

博士論文

シロイヌナズナのタンパク質リン酸化酵素 **SnRK2** のサブクラスⅠおよびⅡファミリーのストレス応答における機能解析

応用生命化学専攻 植物分子生理学研究室

平成 19 年度博士課程入学 溝口 昌秀

指導教員 篠崎 和子

目 次

目次	i
略語一覧	iv
第 I 章 序論	1
第 II 章 材料および方法	9
II-1. 実験材料	9
II-2. 生育条件	9
II-2-1. 寒天培地における生育	9
II-2-2. 鉢植えにおける生育	9
II-3. シロイヌナズナ培養細胞の生育条件	9
II-4. T-DNA 挿入変異体の単離および多重変異体の作成	10
II-5. アグロバクテリウムへのコンストラクトの導入	10
II-6. シロイヌナズナの形質転換	11
II-6-1. 形質転換用シロイヌナズナの育成	11
II-6-2. アグロバクテリウムによる感染	11
II-6-3. 形質転換シロイヌナズナの選抜 (T1 種子の選抜)	12
II-7. T87 培養細胞の形質転換	12
II-8. RNA 抽出、精製	13
II-8-1. TRIzol Reagent を用いた RNA 抽出	13
II-8-2. 塩化リチウム沈殿による RNA の精製	13
II-8-3. cDNA の合成	13
II-9. ノーザンブロット解析	14
II-10. マイクロアレイ解析	15
II-10-1. cDNA 合成	15
II-10-2. ラベリング反応	16
II-10-3. ハイブリダイゼーション	16
II-10-4. Probe Array の洗浄と染色	17

II-10-5. シグナルの検出	18
II-10-6. データ解析	18
II-11. 定量 RT-PCR	18
II-12. 植物体および T87 培養細胞からのタンパク質抽出	18
II-13. ウェスタンブロッティング	19
II-14. <i>in vitro</i> におけるリン酸化実験	20
II-15. ゲル内リン酸化実験	21
II-16. GUS 染色による遺伝子発現組織の解析	22
II-17. プロトプラストを用いた遺伝子の一過的発現	22
II-18. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた GFP 蛍光の観察	24
II-19. 植物への乾燥および ABA 処理	24
II-20. T87 培養細胞への浸透圧および植物ホルモン処理	24
II-21. 乾燥耐性試験	24
II-22. 酸性植物ホルモンの定量	25
II-22-1. 抽出用サンプルの準備	25
II-22-2. 植物ホルモンの抽出	25
II-22-3. 逆相カラムによる精製	26
II-22-4. 陰イオン交換カラムによる精製	26
II-22-5. LC-MS 装置による解析	27
II-23. <i>Pst</i> DC3000 の感染実験	27
II-23-1. <i>Pst</i> DC3000 の感染	27
II-23-2. 感染菌数の測定	27
第 III 章 サブクラス II SnRK2 の機能解析	29
III-1. 緒言	29
III-2. 結果	31
III-2-1. サブクラス II SnRK2 遺伝子発現の組織特異性	31
III-2-2. サブクラス II SnRK2 タンパク質の細胞内局在	31
III-2-3. 2 重変異体 <i>srk2cf</i> の作成および乾燥ストレス下における <i>srk2cf</i> の表現型	32
III-2-4. マイクロアレイによる乾燥処理における <i>srk2cf</i> の遺伝子発現の網羅的解析	32

III-2-5. 酵母ツーハイブリッド法を用いた SRK2C と相互作用する AREB/ABF 型転写因子の解析	35
III-2-6. AREB/ABF 型転写因子の <i>in vitro</i> での SRK2C によるリン酸化	36
III-2-7. ABA 処理における <i>srk2cf</i> の遺伝子発現解析	36
III-3. 考察	38
第 IV 章 サブクラス I に属する 4 つの SnRK2 の機能解析	56
IV-1. 緒言	56
IV-2. 結果	59
IV-2-1. サブクラス I SnRK2 の植物ホルモンによる活性化の検討	59
IV-2-2. サブクラス I SnRK2 遺伝子発現の組織特異性	60
IV-2-3. サブクラス I SnRK2 タンパク質の細胞内局在	61
IV-2-4. 4 重変異体 <i>srk2abgh</i> の作成およびゲル内リン酸化による <i>srk2abgh</i> における内生 SnRK2 の活性化	61
IV-2-5. 4 重変異体 <i>srk2abgh</i> の通常生育時の表現型	62
IV-2-6. マイクロアレイによる乾燥処理における 4 重変異体 <i>srk2abgh</i> の遺伝子発現の網羅的解析	63
IV-2-7. 4 重変異体 <i>srk2abgh</i> における植物ホルモンの定量	65
IV-2-8. 4 重変異体 <i>srk2abgh</i> の乾燥処理における MPK6 の活性化	66
IV-2-9. 病原菌 (<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) DC3000) 感染における <i>srk2abgh</i> の表現型解析	67
IV-2-10. 4 重変異体 <i>srk2abgh</i> の乾燥ストレスにおける表現型解析	67
IV-3. 考察	68
第 V 章 総合考察	89
V-1. サブクラス II とサブクラス III SnRK2 の機能重複	89
V-2. 特徴的なサブクラス I SnRK2 の生理機能	91
V-3. 植物における SnRK2 ファミリーの全体像	93
引用文献	96
謝辞	104

略語一覽

ABA;	Absciscic acid
ATP;	Adenine triphosphate
BSA;	Bovine Serum Albumin
CaMV;	Califlower mosaic virus
cDNA;	complementary DNA
CDS;	Coding sequence
CFP;	Cyan Fluorescence Protein
CIM;	Cell Invasion/Migration
CTP;	Cytidine triphosphate
DNA;	Deoxyribonucleic acid
dNTP;	Deoxyribonucleotide triphosphate
DTT;	Dithiothreitol
EDTA;	Ethylenediaminetetra acetate
EGTA;	Ethylene glycol tetraacetic acid
EtBr;	Ethidium Bromide
GFP;	Green Fluorescence Protein
GM;	Germination medium
GST;	Glutathione S-transferase
GUS;	β -glucuronidase
HEPES;	4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
JPL;	Jouanneau and Peaud-Lenoel
MES;	2-Morpholinoethanesulfonic acid
MOPS;	3-Morpholinopropanesulfonic acid
mRNA;	messenger RNA

MS;	Murashige and Skoog
NAA;	Naphthaleneacetic acid
NaF;	Sodium fluoride
Na ₃ VO ₄ ;	Ortho vanadate
PBS;	Phosphate Buffered Saline
PCR;	Polymerase chain reaction
PEG;	Polyethylene glycol
PP2C	Protein Phosphatase 2C
RI;	Radioisotope
RNA;	Ribonucleic acid
rRNA;	Ribosomal RNA
RT-PCR;	Reverse transcription PCR
SDS;	Sodium dodecyl sulfate
SNF1	Sucrose non-fermenting 1
SnRK2	SNF1-related protein kinase 2
sGFP;	Synthetic GFP
T-DNA;	Transfer DNA
Tris;	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UTR;	Untranslated region
WT;	Wild type
X-gal;	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
X-Gluc;	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide

第Ⅰ章 序論

世界では食糧不足が深刻化しており、飢餓により毎日多くの人々が命を落としている。さらに、主に発展途上国における急激な人口の増加、産業の発展と食生活の変化が、食糧問題に拍車をかけることが懸念されている。2010 年 10 月 20 日に国連人口基金 UNFPA (United Nations Fund for Population Activities) が発表した「世界人口白書 2010」によると、世界の人口は 69 億 870 万人で 2011 年には 70 億人を超える見通しである。また、地球温暖化や砂漠化などの地球環境問題の進行、ならびに洪水や旱魃をはじめとする異常気象の頻発は、農業生産へ多大な被害を及ぼしている。食糧不足を解消するためには、食糧供給を安定させることが必要である。したがって、不良環境下における農業の生産性を向上させることができれば、食糧問題の解決に向けた有効な方策の一つとなることが期待される。

植物は発芽して土に根を張ると、動物のように生育に良い環境を求めて移動することができないため、乾燥、高温、低温、高塩などの不良環境に曝されても耐えるしかない。特に乾燥は程度の軽いものを含めると日常的に頻繁に発生するものであり、陸上植物においては宿命ともいえ生長に悪影響をあたえる環境要因である。そのため、植物は乾燥などの不良環境下においても子孫を残し繁栄するために、動物にはない独自の環境ストレス耐性機構と環境ストレス応答のシグナル伝達経路を発達させてきた。植物の環境ストレスへの耐性獲得機構およびシグナル伝達に関してはこれまで盛んに分子生物学的研究がなされており、環境ストレス応答の主要因子の機能解析が進み、遺伝子組換え技術を利用した乾燥ストレス耐性作物の作出など、得られた知見の応用移転も進んでいる (Umezawa et al., 2006; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Hirayama and Shinozaki, 2010)。

植物は、乾燥などの環境ストレスに対して、個体から器官、組織、細胞に至るまで様々なレベルで生理的な応答することがわかっている。その中でも、乾燥ストレスによる気孔の速やかな閉鎖は最もよく知られた現象である。気孔の閉鎖は、植物ホルモンの 1 つであるアブシシン酸 (ABA) によって促進される。乾燥ストレス時には植物体において多量の ABA が蓄積し、気孔以外にも様々な応答を制御する (Finkelstein and Rock,

2002; Cutler et al., 2010)。細胞レベルでは、糖やプロリンなどの浸透圧調節物質（適合溶質）などの細胞を保護するための物質代謝が盛んに行なわれる (Urano et al., 2010)。このような植物の環境ストレスへの細胞や分子レベルでの応答には、多くの遺伝子発現の変化が関与する。乾燥などの環境ストレスに深く関係する遺伝子群は大きく 2 つのグループに分けることができ、1 つは前述した適合溶質を合成する酵素、トランスポーター、シャペロンなど耐性獲得への重要な働きをするグループで、機能遺伝子群と呼ばれる。もう 1 つは転写因子、プロテインキナーゼ、プロテインホスファターゼなどの遺伝子発現の制御やシグナル伝達の役割を担う制御遺伝子群である。このような遺伝子発現の制御機構は、これまでの研究で詳細に調べられている (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Chinnusamy et al., 2007; Hirayama and Shinozaki, 2010; Thomashow, 2010)。

乾燥などの環境ストレスに応答した遺伝子発現の制御経路は、ABA 依存的なシグナル伝達経路と ABA 非依存的なシグナル伝達経路の 2 つに分類することができる (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。前述のように、ABA は乾燥ストレス下において植物内で多量に蓄積され、C/TACGTGGC からなる G ボックス様のシス配列の ABRE (ABA-responsive element) を介して遺伝子発現を制御する。ABRE 配列に特異的に結合する転写因子は、AREB (ABRE-binding protein) /ABF (ABRE-binding factors) と呼ばれる。AREB/ABF は塩基性ロイシンジッパー型の転写因子群の一つであり、シロイヌナズナには 9 つ存在する。それらのうち、ABI5 が種子特異的に機能することや (Finkelstein and Lynch, 2000; Lopez-Molina and Chua, 2000)、AREB1/ABF2、AREB2/ABF4、ABF3 が植物体で主に働くことなどが明らかになっている (Yoshida et al., 2010)。

一方、ABA 非依存的な遺伝子発現を制御する転写因子として、DRE (dehydration-responsive element) /CRT (C-repeat element) シス配列に結合する DREB (DRE-binding protein) /CBF (C-repeat binding factor) ファミリーが知られている (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Thomashow, 2010)。DREB/CBF は ERF/AP2 型の DNA 結合ドメインを持つ転写因子であり、シロイヌナズナには 6 つの DREB1 (DREB1A~F) と 8 つの DREB2 (DREB2A~H) が存在する。DREB1A 遺伝

子の過剰発現植物を用いたマイクロアレイ解析において、多くの環境ストレス誘導性遺伝子が誘導され、ストレス耐性が向上することが報告されている。また、**DREB1** を利用した遺伝子工学的手法は、イネやコムギ、ダイズなどの作物への応用が始まっており、今後の展開が期待されている。一方、**DREB2A** の過剰発現植物では環境ストレス耐性の表現型に変化が見られない。これは、**DREB2A** がプロテアソームによるタンパク分解の制御を受けているためであり、DNA 結合ドメイン近傍の 30 アミノ酸を欠失させることで活性型（非分解型）を作ることができる。この活性型 **DREB2A** の過剰発現植物は、ストレス耐性の向上が認められる（Sakuma et al., 2006）。

AREB/ABF や **DREB2** の例に見られたように、転写因子の活性は翻訳後修飾によって制御されるケースが多い。このような例は枚挙にいとまがなく、翻訳後修飾が細胞内シグナル伝達の中核部分を占めていることに疑問の余地はない。数ある翻訳後修飾の中でも、タンパク質のリン酸化は特に重要なものの一つとしてよく知られている。リン酸化は、文字通りタンパク質のアミノ酸残基（セリン、スレオニン、チロシン、ヒスチジン等）にリン酸基が付加される反応のことであり、プロテインキナーゼが **ATP** からリン酸基を転移することで成立する。リン酸基は負の電荷を持つために、タンパク質の立体構造や局在などが変化し、タンパク質機能の発現および抑制が引き起こされる。一方、タンパク質のリン酸化は可逆的な翻訳後修飾であり、プロテインホスファターゼによって脱リン酸化が触媒される。このように、タンパク質のリン酸化、脱リン酸化が必要に応じて行われることによって、タンパク質機能の切り替えが可能となり、シグナル伝達にとって都合の良い様式となっている。このタンパク質のリン酸化、脱リン酸化は、植物の環境ストレス応答においても重要な役割も持つことが、これまでの多くの研究によって示唆されてきた。

植物の環境ストレス応答におけるリン酸化の代表的な例は、前述の **ABA** 応答性遺伝子発現を制御する **AREB/ABF** である。**AREB/ABF** は、**ABA** に応答したリン酸化レベルの上昇によって転写活性が調節されている（Kobayashi et al., 2005; Furihata et al., 2006）。近年、**ABA** の受容から **AREB/ABF** のリン酸化に至るまでのシグナル伝達経路が解明され、この分野の研究は劇的な進展を見せた（Cutler et al., 2010; Hubbard et al., 2010; Klingler et al., 2010; Raghavendra et al., 2010; Umezawa et al., 2010）。このシグ

ナル伝達経路を以下に要約する。基本的に3つの因子(PYR/PYL/RCAR, PP2C, SnRK2)がこのシグナル伝達系を構成する。PYR/PYL/RCAR は近年発見された可溶性の ABA 受容体である (Ma et al., 2009; Park et al., 2009)。PP2C はプロテインホスファターゼの一種であり、ABA シグナル伝達の負の制御因子としてよく知られていた (Schweighofer et al., 2004; Hirayama and Shinozaki, 2007)。SnRK2 は、SNF1-related protein kinase 2 の略で、ABA によって活性化し、シグナルを正に制御する因子である (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002, 2006; Fujii et al., 2007)。新しいシグナル伝達モデルでは、まず 1) 通常状態において、PP2C が SnRK2 を脱リン酸化して不活性化している。2) ストレスなどによって ABA 量が増加すると、PYR/PYL/RCAR に結合し、立体構造を変化させる。3) ABA 結合型 PYR/PYL/RCAR が PP2C と相互作用し、PP2C 活性を抑制する。4) SnRK2 が PP2C の負の制御から解放され、活性化して AREB/ABF 型転写因子を含む下流因子をリン酸化する。このように、ABA に依存したシグナル伝達は、ABA の受容から遺伝子発現までわずか4段階で説明することができ、基本部分は明らかになったといえる (Fujii et al., 2009; Umezawa et al., 2009)。

一方で、ABA 非依存経路におけるシグナル伝達経路には未解明の部分が多く残されている。環境ストレスに関与するプロテインキナーゼについては、これまでに多くの報告例がある。たとえば、酵母では浸透圧ストレスを受けると浸透圧センサーである SLN1 と SHO1 から MAPK (mitogen-activated protein kinase) カスケードを経由して、MAPK である HOG1 (high-osmolarity glycerol response 1) がリン酸化される。シロイヌナズナにおけるヒスチジンキナーゼ AtHK1 は、酵母の浸透圧センサーのカウンターパートとして単離されたが、そのセンサーとしての機能が示唆されている。また、多くの生物種で環境ストレス応答に関わっている MAPK についても多くの研究が行われ、シロイヌナズナに 20 個ある MAPK のうち MPK4 および MPK6 は低温や高塩ストレスで上流の MAPKK (MAPK kinase) である MKK2 依存的に活性化され、低温、高塩ストレスに対する耐性を増加させることなどが報告されてきた。その他にもカルシウム依存性のプロテインキナーゼである CDPK (calcium-dependent protein kinase) や SnRK2 も植物における環境ストレス応答へ関与することが知られている。

当研究室では、植物の環境ストレス応答に関わるプロテインキナーゼとして、SnRK2

に注目して研究を行ってきた (Yoshida et al., 2002, 2006; Umezawa et al., 2004, 2009)。SnRK2 は植物に固有のキナーゼであり、ヒメツリガネゴケのような下等植物から高等植物に至るまで高度に保存されている (図 1) (Umezawa et al., 2010)。SnRK2 は C 末端にある酸性アミノ酸に富む配列によってサブクラス I からサブクラス III まで分類され、シロイヌナズナには 10 個 (SRK2A~J/SnRK2.1~2.10) 存在する (Yoshida et al., 2002, 2006)。SnRK2 は通常は不活性化型であるが、浸透圧ストレスおよび ABA によって活性化して、下流の標的タンパク質をリン酸化してシグナルを伝達すると考えられている。これまでの研究から、SRK2J を除く全ての SnRK2 は浸透圧ストレスによって活性化することがわかっている (Boudsocq et al., 2004)。一方で ABA による活性化はサブクラス II およびサブクラス III のみで見られる。このような違いは、SnRK2 は C 末端配列に起因すると考えられており、この領域には SnRK2 全般に保存されている領域 I と酸性アミノ酸に富む領域 II が存在する (図 2)。領域 I および領域 II は、それぞれ浸透圧および ABA による活性化の制御に関わることが示されている (Yoshida et al., 2006)。

植物における SnRK2 の研究の歴史は、1990 年代にさかのぼることができる。まず、コムギにおいて ABA 誘導性の遺伝子として PKABA1 が単離され (Anderberg and Walker-Simmons, 1992)、続いてシロイヌナズナから ASK1 (SRK2A) 遺伝子がクローニングされた (Park et al., 1993)。さらに、ソラマメ孔辺細胞から ABA によって活性化する AAPK (abscisic acid-activated protein kinase) が単離され、ABA を介する気孔閉鎖を制御していることが明らかになった (Li and Assmann, 1996; Li et al., 2000)。一方、当研究室の吉田らは、シロイヌナズナ培養細胞を用いて ABA によって活性化されるプロテインキナーゼを探索し、分子量と等電点の情報にもとづいて、目的のプロテインキナーゼが SnRK2 ファミリーに相当することを確認した。さらに、SnRK2 の一つである SRK2E について機能解析を進め、SRK2E が ABA を介する気孔閉鎖を正に制御する因子であることを明らかにした (Yoshida et al., 2002)。SRK2E は、気孔閉鎖に異常を示す変異体の原因遺伝子として、遺伝学的に単離された OST1 (Open Stomata 1) と同一のものであった (Mustilli et al., 2002)。SRK2E/OST1 の研究により、SnRK2 が ABA 応答のシグナル伝達に関わる重要な因子であることが確実となった。その後も SnRK2

ファミリーの機能解析が進められ、SRK2C/SnRK2.8 が植物の乾燥耐性に関わることや (Umezawa et al., 2004)、SRK2D/SnRK2.2 および SRK2I/SnRK2.3 が互いに協調して気孔閉鎖以外の ABA シグナル伝達に関与することなどが明らかにされた (Fujii et al., 2007)。そして、2009 年になって前述の ABA 受容体、PP2C および SnRK2 からなるシグナル伝達経路が明らかとなり (Ma et al., 2009; Park et al., 2009; Umezawa et al., 2009; Vlad et al., 2009)、3 つのサブクラス III SnRK2 が ABA シグナル伝達の主要な経路を制御することが明らかとなった (Fujii and Zhu, 2009; Fujita et al., 2009; Nakashima et al., 2009)。

一方、サブクラス I および II の機能解析は、サブクラス III に比べると十分とはいえない。前述のように、サブクラス II については SRK2C/SnRK2.8 の先行研究が存在し、遺伝子の過剰発現の結果により乾燥耐性に関わることが示されている (Umezawa et al., 2004)。しかし、SRK2C/SnRK2.8 は栄養応答にも関わっていることが報告されており (Shin et al., 2007)、その機能については議論の余地が残っている。また、サブクラス I については、イネの *SAPK4* を過剰発現する植物が高塩ストレスに耐性を示すことが報告されているが (Diedhiou et al., 2008)、生理機能について議論するための情報は不足していると言わざるを得ない。これまでの研究によって、SnRK2 はファミリー全体として植物の環境ストレス応答に関わることが示唆されていること、さらにサブクラス III は ABA の主要なシグナル伝達経路に働くことが示されたことから、サブクラス I およびサブクラス II の機能解析を行うことは植物固有のプロテインキナーゼファミリーである SnRK2 の理解を深めることにつながり、ひいては植物の環境ストレス応答のシグナル伝達機構を解明する上で重要であると考えられた。そこで、本研究では、サブクラス I およびサブクラス II SnRK2 の植物における機能を解析することを目的として、シロイヌナズナの多重変異体による逆遺伝学的手法を中心としたアプローチによって研究を行った。

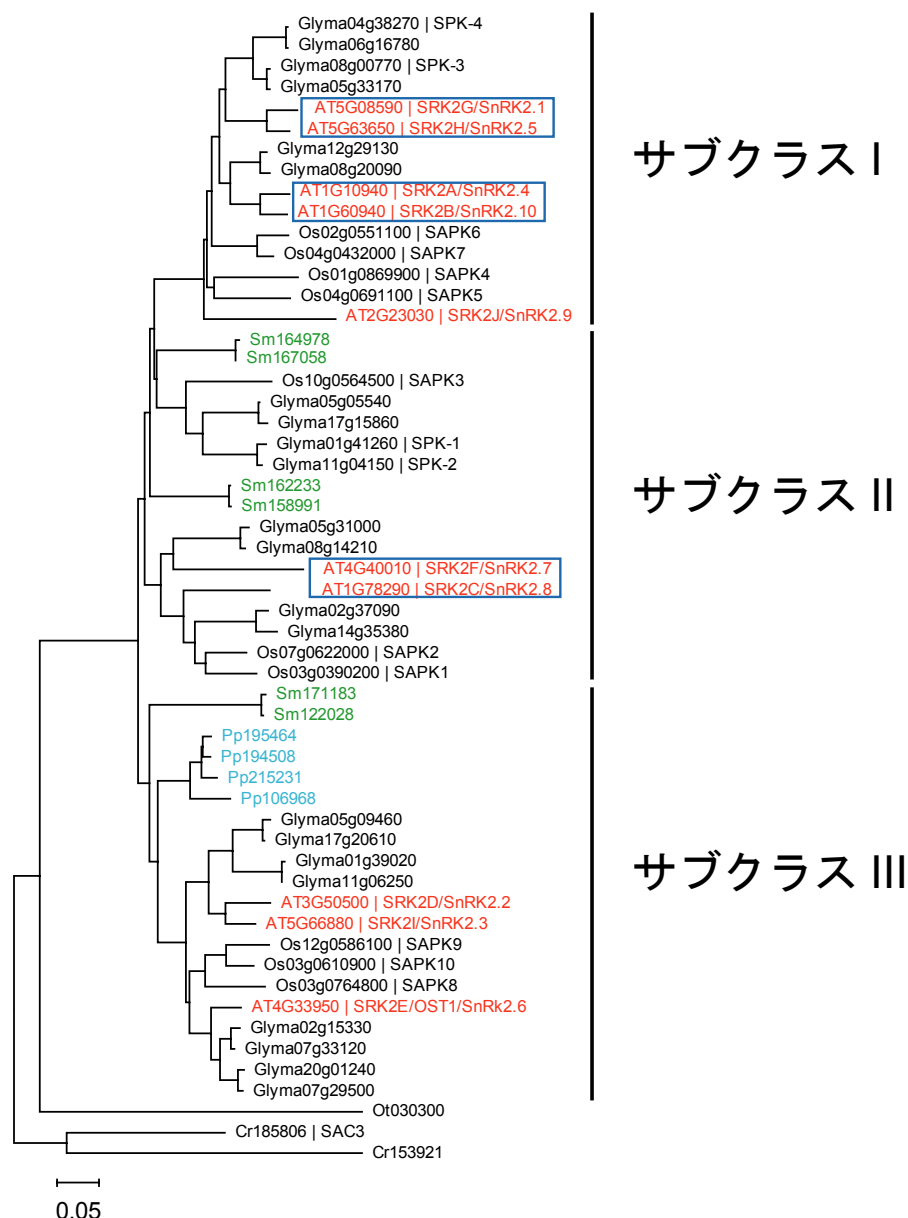


図 1. SnRK2 ファミリーの分子系統樹

植物における SnRK2 ファミリーの近縁関係を明らかにするため分子系統樹を作成した。SnRK2 ファミリーの分子系統樹の作成には、シロイヌナズナの SRK2A のアミノ酸配列を基準に相同性の高い配列を持つ遺伝子を集めた。生物種としてはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、ダイズ (*Glycine max*)、イネ (*Oryza sativa*)、イヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*)、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*)、オステロコッカス (*Ostreococcus tauri*) を対象とした。分子系統樹の作成には、これまで同定されているアミノ酸配列を用いて作成した。分子系統樹は MEGA4.0 (<http://www.megasoftware.net/>) を用いて作成した。

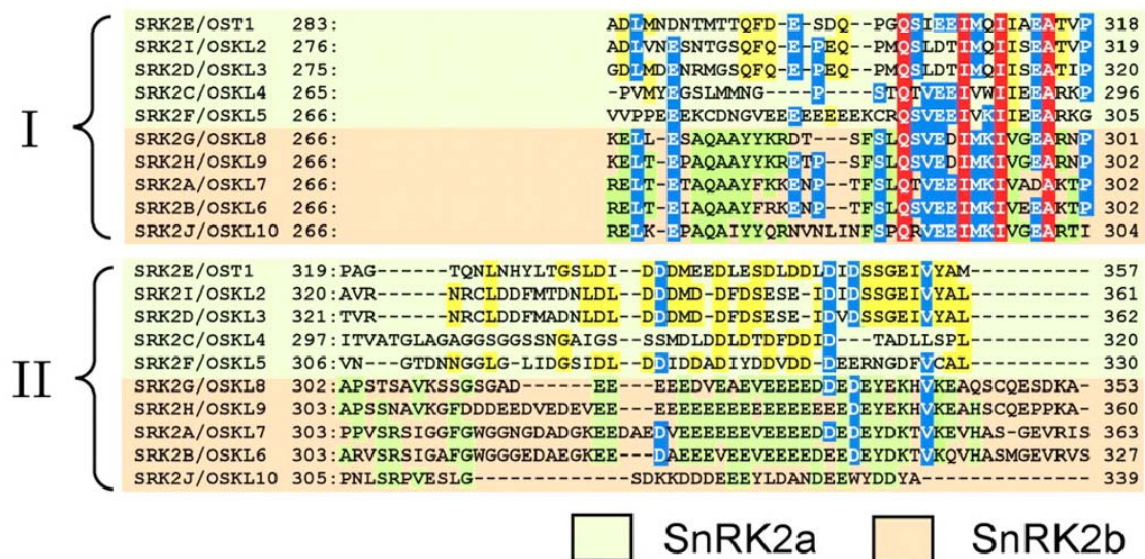


図 2. SnRK2 ファミリーの C 末端領域の比較

SnRK2 の内部構造は N 末端側のキナーゼ触媒部位と、C 末端側の領域に分けられる。この図はシロイヌナズナ SnRK2 ファミリーの C 末端領域を並べたものである。上から、サブクラス III (SRK2D,E,I)、サブクラス II (SRK2C,F) およびサブクラス I (SnRK2A,B,G,H,J) という順になっている。この C 末端領域はさらに二つに分けられ、前半部分の領域 I、そして後半部分の領域 II である。領域 I がすべての SnRK2 でよく保存されているのに対し、領域 II には酸性アミノ酸に富んだ特徴的な配列が存在し、サブクラス II, III ではアスパラギン酸が多く、サブクラス I にはグルタミン酸が多いという違いがある。これまでの研究から (Yoshida et al. 2006)、領域 I は浸透圧ストレスによる活性化に、領域 II は ABA による活性化に重要なことがわかっている。

(図は Yoshida et al. (2006) より転載)

第 II 章 材料および方法

II-1. 実験材料

本研究にはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた。野生型植物としては Columbia 株 (Col-0) を用いた。

II-2. 生育条件

II-2-1. 寒天培地における生育

寒天培地におけるシロイヌナズナの生育には 3% スクロース GM 培地を用いた。

3% スクロース GM 寒天培地の組成は、4.6 g/l ムラシゲ、スクーグ培地用混合塩類 (日本製薬)、0.5 g/l MES-KOH (pH5.7)、30 g/l スクロース、1 ml Gamborg Vitamin Solution 1000 X (SIGMA)、8 g/l Bacto™ Agar (BD) とした。マイクロチューブに入れた種子を 70% エタノールでリンスした後、滅菌溶液 (1% 次亜塩素酸ナトリウム、0.02% Triton X-100) で 10 分間滅菌した。滅菌水で種子を十分にすすいだ後、GM 寒天培地に播種した。4℃の暗所にて 2 日間静置し、その後植物育成チャンバーCF-405 (TOMY) 内にて 22℃、白色光 ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、明期 16 時間 / 暗期 8 時間の条件で生育した。

II-2-2. 鉢植えにおける生育

鉢植えでのシロイヌナズナの生育にはプロフェッショナル用培土 (ダイオ化成) を用いた。水に浸けた種子を 4℃の暗所で 2 日間静置した後、土に播種した。22℃、白色光 ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、明期 16 時間 / 暗期 8 時間の条件の栽培室にて生育した。

II-3. シロイヌナズナ培養細胞の生育条件

本研究に用いたシロイヌナズナ懸濁培養細胞 T87 株は理化学研究所バイオリソースセンターから分与された。以下に培養に用いた液体培地の組成を示す。

JPL 液体培地: 1965 mg/l KNO_3 、132 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、111 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、56.308

mg/l KH_2PO_4 、21.847 mg/l Na_2HPO_4 、1.86 mg mg/l H_3BO_3 、6.69 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、3.18 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.249 mg/l KI 、0.075 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.0075 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.0075 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、5.56 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、7.44 mg/l EDTA-2Na 、100 mg/l ミオイノシトール、2 mg/l グリシン、0.5 mg/l ニコチン酸、0.5 mg/l ピリドキシン塩酸塩、0.4 mg/l チアミン塩酸塩、100 mg/l カゼイン加水分解物、15 g/l スクロース、1 μM NAA

上記の液体培地を用いて T87 細胞を 22°C、連続光（白色光、60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）条件で振とう培養（120 rpm）した。また、T87 細胞は 1 週間ごとに新しい液体培地への植え継ぎを行った。

II-4. T-DNA 挿入変異体の単離および多重変異体の作成

シロイヌナズナの T-DNA 挿入変異体データベースである T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) を用いて *SRK2A*、*SRK2B*、*SRK2G*、*SRK2H*、*SRK2C*、*SRK2F* 遺伝子の T-DNA 挿入変異体を検索した。SALK_075890 (*srk2a*)、WiscDsLox 233E9 (*srk2b*)、SALK_073395 (*srk2c*)、SALK_042338 (*srk2f*)、GABI_081B08 (*srk2g*)、GABI_104E01 (*srk2h*) の種子を Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) より取り寄せた。植物より抽出したゲノミック DNA を用いて T-DNA 領域の右側部分のプライマーと各遺伝子側プライマーで PCR を行い、T-DNA をホモに持つ個体を選抜した。2 重変異体である *srk2cf* は、*srk2c* と *srk2f* の交配により作成した。2 重変異体 (*srk2ab*、*srk2gh*) と 4 重変異体 (*srk2abgh*) の作成は *srk2a*、*srk2b*、*srk2g*、*srk2h* の掛け合わせにより作成した。多重変異体を含む全ての T-DNA 挿入変異体において、植物より RNA を抽出して RT-PCR 法によって、標的遺伝子の発現の有無を確認した。

II-5. アグロバクテリウムへのコンストラクトの導入

アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) には GV3101 株または C58 株を用いた。導入するプラスミドをアグロバクテリウムのコンピテントセルと混ぜ、(2.20

kV、10 μ F、600 Ω 、2.5 msec) の条件でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション装置には Micropulser (Bio-Rad) を用いた。プラスミドを導入後、抗生物質を含む LB 寒天培地 (25 g/l LB 培地 Miller (ナカライテスク)、15 g/l 寒天粉末 (純正化学)) にてアグロバクテリウムを選抜した。抗生物質は C58 株の場合は、50 mg/l ゲンタマイシン (SIGMA)、50 mg/l リファンピシン (SIGMA)、50 mg/ml カナマイシンを使用し、GV3101 株の時は前述の 3 つに 5 mg/ml テトラサイクリン (SIGMA) を加えた。

II-6. シロイヌナズナの形質転換

II-6-1. 形質転換用シロイヌナズナの育成

シロイヌナズナの形質転換には、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) による花序浸し法 (Clough and Bent, 1998) を行った。鉢植えで野生型シロイヌナズナを育成した。形質転換に用いるシロイヌナズナの育成のみ、土にはジフィーミックス (サカタのタネ) を用いた。約 5 週間後に第 1 花茎が伸びてきたら側茎が多く生えるように第 1 花茎を株元から切り取った。第 1 花茎を切り取って約 10 日後の植物を形質転換に用いた。

II-6-2. アグロバクテリウムによる感染

感染に用いるアグロバクテリウムを、抗生物質を含む 2 ml LB 液体培地で 2 日間前培養 (28°C) した。前培養したアグロバクテリウム培養液を 1 ml を新しい培地 600 ml に継代し、12-16 時間培養した。培養したアグロバクテリウムを 4°C、4500g で 10 分間遠心分離して集菌した。菌体を 500 ml infiltration buffer に懸濁した。infiltration buffer の組成は 2.3 g/l ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、112 μ l/l Gamborg Vitamin Solution 1000 X、50 g/l スクロース、10 μ g/l 6-ベンジルアミノプリン (SIGMA)、0.02% SILWET L-77 (GE 東芝シリコーン) である。植物体を菌懸濁液に根本の花芽までしっかり液に浸かるように 10 秒ほど懸濁液に浸した。その後、感染植物を通常の方法で育てサヤが成熟したら刈り取りを行った。1 週間ほど紙袋にシリカゲルと共に入れ乾燥させた後、種子を精製した。

II-6-3. 形質転換シロイヌナズナの選抜 (T1 種子の選抜)

0.5 ml の T1 種子を 50 ml ポリプロピレンチューブに入れ、70% エタノールと 2.5% 次亜塩素酸溶液を用いて滅菌処理をした。4℃、暗黒中で 1 週間静置した。種子を 40 ml 0.8% Bacto™ Agar (200 mg/l クラフォラン) に懸濁し、30 mg/l カナマイシン、200 mg/l クラフォランを含む 3% スクロース GM 寒天培地 (GMK 寒天培地) に均一に広げた。プレートの直径は 15 cm のものを用いて、1 プレートあたり 4 ml の種子懸濁液を塗り広げた。約 10 日後、緑色の大きな個体を新しい GMK 寒天培地に移植して、さらに 1 週間生育させた。その後、ポットに移植して土植で生育させた。解析には T2 世代以降の植物を用いた。

II-7. T87 培養細胞の形質転換

T87 培養細胞の形質転換はアグロバクテリウム法により行った。以下に用いた試薬を示す。

CIM 培地: 3.3 g/l ガンボーク B5 培地用混合塩類(日本製薬)、0.5 g/l MES-KOH(pH5.7)、30 g/l スクロース、1 ml Gamborg Vitamin Solution 1000 X、1 μM NAA 、6 g/l Bacto™ Agar

継代 1 週目の培養細胞を 0.5 mm のナイロンメッシュで漉して新しい培地で 10 倍に希釈した。細胞濃度が 30 mg/ml になるまで 2-3 日間培養した。感染に用いたアグロバクテリウムは、2 日間培養したものを集菌し滅菌水で 3 回洗浄した後、500 μl の JPL 液体培地に懸濁した。

100 ml フラスコに T87 培養細胞懸濁液を 5 ml とアグロバクテリウム懸濁液を 50 μl 加え、120 rpm で 2 日間共存培養した。共存培養後、培養細胞を 200 mg/l クラフォラン (アベンティス) を含む JPL 液体培地で 3 回洗浄し、5 ml の JPL 液体培地 (200 mg/l クラフォラン) で 3 日間振とう培養した。その後、滅菌したナイロンメンブレン (直径 15 cm) を CIM 寒天培地 (200 mg/l クラフォラン) に敷き、ナイロンメンブレン上に

培養細胞を均一に広げた。1週間後、培養細胞が載ったメンブレンを 30 mg/l カナマイシン（明治製菓）を含む CIM 寒天培地（200 mg/l クラフォラン）に移し替えて選抜を行った。3週間後、出現した緑色のカルスを形質転換体として、カルスを新しい CIM 寒天培地（30 mg/l カナマイシン、200 mg/l クラフォラン）に移植した。

寒天培地で生育させたカルスの一部を JPL 液体培地にて増殖し、以後の SnRK2 のゲル内リン酸化の実験に用いた。

II-8. RNA 抽出、精製

RNA 抽出には TRIzol Reagent（Invitrogen）を用いた。

II-8-1. TRIzol Reagent を用いた RNA 抽出

液体窒素で凍結させた植物試料を乳鉢と乳棒を用いて粉砕した。粉砕試料を 50℃に暖めた TRIzol へ入れ攪拌し、50℃の恒温槽に 10 分間インキュベーションして RNA を抽出した。1/5 量のクロロホルムを加えて攪拌した。4℃、18000g で 15 分間遠心分離した後、上清を等量のイソプロパノールに加えて攪拌した。4℃、18000g で 15 分間遠心分離し回収した RNA を 70% エタノールですすいだ。その後、RNA を 1ml Milli Q 水に溶解した。

II-8-2. 塩化リチウム沈殿による RNA の精製

RNA 溶液に 1/3 量の 8 M LiCl を加え、-20℃で 12 時間以上静置し RNA を沈殿させた。4℃、18000g で 15 分間遠心分離し、精製した RNA を 70% エタノールですすぎ、適量の Milli Q 水に溶解した。以後のマイクロアレイ解析、RT-PCR、ノーザンブロット解析にはこの RNA 溶液を実験に使用した。定量 RT-PCR には、抽出した 50 µg total RNA に対して 10 unit DNase I（タカラバイオ）を用いて DNA を除去した後、cDNA 合成に用いた。

II-8-3. cDNA の合成

total RNA からの cDNA の合成には SuperScript™ III Reverse Transcriptase

(Invitrogen)を使用した。2 µg/4µl total RNA に 2 µl dNTP (各 2.5 mM) と 0.5 µl random hexamer (100 ng/µl) または 0.5 µl oligo (dT)₂₀ (50 µM) を加えて混合し、65℃で 5 分間処理した後氷令した。熱処理した RNA 溶液に 2 µl 5× First-Strand Buffer (Invitrogen)、0.5 µl 0.1 M DTT、0.5 µl Recombinant RNase Inhibitor (タカラバイオ)、0.5 µl SuperScript™ III Reverse Transcriptase を加え混合し、50℃で 1 時間逆転写反応を行った。random hexamer を用いた時は 50℃で処理する前に 25℃で 5 分間処理した。逆転写反応の後、70℃で 15 分間処理し逆転写酵素を失活させた。

II-9. ノーザンブロット解析

ノーザンブロット解析で用いた試薬を以下に示す。

10× MOPS バッファー: 0.2 M MOPS、50 mM 酢酸ナトリウム (pH7.0)、10 mM EDTA (pH7.0)

ホルムアルデヒド変性ゲル: 1% (w/v) アガロース、1× MOPS、2.2% ホルムアルデヒド

RNA 染色溶液: 55% ホルムアミド、6% ホルムアルデヒド、1× MOPS 緩衝液、5% グリセロール、0.1% BPB、33 mg/l 臭化エチジウム

20× SSC (pH7.0) : 3 M NaCl、0.3 M クエン酸ナトリウム
HCl で pH7.0 に合わせた。

20× SSPE (pH7.0) : 3M NaCl、173 mM NaH₂PO₄、25mM EDTA
HCl で pH7.0 に合わせた。

50× デンハルト溶液: 1% (w/v) BSA、1% (w/v) Ficoll 400、1% (w/v) ポリビニルピロリドン

ハイブリダイゼーション溶液: 5× SSPE、5× デンハルト溶液、0.5% SDS

10 µg/5 µl の RNA と 10 µl RNA 染色溶液を混合した溶液を 65°C で 15 分間処理し氷冷した。1% アガロース変性ゲルにて 50 V で約 2 時間電気泳動した。20× SSC を用いてキャピラリーブロッティングにより RNA をゲルからナイロンメンブレン Hybond-N⁺ (GE ヘルスケア) へ転写した。転写したメンブレンは UV クロスリンクをした後、80°C で 2 時間ベーキングした。RI 標識プローブの作成には各遺伝子の ORF を鋳型にして、*BcaBEST*TM Labeling Kit (タカラバイオ) と [α -³²P]dCTP (PerkinElmer) を用いて、ランダムプライマー法により作成した。作成したプローブは、使用時にハイブリダイゼーション溶液 1 ml あたり 100 µg の 1 本鎖サケ精子 DNA (SIGMA) と混合し、95°C で 3 分間処理し氷冷したものを使用した。メンブレンが入ったハイブリダイゼーションバッグにハイブリダイゼーション溶液を入れ、65°C で 2 時間プレハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション溶液をバッグから捨て、プローブとハイブリダイゼーション溶液を混ぜたものをバッグに入れ、65°C で 16 時間ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを 2× SSC で軽くすすいだ後、2× SSC (0.1% SDS、65°C)、1× SSC (0.1% SDS、65°C)、0.1× SSC (0.1% SDS、65°C) の順に各溶液を 2 回ずつ用いてメンブレンを洗浄した。洗い終わったメンブレンは 2× SSC ですすいだ後サランラップで包み、上から X 線フィルム、増感紙の順に載せ-80°C でオートラジオグラフを行い、シグナルを検出した。

II-10. マイクロアレイ解析

本実験でマイクロアレイ解析を行うに当たり、Affymetrix 社の Gene Chip system (Arabidopsis ATH1 Genome Array) を用いた。total RNA からの cDNA 合成、ラベリング、ハイブリダイゼーション、染色、シグナル検出までの全ての操作を Affymetrix 社のキットおよび装置のプロトコール通りに行った。以下に実験手順を示す。

II-10-1. cDNA 合成

50 µg total RNA を RNeasy MinEluteTM Cleanup Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

精製した 5 µg/8 µl total RNA と 2 µl Diluted poly-A RNA control、2 µl 50 µM T7-Oligo (dT) Primer を混合し、70℃で 10 分間処理した後、直ちに氷令した。熱処理した RNA 溶液に 7 µl First-Strand Master Mix (4 µl 5× 1st Strand Reaction Mix、1 µl dNTP (各 10 mM)、4 µl DTT) を混ぜ、42℃で 2 分間処理をした。さらに、1 µl SuperScript II を加えてよく攪拌し 42℃で 1 時間処理し First Strand cDNA を合成した。次に 4℃で 2 分間静置した後、130 µl Second-Strand Master Mix (91 µl RNase-free Water、30 µl 5× 2nd Strand Reaction Mix、3 µl dNTP (各 10 mM)、1 µl *E. coli* DNA ligase、4 µl *E. coli* DNA polymerase I、1 µl RNase H) を加えてよく攪拌した。16℃で 2 時間反応を行い Second Strand cDNA を合成した。4 µl T4 DNA Polymerase を混合し 16℃で 5 分間静置した後、4 µl 0.5 M EDTA を加えて反応を停止した。合成した Double-Strand cDNA は GeneChip Sample Cleanup Module (cDNA Cleanup Spin Column) を用いて精製した。精製により得た cDNA 溶液 (約 12 µl) を全量使用して続くラベリング反応を行った。

II-10-2. ラベリング反応

cDNA 溶液に 40 µl IVT Labeling Mix (8 µl RNase-free Water、4 µl 10× IVT Labeling Buffer、12 µl IVT Labeling NTP Mix、4 µl 10× IVT Labeling Enzyme Mix) を加えよく混ぜた。37℃で 16 時間反応させて、cDNA からビオチンラベル化された cRNA を合成した。合成した cRNA は GeneChip Sample Cleanup Module (cRNA Cleanup Spin Column) を用いて精製した。精製した 20 µg/32 µl cRNA と 8 µl Fragmentation Buffer を混ぜ、94℃で 35 分間処理し cRNA を metal-induced hydrolysis により 35 塩基から 200 塩基のフラグメントに断片化した。

II-10-3. ハイブリダイゼーション

GeneChip Probe Array ATH1 に 200 µl Pre-Hybridization Mix を入れ、45℃、60 rpm で 30 分間プレハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションオープンには Hybridization Oven 640 (Affymetrix) を用いた。Hybridization Cocktail (15 µg/30 µl Fragmented cRNA、5 µl Control Oligonucleotide B2、15 µl 10× Eukaryotic Hybridization Controls、150 µl 2× Hybridization Mix、30 µl DMSO、70 µl Nuclease-free Water) を

99℃で 5 分間処理した。その後、45℃で 5 分間静置し 18000g で 5 分間遠心分離して不溶物を沈殿させた。Probe Array から Pre-Hybridization Mix を捨てて、遠心分離した Hybridization Cocktail の上清を 200 µl 注入した。同じオープンを用い 45℃、60 rpm で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。

II-10-4. Probe Array の洗浄と染色

ハイブリダイゼーション終了後、Probe Array から Hybridization Cocktail を抜き取り、250 µl Wash Buffer A で満たした。Probe Array の洗浄と染色の操作は全自動装置 Fluidics Station 450 (Affymetrix) を使用して行った。使用した Protocol は FS450_0001 であり、以下に操作の概略を示す。

Post Hyb Wash #1

30℃の Wash Buffer A での洗浄 (2 mixes/cycles*) を 10 回繰り返した。

Post Hyb Wash #2

50℃の Wash Buffer B での洗浄 (15 mixes/cycles) を 10 回繰り返した。

1st Stain

35℃の Stain Cocktail 1 で 5 分間染色した。

Post Stain Wash

30℃の Wash Buffer A での洗浄 (4 mixes/cycles*) を 10 回繰り返した。

2nd Stain Wash

35℃の Stain Cocktail 2 で 5 分間染色した。

3rd Stain Wash

35℃の Stain Cocktail 3 で 5 分間染色した。

Final Wash

35℃の Wash Buffer A での洗浄 (4 mixes/cycles*) を 15 回繰り返した。その後、Array Holding Buffer を満たした。

*mixes/cycles; Probe Array を均一に洗浄する目的で、バッファを Probe Array へ注入して抜く操作を繰り返すこと。

II-10-5. シグナルの検出

Probe Array のシグナル検出はアレイスキャナー GeneChip Scanner 3000 7G (Affimetrix) を用いて行った。スキャンして得られた CELL ファイルを以後のデータ解析に使用した。

II-10-6. データ解析

得られた CELL ファイルを統計ソフトウェア R (<http://www.r-project.org/>) 上で動くパッケージソフトウェアの afflymGUI に取り込みデータ解析を行った。

II-11. 定量 RT-PCR

定量 RT-PCR には SYBR *Premix* Ex Taq II (タカラバイオ) を用いた。サーマルサイクラーおよび検出装置には ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いた。反応液の組成 (計 10 μ l) は 2.5 μ l cDNA (1/10 希釈したもの)、5 μ l SYBR *Premix* Ex Taq II、0.04 μ l Forward primer (100 μ M)、0.04 μ l Reverse primer (100 μ M)、2.42 μ l MilliQ 水とした。反応の条件は 95°C、30 秒、(95°C、5 秒、60°C、31 秒) を 40 回繰り返した。その後 60°C から 95°C まで温度を 1°C ずつ上昇させ、増幅フラグメント DNA の融解温度 (T_m 値) を求めた。内部標準としては 18S rRNA を用いた。

II-12. 植物体および T87 培養細胞からのタンパク質抽出

タンパク質抽出に用いた抽出液の組成を以下に示す。

タンパク質抽出液: 50 mM HEPES-KOH (pH7.5)、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1mM Na_3VO_4 、25 mM NaF、50 mM β -グリセロリン酸、20% グリセロール、1 mM DTT、1% Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts (SIGMA)

植物体からタンパク質を抽出する場合は、凍結サンプルとジルコニアビーズ (直径 2.3 mm) が入ったマイクロチューブを Capmix (ESPE) で 10 秒間激しく振とうして

サンプルを粉砕した。粉砕サンプルにタンパク質抽出液を加え攪拌してタンパク質を抽出した。培養細胞からタンパク質を抽出する場合は、培養細胞が入ったマイクロチューブにタンパク質抽出液を加え、電動ペッスルでホモジナイズしタンパク質を抽出した。サンプルと抽出液のホモジネートは 4℃、18000g で 10 分間遠心分離して、上清を新しいマイクロチューブに移した。以後のゲル内リン酸化実験にはこの粗抽出のタンパク質を用いた。また、タンパク質濃度の測定には 1/10 に希釈したサンプルを Bradford 法により測定した。

II-13. ウェスタンブロッティング (SRK2A-GFP の検出)

ウェスタンブロッティングには Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗体と反応させて化学発光により検出するシステムを用いた。以下に実験に用いた試薬を示す。

30% アクリルアミド溶液: 29.2% アクリルアミド、0.8% N-N'-メチレンビスアクリルアミド

SDS-ポリアクリルアミドゲル (8% 分離ゲル 10 ml): 2.7 ml 30% アクリルアミド溶液、2.5 ml 1.5 M Tris-HCl (pH8.8)、0.1 ml 10% SDS、0.1 ml 10% 過硫酸アンモニウム、6 µl TEMED、4.6 ml MilliQ 水

SDS-ポリアクリルアミドゲル (濃縮ゲル 5 ml): 0.83 ml 30%アクリルアミド溶液、0.63 ml 1.0 M Tris-HCl (pH8.8)、0.05 ml 10% SDS、0.05 ml 10% 過硫酸アンモニウム、5 µl TEMED、3.4 ml MilliQ 水

2× サンプルバッファー: 100 mM Tris-HCl (pH6.8)、3% SDS、8% スクロース、0.04% BPB、200 mM DTT

電気泳動バッファー: 25 mM Tris、192 mM グリシン、0.1% SDS

転写バッファー: 25 mM Tris、195 mM グリシン、20% メタノール

TBS (Tris-buffered saline) -T (Tween) バッファー: 10 mM Tris (pH7.5)、150 mM NaCl、0.1% Tween 20 (SIGMA)

粗抽出タンパク質 40 µg/10 µl と 10µl の 2× サンプルバッファーを混合し 72℃で 10 分間処理した。サンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて、125V の定電圧で 110 分間電気泳動した。電気泳動後、ゲルからタンパク質を PVDF メンブレン Immobilon-P (Millipore) ヘタンク式のプロットティング装置を用いて転写した。転写の条件は、20 V の定電圧で 3 時間行った。プロットティング後、メンブレンを 5% スキムミルク (和光純薬) を含む TBS-T バッファーで 15 時間振とう (50rpm) してブロッキング処理を行った。ブロッキング後メンブレンを TBS-T バッファーで洗浄した。TBS-T バッファーで 3000 倍に希釈した GFP 抗体 (anti-GFP purified IgG/rabbit, MBL) を用いて 1 次抗体反応を 1 時間行った。メンブレンを 15 分間 TBS-T バッファーで洗浄した後、TBS-T バッファー (5% スキムミルク) で 3000 倍に希釈した IgG 抗体 Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey (GE ヘルスケア) で 2 次抗体反応を行った。1 時間の抗体反応後、TBS-T バッファーで 15 分間振とうして洗浄した。洗浄したメンブレンに 3 ml Luminata Classico Western HRP substrate (Millipore) をかけて化学発光を起こした。化学発光の検出は X 線フィルム Hyperfilm ECL (GE ヘルスケア) に露光させて行った。

II-14. *in vitro* におけるリン酸化実験

EEL および ABF3 に関してはキット Rabbit Reticulocyte Systems (Promega) を用いて *in vitro* 翻訳系でタンパク質を作らせた。EEL および ABF3 の各全長 CDS に *myc* タグをつなげた融合遺伝子をキットの指示に従って蛋白質を合成した後、抗 *myc* 抗体を用いて免疫沈降により精製した。SRK2C に関しては、全長 CDS に *GST* タグをつなげた融合遺伝子を大腸菌に導入しタンパク質を作らせた後、グルタチオン-セファロースカラムを用いて精製した。

その後、SRK2C と EEL および ABF3 を *in vitro* において $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の存在下においてリン酸化反応を行った。その後 X 線フィルムにてシグナルを検出した。

II-15. ゲル内リン酸化実験

SnRK2 のリン酸化活性を調べる基質としてはヒストン (Histone from calf thymus Type III-S, SIGMA) を用いた。SnRK2 のゲル内リン酸化実験に使用した試薬を以下に示す。

洗浄液 I : 25 mM Tris-HCl (pH7.5)、5 mM NaF、0.1 mM Na_3VO_4 、0.5 mg/ml BSA、0.1% Triton X-100、0.5 mM DTT

Renature Buffer: 25 mM Tris-HCl (pH7.5)、5 mM NaF、0.1 mM Na_3VO_4 、1mM DTT

Reaction Buffer: 40 mM HEPES-KOH (pH7.5)、0.1 mM EGTA、20 mM MgCl_2 、1 mM DTT、

洗浄液 II : 5% トリクロロ酢酸、1% ピロリン酸ナトリウム

粗抽出タンパク質 40 $\mu\text{g}/10\text{ }\mu\text{l}$ と 10 μl の 2 \times サンプルバッファーを混合し 72°C で 10 分間処理した。サンプルを 0.5 mg/ml ヒストンを含む SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて、125V の定電圧で 110 分間電気泳動した。電気泳動後、ゲルを 100 ml 洗浄液 I が入ったタッパーに浸け、室温で 30 分間振とう (40 rpm) した。この操作を 3 回繰り返してゲルを洗浄した。次にタッパーに Renature Buffer を 100 ml 入れ 4°C で振とうしてタンパク質をリホールディングした。リホールディングの処理は 5 回繰り返して、最初の 3 回は 30 分間で、4 回目は 10 時間、5 回目は 30 分間行った。タッパーに Reaction Buffer を 100 ml 入れ室温で 1 時間振とうした。その後プラスチックバッグにゲルを入れ、1.85 MBq $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (PerkinElmer) と 20 μM cold ATP を 12.5 ml Reaction Buffer と混合しバッグに加え、室温で 2 時間反応処理を行った。反応後、100 ml 洗浄液 II で 30 分間振とうしてゲルの洗浄を行った。これを 4 回繰り返した。ゲルを 5% グリセロールで 5 分間振とうした。ゲルをラピドライ (ATTO) を用いて、完全に乾燥させた。

乾燥させたゲルの上に X 線フィルム RX-U（富士フィルム）、増感紙の順で載せ-80℃でオートラジオグラフを行い、リン酸化のシグナルを検出した。

II-16. GUS 染色による遺伝子発現組織の解析

GUS 染色実験に用いた試薬を以下に示す。

GUS 染色溶液（用時調製した。）：50 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.2）、0.2% Triton-X-100、2 mM フェロシアン化カリウム（和光純薬）、2 mM フェリシアン化カリウム（SIGMA）

組織透明化液：8 g 抱水クロラル（和光純薬）、1 ml グリセロール（SIGMA）、2 ml MilliQ 水。抱水クロラルが完全に溶けるまで攪拌した。

24 穴プレートの穴に植物を各ラインにつき 2 個体ずつ入れ、2 ml 90%アセトン（-20℃）を加えて-20℃の冷凍庫で 30 分間静置した。アセトンを捨て、1 ml GUS 染色溶液を入れて軽く攪拌して GUS 染色溶液を捨てた。この操作を 2 回繰り返して、アセトンを完全に除いた。1 mg/ml X-Gluc（Rose Scientific）を含む GUS 染色溶液を 1 ml 加えて、30 分間減圧処理をした。その後、12 時間 37℃のインキュベーターで反応を行った。GUS 染色溶液を除き、30 分ずつエタノールアップシリーズ（20%、30%、50%、75%）を 1 ml ずつ行った。75%エタノールを途中で交換しながら、クロロフィルを完全に組織から除いた。その後、30 分ずつエタノールダウンシリーズ（70%、50%、30%、20%）を 1 ml ずつ行い、最後に 1 ml の MilliQ 水に浸した。観察はスライドガラスに染色した植物をのせ、組織透明化液を添加してプレパラートを作成した。植物全体の撮影にはスキャナーGT-X900（EPSON）を用いた。また、光学顕微鏡による観察にはAxioplan2（Zeiss）を用いた。

II-17. プロトプラストを用いた遺伝子の一過的発現

以下に実験に用いた試薬を示す。

酵素液: 20 mM MES-KOH (pH5.7)、1% (w/v) セルラーゼ「オノズカ」RS (ヤクルト薬品工業)、0.3% マセロザイム R10 (ヤクルト薬品工業)、0.4 M マンニトール、20 mM KCl、10 mM CaCl₂

W5 Solution : 2 mM MES-KOH (pH5.7)、154 mM NaCl、125 mM CaCl₂、5 mM KCl

MMG Solution : 4 mM MES-KOH (pH5.7)、0.4 M マンニトール、15 mM CaCl₂

PEG-Ca²⁺トランスフェクション溶液 : 40% (w/v) PEG4000 (Fluka)、0.2 M マンニトール、100 mM CaCl₂

WI Solution : 4 mM MES-KOH (pH5.7)、0.5 M マンニトール、20 mM KCl

土植えて1ヶ月ほど育てた植物のロゼット20枚をカミソリ(フェザー)で数mm角に細断し、酵素液25 mlが入った300 ml フラスコへ直ちに加えた。22℃、暗黒中で3時間静置してプロトプラストを単離した。プロトプラスト懸濁液に25 ml W5 Solutionを混ぜて、70 μmのナイロンメッシュで濾過した。100gで2分間遠心して、上清を捨てプロトプラストを10 ml W5 Solutionに懸濁した。その後、プロトプラスト懸濁液を氷上で30分間静置した。プロトプラスト懸濁液を100gで2分間遠心し、上清を少し(約500 μl)残して捨てた。プロトプラスト濃度をトーマ血球計算盤(エルマ)を用いて計測した。MMG Solutionを用いてプロトプラスト濃度を1×10⁵個/mlに希釈した。

導入するプラスミドを20 μg/10 μlをプロトプラスト懸濁液100 μl (1×10⁴個のプロトプラスト)と混ぜた。そこへPEG-Ca²⁺トランスフェクション溶液を110 μlを加えて穏やかによく混合し15分間静置した。1 mlのW5を静かに加えて、穏やかによく混合しPEGを洗浄した。100gで2分間遠心して上清を捨て、プロトプラストを500 μlのWIに懸濁した。その後12穴プレートに移して、22℃、暗黒中で1晩培養した。

II-18. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた GFP 蛍光の観察

蛍光の検出には共焦点顕微鏡 LSM5 PASCAL (Carl Zeiss) を用いた。GFP 蛍光の励起波長は 488 nm、検出波長は 505-530 nm で観察を行った。

II-19. 植物への乾燥および ABA 処理

マイクロアレイ解析および定量 RT-PCR 解析に用いた植物サンプルは以下に述べる方法により処理を行った。2 週間 3% スクロース GM 寒天培地で育てた植物を、プレートから根を切らないように引き抜いた。各植物ライン、処理区ごとに、滅菌水 10 ml が入ったシャーレ (直径 9 cm) へ約 20 個体ずつ移した。22°C、連続光 (白色光, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の条件で 12 時間~15 時間静置して、プレートから引き抜いた時に植物が受けたストレスを脱感作した。脱感作処理後、ABA 処理の場合はプレートから水をピペットで吸い取り捨て、100 μM ABA を 10 ml 注いで、各時間処理した。乾燥処理の場合は、プレートから取り出した植物をキムタオル (日本製紙クレシア) で水分をよく除いた後、ろ紙 (定性分析用 No.1, アドバンテック) を敷いたプレートに移して乾燥処理を行った。1 時間乾燥処理はプレートの蓋を全開で行い、4 時間乾燥処理は 80% 蓋を閉め開口部を変えながら乾燥処理を行った。処理後の植物は液体窒素で凍結させ、RNA 抽出を行うまで -80°C のフリーザーで保存した。

II-20. T87 培養細胞への浸透圧ストレスおよび植物ホルモン処理

継代後 1 週間ぐらいの T87 細胞培養液をマイクロチューブに 500 μl ずつ分注した。マイクロチューブに 500 μl の NaCl、(+/-) アブシシン酸 (ABA; SIGMA)、インドール-3-酢酸 (IAA; SIGMA)、6-ベンジルアミノプリン (BA; SIGMA)、ジベレリン A₃ (GA; 和光純薬)、1-アミノシクロプロパンカルボン酸 (ACC; SIGMA)、サリチル酸 (SA; SIGMA)、ジャスモン酸メチル (MeJA; 和光純薬)、ブラシノライド (BL; 第一ファインケミカル) を各々加えて転倒混和した。30 分間処理後マイクロチューブから溶液を完全に捨て、サンプルを液体窒素で凍結しタンパク質抽出に用いるまで -80°C の冷凍庫で保存した。

II-21. 乾燥耐性試験

土を詰めたバットに 2 日間低温処理した種子を播いた。2 週間後、植物の大きさを揃えてポット（直径 6 cm）に移植した。ポットに詰める土は土 10 L に対して水 3 L を混ぜたものを 1 ポットあたりにつき 65 g とした。また 1 ポットに野生型植物と *srk2c*、*srk2f*、*srk2cf* を 1 個体ずつ混植させた。ポットに移植後、さらに 1 週間生育させた。乾燥処理はポットの水気をペーパータオルでよく拭き取った後、新しいバットに移して水を与えず生育させた。水切り 16 日後バットに十分水を入れ、植物に再吸水させた。植物の生存、枯死の判定は再吸水した日から 3 日後に行った。

II-22. 酸性植物ホルモンの定量

本実験では SA、ABA、IAA、GA₄、JA、JA-Ile の 6 つの酸性植物ホルモンについて、LC-MS 装置を用いて定量した。本実験で使用した LC-MS 装置は 6410 Triple Quad LCMS (Agilent) である。植物ホルモンの抽出溶液および用いた内部標準を以下に示す。

植物ホルモン内部標準 Mix: 200 pg/μl d₆-SA (SIGMA)、20 pg/μl d₆-ABA (Icon Isotopes)、20 pg/μl d₂-IAA (SIGMA)、20 pg/μl d₂-JA (東京化成)、1 pg/μl d₂-GA₄ (OIChemIm)、1 pg/μl ¹³C₆-JA-Ile (Jikumaru et al., 2004)

植物ホルモン抽出溶液 (3 ml) : 80% アセトニトリル、1% 酢酸、150 μl 植物ホルモン内部標準 Mix

II-22-1. 抽出用サンプルの準備

植物サンプルは 15 ml ポリプロピレンチューブ (FALCON) に入れ、直ちに液体窒素で凍結させた。その後、凍結乾燥機 FDU-540 (EYELA) を用いて 2 日間凍結乾燥させた。凍結乾燥させたサンプルは植物ホルモンを抽出するまで -80℃ のフリーザーで保存した。

II-22-2. 植物ホルモンの抽出

サンプルの入ったチューブを液体窒素に浸け、10 mm のセラミックビーズをチュー

ブに入れボルテックスして植物を粉碎した。1.5 ml 植物ホルモン抽出液を加えて軽く攪拌し、室温で1時間静置し植物ホルモンを抽出した。3000gで20分間遠心分離し上清を5 ml ガラスチューブに移した。残った沈殿に1.5 ml 80% アセトニトリル (1% 酢酸) を加えて室温で10分間静置し植物ホルモンを再抽出した。3000gで20分間遠心分離し上清を前述のガラスチューブに移した。500 µl 1% 酢酸を加えて、真空遠心によりアセトニトリルを完全に除去した。真空遠心装置には SpeedVac (Thermo Fisher) を用い40℃で約2時間行った。

II-22-3. 逆相カラムによる精製

逆相カラムには Oasis HLB extraction cartridge (30 mg, 1 mL; Waters) を使用した。HLB カラムは使用前に1 ml 100% アセトニトリル、1 ml 100% メタノールの順に流しコンディショニングした後、1 ml 1% 酢酸で平衡化した。平衡化した HLB カラムに抽出液をロードし、カラムに植物ホルモンを吸着させた。1 ml 1% 酢酸を流し極性の高い不純物を溶出した。2 ml (1 ml × 2) 80% アセトニトリル (1% 酢酸) で植物ホルモンを溶出した。溶出液のうち、200 µl を96穴プレートに移して、真空遠心により乾固させ SA 分析用とした。

II-22-4. 陰イオン交換カラムによる精製

陰イオンカラムには Oasis WAX extraction cartridges (30 mg, 1 mL; Waters) を使用した。WAX カラムは使用前に1 ml 100% アセトニトリル、1 ml 100% メタノールの順に流しコンディショニングした後、500 µl 0.1 N KOH で Regeneration し最後に1 ml 1% 酢酸で平衡化した。逆相カラムで精製した抽出液をロードした。1 ml 1% 酢酸、2 ml (1 ml × 2) 80% アセトニトリル (1% 酢酸) でカラムを洗浄した。2 ml (1 ml × 2) 80% アセトニトリル (1% 酢酸) で植物ホルモンを溶出した。その後、真空遠心により乾固した。100 µl 100% メタノールに溶かして、96穴のプレートに移した。真空遠心により溶媒を飛ばし乾固させ、これを SA 以外の酸性植物ホルモン分析用サンプルとした。

II-22-5. LC-MS 装置による解析

本実験で使用した LC-MS 装置は 6410 Triple Quad LCMS (Agilent) である。LC のコンディションおよび LC-ESI-MS/MS 解析のパラメーターは表 1、2 に示した。

II-23. *Pst* DC3000 の感染実験

*Pst*DC3000 を用いた感染実験は理化学研究所 植物科学研究センター 植物免疫研究グループの吉本光希博士に解析を依頼した。

II-23-1. *Pst* DC3000 の感染

LB 液体培地で *Pseudomonas syringae* pv *tomato*: *Pst* DC3000 を 28℃で振とう培養 (OD₆₀₀=0.6-1.0) した。培養した *Pst* DC3000 を 2500g で 10 分間遠心分離し菌体を集めた。菌体を滅菌水 (10 mM MgCl₂) によく懸濁し、再び 2500g で 10 分間遠心分離した。これを 2 回繰り返して菌体の洗浄を行った。その後 1×10^5 cfu/ml になるように、菌体を滅菌水 (10 mM MgCl₂) に懸濁した。植物を鉢植えにおいて短日条件 (明期 8 時間 / 暗期 16 時間) で 2 週間生育させた。1 ml *Pst* DC3000 懸濁液を針のないシリンジを用いて主脈を傷付けないように葉の裏側に塗布した。*Pst* DC3000 を塗布した葉をよく乾燥させた後、プラスチックの容器でポットを覆って高湿度条件で 3 日間感染させた。

II-23-2. 感染菌数の測定

Pst DC3000 を感染させた葉を 70 %エタノールに 1 分間浸して表面殺菌した。葉についているエタノールをペーパータオルにてよく拭き取り、その後滅菌水にて十分に濯いだ。葉を滅菌水から取り出しペーパータオルで水気をよく除き、0.5 cm² のコルクボーラーで打ち抜きリーフディスクを作成した。マイクロチューブに 1 つリーフディスクを入れ 100 µl 滅菌水を加え、プラスチックペッスルで十分にすり潰した。使用したペッスルを 900 µl 滅菌水にてよくすすいだ。ペッスルをすすいだ滅菌水を先ほどのホモジェネートに加え合計 1 ml とした。ホモジェネート原液 100 µl を滅菌水にて 10 倍希釈シリーズによって 10^{-7} 倍まで作成した。各希釈シリーズから 10 µl をプレート培地 (King's medium B) に塗布し、28℃で培養した。2 日後、プレートに生えてきたコロ

ニー数をカウントして感染菌数を算出した。

表1 LCコンディション

Method No.	溶媒 A	溶媒 B	グラジエント
1	0.01%(酢酸)	アセトニトリル 0.05% (酢酸)	3% ~ 50% (20分間)
2	0.01%(酢酸)	アセトニトリル 0.05% (酢酸)	3% ~ 25% (27分間)

表2 LC-ESI-MS/MS解析のパラメーター

	LC method	Retention time on LC (min)	ESI	MS/MS transitions for quantifications (m/z)	Collision energy (V)	Fragmentor (V)
ABA D ₆ -ABA	1	10.8	—	263/153 269/159	8	140
GA ₄ D ₂ -GA ₄	1	14.1	—	331/257 333/259	26	150
IAA D ₂ -IAA	1	9.9	+	176/130 178/132	18	110
JA D ₂ -JA	1	12.6	—	209/59 211/59	10	150
JA-Ile ¹³ C ₆ -JA-Ile	1	14.7	—	328/136 322/130	14	160
SA D ₆ -SA	3	6.1	—	137/93 143/99	16	100

第 III 章 サブクラス II SnRK2 の機能解析

III-1. 緒言

シロイヌナズナゲノムには、サブクラス II に分類される SnRK2 メンバーとして、SRK2C と SRK2F の 2 つが存在する。これまでのサブクラス II SnRK2 に関する研究としては、*SRK2C* 遺伝子の機能解析が先行している。生化学的解析から、*SRK2C* は塩やマンニトール処理などの浸透圧ストレスによって強く活性化し、また乾燥ストレスによる活性化も認められる (Umezawa et al., 2004)。一方、ABA 処理による活性化はサブクラス III と比較すると非常に弱い傾向があることが分かっている。(Boudsocq et al., 2004)。また、*SRK2C* 遺伝子を過剰発現させた植物は、乾燥ストレスに対して耐性を示すことが報告されている (Umezawa et al., 2004)。そして、マイクロアレイを用いた下流制御遺伝子の網羅的な解析を行った結果、*SRK2C* 過剰発現植物では多くの乾燥ストレス誘導性遺伝子の発現が制御されていることが明らかとなった。以上の結果から、サブクラス II もサブクラス III と同様に、乾燥ストレス応答におけるリン酸化シグナル伝達に関わっていることが示された。一方で、*SRK2C* は栄養や代謝のシグナル伝達にも関与しており、サブクラス III とは異なる機能を持つ可能性があることも示唆されている (Shin et al., 2007)。

他の植物でも、サブクラス II のメンバー構成は比較的よく保存されている。たとえば、コムギから単離された PKABA1 はサブクラス II に属する SnRK2 の 1 つである。PKABA1 は ABA 応答性遺伝子の 1 つとして単離され、SnRK2 の中でもっとも初期にクローニングされたものの 1 つである (Anderberg and Walker-Simmons, 1992)。PKABA1 は、オムギアリュールン層細胞を用いた一過的発現系の解析によって、ABA のシグナル伝達に関与することが報告されている (Gómez-Cadenas et al., 1999)。しかし、実際のコムギ植物体における機能はまだ解析されていない。また、ダイズではサブクラス II SnRK2 と相同性の高い *SPK1* および *SPK2* 遺伝子が同定されている (Monks et al., 2001)。酵母を用いた *SPK1* および *SPK2* 高発現株の解析から、*SPK1* および *SPK2* は、浸透圧ストレスで活性化されることが明らかとなった。また、ホスファチジルイノシト

ール転移タンパク質 PITP (Phosphatidylinositol transfer protein) をリン酸化することが示された。しかし、SPK1 および SPK2 の植物における機能はよくわかっていない。

したがって、環境ストレス応答に関与するサブクラス II SnRK2 の生理機能の詳細は、まだ議論の途上にあると言える。特に、サブクラス II の植物における機能解析の例が少なく、情報が不足している。明らかにすべき点としては、乾燥ストレスによって活性化したサブクラス II SnRK2 が制御する応答経路や、ABA シグナル伝達における機能、あるいは SRK2C、SRK2F の機能重複やサブクラス間の関係などが挙げられる。そこでサブクラス II SnRK2 の植物における機能を詳しく解析するため、2 重変異体 *srk2cf* を作成して、植物体内における生理機能の詳細な機能解析を行うこととした。

III-2. 結果

III-2-1. サブクラス II SnRK2 遺伝子発現の組織特異性

まずシロイヌナズナにおけるサブクラス II SnRK2 の 2 つの遺伝子 *SRK2C* と *SRK2F* の発現組織を同定するため、定量 RT-PCR 解析を行った。根、茎、ロゼット葉、茎生葉、花、サヤ、および種子の各組織から抽出した total RNA から cDNA を合成し、*SRK2C* および *SRK2F* それぞれに特異的なプライマーを用いて定量 RT-PCR を行った (図 3)。*SRK2C* は他の組織に比べて、根において高い mRNA の蓄積が見られた。*SRK2C* の発現の組織特異性については、*SRK2C* プロモーター : GUS 植物を用いた解析で同様の結果が報告されている (Umezawa et al., 2004)。一方で *SRK2F* の mRNA の蓄積量は解析した組織間で目立った差はなく、植物全体にわたることが示された (図 3)。

さらに、*GUS* リポーター遺伝子の上流にサブクラス II SnRK2 のプロモーター領域をつないだコンストラクトをシロイヌナズナに導入し形質転換植物を作成した。プロモーター領域は *SRK2C* および *SRK2F* の翻訳開始点からそれぞれ上流 2059 塩基 (Umezawa et al., 2004)、1494 塩基である。播種後 2 週間生育させた植物に GUS 染色を行った。結果、*SRK2C* は主に根端で染色が観察されたのに対して、*SRK2F* は気孔、根や葉の維管束組織、茎頂において強い GUS 染色が観察された (図 4)。定量 RT-PCR 解析とプロモーター : GUS 植物の解析より *SRK2C* と *SRK2F* は遺伝子発現の組織特異性が異なることが示された。

III-2-2. サブクラス II SnRK2 タンパク質の細胞内局在

次にサブクラス II SnRK2 タンパク質の細胞内局在を明らかにするために、プロトプラストを用いた遺伝子の一過的発現系を利用した。*SRK2C* および *SRK2F* の全長 CDS と *sGFP* の融合遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス由来の CaMV35S プロモーター制御下で発現させるコンストラクトを作成し、シロイヌナズナの葉肉細胞由来のプロトプラストへ PEG を用いて導入した。GFP 蛍光の観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。*SRK2C* と *SRK2F* 両方とも 35S-*sGFP* のコントロールと似た局在を示し、細胞質と核で GFP 蛍光が観察された (図 5)。*SRK2C* と *SRK2F* タンパク質の細胞内局在が

類似していたことから、サブクラス II SnRK2 は発現の組織特異性は若干異なるが、細胞内では互いに冗長的に機能している可能性が示唆された。

III-2-3. 2重変異体 *srk2cf* の作成および乾燥ストレス下における *srk2cf* の表現型

3つのサブクラス III SnRK2 は植物における ABA シグナル制御において重要なキナーゼであり、かつその機能は互いに冗長的である。サブクラス II SnRK2 のメンバー SRK2C と SRK2F も植物において冗長的に機能している可能性がある。そこで植物におけるサブクラス II SnRK2 の機能を明らかにするため、SRK2C および SRK2F の T-DNA 挿入変異体 *srk2c* および *srk2f* を掛け合わせて 2 重変異体 *srk2cf* を作成した (図 6A)。*srk2cf* から抽出した RNA を用いて RT-PCR を行い、SRK2C と SRK2F の遺伝子発現が *srk2cf* で検出されないことを確認した (図 6B)。鉢植えで育てたところ、*srk2cf* は通常の生育を示し、野生型植物と形態や生育において差は認められなかった (図 6C)。

サブクラス II SnRK2 は浸透圧ストレスで強く活性化するキナーゼである。そこで *srk2cf* における乾燥への耐性が変化しているか調べるため、乾燥ストレス耐性試験を行った。植物を鉢植えで 3 週間生育させ、その後水を与えずに 16 日間育てた後再吸水を行った。植物生死の判定は再吸水 3 日後に行った (図 7A)。結果、再吸水後の生存率は野生型植物と *srk2c*、*srk2f*、*srk2cf* で差は見られなかった (図 7B)。乾燥耐性に差が見られなかったことから、サブクラス II SnRK2 の乾燥などの浸透圧ストレス時における耐性獲得への寄与は低いと考えられた。

III-2-4. マイクロアレイによる乾燥処理における 2 重変異体 *srk2cf* の遺伝子発現の網羅的解析

srk2cf は乾燥耐性に関しては野生型植物との差は認められなかったが、サブクラス II SnRK2 は乾燥などの浸透圧ストレスにおいて強く活性化するキナーゼである。そこでサブクラス II の浸透圧ストレス時における機能を明らかにするため、マイクロアレイを用いて *srk2cf* の乾燥ストレス処理における遺伝子発現を網羅的に解析することにした。プレートで 2 週間生育させた植物に乾燥処理を 4 時間行い、RNA を抽出した。マイク

ロアレイには Affymetrix 社の Arabidopsis ATH1 Genome Array を用いた。マイクロアレイで得たデータは統計ソフトウェア R 上で動くパッケージソフトウェアの affyImGUI を用いて解析を行った。マイクロアレイの結果、乾燥処理 4 時間で *srk2cf* において野生型植物と比べて多くの遺伝子の発現が減少しており、2 倍以上 (\log_2 比 <-1.0 , P 値 <0.05) 発現が減少した遺伝子は 74 個あった。そのうちの上位 30 個の遺伝子について表 3 に示した。次に、これらの *srk2cf* において発現が減少した遺伝子の特徴を知るため、マイクロアレイデータベースの Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>; Zimmermann et al., 2004) を用いて解析した。すると、*srk2cf* において発現が減少した 74 個の遺伝子の多くは ABA 処理や乾燥、塩などの浸透圧ストレスで発現が強く誘導される遺伝子であることが示された (図 8)。*srk2cf* で発現が減少した遺伝子の上位には、多くの *LEA* (*Late embryogenesis abundant*) 遺伝子や代表的な ABA 誘導性遺伝子である *RD29B* (*RESPONSIVE TO DESSICATION 29B*) などが見られた。また、*srk2cf* において野生型植物より発現が減少したこれら乾燥および ABA 誘導性の *LEA* 遺伝子や *RD29B* は、サブクラス III SnRK2 の 3 重変異体 *srk2dei* においても乾燥、ABA 処理による遺伝子発現の誘導が著しく低下することが報告されている (Fujita et al., 2009)。このことはサブクラス II とサブクラス III の機能の部分的な重複の可能性を示唆した。一方で、乾燥処理において *srk2cf* で野生型植物より 2 倍以上 (\log_2 比 >1.0 , P 値 <0.05) 発現が増加した遺伝子は 34 個あった。そのうちの上位 30 個について表 4 に示した。Genevestigator の解析の結果、*srk2cf* で発現が野生型植物より増加した 34 個の遺伝子は ABA 処理や乾燥処理などで発現が抑制される傾向があることが示された。

続いてマイクロアレイの結果を確認するために、定量 RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行った (図 9)。プレートで 2 週間生育させた野生型植物や各種の変異体 *srk2c*、*srk2f*、*srk2cf*、*srk2dei* に乾燥処理を行い、RNA を抽出した。*LEA* 遺伝子と *RD29B* を含む 9 個の遺伝子を選び、各遺伝子に特異的なプライマーを用いて定量 RT-PCR を行った。調査したほとんどの遺伝子で、野生型植物や *srk2c* や *srk2f* の変異体と比べて 2 重変異体 *srk2cf* の乾燥処理 4 時間における mRNA の蓄積が半分程度に低下していた。また、マイクロアレイ解析で野生型植物と *srk2cf* で乾燥処理において差がなかった

RD29A に関しては、定量 RT-PCR 解析でも同様の結果を示した。一方で 3 重変異体 *srk2dei* に関しては *RD29A* を含む調べた全ての遺伝子において乾燥処理における発現誘導が著しく低下した(図 9)。以上の結果から、サブクラス II SnRK2 メンバーの *SRK2C* と *SRK2F* は、植物において乾燥ストレス時に互いに協調して乾燥誘導性遺伝子の発現を正に制御していると考えられた。

サブクラス III の *SRK2D*、*SRK2E*、*SRK2I* は *AREB1* などの *AREB/ABF* 型転写因子をリン酸化することで活性化させ下流の *ABA* 誘導性遺伝子の発現を誘導させる。乾燥処理で *srk2cf* において発現誘導が低下した *LEA* 遺伝子や *RD29B* はプロモーター領域に *ABRE* を有し *AREB/ABF* ファミリーの標的遺伝子として知られている。そこで、乾燥処理で *srk2cf* において発現誘導が低下した上位 30 個の遺伝子のプロモーター領域の *ABRE* 配列の有無を調べた。プロモーター領域は各遺伝子の翻訳開始点から上流 1000 塩基とした。*SRK2C* と *SRK2F* を除いた 28 個の遺伝子のうち約 80%にあたる 23 個の遺伝子のプロモーター領域に *ABRE* 配列を確認することができた。一方で全遺伝子の翻訳開始点から 1000 塩基のプロモーター領域のデータセットの *TAIR9 upstream_1,000 data set* を用いて全遺伝子の *ABRE* 配列の有無を網羅的に調べたところ、335181 個の遺伝子のうちわずか 8%の 2664 個の遺伝子のプロモーター領域でのみ *ABRE* を確認した。*srk2cf* において乾燥誘導が低下した遺伝子の多くはプロモーター領域に *ABRE* 配列を有していることが示された。よって、サブクラス II SnRK2 が制御している遺伝子は *AREB/ABF* ファミリーによる転写調節を受けていることが考えられた。

そこで、*AREB/ABF* ファミリーの *srk2cf* における遺伝子発現を解析した。野生型植物および 4 種の変異体 *srk2c*、*srk2f*、*srk2cf*、*srk2dei* に乾燥処理を行い、RNA を抽出した。*AREB1/ABF2*、*ABI5*、*ABF3* に特異的な各プライマーを用いて定量 RT-PCR を行った。結果、乾燥処理 4 時間で 2 重変異体 *srk2cf* において *AREB1*、*ABI5*、*ABF3* の乾燥による mRNA の蓄積は野生型植物や *srk2c* や *srk2f* に比べて低下していることが示された(図 10)。*srk2dei* においてもこれら *AREB/ABF* ファミリーの乾燥による遺伝子発現の誘導は非常に低下していた。この結果からもサブクラス II SnRK2 が *AREB/ABF* ファミリーと関係している可能性を示唆した。

III-2-5. 酵母ツーハイブリッド法を用いた **SRK2C** と相互作用する **AREB/ABF** 型転写因子の解析

マイクロアレイを用いた *srk2cf* の乾燥ストレス下における遺伝子発現解析の結果、サブクラス II SnRK2 の **SRK2C** と **SRK2F** は協調して乾燥ストレスにおいて **AREB/ABF** ファミリーによって制御される遺伝子の発現を誘導するキナーゼであることが示された。また、サブクラス II SnRK2 と **AREB/ABF** ファミリーとの関わりが示唆された。次にサブクラス II SnRK2 がどのような機構で **ABA** や乾燥誘導性遺伝子の発現を制御しているのか知るため、サブクラス II SnRK2 がリン酸化する標的タンパク質を同定することは必要であると考えられた。サブクラス II SnRK2 と相互作用する因子の同定を **SRK2C** の全長 CDS をベイトとして酵母のツーハイブリッド法を用いたスクリーニングにより試みた。その結果、**SRK2C** と相互作用する因子として **AREB/ABF** ファミリーの 1 つである **EEL/DPBF4** が単離された (Taishi Umezawa, 未発表データ)。

さらに詳しく **SRK2C** が **EEL** のどの部分と相互作用するのか調べるため、酵母ツーハイブリッド法を用いてドメイン解析を行った。**SRK2C** をベイトとし、4 種類の **EEL** の N 末端を欠失したものをプレイとして酵母 **AH109** 株に形質転換した。**EEL** の欠失コンストラクトを用いたドメイン解析の結果、**SRK2C** は **EEL** の N 末端の保存領域と結合している可能性が示唆された (図 11A)。**EEL** は成熟中の種子における強い遺伝子発現が報告されている。そこで、種子以外における **EEL** の組織特異性について調べるため、**EEL** プロモーター : **GUS** 植物を作成して解析に用いた。プロモーターは **EEL** 上流の 1807 塩基とした。プレートで 2 週間育てた植物に **GUS** 染色を行ったところ、興味深いことに **EEL** は **SRK2C** と同様に根端において強い **GUS** 染色が観察された (図 11B)。タンパク質同士の相互作用に加え、組織特異性も類似していることから **EEL** が **SRK2C** の標的タンパク質である可能性が考えられた。また、9 つある **AREB/ABF** ファミリーは全て N 末端に 3 つと C 末端に 1 つ保存領域を持っていることが知られている。**EEL** の N 末端保存領域が **SRK2C** との相互作用に重要な領域であることから、**SRK2C** が他の **AREB/ABF** ファミリーとも相互作用する可能性がある。

次に、酵母ツーハイブリッド法により **EEL** 以外の **AREB/ABF** ファミリーと **SRK2C** との相互作用を調べた。ベイトを **SRK2C** の全長 CDS とし、プレイには **ABF1**、**ABI5**、

AREB3 の各全長 CDS とした。結果、SRK2C は調べた 3 つの AREB/ABF ファミリーの全てと相互作用することが観察された (図 11C)。以上の結果から、サブクラス II もサブクラス III と同様に AREB/ABF ファミリーのリン酸化を介して遺伝子発現を制御している可能性が考えられた。

III-2-6. AREB/ABF 型転写因子の SRK2C による *in vitro* でのリン酸化

サブクラス II SnRK2 との相互作用が見出された AREB/ABF 型転写因子はサブクラス II の標的タンパク質である可能性が十分に考えられた。そこで *in vitro* によるリン酸化実験を行い SRK2C が AREB/ABF ファミリーをリン酸化できるかどうか調べた。EEL および ABF3 の全長 CDS に *myc* タグをつなげた融合遺伝子をウサギ網状赤血球の *in vitro* 翻訳系を用いてタンパク質を作らせた後、抗 *myc* 抗体を用いて免疫沈降により精製した。SRK2C は全長 CDS に GST タグをつなげた融合遺伝子を大腸菌に導入しタンパク質を作らせた後、グルタチオン-セファロースを用いて精製した。精製した GST 融合 SRK2C と *myc* タグ融合 EEL および ABF3 を用いて *in vitro* リン酸化実験を行ったところ、EEL と ABF3 の両方で SRK2C によるリン酸化を検出することができた (図 12)。*in vitro* 翻訳系のコントロールとして用いた LUC では SRK2C によるリン酸化は検出されなかった。*in vitro* でのリン酸化実験によりサブクラス II が AREB/ABF ファミリーをリン酸化できることが示された。また、サブクラス II SnRK2 が乾燥ストレス時に AREB/ABF ファミリーのリン酸化を介して下流の遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。

III-2-7. ABA 処理における *srk2cf* の遺伝子発現解析

サブクラス II SnRK2 はサブクラス III と同様に浸透圧ストレスだけでなく ABA においても活性化が見られる。そこで最後に、ABA 処理における *srk2cf* の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法により調べた。野生型植物と変異体 *srk2cf*、*srk2dei* に ABA 処理を行い、RNA を抽出した。乾燥処理で *srk2cf* において発現誘導が野生型植物より減少した遺伝子のうち、*LEA* 遺伝子と *RD29B* をふくむ 3 つの遺伝子の発現を調べた。驚いたことに、調査した 3 つの遺伝子の全てで、ABA 処理において *srk2cf* で野生型植物と同様の発現誘

導が見られた (図 13)。その一方で *srk2dei* においては ABA 処理でこれらの遺伝子はほとんど発現が誘導されなかった (図 13)。さらに、ABA 処理における *srk2cf* での遺伝子発現を詳しく調べるためにマイクロアレイ解析を行ったが、ABA 処理で *srk2cf* において野生型植物より増加または減少している遺伝子はほとんどなく、全ての ABA 誘導性遺伝子が *srk2cf* において ABA 処理で野生型植物と同じように発現誘導されることが示された。

III-3. 考察

植物の環境ストレス応答のシグナル伝達においてプロテインキナーゼによるタンパク質のリン酸化は重要である。環境ストレスに関わるプロテインキナーゼのうち、植物が特有に持つ **SnRK2** ファミリーが注目されている。**SnRK2** は **C** 末端に特徴的な配列を持っており保存されたアミノ酸配列の領域Ⅰと酸性アミノ酸に富む領域Ⅱに分けられる (Yoshida et al., 2006)。領域Ⅱのアミノ酸配列の違いからサブクラスⅠからサブクラスⅢまで分類される **SnRK2** は、ヒメツリガネゴケのような下等植物からシロイヌナズナといった高等植物まで植物全体にわたって高度に保存されていると考えられる。しかし、シロイヌナズナ、ダイズ、イネなどの高等植物ではサブクラスⅠからサブクラスⅢまで全てのサブクラスの **SnRK2** が存在するのに対して、ヒメツリガネゴケにおいてはサブクラスⅢしか存在しない。また進化上苔類と高等植物の間に位置するシダ類であるイヌカタヒバにおいても、サブクラスⅢとサブクラスⅡは存在するが、サブクラスⅠは存在しない。このことは原始的な苔類においてまずサブクラスⅢが出現し、その後に植物が進化する過程においてシダ類でサブクラスⅡが、被子植物でサブクラスⅠが出現し順にすべてのサブクラスの **SnRK2** を獲得したと考えられる (Umezawa et al., 2010)。サブクラスⅠからサブクラスⅢまでの3つに分類される **SnRK2** の中で、サブクラスⅢは発芽、根の生長、気孔閉鎖など **ABA** シグナル伝達制御の重要な因子であることが明らかになった (Fujii and Zhu, 2009; Fujita et al., 2009; Nakashima et al., 2009)。本章では分子系統的にサブクラスⅢに近いサブクラスⅡについて2重変異体 *srk2cf* を用いて機能解析を行った。

まず、サブクラスⅡ **SnRK2** の遺伝子の発現組織を調べるため、定量 RT-PCR とプロモーター: **GUS** 植物を用いて解析を行ったところ、**SRK2C** は主に根において遺伝子発現が見られた。一方で **SRK2F** は根や葉の維管束や気孔といった植物全体にわたって発現が見られた (図 3-4)。またプロトプラストの一過的発現系を用いて細胞内局在を観察したところ、**SRK2C** および **SRK2F** はどちらも細胞質と核の両方において局在が見られた (図 5)。サブクラスⅢでは **SRK2D**、**SRK2E**、**SRK2I** のメンバーで発現の組織特異性が異なり、また細胞内局在については3つのメンバー全てが核において観察され

た。細胞内局在が **SRK2C** と **SRK2F** で類似しているため、サブクラス II SnRK2 は互いに協調して植物内において機能している可能性が示唆された。しかし発現部位にメンバー間で違いが見られるため、植物の各組織に特化した機能を持つ可能性も考えられる。

次に、サブクラス II SnRK2 の機能を解析するために、機能の冗長性を考慮に入れ 2 重変異体 *srk2cf* を作成して解析を行った (図 6)。短時間乾燥処理を受けた *srk2c* は、その後根の生長が阻害されることが観察されている。逆に **SRK2C** を過剰発現する植物は *DREB1A* や *RD29A* の発現が増加しており、乾燥ストレス耐性の改善が報告されている (Umezawa et al., 2004)。しかし、*srk2cf* では通常生育時における表現型に野生型植物と明確な差は見出されなかった (図 6C)。また乾燥ストレス耐性も *srk2cf* と野生型植物とで顕著な違いは見られなかった。一方でサブクラス III SnRK2 の 3 重変異体 *srk2dei* では乾燥耐性はほぼ失われており、通常の鉢植えにおいて著しい生育遅延を示す (Fujii and Zhu, 2009; Fujita et al., 2009; Nakashima et al., 2009)。また、ABA 応答もほぼ全て失われておりサヤにおいては穂発芽が観察される。*srk2cf* の弱い表現型からは以下の 2 つの可能性が考えられる。1 つはサブクラス II が植物における乾燥ストレス耐性獲得へ実質的には関与しないことであり、もう 1 つは耐性獲得へある程度関与しているものの、サブクラス III に比べて影響が弱いためにその効果がマスクされているという可能性である。

さらに浸透圧ストレス下におけるサブクラス II SnRK2 の機能解析をするために、マイクロアレイを用いて乾燥処理下で *srk2cf* における遺伝子発現を網羅的に解析した。すると乾燥処理で *RD29B* や *LEA* などの遺伝子を含む多くの乾燥や ABA 誘導性遺伝子の発現が、*srk2cf* において野生型植物より低下していた (表 3 および図 8)。次に定量 RT-PCR を用いた解析によって、*srk2cf* において *RD29B* や *LEA* などの遺伝子の乾燥処理による誘導が野生型植物や *srk2c*、*srk2f* の半分程度に減少していることが確認された (図 9)。一方で *srk2dei* では乾燥処理で非常に多くの乾燥や ABA 誘導性遺伝子の発現誘導が著しく低下することがわかっており、*srk2cf* より遺伝子発現に及ぼす影響は大きい (Fujita et al., 2009)。*srk2dei* と比較して、*srk2cf* における乾燥で発現誘導が低下する遺伝子の数や程度は非常に限定的であった。さらにマイクロアレイおよび定量 RT-PCR 解析から、ABA を処理した *srk2cf* での *RD29B* や *LEA* などの ABA 誘導性遺伝

子の発現には、野生型植物と差が見られなかった。以上のことから、サブクラス II SnRK2 が乾燥などの浸透圧ストレスによって活性化し、乾燥ストレス応答性遺伝子発現を制御するシグナル伝達系に関与していることが明らかとなった。この結論は、以前の SRK2C 過剰発現植物を用いた研究において、SRK2C がストレス応答性の遺伝子発現を制御するという結果が得られたことと一致する (Umezawa et al., 2004)。一方、サブクラス II SnRK2 は ABA による弱い活性化が見られるものの、ABA シグナル伝達への関与は実験的に観測できなかったため、ABA シグナル伝達に関してはサブクラス III SnRK2 の影響が非常に大きいものと推察される。

また、*srk2cf* において乾燥処理で野生型植物より遺伝子発現が減少した多くの遺伝子のプロモーター領域には、ABRE 配列の存在が確認された。ABRE 配列に結合し ABA 誘導性遺伝子の発現を制御している転写因子 AREB/ABF も、*srk2cf* において乾燥処理で野生型植物より発現が減少していた (図 10)。これらのことから *srk2cf* において乾燥で遺伝子発現が低下する遺伝子が AREB/ABF ファミリーによる転写調節を受けていることが考えられ、サブクラス II SnRK2 と AREB/ABF ファミリーが関係していることが示唆された。実際に、SRK2C と相互作用するタンパク質を酵母ツーハイブリッド法でスクリーニングした結果、AREB/ABF 型転写因子の一つである EEL が単離されたことから、サブクラス III と同様にサブクラス II も AREB/ABF ファミリーの制御に関与する可能性がさらに高まった。そこで、EEL プロモーター : GUS 植物を用いて発現の組織特異性を調べたところ、EEL は SRK2C と同様に根端において強い GUS 染色が確認され、EEL が SRK2C と協調して機能していることが考えられた (図 11B)。さらに EEL 以外の他の AREB/ABF ファミリー (ABF1、ABI5、AREB3) が酵母内で SRK2C と相互作用したことから、EEL に限らず他の AREB/ABF ファミリーにも SRK2C による制御が及んでいる可能性が示唆された (図 11C)。次に、サブクラス II SnRK2 が AREB/ABF ファミリーをリン酸化するかどうかを *in vitro* の系を用いて調べたところ、SRK2C が EEL や ABF3 をリン酸化することが示されたことから、サブクラス II もサブクラス III と同様に浸透圧ストレスに応答して転写因子 AREB/ABF タンパク質をリン酸化し、乾燥や ABA 誘導性遺伝子の発現を制御するという結論が導かれた (図 12)。

ABA 処理による遺伝子発現の誘導においては、サブクラス II の 2 重変異体 *srk2cf* と

野生型植物で差が見られなかったのに対して、サブクラス III の 3 重変異体 *srk2dei* では ABA 処理で多くの ABA 誘導性遺伝子の発現が減少する。それぞれのサブクラス間でこのような違いが生まれる原因として、まずサブクラス II とサブクラス III の ABA による活性化パターンが異なることが挙げられる。分子系統的に見るとサブクラス II とサブクラス III は比較的近縁であるが、C 末端の領域 II と呼ばれる部分に若干の違いが認められる (図 2)。領域 II は ABA による活性化に関わるとされる部分である。一方、浸透圧ストレスによる活性化に重要とされる C 末端の領域 I は、すべての SnRK2 で高度に保存されている。活性化パターンを見てみると、サブクラス II と III はどちらも浸透圧と ABA によって活性化する。しかしサブクラス III SnRK2 は浸透圧ストレスと ABA 両方で強い活性化を示すが、サブクラス II SnRK2 は ABA では非常に弱い活性化しか検出されない (Boudsocq et al., 2004)。この原因として、プロテインホスファターゼ (グループ A PP2C) との相互作用の違いが挙げられる。グループ A PP2C は SnRK2 を脱リン酸化することによって不活性化する負の制御因子であり、サブクラス III SnRK2 と強く相互作用する一方、サブクラス II との相互作用は限定的であることが報告されている (Umezawa et al., 2009)。このことから、サブクラス II にはグループ A PP2C 以外の制御因子も関与していることが考えられる。以上をまとめると、サブクラス III SnRK2 の ABA による活性化が相対的にサブクラス II SnRK2 より強いことが、サブクラス III の ABA シグナル伝達における作用が大きいことの一因ではないかと推察する。このことは、*srk2cf* で表現型がそれほど強く出なかった理由としても説明可能である。すなわち、ABA によって活性化したサブクラス III SnRK2 の働きが、*srk2cf2* 重変異体による影響を無視できるほど強かったのではないかと考えられる。一方で、乾燥ストレス下におけるサブクラス II とサブクラス III の作用力の違いは、ABA の時と比べて相対的に小さいと考えられる。言い換えると、サブクラス II SnRK2 は乾燥ストレス下では有効に機能しているだろう。なぜなら、上述のように *srk2cf* における乾燥応答性の遺伝子発現には明確な差が認められるからである。しかし、乾燥ストレス下の *srk2cf* における遺伝子発現の変化は、*srk2dei* と比較して依然限定的であったことから、やはりサブクラス II の作用はサブクラス III に比べると弱いと言わざるを得ない。

本章では、植物の環境ストレス応答において中心的な役割を持つと考えられている

SnRK2 の 3 つのサブクラスのうち、サブクラス II の 2 つのメンバー (SRK2C,SRK2F) について詳細な機能解析を行い、これら 2 つのプロテインキナーゼが乾燥ストレスのシグナル伝達において重要な役割を有すること、および AREB/ABF ファミリーに属する転写因子のリン酸化を介して、乾燥ストレス応答性遺伝子発現を制御していることなどを明らかにすることができた (Mizoguchi et al., 2010)。これらサブクラス II の機能はサブクラス III と多くの部分で重複していることから、植物ではサブクラス II と III が協調して、乾燥などのストレス応答を制御している実態が明らかとなった。しかし、一方でサブクラス II には環境ストレス応答以外に植物の養分吸収に関わる機能など、サブクラス III と異なる部分も報告されている。このようなサブクラス II に特有の機能については、今後の解析が必要である。また、サブクラス II の 1 つである SRK2C を過剰発現させることによって、植物の乾燥耐性が向上することがすでに報告されている (Umezawa et al., 2004)。本研究によって、サブクラス II SnRK2 の機能が詳細に明らかになったことで、乾燥耐性の分子育種などバイオテクノロジー的利用の促進が期待される。

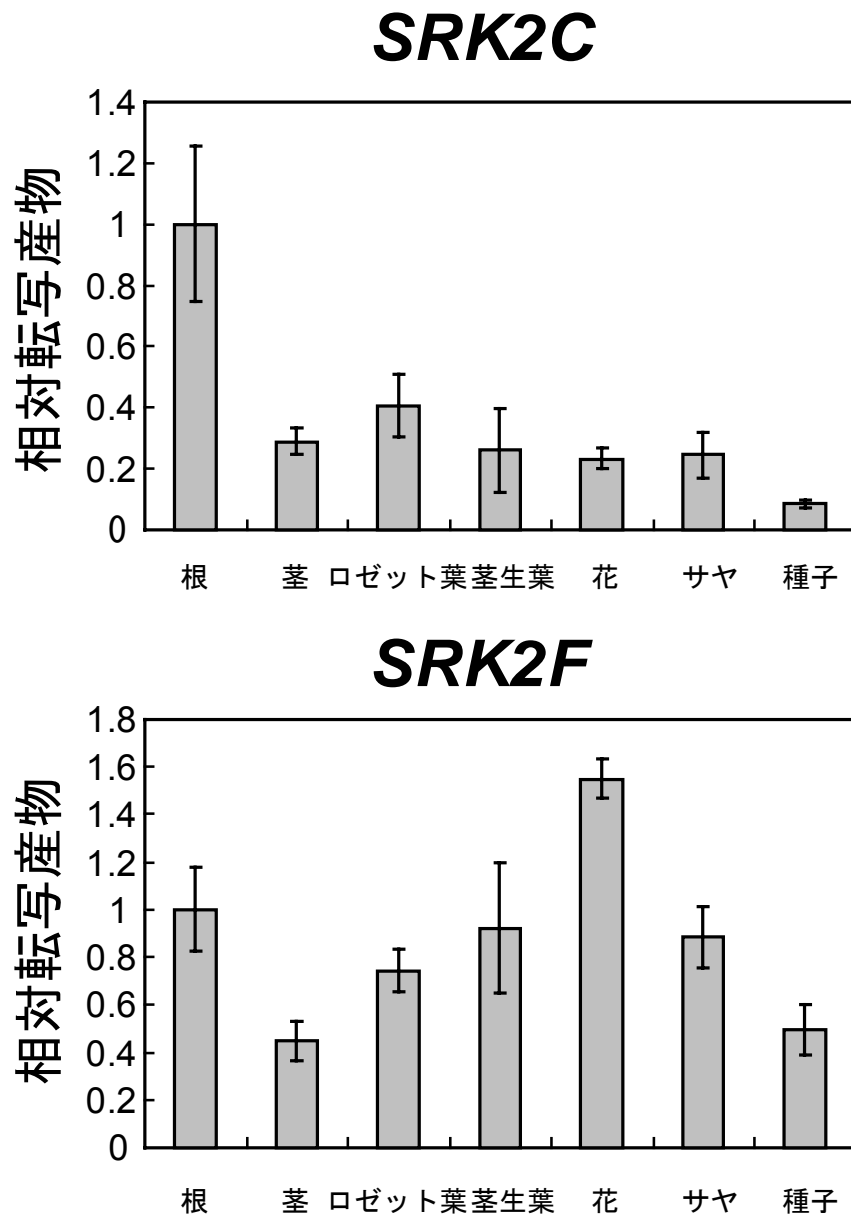
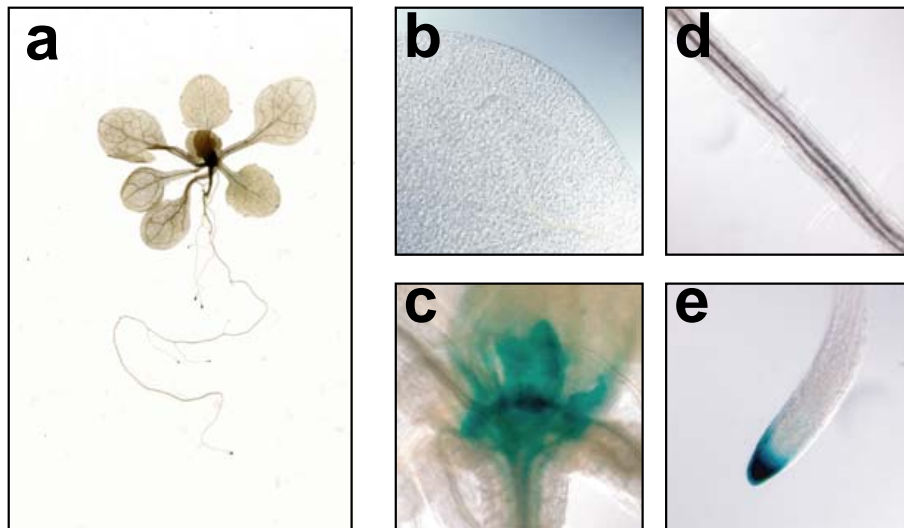


図 3. シロイヌナズナ各組織におけるサブクラス II SnRK2 遺伝子の発現解析

シロイヌナズナの根、茎、ロゼット葉、茎生葉、花、サヤ、種子から total RNA を抽出し、*SRK2C*、*SRK2F* 遺伝子の組織特異的な発現量を、定量 RT-PCR 法を用いて解析を行った。各実験区につき 3 回の反復実験を行い、その平均値と標準偏差値を示した。

ProSRK2C:GUS



ProSRK2F:GUS

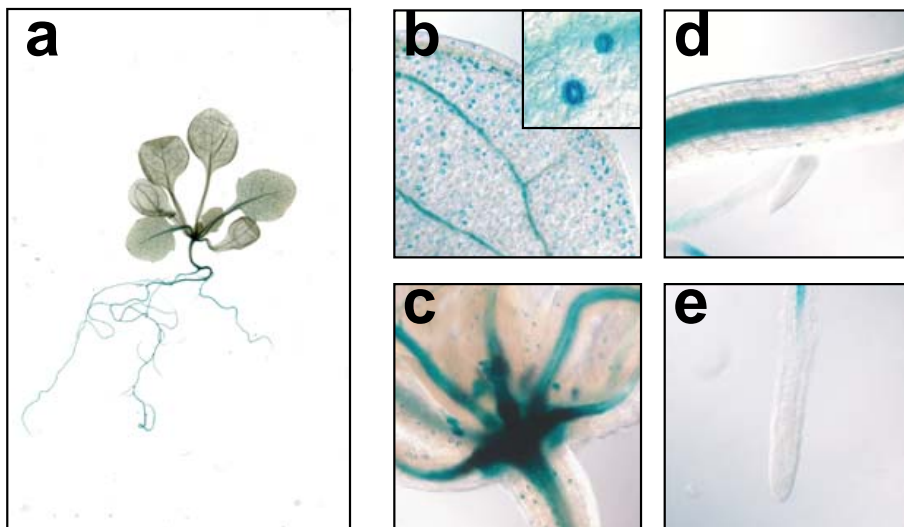


図 4. *GUS* レポーター遺伝子を用いたサブクラス II SnRK2 遺伝子の植物体における組織別発現解析

SRK2C、*SRK2F* 各遺伝子のプロモーター領域を *GUS* レポーター遺伝子と結合させたコンストラクトを用いて、シロイヌナズナ形質転換植物体を作製した。播種後 2 週間生育させた植物体を用いて *GUS* 染色を行った。青色に染色された組織は、各遺伝子の発現部位を示す。植物体全体像 (a)、本葉 (b)、茎頂分裂組織 (c)、主根 (d)、根端 (e) の各部位において、それぞれ解析を行った。

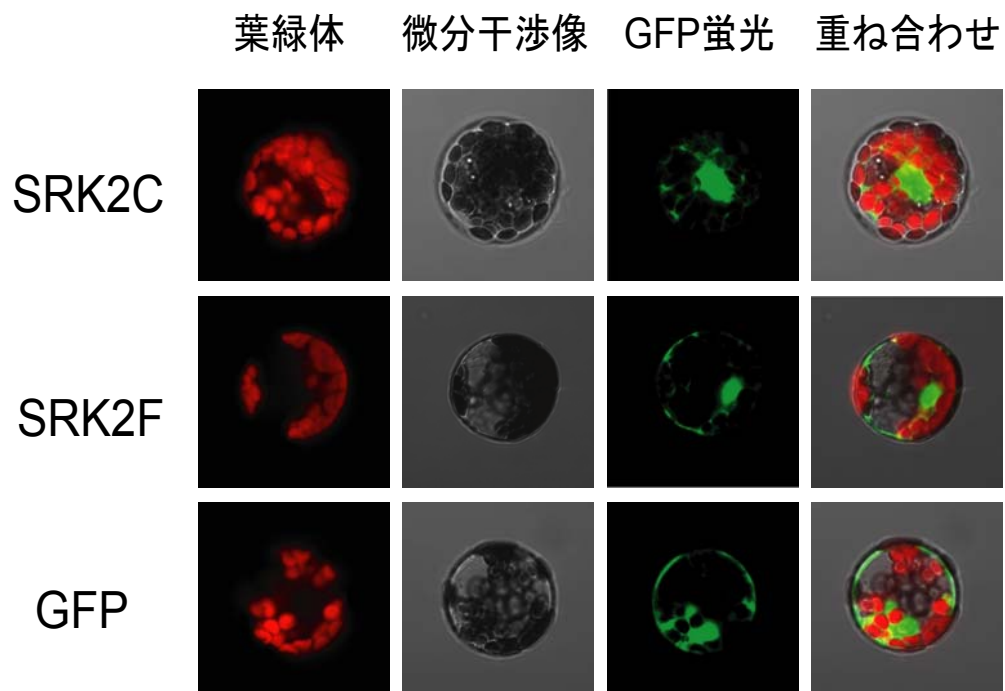


図 5. 葉肉細胞由来のプロトプラストでの一過的発現系を用いたサブクラス II SnRK2-GFP 融合タンパク質の細胞内局在の解析

SRK2C-GFP、*SRK2F-GFP* をシロイヌナズナの葉肉細胞から単離したプロトプラストに導入し、一過的に発現させた。暗条件下で 1 晩静置した後、GFP 蛍光を観察した。左から葉緑体自家蛍光像、微分干渉像、GFP 蛍光像、重ね合わせ像を示す。

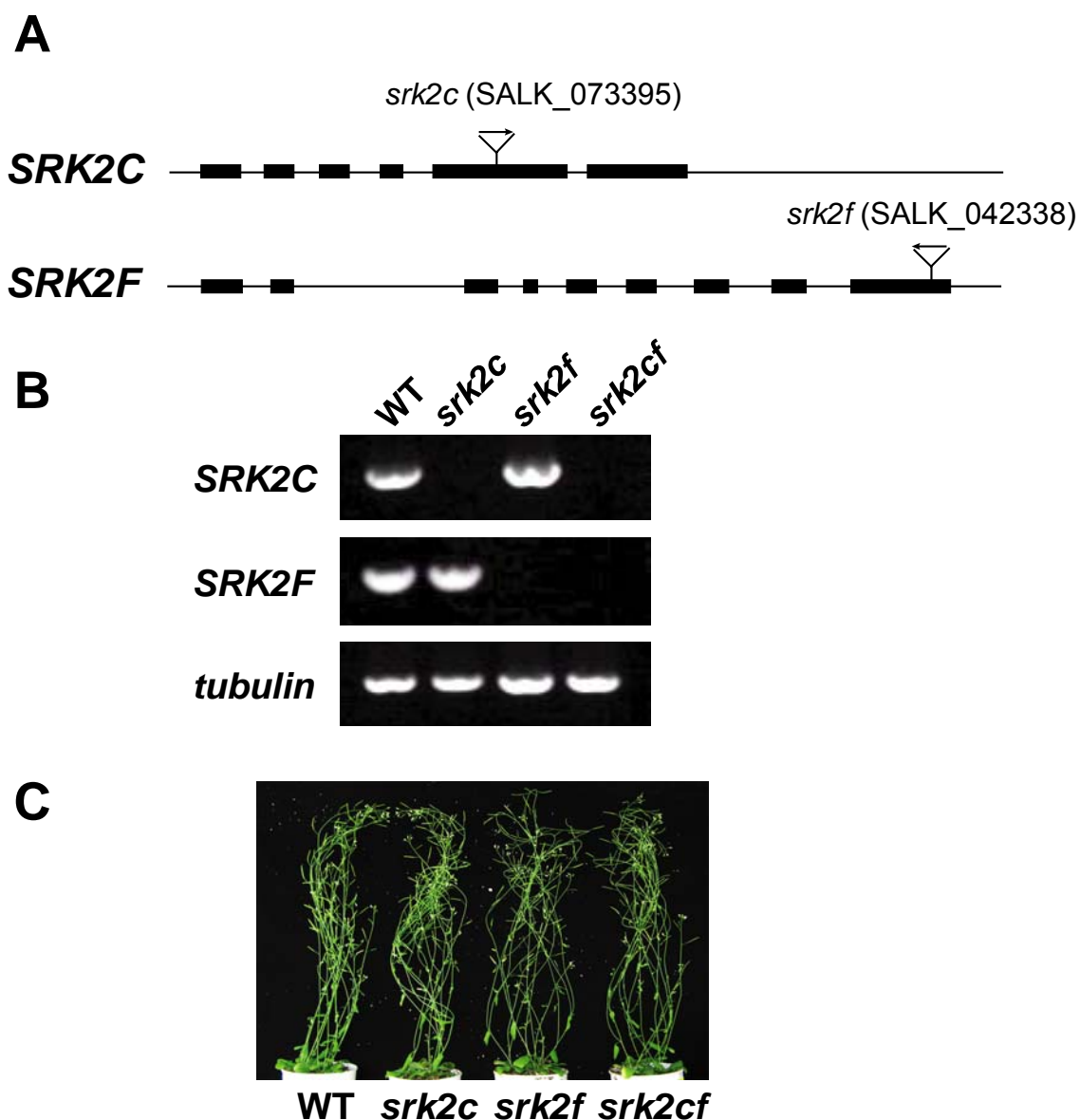


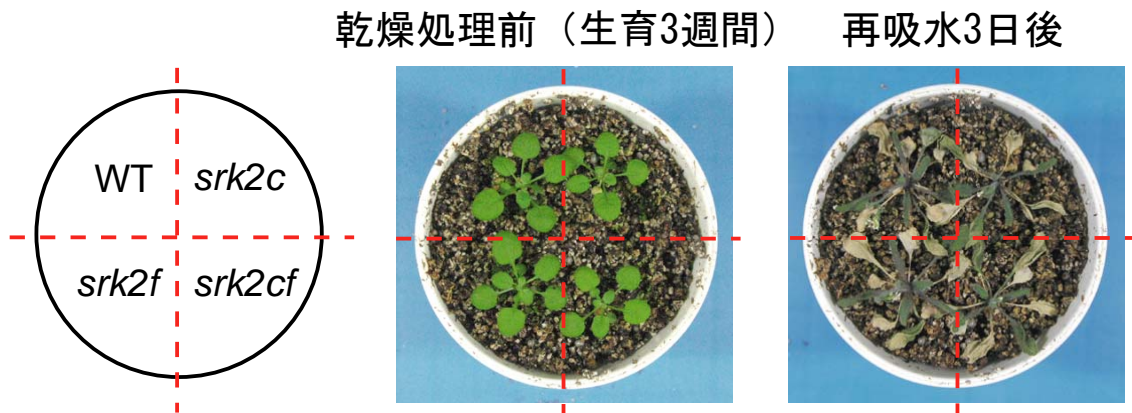
図 6. サブクラス II SnRK2 の 2 重変異体 *srk2cf* の作出と、通常生育条件下での表現型解析

A. 機能破壊変異体における *SRK2C*、*SRK2F* 各遺伝子への T-DNA 挿入位置の模式図。黒色枠は遺伝子のエクソン部分、矢印は T-DNA 挿入位置を示す。

B. サブクラス II SnRK2 の各変異体から total RNA を抽出し、*SRK2C*、*SRK2F* 各遺伝子の mRNA 蓄積量を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR 法) を用いて解析した。反応条件のコントロールとして、*Tubulin* 遺伝子を用いた。

C. 播種後 60 日間、通常条件下で土植によって生育させた野生型 (*WT*)、1 重変異体 (*srk2c*、*srk2f*)、2 重変異体 *srk2cf* の表現型を観察した。

A



B

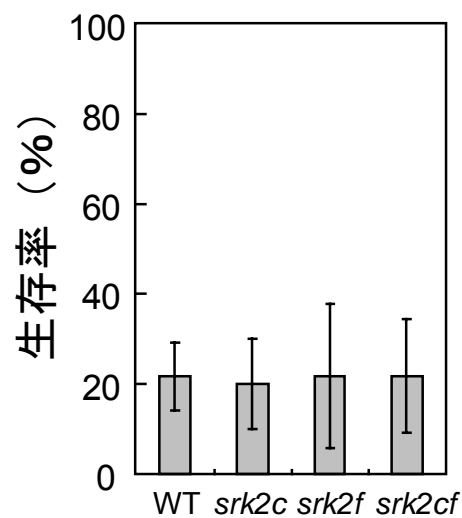


図 7. サブクラス II SnRK2 の 2 重変異体 *srk2cf* を用いた乾燥ストレス耐性試験

A. 野生型 (WT)、1 重変異体 (*srk2c*、*srk2f*)、2 重変異体 *srk2cf* を用いて、乾燥ストレスに対する耐性評価を行った。播種後、3 週間の植物体に対して (中図)、乾燥処理を 16 日間行った。その後、再吸水を行い 3 日後の植物体の状態を示す (右図)。

B. 野生型 (WT)、各変異体を用いた乾燥ストレス耐性を、生存率で評価した。乾燥ストレスを行わなかった場合を基準として、ストレス処理後の生存率をパーセント (%) で示す。各実験区につき 3 回の反復実験 (各実験 $n=20$) を行い、その平均値と標準偏差値を示した。

表3 *srk2cf*で野生型植物より発現が減少した上位30個の遺伝子（乾燥4時間）

probe set ID	AGI code	Description	log ₂ fold change	P-value ^a	ABRE ^b	ABA ^c	Dry ^d
260774_at	At1g78290	SRK2C/SnRK2.8	-4.64	1.43E-09	0	-	Down
260998_at	At2g37870	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-3.21	0.005045296	1	Up	Up
267080_at	At2g41190	amino acid transporter family protein	-2.64	0.016436419	1	Up	Up
249675_at	At5g35940	jacalin lectin family protein	-2.54	0.017445071	0	-	Up
256464_at	At1g32560	LEA group 1 domain-containing protein	-2.43	0.012878513	6	Up	Up
248352_at	At5g52300	LT65/RD298 (RESPONSIVE T O DESSICATION 29B)	-2.28	0.031872504	5	Up	Up
266462_at	At2g47770	benzodiazepine receptor-related	-2.25	0.006300416	0	Up	Up
266544_at	At2g35300	LEA group 1 domain-containing protein	-2.25	0.00613142	4	Up	Up
253344_at	At4g33550	lipid binding	-2.22	0.007757483	0	Up	Up
252872_at	At4g40010	SRK2F/SnRK2.7	-2.21	0.006300416	3	Up	Up
251668_at	At3g57010	strictosidine synthase family protein	-2.12	0.008371155	2	Up	Up
258224_at	At3g15670	LEA protein, putative	-2.11	0.001927698	4	Up	Up
258498_at	At3g02480	ABA-responsive protein-related	-2.04	0.048125788	6	Up	Up
245953_at	At5g28520	similar to jacalin lectin family protein	-2.00	0.009802851	2	Up	-
263881_at	At2g21820	unknown protein	-1.99	0.010754294	3	Up	Up
248969_at	At5g45310	unknown protein	-1.96	0.00613142	1	Up	Up
262128_at	At1g52690	LEA protein, putative	-1.92	0.035283906	5	Up	Up
247718_at	At5g59310	LTP4 (LIPID TRANSFER PROTEIN 4)	-1.89	0.031872504	2	Up	Up
265211_at	At2g36640	ATECP63 (EMBRYONIC CELL PROTEIN 63)	-1.88	0.022302055	5	Up	-
259439_at	At1g01480	ACS2 (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 2)	-1.88	0.03971763	0	Up	Up
245955_at	At5g28510	glycosyl hydrolase family 1 protein	-1.87	0.006724319	0	Up	Down
258347_at	At3g17520	LEA domain-containing protein	-1.86	0.041784005	3	Up	Up
250648_at	At5g06760	LEA group 1 domain-containing protein	-1.84	0.007386384	4	Up	Up
263907_at	At2g36270	AB15 (ABA INSENSITIVE 5)	-1.82	0.001658673	6	Up	Up
265119_at	At1g62570	flavin-containing monooxygenase(FMO) family protein	-1.75	0.015802557	1	Up	Up
247511_at	At5g62040	brother of FT and TFL1 protein (BFT)	-1.74	0.015742348	1	-	Up
253293_at	At4g33905	peroxisomal membrane protein, putative	-1.72	0.048945007	4	Up	Up
263231_at	At1g05680	UDP-glucoronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-1.68	0.043176558	3	Up	Up
246799_at	At5g26940	exonuclease family protein	-1.67	0.003764367	2	-	Up
248505_at	At5g50360	unknown protein	-1.59	0.041675648	6	Up	Up

^a 各3反復の実験からP-value (P-value<0. 05) を計算した。

^b 各遺伝子の 上流1000塩基における ABREコア配列 (ACGTGGT) の数を示した。

^c Genevestigator stimulus set (ABA) を参考にした。UP：2倍以上上昇。DOWN：2倍以上減少。－：変化無し

^d Genevestigator stimulus set (drought study 2(Col-0)) を参考にした。UP：2倍以上上昇。DOWN：2倍以上減少。－：変化無し

表4 *srl2cf*で野生型植物より発現が上昇した上位30個の遺伝子（乾燥4時間）

probe set ID	AGI code	Description	log ₂ fold change	P-value ^a
256526_at	At1g66090	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative	1.87	0.044030253
259671_at	At1g52290	protein kinase family protein	1.78	0.024606014
252346_at	At3g48650	pseudogene, At14a-related protein	1.76	0.039867486
244970_at	AtCg00660	chloroplast ribosomal protein L20	1.59	0.006300416
252589_s_at	At3g45650/At3g45660	NAXT1 (NITRATE EXCRETION TRANSPORTER1/proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	1.52	0.017445071
260237_at	At1g74430	MYB95 (myb domain protein 95)	1.50	0.031872504
262374_s_at	At1g72910/At1g72930	disease resistance protein (TIR-NBS class)/TIR (TOLL/INTERLEUKIN-1 RECEPTOR-LIKE)	1.43	0.023149856
259560_at	At1g21270	WAK2 (wall-associated kinase 2)	1.41	0.010776508
245000_at	AtCg00210	unknown protein	1.41	0.020506402
254242_at	At4g23200	protein kinase family protein	1.40	0.025673376
267076_at	At2g41090	calmodulin-like calcium-binding protein, 22 kDa (CaBP-22)	1.38	0.006596747
244926_s_at	At2g07712/AtMg00520	pseudogene, similar to maturase-related protein/unknown protein	1.34	0.020506402
253405_at	At4g32800	AP2 domain-containing transcription factor TINY, putative	1.28	0.010776508
261037_at	At1g17420	LOX3 (lipoxygenase 3)	1.25	0.005214741
266956_at	At2g34510	unknown protein	1.25	0.048945007
257338_s_at	At2g07711/AtMg00513	pseudogene, similar to NADH dehydrogenase subunit 5/Mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5	1.22	0.046493907
255344_s_at	At4g04540/At4g04570	protein kinase family protein	1.20	0.042697478
254996_at	At4g10390	protein kinase family protein	1.19	0.009963167
264449_at	At1g27460	NPGR1 (NO POLLEN GERMINATION RELATED 1)	1.15	0.017445071
252272_at	At3g49670	BAM2 (big apical meristem 2)	1.15	0.030254178
255177_at	At4g08040	ACS11 (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 11)	1.15	0.041784005
251633_at	At3g57460	catalytic/ metal ion binding / metalloendopeptidase/ zinc ion binding	1.14	0.041470574
245015_at	AtCg00490	large subunit of RUBISCO	1.13	0.007957221
263584_at	At2g17040	ANAC036 (Arabidopsis NAC domain containing protein 36)	1.12	0.036785134
260656_at	At1g19380	unknown protein	1.12	0.044987543
248704_at	At5g48450	SKS3 (SKU5 Similar 3): copper ion binding	1.09	0.032532785
266805_at	At2g30010	similar to PMR5 (POWDERY MILDEW RESISTANT 5)	1.08	0.048125788
249321_at	At5g40920	pseudogene, disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	1.04	0.043176558
261581_at	At1g01140	CIPK9 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 9)	1.04	0.033630599
263777_at	At2g46450	ATNGC12 (cyclic nucleotide gated channel 12)	1.03	0.041784005

^a 各3反復の実験からP-value (P-value<0.05) を計算した。

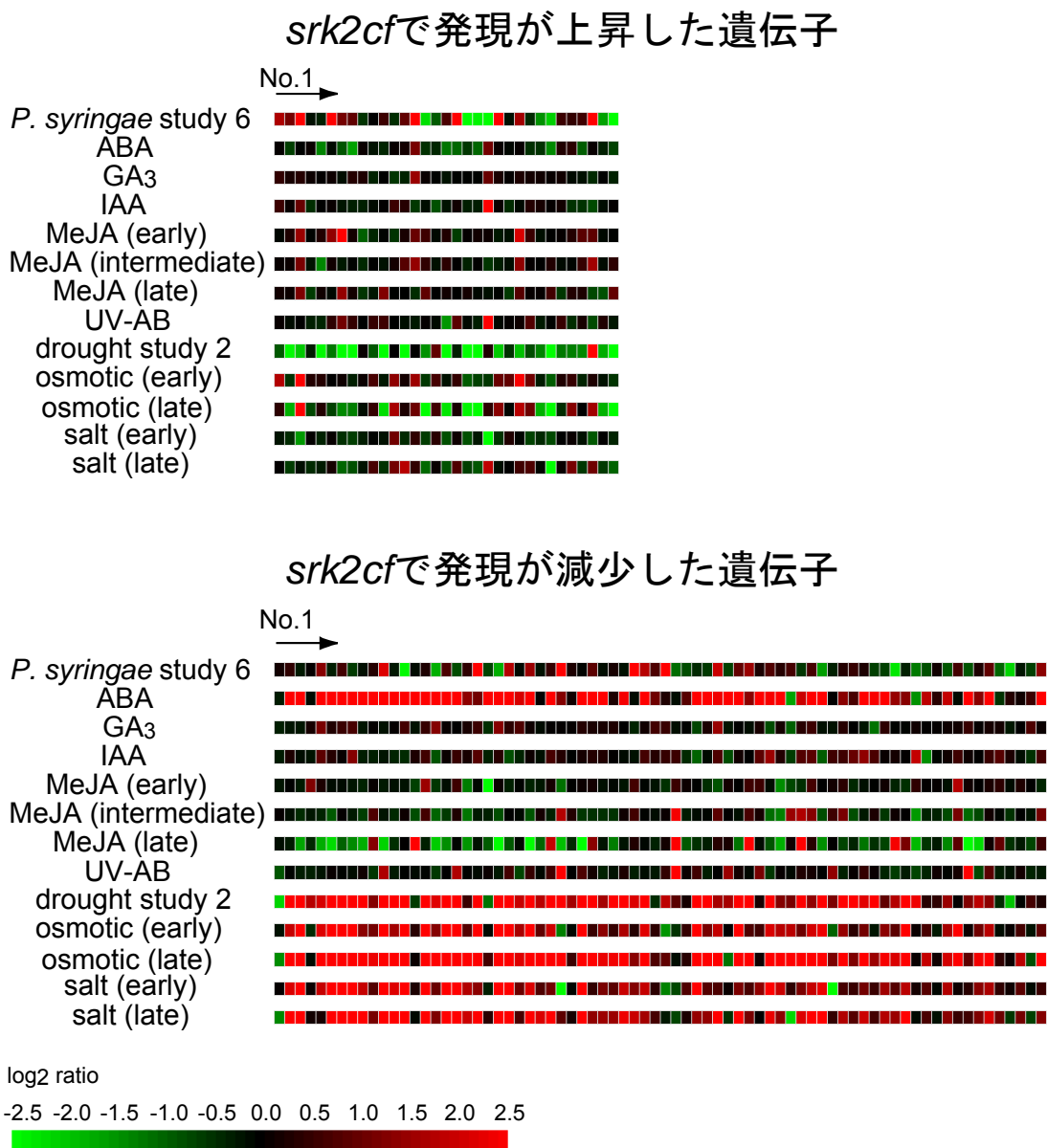


図 8. マイクロアレイ解析で検出された *srk2cf* で変化した遺伝子群の網羅的な解析

GM 培地に播種後 2 週間生育させた、野生型と *srk2cf* に、乾燥処理 4 時間を行い、total RNA を抽出した。その後、Affymetrix 社の Gene Chip system (Arabidopsis ATH1 Genome Array) を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。*srk2cf* で発現が上昇していた遺伝子群 34 遺伝子と、*srk2cf* で発現が減少していた遺伝子群 74 遺伝子に関して、Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) を用いて、他の様々な処理による遺伝子群変動とどのように相関があるかを解析した。各行のブロックは *srk2cf* で発現が変動していた遺伝子を示す。また赤色は、各種処理で発現が上昇していた場合、緑色は発現が減少していた場合の相関を示す。

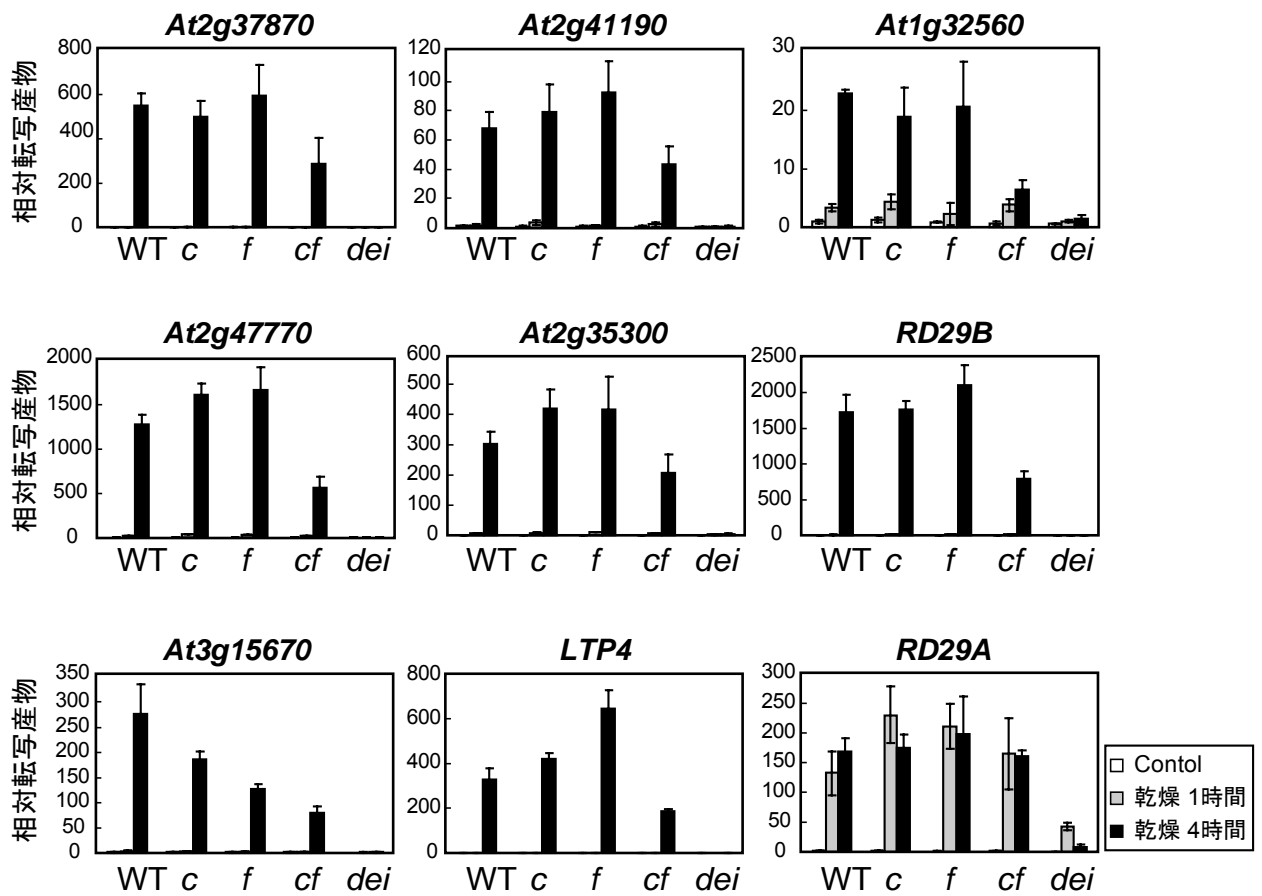


図 9. サブクラス II SnRK2 の 2 重変異体 *srk2cf* における、乾燥処理によって発現誘導される遺伝子群の解析

GM 培地に播種後 2 週間生育させた野生型 (WT) とサブクラス II SnRK2 の 1 重変異体 (*srk2c*, *srk2f*)、2 重変異体 *srk2cf*、およびサブクラス III SnRK2 の 3 重変異体 *srk2dei* に無処理 (白)、乾燥 1 時間処理 (灰色)、乾燥 4 時間処理 (黒) を行い、total RNA を抽出した。その後定量 RT-PCR 法を用いて、乾燥誘導性遺伝子の発現を解析した。各実験区につき 3 回の反復実験を行い、その平均値と標準偏差値を示した。

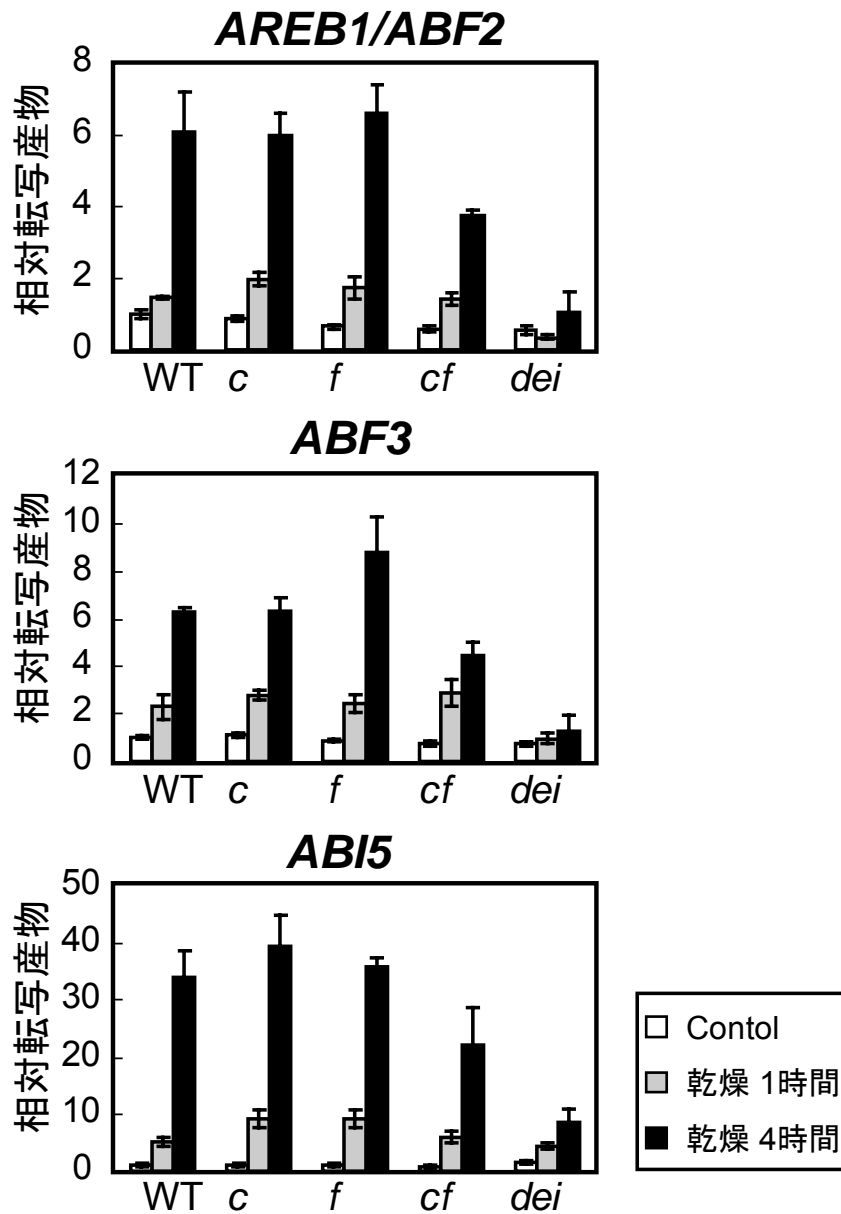


図 10. サブクラス II SnRK2 の 2 重変異体 *srk2cf* を用いた転写因子 AREB/ABF ファミリーの発現解析

GM 培地に播種後 2 週間生育させた野生型 (WT) と 1 重変異体 (*srk2c*、*srk2f*)、2 重変異体 *srk2cf*、3 重変異体 *srk2dei* に無処理 (白)、乾燥 1 時間処理 (灰色)、乾燥 4 時間処理 (黒) を行い、total RNA を抽出した。その後定量 RT-PCR 法を用いて、*AREB1/ABF2*、*ABF3*、*ABI5* 遺伝子の発現を解析した。各実験区につき 3 回の反復実験を行い、その平均値と標準偏差値を示した。

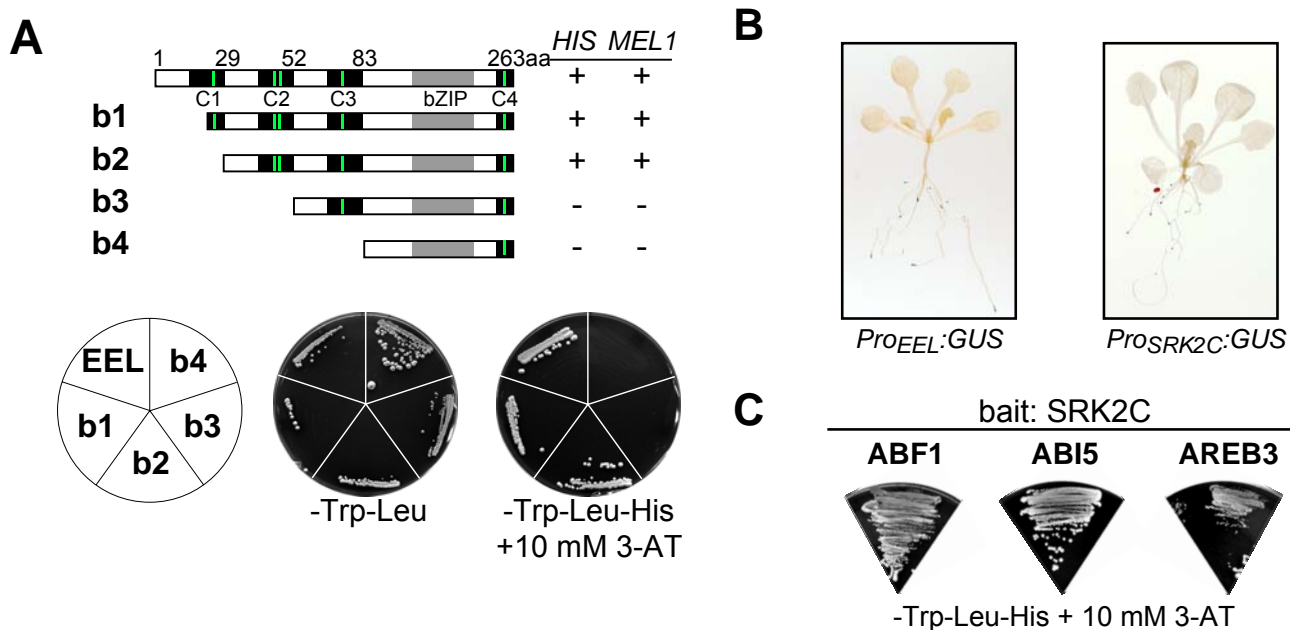


図 11. 酵母ツーハイブリッド法を用いた **SRK2C** と **ABRE/ABF** ファミリーのタンパク質間相互作用の解析

A. *EEL* 遺伝子の欠損断片の模式図と、酵母ツーハイブリッド (YTH) 法を用いた *SRK2C* と *EEL* の相互作用の解析結果。*EEL* 遺伝子の欠損断片 (左図) は、全長、または 83 番目から 263 番目のアミノ酸を様々な長さで欠損させた断片 (b1、b2、b3、b4) を用いた。黒枠は、*ABRE/ABF* ファミリーでの保存領域 (C1、C2、C3) を、灰色枠は bZIP 配列を示す。下図は LW 欠乏培地 (*HIS*) および LWH 欠乏 + 10 mM 3-AT 添加培地 (*MEL1*) での YTH 法による相互作用の結果を示す。

B. *EEL*、*SRK2C* 各遺伝子のプロモーター領域を *GUS* レポーター遺伝子と結合させ、シロイヌナズナ形質転換植物体を作製した。播種後 2 週間生育させた植物体を用いて *GUS* 染色を行った。青色に染色された組織は、各遺伝子の発現部位を示す。

C. 酵母ツーハイブリッド法を用いた *SRK2C* と *ABRE/ABF* ファミリーである *ABF1*、*ABI5*、*AREB3* とのタンパク質間相互作用の結果。方法は A と同様である。

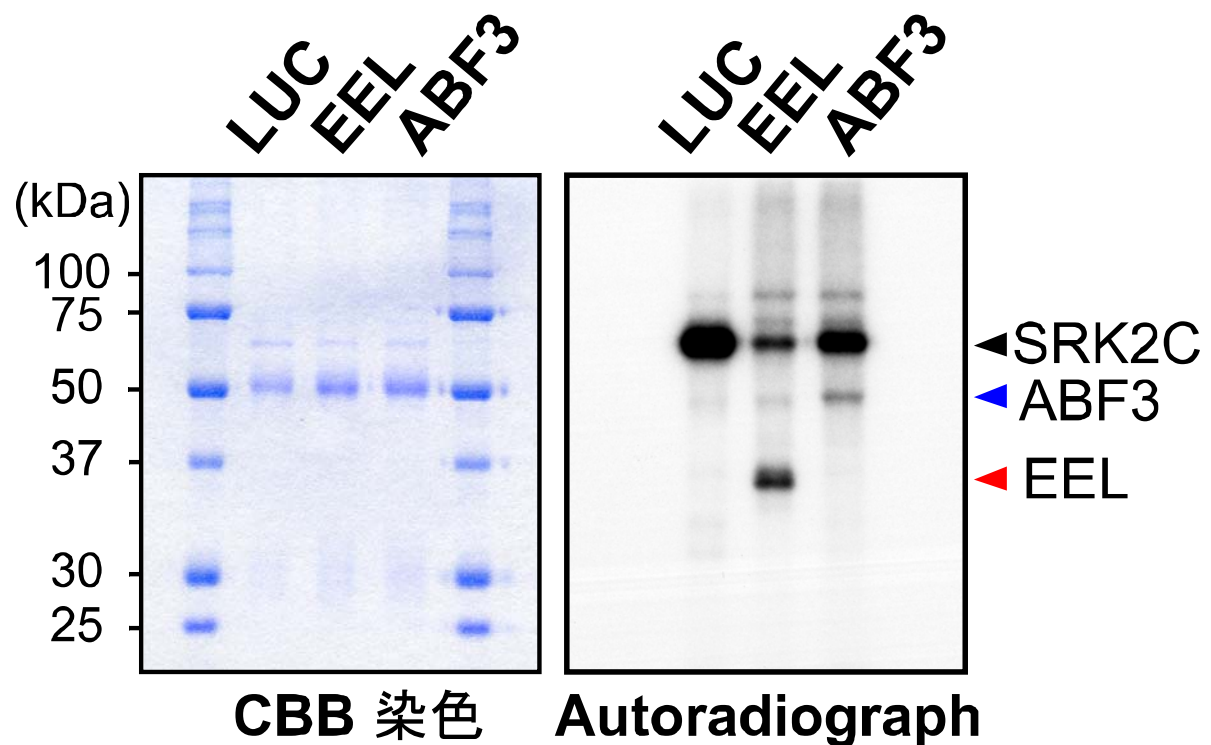


図 12. SRK2C による転写因子 AREB/ABF ファミリーのリン酸化解析

ウサギ網状赤血球溶液を用いた *in vitro* 翻訳系を用いて、*myc* タグを融合させた LUC-*myc*、EEL-*myc*、ABF3-*myc* タンパク質を作製した。抗 *myc* 抗体を用いて免疫沈降後、基質として *in vitro* リン酸化反応溶液に加えた。大腸菌を用いて GST 融合 SRK2C タンパク質を作製し、GST カラムを用いて融合タンパク質を濃縮し、基質と同様に *in vitro* リン酸化反応に用いた。反応液は SDS-PAGE を用いてタンパク質を分離させた後、Autoradiograph を用いてリン酸化活性を測定した（右図）。黒三角は SRK2C-GST タンパク質の自己リン酸化活性、青三角は SRK2C-GST による ABF3-*myc* のリン酸化活性、赤三角は SRK2C-GST による EEL-*myc* のリン酸化活性を示す。用いた泳動ゲルは CBB 染色を行い、用いたタンパク質が等量であることを示した。

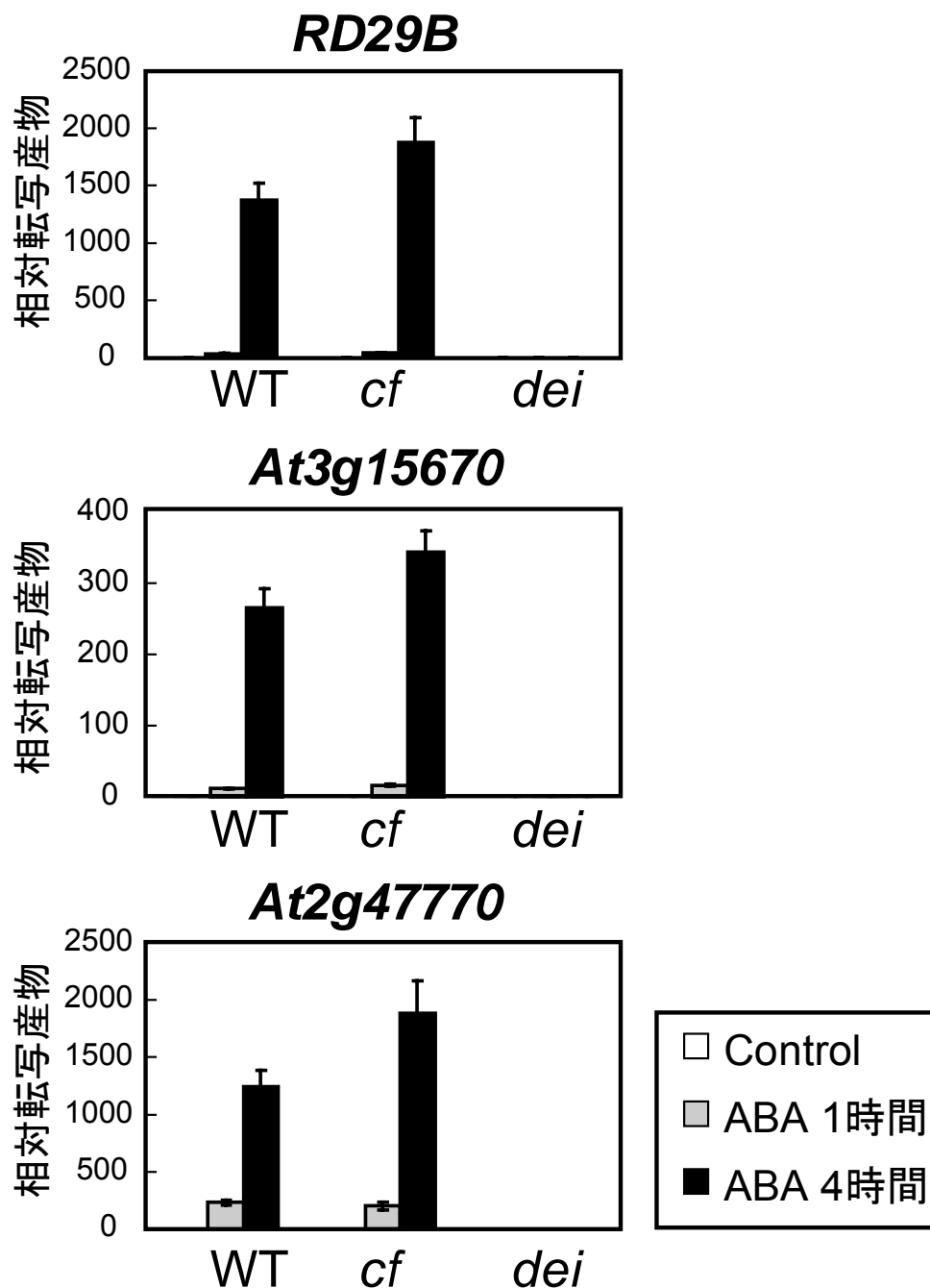


図 13. サブクラス II SnRK2 の 2 重変異体 *srk2cf* における、ABA 処理によって発現誘導される遺伝子群の解析

GM 培地に播種後 2 週間生育させた野生型 (WT) と 2 重変異体 *srk2cf*、3 重変異体 *srk2dei* に無処理 (白)、50 μ M の ABA1 時間処理 (灰色)、ABA4 時間処理 (黒) を行い、total RNA を抽出した。その後定量 RT-PCR 法を用いて、ABA 誘導性を示す *RD29B*、*At3g15670*、*At2g47770* 遺伝子の発現を解析した。各実験区につき 3 回の反復実験を行い、その平均値と標準偏差値を示した。

第 IV 章 サブクラス I に属する 4 つの SnRK2 の機能解析

IV-1. 緒言

SnRK2 の 3 つのサブクラス に関してサブクラス III SnRK2 は ABA の主要なシグナル伝達経路において重要な役割を果たすことが示されている。さらに、前章においてサブクラス II SnRK2 の活性化に関する解析、組織特異的な発現解析、さらに 2 重変異体 *srk2cf* のマイクロアレイ解析から、サブクラス II SnRK2 が乾燥などの浸透圧ストレス応答や ABA 応答におけるシグナル伝達に一定の機能を有しており、またその機能の一部はサブクラス III と重複していることが明らかとなった (Mizoguchi et al., 2010)。特に、ABA 応答におけるシグナル伝達に転写因子 AREB/ABF タンパク質のリン酸化や下流の ABA 誘導性遺伝子の発現制御に関して、サブクラス II はサブクラス III に比べて補助的な役割を担うと考えられた。これによって、高等植物に 3 つ存在する SnRK2 のサブクラスのうち、サブクラス II とサブクラス III の 2 つのサブクラスの機能が明らかになったことになる。残る 1 つはサブクラス I SnRK2 であり、このサブクラスの機能が明らかになれば、SnRK2 ファミリー全体の細胞内シグナル伝達系に関する役割分担に関する議論が可能となる。高等植物では、SnRK2 ファミリーは高度に保存されており、それぞれのサブクラスのメンバー構成に大きな違いはない。たとえばシロイヌナズナ、イネ、ダイズにはサブクラス I SnRK2 がそれぞれ 5 個、6 個、4 個存在している。しかし、サブクラス I の機能については、他の 2 つに比べてそれほど研究が進んでいないのが現状である。また、進化的に見てもサブクラス I SnRK2 は他の 2 つと系統的に離れており、その活性化も浸透圧ストレスに応答して活性化されるが ABA で活性化されないなど異なっており、これらの機能を明らかにすることは SnRK2 の細胞内シグナル伝達系における役割を明らかにする上でも興味深い。

これまでのサブクラス I に関する研究としては、シロイヌナズナにおいて ASK1 (SRK2A) と ASK2 (SRK2G) が単離されたのが最初である (Park et al., 1993)。その後タバコで MBP (Myelin basic protein) を基質にしたゲル内リン酸化実験において、浸透圧ストレスで非常に早い活性化が見られるカルシウム非依存的なプロテインキナ

一ゼが検出された (Hoyos and Zhang, 2000)。同様の浸透圧ストレスによる早い活性化を示すプロテインキナーゼがシロイヌナズナやアルファルファの培養細胞を用いた研究においても見出された (Munnik et al., 1999; Droillard et al., 2000)。これらの浸透圧ストレスによる速やかな活性化を示すプロテインキナーゼのうち、タバコでは **NtOSAK** が単離されシロイヌナズナの **ASK1 (SRK2A)** と高い相同性を示すことが判明した (Kelner et al., 2004)。

サブクラス I **SnRK2** は、他のサブクラスとは異なった活性化パターンを示すことが明らかとなっている。シロイヌナズナの葉肉細胞プロトプラストを用いた一過的発現系で、**SnRK2** ファミリーを網羅的に調べた研究によると、サブクラス II とサブクラス III が **ABA** および浸透圧ストレスによって活性化したのに対し、サブクラス I は塩処理やマンニトール処理などの浸透圧ストレスによって活性化するが、**ABA** では活性化しなかった (Boudsocq et al., 2004)。また、イネを用いた実験でも同様の結果が得られている。さらに、タバコの **NtOSAK** について調べた研究では、浸透圧ストレスによる活性化が 30 秒以内に起こることが示され、非常に早い活性化が特徴となっている (Kelner et al., 2004)。

サブクラス I **SnRK2** の生化学的な解析が進められた一方で、植物における機能解析はなかなか進んでいない。イネにおけるサブクラス I **SnRK2** の 1 つである **SAPK4** を過剰発現させると高塩ストレスに強くなることが示され、酸化ストレスに関係する遺伝子の過剰発現植物における誘導が見られた (Diedhiou et al., 2008)。また、シロイヌナズナにコムギの **TaSnRK2.7** を導入して過剰発現させると、高塩、乾燥、低温など様々な環境ストレスに対する耐性向上が見られた (Zhang et al., 2010)。したがって、サブクラス I **SnRK2** も他の **SnRK2** と同様にやはり環境ストレス応答に関与することが示唆されたが、植物における機能について十分な知見が得られているとは言い難い。現時点では、人為的な過剰発現によって機能を類推した情報しかなく、それがサブクラス I **SnRK2** の機能を反映しているという確証は得られていない。また、モデル植物であるはずのシロイヌナズナにおいて、サブクラス I **SnRK2** の機能解析は報告されていないのが現状である。

前述のように、サブクラス I **SnRK2** はその活性化パターンから浸透圧ストレス応答に

関与していると考えられる。実際にサブクラスⅠが浸透圧ストレス応答のシグナル伝達に関与しているのか否か変異体を用いて解析することが重要である。さらに、サブクラスⅠは ABA 応答に関与しないことが示唆されているため、他の SnRK2 とは異なった機能を有する可能性が考えられる (Boudsocq et al., 2004; Kobayashi et al., 2004; Yoshida et al., 2006)。また、他のサブクラス との機能分担や機能重複も興味深い点である。さらに、高等植物において高度に保存されているサブクラスⅠ SnRK2 の機能を明らかにすることは、植物の浸透圧ストレス応答や ABA 応答における SnRK2 ファミリー全体の機能について理解を深める上で重要であると考えられる。本研究では、サブクラスⅠ SnRK2 の植物での環境ストレス応答における機能を明らかにすることを目的として研究を行った。シロイヌナズナに 10 個ある SnRK2 のうち、サブクラスⅠに属するものは SRK2A、SRK2B、SRK2G、SRK2H、SRK2J の 5 つである。ただし、ゲル内リン酸化実験による解析から、SRK2J の除く 4 つのメンバーが浸透圧ストレスによって活性化することが報告されている (Boudsocq et al., 2004)。そこで本章では、浸透圧ストレスによる活性化が見られ、かつアミノ酸の相同性が高い SRK2A、SRK2B、SRK2G、SRK2H の 4 つサブクラスⅠ SnRK2 を解析対象とした。そしてシロイヌナズナの多重変異体を用いた逆遺伝学的解析を基盤とし、多重変異体の表現型解析、また遺伝子発現解析やホルモンの一斉分析などにより、サブクラスⅠ SnRK2 の植物体での機能解明を進めた。

IV-2. 結果

IV-2-1. サブクラス I SnRK2 の植物ホルモンによる活性化の検討

サブクラス II と サブクラス III は浸透圧ストレス以外に ABA でも活性化することが報告されている。そこでサブクラス I SnRK2 における様々な植物ホルモンによる活性化の有無を解析した。サブクラス I SnRK2 のメンバーである *SRK2A* の全長 CDS と *sGFP* の融合遺伝子を *CaMV35S* プロモーター制御下で発現させるコンストラクトを作成し、T87 培養細胞に形質転換した。形質転換 T87 培養細胞に植物ホルモン (ABA、IAA、BA、GA、ACC、SA、MeJA、BL) を処理し、*SRK2A-sGFP* の活性化をゲル内リン酸化法により調べた。ゲル内リン酸化法は、目的のプロテインキナーゼのリン酸化活性を検出する方法であり、基質を含む SDS-PAGE ゲルで電気泳動したタンパク質を分離後ゲル内でリン酸化反応を行う方法である。ゲルでタンパク質が分離されているので粗抽出サンプルでも、目的のキナーゼの分子量が分かっているならば容易に活性化を知ることができる。なお本実験では、SnRK2 の基質にはヒストンを使用した。図 14 で示したように、浸透圧ストレス (500 mM NaCl) 処理で、*SRK2A* は強く活性化された。活性化シグナルは約 60 kDa 付近に 2 本検出され、高分子側の方が低分子側よりシグナルが強い傾向が認められた。興味深いことに GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングでは、低分子側に相対的に多くの *SRK2A-sGFP* 融合タンパク質が検出され、浸透圧ストレスによって高分子側へバンドがシフトしていることが示された (図 14)。これらの結果から浸透圧ストレスによって活性化される時に、*SRK2A* 自身が何らかのタンパク質修飾を受けていることが示唆された。一方で植物ホルモンによる *SRK2A* の活性化シグナルは、ABA を含めて解析した全ての植物ホルモンで検出されなかった (図 14)。ABA 処理において 40kDa 付近に検出されている活性化シグナルは T87 培養細胞の内生のサブクラス III SnRK2 であり、ABA 処理自体に問題がないことが示された。以上の結果からサブクラス I SnRK2 は浸透圧ストレス特異的に活性化されることから、植物において浸透圧ストレス時に重要な役割を担うことが考えられた。また、活性化される時にタンパク質修飾を受けている可能性が示唆された。

IV-2-2. サブクラス I SnRK2 遺伝子発現の組織特異性

シロイヌナズナにおけるサブクラス I SnRK2 遺伝子の発現している器官を同定するため、根、茎、ロゼット葉、茎生葉、花、サヤ、種子の各器官から抽出した RNA を用いてノーザンブロット解析を行った。調べた 4 つのサブクラス I SnRK2 (*SRK2A*、*SRK2B*、*SRK2G*、*SRK2H*) 遺伝子の全ての器官での発現が検出された (図 15A)。特に *SRK2A*、*SRK2B*、*SRK2G* は根、茎、葉、花など植物全体にわたり強い発現が見られた。*SRK2H* については、根や花において強い発現が検出された。また、*SRK2A* および *SRK2B* は種子においても発現が認められた。しかし 4 つのサブクラス I SnRK2 はアミノ酸配列の相同性が高く、特に *SRK2A* と *SRK2B* は塩基配列においても非常に相同性が高く、*SRK2G* と *SRK2H* は塩基配列の相同性が高い。そのためノーザンブロット解析においてクロスハイブリダイゼーションの影響が無視できず、それぞれの遺伝子の器官特異的発現に関しては違う方法で確認する必要があると考えられた。そこで定量 RT-PCR 法によりサブクラス I SnRK2 が発現している組織を解析した。定量 RT-PCR 法で用いたプライマーについては、相同性がない各遺伝子の 5'非翻訳領域の配列を用いて設定した。その結果 *SRK2A*、*SRK2B*、*SRK2G*、*SRK2H* の各器官における mRNA の蓄積は前述のノーザンブロット解析の結果とよく合致した (図 15B)。*SRK2A*、*SRK2B*、*SRK2G* は根、茎、葉、花などの植物全体で発現していることが確認された。*SRK2A*、*SRK2B* は種子においても発現がみられ、特に *SRK2B* は種子で mRNA が蓄積していることが示された。一方で *SRK2H* は根と花で主に発現していると考えられた。

次にそれぞれの器官での組織特異的な発現を解析するために *GUS* リポーター遺伝子の上流にサブクラス I SnRK2 のプロモーター領域をつないだコンストラクトをシロイヌナズナに導入し形質転換植物を作成した。プロモーター領域は *SRK2A*、*SRK2B*、*SRK2G*、*SRK2H* の翻訳開始点からそれぞれ上流 1044 塩基対、1466 塩基対、1500 塩基対、1492 塩基対の領域である。播種後 2 週間生育した形質転換シロイヌナズナを用いて *GUS* 染色を行った。*SRK2A*、*SRK2B*、*SRK2G* プロモーター : *GUS* 形質転換シロイヌナズナは植物体全体で染色が観察され *GUS* 染色のパターンは互いに非常に類似していた (図 16)。特に根や葉の維管束および茎頂において強い *GUS* 染色が見られた。一方で、*SRK2H* プロモーター:*GUS* 植物では根端のみで強い染色が検出された。この

ようにプロモーター:GUS 形質転換植物を用いた GUS 染色の結果は、前述のノーザンブロット解析および定量 RT-PCR 解析の結果とよく合致していた。サブクラス I の 4 個の遺伝子は植物全体にわたり強く発現しており、各遺伝子の発現が多く組織で重複していることが示された。遺伝子発現の組織特異性からサブクラス I SnRK2 が植物において互いに冗長的に機能していると考えられる。

IV-2-3. サブクラス I SnRK2 タンパク質の細胞内局在

サブクラス I SnRK2 タンパク質の細胞内局在を明らかにするために、プロトプラストを用いた遺伝子の一過的発現系を利用した。各サブクラス I SnRK2 の全長 CDS と sGFP の融合遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス由来の CaMV35S プロモーター制御下で発現させるコンストラクトを作成し、シロイヌナズナの葉肉細胞由来のプロトプラストへ PEG を用いて導入した。GFP 蛍光の細胞内の局在を観察したところ、SRK2A、SRK2B、SRK2G、SRK2H の各 GFP タンパク質の細胞内局在は互いに類似しており、核と細胞質両方で観察された (図 17)。このことは 4 個のサブクラス I のタンパク質が細胞内での類似した局在性を示す。遺伝子のアミノ酸配列の高い相同性、植物の各組織における遺伝子発現の高度な重複、タンパク質の細胞内局在の高い類似性は、4 つのサブクラス I SnRK2 の植物における機能が冗長的であることを強く示唆した。

IV-2-4. 4 重変異体 *srk2abgh* の作成およびゲル内リン酸化による *srk2abgh* における内生 SnRK2 の活性化

サブクラス I SnRK2 の植物体での機能を明らかにするために、SRK2A、SRK2B、SRK2G、SRK2H 各遺伝子について T-DNA 挿入変異体 *srk2a*、*srk2b*、*srk2g*、*srk2h* を単離した。前述で述べたようにサブクラス I SnRK2 も 4 つのメンバーが植物において冗長的に機能している可能性が強く示唆されている。そこで各 T-DNA 挿入変異体同士の掛け合わせを繰り返し行い、最後に 4 つの遺伝子を全て破壊した 4 重変異体 *srk2abgh* を得た (図 18A)。植物から抽出した RNA を用いて RT-PCR を行い、*srk2abgh* において SRK2A、SRK2B、SRK2G、SRK2H の遺伝子発現が全く検出されないことを確認した (図 18B)。

さらに *srk2abgh* において内生のサブクラス I SnRK2 の活性化が変化しているか調べることは重要である。そこで 4 重変異体 *srk2abgh* を含む T-DNA 挿入変異体と野生型植物に乾燥、ABA 処理を行い、植物から抽出したタンパク質を用いてゲル内リン酸化実験を行った。乾燥処理 1 時間で野生型植物の植物において 44 kDa、42 kDa、40 kDa あたりに強い内生の SnRK2 活性が確認された (図 18C)。これに対して 4 重変異体 *srk2abgh* では乾燥処理で 42 kDa と 40 kDa 付近の活性シグナルが著しく減少していたため、42 kDa および 40 kDa 付近のシグナルが内生のサブクラス I SnRK2 の活性に対応すると考えられた。詳しく見ていくと、乾燥処理した 2 重変異体 *srk2ab* の活性化パターンは 42 kDa 付近の活性が消失している。そのため SRK2A および SRK2B は約 42 kDa のキナーゼであると考えられる。また SRK2G の変異体 *srk2g*、2 重変異体 *srk2gh* では 40 kDa 付近の活性化パターンが著しく減少していることから、SRK2G は約 40 kDa のキナーゼであることが示された (図 18C)。しかし SRK2H の変異体 *srk2h* では乾燥処理における活性化パターンに野生型植物との差が見られず、SRK2H に対応する活性化シグナルを見いだせなかった。原因としては、SRK2H が根で特異的に発現しており、植物体全体からタンパク質を抽出したことで相対的に SRK2H の量が少なくなったことが考えられる。また乾燥処理において 4 重変異体 *srk2abgh* で内生 SnRK2 の活性が著しく減少したのに対して、1 時間の ABA 処理では野生型植物と *srk2abgh* の内生 SnRK2 の活性化パターンに全く違いが見られなかった。よって ABA 処理でみられる活性化のシグナルはサブクラス III SnRK2 によるものと考えられ、T87 培養細胞を用いた実験結果と一致した。植物を用いたゲル内リン酸化実験から、4 重変異体 *srk2abgh* では遺伝子発現だけではなくタンパク質レベルで機能が破壊されていることが確認できた。そして、サブクラス I SnRK2 タンパク質は植物体において多量に存在し、浸透圧ストレス特異的に活性化することが示された。

IV-2-5. 4 重変異体 *srk2abgh* の通常生育時の表現型

srk2abgh の通常生育時における表現型を調べるため、鉢植えで植物を生育させて観察した。鉢植えで 1 ヶ月生育させた時、*srk2abgh* のロゼット葉の直径が明らかに野生型植物より小さくなることが示された (図 19)。鉢植え 1 ヶ月後の葉の枚数は野生型植

物と *srk2abgh* で差はなく約 17 枚であった。しかし、多くの葉において大きさが *srk2abgh* で野生型植物より小さくなる傾向があった。第 9 葉について調べたところ葉身の長さおよび幅、葉柄でいずれも *srk2abgh* が野生型植物より約 20% 小さかった (図 20)。 *srk2abgh* の各葉が小さくなることで植物全体が小さくなったと考えられた。2 重変異体の *srk2ab* および *srk2gh* においてはこのように植物が小さくなることはなく、通常生育時の表現型はサブクラス I SnRK2 の植物における機能の冗長性を示唆する結果となった。一方で *srk2abgh* は花茎伸長や花芽形成の時期、花の形態については野生型植物と差は見られなかった (図 19)。

IV-2-6. マイクロアレイによる乾燥処理における 4 重変異体 *srk2abgh* の遺伝子発現の網羅的解析

浸透圧ストレス特異的に強く活性化するサブクラス I SnRK2 の植物体における機能を明らかにするために、マイクロアレイを用いて *srk2abgh* の乾燥下における遺伝子発現を網羅的に解析した。プレートで 2 週間生育させた植物に乾燥処理を 4 時間行い、RNA を抽出してマイクロアレイに用いた。マイクロアレイには Affymetrix 社の Arabidopsis ATH1 Genome Array を用いた。マイクロアレイで得たデータは統計ソフトウェア R 上で動く affyImGUI パッケージを用いて解析を行った。マイクロアレイの結果、乾燥処理 4 時間で *srk2abgh* においてそれぞれ 100 個を超える遺伝子の発現が野生型植物より増加または減少していた。乾燥処理で *srk2abgh* において野生型植物より 2 倍以上 (\log_2 比 >1.0 , P 値 <0.05) 発現が増加した遺伝子は 130 個あった。そのうち上位 30 個の遺伝子について表 5 に示した。一方、乾燥処理で *srk2abgh* において野生型植物より 2 倍以上 (\log_2 比 <-1.0 , P 値 <0.05) 発現が減少した遺伝子は 104 個あった。そのうち上位 30 個の遺伝子について表 6 に示した。これらの *srk2abgh* において野生型植物と発現が変化した遺伝子の特徴を知るため、マイクロアレイデータベースの Genevestigator を用いて解析した (図 21)。 *srk2abgh* において乾燥処理で野生型植物より発現が増加した遺伝子の多くは病原菌感染、サリチル酸、benzothiadiazole (BTH)、エリシター (フラジェリン、FLG22)、オゾンなどの処理により強く誘導される遺伝子であることが判明した。BTH はサリチル酸のアナログであり、オゾン処理はサリチル

酸の蓄積を誘導することが知られている。このことからサリチル酸や病害により誘導される遺伝子が *srk2abgh* において発現が増加していることが示された。*srk2abgh* で野生型植物より発現が増加した遺伝子には *PR1*、*PR2* などの *PR* 遺伝子や *WRKY70* などサリチル酸のシグナル伝達に関わる重要な遺伝子が多く含まれていた。一方で *srk2abgh* において乾燥処理で野生型植物より発現が減少した遺伝子について同様に *Genevestigator* を用いて解析したところ、逆に病原菌感染、サリチル酸、BTH、エリシター、オゾン処理などで減少する傾向が見られた (図 21)。マイクロアレイ解析の結果はサブクラス I SnRK2 が乾燥ストレスに応答して病害およびサリチル酸応答性遺伝子の発現を抑制している可能性を示唆した。

次にマイクロアレイの結果を確認するために、ノーザンブロットによる解析を行った。野生型植物、*srk2ab*、*srk2gh*、*srh2abgh* に乾燥処理を行い、抽出した RNA を用いてノーザンブロット解析を行った。マイクロアレイの結果から 4 重変異体 *srk2abgh* において野生型植物より発現が増加した遺伝子を含む 9 個の遺伝子について解析を行った。ノーザンブロット解析の結果、調べた 9 個の遺伝子のうち乾燥処理マーカーに用いた *RD29A* 以外はサリチル酸で誘導されることが確認された (図 22)。*PR1* や *PR2* などは野生型植物においては乾燥処理でほとんど発現が誘導されないが、*srk2abgh* では乾燥処理において強い発現誘導が見られた。

PCC1、*At4g12490* (*LTP*)、*WRKY70* では野生型植物では乾燥処理で時間依存的に発現量が減少しているにも関わらず、*srk2abgh* では乾燥処理における発現の減少が抑えられていることが示された。残りの *WAK2*、*At5g10760* (aspartyl protease)、*SIB1* においては野生型植物では乾燥 1 時間で一過的に発現が上昇するが、その後乾燥 4 時間では発現が著しく低下している (図 22)。一方で *srk2abgh* においてはこれらの 3 つの遺伝子は乾燥 1 時間では野生型植物に比べてより発現が上昇し、乾燥 4 時間における発現の減少も抑えられる傾向が見られた。乾燥処理のマーカー遺伝子である *RD29A* に関しては野生型植物、*srk2ab*、*srk2gh*、*srk2abgh* の間で乾燥処理による発現誘導に差は見られなかった (図 22)。これら *srk2abgh* において野生型植物より発現が増加した遺伝子は、乾燥ストレス下で発現が上昇しようとする傾向があるが、同時に強い負の制御を受けていることが示唆された。*Genevestigator* における解析でも *srk2abgh* において

野生型植物より発現が増加した遺伝子は乾燥処理で発現が減少する傾向が見られた。ノーザン解析の結果から、サブクラス I SnRK2 のメンバー *SRK2A*、*SRK2B*、*SRK2G*、*SRK2H* は乾燥ストレス下で互いに協調して病害およびサリチル酸応答遺伝子の発現を抑制していることが示された。

さらに、4 重変異体 *srk2abgh* において野生型植物より遺伝子発現が上昇した原因がサブクラス I SnRK2 の機能の破壊によるかどうか確認するために、*srk2abgh* の相補ラインを作成しノーザンブロット解析を行った。*SRK2A* および *SRK2G* の全長 CDS を CaMV35S プロモーター制御下で発現させるコンストラクトを *srk2abgh* へ遺伝子導入し、*SRK2A* (A3) および *SRK2G* (G6) を発現する 4 重変異体の相補株をそれぞれ得た (図 23A)。野生型植物、*srk2abgh*、相補株 A3、相補株 G6 に乾燥処理を行い、抽出した RNA を用いてノーザンブロット解析を行った (図 23B)。*PR2* の発現について調べたところ、*srk2abgh* においては乾燥で *PR2* の強い発現が見られたが、相補株 A3 と相補株 G6 では乾燥 4 時間における *PR2* の発現誘導が *srk2abgh* と比べて抑えられていた。また相補株 G6 と比較して、相補株 A3 の方がより強く発現が抑制されており、サブクラス I SnRK2 の中でも *SRK2A* と *SRK2B* の方が *SRK2G* と *SRK2H* より乾燥ストレス下における病害およびサリチル酸応答遺伝子の抑制に強く働いている可能性が考えられた。相補ラインを用いた解析からもサブクラス I SnRK2 のメンバー *SRK2A*、*SRK2B*、*SRK2G*、*SRK2H* は乾燥ストレス下で病害およびサリチル酸応答遺伝子の発現を負に制御する因子であることが確認された。

IV-2-7. 4 重変異体 *srk2abgh* における植物ホルモンの定量

マイクロアレイ解析の結果、*srk2abgh* では病害およびサリチル酸応答性遺伝子が野生型植物より乾燥処理において増加しており、サブクラス I SnRK2 が乾燥ストレス応答と病害やサリチル酸応答のクロストークに関わる可能性が示唆された。従って、*srk2abgh* におけるサリチル酸量を定量することは重要であると考えて、野生型植物と *srk2abgh* におけるサリチル酸を含む酸性ホルモン (ABA、IAA、GA₄、JA、JA-Ile) を LC-MS 装置を用いて定量した (図 24)。植物に乾燥処理を行い、凍結乾燥後アセトニトリルを溶媒にして植物ホルモンを抽出した。精製して酸性植物ホルモンを回収後、

6410 Triple Quad LCMS (Agilent) を用いて測定を行った。その結果では、無処理および乾燥処理両方で *srk2abgh* におけるサリチル酸量は野生型植物と同程度で差はなかった。サリチル酸量に両植物で差がなかったことからサブクラス I SnRK2 はサリチル酸の合成には直接関わらないことが示唆された (図 24)。さらに IAA、GA₄ の量においても野生型植物と *srk2abgh* で差が見られなかった。サリチル酸シグナル伝達に拮抗的に働く植物ホルモンとして ABA や JA が知られているが、ABA については *srk2abgh* と野生型植物との間に差はなく、両植物において乾燥処理によって多量の ABA の蓄積が見られた (図 24)。JA については乾燥処理 4 時間の蓄積が *srk2abgh* において野生型植物より少ない傾向が見られたが、統計的に優位な差ではなかった。しかし興味深いことに、活性型 JA と考えられている JA-Ile の乾燥処理 4 時間における蓄積量は *srk2abgh* では野生型植物の半分ほどしかなかった (図 24)。乾燥ストレス下におけるサブクラス I SnRK2 の病害およびサリチル酸応答性遺伝子の発現の負の制御にはジャスモン酸シグナルを介している可能性が示唆された。

IV-2-8. 4 重変異体 *srk2abgh* の乾燥処理における MPK6 の活性化

酸性植物ホルモンの定量解析により、サブクラス I SnRK2 とジャスモン酸シグナルの関係が示唆された。そこで、ジャスモン酸シグナルに関わる重要なキナーゼに MAPK がよく知られている。シロイヌナズナに 20 個あるうち MPK6 はジャスモン酸で活性化しジャスモン酸シグナルを負に制御することが報告されている (Takahashi et al., 2007)。また、MPK6 は ABA や乾燥処理においても活性化することが知られている。そこで、*srk2abgh* における内生 MPK6 の活性化状態についてゲル内リン酸化実験により調べた (図 25)。植物に ABA と乾燥処理を行い、タンパク質を抽出して MAPK の基質である MBP を用いてゲル内リン酸化実験を行った。ゲル内リン酸化実験の結果、ABA および乾燥処理の両方で *srk2abgh* における内生 MPK6 の活性化は野生型植物と同程度であった。ゲル内リン酸化の結果から乾燥ストレスにおけるサブクラス I SnRK2 とジャスモン酸シグナルとの関係が示唆されるが、MPK6 を介するジャスモン酸シグナルには関与しないことが分かった。

IV-2-9. 病原菌 (*Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) DC3000) 感染における *srk2abgh* の表現型解析

乾燥処理で *srk2abgh* において野生型植物より多くの病害およびサリチル酸応答性遺伝子の発現が増加していたことから、シュードモナス *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) DC3000 を用いた感染実験を行った。シュードモナスは気孔から侵入して感染する。よって乾燥した植物では気孔が閉じてしまい著しく感染効率が下がるため、実験が成り立たなくなる。そこで、プレート植物に比べると多少の乾燥状態にある鉢植え植物を用いて感染に差があるか調べることにした。鉢植え（短日条件）で 7 週間生育させた植物に *Pst* DC3000 を感染させて、3 日後の *Pst* DC3000 の増殖を解析した。*Pst* DC3000 感染試験の結果、やはり *srk2abgh* と野生型植物の間に *Pst* DC3000 に対する抵抗性の違いは見られなかった（図 26）。

IV-2-10. 4 重変異体 *srk2abgh* の乾燥ストレスにおける表現型解析

野生型植物において乾燥処理で病害やサリチル酸応答性遺伝子の発現が速やかに抑制されるのは、これらの遺伝子が乾燥耐性獲得の障害になるためではないかと思われた。乾燥処理で病害やサリチル酸応答性遺伝子の発現が野生型植物より増加する *srk2abgh* において乾燥耐性が変化しているか乾燥耐性試験で調べることにした。植物を鉢植えで 3 週間生育させ、その後水を与えずに 17 日間育てた後再吸水を行った。植物生死の判定は再吸水 3 日後に行った。乾燥耐性試験の結果、再吸水後の生存率は野生型植物と 2 重変異体 *srk2ab*、*srk2gh* と 4 重変異体 *srk2abgh* で差は見られなかった（図 27）。よって乾燥耐性試験の結果からは、乾燥ストレス下におけるサブクラス I SnRK2 の機能が乾燥耐性へ寄与する可能性は低いと考えられた。

IV-3. 考察

シロイヌナズナの SnRK2 にはサブクラス I ~ III の 3 つのサブクラスが存在する。前章ではサブクラス II に関して解析を行い、サブクラス III と同様に乾燥ストレス応答や ABA 応答のシグナル伝達において重要な役割をしていることを明らかにした。本章では、サブクラス I SnRK2 についてその機能を解析して、SnRK2 の機能分担を明らかにすることを旨として解析を行った。サブクラス I SnRK2 は、コケやシダなどでは見いだされていないが、シロイヌナズナやイネなどの高等植物において見いだされている。サブクラス I SnRK2 は進化上最も新しいサブファミリーであり、高等植物での機能解析を行った。サブクラス I SnRK2 は他の SnRK2 と同様に浸透圧ストレスによって強く活性化することがわかっているが、サブクラス III と違って ABA 処理による活性化が見られないなどの特徴がある (Boudsocq et al., 2004; Kobayashi et al., 2004)。本研究では、シロイヌナズナのサブクラス I SnRK2 のメンバーのうち浸透圧ストレスで活性化が見られない SRK2J を除いた SRK2A、SRK2B、SRK2G、SRK2H について、多重変異体を作成して機能解析を行った。

最初にサブクラス I SnRK2 の活性化の条件について検討を行い、サブクラス I SnRK2 は他のサブクラスと違い ABA によって活性化しないこと、そして他の植物ホルモン (IAA、BA、GA、ACC、SA、MeJA、BL) でも活性化しないことを確認した (図 24)。サブクラス I は浸透圧ストレスによる活性化が 30 秒で最大活性を示すなど、きわめて迅速に活性化され、このことはサブクラス I の生化学的特徴であるといえる。サブクラス I SnRK2 が特徴的な活性化を示す理由として、C 末端の配列の特異性が考えられる。ABA で活性化するサブクラス II およびサブクラス III の C 末端の領域 II にはアスパラギン酸に富む配列があり、この部分が ABA シグナル伝達に関係する 2C 型プロテインホスファターゼ (PP2C) と相互作用する部位であることがわかっている (Yoshida et al., 2006; Umezawa et al., 2009)。その一方で、サブクラス I SnRK2 は C 末端の領域 II がアスパラギン酸ではなくグルタミン酸に富んだ配列であり、また PP2C はこの領域と相互作用できない。このことが、サブクラス I SnRK2 が ABA による活性化が起らない理由の 1 つと考えられる。この酸性アミノ酸領域には ABA 関連の PP2C とは異なる抑

制因子が結合しており、ABA 処理ではその抑制が解除されないのではないかと推定している。

次に、サブクラス I SnRK2 の遺伝子発現の組織特異性や細胞内局在性を調べたところ、サブクラス I の 4 つのメンバー間に強い類似性が認められ、機能的な冗長性が高いことが示唆された (図 15-17)。この予想を裏付けるように、サブクラス I SnRK2 の遺伝子破壊株を用いた実験では、単独の遺伝子破壊株や 2 重変異体ではほとんど表現型が観察されなかったのに対して、4 重変異体 *srk2abgh* では生育の抑制が観察された (図 19)。ゲル内リン酸化法によるプロテインキナーゼの活性化試験においても、乾燥ストレス条件下で 4 重変異体ではシグナルが大きく減少していた (図 18)。一方で ABA 処理による内生 SnRK2 の活性化パターンには野生型植物と *srk2abgh* で差が見られず、検出された活性化シグナルは分子量からサブクラス III SnRK2 と考えられた。遺伝子破壊変異体を用いたゲル内リン酸化の解析からは、サブクラス I SnRK2 が大量に植物内に存在していることと、浸透圧ストレス特異的に活性化することが明らかとなった。

4 重変異体 *srk2abgh* の表現型を詳しく観察したところ、鉢植えで生育させた時に葉数や花芽形成時期など生育遅延は見られなかったが、野生型植物や *srk2ab* および *srk2gh* よりロゼット葉が 20%ほど小さくなることが示された (図 20)。サブクラス II SnRK2 の 2 重変異体 *srk2cf* では鉢植え時において野生型植物と比較して生育に差は見られなかった。これに対比してサブクラス III SnRK2 の 3 重変異体 *srk2dei* では乾燥耐性が欠落しており鉢植えでの生育に大幅な遅延がみられた (Fujii and Zhu, 2009; Nakashima et al., 2009; Fujita et al., 2009)。サブクラス I SnRK2 の 4 重変異体 *srk2abgh* の通常生育条件における表現型はサブクラス II の 2 重変異体 *srk2cf* とサブクラス III の 3 重変異体 *srk2dei* とは異なっており、サブクラス I が他のサブクラスと違った生理機能を持つことが示唆された。

浸透圧ストレス特異的に活性化するサブクラス I SnRK2 の機能を明らかにするために、マイクロアレイ解析を用いて 4 重変異体 *srk2abgh* の乾燥処理における遺伝子発現を網羅的に調べた (図 21)。その結果、乾燥処理において *srk2abgh* で野生型植物より多数の遺伝子の発現が上昇していること、その多くが病害応答に関わる *PR1*、*PR2* など *PR* 遺伝子や *WRKY70* などのサリチル酸シグナル伝達に関わる遺伝子であった

(Shah, 2009)。ノーザンブロット解析によって *srk2abgh* において乾燥処理で発現が上昇した遺伝子を解析した結果、それらの遺伝子の野生型植物における発現の特徴が 3 つのパターンを示した (図 22)。1 番目のパターンは、*PR1* や *PR2* などのように乾燥処理によって発現誘導が強く抑制されているタイプである。2 番目の遺伝子は *PCC1* の発現で見られたように乾燥処理において時間依存的に発現が減少するものも存在していた。さらに、3 番目のグループの *WAK2* 遺伝子などは野生型植物では乾燥 1 時間で一過的に発現が上昇するが、乾燥 4 時間では発現が著しく低下した。さらにこの結果を確認するために、*SRK2A* と *SRK2G* をそれぞれ発現する *srk2abgh* の相補ラインを用いてノーザンブロット解析を行ったところ、乾燥 4 時間における *PR2* の発現誘導は 4 重変異体に比べて抑えられており、より野生型に近いパターンとなっていた (図 23)。興味深いことに、*SRK2A* を発現する相補ラインの方が *SRK2G* を発現する相補ラインより *PR2* の乾燥による発現がより抑えられており、*SRK2A* の方が *SRK2G* より重要な役割を果たすと考えられた。以上の結果から、4 重変異体 *srk2abgh* において乾燥処理で野生型植物より発現が上昇した病害やサリチル酸誘導性遺伝子は、乾燥処理において誘導される傾向があり、その誘導をサブクラス I SnRK2 が協調して負に制御していることが示唆された。一方で、これらの遺伝子発現の変化が植物の乾燥耐性にほとんど影響しないことも明らかとなった。すなわち 4 重変異体 *srk2abgh* では野生型植物と比べて乾燥ストレス耐性に差がなかった。

以前の研究において、サブクラス III SnRK2 の 3 重変異体 *srk2dei* では、非常に多くの乾燥、ABA 誘導性遺伝子の発現が抑制されることがわかっている (Fujita et al., 2009)。一方で *srk2dei* において乾燥処理で発現が上昇した遺伝子の上位には *APETALA3* などの花芽形成に関係する遺伝子や、*PDF1.2* などのジャスモン酸で誘導される遺伝子が多く見られる (Fujita et al., 2009)。サブクラス II もサブクラス III と比べると遺伝子数や程度は限定的であるが乾燥ストレスに応答して乾燥、ABA 誘導性遺伝子の発現を制御している。サブクラス II やサブクラス III が乾燥ストレス応答に関わる ABA 誘導性遺伝子の発現を制御しているのに対して、サブクラス I SnRK2 は ABA シグナル伝達には関与しておらず、また乾燥ストレス応答の主要な経路にも関与しないことが示唆された。

マイクロアレイ解析の結果から、サブクラス I SnRK2 がサリチル酸応答性遺伝子の

発現に関与することが明らかとなった。そこで、質量分析の LC-MS 装置を用いて *srk2abgh* におけるサリチル酸を含む酸性ホルモン (ABA、IAA、GA₄、JA、イソロイシン結合型ジャスモン酸 (JA-Ile)) を定量した。しかし、予想に反してサリチル酸に関しては無処理、乾燥処理の両方で野生型植物と *srk2abgh* において差が見られなかった (図 24)。乾燥ストレス下において多量に合成される ABA に関しても野生型植物と *srk2abgh* の間で優位な差は認められなかった。また、IAA、GA₄ に関しても差は見られなかった。このことから、*srk2abgh* でサリチル酸応答性遺伝子の発現が上昇した原因は、サリチル酸量の変化に起因するものではないと考えられた。このことは、*srk2abgh* の病害応答を調べるために行った感染試験で、野生型植物と差が認められなかったことから支持された (図 26)。一方で乾燥や傷害ストレスで多量に合成される JA に関しては、乾燥ストレス下の *srk2abgh* における活性型 JA の JA-Ile の蓄積量が、野生型植物に比べて半分程度に減少していた (図 24)。JA に関しては *srk2abgh* では乾燥ストレスによる蓄積が抑制される傾向があった。このことから、乾燥ストレス下における JA-Ile の蓄積量の減少が、*srk2abgh* においてサリチル酸応答性遺伝子が増加していたことと関係があるのではないかと考えられた。ジャスモン酸とサリチル酸はシグナル伝達のレベルでクロストークしており、互いに拮抗作用を示すことが報告されている (Bari and Jones, 2009)。したがって、4 重変異体 *srk2abgh* では JA-Ile の蓄積量が減少することでサリチル酸シグナルへの抑制作用が弱まり、その結果としてサリチル酸応答性遺伝子の発現が増加したのではないかと解釈できる。以上の結果から、サブクラス I SnRK2 は乾燥ストレスによって誘導されるジャスモン酸合成を正に制御すること、ジャスモン酸とサリチル酸の拮抗作用に関わり乾燥ストレス時のサリチル酸誘導性の遺伝子発現に影響を及ぼすことなどが示唆される。乾燥などの環境ストレス応答とサリチル酸シグナルの間には拮抗作用が存在することが分かっている。これまで ABA 処理をしたシロイヌナズナにおいてはサリチル酸による *PR1* などの遺伝子発現の誘導が抑えられるなど、ABA が環境ストレスにおけるサリチル酸シグナル伝達を負に制御する主要な因子と考えられていた (Yasuda et al., 2008)。しかしながら、本研究において浸透圧ストレス特異的に活性化するサブクラス I SnRK2 は JA-Ile のレベルを制御することで病害感染やサリチル酸応答性遺伝子の発現を乾燥ストレス下で抑制していることが明らかとなっ

た。

他の **SnRK2** と違い、サブクラス I **SnRK2** は高等植物にしか存在しないため、これら病害応答性遺伝子が乾燥ストレス条件下で発現が抑制される生物学的な意義を今後解析することは重要であると考えられた。ジャスモン酸は、植物の傷害応答に重要な機能をもつ植物ホルモンである。本研究の結果からサブクラス I **SnRK2** とジャスモン酸との関係が示唆されたことから、サブクラス I **SnRK2** と傷害ストレス応答の関係がクローズアップされた。しかし、サブクラス I **SnRK2** は浸透圧ストレスによって活性化されることが示されているが傷害応答との関連性は不明であり、今後の課題として残されている。

本研究より、サブクラス I **SnRK2** の高等植物における浸透圧ストレス応答における機能が初めて明らかとなり、浸透圧ストレス応答におけるジャスモン酸とサリチル酸の拮抗作用に関わることが示された。今後は、サブクラス I **SnRK2** がどのようにしてジャスモン酸とサリチル酸の拮抗作用をコントロールするのかそのメカニズムを解析していく必要がある。また、浸透圧ストレスによる活性化はサブクラス I に限らず他のすべての **SnRK2** で見られており、浸透圧ストレスによる **SnRK2** の活性化が引き起こす細胞内シグナル伝達経路や植物の応答機構は必ずしも明らかになっていない。**SnRK2** は植物の環境ストレス応答におけるリン酸化によるシグナル伝達系やストレス応答のクロストークにおいて重要な役割を果たしていると考えられており、浸透圧ストレス応答における **SnRK2** の機能を明らかにしていくことは、今後の植物の環境ストレス応答研究において重要な課題である。

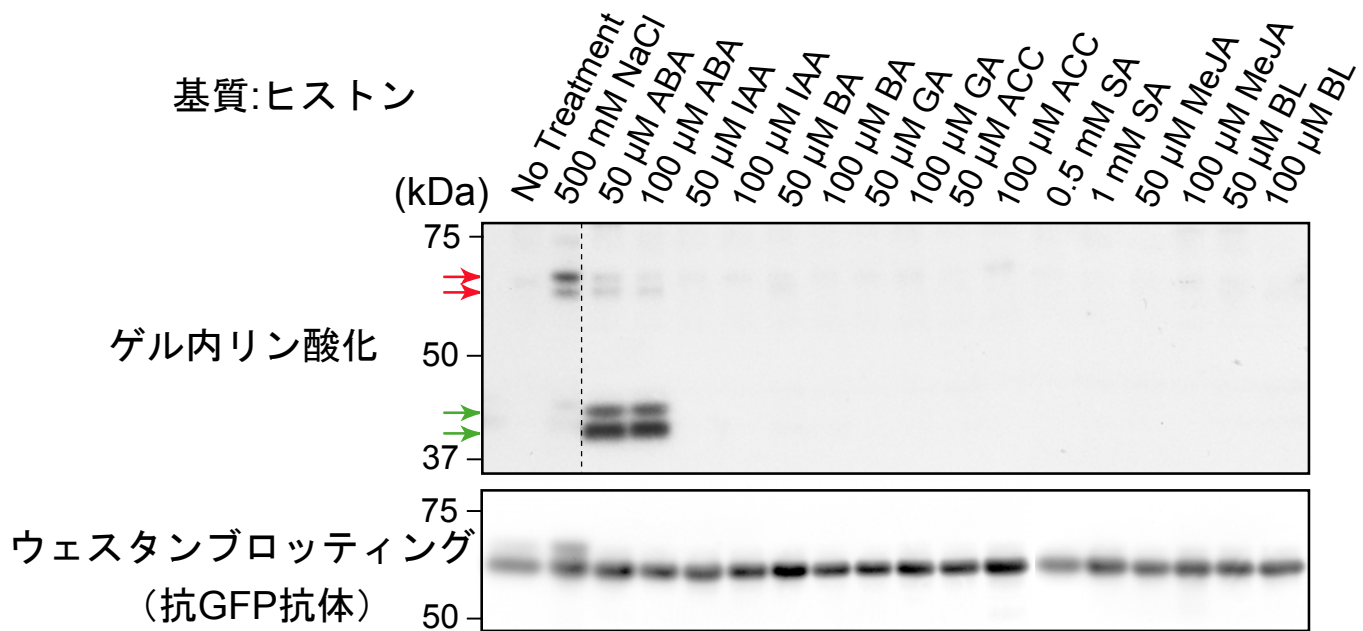


図 14. サブクラス I SnRK2 (SRK2A) の活性に及ぼす植物ホルモン処理の影響

上図: SRK2A を過剰発現させたシロイヌナズナ T87 培養細胞に、各種植物ホルモン処理を 30 分間行った。その後、全タンパク質を抽出し、ヒストンを基質としたゲル内リン酸化法を用いて subclass I SnRK2 の活性を解析した。過剰発現させた SRK2A-GFP 融合タンパク質の活性化バンドを赤矢印、内在性の SRK2 タンパク質の活性化バンドを緑矢印で示す。ABA: アブシシン酸、IAA: インドール酢酸、BA: ベンジルアデニン、GA: ジベレリン、ACC: 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸、SA: サリチル酸、MeJA: ジャスモン酸メチル、BL: ブラシノステロイド

下図.: 過剰発現した SRK2A-GFP のタンパク質量を、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって検出した。各レーンのタンパク質量がほぼ等量であり、ゲル内リン酸化法で検出された SRK2A 活性化のバンドが、タンパク質量の増加によるものではないことを示す。

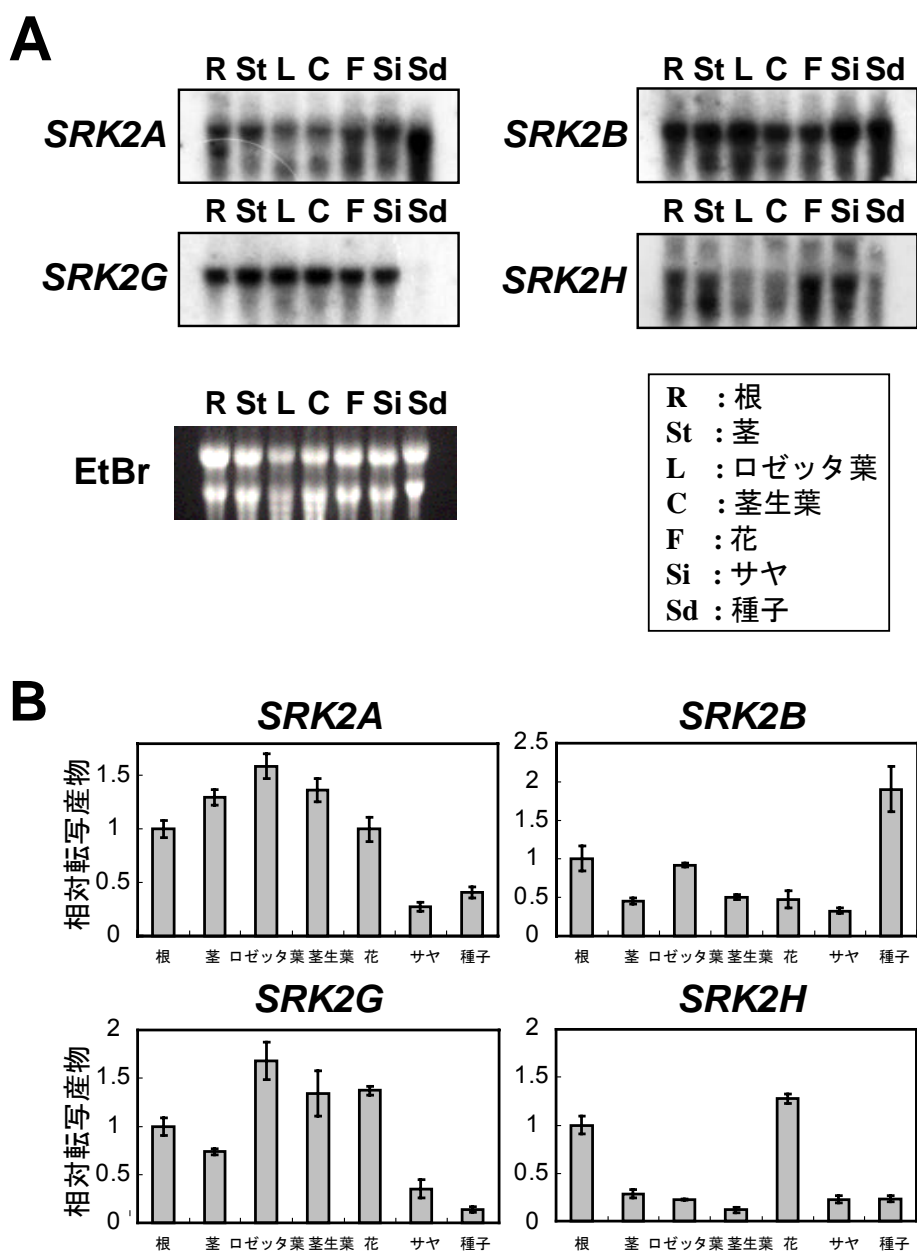


図 15. シロイヌナズナ各組織におけるサブクラス I SnRK2 遺伝子の発現解析

A. シロイヌナズナの根 (R)、茎 (St)、ロゼッタ葉 (L)、茎生葉 (C)、花 (F)、サヤ (Si)、種子 (Sd) から total RNA を抽出し、*SRK2A*、*SRK2B*、*SRK2G*、*SRK2H* 遺伝子の発現量をノーザンブロッティング法を用いて解析した。各サンプル 10 μ g の total RNA を用いた。臭化エチジウム (EtBr) による染色は、各レーンの total RNA の量を示す。

B. サブクラス I SnRK2 遺伝子の組織特異的な発現量を、定量 RT-PCR 法を用いて定量した。それぞれ 3 回の反復実験を行い、平均値と標準偏差値を示した。

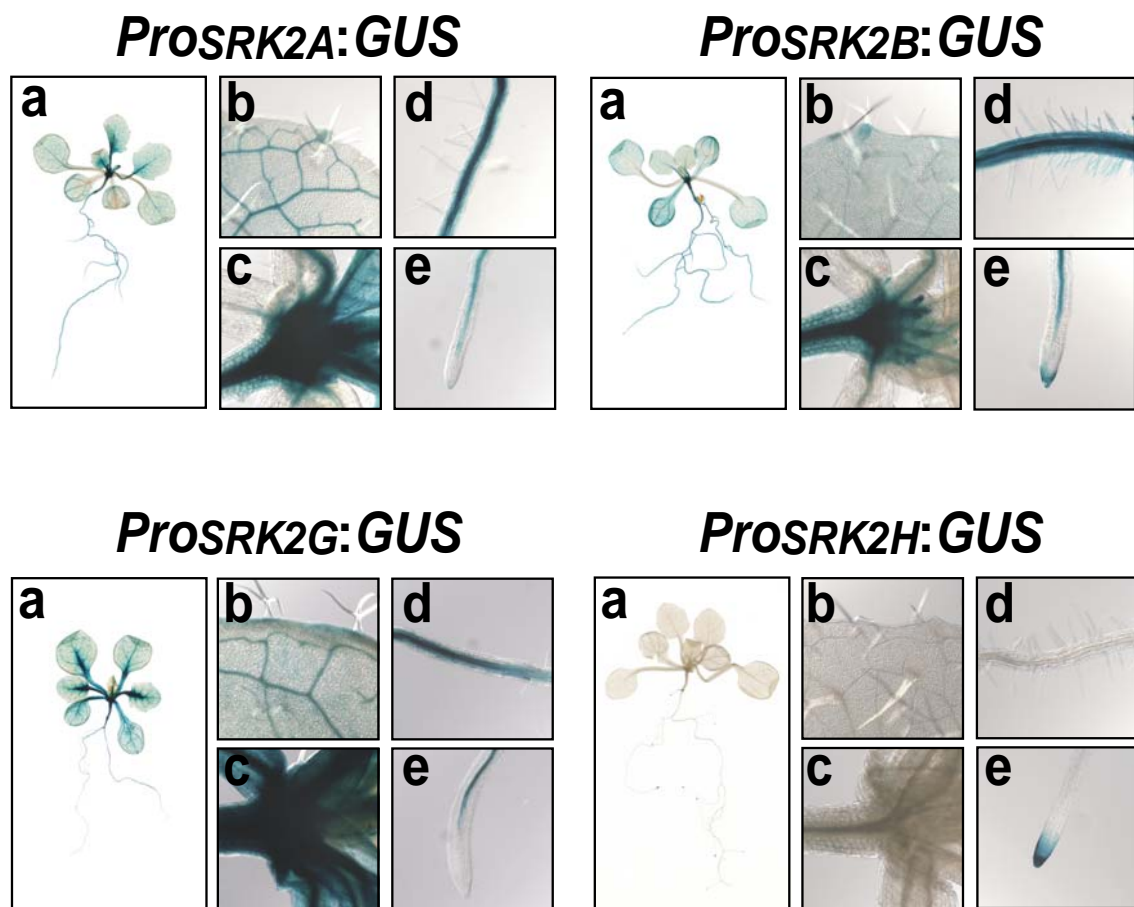


図16. *GUS* レポーター遺伝子を用いたサブクラスI SnRK2遺伝子の植物体における組織別発現解析

SRK2A、*SRK2B*、*SRK2G*、*SRK2H* 各遺伝子のプロモーター領域を *GUS* レポーター遺伝子と結合させたコンストラクトを用いて、シロイヌナズナ形質転換植物体を作製した。播種後2週間生育させた植物体を用いて *GUS* 染色を行った。青色に染色された組織は、各遺伝子の発現部位を示す。植物体全体像 (a)、本葉 (b)、茎頂分裂組織 (c)、主根 (d)、根端 (e) の各部位において、それぞれ解析を行った。

微分干渉像 GFP蛍光 重ね合わせ

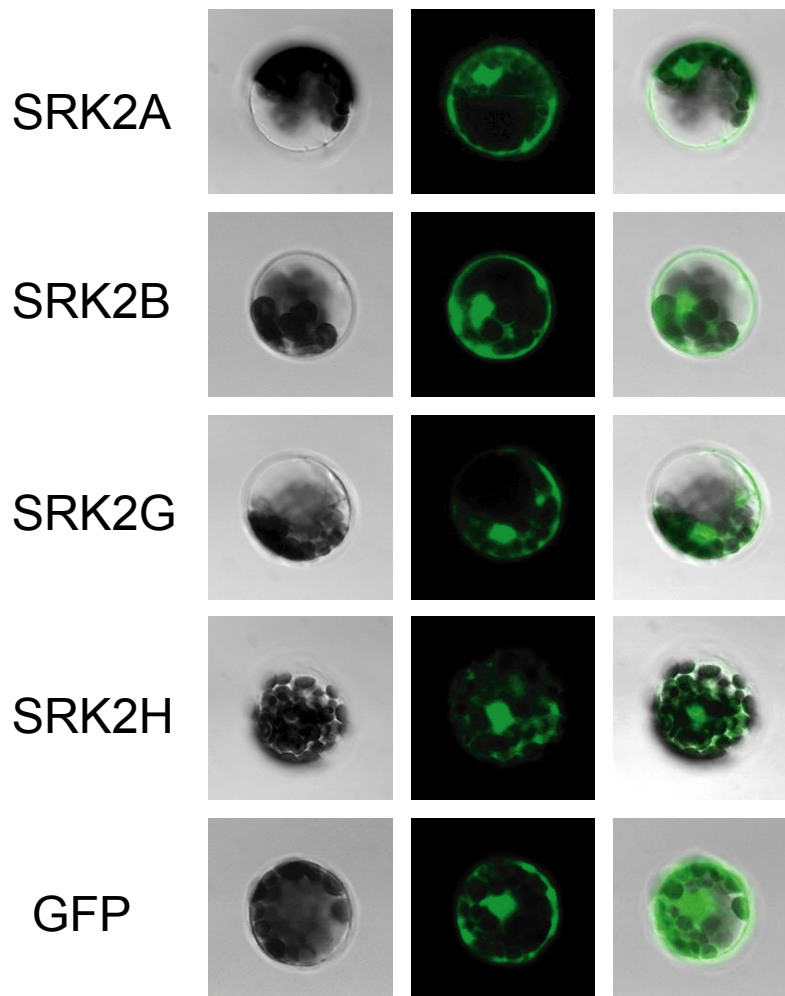


図 17. 葉肉細胞由来のプロトプラストで一過的発現系を用いたサブクラス I **SnRK2-GFP** 融合タンパク質の細胞内局在の解析

SRK2A-GFP、*SRK2B-GFP*、*SRK2G-GFP*、*SRK2H-GFP* をシロイヌナズナの葉肉細胞から単離したプロトプラストに導入し、一過的に発現させた。暗条件下で 1 晩静置した後、GFP 蛍光を観察した。左から微分干渉、GFP 蛍光、重ね合わせ像を示す。

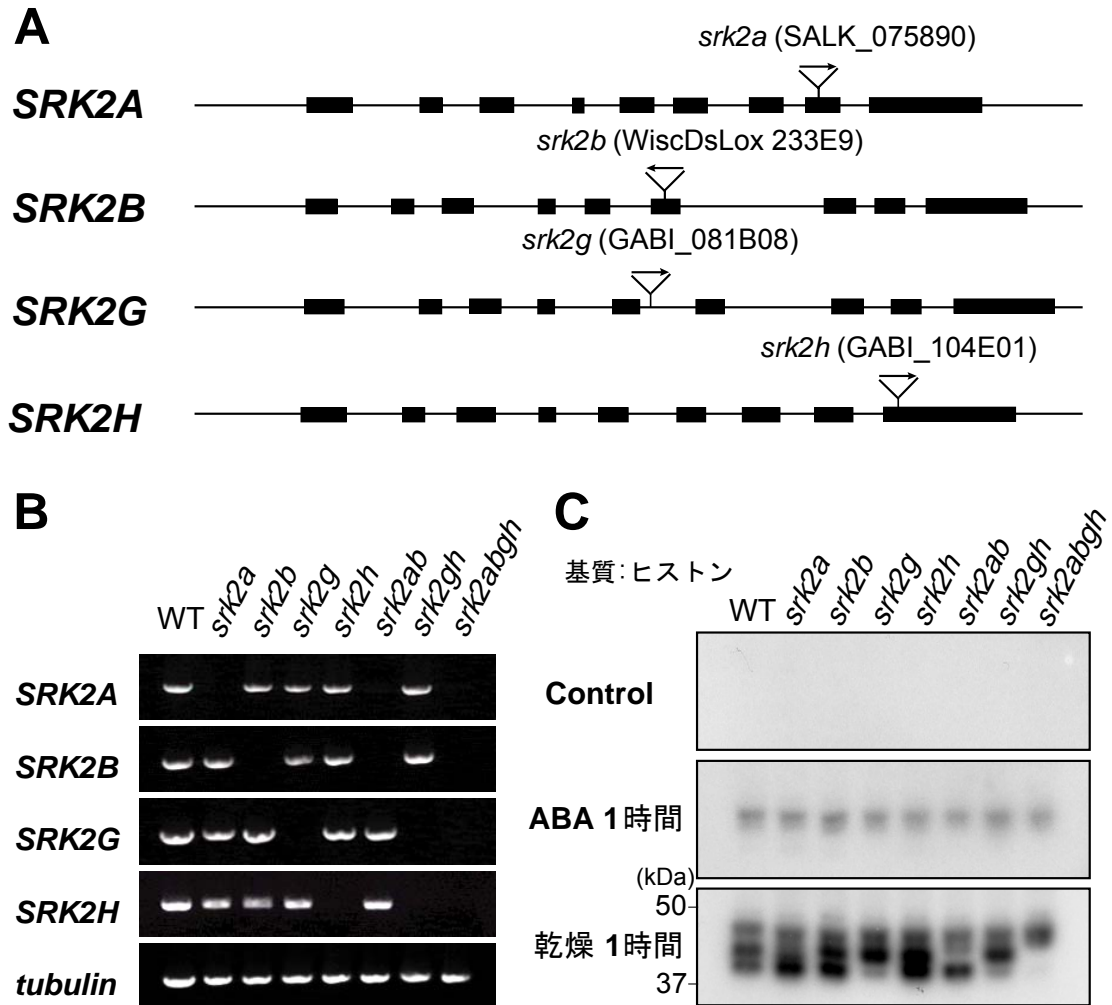


図 18. サブクラス I SnRK2 の 4 重変異体 *srk2abgh* の作出と、ストレス処理による内在性 SnRK2 タンパク質の活性化解析

A. 機能破壊変異体における *SRK2A*、*SRK2B*、*SRK2G*、*SRK2H* 各遺伝子への T-DNA 挿入位置の模式図。黒色枠は遺伝子のエクソン、矢印は T-DNA 挿入位置を示す。

B. サブクラス I SnRK2 の各変異体における各遺伝子の発現。RT-PCR 法によって解析した。*tubulin* 遺伝子は実験のコントロールとして用いた。

C. GM 培地に播種後 2 週間生育させた、野生型 (WT)、1 重変異体 (*srk2a*、*srk2b*、*srk2g*、*srk2h*)、2 重変異体 (*srk2ab*、*srk2gh*)、4 重変異体 *srk2abgh* に 50 μ M の ABA 処理 1 時間、または乾燥処理 1 時間を行い、ヒストンを基質としたゲル内リン酸化法によって、内在性の SnRK2 タンパク質の活性を測定した。対照区として無処理のサンプルを示す (Control)。

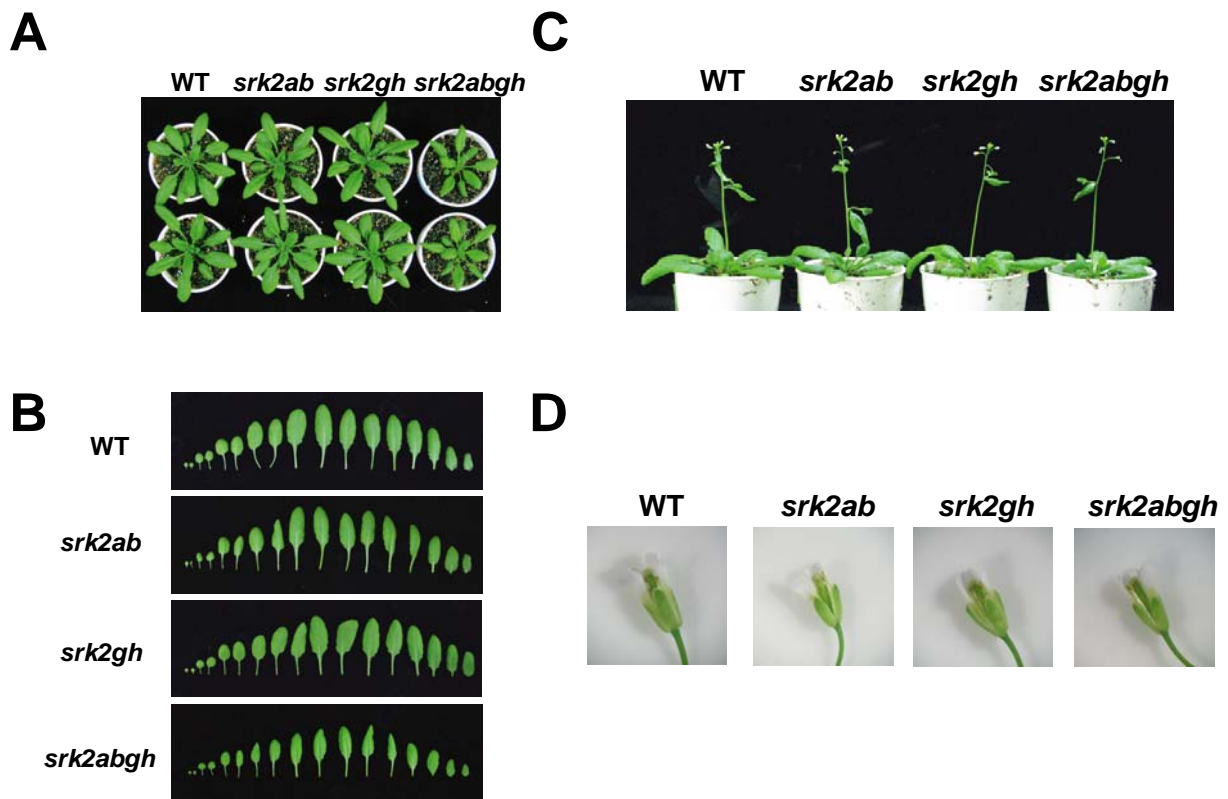


図 19. 通常条件下で生育させたサブクラス I SnRK2 の 4 重変異体 *srk2abgh* における表現型解析

- A. 播種後 5 週間、通常条件下で土植によって生育させた野生型 (WT)、2 重変異体 (*srk2ab*、*srk2gh*)、4 重変異体 *srk2abgh* の表現型。
- B. 播種後 5 週間、通常条件下で土植によって生育させた野生型 (WT)、2 重変異体 (*srk2ab*、*srk2gh*)、4 重変異体 *srk2abgh* での子葉 2 枚、本葉 15 枚の表現型。
- C. 播種後 6 週間、通常条件下で土植によって生育させた、野生型 (WT)、2 重変異体 (*srk2ab*、*srk2gh*)、4 重変異体 *srk2abgh* での第 1 花茎の伸長開始の表現型。
- D. 播種後 7 週間、通常条件下で土植によって生育させた、野生型 (WT)、2 重変異体 (*srk2ab*、*srk2gh*)、4 重変異体 *srk2abgh* での花芽の表現型

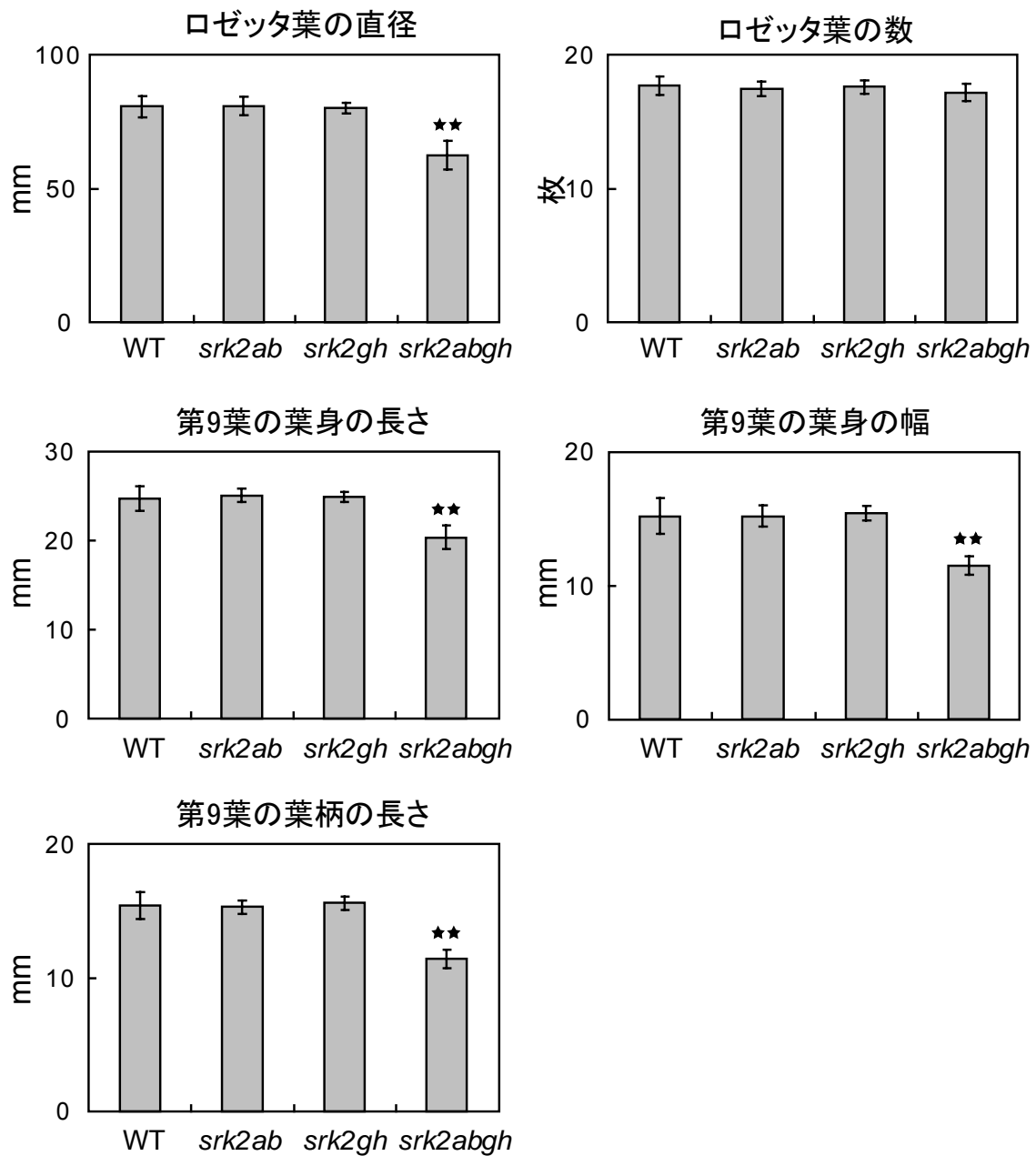


図 20. 通常条件下におけるサブクラス I SnRK2 の 4 重変異体 *srk2abgh* の表現型解析
 播種後 5 週間生育させた、野生型 (WT)、2 重変異体 (*srk2ab*、*srk2gh*)、4 重変異体 *srk2abgh* を用いて、ロゼット葉の直径、ロゼット葉の数、第 9 葉の葉身の長さ、第 9 葉の葉身の幅、第 9 葉の葉柄の長さをそれぞれ測定し、その平均値と標準偏差値を示した (n=10)。★★は t 検定を行い、野生型 (WT) と 4 重変異体 *srk2abgh* とを比較し、それぞれ数値化した値に差があることを示す ($p<0.001$)。

表5 *srk2abgh*で野生型植物より発現が上昇した上位30個の遺伝子（乾燥4時間）

probe set ID	AGI code	Description	log ₂ fold change	P-value ^a	SA ^b	BT ^c
251625_at	At3g57260	PR2 (PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 2)	3.55	0.011069138	Up	Up
266385_at	At2g14610	PR1 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 1)	3.34	0.011400922	Up	Up
260408_at	At1g69880	ATH8 (thioredoxin H-type 8)	3.13	0.001670493	Up	-
252549_at	At3g45860	receptor-like protein kinase, putative	3.07	0.009059324	Up	Up
252346_at	At3g48650	pseudogene, similar to At14a	3.00	0.001189133	-	Up
254265_s_at	At4g23140/At4g23160	CRK6 (CYSTEINE-RICH RLK 6)/protein kinase family protein	2.95	0.003986502	Up	Up
267546_at	At2g32680	disease resistance family protein	2.89	0.008309256	Up	Up
250445_at	At5g10760	aspartyl protease family protein	2.82	0.010896825	Up	Up
246293_at	At3g56710	SIB1 (SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN 1)	2.73	0.001089172	Up	Up
260046_at	At1g73800	unknown protein	2.68	0.002265939	Up	Up
266070_at	At2g18660	EXLB3 (EXPANSIN-LIKE B3 PRECURSOR)	2.66	0.032366237	Up	Up
259561_at	At1g21250	WAK1 (CELL WALL-ASSOCIATED KINASE)	2.64	0.003773001	Up	Up
254242_at	At4g223200	protein kinase family protein	2.55	0.000254855	-	-
256766_at	At3g22231	POC1 (PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROLLED 1)	2.53	0.000322644	Up	Up
256526_at	At1g66090	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative	2.47	0.001189133	Down	Down
254314_at	At4g22470	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	2.47	0.021773337	Up	-
266142_at	At2g39030	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	2.47	0.026109112	-	-
248322_at	At5g52760	heavy-metal-associated domain-containing protein	2.44	0.004715561	Up	Up
261339_at	At1g35710	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	2.41	0.005260473	Up	Up
250942_at	At5g03350	legume lectin family protein	2.24	0.023119384	Up	Up
254832_at	At4g12490	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	2.23	0.036415687	Up	Up
259560_at	At1g21270	WAK2 (wall-associated kinase 2)	2.17	0.007294871	Up	Up
252589_s_at	At3g45650/At3g45660	NAXT1 (NITRATE EXCRETION TRANSPORT ER1)/proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	2.13	0.00350711	-	-
251705_at	At3g56400	WRKY70 (WRKY DNA-binding protein 70)	2.11	0.003780979	Up	Up
250286_at	At5g13320	PBS3 (AVRPPHB SUSCEPTIBLE 3)	2.10	0.042799307	Up	Up
260068_at	At1g73805	calmodulin binding	2.09	0.015083041	Up	Up
256175_at	At1g51670	unknown protein	2.07	0.000308318	-	-
262381_at	At1g72900	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative	2.07	0.001479857	-	Up
263584_at	At2g17040	ANAC036 (Arabidopsis NAC domain containing protein 36)	2.06	0.001479857	-	Up
245076_at	At2g23170	GH3.3, indole-3-acetic acid amido synthetase	1.93	0.000129406	Up	Up

^a 各3反復の実験から*P-value* (*P-value*<0. 05) を計算した。

^b Genevestigator stimulus set (salicylic acid study 3) を参考にした。UP：2倍以上上昇。DOWN：2倍以上減少。－：変化無し

^c Genevestigator stimulus set (Benzothiadiazol study 3(Col-0)) を参考にした。UP：2倍以上上昇。DOWN：2倍以上減少。－：変化無し

表6 *srk2abgh*で野生型植物より発現が減少した上位30個の遺伝子（乾燥4時間）

probe set ID	AGI code	Description	log ₂ fold change	P-value ^a
259724_at	At1g60940	SRK2B/SnRK2.10	-5.81	7.56E-11
248790_at	At5g47450	ATTP2.3 (Arabidopsis thaliana tonoplast intrinsic protein 2.3)	-3.39	0.001031002
250527_at	At5g08590	SRK2G/SnRK2.1	-2.94	6.58E-08
260480_at	At1g10940	SRK2A/SnRK2.4	-2.80	0.000256359
252988_at	At4g38410	dehydrin, putative	-2.79	0.001740222
253344_at	At4g33550	lipid binding	-2.38	0.007583005
249675_at	At5g35940	jacalin lectin family protein	-2.37	0.003344153
249771_at	At5g24080	protein kinase family protein	-2.15	0.001096475
253799_at	At4g28140	AP2 domain-containing transcription factor, putative	-2.10	0.001548501
247760_at	At5g59130	subtilase family protein	-2.05	0.003711362
261247_at	At1g20070	unknown protein	-2.02	0.001189133
251317_at	At3g61490	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	-2.01	5.24E-05
245416_at	At4g17350	unknown protein	-1.86	0.000129406
246700_at	At5g28030	cysteine synthase, putative / O-acetylserine (thiol)-lyase, putative / O-acetylserine sulfhydrylase, putative	-1.86	0.0011715324
245955_at	At5g28510	glycosyl hydrolase family 1 protein	-1.86	0.001608329
254323_at	At4g22620	auxin-responsive family protein	-1.74	0.007294871
262148_at	At1g52560	26.5 kDa class I small heat shock protein-like (HSP26.5-P)	-1.73	0.019737716
256940_at	At3g30720	unknown protein	-1.72	0.000621923
245953_at	At5g28520	similar to jacalin lectin family protein	-1.69	0.026426661
261991_at	At1g33700	catalytic	-1.67	0.000176715
257375_at	At2g38640	unknown protein	-1.66	0.000724861
251291_at	At3g61900	auxin-responsive family protein	-1.64	0.000256359
254836_at	At4g12330	CYP706A7	-1.64	0.014926953
256759_at	At3g25640	unknown protein	-1.64	0.000129406
253851_at	At4g28110	AMMYB41 (myb domain protein 41)	-1.63	0.001727244
263465_at	At2g31940	oxidoreductase/ transition metal ion binding	-1.60	0.000852063
245771_at	At1g30250	unknown protein	-1.58	0.022401509
251928_at	At3g53980	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-1.55	0.014926953
250541_at	At5g09520	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	-1.54	0.010793748
245090_at	At2g40900	modulin MN21 family protein	-1.54	0.002303092

^a 各3反復の実験からP-value (P-value<0.05)を計算した。

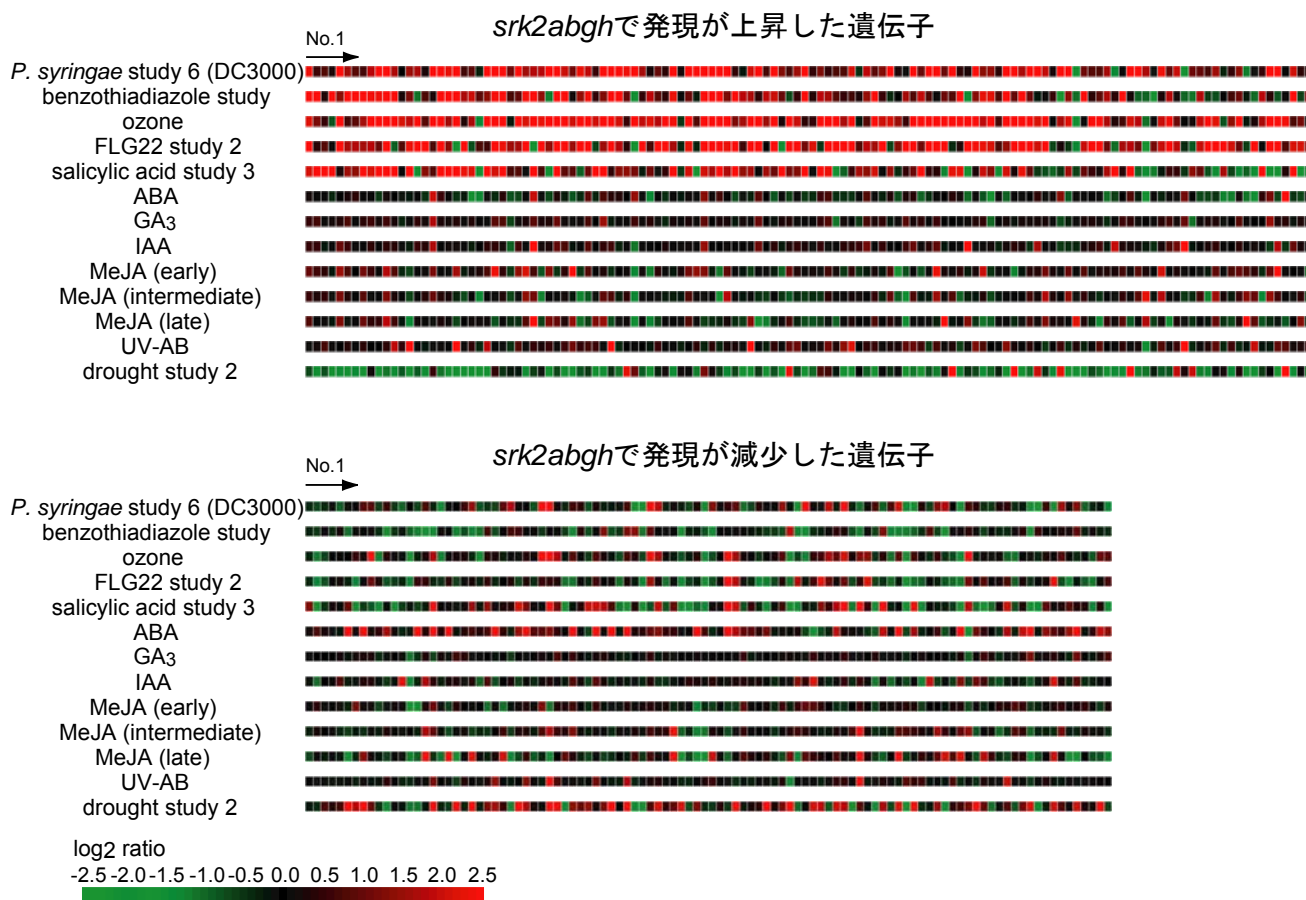


図 21. マイクロアレイを用いたサブクラス I SnRK2 で制御される遺伝子群の網羅的な解析

GM 培地に播種後 2 週間生育させた、野生型と 4 重変異体 *srk2abgh* に、無処理と乾燥処理 4 時間を行い、total RNA を抽出した。その後、Affymetrix 社製、Arabidopsis ATH1 マイクロアレイを用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。*srk2abgh* で発現が上昇していた遺伝子群 130 遺伝子と、*srk2abgh* で発現が減少していた遺伝子群 104 遺伝子に関して、Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) を用いて、他の様々な処理による遺伝子群変動とどのように相関があるかを解析した。各行のブロックは *srk2abgh* 変異体で発現が変動していた遺伝子を示す。赤色は、各種処理で発現が上昇していた場合、緑色は発現が減少していた場合の相関を示す。

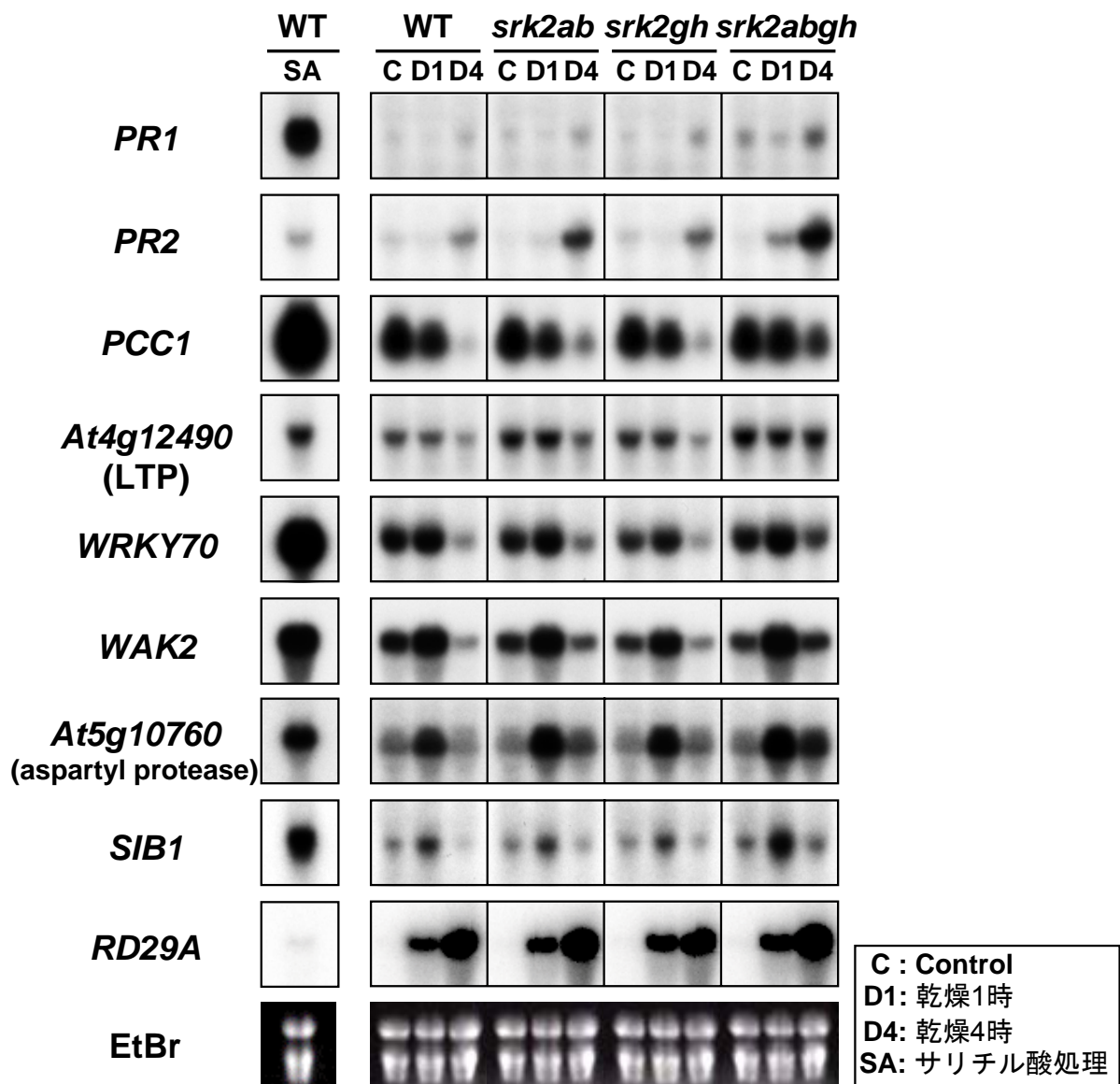


図 22. サブクラス I SnRK2 の 4 重変異体 *srk2abgh* における、乾燥処理またはサリチル酸処理によって発現誘導される遺伝子群の解析

GM 培地に播種後 2 週間生育させた、野生型 (WT)、2 重変異体 (*srk2ab*、*srk2gh*)、4 重変異体 *srk2abgh* に乾燥 1 時間処理 (D1)、乾燥 4 時間処理 (D4)、0.5 mM のサリチル酸 4 時間処理 (SA) を行い、total RNA を抽出した。その後、各サンプル 10μg の total RNA を用いて、ノーザンブロッティング法を行い、乾燥誘導性またはサリチル酸誘導性の遺伝子発現の変化を解析した。臭化エチジウムを用いて泳動ゲルを染色し、用いた RNA の量を示す (EtBr)。

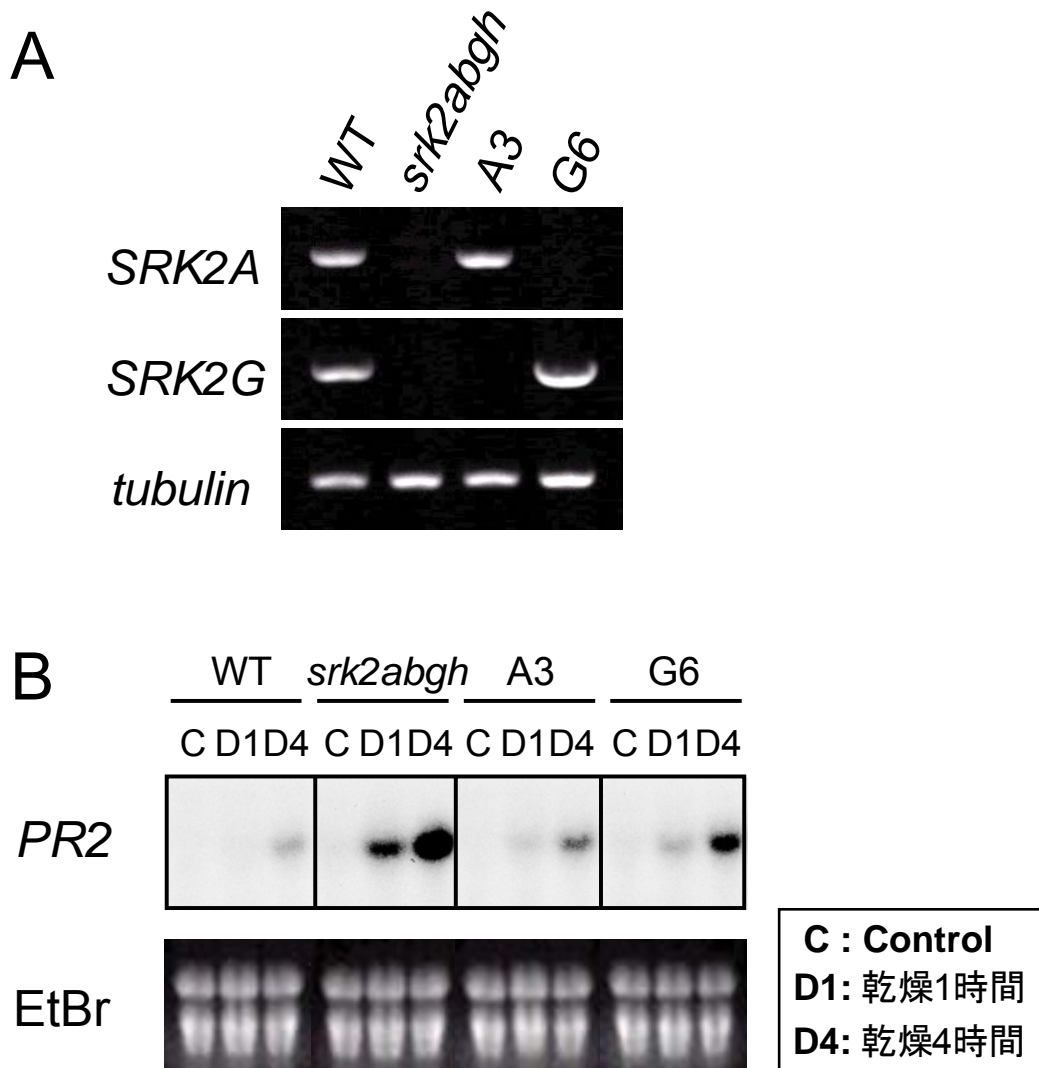


図 23. 4 重変異体 *srk2abgh* の相補株の作出と *PR2* 遺伝子の発現解析

A. 4 重変異体 *srk2abgh* に *SRK2A* 遺伝子を過剰発現させた相補株 (A3) と、*SRK2G* 遺伝子を過剰発現させた相補株 (G6) を作出し、*SRK2A* または *SRK2G* 遺伝子の発現量を RT-PCR によって解析した。*tubulin* 遺伝子は実験のコントロールである。

B. 野生型 (Wt)、4 重変異体 *srk2abgh*、相補植物体 (A3、G6) 植物体に乾燥処理 1 時間 (D1)、乾燥処理 4 時間 (D4) を行い、total RNA を抽出した。10 μ g の total RNA を用いて、ノーザンブロッティングを行い *PR2* (pathogenesis-related protein 2) 遺伝子の発現変動を解析した。エチジウムブロマイドを用いて泳動ゲルを染色し、用いた RNA の量を示す (EtBr)。

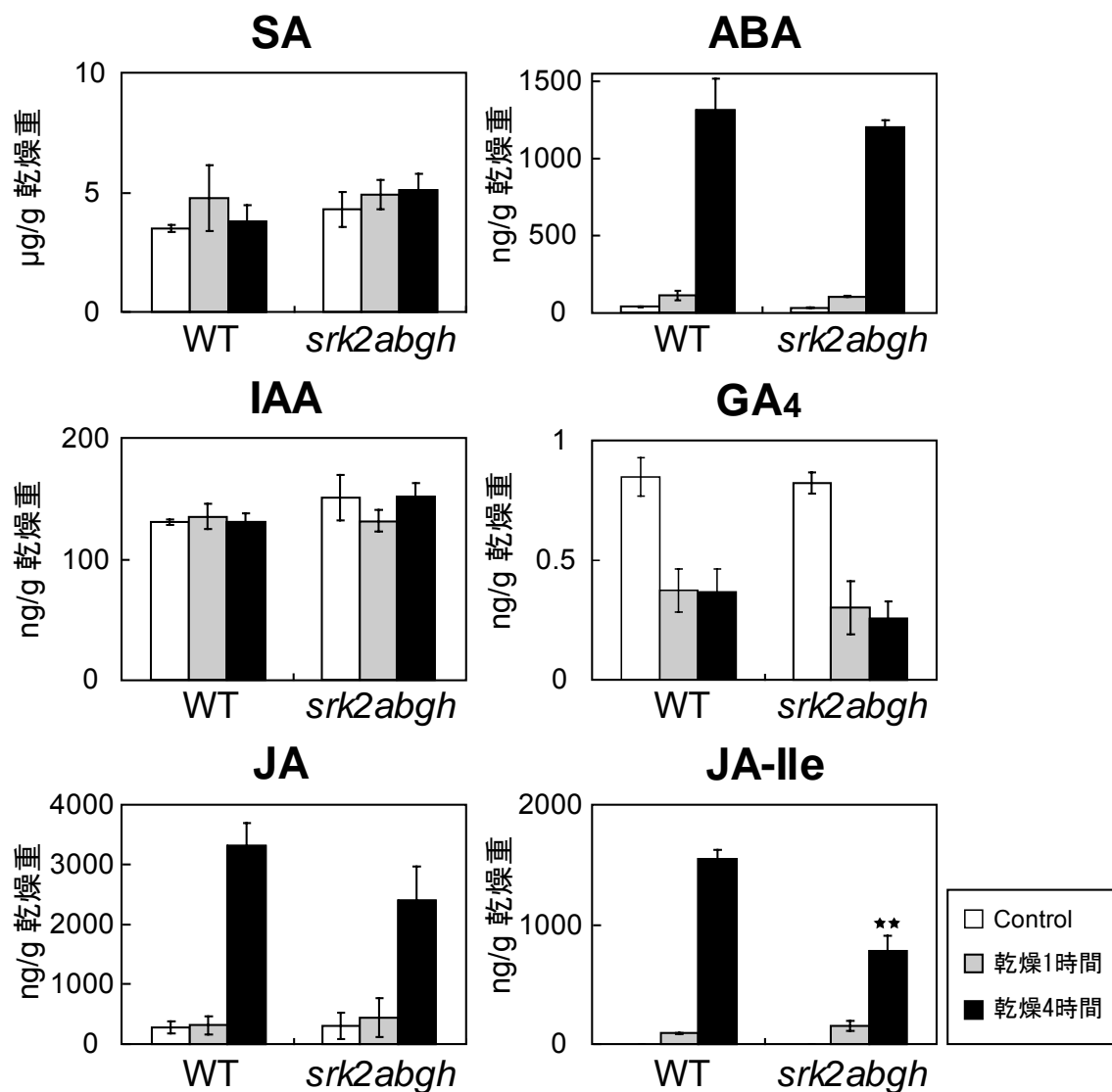


図 24. 4 重変異体 *srk2abgh* を用いた、乾燥ストレス下における植物ホルモン分析

GM 培地に播種後 2 週間生育させた、野生型 (WT) と 4 重変異体 *srk2abgh* に、無処理 (白)、乾燥処理 1 時間 (灰色)、乾燥処理 4 時間 (黒) を行った。植物体を凍結乾燥させた後、抽出を行い LC-MS 装置を用いて各種植物ホルモンの蓄積量を解析した。SA: サリチル酸、ABA: アブシシン酸、IAA: インドール酢酸、GA₄: 活性型ジベレリン、JA: ジャスモン酸、JA-Ile: イソロイシン結合型ジャスモン酸を示す。各実験区につき 3 回の反復実験を行い、その平均値と標準偏差値を示した。★★は t 検定を行い、野生型 (WT) と *srk2abgh* 4 重変異体の内生量に差があることを示す ($p < 0.001$)。

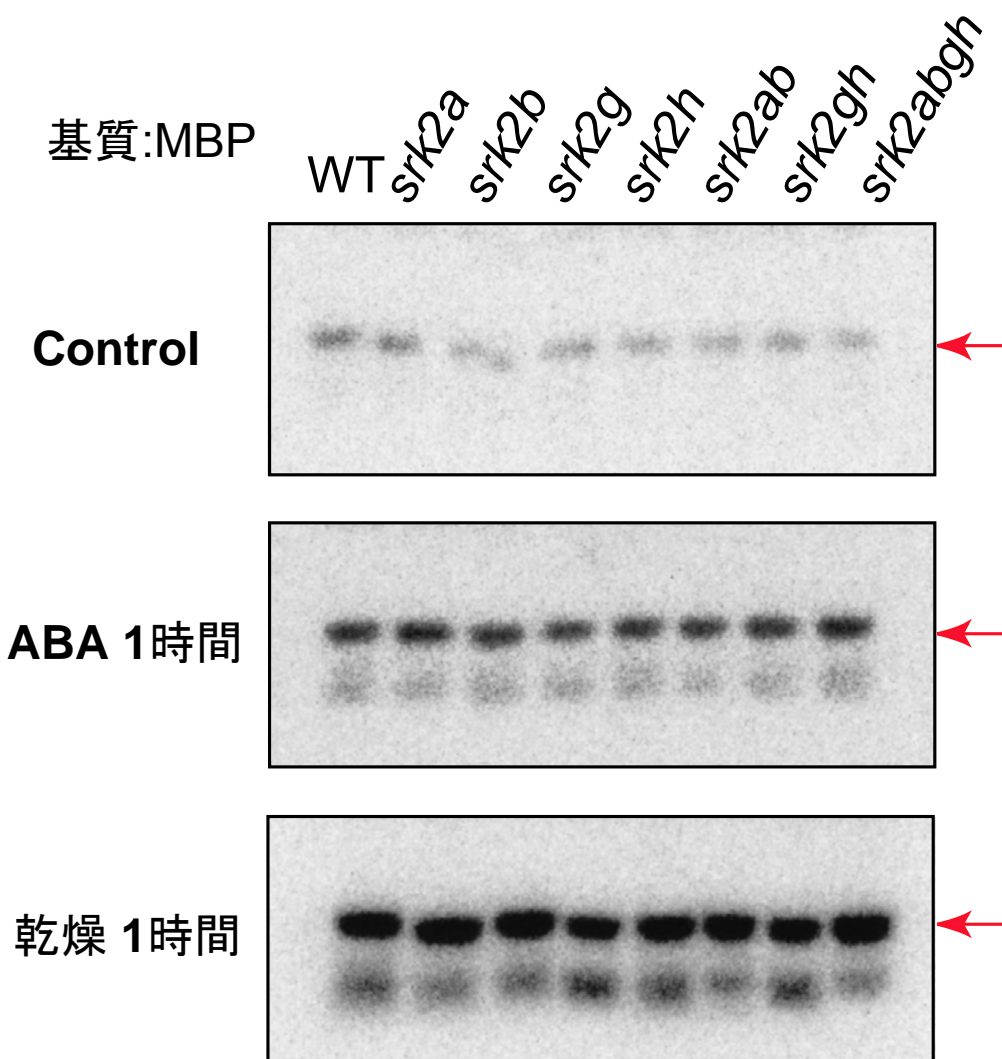


図 25. サブクラス I SnRK2 の 4 重変異体 *srk2abgh* における Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化

GM 培地に播種後 2 週間生育させた、野生型 (WT)、1 重変異体 (*srk2a*、*srk2b*、*srk2g*、*srk2h*)、2 重変異体 (*srk2ab*、*srk2gh*)、4 重変異体 *srk2abgh* に 50 μ M ABA 処理 1 時間、または乾燥処理 1 時間を行い、全タンパク質を抽出した。その後、MBP を基質としてゲル内リン酸化法を行い、内在性の MAPK の活性を測定した。対照区として無処理のサンプルを示す (Control)。46kDa タンパク質 (内在性の MPK6 の分子量に相当) の活性を赤矢印で示す。

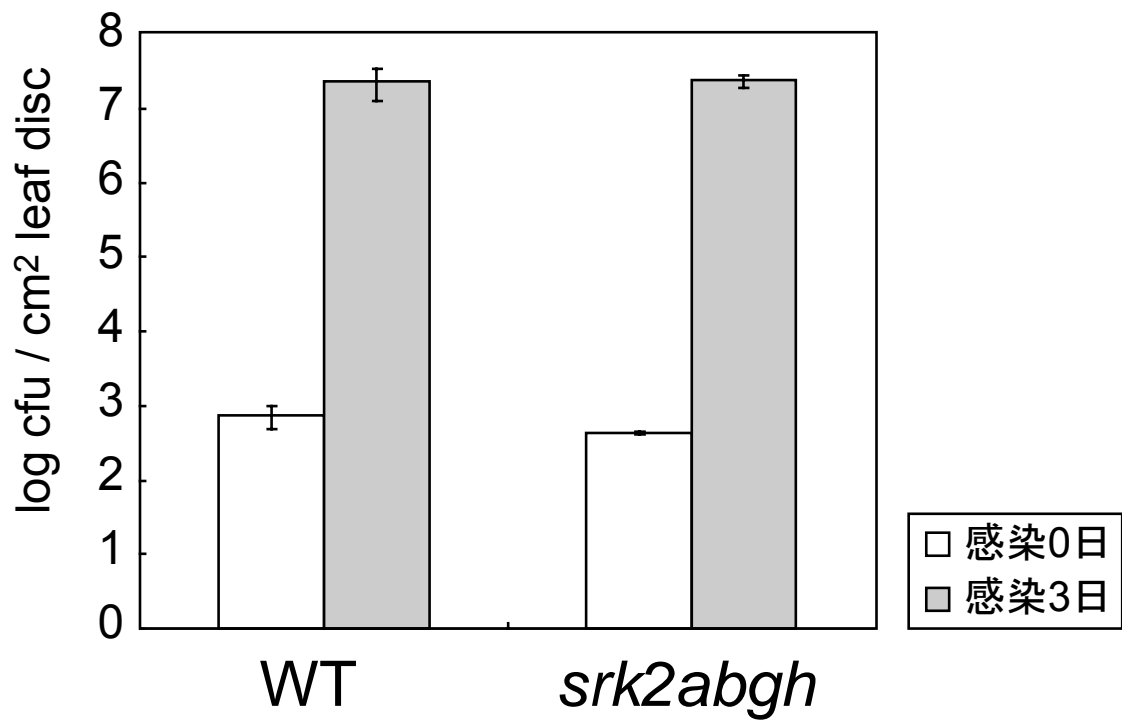


図 26. 4 重変異体 *srk2abgh* を用いた病原菌感染応答における耐性試験

GM 培地に播種後、短日条件で 7 週間生育させた野生型 (Wt) と 4 重変異体 *srk2abgh* の本葉に、*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 を感染させ、感染前 (白) と感染 3 日後 (灰色) での、菌の増殖率を測定した。各実験区につき 3 回の反復実験を行い、その平均値と標準偏差値を示した。

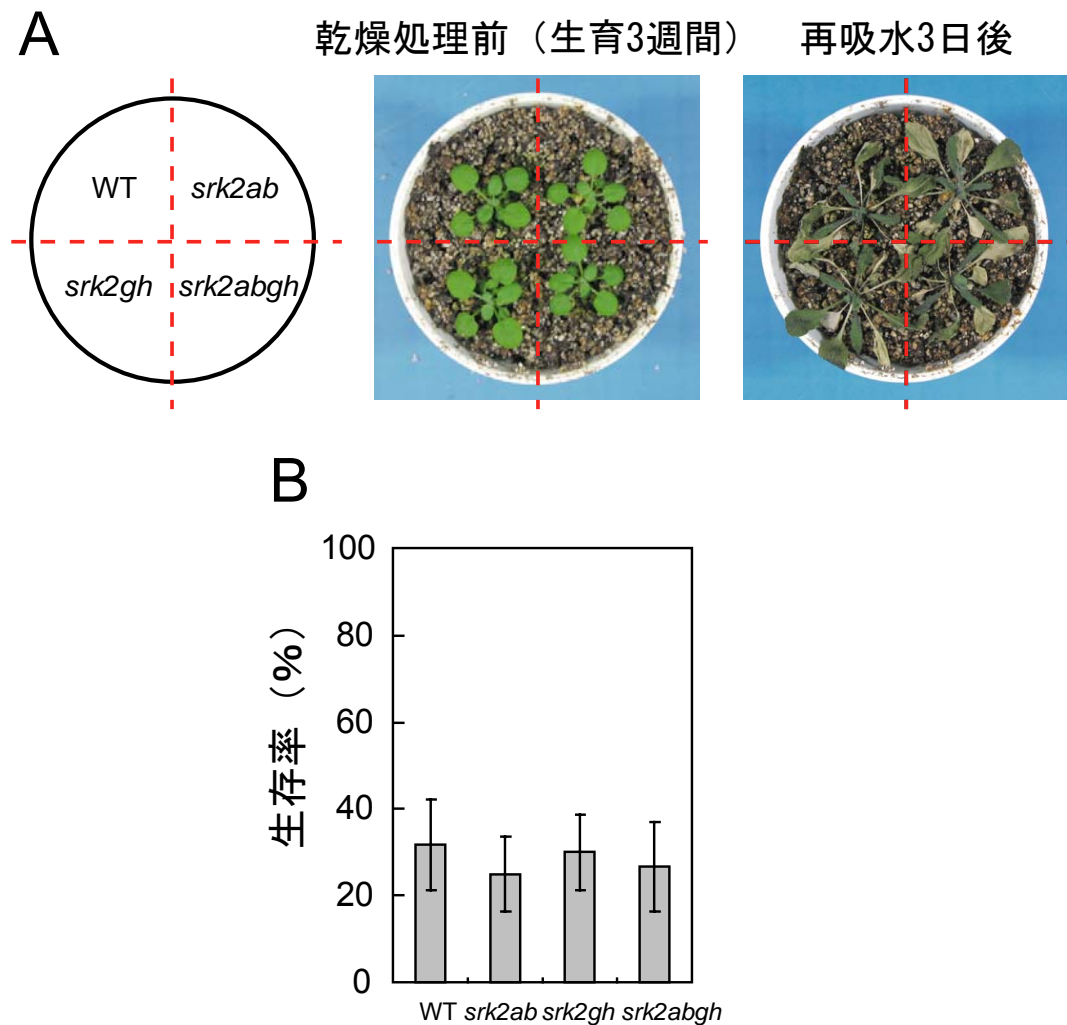


図 27. サブクラス I SnRK2 の 4 重変異体 *srk2abgh* を用いた乾燥ストレス耐性試験

A. 野生型 (WT)、2 重変異体 (*srk2ab*、*srk2gh*)、4 重変異体 *srk2abgh* を用いて、乾燥ストレスに対する耐性評価を行った (左図)。播種後、3 週間の植物体に対して (中図)、乾燥処理を 16 日間行った。その後、再吸水を行い 3 日後の植物体の状態を示す (右図)。

B. 野生型 (WT)、各変異体を用いた乾燥耐性試験における生存率。乾燥ストレスを行わなかった場合を基準として、ストレス処理後の生存率をパーセント (%) で示す。各実験区につき 3 回の反復実験を行い、その平均値と標準偏差値を示した (各実験 $n=20$)。

第 V 章 総合考察

本研究では、植物に固有のプロテインキナーゼである SnRK2 ファミリーを研究対象とした。SnRK2 は浸透圧ストレスや ABA によって活性化することから、植物の環境ストレス応答にとって重要であると考えられている (Umezawa et al., 2010)。SnRK2 はシロイヌナズナには 10 個存在し、サブクラス I, II, および III の 3 つのサブファミリーに分類される (図 1) (Kobayashi et al., 2004)。このうち、サブクラス III については詳細な解析がなされており、ABA のシグナル伝達に必須の因子で受容体やプロテインホスファターゼ (PP2C) とともに複合体を形成し、大部分の ABA シグナルが集約されるネットワークハブとして機能することが明らかになっている (Ma et al., 2009; Park et al., 2009; Umezawa et al., 2009)。このように、サブクラス III が植物の環境ストレス応答にとってきわめて重要な役割を持つことから、他のサブクラスについてもその機能を明らかにすることが、植物の環境ストレス応答機構を理解するために重要であると考えられた。そこで、本研究ではサブクラス I とサブクラス II の解析を行い、それらの植物における生理機能を明らかにすることを主な目的とした。本研究によって、すべての SnRK2 のサブファミリーの機能解析が行われたことになり、初めて植物の SnRK2 ファミリー全体を総括することが可能になった。さらに、各サブファミリー間の機能重複および特異性などの議論や、進化的な観点から考察を加えることも可能になった。

V-1. サブクラス II とサブクラス III SnRK2 の機能重複

第 II 章では、サブクラス II を構成する 2 つのメンバー、SRK2C と SRK2F についての機能解析を行った。SRK2C と SRK2F は、配列の類似性や遺伝子発現パターン、細胞内局在性のデータから部分的に機能が重複している可能性が示唆された (図 2-5)。さらに、2 重変異体 *srk2cf* などの遺伝子破壊株を用いた遺伝学的解析から、SRK2C と SRK2F が協調的に働き、乾燥ストレス応答性の遺伝子発現を制御していることが明らかとなった (表 3)。マイクロアレイ解析によって、*srk2cf* では乾燥処理で誘導される多くの遺伝子発現が野生型より低下していることが明らかとなったが、それらの遺伝子はサブクラス III の 3 重変異体 *srk2dei* でも発現が低下するものであった (図 9)。した

がって、サブクラス II とサブクラス III はともに乾燥ストレス応答を制御するシグナル伝達系に関与しており、その制御経路は重複していると考えられた。このことは、bZip 型の転写因子 AREB/ABF ファミリーとサブクラス II SnRK2 の関係を調べた生化学的解析によって裏付けられた (図 12)。これまでの研究から、サブクラス III SnRK2 は AREB/ABF ファミリーを直接のリン酸化基質としており、多数の ABA 応答性遺伝子の発現を制御することがわかっている (Kobayashi et al., 2005; Furihata et al., 2006; Nakashima et al., 2009)。本研究では、新たにサブクラス II と AREB/ABF ファミリーの間にも、サブクラス III と同様に直接的な関係性が存在することを明らかにすることができた。したがって、サブクラス II とサブクラス III は少なくとも AREB/ABF 転写因子群の制御という点で共通の機能を持っており、ともに乾燥ストレス応答のシグナル伝達因子として働いているという結論が得られた。

しかし、サブクラス II とサブクラス III には明確な違いも認められる。たとえば、SRK2C と SRK2F の 2 重変異体 *srk2cf* では、乾燥ストレスの場合とは異なり、ABA 処理に応答した遺伝子発現に明確な差は認められなかった (図 13)。この結果は、以下の 2 つの可能性を示唆している。1 つはサブクラス III は ABA 応答に決定的に重要なのに対し、サブクラス II は ABA 応答にはほとんど関与しないという可能性である。もうひとつの可能性は、サブクラス II も同様に ABA 応答に関与するが、サブクラス III に比べて作用力が圧倒的に低いため、効果がマスクされてしまうというものである。サブクラス II が ABA によって弱く活性化することや、制御する下流遺伝子群の類似性などから、今のところ後者の可能性が高いと考えられる。一方、乾燥ストレスの場合はサブクラス II も強く活性化するため、相対的に作用力が高くなり 2 重変異体 *srk2cf* での遺伝子発現の差に表れたと考えることができる。したがって、サブクラス II とサブクラス III の機能は、AREB/ABF ファミリーへの作用という点で基本的に同じであるが、上流の活性化制御の違いによって下流因子への影響が異なるものと推察される。

以上は、主に核内での遺伝子発現制御における SnRK2 の機能についての議論である。一方、サブクラス III SnRK2 の基質は AREB/ABF 転写因子だけではなく、陰イオンチャンネルなどの膜タンパク質もターゲットとなっており、ABA による気孔の閉鎖に関与することが報告されている (Lee et al., 2009)。サブクラス II の細胞内局在はサブクラ

ス III と類似しており、核と細胞質両方に存在すること、さらに GUS 染色による遺伝子発現の組織特異性の観察では、SRK2F の孔辺細胞における発現が確認されていることなどから、孔辺細胞においてもサブクラス II とサブクラス III が同様に機能している可能性がある。しかし、2 重変異体 *srk2cf* において気孔に関連する表現型は確認されていない (図 6)。したがって、気孔においてもサブクラス III の作用力が圧倒的に強いということが考えられる。

以上をまとめると、本研究では植物の SnRK2 ファミリーの 1 つであるサブクラス II について多重変異体を用いた詳細な解析を行い、サブクラス II の生理機能を正確に評価することに成功した (Mizoguchi et al., 2010)。サブクラス II は、サブクラス III と多くの部分で機能が重複したプロテインキナーゼであるが、ABA シグナル伝達における役割は限定的なものになっており、サブクラス III に比べると乾燥ストレスのシグナル伝達因子に特化した機能を持つプロテインキナーゼであると考えられた。ただし、以前の研究で、サブクラス II が植物の栄養吸収に関わっていることが示されたように (Shin et al., 2007)、サブクラス II とサブクラス III の機能が完全に一致しているということではなく、サブクラス II に独自の機能が存在する可能性も残されている。

V-2. 特徴的なサブクラス I SnRK2 の生理機能

第 III 章では、サブクラス I SnRK2 の機能解析を行った。サブクラス I はサブクラス II や III と異なり ABA では活性化しないが、浸透圧ストレスで活性化するという点では共通している (図 14) (Boudsocq et al., 2004)。そのため、サブクラス I の機能解析では浸透圧ストレスあるいは乾燥ストレスによる活性化とその役割が、検討すべきポイントとなった。サブクラス I の 5 つのメンバーのうち、浸透圧によって活性化しない SRK2J を除く、SRK2A、SRK2B、SRK2G および SRK2H を研究対象として機能解析を進めたところ、4 つの遺伝子すべてをノックアウトしないと明確な表現型が現れず、これらのメンバー間の機能的冗長性が非常に高いことが示唆された (図 19)。その 4 重変異体 *srk2abgh* の表現型も、鉢植え植物において野生型植物よりロゼット葉が小さくなる傾向があり、またロゼット葉に若干の上偏成長が見られるなど、サブクラス III の 3 重変異体 *srk2dei* に比べると軽微なものにとどまった (図 19)。さらに、マイクロアレ

イ解析の結果は、サブクラス I の制御範囲がサブクラス II や III のそれとは全く異なることを示していた。サブクラス II や III が典型的な ABA 応答性遺伝子や乾燥ストレス誘導性遺伝子を制御するのに対し、サブクラス I は *PR1* や *PR2*、*WRKY70* などといった病害応答あるいはサリチル酸応答性遺伝子を制御していた（表 5 および図 21-22）。これらのことから、サブクラス I *SnRK2* の植物における機能は、他の 2 つとは全く異なることが示唆された。

4 重変異体 *srk2abgh* でサリチル酸応答性遺伝子の発現が上昇していたことから、サブクラス I *SnRK2* の機能として以下の 2 つの可能性が考えられた。1 つは、サリチル酸生合成に影響を及ぼすこと、もう 1 つはサリチル酸シグナル伝達系に影響を及ぼすことである。植物ホルモンの定量分析の結果、内生サリチル酸量は *srk2abgh* で変化していなかったことから、前者の可能性は否定された（図 24）。一方で、乾燥ストレス下のイソロイシン結合型ジャスモン酸 (JA-Ile) の内生量に変化が認められたことから（図 24）、以下の可能性が考えられた。通常の植物では、乾燥ストレスを受けると活性型ジャスモン酸である JA-Ile が蓄積して、JA シグナル伝達系が賦活される（図 24）。この JA シグナル伝達系の活性化によって、サリチル酸応答経路に拮抗作用をもたらし、SA 応答性遺伝子の発現が抑制される。言い換えると、植物が乾燥ストレスを受けたとき、潜在的にサリチル酸応答性遺伝子の発現を誘導させる力が働くが、JA シグナルがそれを抑えている。4 重変異体 *srk2abgh* では、乾燥ストレスによる JA-Ile の蓄積量が不十分なために、本来抑えられているはずのサリチル酸応答性遺伝子が誘導されてしまうのではないかと推察される。ジャスモン酸とサリチル酸の拮抗作用は、すでに多くの文献で報告されており、周知のことである (Wang et al., 2006; Li et al., 2004, 2006)。以上のことをまとめると、サブクラス I *SnRK2* は乾燥ストレスによって活性化し、JA-Ile 生合成を正に制御すること、そして JA シグナル伝達系を介して乾燥ストレス下のサリチル酸シグナル伝達経路を負に制御する因子として働くプロテインキナーゼであることが示唆された。

一方、サブクラス I *SnRK2* がどのように JA-Ile 生合成を制御しているのかについては、現在のところ不明である。今後は、サブクラス I *SnRK2* の直接の基質を同定することで、*SnRK2* がどのように JA-Ile 生合成に関わっているのか明らかになることが期

待される。今回の研究結果は、サブクラス I がサブクラス III とは全く異なる機能を有していること、およびサブクラス I SnRK2 が乾燥ストレス応答と JA シグナル、および SA シグナル間のクロストークに関与していることを示唆したという点で、非常に興味深い結果であるといえる。

V-3. 植物における SnRK2 ファミリーの全体像

本研究において、サブクラス I およびサブクラス II の植物における機能が明らかとなったことで、サブクラス III についての先行研究の結果と併せて、植物における SnRK2 ファミリーを俯瞰することが可能となった。本研究で明らかにしたことの中で、サブクラス II はサブクラス III と機能が一部重複しているが、サブクラス I はサブクラス II や III とは異なる機能を持つという点が、SnRK2 ファミリー全体を考える上で重要である。このことは、SnRK2 ファミリーをその構造や進化的な観点から見るとよりはっきりする。

SnRK2 の内部構造は N 末端側の触媒部位と C 末端側の制御領域に分けられ、触媒部位はすべての SnRK2 間で高度に保存されているが、C 末端にはそれぞれ特徴的であり、領域 I と領域 II から構成される (Yoshida et al., 2006)。領域 I は SnRK2 ファミリー間で保存されており、浸透圧ストレス応答に関係している。領域 II は酸性アミノ酸に富んだ配列であり、サブクラス II および III ではアスパラギン酸、サブクラス I ではグルタミン酸という違いがある。この領域は ABA による活性化に重要であり、サブクラス III の領域 II はグループ A に属する 2C 型プロテインホスファターゼ (PP2C) のドッキング部位となっている (Yoshida et al., 2006; Umezawa et al., 2009)。この PP2C は普段 SnRK2 を脱リン酸化して不活性化しており、PYR/PYL/RCAR 受容体が ABA を認識すると PP2C に結合し、PP2C による SnRK2 の脱リン酸化が阻害される (Ma et al., 2009; Park et al., 2009; Umezawa et al., 2009)。その結果、PP2C による制御から SnRK2 が解放され、活性化する。これと同様のメカニズムが他のサブクラスでも働いていると仮定すると、以下の仮説が提示できる。

まず、サブクラス II について見ると、サブクラス II の領域 II はサブクラス III と同じくアスパラギン酸に富んでいるという点で共通しているが、配列全体で見ると明らかに

異なっている。以前の研究から、サブクラス II の領域 II にもグループ A の PP2C が結合できることが示されているが、サブクラス III に比べるとその相互作用は限定的である (Umezawa et al.,2009)。したがって、このこととサブクラス II の ABA による活性化が弱いこととはよく一致している。一方、サブクラス I の領域 II は明確に異なっており、グルタミン酸に富む配列となっている。また、サブクラス I の領域 II にグループ A の PP2C は結合できない (Umezawa et al.,2009)。そのため、サブクラス I SnRK2 は ABA によって活性化しないと考えられる。これらのことから、サブクラス II および III の領域 II が ABA シグナル伝達因子としての機能を規定していることは明らかである。

一方、すべての SnRK2 は浸透圧ストレスで活性化し、その制御には C 末端の領域 II の手前に存在する領域 I が必要である (Yoshida et al., 2006)。この領域 I は SnRK2 メンバー間で高度に保存されているため、共通の制御機構が存在することが予想される。また、ABA シグナル伝達におけるメカニズムを考慮すると、サブクラス I にも通常状態で活性を抑えるような負の制御因子が必要である。このように、SnRK2 を取り巻いて構成されるタンパク質複合体が存在することが予想され、その複合体の構成因子がサブファミリー間で異なることによって、基質特異性などが変化してそれぞれの機能の違いが生み出されるのではないかと考えられる。今後は、このような SnRK2 と複合体を形成する因子を探索することが重要な課題になるだろう。

次に、SnRK2 ファミリーを進化的な側面から考察する。SnRK2 はもっとも原始的なものではラン藻に存在し、苔類、シダ類、被子植物でその存在が確認されている (図 1) (Umezawa et al.,2010)。様々な植物の SnRK2 を調べてみると、進化の過程に比例して徐々に SnRK2 ファミリーの構成が変化していくことがわかる。高等植物では 3 つのサブクラスがすべて保存されているが、シダ類ではサブクラス I がなくなり、コケではサブクラス III しか存在しない。ラン藻の SnRK2 は 3 つのサブクラスのいずれにも属しておらず、独自のグループを形成する (図 1)。したがって、SnRK2 はラン藻に存在する原始的な形態からコケに至るまでにまずサブクラス III が形成され、その後サブクラス III → サブクラス II → サブクラス I という順番で進化したと考えられる (Umezawa et al.,2010)。ここでは、サブクラス III がその後の SnRK2 の原型になったという点に注目すべきである。前述のように、サブクラス III SnRK2 は ABA 応答の中心的なシグ

ナル伝達因子であり、植物の乾燥耐性にとってなくてはならないものである。**SnRK2** ファミリーが、このサブクラス III を起点に植物の陸上化に伴って進化している点は、非常に示唆的であると言える。つまり、**SnRK2** の進化が植物の陸上化にとって重要なファクターになった可能性がある。このように考えると、サブクラス II がサブクラス III と機能重複していた点、およびサブクラス I がサブクラス III とは異なる機能を有していた点は、リーズナブルであると言える。したがって、サブクラス III は植物全般の乾燥耐性のコア因子として生存に直接関わるような機能を担当し、サブクラス I や II はより高等植物に特異的な機能を持っているという、**SnRK2** ファミリーの全体像が見えてきた。

本研究では、植物の環境ストレス応答に関わるとされる **SnRK2** プロテインキナーゼファミリーの中で、3つのサブファミリーのうちのサブクラス I とサブクラス II のメンバーについて機能解析し、その概要を明らかにすることができた。**SnRK2** は、サブクラス III に代表されるように、植物の環境ストレス応答の中できわめて重要な役割を担っていると考えられている。実際、**SnRK2** を遺伝子工学的に利用することによって、植物の乾燥耐性を向上させることが可能であり、応用面においても重要な遺伝子群であると言える (Umezawa et al. 2004)。今後は、本研究で得られた知見をもとにして、**SnRK2** の解析をさらに進め、**SnRK2** の活性化機構や下流の因子群などを明らかにしていく必要がある。さらに、**SnRK2** に関する研究が進むことで、植物の環境ストレス応答機構の一端を解明し、植物の乾燥耐性の改良等の応用につながっていくことが期待される。

引用文献

Anderberg, R. J., and Walker-Simmons, M. K. (1992) . Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10183-10187.

Bari, R., and Jones, J. D. G. (2009) . Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69, 473-488.

Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Lauriere, C. (2004) . Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279, 41758-41766.

Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, JK. (2007) . Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12, 444-451.

Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., and Abrams, S. R. (2010) . Absciscic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 651-679.

Diedhiou, C., Popova, O., Dietz, K., and Gollack, D. (2008) . The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice. *BMC Plant Biol.* 8, 49.

Droillard, M., Thibivilliers, S., Cazalé, A., Barbier-Brygoo, H., and Laurière, C. (2000) . Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Lett.* 474, 217-222.

Finkelstein, R. R., and Lynch, T. J. (2000) . The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12, 599-610.

Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. L., and Rock, C. D. (2002). *Absciscic Acid Signaling in*

Seeds and Seedlings. *Plant Cell* 14, S15-45.

Fujii, H., Verslues, P. E., and Zhu, J. (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., and Zhu, J. (2009) . *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 8380-8385.

Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S., Cutler, S. R., Sheen, J., Rodriguez, P. L., and Zhu, J. (2009) . In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* 462, 660-664.

Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., et al. (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. USA* 103, 1988-1993.

Gómez-Cadenas, A., Verhey, S. D., Holappa, L. D., Shen, Q., Ho, T. D., and Walker-Simmons, M. K. (1999) . An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc. Natl..Acad. Sci. USA* 96, 1767-1772.

Hirayama, T., and Shinozaki, K. (2007) . Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci.* 12, 343-351.

Hirayama, T., and Shinozaki, K. (2010) . Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.* 61, 1041-1052.

Hubbard, K. E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E. D., and Schroeder, J. I. (2010) . Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev.* 24, 1695-1708.

Hoyos, M. E., and Zhang, S. (2000) . Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. *Plant Physiol.* 122, 1355-1364.

Kelner, A., Pekala, I., Kaczanowski, S., Muszynska, G., Hardie, D. G., and Dobrowolska, G. (2004) . Biochemical Characterization of the Tobacco 42-kD Protein Kinase Activated by Osmotic Stress. *Plant Physiol.* 136, 3255-3265.

Klingler, J. P., Batelli, G., and Zhu, J. (2010) . ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *J. Exp. Bot.* 61, 3199-3210.

Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Minami, H., Kagaya, Y., and Hattori, T. (2004) . Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* 16, 1163-1177.

Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A., and Hattori, T. (2005) . Abscisic 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.

Li, J., and Assmann, S. M. (1996) . An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of fava bean. *Plant Cell* 8, 2359-2368.

Li, J., Wang, X., 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, J., Brader, G., and Palva, E. T. (2004). The WRKY70 Transcription Factor: A Node of Convergence for Jasmonate-Mediated and Salicylate-Mediated Signals in Plant Defense. *Plant Cell* 16, 319-331.

Li, J., Brader, G., Kariola, T., and Tapio Palva, E. (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *The Plant Journal* 46, 477-491.

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. USA* 106, 21419-21424.

Lopez-Molina, L., and Chua, N. H. (2000) . A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 41, 541-547.

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.

Mizoguchi, M., Umezawa, T., Nakashima, K., Kidokoro, S., Takasaki, H., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2010) . Two closely related subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression. *Plant Cell Physiol.* 51, 842-847.

Monks, D. E., Aghoram, K., Courtney, P. D., DeWald, D. B., and Dewey, R. E. (2001) . Hyperosmotic stress induces the rapid phosphorylation of a soybean phosphatidylinositol transfer protein homolog through activation of the protein kinases SPK1 and SPK2. *Plant Cell* 13, 1205-1219.

Munnik, Ligterink, Meskiene, Calderini, Beyerly, Musgrave, and Hirt (1999) . Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J.* 20, 381-388.

Mustilli, A., 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.

Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., et al. (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.

Park, Y. S., Hong, S. W., Oh, S. A., Kwak, J. M., Lee, H. H., and Nam, H. G. (1993) . Two putative protein kinases from Arabidopsis thaliana contain highly acidic domains. *Plant Mol Biol* 22, 615-624.

Park, S., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. F., et al. (2009) . Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068-1071.

Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., and Grill, E. (2010) . ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci.* 15, 395-401.

Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) . Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18, 1292-1309.

Schweighofer, A., Hirt, H., and Meskiene, I. (2004) . Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* 9, 236-243.

Shah, J. (2009) . Plants under attack: systemic signals in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 459-464.

Shin, R., Alvarez, S., Burch, A. Y., Jez, J. M., and Schachtman, D. P. (2007) . Phosphoproteomic identification of targets of the Arabidopsis sucrose nonfermenting-like kinase SnRK2.8 reveals a connection to metabolic processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 6460 -6465.

Takahashi, F., Yoshida, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Seo, S., Yonezawa, M., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2007) . The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* *19*, 805-818.

Thomashow, M. F. (2010) . Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant Physiol.* *154*, 571-577.

Umezawa, T., Yoshida, R., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2004) . SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 17306-17311.

Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006) . Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Opin. Plant Biol.* *17*, 113-122.

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. USA* *106*, 17588-17593.

Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) . Molecular basis of the core regulatory network in abscisic acid responses: sensing, signaling, and transport. *Plant Cell Physiol.* *51*, 1821 -1839.

Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., and Shinozaki, K. (2010) . 'Omics' analyses of

regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 13, 132-138.

Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P. L., Lauriere, 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.

Wang, D., Amornsiripanitch, N., and Dong, X. (2006). A Genomic Approach to Identify Regulatory Nodes in the Transcriptional Network of Systemic Acquired Resistance in Plants. *PLoS Pathog.* 2, 1042-1050

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.

Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., Yoshida, S., et al. (2008) . Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 1678-1692.

Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J. R., and Shinozaki, K. (2002) . ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 43, 1473-1483.

Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., and Shinozaki, K. (2006) . The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 281, 5310-5318.

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.

Zhang, H., Mao, X., Jing, R., Chang, X., and Xie, H. (2010) . Characterization of a common wheat (*Triticum aestivum* L.) TaSnRK2.7 gene involved in abiotic stress responses. *J. Biol. Chem.* 62, 975-988

Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W. (2004) . GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* 136, 2621-2632.

謝 辞

本研究を行うに当たり、多大なる御指導、御助言をいただきました植物分子生理学研究室の篠崎和子教授ならびに理化学研究所植物科学研究センターの篠崎一雄センター長に謹んで感謝の意を表します。また、本研究ならびに本論文の執筆に当たり、全面的に御指導、御協力いただきました理化学研究所植物科学研究センター機能開発研究グループ梅澤泰史博士に深く感謝いたします。また、研究生活を支えていただいた理化学研究所植物科学研究センター、国際農林水産業研究センターおよび東京大学植物分子生理学研究室のスタッフならびに学生の方々にも感謝いたします。

また、植物ホルモン定量と感染実験を御指導いただいた理化学研究所植物科学研究センター軸丸裕介博士および吉本光希博士に御礼申し上げます。最後に、実験技術等の多くの面でご協力いただきました、理化学研究所植物科学センター機能開発研究グループ、国際農林水産業研究センター生物資源領域の実験技術補佐員の方々に御礼申し上げます。

平成 23 年 1 月