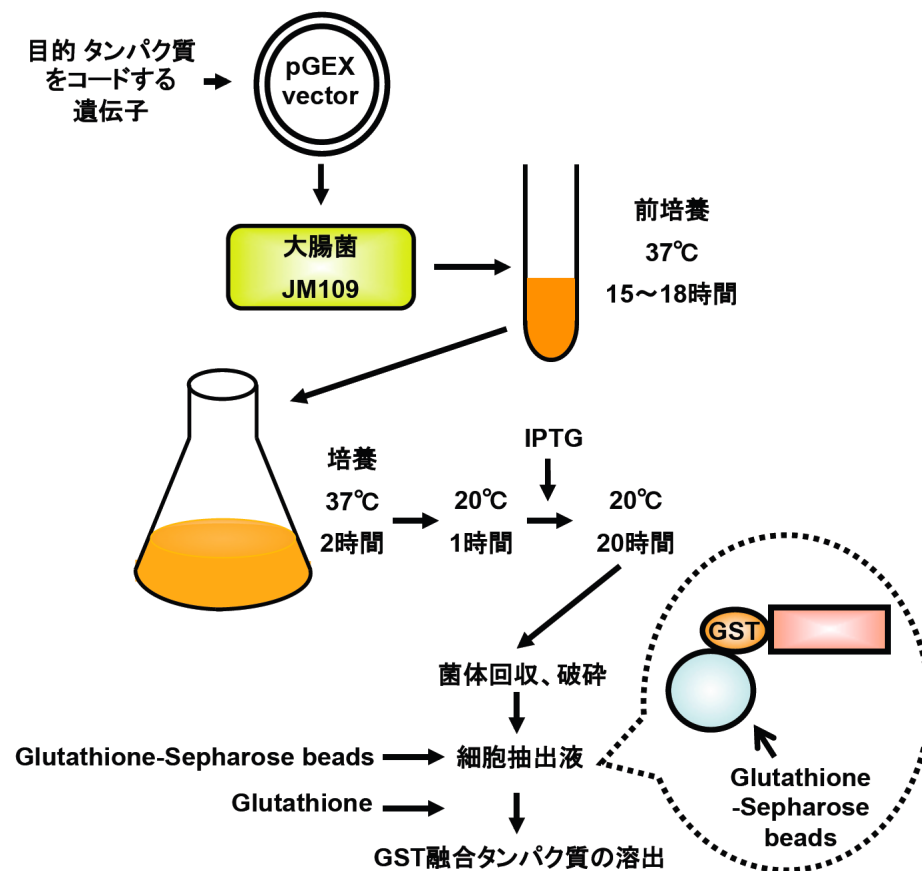


Fig. 10 GST 融合タンパク質の発現及び精製

GST 融合タンパク質として調製したいタンパク質をコードする遺伝子配列を pGEX ベクターに挿入し、大腸菌株 JM109 に形質転換する。形質転換した大腸菌を図のように培養し、IPTG により GST 融合タンパク質の発現を誘導した。大腸菌の細胞抽出液からの GST 融合タンパク質の精製は、GST とグルタチオンの親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーによって行なった。

10% SDS: SDS 10 g

イオン交換水で100 mlにメスアップし、フィルター濾過を行った。

10% APS: APS 0.1 g
 イオン交換水 up to 1 ml

Separating gel	30% acrylamide	4 ml
(2 枚分):	1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	3 ml
	10% SDS	120 ml
	10% APS	92 ml
	TEMED	6.6 ml
	イオン交換水	4.88 ml

Stacking gel	30% acrylamide	0.8 ml
(2 枚分):	0.5M Tris-HCl (pH6.8)	1.33 ml
	10% SDS	53.3 ml
	10% APS	32 ml
	TEMED	8.6 ml
	イオン交換水	3.2 ml

3 x SDS
sample buffer: 188 mM Tris-HCl (pH6.8)
 6% SDS
 30% Glycerol
 0.01% BPB
 15% 2-Me

10 x running buffer:	Tris	15.15 g
	Glycine	72 g
	SDS	5 g
	イオン交換水	up to 500 ml

•試料に1/2量の3 x SDS sample bufferを加え、100°Cで3分間インキュベートし、ゲル1枚につき20 mAの定電流で泳動した。

1B.2.5. CBB染色

•1B.2.4.でSDS-PAGEによって展開したタンパク質をCBB染色によって染色した。
•CBB染色液にSDS-PAGE後のゲルを浸して室温で10分間振盪した。その後、CBB脱色液にゲルを浸して室温で2時間振盪した。CBB染色後のゲルはゲルドライヤー（アトー社）により乾燥させた。

CBB 染色液:	CBB R-250	0.5 g
	Methanol	50 ml
	Acetic acid	15 ml
	イオン交換水	up to 250 ml
CBB 脱色液:	Methanol	500 ml
	Acetic acid	150 ml
	イオン交換水	up to 2 l

1B.3. イムノブロット

各種 GST-MEKK1 タンパク質の確認及びリン酸化修飾を検出するため各種特異抗体を用いたイムノブロットを行なった。

それぞれのイムノブロットに用いた各種特異抗体を以下に示す。

•MEKK1

MEKK1 特異抗体は神戸大学遺伝子実験センター 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 先生に作製して頂いたものを使用した。抗原に用いた合成ペプチドのアミノ酸配列を以下に示す。

Cys-Val-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ala-Ser-Pro-Leu-Leu-Arg-Arg

一次抗体 : MEKK1特異抗体

二次抗体 : Alkaline phosphatase conjugated GOAT anti rabbit IgG (CHEMICON社)

•GST

一次抗体 : Anti-GST Antibody (amersham pharmacia biotech社)

二次抗体 : Alkaline Phosphatase AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG
(H+L) (min X Hu Sr Prot) (jackson immuno research社)

•リン酸化セリン

一次抗体 : Phosphoserine,pAb (EnzoLifeScience社)

二次抗体 : Alkaline phosphatase conjugated GOAT anti rabbit IgG (CHEMICON社)

•リン酸化スレオニン

一次抗体 : Phospho-Threonine Antibody (P-Thr-Polyclonal)
(Cell Signaling Technology 社)

二次抗体 : Alkaline phosphatase conjugated GOAT anti rabbit IgG (CHEMICON社)

•リン酸化チロシン

一次抗体 : Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10® (Millipore 社)

二次抗体 : Goat anti-Mouse IgG, Alkaline Phosphatase conjugate (Millipore社)

•1B.2.4.と同様の方法で SDS-PAGE によって、タンパク質溶液の展開を行なった。

•PVDF 膜 (Immobilon-P、ミリポア社) をゲルの大きさに切り、100% Methanolに30秒浸した後、Blotting buffer B 中で15分振盪させた。

•SDS-PAGE 後、ゲルから PVDF 膜への転写を行った。陰極側から Blotting buffer A に浸した濾紙を2枚、Blotting buffer B に浸した濾紙1枚、ゲル、PVDF 膜、さらに Blotting buffer C に浸した濾紙を3枚の順に重ね、電圧のリットを25V に設定し、ゲル一枚あたり144 mA の定電流で30分間 blotting を行った。

•PVDF 膜を blocking Solution 中で室温、1 時間振盪した。

Blotting buffer A:	0.3 M	Tris
	5%	Methanol
Blotting buffer B:	25 mM	Tris
	5%	Methanol
Blotting buffer C:	25 mM	Tris
	5%	Methanol
	40 mM	6-Aminocaproic acid
T-TBS buffer:	20 mM Tris-HCl (pH 7.5)	
	150 mM NaCl	
	0.05% Tween 20	
Blocking Solution:	BSA	0.5 g
	T-TBS buffer	50 ml

•ハイブリバックに PVDF 膜と Blocking Solution で 1,000 倍希釈した一次抗体液 1ml を入れ、室温で 1 時間振盪した。

•T-TBS buffer で洗い流した後、さらに T-TBS buffer 中室温で 5 分振盪を 2 回行う。

•ハイブリバックに PVDF 膜と Blocking Solution で 10,000 倍希釈した二次抗体を 1ml 入れ、室温で 1 時間振盪した。

•T-TBS buffer で洗い流した後、さらに T-TBS buffer 中で室温 5 分振盪を 2 回行なった。

•イオン交換水で洗浄した。

•Substrate Solution 10 ml に、BCIP 20 μ l と NBT 30 μ l を加え、発色させた。

•発色後、イオン交換水で洗浄し、反応を停止した。

Substrate Solution:	100 mM	Tris-HCl (pH 9.5)
	5 mM	MgCl ₂
	100 mM	NaCl

1B.4. タンパク質脱リン酸化処理

•以下の反応液を調製し、30°Cで20分間反応させた。Lamda Protein PhosphataseはNew England BioLab社のものを用いた。

反応液	タンパク質溶液	
	protein phosphatase buffer	1 μ l
	10 mM MnCl ₂	1 μ l
	Lamda Protein Phosphatase	0.25 μ l
	イオン交換滅菌水	up to 10 μ l

- 3 x SDS sample buffer を反応液の半量加え攪拌し、反応を停止させた。
- 試料を 100°Cで 3 分間インキュベートし、1B.2.4.と同様に SDS-PAGE で展開、抗 GST 抗体、抗リン酸化セリン抗体、抗リン酸化スレオニン抗体、抗チロシン抗体を用いたイムノブロットによりタンパク質の確認及び脱リン酸化の確認を行なった。

1B.5. リン酸化酵素活性測定

1B.2.で調製した GST 融合タンパク質を酵素タンパク質及び基質タンパク質として用いて測定した。また、基質タンパク質にはモデル基質である MBP も用いた。

リン酸化酵素活性の測定は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP から基質への放射活性の転移反応により行った。

- 以下の反応液を調製し、30°Cで20分間反応させた。

反応液:	30 mM Tris-HCl (pH7.5)
	100 mM NaCl
	20 mM MgCl ₂
	50 mM ATP
	1 x 10 ⁶ cpm $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (#35020) (東京メディカル CRO 社)
	0.1 mg 酵素タンパク質
	1 mg 基質タンパク質

- 3 x SDS sample buffer を反応液の半量加え攪拌し、反応を停止させた。
- 試料を 100°C で 3 分間インキュベートし、1B.2.4.と同様に SDS-PAGE で展開した。
- ゲルを染色、脱色後、乾燥させ、バイオイメージングアナライザーBAS2500 を使用して解析を行った。

1B.6. Two-hybrid用ベクターの構築

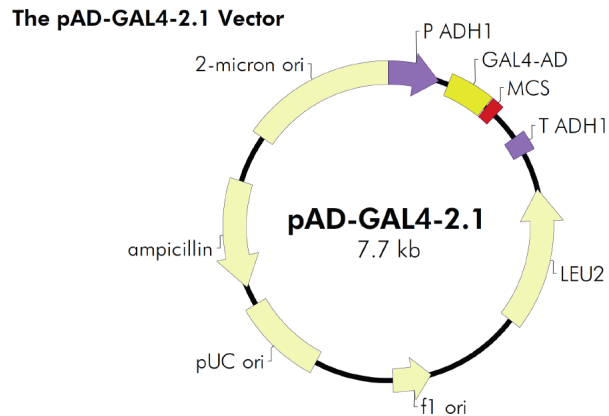
MEKK1の基質選択性を相互作用の観点から検討するため、酵母Two-hybrid法を用いてMEKK1とMAPKKとの相互作用解析を行なった。

Two-hybrid法を用いたMEKK1の相互作用タンパク質の解析に用いる酵母発現用ベクターを作成した。作成したベクターを以下に記した。

名前	MEKK1 の領域	アミノ酸置換
pBD-MEKK1 Full	1-608	
pBD-MEKK1 KD	333-608	
pBD-MEKK1 KN	1-608	361 番目のリジン残基をアルギニンに置換
pBD-MEKK1 KDKN	333-608	361 番目のリジン残基をアルギニンに置換
pBD-MEKK1 Y38F	1-608	38 番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換
pBDMEKK1 Y84F	1-608	84 番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換
pBD-MEKK1 Y204F	1-608	204 番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換
pBD-MEKK1 Y323F	1-608	323 番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換
pAD-MEKK1 Full	1-608	
pAD-MEKK1 KN	333-608	361 番目のリジン残基をアルギニンに置換

その他、pAD及びpBD-MAPKKのベクターは研究室に保存されていたものを用いた。

- 各インサート断片は、1B.1.において作成した pGEX-MEKK1 Full、pGEX-MEKK1 KN、pGEX-MEKK1 KD、pGEX-MEKK1 KDKN、pGEX-MEKK1 Y38F、pGEX-MEKK1 Y84F、pGEX-MEKK1 Y204F、pGEX-MEKK1 Y323F からそれぞれ制限酵素処理によって調製した。
- 制限酵素は、1B.1.1.に記したプライマー配列に含まれる制限酵素サイトに対応するものを用いた。
- 調製したインサート断片を挿入する発現用プラスミドベクターとして pAD-GAL4-2.1 Vector (Fig. 11) 及び pBD-GAL4 Cam Vector (Fig. 12) (STRATEGENE 社) を使用した。
- pBD-MEKK1 Full、KNを作成する際、pBD-GAL4 Cam Vector には *Xho*I サイトがないため *Sa*I で調製したベクターに *Xho*I で調製したインサート断片をライゲーションした。
- ベクターの作成は、1B.1.3.~ 1B.1.11.と同様に行なった。



pAD-GAL4-2.1 Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 812-958)

5' CCA AAC CCA AAA AAA GAG ATC GAA TTA GGA TCC TCT GCT AGC AGA GAA TTC AAT...
 ...TCT CTA ATG CTT CTC GAG AGT ATT AGT CGA CTC TAG AGC CCT ATA GTG AGT CGT ATT...
 ...ACT GCA GAG ATC TAT GAA TCG TAG ATA CTG AAA AAC 3'

Restriction sites: BamHI, XhoI, SalI, XbaI, PstI, BglII, EcoRI, T7 promoter, STOP

Feature	Nucleotide position
yeast <i>ADH1</i> promoter	4-408
GAL4 activation domain (114 amino acids)	488-829
multiple cloning site	839-935
yeast <i>ADH1</i> terminator	1168-1318
yeast <i>LEU2</i> selection marker ORF	1615-2709
f1 origin of ss-DNA replication	3483-3789
pUC origin of replication	4427-5094
ampicillin resistance (<i>bla</i>) ORF	5245-6102
2 μ yeast origin of replication	6489-7653

Fig. 11 酵母 Two-hybrid 用ベクター pAD のベクターマップ

pAD-GAL4-2.1 のマップとマルチクローニングサイトの制限酵素サイトを示した。MEKK1 および MAPKK 遺伝子を導入し、各酵母 Two-hybrid 用ベクターを作製した。酵母に形質転換し、GAL4 転写活性化ドメイン融合タンパク質の発現に用いた。

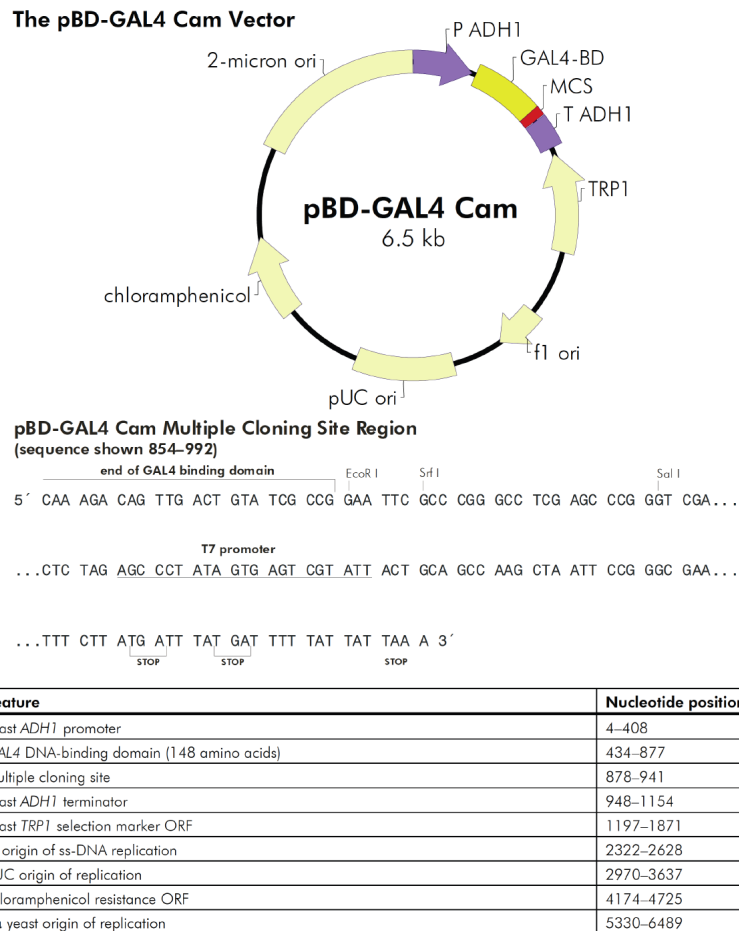


Fig. 12 酵母 Two-hybrid 用ベクター pBD のベクターマップ

pBD-GAL4 Cam のマップとマルチクローニングサイトの制限酵素サイトを示した。MEKK1 および MAPKK 遺伝子を導入し、各酵母 Two-hybrid 用ベクターを作製した。酵母に形質転換し、GAL4 DNA 結合ドメイン融合タンパク質の発現に用いた。

1B.7. 酵母の形質転換および His⁻ 選択培地による相互作用の確認

使用した、酵母株 YRG-2 (STRATAGEN 社) の遺伝子型は以下のとおりである。

Strain	Genotype
YRG-2	MATa <i>ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801</i> <i>trp1-901 leu2-3 112gal4-542 gal80-538</i> LYS2::UAS _{GAL1} -TATA _{GAL1} -HIS3 URA3::UAS _{GAL417mers(x3)} -TATA _{CYC1} - <i>lacZ</i>

•YRG-2 株を YPAD 培地において、30°C、24 時間培養した。

YPAD 培地:	Difco-peptone	20 g
	Bacto-yeast extract	10 g
	Adenine sulfate	40 mg
	イオン交換水	900 ml

1.2N HCl で pH5.8 に調整しイオン交換水で 960 ml にメスアップした。オートクレーブ滅菌後、60°C 以下に冷めてから 40 ml の 50% Glucose を加える。

•One-step buffer を 100 µl に YRG-2 を 10~20 µl 加えた。

One-step buffer:	50% PEG	800 µl
	1 M LiAc	200 µl
	4 M DTT	25 µl

•目的とする遺伝子の入った pAD ベクターのプラスミドを 2 µl、pBD ベクターのプラスミドを 2 µl 加え、懸濁した。

•45°C で 45 分インキュベートし、SD 培地 (Trp⁻, Leu⁻)、SD 培地 (Trp⁻, Leu⁻, His⁻) に撒いた。

•30°C でインキュベートした。形質転換が完了していれば SD 培地 (Trp⁻, Leu⁻) でコロニーができる (3~4 日)。さらに pBD ベクター産物と pAD ベクター産物が相互作用していれば

SD 培地 (Trp⁻, Leu⁻, His⁻) でもコロニーが生育する。

SD 培地:	Difco yeast nitrogen base without amino acid	6.7 g
	D-sorbitol	182.2 g
	イオン交換水	500 ml

10N NaOH で pH5.8 に調整しイオン交換水で 860 ml にメスアップした。オートクレーブ滅菌後、60℃以下に冷ました後、以下の試薬を加える。

10 x Dropout solution	100 ml
50% Glucose	40 ml

10 x Dropout solution の組成を以下に示す。

Component	Weight (mg/ l)
L-Isoleucine	300
L-Valine	1500
L-Adenine hemisulfate salt	200
L-Arginine HCl	200
L-Histidine HCL monohydrate	200
L-Leucine	1000
L-Lysine	300
L-Methionine	200
L-Phenylalanine	500
L-Threonine	2000
L-Tryptophan	200
L-Tyrosine	300

L-Uracil	200
L-Glutamic acid	1000
L-Aspartic acid	1000
L-Serine	4000

以上の組成の完全培地から、必要に応じて L-Leucine を除いたもの SD (Leu⁻)、L-Tryptophan を除いたもの SD (Trp⁻)、L-Tryptophan および L-Leucine を除いたもの SD (Trp⁻, Leu⁻)、L-Tryptophan、L-Leucine および L-Histidine HCl monohydrate を除いたもの SD (Trp⁻, Leu⁻, His⁻)を作製した。

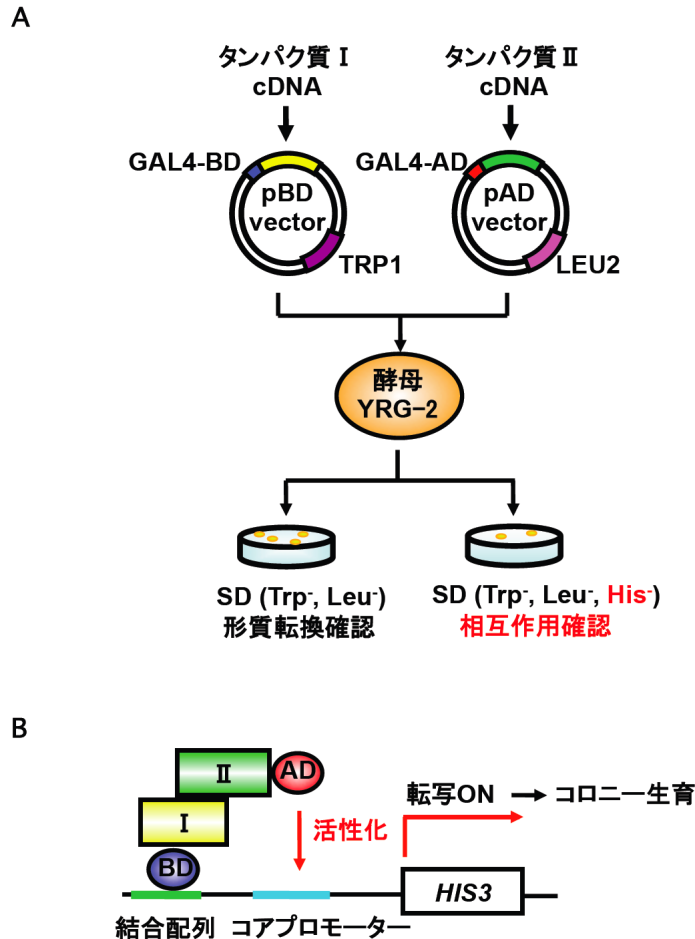


Fig. 13 酵母 Two-hybrid 法について

(A) 本研究で用いた酵母 Two-hybrid 法の実験の流れ。相互作用を検討したいタンパク質をコードする遺伝子を pBD 及び pAD ベクターに挿入し、酵母 YRG-2 株に形質転換する。形質転換は各ベクターの持つ Trp および Leu 合成酵素を利用して行なった。各ベクターの酵母への形質転換は SD (Trp⁻, Leu⁻) 培地でのコロニーの生育を指標に確認した。相互作用の確認は SD (Trp⁻, Leu⁻, His⁻) 培地におけるコロニーの生育を指標に確認した。(B) SD (Trp⁻, Leu⁻, His⁻)培地におけるコロニーの生育原理。pBD 及び pAD ベクターに遺伝子を挿入したタンパク質が相互作用する場合、それぞれのタンパク質に融合された GAL4 転写因子が再構成され、His 合成酵素が転写誘導される。

1C. 結果

1C.1. 大腸菌発現 GST-MEKK1 タンパク質の特徴

MEKK1 のタンパク質としての機能を解明するため、pGEX ベクター (Fig. 9) を用いた大腸菌発現系によって、GST 融合タンパク質として MEKK1 の調製を行なった。調製をした GST 融合タンパク質は、全長の MEKK1 タンパク質を含む GST-MEKK1 Full (アミノ酸番号 1 から 608 までを含む、1-608)、N 末端領域を段階的に欠損させた GST-MEKK1 Δ 83 (84-608)、 Δ 166 (167-608)、KD (333-608)、及び ATP 結合領域の 361 番目アミノ酸のリジン残基をアルギニン残基に置換した変異 (K361R) を有するリン酸化酵素活性が不活化した変異体 GST-MEKK1 KN (1-608、K361R)、KDKN (333-608、K361R)である。これら GST 融合タンパク質の模式図を Fig. 14 に示した。各 GST-MEKK1 タンパク質を大腸菌で発現、精製後 (Fig. 10)、ブラッドフォード法によりタンパク質の定量および SDS-PAGE によりタンパク質の確認を行った。SDS-PAGE 後のタンパク質の検出は、CBB 染色と抗 MEKK1 特異抗体によるイムノブロットで行なった。抗 MEKK1 特異抗体は、Fig. 8 に示した MEKK1 の C 末端の 15 アミノ酸残基を抗原ペプチドとしてウサギに免疫して得た血清を用いた。結果を Fig. 15 に示した。

全長の MEKK1 はアミノ酸配列より予測される分子量は約 66 kDa で、GST 融合タンパク質として発現させた場合約 92 kDa となる。しかしながら、GST-MEKK1 Full は約 135 kDa と約 130 kDa の位置に CBB 染色によりバンドが検出された。同様に、 Δ 83 は予測分子量 83 kDa に対し約 125 kDa と約 110 kDa、 Δ 166 は、予測分子量 74 kDa に対し約 100 kDa と約 85 kDa、KD は予測分子量 57 kDa に対し、約 70 kDa と約 65 kDa の位置にバンドが検出され、いずれの発現タンパク質も予測分子量より高分子両側に2本のバンドが検出されることがわかった。一方、不活性型の GST-MEKK1 KN は、予測分子量の 92 kDa に近い約 105 kDa の位置にバンドが検出され、KDKN では、予測分子量の 57 kDa とほぼ同位置である約 60 kDa にバンドが確認された。また、MEKK1 特異抗体によるイムノブロットにより、GST-MEKK1 Full、 Δ 83、 Δ 166、KD、KN、KDKN のいずれにおいても先述の CBB 染色で見られたバンドが確認された。抗 MEKK1 特異抗体は MEKK1 の C 末端 15 アミノ酸残基を認識配列として作成されていること、GST 融合 MEKK1 タンパク質は N 末端領域に GST タグを融合しており、その親和性により精製していることから GST-MEKK1 Full、 Δ 83、 Δ 166、KD において確認された高分子量側に位置する2本のバンドはいずれも分解物ではなくそれぞれの完全長を有していることが示された。

タンパク質のバンドシフトは、リン酸化等の翻訳後修飾によっておこることがある。不活性

型の GST-MEKK1 KN、KDKN では大きなバンドシフトが検出されなかったことから、GST-MEKK1 Full、 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ 、KD でみられたバンドシフトは、自己リン酸化による影響であることが予想された。GST-MEKK1 タンパク質のバンドシフトにリン酸化修飾が関与するのかを明らかにするために、タンパク質脱リン酸化酵素によって GST-MEKK1 Full、KD、KN、KDKN の脱リン酸化処理を行い、抗 GST 抗体を用いたイムノブロットにより確認した (Fig. 16)。

その結果、GST-MEKK1 Full において2本確認されていたバンドは脱リン酸化処理により1本になり、GST-MEKK1 KN と同様の位置にバンドが確認された。また、GST-MEKK1 KN は、脱リン酸化処理による影響は見られなかった。GST-MEKK1 KD においても、GST-MEKK1 KDKN と同様の位置にバンドが確認された。GST-MEKK1 KDKN の脱リン酸化処理による変化は見られなかった。これらの結果は、GST-MEKK1 タンパク質の高分子量側へのバンドシフトにそれら自己リン酸化によるリン酸化修飾が影響していること示唆している。

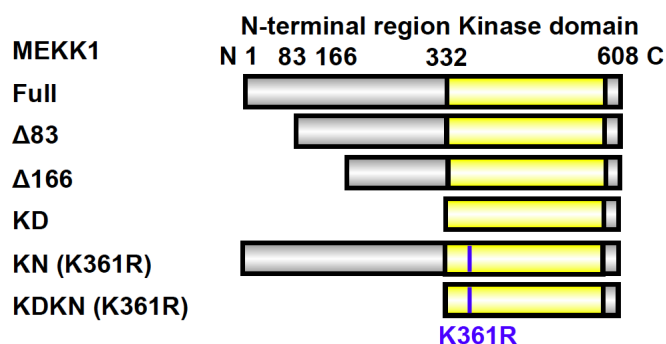


Fig. 14 大腸菌発現系で調製した GST 融合 MEKK1 タンパク質の模式図

本研究において用いた各種 MEKK1 のタンパク質模式図。全長 MEKK1 Full (1-608) 及び各種 N 末端領域欠損 MEKK1 $\Delta 83$ (84-608)、 $\Delta 166$ (167-608)、KD (333-608) 及び 361 番目の Lys 残基を Arg 残基に置換したリン酸化酵素活性欠損 MEKK1 KN (1-608、K361R)、KDKN (333-608、K361R) のタンパク質模式図を示した。これらをコードする遺伝子を pGEX ベクターに挿入したプラスミドを作製し、GST 融合タンパク質として大腸菌発現系により調製した。

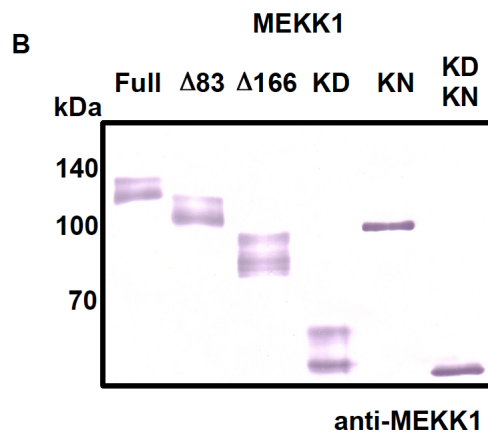
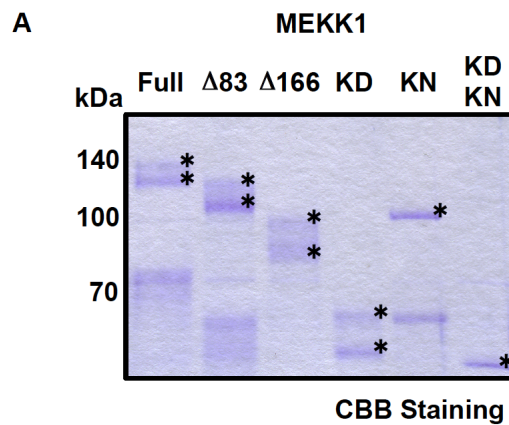


Fig. 15 大腸菌発現系で調製した GST-MEKK1 タンパク質

大腸菌発現系において GST 融合タンパク質として調製した GST-MEKK1 Full、 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ 、KD、KN、KDKN を SDS-PAGE により展開し、CBB 染色 (CBB Staining) 及び PVDF 膜に転写後、抗 MEKK1 特異抗体によるイムノブロット (anti-MEKK1) を行った。図の左には分子量に示した。* は各 GST 融合 MEKK1 タンパク質の完全長のバンドを示した。

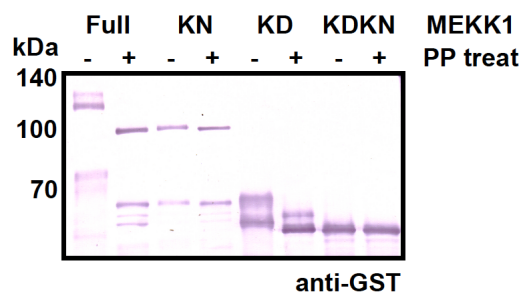


Fig. 16 GST-MEKK1 の脱リン酸化処理

大腸菌発現系において GST 融合タンパク質として調製した GST-MEKK1 Full、KN、KD、KDKN をタンパク質脱リン酸化酵素 (Lambda Protein phosphatase) により脱リン酸化処理 (30°C、30 min) した。脱リン酸化処理を行なったサンプルを PPtreat +、比較として脱リン酸化処理を行なわなかったサンプルを PPtreat - で表した。脱リン酸化処理後、SDS-PAGE により展開し、抗 GST 抗体 (anti-GST) を用いてイムノプロットした。

1C.2. GST-MEKK1 の MAPKK に対するリン酸化酵素活性

MEKK1 の MAPKK に対するリン酸化能を調べるために、大腸菌で発現させた、GST-MEKK1 KD を用いて、シロイヌナズナにおける全 10 種類の MAPKK (Fig. 17) に対するリン酸化酵素活性測定を行った。リン酸化酵素活性測定は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ から基質への放射活性の転移反応を測定した。基質には、MAPKK の ATP 結合領域のリジン残基をアルギニン残基にアミノ酸置換を行い不活性化した GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN、GST-MKK4 KN、GST-MKK5 KN、GST-MKK9 KN 及び、自己リン酸化酵素活性を持たない GST-MKK3、GST-MKK7、GST-MKK8、GST-MKK10 を用いた。各種 GST 融合タンパク質は大腸菌で発現、精製後、タンパク質の定量および SDS-PAGE により、タンパク質の量を確認しリン酸化酵素活性測定に用いた (Fig. 18)。

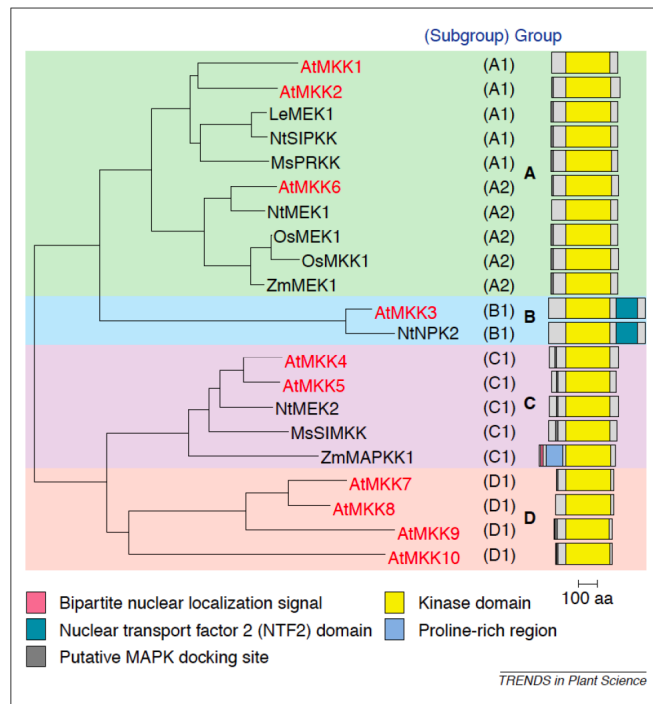
GST-MEKK1 KD は A グループの MAPKK である GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN をリン酸化したが、その他のグループに属する GST-MKK4 KN、GST-MKK5 KN、GST-MKK3、GST-MKK7、GST-MKK8、GST-MKK9 KN、GST-MKK10 はリン酸化しなかった。また、基質として用いたこれらの MAPKK タンパク質の自己リン酸化酵素活性は検出されなかった。MEKK1 のキナーゼドメインは、シロイヌナズナの 10 種の MAPKK のうち A グループの MAPKK である MKK1、MKK2、MKK6 に対する基質選択性を持つことがわかった。

MEKK1 の N 末端領域のリン酸化酵素活性に対する役割を調べるために、大腸菌で発現させた全長 GST-MEKK1 Full および、N 末端領域欠損の GST-MEKK1 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ 、KD を用いて、リン酸化酵素活性測定を行った。基質には、GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN、GST-MKK4 KN、GST-MKK5 KN を用いた (Fig. 19)。

GST-MEKK1 Full は GST-MKK1 KN をリン酸化したが、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN、GST-MKK4 KN、GST-MKK5 KN はリン酸化しなかった。N 末端領域欠損の GST-MEKK1 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ 、KD は、GST-MKK1 KN に対する活性が欠損領域の増加に伴って上昇した。また、GST-MEKK1 Full、 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ による GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN、GST-MKK4 KN、GST-MKK5 KN に対するリン酸化酵素活性は、ほとんど検出できなかった。しかしながら Fig. 19 でも見られたように GST-MEKK1 KD は、GST-MKK1 KN を強くリン酸化するだけでなく、GST-MKK2 KN や GST-MKK6 KN も同様にリン酸化した。

これら結果は、MEKK1 の N 末端領域はキナーゼドメインの持つタンパク質リン酸化酵素活性を抑制する機能を持っていることを示している。また、GST-MEKK1 Full、 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ が GST-MKK1 KN に対してのみリン酸化を行なった一方、GST-MEKK1 KD は GST-MKK2 KN や GST-MKK6 KN もリン酸化したことから、このような基質の選択に N 末端領域、特に

167 番目から 332 番目のアミノ酸残基の領域が影響していることがわかった。



(Ichimura *et al.* 2002)

Fig. 17 植物 MAPKK の分類

シロイヌナズナをはじめとした様々な植物で同定されている MAPKK のドメイン構造及びそのアミノ酸配列により系統的に分類した図を Ichimura *et al.* 2002 より引用した。植物の MAPKK は 4 つのグループに分類されている。

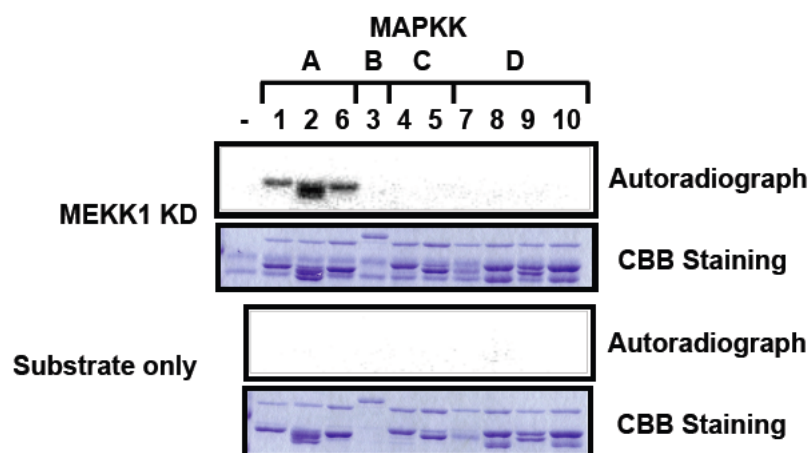


Fig. 18 大腸菌発現系により調製した GST-MEKK1 KD による MAPKK へのリン酸化酵素活性測定

大腸菌発現系により調製した GST-MEKK1 KD と各 MAPKK (GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN、GST-MKK4 KN、GST-MKK5 KN、GST-MKK7、GST-MKK8、GST-MKK9 KN、GST-MKK10) を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下で 37°C 、20 分間反応させた。反応を SDS サンプルバッファーで停止し、SDS-PAGE で展開した。SDS-PAGE 後のゲルを CBB 染色し (CBB Staining)、BAS2500 を用いて放射活性を検出した (Autoradiograph)。コントロールとして、GST-MEKK1 KD 非存在下で同様の反応を行なった結果を Substrate only に示した。

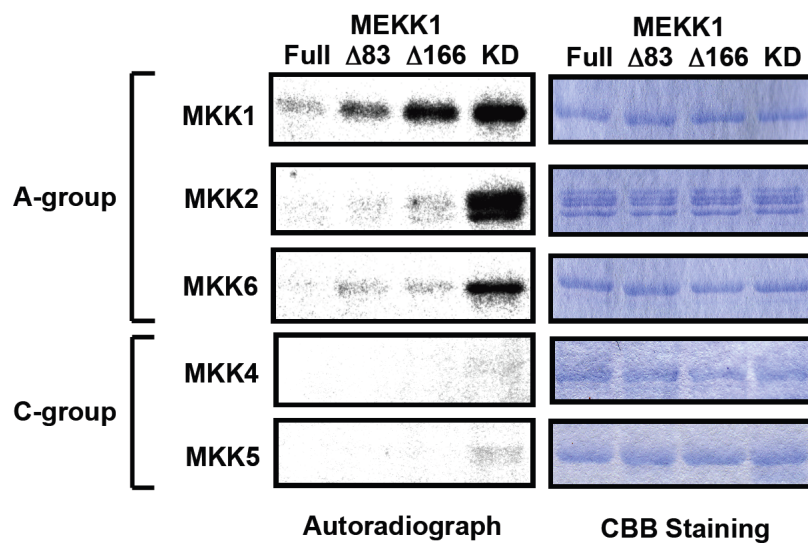


Fig. 19 大腸菌発現系により調製した GST-MEKK1 のリン酸化酵素活性測定
 大腸菌発現系により GST 融合タンパク質として調製した GST-MEKK1 Full、Δ83、Δ166、KD のリン酸化酵素活性を GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN、GST-MKK4 KN、GST-MKK5 KN を基質に [γ - 32 P] ATP を用いて測定した。基質のリン酸化のバンドを Autoradiograph 及び基質タンパク質のバンドを CBB Staining に示した。

1C.3. MEKK1 と MAPKK の相互作用

MEKK1 の基質選択機構を、タンパク質間の相互作用様式、特に MEKK1 リン酸化酵素活性と相互作用の関係を検討するために、酵母 Two-hybrid 法による相互作用解析を行った。MEKK1 Full、KN、KD、KDKN をコードする遺伝子を pBD ベクターに導入し、シロイヌナズナの MAPKK 全 10 種類をコードする遺伝子を pAD ベクターに導入した。両ベクターを酵母 YRG-2 株に形質転換し、ヒスチジン要求性によって相互作用の検出を行った (Fig. 20)。

MEKK1 Full 及び KD は MKK2 との相互作用が確認された。MEKK1 KN 及び KDKN を用いた際には、MKK1、MKK2 に対する相互作用が見られた。また、いずれの MEKK1 を用いた際にも、MKK1 及び MKK2 以外の MAPKK との相互作用は見られなかった。このことから MEKK1 は、少なくともキナーゼドメインにおいて MKK1、MKK2 と相互作用していること、MKK1 がリン酸化された状態であると相互作用が検出できなくなることが示唆された。

そこで、MKK1 に対するリン酸化が相互作用に影響をしているのかを検討するため、MKK1 と MKK2 のリン酸化部位のセリン、スレオニン残基を酸性アミノ酸のアスパラギン酸もしくはグルタミン酸にアミノ酸置換し、リン酸化状態を模倣した活性型の AC を用いて酵母 Two-hybrid 法を行った (Fig. 21A)。MEKK1 Full、MEKK1 KN の遺伝子は pAD ベクターに、MKK1、MKK 2 の WT 及び AC の遺伝子は pBD ベクターに導入した。結果を Fig. 21B に示した。

MEKK1 と MKK1 の相互作用は、MEKK1 KN と MKK1 WT のときのみ相互作用が検出され、MEKK1 が Full もしくは MKK1 AC のときは相互作用が見られなかった。一方、MKK2 との相互作用は、すべてのコンストラクトで相互作用が確認された。この結果から、MEKK1 と MKK1 との相互作用は、MKK1 のリン酸化状態に影響され、リン酸化を受けた活性型の MKK1 は MEKK1 との相互作用が弱くなることがわかった。一方、MKK2 のリン酸化状態は MEKK1 との相互作用に影響しなかった。

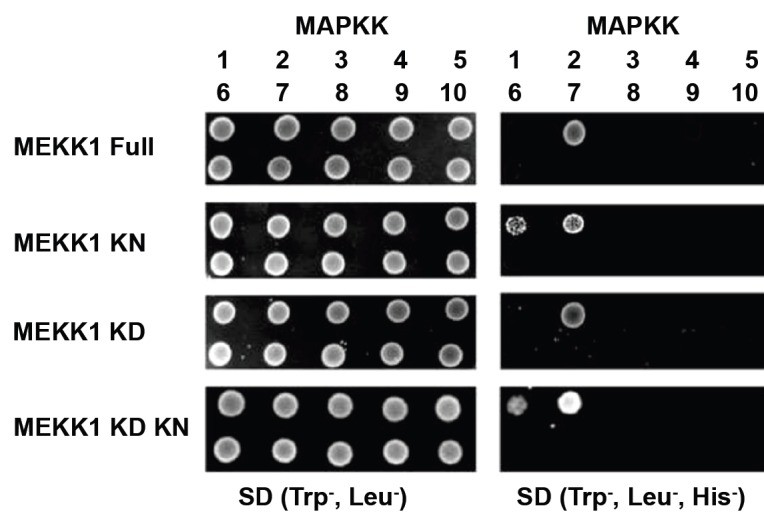
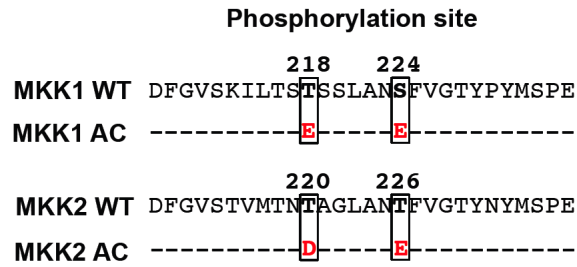


Fig. 20 MEKK1 と MAPKK の酵母 Two-hybrid 法による相互作用の解析

MEKK1 の遺伝子を pBD ベクターに挿入した pBD-MEKK1 及び MAPKK の遺伝子をそれぞれ pAD ベクターに挿入した pAD-MAPKK を酵母 YRG-2 株に Trp と Leu の栄養要求性を利用して形質転換した。SD (Trp⁻, Leu⁻) 及び SD (Trp⁻, Leu⁻, His⁻) 培地での生育を示した。SD (Trp⁻, Leu⁻, His⁻) 培地における生育を指標に相互作用解析を行った。

A



B

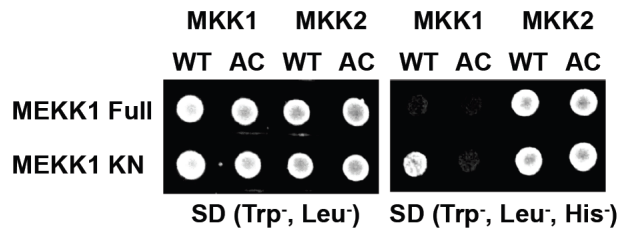


Fig. 21 MEKK1 との相互作用における MKK1 及び MKK2 のリン酸化状態の影響

(A) 野生型 (WT) の MKK1 及び MKK2 と活性型 (AC) の MKK1 AC (T218E/S224E), MKK2 AC (T220D/S226E) のリン酸化サイト周辺のアミノ酸配列を示した。太字はリン酸化サイト (黒字) 及び置換したアミノ酸 (赤字) をそれぞれ示した。

(B) MEKK1 の Full 及び KN の cDNA を pAD ベクターに挿入した pAD-MEKK1 Full 及び KN と MKK1、MKK 2 の野生型 (WT) 及び活性型 (AC) の cDNA を pBD ベクターに挿入した pBD-MKK1 WT, AC, MKK2 WT, AC を酵母 YRG-2 株に Trp と Leu の栄養要求性を利用して形質転換した。SD (Trp⁻, Leu⁻) 培地での生育、SD (Trp⁻, Leu⁻, His⁻) 培地での生育を示した。

1C.4. MEKK1 の N 末端領域によるリン酸化酵素活性の阻害

1C.2.で見られた MEKK1 の N 末端領域とリン酸化酵素活性の関係をさらに検討するために、GST 融合タンパク質として N 末端領域の GST-MEKK1 1-166、1-332 を大腸菌発現系により発現、精製した。これら N 末端領域タンパク質存在下において GST-MEKK1 KD のリン酸化酵素活性を測定することで、N 末端領域のリン酸化酵素活性への影響を調べた。リン酸化酵素活性測定の基質には、セリン/スレオニンキナーゼのモデル基質である MBP を用いた (Fig. 22)。

GST-MEKK1 KD は、N 末端領域非存在下において MBP をリン酸化した。GST-MEKK1 1-166 存在下において、GST-MEKK1 KD の MBP リン酸化活性はほとんど変化しなかったが、GST-MEKK1 1-332 の存在下では、そのリン酸化酵素活性の低下がみられた。また、GST-MEKK1 1-166 と GST-MEKK1 1-332 は、GST-MEKK1 KD によりリン酸化された。

N 末端領域の存在によるリン酸化酵素活性への影響をさらに詳細に検討するため、各 N 末端領域タンパク質量を1倍量、2倍量、4倍量と変化させて、Fig. 22 と同様の実験を行なった (Fig. 23)。GST-MEKK1 1-166 はそのタンパク質量を変化させても、GST-MEKK1 KD の MBP リン酸化活性に対する影響は見られなかった。一方、GST-MEKK1 1-332 のタンパク質量の増加に伴って、GST-MEKK1 KD の MBP リン酸化活性は低下することがわかった。

これらのことから、MEKK1 の N 末端領域がキナーゼドメインの活性を直接抑制する機能を持つことがわかった。さらに、GST-MEKK1 1-166 では影響が見られず、GST-MEKK1 1-332 でリン酸化酵素活性の抑制効果が見られたことから、167 番目から 332 番目のアミノ酸残基が特にキナーゼドメインの持つリン酸化酵素活性を抑制する機能を有していることが示唆された。

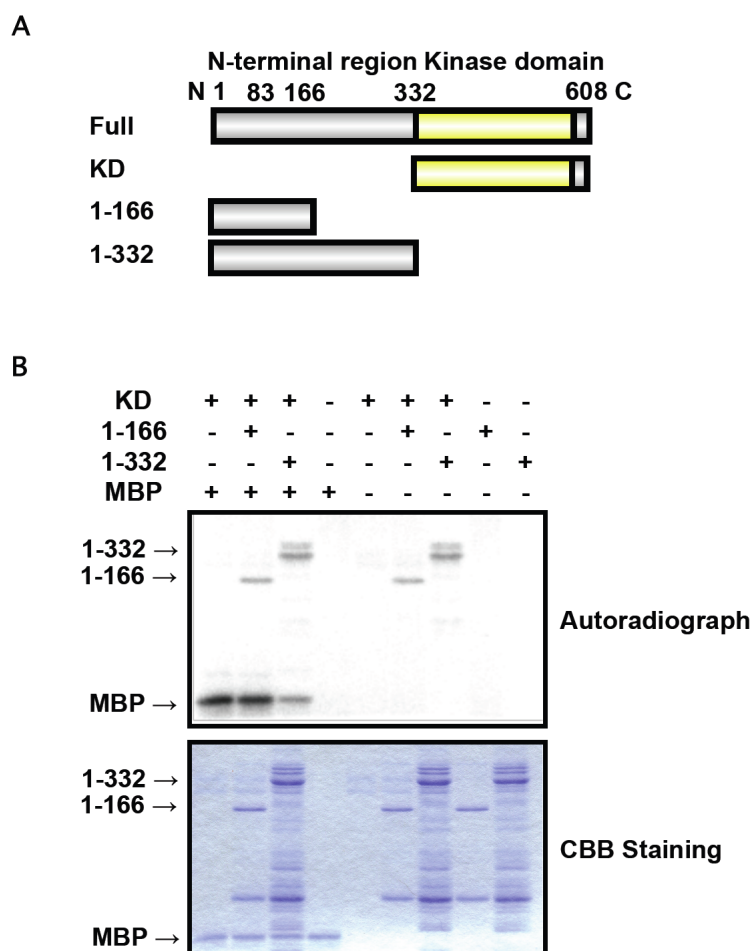


Fig. 22 N 末端領域存在下における MEKK1 KD のリン酸化酵素活性測定

(A) 本実験で用いた N 末端領域 MEKK1 1-166、1-332 の模式図を示した。

(B) GST-MEKK1 1-166、1-332 の存在下における GST-MEKK1 KD のモデル基質 MBP へのリン酸化酵素活性を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を用いて測定した。Autoradiograph 及び CBB Staining の結果を示した。

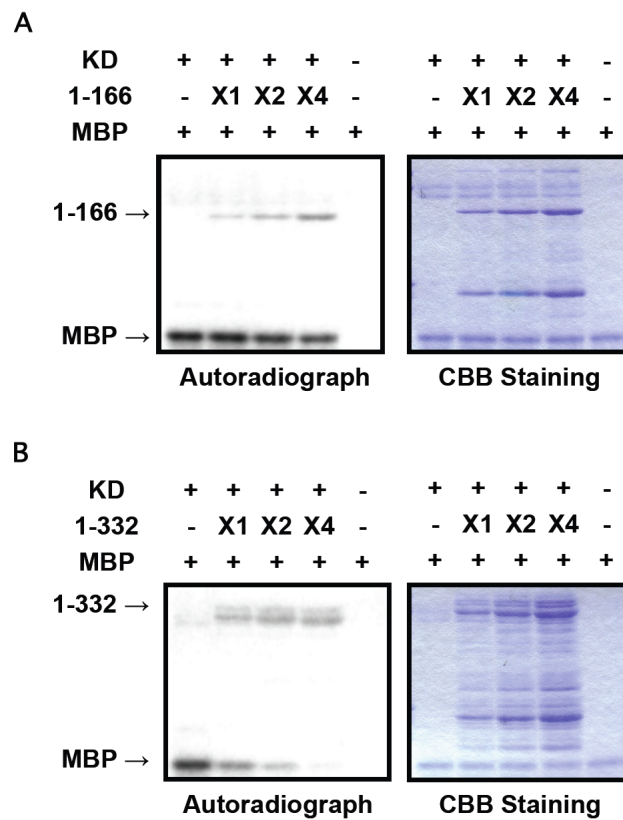


Fig. 23 N 末端領域存在量と MEKK1 KD のリン酸化酵素活性

GST-MEKK1 1-166 (A)、GST-MEKK1 1-332 (B) の存在下における GST-MEKK1 KD のリン酸化酵素活性を MBP を基質に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を用いて測定した。GST-MEKK1 1-166、1-332 のタンパク質添加量を 1 倍 (X 1)、2 倍 (X 2)、4 倍 (X 4) と変化させて検討した結果を Autoradiograph 及び CBB Staining に示した。

1C.5. GST-MEKK1 のリン酸化アミノ酸残基

1C.1.の検討から、GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させた MEKK1 タンパク質 GST-MEKK1 Full、 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ 、KD は自己リン酸化によりバンドシフトすることがわかった。そこで、そのリン酸化アミノ酸残基を特定するため各リン酸化アミノ酸残基を認識する抗体 (抗リン酸化セリン抗体、抗リン酸化スレオニン抗体、抗リン酸化チロシン抗体) を用いて、GST-MEKK1 Full、 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ 、KD、KN、KDKN タンパク質をイムノブロットした。また、各 GST 融合タンパク質の泳動量の確認は抗 GST 抗体を用いて行なった (Fig. 24)。

抗リン酸化セリン抗体によるイムノブロットの結果、GST-MEKK1 Full、 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ 、KD において抗 GST 抗体でみられた2本のバンドのいずれも検出された。また、GST-MEKK1 KN、KDKN では、バンドは検出されなかった。抗リン酸化スレオニン抗体によるイムノブロットでは、抗リン酸化セリン抗体と同様に、GST-MEKK1 Full、 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ 、KD の2本のバンドのいずれも検出された。しかし、抗リン酸化スレオニン抗体では GST-MEKK1 KN においてバンドが弱く検出された。GST-MEKK1 KDKN のバンドは検出されなかった。抗リン酸化チロシン抗体を用いた場合、その他のリン酸化アミノ酸抗体と異なり、N 末端領域を含んでいる GST-MEKK1 Full、 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ において2本のバンドが検出され、GST-MEKK1 KD、KN、KDKN では、バンドは検出されなかった。この結果より、大腸菌内で発現した GST 融合 MEKK1 は、セリン、スレオニン残基だけでなくチロシン残基も自己リン酸化により修飾されていること、またリン酸化チロシン残基は N 末端領域に存在することが示唆された。

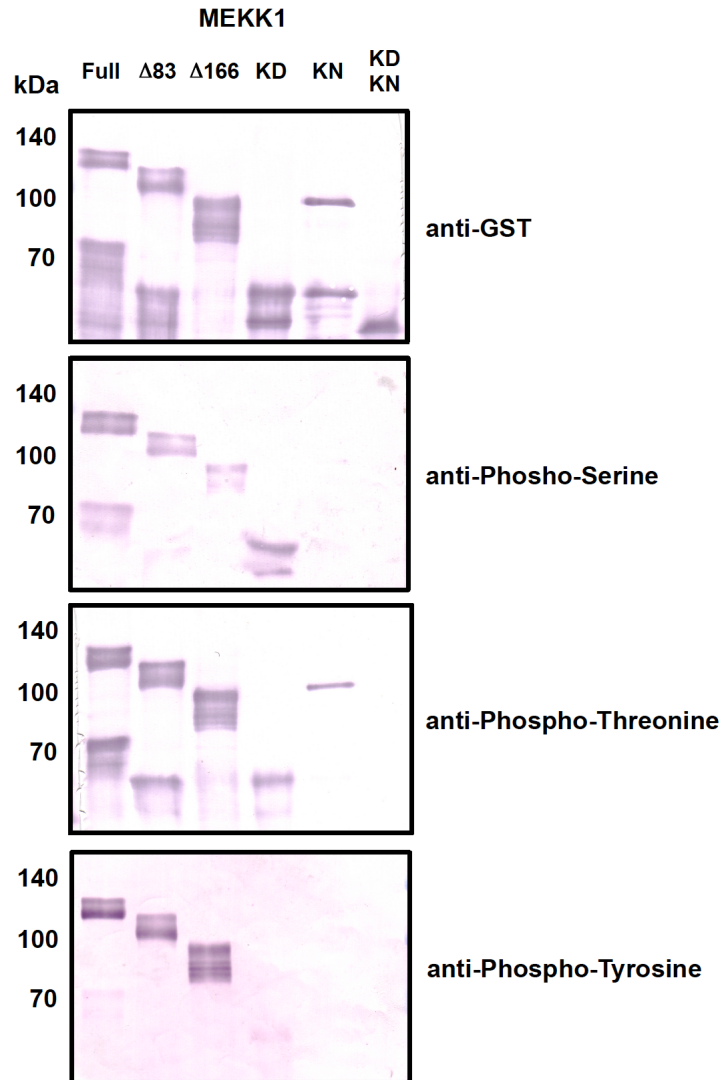


Fig. 24 GST-MEKK1 のリン酸化修飾

大腸菌発現系において GST 融合タンパク質として調製した GST-MEKK1 Full、Δ83、Δ166、KD、KN、KDKN を SDS-PAGE により展開し、抗 GST 抗体 (anti-GST)、抗リン酸化セリン抗体 (anti-Phospho-Serine)、抗リン酸化スレオニン抗体 (anti-Phospho-Threonine)、抗リン酸化チロシン抗体 (anti-Phospho-Tyrosine) を用いてイムノブロットした。図の左に分子量を示した。

1C.6. GST-MEKK1 のチロシンリン酸化

1C.5.において、抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロットで GST-MEKK1 Full、 Δ 83、 Δ 166 と比較して GST-MEKK1 KD の検出がほとんど見られなかったことから、GST-MEKK1 のチロシンリン酸化修飾は、主に N 末端領域に存在していることが示唆された。MEKK1 は N 末端領域において、N 末端側から 38 番目、84 番目、204 番目、323 番目の位置に計 4 つのチロシン残基を持つ (Fig. 25A)。そこで、GST-MEKK1 のチロシンリン酸化修飾サイトを同定するため、これら 4 箇所のチロシン残基をそれぞれリン酸化の修飾を受けないフェニルアラニン残基に置換した、GST-MEKK1 Y38F、Y84F、Y204F、Y323F のタンパク質を大腸菌発現系により調製した。調製したタンパク質の模式図を Fig. 25B に示す。これらチロシン変異型 MEKK1 タンパク質を GST-MEKK1 Full 及び KN を比較対象として、抗 GST 抗体、抗リン酸化セリン抗体、抗リン酸化スレオニン抗体、抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロットをすることにより、MEKK1 タンパク質におけるチロシンリン酸化修飾の影響を調べた (Fig. 26)。

GST-MEKK1 Y38F、Y84F、Y204F、Y323F のいずれのチロシン変異タンパク質も、抗 GST 抗体、抗リン酸化セリン抗体、抗リン酸化スレオニン抗体によるイムノブロットの結果、GST-MEKK1 Full と比較して変化は見られず、約 135 kDa と約 130 kDa の位置に 2 本のバンドが検出された。しかし、抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロットにおいて、GST-MEKK1 Y323F のチロシン変異体では GST-MEKK1 Full との差異はほとんど見られないのに対し、GST-MEKK1 Y204F において約 130 kDa の低分子量側のバンドの検出が弱くなること、GST-MEKK1 Y38F、Y84F では高分子量側のバンドの検出が少し弱くなることがわかった。この結果から、MEKK1 の N 末端領域へのリン酸化サイトは複数存在すると考えられるが、最も影響のあった 204 番目のチロシン残基がリン酸化修飾の主なサイトであることが示唆された。

さらに、チロシン変異体 GST-MEKK1 Y38F、Y84F、Y204F、Y323F タンパク質の基質リン酸化酵素活性を測定した (Fig. 27)。リン酸化酵素活性は GST-MEKK1 Full を比較対象として、1C.2.において GST-MEKK1 Full で活性が見られた GST-MKK1 KN を基質として行なった。

GST-MEKK1 Full、Y38F、Y84F、Y323F において GST-MKK1 KN のリン酸化が確認され、それらと比較して GST-MEKK1 Y204F のリン酸化酵素活性の低下が見られた。Fig. 26 でチロシンリン酸化が最も低下していた 204 番目のチロシン変異型 MEKK1 である GST-MEKK1 Y204F のリン酸化酵素活性が低下していたことから、204 番目のチロシン残基のリン酸化がリン酸化酵素活性に影響する可能性が示唆された。

A

```

1 MDRILARMKK STGRRGGDKN ITPVRRLEER DAARNIN38DA ASCSSSSAED LSVSTSSLMT
61 RSLEFPEPTS FRIGGGVGEM DRI84RSLGVS GPDDLAI166SFD AWEACKKRSS SDVVNRFKSF
121 DLDKVRDQDL SEEGPSGVVV GDSMNHKVQ GQDLSEAGPS GGIVTELSEI GNLITPVDRL
181 VADGVVENRR VMERTPTIVK SKG204LVPNNV VAVGVGVGGG IKGLRPPVLK PPPAMKRPI
241 DHRGSSWDFL THFAPSETVK RPSSSSSSSE DGCDEEEGKE EEAEAEEMGA RFIQLGDTAD
301 ETCSTFTNEG DSSSTVSN332TS PI332PDGGAI I TS332WQKQQLG RGSFSGSVYEG ISGDGFFFAV
361 KEVSLLDQGS QAQECIQQLE GEIKLLSQLQ HQNIVRYRGT AKDGSNLYIF LELVTQGSLL
421 KLYQRYQLRD SVVSLYTRQI LDGLKYLHDK GFIHRDIKCA NILVDANGAV KLADFLAKV
481 SKFN481DIK481SCK GTPFWMAPEV INRKDS541DGYG SPADIWSLGC TVLEMCTGQI PYS541DLEPVQA
541 LFRIGRGTLP EVPDTLSLDA RLFILKCLKV NPEERPTAAE LLNH601PFVRRP LPSVGGSGSG
601 SASPLLR

```

B

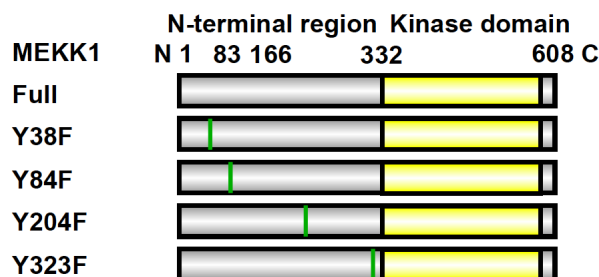


Fig. 25 チロシン変異型 MEKK1 タンパク質の模式図

(A) MEKK1 の N 末端領域に存在するチロシン残基を緑色で示した。黄色の領域はキナーゼドメインを示している。(B) 大腸菌発現系において GST 融合タンパク質として調製したチロシン変異型 MEKK1 のタンパク質模式図を示した。38、84、204、323 番目の Tyr 残基をリン酸化されない Phe 残基に置換したチロシン変異型 MEKK1 Y38F、Y84F、Y204F、Y323F を作製した。置換したチロシン残基の位置を緑線で示した。

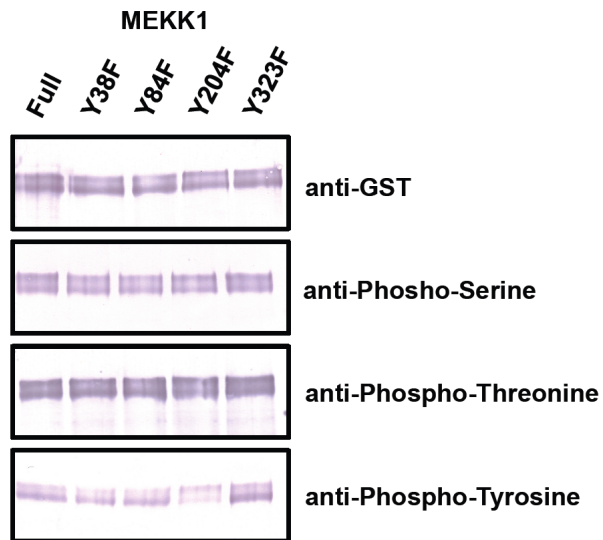


Fig. 26 チロシン変異型 GST-MEKK1 のリン酸化修飾

大腸菌発現系により調製した GST-MEKK1 Full、Y38F、Y84F、Y204F、Y323F を SDS-PAGE により展開し、抗 GST 抗体 (anti-GST)、抗リン酸化セリン抗体 (anti-Phospho-Serine)、抗リン酸化スレオニン抗体 (anti-Phospho-Threonine)、抗リン酸化チロシン抗体 (anti-Phospho-Tyrosine) を用いてイムノブロットした。

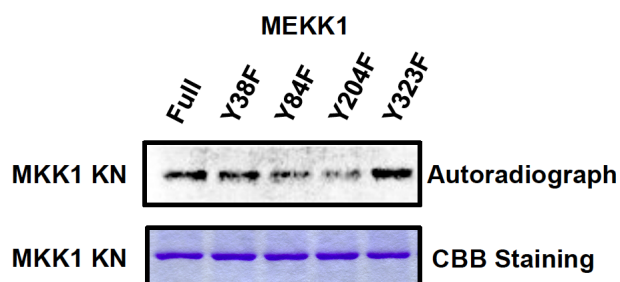


Fig. 27 チロシン変異型 GST-MEKK1 のリン酸化酵素活性測定

大腸菌発現系により調製した GST-MEKK1 Full、Y38F、Y84F、Y204F、Y323F を用いて GST-MKK1 KN を基質としてリン酸化酵素活性測定を行なった。基質のリン酸化のバンドを Autoradiograph 及び基質タンパク質のバンドを CBB Staining に示した。

1C.7. チロシン変異型 MEKK1 と MAPKK との相互作用

1C.3.においてMEKK1のリン酸化酵素活性が酵母 Two-hybrid 法を用いた MKK1 との相互作用に影響することを示した。GST-MEKK1 Y204F の GST-MKK1 KN へのリン酸化酵素活性の低下が見られたことから、チロシン変異体とMKK1、MKK2との相互作用への影響を検証した。相互作用の解析は酵母 Two-hybrid 法を用いた。MEKK1 Full、Y38F、Y84F、Y204F、Y323F、KN の遺伝子を pAD ベクターに、MKK1、MKK 2 の WT 及び AC の遺伝子を pBD ベクターに導入した。両ベクターを酵母 YRG-2 株に形質転換し、ヒスチジン要求性によって相互作用の解析を行った (Fig. 28)。

各チロシン変異型 MEKK1 はいずれも MEKK1 Full と同様に MKK2 との相互作用は検出された。一方で、MKK1 との相互作用は検出されなかった。この結果はこれらチロシン残基のリン酸化は MAPKK との相互作用に影響しないことを示唆している。

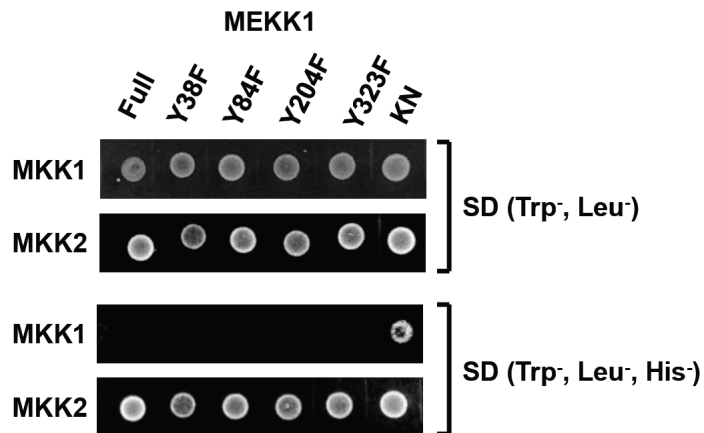


Fig. 28 チロシン変異型 MEKK1 と MKK1 及び MKK2 との相互作用解析

MEKK1 の Full、Y38F、Y84F、Y204F、Y323F、KN の cDNA を pBD ベクターに挿入した pBD-MEKK1 Full、Y38F、Y84F、Y204F、Y323F、KN と MKK1、MKK 2 の cDNA を pAD ベクターに挿入した pAD-MKK1、MKK 2 を酵母 YRG-2 株に Trp と Leu の栄養要求性を利用して形質転換した。SD (Trp⁻, Leu⁻) 培地での生育、SD (Trp⁻, Leu⁻, His⁻) 培地での生育を示した。

1D. 考察

1D.1. 大腸菌発現 GST-MEKK1 タンパク質のリン酸化修飾

大腸菌発現系により GST 融合タンパク質として調製した全長の MEKK1 Full 及び N 末端欠損の MEKK1 Δ 83、 Δ 166、KD タンパク質は SDS-PAGE 上で予測分子量より高分子量側に 2 本のバンドが検出され、そのいずれも完全長の GST-MEKK1 タンパク質であることが C 末端領域を認識する抗 MEKK1 特異抗体でイムノブロットすることで確認された (Fig. 15)。この 2 本のバンドは脱リン酸化により予測分子量の位置に 1 本のバンドとして検出されること (Fig. 16)、また抗リン酸化アミノ酸抗体によりセリン、スレオニン、チロシン残基のリン酸化が検出されたことから (Fig. 24)、大腸菌発現 GST-MEKK1 タンパク質はリン酸化により SDS-PAGE 上でバンドシフトすることがわかった。このバンドシフトは不活性型の GST-MEKK1 KN、KDKN では見られなかったことから大腸菌内で GST-MEKK1 が自己リン酸化酵素活性によりリン酸化修飾されると考えられる (Fig. 15)。またこのバンドシフトは GST-MEKK1 KD においても見られたことからキナーゼドメインのリン酸化修飾が主に関与していることが考えられる (Fig. 15)。また抗リン酸化アミノ酸抗体によるイムノブロットの結果からキナーゼドメインにセリン及びスレオニンのリン酸化が検出された一方、チロシン残基のリン酸化は検出されなかったこと (Fig. 24)、また、チロシン残基を変異させた GST-MEKK1 Y38F、Y84F、Y204F、Y323F でも GST-MEKK1 Full と同様のバンドシフトが検出されたことから (Fig. 26)、キナーゼドメインにおけるセリン及びスレオニンのリン酸化がバンドシフトに影響していることが示唆される。

1D.2. MEKK1 の基質選択性

MEKK1 はこれまでの研究より酵母 Two-hybrid 法を用いた相互作用や酵母の機能相補実験により MKK1、MKK2 を下流因子として持つことが報告されている (Ichimura *et al.* 1998; Mizoguchi *et al.* 1998)。しかしながら、MEKK1 の MAPKK に対するリン酸化酵素活性の測定はほとんどなされていなかった。本研究において大腸菌発現系により調製した MEKK1 のキナーゼドメインはシロイヌナズナの全 10 種類の MAPKK のうち A グループの MAPKK である MKK1、MKK2、MKK6 を選択的にリン酸化した (Fig. 18)。この結果より、MKK1 と MKK2 は MEKK1 と相互作用するだけでなく、MEKK1 によってリン酸化されることが明らかになった。さらに MEKK1 は MKK6 もリン酸化したことから、MKK6 も下流因子として機能する可能性が考えられる。

これまでの酵母 Two-hybrid 法による MEKK1 と MAPKK との相互作用に関する報告から MKK1 及び MKK2 と相互作用することは報告されているが、対象とした MAPKK は MKK1、MKK2、MKK3、MKK4 の4分子種に限られている (Ichimura *et al.* 1998; Mizoguchi *et al.* 1998)。MEKK1 のキナーゼドメインは MKK1、MKK2 だけでなく MKK6 もリン酸化したことから (Fig. 18)、MEKK1 とシロイヌナズナに存在している全 10 種類の MAPKK との相互作用の検討を行った (Fig. 20)。MEKK1 Full 及び KD は MKK2 のみと相互作用が見られ、リン酸化酵素活性を消失させた MEKK1 KN、KDKN は MKK1、MKK2 と相互作用した。いずれのコンストラクトにおいても MKK1、MKK2 以外の MAPKK とは相互作用が見られなかった。MEKK1 は MKK6 に対するリン酸化酵素活性を有しているが、酵母 Two-hybrid 法による相互作用解析では相互作用は検出されなかった。MKK6 はこれまで細胞質分裂の制御に関わるシグナル伝達経路において ANP1 および ANP3 の下流で働くことが報告されており (Takahashi *et al.* 2010)、また BiFC 法により、MKK6 と ANP3 の相互作用が検出されるが、MKK6 と MEKK1 との相互作用は検出されないことも報告されている (Zeng *et al.* 2011)。これらの報告を踏まえると、MKK6 の上流で機能する MAPKKK は MEKK1 よりも ANP3 もしくは ANP1、ANP2 であると考えられる。

これまで、MKK1 は傷害や病原菌感染において活性化すること、一方、MKK2 は低温や高塩によって活性化することが報告されており (Teige *et al.* 2004)、その上流とされる MEKK1 は各シグナルに応じて MKK1 と MKK2 を選択してシグナルを伝達していると考えられている。キナーゼドメインのみの GST-MEKK1 KD では A グループの MAPKK である MKK1、MKK2、MKK6 へのリン酸化酵素活性に違いは見られなかったが、全長及び N 末領域を部分的に欠損させた GST-MEKK1 Full、 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ は MKK1 をリン酸化するものの、MKK2、MKK6 へのリン酸化は検出されないという基質によるリン酸化酵素活性の違いが見られた (Fig. 19)。このことは MEKK1 の N 末端領域、特に 167 番目から 332 番目の領域は、キナーゼドメインの持っている A グループの MAPKK に対する選択性をさらに調節し、MKK1、MKK2、MKK6 の間の選択に関係していると考えられる。

さらに、酵母 Two-hybrid 法による相互作用解析において MEKK1 と MKK1 との相互作用は不活性型の MEKK1 KN、KDKN でのみ検出され、MKK2 との相互作用は MEKK1 の活性に関係なく検出された (Fig. 20)。MKK1 および MKK2 にリン酸化された状態を模倣するアミノ酸置換を導入し、MEKK1 との相互作用を検証したところ、MKK1 AC (リン酸化型 MKK1) は MEKK1 KN との相互作用が見られなかった。一方、MKK2 に対するリン酸化は相互作用に影響しないことがわかった (Fig. 21)。このような相互作用様式の違いと MEKK1 の基質の選択の関連は今後さらに検討していく必要がある。このようにタンパク質間相互作用が、リン酸化の影響を受けることは、他のリン酸化酵素においても報告されてお

り以下に例を示す。病原菌応答のときにフラジェリンのレセプターおよびそのコレセプターとして働く Leucine-rich repeat receptor-like kinase FLS2 と BAK1 は、receptor-like cytoplasmic kinase BIK1 と相互作用し、リン酸化することが報告されている (Lu *et al.* 2010)。共免疫沈降実験の結果、フラジェリン処理によりそれらの相互作用が低下することから、フラジェリンにより活性化された FLS2 と BAK1 が BIK1 をリン酸化することにより、BIK1 がレセプター複合体から解離することが推測されている。

動物の MAPKKK と MAPKK との相互作用において DVD サイトと呼ばれる結合サイトが重要な役割を持つことが報告されている (Takekawa *et al.* 2005)。この DVD サイトは MAPKK の C 末端領域に存在し、そのサイトにおいて MAPKKK のキナーゼドメインと相互作用すること、また MAPKK の活性化に重要であるとされている。また、DVD サイトは MAPKKK と MAPKK の基質選択にも関係しているとされている。動物の MKK4 は N 末端領域を欠損させた MEKK1 (MEKK1 Δ N) と N 末端領域を欠損させた MTK1 (MTK1 Δ N) のいずれからもリン酸化されるが、MKK7 は MEKK1 Δ N にのみリン酸化される。このことは MKK4 が MEKK1 Δ N と MTK1 Δ N のいずれとも相互作用する。一方、MKK7 は MEKK1 Δ N のみ相互作用することと関連していると考えられている (Takekawa *et al.* 2005)。つまり相互作用の違いが基質選択に関係しており、MEKK1 と MKK1、MKK2 の間で見られた相互作用の様式に違いが基質の選択性を行なうための機構として作用していることが考えられる。植物の MAPKK においては動物 MAPKK で保存されているような DVD サイトは見られないが、配列は異なるものの、同様のメカニズムで MAPKKK と MAPKK の相互作用が制御されているかもしれない。

1D.3. MEKK1 のリン酸化酵素活性制御における N 末端領域の役割

酵母の高塩ストレス耐性に関与する MAPK カスケードの MAPKK である PBS2 欠損株に MEKK1 と MKK1 もしくは MKK2 を共発現させると、高塩ストレス下で酵母が生育可能であり、この機能相補は N 末端領域を部分的に欠損した MEKK1 Δ N(288-608)を用いるとさらに増強されることが報告されている (Ichimura *et al.* 1998; Mizoguchi *et al.* 1998)。つまり、MEKK1 の N 末端領域はリン酸化酵素活性を抑制しており、N 末端を欠損させた MEKK1 は全長の MEKK1 と比較して、MKK1/MKK2 に対するリン酸化酵素活性が上昇する、それによりリン酸化された活性型 MKK1/MKK2 が増加し、高塩ストレス耐性獲得のため遺伝子発現が強化され、より強い塩濃度でも生育が可能になったのではないかと考えられる。本研究において大腸菌調製 MEKK1 のリン酸化酵素活性を実際に測定した結果、全長の MEKK1 は MKK1 を弱くリン酸化し、N 末端領域を欠損させることにより段階的にリン酸化が

強まった (Fig. 19)。また、MKK2、MKK6 に対するリン酸化は、キナーゼドメインのコンストラクトで MKK1 と同様に検出されるが、N 末端領域の存在によりほとんど見られなくなった (Fig. 19)。このことは、基質の種類によって差はあるものの N 末端領域はリン酸化酵素活性を抑制する機能を持っていることを表している。つまり、N 末端領域がリン酸化酵素活性を負に制御していることを明らかにした。この結果は、前述の Ichimura らや、Nakagami らの報告を裏付けている (Ichimura *et al.* 1998; Mizoguchi *et al.* 1998)。キナーゼドメイン以外の領域が、リン酸化酵素活性の抑制に働くことはシロイヌナズナの MAPKKK である ANP1 においても報告されている (Kovtun *et al.* 2000)。ANP1 は MEKK1 とは異なり、N 末端側にキナーゼドメインを、C 末端にそれ以外の延長された領域を有している。この C 末端領域を欠損させた ANP DC をプロトプラストで発現させた場合、全長の ANP1 に比べて MAPK のリン酸化が促進されることが報告されている。一方、シロイヌナズナ Raf タイプの CTR1 はその N 末端領域を欠損させると、全長の CTR1 と比較して、リン酸化酵素活性が弱くなる報告がされている (Huang *et al.* 2003)。このように、いくつかの MAPKKK はその役割こそ異なるものの、キナーゼドメイン以外の領域が、リン酸化酵素活性の制御に関与すると考えられる。

N 末端領域によるリン酸化酵素活性の抑制効果をより直接的に検証するため、GST-MEKK1 1-166、1-332 存在下において GST-MEKK1 KD のモデル基質 MBP リン酸化酵素活性を測定した結果、GST-MEKK1 1-166 の存在で影響しなかったが、GST-MEKK1 1-332 存在下で GST-MEKK1 KD の MBP リン酸化酵素活性が低下することがわかった (Fig. 22, Fig. 23)。これらのことは、MEKK1 の N 末端領域が、キナーゼドメインの持つリン酸化酵素活性を抑制する役割を持っていることを支持しており、さらに、特に 167 番目から 332 番目の領域がその抑制に重要な役割を持っていることを示唆している。この領域のうち、特に、227 番目から 329 番目の領域は MEKK1 と同じ A1 サブグループに属する MEKK2、MEKK3、MEKK4 も同様の配列が保存されている。このことは、この領域が機能的に重要な役割を持つことを支持していると考えられる。N 末端領域はこれまでに報告されているような典型的なモチーフ構造を持たず、配列情報から機能を推察することは難しいが、そのアミノ酸配列にセリン残基が多いことが特徴の一つであるといえる (Fig. 8)。N 末端領域だけで 40 カ所のセリン残基が存在し、その他のアミノ酸残基の存在率が約 5% なのに比べてセリン残基の存在率は 12% である。さらにセリン残基の箇所は先述の 167 番目から 332 番目の領域に特に多く存在し、それらセリン残基が機能に関係していることも考えられる。また、チロシンリン酸化の主なサイトであると考えられる 204 番目のチロシン残基も 167 番目から 332 番目の領域に存在しており (Fig. 25A)、このチロシン変異型 MEKK1 の MKK1 に対するリン酸化酵素活性が野性型 MEKK1 と比較して低下していたことから (Fig.

27)、167 番目から 332 番目の領域におけるチロシンリン酸化もリン酸化酵素活性の制御に関係しているかもしれない。

1D.4. MEKK1 のチロシンリン酸化の役割

大腸菌で発現させた MEKK1 タンパク質はセリン/スレオニンリン酸化酵素であるにもかかわらずチロシン残基のリン酸化修飾が検出された (Fig. 24)。このチロシンリン酸化は GST-MEKK1 Full、 $\Delta 83$ 、 $\Delta 166$ で検出されたが、GST-MEKK1 KD ではほとんど検出されなかったことから、チロシンリン酸化サイトは N 末端領域に存在していることが考えられた。N 末端領域に存在する 4 つすべてのチロシン残基をそれぞれフェニルアラニン残基に置換したチロシン変異型 MEKK1 タンパク質のうち、204 番目のチロチン残基の変異体において最もチロシンリン酸化が低下したことからこのチロシン残基が主なリン酸化サイトであることが示唆された (Fig. 26)。しかしながら、いずれのチロシン残基の変異体においても完全なチロシンリン酸化の消失は見られず、複数のチロシンリン酸化サイトが存在すると考えられる。これらチロシンリン酸化サイトを決定するためには、複数のチロシン残基を置換したチロシン変異型 MEKK1 を作製し検討する必要があると思われる。

また、204 番目のチロシン残基の変異体の MKK1 に対するリン酸化酵素活性が、野性型や他のチロシン変異体と比較して低下していたことから、このチロシンリン酸化がリン酸化酵素活性に影響することが示唆された (Fig. 27)。チロシン残基のリン酸化によって活性制御される MAPKKK として、動物の MAPKKK である c-Raf が報告されている (Chong *et al.* 2003; Roskoski 2010)。c-Raf は単量体 G タンパク質である Ras の結合により活性化するが、Ras との結合はチロシンリン酸化酵素 Src による c-Raf のキナーゼドメイン近傍の 341 番目のチロシン残基のリン酸化を誘導し、そのチロシンリン酸化は c-Raf の活性化に影響することが知られている (Chong *et al.* 2001)。

植物は、動物で見られるような典型的なチロシントタンパク質リン酸化酵素を持たないが、シロイヌナズナのリン酸化タンパク質を網羅的に解析したところ、94 箇所のチロシン残基のリン酸化修飾が検出されこれは、検出されたリン酸化サイトの 4.3% であることが報告されている (Sugiyama *et al.* 2008)。この比率は動物細胞におけるチロシンリン酸化の比率と大きな違いがないことが報告された。しかし、報告されたチロシンリン酸化タンパク質には MEKK1 は含まれていなかった。近年、ブラシノステロイドのレセプターやそのコレセプターである Leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK)、BRI1 や BAK1 がチロシン残基の自己リン酸化活性を持っていること、また実際に植物内でチロシン残基のリン酸化が生じていることが報告されてきた (Oh *et al.* 2009; Oh *et al.* 2010)。BRI1 は複数のチロシンリン

酸化サイトを持ち、キナーゼドメイン内の 956 番目のチロシン残基のリン酸化がリン酸化酵素活性に必要であることや、膜近傍ドメインにある 831 番目のチロシン残基のリン酸化はリン酸化酵素活性に必須ではないが、植物内でのブラシノステロイドシグナリングにおいて重要な役割を持つことが報告されている (Oh *et al.* 2009)。また、23 種の LRR-RLK の細胞質ドメインを大腸菌で調製したところ、そのうち 11 種が自己リン酸化活性を持ち、9 種でスレオニン残基のリン酸化、6 種でチロシン残基のリン酸化が確認され、チロシン残基のリン酸化が植物のレセプターキナーゼに幅広く存在していることが示唆された (Oh *et al.* 2009)。本研究において、大腸菌発現系により調製した MEKK1 はチロシンリン酸化修飾を受けていたが (Fig. 24)、実際に、植物内においてこれらチロシン残基のリン酸化を確認することが MEKK1 のチロシンリン酸化修飾の機能をさらに検証する上で今後重要であると思われる。

第2章

MEKK1 を介した低温シグナル伝達経路

2A. 緒論

植物は様々な環境ストレスに常に晒されている。凍結温度すなわち 0°C以下の極端な低温状態の継続は植物の生育、発生、生産性に影響する要因の1つである。一般的に、温帯以北を起源とするシロイヌナズナやハウレンソウのような植物は 0°C~12°C程度の凍結しない低温に晒されている期間に凍結への耐性を増強するメカニズムを進化させてきた。この現象は低温馴化と呼ばれている。一方で、熱帯や亜熱帯の植物は低温ストレスに感受性で、低温馴化のメカニズムを持たない。シロイヌナズナは比較的短時間で低温馴化が起こること (Gilmour *et al.* 1988)、また、モデル植物として多くの知見があることから、低温馴化の研究に多く用いられてきた。これまでの研究から低温馴化した植物において、細胞膜の脂質組成の変化 (Uemura & Steponkus 1994; Uemura *et al.* 1995)、糖等の細胞内適合溶質の蓄積 (Koster & Lynch 1992; Wanner & Juntila 1999; Kamata & Uemura 2004)等の様々な細胞内での変化が起こることが報告されている。

また、低温応答遺伝子の発現解析から、低温馴化の遺伝子レベルでの制御機構が明らかになってきた。マイクロアレイの結果から、多くの遺伝子の発現が低温により変動することが報告された (Seki *et al.* 2001)。それら低温誘導性遺伝子の多くが c-repeat binding factor、CBF1、CBF2、CBF3 (CBF1/DREB1b、CBF2/DREB1c、CBF3/DREB1a) と呼ばれる転写因子によって転写制御されていることがわかっている。CBF/DREB1 型の転写因子は CRT/DRE 配列 (c-repeat/dehydration-responsive) や ABA 非依存配列 (ABA-independent sequence element) と呼ばれるプロモーター配列に結合する。cold-responsive (COR) 遺伝子群は CRT/DRE 配列をプロモーター領域に持ち、CBF がそのプロモーター領域に結合することで遺伝子発現が制御される (Murayama *et al.* 2004)。シロイヌナズナ COR 遺伝子である COR78/RD29A、COR47、COR15A、COR6.6 は低温により誘導され、group 2 LEA タンパク質として知られる dehydrin をコードしている (Thomashow *et al.* 1998)。LEA タンパク質は細胞膜の安定化や、タンパク質が凝集することを防ぐために重要であると考えられている (Hundertmark & Hincha 2008)。また CBF の発現も低温により誘導されること、またその誘導は induce of CBF expression 1 (ICE1) を介して制御されていることが報告されている (Chinnusamy *et al.* 2003、Lee *et al.* 2005)。さらに ICE1 は恒常的に発現が見られる遺伝子であるが、CBF の発現誘導は低温応答においてのみ生じることから、ICE1 が下流遺伝子の転写を活性化するためには低温により誘導される翻訳後修飾が重要であると考えられている。実際に、ICE1 がポリユビキチン化により負に制御されること (Dang *et al.* 2006)、SUMO 化されることにより正に制御されることが報告されている (Miura *et al.* 2007)。また、ICE1 はリン酸化されることも示唆されている

(Chinnusamy *et al.* 2007)。しかしながら、低温の感受から段階的な転写因子の活性化や低温応答遺伝子の発現に至までのシグナル伝達経路はあまりわかっていない。

低温に晒された植物細胞において、数秒以内に細胞内 Ca^{2+} レベルの一過的な上昇が確認され(Knight *et al.* 1991)、この現象も低温の感受において重要な役割を果たしていると考えられている。植物は CaM (calmodulin)、CMLs (CaM-like)、CDPKs (Ca²⁺-dependent protein kinases)、CCaMK (Ca²⁺-and Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase)、CAMTA (CaM-binding transcription activator)、CBLs (calcineurin B-like proteins)、CIPKs (CBL-interacting protein kinases)を含む多くの Ca^{2+} の結合タンパク質を持っている(Defalco *et al.* 2010)。CIPK7 が CBL1 と相互作用すること、また低温による CIPK7 の転写誘導に CBL1 が関与することが報告されている (Huang *et al.* 2011)。CAMTA3 は CBF2 のプロモーターに結合し、その発現を正に制御すること、さらに CAMTA1 CAMTA3 の二重遺伝子欠損植物は凍結耐性が低下するも報告されている (Doherty *et al.* 2009)。

低温馴化においてMAPKカスケードも機能することが報告されている。シロイヌナズナのMPK4とMPK6が低温により活性化すること (Ichimura *et al.* 2000)、MPK4とMPK6は低温依存的にMKK2によってリン酸化されることが報告されている (Teige *et al.* 2004)。また活性化型MKK2過剰発現植物が低温馴化なしに凍結耐性を示す一方で、MKK2遺伝子欠損植物は低温馴化できないことから、低温においてMKK2-MPK4/MPK6の経路が機能することが示唆されている(Teige *et al.* 2004)。また、MKK2過剰発現植物においてCBF2、CBF3の遺伝子発現が正に制御されていることも報告されている。これまでの様々な報告よりMEKK1がMKK2の上流候補であることが考えられてきた (Ichimura *et al.* 1998; Mizoguchi *et al.* 1998)。1章において、MEKK1のキナーゼドメインがMKK2を含むA-groupのMAPKKに対するリン酸化酵素活性を有していることを示した、しかしながら、これまで植物内在性MEKK1の活性を測定した報告は少なく、低温状態において実際にMEKK1が活性化するのはわかっていない。また、低温や高塩ストレスにおいてMKK2が活性化する一方、MKK1はそれらのストレスにより活性化せず、傷害や病原菌の感染により活性化するというように、各ストレスに応じてMAPKKが選択的に活性化することが報告されている (Teige *et al.* 2004)。

本章では、低温処理したシロイヌナズナよりMEKK1特異抗体を用いて免疫沈降したMEKK1のリン酸化酵素活性を測定することで、低温におけるMEKK1の活性制御や基質の選択について検証した。さらに低温応答におけるMEKK1の上流シグナル伝達経路を明らかにするためMEKK1に対するリン酸化に着目し、 Ca^{2+} シグナリングがMEKK1の上流経路として関与するのかを検証した。最近、calcium/calmodulin (Ca^{2+} /CaM) -regulated receptor-like kinase、CRLK1が低温シグナリングにかかわるリン酸化酵素であり(Yang *et al.* 2009)、

MEKK1と相互作用することが報告された (Yang *et al.* 2010)。このCRLK1がMEKK1に対するリン酸化酵素活性を有しているのかについても検討を行った。

2B. 材料と方法

2B.1. シロイヌナズナの栽培

実験に用いた *Arabidopsis thaliana* Columbia 系統種子は、本研究室で冷蔵保存してあったものを用いた。植物の無菌培養には Gamborg's B5 培地を用いた。

使用した培地の組成 (1 l あたり) とその調整法を以下に示す。Gamborg's B5 Medium Salt Mixture は日本製薬社のものを用い、Gamborg's Vitamin Solution は Sigma 社ものを用いた。

Gamborg's B5 培地:	Gamborg's B5 Medium Salt Mixture	3.3 g
	Sucrose	20 g
	Gamborg's Vitamin Solution	1 ml
	イオン交換水	1 l

1 N KOH で pH5.7 に調整し、Agar を 8 g 加えた後、オートクレーブ滅菌を行った。

•播種前の殺菌処理として、まず 70%エタノールを 1 ml 加えて、ボルテックスし、3 分間静置した。その後、エタノールを捨て、次亜塩素酸/Triton 溶液を 1 ml 加え、7 分間混和して殺菌した後、種子を滅菌水で 5 回洗浄した。0.2%寒天液に懸濁後、Gamborg's B5 培地に播種した。

次亜塩素酸/Triton 溶液:	20% Triton X-100	5 μ l
	次亜塩素酸ナトリウム	200 μ l
	イオン交換水	up to 1 ml

•種子を植えた培地を 4°C で 1-2 日保存した後、22°C・連続光下に移して生育させた。

2B. 2. シロイヌナズナ低温処理

2B.1.に示した方法で、野生型植物を生育させ、低温処理を行った。発芽後 2 週間の実生をイオン交換滅菌水 20 ml の入った丸シャーレに 1 サンプル当たり約 15 個体浮かべ、22°C の連続光の条件で一晩置いた。低温処理は、植物を置いているシャーレを氷上に移し、シャーレ内の水と植物を冷やすことで行った。指定時間経過した後、植物体を即座に液体窒素で凍らせた。EGTA による前処理として、終濃度 10 mM の EGTA になるように、低温処理の 1 時間前にシャーレに溶液を添加した。

2B.3. 植物細胞抽出液の調製

・植物組織約 0.2g を液体窒素中で破碎後、タンパク質抽出バッファー 1 ml を加えさらにすりつぶした。

タンパク質抽出バッファー:	100 mM	Tris-HCl (pH8.5)
	1 mM	EDTA
	150 mM	NaCl
	1%	Triton X-100
	2 mM	DTT
	1 mM	PMSF
	1 mg/ml	Leupeptin
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	25 mM	NaF
	50 mM	β -glycerophosphate

・エッペンに移して、15000 rpm、4°C で 30 分間遠心し、上清を回収した。
・抽出したタンパク質は 1B.2.3.と同様にブラッドフォード法で定量した。定量には Bio-Rad 社の Proein Assay を使用した。

2B.4. 免疫沈降

・2B.3.で調製したタンパク質抽出液（タンパク質 2 mg）に MEKK1 特異抗体を 1/200 倍量または MPK4 抗体 (Anti-AtMPK4 antibody、Sigma 社) を 1/1000 倍量加え、4°C で 1 時間静置した。
・タンパク質抽出バッファーで 3 回洗浄し、1/2 倍に希釈した protein A sepharose を 20 μ l

加え、さらに 4°C で 3 時間、攪拌、吸収させた。

・遠心分離により回収したレジンを、タンパク質抽出バッファーで 3 回洗浄した。

2B.5. イムノブロット

2B.4. で免疫沈降したサンプルのイムノブロットを免疫沈降に用いた抗体を一次抗体として行った。2B.4. の免疫沈降物に 3 × SDS sample buffer を 7.5 μl 加え、100°C で 5 分間加熱後、1B.3. と同様の方法でイムノブロットを行った。

それぞれのイムノブロットに用いた各種特異抗体を以下に示す。

•MEKK1

一次抗体 : MEKK1 特異抗体

二次抗体 : Alkaline phosphatase conjugated GOAT anti rabbit IgG (CHEMICON社)

•MPK4

一次抗体 : Anti-AtMPK4 antibody (Sigma社)

二次抗体 : Alkaline phosphatase conjugated GOAT anti rabbit IgG (CHEMICON社)

2B.6. 大腸菌発現ベクターの構築

GST-MEKK 2 KN、GST-MEKK2 KDKN、GST-MEKK3 KN、GST-MEKK3 KDKN、GST-CRLK1タンパク質調製するための大腸菌発現用ベクターを作製した。作製したベクターについて以下に記した。

名前	アミノ酸領域	アミノ酸置換
pGEX-MEKK2	1-773	
pGEX-MEKK2 KD	501-773	

pGEX-MEKK2 KN	1-773	529 番目のリジン残基をアルギニンに置換
pGEX-MEKK2 KDKN	501-773	529 番目のリジン残基をアルギニンに置換
pGEX-MEKK3	1-560	
pGEX-MEKK3 KD	303-560	
pGEX-MEKK3 KN	1-560	331 番目のリジン残基をアルギニンに置換
pGEX-MEKK3 KDKN	303-560	331 番目のリジン残基をアルギニンに置換
pGEX-CRLK1	29-440	

MEKK2、MEKK3、CRLK1のインサート断片は、1B.1.1と同様に2週間生育したシロイヌナズナの実生より得たcDNA(本研究室に保存されていたもの)を鋳型としたPCRにより増幅した。

プライマーの配列を以下に示した。

	Primer name	sequence (5' → 3')
MEKK2	MEKK2- <i>EcoR</i> I Forward	gaaagaattcatgaagaagtcgctcggataag
	MEKK2- <i>SaI</i> I Reverse	gtttgtcgactcatctacggattagcggagatgt
MEKK3	MEKK3- <i>EcoR</i> I Forward	gaaagaattcatggacgtaactgctatcttc
	MEKK3- <i>Xho</i> I Reverse	gtttctcgagtcaaagattataacaaatgg
CRLK1	CRLK1 M28 <i>BamH</i> I Forward	gaaaggatccttctgcttaggtatcatag
	CRLK1- <i>SaI</i> I Reverse	gtttgtcgacttacaatacagcttctcag

- 制限酵素は、プライマー配列に含まれる制限酵素サイトに対応するものを用いた。
- 調製したインサート断片を挿入する発現用プラスミドベクターとして pGEX4T-1 を使用した。
- ベクターの作成は、1B.1.3~ 1B.1.10と同様に行なった。

MEKK2 の N 末端領域を欠損した MEKK2 KD をコードする遺伝子を含むプラスミドおよび

MEKK3 の N 末端領域を欠損した MEKK3 KD をコードする遺伝子を含む各プラスミドの作製を行った。

PCRのtemplateはpGEX-MEKK2、pGEX-MEKK3のプラスミドをそれぞれ用いた。作製は、1B.1.11.と同様の方法で行なった。

以下にプライマーの配列を示す。

	Primer name	sequence (5' → 3')
MEKK2 KD	MEKK2 KD- <i>EcoR</i> I Forward	gaaagaattcatgtggcaaaagggtcaacttct
	MEKK2- <i>SaI</i> I Reverse	gtttgtcgactcatctacggattagcggagatgt
MEKK3 KD	MEKK3 KD- <i>EcoR</i> I Forward	gaaagaattcatgtggctgaagggtcaacttct
	MEKK3- <i>Xho</i> I Reverse	gtttctcgagtcaaagattataacaaatgg

MEKK2 の 529 番目の Lys 残基を Arg 残基に置換した MEKK2 KN 及び MEKK2 KDKN をコードする遺伝子を含む各プラスミドおよび MEKK3 の 331 番目の Lys 残基を Arg 残基に置換した MEKK3 KN 及び MEKK3 KDKN をコードする遺伝子を含む各プラスミドの作製を行った。

PCRのtemplateはpGEX-MEKK2、pGEX-MEKK2 KD、pGEX-MEKK3、pGEX-MEKK3 KDのプラスミドをそれぞれ用いた。作製は、1B.1.12.と同様の方法で行なった。

以下にプライマーの配列を示す。

	Primer name	sequence (5' → 3')
MEKK2 KN, KDKN	MEKK2 K529R Forward	ttctttgctgtcaggggaagtttcaactt
	MEKK2 K529R Reverse	aagtgaaactccctgacagcaaagaa
MEKK3 KN, KDKN	MEKK3 K331R Forward	ttctttgctgtcaggggaagtttcaactt
	MEKK3 K331R Reverse	aagtgaaactccctgacagcaaagaa

2B.7. GST融合タンパク質の発現、精製及び、定量

GST融合タンパク質として、GST-MEKK2 KN、GST-MEKK2 KDKN、GST-MEKK3 KN、GST-MEKK3 KDKN、GST-CRLK1を調製した。各種タンパク質の調製には、2B.7.で作成したpGEX-MEKK2 KN、pGEX-MEKK2 KDKN、pGEX-MEKK3 KN、pGEX-MEKK3 KDKN、pGEX-CRLK1プラスミドを用いた。1B.2.と同様にGST融合タンパク質を、大腸菌内で発現、精製した。

2B.8. リン酸化酵素活性測定

2B.8.1. 免疫沈降したMEKK1及びMPK4のリン酸化酵素活性測定

2B.4.で免疫沈降したサンプルのリン酸化酵素活性を測定した。免疫沈降した MEKK1 のリン酸化酵素活性は 1B.2.で調製した GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN を基質タンパク質として用いて測定した。また、免疫沈降した MPK4 のリン酸化酵素活性測定にはモデル基質である MBP を基質タンパク質として用いた。

1B.5.と同様に、リン酸化酵素活性の測定は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP から基質への放射活性の転移反応により行った。

2B.8.2. 植物細胞抽出液のリン酸化酵素活性測定

2B.3.で調製したシロイヌナズナ細胞抽出液のリン酸化酵素活性を測定した。1B.2.及び2B.7.で調製した GST-MEKK1 KN、GST-MEKK2 KN、GST-MEKK3 KN、GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN を基質タンパク質として用いて測定した。リン酸化酵素活性の測定は、1B.5.と同様に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP から基質への放射活性の転移反応により行った。

2B.8.3. GST-CRLK1のリン酸化酵素活性測定

2B.7.で調製したGST-CRLK1のリン酸化酵素活性を測定した。1B.2.及び2B.7.で調製した GST-MEKK1 KN、GST-MEKK2 KN、GST-MEKK3 KN、GST-MEKK1 KDKN、GST-MEKK2 KDKN、GST-MEKK3 KDKNを基質タンパク質として用いて測定した。リン酸化酵素活性の測定は、1B.5.と同様に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPから基質への放射活性の転移反応により

行った。また、終濃度0.5 mMのCaCl₂及び0.2 μMまたは2 μMのカルモジュリン (Sigma社) を反応液に添加し、同様にリン酸化酵素活性の測定を行った。
件で生育させた植物も観察した。

2C. 結果

2C.1 低温シグナリングにおける MEKK1 の活性化

シロイヌナズナの実生を4°Cに移動し、0、10、30、60、180 分間低温処理を行った。低温処理した実生より細胞抽出液を調製し、抗 MEKK1 特異抗体により内在性 MEKK1 を免疫沈降した。免疫沈降物を抗 MEKK1 特異抗体を用いてイムノブロットしたところ、MEKK1 の予測分子量約 66 kDa の位置に1本のバンドが検出された。この内在性 MEKK1 のタンパク質量は低温処理を通して変化が見られなかった (Fig. 29A)。次に、免疫沈降した MEKK1 のリン酸化酵素活性を基質に GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN を用いて測定した (Fig. 29B)。低温処理 10 分以降で GST-MKK2 KN に対するリン酸化が検出されたが、GST-MKK1 KN、GST-MKK6 KN に対するリン酸化の増加は検出されなかった。各基質に対する MEKK1 のリン酸化酵素活性を定量した結果を Fig. 29C に示した。定量は3回の独立した結果により行い、0分処理の MKK2 のリン酸化を 100 として、それぞれの基質のリン酸化量を算出した。0分処理において GST-MKK1 KN、GST-MKK6 KN のリン酸化は GST-MKK2 KN に対するリン酸化の約半分量で、低温処理を通じて変化しなかった。一方、GST-MKK2 KN に対するリン酸化は 10 分後に約 150 に到達し、180 分までそのレベルは維持された。これらの結果は MEKK1 が低温ストレス下で活性化し、MKK2 を選択的にリン酸化することを示唆している。低温において、MPK4 が活性化することがこれまでに報告されている (Ichimura *et al.* 2000)。そこで低温処理の確認として、同じ細胞抽出液から MPK4 を免疫沈降し、モデル基質 MBP を基質に用いてリン酸化酵素活性を測定した (Fig. 30)。免疫沈降物を抗 MPK4 抗体でイムノブロットした結果より、MPK4 の免疫沈降が確認された。また、低温処理を通してタンパク質量の変化は見られなかった。MPK4 のリン酸化酵素活性は 10 分後より検出され、30 分から 60 分にかけて最大活性に到達した。

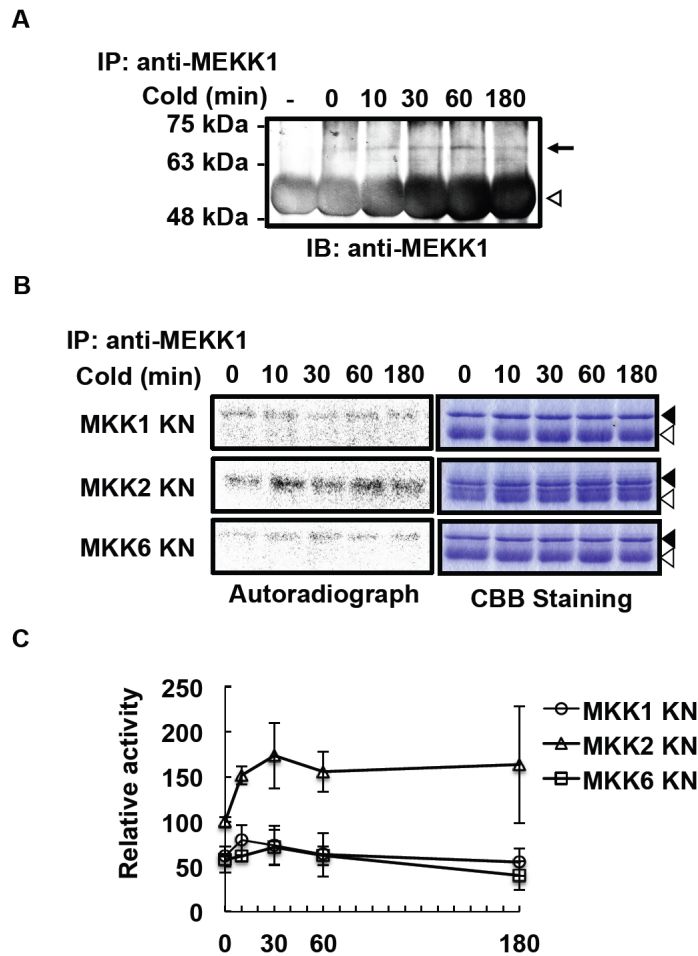


Fig. 29 低温処理シロイヌナズナ芽生えから免疫沈降した MEKK1 のリン酸化酵素活性測定

(A)シロイヌナズナの芽生えを 0、10、30、60、180 分間低温処理し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液から抗 MEKK1 抗体 (anti-MEKK1) により MEKK1 を免疫沈降した。免疫沈降物を SDS-PAGE により展開し、PVDF 膜に転写後、抗 MEKK1 抗体 (anti-MEKK1) を用いてイムノブロットした。図の左には分子量を示した。矢印は MEKK1 の位置、△は IgG の重鎖の位置をそれぞれ示した。(B)免疫沈降物と各 MAPKK (GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN) を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在下で 37°C、20 分間反応させた。反応後、SDS-PAGE で展開し、ゲルを CBB 染色し (CBB Staining)、BAS2500 を用いて放射活性を検出した (Autoradiograph)。◀は基質の位置を、△は IgG の重鎖の位置をそれぞれ示した。(C)各 MKK のリン酸化を定量した。各リン酸化の相対量を低温処理 0 分における MKK2 のリン酸化を 100 として計算し、平均値で表した。各エラーバーは3回の独立した結果に基づく標準誤差を示した。

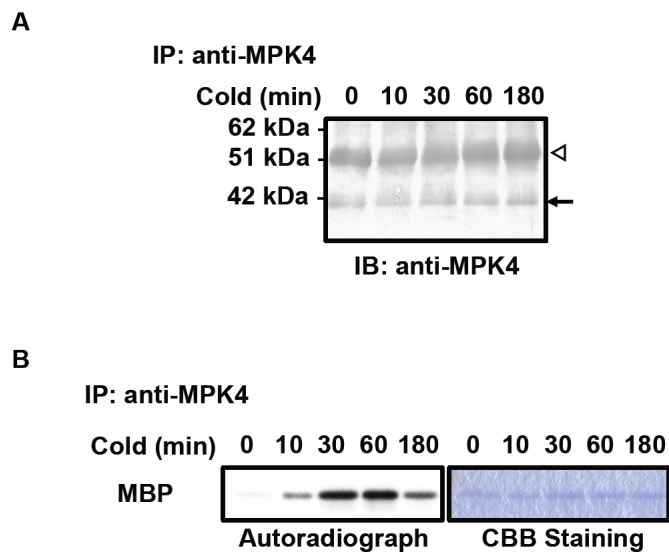


Fig. 30 低温処理シロイヌナズナ芽生えから免疫沈降した MPK4 のリン酸化酵素活性測定

(A) Fig. と同じ細胞抽出液から抗 MPK4 抗体 (anti-MPK4) により MPK4 を免疫沈降した。免疫沈降物を SDS-PAGE により展開し、PVDF 膜に転写後、抗 MPK4 抗体 (anti-MPK4) を用いてイムノプロットした。図の左には分子量に示した。矢印は MPK4 の位置、△は IgG の重鎖の位置をそれぞれ示した。(B) 免疫沈降した MPK4 のリン酸化酵素活性をモデル基質 MBP に対するリン酸化により測定した。MBP のリン酸化のバンドを Autoradiograph 及び MBP タンパク質のバンドを CBB Staining に示した。

2C.2. 低温における Ca^{2+} シグナリングを介した MEKK1 のリン酸化

低温下での MEKK1 の活性制御メカニズムを明らかにするため、MEKK1 のリン酸化に着目し実験を行った。低温処理したシロイヌナズナの芽生えより細胞抽出液を調製し、GST-MEKK1 KN を基質にリン酸化酵素活性を測定した。また、MEKK1 と同じグループに属している MEKK2 及び MEKK3 の不活性型タンパク質 GST-MEKK2 KN、GST-MEKK3 KN も基質として用いた。細胞抽出液による GST-MEKK1 KN へのリン酸化活性は低温処理により増加したが、GST-MEKK2 KN、GST-MEKK3 KN へのリン酸化は検出されなかった (Fig. 31)。シロイヌナズナの細胞において低温処理により細胞内 Ca^{2+} の濃度が急速に増加することが以前より報告されている (Knight *et al.* 1996)。そこで低温依存的に増加する MEKK1 へのリン酸化に細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が影響するのかを検証するため、実生を Ca^{2+} キレーターである EGTA で 1 時間前処理し、その後に低温処理を行った。EGTA 存在下で低温処理した実生より細胞抽出液を調製し、同様にリン酸化酵素活性の測定を行ったところ、GST-MEKK1 KN へのリン酸化は EGTA 前処理によって抑制された (Fig. 31)。さらに、MEKK1 の下流候補 MKK が、EGTA 存在下/非存在下で低温処理した実生から得た同じ細胞抽出液でリン酸化されるかを検証した。基質には GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN を用いた。GST-MKK2 KN は低温処理後時間依存的にリン酸化され、そのリン酸化は EGTA 前処理によって抑制された (Fig. 32)。対照的に、GST-MKK1 KN と GST-MKK6 KN へのリン酸化は EGTA 存在下/非存在に関わらず検出されなかった。

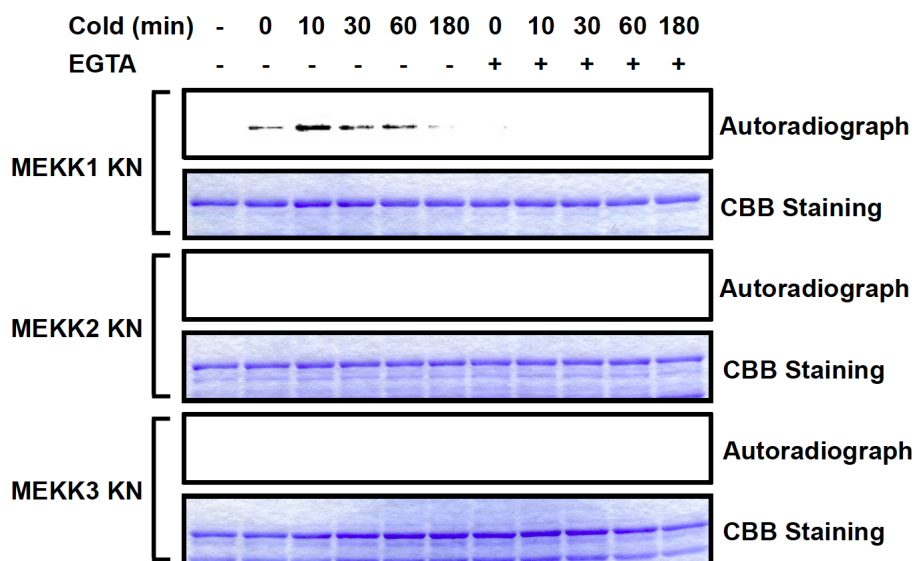


Fig. 31 低温処理シロイヌナズナ芽生え由来細胞抽出液による MEKK へのリン酸化
シロイヌナズナの芽生えを 0、10、30、60、180 分間低温処理し、細胞抽出液を調製した。また低温処理は EGTA 存在下 (+) または非存在下 (-) で行った。細胞抽出液 (0.1 mg) と各 MEKK タンパク質 (GST-MEKK1 KN、GST-MEKK2 KN、GST-MEKK3 KN) を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在下で 37°C、20 分間反応させ、MEKK タンパク質へのリン酸化酵素活性を測定した。基質のリン酸化のバンドを Autoradiograph 及び基質タンパク質のバンドを CBB Staining に示した。

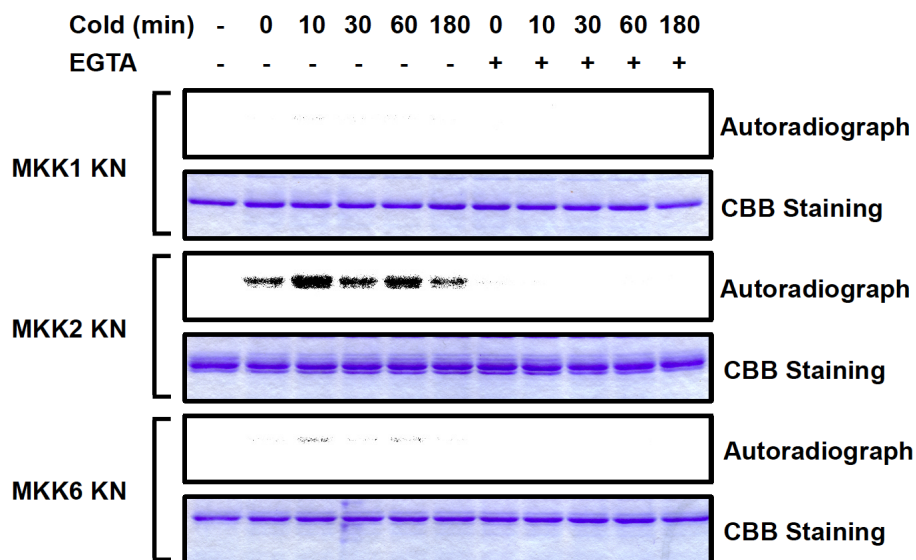


Fig. 32 低温処理シロイヌナズナ芽生え由来細胞抽出液による MKK へのリン酸化
 Fig. で用いたタンパク質抽出液を用いて同様に、各 MKK タンパク質 (GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、GST-MKK6 KN) へのリン酸化を解析した。基質のリン酸化のバンドを Autoradiograph 及び基質タンパク質のバンドを CBB Staining に示した。

2C.3. CRLK1 による MEKK1 のリン酸化

最近、Ca²⁺/CaM-regulated receptor-like kinase、CRLK1 が低温シグナリングにかかわるリン酸化酵素であり、そのリン酸化酵素活性が Ca²⁺/カルモジュリンによって制御されることが報告された (Yang *et al.* 2009)。さらに、GST プルダウン法や BiFC 法により CRLK1 と MEKK1 が相互作用することが報告された (Yang *et al.* 2010)。しかしながら CRLK1 が MEKK1 に対するリン酸化酵素活性を有しているのか検証されていない。そこで CRLK1 を大腸菌発現系により GST 融合タンパク質として調製し、GST-CRLK1 のリン酸化酵素活性を GST-MEKK1 KN、GST-MEKK2 KN、GST-MEKK3 KN、GST-MEKK1 KDKN、GST-MEKK2 KDKN、GST-MEKK3 KDKN を基質として測定した。その結果、GST-CRLK1 は強い自己リン酸化酵素活性を示した (Fig. 34A)。GST-CRLK1 は GST-MEKK1 KN をリン酸化し、GST-MEKK2 KN を弱くリン酸化し、GST-MEKK3 KN に対するリン酸化はほとんど見られなかった (Fig. 34A)。GST-CRLK1 は GST-MEKK1 KDKN も GST-MEKK1 KN と比較すると弱いながらもリン酸化した。この結果は、CRLK1 による MEKK1 の主なリン酸化サイトが MEKK1 の N 末端領域にあることを示唆する。前述のように、CRLK1 は Ca²⁺/カルモジュリンの存在によりリン酸化酵素活性が増加することが報告されている (Yang *et al.* 2009)。そこで Ca²⁺/カルモジュリン存在下での GST-MEKK1 KN へのリン酸化酵素活性を測定したところ、GST-CRLK1 による GST-MEKK1 KN へのリン酸化は Ca²⁺ とカルモジュリンの存在により増加した (Fig. 34B)。

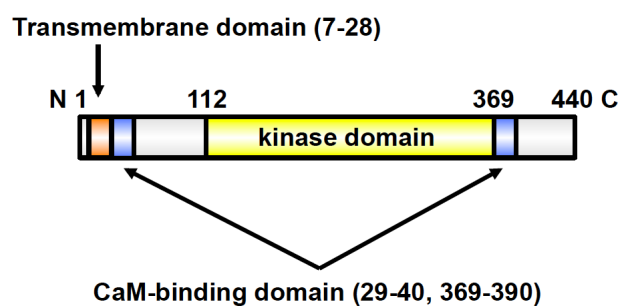


Fig. 33 CRLK1 のドメイン構造

CRLK1のドメイン構造を示した。CRLK1は全長440アミノ酸残基で構成されており、C黄色で示した112番目から369番目のアミノ酸残基の領域がセリン/スレオニンリン酸化酵素活性を持つ触媒領域とされるキナーゼドメイン (kinase domain) である。7番目から28番目のアミノ酸残基は膜貫通領域を、28番目から49番目及び369番目から390番目のアミノ酸残基は2つのCaM-binding domainをコードしている。膜貫通領域である28番目のアミノ酸までを欠損させた配列をpGEXベクターに挿入したプラスミドを作製し、GST融合タンパク質として大腸菌発現系により調製した。

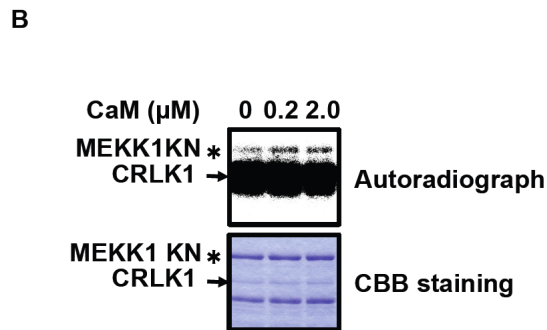
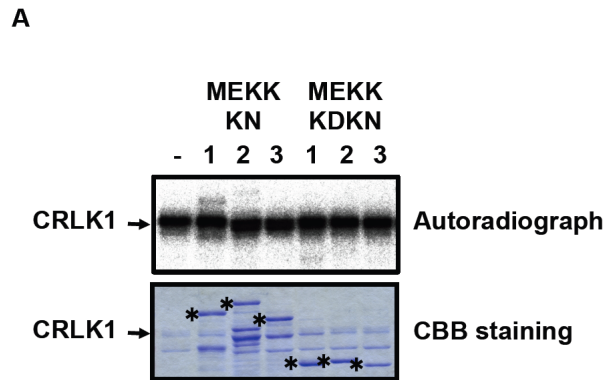


Fig. 34 大腸菌発現系により調製した CRLK1 による MEKK へのリン酸化

(A) CRLK1 タンパク質は大腸菌発現系で GST 融合タンパク質として発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。GST-CRLK1 のリン酸化酵素活性を GST-MEKK1 KN、GST-MEKK2 KN、GST-MEKK3 KN、GST-MEKK1 KDKN、GST-MEKK2 KDKN、GST-MEKK3 KDKN を基質に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を用いて測定した。Autoradiograph 及び CBB Staining の結果を示した。アスタリスクは基質のバンド、矢印は GST-CRLK1 のバンドを示す。(B) GST-CRLK1 による GST-MEKK1 KN へのリン酸化酵素活性を 0.5 mM CaCl_2 と各濃度 (0、0.2、2.0 μM) のカルモジュリン (CaM) 存在下で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を用いて測定し、Autoradiograph 及び CBB Staining の結果を示した。アスタリスクは GST-MEKK1 KN のバンド、矢印は GST-CRLK1 のバンドの位置を示した。

2D. 考察

2D.1. 低温シグナリングにおける MEKK1 を介した MAPK カスケードの役割

低温シグナリングにおいて、MPK4及びMPK6が活性化すること (Ichimura *et al.* 2000)、さらにMKK2が活性化し、MPK4やMPK6のリン酸化をすることが報告されている (Teige *et al.* 2004)。酵母 Two-hybrid 法による相互作用解析や酵母相補実験の結果からMEKK1がMKK2の上流であると考えられており、低温におけるMEKK1-MKK2-MPK4/MPK6のMAPKカスケードが構成されることが示唆されていた1章において、大腸菌発現系により調製したMEKK1のキナーゼドメインがMKK2に対するリン酸化酵素活性を有していることを明らかにした (Fig. 18, Fig. 19)。しかしながら、植物内在性のMEKK1のリン酸化酵素活性が測定された報告はほとんどなく、低温においてMEKK1が実際にMKK2をリン酸化するのかわかっていなかった。本章において、低温処理したシロイヌナズナ実生より抗MEKK1抗体を用いて免疫沈降した内在性MEKK1が、低温処理依存的に活性化し、A-groupのMAPKKのうちMKK2を選択的にリン酸化することを明らかにした (Fig. 29)。このことは低温によりMKK2が活性化する一方、MKK1の活性化は見られないことと一致している (Teige *et al.* 2004)。1章においてMEKK1のキナーゼドメインはMKK2だけでなく同じA-groupのMAPKKであるMKK1、MKK6に対するリン酸化酵素活性を持つことを報告したが (Fig. 18, Fig. 19)、低温において内在性MEKK1がMKK2を選択的にリン酸化したことから (Fig. 29)、MEKK1がストレスに応じて基質を選択することが考えられる。この基質の選択には1章で示唆したように、N末端領域やMAPKKとの相互作用様式が関与していると思われる。

これまで、MKK2遺伝子欠損植物が低温馴化出来ず、凍結耐性を示さないこと、一方、活性型MKK2過剰発現植物が低温馴化処理なしに凍結耐性を示すことが報告されている (Teige *et al.* 2004)。また、活性型MKK2過剰発現植物において凍結耐性の獲得に重要な低温応答遺伝子であるCBF2及びCBF3がWTと比較して多く発現していることも示された。低温においてMEKK1が活性化しMKK2を選択的にリン酸化したことから、低温馴化において、MEKK1がMKK2の上流として働き、MEKK1-MKK2-MPK4の経路がCBF2やCBF3の遺伝子発現を正に制御することが考えられる。また、CBFの遺伝子転写はICE1により制御されている (Chinnusamy *et al.* 2003)。ICE1は低温による転写誘導が見られないことから、翻訳後修飾により転写活性が制御されていると考えられているが、その制御メカニズムは未だにわかっていない。しかしながら、ICE1はリン酸化修飾を受けることが示唆されており (Chinnusamy *et al.* 2007)、リン酸化が転写活性制御に影響することが考えられる。

MPK4は直接的または間接的に ICE1 をリン酸化することでその転写活性を正に制御し、CBF を介した低温応答遺伝子を誘導することで凍結耐性の獲得に関わっているのかもしれない。

2D.2. 低温シグナリングにおける MEKK1 の活性制御機構

低温により MEKK1 が活性化し、MKK2 をリン酸化することを示したが (Fig. 29)、MEKK1 の活性制御がどのように行われているのかわかっていない。一般的に、リン酸化酵素の活性制御の様式として、リン酸化修飾等の翻訳後修飾や活性調節タンパク質の相互作用等が知られている。低温処理したシロイヌナズナから得た細胞抽出液が MEKK1 に対するリン酸化酵素活性を示したことから、低温により MEKK1 のリン酸化が生じることを示唆した (Fig. 31)。MEKK1 と同じグループに属している MEKK2 及び MEKK3 は同様の検討でリン酸化されなかったことからこのリン酸化は MEKK1 に対して特異的に生じていることが示唆される。さらに、MEKK1 のリン酸化と活性化は同じタイムコースで生じており、このことは MEKK1 のリン酸化がそのリン酸化酵素活性に影響することを推測させる (Fig. 29、Fig. 31)。

酵母の MAPKKK である Ste11 は、MAPKKKK である Ste20 によってリン酸化されることが報告されている (Drogen *et al.* 2000)。Ste20 は Ste11 の N 末端領域のセリン/スレオニン残基を3カ所リン酸化し、このリン酸化によって Ste11 は活性化される。また近年、植物 MAPKKK の制御にリン酸化修飾に関わる例が報告されてきた。シロイヌナズナ MAPKKK、YDA は、YDA-MKK4/5/7/9-MPK3/6 の MAPK カスケードを介して気孔の発生を抑制することが知られている。植物ホルモンのブラシノステロイドの下流で機能する GSK3-like kinase、BIN2 は YDA の N 末端領域をリン酸化することで、そのキナーゼ活性を負に制御することが示された (Kim *et al.* 2012)。タバコ NPK1 は細胞質分裂に関わる MAPKKK であり、M 期に NPK1-activating kinesin-like protein1, NACK1 との相互作用によって活性化する。M 期以前では、この相互作用は、cyclin-dependent kinase (CDKs)によって NPK1、NACK1 が共にリン酸化されることにより阻害され、NPK1 は不活性化される (Sasabe *et al.* 2011)。このように MAPKKK の N 末端領域におけるリン酸化は、そのキナーゼ活性を直接的に正もしくは負に制御することや、活性化タンパク質との相互作用に影響することで MAPKKK の活性を制御する。低温において見られる MEKK1 のリン酸化もその活性制御に関わることが考えられるが、その役割については今後更なる検証が必要である。

2D.3. 低温シグナリングにおける MEKK1 上流経路

低温処理によって、植物細胞内の Ca^{2+} の濃度は増加することはこれまでに報告されている (Knight *et al.* 1996)。本研究において、低温処理したシロイヌナズナ実生から得た細胞抽出液による MEKK1 へのリン酸化が、低温処理前に Ca^{2+} のキレーターである EGTA で前処理することにより抑制されることを明らかにした (Fig. 31)。このことは MEKK1 リン酸化の上流経路に Ca^{2+} の流入が関与することを示唆している。近年、Pull-down assay 及び BiFC 法を用いた方法によって MEKK1 と相互作用するリン酸化酵素として CRLK1 が報告された (Yang *et al.* 2010)。CRLK1 は Ca^{2+} /カルモジュリンによって活性制御されるキナーゼであり低温シグナル伝達において機能することも示されている (Yang *et al.* 2009)。大腸菌発現系により調製した CRLK1 が MEKK1 をリン酸化することを明らかにした (Fig. 34)。また MEKK1 と同グループに属する MEKK2、MEKK3 に対する CRLK1 からのリン酸化は、MEKK2 において弱く検出されたが、MEKK3 ではほとんど検出されず、CRLK1 が MEKK1 に対する基質特異性を持っていることを示した (Fig. 34A)。また、MEKK1 の全長タンパク質に対するリン酸化と比較して、キナーゼドメインのみのタンパク質を基質とした場合の CRLK1 からのリン酸化は弱くなった。このことは CRLK1 による MEKK1 のリン酸化サイトは主に N 末端領域に存在することを示唆する (Fig. 34A)。1 章において MEKK1 の N 末端領域がリン酸化酵素活性や基質選択性に関して重要な役割を持つことを示してきた。CRLK1 により MEKK1 の N 末端領域がリン酸化されることが、MEKK1 の活性制御においてどのような機能を持つのかについて更なる検討が必要である。CRLK1 は Ca^{2+} /カルモジュリンにより自己リン酸化活性及びモデル基質 Casein に対するリン酸化酵素活性が上昇することが報告されている (Yang *et al.* 2009)。CRLK1 の MEKK1 に対するリン酸化酵素活性も Ca^{2+} /カルモジュリンの共存により活性化されることがわかった (Fig. 34B)。これらの結果より、低温により Ca^{2+} の細胞質内濃度の上昇が起こり、 Ca^{2+} /カルモジュリンによって CRLK1 が活性化され MEKK1 のリン酸化をすることが示唆された。

第3章

低温感受における細胞膜流動性変化の役割

3A. 結論

シロイヌナズナなどの温帯起源の多くの植物が凍結耐性を獲得するためには低温馴化が重要である。低温馴化とは、植物が 0°C~12°C 程度の凍結しない低温に晒されている期間に凍結耐性を増強するメカニズムである。しかしながら、植物が低温を感受するのメカニズムに関しては未だに未知の部分が多く、特に低温のセンサーは同定されていない。また低温の感受には複数のセンサーが関わっていると考えられており、それぞれのセンサーが異なる経路に伝達していることも考えられる。一般的に、低温は細胞膜の流動性を低下させることが報告されており (Los *et al.* 2013)、細胞膜の流動性低下が、低温センサーの1つとして働くことが示唆されている (Vigh *et al.* 1993; Murata & Los 1997)。細胞膜は通常温度条件において不飽和脂肪酸の割合を調整し、適度な細胞膜流動性を保っているが (Szalontai *et al.* 2000)、低温環境になると適度な流動性を持つ液晶状態から流動性の低下したゲル状態へ物性移行が生じると考えられている (Los *et al.* 2013)。このような細胞膜の物理的な性質の変化が低温感受に重要であることが推測されている (Murata & Los 1997)。植物においても実際に、細胞膜の流動性を測定するため蛍光試薬である 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) を用いて、アルファルファのプロトプラストの細胞膜流動性に対する温度変化の影響を測定した報告より、常温 (25°C) と比較して低温 (4°C) において細胞膜の流動性が低下することが示された (Oriver *et al.* 2000) (Fig. 35)。また、DMSO 処理によっても低温と同様に細胞膜の流動性が低下すること、Benzyl Alcohol 処理により低温による細胞膜流動性の低下が緩和されることも報告された (Oriver *et al.* 2000) (Fig. 35)。アルファルファ培養細胞において細胞膜流動性の低下は Ca^{2+} シグナリング、細胞骨格の再構成、MAPK の活性化、COR 遺伝子の発現などを誘導することが知られており、低温シグナル伝達への関与している (Oriver *et al.* 2000; Sangwan *et al.* 2002)。第2章において、低温処理により MEKK1 や MPK4 が活性化すること、また低温依存的な MEKK1 へのリン酸化が生じること、その上流に Ca^{2+} シグナリングが存在することを示してきた。そこで、低温による細胞膜流動性の低下がこれらシグナル伝達経路の上流で機能するのかを検証することとした。また、シロイヌナズナが凍結耐性の獲得する低温馴化において、細胞膜の流動性が関与するのについても調べた。

そこで本章では、細胞膜硬化剤である DMSO や細胞膜流動化剤である Benzyl Alcohol によりシロイヌナズナを処理することで細胞膜流動性を変化させ、低温における MEKK1 のリン酸化や MPK4 の活性化に細胞膜流動性の低下が関与しているのかを検証した。また、シロイヌナズナの凍結耐性の獲得における細胞膜の流動性変化の重要性についても報告する。

Table 1. Polarization index (p) of isolated protoplasts treated with cold, BA, DMSO

Treatment	Temperature (°C)	Polarization index (p)
Experiment 1		
Control	25	0.0954 ± 0.0073^a
Control	4	0.1315 ± 0.0138^b
Experiment 2		
Control	25	0.0825 ± 0.0043^a
Control	4	0.1173 ± 0.0122^b
BA (5 mM)	4	0.0853 ± 0.0064^a
Experiment 3		
Control	25	0.0870 ± 0.0015^a
Control	4	0.1322 ± 0.0048^b
DMSO (3%)	25	0.1003 ± 0.0029^c

Data are expressed as the mean \pm SD of three replicates. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$) in each experiment as determined by Student's t -test.

(Orvar et al. The Plant Journal 2000)

Fig. 35 アルファルファプロトプラストを用いた細胞膜流動性の測定

アルファルファのプロトプラストを調製し、各処理後の細胞膜流動性を蛍光試薬 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene 測定した結果を Orvar et al. 2000 より引用した。プロトプラスト調製後 25°C で 30 分さらに 6 μ M 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene と共に 30 分インキュベートし、その後各処理を 20 分間行った。蛍光強度を測定後、細胞膜の流動性の指標となる Polarization index (p) を算出した。この値が高いほど細胞膜流動性が低下していることを示す。

3B. 材料と方法

3B.1. シロイヌナズナ実生の DMSO および Benzyl Alcohol 処理

2B.1.に示した方法で、野生型植物を生育させ、各処理を行った。発芽後 2 週間の実生をイオン交換滅菌水 20 ml の入った丸シャーレに 1 サンプル当たり約 15 個体浮かべ、22°C の連続光の条件で一晩置いた。低温処理は、植物を置いているシャーレを氷上に移し、シャーレ内の水と植物を冷やすことで行った。指定時間経過した後、植物体を即座に液体窒素で凍らせた。DMSO 処理は、植物を置いているシャーレに終濃度 3%、6% になるように溶液を添加し、指定時間経過した後、植物体を即座に液体窒素で凍らせた。EGTA 及び Benzyl Alcohol による前処理として、終濃度 10 mM の EGTA、終濃度 20 mM または 40 mM の Benzyl Alcohol になるように、ストレス処理の 1 時間前にシャーレに溶液を添加した。

3B.2. リン酸化酵素活性測定

3B.2.1. 植物細胞抽出液のリン酸化酵素活性測定

3B.1.において処理したシロイヌナズナを用いて、2B.3.と同様の方法で調製したシロイヌナズナ細胞抽出液のリン酸化酵素活性を測定した。1B.2.及び2B.7.で調製したGST-MEKK1 KN、GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN、を基質タンパク質として用いて測定した。リン酸化酵素活性の測定は、1B.5.と同様に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPから基質への放射活性の転移反応により行った。

3B.2.2. 免疫沈降したMPK4のリン酸化酵素活性測定

3B.1.において処理したシロイヌナズナから 2B.4.と同様に抗 MPK4 抗体を用いて免疫沈降し、MPK4 のリン酸化酵素活性を測定した。モデル基質である MBP を基質タンパク質として用い、2B.8.1.と同様に行った。

3B.3. イムノブロット

3B.2.1.において調製した、シロイヌナズナ細胞抽出液に 3xSDS sample buffer を加え、100°C で 5 分間加熱後、1B.3.と同様の方法で抗 MPK4 抗体を用いてイムノブロットを行っ

た。

3B.4. 凍結耐性測定

2B.1.に示した方法で、野生型植物を生育させた。発芽後 2 週間の実生をイオン交換滅菌水 20 ml の入った丸シャーレに浮かべ、各前処理を行った。各前処理の方法を以下に記した。

・22°C

植物を浮かべたシャーレを、22°Cの連続光の条件で 24 時間静置した。

・4°C

植物を浮かべたシャーレを、4°Cの連続光の条件で 24 時間静置した。

・DMSO

植物を浮かべたシャーレに終濃度 6%になるように溶液を添加し、22°Cの連続光の条件で 24 時間静置した。

・Benzyl Alcohol + 22°C

植物を浮かべたシャーレに終濃度 40 mMになるように溶液を添加し、22°Cの連続光の条件で 25 時間静置した。

・Benzyl Alcohol + 4°C

植物を浮かべたシャーレに終濃度 40 mMになるように溶液を添加し、22°Cの連続光の条件で 1 時間静置した。その後、4°Cの連続光の条件に移し、24 時間静置した。

指定時間経過した後、植物体をポットに移植した。凍結処理はポットを-4°Cの暗黒下の条件に移し、30 時間静置することで行った。凍結処理後、22°Cの連続光の条件に移し、その後の生育を観察した。また、コントロールとして各前処理後、ポットに移植し、22°Cの連続光の条件で生育させた植物も観察した。

3C. 結果

3C.1. 低温における細胞膜流動性の低下を介した MEKK1 のリン酸化

細胞膜流動性を低下させる試薬として DMSO 処理を発芽後2週間のシロイヌナズナ実生に行った。DMSO は3%と6%の終濃度になるように添加し 0、30、180 分間処理を行った。また、比較として低温処理も同様に 30、180 分間行った。低温及び DMSO 処理した実生より細胞抽出液を調製し、GST-MEKK1 KN を基質としてリン酸化酵素活性を測定した (Fig. 36A)。2C.2 と同様に低温処理した実生由来の細胞抽出液により GST-MEKK1 KN へのリン酸化が見られた。さらに、低温処理と同様にいずれの濃度の DMSO 処理においても GST-MEKK1 KN へのリン酸化酵素活性が検出された。また、同様の検討を GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN を基質に行ったところ、低温処理と同様に、DMSO 処理からの細胞抽出液による GST-MKK2 KN へのリン酸化が検出された一方、GST-MKK1 KN へのリン酸化は見られなかった (Fig. 36B)。

さらに、低温処理による細胞膜流動性の低下を緩和させる効果を有している Benzyl Alcohol を用いた。低温処理の1時間前に 20 mM 及び 40 mM の Benzyl Alcohol で発芽後2週間のシロイヌナズナの実生に前処理し、その後、4°Cに移行することで低温処理を開始し、30 分及び 180 分間の低温処理を行った。比較として Benzyl Alcohol で前処理なしの低温処理も行った。各処理を行った細胞抽出液を用いて GST-MEKK1 KN 及び GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN に対するリン酸化酵素活性を測定した (Fig. 27)。Benzyl Alcohol で前処理なしで低温処理した細胞抽出液による GST-MEKK1 KN 及び GST-MKK2 KN へのリン酸化活性と比較して Benzyl Alcohol 前処理によりリン酸化の減少が見られ、特に 40 mM Benzyl Alcohol 前処理において顕著な減少が見られた。GST-MKK1 KN に対するリン酸化はいずれの処理においても検出されなかった。

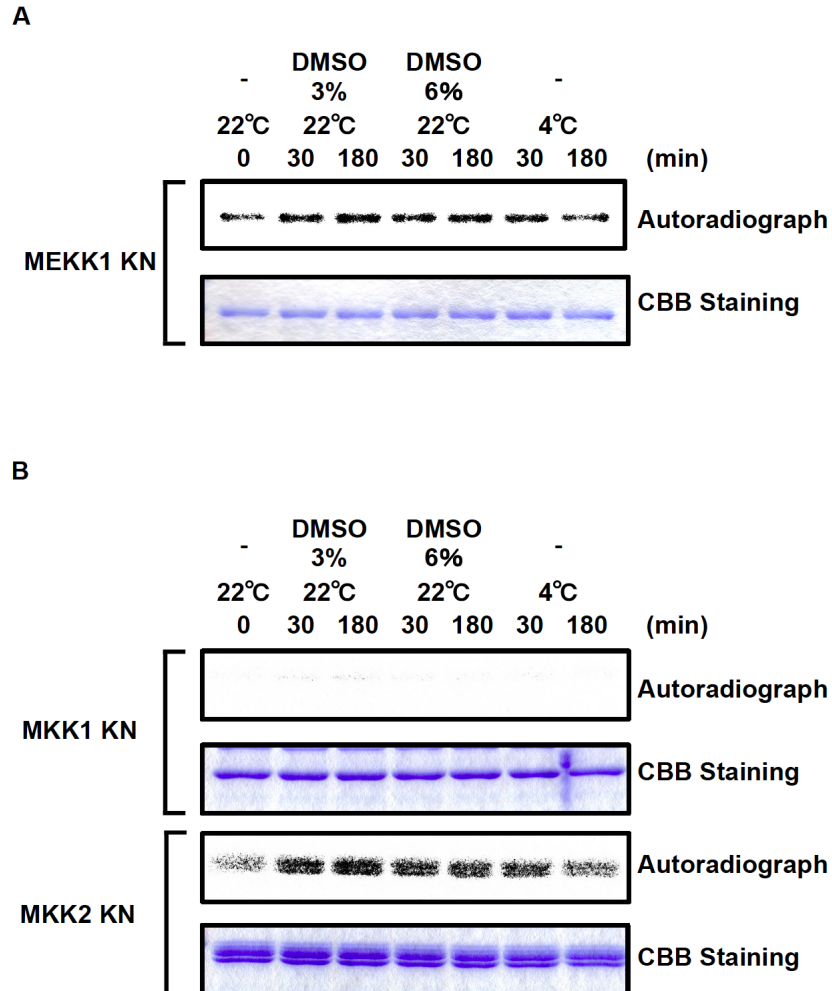


Fig. 36 細胞膜硬化剤 DMSO 処理シロイヌナズナ芽生え由来細胞抽出液による MEKK1 及び MKK のリン酸化

(A) Fig. で用いた細胞抽出液 (0.1 mg) と GST-MEKK1 KN を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在下で 37°C、20 分間反応させ、GST-MEKK1 KN へのリン酸化酵素活性を測定した。基質のリン酸化のバンドを Autoradiograph 及び基質タンパク質のバンドを CBB Staining に示した。(B) (A) と同様に 各 MKK タンパク質 (GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN) へのリン酸化を解析した。各 MKK タンパク質のリン酸化 (Autoradiograph) 及び CBB 染色 (CBB Staining) を示した。

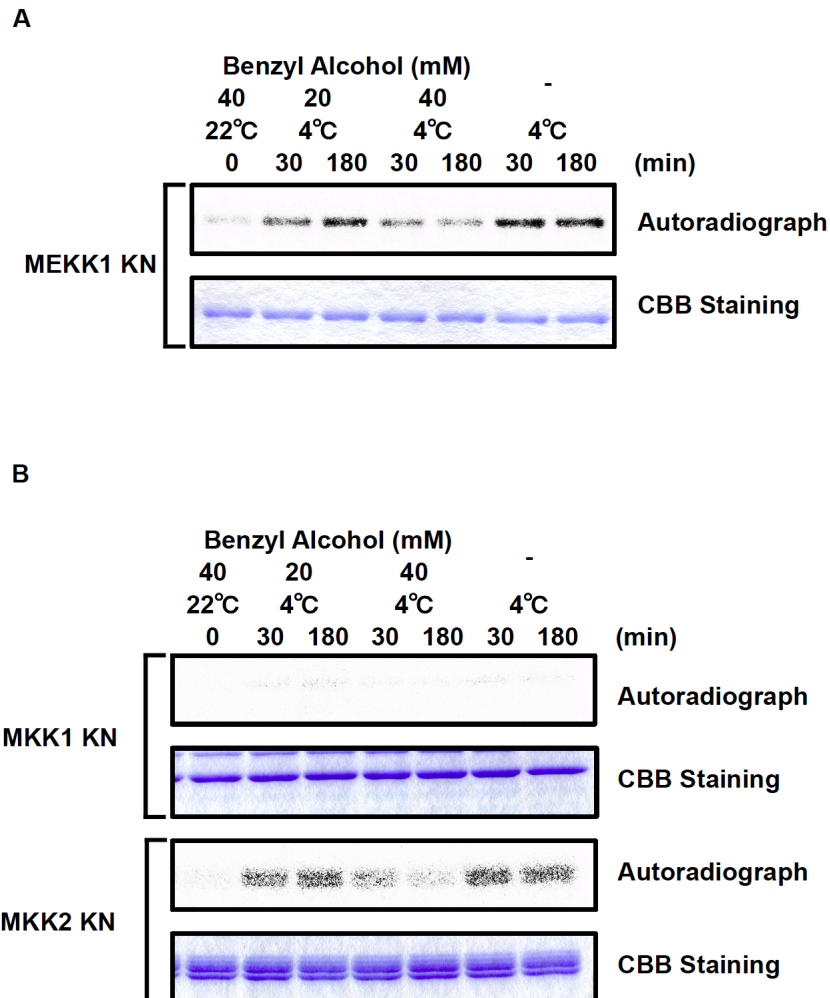


Fig. 37 細胞膜流動化剤 Benzyl Alcohol 処理シロイヌナズナ芽生え由来タンパク質抽出液による MEKK1 及び MKK のリン酸化

(A) Fig. で用いた細胞抽出液 (0.1 mg) と GST-MEKK1 KN を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在下で 37°C、20 分間反応させ、GST-MEKK1 KN へのリン酸化酵素活性を測定した。基質のリン酸化のバンドを Autoradiograph 及び基質タンパク質のバンドを CBB Staining に示した。(B) (A)と同様に 各 MKK タンパク質 (GST-MKK1 KN、GST-MKK2 KN) へのリン酸化を解析した。各 MKK タンパク質のリン酸化 (Autoradiograph)及び CBB 染色 (CBB Staining) を示した。

3C.2. 低温における細胞膜流動性の低下を介した MPK4 の活性化

3C.1.において調製した DMSO 及び低温処理したシロイヌナズナ実生由来の細胞抽出液より、抗 MPK4 抗体を用いて免疫沈降した MPK4 のリン酸化酵素活性をモデル基質である MBP を基質として測定した (Fig. 38A)。

低温処理 30 分及び 180 分で MPK4 の MBP に対するリン酸化が検出され、同様に3% DMSO 及び 6% DMSO のいずれの処理においても MPK4 の活性化が検出された。低温、DMSO とともに 180 分処理と比較して、30 分処理において強い MPK4 活性が見られた。また、各細胞抽出液を抗 MPK4 抗体でイムノブロットしたところ、MPK4 のタンパク質量に変化は見られなかった (Fig. 38B)。

低温における細胞膜流動性の低下が MPK4 のリン酸化酵素活性に影響するのかをさらに検証するため、3C.1.において用いた Benzyl Alcohol 存在及び非存在下で低温処理を行った実生より得た細胞抽出液から免疫沈降した MPK4 のリン酸化酵素活性を MBP を測定した (Fig. 39A)。

Benzyl Alcohol で前処理すると 20mM、40 mM のいずれの濃度の Benzyl Alcohol の場合においても Benzyl Alcohol で前処理なしで低温処理を行った同時間の MPK4 のリン酸化酵素活性と比べ低下した。またイムノブロットの結果より各処理において MPK4 タンパク質の量は変化しなかった (Fig. 39B)。

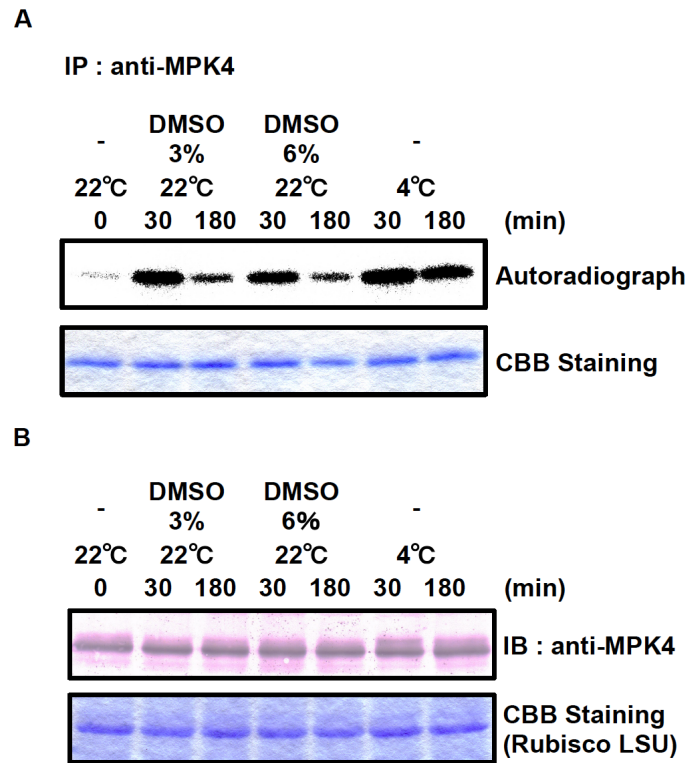


Fig. 38 細胞膜硬化剤 DMSO 処理シロイヌナズナ芽生えから免疫沈降した MPK4 のリン酸化酵素活性測定

(A)シロイヌナズナの芽生えを各濃度 (3%、6%) の DMSO 及び低温で 0、30、180 分間処理し、細胞抽出液を調製した。調製した細胞抽出液より抗 MPK4抗体 (anti-MPK4) により MPK4 を免疫沈降した。免疫沈降した MPK4 のリン酸化酵素活性をモデル基質 MBPを基質に測定した。基質のリン酸化のバンドを Autoradiograph 及び基質タンパク質のバンドを CBB Staining に示した。(B) (A) の細胞抽出液を SDS-PAGE により展開し、抗 MPK4 抗体を用いてイムノブロットした。MPK4 のバンドを IB : anti-MPK4 に示した。コントロールとして CBB 染色したゲルの Rubisco の Large Subunit のバンドを CBB Staining (Rubisco LSU) に示した。

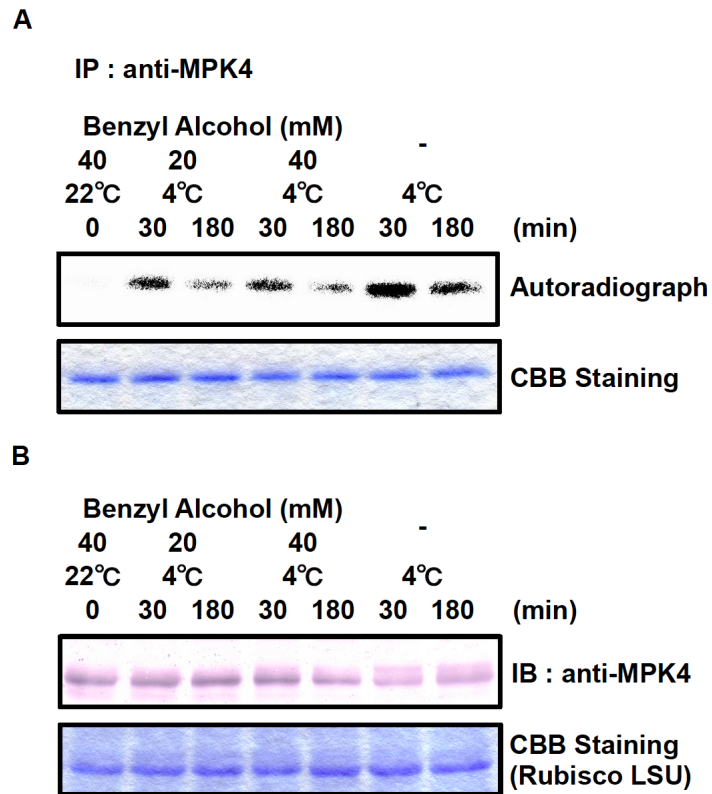


Fig. 39 細胞膜流動化剤 Benzyl Alcohol 処理シロイヌナズナ芽生えから免疫沈降した MPK4 のリン酸化酵素活性測定

(A)シロイヌナズナの芽生えを各濃度 (20 mM、40 mM) の Benzyl Alcohol で 60 分間前処理を行った後、低温で 0、30、180 分間処理した。細胞抽出液を調製し、抗 MPK4 特異抗体により MPK4 を免疫沈降した。免疫沈降した MPK4 のリン酸化酵素活性をモデル基質 MBP を基質に測定した。基質のリン酸化のバンドを Autoradiograph 及び基質タンパク質のバンドを CBB Staining に示した。(B) (A) の細胞抽出液を SDS-PAGE により展開し、抗 MPK4 抗体を用いてイムノブロットした。MPK4 のバンドを IB : anti-MPK4 に示した。コントロールとして CBB 染色したゲルの Rubisco の Large Subunit のバンドを CBB Staining (Rubisco LSU) に示した。

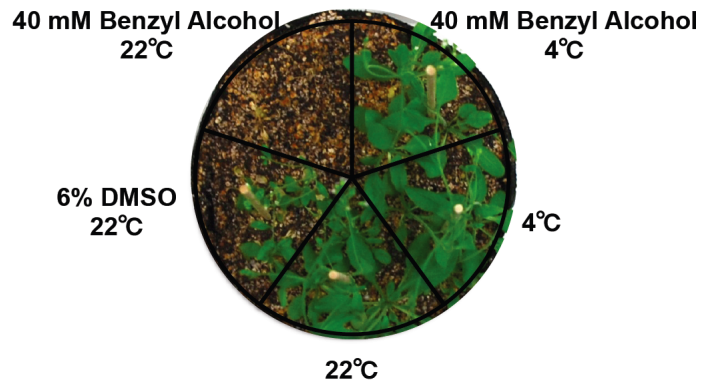
3C.3. 細胞膜流動性の低下による凍結耐性の獲得

B5 培地にて2週間生育させたシロイヌナズナの実生を 22°Cで 24 時間 (22°C)、6% DMSO 添加後 22°Cで 24 時間 (DMSO + 22°C)、40 mM Benzyl Alcohol 添加後 22°Cで 25 時間 (BA +22°C)、40 mM Benzyl Alcohol 添加後 22°Cで 1 時間さらに4°Cに移行し 24 時間 (BA + 4°C)、4°Cで 24 時間 (4°C) の各前処理を行った。その後、ポットに植替え、そのまま 22°Cで栽培もしくは-4°Cで 30 時間凍結処理を行いその後 22°Cで栽培した。

凍結処理を行わず、そのまま栽培したポットにおいて、BA +22°C前処理の植物体のみ生育しなかった (Fig. 40A)。一方で BA + 4°C前処理の植物体は、22°Cや 4°Cで処理した植物と同様に植物体が生育した。また、DMSO + 22°C前処理の植物体は 22°Cや 4°Cで処理した植物体と比較してサイズが小型化した (Fig. 40A)。

各処理後に-4°Cに移行することで凍結処理を行い、各処理の凍結耐性への影響を検証した。これまでの様々な報告と同様に、22°C前処理で馴化を行わなかった場合凍結処理によって致死であったが、4°Cで前処理することで馴化した植物は凍結処理後に生育が確認された (Fig. 40B)。DMSO + 22°C前処理を行うと 4°Cによる馴化処理と同様に凍結耐性が見られた。一方、BA + 4°Cの前処理した植物は凍結耐性を示さなかった。これらの結果は細胞膜流動性の低下が低温の感受に関わっており、シロイヌナズナが馴化を通して凍結耐性を獲得することに寄与することを示している。

A 22°C (30h) → 22°C



B -4°C (30h) → 22°C

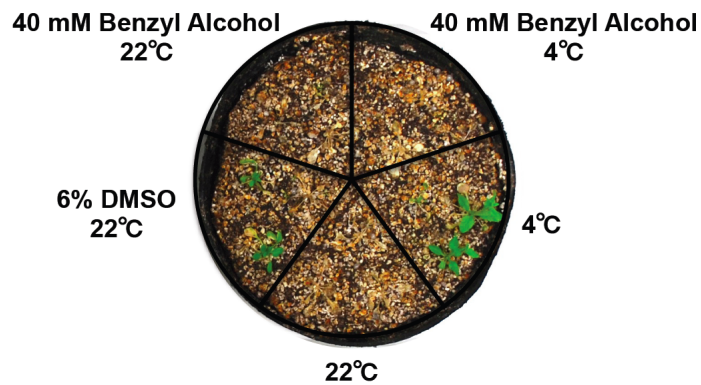


Fig. 40 細胞膜硬化剤及び細胞膜流動化剤による凍結耐性への影響

発芽後 2 週間後のシロイヌナズナの芽生えをシャーレに浮かべ低温 (4°C)、6% DMSO (22°C)、40 mM Benzyl Alcohol (22°C)、40 mM Benzyl Alcohol (22°C) で 1 時間前処理後低温 (4°C) で 24 時間処理し、ポットに移替え 22°C (A) 及び -4°C (B) で 30 時間処理した。その後、22°C で生育させた。処理から 12 日後の生育状況を示した。

3D. 考察

3D.1. 低温における細胞膜流動性の低下を介した MEKK1-MKK2-MPK4 カスケードの活性化

低温の感受において、細胞膜流動性の低下は重要な要因であると考えられている。シロイヌナズナ実生を細胞膜硬化剤である DMSO 処理したところ低温処理と同様に MEKK1 および MKK2 に対するリン酸化活性が検出され、また MPK4 の活性化も見られた (Fig. 36、Fig. 38)。一方、低温処理において見られる MEKK1、MKK2 へのリン酸化活性や MPK4 の活性化が細胞膜流動化剤 Benzyl Alcohol 前処理により阻害されることを示した (Fig. 37、Fig. 39)。これら結果は、低温における細胞膜流動性の低下が MEKK1 のリン酸化や MEKK1-MKK2-MPK4 カスケードの活性化に必要であることを示唆している。第 2 章で、低温は Ca^{2+} シグナリングを介して MEKK1 のリン酸化を誘導すること、 Ca^{2+} /カルモジュリンによって活性化される CRLK1 が MEKK1 の上流リン酸化酵素の候補であることを示しており、これら上流経路が細胞膜流動性と関連していると考えられる。細胞膜流動性と Ca^{2+} シグナリングの関連性について、アルファルファや *Brassica napus* を用いた実験より細胞膜流動性の低下は Ca^{2+} 濃度の上昇より先に生じるとされている (Orvar et al. 2000; Sangwan et al. 2001)。

これまでの結果や報告をまとめると、低温により細胞膜の流動性が低下すると、その後、 Ca^{2+} /カルモジュリン-CRLK1-MEKK1-MKK2-MPK4/6 の経路が活性化され低温応答遺伝子の発現制御を行うことで、低温馴化が起こり、シロイヌナズナが凍結耐性を獲得する一連のシグナル伝達経路の存在が示唆される (Fig. 41)。

3D.2. シロイヌナズナの低温馴化における細胞膜流動性低下の役割

本研究において、シロイヌナズナを DMSO 処理することで、4°C による低温馴化と同様の凍結耐性が獲得出来ることを示した (Fig. 40)。これは DMSO 処理による細胞膜流動性低下が低温状態を模倣できることを示唆している。一方、Benzyl Alcohol 存在下で 4°C による低温馴化を行ったシロイヌナズナは凍結耐性を示さなかった (Fig. 40)。このことは 4°C による細胞膜流動性を低下させる作用を Benzyl Alcohol が緩和することで細胞膜流動性が低下せず、低温馴化に関わるシグナルが働かなかつたため、凍結耐性が示されなかつたと考えられる。これらの結果より、シロイヌナズナの低温馴化において細胞膜流動性が必要であることが示唆される。低温処理や DMSO 処理が MEKK1 のリン酸化及び MPK4 の活性化

を誘導する一方、Benzyl Alcohol がそれらを抑制することを示した (Fig. 36、Fig. 37、Fig. 38、Fig. 39)。また、MKK2 の遺伝子欠損植物が低温馴化出来ないが、活性型 MKK2 の過剰発現植物が低温処理なしに凍結耐性を獲得できることが報告されている (Teige *et al.* 2004)。これらより、DMSO 処理シロイヌナズナにおいても、細胞膜流動性の低下を介した MEKK1 のリン酸化や MEKK1-MKK2-MPK4 経路の活性化が低温馴化による凍結耐性の獲得に寄与していると思われる。しかしながら、DMSO は動物培養細胞等を凍結保存する際に凍結保護剤として一般的に用いられることが知られている。これは培地に 10%程度の DMSO を添加することで、DMSO が細胞内に浸透し、細胞内水分の結晶化を防ぐことによるとされている。本研究においても、DMSO が同様のメカニズムにより植物体に凍結耐性を付与している可能性も考慮する必要がある。

DMSO 処理を行った後、凍結処理を行わず 22°Cでそのまま生育させたシロイヌナズナは全個体生育したものの、22°Cのコントロール植物と比較して植物体のサイズの小型化が見られた (Fig. 40A)。DMSO 処理後に脱イオン水で洗浄していることから、植物内に取り込まれた DMSO がその後の生育を阻害することが考えられる。また、Benzyl Alcohol 処理を 22°Cで行った植物は、凍結処理を行わない場合においても、その後生育できなかった (Fig. 40A)。一方で、Benzyl Alcohol 存在下で 4°C処理した植物は凍結処理を行わない場合、Benzyl Alcohol 非存在下での 22°C及び 4°Cで処理した植物と同様の生育が観察された (Fig. 40B)。このことから、Benzyl Alcohol 処理を 22°Cで行った植物は細胞膜の流動性が 22°Cの状態より増加し、高温状態と同じような細胞膜の状態になり生育出来なかったことが考えられる。Benzyl Alcohol 存在下で 4°C処理した植物は、Benzyl Alcohol による細胞膜流動性の増加と低温による細胞膜流動性の低下が同時に生じることで適切な細胞膜流動性が維持され生育が可能となったが、低温状態のような流動性低下も生じず、低温馴化を介した凍結耐性の獲得は出来なかったと考えられる。実際にアルファルファプロトプラストを生育温度である 25°Cにおいて Benzyl Alcohol 処理すると、細胞膜の流動性が上昇し高温ストレスと同様な働きをすることが報告されている (Sangwan *et al.* 2002)。

植物の低温馴化において、MAPK カスケードだけでなく様々な因子がシグナル伝達に関与していることが報告されている (Ruelland *et al.* 2009; Miura & Furumoto 2013)。低温による細胞膜流動性の低下は、植物が低温状態を感受することにおいて重要なセンサーになっていることが推測されるが、どのようなシグナル伝達経路が細胞膜流動性低下の下流で働いているのかはほとんどわかっていない。また、細胞膜の流動性の低下がどのようなメカニズムで下流シグナル伝達経路にシグナルを伝えるのかもわかっていない。今後、細胞膜の流動性変化がどのように認識、伝達されるのが解明されることで、低温の感受の仕組みが明らかになっていくだろう。

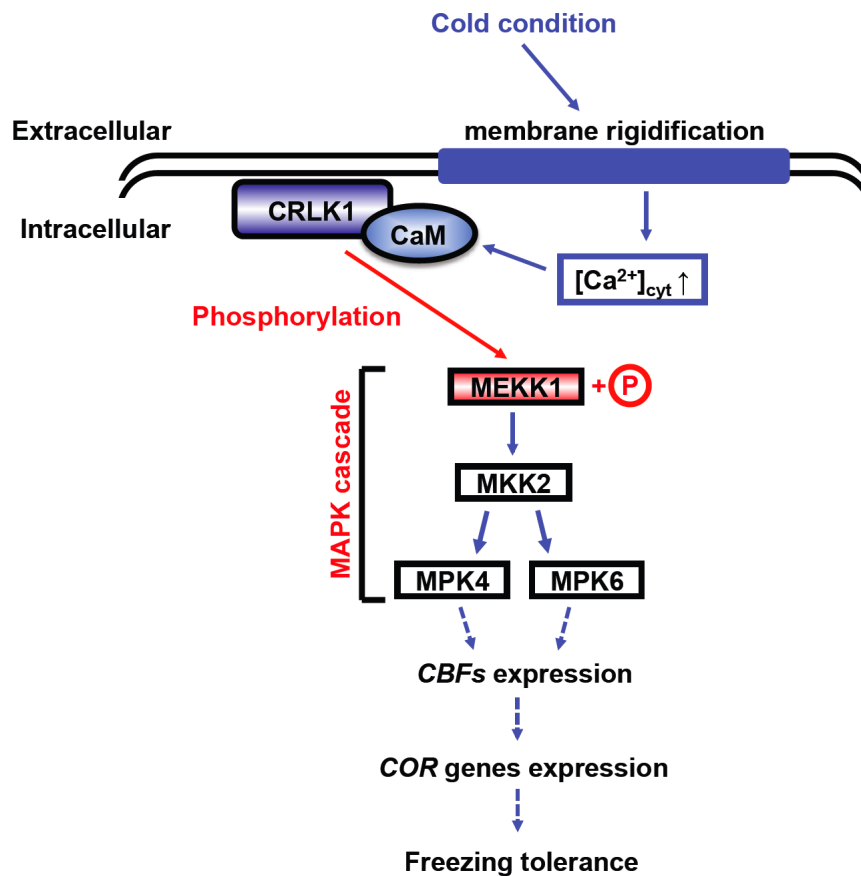


Fig. 41 低温における MEKK1 を介したシグナル伝達経路のモデル図

本章の結果をまとめモデル図を示す。低温環境において細胞膜流動性の低下、細胞質内 Ca^{2+} 濃度の上昇が起こる。 Ca^{2+} はカルモジュリンと結合し、CRLK1を活性化する。活性化したCRLK1はMEKK1をリン酸化し、MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6のMAPKカスケードを活性化する。この経路の下流ではCBF遺伝子群の発現が誘導され、低温応答遺伝子群の発現が制御されることで凍結耐性が向上すると考えられる。

第4章

***3xFLAG-MEKK1*過剰発現植物の作製**

4A. 緒論

植物は動物とは異なり、移動できないため環境に適応して生存していかなければならず、環境の変化に応答しさまざまな生理的変化を起こし、その環境変化への適応を示す。劣悪な環境条件となる高塩、乾燥、低温などの環境ストレスに晒された植物は個体レベル、組織レベル、細胞レベルあるいは遺伝子レベルで応答する。これらの環境ストレスはシグナルとして細胞内に伝えられ、ストレス応答性遺伝子の転写を誘導するなど個々の細胞における遺伝子の発現様式を変化させる (Huang *et al.* 2012)。このような植物が本来持っている環境適応に関わる遺伝子を植物内で過剰に発現することで、ストレス耐性植物の作出が可能となると考えられており、植物のストレス耐性メカニズムについて様々な研究が行われ、知見が得られてきている。当研究室において、RafタイプのMAPKKKであるMAP3K δ 4過剰発現植物を作製し、高塩耐性が上昇したことを報告している (Shitamichi *et al.* 2013)。本研究の対象であるMEKK1の下流で働くMAPKKやMAPKに関しても、それらの過剰発現植物に関する報告がなされてきている。活性型MKK2過剰発現植物は低温馴化なしに凍結耐性を示すこと (Teige *et al.* 2004)、また、活性型MPK4過剰発現植物は病原菌に対する抵抗性が低下することが示唆されている (Berriri *et al.* 2012)。しかしながら、MEKK1の過剰発現植物に関する報告はこれまでなされていない。MEKK1は様々な環境ストレスに関わることが報告されていることから、MEKK1過剰発現植物は、複合的なストレス耐性植物の作製に繋がることが期待される。

そこで、本章ではMEKK1過剰発現植物の作出を行った。また不活性型MEKK1 KN過剰発現植物も作製し比較解析することで、植物体におけるMEKK1のリン酸化酵素活性の役割を検証した。作製したMEKK1 Full、KN過剰発現植物の生育への影響および凍結耐性を解析した。

4B. 材料と方法

4B.1. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の作製

4B.1.1. 3xFLAG-MEKK1 発現ベクターの作製

MEKK1 を過剰発現するトランスジェニック植物作製に用いるベクターの構築を行った。MEKK1 Full (MEKK1 の全長遺伝子) 及び MEKK1 KN (MEKK1 の 361 番目のアミノ酸である Lys 残基を Arg 残基に置換したタンパク質をコードする) に 3xFLAG タグの配列を付加するため、p3xFLAG-CMV-10 (Sigma 社) に導入後、3xFLAG-MEKK1 Full 及び 3xFLAG-MEKK1 KN の配列をバイナリーベクター pBI121 に導入し、pBI121-3xFLAG-MEKK1 Full 及び pBI121-3xFLAG-MEKK1 KN を構築した (Fig. 42)。

p3xFLAG-CMV-10 ベクターに MEKK1 Full 及び MEKK1 KN を導入した p3xFLAG-MEKK1 Full 及び p3xFLAG-MEKK1 KN を作製するためのインサートを 1B.1. と同様の方法で調製した。鋳型には 1B.1. で調製した pGEX-MEKK1 Full 及び pGEX-MEKK1 KN をそれぞれ用いた。

p3xFLAG-CMV-10 ベクターに挿入するための制限酵素 *EcoR* I と *BamH* I 認識配列を導入したプライマーを設計した。プライマーの配列を以下に示した。

Primer name	sequence (5' → 3')
MEKK1- <i>EcoR</i> I g atg Forward	gaaagaattcgatggacaggattctagct
MEKK1- <i>BamH</i> I Reverse	gtttggatcctcatctacggagaaggggagatgc

- 制限酵素は、プライマー配列に含まれる制限酵素サイトに対応するものを用いた。
- ベクターの作成は、1B.1.3.~ 1B.1.10. と同様に行なった。

pBI121 ベクターに 3xFLAG-MEKK1 Full 及び 3xFLAG-MEKK1 KN を導入した pBI121-3xFLAG-MEKK1 Full 及び pBI121-3xFLAG-MEKK1 KN を作製するためのインサートを 1B.1. と同様の方法で調製した。

バイナリーベクターpBI121 は本研究室に保存されていた Clontech 社のものを使用した。pBI121 に挿入するための制限酵素 *Bam* HI と *Sac* I 認識配列を導入したプライマーを設計した。以下にプライマー配列を記す。鋳型には p3xFLAG-MEKK1 Full 及び p3xFLAG-MEKK1 KN をそれぞれ用いた。

Primer name	sequence (5' → 3')
3xFLAG- <i>Bam</i> HI Forward	gaaaggattcatggactacaaagacatgac
MEKK1- <i>Sac</i> I Reverse	gtttgagctctcatctacggagaaggggatgc

- 制限酵素は、プライマー配列に含まれる制限酵素サイトに対応するものを用いた。
- ベクターの作成は、1B.1.3.~ 1B.1.10.と同様に行なった。

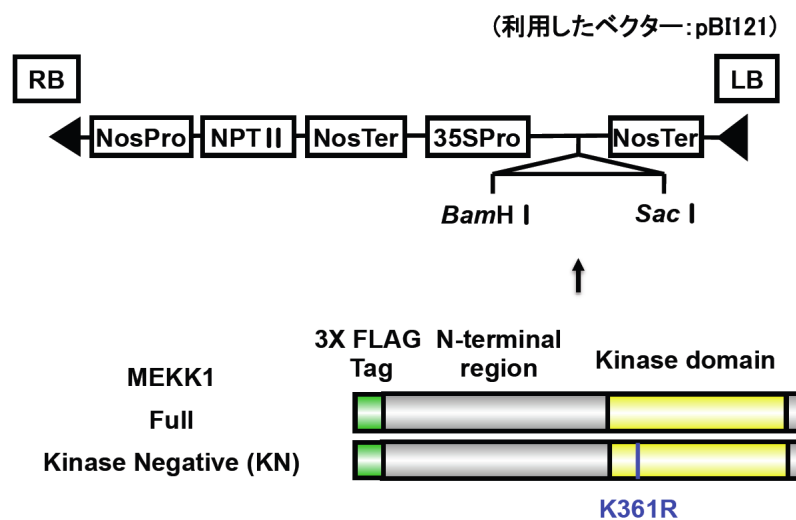


Fig. 42 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の作製に用いた発現ベクター

MEKK1 を過剰発現するトランスジェニック植物を作製するため、バイナリーベクターpBI121 に 3xFLAG tag の配列を融合した全長 MEKK1 (3xFLAG-MEKK1 Full) および 361 番目の Lys 残基を Arg 残基に置換したリン酸化酵素活性欠損 MEKK1 (3xFLAG-MEKK1 KN) をコードする配列を挿入した発現ベクターを構築した。

4B.1.2. Three-way mating 法による形質転換アグロバクテリウムの作製

ヘルパープラスミド pRK2013、及びアグロバクテリウム C58 株は、本研究室に保存されていたものを使用した。

- ・ヘルパープラスミドを持つ大腸菌を LB (Km⁺) プレートに広げ、37°Cで一晩培養した。アグロバクテリウムは LB (Rf⁺) プレートに広げ、28°Cで2日間培養した。
- ・発現ベクターをトランスフォーメーションした大腸菌と、上記で得られたヘルパープラスミドを持つ大腸菌の単一コロニーをそれぞれ3 mlのLB (Km⁺) 液体培地に植菌し、37°Cで一晩振盪培養した。
- ・アグロバクテリウムは3 mlのLB (Rf⁺) 液体培地に植菌し、28°Cで2日間振盪培養した。
- ・それぞれの培養液をエッペンに移し、10000 rpm、室温で1分遠心して集菌し、滅菌した10 mM MgSO₄ 50 mlを加えて懸濁した。
- ・1つのエッペンにそれぞれの懸濁液30 µlずつ加えて混合し、LBプレートに10 µlずつスポットし、10分間乾燥させた後、28°Cで一晩培養した。
- ・コロニーを葉さじでかきとり、10 mM MgSO₄ 200 µlの入ったエッペンに入れて懸濁し、LB (Km⁺, Rf⁺) プレートにまいて、28°Cで2日間培養した。
- ・単一コロニーをLB (Km⁺, Rf⁺) 液体培地3 mlに植菌し、28°Cで2日間振盪培養した。
- ・培養液500 mlと50%グリセロール500 mlを混合し、-80°Cで保存した。

1B.1.6.で記したLB培地にカナマイシン (終濃度20 mg/ml) を加えたものをLB (Km⁺)、リファンピシン (終濃度100 mg/ml) を加えたものをLB (Rf⁺)、カナマイシンとリファンピシンを加えたものをLB (Km⁺, Rf⁺) として使用した。抗生物質はオートクレーブ後加えた。

4B.1.3. 形質転換用の植物の栽培方法

- ・直径8 cmの鉢にバーミキュライトを入れ、表面をメッシュで覆った。その際、バーミキュライト表面とメッシュの間に隙間ができないように留意した。
- ・等間隔で5箇所、2粒ずつを、先端を水でぬらした爪楊枝を用いて播種した。
- ・播種後、22°Cの連続光下で育てた。水やりは水が涸れない程度に定期的に行った。
- ・植物体が大きくなってきたら、成長の妨げとなるネット部分をはさみで切り、ネットの上に葉を出した。約3週間後、花茎の長さが数cmになってきたところで摘心を行った。
- ・摘心後、植物を数日から10日間置き、側枝が伸長して、側枝上の最初の開花や結実が始

まる直前の状態まで育てた。

4B.1.4. アグロバクテリウム懸濁液の準備

4B.1.2.で形質転換したアグロバクテリウムを LB (Km⁺、Rf⁺) プレートに広げ、28°Cで 2 日間培養した。単一コロニーを LB (Km⁺、Rf⁺) 3 ml に植菌し、28°Cで 2 日間振盪培養した (前培養)。前培養液を LB (Km⁺、Rf⁺) 200 ml に移し、28°C、130 rpm で 24 時間振盪培養した (本培養)。そして浸潤用懸濁液を調製した。組成は以下の通りである。

浸潤用懸濁液:	Murashige and Skoog Plant Salt Mixture	2.3 g
	Sucrose	50 g
	MES	0.5 g
	イオン交換水	800 ml

1 N KOH で pH5.7 に調整し、イオン交換水で 1 l にメスアップした。使用直前に以下の試薬を加えた。

Gamborg's vitamin solution	0.5 ml
1 mg/ml ベンジルアミノプリン	10 µl
Silwet L-77	0.2 ml

本培養液を 3600 rpm、室温で 10 分間遠心してアグロバクテリウムを集菌し、300 ml の浸潤用懸濁液に懸濁した。

4B.1.5. 減圧湿潤法による感染

- ・シロイヌナズナから、すでに開花している花や莢を取り除いた。
- ・アグロバクテリウムの懸濁液が用土に吸収されるのを軽減するために、鉢の用土に十分に吸水させた。
- ・200 ml 容ビーカーにアグロバクテリウム懸濁液を入れ、鉢を逆さにして植物を懸濁液に浸した。その際、植物の先端などを傷つけないよう注意した。
- ・鉢を入れたビーカーを 400 mm Hg で 15 分間減圧処理した。
- ・植物をアグロバクテリウム懸濁液から取り出し、軽く揺すって植物上と用土中の余分な懸

濁液を除いた。

- ・トレイに鉢を横にして置き、ラップで覆い、この状態で1日おいた。
- ・1日後、トレイの覆いを外して鉢を起こし、植物の先端がしおれていないか確認した後、22°Cで生育させた。約2-4週間後、最初の莢が熟し始めた時点で、種子を回収した。

4B.1.6. 形質転換体の選抜

2B.1.と同様に種子の殺菌処理を行い、1/2MS (Km⁺) 培地に播種した。種子を植えた培地を4°Cで2-3日保存した後、22°Cに移して発芽させ、発芽後約10日間生育させた後、カナマイシン耐性植物を同定した。耐性植物をシロイヌナズナ用屋内育成・種子回収キットのアラシシステム（バイオメディカルサイエンス社）で栽培し、約2-4週間後、最初の莢が熟し始めた時点で、種子を回収した。この選抜の操作を2-3世代繰り返し行い、ホモ個体を形質転換体として獲得し、更なる実験に使用した。

1/2 MS (Km ⁺) 培地	Murashige and Skoog Plant Salt Mixture	2.3 g
	Sucrose	10 g
	MES	0.5 g
	Gamborg's Vitamin Solution	1 ml
	イオン交換水	1 l

1 N KOH で pH5.7 に調整、Agar を 8 g 加えた。

オートクレーブ滅菌後、60°C以下に冷ましてから以下の試薬を加えた。

20 mg/ml Kanamycin Sulfate	1 ml
100 mg/ml Carbenicillin Sodium Salt	1.5 ml
10 mg/ml Benomyl	1 ml

4B.2. ゲノム DNA 精製およびゲノム PCR

3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の遺伝子導入を確認するためゲノム DNA を精製し、ゲノム PCR を行った。

- ・B5培地で2週間栽培した野性型及び 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の芽生え3個体を(最大 100 mg) をエッペンに入れ、nippi バイオマッシャー II (ニッピ社)ですりつぶした。
- ・DNA 抽出液 100 ml に懸濁した後、フェノール/クロロホルムを 100 ml 加え、10000 rpm で5分遠心し、200 ml のエタノールにその上清を加えて混合した。
- ・15000 rpm、4°Cで10分遠心し上清を取り除き、50°Cで dry up した。
- ・沈殿をイオン交換滅菌水 30 ml に溶解した。

DNA 抽出液:	200 mM	Tris-HCl(pH7.5)
	250 mM	NaCl
	25 mM	EDTA
	0.50%	SDS

・ゲノム PCR は Hot start *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs 社) を用いた。2B.9.4.と同様の反応液及び PCR 反応条件で行った。

・プライマーの配列は、ゲノム由来の PCR 産物 (1130 bp) と導入遺伝子由来の PCR 産物 (958 bp) が区別できるように1番目のイントロンを挟む位置で設計した (Fig. 43)。使用したプライマー配列を以下に示す。

Primer name	sequence (5' → 3')
MEKK1- 125-144 Forward ①	catgttctagttcgtcagct
MEKK1-K361R Reverse ②	aagtgaaacttcctgacagcaaagaa

その後、ゲノム PCR 産物をサンプルとしてアガロースゲル電気泳動を行った。

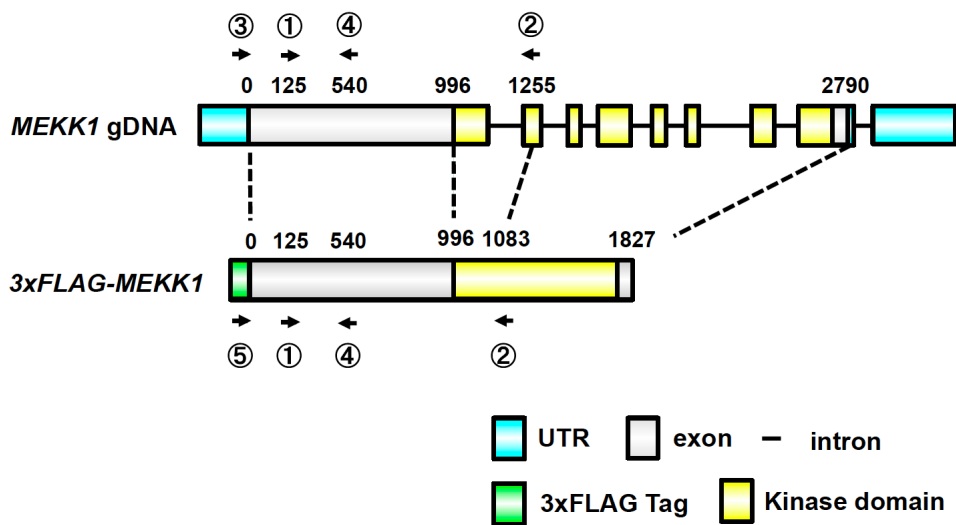


Fig. 43 ゲノム PCR 及び RT-PCR に用いたプライマー

MEKK1 のゲノム DNA と導入遺伝子 (*3xFLAG-MEKK1*) の模式図と遺伝子の導入確認及び mRNA 発現確認に用いたプライマーの位置を示した。*3xFLAG-MEKK1* 過剰発現体の系統確認のため、プライマー①と②をゲノム PCR に用いた。WT ゲノム由来の *MEKK1* をテンプレートとした PCR では 1130 bp の産物が生じ、導入遺伝子由来の *3xFLAG-MEKK1* をテンプレートとした PCR では 958 bp の産物が生じると予想される。*3xFLAG-MEKK1* 過剰発現体における mRNA の発現解析に用いたプライマーの位置を示した。WT ゲノム由来の内在性 *MEKK1* (endogenous) の発現解析にはプライマー③と④、導入遺伝子由来の *3xFLAG-MEKK1* の発現解析にはプライマー⑤と④を用いた。また導入遺伝子と WT ゲノム由来の *MEKK1* の総 mRNA の解析にプライマー①と④の組み合わせを用いた。

4B.3. RT-PCR による遺伝子発現解析

3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物における WT ゲノム由来の内在性遺伝子 MEKK1、導入遺伝子 3xFLAG-MEKK1 の mRNA の発現解析を RT-PCR を用いて行った。

・B5培地で2週間栽培した野性型及び 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の芽生えから total RNA を抽出、1st Strand cDNA を合成し、RT-PCR 解析を行った。

4B.3.1. total RNA 抽出

RNA 精製は QIAGEN 社の RNeasy Plant Mini Kit を使用した。

- ・植物組織 50 mg を液体窒素で破砕する。
- ・RLT Buffer 450 μ l と 2-Mercaptoethanol 4.5 μ l を混合し、激しくボルテックスする。
- ・この混合液と破砕した植物組織を混合し、激しくボルテックスする。
- ・2 ml のコレクションチューブにセットした QIAshredder スピンカラムにライセートを添加し、15,000 rpm で2分間遠心する。
- ・QIAshredder からのろ液の上清を、コレクションチューブ中の細胞破片ペレットを乱さないように新しいエッペンに移す。
- ・清澄化したライセートに 100%エタノール 225 μ l を添加し、すぐにピペッティングにより混和する。
- ・形成した沈殿も含むサンプルを、2 ml コレクションチューブにセッティングした RNeasy スピンカラムにアプライし、蓋を静かに閉めて 15,000 rpm で 15 秒遠心後、ろ液を捨てる。
- ・RW1 Buffer 500 μ l を RNeasy スピンカラムに添加し、15,000 rpm で 15 秒遠心し、ろ液を捨てる。
- ・DNase 10 μ l と RDD Buffer 70 μ l の混合液を作製し、RNeasy スピンカラムに添加した後、30°C で 30 分インキュベートする。
- ・RW1 Buffer 350 μ l を RNeasy スピンカラムに添加し、15,000 rpm で 15 秒遠心し、ろ液を捨てる。
- ・RPE Buffer 500 μ l を RNeasy スピンカラムに添加し、15,000 rpm で 15 秒遠心し、ろ液を捨てる。
- ・RPE Buffer 500 μ l を RNeasy スピンカラムに添加し、15,000 rpm で 2 分間遠心する。
- ・RNeasy スピンカラムを新しい 2 ml コレクションチューブに移し、ろ液の入った古いコレクシ

オンチューブを捨てる。15,000 rpm で 1 分間遠心する。

・RNeasy スピнкаラムを新しい 1.5 ml コレクションチューブにセットする。RNase フリー水 30~50 μ l を直接スピнкаラム・メンブレンの中心に添加し、15,000 rpm で 1 分間遠心して、RNA を溶出する。

・溶出液をもう一度、スピнкаラム・メンブレンの中心に添加し、15,000 rpm で 1 分間遠心する。

4B.3.2. RNA の濃度定量及び純度検定

3B.3.1. で植物組織から抽出及び精製した RNA 溶出液の吸光度を測り、濃度定量及び純度検定を行った。測定は分光光度計 NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて行った。吸光度比 (A_{260}/A_{280}) が 1.9-2.1 の不純物の少ない RNA を以降の実験に供した。

4B.3.3. 1st strand cDNA の合成

1st strand cDNA の合成には、Prime Script™ 1st Strand cDNA synthesis Kit (Takara 社) を使用した。

・4B.3.1. で植物組織から抽出及び精製された RNA を 4 μ g/8 μ l になるように RNase フリー水に溶解した。

・エッペンチューブに以下の反応液を準備した。

Oligo dT Primer	0.5 μ l
Random 6 mers	0.5 μ l
dNTP mixture	1 μ l
total RNA	8 μ l

・65°C で 5 分インキュベート後、氷上で 5 分。

・以下の反応液を準備した。

上記の反応液	10 μ l
5 X Primer Script Buffer	4 μ l
RNase inhibitor	0.5 μ l
Primer Script Rtase	1 μ l
RNase フリー水	4.5 μ l

・穏やかに攪拌後、以下の温度条件で cDNA を合成した。

Step 1	30°C	10 分
Step 2	42°C	60 分
Step 3	95°C	5 分
Step 4	4°C	5 分以上

・合成終了後、cDNA を含む反応液はイオン交換滅菌水を用いて 8 倍希釈して次の PCR に利用した。

4B.3.4. PCR による遺伝子発現解析

PCR 反応はアステック社の PC-707 を用いて行った。PCR に用いたプライマーの調製は greiner 社に委託した。

PCR に用いたプライマーの配列を以下に示す。それぞれのプライマーの位置を Fig. 43 に示した。また、コントロールとして *Actin8* の RT-PCR も行った。

MEKK1 (endogenous)

Primer name	sequence (5' → 3')
MEKK1 5'UTR -20 - -1 Forward ③	cgatggatttgagctggtt
MEKK1-540-521 Reverse ④	taacctatccacaggagtga

3xFLAG-MEKK1

Primer name	sequence (5' → 3')
3xFLAG- <i>Bam</i> H I Forward ⑤	gaaaggattcatggactacaaagaccatgac
MEKK1-540-521 Reverse ④	taacctatccacaggagtga

3xFLAG-MEKK1 + MEKK1 (endogenous)

Primer name	sequence (5' → 3')
MEKK1- 125-144 Forward ①	catgttctagttcgtcagct
MEKK1-540-521 Reverse ④	taacctatccacaggagtga

Actin8

Primer name	sequence (5' → 3')
Actin8 Forward	gaaggacctttacggtaaca
Actin8 Reverse	ccaatccagacactgtactt

プライマーは 10 μM に希釈して用いた。

PCR 酵素は Hot start *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs 社)を用いた。反応液、及び PCR 反応条件を以下に記す。

反応液:	10×Standard Taq buffer	1 μl
	2 mM dNTP mixture	0.8 μl
	template	0.5 μl
	Forward Primer	0.2 μl
	Reverse Primer	0.2 μl

Hot start <i>Taq</i> polymerase	0.05 μ l
イオン交換滅菌水	up to 10 μ l

•以下の条件でPCRを行った。

Step 1	95°C	30 秒
Step 2	95°C	30 秒
Step 3	45°C	30 秒
Step 4	68°C	60 秒
Step 5	95°C	30 秒
Step 6	45°C	30 秒
Step 7	68°C	5 分
Step 8	4°C	-

Step2-4 を 28 サイクル行った。

Actin8 の PCR 反応条件は Step 3 のアニーリング温度を 55°C、Step 4 の伸長時間を 10 秒とし、25 サイクル行った。

RT-PCR 産物の確認のためにアガロースゲル電気泳動を行った。

4B.4. イムノプロットによるタンパク質の発現解析

3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物における 3xFLAG-MEKK1 タンパク質の発現解析を抗 FLAG 抗体を用いたイムノプロットにより行った。

- B5培地で2週間栽培した野性型及び 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の芽生え 3 個体を液体窒素中で破碎後、タンパク質抽出バッファー 1 ml を加えさらにすりつぶした。
- エッペンに移して、15000 rpm、4°Cで 30 分間遠心し、上清を回収した。
- 抽出したタンパク質は 1B.2.3.と同様にブラッドフォード法で定量した。定量には Bio-Rad 社の Proein Assay を使用した。

- ・タンパク質濃度を1.5 mg/mlに調製し、1/2量の3 x SDS sample bufferを加え、100°Cで3分間インキュベートした。
- ・1B.2.4.と同様にSDS-PAGEを行った。各サンプルを1レーンあたり30 μ lアプライし、ゲル1枚につき20 mAの定電流で泳動した。
- ・1B.2.5、1B.3.と同様の方法でCBB染色及びイムノブロットを行った。

イムノブロットに用いた各種特異抗体を以下に示す。

FLAG

一次抗体 : Anti DYKDDDDK tag, Monoclonal Antibody (Wako社)

二次抗体 : Goat anti-Mouse IgG, Alkaline Phosphatase conjugate (Millipore社)

4B.5. トランスジェニック植物の成長パターン解析

野生型植物、3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物、3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物、をB5培地にて栽培し、播種2に週間後にプロフェッショナル用培土(ダイワ化成社)へ移植し、バイオメディカルサイエンス社のアラシステムを使用して栽培した。その後、生育させ、トランスジェニック植物と野生型植物とで成長パターンを観察・比較した。

抽臺日数は、各植物の花茎が0.5 cmに到達した播種後の日数を1日ごとに測定した。

新鮮重はMETTLER社のPJ 300を用いて測定した。播種後40日目の植物の地上部を、5個体を計測した。

4B.6. 凍結耐性測定

2B.1.に示した方法で、野生型植物および3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物、3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物をB5培地で生育させた。発芽3週間後の植物体をポットに移植し、22°Cの連続光の条件で1週間栽培した。各ポットを22°Cおよび4°Cで24時間静置し、前処理を行った。その後、-4°Cの暗黒下の条件に移し、30時間静置することで凍結処理を行った。凍結処理後、22°Cの連続光の条件に移し、その後の生育を観察した。また、コントロールとして22°Cの連続光で前処理後、凍結処理を行わずに継続して22°Cの連続光の条件で生育させた植物も観察した。

4C. 結果

4C.1. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現シロイヌナズナの作製

MEKK1 および不活性型 MEKK1 KN を 3xFLAG タグ融合タンパク質として過剰発現するトランスジェニック植物 (3xFLAG-MEKK1 Full, 3xFLAG-MEKK1 KN) の作製を行った。トランスジェニック植物はアグロバクテリウム法を用いて作製し、MS (Km⁺) 培地で選抜した。3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物は、T₁ 世代において、12 系統(Full1~Full12)を得た。さらにカナマイシンで選抜した T₂ 世代は Full4、Full12 以外の系統で 10 系統ずつ (Full1-1~10、Full2-1~10、Full3-1~10、Full5-1~10、Full6-1~10、Full7-1~10、Full8-1~10、Full9-1~10、Full9-1~10、Full9-1~10、Full10-1~10、Full11-1~10)、Full12 で 5 系統 (Full12-1~5) 得た。これをさらに MS (Km⁺) 培地に播種した F3 世代において、発芽種子全てがカナマイシン耐性を示した Full1-2、Full1-4、Full1-8、Full1-9、Full1-10、Full2-2、Full2-4、Full2-6、Full3-9、Full5-8、Full7-2、Full7-3、Full7-4、Full7-5、Full7-8、Full9-6、Full10-1、Full10-3、Full10-6、Full11-3、Full11-4、Full11-5、Full11-7、Full11-8、Full11-9、Full11-10、Full12-2、Full12-7 の系統を形質転換ホモ個体と判断した。

一方、3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物は、T₁ 世代において、9 系統 (KN1~KN9) を得た。T₂ 世代は KN4、KN5 以外の系統で 10 系統ずつ (KN1-1~10、KN2-1~10、KN3-1~10、KN6-1~10、KN7-1~10、KN8-1~10、KN9-1~10)、KN4 で 4 系統 (KN4-1~4)、KN5 で 3 系統 (KN5-1~3) 得た。さらに T3 世代において発芽種子全てがカナマイシン耐性を示した系統として KN1-2、KN1-4、KN1-5、KN1-6、KN1-8、KN1-9、KN2-3、KN2-4、KN2-10、KN3-4、KN3-5、KN3-7、KN5-1、KN5-2、KN5-3、KN6-3、KN6-4、KN6-5、KN6-7、KN6-8、KN7-3、KN7-10、KN8-3、KN8-8、KN8-9、KN8-10、KN9-1、KN9-5 を得た。

得られた 3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物及び 3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物から数系統ずつ選び、ゲノム DNA を抽出し、それらをテンプレートに PCR することで遺伝子導入の確認を行った。PCR は Fig. 43 に示したように導入遺伝子及びゲノムに由来する PCR 産物がそれぞれ確認できるように設計したプライマーを用いて行った。その結果、3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物の Full1-2、Full2-2、Full7-2、Full9-6、Full10-1、Full11-3、Full12-2 の 7 系統及び 3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物の KN1-2、KN2-3、KN3-4、KN5-1、KN6-3、KN7-3、KN8-3、KN9-1 の 8 系統において導入遺伝子由来の PCR 産物が確認された (Fig. 44)。そこでこれらの系統を以下の検討に用いた。

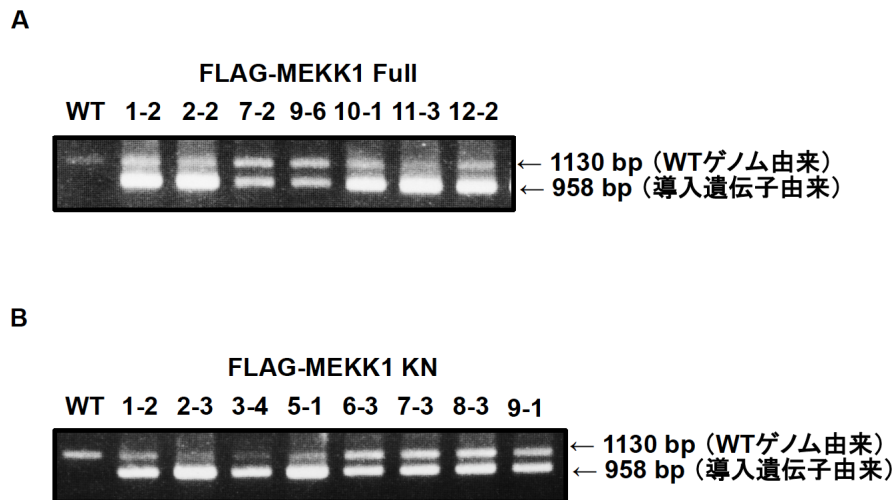


Fig. 44 ゲノム PCR による *3xFLAG-MEKK1* 過剰発現植物の遺伝子導入の確認
 野生型植物 (WT) および *3xFLAG-MEKK1 Full* 過剰発現植物 (Full1-2、Full2-2、Full7-2、Full9-6、
 Full10-1、Full11-3、Full12-2)、*3xFLAG-MEKK1KN* 過剰発現植物 (KN1-2、KN2-3、KN3-4、KN5-1、
 KN6-3、KN7-3、KN8-3、KN9-1) から抽出したゲノム DNA をテンプレートとしてゲノム PCR を行い、アガ
 ロースゲル電気泳動を行った。

4C.2. *3xFLAG-MEKK1* 過剰発現植物における *MEKK1* 遺伝子発現解析

3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物および *3xFLAG-MEKK1 KN* 過剰発現植物において
 導入遺伝子の発現レベル及びゲノム由来の内在性 *MEKK1* 遺伝子の発現レベルを検証し
 た。3C.1.において遺伝子の導入を確認した各系統の植物を B5 培地で 2 週間生育後、total
 RNA を抽出し cDNA を調製した。導入遺伝子由来の *3xFLAG-MEKK1* の発現レベル及び
 ゲノム由来の *MEKK1* の発現レベル、さらにそれらを足し合わせた総 *MEKK1* 遺伝子の発現
 レベルを Fig. 43 に示したそれぞれのプライマーを用いた PCR により検証した (Fig. 45、Fig.
 46)。RT-PCR の結果、*3xFLAG-MEKK1 Full* 過剰発現植物および *3xFLAG-MEKK1 KN*
 過剰発現植物のいずれの系統においても導入遺伝子由来の *3xFLAG-MEKK1* の発現が確
 認された。また、系統間における発現レベルはあまり差が見られなかった。これら過剰発現
 植物におけるゲノム由来の内在性 *MEKK1* 遺伝子の発現レベルはいずれの系統におい
 ても WT と同様の発現量を示した。過剰発現植物における総 *MEKK1* 遺伝子発現レベルを検
 証したところ、WT と比較していずれの系統においても発現レベルの増加が見られた。

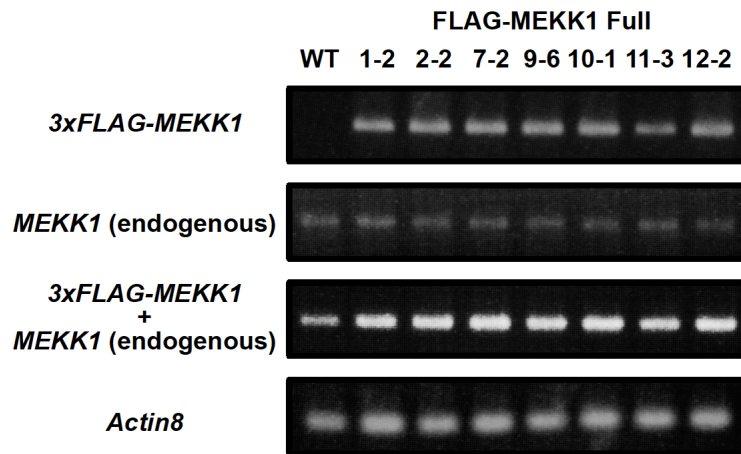


Fig. 45 *3xFLAG-MEKK1 Full* 過剰発現植物における *MEKK1* 遺伝子の発現解析
 野生型植物 (WT) および *3xFLAG-MEKK1 Full* 過剰発現植物 (Full1-2、Full2-2、Full7-2、Full9-6、
 Full10-1、Full11-3、Full12-2) から total RNA を抽出し、逆転写により cDNA を得た。それらをテンプレ
 ートとして PCR を行い、各系統の *MEKK1* 発現レベルを調査した。コントロールとして *Actin8* 遺伝子を
 用いた。

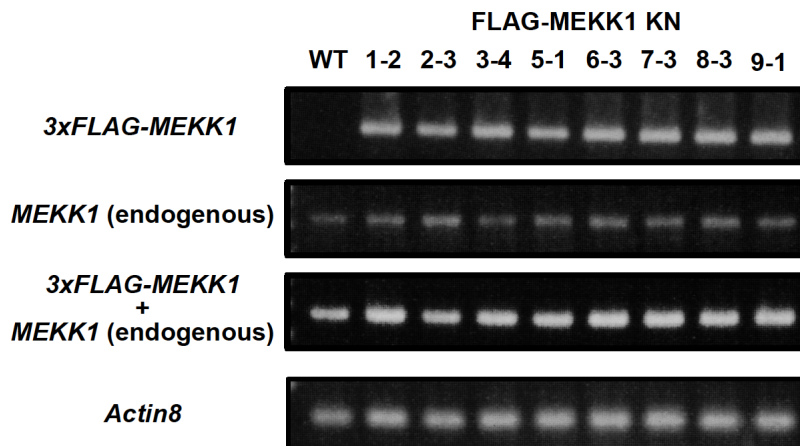


Fig. 46 *3xFLAG-MEKK1 KN* 過剰発現植物における *MEKK1* 遺伝子の発現解析
 野生型植物 (WT) および *3xFLAG-MEKK1 KN* 過剰発現植物 (KN1-2、KN2-3、KN3-4、KN5-1、KN6-3、
 KN7-3、KN8-3、KN9-1) から total RNA を抽出し、逆転写により cDNA を得た。それらをテンプレートとし
 て PCR を行い、各系統の *MEKK1* 発現レベルを調査した。コントロールとして *Actin8* 遺伝子を用いた。

4C.3. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物における 3xFLAG-MEKK1 タンパク質発現解析

遺伝子の導入及び遺伝子発現が確認された各 3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物および 3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物における、3xFLAG-MEKK1 Full 及び 3xFLAG-MEKK1 KN タンパク質の発現を検証した。各系統の植物を B5 培地で 2 週間生育し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液を SDS-PAGE で展開後、抗 FLAG 抗体を用いてイムノブロットした。

3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物のいずれの系統においても FLAG-MEKK1 Full タンパク質と思われるバンドは検出されなかった (Fig. 47A)。一方、3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物では、3xFLAG-MEKK1 KN タンパク質の予測分子量である約 69 kDa の位置に一本のバンドが検出された (Fig. 47B)。各系統間において 3xFLAG-MEKK1 KN タンパク質の量に差が見られ、KN1-2、KN6-3、KN7-3、KN8-3、KN9-1 の系統でのタンパク質量と比較して KN2-3、KN3-4、KN5-1 の系統ではタンパク質量が少なかった。

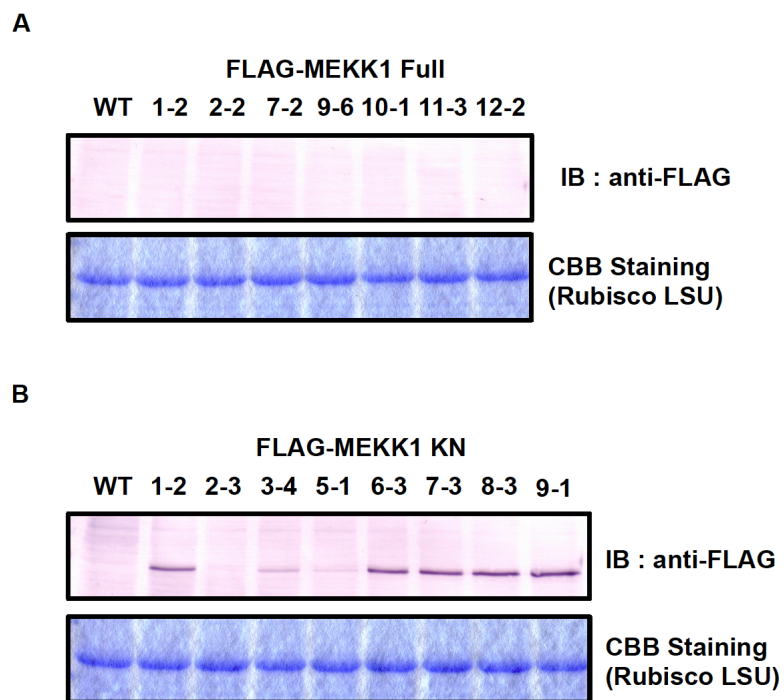


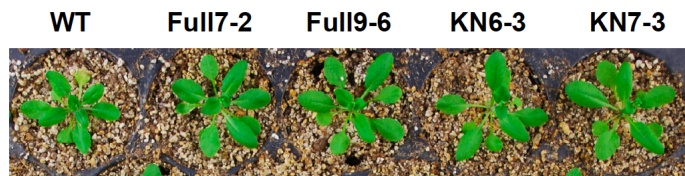
Fig. 47 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物における 3xFLAG-MEKK1 タンパク質の発現解析

野生型植物 (WT) および 3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物 (Full1-2、Full2-2、Full7-2、Full9-6、Full10-1、Full11-3、Full12-2)、3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物 (KN1-2、KN2-3、KN3-4、KN5-1、KN6-3、KN7-3、KN8-3、KN9-1) の実生より細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE で展開後、抗 FLAG 抗体 (anti-FLAG) でイムノブロットした。コントロールとして CBB 染色したゲルの Rubisco の Large Subunit のバンドを CBB Staining (Rubisco LSU) に示した。

4C.4. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の形態

3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物 Full7-2、Full9-6 および 3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物 KN6-3、KN7-3 の系統を WT と共に 22°C、連続光下で生育させた。B5 培地で 2 週間生育した後、アラシシステムに移植し抽臺日及び新鮮重を測定した。Fig. 48 に 28 日目及び 40 日目の植物体の写真を示した。WT と比較していずれの系統の植物体も顕著な違いは見られなかった。花茎の長さが 0.5 cm に到達するのを指標に抽臺の日数を測定したところ、WT で 25 ± 0.43 日、3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物 Full7-2 25 ± 0.72 日、Full9-6 25 ± 0.27 日、3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物 KN6-3 24 ± 0.63 日、KN7-3 26 ± 0.75 日でありそれぞれの系統間での差は見られなかった (Fig. 49A)。また、40 日目の各植物体の地上部の新鮮重を測定した。WT で 241 ± 8.5 mg、3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物 Full7-2 248 ± 20.1 mg、Full9-6 249 ± 14.9 mg、3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物 KN6-3 255 ± 15.1 mg、KN7-3 235 ± 24.7 mg の値をそれぞれ示し、系統間での差は検出されなかった (Fig. 49B)。

A



B

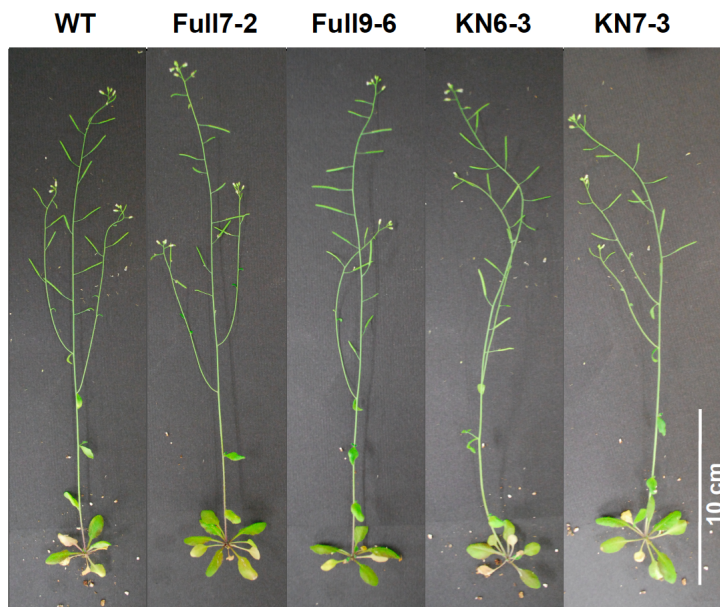


Fig. 48 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の形態

野生型植物 (WT) および 3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物 (Full7-2、Full9-6)、3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物 (KN6-3、KN7-3) の各植物の 28 日齢 (A) および 40 日齢 (B) の形態を示した。

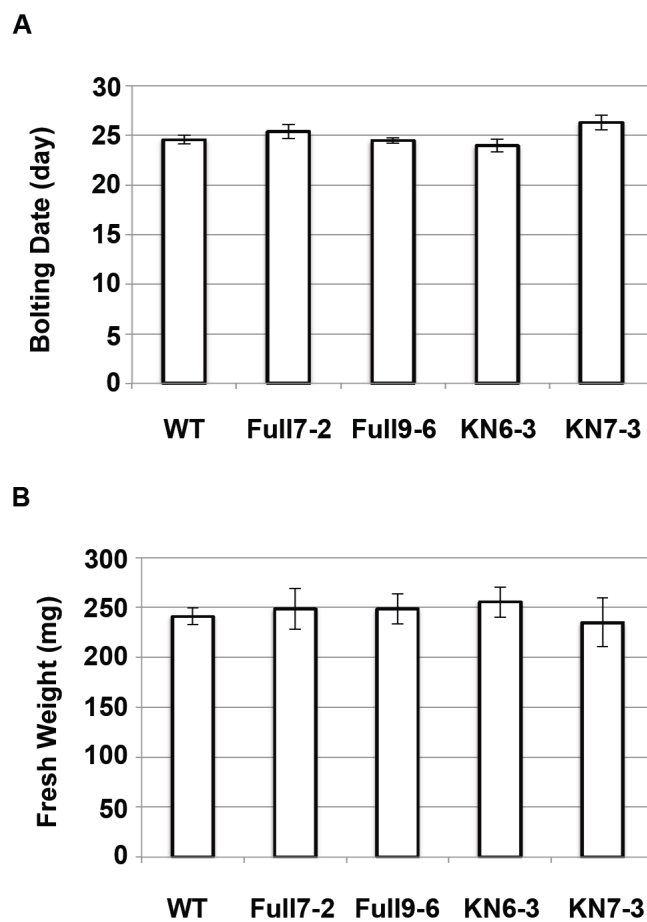


Fig. 49 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の成長解析

野生型植物 (WT) および 3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物 (Full7-2、Full9-6)、3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物 (KN6-3、KN7-3) の各植物の抽薹を開始する日数 (A)、及び 40 日齢の植物体の新鮮重 (B) を測定した。測定した 10 個体 (A) 及び 5 個体 (B) の平均と標準誤差を示す。

4C.5. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の凍結耐性

3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物 Full1-2、Full2-2 および 3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物 KN6-3、KN7-3 の系統と WT の植物を 22°C、連続光下で生育させた。B5 培地で 2 週間生育した後、ポットに移植し 1 週間後に凍結耐性を検証した。4°C で 24 時間低温馴化処理したポット (CA) 及び 22°C で 24 時間静置したポット (NA) を -4°C に移行することで凍結処理を開始し、30 時間後に 22°C に戻した。その後の植物体の生存を指標に検証した。コントロールとして低温馴化処理、凍結処理のいずれも行わないポットも用意した。Fig. 50 に凍結処理 4 日後の植物体の写真を示した。低温馴化処理、凍結処理をしていないコントロールのポットでは WT、3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物 (Full1-2、Full2-2)、3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物 (KN6-3、KN7-3) のいずれも生存が確認され系統間での違いは見られなかった。低温馴化処理を行わずに凍結処理したポットの植物体はいずれの系統でも生存した植物体は確認できなかった。一方、低温馴化処理後に凍結処理をしたポットではいずれも系統においても数個体の死滅が見られたがほとんどの個体が生存した。このことは 3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物及び 3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物の凍結耐性及び低温馴化能が WT と同等であることを示唆している。

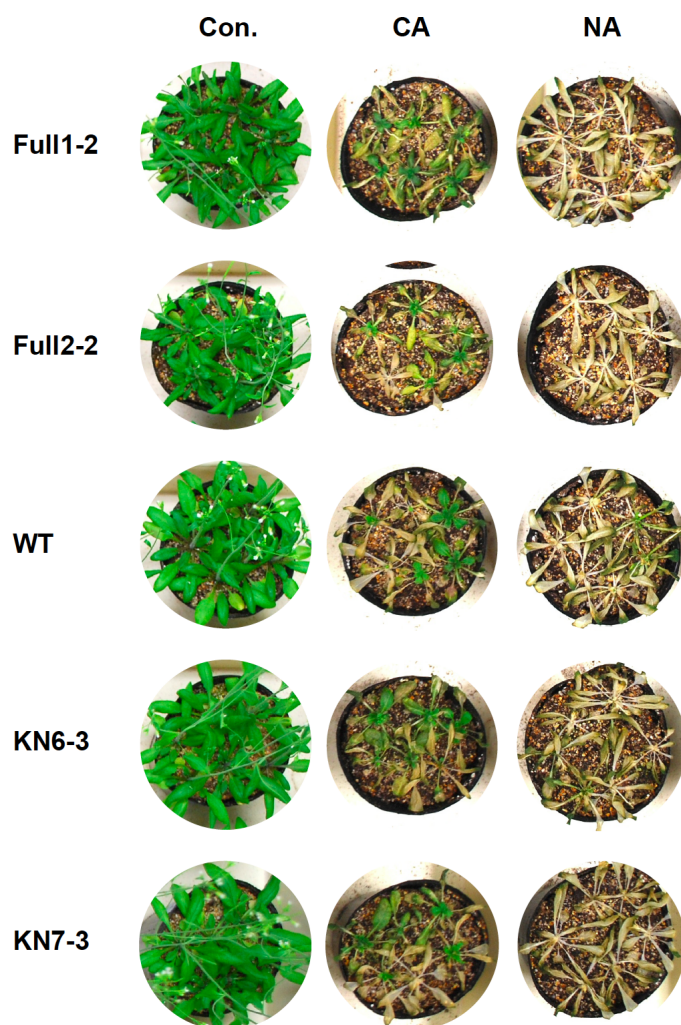


Fig. 50 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の凍結耐性

野生型植物 (WT) および 3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物 (Full1-2、Full2-2)、3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物 (KN6-3、KN7-3) の各植物 (4 週齢) を用いた。4°C で 24 時間低温馴化処理したポット (CA) 及び 22°C で 24 時間静置したポット (NA) を -4°C に移行することで凍結処理を行った、その後の 22°C での生存を観察した。また凍結処理を行わなかったポット (Con.) も観察した。凍結処理 4 日後の植物体の写真を示す。

4D. 考察

4D.1. 3xFLAG-MEKK1 過剰発現植物の特徴

作製した 3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物及び 3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物は、通常の生育環境において、野性型と比較して形態や生育速度、大きさにおいてほとんど違いが検出されなかった (Fig. 48、Fig. 49)。3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物は導入遺伝子の発現が確認されたにも関わらず (Fig. 45)、抗 FLAG 抗体によるイムノブロットの結果、3xFLAG-MEKK1 タンパク質がいずれの系統においても検出されなかった (Fig. 47A)。3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物で 3xFLAG-MEKK1 KN タンパク質は検出されたことから (Fig. 47B)、植物細胞内で、3xFLAG-MEKK1 Full タンパク質と 3xFLAG-MEKK1 KN タンパク質を識別し、MEKK1 の量的制御が行われていることが示唆された。その結果、3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物は野性型と同様の表現形となったと考えられる。一方で、MEKK1 遺伝子欠損植物は矮小の形質を示すことが報告されている (Ichimura *et al.* 2006; Nakagami *et al.* 2006)。同様の形質は MKK1 MKK2 二重遺伝子欠損植物や MPK4 遺伝子欠損植物においても見られる (Su *et al.* 2007; Qui *et al.* 2008)。この矮小の形質は MEKK1 MEKK2 二重遺伝子欠損植物で回復すること (Kong *et al.* 2012)、MPK4 遺伝子欠損植物において MEKK2 の遺伝子発現とタンパク質量が増加することなどから、MEKK1 を含む MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 経路のいずれかの構成要素が欠損した際に、MEKK2 が通常より過剰に発現しそのことが自然免疫応答と伴う矮小の形態を誘導すると考えられている (Su *et al.* 2013)。このことは MEKK1、MKK1、MKK2、MPK4 のタンパク質量を認識するシステムが存在することを示唆している。3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物において 3xFLAG-MEKK1 Full タンパク質は検出されなかったが矮小の形質は示さなかったことから、この植物内において、通常の生育に必要な MEKK1 タンパク質量が維持されていることが考えられる。3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物において、導入遺伝子の発現 (Fig. 46) 及び 3xFLAG-MEKK1 KN タンパク質 (Fig. 47B) が検出されたが生育に影響は見られなかった (Fig. 48、Fig. 49)。このことは、3xFLAG-MEKK1 KN タンパク質の過剰発現が、ドミナントネガティブとして機能していないことを示唆していると考えられる。もしくは、MEKK1 のリン酸化酵素活性は、植物の成長に影響していないのかもしれない。実際に、MEKK1 遺伝子欠損植物に 361 番目のリジン残基をメチオニン残基に置換することにより作製した不活性型の MEKK1 K361M を発現させると、MEKK1 遺伝子欠損植物の矮小の形質が回復し、正常に生育することが報告されている (Su *et al.* 2007)。

また、3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物の凍結耐性は野性型と同様で、低温馴化した

場合のみ生育が確認された (Fig. 50)。3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物において 3xFLAG-MEKK1 Full タンパク質の発現が検出されなかったことから (Fig. 47A)、3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物における MEKK1 タンパク質量が野生型と同等であることが推測され、そのため同様の形質しか見られないと考えられる。もしくは、2 章で示したように MEKK1 が低温依存的に活性化し MKK2 をリン酸化することから、通常環境では MEKK1 のリン酸化酵素活性が制御されており、MEKK1 を介したシグナル伝達経路が MEKK1 の過剰発現だけでは活性化されないためとも考えられる。また、3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物の凍結耐性も野生型と同等であった (Fig. 50)。このことは 3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物がドミナントネガティブとして働かないことをさらに支持する。

これまでの結果より、作製した 3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物及び 3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物の野生型植物と異なる形質は検出できていない。しかしながら、MEKK1 は生育や低温応答だけでなく、高塩や傷害、病原菌等の様々な環境ストレスに関わることが報告されていることから、更なる詳細な検証をすることで、MEKK1 過剰発現植物の特徴的な形質を見いだすことが出来るかもしれない。それにより、MEKK1 の機能がさらに解明されることを期待している。

4D.2. MEKK1 タンパク質の量的制御

3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物を作製したところ、導入遺伝子の発現は確認できるが、3xFLAG-MEKK1 Full タンパク質は検出できなかった (Fig. 47A)。植物内においてタンパク質の量は遺伝子転写、翻訳、翻訳後の各段階で制御されていると考えられる。導入遺伝子の発現が見られることから遺伝子転写は行われており、同様の遺伝子発現量を示す 3xFLAG-MEKK1 KN 過剰発現植物において 3xFLAG-MEKK1 KN タンパク質が検出されることから翻訳も行われていると推測される。つまり、3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物において 3xFLAG-MEKK1 Full タンパク質量を翻訳後に制御するメカニズムが存在していることが示唆される。また、このタンパク質量の制御は不活性型の MEKK1 KN タンパク質には起こらないことから、リン酸化酵素活性がタンパク質の量的制御メカニズムにおいて関与することがわかった。シロイヌナズナプロトプラストで一過的発現させた MEKK1 が H_2O_2 によって活性化すること、またプロテアソーム阻害剤による MEKK1 タンパク質の増加すること、それに伴ってキナーゼ活性が増加することを報告している。これらの結果より、MEKK1 の活性化にはプロテアソームの関与する MEKK1 タンパク質の量的制御と翻訳後修飾の両方が作用することが示唆されている (Nakagami *et al.* 2006)。また、当研究室において

MEKK1 をベイトにした酵母 Two-hybrid 法による相互作用タンパク質スクリーニングの結果、ユビキチン修飾系 SCF コンプレックスの構成要素である SKP タンパク質の1つである ASK1 との相互作用が検出された。この相互作用は、全長および KD のみの MEKK1 で検出されたため、少なくとも、キナーゼドメインにおいて相互作用すると考えられる (Nomura 2007)。

これらの結果より、MEKK1 は植物内でユビキチン修飾を介したプロテアソームタンパク質分解系によりそのタンパク質量の制御がなされていること、また、MEKK1 のリン酸化酵素活性がその制御に影響することが示唆された。1 章において MEKK1 が自己リン酸化酵素活性を持つことが示唆されており、この自己リン酸化がユビキチン修飾系の認識に関与しているのかもしれない。今後、MEKK1 のタンパク質量がどのように制御されているのかを検証することは、植物内における MEKK1 の機能を解析する上で重要であると考えられる。

総合考察

環境応答における MEKK1 を介したシグナル伝達

本研究およびこれまでの報告から、MEKK1 の活性制御には大きく分けて2つのメカニズムが関与していることが推測される。1つは MEKK1 タンパク質の翻訳後制御による活性制御である。本研究では低温応答に着目して研究を行い、低温において MEKK1 タンパク質の量は変化しないがリン酸化酵素活性の上昇が見られたことから (Fig. 29)、ストレス環境応答において MEKK1 が翻訳後修飾により活性化することが示唆された。さらに MEKK1 が低温依存的にリン酸化されること (Fig. 31)、CRLK1 が MEKK1 をリン酸化することを示した (Fig. 34)。また、CRLK1による MEKK1 のリン酸化サイトが N 末端領域に存在することが示唆されている。MEKK1 の N 末端領域は MEKK1 のリン酸化酵素活性を抑制する役割を持つことが明らかになった (Fig. 19、Fig. 22、Fig. 23)。このことから、MEKK1 が活性化するには、この N 末端領域によるリン酸化酵素活性の抑制が解除される必要があると考えられる。この解除に N 末端領域のリン酸化が関与しているのかもしれない。もう1つは MEKK1 のタンパク質の量的制御である。3xFLAG-MEKK1 Full 過剰発現植物において導入遺伝子の発現が見られるにもかかわらず、3xFLAG-MEKK1 タンパク質の発現が検出できなかったことからタンパク質の量を制御するメカニズムが存在することが示唆される。この制御は MEKK1 のリン酸化酵素活性に影響されることが考えられる。また、Nakagami らの報告により、MEKK1 がプロテアソームによるタンパク質分解系により制御されていることが示されている (Nakagami *et al.* 2006)。一方で、MEKK1 遺伝子欠損植物が矮小の形態を示すことなどから、MEKK1 は通常環境において適切なタンパク質量に調製されている必要があると考えられる。このように、MEKK1 が複合的なメカニズムで活性制御されていることが考えられるが、それぞれの分子メカニズムの解明には更なる研究が必要である。

MEKK1 は、これまでの研究より、傷害、病原菌、低温、高塩ストレスのシグナル伝達経路に関連していることが示されている。本研究では低温における MEKK1 の上流経路に細胞膜流動性の低下、Ca²⁺シグナリングが存在すること、さらに CRLK1により MEKK1 がリン酸化されることを示唆した (Fig. 41)。MEKK1 は低温以外にも様々なストレスのシグナル伝達に関わると考えられており、その上流経路は未だにあまりわかっていないが、いくつかの上流因子の候補が示唆されてきている。病原菌によるストレスシグナル伝達経路における MEKK1 の上流候補として病原菌のフラジェリン由来のペプチド flg22 のレセプターとして FLS2が報告されている (Asai *et al.* 2002)。FLS2はロイシンリッチリピートレセプターキナ

一ゼであり、ロイシンリッチリピートレセプター様キナーゼ BAK1 と複合体を形成し flg22 を認識する (Chinchilla *et al.* 2007)。その下流として最近、レセプター様細胞質キナーゼ BIK1 が同定された。flg22 を認識した FLS2/BAK1 複合体は、BAK1 の細胞内キナーゼドメインにおいて BIK1 をリン酸化し、またリン酸化された BIK1 は FLS2、BAK1 の細胞内キナーゼドメインをリン酸化する (Lu *et al.* 2009)。しかしながらこれらリン酸化酵素と MEKK1 との直接的な関係を示す報告は未だない。また、MEKK1 は過酸化水素処理によってそのリン酸化酵素活性が上昇することが報告されている (Nakagami *et al.* 2006)。過酸化水素は、病原菌感染や傷害等の様々なストレス時に発生することから、これらのストレスシグナルの伝達経路において MEKK1 の上流シグナルとして働くことが考えられる。また、MEKK1 との関連は報告されていないものの、高塩ストレス耐性のシグナル伝達機構として、Salt-Overly-Sensitive (SOS) 経路が報告されている (Chinnusamy *et al.* 2003)。この経路は、Ca²⁺結合タンパク質 SOS3、セリン/スレオニンリン酸化酵素 SOS2、Na⁺/H⁺アンチポーター-SOS1 から構成されており、高塩ストレスによって Ca²⁺濃度が上昇すると SOS3 が活性化され、SOS2 と結合する (Guo *et al.* 2001)。SOS2 はこの結合によって活性化され、SOS1 をリン酸化する。その結果、SOS1 による Na⁺の排出が活性化され高塩耐性を獲得するとされている。しかしこの経路において、塩ストレスを認識し、Ca²⁺濃度が上昇させるレセプターは同定されていない。このように様々なストレスにおける上流候補が推測されているが、これらが実際に MEKK1 の上流経路として働くのかを明らかにするためには更なる研究が必要とされる。また、上流経路に応じて MEKK1 の活性制御のメカニズムが異なることが予測されるため、MEKK1 の上流経路と活性制御メカニズムを同時に検討していくことが重要であると思われる。

今後の展望

本研究は、様々な環境ストレス応答に関わる MAPKKK である MEKK1 の活性制御や基質選択について大腸菌発現タンパク質や酵母 Two-hybrid 法を用いて検証し、N 末端領域が MEKK1 の活性制御と基質選択のいずれにおいても重要な役割を持つことを示唆した。さらに、N 末端領域にチロシンリン酸化サイトが存在し、またリン酸化酵素活性に影響する可能性を示した。続いて低温において実際に MEKK1 が活性化し MKK2 を選択的にリン酸化することを明らかにした。さらに低温により MEKK1 がリン酸化されること、MEKK1 の上流経路に細胞膜流動性の低下、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を介した Ca²⁺/カルモジュリン-CRLK1-MEKK1 経路が存在し、CRLK1 によって MEKK1 がリン酸化されることを示唆した。

この研究結果は、MEKK1 の活性制御や基質選択に新たな知見をもたらすと共に、低温における MEKK1 を介した一連のシグナル伝達経路を提唱するものである。

今後、低温においてみられる MEKK1 のリン酸化が実際にリン酸化酵素活性に影響しているのかを明らかにすることは必須であると考えている。このリン酸化のサイトを同定すると共に、その役割を検証することは MEKK1 の活性制御メカニズムの解明において重要である。また、低温以外の MEKK1 が関与すると考えられている様々なストレスにおいても同様のリン酸化が生じるのか、他の制御メカニズムが存在するのかを調べることで、様々なストレスにおいて MEKK1 がどのように適切な基質を選択しているのか、また、どのような上流経路を介して伝達されるのかということについての知見が得られると予想される。

本研究では、MEKK1 のシグナル伝達における分子メカニズムについて新しい知見が得られた。また低温における MEKK1 の上流経路について明らかにしてきた。しかしながら、植物のストレス応答は複雑であり、今後さらなる研究が必要とされている。ストレス応答の全容解明には各シグナル伝達経路やその分子メカニズムを研究することはもちろん、シグナル伝達経路間のクロストークを含めた解析が求められている。また、作製した *MEKK1* 過剰発現植物は凍結耐性の向上が見られなかった。今後、MEKK1 の活性や MEKK1 タンパク質の存在量を制御するメカニズムを解明することやストレス応答のメカニズムを把握することでより効率的なストレス耐性植物の作出に向けた知見が蓄積されていくことを期待する。

引用文献

Andreasson E, Ellis B. Trends Plant Sci. 2010 Feb;15(2):106-13. Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus.

Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. Nature. 2002 Feb 28;415(6875):977-83. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity.

Avruch J. Biochim Biophys Acta. 2007 Aug;1773(8):1150-60. MAP kinase pathways: the first twenty years.

Bergmann DC, Lukowitz W, Somerville CR. Science. 2004 Jun 4;304(5676):1494-7. Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase.

Berriri S, Garcia AV, Dit Frey NF, Rozhon W, Pateyron S, Leonhardt N, Montillet JL, Leung J, Hirt H, Colcombet J. Plant Cell. 2012 Oct;24(10):4281-93. Constitutively active mitogen-activated protein kinase versions reveal functions of *Arabidopsis* MPK4 in pathogen defense signaling.

Champion A, Picaud A, Henry Y. Trends Plant Sci. 2004 Mar;9(3):123-9. Reassessing the MAP3K and MAP4K relationships.

Chen RE, Thorner J. Biochim Biophys Acta. 2007 Aug;1773(8):1311-40. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T. Nature. 2007 Jul 26;448(7152):497-500. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence.

Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, Zhu JK. Genes Dev. 2003 Apr 15;17(8):1043-54. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*.

Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK. J Exp Bot. 2004 Jan;55(395):225-36. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants.

Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. Trends Plant Sci. 2007 Oct;12(10):444-51. Cold stress regulation of gene expression in plants.

Chong H, Lee J, Guan KL. EMBO J. 2001 Jul 16;20(14):3716-27. Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation.

Chong H, Vikis HG, Guan KL. Cell Signal. 2003 May;15(5):463-9. Mechanisms of regulating the Raf kinase family.

Colcombet J, Hirt H. Biochem J. 2008 Jul 15;413(2):217-26. *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes.

Crews CM, Alessandrini AA, Erikson RL. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Oct 1;88(19):8845-9. Mouse Erk-1 gene product is a serine/threonine protein kinase that has the potential to phosphorylate tyrosine.

Cuevas BD, Abell AN, Johnson GL. Oncogene. 2007 May 14;26(22):3159-71. Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration.

DeFalco TA, Bender KW, Snedden WA. Biochem J. 2009 Dec 14;425(1):27-40. Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling.

Doherty CJ, Van Buskirk HA, Myers SJ, Thomashow MF. Plant Cell. 2009 Mar;21(3):972-84. Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance.

Dong CH, Agarwal M, Zhang Y, Xie Q, Zhu JK. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 May 23;103(21):8281-6 The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1.

Drogen F, O'Rourke SM, Stucke VM, Jaquenoud M, Neiman AM, Peter M. Curr Biol. 2000 Jun 1;10(11):630-9. Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling *in vivo*.

Duerr B, Gawienowski M, Ropp T, Jacobs T. Plant Cell. 1993 Jan;5(1):87-96. MsERK1: a mitogen-activated protein kinase from a flowering plant.

Gao L, Xiang CB. Plant Mol Biol. 2008 May;67(1-2):125-34. The genetic locus At1g73660 encodes a putative MAPKKK and negatively regulates salt tolerance in *Arabidopsis*.

Gao M, Liu J, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S, Zhang Y. Cell Res. 2008 Dec;18(12):1190-8. MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants.

Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE. J Biol Chem. 2003 Sep 5;278(36):34725-32. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes.

Gilmour SJ, Hajela RK, Thomashow MF. Plant Physiol. 1988 Jul;87(3):745-50. Cold Acclimation in *Arabidopsis thaliana*.

Guo Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu JK. Plant Cell. 2001 Jun;13(6):1383-400. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance.

Hadiarto T, Nanmori T, Matsuoka D, Iwasaki T, Sato K, Fukami Y, Azuma T, Yasuda

T. Planta. 2006 Mar;223(4):708-13. Activation of *Arabidopsis* MAPK kinase kinase (AtMEKK1) and induction of AtMEKK1-AtMEK1 pathway by wounding.

Harper JF, Harmon A. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Jul;6(7):555-66. Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection.

Huang C, Ding S, Zhang H, Du H, An L. Plant Sci. 2011 Jul;181(1):57-64. CIPK7 is involved in cold response by interacting with CBL1 in *Arabidopsis thaliana*.

Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF. Mol Biol Rep. 2012 Feb;39(2):969-87. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants.

Huang Y, Li H, Hutchison CE, Laskey J, Kieber JJ. Plant J. 2003 Jan;33(2):221-33. Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*.

Hundertmark M, Hinch DK. BMC Genomics. 2008 Mar 4;9:118. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*.

Ichimura K, Casais C, Peck SC, Shinozaki K, Shirasu K. J Biol Chem. 2006 Dec 1;281(48):36969-76. MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*.

Ichimura K, Mizoguchi T, Irie K, Morris P, Giraudat J, Matsumoto K, Shinozaki K. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Dec 18;253(2):532-43. Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*.

Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki K. Plant J. 2000 Dec;24(5):655-65. Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6.

Ichimura K. et al (MAPK Group) Trends Plant Sci. 2002 Jul;7(7):301-8.

Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature.

Ishikawa M, Soyano T, Nishihama R, Machida Y. Plant J. 2002 Dec;32(5):789-98. The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase contains a functional nuclear localization signal at the binding site for the NACK1 kinesin-like protein.

Jonak C, Ökrész L, Bögre L, Hirt H. Curr Opin Plant Biol. 2002 Oct;5(5):415-24. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling.

Jouannic S, Champion A, Segui-Simarro JM, Salimova E, Picaud A, Tregear J, Testillano P, Risueño MC, Simanis V, Kreis M, Henry Y. Plant J. 2001 Jun;26(6):637-49. The protein kinases AtMAP3K ϵ 1 and BnMAP3K ϵ 1 are functional homologues of *S. pombe* cdc7p and may be involved in cell division.

Kamata T, Uemura M. Cryo Letters. 2004 Sep-Oct;25(5):311-22. Solute accumulation in heat seedlings during cold acclimation: contribution to increased freezing tolerance.

Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR. Cell. 1993 Feb 12;72(3):427-41. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases.

Kim TW, Michniewicz M, Bergmann DC, Wang ZY. Nature. 2012 Feb 5;482(7385):419-22. Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway.

Knight H, Trewavas AJ, Knight MR. Plant Cell. 1996 Mar;8(3):489-503. Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation.

Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ. Nature. 1991 Aug 8;352(6335):524-6. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium.

Koster KL, Lynch DV. Plant Physiol. 1992 Jan;98(1):108-13. Solute Accumulation and Compartmentation during the Cold Acclimation of Puma Rye.

Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Mar 14;97(6):2940-5. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants.

Krysan PJ, Jester PJ, Gottwald JR, Sussman MR. Plant Cell. 2002 May;14(5):1109-20. An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis.

Lee BH, Henderson DA, Zhu JK. Plant Cell. 2005 Nov;17(11):3155-75. Epub 2005 Oct 7. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1.

Lee JS, Huh KW, Bhargava A, Ellis BE. Plant Signal Behav. 2008 Dec;3(12):1037-41. Comprehensive analysis of protein-protein interactions between Arabidopsis MAPKs and MAPK kinases helps define potential MAPK signalling modules.

Los DA, Mironov KS, Allakhverdiev SI. Photosynth Res. 2013 Oct;116(2-3):489-509. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions.

Lu D, Wu S, Gao X, Zhang Y, Shan L, He P. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jan 5;107(1):496-501. A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity.

Lukowitz W, Roeder A, Parmenter D, Somerville C. Cell. 2004 Jan 9;116(1):109-19. A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*.

Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *Plant J.* 2004 Jun;38(6):982-93. Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems.

Matsuoka D, Nanmori T, Sato K, Fukami Y, Kikkawa U, Yasuda T. *Plant J.* 2002 Mar;29(5):637-47. Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, *in vitro* and *in vivo*: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings.

Mészáros T, Helfer A, Hatzimasoura E, Magyar Z, Serazetdinova L, Rios G, Bardóczy V, Teige M, Koncz C, Peck S, Bögre L. *Plant J.* 2006 Nov;48(4):485-98. The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin.

Miao Y, Laun TM, Smykowski A, Zentgraf U. *Plant Mol Biol.* 2007 Sep;65(1-2):63-76. *Arabidopsis* MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter.

Miura K, Furumoto T. *Int J Mol Sci.* 2013 Mar 6;14(3):5312-37. Cold signaling and cold response in plants.

Miura K, Jin JB, Lee J, Yoo CY, Stirm V, Miura T, Ashworth EN, Bressan RA, Yun DJ, Hasegawa PM. *Plant Cell.* 2007 Apr;19(4):1403-14. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*.

Mizoguchi T, Ichimura K, Irie K, Morris P, Giraudat J, Matsumoto K, Shinozaki K. *FEBS Lett.* 1998 Oct 16;437(1-2):56-60. Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants.

Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jan 23;93(2):765-9. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*.

Murakami-Kojima M, Nakamichi N, Yamashino T, Mizuno T. Plant Cell Physiol. 2002 Jun;43(6):675-83. The APRR3 component of the clock-associated APRR1/TOC1 quintet is phosphorylated by a novel protein kinase belonging to the WNK family, the gene for which is also transcribed rhythmically in *Arabidopsis thaliana*.

Murata N, Los DA. Plant Physiol. 1997 Nov;115(3):875-879. Membrane Fluidity and Temperature Perception.

Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. Trends Plant Sci. 2005 Jul;10(7):339-46. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling.

Nakagami H, Soukupová H, Schikora A, Zárský V, Hirt H. J Biol Chem. 2006 Dec 15;281(50):38697-704. A Mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*.

Oh MH, Wang X, Kota U, Goshe MB, Clouse SD, Huber SC. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jan 13;106(2):658-63. Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*.

Oh MH, Wang X, Wu X, Zhao Y, Clouse SD, Huber SC. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Oct 12;107(41):17827-32. Autophosphorylation of Tyr-610 in the receptor kinase BAK1 plays a role in brassinosteroid signaling and basal defense gene expression.

Örvar BL, Sangwan V, Omann F, Dhindsa RS. Plant J. 2000 Sep;23(6):785-94. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity.

Qiu JL, Zhou L, Yun BW, Nielsen HB, Fiil BK, Petersen K, Mackinlay J, Loake GJ, Mundy J, Morris PC. Plant Physiol. 2008 Sep;148(1):212-22. Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1.

Roskoski R Jr. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Aug 27;399(3):313-7. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation.

Ruelland E, Vaultier M-N, Zachowski A, Hurry V. Adv. Bot. Res. 2009 49:35-150. Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants.

Sangwan V, Foulds I, Singh J, Dhindsa RS. Plant J. 2001 Jul;27(1):1-12. Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx.

Sangwan V, Örvär BL, Beyerly J, Hirt H, Dhindsa RS. Plant J. 2002 Sep;31(5):629-38. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways.

Sasabe M, Boudolf V, De Veylder L, Inzé D, Genschik P, Machida Y. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Oct 25;108(43):17844-9. Phosphorylation of a mitotic kinesin-like protein and a MAPKKK by cyclin-dependent kinases (CDKs) is involved in the transition to cytokinesis in plants.

Sasayama D, Matsuoka D, Oka M, Shitamichi N, Furuya T, Azuma T, Itoh K, Nanmori T. Plant Biotechnology 2011 28: 463-470. MAP3K δ 4, an *Arabidopsis* Raf-like MAP3K, regulates plant growth and shoot branching.

Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K. Plant Cell. 2001 Jan;13(1):61-72. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray.

Shitamichi N, Matsuoka D, Sasayama D, Furuya T, Nanmori T. Plant Biotechnology 2013 30: 111-118 Over-expression of MAP3K δ 4, an ABA-inducible Raf-like MAP3K that confers salt tolerance in *Arabidopsis*.

Strnisková M, Barancík M, Ravingerová T. Gen Physiol Biophys. 2002 Sep;21(3):231-55. Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes.

Su S., Suarez M.C. and Krysan P. FEBS Lett. 2007 581:3171–3177. Genetic interaction and phenotypic analysis of the *Arabidopsis* MAP kinase pathway mutations *mekk1* and *mpk4* suggests signaling pathway complexity.

Suarez M.C., Adams L., Liu Y., Wang H., Su S.H., Jester P.J., Zhang S., Bent A.F. and Krysan P.J. Plant Physiol. 2007 143:661-669. MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants.

Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, Daudi A, Tomita M, Shirasu K, Ishihama Y. Mol Syst Biol. 2008;4:193. Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*.

Szalontai B, Nishiyama Y, Gombos Z, Murata N. Biochim Biophys Acta. 2000 Dec 20;1509(1-2):409-19. Membrane dynamics as seen by fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio.

Takahashi Y, Soyano T, Kosetsu K, Sasabe M, Machida Y. Plant Cell Physiol. 2010 Oct;51(10):1766-76. HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*.

Takekawa M, Tatebayashi K, Saito H. Mol Cell. 2005 Apr 29;18(3):295-306. Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases

by specific MAP kinase kinase kinases.

Tang D, Christiansen KM, Innes RW. *Plant Physiol.* 2005 Jun;138(2):1018-26. Regulation of plant disease resistance, stress responses, cell death, and ethylene signaling in *Arabidopsis* by the EDR1 protein kinase.

Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Dóczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H. *Mol Cell.* 2004 Jul 2;15(1):141-52. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*.

Thomashow MF. *Plant Physiol.* 1998 Sep;118(1):1-8. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance.

Torres MA. *Physiol Plant.* 2010 Apr;138(4):414-29. ROS in biotic interactions.

Uemura M, Joseph RA, Steponkus PL. *Plant Physiol.* 1995 Sep;109(1):15-30. Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions).

Uemura M, Steponkus PL. *Plant Physiol.* 1994 Feb;104(2):479-496. A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance.

Urano D, Phan N, Jones JC, Yang J, Huang J, Grigston J, Taylor JP, Jones AM. *Nat Cell Biol.* 2012 Oct;14(10):1079-88. Endocytosis of the seven-transmembrane RGS1 protein activates G-protein-coupled signalling in *Arabidopsis*.

Vigh L, Los DA, Horváth I, Murata N. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Oct 1;90(19):9090-4. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803.

Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S. *Plant Cell*. 2007 Jan;19(1):63-73. Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*.

Wanner LA, Junttila O. *Plant Physiol*. 1999 Jun;120(2):391-400. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*.

Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK. *Plant Cell*. 2002;14 Suppl:S165-83. Cell signaling during cold, drought, and salt stress.

Yang T, Chaudhuri S, Yang L, Du L, Poovaiah BW. *J Biol Chem*. 2010 Mar 5;285(10):7119-26. A calcium/calmodulin-regulated member of the receptor-like kinase family confers cold tolerance in plants.

Yang T, Shad Ali G, Yang L, Du L, Reddy AS, Poovaiah BW. *Plant Signal Behav*. 2010 Aug;5(8):991-4. Calcium/calmodulin-regulated receptor-like kinase CRLK1 interacts with MEKK1 in plants.

Yoo SD, Cho YH, Tena G, Xiong Y, Sheen J. *Nature*. 2008 Feb 14;451(7180):789-95. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling.

Zeng Q, Chen JG, Ellis BE. *Plant J*. 2011 Sep;67(5):895-906. AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*.

論文目録

Furuya T., Matsuoka D, Nanmori T.

Journal of Plant Research 2013 126:833–840

Phosphorylation of *Arabidopsis thaliana* MEKK1 via Ca²⁺ signaling as a part of the cold stress response.

Furuya T., Matsuoka D, Nanmori T.

FEBS letters 投稿予定

Membrane rigidification functions in the upstream of MEKK1-MKK2-MPK4 cascade, concerning freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*.

Furuya T., Matsuoka D, Nanmori T.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 投稿予定

Regulation of the protein kinase activity of an *Arabidopsis thaliana* MAPKKK, MEKK1 by its N-terminal region.

参考論文

Shitamichi N, Matsuoka D, Sasayama D, **Furuya T**, Nanmori T.

Plant Biotechnology 2013 30: 111-118

Over-expression of MAP3K δ 4, an ABA-inducible Raf-like MAP3K that confers salt tolerance in *Arabidopsis*.

Sasayama D, Matsuoka D, Oka M, Shitamichi N, **Furuya T**, Azuma T, Itoh K, Nanmori T. Plant Biotechnology 2011 28: 463-470.

MAP3K δ 4, an *Arabidopsis* Raf-like MAP3K, regulates plant growth and shoot branching.

謝辞

本研究の御指導、御激励を賜りました神戸大学自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センター教授・南森隆司先生に謹んで感謝の意を表します。更に、本論文の審査して頂くと共に御指導を賜りました神戸大学大学院農学研究科教授・竹田真木生先生、神戸大学大学院農学研究科教授・中屋敷均先生に深く感謝致します。

研究全般を御指導して頂くと共に、様々な局面で御助言、御激励を頂いた神戸大学自然科学系先端融合研究環重点研究部助教・松岡大介先生に心より感謝致します。

研究を遂行するにあたり御指導、御協力くださいました神戸大学自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センター教授・深見泰夫先生、神戸大学自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センター助教・岩崎哲史先生、神戸大学自然科学系先端融合研究環重点研究部特命助教・笹山大輔先生、神戸大学連携創造本部准教授・鶴田宏樹先生、神戸大学自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センター准教授・乾秀之先生、神戸大学自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センター技術員・川本智氏に厚く御礼申し上げます。

本研究室の先輩方、同級生、後輩の皆様に研究のみならず多方面での御協力、御激励を頂きました。多くの御指導、御助言を頂いた元神戸大学大学院農学研究科・野村国広氏、林文勇氏、住田洋輔氏、杉本友香さん、共に研究に励んだ元神戸大学大学院農学研究科・杉山由加理さん、岡麻理子さん、下道奈里子さん、神戸大学大学院農学研究科、安福拓斗君、石原大嗣君、岩田恵理子さん、杉本紘基君、高岡翔平君、元神戸大学農学部・森本有紀さん、荒木辰哉君、高杉早紀さん、溝口愛美さん、吉本秀美さん、神戸大学農学部・沖田勇君、加藤知紗美さん、塚本駿介君、辻潤一郎君、農野将功君、赤澤真衣さん、曾賀薫さん、長岡理世さん、向井結佳子さん、山村優太君に感謝致します。

最後に、これまで様々な面で支えて頂いた両親と家族、様々な御激励を頂いた友人達に深く感謝致します。

