

論文内容の要旨

植物は外界の様々な刺激に応答し、環境の変化に適応するが、その分子生物学的なメカニズムには不明な点が多い。しかし、タンパク質のリン酸化が様々な外的、内的なシグナル伝達系に重要な働きをすることが知られている。コムギのセリン/スレオニンプロテインキナーゼである **WPK4** は光、栄養飢餓、サイトカイニンなどの刺激により mRNA が蓄積し、その蓄積は抗サイトカイニン存在下で阻害されることが明らかにされた。したがって、光、栄養の情報はサイトカイニンを介して伝達されていると考えられた。相同性検索の結果、**WPK4** は出芽酵母での炭素代謝系の調節因子である **SNF1** (sucrose non fermenting 1) とアミノ酸配列で 23% の相同性がある。よって、**WPK4** 遺伝子翻訳産物は炭素代謝に深く関わっている可能性が考えられた。

これまで様々な植物から 20 以上の **SNF1** 関連遺伝子が単離され、3 つのサブファミリーに分類されている (**SNF-1 related protein kinase: SnRK1**, 2, 3)。**WPK4** はサブファミリー 3 に属する。出芽酵母、ヒトにおいては **SNF1** 関連遺伝子はそれぞれ 1 種類しか報告されていないが、植物では 1 種当たりのゲノム中に 10 種類以上存在し、3 つのサブファミリーを構成する。これらのサブファミリーは異なる機能を分担していると考えられる。**SnRK1** は酵母 *snf1* 変異体を相補し、**SNF1** 複合体と同様の調節因子と複合体を形成することから、**SNF1** キナーゼの ortholog と考えられている。トランスジェニック植物を用いた解析から、糖誘導性の sucrose synthase (**Susy**) の遺伝子発現を昂進することが明らかになった。このことから、**SnRK1** は糖シグナリングにおける遺伝子発現制御に関与していると考えられている。しかし、**SnRK2**、3 の役割については不明である。

本研究では、初めにコムギの個体を用いて、栄養の変化による **WPK4** の mRNA 量の経時変化を詳しく解析した。土壌で育てた成熟個体における **WPK4** の組織特異性を解析したところ、葉、茎など主に光合成を行なう組織で mRNA が蓄積していた。根では殆ど蓄積は確認出来なかった。**WPK4** の mRNA はショ糖および無機塩飢餓により蓄積し、逆に、ショ糖および無機塩添加により減少した。糖の種類による応答特異性はショ糖にのみ見られ、グルコースあるいはガラクトースには応答しなかった。水耕栽培した培地の無機塩濃度により、サイトカイニンに対する応答性が反比例的に変化した。栄養とサイトカイニンとの関係を解析したところ、栄養添加とサイトカイニン添加の情報は拮抗的に作用し、その優位性は、相互の量に依存していることが示唆された。

WPK4 遺伝子翻訳産物を **GST** との融合タンパク質として調製し、自己リン酸化能を調べた。その結果、 Mg^{2+} イオンに依存した自己リン酸化能を持ち、そのリン酸化部位は非触媒領域の C 末端であることが分かった。これまでに、**SnRK1** あるいはカルシウム依存的キナーゼ (**CDPK**) が 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase (**HMGR**) の C 末端領域及び Nitrate reductase (**NR**) ヒンジ 1 領域のセリン残基をリン酸化することが報告されている。**WPK4** についてもこれらの領域のアミノ酸を基質としてリン酸化反応を調べた結果、これらのペプチドをリン酸化した。**WPK4** と **SnRK1** のキナーゼドメイン間では約 50% の相同性が認められることから、少なくとも *in vitro* では似たような基質特異性を示

すことが考えられる。これまでに、SnRK1は酵母*snf1*変異体相補し、モロコシのSnRK3ホモログ(*SNFL1*)は相補しないことが報告されている。WPK4についても相補性試験を行ったところ、全長では相補しなかったが、C末端の非触媒領域を欠いたキナーゼ領域だけの変異体で相補した。このことから、WPK4のC末端領域はキナーゼ領域に負の作用を及ぼす事が示唆された。

WPK4の生体内での役割を明らかにするために、WPK4と相互作用する因子を yeast two-hybrid法によって単離した。異なる2つのアイソフォームの14-3-3タンパク質が単離され、これらをTaWIN (*Triticum aestivum* WPK4 interacting factor)1、TaWIN2と命名した。TaWIN1はイネより単離されたGF14d(単子葉型)と高い相同性を示し、TaWIN2は ω 型と相同性が認められた。共にC末端側にEFハンドに似たモチーフが1箇所存在し、Ca²⁺イオンの関与が示唆された。TaWIN1、TaWIN 2 共に、WPK4のC末端の2箇所の領域(RPAPSLN, RFIpSGEPM: pSはリン酸化セリン)を介して、1分子のWPK4に対してダイマーのTaWIN1あるいはTaWIN2がWPK4のキナーゼ活性依存的に結合することが明らかになった。これらの2つの配列中のセリン残基は、*in vitro*で自己リン酸化されることがわかった。

一般的に、キナーゼ領域中のいわゆるアクティベーションループに保存されているスレオニン残基のリン酸化がキナーゼ活性に影響を与えることが知られている。WPK4においても、スレオニン残基をアラニン(T204A)あるいはグルタミン酸(T204E)に置換した変異体を作成し、これらとTaWIN1あるいはTaWIN2との結合能に影響を及ぼすかを調べた。その結果、野生型と比べ、T204Aで結合能が75%、T204Eで116%となった。このことは、WPK4においても、アクティベーションループ中のスレオニン残基のリン酸化がキナーゼ活性に影響を及ぼすことを示唆する。またTaWIN1のK60、R67、L185、V189、L233のアミノ酸がWPK4との結合に重要であることが明らかとなった。*in vitro*において、これらの異なるアイソフォームの14-3-3タンパク質がホモ、ヘテロダイマーを形成した。TaWIN1のmRNAはどの組織においても蓄積しており、WPK4のmRNAが蓄積する条件下でもその蓄積量は変化なかったことから、転写レベルでは制御されていないことが分かった。

以上のことから、SnRK3に属するWPK4がSnRK1に近い基質特異性を示したこと、そして14-3-3タンパク質という新規な因子と相互作用することを明らかにした。これまでに14-3-3タンパク質と結合するキナーゼが報告されているが、自己リン酸化依存的に結合するのはWPK4だけである。WPK4の基質となったNRは14-3-3タンパク質と結合して不活性化されることが報告されている。TaWIN1あるいはTaWIN2がWPK4によりリン酸化されたNRと結合する可能性もあり興味深い。これらの知見から、SnRK3に属するWPK4は代謝酵素群を直接リン酸化して活性調節を行うことが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 池田佳久

植物は外界の様々な刺激に応答し、環境の変化に適応する。その情報伝達系ではタンパク質のリン酸化が中心的な働きをする。栄養代謝に係わるプロテインキナーゼとしては、出芽酵母での炭素代謝系の調節因子である *SNF1* ファミリーに属するグループが知られている。植物の *SNF1* 関連遺伝子は3つのサブファミリーに分類され (*SnRK1*, *SnRK2*, *SnRK3*)、それぞれ、異なる機能を分担するらしい。*SnRK1* は糖シグナリングにおける遺伝子発現制御に関与する。しかし、*SnRK2*、*SnRK3* の役割については不明である。

コムギのセリン／スレオニンプロテインキナーゼである *WPK4* は *SnRK3* に属し、光、栄養飢餓、サイトカニンなどの刺激により mRNA が蓄積する。その蓄積は抗サイトカニン存在下で阻害される。したがって、光、栄養の情報はサイトカニンを介して伝達されていると考えられた。本研究では、*SnRK3* の機能を解析するために、*WPK4* をモデル系とし、コムギの個体を用いて、栄養応答をさらに詳しく解析した。*WPK4* の mRNA はショ糖および無機塩飢餓により蓄積し、逆に、ショ糖および無機塩添加により減少した。栄養とサイトカニンとの関係を解析したところ、栄養添加とサイトカニン添加の情報は拮抗的に作用し、その優位性は、相互の量に依存した。サイトカニンによる *WPK4* の活性化は糖合成を促進し、生じた糖はフィードバック的に *WPK4* を抑制することが示唆された。

WPK4 タンパク質は Mg^{2+} イオンに依存した自己リン酸化能を持ち、そのリン酸化部位は非触媒領域の C 末端であることが分かった。さらに、外来基質として 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase (HMGR) の C 末端領域、および Nitrate reductase (NR) ヒンジ1領域のセリン残基をリン酸化した。これらの結果は *WPK4* が栄養代謝系の酵素類をリン酸化し、活性調節することを示唆する。これを直接、証明するために、酵母 *snf1* 変異体の相補テストを行った。*WPK4* 全長では相補しなかったが、C 末端の非触媒領域を欠いたキナーゼ領域だけでは相補した。このことから、*WPK4* の C 末端領域はキナーゼ領域に負の作用を及ぼす事が示めされた。

さらに、*WPK4* と相互作用する因子を yeast two-hybrid 法によって単離した。異なる2つのアイソフォームの 14-3-3 タンパク質が単離され、これらを TaWIN1 および TaWIN2 と命名した。1 分子の *WPK4* に対してダイマーの TaWIN1 あるいは TaWIN2 が *WPK4* のキナーゼ活性依存的に結合することが明らかになった。さらに両者の相互作用を詳しく検討したところ、*WPK4* の 388 と 418 のセリン残基のリン酸化が必要であることが示された。また TaWIN1 の K60、R67、L185、V189、L233 のアミノ酸が *WPK4* との結合に重要であることも明らかとなった。TaWIN1 の mRNA はどの組織においても蓄積しており、*WPK4* の mRNA が蓄積する条件下でもその蓄積量は変化なかったことから、転写レベルでは制御されていないことが分かった。これらの実験から、*SnRK3* に属する *WPK4* が 14-3-3 タンパク質という新規な因子と相互作用すること、その複合体は代謝酵素群を直接リン酸化して活性調節を行うことが示唆された。

以上のように、本論文は栄養代謝に係わる情報伝達系の作用機構の本質に迫るもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。