



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。



博士論文内容の要旨

氏名 古谷 朋之

専攻・講座 生命機能科学専攻・農環境生物学講座

論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

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

指導教員 南 森 隆 司

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関わらず、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。

氏名	古谷 朋之		
論文 題目	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		
審査 委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	南森 隆司
	副査	教授	竹田 真木生
	副査	教授	中屋敷 均
	副査		印
	副査		印

要旨

概要

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 Ca²⁺シグナリングや細胞膜流動性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される。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 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

氏名	古谷 朋之
<p>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1章の内容の一部は、Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 誌に投稿準備中である。</p> <p>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。</p> <p>第1章一部及び第2章の内容は、Journal of Plant Research 126:833-840 (2013) に掲載された。</p> <p>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ている。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 の前処理により抑制された。さらに、シロイヌナズナを DMSO 処理することで、4°C 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3章の内容は、FEBS letters 誌に投稿準備中である。</p> <p>第4章は、MEKK1 の過剰発現植物の作成について検討している。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関わらず、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。</p> <p>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。</p> <p>本研究は、植物の環境応答(低温耐性)シグナリングの受容から耐性形質の獲得までの、一連の細胞内プロセスの解明し、重要な新規知見の集積であることを認める。よって、学位申請者の古谷朋之は、博士(農学)の学位を得る資格があると認める。</p>	