

アブラナ科植物の自家不和合性における
リン酸化を介した情報伝達機構の解析

垣田 満

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞間情報学講座
(高山 誠司 教授)

平成19年1月29日 提出

目次

序論	- 3 -
第1章 MLPKの発現調節と膜局在性の意義	
1-1 序	- 13 -
1-2 材料及び方法	- 17 -
1-3 結果	- 23 -
1-4 考察	- 33 -
第2章 アブラナ科植物の自家不和合情報伝達系における MLPKの機能解析	
2-1 序	- 38 -
2-2 材料及び方法	- 39 -
2-3 結果	- 48 -
2-4 考察	- 70 -
第3章 和合／不和合受粉時の柱頭における タンパク質リン酸化の変動解析	
3-1 序	- 76 -
3-2 材料及び方法	- 77 -
3-3 結果	- 85 -
3-4 考察	- 105 -
総括	- 111 -
謝辞	- 113 -
参考文献	- 114 -

序論

地球上には、1 億以上もの生物種が存在していると言われている。これらの生物は、それぞれが地球上の多種多様な環境に適応し生活を営んでいる。しかし、ひとたびその環境に変化が起きると、そこで生活する生物は多大な影響を受け、その変化に適応できない者は絶滅し、適応できた者のみが生き残ることができる。そのため、生物は長い年月をかけ、環境の変化に適応する手段を発達させてきた。その手段の 1 つとして、同じ生物種内で遺伝的多様性を作りだし、それを保持することが挙げられる。遺伝的な多様性を得ることで、その生物種は環境の変化に柔軟に対応することが可能となる。

遺伝的多様性を保持するためには、近親間での交配を回避することが最も重要である。動物は移動し、他個体と交配することで、比較的容易に近親交配を回避することができる。一方、移動能力を持たない植物は、動物とは異なる植物独自の方法を作り出す必要があった。ある植物種は雌雄で別々の花をつけることで（雌雄異株性、雌雄異花性）、また、ある植物種は雌ずいと雄ずいの成熟時期をずらすことで（雌雄異熟性）、近親間での受粉を物理的に回避してきた。これに対し、多くの高等植物は近親間での受精を生理的に回避する全く異なる機構を発達させてきた。これは、自家不和合性（self-incompatibility）と呼ばれ、今日、高等植物でもっとも発達した機構である。

植物における自家不和合性とは、同種の花粉・花粉管と雌ずいとの間で、自己／非自己の認識を行い、自己花粉の吸水や発芽、花粉管の伸長を抑制することによって、非自己花粉との受精が優先的に行われる現象である。古典的な遺伝学による解析から、植物の自家不和合性における自他識別機構は、*S* と呼ばれる 1 つの遺伝子座上（*S* 遺伝子座）に存在し強く連鎖する複対立遺伝子群（*S* ハプロタイプ）によって支配されていることが明らかとされている。すなわち、*S* 遺伝子座上の花粉（あるいは花粉親）の表現型を決定する遺伝子（花粉側 *S* 遺伝子）と雌ずいの表現型を決定する遺伝子（雌ずい側 *S* 遺伝子）が同一の *S* ハプロタイプを有する場合に自家不和合反応が誘起され、自己花粉による受精は回避される（Bateman *et al.*, 1955）。

このような自家不和合性は、被子植物の過半数が持つと言われているが、その遺伝様式と花の形態には、様々なバリエーションが存在し、個々の植物種が進化の過程で独自の自家不和合性を発達させてきたと考えられている（de Nettancourt, 2001; Fig. 1）。サクラソウ科やタデ科、カタバミ科は、雌ずいと雄ずいの相対的な長さの違いが *S* 遺伝子の表現型と連鎖しており、異形花型自家不

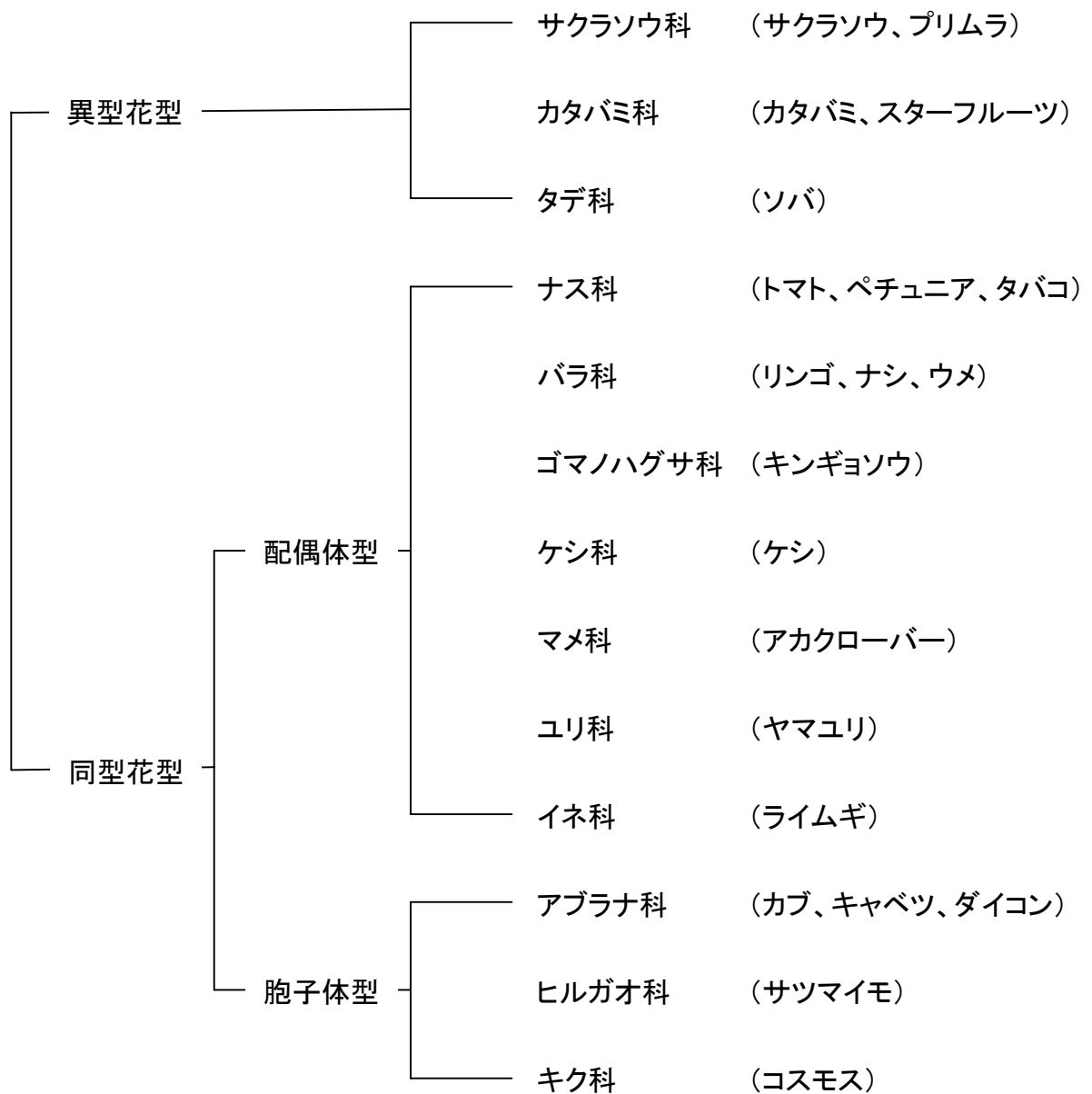


Fig. 1 自家不和合性の多様性

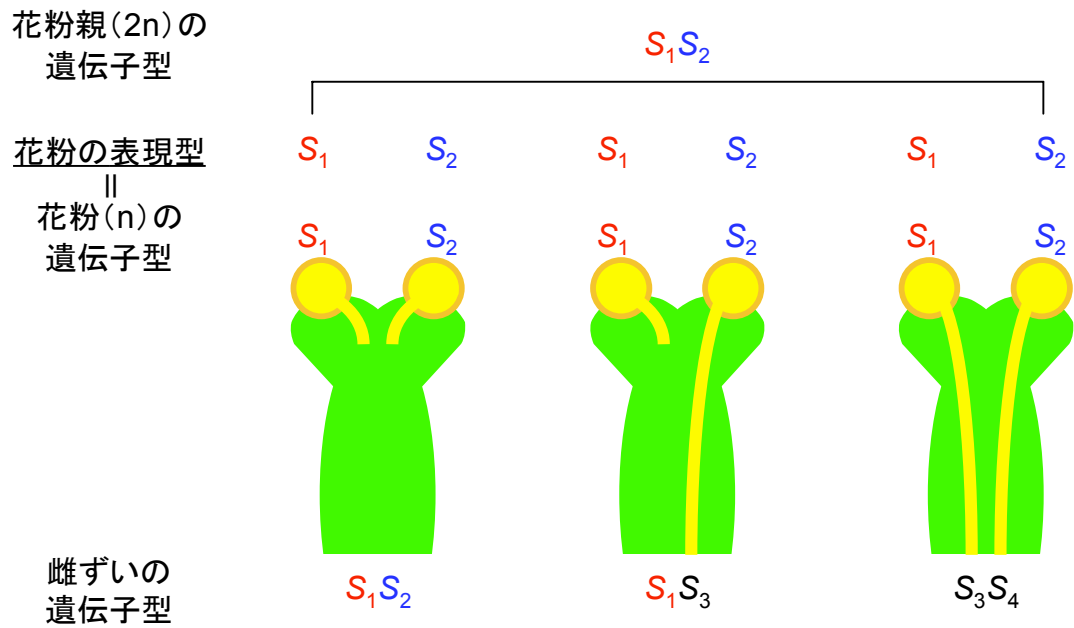
和合性と呼ばれている。一方、花の形態に差異は認められないが、自家不和合性を持つものを、同型花型自家不和合性と呼んでいる。同形花型自家不和合性は、花粉における *S* 遺伝子の発現様式の違いから、さらに配偶体型と孢子体型に分類される。配偶体型自家不和合性は、花粉の表現型が配偶体 (*n*) である花粉の持つ *S* 遺伝子の遺伝子型によって決定される、言い換えれば、花粉側 *S* 遺伝子産物が花粉で産生されるタイプであり、ナス科、バラ科、ケシ科などで見られる。一方、孢子体型自家不和合性では、*S* 遺伝子産物が孢子体 (*2n*) である花粉親で産生されるため、花粉の表現型が花粉自身の *S* 遺伝子型に因らず、花粉親の *S* 遺伝子型によって決定されるタイプであり、アブラナ科やヒルガオ科などがこのタイプに属する (Fig. 2)。なお、ここで述べた例は、それぞれの植物体の *S* 遺伝子が全て共優性を示す場合であるが、*S* 遺伝子間で優劣性の関係となる場合も存在し、和合／不和合性の関係は実際のところより複雑である (Nou *et al.*, 1993; Shiba *et al.*, 2002; Shiba *et al.*, 2006)。

本論文で扱うアブラナ科植物は、孢子体型の自家不和合性を持ち、これまでに野生集団の交配実験から、キャベツ、ブロッコリーなどの *Brassica oleracea* では 50 種類、カブ、ハクサイなどの *Brassica rapa* においては 30 種類余りの *S* 遺伝子が同定されている (Ockendon, 1985; Nou *et al.*, 1993)。

アブラナ科植物の柱頭は、乳頭細胞 (papilla cell) と呼ばれる一層の円筒状の細胞で覆われている。アブラナ科植物の自家不和合反応は、花粉とこの乳頭細胞間の相互作用によって起きる。和合受粉時には、受粉後しばらくは花粉の形態は変化しないが、花粉と柱頭との接着面に foot と呼ばれる構造が形成される。そして 20～60 分の後、foot を介して急激な吸水が起こり花粉は膨潤して丸くなる (Elleman and Dickinson, 1990)。その後、花粉管が発芽し、foot を通って乳頭細胞へ進入していく (Elleman and Dickinson, 1994; Dickinson, 1995)。またこの時、乳頭細胞の直下領域において、多数の分泌小胞が細胞膜と融合する様子や、細胞壁の外層が弛緩し、膨張している様子が観察される (Elleman and Dickinson, 1996)。発芽した花粉管は、クチクラ層を突き抜け、弛緩した細胞壁外層と内層の間を伸長して乳頭細胞の基部に達し、その後、花柱の誘導組織の細胞間隙を経て胚珠に向かう。一方、不和合受粉時には、花粉と乳頭細胞間に foot の形成は認められるものの、その後に起きる、花粉の吸水・発芽や花粉管の乳頭細胞内への進入などが抑制される。

アブラナ科植物で見られるこのような自家不和合反応は、花粉親と雌ずいが同一の *S* 遺伝子を表現型として有する時に誘導されることから、花粉と柱頭の

A



B

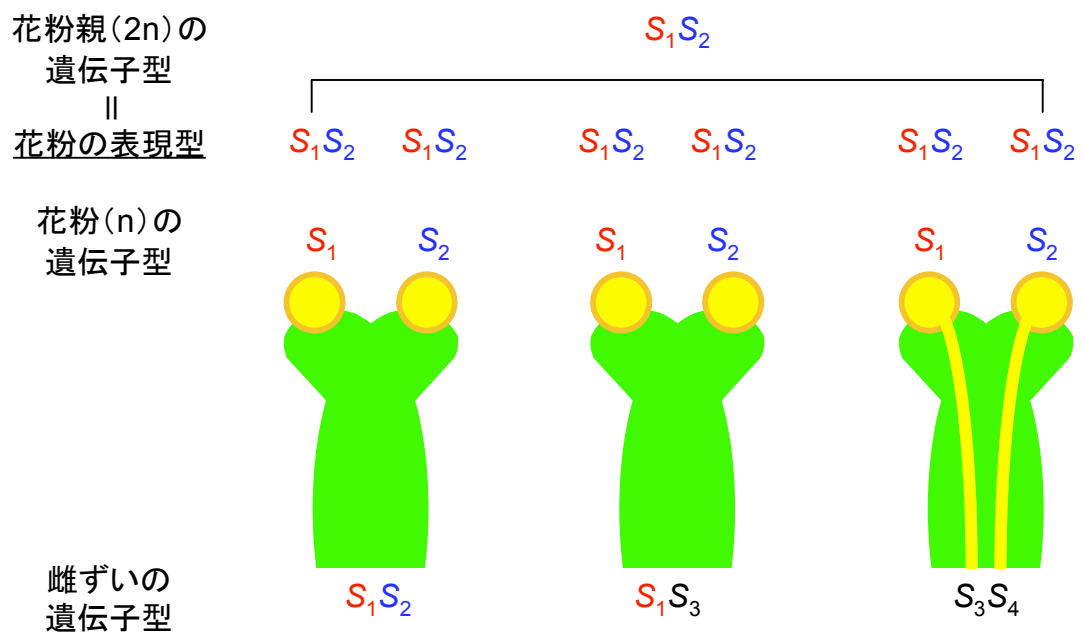


Fig. 2 配偶体型自家不和合性と胞子体型自家不和合性

配偶体型自家不和合性では、花粉の表現型は花粉の遺伝子型と一致するが、胞子体型自家不和合性では、花粉の表現型は花粉親の遺伝子型と一致する。図では、花粉と雌ずいにおいて2つのS遺伝子が共優性である場合を示した。

乳頭細胞上に存在する *S* 遺伝子産物のハプロタイプ特異的な相互作用を介して自他識別が行われていると推定される。そこで、アブラナ科植物自家不和合性の研究はこの *S* 遺伝子産物の実体解明を目的とし研究が進められ、今日までに、雌ずい側の因子として SLG (*S*-locus glycoprotein)、SRK (*S* receptor kinase) が、花粉側の因子として SP11/SCR (*S*-locus protein11/*S*-locus cysteine-rich protein) が同定されている。

SLG はアブラナ科植物柱頭より同定された *S* ハプロタイプ間で多型を示す、約 55 kDa の分泌型糖タンパク質であり、乳頭細胞の細胞壁に非常に多量に存在することが知られている (Takayama *et al.*, 1986, 1987; Nasrallah *et al.*, 1987; Trick and Flavell, 1989; Lalonde *et al.*, 1989; Chen and Nasrallah, 1990; Watanabe *et al.*, 1994)。形質転換植物の解析から、自家不和合反応を補助する機能を有すると考えられているが、その機能は明らかとされていない (Takasaki *et al.*, 2000)。

SRK は SLG と高い相同性を持つ細胞外ドメイン (*S*-domain) と、膜貫通ドメイン、細胞内キナーゼドメインを持つ、受容体型セリン/スレオニンキナーゼとして同定された (Stein *et al.*, 1991)。SRK は SLG とともに *S* ハプロタイプ間で多型を示し、*S*₆₀ ハプロタイプをホモに持つ系統 (*S*₆₀*S*₆₀ 株) に *S*₉ ハプロタイプの SRK (*SRK*₉) を導入した形質転換体の雌ずいは *S*₉*S*₉ 株由来の花粉に対して、不和合性を示すことから、SRK は雌ずい側 *S* 遺伝子であることが明らかにされている (Takasaki *et al.*, 2000)。

SP11 は、当研究室における FDD (fluorescent differential display) 法による探索により、*B. rapa* の *S*₈*S*₈ 及び *S*₁₂*S*₁₂ 株で多型を示す発現遺伝子として見いだされた (Takayama *et al.*, 2000)。また、*B. rapa* の *S*₉*S*₉ 株のゲノム解析により、この遺伝子の対立遺伝子が、*S* 遺伝子座領域に存在し、特異的に発現している遺伝子であることも同時に明らかとなり、SP11 は有力な花粉側 *S* 遺伝子の候補であることが示された。 (Suzuki *et al.*, 1999)。一方、Schopfer ら (1999) は、*B. rapa* *S*₈ ホモ系統の SRK/SLG ゲノム領域の探索から、システイン残基に富むタンパク質をコードする遺伝子として *SP11* を見だし、SCR (*S*-locus cysteine rich) という独自の名前で報告した。彼らは、γ 線照射により得られた *B. oleracea* *S*₁₃*S*₁₃ 株の自家和合変異株の 1 つが *SCR*₁₃ を欠失していたという loss of function の結果、及び *B. oleracea* *S*₆*S*₆ 株由来の *SCR*₆ を *B. oleracea* *S*₂*S*₂ 株に導入した形質転換体の花粉が、*S*₆*S*₆ 株の柱頭に対して不和合を示したという gain of function の結果から、SCR が花粉側 *S* 遺伝子であることを証明した (Schopfer *et al.*, 1999)。さらに、大腸菌で発現させた SP11 タンパク質が、*S* ハプロタイプ特異的に乳頭細胞に不和合反応を誘起し、和合花粉の吸水が阻害されること、 (Takayama *et al.*, 2000)、*S*₈*S*₈ 株及び *S*₉*S*₉ 株の *SP11* を *B. rapa* cv. Osome (*S*₅₂*S*₆₀ 株) にそれぞれ導入した形

質転換体の花粉がそれぞれ S_8S_8 株及び S_9S_9 株の柱頭に対して不和合反応を示すことが示された (Shiba *et al.*, 2001)。以上の実験より、*SP11/SCR* は自家不和合反応の自他識別に関わる花粉側 *S* 遺伝子そのものであることが明らかとなった。さらに、化学合成された *SP11* を柱頭膜画分に添加すると、*S* ハプロタイプ特異的な *SRK* の自己リン酸化活性の上昇が見られること、*B. rapa* 柱頭膜画分から Biotin 化 *SP11* によって *SRK* が *S* ハプロタイプ特異的に精製できることから、*SP11* と *SRK* の *S* ハプロタイプ特異的な相互作用が花粉-乳頭細胞間の自他識別機構の基礎となっていることが明らかとされた (Takayama *et al.*, 2001; Shimosato *et al.*, 2007)。

自家不和合性における自他識別反応が、花粉側因子 *SP11* と雌ずい側因子 *SRK* の相互作用によって引き起こされることが明らかにされる一方で、*SRK* 以降の乳頭細胞内での情報伝達機構に関する研究も同時に進められてきた。これまでの研究で明らかとされてきた情報伝達因子の多くは、*SRK* のキナーゼドメインを bait とした酵母 two-hybrid screening によって同定されたものである。

ARC1 (arm-repeat containing protein 1) は、 β -catenin 様の arm-repeat を持つタンパク質で、*SRK* のキナーゼドメインと直接相互作用するタンパク質として酵母 two-hybrid 法により同定された (Gu *et al.*, 1998)。*ARC1* のアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体は、部分的ながらも自家和合性を示すことから、*ARC1* は自家不和合反応を正に制御する因子であると考えられている (Stone *et al.*, 1999)。*ARC1* は *N* 末端に E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つとされる U-box ドメインを持つことが知られていたが (Azevedo *et al.*, 2001)、最近になって *ARC1* が実際に *in vitro* において E3 活性を持つことが示された。野生株では不和合受粉時に柱頭でユビキチン化タンパク質が増加する一方、*ARC1* のアンチセンス形質転換体ではその増加が認められないことも示された。さらに、プロテアソーム阻害剤によって自家不和合性が弱まることが示され、*ARC1* が *SRK* の下流で活性化され、和合受粉に必須の何らかのタンパク質をユビキチン化し分解することで不和合反応を誘起しているとする仮説が提唱されている (Stone *et al.*, 2003)。

THL1、*THL2* (thioredoxin-h-like 1, 2) もまた、*SRK* のキナーゼドメインと直接相互作用するタンパク質として酵母 two-hybrid 法により同定された (Bower *et al.*, 1996)。Cabrillac ら (2001) は昆虫細胞で発現させた *SRK* を用い、*THL1* が *in vitro* で *SRK* の自己リン酸化を抑制すること、また同じ *S* ハプロタイプの花粉からの抽出タンパクの付加によって、この抑制が解除され *SRK* が自己リン酸化することから、乳頭細胞上の *SRK* は *THL1* によって不活性状態に保持されており、*SP11* の *SRK* への結合によってこの抑制が解除され、*SRK* が活性化される

との仮説を提唱した。しかし、当研究室による検証の結果、この実験の再現性はとれず、化学合成された SP11 は、THL の有無にかかわらず単独で SRK のリン酸化活性の上昇を引き起こすことが示され、この仮説には疑問が持たれた

(Takayama *et al.*, 2001; 下里, 2002)。近年、THL のアンチセンス形質転換体が和合／不和合受粉にかかわらず弱い不稔性を示すことが報告され、現在、THL は乳頭細胞が花粉を受け入れる際に関わる分子であると一般には考えられている (Haffani *et al.*, 2004)。

さらに、*in vitro* で SRK と相互作用する因子として、KAPP (kinase-associated protein phosphatase)、calmodulin、SNX1 (sorting nexin 1) が同定されている

(Vanoosthuyse *et al.*, 2003)。KAPP はシロイヌナズナの変容体型キナーゼと広く結合する negative regulator として知られている分子である (Williams *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1998; Gomez-Gomez *et al.*, 2001)。Brassica oleracea よりクローニングされた KAPP も *in vitro* において SRK の自己リン酸化活性を抑制することから、SRK の negative regulator として機能している可能性が示唆されている

(Vanoosthuyse *et al.*, 2003)。calmodulin、SNX1 はともに、SRK のみならず他の変容体型キナーゼとも同様に結合することが明らかとされており、このことから calmodulin、SNX1 は、植物の変容体型キナーゼに対して、広く何らかの役割を果たしていると考えられている (Vanoosthuyse *et al.*, 2003)。

ここまで述べてきたように、SRK のキナーゼドメインを用いた酵母 two-hybrid screening によって情報伝達系に関わることが期待されるいくつかの因子が同定されてきたが、実際に形質転換実験によって自家不和合性への関与が証明された因子は ARC1 のみである。また ARC1 のアンチセンス形質転換体は、完全な自家和合性の形質を示さないことから、ARC1 を介さない別の情報伝達系の存在が示唆されており、アブラナ科植物の自家不和合情報伝達機構はほとんど明らかとなっていないのが現状である。

近年の植物における情報伝達因子の探索は、主に変異体を用いた遺伝学的解析によって進められている。これは、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) や、イネ (*Oryza sativa*)、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) などのゲノム配列や遺伝子マーカーの解析、データベースの整備などが精力的に進められてきた結果であり、これらの情報を利用して多くの情報伝達因子が変異体の原因遺伝子として単離・同定されてきた。一方、本研究で用いるアブラナ科植物 *B. rapa* は、ゲノム配列や遺伝子マーカーの情報がほとんどないこと、世代期間が長いこと、形質転換実験が困難なことなどから、遺伝学的手法を用いた情報伝達因子の探索には不向きな材料であると考えられており、このようなアプローチは

ほとんど為されてこなかった。

こうしたなか、本研究室では、アブラナ科植物の自家和合性変異株 *B. rapa* var. *Yellow sarson* の解析が進められてきた。*B. rapa* var. *Yellow sarson* はインド原産の自家和合性栽培種である。*Yellow sarson* は、遺伝学的な解析から *S* 遺伝子座とは連鎖しない別の遺伝子座の遺伝子変異によって自家和合性の形質を示すことが明らかとされており、その原因遺伝子は *modifier* (*m*) 遺伝子と命名されている (Hinata *et al.*, 1983)。*m* 遺伝子は劣性形質を示し、*mm* 変異株は完全な自家和合性を示すことから、*M* 遺伝子は自家不和合反応の情報伝達に関わる重要な因子をコードしていると考えられてきた。Ikeda ら (1997) は Differential Display 法によりスクリーニングされた *M* 遺伝子が、水チャネル分子であるアクアポリン様のタンパク質 (*MIP-MOD*) をコードしており、ホモ個体ではその発現量が減少していると報告した。しかし、*B. rapa* の自家不和合系統であるおそめ (*B. rapa* cv. *Osome*) や *S₈S₈* 系統の *MIP-MOD* 遺伝子が *Yellow sarson* と全く同じアミノ酸配列を有すること、自家不和合系統である Waseokabu の *MIP-MOD* 遺伝子の発現量が *Yellow sarson* と同程度に非常に少なかったこと、また、 γ 線照射によって得られた *M* 遺伝子欠損株 (γ -3 株) が *MIP-MOD* 遺伝子を保持していたことから、この *MIP-MOD* 遺伝子が *M* 遺伝子の本体ではないことが示された (Fukai *et al.*, 2001)。*M* 遺伝子は *MIP-MOD* 遺伝子と強く連鎖していることは明らかであるが、その原因遺伝子は長年謎とされてきた。

近年、本研究室における独自のポジショナルクローニングの結果、*M* 遺伝子がプロテインキナーゼをコードすることが明らかとされ、*MLPK* (*M*-locus protein kinase) と命名された (Murase *et al.*, 2004)。*MLPK* は細胞外ドメインを持たない *RLCK* (receptor-like cytoplasmic kinase) ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼである (Shui and Bleecker, 2001)。*Yellow sarson* 由来の変異型 *MLPK* は、キナーゼドメインの保存領域である 194 番目のグリシン残基がアルギニンに置換しており、*in vitro* において自己リン酸化活性を示さないこと、柱頭においてはタンパク質として存在しないことが示された (Murase *et al.*, 2004)。*mm* 変異株は、正常な *SRK* 遺伝子を有していても完全な自家和合性を示すことから、*MLPK* は *SRK* 下流の自家不和合性情報伝達系において重要な役割を果たしていると考えられ、その機能は明らかとなっていない。

現在までに明らかとされている、アブラナ科植物自家不和合性における情報伝達機構の概略図を Fig. 3 に示す。不和合受粉時には、花粉表層に存在する花粉側因子 SP11 が、乳頭細胞上の雌ずい側因子 *SRK* と結合し、*SRK* の自己リン酸化活性を上昇させる。この SP11-*SRK* 間の相互作用は、両者間の *S* ハプロタイプ

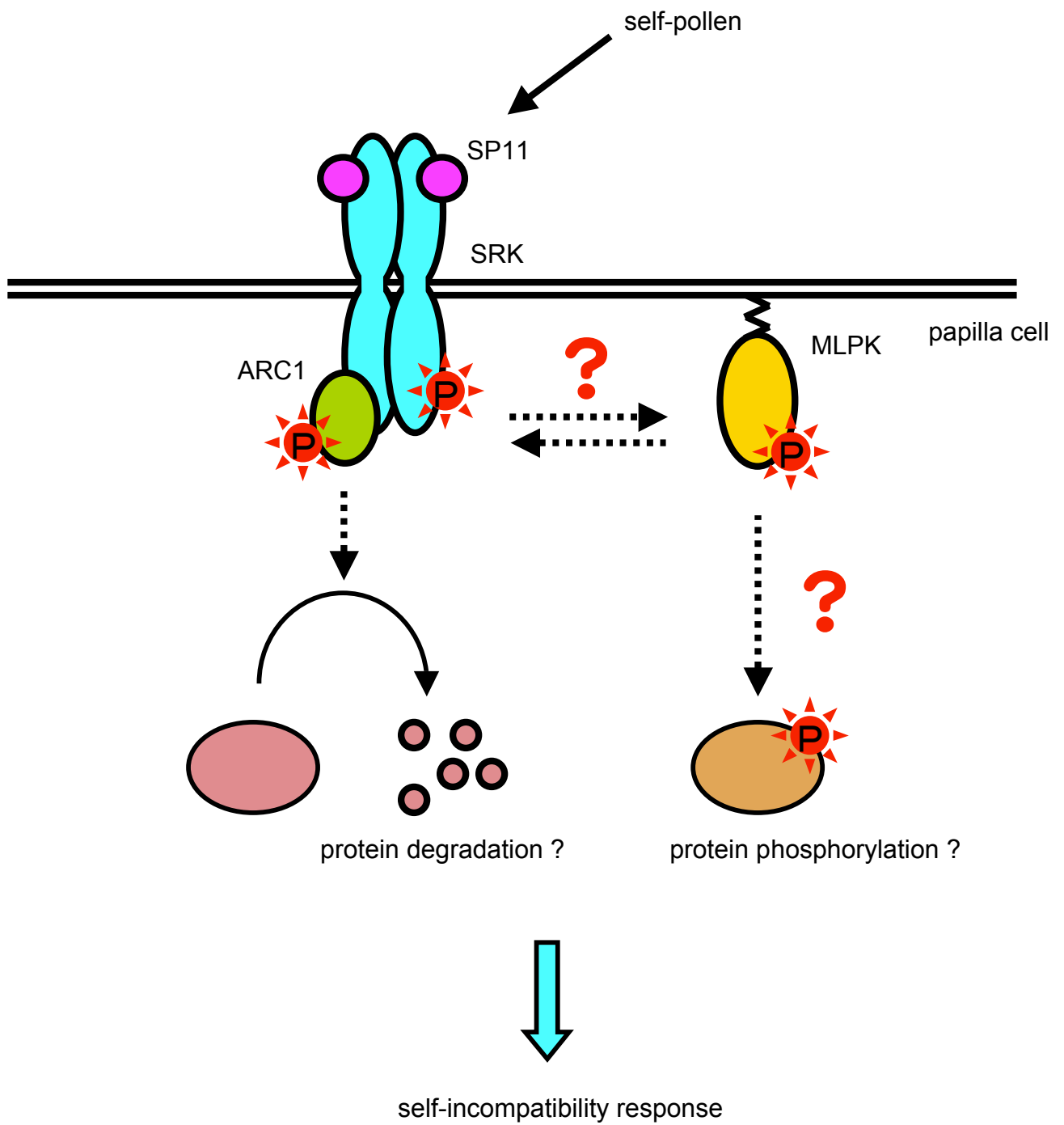


Fig. 3 アブラナ科植物自家不和合反応の分子機構のモデル

が一致したときのみに起きるが、この *S* 特異的な結合が、アブラナ科植物の自家不和合性における自他識別機構の基本となっている。SRK 以降の情報伝達には ARC1 と MLPK が関わることが知られている。ARC1 は SRK によりリン酸化された後、ユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解に関わることで自家不和合反応を正に制御していると考えられているが、ARC1 を介さない別の情報伝達経路の存在も示唆されている。MLPK は、SRK の下流でタンパク質リン酸化を介して情報を下流に伝えていると考えられているが、その標的因子は同定されておらず、SRK と ARC1 の関係も明らかとされていない。SRK と MLPK がキナーゼ活性をもつ分子であること、ARC1 がリン酸化されることなどから、この自家不和合情報伝達系には、タンパク質のリン酸化が深く関わっていると推定される。

筆者は、アブラナ科植物の自家不和合性に関わるリン酸化を介した情報伝達機構を解明することを目的とし、情報伝達因子として重要な役割を果たしていると考えられる MLPK の機能解析と、和合／不和合受粉時の乳頭細胞におけるタンパク質リン酸化の変動解析という2つの方向から研究を進めることとした。

本論文の第1章では、MLPK に関して発現解析、細胞内局在機構など詳細に解析した。そして、MLPK の持つ膜局在性が自家不和合情報伝達系に重要な役割を果たしていることを見出した。継いで第2章では、MLPK と SRK 間相互作用、MLPK の活性調節機構を解析することで、自家不和合情報伝達系における MLPK の機能を明らかにした。第3章では、二次元電気泳動法により、和合／不和合受粉時のリン酸化レベルの変動を *in vivo* で検出する実験系を確立し、和合／不和合受粉特異的に柱頭でリン酸化される新規タンパク質を同定した。

第1章

MLPK の発現調節と膜局在性の意義

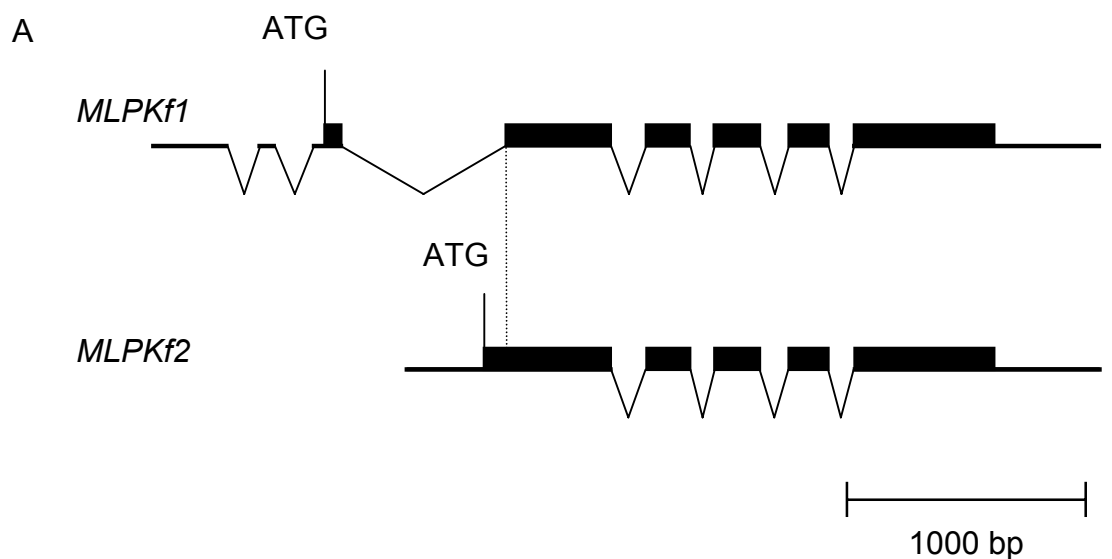
1-1 序

近年、アブラナ科植物の自家和合性変異株 Yellow sarson の原因遺伝子としてプロテインキナーゼをコードする *MLPK* (M-locus protein kinase) が単離・同定された (Murase *et al.*, 2004)。MLPK は、*N* 末端側から *N*-ミリスチル化モチーフ、Ser-rich 領域、セリン/スレオニンキナーゼドメインからなる構造を有する 404 アミノ酸からなるタンパク質であり、シロイヌナズナの RLCK (receptor-like cytoplasmic kinase) ファミリーに属している。生化学的な解析から、MLPK は、柱頭の細胞膜画分に存在する膜結合型のキナーゼであること、この膜局在性には *N* 末端のミリスチル化モチーフが関わっていることが明らかとされた

(Murase *et al.*, 2004)。MLPK の欠損した *mm* 株は完全な自家和合性の表現型を示すことから、MLPK は自家不和合情報伝達系を正に制御する重要なタンパク質であることが期待される。

MLPK の 5' RACE 解析の過程で、当研究室の村瀬は、MLPK には *N* 末端の異なる 2 つの isoform が存在することを見出し、それぞれ MLPKf1、MLPKf2 と命名した (村瀬, 2004)。MLPKf1 は既に報告されていた isoform であり、8 つのエキソンと 7 つのイントロンからなるゲノム構造を有している (Fig. 1-1A)。一方、新たに発見された MLPKf2 は、MLPKf1 の第 3 イントロン内に転写開始点を持ち、その結果、MLPKf1 と比較して *N* 末端部分のみ異なる、410 アミノ酸からなる構造を有している (Fig. 1-1, 1-2)。また、MLPKf2 には MLPKf1 に見られる *N*-ミリスチル化モチーフは存在しなかった (Fig. 1-1B)。RT-PCR による発現解析の結果、MLPKf2 は、柱頭特異的な強い発現を示し、MLPKf1 は、葯を除く組織で広く発現していた (村瀬, 2004; Fig. 1-3)。このことから、アブラナ科植物の自家不和合性には、これまで報告されてきた MLPKf1 だけではなく、MLPKf2 も関わっている可能性が示唆される。

そこで、本章では、MLPK の 2 つの isoform の関係について、これまで得られている知見をもとに、MLPKf1 と MLPKf2 の発現調節と膜局在性に関する詳細な解析を行った。さらに、その過程で見えてきた、自家不和合情報伝達機構における MLPK の機能と膜局在性との関係を明らかにした。



B

MLPKf1 MGICMSVQ-----VKAESPSNT

MLPKf2 MGFVKKVQSKVFLYVNYLFGVCIGA SPKYMSSEANDTQSMGSKCSSVSVR

TSPRTEGEILQSPNLKCFSFAELKA ATRNFRLDSVLGEGGFGCVFKGWID

EESLTASKPGTGMVIAV**R**LNIEGW QGHQEWLAEVNYLGRLSHPNLVKLI

GYCLEDEHHLLVYEFMPCGSLENHL FRRGSYFEPLSWNIRLKIALGCAKG

LAFHSAETOVIYRDFKTSNILLDS NYNAKLSDFGLAKDGPTGDNSHVST

RVIGTYGYVDPGYLLNGHLTTKSDV YSYGVVLEMLSGRKVVDNNRPPRE

OKLVDWAKPLLANKKKVSRVIDNRI RDQISVKEAHKVATQVFRCLDVDKN

ORPNMNEIVFHLENIQASREEGKNK TEKRMRRRRDSFAQQTGVGGIATAY

PRPSASPLFV

Fig. 1-1 *MLPKf1* と *MLPKf2* の構造

MLPK から産生される 2 つの isoform (*MLPKf1* と *MLPKf2*) の mRNA の構造 (A) と、アミノ酸配列 (B) を示した。

下線 (赤) は *N*-ミリスチル化モチーフを、下線 (青) は疎水性領域を、下線 (橙) は Ser-rich 領域を、下線 (黄) はセリンスレオニンキナーゼドメインを示した。

ATP 結合部位である *MLPKf1* の 112 番目のリジンを赤字で示した。

AGTAATAAAAACAATTGTAGCTAGTCGTTGCTAAATGGAACAATTATAGCAACCAATTAT
 CTCTAGCTAATGAGTAACATTTAGCTATAGATTACCAACGGAATCCGTCTCTAGCTATA
 TAGATACGGAATGCTATAGTTAGCCACATATTTAGCTACAAAGTTAAACTATGTGTTTT
 GTCCTATATGTGTAGTTAAAAACCTGGCTACGAAAATGTCTTCGCCAATCTATAACTA
 ACTTAATGAATTCTTGTGTCTTGGTTGTGGCGCCGCCCTTACACAAAGCCGATGCACTC
 GCTTGC GGCCATTGGTTTTATTAATTAAATTCGGCCACACCTTACAAATAACTTCTTTAG
 TCTAGTGGCTAACAGGTATGTCCACAATTTCAACTTCTTATTTTCTTTCTGTTCTTCTCT
 TTTCTTCAAAGACTTAAAGAGTGGCCACATATATATTTTTTTTTTGGTTGCATCCAGCCT
 TTCAAATTCTAGGACTGGCTCTGCTTGGTTGACAACGAAATTTGGTGAGCAAAGTTTCCT
 TCTTATTAATTTAATGTTTCGTTTTCTTTAATATGTACTTTCATCCAGCTTGAAAACATTT
 CAAATCTCTTTGTCCTCACATTATGATATGTTTCTTCTTGAGATAGAAAAATGGGTTTT
 GTTTGATCCGTCTCAAATCATGGGGATTTGCATGAGTGTTCAAGTTAAAGCTGAGAGTC

M G I C M S V Q V K A E S

CAAGTAACACAGGTACTACAAGGCTCAAGCTTTCAAATTTTCATATATAGAATAACGACTA
 P S N T

CTCCTACAAATGTTTATTTGTAAACAAATATTTAATTTTGAGGTTTTAAGAGTTTGAATT
 TATTTTGGTCGGCAATAGAGTAGGGTCTAACTTTAGGGTTTGTTGTTCAATTTATTTTTT
 ACGTATTTTTTTCAATTCGAGGTTAGGCTTTCCGGGACTTAAGTCACTTAACTTAAAGT
 TTGGTTTCTAACGCTAAAAATAATTAGTTTTTTTTTTATATTTCAAAAAACAAATTAAT
 GATTAGGTTTTCGTAACTGTCTTTTTGGGTGTTTGGCTAATTCACGGCTCATTTTAGTT
 GCCAGAGGAAAAGACAAGCAAGAAAATTCAGAATCTTTACATTTGTCTGATCTCTTAATT
 ACAACAAAACCATTTGTACTAAATTTTCGGATAAATGGGTTTTGTGAAAAAGTGCAATCA

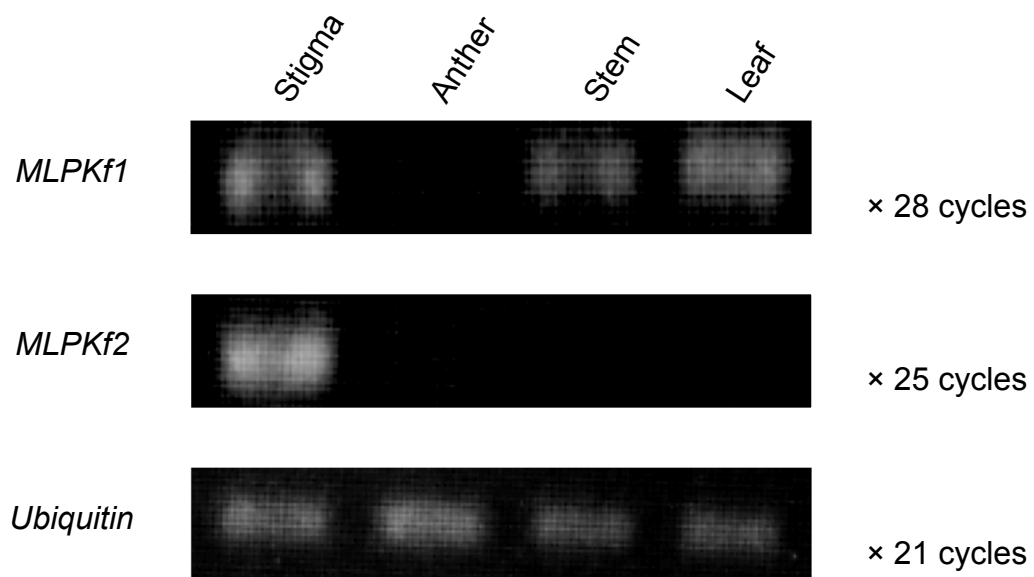
M G F V K K V Q S

AAAGTTTTTTTATATGTAACTATTTGTTTGGTGTTTGCATAGGTGCGAGTCCGAAGTAT
 K V F L Y V N Y L F G V C I G A S P K Y

ATGAGCTCAGAGGCAAATGATACACAAAGCATGGGAAGCAAATGCTCTTCTGTG.....
 M S S E A N D T Q S M G S K C S S V

Fig. 1-2 *MLPK*遺伝子の5'領域のゲノム構造

MLPKf1 (赤字)、*MLPKf2* (青字) に特異的なエキソンの配列を、
 下線 (黒) は*MLPKf1*と*MLPKf2*に共通なエキソンの配列部分を示した。
 塩基配列の下は、コードしているアミノ酸配列を示した。
 下線 (赤) と下線 (青) は、*in situ*ハイブリダイゼーションに用いたプローブの作製部位を示した。



(村瀬、2004)

Fig. 1-3 *MLPK*遺伝子の発現解析

*MLPKf1*と*MLPKf2*の柱頭、約、茎、葉における発現を特異的プライマーを用いたRT-PCR法により解析した村瀬（2004）の図を示した。

1-2 材料・方法

実験材料

本研究で用いた化学薬品は特に記載のない場合、和光純薬製もしくはナカライテクス製の特級試薬、遺伝子工学用試薬は Takara 製のものをを用いた。

本研究では植物材料として、本学で栽培・維持されている自家不和合性 *Brassica rapa* S_8 ホモ系統 (S_8S_8MM)、 S_9 ホモ系統 (S_9S_9MM)、 S_{12} ホモ系統 ($S_{12}S_{12}MM$)、*B. rapa* var. *yellow sarson* ($S_{12}S_{12}mm$) 及び、*Arabidopsis thaliana* (Columbia) を用いた。

$S_{12}S_{12}$ ホモ系統 ($S_{12}S_{12}MM$)、及び *mlpk/mlpk* 変異株 (S_8S_8mm) は、アブラナ科植物の自家和合種である *B. rapa* var. *Yellow salson* を、*B. rapa* S_8 ホモ系統とそれぞれ 4 回、戻し交配を行った株の後代を用いた。 $S_{12}S_{12}$ 株及び *mm* 株の選抜は村瀬 (2004) の方法に従い行った。

Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR に使用する total RNA は、*B. rapa* (S_9S_9MM) の柱頭および葉から、ISOGEN (Nippongene) を用い、添付のプロトコールに従い抽出・精製した。得られた total RNA 画分は、RNase-free DNaseI (Qiagen) を加え、37°C、30 分間インキュベートすることで、DNA を完全に除去した。得られた total RNA 画分は、NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (スクラム) を用い、吸光度 ($\lambda=260$ nm) より濃度を算出した。

One-step Real-time RT-PCR は、QuantiTect™ SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen) を用い、添付のプロトコールに従い行った。反応に用いたプライマーの配列及び組み合わせは、*MLPKf1* は *MLPKf1-F* (5'-ATGGGGATTTGCATGAGTGTTC-3') と *MLPKf2-52_R* (5'-CTAGCTTGTTCTGACAGACACAGA-3')、*MLPKf2* は *MLPKf2_F* (5'-ATGGGTTTTGTGAAAAAAGTGCA-3') と *MLPKf2-52_R* であり、PCR の反応条件は、[50°C, 30 min; 95°C, 15 min; (94°C, 15 sec; 55°C, 30 sec; 60°C, 30 sec) × 40 cycles] である。

テンプレートとして先に精製した total RNA を 100 ng 加えた反応溶液 20 μ l を、ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems Japan Ltd.) を

用いて、逆転写及び PCR 反応を行った。後述の *MLPKf1*、*MLPKf2* エントリーベクターの希釈系列 (1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 、 1×10^0 、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} fg) も同様に反応を行い、検量線を作製した。この検量線を基にテンプレートして加えた 100 ng の total RNA より逆転写された目的の cDNA 量として発現量を算出した。

in situ ハイブリダイゼーション

in situ ハイブリダイゼーションは、Takayama ら (2002) の方法に従い、パラフィン切片を作成し、ハイブリダイゼーション反応を行った。*B. rapa* S₈S₈MM より採取した開花前日の花柱を、固定液 (50 mM phosphate buffer (pH 7.2)、4% paraformaldehyde、0.25% glutaraldehyde) に一晩浸したものを、Paraplast Xtra (Sigma) に包埋した。これを、ミクロトーム (HM640E, microm) を用いて、厚さ 8 μ m の切片を作製した。Digoxigenin (DIG) 標識した、DNA プローブは日本遺伝子研究所に受託し、sense 及び antisense プローブを合成した。プローブとして用いた合成 DNA の領域は、*MLPKf1* は

(5'-GATCCGTCTCAAAATCATGGGGATTTGCATGAGTGTTTCAGGTTAAAGCTGAGAGTCCAAG-3')、*MLPKf2* は

(5'-ACATTTGTCTGATCTCTTAATTACAACAAAACCATTTGTACTAAATTTCGGATAAATGGG-3') である (Fig. 1-2)。

調製した切片は、DIG 標識プローブを含む、hybridization buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2.5 mM EDTA、1 $\times$ Denhardt's solution、300 mM NaCl、50% formamide、10% dextran sulphate、1 mg/ml salmon sperm DNA) に浸し、42°Cで一晩、ハイブリダイゼーションを行った。その後、45°Cの 50% formamid を含む 2 $\times$ SSC 溶液 (33 mM NaCl、33 mM Na₃(C₆H₅O₇) $\cdot$ 2H₂O) で 2 回、45°Cの 2 $\times$ SSC 溶液で 2 回、室温の 1 $\times$ SSC 溶液で 1 回、洗浄した。次に、TBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、137 mM NaCl、0.05% Tween20) で洗浄後、Superblock (PIERCE) を用い、30 分間ブロッキングを行った。その後 1% BSA を含む TBST buffer で 1/500 に希釈した Anti-Digoxigenin-AP (Roche) 溶液中で、室温で一晩反応させた。その後、TBST buffer で 5 分間、3 回洗浄し、BCIP/NBT (VECTOR laboratories, Inc.) を用いて発色させた。

無細胞翻訳系による組換えタンパク質の作製

組換えタンパク質を発現するコンストラクトを作製するために、まず、既存の発現ベクターpCMVTnTTM vector (Promega) をディステーションベクターに改変した。pCMVTnTTM vector を XhoI で制限酵素処理し、平滑末端処理後、Gateway[®] rf A Cassettes (Invitrogen) とライゲーションし、pCMVTnTgw とした。

次に、*MLPKf1*、*MLPKf2*、*MLPKf1*^{G2A}、*MLPKf2*^{G2A} を *B. rapa* (*S₉S₉MM*) の開花前日の柱頭より抽出した total RNA より合成した cDNA をテンプレートとした PCR 反応により増幅し、エントリーベクターpENTR/D-TOPO (Invitrogen) にクローニングした。PCR 反応に用いたプライマーの配列及び組み合わせは、*MLPKf1* は *MLPKf1_F* (5'-CACCATGGGGATTTGCATGAGTGTTCAG-3') と *MLPK_R* (5'-TCAGACAAACAGAGGCGAAGCAGACGGAC-3')、*MLPKf2* は *MLPKf2_F* (5'-CACCATGGGTTTTGTGAAAAAAGTGCAATC-3') と *MLPK_R*、*MLPKf1*^{G2A} は *Mf1G2A_F*

(5'-CACCATGGCGATTTGCATGAGTGTTCAGGTAAAG-3') と *MLPK_R*、*MLPKf2*^{G2A} は *Mf2G2A_F* (5'-CACCATGGCTTTTGTGAAAAAAGTGCA-3') と *MLPK_R* であり、PCR の反応条件は、[95°C, 5 min; 94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 2 min] × 35 cycles; 68°C, 5 min] である。作製した *MLPKf1*、*MLPKf2*、*MLPKf1*^{G2A}、*MLPKf2*^{G2A} エントリーベクターの pCMVTnTgw への組換え反応は、Gateway[®] LR Clonase[®] Enzyme Mix (Invitrogen) を用いて、そのプロトコールに従い行った。

無細胞翻訳系による組換えタンパク質の作製には、TnT[®] Coupled Wheat Germ Extract Systems (Promega) を用い、添付のプロトコールに従い行った。

全タンパク質の検出には、L-[³⁵S]Methionine (GE Healthcare) を終濃度 0.1 μCi/μl になるように加え、また、ミリストイル化タンパク質の検出には、[9, 10(n)-³H]Myristic acid (GE Healthcare) を終濃度 1 μCi/μl になるように加えた。[9, 10(n)-³H]Myristic acid は、遠心エバポレーターを用い、エタノールを蒸発させた後、超純水に懸濁したものをを用いた。タンパク質の合成後、10%のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、ゲルの乾燥後、イメージングアナライザー (BAS2500, Fuji Film) を用い、標識されたタンパク質を検出した。

タバコプロトプラストでの一過的発現に用いる発現コンストラクトの作製

C 末端側に蛍光タンパク質 Venus を融合させたタンパク質をタバコ BY-2 細胞で発現させるコンストラクトを作製するために、まず、gateway cassette と Venus を連結させたディスティネーションベクターを作製した。

Venus のコンストラクトは理化学研究所 宮脇敦博士により提供された。Venus をフォワードプライマー、リバースプライマーに SmaI と SacI の制限酵素サイトをそれぞれ付けたプライマーセットで PCR 反応を行い、pGEM T-easy (Promega) にクローニングした。PCR 反応に用いたプライマーは、SmaVenusF (5'-CCCGGGACCATGGTGAGCAAG-3') と SacVenusR (5'-GAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTC-3') であり、PCR の反応条件は、[95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 90 sec) × 35 cycles; 68°C, 5 min] である。

配列確認後、SmaI/SacI で切り出し、植物発現ベクター pBI221 (Clontech) の SmaI/SacI 部位にライゲーションを行った。さらに、このベクターを SmaI で切断後、Gateway® rf A Cassettes (Invitrogen) とライゲーションし、35Spro:gw:Venus/pBI221 とした。

次に、*MLPKf1(-stop)*、*MLPKf1^{G2A}(-stop)*、*MLPKf2(-stop)*、*MLPKf2^{G2A}(-stop)*、*MLPKf2Δ11-23(-stop)*、を *B. rapa* (*S₉S₉MM*) 柱頭由来の cDNA をテンプレートとした PCR 反応により増幅し、エントリーベクター pENTR/D-TOPO (Invitrogen) にクローニングした。PCR 反応に用いたプライマーの配列及び組み合わせは、*MLPKf1(-stop)* は MLPKf1_F と MLPK(-stop)_R

(5'-GACAAACAGAGGCGAAGCAGACGG-3')、*MLPKf1^{G2A}(-stop)* は、Mf1G2A_F と MLPK(-stop)_R、*MLPKf2(-stop)* は、MLPKf2_F と MLPK(-stop)_R、*MLPKf2^{G2A}(-stop)* は、Mf2G2A_F と MLPK(-stop)_R、*MLPKf2Δ11-23(-stop)* は、Mf2 Δ HR_F

(5'-CACCATGGGTTTTGTGAAAAAAGTGCAATCAAAAGGTGCGAGTCCGA AGTATATG-3') と MLPK(-stop)_R であり、PCR の反応条件は、[95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 2 min) × 35 cycles; 68°C, 5 min] である。

作製した *MLPKf1(-stop)*、*MLPKf1^{G2A}(-stop)*、*MLPKf2(-stop)*、*MLPKf2^{G2A}(-stop)*、*MLPKf2Δ11-23(-stop)* エントリーベクターの 35Spro:gw:Venus/pBI221 への組換え反応は、Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix (Invitrogen) を用いて、そのプロトコールに従い行った。

BY-2 細胞のプロトプラスト化と PEG 法を用いた形質転換

タバコ培養細胞は酵素溶液（4% Cellulase Onozuka RS（Yakult）、0.3% Pectolyase Y-23、0.4 M Mannitol、5 mM MES-KOH (pH 5.8)）中で 2 時間、室温でインキュベートし、プロトプラストにした。プロトプラストは 50×g で 2 分間遠心して回収し、wash buffer（0.4 M Mannitol、70 mM CaCl₂、5 mM MES-KOH (pH 5.8)）で 2 回洗浄した。

PEG 法によるプロトプラストへの遺伝子導入は、Abel と Theologis (1994) の方法を参考にして行った。プロトプラストに W5 buffer (154 mM NaCl、125 mM CaCl₂、5 mM KCl、5 mM glucose、1.5 mM MES-KOH (pH 5.8)) を細胞密度が 1.0×10^5 cells/ml になるように加え、懸濁し、氷上で 30 分インキュベートした。遠心し、上清を除いた後、300 μ l の MaMg buffer (0.4 M mannitol、15 mM MgCl₂、5 mM MES-KOH (pH 5.8)) を加えたプロトプラスト溶液に、30 μ g のプラスミドと、50 μ g の Salmon tests DNA (SIGMA)、300 μ l の PEG-CMS 溶液 (0.4 M mannitol、100 mM Ca(NO₃)₂、40% polyethyleneglycol 4000 (Furuka)) を加え、懸濁し、氷上で 20 分インキュベートした。プロトプラストを W5 buffer で 2 回洗浄した後、プロトプラスト培養液（1×Murashige and Skoog Plant Salt Mixture、1×Gamborg B5 vitamins、3% sucrose、0.4 M mannitol (pH 5.8)）に移し、暗黒下 25℃で、一晚培養した。その後、共焦点レーザー顕微鏡（LSM510 META, Carl Zeiss）を用い、Venus の蛍光を観察した。

B. rapa 乳頭細胞での一過的発現に用いる発現コンストラクトの作製

B. rapa 乳頭細胞で、*MLPK* 及び変異型 *MLPK* を発現するコンストラクトを作製するために、まず、乳頭細胞で高発現を示す *SLG₉* プロモーターの下流に gateway cassette をつないだディスティネーションベクターを作製した。*SLG₉* プロモーターを含むコンストラクト *SLG9pro:SP11/pBI101* は、東北大学 渡辺正夫教授より提供された。

まず、*SLG9pro:SP11/pBI101* を HindIII/BamHI で *SLG₉* プロモーターを切り出し、*pBI221* の HindIII/BamHI サイトにライゲーションした。さらに、このベクターを、SmaI/SacI で切断し、平滑末端処理後、Gateway® rf A Cassettes (Invitrogen) とライゲーションし、*SLG9pro:gw/pBI221* とした。

次に、*MLPKf2Δ11-23* を *B. rapa* (*S₉S₉MM*) 乳頭由来の cDNA をテンプレート

としたPCR反応により増幅し、エントリーベクターpENTR/D-TOPO (Invitrogen) にクローニングした。PCR反応に用いたプライマーの配列及び組み合わせは、Mf2 Δ HR_F と MLPK_R であり、PCRの反応条件は、[95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 2 min) $\times$ 35 cycles; 68°C, 5 min]である。

作製した、MLPKf1^{G2A}、MLPKf2 Δ 11-23 エントリーベクター、及び、前述の MLPKf1、MLPKf2、MLPKf1^{G2A} エントリベクターの SLGp:gw/pBI221 への導入は、Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix (Invitrogen) を用いて、そのプロトコールに従った。

RFP を乳頭細胞で発現させるコンストラクト (SLGp:RFP) は、村瀬によって作製されたものを用いた (Murase et al., 2004)。

パーティクルガン法による *B. rapa* 乳頭細胞への遺伝子導入

パーティクルガンを用いた *B. rapa* 乳頭細胞への遺伝子導入は、Murase ら (2004) の方法に従った。

導入するプラスミドは、Endofree Plasmid Maxi kit (Qiagen) を用いて精製した。精製した MLPK 発現プラスミドと RFP 発現プラスミドは各 30 μ g をあらかじめ混合し、2 mg の 1.0 Micron Gold (BIO-RAD) に結合させた。250 μ l の 100% エタノールで洗浄後、150 μ l の 100% エタノールに懸濁し、-20°C で保存した。

開花前日の *B. rapa* (*S₈S₈mm*) つぼみから、花弁、がく、雄ずいを取り除いた花柱を MS 培地 (1 $\times$ Murashige and Skoog Plant Salt Mix (Wako)、1 $\times$ Gamborg B5 Vitamin、3% sucrose、0.2% phytagel (SIGMA)) に挿した。パーティクルガンには、Model PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System (BIO-RAD) を、Rupture Disk (BIO-RAD) は、900 psi のものを用いた。サンプルは下から2段目の位置に置き、プラスミド 1 μ g に相当する上記の金粒子を1サンプルにつき、2度打ち込んだ。遺伝子導入後の花柱は、25°C で20時間、静置したのち、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 META, Carl Zeiss) で RFP の蛍光を観察した。RFP 蛍光の見られる乳頭細胞に対し、マニピレーターを用いて和合受粉 (*S₉S₉MM*) あるいは不和合受粉 (*S₈S₈MM*) を行った。1時間後、花粉管の乳頭細胞への進入の有無を観察した。

1-3 結果

MLPK の発現解析

これまでの研究から、MLPK は2種類の転写産物 (*MLPKf1*、*MLPKf2*) を産生すること、これらの転写産物から翻訳されたタンパク質はN末端部分の配列のみが異なるキナーゼ分子であることが明らかにされている (村瀬、2004; Fig. 1-1, 1-2)。MLPK のこれら2つの isoform の関係を明らかにする上で、両者間の発現部位・発現時期の違いを明確にすることは重要である。

B. rapa 柱頭由来の cDNA ライブラリーを用いた 5' RACE 解析の結果、柱頭では主に *MLPKf2* が発現していることが示された (村瀬、2004)。また、RT-PCR による発現解析の結果、*MLPKf2* は柱頭で特異的に発現し、*MLPKf1* は葯を除く全身で発現していることが明らかとされている (村瀬、2004; Fig. 1-3)。このことから、アブラナ科植物の自家不和合性には、*MLPKf2* が主に関わっていると推定されるが、*MLPKf1* も同様に柱頭で発現が見られることから、両者の関係は依然不明確である。

そこで、*MLPKf1* と *MLPKf2* の花の発達過程における発現パターンを詳細に解析するために、Real-time RT-PCR を行い、花の発達過程における柱頭、並びに葉での *MLPKf1* と *MLPKf2* の mRNA 量を定量した。その結果、柱頭における発現量はどの stage においても *MLPKf2* は *MLPKf1* よりも高い発現を示すことが明らかになった (Fig. 1-4)。この結果は、*MLPKf2* が柱頭における主な転写産物であることを示したこれまでの解析結果と一致する。また、*MLPKf1*、*MLPKf2* は花の成長過程に伴い徐々に発現量が増加し、開花当日の柱頭で最も高い発現を示した (Fig. 1-4)。この発現パターンは、*SRK*、*SLG* などの自家不和合関連遺伝子のものと類似し (Nasrallah *et al.*, 1988; Goring and Rothstein, 1992; Robert *et al.*, 1994)、アブラナ科植物が自家不和合性を獲得する時期とも一致していることから、*MLPKf1* と *MLPKf2* は共に自家不和合反応に関わっている可能性が示唆される。さらに、*MLPKf1* は、*MLPKf2* と比較してやや遅い時期であるつぼみの大きさが 6~8 mm の時期から顕著な発現上昇が見られた。さらに、柱頭においてはどの stage でも *MLPKf2* は、*MLPKf1* よりも発現量が高く、*MLPKf1* は葉で *MLPKf2* よりも発現量が高かった (Fig. 1-4)。この結果は、*MLPKf1* と *MLPKf2* は互いに異なる発現調節を受けていることを示している。

MLPKf1 と *MLPKf2* はともに柱頭での発現が認められたが、実際に自家不和合反応の場である柱頭表層の乳頭細胞で発現しているかどうかは、重要な問題で

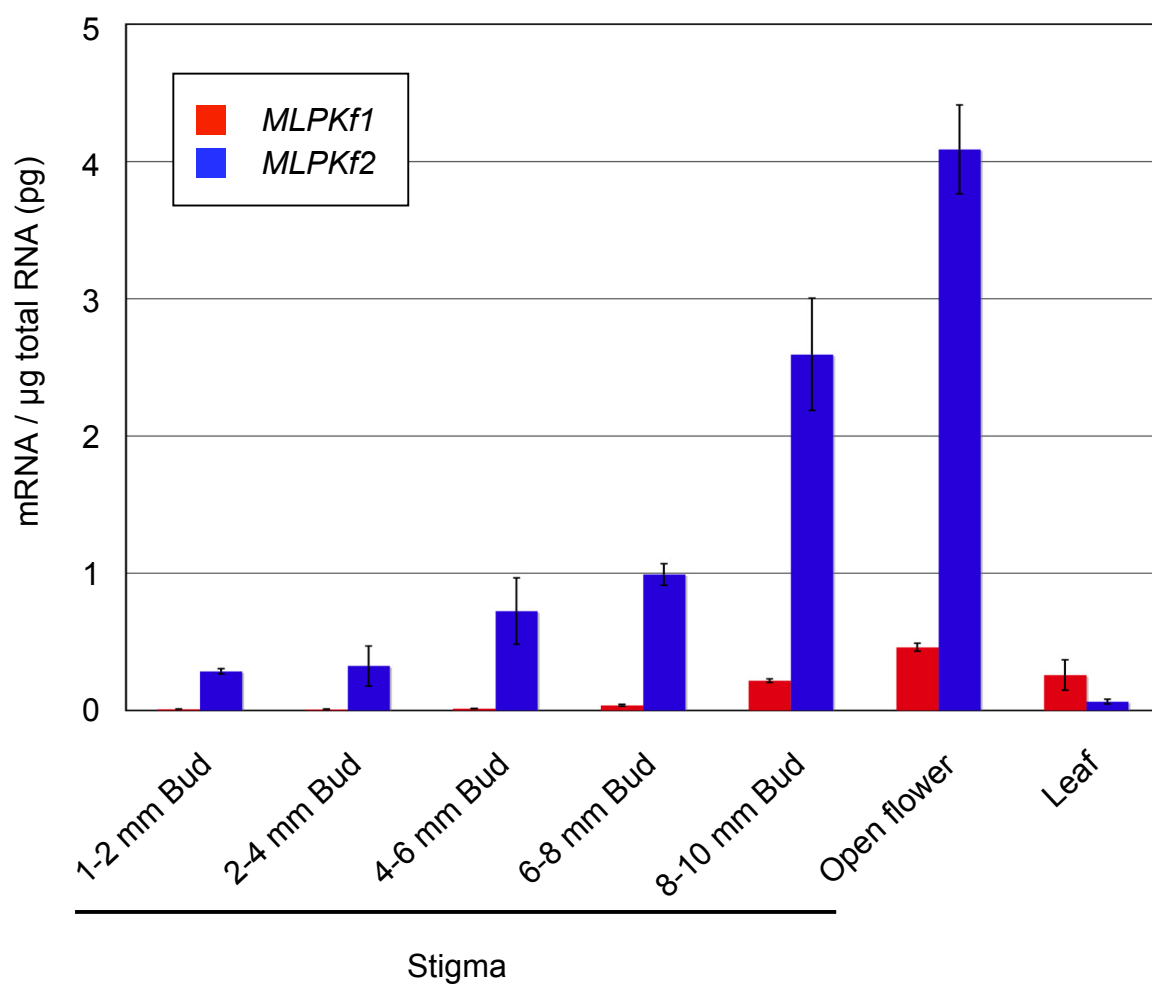


Fig. 1-4 Real-time PCRによる*MLPKf1*と*MLPKf2*の発現解析

つぼみの各成長段階より採集した柱頭と葉より抽出した total RNA をテンプレートに*MLPKf1*と*MLPKf2*特異的なプライマーを使用したReal-time PCRによる発現解析を行い、各組織に由来するmRNA量を定量した。

あるが、これまで明らかとされていない。そこで、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、*MLPKf1* と *MLPKf2* の乳頭細胞での発現を確認することとした。

Real-time PCR による解析結果より、*MLPKf1* と *MLPKf2* で強い発現が見られた開花前日の *B. rapa* S₉S₉ 株の花柱より切片を作製し、*MLPKf1* あるいは *MLPKf2* に特異的な領域で sense 及び antisense プローブを作製し、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。プローブの作製位置は Fig. 1-2 に示した。*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、*MLPKf1* と *MLPKf2* は共に、乳頭細胞で発現していることが明らかとなった (Fig. 1-5)。この結果は、*MLPKf1* と *MLPKf2* の双方ともが、自家不和合情報伝達機構に関わっている可能性を示唆している。

MLPK の細胞内局在機構

MLPKf1 と GFP との融合タンパク質をタバコ培養細胞で発現させると、GFP の蛍光が細胞膜上で検出されること、また、MLPK 特異的抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、MLPK がタンパク質レベルで柱頭の膜画分から特異的に検出されることが示されており、この結果から、MLPK は細胞膜に局在していると考えられている (Murase *et al.*, 2004)。*MLPKf1* は、*N* 末端に典型的な *N*-ミリスチル化モチーフを持つことから (Boisson *et al.*, 2003)、この *N*-ミリスチル化が *MLPKf1* の膜局在性に関わっていると考えられており、実際に *N*-ミリスチル基による修飾部位である 2 残基目のグリシンをアラニンに置換した変異型 *MLPKf1* は、膜局在性が失われることが報告されている (Murase *et al.*, 2004)。一方で、*MLPKf2* も細胞膜上に存在することが期待されるが、*MLPKf2* の *N* 末端には、2 残基目のグリシンは保存されているものの、明確なミリスチル化モチーフは存在しない (Fig. 1-1B)。

そこで、*MLPKf2* が、ミリスチル化されていないかどうか確認するために、小麦胚芽抽出液を用いた無細胞翻訳系で組換えタンパク質を翻訳させ、*MLPKf1* 又は *MLPKf2* への [³H]-ミリスチン酸の取り込みの有無を確認した。その結果、典型的な *N*-ミリスチル化モチーフを有する *MLPKf1* にはミリスチル基の取り込みが検出された一方で、*MLPKf2* には、[³H]-ミリスチン酸由来の放射能シグナルは全く検出されなかった (Fig. 1-6)。この結果は、*MLPKf1* が *N*-ミリスチル基を介して細胞膜に局在していることを、また *MLPKf2* は、*N*-ミリスチル基を介さず、*MLPKf1* とは異なる機構で膜に結合することを示唆している。

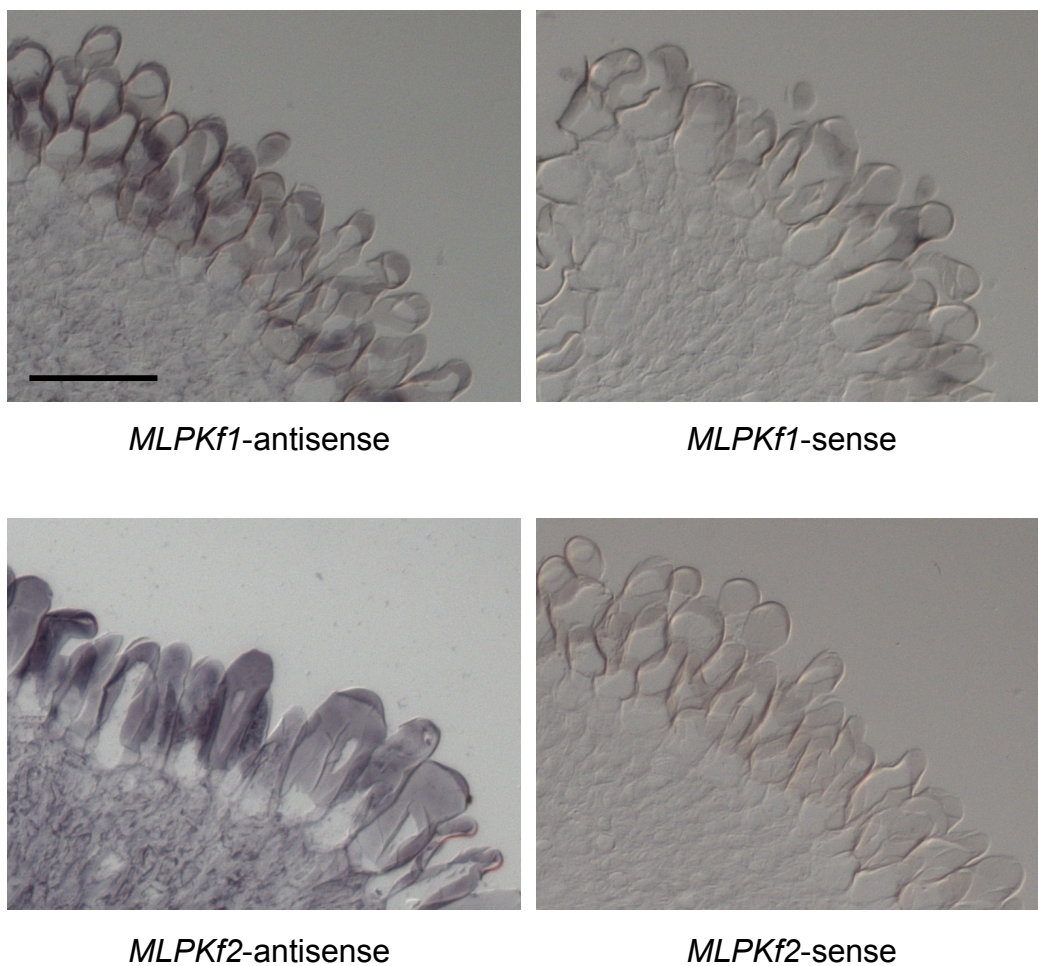


Fig. 1-5 *in situ* ハイブリダイゼーションによる*MLPK*の発現解析

B. rapa S_9S_9 株の雌ずいより作製したパラフィン切片を用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。*MLPKf1*及び*MLPKf2*に特異的な配列 (Fig. 1-2) を基にした、DIG標識antisenseもしくはsense DNAプローブを用いた。スケールバーは50 μ mを示した。

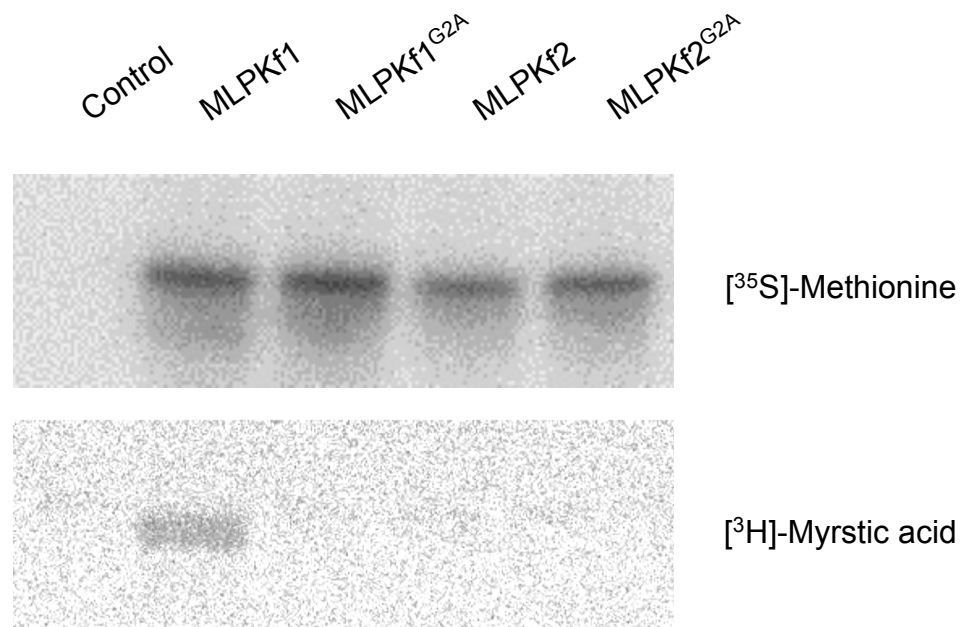


Fig. 1-6 *in vitro*翻訳系によるミリスチル化試験

L-[³⁵S]Methionine（上図）又は[9, 10(n)-³H]Myristic acid（下図）を含む小麦胚芽抽出液に、MLPKあるいは変異型MLPKの発現コンストラクトを加え、タンパク質を発現させた後、SDS-PAGEでタンパク質を分離し、アイソトープの取り込みをオートラジオグラフィーで検出した。空ベクター（pCMVTnT）を加えたものをControlとした。

MLPKf1 と MLPKf2 は *N* 末端部分のみ異なるアミノ酸配列を有しているが、MLPKf2 の *N* 末端部分 (11~23 番目までのアミノ酸配列) には特徴的な疎水性アミノ酸に富んだ領域が存在し (Fig. 1-1B)、この領域が MLPKf2 の膜局在性に関与している可能性が考えられた。

そこで、MLPKf2 全長、その疎水性領域を欠失させた変異体などを蛍光タンパク質 YFP の変異体である Venus との融合タンパク質としてタバコ培養のプロトプラストに一過的に発現させ、それらの細胞内局在を解析した (Nagai *et al.*, 2002)。MLPKf2 の全長 (MLPKf2)、2 残基目のグリシンをアラニンに置換したもの (MLPKf2^{G2A}) 11~23 番目までの疎水性アミノ酸領域を除いたもの

(MLPKf2Δ11-23)、2~23 番目までのアミノ酸を除いたもの (MLPKΔ2-23) を、それぞれ蛍光タンパク質 Venus との融合タンパク質 (MLPKf2-Venus、MLPKf2^{G2A}-Venus、MLPKf2Δ11-23-Venus、MLPKΔ2-23-Venus) として、タバコ培養細胞のプロトプラストに一過的に発現させ、Venus の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した (Fig. 1-7A)。

コントロールとして、Venus タンパク質のみを発現させた細胞では、Venus 由来の蛍光は主に細胞質と核で検出されたのに対し、全長の MLPKf2 と Venus との融合タンパク質 (MLPKf2-Venus) を発現させた場合には、強い蛍光が細胞膜上検出された。このことから、MLPKf2 が MLPKf1 と同様に細胞膜に局在することが明らかとなった (Fig. 1-7B)。次に、MLPKf2 の 2 残基目のグリシンをアラニンに置換したものと Venus との融合タンパク質 (MLPKf2^{G2A}-Venus) を発現させたところ、Venus の蛍光は MLPKf2-Venus と同様に細胞膜上で観察された (Fig. 1-7B)。これは、変異型 MLPKf1 (MLPKf1^{G2A}-Venus) が細胞膜局在性を失うという先の結果と合わせて、MLPKf2 が MLPKf1 の *N* 末端ミリストイル化とは異なる機構で膜に局在していることを示している。さらに、MLPKf2 の 11~23 番目までの疎水性アミノ酸領域を欠失させた変異体 (MLPKf2Δ11-23-Venus) を発現させたところ、細胞膜局在性を失い、Venus の蛍光は細胞質と核で検出された (Fig. 1-7B)。これらの結果は、MLPKf2 においては *N* 末端の疎水性アミノ酸領域がその膜局在性に関わっていることを強く示唆している。

一過的発現系を用いた相補試験による MLPK の機能解析

In situ ハイブリダイゼーションによる解析の結果、MLPK の 2 つの isoform である *MLPKf1* と *MLPKf2* はともに乳頭細胞で発現していることが明らかとなった。このことから MLPKf1 と MLPKf2 は双方とも自家不和合情報伝達系に関わって

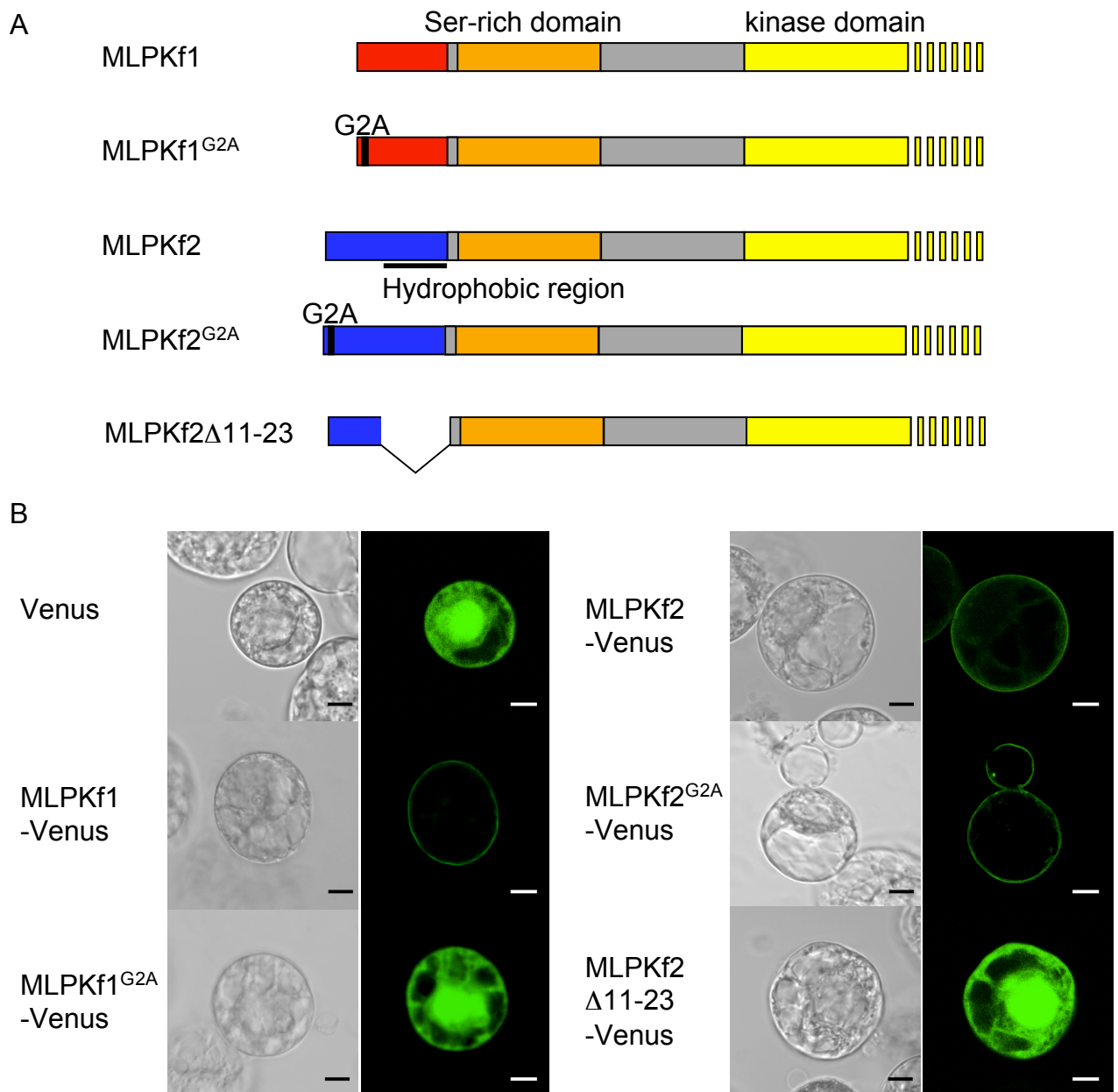


Fig. 1-7 MLPKの細胞内局在

- (A) 発現させたMLPK、変異型MLPKのN末端の構造。
- (B) 蛍光タンパク質VenusとMLPKの融合タンパク質をBY-2プロトプラストに発現させた際の共焦点顕微鏡による、明視野（左図）とVenusの蛍光像（右図）。スケールバーは10 μm を示した。

いる可能性が考えられる。そこで、*MLPKf1* と *MLPKf2* が *mm* 変異株の表現型を相補することができるかどうかを確かめるために、当研究室で既に確立されているアブラナ乳頭細胞での一過的発現系を用い、相補試験を行った (Murase *et al.*, 2004)。

全長の *MLPKf1*、*MLPKf2* をそれぞれ、蛍光タンパク質 *RFP* を発現させるコンストラクトとともに、*S₈S₈ mm* 変異株の乳頭細胞に、パーティクルガン法により導入した。プロモーターには乳頭細胞で強い発現を示す *SLG₉* のものを用いた。そして、*RFP* 蛍光の認められる乳頭細胞に対して、和合花粉 (*S₉S₉* 株) あるいは、不和合花粉 (*S₈S₈* 株) による受粉を行い、花粉管の乳頭細胞への進入を観察することで、導入遺伝子により自家不和合性の表現型が回復するかどうかを調べた。

まず、コントロールとして *RFP* を単独で乳頭細胞に導入した。その後、*RFP* 蛍光の認められる乳頭細胞に和合／不和合受粉を行ったところ、双方ともに花粉管の進入が観察された (Table 1-1)。この結果は、*mm* 変異株が本来持つ、自家和合性の表現型を示しており、*RFP* の発現や、パーティクルガンによる傷害が、乳頭細胞への花粉管の進入には影響しないことを示している。次に、全長の *MLPKf1* あるいは *MLPKf2* を *RFP* と共導入した乳頭細胞に、和合受粉 (*S₉S₉* 株) あるいは、不和合花粉 (*S₈S₈* 株) による受粉を行ったところ、不和合受粉の組み合わせとなる *S₈S₈* 株の花粉を受粉させた際にのみ花粉管の伸長が抑制された (Table 1-1)。これは、導入した *MLPKf1* や *MLPKf2* によって、*mm* 変異株の表現型が相補され、自家不和合性が回復したことを示している。以上の結果は、*MLPKf1* および *MLPKf2* が共に自家不和合情報伝達系において機能しうることを示唆するものである。

先の実験より、*MLPKf1* と *MLPKf2* はそれぞれが異なる機構により、膜に結合していることが明らかとなった。このことから、筆者はこの膜局在性が *MLPK* の機能と密接に関わっている可能性を考えた。そこで、この仮説を検証するために、膜局在性を失った変異型 *MLPK* について、先と同様の相補試験を行った。ミリストイル化のターゲットである 2 残基目のグリシンをアラニンに置換することで膜局在性を失った *MLPKf1^{G2A}*、および疎水性領域を除いた *MLPKf2Δ11-23* を *SLG₉* プロモーターに繋いだコンストラクトを、それぞれ *RFP* と共に *S₈S₈mm* 変異株に導入し、変異型 *MLPK* の相補活性を検証した。まず、*MLPKf1^{G2A}* を *RFP* と共に乳頭細胞に導入し、和合花粉 (*S₉S₉* 株) あるいは、不和合花粉 (*S₈S₈* 株) による受粉をおこなったところ、和合／不和合受粉のいずれの場合にも、花粉管の伸長が観察された。さらに、*MLPKf2Δ11-23* と *RFP* を共導入した場合でも同様に、和合／不和合受粉のいずれの場合においても花粉管の伸長が観察され

Table 1-1 *mm*変異株への*MLPK*導入試験

Plant	Transgene	Pollen	Pollen tube penetration/tests (%)	
<i>S₈S₈mm</i>	<i>RFP</i>	self	29/41	(71)
		cross	26/32	(81) ※ 1, 2
	<i>RFP + MLPKf1</i>	self	15/40	(38) ※ 1
		cross	30/39	(77)
	<i>RFP + MLPKf1^{G2A}</i>	self	50/69	(72)
		cross	46/66	(70)
	<i>RFP + MLPKf2</i>	self	12/33	(36) ※ 2
		cross	20/25	(80)
	<i>RFP + MLPKf2Δ11-23</i>	self	32/49	(65)
		cross	33/42	(78)

*S₈S₈mm*株の乳頭細胞に、パーティクルガンを用いて*MLPK*を*RFP*と共導入し、*RFP*蛍光の認められる乳頭細胞に対し、和合受粉 (*S₉S₉*株) 及び、不和合受粉 (*S₈S₈*株) を行った。

χ^2 乗検定は、*RFP*のみを導入した際の不和合受粉との間で行った。

※1: *MLPKf1*, $\chi^2 = 9.01$, $p < 0.01$ 、※2: *MLPKf2*, $\chi^2 = 8.74$, $p < 0.01$

た (Table 1-1)。以上の結果から、*MLPKf1^{G2A}* と *MLPKf2Δ11-23* は *mm* 変異株の表現型を相補する活性を失っており、言い換えれば、MLPK が情報伝達因子として機能するためには、自身の持つ膜局在性が必須であることが明らかとなった。

1-4 考察

本章では、まず、*MLPK*遺伝子に由来する2つの転写産物である*MLPKf1*と*MLPKf2*がそれぞれ異なる転写開始点を持ち、異なる転写調節を受けていることを明らかにした。さらに、*MLPK*の2つの転写産物がそれぞれ異なる機構で細胞膜に結合していること、この膜局在性が*MLPK*の機能に必須であることを示した。

1つの遺伝子から異なる転写産物が産生される代表的な機構として、alternative splicingが挙げられる。Alternative splicingとは1つの転写開始点から作られたmRNAのスプライシング部位の違いによって、いくつかの異なる転写産物ができる機構であり、少ない遺伝子から多様なタンパク質を作り出す機構として、動物、植物を問わず広く保存されている。また、モデル植物であるシロイヌナズナやイネにおいて、発現遺伝子の20%以上がalternative splicingによる何らかの転写後調節を受けているとの報告もあり (Wang and Brendel, 2006)、非常によく知られた機構であるといえる。

本章で扱った*MLPKf2*は、vector-capping法 (Kato *et al.*, 2005) で作製された完全長cDNAクローンの配列解析から、*MLPKf1*の第3イントロン内の独自の転写開始点を持つことが確認されている。また、これまでのRT-PCRによる発現解析から、*MLPKf2*が柱頭で強く発現しているのに対し、*MLPKf1*が弱いながら多くの組織で発現していることが示唆されてきたが、それが今回のReal-time PCRでも確認された。これとは別に、筆者は、*MLPKf1*の開始メチオニンから*MLPKf2*の開始メチオニンまでの領域 (*MLPKf2* -490~-1) にレポーター遺伝子を連結したコンストラクトを、パーティクルガン法を用いて乳頭細胞に導入したプロモーター解析により、このゲノム領域が乳頭細胞内でプロモーター活性を有していることを確認している (data not shown)。これらの結果は、*MLPK*から産生される2つのisoformが、alternative splicingによるものではなく、それぞれが異なる転写開始点を持つためであるというこれまでの結果と一致する。

*MLPK*で見られるように、1つの転写産物の最初のエキソンが、もう一方の転写産物のイントロン内に存在する転写様式は、alternative first exons (AFEs) と呼ばれている。動物において、AFEsによる開始メチオニン部位の違いが、N末端アミノ酸配列の多様性をもたらす数多くの例が報告されており、多くは組織や成長分化の段階で異なる転写調節を受けていることが知られている

(Hugnot *et al.*, 1992; Nakhei *et al.*, 1998; Takano *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2001)。イネとマウスのESTデータベースの比較解析から、AFEsは動物においてよりよく見られる機構であると考えられているが (Kitagawa *et al.*, 2005)、植物においてもAFEsをもつ遺伝子の例がいくつか報告されている。シロイヌナズナの*SYN1*は、減数分裂に関わる*RAD21*様遺伝子である。*SYN1*は、2つの異なる転写開始点より、5'末端の異なる2つの転写産物を作り出す。BP2と呼ばれる一方の転写産物は、調べられた全ての器官で弱く発現しており、BP5と呼ばれるもう一方の転写産物は、蕾でのみ非常に強い発現を示した。BP2は、減数分裂に関わる以外の役割を持っていると考えられているが、明らかとされていない (Bai *et al.*, 1999)。イネのKNOXファミリーの*HOS66*もまた、AFEsによりN末端の異なる2種類のhomeoboxタンパク質を作り出すことが知られている。*HOS66S*と呼ばれる転写産物は、*HOS66L*と呼ばれるもう一方の転写産物の第1イントロン内に転写開始点を持つ。この結果、*HOS66L*から翻訳されるタンパク質は*HOS66S*に比べ約120残基分長いアミノ酸配列を有しており、この領域にはグリシンとアラニンに富んだ特徴的なドメインが見られる。N末端にこのようなドメインを持つhomeoboxタンパク質は、転写阻害に関わる機能を有することが知られており (Tamaoki *et al.*, 1995)、*HOS66S*と*HOS66L*は転写調節において異なる機能を持つと推定されている (Ito *et al.*, 2002)。

*MLPK*は花粉を除く多くの器官で弱く発現する*MLPKf1*と、柱頭特異的な強い発現を示す*MLPKf2*の2つの転写産物を作り出す。このような発現様式は、シロイヌナズナの*MLPK*相同遺伝子である*APK1b*でも保存されている。*APK1b*は*MLPK*と同様に2つの転写産物を産生し、それらはN末端領域のみ異なるタンパク質をコードしている (松本, 2004)。さらに、*APK1b*と相同性の高いシロイヌナズナの*APK1a*や*NAK*でも、異なる転写開始点を持つと考えられる完全長cDNAがweb上のデータベース (Tair; <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) に登録されている。1つの遺伝子から複数の転写産物が作られるこのような機構は、*MLPK/APK1b*の属する遺伝子ファミリー内で比較的良く保存されている機構なのかもしれない。

*MLPK*の発現解析の結果は、柱頭においては*MLPKf2*が*MLPKf1*に比べて強く発現することを示している。このことから、アブラナ科植物の自家不和合反応においては*MLPKf2*が主に関わっていると考えられる。しかし、*MLPKf1*も乳頭細胞で発現が認められ、*mm*変異株の機能を相補できることから、*MLPKf2*と同様に自家不和合反応に関わっていると考えられる。一方で、*MLPKf1*は柱頭以外の器官でも広く発現が見られることから、自家不和合反応とは異なる別の機

能を有している可能性がある。

シロイヌナズナのMLPK相同遺伝子*APK1b*は、*APK1bf1*と*APK1bf2*の2つの異なる転写産物を産生するが、*APK1bf2*は*MLPKf2*と同様に柱頭で特異的に発現し、*APK1bf1*は*MLPKf1*と同様に多くの器官で広く発現が見られる（松本、2004）。*MLPK*と*APK1b*は、そのゲノム構造も非常によく似ており、*B. rapa*とシロイヌナズナ間で非常に保存されていると言える。自家和合性を示すシロイヌナズナは、祖先の自家不和合性アブラナ科植物が進化の過程で、*SP11*を失うことで自家和合性となり、その結果、淘汰圧の下がった*SRK*や*SLG*を失ったと考えられている（Shimizu *et al.*, 2004）。もし、*MLPK*が自家不和合性反応でのみの機能しか有しないとすれば、シロイヌナズナへの進化の過程でこれらの自家不和合性に関連する遺伝子と同様に失われても良いはずである。実際に、*APK1bf2*の柱頭での発現量は*APK1bf1*と比べ同程度にまで低下していることが明らかとされており（松本、2004; Fig. 1-3）、*APK1bf2*の祖先遺伝子が本来有していた自家不和合反応における機能に関しては、徐々に失われているのかもしれない。しかし、実際には*MLPKf1*と*APK1bf1*の発現パターンやゲノム構造は、*B. rapa*とシロイヌナズナ間で高度に保存されており、このことから、多くの器官で広く発現の見られる*MLPKf1*や*APK1bf1*は、不和合反応に関わる以外の何らかの機能を担っており、そのため、別の淘汰圧が掛かっていると考えられる。*MLPKf1*、*APK1bf1*の別の機能の解明は、殆ど明らかとされていない植物のAFEsの意義についても新たな知見を与えるものとなることが期待されるが、明らかとされていない。当研究室における、*APK1b*及びその相同遺伝子である*APK1a*、*NAK*のT-DNAタグラインの解析が進められたが、野生株と比べて、表現型に差異は見られなかった（松本、2004）。*APK1b*、*APK1a*、*NAK*は高い相同性（68~85%）を示し、さらに発現する組織も類似していることが、T-DNAタグラインの表現型が示されなかった理由として挙げられる。よって、*MLPKf1*、*APK1bf1*が持つ柱頭以外の組織での役割を明らかにするためには、これら変異株を交配させた二重、三重変異体や過剰発現体を作製し、個体・遺伝子レベルで詳細に観察するなどさらなる解析が必要である。

*MLPK*の2つのisoformは共に細胞膜に局在するが、その局在機構は両者間で異なっていることが明らかとなった。*MLPKf1*はN末端にミリスチル化モチーフを持ち、N末端のミリスチル化を介して細胞膜と結合している。N-ミリスチル化とは脂肪酸によるタンパク質の修飾反応の1つであり、タンパク質のN末端に炭素数14の飽和脂肪酸であるミリスチン酸が共有結合する不可逆的な脂質修飾である。N-ミリスチル化されるタンパク質は、Srcチロシンキナーゼファ

ミリーやGタンパク質の α サブユニットといった細胞内情報伝達に直接関与する生理活性タンパク質である場合が多く、これらのタンパク質は細胞膜やオルガネラ膜との結合や、特異的なタンパク質間相互作用を介して、細胞内情報伝達系において重要な役割を果たしていることが知られている（内海、2004）。近年、植物においてもいくつかのミリストイル化タンパク質が同定され、解析が進められている。

シロイヌナズナのCaイオン結合タンパク質であるSOS3（salt overly sensitive 3）は、植物の塩耐性に関わるミリストイル化タンパク質である（Liu *et al.*, 1998）。SOS3のミリストイル化のターゲットである2残基目のグリシンをアラニンに置換した変異型SOS3（SOS3(G2A)）は*sos3*変異株の表現型を相補することができないこと、ミリストイル化阻害剤2-Hydroxymristic acidを処理した野生株の根は塩ストレス時に*sos3*変異株とよく似た表現型を示すことから、N-ミリストイル化はSOS3の機能に必須であると考えられている（Ishitani *et al.*, 2000）。SOS3はCaイオンとの結合をきっかけに、セリンスレオニンキナーゼであるSOS2（salt overly sensitive 2）と結合し、細胞膜型Na⁺/H⁺対向輸送体であるSOS1（salt overly sensitive 1）を活性化すると考えられている（Halfter *et al.*, 2000; Gou *et al.*, 2001）。このSOS2との結合の過程において、SOS3のミリストイル化が何らかの役割を果たしていると推定されているがその詳細は未だ明らかになっていない。また、SOS3の細胞内局在性とミリストイル化との関係も不明瞭である。

N末端のミリストイル化がタンパク質の機能に重要な役割を果たしているもう一つの例としてトマト（*Lycopersicon esculentum*）で病原抵抗性に関わるプロテインキナーゼであるPto（*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*）が挙げられる。Ptoは、*P. syringae*のavr遺伝子産物であるavrPtoと直接相互作用することが明らかとされている（Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996; Scofield *et al.*, 1996）。Ptoのミリストイル化のターゲットである2残基目のグリシンをアラニンに置換した変異型PtoをavrPtoと共にタバコの葉で発現させた際、野生型Ptoを発現させたときに見られる過敏感細胞死反応が見られなくなることから、N-ミリストイル化はPtoの機能に重要な役割を果たしていると考えられている（de Vries *et al.*, 2006）。Ptoは細胞質に局在し、N-ミリストイル化はその局在には影響しないことも同時に示されており、N-ミリストイル化は細胞内局在性に関わるのではなくむしろ下流情報伝達因子とのタンパク質間相互作用あるいは自己のキナーゼ活性の抑制に関わっていると推定されている（Andriotis and Rathjen, 2006）。

これらとは別の例として、ジャガイモ（*Solanum tuberosum*）のCDPK、シロ

イヌナズナのPBS1、トマトのLeCRK1などがN-ミリスチル化されるタンパク質として知られている。これらのタンパク質は、N-ミリスチル化を介して膜に結合することが示されているが、N-ミリスチル化による膜局在性がその機能に及ぼす生理的な意義は明らかとされていない。(Raíces *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2003; Leclercq *et al.*, 2005)

本研究により、MLPKf1は、実際にN-ミリスチル化され、細胞膜に局在することが明らかとなった。ミリスチル化部位である2残基目のグリシンをアラニンに置換した変異型MLPKf1^{G2A}は、細胞膜局在性を失うと共に、*mm*変異体に導入しても自家不和合性を回復させることが出来ず、自家不和合性の情報伝達系において機能しないことが明らかとなった。このことは、MLPKf1のミリスチル化を介した細胞膜局在性が、MLPKの自家不和合反応における機能に必須であることを示唆する。さらに、N-ミリスチル化とは異なる疎水性領域を介して膜に局在することが明らかとなったMLPKf2においても、その疎水性領域を欠失させると相補活性も失うことが示された、このことから、MLPKf1の細胞膜局在性に関わるN-ミリスチル化は、自家不和合性におけるMLPKの生理活性と非常に強く関わっていることが明らかとなった。

本章では、MLPKが異なる転写制御下にある2種類の転写産物を産生すること、またそれらにコードされたMLPKタンパク質は、N末端配列の違いにより異なる機構で細胞膜に移行することを明らかにしてきた。さらに、自家不和合性反応の場である乳頭細胞においては、両者が共に発現し、いずれも自家不和合性の情報伝達系において機能しうること、各々の細胞膜局在性がその機能に必須であることを明らかにしてきた。しかし、何故2種類の転写産物が産生されるのか、細胞膜局在性機構の差に何らかの機能的な差が含まれるのか、といった点については全く明らかとならなかった。植物体内においてMLPKが自家不和合性以外の情報伝達系に関与しているのかどうかという点と合わせて、今後明らかにしていく必要のある課題である。

第2章

アブラナ科植物の自家不和合情報伝達系における MLPK の機能解析

2-1 序

前章の結果から、MLPK が転写開始点の異なる 2 つの isoform (MLPKf1、MLPKf2) を持つこと、いずれもが乳頭細胞で発現しており自家不和合性の情報伝達系において機能しうること、それぞれ異なる機構で細胞膜上に局在しており、その膜局在性が自家不和合性の情報伝達系において機能する上で必須であることが明らかとなった。自家不和合反応における雌ずい側因子 SRK も MLPK と同様に乳頭細胞の細胞膜上に局在することから、MLPK は SRK との相互作用を介して、SRK に伝達された自己花粉のシグナルを下流に伝えていると推定されるが、SRK と MLPK の関係は明らかとされていない。また、MLPK がどういった分子を活性化し、情報を伝達しているのかといった、自家不和合情報伝達系における MLPK の具体的な機能も明らかとされていない。

本章では、pull-down 法、酵母 two-hybrid 法、BiFC 法など様々な方法を用いて、MLPK-SRK 間相互作用の検出を試みた。さらに、生化学的および分子生物学的解析から MLPK の活性調節機構を明らかとすることによって、アブラナ科植物の自家不和合反応情報伝達における MLPK の役割を明らかにすることを試みた。

2-2 材料・方法

エントリーベクターへの点変異の導入

MLPKf1 の 112 残基目のリジンをアルギニン残基に置換したエントリーベクター (*MLPKf2^{K112R}*) を作製するために、第 1 章で作製した、*MLPKf1* エントリーベクターに点変異を導入した。点変異の導入には、GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) を用い、添付のプロトコールに従い行った。使用したプライマーの配列は、Mf1K112R-1(5'-GGCATGGTTATTGCTGTCAGAAGACTTAACATA-3')と、Mf1K112R-2(5'-GACAGCAATAACCATGCCGGTTCCCGGTTT-3') であり、PCR の反応条件は、[95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 5 min) × 35 cycles; 68°C, 10 min] である。PCR 反応後、得られた反応産物を DH5α™-T1^R (Invitrogen) に形質転換し、*MLPKf1^{K112R}* プラスミドを得た。

大腸菌発現タンパク質用の発現コンストラクトの作製

大腸菌で MBP (maltose binding protein) と GST (glutathione S-transferase) の融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製するために、まず、大腸菌発現ベクター pGEX5X-3 (GE Healthcare Bioscience)、pMALc2E (New England Biolabs) をディステーションベクターに改変した。

pGEX5x-3 を SmaI で、pMALc2E を BamHI でそれぞれ切断し、pMALc2E はさらに平滑末端処理を行った。その後、pGEX5x-3 は、Gateway® rf C Cassettes (Invitrogen) と、pMALc2E は、Gateway® rf B Cassettes (Invitrogen) とライゲーションし、それぞれ pGEXgw、pMALgw とした。

次に、*SRK₈KD*、*SRK₉KD*、*MLPKΔ1-23*、*MLPK Δ1-39*、*MLPK Δ1-52*、*MLPKf2Δ1-10*、*MLPKf2Δ11-23*、*MLPK24-79* エントリーベクターを作製した。*B. rapa* S₈S₈ 株、及び *B. rapa* S₉S₉ 株の柱頭 cDNA をテンプレートとした PCR 反応により得られた DNA 断片を pENTR/D-TOPO (Invitrogen) にクローニングした。使用したプライマーの配列及び組み合わせは、*SRK₈KD* が、SRK-KD8_F(5'-CACCCAAAATCGAGCAAAAGCAATGGCA-3')と SRK-KD8_R(5'-TCCGCGGTTACCGGGCATCGATGACTGAG-3')、*SRK₉KD* が、SRK-KD9_F(5'-CACCAAAGGCGAGCAAAAGCAATGGCA-3')と SRK-KD9_R(5'-AACCGCGGTTAGCGGGCATCTATGACTGA-3')、*MLPKΔ1-23* が、

MLPK24_F(5'-CACCGGTGCGAGTCCGAAGTATATGAG-3')と
 MLPK_R(5'-TCAGACAAACAGAGGCGAAGCAGACGGAC-3')、*MLPKΔ1-39* が、
 MLPK40_F(5'-CACCATGGGAAGCAAATGCTCTTCTGTG-3')と、MLPK_R、
MLPKΔ1-52 が、MLPK53_F(5'-CACCCCTCGAACCGAAGGAGAGATCTTG-3')
 と MLPK_R、*MLPKf2Δ1-10* が、Mf2 11_F
 (5'-CACCGTTTTTTTATATGTAACTATTTGTTTGGT-3')と MLPK_R、
MLPKf2Δ11-23 が、
 Mf2ΔHR_F(5'-CACCATGGGTTTTGTGAAAAAAGTGCAATCAAAAGGTGCGAG
 TCCGAAGTATATG-3')と MLPK_R、*MLPK24-79* が、MLPK24_F と
 Mf2-79stop_R(5'-TCAATTCCTAGTTGCTGCTTTGAG-3') であり、PCR の反応条
 件は、[95°C, 5 min; 94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 2 min)×35 cycles; 68°C, 5 min]
 である。

作製した *SRK₈KD*、*SRK₉KD*、*MLPK24-79* エントリーベクターは pGEXgw と、
MLPKΔ1-23、*MLPK Δ1-39*、*MLPK Δ1-52*、*MLPKf2Δ1-10*、*MLPKf2Δ11-23*、エン
 トリーベクターと前述の *MLPKf1*、*MLPKf2*、*MLPKf1^{K112R}* エントリーベクターは
 pMALgw と組換え反応を行った。組換え反応は、Gateway® LR Clonase® Enzyme
 Mix (Invitrogen) を用い、そのプロトコールに従い行った。

MBP 融合発現タンパク質の精製

作製した発現ベクターを、大腸菌株 BL21-codon plus (DE3)RIL (Stratagene) に
 形質転換した。形質転換した大腸菌 1 コロニーを 2×YTA 培地 (16 g/l Tryptone
 pepton、10 g/l Yeast extract、5 g/l NaCl、50 μg/ml Ampicillin、pH 7.0) に移し、37°C
 で一晩、振盪培養した。この培養液を 2×YTA 培地に 1/100 量移し、培養液の
 O.D. 600 が 0.5 になるまで 30°C で振盪培養した。その後、IPTG を終濃度が 1 mM
 になるように加え、1 時間又は 3 時間培養し、大腸菌を遠心分離により回収した。
 回収した大腸菌ペレットから完全に培地成分を除くために 10 ml PBS buffer (20
 mM phosphatebuffer (pH 7.4)、0.9%(w/v) NaCl) を加え、ピペッティングにより懸
 濁し、再び遠心分離し、大腸菌ペレットを回収した。

回収した大腸菌ペレットは、BugBuster Master Mix (Novagen) を用い、添付の
 プロトコールに従って可溶化した後、遠心分離 (100,000×g、20 min) し、上清
 を可溶性画分とした。得られた可溶性画分からの MBP 融合タンパク質の精製に
 は、amylose resin (New England Biolabs) を用い、そのプロトコールに従い精製
 した。精製したタンパク質画分は、kinase assay buffer (20 mM Hepes-KOH(pH 7.4)、

150 mM NaCl、0.01% TritonX-100、10% glycerol) で透析を行い、-80℃で保存した。精製したタンパク質は、SDS-PAGE による分離後、BSA との相対量としてタンパク質濃度を決定した。

GST 融合発現タンパク質の精製

GST-SRK₉KD^{K557R} の発現ベクターは下里により作製された (未発表)。大腸菌発現ベクターを、大腸菌株 BL21-codon plus (DE3)RIL (Stratagene)、に形質転換し培養した。菌体の培養・回収、可溶化は上記と同様におこない、発現タンパク質を含む可溶性画分を得た。

得られた可溶性画分からの GST 融合タンパク質の精製には、Glutathione uniflow Resin (Clontech) を用い、そのプロトコールに従い精製した。精製したタンパク質画分は、kinase assay buffer (20 mM Hepes-KOH (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.01% TritonX-100、10% glycerol) で透析を行い、-80℃で保存した。精製したタンパク質は、SDS-PAGE による分離後、同時に泳動した BSA との相対量としてタンパク質濃度を決定した。

pull-down 法による相互作用解析

上記の発現タンパク質を用いて、pull-down による相互作用解析を行った。発現タンパク質を各 2 μ g 加え、binding buffer (20 mM Hepes-KOH (pH 7.4)、150 mM NaCl、5 mM MgCl₂、5 mM MnCl₂、1 mM EDTA、0.05% Triton-X100、1 mM DTT) で 100 μ l に調製したタンパク質溶液に、10 μ l の Glutathione uniflow Resin (Clontech) を加えた。4℃で2時間、転倒混和した後、遠心分離 (1,000 rpm、30 sec) し、上清を除いた樹脂を 500 μ l の binding buffer で3回洗浄した。この樹脂に 100 μ l の 2×SDS-PAGE sample buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、20% glycerol、0.01%(w/v) BPB、50 mM DTT) を加え、96℃で5分間インキュベートすることでタンパク質を溶出し、20 μ l 量を SDS-PAGE に供した。泳動後、銀染色、および MBP 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行い、タンパク質を検出した。銀染色には Silver staining II Kit (Wako) を用いた。ウエスタンブロット解析には、MBP 抗体として、Anti-MBP Monoclonal Antibody (New England Biolabs) を、HRP 標識二次抗体として anti-rabbit IgG HRPconjugate (BIO-RAD) を、シグナルの検出には ECL plus (GE Healthcare) を用いた。

split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system による相互作用解析

split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid (以下 Dualmembrane 酵母 two-hybrid と呼ぶ) 用ベクター、pCCW-SUC、pPR3-C (Dualsystems Biotech) をディステイナーションベクターに改変した。pCCW-SUC は SfiI で切断し、平滑末端処理後、Gateway® rf C Cassettes とライゲーションを行い、pCCW-SUCgw とした。pPR3-C は ClaI で切断し、平滑末端処理後、Gateway® rf A Cassettes とライゲーションを行い、pPR3-Cgw とした。

次に、*SRK8KDt*、*MLPKf1t*、*MLPKf2t* エントリーベクターを作製した。*B. rapa* S₈S₈ 株の柱頭 cDNA をテンプレートとした PCR 反応により得られた DNA 断片を pCR®8/GW/TOPO (Invitrogen) に TA クローニングした。使用したプライマーの配列及び組み合わせは、*SRK8KDt* が

SRK8_Ft(5'-ATGCAAGGTGTACGATACATCTATC-3')と、

SRK8(-stop)_R(5'-TCCGCGGTTACCGGGCATCGATGACTGAG-3')、*MLPKf1t* が、MLPKf1_Ft(5'-ATGGGGATTTGCATGAGTGTTC-3')と MLPK(-stop)_R、*MLPKf2t* が MLPKf2_Ft(5'-ATGGGGTTTTGTGAAAAAAGTGCA-3')と MLPK(-stop)_R であり、PCR の反応条件は、*SRK8KDt* が、[95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 2.5 min) × 35 cycles; 68°C, 5 min]、*MLPKf1t* と *MLPKf2t* が、[95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 2 min) × 35 cycles; 68°C, 5 min]である。

作製した *SRK8t* エントリーベクターは pCCW-SUCgw と、*MLPKf1t*、*MLPKf2t* エントリーベクターは pPR3-Cgw と組換え反応を行った。組換え反応には、Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix (Invitrogen) を用い、そのプロトコールに従い行った。

酵母への形質転換は、BD Clontech の web ユーザーマニュアル (<http://www.clontech.com/images/pt/PT3247-1.pdf>) を参考に行った。酵母 NMY32 株 (Dualsystems Biotech) を 30°C、一晚 YPDA 液体培地 (10 g/l Bacto yeast extract、20 g/l Bacto pepton、20 g/l glucose、40 mg/l adenine) 中で振盪培養した。この培養液を 2 ml YPDA 液体培地に O. D₆₀₀=0.2~0.3 になるように加え、30°C、3 時間振盪培養した。培養液を遠心分離 (6,000 × g、1 min) し、上清を除き、酵母菌体を得た。この酵母菌体を滅菌蒸留水で 2 回洗浄し、遠心分離後、1 ml の 1 M 酢酸リチウム溶液に懸濁した。この酵母溶液 50 μl 量に 50%(w/v) Polyethylenglycol 4000 (Furuka) を 240 μl、1 M 酢酸リチウム溶液を 36 μl、96°C で加熱し、氷冷した 5 mg/ml Salmon test DNA (SIGMA) を 10 μl、0.5 μg/μl plasmid DNA を 50 μl 加え、1 分間の vortex による攪拌後、30°C で 30 分間インキュベートした。その

後、42℃で20分間インキュベートを行い、遠心分離（6,000×g）した。上清を除き、滅菌蒸留水で2回洗浄後の酵母菌株を、30℃で2日間、SD/-L, -W 選択培地上で培養することで、形質転換株を得た。その後、SD/-L, -W, -Ade, -H 選択培地上に移し、相互作用の有無を確認した。

in vitro リン酸化解析

精製した発現タンパク質は、それぞれ 200 ng に相当する量を reaction buffer (20 mM Hepes-KOH(pH 7.4)、150 mM NaCl、0.01% TritonX-100、5 mM MgCl₂、5 mM MnCl₂、10% glycerol、1 mM DTT、5 μCi [γ-³²P]ATP (GE Healthcare Bioscience)) に終量が 10 μl になるように懸濁した。基質として加えたタンパク質のリン酸化を検出する際は、基質となるタンパク質量を 1 μg 又は 5 μg とし、cold-ATP を 50 μM になるように反応液に加えた。この反応液を室温で 30 分反応させた。反応の停止は、SDS-PAGE sample buffer を加え、96℃で5分インキュベートすることで行い、SDS-PAGE によってタンパク質を分離した。泳動後のゲルは、CBB 染色の後、ゲルドライヤーで乾燥させた。CBB 染色像は、スキャナ (EPSON) で、オートラジオグラフィ像はイメージングアナライザー (BAS5000, Fuji Film) で取り込んだ。

BiFC (Bimolecular Fluorescent Complementation) 法による相互作用解析

タバコ培養細胞内での相互作用解析に用いる BiFC 用ベクターは、当研究室永吉によって作製された pBI221/S₇RNase:VN と pBI221/S₇SLF:VC をディスティネーションベクターに改変して用いた (永吉、2004)。pBI221/S₇RNase:VN と pBI221/S₇SLF:VC は、XbaI/XhoI で切断し、平滑末端処理後、Gateway[®] rf A Cassettes とライゲーションを行い、それぞれ 35S:gw:VN/pBI221、35S:gw:VC/pBI221 とした。

次に、エントリーベクターを作製した。*B. rapa* S₉S₉株及び *Arabidopsis thaliana* の柱頭 cDNA をテンプレートとした PCR 反応により得られた DNA 断片を pENTR/D-TOPO (Invitrogen) にクローニングした。使用したプライマーの配列及び組み合わせは、SRK9(-stop)が、SRK9_F(5'-CACCATGAAAGGTGTACGAAACAT-3')と SRK9(-stop)_R(5'-GCGGGCATCTATGACTGAGCAGGT-3')、sRLK1(-stop)は、

sRLK1_F(5'-CACCATGGCTCCGTCGTTAAGGAATTTCA-3')と
sRLK1_R(5'-ACTTATTTCTTTGACCTTGACATCACT-3')、*sRLK2(-stop)*は、
sRLK2_F(5'-CACCATGACTCGTTTACCCTTACCTTTC-3')と
sRLK2_R(5'-TACAAAACCTAAATCTTCATCTTCTAC-3') であり、PCR の反応条件は、[95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 2.5 min)×35 cycles; 68°C, 5 min]である。

作製した *SRK9(-stop)*、*sRLK1(-stop)*、*sRLK2(-stop)* エントリーベクターと前述の *MLPKf1(-stop)*、*MLPKf2(-stop)* の 35S:gw:VN/pBI221、35S:gw:VC/pBI221、35S:gw:Venus/pBI221 への組換え反応は、Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix (Invitrogen) を用い、そのプロトコールに従った。

コントロールとして用いた 35S:eCFP/pBI221 は、当研究室円谷によって作製されたものを用いた (円谷、未発表)。

作製した、BiFC ベクターを 35S:eCFP/pBI221 と共に、第 1 章で述べたのと同様の PEG 法によりタバコ培養細胞に共導入し、eCFP と Venus の蛍光を協商点レーザー顕微鏡 (LSM510 META, Carl Zeiss) で観察した。

B. rapa 乳頭細胞での一過的発現系による Ser-rich 領域欠失型 MLPK の機能解析

まず、*MLPKΔ2-52* エントリーベクターを作製した。*B. rapa* *S₉S₉* の柱頭 cDNA をテンプレートとした PCR 反応を行い、得られた DNA 断片を pENTR/D-TOPO (Invitrogen) にクローニングした。使用したプライマーの配意列及び組み合わせは、MLPKD2-52(5'-CACCATGCCTCGAACCGAAGGAGAGATCTTG -3')と MLPK_R であり、PCR の反応条件は、[95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 1.5 min)×35 cycles; 68°C, 5 min]である。作製した *MLPKΔ2-52* エントリーベクターと前述の SLGp:gw/pBI221 との組換え反応は、Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix (Invitrogen) を用い、そのプロトコールに従った。

作製した発現ベクターは、RFP 発現ベクターと共に、パーティクルガン法を用いて *B. rapa* *S₈S₈mm* 株及び、*S₁₂S₁₂MM* 株の乳頭細胞へ共導入した。パーティクルガンを用いた、*B. rapa* 乳頭細胞への遺伝子導入と受粉試験は、第 1 章で述べたのと同様の方法で行った。

シロイヌナズナ形質転換用コンストラクトの作製

SLG₉プロモーターと gateway cassette とを連結させたディスティネーションベクターを作製した。SLG9pro:SP11/pBI101 を HindIII/SacI で切断し、平滑末端処理後、Gateway[®] rf A Cassettes (Invitrogen) とライゲーションし、SLGp:gw/pBI101 とした。

ψSRK プロモータープロモーターと gateway cassette とを連結させたディスティネーションベクターを作製するために、まず、*Arabidopsis thaliana* (Columbia) ゲノム DNA から、ψSPK プロモーターを PCR 反応により増幅した。フォワードプライマーには HindIII の制限酵素サイトを、リバースプライマーには KpnI と SacI の制限酵素サイトを付加したものを作製した。使用したプライマーの配列は、ψSRKpro_F(5'-AAGCTTAATTCGGGTTGTACGTTTTGAGA-3')と ψSRKpro_R(5'-GAGCTCAAGGTACCATGTTGTTTCATTTCC-3') であり、PCR の反応条件は、[95°C, 5 min; 94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 2 min] × 35 cycles; 68°C, 5 min] である。増幅した DNA 断片は、pGEM T-Easy (Promega) に TA クローニングし、配列を確認した。配列確認後、ψSRK プロモーター断片を HindIII/SacI で切り出し、pBI121 (Clontech) の HindIII/SacI サイトにライゲーションした。その後、KpnI で切断し、平滑末端処理後、Gateway[®] rf A Cassettes (Invitrogen) とライゲーションし、ψSRKp:gw/pBI121 とした。

次に、APK1bΔ2-50 と MLPKΔ2-52 エントリーベクターを作製した。*Arabidopsis thaliana* 及び *B. rapa* S₉S₉ 株の柱頭 cDNA をテンプレートとした PCR 反応により得られた DNA 断片を pCR[®]8/GW/TOPO (Invitrogen) にクローニングした。使用したプライマーの配列と組み合わせは、APK1bΔ2-50 が

APK1bMet53_Ft(5'-ATGCCAAGAACTGAAGGAGAGATCTTG-3')と

APK1b_R(5'-TCAAACAAACAGAGGCGAATCAGA-3')、MLPKΔ2-52 が、

MLPKMet53_Ft(5'-ATGCCTCGAACCGAAGGAGAGATCTTG-3')と MLPK_R であり、PCR の反応条件は、[95°C, 5 min; 94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 2 min] × 35 cycles; 68°C, 5 min] である。

作製した APK1bΔ2-50 と MLPKΔ2-52 エントリーベクターの SLGp:gw/pBI101、ψSRKp:gw/pBI121 への組換え反応には、Gateway[®] LR Clonase[®] Enzyme Mix (Invitrogen) を用い、そのプロトコールに従い行った。作製した、発現ベクターは精製後、*Agrobacterium rhizogenes* EHA105 株に形質転換した。

減圧浸潤法によるシロイヌナズナ形質転換体の作製と表現型の解析

シロイヌナズナへの減圧浸潤法による形質転換は、荒木の方法（1996）を改変して行った。

A. thaliana Col-0 株は 22°C、14 時間明期、10 時間暗期の条件下で栽培したものを使用した。アグロバクテリウムを OD₆₀₀ が 0.8 になるように加えた浸潤用懸濁培地（1/2×MS salt、1/2×Gamborg B5 vitamin、5% sucrose、0.5g/l MES-KOH、10 μg/l 6-Benzylaminopurine、200 μl/l(v/v) Silwet L-77、pH 5.7）に花、果実をあらかじめ取り除いた株を浸し、デシケーター内で 400 mmHg にまで減圧し、5 分間置いた。減圧を解除し、浸潤液から植物体を取り出し、室温、暗所で一晩おいた後、はじめの一週間は水を与えずに、温室内で栽培した。2〜4 週間後、種を回収した。

回収した乾燥種子 60 mg を 15 ml ファルコンチューブにとり、クリーンベンチ内で 70 % エタノール、次亜塩素酸ナトリウム溶液（3 % 次亜塩素酸ナトリウム）で滅菌処理した。滅菌水で洗浄した種子を 0.1%寒天溶液に懸濁し、60 μg/ml のカナマイシンを含む、GM 培地（1×MS salt mix、100 mg/l myo-inositol、1×Gamborg B5 vitamin、1% sucrose、0.2% agar powder、pH 5.7）に蒔いた。22°C、14 時間明期、10 時間暗期条件下で 1〜2 週間栽培し、カナマイシン耐性を示す株を選抜した。成長後、自然交配による種子形成を観察することで稔性の有無を確認した。

導入遺伝子の発現は Real-time PCR で確認した。Real-time PCR に用いる Total RNA は第 1 章で述べたのと同様の方法で形質転換体の乳頭細胞より抽出した。Real-time PCR は、Comparative Ct 法により Web 上のプロトコールを参考に行った (<http://docs.appliedbiosystems.com/pebiadocs/04303859.pdf>)。逆転写反応、及び、PCR 反応の条件、反応液の組成は第 1 章と同様に行った。シロイヌナズナの *GAPDH* (At3g04120) を内部標準とし、野生株の $2^{\{(標的遺伝子の Ct 値)-(GAPDH の Ct 値)\}}$ を 1 とした時の相対値として、形質転換体での導入遺伝子の発現量を算出した。使用したプライマーの配列および組み合わせは、*MLPKΔ2-52* が、MLPK_6F-RT(5'-ACTACCGTGTTCAGATGTCTCGACGT-3')と attL2_R-RT(5'-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC-3')、*APK1bΔ2-50* が、APK1b_6F-RT(5'-AGATGCCTCACATTTCGAGATAAAGCT-3')と attL2_R-RT(5'-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC-3')、*GAPDH* が、GAPDH_F(5'-GACCTTACTGTCAGACTCGAG-3')と GAPDH_R(5'-CGGTGTATCCAAGGATTCCCT-3') であり、PCR の反応条件は、

[50°C, 30 min; 95°C, 15 min; (94°C, 15 sec; 55°C, 30 sec; 60°C, 30 sec)×40 cycles]である。

形質転換体の稔性の確認は、アニリンブルー染色により雌ずいでの花粉管の伸長を観察することで行った (Kho and Bear, 1968)。開花当日の柱頭に花粉をのせた後、6 時間後の花柱を固定液 (75%(v/v) ethanol、25%(v/v) acetic acid) に 2 時間浸し固定した後、1 N 水酸化ナトリウム水溶液に浸し、60°C で 2 時間置いた。その後、染色液 (2%(w/v) アニリンブルー、2%(w/v) K_3PO_4) 中で遮光し 2 時間、置いた。得られた雌ずいをスライドガラス上で、50%(v/v) グリセロールと、VECTASHIELD (VECTOR) を数滴添加し、カバーガラスをかけてつぶしたものをサンプルとした。これを、蛍光顕微鏡 (Axiophot; ZEISS) で励起波長 365 nm の紫外光により観察した。

2-3 結果

発現タンパク質を用いた SRK-MLPK 間相互作用解析

SRK と MLPK が直接相互作用するかどうかを調べるために、大腸菌を用いて両者の発現タンパク質を作製し、pull-down 法による相互作用解析を行った。

MLPKf1 の N 末端に MBP (maltose-binding protein) を融合させた発現タンパク質 (MBP-MLPKf1) と、SRK₉ のキナーゼドメインの N 末端に GST (glutathione S-transferase) を融合させた発現タンパク質 (GST-SRK₈KD) をそれぞれ作製し、実験に用いた。両者を混合し、Glutathione Sepharose に吸着させ、洗浄後、この樹脂への吸着画分を、SDS-PAGE で分離し、抗 MBP 抗体で検出した。

その結果、GST-SRK₈KD と共に MBP-MLPKf1 が少量回収されてくることが示されたが (Fig. 2-1 lane 4)、その量はコントロールとして行った GST と MBP-MLPKf1 との混合物からの回収量と差が認められなかった (Fig. 2-1 lane 6)、これは SRK₈KD と MLPKf1 間の特異的な相互作用によるものではないと判断された。この pull-down 法では SRK₈KD と MLPKf1 の間に有意な相互作用は検出されなかったが、これは必ずしも両者間の直接的相互作用を否定するものではなく、両者間の相互作用が弱いために長時間の洗浄過程を介する pull-down 法では検出できない、あるいは大腸菌で発現させた融合タンパク質が正しいコンフォメーションをとっていないなど、実験上の問題に因るものである可能性も考えられた。そこで、さらに別の手法を用いて両者間の相互作用の有無を検討することとした。

酵母 two-hybrid 法を用いた SRK-MLPK 間相互作用解析

次に、真核生物の細胞を用いることでより生体内により近い条件で相互作用を検討できるとされる酵母 two-hybrid 法を用いて SRK-MLPK 間の相互作用を検討することとした。MLPK が機能するためには膜局在性が必須であること、SRK は膜貫通型のタンパク質であることから、Dualsystem Biotec 社の DUALmembrane system を用いることとした。これは、酵母の細胞膜上で分割ユビキチンの再構成を指標に膜タンパク質間相互作用を検出する系であり、細胞膜に局在する SRK と MLPK の相互作用の検出を目的とした本実験に適した酵母 two-hybrid システムであると考えた (Stagljar *et al.*, 1998)。

SRK₈ の C 末端にユビキチンの C 末端側 (Cub) と転写因子 (LexA-VP16) を

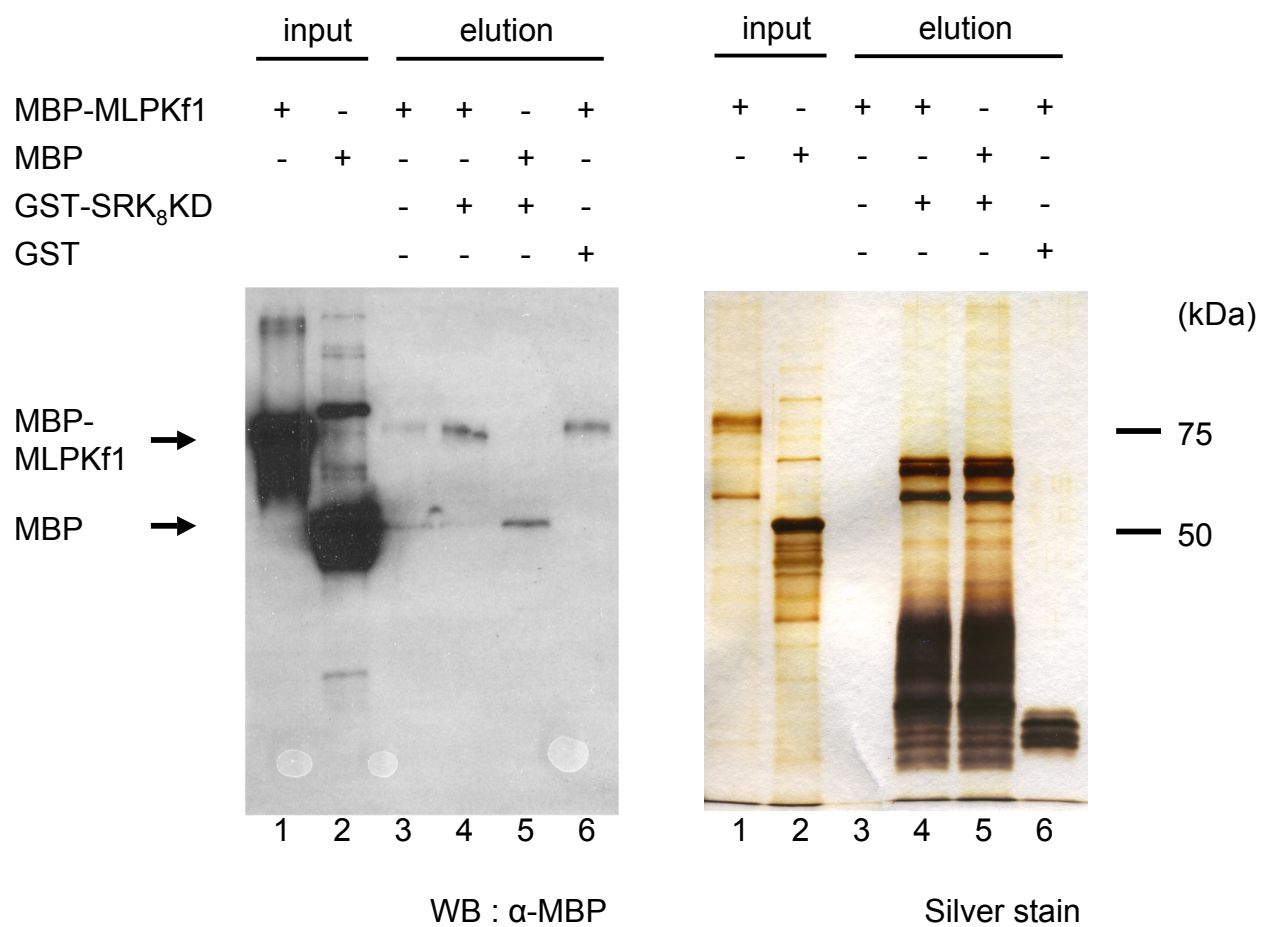


Fig. 2-1 pull-down法によるSRK-MLPK間相互作用解析

GST又は、GST-SRK₈KDを結合させたGlutathione Sepharoseに、MBP又はMBP-MLPKf1を加え、共沈した各タンパク質をSDS-PAGEにより分離したゲルのウェスタンブロット解析の結果（左図）と、銀染色像（右図）。ウェスタンブロット解析には、抗MBP抗体を用いた。

連結させた融合タンパク質を発現させるための bait vector と、MLPKf1 あるいは MLPKf2 の C 末端に変異型ユビキチンの N 末端側 (NubG) を連結させた融合タンパク質を発現させるための prey vector をそれぞれ作製し、実験に供した。まず、これらの vector を empty vector との組み合わせで、酵母を形質転換したところ、何れの組み合わせにおいても選択培地 (SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His 培地) 上での酵母の生育は認められなかった (Fig. 2-2)。これは、作製した全てのベクターが自立活性を持たないことを示している。そこで、次に上記で作製したベクターを SRK₈ と MLPKf1、あるいは SRK₈ と MLPKf2 の相互作用を検出する組み合わせで酵母に共導入し、選択培地で培養した。両因子が相互作用すると、通常では結合しない NubG と Cub が接近し、スプリット型ユビキチンが再構成され、酵母内のユビキチン特異的プロテアーゼを介して LexA-VP が切り出されて、選択培地上での生育を可能とする各種レポーター遺伝子が活性化されることが期待される。しかし、いずれの組み合わせにおいても選択培地上での酵母の生育は確認されなかった (Fig. 2-2)。

BiFC 法による SRK-MLPK 間相互作用解析

MLPK と SRK の植物細胞内での相互作用を解析するために、BiFC (Bimolecular Fluorescent Complementation) 法を用い、タバコ培養細胞内での両者間の相互作用の検出を試みた。BiFC 法は、蛍光タンパク質 Venus の β バレル構造のループ部分で分離された 2 つの断片が、それぞれの断片と融合した任意のタンパク質間の相互作用によって、Venus が元の構造をとり、蛍光を発する現象を基礎とした方法であり、生きた細胞内での 2 分子間の相互作用を検出できる利点がある。また、2 つの Venus 断片が元の構造をとる際、安定した構造をとるため、解離速度の速いタンパク質相互作用を検出できる利点もある。(Hu *et al.*, 2002)

BiFC 法による相互作用解析を行う前に、SRK がタバコ培養細胞の細胞膜上に正しく発現するかどうかを確認するために、SRK₉ の C 末端に Venus を連結させた融合タンパク質 (SRK₉-Venus) をタバコ培養細胞に一過的に発現させ、蛍光を観察した。その結果、SRK₉-Venus は、タバコ培養細胞内で発現し、細胞膜上へ局在することが確認された。(Fig. 2-3)

第 1 章の結果と合わせ、MLPK、SRK がともにタバコ培養細胞内で膜局在を示すことが確認できたので、次に MLPKf1 あるいは MLPKf2 と Venus の N 末端側 (VN) との融合タンパク質 (MLPKf1-VN、MLPKf2-VN) と、SRK₉ と Venus の C 末端側 (VC) との融合タンパク質 (SRK₉-VC) を発現させるためのプラス

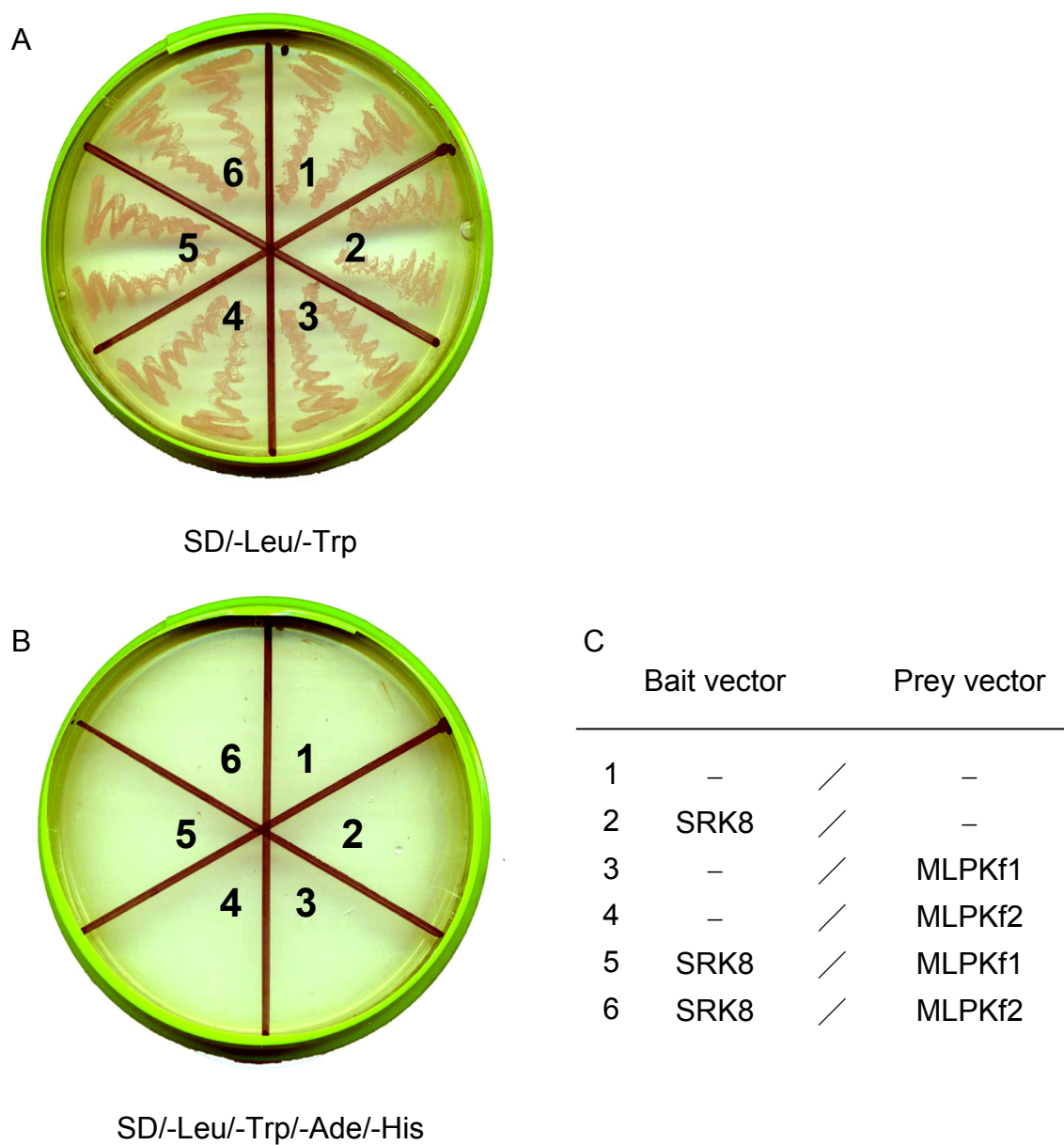


Fig. 2-2 酵母 two-hybrid法によるSRK-MLPK間相互作用解析

SD/-Leu/-Trp (A) 、SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His (B) 培地を用いた時の、酵母の生育。ベクターの組み合わせは (C) に示した。

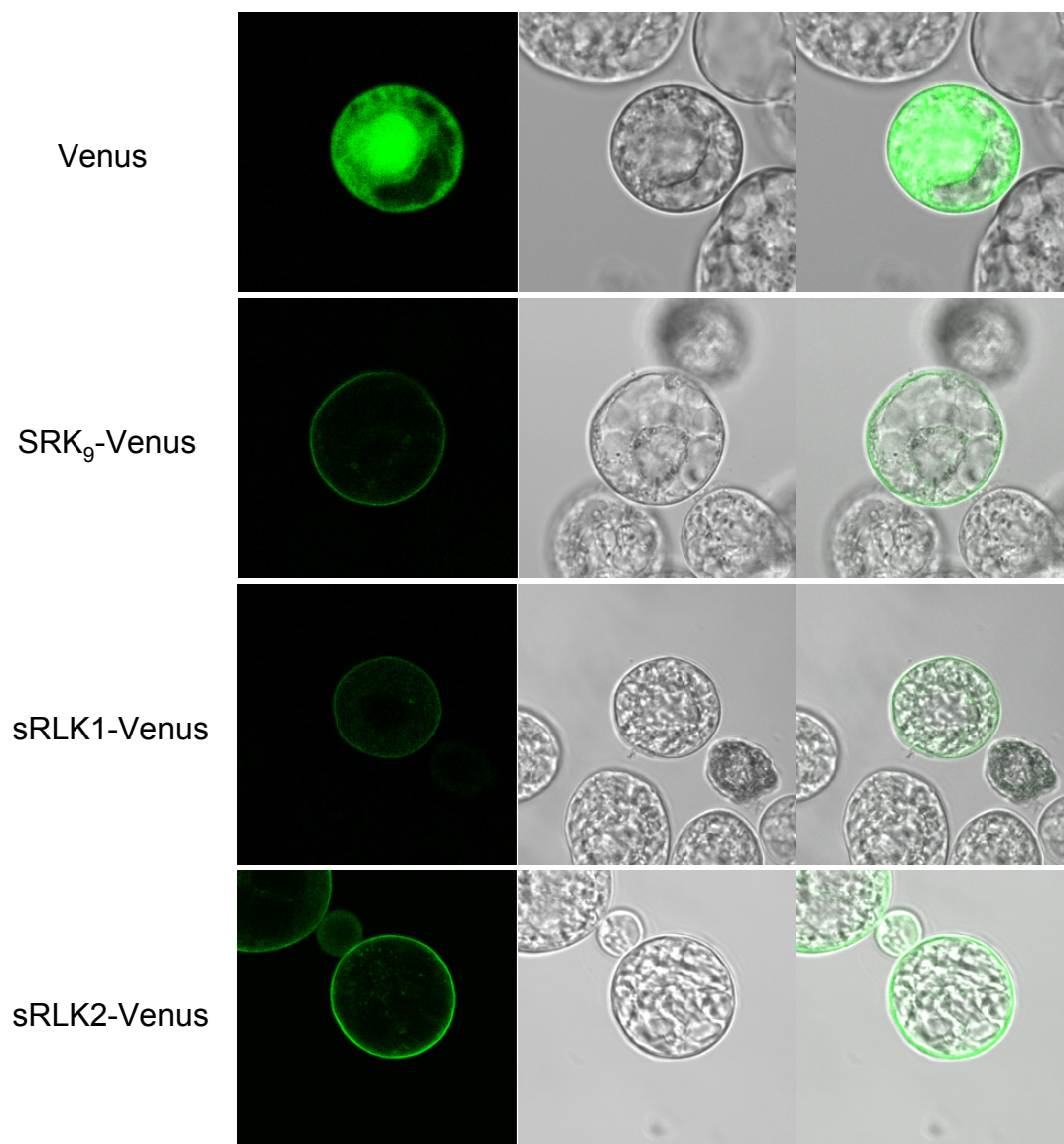


Fig. 2-3 SRK、sRLK1、sRLK2の細胞内局在

蛍光タンパク質VenusとSRK9、sRLK1、sRLK2の各融合タンパク質をBY-2プロトプラストに発現させた際の共焦点顕微鏡による観察結果を示した。左から、Venusの蛍光像、明視野像、Marge像。

ミドを作製し、タバコ培養細胞内に共導入した。プラスミドが導入された細胞を特定する目的で、蛍光タンパク質 **eCFP** を発現させるためのコンストラクトも同時に導入し、**eCFP** の蛍光が認められる細胞に対して、**Venus** 蛍光の有無を判定した。

その結果、**MLPKf1-VN** あるいは **MLPKf2-VN** を **SRK₉-VC** と共導入した細胞では、**eCFP** を発現している細胞の約 50%において、再構成された **Venus** に由来すると推定される蛍光が細胞膜上に観察された (Fig. 2-4)。また、共焦点レーザースキャン蛍光顕微鏡システム (**LSM 510 META**) を用いて蛍光スペクトルを測定することで、観察された蛍光が再構成された **Venus** に由来することを確認した (Fig. 2-5)。さらに、コントロールとして **MLPKf1-VN** と **VC**、**MLPKf2-VN** と **VC**、**VN** と **SRK₉-VC** の組み合わせで共導入した細胞からは、いずれも **Venus** の蛍光は観察されないことを確認した (Fig. 2-4)。

BiFC 法で検出された **SRK₉-MLPK** 間相互作用が、この 2 種類のタンパク質キナーゼ分子間に特異的なものであるかを確認するために、**SRK** 以外の受容体型キナーゼと **MLPK** との間の相互作用を同じ **BiFC** 法を用いて解析することとした。シロイヌナズナの柱頭由来の cDNA より、ロイシンリッチリピート型の細胞外ドメインを有する受容体型セリンスレオニンキナーゼ **At1g09970** (以後 **sRLK1** (stigmatic RLK-1) と呼ぶ) および **At5g25930** (以後 **sRLK2** (stigmatic RLK-2) と呼ぶ) をクローニングし、相互作用解析に供することとした。**sRLK1** は、シロイヌナズナの柱頭で最も発現量の高い受容体型キナーゼ遺伝子として、**sRLK2** は、シロイヌナズナの受粉時に最も発現量の増加する受容体型キナーゼ遺伝子として、マイクロアレイ解析により同定されたものである。(森山、2007)

まず、**sRLK1** と **sRLK2** が期待される細胞膜局在性を示すかどうかを確認するため、**Venus** との融合タンパク質 (**sRLK1-Venus**、**sRLK2-Venus**) としてタバコ培養細胞内で発現させ、**Venus** 蛍光の局在を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、**sRLK1-Venus** と **sRLK2-Venus** は、共に細胞膜に局在することが確認された (Fig. 2-3)。そこで、これら 2 つのタンパク質と **MLPKf1**、**MLPKf2** との結合を先と同様に **BiFC** 法を用いて調べることにした。**sRLK1** と **sRLK2** を **VC** との融合タンパク質 (**sRLK1-VC**、**sRLK2-VC**) として、タバコ培養細胞内で **MLPKf1-VN** あるいは **MLPKf2-VN** と共発現させた時、何れの組み合わせにおいても再構成された **Venus** の蛍光は認められなかった (Fig. 2-6)。以上の結果より、**MLPKf1** と **MLPKf2** は、共に細胞膜上で **SRK** と特異的に相互作用することが明らかとなった。

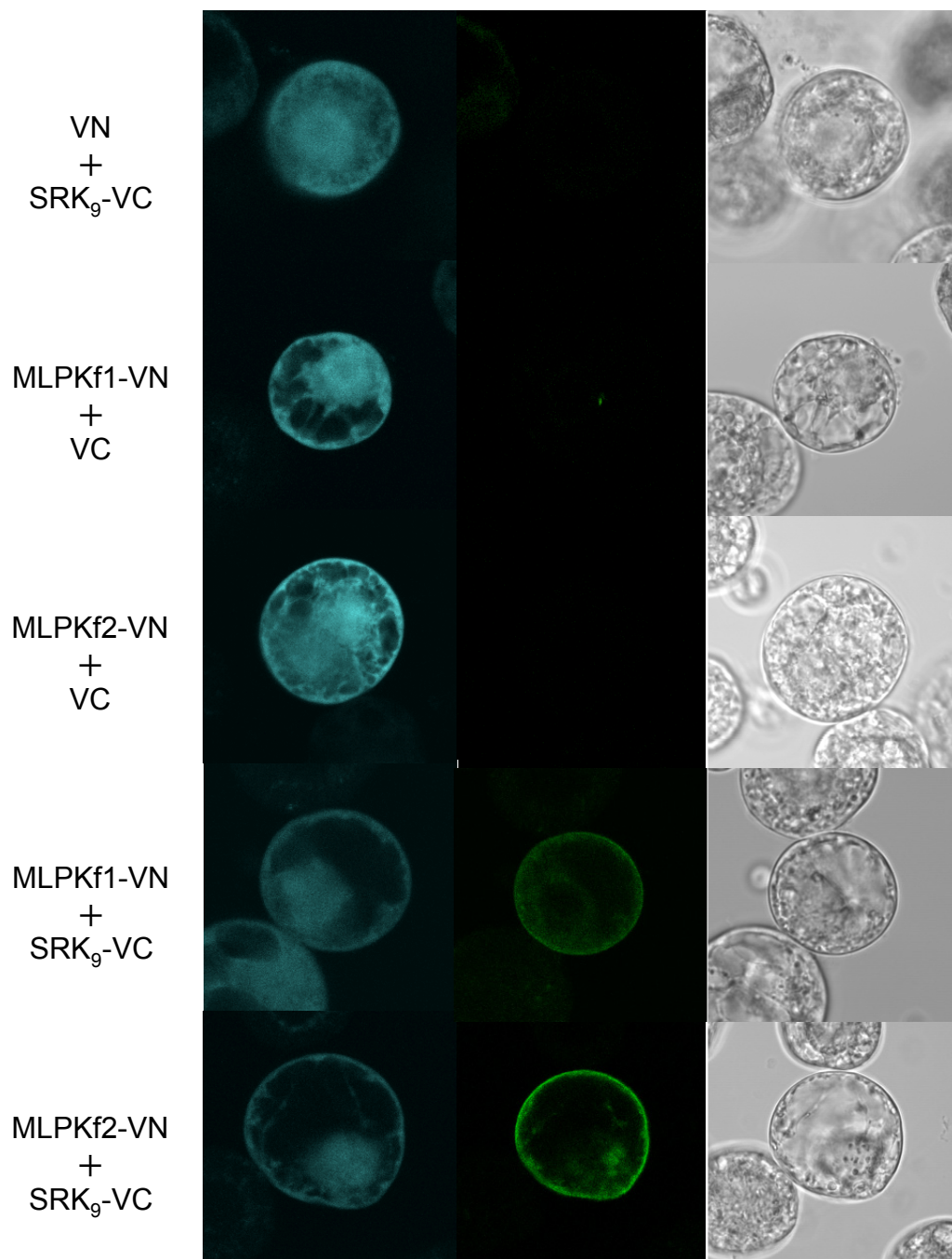


Fig. 2-4 BiFC法によるMLPK-SRK間相互作用解析

BiFC解析用コンストラクトを蛍光タンパク質eCFPを発現させるコンストラクトと共にBY-2プロトプラストに発現させた際の共焦点顕微鏡による観察結果を示した。左から、eCFPの蛍光像、Venusの蛍光像、Marge像。

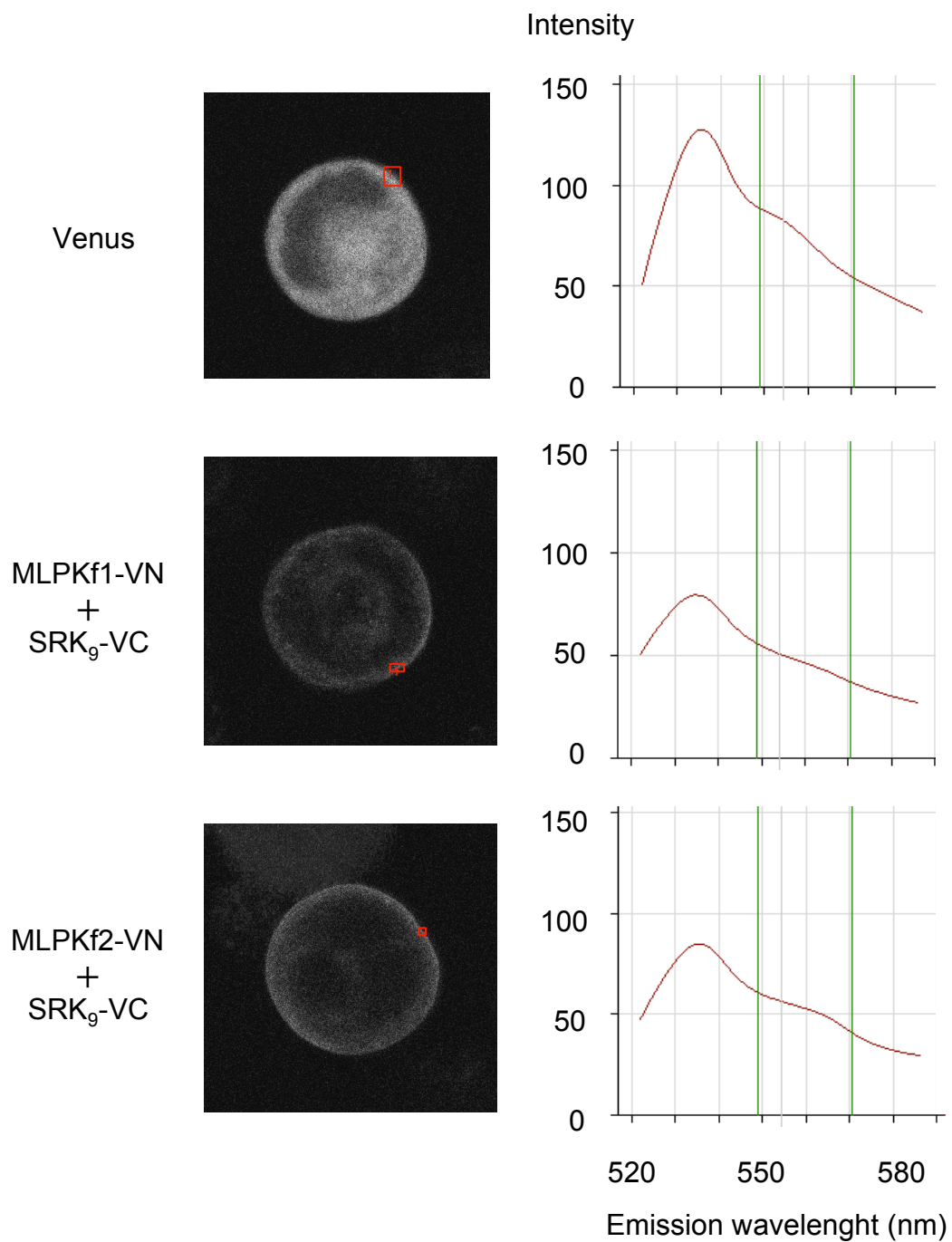


Fig. 2-5 蛍光スペクトル

BiFC法で蛍光の確認されたタバコ培養細胞（左図）の蛍光スペクトル（右図）。取得したスペクトルの範囲を赤枠で示した。

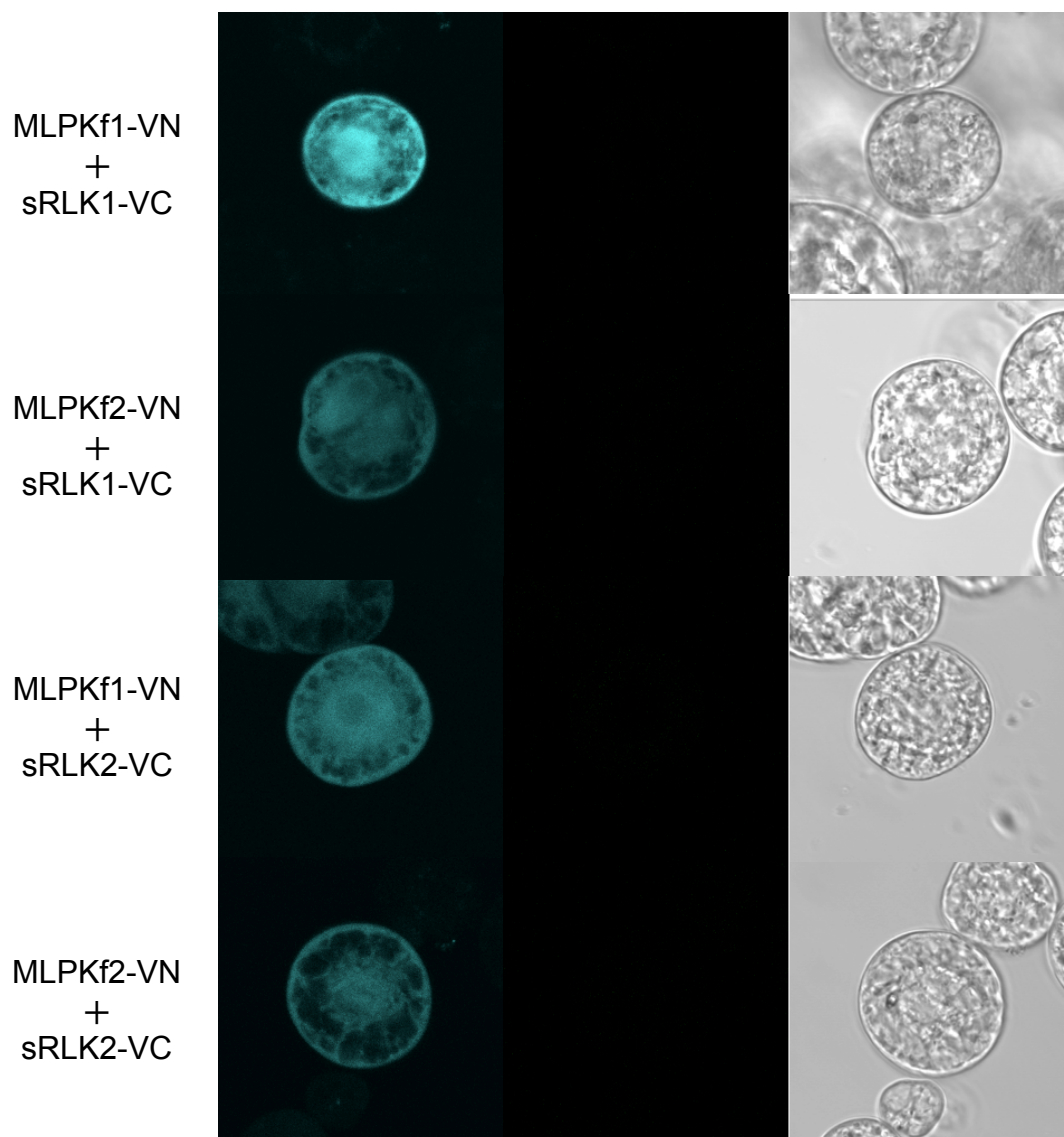


Fig. 2-6 BiFC法によるMLPKとsRLK1、sRLK2との相互作用解析

BiFC解析用コンストラクトを蛍光タンパク質eCFPを発現させるコンストラクトと共にBY-2プロトプラストに発現させた際の共焦点顕微鏡による観察結果を示した。左から、eCFPの蛍光像、Venusの蛍光像、Marge像。

SRK-MLPK 間の *in vitro* リン酸化解析

2つのキナーゼが相互作用する際、両者のリン酸化が助長される例がシロイヌナズナのブラシノステロイド受容体である BRI1 とその結合因子である BAK1 で報告されている (Li *et al.*, 2002; Nam and Li, 2002)。MLPK-SRK 間にもそのようなリン酸化活性の増加が見られるかどうかを、発現タンパク質を用いた *in vitro* でのリン酸化実験で調べた。

SRK₈ のキナーゼドメインの N 末端に GST を融合させた発現タンパク質 (GST-SRK₈KD) を作製し、先の MLPKf1 の N 末端に MBP を融合させた発現タンパク質 (MBP-MLPKf1) と併せて実験に用いた。GST-SRK₈KD と MBP-MLPKf1 を混合し、 γ -[³²P]-ATP 存在下でインキュベートすることで、GST-SRK₈KD、MBP-MLPKf1 のそれぞれが単独の場合と比較して、³²P の取り込み量が増減するかどうか調べた。その結果、GST-SRK₈KD、MBP-MLPKf1 とともに ³²P の取り込み量に変化は見られなかった (Fig. 2-7 lane 1, 2, 5)。

先の実験では、MLPKf1 自身の自己リン酸化活性のために、SRK₉ による MLPKf1 のリン酸化が検出できなかった可能性がある。そこで、ATP 結合領域である MLPKf1 の 112 番目のリジンをアルギニンに置換させることで、キナーゼ活性を消失させた変異型 MLPKf1 (MLPKf1^{K112R}, Fig. 1-1B) と MBP との融合タンパク質を作製し、この MLPKf1^{K112R} が SRK によってリン酸化を受けるかどうかを調べた。

MLPKf1^{K112R} を MBP との融合タンパク質 (MBP-MLPKf1^{K112R}) として大腸菌に発現させ、実験に供した。先に精製した GST-SRK₉KD とこの MBP-MLPKf1^{K112R} を各々単独あるいは共存下で γ -[³²P]-ATP を添加し、両タンパク質への ³²P の取り込み量の変化を調べた。その結果、MBP-MLPKf1^{K112R} は期待通りキナーゼ活性を消失していることが示されると共に (Fig. 2-8 lane 3)、GST-SRK₉KD により強くリン酸化されることが示された (Fig. 2-8 lane 2)。MBP 単独の発現タンパク質や混在する大腸菌由来の不純物タンパク質からは ³²P の取り込みが検出されないことから (Fig. 2-8 lane 1)、GST-SRK₈KD によるリン酸化は MLPKf1 に対して特異的に起きていることが示唆された。以上の結果は、MLPK が SRK 特異的な基質として機能している可能性を示唆するものである。

MLPK は、プロテインキナーゼ領域の N 末端側、MLPKf1 と MLPKf2 で共通の配列を持つ部分にセリン残基に富んだ領域が存在し、村瀬はこの領域を Ser-rich 領域と命名した (村瀬, 2004, Fig. 1-1B)。筆者は、この Ser-rich 領域が

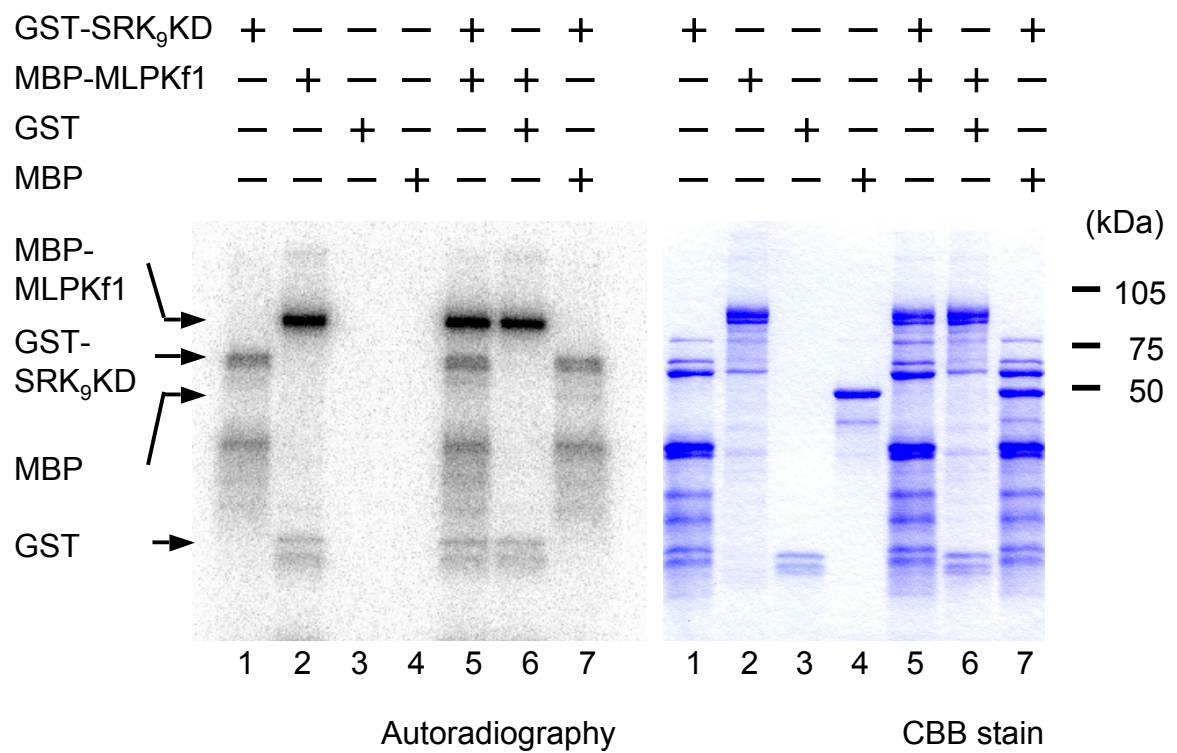


Fig. 2-7 *in vitro*リン酸化実験

GST-SRK₉KDとMBP-MLPKf1を混合し、 γ -[³²P]-ATP存在下で、インキュベートし、SDS-PAGEによるタンパク質の分離後のゲルの、オートラジオグラフィ像（左図）とCBB染色像（右図）。

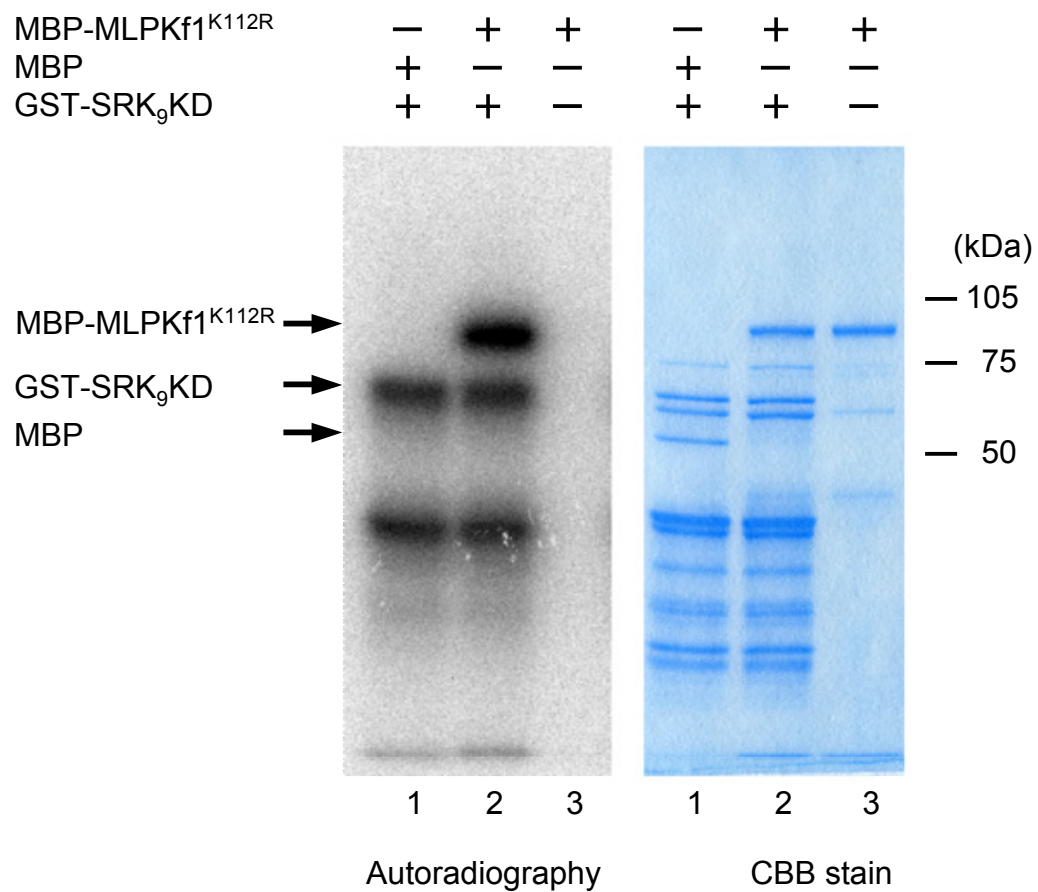


Fig. 2-8 SRKによるMLPKのリン酸化

GST-SRK₉KDとMBP-MLPKf1^{K112R}を混合し、 γ -[³²P]-ATP存在下で、インキュベートし、SDS-PAGEによるタンパク質の分離後のゲルの、オートラジオグラフィ像（左図）とCBB染色像（右図）。

SRK による MLPK リン酸化のターゲット領域の有力な候補となりうると考えた。そこで、Ser-rich 領域が SRK によるリン酸化のターゲットである可能性を確認するために、MLPKf2 の Ser-rich 領域を含む 24~79 番目までのペプチド断片を GST との融合タンパク質 (GST-MLPK24-79; Fig. 2-9) として大腸菌に発現させ、このペプチド断片が SRK によってリン酸化されるかどうかを調べた。

先の GST-SRK₉KD に、GST-MLPK24-79 を加え、 γ -[³²P]-ATP 存在下で反応させたところ、コントロールの GST に比べ、GST-MLPK24-79 は強くリン酸化されることが示された (Fig. 2-10 lane 1, 2)。このリン酸化は、ATP 結合領域である 557 番目のリジンをアルギニンに置換することでキナーゼ活性を消失させた変異型 SRK₉KD と GST との融合タンパク質 (GST-SRK₉KD^{K557R}) を同様に作製し、GST-MLPK24-79 に添加した際には見られなかったことから (Fig. 2-10 lane 3)、混入する大腸菌由来のキナーゼによるものではなく GST-SRK₉KD によるものであることが確認された。以上の結果から、MLPK の Ser-rich 領域は SRK の基質としてリン酸化される可能性が示唆された。

MLPK の *in vitro* リン酸化活性の解析

次に、MLPK の Ser-rich 領域が、MLPK 自身のリン酸化活性調節に関与している可能性を検討することにした。そこで、まず MLPKf1 および MLPKf2 をそれぞれ MBP との融合タンパク質 (MBP-MLPKf1、MBP-MLPKf2) を作製し、これらタンパク質の *in vitro* における自己リン酸化活性を γ -[³²P]-ATP 存在下で測定した。その結果、MBP-MLPKf1 には自己リン酸化活性が認められたものの、MBP-MLPKf2 は自己リン酸化活性が検出されないという全く予想外の結果が得られた (Fig. 2-11 lane 1, 4)。

MLPKf1、MLPKf2 は N 末端アミノ酸配列のみ異なり、MLPKf2 には固有の疎水性アミノ酸領域が存在する (Fig. 1-1B)。この領域がキナーゼ活性を負に制御している可能性を考え、MLPKf2 の N 末端の 1~10 番目までのアミノ酸を除いたもの (MLPKf2 Δ 1-10) と、11~23 番目までの疎水性領域に相当する部分を除いたもの (MLPKf2 Δ 11-23) を、MBP との融合タンパク質として発現させ、自己リン酸化活性を測定した (Fig. 2-9)。その結果、MBP-MLPK Δ 11-23 において、MBP-MLPKf1 と同様の自己リン酸化活性が認められた (Fig. 2-11 lane 4, 5, 6)。このことから、MLPKf2 の固有の疎水性領域が自身のキナーゼ活性を負に制御していることが示唆された。なお、本実験で使用した MBP-MLPKf1 は N 末端に MBP を連結させた融合タンパク質であるが、植物体内では 2 残基目のグリシン

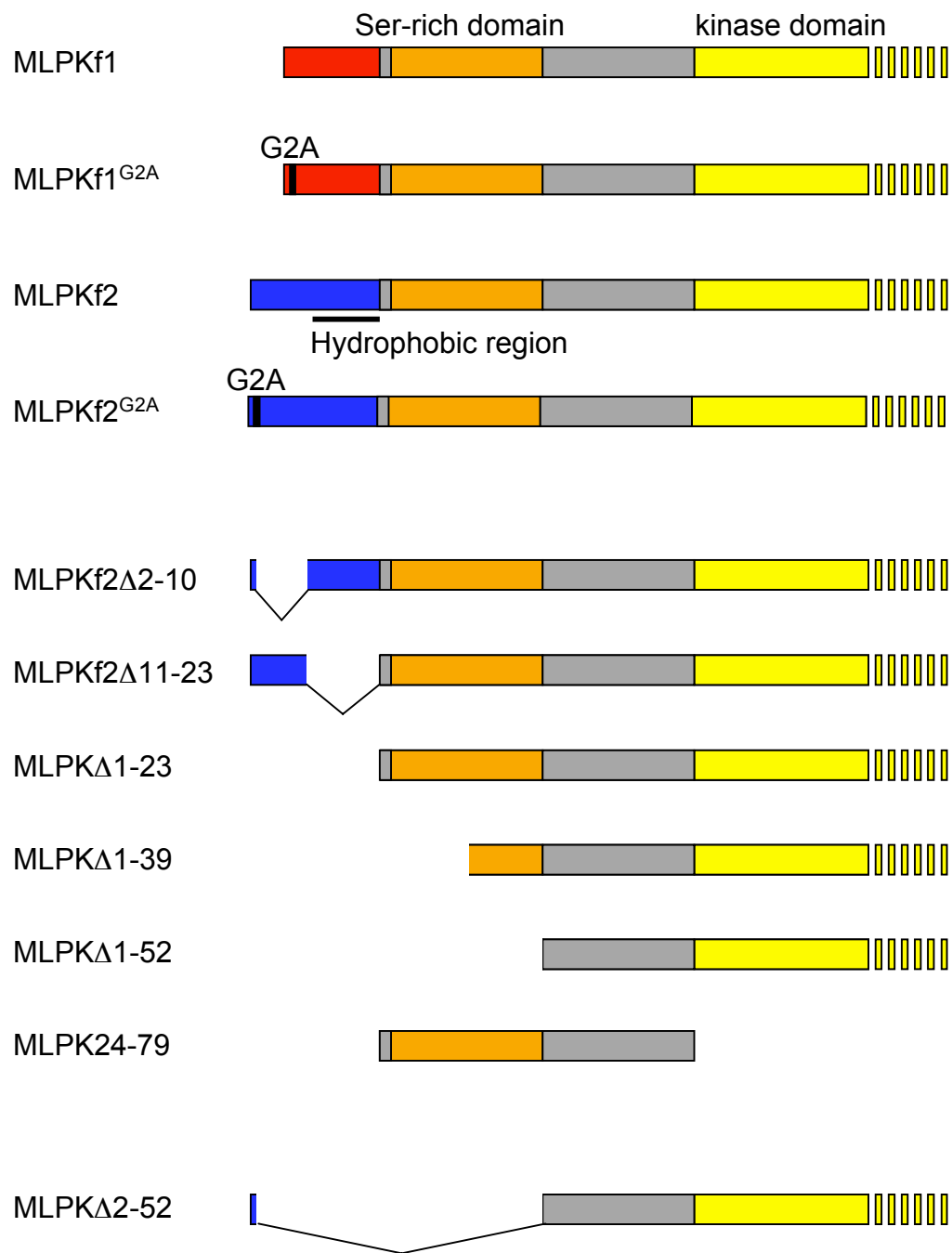


Fig. 2-9 作製した変異型MLPKのN末端構造

MLPKf1とMLPKf2の共通部分で作製した変異型MLPKのアミノ酸番号はMLPKf2のものに準じた。

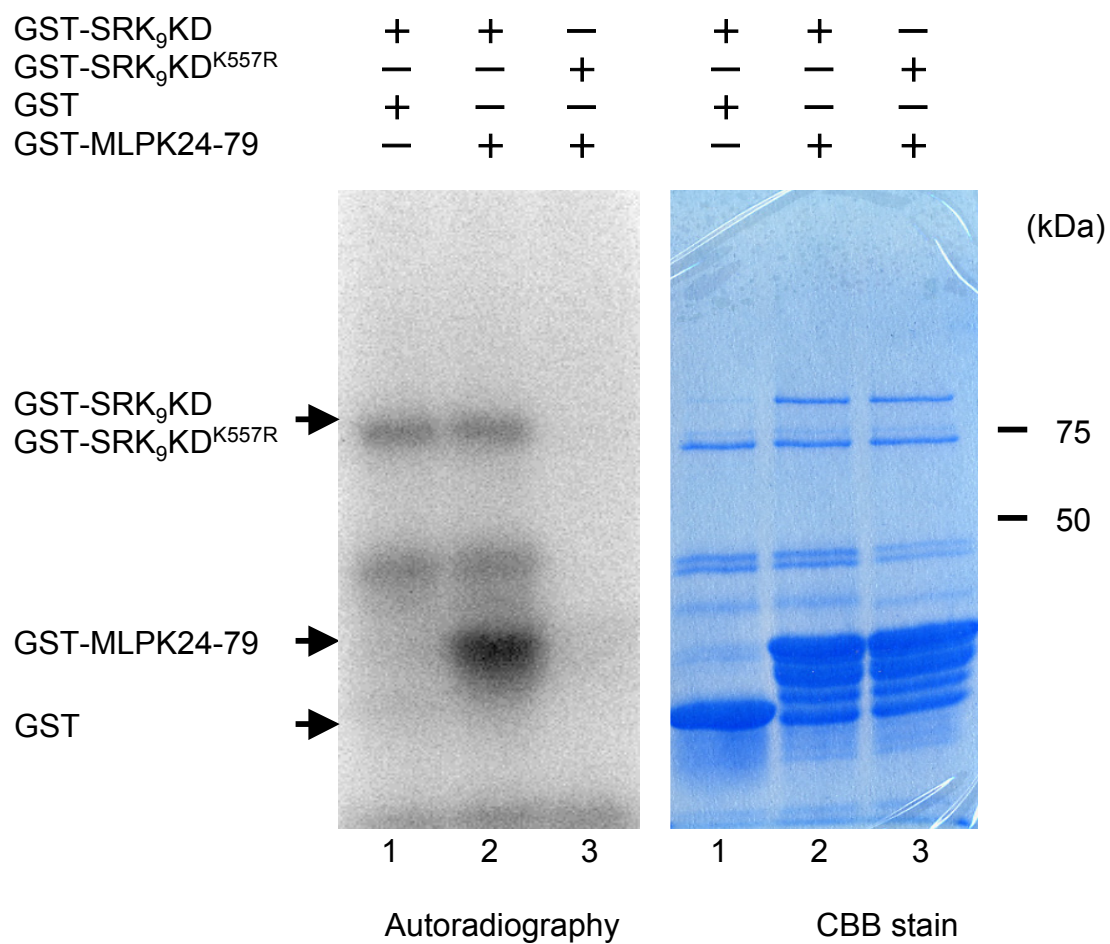


Fig. 2-10 SRKによるMLPK Ser-rich領域のリン酸化

GST-SRK₉KDとGST-M24-79を混合し、 γ -[³²P]-ATP存在下で、インキュベートし、SDS-PAGEによるタンパク質の分離後のゲルのオートラジオグラフィ像（左図）とCBB染色像（右図）。

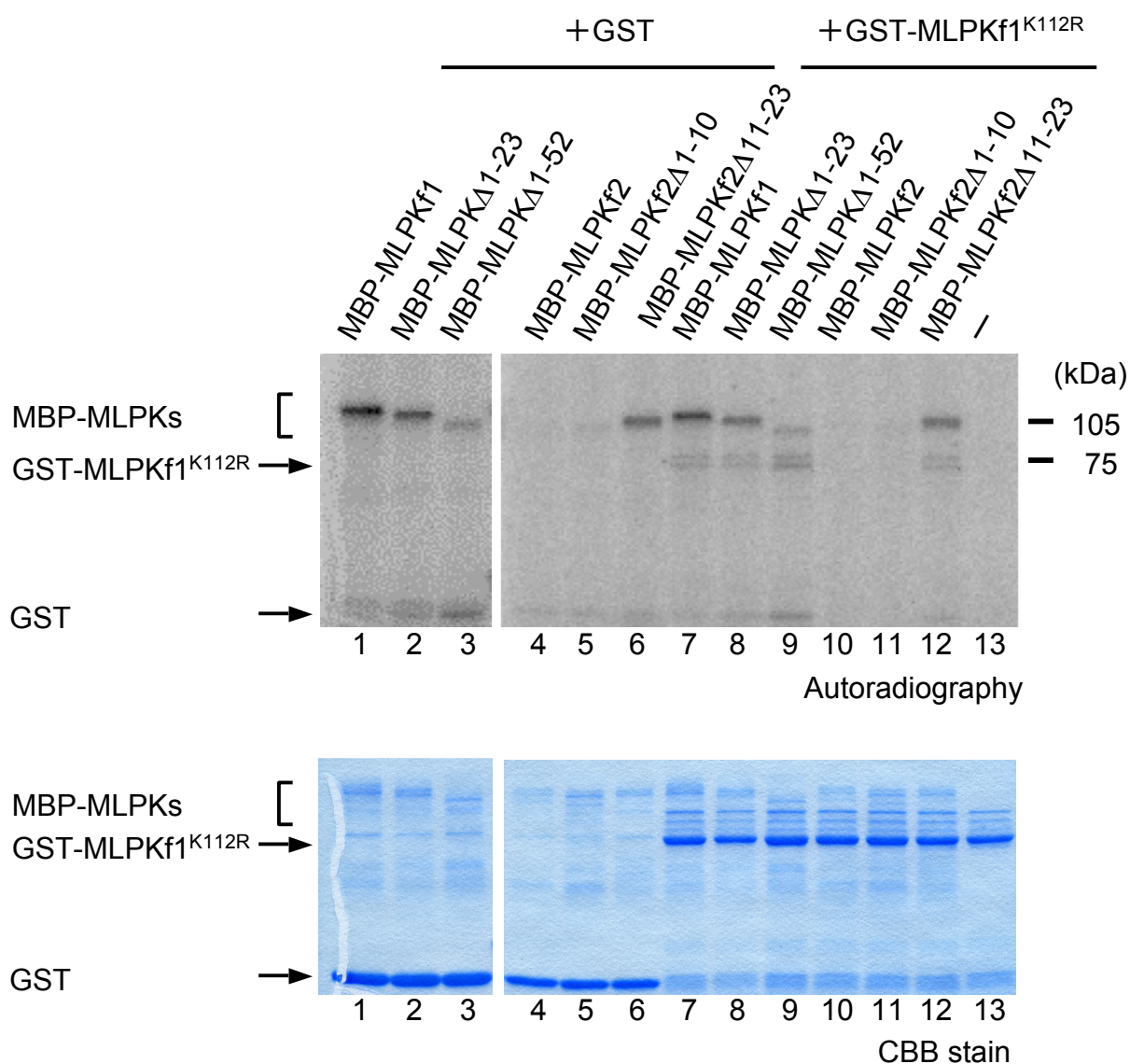


Fig. 2-11 MLPKのキナーゼ活性測定

変異型MLPKとMBPとの融合タンパク質を、 γ -[³²P]-ATP存在下で、インキュベートし、SDS-PAGEによるタンパク質の分離後のゲルのオートラジオグラフィ像（上図）とCBB染色像（下図）を示した。

が疎水性のミリストイル基で修飾されており、MLPKf2 と同様に、この疎水性基を介してキナーゼ活性が負に制御されている可能性も推定された（考察参照）。

次に、Ser-rich 領域が MLPK 自身のキナーゼ活性に対する作用を調べる目的で、N 末端から抑制的に機能している疎水性領域までを除いたもの（MLPK Δ 1-23）と、さらに Ser-rich 領域までを除いたもの（MLPK Δ 1-52）を MBP との融合タンパク質（MBP-MLPK Δ 1-23, MBP-MLPK Δ 1-52）を作製し、自己リン酸化活性を測定した（Fig. 2-9）。その結果、Ser-rich 領域を含む MBP-MLPK Δ 1-23 と比較して Ser-rich 領域を欠く MBP-MLPK Δ 1-52 では、自己リン酸化が有意に減少する様子が観察された（Fig. 2-11 lane 2, 3）。この理由として、MLPK のキナーゼ活性の低下と、MLPK の持つ自己リン酸化の標的となる部位の減少、の 2 つの可能性が考えられた。そこで、このリン酸化反応の系に共通の基質を加え、各融合タンパク質のキナーゼ活性を比較検討することとした。まず、共通の基質として、キナーゼ活性を消失させた MLPKf1^{K112R} と GST との融合タンパク質

（GST-MLPKf1^{K112R}）を添加したところ、Ser-rich 領域を欠く MBP-MLPKf2 Δ 1-52 は、MBP-MLPKf2 Δ 1-23 と比較して自己リン酸化活性は減少するものの、GST-MLPKf1^{K112R} への ³²P の取り込み量はむしろ増加していることが観察された（Fig. 2-11 lane 8, 9）。このリン酸化活性の上昇は、基質として MLPK の Ser-rich 領域を含む N 末端部分と GST との融合タンパク質（GST-MLPK24-79）を用いた際に、より顕著に観察された（Fig. 2-12）。GST-MLPK24-79 に対するリン酸化活性は、全長の MBP-MLPKf1 と比較して MBP-MLPK Δ 1-23 で若干増加し、さらに Ser-rich 領域を削除した MBP-MLPK Δ 1-39 や MBP-MLPK Δ 1-52 では、更に増加する様子が確認された（Fig. 2-12）。

以上の結果から、MLPK の N 末端部分、特に MLPKf2 の疎水性領域と MLPKf1 と MLPKf2 に共通する Ser-rich 領域は、MLPK 自身のキナーゼ活性を負に制御していることが強く示唆された。

Ser-rich 領域欠失型 MLPK の機能解析

in vitro における自己リン酸化解析の結果から、MLPK の N 末端の Ser-rich 領域がキナーゼ活性の調節領域として機能している可能性が示された。この結果から、Ser-rich 領域を除いた MLPK は、constitutive active (CA) 型として機能することが期待される。そこで、MLPKf2 の 2~52 残基目までの領域を除いた、MLPK Δ 2-52 を、マーカー遺伝子 *RFP* とともに、パーティクルガン法を用いて、

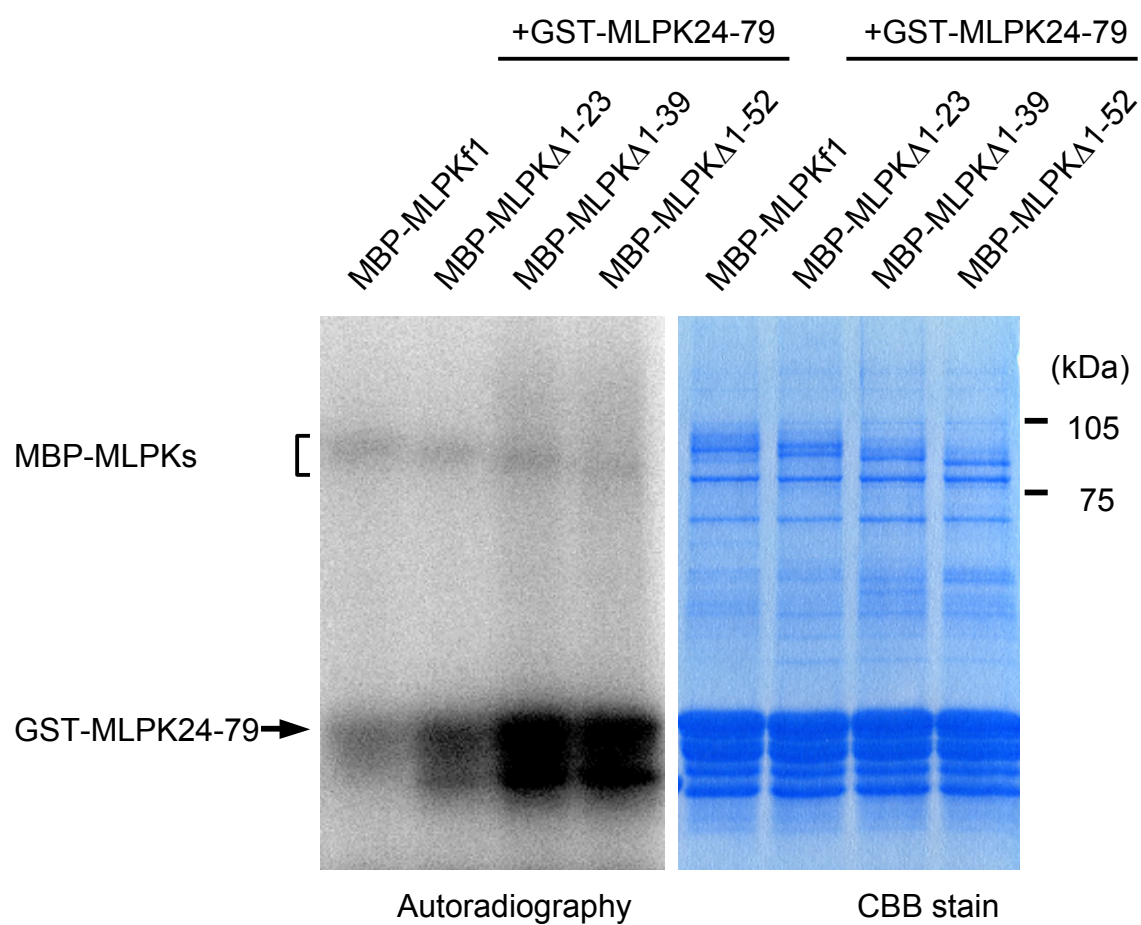


Fig. 2-12 MLPKによるMLPK Ser-rich領域のリン酸化

変異型MLPKとMBPとの融合タンパク質を、GST-MLPK24-79と、 γ -[^{32}P]-ATP存在下で、インキュベートし、SDS-PAGEによるタンパク質の分離後のゲルのオートラジオグラフィー像（上図）とCBB染色像（下図）を示した。

B. rapa 自家和合性変異株である S_8S_8mm 株の乳頭細胞に導入し、RFP の蛍光の認められる乳頭細胞に対して受粉試験を行った (Fig. 2-9)。

コントロールとして全長の *MLPKf2* と *RFP* を共導入し、RFP 蛍光の認められた乳頭細胞に和合花粉 (S_9S_9 株) と不和合花粉 (S_8S_8 株) をそれぞれ受粉した際、不和合花粉は和合花粉よりも有意に、花粉管の乳頭細胞への進入が抑制された (Table 2-1A)。この結果は、自家和合性を示す S_8S_8mm 株の表現型が *MLPKf2* の導入によって相補されたことを示すとともに、この実験系が正常に機能していることを示している。そこで、*MLPKΔ2-52* と *RFP* を、パーティクルガン法を用いて、乳頭細胞に共導入した。RFP 蛍光の認められる細胞に受粉試験を行ったところ、不和合受粉時のみならず、和合受粉時にも花粉管の乳頭細胞への進入が顕著に抑制された (Table 2-1A)。この結果は、*MLPKΔ2-52* が乳頭細胞内で CA 型として機能しており、MLPK の下流の不和合性情報伝達系が常に活性化しているために和合花粉、不和合花粉に関わらず、すべての花粉を受け付けなくなっていることを示唆している。

CA 型 MLPK (*MLPKΔ2-52*) の機能解析

MLPKΔ2-52 が CA 型として機能していることが一過的発現系を用いた解析で明らかとなった。これまでの研究から、*A. thaliana* は *SRK*、*SP11* 遺伝子を欠損している自家和合性株であるが (Kusaba *et al.*, 2001)、*SRK* および *SP11* 遺伝子を導入すると自家不和合性の表現型が回復することから、それ以外の不和合反応に関わる情報伝達因子は保持されていることが示されている (Nasrallah *et al.*, 2002; Nasrallah *et al.*, 2004)。このことから、今回得られた CA 型 MLPK

(*MLPKΔ2-52*) を乳頭細胞で発現させたシロイヌナズナ形質転換体は、常に不和合反応経路が活性化され不稔の表現型を示すことが期待される。

MLPKΔ2-52 が実際に植物内で CA 型として機能するかどうかを確かめるために、*MLPKΔ2-52* を導入した形質転換体、並びに、シロイヌナズナの *MLPK* オルソログ遺伝子である *APK1b* の同じ領域に相当する部分を除いたもの

(*APK1bΔ2-50*) を、乳頭細胞で発現させるコンストラクトを用い、シロイヌナズナを形質転換した (Fig. 2-13A)。プロモーターは、*B. rapa* 由来の *SLG*₉ プロモーター (*SLGp*) と、シロイヌナズナの *SRK* 偽遺伝子 (At4g21370) である *ψSRK* のプロモーター (*ψSRKp*) を用いた。*ψSRK* プロモーターは Kusaba ら (2001) により、*SLG* プロモーターは Iwano ら (2004) により、シロイヌナズナ乳頭細胞での発現が確認されている。

Table 2-1 S_8S_8mm 株及び $S_{f2}S_{f2}MM$ 株へのCA型 $MLPK$ の導入試験

A

Plant	Transgene	Pollen	Pollen tube penetration / tests(%)	
S_8S_8mm	$RFP + MLPKf2$	Self	15 / 36	(42)
		Cross	27 / 38	(71) ※1
	$RFP + MLPK\Delta2-52$	Self	22 / 50	(44)
		Cross	22 / 49	(45) ※1

B

Plant	Transgene	Pollen	Pollen tube penetration / tests(%)	
$S_{f2}S_{f2}MM$	$RFP + MLPKf2$	Self	39 / 49	(80)
		Cross	34 / 44	(77) ※2
	$RFP + MLPK\Delta2-52$	Self	34 / 48	(71)
		Cross	25 / 36	(69) ※2

(A) S_8S_8mm 株の乳頭細胞に、パーティクルガンを用いてCA型 $MLPK$ ($MLPK\Delta2-52$)を RFP と共導入し、 RFP 蛍光の認められる乳頭細胞に対し、和合受粉又は不和合受粉 (S_8S_8) を行った。※1: $\chi^2 = 6.40$, $p < 0.02$

(B) S_9S_9MM 株の乳頭細胞に、パーティクルガンを用いてCA型 $MLPK$ ($MLPK\Delta2-52$)を RFP と共導入し、 RFP 蛍光の認められる乳頭細胞に対し、自家受粉又は他家受粉 (S_9S_9) を行った。※2: $\chi^2 = 6.27$, $p < 0.02$

A

MLPKf1	MGICMSVQVKAESPSNT
APK1bf1	MGICLSAQIKAVSP---
MLPKf2	MGFVKKVQSKVFLYVNYLFGVCIGASPKYMSSEANDTQSMGSKCSSVSVRTSPRTEGEIL
APK1bf2	MGFVEKVKSNVFLYANYVFGCCIGASPKYMSSEAND--SLGSKSSSVSIRTNPRTGEIL

Ser-rich domain

B

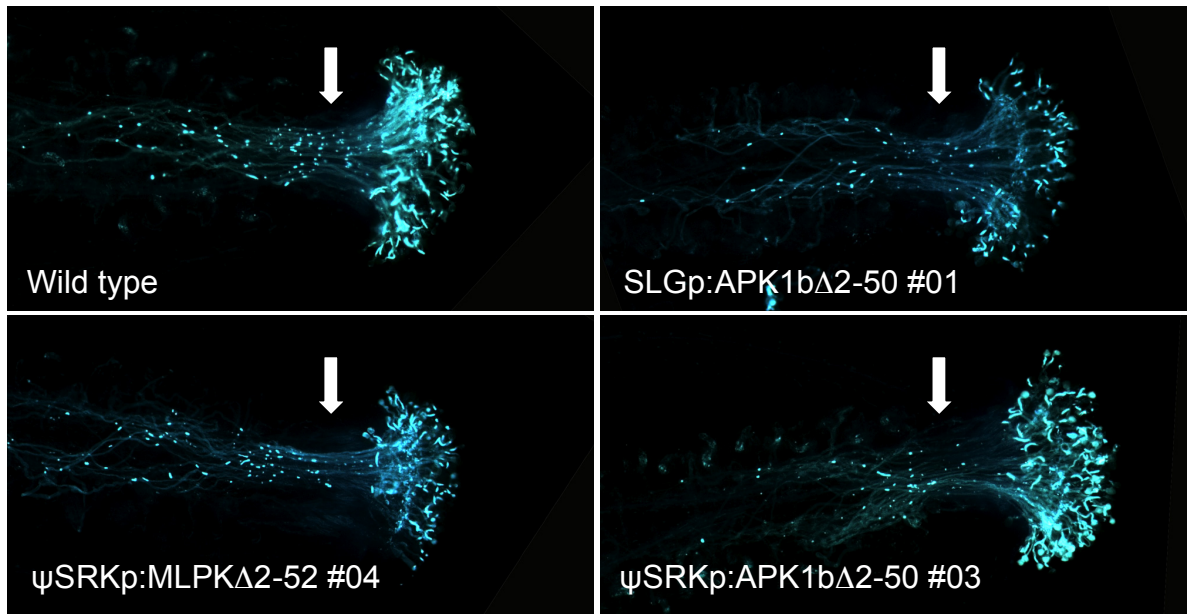


Fig. 2-13 シロイヌナズナ形質転換体

- (A) シロイヌナズナのMLPKオルソログであるAPK1bのSer-rich領域。
- (B) SLGp:APK1bΔ2-50、ψSRKp:MLPKΔ2-52、ψSRKp:APK1bΔ2-50の各形質転換体の雌ずいに野生型の花粉を受粉させ、花粉管の伸長をアニリンブルー染色で観察した際の典型的な表現型を示した。矢印は花粉管を示した。

減圧浸潤法により、SLGp:MLPK Δ 2-52、SLGp:APK1b Δ 2-50、 ψ SRKp:MLPK Δ 2-52、 ψ SRKp:APK1b Δ 2-50 をシロイヌナズナに形質転換した。処理した植物体より得られた T₁ 種子を、カナマイシンを含む GM 培地で発芽・生育させたところ、SLGp:APK1b Δ 2-50 の T₁ 種子から 77 個体、 ψ SRKp:MLPK Δ 2-52 の T₁ 種子から 56 個体、 ψ SRKp:APK1b Δ 2-50 の T₁ 種子から 76 個体のカナマイシン耐性を示す個体が得られたが、いずれも期待された不稔性の表現型を示さなかった。カナマイシン耐性を示した SLGp:APK1b Δ 2-50、 ψ SRKp:MLPK Δ 2-52、 ψ SRKp:APK1b Δ 2-50 形質転換体より 3 個体ずつ選抜し、Real-time PCR を行ったところ導入遺伝子の発現が確認されたが (data not shown)、これら形質転換体に対し野生株の花粉を受粉させたが、すべての形質転換体から野生型と同程度の花粉管の伸長が観察された (Fig. 2-13B)。また、SLGp:MLPK Δ 2-52 の T₁ 種子からは、カナマイシン耐性を示す形質転換個体は得られなかった。以上の結果より、今回作製したシロイヌナズナ形質転換体においては、MLPK53、APK1b53 は CA 型として機能せず、期待された不稔性の表現型を示す個体を得ることはできなかった。

CA 型の MLPK Δ 2-52 あるいは APK1b Δ 2-50 を導入した形質転換シロイヌナズナは期待された不稔性の表現型を示さず、花粉を受け入れることが示された。シロイヌナズナの乳頭細胞には、自家不和合情報伝達系に関わる因子は SRK 以外すべてそろっていると考えられていることから、CA 型である MLPK Δ 2-52 が、不和合情報伝達系を活性化するためには SRK が必要である可能性が考えられた。この仮説を検証するために、SRK を欠失した *B. rapa* S₂S₂ 株 (村瀬、2004; Fujimoto *et al.*, 2006) の乳頭細胞にパーティクルガン法を用いて、MLPK Δ 2-52 遺伝子を導入し、その表現型を観察した。その結果、MLPK Δ 2-52 を正常な SRK を持つ S₈S₈mm 株に導入した場合 (Table 2-2A) と異なり、S₂S₂MM 株では不稔性を示さず、和合／不和合受粉のどちらにおいても花粉管を受け入れることが明らかとなった (Table 2-2B)。このことから、シロイヌナズナにおいて CA 型 MLPK Δ 2-52 が機能しなかったのは、シロイヌナズナが SRK を欠損していることがその理由であると考えられる。さらに、SRK の非存在下で MLPK Δ 2-52 が CA 型として機能しなかったことから、SRK が MLPK の下流因子としても機能しうることも同時に明らかとなった。以上の結果は、MLPK Δ 2-52 が CA 型として不和合反応を誘起するには SRK の存在が不可欠であることを示しており、自家不和合性の情報伝達系において MLPK の下流で SRK が活性化される可能性が強く示唆された。

2-4 考察

本章では、植物培養細胞内で発現させた MLPK と SRK が細胞膜上で相互作用すること、大腸菌発現タンパク質を用いた *in vitro* リン酸化実験において MLPK の Ser-rich 領域が SRK キナーゼドメインによりリン酸化されることを明らかにした。次に、MLPK の Ser-rich ドメインが MLPK のキナーゼ活性を負に制御していることを明らかとし、この Ser-rich ドメインを除いた MLPK Δ 2-52 が、乳頭細胞内で constitutive active (CA) 型として機能することを示した。さらに、この MLPK Δ 2-52 が SRK を欠損したシロイヌナズナや *B. rapa* S₂S₂ 株においては機能しないことを示し、不和合情報伝達機構において MLPK が SRK の上流の因子としても機能していることを明らかにした。

本章では、様々な方法を用いて SRK-MLPK 間相互作用の検出を試みた。その結果、発現タンパク質を用いた pull-down 法と、Dualmembrane 酵母 two-hybrid 法では両者間の相互作用は検出できなかったものの、タバコ培養細胞を用いた BiFC 法において直接的な相互作用を検出することができた。

今回の実験では、用いた実験手法によって、SRK-MLPK 間の結合の有無に差が出る結果となったが、幾つかの理由が考えられる。まず、pull-down 法では大腸菌で発現させたタンパク質を、Dualmembrane 酵母 two-hybrid 法では、酵母の膜上に発現させたタンパク質を用いているのに対し、BiFC 法では、乳頭細胞と同じ植物細胞の細胞膜上に発現させたタンパク質を用いて相互作用を検出している点である。すなわち、植物固有の翻訳後修飾や、植物由来の他のタンパク質の存在が、安定した SRK-MLPK 間相互作用に必要であることが考えられる。実際、当研究室の下里は、植物細胞で発現させた SRK が SP11 に対する高親和性受容能を獲得するのにに対し、酵母や動物細胞で発現させた SRK が何故か SP11 に対する受容能を獲得できないという現象を確認している（下里、私信）。この原因としては、修飾される糖鎖構造の違いを推定しているが、動物の ERK

(extracellular signal-regulated protein kinases) や JNK (c-Jun N-terminal kinases) などの MAPK (mitogen-activated protein kinases) では、scaffold protein と呼ばれる一群のタンパク質が、MAPK と MAPKK や MAPKKK など他のキナーゼ類との安定な機能的複合体の形成に深く関わっていることが知られている (Weston and Davis 2002; Morrison and Davis 2003)。植物における scaffold protein 研究は遅れているが、タバコ培養細胞とアブラナの細胞に共通する未知のタンパク質を介して、SRK と MLPK が安定した結合状態を取ることができた可能性も考えら

れる。

また、SRK-MLPK 間の結合が、一般的な酵素と基質との間で観察される様な一過性の弱い結合であるために、BiFC 法以外の方法では相互作用が観察されなかった可能性も考えられる。BiFC 法は、Venus 分子が一旦再構成されるとその構造は安定に維持されるので、一過性の相互作用を蛍光として観察できるという利点がある。実際、pull-down 法では検出できなかった大腸菌発現 SRK-MLPK 間の相互作用も、*in vitro* リン酸化実験では MLPK の Ser-rich ドメインのリン酸化という形で検出できたこともこの考えを支持する。さらに、当研究室の下里は、biotin 標識した SP11 を用いて *B. rapa* の柱頭膜画分より SRK 受容体を精製したが、その画分中に MLPK は含まれなかったという観察結果も、SRK-MLPK 間の相互作用が一過性のものであることを示唆する (Shimosato *et al.*, 2007; 下里、私信)。

SRK-MLPK 間の直接的な相互作用が BiFC 法と *in vitro* リン酸化解析でのみ検出できた原因としては、これまで述べてきたこと、あるいはこれらの複合的な原因によるものと考えられるが、生きた植物細胞内での相互作用を検出できる BiFC 法で SRK-MLPK の直接的な相互作用が確認できたことは、乳頭細胞内でも同様の相互作用が起きていることを強く示唆している。今回の解析では、SP11 の非存在下での SRK-MLPK 間相互作用を観察したが、SP11 の SRK への結合に伴ってこの相互作用に変化が観察されるかどうかは、興味深い問題であり、今後の重要な検討課題である。

SRK-MLPK 間で見られるような RLK ファミリーに属する 2 つのキナーゼが直接相互作用する例は、植物では唯一ブラシノステロイド情報伝達系で研究が進められている。植物ホルモンブラシノステロイドの受容体である BRI1

(brassinosteroid-insensitive 1) は、ロイシンリッチリピート型の受容体型キナーゼであり、同じロイシンリッチリピート型の受容体型キナーゼである BAK1

(BRI1-associated receptor kinase 1) とヘテロ二量体を形成する (Wang *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Nam and Li, 2002; Russinova *et al.*, 2004)。BRI1 と BAK1 の関係については 2 つの説が想定されている。1 つは、ブラシノステロイドによって活性化された BRI1 が BAK1 をリン酸化することによって情報を下流に伝えているとする説である。このような例は動物の TGF β (transforming growth factor β) 受容体で見られる。膜貫通型のセリンスレオニンキナーゼである T β RII (type 2 receptor) にリガンド分子 TGF β が結合すると、T β RII はもう 1 つの膜貫通型キナーゼ T β RI (type 1 receptor) とヘテロ 4 量体を形成し、T β RI をリン酸化する。そしてリン酸化された T β RI は R-Smad (receptor regulated Smad) をリン酸化す

ることで下流にシグナルを伝えることが知られている (Massague, 1998)。もう 1 つの説は、BRI1 と BAK1 がヘテロ二量体として存在し、リガンド分子の結合によって相互にリン酸化し合うことで情報を下流に伝えているとする説であり、このような例は動物の受容体チロシンキナーゼ (RTK: receptor tyrosine kinase) で見られる。PDGF 受容体や、EGF 受容体はリガンド分子と結合すると、細胞内型チロシンキナーゼである Src ファミリーと相互にリン酸化し合うことで活性化し、情報を下流に伝えることが知られている (Thomas and Brugge, 1997; Schlessinger, 2000)。Li ら (2002) は、大腸菌発現融合タンパク質を用いた *in vitro* リン酸化実験において、BRI1 と BAK1 のキナーゼ領域を共存させると BAK1 のリン酸化が上昇する観察をもとに前者の説を提唱した。一方、Nam と Li (2002) は酵母内に全長の BRI1 と BAK1 を発現させる実験を行い、野生型の BRI1 と BAK1 を共発現させた時のみ、両者のリン酸化が検出されたことから後者の説を提唱している。BRI1 と BAK1 の関係がどちらのモデルに近いのかは現在までに明確にはされていない。

今回筆者が明らかにした、キナーゼ活性調節に関わっていると予測された MLPK の Ser-rich 領域が SRK によりリン酸化されるという観察結果と、活性化型 MLPK の下流に SRK が位置しているという観察結果から、自己花粉情報 SP11 の受容に関して以下の様なモデルが推定される (Fig. 2-14)。まず、SP11 を受容し活性化された SRK は、MLPK のキナーゼ活性を負に制御している Ser-rich ドメインをリン酸化し、その抑制を解除することで MLPK のキナーゼドメインを活性化する。その後、活性化型の MLPK によって SRK が更に活性化されることが引き金となって、自己花粉の情報がさらに下流に伝達される。すなわち、MLPK は SRK の co-receptor として機能し、両者は相互にリン酸化し合うことで互いを活性化し、下流に情報を伝達しているものと推定される。

今回の大腸菌発現タンパク質を用いた、*in vitro* リン酸化実験では、MLPKf1 の全長の融合タンパク質 (MBP-MLPKf1) は自己リン酸化活性を示したが、MLPKf2 の全長の融合タンパク質 (MBP-MLPKf2) は自己リン酸化活性を全く示さなかった。MBP-MLPKf2 については、MLPKf2 に固有の疎水性領域を欠損させた時に自己リン酸化活性を回復したことから、膜結合に関わるこの疎水性領域が、溶液中では MLPKf2 の自己リン酸化の抑制に働いていることが示唆された。一方、N 末端に MBP を連結することでミリスチル化ドメインを欠失させる形で発現させた MBP-MLPKf1 は、自己リン酸化活性を示したが、本来の N 末端がミリスチル化された形の MLPKf1 は、溶液中では自己リン酸化が同様

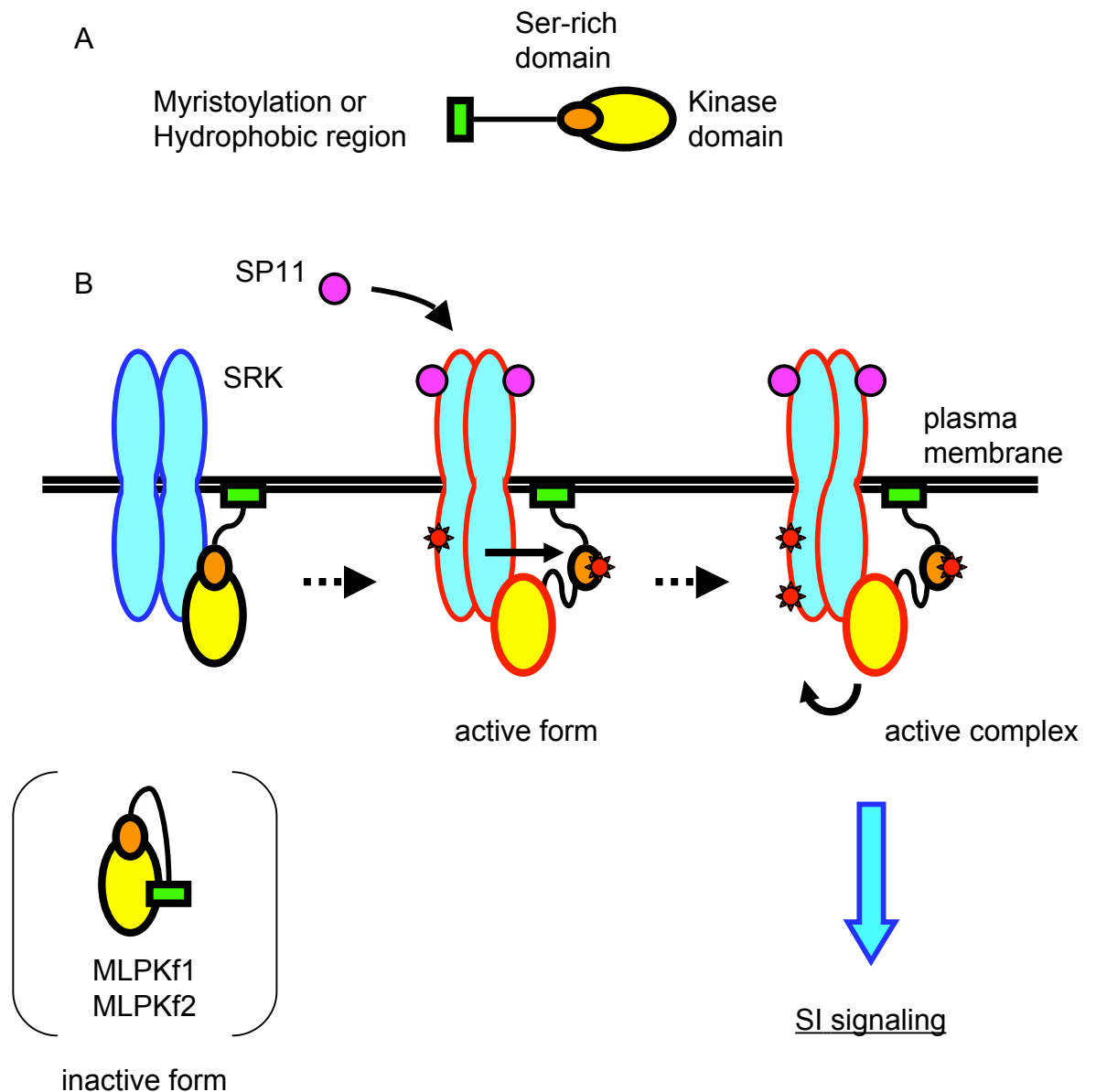


Fig. 2-14 MLPK-SRK受容体複合体の活性化機構のモデル

- (A) MLPKの構造。
- (B) SP11がSRKに結合すると、SRKはMLPKの活性調節領域であるSer-richドメインをリン酸化(★)することで、MLPKを活性化する。活性化したMLPKはSRKを活性化し、この受容体複合体が不和合(SI)シグナルを下流に伝達する。

に抑制されている可能性が推察された。実際、*N*-ミリストイル化によって自己リン酸化活性が抑制される例が、動物の Src キナーゼファミリーに属する c-Abl (Abelson tyrosine kinase) で見出されている。ヒトの c-Abl では、MLPK と同様に *N* 末端部分のみ異なる 2 つの isoform (c-Abl 1a と c-Abl 1b) が存在し、1b には 1a に存在しない *N*-ミリストイル化モチーフが存在する。c-Abl 1b は、*N* 末端側から *N*-ミリストイル化モチーフ、SH2 ドメイン (Src homology 2)、SH3 ドメイン (Src homology 3)、キナーゼドメイン、proline-rich 領域、DNA 結合ドメイン、アクチン結合ドメインからなるタンパク質である。*N* 末端からキナーゼドメインまでの部分配列の結晶構造解析及び生化学的解析から、ミリストイル基を含む *N* 末端領域がキナーゼドメインの hydrophobic pocket と呼ばれる部分に結合し、SH2 ドメインと SH3 ドメインがキナーゼドメインを塞ぐような分子内構造をとることによって自身のキナーゼ活性を抑制していることが明らかとなっている (Hantschel *et al.*, 2003; Nagar *et al.*, 2003)。最近になって、植物でも同様の例がトマト (*Lycopersicon esculentum*) の病原抵抗性に関わる *R* 遺伝子産物である Pto キナーゼで報告されている。ミリストイル基の結合部位である 2 番目グリシン残基を含む 2~10 番目のアミノ酸を除いた Pto 発現タンパク質である、GST-Pto[N-10]はキナーゼ活性を示すが、これに Pto の 2~10 番目までと同じアミノ酸鎖にミリストイル基を付加した合成ペプチド *myr*-Pto_[2-10]を加えると、Pto のキナーゼ活性が抑制されることが示された。さらに、Pto のキナーゼドメイン中の negative regulatory patch (NRP) と呼ばれる疎水性領域中に変異を入れた Pto (GST-Pto[N-10]^{I214D}) は、この合成ペプチドを加えてもキナーゼ活性が抑制されないことから、細胞内での Pto は *N* 末端のミリストイル基が NRP 領域と結合することで、自身のキナーゼ活性を抑制していると考えられている。(Wu *et al.*, 2004; Andriotis and Rathjen, 2006)。

MLPKf1 が *N*-ミリストイル化モチーフを持つキナーゼタンパク質であることから、c-Abl や Pto と同様に *N*-ミリストイル化によって自己のキナーゼ活性が抑制されている可能性が考えられる。また、MLPKf2 は固有の疎水性領域がミリストイル基の代わりとなって同様の機構によって自己リン酸化を抑制しているのかもしれない。今後は、*N*-ミリストイル化された MLPKf1 の自己リン酸化活性が実際に抑制されているかどうかを、植物細胞内で MLPKf1 を発現させるなどして検証していく必要があると考えられる。

今回の実験から、MLPK の Ser-rich 領域が MLPK の活性を抑制していること、さらにはこの Ser-rich 領域の SRK によるリン酸化が MLPK の活性化の引き金になっている可能性が示唆された。近年、ブラシノステロイド受容体である BRI1

と相互作用するタンパク質として BKI1 (BRI1 kinase inhibitor 1) が同定された (Wang and Chory, 2006)。BKI1 は、*N* 末端側と *C* 末端側に計 2 つの Ser-rich 領域を持ち、*C* 末端側の Ser-rich 領域を介して BRI1 のキナーゼドメインと直接相互作用する。BKI1 の過剰発現体は、*bri1* 変異体と似た矮性形質を示すこと、さらには、野生型で見られるブラシノステロイド添加による BES1 の脱リン酸化が、BKI1 過剰発現体では抑制されることなどから、BKI1 は Ser-rich 領域を介して BRI1 と結合し、BRI1 の活性を負に制御していると考えられている (Wang and Chory, 2006)。BKI1 の Ser-rich 領域と MLPK の Ser-rich 領域間の相同性は認められないが、アミノ酸配列内のセリン残基に富んだ領域が、リン酸化依存的な活性制御に関わることが、いくつかの例で知られている (Dominguez *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005; Briknarova *et al.*, 2005)。このことから、MLPK の Ser-rich 領域も自身のキナーゼドメインをリン酸化依存的に制御している可能性が考えられる。

MLPK の属するシロイヌナズナの RLCK ファミリーの RLCKVII サブファミリー内において、*N* 末端側の Ser-rich 領域は配列の相同性は低いものの広く保存された構造であることから、今回得られた結果より推定される Ser-rich 領域の機能は、このサブファミリーに属するキナーゼに共通した一般的なものである可能性が示唆される。RLCKVII サブファミリーに属するタンパク質としては、病原細菌 *Pseudomonas syringae* の非病原性 (*avr*) 遺伝子 *avrPphB* に対する抵抗性 (*R*) 遺伝子として同定された *PBS1* (Swiderski and Innes, 2001; Shao *et al.*, 2003)、花芽形成に関わっている可能性がある *APK2a* (Ito *et al.*, 1997)、乾燥や塩ストレスに関わっている可能性がある *ARSKI* (Hwang and Goodman, 1995) などが報告されており、これらは MLPK と類似の Ser-rich 領域を有しているが、キナーゼ活性の調節機構といったような解析はなされておらず、Ser-rich 領域の機能も明らかとされていない。

今回の研究では、自家不和合時に乳頭細胞内で MLPK の Ser-rich 領域が実際にリン酸化されているかどうかに関しては、確認することができなかったが、MLPK の Ser-rich 領域がキナーゼ活性を負に制御していることが明らかにされたことは、自家不和合性の情報伝達系の解明のみならず、現在全く明らかとされていない RLCK ファミリーに属するキナーゼの活性調節機構の解明に向けても、非常に意義のあるものとなることが期待される。

第3章

和合／不和合受粉時の柱頭におけるタンパク質リン酸化の変動解析

3-1 序

筆者は前章において、MLPKはSRKのco-receptorとして機能し、両者は相互にリン酸化し合うことで活性化し、下流に情報を伝達するというモデルを提唱した。活性化されたSRK-MLPK受容体複合体の標的となる候補因子としては、SRKによりリン酸化され、自家不和合反応を正に制御することが知られているARC1が想定される(Gu *et al.*, 1998)。ARC1は、E3ユビキチンリガーゼとしての活性を有しており、不和合受粉時には、SRKによりリン酸化されることで活性化し、和合受粉時に必須の何らかのタンパク質を分解することによって自家不和合反応を誘起していると考えられている(Stone *et al.*, 2003)。しかし、ARC1のアンチセンス形質転換体の表現型が部分的なものであることから、活性化されたSRK-MLPK受容体複合体以降の情報伝達系は、ARC1を介する経路と、それ以外の経路へと分岐している可能性も指摘されている(Stone *et al.*, 1999)。また、筆者の行った発現タンパク質を用いたpull down解析、*in vitro*リン酸実験ではSRK-ARC1間の相互作用は確認できておらず(data not shown)、このことから、ARC1に依らず広く情報伝達因子を探索することは、SRK-MLPK以降の情報伝達機構の解明には重要である。筆者は、SRKとMLPKがキナーゼであることから、これ以降の情報伝達系には何らかのタンパク質のリン酸化が深く関わっていると考えた。

そこで本章では、アブラナ科植物の和合／不和合受粉時の乳頭細胞内でのタンパク質リン酸化の変動を二次元電気泳動法により検出することで、SRK、MLPK以降の情報伝達機構を明らかにすることを目的とした。まず、二次元電気泳動法により柱頭のタンパク質リン酸化の変動を検出する実験系を確立し、その実験系を用いて、アブラナ科植物の和合／不和合受粉時で特異的にリン酸化されるタンパク質を探索し、同定した。

3-2 材料・方法

柱頭への $[^{32}\text{P}]$ -リン酸の取り込み法

柱頭への $[^{32}\text{P}]$ -リン酸の取り込み法は Cabrillac ら (2001) の方法を参考に行った。開花当日の *B. rapa* S_9S_9MM 、 S_8S_8mm の雌ずいを水中にてカミソリを用い先端から 5~6 mm のところで切り取り、5 本ずつを 125 μCi の PHOSPHORUS-32 (GE Healthcare Bioscience) を含む 25 μl の 10 mM MES-HCl (pH 6.0) 中に基部の部分浸漬し、0、1、4 時間、室温で吸水させた。

吸水後、雌ずいが正常な自家不和合反応を示すことを確認するために、和合／不和合受粉を行い、花粉管の伸長の有無をアニリンブルー染色で、確認した。アニリンブルー染色の方法は第 2 章に記載した。

二次元電気泳動用の柱頭タンパク質の調製

二次元電気泳動に用いるサンプルは、SDS を用いて柱頭からタンパク質を抽出する方法と、界面活性剤を含まないバッファーで抽出したタンパク質を可溶性タンパク質と膜タンパク質とに分離する方法の、2 つの方法で調製した。

B. rapa 柱頭からの SDS を用いたタンパク質の抽出は、PPMdb (Plant Plasma Membrane DataBase) の web 上 (<http://sphinx.rug.ac.be:8080/ppmdb/index.html>) に公開されている方法を改変して行った。 $[^{32}\text{P}]$ -リン酸を含む溶液中で 4 時間吸水させた *B. rapa* 雌ずい 50 本分を 5 本ずつにまとめ、 $[^{32}\text{P}]$ -リン酸を含まない 25 μl の 10 mM MES-HCl (pH 6.0) に移し、和合もしくは不和合受粉を行った。室温で、1 時間置いた後、雌ずいより柱頭部分のみを採取し、homogenization buffer-1 (50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、4% SDS、20% glycerol、10 mM NaF、25 mM β -glycerophosphate、1 mM DTT、1 $\times$ complete (Roche)) を加え、チューブ内で破碎した。破碎後、95 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間処理した。遠心分離 (6,000 rpm、20 min、室温) を行い、上清を回収し、アセトンを終濃度 90% になるように加えた。-30 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間放置した後、遠心 (15,000 rpm、20 min、4 $^{\circ}\text{C}$) し、沈殿を乾燥させ、泳動用のサンプルとした。

可溶性タンパク質と膜タンパク質との分離は遠心法により行った。 $[^{32}\text{P}]$ -リン酸を取り込ませた柱頭 50 花分を、100 μl の homogenization buffer-2 (50 mM phosphate buffer (pH 7.0)、150 mM NaCl、10 mM NaF、25 mM β -glycerophosphate、

1 mM DTT、1 μ M okadaic acid、5 μ M microcystin LR、25 mM EDTA、1 $\times$ complete (Roche)) で破碎し、遠心分離 (6,000 $\times$ g, 20 min, 4°C) した。上清をさらに遠心分離 (120,000 $\times$ g, 60 min, 4°C) し、上清を可溶性画分、沈殿を膜タンパク質画分とした。可溶性画分にはアセトンを終濃度 90% となるように加え、-30°C で 2 時間放置した後、遠心 (15,000 rpm, 20 min, 4°C) し、沈殿を乾燥させ、泳動用の可溶性タンパク質サンプルとした。

二次元電気泳動

一次元目の等電点電気泳動は、Multiphor II システム (GE Healthcare Bioscience) を用いて行った。抽出サンプルは、2-DE sample buffer (7 M urea、2 M thiourea、100 mM DTT、0.5% Triton X-100、4% CHAPS、0.5% IPG buffer (pH 5-6、又は pH3-10)(GE Healthcare Bioscience)) 100 μ l に懸濁した後 1 時間以上室温に放置し、溶解させた。遠心分離 (15,000 rpm、20 min、室温) し、上清を二次元電気泳動に供した。等電点電気泳動のゲル (Immobiline Dry Strip pH range 4-7 (18 cm)、又は 5-6 (18 cm)) (GE Healthcare Bioscience) は、あらかじめ sample buffer で 14 時間以上膨潤した後、使用した。pH range 4-7 のゲルの使用時には、500 V で 6 時間、定電圧で泳動後、3,500 V まで 6 時間かけて上昇させ、さらに 3,500 V で 24 時間、定電圧にて泳動した。pH range 5-6 のゲルの使用時には、0 V から 500 V まで 3 時間かけ上昇させた後、500 V から 3,500 V まで 3 時間かけて上昇させ、さらに 3,500 V で 18 時間、定電圧にて泳動した。泳動後のゲルは-30°Cにて保存した。

二次元目の SDS-PAGE には、240 mm $\times$ 350 mm $\times$ 1 mm のラージゲル (日本エイドー) を用いた (Oguri *et al.*, 2002)。ゲルの濃度は 10% T、2.7% C とした。等電点電気泳動のゲルは、10 ml の SDS 平衡化バッファーA (50 mM Tris-HCl (pH6.8)、6 M urea、30% glycerol、1% SDS、65 mM DTT) 中で、20 分間振盪した後、10 ml の SDS 平衡化バッファーB (50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、1% SDS、135 mM iodoacetamide) 中で 20 分間振盪した。等電点電気泳動のゲルを SDS ゲル上部に密着させ、SDS-PAGE 用泳動バッファーに溶解した 0.5% agarose M (GE Healthcare Bioscience) で固めた。泳動は 20 mA/gel の固定電流で約 13 時間行った。

泳動ゲルからのタンパク質の染色は銀染色により行った。染色後のゲルから

タンパク質スポットを切り出し、質量分析を行う際の銀染色は谷口（2001）の方法で行った。

まず、泳動後のゲルを固定液（50%(v/v) エタノール、5%(v/v) 酢酸）に浸し、室温で 20 分間、振盪した。次に固定液を除き、50%(v/v) エタノール溶液に換え、室温で 10 分間、振盪した。その後、超純水で 10 分間、室温で振盪したゲルに 0.2 mg/ml チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、室温で 1 分間、振盪した。超純水で 1 分間、3 回洗浄した後、あらかじめ 4℃に冷却しておいた 1 mg/ml 硝酸銀水溶液を加え、4℃で 20 分間、振盪した。超純水で 1 分間、3 回洗浄した後、現像液（0.037%(v/v) ホルムアルデヒド、20 mg/ml 炭酸ナトリウム）を加え、適当な濃さに染色されるまで室温で振盪した。現像液を除き、5%(v/v) 酢酸溶液を加えることで反応を停止させ、超純水で 5 分間、5 回洗浄した。

染色後のゲルからタンパク質スポットを切り出さない場合の銀染色には、Silver Staining Kit（GE Healthcare Bioscience）を用い、添付プロトコールに従い、行った。

染色後のゲルは、ゲルドライヤーで乾燥させ、銀染色像は、スキャナ（EPSON）で、オートラジオグラフィ像はイメージングアナライザー（BAS5000, Fuji Film）で取り込んだ。

逆相クロマトグラフィーによるタンパク質の分画

柱頭由来の可溶性タンパク質画分を C4 カラム（POROS R1/10, 4.6 mm × 50mm; PerSeptive Biosystems）を用いた逆相分配系 HPLC に供し分画した。可溶性タンパク質の調製は、上記と同様の方法で行ったが、抽出の際に加える homogenization buffer-2 の液量は、1000 個の柱頭に対して約 1 ml 量とした。

分画操作は 0.1% TFA で平衡化したカラムを、流速 3 ml/min でアセトニトリル濃度 0～64%までの 10 分間のグラジエントによって行った。事前に調べておいたタンパク質の溶出の始まる、アセトニトリル濃度 19.2%からサンプルの回収を始めた。1 ml/fraction とし、24 個のフラクションに分画した。サンプルの液量が 1 ml を超える場合は、1 回につき 1 ml を上限とし、数回に分けて操作を行った。分画したサンプルは凍結乾燥後、2DE-sample buffer に溶解し泳動用サンプルとした。

タンパク質のゲル内消化法

泳動後のタンパク質のゲル内消化は、Shevchenko ら (1996) の方法、並びに谷口ら (2002B) の方法を改変して行った。

染色後のゲルから、直径約 3~4 mm のゲル片としてスポットを先切りチップを用いて切り出し、チューブ (ハイテックチューブ, ハイテック) に移した。脱銀染液 (15 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 、50 mM $Na_2S_2O_3$) を 100 μ l 加え、室温にて 10 分間振盪した後、脱銀染液を取り除き、蒸留水を 500 μ l 加え 10 分間振盪する操作を、ゲルから完全に色が抜けるまで繰り返した。脱色後、アセトニトリルを 100 μ l 加え、室温で 5 分間振盪し、脱水した。アセトニトリルを除き、遠心エバポレーターでゲルを乾燥させた。乾燥させたゲルに還元液 (10 mM DTT、25 mM NH_4HCO_3) を 100 μ l 加え 56°C で 1 時間振盪した。還元後、洗浄用バッファー (25 mM NH_4HCO_3) を 100 μ l 加えゲル片を洗浄した後、アルキル化液 (55 mM ICH_2CONH_2 、25 mM NH_4HCO_3) を 100 μ l 加え、遮光し室温で 45 分振盪した。液を取り除き 100 μ l 洗浄用バッファーで洗浄した後、脱水液 (50% CH_3CN 、25 mM NH_4HCO_3) を 200 μ l 加え室温で 10 分間振盪した。脱水液を除き、この脱水の操作をもう一度繰り返した後、遠心エバポレーターでゲルを乾燥させた。乾燥させたゲルに、トリプシン溶液 (10 μ g/ml Trypsin: Trypsin, modified, sequencing Grade (Roche)、50 mM NH_4HCO_3) を 50 μ l 加え、氷上にて 45 分インキュベートした。余分なトリプシン溶液を取り除き、37°C で 16 時間以上インキュベートし、タンパク質を断片化した。その後、ゲル片に 25 mM NH_4HCO_3 を 10 μ l 加え、室温で 10 分間振盪した後、アセトニトリルを 20 μ l 加え、室温で 10 分間振盪した。液を別のチューブに集め、残ったゲル片に 5% ギ酸を 10 μ l 加え、室温で 10 分間振盪した後、アセトニトリルを 20 μ l 加え、室温で 10 分間振盪した。液を別のチューブに回収した後、このギ酸抽出の操作をもう一度繰り返した。得られた溶液を遠心エバポレーターにより最終的に 5~10 μ l まで濃縮し、MS 用溶媒 (10% CH_3CN 、0.1%(v/v) formic acid) で、約 20 μ l にし、MS 解析用のサンプルとした。

質量分析計によるタンパク質の同定

タンパク質の同定のために、ナノエレクトロスプレーイオン化-イオントラップ型質量分析計 (LCQ DECA, ThermoQuest) を用いた。MS 測定データの解析には、Xcalibur for LCQ DECA (ThermoQuest) を、得られたデータからのタンパク質の同定には Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) を用いた。検索には

NCBI Inr データベースを利用した。

BrIPP 遺伝子のクローニング

5' RACE、3' RACE 法を用いて *BrIPP* 遺伝子をクローニングした。鋳型となる一本鎖 cDNA は開花当日の *B. rapa* S9 系統の柱頭より、ISOGEN（日本ジーン）を用いて抽出した total RNA より、oligo(dT) primer と Superscript II（GIBCO）を用い合成した。5'-RACE、3'-RACE 法に必要な 5'末端への poly(G)の付加には DNA tailing kit（Roche）を用いた。PCR 反応に用いるプライマーは、当研究室で構築されたアブラナ柱頭の EST データベースの情報と、シロイヌナズナ IPP 遺伝子群の保存領域の配列情報を利用した。作製したフォワードプライマーの配列は、IPP F2 (5'-GATCTTGAGATTGGACCTGGAG-3')、IPP F3D (5'-ATHGCNGTNTGYGTNGAYGAYCCNGA-3')、IPP F7 (5'-GATCAGGGTGAGAAAGATGACA-3')、リバープライマーの配列は IPP R3D (5'-TCNGGRTCTRCNACRCANACNGCDAT-3')、IPP R6 (5'-GACGAAACCATAGTTGTGAG-3')、IPP R8 (5'-TGATGAGTCCAGTCTTTTTTGTCA-3') である。3'RACE はフォワードプライマーと Eco-Not T (5'-ACTCGAATTCACGCGGCCGCATTTTTTTTTTTTTTTT-3') の組み合わせで、5'RACE は、リバープライマーと Eco-Not C (5'-ACTCGAATTCACGCGGCCGCACCCCCCCCCCCCCC-3') で、1st PCR を行い、2nd PCR には Eco-Not T と Eco-Not C に代えて、Eco-Not (5'-ACTCGAATTCACGCGGCCGCC-3') を用いた。1st PCR の反応条件は、[95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 42°C, 30 sec; 68°C, 2 min) × 10 cycles; (94°C, 30 sec; 42°C (+0.2°C/cycle), 30 sec; 68°C, 2 min) × 30 cycles; 68°C, 5 min]、2nd PCR の反応条件は、[95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 2 min) × 35 cycles; 68°C, 5 min] である。また、フォワードプライマーとリバープライマーの組み合わせでも PCR 反応を行なった。PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動による確認の後、pGEM®-T Easy Vector（Promega）に TA クローニングし、塩基配列を決定した。そして、最終的な塩基配列の確認のために、*BrIPP* 遺伝子の ORF を増幅するプライマーを作製し、PCR 反応を行い、クローニングを行った。PCR 反応に用いたプライマーの配列及び組み合わせは、*BrIPP-1* は BrIPP-1 F (5'-ATGAGTGAAGAAACGAAGGAG-3') と BrIPP-1 R (5'-TCAACGTCGCAGGGTATG-3')、*BrIPP-2* は BrIPP-2 F (5'-ATGAGTGAAGAGCAGCAGCGACCT-3') と BrIPP-2 R

(5'-TTACAAGAAAAACAGAGAAAGTA-3')、*BrIPP-3* は BrIPP-3 F
 (5'-ATGAGTGAAGAAACATATGAAGAA-3') と BrIPP-3 R
 (5'-TCATCTCCTCAAGGTATGGAGAAT-3')、*BrIPP-4* は BrIPP-4 F
 (5'-ATGGCGCCACCCATTGAGATTGCT-3') と BrIPP-4 R
 (5'-TCACCGTCTCAAGGTTTCCATGAC-3')、*BrIPP-5* は BrIPP-5 F
 (5'-ATGGCTGATATCAAGGATGAAGGA-3') と BrIPP-5 R
 (5'-CTAACGCTGCAGGCCAGCTTTGAT-3') であり、PCR の反応条件は、[95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 1 min) × 35 cycles; 68°C, 5 min] である。PCR 産物は、pGEM®-T Easy Vector に TA クローニングし、塩基配列の確認を行った。

His-BrIPP1 発現タンパク質の作製

BrIPP-1 の特異的抗体を作製するために 6×His タグを融合させた大腸菌発現タンパク質を作製した。

B. rapa S₁₂S₁₂ 系統より合成した柱頭 cDNA をテンプレートとした PCR 反応により、全長鎖の *BrIPP1* を増幅し、大腸菌発現ベクター pCR®T7/NT TOPO (Invitrogen) に TA クローニングした。使用したプライマーの配列は、BrIPP-1_F と BrIPP-1_R であり、PCR の反応条件は、[95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 1 min) × 35 cycles; 68°C, 5 min] である。

配列確認後、この発現ベクターを T7 発現用コンピテントセル BL21 (DE3) pLysS に導入した。菌体の培養、タンパク質の発現誘導、及び、菌体の回収方法は第 2 章で述べたのと同様の方法で行った。回収した大腸菌ペレットは、lysis buffer (100 mM phosphate buffer (pH 8.0), 300 mM NaCl, 8 M Urea, complete(EDTA free) (Roche), 5 mM mercaptoethanol) 中で超音波破碎し、遠心分離 (10,000 × g, 20 min, 4°C) した。得られた上清に Ni-agarose 樹脂 (Clontech) 1 ml を加え、4°C で 1 時間、転倒混和した。その後、TALON Disposable Column (Clontech) に樹脂を回収し、lysis buffer で洗浄した後、elution buffer (100 mM phosphate buffer (pH 5.9), 300 mM NaCl, 8 M Urea) で溶出した。得られたタンパク質画分は、6M Urea を含む、dialysis buffer (100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 200 mM NaCl) で透析を行い、段階的に Urea の濃度を 2 M にまで下げた。

抗 BrIPP1 抗体の作製

上記、His-BrIPP1 タンパク質を抗原とするウサギポリクローナル抗体を作製した。His-BrIPP1 タンパク質のウサギへの接種、抗血清の採取は、スカフラット(株)に受託した。アフィニティー精製に使用する His-BrIPP1 タンパク質の固定化カラムは、NHS-activated Sepharose 4FF (GE Healthcare Bioscience) に 1 mg の His-BrIPP1 を、BrIPP1 の N 末端アミノ基を介して固定する方法で作製した。カラムへのタンパク質の固定化は、添付のプロトコールに従い行った。

抗 His-BrIPP1 抗血清 10 ml は硫酸沈殿法により、IgG 画分を精製し、PBS buffer (20 mM phosphate buffer (pH 7.0)、0.9% NaCl) で平衡化した PD-10 column (GE Healthcare Bioscience) を用い脱塩し、His-BrIPP1 固定カラムに供した。PBS buffer でカラムを洗浄後、0.1 M Glycine-HCl (pH 1.8) で溶出し、直ちに 1 M Tris-HCl (pH 9.5) で中和した。タンパク質定量後、NAPTM column (GE Healthcare Bioscience) で脱塩したものを、抗 BrIPP1 特異抗体として使用した。

ウエスタンブロット解析

B. rapa S₉S₉ 株の柱頭 200 個より可溶性画分を抽出し、アセトン沈殿後、2DE-sample buffer に溶解し、二次元電気泳動を行った。得られたゲルは、blotting buffer (3.02 g/l Tris, 14.4 g/l glycine, 20%(v/v) methanol, 0.1%(w/v) SDS) 中で 10 分間振盪した。タンパク質の PVDF 膜 (Hybond-P; GE Healthcare) への転写は、TRANS-BROT SD CELL (Bio-Rad) を用いた。転写は、10 V、30 分で行い、ゲルにタンパク質が一部残るようにした。転写後のゲルは銀染色によりタンパク質を検出し、PVDF 膜は、*Euglena* の cAPX モノクローナル抗体によるウエスタンブロット解析に用いた。*Euglena* の cAPX モノクローナル抗体は、近畿大学重岡成博士、吉村和也博士より提供された (Yoshimura *et al.*, 2000)。

免疫沈降

[³²P]-リン酸を取り込ませた *B. rapa* S₉S₉MM 株の花柱 100 本に、和合花粉 (S₈S₈) あるいは不和合花粉 (S₉S₉) を受粉させ、60 分後に柱頭を回収した。これを、1 ml の homogenization buffer (50 mM phosphate buffer (pH 7.0)、10 mM NaF、25 mM β-glycerophosphate、1×complete (Roche)) で破碎し、遠心分離 (6,000 ×g, 20 min,

4℃) した。上清をさらに遠心分離 (120,000×g, 60 min, 4℃) し、可溶性画分を得た。この可溶性画分に、 $[^{32}\text{P}]$ -リン酸を取り込ませていない未受粉の柱頭 900 花分から同様に抽出した可溶性画分を加え、それぞれ合計 1000 花分とし、この可溶性画分に、50 μg の抗 BrIPP1 抗体を先に結合させておいた 20 μl の rProteinA Sepharose (GE Healthcare Bioscience) を加え、1 時間、4℃で転倒混和させた。その後、樹脂を 1 ml の wash buffer-1 (50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、500 mM NaCl、10 mM NaF、25 mM β -glycerophosphate、1 mM DTT、1×complete(Roche)) で 3 回、wash buffer-2 (50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、10 mM NaF、25 mM β -glycerophosphate、1 mM DTT) で 2 回、洗浄した。その後、100 μl の 2-DE sample buffer を加え、室温で 10 分間放置して得た上清を二次元電気泳動用サンプルとし、泳動を行った。

3-3 結果

受粉時における柱頭リン酸化タンパク質検出系の確立

本章の実験の流れを Fig. 3-1 示す。まず、 $[^{32}\text{P}]$ -リン酸を取り込ませた柱頭に和合受粉又は不和合受粉を行い、それぞれからタンパク質を抽出する。その後、二次元電気泳動法によりタンパク質を分離し、和合受粉又は不和合受粉後に各タンパク質に取り込まれた ^{32}P に由来する放射活性の経時的変動をオートラジオグラフィーにより検出することを試みた。

和合／不和合受粉時の柱頭内タンパク質のリン酸化の変動を、放射活性を指標に検出するには、目的とする柱頭内に $[^{32}\text{P}]$ -リン酸が取り込まれていることが必要である。そこでまず、切り出した *B. rapa* の雌ずいに $[^{32}\text{P}]$ -リン酸を含む水を吸わせ、柱頭に $[^{32}\text{P}]$ -リン酸が到達するのに必要な時間を計測した。 $[^{32}\text{P}]$ -リン酸を含む溶液に雌ずい (S_9S_9 株) を挿してから、0、1、4 時間後の雌ずいへの $[^{32}\text{P}]$ -リン酸の取り込みの様子を、オートラジオグラフィーを用いて検出した。その結果、実験開始 4 時間後に、柱頭部分へ $[^{32}\text{P}]$ -リン酸の十分な取り込みが確認されたので (Fig. 3-2A)、 $[^{32}\text{P}]$ -リン酸の柱頭への取り込み時間は 4 時間に設定することとした。

次に、この条件下で *B. rapa* 柱頭が正常な自家不和合反応を保持しているかどうかを確認した。確認には、カロース染色法であるアニリンブルー染色を用い、和合／不和合受粉後の花粉管の伸長を観察し、判断した。その結果、 S_8S_8 株由来の花粉を受粉（和合受粉）させたものでは多数の花粉管の伸長が観察された一方、 S_9S_9 株由来の花粉を受粉（不和合受粉）させたものでは花粉管の伸長は全く観察されなかった (Fig. 3-2B)。従って、4 時間、 $[^{32}\text{P}]$ -リン酸を取り込ませた雌ずいは、正常な他家和合反応および自家不和合反応を保持しているものと判断し、この条件下で以下の実験を進めることとした。

二次元電気泳動法によるリン酸化タンパク質の探索

先の条件により $[^{32}\text{P}]$ -リン酸を取り込ませた S_9S_9 株の雌ずいに和合／不和合受粉を行い、不和合受粉後 0 分、60 分、和合受粉後 60 分の柱頭からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行い銀染色像とオートラジオグラフィー像をそれぞれ得た (Fig. 3-3)。泳動はそれぞれ複数回行い、シグナル強度差の大きく、また、比較的再現性の高いスポットを、和合／不和合受粉時に特異的にリン酸化され

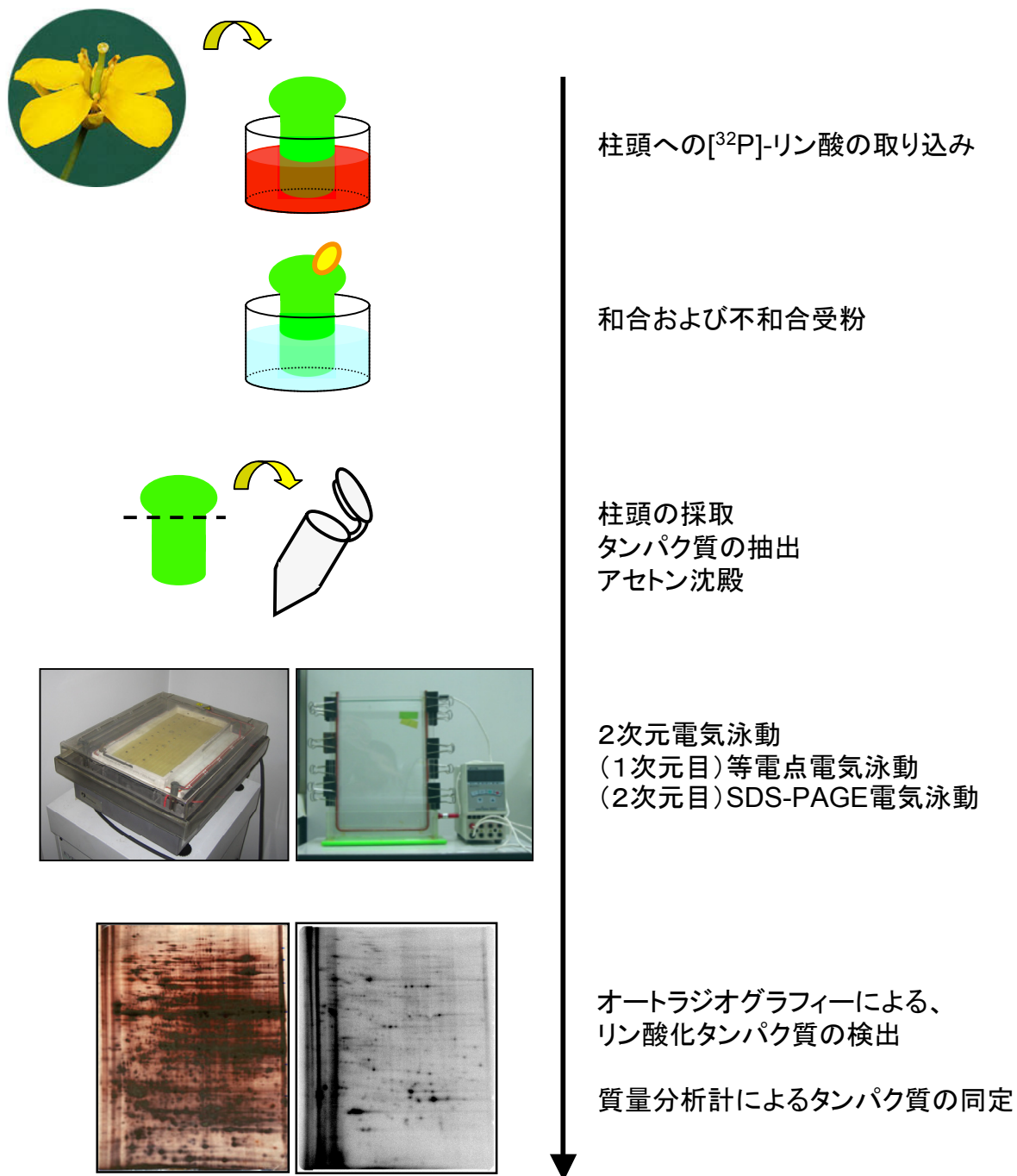
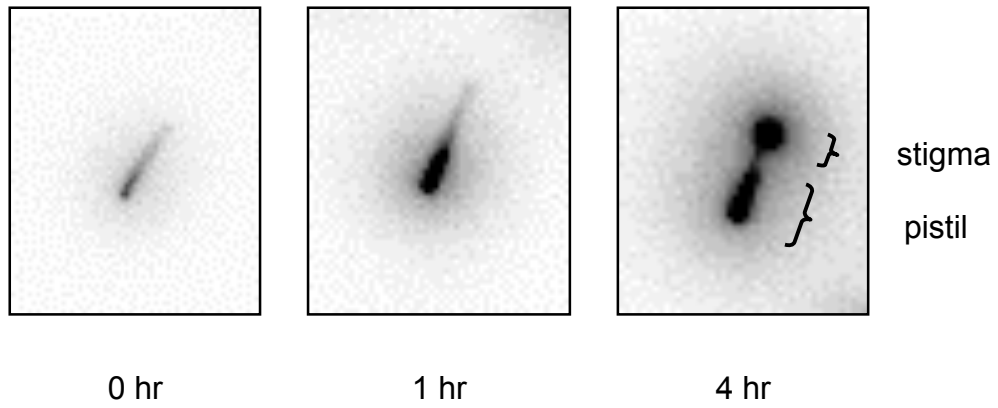


Fig. 3-1 和合／不和合受粉時のタンパク質リン酸化の検出手法

A



B

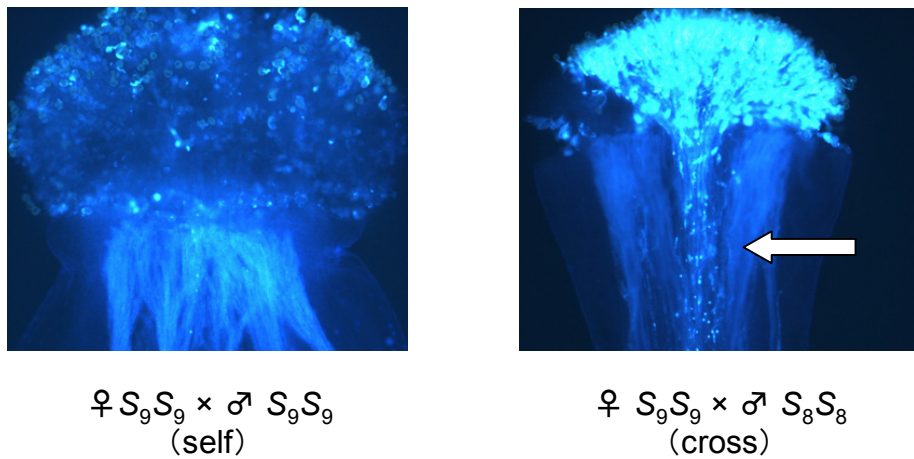


Fig. 3-2 柱頭への $[^{32}\text{P}]$ -リン酸の取り込み

- (A) 左から0, 1, 4時間、 $[^{32}\text{P}]$ -リン酸溶液中でインキュベートした雌ずいのオートラジオグラフィ像
- (B) リン酸溶液中で4時間インキュベートした雌ずいに不和合受粉（左図）又は、和合受粉（右図）を行い、アニリンブルー染色を行った。矢印は花粉管を示す。

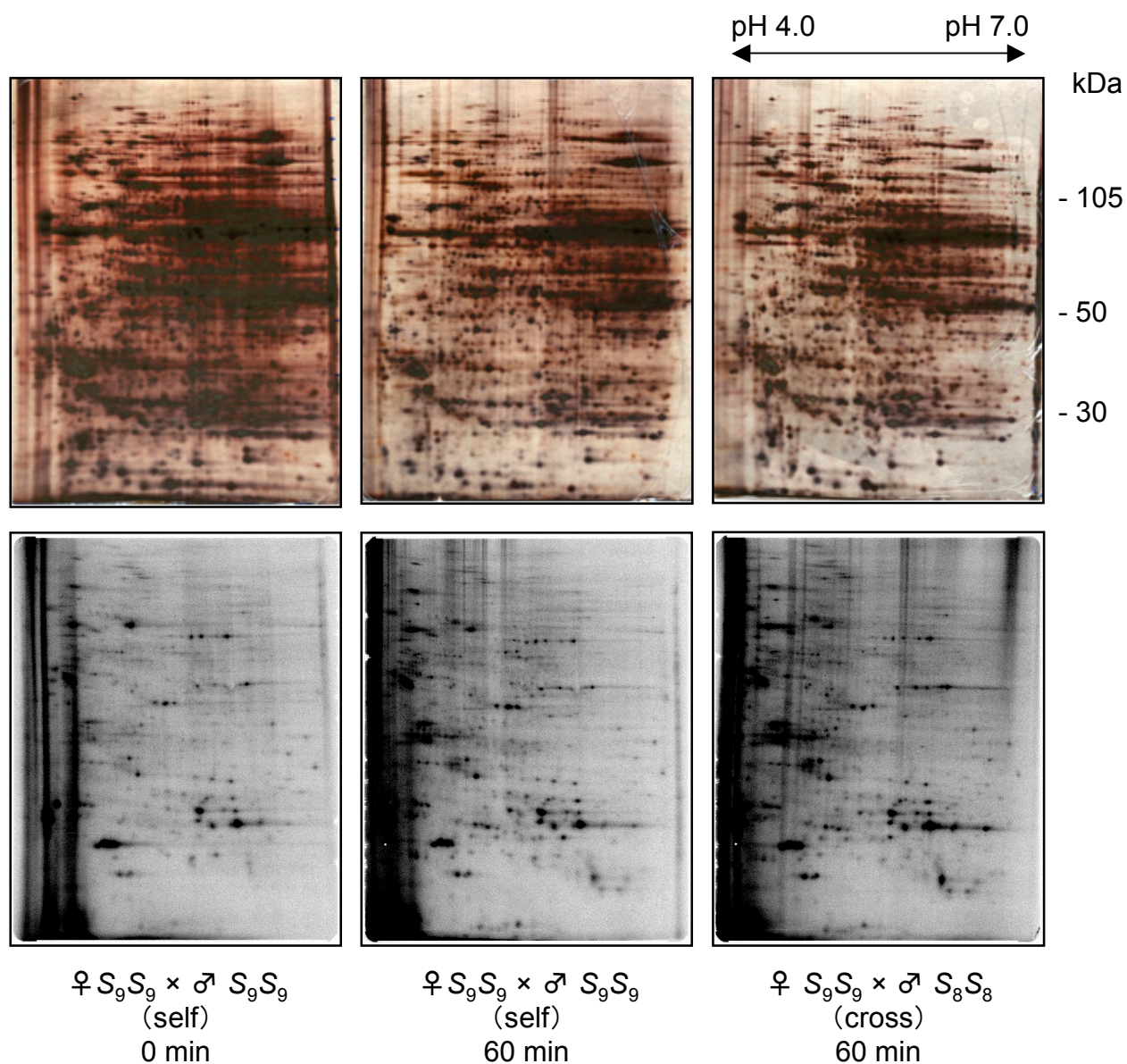


Fig. 3-3 二次元電気泳動像

[^{32}P]-リン酸を取り込ませた S_9S_9 株に和合受粉 (S_8S_8 株) 又は不和合受粉 (S_9S_9 株) を行い、60分後柱頭よりタンパク質を抽出し二次元電気泳動を行った。左から、不和合受粉直後、不和合受粉後60分、和合受粉後60分の銀染色像 (上段) とオートラジオグラフィ像 (下段)。

るタンパク質として選抜することとした。

不和合受粉後 0 分、60 分、和合受粉後 60 分の 3 者間のオートラジオグラフィ像の比較から、不和合受粉 (self-pollination) 時に特異的にリン酸化されるタンパク質を 1 個、和合受粉 (cross-pollination) 時に特異的にリン酸化されるタンパク質を 1 個、和合／不和合受粉にかかわらず、受粉 (pollination) 時に特異的にリン酸化されるタンパク質を 4 個、見出し、それぞれ、s1、c1、p1、p2、p3、p4 とした (Fig. 3-3, 3-4)。この解析で得られた 6 個のタンパク質スポットの等電点と分子量を Table 3-1 に示す。不和合受粉時特異的にリン酸化される s1 と和合受粉時特異的にリン酸化される c1 は、ほぼ同じ分子量で且つ等電点のみ若干異なるリン酸化タンパク質であることから、この両スポットは同じタンパク質の異なるリン酸化状態を見ている可能性が高く、自家不和合性の情報伝達に関わる極めて有力な下流因子候補であると判断した。そこで、これ以後は、このタンパク質スポットに注目し解析を進めることとした。

なお、Goring らが見出した ARC1 は、不和合受粉時に特異的に SRK によりリン酸化を受けることが期待される (Gu *et al.*, 1998)。しかし、ARC1 が存在すると予測される二次元電気泳動ゲルの領域 (分子量 73,500、等電点 6.6) には、リン酸化変動の認められるスポットは検出されなかった。

B. rapa S_8S_8mm 変異株における候補タンパク質のリン酸化

MLPK が、アブラナ科植物自家不和合情報伝達系において、SRK と受容体複合体と形成し、情報を下流に伝えているという前章の結果から、今回見つかった 2 つのリン酸化タンパク質 s1 と c1 は、SRK-MLPK 受容体複合体の下流でリン酸化による制御を受けているものと推察される。

そこで、今回、見つかった 2 つのリン酸化タンパク質 s1、c1 が SRK-MLPK 受容体複合体の下流で実際にリン酸化により制御されているのかどうかを調べるために、MLPK の欠損した *B. rapa* 自家和合性変異株 (S_8S_8mm 株) に対して不和合花粉 (S_8S_8 株) を受粉させ、先と同様に二次元電気泳動法により s1 と c1 のタンパク質リン酸化の変動を解析した。 S_8S_8mm 株に、自己の花粉を受粉させた時、s1 のスポットは検出されず、c1 のスポットのみが検出された (Fig. 3-5)。これは野生株において和合受粉をした際と同じスポットのパターンであり、 S_8S_8mm 株が自家和合性を示すという形質と一致する。

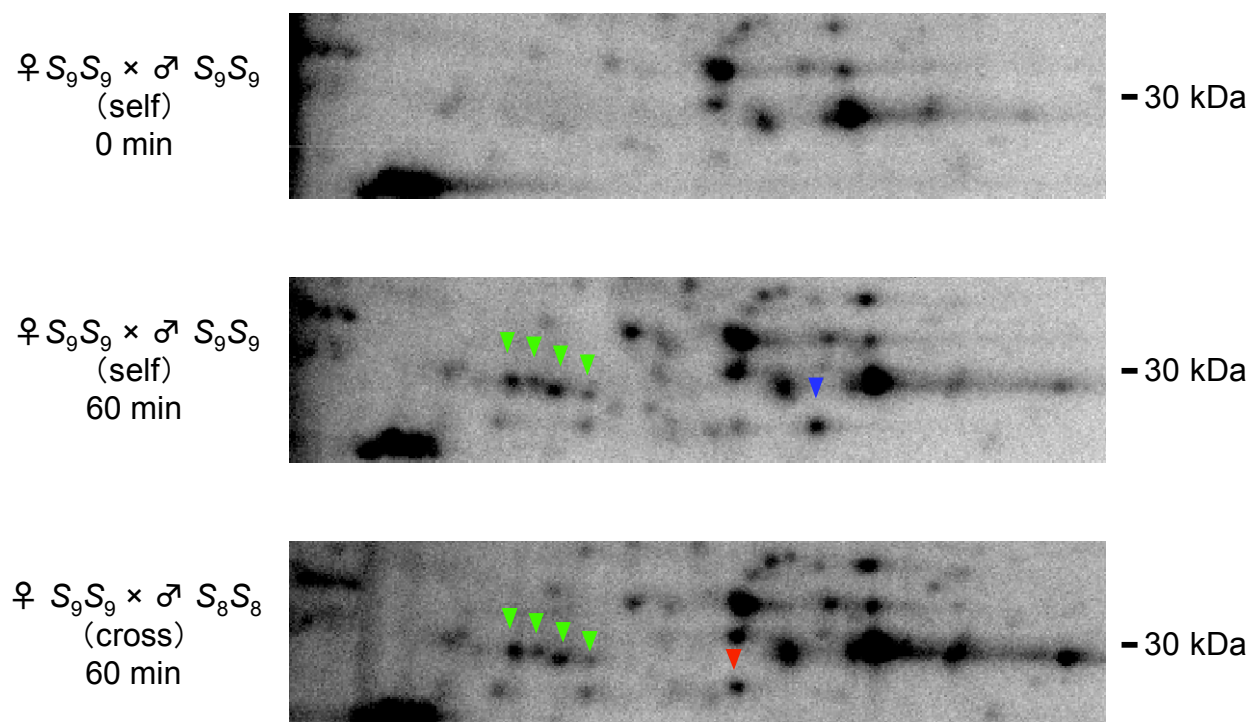


Fig. 3-4 和合／不和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質

Fig. 3-3のオートラジオグラフィー像を拡大して示した。

不和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質を▼で、和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質を▼で、和合・不和合受粉に因らず受粉時に特異的にリン酸化されるタンパク質を▼で示した。

Table 3-1 和合／不和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質

	spot ID	M.W.	pI
self/cross	p1	35 kDa	4.8
	p2	35	4.9
	p3	35	5.0
	p4	35	5.1
self	s1	29	5.6
cross	c1	29	5.9

和合又は不和合受粉後60分でリン酸化されるタンパク質の等電点と分子量を示した。

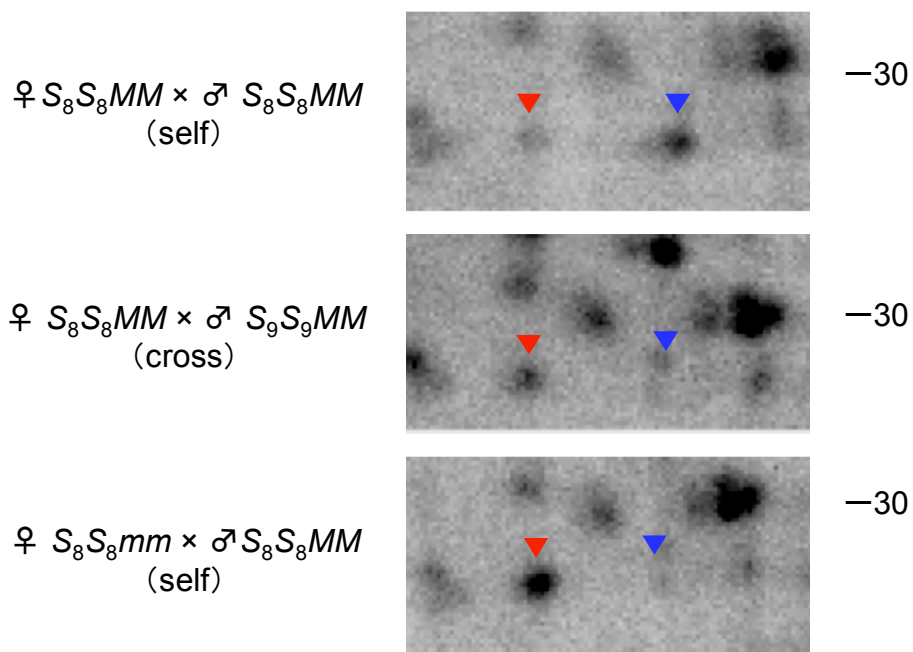


Fig. 3-5 *mm*変異株でのリン酸化タンパク質の挙動

[^{32}P]-リン酸を取り込ませた S_8S_8MM 株又は S_8S_8mm 株に和合受粉 (S_8S_8 株) 又は不和合受粉 (S_9S_9 株) を行い、60分後柱頭よりタンパク質を抽出し二次元電気泳動を行った。上から $S_8S_8MM \times S_8S_8MM$ 、 $S_8S_8MM \times S_9S_9MM$ 、 $S_8S_8mm \times S_8S_8MM$ のオートラジオグラフィ像。不和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質s1を▼で、和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質c1を▼で示した。

質量分析計によるリン酸化タンパク質 s1、c1 の同定

先に同定した、和合または不和合受粉時に特異的にリン酸化するタンパク質 s1、c1 は、オートラジオグラフィー像上では検出できるものの、銀染色像上ではスポットとして検出することが出来なかった。これは、このリン酸化タンパク質が、細胞内に微量にしか存在しないことを示唆しており、これらタンパク質を質量分析計で同定するためには、二次元電気泳動を行う前に柱頭抽出画分の予備精製する必要があると判断した。

和合または不和合受粉時特異的にリン酸化するタンパク質 s1、c1 の予備精製の第一段階として、筆者はまず、目的とするタンパク質が可溶性タンパク質であるか膜タンパク質であるかを明らかにすることとした。 [^{32}P]-リン酸存在下で和合／不和合受粉を行った柱頭を、界面活性剤を含まない phosphate buffer で破碎し、遠心法により可溶性画分、膜画分に分画し、それぞれの画分を二次元電気泳動に供した。オートラジオグラフィーによる検出の結果、不和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質 s1、および、和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質 c1 は、ともに可溶性画分に存在することが明らかとなった (Fig. 3-6)。

リン酸化タンパク質 s1 と c1 が比較的低分子量であり、かつ可溶性画分に存在することが明らかとなったので、次に逆相クロマトグラフィーによる精製を検討することにした。 [^{32}P]-リン酸を取り込ませ、不和合受粉を行った柱頭 100 個分の可溶性画分に、同様に受粉し、調製した、 [^{32}P]-リン酸を取り込ませていない受粉柱頭の可溶性画分を 900 個分加え、合計 1,000 個相当の柱頭可溶性画分を逆相クロマトグラフィーに供した。タンパク質の溶出の始まる、アセトニトリル濃度 19.2%よりサンプルを回収し、1 フラクションあたり 1 ml、合計 24 フラクション (Fr. 1~24) に分離した (Fig. 3-7A)。その後、分離したサンプルの半分をまず、Fr. 1~6、Fr. 7~12、Fr. 13~18、Fr. 19~24 の合計 4 つにまとめ、凍結乾燥の後、それぞれについて二次元電気泳動を行った。その結果、s1 と c1 は、Fr. 1~6 に最も多くふくまれており、Fr. 7~12 に、極少量含まれていることが明らかとなった (Fig. 3-7B)。そこで、Fr. 3、Fr. 4、Fr. 5、Fr. 6 の 4 つのフラクションについてそれぞれ同様に二次元電気泳動を行った。その結果、Fr. 6 (アセトニトリル濃度 29.8~32.0%) でのみ、s1、c1 が検出され (Fig. 3-7C)、これらのタンパク質はこの 1 フラクションに効率良く回収できると判断された。そこで、和合／不和合受粉後 60 分の柱頭 5,000 個分からそれぞれ可溶性画分を調製し、逆相クロマトグラフィーに供し、アセトニトリル濃度 29.8~32.0%のフラクションについて凍結乾燥後、二次元電気泳動を行った。その結果、今までオートラジオグラ

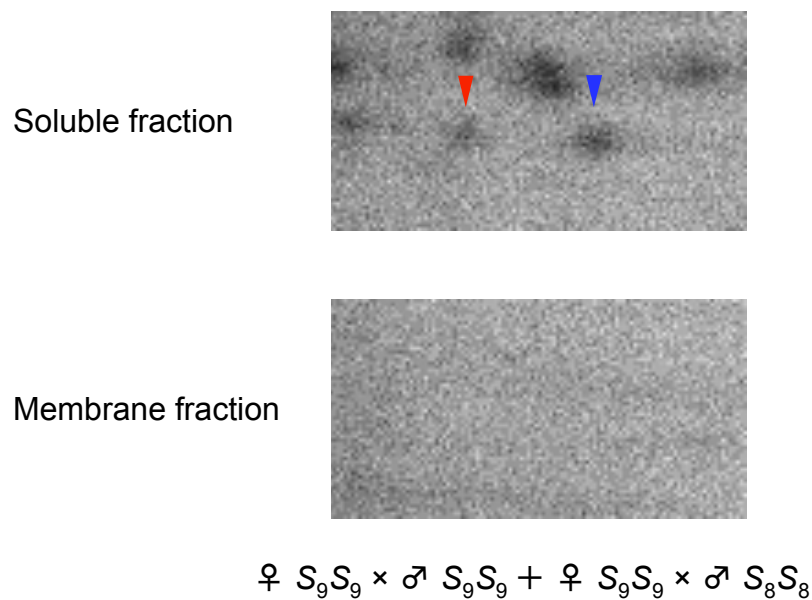


Fig. 3-6 リン酸化タンパク質s1、s2の細胞内局在

[^{32}P]-リン酸を取り込ませた S_9S_9 株に和合受粉（ S_8S_8 株）、不和合受粉（ S_9S_9 株）を行い、60分後柱頭よりタンパク質を抽出し、両者を混合後、遠心法により可溶性画分（上図）と膜画分（下図）に分離したものを二次元電気泳動に供した。不和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質s1を▼で、和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質c1を▼で示した。

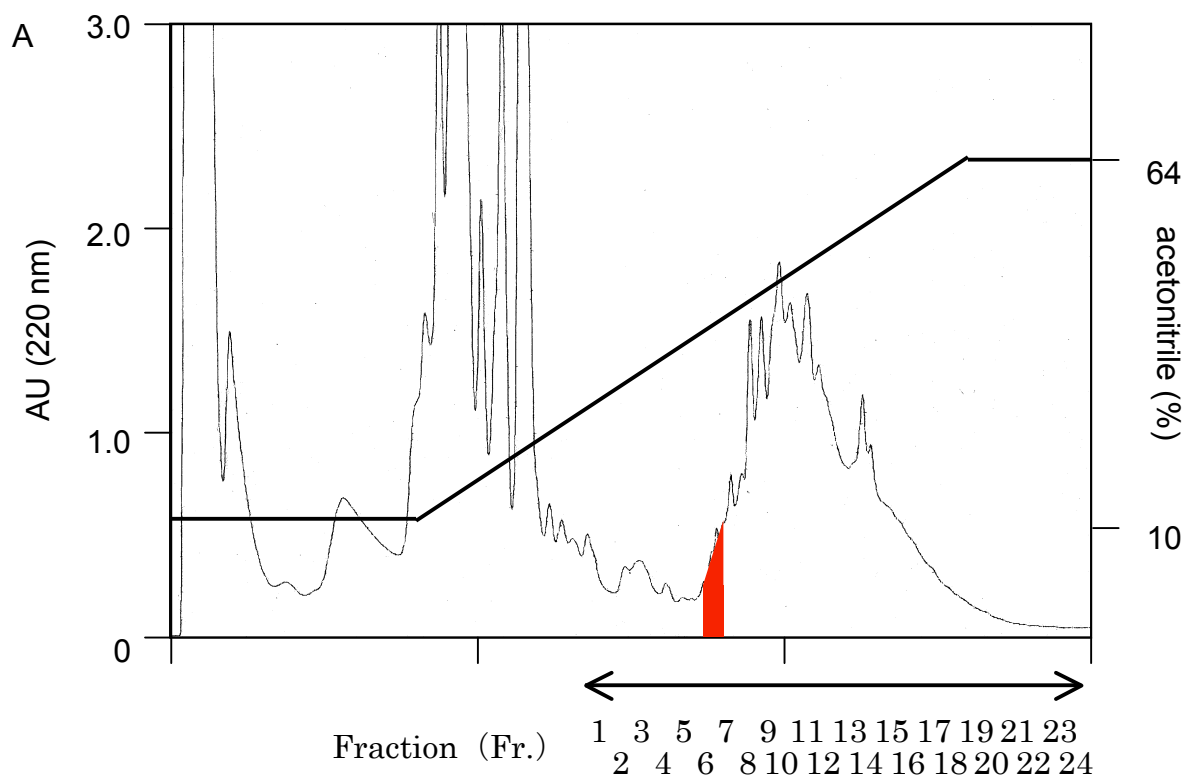


Fig. 3-7 逆相クロマトグラフィーによる、タンパク質の精製

(A) [^{32}P]-リン酸を取り込ませた S_9S_9 株に不和合受粉 (S_9S_9 株) を行い、60分後柱頭より可溶性タンパク質を抽出し、逆相HPLC (POROS R1/10, 4.6 mm $\times$ 50 mm; PerSeptive Biosystems) に供した際の、クロマトグラフィーのチャート及び、フラクションの位置を示した。

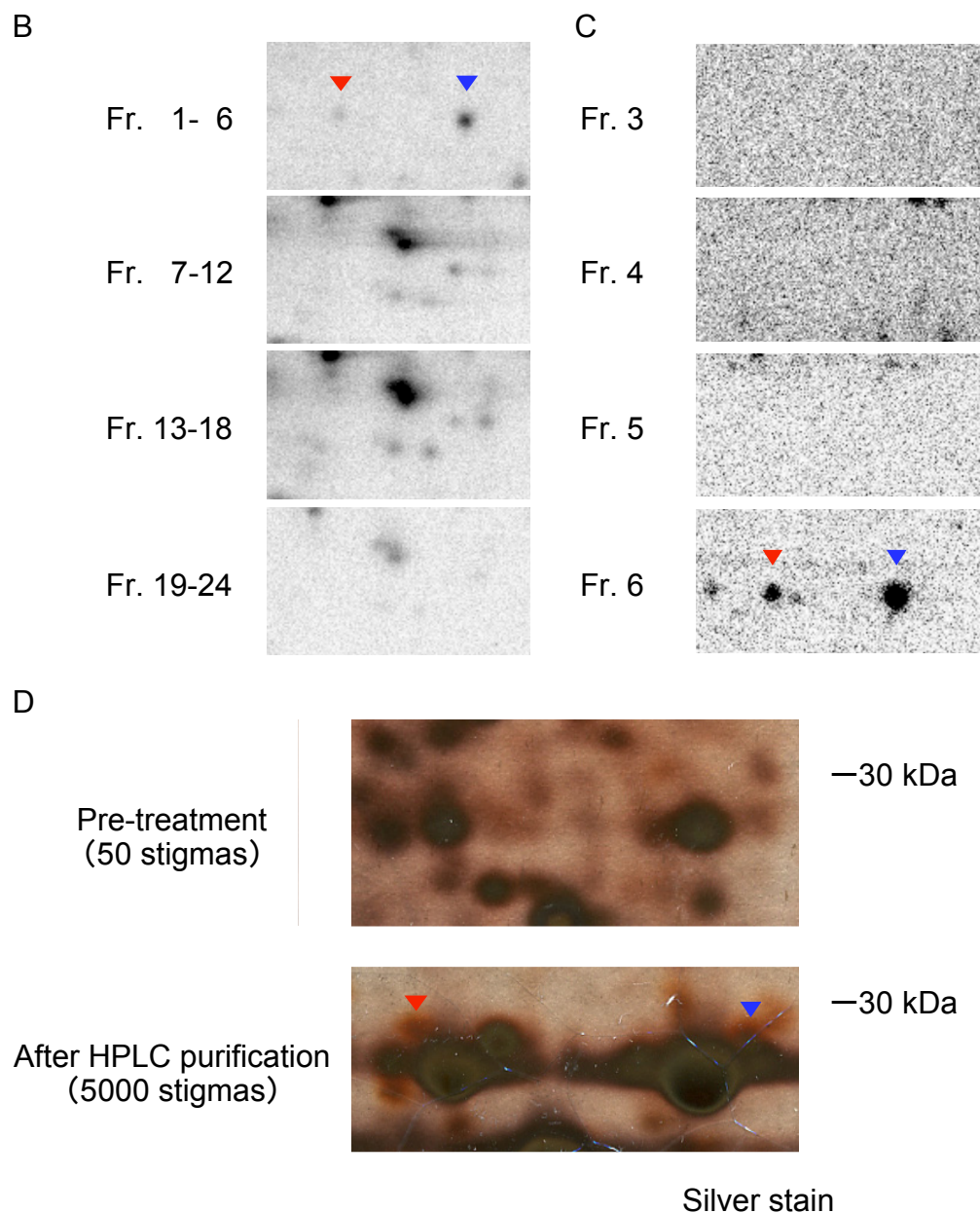


Fig. 3-7 逆相クロマトグラフィーによる、タンパク質の精製

- (B) (A) で分取したフラクションを6つずつまとめて、二次元電気泳動したゲルのオートラジオグラフィー像。
- (C) Fr. 3~6までをそれぞれ二次元電気泳動したゲルのオートラジオグラフィー像。
- (D) Fr. 6を二次元電気泳動したゲルの銀染色像。
不和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質s1を▼で、和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質c1を▼で示した。

フィーにより検出されていたのと同じスポットの位置に銀染色により検出できるスポットが観察された (Fig. 3-7D)。

そこで、このゲルより、s1 と c1 を切り抜き、トリプシンによるゲル内消化によりペプチド断片化し、回収したペプチド断片を nano LC-nano ESI MS に供し、MS/MS 解析を行った。得られた測定結果をもとに行った Mascot によるデータベース検索の結果を Table 3-2 に示す。不和合受粉時に特異的にリン酸化されるタンパク質 s1 からは、シロイヌナズナの soluble inorganic pyrophosphatase (IPP) の部分配列と推定されるペプチド断片が 2 つ、*Brassica juncea* の ascorbate peroxidase (APX) の部分配列と推定されるペプチド断片が 2 つ、有意の信頼度 ($P<0.05$) をもって検出・同定された。一方、和合受粉時に特異的にリン酸化されるタンパク質 c1 からは、同じく IPP の部分配列と推定されるペプチド断片が 1 つ、*Raphanus sativus* の APX の部分配列と推定されるペプチド断片が 1 つ、同定された。

この同定結果を確認するために、まず、*Euglena* の APX に対するモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った (Yoshimura *et al.*, 2000)。柱頭の可溶性画分を二次元電気泳動後、ウエスタンブロット解析に供したところ、s1 と c1 のスポットの位置とは異なる近傍の大きなスポットが抗 APX 抗体により検出された (Fig. 3-8)。このことから、質量分析の結果 s1、c1 より同定された APX に由来するペプチド断片は、これら近傍に大量に存在する APX の混入によるものであると推定された。以上の結果から、和合／不和合受粉時にリン酸化されるタンパク質 s1、c1 は IPP であると推定し、さらに以下の検証を進めることとした。

Brassica rapa における IPP 遺伝子群のクローニング

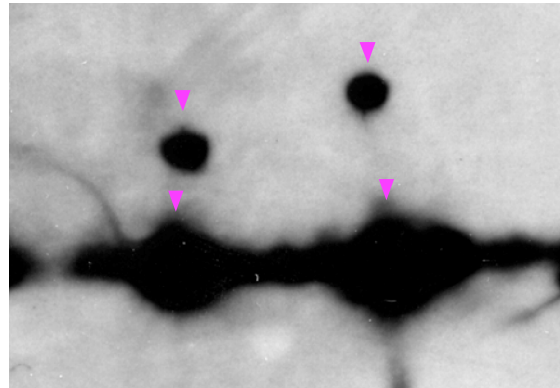
B. rapa における IPP 遺伝子群の全塩基配列は報告されていない。そこで、筆者は、*B. rapa* における IPP 遺伝子のクローニングを試みた。

当研究室で作製された *B. rapa* 柱頭の EST (expressed sequence tag) データベースの検索の結果、IPP 遺伝子の部分配列を含むクローンが 2 個存在することが確認された。そこで、この塩基配列を基にプライマーを作製し、*B. rapa* S₁₂S₁₂ 株の柱頭由来の cDNA をテンプレートとした 5'RACE 法、3'RACE 法により、これら IPP 遺伝子の全長のクローニングを試みた。その結果、639 bp、621 bp からなる 2 つの独立したクローンを得ることができたので、それぞれ *BrIPP-1*、*BrIPP-2*

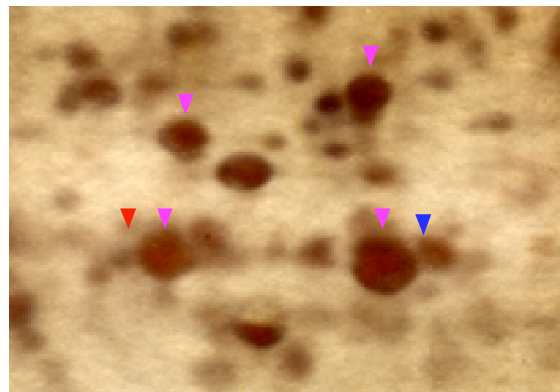
Table 3-2 MS/MS解析によるs1、c1タンパク質の同定

Spot ID	m/z	Mr(expect) ^a	Peptide sequence	MW(calc) ^b	a-b	Score [*]	Identified protein
s1	451.42	900.82	TGLIKVDR	901.07	-0.25	53	inorganic pyrophosphatase (<i>A. thaliana</i>)
	676.02	2025.03		2025.34	-0.30	57	inorganic pyrophosphatase (<i>A. thaliana</i>)
	473.40	944.78	AAGITSIGVR	944.10	0.68	77	ascorbate peroxidase (<i>Brassica juncea</i>)
	823.68	1645.35	FQYGYEMPADILAK	1645.89	-0.54	56	ascorbate peroxidase (<i>Brassica juncea</i>)
c1	451.56	901.10	TGLIKVDR	901.07	0.03	55	inorganic pyrophosphatase (<i>A. thaliana</i>)
	550.45	1098.89	EGLQLPSDK	1099.25	-0.36	56	ascorbate peroxidase (<i>Raphanus sativus</i>)

※ Individual ions scores >53 indicate identity or extensive homology. (P<0.05)



WB: anti-APX



Silver staining

Fig. 3-8 cAPX抗体を用いたウエスタンブロット解析

B. rapa S_9S_9 株柱頭より得られた可溶性画分を二次元電気泳動により分離し、抗cAPX抗体を用いたウエスタンブロット、及び、銀染色により検出した。不和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質s1を▼で、和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質c1を▼で、APXを▼で、示した。

と命名した。また、データベース (Tair: <http://www.arabidopsis.org/>) 検索により、シロイヌナズナゲノム上には 5 個の *IPP* 遺伝子が存在することが明らかとなった (*AtIPP-1*: At1g01050、*AtIPP-2*: At4g01480、*AtIPP-3*: At2g46860、*AtIPP-4*: At3g53620、*AtIPP-5*: At2g18230)。そこで、これらの配列情報を基に新たなプライマーを作製し、再度 5'RACE 法、3'RACE 法により、他の *IPP* 遺伝子のクローニングを試みた。その結果、*BrIPP-1*、*BrIPP-2* とは異なる 3 つの独立したクローンを新たに得ることができた。これらは、651 bp、720 bp、660 bp からなる遺伝子であり、それぞれ、*BrIPP-3*、*BrIPP-4*、*BrIPP-5* と命名した。得られた塩基配列から推定される *BrIPP-1*、*BrIPP-2*、*BrIPP-3*、*BrIPP-4*、*BrIPP-5* のアミノ酸配列を Fig. 3-9 に示した。5 つすべての *BrIPP* には pyrophosphatase ドメインが存在するが、このドメインは *BrIPP* 間で非常に高く保存されていた。また、*BrIPP-1* は *AtIPP-1* と、*BrIPP-2* は *AtIPP-2* と、*BrIPP-3* は *AtIPP-3* と、*BrIPP-4* は *AtIPP-4* と、*BrIPP-5* は *AtIPP-5* と、それぞれ最も高い相同性を示し、それぞれオルソログの関係にあると考えられた。

免疫沈降解析による同定結果の確認

質量分析及び、抗 APX 抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果より、和合／不和合受粉時に特異的にリン酸化されるタンパク質 s1、c1 は、*BrIPP-1*~5 のいずれかであることが示唆されたが、検出されたペプチド断片がそれぞれ 2 つ、1 つと非常に少ないことから、この同定結果は再検討する必要がある。そこで、*BrIPP-1* の特異的抗体を作製し、免疫沈降実験を行うこととした。

まず、先に得られた *BrIPP-1* 全長と 6×His との融合タンパク質 (*His-BrIPP1*) を作製した。精製した *His-BrIPP-1* タンパク質をウサギに免疫し、得られた抗血清を *His-BrIPP-1* を固定したアフィニティカラムで精製することによって、抗 *BrIPP1* 抗体を作製した。

この精製した抗体の特異性を確認するために、柱頭より抽出した可溶性画分と、抗原として用いた *His-BrIPP* に対してウェスタンブロット解析を行った。その結果、可溶性画分を泳動したレーンから *BrIPP* の推定分子量に近い約 25 kDa の位置にバンドが検出された (Fig. 3-10)。

そこで、この *BrIPP1* 抗体を用い免疫沈降実験を行った。*B. rapa* (S_9S_9 株) の柱頭に [32 P]-リン酸を取り込ませ、和合花粉 (S_8S_8 株) あるいは不和合花粉 (S_9S_9 株) による受粉を行った柱頭より抽出した可溶性画分に対して、先の抗体を用い免疫沈降を行った。回収されたタンパク質画分を二次元電気泳動し、そのオ

BrIPP-1	1	---MSEETK-ENQKLQR---PA--PRLNERILSSLSRRSVAHPWHDL	EIGPGAPQIFNV	51		
BrIPP-2	1	---MSEEQ-----QR---PA--PRLNERILSSLSRRSVAHPWHDL	EIGPGAPQIFNV	45		
BrIPP-3	1	---MSEETYEETMESNESRPA--PKLNERILSTLSKRSVAHPWHDL	EIGPEAPLVFNV	55		
BrIPP-4	1	---MAPPIEIAATKSYAE-KQVSLPLLNERILSSMTHRSVAHPWHDL	EIGPEAPIIFNC	56		
BrIPP-5	1	MADIKDEGTPKSSASSPLRNPN-VT-LNERNFAAFTHRSAAHPWHDL	EIGPEAPAVFNC	58		
BrIPP-1	52	VVEITKGSVKYELDKK	TGLIKVDRILYSSVVYPHNYGFVPRTL	CEDNDPIDVLVIMQEP	111	
BrIPP-2	46	VVEITKGSVKYELDKK	TGLIKVDRILYSSVVYPHNYGFVPRTL	CEDNDPIDVLVIMQEP	105	
BrIPP-3	56	VVEITKGSVKYELDKK	TGLIKVDRILYSSVVYPHNYGFIPRTL	CEDNDPIDVLVIMQEP	115	
BrIPP-4	57	VVEIGKGSVKYELDKTTGLIKVDRILYSSVVYPHNYGFIPRTL	CEDNDPIDVLVIMQEP	116		
BrIPP-5	59	<u>VVEISKGGVKYELDKNSGLIKVDRVLYSSIVYPHNYGFIPRTICEDSDPIDVLVIMQEP</u>			118	
BrIPP-1	112	VLPGCFRLRAR-----	AIGLMPMIDQGEKDDKIIAVCADDPEYK	149		
BrIPP-2	106	VLPGCFRLRAR-----	AIGLMPMIDQGEKDDKIIAVCADDPEYK	143		
BrIPP-3	116	VLPGCFRLRAR-----	AIGLMPMIDQGEKDDKIIAVCADDPEYK	153		
BrIPP-4	117	VIPGCFRLRAKAIGLMPMIDQEPVIPGCFRLRAKAIGLMPMIDQGEKDDKIIAVCADDPEYR	176			
BrIPP-5	119	<u>VLTGSFLRAR-----AIGLMPMIDQGEKDDKIIAVCADDPEFR</u>			156	
BrIPP-1	150	HYTDIKELPPHRLSEIRRFEDYKKKENKEVAVNDFLPSEKAVDAIQYSMDLYAEYILHT	209			
BrIPP-2	144	HYTDIKELPPHRLSEIRRFEDYKKKENKEVAVNDFLPSENAIEAIQYSMDLYAEYILHT	203			
BrIPP-3	154	HFTDIKQLAPHRLSEIRRFEDYKKNEHKEVAVNDFLPSEKAHEAIQYSMDLYAEYILHT	213			
BrIPP-4	177	HYNDIKELPPHRLAEIRRFEDYKKKENKEVAVNDFLPATAAYEAVQHSM	DLAYDYVMET	236		
BrIPP-5	157	<u>HYRDIKELPPHRLAEIRRFEDYKKKENKKVDVEGFLPAQAAIDA</u>			<u>IKDSMDLYAAYIKAG</u>	216
BrIPP-1	210	LRR	212			
BrIPP-2	204	LRR	206			
BrIPP-3	214	LRR	216			
BrIPP-4	237	LRR	239			
BrIPP-5	217	LQR	219			

Fig. 3-9 *BrIPP*遺伝子群の推定アミノ酸配列

pyrophosphataseドメインを下線（赤）で示した。
質量分析の結果、s1とc1の両方から検出されたペプチド断片と一致する領域を紫色の字で、s1より検出されたペプチド断片と一致する領域を、青字で示した。

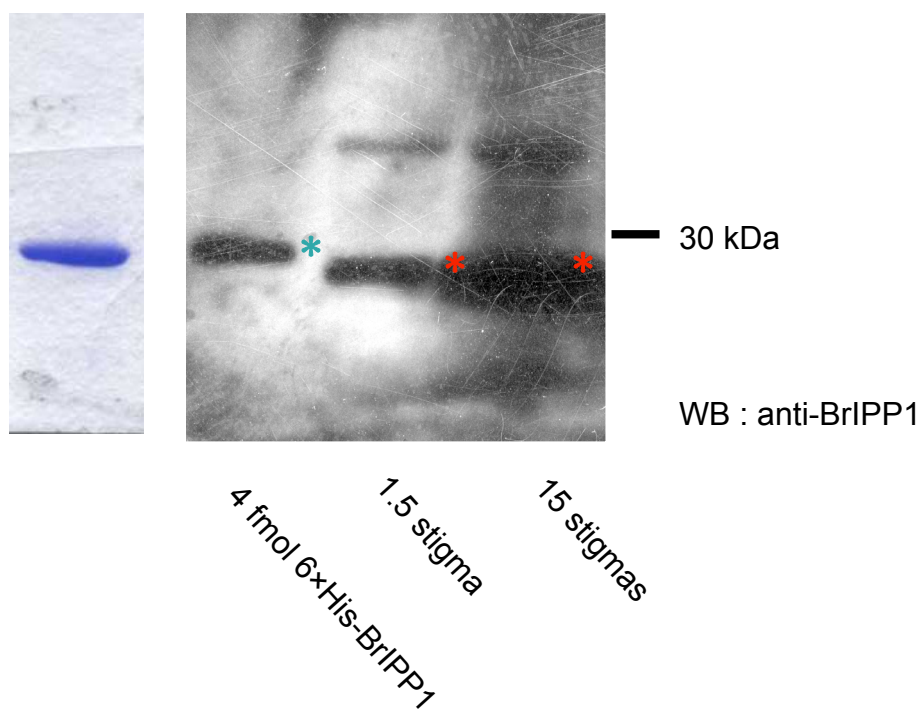


Fig. 3-10 BrIPP抗体の作製

抗原として用いた6xHis-BrIPP1タンパク質と柱頭可溶性画分をSDS-PAGEで分離し、作製した抗BrIPP1抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った（右図）。左には6xHis-BrIPP1をSDS-PAGEで分離した泳動ゲルのCBB染色像を示した。

オートラジオグラフィー像を比較したところ、和合／不和合受粉時に特異的なリン酸化を示すスポット s1、c1 が共に、この抗体によって特異的に沈降してくることが確認された (Fig. 3-11)。以上の結果から、s1 と c1 は共に BrIPP であり、この BrIPP は和合／不和合受粉時特異的なリン酸化の挙動を示すことが明らかとなった。

なお、免疫沈降実験のために今回作製した BrIPP1 抗体は、BrIPP-1 全長の発現タンパク質を免疫しているため、BrIPP-1~5 のいずれとも交差反応すると考えられる。よって、この免疫沈降実験からは、s1 と c1 が BrIPP-1~5 のどれに相当するかを判断することは出来ない。また、MS/MS 解析においては、s1 と c1 からは TGLIKVDR のペプチド断片が、s1 からはさらに ILYSSVVP HNYGFIPR のペプチド断片が同定されたが、前者は、BrIPP-3、BrIPP-4 中に一致する配列が、後者は、BrIPP-1、BrIPP-2、BrIPP-3 中に一致する配列が存在する (Fig. 3-9)。なお、今回クローニングされた *BrIPP-1~5* 遺伝子の推定アミノ酸配列の情報をもとに質量分析の結果を再解析したが、新たなペプチド断片は同定されなかった。今回の解析から、s1 と c1 が同じ *BrIPP* 遺伝子に由来するならば、s1、c1 は BrIPP-3 である可能性が示唆されるが、同定されたペプチド断片がそれぞれ 2 つ、1 つと非常に少ないことから、更に詳細な解析が必要であると考えられる。

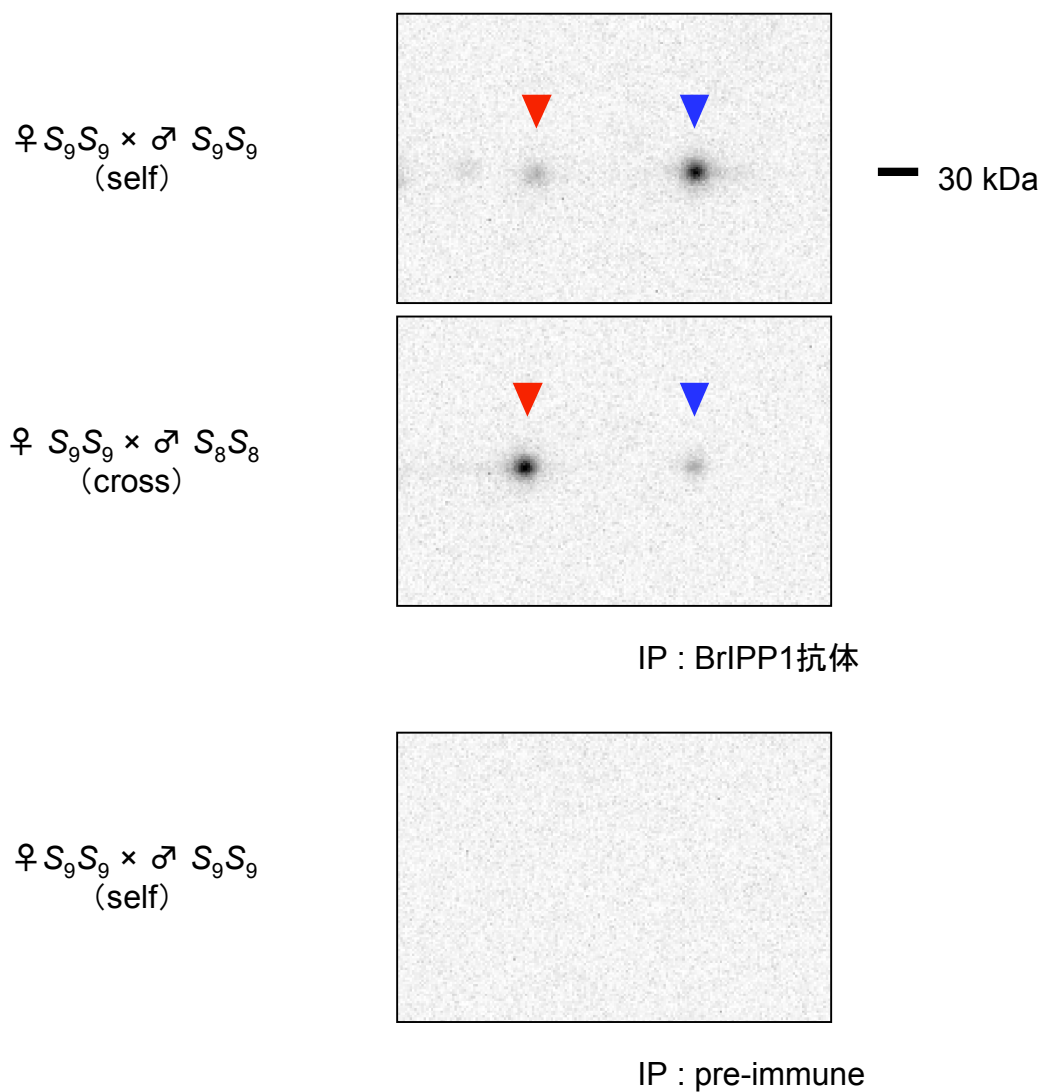


Fig. 3-11 抗BrIPP1抗体を用いた免疫沈降実験

[^{32}P]-リン酸を取り込ませた S_9S_9 株に和合受粉 (S_8S_8 株) 又は不和合受粉 (S_9S_9 株) を行い、60分後柱頭より抽出した可溶性画分それぞれ対し、抗BrIPP1抗体を用いた免疫沈降を行った。ネガティブコントロールとして、免疫前のウサギ抗血清のIgG画分を用いて、同様に免疫沈降を行った。精製画分は二次元電気泳動で分離し、リン酸化タンパク質をオートラジオグラフィで検出した。不和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質s1を▼で、和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質c1を▼で示した。

3-4 考察

本章では、二次元電気泳動法により、アブラナ科植物の和合／不和合受粉時の柱頭でのタンパク質リン酸化の変動を解析し、その結果、不和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質を1個、和合受粉時にリン酸化されるタンパク質を1個、見出した。さらに、質量分析計による解析と、免疫沈降実験により、これら2個のタンパク質が共に、inorganic pyrophosphatase (IPP) であることを明らかにした。

今回の解析では、複数回の実験から、比較的再現性の高いs1とc1を解析の対象としたが、和合受粉後60分と不和合受粉後60分のゲルの比較において、s1とc1でのリン酸化強度の差が小さい又は見られないことが何度かあった。乳頭細胞は厚いクチクラ層に覆われているが、不和合受粉の際、SP11は花粉表層のクチナーゼ等の助けを借りて、乳頭細胞を覆う厚いクチクラ層を通過し、さらに細胞壁中を通して、細胞膜上のSRKに自己花粉の情報を伝達すると考えられる(Dickinson, 1995)。このため、リガンドが細胞膜上の受容体と瞬時に結合できる動物培養細胞を用いた実験系等とは異なり、SP11がSRKと結合するまでに要する時間は、温度、湿度、植物体の成熟度などといった、様々な要因によって影響を受けることが予測される。また、和合受粉においても、受粉から花粉が水を吸水し始めるまでに要する時間は、約20~60分と幅広いことが報告されている(Elleman and Dickinson, 1990)。今回は受粉60分後での比較を行ったが、和合／不和合反応過程でのこのような要因による時間的な曖昧さによって、再現性にも影響が出たのかもしれない。

SRK-MLPK受容体複合体の標的因子の候補としてARC1が挙げられる。ARC1は、SRKと結合し、SRKによって特異的にリン酸化されることが*in vitro*での解析で明らかとされているが(Gu *et al.*, 1998)、実際に不和合受粉時に乳頭細胞内でリン酸化されるかどうかは知られていない。今回の二次元電気泳動での解析では、ARC1の不和合受粉時特異的なリン酸化を検出することはできなかった。この理由として、まず、サンプル中に含まれているARC1のタンパク質の量的な問題が挙げられる。今回の実験系は、ラジオアイソトープによる検出系であり、実際に、和合／不和合受粉時特異的なリン酸化を示すタンパク質として検出されたs1とc1は、銀染色では検出できないほど細胞内に微量にしか存在しなかったことから、非常に高感度であると考えられる。しかし、今回の柱頭50

個分を用いて行った二次元電気泳動ゲルからは、ARC1 の不和合受粉時特異的なリン酸化は検出されなかった。リン酸化された ARC1 は今回の実験系では検出できないほど非常に微量にしか、細胞内に存在しないのかもしれない。また、筆者の行った発現タンパク質を用いた *in vitro* リン酸解析では SRK-ARC1 間の相互作用は確認できなかったことから (data not shown)、ARC1 が実際には、SRK-MLPK の下流でリン酸化を受けていない可能性も考えられる。今後、ARC1 のリン酸化に関しては、特異的抗体を用いたアフィニティ精製により濃縮することで、不和合受粉時の *in vivo* 条件下でのリン酸化の有無を検証することが重要であると考えられる。

本章で和合／不和合受粉時特異的なタンパク質リン酸化の挙動を示すタンパク質として同定された、IPP は原核生物、真核生物を問わず多くの生物種で不可欠の可溶性のタンパク質である。植物においても、シロイヌナズナや barley、potato など数多くの種で同定されている (Kieber and Signer *et al.*, 1991; Visser *et al.*, 1998; du Jardin *et al.*, 1995)。生物が、DNA や RNA の合成時に新たなヌクレオシド 3 リン酸が DNA/RNA 鎖に付加していく際、または、タンパク質合成時にアミノ酸鎖が tRNA に結合する際、その副産物として有害なピロリン酸が大量に作られる。IPP はこの過剰なピロリン酸を加水分解し、除去する働きをしていると考えられている (Cooperman *et al.*, 1992)。

近年、Rudd と Franklin-Tong (2003) によって、ケシ科植物 *Papaver rhoeas* (field poppy) の自家不和合反応時に特異的にリン酸化される花粉タンパク質 p26 が IPP であることが明らかとされた (Rudd and Franklin-Tong, 2003)。*P. rhoeas* は、配偶体型の自家不和合性を示し、同じ *S* ハプロタイプの雌ずい側因子 *S* protein と未同定の花側因子の相互作用により、花粉管の伸長が阻害されると推定されている (Franklin-Tong and Franklin, 2003)。ケシ科植物では、培地上で伸長させた花粉管に雌ずい側因子 (*S* protein) を添加すると、*S* ハプロタイプ特異的に花粉管の伸長停止が起きることが知られている。すなわち、*in vitro* 条件下において自家不和合反応を再現できることから、自家不和合時に花粉管内で起きる現象について多くの知見が得られている。まず、不和合受粉時に花粉管の先端部より少し離れた花粉管内部でカルシウムイオン濃度が急激に増加することが確認されている (Franklin-Tong *et al.*, 1993; Franklin-Tong, 1999)。そして、このカルシウムイオンの増加が引き金となって、速やかに花粉管内のアクチンフィラメントが崩壊し花粉管伸長が停止すること (Geitmann *et al.*, 2000; Snowman *et al.*, 2002)、その後、花粉管が動物のアポトーシスと類似したプログラム細胞死を起こすこと (Tomas and Franklin-Tong, 2004) が報告されている。

後に IPP と同定された *P. rhoeas* の花粉タンパク質 p26 は、もともと培地上で [³²P]-リン酸を取り込ませた花粉管に不和合の組み合わせとなる S protein を付加した際、特異的にリン酸化される分子量約 26 K のタンパク質として、二次元電気泳動法により見いだされた (Rudd *et al.*, 1996)。p26 は花粉管内においてカルシウムイオン濃度と calmodulin に依存してリン酸化される。また、p26 タンパク質は、pyrophosphatase 活性を有し、カルシウムイオンの添加およびリン酸化によってその活性は相加的に阻害される (Rudd and Franklin-Tong, 2003; de Graaf *et al.*, 2006)。さらには、p26 のアンチセンスオリゴヌクレオチドとトランスフェクション試薬 (cytofectin) を含む培地上で *P. rhoeas* の花粉を培養したところ、花粉管の生育が阻害されたことから、p26/IPP は本来花粉管の伸長に必須のタンパク質であるが、不和合受粉時には細胞内カルシウムイオン濃度の増加およびリン酸化により活性が抑制されることによって、花粉管内にピロリン酸が蓄積された結果、花粉管伸長が阻害されるとの説を提唱している (de Graaf *et al.*, 2006)。

Iwano ら (1999) は、X 線マイクロアナライザを取り付けた走査電子顕微鏡を用いた解析から、受粉後の花粉直下の乳頭細胞内においてカルシウムが和合／不和合受粉に関わらず集積してくることを報告している。さらに岩野は、細胞膜非透過性のカルシウムイオン蛍光指示薬 (カルシウムオレンジ) を予め塗布した乳頭細胞に和合あるいは不和合受粉させるという実験を行い、和合受粉時には速やかにカルシウムイオンを含む水が乳頭細胞より流出してくるのに対し、不和合受粉時にはその流出が阻害されることを見出している (岩野、私信)。以上の結果は、不和合受粉時において乳頭細胞内のカルシウムイオン濃度が持続的に上昇している可能性を示唆するものである。また、F-actin に結合するキノコ毒素であるファロイジンをローダミンで蛍光標識したプローブを用い、和合／不和合受粉時の *B. rapa* 乳頭細胞内 F-actin を検出したところ、和合受粉時には接着花粉直下で F-actin の束化が観察される一方、不和合受粉時には接着花粉直下での F-actin の消失が観察されている。同様の結果は、F-actin 結合タンパク質である talin と GFP との融合タンパク質を *B. rapa* 乳頭細胞内に一過的に発現させて和合／不和合受粉時の F-actin を検出した場合でも観察されている (三輪、2004)。

このように、*B. rapa* の不和合受粉時に乳頭細胞で観察されるカルシウムイオンの上昇、F-actin の消失といった生理反応は、不和合反応時に *P. rhoeas* 花粉で見られるものと非常によく似ているが、今回の解析から、和合／不和合受粉時に特異的なリン酸化の挙動を示すタンパク質として *B. rapa* より同定されたタンパク質が IPP であったことから、不和合反応に関与するタンパク質レベルにおいても両者は類似していることが明らかになった。

当研究室で行われている、アブラナ科植物の受粉時における乳頭細胞の動態解析から、和合受粉時に認められる乳頭細胞からのカルシウムイオンを含む水の流出や乳頭細胞内の F-actin の束化といった現象が、和合性の花粉から回収した花粉表層物質 (pollen coat) のみを乳頭細胞に処理した場合にも観察されることから、pollen coat 中にはこういった反応を誘導する何らかの「和合シグナル」分子が含まれていると考えられてきている。このことから、アブラナ科植物の和合／不和合受粉時の乳頭細胞では大きく分けて 2 種類のリン酸化によるシグナル伝達機構が働いていると推測される。1 つは、不和合受粉時の際の SP11 による SRK-MLPK 受容体複合体の活性化が引き金となり、自家不和合反応を誘起するシグナル伝達系、そしてもう 1 つは、和合受粉／不和合受粉にかかわらず、花粉からの「和合シグナル」が引き金となり、アクチン束の形成、細胞内カルシウムイオンの増加などの和合反応を誘起するシグナル伝達系であり、不和合受粉時には SRK の下流でこの和合シグナル伝達系が阻害されることが、アブラナ科植物の自家不和合反応の本質であると考えられる。和合受粉時の乳頭細胞では、先に述べた、カルシウムイオンを含む水の流出、アクチン束の形成の他にも、花粉接着面直下での分泌小胞と細胞膜との融合や、細胞壁の外層の弛緩など、様々な現象が見られるが (Elleman, 1996)、この現象に関わる和合シグナル伝達系はこれまでほとんど明らかとされていない。今回、自家不和合情報伝達機構の解析より同定された BrIPP は、和合受粉時にリン酸化されることから、「和合シグナル」の下流因子としてこの情報伝達系に関わっていることが期待される。

本章の結果より想定されるアブラナ科植物の和合不和合受粉時の BrIPP リン酸化の挙動を Fig. 3-12 に示す。和合受粉時には和合シグナル伝達系の下流で BrIPP はリン酸化される (Fig. 3-12A)。一方の不和合受粉時には、和合シグナル伝達系による BrIPP のリン酸化の一部が SRK-MLPK 受容体複合体の下流で抑制される場合 (Fig. 3-12B) と、リン酸化された BrIPP が SRK-MLPK 受容体複合体の下流で脱リン酸化される場合 (Fig. 3-12C) の 2 通りのモデルが考えられる。

本章では、和合／不和合受粉時特異的にリン酸化されるタンパク質 s1、c1 が BrIPP であることが明らかとなったが、同定された BrIPP タンパク質 s1 と c1 が今回クローニングされた 5 つの *BrIPP* 遺伝子 (*BrIPP1*~*BrIPP5*) の内の、どの *BrIPP* 遺伝子に由来するのか判断できなかった。また、今回の解析では、s1 と c1 が同じ BrIPP 分子の異なるリン酸化状態を見ているものであるとし、議論を進めてきたが、厳密には s1 と c1 が同一の分子であるという結果は得られていな

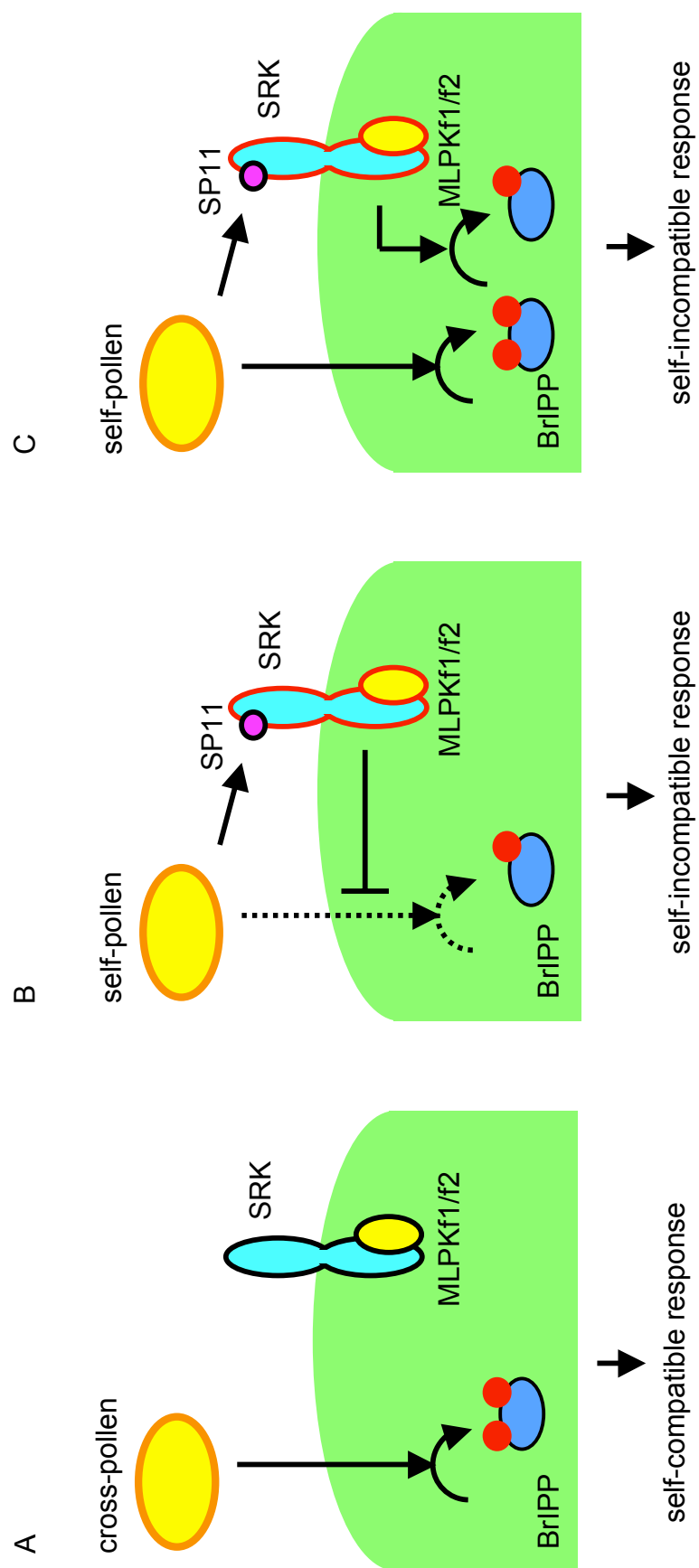


Fig. 3-12 BrIPPの和合／不和合受粉時特異的なリン酸化状態の変化

和合受粉時には、花粉からの和合性シグナルの下流で、**BrIPP**はリン酸化される(A)。不和合受粉時には、活性化した**SRK-MLPK**受容体複合体の下流で、和合シグナル下流の**BrIPP**のリン酸化が抑制(B)、又はリン酸化された**BrIPP**が脱リン酸化される(C)。

い。BrIPP が和合不和合受粉時に受けるリン酸化状態の変化と機能との関係も含めて、今後明らかとしていくべき課題である。

総括

植物における自家不和合性は、雑種強勢を利用した F_1 雑種育種法による採種技術を支える上で非常に有用な性質である。そのため、自家不和合性の理解は将来の新しい育種法の開発への糸口となることが期待されている。しかし、こうした育種学的な観点のみならず、植物が自己と非自己を識別するという科学的な面白さに加え、自家不和合性の遺伝学的な性質上、相互作用する 2 分子が同じ遺伝子座上に存在するという研究材料としての優位さから、自家不和合性の分子機構は、今日までに多くの研究者達の興味を惹きつけ、注目されてきた。

本研究で筆者は、アブラナ科植物の自家不和合情報伝達系において重要な役割を果たしていると考えられる細胞内キナーゼ **MLPK** の機能解析と、和合／不和合受粉時の柱頭におけるタンパク質リン酸化の変動を解析することで、アブラナ科植物自家不和合反応を誘起するリン酸化を介した情報伝達機構の解明を目指した。

第 1 章では、**MLPK** 遺伝子に由来する 2 つの転写産物である **MLPKf1** と **MLPKf2** がそれぞれ異なる転写開始点を持ち、異なる転写調節を受けていることを明らかにした。さらに、**MLPK** の 2 つの転写産物がそれぞれ異なる機構で細胞膜に結合していること、この膜局在性が自家不和合性における **MLPK** の機能に必須であることを示した。次いで、第 2 章では、**MLPK** と **SRK** が細胞膜上で結合すること、**MLPK** が **SRK** の基質となりうることを明らかにした。また、**MLPK** の活性調節領域を明らかとし、**SRK** によりリン酸化される **MLPK** の Ser-rich 領域が **MLPK** 自身のキナーゼ活性を負に制御している可能性を示すと共に、この領域を除いた変異型 **MLPK** が、乳頭細胞内で constitutive active (CA) 型として自家不和合反応を誘起することを示した。また、この変異型 **MLPK** が CA 型として自家不和合反応を誘起するには、**SRK** の存在が不可欠であることを示した。そしてこれらの結果を基に、**MLPK** が **SRK** の co-receptor として機能し、SP11 の受容の際に、**MLPK** と **SRK** が相互に活性化し合うことで情報を伝達するという、新たな分子モデルを提唱した。さらに、第 3 章では、アブラナ科植物の他家および自家受粉後に異なるリン酸化調節を受ける柱頭タンパク質を探索する過程で BrIPP (inorganic pyrophosphatase) を同定し、このタンパク質が柱頭において、自家不和合性の情報伝達に関与している可能性を示した。

シロイヌナズナのゲノム解析より、共通の祖先を持つ 610 ものセリンスレオニンキナーゼの存在が明らかにされると共に、このファミリーは細胞外ドメインを持つもの (RLK: receptor-like kinase) と細胞外ドメインを持たないもの (RLCK: receptor-like cytoplasmic kinase) の 2 つに分類されることが示されてきた (Shui and Bleeker, 2001)。これまでの研究から、RLK ファミリーは、細胞外シグナルを受容し、細胞内へとシグナルを伝える重要な因子であると考えられているが、(Becraft 2002; Morillo and Tax, 2006)、実際にリガンド分子が同定された例は極めて少なく、下流の情報伝達経路に至ってはまだ殆ど明らかにされていない状況である。また、本研究で扱った MLPK が属する RLCK ファミリーに関してはさらに研究が遅れており、本研究は RLCK ファミリーの一員が RLK の co-receptor として機能することを明らかにした初めての例である。

アブラナ科植物の自家不和合反応は、花粉-乳頭細胞間の一対一の相互作用によって反応が起きているシンプルな系であることに加えて、花粉の吸水・発芽、花粉管の伸長の有無といった表現型が目に見える変化として短時間のうちに観察できること、リガンドの化学合成ペプチドが単独で受容体を活性化することが確認されていることなど、研究上有利な点が多数存在する。本研究で得られた新たな知見を基に、これらの利点を生かすことで、今後、アブラナ科植物の自家不和合情報伝達系に関する研究がより一層発展することを期待している。

謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座 磯貝彰教授（現同大学副学長）並びに、高山誠司教授のもと、2001年6月より、2007年1月までの約6年間にわたり行われました。

本研究を行うにあたり、魅力的なテーマと最高の環境を与えてくださり、丁寧な御指導を頂いた、高山誠司教授に厚くお礼申し上げます。また、磯貝彰前教授には、副学長に就任されてからも変わらず、数多くの有益な御助言、御批判を賜りました。心より感謝申し上げます。

日頃より、セミナーや実験など研究生活での多くの場面でお世話になりました、同大学助手 岩野恵博士、円谷徹之博士、同研究員 下里裕子博士、村瀬浩司博士に深く感謝致します。特に、下里裕子博士、村瀬浩司博士には、入学以来、数多くの有益な御助言を頂きました。心より感謝致します。

形質転換ベクターを分与頂いた、東北大学 渡辺正夫教授、二次元電気泳動法を直接ご指導頂いた、奈良先端科学技術大学院大学 稲垣直之助教授、質量分析によるタンパク質の同定で御協力頂いた、同大学職員 桑野晶喜様、抗体を分与頂いた、近畿大学 重岡成教授、同研究員 吉村和也博士（現中部大学講師）に、この場を借りて深く御礼申し上げます。

本研究を進める上で、生化学実験で終始協力して頂いた、奈良先端科学技術大学院大学職員 太田礼様、大植真実様、植物への形質転換実験でお世話になりました、大西淑恵様、山本文余様、日頃より実験材料である植物のお世話をさせて頂いた、市川ひとみ様、ベクター構築を手伝って頂いた、松村牧様、研究室内の様々な場面でお世話になりました山口美保様、阿部愛様に、深く感謝申し上げます。

奈良先端科学技術大学院大学 横田明穂教授、田坂昌生教授、橋本隆教授には、本博士論文を審査して頂き、貴重なご助言を頂きました。心より感謝申し上げます。

この6年間、多くの迷惑をかけ、またお世話になりました、細胞間情報学講座の教官、先輩方、技術補佐員、同期、後輩に、深く感謝致します。楽しく、また大変有意義な時間を過ごすことができました。

最後に、この6年間の研究生活を暖かく見守って頂いた両親に感謝致します。

引用文献

- Abel, S., and Theologis, A. (1994). Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J.* 5, 421-427.
- Andriotis, V.M., and Rathjen, J. (2006). The Pto kinase of tomato which regulates plant immunity is repressed by its myristoylated N-terminus. *J. Biol. Chem.* 281, 26578-26586.
- 荒木崇 (1996) . 減圧浸潤法による形質転換. 植物細胞工学シリーズ 4 モデル植物の実験プロトコール, pp. 109-113.
- Azevedo, C., Santos-Rosa, M.J., and Shirasu, K. (2001). The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci.* 6, 354-358.
- Bai, X., Peirson, B.N., Dong, F., Xue, C., and Makaroff, C.A. (1999). Isolation and characterization of *SYN1*, a RAD21-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 417-430.
- Bateman, A.J. (1955). Self-incompatibility systems in angiosperms. III. Cruciferae. *Heredity* 9, 52-68.
- Becraft, P.W. (2002). Receptor kinase signaling in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 163-192.
- Boisson, B., Giglione, C., and Meinel, T. (2003). Unexpected protein families including cell defense components feature in the *N*-myristoylome of a higher eukaryote. *J. Biol. Chem.* 278, 43418-43429.
- Bower, M.S., Matias, D.D., Fernandes-Carvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T., Rothstein, S.J., and Goring, D.R. (1996). Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica S* locus receptor kinase. *Plant Cell* 8, 1641-1650.

- Briknarová, K., Nasertorabi, F., Havert, M.L., Eggleston, E., Hoyt, D.W., Li, C., Olson, A.J., Vuori, K., Ely, K.R. (2005). The serine-rich domain from Crk-associated substrate (p130cas) is a four-helix bundle. *J. Biol. Chem.* 280, 21908-21914.
- Cabrillac, D., Cock, J.M., Dumas, C., and Gaude, T. (2001). The *S*-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* 410, 220-223.
- Chen, C.H., and Nasrallah, J.B. (1990). A new class of *S* sequences defined by a pollen recessive self-incompatibility allele of *Brassica oleracea*. *Mol. Gen. Genet.* 222, 241-248.
- Cooperman, B.S., Baykov, A.A., and Lahti, R. (1992). Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends Biochem. Sci.* 17, 262-266.
- de Graaf, B.H., Rudd, J.J., Wheeler, M.J., Perry, R.M., Bell, E.M., Osman, K., Franklin, F.C., and Franklin-Tong, V.E. (2006). Self-incompatibility in *Papaver* targets soluble inorganic pyrophosphatases in pollen. *Nature* 444, 490-493.
- de Nettancourt, D. (2001). Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants. Springer-Verlag, 322pp. 2nd ed.
- de Vries, J.S., Andriotis, V.M., Wu, A.J., Rathjen, J.P. (2006). Tomato *Pto* encodes a functional *N*-myristoylation motif that is required for signal transduction in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 45, 31-45.
- Dickinson, H.G. (1995). Dry stigmas, water and self-incompatibility in *Brassica*. *Sex. Plant Reprod.* 8, 1-10.
- Domínguez, D., Montserrat-Sentís, B., Virgós-Soler, A., Guaita, S., Grueso, J., Porta, M., Puig, I., Baulida, J., Francí, C., and García de Herreros, A. (2003). Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol. Cell Biol.* 23, 5078-5089.

- du Jardin, P., Rojas-Beltran, J., Gebhardt, C., and Brasseur, R. (1995). Molecular cloning and characterization of a soluble inorganic pyrophosphatase in potato. *Plant Physiol* 109, 853-860.
- Elleman, C.J., and Dickinson, H.G. (1990). The role of the exine coating in pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea* L. *New Phytol.* 114, 511-518.
- Elleman, C.J., and Dickinson, H.G. (1994). Non-host resistance, phytoalexins and the self-incompatibility response in *Brassica oleracea*. *J. Exp. Bot.* 45, 26-27.
- Elleman, C.J., and Dickinson. (1996). Identification of pollen components regulating papillae of *Brassica oleracea*. *New Phytol.* 133, 197-205.
- Franklin-Tong, V.E., Ride, J.P., Read, N.D., Trewavas, A.J., and Franklin, F.C.H. (1993). The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *Plant J.* 4, 163-177.
- Franklin-Tong, V.E. (1999). Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell* 11, 727-738.
- Franklin-Tong, N.V., Franklin, F.C. (2003). Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends Plant Sci.* 8, 598-605.
- Fujimoto, R., Sugimura, T., Fukai, E., and Nishio, T (2006). Suppression of gene expression of a recessive *SP11/SCR* allele by an untranscribed *SP11/SCR* allele in *Brassica* self-incompatibility. *Plant Mol. Biol.* 61, 577-587.
- Fukai, E., Nishio, T., and Nasrallah, M.E. (2001). Molecular genetic analysis of the candidate gene for *MOD*, a locus required for self-incompatibility in *Brassica rapa*. *Mol. Genet. Genomics* 265, 519-525.
- Geitmann, A., Snowman, B.N., Emons, A.M., and Franklin-Tong, V.E. (2000). Alterations in the actin cytoskeleton of pollen tubes are induced by the self-incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. *Plant Cell* 12, 1239-1251.

- 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.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M., and Zhu, J.K. (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* 13, 1383-1400.
- Gu, T., Mazzurco, M., Sulaman, W., Matias, D.D., and Goring, D.R. (1998). Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 382-387.
- Haffani, Y. Z., Gaude, T., Cock, J. M., and Goring, D. R. (2004). Antisense suppression of thioredoxin h mRNA in *Brassica napus* cv. Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response. *Plant Mol. Biol.* 55, 619-630.
- Halfter, U., Ishitani, M., and Zhu, J.K. (2000). The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3735-3740.
- Hantschel, O., Nagar, B., Guettler, S., Kretschmar, J., Dorey, K., Kuriyan, J., and Superti-Furga, G. (2003). A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell* 112, 845-857.
- Hinata, K., Okazaki, K., Nishio, T. (1983). Gene analysis of self-compatibility in *Brassica campestris* var. Yellow Sarson (a case of recessive epistatic modifier). *Proceedings of the 6th International Rapeseed Conference, Paris.* vol. 1, pp. 354-359
- Hu, C.D., Chinenov, Y., Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence

- complementation. *Mol. Cell* 9, 789-798.
- Hugnot, J.P., Gilgenkrantz, H., Vincent, N., Chafey, P., Morris, G.E., Monaco, A.P., Berwald-Netter, Y., Koulakoff, A., Kaplan, J.C., and Kahn, A. (1992). Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7506-7510.
- Hwang, I., Goodman, H.M. (1995). An *Arabidopsis thaliana* root-specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. *Plant J.* 8, 37-43.
- Ikeda, S., Nasrallah, J.B., Dixit, R., Preiss, S., and Nasrallah, M.E. (1997). An aquaporin-like gene required for the *Brassica* self-incompatibility response. *Science* 276, 1564-1566.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.S., Shi, W., and Zhu, J.K. (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires *N*-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* 12, 1667-1678.
- Ito, T., Takahashi, N., Shimura, Y., and Okada, K. (1997). A serine/threonine protein kinase gene isolated by an in vivo binding procedure using the *Arabidopsis* floral homeotic gene product, AGAMOUS. *Plant Cell physiol.* 38, 248-258.
- Ito, Y., Hirochika, H., and Kurata, N. (2002). Organ-specific alternative transcripts of KNOX family class 2 homeobox genes of rice. *Gene* 288, 41-47.
- Iwano, M., Wada, M., Morita, Y., Shiba, H., Takayama, S., and Isogai, A. (1999). X-ray microanalysis of papillar cells and pollen grains in the pollination process in *Brassica* using a variable-pressure scanning electron microscope. *J. Electron Microscop.* 48, 909-917.
- Iwano, M., Shiba, H., Miwa, T., Che, F.S., Takayama, S., Nagai, T., Miyawaki, A., Isogai, A. (2004). Ca^{2+} dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 3562-3571.

- Kato, S., Ohtoko, K., Ohtake, H., and Kimura, T. (2005). Vector-capping: a simple method for preparing a high-quality full-length cDNA library. *DNA Res.* 12, 53-62.
- Kho, Y.O., and Bear, J. (1968). Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* 17, 298-302.
- Kieber, J.J., and Signer, E.R. (1991). Cloning and characterization of an inorganic pyrophosphatase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 16, 345-348.
- Kitagawa, N., Washio, T., Kosugi, S., Yamashita, T., Higashi, K., Yanagawa, H., Higo, K., Satoh, K., Ohtomo, Y., Sunako, T., Murakami, K., Matsubara, K., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Kikuchi, S., and Tomita, M. (2005) Computational analysis suggests that alternative first exons are involved in tissue-specific transcription in rice (*Oryza sativa*). *Bioinformatics* 21, 1758-1763.
- Kusaba, M., Dwyer, K., Hendershot, J., Vrebalov, J., Nasrallah, J. B., and Nasrallah, M. E. (2001). Self-Incompatibility in the Genus *Arabidopsis*: Characterization of the *S* Locus in the Outcrossing *A. lyrata* and Its Autogamous Relative *A. thaliana*. *Plant Cell*. 13, 627-643.
- Lalonde, B.A., Nasrallah, M.E., Dwyer, K.G., Chen, C.H., Barlow, B., and Nasrallah, J.B. (1989). A highly conserved *Brassica* gene with homology to the *S*-locus-specific glycoprotein structural gene. *Plant Cell* 1, 249-258.
- Leclercq, J., Ranty, B., Sanchez-Ballesta, M.T., Li, Z., Jones, B., Jauneau, A., Pech, J.C., Latché, A., Ranjeva, R., and Bouzayen, M. (2005). Molecular and biochemical characterization of LeCRK1, a ripening-associated tomato CDPK-related kinase. *J. Exp. Bot.* 56, 25-35.
- Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E., Walker, J.C. (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110, 213-222.
- Liu, J., and Zhu, J.K. (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt

- tolerance. *Science* 208, 1943-1945.
- Massagué, J. (1998). TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.
- 松本知人 (2004). 自家不和合性の情報伝達に関わる膜結合型キナーゼ MLPK の機能解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)
- 三輪輝彦 (2004). 受粉時における乳頭細胞内 Ca イオンとアクチンフィラメントの動態解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)
- Morillo, S. A., and Tax, F. E. (2006). Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 460-469.
- 森山秀樹 (2007). アブラナ科植物における和合受粉-受精機構の解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)
- Morrison, D.K., and Davis, R.J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 91-118.
- 村瀬浩司 (2004). アブラナ科植物の自家不和合性におけるシグナル伝達機構の解析. 博士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)
- Murase, K., Shiba, H., Iwano, M., Che, F. S., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. (2004). A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science*. 303, 1516-1519.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20, 87-90.
- Nagar, B., Hantschel, O., Young, M.A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G., and Kuriyan, J. (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112, 859-871.
- 永吉雅之 (2005). バラ科植物の自家不和合性における自他識別機構の解析. 修

士論文（奈良先端科学技術大学院大学）

- Nakhei, H., Lingott, A., Lemm, I., and Ryffel, G.U. (1998). An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4 α predominates in undifferentiated murine cell types. *Nucleic Acids Res.* 26, 497-504.
- Nam, K.H., and Li, J. (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110, 203-212.
- Nasrallah, J.B., Kao, T.H., Chen, C.H., Goldberg, M.L., and Nasrallah, M.E. (1987). Amino acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the *S* locus of *Brassica oleracea*. *Nature* 326, 617-619.
- Nasrallah, J.B., Yu, S.M., and Nasrallah, M.E. (1988). Self-incompatibility genes of *Brassica oleracea*: expression, isolation and structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 25, 5551-5555.
- Nasrallah, M.E., Liu, P., Nasrallah, J.B. (2002). Generation of self-incompatible *Arabidopsis thaliana* by transfer of two *S* locus genes from *A. lyrata*. *Science* 297, 247-249.
- Nasrallah, M.E., Liu, P., Sherman-Broyles, S., Boggs, N.A., and Nasrallah, J.B. (2004). Natural variation in expression of self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*: implications for the evolution of selfing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 16070-16074.
- Nou, I.S., Watanabe, M., Isogai, A., and Hinata, K. (1993). Comparison of *S*-alleles and *S*-glycoproteins between two wild populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. *Sex. Plant Reprod.* 6, 79-86.
- Ockendon, D.J. (1985). Genetics and physiology of self-incompatibility in *Brassica*. In *Plant Cell/Cell Interactions*, I. Sussex, A. Ellingboe, M. Crouch and R. Malmberg, eds. (New York: Cold Spring Harbor Press), pp. 1-6.
- Oguri, T., Takahata, I., Katsuta, K., Nomura, E., Hidaka, M., and Inagaki, N. (2002).

- Proteome analysis of rat hippocampal neurons by multiple large gel two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2, 666-672.
- Raíces, M., Gargantini, P.R., Chinchilla, D., Crespi, M., Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R.M. (2003). Regulation of CDPK isoforms during tuber development. *Plant Mol. Biol.* 52, 1011-1024.
- Robert, L.S., Allard, S., Franklin, T.M., and Trick, M. (1994). Sequence and expression of endogenous *S*-locus glycoprotein genes in self-compatible *Brassica napus*. *Mol. Gen. Genet.* 242, 209-216.
- Rudd, J.J., Franklin, F., Lord, J.M., and Franklin-Tong, V.E. (1996). Increased phosphorylation of a 26-kD pollen protein is induced by the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. *Plant Cell* 8, 713-724.
- Rudd, J.J., and Franklin-Tong, V.E. (2003). Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *J. Exp. Bot.* 54, 141-148.
- Russinova, E., Borst, J.W., Kwaaitaal, M., Caño-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J., de Vries, S.C. (2004). Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell* 16, 3216-3229.
- Schlessinger, J. (2000). New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell* 100, 293-296.
- Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., and Nasrallah, J.B. (1999). The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286, 1697-1700.
- Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J.P., Chang, J.H., Lavelle, D.T., Michelmore, R.W., and Staskawicz, B.J. (1996). Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* 274, 2063-2065.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E., Innes, R.W. (2003). Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* 301,

1230-1233.

- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- Shiba, H., Takayama, S., Iwano, M., Shimosato, H., Funato, M., Nakagawa, T., Che, F.S., Suzuki, G., Watanabe, M., Hinata, K., and Isogai, A. (2001). A pollen coat protein, *SP11/SCR*, determines the pollen *S*-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiol.* 125, 2095-2103.
- Shiba, H., Iwano, M., Entani, T., Ishimoto, K., Shimosato, H., Che, F.S., Satta, Y., Ito, A., Takada, Y., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. (2002). The dominance of alleles controlling self-incompatibility in *Brassica* pollen is regulated at the RNA level. *Plant Cell* 14, 491-504.
- Shiba, H., Kakizaki, T., Iwano, M., Tarutani, Y., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. (2006). Dominance relationships between self-incompatibility alleles controlled by DNA methylation. *Nat. Genet.* 38, 297-299.
- Shimizu, K.K., Cork, J.M., Caicedo, A.L., Mays, C.A., Moore, R.C., Olsen, K.M., Ruzsa, S., Coop, G., Bustamante, C.D., Awadalla, P., and Purugganan, M.D. (2004). Darwinian selection on a selfing locus. *Science* 306, 2081-2084.
- 下里裕子 (2002). アブラナ科植物の自家不和合性における自他識別機構の解明. 博士論文 (奈良先端科学技術大学院大学) .
- Shimosato, H., Yokota, N., Shiba, H., Iwano, M., Entani, T., Che, F. S., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S., (2007). Characterization of the SP11/SCR high-affinity binding site involved in self/nonself recognition in *Brassica* self-incompatibility. *Plant Cell*, Epub 2007 Jan 12; 10.1105/tpc.105.038869
- Shiu, S.H., and Bleecker, A.B. (2001). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci. STKE*, RE22.

- Snowman, B.N., Kovar, D.R., Shevchenko, G., Franklin-Tong, V.E., and Staiger, C.J. (2002). Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *Plant Cell* 14, 2613-2626.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N., and te Heesen, S. (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5187-5192.
- Stein, J.C., Howlett, B., Boyes, D.C., Nasrallah, M.E., and Nasrallah, J.B. (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8816-8820.
- Stone, J. M., Trotochaud, A. E., and Walker, J. C., Clark, SE. (1998) Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiol.* 117, 1217-1225.
- Stone, S. L., Arnoldo, M., and Goring, D.R. (1999). A break down of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* 286, 1729-1231.
- Stone, S. L., Anderson, E. M., Mullen, R. T., and Goring, D. R. (2003). ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell.* 15, 885-898.
- Sun, Q.A., Zappacosta, F., Factor, V.M., Wirth, P.J., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2001). Heterogeneity within animal thioredoxin reductases. Evidence for alternative first exon splicing. *J. Biol. Chem.* 276, 3106-3114.
- Suzuki, G., Kai, N., Hirose, T., Fukui, K., Nishio, T., Takayama, S., Isogai, A., Watanabe, M., and Hinata, K. (1999). Genomic organization of the S locus: Identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S₉ haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* 153, 391-400.
- Swiderski, M.R., and Innes, R.W. (2001). The *Arabidopsis* PBS1 resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *Plant J.* 26, 101-112.

- Takano, J., Watanabe, M., Hitomi, K., and Maki, M. (2000). Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues. *J. Biochem.(Tokyo)* 128, 83-92.
- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and Hinata, K. (2000). The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature* 403, 913-916.
- Takayama, S., Isogai, A., Tsukamoto, C., Ueda, Y., Hinata, K., Okazaki, K., and Suzuki, A. (1986). Isolation and some characterization of *S*-locus-specific glycoproteins associated with self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Agric. Biol. Chem.* 50, 1365-1367.
- Takayama, S., Isogai, A., Tsunemoto, C., Ueda, Y., Hinata, K., Okazaki, K., and Suzuki, A. (1987). Sequences of *S*-glycoproteins, products of the *Brassica campestris* self-incompatibility locus. *Nature* 326, 102-104.
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F.S., Kai, N., Watanabe, M., Suzuki, G., Hinata, K., and Isogai, A. (2000). The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1920-1925.
- Takayama, S., Shimosato, H., Shiba, H., Funato, M., Che, F.S., Watanabe, M., Iwano, M., and Isogai, A. (2001). Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature* 413, 534-538.
- Tamaoki, M., Tsugawa, H., Minami, E., Kayano, T., Yamamoto, N., Kano-Murakami, Y., and Matsuoka, M. (1995). Alternative RNA products from a rice homeobox gene. *Plant J.* 7, 927-938.
- Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y., and Martin, G.B. (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* 274, 2060-2063.

- 谷口寿章, 菊池美紀 (2002A). 最新プロテオーム解析プロトコル② 質量分析のためのゲル染色法. 細胞工学 21, pp. 412-421.
- 谷口寿章, 菊池美紀 (2002B). 最新プロテオーム解析プロトコル③ プロテアーゼによるゲル内消化. 細胞工学 21, pp. 524-534.
- Thomas, S.G., and Franklin-Tong, V.E. (2004). Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature* 429, 305-309.
- Thomas, S.M., and Brugge, J.S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513-609
- Trick, M., and Flavell, R.B. (1989). A homozygous *S* genotype of *Brassica oleracea* expresses two *S*-like genes. *Mol. Gen. Genet.* 218, 112-117.
- 内海俊彦 (2004). N-ミリスチル化によるタンパク質の膜局在化と機能調節. 実験医学 22, pp. 1252-1259.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E., and Bonas, U. (1996). Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* 87, 1307-1316.
- Vanoosthuyse, V., Tichtinsky, G., Dumas, C., Gaude, T., and Cock, J. M. (2003). Interaction of calmodulin, a sorting nexin and kinase-associated protein phosphatase with the *Brassica oleracea* *S* locus receptor kinase. *Plant Physiol.* 133, 919-929.
- Visser, K., Heimovaara-Dijkstra, S., Kijne, J.W., and Wang, M. (1998). Molecular cloning and characterization of an inorganic pyrophosphatase from barley. *Plant Mol. Biol.* 37, 131-140.
- Wang, B.B., and Brendel, V. (2006). Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 7175-7180.
- Wang, Z.Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., and Chory, J. (2001). BRI1 is a critical

- component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410, 380-383.
- Wang, X., and Chory, J. (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* 313, 1118-1122.
- Watanabe, M., Takasaki, T., Toriyama, K., Yamakawa, S., Isogai, A., Suzuki, A., and Hinata, K. (1994). A high degree of homology exists between the protein encoded by *SLG* and the *S* receptor domain encoded by *SRK* in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Plant Cell Physiol.* 35, 1221-1229.
- Weston, C.R., and Davis, R.J. (2002). The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 14-21.
- Williams, R. W., Wilson, J. M., and Meyerowitz, E. M. (1997). A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the *Arabidopsis* CLAVATA1 signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. USA.* 94, 10467-10472.
- Wu, A., Tu, X., Prisco, M., and Baserga, R. (2005). Regulation of upstream binding factor 1 activity by insulin-like growth factor I receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 2863-2872.
- Wu, A.J., Andriotis, V.M., Durrant, M.C., and Rathjen, J.P. (2004). A patch of surface-exposed residues mediates negative regulation of immune signaling by tomato Pto kinase. *Plant Cell* 16, 2809-2821.
- Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T., and Shigeoka, S. (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant physiol.* 123, 223-234.