

# 高等植物における高浸透圧シグナル伝達機構の解明

課題番号18570038

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金  
( 基盤研究 (C) ) 研究成果報告書

平成20年4月

研究代表者 小林裕子  
三重大学生命科学研究支援センター・学術研究員

## はじめに

水ストレスを受けた植物は、その合成・移動を介して植物ホルモンアブシジン酸(ABA)の濃度を上昇させ、気孔の閉鎖や遺伝子発現など様々な応答現象を引き起こす。また、一方でABAを介さずに遺伝子発現を誘導する水ストレス応答経路も知られている。ABAの濃度上昇に至るシグナル経路もABA非依存性であると言える。水ストレスは細胞レベルあるいは実験的には浸透圧ストレスとして扱われる。酵母やほ乳類の場合と同様、植物においても、浸透圧ストレスに応答してある特定のMAP kinase(MAPK)カスケードが活性化されることが示されている。しかし、一方でMAPKカスケードとは異なる高浸透圧によって活性化される40-42KDaのser/thr protein kinase(PK)が種々の植物において報告され、SNF1-related protein kinase-2(SnRK2)ファミリーに属するタバコASK1ホモログ、ダイズSPK1およびSPK2はこの40-42KDaのPKに対応すると考えられている。コムギのABA誘導性PK、PKABAも同ファミリーに属し、オオムギアリユールン層において過剰発現させると $\alpha$ -amylaseプロモーターなどのジベレリン(GA)誘導性の転写を抑制することから、GAシグナリングのABAによる抑制経路において機能すると報告されている。一方、同ファミリーに属するソラマメの孔辺細胞特異的AAPKは、ABAによる活性化を受け、ABAの受容から気孔の閉鎖に至るシグナル伝達系において機能することが、そのdominant negative型変異タンパク質を発現させる実験から示唆されている。

我々はイネゲノム中に存在している10個すべてのSnRK2ファミリーメンバーをクローニングし、それらをSAPK1~10と命名した。これらの機能を明らかにする目的でHis-affinity tagおよびHA-epitope tagを付けたSAPKをイネプロトプラストで一過的に発現させた。その結果、10個全てが浸透圧ストレスによって活性化されることが明らかとなった。さらに興味深いことにそのうちの3つはABAによっても活性化されることが明らかになった。このことは、SnRK2ファミリー全体が浸透圧ストレス応答に関わっていること、ならびにその内のいくつかはABAシグナリングとのクロストークにも関与している可能性を示している。

以上のような研究の経緯から、SnRK2ファミリーのProtein kinase(PK)が高浸透圧ストレス応答のシグナル伝達系において重要な役割を果たしていることが明らかとなり、これらのPKを中心とした解析を進めることにより、浸透圧ストレスおよびABAシグナル伝達経路に関する有用な知見が得られると考えられる。我々はSAPKが高浸透圧ストレスに応答して速やか(1分以内)に活性化されることが、ならびにこの活性化は未同定の上流キナーゼによるリン酸化によるものであることを明らかにしてきた。このようなこれまでの成果に基づき、本研究ではSAPKをリン酸化し、活性化する上流キナーゼとSAPKの標的因子を明らかにする目的で研究を遂行した。その結果は以下の通りである。

### (1) SAPK2のin vivoにおける標的基質の同定

高塩処理と無処理の培養細胞から抽出したタンパク質を、それぞれを二次元電気泳動によって展開し、リン酸化タンパク質を特異的に染色することができるPro Q Diamondによって染色後両区を比較することによって高塩処理によってリン酸化されるタンパク質を選抜した。選抜したスポットについて、TOF-MASSによりタンパク質を同定した結果、 $\alpha$ -チューブリン、

SEC14 ホモログ、HSP70 であった。これらのタンパク質を大腸菌で発現させ、SAPK2 の基質となるか否かを検討した結果、 $\alpha$ -チューブリンと HSP70 は SAPK2 によってリン酸化されることから SAPK2 の基質である可能性が示唆された。

## (2) SAPK 活性化に関わるプロテインキナーゼの同定の試み

SAPK2 の ATA 結合部位のリジンアラニンに置換した不活性型 SAPK2 (SAPK2K/A) を基質として SAPK キナーゼの特徴調べた結果、SAPK キナーゼはカルシウム依存的に SAPK をリン酸化することが明らかとなったが、その候補の同定にはいたらなかった。

これらの研究結果の一部は、関連学会にてすでに公表している。本書はこれらの内容を中心にまとめ、科学研究費補助金(基盤研究(C))の研究成果報告書とした。

平成 20 年 4 月

研究代表者 小林裕子

## 研究組織

研究代表者：小林裕子〈三重大学生命科学研究支援センター・学術研究員〉

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	2,300,000	0	2,300,000
平成 19 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,600,000	390,000	3,990,000

## 研究発表

### (1) 雑誌論文

1. Yuhko Kobayashi and Issei Kobayashi  
Depolymerization of the actin cytoskeleton induces defense responses in tobacco plants.  
Journal of General Plant Pathol. 2007 年 10 月、Vol. 73, 360-364.
2. Issei Kobayashi, Masako Yamada and Yuhko Kobayashi  
Calcium ion is a specific promotive factor for successful penetration of powdery mildew fungi to barley cells.. Journal of General Plant Pathol. 2007年12月、Vol. 73, 399-404.

### (2) 学会発表

1. 伴 佳典、小林裕子、筒井 悠、小川大輔、武田 真、服部束穂。  
イネ  $\alpha$ -tubulin サブユニットは高浸透圧ストレスに应答して迅速にリン酸化される。日本分子生物学会、横浜市、平成 19 年〔2007〕12 月。
2. 小林裕子、鈴木雅志、竹内竜馬、荒川勉、島田真奈美、小林一成。  
イネのいもち病抵抗性機構における2つの低分子量 G タンパク質 OsRac3 及び OsRac5 の機能解析。日本植物生理学会、札幌市、平成 20 年〔2008〕3 月。

### (3) 図書

1. 服部束穂、小林裕子  
高浸透圧ストレス応答におけるアブシジン酸のシグナル伝達に関するプロテインキナーゼ SnRk2 プロテインキナーゼを中心として、「植物における環境と生物ストレスに対する応答」  
蛋白質 核酸 酵素 別冊 52 巻、pp557-564、2007 年。
2. Issei Kobayashi, and Yuhko Kobayashi  
Microtubules and Pathogen Defence. In Plant Microtubules ? Development and Flexibility. (ed. By Nick, P.), Springer Verlag, Heidelberg, New York, Tokyo. 2008年。



## 目次

- (1) イネ SnRK2 プロテインキナーゼの活性制御  
ー大量発現系の構築と組換えタンパク質の性質を中心として  
..... 1
- (2) 高等植物における高浸透圧ストレス応答のシグナル伝達機構  
..... 65

## イネ SnRK2 プロテインキナーゼの活性制御

### ー大量発現系の構築と組換えタンパク質の性質を中心として

## 第一章 序論

植物は動物と異なり自ら移動ができないため、環境変化に速やかに応答・適応するためのきわめて精巧な機構を備えている。水ストレス、すなわち水分欠乏条件下では、植物細胞は高浸透圧ストレスを受けたときと同じ状態となる。高浸透圧ストレスにさらされた植物細胞は、遺伝子誘導やタンパク質機能変更修飾などを介して、細胞機能を保護し、植物全体を健全に保とうとする (Bray, 1997; Xiong and Zhu, 2002; Zhu, 2002)。細胞内成分を変性や酸化から保護する機能を持つタンパク質や、浸透圧調節物質 (プロリン、グルタミン酸など) の生合成酵素をコードする遺伝子群がストレスによって誘導されることが知られている (Delauney and Verma, 1993; Oono et al., 2003; Shinozaki and Yamaguchi-shinozaki, 1996, 2000)。気孔開閉の制御をはじめとする様々なストレス応答調節に関わる植物ホルモン、アブシジン酸 (ABA) 合成も水分欠乏によって誘導される (Zeevaart, 1999)。

これまで、水分欠乏あるいは浸透圧ストレス応答およびそれらのシグナル伝達に関する数多くの研究が主に生化学的、生理学的あるいは分子生物学・遺伝学的アプローチによって行われてきた (Bray, 1997; Knight, 2000; Xiong and Zhu, 2002; Xiong et al., 2002; Zhu et al., 1997; Zhu, 2002)。その結果、プロテインキナーゼおよびプロテインフォスファターゼといったシグナル伝達因子や、カルシウムイオン、リン脂質、イノシトールリン酸などのセカンドメッセンジャー、ならびにそれらを合成する酵素の関与が明らかにされてきた (DeWald et al., 2001; Munnik et al., 1999, 2000; Pical et al., 1999; Wang, 1999; Xiong et al., 2002)。しかし、それら因子全てが同じシグナル伝達経路で作用するのか、それらが主要なシグナル伝達経路の中心的因子なのかあるいは他のシグナルと相互作用するような因子なのか、また、カスケードを構成するそれぞれの因子が直接の上流因子から情報を受けとることによりどのような分子的变化を引き起こすのか、そして次の因子にどのような分子的变化をもたらすかなど、多くの問題は未解明のままである。

プロテインキナーゼは、多くの他のシグナルカスケードと同様、浸透圧ストレスシグナル伝達においても重要な役割を果たしていると思われる (Zhu, 2001, 2002)。浸透圧およびその他非生物的・生物的ストレスのシグナル伝達にカルシウムイオンが関与していることが知られており、ストレスに応答して細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こすことが示されている (Knight, 2000)。カルシウム依存性プロテインキナーゼ (Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase; CDPK) は水分欠乏を含む様々な非生物的ストレスにより誘導されることから、CDPK がこれらのストレスシグナル伝達に関与していることが示唆されている (Urao et al., 1994)。さらに、イネ CDPK の 1 つ、OsCDPK7 を過剰発現させると低温と浸透圧ストレスに対する耐性を示すようになることも報告されている (Saijo et al., 2000)。このような結果から、CDPK はおそらく浸透圧ストレスシグナル伝達経路で重要な役割を果たしていると考えられる。トウモロコシの葉肉細胞プロトプラストにおいてシロイヌナズナ CDPK、AtCDPK1 の構成的活性型を発現させると、ストレス誘導性の HVA1 遺伝子のプロモーターが活性化されることも報告されており、CDPK がストレスシグナル伝達において主要な機能を演じていることは間違いなさそうである (Sheen, 1996)。

ストレスシグナル伝達で重要な役割を担っていると考えられる別の Ca<sup>2+</sup> 制御型プロテイン

キナーゼ群として CIPK (CBL-interacting protein kinase)/PKS (SOS2-like protein kinase)/SnRK3 (SNF1-related protein kinase 3) ファミリーがあげられる (Guo et al., 2001; Halford and Hardie, 1998; Hrabak et al., 2003; Liu et al., 2000; Luan et al., 2002)。これらのプロテインキナーゼはそれ自身ではカルシウムイオンと結合せず、カルシウムイオンセンサーである CBL (calcieneulin B-like protein)/ScaBP (SOS2-like  $\text{Ca}^{2+}$  binding protein) ファミリーの特典メンバーと相互作用することにより  $\text{Ca}^{2+}$  の制御を受けることが分かっている (Albrecht et al., 2001; Kim et al., 2000; Luan et al., 2002; Liu and Zhu, 1998; Guo et al., 2001)。例えば、SOS2 (CIPK/PKS の一つ) と SOS3 (CBL/ScaBP の一つ) の複合体は、高塩濃度ストレス下において、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターの活性を制御してイオンホメオスタシス維持に関与することが示されている (Qiu et al., 2002)。また、PKS3 と ScaBP5 の複合体は ABA シグナル伝達に関与していることが報告されている (Guo et al., 2002; Kim et al., 2003)。同様に、CBL1 はこれと相互作用する CIPK とともに、浸透圧ストレスシグナル伝達経路で重要な役割を果たしていることが示唆されている (Cheong et al., 2003)。

酵母では、高浸透圧ストレスシグナルはセンサーであるヒスチジンキナーゼによって感知され、ヒスチジンとアスパラギン酸残基間でのリン酸リレーを経て mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードに伝達され、防御反応を示す (Maeda et al., 1994)。シロイヌナズナにおいても、乾燥/高浸透圧誘導性のセンサー様ヒスチジンキナーゼ AtHK1 が同定され、酵母のセンサーキナーゼ変異体を相補して高浸透圧ストレス耐性を回復させたことから、植物においてもセンサー様ヒスチジンキナーゼが浸透圧ストレスセンサーとして機能している可能性も示唆されている (Urao et al., 1999)。浸透圧ストレスシグナル伝達に関与していると思われる MAPK と MAPK kinase (MAPKK) がアルファルファ (SIMKK-SIMK; Kiegl et al., 2000) やタバコ (NtMEK2- SIPK/WIPK; Yang et al., 2001) において同定されている。また、シロイヌナズナの MAPK のうち、AtMAPK4 および AtMAPK6 が高浸透圧ストレスによって活性化されることも報告されている (Ichimura et al., 2000)。しかし、同じ MAPK カスケードが浸透圧ストレスだけではなく低温や傷、あるいはサリチル酸、 $\text{H}_2\text{O}_2$  やエリシターなどのシグナル分子によっても活性化されることが報告されている (Hoyos and Zhang, 2000; Mikolajczyk et al., 2000; Zhang and Klessig, 1998; Yuasa et al., 2001; Desikan et al., 2001; Nuhse et al., 2000)。シロイヌナズナの MAPK kinase kinase (MAPKKK) の 1 つ ANP1 の構成的活性型を発現させると AtMAPK3、4 および 6 が活性化され、GST6 や HSP18.2 のような酸化ストレス誘導性プロモーターが活性化されることが観察されたが、ABA/乾燥/低温誘導性 RD29A プロモーターの活性化はみられなかった (Kovtun et al., 2000)。さらに、タバコで ANP1 のオルソログである NPK1 を構成的に発現させると、凍結、高温、高塩濃度など幅広いストレスに対して耐性を示すことも報告されている (Kovtun et al., 2000)。これらのことをあわせて考えると、MAPK は酸化的ストレスを伴う広汎なストレス応答に関わるストレスシグナル伝達において機能しているものと推測される。

タバコ培養細胞あるいは葉の抽出液を用いて myelin basic protein (MBP) を基質にしたゲル内リン酸化アッセイを行うと、上述の MAPK とともに 40 kDa 周辺に浸透圧ストレスによって速やかに活性化される  $\text{Ca}^{2+}$  非依存的プロテインキナーゼが検出される (Droillard, 2000; Hoyos and Zhang, 2000; Mikolajczyk et al., 2000; Monks et al., 2001)。また、アルファルファ (Munnik et al., 1999) やシロイヌナズナ培養細胞 (Droillard et al., 2002) においても同様の結果が報告されている。このような高浸透圧ストレスによって活性化されるプロテインキナーゼとして 42 kDa プロテインキナーゼがタバコ培養細胞から精製された (Mikolajczyk et al.,

2000)。このプロテインキナーゼはその部分アミノ酸配列の相同性から、SnRK2 ファミリーに属するシロイヌナズナ ASK1 のホモログであることが示された (Halford and Hardie, 1998; Hrabak et al., 2003)。最近になって、Kelnerら (2004) により、この 42 kD プロテインキナーゼは NtOSAK としてクローニングされ、生化学的な特徴が報告されている。

一方、ソラマメの孔辺細胞からは ABA によって活性化される SnRK2 ファミリーのプロテインキナーゼ AAPK (abscisic acid-activated protein kinase) が精製され、クローン化されている (Li and Assmann, 1996; Li et al., 2000)。キナーゼ活性を持たないドミナントネガティブ型の AAPK 変異タンパク質を孔辺細胞プロトプラストで過剰発現させると、ABA による陰イオンチャネルの活性化がみられなくなり、その結果、ABA による気孔の閉鎖がみられなくなることが示されている (Li et al., 2000)。また、シロイヌナズナにおいても AAPK と高い相同性を示す SnRK2 ファミリーのプロテインキナーゼ OST1/SRK2E が ABA によって活性化されること、ならびに ABA による気孔の閉鎖や遺伝子発現誘導に関与することが報告されている (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002)。さらに、コムギ (*Triticum aestivum*) では SnRK2 ファミリーに属する PKABA1 が ABA による発現誘導を受けること、ならびにこれをアリューロン層において一過的に過剰発現させるとジベレリンによる  $\alpha$ -amylase 遺伝子プロモーターの活性化が抑制されることから、ジベレリン応答の ABA による抑制制御系のシグナル伝達への関与が示されている (Gomez-Cadenas et al., 1999, 2001; Shen et al., 2001; Johnson et al., 2002)。

SnRK2 ファミリーのプロテインキナーゼが、傷、浸透圧ストレス、低温、エリシター、エチレン、ABA など様々なシグナル伝達経路に関与している phosphatidic acid (PA) のターゲットとなっている可能性も示唆されている (Testerink et al., 2004)。また、NtOSAK の高浸透圧ストレスによる活性化に一酸化窒素が関わるという報告がなされている (Lamotte et al., 2006)。

SnRK2 プロテインキナーゼは、N 末端側のよく保存されたキナーゼドメインと、C 末端側の制御領域と考えられる酸性アミノ酸に富むユニークな領域からなる (図 1; Halford and Hardie, 1998; Hrabak et al., 2003)。キナーゼドメインのアミノ酸配列をもとに系統樹を書くと、大きく分けて I、II、III の 3 つのサブクラスに分かれる (図 2; Kobayashi et al., 2004)。当研究室では、イネゲノムにコードされる 10 個の SnRK2 ファミリーメンバー SAPK1 ~ SAPK10 を全てクローン化し、機能解析を進めてきた。これまでに、これら全てのメンバーが高浸透圧ストレスによって速やかに活性化されること、ならびにそのうちサブクラス III に属する 3 つ (SAPK8、9 および 10) は ABA によっても活性化されることなどを他の植物由来の SnRK2 プロテインキナーゼに先駆けて明らかにした (Kobayashi et al., 2004)。さらに、SnRK2 プロテインキナーゼの活性化はリン酸化によって制御されていることや、ABA シグナルが C 末端領域によって認識されることも同時に報告した (Kobayashi et al., 2004)。続いて、シロイヌナズナにおいても 10 個の SnRK2 ファミリーのプロテインキナーゼのうち 9 個が浸透圧ストレスによって活性化され、そのうちのサブクラス II および III に属する 5 個が ABA により活性化されること、低温ではどれも活性化されないことが示された (Boudsocq et al., 2004)。さらに、シロイヌナズナの SnRK2 ファミリーのプロテインキナーゼ SRK2C は主に根端で発現がみられ、浸透圧ストレスによって誘導および活性化を受け、過剰発現体や T-DNA 挿入変異体の解析から、ストレス応答性遺伝子発現を制御することによって乾燥耐性に関与することを示唆する報告がなされた (Umezawa et al., 2004)。

SnRK2 プロテインキナーゼの C 末端領域は、さらに 2 つの領域に分けられる (図 1;

Yoshida et al., 2006)。キナーゼドメインに続く約 30 アミノ酸からなる領域 (ドメイン 1) およびその後続く約 40 アミノ酸からなる領域 (ドメイン 2) である。ドメイン 1 は、SnRK2 ファミリー全体で比較的相同性が高い。一方、ドメイン 2 は、酸性アミノ酸を多く含み、サブクラス I とサブクラス II および III の間で大きな違いが見られる。当研究室では、ABA による活性化を受けない SAPK2 と活性化を受ける SAPK8 のドメイン交換実験により、SAPK2 の C 末端領域全体を SAPK8 のそれに置換すると、弱いながらも ABA による活性化を受けるようになることを報告した (Kobayashi et al., 2004)。シロイヌナズナにおいては、OST1/SRK2E の C 末端領域のドメイン 2 を欠失すると ABA による活性化が起こらなくなる一方で、C 末端領域全体を欠失すると ABA によらない活性化も影響を受けることが報告された (Yoshida et al., 2006)。また、大腸菌で発現させた組換え OST1/SRK2E の C 末端領域のドメイン 2 および 1 の一部分を欠失するとリン酸化活性がなくなることが報告されている (Belin et al., 2006)。さらに、OST1/SRK2E の C 末端領域には、プロテインホスファターゼ 2C である ABI1 が結合することが酵母 two-hybrid アッセイにより示されている (Yoshida et al., 2006)。これらのことから、SnRK2 プロテインキナーゼの C 末端領域は、上流のシグナルを受容するとともに、活性を正に制御する働きがあると推察できる。

リン酸化による制御を受けるプロテインキナーゼの多くについて、そのキナーゼドメインの中央に存在するアクチベーションループと呼ばれる領域のセリン、スレオニンあるいはチロシンのリン酸化により活性化されることが知られている (Johnson et al., 1996; Nolen et al., 2004)。当研究室では、SAPK2 が高浸透圧ストレスに応答してリン酸化された時、アクチベーションループ内で 3 ヶ所にリン酸化が起こっていることを二次元電気泳動を用いて明らかにしている (小林ら未発表)。同様に、Burza ら (2006) は、NtOSAK のアクチベーションループ内の 154 番目と 158 番目のセリンが高浸透圧に応答してリン酸化されることを報告した。一方、Belin ら (2006) は、大腸菌で発現させた組換え OST1/SRK2E はアクチベーションループ内のセリン以外にも数ヶ所がリン酸化を受けていることを報告している。

高浸透圧ストレスや ABA により活性化された SnRK2 プロテインキナーゼが、植物細胞内でどのようなタンパク質のリン酸化に関わっているかについての知見は限られている。ABA により活性化された AAPK によるリン酸化のターゲットの候補として、AKIP1 と名づけられた RNA 結合タンパク質が報告されている (Li et al., 2002)。AKIP1 が酵母 two-hybrid アッセイにおいて、AAPK と結合すること、および試験管内リン酸化アッセイにおいて AAPK が AKIP をリン酸化することがその根拠である。一方、ダイズの SnRK2 ファミリーメンバーである SPK1 と SPK2 は、酵母細胞内において高浸透圧ストレスによって活性化されることが示されている (Monks et al., 2001)。SPK1 および SPK2 が植物細胞内で実際に高浸透圧ストレスにより活性化されることは示されていないが、ダイズの Sec14p 関連 phosphatidylinositol transfer protein (PITP) を高浸透圧ストレス依存的にリン酸化するプロテインキナーゼ活性に対応すると推定されている (Monks et al., 2001)。PITP は phosphatidylinositol 3-kinase あるいは 4-kinase 活性を促進することが示されていることから、SPK1 と SPK2 はフォスファチジルイノシトール代謝を制御することで浸透圧ストレス応答に関与していると想像されている。

OST1/SRK2E は ABA による気孔の閉鎖だけでなく遺伝子発現誘導にも関与することが報告されている (Yoshida et al., 2002)。当研究室では、ABA による転写誘導を担うイネの bZIP 型転写因子 TRAB1 を同定し、この因子の転写活性化能がリン酸化により制御されて

いること、ならびにそのリン酸化部位の 1 つが 102 番目のセリンであることを明らかにした (Kagaya et al., 2002)。さらに、ABA により活性化された SAPK8 ~ 10 がこのセリンを試験管内で効率よくリン酸化することや、培養細胞内で過剰発現させた SAPK10 と TRAB1 が免疫沈降により共沈降することなどを報告した (Kobayashi et al., 2005)。一方、TRAB1 のホモログであるイネやコムギの ABA 応答エレメント (ABRE) 結合因子 (それぞれ OREB1 および TaABF) が酵母 two-hybrid アッセイにおいて SnRK2 プロテインキナーゼと結合することが報告されている (Chae et al., 2007; Johnson et al., 2002)。また、シロイヌナズナの ABRE 結合因子についても SnRK2 によるリン酸化が報告された (Furihata et al., 2006)。

以上のように、SnRK2 ファミリーに属するプロテインキナーゼが ABA および高浸透圧ストレス応答におけるシグナル伝達において中心的な役割を果たしている可能性を示すデータが蓄積してきている。しかし、これらのプロテインキナーゼを介するシグナル伝達経路の下流応答や活性化に関わる上流因子についての知見は未だに乏しく、今後の課題となっている。また、リン酸化による活性化や C 末端領域による正の活性制御など、SnRK2 プロテインキナーゼのユニークな活性調節の分子機構について、詳細に述べるには到っていない。このような活性制御の分子機構を理解するためには、SnRK2 プロテインキナーゼタンパク質の高次構造に関する情報が必要不可欠である。さらに、高次構造に関する情報が得られれば、SnRK2 では未だに得られていない構成的活性化型キナーゼの作出など、下流応答や上流因子の検索に有用なキナーゼ変異体を得る重要な手がかりとなる。そこで本研究では、SAPK の立体構造解析およびこれに基づく活性制御機構の解明を目的とし、SAPK2 およびその変異体の大腸菌を用いた大量発現系の構築と精製プロトコルの確立を行った。また、得られた組換え SAPK2 およびその変異体についてリン酸化活性およびリン酸化状態を調べた。さらに、X 線立体構造解析を目指した組換え SAPK2 の結晶化、SAPK2 C 末端領域に関する NMR を用いた解析、および ホモロジーモデリングを用いた SAPK2 のモデリング構造の構築を試みた。得られた実験結果に基づき、SAPK2 の構造と活性制御について考察した。

## 第二章 実験

### 1. プラスミド構築

SAPK2 およびその変異体の cDNA 断片は、pGEX-5X-1-SAPK2 (WT) (青田、2005、名古屋大学農学部応用生物科学科卒業論文) および p35S-sh $\square$ -SAPK2-K33A-dHA-His (山本未発表) を鋳型にした PCR によって取得した。SAPK2 (WT) は野生型の SAPK2 を示す。コンストラクト作製には Gateway 法を用いた。全てのエンタリークローンは PCR Directional TOPO クローニング (pENTR/SD/D-TOPO Cloning Kits; Invitrogen) によって作製した。用いたプライマーを表 1 に示す。cDNA 取得のための PCR には、センスプライマーの 5' 末端に CACC を付加したプライマーを用いた。また、このセンスプライマーには、CACC とコード領域の最初の ATG の間に、Enterokinase (EK)、PreScission Protease (PreS) あるいは Factor Xa (FacXa) のいずれかのプロテアーゼサイトに相当する配列を導入した。得られた cDNA 断片をエンタリーベクター pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen) に組み込み、シークエンスを確認後、Gateway LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen) を用いた LR 反応によって、大腸菌用発現ベクター pDEST-his および pDEST-trx (Tsunoda et al., 2005) に組み込ん

だ。これらのベクターの模式図を図 3 に示す。

## 2. 培養と精製

### 2-1. 培養

得られた発現ベクターおよびコントロールとして pET-32a (+) (Novagen) を、それぞれ大腸菌に導入した。発現ベクターと大腸菌の組み合わせを表 2 に示す。得られた単一コロニーを LB 液体培地 (50  $\mu$ g/ml ampicillin) を用いて 37 °C で OD600 が 0.6~0.8 になるまで振盪培養し、終濃度 50  $\mu$ M または 1 mM になるように IPTG を加え、さらに 30~37 °C で 3 時間もしくは 18 °C で一晩培養した。その後、培養液を 3,000 x g で 20 分間遠心することにより大腸菌を回収し、-80 °C で保存した。遠心分離には、Avanti TM HP-25 Centrifuge (BECKMAN COULTER TM) もしくは Mx-300 (TOMY) を使用した。

また、NMR の測定に用いる <sup>15</sup>N 安定同位体標識タンパク質試料作成のためには、発現ベクターを導入した大腸菌を 37 °C で 4 時間、LB 液体培地 (50  $\mu$ g/ml ampicillin) で前培養した後、遠心により回収した菌体を M9 培地 (表 3) 1 L に懸濁し、さらに 37 °C で OD600 が 0.6~0.8 になるまで振盪培養し、終濃度 1 mM になるように IPTG を加え、37 °C で 4 時間培養した。その後、培養液を Avanti TM HP-25 Centrifuge を使用して 3,000 x g で 20 分間遠心することにより大腸菌を回収し、-80 °C で保存した。

### 2-2. 精製

精製の過程における共通の操作について、以下に示す。

タンパク質濃度は 280 nm における吸光度を測定し、1 次構造から得たトリプトファン及びチロシンの数に基づいて算出した  $\epsilon$  の値から求めた。遠心分離には、Avanti TM HP-25 Centrifuge もしくは Mx-300 を使用した。タンパク質溶液の濃縮は、分画分子量 10,000 の Centriplus YM-10 (Millipore) および Centricon YM-10 (Millipore)、分画分子量 3,000 の Centriplus YM-3 (Millipore) および Centricon YM-3 (Millipore) を用いて限外ろ過により行った。濃縮する際の遠心分離は、Centriplus は 3000 x g、4 °C で、Centricon は 5000 x g、4 °C で行った。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、目的タンパク質の分子量に応じて、5-20 % グラジエント、12.5 % もしくは 15 % のポリアクリルアミドゲルを用いて行い、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色 (Quick CBB; Wako) によりタンパク質バンドを検出した。分子量マーカーとして High-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare) または Low-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare) を用いた。

#### 2-2-1. 発現の確認および発現ベクターの検討

冷凍した菌体を sonication buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole] に懸濁し、氷上で超音波処理 (TOMY, UD-201; out put 3, duty cycle 50 %) 5 分間を 2 ~ 8 回行った。得られた破碎液を 15,000 rpm で 15 分間あるいは 40,000 x g で 30 分間遠心し、可溶性画分と不溶性画分に分離した。目的融合タンパク質の発現および

可溶化の確認は、SDS-PAGE により行った。

発現ベクターの検討のために、可溶性タンパク質を用いてアフィニティー精製を行った。Glutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質は、GSTrap HP カラム (GE Healthcare) を用いて、hexahistidine (His6) タグを含む融合タンパク質は、Ni イオンをキレートさせた HiTrap chelating HP 5 ml カラム (GE Healthcare) を用いて精製を行った。Ni イオンをキレートさせた HiTrap chelating HP 5 ml カラムは、以下 5 ml Ni chelating カラムと記す。可溶性 GST 融合タンパク質を Tris-HCl (pH 7.5) で 3 倍希釈し、GSTrap カラムに吸着させ、カラムを 40 ml の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl で洗浄後、20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM glutathione で溶出した。His タグを含む可溶性融合タンパク質は、5 ml Ni chelating カラムに吸着させ、40 ml の sonication buffer で洗浄後、Imidazole 濃度を 5 mM から 300 mM まで 5.9 mM/ml の濃度勾配をかけて溶出した。目的融合タンパク質の発現量およびアフィニティーカラムによる回収量の確認は、SDS-PAGE により行った。

#### 2-2-2. SAPK2 (WT)、SAPK2 (M1-S308) および SAPK2 (K33A) の精製

SAPK2 (WT)、SAPK2 (M1-S308) および SAPK2 (K33A) の大量精製には、終濃度 50  $\mu$  M の IPTG で誘導し、18  $^{\circ}$ C で一晩培養した大腸菌を用いた。冷凍した菌体を sonication buffer に懸濁し、氷上で超音波処理 (out put 4.5, duty cycle 50 %) 5 分間を 8 回行った。得られた破碎液を 40,000  $\times$  g で 30 分間遠心し、可溶性タンパク質を回収した。得られた可溶性融合タンパク質は、Chelating Sepharose Fast Flow レジン (GE Healthcare) 20 ml を充填し、Ni イオンをキレートさせたカラムに吸着させ、160 ml の sonication buffer で洗浄後、Imidazole 濃度を 5 mM から 300 mM まで 1.5 mM/ml の濃度勾配をかけて溶出した。ただし、SAPK2 (M1-S308) の精製に用いたバッファーのみ pH 7.8 とし、他のタンパク質の精製には pH 7.5 のバッファーを用いた。Chelating Sepharose Fast Flow レジン 20 ml を充填し、Ni イオンをキレートさせたカラムは、以下 20 ml Ni chelating カラムと記す。融合タンパク質を含む 20 ml Ni chelating カラム溶出画分は、透析膜 (Viskase) に移し 100 倍容の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.2 mM DTT に対して 4  $^{\circ}$ C で 2 時間透析するか、または、Centriplus YM-10 による濃縮後に、ゲルろ過 buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl] で平衡化した HiLoad 26/60 Superdex 75 pg (GE Healthcare) を用いてゲルろ過にかけた。これらの精製融合タンパク質に終濃度 0.5 mM になるように DTT を加え、4  $^{\circ}$ C で 16 時間、0.25 U/1 mg protein の Enterokinase (Invitrogen) あるいは 17 ~ 20 U/1 mg protein の PreScission Protease (GE Healthcare) で処理し、Thioredoxin (Trx)-His6 タグの切断を行った。ただし、SAPK2 (M1-S308) および SAPK2 (K33A) に関しては、PreScission Protease の処理時間を 3 日間とした。プロテアーゼ処理の後の反応液を、5 ml Ni chelating カラムにかけて、Trx-His6 タグおよび未消化融合タンパク質を吸着させ、非吸着画分に目的タンパク質を回収した。得られた非吸着画分を、イオン交換カラムによる精製後、または、そのまま Centriplus YM-10 による濃縮を行い、HiLoad 26/60 Superdex 75 pg を用いたゲルろ過精製に用いた。イオン交換カラムによる精製は、非吸着画分を透析膜に移し、100 倍容の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM DTT に対して 4  $^{\circ}$ C で 2 時間透析後、陰イオン交換カラムである HiTrap Q HP カラム (GE Healthcare) に吸着させ、40 ml の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄後、NaCl 濃度を 0



mM から 1 M まで 20 mM/ml の濃度勾配をかけて溶出した。目的タンパク質を含む HiTrap Q HP カラム溶出画分または濃縮した 5 ml Ni chelating カラム非吸着画分をゲルろ過により精製し、終濃度 0.5 mM になるように DTT を加え、Centriplus YM-10 および Centricon YM-10 を用いて目的タンパク質を濃縮した。

### 2-2-3. SAPK2 (P284-L339) の精製

SAPK2 (P284-L339) は、NMR の測定に用いるため、<sup>15</sup>N 安定同位体標識タンパク質を精製した。冷凍した菌体を 100 ml の sonication buffer に懸濁し、氷上で超音波処理 (output 4.5, duty cycle 50 %) 5 分間を 8 回行った。得られた破碎液を 40,000 x g で 30 分間遠心し、可溶性タンパク質を回収した。得られた可溶性融合タンパク質は 20 ml Ni Chelating カラムに吸着させ、100 ml の sonication buffer および 200 ml の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 54.5 mM Imidazole で洗浄後、20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole で溶出した。さらに、融合タンパク質を含む溶出画分を Centriplus YM-10 により濃縮後、ゲルろ過 buffer で平衡化した HiLoad 26/60 Superdex 75 pg を用いてゲルろ過精製を行い、100 倍容の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM DTT に対して 4 °C で 1 時間半透析した。その後、HiTrap Q HP カラムに吸着させ、40 ml の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄後、NaCl 濃度を 0 mM から 1 M まで 10 mM/ml の濃度勾配をかけて溶出した。そして、融合タンパク質を含む溶出画分を Centriplus YM-10 により濃縮し、さらに HiLoad 26/60 Superdex 75 pg を用いたゲルろ過精製を行った。得られた融合タンパク質を Centriplus YM-10 により濃縮し、NMR 測定の試料とした。NMR 測定後、融合タンパク質を回収し、25 °C で 13 時間、0.16 U/1 mg protein の Enterokinase (Invitrogen) で処理し、再びゲルろ過精製を行った。その後、目的の SAPK2 (P284-L339) が含まれる溶出画分を回収し、5 ml Ni chelating カラムを用いた精製を行い、非吸着画分に目的タンパク質を回収した。得られた目的タンパク質を、Centriplus YM-3 および Centricon YM-3 を用いて濃縮し、NMR 測定の試料とした。また、前述の 5 ml Ni chelating カラムより溶出した Trx-His6 タグは、ゲルろ過 buffer で 5 倍希釈し、Centriplus YM-10 および Centricon YM-10 を用いて濃縮し、NMR 測定の試料とした。

### 3. 試験管内リン酸化アッセイ

精製した SAPK2 (WT) 0.2 μg もしくは 0.04 μg に、5×kinase buffer [100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM DTT, 50 mM MnCl<sub>2</sub>] を 4 μl、基質として MBP、100 μM ATP 2 μl および 2 μCi の [γ-<sup>32</sup>P]ATP (比放射能 3000 Ci/mmol) を加え、滅菌水で総容量を 20 μl にした。基質として加えた MBP の量は、SAPK2 (WT) 0.2 μg と等 mol (91 ng)、その 1/4 倍、4 倍あるいは MBP なしの 4 段階とした。30 °C で 10 分間の反応後、15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分画した。分子量マーカーは Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad) を用いた。電気泳動後、洗浄液 (5 % TCA, 1 % Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>・10H<sub>2</sub>O) で 15 分間の洗浄を 2 回を行い、CBB 染色 (Simply Blue™ SafeStain; Invitrogen) を行った後、IP プレート (Kodak) に露光し、Typhoon 9200 (GE healthcare) を用いて検出した。

また、精製した SAPK2 (WT) もしくは SAPK2 (M1-S308) 1 μg に、5×kinase buffer を 4

μl、基質として MBP もしくは GST 融合 phosphatidylinositol-4 kinase (GST-PI4K) を 1 μg、200 μM ATP 1 μl および 2 μCi の [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (比放射能 3000 Ci/mmol) を加え、滅菌水で総容量を 20 μl にした。基質のコントロールとして、GST 1 μg を加えた反応液も用意した。30 °C で 1 時間反応を行い、10 % もしくは 15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分画後、同様に検出した。

#### 4. フォスファターゼ処理

精製した SAPK2 (WT)、SAPK2 (M1-S308) および SAPK2 (K33A) をゲルろ過 buffer で 200 ng/μl になるように希釈し、仔ウシ胸腺アルカリフォスファターゼ (CIAP, Takara Bio) 処理を行った。試料 1 μl に、酵素に添付された 10×Buffer [500 mM Tris-HCl (pH 9.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>] を 1 μl、CIAP (10 ~ 30 U/μl) を 1 μl 加え、滅菌水で総容量を 10 μl にし、37 °C、24 時間反応させた。対照として、CIAP の代わりに滅菌水 1 μl を加えた反応も行った。反応後、10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分画した。

#### 5. リン酸化タンパク質の検出

SDS-PAGE 後のゲルに対して固定液 (50 % methanol, 10 % acetic acid) で 30 分以上の振とうを 2 回行い、蒸留水による 10 分間の洗浄を 3 回行った。その後、Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain (Molecular Probes) 液中で 1 時間振とうすることにより、リン酸化タンパク質を特異的に染色した。これ以降の操作は、遮光して行った。次に、脱色液 [20 % acetonitrile, 50 mM sodium acetate (pH 4.0)] に置換し、30 分間の脱色を 3 回行い、蒸留水による 5 分間の洗浄を 2 回行った。このゲルを Typhoon 9200 (GE healthcare) を用いて、532 nm レーザー光により励起し、560 nm longpass の emission filter を通してリン酸化タンパク質を検出した。その後、SYPRO Ruby protein gel stain (Molecular Probes) で一晩振とうすることにより、全タンパク質を染色した。洗浄液 (10 % methanol, 7 % acetic acid) に置換して 30 分間振とうし、蒸留水による 5 分間の洗浄を 2 回行った。このゲルを Typhoon 9200 を用いて、532 nm レーザー光により励起し、610 BP 30 の emission filter を通して全タンパク質を検出した。

#### 6. 二次元電気泳動

二次元電気泳動の一次元目の泳動は、ZOOM IPGRunner システム (Invitrogen) を用い、添付の説明書にしたがって行った。上述のように精製し、タンパク量を測定した SAPK2 (WT)、SAPK2 (M1-S308) および SAPK2 (K33A) をゲルろ過 buffer で 200 ng/μl になるように希釈し、1 □l を Sample buffer [7 M Urea, 2 M Thiourea, 20 mM DTT, 0.5 % ZOOM Carrier Ampholytes (pH 4-7; Invitrogen), 0.002 % Bromo Phenol Blue] 160 μl に加え、15000 rpm、4 °C、15 分間遠心後、上清をサンプル溶液とした。ZOOM カセットを平らな実験台上に置き、サンプル溶液 155 μl をサンプルローディングデバイスに充填し、一次元等電点電気泳動用の ZOOM ストリップゲル (pH 4-7; Invitrogen) をカセットに添加し、そのまま室温で 90 分間静置して、ストリップゲルを膨潤させた。

電極用ろ紙 2 枚に蒸留水を浸み込ませ、ゲルの両端に置き、カセットを ZOOM

IPGRunner にセットして電気泳動を開始した。通電条件は表 4 に示した 3 段階で、限界電流値及び限界電力値はそれぞれストリップゲル 1 本当たり 1 mA、2 W に設定した。

一次元電気泳動終了後、次のような SDS 平衡化処理を行った。ストリップゲルをカセットから取り出し、ゲル 1 本当たり 5 ml の SDS 処理溶液 [1×NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen), 1×NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen)] で 15 分間振とうした。さらに、ゲル 1 本当たり 5 ml の s-アルキル化溶液 [125 mM Iodoacetamide (Wako), 1×NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen)] で 15 分間振とうした。

NuPAGE 10% ビス-トリスゲル 1 mm 1 well (Invitrogen) を用いて、次のように二次元目の電気泳動を行った。SDS 平衡化処理した一次元ストリップゲルを二次元目ゲルのウェルに乗せ、ゲル同士が密着するようにミクロスパーテルで軽く押し、分子量マーカー (Precision Plus Protein All Blue Standards) 3  $\mu$ l を浸み込ませた小片ろ紙をストリップゲルの陽極外側に挿入した。二次元目のゲルを泳動槽にセットし、泳動 Buffer [1×NuPAGE MES SDS Running Buffer (Invitrogen)] を注ぎ、通電条件は定電圧 200 V で 35 分間、ゲル一枚あたりの限界電流値及び限界電力値はそれぞれ 120 mA 及び 25 W に設定し、泳動した。泳動後、CBB 染色 (Simply Blue™ SafeStain) により目的タンパク質を検出した。

## 7. 結晶化

X 線法を用いた立体構造解析のため、結晶化条件を検討した。上述のように精製した SAPK2 (WT)、SAPK2 (M1-S308) および SAPK2 (K33A) のタンパク質溶液を、分画分子量 30,000 の Centriplus YM-30 (Millipore) および Centriplus YM-10 を用いて限外ろ過により濃縮した。遠心分離は Allegra TM X-22R Centrifuge (BECKMAN COULTER TM) を使用して 1000 x g、4 °Cで行い、タンパク質最終濃度 2.9 ~ 20 mg/ml まで濃縮した。タンパク質濃度は 280 nm における吸光度を測定し、1 次構造から得たトリプトファン及びチロシンの数に基づいて算出した  $\epsilon$  の値から求めた。その後、結晶化条件の初期スクリーニングを、表 5 に示す市販の結晶化キットを用いて行った。結晶化は24穴VDX プレート (Hanpton Research) を使用したハンギングドロップ蒸気拡散法で行い、リザーバーの体積を 500  $\mu$ l、ドロップレット体積はタンパク質溶液 0.7  $\mu$ l とリザーバー溶液 0.7  $\mu$ l を混合して 1.4  $\mu$ l とした。タンパク質溶液は 2.9 ~ 16.4 mg/ml タンパク質、20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT とした。ただし、SAPK2 (M1-S308) に関しては、3.0 ~ 7.8 mg/ml タンパク質、20 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT とした。ハンギングドロップ蒸気拡散法の模式図を図 4 に示した。結晶化プレートのセット後、20 °Cのインキュベーター内に静置し、1 日から数日間の間隔をあけて結晶析出の有無を偏光顕微鏡によって観察した。

## 8. NMR 測定と解析

すべての NMR スペクトル測定は、27 °Cで 5 mm の CHN 三重共鳴クライオ検出器を装着した Bruker AV600 NMR 装置 (Burker BioSpin) を用いて行った。タンパク質試料は濃度を測定し、10 % D<sub>2</sub>O を加えてシゲミチューブ (SHIGEMI) に充填し、測定に供した。測定に用いたタンパク質試料の濃度および buffer 条件を表 6 に示した。スペクトルは、Xwinnmr ソフトウェア (Burker BioSpin) で処理し、Sparky ソフトウェア (University of California の

Goddard, T.D. と Kneller, D.G. による開発; <http://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/>) で解析した。

15N 標識 SAPK2 (P284-L339) と非標識 SAPK2 (M1-S308) を用いた NMR 滴定実験用のサンプルは次のように調整した。上述のように精製した 15N 標識 SAPK2 (P284-L339) の最終濃度 0.16 mM に対して非標識 SAPK2 (M1-S308) の濃度比が 1 : 2 となるように混合し、NMR 滴定実験用サンプルとした。

## 9. モデリング

モデリングには、SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>; Peitsch, 1995; Guex and Peitsch, 1997; Schwede et al., 2003) を用いた。テンプレートには "BLAST search against 3D-structure" (<http://spock.genes.nig.ac.jp/%7Egenome/cgi-bin/gbltpdbform.pl.cgi>) を用いた検索により SAPK2 (WT) との相同性が最も高かった MARK1 (PDB ID: 2HAK) を用い、Protein Data Bank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>) から PDB ファイルを取得した。まず、SWISS-MODEL の First Approach mode で、SAPK2 (WT) のアミノ酸配列を入力したところ、PDB に登録されているタンパク質の中で SAPK2 (WT) と相同性が高いものをサーバーが選択し、2HAK A、C、D、E および F chain をテンプレートとしたモデリング構造を得た。以後、この構造を First Approach 1 と表記する。次に、同じく First Approach mode で、SAPK2 (WT) の配列を入力し、テンプレートとして 2HAK E chain の PDB ファイルを添付し、以下で First Approach 2 と表記するモデリング構造を得た。さらに、SWISS-MODEL の Alignment Interface で、CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>; Thompson et al., 1994) を用いて作成した SAPK2 (WT) と 2HAK のアライメントを入力し、テンプレートとして 2HAK E chain を指定し、以下で Alignment Interface 1 と表記するモデリング構造を得た。最後に、SWISS-MODEL の Alignment Interface で、上述のアライメントをより詳細に確認しながら変更を加えて入力し、テンプレートとして 2HAK E chain を指定し、以下で Alignment Interface 2 と表記するモデリング構造を得た。2HAK E chain およびそれぞれのモデリング構造は、PyMOL ソフトウェア (DeLano Scientific の DeLano, W. L. による開発; <http://pymol.sourceforge.net/>) を用いて、リボン構造および表面電化構造を示した。SAPK2 の二次構造予測は、Chou-Fasman 法 ([http://mbs.cbrc.jp/papia/cgi/ssp\\_menuJ.pl](http://mbs.cbrc.jp/papia/cgi/ssp_menuJ.pl); Chou and Fasman, 1974) および Jpred 法 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/%7Ewww-jpred/>; Cuff et al., 1998) により行った。

## 第三章 結果

### 1. 精製

#### 1-1. 大量発現系の構築と精製プロトコルの確立

SAPK の立体構造解析およびこれに基づく活性制御機構の解明を目的とし、実験に用いるタンパク質の大量かつ高純度での精製条件の検討を行った。発現系は大腸菌を用いた。イネゲノムにコードされた 10 個の SAPK のうち、リン酸化部位の解析など当研究室において最も機能解析が進められている SAPK2 に焦点をあてて実験を行った。本研究で発現および精

製を試みた SAPK2 およびその変異体のドメイン構造を図 5 に示した。

#### 1-1-1. SAPK2 (WT)

野生型の SAPK2 (SAPK2 (WT)) の大量精製を目指して、発現に用いる大腸菌株、誘導のための IPTG 濃度および誘導後の培養温度について検討を行った。その結果を図 6 に示した。まず、大腸菌発現株による SAPK2 (WT) の発現を比較した結果、18 °Cで一晩培養した場合には大きな違いは見られなかった (図 6 (C) および (D))。しかし、37 °C、3 時間培養した場合、BL21 (DE3) 株で発現させると目的タンパク質はほとんど不溶性画分に存在したのに対して (図 6 (A))、BL21 (DE3) pLysS 株では目的タンパク質の半分以上が可溶化した (図 6 (B))。この結果から、BL21 (DE3) pLysS 株の方が目的タンパク質の可溶化傾向が見られると判断し、BL21 (DE3) pLysS 株を発現株として用いることにした。次に、目的タンパク質の誘導に用いる IPTG 濃度について検討した。その結果、培養温度や菌株に関わらず、IPTG 濃度が 1 mM の時よりも 50  $\mu$ M の時の方が目的タンパク質は可溶化する傾向が見られた。この結果から、50  $\mu$ M の IPTG で誘導を行うこととした。さらに、培養温度の検討を行った。その結果、発現量は 37 °Cで培養した方 (図 6 (B) Lane 3) が 18 °Cの時 (図 6 (D) Lane 3) よりも多かった。しかし、18 °Cで培養を行った場合、目的タンパク質の可溶化する割合が高いことがわかった (図 6 (D) Lane 4,5)。本研究では、構造解析および活性測定に用いる活性型タンパク質を精製することを目的にしている。不溶化したタンパク質は活性が失われている場合が多く、上記の目的には可溶性タンパク質として発現する条件で培養することが必須である。そこで、目的タンパク質の発現量よりも可溶化を優先し、18 °Cで一晩培養することとした。以上の結果から、組換え SAPK2 の発現には、大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株を用い、50  $\mu$ M IPTG で誘導し、18 °Cで一晩振とう培養する方法が最適であると結論した。

次に、発現ベクターの検討を行った。その結果を図 7 に示した。異なるタグが N 末端側にそれぞれ付加される 3 種類のベクターに SAPK2 (WT) を組み込み、発現量およびアフィニティー精製の収量が高くなる発現ベクターを調べた。GST タグが付加される pGEX-5X-1-SAPK2 (WT)、His6 タグが付加される pDEST-his-EK-SAPK2 (WT)、および Trx-His6 タグが付加される pDEST-trx-EK-SAPK2 (WT) をそれぞれ大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入し、40 ml の LB 培地を用いて、前述した条件で目的タンパク質を発現させ、アフィニティー精製を行った。この 3 つのベクターを比較した結果、pDEST-trx ベクターを用いたときに、目的タンパク質の発現量および回収量ともに最も多くなることが分かった。

SAPK2 (WT) の直上に導入したプロテアーゼサイトについて検討を行った。その結果を図 8 に示した。EK サイトを導入した pDEST-trx-EK-SAPK2 (WT) および PreS サイトを導入した pDEST-trx-PreS-SAPK2 (WT) について検討を行った。それぞれのベクターを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入し、上述した条件で目的タンパク質の発現および精製を行った。導入したプロテアーゼサイトによる Trx-His6 タグ融合タンパク質の発現量や可溶性に違いはほとんど見られなかったが、プロテアーゼ処理により現れる SAPK2 (WT) の大きさが異なっていた (図 8 (B))。PreS で処理した場合、推定分子マス 38.7 kDa と一致する位置にタグが切断された SAPK2 (WT) のバンドが現れた (図 8 (B) 赤矢印)。一方、EK で処理した場合には、推定分子マス 38.5 kDa よりも大きい位置にバンドが現れた (図 8 (B) 青矢印)。これは、直上に導入した EK サイトでは切断されず、ベクター由来の EK サイト (図 3 (B)) でのみ切断されたことを示す。また、EK 処理後では SAPK2 (WT) 内部での分解が徐々に見られ

たが、PreS 処理後の SAPK2 (WT) には分解が見られなかった。これらの結果から、発現ベクターに導入するプロテアーゼサイトとして、PreS サイトが適切であることが分かった。

精製条件について検討を行った。その結果を図 9 に示した。大腸菌抽出液を Ni chelating カラムにより精製した後、透析により buffer 交換を行い、PreS 処理を行った結果、消化効率が著しく低いことが分かった (図 9 (A) Lane 2)。そこで、Ni chelating カラム精製後の溶液についてゲルろ過精製を行い PreS 処理を行った。その結果、同じ処理条件での消化効率が著しく向上した (図 9 (A) Lane 5)。このときのゲルろ過精製のクロマトグラムを図 9 (B) に示した。この消化効率の向上は、ゲルろ過精製を行うことにより、主に排除限界で溶出される凝集した目的タンパク質および夾雑物が除かれたためと考えられる。この結果から、組換え SAPK2 の精製には、プロテアーゼ処理の前にゲルろ過精製を行うこととした。

以上の結果を考慮して決定した SAPK2 (WT) の最終精製プロトコルおよびその精製結果を図 10 に示した。本実験で確立した条件で精製を行うことにより、ほぼ単一バンドとして SAPK2 (WT) の精製が可能となった。

#### 1-1-2. SAPK2 (M1-P265)

SnRK2 ファミリープロテインキナーゼは、N 末端側の高度に保存されたキナーゼ領域と、C 末端側の酸性アミノ酸に富むユニークな制御領域からなっている。SAPK2 の 265 番目のプロリンまでの領域は、SnRK2 ファミリープロテインキナーゼで相同性が高く、他のプロテインキナーゼのキナーゼ領域との相同性が高い領域ともほぼ一致している (図 1)。そこで、この 265 番目のプロリンまでの N 末端側領域を、SAPK2 のキナーゼドメインとして精製するためにサブクローニングを行った。

SAPK2 (M1-P265) は、SAPK2 (WT) と同様に、大腸菌用発現ベクター pDEST-trx に組み込み、pDEST-trx-EK-SAPK2 (M1-P265) を作成した。直上に導入したプロテアーゼサイトは、前述した PreS ではなく、EK を用いた。SAPK2 (WT) では、導入したプロテアーゼサイトによる目的タンパク質の発現量や可溶化に違いは見られなかった。この結果から、SAPK2 (M1-P265) の場合においても PreS と EK で発現量や可溶化に違いが見られないと予想されるため、EK を用いても可溶化の確認に問題はないと判断した。

pDEST-trx-EK-SAPK2 (M1-P265) を大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入し、50  $\mu$ M または 1 mM の IPTG により遺伝子発現を誘導後、37  $^{\circ}$ C もしくは 18  $^{\circ}$ C で培養し、発現および可溶化を確認した。その結果を図 11 (A) に示した。目的タンパク質の発現量が多いものの、どの条件で培養しても目的タンパク質はほとんど不溶性画分に存在し、可溶性画分には得られなかった。

#### 1-1-3. SAPK2 (M1-T283)

上述のように、SAPK2 のキナーゼドメインとして精製を試みた SAPK2 (M1-P265) の Trx-His6 融合タンパク質は可溶化しなかった。図 21 に示したように、Jpred 法による二次構造予測では 265 番目のプロリンの周辺に二次構造は予測されないが、Chou-Fasman 法では 259 番目のトリプトファンから 271 番目のグルタミン酸までに  $\alpha$ -ヘリックスが予測された。欠変異体を作成する際に、 $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -シートなど二次構造の途中で欠失させるとこの部分の二次構造が崩れ、これがタンパク質の凝集などの原因となることがある。そこで、1

番目のメチオニンから、Jpred 法および Chou-Fasman 法ともに二次構造が予測されていない 283 番目のスレオニンまで (SAPK2 (M1-T283))のサブクローニングを行った。

SAPK2 (M1-T283) は大腸菌用発現ベクター pDEST-trx に組み込み、pDEST-trx-PreS-SAPK2 (M1-T283) を作成した。プロテアーゼサイトは、SAPK2 (WT) で用いた PreS を導入した。この発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入し、SAPK2 (M1-P265) と同様に発現および可溶化を確認した。その結果を図 11 (B) に示した。しかし、SAPK2 (M1-T283) も可溶性画分に得ることはできなかった。

#### 1-1-4. SAPK2 (M1-S308)

SAPK2 (M1-T283)と同様に、二次構造予測の結果を考慮し C 末端側を SAPK2 (M1-T283)に加え、さらに C 末端側へ 25 残基のばした SAPK2 (M1-S308) について検討を行った。

SAPK2 (M1-S308) を大腸菌用発現ベクター pDEST-trx に組み込み、pDEST-trx-PreS-SAPK2 (M1-S308) を作成した。プロテアーゼサイトは、PreS を導入した。この発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入し、SAPK2 (M1-P265) と同様に発現および可溶化を確認した。その結果を図 12 (A) に示した。18 °Cで培養した場合、目的タンパク質が可溶化することがわかった。以上の結果から、SAPK2 (WT) と同様に、50  $\mu$ M IPTG で誘導し、18 °Cで一晩振とう培養することとした。

図 10 (A) に示した精製プロトコールに従って、SAPK2 (WT) と同様に精製した結果、SAPK2 (WT) と同じ条件で PreS 処理を行ったところ切れ残りが大変多かった。しかし、時間が経過すると PreS によりほぼ完全に酵素消化されることがわかったので、処理時間を 16 時間から 3 日間に変更した。SAPK2 (M1-S308) の精製結果を図 12 (B) に示した。夾雑物のマイナーバンドが 2 本ほど残るもののほぼ単一バンドとして精製できた。

#### 1-1-5. SAPK2 (K33A)

ソラマメの ABA シグナリングに関わる SnRK2 プロテインキナーゼ AAPK では、プロテインキナーゼで高度に保存された ATP 結合部位のリジンアラニンに置換すると、孔辺細胞プロトプラストで発現させた GFP 融合 AAPK のリン酸化活性がなくなり、この変異型タンパク質を発現させたトランスジェニック植物では、ABA に応答した気孔の閉鎖が見られなくなることが報告されている (Li et al., 2000)。また、ATP 結合部位のリジンアラニンに置換した SAPK2 (SAPK2 K33A) をイネ培養細胞プロトプラストで発現させた場合、ドミナントネガティブ効果は確認できないもののそのリン酸化活性は失われることが示されている (山本未発表)。さらに、大腸菌で発現させ、不溶性画分から回収した GST 融合 SAPK2 K33A では、自己リン酸化活性および MBP リン酸化活性が失われることを確認した (青田, 2005、名古屋大学農学部応用生物科学科卒業論文)。

後述するように、SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) は、大腸菌中ですでにリン酸化されており、そのリン酸化状態は均一でないことがわかった。これらの SAPK2 の結晶が得られない要因の一つとして、不均一なリン酸化により表面電荷が異なるタンパク質の集合となっていることが予想された。そこで、大腸菌の中でリン酸化されない、もしくは、リン酸化状態が均一であるような SAPK2 タンパク質を得ることを検討した。大腸菌におけるリン酸化は自己リ

ン酸化であることが予想されるため、自己リン酸化活性を持たない SAPK2 変異体 SAPK2 (K33A) について検討を行った。

SAPK2 (K33A) を、大腸菌用発現ベクター pDEST-trx に組み込み、プロテアーゼサイトとして PreS を導入した pDEST-trx-PreS-SAPK2 (K33A) を作成した。この発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入し、SAPK2 (M1-P265) と同様に発現および可溶化を確認した。その結果を図 13 (A) に示した。50  $\mu$ M IPTG で誘導し 18  $^{\circ}$ C で培養した場合、目的タンパク質の可溶性が最も高くなることがわかった。以上の結果から、SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) と同様の条件で培養することとした。

図 10 (A) に示した精製プロトコールに従って精製した結果、SAPK2 (M1-S308) と同様に PreS 消化の効率が低かった。この場合も処理時間を 3 日間に変更するとほぼ完全に酵素消化されることがわかった。SAPK2 (K33A) の精製結果を図 13 (B) に示した。夾雑物のマイナーバンドが残るもののほぼ単一バンドとして精製できた。ただし、SAPK2 (WT) や SAPK2 (M1-S308) に比べて、タンパク質が不安定であり、短時間で分解する傾向が見られた。

#### 1-1-6. SAPK2 (P284-L339)

これまでに当研究室および他の研究グループにより行われた研究の結果から、SnRK2 ファミリープロテインキナーゼの C 末端側の領域は、上流からのシグナルを受容するとともに活性を正に制御する機能があると考えられている(Kobayashi et al., 2004; Yoshida et al., 2006)。そのため、リン酸化による活性化とともにこの領域に関わる活性調節のメカニズムに興味を持たれる。このようにユニークなプロテインキナーゼ活性制御の分子機構の理解には高次構造に関する情報が必要不可欠である。そこで、C 末端領域の構造解析を目的として、SAPK2 の 284 番目のプロリンから 339 番目 (C 末端) のロイシンまでの領域 (SAPK2 (P284-L339)) の発現および精製について検討を行った。

SAPK2 (P284-L339) を大腸菌用発現ベクター pDEST-trx に組み込み、プロテアーゼサイトとして FacXa サイトを導入した pDEST-trx-FacXa-SAPK2 (P284-L339) を作成した。目的タンパク質の直上にプロテアーゼサイトを導入する場合、そのプロテアーゼサイトと目的タンパク質の N 末端の局所的 pI が近い方が可溶化しやすいという報告がなされている (Tsunoda et al., 2005)。SAPK2 (P284-L339) の N 末端側 5 残基の局所的 pI は 6.5 と中性付近であったので、同じく中性付近の局所的 pI を持つ FacXa サイトを選択した。この発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入し、他の SAPK2 変異体と同様に発現および可溶化を確認した。その結果を図 14 (A) に示した。目的タンパク質は、培養温度に関わらず可溶化することがわかった。NMR 測定には、 $^{15}$ N 安定同位体標識したタンパク質が必要である。そのために M9 培地での培養を検討した。その結果、LB 培地で発現させた時と同様の結果が、M9 培地を用いた場合にも確認できた。このため、1 mM IPTG で誘導し、発現量が多くなる 37  $^{\circ}$ C で 4 時間振とう培養することとした。

SAPK2 (P284-L339) の精製プロトコールを図 15 に、精製結果を図 14 (B) に示した。Trx-His6 融合タンパク質も NMR 測定に供するため、夾雑物を取り除く目的で、1 回目のゲルろ過精製を行った後、陰イオン交換カラムで精製し、再度ゲルろ過精製を行った。この操作により、目的融合タンパク質はほぼ単一のバンドまで精製できた。その結果を図 14 (B) (Lane 6) に示す。SAPK2 (P284-L339) の発現ベクターには FacXa サイトを導入したが、FacXa 処理を行ったところ著しく消化効率が悪かった。そこで、発現ベクター由来のプロテアーゼのう



ち、タグと切断後の目的タンパク質の大きさが異なっており、比較的分離が行いやすい EK で処理することとした (図 3 (B))。NMR 測定に用いた Trx-His6 融合タンパク質を回収し、適当な濃度に希釈後、EK 処理を行った。EK 処理後、ゲルろ過精製によりプロテアーゼと目的タンパク質を分離した。切断されたタグと目的タンパク質は、大きさが異なるのにも関わらず、目的タンパク質が存在する画分にはタグも含まれていた (図 14 (B) Lane 8)。このため、目的タンパク質が含まれている画分を集めて Ni chelating カラムに供し、目的タンパク質 SAPK2 (P284-L339) を非吸着画分 (図 14 (B) Lane 9) に、Trx-His6 タグを溶出画分 (図 14 (B) Lane 10) に回収した。その後、SAPK2 (P284-L339) が含まれる非吸着画分を濃縮し、NMR 測定に用いた。また、Trx-His6 タグが含まれる溶出画分は、ゲルろ過バッファーで希釈した後、濃縮し同様に NMR の測定に供した。

## 2. 組換え SAPK2 のリン酸化活性とリン酸化状態

### 2-1. リン酸化活性

精製した組換え SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) のリン酸化活性を調べた。まず、SAPK2 (WT) を酵素とし、MBP を基質として、試験管内リン酸化アッセイを行った。その結果を図 16 に示した。5 倍の酵素濃度で反応させると、酵素タンパク質あたりの自己リン酸化活性が、2.8 ~ 5.2 倍高くなった (図 16 (B))。また、酵素濃度が一定の時、基質濃度の上昇に対応して、SAPK2 (WT) の自己リン酸化活性も高くなった (図 16 (B))。

次に、SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) を酵素とし、MBP および GST-PI4K を基質として、試験管内リン酸化アッセイを行った。その結果を図 17 に示した。基質である PI4K が GST 融合タンパク質なので、コントロールとして GST を基質に用いた反応も行った。C 末端の 31 残基を欠失した SAPK2 (M1-S308) の MBP に対する基質リン酸化活性および自己リン酸化活性は、SAPK2 (WT) と比較して顕著に低下した。それに対して、PI4K に対する基質リン酸化活性は、SAPK2 (WT) と SAPK2 (M1-S308) でほとんど変化がなかった。また、MBP を基質として用いた場合、SAPK2 (WT) の自己リン酸化活性が図 16 と同様に高くなったが、SAPK2 (M1-S308) の自己リン酸化活性に対する MBP の影響はあってもごくわずかであった。一方、PI4K を基質として用いた場合、SAPK2 (WT) の自己リン酸化活性は、逆に低下した (図 17 (B))。SAPK2 (M1-S308) の自己リン酸化活性に対しても PI4K は、抑制作用を示したが、その程度は SAPK2 (WT) に対するそれに比べてわずかであった。

### 2-2. リン酸化状態

SAPK2 が活性をもつには、酵素タンパク質のリン酸化が必要であることが、当研究室における研究から明らかにされている (Kobayashi et al., 2004)。上述のように、精製した組換え SAPK2 が顕著なリン酸化活性を持っていたことから、精製タンパク質がリン酸化されているか否かを調べた。まず、精製した SAPK2 (WT)、SAPK2 (M1-S308) および SAPK2 (K33A) に対して、アルカリフォスファターゼ (CIAP) 処理あるいはコントロール処理を行い、SDS-PAGE で展開した。その後、リン酸化タンパク質を特異的に検出する Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain (Pro-Q) および全タンパク質を検出する SYPRO Ruby protein

gel stain で染色した。その結果を図 18 (A) に示した。SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) は、コントロール処理の場合は Pro-Q で強く染色され、CIAP 処理を行うと Pro-Q による染色レベルが低下した。このことから、両タンパク質は大腸菌中ですでにリン酸化されていたことがわかった。また、SAPK2 (K33A) は、CIAP 処理の有無に関わらず、Pro-Q でほとんど染色されなかったため、大腸菌中ではほとんどリン酸化されないことがわかった。これらの結果から、SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) の大腸菌中におけるリン酸化は、自己リン酸化によるものであることが推定された。

次に、精製した SAPK2 (WT)、SAPK2 (M1-S308) および SAPK2 (K33A) をそれぞれ二次元電気泳動で展開し、CBB 染色で検出した。その結果を図 18 (B) に示した。SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) は、それぞれ少なくとも 3 つ以上のスポットに分かれたことから、これらのリン酸化状態は均一でないと考えられた。これに対して、SAPK2 (K33A) はほぼ単一のスポットとして検出された。この結果は、図 18 (A) の結果と一致していた。

リン酸化が確認された精製 SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) は、18 °C で一晩培養した大腸菌から精製した。培養温度は低いが培養時間が長いため、菌体内での自己リン酸化が進行した可能性が考えられる。そこで、培養時間が短くなるとリン酸化が起こらない、もしくはリン酸化レベルが下がるという可能性を考え、Trx-His6 融合 SAPK2 (WT) および SAPK2 (K33A) のリン酸化状態を、大腸菌の培養温度および時間を変化させて検討した。この結果を図 19 に示した。今回使用した pDEST-trx ベクターは pET-32a (+) を改変している (Tsunoda et al., 2005)。そこで、融合タンパク質のリン酸化が Trx-His6 タグ部分ではなく、SAPK2 部分で起こっていることを示すコントロールとしては、pET-32a (+) を使用した。pET-32a (+)、pDEST-trx-PreS-SAPK2 (WT) および pDEST-trx-PreS-SAPK2 (K33A) を大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入し、それぞれの大腸菌を 50  $\mu$ M IPTG により遺伝子発現を誘導後、37 °C または 30 °C で 3 時間 もしくは 18 °C で一晩培養した。その後、大腸菌を超音波処理により破碎し、融合タンパク質誘導前、誘導後、超音波破碎後の可溶性画分および不溶性画分に分けて、SDS-PAGE で展開した。そして、図 18 (A) と同様に、Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain (Pro-Q) および SYPRO Ruby protein gel stain で染色した。Trx-His6-SAPK2 (WT) のバンドは、他のタンパク質と比較して、Pro-Q により顕著に染色されていた。予想に反して、その染色の程度は培養温度および時間による違いが見られなかった。また、融合タンパク質誘導後および超音波破碎後の可溶性画分に見られたタンパク質だけでなく、不溶性画分に見られたタンパク質もリン酸化されていた。一方、Trx-His6-SAPK2 (K33A) の Pro-Q による染色の程度は他のタンパク質とほぼ変わらず、Trx-SAPK2 (K33A) はリン酸化されていないことがわかった。pET-32a (+) を導入して発現させた Trx-His6 タグはわずかにリン酸化されていたが、タンパク質あたりのリン酸化レベルを比較すると SAPK2 (WT) の方がよりリン酸化されていた。この結果から、Trx-His6-SAPK2 (WT) で検出されたリン酸化は、ほとんどが SAPK2 部分で起こったと言える。

### 3. 立体構造解析

#### 3-1. X 線立体構造解析のための結晶化

SAPK2 (WT)、SAPK2 (M1-S308) および SAPK2 (K33A) について、X 線法による立体構造解析を目指して、結晶化条件探索のための初期スクリーニングを行った。まず、SAPK2

(WT) および SAPK2 (M1-S308) の結晶化を、市販されている結晶化キットを用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法により試みた (図 4)。SAPK2 (WT) については、表 5 に示したように 6 キット、計 290 条件、SAPK2 (M1-S308) については、3 キット、計 144 条件のリザーバー溶液について結晶化を試みたが、現時点で結晶は得られていない。

上述のように、精製した SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) はすでに大腸菌中でリン酸化されており、そのリン酸化状態は均一でないことがわかった (図 18)。リン酸化により、タンパク質にはリン酸基の負電荷が導入される。このことにより、リン酸化されたタンパク質では、リン酸化される前と比較して、表面電荷に変化があると予想される。また、二次元電気泳動でスポットが分かれた (図 18 (B)) ことから、リン酸化されたことによりタンパク質の pI に変化があったことがわかる。したがって、これらのタンパク質溶液には表面電荷や pI の異なるいくつかのタンパク質が含まれていると考えられる。タンパク質の結晶化において、タンパク質試料の均質性は重要であり、これらのタンパク質のリン酸化状態の不均一さが結晶化の妨げになっていることが可能性として考えうる。現状では、リン酸化されたタンパク質から効率的にすべてのリン酸基を脱リン酸化する方法はないと思われる。そこで、全くリン酸化されない、もしくは、リン酸化はされているがリン酸化状態が均一な SAPK2 タンパク質が必要であると考えた。精製した SAPK2 (K33A) は、図 18 および図 19 の結果から、ほとんどリン酸化されていないということがわかった。そこで、SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) と同様に SAPK2 (K33A) の結晶化を試みた。表 5 に示したように 2 キット、計 98 条件のリザーバー溶液について結晶化を試みたが、SAPK2 (K33A) に関しても現時点で結晶は得られていない。

### 3-2. NMR 測定

SAPK2 の C 末端領域の構造解析および機能解明を目指して、NMR 法による解析を行った。最初に、<sup>15</sup>N 標識した Trx-His6 融合 SAPK2 (P284-L339) および Trx-His6 タグの <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC の測定を行った。その結果をそれぞれ図 20 (A) および (B) に示した。<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC は、各アミノ酸のアミド基の NH を観測することが可能であり、NH のプロトン (<sup>1</sup>H) と窒素 (<sup>15</sup>N) の相関を検出する。つまり、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトル上のそれぞれのシグナルがタンパク質を構成するアミノ酸それぞれに対応している。試料タンパク質が立体構造を保持している場合、各アミノ酸の化学環境はそれぞれが大きく異なるので、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC の各シグナルは分離する。それに対して、明確な立体構造を保持しないランダムコイルの場合、それぞれのアミノ酸が置かれた化学環境がほぼ同じとなるため、この分散度は消失し、各シグナルはスペクトルの中心に集中する。図 20 (A) に示した Trx-His6 融合 SAPK2 (P284-L339) の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC のスペクトルは、スペクトルの中心にシグナルが集まっている部分が見られるものの、全体的にシグナルが分散していた。この結果は、少なくとも明確な立体構造をとっている部分があることを示している。続いて、図 20 (B) に示した Trx-His6 タグのスペクトルは、それぞれのシグナルが分散しており、Trx タグは安定な立体構造を保持していることを支持する結果が得られた。図 20 (C) には、Trx-His6-SAPK2 (P284-L339) (マゼンダ) と Trx-His6 タグ (シアン) の HSQC を重ね合わせたスペクトルを示した。また、Trx-His6-SAPK2 (P284-L339) のスペクトルのみで見られたシグナルおよび Trx-His6 タグのみで見られたシグナルをそれぞれ赤および青で囲んだ。Trx-His6-SAPK2 (P284-L339) のスペクトルでは見られるが、SAPK2 (P284-L339) を除去した Trx-His6 タグのみのスペクトル

ルには見られないシグナルがいくつか見られた。このようなシグナルは、中心にシグナルが集まっていた部分だけでなく、周辺に分散した特徴的なシグナルの部分にもいくつか見られた。例えば、 $^1\text{H}$ : 11.26 ppm,  $^{15}\text{N}$ : 102.5 ppm あるいは  $^1\text{H}$ : 6.844 ppm,  $^{15}\text{N}$ : 107.2 ppm のシグナルである。この結果から、SAPK2 (P284-L339) が明確な立体構造を保持している可能性が予想された。そこで、本実験の目的である  $^{15}\text{N}$  標識した SAPK2 (P284-L339) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC の測定を行った。その結果を図 20 (D) に示した。予想に反して、このスペクトルではそれぞれのシグナルが中心に集中しており、SAPK2 (P284-L339) は明確な立体構造を保持していないことを示唆する結果が得られた。

次に、SAPK2 C 末端領域は、キナーゼドメインと相互作用するかどうかを NMR 測定により調べた。 $^{15}\text{N}$  標識した SAPK2 (P284-L339) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC の測定を行った直後に、標識していない SAPK2 (M1-S308) を 2 倍濃度になるように加えて、再び SAPK2 (P284-L339) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC の測定を行った。この時のスペクトルを図 20 (E) に示した。また、図 20 (F) には、SAPK2 (P284-L339) のみの時 (マゼンダ) と SAPK2 (M1-S308) を加えた時 (シアン) の HSQC を重ね合わせたスペクトルを示した。図 20 (F) 中に、SAPK2 (M1-S308) を加えると消えるシグナルを赤で、SAPK2 (M1-S308) を加えると現れるシグナルを青で囲んだ。このようなシグナルの変化は、SAPK2 C 末端領域がキナーゼドメインと相互作用する可能性を示している。

### 3-3. モデリング

X 線、NMR とともに SAPK2 の構造解析には至らなかった。立体構造を決定する方法は、実験により直接決定する方法 (NMR、X 線、電子線顕微鏡など) の他に、モデリング法がある。モデリング法はさらに 2 つに分けられる。1 つは、アミノ酸配列に基づき構造未知タンパク質の立体構造を予測するモデリング法である。もう 1 つは、ホモロジーモデリング法と呼ばれ、アミノ酸配列に相同性のある構造既知タンパク質の立体構造をテンプレートとして、構造未知タンパク質の立体構造を予測する手法である。ホモロジーモデリング法では、アミノ酸相同性の高いタンパク質の立体構造が既知であることが必須条件となる。近年、Protein Data Bank (PDB) に登録されるタンパク質構造は著しく増加し、2007 年 1 月 30 日現在、41,385 のタンパク質構造が登録されている。このことから、ホモロジーモデリング法の精度が上がり、その有用性が高まりつつある。

PDB には、微生物や動物などのプロテインキナーゼの構造も数多く含まれている。そこで、PDB に登録されているタンパク質のうち SAPK2 と相同性の高いものの構造をもとに、SAPK2 の立体構造モデルをホモロジーモデリング法により構築した。PDB に登録されているタンパク質のうち SAPK2 (WT) と相同性を示すものの検索を BLAST search against 3D-structure により行った。その結果、SAPK2 (WT) と 34 % のアミノ酸が同一である 2HAK (PDB ID; タンパク質名は MARK1) の立体構造が PDB に登録されていることがわかった。そこで、この 2HAK をテンプレートとして、SWISS-MODEL によるモデリングを行った。

モデリング構造は、SWISS-MODEL の First Approach mode を利用して 2 種類 (First Approach 1 および 2)、Alignment Interface を利用して 2 種類 (Alignment Interface 1 および 2)、合わせて 4 種類の構造を得た。これらのモデリング構造を図 22 に示した。図 22 (B) はリボン構造を、(C) は表面電荷構造を示した。テンプレートとした 2HAK は、X 線結晶構造解析により、A chain から H chain までの八量体として構造が解析されている (Marx et

al., 2006)。このうち、アクチベーションループ部分の電子線密度が検出でき構造が登録されているものは、E および F chain のみである。そこで、First Approach 2、Alignment Interface 1 および 2 では、2HAK E chain をテンプレートに指定しモデリングを行った。2HAK E chain のリボン構造および表面電荷構造を図 22 (A) に示した。

テンプレートとした 2HAK E chain の構造および SAPK2 (WT) のモデリング構造を詳細に比較するために、これらの構造の二次構造および SAPK2 の二次構造予測の結果を含めた SAPK2 (WT) および 2HAK のアライメントを図 21 に示した。SAPK2 (WT) のモデリング構造の二次構造は、テンプレートである 2HAK E chain の二次構造や Jpred を用いた SAPK2 の二次構造予測の結果とよく一致していた (図 21)。一方、古典的 Chou-Fasman 法による予測とはあまり一致しなかったものの、C 末端領域に関しては  $\alpha$ -ヘリックスが予測されているという共通点はあった (図 21)。

得られたモデリング構造を比較した結果、以下のことが明らかとなった。First Approach の両モデリング構造は、キナーゼドメインとほぼ一致する 264 番目のロイシンまでしか予測されていない (図 21 および 22 (B))。First Approach mode では、テンプレートと相溶性が高い部分のみしかモデリングされないと言える。一方、Alignment Interface では、2HAK の配列とアライメントされない C 末端の 7 残基を除いて全長がモデリングされていた (図 21 および 22 (B))。First Approach 1 では、テンプレート構造を指定していないが、それ以外の構造では 2HAK E chain をテンプレートとして指定してモデリングを行った。その結果、First Approach 1 以外の構造ではアクチベーションループの領域に  $\alpha$ -ヘリックスが存在する構造が得られた。また、Alignment Interface を用いて行ったモデリング構造では、First Approach で予測したときに存在していない  $\alpha$ -ヘリックス (F209-S218) が予想された。この違いは、Alignment Interface と First Approach に用いたアライメントでのギャップの挿入位置 (Alignment Interface では P203-P206 を 2HAK のギャップとした) の違いに起因すると思われる。以上の結果から、ホモロジーモデリング構造を構築するときの重要な点として、アミノ酸相溶性の高いテンプレートを使用すること、精度の高い既知構造をテンプレートに用いること、そして、アライメント精度を高めることが重要であることがわかった。Alignment Interface で得られた 2 つの構造は、類似性が高い。しかし、二次構造を加味して、CLASTALW によるアライメントを補正していることから、本研究では、構造機能相関を議論するために用いるモデリング構造は、Alignment Interface 2 が適当であると判断した。

Alignment Interface 2 と 2HAK の構造をリボン表記および表面電荷構造で比較した。その結果、分子表面の細部の構造が異なることに加えて、表面の電荷の分布に違いがあることがわかった (図 22 (A) および (C))。

## 第四章 考察

### 1. SAPK2 (WT) およびその変異体の精製条件の確立

タンパク質の立体構造解析手法として、X 線結晶構造解析および溶液 NMR 法が一般的に用いられる。どちらの手法を選択する場合でも、大量かつ高純度の試料タンパク質が必要となる。また、*in vitro* での活性測定実験にも組換えタンパク質は必須であり、かつ定量性のある精度の高い活性実験には、活性型でかつ純度の高いタンパク質を用いることが重要である。目的タンパク質を活性型で、高純度かつ大量に得るためには、様々な発現および精製条件の

検討を行う必要がある。本研究では、培養が容易で短時間で行える大腸菌発現系を用いて、SAPK2 およびその変異体の発現および精製のための様々な検討を行った。

大腸菌内で発現させた組換えタンパク質を可溶性の形で得るためには、目的タンパク質と融合させて発現するタグタンパク質の選定が重要である。Tsunoda ら (2005) は、様々なイネタンパク質を検討した結果、Trx 融合タンパク質として、目的タンパク質を発現させた場合に可溶化しやすい傾向があることを報告している。また、Kapust ら (1999) および LaVallie ら (2003) はタグとして Trx、GST および maltose binding protein (MBP) を使用した場合、目的の融合タンパク質は効率良く大腸菌内の可溶性画分に回収されることを報告している。なかでも Trx はバクテリアだけでなく、広く動植物に分布しており (Bayer, 1968; Holmgren, 1985)、ヒトやマウスのインターロイキンタンパク質を含む数々のタンパク質は Trx 融合タンパク質として大腸菌内の可溶性画分に回収されることが報告されている (LaVallie, 1993)。加えて、目的タンパク質の可溶化には、大腸菌発現株の選択や培養条件なども大きな影響を与える。SAPK2 (WT) についてこれらの条件の検討を行った結果、発現および精製に用いるタグによる発現量の違いや、大腸菌発現株による可溶化の違いが大きいことがわかった。特に、SAPK2 においても融合タンパク質として Trx を用いた場合、タンパク質の可溶化に効果があることがわかった。

SAPK2 (WT) とそのそれぞれの変異体では、培養条件を変化させた時の挙動が大きく異なることがわかった。この結果から、目的タンパク質のドメイン化を検討することの重要性が示唆された。

構造解析に用いるためには、活性測定に用いる場合とは異なり、タグなどの余分な配列が付加しないことが望ましい。そこで、本研究では、目的タンパク質の N 末直上に任意のプロテアーゼサイトを導入して、発現ベクターを構築した。その結果、導入するプロテアーゼサイトにより、切断効率やプロテアーゼ処理後の安定性に大きな差があることが明らかとなった。例えば、図 8 に示したように、SAPK2 (WT) に EK を導入した場合、直上のプロテアーゼサイトで切れないこと、分解が起こることが問題となった。直上のプロテアーゼサイトで切れないという現象は、TEV protease (TEV) を導入した場合でも見られた。また、PreS 処理では正しい位置で切断が起こるが、酵素量としては添付のプロトコールに記載されている最小使用量の約 2 倍を用いている。プロテアーゼ処理の効率が悪い理由は以下に示す 2 つのことが考えられる。1 つ目は、プロテアーゼサイトのすぐ近傍に SAPK2 が物理的空間を占めていて、プロテアーゼとプロテアーゼサイトの相互作用を阻害する可能性が考えられる。図 21 に示した二次構造予測およびモデリングの結果によると、SAPK2 の 3 番目のアルギニンから  $\alpha$ -シートが予測されていることから、この可能性は高いと考えられる。2 つ目は、導入したプロテアーゼサイトや Gateway ベクター由来の付加的配列が SAPK2 の立体構造形成を阻害し、unfold 構造のためにプロテアーゼが作用できないという可能性である。EK サイトの導入による目的タンパク質の分解は、プロテアーゼサイトの認識が甘く、また活性が強いため非特異的な切断が起こりやすいためと考えられる。一般的に、EK、Thrombin および FacXa などの認識配列が短いプロテアーゼは、プロテアーゼサイトの配列特異性が低いことが知られている。実際、EK サイトを導入した Trx-His6-SAPK2 (WT) を、これら 3 つのプロテアーゼで処理すると、認識サイト以外でも非特異的な切断が起こった。それに対して、認識配列が長い PreS および TEV で同様に処理すると、非特異的な切断は全く起こらなかった。

SAPK2 (P284-L339) の場合、N 末端側 5 残基の局所的 pI は 6.5 と中性付近であっ

たことから、同じく中性付近の局所的  $pI$  を持つ FacXa サイトを選択した。しかし、Trx-His6 融合タンパク質を FacXa で処理した結果、消化効率が著しく悪かった。上記で示した理由と同様の可能性が考えられる。導入した FacXa サイトでの切断が行えなかったため、pET-32a (+) 由来の EK もしくは Thrombin サイトでの切断を試みた (図 3 (B))。これらの位置では切断されたが、どちらのプロテアーゼを用いた場合も目的の SAPK2 (P284-L339) に加えて分解産物も見られた。Thrombin サイトで切断した場合、タグと目的タンパク質の大きさ (推定分子マスのそれぞれ 13.9 kDa および 12.3 kDa) が近いので、その後の分離が難しいと考え、EK サイトで切断することにした。EK サイトで切断すると、精製および濃縮の過程で再び分解する傾向が見られた。以上の結果から、今後 SAPK2 (P284-L339) の研究を進めるためには、直上に導入した時に正しく切断が起こり、かつ目的タンパク質が分解しないようなプロテアーゼサイトの再検討を行う必要がある。

プロテアーゼ処理効率に、処理する前のタンパク質純度が大きく影響することがわかった (図 9)。つまり、少ない酵素量で効率的に切断するためには、夾雑物や可溶性であるにもかかわらずある程度凝集している目的タンパク質を取り除くことが重要であると考えられた。用いるプロテアーゼの酵素量を減らすことは、非特異的な切断を抑えることにもつながると思われる。

また、SAPK2 (K33A) は、SAPK2 (WT) や SAPK2 (M1-S308) に比べて、タンパク質が不安定であった。PreS 処理後に一部分解産物が見られ、ゲルろ過によりこれを除去しても、精製後に再び分解産物が増加した。この結果は、33 番目のリジンがリン酸化活性ばかりでなく、SAPK2 タンパク質の安定性に重要である可能性を示唆する。

## 2. 組換え SAPK2 のリン酸化活性

ソラマメ AAPK、タバコ NtOSAK およびシロイヌナズナ OST1/SRK2E など様々な植物由来の SnRK2 プロテインキナーゼを大腸菌で発現させた場合、これらの組換え SnRK2 タンパク質はリン酸化活性を持たないという報告がなされていた (Li et al., 2000; Kelner et al., 2004; Mustilli et al., 2002)。一方、最近になって、NtOSAK および OST1/SRK2E を大腸菌で発現させた組換えタンパク質は、リン酸化活性をもっており、大腸菌内でリン酸化されていることが報告された (Burza et al., 2006; Belin et al., 2006)。また、大腸菌で発現させたイネ SAPK6/OSRK1 もリン酸化活性を持つことおよびその生化学的な特徴が報告された (Chae et al., 2007)。本研究では、構造解析を目的とした大量かつ高純度の SAPK2 およびその変異体の精製に成功した。上記のように報告によって結果が大きく異なるのは、実験に用いた組換えタンパク質の純度 (活性型、非活性型の存在量、不純物の混入等) が異なる可能性を示唆している。本研究で確立した手法により得られたタンパク質は、ゲルろ過分析の結果、単分散で存在していることを確認しており、会合状態でなく活性型である可能性が高い。また、精製純度も高い。これらのことから、この研究で得た組換え SAPK2 タンパク質はその生化学的性質の解析に適していると考えられた。

### 2-1. SAPK2 (WT) の自己リン酸化様式

SAPK2 (WT) で確認された自己リン酸化が分子内自己リン酸化または分子間自己リン酸化のどちらで起きているのかを検討した。SAPK2 の自己リン酸化が分子内自己リン酸化である場合は、それぞれの分子のみが酵素であり基質であると仮定できる。すなわち、酵素濃度が

上昇しても酵素あたりの基質濃度は増えないので、酵素タンパク質あたりの自己リン酸化活性は同じになるはずである。一方、分子間自己リン酸化の場合は、酵素濃度の上昇に伴い、酵素あたりの基質濃度も上昇していくと考えられるので、酵素タンパク質あたりの自己リン酸化レベルは酵素濃度に比例して上昇すると考えられる。図 16 に示した実験から、酵素として加えた SAPK2 (WT) を 5 倍濃度で反応させると、酵素タンパク質あたりの自己リン酸化レベルが、2.8 ~ 5.2 倍高くなるという結果が得られた。本実験では、酵素濃度を 2 点しかとっていないが、この結果は、SAPK2 (WT) で見られる自己リン酸化が分子間自己リン酸化であることを強く示唆する。

## 2-2. SAPK2 C 末端領域の 31 残基の欠失が自己リン酸化活性に与える影響

図 17 に示した実験では、SAPK2 (M1-S308) の自己リン酸化レベルは、SAPK2 (WT) と比較して顕著に低下していた。この結果は、SAPK2 の C 末端領域が、SAPK2 のリン酸化活性もしくは活性化に重要であることを強く示唆している。培養細胞で一過的に SAPK1 (M1-M319) および SAPK2 (M1-L319) を過剰発現させた場合、浸透圧ストレスで誘導されるこれらのリン酸化活性は WT の 10 分の 1 以下であった (Kobayashi et al., 2004)。本研究の結果は、in vivo での結果とよく一致しており、C 末端領域のドメイン 2 は SnRK2 の活性化に重要な役割を果たしているのかもしれない。一方、SAPK2 (M1-S308) とほぼ同じ領域を欠失させた OST1/SRK2E の C 末端領域欠失変異体は、大腸菌で発現させた場合、自己リン酸化活性の低下は見られないという結果が得られている (Belin et al., 2006)。OST1/SRK2E は SAPK8 と同じサブクラス III に属しており、我々が着目している SAPK2 とは C 末端領域の相同性が低く、かつ SAPK2 とは異なり ABA によっても活性化されるなどの相違点がある。SAPK2 と OST1/SRK2E で見られた組換え C 末端領域欠失変異体のリン酸化活性の違いは、サブクラスの違い、つまりは C 末端領域の配列の違い (図 1) に起因するものであるかもしれない。

## 2-3. 基質が SAPK2 の自己リン酸化活性に与える影響

図 16 および 17 に示した 2 つの実験では、MBP を基質として用いた場合、SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) とともに自己リン酸化レベルが酵素単独の場合よりも高くなった。一方、PI4K を用いた場合には、逆に低下した。類似した現象は、シロイヌナズナ OST1/SRK2E やイネ SAPK6/OSRK1 でも見られた (Belin et al., 2006; Chae et al., 2007)。ただし、これらのタンパク質の自己リン酸化レベルは、基質としてヒストンを加えることで高くなっていた。加えて、SAPK6/OSRK1 では、ヒストン以外に標的基質であることが示唆されたイネ bZIP 型転写因子 OREB1 の場合にもこの現象が見られた (Chae et al., 2007)。また、SAPK6/OSRK1 では、基質として MBP を加えた場合は、逆に自己リン酸化レベルは下がっていた (Chae et al., 2007)。SAPK2 と SAPK6/OSRK1 の間で、MBP の SAPK 自己リン酸化に与える影響が逆になるという結果は、基質との相互作用あるいは認識様式が SnRK2 メンバー間で異なっていることを示唆する。SAPK6/OSRK1 に関する論文では、SnRK2 と標的基質の相互作用により、オリゴマー形成が促進される可能性が指摘されている (Chae et al., 2007)。



## 2-4. SAPK2 C 末端領域の 31 残基の欠失が基質リン酸化活性に与える影響

SAPK2 (M1-S308) の MBP に対する基質リン酸化活性は SAPK2 (WT) と比較して顕著に低下していたが、PI4K に対する基質リン酸化レベルは、SAPK2 (WT) と SAPK2 (M1-S308) で変化が見られなかった。この結果から、基質の種類によって、SAPK2 の基質認識のメカニズムが異なることが示唆される。PI4K が SAPK2 (WT) の自己リン酸化を阻害したことは、PI4K と基質 SAPK2 は酵素 SAPK2 に対して競合していることを意味する。SAPK2 (M1-S308) を用いた場合には、PI4K による阻害効果が大幅に減少したことから、SAPK2 (M1-S308) で欠失した領域、すなわちドメイン 2 は酵素-基質間相互作用に何らかの形で関与していることを示唆する。SAPK2 (M1-S308) の PI4K に対するリン酸化活性は、SAPK2 (WT) とほぼ同レベルであるにもかかわらず自己リン酸化活性のみが低下したことは、SAPK2 (M1-S308) において欠失した領域が基質 SAPK2 が酵素 SAPK2 と相互作用するのに必要な領域ではないかと推察される。また、PI4K および基質としての SAPK2 はこの領域以外において酵素としての SAPK2 に認識されていることになる。一方、基質が MBP である場合には、SAPK2 (M1-S308) によるリン酸化活性が SAPK2 (WT) に比べて顕著に低下したことから、酵素 SAPK2 と MBP との相互作用にはドメイン 2 が関与していることが予想される。SAPK2 (M1-S308) では SAPK2 (WT) においてみられた MBP による自己リン酸化促進効果がほとんどみられなくなったことは、このことを裏付ける。

それでは、MBP による自己リン酸化促進効果はどのようなメカニズムによるものであろう。上記のような MBP とドメイン 2 との相互作用によりコンフォメーション変化が引き起こされることが予想される。その結果、酵素 SAPK2 が基質 SAPK2 のドメイン 2 と相互作用するのに必要な領域をより露出させ、反応性が高まることにより SAPK2 の自己リン酸化が亢進するのではないだろうか。

このような仮説は、いくつかの実験によって検証可能であろう。たとえばこの仮説では、PI4K は基質 SAPK2 と同様なメカニズムで酵素 SAPK2 によって認識されることを仮定していることから、PI4K の SAPK2 によるリン酸化は SAPK2 自己リン酸化の場合と同様に MBP によって促進されることが予想される。ただし、この仮説では、SAPK2 (M1-S308) で欠失した領域に自己リン酸化部位の一部が含まれている可能性を考慮に入れていないことから、この点について実験的に確認する必要があるだろう。いずれにしても、本実験の結果は、基質によって SAPK2 との相互作用メカニズムが異なっていること、またこのような相互作用に C 末端領域が深く関与していることは、間違いないであろう。これまでの報告で C 末端領域は、上流シグナルの認識に重要な働きをしていることが明らかにされてきた。これに加えて、本研究では同領域が下流因子 (基質) との相互作用にも機能している可能性を示すことができたといえる。

## 3. 組換え SAPK2 のリン酸化状態

### 3-1. SAPK2 (WT) と SAPK2 (M1-S308) におけるリン酸化状態

図 18 に示した二次元電気泳動の結果、SAPK2 (WT) の方が、SAPK2 (M1-S308) よりもスポットの数が多く、多くの部位でリン酸化されていることがわかった。SAPK2 (WT) の方が SAPK2 (M1-S308) にくらべて多くリン酸化されているとすれば、この原因がリン酸化活性の違いに起因するものなのか、それとも、C 末端側にもリン酸化される部位があるためなのかと

いうことに興味を持たれる。

### 3-2. 培養条件が SAPK2 (WT) のリン酸化に与える影響

培養時間が短くなるとリン酸化が起こらない、もしくはリン酸化効率が下がるという可能性を考え実験を行った。しかし、培養温度や培養時間に関わらず、大腸菌で発現させた SAPK2 (WT) はリン酸化されていた。一方、大腸菌で発現させた NtOSAK は、培養温度によりリン酸化される部位およびリン酸化活性が異なっていると報告された (Burza et al., 2006)。30 °C と 18 °C とでリン酸化されている部位が異なること、および 30 °C、3 時間の培養では活性化に必要な 158 番目のセリンのリン酸化は起こらないため、この条件で培養するとリン酸化活性が低下することが言われている。本研究では、培養条件の違いによるトータルのリン酸化状態のみを調べた。今後はリン酸化部位を特定し、それぞれの部位のリン酸化状態を調べる実験が必要かもしれない。

### 3-3. 大腸菌で発現させたタンパク質と植物で発現させたタンパク質のリン酸化活性の違い

タバコ NtOSAK では、大腸菌から精製した NtOSAK およびその変異体の MBP に対するリン酸化活性は、NaCl 処理した培養細胞から精製したものと比較して 1-4 % の活性しか持たないことが報告されている (Burza et al., 2006)。これは、植物の中で厳密に制御されたシグナル伝達経路における活性化と、大腸菌内における自己リン酸化では、リン酸化部位が異なるためであろうと予想されている。実際に、NaCl 処理した培養細胞から精製した NtOSAK では、アクチベーションループの 154 番目と 158 番目のセリン (SAPK2 においても同じ残基に相当) がリン酸化されていたのに対して、大腸菌から精製した NtOSAK およびその変異体では、158 番目のセリンに加えて、いくつかのセリンおよびスレオニン残基がリン酸化されていたことが報告された (Burza et al., 2006)。このとき、154 番目のセリンはリン酸化されていなかった。また、大腸菌で発現させた OST1/SRK2E のリン酸化部位も Belin ら (2006) により同定されたが、アクチベーションループの 175 番目のセリンおよび 176 番目のスレオニン (SAPK2 ではそれぞれ 158 番目のセリンおよび 159 番目のスレオニンに相当) に加えて、試験管内のリン酸化アッセイにおいてキナーゼ活性に必要なことが示されたいくつかのセリン残基がリン酸化されていた。SAPK2 においても、大腸菌から精製したタンパク質と、植物から精製したタンパク質のリン酸化状態およびリン酸化活性の比較が必要であろう。

### 3-4. SAPK2 (WT) の不溶性画分におけるリン酸化

SAPK2 (WT) の不溶性画分に見られるタンパク質は、可溶性タンパク質と同様にリン酸化されていることが明らかとなった。この結果は、大腸菌の中ですでに封入体を形成しているのではなく、破碎時に凝集し沈殿するという可能性を示唆している。

## 4. 植物内における SAPK2 の活性化と自己リン酸化との関係

植物内における SAPK2 の活性化に自己リン酸化は関係しているかどうかについて以下に考察する。大腸菌で発現させた NtOSAK や OST1/SRK2E と同様に、SAPK2 (WT) お

よび SAPK2 (M1-S308) は、大腸菌内で自己リン酸化によりリン酸化され、活性化されていた。これは、SnRK2 プロテインキナーゼが、上流のキナーゼによるリン酸化だけでなく、自己リン酸化によっても活性化されることを示している。また、NtOSAK では、活性化に必須であるが十分ではないと示された 158 番目のセリンが自己リン酸化によりリン酸化されていたことから (Burza et al., 2006)、SnRK2 プロテインキナーゼは自身の活性化に関わるセリン残基をリン酸化することができると言える。しかし、上述したように自己リン酸化により活性化された NtOSAK の活性は浸透圧ストレスより活性化された時の 1-4 % しかないことから (Burza et al., 2006)、自己リン酸化による活性化のみでは十分な活性が得られないと考えられる。このため、植物内における SnRK2 プロテインキナーゼの活性化には上流のキナーゼによるリン酸化が必須であると思われる。ただし、自己リン酸化により活性化されるキナーゼもいくつか報告されていることから (Johnson et al., 1996; Nolen et al., 2004)、SnRK2 プロテインキナーゼの活性化にも、上流キナーゼによるリン酸化に加えて、自己リン酸化による活性化が関わっている可能性も否定できない。

## 5. SAPK2 の立体構造解析

タンパク質の立体構造解析の主な手段としては、X 線結晶構造解析と溶液 NMR による構造解析の 2 つが挙げられる。X 線結晶構造解析は、解析を行うタンパク質の大きさに制限がないというメリットがあるが、結晶化の段階が大きな障壁となる。また、結晶中の構造を解析するため、溶液中でのタンパク質の動きに関する情報は得られない。一方、溶液 NMR による構造解析は、溶液状態で測定が可能であるため、溶液中でのタンパク質の動的な情報が得られるというメリットがある。しかし、解析できるタンパク質の大きさは、30 kDa くらいまでとデメリットもある。タンパク質によっては、実験的に構造解析が不可能な場合がある。近年、PDB データベースへの構造情報の登録が著しく増加したこと、また簡便に使えるホモロジーモデリングソフトが普及したことにより、ホモロジーモデリングによる立体構造の精度が向上しつつある。

本研究では、SAPK2 の構造解析を目指して研究を行った。解析するタンパク質の分子量を考慮して SAPK2 (WT) およびその変異体に関しては X 線結晶構造解析法を目指して結晶化を、SAPK2 C 末端領域に関しては NMR による構造解析を試みた。

### 5-1. X 線結晶構造解析法を目指した結晶化の検討

表 5 に示したように、SAPK2 (WT)、SAPK2 (M1-S308) および SAPK2 (K33A) の結晶化を試みたが、現時点で結晶は得られなかった。SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) は大腸菌の中で不均一にリン酸化されていたことから、この不均一なリン酸化が結晶化しない原因の 1 つであると考えた。そこで、リン酸化活性がほとんどなく、ほぼリン酸化されていない SAPK2 (K33A) についても結晶化に供したが、結晶は得られなかった。このことから、リン酸化の有無以外に、精製したタンパク質の性質の方が、結晶化しない大きな要因であると考えられた。結晶化に用いるタンパク質濃度は、通常 5 mg/ml 以上であるが、SAPK2 およびその変異体タンパク質は濃縮により濃度が高くなると凝集し沈殿する傾向にある。また、沈殿せずに 5 mg/ml 以上まで濃縮できても、結晶化に用いるタンパク質濃度を検討するための Pre-Crystallization Test を行くと、5 mg/ml 以下の濃度でも結晶化するには濃すぎるという

結果となった。これらの結果から、Buffer 条件の検討およびタンパク質の濃縮条件の検討が必要であると考えられる。また、今回はすべて 20 °C で結晶化を行ったので、4 °C での結晶化も検討の余地がある。

## 5-2. NMR による SAPK2 C 末端領域の構造解析の検討

SAPK2 の C 末端領域は SAPK2 の機能発現に重要な役割を担っていると予想されているが、その分子機能は未知の部分が多い。この領域 (SAPK2 (P284-L339)) について NMR を用いた構造解析を検討した。図 20 に示した実験から、SAPK2 (P284-L339) は明確な立体構造を保持していないことを示唆する結果が得られた。今回の測定に用いた SAPK2 (P284-L339) は、立体構造を持たないと推察される Gateway 由来の余分な配列が N 末端側に 30 残基ほど残っている。56 残基からなる SAPK2 (P284-L339) に対してこれらの配列が占める割合は大きいと考えられる。この結果、この部分のシグナルが中心に集まって SAPK2 (P284-L339) の部分に対応するシグナルを見えにくくすることで、見かけ上明確な立体構造を保持していないという結果が得られた可能性もわずかではあると考えられる。SAPK2 (P284-L339) が明確な立体構造を保持しているかどうかの結論を出すためには、前述したようにプロテアーゼサイトの検討を行い、SAPK2 (P284-L339) の部分だけでもう一度測定をする必要がある。これに加えて、ドメインの最適化も検討する必要があるかもしれない。また、SAPK2 だけでなく、他の SAPK メンバーの C 末端領域についての検討が有用かもしれない。

SAPK2 (P284-L339) に SAPK2 (M1-S308) を加え、SAPK2 (P284-L339) の NMR シグナルの変化を観測した。この結果、SAPK2 C 末端領域がキナーゼドメインと相互作用する可能性を示唆する結果が得られた。しかし、SAPK2 (M1-S308) を加えることで SAPK2 (P284-L339) に劇的な変化が起こったとは言いがたい。今回の実験に用いたキナーゼドメイン (SAPK2 (M1-S308)) と C 末端領域 (SAPK2 (P284-L339)) には 25 残基の重複がある。さらに、SAPK2 (P284-L339) は、Gateway 由来の余分な配列が N 末端側に 30 残基ほど余分についている。実際には、SAPK2 のキナーゼドメインと C 末端領域は相互作用しているけれども、これらの重複部分や余分な配列が物理的な妨げとなって、相互作用の形成を阻害している可能性も考えられる。このため、重複がないように SAPK2 キナーゼドメインおよび SAPK2 C 末端ドメインについて、ドメインの最適化を検討し、再実験を行う必要がある。SAPK2 のキナーゼドメインと C 末端領域が相互作用している場合は、SAPK2 (P284-L339) と、単独では不溶性であった SAPK2 (M1-T283) を共精製することで可溶化する可能性も残されている。この共精製についても検討の余地がある。

## 6. SAPK2 の立体構造と機能との相関

SAPK2 と 2HAK のキナーゼドメイン (それぞれ M1-F260 と G37-M304) は 41 % のアミノ酸が同一であったが、C 末端領域 (それぞれ L261-L339 と N305-K371) では 13 % しか同一でない。このため、キナーゼドメインに関しては、モデリング構造と実際の高次構造にあまり差異はないと推察できるが、C 末端領域についてはモデリング構造が正しいかどうかの議論は難しい。しかし、二次構造予測の結果を踏まえると、C 末端領域に  $\alpha$ -ヘリックスが存在する可能性は高い。特に、Alignment Interface の両モデリング構造で予想された 286 番

目のグルタミンから 295 番目のイソロイシンまでの  $\alpha$ -ヘリックスは、多少の前後や長さの違いはあっても、実際に存在するのではないと思われる。

テンプレートとした 2HAK では、キナーゼドメインの N 末端側で活性部位の裏側 (N-lobes) に、C 末端側の UBA (ubiquitin-associated) ドメインが相互作用しているという構造が見られる (図 22 (A); Marx et al., 2006)。UBA ドメインはいくつかのタンパク質においてユビキチンと相互作用することがわかっているドメインであるが、2HAK の UBA ドメインは、他のタンパク質の UBA ドメインがユビキチンと相互作用する位置で N-lobes と相互作用している (Marx et al., 2006; Panneerselvam et al., 2006)。SAPK2 のモデリング構造でも、Alignment Interface 1 および 2 で、テンプレートに合わせて C 末端側は同様に N 末端側と相互作用するような構造が得られた (図 22 (B) および (C))。2HAK の N-lobes と UBA ドメインの相互作用は、疎水性相互作用であると報告されている (Marx et al., 2006; Panneerselvam et al., 2006)。それに対して、SAPK2 の C 末端領域は酸性アミノ酸に富んでいる。特に SAPK2 の最も C 末端側で N 末端との相互作用に重要ではないかと考えられる  $\alpha$ -ヘリックスは、酸性パッチと呼ばれる SnRK2 プロテインキナーゼに特有の酸性アミノ酸が多い領域とほぼ一致する。一方、First Approach 1 および 2 では C 末端領域がモデリングされていないため、キナーゼドメインの N 末端側は表面に露出する形となっており、Alignment Interface 1 および 2 で C 末端側と相互作用すると予想された領域には塩基性アミノ酸が多いことがわかった。このことから、SAPK2 の キナーゼドメインの N 末端側と C 末端側は静電的相互作用により相互作用しているという可能性が考えられる。よって SAPK2 では、2HAK で見られるのとは異なる様式で N 末端側と C 末端側領域が相互作用していることが推察される。

二次構造予測では、キナーゼドメインと C 末端領域の境界部分に 2HAK では見られない  $\alpha$ -ヘリックスが予測されており、モデリング構造においても 265 番目のプロリンから 268 番目のイソロイシンまでが  $\alpha$ -ヘリックスであると予測されている。このことから、SAPK2 のキナーゼドメインの末端から C 末端領域の最初にかけての構造は、2HAK と全く異なっている可能性も高い。SnRK2 ファミリーで高度に保存されている領域が 265 番目のプロリンまでであること、および、他のプロテインキナーゼと相溶性が高い部分もこの周辺までであることを考慮し、SAPK2 のキナーゼドメインとして SAPK2 (M1-P265) のサブクローニングおよび発現を行った。しかし、このタンパク質は可溶性画分に得られなかった。この原因の 1 つとしては、前述したように、二次構造の途中で欠失させたという可能性が挙げられる。そこで、二次構造予測の結果を考慮して、SAPK2 (M1-T283) および SAPK2 (M1-S308) のサブクローニングおよび発現を行った。その結果、SAPK2 (M1-T283) は可溶性画分に得られなかったが、SAPK2 (M1-S308) は可溶性画分に得られた。これら大腸菌での発現実験の結果から、SAPK2 の 265 番目のプロリンおよび 283 番目のスレオニンとその周辺のアミノ酸は、予想に反して二次構造の形成に関わっている可能性が考えられた。この結果と SnRK2 プロテインキナーゼの活性を結びつける興味深い報告がなされている。シロイヌナズナの SnRK2 プロテインキナーゼ OST1/SRK2E では、C 末端領域の一部もしくは全体を欠失させた変異体を培養細胞あるいは大腸菌で発現させ、そのリン酸化活性が調べられた (Yoshida et al., 2006; Belin et al., 2006)。C 末端領域のドメイン 2 のみを欠失させると、ABA による活性化のみが起こらなくなる一方で、C 末端領域全体を欠失すると浸透圧ストレスおよび ABA による活性化の両方が起こらなくなった (Yoshida et al., 2006)。また、大腸菌で発現させた場合、

ドメイン 2 の一部あるいは全体を欠失させてもリン酸化活性が見られたが、それに加えてドメイン 1 の一部あるいは全体を欠失させるとリン酸化活性が失われた (Belin et al., 2006)。SAPK2 では、I266-P301 がドメイン 1 に、G302-L339 がドメイン 2 に相当する。言い換えれば、SAPK2 (M1-T283) はドメイン 1 の一部とドメイン 2 全体を欠失した変異体、SAPK2 (M1-S308) はドメイン 2 を欠失した変異体とほぼ一致している。大腸菌で発現させた OST1/SRK2E の C 末端欠失変異体は、SAPK2 の場合と異なり、すべて可溶性画分に得られていた (Belin et al., 2006)。OST1/SRK2E における結果から、SnRK2 プロテインキナーゼ C 末端領域のドメイン 1 は SnRK2 のキナーゼ活性に必須であると考えられた (Belin et al., 2006)。これらの結果と本研究の結果を合わせて考えると、C 末端領域のドメイン 1 は、SnRK2 プロテインキナーゼのキナーゼドメインの構造維持に関わっており、ドメイン 1 がなくなるとキナーゼドメインの構造が維持できなくなり、その結果としてリン酸化活性が失われるという仮説が成り立つ。また、SAPK2 の C 末端領域ドメイン 1 の実際の構造は、テンプレートとした 2HAK や二次構造予測結果と異なっていることも示唆される。構造とリン酸化活性の相関の観点から、SAPK2 の構造、特にこの C 末端領域ドメイン 1 の構造の解明が期待される。

表 1 TOPO クローニングに用いたプライマー

コンストラクト	方向	プライマー名 : 配列 (5' to 3')
EK-SAPK2 (M1-L339)	センス	SAPK2_M1FEk : CACCGACGACGACGACAAGATGGAGAGGTACGAGGTGAT
	アンチセンス	SAPK2_L339R : TCACAATGCGCACACG
PreS-SAPK2 (M1-L339)	センス	SAPK2_M1FPreS : CACCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATGGAGAGGTACGAGGTGAT
	アンチセンス	SAPK2_L339R : TCACAATGCGCACACG
EK-SAPK2 (M1-P265)	センス	SAPK2_M1FEk : CACCGACGACGACGACAAGATGGAGAGGTACGAGGTGAT
	アンチセンス	SAPK2_P265R : CTACGGCAGGTTCTTGAGG
PreS-SAPK2 (M1-T283)	センス	SAPK2_M1FPreS : CACCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATGGAGAGGTACGAGGTGAT
	アンチセンス	SAPK2_T283R : CTAGGTGTTGATGTCGTTTCATC
PreS-SAPK2 (M1-S308)	センス	SAPK2_M1FPreS : CACCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATGGAGAGGTACGAGGTGAT
	アンチセンス	SAPK2_S308R : CTAGGAGAATTTGGAGCCATC
FacXa-SAPK2 (P284-L339)	センス	SAPK2_P284FXa : CACCATCGAAGGTCGTCCGTCACAGGGCCTG
	アンチセンス	SAPK2_L339R : TCACAATGCGCACACG
PreS-SAPK2 (K33A)	センス	SAPK2_M1FPreS : CACCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATGGAGAGGTACGAGGTGAT
	アンチセンス	SAPK2_L339R : TCACAATGCGCACACG

表 2 発現ベクターと大腸菌

発現ベクター	タグ	大腸菌
pGEX-5X-1-SAPK2 (WT)	GST	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS 株
pDEST-his-EK-SAPK2 (WT)	His <sub>6</sub>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS 株
pDEST-trx-EK-SAPK2 (WT)	Trx-His <sub>6</sub>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS 株
pDEST-trx-PreS-SAPK2 (WT)	Trx-His <sub>6</sub>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) 株
pDEST-trx-PreS-SAPK2 (WT)	Trx-His <sub>6</sub>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS 株
pDEST-trx-EK-SAPK2 (M1-P265)	Trx-His <sub>6</sub>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS 株
pDEST-trx-PreS-SAPK2 (M1-T283)	Trx-His <sub>6</sub>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS 株
pDEST-trx-PreS-SAPK2 (M1-S308)	Trx-His <sub>6</sub>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS 株
pDEST-trx-FacXa-SAPK2 (P284-L339)	Trx-His <sub>6</sub>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS 株
pDEST-trx-PreS-SAPK2 (K33A)	Trx-His <sub>6</sub>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS 株



表 3 M9 培地の組成

試薬	終濃度
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.8 %
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.3 %
$\text{NaCl}$	0.05 %
glycerol	0.5 %
D(+)-glucose	0.4 %
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	0.05 %
$\text{MgSO}_4$	1 mM
$\text{MnCl}_2$	50 $\mu\text{M}$
$\text{CaCl}_2$	0.1 mM
$\text{FeCl}_3$	3.3 $\mu\text{M}$
ampicillin	50 $\mu\text{g} / \text{ml}$
adenosine	0.002 %
guanosine	0.002 %
cytidine	0.002 %
thymine	0.002 %
biotin	0.002 %
thiamin hydrochloride	0.002 %

表 4 二次元電気泳動の通電条件		
段階	電圧 (V)	時間 (分)
1	175	20
2	175～2000	45
3	2000	30

表 5 検討した結晶化条件

試料タンパク質	スクリーニングキット	条件数	合計
SAPK2 (WT)	Wizaed I (Emerald BioSystems)	48	290 条件
	Wizaed II (Emerald BioSystems)	48	
	Crystal Screen I (Hanpton Research)	50	
	Crystal Screen II (Hanpton Research)	48	
	Natrix (Hanpton Research)	48	
	PEG/Ion Screen (Hanpton Research)	48	
SAPK2 (M1-S308)	Wizaed I (Emerald BioSystems)	48	144 条件
	Wizaed II (Emerald BioSystems)	48	
	Wizaed III (Emerald BioSystems)	48	
SAPK2 (K33A)	Crystal Screen I (Hanpton Research)	50	98 条件
	Crystal Screen II (Hanpton Research)	48	

**表 6 NMR 測定に用いたタンパク質の濃度および buffer 条件**

試料タンパク質	濃度 (mM)	buffer 条件
<sup>15</sup> N-Trx-His <sub>6</sub> -SAPK2 (P284-L339)	0.25	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl
<sup>15</sup> N-Trx-His <sub>6</sub> tag	0.23	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl
<sup>15</sup> N-SAPK2 (P284-L339)	0.16	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl
<sup>15</sup> N-SAPK2 (P284-L339) + non-SAPK2 (M1-S308)	0.09 + 0.18	20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl

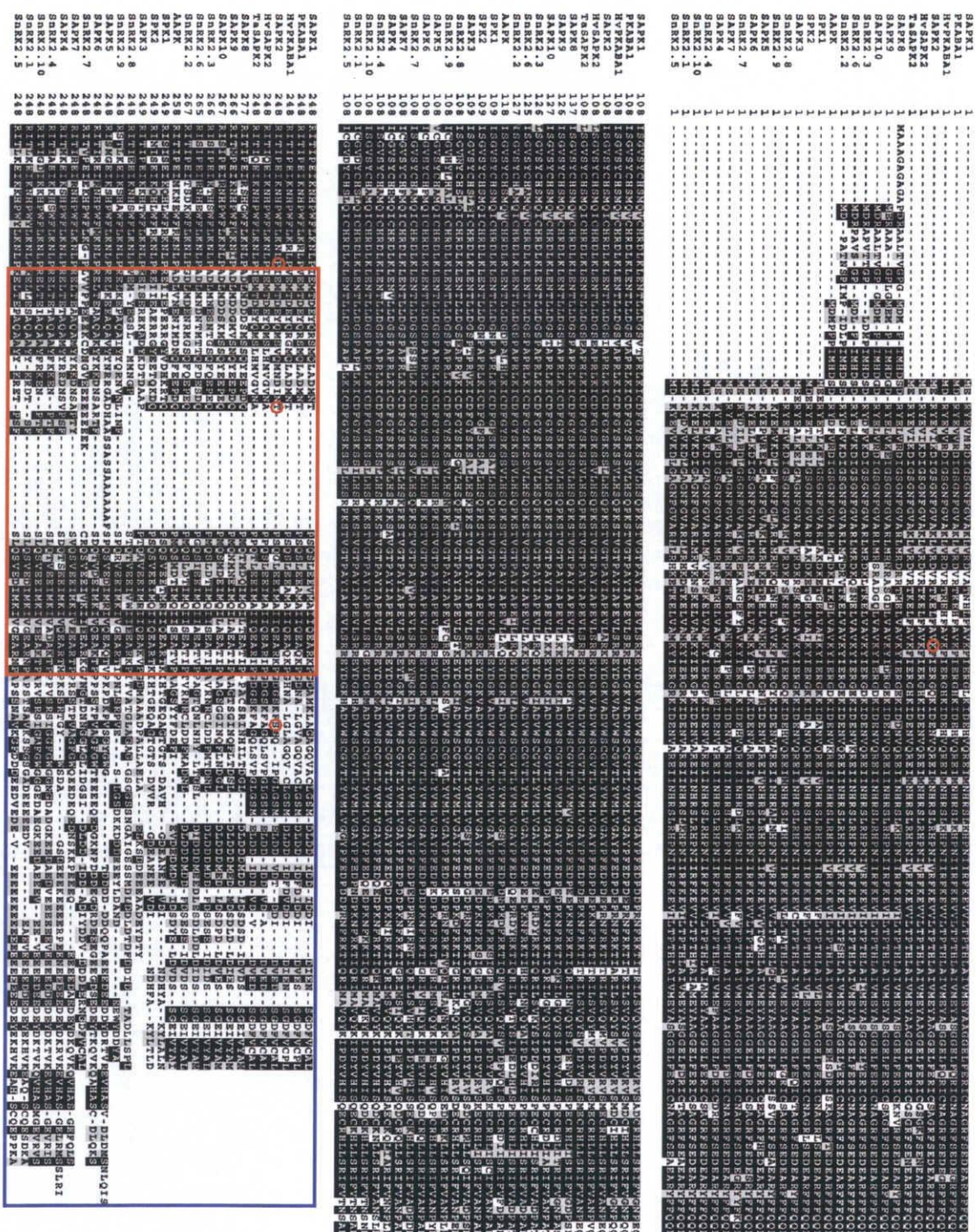


図 1 イネおよびシロイヌナズナ SnRK2 プロテインキナーゼファミリーメンバーのアミノ酸配列のアライメント

同一のアミノ酸残基は黒で囲み、類似の残基は灰色で影をつけた。また、C 末端領域のドメイン 1 を  で、ドメイン 2 を  で囲んだ。また、SAPK2 の K33、P265、T283 および S308 の各残基を  で囲んだ。



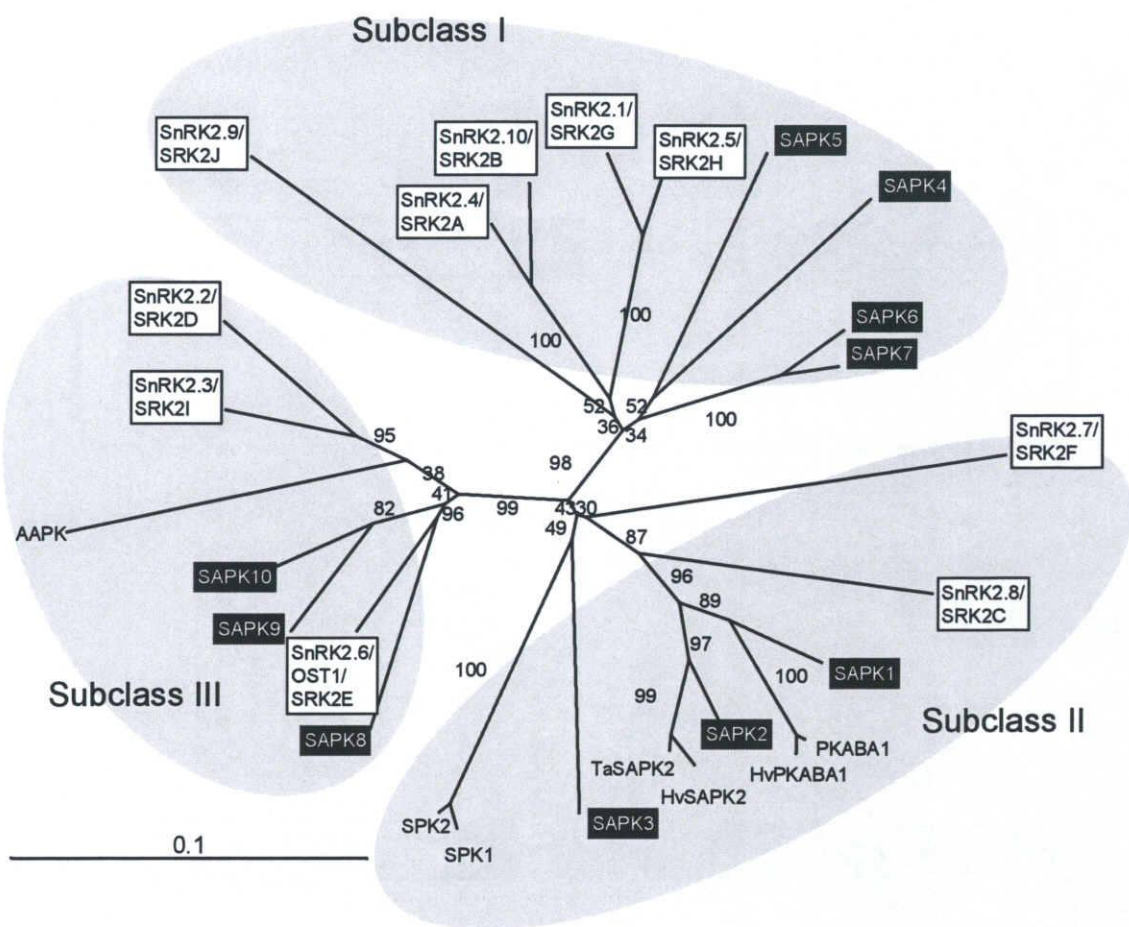
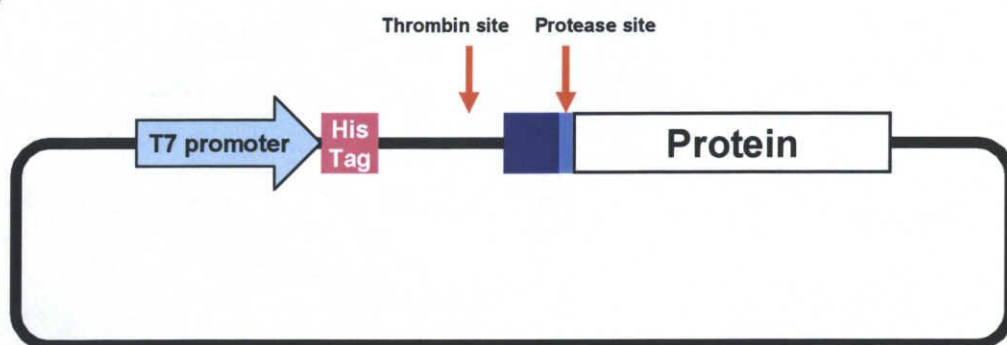


図 2 イネおよびシロイヌナズナ SnRK2 プロテインキナーゼファミリーメンバーの系統関係

イネおよびシロイヌナズナの全 SnRK2 メンバーと他の種で機能解析が行われたメンバーのアミノ酸配列 (SAPK1 の 1 ~ 268 のアミノ酸残基に相当) を基に系統樹を作成した。イネおよびシロイヌナズナメンバーはそれぞれ黒と白の背景で強調した。系統樹内の数値は Bootstrap (%) を表す。シロイヌナズナメンバーの命名は PlantsP database (<http://plantsp.sdsc.edu/>; Hrabak et al., 2003) に記載されているものを採用した。SnRK2.6 は OST1/SRK2E と名づけられている。シロイヌナズナメンバーの AGI 遺伝子番号は次のとおりである。SnRK2.1 (At5g08590), SnRK2.2 (At3g50500), SnRK2.3 (At5g66880), SnRK2.4 (At1g10940), SnRK2.5 (At5g63650), SnRK2.6/OST1/SRK2E (At4g33950), SnRK2.7 (At4g40010), SnRK2.8 (At1g78290), SnRK2.9 (At2g23030), SnRK2.10 (At1g60940)。他の種メンバーの GenBank アクセッション番号は次のとおりである。AAPK (AAF27340), PKABA1 (BAB61735), HvPKABA1 (BAB61735), SPK1 (L01453), SPK2 (L19360), SAPK1 (AB125302), SAPK2 (AB125303), SAPK3 (AB125304), SAPK4 (AB125305), SAPK5 (AB125306), SAPK6 (AB125307), SAPK7 (AB125308), SAPK8 (AB125309), SAPK9 (AB125310), SAPK10 (AB125311)。TaSAPK2 と HvSAPK2 の全長配列は EST 部分配列をつなげることで得た (TaSAPK2 は BJ251841 および BJ317817, HvSAPK2 は AV834998, BJ471725 および BJ463508)。

(A)



(B)

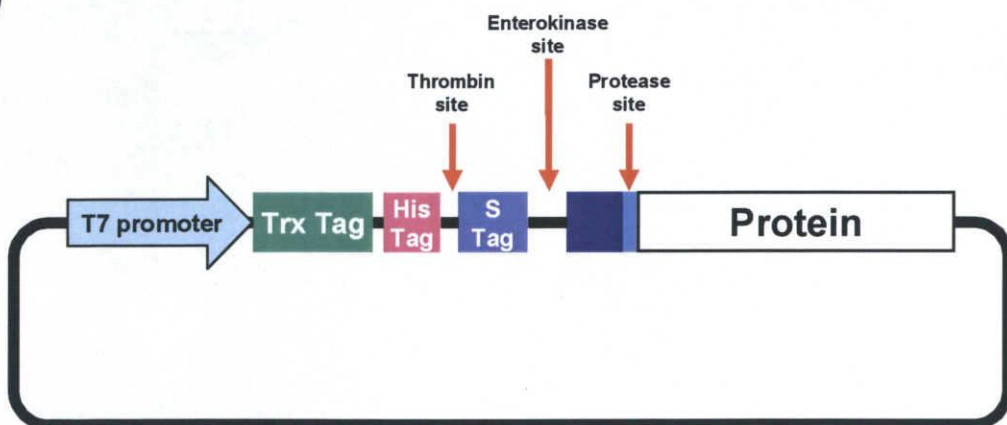


図 3 発現ベクターの模式図

(A) pDEST-his の模式図。■ は Gateway 由来の配列を示した。また、■ は任意に導入したプロテアーゼサイトを示した。

(B) pDEST-trx の模式図。(A) と同様に示した。

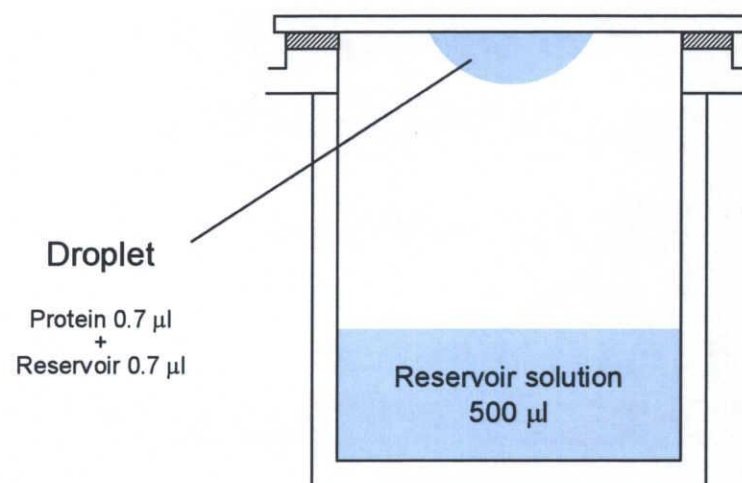


図 4 ハンギングドロップ蒸気拡散法の模式図



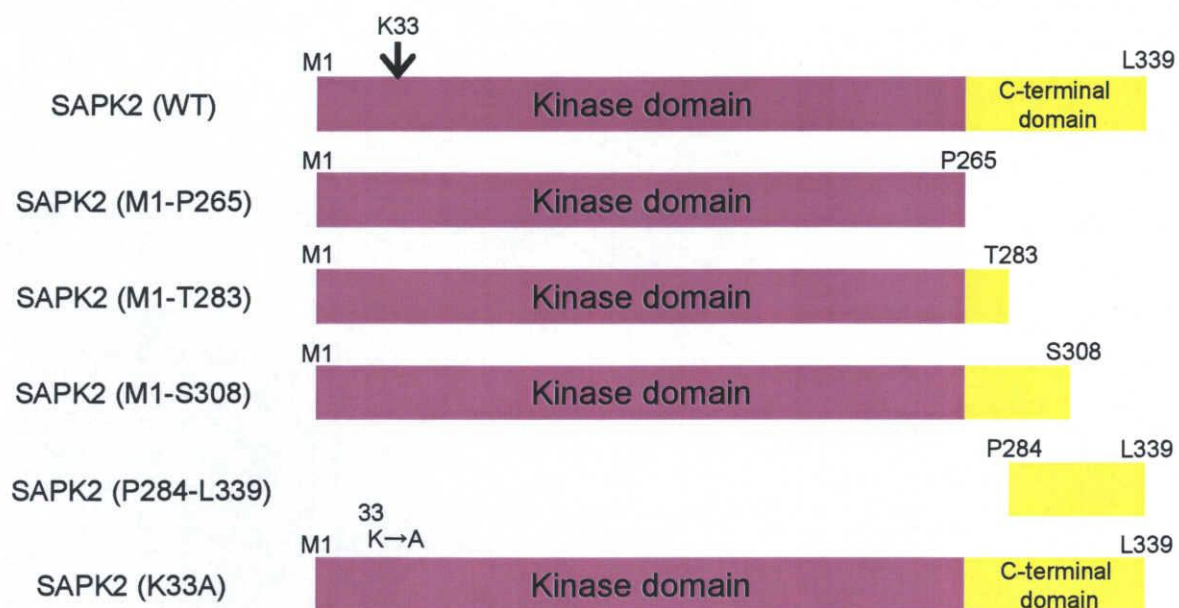


図5 発現および精製を試みた SAPK2 (WT) およびその変異体のドメイン構造の模式図  
SAPK2 のキナーゼドメインをピンクで、C 末端ドメインを黄色で示した。

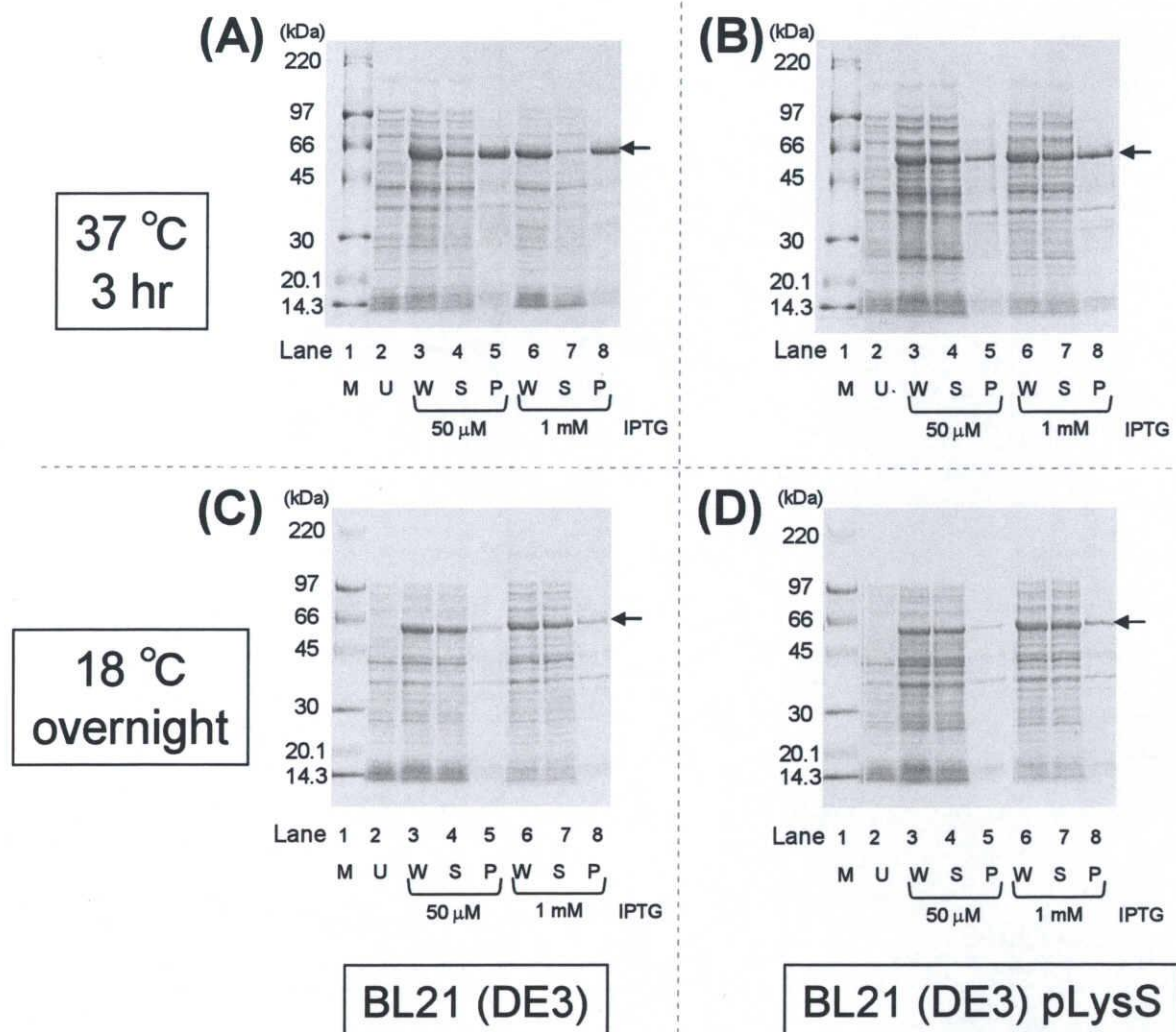


図 6 大腸菌発現株および培養条件の検討

SAPK2 (WT) の発現に用いる大腸菌株、IPTG 濃度および培養条件の検討における SDS-PAGE の結果。SDS-PAGE は 5-20 % ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ分子量マーカー (M)、融合タンパク質誘導前 (U)、誘導後 (W)、超音波破碎後の可溶性画分 (S)、超音波破碎後の不溶性画分 (P) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (WT) タンパク質を示す。

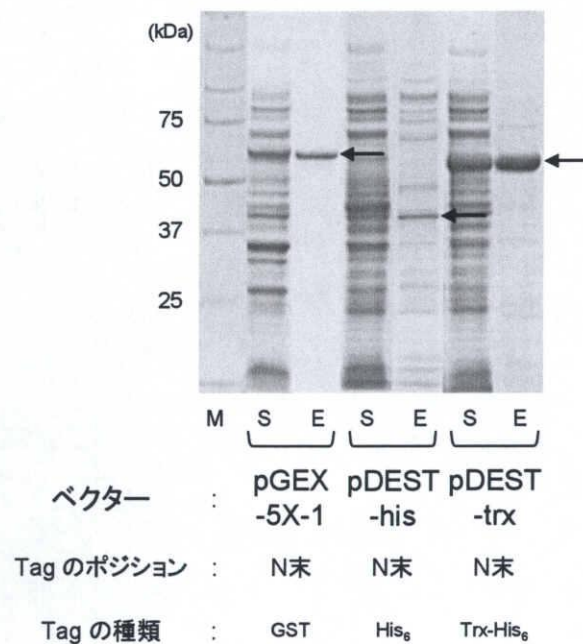
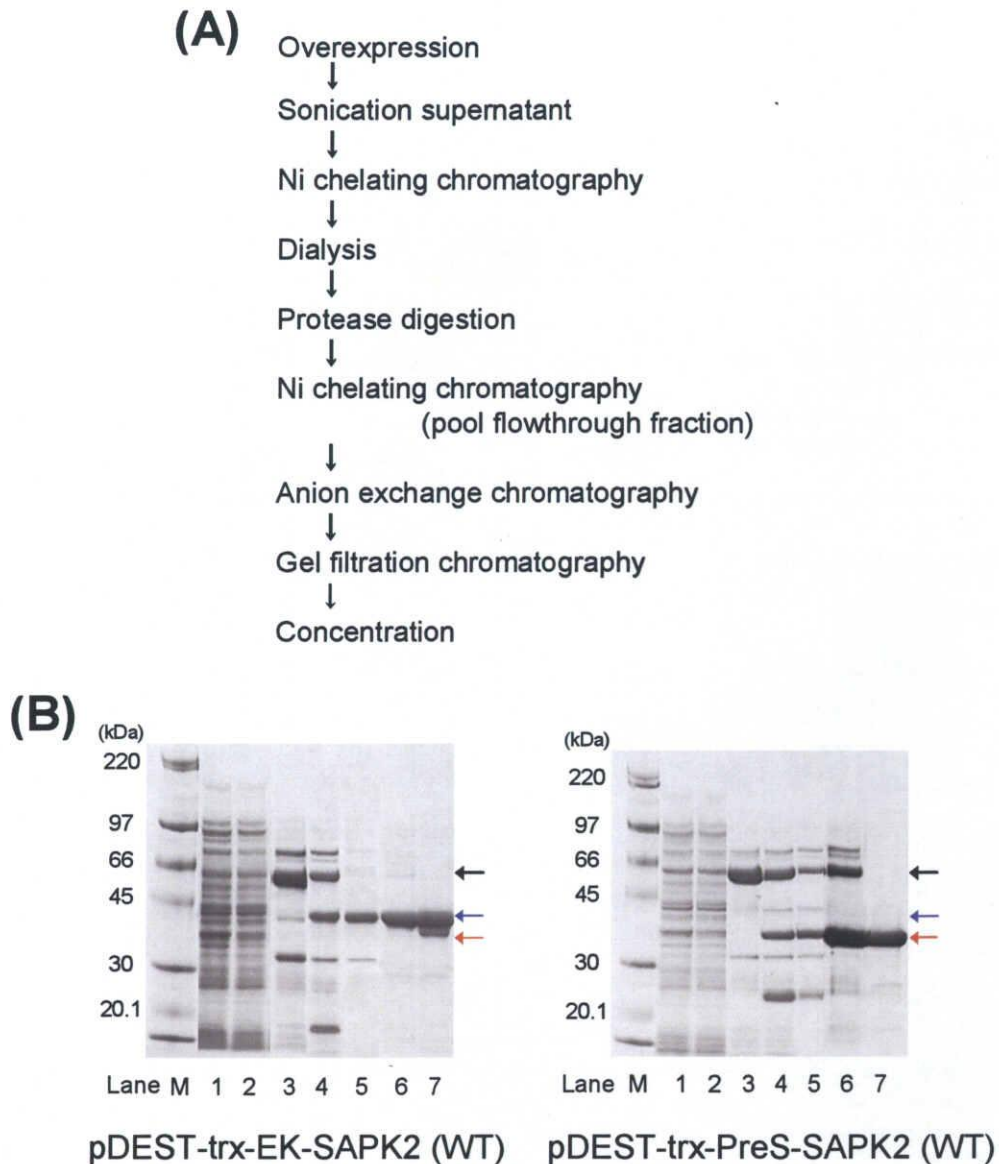


図 7 発現ベクターの検討

SAPK2 (WT) の発現に用いる発現ベクターの検討における SDS-PAGE の結果。SDS-PAGE は 5-20 % ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ分子量マーカー (M)、超音波破碎後の可溶性画分 (S)、アフィニティーカラムの溶出画分 (E) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (WT) タンパク質を示す。

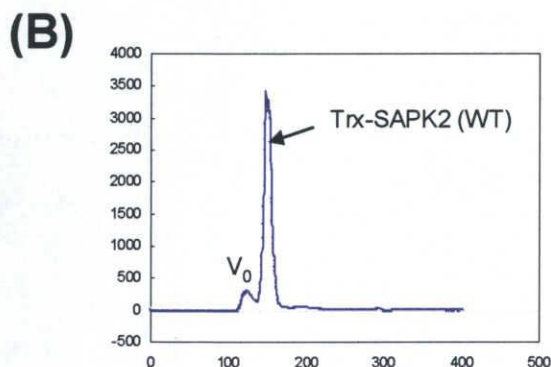
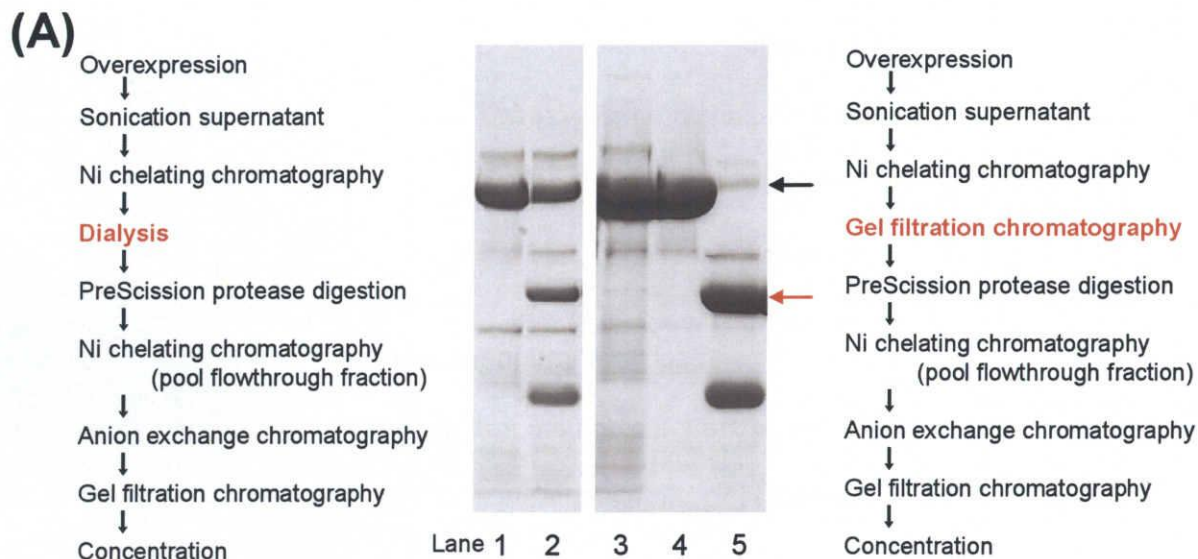


**図 8 プロテアーゼサイトの検討**

(A) SAPK2 (WT) の直上に導入するプロテアーゼサイトの検討を行った際の精製プロトコール。

(B) (A) のプロトコールに従い精製を行った時の SAPK2 (WT) 各精製段階における SDS-PAGE 結果。SDS-PAGE は 5-20 % ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ分子量マーカー (M)、融合タンパク質誘導後 (Lane 1)、超音波破砕後の可溶性画分 (Lane 2)、Ni chelating カラムを用いた精製後 (Lane 3)、プロテアーゼ処理後 (Lane 4)、Ni chelating カラム非吸着画分 (Lane 5)、陰イオン交換カラムを用いた精製後 (Lane 6)、最後のゲルろ過精製後 (Lane 7) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (WT) タンパク質、← は EK 処理により切断された推定分子マス 38.5 kDa よりも大きい SAPK2 タンパク質、← は PreS 処理により切断された推定分子マス 38.5 kDa とほぼ一致する SAPK2 タンパク質を示す。

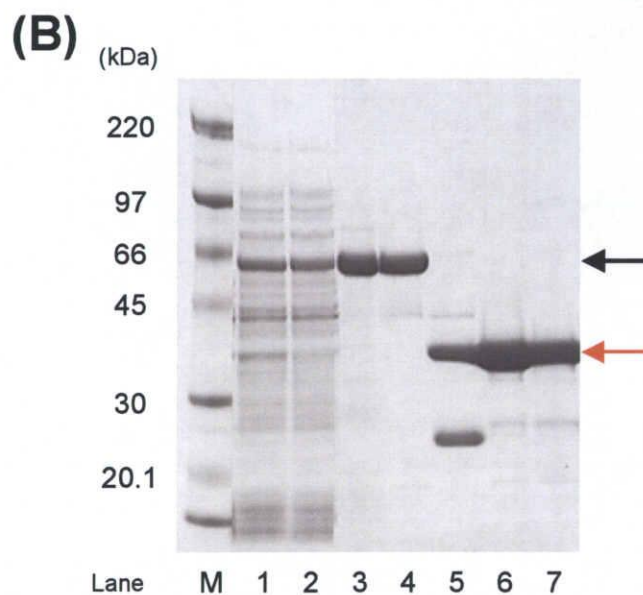
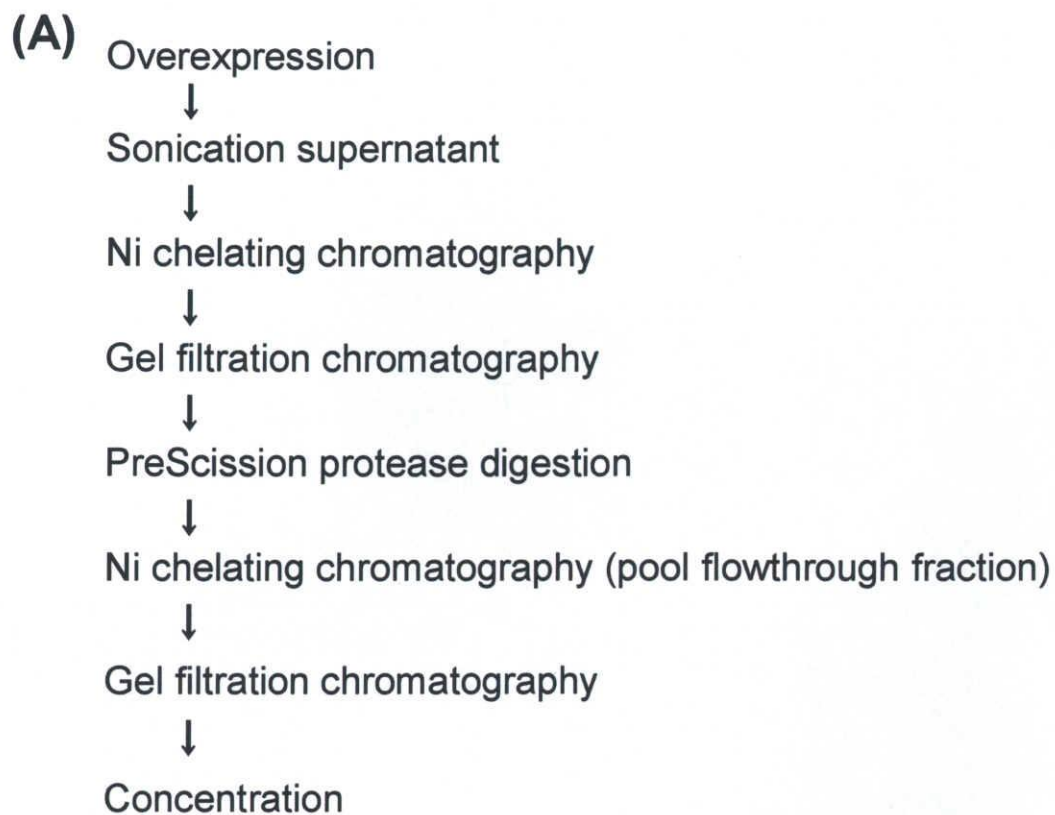




**図 9 Ni chelating カラム精製後のゲルろ過精製により、プロテアーゼ処理の消化効率が向上する**

(A) Ni chelating カラム精製後の処理の違いによる SAPK2 (WT) の PreS 処理の消化効率を比較した。精製プロトコールおよびプロテアーゼ処理前後における SDS-PAGE の結果を示した。SDS-PAGE は 5-20 % ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ Ni chelating カラムを用いた精製後 (Lane 1 および 3)、透析後の PreS 処理 (Lane 2)、Ni chelating カラム精製後のゲルろ過精製 (Lane 4)、ゲルろ過精製後の PreS 処理 (Lane 5) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (WT) タンパク質、→ は SAPK2 (WT) を示す。

(B) Ni chelating カラム精製後のゲルろ過精製のクロマトグラム。 $V_0$  は排除限界を示す。

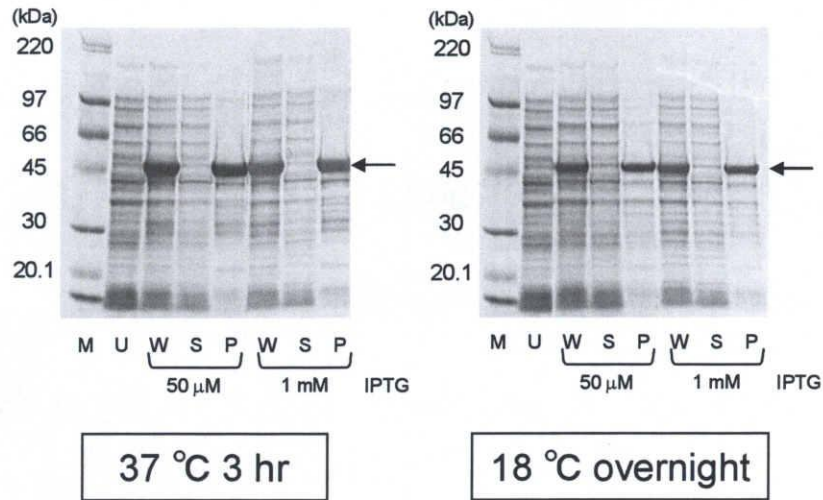


**図 10 SAPK2 (WT) の最終精製プロトコールおよび精製結果**

(A) SAPK2 (WT) の最終精製プロトコール。

(B) SAPK2 (WT) 各精製段階における SDS-PAGE の結果。SDS-PAGE は 5-20 % ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンそれぞれ分子重量マーカー (M)、融合タンパク質誘導後 (Lane 1)、超音波破碎後の可溶性画分 (Lane 2)、Ni chelating カラムを用いた精製後 (Lane 3)、ゲルろ過精製後 (Lane 4)、PreS 処理後 (Lane 5)、Ni chelating カラム非吸着画分 (Lane 6)、最後のゲルろ過精製後 (Lane 7) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (WT) タンパク質、← は SAPK2 (WT) を示す。

(A)



(B)

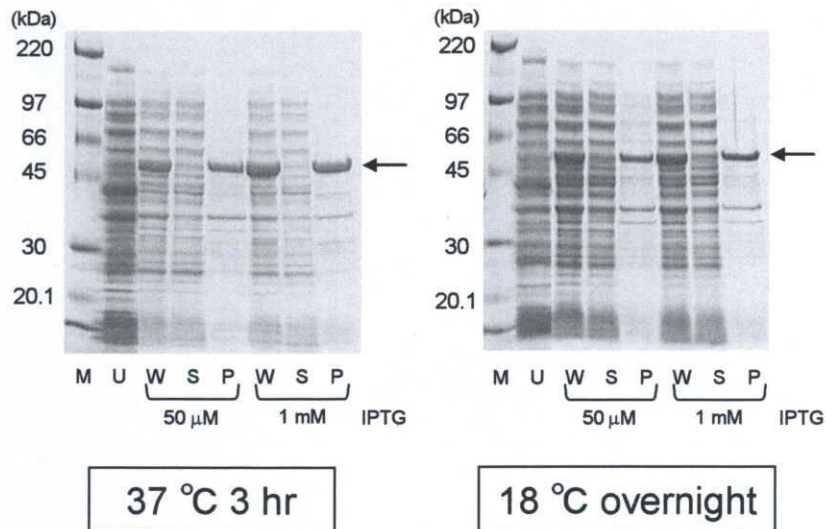
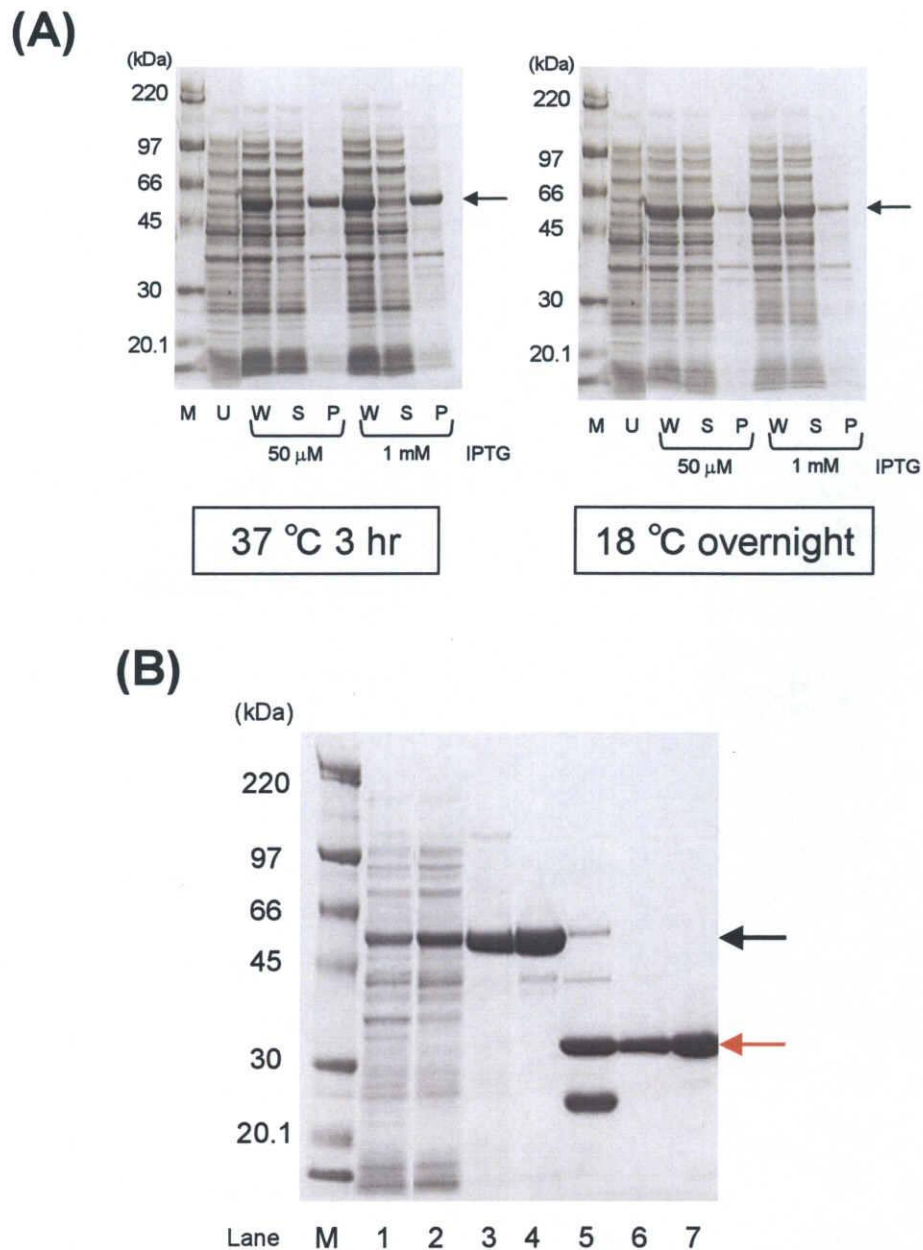


図 11 SAPK2 (M1-P265) および SAPK2 (M1-T283) の発現と可溶化の確認

(A) SAPK2 (M1-P265) の発現および可溶化を確認した SDS-PAGE の結果。SDS-PAGE は 5-20 % ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ分子量マーカー (M)、融合タンパク質誘導前 (U)、誘導後 (W)、超音波破碎後の可溶性画分 (S)、超音波破碎後の不溶性画分 (P) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (M1-P265) タンパク質を示す。

(B) SAPK2 (M1-T283) の発現および可溶化を確認した SDS-PAGE の結果。SDS-PAGE は 5-20 % ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ分子量マーカー (M)、融合タンパク質誘導前 (U)、誘導後 (W)、超音波破碎後の可溶性画分 (S)、超音波破碎後の不溶性画分 (P) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (M1-T283) タンパク質を示す。





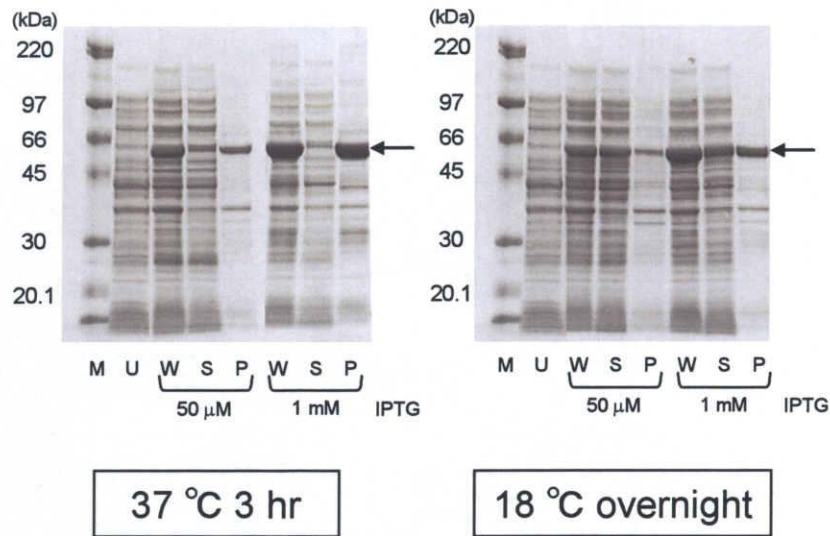
**図 12 SAPK2 (M1-S308) の発現と可溶化の確認および精製結果**

(A) SAPK2 (M1-S308) の発現および可溶化を確認した SDS-PAGE の結果。SDS-PAGE は 5-20 % ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ分子量マーカー (M)、融合タンパク質誘導前 (U)、誘導後 (W)、超音波破碎後の可溶性画分 (S)、超音波破碎後の不溶性画分 (P) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (M1-S308) タンパク質を示す。

(B) SAPK2 (M1-S308) 各精製段階における SDS-PAGE の結果。SDS-PAGE は 5-20 % ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ分子量マーカー (M)、融合タンパク質誘導後 (Lane 1)、超音波破碎後の可溶性画分 (Lane 2)、Ni chelating カラムを用いた精製後 (Lane 3)、ゲルろ過精製後 (Lane 4)、PreS 処理後 (Lane 5)、Ni chelating カラム非吸着画分 (Lane 6)、最後のゲルろ過精製後 (Lane 7) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (M1-S308) タンパク質、→ は SAPK2 (M1-S308) を示す。



(A)



(B)

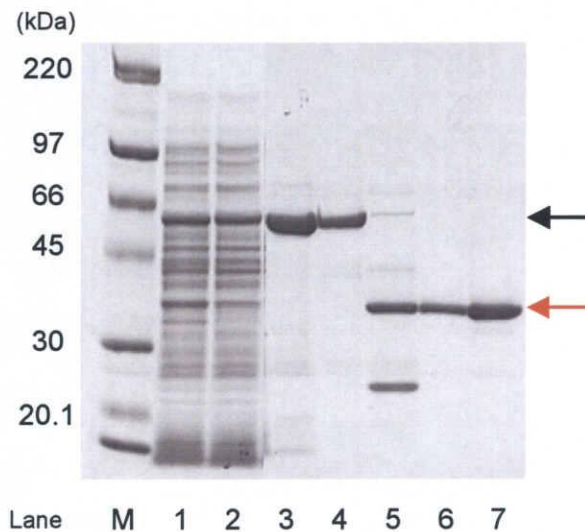


図 13 SAPK2 (K33A) の発現と可溶化の確認および精製結果

(A) SAPK2 (K33A) の発現および可溶化を確認した SDS-PAGE の結果。SDS-PAGE は 5-20 % ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ分子量マーカー (M)、融合タンパク質誘導前 (U)、誘導後 (W)、超音波破碎後の可溶性画分 (S)、超音波破碎後の不溶性画分 (P) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (K33A) タンパク質を示す。

(B) SAPK2 (K33A) 各精製段階における SDS-PAGE の結果。SDS-PAGE は 5-20 % ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ分子量マーカー (M)、融合タンパク質誘導後 (Lane 1)、超音波破碎後の可溶性画分 (Lane 2)、Ni chelating カラムを用いた精製後 (Lane 3)、ゲルろ過精製後 (Lane 4)、PreS 処理後 (Lane 5)、Ni chelating カラム非吸着画分 (Lane 6)、最後のゲルろ過精製後 (Lane 7) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (K33A) タンパク質、→ は SAPK2 (K33A) を示す。

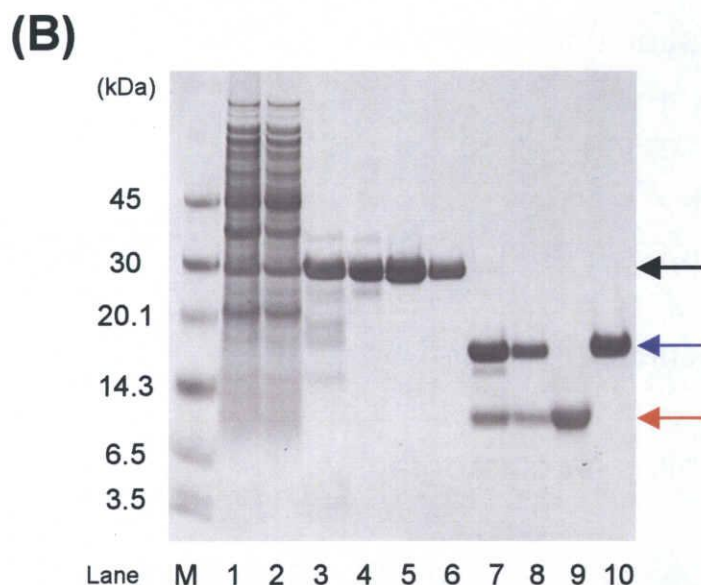
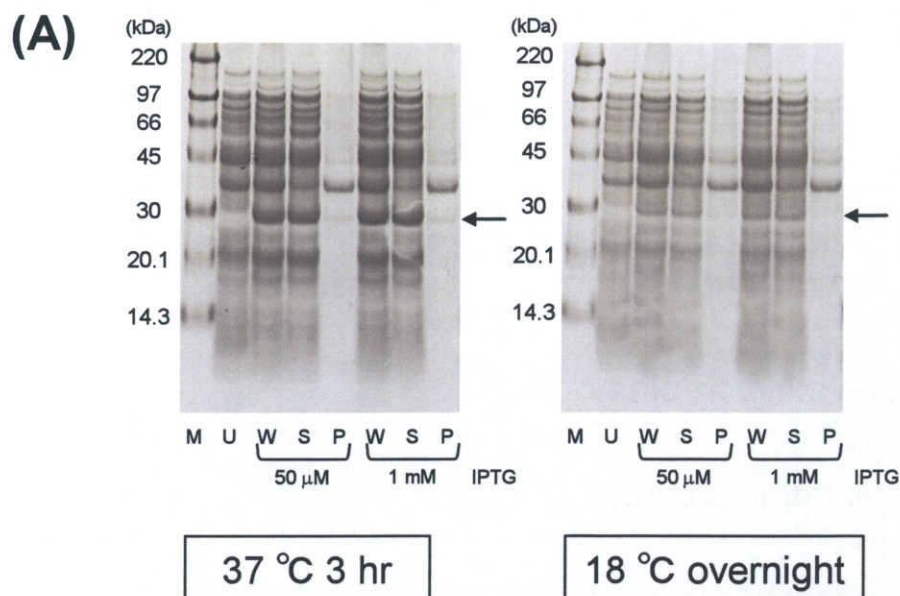


図 14 SAPK2 (P284-L339) の発現と可溶化の確認および精製結果

(A) SAPK2 (P284-L339) の発現および可溶化を確認した SDS-PAGE の結果。SDS-PAGE は 15 % ポリアクリルアミドゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ分子量マーカー (M)、融合タンパク質誘導前 (U)、誘導後 (W)、超音波破碎後の可溶性画分 (S)、超音波破碎後の不溶性画分 (P) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (P284-L339) タンパク質を示す。

(B) SAPK2 (P284-L339) 各精製段階における SDS-PAGE の結果。SDS-PAGE は 15 % ポリアクリルアミドゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ分子量マーカー (M)、融合タンパク質誘導後 (Lane 1)、超音波破碎後の可溶性画分 (Lane 2)、Ni chelating カラムを用いた精製後 (Lane 3)、1 回目のゲルろ過精製後 (Lane 4)、陰イオン交換カラム精製後 (Lane 5)、2 回目のゲルろ過精製後 (Lane 6)、EK 処理後 (Lane 7)、3 回目のゲルろ過精製後 (Lane 8)、Ni chelating カラム非吸着画分 (Lane 9)、Ni chelating カラム精製の溶出画分 (Lane 10) を示す。← は Trx-His<sub>6</sub> 融合 SAPK2 (P284-L339) タンパク質、← は Trx-His<sub>6</sub> タグ、← は SAPK2 (P284-L339) を示す。

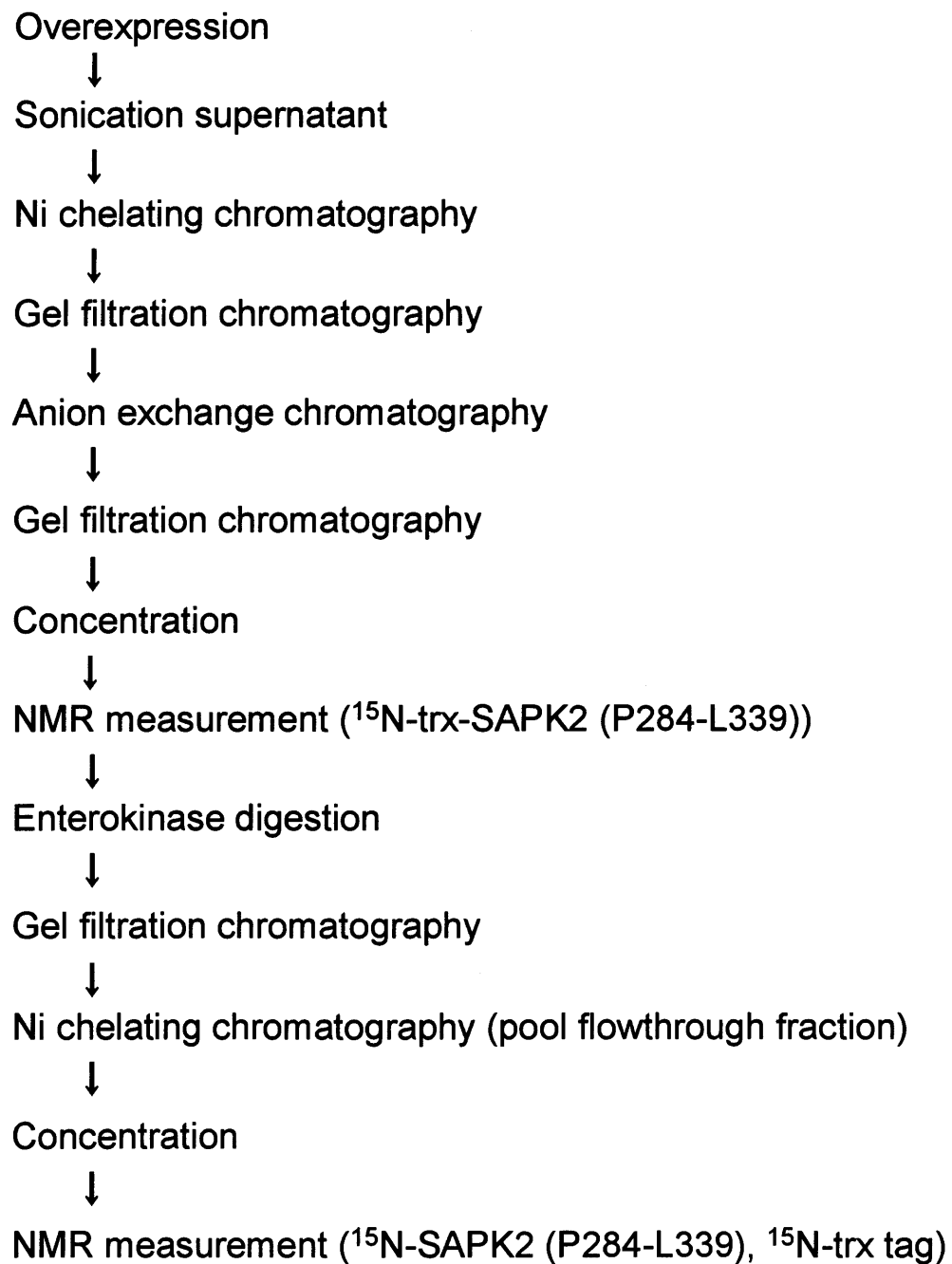
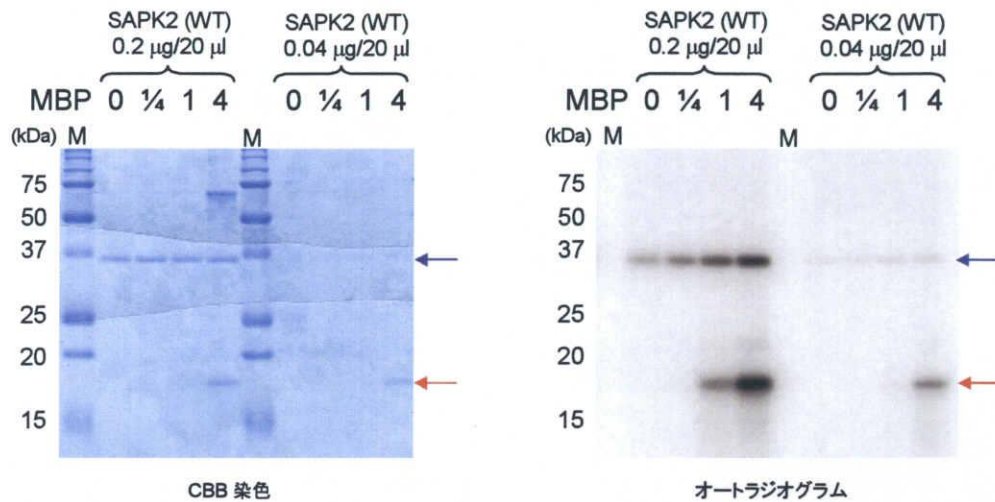


図 15 SAPK2 (P284-L339) の精製プロトコール

(A)



(B)

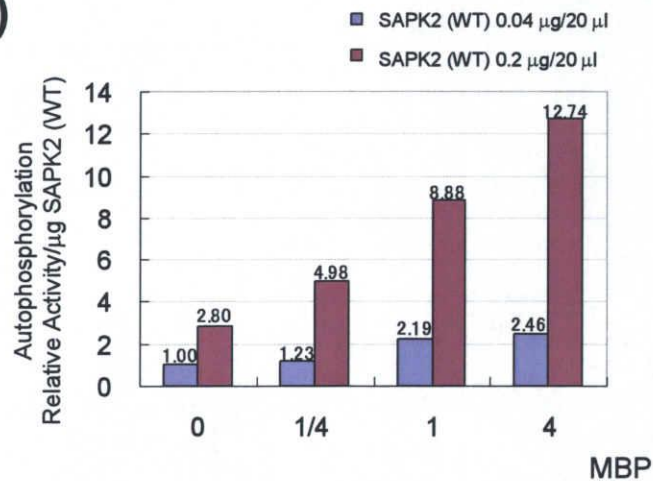


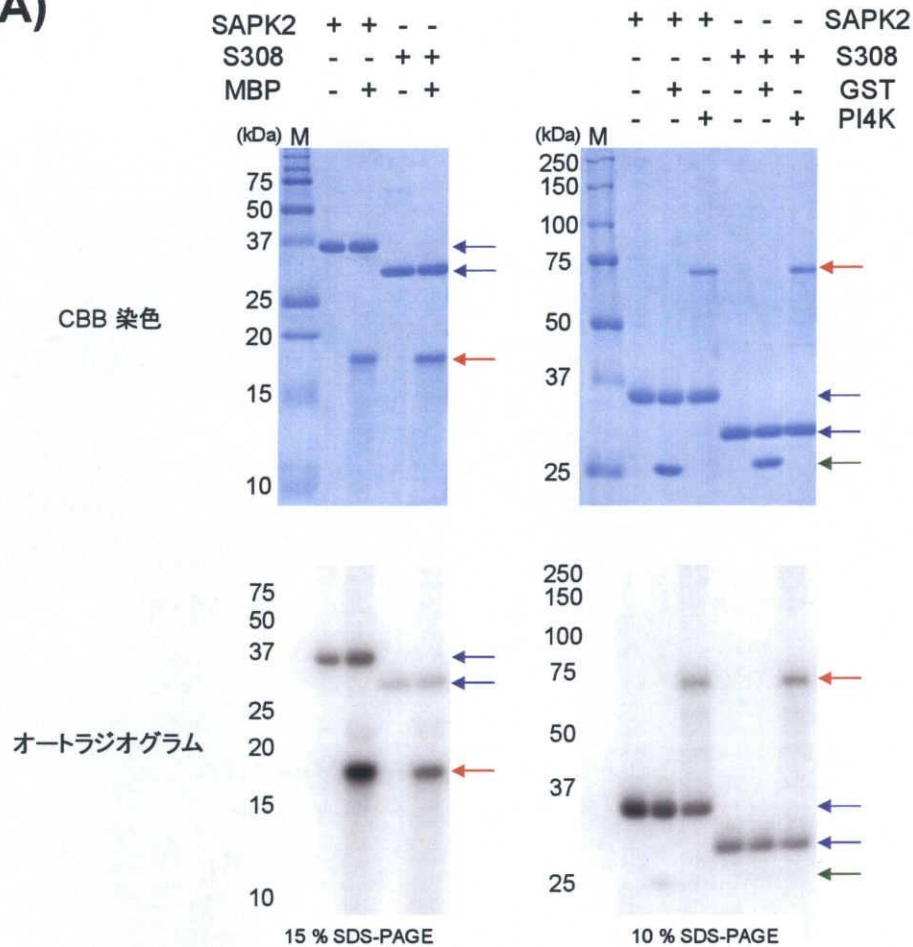
図 16 組換え SAPK2 の試験管内リン酸化アッセイその 1

(A) 精製した SAPK2 (WT) を酵素とし、MBP を基質として、試験管内リン酸化アッセイを行った。左に CBB 染色像、右にオートラジオグラムを示した。M は分子量マーカを示す。← は SAPK2 (WT)、← は MBP を示す。

(B) (A) の SAPK2 (WT) の自己リン酸化レベルの定量結果。酵素タンパク質あたりの相対放射活性を示した。



(A)



(B)

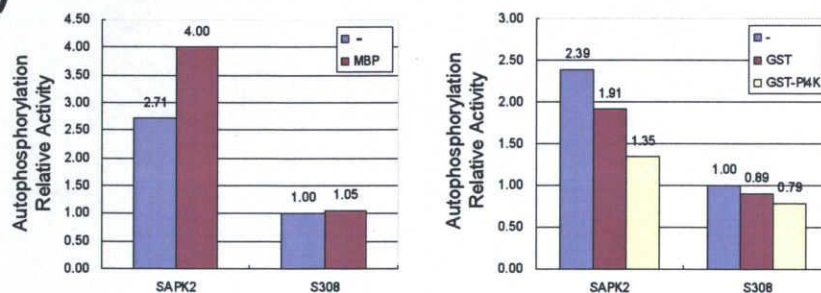


図 17 組換え SAPK2 の試験管内リン酸化アッセイその 2

(A) 精製した SAPK2 (WT) および SAPK2 (M1-S308) を酵素とし、MBP および GST-PI4K を基質として、試験管内リン酸化アッセイを行った。GST は基質のコントロールとして用いた。上段に CBB 染色像、下段にオートラジオグラムを示した。M は分子量マーカを示す。←は酵素、←は基質、←は GST を示す。

(B) (A) の酵素の自己リン酸化レベルの定量結果。左に基質が MBP の場合の結果、右に PI4K の場合の結果を示した。

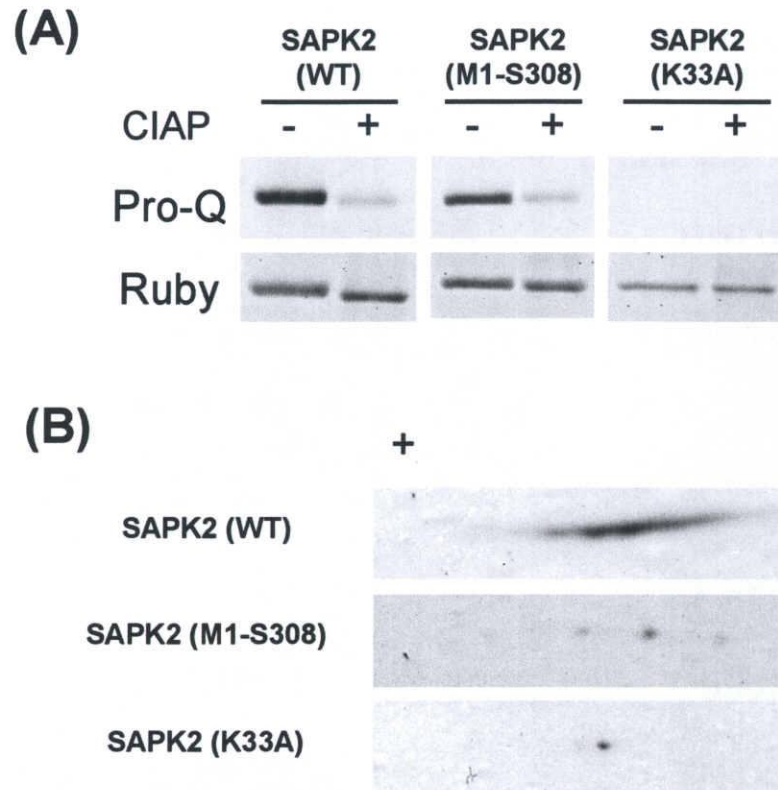


図 18 組換え SAPK2 は大腸菌の中ですでにリン酸化されている

(A) 精製した SAPK2 (WT)、SAPK2 (M1-S308) および SAPK2 (K33A) のリン酸化状態を調べた。これらのタンパク質について、コントロール処理 (- CIAP) あるいはアルカリホスファターゼ処理 (+ CIAP) を行い、10 % のゲルを用いた SDS-PAGE で展開し、Pro-Q Diamond (Pro-Q) と SYPRO Ruby (Ruby) で染色した。

(B) 精製した SAPK2 (WT)、SAPK2 (M1-S308) および SAPK2 (K33A) を二次元電気泳動で展開し、CBB 染色により検出した。

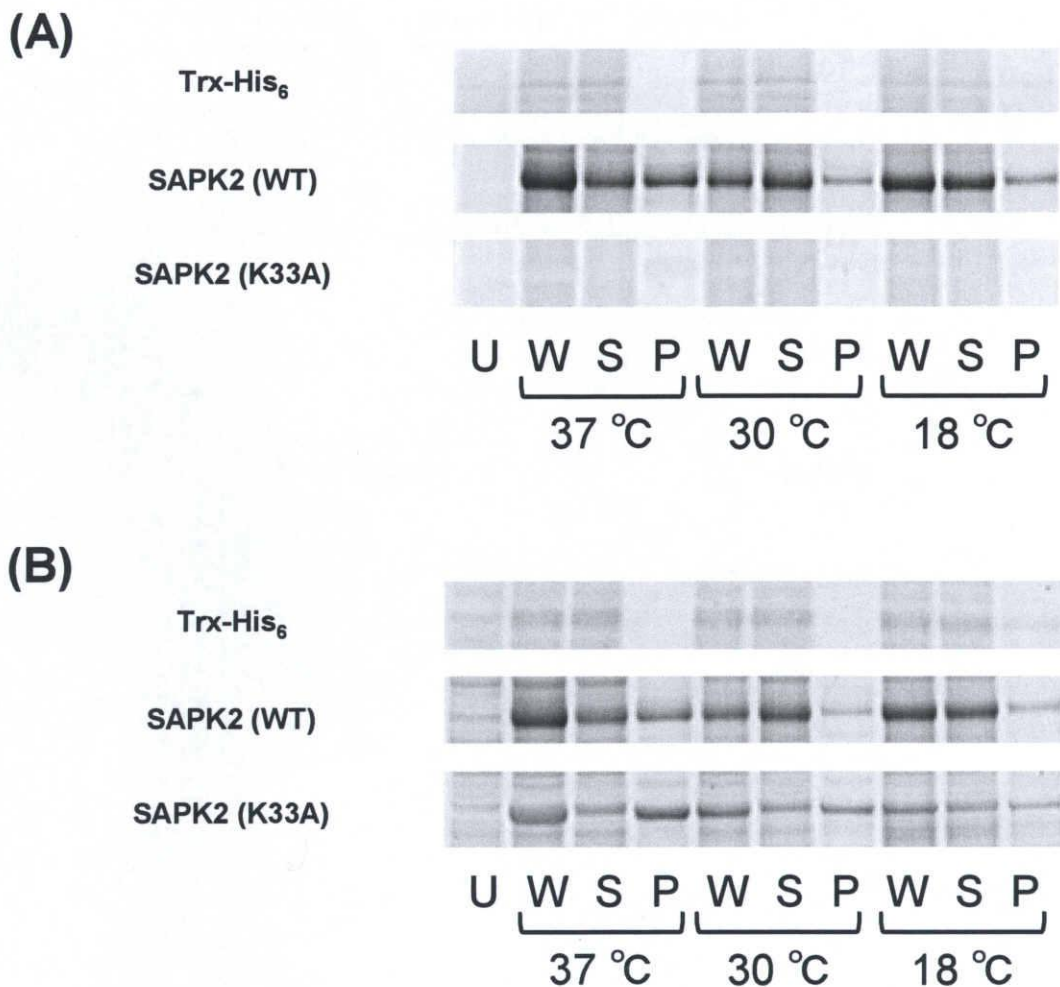


図 19 組換え SAPK2 は培養温度に関わらずリン酸化されている

(A) Trx-His<sub>6</sub> タグ、Trx-His<sub>6</sub>-SAPK2 (WT) および Trx-His<sub>6</sub>-SAPK2 (K33A) のリン酸化状態をPro-Q Diamond により調べた。SDS-PAGE は 12.5 % ポリアクリルアミドゲルを用い、全て還元条件で行った。各レーンはそれぞれ融合タンパク質誘導前 (U)、誘導後 (W)、超音波破碎後の可溶性画分 (S)、超音波破碎後の不溶性画分 (P) を示す。

(B) (A) のゲルの SYPRO Ruby 染色像。

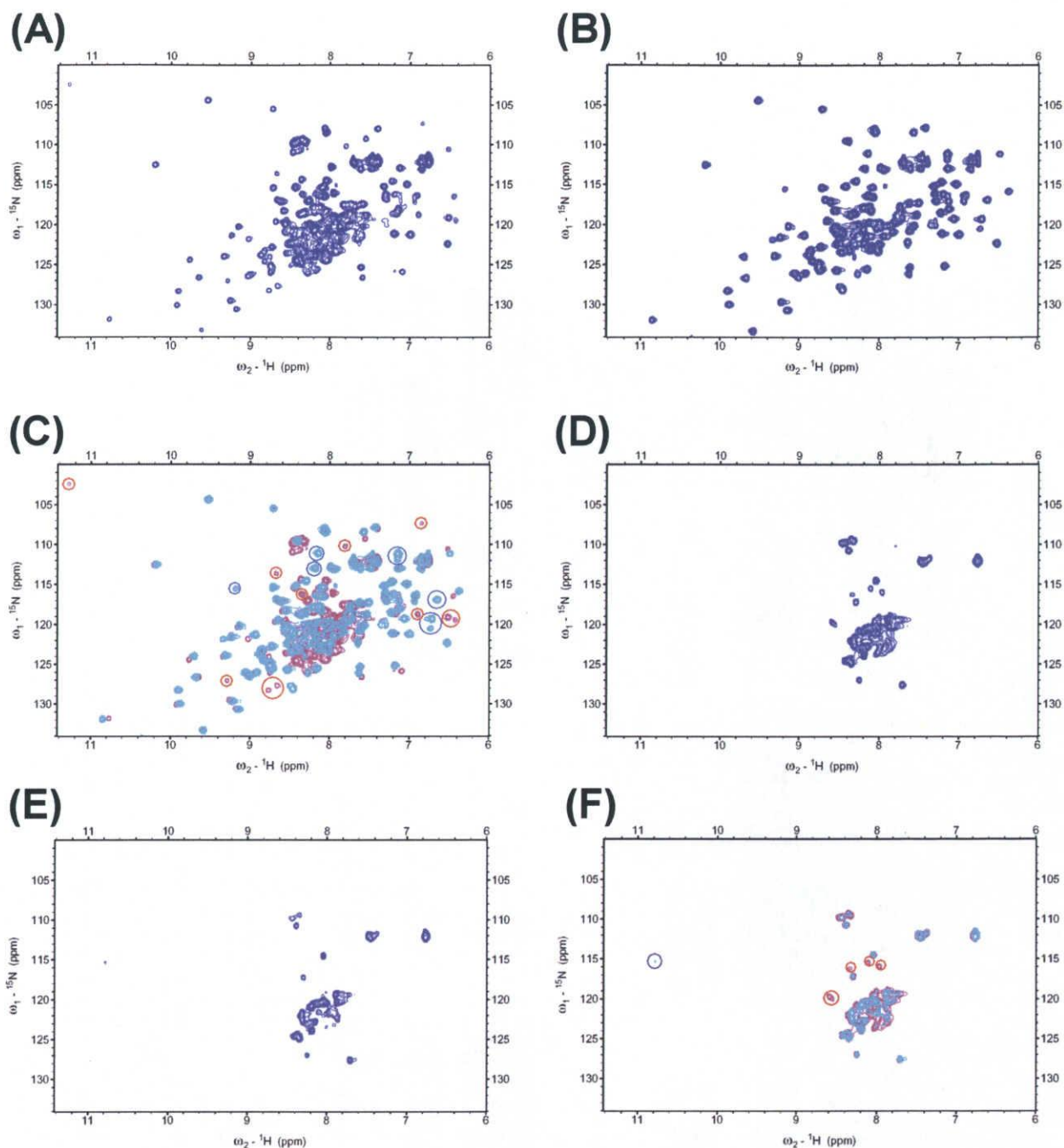


図 20 SAPK2 (P284-L339) の NMR による解析

(A)  $^{15}\text{N}$ -Trx-His<sub>6</sub>-SAPK2 (P284-L339) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル。

(B)  $^{15}\text{N}$ -Trx-His<sub>6</sub> タグの  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル。

(C) (A) および (B) のスペクトルの重ね合わせ。(A) のスペクトルをマゼンダで示し、(A) のみで見られる主なシグナルを○で囲んだ。また、(B) のスペクトルをシアンで示し、(B) のみで見られる主なシグナルを○で囲んだ。

(D)  $^{15}\text{N}$ -SAPK2 (P284-L339) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル。

(E)  $^{15}\text{N}$ -SAPK2 (P284-L339) に non-SAPK2 (M1-S308) を加えたときの  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル。

(F) (D) および (E) のスペクトルの重ね合わせ。(D) のスペクトルをマゼンダで示し、(D) のみで見られる主なシグナルを○で囲んだ。また、(E) のスペクトルをシアンで示し、(E) のみで見られる主なシグナルを○で囲んだ。



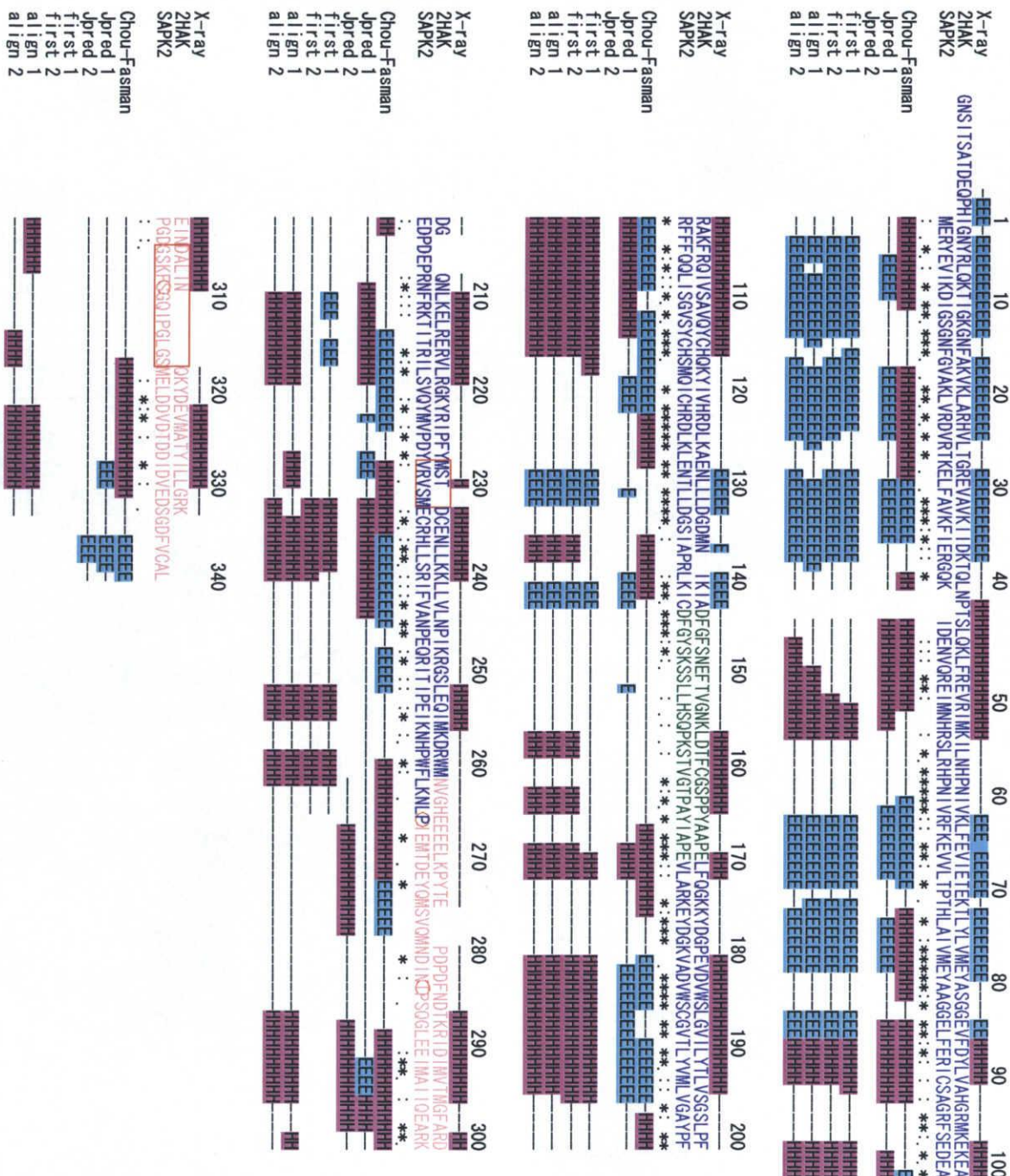


図 21 SAPK2 (WT) と 2HAK E chain のアミノ酸配列および二次構造のアライメント

2HAK はテンプレートに用いた 2HAK のアミノ酸配列、SAPK2 はSAPK2 (WT) のアミノ酸配列を示す。キナーゼドメインを青、但し、アクチベーションループは緑、C 末端領域をピンクで示した。また、P265、T283 および S308 の各残基を○で囲んだ。  
 \* は同一のアミノ酸残基、: および . は類似の残基を示す。X-ray は構造解析された 2HAK E chain の二次構造、Chou-Fasman は SAPK2 (WT) の Chou-Fasman 法による二次構造予測の結果、Jpred 1 および Jpred 2 はそれぞれ SAPK2 (WT) および SAPK2 (L261-L339) の Jpred 法による二次構造予測の結果を示す。また、First 1、First 2、Align 1 および Align 2 は、それぞれ SAPK2 (WT) のモデリング構造 (First Approach 1、First Approach 2、Alignment Interface 1 および Alignment Interface 2) の二次構造を示した。 $\alpha$ -ヘリックスを ■、 $\beta$ -シートを ■ およびランダムコイルを - で示した。また、Alignment Interface 2 におけるアライメントの変更部分を   で示した。

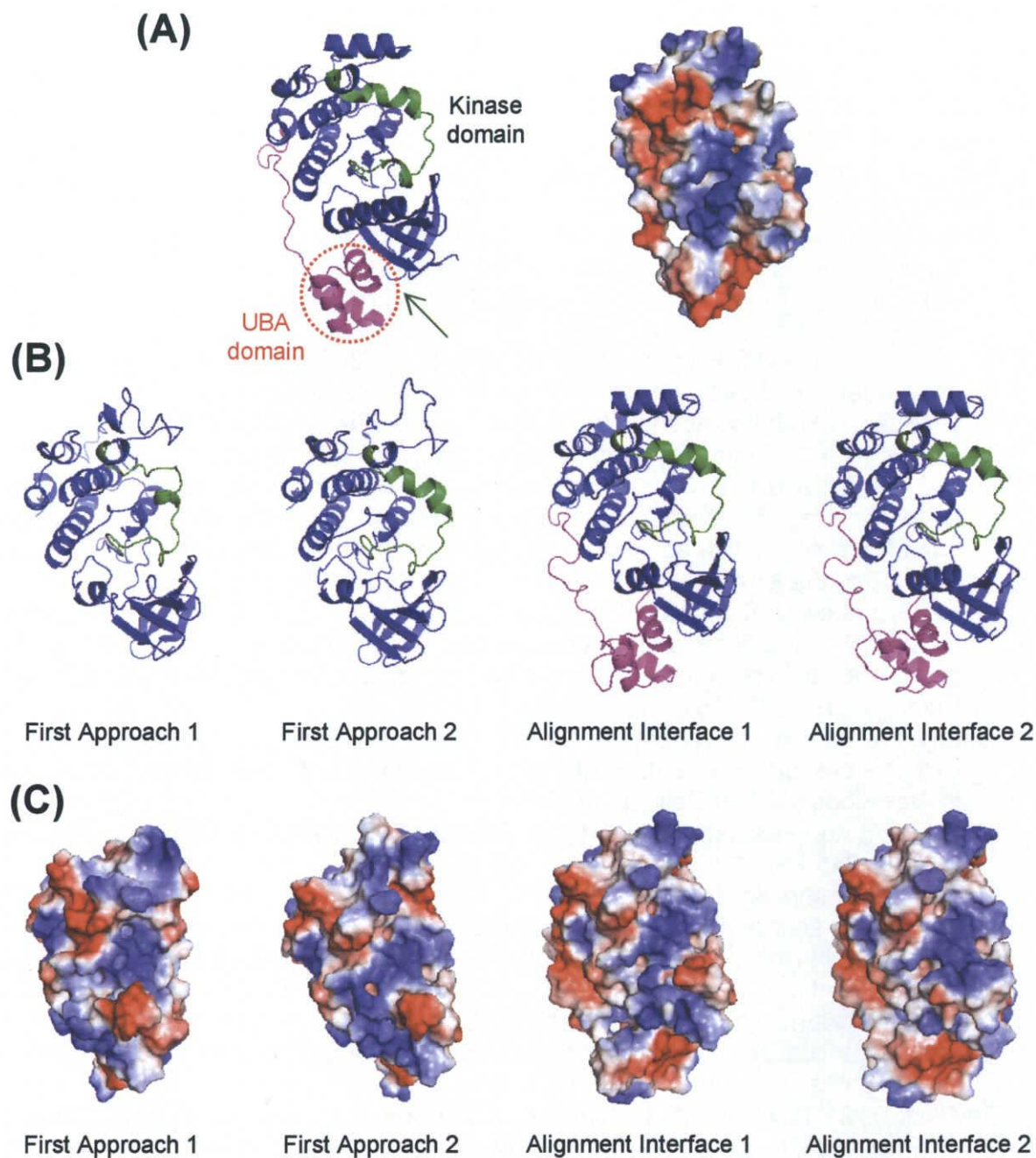


図 22 SAPK2 のモデリング構造

(A) モデリングのテンプレートに用いた 2HAK E chain のリボン構造および表面電荷構造。リボン構造では、キナーゼドメインを青、C 末端ドメインをマゼンダで示した。但し、キナーゼドメインのうちアクチベーションループは緑で示した。表面電荷構造は、酸性領域を赤、塩基性領域を青、疎水性領域を白で示した。

(B) SAPK2 のモデリング構造。(A) と同様の色を用いて示した。

(C) SAPK2 の表面電荷構造。(A) と同様の色を用いて示した。



## 参考文献

- Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., Harter, K., and Kudla, J. (2001). The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca<sup>2+</sup>-regulated kinases. *EMBO J.* 20, 1051-1063.
- Bayer, M. E. (1968). Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 53, 395-404.
- Belin, C., de Franco, P. O., Bourbousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J. M., Vavasseur, A., Giraudat, J., Barbier-Brygoo, H., and Thomine, S. (2006). Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiol.* 141, 1316-1327.
- Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Lauriere, C. (2004). Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279, 41758-41766.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2, 48-54.
- Burza, A. M., Pekala, I., Sikora, J., Siedlecki, P., Malagocki, P., Bucholc, M., Koper, L., Zielenkiewicz, P., Dadlez, M., and Dobrowolska, G. (2006). *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated kinase is regulated by phosphorylation on Ser-154 and Ser-158 in the kinase activation loop. *J. Biol. Chem.* 281, 34299-34311.
- Chae, M. J., Lee, J. S., Nam, M. H., Cho, K., Hong, J. Y., Yi, S. A., Suh, S. C., and Yoon, I. S. (2007). A rice dehydration-inducible SNF1-related protein kinase 2 phosphorylates an abscisic acid responsive element-binding factor and associates with ABA signaling. *Plant Mol. Biol.* 63, 151-169.
- Cheong, Y. H., Kim, K. N., Pandey, G. K., Gupta, R., Grant, J. J., and Luan, S. (2003). CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 1833-1845.
- Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13, 222-245.
- Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M., and Barton, G. J. (1998). JPred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics* 14, 892-893.
- Delauney, A. J., and Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4, 215-223.
- Desikan, R., Hancock, J. T., Ichimura, K., Shinozaki, K., and Neill, S. J. (2001). Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol.* 126, 1579-1587.
- DeWald, D. B., Torabinejad, J., Jones, C. A., Shope, J. C., Cangelosi, A. R., Thompson, J. E., Prestwich, G. D., and Hama, H. (2001). Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126, 759-769.
- Droillard, M., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Lauriere, C. (2002). Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Lett.* 527, 43-50.
- Droillard, M. J., Thibivilliers, S., Cazale, A. C., Barbier-Brygoo, H., and Lauriere, C. (2000). Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific

- protein kinase. *FEBS Lett.* 474, 217-222.
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Absciscic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 1988-1993.
- Gomez-Cadenas, A., Verhey, S. D., Holappa, L. D., Shen, Q., Ho, T. H., and Walker-Simmons, M. K. (1999). An absciscic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates absciscic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 1767-1772.
- Gomez-Cadenas, A., Zentella, R., Walker-Simmons, M. K., and Ho, T. H. (2001). Gibberellin/absciscic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* 13, 667-679.
- Guex, N., and Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M., and Zhu, J. K. (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* 13, 1383-1400.
- Guo, Y., Xiong, L., Song, C. P., Gong, D., Halfter, U., and Zhu, J. K. (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of absciscic acid signaling in Arabidopsis. *Dev. Cell* 3, 233-244.
- Halford, N. G., and Hardie, D. G. (1998). SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol. Biol.* 37, 735-748.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 237-271.
- Hoyos, M. E., and Zhang, S. (2000). Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. *Plant Physiol.* 122, 1355-1363.
- Hrabak, E. M., Chan, C. W., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J. H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H. G., Sussman, M. R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J. K., and Harmon, A. C. (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* 132, 666-680.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., and Shinozaki, K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* 24, 655-665.
- Johnson, L. N., Noble, M. E., and Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85, 149-158.
- Johnson, R. R., Wagner, R. L., Verhey, S. D., and Walker-Simmons, M. K. (2002). The absciscic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific absciscic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol.* 130, 837-846.
- Kagaya, Y., Hobo, T., Murata, M., Ban, A., and Hattori, T. (2002). Absciscic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an absciscic acid response element binding factor, TRAB1. *Plant Cell* 14, 3177-3189.
- Kapust, R. B., and Waugh, D. S. (1999). Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8, 1668-1674.
- Kelner, A., Pekala, I., Kaczanowski, S., Muszynska, G., Hardie, D. G., and Dobrowolska,

- G. (2004). Biochemical characterization of the tobacco 42-kD protein kinase activated by osmotic stress. *Plant Physiol.* 136, 3255-3265.
- Kiegerl, S., Cardinale, F., Siligan, C., Gross, A., Baudouin, E., Liwosz, A., Eklof, S., Till, S., Bogre, L., Hirt, H., and Meskiene, I. (2000). SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell* 12, 2247-2258.
- Kim, K. N., Cheong, Y. H., Grant, J. J., Pandey, G. K., and Luan, S. (2003). CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 411-423.
- Kim, K. N., Cheong, Y. H., Gupta, R., and Luan, S. (2000). Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiol.* 124, 1844-1853.
- Knight, H. (2000). Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.* 195, 269-324.
- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A., and Hattori, T. (2005). Absciscic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J.* 44, 939-949.
- Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Minami, H., Kagaya, Y., and Hattori, T. (2004). Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* 16, 1163-1177.
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., and Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 2940-2945.
- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., Besson, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2006). Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in *Nicotiana glauca* cells. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1369-1376.
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F., and McCoy, J. M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology N. Y.* 11, 187-193.
- LaVallie, E. R., DiBlasio-Smith, E. A., Collins-Racie, L. A., Lu, Z., and McCoy, J. M. (2003). Thioredoxin and related proteins as multifunctional fusion tags for soluble expression in *E. coli*. *Methods Mol. Biol.* 205, 119-140.
- Li, J., and Assmann, S. M. (1996). An Absciscic Acid-Activated and Calcium-Independent Protein Kinase from Guard Cells of Fava Bean. *Plant Cell* 8, 2359-2368.
- Li, J., Kinoshita, T., Pandey, S., Ng, C. K., Gygi, S. P., Shimazaki, K., and Assmann, S. M. (2002). Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* 418, 793-797.
- Li, J., Wang, X. Q., Watson, M. B., and Assmann, S. M. (2000). Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287, 300-303.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C. S., and Zhu, J. K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 3730-3734.
- Liu, J., and Zhu, J. K. (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280, 1943-1945.

- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S., and Gruissem, W. (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* 14 (Suppl.), S389-400.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., and Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369, 242-245.
- Marx, A., Nugoor, C., Muller, J., Panneerselvam, S., Timm, T., Bilang, M., Mylonas, E., Svergun, D. I., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (2006). Structural variations in the catalytic and ubiquitin-associated domains of microtubule-associated protein/microtubule affinity regulating kinase (MARK) 1 and MARK2. *J. Biol. Chem.* 281, 27586-27599.
- Mikolajczyk, M., Awotunde, O. S., Muszynska, G., Klessig, D. F., and Dobrowolska, G. (2000). Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* 12, 165-178.
- Monks, D. E., Aghoram, K., Courtney, P. D., DeWald, D. B., and Dewey, R. E. (2001). Hyperosmotic stress induces the rapid phosphorylation of a soybean phosphatidylinositol transfer protein homolog through activation of the protein kinases SPK1 and SPK2. *Plant Cell* 13, 1205-1219.
- Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., and Hirt, H. (1999). Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress *Plant J.* 20, 381-388.
- Munnik, T., Meijer, H. J. G., ter Riet, B., Hirt, H., Frank, W., Bartels, D., and Musgrave, A. (2000). Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J.* 22, 147-154.
- Mustilli, A. C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., and Giraudat, J. (2002). Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14, 3089-3099.
- Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G. (2004). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol. Cell.* 15, 661-675.
- Nuhse, T. S., Peck, S. C., Hirt, H., and Boller, T. (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6. *J. Biol. Chem.* 275, 7521-7526.
- Oono, Y., Seki, M., Nanjo, T., Narusaka, M., Fujita, M., Satoh, R., Satou, M., Sakurai, T., Ishida, J., Akiyama, K., Iida, K., Maruyama, K., Satoh, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2003). Monitoring expression profiles of Arabidopsis gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J.* 34, 868-887.
- Panneerselvam, S., Marx, A., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (2006). Structure of the catalytic and ubiquitin-associated domains of the protein kinase MARK/Par-1. *Structure* 14, 173-183.
- Peitsch, M. C. (1995). Protein modeling by E-mail. *Bio/Tecnology* 13, 658-660.
- Pical, C., Westergren, T., Dove, S. K., Larsson, C., and Sommarin, M. (1999). Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in Arabidopsis thaliana cells. *J. Biol. Chem.* 274, 38232-38240.
- Qiu, Q. S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S., and Zhu, J. K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 8436-8441.

- Saijo, Y., Hata, S., Kyoizuka, J., Shimamoto, K., and Izui, K. (2000). Over-expression of a single  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* 23, 319-327.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3381-3385.
- Sheen, J. (1996).  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 274, 1900-1902.
- Shen, Q., Gomez-Cadenas, A., Zhang, P., Walker-Simmons, M. K., Sheen, J., and Ho, T. H. (2001). Dissection of abscisic acid signal transduction pathways in barley aleurone layers. *Plant Mol. Biol.* 47, 437-448.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 217-223.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1996). Molecular responses to drought and cold stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 161-167.
- Testerink, C., Dekker, H. L., Lim, Z. Y., Johns, M. K., Holmes, A. B., Koster, C. G., Ktistakis, N. T., and Munnik, T. (2004). Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *Plant J.* 39, 527-536.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Tsunoda, Y., Sakai, N., Kikuchi, K., Katoh, S., Akagi, K., Miura-Ohnuma, J., Tashiro, Y., Murata, K., Shibuya, N., and Katoh, E. (2005). Improving expression and solubility of rice proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 42, 268-277.
- Umezawa, T., Yoshida, R., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2004). SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 17306-17311.
- Urao, T., Katagiri, T., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., and Shinozaki, K. (1994). Two genes that encode  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 244, 331-340.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., and Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* 11, 1743-1754.
- Wang, X. (1999). The role of phospholipase D in signaling cascades *Plant Physiol.* 120, 645-652.
- Xiong, L., Schumaker, K. S., and Zhu, J. K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14 (Suppl), S165-183.
- Xiong, L., and Zhu, J. K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 25, 131-139.
- Yang, K. Y., Liu, Y., and Zhang, S. (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 741-746.
- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J. R.,

- and Shinozaki, K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 43, 1473-1483.
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., and Shinozaki, K. (2006). The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 281, 5310-5318.
- Yuasa, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., and Shinozaki, K. (2001). Oxidative stress activates ATMPK6, an Arabidopsis homologue of MAP kinase. *Plant Cell Physiol.* 42, 1012-1016.
- Zeevaart, J. A. D. (1999). Absciscic acid metabolism and its regulation. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones* (eds P. J. J. Hooykaas, M. A. Hall & K. R. Libbenga), pp. 189-207. Elsevier Science, Amsterdam.
- Zhang, S., and Klessig, D. F. (1998). The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 7225-7230.
- Zhu, J. K. (2001). Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 401-406.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247-273.
- Zhu, J.K., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (1997). Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25, 253-277.



## 要約

SNF1-related protein kinase 2 (SnRK2) ファミリーのプロテインキナーゼ群に属するプロテインキナーゼは、植物において、高浸透圧ストレスやストレスホルモンとして知られているアブシジン酸 (ABA) により活性化される。これらのプロテインキナーゼが ABA や高浸透圧ストレス応答におけるシグナル伝達において中心的な役割を果たしていることを示唆する報告が相次いでいる。しかし、SnRK2 プロテインキナーゼのユニークな活性制御の分子機構については、不明な点が多い。この分子機構の理解には、SnRK2 タンパク質の高次構造に関する情報が必要不可欠である。本研究では、SnRK2 ファミリーに属するイネ SAPK2 の立体構造およびこれに基づく機能メカニズムの解明を目的とし、SAPK2 およびその変異体タンパク質の大量かつ高純度の精製を試み、これに成功した。得られた組換えタンパク質のプロテインキナーゼ活性やリン酸化状態の解析を行い、SAPK2 が大腸菌内においては分子間自己リン酸化により不均一にリン酸化されること、C 末端領域のドメイン 2 が SAPK2 の酵素活性もしくは自己リン酸化による被リン酸化能に重要であることなどを明らかにした。また、X 線立体構造解析を目指した組換え SAPK2 の結晶化、SAPK2 C 末端領域に関する NMR を用いた解析およびホモロジーモデリングを用いた SAPK2 のモデリング構造の構築を試みた。これらの実験から、SAPK2 のキナーゼドメインが C 末端領域と相互作用する可能性、ならびに C 末端領域のドメイン 1 がキナーゼドメインの構造維持に重要であることが示唆された。

## 高等植物における高浸透圧ストレス応答のシグナル伝達機構

### 第一章 序論

植物の成長にとって水欠乏は致命的である。植物は、利用可能な水分が制限されると、個体および細胞レベルで、水分の損失を抑えたり、吸収を促進することにより、水欠乏によるストレス(水ストレス)状態を回避するような反応を示す。たとえば、個体レベルでの短期間の応答としては気孔閉鎖の誘導、長期の応答としては、根系発達の促進などが挙げられる。また、細胞レベルでの応答としては、プロリンをはじめとするアミノ酸や糖などの適合溶質の蓄積の誘導により、浸透ポテンシャルを調整し水の流出を防いで膨圧を保つ。また、細胞は脱水による様々な悪影響に対してその機能を保護する仕組みを誘導する(Ingram and Bartels, 1996)。乾燥などによる水ストレスによって誘導される一連の LEA 関連タンパク質は、様々な機能タンパク質に対して保護作用をもつとされている。多くの場合、細胞レベルでの水ストレスは、高浸透圧ストレスによって模倣されることから、実験的には高浸透圧ストレス応答が様々な視点から研究されている。

これまでに、水欠乏あるいは浸透圧ストレス応答、およびそれらのシグナル伝達に関する数多くの研究が主に生化学的、生理学的あるいは分子生物学・遺伝学的アプローチによって行われてきた(Bray, 1997; Knight, 2000; Xiong and Zhu, 2002; Xiong et al., 2002; Zhu et al., 1997; Zhu, 2002)。その結果、プロテインキナーゼ(タンパク質リン酸化酵素)およびプロテインフォスファターゼといったシグナル伝達因子や、カルシウムイオン、リン脂質、イノシトールリン酸などのセカンドメッセンジャー、ならびにそれらを合成する酵素の関与が明らかにされてきた(DeWald et al., 2001; Munnik et al., 1999, 2000; Pical et al., 1999; Wang, 1999; Xiong et al., 2002)。しかし、それらの因子全てが同じカスケードで機能するとは考えにくく、情報伝達経路の全容をその素反応の連続として理解するまでには至っていない。

さまざまなシグナル伝達因子の中でもプロテインキナーゼは、多くのシグナル伝達経路において鍵的役割を果たす。酵母では、高浸透圧ストレスシグナルはセンサーであるヒスチジンキナーゼによって感知され、ヒスチジンとアスパラギン酸残基間でのリン酸リレーを経て mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードに伝達され、防御反応を示す(Maeda et al., 1994)。シロイヌナズナにおいても、乾燥/高浸透圧誘導性のセンサー様ヒスチジンキナーゼ AtHK1 が同定され、酵母のセンサーキナーゼ変異体を相補して高浸透圧ストレス耐性を回復させたことから、植物においてもセンサー様ヒスチジンキナーゼが浸透圧ストレスセンサーとして機能している可能性も示唆されている(Urao et al., 1999)。しかし、受容体ヒスチジンキナーゼの一つであるサイトカイニン受容体も、酵母においては浸透圧センサーとして機能することが報告されている(Reiser et al., 2003)。したがって、AtHK1 が植物においても浸透圧センサーとして機能するかどうかは、今後の研究を待たなければならない。

低温や傷、あるいはサリチル酸、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> やエリシターなどのシグナル分子によって活性化される MAP キナーゼカスケードが高浸透圧ストレスで活性化されることや、タバコの MAPKKK (MAPK kinase kinase) である NPK1 の構成的発現により、植物が凍結、高温、高塩濃度など幅広いストレスに対して耐性を示すようになることも報告されている(Hoyos and Zhang, 2000; Ichimura et al., 2000; Mikolajczyk et al., 2000; Zhang and Klessig, 1998)。これらのことを合わせて考えると、MAPK は酸化的ストレスを伴う広汎なストレス応答に関わるストレスシグナ

ル伝達において機能しているものと推測される。

シロイヌナズナ ASK1 および ASK2 は、SnRK2 プロテインキナーゼとして最初に同定されたものである(Park et al., 1993)。それらの触媒ドメインの C-末端側に酸性アミノ酸に富んだ領域を含むドメインをもつ特徴が指摘されていた。その後、タバコ培養細胞あるいは葉の抽出液を用いて myelin basic protein (MBP) を基質にしたゲル内リン酸化アッセイを行うと、40 kD 周辺に浸透圧ストレスによって速やかに活性化される  $\text{Ca}^{2+}$  非依存的プロテインキナーゼが検出されることが報告された(Droillard et al., 2000; Hoyos and Zhang, 2000; Mikolajczyk et al., 2000; Monks et al., 2001)。また、アルファルファ(Munnik et al., 1999)やシロイヌナズナ培養細胞(Droillard et al., 2002)においても同様の結果が報告されている。このような高浸透圧ストレスによって活性化されるプロテインキナーゼとして 42 kD プロテインキナーゼがタバコ培養細胞から精製された(Mikolajczyk et al., 2000)。このプロテインキナーゼはその部分アミノ酸配列の相同性から、SnRK2 ファミリーに属し、シロイヌナズナ ASK1 のホモログであることが示された(Halford and Hardie, 1998; Hrabak et al., 2003)。最近になって、Kelner ら(2004)により、この 42 kD プロテインキナーゼは NtOSAK としてクローニングされ、生化学的な特徴が報告されている。一方、ソラマメの孔辺細胞からは ABA によって活性化される AAPK (abscisic acid-activated protein kinase) が精製、クローン化され、SnRK2 プロテインキナーゼの ABA シグナル伝達における重要性が決定的になった(Li and Assmann, 1996; Li et al., 2000)。活性を持たないドミナントネガティブ型の AAPK 変異タンパク質を孔辺細胞プロトプラストで過剰発現させると、ABA による陰イオンチャネルの活性化がみられなくなるとともに、ABA による気孔の閉鎖が阻害された(Li et al., 2000)。

シロイヌナズナにおいても、遺伝学および逆遺伝学の手法により AAPK ホモログの ABA シグナル伝達への関与が明らかにされた。気孔が開いた状態では蒸散により気化熱が奪われるため、閉鎖状態に比べ、葉温度が低下する。open stomata1 (ost1) は赤外線イメージングを用いたスクリーニングにより葉温度の低い変異体として分離され、その原因遺伝子が AAPK1 と高い相同性をもつ SnRK2 プロテインキナーゼをコードすることがわかった(Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002)。また、ほぼ同時期にゲル内リン酸化アッセイで検出される ABA 活性化プロテインキナーゼの性質とゲノム情報に基づき、SRK2E が同定され、OST1 と同様の機能が明らかにされ、両者は同一のプロテインキナーゼであることがわかった(Yoshida et al., 2002)。さらに、コムギ(*Triticum aestivum*)では SnRK2 ファミリーに属する PKABA1 が ABA による発現誘導を受けること、ならびにこれを一過的に過剰発現させるとアリューロン層における  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子プロモーターのジベレリンによる活性化が抑制されることから、ジベレリン応答の ABA による抑制制御への関与が示されている(Gomez-Cadenas et al., 1999, 2001; Johnson et al., 2002; Shen et al., 2001)。一方、フォスファチジルイノシトール代謝の研究からも高浸透圧ストレス応答に SnRK2 が関与する可能性が指摘された。Monks ら(2001)は、ダイズの Sec14p 関連フォスファチジルイノシトール転移タンパク質(PITP)が高浸透圧によって迅速にリン酸化されることを見いだした。そして、ゲル内リン酸化アッセイにより、SnRK2 様の活性がこの PITP をリン酸化することを示した。興味深いことに、ダイズ SnRK2 プロテインキナーゼ、SPK1 あるいは SPK2 を酵母細胞内で発現させるとこれらが高浸透圧ストレスによって活性化されることとともに、同時に発現させた PITP がリン酸化されるようになることを報告している。SnRK2 ファミリーのプロテインキナーゼが、傷、浸透圧ストレス、低温、エリシター、エチレン、ABA など様々なシグナル伝達経路に関与しているフォスファチジン酸(PA)の

ターゲットとなっている可能性も示唆されている(Testerink et al., 2004)。

SnRK(Snf1 related protein kinase)ファミリーは、その名のように酵母の Snf1 と類似性を示す一群のプロテインキナーゼで 3 つのサブファミリー、SnRK1、SnRK2 および SnRK3 に分類される(Hrabak et al., 2003)。しかし、実際には、系統樹上および機能的には、SnRK1 が酵母の Snf1 とより関連性が高い。SnRK1 サブファミリーは、Snf1 や動物のホモログである AMP-activated protein kinase と同様に炭素代謝や栄養シグナル応答に関与している。一方、SnRK2 および SnRK3 は、植物に特有なサブファミリーであり、以下に述べるように環境ストレス応答におけるシグナリングに特化したサブファミリーであると思われる。また、SnRK ファミリーはカルシウム依存性プロテインキナーゼ CDPK ファミリーとも相対的類似性が高く、CDPK-SnRK スーパーファミリーと称されることもある(Hrabak et al., 2003)。

イネゲノムには 10 種の SnRK2 プロテインキナーゼがコードされている。同様にシロイヌナズナにも 10 個の遺伝子が存在する(Hrabak et al., 2003; Kobayashi et al., 2004)。触媒ドメインのアミノ酸配列をもとに系統樹を書くと、大きくわけて I、II、III の 3 つのサブクラスに分かれる。サブクラス III には AAPK や OST1/SRK2E が含まれる。それぞれのサブクラスにはシロイヌナズナとイネで同じ数のメンバーが含まれるが、サブクラス内では一対一のオルソログ関係は成り立たない。したがって、サブクラス内では、両植物種の祖先が分岐した後、それぞれのメンバーが生じたものと思われる。

当研究室では、イネゲノムにコードされる 10 個の SnRK2 ファミリーメンバー(SAPK1 から SAPK10 と命名)を全てクローン化し、機能解析を進めてきた。これまでに、これら全てのメンバーが高浸透圧ストレスによって速やかに活性化されること、ならびにそのうちサブクラス III に属する 3 つ(SAPK8、9 および 10)は ABA によっても活性化されることなどを他の植物由来の SnRK2 プロテインキナーゼに先駆けて明らかにした(Kobayashi et al., 2004)。さらに、SnRK2 プロテインキナーゼの活性化はリン酸化によって制御されていることや、ABA シグナルが C-末端領域によって認識されることも同時に報告した(Kobayashi et al., 2004)。続いて、シロイヌナズナにおいても 10 個の SnRK2 ファミリーのプロテインキナーゼのうち 9 個が浸透圧ストレスによって活性化され、そのうちのサブクラス II および III に属する 5 個が ABA により活性化されること、低温ではどれも活性化されないことが示された(Boudsocq et al., 2004)。

SnRK2 プロテインキナーゼは、触媒ドメインの C-末端側に制御ドメインと考えられる 60 から 80 アミノ酸からなる領域を持つ。当研究室では、ABA による活性化を受ける SAPK8 と受けない SAPK2 の間でドメイン交換実験により、SAPK2 の C-末端ドメインを SAPK8 のそれで置換したところ、このキメラプロテインキナーゼは、弱いながら ABA による活性化を受けるようになることを報告した(Kobayashi et al., 2004)。一方、SAPK10 やシロイヌナズナ OST1/SRK2E の C-末端ドメインの一部欠失によって ABA による活性化のみが消失することも示されている(Yoshida et al., 2006)。また、大腸菌で発現させた組換え OST1/SRK2E の C-末端領域のドメイン 2 および 1 の一部分を欠失するとリン酸化活性がなくなることが報告されている(Belin et al., 2006)。さらに、OST1/SRK2E C-末端ドメインには、プロテインフォスファターゼ 2C である ABI1 が結合することが酵母 two-hybrid アッセイによって示されている(Yoshida et al., 2006)。これらのことは、C-末端ドメインが上流シグナルの受容に必要なドメインであることを示している。

リン酸化による制御をうけるプロテインキナーゼの多くについて、その触媒ドメイン中央に存在するアクティベーションループと呼ばれる領域のセリン、スレオニンあるいはチロシンのリン

酸化によって活性化されることが知られている (Johnson et al., 1996; Nolen et al., 2004)。また、これらのアミノ酸を酸性アミノ酸で置換することにより構成的活性型になる場合も知られている (Asai et al., 2002; Gong et al., 2002)。SnRK2 のアクティベーションループ中には7つのセリンおよびスレオニンが存在するが、これらの幾つかあるいはその組み合わせについて酸性アミノ酸への置換による構成的活性化型への変換が試みられたが、明瞭な構成的活性型を得ることに成功していない (Kobayashi et al., 2004)。

SnRK2 プロテインキナーゼが高浸透圧ストレスによって迅速に活性化されることは、高浸透圧ストレス応答のシグナル伝達における中心的役割を想像させる。しかし、高浸透圧シグナリングにより活性化された SnRK2 プロテインキナーゼが、植物細胞内でどのようなタンパク質をリン酸化しているかについての知見は極めて限られている。

ABA による活性化を受けた AAPK によるリン酸化標的の候補として、AKIP1 と名づけられた RNA 結合タンパク質が報告されている (Li et al., 2002)。AKIP1 が酵母 two-hybrid アッセイにおいて、AAPK と結合すること、試験管内において AAPK は AKIP1 をリン酸化すること、AKIP1 が ABA シグナリングによって核スペckルとよばれる核内の特定の構造に局在するようになることなどがその根拠である。

srk2e 変異体を用いた実験から、ABA によって活性化を受ける SnRK2 プロテインキナーゼは気孔応答のみならず、ABA による遺伝子発現誘導に至るシグナル経路においても機能していると考えられた (Yoshida et al., 2002)。当研究室では、ABA による転写誘導を担う bZIP 型転写因子 TRAB1 を同定し、この因子の転写活性化能がリン酸化によって制御されていること、ならびにそのリン酸化部位の1つが Ser102 であること明らかにした (Kagaya et al., 2002)。さらに、ABA により活性化された SAPK8 から 10 がこのセリンを試験管内で効率よくリン酸化することや、培養細胞内で過剰発現させた SAPK10 と TRAB1 が免疫沈降により共沈降することなどを報告した (Kobayashi et al., 2005)。

一方、TRAB1 ホモログであるイネやコムギの ABA 応答エレメント (ABRE) 結合因子 (それぞれ OREB1 および TaABF) と SnRK2 プロテインキナーゼの特異的相互作用も酵母 two-hybrid アッセイによって示されている (Chae et al., 2007; Johnson et al., 2002)。これらのことから、ABRE 結合因子は、ABA によって活性化を受けた SnRK2 プロテインキナーゼによってリン酸化され、その転写活性化能が増加するものと考えられる。TRAB1 は Ser102 に加えて Ser94 も SAPK10 によってリン酸化される。シロイヌナズナの ABRE 結合因子についても SnRK2 によるリン酸化が報告された (Furihata et al., 2006)。これらリン酸化部位の周囲の配列から、LxRxxS という共通配列が浮かびあがってくる。興味深いことに、このような標的配列のコンセンサスは CDPK の認識配列ともオーバーラップしており、ABRE 結合タンパク質のリン酸化に寄与するプロテインキナーゼは SnRK2 のみではない可能性もある。実際、シロイヌナズナ CDPK の1つである AtCPK4 と ABF4 との相互作用が酵母 two-hybrid アッセイによって示されている (Choi et al., 2005)。

以上のように、SnRK2 ファミリーに属するプロテインキナーゼが、高浸透圧ストレスおよび ABA 応答におけるシグナル伝達において中心的な役割を果たしている可能性を示すデータが蓄積してきている。しかし、これらのプロテインキナーゼを介するシグナル伝達経路の下流応答や活性化に関わる上流因子についての知見は未だに乏しく、今後の課題となっている。

そこで本研究では、高浸透圧ストレスや ABA シグナルが SnRK2 プロテインキナーゼまで伝達されるメカニズム、すなわち同プロテインキナーゼの上流因子に関する知見を深めることを

目指した。そのためまず、高浸透圧ストレスや ABA シグナルによる SnRK2 プロテインキナーゼの活性化を引き起こすリン酸化のリン酸化部位の同定を行ったうえで、これに関わる上流プロテインキナーゼの同定を試みた。また、想定しうる上流因子として 3 量体 G タンパク質やフォスファチジン酸の関与について検討を行った。また、研究の過程で SAPK のフォスファチジン酸結合能が確認されたため、フォスファチジン酸と SAPK における活性化メカニズムの関係についても検討した。

## 第二章 実験

### 1. プロトプラストを用いたトランジェント発現

エレクトロポレーション法によるトランジェント発現は、イネ培養細胞 (Oc-line) から調製したプロトプラストを用い、Kagaya ら(2002)が記載した方法に従った。共発現に用いた SAPK 発現プラスミドは Kobayashi ら(2004, 2005)が記載したプラスミドあるいは、当研究室において小林により作製されたプラスミド(未発表)を用いた。エレクトロポレーション後の細胞を、1.2 ml の R2P 培地 (Kyoizuka and Shimamoto, 1991) (細胞濃度はおよそ  $1 \times 10^6$  cells/ml)を用いて 30 °C で 12 から 15 時間培養した。よく懸濁した 1 ml のプロトプラスト培養液を 2 ml 遠心チューブ(アシスト)に移し、終濃度の 5 倍の濃度の NaCl または ABA を含む R2P 培地を 1/4 容を加え、15 分間処理した。

また、使用した薬剤は次のようにプロトプラスト培養液に処理した。滅菌水に溶解したマストパン(Wako)あるいはメタノールに溶解したスフィンゴシン 1-リン酸(Sigma)を目的の処理濃度になるように R2P 培地、400 mM NaCl あるいは 50  $\mu$ M ABA を含む R2P 培地に加え、15 分間静置、処理した。

リン脂質の処理は次のように行った。3-sn-フォスファチジン酸 (PA; Sigma)、oleoyl-L- $\alpha$ -リゾフォスファチジン酸 (LPA; Sigma)、L- $\alpha$ -フォスファチジルコリン (PC; Sigma) あるいは 3-sn-フォスファチジルエタノールアミン (PE; Sigma) は、クロロホルムに溶解した。使用前にクロロホルムを揮発させ、R2P 培地に約 30 分間の超音波処理 (BRANSON, YAMATO BRANSONIC 1510)により完全にミセル化させた後、プロトプラスト培養液に加えて処理した。

### 2. 二次元電気泳動とイムノブロットイング

#### 2-1. 目的タンパク質の精製

目的タンパク質をトランジェント発現させたプロトプラストの培養液 1 ml に対して各処理を行い、10,000 rpm、室温で 3 分間遠心後、上清を除去し、液体窒素で凍結した。凍結した細胞に抽出 buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM  $\beta$ -グリセロリン酸, 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1xComplete<sup>TM</sup>-EDTA-free (Roche), 250 mM スクロース, 0.1% Tween 20]を 200  $\mu$ l 加えてボルテックスし、15,000 rpm、4 °C で 15 分間遠心後、上清を新しいエッペンにとった。これに 200  $\mu$ l の TE 飽和フェノール (pH 8.0)を加えボルテックスし、15,000 rpm、4 °C で 15 分間遠心後、上清を除去した。50 mM Tris-HCl (pH 7.5) を 200  $\mu$ l 加えボルテックスし、15,000 rpm、4 °C で 15 分間遠心後、上清を除去し、メタノールに溶解した 100 mM 硫酸アンモニウムを 1 ml 加えて混合後、-20 °C で一晩保存し

た。これを 15,000 rpm、4 °Cで 15 分間遠心した後、上清を除去し、さらにメタノールに溶解した 100 mM 硫酸アンモニウムを 1 ml 加えて混合後、15,000 rpm、4 °Cで 15 分間遠心し、上清を除去した。この操作を 2 回繰り返した後、80 %アセトン を 1.5 ml 加え、15,000 rpm、4 °Cで 15 分間遠心し、上清を除去した。この操作を 2 回繰り返した後、サンプルを風乾させた。

## 2-2. 二次元電気泳動

二次元電気泳動の一次元目の泳動は、ZOOM IPGRunner システム (Invitrogen) を用い、添付の説明書にしたがって行った。上述のように精製した風乾後のサンプルに、Sample buffer[7.7 M 尿素, 2.2 M チオウレア, 4 % CHAPS, 20 mM DTT, 0.5 % ZOOM Carrier Ampholytes (pH 4-7; Invitrogen), 0.002 % プロモフェノールブルー]160  $\mu$ l を加えて溶解し、15,000 rpm、4 °Cで 15 分間遠心後、上清をサンプル溶液とした。ZOOM カセットを平らな実験台上に置き、サンプル溶液 155  $\mu$ l をサンプルローディングデバイスに充填し、一次元等電点電気泳動用の ZOOM ストリップゲル (pH 4-7; Invitrogen) をカセットに挿入し、そのまま室温で 90 分間静置して、ストリップゲルを膨潤させた。

電極用ろ紙 2 枚に蒸留水を浸み込ませ、ゲルの両端に置き、カセットを ZOOM IPGRunner にセットして電気泳動を開始した。通電条件は表 1 に示した 3 段階で、限界電流値及び限界電力値はそれぞれストリップゲル 1 本当たり 1 mA、2 W に設定した。

一次元電気泳動終了後、次のような SDS 平衡化処理を行った。ストリップゲルをカセットから取り出し、ゲル 1 本当たり 5 ml の SDS 処理溶液[1xNuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen), 1xNuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen)]で 15 分間振盪した。さらに、ゲル 1 本当たり 5 ml の S-アルキル化溶液[125 mM イミダゾール (Wako), 1xNuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen)]で 15 分間振盪した。

NuPAGE 10 %ビス-トリスゲル 1 mm 1 well (Invitrogen) を用いて、次のように二次元目の電気泳動を行った。SDS 平衡化処理した一次元ストリップゲルを二次元目ゲルのウェルに乗せ、ゲル同士が密着するようにミクロスパーテルで軽く押し、分子量マーカー (Precision Plus Protein All Blue Standards; Bio-Rad) 3  $\mu$ l を浸み込ませた小片ろ紙をストリップゲルの陽極外側に挿入した。二次元目のゲルを泳動槽にセットし、泳動 buffer[1xNuPAGE MES SDS Running Buffer (Invitrogen)]を注ぎ、通電条件は定電圧 200 V で 35 分間、ゲル一枚あたりの限界電流値及び限界電力値はそれぞれ 120 mA 及び 25 W に設定し、泳動した。

## 2-3. イムノブロットイング

上記の方法で泳動したゲルを Blotting buffer[4.8 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン, 3.9 mM グリシン, 20 % メタノール, 0.13 mM SDS]を用いてトランスブロット SD セル (Bio-Rad) によりニトロセルロースメンブレン (Trans-Blot Transfer Medium; Bio-Rad) に電気泳動的に転写した。転写後のメンブレンをブロッキング溶液[1 % BSA, 5 % スキムミルクを含む TBS buffer[50 mM Tris (pH7.8), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O]]中で 37 °Cで 1 時間穏やかに振盪しながらインキュベートした。その後、1/1000 希釈の抗 HA 抗体 (Covance, Richmond, CA) を含むブロッキング溶液中で、37 °C、1 時間振盪した。TTBS buffer[0.05 % TWEEN20 を含む TBS buffer(pH7.8)]で 3 回洗浄した後、1/2000 希釈のペルオキシダーゼ (Hoseraishi Peroxidase) 標識した二次抗体 (ECL Anti-mouse IgG, Horseradish



Peroxidase linked whole antibody; Amersham)を含むブロッッキング溶液中で、37 °C、1 時間振盪した。その後、TTBS buffer で 3 回、TBS buffer で 3 回洗浄した後、ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham) を用いて発光反応を行い、X 線フィルム (Hyperfilm ECL; Amersham)に露光した。

### 3-1. 目的タンパク質のアフィニティー回収

各処理をしたプロトプラスト培養液 1 ml に、5 倍濃縮 His 結合 buffer[100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4), 50 mM イミダゾール, 5 % Tween20, 250 mM  $\beta$ -グリセロリン酸, 500  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2.5 mM PMSF, 5xComplete<sup>TM</sup>-EDTA-free]255  $\mu$ lを加え、液体窒素で速やかに凍結した。終濃度 0.5 M および全容量 1.7 ml になるように 5 M NaCl および滅菌水をそれぞれ加え、融解した。さらに、超音波処理 (BRANSON, SONIFIER MODEL450; out put 1.3, duty cycle 10%) 15 秒間を 2 回行い、15,000 rpm、4 °C で 15 分間の遠心によって残渣を取り除いた。このようにして得た細胞抽出液を 30  $\mu$ l の Ni-NTA アガロースレジン (QIAGEN) と混合し、4 °C で 30 分間、回転により攪拌した。レジンを Wash buffer[20 mM リン酸緩衝液 (pH7.4), 20 mM イミダゾール, 500 mM NaCl, 50 mM  $\beta$ -グリセロリン酸, 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5 mM PMSF, 1xComplete<sup>TM</sup> EDTA-free]で 3 回洗浄し、次に 1xComplete<sup>TM</sup> EDTA-free を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で 3 回洗浄した後、30  $\mu$ l の 2 x Sample buffer を加えた。これを 95 °C、5 分間処理し、結合タンパク質を溶出して、15,000 rpm、1 分間の遠心によってレジンを取り除いた。

### 3-2. Phos-Tag SDS-PAGE

Phos-Tag SDS-PAGE は Kinoshita ら(2006) の方法にしたがって行った。Phos-Tag (NARD)の終濃度が 100  $\mu$ M になるように作製した 10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルに、上記の溶出液をアプライし、SDS-PAGE により分画した。電気泳動後、10 mM EDTA を含む Towbin buffer[25 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン, 192 mM グリシン, 10 % メタノール]でゲルを 10 分間振盪し、再度 EDTA を含まない Towbin buffer で 10 分間振盪して上記の方法でイムノブロッティングを行った。

## 4. 変異体 SAPK2 リコンビナントタンパク質の調製

### 4-1. コンストラクトの作製

p35S-sh  $\Delta$ -SAPK2 K/A-7S/N-dHA-His (小林、未発表) の Nsp V および Eco81 I (TaKaRa) による部分消化により得られた SAPK2 K/A-7S/N 断片領域を、pENTR/SD/D-TOPO-PreS SAPK2(K33A) (青田、2007、名古屋大学大学院生命農学研究科修士論文)を同制限酵素で消化して得られたベクター側断片に組み込み、シーケンスを確認後、Gateway LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen) を用いた LR 反応によって、大腸菌用発現ベクター pDEST-trx (Tsunoda et al., 2005) に組み込んだ。発現ベクターの模式図を付図 1 に示した。SAPK2 K/A の調製には、当研究室において青田により作製された発現ベクター (青田、2007、名古屋大学大学院生命農学研究科修士論文)を使用した。

#### 4-2. 培養

得られた発現ベクターを、E. coli BL21 (DE3) pLysS 株に導入した。得られた形質転換体の単一コロニーを LB 液体培地 (50  $\mu$ g/ml アンピシリン) に植菌し、37  $^{\circ}$ C で OD600 が 0.6 から 0.8 になるまで振盪培養し、終濃度 50  $\mu$ M になるように IPTG を加えた。さらに 37  $^{\circ}$ C で 3 時間もしくは 18  $^{\circ}$ C で一晩培養した後、3,000  $\times$  g で 20 分間遠心することにより大腸菌を回収し -80  $^{\circ}$ C で保存した。

#### 4-3. 精製

精製の過程における共通の操作について、以下に示す。  
タンパク質濃度は、280 nm における吸光度と一次構造から得たトリプトファン及びチロシン残基の数に基づいて算出した  $\epsilon$  の値から求めた。タンパク質溶液の濃縮は、分画分子量 10,000 の Centriplus YM-10 (Millipore) および Centricon YM-10 (Millipore) を用いて限外ろ過により行った。遠心濃縮は、Centriplus の場合 3,000  $\times$  g、4  $^{\circ}$ C で、Centricon の場合は 5,000  $\times$  g、4  $^{\circ}$ C で行った。SDS-PAGE には、12.5 %ポリアクリルアミドゲルを用い、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色 (Quick CBB; Wako) によりタンパク質バンドを検出した。分子量マーカーとして High-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare) を用いた。

#### 4-4. 発現の確認

冷凍した菌体を Sonication buffer[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 5 mM イミダゾール]に懸濁し、氷上で超音波処理 (TOMY, UD-201; out put 2.5, duty cycle 100 %) 2.5 分間を 2 回行った。得られた破砕液を 15,000 rpm で 15 分間遠心し、可溶性画分と不溶性画分に分離した。目的融合タンパク質の発現および可溶化の確認は、SDS-PAGE により行った。

#### 4-5. SAPK2 K/A および SAPK2 K/A- 7S/N の大量精製

SAPK2 K/A および SAPK2 K/A- 7S/N の大量精製には、終濃度 50  $\mu$ M の IPTG で誘導し、18  $^{\circ}$ C で一晩培養した大腸菌を用いた。冷凍した菌体を Sonication buffer に懸濁し、氷上で超音波処理 (out put 4.5, duty cycle 50 %) 2.5 分間を 8 から 12 回行った。得られた破砕液を 40,000  $\times$  g で 1 時間遠心し、可溶性タンパク質を回収した。得られた可溶性融合タンパク質を、Chelating Sepharose Fast Flow レジン (GE Healthcare) 20 ml を充填し Ni イオンをキレートさせたカラム (以下 20 ml Ni chelating カラムなどと記す) に吸着させ、160 ml の Sonication buffer で洗浄後、イミダゾール濃度を 5 mM から 300 mM まで 1.5 mM/ml の濃度勾配をかけて溶出した。融合タンパク質を含むカラム溶出画分は、Centriplus YM-10 による濃縮後、ゲルろ過 buffer[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl] で平衡化した HiLoad 26/60 Superdex 75 pg (GE Healthcare) を用いてゲルろ過した。これらの精製融合タンパク質の一部に終濃度 0.5 mM になるように DTT を加え、1 mg タンパク質あたり 17 から 20 U の PreScission Protease (GE Healthcare) で 4  $^{\circ}$ C で、SAPK2 K/A の場合は 2 日間、SAPK2 K/A- 7S/N の

場合は 3 日間処理し、チオレドキシン (Trx)-His6 タグを切断した。プロテアーゼ処理の後の反応液を、5 ml Ni chelating カラムにかけて、Trx-His6 タグおよび未消化融合タンパク質を吸着させ、非吸着画分に目的タンパク質を回収した。得られた非吸着画分をそのまま Centriplus YM-10 により濃縮し、HiLoad 26/60 Superdex 75 pg を用いたゲルろ過精製に供した。さらに、終濃度 0.5 mM になるように DTT を加え、Centriplus YM-10 および Centricon YM-10 を用いて目的タンパク質を濃縮した。

## 5. ゲル内リン酸化アッセイ

### 5-1. イネ培養細胞からの細胞抽出液の調製

植え継ぎ後 3 日目のイネ培養細胞 (Oc 株) の培地を除き、0.4 M NaCl を含む R2S 培地または NaCl を含まない R2S 培地で 10 分間処理した後、処理培地を吸引により抜き取り、液体窒素で速やかに凍結した。液体窒素温度でこれを乳鉢、乳棒を用いてパウダー状に破碎し、3 倍容の Extraction buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.5), 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM  $\beta$ -グリセロリン酸, 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1xComplete<sup>TM</sup> EDTA-free, 250 mM スクロース, 0.1 % Tween20] に懸濁した。懸濁後 1,000 rpm、4 °C で 5 分間遠心して得た細胞抽出液を、あらかじめ Kinase buffer [25 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM  $\beta$ -グリセロリン酸, 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1xComplete<sup>TM</sup>-EDTA-free, 5 % グリセロール] で平衡化したゲル濾過カラム (エコノパック 10DG カラム; Bio-Rad) によってバッファー置換を行うとともに低分子成分を除去した。その後、15,000 rpm、4 °C で 15 分間遠心し、上清画分をゲル内リン酸化アッセイのサンプルとした。

### 5-2. ゲル内リン酸化アッセイ

基質タンパク質を終濃度 0.2 mg/ml になるように加えて作製した 10 % ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。電気泳動後、ゲルをプロパノール液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 % 2-プロパノール] 中で 30 分間振盪する操作を 2 回行った。その後、A 液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 % (v/v) 2-メルカプトエタノール, 0.2 mM EDTA]、続いて変性液 [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.5 % (v/v) 2-メルカプトエタノール, 0.2 mM EDTA, 6 M グアニジン] でそれぞれ 30 分間を 2 回ずつ振盪処理した。あらかじめ、4 °C で冷やしておいた再生液 [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.5 % (v/v) 2-メルカプトエタノール, 0.2 mM EDTA, 0.04 % Tween 40] で 4 °C、30 分間の振盪処理を 2 回、4 °C で一晩の処理を 1 回、さらにもう一度再生液で 4 °C、30 分間の振盪処理を行った。次に、B 液 [10 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1 mM EGTA, 2 mM DTT, 15 mM MgCl<sub>2</sub>] に置換して 30 分間振盪し、さらに 10 ml の B 液に交換した後、100  $\mu$ M ATP を 2  $\mu$ l と 50  $\mu$ M Ci/ml [  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ] ATP (比放射能 3000 Ci/mmol) を 5  $\mu$ l、また、場合によっては、目的の処理濃度になるようにスタウロスポリン (Wako) を加え、37 °C で 1 時間反応した。その後、洗浄液 (5 % TCA, 1 % Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O) で 30 分間 8 回洗い、ゲルを乾燥させた後、IP プレート (Molecular Dynamics) に露光し、Typhoon 9200 (GE healthcare) を用いて検出した。

## 6. 試験管内リン酸化アッセイ

Kinase buffer[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 10 mM MnCl<sub>2</sub>]4  $\mu$ lに、酵素として SAPK2 WT を 200 ng、基質として Trx-SAPK2 K/A、Trx-SAPK2 K/A-7S/N あるいは MBP を 200 ng、および 200  $\mu$ M ATP 1  $\mu$ lならびに 2  $\mu$ Ci の[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP を加え、滅菌水で総容量を 20  $\mu$ l にした。30  $^{\circ}$ C で反応後、10 あるいは 15 % ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分画した。分子量マーカーは Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad) を用いた。電気泳動後、洗浄液 (5 % TCA, 1 % Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O) で 15 分間の洗浄を 2 回行い、CBB 染色 (Simply Blue<sup>TM</sup> SafeStain; Invitrogen) を行った後乾燥した。乾燥後のゲルを IP プレート (Molecular Dynamics) に露光し、Typhoon 9200 (GE healthcare) を用いて検出した。

## 7. 抗 SAPK-リン酸化 Ser158 ペプチド抗体を用いたリコンビナント SAPK2 リン酸化活性の検出

Kinase buffer[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 10 mM MnCl<sub>2</sub>]に酵素として 200 ng の SAPK2 WT、基質として 200 ng の SAPK2 K/A あるいは SAPK2 K/A-7S/N、200  $\mu$ M の ATP を 1  $\mu$ l 加え、総容量を 20  $\mu$ l にした。30  $^{\circ}$ C で 60 分間の反応後、6 x Sample buffer を 4  $\mu$ l 加え、イムノブロットングに供した。抗 SAPK-リン酸化抗体を用いたイムノブロットングは上記の方法に幾つかの変更を加えた。メンブレンには PVDF メンブレン (Hybond-P; Amersham) を用いた。ブロッキングは、ブロッキング溶液[2 % BSA, 10 % スkimミルクを含む TTBS buffer]を用いて、室温で 1 晩穏やかに振盪しながらインキュベートすることにより行った。一次抗体処理は、1/20 希釈の抗 SAPK-リン酸化抗体を含むブロッキング溶液中で、37  $^{\circ}$ C で 1 時間振盪することにより行った。二次抗体処理は、1/2000 希釈のペルオキシダーゼ (Horse radish Peroxidase) 標識した二次抗体 (ECL Anti-rabbit IgG, Horse radish Peroxidase linked whole antibody; Amersham)を含むブロッキング溶液中で、37  $^{\circ}$ C で 1 時間振盪することにより行った。

## 第三章 結果

### 1. SAPK2 リン酸化部位の同定

SAPK を介する高浸透圧ストレスシグナル伝達、特に SAPK 分子に情報を伝える上流プロテインキナーゼを明らかにするためには、高浸透圧ストレスに応答してリン酸化されるアミノ酸残基を同定することが必須である。そこで、図1に示した SAPK2 アクティベーションループ中のセリンおよびスレオニン残基に変異を導入した発現プラスミドを作製し、高浸透圧ストレスに応答したリン酸化に変化があるかどうかを調べることによりリン酸化部位の同定を試みた。これまでの研究では、SAPK 分子のリン酸化状態の変化は、SDS-PAGE 上の移動度シフトにより観察してきたが、その解像度は高くなく、複数のリン酸化部位が存在する場合のリン酸化状態を区別することには限界があった。そこで、ここではリン酸化状態の変化を二次元電気泳動上の pI シフト、すなわちリン酸基の付加によるスポットの酸性側への移行として検出した。

dHA-His タグを付加した SAPK2(SAPK2-dHA-His)をプロトプラストで一過的に発現させ、

コントロール処理あるいは高浸透圧ストレス処理(400 mM NaCl)を行った後、二次元電気泳動によりタンパク質を分離、SAPK2-dHA-His を抗 HA 抗体を用いたイムノブロット解析により検出した。コントロール処理を施した細胞の SAPK2 は 1 つのメジャースポットと、それより酸性側の 1 つのマイナースポットとして検出された(図 2)。メジャースポットを基底状態として考えると、コントロール処理においても一部の分子がリン酸化を受けているものと思われた。また、高浸透圧ストレス処理を行うと、基底状態より酸性側に 4 つのスポットが出現した(図 2)。したがって、SAPK2 は高浸透圧ストレスに応答して少なくとも 4 カ所でリン酸化されると考えられた。また、アクティベーションループ前半の 4 つのセリンをアスパラギンに置換した ANS1 では基底状態より酸性側に移行した 2 つのスポットが確認された(図 2)。アクティベーションループ後半の 3 つのセリンおよびスレオニンをアスパラギンに置換した ANS2 では基底状態より酸性側に移行した 3 つのスポットが、アクティベーションループ中の 7 つ全てのセリンおよびスレオニンをアスパラギンに置換した ANS3 では酸性側に移行した 1 つのスポットが出現した(図 2)。ANS3 でも pI シフトがみられたことより、SAPK2 はアクティベーションループ外の領域に少なくとも 1 ヶ所リン酸化部位が存在すると思われる。また、ANS1 および ANS2 変異でのスポットの減少から、SAPK2 のアクティベーションループ前半には少なくとも 2 ヶ所、アクティベーションループ後半には少なくとも 1 ヶ所リン酸化部位が存在すると思われた。ANS1 あるいは ANS2 にさらに 1 アミノ酸の変異を加えたコンストラクトを用いて細かく調べてみると、コンストラクト 147、149、150 および 154 を用いた場合において、147 および 149 では基底状態より酸性側に移行したスポットが共に 3 つであったのに対し、150 および 154 では酸性側に移行したスポットが 2 つであった(図 2)。ここで、ANS2 で酸性側に移行したスポットの数は 2 つにもみえたが、147 および 149 では共に酸性側移行スポットが 3 つであったことから、ANS2 でみられた酸性側移行スポットも 3 つであると考えた。また、コンストラクト 158、159 および 162 を用いた場合、159 および 162 では酸性側に移行したスポットが 2 つであったのに対し、158 では酸性側に移行したスポットが 1 つであった(図 2)。これらの結果およびアクティベーションループ外の領域に 1 ヶ所リン酸化部位が存在することから、SAPK2 は高浸透圧ストレスに応答して少なくともアクティベーションループ内 Ser150、Ser154、Ser158 がリン酸化されると考えられた。

研究の途中で、Phos-Tag というリン酸基に親和性をもつ化合物をポリアクリルアミドに結合させたゲルを用いて SDS-PAGE を行うことによりタンパク質のリン酸化を明瞭な移動度シフトとして検出できる技術があることがわかった。そこで、この手法を用いて、上記の SAPK2 変異体の幾つかについて、高浸透圧ストレスに応答したリン酸化状態の変化を調べた。

SAPK2 (WT)および変異体 ANS1、ANS2 および ANS3 を Phos-Tag SDS-PAGE に供したところ、WT ではコントロール処理した場合に基底状態と思われるバンドが 1 つ、高浸透圧ストレス処理した場合に高度にリン酸化されたとと思われるバンドが 1 つ出現した(図 3)。また ANS1 では高浸透圧ストレス処理した場合に 3 つのバンド、ANS2 では 5 つのバンド、ANS3 では 2 つの明確なバンドが確認された(図 3)。各レーンの 1 番下に現れたバンドを基底状態とすると、まず ANS3 の結果から SAPK2 アクティベーションループ外の領域には少なくとも 1 ヶ所リン酸化部位が存在すると思われた。このことから、SAPK2 アクティベーションループ領域前半には少なくとも 3 ヶ所、後半には少なくとも 1 ヶ所、つまりアクティベーションループ全体では少なくとも 4 ヶ所が高浸透圧ストレスに応答してリン酸化されると思われた。

この結果と上述した二次元電気泳動の結果を比較すると、SAPK2 アクティベーションループ後半およびアクティベーションループ外の領域に存在すると推測されたリン酸化部位の数は一

致した。アクティベーションループ前半において推測されるリン酸化部位の数が、Phos-Tag SDS-PAGE で調べた場合、二次元電気泳動で調べた場合よりも 1 つ多くなったが、Ser150、Ser154 および Ser158 が SAPK2 リン酸化部位であるという結果に対しては問題ないと思われた。ところが、Phos-Tag SDS-PAGE はタンパク質のリン酸化の程度に準じた移動度シフトを生じさせることを考慮すると、ANS2 で現れた下から 2 番目のバンドが示す SAPK2 リン酸化状態と下から 3 番目のバンドが示す SAPK2 リン酸化状態の間には、1 つあるいは 2 つの別の SAPK2 リン酸化状態が存在する可能性が残されたが、他のコンストラクトを用いて確認するには至らなかった。

## 2. 抗 SAPK-リン酸化 Ser158 ペプチド抗体の作製

上記の結果から、SAPK の活性化に関わる上流プロテインキナーゼは Ser158 を含むアクティベーションループ中の幾つかのセリン・スレオニンを効率よくリン酸化するプロテインキナーゼであることが期待される。これらセリンのリン酸化を特異的に認識する抗体が得られれば、このような活性を持つプロテインキナーゼの検出・同定を試みるための有力なツールになる。また、*in vivo* での SAPK のリン酸化状態、活性化状態をモニターすることもできる。そこで、このリン酸化 Ser158 と周辺配列を含む 9 アミノ酸のペプチドにカップリング用のシステインを加えた QPK(pS)TVGTPC を合成し、ウサギに免疫した(MBL 社に外注)。このペプチド配列の選択に当たっては、抗原性と SAPK ファミリーの複数のメンバーを認識できることの 2 点を考慮に入れた。得られた血清から、リン酸化ペプチドを用いたアフィニティー精製と対応する非リン酸化ペプチドによる吸収により抗 SAPK-リン酸化 Ser158 ペプチド抗体(抗 SAPK-リン酸化抗体)を得た。

大腸菌で発現させ、精製したチオレドキシン(Trx) 融合 SAPK2(Trx-SAPK2 WT)、その活性部位のリジンアラニンを置換することにより酵素活性をもたなくなった改変 SAPK2(Trx-SAPK2 K/A)、さらにアクティベーションループ中の全てのセリンおよびスレオニンをアスパラギンに置換した改変 SAPK2(Trx-SAPK2 K/A-7S/N)それぞれ 10 から 1000 ng を SDS-PAGE によって分画し、1/20 希釈の抗 SAPK-リン酸化抗体および 1/2000 希釈のペルオキシダーゼ(Horse Radish Peroxidase)標識した二次抗体(抗ウサギ IgG)を用いてイムノブロット解析を行った。その結果、100 ng 以上の Trx-SAPK2 WT についてのみ抗 SAPK2-リン酸化抗体によるシグナルが検出された(図 4)。Trx-SAPK2 WT は大腸菌内ですでに自己リン酸化を受けているのに対して、Trx-SAPK2 K/A はリン酸化されていないことが明らかにされている(青田、2007、名古屋大学大学院生命農学研究科修士論文)。したがって、この抗体は Ser158 のリン酸化を特異的に認識できる抗体であると考えられた。ただし、1/20 希釈という高い濃度を用いても 100 ng 以上の Trx-SAPK2 WT しか検出できなかったことから、この抗体を用いて *in vivo* での SAPK のリン酸化状態や活性化状態をモニターするには力価は不十分であると予想された。ただし、Trx-SAPK2 WT のどの程度の割合の分子の Ser158 がリン酸化されているかは不明であることから、実際の検出感度はもっと高い可能性もある。

## 3. イネ培養細胞抽出液による SAPK2 リン酸化活性

SAPK リン酸化活性をもつプロテインキナーゼを探索する目的で、高浸透圧ストレス処理、あるいはコントロール処理をしたイネ培養細胞抽出液を用いて、SAPK2 リン酸化活性を



SAPK2 K/A あるいは SAPK2 K/A-7S/N(図 5-A)を基質としたゲル内リン酸化アッセイによって調べた。高浸透圧ストレスシグナルが SAPK に伝達される経路において  $\text{Ca}^{2+}$  が働いていることが当研究室で明らかにされている。そこでゲル内リン酸化アッセイは  $\text{Ca}^{2+}$  存在下および非存在下の両方で行った。その結果、55 kD 付近に  $\text{Ca}^{2+}$  存在下のみにおいて検出される SAPK2 リン酸化活性バンドが確認された(図 5-B)。また、この活性バンドの移動度は SAPK2 K/A を基質とした場合のほうが SAPK2 K/A-7S/N を基質にした場合よりも遅かった(図 5-B)。これには、基質の違いにより異なるプロテインキナーゼを検出している可能性と、アクティベーションループ中のセリン・スレオニンとの親和性の違いにより移動度が変化している可能性の 2 つが考えられた。前者であるとすれば、SAPK2 K/A でみられたリン酸化活性はアクティベーションループ内のリン酸化であり高浸透圧ストレスシグナルを SAPK2 に伝達する上流プロテインキナーゼによるものかもしれない。また、後者である場合においても、アクティベーションループ中のアミノ酸配列の違いに起因することから、SAPK のリン酸化に関わるプロテインキナーゼであることを否定するものではない。

また、特異性の低いプロテインキナーゼ阻害剤であるスタウロスポリンは SnRK2 プロテインキナーゼの活性を強く阻害するが、高浸透圧ストレスおよび ABA 処理による *in vivo* での SnRK2 メンバーの活性化はスタウロスポリンによる阻害を受けないことが報告されている(Boudsocq et al., 2007)。また、当研究室においても、スタウロスポリンは高い濃度においてのみ SAPK2 の高浸透圧ストレスによる活性化を阻害することが示されている。したがって、SAPK の上流プロテインキナーゼは、スタウロスポリンに対する感受性が低いことが期待される。そこで、上記のゲル内リン酸化反応を種々の濃度のスタウロスポリン存在下で行ってみた。スタウロスポリン 0.1  $\mu\text{M}$  存在下では、75 kD 付近のプロテインキナーゼ活性を強く阻害したのに対し、上述の 55 kD 付近の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性活性は阻害しなかった(図 5-C)。さらに高い 1  $\mu\text{M}$  ではこの活性は完全に阻害された。一方、これより低い分子量のプロテインキナーゼ活性はこの濃度においても阻害されなかった(図 5-C)。したがって、SAPK をリン酸化する 55 kD 付近の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性プロテインキナーゼはスタウロスポリンによって阻害されるものの、その感受性は高くないものと思われる。しかし、この  $\text{Ca}^{2+}$  依存性プロテインキナーゼが SAPK の上流キナーゼであるか否かについては、さらに詳細な検討が必要である。

#### 4. 3 量体 G タンパク質の SAPK10 活性化に与える影響

種々の阻害剤を用いた研究により、高浸透圧ストレスに応答した SAPK の活性化には  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが関与することがこれまでに示されている。本研究では、文献情報をもとにさらに別の上流因子に関する探索を試みた。SAPK メンバーのうち、SAPK8 から 10 は高浸透圧ストレスのみならず、ABA による活性化も受ける。そこで ABA シグナルによる活性化も含め、SAPK10 の活性化に影響を及ぼす因子を探索することにした。

気孔の ABA 応答には 3 量体 G タンパク質の関与が示されており、さらにこの応答には ABA 活性化型の SnRK2 プロテインキナーゼが働いている。そこで、動物で 3 量体 G タンパク質の活性化剤として働くことが知られているマストパランや、3 量体 G タンパク質  $\alpha$  サブユニットおよびその構成的活性型の共発現による SAPK10 活性化に対する影響を調べた。

dHA-His タグを付加した SAPK10 を一過的に発現させたプロトプラストに対し、終濃度 0 から 25  $\mu\text{M}$  のマストパラン存在下で、コントロール処理あるいは高浸透圧ストレス処理(400 mM NaCl)あるいは、ABA 処理(50  $\mu\text{M}$ )を 15 分間処理した後、MBP を基質としたゲル内リ

ン酸化アッセイにより発現した SAPK10 活性を検出した。高浸透圧ストレス処理による SAPK10 の活性化は、マストパランによって影響されなかったが、ABA による SAPK10 の活性化は、マストパラン濃度に依存して少ないながら低下した(図 6-A)。このことは、3 量体 G タンパク質が ABA による SAPK10 の活性化を負に制御している可能性を示唆する。

また、3 量体 G タンパク質  $\alpha$  サブユニット( $G\alpha$ )またはその構成的活性型変異体( $G\alpha^*$ )を共発現させたとき、SAPK10 の活性化に影響するか否かを調べた。その結果、 $G\alpha$  および  $G\alpha^*$  は、高浸透圧ストレス処理を施したときの SAPK10 の活性を促進するようにみえた(図 6-B)。そこで、それぞれの発現プラスミドの組み合わせによる遺伝子導入(エレクトロポレーション)を 3 反復行い、イムノブロットで検出した SAPK10 シグナルで標準化 SAPK 活性を定量化した。その結果、 $G\alpha$  および  $G\alpha^*$  は、SAPK10 の活性化を促進する傾向を示したが、その効果はあってもわずかであると思われた(図 6-C)。

動物ではスフィンゴシンは、細胞内メッセンジャーとして、またスフィンゴシン受容体ファミリーの G タンパク質共役型受容体に対する細胞外リガンドとして機能し、細胞分裂からアポトーシスに至る多様な生命現象を調節している。植物では、スフィンゴシンが ABA による孔辺細胞膨圧の調節に関与する 3 量体 G タンパク質の上流因子であることが報告されている(Coursol et al., 2003)。そこで、スフィンゴシン 1-リン酸の SAPK10 活性化に対する影響を調べたが、濃度 1 から 25  $\mu$ M の範囲では、顕著な効果は観察されなかった(データは示さず)。

## 5. フォスファチジン酸の SAPK 活性化に対する効果

これまで、ホスホリパーゼ D(PLD)やこの酵素反応産物であるフォスファチジン酸(PA)が ABA シグナル伝達や高浸透圧ストレス応答シグナル伝達において重要な働きをしていることが報告されている(Mustilli et al., 2002)。また、細胞外からミセル状で与えた PA もシグナル分子として機能することが幾つかの研究で報告されている(Komis et al., 2006; Zhang et al., 2003)。そこで、SAPK2 あるいは SAPK10 を一過的に発現させたプロトプラストに PA を添加し、SAPK を活性化するか否か、あるいは高浸透圧ストレスや ABA による活性化に対して影響があるか否かを調べた。しかし、50 から 1,000  $\mu$ M の範囲で PA が SAPK2 を活性化することにはなかった(図 7-A)。一方、Phos-Tag ゲルによるイムノブロット解析によって発現した SAPK2 を検出すると、高浸透圧ストレスによるリン酸化・活性化に伴って移動度シフトしたバンドよりさらに泳動度が遅いバンドが観察された(図 7-A)。SAPK10 についても同様な結果が得られた(図 7-B)。このような結果から、SAPK2 および SAPK10 は、PA 処理によって活性化とは無関係に高いレベルのリン酸化を受けるように思えた。

次に細胞に与えた PA が、高浸透圧ストレスや ABA による SAPK の活性化に影響するか否かを調べた。dHA-His タグを付加した SAPK10 を 500  $\mu$ M PA 存在下あるいは非存在下において 400 mM NaCl あるいは 50  $\mu$ M ABA で処理し、タイムコースをとって SAPK10 活性を測定するとともに Phos-Tag SDS-PAGE によりリン酸化状態を調べた。その結果、処理 5 分から 60 分の間において PA は、高浸透圧ストレスおよび ABA 処理による SAPK10 の活性化に対して影響を及ぼさないことがわかった(図 8)。一方、Phos-Tag SDS-PAGE 後のイムノブロット解析では、処理時間にかかわらず PA 処理による大きな移動度シフトが観察された(図 8)。

## 6. SAPK の PA 結合活性

5分という短いPA処理で定常レベルの大きな移動度シフトが起きたことから、この移動度シフトが本当にPAシグナルを受けてのSAPKのリン酸化レベルの上昇を現しているのか否かについて疑念をもった。そこで、処理時間0分、すなわち、PAを添加直後にプロトプラスト培養液を液体窒素で凍らせ、Phos-Tag SDS-PAGEを行ったところ、同様の移動度シフトが観察された(図9)。また、プロトプラストを未処理のまま液体窒素で凍結し、ソニケーションによる細胞破碎後、PAを添加しPhos-Tag SDS-PAGEを行った場合においても同様に移動度シフトが観察された。したがって、このPhos-Tag上でのSAPKの大きな移動度シフトは、PAによって誘起されたリン酸化によるものではないと考えた。PAがリン酸基をもつこと、およびこのプロトプラストを用いた実験系では細胞を培地ごと抽出しており、抽出液中にもPAが高い濃度で含まれていることから考えて、この大きな移動度シフトは、リン酸化ではなくSAPK分子にPAが強固に結合し、そのPAに含まれるリン酸基がPhos-Tagに強い親和性を示した結果によるものであらうと考えた。蛍光あるいはRI標識PAを用いた実験での確認が必要ではあるが、シロイヌナズナ中のPA結合タンパク質をPA-アガロースを用いて網羅的に解析した研究においてSnRK2プロテインキナーゼの一つがPA結合タンパク質として報告されていた(Testerik et al., 2004)ことから考えても、この結論は間違いないものと思われる。

上記のようなSAPKのPA結合能が生物学的に意味のあるものか否かを検討するために、他のリン脂質でも同様な移動度シフトが起きるか否かを確かめた。すなわち、SAPK2あるいはSAPK10を発現するプロトプラストの抽出液に、PAのほか、リゾフォスファチジン酸(LPA)、フォスファチジルコリン(PC)あるいはフォスファチジエタノールアミン(PE)を添加し、Phos-Tag SDS-PAGEを行った。その結果、PA添加時のみに明瞭な大きな移動度シフトが観察された(図10-B)。また、この実験でSAPK10の方がSAPK2よりPA結合能が高いようにみえた。PCおよびPEに含まれるリン酸基はグリセロール骨格とのエステル結合に加えてコリンあるいはエタノールアミン残基とも結合している点でPAとは異なり、Phos-Tagとの相互作用がないか弱いために移動度シフトが観察されなかった可能性も否定できない。しかし、LPAのリン酸基はPAと同等の状態にあり、構造上もアシル基が一つ少ないだけである。このことから考えて、PAのSAPKに対する結合は特異性の高いものであると思われた。

PA添加による移動度シフトが、SAPKに特異的なものではなく、サンプルに残存するPAによりタンパク質の種類に限らず、Phos-Tag SDS-PAGE上で移動度シフトを引き起こすという可能性についても検討した。当研究室でこれまで使用してきたdnaJ様タンパク質、sec14様タンパク質、HSP90および $\alpha$ -tubulinのdHA-Hisタグ付きタンパク質発現プラスミドを用いて同様にPAによるPhos-Tag SDS-PAGE上での移動シフトを調べた。これ以降の実験では、リン脂質を添加直後にプロトプラスト培養液を液体窒素で凍結し、タンパク質を抽出した。その結果、dnaJ様タンパク質およびsec14様タンパク質に関しては、PA添加による明瞭な移動度シフトは見られなかった(図11)。一方、HSP90および $\alpha$ -tubulinはPA添加により非常に明確な移動度シフトを示した(図11)。偶然の一致ではあるが、HSP90および $\alpha$ -tubulinは先に述べたPA結合タンパク質の網羅的解析のなかでPA結合性が示されていた(Testerik et al., 2004)。したがって、これらの結果は、Phos-Tag SDS-PAGEにおける移動度シフトでみたPA結合性は、タンパク質に関して特異性があることを示している。

さらに、結合の特異性およびSAPK中のPA結合部位に関する情報を得るために、SAPK10のC-末端欠失タンパク質の発現プラスミドを用いてPA結合能を比較した。その結果、SAPK10のC-末端側アミノ酸配列のうち、酸性アミノ酸に富む特徴的な領域の欠失によりPA

結合能が上昇することがわかった(図 12-B)。これは、この領域が SAPK と PA の結合に対して阻害的に働いているものと考えられた。また、SAPK1 についても同様の傾向が観察された(データは示さず)。

以上の結果は、PA が浸透圧ストレスや ABA シグナリングにおいて情報分子として働いているという報告を考え合わせると、PA と SAPK の結合はシグナル伝達において何らかの意味があることを期待させる。

## 7. PA の結合が SAPK2 活性に与える影響

SAPK と PA の特異的結合の生理的意義についてさらに検討するために、PA の SAPK 酵素活性に対する影響を調べた。大腸菌で発現させ、精製した SAPK2 を用い、MBP を基質とした試験管内リン酸化反応に PA を添加した。また、同時に基質を加えない反応も行い、SAPK2 の自己リン酸化反応に対する PA の効果も調べた。その結果、PA 添加(100  $\mu$ M)は、MBP リン酸化活性および同時に起きる SAPK2 自己リン酸化活性には大きな影響を及ぼさないことがわかった(図 13-A)。一方、基質を加えないで反応させた場合の SAPK2 自己リン酸化活性は、PA 添加により顕著に促進されることがわかった(図 13-A)。そこで、PA の自己リン酸化反応促進効果についてさらに検討を加えた。

SnRK2 は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的なプロテインキナーゼではないが、 $\text{Ca}^{2+}$  によってその活性が若干促進されることが報告されている。また、高浸透圧ストレスシグナルが SAPK に伝達される経路において  $\text{Ca}^{2+}$  が働いていることも当研究室で明らかにされている。そこで  $\text{Ca}^{2+}$  存在下および非存在下の両方において PA の SAPK2 自己リン酸化に対する影響をタイムコースをとって調べた。その結果、反応時間 15 分では明確でなかったものの、反応時間 60 および 120 分において SAPK2 の自己リン酸化活性が、 $\text{Ca}^{2+}$  の有無にかかわらず、PA によって促進されることが確認できた(図 13-B)。

次に、この SAPK2 自己リン酸化促進作用が、PA 特異的なものであるのかを調べるために、LPA、PC および PE の効果を調べたところ、何れのリン脂質も自己リン酸化を促進することがわかった(図 14)。したがって、PA の自己リン酸化促進作用は、その SAPK への特異的結合とは関連しない可能性が高いと思われた。

SAPK の自己リン酸化とその PA による促進作用は、SAPK の活性制御において何らかの意義があるのだろうか？その可能性を探る目的で、この自己リン酸化によってアクティベーションループ中のセリンおよびスレオニンがリン酸化されるかどうかを調べた。SAPK2 の分子間自己リン酸化は、野生型組換え SAPK2(SAPK2 WT)を酵素とし、活性部位のリジンアラニンに置換しかつ N 末端に TRX タグを付した酵素活性を持たない改変 SAPK2(Trx-SAPK2 K/A)を基質に用いて活性を測定し、アクティベーションループ中のセリンおよびスレオニンを全てアスパラギンに置換した Trx-SAPK2 K/A-7S/N を基質に用いた場合と比較した。その結果、Trx-SAPK2 K/A-7S/N を基質に用いた場合、Trx-SAPK2 K/A に比べてそのリン酸化レベルは低下した(図 15)。このことは、分子間自己リン酸化の一部は、アクティベーションループ中に起こっていることを示している。また、SAPK2 による Trx-SAPK2 K/A のリン酸化も PA により促進されることがわかった(図 15)。このことは、PA の活性促進作用が(分子間)自己リン酸化に特有の現象であることを示すものである。

さらに、このアクティベーションループ中に起こる SAPK2 の分子間自己リン酸化が、この研究で明らかにした活性制御に重要であるリン酸化部位 Ser158 に起こっているかどうかを上述

の抗 SAPK-リン酸化抗体を用いて調べた。この抗体の力価が高くないことを考慮して、酵素 SAPK2 WT と基質 Trx-SAPK2 K/A あるいは Trx-SAPK2 K/A-7S/N の濃度を標準より 5 倍高い濃度にし、非標識 ATP を用いた試験管内リン酸化反応を行った。反応産物を抗 SAPK-リン酸化抗体を用いたイムノブロット解析で調べたところ、Trx-SAPK2 K/A あるいは Trx-SAPK2 K/A-7S/N は抗体と反応しないことがわかった(図 16)。したがって、SAPK2 の自己リン酸化では、Ser158 はリン酸化されないかあるいはされても極低レベルであるものと考えられた。

## 第四章 考察

### 1. 高浸透圧ストレスシグナルにおける SAPK2 のリン酸化部位

SnRK2 メンバーが高浸透圧ストレスに応答してリン酸化されるアミノ酸残基を同定することは、SnRK2 プロテインキナーゼの活性化メカニズムの理解だけではなく、SnRK2 プロテインキナーゼにシグナルを伝える上流プロテインキナーゼを明らかにし、そのシグナル伝達機構を解明するための有力な情報となる。そこで本実験では、イネゲノムにコードされた 10 個の SAPK のうち、当研究室において大腸菌による大量発現系が構築されているなど、最も機能解析が進められている SAPK2 に焦点をあてて実験を行った。

二次元電気泳動を用いた解析では、SAPK2 は高浸透圧ストレス処理(400 mM NaCl)によりアクティベーションループ内の Ser150、Ser154、Ser158 およびアクティベーションループ外に 1ヶ所の計 4ヶ所がリン酸化されることが推定された(図 2)。この解析で調べた全てのアミノ酸置換変異体において、二次元電気泳動上で示すスポット数とそれぞれが示す予想されるリン酸化部位の数の間に矛盾が生じなかったことから、信頼性の高い結論であるといえる。また研究過程において Burza ら(2006)により、培養細胞から精製したタバコ SnRK2 プロテインキナーゼ NtOSAK のアクティベーションループ内の Ser154 と Ser158(SAPK2 においても同じ残基に相当)が高浸透圧ストレスに応答してリン酸化されると報告されており、本研究の結論を支持するものである。しかし、アクティベーションループ外のリン酸化はこれまで指摘されておらず、新奇の発見である。一方 Phos-Tag SDS-PAGE を用いた解析からは、SAPK2 は少なくとも 5ヶ所リン酸化されるという可能性が示され、そのうち 1つは Ser147 あるいは Ser149 であると思われた(図 3)。しかし、アクティベーションループ後半に存在する2つのセリン・スレオニンを全て置換しても、野生型と同じ高いレベルのリン酸化に相当するバンドが検出されたことの説明はついていない。コントロール処理においても一部の分子がリン酸化を受けていることから、SAPK2 の活性化に必要な複数のリン酸化部位のうち、活性を得るには至らないがとてもリン酸化されやすいリン酸化部位が存在すると思われ、また SAPK2 は段階的なリン酸化を経て迅速に活性化されると予想される。各変異体についてゲル内リン酸化アッセイでそれらの活性を調べることはしていないが、これまで SnRK2 プロテインキナーゼのアクティベーションループ中の幾つかのセリン・スレオニンについてアミノ酸置換が試されており、何れの場合も活性を失うことが報告されている。しかし、全てについて解析が行われているわけではないことから、さらに徹底した解析が必要であろう。また、これまで、同領域のセリン・スレオニンを酸性アミノ酸に置換することによりリン酸化を模倣し、構成的活性化型の変異体を得る試みが複数の研究室で行われてきたが、何れにおいても成功しておらず、全ての場合において活性が失われるという結果になっている。このような点において今回明らかになったアクティベーションループ外のリン酸化は興味深い。今後このリン酸化部位を同定することにより SAPK2 を含む

SnRK2 プロテインキナーゼの活性化制御の仕組みがより詳細に解明されることが期待され、また構成的活性型変異体の作製にもつながるかもしれない。

また、SAPK8、SAPK9 および SAPK10 は ABA と高浸透圧ストレスによって相乗的に活性化されることが示されている(山本、2004、三重大学大学院生物資源学研究科修士論文)。この ABA による活性化は迅速で、ABA の合成蓄積を介するものとは考えられない。SAPK メンバーによって ABA による活性化を受けるものと受けないものがあること、および C-末端制御ドメインの部分欠失によって ABA による活性化のみが消失することは、高浸透圧ストレスシグナルと ABA シグナルが独立に ABA 活性化型 SnRK2 プロテインキナーゼに伝達されることを意味する。このことから、ABA シグナルによるリン酸化が高浸透圧ストレスによるそれとは異なる部位で起こる可能性も考えられる。つまり、同じ部位がリン酸化されるならば、高浸透圧ストレスによりそれ以上活性化されない状態に ABA を同時に処理しても、活性化に対する付加的な効果は見られないはずである。こうした意味において、ABA シグナルによる SAPK のリン酸化部位についても調べることはとても興味深い。最近、Boudsocq ら(2007)は、シロイヌナズナの SnRK2 プロテインキナーゼの活性化におけるリン酸化の程度がメンバーごとに違うこと、また、ABA による活性化を受けるメンバーでは、高浸透圧ストレスによる活性化と ABA による活性化ではリン酸化のレベルが異なることを主張している。また、SAPK2 と同じサブクラス II に属し、高浸透圧ストレスのみによって活性化される SAPK3 では、SAPK2 の Ser150 に相当するアミノ酸残基はセリンではなくアラニンであることから、少なくとも同定したリン酸化アミノ酸部位は SAPK メンバー全てに共通ではないといえる。これは、Boudsocq の結果と一致している。SAPK2 の高浸透圧ストレスによるリン酸化は、通常の SDS-PAGE でも長時間の泳動により移動度シフトとして観察できる。しかし、メンバーによっては活性化に伴う移動度シフトを検出できないものもあり、これもメンバー間でのリン酸化レベルの違いを反映しているものと思われる。SAPK2 の Ser154 および Ser158 についてはイネ SnRK2 メンバー全てに保存されていることを考えると、それらのリン酸化がイネ SnRK2 プロテインキナーゼの活性化メカニズムに基本的に重要な働きをしていると推定される。また、Phos-Tag SDS-PAGE を用いた解析において Ser147 あるいは Ser149 がリン酸化部位である可能性が示唆されたが、これらのアミノ酸残基もメンバー全てに保存されている。このことを考えると、メンバー間で活性化に伴うリン酸化のレベルが異なることは、対応するリン酸化部位があるかないかの違いのみによるものではないものと思われる。

## 2. イネ SnRK2 メンバーを活性化する上流因子の探索

高等植物において  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に活性化されることが知られているプロテインキナーゼは calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)、カルモジュリン様ドメインを分子内にもつ  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase (CDPK) および calcineurin 様カルシウム結合タンパク質 (CBL) と結合する CBL-interacting protein kinase (CIPK) である。ただし、CaMK は、幾つかの植物では報告があるもののシロイヌナズナゲノムにはコードされていない。CDPK ファミリーの幾つかのメンバーや CIPK および CBL ファミリーの特定メンバーの高浸透圧を含むストレス応答への関与が知られている。特に、CDPK は  $\text{Ca}^{2+}$  に加えて、シグナル依存的なリン酸化による活性を受ける場合や (Romeis et al., 2001)、自己リン酸化による活性化を受ける場合 (Cheng et al., 2002) が知られている。



これまでに、当研究室においても高浸透圧ストレスシグナルが SAPK に伝達される経路において  $\text{Ca}^{2+}$  が働いていることが明らかにされている。そこで、イネ培養細胞抽出液中に存在する未知の上流プロテインキナーゼを探索する目的で、SAPK2 リン酸化活性をゲル内リン酸化アッセイにより調べたところ、55 kD 付近に確かに  $\text{Ca}^{2+}$  依存性であるリン酸化活性が検出された(図 5-B)。また、この活性バンドの移動度は SAPK2 K/A を基質とした場合と SAPK2 K/A-7S/N を基質にした場合で異なっていた。もしこの違いが、SAPK2 K/A および SAPK2 K/A-7S/N 両基質のアクティベーションループにおけるアミノ酸配列の違いを認識した異なるプロテインキナーゼによるリン酸化の結果であるとする、SAPK2 K/A でみられたリン酸化活性はアクティベーションループ内のリン酸化であり、SAPK2 K/A をリン酸化したプロテインキナーゼが高浸透圧ストレスシグナルを SAPK2 に伝達する上流プロテインキナーゼである可能性も含まれる。一方、これらが同じプロテインキナーゼであるとするならば、そのアクティベーションループ中のセリン・スレオニンへの親和性の違いに起因して移動度の違い(遅れ)が観察されたものと考えられ、この場合も、SAPK2 の活性化と何らかの関係がある可能性がある。

一方、Boudsocq ら(2007)は、*in vivo* での高浸透圧ストレスおよび ABA シグナルによる SnRK2 メンバーの活性化はスタウロスポリンによって阻害されないことを報告した。スタウロスポリンが上述の SAPK2 リン酸化活性にどのような影響を及ぼすのかについて同様にゲル内リン酸化アッセイによって調べたところ、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性な 55 kD 付近のプロテインキナーゼ活性は  $1 \mu\text{M}$  のスタウロスポリンで処理した場合、ほとんど活性が阻害されたものの、75 kD 付近のプロテインキナーゼ活性に比べ、スタウロスポリンによる阻害感受性は低かった(図 5-C)。ただ、この  $\text{Ca}^{2+}$  依存性活性より低い分子量の  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性プロテインキナーゼ活性は  $1 \mu\text{M}$  スタウロスポリン処理においても阻害されなかった。今回の実験で、Boudsocq ら(2007)が報告したようにスタウロスポリンの活性阻害を受けない、あるいは阻害感受性の低いプロテインキナーゼ活性が複数観察されたが、SAPK の上流プロテインキナーゼであるという明確な情報は得られなかったため、さらに検証する必要がある。

気孔の ABA 応答には 3 量体 G タンパク質、PLD および PA の関与が示されており(Wang, 2002; Wang et al., 2006)、さらにこの応答には ABA 活性化型の SnRK2 プロテインキナーゼが働いていることが分かっている(Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002)。また 3 量体 G タンパク質は、細胞膜の細胞質側表層に存在する受容体 G protein-coupled receptor (GPCR) で受け取られた情報を細胞内に伝達する役割を果たすことが明らかとなっている(Pierce et al., 2002)。最近、シロイヌナズナ GPCR 様タンパク質が細胞膜における ABA 受容体であることが報告された(Liu et al., 2007)。ただ、この報告に対する否定的な見解も発表されている。このような背景に基づき、高浸透圧ストレスおよび ABA シグナルにより活性化される SAPK10 を用いて、動物では 3 量体 G タンパク質の活性化剤として働くマストパランや PLD の活性化剤であるスフィンゴシンによる薬剤処理、あるいは 3 量体 G タンパク質  $\alpha$  サブユニットおよびその構成的活性型の共発現による SAPK10 の活性化に対する影響を調べた。その結果、スフィンゴシンによる SAPK10 活性化への影響は見られなかったが、SAPK10 を一過的に発現させたプロトプラスト培養液を ABA およびマストパランで処理したところ、ABA による SAPK10 の活性化が阻害された(図 6-A)。一方、3 量体 G タンパク質  $\alpha$  サブユニットまたはその構成的活性型変異体を共発現させたとき、高浸透圧ストレスに応じて SAPK10 の活性化を促進する傾向を示したが、その効果は顕著ではなかった(図 6-B, C)。また、プロトプラスト培養液に PA を処理した何れの場合においても、SAPK2 および SAPK10 活性化への影響は観

察されなかった(図 7, 8)。残念なことに、今回の実験からは SAPK の活性化に関与すると思われる上流因子の決定的な手掛かりを得るには至らず、また、植物におけるマストパランの効果には疑問も投げかけられているが、3 量体 G タンパク質は ABA による SAPK10 の活性化を負に制御するという可能性を残した。何らかの有効な手掛かりとなることを期待したい。

### 3. フォスファチジン酸の特定タンパク質への特異的結合

上述のように PA の効果を調べる過程で、SAPK のリン酸化状態を Phos-Tag SDS-PAGE によるバンドの移動度シフトとして観察しようとしたところ、PA 処理によるリン酸化とも思える移動度の遅延が観察された。しかし、シフトしたバンドの移動度は高浸透圧ストレスおよび ABA 処理したときの活性化状態を示すそれよりも大きく、そのうえ SAPK の活性化に伴うものではなかった(図 7, 8)。この移動度シフトは始め、リン酸化によるものと考えたが、詳しく調べてみると、この現象が PA シグナルを受けての SAPK のリン酸化に起因するものではなく、PA が SAPK 分子に強固に結合し、PA に含まれるリン酸基が Phos-Tag に強い親和性を示した結果であると考えられた。ただし、蛍光あるいは RI 標識 PA を用いて PA の SAPK 結合能を確認するまでには至っていない。また、この結合によるバンドシフトは、PA と同様の状態のリン酸基をもつ LPA をはじめ、種々のリン脂質処理において観察されなかったことから、PA 特異的なものであることが確認された(図 10)。さらに、HSP90 および  $\alpha$ -tubulin においては PA との結合能(移動度シフト)を示したのに対し、dnaJ 様タンパク質および sec14 様タンパク質では PA との結合能を示さなかった(図 11)。この結果を裏付けるものとして、Testerik ら(2004)が PA-Sepharose を用いて行ったシロイヌナズナ中の PA 結合タンパク質の網羅的解析が挙げられる。Testerik らは其中で、PA 結合タンパク質の候補として SnRK2 プロテインキナーゼ、HSP90 および  $\alpha$ -tubulin が含まれることを示している。本実験で PA 結合性を試したタンパク質は何れも当研究室で SAPK の標的基質の探索する上でその候補として発現ベクターを構築したもので、酵母 two-hybrid スクリーニングで選抜されたもや、高浸透圧ストレスによって迅速にリン酸化されると考えられるタンパク質である。HSP90 および  $\alpha$ -tubulin の PA への結合と SAPK への PA の結合は、単なる偶然の一致ではなく、何らかの生物学的意味が含まれているのかもしれない。

### 4. フォスファチジン酸の SAPK 結合能と SAPK2 自己リン酸化促進作用の関連

PA が SAPK へ結合するところによる生物学的意味を見いだすために、試験管内で PA が SAPK 活性に影響を与えるか否かについて、大腸菌で発現させ、精製した SAPK2 を用い、MBP を基質とした試験管内リン酸化アッセイによって調べたが、MBP のリン酸化活性には大きな影響は見られなかった(図 13-A)。しかし、基質を加えないで反応させた場合の SAPK2 の自己リン酸化活性が PA 添加により促進することがわかった(図 13-B)。ただし、この SAPK2 自己リン酸化活性の促進は LPA、PC および PE 何れのリン脂質を添加した場合においても観察された(図 14)ことから、PA の SAPK への特異的結合とは関連しない、広い範囲のリン脂質による作用であることがわかった。

これらの結果を受け、SAPK の活性制御における PA(リン脂質)の意義を、SAPK2 の分子間自己リン酸化活性を調べることで検討した。SAPK2 WT を酵素とし、N 末端に TRX タグを付

した酵素活性を持たない Trx-SAPK2 K/A を基質に用いて活性を測定し、アクティベーションループ中のセリンおよびスレオニンを全てアスパラギンに置換した Trx-SAPK2 K/A-7S/N を基質に用いた場合と比較したところ、分子間自己リン酸化の一部はアクティベーションループ中に起こり、そのリン酸化も PA (リン脂質) によって促進される (図 15) ことから、PA の活性促進作用は (分子間) 自己リン酸化に特有の現象であることが示唆された。また、抗 SAPK2-リン酸化抗体を用いたイムノブロット解析により、SAPK2 の自己リン酸化においては、Ser158 はリン酸化されないか検出できないレベルであると思われた (図 16)。

これらの結果より、PA の SAPK 結合能と PA (リン脂質) による SAPK2 の自己リン酸化促進作用は、とりあえずわけて考える必要がある。PA と SAPK の結合性は特異的ではあるが、高浸透圧ストレスおよび ABA シグナルによる SAPK の活性化には影響しないことから別の作用を考える必要がある。ABI1 は、ABA シグナル伝達の負の調節因子でプロテインフォスファターゼ 2C の一つであるが、Zhang ら (2004) は、ABI1 も PA と特異的に結合し、ABA シグナルによって PA 依存的に細胞膜へ局在するようになることを報告している。PA と SAPK の結合も、膜との相互作用やその調節に働いているのかもしれない。また、 $\alpha$ -tubulin は PLD を介して細胞膜と相互作用しているという報告もある。PLD、その酵素反応産物である PA、基質である膜のリン脂質と  $\alpha$ -tubulin の関係がどのようになっているかは分かっていない。ただ、当研究室では  $\alpha$ -tubulin と浸透圧ストレス応答の関係が解き明かされつつあり (伴、私信)、PA が高浸透圧ストレス応答のシグナル分子である可能性を考えると、SAPK の PA 結合能と関連させて考えることも興味深い。

PA (リン脂質) による SAPK2 の自己リン酸化活性の促進は、複数の SAPK2 分子がミセル状の PA (リン脂質) に結合することで、SAPK2 の分子間距離が縮まり、自己リン酸化を引き起こしやすくなったとも考えられる。青田 (2007) は、SAPK2 の分子間自己リン酸化が基質 MBP の添加によって、競合により阻害されるところか、逆に促進されることを観察している。また、他の植物の SnRK プロテインキナーゼに関しても同様の報告がある。さらに青田 (2007) は、この基質による自己リン酸化の促進が、C-末端ドメインの欠失により顕著に低下することを示している。彼女はこれらの結果から、外部基質 MBP と酵素 SAPK2 の結合により SAPK2 の構造が変化し、分子間自己リン酸化の基質としての SAPK2 とのリン酸化部位や相互作用部位が露出することにより、基質 SAPK2 のリン酸化が促進されるというモデルを議論している。同様のことが PA (リン脂質) の自己リン酸化促進作用の場合にも当てはまるかもしれない。この自己リン酸化においては、アクティベーションループ内のセリンおよび/あるいはスレオニンもリン酸化されるが、Ser158 はほとんどリン酸化されないことから、直接の活性化とは結びつかないと思われる。いずれにせよ、これらのことが SAPK の細胞内での働きと何らかの関係があるか否かについては今後の課題である。

最後に、Phos-Tag SDS-PAGE によりタンパク質の特異的な PA への結合を検出できることがわかったことは予期せぬ成果であった。今後、高浸透圧ストレスや ABA シグナリングのみならず、PA が関与するシグナル伝達の分子メカニズムを研究するうえで有効なツールとなることが期待される。

表          二次元電気泳動の通電条件

段	電	時 (分)
1	17	2
2	17 ~ 200	4
3	200	3

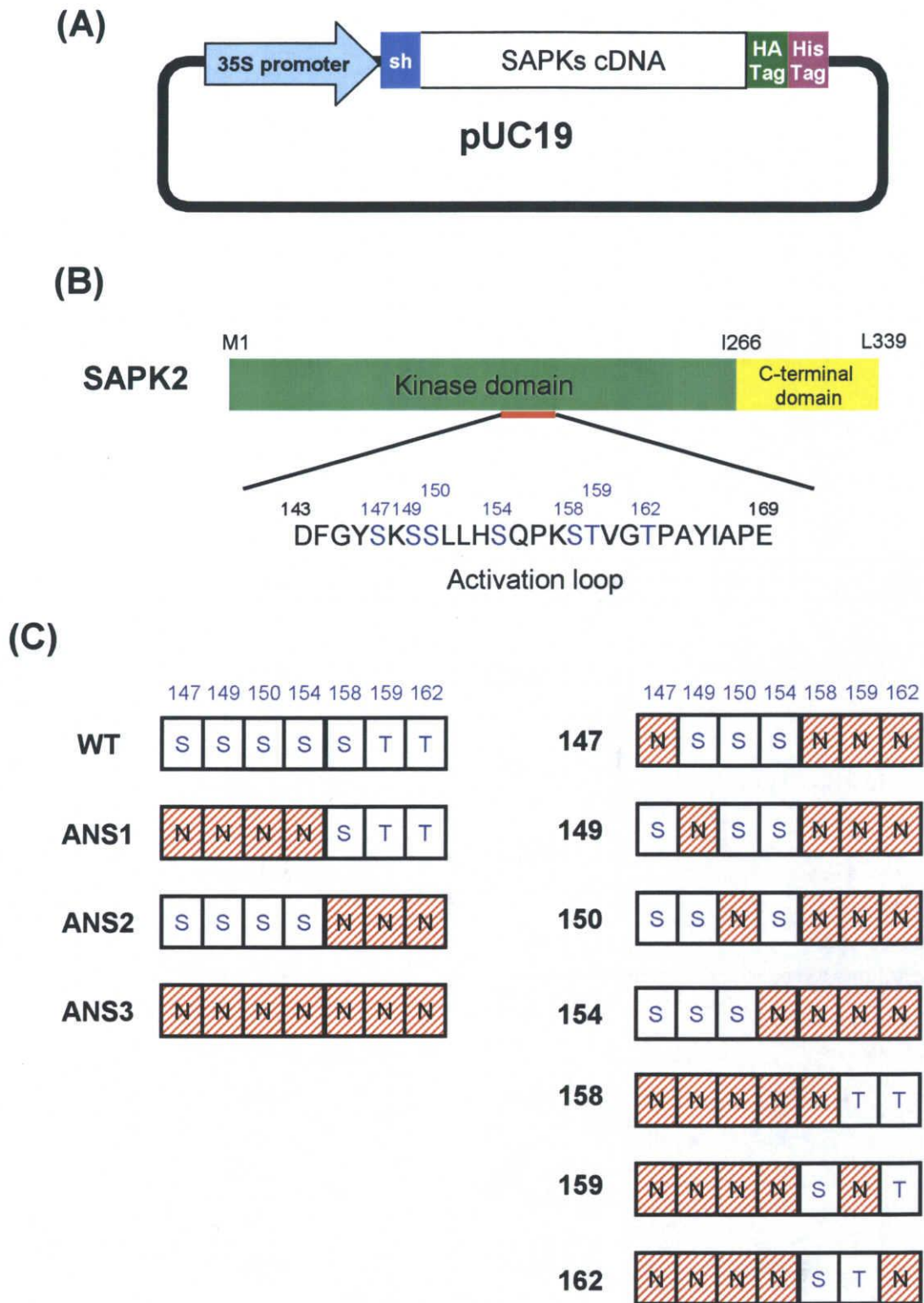


図 1 リン酸化部位同定のために用いた SAPK2 変異体コンストラクト

(A) 発現ベクターの概要を示す模式図。

(B) SAPK2 アクティベーションループのアミノ酸配列。キナーゼドメインを緑、C 末端ドメインを黄色で示した。セリンまたはスレオニン残基は青字で示した。

(C) 図 2 以降の実験に用いた SAPK2 変異体のアクティベーションループ中のアミノ酸置換を表す模式図。セリンまたはスレオニンをアスパラギンに置換した残基を赤い斜線で示した。

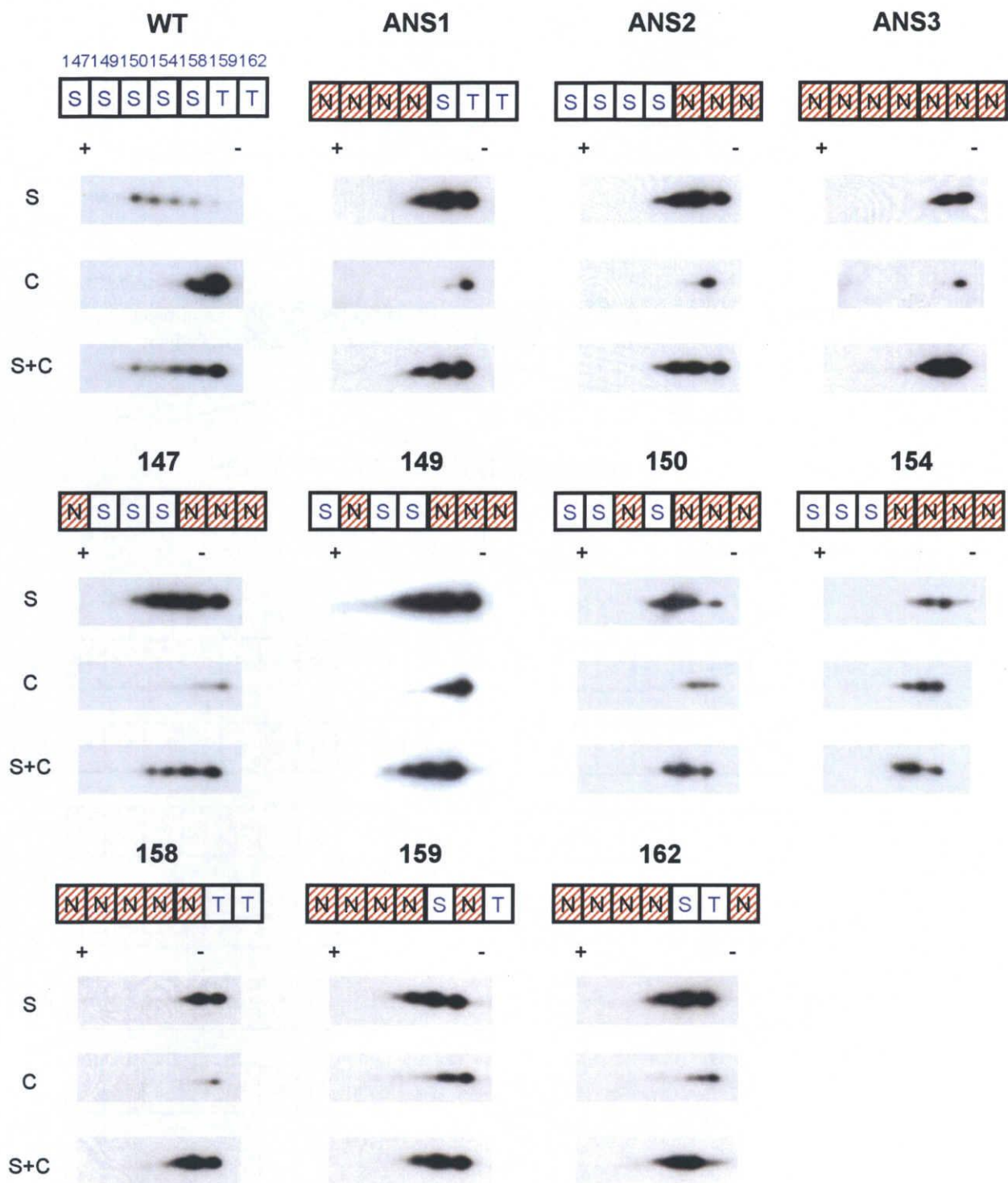


図 2 アクティベーションループ中のアミノ酸置換による高浸透圧ストレスに応答した SAPK2 リン酸化への影響

SAPK2-dHA-His あるいはその変異体(図1)をプロトプラストで発現させ、未処理として R2P 培地、高浸透圧ストレス処理として 400 mM NaCl を含む培地で 15 分間処理した。精製したそれぞれのタンパク質を高浸透圧ストレス処理 (S) および未処理 (C)、両サンプルを混合したもの (S+C) とし、二次元電気泳動で展開、抗 HA 抗体を用いたイムノブロット解析を行った。上段にアミノ酸置換部位、下段にイムノブロットの結果を示す。



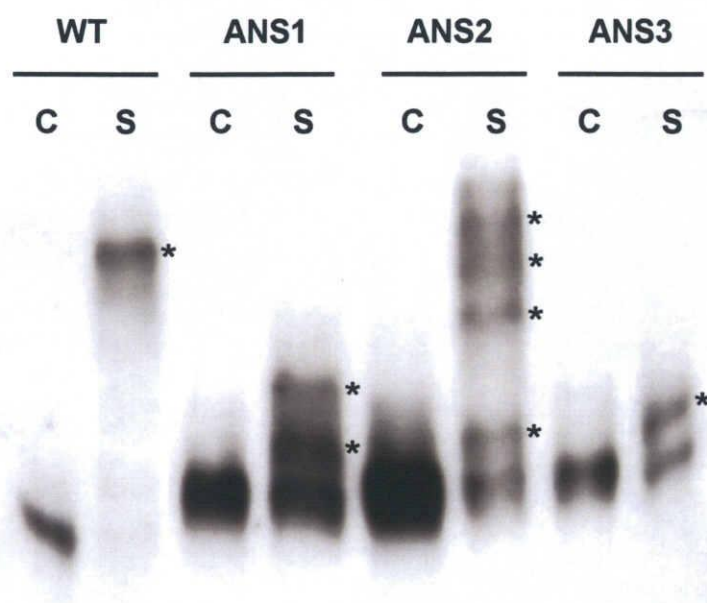


図 3 Phos-Tag SDS-PAGE による SAPK2 リン酸化の検出とアクティベーションループ中のアミノ酸置換の影響

SAPK2-dHA-His あるいはその変異体(図 1)をプロトプラストで発現させ、高浸透圧ストレス処理として 400 mM NaCl を含む培地で 15 分間処理した (S)。コントロール処理 (C) は NaCl を含まない培地を加えることにより行った。処理後、発現タンパク質を Ni-NTA アガロースレジンでアフィニティー回収し、Phos-Tag SDS-PAGE に供した後、抗 HA 抗体を用いたイムノブロット解析により検出した。リン酸化による移動度シフトを \* で示した。

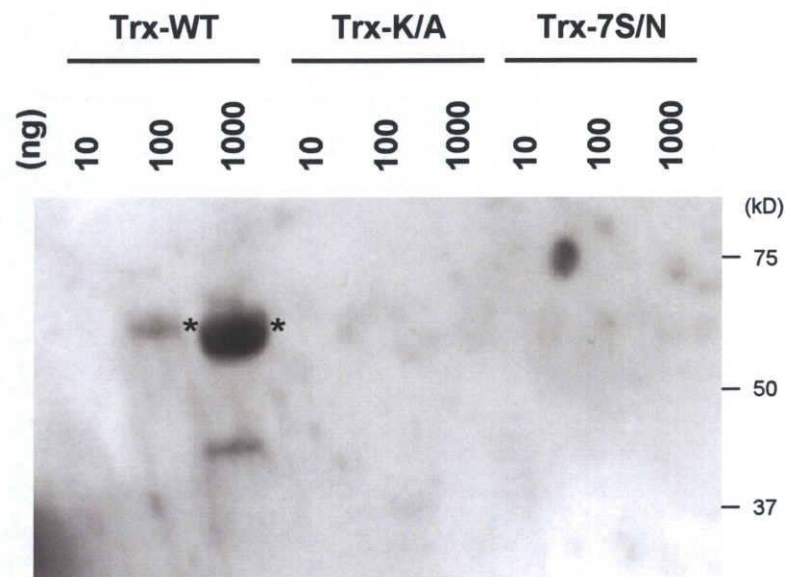


図 4 抗 SAPK2-リン酸化 Ser158 ペプチド抗体(抗リン酸化 SAPK 抗体)の特異性

10 から 1,000 ng のリコンビナント Trx 融合 SAPK2 WT (Trx-WT) 、Trx-SAPK2 K/A (Trx-K/A) および Trx-SAPK2 K/A-7S/N (Trx-7S/N) を SDS-PAGE によって分画した後、1/20 希釈の抗 SAPK-リン酸化抗体および 1/2000 希釈のペルオキシダーゼ標識した二次抗体(抗ウサギ IgG)を用いてイムノブロット解析を行った。抗 SAPK-リン酸化抗体で検出された Trx-SAPK2 WT を \* で示す。

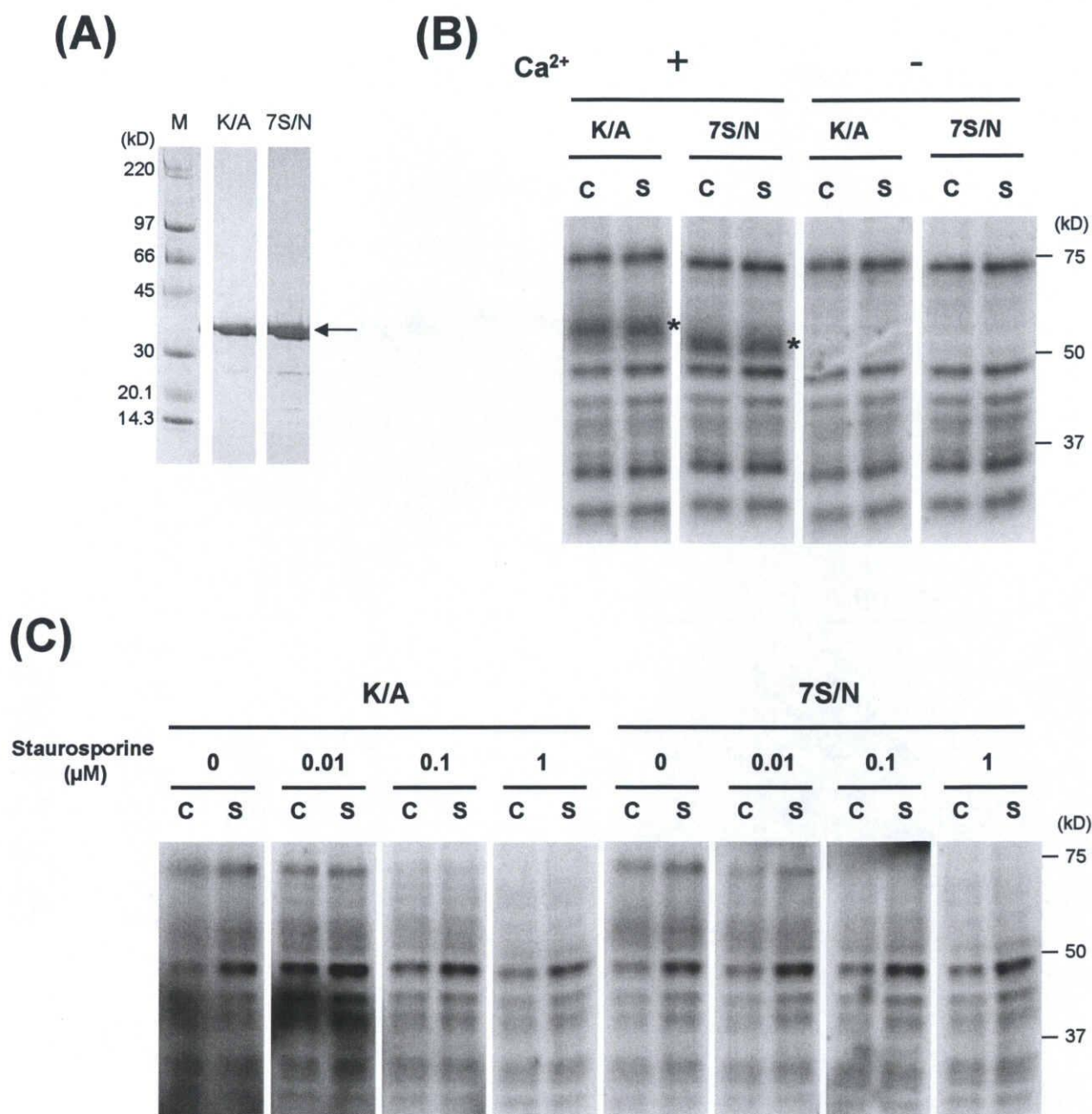


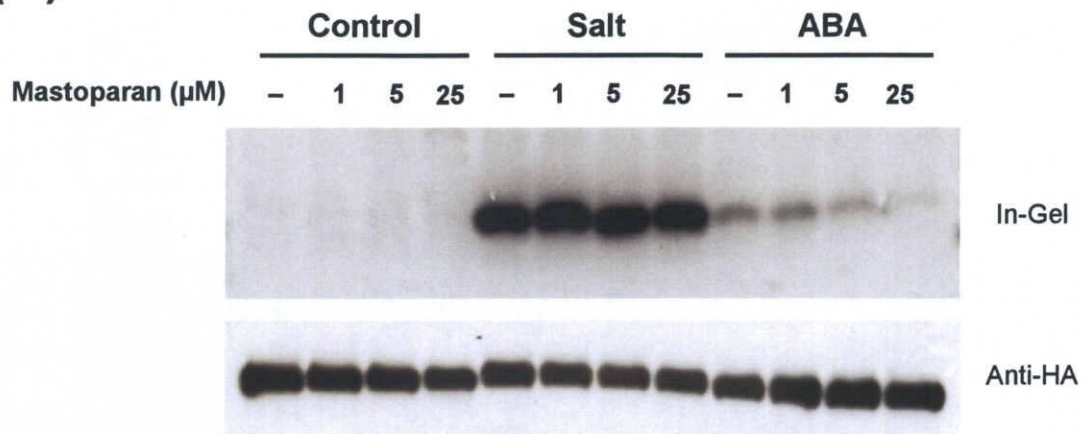
図5 イネ培養細胞抽出液中の SAPK2 リン酸化活性

(A) 基質に用いたリコンビナント SAPK2 K/A (K/A) および SAPK2 K/A-7S/N (7S/N) の SDS-PAGE の CBB 染色像。M は分子量マーカー、← は SAPK2 K/A および SAPK2 K/A-7S/N を示す。

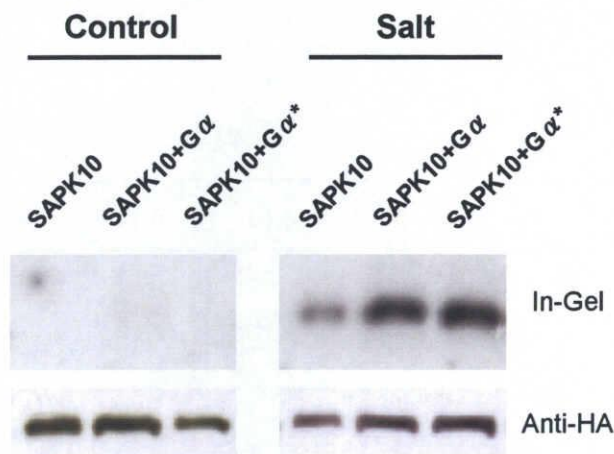
(B) SAPK2 K/A (K/A) あるいは SAPK2 K/A-7S/N (7S/N) を基質として混ぜたポリアクリルアミドゲルを用いて、コントロール処理 (C) あるいは 400 mM NaCl 処理 (S) したイネ培養細胞抽出液を SDS-PAGE で分画し、ゲル内リン酸化アッセイを行った。リン酸化反応は  $\text{Ca}^{2+}$  存在下 (+) あるいは非存在下 (-) で 30 °C、1 時間行った。  $\text{Ca}^{2+}$  存在下のみにおいて検出された SAPK2 リン酸化活性を \* で示した。

(C) 0 から 1  $\mu\text{M}$  のスタウロスポリン存在下で (B) と同様のゲル内リン酸化アッセイを行った。

(A)



(B)



(C)

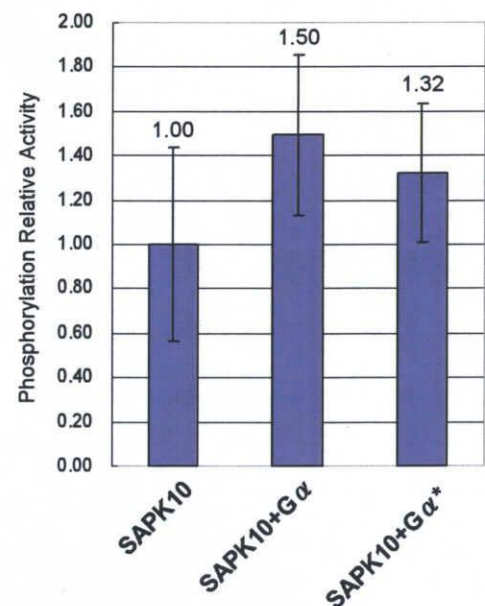


図 6 マストパン処理および 3 量体 G タンパク質の共発現が SAPK10 の活性化に与える影響

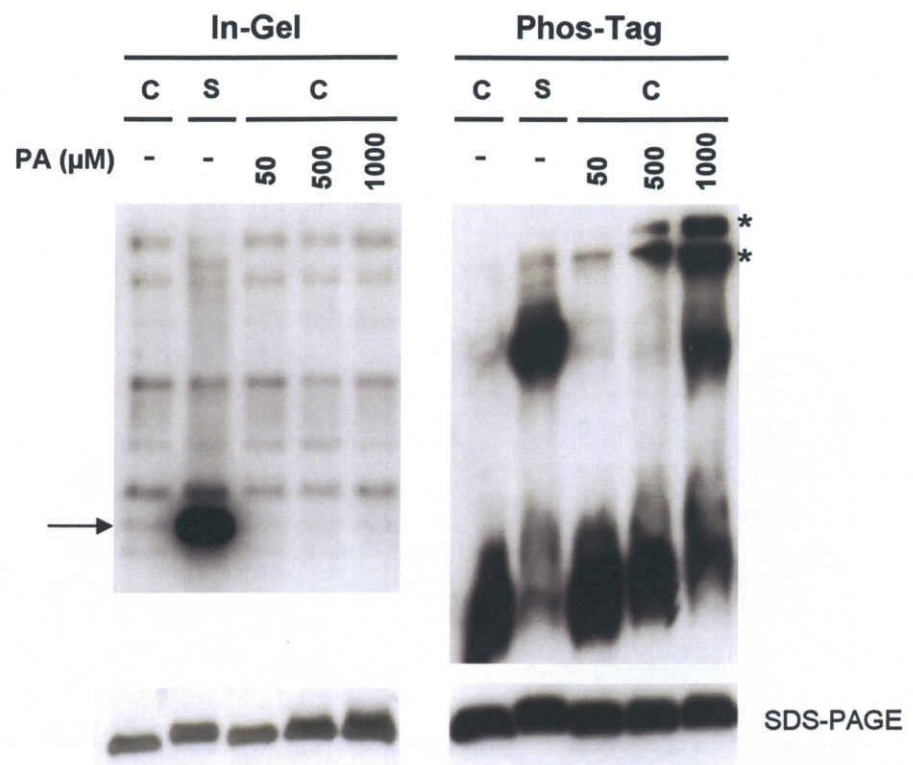
(A) SAPK10-dHA-His をプロトプラストで発現させ、高浸透圧ストレス処理として 400 mM NaCl を含む培地 (Salt)、ABA 処理として 50 μM ABA を含む培地 (ABA) に各濃度のマストパンを加え、15 分間処理した。コントロール (Control) は何も含まない培地で処理した。発現タンパク質を Ni-NTA アガロースレジンを用いてアフィニティー回収した後、MBP を基質としたゲル内リン酸化アッセイ (In-Gel)、およびイムノブロット解析 (Anti-HA) に供した。

(B) SAPK10-dHA-His のみ (SAPK10)、およびこれとともに 3 量体 G タンパク質 α サブユニット (Gα; SAPK10+Gα) あるいはその構成的活性型 (Gα\*; SAPK10+Gα\*) をプロトプラストで発現させ、高浸透圧ストレス処理として 400 mM NaCl を含む培地で 15 分間処理した (Salt)。コントロール (Control) は NaCl を含まない培地で処理した。処理後、(A) と同様の解析を行った。

(C) (B) の実験を 3 反復し (Salt のみ)、SAPK10 と 3 量体 G タンパク質を共発現させたときの SAPK10 の活性化レベルを定量化した。



# (A) **SAPK2**



# (B) **SAPK10**

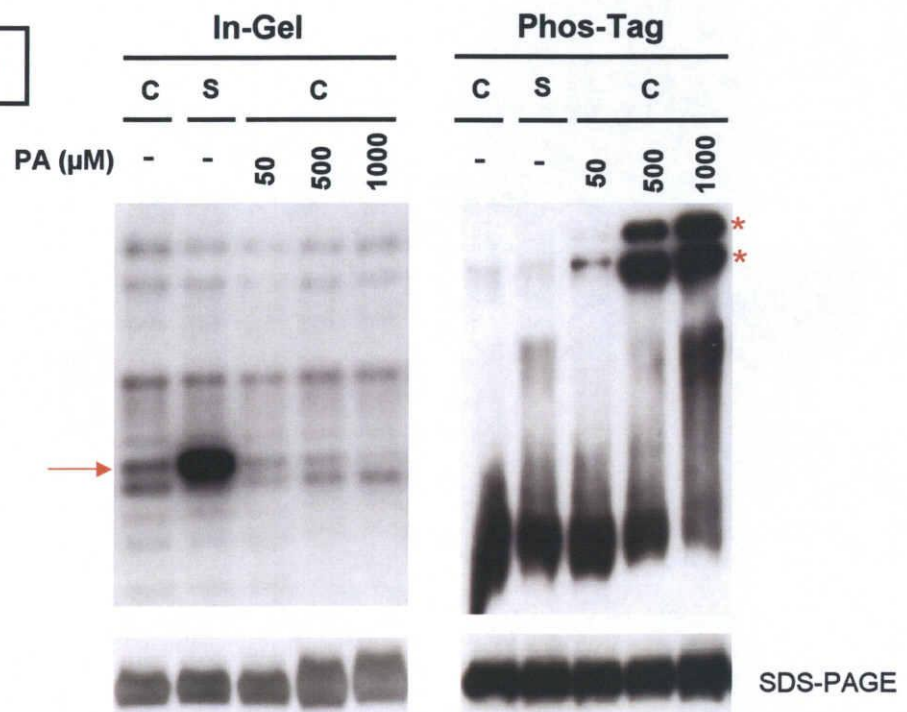


図 7 PA 処理による Phos-Tag 上での SAPK2 の移動度シフト

(A) SAPK2-dHA-His をプロトプラストで発現させ、ミセル化した PA を種々の濃度になるように加えた培地で 30 分間処理した。さらに、高浸透圧ストレス処理 (S) として 400 mM NaCl で 15 分間処理した後、発現タンパク質を Ni-NTA アガロースレジンによってアフィニティー回収し、MBP を基質としたゲル内リン酸化アッセイ (In-Gel) およびイムノブロット解析を行った。SAPK2 の活性化を示すシグナルを  $\rightarrow$  で示した。発現・回収したタンパク質の量およびリン酸化状態を確認する目的で、通常の SDS-PAGE (SDS-PAGE)、Phos-Tag SDS-PAGE (Phos-Tag) を行いイムノブロット解析に供した。PA 処理による高いレベルの移動度シフトを \* で示した。

(B) SAPK10-dHA-His を用いて (A) と同様の実験を行った。SAPK10 の活性化を示すシグナルを  $\rightarrow$  で示した。また、PA 処理による高いレベルの移動度シフトを \* で示した。

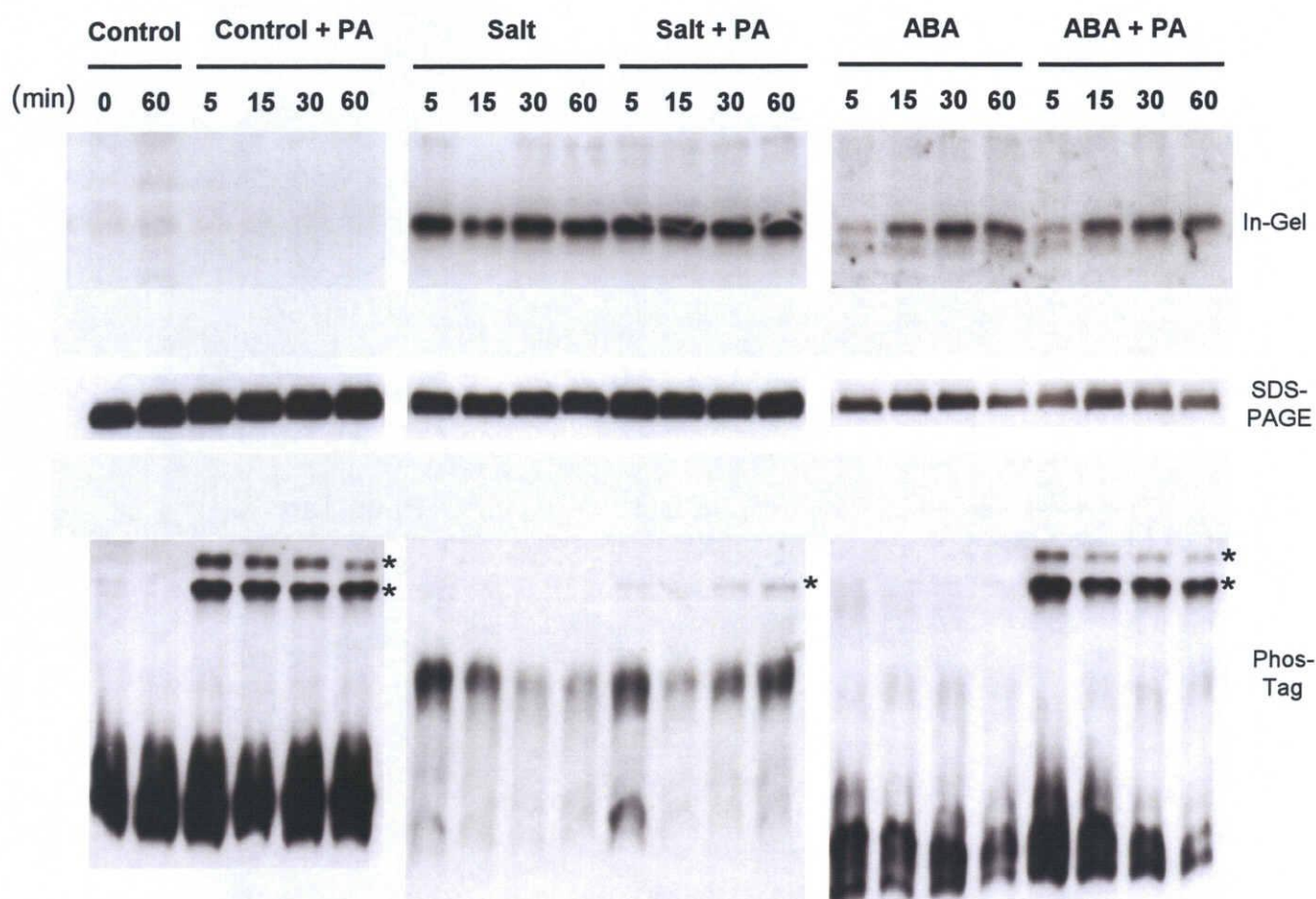


図 8 PA の高浸透圧ストレスおよび ABA による SAPK10 の活性化に対する影響

SAPK10-dHA-His をプロトプラストで発現させ、400 mM NaCl を含む培地 (Salt)、それに終濃度 500  $\mu$ M PA を含む培地 (Salt+PA)、50  $\mu$ M ABA を含む培地 (ABA) あるいはそれに終濃度 500  $\mu$ M PA を含む培地 (ABA+PA) で経時的にプロトプラスト培養液に処理した。コントロール (Control) は何も含まない培地で処理した。処理後、発現タンパク質を Ni-NTA アガロースレジンによってアフィニティー回収した後、MBP を基質としたゲル内リン酸化アッセイ (In-Gel)、Phos-Tag SDS-PAGE (Phos-Tag) および発現したタンパク質の量を確認するためのイムノブロット解析 (SDS-PAGE) を行った。PA 処理による移動度シフトを \* で示した。

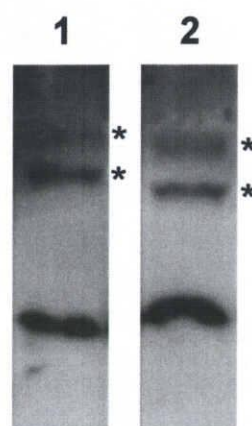


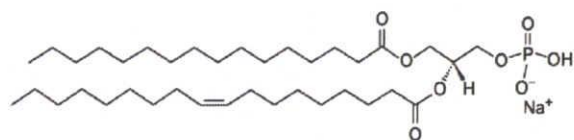
図 9 SAPK の PA 結合による Phos-Tag SDS-PAGE 上の移動度シフト

SAPK10-dHA-His をプロトプラストで発現させ、終濃度が 500  $\mu$ M になるようにミセル化した PA を含む培地を加え、15 分後 (Lane 1)、あるいは直後 (Lane 2) に液体窒素で凍結した。凍結細胞培養液から発現タンパク質を Ni-NTA アガロースレジンによってアフィニティー回収した後、Phos-Tag SDS-PAGE を行った。SAPK10 と PA の結合による移動度シフトを \* で示した。

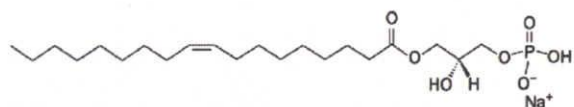


(A)

### Phosphatidic acid (PA)

L- $\alpha$ -Phosphatidic Acid (Egg)

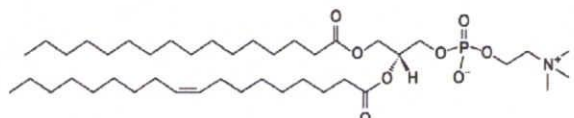
Lyso-phosphatidic acid (LPA)



18:1 Lyso PA

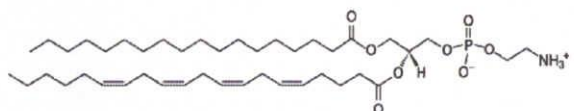
1-Oleoyl-2-Hydroxy-*sn*-Glycero-3-Phosphate

### Phosphatidylcholine (PC)



**L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (Egg)**

### Phosphatidylethanolamine (PE)

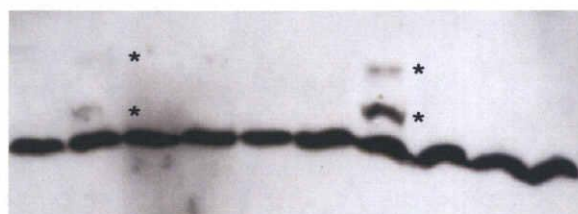
L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamine (Heart, Bovine)

(B)

## SAPK2

## SAPK10

C PA LPA PC PE C PA LPA PC PE



Phos-Tag



## SDS-PAGE

図 10 SAPK のリン脂質結合特異性

(A) SAPK との結合アッセイに用いたリン脂質の名称と構造。

(B) SAPK2-dHA-His あるいは SAPK10-dHA-His をプロトプラストで発現させ、培養液を未処理のまま液体窒素で凍結させた後、タンパク質を抽出し、終濃度が 500  $\mu$ M になるようにミセル化した PA あるいはその他のリン脂質を加え 15 分間氷上でインキュベートした。コントロール (C) はリン脂質を加えないインキュベーション。インキュベーション後、発現タンパク質を Ni-NTA アガロースレジンによってアフィニティー回収し、通常の SDS-PAGE (SDS-PAGE) および Phos-Tag SDS-PAGE (Phos-Tag) にかきイムノブロット解析を行った。PA 処理による移動度シフトを \* で示した。

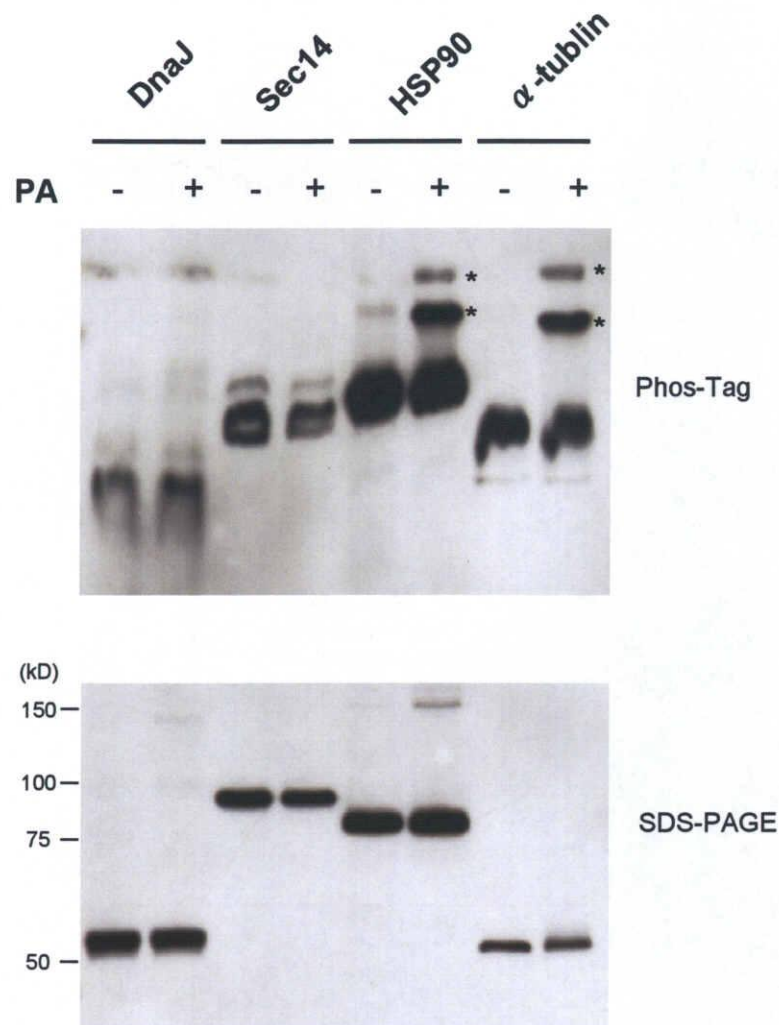
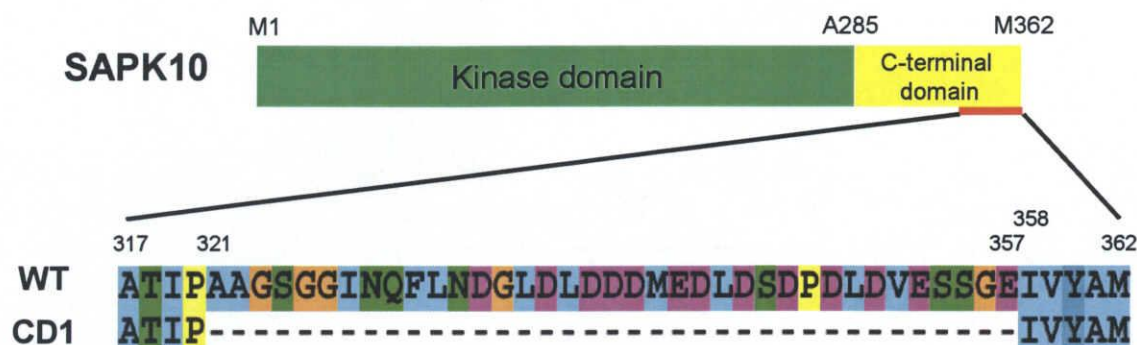


図 11 Phos-Tag SDS-PAGE 上の移動度シフトでみた PA 結合のタンパク質特異性

dHA-His タグを付加した各発現プラスミドをエレクトロポレーションによりプロトプラストに導入し、終濃度が 500  $\mu$ M になるようにミセル化した PA を含む (+) あるいは含まない (-) 培地を加えた後、すぐに液体窒素で凍結した。発現タンパク質を Ni-NTA アガロースレジンによってアフィニティー回収した後、Phos-Tag SDS-PAGE (Phos-Tag) および発現したタンパク質を確認するためのイムノブロット解析 (SDS-PAGE) を行った。PA 処理によって移動度がシフトしたバンドを \* で示した。

(A)



(B)

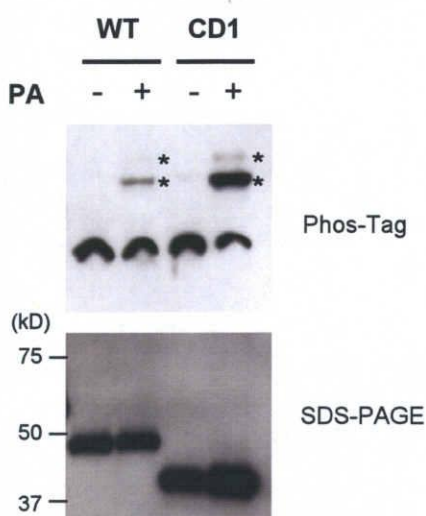


図 12 SAPK10 C 末端側酸性アミノ酸領域欠失の PA 結合への影響

(A) C 末端欠失 SAPK10(CD1) の C 末端側アミノ酸配列。

(B) dHA-His タグを付加した SAPK10 あるいは CD1 をプロトプラストで発現させ、終濃度が 500  $\mu$ M になるようにミセル化した PA を含む (+) あるいは含まない (-) R2P 培地を加えた後、すぐに液体窒素で凍結した。発現タンパク質を Ni-NTA アガロースレジンによってアフィニティー回収した後、通常の SDS-PAGE (SDS-PAGE) および Phos-Tag SDS-PAGE (Phos-Tag) にかけてイムノブロット解析を行った。PA 処理によって移動度がシフトしたバンドを \* で示した。

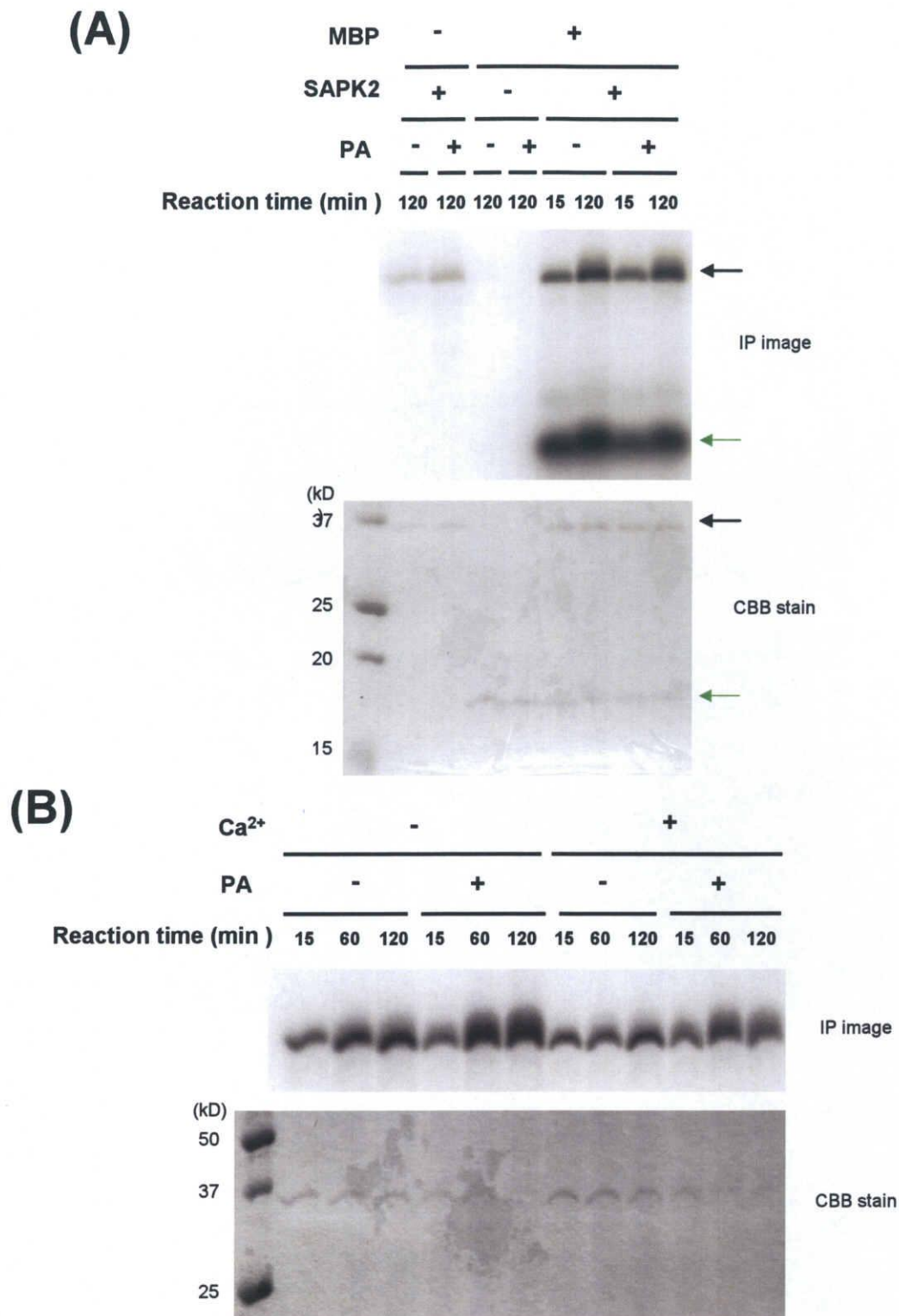


図 13 PA による SAPK2 自己リン酸化活性の促進

(A) 終濃度が 100  $\mu$ M になるようにミセル化した PA を含む (+) Kinase buffer あるいは含まない (-) Kinase buffer 中で SAPK2 WT および MBP をそれぞれ 200 ng 加え、 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP と共に 30  $^{\circ}$ C で 15 分間あるいは 120 分間インキュベートした。反応後、SDS-PAGE で分画し、CBB 染色を行った後、IP プレートに露光した。基質を含まずに同様の処理をした自己リン酸化反応も行った。上に IP 像 (IP image)、下に CBB 染色像 (CBB stain) を示した。← は SAPK2 WT、← は MBP の位置を示す。

(B) 1 mM Ca<sup>2+</sup> 存在下 (+) あるいは非存在下 (-)、かつ 100  $\mu$ M PA 存在下 (+) あるいは非存在下 (-) で 200 ng の SAPK2 WT を  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP と共に 30  $^{\circ}$ C で 15、60 あるいは 120 分間インキュベートした。反応後 (A) と同様の操作を行った。上に IP 像 (IP image)、下に CBB (CBB stain) 染色像を示した。



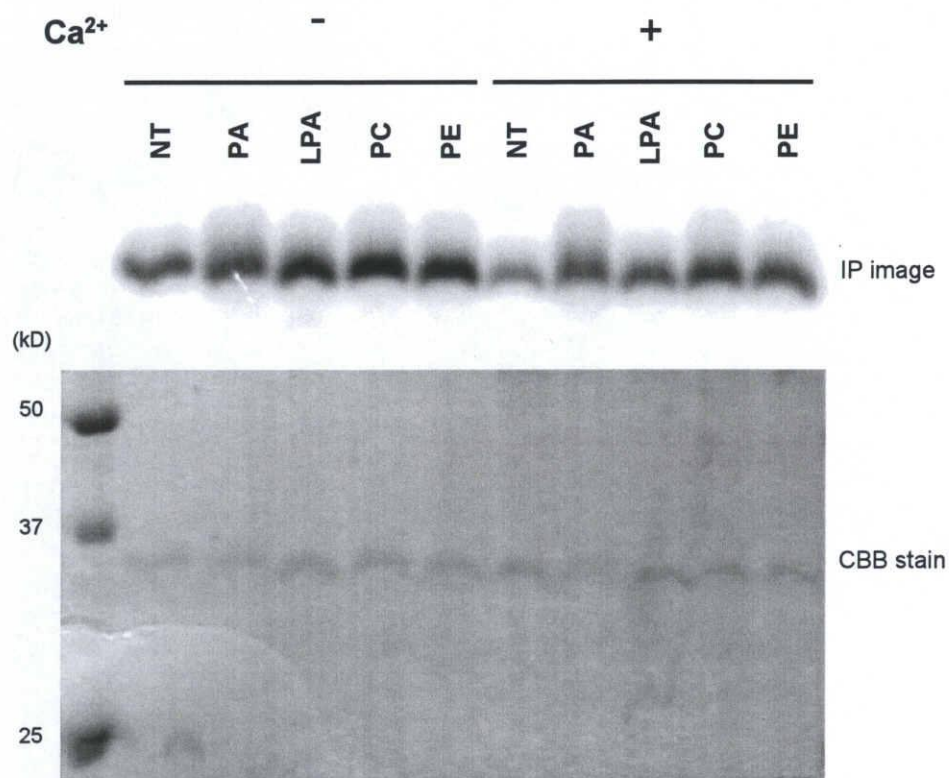


図 14 SAPK2 自己リン酸化促進作用は PA 特異的ではない

1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下 (+) あるいは非存在下 (-) において、終濃度が 100  $\mu\text{M}$  になるようにミセル化した各リン脂質を含む Kinase buffer あるいはリン脂質を含まない Kinase buffer に 200 ng の SAPK2 WT を加え、 $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP と共に 30  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートした。反応後、図 14 (A) と同様の解析を行った。上に IP 像 (IP image)、下に CBB 染色像 (CBB stain) を示した。

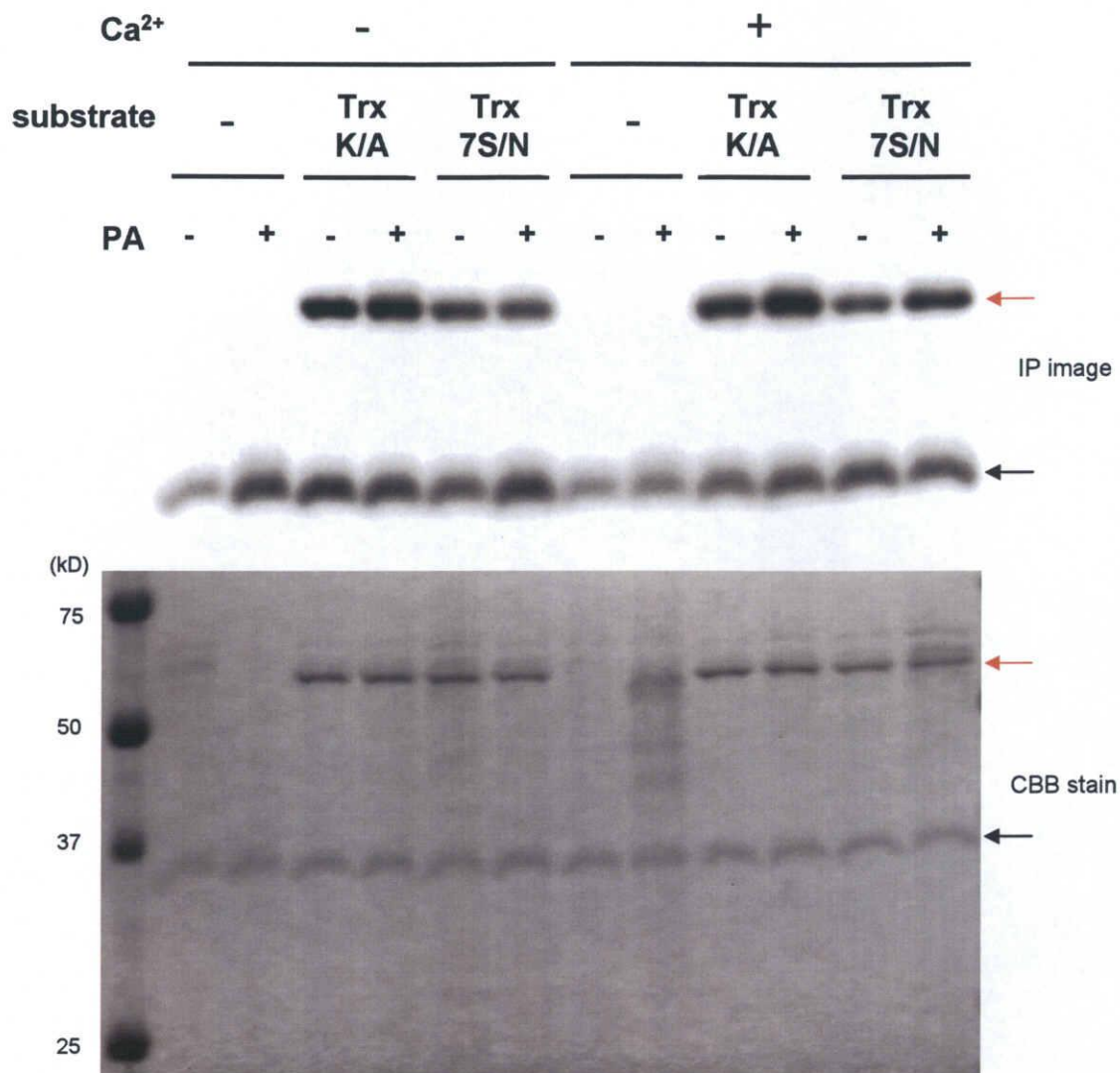


図 15 SAPK2 自己リン酸化はアクティベーションループ内でも起き、そのリン酸化は PA によって促進される

1 mM Ca<sup>2+</sup> 存在下 (+) あるいは非存在下 (-) において、終濃度が 100 μM になるようにミセル化した PA を含む (+) Kinase buffer あるいは PA を含まない (-) Kinase buffer 中に酵素として SAPK2 (WT)、基質として Trx-SAPK2 K/A (Trx-K/A) あるいは Trx-SAPK2 K/A-7S/N (Trx-7S/N) をそれぞれ 200 ng 加え、 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP と共に 30 °C で 1 時間インキュベートした。反応後、図 14 (A) と同様の解析を行った。上に IP 像 (IP image)、下に CBB 染色像 (CBB stain) を示した。← は SAPK2 WT、← は Trx-K/A または Trx-7S/N の位置を示す。

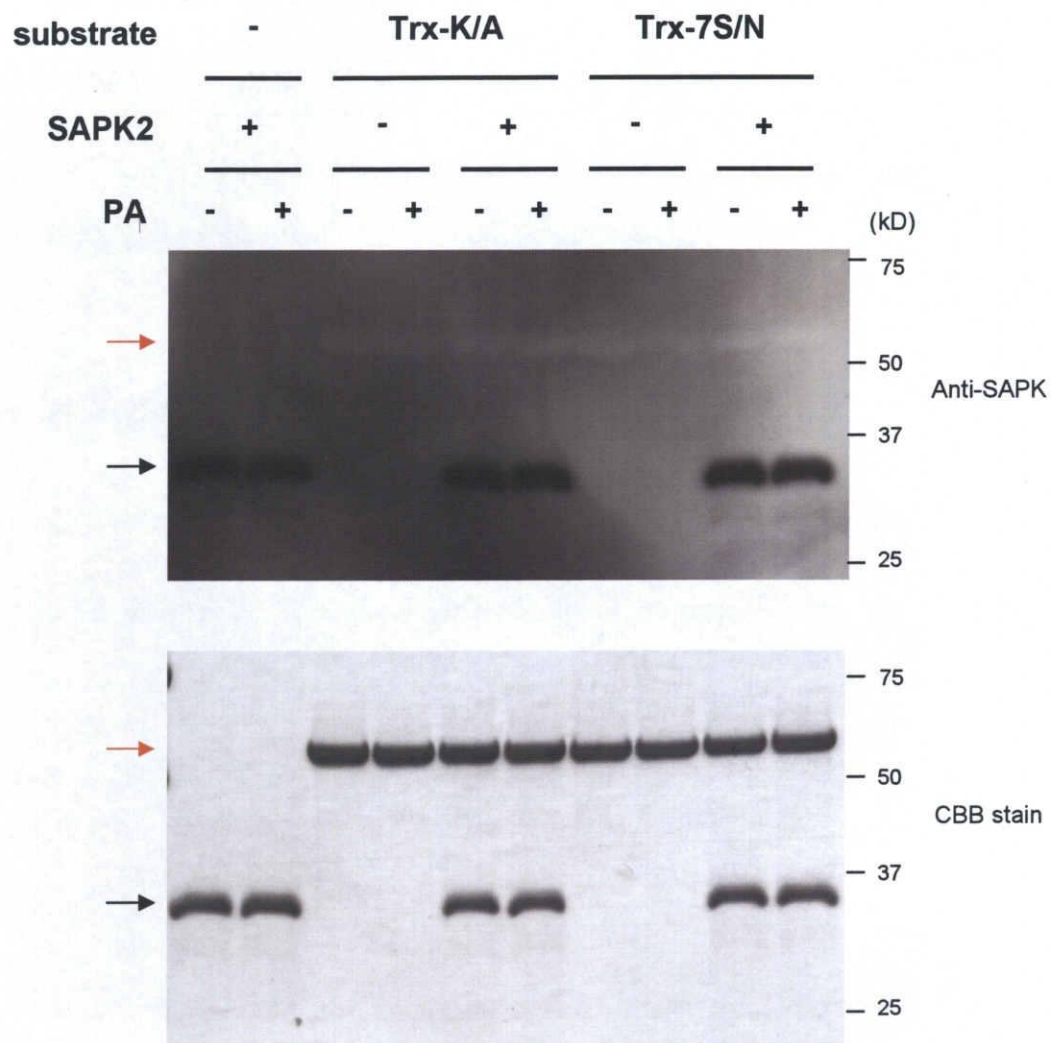
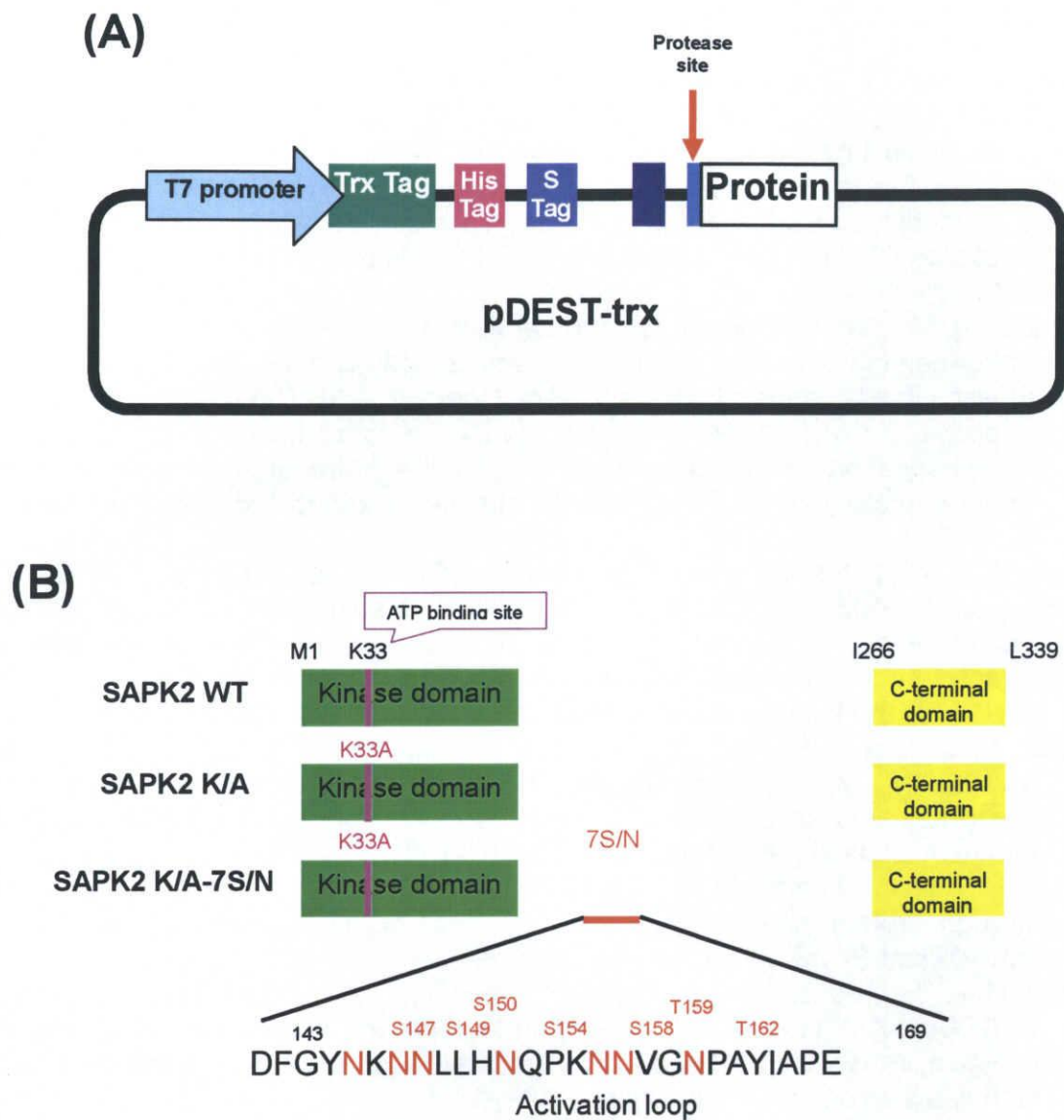


図 16 SAPK2 アクティベーションループ内の Ser158 は自己リン酸化されない

終濃度が 100  $\mu$ M になるようにミセル化した PA を含む (+) Kinase buffer あるいは含まない (-) Kinase buffer 中に酵素として SAPK2 WT、基質として Trx-SAPK2 K/A (Trx-K/A) あるいは Trx-SAPK2 K/A-7S/N (Trx-7S/N) をそれぞれ 1  $\mu$ g 加え、非標識 ATP と共に 30  $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。反応後 SDS-PAGE で分画し、抗 SAPK-リン酸化抗体を用いたイムノブロット解析を行った (Anti-SAPK)。また同様に SDS-PAGE を行い CBB 染色した。上にイムノブロット解析の結果、下に CBB 染色像を示した。→ は SAPK2 WT、→ は Trx-K/A または Trx-7S/N を示す。





付図1 SAPK2 および変異体 SAPK2 の発現ベクター

(A) 用いた発現ベクターの概要を示す模式図。pDEST-trx ベクターに Gateway システムを用いて SAPK2 あるいはその変異体のコード配列を組み込んだ。■ は Gateway 由来の配列を示す。■ は導入したプロテアーゼサイトを示す。

(B) 野生型 SAPK2 (SAPK2 WT) および変異型 SAPK2 (SAPK2 K/A および SAPK2 K/A-7S/N) のアクティベーションループのアミノ酸配列。SAPK2 K/A は ATP 結合部位に位置する 33 番目のリジンのアラニンに置換したもの。SAPK2 K/A-7S/N はさらにアクティベーションループ中の全てのセリンおよびスレオニンのアスパラギンに置換したもの。

## 参考文献

- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., and Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415, 977-983.
- Belin, C., de Franco, P. O., Bourbonousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J. M., Vavasseur, A., Giraudat, J., Barbier-Brygoo, H., and Thomine, S. (2006). Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiol.* 141, 1316-1327.
- Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Lauriere, C. (2004). Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279, 41758-41766.
- Boudsocq, M., Droillard, M.J., Barbier-Brygoo, H., and Laurière, C. (2007). Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 63, 491-503.
- Bray, E., A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2, 48-54.
- Burza, A. M., Pekala, I., Sikora, J., Siedlecki, P., Malagocki, P., Bucholc, M., Koper, L., Zielenkiewicz, P., Dadlez, M., and Dobrowolska, G. (2006). *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated kinase is regulated by phosphorylation on Ser-154 and Ser-158 in the kinase activation loop. *J. Biol. Chem.* 281, 34299-34311.
- Chae, M. J., Lee, J. S., Nam, M. H., Cho, K., Hong, J. Y., Yi, S. A., Suh, S. C., and Yoon, I. S. (2007). A rice dehydration-inducible SNF1-related protein kinase 2 phosphorylates an abscisic acid responsive element-binding factor and associates with ABA signaling. *Plant Mol. Biol.* 63, 151-169.
- Cheng, S. H., Willmann, M. R., Chen, H. C., and Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* 129, 469-485.
- Choi, H.-i., Park, H.-J., Kim, S., Im, M.-Y., Seo, H.-H., Kim, Y.-W., Hwang, I., and Kim, S. Y. (2005). *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiol.* 139, 1750-1761.
- Coursol, S., Fan, L. M., Le, Stunff, H., Spiegel, S., Gilroy, S., and Assmann, S. M. (2003). Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* 423, 651-654.
- DeWald, D. B., Torabinejad, J., Jones, C. A., Shope, J. C., Cangelosi, A. R., Thompson, J. E., Prestwich, G. D., and Hama, H. (2001). Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126, 759-769.
- Droillard, M., Boud socq, M., Barbier-Brygoo, H., and Lauriere, C. (2002). Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Lett.* 527, 43-50.
- Droillard, M. J., Thibivilliers, S., Cazale, A. C., Barbier-Brygoo, H., and Lauriere, C. (2000). Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific

- protein kinase. *FEBS Lett.* 474, 217-222.
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Absciscic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 1988-1993.
- Gomez-Cadenas, A., Verhey, S. D., Holappa, L. D., Shen, Q., Ho, T. H., and Walker-Simmons, M. K. (1999). An absciscic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates absciscic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 1767-1772.
- Gomez-Cadenas, A., Zentella, R., Walker-Simmons, M. K., and Ho, T. H. (2001). Gibberellin/absciscic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* 13, 667-679.
- Gong, D., Guo, Y., Jagendorf, A. T., and Zhu, J. K. (2002). Biochemical characterization of the Arabidopsis protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol.* 130, 256-264.
- Halford, N. G., and Hardie, D. G. (1998). SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol. Biol.* 37, 735-748.
- Hoyos, M. E., and Zhang, S. (2000). Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. *Plant Physiol.* 122, 1355-1363.
- Hrabak, E. M., Chan, C. W., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J. H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H. G., Sussman, M. R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J. K., and Harmon, A. C. (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* 132, 666-680.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., and Shinozaki, K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* 24, 655-665.
- Ingram, J., and Bartels, D. (1996). THE MOLECULAR BASIS OF DEHYDRATION TOLERANCE IN PLANTS. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bol.* 47, 377-403.
- Johnson, L. N., Noble, M. E., and Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85, 149-158.
- Johnson, R. R., Wagner, R. L., Verhey, S. D., and Walker-Simmons, M. K. (2002). The absciscic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific absciscic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol.* 130, 837-846.
- Kagaya, Y., Hobo, T., Murata, M., Ban, A., and Hattori, T. (2002). Absciscic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an absciscic acid response element binding factor, TRAB1. *Plant Cell* 14, 3177-3189.
- Kelner, A., Pekala, I., Kaczanowski, S., Muszynska, G., Hardie, D. G., and Dobrowolska, G. (2004). Biochemical characterization of the tobacco 42-kD protein kinase activated by osmotic stress. *Plant Physiol.* 136, 3255-3265.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K., and Koike, T. (2006). Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell Proteomics.* 5, 749-757.
- Knight, H. (2000). Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.* 195, 269-324.

- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A., and Hattori, T. (2005). Absciscic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J.* 44, 939-949.
- Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Minami, H., Kagaya, Y., and Hattori, T. (2004). Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* 16, 1163-1177.
- Komis, G., Quader, H., Galatis, B., and Apostolakos, P. (2006). Macrotubule-dependent protoplast volume regulation in plasmolysed root-tip cells of *Triticum turgidum*: involvement of phospholipase D. *New Phytol.* 171, 737-750.
- Kyozuka, J., and Shimamoto, K. (1991). Transformation and regeneration of rice protoplasts. In *Plant Tissue Culture Manual*, B1 (Lindsey, K., ed.) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 1-16.
- Li, J., and Assmann, S. M. (1996). An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of Fava Bean. *Plant Cell* 8, 2359-2368.
- Li, J., Kinoshita, T., Pandey, S., Ng, C. K., Gygi, S. P., Shimazaki, K., and Assmann, S. M. (2002). Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* 418, 793-797.
- Li, J., Wang, X. Q., Watson, M. B., and Assmann, S. M. (2000). Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287, 300-303.
- Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W. H., and Ma, L. (2007). A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315, 1712-1716.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., and Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369, 242-245.
- Mikolajczyk, M., Awotunde, O. S., Muszynska, G., Klessig, D. F., and Dobrowolska, G. (2000). Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* 12, 165-178.
- Monks, D. E., Aghoram, K., Courtney, P. D., DeWald, D. B., and Dewey, R. (2001). Hyperosmotic stress induces the rapid phosphorylation of a soybean phosphatidylinositol transfer protein homolog through activation of the protein kinases SPK1 and SPK2. *Plant Cell* 13, 1205-1219.
- Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., and Hirt, H. (1999). Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J.* 20, 381-388.
- Munnik, T., Meijer, H. J. G., ter Riet, B., Hirt, H., Frank, W., Bartels, D., and Musgrave, A. (2000). Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J.* 22, 147-154.
- Mustilli, A. C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., and Giraudat, J. (2002). Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14, 3089-3099.
- Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G. (2004). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol. Cell.* 15, 661-675.
- Park, Y. S., Hong, S. W., Oh, S. A., Kwak, J. M., Lee, H. H., and Nam, H. G. (1993). Two putative protein kinases from *Arabidopsis thaliana* contain highly acidic domains. *Plant Mol Biol* 22, 615-624.

- Pical, C., Westergren, T., Dove, S. K., Larsson, C., and Sommarin, M. (1999). Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. *J. Biol. Chem.* 274, 38232-38240.
- Pierce, K. L., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 639-650.
- Reiser, V., Raitt, D. C., and Saito, H. (2003). Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J. Cell Biol.* 161, 1035-1040.
- Romeis, T., Ludwig, A. A., Martin, R., and Jones, J. D. G. (2001). Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defense response. *EMBO J.* 20, 5556-5567.
- Shen, Q., Gomez-Cadenas, A., Zhang, P., Walker-Simmons, M. K., Sheen, J., and Ho, T. H. (2001). Dissection of abscisic acid signal transduction pathways in barley aleurone layers. *Plant Mol. Biol.* 47, 437-448.
- Testerink, C., Dekker, H. L., Lim, Z. Y., Johns, M. K., Holmes, A. B., Koster, C. G., Ktistakis, N. T., and Munnik, T. (2004). Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *Plant J.* 39, 527-536.
- Tsunoda, Y., Sakai, N., Kikuchi, K., Katoh, S., Akagi, K., Miura-Ohnuma, J., Tashiro, Y., Murata, K., Shibuya, N., and Katoh, E. (2005). Improving expression and solubility of rice proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 42, 268-277.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., and Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* 11, 1743-1754.
- Wang, X. (1999). The role of phospholipase D in signaling cascades. *Physiol.* 120, 645-652.
- Wang, X. (2002). Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 408-414.
- Wang, X., Devaiah, S. P., Zhang, W., and Welti, R. (2006). Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid Res.* 45, 250-278.
- Xiong, L., Schumaker, K. S., and Zhu, J. K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14 (Suppl), S165-183.
- Xiong, L., and Zhu, J. K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 25, 131-139.
- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J. R., and Shinozaki, K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 43, 1473-1483.
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., and Shinozaki, K. (2006). The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 281, 5310-5318.
- Zhang, S., and Klessig, D. F. (1998). The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 7225-7230.
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., and Wang, X. (2004). Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 9508-9513.
- Zhang, W., Wang, C., Qin, C., Wood, T., Olafsdottir, G., Welti, R., and Wang, X. (2003).

- The oleate-stimulated phospholipase D, PLDdelta, and phosphatidic acid decrease H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in Arabidopsis. *Plant Cell* 15, 2285-2295.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247-273.
- Zhu, J.K., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (1997). Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25, 253-277.

## 要約

SNF1-related protein kinase 2 (SnRK2) ファミリーのプロテインキナーゼ群に属するプロテインキナーゼは、植物において、高浸透圧ストレスやストレスホルモンとして知られているアブシジン酸 (ABA) により活性化される。これらのプロテインキナーゼが高浸透圧ストレスや ABA 応答におけるシグナル伝達において中心的な役割を果たしていることを示唆する報告が相次いでいる。しかし、これらのプロテインキナーゼを介するシグナル伝達経路の下流応答や活性化に関わる上流因子についての知見は未だに乏しい。本研究では、イネ SnRK2 プロテインキナーゼの上流因子に関する知見を深めることを目的とし、まず SAPK2 のリン酸化部位の同定を行い、Ser150、Ser154 および Ser158 が高浸透圧ストレスによってリン酸化されることを示した。上流因子の探索においては、スタウロスポリンの感受性が低く、Ca<sup>2+</sup> 依存的な SAPK2 をリン酸化するプロテインキナーゼの存在を見だし、3 量体 G タンパク質が ABA による SAPK の活性を負に制御している可能性を示唆した。さらに、フォスファチジン酸は SAPK の活性には直接関与しない特異的な結合をし、その結合が生物学的意味を有している可能性を示した。また、プロテインキナーゼのリン酸化状態を検出するための技術である Phos-Tag SDS-PAGE は、タンパク質の特異的なフォスファチジン酸への結合を検出するための新たな手法となることが期待された。