

# 博士論文

シロイヌナズナにおいて  $\text{Mg}^{2+}$  感受性を調節する  
2つのプロテインキナーゼファミリーに関する研究

最上 惇郎

## 目次

図表一覧	1
遺伝子一覧表	5
略号一覧	6
序章	8
第1章 サブクラス III SnRK2 と物理的に相互作用する新規因子の探索	
第1節 シロイヌナズナにおける SRK2D の新規相互作用因子の同定	
I-1-1. 序論	13
I-1-2. 方法	15
I-1-3. 結果	21
I-1-4. 考察	25
第2節 SnRK2、CIPK ファミリー間の物理的な相互作用の解析	
I-2-1. 序論	34
I-2-2. 方法	36
I-2-3. 結果	43
I-2-4. 考察	47
第3節 総合考察	61
第2章 CIPK26/3/9/23 の植物体における機能の解析	
II-1. 序論	62
II-2. 方法	63
II-3. 結果	67
II-4. 考察	74

### 第3章 SnRK2 と CIPK26/3/9/23 が調節する新規な生理応答の解析

#### 第1節 $Mg^{2+}$ 感受性調節におけるサブクラス III SnRK2 の役割およびサブクラ

#### ス III SnRK2 と CIPK26/3/9/23 との機能的関連性

III-1-1. 序論 . . . . . 89

III-1-2. 方法 . . . . . 90

III-1-3. 結果 . . . . . 91

III-1-4. 考察 . . . . . 93

#### 第2節 $Mg^{2+}$ 感受性調節における ABA の役割

III-2-1. 序論 . . . . . 102

III-2-2. 方法 . . . . . 103

III-2-3. 結果 . . . . . 104

III-2-4. 考察 . . . . . 106

#### 第3節 SRK2D と CIPK26 の分子レベルでの関連性およびそれらの標的基質の探索

III-3-1. 序論 . . . . . 110

III-3-2. 方法 . . . . . 112

III-3-3. 結果 . . . . . 116

III-3-4. 考察 . . . . . 119

#### 第4節 総合考察 . . . . . 127

### 第4章 本研究の総合考察 . . . . . 130

### 参考文献 . . . . . 138

### 謝辞 . . . . . 151

## 図表一覧

図 1. サブクラス III SnRK2 を介したシグナル伝達経路の模式図

表 1. 植物科学研究においてタンパク質複合体の LC-MS/MS 解析により新規相互作用因子を同定した先行研究

図 2. 構成的に発現させた SRK2D-sGFP タンパク質は植物内で機能的である

図 3. 抗 GFP 抗体結合磁性ビーズを用いた免疫沈降の実験条件の検討～抽出バッファの検討

図 4. LC-MS/MS 解析のための免疫沈降産物を泳動したゲルの銀染色写真

表 2. LC-MS/MS 解析により同定された SRK2D の相互作用因子の候補

表 3. LC-MS/MS 解析により同定され、ABI1 へ帰属されたペプチド配列のリスト

表 4. LC-MS/MS 解析により同定され、CIPK26 へ帰属されたペプチド配列のリスト

図 5. 酵母ツーハイブリッド法による SRK2D と相互作用因子の候補との物理的な相互作用解析

図 6. CIPK26 遺伝子の発現解析

図 7. sGFP 融合 CIPK26 タンパク質の細胞内局在の解析

図 8. Myc タグ融合 CIPK26 タンパク質と GFP 融合 SRK2D タンパク質との共免疫沈降実験

図 9. 酵母ツーハイブリッド法による SRK2D の各領域と CIPK26 との物理的な相互作用解析

図 10. 酵母ツーハイブリッド法による各 SnRK2 と CIPK26 との物理的な相互作用解析

図 11. BiFC 法による SRK2D, SRK2E, SRK2C と CIPK26, CIPK24 との物理的な相互作用解析

図 12. 陸上植物の CIPK 様プロテインキナーゼの系統解析

図 13. 酵母ツーハイブリッド法による SRK2D の制御領域と CIPK26, CIPK3,



CIPK9, CIPK23 あるいは CIPK24 との物理的な相互作用解析

図 14. BiFC 法による SRK2D と CIPK26, CIPK3, CIPK9, CIPK23 あるいは CIPK24 との物理的な相互作用解析

図 15. 明らかにされた SnRK2 ファミリー、CIPK ファミリー間の物理的相互作用のまとめ

図 16. *cipk26*, *cipk3*, *cipk9*, *cipk23* とその多重変異体の整備

図 17. *cipk26*, *cipk3*, *cipk9*, *cipk23* とその多重変異体の表現型解析～  
GM 寒天培地における生育表現型

図 18. *cipk26*, *cipk3*, *cipk9*, *cipk23* とその多重変異体の表現型解析～  
土耕栽培条件下における生育表現型

図 19. CIPK26 遺伝子の発現による *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育阻害からの回復試験

図 20. *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の ABA 感受性試験

図 21. *cipk26/3/9* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体を用いた乾燥ストレス耐性試験および *cipk26/3/9* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体におけるストレス処理に応答した *RD29B* 遺伝子の発現解析

図 22. *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される生育阻害は低[Ca<sup>2+</sup>]条件下において回復しない

図 23. *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される生育阻害は低[Mg<sup>2+</sup>]条件下において回復する

図 24. 液肥中の Mg<sup>2+</sup>濃度を低下させることによる *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育阻害からの部分的な回復

図 25. 高濃度の Mg<sup>2+</sup>含有培地における CIPK26 過剰発現シロイヌナズナの生育試験

図 26. CIPK26 過剰発現シロイヌナズナの Ca<sup>2+</sup>欠乏条件下での生育試験

図 27. 高濃度の Mg<sup>2+</sup>含有培地における *srk2d/e/i*, *cipk26/3/9* 三重変異体および

*cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育試験

- 図 28. 20 mM  $\text{MgCl}_2$  含有培地において生育させた *srk2d/e/i*, *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体では Mg 含量および K 含量の有意な低下がみられる
- 図 29. 高濃度の  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ あるいは  $\text{Ca}^{2+}$ 含有培地における *srk2d/e/i*, *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育試験
- 図 30. 高濃度の  $\text{Mg}^{2+}$ 含有培地における *cipk* 一重変異体および多重変異体、あるいは *snrk2* 一重変異体および多重変異体の生育試験
- 図 31. *SRK2D* 遺伝子の発現による *srk2d/e/i* 三重変異体の高濃度の  $\text{Mg}^{2+}$ に対する高感受性の部分的な回復
- 図 32. *srk2d/e/i/cipk26/3/9/23* 七重変異体を用いた高濃度の  $\text{Mg}^{2+}$ 含有培地における生育試験
- 図 33. 高濃度の  $\text{Mg}^{2+}$ 含有培地における ABA 生合成変異体 (*aba2-1*, *nced3-2*) および *areb1/areb2/abf3* 三重変異体の生育試験
- 図 34. ABA の添加による高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$ 条件下における *aba2-1* 変異体の生育阻害からの回復試験
- 図 35. 試験管内リン酸化反応系における *SRK2D*-MBP および *CIPK26*-GST の活性評価および活性欠損型 *SRK2D*-MBP, *CIPK26*-GST の作出
- 図 36. 試験管内リン酸化反応系における *CIPK26*-GST による活性欠損型 *SRK2D*-MBP のリン酸化試験あるいは *SRK2D*-MBP による活性欠損型 *CIPK26*-GST のリン酸化試験
- 図 37. *vha-a2 vha-a3* 二重変異体の高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$ に対する感受性試験
- 図 38. *vha-a2 vha-a3* 二重変異体の高濃度の外界  $\text{Zn}^{2+}$ に対する感受性試験
- 図 39. 酵母ツーハイブリッド法による MRS ファミリーに属する  $\text{Mg}^{2+}$ トランスポーターと *CIPK26* あるいは *SRK2D* との物理的な相互作用解析
- 図 40. 試験管内リン酸化反応系における *CIPK26*-GST あるいは *SRK2D*-MBP に

よる MRS2-5 の N 末端領域のリン酸化試験

図 41. シロイヌナズナの  $Mg^{2+}$  感受性の調節におけるサブクラス III SnRK2 とそれらの新規相互作用因子である CIPK26/3/9/23 を介したシグナル伝達経路のモデル図

表 5. 本研究で用いたプライマー配列のリスト

遺伝子一覧表

遺伝子名	AGIコード
<i>SRK2D/SnRK2.2</i>	At3g50500
<i>SRK2E/SnRK2.6/OST1</i>	At4g33950
<i>SRK2I/SnRK2.3</i>	At5g66880
<i>SRK2C/SnRK2.8</i>	At1g78290
<i>SRK2F/SnRK2.7</i>	At4g40010
<i>SRK2A/SnRK2.4</i>	At1g10940
<i>SRK2B/SnRK2.10</i>	At1g60940
<i>SRK2G/SnRK2.1</i>	At5g08590
<i>SRK2H/SnRK2.5</i>	At5g63650
<i>SRK2J/SnRK2.9</i>	At2g23030
<i>CIPK26</i>	At5g21326
<i>CIPK3</i>	At2g26980
<i>CIPK9</i>	At1g01140
<i>CIPK23</i>	At1g30270
<i>CIPK24/SOS2</i>	At5g35410
<i>ABI1</i>	At4g26080
<i>TSN2</i>	At5g61780
<i>ACLB-1</i>	At3g06650
<i>RD29B</i>	At5g52300
<i>CAX1</i>	At2g38170
<i>CAX3</i>	At3g51860
<i>MRS2-1/MGT2</i>	At1g16010
<i>MRS2-3/MGT4</i>	At3g19640
<i>MRS2-5/MGT3</i>	At2g03620
<i>MRS2-7/MGT7</i>	At5g09690
<i>ABA2</i>	At1g52340
<i>NCED3</i>	At3g14440
<i>AREB1</i>	At1g45249
<i>AREB2</i>	At3g19290
<i>ABF3</i>	At4g34000
<i>VHA-A2</i>	At2g21410
<i>VHA-A3</i>	At4g39080

## 略号一覧

ABA; abscisic acid

ATP; adenosine triphosphate

BiFC; bimolecular fluorescence complementation

CBB; coomassie brilliant blue

cDNA; complementary deoxyribonucleic acid

CIPK; Calcineurin B-like (CBL) interacting protein kinase

DNA; deoxyribonucleic acid

DTT; dithiothreitol

EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid

GFP; green fluorescent protein

GST; glutathione S-transferase

GUS;  $\beta$ -glucuronidase

ICP-MS; inductively coupled plasma-mass spectrometry

LC-MS/MS; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MBP; maltose-binding protein

MES; 2-morpholinoethanesulfonic acid

MS; Murashige and Skoog

PCR; polymerase chain reaction

RFP; red fluorescent protein

RNA; ribonucleic acid

rRNA; ribosomal RNA

RT-PCR; reverse transcription polymerase chain reaction

SDS; sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

sGFP; synthetic green fluorescent protein

SnRK2; Sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 2

T-DNA; Transfer DNA

Triton X-100; polyoxyethylene(10) octylphenyl ether

Tris-HCl; tris(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride

YFP; yellow fluorescent protein

## 序章

世界は、2050 年までに 90 億人を超えると見込まれている人口増加（国連「World population prospect The 2012 Revision」）、人々の食生活の変化（食肉や乳製品の摂取量の増加）、バイオ燃料の増加などの要因により、穀物生産量を増加させる必要性に迫られている。これらの需要に応えるために、2050 年までに世界の穀物生産量を現在の生産量よりも 60%～110%程度増加させる必要があると見積もられている（Tilman et al., 2011）。世界の穀物収穫面積は 1960 年以降ほぼ横ばいとなって推移している（平成 20 年度農林水産白書）。一方、穀物の単位面積あたりの収量は、緑の革命に代表される多収量品種の導入、化学肥料の投入、灌漑施設の整備などにより、1960 年代から約 2 倍に増加したが、近年の穀物生産成長率は世界的に減少傾向にある（世界食糧農業白書 2007 年報告）。主要穀物であるトウモロコシ、イネ、コムギおよびダイズにおける現在の収量増加のペースでは、2050 年までに予想される穀物生産量の需要を満たせないことが示されている（Ray et al., 2013）。そのため、今後、安定的に多収を維持できる革新的な農業技術の確立および作物品種の育成が早急に求められる。

農作物を含め、植物は一般に発芽した場所から移動することではなく、置かれた環境に適応して生存していかなければならない。植物の生育は、病害、虫害、雑草害、栄養欠乏、乾燥や塩害などの環境要因に左右される。とりわけ、乾燥や塩害などによって引き起こされる水分ストレスが植物の生育に与える影響は大きく、実際、農作物の収量は干ばつや塩害による水分ストレスによって最も影響を受けることが報告されている（Boyer, 1982）。干ばつや塩害などの水分ストレスによる農作物の収量損失を抑制するための方策の一つとして、これらのストレスに対する植物の耐性獲得機構への基礎的な理解を深めることは重要である。基礎研究により得られた知見を、干ばつ地域や塩類集積土壌などの劣悪条件下でも安定した収量が見込めるような環境ストレス耐性作物の分子育種へと転換していくことが期待されている。実際、モデル実験植物であるシロイヌ

ナズナで得られた基礎的な知見を活用して、主要穀物であるイネにおいて乾燥ストレス耐性能を増強できることが報告されている (Ito et al., 2006、Xiang et al., 2008)。これらの報告は、植物種間に共通な水分欠乏ストレス応答システムが存在しており、モデル実験植物の研究から得られた知見を作物種の分子育種に応用できることを示している。

水分欠乏ストレスが植物の生長に及ぼす影響は、水分欠乏ストレスの程度に依存する。比較的穏やかな水分欠乏は、光合成活性にはさほど影響を与えない一方で、葉の細胞の分裂や細胞伸長を抑制し、植物の地上部の生育を遅延させ、また根系の発達を促進させる (Saab et al., 1990)。このような生理応答は、水分欠乏ストレスによる悪影響を軽減するための植物の防御手段の一つであると考えられる。著しい水分欠乏ストレスは、植物の光合成を抑制し、細胞内を高浸透圧状態にし、細胞に致命的な障害を与える。植物は、このような水分環境の変化を迅速に感知して対応するための機構、すなわち蒸散を抑制するための気孔の閉鎖、浸透圧の調節、細胞機能の保護、活性酸素種の消去などの機構を備えている。これら細胞レベルでの応答には、様々な機能遺伝子の発現やタンパク質の修飾が関与していることが示されている (Bartels and Sunkar, 2005)。

水分欠乏ストレス耐性獲得の過程では、水分欠乏ストレスに応答して蓄積量が増加する植物ホルモンのアブシシン酸 (ABA) が重要な役割を担っており、蒸散による水分損失を抑制するための気孔の閉鎖や耐性獲得に関与する遺伝子の発現制御などの様々な生理応答を制御している。水分欠乏ストレスにさらされた植物では、多くの遺伝子の発現誘導がみられるが、これらはストレス耐性に直接機能する機能遺伝子とストレス応答性遺伝子の発現制御に関与する調節遺伝子に大別される。機能遺伝子には、シャペロン、LEA (late embryogenesis abundant) タンパク質、水チャネルタンパク質、解毒酵素などをコードする遺伝子群が含まれ、調節遺伝子には、転写因子、タンパク質リン酸化酵素 (プロテインキナーゼ)、タンパク質脱リン酸化酵素 (プロテインホスファターゼ)、カ



ルシウムシグナルに関わるタンパク質などをコードする遺伝子群が含まれる (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。水分ストレス応答性遺伝子群の発現は、ABA 依存的な経路と ABA 非依存的な経路があることが知られており、ABA 依存的な経路では、AREB (abscisic acid-responsive element-binding protein) /ABF (abscisic acid responsive element-binding factor) 転写因子が、ABA 非依存的な経路では、DREB2 (dehydration-responsive element-binding protein 2) 転写因子などが主要な活性化因子として機能する (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。

ABA を介した水分ストレスシグナル伝達経路において、プロテインキナーゼであるサブクラス III SnRK2 (SNF1-related protein kinase 2) が中心的な正の制御因子として機能していることが報告されている (Fujii et al., 2009、Fujita et al., 2009)。サブクラス III SnRK2 は ABA 処理に応答して活性化されるプロテインキナーゼとしてソラマメで初めて同定された (Li et al., 1996、Li et al., 2000)。一方、サブクラス III SnRK2 は浸透圧ストレスに応答して ABA 非依存的な様式でも活性化されることが報告されている (Yoshida et al., 2006)。シロイヌナズナやイネを用いた研究により、水分欠乏ストレスに応答して活性化されたサブクラス III SnRK2 は、気孔閉鎖に関与するイオンチャネルや遺伝子発現制御に関与する AREB/ABF 転写因子群の活性をそれらのリン酸化を通じて調節することで、ABA シグナル伝達経路の調節因子としての機能を果たしていることが明らかにされた (Geiger et al., 2009、Lee et al., 2009、Kobayashi et al., 2005、Furihata et al., 2006、Fujii et al., 2009、Fujita et al., 2009)。シロイヌナズナのサブクラス III SnRK2 (SRK2D/SnRK2.2、SRK2E/SnRK2.6/OST1 および SRK2I/SnRK2.3) を全て欠損した変異体、*srk2d/e/i* 三重変異体は ABA にほとんど応答しない。そのため、*srk2d/e/i* 三重変異体では水分欠乏ストレスに応答した遺伝子発現や気孔閉鎖が誘導されず、*srk2d/e/i* 三重変異体は、通常の相対湿度条件 (< 60 %) では著しく生育が阻害されるほど乾燥ストレスに対して極度に弱い表現型を示す (Fujii et al., 2009、Fujita et al., 2009)。このことから、水分欠乏ストレス耐性獲得の過程

において、サブクラス III SnRK2 が中枢的な機能を果たしていることが示された。

現在までにサブクラス III SnRK2 の ABA 依存的な活性化機構については急速に理解が進んでいる (Ma et al., 2009、Park et al., 2009、Umezawa et al., 2009)。また、サブクラス III SnRK2 の下流の標的基質についても精力的に研究が進められている (Umezawa et al., 2013、Wang et al., 2013)。しかし、既知の標的基質の機能だけでは、*srk2d/e/i* 三重変異体でみられる乾燥ストレスに極度に弱い表現型を十分には説明できておらず、サブクラス III SnRK2 を介したシグナル伝達の全体像は依然不明なままである (図 1)。水分欠乏ストレス耐性獲得におけるサブクラス III SnRK2 の中枢的な役割を鑑みると、サブクラス III SnRK2 を介したシグナル伝達を解明することは、植物が水分欠乏ストレス条件を生き抜くための根本的な生存戦略の一端を理解できると期待され、重要であると考えられる。

本研究では、シロイヌナズナのサブクラス III SnRK2 に着目し、植物体でサブクラス III SnRK2 と物理的に相互作用するタンパク質因子を同定することを通じて、サブクラス III SnRK2 を介したシグナル伝達経路に関する新たな知見を得ることを目的とした。第 1 章では、サブクラス III SnRK2 と植物体内において物理的に相互作用する新規因子の探索をおこなった。第 2 章では、新規相互作用因子として同定されたプロテインキナーゼ群、CIPK26/3/9/23 の植物体における機能を解析した。第 3 章では、サブクラス III SnRK2 と CIPK26/3/9/23 が調節する新規な生理応答を見いだした。第 4 章では、本研究により明らかにされたサブクラス III SnRK2 と CIPK26/3/9/23 の新規な生理的機能と、サブクラス III SnRK2 と CIPK26/3/9/23 の既知の機能とを合わせて、サブクラス III SnRK2 および CIPK26/3/9/23 が植物体でどのような役割を果たしているのかを考察した。

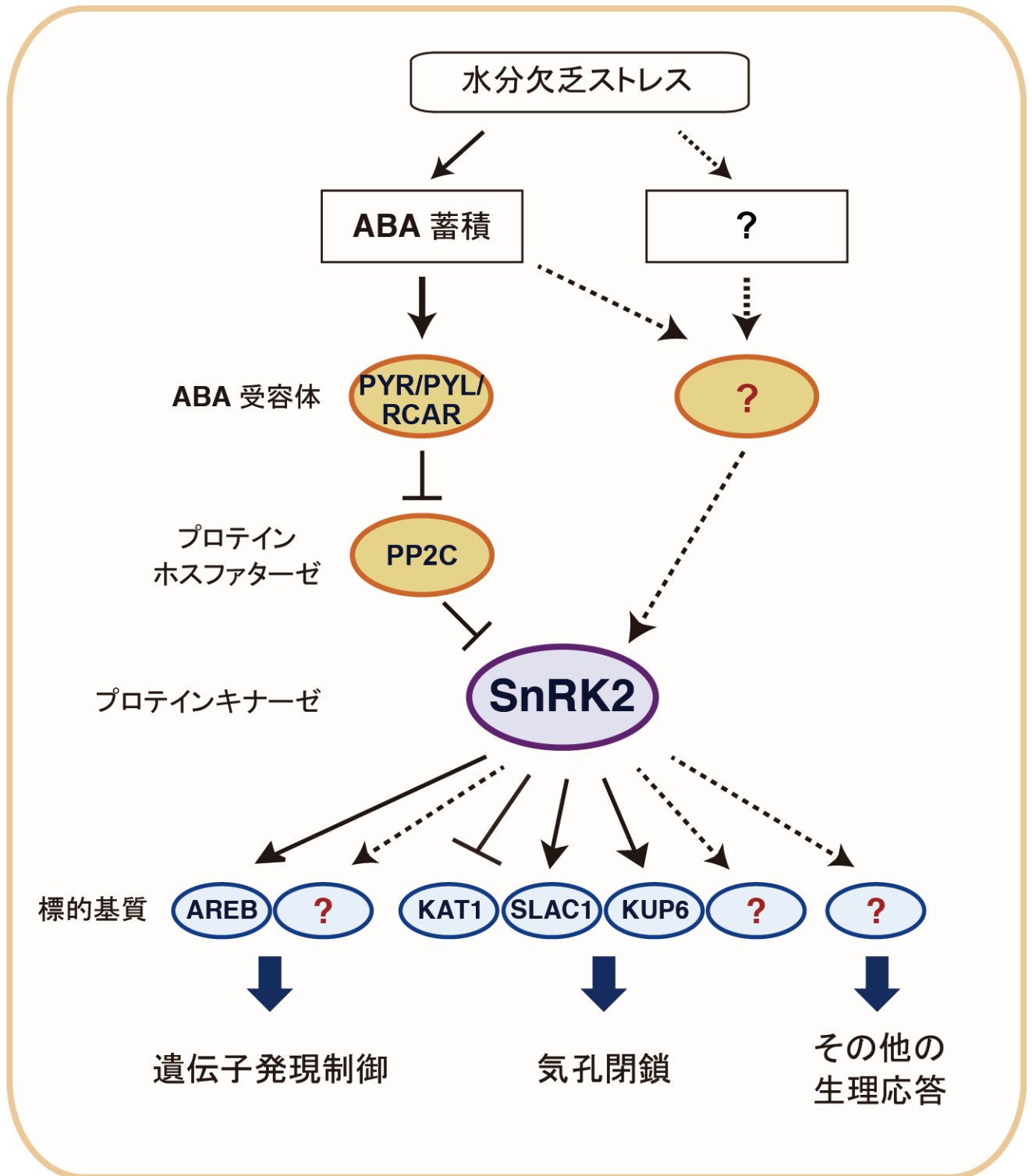


図 1. サブクラス III SnRK2 を介したシグナル伝達経路の模式図

水分欠乏ストレスに応答して植物中の ABA 濃度が上昇すると、ABA に結合した PYR/PYL/RCAR により、PP2C の活性が抑制される。その結果、通常条件下では PP2C によって活性が抑制されていたサブクラス III SnRK2 が活性化される。サブクラス III SnRK2 はまた、ABA を介さない様式によっても活性化される。活性化されたサブクラス III SnRK2 は、下流の標的基質をリン酸化し、それらの活性を調節する。実線は、実験的に支持されたシグナル伝達経路を示す。点線は、想定されるシグナル伝達経路を示す。

## 第 1 章 サブクラス III SnRK2 と物理的に相互作用する新規因子の探索

### 第 1 節 シロイヌナズナにおける SRK2D の新規相互作用因子の同定

#### I-1-1. 序論

サブクラス III SnRK2 プロテインキナーゼは、ABA を介した水分欠乏ストレス応答の主要な調節因子として機能する。水分欠乏ストレス耐性獲得の過程におけるサブクラス III SnRK2 の重要性にも関わらず、サブクラス III SnRK2 を介したシグナル伝達経路の全容は依然不明なままである。本研究では、植物体でサブクラス III SnRK2 と物理的に相互作用するタンパク質因子を同定することを通じて、サブクラス III SnRK2 を介したシグナル伝達経路に関する新たな知見を得ることを目的とする。相互作用因子の単離に立脚することは、順遺伝学的アプローチでしばしば弊害となる遺伝子間の機能的冗長性の問題を克服できるという利点がある。

近年、*srk2d/e/i* 三重変異体を用いたリン酸化プロテオミクス解析により、乾燥ストレスあるいは ABA 処理に応答してサブクラス III SnRK2 によってリン酸化される新規な下流標的因子が同定された (Umezawa et al., 2013、Wang et al., 2013)。その中には、ABA 応答の調節に関わる新規因子である SnRK2-substrate 1 (SNS1) や、花成の時期を調節する Flowering Basic Helix-loop helix-type transcription factor 3 (FBH3) が含まれていた。このように、変異体とリン酸化プロテオミクス解析を組み合わせた解析は、プロテインキナーゼの新規な基質を同定するための強力な手法である。しかし、この手法ではプロテインキナーゼの直接的な基質とならない、二次的にリン酸化された因子も同定されるため、試験管内リン酸化反応などの別の実験系により、目的のプロテインキナーゼによる直接的なリン酸化かどうかを検証する必要がある。また、この手法ではプロテインキナーゼのリン酸化の標的とならないタンパク質因子、例えばプロテインキナーゼの活性を調節する上流因子や別のタンパク質との結合を仲介する

アダプタータンパク質などの新規因子を同定することはできない。一方、免疫沈降と質量分析装置を組み合わせて相互作用因子を同定する手法を用いることにより、ベイトタンパク質の上流の制御因子や他のタンパク質との相互作用を仲介するアダプタータンパク質などの新規因子を同定した例が植物科学研究において近年報告されている（表 1）。その中には、ABA 応答の制御因子である ABA Insensitive 1 (ABI1)タンパク質の相互作用因子として同定された ABA 受容体（PYR/PYL/RCAR）や、jasmonate ZIM-domain 1（JAZ1）タンパク質の相互作用因子として同定され、JAZ タンパク質と転写抑制因子である TOPLESS との相互作用を仲介する Novel Interactor of JAZ（NINJA）が含まれており（Nishimura et al., 2010、Pauwels et al., 2010）、この手法の有用性を示している。このように、免疫沈降と質量分析計を組み合わせて相互作用因子を同定する手法は、変異体とリン酸化プロテオミクス解析を組み合わせた解析手法を補完するものであり、プロテインキナーゼを介したシグナル伝達経路をさらに解明するために有用であると考えられる。

本研究では、サブクラス III SnRK2 を介したシグナル伝達経路に関する新たな知見を得るために、植物体においてサブクラス III SnRK2 と物理的に相互作用する新規因子の同定を試みた。本研究では、サブクラス III SnRK2 のうち、栄養生長期において根および葉の組織で強く発現しており、ABA 応答の制御において重要な役割を果たしている SRK2D/SnRK2.2（Fujii et al., 2007、Fujita et al., 2009）に着目し、SRK2D の植物体における相互作用因子の探索をおこなった。

## I-1-2. 方法

### 1. 植物体の生育

シロイヌナズナ野生型株として、*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ecotype Columbia (Col)を用いた。シロイヌナズナの生育は、Kim et al., 2012 の方法に従った。乾燥種子を 70 % エタノールで軽く洗浄した後、1%次亜塩素酸ナトリウム、0.02% (v/v) Triton X-100 水溶液に 5 分間浸して、種子表面の消毒をおこなった。その後滅菌水で種子を 3 度洗浄して、種子を germination medium (GM)寒天培地 [4.6 g/L ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (和光純薬工業)、1 mL/L B5 ビタミン (シグマアルドリッチジャパン)、0.5 g/L MES, 30 g/L スクロース、8.3 g/L Bacto Agar (BD Biosciences)、pH 5.7 (KOH)] に播種した。4°C で 3 日間低温処理をおこなった後、明期 ( $40 \pm 10 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) 16 時間/暗期 8 時間、22°C 条件のインキュベータ内で生育させた。形質転換体については、10 mg/L の ハイグロマイシン B (和光純薬工業) を含む GM 寒天培地 (GMH<sub>10</sub> 寒天培地) で同様に生育させた。

シロイヌナズナの形質転換には、予めヘルパープラスミド pSoup を導入した *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) 株を用いた。アグロバクテリウムの形質転換は凍結融解法 (Weigel and Glazebrook, 2006) によっておこなった。アグロバクテリウムの形質転換体は、カナマイシン含有 LB 寒天培地 [10 g/L Bacto Tryptone (BD Biosciences)、5 g/L Bacto Yeast extract (BD Biosciences)、10 g/L 塩化ナトリウム、pH 7.0 (NaOH)、50 mg/L 硫酸カナマイシン (明治製菓)、12g/L Bacto Agar] 上で選抜した。形質転換シロイヌナズナの作出は、作製したプラスミドを保持する形質転換アグロバクテリウムを用いた花序浸し法 (Clough et al., 2005) によっておこなった。

### 2. ゲル内リン酸化アッセイ

GM 寒天培地上で発芽後 12 日間生育させた未処理の幼植物体、あるいは 50

μM ABA 溶液あるいは 0.8 M D-マンニトール溶液で所定の時間処理した幼植物体を解析に供した。1 サンプルあたり 3 植物体を解析に供した。ストレス処理の方法は Yoshida et al., 2010 の方法に従った。タンパク質抽出およびゲル内リン酸化アッセイは Nakashima et al., 2009 の方法に従った。リン酸化の基質として、ミエリン塩基性タンパク質 (myelin basic protein、シグマアルドリッチジャパン) を用いた。

### 3. 乾燥ストレス処理

GM 寒天培地上で発芽後 3 週間生育させたシロイヌナズナ幼植物体を土植えし、さらに 4 日間生育させた。給水を止めることにより乾燥ストレスを与え、給水停止後 6-7 日で再給水をおこなった。その後、4 日間生育させ、写真を撮り、生存個体の数を数えた。

### 4. 免疫沈降

GM 寒天培地上で発芽後 3 週間生育させたシロイヌナズナ植物体 (生体重で 4 ~6 g 換算) をタンパク質抽出に供した。回収した植物体を乳鉢と乳棒を用いて液体窒素存在下において粉末状になるまで破碎した。破碎したサンプルを氷上にて 3 倍量の抽出バッファーに懸濁させた。抽出バッファーとして、抽出バッファーA [1% (w/v) Triton X-100, 150 mM 塩化ナトリウム, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 錠の Complete (Roche Applied Science) / 25 ml]、抽出バッファーB [0.2% (w/v) Triton X-100, 75 mM 塩化ナトリウム, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 錠の Complete/ 25 ml]、あるいは抽出バッファーC [0.2% (w/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 錠の Complete/ 25 ml]を用いた。懸濁液を 4°C、5,000 g で 10 分間遠心した後、上清を回収して一層のミラクロス (Miracloth、Calbiochem) で濾過した。得られた濾過液を 4°C、20,000 g で 20 分間遠心した後、上清を回収し、タンパク質抽出液を得た。タンパク質抽出液に 100 μL の抗 GFP 抗体結合磁

性ビーズ (μMACS Anti-GFP MicroBeads、ミルテニーバイオテック) を加え、4°C で 30 分間静置した。磁性を持つ MiniMACS セパレーター (ミルテニーバイオテック) に設置した M カラム (ミルテニーバイオテック) にタンパク質-抗 GFP 抗体結合磁性ビーズの混合液を 2 mL ずつアプライした。抽出時と等量の Complete を含まない抽出バッファーをアプライ後の M カラムに 2 mL ずつアプライしてカラムを洗浄した。その後、95°C に熱した 100 μL の溶出バッファー [50 mM Tris HCl (pH 6.8), 50 mM DTT, 1 % SDS, 1 mM EDTA, 0.005% ブロモフェノールブルー、10% グリセロール] をカラムにアプライし、免疫沈降産物をカラムから溶出し、回収した。

## 5. 銀染色

免疫沈降産物に含まれるタンパク質を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離し、得られたゲルを PlusOne Silver Staining Kit, Protein (GE ヘルスケア・ジャパン) による銀染色に供した。液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 解析のための銀染色では、SilverQuest Silver Staining Kit (ライフテクノロジーズジャパン) を用いた。方法は添付の説明書に従った。

## 6. イムノブロット解析

### 6.1 メンブレンへの転写

SDS-PAGE 後のゲルをイムノブロット解析に供した。ゲルのサイズに合わせて切り分けたメンブレン (Immobilon-P、Millipore) をメタノール (特級、和光純薬工業) に浸した後、ゲル 1 枚当り 50 ml のブロッキング溶液 (5% (v/v) メタノール、12.1 g/L Tris, 14.4 g/L グリシン) に浸漬した。セミドライ式ブロッキング装置 (ATTO) の陽極電極版をブロッキング溶液で湿らせ、予めブロッキング溶液を浸潤させたろ紙 (BIO-RAD)、メンブレンを載せて、さらにゲル



とろ紙を重ね、気泡を除いてから陰極版を載せて固定した。メンブレン 1 cm<sup>2</sup> 当り 2 mA の定電流で 75 分間泳動し、タンパク質をメンブレンに転写した。

## 6.2 ブロッキング

転写後のメンブレンをブロッキング溶液 (5% スキムミルク (和光純薬工業)、1×TBS-T [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.8% 塩化ナトリウム、0.1% Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween20 相当品、和光純薬工業)]) に浸して、振盪器を用いて室温で 1 時間振盪した。その後、4°C・暗所で一晩静置した。

## 6.3 抗体標識

抗 GFP 抗体 (Roche) (1:2500) を含む 1×TBS-T 溶液中にブロッキング後のメンブレンを浸し、室温で 2 時間振盪した。その後、1×TBS-T 溶液を用いてメンブレンを 3 回洗浄した。二次抗体反応として、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 修飾抗マウス IgG 抗体 (シグマアルドリッチジャパン) (1:10000) を含む 1×TBS-T 溶液中でメンブレンを 1 時間振盪した。一次抗体反応後と同様にメンブレンを洗浄した。

## 6.4 検出

シグナルの検出には ECL prime Western Bolotting Detection Reagent (GE ヘルスケア・ジャパン) を用い、LAS3000 (富士フィルム) を用いて化学発光を検出した。方法は添付の説明書に従った。

## 7. ゲル内トリプシン消化

タンパク質のゲル内トリプシン消化は、Shevchenko et al., 2006 の方法に従っておこなった。トリプシン消化されたペプチドは、トリプシン消化後のゲル断片に 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸含有 5% (v/v) アセトニトリル溶液を加えること

で回収し、C18 disk membrane (3M、エムポア) と StageTips を用いて脱塩を行い (Rappsilber et al., 2003)、減圧乾燥機を用いて乾燥させた後、9  $\mu$ L の 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸含有 5% (v/v) アセトニトリル溶液で溶解させた。

## 8. 質量分析解析およびデータベース検索

nano-LC-MS/MS 解析には、EASY-nLC 1000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) と LTQ-Orbitrap XL (サーモフィッシャーサイエンティフィック) をつなぎ合わせた装置を用いた。nano-LC-MS/MS 解析は、(独) 理化学研究所 環境資源科学研究センター 中神弘史博士および野村有子技術補佐員に依頼した。Mascot 検索エンジン (2.3.02 版、Matrix Science) を用いて、The Arabidopsis Information Resource の データベース (TAIR10\_pep\_20101214, [ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Sequences/blast\\_datasets/TAIR10\\_blastsets/](ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Sequences/blast_datasets/TAIR10_blastsets/)) に対する検索をおこない、得られた MS および MS/MS スペクトルのペプチド配列およびタンパク質への帰属をおこなった。

## 9. 酵母ツーハイブリッド法による物理的相互作用の解析

### 9-1. pGBKT7-SRK2D および pGADT7-ABI1、CIPK26、TSN2、ACLB-1 の作製

*SRK2D* の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*EcoRV* で消化した PCR 産物を pGBKT7 (Clontech) の平滑末端化した *Bam*HI 部位に挿入して pGBKT7-SRK2D を得た。

*ABI1*、*CIPK26* あるいは *TSN2* の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*Sma*I で消化した PCR 産物を pGADT7 (Clontech) の平滑末端化した *Bam*HI 部位に挿入して pGADT7-ABI1、CIPK26、TSN2 を得た。*ACLB-1* の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*EcoRV* で消化した PCR 産物を pGADT7 の平滑末端化した *Bam*HI 部位に挿入して pGADT7-ACLB-1 を得た。

## 9-2. 酵母ツーハイブリッドアッセイ

酵母ツーハイブリッドアッセイは MatchMaker GAL4 two-hybrid system 3 (Clontech)を用いておこなった。方法は添付の説明書に従った。出芽酵母 AH109 株を pGBKT7 に基づいたプラスミドおよび pGADT7 に基づいたプラスミドで形質転換した。AH109 株の形質転換には、Fast Yeast Transformation (G-Biosciences) を用いた。形質転換体の選抜は、Leu および Trp を含まない選抜 SD 寒天培地 (SD/-LW、[6.7 g/L Difco Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (BD Biosciences)、10% (v/v) 10×Dropout 溶液\*、20 mg/L L-ヒスチジン塩酸塩、20 mg/L アデニン硫酸塩、2 % (v/v) D-グルコース、18 g/L BA-10 寒天 (フナコシ)]) 上でおこなった。形質転換体を 30°C で SD/-LW 液体培地を用いて対数増殖期まで生育させ、アデニン硫酸塩、His、Leu および Trp を含まず、種々の濃度の 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) を含むアッセイ用 SD 寒天培地 (SD/-LWHA、[6.7 g/L Difco Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (BD Biosciences)、10% (v/v) 10×Dropout 溶液\*、2 % (v/v) D-グルコース、18 g/L BA-10 寒天 (フナコシ)]) 上で 30°C で生育させた。生育対照区として、形質転換を SD/-LW 寒天培地上で 30°C で生育させた。

\*10×Dropout 溶液: 200 mg/L L-アルギニン塩酸塩、300 mg/L L-イソロイシン、300 mg/L L-リジン塩酸塩、200 mg/L L-メチオニン、500 mg/L L-フェニルアラニン、2000 mg/L L-トレオニン、300 mg/L L-チロシン、1500 mg/L L-バリン、200 mg/L L-ウラシル

### I-1-3. 結果

免疫沈降と質量分析計を組み合わせた手法により、シロイヌナズナ植物体で SRK2D と相互作用する新規因子の同定を目指した。我々の研究グループの先行研究により、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーターの制御下で sGFP 融合 SRK2D タンパク質 (SRK2D-sGFP) を構成的に発現する形質転換シロイヌナズナが既に作出されている (Fujita et al., 2009)。GFP タグあるいは GFP 誘導体である YFP タグを融合したベイトタンパク質を用いて免疫沈降を行い、質量分析計により新規因子を同定した成功例が報告されていることから (表 1。Nishimura et al., 2010、Tamura et al., 2010)、既存の SRK2D-sGFP 発現シロイヌナズナを材料とする免疫沈降実験を計画した。SRK2D-sGFP 発現ラインおよび対照実験で用いる sGFP 対照ラインを GM 寒天培地上で生育させたところ、野生型株 (WT) と同様の生育パターンを示した (図 2A、2B)。構成的に発現させた SRK2D-sGFP タンパク質が植物体で機能的であるかどうかを検証するために、ABA 処理あるいは 0.8 M マンニトール溶液処理による高浸透圧ストレスに応答した SRK2D-sGFP タンパク質の活性化パターンをゲル内リン酸化実験により評価した (図 2C)。その結果、ABA 処理、マンニトール処理に応答して、SRK2D-sGFP の活性が上昇することが示され、発現させた SRK2D-sGFP タンパク質が機能的であることが示唆された (図 2C)。さらに、3 つ全てのサブクラス III SnRK2 (SRK2D/SnRK2.2、SnRK2E/SnRK2.6/OST1、SnRK2I/SnRK2.3) を欠損した変異体、*srk2d/e/i* 三重変異体で SRK2D-sGFP を発現させ、*srk2d/e/i* 変異体で観察される乾燥ストレスに極度に弱い表現型が相補されるかどうかを検証した (図 2D)。その結果、sGFP 発現ラインと比較して、SRK2D-sGFP 発現ラインにおいて乾燥ストレス耐性が回復していることが示された (図 2D)。このことから、植物体内において構成的に発現させた SRK2D-sGFP タンパク質が機能的であることが示された。

sGFP 対照ラインおよび SRK2D-sGFP 発現ラインを用いて、抗 GFP 抗体を用

いた免疫沈降により SRK2D-sGFP と共免疫沈降されるタンパク質因子の単離を試みた。まず、タンパク質抽出に用いる抽出バッファの検討をおこなった (図 3A-C)。ストリンジェンシーの高い抽出バッファA を用いてタンパク質を抽出して免疫沈降をおこなった (図 3A)。その結果、sGFP サンプルでは観察されず、SRK2D-sGFP サンプルで特異的に同定されるバンドが複数観察された (図 3A)。これらのバンドには SRK2D-sGFP タンパク質と相互作用する因子が含まれている可能性が考えられた。そこで、得られた免疫沈降産物をゲル内トリプシン消化後、液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) 解析に供したが、有望な相互作用の候補は同定されなかった (東京大学生物生産工学研究センター 柳澤修一准教授および石田哲也博士との共同研究。未記載。)。タンパク質抽出に用いる抽出バッファには界面活性剤および塩が含まれるため、抽出バッファの強度 (ストリンジェンシー) は、タンパク質の抽出効率に影響を与えるのみならず、タンパク質間の疎水的相互作用や静電的相互作用に影響を与え、結果的にタンパク質複合体の安定性にも影響を与えと考えられる。そこで、よりストリンジェンシーを低下させた抽出バッファの検討をおこなった。ストリンジェンシーが中程度の抽出バッファB あるいはストリンジェンシーの低い抽出バッファC を用いてタンパク質抽出を行い、抗 GFP 抗体による免疫沈降実験に供した (図 3B、3C)。その結果、これらの抽出バッファを用いることで、図 3A で用いたストリンジェンシーの高い抽出バッファを用いた場合と比較して、SRK2D-sGFP サンプルのレーンでより多くの特異的なバンドが同定された (図 3B、3C)。また、抽出バッファC を用いて抽出したタンパク質の免疫沈降産物を抗 GFP 抗体によるイムノブロット解析に供したところ、sGFP あるいは SRK2D-sGFP に由来する単一のバンドを確認できた (図 3D)。

次に、抽出バッファC を用いて抽出したタンパク質の免疫沈降産物をゲル内トリプシン消化後、LC-MS/MS 解析に供し、SRK2D-sGFP と共免疫沈降してきたタンパク質因子の同定を試みた (理化学研究所 環境資源科学研究センター

中神弘史博士および野村有子技術補佐員との共同研究。図 4A-C、表 2)。3 回の独立した LC-MS/MS 解析のための免疫沈降産物を SDS-PAGE および銀染色に供し、免疫沈降産物中のタンパク質を可視化した写真を図 4A-C で示した。図中の赤矢印に対応する位置の各レーン (sGFP サンプルあるいは SRK2D-sGFP) のゲルを切り出し、ゲル内トリプシン消化に供した。得られたトリプシン消化ペプチドを LTQ-Orbitrap LC-MS/MS を用いた質量分析に供した。得られた MS および MS/MS スペクトルは Mascot 検索エンジンを用いて特異的なペプチド配列に帰属させた。

3 回の独立した LC-MS/MS 解析 (2 回の独立した未処理の植物体由来のサンプルおよび 1 回の独立したマンニトール処理した植物体由来のサンプルの解析) により、SRK2D-sGFP の相互作用因子の候補を多数同定した (未記載)。SRK2D-sGFP の相互作用因子の候補をさらに絞り込むために、以下の 3 つの基準に基づいてタンパク質因子を絞り込んだ。(i)タンパク質因子は 2 種類以上のユニークペプチドをもつこと。(ii)帰属に用いられたペプチド配列が 3 回の解析のうち少なくとも 2 回で検出されていること。(iii) SRK2D タンパク質が細胞質と核に局在すること (Fujita et al., 2009)を考慮し、同定されたタンパク質因子は SUBA3 プログラムによる予測 (Tanz et al., 2013)で細胞質、核、あるいは細胞膜に局在すること。絞り込みの結果、合計で 25 種類のタンパク質がこれらの基準を満たすことが明らかとなった (表 2)。また、サブクラス III SnRK2 の負の活性調節因子として物理的に相互作用することが既に明らかにされているプロテインホスファターゼである ABI1 が候補因子の中に含まれていた (表 3)。このことは、今回採用した免疫沈降の実験条件下において既知の SRK2D-ABI1 タンパク質複合体が、少なくとも一部分は無傷なまま単離されてきたことを示しており、本手法を用いることで既知あるいは新規な SRK2D の相互作用因子を同定できる可能性を示している。

次に、同定された相互作用因子の候補と SRK2D との物理的な相互作用を酵母ツーハイブリッド法により検証した（図 5）。試験した範囲において、ABI1 の他に CBL-interacting Protein Kinase 26 (CIPK26)が酵母において SRK2D と物理的に相互作用することが示された（図 5）。一方、TUDOR-SN protein 2 (TSN2)および ATP-cytrate lyase B-1 (ACLB-1)と SRK2D との物理的な相互作用は酵母において検出されなかった（図 5）。以上より、CIPK26 が SRK2D の新規相互作用因子として同定された。LC-MS/MS 解析により同定され、CIPK26 へ帰属したペプチド配列のリストを表 4 で示した。

#### I-1-4. 考察

免疫沈降および LC-MS/MS 解析を組み合わせた解析より SRK2D/SnRK2.2 の新規相互作用因子を探索し、複数の相互作用因子の候補を同定した (表 2)。候補の中にはサブクラス III SnRK2 の活性を負に調節することが知られているプロテインホスファターゼ、ABI1 が含まれており (表 2、表 3)、本手法の妥当性を示すと考える。しかしながら、SRK2D の既知の相互作用因子であり、標的であることが示されている AREB1/ABF2 転写因子に帰属されるペプチドは見いだされなかった。このことから、タンパク質抽出あるいは免疫沈降の過程において、核に局在する SRK2D-AREB1 タンパク質複合体を抽出できていない、あるいは SRK2D-AREB1 タンパク質複合体を破壊してしまった可能性が考えられる。今後、タンパク質抽出液中に含まれる核タンパク質 (例えばヒストンタンパク質) の量を定量して核画分の抽出効率を評価するとともに、免疫沈降の条件を更に検討することで、SRK2D-AREB1 タンパク質複合体を精製できる条件が見いだせるかもしれない。そのような条件において、今回の解析では同定されなかった SRK2D の新規な相互作用因子が同定されると期待される。

酵母ツーハイブリッド法による検証では陰性な結果を示した候補因子の TSN2 や ACLB-1、および未だ酵母ツーハイブリッド法による検証ができていない他の候補因子についても、bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法などの手法により SRK2D との相互作用解析を進めていくことで、新規な相互作用因子が見いだされる可能性が残されている。



表 1. 植物科学研究においてタンパク質複合体の LC-MS/MS 解析により新規相互作用を同定した先行研究

ベイトタンパク質	タグの種類	同定された新規相互作用因子	相互作用因子の機能	発表論文
HXK1	FLAG	VHA-B1, RPT5B	グルコース感受性の調節	Cho et al., 2006
SOS2	TAP	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPases	液胞膜局在型 H <sup>+</sup> -ATPase	Batelli et al., 2007
ABI1	YFP	PYR/PYLs/RCARs	ABA 受容体	Nishimura et al., 2010
JAZ1	TAP	NINJA	TOPLESS と JAZ のアダプタータンパク質	Pauwels et al., 2010
RAE1	GFP	nucleoporins	核膜孔複合体の構成因子	Tamura et al., 2010
BZR1	TAP	PP2A	BZR1 に対する脱リン酸化酵素	Tang et al., 2011

TAP; tandem affinity purification, YFP; yellow fluorescent protein, GFP; green fluorescent protein.

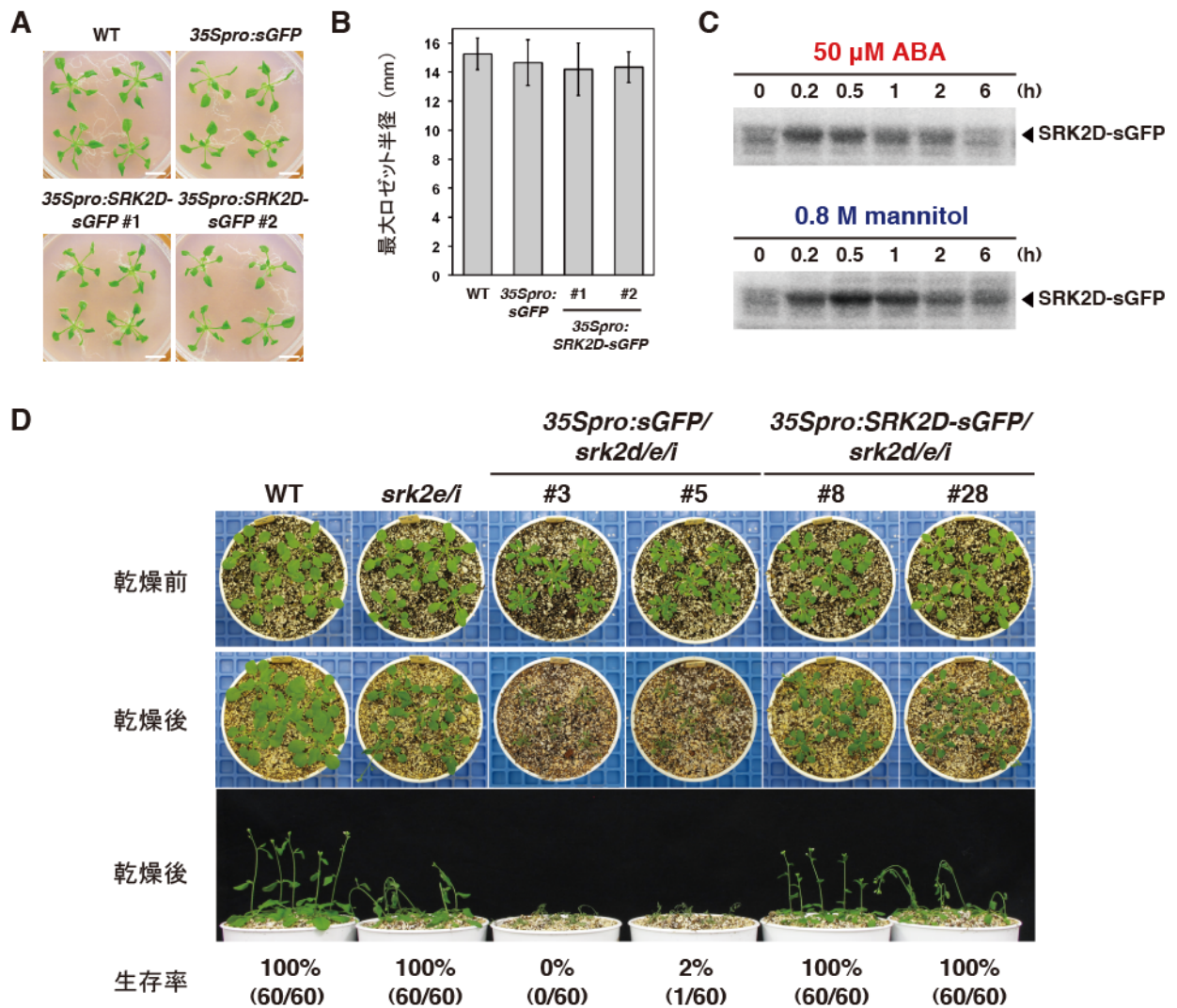


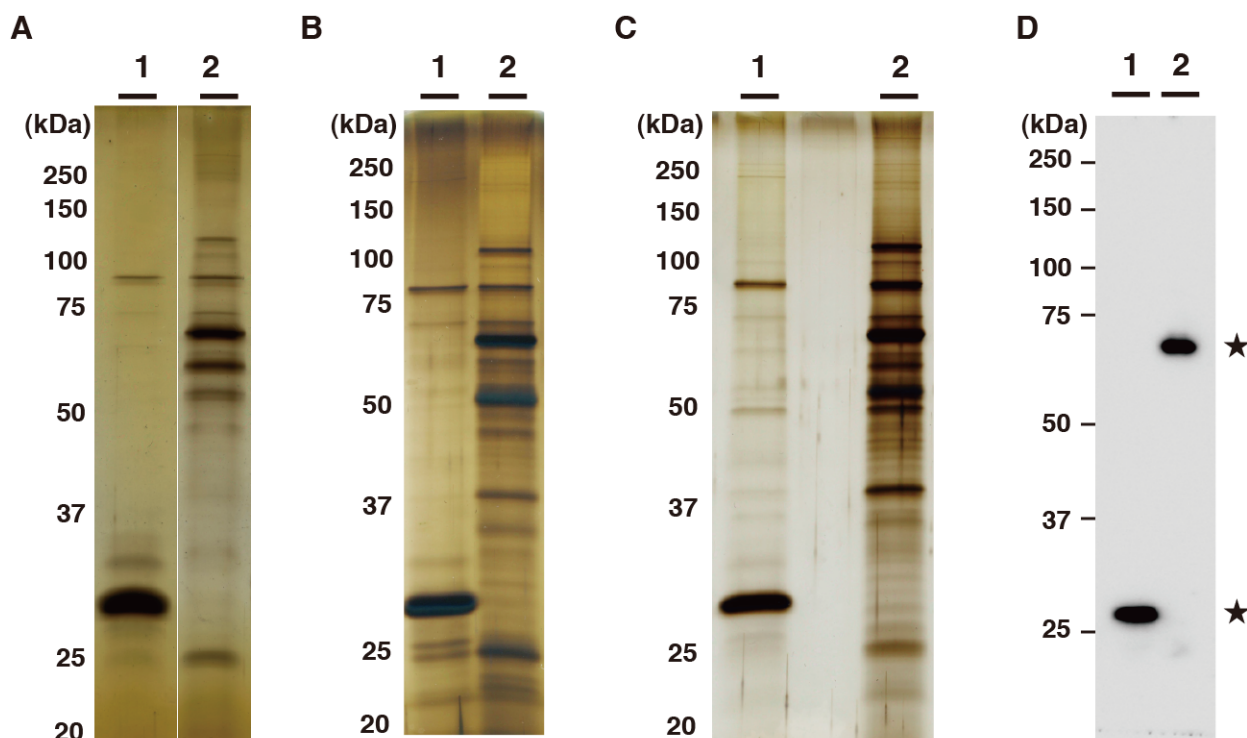
図 2. 構成的に発現させた SRK2D-sGFP タンパク質は植物内で機能的である

(A) Germination medium (GM) 寒天培地で 3 週間生育させた野生型株、sGFP 対照ライン、SRK2D-sGFP 発現ライン（ライン #1, #2）の植物体の写真。スケールバーは 1 cm。

(B) GM 寒天培地で 3 週間生育させた植物体の最大ロゼット半径。エラーバーは標準偏差（n = 8）を示す。

(C) ゲル内リン酸化アッセイによる ABA あるいは高濃度のマンニトール処理に応答した SRK2D-sGFP タンパク質の活性化パターンの評価。SRK2D-sGFP 発現ライン（ライン #1）の植物体を図示した時間 50  $\mu$ M ABA あるいは 0.8 M マンニトール処理に供した。その後、タンパク質を抽出し、ゲル内リン酸化アッセイに供した。レーンあたり 20  $\mu$ g のタンパク質をアプライした。

(D) SRK2D-sGFP の構成的な発現による *srk2d/e/i* 三重変異体の極度に乾燥ストレスに弱い表現型の相補。乾燥ストレス後の生存率を示す。写真は、乾燥ストレス前後の植物体を示す。GM 寒天培地で 3 週間生育させた野生型株 (WT)、*srk2e/i* 二重変異体、sGFP あるいは SRK2D-sGFP 発現ライン（*srk2d/e/i* 三重変異体遺伝的背景）を土植えし、さらに 4 日間生育させた。その後、給水を停止することにより乾燥ストレスを与えた。乾燥ストレス開始後 6-7 日に再給水を行い、さらに 4 日後に生存している個体を生存個体とみなした。生存率は、3 回の独立した試験（各試験 n = 20）の結果から計算した。



1; sGFP サンプル、2; SRK2D-sGFP サンプル

図 3. 抗 GFP 抗体結合磁性ビーズを用いた免疫沈降の実験条件の検討～抽出バッファの検討

(A) *sGFP* 対照ラインあるいは *SRK2D-sGFP* 発現ライン（ライン #1）の未処理の植物体から、ストリンジェンシーの高い抽出バッファ **A** [1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 錠の Complete/ 25 ml] を用いてタンパク質を抽出し、抗 GFP 抗体による免疫沈降に供した。得られた免疫沈降産物を SDS-PAGE に供し、ゲル内に含まれるタンパク質を銀染色により可視化した。

(B) *sGFP* 対照ラインあるいは *SRK2D-sGFP* 発現ライン（ライン #1）の未処理の植物体から、ストリンジェンシーが中程度の抽出バッファ **B** [0.2% Triton X-100, 75 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 錠の Complete/ 25 ml] を用いてタンパク質を抽出し、抗 GFP 抗体による免疫沈降に供した。得られた免疫沈降産物を SDS-PAGE に供し、ゲル内に含まれるタンパク質を銀染色により可視化した。

(C) *sGFP* 対照ラインあるいは *SRK2D-sGFP* 発現ライン（ライン #1）の未処理の植物体から、ストリンジェンシーの低い抽出バッファ **C** [0.2% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 錠の Complete/ 25 ml] を用いてタンパク質を抽出し、抗 GFP 抗体による免疫沈降に供した。得られた免疫沈降産物を SDS-PAGE に供し、ゲル内に含まれるタンパク質を銀染色により可視化した。

(D) (C) と同様の実験条件で得られた免疫沈降産物を SDS-PAGE により分離し、その後抗 GFP 抗体によるイムノブロット解析に供した。★印はそれぞれ *sGFP* および *SRK2D-sGFP* タンパク質のバンドを示す。

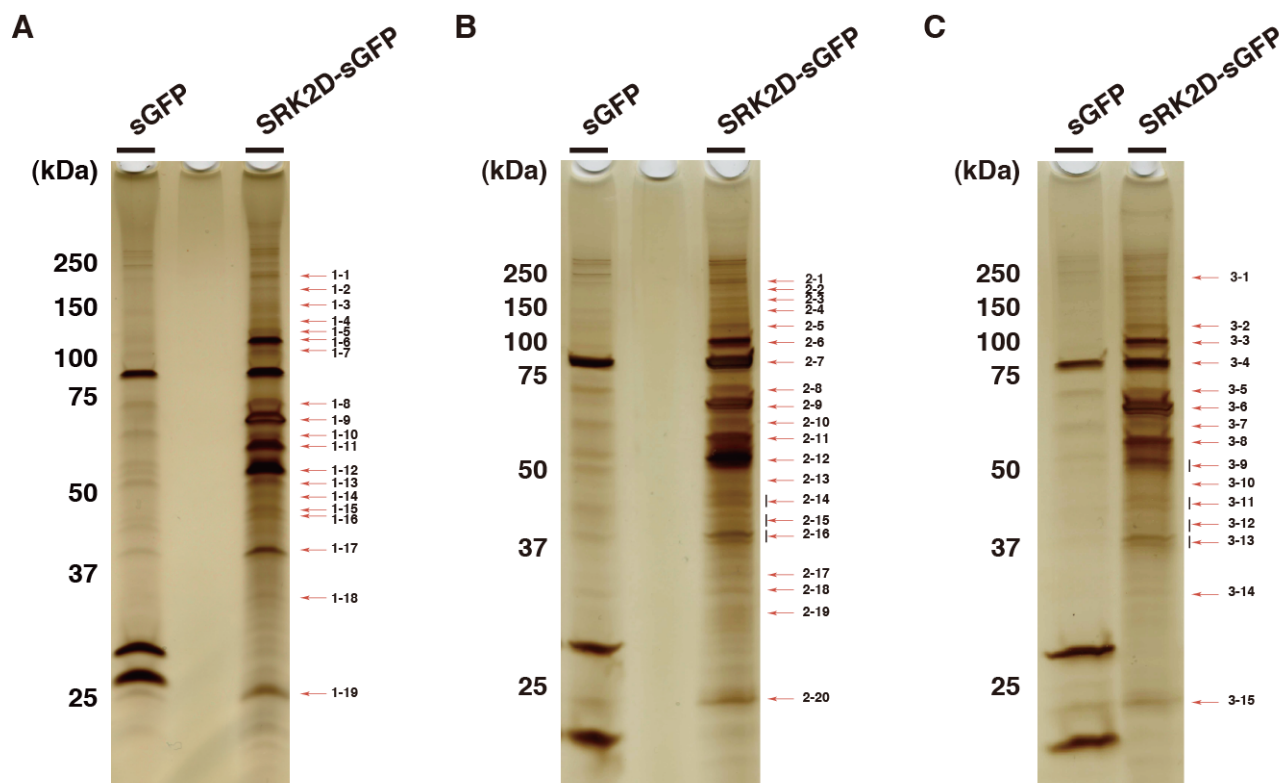


図 4. LC-MS /MS 解析のための免疫沈降産物を泳動したゲルの銀染色写真

(A) sGFP 発現ラインあるいは SRK2D-sGFP 発現ライン (ライン #1) の未処理の植物体から抽出したタンパク質を抗 GFP 抗体による免疫沈降に供した。免疫沈降の条件は図 3 (C) に従った。得られた免疫沈降産物を SDS-PAGE に供し、その後ゲル内に含まれるタンパク質を銀染色により可視化した。赤い矢印は sGFP サンプルでは検出されず、SRK2D-sGFP サンプルで特異的に検出されたバンドの位置を示す。各レーン (sGFP サンプルあるいは SRK2D-sGFP サンプル) において、これらバンドに対応する位置のゲルを切り出し、切り出したゲル断片をゲル内トリプシン消化に供した。その後、トリプシン消化産物を 1 回目の LC-MS/MS 分析に供した。

(B) sGFP 発現ラインあるいは SRK2D-sGFP 発現ライン (ライン #1) の未処理の植物体由来の免疫沈降産物。免疫沈降実験以降の方法は (A) と同様におこなった。得られたトリプシン消化産物を 2 回目の LC-MS/MS 分析に供した。

(C) 0.8 M マンニトール溶液で 1 時間処理した sGFP 発現ラインあるいは SRK2D-sGFP 発現ライン (ライン #1) の植物体由来の免疫沈降産物。免疫沈降実験以降の方法は (A) と同様におこなった。得られたトリプシン消化産物を 3 回目の LC-MS/MS 分析に供した。



表 2. LC-MS/MS 解析により同定された SRK2D の相互作用因子の候補

AGIコード	タンパク質名	アノテーション	細胞内局在※
AT3G50500.1	SRK2D/SnRK2.2	Encodes a member of SNF1-related protein kinases (SnRK2) whose activity is activated by ionic (salt) and non-ionic (mannitol) osmotic stress.	核
AT4G26080.1	ABI1	Involved in abscisic acid (ABA) signal transduction. Negative regulator of ABA promotion of stomatal closure.	細胞質
AT5G21326.1	CIPK26	Ca2+-regulated serine-threonine protein kinase family protein;	細胞質
AT5G61780.1	TSN2	Involved in the regulation of AIGA2Ox3 expression, as well as seed germination.	核
AT3G06650.1	ACLB-1	One of the two genes encoding subunit B of the trimeric enzyme ATP Citrate lyase	細胞質
AT5G07350.1	TSN1	RNA binding protein with nuclease activity essential for stress response. Involved in mechanisms acting on mRNAs entering the secretory pathway. Functionally redundant with TSN2.	核
AT1G79930.1	Hsp91	Encodes high molecular weight heat shock protein 70 not a HSP90 homolog, mRNA is constitutively expressed but transiently induced after heat shock	細胞質
AT1G79920.1	-	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein;	細胞質
AT3G09440.1	-	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein;	細胞質
AT1G31440.1	-	SH3 domain-containing protein;	細胞質
AT1G13440.1	GAPC-2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2;	細胞質
AT1G54270.1	EIF4A-2	Member of eIF4A - eukaryotic initiation factor 4A	細胞質
AT5G62690.1	TUB2	Encodes tubulin beta-2/beta-3 chain	細胞質
AT5G19770.1	TUA3	tubulin alpha-3;tubulin 3	細胞質
AT5G09810.1	ACT7	Member of Actin gene family.Mutants are defective in germination and root growth.	細胞質
AT1G72150.1	PATL1	Novel cell-plate-associated protein that is related in sequence to proteins involved in membrane trafficking in other eukaryotes	細胞質
AT4G31180.1	-	Class II aminoacyl-tRNA and biotin synthetases superfamily protein;	細胞膜
AT2G38750.1	ANNAT4	Annexins are a family of calcium dependent membrane binding proteins though to be involved in Golgi mediated secretion. This is one of four annexins identified in Arabidopsis.	細胞質、細胞膜
AT1G56070.1	LOS1	Encodes a translation elongation factor 2-like protein that is involved in cold-induced translation. Mutations in this gene specifically blocks low temperature-induced transcription of cold-responsive genes but induces the expression of CBF genes and mutants carrying the recessive mutations fail to acclimate to cold and is freezing sensitive.	細胞質
AT3G13330.1	PA200	Encodes a protein that interacts with the 26S proteasome. Mutants are phenotypically indistinguishable from wild type plants under a variety of growth conditions. Protein levels increase upon exposure of seedlings to MG132, a specific, potent, reversible, and cell-permeable proteasome inhibitor.	核
AT3G59770.1	SAC9	Encodes a phosphoinositide phosphatase. The sac9 null mutant accumulates elevated levels of PtdIns(4,5)P2 and Ins(1,4,5)P3. The mutant plants have characteristics of constitutive stress responses.	細胞膜
AT4G05420.1	DDB1A	Structurally similar to damaged DNA binding proteins.DDB1a is part of a 350 KDa nuclear localized DET1 protein complex. This complex may physically interact with histone tails and while bound to chromatin- repress transcription of genes involved in photomorphogenesis.	核
AT1G30360.1	ERD4	Early-responsive to dehydration stress protein (ERD4);	細胞膜
AT2G36580.1	-	Pyruvate kinase family protein;	細胞質、細胞膜
AT2G23070.1	-	Protein kinase superfamily protein;	細胞質

※ SUBA3プログラムによる予測

表 3. LC-MS/MS解析により同定され、ABI1へ帰属されたペプチド配列のリスト

AT4G26080.1      ABI1			
バンドナンバー	サンプル名	ペプチド配列 (N-C)	Mascotイオンスコア
1-11	SRK2D-sGFP	DNISVVVVDLKPR	60.5
2-11	SRK2D-sGFP	ALFNSFLR	30.6
2-11	SRK2D-sGFP	ALFNSFLR	43.4
2-11	SRK2D-sGFP	GSKDNISVVVVDLKPR	31.8
2-11	SRK2D-sGFP	GSKDNISVVVVDLKPR	61.9
2-11	SRK2D-sGFP	GSKDNISVVVVDLKPR	78.5
2-11	SRK2D-sGFP	MHLALAEIYAK	22.2
2-11	SRK2D-sGFP	SIGDRYLKPSIIPDPEVTAVKR	24.1
2-11	SRK2D-sGFP	SVPLYGFTSICGR	60.8
2-11	SRK2D-sGFP	SVPLYGFTSICGR	72.7
2-11	SRK2D-sGFP	VFGVLAMSR	22.6
3-8	SRK2D-sGFP	ALFNSFLR	48.6
3-8	SRK2D-sGFP	ALFNSFLR	50.7
3-8	SRK2D-sGFP	DNISVVVVDLKPR	36.3
3-8	SRK2D-sGFP	DNISVVVVDLKPR	61.3
3-8	SRK2D-sGFP	DNISVVVVDLKPR	67.5
3-8	SRK2D-sGFP	DNISVVVVDLKPR	84.1
3-8	SRK2D-sGFP	FLQSSSGSMLDGR	29.5
3-8	SRK2D-sGFP	FLQSSSGSMLDGR	64.1
3-8	SRK2D-sGFP	FLQSSSGSMLDGR	66.1
3-8	SRK2D-sGFP	MHLALAEIYAK	39.3
3-8	SRK2D-sGFP	MHLALAEIYAK	55.2
3-8	SRK2D-sGFP	MHLALAEIYAK	52.2
3-8	SRK2D-sGFP	MHLALAEIYAK	57.1
3-8	SRK2D-sGFP	MHLALAEIYAK	63.2
3-8	SRK2D-sGFP	MHLALAEIYAK	67.5
3-8	SRK2D-sGFP	NAVAGDASLLADER	109
3-8	SRK2D-sGFP	NAVAGDASLLADER	111
3-8	SRK2D-sGFP	RPEMEDAVSTIPR	24.3
3-8	SRK2D-sGFP	RPEMEDAVSTIPR	28
3-8	SRK2D-sGFP	RPEMEDAVSTIPR	46.3
3-8	SRK2D-sGFP	SVPLYGFTSICGR	82.5
3-8	SRK2D-sGFP	SVPLYGFTSICGR	98
3-8	SRK2D-sGFP	TALPLSVDHKPDREDEAAR	22.1
3-8	SRK2D-sGFP	TALPLSVDHKPDREDEAAR	23.4
3-8	SRK2D-sGFP	VFGVLAMSR	43.4
3-8	SRK2D-sGFP	YLKPSIIPDPEVTAVK	37.5

表 4. LC-MS/MS解析により同定され、CIPK26へ帰属されたペプチド配列のリスト

AT5G21326.1 CIPK26

バンドナンバー	サンプル名	ペプチド配列 (N-C)	Mascotイオンスコア
1-13	SRK2D-sGFP	ALDLGNLFEEEEEGFK	72.3
1-13	SRK2D-sGFP	ITIPVLGDAWFK	52.3
1-14	SRK2D-sGFP	ALDLGNLFEEEEEGFK	73.2
1-15	SRK2D-sGFP	ALDLGNLFEEEEEGFK	35.2
2-14	SRK2D-sGFP	ALDLGNLFEEEEEGFKR	23.9
2-14	SRK2D-sGFP	DLKPENLLLLDAQGNLK	55.5
2-14	SRK2D-sGFP	VSDFGLSALSR	85.6
3-10	SRK2D-sGFP	ALDLGNLFEEEEEGFKR	36.9
3-10	SRK2D-sGFP	DLKPENLLLLDAQGNLK	23.3
3-10	SRK2D-sGFP	DLKPENLLLLDAQGNLK	53.2
3-10	SRK2D-sGFP	DLKPENLLLLDAQGNLK	72.8
3-10	SRK2D-sGFP	EEANLDDVDAVFK	31.4
3-10	SRK2D-sGFP	IEEASKPLGFDIQK	21.9
3-10	SRK2D-sGFP	KEEQPTSMNAFELISMSR	38.4
3-10	SRK2D-sGFP	KEEQPTSMNAFELISMSR	42
3-10	SRK2D-sGFP	VSDFGLSALSR	70.2
3-10	SRK2D-sGFP	VSDFGLSALSR	104
3-11	SRK2D-sGFP	ALDLGNLFEEEEEGFKR	33.1
3-11	SRK2D-sGFP	DLKPENLLLLDAQGNLK	25.8
3-11	SRK2D-sGFP	DLKPENLLLLDAQGNLK	58.7
3-11	SRK2D-sGFP	DLKPENLLLLDAQGNLK	68.2
3-11	SRK2D-sGFP	EEANLDDVDAVFK	65.1
3-11	SRK2D-sGFP	KEEQPTSMNAFELISMSR	31.3
3-11	SRK2D-sGFP	KEEQPTSMNAFELISMSR	33.2
3-11	SRK2D-sGFP	VSDFGLSALSR	99.6
3-11	SRK2D-sGFP	VSDFGLSALSR	108
3-12	SRK2D-sGFP	ALDLGNLFEEEEEGFKR	28.9
3-12	SRK2D-sGFP	DLKPENLLLLDAQGNLK	56.4
3-12	SRK2D-sGFP	VSDFGLSALSR	121

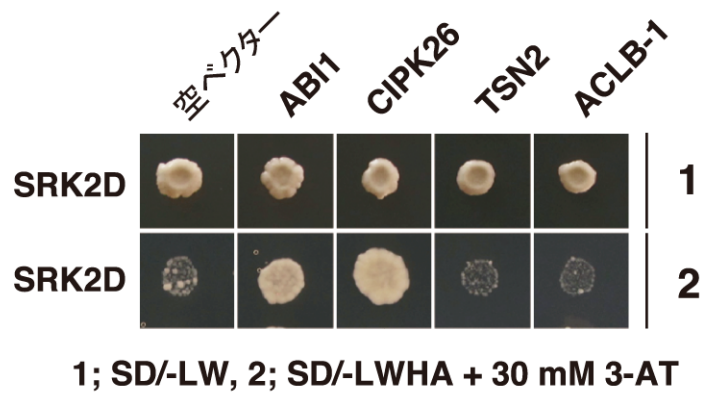


図 5. 酵母ツーハイブリッド法による SRK2D と相互作用因子の候補との物理的な相互作用解析

pGBKT7-SRK2D および pGADT7 ベクター（空ベクター）、pGADT7-ABI1、CIPK26、TSN2、ACLB-1 を導入した出芽酵母（AH109 株）の SD/-LW 培地、30 mM 3-AT を添加した SD/-LWHA 培地における生育試験。OD<sub>600</sub> = 0.1 相当の酵母懸濁液を各培地上に 2.5  $\mu$ l ずつ滴下し、30 °C で 7 日間生育させた。実験は 2 回行い、代表的な結果を示す。



## 第 1 章 第 2 節 SnRK2、CIPK ファミリー間の物理的な相互作用の解析

### I-2-1. 序論

第 1 章 第 1 節において、免疫沈降および LC-MS/MS 解析を組み合わせた解析により SRK2D/SnRK2.2 の新規相互作用因子として CIPK26 を同定した(表 2、表 4、図 5)。

CIPK26 は植物特異的なプロテインキナーゼである Calcineurin B-like (CBL)-interacting protein kinase (CIPK) ファミリーに属するプロテインキナーゼである (Weinl and Kudla, 2009)。CIPK ファミリーは別名 SnRK3/PKS ファミリーと呼ばれ、SnRK2 ファミリーと SnRK1 ファミリーとともに SnRK プロテインキナーゼファミリーを構成している (Hrabak et al., 2003)。CIPK は、植物体内において  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に CBL と物理的に相互作用することで活性化し、下流の標的基質をリン酸化することにより、それらの活性を調節することで機能すると考えられている (Gong et al., 2004)。CIPK ファミリーには植物体内での陽イオンのバランスを調節する役割を果たしている因子が報告されている。例えば、CIPK24/SOS2 は、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  対向輸送体である SOS1 のリン酸化を介した活性調節を通じて高塩ストレス条件下での植物の生長において重要な役割を担っている (Qiu et al., 2002)。CIPK23/LKS1 は、高親和性  $\text{K}^+$  チャネルである AKT1 のリン酸化による活性調節を通じて  $\text{K}^+$  欠乏条件下での  $\text{K}^+$  吸収を制御している (Li et al., 2006, Xu et al., 2006)。また、CIPK ファミリーには乾燥、高塩などの環境ストレスや ABA に対する応答に関与する遺伝子が含まれている (Kim et al., 2003, Cheong et al., 2007, Roy et al., 2013)。CIPK26 の機能についても最近報告があり、ROS の産生に関わる NADPH オキシダーゼである RbohF を CIPK26 がリン酸化し、その活性を上昇させることがヒトの培養細胞の系などを用いて示されているが (Kimura et al., 2013, Drerup et al., 2013)、植物体における CIPK26 の機能は明らかにされていない。

本章では、*CIPK26* 遺伝子の発現パターンを解析するとともに、SRK2D と *CIPK26* との物理的相互作用を詳細に解析した。さらに、SnRK2、CIPK ファミリー間の物理的な相互作用を検証した。

## I-2-2. 方法

### 1. GUS 染色による *CIPK26* 遺伝子の発現部位の解析

#### 1-1. pGH-CIPK26pro:GUS の作製

*CIPK26* 遺伝子のプロモーター配列として、*CIPK26* 遺伝子の翻訳開始点から上流 2033 bp の配列をシロイヌナズナ野生型株のゲノム DNA を鋳型とする PCR により増幅した。*Sma*I で消化した PCR 産物を pGH-GUS (Fujita et al., 2012) の *Sma*I 部位に挿入して pGH-CIPK26pro:GUS を得た。

#### 1-2. GUS 染色および顕微鏡観察

I-1-2-1.の方法に従い、pGH-CIPK26pro:GUS を保持する形質転換シロイヌナズナを作出した。得られた形質転換ラインを用いて GUS 染色をおこなった。氷冷した 90% (v/v) アセトンで植物体を入った容器に加え、氷上に 15 分間置いた。90% アセトンをよく除き、100 mM NaPO<sub>4</sub> バッファー (pH 7.0) で植物体を洗浄した後、GUS 染色液 [100 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 7.0)、10 mM EDTA、5 mM フェリシアン化カリウム、5 mM フェロシアン化カリウム、0.1% (w/v) Triton X-100、0.5 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc)] に植物体を浸した。20 分間脱気して染色液を組織に浸透させた後、37°C で一晩反応させた。染色液を除き、70% エタノールで数回洗浄した後、エタノール/酢酸溶液 (v/v、6:1) を加え、クロロフィルなどの色素を除去した。その後、70% エタノール、MilliQ 水の順番に置換し、実体顕微鏡を用いて植物体を観察した。

### 2. 定量 RT-PCR

#### 2-1. 植物体からの全 RNA の抽出

全 RNA の抽出は、Sato et al., 2004 の方法に若干の改変を加えて、RNAiso (TaKaRa) を用いた酸性フェノール法によっておこなった。-80°C で凍結した約 100 mg の植物体とステンレス球の入った 2 mL 微量遠心管を冷却したアルミの

ブロックに立て、凍結状態を保ちながら Shakemaster (Bio Medical Science) で 2 分間粉砕した。粉砕後直ちに 1 mL の RNAiso を加え、室温で 5 分間攪拌した。4°C、20,000×g で 10 分間遠心した後、上清を新しい微量遠心管に移してクロロホルム 200 µL を加えて十分に攪拌し、4°C、20,000×g で 15 分間遠心した。この作業をもう一度繰り返した後、上清を新しい微量遠心管に移し、250 µL の High Salt 溶液 (0.8 M クエン酸ナトリウム、1.2 M 塩化ナトリウム) と 250 µL の 2-プロパノールを加え、室温で 5 分間攪拌して 4°C、20,000×g で 15 分間遠心した。上清を完全に除去し、沈殿に 500 µL の 75 %エタノールを加えて 4°C、20,000×g で 5 分間遠心した。この作業をもう一度繰り返した。上清を完全に除去し、風乾した後に 40 µL の Milli-Q 水を加えて沈殿を完全に溶解させた。NANODROP 1000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック)を用いて、RNA の濃度測定を行うとともに、OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比を測定して抽出した RNA の質に問題がないことを確認した。

## 2-2. 一本鎖 cDNA の合成

SuperScript III Reverse Transcriptase (ライフテクノロジーズジャパン)を用いて、全 RNA から一本鎖 cDNA を合成した。全 RNA 500 ng、0.25 µL のランダムプライマー (25 pmol/µL、ライフテクノロジーズジャパン)、0.5 µL の 10 mM dNTP Mixture を合計で 7 µL になるように Milli-Q 水でメスアップした。これを 65°C で 5 分間熱変性処理した後に氷上で 1 分以上静置した。2 µL の 5×First-Strand Buffer、0.5 µL の 0.1 M DTT、0.5 µL の SuperScript TM III Reverse Transcriptase を加え、25°C・5 分間、50°C・60 分間、70°C・15 分間反応させて逆転写をおこなった。

## 2-3. 定量 RT-PCR による発現解析

定量 RT-PCR には、Real-Time PCR system 7300 (Applied Biosystems)を使用した。

反応には Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いた。5  $\mu$ L の 2 $\times$ Power SYBR Green PCR Master Mix、0.2  $\mu$ L の forward プライマー (10 pmol/ $\mu$ L)、0.2  $\mu$ L の reverse プライマー (10 pmol/ $\mu$ L)、3.6  $\mu$ L の MilliQ 水を混合し、希釈した cDNA 溶液を 1 $\mu$ L 加えて反応させた。なお、内部標準として 18S rRNA を用いた。使用したプライマーの配列は表 5 に示した。反応条件は、95°C・10 分間、[95°C・15 秒間、60°C・1 分間]を 40 回、この後、95°C まで温度を上昇させ、そこから 60°C まで徐々に温度を下げていき、融解温度を測定することにより増幅産物が単一であることを確認した。

### 3. ベンサミアーナタバコ葉における sGFP 融合 CIPK26 (sGFP-CIPK26) の細胞内局在解析

#### 3-1. pGH-35Spro:sGFP-CIPK26 および pGH-35Spro:SRK2D-mCherry の作製

*CIPK26* の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*Sma*I で消化した PCR 産物を pGH35S-sGFP (Fujita et al., 2009) の *Eco*RV 部位に挿入して pGH-35Spro:sGFP-CIPK26 を得た。

vac-rk プラスミド (CD3-975、Nelson et al., 2007) 由来の mCherry 配列を PCR により増幅した。*Bam*HI-*Eco*RV で消化した PCR 産物を pGH35S-sGFP の *Bam*HI-*Eco*RV 部位に挿入して pGH-35Spro:mCherry を得た。*SRK2D* の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*Eco*RV で消化した PCR 産物を pGH-35Spro:mCherry の *Sma*I 部位に挿入して pGH-35Spro:SRK2D-mCherry を得た。

#### 3-2. ベンサミアーナタバコ葉へのアグロインフィルトレーション

I-1-2-1. の方法に従い、*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) 株を pGH-35Spro:sGFP-CIPK26 あるいは pGH-35Spro:SRK2D-mCherry で形質転換した。得られた形質転換体および Tomato bushy stunt virus 由来の p19 サイレンシングサブプレッサーを発現する GV3101 株を 30°C でカナマイシン含有 LB 液体培地を用

いて培養して混合させ、Waadt et al., 2008 の方法に従って発芽後 5 週間生育させたベンサミアータバコ (*Nicotiana benthamiana*) の展開葉に浸潤させた (アグロインフィルトレーション)。その後、植物体を 4-5 日間生育させた。

### 3-3. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光観察

アグロバクテリウムを浸潤させたベンサミアータバコ葉の背軸側の表皮細胞において、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5 PASCAL、Carl Zeiss) を用いて蛍光観察をおこなった。蛍光観察では、GFP 蛍光 (励起光 ; 488 nm、フィルター; 505-530 nm) および RFP 蛍光 (励起光 ; 543 nm、フィルター; 560-615 nm) の観察をおこなった。複数の葉を観察に供し、同様の蛍光パターンが観察されることを確認した。

## 4. シロイヌナズナ本葉における sGFP 融合 CIPK26 タンパク質の細胞内局在解析

### 4-1. pGH-CIPK26pro:sGFP-CIPK26 の作製

*CIPK26* 遺伝子のプロモーター配列として、*CIPK26* 遺伝子の翻訳開始点から上流 2033 bp の配列をシロイヌナズナ野生型株のゲノム DNA を鋳型とする PCR により増幅した。*Sma*I で消化した PCR 産物を pGH35S-sGFP の平滑末端化した *Kpn*I-*Xba*I 部位に挿入して pGH-CIPK26pro:sGFP を得た。*CIPK26* の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*Sma*I で消化した PCR 産物を pGH-CIPK26pro:sGFP の *Eco*RV 部位に挿入して pGH-CIPK26pro:sGFP-CIPK26 を得た。

### 4-2. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光観察

I-1-2-1.の方法に従い、pGH-CIPK26pro:sGFP-CIPK26 を保持する形質転換シロイヌナズナを作出した。得られた形質転換シロイヌナズナの本葉の表皮細胞を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。方法は I-2-2-3.3 の方法に従った。

## 5. Myc タグ融合 CIPK26 と GFP タグ融合 SRK2D との共免疫沈降実験

### 5-1. pGH-35Spro:4×Myc-CIPK26 および pGK-35Spro:SRK2D-sGFP の作製

pGWB17 (Nakagawa et al., 2007) の 35S プロモーター領域を PCR により増幅した。*KpnI* で消化した PCR 産物を pG0129-NosT (Matsukura et al., 2010) の *KpnI* 部位に挿入して pGH-35Spro を得た。pGWB17 (Nakagawa et al., 2007) の 4×Myc 配列を PCR により増幅した。*PstI* で消化した PCR 産物を pGH-35Spro の *PstI* 部位に挿入して pGH-35Spro:4×Myc を得た。*CIPK26* の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*SmaI* で消化した PCR 産物を pGH-35Spro:4×Myc の *SmaI* 部位に挿入して pGH-35Spro:4×Myc-CIPK26 を得た。

*SRK2D* の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*EcoRV* で消化した PCR 産物を pGK-35Spro:sGFP の *SmaI* 部位に挿入して pGK-35Spro:SRK2D-sGFP を得た。

### 5-2. 共免疫沈降およびイムノブロット解析

I-1-2-1. の方法に従い、pGH-35Spro:4×Myc-CIPK26 および pGK-35Spro:SRK2D-sGFP あるいは pGK-35Spro:sGFP の両方を保持する形質転換シロイヌナズナを作出した。免疫沈降およびイムノブロット解析は I-1-2-4. および I-1-2-6. の方法に従った。イムノブロット解析において、4×myc-CIPK26 タンパク質の検出には抗 c-myc 抗体 (MBL) (1:1000) を用いた。

## 6. 酵母ツーハイブリッド法による物理的相互作用の解析

### 6-1. SRK2D の各領域あるいは各 SnRK2 の pGBKT7 へのクローニングおよび pGADT7-CIPK3、CIPK9、CIPK23、CIPK24 の作製

SRK2D の各領域を PCR により増幅した。*EcoRV* で消化した PCR 産物を pGBKT7 の平滑末端化した *BamHI* 部位に挿入して、SRK2D の各領域が挿入された pGBKT7 プラスミドを得た。各 *SnRK2* 遺伝子の全長翻訳領域を含む DNA 断

片を PCR により増幅した。*SRK2D*、*SRK2I* および *SRK2F* を除く各 *SnRK2* の DNA 断片を *Sma*I で消化し、pGBKT7 の平滑末端化した *Bam*HI 部位にクローニングした。*SRK2I* あるいは *SRK2F* の DNA 断片を *Eco*RI および *Pst*I で消化し、pGBKT7 の *Eco*RI-*Pst*I 部位にクローニングした。

*CIPK3*、*CIPK9*、*CIPK23* あるいは *CIPK24* の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*Sma*I で消化した PCR 産物を pGADT7 の平滑末端化した *Bam*HI 部位に挿入して pGADT7-*CIPK3*、*CIPK9*、*CIPK23*、*CIPK24* を得た。

## 6-2. 酵母ツーハイブリッドアッセイ

I-1-2-9-2.の方法と同様におこなった。

## 7. ベンサミアーナタバコ葉の一過的発現系を用いた BiFC アッセイ

### 7-1. pSPYNE-SRK2D、SRK2E、SRK2C および pSPYCE(M)-CIPK26、CIPK3、CIPK9、CIPK23、CIPK24 の作製

*SRK2D* の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*Eco*RV で消化した PCR 産物を pSPYNE173 (Waadt et al., 2008) の *Sma*I 部位に挿入して pSPYNE-SRK2D を得た。*SRK2E* あるいは *SRK2C* の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*Sma*I で消化した PCR 産物を pSPYNE173 の *Sma*I 部位に挿入して pSPYNE-SRK2E、SRK2C を得た。

*CIPK26*、*CIPK3*、*CIPK9*、*CIPK23* あるいは *CIPK24* の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*Sma*I で消化した PCR 産物を pSPYCE(M) (Waadt et al., 2008) の *Sma*I 部位に挿入して pSPYCE(M)-*CIPK26*、*CIPK3*、*CIPK9*、*CIPK23*、*CIPK24* を得た。

### 7-2. ベンサミアーナタバコ葉へのアグロインフィльтраーション

I-1-2-1.の方法に従い、pSPYNE ベクターに基づいたプラスミドあるいは



pSPYCE(M)ベクターに基づいたプラスミドで *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90)株を形質転換した。得られた形質転換体および p19 サイレンシングサブレッサーを発現する GV3101 株を用いて、I-2-2-3-2.の方法に従ってベンサミアーナタバコ葉へのアグロインフィルトレーションをおこなった。

### 7-3. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光観察

I-2-2-3-3.の方法に従った。

### I-2-3. 結果

*CIPK26* 遺伝子が発現している組織特異性を明らかにするために、pGH-*CIPK26*pro:GUS を保持する形質転換シロイヌナズナを作出した。得られた形質転換ラインを用いて GUS 染色をおこなった。GUS 活性は、発芽 1、8、18 日後の植物体の根、ロゼット葉の双方において強く検出された (図 6A)。このことから、*CIPK26* 遺伝子は栄養組織で広く発現していることが示唆された。

サブクラス III SnRK2 は乾燥や高塩条件下において植物が水分欠乏状態にさらされると活性化することが知られている (Boudsocq et al., 2004)。また ABA 処理によっても活性化することが知られている (Li et al., 1996、Mustilli et al., 2002、Boudsocq et al., 2004)。サブクラス III SnRK2 が活性化するこのようなストレス条件下における *CIPK26* 遺伝子の発現パターンを明らかにするために、ABA 処理、高塩ストレス、乾燥ストレス条件下における *CIPK26* 遺伝子の発現レベルを定量 RT-PCR 法により解析した (図 6B)。その結果、これらストレス条件下における *CIPK26* 遺伝子の発現レベルは、対照区である水処理区での発現レベルと比較して顕著な (4 倍以上あるいは 1/4 倍以下) 変化を示さなかった (図 6B)。このことから、*CIPK26* 遺伝子はサブクラス III SnRK2 の活性化が引き起こされるようなストレス条件下においても通常生育条件下と同程度に発現していることが示唆された。

次に、*CIPK26* タンパク質の細胞内局在をベンサミアータタバコの葉を用いて解析した。sGFP 融合 *CIPK26* 遺伝子 (sGFP-*CIPK26*) および mCherry 融合 SRK2D 遺伝子 (SRK2D-mCherry) を共発現させたベンサミアータタバコ葉の表皮細胞において共焦点顕微鏡による GFP 蛍光および RFP 蛍光観察をおこなった。共焦点顕微鏡観察により、細胞質において GFP 蛍光と RFP 蛍光の重なりが観察され、また核内では強い RFP 蛍光が観察された (図 7A)。このことから、SRK2D-mCherry は主に細胞質と核に局在しているのに対し、sGFP-*CIPK26* は主

に細胞質に局在していることが示された。さらに、*CIPK26* 遺伝子のプロモーターの制御下で sGFP-CIPK26 を発現させるコンストラクト、pGH-CIPK26pro: sGFP-CIPK26 を導入した形質転換シロイヌナズナを用いて GFP 蛍光を観察したところ、ベンサミアーナタバコ葉の一過的発現系の結果と同様に、GFP 蛍光は主に細胞質で検出された (図 7B)。このことから、シロイヌナズナ植物体においても sGFP-CIPK26 は主に細胞質に局在していることが示された。

ストレス条件下における SRK2D と CIPK26 との物理的な相互作用を明らかにするために、4×myc タグ融合 CIPK26 (4×myc-CIPK26) および sGFP あるいは SRK2D-sGFP の双方を発現する形質転換シロイヌナズナを作出し、抗 GFP 抗体による免疫沈降実験をおこなった (図 8)。LC-MS/MS 解析の結果と一致して、未処理の SRK2D-sGFP 発現植物体由来の免疫沈降画分において、4×myc-CIPK26 が検出されたが、未処理の sGFP 発現植物体由来の免疫沈降画分では 4×myc-CIPK26 が検出されなかった (図 8)。また、ABA 処理あるいはマンニトール処理に供した SRK2D-sGFP 発現植物体の免疫沈降画分においても 4×myc-CIPK26 が検出された (図 8)。以上より、CIPK26 は、通常生育条件下のみならず、ストレス条件下においても SRK2D と物理的に相互作用し得ることが示された。

CIPK26 との物理的相互作用に必要な SRK2D の領域を絞り込むために、SRK2D の各領域と CIPK26 との物理的相互作用を酵母ツーハイブリッド法により検証した (図 9)。SRK2D の制御領域 (ドメイン I およびドメイン II) を欠失した  $\Delta$ I, II 断片と CIPK26 との相互作用は検出されなかった。一方、SRK2D の制御領域 (SRK2D RD) と CIPK26 との相互作用が検出された。このことから、SRK2D の制御領域が CIPK26 との物理的相互作用に必要かつ十分であることが示された。さらに、ドメイン I あるいはドメイン II のそれぞれの領域と CIPK26 との物理的相互作用が検出されたことから (図 9)、ドメイン I あるいはドメイン II のそれぞれの領域が CIPK26 との物理的相互作用に十分であることが示さ

れた。

シロイヌナズナのゲノム上には、10 個の SnRK2 プロテインキナーゼがコードされており、それらはサブクラス I、II あるいは III に分類される (Fujita et al., 2013)。サブクラス III SnRK2 (SRK2D、SRK2E および SRK2I) が ABA を介した生理応答の制御において、それぞれ異なる機能を有するだけでなく、重複した機能を有することを示す報告 (Fujii et al., 2009、Fujita et al., 2009、Nakashima et al., 2009) をもとに、CIPK26 が SRK2D 以外の SnRK2 と物理的に相互作用する可能性を考えた。酵母ツーハイブリッド法により 10 個の SnRK2 と CIPK26 との物理的相互作用について解析したところ、SRK2D に加えて、サブクラス III SnRK2 である SRK2E および SRK2I、さらにサブクラス II SnRK2 である SRK2C/SnRK2.8 および SRK2F/SnRK2.7 が CIPK26 と物理的に相互作用することが示された (図 10)。一方、サブクラス I SnRK2 である SRK2A/SnRK2.4、SRK2B/SnRK2.10、SRK2G/SnRK2.1、SRK2H/SnRK2.5 および SRK2J/SnRK2.9 と CIPK26 との物理的相互作用は酵母において検出されなかった (図 10)。さらに、BiFC 法により SRK2D、SRK2E および SRK2C がベンサミアーナタバコ葉の表皮細胞において CIPK26 と物理的に相互作用し得ることが示された (図 11)。一方、CIPK26 に遠縁な CIPK24/SOS2 と SRK2D、SRK2E および SRK2C との物理的な相互作用を示す YFP 蛍光は検出されなかった (図 11)。

シロイヌナズナのゲノム上には、26 個の CIPK プロテインキナーゼがコードされている (Weinl and Kudla, 2009)。全ゲノム配列が解読された陸上植物のうち、コケ植物のヒメツリガネゴケ、シダ植物のイヌカタヒバ、イネ、およびシロイヌナズナに着目し、それらの CIPK 様プロテインキナーゼの配列をデータベース (Phytozome v9.1; <http://www.phytozome.net>) より取得した。得られた配列の多重整列を図 12A に示した。これらの多重整列を基に CIPK 様プロテインキナーゼの系統樹を作成した (図 12B)。分子系統解析の結果、CIPK26 が属する単系統

群にはヒメツリガネゴケやイヌカタヒバの CIPK 様プロテインキナーゼが含まれていた (図 12B)。このことから、この単系統群は、植物が陸上に進出して維管束植物に分岐するより以前に分化したことが示唆された。この単系統群には CIPK26 の他にシロイヌナズナの CIPK3、CIPK9、CIPK23 が含まれており (図 12B)、CIPK26、CIPK3、CIPK9、CIPK23 が何らかの重複した機能を有していることが推察された。

酵母ツーハイブリッド法および BiFC 法により、CIPK3、CIPK9 および CIPK23 が SRK2D と物理的に相互作用するかどうかを検証した (図 13、14)。酵母ツーハイブリッドアッセイにより、CIPK26 に加えて CIPK3 および CIPK9 が SRK2D と酵母において SRK2D の制御領域 (SRK2D RD) と物理的に相互作用することが示された (図 13)。一方、CIPK23 および CIPK24 と SRK2D との物理的相互作用は観察されなかった (図 13)。BiFC アッセイにより、CIPK26 に加えて CIPK3、CIPK9 および CIPK23 がベンサミアーナ葉の表皮細胞の主に細胞質において SRK2D と物理的に相互作用することが示された (図 14)。一方、CIPK24 と SRK2D との物理的な相互作用のシグナルは検出されなかった (図 14)。以上より、植物体において、CIPK26 に加えて CIPK3、CIPK9、CIPK23 が SRK2D と物理的に相互作用することが示された。以上の解析により明らかにされた SnRK2、CIPK ファミリー間の物理的な相互作用の結果を図 15 にまとめた。

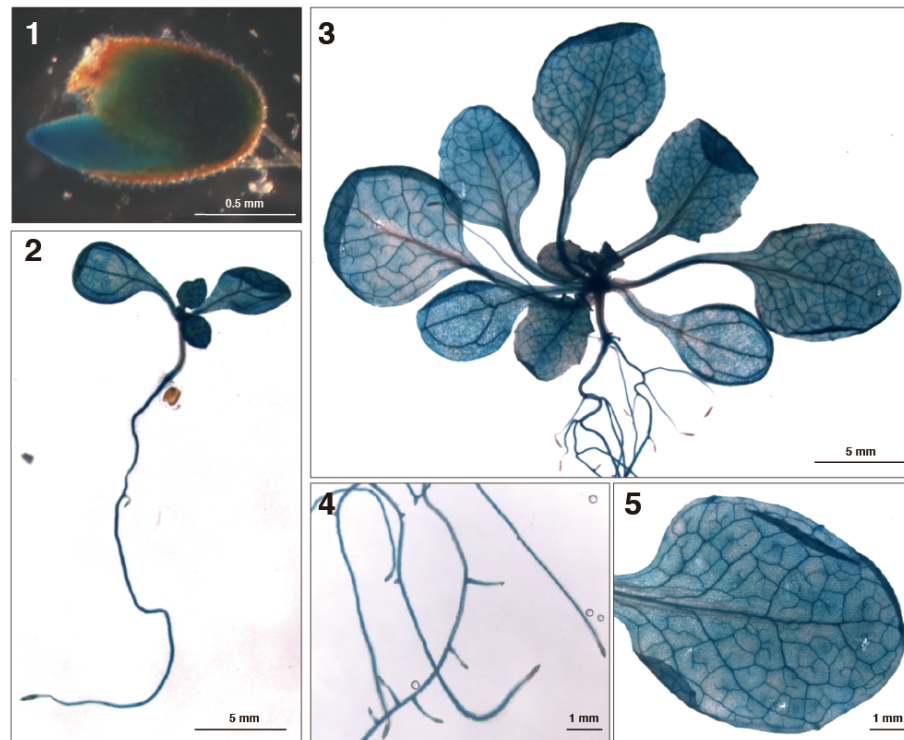
#### I-2-4. 考察

*GUS* レポーター遺伝子を用いた解析により、植物体の根および地上部で広く *CIPK26* 遺伝子のプロモーター活性が検出された (図 6A)。先行研究において、同様の解析により、*SRK2D/SnRK2.2* 遺伝子のプロモーター活性が幼植物体の根および地上部で広く、また維管束において強く検出されていることから (Fujii et al., 2007、Fujita et al., 2009)、*CIPK26* 遺伝子の発現部位と *SRK2D* 遺伝子の発現部位は少なくとも一部分において重複していることが示唆された。

免疫沈降および BiFC 法による解析により、*CIPK26* が植物体において *SRK2D* と物理的に相互作用し得ることが示され (図 8、11)、*CIPK26* が *SRK2D* の新規相互作用因子であることが支持された。また、通常生育条件下のみならず、高濃度の ABA 存在下あるいは高浸透圧ストレス条件下においても *CIPK26* は *SRK2D* と物理的に相互作用し得ることが示唆された (図 8)。

*SnRK2* ファミリー、*CIPK* ファミリー間の相互作用解析により、*CIPK26* が *SRK2D* の他にサブクラス II および III *SnRK2* の因子と物理的に相互作用し得ること (図 10、11)、植物体において *CIPK26* の他に *CIPK3*、*CIPK9*、*CIPK23* が *SRK2D* と物理的に相互作用し得ることが明らかにされた (図 14、15)。以上より、確認された範囲において 8 通りの組み合わせの“*SnRK2*-*CIPK*”複合体が存在し得ることが示された (図 15)。現時点では実験的証拠はないが、他の組み合わせの“*SnRK2*-*CIPK*”複合体が存在していることが推察され、*SnRK2* および *CIPK26/3/9/23* が、植物体内において多様な相互作用ネットワークを形成している可能性が考えられた。

A



B

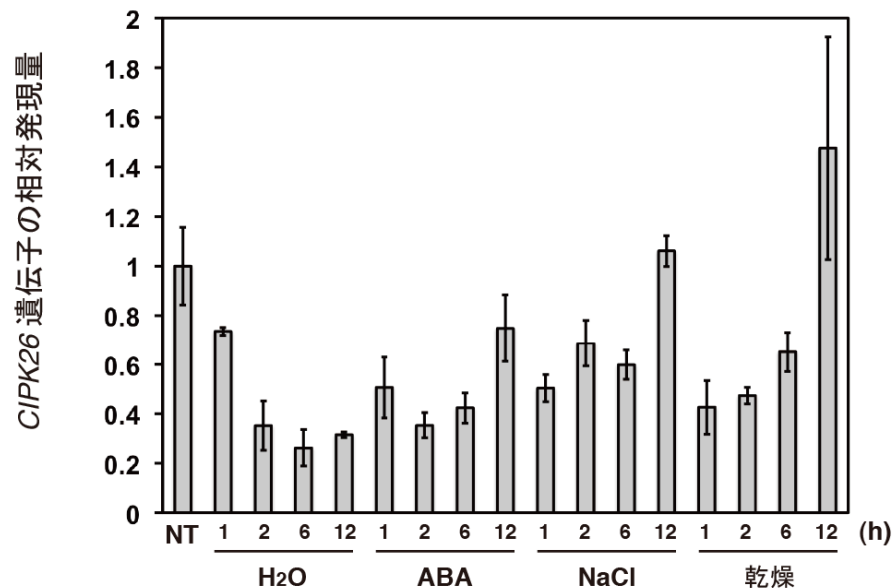
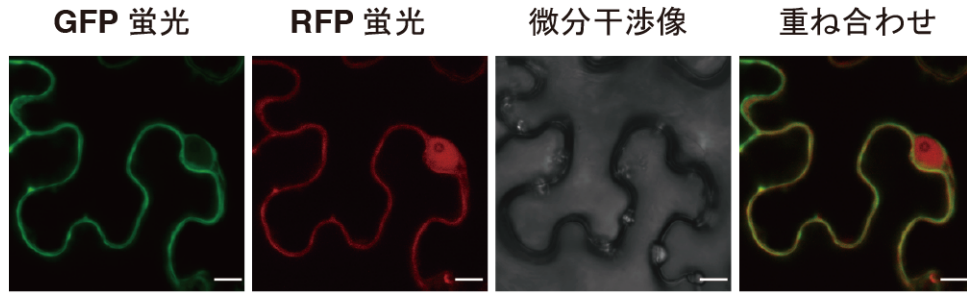


図 6. *CIPK26* 遺伝子の発現解析

(A) *CIPK26pro:GUS* 発現シロイヌナズナにおける GUS 活性の組織化学的局在性。様々な生育段階の植物体を GUS 染色に供した。1: 発芽 1 日後の発芽種子、2: 発芽 8 日後の幼植物体、3-5: 発芽 18 日後の植物体 (3: 地上部、4: 根、5: 本葉)。同様の染色パターンは他のラインにおいても観察された。代表的な染色写真を示す。

(B) 定量 RT-PCR 法による ABA 処理、高塩ストレス、乾燥ストレス条件下における *CIPK26* の発現レベルの解析。ABA (50  $\mu$ M ABA)、高塩 (250 mM NaCl) あるいは乾燥処理を図示した時間おこなった野生型株を解析に供した。未処理 (NT) の野生型株における *CIPK26* の発現量を 1 とした。値は 3 回反復しておこなった PCR 反応の平均値と標準偏差を示す。実験は独立したサンプルを用いて 2 回行い、代表的な結果を示した。定量 RT-PCR 解析は当研究室の城所聡博士と村崎さゆり技術補佐員によっておこなわれた。

A



B

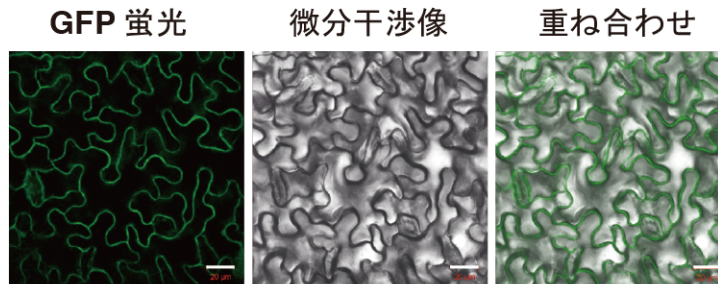


図 7. sGFP 融合 CIPK26 タンパク質の細胞内局在の解析

(A) *Nicotiana benthamiana* (ベンサミアーナタバコ) の葉の表皮細胞における sGFP 融合 CIPK26 タンパク質 (sGFP-CIPK26) および mCherry 融合 SRK2D タンパク質 (SRK2D-mCherry) の細胞内局在。sGFP-CIPK26 および SRK2D-mCherry を共発現させたベンサミアーナタバコ葉の表皮細胞を共焦点顕微鏡を用いて解析した。GFP 蛍光像、RFP 蛍光像、微分干渉像を示す。スケールバーは  $10\ \mu\text{m}$ 。

(B) *CIPK26pro:sGFP-CIPK26* を発現する形質転換シロイヌナズナの葉の表皮細胞における GFP 蛍光を共焦点顕微鏡を用いて解析した。GFP 蛍光像、微分干渉像を示す。スケールバーは  $20\ \mu\text{m}$ 。同様の蛍光パターンは他のラインでも観察された。代表的な蛍光像を示す。



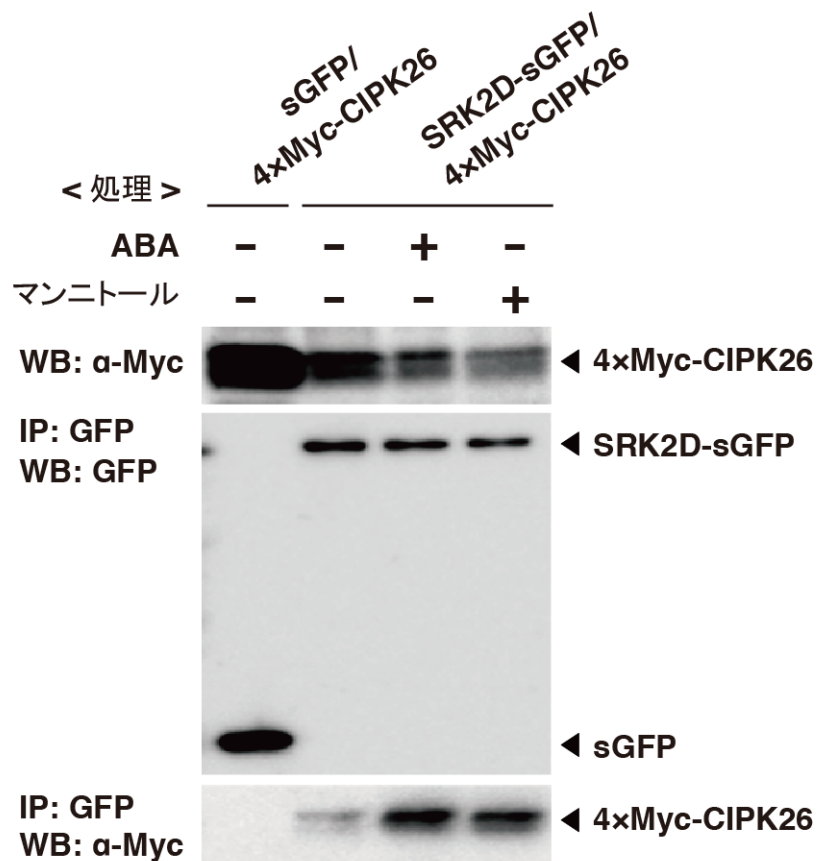


図 8. Myc タグ融合 CIPK26 タンパク質と GFP 融合 SRK2D タンパク質との共免疫沈降実験

pGH-35Spro:4×Myc-CIPK26 および pGK-35Spro:SRK2D-sGFP あるいは pGK-35Spro:sGFP の両方を保持する形質転換シロイヌナズナを抗 GFP 抗体による免疫沈降実験に供した。未処理の植物体、50  $\mu$ M ABA あるいは 0.8 M マンニトールを 1 時間処理した植物体を解析に供した。5  $\mu$ l および 20  $\mu$ l の免疫沈降産物をそれぞれ抗 GFP 抗体、抗 c-Myc 抗体を用いたイムノブロット解析に供した。インプットとして、30  $\mu$ g の全タンパク質を SDS-PAGE で分離後、抗 c-Myc 抗体によるイムノブロット解析に供した。WB; イムノブロット、IP; 免疫沈降。同様の結果が2回の生物学的反復実験で得られた。代表的な結果を示す。

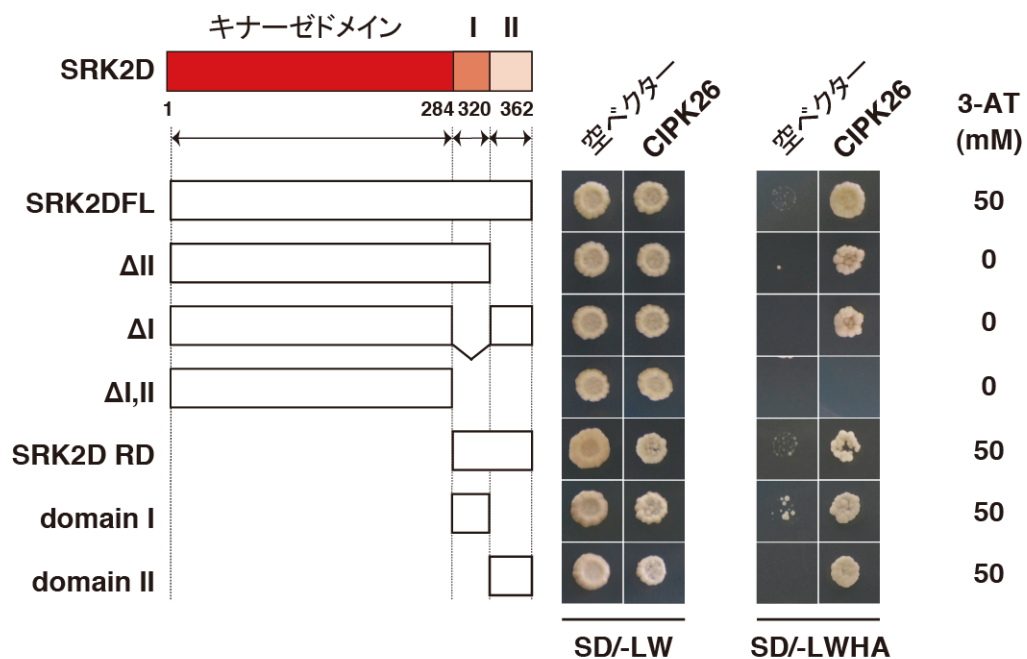


図 9. 酵母ツーハイブリッド法による SRK2D の各領域と CIPK26 との物理的な相互作用解析

SRK2D の各領域を pGBKT7 ベクターに挿入したプラスミドおよび pGADT7 ベクター（空ベクター）あるいは pGADT7-CIPK26 を導入した出芽酵母（AH109 株）の SD/-LW 培地、3-AT を添加した SD/-LWHA 培地における生育試験。OD<sub>600</sub> = 0.1 相当の酵母懸濁液を各培地上に 2.5 μl ずつ滴下し、30 °C で 7 日間生育させた。実験は 2 回行い、代表的な結果を示す。解析に用いた SRK2D の各領域を左図に示す。

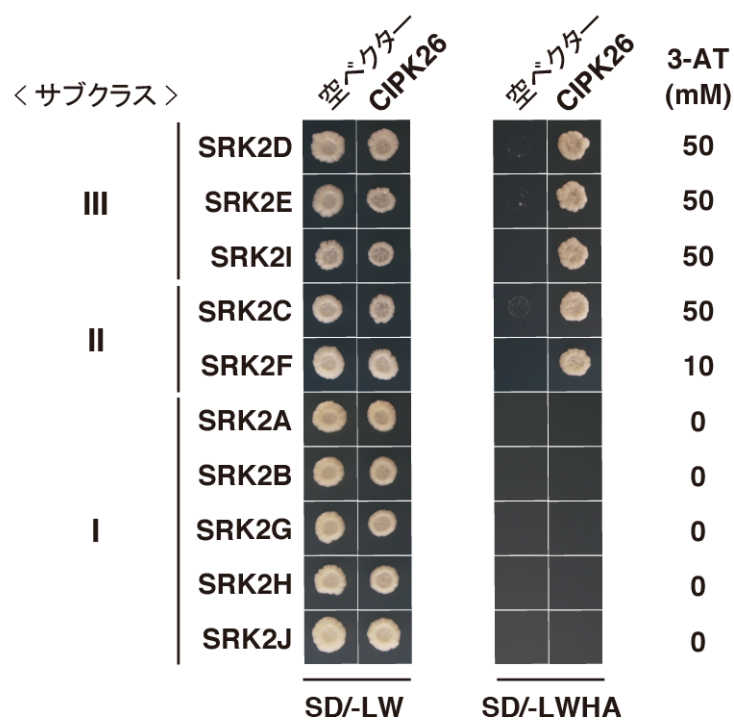


図 10. 酵母ツーハイブリッド法による各 SnRK2 と CIPK26 との物理的な相互作用解析

各 SnRK2 (SRK2A - SRK2J) を pGBKT7 ベクターに挿入したプラスミドおよび pGADT7 ベクター（空ベクター）あるいは pGADT7-CIPK26 を導入した出芽酵母（AH109 株）の SD/-LW 培地、3-AT を添加した SD/-LWHA 培地における生育試験。OD<sub>600</sub> = 0.1 相当の酵母懸濁液を各培地上に 2.5  $\mu$ l ずつ滴下し、30  $^{\circ}$ C で 7 日間生育させた。実験は 2 回行い、代表的な結果を示す。

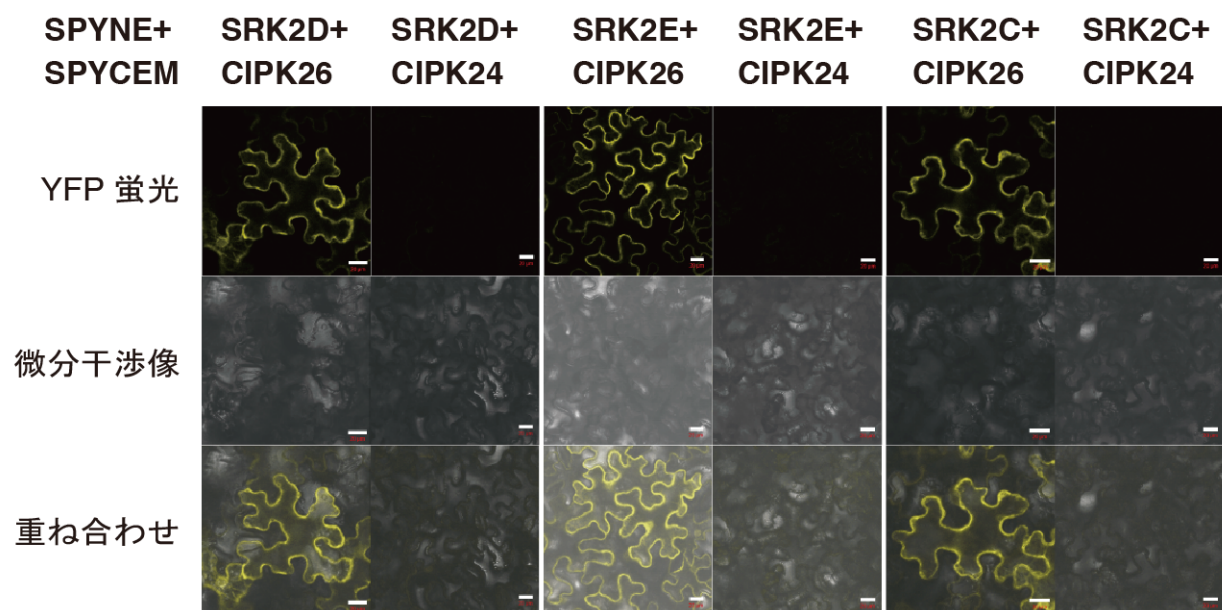


図 11. BiFC 法による SRK2D, SRK2E, SRK2C と CIPK26, CIPK24 との物理的な相互作用解析

BiFC 法によるベンサミアーナタバコの葉の表皮細胞における SRK2D, SRK2E, SRK2C と CIPK26, CIPK24 との物理的な相互作用解析。SRK2D-, SRK2E-, SRK2C-YFP<sup>n</sup> および CIPK26-, CIPK24-YFP<sup>c</sup> を共発現させたベンサミアーナタバコ葉の表皮細胞を共焦点顕微鏡を用いて解析した。YFP 蛍光像、微分干渉像を示す。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。



図 12. 陸上植物の CIPK 様プロテインキナーゼの系統解析

(A) シロイヌナズナ、イネ、イヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*)、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) 由来の CBL-interacting Protein Kinase (CIPK) 様プロテインキナーゼの保存領域から作成した多重整列。黒色、濃灰色、淡灰色の網かけは相同及び類似残基がそれぞれで 100%, 80%, 60% 保存されていることを示す。多重整列の下に示された黒い線は、系統樹作成に用いられた部分を示す。系統解析は当研究室の溝井順哉博士によっておこなわれた。

## A ( 続き )

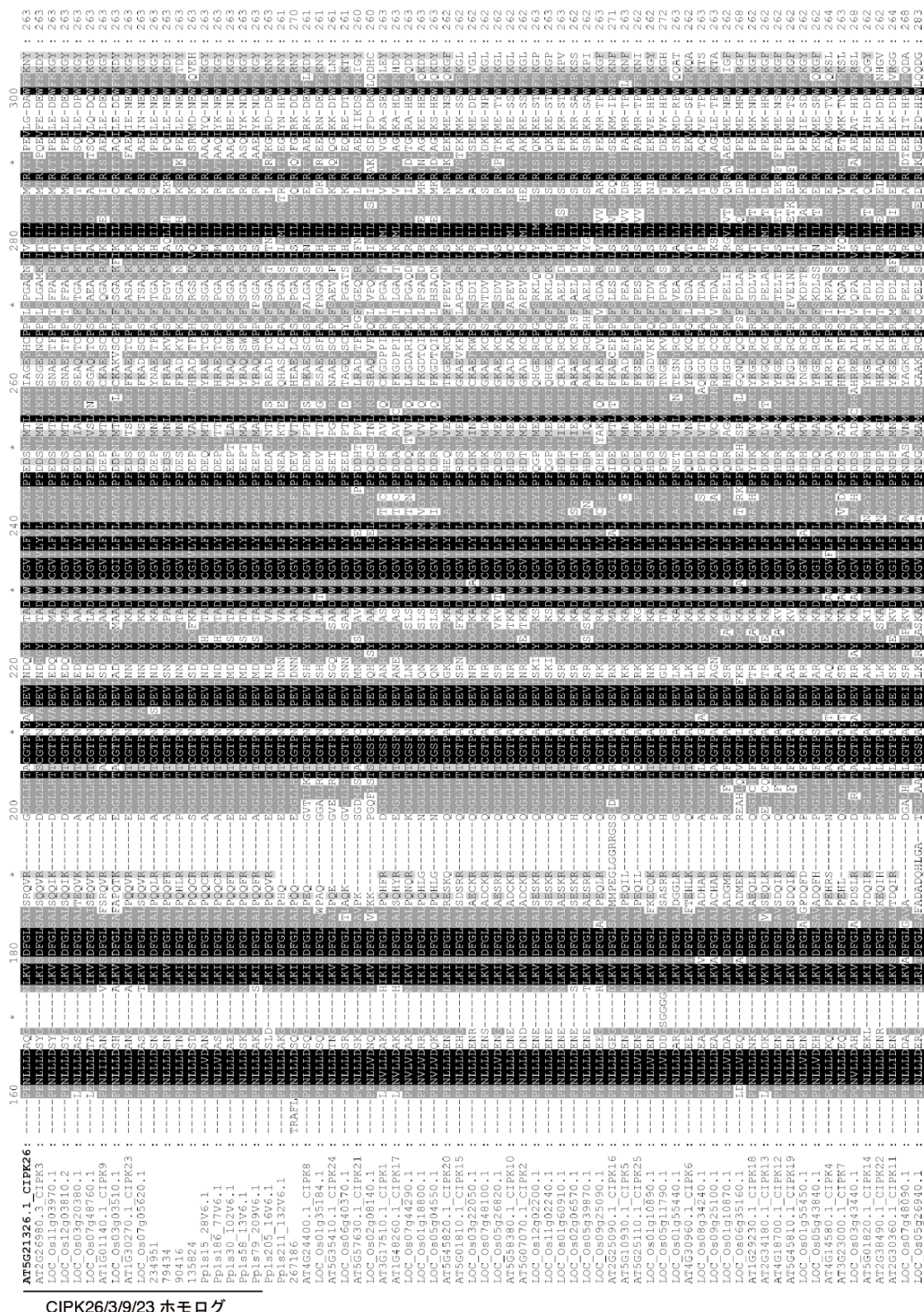


図 12 ( 続き ). 陸上植物の CIPK 様プロテインキナーゼの系統解析



A75621326.1_C1PKP26:	IS-MERAL	EGFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103	
A75626980.3_C1PKP3:	IS-MERL	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os11093970.1	IS-MAL	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	111
LOC_Os1203810.2	IS-MAL	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os03240380.1	IS-INQAL	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os0748760.1	IS-INKE	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os040503510.1	IS-ROF	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os040503510.1	IS-ROF	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os0705620.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os0705620.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
234951	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
90416	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
135924	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
EP1515_28v6.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
EP15186_77v6.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
EP1590_102v6.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
EP1596_13v6.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
EP1597_20v6.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
EP15205_11v6.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
EP15211_132v6.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
267186	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
A74624440.1_C1PKP8	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os0135184.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
A75535410.1_C1PKP24	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os06940370.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
A75557630.1_C1PKP21	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os02081840.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
A743717510.1_C1PKP1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
A74148260.1_C1PKP17	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os07442790.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os0116800.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os0504550.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
A75644820.1_C1PKP20	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
A75641810.1_C1PKP15	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	98
LOC_Os0322050.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os0748100.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os05026820.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
A7558380.1_C1PKP10	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
A75607070.1_C1PKP2	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os1202700.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os11902240.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os01900910.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os02906570.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os09245090.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
A75625090.1_C1PKP16	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
A75610930.1_C1PKP5	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
A75625110.1_C1PKP25	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os05110830.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os050511790.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	113
LOC_Os030960.1_C1PKP6	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	103
LOC_Os08034240.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	105
LOC_Os09262100.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	110
LOC_Os01010870.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	81
LOC_Os06335160.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	115
A71629230.1_C1PKP18	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	100
A74634180.1_C1PKP13	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	91
A746318700.1_C1PKP12	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	100
A75645810.1_C1PKP19	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	101
LOC_Os0155450.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	100
LOC_Os050243840.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	100
LOC_Os04580.1_C1PKP4	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	97
LOC_Os023000.1_C1PKP7	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	102
LOC_Os0304340.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	100
A75601820.1_C1PKP14	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	100
A75638490.1_C1PKP21	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	100
A7563050.1_C1PKP22	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	100
LOC_Os0746090.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	100
LOC_Os0526940.1	IS-TOI	ENDE	QFRET	ILARGAAND	QKBEAKRP	LCED	Q-KNNYK	KNRINTAT	FOA	ISU	SHURK	KTLE	101

図 12 ( 続き ). 陸上植物の CIPK 様プロテインキナーゼの系統解析

B

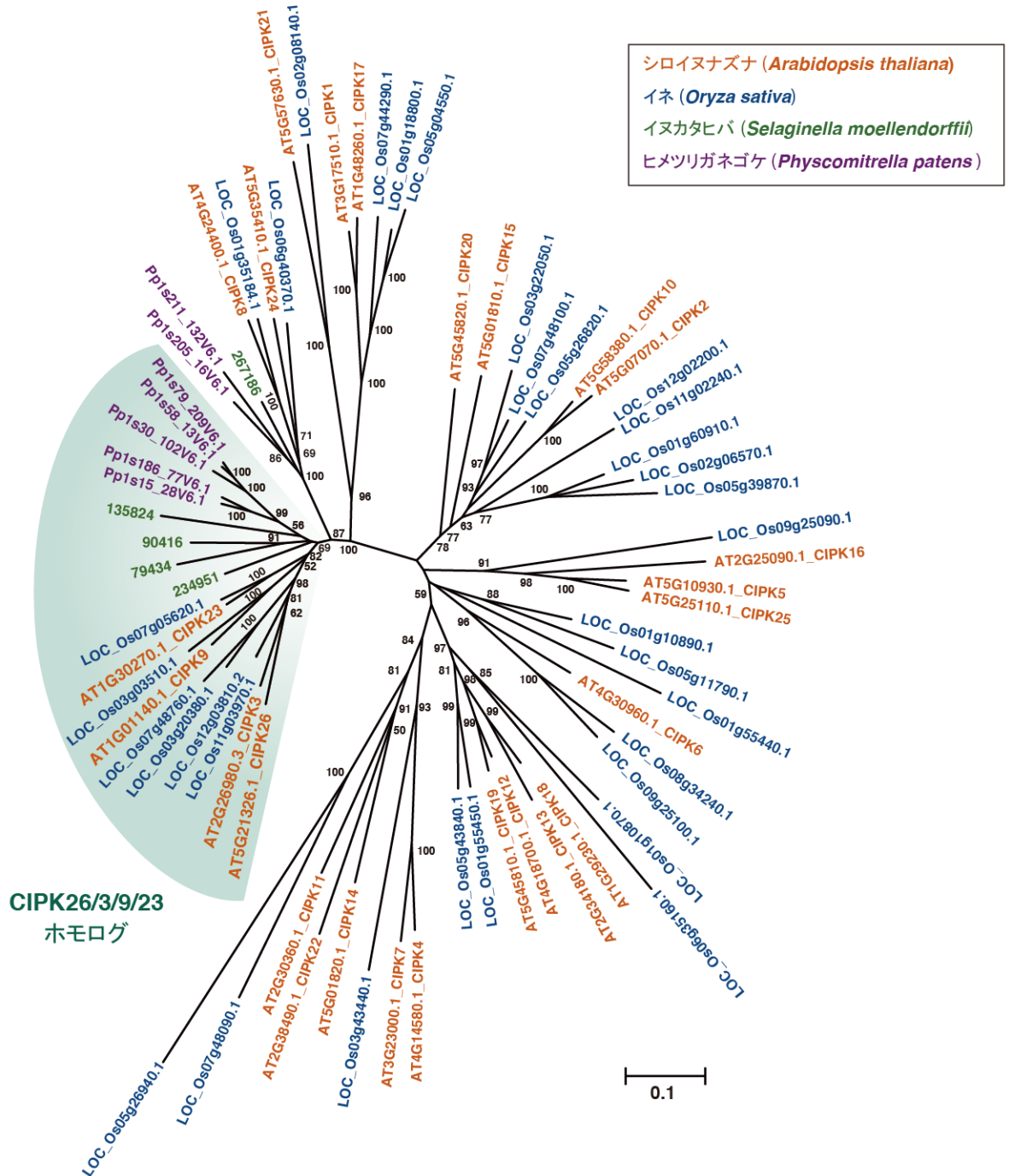


図 12 ( 続き ). 陸上植物の CIPK 様プロテインキナーゼの系統解析

(B) シロイヌナズナ、イネ、イヌカタヒバ、ヒメツリガネゴケ由来の CIPK 様プロテインキナーゼの無根系統樹。系統樹は (A) に示す多重整列を基に近隣結合法を用いて作成した。1000 回反復のブーツストラップ値 ( $\geq 50\%$ ) を各枝に示す。バーはサイト当り 0.1 置換。CIPK26, CIPK3, CIPK9 および CIPK23 を含む単系統群をハイライトで示す。系統解析は当研究室の溝井順哉博士によっておこなわれた。



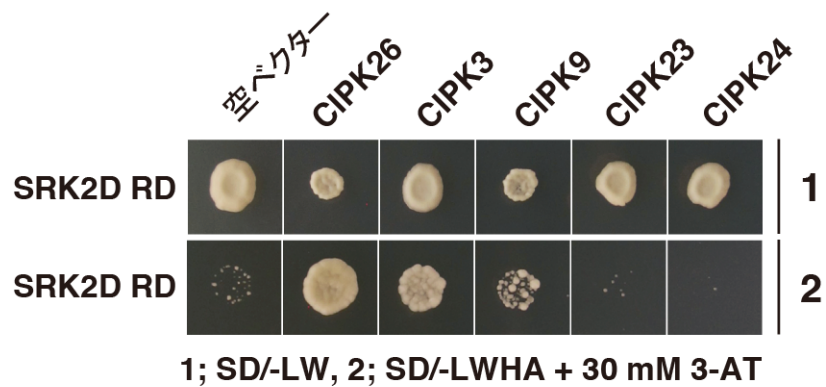


図 13. 酵母ツーハイブリッド法による SRK2D の制御領域と CIPK26, CIPK3, CIPK9, CIPK23 あるいは CIPK24 との物理的な相互作用解析

SRK2D の制御領域 (SRK2D RD) を pGBKT7 ベクターに挿入したプラスミドおよび pGADT7 ベクター (空ベクター)、pGADT7-CIPK26、CIPK3、CIPK9、CIPK23、CIPK24 を導入した出芽酵母 (AH109 株) の SD/-LW 培地、30 mM 3-AT を添加した SD/-LWHA 培地における生育試験。OD<sub>600</sub> = 0.1 相当の酵母懸濁液を各培地上に 2.5  $\mu$ l ずつ滴下し、30 °C で 7 日間生育させた。実験は 2 回行い、代表的な結果を示す。

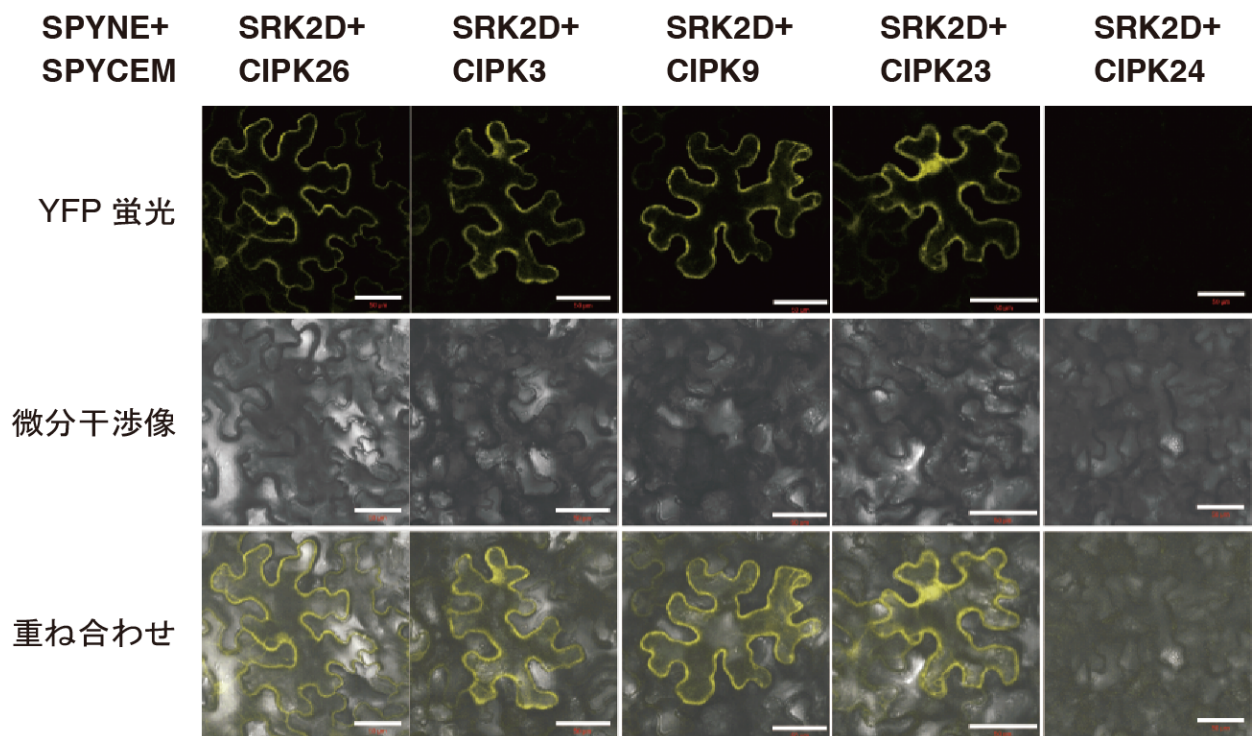


図 14 . BiFC 法による SRK2D と CIPK26, CIPK3, CIPK9, CIPK23 あるいは CIPK24 との物理的な相互作用解析

BiFC 法によるベンサミアータタバコの葉の表皮細胞における SRK2D と CIPK26, CIPK3, CIPK9, CIPK23 および CIPK24 との物理的な相互作用解析。SRK2D-YFP<sup>n</sup> および CIPK26-, CIPK3-, CIPK9-, CIPK23-, CIPK24-YFP<sup>c</sup> を共発現させたベンサミアータタバコ葉の表皮細胞を共焦点顕微鏡を用いて解析した。YFP 蛍光像、微分干渉像を示す。スケールバーは 50  $\mu$ m。

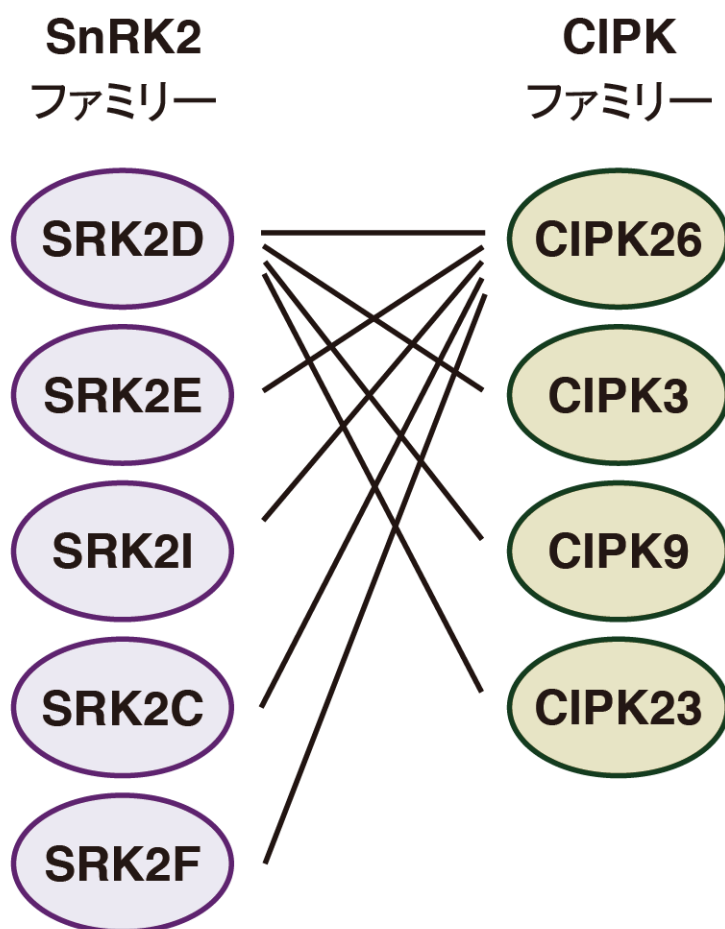


図 15. 明らかにされた SnRK2 ファミリー、CIPK ファミリー間の物理的相互作用のまとめ

酵母ツーハイブリッド法あるいは BiFC 法により確認された SnRK2 ファミリーおよび CIPK ファミリー間の物理的相互作用を黒線で示した。

### 第 3 節 総合考察

第 1 節において、免疫沈降および LC-MS/MS 解析を組み合わせた解析より SRK2D/SnRK2.2 の新規相互作用因子として CIPK26 を同定した (表 3、図 5)。SRK2D は、それ自身のプロテインキナーゼ活性に必要不可欠である制御領域 (Belin et al., 2006、Yoshida et al., 2006) を介して CIPK26 と物理的に相互作用していること (図 9)、およびサブクラス III SnRK2 が浸透圧ストレスあるいは ABA 処理に応答してリン酸化を受け、活性化されること (Umezawa et al., 2009、Vlad et al., 2009) をふまえると、CIPK26 は SRK2D のリン酸化を担うプロテインキナーゼであり、CIPK26 が SnRK2 の活性調節に関与している可能性が考えられた。

第 2 節において、酵母ツーハイブリッドによる相互作用解析により、サブクラス I に属する SnRK2 と CIPK26 との物理的相互作用は検出されなかったが、サブクラス II あるいはサブクラス III に属する SnRK2 と CIPK26 との物理的相互作用が検出された (図 10、11)。SnRK2 の活性化様式として、SRK2J/SnRK2.9 を除く全ての SnRK2 は高浸透圧ストレスに応答して活性化されることが報告されている (Boudsocq et al., 2004)。一方、サブクラス II およびサブクラス III に属する SnRK2 は ABA 処理に応答して活性化されるが、サブクラス I に属する SnRK2 は ABA 処理によって活性化されないことが報告されている (Boudsocq et al., 2004)。これらのことをふまえると、CIPK26 は、サブクラス II およびサブクラス III SnRK2 との物理的相互作用を介して、ABA シグナル伝達経路に関連している可能性が提示された。

SnRK2 ファミリー、CIPK ファミリー間の相互作用解析により、CIPK26 がサブクラス II および III SnRK2 の因子と物理的に相互作用し得ること (図 10、11)、また、CIPK26、CIPK3、CIPK9 および CIPK23 が SRK2D と物理的に相互作用し得ることが示された (図 14、15)。このことから、植物体内においてこれら SnRK2 と CIPK が相互作用し、何らかの生理応答を協調的に調節している可能性が考えられた。

## 第 2 章 *CIPK26/3/9/23* の植物体における機能の解析

### II-1. 序論

第 1 章において、SRK2D と物理的に相互作用することが示された CIPK3、CIPK9 および CIPK23 は、植物においてそれぞれ独立した役割を果たしていることが報告されている。CIPK3 は発芽段階において ABA シグナル伝達経路を負に制御している (Kim et al., 2003)。CIPK9 は低  $K^+$  条件下での植物の生育維持に関与している (Pandey et al., 2007)。CIPK23/LKS1 は、前述のように高親和性  $K^+$  チャンネルである AKT1 のリン酸化による活性調節を通じて  $K^+$  欠乏条件下での  $K^+$  吸収を制御している (Li et al., 2006、Xu et al., 2006)。CIPK26 は、前述のようにヒトの培養細胞系において RbohF をリン酸化し、その活性を上昇し得ることが示されている (Kimura et al., 2013、Drerup et al., 2013)。一方、分子系統解析により CIPK26、CIPK3、CIPK9 および CIPK23 (以下、CIPK26/3/9/23 と表記) が単系統群を形成すること (図 12B)、および植物体内において SRK2D と物理的に相互作用すること (図 14) をふまえると、それぞれの独立した役割に加えて、CIPK26、CIPK3、CIPK9 および CIPK23 が重複した機能を有している可能性が考えられた。現時点において、*CIPK26*、*CIPK3*、*CIPK9* あるいは *CIPK23* 遺伝子のうち、複数の遺伝子を欠損した機能欠損多重変異体に関する報告はなされていない。そこで、第 2 章では、主に機能欠損多重変異体を用いた解析により、植物体における *CIPK26*、*CIPK3*、*CIPK9* および *CIPK23* 遺伝子 (以下、*CIPK26/3/9/23* と表記) の機能について明らかにすることを試みた。

## II-2. 方法

### 1. 多重変異体の作出

T-DNA 挿入による機能欠損変異体は、Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)から入手した。*CIPK26* の機能欠損変異体 *cipk26* (SALK\_005859C; Col-0 ecotype)、*CIPK3* の機能欠損変異体 *cipk3* (SALK\_137779C; Col-0 ecotype)、*CIPK9* の機能欠損変異体 *cipk9* (SALK\_058629; Col-0 ecotype) および *CIPK23* の機能欠損変異体 *cipk23* (SALK\_032341; Col-0 ecotype) を用いた。これら機能欠損変異体に関する情報は、米国カリフォルニア州にあるソーグ研究所ゲノム解析研究室 (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory; <http://signal.salk.edu>) から得た。T-DNA の挿入部位は T-DNA left-border プライマーと表 5 に示す各遺伝子特異的なプライマーを用いて確認した。各遺伝子の T-DNA 挿入は、表 5 に示すプライマーを用いた各植物のゲノム DNA を鋳型とする PCR により確認した。

多重変異体は各系統を交配することにより作出した。各 *cipk* ホモ接合変異体 (*cipk26*、*cipk3*、*cipk9* および *cipk23*) を GM 寒天培地で 2 週間ほど生育させた後、土植えてさらに 2-3 週間生育させた。十分に抽だいしてきた植物体を交配に用いた。開花前の花芽から、雌蕊を傷つけないように注意しながら、萼、花弁および雄蕊を、双眼実体顕微鏡を用いてピンセットで丁寧に除去した。十分に花粉が成熟した他系統の葯を雌蕊に押しつけ、受粉させた。3 日間ほどで伸長してきた雌蕊をそのまま 2-3 週間ほど成熟させ、十分に乾燥した F1 世代の種子を回収し、GM 寒天培地に播種した。GM 寒天培地上で 2 週間ほど生育させた植物体からロゼット葉を一枚切除し、ゲノム DNA を抽出して PCR により T-DNA の挿入を確認した。T-DNA の挿入が確認された個体をそのまま生育させ、F2 世代の種子を得た。F2 世代からホモ接合系統の各 *cipk* 二重変異体を選抜した。選抜した二重変異体同士を交配することで、各 *cipk* 三重変異体および *cipk* 四重変異体を得た。

## 2. RT-PCR

### 2-1. 植物体からの全 RNA の抽出

I-2-2-2.の方法と同様におこなった。

### 2-2. 一本鎖 cDNA の合成

I-2-2-2-2.の方法と同様におこなった。

### 2-3. RT-PCR

合成した cDNA を鋳型として PCR をおこなった。0.25  $\mu$ L の PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase (TaKaRa)、5  $\mu$ L の 5 $\times$ PrimeSTAR GXL Buffer、2  $\mu$ L の 2.5 mM dNTP 混合液、0.5  $\mu$ L の forward プライマー (10 pmol/  $\mu$ L)、0.5  $\mu$ L の reverse プライマー (10 pmol/  $\mu$ L)、16.25  $\mu$ L の MilliQ 水を混合して PCR チューブに分注し、希釈した cDNA 溶液を 1 $\mu$ L 加えた。反応条件は、98 $^{\circ}$ C  $\cdot$  1 分間、[98 $^{\circ}$ C  $\cdot$  10 秒間、55 $^{\circ}$ C  $\cdot$  15 秒間、68 $^{\circ}$ C  $\cdot$  1 分 30 秒間]を 35 回、68 $^{\circ}$ C  $\cdot$  2 分間とした。用いたプライマーの配列は表 5 に示した。

## 3. 定量 RT-PCR による発現解析

I-2-2-2-3.の方法と同様におこなった。

## 4. 土植えでの植物体の生育試験

改変型 BNS (Conn et al., 2011b) [2 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、3 mM  $\text{KNO}_3$ 、0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、2 mM  $\text{KCl}$ 、2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、2 mM  $\text{MgSO}_4$ 、0.6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2 mM  $\text{NaCl}$ 、50  $\mu$ M  $\text{NaFe(III)EDTA}$ 、50  $\mu$ M  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、5  $\mu$ M  $\text{MnCl}_2$ 、10  $\mu$ M  $\text{ZnSO}_4$ 、0.5  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$ 、0.1  $\mu$ M  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ 、pH 5.6 (NaOH)]を含ませたバーミキュライト (福島バーミ) に、GM 寒天培地上で発芽後 2 週間生育させた幼植物体を移植し、明期 (60 $\pm$ 10  $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/s) 16 時間/暗期 8 時間、22 $^{\circ}$ C 条件の育成室内で生育させた。

## 5. 幼植物体を用いた ABA 感受性試験

1.2%の Bacto Agar で固化した GM 寒天培地に各植物体の種子を播種して 4°C で 3 日間低温処理した。その後、プレート を 垂直に立てた状態で明期 ( $60 \pm 10 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) 16 時間/暗期 8 時間、22°C 条件の育成室内で 4 日間生育させた。発芽後 4 日目の幼植物体を 10 あるいは 50  $\mu\text{M}$  ( $\pm$ ) ABA (シグマアルドリッチジャパン) 含有 1/2\*MS 寒天培地 (1%スクロース含む) に移植し、プレート を 垂直に立てた状態で明期 ( $60 \pm 10 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) 16 時間/暗期 8 時間、22°C 条件の育成室内でさらに生育させた。

## 6. 乾燥ストレス耐性試験

I-1-2-3.の方法と同様におこなった。

## 7. 水耕栽培試験

水耕栽培は、the Araponics system (Araponics)を用いて、明期 ( $40 \pm 10 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) 16 時間/暗期 8 時間、22°C 条件の育成室内でおこなった。表面消毒をおこない 4°C で 3 日間吸水させた種子を、0.65% (w/v)の BA-10 寒天 (フナコシ) が充填された種子支持体に播種し、以下の 2 つの水耕液のいずれかを用いて 24 日間生育させた。(i) 種々の濃度の  $\text{CaCl}_2$  を含む改変型 low-calcium 溶液 (LCS) (Conn et al., 2011b) [ $2 \text{ mM NH}_4\text{NO}_3$ ,  $5 \text{ mM KNO}_3$ ,  $2 \text{ mM MgSO}_4$ ,  $0.6 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $2 \text{ mM NaNO}_3$ ,  $50 \mu\text{M NaFe(III)EDTA}$ ,  $50 \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$ ,  $5 \mu\text{M MnCl}_2$ ,  $10 \mu\text{M ZnSO}_4$ ,  $0.5 \mu\text{M CuSO}_4$ ,  $0.1 \mu\text{M Na}_2\text{MoO}_4$ , pH 5.6 (NaOH)]あるいは、(ii) 種々の濃度の  $\text{MgCl}_2$  を含む low-magnesium 溶液 (LMgS) [ $2 \text{ mM NH}_4\text{NO}_3$ ,  $5 \text{ mM KNO}_3$ ,  $0.1 \text{ CaCl}_2$ ,  $2 \text{ mM CaSO}_4$ ,  $0.6 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $2 \text{ mM NaNO}_3$ ,  $50 \mu\text{M NaFe(III)EDTA}$ ,  $50 \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$ ,  $5 \mu\text{M MnCl}_2$ ,  $10 \mu\text{M ZnSO}_4$ ,  $0.5 \mu\text{M CuSO}_4$ ,  $0.1 \mu\text{M Na}_2\text{MoO}_4$ , pH 5.6 (NaOH)] 水耕液は、エアーポンプにより常に通気し、毎週入れ換えをおこなった。



## 8. ICP-MS による元素含量の測定

サンプルの調製および誘導結合プラズマ-質量分析 (ICP-MS) 解析は、原則的に Kamiya et al. 2012 の方法に従っておこなった。回収した植物体の地上部を MilliQ 水で 2 度リンスし、70°C で 3 日間乾燥させた後、乾燥重を測定した。乾燥させたサンプルを、ヒートブロック上において濃硝酸による分解およびそれに続く過酸化水素と濃硝酸の混合液による分解に供した。元素含量の測定には、ICP-MS 分析装置、SPQ9700 (SII Nano Technology) を用いた。

## 9. CIPK26 過剰発現シロイヌナズナを用いた生育試験

### 9-1. CIPK26 過剰発現シロイヌナズナの作出

CIPK26 の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。SmaI で消化した PCR 産物を pGH-35Spro の SmaI 部位に挿入して pGH-35Spro:CIPK26 を得た。I-1-2-1.の方法に従い、pGH-35Spro:CIPK26 を保持する形質転換シロイヌナズナを作出した。

### 9-2. 寒天培地を用いた高濃度の外界 $Mg^{2+}$ 条件下における植物の生育試験

1.2%の Bacto Agar で固化した GM 寒天培地に各植物体の種子を播種して 4°C で 3 日間低温処理した。その後、プレートを垂直に立てた状態で明期 ( $60 \pm 10 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) 16 時間/暗期 8 時間、22°C 条件の育成室内で 4 日間生育させた。発芽後 4 日目の幼植物体を種々の濃度の  $MgCl_2$  含有  $1/2 \times MS$  寒天培地 (1%スクロースを含み、1.2%の Bacto Agar で固化) に移植し、プレートを垂直に立てた状態で明期 ( $60 \pm 10 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) 16 時間/暗期 8 時間、22°C 条件の育成室内でさらに 14 日間生育させた。植物体の写真を撮り、各植物体の生体重を測定した。

### 9-3. 水耕栽培系を用いた低濃度の外界 $Ca^{2+}$ 条件下における植物の生育試験

II-2-7.の方法に従った。

### II-3. 結果

植物体内において SRK2D と物理的に相互作用する CIPK26、CIPK3、CIPK9 および CIPK23 の植物体における機能を明らかにするために、*CIPK26*、*CIPK3*、*CIPK9* および *CIPK23* 遺伝子に T-DNA 断片が挿入された機能欠損変異体を Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から取得し、各変異体ラインのホモ接合変異体を整備した (図 16A)。RT-PCR 法による発現解析により、各ホモ接合変異体において対応する *CIPK* 遺伝子の発現レベルが検出限界以下であることを確認した (図 16B)。各 *cipk* 一重変異体に加えて、それら *cipk* 変異体の多重変異体を作出した。得られた各 *cipk* 多重変異体における各 *CIPK* 遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析し、*CIPK26*、*CIPK3* および *CIPK9* の発現は対応する多重変異体において検出されないことを確認した (図 16B)。一方、*cipk23/9* 二重変異体、*cipk26/3/23*、*cipk26/9/23*、*cipk3/9/23* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体において、弱いながらも *CIPK23* 遺伝子の発現が確認された (図 16B)。同様の現象、すなわち一重変異体では対応する遺伝子の発現レベルが検出限界以下であるにもかかわらず、多重変異体ではその発現が検出されるレベルまで上昇している現象は、シロイヌナズナの他の遺伝子群の多重変異体でも報告されている (Tokunaga et al., 2012)。定量 RT-PCR 法により、前述の多重変異体における *CIPK23* の発現レベルを定量的に解析したところ、これら変異体における *CIPK23* の発現レベルは、野生型株 (WT) における *CIPK23* の発現レベルの 5-21% 程度にまで減少しており (図 16C)、これら変異体において *CIPK23* の発現が有意に減少していることが示された。

単離された一重変異体および多重変異体を GM 寒天培地上で生育させたところ、野生型株 (WT) と同様の生育表現型が観察された (図 17A)。これら変異体の最大ロゼット半径を測定したところ、野生型株のそれと同程度であることが示された (図 17B)。一方、GM 寒天培地上で生育させたこれら変異体を土に

移植してさらに生育させたところ、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体において顕著な生育阻害が観察された (図 18A)。土植えて生育させたこれら変異体の最大ロゼット半径を測定したところ、野生型株のそれと比較して、有意に減少していることが示された (図 18B)。これら変異体のロゼット葉の先端部において黄化が観察された (図 18C)。生殖生長期における *cipk* 一重変異体および多重変異体の植物体の生育表現型を観察したところ、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体において、花茎の長さの有意な減少が観察された (図 18D、18E、18G)。また、これら変異体では花芽が黄化し、それ以上生長しない様子が観察された (図 18F)。他の *cipk* 一重変異体および多重変異体では、ロゼット葉の先端部および花芽における黄化は観察されなかった (未記載)。各変異体の最終的な種子収量を測定したところ、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体において野生型株のそれと比較して有意な減少がみられた (図 18H)。

*cipk26/3/9/23* 四重変異体において 35S プロモーターの制御下で *CIPK26* 遺伝子を発現させると、この変異体で観察される生育阻害 (最大ロゼット半径および花茎長さの減少) が *CIPK26* の発現レベルに応じて部分的に回復したことから (図 19A-E)、*cipk26/3/9/23* 四重変異体を示す生育阻害は、少なくとも一部分は *CIPK26* 遺伝子の欠損によって引き起こされていることが示された。

サブクラス III SnRK2 が制御する生理応答の調節に *CIPK26/3/9/23* が関与しているかどうかを明らかにするために、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体を用いた ABA 感受性試験および乾燥ストレス耐性試験をおこなった (図 20、21)。サブクラス III SnRK2 は ABA シグナル伝達経路の主要な正の制御因子として機能しており、*srk2d/e/i* 三重変異体は、発芽段階および栄養生長期において ABA に対してほとんど応答しない、顕著な ABA 非感受性を示す (Fujii et al., 2009、Fujita et al., 2009、Nakashima et al., 2009)。10 あるいは 50  $\mu$ M ABA

含有寒天培地上で野生型株、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体を生育させたところ、先行研究と同様に *srk2d/e/i* 三重変異体では顕著な ABA 非感受性が観察された (図 20A、20B)。一方、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体では、野生型株 (WT) と同程度の ABA 感受性を示した (図 20A、20B)。このことから、CIPK26、CIPK3、CIPK9 および CIPK23 は、ABA シグナル伝達の主要な制御因子としては機能し得ないことが示唆された。

*srk2d/e/i* 三重変異体では、水分欠乏ストレスに応答した ABA を介した生理応答である遺伝子発現の制御や気孔閉鎖が正常に起こらなくなっており、乾燥ストレスに対する感受性が極度に高くなっている (Fujii et al., 2009、Fujita et al., 2009)。野生型株、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体を用いて乾燥ストレス耐性試験をおこなったところ、先行研究と同様に *srk2d/e/i* 三重変異体では、顕著な乾燥ストレス耐性の低下が観察された (図 21A)。一方、*srk2d/e/i* 三重変異体が枯死してしまう程の乾燥ストレス条件下において、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体は野生型株と同様に生存していることが示された (図 21A)。また、浸透圧ストレス誘導性であり、サブクラス III SnRK2 の下流で AREB/ABF 転写因子群により発現が制御されている *RD29B* 遺伝子 (Yoshida et al., 2010) について、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体におけるストレス処理に応答した発現パターンを解析した (図 21B)。その結果、これら変異体では、乾燥、高塩処理あるいは ABA 処理に応答して、野生型株と同様に *RD29B* 遺伝子の発現が誘導されることが示された (図 21B)。このことから、CIPK26、CIPK3、CIPK9 および CIPK23 は、サブクラス III SnRK2 および AREB/ABF 転写因子群を介した遺伝子発現の制御経路である”SnRK2-AREB/ABF 経路”を介した浸透圧ストレス応答性遺伝子の発現制御には関与していないことが示唆された。以上より、CIPK26、CIPK3、CIPK9 および CIPK23 は、乾燥ストレス耐性獲得に関わるサブクラス III SnRK2 を介し

たシグナル伝達経路の主要な構成因子としては機能していないことが示唆された。

次に、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される前述の生育阻害に着目した (図 18)。*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される特徴的な生育阻害 (ロゼット葉の先端部および花芽の黄化) と類似した表現型が、液胞膜局在の  $H^+/Ca^{2+}$  対向輸送体である CAX1 あるいは CAX3 をコードする遺伝子の二重欠損変異体である *cax1/cax3* 二重変異体においても報告されている (Cheng et al., 2005)。*cax1/cax3* 二重変異体では、液胞への  $Ca^{2+}$  輸送が攪乱されており、この変異体は高濃度の  $Ca^{2+}$  に高い感受性を示すこと、および低濃度の  $Ca^{2+}$  条件下あるいは高濃度の  $Mg^{2+}$  条件下において生育阻害から回復することが報告されている (Cheng et al., 2005、Liu et al., 2011)。*cipk26/3/9* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体および *cax1/cax3* 二重変異体の類似した表現型を考慮すると、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される生育阻害が外界の  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$  条件によって引き起こされている可能性が考えられた。そこで、水耕栽培系を用いて、種々の外界  $Ca^{2+}$  濃度あるいは  $Mg^{2+}$  濃度条件下における野生型株、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育試験をおこなった (図 22、23)。

水耕栽培系を用いると、通常生育条件である 2 mM  $CaCl_2$  条件下 (図 22A) あるいは 2 mM  $MgCl_2$  条件下 (図 23A) において、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で土植え時と同様の生育阻害 (ロゼット葉の生育阻害およびロゼット葉先端部の黄化) が観察された。種々の濃度の  $CaCl_2$  条件下 (4、2、0.2 あるいは 0.1 mM) において植物体を生育させたところ、低濃度の外界  $Ca^{2+}$  濃度条件下 (0.2 あるいは 0.1 mM) において *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体でより顕著な生育阻害が観察された (図 22A)。種々の濃度の  $MgCl_2$  条件下 (4、2、0.2 あるいは 0.1 mM) において植物体を生育させ

たところ、高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  濃度条件下（4 mM）において *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体でより顕著な生育阻害が観察された（図 23A）。一方、低濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  濃度条件下（0.2 あるいは 0.1 mM）で生育させた *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体では、生育阻害から回復する様子が観察された（図 23A）。各条件で生育した植物体の地上部の生体重を測定したところ、通常生育条件下で生育した *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体では野生型株（WT）と比較して有意な生体重の低下がみられたが、生育阻害からの回復がみられる 0.1 mM  $\text{MgCl}_2$  条件下では、野生型株、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生体重が同程度であることが示された（図 23B）。以上の結果より、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体は、外界のより高濃度な  $\text{Mg}^{2+}$  濃度に高感受性を示すことが明らかになった。

水耕栽培系で生育した *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体においてイオン恒常性が影響を受けているかどうかを明らかにするために、誘導結合プラズマ-質量分析（ICP-MS）により、各植物体の地上部における Mg、Ca、K および Na 含量の測定をおこなった（図 22C、23C）。ICP-MS による元素含量の測定は、東京大学大学院農学生命科学研究科 藤原徹教授および西田翔博士との共同研究としておこなった。ICP-MS 解析の結果、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体において生育阻害が観察される条件において、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の Ca 含量あるいは Mg 含量が、野生型株のそれらと比較して有意に低下していることが示された（図 22C、23C）。また、これら変異体の Na 含量は野生型株のそれと比較して上昇する傾向がみられた（図 22C、23C）。一方、これら変異体における K 含量は、一部の例外を除いて、野生型株のそれと同程度であった（図 22C、23C）。*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育阻害からの回復がみられる低濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  濃度条件下（0.2 あるいは 0.1 mM）では、これら変異体における Ca

および Mg 含量が野生型株のそれらと同程度であることが示された (図 22C、23C)。

これらの結果と一致して、前述 (図 18) の土植えでの生育条件下において観察される *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育阻害は、無機栄養素として与えた液体培地中の  $Mg^{2+}$  濃度を 2 mM から 0.1 mM に低下させることによって部分的に回復することが観察された (図 24)。

*CIPK26* 遺伝子の過剰発現が高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下あるいは低濃度の外界  $Ca^{2+}$  条件下での植物の生育に与える影響を評価するために、35S プロモーターの制御下で *CIPK26* 遺伝子を過剰発現する形質転換シロイヌナズナを作出し、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下あるいは低濃度の外界  $Ca^{2+}$  条件下における生育評価をおこなった (図 25、26)。*CIPK26* 遺伝子を過剰発現する 2 つの独立したラインを整備し、それらにおける *CIPK26* 遺伝子の発現レベルが野生型株、ベクター対照ラインのそれと比較して顕著に上昇していることを確認した (図 25A)。次に、高濃度の  $MgCl_2$  (20 あるいは 25 mM  $MgCl_2$ ) 含有寒天培地上における各植物体の生育を評価した (図 25B)。まず、コントロール培地上において *CIPK26* 過剰発現ラインが野生型株 (WT) やベクター対照ラインと同様に生育することを確認した。*CIPK26* 過剰発現ラインは高濃度の  $MgCl_2$  含有培地において野生型株やベクター対照ラインと比較して良く生育する様子が観察された (図 25B)。生育後の植物体の生体重を測定したところ、25 mM  $MgCl_2$  条件下において *CIPK26* 過剰発現ラインの生体重は、ベクター対照ラインのそれと比較して有意に高いことが示された (図 25C)。次に、水耕栽培系を用いて低濃度の外界  $CaCl_2$  条件 (0.1 mM  $CaCl_2$ ) における各植物体の生育を評価した (図 26A)。まず、通常生育条件 (2 mM  $CaCl_2$  条件) において *CIPK26* 過剰発現ラインが野生型株 (WT) やベクター対照ラインと同様に生育することを確認した。*CIPK26* 過剰発現ラインは 0.1 mM  $CaCl_2$  条件においてベクター対照ラインと比較して良く生育する様子が観察

された（図 26A）。生育後の植物体の生体重を測定したところ、0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  条件下において *CIPK26* 過剰発現ラインの生体重は、ベクター対照ラインのそれと比較して有意に高いことが示された（図 26B）。



## II-4. 考察

本章では、主に機能欠損多重変異体を用いて、*CIPK26/3/9/23* の機能を解析した。試験した限りにおいて、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体は、*srk2d/e/i* 三重変異体で観察されるような顕著な ABA 非感受性を示さなかった (図 20)。また、これら変異体では、*srk2d/e/i* 三重変異体で観察されるような乾燥ストレスに極度に弱い表現型は観察されず (図 21A)、サブクラス III SnRK2 を介してその発現が制御される *RD29B* 遺伝子のストレスに応答した発現パターンは野生型株と同様であった (図 21B)。以上の結果より、植物体において *CIPK26/3/9/23* は、水分欠乏ストレス耐性獲得におけるサブクラス III SnRK2 を介した ABA シグナル伝達経路の制御因子としては機能していない可能性が高いと考えられる。第 1 章 第 3 節の総合考察において、*CIPK26* がサブクラス II およびサブクラス III SnRK2 を介して ABA シグナル伝達経路に関連している可能性、および *CIPK26* が *SRK2D* の活性調節に関与している可能性を議論したが、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体を用いた表現型解析からは、これらの考えを支持するような結果は得られなかった。

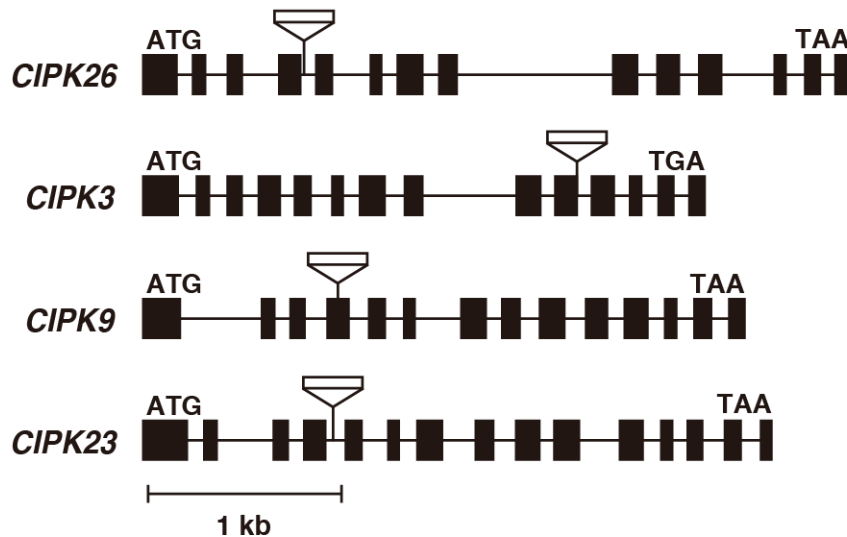
他方、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される生育阻害 (図 18) に着目し、同様の生育表現型を示す *cax1/cax3* 二重変異体の先行研究を参考にして、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体が外界のより高濃度な  $Mg^{2+}$  濃度に高感受性を示すことを明らかにした (図 23A、23B)。このことから、植物体において *CIPK26/3/9/23* は、種々の外界の  $Mg^{2+}$  濃度条件下、特に高濃度の外界  $Mg^{2+}$  濃度条件下において植物の生長を維持するために重要な役割を担っていることが明らかになった。

*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体が生育阻害を示す条件下において、これら変異体の地上部では Mg および Ca 含量の有意な低下がみられた (図 22C、23C)。このことから、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される生育阻害は、少なくとも一部分においては植物体地上部

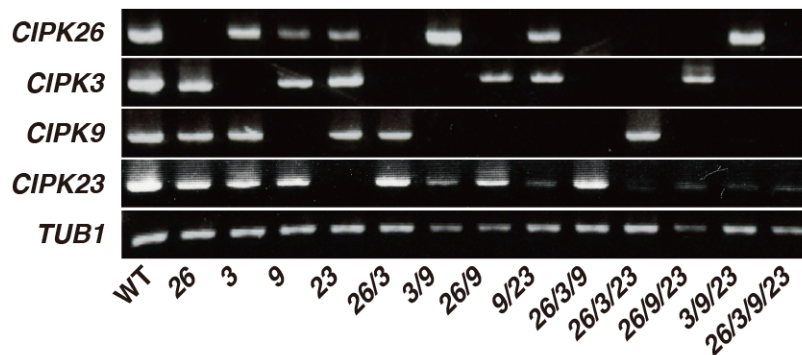
における  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  恒常性の攪乱に起因していることが示唆された。

*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の表現型と一貫して、*CIPK26* 遺伝子を過剰発現する形質転換シロイヌナズナは、高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下および低濃度の外界  $\text{Ca}^{2+}$  条件下においてベクター対照ラインと比較して優れた生長能力を示した（図 25、26）。これらの結果より、*CIPK26* 遺伝子が、高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下および低濃度の外界  $\text{Ca}^{2+}$  条件下において植物体の生育を維持するための重要な役割を、それ自身の発現量依存的に果たしているという考えが支持された。

A



B



C

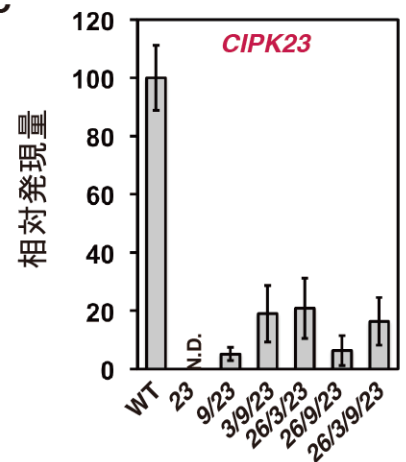


図 16. *cipk26*, *cipk3*, *cipk9*, *cipk23* とその多重変異体の整備

(A) *CIPK26*, *CIPK3*, *CIPK9*, *CIPK23* 遺伝子の構造。エクソンは太線、イントロンは細線で示す。T-DNA の挿入位置を示す。

(B) 各変異体における *CIPK26*, *CIPK3*, *CIPK9*, *CIPK23* 遺伝子の発現量を RT-PCR 法により解析した。全 RNA を発芽後 12 日の幼植物体から抽出し、ランダムプライマー (6 mer) を用いて逆転写をおこなった。RT-PCR では、*CIPK26*, *CIPK3*, *CIPK9*, *CIPK23*, *TUB1* を特異的に増幅するプライマーペアを用いた。

(C) 定量 RT-PCR 解析による各 *cipk* 変異体における *CIPK23* の発現レベルの解析。野生型株 (WT) における *CIPK23* の発現量を 1 とした。値は 3 回反復しておこなった PCR 反応の平均値と標準偏差を示す。

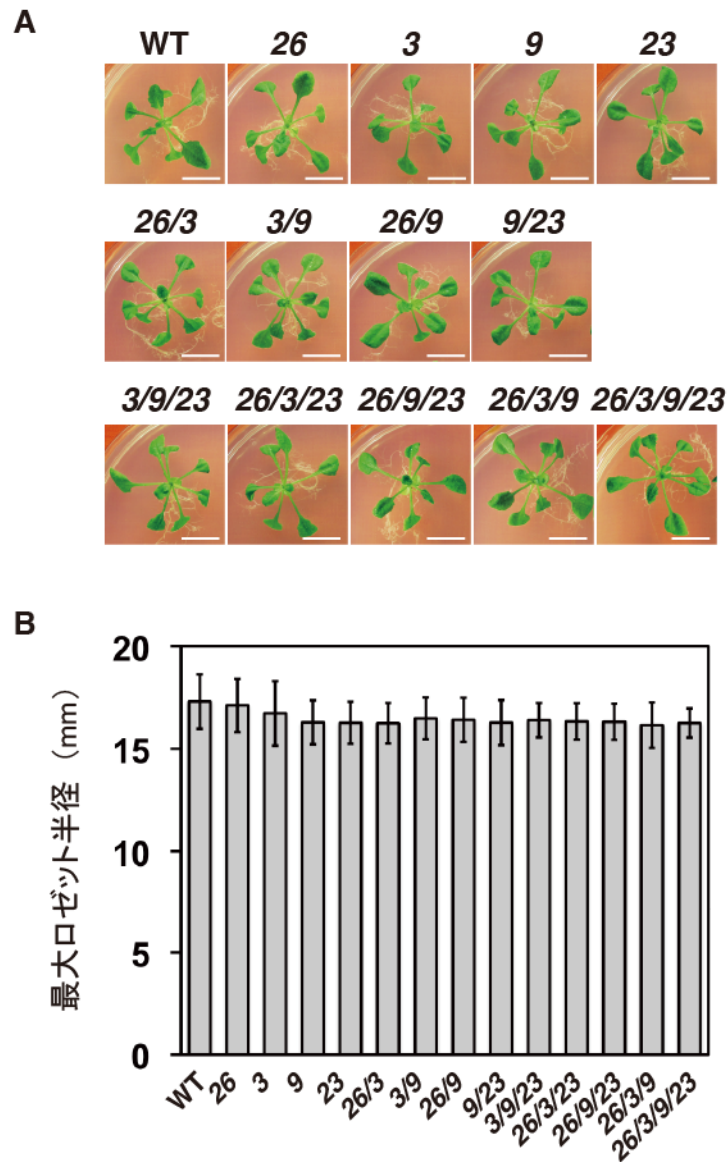


図 17. *cipk26*, *cipk3*, *cipk9*, *cipk23* とその多重変異体の表現型解析～  
GM 寒天培地における生育表現型

(A) GM 寒天培地上で 3 週間生育させた植物体の写真。スケールバーは 1 cm。

(B) 発芽後 3 週間 GM 寒天培地上で生育させた植物体の最大ロゼット半径。2 回の実験のうち代表的な結果を示す。エラーバーは標準偏差 (n = 8) を示す。

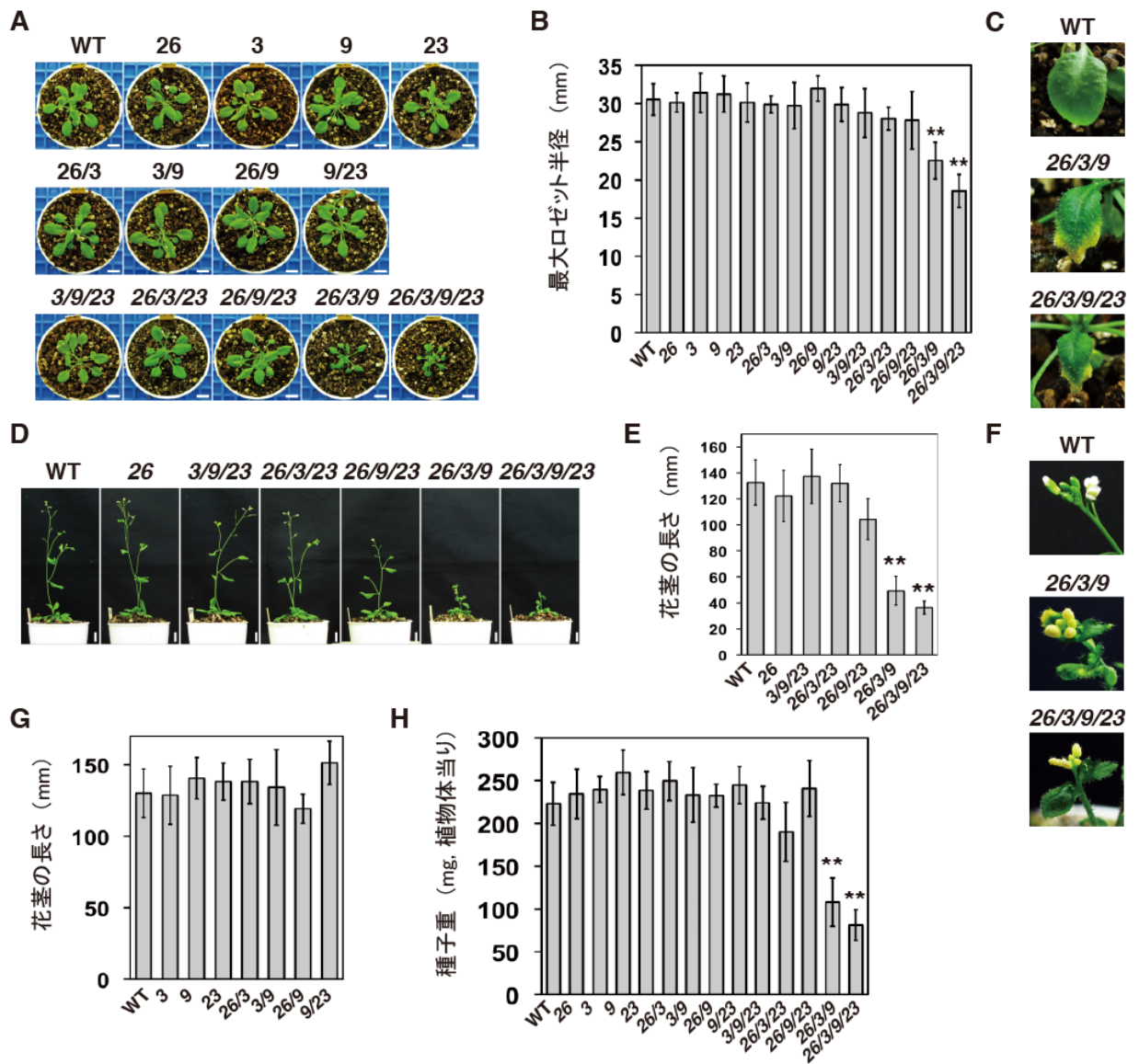


図 18. *cipk26*, *cipk3*, *cipk9*, *cipk23* とその多重変異体の表現型解析～  
土耕栽培条件下における生育表現型

(A) GM 培地上で 2 週間生育させ、土植えでさらに 10 日間生育させた植物体の写真。WT: 野生型株。スケールバーは 1 cm。(B) (A) で記述したように生育させた植物体の最大ロゼット半径。2 回の実験のうち代表的な結果を示す。エラーバーは標準偏差 (n = 6) を示す。\*\* $P < 0.01$  (Dunnett の多重比較検定、野生型株 (WT) との比較)。(C) 野生型株 (WT)、*cipk26/3/9* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体のロゼット葉の代表的な写真。(D) GM 培地上で 2 週間生育させ、土植えでさらに 14 日間生育させた植物体の写真。WT: 野生型株。スケールバーは 1 cm。(E) (D) で記述したように生育させた植物体の花茎の長さ。エラーバーは標準偏差 (n = 6) を示す。\*\* $P < 0.01$  (Dunnett の多重比較検定、野生型株 (WT) との比較)。(F) 野生型株 (WT)、*cipk26/3/9* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体の花序の先端部の代表的な写真。(G) (D) で記述したように生育させた、(E) で記載されていない変異体の植物体の花茎の長さ。エラーバーは標準偏差 (n = 6) を示す。(H) 土植えで生育させた各植物体の種子収量 (個体あたりの種子重)。エラーバーは標準偏差 (n = 6) を示す。\*\* $P < 0.01$  (Dunnett の多重比較検定、野生型株 (WT) との比較)。

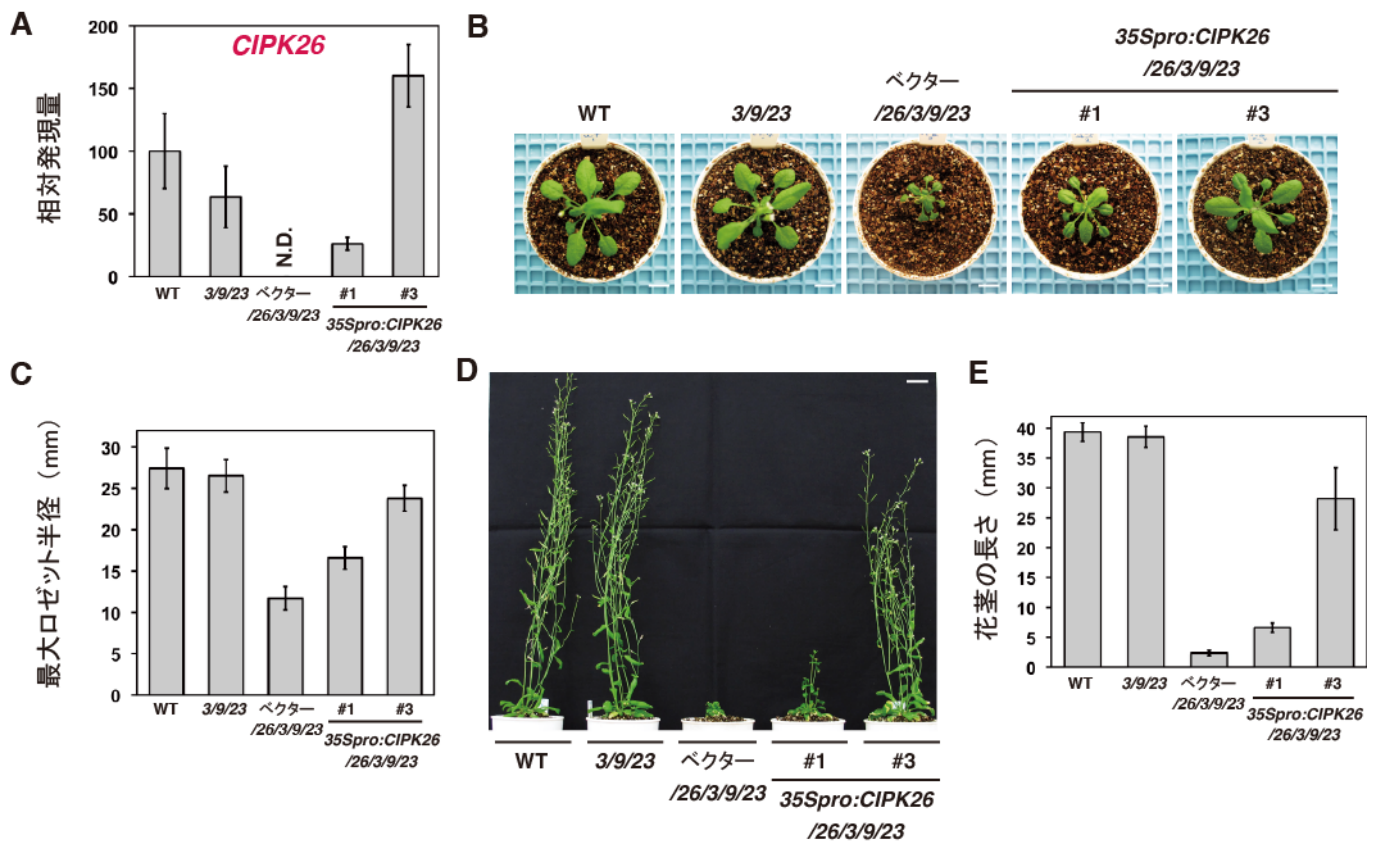


図 19. *CIPK26* 遺伝子の発現による *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育阻害からの回復試験

(A) 定量 RT-PCR 解析による野生型株 (WT)、*cipk3/9/23* 三重変異体、ベクターコントロールラインあるいは *CIPK26* 発現ライン (*cipk26/3/9/23* 四重変異体遺伝的背景) における *CIPK26* の発現レベルの解析。野生型株 (WT) における *CIPK26* の発現量を 100 とした。値は 3 回反復しておこなった PCR 反応の平均値と標準偏差を示す。(B) GM 培地上で 2 週間生育させ、土植えてさらに 10 日間生育させた植物体の写真。WT；野生型株。スケールバーは 1 cm。(C) (B) で記述した植物体の最大ロゼット半径。エラーバーは標準偏差 (n = 6) を示す。(D) GM 培地上で 2 週間生育させ、土植えてさらに 4 週間生育させた植物体の写真。WT；野生型株。スケールバーは 2 cm。(E) (D) で記述したように生育させた植物体の花茎の長さ。エラーバーは標準偏差 (n = 6) を示す。



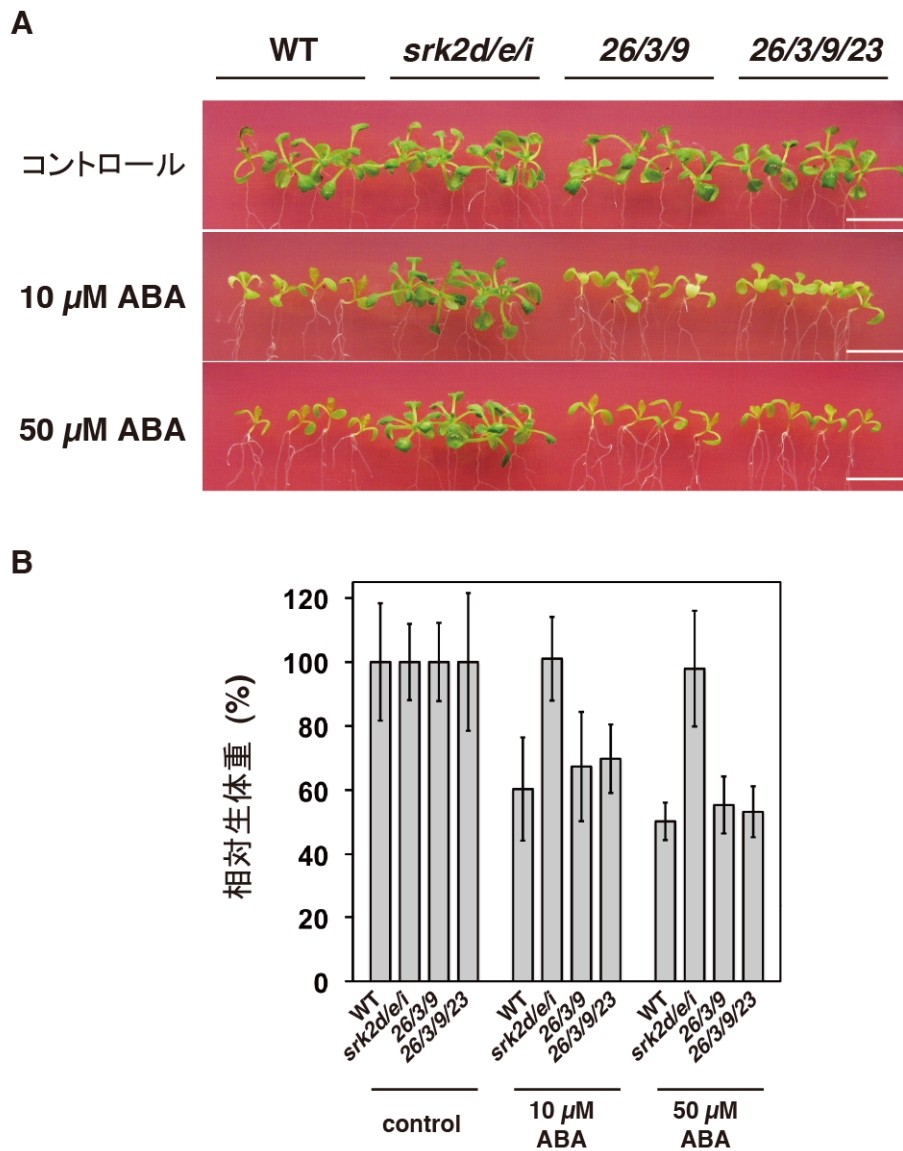
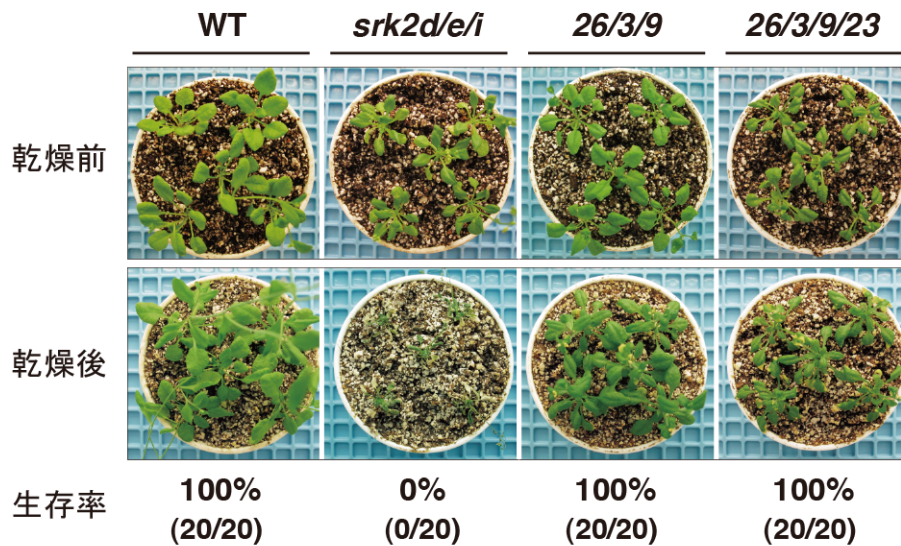


図 20. *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の ABA 感受性試験

(A) 野生型株 (WT)、*srk2d/e/i*, *cipk26/3/9* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体を用いた栄養生長期における ABA 感受性試験。写真は、幼植物体をコントロール寒天培地 (1/2\*MS 寒天培地)、10 あるいは 50  $\mu$ M ABA 含有寒天培地に移植して 10 日間生育させた植物体を示す。幼植物体は発芽後 4 日目に移植した。スケールバーは 1 cm。

(B) (A) で記述したように生育させた植物体の相対生体重。コントロール寒天培地上で生育させた各植物体の生体重の値を 100% として示す。エラーバーは標準偏差 ( $n = 8$ ) を示す。同様の結果が 2 回の生物学的反復実験で得られた。代表的な結果を示す。

A



B

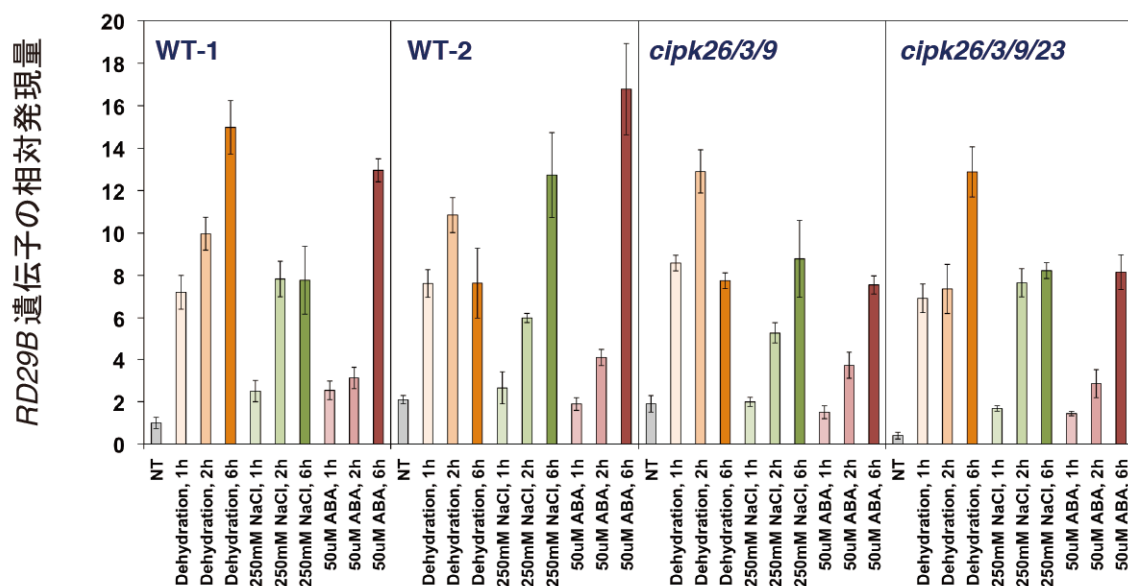


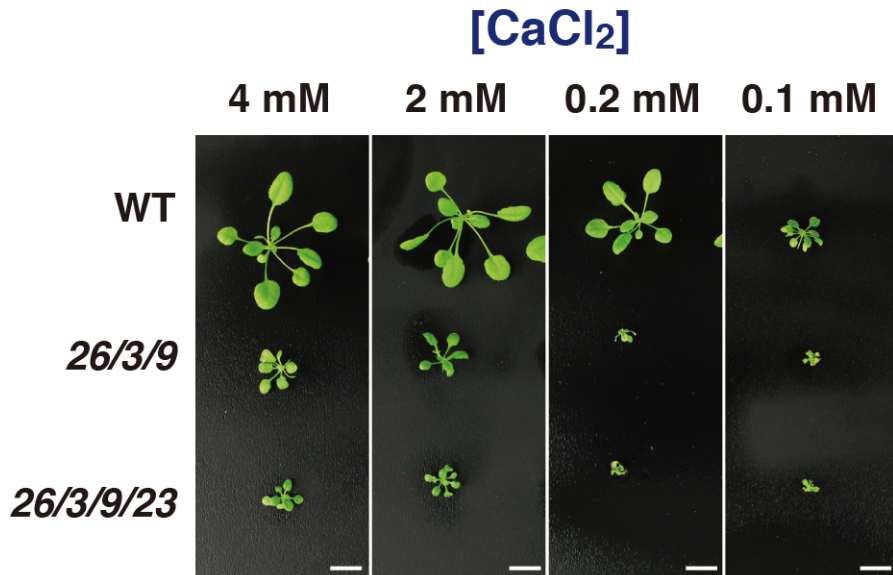
図 21. *cipk26/3/9* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体を用いた乾燥ストレス耐性試験および *cipk26/3/9* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体におけるストレス処理に応答した *RD29B* 遺伝子の発現解析

(A) 乾燥ストレス耐性試験。写真は乾燥ストレス前後の植物体を示す。GM 寒天培地で 3 週間生育させた野生型株 (WT)、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体を土植えし、さらに 4 日間生育させた。その後、給水を停止することにより乾燥ストレスを与えた。乾燥ストレス開始後 10 日に再給水を行い、さらに 4 日後に生存している個体を生存個体とみなした。

(B) 定量 RT-PCR 法による野生型株、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体における乾燥ストレス、高塩ストレス、ABA 処理に応答した *RD29B* 遺伝子の発現レベルの解析。ABA (50  $\mu$ M ABA)、高塩 (250 mM NaCl) あるいは乾燥処理を図示した時間おこなった植物体を解析に供した。未処理 (NT) の野生型株 (WT-1) における *RD29B* の発現量を 1 とした。値は 3 回反復しておこなった PCR 反応の平均値と標準偏差を示す。定量 RT-PCR 解析は当研究室の吉田拓也博士によっておこなわれた。



A



B

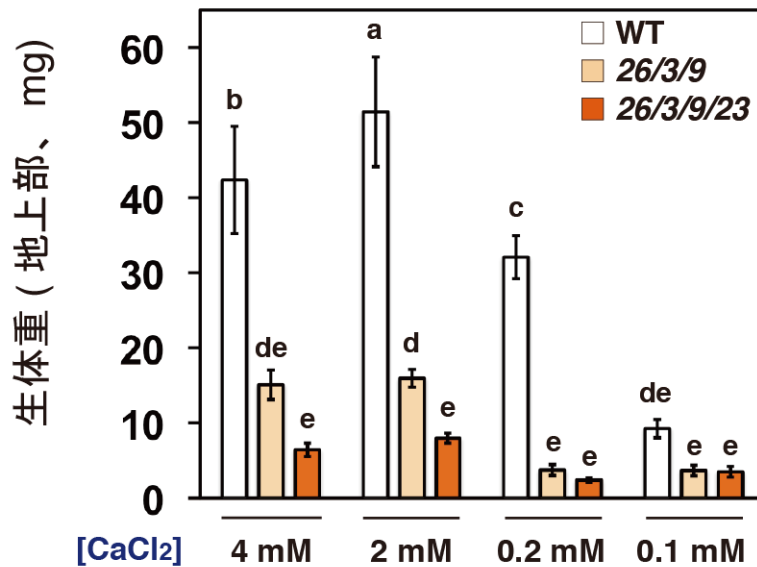


図 22. *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される生育阻害は低 [Ca<sup>2+</sup>] 条件下において回復しない

(A) 水耕栽培系における各種濃度の CaCl<sub>2</sub> 条件下での植物の生育。写真は、図示された濃度の CaCl<sub>2</sub> を含む改変低カルシウム溶液（改変 LCS）を用いて 24 日間生育させた野生型株 (WT)、*cipk26/3/9* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体の代表的な植物体の様子を示す。スケールバーは 1 cm。

(B) (A) で記述したように生育させた植物体の地上部の生体重。エラーバーは標準偏差 (n = 6)。同様の結果が 2 回の生物学的反復実験で得られた。代表的な結果を示す。バーの上側に示された英小文字は対応する平均値が有意に異なることを示す ( $P < 0.01$ , Tukey-Kramer の多重比較検定)。

C

□ WT, ■ 26/3/9, ■ 26/3/9/23

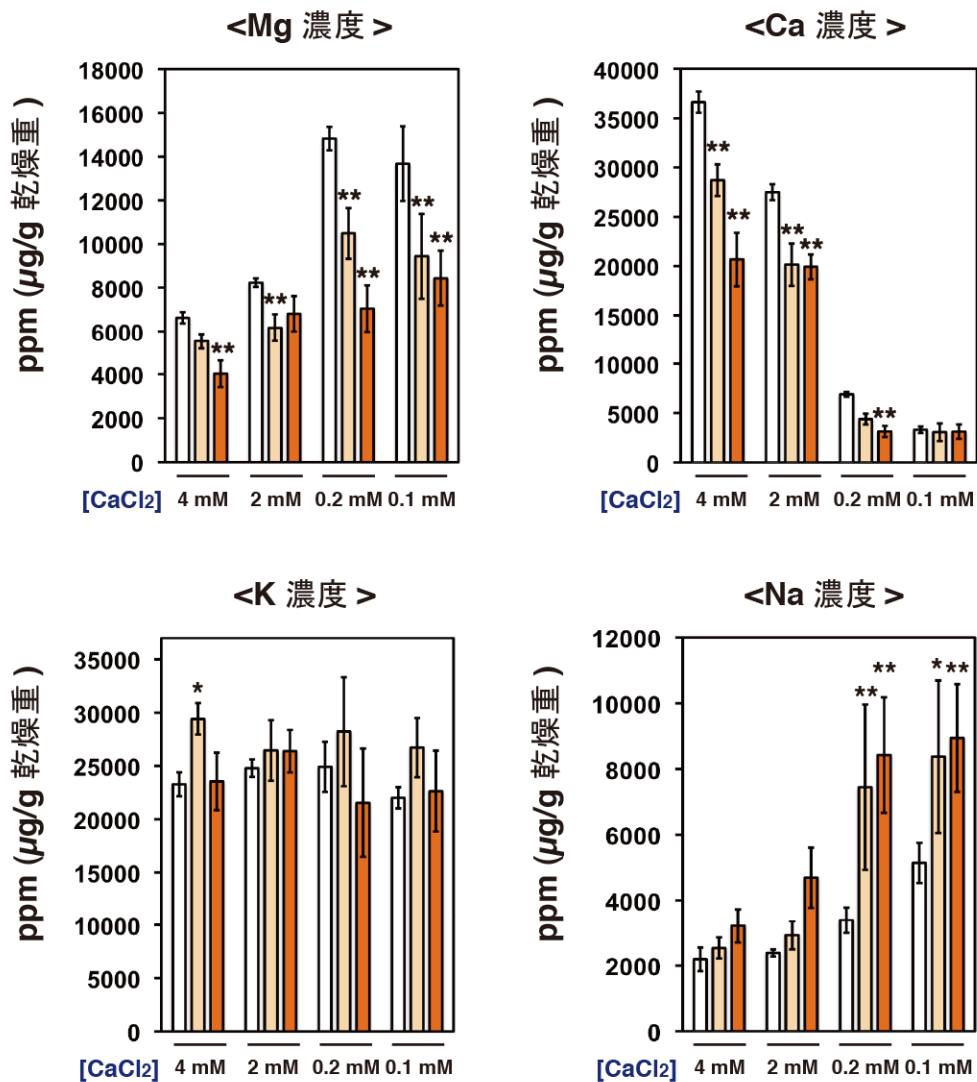
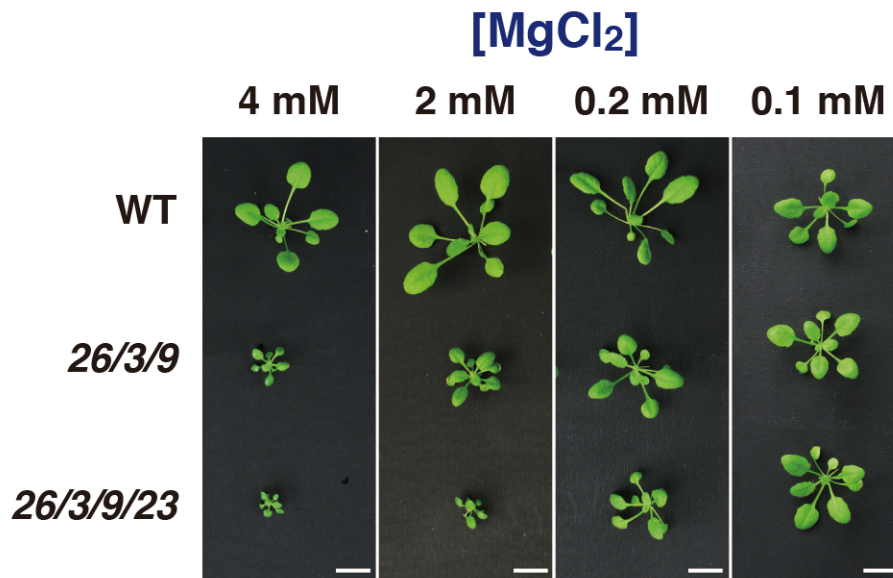


図 22 ( 続き ). *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される生育阻害は低  $[Ca^{2+}]$  条件下において回復しない

(C) (A) で記述したように生育させた植物体の地上部における Mg, Ca, K, Na 含量の ICP-MS による測定。データは平均値と標準偏差 ( $n = 6$ ) を示す。バーの上側に示されたアスタリスクは、対応する平均値が同一生育条件下における野生型株 (WT) のそれと比較して有意に異なることを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Tukey-Kramer の多重比較検定)。硝酸分解によるサンプル調製は最上惇郎によって、ICP-MS 解析は西田翔博士によっておこなわれた。

A



B

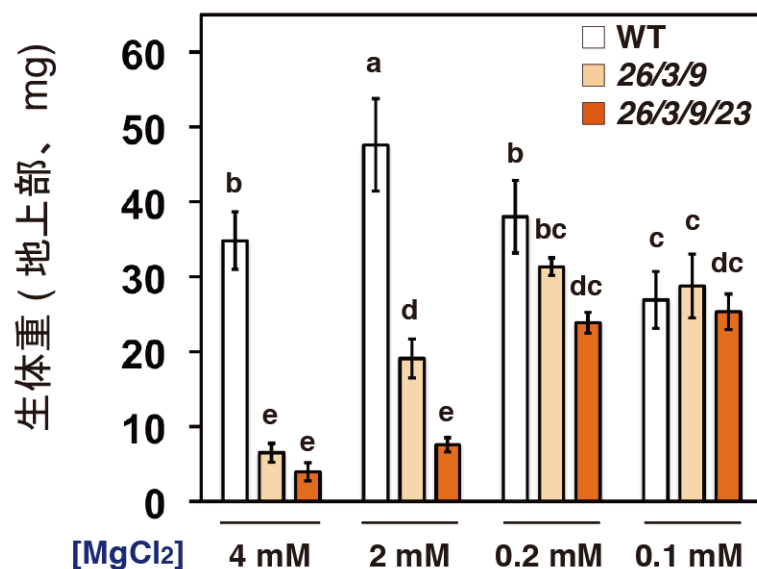


図 23. *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される生育阻害は低 [Mg<sup>2+</sup>] 条件下において回復する

(A) 水耕栽培系における各種濃度の MgCl<sub>2</sub> 条件下での植物の生育。写真は、図示された濃度の MgCl<sub>2</sub> を含む低マグネシウム溶液 (LMgS) を用いて 24 日間生育させた野生型株 (WT)、*cipk26/3/9* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体の代表的な植物体の様子を示す。スケールバーは 1 cm。

(B) (A) で記述したように生育させた植物体の地上部の生体重。エラーバーは標準偏差 (n = 6)。同様の結果が 2 回の生物学的反復実験で得られた。代表的な結果を示す。バーの上側に示された英小文字は対応する平均値が有意に異なることを示す ( $P < 0.01$ , Tukey-Kramer の多重比較検定)。

C

□ WT, ■ 26/3/9, ■ 26/3/9/23

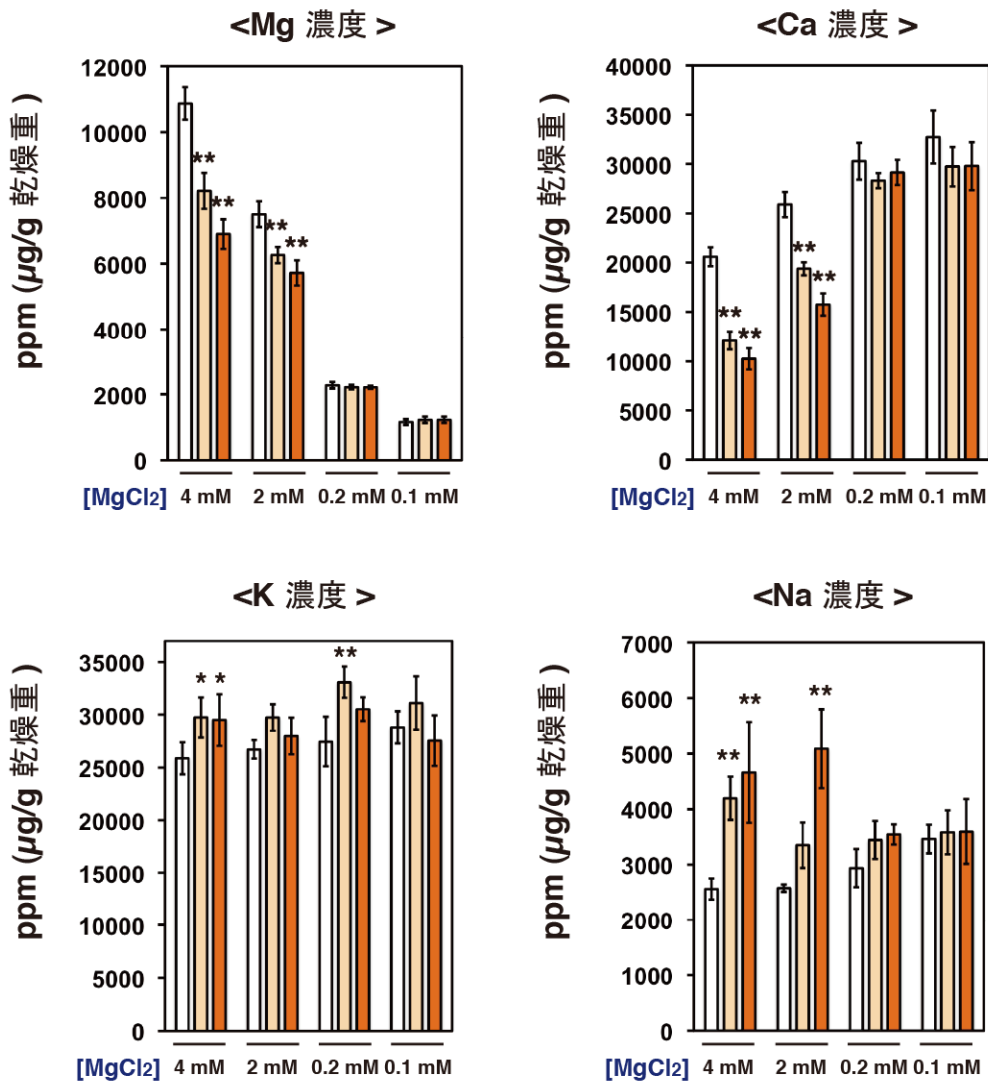


図 23 ( 続き ). *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される生育阻害は低  $[Mg^{2+}]$  条件下において回復する

(C) (A) で記述したように生育させた植物体の地上部における Mg, Ca, K, Na 含量の ICP-MS による測定。データは平均値と標準偏差 ( $n = 6$ ) を示す。バーの上側に示されたアスタリスクは、対応する平均値が同一生育条件下における野生型株 (WT) のそれと比較して有意に異なることを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Tukey-Kramer の多重比較検定)。硝酸分解によるサンプル調製は最上惇郎によって、ICP-MS 解析は西田翔博士によっておこなわれた。

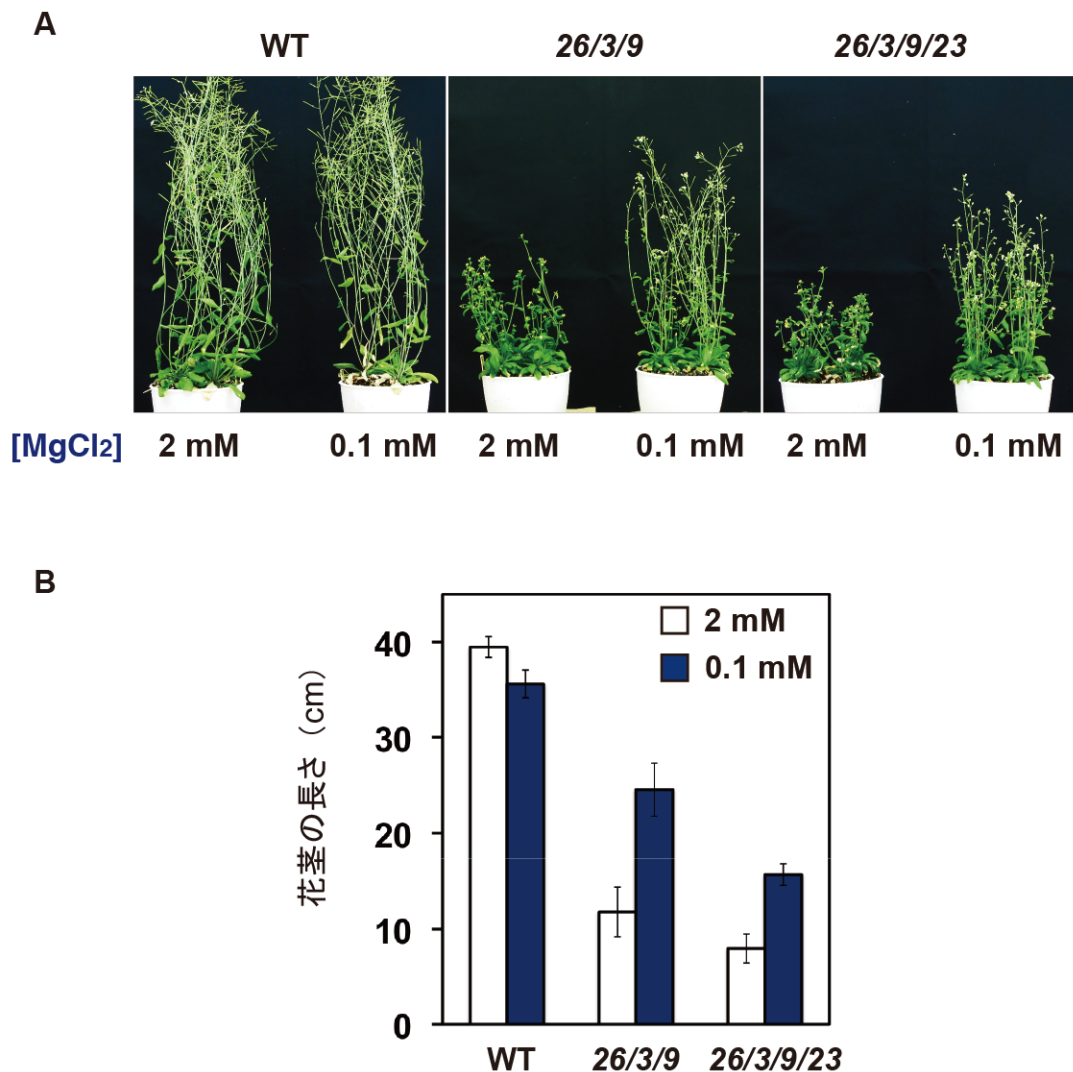


図 24. 液肥中の  $Mg^{2+}$  濃度を低下させることによる *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育阻害からの部分的な回復

(A) GM 培地上で 2 週間生育させ、土植えでさらに 4 週間生育させた植物体の写真。WT；野生型株。土植えでは、図示した濃度の  $MgCl_2$  を含む LMgS を供給したバーミキュライトを充填したポットで生育させた。各ポットあたり 4 個体を生育させた。

(B) (A) で記述したように生育させた各植物体の花茎の長さ。エラーバーは標準偏差 ( $n = 8$ ) を示す。



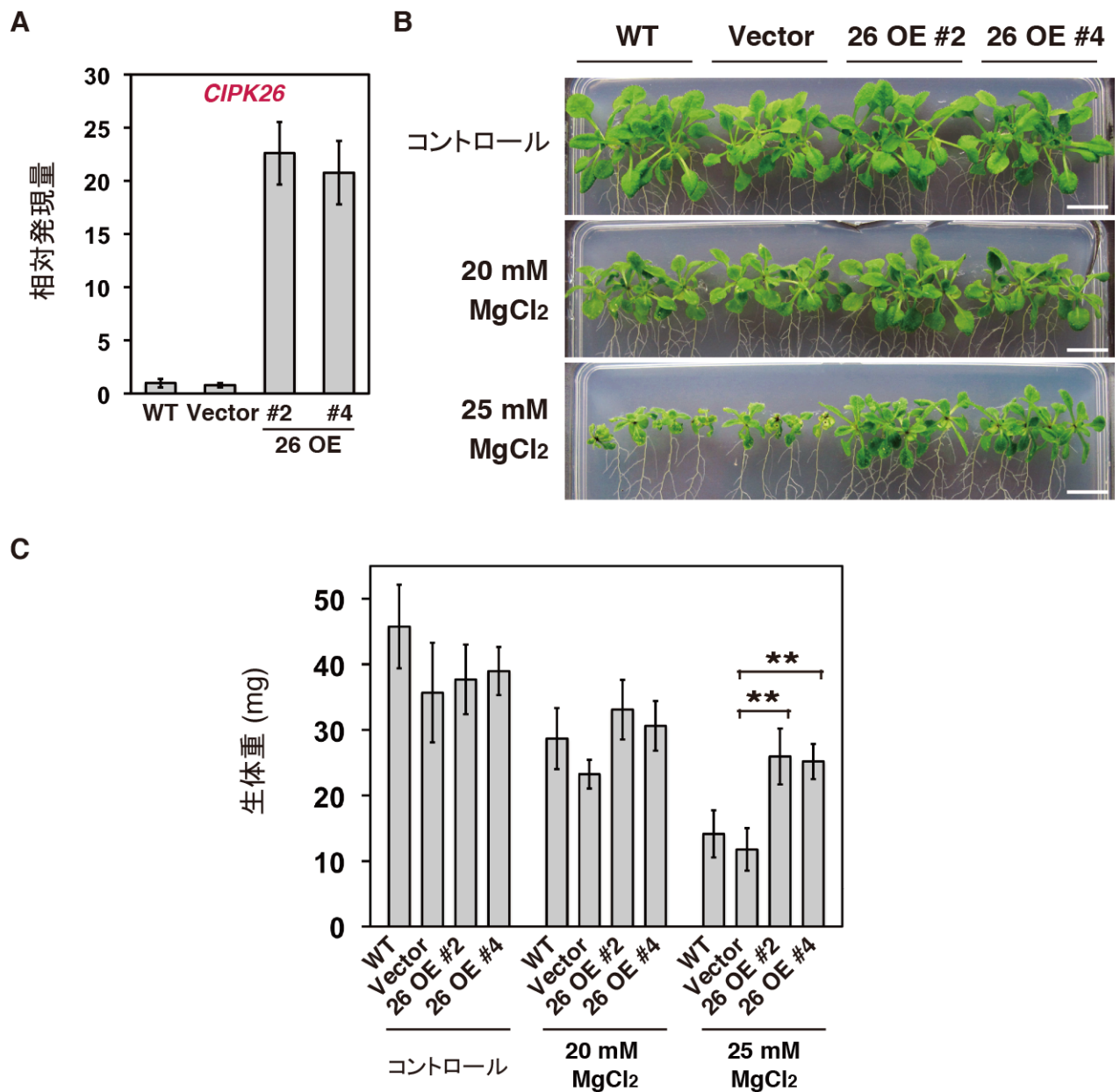


図 25. 高濃度の  $Mg^{2+}$  含有培地における *CIPK26* 過剰発現シロイヌナズナの生育試験

(A) 定量 RT-PCR 解析による野生型株 (WT)、ベクターコントロールライン (Vector)、*CIPK26* 過剰発現ライン (26 OE #2, #4) における *CIPK26* の発現レベルの解析。野生型株における *CIPK26* の発現量を 1 とした。値は 3 回反復しておこなった PCR 反応の平均値と標準偏差を示す。

(B) 野生型株、ベクターコントロールライン、*CIPK26* 過剰発現ライン (26 OE #2, #4) を用いた高濃度の  $MgCl_2$  に対する感受性試験。写真は、幼植物体をコントロール寒天培地 (1/2\*MS 寒天培地)、20 あるいは 25 mM  $MgCl_2$  添加寒天培地に移植して、プレートを垂直に立てた状態でさらに 14 日間生育させた植物体を示す。幼植物体は発芽後 4 日目に移植した。スケールバーは 1 cm。

(C) (B) で記述したように生育させた植物体の生体重。エラーバーは標準偏差 ( $n = 12$ ) を示す。バーの上側に示されたアスタリスクは、対応する平均値が同一生育条件におけるベクターコントロールラインのそれと比較して有意に異なることを示す (\*\* $P < 0.01$ , Tukey-Kramer の多重比較検定)。同様の結果が 2 回の生物学的反復実験で得られた。代表的な結果を示す。

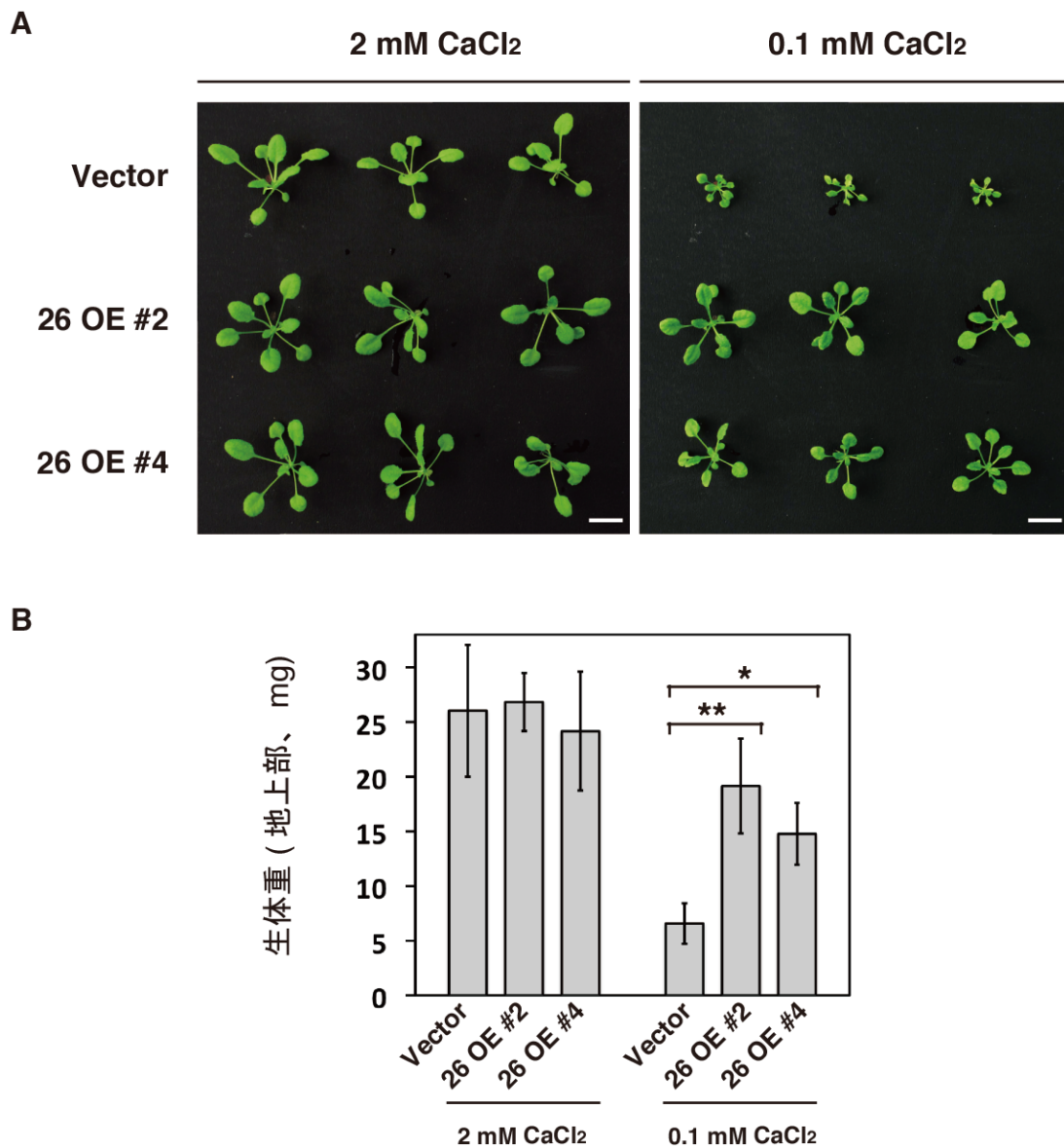


図 26. *CIPK26* 過剰発現シロイヌナズナの  $\text{Ca}^{2+}$  欠乏条件下での生育試験

(A) 水耕栽培系における低  $\text{Ca}^{2+}$  条件下での植物体の生育試験。写真は、2 あるいは 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  を含む改変 LCS を用いた水耕栽培系において 24 日間生育させたベクターコントロールライン (Vector)、*CIPK26* 過剰発現ライン (26 OE #2, #4) の代表的な植物体の様子を示す。スケールバーは 1 cm。

(B) (A) で記述したように生育させた植物体の生体重。エラーバーは標準偏差 ( $n=6$ ) を示す。バーの上側に示されたアスタリスクは、対応する平均値が同一生育条件におけるベクターコントロールラインのそれと比較して有意に異なることを示す (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , Tukey-Kramer の多重比較検定)。

### 第3章 SnRK2 と CIPK26/3/9/23 が調節する新規な生理応答の解析

#### 第1節 $Mg^{2+}$ 感受性調節におけるサブクラス III SnRK2 の役割およびサブクラス III SnRK2 と CIPK26/3/9/23 との機能的関連性

##### III-1-1. 序論

第2章において、*CIPK26*、*CIPK3*、*CIPK9* および *CIPK23* が、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生長維持において重要な役割を果たしていることが示された（図 22、23）。サブクラス III SnRK2 が *CIPK26* と物理的に相互作用すること（図 10、11）および *SRK2D* が *CIPK26*、*CIPK3*、*CIPK9* および *CIPK23* と植物体において物理的に相互作用する結果（図 14）をふまえ、サブクラス III SnRK2 が高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生長調節において何らかの役割を果たしている可能性を考えた。本章では、サブクラス III SnRK2 の機能欠損変異体、*srk2d/e/i* 三重変異体を用いて、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下での生長調節におけるサブクラス III SnRK2 の役割を評価した。



### III-1-2. 方法

#### 1. 寒天培地を用いた高濃度の外界 $Mg^{2+}$ 条件下における植物の生育試験

II-2-9-2.の方法と同様におこなった。

#### 2. ICP-MS による元素含量の測定

II-2-8.の方法と同様におこなった。

#### 3. 寒天培地を用いた高濃度の外界 $K^+$ 、 $Na^+$ あるいは $Ca^{2+}$ 条件下における植物の生育試験

1.2%の Bacto Agar で固化した GM 寒天培地に各植物体の種子を播種して  $4^{\circ}C$  で 3 日間低温処理した。その後、プレートを垂直に立てた状態で明期 ( $60 \pm 10 \mu mol$  photons/ $m^2/s$ ) 16 時間/暗期 8 時間、 $22^{\circ}C$  条件の育成室内で 4 日間生育させた。発芽後 4 日目の幼植物体を、図示した濃度の KCl、NaCl あるいは  $CaCl_2$  を含有する  $1/2 * MS$  寒天培地 (1%スクロースを含み、1.2%の Bacto Agar で固化) に移植し、プレートを垂直に立てた状態で明期 ( $60 \pm 10 \mu mol$  photons/ $m^2/s$ ) 16 時間/暗期 8 時間、 $22^{\circ}C$  条件の育成室内でさらに 14 日間生育させた。植物体の写真を撮影後、各植物体の生体重を測定した。

### III-1-3. 結果

*srk2d/e/i* 三重変異体は乾燥に対して極度に弱く、水耕栽培系で生育させることが困難だったため（未記載）、寒天培地上での評価系を用いて *srk2d/e/i* 三重変異体の高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における生育を評価した（図 27）。まず、生育試験に供した野生型株 (WT)、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体がコントロール培地上において同程度に生育することを確認した（図 27A）。前述（図 22、23）の水耕栽培系の結果と一致して、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体は、高濃度の  $MgCl_2$ （10 あるいは 20 mM  $MgCl_2$ ）を含む培地において特徴的な生育阻害を示した（図 27A）。この評価系による生育試験により、20 mM  $MgCl_2$  含有培地において *srk2d/e/i* 三重変異体が顕著な生育阻害を示した（図 27A）。生育後の植物体の生体重を測定したところ、20 mM  $MgCl_2$  条件において *srk2d/e/i* 三重変異体の生体重が野生型株のそれと比較して有意に低下していることが示された（図 27B）。

コントロール条件あるいは 20 mM  $MgCl_2$  条件において生育した野生型株、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の地上部における Mg、Ca、K および Na 含量を ICP-MS 解析により測定した（図 28）。その結果、野生型株との比較において、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体と同様に、*srk2d/e/i* 三重変異体において Mg および K 含量の有意な低下が観察された。一方、これら変異体における Na 含量は野生型株のそれと比較して同程度であった。Ca 含量については、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体において有意な低下がみられた（図 28）。

次に、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体が高濃度の外界  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$  に対して高感受性を示すかどうかを検証した（図 29）。生育試験の結果、少なくとも試験した限りにおいて、*srk2d/e/i* 三重変異体は高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対して特異的に高感受性を示した（図 29）。*cipk26/3/9* 三重変異

体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体は、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  の他に、高濃度の外界  $Ca^{2+}$  に対しても高感受性を示した (図 29)。

寒天培地上での評価系を用いて、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における各 *cipk* 一重変異体および多重変異体の生育を評価した (図 30A)。その結果、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対して、各 *cipk* 一重変異体は野生型株 (WT) と同程度の感受性を示した。*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の他に、*cipk26/3* 二重変異体、*cipk26/3/23*、*cipk26/9/23* 三重変異体が高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対して高感受性を示した (図 30A)。

同様に、各 *snrk2* 一重変異体および多重変異体の生育を評価した (図 30B)。その結果、*srk2d/e/i* 三重変異体は前述のように高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対して高感受性を示したが (図 30B)、各 *snrk2* 一重変異体および二重変異体は野生型株 (WT) と同程度の感受性を示した (図 30B)。*srk2d/e/i* 三重変異体において 35S プロモーターの制御下で *SRK2D* 遺伝子を発現させると、この変異体で観察される高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する高感受性が部分的に回復した (図 31A、31B)。このことから、*srk2d/e/i* 三重変異体が示す高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する高感受性は、少なくとも一部分は *SRK2D* 遺伝子の欠損によって引き起こされていることが示された。

次に、サブクラス III SnRK2 遺伝子(*SRK2D/E/I*)と *CIPK26/3/9/23* 遺伝子間の遺伝的な相互作用を明らかにするために、*SRK2D/E/I* と *CIPK26/3/9/23* の双方が欠損した七重変異体、*srk2d/e/i/cipk26/3/9/23* を作出した。前述 (図 27) の寒天培地上での評価系を用いて、得られた *srk2d/e/i/cipk26/3/9/23* 七重変異体の高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する応答を評価した (図 32)。その結果、10 mM  $MgCl_2$  条件、20 mM  $MgCl_2$  条件の双方において、*srk2d/e/i/cipk26/3/9/23* 七重変異体は *cipk26/3/9/23* 四重変異体と同程度の感受性を示した (図 32A、32B)。

#### III-1-4. 考察

本節では、サブクラス III SnRK2 の機能欠損変異体、*srk2d/e/i* 三重変異体を主に用い、高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下における植物の生育維持にサブクラス III SnRK2 が関与しているかどうかを解析した。

寒天培地上での評価系を用いた表現型解析により、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体に加えて、*srk2d/e/i* 三重変異体が高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件 (20 mM  $\text{MgCl}_2$  条件) 下において生育障害を示すことが明らかになった (図 27A、27B)。この観察結果は、CIPK26/3/9/23 に加えて、サブクラス III SnRK2 が高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下における植物の生長維持において重要な役割を果たしていることを示している。

ICP-MS 解析により、高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件 (20 mM  $\text{MgCl}_2$  条件) 下で生育させた植物体の地上部における元素含量を測定したところ、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体において、野生型株と比較して有意な Mg および K 含量の低下がみられた (図 28)。このことから、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体では、高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下において  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$  恒常性が攪乱されていることが示唆された。さらに、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体では、高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下において野生型株と比較して有意な Ca 含量の低下がみられたことから (図 28)、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体では  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$  恒常性に加えて  $\text{Ca}^{2+}$  恒常性が攪乱されていることが示唆された。水耕栽培系の高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下において、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体では  $\text{Na}^+$  恒常性の攪乱が観察された (図 23C)。一方、寒天培地上での評価系ではこれら変異体において  $\text{Na}^+$  恒常性の攪乱は観察されず、 $\text{K}^+$  恒常性の攪乱が観察された (図 28)。実験系の違いによるこれら相違点は、生育条件の違い、すなわち湿度条件、無機栄養素の種類やそれらの濃度、あるいはスクロースの有無などの違いに起因していると考えられる。一方、高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下での

*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体における Mg および Ca 含量の低下は、水耕栽培系および寒天培地上での評価系の双方において観察された (図 23C、28)。このことから、植物体の地上部における Mg および Ca 含量の低下は、生育条件に関わらず、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育阻害に伴うと考えられた。

*srk2d/e/i* 三重変異体は、少なくとも試験した限りにおいて、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下特異的に生育阻害を示したが、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体は高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下の他に、高濃度の外界  $Ca^{2+}$  条件下においても、程度は弱いながら生育阻害を示した (図 29)。このことから、*CIPK26/3/9/23* は、高濃度の外界  $Ca^{2+}$  条件下における植物の生長維持にも貢献していることが示唆された。*CIPK26/3/9/23* と高濃度の  $Ca^{2+}$  との関連性をより鮮明にするために、高濃度の外界  $Ca^{2+}$  条件下における *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育阻害が水耕栽培系においても再現されるかどうかを今後検証する必要がある。

各 *cipk* 一重変異体および多重変異体を用いた高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における生育試験において、各 *cipk* 一重変異体が野生型株と同程度の生育を示したことから (図 30A)、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生育維持において、*CIPK26*、*CIPK3*、*CIPK9* あるいは *CIPK23* が重複的な機能を有していることが示された。高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下において、*cipk3/9/23* 三重変異体が野生型株と同程度の生育を示すこと、また *cipk26/3* 二重変異体が高感受性を示すこと (図 30A) を考慮すると、4 つの *CIPK* 遺伝子のうち、*CIPK26* 遺伝子が高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生育維持に最も貢献していることが推察された。

各 *snrk2* 一重変異体および多重変異体を用いた高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における生育試験において、各 *snrk2* 一重変異体および二重変異体が野生型株と同程度の生育を示し、*srk2d/e/i* 三重変異体のみが高感受性を示したことから (図 30B)、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生育維持において、*SRK2D*、*SRK2E* お

よび *SRK2I* の 3 遺伝子が重複的な機能を有していることが示された。  
*srk2d/e/i/cipk26/3/9/23* 七重変異体は、10 mM  $\text{MgCl}_2$  条件および 20 mM  $\text{MgCl}_2$  条件において、*cipk26/3/9/23* 四重変異体と同程度の生育阻害を示した（図 32）。このことから、サブクラス III SnRK2 とそれらの相互作用因子である CIPK26/3/9/23 は、共通の経路を介して高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下における植物の生長を調節していることが示唆された。

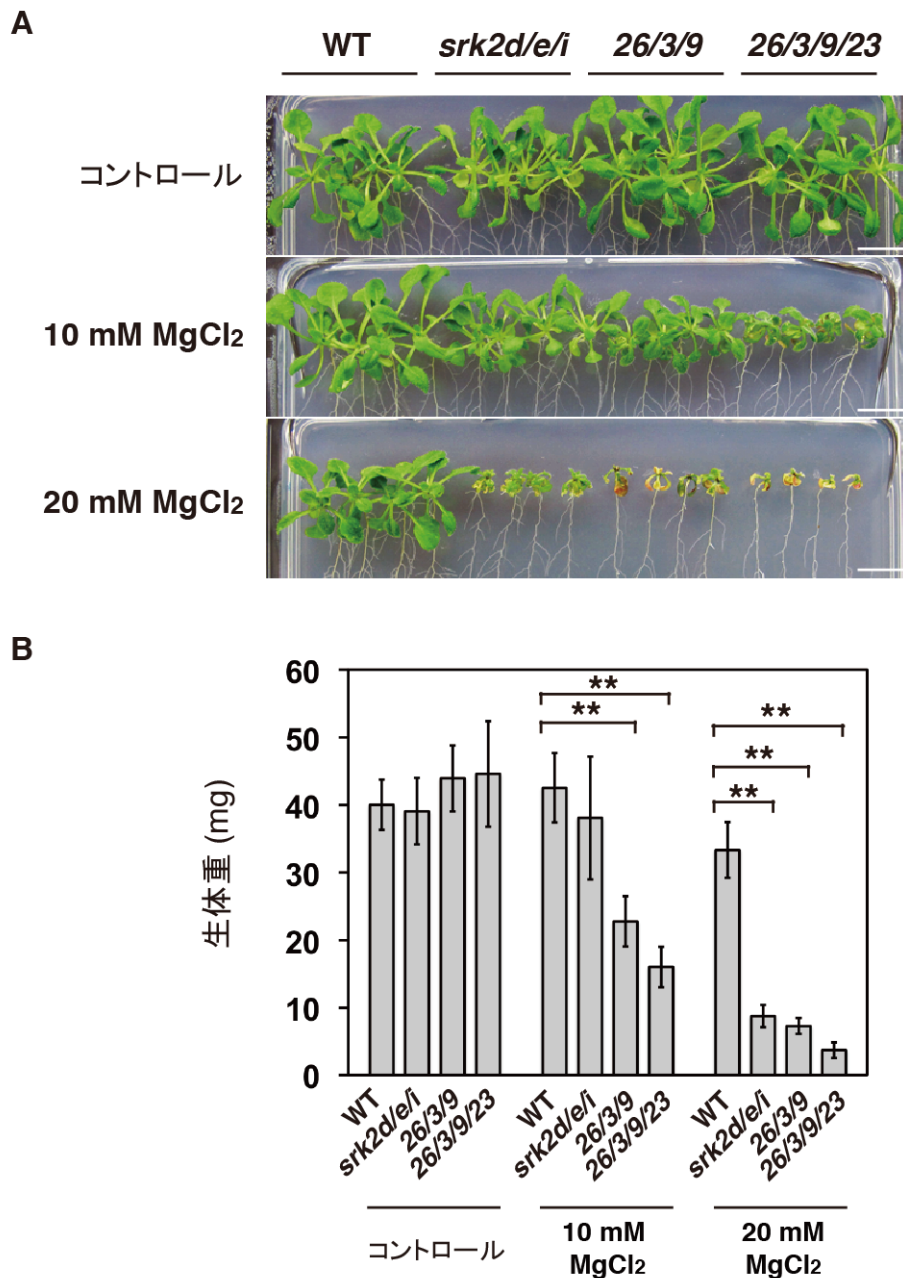


図 27. 高濃度の  $Mg^{2+}$  含有培地における *srk2d/e/i*, *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育試験

(A) 野生型株 (WT)、*srk2d/e/i*, *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体を用いた高濃度の  $MgCl_2$  に対する感受性試験。写真は、幼植物体をコントロール寒天培地（1/2\*MS 寒天培地）、10 あるいは 20 mM  $MgCl_2$  添加寒天培地に移植して、プレートを垂直に立てた状態でさらに 14 日間生育させた植物体を示す。幼植物体は発芽後 4 日目に移植した。スケールバーは 1 cm。

(B) (A) で記述したように生育させた植物体の生体重。エラーバーは標準偏差（ $n = 8$ ）を示す。バーの上側に示されたアスタリスクは、対応する平均値が同一生育条件における野生型株のそれと比較して有意に異なることを示す（\*\* $P < 0.01$ , Tukey-Kramer の多重比較検定）。同様の結果が 2 回の生物学的反復実験で得られた。代表的な結果を示す。

□ コントロール培地, ■ 20 mM MgCl<sub>2</sub> 添加培地,

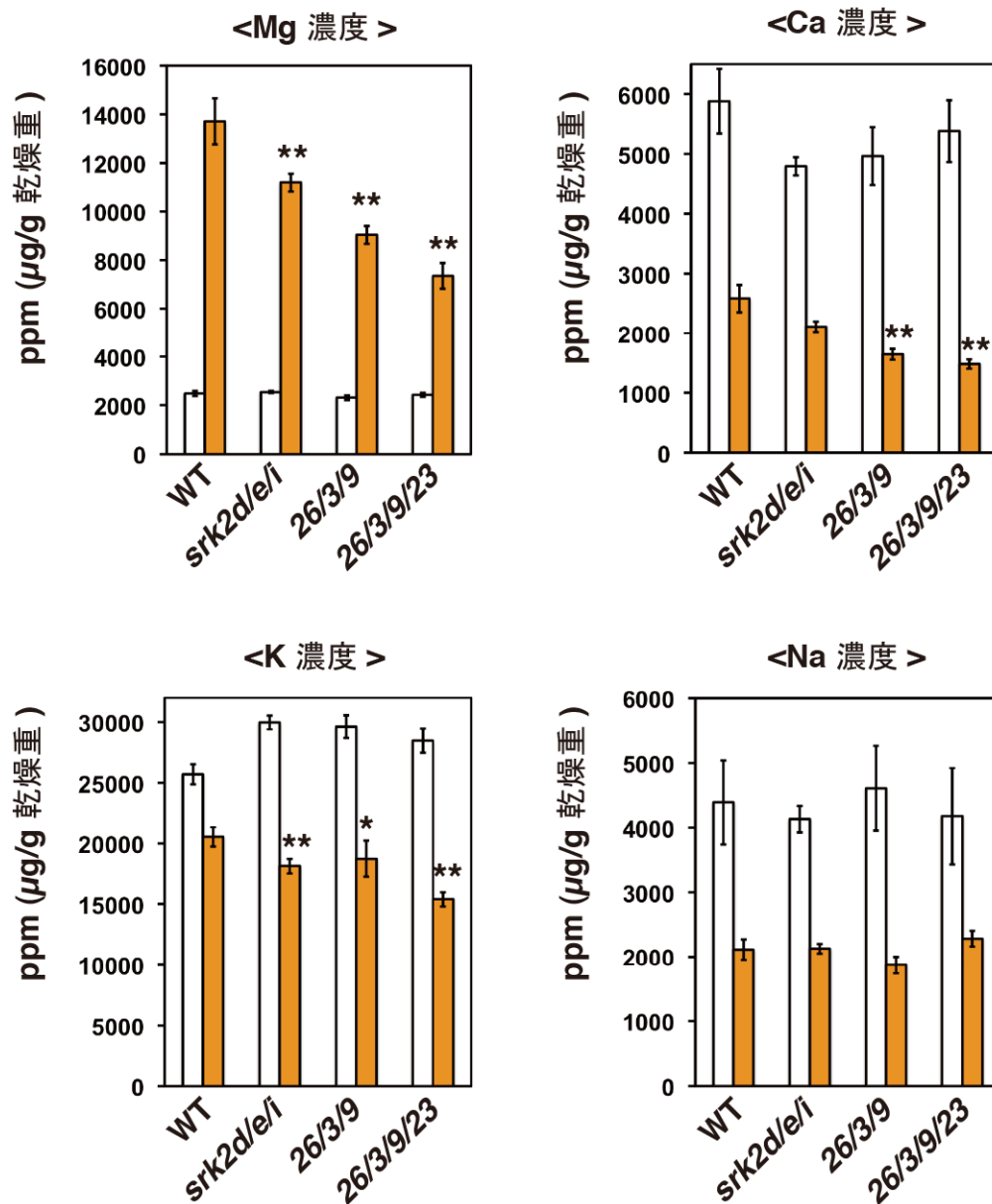


図 28. 20 mM MgCl<sub>2</sub> 含有培地において生育させた *srk2d/e/i*, *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体では Mg 含量および K 含量の有意な低下がみられる

発芽 4 日後の幼植物体をコントロール寒天培地 (1/2\*MS 寒天培地) あるいは 20 mM MgCl<sub>2</sub> 含有培地に移植して、プレートを垂直に立てた状態でさらに 12 日間生育させた。得られた植物体の地上部由来のサンプルを ICP-MS 解析に供し、地上部における Mg, Ca, K, Na 含量の測定をおこなった。1 サンプルあたり、4 個体由来の地上部を含む。データは平均値と標準偏差 (n = 6) を示す。バーの上側に示されたアスタリスクは、対応する平均値が同一生育条件における野生型株 (WT) のそれと比較して有意に異なることを示す (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, Tukey-Kramer の多重比較検定)。硝酸分解によるサンプル調製は最上惇郎によって、ICP-MS 解析は西田翔博士によっておこなわれた。



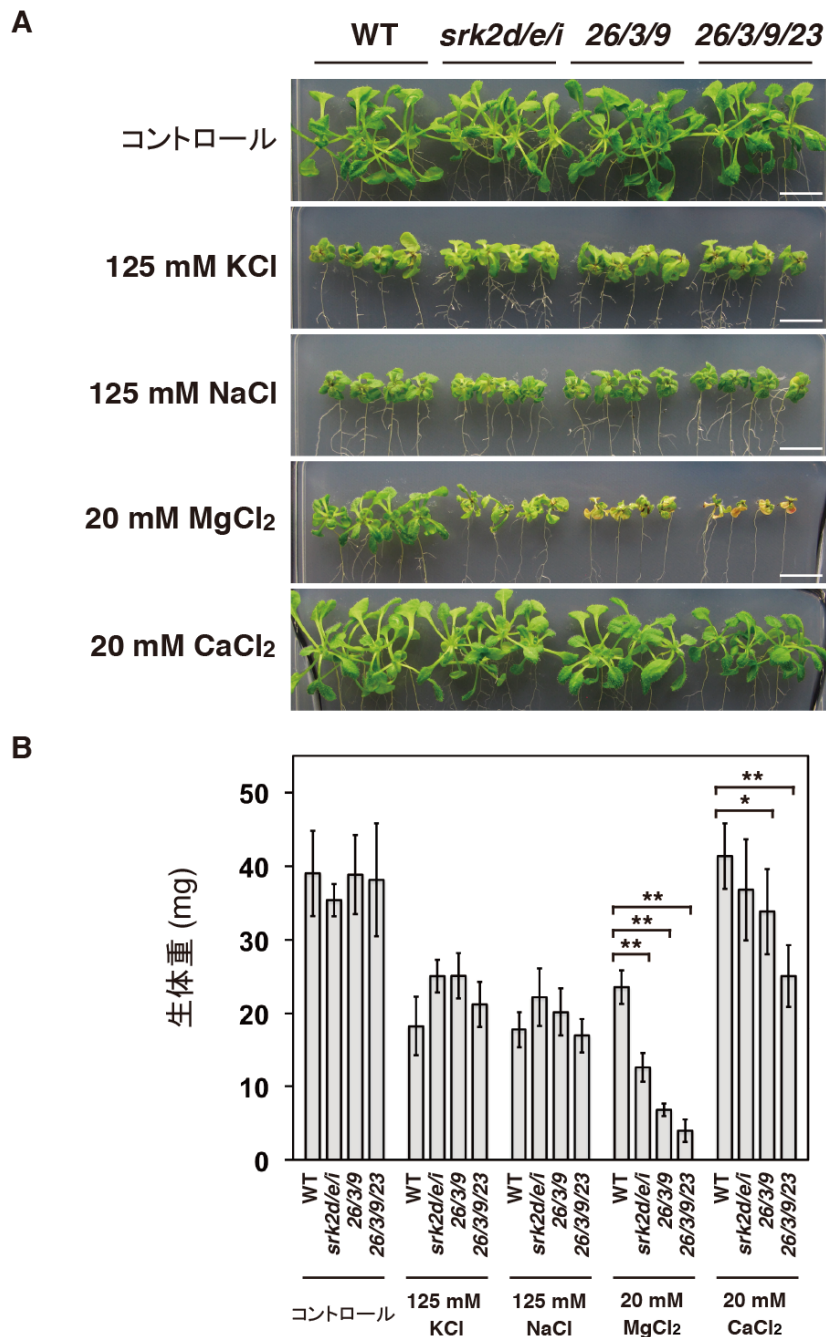


図 29. 高濃度の  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  あるいは  $Ca^{2+}$  含有培地における *srk2d/e/i*, *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育試験

(A) 野生型株 (WT)、*srk2d/e/i*, *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体を用いた高濃度の KCl, NaCl,  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  に対する感受性試験。写真は、幼植物体をコントロール寒天培地 ( $1/2 \times MS$  寒天培地)、125 mM KCl, 125 mM NaCl, 20 mM  $MgCl_2$  あるいは 20 mM  $CaCl_2$  添加寒天培地に移植して、プレートを垂直に立てた状態でさらに 14 日間生育させた植物体を示す。幼植物体は発芽後 4 日目に移植した。スケールバーは 1 cm。

(B) (A) で記述したように生育させた植物体の生体重。エラーバーは標準偏差 ( $n = 6$ ) を示す。バーの上側に示されたアスタリスクは、対応する平均値が同一生育条件における野生型株のそれと比較して有意に異なることを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Tukey-Kramer の多重比較検定)。

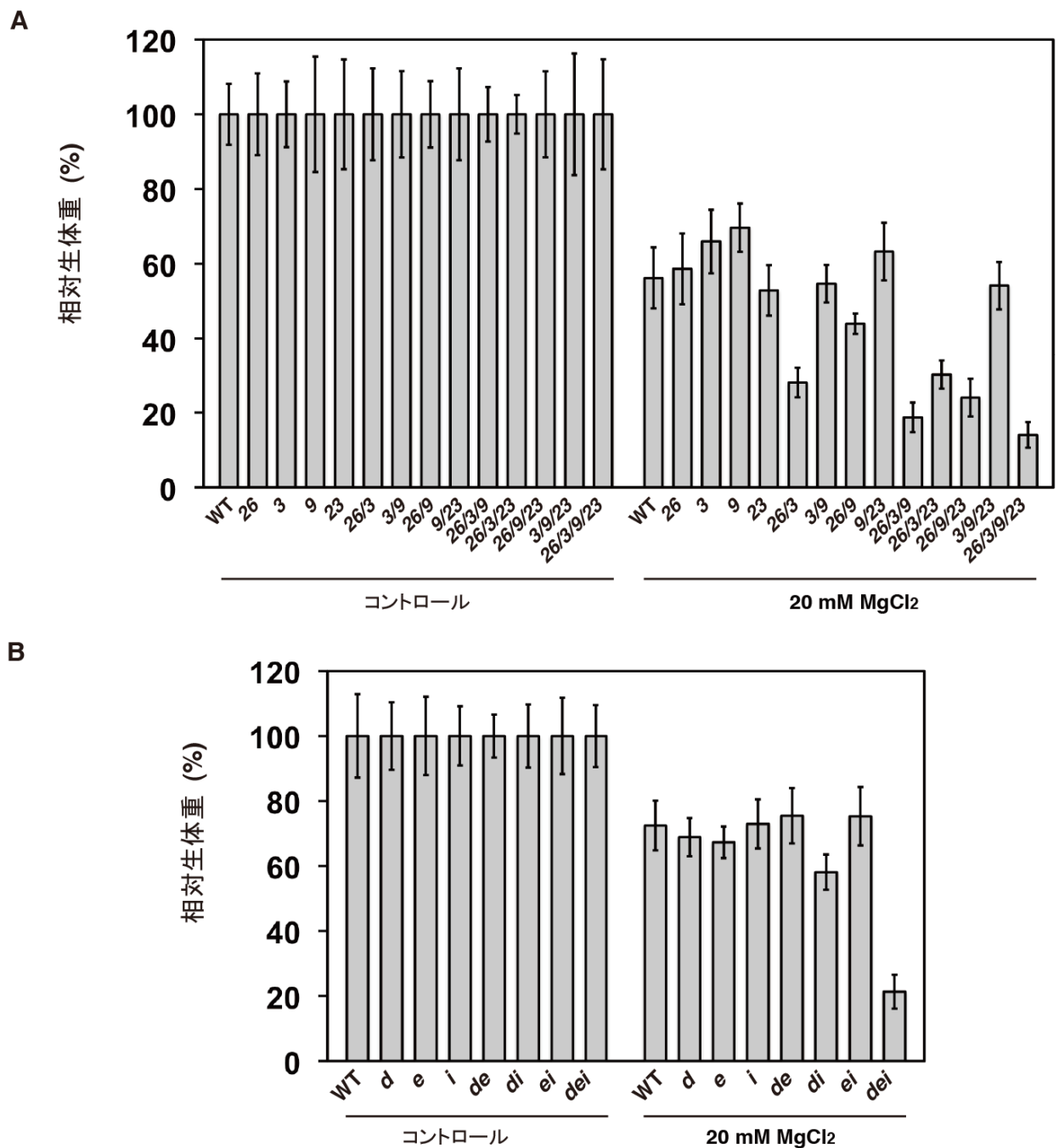
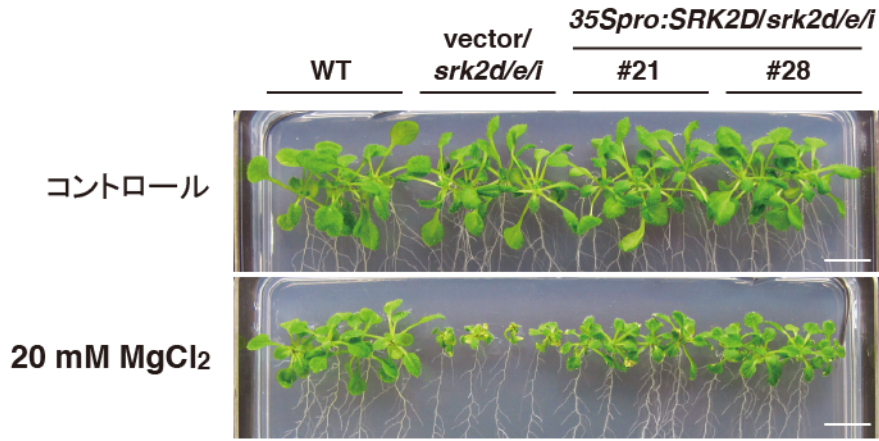


図 30. 高濃度の  $Mg^{2+}$  含有培地における *cipk* 一重変異体および多重変異体、あるいは *snrk2* 一重変異体および多重変異体の生育試験

(A) 野生型株 (WT)、*cipk* 一重変異体および多重変異体を用いた高濃度の  $MgCl_2$  に対する感受性試験。発芽後 4 日の幼植物体をコントロール寒天培地 (1/2\*MS 寒天培地) あるいは 20 mM  $MgCl_2$  添加寒天培地に移植してプレートを垂直に立てた状態でさらに 14 日間生育させた。試験後の植物体の相対生体重 (%) を示す。コントロール寒天培地上で生育させた各植物体の生体重の値を 100% として示す。エラーバーは標準偏差 ( $n=6$ ) を示す。同様の結果が 2 回の生物学的反復実験で得られた。代表的な結果を示す。

(B) 野生型株、*snrk2* 一重変異体および多重変異体を用いた高濃度の  $MgCl_2$  に対する感受性試験。感受性試験は (A) と同様におこなった。試験後の植物体の相対生体重 (%) を示す。コントロール寒天培地上で生育させた各植物体の生体重の値を 100% として示す。エラーバーは標準偏差 ( $n=8$ ) を示す。

A



B

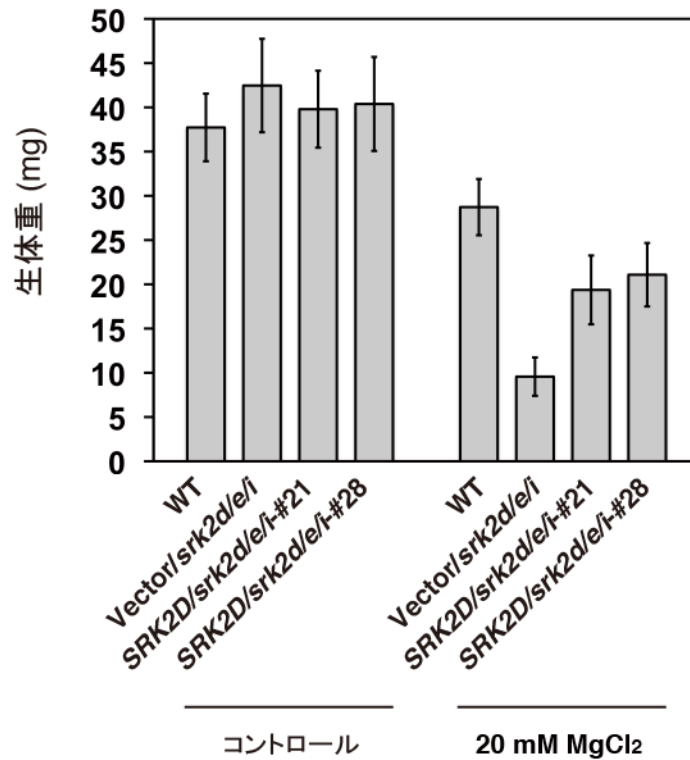
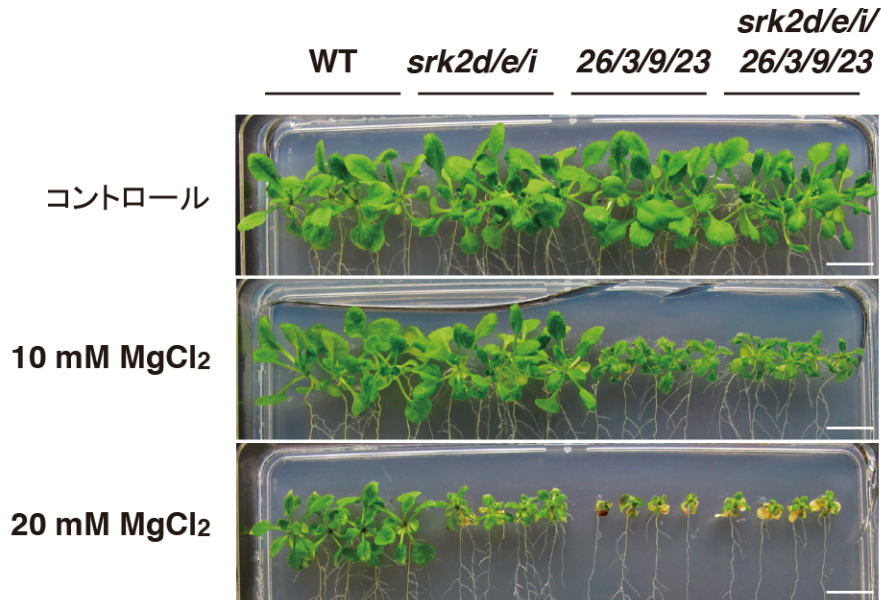


図 31. *SRK2D* 遺伝子の発現による *srk2d/e/i* 三重変異体の高濃度の  $Mg^{2+}$  に対する高感受性の部分的な回復

(A) 野生型株 (WT)、*srk2d/e/i* 三重変異体、*SRK2D* 発現ライン (*srk2d/e/i* 三重変異体遺伝的背景) を用いた高濃度の  $MgCl_2$  に対する感受性試験。写真は、幼植物体をコントロール寒天培地 (1/2\*MS 寒天培地) あるいは 20 mM  $MgCl_2$  添加寒天培地に移植して、プレートを垂直に立てた状態でさらに 14 日間生育させた植物体を示す。幼植物体は発芽後 4 日目に移植した。スケールバーは 1 cm。

(B) (A) で記述したように生育させた植物体の生体重。エラーバーは標準偏差 ( $n = 12$ ) を示す。

A



B

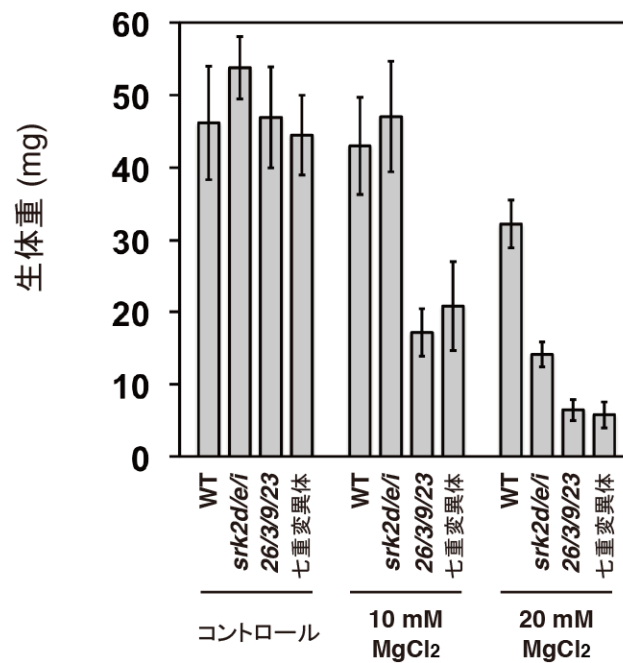


図 32. *srk2d/e/i/cipk26/3/9/23* 七重変異体を用いた高濃度の Mg<sup>2+</sup> 含有培地における生育試験

(A) 野生型株 (WT)、*srk2d/e/i* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体および *srk2d/e/i/cipk26/3/9/23* 七重変異体を用いた高濃度の MgCl<sub>2</sub> に対する感受性試験。写真は、幼植物体をコントロール寒天培地 (1/2\*MS 寒天培地)、10 あるいは 20 mM MgCl<sub>2</sub> 添加寒天培地に移植して、プレートを垂直に立てた状態でさらに 14 日間生育させた植物体を示す。幼植物体は発芽後 4 日目に移植した。スケールバーは 1 cm。

(B) (A) で記述したように生育させた植物体の生体重。エラーバーは標準偏差 (n = 8) を示す。同様の結果が 2 回の生物学的反復実験で得られた。代表的な結果を示す。

## 第3章 第2節 $\text{Mg}^{2+}$ 感受性調節における ABA の役割

### III-2-1. 序論

第3章 第1節において、サブクラス III SnRK2 の機能欠損変異体、*srk2d/e/i* 三重変異体が高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件に高感受性を示すことを明らかにした (図 27)。本節では、サブクラス III SnRK2 が、どのようなシグナル伝達経路を介して高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  に対する感受性を調節しているのかについて洞察を得ることを目的とした。ABA シグナル伝達において、サブクラス III SnRK2 は ABA の下流に位置し、ABA 依存的に活性化を受ける (Boudsocq et al., 2004)。活性化されたサブクラス III SnRK2 は AREB/ABF 転写因子群などの下流の標的因子をリン酸化し、それらの活性を調節する (Kobayashi et al., 2005、Furihata et al., 2006)。

本節では、サブクラス III SnRK2 の上流に位置する ABA 生合成系、およびサブクラス III SnRK2 の下流で機能する AREB/ABF 転写因子群に着目した。まず、ABA 生合成欠損変異体を用いて、高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下での生長調節における ABA の役割を評価した。さらに、サブクラス III SnRK2 の多くの下流的流遺伝子群の発現制御を担う AREB/ABF 転写因子群、AREB1、AREB2 および ABF3 を欠損した *areb1/areb2/abf3* 三重変異体 (Yoshida et al., 2010) を用いて、高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下での生長調節と、AREB/ABF を介した転写制御系との関連性について評価した。

### **III-2-2. 方法**

#### **1. 寒天培地を用いた高濃度の外界 $Mg^{2+}$ 条件下における植物の生育試験**

II-2-9-2.の方法と同様におこなった。

#### **2. ABA を含む寒天培地を用いた高濃度の外界 $Mg^{2+}$ 条件下における植物の生育試験**

1.2%の Bacto Agar で固化した GM 寒天培地に各植物体の種子を播種して 4°C で 3 日間低温処理した。その後、プレートを垂直に立てた状態で明期 ( $60 \pm 10 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) 16 時間/暗期 8 時間、22°C 条件の育成室内で 4 日間生育させた。発芽後 4 日目の幼植物体を、20 mM  $MgCl_2$  あるいは 1  $\mu\text{M}$  ( $\pm$ ) ABA 含有 1/2\*MS 寒天培地 (1%スクロースを含み、1.2%の Bacto Agar で固化) に移植し、プレートを垂直に立てた状態で明期 ( $60 \pm 10 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) 16 時間/暗期 8 時間、22°C 条件の育成室内でさらに 14 日間生育させた。植物体の写真を撮影後、各植物体の生体重を測定した。

### III-2-3. 結果

ABA 生合成欠損変異体である *aba2-1* 変異体 (Léon-Kloosterziel et al., 1996) および *nced3-2* 変異体 (Endo et al., 2008、Urano et al., 2009) を解析に供した。*aba2-1* 変異体では、キサントキシンをアブシシンアルデヒドへ変換する主要なショートチェーンデヒドロゲナーゼ/リダクターゼ (SDR) であると考えられている ABA2 をコードする遺伝子の機能が欠損しており、通常条件下において内生の ABA 量が野生型株のそれと比較して 20% 以下にまで減少している (Léon-Kloosterziel et al., 1996)。また、*aba2-1* 変異体では、野生型株でみられる乾燥ストレスに応答した内生 ABA 量の顕著な増加がみられない (Léon-Kloosterziel et al., 1996)。*nced3-2* 変異体では、9'-*cis*-ビオラキサンチンあるいは 9'-*cis*-ネオキサンチンを酸化的開裂反応によりキサントキシンを産生する反応を触媒する 9'-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼのひとつである NCED3 をコードする遺伝子の機能が欠損しており、通常条件下では野生型株と同程度の内生 ABA 量を有するが、野生型株でみられる乾燥ストレスに応答した内生 ABA 量の顕著な増加がこの変異体ではみられないことが報告されている (Endo et al., 2008、Urano et al., 2009)。

*aba2-1* 変異体および *nced3-2* 変異体の高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における生育を評価した (図 33)。高濃度の  $MgCl_2$  条件 (20 mM  $MgCl_2$ ) において、*aba2-1* 変異体は *srk2d/e/i* 三重変異体と同様に生育阻害を示した (図 33A)。一方、*nced3-2* 変異体は野生型株 (WT) と同様の生育を示した (図 33A)。これらの結果は、生育後の植物体の生体重を測定した結果によって支持された (図 33B)。

次に、*areb1/areb2/abf3* 三重変異体の高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における生育を評価した (図 33)。高濃度の  $MgCl_2$  条件 (20 mM  $MgCl_2$ ) で生育させた *areb1/areb2/abf3* 三重変異体は野生型株と同様の生育を示した (図 33A)。これらの結果は、生育後の植物体の生体重を測定した結果によって支持された (図 33B)。

次に、*aba2-1* 変異体で観察される高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  に対する高感受性が内在性の ABA 量の低下に起因するかどうかを明らかにするために、ABA の外生投与により *aba2-1* 変異体で観察される高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  に対する高感受性が回復するかどうかを検証した (図 34)。20 mM  $\text{MgCl}_2$  および 1  $\mu\text{M}$  ABA を含む培地 (20 mM  $\text{MgCl}_2$  + 1  $\mu\text{M}$  ABA 条件) 上で生育させた *aba2-1* 変異体では、ABA を含まない 20 mM  $\text{MgCl}_2$  含有培地 (20 mM  $\text{MgCl}_2$  + EtOH 条件) 上で生育させた *aba2-1* 変異体と比較して生育障害の緩和が観察された (図 34A)。一方、*srk2d/e/i* 三重変異体では ABA の添加による生育障害の緩和は観察されなかった (図 34A)。生育後の植物体の生体重を測定したところ、両条件間における *aba2-1* 変異体の生体重に有意な差が検出された (図 34B)。以上より、*aba2-1* 変異体で観察される高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  に対する高感受性は、この変異体における内生の ABA 量の低下に起因していることが示唆された。



### III-2-4. 考察

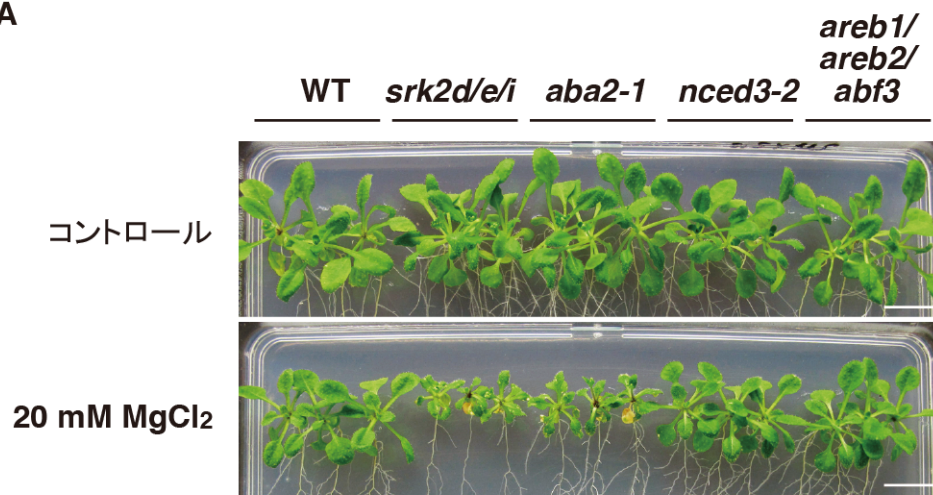
ABA 生合成欠損変異体である *aba2-1* 変異体が高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件に高感受性を示すこと、およびこの高感受性が ABA の添加により回復することを示した (図 33、34)。この発見により、シロイヌナズナにおいて高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下で ABA が植物の生育を調節していることが明らかになった。*aba2-1* 変異体とは対照的に、*nced3-2* 変異体では高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する高感受性が観察されなかった (図 33)。このことは、乾燥ストレスに応答して NCED3 依存的に誘導される内生 ABA 量の増加は、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  における生長調節とは関係していないことを示している。シロイヌナズナのゲノムには、9'-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼをコードする遺伝子が *NCED3* 遺伝子以外にも存在しているため (Tan et al., 2003、Frey et al., 2012)、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下において、他の遺伝子にコードされる 9'-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼによって ABA の生合成が進められていると推察される。

通常生育条件下において内生の ABA 量が減少している *aba2-1* 変異体において高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する高感受性が観察された結果 (図 33) は、基底レベルの内生の ABA が、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生長調節において機能している可能性を示している。最近、基底レベルの内生 ABA が、孔辺細胞への分化の初期段階で機能しており、最終的な気孔密度を調節していることが報告された (Tanaka et al., 2013)。このことから、サブクラス III SnRK2 を介した遺伝子発現制御や気孔閉鎖が誘導されない程度の基底レベルの内生 ABA が、他に何らかの生理機能を有していることは十分に考えられる。一方、現時点では高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下で生育させた植物体において内生の ABA 量が増加している可能性を否定できないため、今後、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下で生育させた植物体における内生の ABA 量を測定することで、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生長調節においてどの程度のレベルの ABA 蓄積が必要なのか、明らかにされると期待される。

サブクラス III SnRK2 の下流遺伝子群の多くの発現制御を担うことが示されている AREB/ABF 転写因子群の変異体、*areb1/areb2/abf3* 三重変異体は、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下において野生型株と同程度の生育を示した (図 33)。この結果は、サブクラス III SnRK2 および AREB/ABF 転写因子群を介した遺伝子発現の制御経路である“SnRK2-AREB/ABF 経路” (Fujita et al., 2011) が、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生長調節とは関係していないことを示唆している。

本節で提示された実験結果により、ABA2 を介して合成される内生の ABA が、“SnRK2-AREB/ABF 経路”を介した転写制御経路とは独立して、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生長の調節において重要な役割を果たしていることが示唆された。

A



B

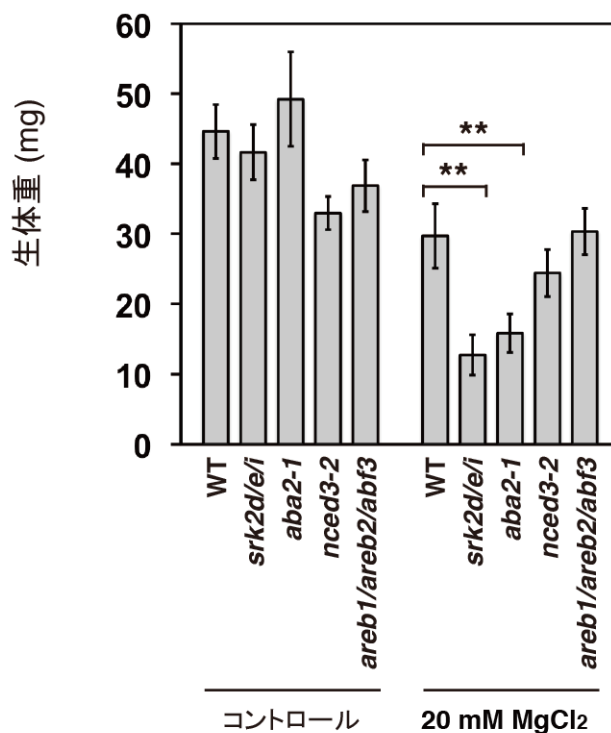
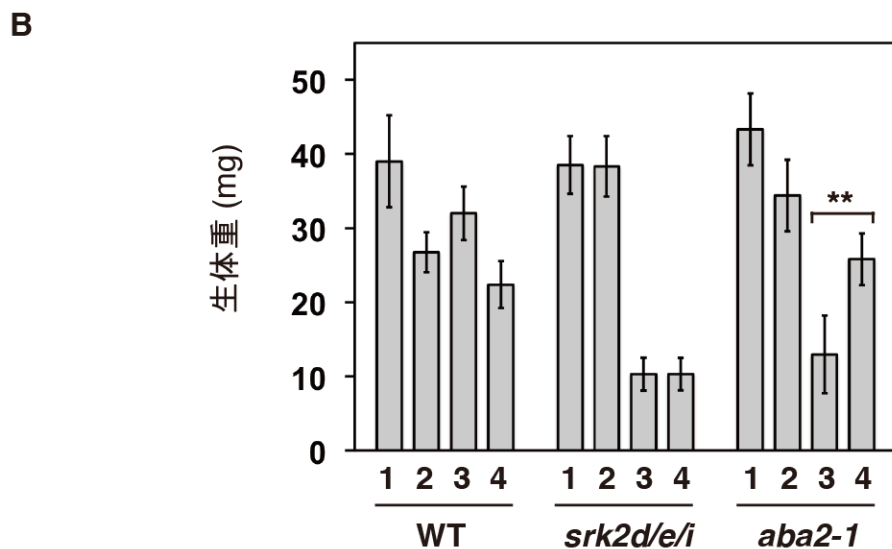
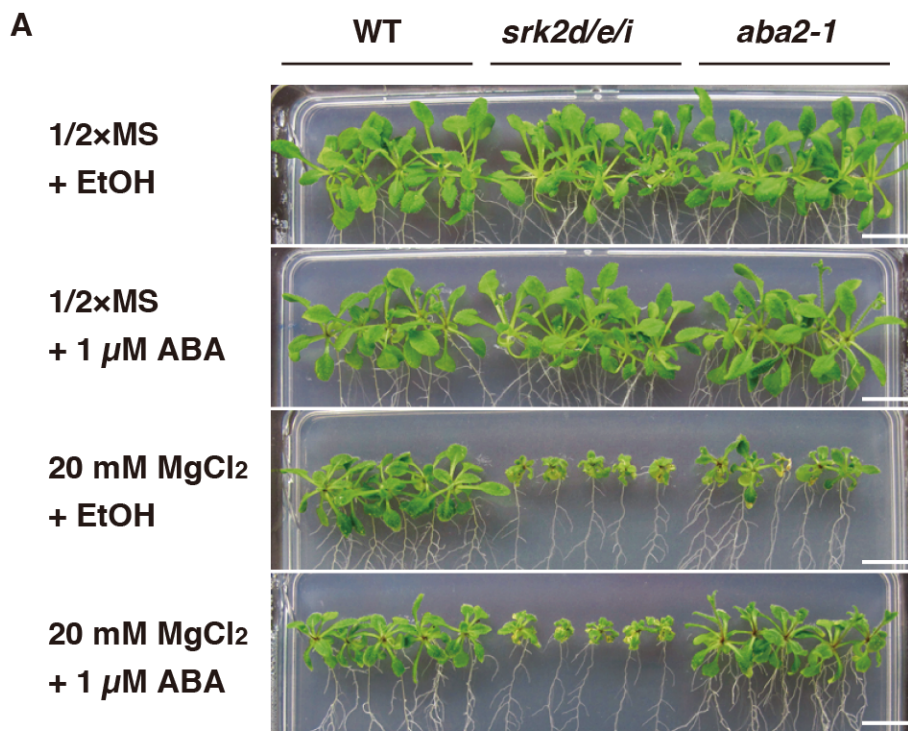


図 33. 高濃度の  $Mg^{2+}$  含有培地における ABA 生合成変異体 (*aba2-1*, *nced3-2*) および *areb1/areb2/abf3* 三重変異体の生育試験

(A) 野生型株 (WT)、*srk2d/e/i* 三重変異体、ABA 生合成変異体 (*aba2-1* あるいは *nced3-2*) および *areb1/areb2/abf3* 三重変異体を用いた高濃度の  $MgCl_2$  に対する感受性試験。写真は、幼植物体をコントロール寒天培地 (1/2\*MS 寒天培地) あるいは 20 mM  $MgCl_2$  添加寒天培地に移植して、プレートを垂直に立てた状態でさらに 14 日間生育させた植物体を示す。幼植物体は発芽後 4 日目に移植した。スケールバーは 1 cm。

(B) (A) で記述したように生育させた植物体の生体重。エラーバーは標準偏差 ( $n = 9$ ) を示す。バーの上側に示されたアスタリスクは、対応する平均値が同一生育条件における野生型株のそれと比較して有意に異なることを示す (\*\* $P < 0.01$ , Tukey-Kramer の多重比較検定)。同様の結果が 2 回の生物学的反復実験で得られた。代表的な結果を示す。



1; 1/2×MS + EtOH, 2; 1/2×MS + 1 μM ABA

3; 20 mM MgCl<sub>2</sub> + EtOH, 4; 20 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 μM ABA

図 34. ABA の添加による高濃度の外界 Mg<sup>2+</sup> 条件下における *aba2-1* 変異体の生育阻害からの回復試験

(A) 外生の ABA 添加が野生型株 (WT)、*srk2d/e/i* 三重変異体および *aba2-1* 変異体の高濃度の Mg<sup>2+</sup> に対する感受性に与える影響の評価。写真は、発芽後 4 日目の幼植物体を図示した寒天培地に移植して、プレートを垂直に立てた状態でさらに 14 日間生育させた植物体を示す。対照実験では、等量のエタノール (ABA の溶媒) を培地に添加した。スケールバーは 1 cm。

(B) (A) で記述したように生育させた植物体の生体重。エラーバーは標準偏差 (n = 10) を示す。バーの上側に示されたアスタリスクは、対応する 2 つの平均値が有意に異なることを示す (\*\*P < 0.01, Tukey-Kramer の多重比較検定)。同様の結果が 2 回の生物学的反復実験で得られた。代表的な結果を示す。

### 第3章 第3節 SRK2D と CIPK26 の分子レベルでの関連性およびそれらの標的基質の探索

#### III-3-1. 序論

第3章 第1節において、サブクラス III SnRK2 と CIPK26/3/9/23 の双方が高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生育維持において重要な役割を果たしていることが示された (図 23、27)。また、サブクラス III SnRK2 と CIPK26/3/9/23 が共通の経路を介して高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する感受性を調節していることが示唆された (図 32)。しかしながら、現時点ではサブクラス III SnRK2 および CIPK26/3/9/23 が、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生長をどのように調節しているのかについては明らかにされていない。

まず、サブクラス III SnRK2 および CIPK26/3/9/23 が分子レベルでどのように関連しているのかを明らかにするために、試験管内リン酸化反応系を用いて CIPK26 による SRK2D のリン酸化、あるいは SRK2D による CIPK26 のリン酸化が起こり得るかどうかを評価した。

次に、サブクラス III SnRK2 および CIPK26/3/9/23 が Ser/Thr プロテインキナーゼであることから、これらが“調節因子”として機能しており、 $Mg^{2+}$  に対する感受性調節を直接担う“機能的因子”をリン酸化し、それら因子の活性等を調節することで機能を果たしているという仮説をたて、サブクラス III SnRK2 および CIPK26/3/9/23 の標的基質の探索をおこなった。まず、サブクラス III SnRK2 あるいは CIPK26/3/9/23 の下流で  $Mg^{2+}$  に対する感受性調節において機能している可能性が考えられる因子の変異体の表現型解析をおこなった。候補因子として、液胞膜局在液胞型 ATP アーゼ (V-ATPase) に着目した。

多くの無機イオンや代謝産物などの液胞への蓄積は、2つのプロトンポンプ、すなわち液胞型 ATP アーゼ (V-ATPase) と液胞型  $H^+$ -ピロフォスファターゼ (V-PPase) によって形成される電気化学ポテンシャル差に支えられた二次性能

動輸送によってなされる。興味深いことに、液胞膜局在 V-ATPase のサブユニットの一つである VHA-a を構成する因子をコードする *VHA-A2* および *VHA-A3* 遺伝子の双方を欠損した *vha-a2 vha-a3* 二重変異体において、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体と同様の生育表現型、すなわち土植え時の生育阻害およびロゼット葉の先端部および花芽の黄化が報告されている (Krebs et al., 2010)。*vha-a2 vha-a3* 二重変異体では液胞膜上の V-ATPase 活性が大きく低下しているため、液胞への  $H^+$  輸送能が低下しており、液胞内の pH が上昇している (野生型株; pH 5.9 に対し、変異体; pH 6.4、Krebs et al., 2010)。これら変異体の類似した生育表現型を考慮し、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育阻害が、少なくとも一部分において液胞膜上の V-ATPase 活性の低下に起因している可能性を考えた。そこで、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における *vha-a2 vha-a3* 二重変異体の生育を評価し、液胞膜上の V-ATPase 活性の低下が高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する感受性に与える影響を評価した。

また、サブクラス III SnRK2 あるいは CIPK26/3/9/23 と物理的に相互作用し得る下流標的の候補を探索し、候補として同定された因子が SRK2D あるいは CIPK26 によって試験管内リン酸化反応系でリン酸化されるかどうかを検証した。

Mitochondrial RNA splicing (MRS) ファミリーに属する  $Mg^{2+}$  トランスポーターは、出芽酵母、哺乳類細胞および植物において  $Mg^{2+}$  輸送を担っており、 $Mg^{2+}$  恒常性の維持において重要な役割を果たしている (Kolisek et al., 2003、Pisat et al., 2009、Conn et al., 2011a、Lenz et al., 2013)。シロイヌナズナにおいて、液胞膜に局在する MRS2-1/MGT2、あるいは MRS2-5/MGT3 の欠損により、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下において液胞への  $Mg^{2+}$  の隔離能が低下することが報告されている (Conn et al., 2011a)。本章では、MRS ファミリーに属する  $Mg^{2+}$  トランスポーターが CIPK26 あるいは SRK2D の標的となり得るかどうかを解析した。

### III-3-2. 方法

#### 1. 試験管内リン酸化反応系を用いたタンパク質のリン酸化試験

##### 1-1. pGEX-4T-2-CIPK26、CIPK26<sup>K42N</sup>、MRS2-5 および pMALc2X-SRK2D、SRK2D<sup>K52N</sup> の作製

CIPK26-K42N-Rev および CIPK26-K42N-For プライマーペア（表 5）を用いた Inverse PCR により、*CIPK26* 断片に対して部位特異的変異導入をおこない、*CIPK26*<sup>K42N</sup>断片を作出した。Inverse PCR による部位特異的変異導入は Imai et al., 1991 の方法に従った。*CIPK26* および *CIPK26*<sup>K42N</sup>の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*Sma*I で消化した PCR 産物を pGEX-4T-2（GE ヘルスケア・ジャパン）の *Sma*I 部位に挿入して pGEX-4T-2-CIPK26、CIPK26<sup>K42N</sup>を得た。MRS2-5 の N 末端側断片をコードする領域を PCR により増幅した。*Sma*I で消化した PCR 産物を pGEX-4T-2 の *Sma*I 部位に挿入して pGEX-4T-2-MRS2-5 を得た。

SRK2D-K52N-Rev および SRK2D-K52N-For プライマーペア（表 5）を用いた Inverse PCR により、*SRK2D* 断片に対して部位特異的変異導入をおこない、*SRK2D*<sup>K52N</sup>断片を作出した。*SRK2D* および *SRK2D*<sup>K52N</sup>の全長翻訳領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。*Sal*I および *Pst*I で消化した PCR 産物を pMALc2x ベクター（New England Biolabs）の *Sal*I-*Pst*I 部位に挿入して pMALc2X-SRK2D、SRK2D<sup>K52N</sup>を得た。

##### 1-2. GST 融合、あるいは MBP 融合組換えタンパク質の発現、精製

pGEX-4T-2 ベクターに基づいたプラスミド、あるいは pMALc2X ベクターに基づいたプラスミドを用いて *Escherichia coli* BL21-Gold 株 (DE3; Agilent Technologies)を形質転換した。形質転換体は、200 mg/L のアンピシリンナトリウムを含む LB 寒天培地上で選抜した。形質転換体を 37°C でアンピシリン含有 2×YT 液体培地 [16 g/L Bacto Tryptone (BD Biosciences)、10 g/L Bacto Yeast extract

(BD Biosciences)、5 g/L 塩化ナトリウム、pH 7.0 (NaOH)、200 mg/L アンピシリンナトリウム (明治製菓)]を用いて OD<sub>600</sub> = 1.0 に達するまで増殖させて、終濃度 0.1 mM になるように Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 溶液を加え、16°C で一晩振とう培養した。glutathione S-transferase (GST) 融合組換えタンパク質の精製では、培養後の菌体からタンパク質を抽出し、glutathione sepharose 4B (GE ヘルスケア・ジャパン) を用いて GST 融合組換えタンパク質の精製をおこなった。タンパク質の抽出および GST 融合組換えタンパク質の精製は付属の方法に従った。maltose-binding protein (MBP) 融合組換えタンパク質の精製では、培養後の菌体からタンパク質を抽出し、amylose resin (New England Biolabs) を用いて MBP 融合組換えタンパク質の精製をおこなった。タンパク質の抽出および MBP 融合組換えタンパク質の精製は付属の方法に従った。

### 1-3. 試験管内リン酸化反応

プロテインキナーゼアッセイ buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.5)、100 mM NaCl、5 mM MnSO<sub>4</sub>、0.5 mM CaCl<sub>2</sub>、2 mM DTT、10 μM ATP、10 μCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP] を含む 15 μL 反応系において、組換えタンパク質あるいはミエリン塩基性タンパク質を反応させた。リン酸化反応は 30°C で 60 分間おこない、5 μL の 4×SDS-PAGE サンプルバッファー[200 mM Tris-HCl (pH6.8)、8 mM EDTA、4% (w/v) SDS、0.2% (w/v) ブロモフェノールブルー、20% (v/v) 2-メルカプトエタノール、40% (v/v) グリセロール]を加えて 95°C で 3 分間処理することで、反応を停止させた。リン酸化反応後のタンパク質溶液を SDS-PAGE に供し、その後ゲルを乾燥させてイメージングプレート(BAS-MS、富士フィルム)に 1 日間さらした。放射性標識されたリン酸残基の取り込みは、FLA-5000 (富士フィルム) を用いたオートラジオグラフィーによって可視化した。反応に供したタンパク質レベルは泳動後のゲルの Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色によって確認した。



## 2. *vha2 vha-a3* 二重変異体の作出

II-2-1.の方法と同様におこなった。*VHA-A2* の機能欠損変異体 *vha-a2* (SALK\_142642C; Col-0 ecotype) と *VHA-A3* の機能欠損変異体 *vha-a3* (CS859757; Col-0 ecotype) とを交配することにより、*vha2 vha-a3* 二重変異体を作出した。各遺伝子の T-DNA 挿入は、表 5 に示すプライマーを用いた各植物のゲノム DNA を鋳型とする PCR により確認した。

## 3. 寒天培地を用いた高濃度の外界 $Mg^{2+}$ 条件下における植物の生育試験

II-2-9-2.の方法と同様におこなった。

## 4. 寒天培地を用いた高濃度の外界 $Zn^{2+}$ 条件下における植物の生育試験

1.2%の Bacto Agar で固化した GM 寒天培地に各植物体の種子を播種して 4°C で 3 日間低温処理した。その後、プレートを垂直に立てた状態で明期 ( $60 \pm 10 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) 16 時間/暗期 8 時間、22°C 条件の育成室内で 4 日間生育させた。150  $\mu\text{M}$   $ZnCl_2$  含有 1/10\*MS 寒天培地 (0.5%スクロースを含み、1.2%の Bacto Agar で固化) に発芽後 4 日目の幼植物体を移植し、プレートを垂直に立てた状態で明期 ( $60 \pm 10 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) 16 時間/暗期 8 時間、22°C 条件の育成室内でさらに 14 日間生育させた。植物体の写真を撮影後、各植物体の生体重を測定した。

## 5. 酵母ツーハイブリッド法による物理的相互作用の解析

### 5-1. MRS2-1、MRS2-3、MRS2-5 あるいは MRS2-7 の N 末端側断片を pGBKT7 ベクターに挿入したプラスミドの作製

MRS2-1、MRS2-3、MRS2-5 あるいは MRS2-7 の N 末端側断片をコードする領域を PCR により増幅した。*SmaI* で消化した PCR 産物を pGBKT7 の平滑末端化した *BamHI* 部位に挿入して、pGBKT7-MRS2-1、MRS2-3、MRS2-5、MRS2-7 を得た。

## 5-2. 酵母ツーハイブリッドアッセイ

I-1-2-9-2.の方法と同様におこなった。

### III-3-3. 結果

SRK2D と CIPK26 の分子レベルでの機能的関連性を明らかにするために、試験管内リン酸化反応系において SRK2D の CIPK26 によるリン酸化あるいは CIPK26 の SRK2D によるリン酸化が起こり得るかどうかを評価した(図 35、36)。マルトース結合タンパク質(MBP)融合 SRK2D 組換えタンパク質(SRK2D-MBP)およびグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合 CIPK26 組換えタンパク質 (CIPK26-GST) は、試験管内リン酸化反応系においてそれぞれ自己リン酸化活性およびミエリン塩基性タンパク質 (Myelin basic protein) に対するプロテインキナーゼ活性を示した (図 35、レーン 1、3、6 および 8)。SRK2D-MBP および CIPK26-GST の自己リン酸化活性により、SRK2D と CIPK26 間のリン酸残基転移反応を評価することが難しいため、自己リン酸化活性を欠損した活性欠損型 SRK2D-MBP および CIPK26-GST の作出を試みた。CIPK26 の 42 番目のリジン残基および SRK2D の 52 番目のリジン残基は、多くのプロテインキナーゼにおいてよく保存されており、そのキナーゼ活性に必要不可欠なリジン残基 (Hanks et al., 1988) に対応する。CIPK26 の 42 番目のリジン残基をアスパラギン酸残基に置換した組換えタンパク質 (CIPK26<sup>K42N</sup>-GST)、あるいは SRK2D の 52 番目のリジン残基をアスパラギン酸残基に置換した組換えタンパク質 (SRK2D<sup>K52N</sup>-MBP) は、試験管内リン酸化反応系において自己リン酸化活性およびミエリン塩基性タンパク質に対するプロテインキナーゼ活性を欠損していることが確認された (図 35、レーン 2、4、7 および 9)。そこで、CIPK26<sup>K42N</sup>-GST あるいは SRK2D<sup>K52N</sup>-MBP を基質とする試験管内リン酸化反応をおこなった (図 36)。

その結果、SRK2D-MBP による CIPK26<sup>K42N</sup>-GST のリン酸化のシグナルは検出されなかった (図 36、レーン 3)。一方、CIPK26-GST による SRK2D<sup>K52N</sup>-MBP のリン酸化シグナルが検出された (図 36、レーン 6)。

*vha-a2 vha-a3* 二重変異体を作成し、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件における生育試験に供した (図 37)。20 mM  $MgCl_2$  条件下において、*srk2d/e/i* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体では前述 (図 27) のように生育阻害が観察されたが、*vha-a2 vha-a3* 二重変異体は、顕著な生育阻害を示さなかった (図 37A)。生育後の生体重を測定して相対生体重を求めたところ、20 mM  $MgCl_2$  条件下において、*vha-a2 vha-a3* 二重変異体は野生型株 (WT) と同程度の相対生体重値を示した (図 37B)。

*vha-a2 vha-a3* 二重変異体では、細胞質と液胞間の電気化学ポテンシャル差の低下により過剰な  $Zn^{2+}$  を液胞に輸送する能力が低下しているため、この変異体は過剰な  $ZnCl_2$  に高感受性を示すことが報告されている (Krebs et al., 2010)。150  $\mu M$   $ZnCl_2$  含有培地上において、野生型株 (WT)、*srk2d/e/i* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体および *vha-a2 vha-a3* 二重変異体を生育させたところ、*vha-a2 vha-a3* 二重変異体は顕著な生育阻害を示した (図 38A)。一方、野生型株、*srk2d/e/i* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体は 150  $\mu M$   $ZnCl_2$  含有培地上において同程度に生育した (図 38A)。この結果は、生育後の生体重を測定して算出された相対生体重値によって支持された (図 38B)。

酵母ツーハイブリッド法により、MRS ファミリーに属する  $Mg^{2+}$  トランスポーターが CIPK26 あるいは SRK2D と物理的に相互作用し得るかどうかを検証した (図 39)。シロイヌナズナの MRS ファミリーに属する  $Mg^{2+}$  トランスポーターは、その C 末端付近に 2 つの膜貫通領域をもち、N 末端側に比較的大きな推定細胞質ドメインをもつ (Gebert et al., 2009)。試験した範囲において、MRS2-1、MRS2-3/MGT4、MRS2-5 および MRS2-7/MGT7 の N 末端側断片が、CIPK26 と酵母において物理的に相互作用することが示された (図 39)。一方、MRS2-1、MRS2-3/MGT4、MRS2-5 および MRS2-7/MGT7 の N 末端側断片と SRK2D との酵母における物理的な相互作用は検出されなかった (図 39)。

次に、試験管内リン酸化反応系を用いて、MSR2-5 の N 末端側断片が CIPK26 あるいは SRK2D によってリン酸化されるかどうかを検証した（図 40）。その結果、CIPK26-GST と GST 融合 MRS2-5 N 末端側断片（MRS2-5 Nter-GST）とを共存させると、MRS2-5 Nter-GST のリン酸化が検出された（図 40、レーン 6）。一方、SRK2D-MBP を MRS2-5 Nter-GST と共存させると、非常に弱い MRS2-5 Nter-GST のリン酸化シグナルが検出された（図 40、レーン 8）。

### III-3-4. 考察

試験管内リン酸化反応系において、CIPK26<sup>K42N</sup>-GST は SRK2D-MBP によってリン酸化されないこと、および SRK2D<sup>K52N</sup>-MBP は CIPK26-GST によってリン酸化されることが示された (図 36)。このことから、CIPK26 は SRK2D の基質となり得ないこと、および SRK2D が CIPK26 の基質となり得ることが示唆された。今後、植物体における SRK2D と CIPK26 との分子レベルでの関連性に関する洞察を得るために、CIPK26 による SRK2D のリン酸化が植物体内で起こるかどうかを評価することが必要だと考える。

高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件において、*vha-a2 vha-a3* 二重変異体は野生型株と同程度の生育を示した (図 37)。このことから、液胞膜上の V-ATPase 活性が低下していても、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件における生育には直接的には影響しないことが示された。また、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件での生育阻害は、液胞膜上の V-ATPase 活性の低下によって引き起こされているのではなく、別の過程の異常によって引き起こされていることが示唆された。さらに、*srk2d/e/i* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体が 150  $\mu M$   $ZnCl_2$  含有培地上において野生型株と同程度の生育を示した結果 (図 38) は、これら変異体において液胞膜上の V-ATPase 活性が低下していないことを示唆している。

本研究では、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体が土植え時に示した生育阻害の表現型 (図 18C、18F) が、*cax1/cax3* 二重変異体や *vha-a2 vha-a2* 二重変異体が生ずる生育表現型と類似していることに着目した。しかしながら、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対して、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体が高感受性を示す (図 27) のに対し、*vha-a2 vha-a3* 二重変異体は野生型株と同程度の感受性を示した (図 37)。一方、*cax1/cax3* 二重変異体は高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対して低感受性を示すことが報告されている (Cheng et al., 2005)。このことから、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する *cipk26/3/9* 三重変異体およ

び *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生理応答は、*cax1/cax3* 二重変異体や *vha-a2 vha-a3* 二重変異体のそれとは異なることが示唆される。*cax1/cax3* 二重変異体や *vha-a2 vha-a2* 二重変異体でみられる生育阻害は、地上部における Ca 欠乏が伴うことが報告されている (Cheng et al., 2005、Krebs et al., 2010)。水耕栽培系や寒天培地での評価系において、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の地上部では生育阻害に伴った Ca 含量の低下がみられていること (図 23C、28)、また、土植えて生育させた *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の地上部では、野生型株と比較して Ca 含量が低下する傾向がみられていること (未記載) から、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の土植え時の生育阻害は、Ca 欠乏に起因しているのかもしれない。

MRS ファミリーに属する  $Mg^{2+}$  トランスポーターである MRS2-5 の N 末端側断片は、酵母において CIPK26 と物理的に相互作用し (図 39)、試験管内リン酸化反応系において CIPK26 によってリン酸化された (図 40)。このことから、MRS2-5 は CIPK26 の下流標的の有望な候補のひとつであることが示唆された。今後、MRS2-5 が CIPK26 の下流の標的基質であることを示すために、植物体内において MRS2-5 が CIPK26 と相互作用するかどうか、また、植物体内において MRS2-5 が CIPK26 によってリン酸化されるかどうかを検証していく必要がある。

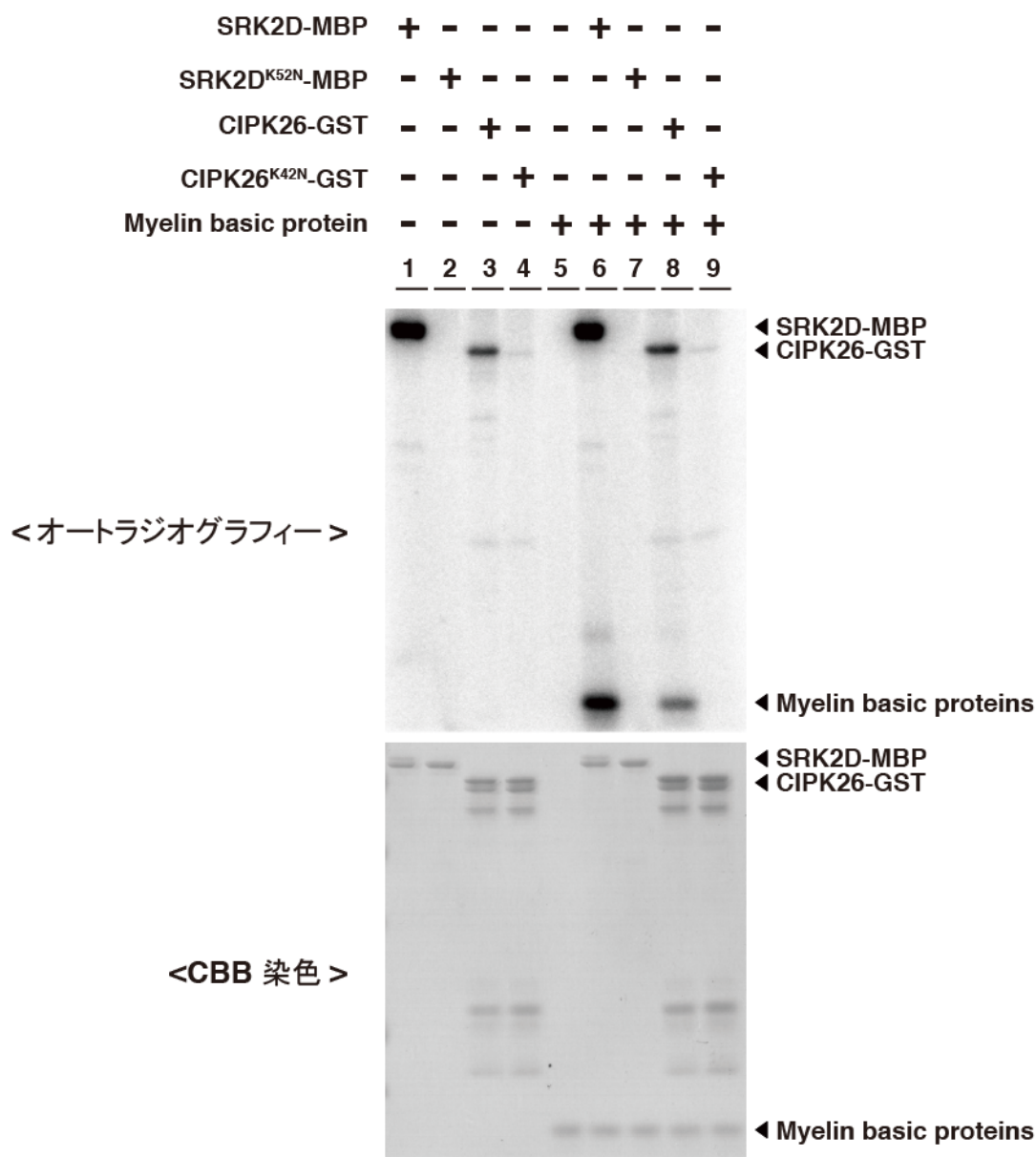


図 35. 試験管内リン酸化反応系における SRK2D-MBP および CIPK26-GST の活性評価および活性欠損型 SRK2D-MBP, CIPK26-GST の作出

MBP 融合 SRK2D (あるいは SRK2D<sup>K52N</sup>) タンパク質 (SRK2D-MBP、SRK2D<sup>K52N</sup>-MBP)、GST 融合 CIPK26 (あるいは CIPK26<sup>K42N</sup>) タンパク質 (CIPK26-GST、CIPK26<sup>K42N</sup>-GST) あるいはミエリン塩基性タンパク質 (Myelin basic proteins) を用いて、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP を含む反応系においてリン酸化反応を行った。リン酸化反応に供したタンパク質の組み合わせを各レーンの上に示す。リン酸化反応後の産物を SDS-PAGE に供し、オートラジオグラフィーにより [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP で標識されたタンパク質を可視化した。実験に供したタンパク質の量を評価するために CBB 染色を行い、タンパク質を可視化した。リン酸化反応には、200 ng の SRK2D-MBP, SRK2D<sup>K52N</sup>-MBP、800 ng の CIPK26-GST、CIPK26<sup>K42N</sup>-GST および 200 ng のミエリン塩基性タンパク質を供した。



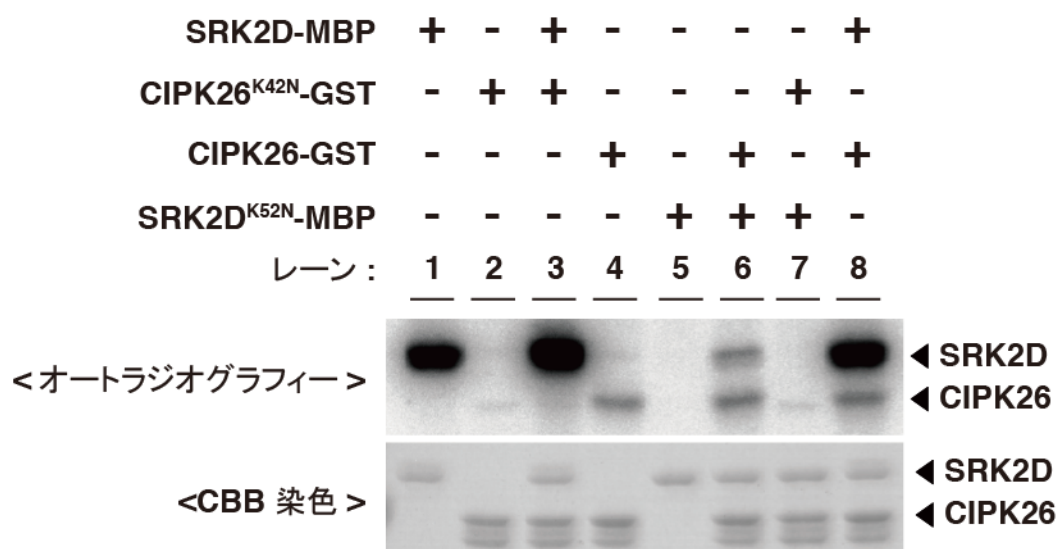
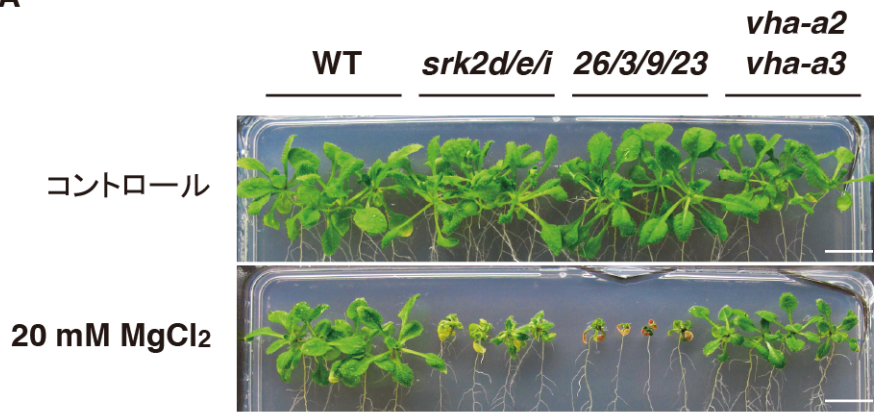


図 36. 試験管内リン酸化反応系における CIPK26-GST による活性欠損型 SRK2D-MBP のリン酸化試験あるいは SRK2D-MBP による活性欠損型 CIPK26-GST のリン酸化試験

SRK2D-MBP、SRK2D<sup>K52N</sup>-MBP、CIPK26-GST あるいは CIPK26<sup>K42N</sup>-GST を用いて、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP を含む反応系においてリン酸化反応を行った。リン酸化反応に供したタンパク質の組み合わせを各レーンの上に示す。リン酸化反応後の産物を SDS-PAGE に供し、オートラジオグラフィーにより [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP で標識されたタンパク質を可視化した。実験に供したタンパク質の量を評価するために CBB 染色を行い、タンパク質を可視化した。リン酸化反応には、200 ng の SRK2D-MBP (あるいは SRK2D<sup>K52N</sup>-MBP) および 800 ng の CIPK26-GST (あるいは CIPK26<sup>K42N</sup>-GST) を供した。

A



B

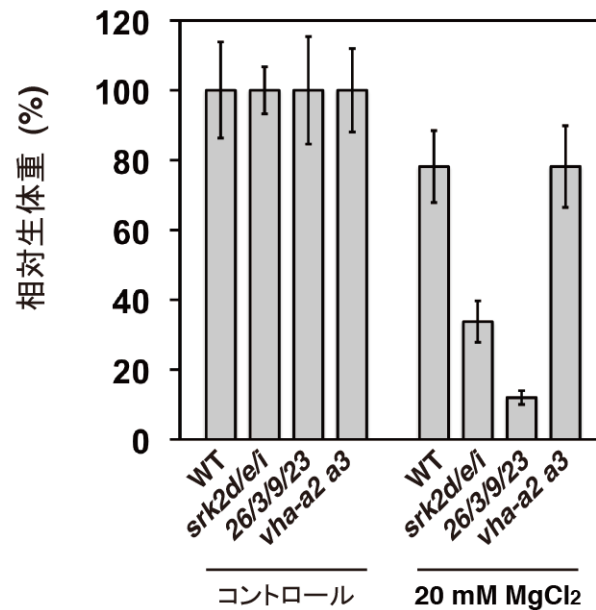
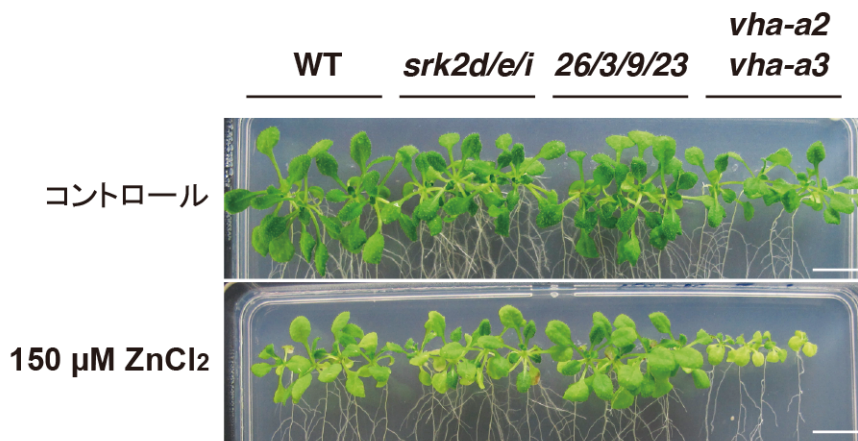


図 37. *vha-a2 vha-a3* 二重変異体の高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する感受性試験

(A) 野生型株 (WT)、*srk2d/e/i* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体および *vha-a2 vha-a3* 二重変異体を用いた高濃度の  $MgCl_2$  に対する感受性試験。写真は、発芽後 4 日の幼植物体をコントロール寒天培地 (1/2\*MS 寒天培地) あるいは 20 mM  $MgCl_2$  添加寒天培地に移植して、プレートを垂直に立てた状態でさらに 14 日間生育させた植物体を示すスケールバーは 1 cm。

(B) (A) で記述したように生育させた植物体の相対生体重 (%)。コントロール寒天培地上で生育させたそれぞれの個体群の生体重の値を 100% として示す。エラーバーは標準偏差 ( $n = 8$ ) を示す。同様の結果が 2 回の生物学的反復実験で得られた。代表的な結果を示す。

A



B

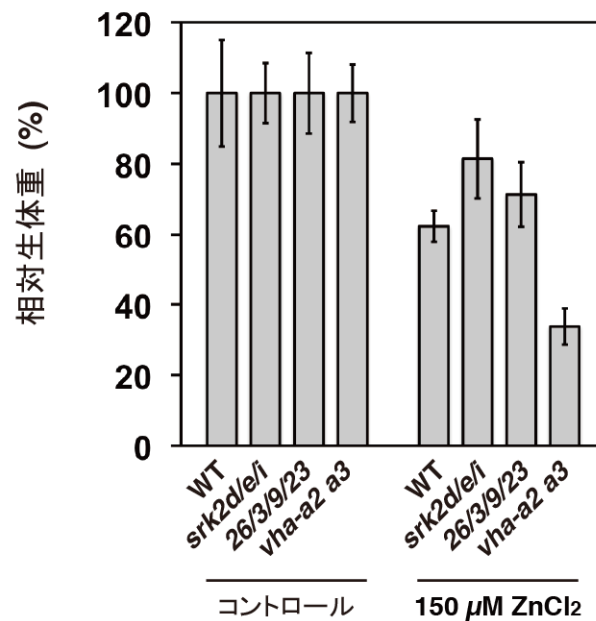


図 38. *vha-a2 vha-a3* 二重変異体の高濃度の外界  $\text{Zn}^{2+}$  に対する感受性試験

(A) 野生型株 (WT)、*srk2d/e/i* 三重変異体、*cipk26/3/9/23* 四重変異体および *vha-a2 vha-a3* 二重変異体を用いた高濃度の  $\text{ZnCl}_2$  に対する感受性試験。写真は、発芽後 4 日の幼植物体をコントロール寒天培地 (1/10\*MS 寒天培地) あるいは 150 μM  $\text{ZnCl}_2$  添加寒天培地に移植して、プレートを垂直に立てた状態でさらに 14 日間生育させた植物体を示すスケールバーは 1 cm。

(B) (A) で記述したように生育させた植物体の相対生体重 (%)。コントロール寒天培地上で生育させたそれぞれの個体群の生体重の値を 100% として示す。エラーバーは標準偏差 (n = 8) を示す。同様の結果が 2 回の生物学的反復実験で得られた。代表的な結果を示す。

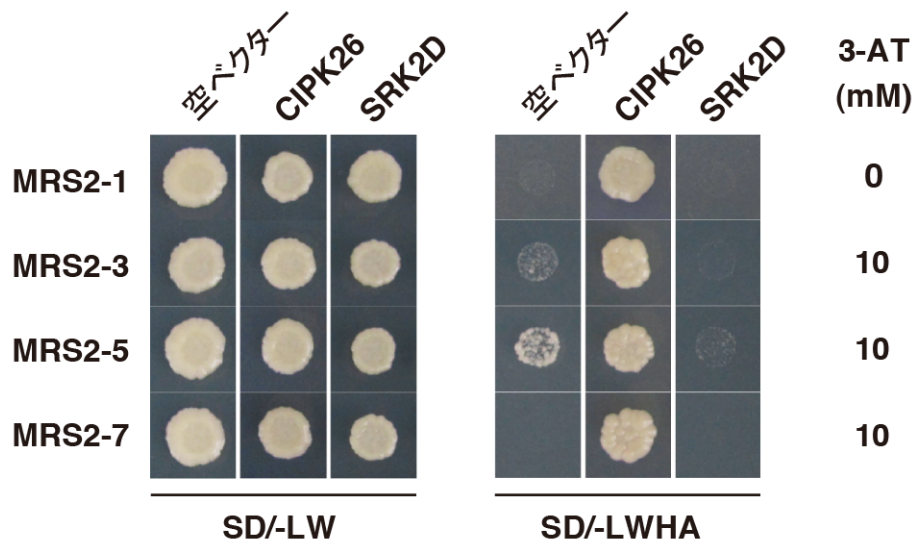


図 39. 酵母ツーハイブリッド法による MRS ファミリーに属する  $Mg^{2+}$  トランスポーターと CIPK26 あるいは SRK2D との物理的な相互作用解析

MRS2-1, MRS2-3, MRS2-5 あるいは MRS2-7 の N 末端側断片を pGBKT7 ベクターに挿入したプラスミドおよび pGADT7 ベクター（空ベクター）、pGADT7-CIPK26, SRK2D を導入した出芽酵母（AH109 株）の SD/-LW 培地および 3-AT を添加した SD/-LWHA 培地における生育試験。OD<sub>600</sub> = 0.1 相当の酵母懸濁液を各培地上に 2.5  $\mu$ l ずつ滴下し、30  $^{\circ}$ C で 7 日間生育させた。実験は 2 回行い、代表的な結果を示す。

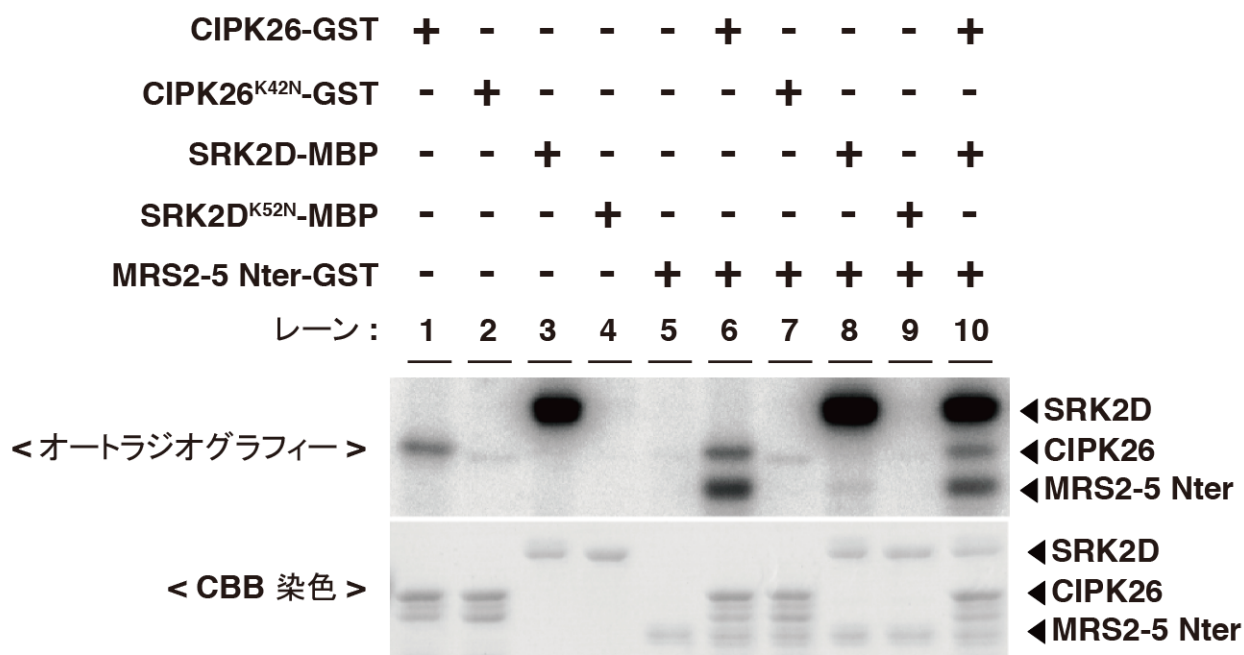


図 40. 試験管内リン酸化反応系における CIPK26-GST あるいは SRK2D-MBP による MRS2-5 の N 末端領域のリン酸化試験

SRK2D-MBP、SRK2D<sup>K52N</sup>-MBP、CIPK26-GST、CIPK26<sup>K42N</sup>-GST あるいは GST 融合 MRS2-5 N 末端側断片タンパク質 (MRS2-5 Nter-GST) を用いて、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP を含む反応系においてリン酸化反応を行った。リン酸化反応に供したタンパク質の組み合わせを各レーンの上に示す。リン酸化反応後の産物を SDS-PAGE に供し、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP で標識されたタンパク質をオートラジオグラフィーにより可視化した。実験に供したタンパク質の量を評価するために CBB 染色を行い、タンパク質を可視化した。リン酸化反応には、200 ng の SRK2D-MBP (あるいは SRK2D<sup>K52N</sup>-MBP)、800 ng の CIPK26-GST(あるいは CIPK26<sup>K42N</sup>-GST) および 200 ng の MRS2-5 Nter-GST を供した。

### 第3章 第4節 総合考察

*aba2-1* 変異体および *srk2d/e/i* 三重変異体が高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下に同程度の高感受性を示すこと (図 33) や、サブクラス III SnRK2 が ABA シグナル伝達経路の主要な正の調節因子であること (Fujii and Zhu, 2009、Fujita et al., 2009、Nakashima et al., 2009) を考慮すると、ABA はサブクラス III SnRK2 を介したシグナル伝達経路を通じて高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下において植物の生育を調節している可能性が高いと考えられる。今後、*ABA2* および *SRK2D/E/I* の双方が欠損した四重変異体、*aba2-1/srk2d/e/i* の高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する感受性を評価することで、ABA を介した高濃度の外界  $Mg^{2+}$  における生長調節がサブクラス III SnRK2 を介して制御されているかどうかを明らかにできると期待される。

ABA を介したサブクラス III SnRK2 依存的な転写制御に関わる AREB/ABF 転写因子群の変異体、*areb1/areb2/abf3* 三重変異体では  $Mg^{2+}$  に対する高感受性は観察されないこと (図 33)、さらに、ABA に応答した気孔閉鎖の主要な制御因子である SRK2E/OST1 の変異体 (*srk2e*) においても  $Mg^{2+}$  に対する高感受性は観察されないこと (図 30B) から、サブクラス III SnRK2 は、浸透圧ストレスに応答した遺伝子発現および気孔閉鎖の制御系とは独立した制御系を介して、 $Mg^{2+}$  感受性を調節していることが示唆される。現時点では、サブクラス III SnRK2 を介した  $Mg^{2+}$  に対する感受性調節が浸透圧ストレス耐性獲得の過程において何らかの役割を果たしているかどうかは不明であるが、乾燥ストレス耐性獲得におけるサブクラス III SnRK2 を介した ABA シグナル伝達経路の中核的な役割 (Fujita et al., 2009) を考慮すると、 $Mg^{2+}$  に対する感受性調節制御系は、植物が乾燥ストレス耐性を獲得するうえで何らかの役割を担っているのかもしれない。今後、種々の  $Mg^{2+}$  濃度条件下で生育させた植物体の乾燥ストレス耐性能を評価していくことで、乾燥ストレス耐性獲得における  $Mg^{2+}$  の役割の一端が理解されると期待される。

高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件において、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および

*cipk26/3/9/23* 四重変異体は生育阻害を示すにも関わらず、それらの地上部において、野生型株と比較して Mg 含量の有意な低下が観察された (図 27、28)。これらの結果は、これら変異体において細胞内の  $Mg^{2+}$  恒常性が攪乱されていることを示唆している。しかしながら、現時点では細胞内のどこで、どのように  $Mg^{2+}$  恒常性が攪乱されているのかは明らかではない。

高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下では、植物体地上部の Mg 含量が顕著に増加するが (図 28)、種々の酵素反応を適正に進行させるために、細胞質や各細胞小器官における  $Mg^{2+}$  濃度は厳格に制御されていなければならない。そのため、過剰な  $Mg^{2+}$  を液胞へ輸送し、細胞内の  $Mg^{2+}$  濃度を調節する機構を植物は有している。実際、高濃度の  $Mg^{2+}$  を含む水耕液で生育させたシロイヌナズナの葉肉細胞内の液胞では、80 mM 程度までの  $Mg^{2+}$  の蓄積がみられることから (Conn et al., 2011a)、葉肉細胞内の液胞は、過剰な  $Mg^{2+}$  を蓄積するためのプールとして機能していることが推察されている。この報告および図 28 の結果を考慮すると、現時点では実験的証拠はないが、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する高感受性は、少なくとも一部分において、液胞への  $Mg^{2+}$  輸送能が低下していることに起因している可能性が考えられる。

液胞膜局在 V-ATPase 活性が著しく低下した変異体、*vha-a2 vha-a3* 二重変異体は、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対して野生型株と同程度の感受性を示したことから (図 37)、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体で観察される高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する高感受性は、液胞膜上の V-ATPase 活性の低下によって引き起こされているのではなく、別の過程の異常によって引き起こされていることが示唆された。この考えは、液胞膜局在の MRS2-5 が CIPK26 のリン酸化の標的となり得ること (図 40) と矛盾しないと考える。今後、MRS2-5 が植物体で CIPK26 の標的となるかどうか更なる検証が必要ではあるが、この結果は、CIPK26 がリン酸化を介して MRS2-5 の翻訳後制御に関与している可能性

を示している。今後、*srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体における種々の細胞小器官、例えば液胞内の  $Mg^{2+}$  濃度を測定することで、細胞内のどこで、どのように  $Mg^{2+}$  恒常性が影響を受けているのかをより深く理解できると期待される。

試験管内リン酸化反応系において、 $SRK2D^{K52N}$ -MBP が CIPK26-GST によってリン酸化された (図 36)。この結果をふまえると、CIPK26 は  $SRK2D$  の上流の制御因子として機能しており、少なくとも一部分において、 $SRK2D$  のリン酸化を通じて高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生長を調節しているのかもしれない。この考えは、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対して、*srk2d/e/i/cipk26/3/9/23* 七重変異体が *cipk26/3/9/23* 四重変異体と同程度の感受性を示した結果 (図 32) と矛盾しないと考える。つまり、*cipk26/3/9/23* 四重変異体に対して、さらに  $SRK2D/E/I$  遺伝子を欠損させても高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する感受性には付加的な影響がないことをふまえると、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下において植物の生長を調節しているサブクラス III SnRK2 の機能は、CIPK26/3/9/23 に依存していることが推察される。今後、CIPK26 による  $SRK2D$  のリン酸化が植物体内で起こり得るかどうかが、およびそのリン酸化が  $SRK2D$  の活性に与える影響を評価することで、CIPK26 と  $SRK2D$  との機能的な関連性がより鮮明に理解されることが期待される。



## 第4章 本研究の総合考察

細胞内に豊富に存在しているマグネシウムイオン ( $\text{Mg}^{2+}$ ) は、DNA、RNA および ATP などのリン酸化合物の安定化に関与しており、また多くの酵素の機能に必須である。植物において、 $\text{Mg}^{2+}$  はクロロフィル分子のポルフィリン環に配位しており、光合成において必須な機能を担っている。植物体における  $\text{Mg}^{2+}$  の重要性にも関わらず、外界のイオン濃度の変化に応答して細胞の  $\text{Mg}^{2+}$  恒常性を調節する機構に関する知見は乏しい。近年、MRS ファミリーに属する  $\text{Mg}^{2+}$  トランスポーターが低濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下における植物の生育維持において重要な役割を担っていることが明らかにされたが (Gebert et al., 2009、Lenz et al., 2013)、それらトランスポーターの発現制御や活性制御についてはほとんど明らかにされていない。また、高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下において植物がどのように生育を維持しているのか不明なままであった。

本研究により、2 つの異なるファミリーに属するプロテインキナーゼ、サブクラス III SnRK2 (SRK2D/E/I) と CIPK26/3/9/23 が、シロイヌナズナにおいて  $\text{Mg}^{2+}$  感受性を調節する主要な調節因子として機能していることを明らかにした。サブクラス III SnRK2 に関する多くの先行研究では、水分欠乏ストレスに応答した ABA シグナル伝達経路の主要な調節因子としてのサブクラス III SnRK2 の生理機能が着目されてきた (Mustilli et al., 2002、Kobayashi et al., 2005、Fujii and Zhu, 2009、Fujita et al., 2009、Nakashima et al., 2009)。また、CIPK26/3/9/23 に関する先行研究により、各 CIPK 遺伝子の独立した機能が特徴付けられてきた (Kim et al., 2003、Li et al., 2006、Xu et al., 2006、Cheong et al., 2007、Pandey et al., 2007、Drerup et al., 2013、Kimura et al., 2013、Lyzenga et al., 2013)。本研究により、サブクラス III SnRK2 および CIPK26/3/9/23 が、今までに特徴付けされたそれらの機能に加えて、新規な生理応答、すなわち高濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$  条件下における植物の生育維持を調節する役割を果たしていることが見いだされた。また、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体は通常生育レベルの濃度の外界  $\text{Mg}^{2+}$

に対して高感受性を示したことから (図 23A)、CIPK26/3/9/23 は、通常の生育条件において植物が  $Mg^{2+}$  恒常性を維持するための基本的な役割も担っていることが示唆された。

最近、NADPH オキシダーゼのひとつである RBOHF が、SRK2E/OST1 あるいは CIPK26 によってリン酸化され得ることが示された ((Sirichandra et al., 2009、Drerup et al., 2013、Kimura et al., 2013)。現時点では、SRK2E/OST1 によるリン酸化が RBOHF の活性に与える影響は不明なままであるが、CIPK26 は、HEK293T 細胞において CBL1 および CBL9 と協調して RBOHF の活性を上昇できることが示されている (Drerup et al., 2013)。これらの報告と、本研究で明らかにした植物体における SRK2D あるいは SRK2E/OST1 と CIPK26 との物理的な相互作用 (図 8、11) を考慮すると、サブクラス III SnRK2 および CIPK26 が、 $Mg^{2+}$  恒常性の維持に関与する共通の下流標的をもち、協調的なリン酸化を介してそれら標的の活性を調節している可能性が考えられる (図 41)。哺乳類細胞の Ser/Thr プロテインキナーゼである mammalian Target of Rapamycin (mTOR) が、独立したタンパク質複合体である "mTORC1" と "mTORC2" を形成し、それぞれの複合体が異なる生理応答を制御していること (Bracho-Valdés et al., 2011) をふまえると、植物体内においてサブクラス III SnRK2 は、浸透圧ストレスに応答して遺伝子発現や気孔閉鎖の制御を担う SnRK2 タンパク質複合体とは別に、CIPK26/3/9/23 と "SnRK2-CIPK" タンパク質複合体を形成して、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下において植物の生長を維持する機能を果たしているのかもしれない。

一方、MRS2-5 は SRK2D の基質とはならず、CIPK26 の基質となり得ること (図 40) を考慮すると、CIPK26 は、"SnRK2-CIPK" タンパク質複合体を介した制御系とは別に、SRK2D に依存しない経路を介して高濃度の外界  $Mg^{2+}$  に対する感受性調節を担っていることが示唆される (図 41)。サブクラス III SnRK2 の標的とはならない CIPK26 特異的な標的が存在するという考えは、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下において *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体が

*srk2d/e/i* 三重変異体よりも顕著な生育阻害を示す結果（図 27）を説明できるかもしれない。

*CIPK26* 遺伝子を過剰発現する形質転換シロイヌナズナは、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下および低濃度の外界  $Ca^{2+}$  条件下においてベクター対照ラインと比較して優れた生長能力を示した（図 25、26）。高濃度の外界  $Mg^{2+}$  や低濃度の外界  $Ca^{2+}$  によって引き起こされる低  $Ca:Mg$  モル比条件は、蛇紋岩土壌でみられる特徴のひとつである。蛇紋岩土壌を含む一部地域では作物の生長障害が問題となっている。*CIPK26* 遺伝子に近縁な遺伝子は陸上植物において広く保存されていること（図 12B）から、シロイヌナズナ以外の植物種における *CIPK26* 相同遺伝子の機能を今後明らかにしていくことで、陸上植物の  $Mg^{2+}$  感受性調節において *CIPK26* 相同因子がどの程度普遍的な役割を担っているかが明らかにされ、蛇紋岩土壌においても生育障害が生じにくい作物や、 $Mg$  あるいは  $Ca$  などの必須元素の吸収能の向上した作物の分子育種への展開が期待できる。

本研究により、2 つの異なるファミリーに属するプロテインキナーゼ、サブクラス III SnRK2 および *CIPK26/3/9/23* が、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下においてシロイヌナズナ植物体の生長を維持するための重要な役割を担っていることが明らかにされた。本研究は、これらプロテインキナーゼを介したリン酸化シグナリングが植物の  $Mg^{2+}$  感受性を調節していることを示している。将来の研究において、これらプロテインキナーゼの標的基質であり、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における  $Mg^{2+}$  感受性を調節している因子の同定を通じて、外界のイオン濃度の変化に応答して植物がいかに細胞内の  $Mg^{2+}$  恒常性を制御しているのかをより深く理解できると期待される。

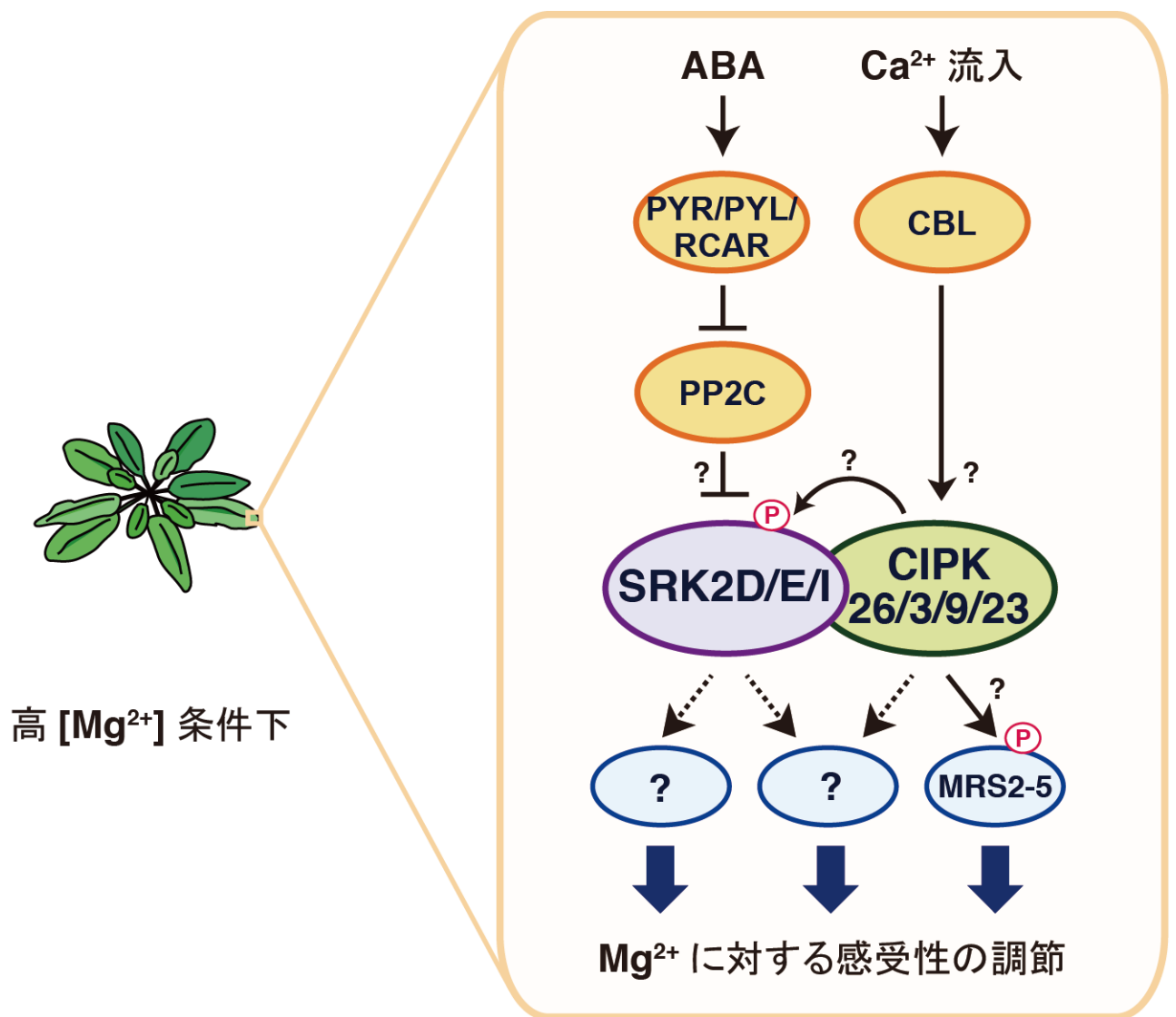


図 41. シロイヌナズナの  $Mg^{2+}$  感受性の調節におけるサブクラス III SnRK2 とそれらの新規相互作用因子である CIPK26/3/9/23 を介したシグナル伝達経路のモデル図

サブクラス III SnRK2 (SRK2D、SRK2E および SRK2I) および CIPK26、3、9、23 (CIPK26/3/9/23) は、シロイヌナズナにおいて  $Mg^{2+}$  感受性の主要な調節因子として機能している。高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下において、サブクラス III SnRK2 および CIPK26/3/9/23 は、 $Mg^{2+}$  感受性の調節に関与する下流標的因子をリン酸化し、それらの活性を調節することで機能を発揮すると考えられる。実線は、先行研究および本研究により実験的に支持されたシグナル伝達経路を示す。点線は、想定されるシグナル伝達を示す。

表 5. 本研究で用いたプライマー配列のリスト

遺伝子/派生物	AGIコード	プライマーの名前	配列
pGBKT7関連コンストラクトの構築に用いたプライマー			
SRK2D	At3g50500	SRK2DFL- <i>EcoRV</i> -F	5'-AAAGATATCATGGATCCGGCGACTAATTC-3'
		SRK2DFLns- <i>EcoRV</i> -R	5'-AAAGATATCGAGAGCATAAACTATCTCTCC-3'
SRK2DAII	At3g50500	SRK2DFL- <i>EcoRV</i> -F	5'-AAAGATATCATGGATCCGGCGACTAATTC-3'
		SRK2DAII- <i>EcoRV</i> -R	5'-AAAGATATCCGGAATCGTAGCCTCCG-3'
SRK2DAI	At3g50500	SRK2D_ΔI_F1	5'-ACTGTTCGTAATCGTTGCCCTC-3'
		SRK2D_ΔI_R1	5'-GATCCTCGATATTAGATGGCG-3'
SRK2DAI, II	At3g50500	SRK2DFL- <i>EcoRV</i> -F	5'-AAAGATATCATGGATCCGGCGACTAATTC-3'
		SRK2DAI,II- <i>EcoRV</i> -R	5'-AAGATATCTGGTAGATTCTTCAAGAACC-3'
SRK2D_RD	At3g50500	2D_domain I- <i>EcoRV</i> -F	5'-AAGATATCGGTGATTTGATGGATGAGAAC-3'
		SRK2DFLns- <i>EcoRV</i> -R	5'-AAAGATATCGAGAGCATAAACTATCTCTCC-3'
SRK2D_domain I	At3g50500	2D_domain I- <i>EcoRV</i> -F	5'-AAGATATCGGTGATTTGATGGATGAGAAC-3'
		2D_domain I- <i>EcoRV</i> -R	5'-AAGATATCCGGAATCGTAGCCTCCGATA-3'
SRK2D_domain II	At3g50500	2D_domain II- <i>EcoRV</i> -F	5'-AAGATATCACTGTTCGTAATCGTTGCC-3'
		SRK2DFLns- <i>EcoRV</i> -R	5'-AAAGATATCGAGAGCATAAACTATCTCTCC-3'
SRK2E	At4g33950	SRK2EFL- <i>SmaI</i> -F	5'-TCCCCCGGGATGGATCGACCAGCAGTGAG-3'
		SRK2EFLns- <i>SmaI</i> -R	5'-TCCCCCGGGCATTGCGTACACAATCTCTCC-3'
SRK2I	At5g66880	2I/bK7/ <i>Eco</i> /n	5'-GGGGAATTCATGGATCGAGCTCCGGTG-3'
		2I/bK7/ <i>Pst</i> /c	5'-GGGGGCTGCAGGTTAGAGAGCGTAACTATC-3'
SRK2C	At1g78290	SRK2CFL- <i>SmaI</i> -F	5'-CCCCCGGGATGGAGAGGTACGAAATAGTG-3'
		SRK2CFLns- <i>SmaI</i> -R	5'-CCCCCGGGCAAAGGGGAAAGGAGATCAG-3'
SRK2F	At4g40010	2F/bK7/ <i>Eco</i> /n	5'-GGGGAATTCATGGAGAGATACGACATC-3'
		2F/bK7/ <i>Pst</i> /c	5'-GGGGGCTGCAGGTCATAGACACATACGAAATC-3'
SRK2A	At1g10940	SRK2A,BFL- <i>SmaI</i> -F	5'-CCCCCGGGATGGACAAGTACGAGCT-3'
		SRK2AFLns- <i>SmaI</i> -R	5'-CCCCCGGGACTTATTCTCACTTCTCCACTTG-3'
SRK2B	At1g60940	SRK2A,BFL- <i>SmaI</i> -F	5'-CCCCCGGGATGGACAAGTACGAGCT-3'
		SRK2BFLns- <i>SmaI</i> -R	5'-CCCCCGGGACTGACTCGGACTTCTCC-3'
SRK2G	At5g08590	SRK2GFL- <i>SmaI</i> -F	5'-CCCCCGGGATGGACAAGTATGACGTTGTC-3'
		SRK2GFLns- <i>SmaI</i> -R	5'-CCCCCGGGAGCTTTGTCAGACTCTTGAC-3'
SRK2H	At5g63650	SRK2HFL- <i>SmaI</i> -F	5'-CCCCCGGGATGGACAAGTATGAGGTTGTG-3'
		SRK2HFLns- <i>SmaI</i> -R	5'-CCCCCGGGAGCTTTGGGAGGCTCTTGAC-3'
SRK2J/SnRK2.9	At2g23030	SRK2JFL- <i>SmaI</i> -F	5'-CCCCCGGGATGGAGAAGTATGAGATGGTG-3'
		SRK2JFLns- <i>SmaI</i> -R	5'-CCCCCGGGTGCGTAATCATCATACCATCTTC-3'
MRS2-1_N-terminal region	At1g16010	2-1Nter- <i>SmaI</i> -F	5'-CCCCCGGGATGTCTGAGCTAAAAGAGCGC-3'
		2-1Nter- <i>SmaI</i> -R	5'-CCCCCGGGCAACTCGAACTGGATCAGCTG-3'
MRS2-3_N-terminal region	At3g19640	2-3Nter- <i>SmaI</i> -F	5'-CCCCCGGGATGAGAGGAGCTAGACCCG-3'
		2-3Nter- <i>SmaI</i> -R	5'-CCCCCGGGTGTTAGCATCACACCATCTG-3'
MRS2-5_N-terminal region	At2g03620	2-5Nter- <i>SmaI</i> -F	5'-CCCCCGGGATGGGAGAACTAGATCC-3'
		2-5Nter- <i>SmaI</i> -R	5'-CCCCCGGGCAGTTGAAACTGAATCAACTGATTC-3'
MRS2-7_N-terminal region	At5g09690	2-7Nter- <i>SmaI</i> -F	5'-CCCCCGGGATGGCATTGGGTTTAAGCAGTG-3'
		2-7Nter- <i>SmaI</i> -R	5'-CCCCCGGGTAACATTAGCTCTAACTGAATCAGC-3'

**pGADT7関連コンストラクトの構築に用いたプライマー**

CIPK26	At5g21326	26FL- <i>Sma</i> I-F	5'-TCCCCCGGGATGAATCGGCCAAAGGTTTCAG-3'
		26FLns- <i>Sma</i> I-R	5'-TCCCCCGGGTTTGCTTAGACCAGAGCTCTC-3'
CIPK3	At2g26980	3.2FL- <i>Sma</i> I-F	5'-CCCCCGGGATGAATCGGAGACAGCAAGTG-3'
		3FLst- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGTCACTTTGCTGTTTCTTTCTTAAC-3'
CIPK9	At1g01140	9FL- <i>Sma</i> I-F	5'-CCCCCGGGATGAGTGGAAGCAGAAGG-3'
		9FLns- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGTTGCTTTTGTCTTCAGCGG-3'
CIPK23	At1g30270	23FL- <i>Sma</i> I-F	5'-CCCCCGGGATGGCTTCTCGAACACGCC-3'
		23FLns- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGTGTGCGACTGTTTTCGAATTGTC-3'
CIPK24	At5g35410	24FL- <i>Sma</i> I-F	5'-CCCCCGGGATGACAAAGAAAATGAGAAGAG-3'
		24FLns- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGAAACGTGATTGTTCTGAGAATC-3'
ABI1	At4g26080	ABI1FL- <i>Sma</i> I-F	5'-CCCCCGGGATGGAGGAAGTATCTCCG-3'
		ABI1FLns- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGTTCAAGGGTTTGCTCTTGAG-3'
TSN2	At5g61780	TSN2FL- <i>Sma</i> I-F	5'-CCCCCGGGATGGCGACTGGGGCAGCAAC-3'
		TSN2FLns- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGCCCGCGACCCGGTTTCTTG-3'
ACLB-1	At3g06650	ACLB-1FL- <i>Eco</i> RV-F	5'-AAGATATCATGGCTACGGGACAGCTATT-3'
		ACLB-1FLns- <i>Eco</i> RV-R	5'-AAGATATCCTTGGTGTACAAGACATCTTC-3'
SRK2D	At3g50500	SRK2DFL- <i>Eco</i> RV-F	5'-AAAGATATCATGGATCCGGCGACTAATTC-3'
		SRK2DFLns- <i>Eco</i> RV-R	5'-AAAGATATCGAGAGCATAACTATCTCTCC-3'

**pGH-CIPK26pro:GUSおよびpGH-CIPK26pro:sGFP-CIPK26用にプロモーター領域を増幅するためのプライマー**

CIPK26	At5g21326	26pro_2033bp- <i>Sma</i> I-F	5'-CCCCCGGGAAGAGAGAGAGCCCAACAAC-3'
		26pro_2033bp- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGCACTCCGAATGTTACCTCTTG-3'

**pGH-35Spro:mCherry、pGH-35SproおよびpGH-35Spro:4×Mycベクターの構築に用いたプライマー**

CaMV 35S promoter	-	35Spro- <i>Kpn</i> I-F	5'-GGGGTACCCCCAGATTAGCCTTTTCAATTTC-3'
		35Spro- <i>Kpn</i> I-R	5'-GGGGTACCCGTGTTCTCTCCAAATG-3'
mCherry	-	mCherry- <i>Bam</i> HI-F	5'-AAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCG-3'
		mCherry-+3' <i>Eco</i> RV-R	5'-TTAGATATCCTTGTACAGCTCGTCCATG-3'
4×Myc	-	<i>Pst</i> I-ATG-4×Myc-F1	5'-AACTGCAGATGGGGTTAATTAACGGTGAAC-3'
		<i>Pst</i> I-4×Myc-R1	5'-AACTGCAGGCTACCGTTCAAGTCTTCC-3'

**pGH-CIPK26pro:sGFP-CIPK26、pGH-35Spro:4×Myc-CIPK26およびpGH-35Spro:CIPK26用にタンパク質翻訳領域の増幅に用いたプライマー**

CIPK26	At5g21326	26FL- <i>Sma</i> I-F	5'-TCCCCCGGGATGAATCGGCCAAAGGTTTCAG-3'
		26FLst- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGTTATTTGCTTAGACCAGAGCTC-3'

**pGH-35Spro:SRK2D-mCherry用にタンパク質翻訳領域の増幅に用いたプライマー**

SRK2D	At3g50500	SRK2DFL- <i>Eco</i> RV-F	5'-AAAGATATCATGGATCCGGCGACTAATTC-3'
		SRK2DFLns- <i>Eco</i> RV-R	5'-AAAGATATCGAGAGCATAACTATCTCTCC-3'

**BiFC解析用にタンパク質翻訳領域の増幅に用いたプライマー**

SRK2D	At3g50500	SRK2DFL- <i>Eco</i> RV-F	5'-AAAGATATCATGGATCCGGCGACTAATTC-3'
		SRK2DFLns- <i>Eco</i> RV-R	5'-AAAGATATCGAGAGCATAACTATCTCTCC-3'
SRK2E	At4g33950	SRK2EFL- <i>Sma</i> I-F	5'-TCCCCCGGGATGGATCGACCAGCAGTGAG-3'
		SRK2EFLns- <i>Sma</i> I-R	5'-TCCCCCGGGCATTGCGTACACAATCTCTCC-3'
SRK2C	At1g78290	SRK2CFL- <i>Sma</i> I-F	5'-CCCCCGGGATGGAGAGGTACGAAATAGTG-3'
		SRK2CFLns- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGCAAAGGGGAAAGGAGATCAG-3'
CIPK26	At5g21326	26FL- <i>Sma</i> I-F	5'-TCCCCCGGGATGAATCGGCCAAAGGTTTCAG-3'
		26FLns- <i>Sma</i> I-R	5'-TCCCCCGGGTTTGCTTAGACCAGAGCTCTC-3'

CIPK3	At2g26980	3.2FL- <i>Sma</i> I-F 3FLns- <i>Sma</i> I-F	5'-CCCCCGGGATGAATCGGAGACAGCAAGTG-3' 5'-CCCCCGGGCTTTGCTGTTTCTTTCTTAAC-3'
CIPK9	At1g01140	9FL- <i>Sma</i> I-F 9FLns- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGATGAGTGAAGCAGAAGG-3' 5'-CCCCCGGGTTGCTTTTGTCTTCAGCGG-3'
CIPK23	At1g30270	23FL- <i>Sma</i> I-F 23FLns- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGATGGCTTCTCGAACAACGCC-3' 5'-CCCCCGGGTGTGCGACTGTTTGTCAATTGTC-3'
CIPK24	At5g35410	24FL- <i>Sma</i> I-F 24FLns- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGATGACAAAAGAAAATGAGAAGAG-3' 5'-CCCCCGGGAAACGTGATTGTTCTGAGAATC-3'
<b>pGEX-4T-2関連コンストラクトの構築に用いたプライマー</b>			
CIPK26	At5g21326	26FL- <i>Sma</i> I-F 26FLst- <i>Sma</i> I-R	5'-TCCCCCGGGATGAATCGGCCAAAGGTTTCAG-3' 5'-CCCCCGGGTTATTTGCTTAGACCAGAGCTC-3'
CIPK26K42N	At5g21326	CIPK26-K42N-For CIPK26-K42N-Rev	5'-CTCAACATACTTGATAAGGAGAAGG-3' 5'-AGCCACGCGTTCTCCTGTC-3'
MRS2-5_N-terminal region	At2g03620	2-5Nter- <i>Sma</i> I-F 2-5Nter- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGATGGGAGAACAACTAGATCC-3' 5'-CCCCCGGGCAGTTGAAACTGAATCAACTGATTC-3'
<b>pMALc2x関連コンストラクトの構築に用いたプライマー</b>			
SRK2D	At3g50500	SRK2DFL- <i>Sal</i> I-F SRK2DFLst- <i>Pst</i> I-R	5'-AAAGTCGACATGGATCCGGCGACTAATTC-3' 5'-AAACTGCAGTCAGAGAGCATAAACTATCTCTCC-3'
SRK2DK52N	At3g50500	SRK2D-K52N-For SRK2D-K52N-Rev	5'-GTTAACATACGAGAGAGGAG-3' 5'-AGCAACAAGCTCCTTGGTG-3'
<b>T-DNA挿入の確認に用いたプライマー</b>			
CIPK26	At5g21326	cipk26-1_LP cipk26-1_RP	5'-GCGTGGCTCTCAAAATACTTG-3' 5'-CAGGAGCAGCATAGTTTGGAG-3'
CIPK3	At2g26980	cipk3-1_LP cipk3-1_RP	5'-ATCATCCACACAAAAGTAGCCG-3' 5'-TTTTTGGCAAAAATCAACCAC-3'
CIPK9	At1g01140	cipk9-1_LP cipk9-1_RP	5'-ATTAGGGACCCACATGTCTC-3' 5'-CCATCTTCCTGCATTCAAAAG-3'
CIPK23	At1g30270	cipk23-1_LP cipk23-1_RP	5'-GAGGCTTTTATACAGCCACCC-3' 5'-ATTTGTGGTCCCTGGCTAATC-3'
VHA-A2	At2g21410	vha-a2-1-LP vha-a2-1-RP	5'-ACCTCTGGCTCAAAATTGTCC-3' 5'-TCCACATGAATATAGCCCGAG-3'
VHA-A3	At4g39080	vha-a3-1-LP vha-a3-1-RP	5'-TGGAATGAGAAGCATGGATC-3' 5'-ATTGGGTCCATTTGAAAAGC-3'
<b>RT-PCRに用いたプライマー</b>			
CIPK26	At5g21326	cipk26-1_LP cipk26-1_RP	5'-GCGTGGCTCTCAAAATACTTG-3' 5'-CAGGAGCAGCATAGTTTGGAG-3'
CIPK3	At2g26980	3.2FL- <i>Sma</i> I-F 3FLst- <i>Sma</i> I-F	5'-CCCCCGGGATGAATCGGAGACAGCAAGTG-3' 5'-CCCCCGGGTCACTTTGCTGTTTCTTTCTTAAC-3'
CIPK9	At1g01140	CIPK9FL-For CIPK9FLst-Rev	5'-ATGAGTGGAAGCAGAAGGAAGGCGACGCC-3' 5'-TTATTGCTTTTGTCTTCAGCGGCTGCATC-3'
CIPK23	At1g30270	CIPK23FL- <i>Sma</i> I-F CIPK23FLst- <i>Sma</i> I-R	5'-CCCCCGGGATGGCTTCTCGAACAACGCC-3' 5'-CCCCCGGGTTATGTCGACTGTTTGTCAATTG-3'
TUB1	At1g75780	TUB1F TUB1R	5'-ATCCCACCGGACGTTACAAC-3' 5'-TTCGTTGTGCGAGGACCATGC-3'

**定量リアルタイムRT-PCRに用いたプライマー**

CIPK23	At1g30270	23_qRT-For1	5'-GCGGTTGATTATTGTCATAGCA-3'
		23_qRT-Rev1	5'-CCATTAGCATCCAAAAGCAAA-3'
CIPK26	At5g21326	26_qRT-For1	5'-ACAAGTCAGGGGTGATGGTC-3'
		26_qRT-Rev1	5'-GCCCCGTCATAACCTTGAT-3'
18S rRNA	-	18S rRNA-F	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'
		18S rRNA-R	5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'

---



## 参考文献

- Bartels, D. and Sunkar, R.** (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci* **24**, 23-58.
- Batelli, G., Verslues, P.E., Agius, F., Qiu, Q., Fujii, H., Pan, S., Schumaker, K.S., Grillo, S., and Zhu, J.K.** (2007). SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and upregulating its transport activity. *Mol Cell Biol* **27**, 7781-7790.
- 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 Laurière, 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.
- Boyer, J.** (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**, 443-448.
- Bracho-Valdés, I., Moreno-Alvarez, P., Valencia-Martínez, I., Robles-Molina, E., Chávez-Vargas, L., and Vázquez-Prado, J.** (2011). mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *IUBMB Life* **63**, 896-914.
- Cheng, N.H., Pittman, J.K., Shigaki, T., Lachmansingh, J., LeClere, S., Lahner, B., Salt, D.E., and Hirschi, K.D.** (2005). Functional association of Arabidopsis CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiol* **138**, 2048-2060.
- Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li, L., Kim, B.G., Lee, S.C., Kudla, J., and Luan, S.** (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root

- potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant J* **52**, 223-239.
- Cho, Y.H., Yoo, S.D., and Sheen, J.** (2006). Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell* **127**, 579-589.
- Clough, S.J.** (2005). Floral dip: *Agrobacterium*-mediated germ line transformation. *Methods Mol Biol* **286**, 91–102.
- Conn, S.J., Conn, V., Tyerman, S.D., Kaiser, B.N., Leigh, R.A., and Gilliam, M.** (2011a). Magnesium transporters, MGT2/MRS2-1 and MGT3/MRS2-5, are important for magnesium partitioning within *Arabidopsis thaliana* mesophyll vacuoles. *New Phytol* **190**, 583-594.
- Conn, S.J., Gilliam, M., Athman, A., Schreiber, A.W., Baumann, U., Moller, I., Cheng, N.H., Stancombe, M.A., Hirschi, K.D., Webb, A.A., Burton, R., Kaiser, B.N., Tyerman, S.D., and Leigh, R.A.** (2011b). Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by *CAX1* regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 240-257.
- Drerup, M.M., Schlücking, K., Hashimoto, K., Manishankar, P., Steinhorst, L., Kuchitsu, K., and Kudla, J.** (2013). The Calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase RBOHF. *Mol Plant* **6**, 559-569.
- Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., Okamoto, M., Ikegami, K., Koiwai, H., Seo, M., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., Shinozaki, K., Nakazono, M., Kamiya, Y., Koshiba, T., and Nambara, E.** (2008). Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol* **147**, 1984-1993.
- Frey, A., Effroy, D., Lefebvre, V., Seo, M., Perreau, F., Berger, A., Sechet, J., To, A., North, H.M., and Marion-Poll, A.** (2012). Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought

- tolerance with other NCED family members. *Plant J* **70**, 501-512.
- Fujii, H., and Zhu, J.K.** (2009). *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8380-8385.
- Fujii, H., Verslues, P.E., and Zhu, J.K.** (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 485-494.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L., and Zhu, J.K.** (2009). *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462**, 660-664.
- Fujita, M., Fujita, Y., Iuchi, S., Yamada, K., Kobayashi, Y., Urano, K., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2012). Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 6343-6347.
- Fujita, Y., Yoshida, T., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2013). Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiol Plant* **147**, 15-27.
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res* **124**, 509-525.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **50**, 2123-2132.

- 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 U S A* **103**, 1988-1993.
- Gebert, M., Meschenmoser, K., Svidová, S., Weghuber, J., Schweyen, R., Eifler, K., Lenz, H., Weyand, K., and Knoop, V. (2009).** A root-expressed magnesium transporter of the *MRS2/MGT* gene family in *Arabidopsis thaliana* allows for growth in low-Mg<sup>2+</sup> environments. *Plant Cell* **21**, 4018-4030.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A., Romeis, T., and Hedrich, R. (2009).** Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21425-21430.
- Gong, D., Guo, Y., Schumaker, K.S., and Zhu, J.K. (2004).** The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in Arabidopsis. *Plant Physiol* **134**, 919-926.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., and Rokhsar, D.S. (2012).** Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* **40**, D1178-1186.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. (1988).** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Porée, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.A., Simonneau, T., Thibaud, J.B., and Sentenac, H. (2003).** The Arabidopsis outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration.

Proc Natl Acad Sci U S A **100**, 5549-5554.

- 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.
- Imai, Y., Matsushima, Y., Sugimura, T., and Terada, M.** (1991). A simple and rapid method for generating a deletion by PCR. *Nucleic Acids Res* **19**, 2785.
- Imes, D., Mumm, P., Böhm, J., Al-Rasheid, K.A., Marten, I., Geiger, D., and Hedrich, R.** (2013). Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in Arabidopsis guard cells. *Plant J* **74**, 372-382.
- Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Taji, T., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2006). Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol* **47**, 141-153.
- Ji, H., Pardo, J.M., Batelli, G., Van Oosten, M.J., Bressan, R.A., and Li, X.** (2013). The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Mol Plant* **6**, 275-286.
- Kamiya, T., Yamagami, M., Hirai, M.Y., and Fujiwara, T.** (2012). Establishment of an *in planta* magnesium monitoring system using *CAX3* promoter-luciferase in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **63**, 355-363.
- Kim, J.S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima, J., Nakashima, K., Mitsuda, N., Takiguchi, Y., Ohme-Takagi, M., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Matsui, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2012). *Arabidopsis* GROWTH-REGULATING FACTOR7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including *DREB2A*. *Plant Cell* **24**, 3393-3405.

- 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.
- Kimura, S., Kawarazaki, T., Nibori, H., Michikawa, M., Imai, A., Kaya, H., and Kuchitsu, K. (2013).** The CBL-interacting protein kinase CIPK26 is a novel interactor of *Arabidopsis* NADPH oxidase AtRbohF that negatively modulates its ROS-producing activity in a heterologous expression system. *J Biochem* **153**, 191-195.
- 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.
- Kolisek, M., Zsurka, G., Samaj, J., Weghuber, J., Schweyen, R.J., and Schweigel, M. (2003).** Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic  $Mg^{2+}$  influx system in mitochondria. *EMBO J* **22**, 1235-1244.
- Krebs, M., Beyhl, D., Görlich, E., Al-Rasheid, K.A., Marten, I., Stierhof, Y.D., Hedrich, R., and Schumacher, K. (2010).** *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3251-3256.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Lee, S.C., Lan, W., Buchanan, B.B., and Luan, S. (2009).** A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21419-21424.

- Lee, S.C., Lan, W.Z., Kim, B.G., Li, L., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Lu, G., Buchanan, B.B., and Luan, S.** (2007). A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15959-15964.
- Lenz, H., Dombinov, V., Dreistein, J., Reinhard, M.R., Gebert, M., and Knoop, V.** (2013). Magnesium deficiency phenotypes upon multiple knockout of *Arabidopsis thaliana* MRS2 clade B genes can be ameliorated by concomitantly reduced calcium supply. *Plant Cell Physiol* **54**, 1118-1131.
- 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., 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.
- Li, L., Kim, B.G., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., and Luan, S.** (2006). A  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway regulates a  $\text{K}^{+}$  channel for low-K response in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12625-12630.
- Liu, T.Y., Aung, K., Tseng, C.Y., Chang, T.Y., Chen, Y.S., and Chiou, T.J.** (2011). Vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  transport activity is required for systemic phosphate homeostasis involving shoot-to-root signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **156**, 1176-1189.
- Lyzenga, W.J., Liu, H., Schofield, A., Muise-Hennessey, A., and Stone, S.L.** (2013). *Arabidopsis* CIPK26 interacts with KEG, components of the ABA signalling network and is degraded by the ubiquitin-proteasome system. *J Exp Bot* **64**, 2779-2791.
- Léon-Kloosterziel, K.M., Gil, M.A., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E.,**

- Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A., and Koornneef, M.** (1996). Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J* **10**, 655-661.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E.** (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324**, 1064-1068.
- Matsukura, S., Mizoi, J., Yoshida, T., Todaka, D., Ito, Y., Maruyama, K., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2010). Comprehensive analysis of rice *DREB2*-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Mol Genet Genomics* **283**, 185-196.
- 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.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**, 34-41.
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009). Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol* **50**, 1345-1363.
- Nelson, B.K., Cai, X., and Nebenführ, A.** (2007). A multicolored set of *in vivo*



- organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J* **51**, 1126-1136.
- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S.Y., Wang, A., Carvalho, P.C., Lee, S., Caddell, D.F., Cutler, S.R., Chory, J., Yates, J.R., and Schroeder, J.I.** (2010). PYR/PYL/RCAR family members are major *in-vivo* ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *Plant J* **61**, 290-299.
- Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Kim, B.G., Grant, J.J., Li, L., and Luan, S.** (2007). CIPK9: a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in *Arabidopsis*. *Cell Res* **17**, 411-421.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., Alfred, S.E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N.J., Desveaux, D., Rodriguez, P.L., McCourt, P., Zhu, J.K., Schroeder, J.I., Volkman, B.F., and Cutler, S.R.** (2009). Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**, 1068-1071.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A.C., Chico, J.M., Bossche, R.V., Sewell, J., Gil, E., García-Casado, G., Witters, E., Inzé, D., Long, J.A., De Jaeger, G., Solano, R., and Goossens, A.** (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**, 788-791.
- Pisat, N.P., Pandey, A., and Macdiarmid, C.W.** (2009). *MNR2* regulates intracellular magnesium storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **183**, 873-884.
- 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 U S A* **99**, 8436-8441.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., and Mann, M.** (2003). Stop and go extraction tips for

- matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* **75**, 663-670.
- Ray, D.K., Mueller, N.D., West, P.C., and Foley, J.A.** (2013). Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS One* **8**, e66428.
- Roy, S.J., Huang, W., Wang, X.J., Evrard, A., Schmöckel, S.M., Zafar, Z.U., and Tester, M.** (2013). A novel protein kinase involved in Na<sup>+</sup> exclusion revealed from positional cloning. *Plant Cell Environ* **36**, 553-568.
- Saab, I.N., Sharp, R.E., Pritchard, J., and Voetberg, G.S.** (1990). Increased endogenous abscisic Acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiol* **93**, 1329-1336.
- Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2004). A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **45**, 309-317.
- Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H.C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., Valot, B., Zivy, M., Leung, J., Merlot, S., and Kwak, J.M.** (2009). Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett* **583**, 2982-2986.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., and Mann, M.** (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**, 2856-2860.
- Tamura, K., Fukao, Y., Iwamoto, M., Haraguchi, T., and Hara-Nishimura, I.** (2010). Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 4084-4097.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S.** (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,

- evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- Tan, B.C., Joseph, L.M., Deng, W.T., Liu, L., Li, Q.B., Cline, K., and McCarty, D.R.** (2003). Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-*cis* epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* **35**, 44-56.
- Tanaka, Y., Nose, T., Jikumaru, Y., and Kamiya, Y.** (2013). ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in *Arabidopsis* leaves. *Plant J* **74**, 448-457.
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Oses-Prieto, J.A., Kim, T.W., Zhou, H.W., Deng, Z., Gampala, S.S., Gendron, J.M., Jonassen, E.M., Lillo, C., DeLong, A., Burlingame, A.L., Sun, Y., and Wang, Z.Y.** (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol* **13**, 124-131.
- Tanz, S.K., Castleden, I., Hooper, C.M., Vacher, M., Small, I., and Millar, H.A.** (2013). SUBA3: a database for integrating experimentation and prediction to define the SUBcellular location of proteins in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* **41**, D1185-1191.
- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., and Befort, B.L.** (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20260-20264.
- Tokunaga, H., Kojima, M., Kuroha, T., Ishida, T., Sugimoto, K., Kiba, T., and Sakakibara, H.** (2012). *Arabidopsis* lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *Plant J* **69**, 355-365.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Takahashi, F., Anderson, J.C., Ishihama, Y., Peck, S.C., and Shinozaki, K.** (2013). Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in

*Arabidopsis thaliana*. Sci Signal **6**, rs8.

- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., and Shinozaki, K.** (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A **106**, 17588-17593.
- Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2009). Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. Plant J **57**, 1065-1078.
- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P.L., Laurière, C., and Merlot, S.** (2009). Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. Plant Cell **21**, 3170-3184.
- Waadt, R., Schmidt, L.K., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R., and Kudla, J.** (2008). Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes *in planta*. Plant J **56**, 505-516.
- Wang, P., Xue, L., Batelli, G., Lee, S., Hou, Y.J., Van Oosten, M.J., Zhang, H., Tao, W.A., and Zhu, J.K.** (2013). Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. Proc Natl Acad Sci U S A **110**, 11205-11210.
- Weigel, D., and Glazebrook, J.** (2006). Transformation of *Agrobacterium* using the freeze-thaw method. Cold Spring Harbor Protocols **7**, prot4666.
- Weinl, S., and Kudla, J.** (2009). The CBL-CIPK Ca<sup>2+</sup>-decoding signaling network: function and perspectives. New Phytol **184**, 517-528.

- Xiang, Y., Tang, N., Du, H., Ye, H., and Xiong, L.** (2008). Characterization of OsbZIP23 as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiol* **148**, 1938-1952.
- Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L., and Wu, W.H.** (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* **125**, 1347-1360.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 781-803.
- 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.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* **61**, 672-685.
- Zhu, J.K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 247-273.

## 謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、多大なご指導ご鞭撻を賜りました植物分子生理学研究室の篠崎和子教授に謹んで感謝申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、多くのご指導とご助力を賜りました（独）国際農林水産業研究センター 生物資源・利用加工領域の研究員、技術補佐員、秘書の皆様に謹んで感謝申し上げます。特に、研究計画、実験手法全般にわたってご指導を賜りました藤田泰成主任研究員に厚く御礼申し上げます。

また、（独）理化学研究所 環境資源科学研究センター機能開発研究グループの篠崎一雄グループディレクターおよび研究員の皆様には研究計画に貴重なご助言を賜りました。心より御礼申し上げます。

本論文第1章の LC-MS/MS 解析は、東京大学生物生産工学研究センターの柳澤修一准教授および石田哲也博士、また、（独）理化学研究所 環境資源科学研究センター植物プロテオミクス研究ユニットの中神弘史博士およびテクニカルスタッフの野村有子様との共同研究として遂行することができました。深く感謝申し上げます。

本論文第2、3章の ICP-MS 解析は、東京大学大学院農学生命科学研究科 植物栄養・肥料科学研究室の藤原徹教授および西田翔博士との共同研究として遂行することができました。私にとって未経験であった元素分析について、多くの貴重なご指導とご助力を賜りましたこと、深く感謝申し上げます。

ケンブリッジ大学の David Baulcombe 博士には pBin-P19 を分与していただき、名古屋大学大学院生命農学研究科 生物関連防御学研究分野の吉岡博文准教授には、ベンサミアーナタバコを用いたアグロインフィルトレーションの実験手法のご指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、日々温かいご指導とご助力を賜りました植物分子生理学研究室の皆様に深く感謝申し上げます。特に、LC-MS/MS 解

析および系統解析にご指導とご助力を賜りました溝井順哉講師、顕微鏡観察にご指導とご助力を賜りました城所聡助教、実験手法全般および本論文をご指導してくださいました吉田拓也博士に心より感謝申し上げます。

2014 年 3 月