

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成12年度博士課程進学

氏名 樽谷 芳明

指導教官名 山口 五十麿

論文題目

ストレス応答に関与する植物固有の受容体様キナーゼの解析

細胞外の受容体様領域、膜貫通領域、細胞内のキナーゼ領域から成る受容体様キナーゼ (RLK) は、植物固有の受容体であり、細胞外のリガンドによる刺激に伴いキナーゼ領域が活性化され、細胞内標的タンパク質をリン酸化することで細胞外からの情報を細胞内へと伝達すると考えられている。このような RLK はシロイヌナズナのゲノム上に約 600 種存在しているが、その機能およびリガンドが判明しているものは、CLV1, BRI1, BAK1, FLS2 などごく僅かなものに限られる。

シロイヌナズナ変異株のスクリーニングの過程で得られた変異株 902 (*rlk902*) では、このような RLK の一つである *RLK902* に T-DNA が挿入されていた。ノーザン解析から *rlk902* では *RLK902* が発現していないことが判明したが、通常の生育下では *rlk902* は野生型と比較して明瞭な形質の違いを示さなかったことから、*RLK902* と相補的な働きをする RLK の存在が示唆された。相補的な働きをする RLK の候補として、BLAST 検索の結果 *RLK902* と最も高い相同性を示した *RKL1* に着目した。本研究では、*RLK902*, *RKL1* の発現解析、下流で機能するタンパク質のスクリーニングを行い、これらの RLK が介する情報伝達経路を追求することを目的とした。

1. 各破壊株、各種形質転換体を用いた *RLK902*, *RKL1* の機能解析

rlk902 が通常の生育条件下で明瞭な表現型を示さなかったように、*rkl1* 破壊株も通常の生育条件下では明瞭な表現型を示さなかった。そこで、*rlk902/rkl1* 二重破壊株を作製したが、通常の生育条件下では、*rlk902*, *rkl1* と同様、明瞭な表現型を示さなかった。このことから、*RLK902* と *RKL1* は互いに相補的な機能を有してはいないか、あるいはさらに別の相補的な情報伝達経路が存在しているものと考えられた。

次に、 β -エストラジオール誘導性プロモーター制御下で *RLK902* cDNA を発現させ、誘導の有無による形質の違いを観察した。2 μ M β -エストラジオール添加により *RLK902* cDNA の発現増加は認められたものの、明瞭な形質の違いは認められなかった。また、ドミナントネガティブな効果を期待して *RLK902* の受容体様領域のみを CaMV35S プロモーター下で発現させたが、形質の変化は認められなかった。以上の結果から、*RLK902* が介する情報は、*RLK902* のみによって制御されているのではなく、複数の因子によって制御されている可能性が示唆された。

2. *RLK902*, *RKL1* の発現解析

高い相同性にもかかわらず、*RLK902* と *RKL1* が相補的な機能が観察されない原因を究明するため、これらの *RLK* の発現の時間的、空間的な重複性を検討した。通常の生育状況において *RLK902*, *RKL1* がどの部位で発現しているかを検討するため、花序・ロゼット葉・花茎・根の各部位から RNA を抽出し、ノーザン解析を行った。その結果、*RLK902*, *RKL1* 共に花序で強い発現を示し、花茎やロゼット葉では弱く、根では中程度の発現量を示した。より詳細に発現部位を解析するため、*RLK902*, *RKL1* プロモーター制御下で *GUS* レポーター遺伝子を発現させ、*GUS* 活性を指標に両遺伝子の発現部位を調べた。プロモーターとして、*RLK902* は開始コドンの上流 2000 bp の領域を、*RKL1* は開始コドンの上流 2548 bp の領域をそれぞれ PCR により増幅し用いた。*RLK902* プロモーター-*GUS* 形質転換株では、根において先端や側根原基で強い *GUS* 活性が認められ、維管束においても *GUS* 活性が認められた。地上部では、托葉・花器官離層形成領域で *GUS* 活性が認められ、ロゼット葉・花茎では *GUS* 活性が認められなかった。このように根では細胞分裂が盛んな場所に局在して発現しているのに対して、地上部では細胞死や老化等を連想させる部分で発現しており、本遺伝子機能の複雑さが示された。一方、*RKL1* プロモーター-*GUS* 形質転換株では、根において、維管束で *GUS* 活性が認められたが、先端では *GUS* 活性は認められなかった。地上部では、葉の排水構造・トライコーム、花糸の先端、葯・がくの孔辺細胞、花器官離層形成領域で *GUS* 活性が認められ、水分排出との関連性が考えられた。また、以上のように、*RLK902* と *RKL1* は基本的な発現場

所が異なるために生物学的には重複する機能を持っていないが、生化学的な機能の相同性については、さらに検討する必要があると考えられた。

細胞内での局在性を調べるため、RLK902 の C 末端に GFP を融合させ、上記の *RLK902* プロモーター制御下で発現させた。根における *RLK902*:GFP 蛍光は、*RLK902* プロモーター-*GUS* と同様、根の先端や側根原基の細胞表面で観察された。また、維管束の前形成層・内鞘といった組織でも蛍光が認められた。根を 0.8 M のマンニトールで処理し原形質分離を起こさせると、蛍光は細胞壁から分離した細胞膜に認められたことから、*RLK902* は細胞膜上に存在することが示された。

RLK902 プロモーター-*GUS* 発現株の解析時に、植物体の切断部位の近傍で *GUS* 活性が認められた。そこで、*RLK902*, *RKL1* の傷害応答性をプロモーター-*GUS* 形質転換株を用い検討した。*RLK902* プロモーター-*GUS* 形質転換株では、傷害を与えた部位の周辺部で、花茎・葉柄・葉の主脈では処理直後から、ロゼット葉では処理後 3 時間後以降から *GUS* 活性が認められた。*RKL1* プロモーター-*GUS* 形質転換株でも、花茎・葉柄の切断部位の近傍の孔辺細胞で *GUS* 活性が認められ、いずれの *RLK* も傷害応答への関与が示唆された。

3. *RLK902*, *RKL1* が介する情報伝達経路の解明

RLK は、細胞内標的タンパク質をリン酸化することにより情報伝達を行う。そこで、まず、*RLK902*, *RKL1* のキナーゼ領域がリン酸化能を有するかどうかを検討した。*RLK902*, *RKL1* のキナーゼ領域を glutathione S-transferase との融合タンパク質（以下それぞれ *GST-902KD*, *GST-1KD* と記す）として大腸菌で発現させ、各融合タンパク質をアフィニティー精製し、³²P-ATP を用いて自己リン酸化能の有無を調べたところ、*GST-902KD*, *GST-1KD* 共にリン酸化能を有することが判明した。

次に、*RLK902*, *RKL1* の細胞内標的タンパク質の同定を目指し、両 *RLK* のキナーゼ領域を用いた yeast two-hybrid 法によるシロイヌナズナ cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。His 要求性、 α -Gal 活性を指標にしたところ、*RLK902*, *RKL1* 両者に共通して相互作用するクローンとして Y-1~Y-4 の 4 種類のクローンが取得された。Y-1 は 615 アミノ酸から成る機能未知のタンパク質を、Y-2 は 234 アミノ酸から成る Ser rich region、核局在シグナルを持つタンパク質を、Y-3 は 211 アミノ酸から成る核局在シグナルを持つタンパク質を、Y-4 は 242 アミノ酸から成る機能未知のタンパク質をそれぞれコードしていた。これらのクローンは、*RLK* の一つである *BRI1* のキナーゼ領域とは相互作用を示さないことから、これらは *RLK* ファミリーに非特異的に結合するのではなく、*RLK902* 及び *RKL1* に対して選択的に結合するものと考えられた。

Y-1, 2, 3 の発現部位、花茎・ロゼット葉での傷害応答を RT-PCR により検討した。Y-1 は、花茎・ロゼット葉で発現しており、花序での発現は弱く、根での発現はほとんど認められなかった。傷害により、花茎・ロゼット葉のどちらにおいても、処理後 30 分以内に発現量が増加し、1 時間後ではその発現量が維持され、3 時間後以降で元の発現量に戻る傾向が認められた。Y-2 は、花茎・ロゼット葉・根で発現しており、花序での発現は低かった。傷害により、花茎・ロゼット葉のどちらにおいても、処理後 30 分以内に発現量が増加し、1 時間後ではその発現量が維持され、3 時間後以降で元の発現量に戻る傾向が認められた。Y-3 は、花序・花茎・ロゼット葉で発現しており、根での発現は低かった。傷害により、花茎・ロゼット葉のどちらにおいても、処理後 30 分以内に発現量が減少しはじめ、1 時間後でその発現量が最も低くなり、6 時間後以降で元の発現量に戻る傾向が認められた。以上のように、傷害処理後 30 分で Y-1, Y-2 は発現量の増加、Y-3 は発現量の減少が認められたことから、これらのクローンは傷害応答時の情報伝達に関与していることが示唆された。なお、Y-4 に関しては、現在調査中である。

まとめ

本研究により、相同性が高い二つの RLK、RLK902 と RKL1 は、基本的な発現部位の空間的違いから生物学的には重複する機能を持っていないが、yeast two-hybrid 法によるスクリーニングにより、両 RLK のキナーゼ領域に共通して相互作用する 4 種類のクローンが取得されたことから、生化学的には相同的な機能を持っている可能性が示された。また、取得された 3 種類のクローンの発現量が、傷害処理後 30 分以内に増加あるいは減少すること、*RLK902*, *RKL1* プロモーターが傷害を与えた部位の近傍で活性化されることから、これらの遺伝子が傷害応答に関与している可能性が示唆された。これらの結果に基づき、傷害処理後の各クローンのタンパク質レベルでの挙動を追究することで、RLK902, RKL1 が介する情報伝達経路の一端が解明されると期待される。