

## 論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻  
平成22年度博士課程 進学  
氏名 最上 惇郎  
指導教員名 篠崎 和子

### 論文題目

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

#### 【序論】

自発的な移動の手段をもたない植物は、生育場所を選ばず、乾燥や塩害、病害虫による食害など様々な劣悪環境を回避できないため、自ら外界環境に適応して生き抜く生理機構を備えていると考えられる。特に、陸上に進化した植物はその全生活環において乾燥による水分欠乏ストレスにさらされているため、水分欠乏ストレス耐性の獲得は植物の重要な生存戦略の一つであると考えられる。水分欠乏ストレス耐性獲得の過程では、水分ストレスに応答して蓄積する植物ホルモン、アブシシン酸 (ABA) が重要な役割を担っており、蒸散による水分損失を抑制するための気孔の閉鎖や耐性獲得に関与する遺伝子の発現制御などの様々な生理応答を制御している。

ABA を介した水分ストレスシグナル伝達経路では、プロテインキナーゼであるサブクラス III SnRK2 (SNF1-related protein kinase 2) が中心的な正の制御因子として機能している。サブクラス III SnRK2 は、ABA 依存的に活性化され、気孔閉鎖に関与するイオンチャネルや遺伝子発現制御に関与する転写因子をリン酸化し、それらの活性を調節することで機能を発揮する。しかし、これら既知の標的因子の機能だけでは、シロイヌナズ

ナのサブクラス III SnRK2 の機能欠損変異体である *srk2d/e/i* 三重変異体が示す、乾燥ストレスに対して極度に弱い表現型を十分には説明できていない。水分欠乏ストレス耐性獲得の過程におけるサブクラス III SnRK2 の重要性にも関わらず、サブクラス III SnRK2 を介したシグナル伝達経路の全容は依然不明なままである。

本研究では、シロイヌナズナ植物体でサブクラス III SnRK2 と物理的に相互作用するタンパク質因子を同定することを通じて、サブクラス III SnRK2 を介したシグナル伝達経路に関する新たな知見を得ることを目的とした。

## 【結果】

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

サブクラス III SnRK2 のうち、栄養生長期において根および葉の組織で強く発現しており、ABA 応答の制御において重要な役割を果たしている SRK2D/SnRK2.2 に着目し、SRK2D の植物体における相互作用因子の探索を行った。

免疫沈降により植物体から SRK2D タンパク質複合体を精製して、その複合体に含まれるタンパク質因子を液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) により同定した。その結果、25 個のタンパク質因子が SRK2D の相互作用因子の候補として同定された。サブクラス III SnRK2 の負の活性調節因子として物理的に相互作用することが既に明らかにされているプロテインホスファターゼ、ABI1 が候補因子の中に含まれており、本手法の妥当性が示された。

数種の候補因子と SRK2D との物理的な相互作用を酵母ツーハイブリッド法により検証し、酵母において CBL-interacting protein kinase 26 (CIPK26) が SRK2D と物理的に相互作用することを示した。CIPK26 と SRK2D との植物体における物理的相互作用は、免疫沈降実験および BiFC 法によって再確認された。SRK2D 以外の他の SnRK2 と CIPK26 との相互作用解析を行い、CIPK26 は、SRK2D の他にサブクラス III SnRK2 あるいはサブクラス II SnRK2 と物理的に相互作用し得ることが示された。他方、SRK2D は、CIPK26 の他に CIPK26 に近縁な CIPK3、CIPK9、CIPK23 と物理的に相互作用し得ることが示された。このことから、植物体内においてこれら SnRK2 と CIPK が物理的に相互作用し、何らかの生理応答を協調的に調節している可能性が考えられた。

### CIPK26/3/9/23 の植物体における機能の解析

CIPK26、CIPK3、CIPK9 および CIPK23 遺伝子（以下、CIPK26/3/9/23 と表記）の植物体における機能を明らかにするために、これら CIPK 遺伝子を欠損した機能欠損多重変異体を作成し、表現型解析を行った。CIPK26、CIPK3 および CIPK9 を欠損した *cipk26/3/9* 三重変異体、CIPK26、CIPK3、CIPK9 および CIPK23 を欠損した *cipk26/3/9/23* 四重変異体では、土植え生育時にロゼット葉の先端および花芽の黄化で代表される生育阻害が観察された。同様の表現型は、外界の  $Mg^{2+}$  および  $Ca^{2+}$  に対して異常な応答性を示す *cax1/cax3* 二重変異体でも報告されていたことから、これら *cipk* 多重変異体における生育阻害が外界の  $Mg^{2+}$ - $Ca^{2+}$  条件によって引き起こされている可能性が考えられた。

そこで、水耕栽培系を用いて種々の外界  $Mg^{2+}$  濃度条件あるいは外界  $Ca^{2+}$  濃度条件下における *cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育表現型を解析した。その結果、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体は、外界の  $Mg^{2+}$  濃度の低下に応じて生育阻害から回復することが示された。*cipk* 多重変異体の生育表現型と一貫して、CIPK26 過剰発現シロイヌナズナは、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下において、ベクター対照植物と比較して良く生育することが示された。これらの結果から、植物体において CIPK26/3/9/23 は、種々の外界  $Mg^{2+}$  濃度条件下、特に高濃度の外界  $Mg^{2+}$  濃度条件下において植物の生長を維持するために重要な役割を担っていることが明らかになった。

### サブクラス III SnRK2 と CIPK26/3/9/23 が調節する新規な生理応答の解析

次に、サブクラス III SnRK2 が高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生長調節において何らかの役割を果たしているかどうか検証した。

寒天培地上での評価系を用いて、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における *srk2d/e/i*、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体の生育を評価した。前述の水耕栽培系の結果と一貫して、*cipk26/3/9* 三重変異体および *cipk26/3/9/23* 四重変異体は、高濃度の  $MgCl_2$ （10 あるいは 20 mM  $MgCl_2$ ）を含む培地において特徴的な生育阻害を示した。この評価系による生育試験により、20 mM  $MgCl_2$  含有培地において *srk2d/e/i* 三重変異体も顕著な生育阻害を示すことが明らかにされた。このことから、CIPK26/3/9/23 に

加えて、サブクラス III SnRK2 が高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生長維持において重要な役割を果たしていることが示された。

次に、サブクラス III SnRK2 遺伝子(*SRK2D/E/I*)と *CIPK26/3/9/23* との遺伝的相互作用を明らかにするために、*SRK2D/E/I* と *CIPK26/3/9/23* の双方が欠損した七重変異体、*srk2d/e/i/cipk26/3/9/23* を作出し、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における *srk2d/e/i/cipk26/3/9/23* 変異体の生育を評価した。高濃度の  $MgCl_2$  (10 あるいは 20 mM  $MgCl_2$ ) を含む培地において、*srk2d/e/i/cipk26/3/9/23* 変異体は *cipk26/3/9/23* 変異体と同程度の生育阻害を示した。このことから、サブクラス III SnRK2 とそれらの相互作用因子である *CIPK26/3/9/23* は協調的に機能しており、共通の経路を介して高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下における植物の生長を調節していることが示唆された。

## 【結論】

本研究により、サブクラス III SnRK2 およびそれらの相互作用因子であるプロテインキナーゼ、*CIPK26/3/9/23* が、植物体において  $Mg^{2+}$  感受性を調節する主要な調節因子としての新規な機能を担っていることが示された。

## 【展望】

現時点では、サブクラス III SnRK2 を介した  $Mg^{2+}$  に対する感受性調節が乾燥ストレス耐性獲得の過程において何らかの役割を果たしているかどうかは明らかにされていない。今後、サブクラス III SnRK2 を介した乾燥ストレス耐性獲得と  $Mg^{2+}$  に対する感受性調節との関連性を明らかにしていくための更なる研究の進展が望まれる。

本研究で得られた結果は、サブクラス III SnRK2 あるいは *CIPK26/3/9/23* を介したリン酸化シグナリングが、植物の  $Mg^{2+}$  感受性を調節していることを示唆している。今後、これらプロテインキナーゼの標的基質であり、高濃度の外界  $Mg^{2+}$  条件下において  $Mg^{2+}$  感受性を調節している因子の同定を通じて、外界のイオン濃度の変化に応じて植物がいかに細胞内の  $Mg^{2+}$  恒常性を制御しているのかをより深く理解できると期待される。