

氏 名(本籍)	伊 藤 幸 博
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 4 8 8 号
学位授与年月日	平 成 7 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農 学 専 攻
学位論文題目	タバコの細胞膜結合型プロテインキナー ゼに関する研究

論文審査委員(主査)	教 授	日 向 康 吉
	教 授	江 原 淑 夫
	教 授	亀 谷 壽 昭

# 論文内容要旨

## 緒言

植物は、様々な外界の刺激を感知し、その刺激に応じた反応を示す。しかし、それらのシグナルがどのようにして細胞に認識され、細胞内へ伝達され、さらに核にまで伝えられるかは、ほとんど明らかにされていない。一方、動物や酵母では、外界のシグナルの核への伝達にプロテインキナーゼが重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。植物では1990年になって初めて膜結合型プロテインキナーゼが発見され、ようやくプロテインキナーゼが注目されるようになった。そこで、植物からプロテインキナーゼをコードする遺伝子やcDNAをクローニングし、それらの解析を行うことにより植物のシグナル伝達機構を理解することが必要である。

本研究では、まず第1章で植物のプロテインキナーゼの研究をシグナル伝達の観点から総説した。第2章では、タバコ膜結合型プロテインキナーゼNPK15の構造の特徴と、それが含まれるZmPK1プロテインキナーゼファミリーの植物界における一般的存在について検討した。第3章では、タバコ膜結合型プロテインキナーゼNPK15が膜結合のプロテインキナーゼであること、及び、それがセリン/スレオニンキナーゼであることを確かめた。第4章では、遺伝子導入によりタバコ膜結合型プロテインキナーゼNPK15の機能解析を行い、NPK15が細胞の生死に関わる重要な機能を担っていることを示唆した。

## 第1章 植物のプロテインキナーゼ

本章では、現在までにクローニングされている植物のプロテインキナーゼ遺伝子を、(1) 遺伝学的機能が明らかにされているプロテインキナーゼ、(2) 動物や酵母のプロテインキナーゼと相同性がみられるプロテインキナーゼ、(3) 構造に何らかの特徴のあるプロテインキナーゼ、に分けて総説した。特に、エチレンのセンサーと考えられるETR1が細胞膜に結合したヒスチジンキナーゼであることは、植物ホルモンの作用に膜結合型プロテインキナーゼが重要であることを示している。さらに、ETR1の下流にCTR1プロテインキナーゼが存在することが分かった。これらの事実は、植物においてもプロテインキナーゼを介した一連のカスケードにより、外界刺激に応答していることを示している。また、本研究で明らかにしたNPK15プロテインキナーゼが含まれる植物の膜結合型プロテインキナーゼファミリー

(ZmPK1ファミリー)について検討し、このファミリーにはトマトの*Pseudomonas syringae* 抵抗性遺伝子産物Pto、アブラナ科植物の自家不和合性に関与していると考えられているSRKも含まれていることを指摘した。これらの事実は、ZmPK1ファミリープロテインキナーゼが細胞間の認識反応に関与していることを示唆しており、育種学上重要な形質を支配している可能性を指摘した。

## 第2章 タバコ膜結合型プロテインキナーゼ NPK15 の構造的特徴と高等植物における ZmPK1 プロテインキナーゼファミリーの存在

タバコ膜結合型プロテインキナーゼ NPK15 には、N 末端に疎水性領域があり、C 末端側にセリン/スレオニンキナーゼに保存されたアミノ酸配列が存在する (図 1)。このような膜結合ドメインはあるが細胞外のレセプタードメインの見られないプロテインキナーゼは、植物では初めての報告である (図 3)。NPK15 の推定キナーゼドメインは、トマトの Pto やアブラナ科植物の SRK 等の ZmPK1 ファミリープロテインキナーゼとアミノ酸配列に類似性がみられた (図 2)。

NPK15 cDNA をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションより、NPK15 関連遺伝子はナス科植物に保存されていることが分かった (図 4)。ZmPK1 ファミリープロテインキナーゼ遺伝子は、双子葉植物からはいくつかクローニングされているが、単子葉植物からは ZmPK1 一例だけである。そこで単子葉植物にも多くの ZmPK1 ファミリー遺伝子が存在するかどうか明らかにするため、PCR 法によりイネから ZmPK1 ファミリープロテインキナーゼの cDNA の一部をクローニングした (図 5、6)。その結果、イネにも多くの ZmPK1 ファミリープロテインキナーゼ遺伝子が存在することが分かった。このことより、双子葉植物だけでなく単子葉植物にも多くの ZmPK1 ファミリープロテインキナーゼが存在し、植物の細胞間シグナル伝達に重要な役割を担っていると推定された。

## 第3章 タバコ膜結合型プロテインキナーゼ NPK15 のキナーゼ活性と膜局在性

現在までに、植物からクローニングされた遺伝子が活性のあるプロテインキナーゼをコードすることを確かめた例は数少なく、また、その細胞内局在性を明らかにした例はわずか一例しかない。そこで本章では、NPK15 が膜に結合したセリン/スレオニンキナーゼをコードしていることを生化学的に調べた。

ここでは推定されたプロテインキナーゼが真にプロテインキナーゼとして機能していることを確認するため、まず NPK15 のキナーゼドメインとグルタチオン S トランスフェラーゼの融合タンパク質を大腸菌に生産させた (図 7 A)。また、キナーゼ活性が見られなくなるような変異遺伝子を作成して 1 アミノ酸の置換を持つ融合タンパク質も同様に生産させた (図 7 A)。これらの融合タンパク質を部分精製後、自己リン酸化能を調べたところ、野生型の融合タンパク質には自己リン酸化能が見られたが、変異融合タンパク質には自己リン酸化能は見られなかった (図 7 B、C)。また、自己リン酸化されるアミノ酸残基を調べたところ、セリン及びスレオニン残基がリン酸化されており、チロシン残基はリン酸化されていないことが分かった (図

7 D)。さらに、*in vitro*で NPK15 融合タンパク質の基質となるタンパク質を調べた。その結果、NPK15 融合タンパク質は、ヒストンHI、ミエリン塩基性タンパク質、 $\alpha$ -カゼイン、 $\beta$ -カゼイン、エノラーゼ、ミオシン軽鎖をリン酸化することが分かった (図8)。フォスホリパーゼCはリン酸化されなかった (図8)。ヒストンHI及びミエリン塩基性タンパク質のリン酸化されるアミノ酸を調べたところ、セリン及びスレオニン残基がリン酸化されることが分かった。以上の結果より、NPK15はセリン/スレオニンキナーゼであることが明らかとなった。

また、NPK15の細胞内局在性を明らかにするため、NPK15と $\beta$ -グルクロニダーゼの融合タンパク質をタバコ培養細胞BY-2で一過的に生産させた。細胞分画後、GUS活性を測定したところ、野生型のNPK15とGUSの融合タンパク質を生産させた細胞からは、膜画分にも強いGUS活性が見られた (表1)。それに対し、N末端の疎水性領域を欠失したNPK15とGUSの融合タンパク質を生産させた場合は、GUSだけの場合と同程度の活性しか膜画分に見られなかった (表1)。この結果は、NPK15がN末端の疎水性領域で膜に結合して機能していることを示唆している。以上の結果より、NPK15は膜に結合したセリン/スレオニンキナーゼと考えられる。

#### 第4章 タバコ膜結合型プロテインキナーゼ NPK15 の機能の解析

タバコ膜結合型プロテインキナーゼ NPK15 の機能を知る手掛かりを得るため、NPK15 cDNA 及びその様々な誘導体をタバコ細胞で過剰発現させる実験を行った。

NPK15 cDNA 及びその誘導体をカリフラワーモザイクウイルス 35S RNA プロモーターの下流に連結し、アグロバクテリウムを介してタバコ培養細胞 BY-2 に導入したところ、野生型の NPK15 cDNA を導入した場合、得られる形質転換体の数がコントロールに比べ約 10 分の 1 に減少した (図9)。この原因は、NPK15 を過剰発現させるとその細胞が死ぬためだと考えられる。また、このような致死的效果は、キナーゼ活性の見られなくなる点突然変異体や N 末端の疎水性領域の欠失変異体では見られなかった (図9)。従って、NPK15 の過剰発現による致死的效果には、N 末端の疎水性領域とキナーゼ活性の両方が必須であることが分かった。

さらに、この致死的效果を確かめる実験を行った。ジャスモン酸メチルで発現誘導できるプロモーターの下流に NPK15 cDNA あるいは GUS 遺伝子を連結し、タバコ培養細胞 BY-2 に導入した。これらの形質転換 BY-2 細胞にジャスモン酸メチルを作用させたところ、NPK15 cDNA を導入した形質転換 BY-2 細胞では増殖が阻害されたのに対し、GUS 遺伝子を導入した形質転換 BY-2 細胞ではそのような増殖阻害は見られなかった (図10)。この結果は、前の遺伝子導入実験の結果を支持している。

これらのことより、*NPK15*の機能に関し2つの可能性を示唆した。1つは、*NPK15*は通常その活性を厳密に制御されながら細胞増殖を制御しており、その過剰発現により*NPK15*の活性のアンバランスが起これ、その結果その細胞が死に至るという可能性である。もう1つは、*NPK15*は病原菌抵抗性様遺伝子であり、その過剰発現により過敏反応を誘発したという可能性である。いずれにしても、*NPK15*は細胞の生死に関わる重要な機能に関与していると考えられた。

## 結語

本研究では、タバコに存在する*NPK15*に着目し、*NPK15*は膜結合型セリン/スレオニンキナーゼであること、細胞の生死に関わる重要な機能を持つことを明らかにした。*NPK15*は膜貫通型でありながらそのタンパク質内にレセプタードメインがないもので、高等植物においてこのようなキナーゼの存在を示したのは本研究が初めてである。キナーゼドメインの構造から判断すると、*NPK15*はZmPK1プロテインキナーゼファミリーに分類され、ZmPK1ファミリーに属するプロテインキナーゼは高等植物に広く分布するので、植物の細胞膜を介した情報伝達に重要な役割を担っているものと考えられる。

```

AGCCAATCCAAATTGACACACACCCTTTACAGTTTCTTTGTCATAATTCAGTATTTCTCT 60
ATGTCCTCCGCTCTCCAACAACCATCAAACCTTGTGGTTTTGTTGGAATCCCAGTTTCTCTCT 120
TTGACACCTGCTATGTCAGCTCATTAGCTAATCTCCATCCCAGTCTCGCAACATGTCGCA 180
GTTTCTTGCTTTTGGGAAAAGATTGAAGAATGGTTCATAAAGCTGATTAGTTATTATTG 240
M V H K A D L V I I G
GCATCTGTGTCGGTGTGGCTTTTGGAAATTCCTATTGCATCACTTGTGTTTTTGGAAATTC 300
12 I C V G V A F G I L L I A S L V F F G I R
GGTGGTACAAAAGACGTGCTCGTCTTCAGCGCCAAGCAAATGAGCGATGTATAGCAGCTC 360
32 W Y K R R A R L Q R Q A N E R C I A A L
TTCCAATACGGACAAATGGACTCAATACAAGCGTTGATTTTAGTGCATCTCTGTCGAGTT 420
52 P I R T N G L N T S V D F S A S L S S S
CTGTTGCTATTAAATACATCAGGATTTCCGGCCACAATTCACAGCCCAGTTGGTGGAGTC 480
72 V A I N T S G F P A T N S Q P S W W S H
ACCCTAGTAAAGTTCACCTTTGGCTTCAGCATCTGGAATACCAAGATACTTTACAAAGACA 540
92 P S K V H F A S A S G I P R Y S Y K D I
TTCAGAAAGCTACCCAAAACCTTTACAACCATACTGGGTCAGGGGCTTTTCGGCCAGTAT 600
112 Q K A T Q N F T T I L Q S E G P Y
ACAAAGCTACAATGCCTGCTGGTGGAGTGGTGGCTGAAAGTTCTTGCTACGGACTCAA 660
132 K A T M P A G G V V A V V L A T D S K
AACAAAGGAGAAAAGGAGTTCTTTACAGAGGTAACACTTCTAGGTAGGCTTCATCATCGGA 720
152 Q G E K E F F T V T L L G R L H H R N
ATTTGGTAAATTTGGTTGGCTATTGTGTGGATAAAGACATCGCATGTTAATCTATGAAT 780
172 L V N L V G Y C V D K G H R M L I Y E F
TCATGAGTAATGGAAGTTTGGCAAACCTTTTATACAGTGAGGAACACACCTTGAGTTGGG 840
192 M S N G S L A N L L Y S E E H T L S W E
AAGATCGGTTGCAAAATAGCCCTTGATGTTTACATGGCGTTGAGTATCTTCATGACGGGG 900
212 D R L Q I A L D V S H G V E Y L H D G A
CGGTTCCTCCAGTGATACATCGTGATTGGAAGTCTGCCAATATATTGCTAGATCATTCTA 960
232 V P P V I H R L S A I L L D H S M
TGAGACTAAGSTTGCTGATTTTGGGCTGTCAAAGAAGAGGTATATGATGGCCGCAACT 1020
252 R A K V A F E L S K E E V Y D G R N S
CAGGCCCTAAAGGTACATATGGCTACATCGATCCAGTGTATATATCCACAAGCAAGTTTA 1080
272 G L K G T Y G Y I D V Y I S T S K F T
CGACAAGGAGTGACATCTATAGCTTTGGCGTTATCCTTTTGAAGTATGATCACCCTATTTC 1140
292 T R S I Y S F V I L F E L I T A I H
ATCCACATCAGAACTTAATGGAATACGTAATCTTGGCGCTATGAGCTCAGATGGGGTTG 1200
312 E H Q N L M E Y V N L A A M S S D G V D
ACGAGATCCTTGACAAGAAGCTTGTGGGACATGCGTCTAGAGCAAGTAAGGAGTCTTG 1260
332 E I L D K K L V G T C S L E Q V R S L A
CTGCAATGCTCACAATGCATACACAGGACTCTAGAAAAGCGTCTTCCATGGGTGAAA 1320
352 A I A H K C I H R T P R K P S M G E I
TTTCGCATGCAATACTGAGAATAAGACAGAGCGCCTTGTCAAAGAAGATACCATGTCCT 1380
372 S H A I L R I R Q R R L V K E D T M S F
TTACAGGATACGACAGTTCAAGAATGGCAAGTAGGATAGAAAATCAGCAGGTTGAATTA 1440
392 T G Y D S S R M A S R I E N Q Q V E L R
GAAACATGGCCAGCATAAATGAGAGAGAAGCAGAATGAGCACTTTGCTTTTCGTTCTCTG 1500
412 N M A S I N E R E A E *
TTTCAACGCTTGAGCTTATTTTTCAGCTTAAAAGATATAGGAAAAGTCATGTCAGAGT 1560
ATTGAATCAACAAATTTGGCATGGAATTTGTTTTGGATATGATTTAAGTTATATACACT 1620
AACAAATGTAAGCTTTTTTAAAAA

```

図1、cNPK15の塩基配列と推定のアミノ酸配列。  
 下線は疎水性領域とキナーゼドメインのサブドメインVIとVIIIを示す。セリン／スレオニンキナーゼに保存されたアミノ酸は四角で囲い、チロシンキナーゼに保存されたアミノ酸には二重下線を付けた。NPK15タンパク質のコード領域の前のATGは四角で囲った。左側の数字はアミノ酸残基数、右側は塩基数。

```

      * * * * *
NPK15 114 ATONETTI--KQGSFPPYKATMPA-----GGVVRVAVKATDSKQCEKE-----ETENTLLGLRL
TMK1 584 VFNNESSDNIIFSGGCVVYKGLDHD-----GTIKAVKRMENGVIAKGFQAE-----EKSEIAVLTVK
ZmPK1 532 ATRKKEVVE--LRRSGTYYKQVLED-----DRHVAVKKEENVRQCKEV-----FOAELSVICGI
Pro25 266 ATNGVAESRIAGQGGTQYKGLDHD-----NSIVAIKARLQDSSQVEQ-----EINELVLPQI
Pto 37 ATNNEDEHKFLIGHGQVQVYKGLDHD-----GAKVAKKRTPESSQGLEE-----ELETETLSPC
RLK1 529 ATRDEFTEE--LGRGAFIVYKGLYEV-----AGGSEVTVAKKDRDLQDNEKE-----EKNEKVKVIGQI
RLK4 459 ATNGESDK--VHGCGEAVFKQTPG-----SSTFVAVKRRERPG--SESE-----EKAQVCTIG--
RLK5 680 ATDLEKNNVIGPSSGKVKVLELRG-----GEVVAVKKKNKSVKGGEDDEYSSDLSLRDVFAAEAVETLGTI
APK1 64 ATRNFRPDSVLEGGGFCVTFKQWIDEXSLTASRPGTGLVAVKKNQDQWQGHQES-----WLAELNYLQGF
RLK2 64 ATRNFRPDSVLEGGGFCVTFKQWIDEXSLTASRPGTGLVAVKKNQDQWQGHQES-----WLAELNYLQGF
ARK1 515 ATNNEFSNDNKLQGGGFIYVYKGLD-----GKEIAYKRLSKMSSQGTDE-----EANEVRLIAKL
SRK2 530 ATEHFSDFNKVGKGGFIYVYKGLD-----GQETAVKRLSEMSAQGTDE-----EANEVRLMQSF
SRK6 524 ATENFSNCKNLQGGGFIYVYKGLD-----GKEIAYKRLSKTSVQGTDE-----EANEVRLIARL
SRK910 525 ATENFSNCKNLQGGGFIYVYKGLD-----GQETAVKRLSKTSVQGTGE-----EANEVRLIARL
BN443 521 ATENFSNCKNLQGGGFIYVYKGLD-----GQETAVKRLSKTSVQGTDE-----EANEVRLIARL
      I II III

```

```

      * * * * *
NPK15 HHRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
TMK1 HHRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
ZmPK1 NHRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
Pro25 NHRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
Pto NHRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
RLK1 HHRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
RLK4 NHRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
RLK5 NHRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
APK1 SHRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
RLK2 SHRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
ARK1 QHNRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
SRK2 SHNRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
SRK6 QHNRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
SRK910 QHNRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
BN443 QHNRNENVAVYVVDKGRHMLTYETMSNGSLANLIY--SEEHT--LSWEDRLQALDVSHQVEYLDGAVPPVYHRDLKSA
      IV V VIa VIb

```

```

      * * * * *
NPK15 NIISSHSMAKVADEPGLSKVEEYVD----GRNSGLKQTYCYIDRVIISTSKFTTRSDIYSPGVILFEEITAIHP-----
TMK1 NIISSGDMRAVADEPGLSKVEEYVD----KCSIEIETRIACFGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
ZmPK1 NIISSQAFETETDFGLKVLNLRG----GSTONVSHVACGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
Pro25 NIISSVNLTAVADEPGLSKVEEYVD----KEELETMAQGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
Pto NIISSQAFETETDFGLKVLNLRG----GSTONVSHVACGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
RLK1 NIISSQAFETETDFGLKVLNLRG----GSTONVSHVACGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
RLK4 NIISSQAFETETDFGLKVLNLRG----GSTONVSHVACGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
RLK5 NIISSQAFETETDFGLKVLNLRG----GSTONVSHVACGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
APK1 NIISSQAFETETDFGLKVLNLRG----GSTONVSHVACGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
RLK2 NIISSQAFETETDFGLKVLNLRG----GSTONVSHVACGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
ARK1 NIISSQAFETETDFGLKVLNLRG----GSTONVSHVACGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
SRK2 NIISSQAFETETDFGLKVLNLRG----GSTONVSHVACGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
SRK6 NIISSQAFETETDFGLKVLNLRG----GSTONVSHVACGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
SRK910 NIISSQAFETETDFGLKVLNLRG----GSTONVSHVACGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
BN443 NIISSQAFETETDFGLKVLNLRG----GSTONVSHVACGLAEXAVTRVTTKVDVYSGVILIEITGRKSLDESOP
      VII VIII IX

```

```

      * * * * *
NPK15 --HQIMEYVNLAAAMSSDG-----VDEILDKKEVGTCSLEQVRSAAAIHKCIHRTPRKRESRGGEISHAI 375
TMK1 EESIHLQVYVWFKRMYINKEA-----SFKKAIIDTIDLDEEPLASVHTVAELAGHCACAREPYQRDNGHANNI 865 (43%)
ZmPK1 TDEVNSMLARKVRLMSAKLEGGEQSWIDGYLDSKARNPVYVQARTLILKLVSCLEEDRSKRRETHEAVQTE 812 (39%)
Pro25 QSSKHLVSYFATATKENRL-----DEIIGGEVMNENLKEIQEAARTRAECTTNGRG--REPKKEVAAKI 539 (38%)
Pto REMVNLAEVAVESHNNGQL-----EQIVDPNADKIRPESLRKFGDTAVKCALSSEDRREKQDVLTKI 310 (41%)
RLK1 VILIKWYDFCFRQGRLELD-----TEDDSEAMNDMETVERYVYKAIWICQEEHGMRRMNRNYT 799 (37%)
RLK4 TLGKETETPEKWFPPWAAREI IQGNVDSVDSRNGEYNTETVTRMATVAIWCIQDNEIEIRKGTPTVY 738 (42%)
RLK5 --DKDMKAVCTALDKRCL-----EPVIDPKED-LFKKEEISKVIHGLLETSPLELNRESRKRVY 964 (42%)
APK1 SGRKRVVWAKFYLWKNKR-----IFRVIDNRQDQYSMEACKVATLSLRCLTTEIKLARHSEVY 350 (41%)
RLK2 VVEHRLVDWARPYLTKNRR-----LLRVMDRPQQQYSLTRALKIYVILDLQISIDAKSRETYNEIYKTM 350 (39%)
ARK1 NRDIKILGFVRRHWKEGNE-----LEIVDPINIDSSSKPFTHEILRCLQIGLLQVQERAEADRVMSSSV 794 (38%)
SRK2 DSSIKLGCVRWNRKGGGLEIVDPVIDSSLSS--TFRPREILRCLQIGLLQVQERAEADRVMSSSV 809 (36%)
SRK6 DYENDLSYVWSRWKEGRALEIVDPVIDSSLSS--QPSIFQPQVVKLCIQIGLLQVQELAEHREAVSSV 806 (38%)
SRK910 NHENRLLSYVWSHWTEGRALEIVDPVIDSSLSS--PAPFQPKVVKLCIQIGLLQVQELAEHREAVSSV 807 (39%)
BN443 --KNRLLSYVWSHWTEGRALEIVDPVIDSSLSS--TFQPQVVKLCIQIGLLQVQELAEHREAVSSV 798 (37%)
      X XI

```

図2、NPK15とZmPK1ファミリープロテインキナーゼのキナーゼドメインのアミノ酸配列の比較。  
 半数以上のキナーゼで同一のアミノ酸には網を掛けた。星印は全てに保存されているアミノ酸を示す。%はNPK15と同一のアミノ酸の割合、数字はアミノ酸残基の番号を示す。ローマ数字はキナーゼドメインのサブドメインを示す。

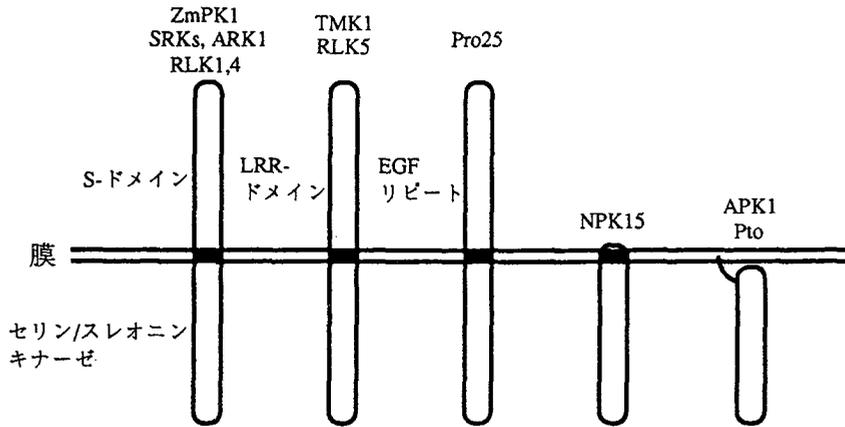


図3、ZmPK1ファミリープロテインキナーゼのドメイン構造の比較。LRR; ロイシンリッチリピート、EGF; 上皮増殖因子。

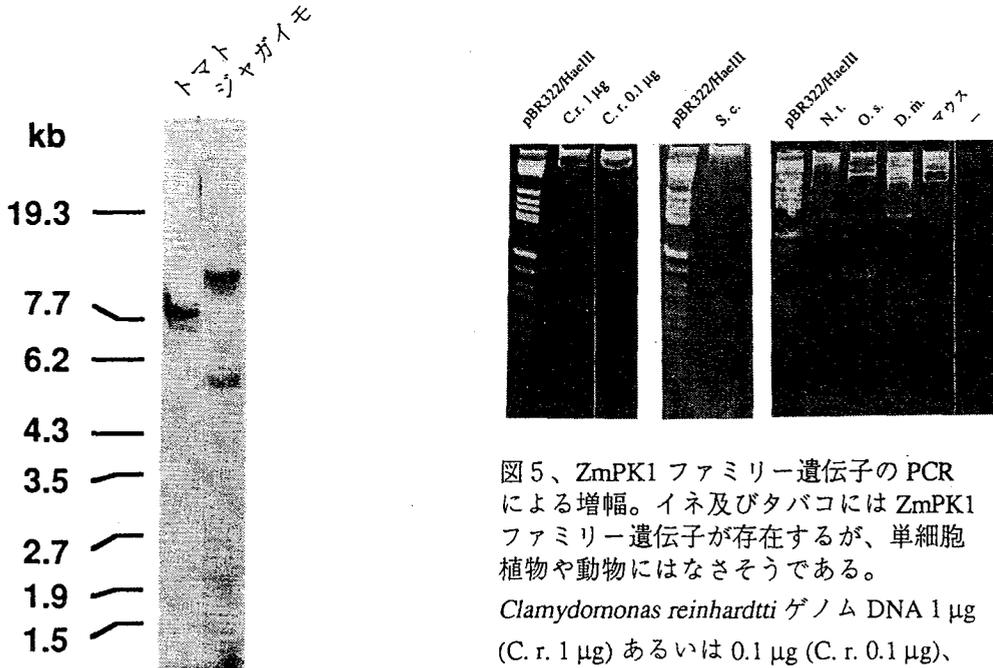


図4、NPK15 cDNA をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション。NPK15 様遺伝子がナス科に一般に存在することを示す。  
トマト及びジャガイモの全 DNA 10 µg を EcoRI で切断し、0.7% アガロースゲル電気泳動を行った。DNA は、一本鎖に変性後、ナイロン膜にトランスファーした。32P で標識した cNPK15 全体をプローブに用いた。

図5、ZmPK1 ファミリー遺伝子の PCR による増幅。イネ及びタバコには ZmPK1 ファミリー遺伝子が存在するが、単細胞植物や動物にはなさそうである。  
*Clamydomonas reinhardtii* ゲノム DNA 1 µg (C. r. 1 µg) あるいは 0.1 µg (C. r. 0.1 µg)、*Saccharomyces cerevisiae* ゲノム DNA ライブラリー 0.1 µg (S. c.)、タバコ全 DNA 1 µg (N. t.)、イネ全 DNA 0.5 µg (O. s.)、*Drosophila melanogaster* 全 DNA 0.5 µg (D. m.)、マウス全 DNA 1 µg を鋳型として、PCR を行った。- は鋳型 DNA を加えなかった場合。PCR 産物は 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、臭化エチジウム染色した。pBR322/HaeIII はサイズマーカー。

NF4	NLVRLMGF	TRGTRRL	LLVYEYMPN
NF5	NLVRLMGY	VEGTQR	MLVYEYMPN
NF6	NLVRLMGY	VEGVNR	MLVYEYMPN
NF7	NLVRLMGC	IQGEEK	LLVYEYMPN
NF8	NLVRLMGC	IQGEEK	LLVYEYMPN
NF9	NLVRLMGY	VEGVNR	MLVYEYMPN
	*	*	
NPK15	NLVN	LVGYCVDK	GHRMLIYEFMSN
TMK1	HLVT	ILGYCLD	GNEKLLVYEYMPQ
ZmPK1	NLVRI	WGFCS	EGSHRLLVSEYVEN
Pro25	NVVK	LGCCLE	TEVPLLVYEFITN
Pto	HLVS	LIGFC	DERNEMILYKIMEN
RLK1	NLVRI	LIGFC	NEGQSOMIVYEFLPQ
RLK4	NLVRI	RGFCS	ENLHRLLVYDYMPO
RLK5	SIVR	LWCCS	SGDCCKLVYEYMPN
APK1	HDVK	LIGYCLE	DEHRLLVYEFMPR
RLK2	NLVK	LIGYCLE	EEHRLLVYEFMTR
ARK1	NLVRL	LGCCVDK	GKMLIYEXLEN
SRK2	NLVRL	LGCCVY	EGEKILYEXLEN
SRK6	NLVQV	LGCCIE	GDEKMLIYEXLEN
SRK910	NLVRI	LGCCIE	ADEKMLVYEXLEN
BN443	NLVQI	IGCCIE	ADEKMLVYEXLEN

図6、イネのNF4～9の推定のアミノ酸配列とZmPK1ファミリープロテインキナーゼのアミノ酸配列の比較。

\*はZmPK1ファミリープロテインキナーゼに完全に保存されているアミノ酸、網掛は半数以上に保存されているアミノ酸を示す。上線はNF4～9のクローニングに用いたPCRプライマーの位置、枠はZmPK1ファミリープロテインキナーゼに特異的に保存されているシステイン残基と疎水性残基を示す。ローマ数字はキナーゼドメインのサブドメイン。

D、自己リン酸化されたアミノ酸。セリン残基及びスレオニン残基がリン酸化される。[ $\gamma$ -32P]ATP存在下で自己リン酸化したGST-NPK15 $\Delta$ の酸分解物を内部マーカーのフォスフォセリン(P-Ser)、フォスフォスレオニン(P-Thr)、フォスフォチロシン(P-Tyr)と混ぜ、薄層電気泳動を行った。レーン1、ニンヒドリン染色、レーン2、オートラジオグラフィ。

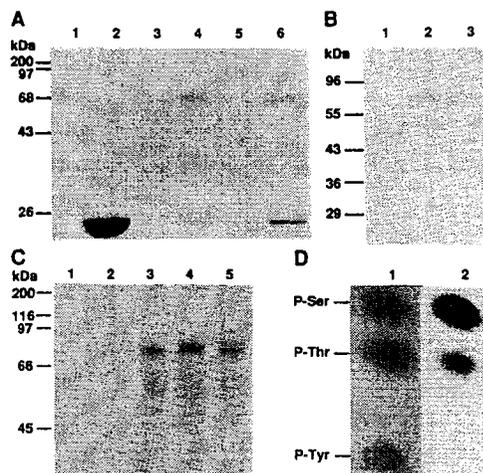


図7、GST-NPK15 $\Delta$ 融合タンパク質の自己リン酸化。

A、部分精製した融合タンパク質のクマシー染色。融合タンパク質が十分精製されている。グルタチオンSトランスフェラーゼ(レーン1,2)、GST-NPK15 $\Delta$ (レーン3,4)、

GST-NPK15 $\Delta$ (K144R)(レーン5,6)の生産は、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子を持つバクテリオファージM13の感染により誘導した(レーン2,4,6)。レーン1,3,5はM13を感染させなかった場合。これらのタンパク質はグルタチオンセファロースによりアフィニティー精製し、SDS-PAGEにより分画した。

B、自己リン酸化活性。GST-NPK15 $\Delta$ のみリン酸化される。セファロースに結合した融合タンパク質は[ $\gamma$ -32P]ATP存在下で自己リン酸化反応を行い、SDS-PAGEにより分画した。レーン1、GST、レーン2、GST-NPK15 $\Delta$ 、レーン3、GST-NPK15 $\Delta$ (K144R)。

C、二価イオン要求性。GST-NPK15 $\Delta$ の自己リン酸化にはMg<sup>2+</sup>かMn<sup>2+</sup>が必要であるが、Ca<sup>2+</sup>は必要ない。自己リン酸化反応とSDS-PAGEはBと同様に行った。ただし、自己リン酸化反応液の二価イオン(各2mM)は次のようにした。レーン1、Ca<sup>2+</sup>、レーン2、Mg<sup>2+</sup>、レーン3、Mn<sup>2+</sup>、レーン4、Ca<sup>2+</sup>とMn<sup>2+</sup>、レーン5、Mg<sup>2+</sup>とMn<sup>2+</sup>。

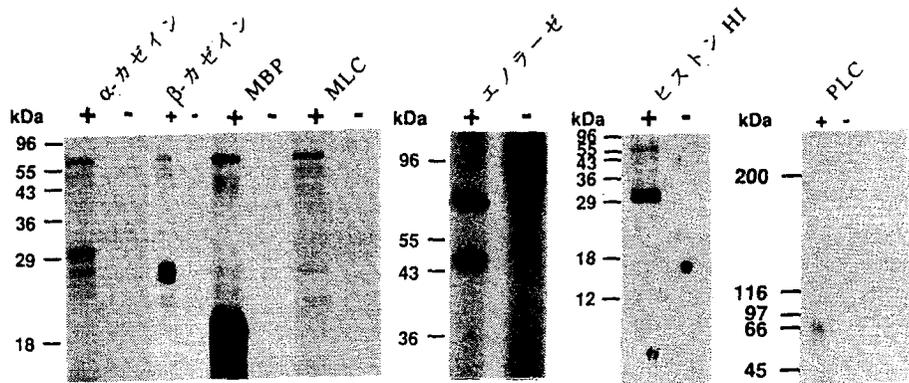


図 8、GST-NPK15 $\Delta$  にリン酸化されるタンパク質。 $\alpha$ -カゼイン、 $\beta$ -カゼイン、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、ミオシン軽鎖 (MLC)、エノラーゼ、ヒストン HI はリン酸化されるが、フォスフォリパーゼ C はリン酸化されない。

図 7 と同様にリン酸化反応を行った。ただし、各レーンの上に記したタンパク質 1  $\mu$ g を反応液に加えた。+ はリン酸化反応液に GST-NPK15 $\Delta$  を加えたことを、- は加えなかったことを示す。MBP; ミエリン塩基性タンパク質、MLC; ミオシン軽鎖、PLC; フォスフォリパーゼ C。70 kDa のバンドは GST-NPK15 $\Delta$  の自己リン酸化。

表 1、GUS 融合タンパク質の膜画分と可溶性画分の GUS 活性。

融合タンパク質	実験 1			実験 2		
	可溶性	膜	膜 (%) <sup>a)</sup>	可溶性	膜	膜 (%) <sup>a)</sup>
NPK15(K144R)-GUS	4474	625	12.2%	3860	1340	25.7%
NPK15 $\Delta$ (K144R)-GUS	2608	188	6.7%	3488	372	9.6%
GUS	1202	60	4.8%	4248	307	6.7%
-	< 1	< 1	-	< 1	< 1	-

pmol MU / 分 / mg タンパク質

a); 膜画分の GUS 活性 / (膜画分の GUS 活性 + 可溶性画分の GUS 活性)

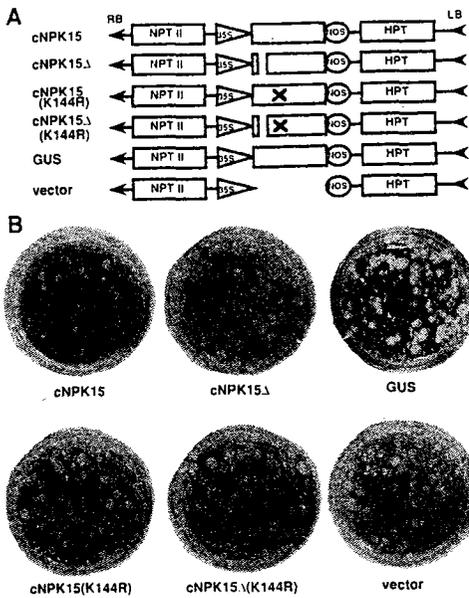


図9、タバコ培養細胞 BY-2 の形質転換。  
A、形質転換に用いたコンストラクトの構造。cNPK15 及びその変異体は、カリフラワーモザイクウイルス 35S RNA プロモーターの下流にセンス方向に連結した。X は 144 番目のリジン残基のアルギニン残基への置換を起こす塩基置換を示す。

NPTII; ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子、35S; カリフラワーモザイクウイルス 35S RNA プロモーター、NOS; ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター、HPT; ハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子、RB; T-DNA のライトボーダー、LB; T-DNA のレフトボーダー。

B、形質転換された BY-2 細胞。cNPK15 を導入すると細胞が増殖しない。形質転換体はカナマイシンとハイグロマイシンの両方で選抜した。写真は、形質転換 1 ヶ月後に撮った。

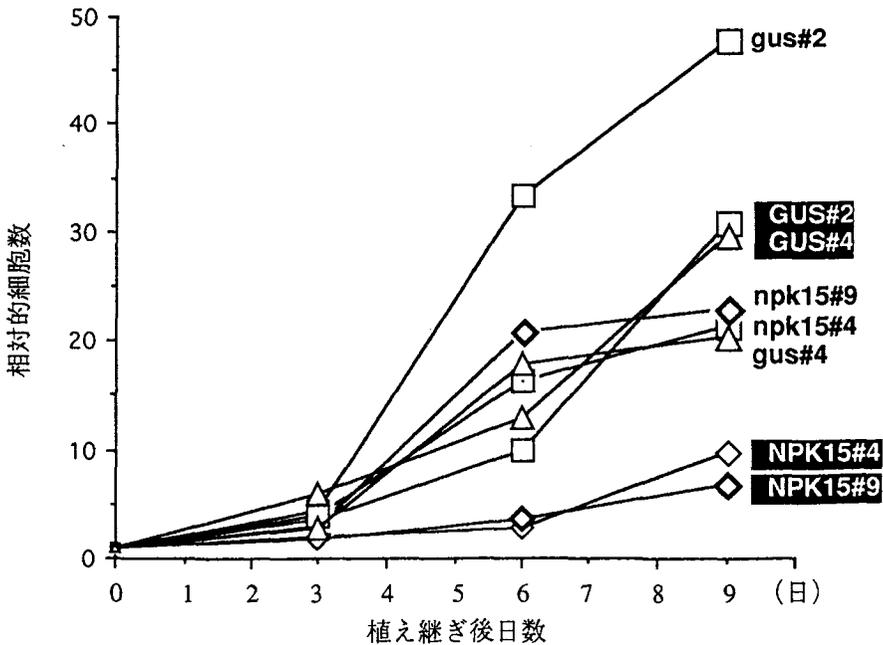


図10、ジャスモン酸メチルによる形質転換 BY-2 の増殖阻害。NPK15 の発現を誘導すると、細胞の増殖が阻害される。

植え継ぎ直後の細胞数を 1 とし、相対的な細胞数を示した。ジャスモン酸メチルは植え継ぎ 1 日後に加えた。白抜きの大文字はジャスモン酸メチルを加えたことを、小文字は加えなかったことを示す。#2、#4、#9 は独立の形質転換体を示す。

## 論文審査の要旨

本研究はタバコの膜結合型プロテインキナーゼをコードする遺伝子、*NPK15*を単離し、その構造と機能について検討し、本遺伝子は細胞の生死に関わる重要な機能を持つ膜結合型プロテインキナーゼの一つであることを示したものである。

まず、タバコの膜結合型プロテインキナーゼとして得られた *NPK15* の塩基配列を確定し、*NPK15* はN末端に疎水性領域をもち、C末端にはセリン/スレオニンキナーゼに良く保存されているアミノ酸配列をもつこと、膜結合ドメインを有するが細胞外のレセプタードメインを欠いており、植物にまだ報告されていない特異な膜結合型プロテインキナーゼであること、キナーゼ部分の塩基配列は *ZmPKI* ファミリーに属すること、などを明らかにした。さらに、*NPK15* cDNA をプローブとして、各種の植物 DNA とのサザン分析および PCR 法により、*ZmPKI* ファミリープロテインキナーゼが高等植物に広く分布していることを示した。

次に、*NPK15* のキナーゼドメインとグルタチオンSトランスフェラーゼの融合タンパク質を大腸菌に作らせる系をつくり、これを用いて、*NPK15* タンパク質はセリン/スレオニンキナーゼであること、ヒストン HI、ミエリン塩基性タンパク質、 $\alpha$ カゼイン、 $\beta$ カゼイン、エノラーゼ、ミオシン軽鎖をリン酸化すること、などを実証した。また、*NPK15* と GUS の融合タンパク質をタバコ細胞中に発現させ、膜画分に強い GUS 活性を検出し、*NPK15* が膜に局在することを示した。

さらに、*NPK15* cDNA およびその塩基配列の一部を改変した cDNA をタバコ培養細胞 BY2 に導入する実験を試み、その機能について考察した。野生型の *NPK15* を導入した場合、得られる形質転換体の数はコントロールに比べ約10分の1に減少した。*NPK15* が膜結合部位を欠くと形質転換体は多くなり、またプロテインキナーゼ活性を失っても形質転換体が多くなった。この結果は、*NPK15* の過剰発現が転換細胞に致死効果を持ち、細胞増殖あるいは過敏反応に関わる機能を有している可能性を示している。いずれにせよ、本実験の結果から、*NPK15* 遺伝子は細胞の生存に必須な役割を果たしていること示唆された。

以上、本研究は細胞の外界刺激に応答する植物のプロテインキナーゼ *NPK15* の構造と機能について検討を行い、植物の育種に基礎的新知見を加えたものであり、博士（農学）の称号を授与するにふさわしいものと判断した。