

シロイヌナズナ花序茎頂で発現する
受容体型キナーゼ遺伝子の機能解析

金本 浩介

2002

1.	緒論	3
2.	1 章	10
2.1.	序論	10
2.2.	材料と方法	12
2.3.	結果	16
2.4.	考察	32
3.	2 章	36
3.1.	序論	36
3.2.	材料と方法	38
3.3.	結果	42
3.4.	考察	61
4.	結論	67
5.	謝辞	69
6.	参考文献	70

1. 緒論

我々が生活している環境を見渡すと様々な種類の植物がそこにはある。それらの植物は四季を通じて我々を和ませ、さらには我々が生きる上で必要となる恵を与えてくれるものである。顕花植物では、およそ 25 万種の植物が存在している。このような多数の種が存在する植物において我々が最もよく目にする特徴はその形態的な違いであると思われる。葉や花の形、色はもちろんのこと、それら葉や花器官の配置なども種によって異なる。植物の地上部は、茎と葉、そして葉の相同器官である花などの側性器官から構成されている。そして茎とその側生の葉は一括してシュートと呼ばれている。このシュートの形態は多様である。アスパラガスでは細長い緑色の茎と薄い鱗片葉とのシュートを形成する。シュートは、地上にまっすぐに伸びるものだけではない。他の植物の幹にからみつくシュート、地中に伸びるシュート、地中で貯蔵器官となっているシュート、腋芽が特殊な栄養繁殖器官となったシュートなどがある。野菜として我々が目にするキャベツやタマネギもシュートである。キャベツの場合は、中心の白くて硬い芯が茎でありその短い茎に食用とする葉が取り囲んでいる。タマネギの場合も同様で、食用となる鱗片葉が中心部の短い茎を囲んでいて、地中にあっても茎の頂端分裂組織由来のシュートである。

高等植物に多様な形態が存在するのは、1つとしてこのシュートの形態的な多様性であるといえる。現在、シュートがどのように形づくられていくのかについて分子生物学による解明が行われ続けている。栄養生長相から生殖生長相への転換である花成については、日長、温度による外的なシグナルや内在性プログラムによって *TFL* (Simon *et al.*, 1996) や *LFY* (Weigel *et al.*, 1992)、*FT* (Kobayashi *et al.*, 1999) などの分裂組織の分化を決定する遺伝子の発現が制御され、花の形成が開始されると考えられている。さらに花を構成する各器官の発生については ABC モデル (Bowman *et al.*, 1989) が提唱されており、制御メカニズムが明らかにされようとしている。しかし、花、葉、根などの器官形成がどのように行われていくのか？それにはどのような下流の遺伝子が実際に機能しているのか？といった疑問は解き明かされていない。この疑問を解き明かす 1 つの方法として高等植物の器官形成の場である分裂組織の機能を分子レベルで調べる必要があると考えた。

高等植物における形態形成

高等植物の地上部の形態形成は、その茎頂に存在する分裂組織において

、地下部の形態形成は根端に存在する分裂組織がそれぞれの役割を担っている。茎頂分裂組織は、栄養生長相には葉、茎器官を形成する。さらに生長して生殖生長相に入った頂端分裂組織は葉、茎以外に花器官を形成する花序分裂組織へと移行する。このように生長相の違いによって形成する器官の種類が異なりはするが、その組織の基本的な構造は維持されている。茎頂分裂組織は、大きく3つの領域に分けられる(図 1-1)。中心領域 (central zone)、周辺領域 (peripheral zone)、髄状領域 (rib zone) から構成されている。中心領域は、未分化な細胞から構成されていて新しい細胞が生み出されているところである。中心領域で分裂した細胞は、中心領域から送りだされ、周辺領域で分化して葉、花器官原基の形成を開始していく。これまでに茎頂分裂組織の機能に影響を与える変異体が報告されており、これらの変異体の解析を通して分裂組織がどのような遺伝子の機能によって機能しているのかについて少しずつわかってきた。例えば、*stm* 変異体では、茎頂分裂組織に存在する未分化な細胞群を維持することができなくなり、分裂組織が最終的には喪失する (Endrizzi *et al.*, 1996)。*wus* 変異体でも *stm* 変異体と同様な表現型が観察されているがその機能は幹細胞を定義する正の因子として考えられている。また、*clv1* 変異体では未分化細胞が分裂組織に蓄積されるために分裂組織の肥大化が生じる (Clark *et al.*, 1997) と考えられており、茎頂分裂組織の維持に機能する遺伝子が明らかになりつつある。一方、根端における細胞の分化では、既に分化した娘細胞からの分化を促すシグナルが求頂的に始原細胞に伝わるのに対し、静止中心からは隣接する始原細胞の分化を抑制して、未分化な状態を維持させるシグナルが伝えられていると考えられている(図 1-1)。根端分裂組織から送りだされた未分化細胞は、根を構成する表皮、皮相、内皮、内鞘などの各組織へと分化し、内鞘組織からは側根が形成されて複雑に枝分かれした根系を作り上げている。

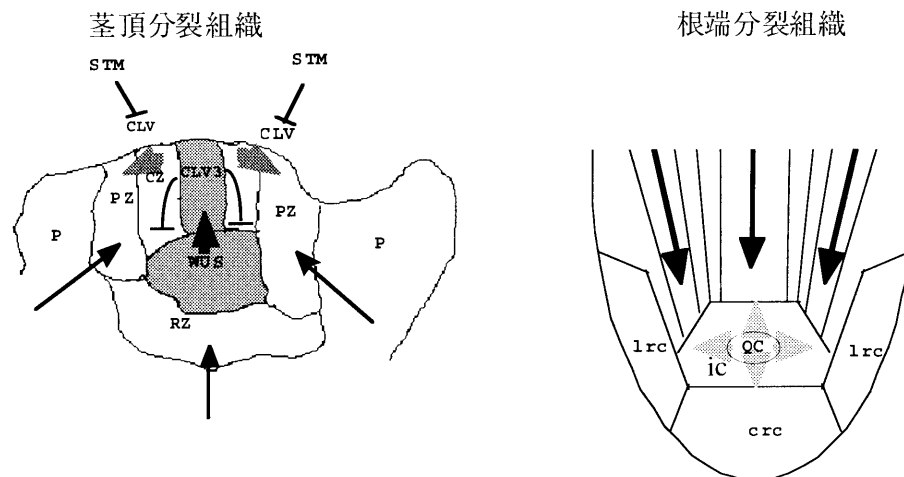


図1-1シロイヌナズナの茎頂分裂組織と根端分裂組織の分化状態を制御する因子

茎頂分裂組織ではWUSを発現している細胞群が機能的中心となり、CLVが発現している上の細胞層に、幹細胞としての多能性を与えられている。一方、根端分裂組織では、静止中心(QC)から周りの始原細胞(ic)に分化を抑制するシグナルが伝達され、未分化な状態が維持されられている。細い矢印は、分化状態の高い組織から伝達される、分化を促進するシグナルの流れを示す。

P：器官原基、PZ：周辺部、CZ：中心部、RZ：髄状部

crc：columella root cap、lrc：lateral root cap、ic：initial cell

細胞間シグナル伝達

一般に着生である植物は、周囲の環境の変化に適応するために環境の変化を敏感に感知するための機構を発達させている。周囲の環境からの刺激としては、光、温度、病傷害、栄養、乾燥、接触、重力などが挙げられる。植物は、これらの刺激を個々の細胞で感知するとともに刺激の種類によっては、他の細胞へもその刺激を伝達する。この刺激の伝達には、植物ホルモンやペプチドなどがシグナル分子として働いていると考えられている。これらのシグナルは、最終的に伝達先の細胞において遺伝子の発現制御に寄与することになる。ゲノムの全塩基配列が明らかにされたシロイヌナズナと線虫やショウジョウバエとのゲノムの比較から、植物のシグナル伝達の機構は独自の発達を遂げてき

たことが窺える。脊椎動物、ハエ、線虫では、シグナル伝達経路として Wiggless/Wnt、Hedgehog、Notch/lin12、JAK/STAT、TGF- β /SMADs、レセプターチロシンキナーゼ/Ras、ステロイドホルモンレセプターなどの経路が知られているが、シロイヌナズナにおいては、これらの経路は見いだされていない(The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000)。シロイヌナズナでは、ブラシノステロイドを介したシグナル伝達に機能する BRI1(Li and Chory, 1997)に代表されるような数多くのセリン／スレオニンキナーゼを有した受容体型キナーゼがシグナル伝達に用いられている。動物でのチロシン型受容体型キナーゼの研究(Ullrich and Schlessinger, 1990)から植物における受容体型キナーゼの作用機序が予想されている(図 1-2)。最初のステップとして細胞外からのリガンドを受容体が認識してリガンドと受容体が結合する。このリガンドの結合が引き金となって細胞内のキナーゼが自己リン酸化を行う。この自己リン酸化によりキナーゼのリン酸化活性が上昇して細胞内のシグナル伝達因子にリン酸化を行う。続いて、MAPKカスケードに見られるリン酸化によるシグナル伝達のリレーが行われ、最終的に細胞内へとシグナルが伝達される。細胞内へと伝達されたシグナルは、遺伝子の発現制御を行い、遺伝子の発現や抑制を引き起こす。その結果、細胞は外部環境からのシグナルに対して応答を示すことになる。動物においては、このようなシグナル伝達によって細胞のアポトーシスや分化、増殖が制御されていることが判ってきており、植物においてもこのようなシグナル伝達経路が働いていることが予想されている。

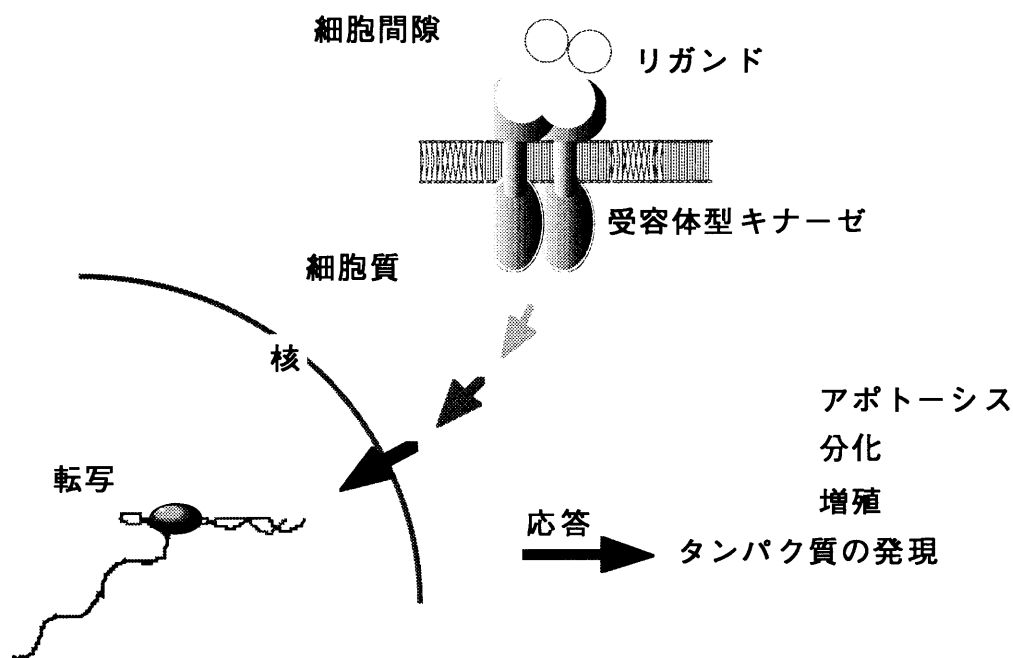


図1-2 受容体型キナーゼを介したシグナル伝達機構のモデル
リガンドを受け取った受容体型キナーゼは、活性化して細胞内へとシグナルを伝達する。シグナルは細胞質内の伝達因子によって最終的に核へ到達して遺伝子の発現制御し、外部環境からのシグナルに対する応答反応を行う。

植物における細胞間シグナル伝達は、外科的あるいは、レーザーなどを用いた細胞除去実験から植物の形態形成にも深く関わっていることが明らかになってきた。例えば、茎頂での葉序については、葉原基の外科的除去によって次に形成されていく葉序の形成パターンに変化が見られることが知られている。*Dryopteris* (シダ植物)の茎頂から葉原基を除去する実験からでは隣接する葉原基の発生が本来とは異なる位置に形成された。このことは、既に存在する葉原基が新しく形成される葉原基の位置決定に関わっていることを示している。葉原基の位置決定に関わる因子としては、葉の原基から他の葉原基の形成を阻害するようなシグナルの存在が提案されている(Wardlaw, 1949)。根端分裂組織では、レーザー除去による実験から細胞間のシグナル伝達が存在することが示され

ている(van den Berg, 1997)。4つの細胞からなる静止中心を除去したときにその周辺に位置する細胞が増殖して除去された部分を埋め合わせる。そして増殖した細胞は、さらに再分化して静止中心の細胞を形成するようになる。これは、細胞系譜による影響ではなく、その細胞の位置がどこにあるかという周辺細胞からのシグナルによって細胞の運命が決定されていることを示している。これらの例は、高等植物の形態形成において細胞間シグナル伝達が機能していることをよく示していると考えられる。

高等植物の受容体型キナーゼは受容体ドメインの種類によって5つのファミリーに分類される。それぞれロイシンリッチリピートタイプ、WAKタイプ、S-ドメインタイプ、レクチンタイプ、CR4-like (表 1-1) から構成される。この中でも leucine-rich repeat (LRR) モチーフを受容体にもつ受容体型キナーゼは、シロイヌナズナのゲノム配列に 174 の遺伝子がコードされていて、植物の受容体型キナーゼの中で最も大きなファミリーを形成していることが判ってきた(The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000)。これまでに高等植物でその機能が明らかとなった受容体型キナーゼは茎頂分裂組織の維持(Clark *et al.*, 1997)、自家不和合性(Nasrallah and Nasrallah, 1993)、病害抵抗性(Gomez-Gomez and Boller, 2000)、器官脱離(Jinn *et al.*, 2000)などのさまざまな植物生理に関わっていることが知られている。これらの機能のうち茎頂分裂組織の維持、病害抵抗性、器官脱離はLRRタイプの受容体型キナーゼの機能によるものである。これらの事実、LRRタイプの受容体型キナーゼが高等植物のシグナル伝達の要として機能していることを示唆している。

表 1-1 高等植物における受容体型キナーゼのファミリー

受容体ドメインの種類	機能
ロイシンリッチリ ピートタイプ 170以上	ブラシノステロイドの 情報伝達(<i>BR11</i>) 分裂組織の維持 (<i>CLV1</i>) 器官脱離 (<i>HAESA</i>) 病害抵抗性 (イネ <i>Xa21</i>)
WAKタイプ (EGFリピート) 5 遺伝子	機能未知
S-ドメイン タイプ 20 以上	自家不和合性(アブラナ <i>SRK1</i>)
レクチン タイプ 30 以上	機能未知
CR4 -like 5 遺伝子	表皮細胞の分化(トウモロコシ <i>CRINKLY4</i>)

これまでに高等植物で知られている受容体型キナーゼを受容体ドメインの種類によって5つのファミリーに分類した。各遺伝子ファミリーの遺伝子数については D. R. McCarty らの総説を参考にした。遺伝子の機能については、シロイヌナズナおよび他の植物で明らかになっている機能を示した。

2.1 章

花序茎頂で発現する受容体型キナーゼ遺伝子の単離とその特徴

2.1.序論

植物の器官形成はその茎頂に存在する分裂組織の営みによって支えられている。しかし、分裂組織がどのように各器官を生み出していくのか？、さらにどのようにして分裂組織を維持し続けるのか？また、多数の細胞から構成される器官をどのように組織立てて作り上げているのだろうか？これらの疑問は、まだ解き明かされていない。だが、遺伝子の緻密な作業によって分裂組織の機能が維持されていることは確かである。分裂組織の1つの機能としては多数の細胞が協調し合って各器官を作り出していることが挙げられ、そこには細胞間のコミュニケーションが必要であると考えられている。実際、緒論で述べた細胞除去実験の結果や、高等植物で多数報告されている受容体型キナーゼの存在からも植物における細胞間コミュニケーションの存在が強く支持されている。これらのことを踏まえて茎頂分裂組織で発現する遺伝子の中で分裂組織での細胞間情報伝達に寄与する遺伝子に注目した。細胞間シグナル伝達に参与するタンパク質の中でも受容体型キナーゼは、細胞膜を貫通するかたちで細胞膜に存在し、細胞外から細胞内へのシグナル伝達の橋渡しをする細胞内への情報伝達の入口となる鍵タンパク質である。つまり受容体型キナーゼは細胞間シグナル伝達において必要不可欠な存在であると言える。分裂組織の機能においても多細胞生物である植物が、何らかの情報のやり取りを周囲の細胞と行っていることは想像に難くない。受容体型キナーゼが何らかの機能を担っていることは、十分に期待できる。

高等植物において多数の受容体型キナーゼが存在し、その植物体における機能も様々であることがわかってきた。例えば、*CLV1* (Clark *et al.*, 1997)、*ER* (Torii *et al.*, 1996)、*HAESA* (Jinn *et al.*, 2000)などの形態形成に参与しているものから、*Xa21* (Song *et al.*, 1995)に代表される病害抵抗性遺伝子、ブラシノステロイドのシグナル伝達に係る *BRI1* が知られている。ここに挙げた遺伝子はどれも受容体として LRR モチーフを持つ受容体型キナーゼ遺伝子である。このように受容体型キナーゼにおいて LRR モチーフが受容体として幅広く用いられている。高等植物において多数の LRR 配列をもつ遺伝子がクローニングされ

てきている事実は、LRR モチーフが植物において重要な機能を担っていることを示すものである。酵母や動物においても LRR モチーフは存在しているが、植物の場合とは異なって、LRR モチーフはホルモンの受容体(McFarland *et al.*, 1989)、細胞接着分子(Hashimoto *et al.*, 1988)、糖タンパク結合細胞外マトリックス(Krusius and Ruoslahti, 1986)、酵素(Dinischiottu *et al.*, 1997)、受容体型チロシンキナーゼ(Martin-Zanca *et al.*, 1989)などにみられることが報告されている。これらの遺伝子の中にはシグナル伝達と関係のない遺伝子も存在するが、LRR モチーフを持つ遺伝子のおよそ半数はシグナル伝達に関与している遺伝子である。しかしいずれの場合においても LRR モチーフは、タンパク-タンパク間の相互作用に機能していると考えられている(Kobe and Deisenhofer, 1994)。

近年の生物のある生理現象の解明法は、遺伝学的な解析によって行われてきたものにより大きく進んだ。そして、数々の変異体が見つけれ、その原因遺伝子の分子レベルでの理解が可能となった。しかし、このような遺伝学的解析では、組織特異的に発現している遺伝子やある遺伝子ファミリーについて系統的な解析を進めていくことは難しい。そのような理由から茎頂組織特異的に発現している遺伝子の解析を逆遺伝学的手法により進めた。

我々の研究室では、これまでに均一化 cDNA ライブラリー(Kohchi *et al.*, 1995)を用いたディファレンシャルハイブリダイゼーションによって花序茎頂特異的な低発現性の遺伝子を 384 クローン得てきた(Takemura *et al.*, 1999)。これらの遺伝子クローンの中で細胞間情報伝達に機能すると予想される受容体型キナーゼをコードする遺伝子クローンの取得を試みた。その結果、受容体型キナーゼと部分相同性を示した新規な遺伝子クローン 3-37 を解析候補として選んだ。この遺伝子はその全 cDNA 塩基配列の解析結果からロイシンリッチリピートを受容体とする受容体型キナーゼをコードしている。そこで、植物の分裂組織(茎頂、花芽および根端組織)での細胞間情報伝達が高等植物でどのような機能を果たしているのかを調べる目的でクローン 3-37 の特徴付けをおこなった。第 1 章ではその 1 次構造、自己リン酸化活性および細胞内局在から、細胞間シグナル伝達経路を構成する因子としてこの遺伝子が機能している可能性を検証した。

2.2.材料と方法

シロイヌナズナ(Col)は、22℃、長日条件下(16h 明、8h 暗)で発芽後、約5週間生育させた。発芽後、5週間後の植物体からノーザンブロット解析のために茎、ロゼット葉、ステージ5までの花芽(Smyth *et al.*, 1990)を含む茎頂組織、開花した花をそれぞれ別々に採取した。

2.2.1.cDNA クローンの単離

IRK 遺伝子の cDNA 全長を含むクローンのスクリーニングを行った。約 4×10^6 個の λ ファージ(シロイヌナズナ(Ler)花組織由来の λ ZAPII cDNA ライブラリー、後藤弘爾先生(岡山生物資源研)より供与、オハイオ州立大学シロイヌナズナ生物資源センターより供与)をスクリーニングに用いた。ハイブリダイゼーションは常法に従った(Church *et al.*, 1984)。プローブは、3-37 の cDNA の断片を [32 P]dCTP を用いてランダムプライム法(random primer kit, Boehringer Mannheim)によりラベルした。cDNA ライブラリーから 3-37 の cDNA をもつファージクローンを取得した。3-37 のゲノム断片を *in vivo* excision により切り出し、pBluescript II SK⁺にクローニングした。ダイデオキシ法(Sanger *et al.*, 1977)により DNA シークエンサー(373S:Applied Biosystems)を用いて cDNA 塩基配列を決定した。

ゲノム DNA クローンの単離

IRK のゲノム DNA のスクリーニングは、シロイヌナズナ(Col)由来の λ fixII ライブラリーを用いて行った。スクリーニングの方法は、前項の cDNA のスクリーニング法に準じ、塩基配列を決定した。

5'RACE

3-IRK-L1: 5'-CCG GTA CCA CAG CAC CGC AAA TTC CCG G-3'と

AP1 プライマーとの組み合わせによりシロイヌナズナ(Col)の茎頂分裂組織から MarathonTM cDNA Amplification Kit (Clontech)を用いて作成された cDNA を鋳型に PCR を行った。非特異的な PCR 産物を除くために

3-IRK-L2: 5'-CCG GTA CCT CCA CCT GCA GGT AGT TCC C)と

AP1 プライマーの組み合わせにより PCR をおこなった。

5'RACE 産物で最長のクローンを *Not* I、*Kpn* I で酵素処理し、pBluescript II KS⁺ の *Not* I、*Kpn* I サイトへクローニングし、塩基配列を決定した。

2.2.2.ノーザンブロット解析

トータル RNA は、GATC 法により ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo)を用いて抽出した。Poly(A)⁺ RNA は OligotexTM-dT30 Super (TAKARA, Kyoto)を用いて精製した。ノーザンブロットには、各レーン 2 µg の poly(A)⁺ RNA を供した。1% ホルムアルデヒド／アガロースゲルで電気泳動後ナイロンメンブレン (HybondN, Amersham)へトランスファーした。*IRK* の cDNA 配列を常法に従いプローブとして用いた。poly(A)⁺ RNA のローディングコントロールのためにユビキチン (*UBQ5*)をプローブとして用いた。

2.2.3.SGFP 融合 *IRK* タンパク質発現コンストラクトの作成

静岡県立大学 丹羽康夫先生から供与して頂いた CaMV35S-SGFP-TYGNos(pUC18)ベクターを改変し、SGFP の開始コドンと 2 番目のバリン残基をコードする塩基配列の間に合成オリゴ DNA を用いて *Apa* I、*Xho* I サイトとグリシンを 4 つコードするリンカー配列 (CCATGGGCCCTCGAGGTGGTGGTGGCGCG) を挿入し、改変 pTH-2XA ベクターを作成した(竹村、未発表)。発現する SGFP 融合タンパク質は、*IRK* タンパク質と SGFP タンパク質の間にグリシン 4 残基からなるグリシンリンカー配列を持つ形で発現するように設計した。下に示したプライマーを用いて PCR により *IRK* 遺伝子のコーディング領域の cDNA 塩基配列を増幅した。

IRKGFP5'N: 5'-CCGGTACCACTAGTCCATGGACAAAGCACTGATT-3'

IRKGFP3'N: 5'-CCGGATCCGGGGCCCAAACTTGAACCCAACTCATCT-3'

増幅した *IRK* 遺伝子の開始コドンから終始コドンまでの cDNA 塩基配列を改変 pTH-2XA プラスミドの *Nco* I、*Apa* I サイトに導入した。タマネギの表皮細胞にパーティクルガン (Bio-Rad PDS-1000/He)を用いて SGFP 融合 *IRK* タンパク質発現用プラスミド (35S::*IRK*:sGFP)を導入した。導入条件は直径 1 µm の金粒子を使用し、28 inches Hg に減圧下、He 圧 1,100 PSIで行った。一晚室温でインキュベーション後、プラスミドを導入したタマネギの表皮細胞に 10%グリセロールを供与し、原形質分離を誘導させた。共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (LSM510, Zeiss)を用いて SGFP の蛍光を観察した。

2.2.4.*IRK* キナーゼドメインと GST の融合タンパク質の発現と精製

Not I、*Sal* I の制限酵素サイトをプライマーに導入したプライマーを作成した。

37ka: 5'-GGG TCG ACG AAC CTG ATT TCA GCA CTG G-3'

37kb: 5'-CCG CGG CCG CCA AAC CGG ATT CCT CTT CGC-3'

native pfu DNA 合成酵素を用いて cDNA をもつ pBC-SK⁺プラスミドを鋳型にして

PCRにより *IRK* のキナーゼをコードする断片を取得した。PCR断片を pBluescript II KS⁺ の *Not* I、*Sal* I サイトにクローニングし PCR での塩基置換がないことを確認した。インサートを pGEX-4T-3 (GST Gene Fusion Vector、Pharmacia) の *Not* I、*Sal* I サイトにクローニングし、*IRK* のキナーゼドメインをインサートにもつ pGEX-4T-3 プラスミド、pGEX-KD を作成した。

pGEX-KD を有する大腸菌を 10 ml の LB 液体培地に接種し、37℃ で O.D.600 = 0.6 になるまで培養した。培養後、IPTG を終濃度 0.1 mM になるように加え、25℃ で 8 時間培養を行い、融合タンパク質の発現を誘導した。集菌以後の操作は氷上、及びそれに準じた冷却器を備えた機器で行い、全ての実験操作は低温下 (4℃) で行った。培養後、大腸菌を 1×PBS buffer で洗浄し、溶菌バッファ (100 mM Tris-HCl pH 8.0、5 mM EDTA、10 mM NaCl、10% Sucrose、1 mM PMSF) を加え、ソニケーター (TOMY SEIKO co, model UR-20P) で菌体を破碎 (出力 40%) した。溶菌した菌液を遠心し、上清を可溶画分として回収した。Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia) を使用して、プロトコール (Pharmacia) に従って GST 融合キナーゼタンパク質を精製した。ブラッドフォード法 (Bradford, 1976) により各画分中のタンパク質量を定量した。

2.2.5. GUS レポーター遺伝子を用いた発現解析

2.6 kb の *IRK* の開始コドンを含むプロモーター領域をゲノム DNA を鋳型に用いて PCR により取得した。

プライマーには、

hPGa: 5'-CCGTCGACCTCCTCCATTGACGATAAAC-3' と

hPGe: 5'-CCGGATCCCAGTGCTTTGTACATCTTTCC-3' を使用した。

増幅した断片は pBI101.1 の *Bam* HI、*Sal* I 制限酵素サイトにクローニングした (Jefferson *et al.*, 1987)。作成したコンストラクトは減圧浸潤法によりシロイヌナズナに導入した。10 ラインの独立した形質転換体について T2 世代での GUS 遺伝子の発現パターンを調べた (Topping *et al.* 1991)。GUS 染色の時間は、組織の浸透性を考慮して 45 分から 14 時間の間に設定した。GUS による染色部位の観察には、暗視野実体顕微鏡 (Stemi SV11, ZEISS) を用いた。テクノビット 7100 に GUS 染色した試料を包埋し切片を作成した。

オーキシン処理およびカルスの作成

GUS レポーターによる *IRK* の発現解析で使った植物体を、発芽後 4 日目に各濃度の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を含む MS 寒天培地移植し 5 日後に GUS 染色を行った。カルスについては、発芽後 5 日経過した植物体の子葉をカルス誘導培地に移植し、約 3 週間後に形成されたカルスを GUS 染色した。

2.2.6.GFP レポーター遺伝子を用いた発現解析用コンストラクト

pBI101.1 の *Bam* HI と *Not* I サイトに GFP 遺伝子をクローニングした pBI101-GFP(XA)ベクターを使用した(竹村、 未発表)。GUS による発現解析に用いた *IRK* のプロモーター配列 2.6 kb を GFP 遺伝子の上流に *Bam* HI と *Sal* I サイトでクローニングした。

2.2.7.自己リン酸化活性の測定

精製したキナーゼドメインとの GST 融合タンパク質 2 μ g をリン酸化活性測定用バッファー(50 mM Tris-Hcl (pH 7.5), 20 μ M ATP、10 μ Ci [γ - 32 P]ATP (5000 Ci/mmol)、10 mM MnCl_2 、1 mM DTT)に加え、室温(26 $^{\circ}$ C)で 1 時間リン酸化反応を行った。反応後、全反応液を 10% SDS-PAGE に供した。オートラジオグラフィにより自己リン酸化タンパク質の検出を行った。

Competitive RT-PCR

トータル RNA をシロイヌナズナの各組織より RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を使用して精製した。1 μ g のトータル RNA から first strand cDNA を合成した(the First strand synthesis kit, Amersham Pharmacia)。cDNA 反応液の 15 分の 1 量を PCR に使用した。10⁴ から 10⁹ の各濃度の DNA コンペティターを解析に用いた。ゲノム DNA 由来の断片の増幅を避けるためにイントロン配列を挟んだプライマーを設計した。DNA コンペティターは、内在性の *IRK* 遺伝子の発現と区別できるように 160 bp だけ長く PCR 増幅されるように設計した。PCR は、95 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒を 1 サイクルとして 35 サイクルの反応を行った。PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動した。

2.3.結果

2.3.1.花序茎頂で発現する受容体型キナーゼ遺伝子のスクリーニング

シロイヌナズナにおいて器官形成がどのような機構によって行われているかを理解するために、栄養生長期の茎頂組織で発現していた 384 の遺伝子をクローニングしてきた(Takemura *et al.*, 1999)。茎頂や花芽組織において多数の細胞の協調した働きによって器官形成が成り立っていることから、細胞間情報伝達が器官形成に果たしている役割に注目した。これまでに花序茎頂組織で低発現している 384 の遺伝子クローンの中に細胞間情報伝達に関与すると予想される受容体型キナーゼ遺伝子と部分相同性を示したクローン(3-37)が存在した。BLAST により相同遺伝子の検索を行った結果、クローン(3-37)は、受容体型キナーゼ遺伝子と高い相同性を示す新規遺伝子であった。以降、クローン(3-37)をその構造と後述する発現組織の特徴から *Inflorescence and Root apices receptor-like kinase (IRK)* と命名した。*IRK* が目的とした花序茎頂で発現している遺伝子であるかどうかを確認するために、ノーザンブロット解析を行った。野生株のシロイヌナズナからロゼット葉、茎、茎頂組織、花の各組織を採取し、poly(A)⁺ RNA を精製した。ノーザンブロット解析の結果、*IRK* は約 3.8 kb のバンドとして検出され、茎頂組織と花において発現している遺伝子であることが明かとなった(図 2-1)。

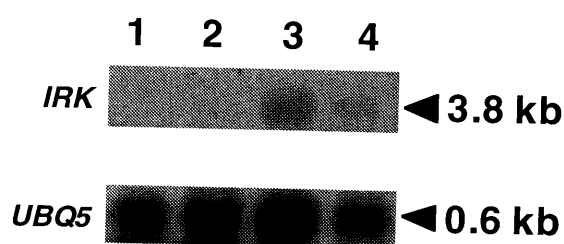


図2-1 *IRK* 遺伝子のノーザンブロット解析

発芽後5週目のシロイヌナズナのロゼット葉、茎、ステージ5までの花を含む花序茎頂組織、花の各器官より poly(A)⁺ RNA を精製した。各レーン 2 μg の poly(A)⁺ RNA を泳動した。RNA サンプルのローディングコントロールとして *UBQ5* 遺伝子をプローブに用いた。レーン 1; ロゼット葉、レーン 2; 茎、レーン 3; 花原基を含む茎頂組織、レーン 4; 花。ローディングコントロールとして *UBQ5* 遺伝子をプローブに使用した。

2.3.2. *IRK* 遺伝子の構造的特徴

IRK 遺伝子の構造を調べるために *IRK* の cDNA クローンの単離を試みた。cDNA ライブラリーからのスクリーニングにより単離された cDNA クローンは、1.8 kb の部分長 cDNA であったことから 5'-RACE 法による全長 cDNA の単離を行った。得られた開始メチオニンを含む 3.4 kb の cDNA 断片の塩基配列を決定した。また *IRK* のゲノムクローンについても単離し、その塩基配列を決定した(浅井、1997)。cDNA 塩基配列とゲノム塩基配列から *IRK* 遺伝子には、5'UTR 領域とコーディング領域にそれぞれイントロン配列が1つずつ存在し、それぞれ 374 bp と 93 bp の長さであることがわかった(図 2-2)。決定した *IRK* の cDNA 塩基配列とそこから推定したアミノ酸配列を(図 2-3)に示す。その結果、開始メチオニンを含んだ遺伝子産物は 964 アミノ酸からなり、推定分子量は 103.7 kD であった。*IRK* の遺伝子産物の疎水性アミノ酸の分布状況を Kyte-Doolittle 法により調べたところ(図 2-4)、アミノ末端より 20 残基までと 605 から 621 残基の領域に疎水性の高い領域が認められた。アミノ末端に位置する疎水性領域は、PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>)による予測から細胞膜への移行シグナルであると予想された。また、20 と 21 残基の間にシグナルペプチドの切断部位が予測された。LRR ドメインとキナーゼドメインに挟まれたもう一方の疎水性領域は、TSEG (<http://www.genome.ad.jp/SIT/tseg.html>)による予測から膜貫通ドメインであることが予測された。膜貫通ドメインのカルボキシル基末端側には正電荷をもつアミノ酸残基(リジン)の存在が認められ、“positive inside rule”(Andersson and von Heijne, 1994)として知られている膜貫通ドメインの細胞質側に存在するアミノ酸残基であると予測した。シグナルペプチド配列に続いてその後ろには、3 回の繰り返し配列からなるロイシンジッパーモチーフが存在しており、*IRK* が二量体を形成する際にタンパクタンパク間の相互作用に働いている可能性が考えられた。*IRK* のアミノ基末端(80-540 残基)には 20 回のロイシンに富んだアミノ酸から構成される LRR モチーフが存在した。一般に LRR モチーフの各リピートは植物においては 24 アミノ酸残基から構成されており、*IRK* についてもロイシン残基が高く保存されていることが判った。図 2-5A には、*IRK* の LRR モチーフの各リピート間で保存されているアミノ酸配列を示した。図 2-5B に示したその他の LRR を持つ受容体型キナーゼ遺伝子の各リピート間で保存されているアミノ酸配列と *IRK* の LRR の保存配列との比較では、各遺伝子においてリピートの回数に違いはあるものの、保存されているアミノ酸残基はほぼ一致していた。LRR ドメインの両端にはシステインモチーフの存在が 1 箇所ずつ予想された。システインモチーフはシステイン残基間でのジスルフィド結合に関与することが予想されており、このジスルフィド結合によってレセプターの二量体化を行っているのかもしれない。*IRK* の細胞膜貫通ドメインのカルボキシ

ル末端側（680-950 残基）には 11 のサブドメインを有した真核生物のセリン／スレオニンキナーゼドメインの存在が相同性検索の結果から予測された(Hanks and Hunter, 1995)。そこでこれまでにシロイヌナズナで機能していることが報告されている HAESA、CLV1、BRI1、ER などの LRR を受容体に持つ受容体型キナーゼのキナーゼドメインと IRK のキナーゼドメインについてそのアミノ酸配列の相同性を調べた。その結果どの遺伝子についても IRK とおよそ 30-35% の相同性を示すことがわかった(図 6)。この相同性の値は、プロテインキナーゼ間の相同性としては一般的な数値であり、IRK がキナーゼとして有意な相同性を持つことを示していた (図 2-6)。また、各サブドメインにおける保存性の高かったアミノ酸配列について白抜き文字で示したほか、これまでに報告されているセリン／スレオニンキナーゼ間で保存性が高いアミノ酸残基については黒丸印で示した。これらのキナーゼ間で保存されたアミノ酸配列の存在から IRK のキナーゼドメインはセリン／スレオニンキナーゼとしての活性を保持していると予想された。以上、IRK の cDNA から導かれたアミノ酸配列を基に IRK の構造モデルを図 2-7 にまとめた。

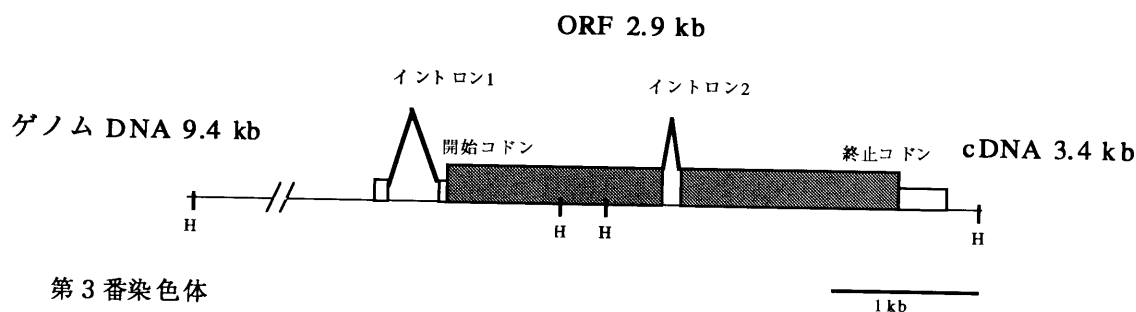


図2-2 IRK遺伝子のゲノム構造

IRKのゲノム塩基配列9.4 kb（コロンビア由来）とcDNA配列3.4 kb（ランズバーグ由来）についてその全塩基配列を決定した。IRK遺伝子のcDNA配列は3.4kb、ORFは2.9kbであった。白抜きの四角は非翻訳領域を示し、黒塗りの四角はエキソン配列を示す。HはHindIIIサイトを示す。イントロン配列は、5' UTRと遺伝子のコーディング領域にそれぞれ1箇所ずつ存在した。

B

SP LRR TM kinase 964 a.a.

(A) イントロン配列の挿入位置は、矢印で示した。シグナルペプチド配列(1-20 a.a.)、ロイシンジッパーモチーフ(25-46 a.a.)、システインモチーフ(57-64, 557-565 a.a.)、膜貫通ドメイン(605-621 a.a.)は下線で示した。正に荷電したアミノ酸残基を○印で示した。N結合型糖鎖付加サイト(NX(S/T))は四角で囲んで示した。(B) IRKタンパク質の予測された構造。SP; シグナルペプチド配列、L; ロイシンジッパーモチーフ、C; システインモチーフ、TM; 膜貫通ドメイン

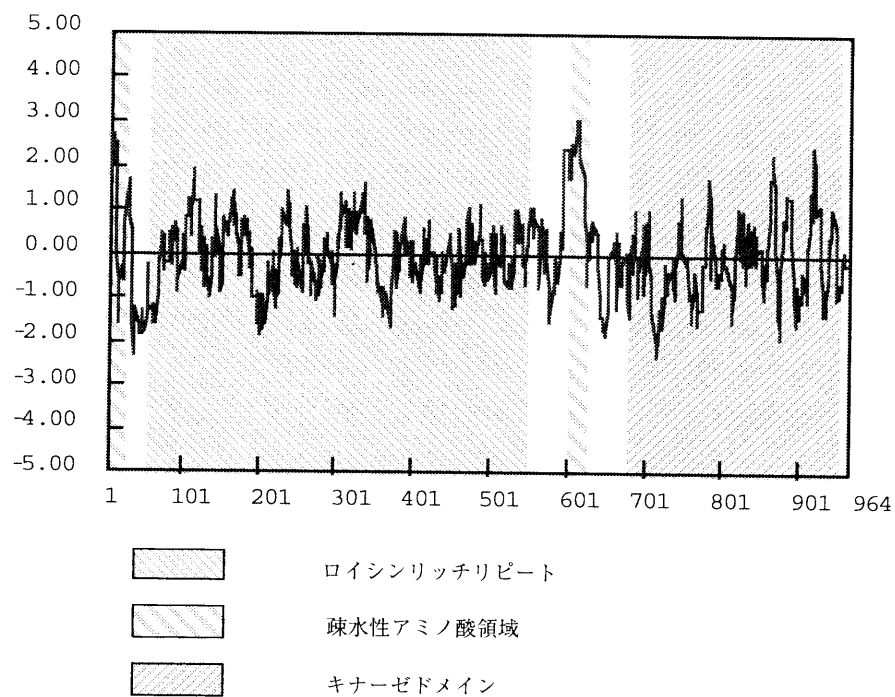


図2-4 IRKの疎水性アミノ酸残基の分布状況

Kyte-Doolittle法によりIRKタンパク質の疎水性アミノ酸の分布を予測した。1-20と605-621アミノ酸残基の領域に疎水性の高い領域があることが予測できた。前者の疎水性領域は、シグナルペプチド配列、後者の疎水性領域は、膜貫通ドメインに相当すると予想された。

A

VTELNLDGFSLSGRI	1
GRGLLQLQFLHKLSLSNNLTGIIN	2
PNMLLSLVNLKVVDLSSNGLSGSLP	3
DEFFRQCGSLRVLSLAKNKLTGKI	4
PVSISSCSSLAALNLSSNGFSGSM	5
PLGIWSLNTLRSLDLRNELEGEF	6
PEKIDRLNNLRALDLNRNRLSGPI	7
PSEIGSCMLLKTIDLSENSLSGSL	8
PNTFQQLSLCYSLNLGKNALEGEV	9
PKWIGEMRSLETLDLSMNKSSGQV	10
PDSIGNLLALKVLNFSGNGLIGSL	11
PVSTANCINLLALDLSGNSLTGKL	12
PMWLFQDGSRDVSALKND	13
NST-GGIKKIQVLDLSHNAFSGEI	14
GAGLGDLRDLEGLHLSRNSLTGPI	15
PSTIGELKHLSVLDVSHNQLNGMI	16
PRETGGAVSLEELRLENNLLEGNI	17
PSSIKNCSSLRSLILSHNKLLGSI	18
PPELAKLTRLEEVDLSFNELAGTL	19
PKQLANLGYLHTFNISHNHLFGEL	20

P--L--L--L--L-LS-N-L-G-I/L consensus

B

Protein	a.a.	LRR consensus sequences	No. of repeats
IRK	964	PxxaxxLxxLxxLxLSxNxLxGxa	20
HAESA	999	PxxLxxLxxLxxLxLxxNxLSGxI	21
CLV1	980	PxxaxxaxxLxxLxaxxNxaTGxI	21
BRI1	1196	PxxaxxaxxLxxLxLSxNxaSGxI	25
ERECTA	976	PxxaGxLxxLxxLxLxxNxLxGxI	20

図2-5 LRRドメインのアミノ酸配列とその保存配列

(A)IRKの20回の繰り返しからなるLRRドメインのアミノ酸配列とその下に各繰り返し配列において保存されているアミノ酸残基を示した。

(B) シロイヌナズナにおけるその他のLRRを持つ受容体型キナーゼとIRKとのLRRモチーフの保存配列の比較。xは、保存されていないアミノ酸残基を示す。aは、芳香族の側鎖を有するアミノ酸残基を示す。a.a.は各タンパク質を構成しているアミノ酸残基の数を示す。

相同性 (%)

34
35
32
32

IRKのキナーゼドメインと他のシロイヌナズナの変異型キナーゼ(HAESA, CLVI, BRII, ER)のキナーゼドメインについてそのアミノ酸配列の相同性を調べた。白抜き文字は5つの遺伝子中4つの遺伝子において保存されていたアミノ酸残基を示す。黒丸印は、これまでにセリン/スレオニンキナーゼにおいて高い保存性が知られているアミノ酸残基を示した。ローマ数字は、キナーゼにおける各サブドメインを示す。IRKと各遺伝子との相同性(identity)の割合についても示した。キナーゼの基質特異性に関するサブドメインIIとサブドメインVIIIのアミノ酸残基に☆印をつけた。

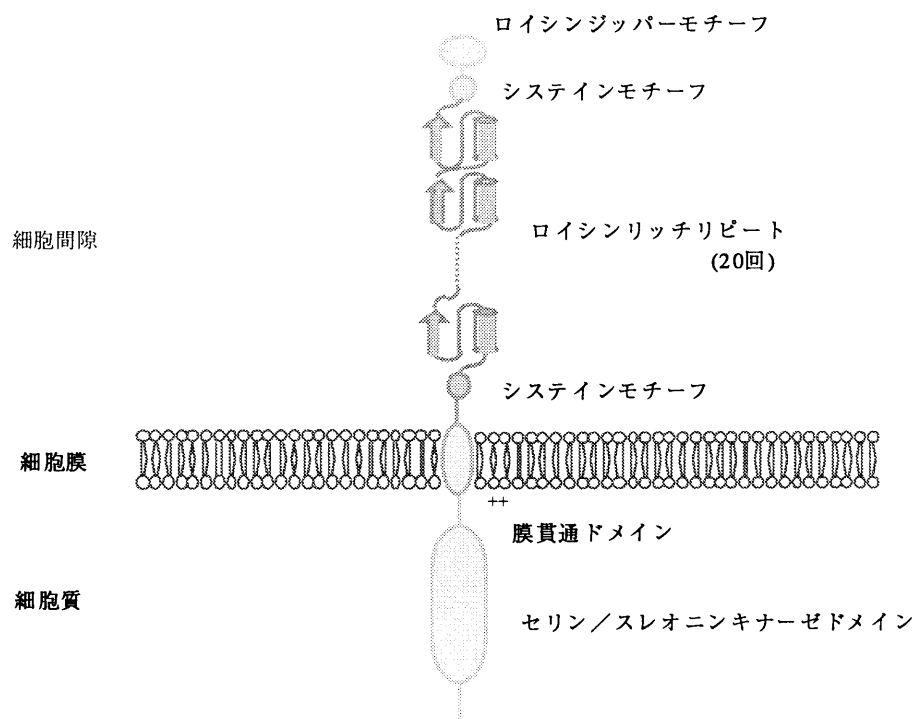


図2-7 IRKタンパク質の構造モデル

IRKの塩基配列から導かれたアミノ酸配列より予測されたIRKタンパク質の構造モデル。アミノ末端側よりロイシンジッパーモチーフ、2箇所存在するシステインモチーフ、ロイシンリッチリピート、膜貫通ドメイン、セリン/スレオニンキナーゼドメインより構成される。N末端にコードされているシグナルペプチド配列は、成熟タンパク質では、切断されることが予想されるので省略した。

2.3.3. RKの自己リン酸化活性

IRKがそのアミノ酸の一次構造から予想された受容体型キナーゼとして機能するかどうかを調べるために、IRKのキナーゼ活性の有無を調べた。GST融合タンパク質としてIRKキナーゼドメインの発現、精製を行った。GSTとの融合タンパク質は、キナーゼドメインの予想分子質量33 kD、GSTタンパク質の予想分子質量26 kDを加えた59 kDのタンパク質として発現することが予測された。glutathione Sepharose 4Bカラムで精製したGST融合タンパク質をSDS-PAGEに供した結果、GST融合タンパク質として予想された分子量のタンパク質が発現していることを確認した。精製したGST融合タンパク質を用いて自己リン酸化

化活性の検出を行った。自己リン酸化反応後、SDS-PAGE を行った結果、GST 融合タンパク質と予想される分子量の位置にリン酸化活性を示すバンドが検出され、IRK のキナーゼドメインが自己リン酸化活性を示すことがわかった(図 2-8)。

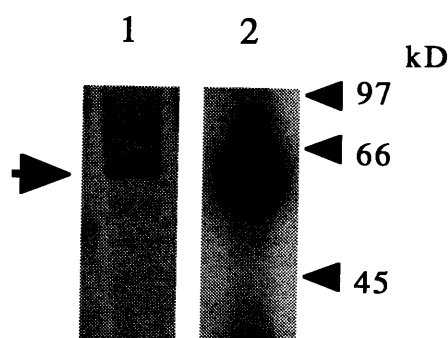


図2-8 IRK キナーゼドメインの自己リン酸化活性の検出
IRK キナーゼドメインをGSTとの融合たんぱく質(59 kD)として精製し、自己リン酸化活性の検出に用いた。矢印は、発現したGST融合タンパク質を示す。レーン2の右側にタンパク質分子量マーカーの位置を示した。レーン1; SDS-PAGE、レーン2; 自己リン酸化活性の検出。

2.3.4. IRK の細胞内局在

IRK の cDNA から導かれたアミノ酸配列から IRK タンパク質は、細胞膜貫通型の受容体型キナーゼと予想された。IRK が受容体型キナーゼとして細胞外からの情報を細胞内へ伝達するためには、細胞膜に局在していることが必要である。そこで IRK の細胞内局在を調べるために IRK のコーディング領域を含む領域を GFP に融合させたタンパク質をパーティクルガンによりタマネギの表皮細胞で一過的に発現させた。10%グリセロールを用いてタマネギ表皮細胞の原形質分離を誘導し、GFP 融合タンパク質の局在を共焦点レーザー蛍光顕微鏡により観察した(図 2-9)。GFP のみのコントロールでは核や細胞質、細胞表層で蛍光が観察され、GFP 蛍光が細胞全体に分布していた(図 2-9B)。IRK と融合した GFP では細胞膜に GFP による蛍光が観察された(図 2-9A)。核および細胞質内における GFP の蛍光は認められなかった。このことから IRK と GFP との融合タンパク質は細胞膜に局在していると判断した。この結果から IRK のアミノ酸配列から予測された細胞膜へのシグナルペプチド配列、膜貫通ドメインは IRK が細胞膜へ局在するために機能的な領域であることが示された。このような IRK

の細胞内局在は、IRK が細胞膜に局在し、細胞外からのシグナルを細胞内へ伝達する受容体型キナーゼとして機能するのに必要な細胞内局在をとることを示唆していた。

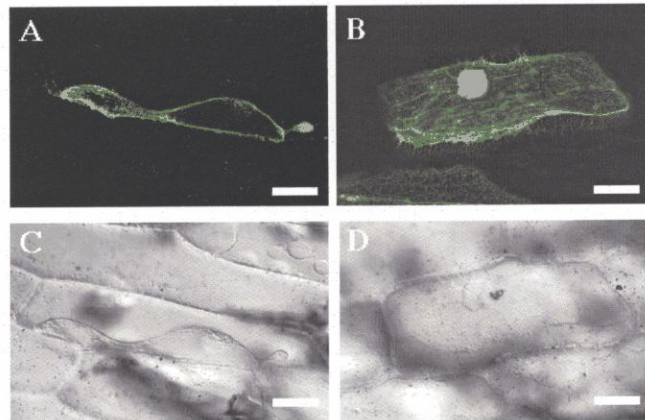


図2-9 IRKの細胞内局在

タマネギ表皮細胞にそれぞれ35S::IRK::GFP (A, C)と35S::GFP (B, D)をパーティクルガンで導入し、10%グリセロールにより原形質分離を誘導した。(A, B)は共焦点レーザー顕微鏡により観察。(C, D)は光学顕微鏡下で観察。スケールバー=50μm

2.3.5. IRK 遺伝子の発現解析

遺伝子の発現時期、組織を知ることはその遺伝子の機能を調べる上で重要な知見を与えてくれる。IRK 遺伝子のコーディング配列の5'上流 2.6 kb には隣接する遺伝子が予想されたことから、この 2.6 kb の領域を IRK のプロモーター配列として用いた。IRK 遺伝子のプロモーター配列の発現特異性を GUS レポーター遺伝子を用いて調べた(図 2-10)。発芽後 6 日目では、主根と側根の根端組織で強い GUS 活性を示した(図 2-10A, B, C)。12 日目の植物体では、根以外に葉の維管束組織で弱い GUS 活性を示していた(図 2-10 D)。生殖生長期における GUS の発現は、組織切片を作成して詳細に調べた。IRK の発現を示す GUS 染色は、茎頂組織や花の心皮の原基、がくで認められた(図 2-10E)。さらに発生の進んだ花でも心皮やがくで IRK が発現していた(図 2-10 F)。ステージ 14 の花の伸長した花糸では GUS 活性が認められたが、ステージ 11 の後期の花の伸長前の花糸では、GUS の染色は認められなかった(図 2-10 H)。また、未熟種子でも GUS の染色がみられた(図 2-10 I)。茎と茎生葉では、GUS 活性は認められな

かった。

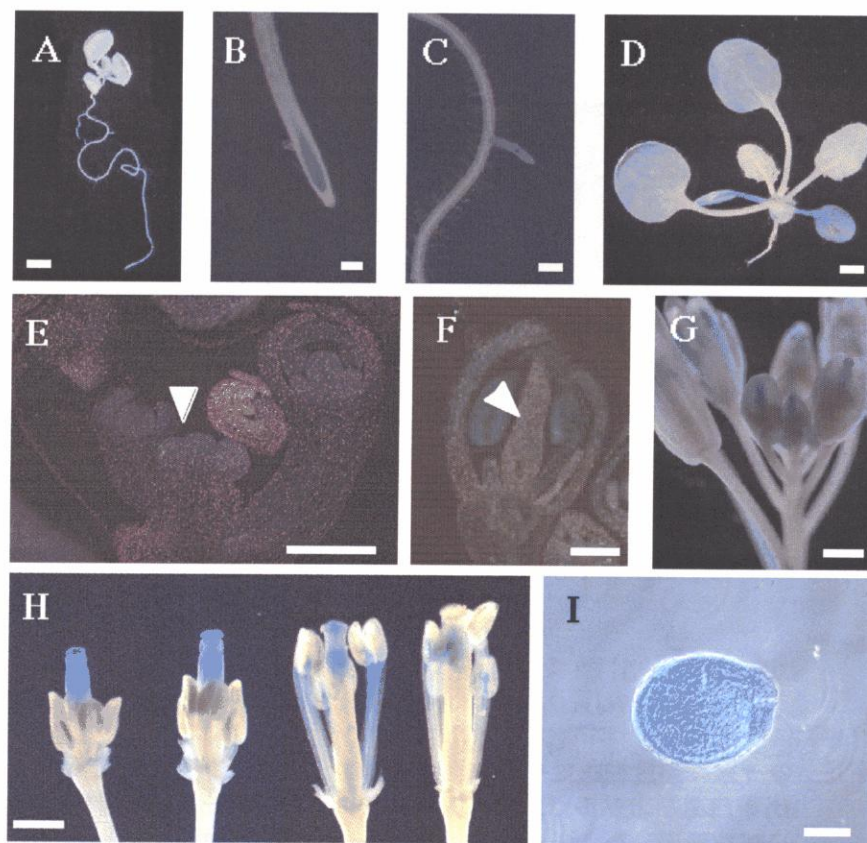


図2-10 *IRK*遺伝子の発現解析

(A)発芽後6日目の芽生え。(B)6日目の芽生えの根端組織。(C)6日目の芽生えの側根。(D)12日目の植物体。(E)暗視野実体顕微鏡による花序分裂組織の観察。矢印は茎頂分裂組織を示している。(F)暗視野実体顕微鏡による花芽の観察。矢印は心皮の位置を示している。(G)花序。(H)花の発生ステージ11から14における心皮と雄しべでのGUS染色のパターン。(I)未熟種子。GUSによる染色は(A-C)が45分、(D-H)が14時間、(I)が3時間それぞれ行った。(A)と(D)のスケールバー=1.0mm、(B)、(C)、(E)、(F)と(I)のスケールバー=100 μ m、(G)と(H)におけるスケールバー=0.5mm。

根端における *IRK* の発現分布を調べるために GUS によるプロモーター解析で用いた *IRK* のプロモーター配列を GFP レポーター遺伝子に繋いだコンストラクトを利用して *IRK* の発現を観察した(図 2-11)。根端における *IRK* の発現は、細胞の分裂と分化が行われている根端分裂組織で最も強く発現しており根端以外の根器官では、中心柱の領域に弱い発現が認められた(図 2-11)。

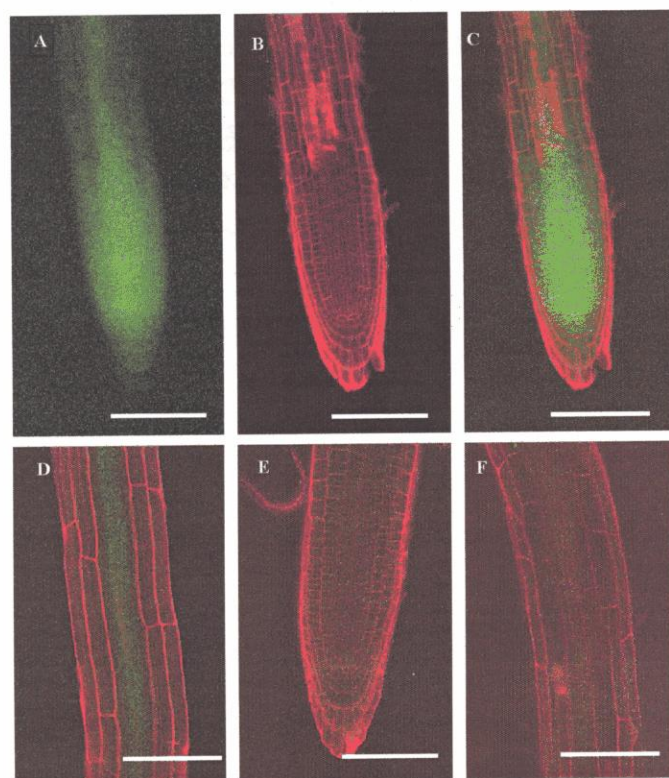
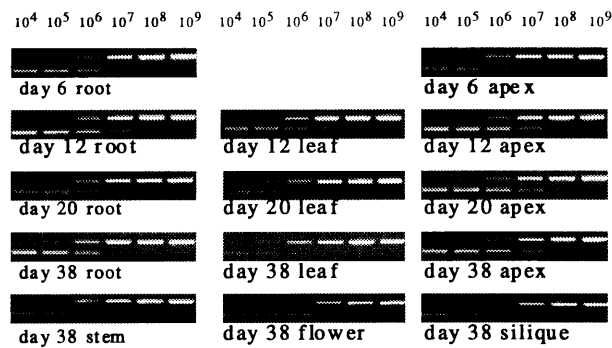


図2-11 GFPレポーター遺伝子による*IRK*遺伝子の根組織での発現
発芽後2日目の芽生えの根における*IRK*遺伝子プロモーターの発現特異性を調べた。(A)、(B)、(C)、(D)は*IRK::GFP*コンストラクトを導入した植物体の蛍光画像。(E)、(F)は野生株の蛍光画像。(A)根端でのGFP蛍光画像。(B)根端でのヨウ化プロピディウムによる蛍光画像。(C)根端におけるGFP(緑)とヨウ化プロピディウム(赤)による二重蛍光画像。(D)根端から約10 mm基部側の根の二重蛍光画像。(E)野生株根端でのGFPとヨウ化プロピディウムによる二重蛍光画像。(F) (D)と同じ位置での野生株の二重蛍光画像。スケールバー = 100 μm 。

シロイヌナズナの各組織における発現量を比較するために competitive RT-PCR により *IRK* の発現量を調べた(図 2-12)。ロゼット葉と茎での発現レベルは、常に低いレベルであった。一方、花序茎頂と根では比較的高い発現レベルを示していた。発芽後 12, 20, 38 日目の花芽を含む茎頂組織での発現レベルの変化から *IRK* 遺伝子の茎頂における発現は、植物体の成長段階に伴って増加していることが示された。鞘での高い *IRK* 遺伝子の発現は、図 2-10 での結果とも考え合わせて、未熟種子での GUS 染色の結果を反映していると考えられた。*IRK*

遺伝子の発現レベルは、生殖生長の進行に伴って増加していた。*IRK* 遺伝子の生殖生長期における発現量の増加は、*IRK* が生殖生長において機能していることを示唆していた。cRT-PCR による根器官での *IRK* 遺伝子の発現解析からは、*IRK* の発現量が植物体の成長につれて減少することを示していた。しかし、植物体の成長につれて根端組織の含まれる割合が減少することを考慮に入れると *IRK* は、根端において恒常的に発現していると考えて矛盾はない。実際、発芽後 24 日目の根端組織の GUS 染色からも根端における *IRK* 遺伝子の発現が確認できており、*IRK* 遺伝子の根端での恒常的な発現を表していると考えられた。

A



B

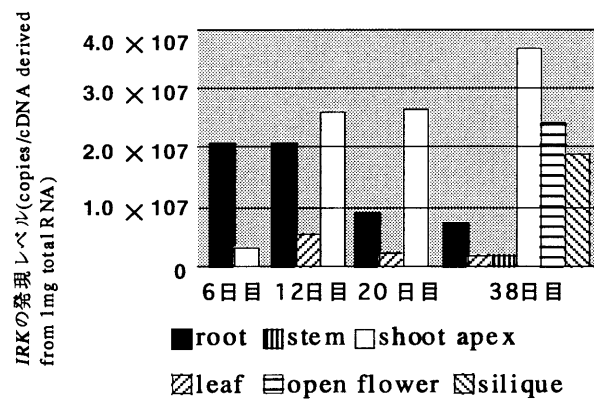


図2-12 cRT-PCRによる *IRK* 遺伝子の発現解析

(A)cRT-PCRの電気泳動写真。500 bpと340 bpのバンドはそれぞれ competitor DNAおよびmRNAの発現を示している。逆転写反応に供与したトータルRNAは発芽後、6、12、20、38日目の植物体から精製した。各PCR反応に使用した competitor DNAのコピー数を写真の上に使用した。6日目の茎頂組織は、子葉と茎頂組織を含む。(B)*IRK* 遺伝子の植物体の生長における相対的な発現量の比較。

2.3.6. *IRK* 遺伝子の発現誘導

遺伝子の発現は、その遺伝子の機能が必要とされる時期と組織において発現することが、植物体の正常な生育に必要である。*IRK* 遺伝子がどのような条件で発現誘導されるかを知ることは、*IRK* の機能を予測する上で重要な知見を与えてくれる。オーキシンの作用として根の伸長や側根形成に関与すること

が報告されていることから、根端組織で発現する *IRK* がオーキシンによる発現制御を受けている可能性を考えた。2,4-D を含む MS 培地にシロイヌナズナの植物体を移植した場合、移植後 7 日目には 10^{-7} - 10^{-6} M で著しい側根の形成が観察され、 10^{-5} - 10^{-4} M では内鞘組織の分裂が活発になって根の肥大化が生じる。そこで *IRK* のプロモーター解析で用いた株を MS 培地で発芽生育させた後に 2,4-D を含む寒天培地に移植し、側根形成や内鞘の細胞分裂を誘導して GUS 染色のパターンを観察した(図 2-13)。これらの植物体での GUS 染色の結果、側根や分裂が著しい内鞘を含む組織で強い GUS 活性が観察された。さらに *IRK::GUS* コンストラクトを導入した植物体をカルス誘導培地に移植してカルス形成についても行った。カルスの GUS 染色ではカルス外周部の細胞分裂活性が高い領域で強い GUS 活性が検出された。これらオーキシン処理やカルスを用いた *IRK* 遺伝子の発現解析から、*IRK* 遺伝子が細胞増殖が活性化した組織で発現することが示された。

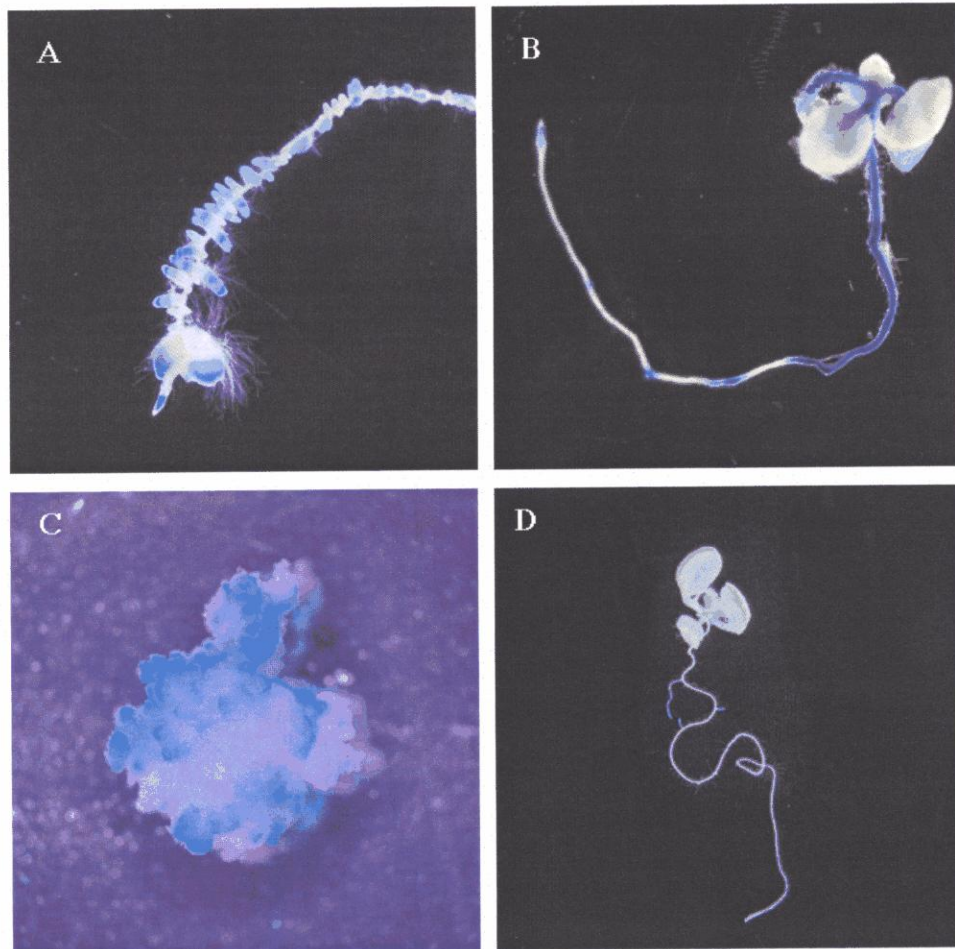


図2-13 植物ホルモンによる*IRK*遺伝子発現への影響
*IRK::GUS*コンストラクトをもつ植物体を植物ホルモンを含む培地で7日間生育させた後にGUS染色を45分間行い、染色パターンを観察した。(A) 10^{-6} M 2,4-Dを含むMS寒天培地 (B) 10^{-5} M 2,4-Dを含むMS寒天培地 (C)カルス誘導培地 (D)MS寒天培地(コントロール)

2.4. 考察

細胞表面に存在する受容体型キナーゼによる細胞間のコミュニケーションは、植物の形態形成において重要な機能を担っていると考えられている。本研究では、ディファレンシャルスクリーニングによって生殖生長期のシロイヌナズナの茎頂で発現していた新規な受容体型キナーゼ遺伝子、*IRK* を単離した。*IRK* は、細胞膜へのシグナル配列、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、キナーゼドメインから構成される遺伝子であった。また、*IRK* のキナーゼドメインは自己リン酸化活性を有し、*IRK* タンパク質は細胞膜に局在することも明らかとなった。さらに *IRK* 遺伝子の特徴としては、細胞外ドメインの LRR モチーフの存在が挙げられた。LRR モチーフは、シグナル伝達や細胞の分化においてタンパク質間の相互作用を介して分子認識に関わるモチーフとして知られている。シロイヌナズナのゲノム配列からは、174 の LRR モチーフを持つ受容体型キナーゼ遺伝子がコードされていることが報告されている。各リピートのアミノ酸配列には芳香族の側鎖をもつアミノ酸やロイシン残基が含まれ、それらのアミノ酸の並び方はほぼリピート間で保存されている。これまでに高等植物で報告されている LRR モチーフもつ受容体型キナーゼ遺伝子としては *HAESA*、*TMK1* (Chang *et al.*, 1992)、*TMKL1* (Valon *et al.*, 1993)、*PRK1* (Mu *et al.*, 1994)、*CLV1*、*ER*、*Xa21* などがクローニングされ、これらの受容体型キナーゼが植物体において重要な役割を担っていることが判ってきた。また、トマトの病原抵抗性遺伝子である *FLS2* も LRR を受容体に持つ遺伝子の一つであるが、*flg22* 遺伝子の産物であるポリペプチドが、そのリガンドであることが示唆されている (Gomez-Gomez *et al.*, 2001)。ポリペプチドをコードする *CLV3* は遺伝学、生化学的解析から *CLV1* のリガンドとして考えられている。動物では、luteinizing hormone/chorionic gonadotropin 受容体がホルモン選択性を決定する因子としてロイシンリッチリピートを用いていることが報告されている (Braun *et al.*, 1991)。また、背腹軸形成に関わるショウジョウバエの *Toll* 遺伝子も細胞膜外にロイシンリッチリピート領域を持つ受容体型キナーゼであり (Hashimoto *et al.*, 1988)、リガンドの結合が細胞内のキナーゼドメインの活性制御を行っていることが知られている (Winans and Hashimoto, 1995)。このように動物においては既に、LRR がリガンドのレセプターとして機能し、さらに細胞内へのシグナル伝達へと繋がっていることが報告されている。しかし、植物の受容体型キナーゼにおいては、どのような機能を植物体で行い、どのようなリガンドを受容しているかについて明らかになった遺伝子は数例に過ぎず、今後の解析が必要な領域である。

解析を行ってきた *IRK* は、受容体型キナーゼとしてこれまでに植物で報告されている遺伝子と共通したドメイン構造を有していた。受容体ドメインである *IRK* の *LRR* については基本的なモチーフは保存しているものの各遺伝子間や同じ遺伝子の各リピート間でもアミノ酸配列に違いが存在していた (図 2-5)。さらに各遺伝子においてはそのリピートの回数も異なっていた。このようなアミノ酸配列の特徴が *LRR* 配列の選択的なリガンド認識に寄与していると考えられた (Kobe and Deisenhofer, 1994)。*IRK* の *LRR* ドメインの両端に存在するシステインモチーフは、受容体タンパク質や、接着タンパク質 (adhesive protein) に保存されている特徴的なモチーフであることが示されている (Kajava, 1998)。ホルモンのレセプターである *LH-CG* レセプターや神経生長因子のレセプターであるチロシンレセプターキナーゼ、細胞接着に関与するコネクチンにも同様なシステインモチーフが *LRR* モチーフの近傍に存在する。*IRK* の *LRR* ドメインの両端についてもシステインモチーフが存在していたことから、*IRK* の *LRR* モチーフについても受容体あるいは、結合タンパク質として機能している可能性が示唆された。

高等植物の受容体型キナーゼの特徴として細胞内にセリン／スレオニンキナーゼドメインを持つことがあげられる。受容体型キナーゼの作用機構としては、動物の受容体型キナーゼのモデルが提唱されている (Ullrich and Schlessinger, 1990)。第一段階としてリガンドが受容体に結合する。この際に受容体が二量体あるいは多量体を形成する。次に、形成した受容体型キナーゼの複合体においてお互いの細胞質ドメインをキナーゼがリン酸化し合う。この現象を自己リン酸化と呼び、キナーゼが互いにリン酸化 (自己リン酸化) することにより受容体型キナーゼが活性化し、細胞内のシグナル伝達経路へとシグナルが伝えられると考えられている。インシュリンレセプターの場合には、自己リン酸化によってチロシンキナーゼの V_{max} が上昇し、活性化状態が維持される。この活性化状態は、リガンドがレセプターから外れても維持されることが知られている (Rosen *et al.*, 1983)。植物の受容体型キナーゼの活性化機構については、植物から多数の遺伝子がクローニングされているにもかかわらず、その活性化機構についてはまだよく判っておらず動物での活性化機構が参照されている状況である。ただ、動物と植物の受容体型キナーゼの大きな違いとしては、動物がチロシンキナーゼを受容体型キナーゼのキナーゼドメインに有しているのに対し、植物のそれはセリン／スレオニンキナーゼを有していることが挙げられる。また動物では、シグナル伝達経路の下流にいくに従ってセリン／スレオニンキナーゼの占める割合が高くなることが知られている。このような違いが動物と植物のシグナル伝達においてどのような違いをもたらしているのかは

、これまでのところは判っておらず、植物の受容体型キナーゼのシグナル伝達機構の詳細な研究が必要であると考えられる。

IRK 遺伝子の発現解析から *IRK* は、茎頂組織、発生中の心皮、未成熟種子、根端組織などの細胞分裂活性が高い組織で主に発現していた。*IRK* の発現パターンと似た発現パターンを示す遺伝子としては、*CycA2;1* や *cyc1At* などの細胞周期に関わる遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子は、細胞分裂が活発な組織で発現している遺伝子である。しかし、*IRK* の発現は、細胞分裂が盛んな組織だけに限らず細胞分裂活性が低い伸長した花糸でも見られていた(図 2-10)。これらの事実から *IRK* の機能は、細胞分裂全般に機能するというよりも組織特異的な機能に関与するものであるのかもしれない。根端での GFP レポーター遺伝子を用いた *IRK* の発現解析からは、*IRK* の発現領域がオーキシンの根における輸送領域と似たパターンを示し *IRK* とオーキシンの関連性が示唆された。

IRK のような受容体型キナーゼでは、細胞間隙を漂うリガンドを受容体が認識することがシグナル伝達の最初のステップとなる。しかし、リガンドが豊富に存在していたとしても細胞表面に受容体が存在しなければシグナル伝達は成立しない。つまり、シグナルを受容する能力が細胞になればシグナル伝達が行えないことになる。今述べたことを裏付けるように発現が誘導される受容体型キナーゼ遺伝子がいくつかクローニングされてきている。例えば、アサガオで発現する受容体型キナーゼは、短日条件で栽培すると発現が誘導されることが知られているし(Bassett *et al.*, 2000)、シロイヌナズナでは、病害やサリチル酸によって発現誘導される遺伝子(Du and Chen, 2000)が報告されている。このことは必ずしも受容体型キナーゼが構成的に発現している必要はなく、必要な時にシグナルを受容できるように細胞表面に受容体を準備すればよいことを示唆している。これまで細胞間シグナル伝達は、単なるリガンドと受容体との結合だけと考えられていたが、シグナルを受容する能力の有無の違いによる調節も考慮する必要があるだろう。このような受容能力の有無は、同じシグナルが個々の細胞に到達した場合にそのシグナルに応答できる細胞とできない細胞が現れることになると考えられる。ショウジョウバエの網膜細胞の分化では、シグナルに対して応答できる能力の有無がその細胞の分化方向を決定する因子の1つであることが報告されている(Xu *et al.*, 2000)。*IRK* については、*IRKpromoter::GUS* コンストラクトを導入した植物体をオーキシンを含む培地に移植することで形成が誘導された側根や細胞分裂が活性化された内鞘組織において *IRK* の発現が誘導された。また、カルスにおいても *IRK* の発現が認められ

、*IRK* が細胞分裂の盛んな部位で発現する傾向があることと、オーキシンと関連性がある可能性が示唆された。

これまでに *IRK* が、受容体型キナーゼとして機能するための構造を有し、*in vitro* の系での自己リン酸化実験からは、キナーゼドメインが自己リン酸化活性を有することを述べてきた。さらに *IRK* タンパク質の細胞内局在の実験からは、*IRK* が細胞膜に局在することが証明された。これらの結果を総括すると *IRK* は、構造モデル(図 2-7)に示したような構造と細胞内局在を採っていると考えられ、*IRK* が受容体型キナーゼとして生体内で機能するために必要なドメイン構造を有していることが明かとなった。また、発現解析の結果からは、花序茎頂組織、根端組織で発現することが判った。以上の特徴から *IRK* は、器官形成が活発な組織で発現する受容体型キナーゼ遺伝子であり、受容体型キナーゼとして機能的な遺伝子であることが示唆された。

3.2 章 IRK 遺伝子の機能解析を目指して

3.1.序論

全ゲノム塩基配列が決定されたシロイヌナズナでは、細胞間、細胞内でのシグナル伝達に機能する遺伝子 (キナーゼ等) が全遺伝子数の 10.4% 存在していることが明かとなっている (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。代謝や転写に関わる遺伝子がそれぞれ 22.5%、16.9% であることを考えるとシグナル伝達が植物において重要な役割を負っていることが推測できる。今述べたことは、シグナル伝達に関与しているキナーゼ遺伝子の数について線虫やショウジョウバエと比較した結果からも示唆されていて、シロイヌナズナがそのゲノム中に 850 以上のキナーゼ遺伝子をコードしているのに対して、線虫では約 400、ショウジョウバエではさらに少なくおよそ 250 しかコードされていないことがわかってきた (Chory and Wu, 2001)。動物と植物においてこのような遺伝子数の差が見られることは、着生である高等植物が巧みに外界からの刺激に応じてその生長を制御していることを反映していると考えられる。細胞間シグナル伝達を担う受容体型キナーゼ遺伝子については、実に 340 の遺伝子の存在がシロイヌナズナで明らかになっている。これらの遺伝子は、レセプタードメイン、膜貫通ドメイン、セリン/スレオニンキナーゼドメインから構成される特徴を持つ (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。これらの遺伝子の中には、病害耐性、分裂組織の維持、ホルモンの受容などにおいて細胞間シグナル伝達に関わっているものが既に知られている。

高等植物における受容体型キナーゼについてもその機能が判った遺伝子は、ごく限られた遺伝子であり、その大半はどのような機能を担っているのか、全く判っていない。受容体型キナーゼの機能は、これからの解析が残された領域である。高等植物が多細胞生物として生存しているのは、まだ機能が明らかにされていないこれら受容体型キナーゼの機能による可能性は十分にあると考えられ、機能未知の受容体型キナーゼがどのような役割を演じているのかを調べることは、高等植物の多細胞性を支える機構を解き明かす糸口になると考えられる。

シロイヌナズナのゲノムプロジェクトからは、高い相同性を示す遺伝子同士が機能的に重複している例がいくつか報告されている (Smyth, 2000)。例えば、*SHP1* (*AGL1*)、*SHP2* (*AGL5*) はアミノ酸レベルで 87% という高い相同性を持つ遺伝子である。この 2 つの遺伝子は、鞘の裂開に必要な遺伝子であり、各々の 1

遺伝子の変異では、表現型が現れないのに対してこれら遺伝子の二重変異体では表現型を示すことが知られている(Liljegen *et al.*, 2000)。これらの高い相同性
を示す遺伝子群の中には、1 遺伝子の変異だけでは、表現型が現れないものも存在することから遺伝子機能の解析を行っていく上で障害となることも多く、これまでの変異体を得て、遺伝学的に解析する方法のみでは、遺伝子の機能を明らかにすることは難しいと予想できる。このように遺伝子機能の冗長性が考えられる場合には、遺伝子の発現や構造などの情報を全て活用してその機能を調べる必要があると考えられた。LRR モチーフを持つ受容体型キナーゼ遺伝子についても遺伝子ファミリーを構成していることが報告されており、これら遺伝子の機能的な冗長性が予想されている。また、LRR タイプの受容体型キナーゼ遺伝子ファミリーの中には、*IRK* と高い相同性
を示す遺伝子の存在も明らかになっており *IRK* の機能解析がこれまでの遺伝学的な解析方法のみでは難しいことを示唆していた。機能解析を行っている *IRK* 遺伝子についても、本論文 1 章で予測された *IRK* タンパク質の構造と細胞膜局在性、自己リン酸化能から機能的な受容体型キナーゼであることが明かとなってきた。さらに発現組織特異性からは、器官形成が活発な組織で主に発現することが明らかになった。しかし、*IRK* を介したシグナル伝達が植物生理においてどのような意味を持つのかは、今のところ予測はできていない。だが、同じ受容体型キナーゼである *HAESA* 遺伝子のように逆遺伝学的な解析によってこれまで遺伝子の機能が不明であったものが明らかになった例も報告されている(Jinn *et al.*, 2000)。発現と構造的特徴から分裂組織の機能に関わると予想された *IRK* 遺伝子の解析を通じて、分裂組織の基本的な機能である器官形成、分裂組織の維持がどのような機構で行われているかを明らかにすることを本研究では目的としてきた。第 2 章においては、*IRK* 遺伝子に関してその遺伝子破壊株、キナーゼドメイン過剰発現株を中心に、これら *IRK* 遺伝子に関した形質転換体の表現型の観察を行い、*IRK* の植物体における役割について解析を進めた。

3.2.材料と方法

3.2.1.形質転換植物の作成

減圧浸潤法(Bechtold and Pelletier, 1998)により形質転換体の作成を行った。アグロバクテリウムは *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif 株を用い、植物体は、*Arabidopsis thaliana* L.(Columbia)を用いた。

形質転換体の選抜

減圧浸潤法により形質転換処理をしたシロイヌナズナから T1 種子を収穫し、MS 寒天培地 (50 µg/ml カナマイシン、0.8%アガー)上で形質転換体を選抜した。

植物体の生育

キナーゼドメイン過剰発現株、*IRK* 変異株、点変異導入株、過剰発現株、野生株の種子を2日間低温処理後、土に播種し、長日条件下(16h 明、8h 暗)で生育させた。

形質転換植物作成に使用したコンストラクトの作成

IRK 遺伝子過剰発現株の作成では、*IRK* のゲノム塩基配列を鋳型にして、PCR により *IRK* の転写開始点の下流 55 bp から終始コドンまでの 3.4 kb を増幅した。プライマーは、次のものを用いた。

5'-*IRK*rec-kpn: 5'-GGGGTACCGCTGCAACATTCTTCGTCGG-3'

Stop type: 5'-TCAGATGAGTTGGGTTCAAGTTGAACTAGTGGTACCGG-3'

PCR による塩基配列の置換が生じていないことを確認後、植物形質転換用プラスミドベクターである pMSH1 の *Kpn* I、*Spe* I サイトにクローニングした。点変異導入 *IRK* 遺伝子の過剰発現株の作成では、*IRK* のキナーゼドメインのサブドメイン II で保存されている 706 番目のリジン残基をグルタミン酸残基に置換するようにリジンをコードしているコドン(AAG)を(GAG)になるように点変異を導入した。点変異(K706E)の導入には、site-directed mutagenesis kit (Clontech)を用いて *IRK* の cDNA 配列に点変異を導入した。変異導入プライマーには、*IRK*mutation: 5'-CCTGTAGCTATCGAGAAGCTCACTGTC-3'

変異体選抜用プライマーには、

pBCselecScaI: 5'-GAATTACAACAGCACTGCGATGAGTGGCAG-3'

をそれぞれ用い、*Sca* I サイトの有無により点変異を生じたプラスミドを選抜した。*IRK* の過剰発現株作成の場合と同様に点変異を持つ *IRK* 遺伝子の cDNA を鋳型にして PCR を行い、pMSH1 の *Kpn* I、*Spe* I サイトに挿入し、コンストラク

トを作成した。

IRK 相同遺伝子の RNAi による発現抑制株の作成では、pBI101.1 を鋳型にして PCR により約 1 kb の GUS 遺伝子の塩基配列を増幅した。5'側のプライマーには *Hpa*I サイトを導入した GUS FH プライマーを 3'側のプライマーには *Sma*I サイトを導入した GUS RM プライマーを用いた。

GUS FH: 5'-GGTTAACCCGCTTCGCGTCGGCATCC-3'

GUS RM: 5'-CCCGGGTCATTGTTTGCCTCCCTGCTG-3'ZZS

PCR 産物を pUC18 の *Sma*I サイトにクローニングした。次に *Xba*I と *Sac*I で GUS 断片を切り出して pBI121 の *Xba*I と *Sac*I にクローニングし、RNAi 用バイナリベクターを作成した。次に *IRK* と相同性が低い LRR ドメインの 400 bp を PCR により増幅した。PCR は、pBS-SKII⁺にサブクローニングしてある *IRK-like* の cDNA を鋳型にし、次のプライマーを用いた。

IRKh5': 5'-CCGGTACCTTCTTTCTTCGCTT TTTACCTCC-3'

IRK_{homo}RNAi3': 5'-CCACTAGTCAGTTGGAGAGAGTCTGTGG-3'

増幅した断片を *Xba*I、*Eco*RI により処理して RNAi 用ベクターの *Xba*I、*Hpa*I サイトを導入し、アンチセンス鎖とした。また *Sac*I、*Eco*RI で PCR 産物を処理して RNAi 用ベクターの *Sma*I、*Sac*I に導入することでセンス鎖とし、35S::Antisense-GUS-Sense コンストラクトを完成した。

3.2.2.T-DNA タギングラインからの *IRK* 遺伝子破壊株のスクリーニング

かずさ DNA 研究所の 23,808 ラインからなる T-DNA タグラインより PCR による *IRK* 遺伝子破壊株のスクリーニングを行った。用いたプライマーは、*IRK* 遺伝子特異的に認識する 5'端プライマーと 3'端プライマーさらに、T-DNA の LB 配列および RB 配列を認識するプライマーで、これら 4 つのプライマーによる 4 つの組み合わせにより PCR 反応をおこなった。スクリーニング方法の詳細はかずさ DNA 研究所より提供されているプロトコールに従った。

IRK 認識プライマーとして次の 2 つのプライマーを使用した。

IRK-T-DNA5: 5'- TTGGCCGAAATGTAGCCGTTGAGATAGATT-3'

IRK-T-DNA3: 5'-TGGTTCAGAACCTGAAATGAAGACTACAGGCT-3'

1 次スクリーニングの PCR により増幅されたバンドについては、サザンブロット解析と塩基配列の決定を行い、*IRK* 遺伝子に T-DNA 断片が挿入されていることを確認した。さらに 3 次元プールからの 2 次スクリーニングにより 1 ラインの植物体にまで絞り込み、T-DNA 挿入変異株を取得した。また、T-DNA 配列の *IRK* 遺伝子内への挿入の確認は、T-DNA 配列を挟み込むように設計した IRK-T-DNA5 と IRK-T-DNA3 のプライマーを使用した。野生株にのみ認められる 260 bp の増幅断片の有無で判断した。

3.2.3. RT-PCR による *IRK* および *IRK-like* 遺伝子発現の検出

発芽後 6 日目の植物体の根、5 週目のシロイヌナズナ(コロンビア)の花序茎頂と花組織から常法に従いトータル RNA を抽出した。1st strand cDNA synthesis kit (Amersham Pharmacia)を用いて 1 μ g のトータル RNA から first strand cDNA を合成した。プライマーは、それぞれ

IRT3N: 5'-TCCCTCTAACTCATTCCTCG-3'

IRTh3N: 5'-CCACTAGTCAGTTGGAGAGAGTCTGTGG-3'

を使用した。

PCR は、first strand cDNA 反応液の 1/5 量を鋳型に使用した。

IRK 遺伝子検出用のプライマーには

IRT5N: 5'-TCTGTTCAACGGAGAAGAGG-3' と IRT3'N を用いた。

IRK-like 遺伝子の検出には、

IRTh5N: 5'-GGGTCCTTGAGGTCCGTTTCC-3' と IRTh3'N を用いた。

PCR には Ex taq DNA ポリメラーゼ (TAKARA)を使用し、反応は、95℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 30 秒を 1 サイクルとして 25 サイクルおこなった。2% アガロースゲルで電気泳動し、RT-PCR 産物を確認した。

IRK 過剰発現株および変異 *IRK* 過剰発現株での導入遺伝子の発現解析

カナマイシン耐性株として得られた *IRK* 過剰発現株 6 ラインと変異 *IRK* 過剰発現株 9 ラインの T1 世代の花序茎頂組織からそれぞれ既述の方法に従いトータル RNA を調整した。*IRK* 遺伝子の cDNA 塩基配列 400 bp をプローブとして常法に従ってノーザンブロット解析をおこなった。*IRK* 過剰発現株の発現解析には各レーン 3 μ g、変異 *IRK* 過剰発現株の発現解析には各レーン 5 μ g のトータル RNA を供した。ローディングコントロールとして、*ACT8* 遺伝子の発現量を参照した。

3.2.4. *IRK-like* 遺伝子発現抑制株の発現解析

ノーザンブロット法により *IRK-like* 遺伝子の発現量を調べた。*IRK-like* の RNAi 抑制株(T 1 世代)9 ラインからそれぞれ約 30 mg の花序茎頂組織を採取し、既述した方法によりトータル RNA を調製した。各レーン 10 μ g のトータル RNA を供与し、1.0%ホルムアルデヒド/アガロースゲルで電気泳動した。以後、既述した方法に従って操作した。*IRK-like* のプローブには、400 bp の cDNA 断片(RNAi に用いた領域は含まない)を用いた。ローディングコントロールとして *UBQ5* 遺伝子の発現を参照した。

3.2.5.cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の解析

IRK の T-DNA 挿入変異株 (*irk-1*)、キナーゼドメイン過剰発現株、野生株(コロンビア)それぞれを MS 寒天培地(0.8%アガー、1%ショ糖)、全日長条件下で2週間生育させた後、植物体の根組織からトータル RNA を精製した。それぞれ 40 µg のトータル RNA を cDNA マイクロアレイに供した。プローブには生殖生長期花序茎頂、栄養生長期花序茎頂、葉、根由来の cDNA ライブラリーから独立した 5722 の遺伝子クローンを使用し、アミノ基誘導型シランコーティングスライドガラスにアレイヤー (SPBIO 2000、日立ソフトウェアエンジニアリング)を用いてスポッティングした。マイクロアレイの画像化には、Scan Array 4000 (ビーム機器)を使用しマイクロアレイによる解析を行った(安藤、2001)。

3.2.6.*IRK* 相同遺伝子(*IRK-like*)のクローニング

シロイヌナズナ (コロンビア) 野生株の花序茎頂組織由来の cDNA ライブラリー(λ ZAPII)からファージ DNA を精製した。精製したファージ DNA を鋳型にして KOD DNA ポリメラーゼによる *IRK* 相同遺伝子のクローニングを行った。プライマーは、次の2つのプライマーを使用した。

IRKh5': 5'-CCGGTACCTTCTTTCTTCGCTTTTTACCTCC-3'

IRKh3': 5'-CCACTAGTGAGGATTGATTCATCTGTAGTTG-3'

PCR は、95℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 1 分を1サイクルとして 45 サイクルの反応を行った。3kb の PCR 増幅産物を pBS-SKII⁺の *Kpn* I、*Spe* I サイトにクローニングした。クローニングした断片が *IRK* の相同遺伝子であることを確認するために、クローニングした断片の両端の約 500 bp の塩基配列を決定した。

二重変異体の作成

ノーザンブロットおよび RT-PCR により発現量の減少が確認された *irk-1* と *IRK-like*RNAi 変異株のラインを用いて交配を行った。交配で得られた F2 植物体から PCR により T-DNA 配列、RNAi コンストラクトを持つ植物体を選抜し、2重変異体を得た。

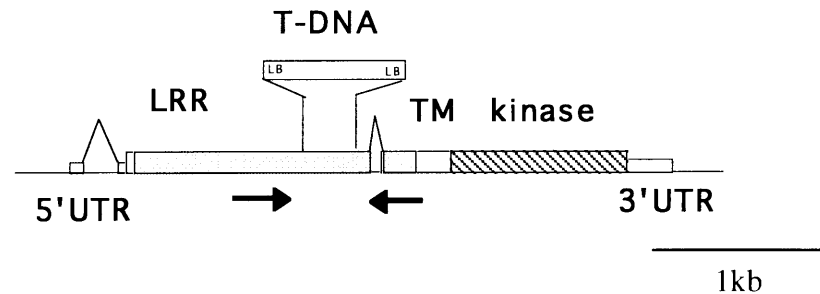
3.3.結果

IRK は受容体型キナーゼとして機能的であることが明らかになったことから *IRK* を介したシグナル伝達が多細胞生物である植物体の形成に重要な役割を担っていることが予想された。そこで第2章では *IRK* の植物体での機能を明らかにすることを目標に *IRK* 遺伝子に関する形質転換植物体をシロイヌナズナを用いて作成し、その表現型からの機能予測を試みることにした。*IRK* 遺伝子の発現は形態形成が活発に行われている花序組織、根端組織であることから、形質転換植物に現れる変化としては花序や根において形態的な異常として現れることが期待された。そこで *IRK* 遺伝子の機能を解明するために *IRK* に関する形質転換体を作成して野生株との形態的な変化の観察を行った。

3.3.1. *IRK* 遺伝子破壊株の同定

IRK 遺伝子が破壊されている植物体は遺伝子の機能が完全に欠失していると期待できることから、機能を知る上で有用な情報が得られることが多い。そこで *IRK* 遺伝子の破壊株を取得するために、かずさ DNA 研究所から公開されているシロイヌナズナの T-DNA タグラインから破壊株の取得を試みた。23,808 のラインからなる T-DNA タグラインから PCR によるスクリーニングを行ったところ、*IRK* の LRR ドメインに T-DNA 配列のインサートをもつラインを1つ選抜することができた(図 3-1A)。得られた *IRK* 破壊株について花序茎頂における *IRK* 遺伝子の発現量を RT-PCR により評価した。供与して頂いた T2 世代の植物から T-DNA をホモに持つ T2 世代3個体を PCR により選抜した。これら3個体の T3 世代の植物体からそれぞれトータル RNA を抽出し RT-PCR をおこなった。野生株では、*IRK* の発現を示す 260 bp の増幅断片が得られたが、T-DNA タグラインの3個体からは、増幅断片は生じなかった(図 3-1B)。この結果から *IRK* の T-DNA 配列挿入変異株においては、*IRK* の発現が消失していることが確認できた。以後、*IRK* の T-DNA 挿入による破壊株を *irk-1* と表記した。形質転換体 T3 世代について人工気象器(長日条件下; 16h 明、8h 暗)で生育し、表現型の観察を行った。植物体の観察では、*IRK* の発現が観察された花序茎頂や花器官における形態的な変化、根における主根の伸長や側根の形成を中心に調べた。しかし、表現型の違いは観察されなかった。また、稔性の低下もみられなかった。

A



B

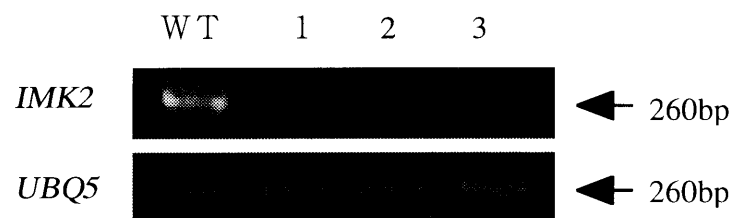


図3-1 T-DNAタグラインからのIRK遺伝子破壊株(irk-1)の探索と発現解析

(A) かずさDNA研究所の23,808のT-DNAタグラインから1ラインの*IRK*遺伝子破壊株をPCRによるスクリーニングにより取得した。*IRK*のLRRドメインにT-DNA配列の挿入が確認できた。PCRに用いたプライマーの位置を矢印で示した。TM: 膜貫通ドメイン。(B) RT-PCRにより*IRK*遺伝子の発現の有無を確認した。

T2世代でT-DNA配列ホモ接合体であった3ラインについてそれぞれのT3世代の植物体の花序茎頂組織からトータルRNAを抽出し、RT-PCRによる*IRK*遺伝子の発現解析を行った。コントロールとして野生株(コロンビア)を用いた。

3.3.2. IRK キナーゼドメイン過剰発現株の同定

IRK のキナーゼドメインを過剰に発現させることによりリガンド分子に依存しないキナーゼの活性化を誘導し、*IRK* を介したシグナルが恒常的に活

性化した植物体の作成を試みた。IRK のキナーゼドメインに相当する 685 番目のアミノ酸残基からストップコドンまでの領域を植物体で過剰発現させた。T1 世代からノーザンブロット解析により 1.3 kb のシグナルとしてキナーゼドメインの過剰発現が確認された株を以降の解析に用い、このキナーゼドメインの過剰発現株を IRK(KD)と表記した(図 3-2)。1 コピーのインサートを持つホモ接合体について人工気象器(長日条件下; 16h 明、8h 暗)で育成し、*irk-1* 同様に IRK(KD)の表現型の観察を行ったが、野生株との表現型の違いは見られなかった。

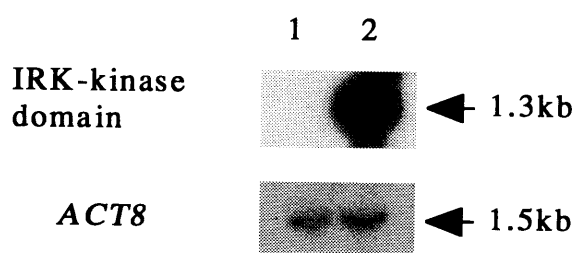


図3-2 IRK キナーゼドメイン過剰発現株の発現解析
*IRK*のキナーゼドメインをCaMV35Sプロモーター制御下過剰発現させた。各レーン10 μ gのトータルRNAを泳動した。レーン 1; 野生株、レーン 2; IRKキナーゼドメイン過剰発現株。ローディングコントロールとしてACT8遺伝子をプローブに使用した。

3.3.3. *IRK* 遺伝子過剰発現株の同定

IRK を CaMV の 35S プロモーターの制御下で過剰発現させることによって、異所的に発現した *IRK* による植物体への影響を調べることにした。また過剰発現によってシグナルに対する感受性が高くなることも期待され、これら 2 つの可能性をもとに植物個体への影響を調べることにした。これまでに 6 ラインの *IRK* 過剰発現用コンストラクト導入株をカナマイシン耐性株として取得した。得られた形質転換植物体において目的どおりに *IRK* の過剰発現を行っているかどうかを確認するために、カナマイシン耐性株として得られてきた植物体の *IRK* 遺伝子の発現量を調べた(図 3-3)。ノーザンブロット解析から *IRK* の過剰発現によるシグナルは約 3.6 kb のバンドとして検出され、6 個体で *IRK* の過剰

発現を確認することができた。以後、IRK の過剰発現株を 35S-IRK と表記した。形質転換体 T2 世代について人工気象器(長日条件下; 16h 明、8h 暗)で育成し、上述した表現型の観察を行ったが表現型の違いは観察されなかった。

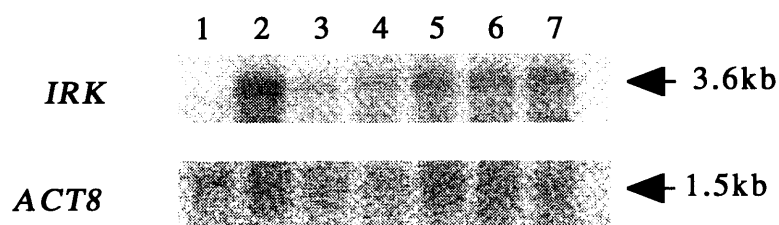


図3-3 IRK過剰発現株の発現解析

IRK遺伝子をCaMV35Sプロモーター制御下過剰発現させた。

6つの独立したT1世代の花序茎頂組織由来のトータル RNAを用いて

IRKの発現解析を行った。レーン1;野生株、レーン2から7;

IRK過剰発現株。ローディングコントロールとしてACT8遺伝子を

プローブに使用した。

3.3.4.点変異を導入した IRK 遺伝子過剰発現株の同定

キナーゼの保存されているサブドメイン II にあるリン酸化活性に必須の 706 番目のアミノ酸残基に位置するリジンをグルタミン酸に置換する点変異を導入し、自己リン酸化活性の欠失した点変異を有する IRK を作成することにした(Horn and Walker *et al.*, 1994)。点変異(K706E)を持つ IRK を CaMV35S プロモーター制御下、植物体で発現させることにした。一般に受容体型キナーゼ遺伝子がリガンドを受容して活性化する際に二量体を形成して自己リン酸化(相互リン酸化)することが知られている(Ullrich and Schlessinger, 1990)。このことからリン酸化活性を欠失させた変異 IRK を植物体で過剰発現させた場合、正常な IRK と二量体を形成して、相互リン酸化を阻害することが予想される。このようにドミナントネガティブ型の IRK が IRK を介したシグナル伝達を抑制することを期待した。これらの各ラインについて変異型 IRK 遺伝子の発現量をノーザンブロット解析により調べた。8 ラインの形質転換体(T1 世代)において約 3.6 kb の変異型 IRK の発現を示すバンドが得られた(図 3-4)。以後、点変異を持つ IRK の過剰発現株を IRK(K750E)と表記した。形質転換体 T2 世代について人工気象器(長日条件下; 16h 明、8h 暗)で育成し、上述したとおりに表現型の観察を行ったが、表現型の違いは観察されなかった。

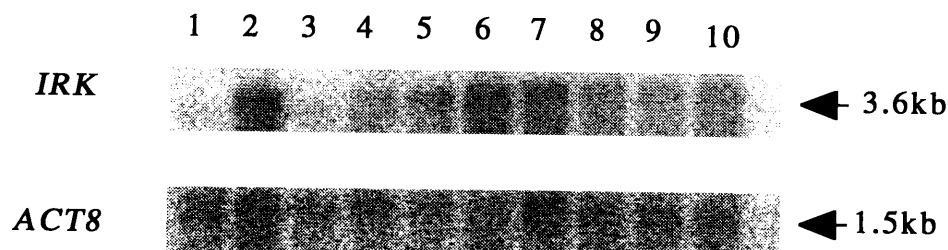


図3-4 点変異導入*IRK*過剰発現株の発現解析

点変異を持つ*IRK*遺伝子をCaMV35Sプロモーター制御下過剰発現させた。

得られた9つの独立した形質転換体(T1世代)について花序茎頂組織

由来のトータル RNAを用いてノーザンブロット解析を行った。レーン1;野生株、

レーン2から10; *IRK*過剰発現株。ローディングコントロールとして*ACT8*遺伝子をプローブに使用した。

3.3.5. *IRK* に高い相同性を示す遺伝子

これまでに観察してきた *IRK* 遺伝子に関する変異体や各種形質転換ラインの解析からは、花序や根における形態的な表現型は観察されなかった。そこで表現型が観察されなかった理由としては、*IRK* と機能的に重複した遺伝子(相同遺伝子)が存在する可能性と、*IRK* を介したシグナル伝達以外の別のシグナル伝達経路が *IRK* に代わって *irk-1* 変異株や *IRK*(KD)過剰発現株で機能する可能性の二つが考えられた。そこで、*IRK* と相同性を示す遺伝子の存在の有無、さらに *IRK* と機能的に重複する可能性について考えた。

シロイヌナズナのゲノムプロジェクトからシロイヌナズナが相同性の高い遺伝子を重複してゲノムにコードしていることが明かとなってきた。また、それら遺伝子が重複した機能を持つ例が報告されている。このような例が報告されてきたことから *IRK* についても高い相同性を示す遺伝子と機能的な重複をもつ可能性が考えられた。*IRK* のアミノ酸配列を用いた BLAST による検索から *IRK* と最も高い相同性を示した遺伝子は ATT20L15 16(以後 *IRK-like* と命名)であった。*IRK-like* は *IRK* と同様にロイシンリッチリピートをレセプターに持つ受容体型キナーゼ遺伝子をコードしていた。*IRK* と *IRK-like* 間での各ドメインにおける相同性を図 3-5 に示した。アミノ酸配列での比較からレセプタードメ

イン間では約 51%の相同性が、キナーゼドメイン間では、約 68%の相同性をもつことがわかった。一般に、セリン／スレオニンキナーゼ間の相同性の値が 30～40%であることからしても *IRK* と *IRK-like* のキナーゼドメインには有意な相同性があるといえる。さらにこれまでに報告されている植物由来の受容体型キナーゼのキナーゼドメインのアミノ酸配列を用いて系統樹を作成し、他の受容体型キナーゼのキナーゼドメインと *IRK* のキナーゼドメインがどのように分類されているのかを系統樹にまとめた (図 3-6)。系統樹からも *IRK* と *IRK-like* 遺伝子のキナーゼドメインが互いに最も高い相同性を示すことが判った。さらに、*ARK1* と *SRK-910* はともに S-domain を持つ遺伝子であるが系統的に近い位置に存在していた。花粉で発現する受容体型キナーゼである *PRK1* と *LePRK1* についても近い位置に存在していた。植物の形態形成に関与している *CLV1*、*HAESA*、*ER* といった遺伝子についても比較的近縁であることを示していた。系統樹に見られた各遺伝子のキナーゼドメインの位置関係は、機能的に似た遺伝子群が系統樹においても近い位置に存在する可能性が高いことを示唆していた。*IRK* とその相同遺伝子である *IRK-like* についても互いに近縁な関係にあったことから、これらの遺伝子が機能的に似た遺伝子である可能性を持つことが考えられた。また、*IRK-like* 以外に *IRK* と相同性を示していた遺伝子としては *At3g28040*、*At1g62950*、*At1g12460* の 3 つの遺伝子が存在していた。

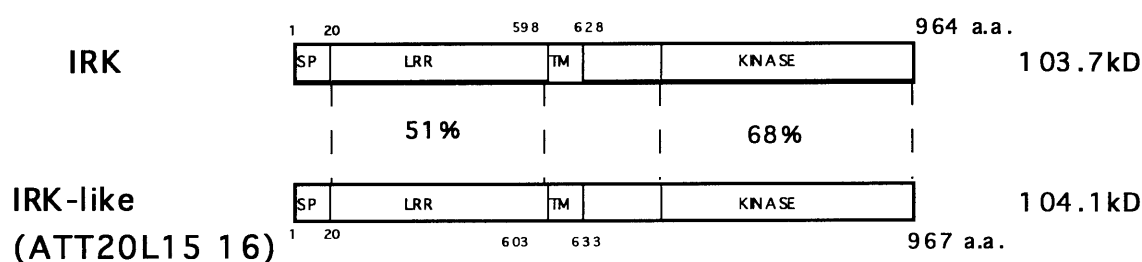


図3-5 *IRK*と*IRK-like*の各ドメイン間での
アミノ酸配列の相同性比較

*IRK*についてはcDNA塩基配列、*IRK-like*についてはゲノムDNAから予測されたアミノ酸配列を用いてLRRドメインおよびキナーゼドメイン間の相同性を比較した。概略図の右には各遺伝子産物の推定分子質量を示した。

SP:シグナルペプチド配列、LRR:ロイシンリッチリピートドメイン。

TM:膜貫通ドメイン、KINASE:セリン／スレオニンキナーゼドメイン

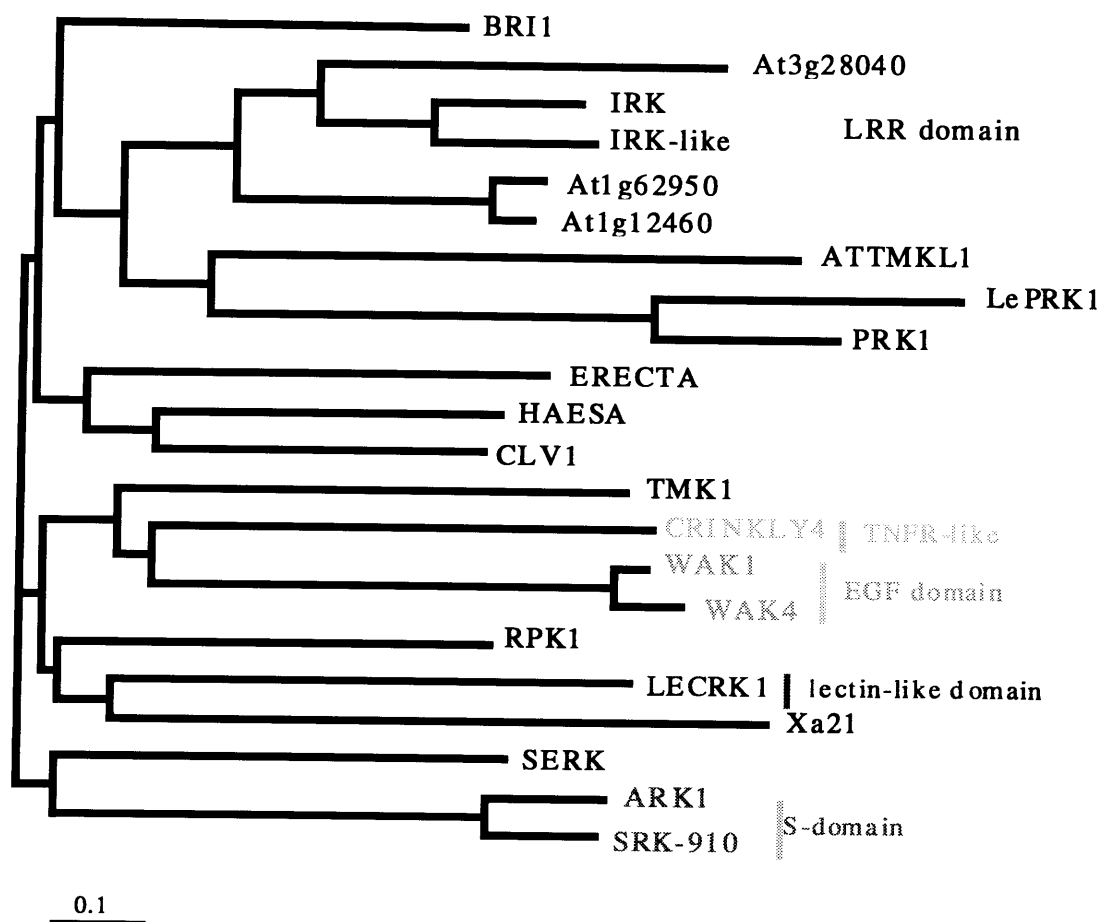


図3-6 高等植物で報告されている主な受容体型キナーゼ遺伝子のキナーゼドメインのアミノ酸配列の系統樹

Clustal Wにより各遺伝子のキナーゼドメインのアミノ酸配列についてアライメントを作成し、TreeViewを用いて系統樹を作成した。受容体ドメインにLRRモチーフを持たない遺伝子については、遺伝子名の後ろに受容体ドメインを構成しているモチーフ名を記述した。系統樹作成に用いた遺伝子のaccession No.を示す。IRK(T49038),IRK-like(T48210),ARK1(M80238),SRK910(JQ1677),SERK(T14354),ERECTA(U47029),RLK5(P47735),CLV1(U96879),RPK1(U55875),TMK1(L00670),CRINKLY4(U67422),WAK1(AJ009696),WAK4(AJ009695),BRI1(AF017056),ATTMKL1(X72863),LePRK1(U58474),PRK1(L27341),LECRK1(AF001168),Xa21(U72723)

3.3.6. *IRK* と *IRK-like* 遺伝子の発現解析

IRK と *IRK-like* 遺伝子が機能的に重複するための必要条件としてこれらの遺伝子が同じ組織で機能していることが必要である。そこで *IRK* と *IRK-like* 遺伝子の発現を RT-PCR によって調べた。シロイヌナズナ野生株のつぼみを含

む茎頂、花、根の各組織から抽出したトータル RNA を用いて RT-PCR を行った。その結果、*IRK* については 645 bp、*IRK-like* については 570 bp の PCR 増幅断片が生じ、両遺伝子が花序茎頂、花、根において共に発現していることが示された (図 3-7)。

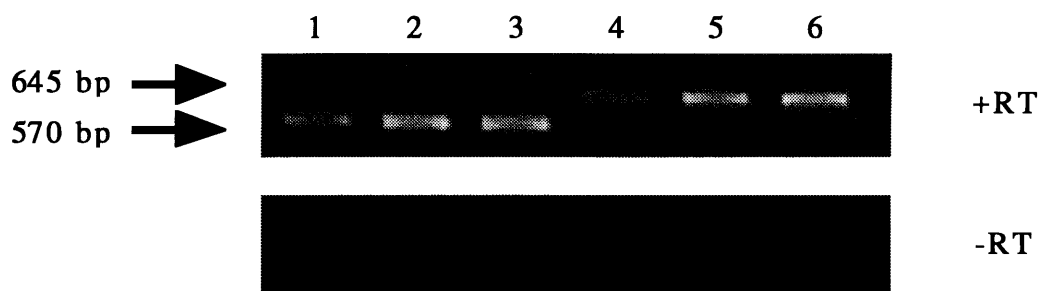


図3-7 *IRK* と *IRK-like* の発現組織

RT-PCRにより*IRK*と*IRK-like*遺伝子の発現している組織を調べた。レーン1から3は*IRK*の発現を、レーン4から6は*IRK-like*の発現を示した。レーン1と4は根、レーン2と5はつぼみを含む茎頂、レーン3と6は開花した花由来のトータルRNAをそれぞれ用いた。それぞれ*IRK*は570 bp、*IRK-like*は645 bpの増幅バンドとして検出された。上段は逆転写反応後PCRを行った。下段は逆転写反応を行わずにPCRを行った。

3.3.7. *IRK-like* 遺伝子の発現抑制株の発現解析

IRK とのアミノ酸配列での高い相同性から *IRK-like* 遺伝子が *IRK* 遺伝子と機能的に重複しているならば、二重変異体の解析が有効であると考えられる。そこで *IRK* 遺伝子と *IRK-like* 遺伝子の二重変異体を作成するために *IRK-like* 遺伝子の変異株を作成することにした。かずさ DNA 研究所の 23,808 の T-DNA タグラインからの PCR によるスクリーニングでは、破壊株を得ることができなかった。そこで *IRK-like* 遺伝子の発現抑制株を、最近シロイヌナズナにも応用可能であることが報告された RNA 干渉法(以下 RNAi と表記)によって作出することを試みた(Chuang and Meyerowitz, 2000)。RNAi は、元々は線虫において遺伝子の発現を抑制する方法として開発された。Chuang らの報告からシロイヌナズ

ナについても最近、この RNAi を利用した遺伝子発現の抑制が効果的であることが証明された。*IRK-like* について変異体を取得するために *IRK-like* 遺伝子について RNAi のコンストラクトを作成し、シロイヌナズナのゲノムへアグロバクテリウムを介して導入した。これまでにカナマイシン耐性を示した形質転換体 32 ラインを取得し、その内の 9 ラインについてその発現抑制の効果をノーザンブロット解析により調べた (図 3-8)。野生株では、約 2.85 kb の大きさに *IRK-like* 遺伝子の発現を示すシグナルが認められたが、形質転換植物体では、*IRK-like* の発現は確認できなかった。このことから RNAi によって *IRK-like* 遺伝子の発現を抑制できたことが確認できた。これら RNAi により *IRK-like* の遺伝子発現が減少した植物体の T1 世代について形態的な影響が表れるかどうかを人工気象器で生育させ調べたが形態的な影響は観察されなかった。さらに *irk-1* と *IRK-like* の RNAi 株との交配による二重変異体の作成を試みた。しかし、交配によって得られた植物体では、T-DNA の挿入により安定的に破壊されている *IRK* の発現は無いことが確認できたが、*IRK-like* の発現は減少しておらず、二重変異体の作成はできなかった。今後二重変異体が致死になる可能性についても検討する必要があると考えられた。*IRK* と *IRK-like* が機能的に重複している可能性が高いことは示唆されたが、実際に *IRK* と *IRK-like* が機能的に重複しているかは、明らかにできなかった。

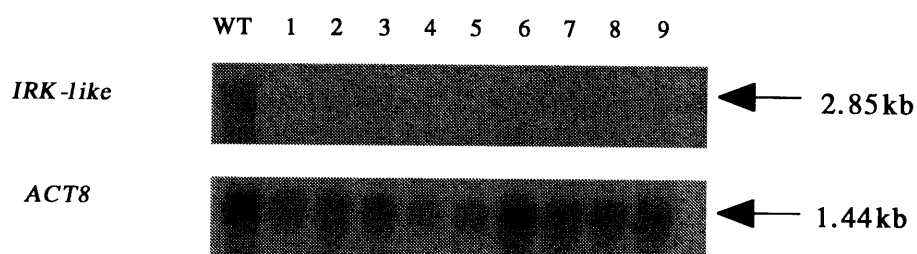


図3-8 *IRK-like* 遺伝子の RNAi による発現抑制株の発現解析
 野生株 (コロンビア) と RNAi コンストラクトを導入した T1 世代の植物体 9 ラインについてトータル RNA を用いたノーザンブロット解析を行った。各レーン 5 μ g の花序茎頂組織由来のトータル RNA を供した。ローディングコントロールには、*ACT8* 遺伝子をプローブに用いた。

3.3.8.cDNA マイクロアレイによる *irk-1* での遺伝子発現の評価

シロイヌナズナの全ゲノム塩基配列が決定された(The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000)ことから遺伝子の塩基配列情報をもとにその遺伝子の生物体における機能を明らかにする逆遺伝学的な解析が増えている。しかし、それら遺伝子の1遺伝子での変異体の解析からは、表現型が現れない例が報告されており、遺伝子機能の解析を進めるに当たって大きな問題となっている(Liljegren et al., 2000)。解析を進めている *IRK* についても *irk-1*、*IRK(KD)*において表現型が観察されなかったことから、*IRK* 相同遺伝子の機能的重複の可能性に加え *IRK* の機能を補うような遺伝的経路の存在が考えられる。

近年、表現型が現れない遺伝子の変異体に対して多数の遺伝子の発現量や代謝産物の蓄積量の変化(Raamsdonk et al., 2001)を解析することによって、その遺伝子の機能を予測する試みが行われている。表現型が現れない変異体におけるこのような試みは、発現量が野生株と比べて変異株で変化している遺伝子の中から、*IRK* のシグナルの下流で発現調節を受けている遺伝子や *IRK* の機能を肩代わりしている遺伝子の候補を探索することによって *IRK* の機能を予測することを目的としている。そこで、*IRK* 遺伝子単独の変異株では表現型が認められなかったこと、*IRK* と *IRK-like* との二重変異体の解析ができなかったことから、多数の遺伝子発現を評価できる cDNA マイクロアレイを用いて *irk-1*、*IRK(KD)* について野生株との遺伝子発現の変化を評価することにした。以降の解析では、*IRK* が根端分裂組織においても発現していたことから、根端における *IRK* の機能を中心に解析を行った。

cDNA マイクロアレイを用いて *irk-1* と野生株間での根器官での遺伝子発現の変化を比較した。*irk-1* では *IRK* を介したシグナル伝達が行われなくなるために、*IRK* によるシグナル伝達の下流に位置する遺伝子の発現や *IRK* を介したシグナル伝達の機能を肩代わりする遺伝子の発現が変化することが予想された。cDNA マイクロアレイの結果、野生株と比べて発現が上昇している遺伝子とその逆に、発現が減少している遺伝子が認められた(図 3-9(A)、表 3-1)。これらマイクロアレイ解析で発現量が変化した遺伝子についてノーザンブロット解析を行い、発現量の変化を確認した(図 3-10)。野生株と比べて発現上昇が認められた遺伝子としては、glutathione S-transferase(GST)と相同性を持つ *Early-Responsive to Dehydration stress (ERD)13* (Kiyosue et al., 1994)、EST として単離された機能未知遺伝子(AV566692、AA597438、AV549114)などの発現量が増加していた(表 3-1)。逆に、発現の減少が認められた遺伝子としては、*IRK* 以外に *Histone H1-3* が

認められた。*ERD13* は、乾燥ストレスの初期に発現誘導される遺伝子として報告されているがその機能については、明らかにされていない。*EST* クローン (AV566692、AA597438、AV549114) については既知のタンパク質モチーフとの相同性は、認められなかった。*Histone H1-3* についても、乾燥ストレスにより発現誘導される遺伝子であることが報告されているがその機能についてはわかっていない (Ascenzi and Gantt, 1997)。*irk-1* で発現量が変化した遺伝子の多くは、乾燥ストレスに関与するものであった(表 3-2)。

次に、*IRK(KD)* と野生株について遺伝子発現の変化を調べた。*IRK(KD)* では、過剰発現させた *IRK* のキナーゼドメインが恒常的にシグナル伝達経路を活性化させることを期待した。恒常的な活性化状態を疑似的に作り出すことによって *IRK* の下流で発現調節を受けていると予想される遺伝子を探索することを試みた。マイクロアレイによる過剰発現株と野生株間での解析から発現量が変化した遺伝子を示した(図 3-9B、表 3-3)。また、*irk-1* の解析と同様にこれら発現の変化を示した遺伝子についてノーザンブロット解析により確認した(図 3-11)。*IRK* 遺伝子の発現が野生株より約 20 倍発現量が上昇したのを始め、putative ribosomal protein や *senescence5* 遺伝子が発現上昇を示した。リボソームタンパク質をコードする遺伝子については、2 倍よりも発現量は少ないもののその他のリボソームタンパク質遺伝子においても発現量が増加する傾向にあった。発現量が減少した遺伝子としては硝酸還元酵素(*NR1*)などの遺伝子が認められた(表 3-4)。

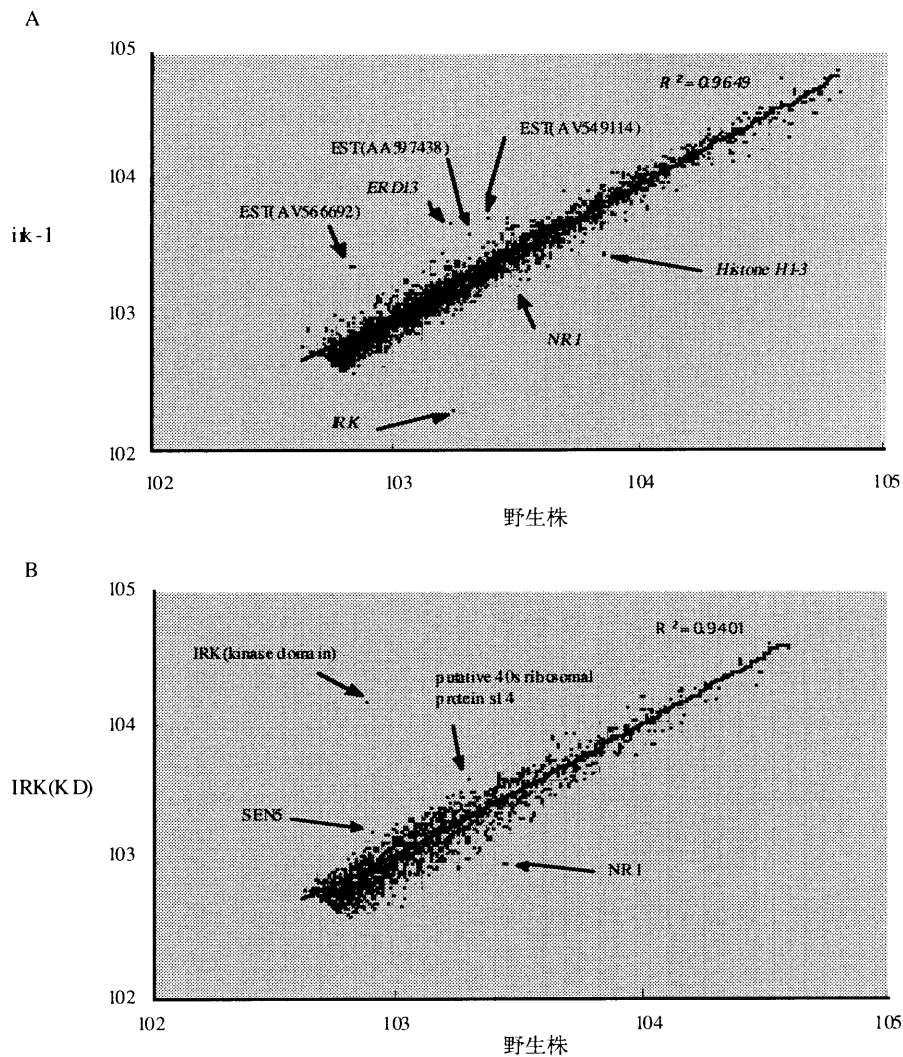


図3-9 マイクロアレイによる遺伝子発現の解析

(A) *irk-1*変異体における遺伝子発現の散布図。縦軸は*irk-1*由来の遺伝子発現を示す蛍光強度、横軸は野生株由来の遺伝子発現を示す蛍光強度を示す。(B) IRK(KD)における遺伝子発現の散布図。縦軸はIRK(KD)由来の遺伝子の蛍光強度、横軸は野生株由来の蛍光強度を示す。縦軸と横軸の蛍光強度の和が1000に満たない弱い発現量の遺伝子については、解析から削除した。

表3-1(1) *irk-1*において発現の増加を示した遺伝子(一部抜粋)

Cy3蛍光強度	Cy5蛍光強度	Cy5/Cy3	Accession No.	遺伝子/タンパク質名
665.4	2415.7	3.6		(No entry)
1607.4	5219.0	3.2	L12057.1	glutathione transferase (ERD13)
2520.1	5748.0	2.3		(No entry)
2063.4	4389.2	2.1		(No entry)
2813.9	5568.2	2.0		(No entry)
1551.5	3040.1	2.0	X89008.1	mRNA for OSMOTIN protein
4684.2	9154.5	2.0	AAF35411.1	unknown protein
2760.3	5161.8	1.9	AF035385.1	SEN5 mRNA
570.9	1064.8	1.9		(No entry)
928.8	1702.4	1.8	AAF27145.1	unknown protein
1449.1	2585.8	1.8	D83025.1	mRNA for proline oxidase precursor
450.7	790.3	1.8	AAC64895.1	unknown protein
1088.6	1901.2	1.7	X89008.1	osmotin protein
2584.4	4508.5	1.7	AAC83028.1	Strong similarity to glycoprotein EP1
1584.3	2754.2	1.7	T46188	inhibition protein homolog
839.7	1432.8	1.7	AAC83028.1	Strong similarity to glycoprotein EP1
1111.8	1889.2	1.7	BAB11669.1	chorismate mutase/prephenate dehydratase-like protein
2212.7	3732.7	1.7	AAD43611.1	unknown protein
888.5	1495.5	1.7	AAF35411.1	unknown protein
1296.0	2166.7	1.7	T05466	putative protein
1582.3	2638.2	1.7	AAB95285.1	putative protein
9260.8	15370.3	1.7	AAF18536.1	Putative phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1 precursor
3613.7	5990.1	1.7	AAC83028.1	Strong similarity to glycoprotein EP1
1319.5	2184.6	1.7	D45848.1	calmodulin and calmodulin-related protein
2628.2	4323.6	1.6	AI007587	monooxygenase 1

発現の変化が大きい順に遺伝子クローンを並べた。Cy3蛍光強度は野生株由来の遺伝子の発現量をCy5蛍光強度は *irk-1* 由来の遺伝子の発現量を反映する。

表3-1(2) *irk-1*において発現の減少を示した遺伝子(一部抜粋)

Cy3蛍光強度	Cy5蛍光強度	Cy5/Cy3	Accession No.	遺伝子/タンパク質名
1708.6	195.6	0.1	T5P19.2	IRK
7038.1	2954.6	0.4	U73781.1	histone H1-3 (His1-3) mRNA
868.2	438.6	0.5	AF134124.1	Lhcb2 protein (Lhcb2.3) mRNA
5602.0	2973.4	0.5		(No entry)
3153.0	1701.8	0.5	AAF08556.1	nitrate reductase 1 (NR1)
1251.4	699.1	0.6	T06057	fructose-bisphosphate aldolase
3426.6	1989.7	0.6		(No entry)
39265.6	22868.2	0.6	X15550.1	25S-18S ribosomal DNA spacer
1753.6	1022.6	0.6		(No entry)
4114.7	2456.8	0.6	T02571	putative myrosinase-binding protein
1247.3	750.1	0.6		Arabidopsis thaliana glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A
17282.2	10439.6	0.6	T46240	hypothetical protein
950.8	579.3	0.6		(No entry)
10523.5	6466.7	0.6	BAB01776	unknown protein
10537.9	6489.2	0.6	AF134124.1	Lhcb2 protein (Lhcb2.3) mRNA
2811.6	1731.8	0.6	X64460.1	Lhb1B2 gene for photosystem II chlorophyll a/b binding protein
10680.9	6627.0	0.6	T02955	probable cytochrome P450 monooxygenase
728.9	453.1	0.6		(No entry)
1502.8	934.2	0.6	X52428.1	mRNA for 33 kDa oxygen-evolving protein
3193.6	1986.0	0.6	X64459.1	Lhb1B1 gene for photosystem II type I chlorophyll a/b binding protein
30235.9	18872.0	0.6	BAB00843.1	unknown protein
1241.4	775.2	0.6	T00713	helicase homolog
27286.4	17099.9	0.6	X71787.1	AAP2 mRNA for amino acid permease
9064.0	5692.2	0.6	X03909.1	(LHCP AB 140) for chlorophyll a/b binding protein
866.0	546.4	0.6		(No entry)

発現の変化が大きい順に遺伝子クローンを並べた。Cy3蛍光強度は野生株由来の遺伝子の発現量をCy5蛍光強度は *irk-1*由来の遺伝子の発現量を反映する。

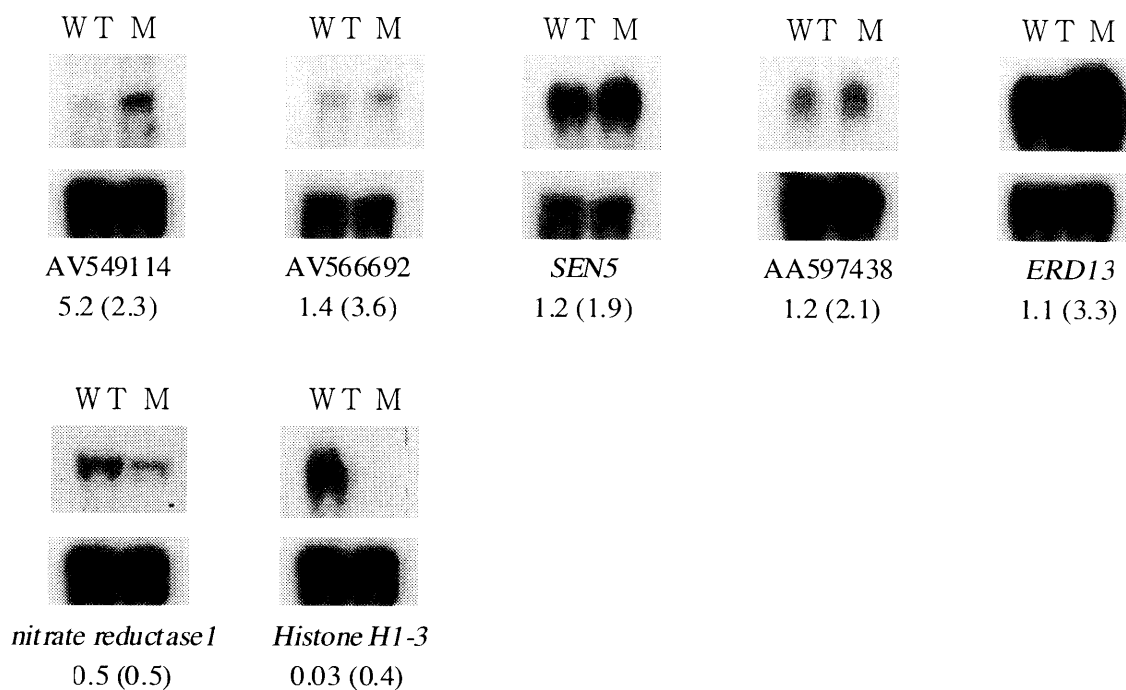


図3-10 *irk-1*変異株と野生株で発現量の変化を示した遺伝子
cDNAマイクロアレイで発現量の変化していた遺伝子のノーザンブロット
解析を行い、各遺伝子の発現量の比を求めた。各レーン10 μ gのトータルRNA
を泳動した。WT; 野生株、 M; *irk-1*。ACT8の発現量をローディングコントロ
ールに用いた。上段は*irk-1*において発現量が減少した遺伝子、下段は減少した
遺伝子を示す。()内には、マイクロアレイの結果から算出された*irk-1*と野生株
での発現量の比を示した。

表 3-2 *IRK* 変異株のマイクロアレイ解析 (まとめ)

遺伝子	野生株との発現量比 (northern blot)	機能または発現条件
EST(AV549114)	5.2	-
EST(AV566692)	1.4	-
SEN(senescence)5	1.2	ABA による老化で発現誘導
EST(AA597438)	1.2	-
ERD13	1.1	乾燥ストレスにより発現誘導
Histone H1-3	0.03	乾燥ストレスにより発現誘導
nitrate reductase 1(NR1)	0.5	硝酸還元

表3-3(1) IRK(KD)において発現の増加した遺伝子(一部抜粋)

Cy3蛍光強度	Cy5蛍光強度	Cy5/Cy3	Accession No.	遺伝子/タンパク質名
758.6	14983.7	19.8	T5P19.20	IRK
1922.7	4026.5	2.1	AAF00665.1	putative 40S ribosomal protein s14
793.1	1620.4	2.0	AF035385	Arabidopsis thaliana SEN5 mRNA
984.2	1928.0	2.0	BAB11317.1	60S acidic ribosomal protein P1-like protein
5638.2	10760.0	1.9	AF057137.1	Arabidopsis thaliana gamma tonoplast intrinsic protein 2 (TIP2) mRNA
4322.2	7979.1	1.8	AAF87023.1	unknown protein
4734.1	8679.5	1.8	AF003728	Arabidopsis thaliana plasma membrane intrinsic protein (SIMIP) mRNA
1589.3	2908.5	1.8	P51419	60S RIBOSOMAL PROTEIN L27
964.8	1760.2	1.8	AAF35411.1	unknown protein
1559.5	2838.4	1.8	T06039	ribosomal protein L14 homolog
1383.2	2501.3	1.8	AB031739	cytoplasmic ribosomal protein S13
1818.5	3285.0	1.8	T48317	hypothetical protein
648.2	1163.3	1.8	BAB08291.1	nodulin-like protein
1826.3	3277.5	1.8	AF035385.1	Arabidopsis thaliana SEN5 mRNA
766.1	1373.5	1.8	AAF26471.1	T25K16.9
1689.3	3023.4	1.8		(No entry)
1440.9	2578.0	1.8		(No entry)
1130.5	2014.6	1.8	F71442	probable membrane channel protein
577.4	1008.9	1.7	CAB78003.1	peroxidase C2 precursor like protein
1059.2	1845.5	1.7	AF253618.1	Arabidopsis thaliana protein synthesis initiation factor 4G (EIF4G) gene
1223.4	2119.0	1.7	T08568	ribosomal protein S25, cytosolic
1780.0	3074.6	1.7	AAB80665.1	60S ribosomal protein L23
953.1	1641.0	1.7	BAA99929.1	60S ribosomal protein L27
1319.5	2184.6	1.7	D45848.1	calmodulin and calmodulin-related protein
2628.2	4323.6	1.6	AJ007587	monooxygenase 1

発現の変化が大きい順に遺伝子クローンを並べた。Cy3蛍光強度は野生株由来の遺伝子の発現量をCy5蛍光強度はIRK(KD)由来の遺伝子の発現量を反映する。

表3-3(2) IRK(KD)において発現の減少した遺伝子(一部抜粋)

Cy3蛍光強度	Cy5蛍光強度	Cy5/Cy3	Accession No.	遺伝子/タンパク質名
2725.4	931.5	0.3	AAF08556.1	nitrate reductase 1 (NR1)
1038.4	467.1	0.4	S70188	small auxin up RNAs Arabidopsis Columbia(SAUR-AC1)
1765.2	873.0	0.5	AAC69932.2	putative myosin heavy chain
1240.3	621.4	0.5	T48501	hypothetical protein ¹
2207.8	1106.7	0.5	L04637.1	Arabidopsis thaliana lipoxxygenase
1217.7	619.6	0.5	M21414	A.thaliana alpha-1-tubulin gene
1058.9	539.3	0.5	AF229402	lumidependens
956.0	489.0	0.5	AF116556	putative transcription factor (HUA2)
943.9	501.9	0.5		(No entry)
1907.3	1030.9	0.5	AAF34311.1	unknown protein
2479.4	1344.5	0.5		(No entry)
766.6	420.9	0.5		(No entry)
1738.4	958.4	0.6	J03240.1	A. thaliana nitrate reductase
2851.6	1594.3	0.6	AF009647	Arabidopsis thaliana arginine decarboxylase (spe2)
2036.6	1144.3	0.6	U05206	Arabidopsis thaliana ribonuclease (RNS1)
2048.4	1151.0	0.6		(No entry)
893.3	505.5	0.6	J03240.1	nitrate reductase mRNA
1790.0	1020.2	0.6	J03240.1	nitrate reductase mRNA
980.0	559.9	0.6	AF180732.1	dynammin-like protein 6 (ADL6) mRNA
797.8	459.4	0.6	D86932	TFL1
2110.8	1216.3	0.6	AB006302.1	nitrite reductase
710.6	414.1	0.6	U61197	PHYB
3446.0	2024.1	0.6	NP 051090.1	RNA polymerase alpha subunit
632.1	372.6	0.6	AAF26130.1	unknown protein
633.1	373.5	0.6	AAB71973.1	unknown protein

発現の変化が大きい順に遺伝子クローンを並べた。Cy3蛍光強度は野生株由来の遺伝子の発現量をCy5蛍光強度はIRK(KD)由来の遺伝子の発現量を反映する。

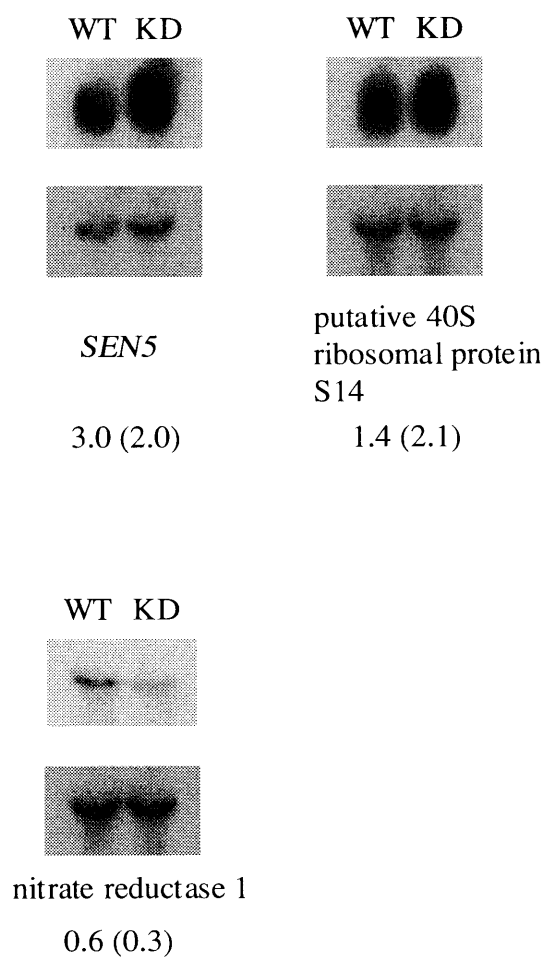


図3-11 IRK(KD)と野生株で発現量の変化を示した遺伝子のノーザンブロット解析

cDNAマイクロアレイで発現量の変化していた遺伝子のノーザンブロット解析を行い、各遺伝子の発現量の比を求めた。各レーン10 μ gのトータルRNAを泳動した。WT; 野生株、KD; IRK(KD)。ACT8をローディングコントロールのプロープに使用した。上段はIRK(KD)において発現量が上昇した遺伝子、下段は減少した遺伝子をそれぞれ示す。()内には、マイクロアレイによるIRK(KD)と野生株での各遺伝子の発現量の比を示した。

表 3-4 IRK キナーゼドメイン過剰発現株のマイクロアレイ解析(まとめ)

遺伝子	野生株との発現量比 (northern blot)	機能または発現条件
putative 40S ribosomal protein	1.4	リボソームタンパク質と相同性
SEN(senescence)5	3.0	ABA による老化で発現誘導
nitrate reductase 1(NR1)	0.6	硝酸還元

3.4. 考察

IRK 遺伝子の植物体における機能を明らかにするために過剰発現株、点変異導入株、変異株(*irk-1*)、キナーゼドメイン(KD)過剰発現株(*IRK(KD)*)を作成し、これら植物体の野生株との表現型の違いを調べてきたが、これまでに有意な違いは観察されなかった。作成した形質転換体の狙いとしては、*irk-1* では、遺伝子機能の欠失による表現型から遺伝子の機能を予測することを試みた。過剰発現株(35S-*IRK*)および、*IRK(KD)*では、過剰に発現した遺伝子がリガンド非依存的に活性化して恒常的にシグナルを流す状態を作り出すことを試みた。最後に、点変異導入株(*IRK(K706E)*)については、ドミナントネガティブな効果を期待したもので(Chang *et al.*, 1994)、*IRK* やその相同遺伝子 *IRK-like* の活性化を阻害することによってこれまで機能的な重複によって現れてこなかった遺伝子の機能を明らかにすることを目的とした。作成した 3 種類の形質転換体とスクリーニングで得られた *irk-1* については、ノーザンブロット解析により、各植物体で機能していることが示唆されており、上述したとおりの働きが期待された。

これまでに作成した *IRK* に関する形質転換植物について野生株との表現型の違いが観察されなかった理由としていくつかの可能性が考えられた。先ず一つ目としては、遺伝子機能の冗長性が考えられた。冗長性については相同遺伝子による機能的な重複の可能性ともう一つはシグナル伝達経路の冗長性が考えられた。また二つ目としては、各形質転換植物体を観察する際の生育条件の設定が表現型の観察に適切でない可能性が考えられた。

IRK 遺伝子の相同遺伝子による機能の冗長性の可能性については有意な相同性を示す *IRK-like* の存在が明らかになったことと、RT-PCR の結果から花序茎頂、根で共に発現することがわかったことからその、可能性が示唆された。また、これまで単純なゲノム構造であると考えられていたシロイヌナズナのゲノム配列の約 70%が重複した配列で占められていることが明らかになっており(The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000)、機能的に重複する遺伝子が潜在的に存在する可能性が高いことも示唆していた。このことから、重複した遺伝子が同じ機能を有していた場合には、どちらか一方に変異が生じたとしても、もう一方の正常な遺伝子によってその機能が補われるために表現型として観察されなかったと考えられた。

シグナル伝達経路の冗長性についてはcDNA マイクロアレイによる解析からその可能性を示唆する結果が示されてきた。受容体型キナーゼによって発現

が調節される遺伝子では、いくつかのシグナル伝達のステップを経て最終的な遺伝子発現の調節に到達すると考えられる。シグナル伝達経路が単純な経路の場合は、IRK の活性化と遺伝子発現の調節はほぼ相関したものになると考えられる。だが、IRK からのシグナルが他のシグナルとクロストークしているなどの複雑な制御の場合は、IRK の活性化とその下流の遺伝子の発現調節との相関性が見えにくくなる可能性が予想される。実際、*irk-1* や IRK(KD)のマイクロアレイ解析において遺伝子発現の変化が見られた遺伝子の多くは、cDNA マイクロアレイ解析で一般に発現量が変化していると認められている閾値(2 倍の発現量の変化) より若干高い程度の変化を示したものがほとんどであった。このことは、IRK によるシグナル伝達が細胞外からのシグナルの受容とそれに対する細胞内での応答が1対1の関係ではなく、もっと複雑なシグナル伝達経路を構成していることを示していると考えられた。

形質転換植物体の cDNA マイクロアレイ解析からは、いくつかの遺伝子が発現量を変化させていることが明らかになった。これら発現量の変化していた遺伝子の予想される機能としては、IRK を介したシグナルの機能を補うような働きを持つ遺伝子や IRK からのシグナル伝達の下流で発現調節を受けている遺伝子である可能性が考えられた。表 3-2 に示すように ERD13(乾燥ストレス)、Histone H1-3(乾燥ストレス)、SEN5(ABA による老化)(Park et al., 1998)、硝酸還元酵素、リボソームタンパク質、EST クローン(AV566692、AA597438、AV549114)などが、発現量の変化を示した遺伝子として得られてきた。これらの遺伝子が IRK を介したシグナル伝達とどのように関連するのかは、現時点では予測できなかった。しかし、ここで発現量の変化を示した遺伝子の中には、IRK の機能と関連する遺伝子も存在すると考えられ、それらの遺伝子が発現誘導される条件において各形質転換植物体の表現型を観察することによりこれまで見えなかった表現型が観察されることが期待される。しかし、オーキシンや浸透圧ストレス、塩ストレスによる根の生育への影響を調べているが、表現型の違いは観察できていない。

IRK 遺伝子を含む LRR タイプの受容体型キナーゼ遺伝子はシロイヌナズナのゲノム配列に 174 遺伝子存在することが報告されている。また、キナーゼドメインを持たない LRR をもつ遺伝子についても 122 遺伝子と多数存在することが判ってきた。このように IRK 遺伝子の機能を解明する上で、シロイヌナズナで大きなファミリーを構成している受容体型キナーゼの分子進化の過程を知ることは、有用な情報を与えてくれると考えられた。主な高等植物の受容体型キナーゼのキナーゼドメインのアミノ酸配列を用いた系統樹を図 3-6 に示し

た。*SRK-910*(Goring and Rothstein, 1992)と *ARK1*(Tobias and Nasrallah, 1996)や *WAK1* と *WAK4*(He et al., 1999)のようにこれらの遺伝子は、それぞれ S ドメインや EGF リピートを持つ受容体型キナーゼ遺伝子である。*PRK1* と *LePRK1* は共に花粉で発現するという共通した特徴を示す。このように同じ受容体ドメインをもつ遺伝子や発現組織が同じ遺伝子同士が系統樹においても近縁であることが判った。図 3-6 の系統樹は、各遺伝子のキナーゼドメインのアミノ酸配列での比較ではあったが、各遺伝子の受容体ドメインの種類や発現パターンなどの特性と系統樹における各遺伝子の位置関係には関連性があることが読み取れた。このことは、受容体ドメインがリガンド分子との結合選択性を示すのと同じように、キナーゼドメインについてもシグナル伝達のターゲット分子に対する特異性を持たせているためであると考えられる。*IRK* についてはこれまでに表現型が報告されている遺伝子とは系統的に離れていることから、これまでに報告されている遺伝子とは異なるシグナル伝達に機能していると考えられた。構造的に相同な受容体型キナーゼが多く存在する中で個々の受容体型キナーゼがどのように各々のシグナル伝達を行い、どのような生理現象に関わっているのかに興味をもたれる。今後、各受容体型キナーゼの機能が明らかになってくれば、各受容体型キナーゼを構成する受容体ドメインとキナーゼドメインを他の遺伝子の受容体ドメインやキナーゼドメインと置き換えるドメインスワッピングによって個々の遺伝子を特徴づけているドメインの機能を調べることができるだろう。さらに、リガンドあるいは、シグナル伝達のターゲットとなる分子の同定を行うことによって、細胞内にさまざまな受容体型キナーゼが存在する中でどのように外部からのシグナルを各遺伝子が認識、伝達しているのかを明らかにできると思われる。

シロイヌナズナのゲノム構造については、その特徴として塩基配列の重複がこれまでに全ゲノム配列が公開されている線虫やショウジョウバエといった生物よりも多いことが挙げられている。遺伝子ファミリーを形成していないユニークな遺伝子の割合で比較すると線虫、ショウジョウバエではそれぞれ 55.2%、72.5%であるのに対しシロイヌナズナでは 35.0%と低く、逆に遺伝子ファミリーを形成する遺伝子の割合が高くなっている。*LRR* を持つ受容体型キナーゼ遺伝子が多数ゲノム上に存在する理由として、*LRR* タイプの受容体型キナーゼがシロイヌナズナが生育する際に必要な機能を提供してきたことが考えられる。シロイヌナズナ以外にもトマトやイネ、ニンジンにおいて *LRR* タイプの受容体型キナーゼが機能していることが報告されており、*LRR* タイプの受容体型キナーゼが高等植物全般にわたって機能していることが明らかにされている。では、*LRR* タイプ受容体型キナーゼはどのようにさまざまな機能を獲得し、進

化してきたのだろうか？ 解析が進んでいるシロイヌナズナの MADS-box 遺伝子である *AGL* 遺伝子ファミリーの例が参考になると思われる。*AGL*(*AGAMOUS-like*)遺伝子も LRR タイプの受容体型キナーゼ遺伝子同様にシロイヌナズナにおいて大きなファミリーを形成する遺伝子群である。この遺伝子ファミリーの最近の研究からはこれら *AGL* 遺伝子が遺伝子の重複を繰り返していくうちに、より発現部位や時期に特異性を示すような新規な *AGL* 遺伝子を進化させてきたと考えられている(Alvarez-Buylla *et al.*, 2000)。このような遺伝子重複によって *AGL* 遺伝子群は、現在みられるような多彩な機能を持つようになったと考えられる。LRR タイプ受容体型キナーゼについても *AGL* 遺伝子ファミリーのように重複を繰り返していく間により再分化された機能を獲得してきているのではないだろうか。*IRK* 遺伝子についても系統樹上に *IRK*、*IRK-like* グループから分かれてきたと予想される遺伝子群(*At3g28040*、*At1g62950*、*At1g12460*)が存在することが示された。このことから *RLK* 遺伝子の機能や発現特異性を知ることにより、*IRK* 遺伝子の機能予測に結びつく情報が得られるかもしれない。

形質転換体を用いた *IRK* の機能解析や cDNA マイクロアレイによる解析は、*IRK* のシグナル伝達の最も下流に位置する部分での解析であった。一方、*IRK* のキナーゼドメインと直接相互作用するターゲット分子やレセプターと結合するリガンド分子の同定も *IRK* の機能を予測する上で有用な情報を与えてくれる。シロイヌナズナにおいて *IRK* のキナーゼドメインと相互作用するターゲット遺伝子を yeast two hybrid 法により単離する試みでは、これまでにターゲット遺伝子の候補とみられる陽性クローンを得た。このターゲット候補遺伝子の産物は、562 アミノ酸残基で、PSORT によるタンパク質の細胞内局在の予測では、細胞膜に局在することが示され、C 末端側(478-494a.a.)には、細胞膜貫通ドメインも予測された。しかし、細胞膜への移行に関わるシグナルペプチドの存在は予測できなかった。また、BLAST による相同性検索では既知の遺伝子との有意な相同性は示されなかった。組換えタンパク質を用いたタンパク質間の相互作用を調べた実験では、*IRK* のキナーゼドメインとターゲット候補との相互作用が *in vitro* で確認され *IRK* を介したシグナル伝達の下流因子としての可能性が示された(八反、未発表)。これまでに *HAESA* や *CLV1* については、ホスファターゼをコードしている *KAPP*(Kinase Associated Protein Phosphatase)(Stone *et al.*, 1994)がシグナル伝達のターゲットとして報告されているのを始め、*CLV1* については、さらに G タンパク質をコードする *Rop*(Rho-related GTPase from plants)遺伝子とそのシグナル伝達に関与することも示唆されていて MAPK カスケードとの関連も考えられている(Trotochaud *et al.*, 1999)。だがこれらの遺伝子による

詳しいシグナル伝達機構は不明である。IRK については、two-hybrid 法によりそのターゲットとなる下流因子の候補が得られたが、既知のタンパク質モチーフとの相同性は低くどのような機能を持つかは明らかにならなかった。

リガンド分子については、IRK の受容体を構成している LRR がタンパク-タンパク間相互作用に関与するモチーフであることからリガンド分子の候補はペプチド性の分子であると予想している。CLV1 では、CLV3 の遺伝子産物から切り出される 78 アミノ酸残基のポリペプチドが、CLV1 のリガンド分子であると予想されている(Fletcher *et al.*, 1999)。この他にも高等植物においては生理活性を示すポリペプチドが数例報告されている。傷害応答ではシステミン(Pearce *et al.*, 1993)、細胞分裂では ENOD40(van de Sande *et al.*, 1996)、細胞増殖ではファイトスルホカイン(Matsubayashi *et al.*, 1997)が報告されている。これらポリペプチドの受容体は未だ明らかにはなっていないが、LRR タイプの受容体型キナーゼがそのレセプターとして機能している可能性は十分に考えられる。IRK の受容体ドメインと相互作用するリガンド分子についてはこれまでのところ明らかにはなっていないが今後、IRK によるシグナル伝達経路が植物体においてどのような生理的な役割を担っているかが明らかになれば、表現型を指標としたリガンド分子のスクリーニングまたは、IRK の LRR ドメインに相互作用する分子の探索からのリガンド分子の取得が可能であると考えられる。

研究が進んでいる茎頂分裂組織の花芽分化については、これまでに花芽分化や無限花序の維持に関わっていると考えられる遺伝子が単離されてきている。それらの変異体には器官形成に異常を示したり、花成時期がずれることが知られている。しかし、これらの遺伝子の一つが機能しなくても程度の差はあるにしろ、多くの場合植物は花芽を分化させ花をつける。この事実は、高等植物において花芽分化に関わる遺伝子は、複数存在していて、それらが互いに協調あるいは、別の独立した経路を経て花芽の分化を決定していることを示している。IRK について作成した形質転換植物体では根や花序茎頂組織において野生株と比較して表現型の違いは観察されなかった。この事実は、IRK によるシグナル伝達が唯一の決定因子ではなく、動物で明らかになってきたように他のシグナルとクロストークし合ってシステムを機能させていることを示唆している。IRK における他のシグナル伝達経路の可能性としては、IRK-like によるシグナル伝達が予想される。IRK と IRK-like との二重変異体の解析は行えなかったため、その真偽については結論を出せなかった。IRK と IRK-like の二重変異体を得られなかった理由については、二重変異体が致死になるために得られなかった可能性もあり今後、作成した F2 植物体の分離比から二重変異体が致死的になるかどうかを検討する必要があると考えられた。二重変異体の表現型は観察できな

かったが、多くの受容体型キナーゼがゲノムに存在していたことを考慮すると *IRK* によるシグナル伝達とクロストークするシグナルは十分存在すると予想された。

高等植物において多くの受容体型キナーゼ遺伝子が植物の生理機能や発生に関与していると考えられている。しかしながら、その機能が明らかになった例は、まだ限られた遺伝子に過ぎない。数多くある受容体型キナーゼ遺伝子の中で個々の遺伝子の機能の違いを生み出している因子としては次の3つの因子が考えられ、これら3つの因子の組み合わせによって受容体型キナーゼ遺伝子の機能が決定されていると考えられる。一つは、リガンド分子の受容体への選択的な結合、二つ目は、受容体型キナーゼによって特異的にリン酸化、活性化されるターゲット分子、三つ目は、遺伝子発現の時期、組織特異性である。本研究では、*IRK* 遺伝子の時期、組織特異的な発現について記述してきた。その結果からは、*IRK* が器官形成や細胞分裂において機能することが示唆されてきた。また、cDNA マイクロアレイでは受容体型キナーゼによるシグナル伝達の最も下流で機能していると予想される候補遺伝子を探索してきた。候補遺伝子が実際に *IRK* によるシグナル伝達に関係するのかどうかについては、検証を必要とした。今後、受容体に結合するリガンド分子やリン酸化されるターゲット分子について明らかにすることにより *IRK* を介したシグナル伝達の植物体における機能が明らかになるだろう。

4. 結論

高等植物の分裂組織がどのように器官形成を行い、分裂組織を維持しているのかを分子レベルで理解することを目的とした。そのために器官形成が活発な花序組織で低発現する 384 の遺伝子がデファレンシャルスクリーニングにより単離された。多数の細胞から構成される分裂組織において個々の細胞が協調して機能するためには細胞間でのシグナル伝達が重要な役割を担うと予想された。そこで本研究では、分裂組織における細胞間シグナル伝達が植物の器官形成にどのように関わっているのかを明らかにするために、新規な受容体型キナーゼ遺伝子、*IRK* の解析を行った。*IRK* は、その予測されたアミノ酸配列から N 末端側から LRR モチーフからなる受容体ドメイン、膜貫通ドメインを経て、セリン/スレオニンキナーゼドメインから構成されていた。GFP レポーター遺伝子を用いた *IRK* の細胞内局在の解析では、*IRK* が細胞膜に局在することが明らかになった。さらに *IRK* のキナーゼドメインが自己リン酸化活性を有したことから *IRK* は、受容体型キナーゼ遺伝子として機能的な構造を持つことが示された。

IRK の機能を予測するために行った *IRK* の発現解析からは、茎頂分裂組織、がく、花糸、心皮、未成熟種子などの花序組織と主根や側根の根端と中心柱で *IRK* が発現していることが明らかになった。その結果 *IRK* が器官形成や細胞分裂の盛んな組織で発現することが明かとなった。さらに cRT-PCR による *IRK* の発現解析からは、茎頂組織での *IRK* の発現が栄養生長相から生殖生長相に移行するに従って増加することが観察された。生殖生長相において *IRK* 遺伝子が心皮や種子の発生などに機能することが予想された。根における *IRK* の発現パターンでは、オーキシンによって細胞分裂が誘導された組織で *IRK* の発現が観察されたことと、カルスの外側の最も細胞分裂が盛んな部分で *IRK* が発現していたことから *IRK* が細胞分裂に関与することも示唆された。*irk-1* や *IRK(KD)* と野生株との表現型の比較では、長日条件下の生育では地上部の組織については、有意な形態的变化は観察されなかった。また、MS 寒天培地での根の生育についても違いは観察されなかった。そこで *IRK* の機能を予測するために、これまでに得た *irk-1*、*IRK(KD)* においてどのような遺伝子発現の変化が生じているかを調べた。*irk-1*、*IRK(KD)* の根器官での cDNA マイクロアレイによる野生株との遺伝子発現の比較からは、細胞分裂、乾燥ストレス、タンパク質合成などに関与する遺伝子が、発現量の変化した遺伝子として得られてきた。しかし、これらの遺伝子発現の変化は小さく、約 2 倍(cDNA マイクロアレイの閾値)程度の変化であった。このように遺伝子発現の変化が少ないのは、*IRK* から伝達されるシグナルとその応答の間に *IRK* 以外からのシグナルによるクロストークが介

在することが予想された。cDNA マイクロアレイの情報からは *IRK* 遺伝子の機能を絞り込むには難しい点もあったが、発現量の変化を示した遺伝子の中には *IRK* と機能的に関連がある遺伝子が存在することが予想され、今後の表現型の解析条件の検討に利用できると考えられた。

本研究で採用した遺伝子の逆遺伝学的な機能解析は、生物のゲノム塩基配列が明らかにされてきたことから、今後も重要な方法として用いられると考えられる。*IRK* 遺伝子と高い相同性を示した *IRK-like* 遺伝子が *IRK* 遺伝子と機能的に重複した遺伝子であるかは明らかにできなかったが、*AGL* 遺伝子の例に見られたように、遺伝子重複によって各遺伝子の機能は複雑に細分化されてきている。受容体型キナーゼについても同様に、様々に進化した受容体型キナーゼがシグナルのクロストークを行って、多細胞生物の器官形成を維持していると考えられる。本研究では、*IRK* 遺伝子の機能解析を通じて分裂組織の機能を分子レベルで解明することを目的としてきた。*IRK* を介したシグナル伝達経路の生理的な機能については今後の解析を必要としたが、*IRK-like* および *IRK* のターゲット分子さらに、マイクロアレイの結果を基に解析を進めることにより *IRK* の機能が明らかになることが期待される。

高等植物であるシロイヌナズナのゲノムには多数の受容体型キナーゼ遺伝子がコードされていたことから高等植物には様々なシグナルネットワークが存在すると予想されている。*IRK* を始め今後、機能未知の受容体型キナーゼ遺伝子の解析を行うことは植物の多細胞性をつくりあげている細胞間コミュニケーションの全体像を明らかにする上で重要な一歩である。

5.謝辞

本研究を行うにあたっては、多くの方々に公私ともにたいへんお世話になりました。奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科分化・形態形成学講座横田明穂教授には、ご指導、ご鞭撻を賜り深く感謝しています。京都大学大山莞爾先生には 1 年間の短い期間ではありましたがいつも研究を楽しんで行われている姿勢に感銘を憶えました。また同講座の河内孝之助教授と竹村美保助手には、生き物とは無縁の世界にいた私に懇切丁寧に実験指導をしていただいたことを深く感謝しています。共同実験者の浅井拓也君と八反順一郎さんには、公私ともどもお世話になりました。マイクロアレイの実験をしていただいた安藤候平君には実験の忙しい中、時間を割いていただき感謝しています。同期入学の嘉美千歳さんと西井晶子さんには、いろいろとご迷惑をかけましたが、実験がうまく進まないときの力強い味方でした。皆さんに出会えたおかげで今の自分があると信じています。本当にありがとうございました。

6.参考文献

- Andersson, H., and von Heijne, G. (1994). Membrane protein topology: effects of H^+ on the translocation of charged residues explain the 'positive inside' rule. *EMBO J.* 13, 2267-2272.
- Alvarez-Buylla, E. R., Liljegren, S. J., Pelaz, S., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., Vergara-Silva, F., and Yanofsky, M. F. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* 24, 457-466.
- Ascenzi, R., and Gantt, J. S. (1997). A drought-stress-inducible histone gene in *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct class of plant linker histone variants. *Plant Mol. Biol.* 34, 629-641.
- Bassett, L. C., Nickerson, L. M., Cohen, A. R., and Rajeevan, S. M. (2000). Alternative transcript initiation and novel post-transcriptional processing of a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase gene that responds to short-day photoperiodic floral induction in morning glory. *Plant Mol. Biol.* 43, 43-58.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R., and Meyerowitz, E. M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1, 37-52.
- Braun, T., Schofield, P. R., and Sprengel, R. (1991). Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J.* 10, 1885-1890.
- Chang, C., Schaller, G. E., Patterson, S. E., Kwok, S. F., Meyerowitz, E. M., and Bleecker, A. B. (1992). The TMK1 gene from *Arabidopsis* codes for a protein with structural and biochemical characteristics of a receptor protein kinase. *Plant Cell* 4, 1263-1271.
- Chang, P. Y., Benecke, H., Le Marchand-Brustel, Y., Lawitts, J., and Moller, D. E. (1994). Expression of a dominant-negative mutant human insulin receptor in the muscle of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 269, 16034-16040.

Chory, J., and Wu, D. (2001). Weaving the Complex Web of Signal Transduction. *Plant Physiol.* 125, 77-80.

Chuang, C. F., and Meyerowitz, E. M. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4985-4990.

Clark, S. E., Williams, R. W., and Meyerowitz, E. M. (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89, 575-585.

Deeken, R., and Kaldenhoff, R. (1997). Light-repressible receptor protein kinase: a novel photo-regulated gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 202, 479-486.

Dinischiotu, A., Beullens, M., Stalmans, W., and Bollen, M. (1997). Identification of sds22 as an inhibitory subunit of protein phosphatase-1 in rat liver nuclei. *FEBS Lett.* 402, 141-144.

Du, L., and Chen, Z. (2000). Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24, 837-847.

Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J. Z., and Laux, T. (1996). The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *Plant J.* 10, 967-979.

Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R., and Meyerowitz, E. M. (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283, 1911-1914.

Gomez-Gomez, L., and Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5, 1003-1011.

Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., and Boller, T. (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and

signaling in *Arabidopsis*. Plant Cell 13, 1155-1163.

Goring, D. R., and Rothstein, S. J. (1992). The S-locus receptor kinase gene in a self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. Plant Cell 4, 1273-1281.

Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase(catalytic)domain structure and classification. FASEB J. 9, 576-596.

Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell 52, 269-279.

He, Z. H., Cheeseman, I., He, D., and Kohorn, B. D. (1999). A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak1-5, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. Plant Mol. Biol. 39, 1189-1196.

Horn, A. H., Walker, C. J. (1994). Biochemical properties of the autophosphorylation of RLK5, a receptor-like protein kinase from *Arabidopsis thaliana*. Biochimica et Biophysica Acta 1208, 65-74

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., and Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6, 3901-3907.

Jinn, T. L., Stone, J. M., and Walker, J. C. (2000). HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. Genes Dev. 14, 108-117.

Jones, J. D. G. (1997). A kinase with keen eyes. Nature 385, 397-398.

Kajava, A. V. (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. J. Mol. Biol. 277, 519-527.

Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1994). Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of three ERDs as HSP cognate genes. Plant Mol. Biol. 25, 791-798.

Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., and Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286, 1960-1962.

Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1994). The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* 19, 415-421.

Kohchi, T., Fujishige, K., and Ohyama, K. (1995). Construction of an equalized cDNA library from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 8, 771-776.

Krusius, T., and Ruoslahti, E. (1986). Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7683-7687.

Li, J., and Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90, 929-938.

Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L., and Yanofsky, M. F. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404, 766-770.

Martin-Zanca, D., Oskam, R., Mitra, G., Copeland, T., and Barbacid, M. (1989). Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol. Cell Biol.* 9, 24-33.

Matsubayashi, Y., Takagi, L., and Sakagami, Y. (1997). Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13357-13362.

McFarland, K. C., Sprengel, R., Phillips, H. S., Kohler, M., Rosemblyt, N., Nikolics, K., Segaloff, D. L., and Seeburg, P. H. (1989). Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245, 494-499.

Mu, J. H., Lee, H. S., and Kao, T. H. (1994). Characterization of a Pollen-Expressed Receptor-like Kinase Gene of *Petunia inflata* and the Activity of Its Encoded Kinase. *The*

Plant Cell 6, 709-721.

Nasrallah, J.B., Nasrallah, M.E. (1993). Pollen-stigma signalling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* 5, 1325-1335.

Park, J. H., Oh, S. A., Kim, Y. H., Woo, H. R., and Nam, H. G. (1998). Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 37, 445-454.

Pearce, G., Johnson, S., and Ryan, C. A. (1993). Structure-activity of deleted and substituted systemin, an 18-amino acid polypeptide inducer of plant defensive genes. *J. Biol. Chem.* 268, 212-216.

Raamsdonk, L. M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M. C., Berden, J. A., Brindle, K. M., Kell, D. B., Rowland, J. J., Westerhoff, H. V., Dam, K. v., and Oliver, S. G. (2001). A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature Bio.* 19, 45-50.

Rosen, O. M., Herrera, R., Olowe, Y., Petruzzelli, L. M., and Cobb, M. H. (1983). Phosphorylation activates the insulin receptor tyrosine protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3237-3240.

Simon, R., Igeno, M. I., and Coupland, G. (1996). Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* 384, 59-62.

Smyth, D. R., Bowman, J. L., and Meyerowitz, E. M. (1990). Early Flower Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2, 755-767.

Smyth, D. (2000). A reverse trend-MADS function revealed. *Trends in plant sci.* 315-317.

Song, W. Y., Wang, G. L., Chen, L. L., Kim, H. S., Pi, L. Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W. X., Zhu, L. H., and *et al.* (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* 270, 1804-1806.

Stone, J. M., Collinge, M. A., Smith, R. D., Horn, M. A., and Walker, J. C. (1994).

Interaction of a protein phosphatase with an *Arabidopsis* serine-threonine receptor kinase. Science 266, 793-795.

Takemura, M., Fujishige, K., Hyodo, H., Ohashi, Y., Kami, C., Nishii, A., Ohyama, K., and Kohchi, T. (1999). Systematic Isolation of Genes Expressed at Low Levels in Inflorescence Apices of *Arabidopsis thaliana*. DNA Research 6, 275-282.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408, 796-815.

Tobias, C., and Nasrallah, J. (1996). An S-locus-related gene in *Arabidopsis* encodes a functional kinase and produces two classes of transcripts. Plant J. 10, 523-531.

Torii, K. U., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, R. F., and Komeda, Y. (1996). The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. Plant Cell 8, 735-746.

Trotochaud, A. E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z., and Clark, S. E. (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a rho-related protein. Plant Cell 11, 393-406.

Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal Transduction by Receptors with Tyrosine Kinase Activity. Cell 61, 203-212.

Valon, C., Smalle, J., Goodman, H. M., and Giraudat, J. (1993). Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene (TMKL1) encoding a putative transmembrane protein with an unusual kinase-like domain. Plant Mol. Biol. 23, 415-421.

van den Berg C, W. V., Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. Nature 390, 287-289.

van de Sande, K., Pawlowski, K., Czaja, I., Wieneke, U., Schell, J., Schmidt, J., Walden, R., Matvienko, M., Wellink, J., van Kammen, A., Franssen, H., and Bisseling, T. (1996). Modification of phytohormone response by a peptide encoded by ENOD40 of legumes and a nonlegume. Science 273, 370-373.

Walker, J. C. (1994). Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 26, 1599-1609.

Wardlaw, C. W. (1949). Experiments on organogenesis in ferns. *Growth* 13, 93-131.

Winans, K. A., and Hashimoto, C. (1995). Ventralization of the *Drosophila* embryo by deletion of extracellular leucine-rich repeats in the Toll protein. *Mol. Biol. Cell* 6, 587-596.

Xu, C., Kauffmann, R. C., Zhang, J., Kladny, S., and Carthew, R. W. (2000). Overlapping activators and repressors delimit transcriptional response to receptor tyrosine kinase signals in the *Drosophila* eye. *Cell* 103, 87-97.

浅井拓也(1997) シロイヌナズナの花序特異的受容体型キナーゼ遺伝子の構造と発現解析 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

安藤候平(2001) シロイヌナズナ標準化 cDNA ライブラリー由来 cDNA マイクロアレイ系の構築 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文