

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770031

研究課題名 (和文) シロイヌナズナ AtMEKK1 情報伝達上流因子の同定

研究課題名 (英文) Identification of upstream signaling pathways of Arabidopsis AtMEKK1

研究代表者

松岡 大介 (MATSUOKA DAISUKE)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環・遺伝子実験センター・研究機関研究員

研究者番号：60437506

研究成果の概要：AtMEKK1 は病原菌の感染や傷害、低温、乾燥、塩などさまざまな環境ストレスに応答して活性化し、その下流因子をリン酸化により情報伝達すると考えられており、外界環境情報伝達のキーエンザイムである。しかしその情報伝達（特に上流）については不明な点が多い。本研究では本酵素と直接結合するタンパク質を同定し、また各種阻害剤を用いた実験により上流情報伝達経路に関する知見を得た。これらの成果は植物のストレスシグナル伝達の解明につながるものと期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：環境応答

1. 研究開始当初の背景

植物は絶えず変化する環境に応答し、自身の形態を変化させ、あるいは代謝を調節することで環境に適応し生育している。このような環境応答を行うためにはそれぞれの刺激を特異的に認識し、それらの情報に応じた細胞応答系に的確に伝達しなければならない。本研究のターゲットであるシロイヌナズナ

の AtMEKK1 はこれまでの研究により病原菌の感染や傷害、低温、乾燥、塩などさまざまな環境ストレスに応答して活性化し、その下流因子をリン酸化により活性化し情報伝達することが知られており、外界環境情報伝達のキーエンザイムである (Nakagami et al. 2005, Trends Plant Sci. 10, 339-346)。本研究の申請者らも傷害ストレスにより

AtMEKK1-AtMEK1-AtMPK4 がリン酸化カスケードを形成し情報を伝達することをこれまでに明らかにした(Matsuoka et al. 2002. Plant J. 29, 637-647, Hadiarto et al. 2006. Planta 223, 708-713)。しかしながらこれら様々な刺激がどのように AtMEKK1 に伝達されるかについてはこれまでのところ病原菌の感染によるエリシター刺激において、flg22 エリシター受容体 (FLS2) が機能していることが報告されている (Asai et al. 2002. Nature 415, 977-983) 以外、その受容体や情報伝達因子の同定はなされていない。特に直接の上流因子についてはこれまでのところ全く報告がない。また AtMEKK1 はその構造として C-末端側に触媒領域 (キナーゼドメイン) を持ち、N-末端側を欠失させることにより活性化することが報告されており、N-末端側が活性制御に対し阻害的な役割を持つと考えられている。つまりさまざまな刺激の情報が何らかの形 (他のタンパク質との相互作用やリン酸化などの修飾反応など) で N-末端側に伝達され活性の阻害が解除されると予想されている。

2. 研究の目的

そこで本研究により AtMEKK1 に直接相互作用する (特に N-末端制御領域に相互作用する) タンパク質の同定を行い、AtMEKK1 活性化における役割を検討し、活性調節機構を明らかにする。またそれぞれのストレス刺激について AtMEKK1 までの経路にどのような因子が関与しているかを明らかにすることでその全容解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) AtMEKK1 相互作用タンパク質の同定

① Yeast two-hybrid 法を利用したスクリーニング

AtMEKK1 全長及び N-末端領域をベイトとし

て pBD ベクターに挿入し、これまでに申請者らが作製していたシロイヌナズナ cDNA ライブラリーを用いて相互作用するタンパク質をスクリーニングする。

② 抗 AtMEKK1 抗体による共沈実験

シロイヌナズナ芽生えに各種 (低温、乾燥、傷害、塩など) ストレス処理を行い、抽出した全タンパク質から抗 AtMEKK1 抗体 (作製済み) を用いて免疫沈降を行い、共沈してきたタンパク質を SDS-PAGE により分離する。各ストレス特異的なものあるいは共通するものなどを質量分析によりアミノ酸配列決定を行いタンパク質の同定を行う。

③ GST-AtMEKK1 発現タンパク質を利用した共沈実験

シロイヌナズナ芽生えに各種 (低温、乾燥、傷害、塩など) ストレス処理を行い、抽出した全タンパク質を GST 融合タンパク質として調製した AtMEKK1 全長および N-末端制御領域を混合し、グルタチオンセファロースビーズを利用して結合タンパク質を共沈させ 2. と同様にアミノ酸配列決定を行いタンパク質の同定を行う。

④ West-western 法を利用した相互作用タンパク質の同定

シロイヌナズナ芽生えに各種 (低温、乾燥、傷害、塩など) ストレス処理を行い、抽出した全タンパク質を 2 次元電気泳動し、PVDF 膜に転写後、GST 融合タンパク質として調製した AtMEKK1 全長および N-末端制御領域と反応させ、結合した AtMEKK1 を GST 抗体により検出することで AtMEKK1 結合タンパク質を同定

し、2.と同様にアミノ酸配列決定を行いタンパク質の同定を行う。

(2) AtMEKK1 N末端領域の機能解析

N末端領域のキナーゼ活性制御や下流酵素の選択性(基質特異性)に対する役割を検証するため以下に示す実験を行う。

①N末端を部分的に欠損させたタンパク質を大腸菌内で発現させ、その活性や基質特異性を検証する。

②AtMEKK1と下流MAPKKとの結合を酵母Two-hybrid法により検証する。またその際AtMEKK1の活性状態を変化させる変異を導入し、下流因子間の差を検証する。

(3) AtMEKK1情報伝達上流因子の検索。

様々な刺激依存的なAtMEKK1の活性化における各種阻害剤の効果あるいは各種活性化剤によるAtMEKK1活性に対する影響を観察することにより上流因子の同定をおこなう。シロイヌナズナ芽生えに各種(低温、乾燥、傷害、塩など)ストレス処理を行い、抽出した全タンパク質からAtMEKK1を免疫沈降し、その活性を大腸菌発現系により調製した活性欠損型AtMEK1を基質に活性測定する。また各ストレス処理を行う際、リン酸化/脱リン酸化酵素の特異的阻害剤やリン脂質の代謝酵素の阻害剤あるいは各種イオンチャンネルの阻害剤などで前処理することによりその活性化に対する影響を観察する。

4. 研究成果

(1) AtMEKK1結合タンパク質のスクリーニングについて

AtMEKK1結合タンパク質を酵母Two-hybrid法を用いて、シロイヌナズナcDNAライブラリーからのスクリーニングを行った。その結

果2つの候補タンパク質(エチレン合成に関わるタンパク質およびユビキチン分解系を構成するタンパク質)を得た、現在これら2種のタンパク質とAtMEKK1との関連をさらに詳しく検証している。

(2) AtMEKK1 N末端領域の機能に関して。

N末端領域の機能を解析するため、同領域を欠損させた複数のコンストラクトを作成し、大腸菌発現系を用いて発現させ、それぞれの酵素活性をシロイヌナズナのMAPKKを用いて測定した。その結果AtMEKK1はN末端領域を欠損させるに従い、活性化しその基質であるAtMCK1をリン酸化した。その活性化はN末端領域を166番目のアミノ酸残基まで欠落させると最大に達し、332番目のアミノ酸残基を欠落させたキナーゼドメインのみからなるコンストラクトと同等の活性を示した。さらにこれらの酵素の基質特異性を検証するためAtMCK2およびAtMCK6を基質として活性を測定したところ、166番目までのアミノ酸残基を欠落させた酵素ではAtMCK1に対する場合と異なり弱い活性しか示さなかった。キナーゼドメインのみを発現させた酵素ではAtMCK1、AtMCK2およびAtMCK6を同様に強くリン酸化した。以上によりAtMEKK1のN末端領域はキナーゼ活性の制御のみならず基質選択においても重要な役割を果たすことが明らかになった。

(3) AtMEKK1と下流MAPKKとの相互作用について

酵母Two-hybrid法により下流MAPKKとの相互作用を検証した結果シロイヌナズナに存在する10種類のMAPKKのうちAtMCK1とAtMCK2との相互作用を検出した。しかしその相互作用において、AtMEKK1とAtMCK1の相互作用はAtMEKK1の酵素活性により影響され、

AtMKK1 がリン酸化されると相互作用が弱くなることが明らかになった。それに対して AtMKK2 との結合は AtMEKK1 の活性状態によらず常に強く結合していた。これらの結合様式の違いを利用して下流因子の選択を行っている可能性がある。

(4) 内在性 AtMEKK1 の活性化における各種ストレス・阻害剤の影響および基質選択性について

シロイヌナズナの芽生えに傷害、低温および高塩ストレス処理を施し、内在性の AtMEKK1 の活性を免疫沈降/活性測定 (IP アッセイ) により測定した。AtMEKK1 は各種ストレス処理により時間依存的に活性化した。その活性を AtMKK1、AtMKK2、および AtMKK6 を基質として測定したところそれぞれのストレス処理により基質選択性に変化が見られた。傷害ストレス時には AtMKK1 を強く辛酸化しまた低温や高塩処理によっては AtMKK2 を強くリン酸化した。またこれらのストレス処理を各種阻害剤で前処理した後にを行った結果、AtMEKK1 の活性化にはカルシウムイオンの関与が示唆された。

以上 (1) から (4) の成果は今後 AtMEKK1 シグナル伝達系の解明につながる事が予想されさらには植物における環境情報受容およびその伝達機構の解明にとって飛躍的な進歩がもたらされることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Matsuoka, D., Hadiarto, T., and Nanmori, T. Cell Signaling and Response via Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Cascade in *Arabidopsis Plant Stress* 1(1), 113-117

2007 年, 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

- ① 松岡大介, 野村国広, 古谷朋之, 林文勇, 南森隆司 シロイヌナズナ MAPKKK、MEKK1 の活性化と基質特異性について, 日本植物学会第 7 2 回大会, 2008 年 9 月 24 日~27 日. 高知,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 大介 (MATSUOKA DAISUKE)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環・遺伝子実験センター・研究機関研究員
研究者番号: 60437506

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者