

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 21 年度博士課程 進学
氏 名 田中 秀典
指導教員名 篠崎 和子

論文題目

シロイヌナズナの浸透圧ストレス誘導性
受容体様プロテインキナーゼ遺伝子の機能解析

序論

乾燥、高塩、低温などの浸透圧ストレスを受けた植物は、細胞レベルや分子レベルで様々な応答反応を示すことが明らかにされつつある。これまでに細胞外環境の認識を行う分子として働くと考えられる受容体様キナーゼ（**RLK**）は植物細胞の分化・発達に重要な受容体として機能し、細胞内にシグナルを伝達することが明らかにされている。**RLK** 遺伝子は植物ゲノム中に多数存在することから、浸透圧ストレスやそれに関与する植物ホルモン等の外的因子を細胞表層で認識し、細胞内に伝達する分子として働くメンバーが存在する可能性が考えられた。本研究では、植物の浸透圧ストレスシグナルの全体像を明らかにするために、浸透圧ストレス応答及び浸透圧ストレスに対する植物の適応や種子の成熟や休眠などで重要な働きを示す植物ホルモンであるアブシジン酸（**ABA**）のシグナル伝達に関与する新規 **RLK** の同定・単離を目的とした。当研究室で行われたマイクロアレイデータおよび公共遺伝子発現データベース **Genevestigator** (<https://www.genevestigator.com/gv/>) を用いて、シロイヌナズナ **RLK** の中から浸

透圧ストレスや ABA により発現が誘導される遺伝子群を探索した。各ストレス条件下で発現誘導が顕著であった遺伝子を ABA- AND OSMOTIC-STRESS-INDUCIBLE RECEPTOR-LIKE CYTOSOLIC KINASE 1 (*ARCK1*) と命名し、ABA 及び浸透圧ストレス条件下における *ARCK1* の関与するシグナル伝達の機能解析を行った。

浸透圧ストレス誘導性 *RLCK* (*ARCK1*) の機能解析

ARCK1 は細胞内のキナーゼドメインのみを持つ受容体様細胞質キナーゼ (*RLCK*) であった。*ARCK1* 遺伝子の発現様式の詳細を明らかにするために、浸透圧ストレス及び ABA 処理を行った野生型シロイヌナズナにおける *ARCK1* 遺伝子の発現誘導の経時変化を定量的 RT-PCR 法で解析した。短時間の浸透圧ストレス及び ABA 処理により *ARCK1* 遺伝子の発現が誘導された。*ARCK1* 遺伝子発現の組織特異性を明らかにするために、*ARCK1* プロモーターにより *GUS* レポーター遺伝子を発現させたシロイヌナズナ形質転換体の *GUS* 活性の局在性を観察した。浸透圧ストレス及び ABA 処理によって主に地上部で *GUS* 活性が上昇した。*ARCK1* タンパク質の細胞内局在性を解析するために *GFP-ARCK1* を恒常的に発現する形質転換シロイヌナズナを作製した。通常生育条件下、*GFP-ARCK1* の蛍光シグナルは細胞質において検出された。*ARCK1* 遺伝子の植物体における機能を明らかにするために、*ARCK1* 欠損変異体 *arck1-1* 及び *arck1-2* の表現型解析を行った。これらの変異体では、塩ストレス及び ABA 存在下で、発芽後の成育段階において野生型に比べて子葉の緑化抑制が観察された。*ARCK1* は発芽後の生育段階で ABA および塩ストレスシグナルにおける負の制御因子であることが示唆された。浸透圧ストレス誘導性 *ARCK1* が浸透圧ストレスシグナルに関与する *RLK* であることが明らかになった。

浸透圧ストレス条件下で *ARCK1* 様発現を示す *CRK36* の機能解析

RLCK は細胞内のキナーゼドメインのみを持つが、細胞膜付近での受容体複合体の形成を介し *RLK* シグナル伝達系において重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。細胞質局在性 *ARCK1* は、膜局在性 *RLK* と協調的に機能し浸透圧ストレスシグナルを制御する可能性が考えられた。*ARCK1* と協調的に機能する *RLK* を探索するために、インターネット上の共発現解析ツールである ATTED-II (<http://atted.jp/>) および Cluster Cutting (<http://prime.psc.riken.jp/>) を用い、遺伝子共発現解析を行った。共発現解析により類似した発現様式を示すと予測された *RLK* 群と *ARCK1* の相互作用について酵母ツーハイブリッドシステムを用いて解

析し、システインリッチリピート (CRR) -RLK (CRK) ファミリーに属する CRK36 のキナーゼドメイン (KD) のみが酵母内で ARCK1 と相互作用した。大腸菌より精製した融合タンパク質 MBP-ARCK1 および GST-CRK36KD を用いてプルダウンアッセイを行い、MBP-ARCK1 が GST-CRK36KD と相互作用することが示された。

CRK36 遺伝子の発現様式の詳細を明らかにするために、浸透圧ストレス及び ABA 処理を行った野生型シロイヌナズナにおける CRK36 遺伝子の発現誘導の経時変化を定量的 RT-PCR 法で解析した。浸透圧ストレス条件下で ARCK1 様の高い発現誘導が生じることが明らかとなった。CRK36 タンパク質の細胞内局在性を解析するために CRK36-GFP を恒常的に発現する形質転換シロイヌナズナを作製した。通常生育条件下、CRK36-GFP の蛍光シグナルは細胞表層において検出され、原形質分離後に細胞壁から離れた。CRK36-GFP は細胞膜に局在する事が示唆された。

植物内における ARCK1 と CRK36 の相互作用を確かめるため、BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) 法による解析を行った。VYNE-ARCK1 および CRK36-SCYCE 融合タンパク質をシロイヌナズナ内で恒常的に発現させる形質転換体を作成し、通常生育条件下で細胞膜において蛍光シグナルが検出された。次に、共免疫沈降法により ARCK1 および CRK36 の相互作用を解析した。VYNE-ARCK1 および CRK36-SCYCE を恒常的に発現させた形質転換体から膜画分を調整し、得られた免疫沈降産物から VYNE-ARCK1 および CRK36-SCYCE が共に検出された。以上より植物細胞内で ARCK1 は細胞膜上で CRK36 と相互作用することが示唆された。

CRK36 は主に浸透圧ストレス条件下で遺伝子発現が誘導されたため、これらの条件で何らかのシグナル伝達に参与する可能性が考えられた。ABA および浸透圧ストレス下における CRK36 の機能を明らかにするために、二本鎖 RNAi 法による CRK36 ノックダウン植物を作成した。子葉緑化個体の割合を指標として、発芽後の成育過程におけるストレス応答性を解析した。ABA、高塩および高浸透圧条件下において、CRK36 RNAi ラインの子葉緑化割合は、野生型や *arck1-2* と比べて低下していた。CRK36 は発芽後の生育段階で ABA および浸透圧ストレスシグナル伝達における負の制御因子として機能することが示唆された。

CRK36 の関与するシグナル伝達における分子レベルの制御機構を明らかにするために、ABA 存在下での CRK36 RNAi 植物と野生型植物の mRNA プロファイルをマイクロアレイ解析により比較した。Genevestigator を用いた解析により CRK36 RNAi 植物において発現変動した遺伝子の多くが ABA 応答性を示す事が明らかになった。定量的 RT-PCR 法を用いた解析により CRK36 RNAi 植物で発現上昇した遺

伝子群の発現は、ABA 存在下で野生型に比べ *arck1-2* 変異体において上昇することが示唆された。CRK36 および ARCK1 は ABA シグナル伝達に関わる多くの遺伝子発現を制御する可能性が示唆された。

ARCK1 および CRK36 の関与するシグナル伝達の分子メカニズムの解析

ARCK1 および CRK36KD が機能的なプロテインキナーゼであるか確かめるために、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を基質として用いた *in vitro* リン酸化実験を行った。ARCK1 は CRK36KD に比べ低いながら自己リン酸化活性を有し、ARCK1 と CRK36KD を共存させた場合には ARCK1 リン酸化シグナルが増強された。CRK36KD は ARCK1 をリン酸化の基質とすることが示唆された。

植物細胞中の ARCK1 のリン酸化の状態を明らかにする為に、*VYNE-ARCK1* および *SCYCE* もしくは *VYNE-ARCK1* および *CRK36-SCYCE* を恒常的に発現させた形質転換シロイヌナズナにおける ARCK1 のリン酸化状態を解析した。*VYNE-ARCK1* および *CRK36-SCYCE* を恒常的に発現させた形質転換体より得られた免疫沈降産物では、塩ストレス依存的に抗リン酸化スレオニン抗体によるシグナルが検出された。*CRK36* の恒常的発現において塩ストレス依存的に ARCK1 のリン酸化が促進されることが示唆された。

総括

本研究では、シロイヌナズナゲノム中に数多く存在する RLK の中でも CRK ファミリーに属する浸透圧ストレス誘導性の CRK36 および ARCK1 が複合体を形成し、種子発芽後の生育段階における ABA および浸透圧ストレスシグナル伝達に対してそれぞれが負の制御因子として機能することを明らかにした。また、塩ストレス条件下でリン酸化が増強される新規の複合体 (CRK36/ARCK1) であることが示唆された。植物は移動の自由を持たず外界環境の変化に対応する必要があり、浸透圧ストレス下においてはストレス応答および生長を適切に制御するために、負のフィードバックシグナル伝達を担うと考えられる ARCK1 および CRK36 の関与するシグナル経路が必要とされるのだろうと考えられる。