

卒業論文

植物の浸透圧ストレスシグナル伝達系における
SnRK2 タンパク質リン酸化酵素の
新奇核内相互作用因子の単離

生命化学・工学専修 植物分子生理学研究室

平成 21 年度入学 福井 佑太

指導教員 篠崎 和子

目次

第1章 序論	・ ・ ・ ・ 1
第2章 方法と材料	・ ・ ・ ・ 6
第1節 Strep II-3×FLAG タグ融合 SRK2D タンパク質を発現する 形質転換体の作出	・ ・ ・ ・ 6
1 コンストラクトの作製	・ ・ ・ ・ 6
1-1 使用したベクター	
1-2 インサート DNA 断片の増幅	
1-3 制限酵素処理	
1-4 インサート DNA とベクターDNA の精製	
1-5 脱リン酸化処理	
1-6 ライゲーション	
1-7 大腸菌の形質転換	
1-8 コロニーPCR	
1-9 プラスミドの抽出 (ミニプレップ) 、精製	
1-10 コンストラクトの塩基配列の確認	
2 シロイヌナズナの形質転換体の作出	・ ・ ・ ・ 10
2-1 アグロバクテリウムの形質転換	
2-2 シロイヌナズナへの感染	
2-2-1 シロイヌナズナの生育条件	
2-2-2 感染用アグロバクテリウムの作製、シロイヌナズナへの感染	
2-3 形質転換種子の選抜	
第2節 SRK2D-sGFP タンパク質相互作用因子の単離	・ ・ ・ ・ 11
1 使用した植物体、培地、育成条件	・ ・ ・ ・ 11
1-1 使用した植物体	
1-2 使用した培地	
1-3 生育条件	
1-4 サンプルング、マンニトール処理	
2 μ MACS Anti-GFP Isolation Kit (Miltenyi Biotec 社) を用いた	

共免疫沈降	・ ・ ・ ・ 13
2-1 使用した Buffer 及びその組成	
2-2 植物体からのタンパク抽出	
2-3 共免疫沈降	
3 SDS-PAGE による抽溶出したサンプルの確認	・ ・ ・ ・ 13
3-1 使用した溶液、器具	
3-2 ゲルの作製、泳動	
3-3 ウェスタンブロッティングによる確認	
3-3-1 使用した溶液	
3-3-2 操作	
3-4 銀染色による確認	
3-4-1 使用した溶液	
3-4-2 染色操作	
4 LC-MS/MS による解析	・ ・ ・ ・ 17
4-1 SDS-PAGE、CBB 染色	
4-2 ゲル内トリプシン消化	
4-3 LC-MS/MS による解析	
第 3 章 結果	・ ・ ・ ・ 20
第 1 節 Strep II -3×FLAG タグ融合 SRK2D タンパク質を発現する 形質転換体の作出	・ ・ ・ ・ 20
第 2 節 SRK2D-sGFP タンパク質相互作用因子の単離	・ ・ ・ ・ 20
第 4 章 考察	・ ・ ・ ・ 33
参考文献	・ ・ ・ ・ 36
謝辞	・ ・ ・ ・ 38

第1章 序論

近年、地球温暖化や干ばつなど様々な環境問題が生じており、異常気象による食糧不足が懸念され続けている。現在 70 億人に達した世界人口も増加率が減少しているとはいえ、留まることなく増加しており、2050 年には世界人口が 91 億人にも達すると予測されている（国連人口基金, 2012；国際経済社会局, 2006）。世界の農業生産力には余力があるといわれてはいるものの、増加し続ける世界人口を背景に、干ばつや洪水などの異常気象は食糧生産に甚大な被害をもたらしていることも事実である。

より適した環境へ自由に移動できる動物とは異なって、植物は与えられる環境に応じて生きていくしかないゆえに環境応答の仕組みは複雑であり、様々な遺伝子が関与している。植物がさらされる環境ストレスの一つに浸透圧ストレスが挙げられる。このストレスに対する応答機構を解明することで、ストレス耐性作物の作出が可能となる。特に、今日では地球温暖化が進み、高温を伴う干ばつによる作物への被害が各地で生じているため、浸透圧ストレス応答機構の解明が重要視されていることは自明である。そこで本研究ではシロイヌナズナの浸透圧ストレス応答の機構の解明を目的に実験をおこなった。

シロイヌナズナをはじめとする高等植物の浸透圧ストレス応答では、タンパク質リン酸化酵素である SnRK2（SNF1-related protein kinase 2）が重要な役割を果たすことが知られている。SnRK2 タンパク質リン酸化酵素は浸透圧ストレス応答遺伝子のプロモーター領域に存在するシス因子である ABA 応答配列に結合する転写因子 AREB（ABA responsive element binding protein）を活性化し、LEA（late embryogenesis abundant）タンパク質などの浸透圧ストレス応答遺伝子の発現を制御している。

SnRK2 タンパク質リン酸化酵素は植物ホルモンのアブシシン酸（ABA）シグナル伝達経路において重要な働きを持つ（Umezawa et al., 2010）。通常条件下で SnRK2 は PP2C 脱リン酸化酵素（Protein phosphatase 2C）が結合していることにより、不活性型となっているが、植物が浸透圧ストレスを受けると、細胞内に ABA が蓄積する。そして、PYR/PYL/RCAR ABA 受容体が ABA を認識すると、PP2C と複合体を形成することで、SnRK2 の脱リン酸化が阻害され、その結果 SnRK2 が活性化される（Fujii et al., 2009; Umezawa et al., 2009）。この一連の反応を中心として、ABA シグナル伝達経路は大きく核内部と核外の細胞膜の 2 つに

分けて伝わるということが分かっている（図 1）。核内部の経路では SnRK2 が AREB 転写因子をはじめとした転写因子を活性化することで LEA タンパク質などを発現させることにより、ストレス耐性を獲得する。核外部の細胞膜における経路では SnRK2 がカリウムチャネルの KAT1 やアニオンチャネルの SLAC1 に作用することで気孔の閉鎖を引き起こす（Umezawa et al., 2010）。

本研究ではサブクラスⅢ SnRK2 に焦点をあてた。SnRK2 タンパク質は N 末端側のキナーゼ触媒部位と、C 末端側の領域に分けられる。さらに C 末端側の領域は前半部分の領域Ⅰと後半部分の領域Ⅱに分類される。領域Ⅰがすべての SnRK2 でよく保存されているのに対して、領域Ⅱには酸性アミノ酸に富んだ特徴的な配列が見られ、サブクラスⅠではグルタミン酸が多く、サブクラスⅡ、サブクラスⅢではアスパラギン酸が多いということが知られている（Yoshida et al., 2006）。これまでの研究から領域Ⅰでは浸透圧ストレスによる活性化に、Ⅱでは ABA による活性化に重要であることがわかっている（Yoshida et al., 2006）。領域Ⅱのアミノ酸配列の違いからサブクラスⅠからⅢまでに分類される SnRK2 は、ヒメツリガネゴケのような進化上初期に現れた陸上植物からシロイヌナズナといった高等植物にまで保存されていると考えられている。しかし、シロイヌナズナやダイズなどの高等植物では全てのサブクラスの SnRK2 が存在するのに対して、ヒメツリガネゴケではサブクラスⅢしか存在しない。またコケ植物と高等植物の間に進化上位置するシダ植物のイヌカタヒバではサブクラスⅢとサブクラスⅡは存在するがサブクラスⅠが存在しないことから、植物が進化する過程においてサブクラスⅢ、サブクラスⅡ、サブクラスⅠの順に SnRK2 を獲得したと考えられる。特にサブクラスⅢでは発芽、根の生長、気孔閉鎖など ABA シグナル伝達制御の重要な因子だということが明らかになっている（Fujii and Zhu, 2009 ; Fujita et al., 2009 ; Nakashima et al., 2009）。また、サブクラスⅢの *srk2d/e/i* の三重変異体は ABA 感受性が顕著に低下することや、乾燥ストレス耐性が顕著に低下していることが分かっている（Fujita et al., 2009）。サブクラスⅢ SnRK2 の生化学的な性質については、SRK2D、SRK2E、SRK2I が ABA や浸透圧ストレスによって強く活性化する（Boudsocq et al., 2004）。また、核内で AREB1 と相互作用し、浸透圧ストレスを加えられることによって、SRK2D が核内部へ移動することが知られている（Fujita et al., 2009 ; 図 2）。

以上の先行研究をふまえて、本研究では ABA を介さない浸透圧ストレス伝達経路においても、SnRK2 が核内部でなんらかの相互作用因子と結合し、浸透圧

ストレス応答性遺伝子の転写を活性化しているのではないかという仮説を立てた。そして、この仮説を検証するために、核内部で SnRK2 と相互作用する未知のタンパク質を単離することにした。尚、本研究においてはサブクラス III SnRK2 から SRK2D を用いて実験をおこなうことにした。SnRK2 サブクラス III の中で、SRK2E や SRK2I でなく、SRK2D について相互作用するタンパク質を単離する理由は、SRK2E は主に気孔で発現し、SRK2I は主に種子で発現するので、局所的な部分に対してのみ検証される恐れがあるのに対し、SRK2D は比較的植物体全体に発現するからである。

実際には以下のような方法を用いて SRK2D と相互作用するタンパクを単離した。まずタグ融合 SRK2D タンパク質を発現するシロイヌナズナの形質転換体を作成する。次に得られたサンプルをヌクレアーゼ処理した後に、共免疫沈降法によって SRK2D と相互作用するタンパク質複合体を単離する。そして、精製した SRK2D タンパク質複合体をウェスタンブロッティング、銀染色によって確認し、LC-MS/MS の解析によって同定をおこなう。

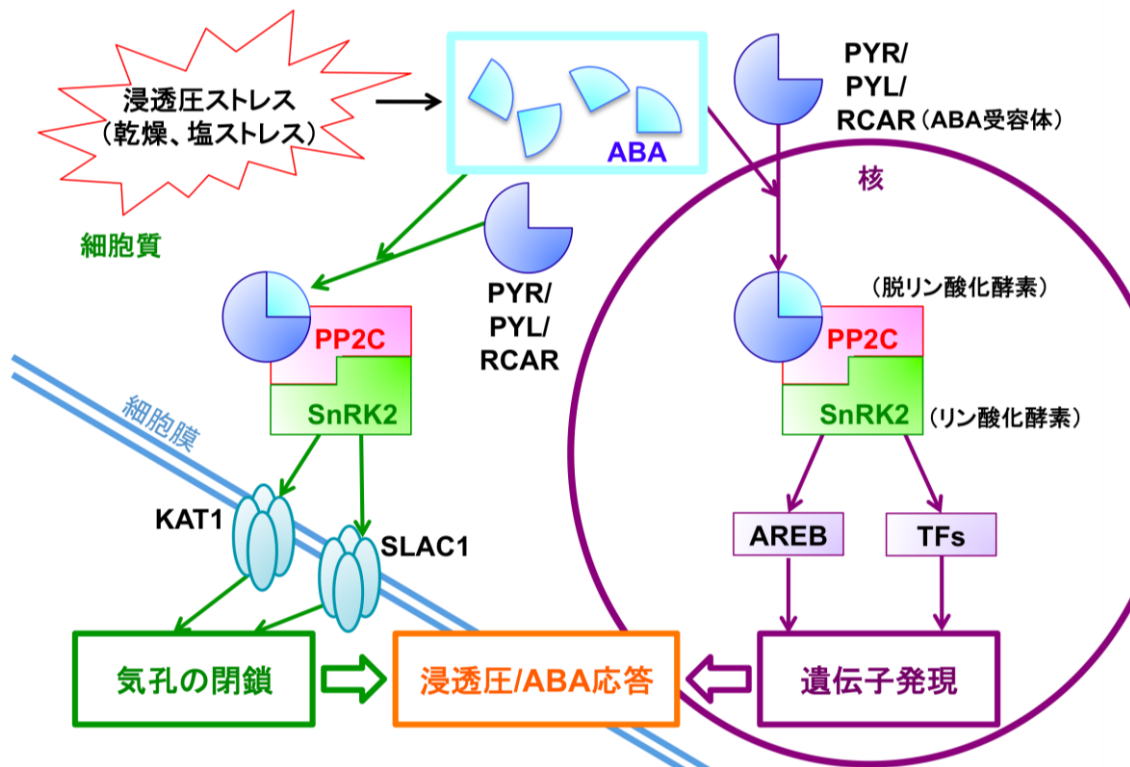


図1 シロイヌナズナの浸透圧ストレスシグナル伝達における SnRK2 の役割

SnRK2 タンパク質リン酸化酵素は植物ホルモンのアブシシン酸（ABA）シグナル伝達経路において重要な働きを持つ。通常条件下で SnRK2 は PP2C 脱リン酸化酵素が結合していることにより、不活性型となっているが、植物が浸透圧ストレスを受けると細胞内に ABA が蓄積する。そして、PYR/PYL/RCAR ABA 受容体が ABA を認識すると、PP2C と複合体を形成することで、SnRK2 の脱リン酸化が阻害され、その結果 SnRK2 が活性化される。この一連の反応を中心として、ABA シグナル伝達経路は大きく核内部と核外の細胞膜の 2 つに分けて伝わるのが分かっている。核内部の経路では SnRK2 が AREB 転写因子をはじめとした転写因子を活性化することで LEA タンパク質などを発現させることにより、ストレス耐性を獲得する。核外部の細胞膜における経路では SnRK2 がカリウムチャネルの KAT1 やアニオンチャネルの SLAC1 に作用することで気孔の閉鎖を引き起こす。

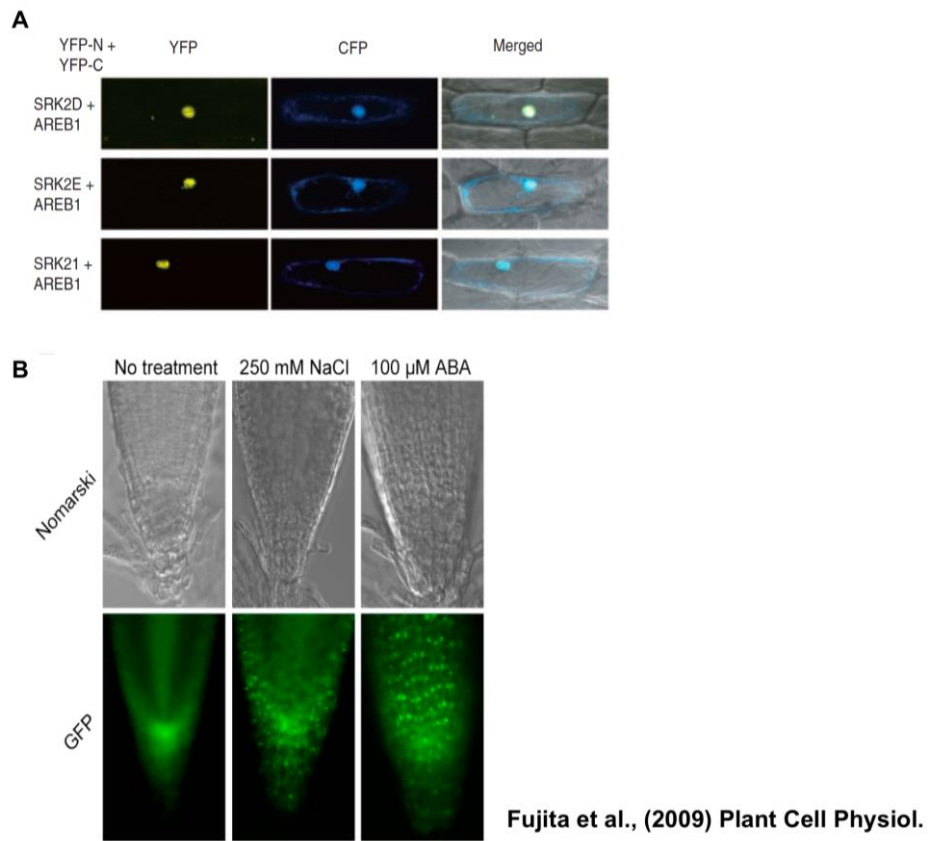


図2 サブクラスⅢ SnRK2 タンパク質の性質

A BiFC 法 (Bimolecular Fluorescence Complementation) によって、サブクラスⅢ SnRK2 タンパク質である SRK2D、SRK2E、SRK2I が核内で浸透圧ストレス経路において重要な転写因子である AREB1 と相互作用することがわかっている。

B SRK2D-GFP を発現する植物体に浸透圧ストレスをかけると、SRK2D-GFP は核内に移動することが知られている。

第2章 材料と方法

以下、特に指定のない場合、試薬は Wako のものを使用した。

第1節 Strep II-3×FLAG タグ融合 SRK2D タンパク質を発現する形質転換体の作出

1 コンストラクトの作製

1-1 使用したベクター

形質転換用ベクターには、pGHX:35S-Strep II-3×FLAG および pGHCSF を用いた。pGHX:35S-Strep II-3×FLAG は当研究室の草壁和也氏から分与して頂いたベクターであり、pGreen II 0129 をバックボーンとして作製されたものである。マルチクローニングサイト内の Xba I サイトに、Spe I /Xba I 認識配列をもつ Strep II 3×FLAG タグ (Strep II タグと 3 つの FLAG タグをつないだもの) が挿入されている。植物における選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子をもつ。pGHCSF は当研究室の吉田拓也特任助教から分与して頂いたベクターであり、pGreen II 0129 をバックボーンとした pGH:35S-sGFP を基に作製されたものである。マルチクローニングサイトの 3'側にある BamH I-EcoR V サイトに、BamH I-EcoR V 認識配列をもつ Strep II 3×FLAG タグが挿入されている。植物における選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子をもつ。

1-2 インサート DNA 断片の増幅

SRK2D の CDS を PCR で増幅させる際の鋳型 DNA には、当研究室の吉田拓也特任助教から分与して頂いた SRK2D 完全長 cDNA を用いた。PCR 反応には、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社) を用いて、目的配列を含むベクターと、それを増幅するプライマーで PCR をおこなった。PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.5 μL、5×PrimeSTAR buffer 10 μL、dNTP Mixture (2.5 mM) 4 μL、forward primer (10 pmol/μL) 0.5 μL、reverse primer (10 pmol/μL) 0.5 μL、鋳型 DNA 0.5 μL を混合し、MilliQ 水で 50 μL にメスアップし、PCR 反応液とした。反応条件は、[98 °C 5 分、(98 °C 10 秒、55 °C 5 秒、72 °C 1 分) ×30 サイクル、72 °C 7 分] でおこなった。使用したプライマーを表 1 に示す。PCR 反応後、PCR 産物をフェノール/クロロホルムで抽出してタンパク質を除き、エタノール沈殿をおこなうことで濃縮した。

1-3 制限酵素処理

濃縮したインサート DNA 断片と、ベクターDNA の制限酵素処理をおこなった。インサート DNA とベクターDNA の一部をアガロースゲル電気泳動にかけ、DNA の濃度を確認した後、タカラバイオ社の制限酵素を用いて、説明書通りに反応液を調製した。各 1 μ L の制限酵素、10 $\times$ buffer 1 μ L、適量のインサート DNA またはベクターDNA を混合し、MilliQ 水で 10 μ L とし、適当な温度で 3 時間インキュベートした。

1-4 インサート DNA とベクターDNA の精製

制限酵素で処理した後の DNA 断片を、GenElute Minus EtBr Spin Column (Sigma-Aldrich 社) を用いて精製した。制限酵素処理後の DNA 断片を全量、1 % アガロースゲルを用いて泳動した後、ゲルを紫外線に短時間当てて、インサート DNA またはベクターDNA のバンド部分をメスで切り取った。切り取ったバンドを、あらかじめ 100 μ L の TE で洗浄しておいた GenElute Minus EtBr Spin Column に入れ、15,000 rpm、室温で 10 分間遠心し、インサート DNA またはベクターDNA を抽出した。インサート DNA またはベクターDNA をフェノール/クロロホルム溶液により抽出し、タンパク質を除き、エタノール沈殿をおこなうことで濃縮した。

1-5 脱リン酸化処理

制限酵素処理したベクターDNA について、Rapid DNA Dephos Kit (Roche 社) を用いて脱リン酸化処理をおこなった。rAPid Alkaline Phosphatase 1 μ L、rAPid Alkaline Phosphatase Buffer, 10 $\times$ conc. 2 μ L、ベクターDNA 6 μ L、MilliQ 水 11 μ L を混合し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間静置し、脱リン酸化処理をおこなった。その後 75 $^{\circ}$ C で 2 分間処理し、rAPid Alkaline Phosphatase を失活させた。脱リン酸化処理後の反応液をそのままライゲーションに用いた。

1-6 ライゲーション

Rapid DNA Ligation Kit (Roche 社) を用いてライゲーションをおこなった。精製したベクターDNA 2 μ L、インサート DNA 0.5 μ L、MilliQ 水 1.5 μ L に、DNA Dilution Buffer 5 $\times$ conc. 1 μ L、T4 DNA Ligation Buffer 5 μ L、T4 DNA Ligase 0.5 μ L を加えて混合し、室温で 5 分間静置することでライゲーション反応をおこなった。

た。

1-7 大腸菌の形質転換

コンピテントセルには大腸菌 (*Escherichia coli*) K-12 株由来の DH5 α コンピテントセルを利用した。まず、氷上でコンピテントセルを融解し、その中に上記でライゲーションした溶液を 1 μ L 加え、氷上で 30 分間放置した。その後、42 $^{\circ}$ C の温浴に移し、30 秒間インキュベートして再び氷上に戻した。800 μ L の液体 LB を加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間震盪培養した。そのうちの 50 μ L を LBK 寒天培地に植菌した。そして、37 $^{\circ}$ C で 1 晩静置培養し、組換え体を得た。LB 培地は LB-Broth 20 g を MilliQ 水 1 L に溶かしたものを使用した。寒天培地を作製する場合はさらに、1 L あたり BA-10 を 15 g を加えて作製した。また、抗生物質は 100 mg/mL の硫酸カナマイシンを 250 μ L/L 加えた。

1-8 コロニーPCR

上記で得られたコロニーが目的のプラスミドを持っているのかをコロニー PCR で確認した。コロニーPCR には TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ社) を使用した。10 $\times$ Ex Taq Buffer 1 μ L、dNTP Mixture 0.8 μ L、forward primer 0.2 μ L、reverse primer 0.2 μ L、MilliQ 水 7.55 μ L、Extaq 0.05 μ L を混合して PCR 反応液とした。コロニーを爪楊枝でつついて反応液につけた後に、PCR 反応をおこなった。反応条件は [95 $^{\circ}$ C 5 分、(95 $^{\circ}$ C 20 秒、60 $^{\circ}$ C 20 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分) $\times$ 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C 7 分]でおこなった。得られた PCR 産物を 1 %アガロースゲルで電気泳動して、目的のインサートに相当するバンドが増えていることを確認した。

1-9 プラスミドの抽出 (ミニプレップ) 、精製

コロニーPCR で目的プラスミドを持っていることが判明したコロニーを爪楊枝でつついて、適切な抗生物質を加えた液体 LB 3 mL につけて、37 $^{\circ}$ C で一晩振盪培養した。培養液を 4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm で 1 分間遠心し、菌体ペレットを得た。以下、プラスミド抽出にはアルカリ法を用いた。

用いた溶液

Solution 1 : 50 mM glucose、25 mM Tris-HCl、10 mM EDTA

Solution 2 : 0.2 N NaOH、1% SDS

Solution 3 : 5 M 酢酸カリウム、11.5 % (v/v) 酢酸

事前に氷冷しておいた Solution 1 を 100 μ L 加え、菌体ペレットを懸濁した。200 μ L の Solution 2 を加えてチューブのふたを閉め、上下反転を繰り返して溶菌した。その後、氷冷した Solution 3 を 150 μ L 加え、氷上で 5 分間放置した。その後 10 μ L のクロロホルムを加え、ボルテックスでよく混合した。15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、上清を新しいチューブに移した。これを 2 回繰り返した。等量のイソプロピルアルコールを加えて室温で 2 分間放置し、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、上清を除去した。70 % エタノールを 1 mL 添加、ボルテックスして 15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心した。上清を取り除き、100 μ L の TE に溶かして RNase 10 μ L を加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間放置した。

等容量のフェノール/クロロホルム溶液を加えて、チューブミキサーで 5 分間混合し、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、上清を等容量のクロロホルム/イソミルアルコール溶液に移した。チューブミキサーで 3 分間混合し、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 3 分間遠心し、上清を取り出した。

2.5 倍量のエタノール/酢酸ナトリウム溶液を加えて転倒混合し、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心し、上清を除去した。70 % エタノールを等容量より少し多く加え、転倒混合し、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、室温で 5 分間乾燥させた後、50 μ L の TE に溶解させた。

1-10 コンストラクトの塩基配列の確認

ミニプレップにより得られたプラスミドの一部を制限酵素処理した後、電気泳動し、ミニプレップで得られたコンストラクトにインサート DNA が挿入されていることを確認した。

続いて、シーケンス反応をおこない、インサート DNA の塩基配列を確認した。まず以下の組成で反応液を調製した。[BigDye Terminator v3.1 Premix 1 μ L、Sequencing Buffer ($\times 5$) 1.5 μ L、forward primer (0.8 pmol/mL) 4 μ L、reverse primer (0.8 pmol/mL) 4 μ L、プラスミド 1 μ L、MilliQ 水 2.5 μ L]。反応条件は [96 $^{\circ}$ C 2 分、(96 $^{\circ}$ C 10 秒、50 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 4 分) $\times 30$ サイクル] でおこなった。PCR 終了後、75 %エタノールを 80 μ L 混合し、室温で 15 分静置し、DNA を沈殿させた。25 $^{\circ}$ C、14,000 rpm で 10 分遠心し、上清を除いた。[70 %エタノールを 200 μ L 添加し、25 $^{\circ}$ C、14,000 rpm で 10 分遠心し、上清を除く] 操作を 2 回繰り返すことで PCR 産物を精製、濃縮した。遠心濃縮機で沈殿を乾燥させ、シーケンスサンプルとした。DNA シーケンサーABI PRISM 3100 Genetic Analyzer

(Applied Biosystems 社) を用いて、ダイターミネーター法により塩基配列を解析した。

2 シロイヌナズナの形質転換体の作出

2-1 アグロバクテリウムの形質転換

pGreen の複製に必要であるヘルパープラスミド pSoup を保持した *Agrobacterium tumefaciens* GV301 のコンピテントセルを用いて形質転換をおこなった。コンピテントセル 25 μL に、濃度が 100 ng/ μL 以上であるプラスミドを 1 μL 混合し、氷上で 20 分間静かに置した。あらかじめ氷冷しておいた Gene Pulser Cuvette 0.1 cm gap (Bio-Rad 社) に、コンピテントセルを移し、Gene Pulser Xcell エレクトロポレーションシステム (Bio-Rad 社) にセットし、初期電圧 2400 V から指数関数的に減少する電気パルスを加え、プラスミドを形質転換した。その後 200 μL の LB 培地を Gene Pulser Cuvette 0.1 cm gap に加え、キューベットの内容物を 1.5 mL 容小型遠心管に移し、28 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間静置培養した。培養液 50 μL をとり、LBK 寒天培地に植菌し、28 $^{\circ}\text{C}$ で 2 晩培養し、形質転換体のシングルコロニーを得た。

シングルコロニーに、大腸菌と同様の方法でコロニーPCR をおこない、目的のプラスミドが形質転換されたことを確認し、そのコロニー由来のアグロバクテリウムを LBK 培地 2 mL に植菌し、28 $^{\circ}\text{C}$ で 1 晩震盪培養した。培養液から 500 μL をとり、500 μL の 30 %グリセロールと混合することで、グリセロールストックを作製した。グリセロールストックは-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

2-2 シロイヌナズナへの感染

2-2-1 シロイヌナズナの生育条件

プロフェッショナル用培土 (ダイオ化成社) 、プランター培土 (ISEKI 社) を等量ずつ混合し、プラントポット 2.5 号 ($\phi 80 \times \text{H}65$ 、大和プラスチック社) に入れた。このプラントポットに野生型植物または *srk2d/e/i* 三重変異体を播種し、明期 ($45 \pm 10 \mu\text{mol} \cdot \text{photons}/\text{m}^2/\text{s}$) 16 時間/暗期 8 時間、22 $^{\circ}\text{C}$ の条件のグロースチャンバーで生育させた。播種から 2 週間したら、1 ポットあたり約 10 個体になるように間引きした。播種から 4 週間後、シロイヌナズナの花茎を切り落とし、腋芽の生長を促した。播種から 5 週間後、開花した花と角果を切り落とし、アグロバクテリウムの感染に用いた。

2-2-2 感染用アグロバクテリウムの作製、シロイヌナズナへの感染

アグロバクテリウムのグリセロールストックを少量とり、LBK 寒天培地に塗布し、28 °Cで2晩培養した。培地に生えてきたコロニーを15個前後とり、15 mL 容遠心管に入った4 mL の YEP+Km 培地に植菌し、28 °Cで1晩震盪培養した。翌日、培養液を15,000 rpm、室温で2分間遠心し、上清を除いた。Infiltration medium 500 μ L を加え、菌体を懸濁した後、15,000 rpm、室温で2分間遠心した。上清を除き、Infiltration medium 1 mL を加え、菌体を懸濁した。

先太チップを用いて、懸濁したアグロバクテリウムを適量とり、シロイヌナズナの花序先端と茎生葉に付着させた。シロイヌナズナを、水で1000倍希釈した花工場 (住友化学園芸社) をはったバットに移した。2枚のOHPフィルムに穴をあけ筒状にし、上部にラップをかけたものをポットにかぶせ、シロイヌナズナの湿度を高く保った。1日後、ラップを外して風通しを良くし、感染前と同様の条件で約2ヶ月間生育させた後、種子を回収した。

2-3 形質転換種子の選抜

得られた種子を50 mL 遠心管に入れ、70 %エタノールを15 mL 加え、15秒間振って洗浄した。エタノールを除き、[次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素濃度1%)、0.02 % Triton X-100]の混合液を20 mL 加え、回転培養機で15分震盪する操作を5回繰り返し、種子をすすいだ。種子0.1 mL あたり5 mL の0.1 %アガロースを加え、ピペッティングで種子を攪拌した後、GMHC 寒天培地1枚あたり5 mL 播き、シャーレを傾けて種子を均等に広げた。シャーレをアルミホイルで包んで遮光し、4 °Cで3日間低温処理をおこなった後にグロースチャンバー [人口気象機 LH-350S (NK system 社)] に移し、22 °C、明期16時間/暗期8時間で生育させた。3週間後、シャーレ上で正常に生育した植物体を選び、土を詰めたセルフトレーに移植し、セルフトレーにラップをかけ、3日間湿度を高く保った。ラップを外し、風通しの良い状態にして温室 (22 °C) で生育させた。土はプロフェッショナル培養土 No.2 (ダイオ化成社) に、水で1000倍希釈した花工場と混ぜ合わせ、適度な湿り気をもたせたものを用いた。約2ヶ月後にT2種子を回収した。

第2節 SRK2D-sGFP タンパク質相互作用因子の単離

1 使用した植物体、培地、育成条件

1-1 使用した植物体

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型植物として Columbia エコタイプを用いた。独立行政法人国際農林水産業研究センターの藤田泰成博士から分与して頂いた、Columbia エコタイプに CaMV 35S プロモーターの制御下で SRK2D-sGFP を発現する形質転換体を用いて実験をおこなった。

1-2 使用した培地

培地には GM 寒天培地を使用した。GM 寒天培地 1 L あたりの組成は以下の通りである。[ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (日本製薬) 4.6 g, B5 ビタミン (GAMBORD' S VITAMIN SOLUTION 1000×) 1 mL, MES 0.5 g, Sucrose 30 g, Bacto agar 8.3 g]

まず、Bacto agar 以外のものを MilliQ 水に溶かし、KOH で pH を 5.7 に調製した。その後、1 L にメスアップをして Bacto agar を加え、オートクレーブにかけた。オートクレーブ終了後、硫酸カナマイシンは 100 mg/mL のものを 200 μ L/L 加え、深型滅菌シャーレ・FX(サンセイ医療器材株式会社)に 1 プレートあたり、40 mL ずつ分注し、GMK 培地とした。

1-3 生育条件

乾燥した種子を 70 %エタノールで洗い、1 % NaClO、0.02 % TritonX-100 溶液に 5 分浸して滅菌処理をおこなった。その後 MilliQ 水で 2 回洗い、GMK 培地に播種した。遮光した状態で 3 日間、4 $^{\circ}$ C の低温処理を行い、その後グロースチャンバー (CHL-301 トミー社、人工気象器 LH-350S NK system 社) に移して 22 $^{\circ}$ C、明期 16 時間/暗期 8 時間で 21~22 日間生育させた。

1-4 サンプルング、マンニトール処理

滅菌 MilliQ 水を入れた角シャーレ (greiner 社) 上にナイロン網にのせ、上記の条件で生育させた 50-100 個体 ($\approx$ 1-2 g) の植物体を移した。22 $^{\circ}$ C、明期 16 時間/暗期 8 時間のグロースチャンバーで 1 日間置き、馴化処理を施した。その後、無処理の植物体はキムタオル上で水を十分切り、アルミホイル包み液体窒素で凍結させ -80 $^{\circ}$ C で保存した。同様の期間生育させ馴化処理した植物体をナイロン網ごと 0.8 M マンニトール溶液を入れた別の角シャーレに移し、マンニトール処理を施した。22 $^{\circ}$ C のグロースチャンバー内で 1 時間浸してから同様に

サンプリングした。

2 μ MACS Anti-GFP Isolation Kit (Miltenyi Biotec 社) を用いた共免疫沈降

2-1 使用した Buffer 及びその組成

Lysis buffer : 1 % Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

Wash buffer 2 : 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)

Elution buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 50 mM DTT, 1 % SDS, 1 mM EDTA, 0.005 % bromophenol blue, 10 % glycerol

2-2 植物体からのタンパク抽出

植物 1 g に対して 3 mL の Lysis buffer を用意し、complete protease inhibitor (Roche 社) を Lysis buffer 50 mL あたり 1 錠加えた。液体窒素で冷やした乳鉢を用いてサンプリングした植物体をすり潰し、Lysis buffer に溶解させ、氷上で 20 分間放置した後、Benzonase (Merck4Biosciences 社) を植物体 1 g に対して 1 μ L 加えて 2 時間氷上で静置した。

続いて 5,000 g、4 °C で 10 分間遠心し、上清を、Miracloth を通して新しい 50 mL チューブに移した。得られた溶液を 1.5 mL チューブに移して再び 10,000 g、4 °C で 20 分間遠心し、上清を新しい 50 mL チューブに回収した。

2-3 共免疫沈降

μ MACS 添付の Anti-GFP microbeads を 50 μ L 加え、転倒混和して、氷上で 30 分間放置した。3~5 分前になったらスタンドを組み立て、 μ Column (Miltenyi Biotec 社) を固定し、Lysis buffer 100 μ L で洗った。サンプルを全量アプライし、そのアプライした量と同じ量の Lysis buffer で洗った。さらに、75 μ L の Wash buffer 2 で洗った。その後、事前に 95 °C で加熱しておいた Elution buffer を 20 μ L アプライし、5 分間放置した。回収用の 1.5 mL チューブを用意して、Elution buffer を 50 μ L アプライして、目的のタンパク質を溶出した。溶出したタンパク溶液は 95 °C で 3 分間処理して変性させ、-30 °C で保存した。

3 SDS-PAGE による抽溶出したサンプルの確認

3-1 使用した溶液、器具

A. 30 % アクリルアミド水溶液 (Wako)

B. 3.75 M Tris-HCl (pH 8.8) 1 % SDS 水溶液

C. 1.25 M Tris-HCl (pH 6.8) 1 % SDS 水溶液

D. 10 % APS (−30 °Cで保存)

Ammonium Peroxodisulfate 100 mg を 1 mL の MilliQ 水に溶かして作製した。

E. SDS-PAGE 泳動 buffer : 25 mM Tris-HCl 250 mM Glycine 0.1 % SDS

ゲル作製には、ATTO 社の AE-6401 型 ミニスクラブゲル作製キットを、泳動槽には ATTO 社の AE-6500 型 ラピダス・ミニスクラブ電気泳動槽を使用した。また、電源には BIO-RAD 社の Power Pac HC を用いた。ウエスタンブロッティングのブロッティングには BIO-RAD 社のトランスブロット SD セルを使用した。

3-2 ゲルの作製、泳動

ゲル溶液を以下の組成で作製した。ただし、D 液と TEMED はゲル板にアプライする直前に加えた。また、分離ゲルのアクリルアミド濃度はサンプルごとによって調整した。以下に記すのは 10 % の場合である。

分離ゲル A : 3 mL, B : 0.9 mL, MilliQ 水: 5.1 mL, 10 % D : 35 μ L,
TEMED : 5 μ L

濃縮ゲル A : 450 μ L, C : 300 μ L, MilliQ 水 : 2.25 mL, D : 9 μ L,
TEMED : 3 μ L

まず、ゲル溶液を作製し、ゲル作製キットを組み立ててから、分離ゲル溶液に D 液と TEMED を加えてそのうちの 6 mL をゲル板にアプライした。その上から MilliQ 水を重層して、空気を遮断した。チューブに残った溶液が固まったら、MilliQ 水を取り除き、MilliQ 水で洗浄した。その後、濃縮ゲル溶液に D 液と TEMED を加えて、そのうちの 2 mL をアプライし、コームをさして、1 時間程度放置した。

ゲルが固まったら、電気泳動槽にゲルをセットして 1 枚につき 10 mA の電流で 3 時間程度泳動した。

3-3 ウエスタンブロッティングによる確認

3-3-1 使用した溶液

Blotting buffer : 0.1 M Tris-HCl, 0.192 M Glycine, 5 % メタノール

TBST : 0.8 % NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1 % Tween20

3-3-2 操作

3-2に従いゲルを作製し、SDS-PAGEをおこなった。泳動終了後、ゲルの余分な部分を取り除いて Blotting buffer に浸けて 20 分程度震盪した。ゲルと同じ大きさにメンブレンとろ紙 2 枚を切った。メンブレンは適量のメタノールにつけて前処理をしてから、Blotting buffer につけて 10 分程度震盪した。電源には BIO-RAD 社の Power Pac HC を、ブロッティングには BIO-RAD 社のトランスブロット SD セルを使用した。まず、トランスブロット SD セルに下から、Blotting buffer に浸したろ紙、メンブレン、ゲル、ろ紙の順番に重ねた。そして、30 分間 10 V の電圧をかけた。

メンブレン 1 枚あたり 25 mL の 5 % スキムミルク/TBST 溶液を作製した。これをトレーに入れてブロッティングしたメンブレンを転写したタンパクの面が上になるようにいれた。4 °Cで一晩置き、翌朝 30 分程度震盪した。TBST で洗い、さらに TBST を加えて 30 分震盪した。

トレーの中の TBST を捨て、10 mL の TBST を加えて、そこに GFP 抗体 (Invitrogen) をメンブレンに直接触れないようにしながら 10 μ L 加えた。そして、メンブレンの上に溶液が浸る程度で、出来るだけゆっくり、1 時間震盪した。1 時間後、抗体溶液を捨て、TBST で 3 回すすいでから TBST を 25 mL 入れて 10 分震盪を 3 回行った。

その後、TBST を捨て、10 mL の TBST を加えて 2 次抗体 (セイヨウワサビペルオキシダーゼ修飾抗ウサギ IgG 抗体、サーモフィッシュヤーサイエンティフィック社) を 5 μ L 入れて、1 次抗体と同様に 1 時間震盪した。1 時間後、再び同様に TBST で洗った。

化学発光は SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (サーモフィッシュヤーサイエンティフィック社) を説明書の通りに使用した。検出には ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare 社) を用いた。

3-4 銀染色による確認

銀染色は GE Healthcare 社の PlusOne Silver Staining Kit, Protein を使用し、基本的な操作は付属の説明書通りにおこなった。

3-4-1 使用した溶液

(ゲル 1 枚につき、全ての溶液を 125 mL 調製した。)

Fixing Solution : エタノール 37.5 mL, 酢酸 12.5 mL, MilliQ 水 75 mL

Sensitizing Solution : エタノール 37.5 mL, チオ硫酸ナトリウム (5 % w/v)
5 mL, 酢酸ナトリウム 8.5 mL, MilliQ 水 82.5 mL,
グルタルアルデヒド(25 % w/v) 625 μ L

Silver Solution : 硝酸銀水溶液(2.5 % w/v) 12.5 mL, MilliQ 水 112.5 mL

Developing Solution : 炭酸ナトリウム 3.125 g, MilliQ 水 125 mL, ホルムアルデヒド (37 % w/v) 100 μ L

Stop Solution : EDTA-Na₂/2H₂O 1.825 g, MilliQ 水 125 mL

3-4-2 染色操作

泳動終了後、ゲルを Fixing Solution に浸けて一晩震盪した。次の日、Fixing Solution を取り除いて Sensitizing Solution を加え、60 分震盪した。Sensitizing Solution を除いて、MilliQ 水を加え 15 分間震盪した。これを 4 回繰り返した。

その後、Silver Solution を加えて 60 分間震盪し、MilliQ 水による洗浄を 1 分間×2 回行った。そして、Developing Solution を加え、様子を見ながら 5 分程度震盪し、Developing Solution を除去して Stop Solution を加えて 60 分間震盪した。ゲルイメージは、HP Officejet 7410 (HP 社) を用いてデジタル画像化した。

4 LC-MS/MS による解析

4-1 SDS-PAGE、CBB 染色

プレキャストゲルである Perfect NT GEL System M (DRC 社) を用いて、SDS-PAGE をおこなった。その後、CBB 染色をした。CBB 染色は以下の行程でおこなった。

CBB 染色液 : 0.25 % CBB R250、10 % メタノール、7 % 酢酸

CBB 脱色液 : 25 % メタノール、7.5 % 酢酸

まずトレイに 25 mL の CBB 染色液を入れ、30 分程度震盪した。その後、CBB 脱色液で軽くすすいでから、脱色液を加えて脇にキムワイプを入れて震盪した。バックグラウンドの色が抜けたら脱色液を除いて、MilliQ を加えて 1 時間程度震盪した。

4-2 ゲル内トリプシン消化

実験機にサランラップを敷き、その上に OHP フィルムを敷いて、その上で上

記の CBB 染色をおこなったゲルのタンパク質を泳動したレーンを切り出した。目的タンパク質、及びベクターコントロールのレーンは 10 等分をして、それぞれ 1.5 mL チューブに入れた。また、ゲル内トリプシン消化、LC-MS/MS による解析のコントロールとして BSA を 1 μ g 泳動し、バンドの部分を同様に切り出して同じく 1.5 mL チューブに移した。チューブに移す前に各ゲルにはカミソリで細かい切れ込みを入れた。

ゲルを入れた各チューブに 30 %アセトニトリル/25 mM NH_4HCO_3 を加えてボルテックスすることで、ゲルの色素を完全に除去した。300 μ L のアセトニトリルを加え、5 分間ボルテックスをしてから上清を除去した。これを二回繰り返した。遠心濃縮器で 1 時間程度遠心して、アセトニトリルを完全に除いた。各チューブに 300 μ L の 10 mM DTT/25 mM NH_4HCO_3 を加え、56 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間振盪し、上清を除去した。300 μ L の 25 mM NH_4HCO_3 を加えて室温で 15 分振盪し、上清を除去した。次に 300 μ L の 55 mM IAA/25 mM NH_4HCO_3 を加えて、室温で遮光をしながら 45 分振盪し、上清を除去した。再度 300 μ L の 25 mM NH_4HCO_3 を加えて室温で 15 分振盪し、上清を除去した。その後、400 μ L の 50 %アセトニトリル/25 mM NH_4HCO_3 を加えて、室温で 15 分振盪し、上清を除去した。遠心濃縮器で 1 時間程度遠心して、溶媒を完全に除いた。70 μ L の 1 μ g/1 μ L トリプシン/50 mM 酢酸を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ に一晩置いた。

翌朝、溶液が残っているものはそれを取り除いてから、150 μ L の 50 %アセトニトリル/5 %ギ酸を加えて、30 分間振盪し、上清を Ultra free-MC 0.45 μ m Filter Unit (Millipore 社) のチューブに移した。これを 2 回繰り返した。上清を移したチューブを 12,000 g で 2 分間遠心してフィルター濾過をおこなった。このペプチド溶解液を遠心濃縮機で乾くまで濃縮した。濃縮後のサンプルは解析まで 30 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

4-3 LC-MS/MS による解析

LC-MS/MS 解析は、共同研究機関である理化学研究所植物科学研究センター機能開発研究グループに依頼した。LC-MS/MS の機器には Eksigent NanoLC Ultra, TripleTOFTM 5600 System をオンライン接続した装置 (AB SCIEX 社) を、LC-MS/MS の解析ソフトには ProteinPilotTM Software 4.0 を使用した。検出した MS/MS の情報は、TAIR10 に載っているタンパク質情報を基にしたトリプシン消化により予測されるペプチド断片に対して、最も相同性の高い予測配列に帰

属させた。

表 1 コンストラクト作製に用いたプライマー

プロモーター	タグ	コンストラクト	ベクター	インサート		
				プライマー名	プライマーの配列(5'から3')	切断サイト (5'/3')
35S	Strep II- 3×FLAG	35S-Strep II-3×FLAG- SRK2D	pGHX35S-Strep II-3×FLAG	S2DF1	AAAGCGGCCGCATGGATCCGGCGGACT	Not I /Not I
				S2DR1	AAAGCGGCCGCTCAGAGAGCATAAAC	
		35S-SRK2D- Strep II-3×FLAG	pGHCSF	S2DF2	AAACCCGGGGATGGATCCGGCGGACTAAT	Sma I /Sma I
				S2DR2	AAACCCGGGGAGAGCATAAACTATCTC	

第3章 結果

第1節 Strep II-3×FLAG タグ融合 SRK2D タンパク質を発現する形質転換体の作出

シロイヌナズナの植物体から SRK2D 相互作用タンパク質を精製するため、タグ融合 SRK2D タンパク質を発現する植物体を作成した。本実験においては、タグとして比較的分子量の小さい Strep II-3×FLAG を使用した。作製したコンストラクトは pGHX:Strep II-3×FLAG-SRK2D と pGHX:SRK2D-Strep II-3×FLAG である (図 3 A)。pGHX:Strep II-3×FLAG-SRK2D は、pGHX:35S-Strep II-3×FLAG ベクター (図 3 B) に S2DF1、S2DR1 のプライマー (表 1) を用いて PCR によって増やした SRK2D のインサート DNA (図 3 C) を挿入することで作製した。ライゲーション後のプラスミドを制限酵素処理することによって、インサート DNA が挿入されていることを確認した (図 3 D)。同様に、S2DF2、S2DR2 のプライマー (表 1) を用いて PCR によって増やした SRK2D のインサート DNA (図 3 C) を、pGHCSF ベクターに挿入することで pGHX:SRK2D-Strep II-3×FLAG を作製した (図 3 D)。

作製したコンストラクトの塩基配列を、DNA シーケンサーABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いたダイターミネーター法により解析した。得られたシーケンスデータから目的のコンストラクトである、pGHX:Strep II-3×FLAG-SRK2D と pGHX:SRK2D-Strep II-3×FLAG が作製できていることを確認した。アグロバクテリウムにこれらコンストラクトを形質転換し、野生型シロイヌナズナ (Col-0) に感染させた。

Strep II-3×FLAG-SRK2D を発現する植物体においては、得られた T1 種子を抗生物質としてハイグロマイシンを加えた GM 寒天培地によって選抜した後に、それらの植物体から T2 種子を採集した。現在はそれら形質転換体における SRK2D の発現量をノーザンブロットィングにより確認するために、GMH 寒天培地に播種して、12 日間生育させた植物体をサンプリングしたところまで実験をすすめた。SRK2D-Strep II-3×FLAG を発現する植物体においては、現在抗生物質としてハイグロマイシンを加えた GM 寒天培地によって T1 植物の選抜をおこなっている。

第2節 SRK2D-sGFP タンパク質相互作用因子の単離

シロイヌナズナ植物体から SRK2D 相互作用タンパク質を精製するため、共免疫沈降法を用いて SRK2D を含むタンパク質複合体を抽出した。共免疫沈降法の方法となるタグ融合 SRK2D タンパク質を発現する植物体として、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーター制御下で SRK2D-sGFP 融合タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナ種子を藤田泰成博士から分与して頂いた。

サブクラス III SnRK2 が核内で AREB1 と相互作用し、また浸透圧ストレスを加えることで SRK2D が核内部へ移動するという先行研究の結果をふまえて (Fujita et al., 2009)、本研究では ABA を介さない浸透圧ストレス伝達経路においても、SnRK2 が核内部でなんらかの相互作用因子と結合し、浸透圧ストレス応答性遺伝子の転写を活性化しているのではないかという仮説を立てた。

まず、この仮説に基づいて SRK2D-sGFP 発現形質転換体を用い、無処理の植物体あるいは 0.8 M のマンニトールによる浸透圧ストレス処理をおこなった植物体をサンプルとした。陰性対照として、sGFP を発現する形質転換体を用いた。そして、核内部の SnRK2 を単離する方法としてヌクレアーゼを用いた手法をとった (図 4)。ベンゾネースヌクレアーゼによって実際に核タンパク質を可溶化画分に溶出することが出来ているかどうかを確認するために、Histone H3 抗体を用いたウェスタンブロッティングをおこなった。液体窒素で凍結させた植物体を乳鉢ですり潰し、バッファーに溶解させ、5,000 ×g、4 °C、10 分で遠心した。遠心する前のサンプルをインプットとし、ウェスタンブロッティングにより Histone H3 抗体で検出したところ、インプットと上清画分に Histone H3 のバンドが検出された (図 5)。

このようにして得られた上清から、μMACS Anti-GFP Isolation Kit (Miltenyi Biotec 社) 付属の Anti-GFP microbeads を用いた共免疫沈降によって SRK2D-sGFP を含むタンパク質複合体を抽出した。この画分に SRK2D-sGFP が精製されていることを確認するために抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングをおこなった。ウェスタンブロッティングの結果から 65 kDa 付近に SRK2D-sGFP のバンドが検出された (図 6 A)。さらに、タンパク質の構成パターンを確認するため、この画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、銀染色に供した。0.8 M のマンニトールによるストレス処理を加えたものと加えていないものを比較すると、①と記した 45 kDa 付近のバンドに関して、マンニトール処理を加えたものに関してのみ、バンドが確認された (図 7 A)。

得られた結果に再現性があるかどうかを確認するために、再び同条件の共免

疫沈降によって得られたタンパク質のサンプルを用いて、ウェスタンブロッティング、および銀染色による評価をおこなった。抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果より、SRK2D-GFP を含むタンパク質複合体が精製できていることを確認した (図 6 B)。また、銀染色の結果から、1 回目におこなった銀染色の結果の 45 kDa 付近のバンドに関してマンニトール処理の有無の両方のサンプルに関して、③で示したように今度はバンドが確認された。sGFP と SRK2D-sGFP 以外で濃いバンドを示したものは、SRK2D-sGFP のサンプルにおける②で示した分子量 110 kDa 付近のバンドと、全てのサンプルにおける④で示した分子量 25 kDa のバンドであった (図 7 B)。

共免疫沈降法により SRK2D-sGFP が精製できており、かつサンプル中に SRK2D を含むタンパク質複合体が存在することが確かめられたので、SRK2D 相互作用因子を同定するために LC-MS/MS による解析をおこなった。LC-MS/MS 解析は共同研究をおこなっている理化学研究所植物科学センター機能開発研究グループの高橋史憲博士に依頼した。LC-MS/MS による解析の結果から、それぞれのサンプルについて ProteinPilot™ により同定率 95%以上とされたペプチドおよびタンパク質を本実験で同定されたものとした。また、1 種類のサンプルを 3 分割して LC-MS/MS で解析したため、1 種類のサンプルの中で重複して同定されたタンパク質を除き、単一タンパク質の数を示した (表 2)。無処理あるいはマンニトール処理をおこなった SRK2D-sGFP 発現植物体から調製したサンプルを LC-MS/MS 解析に供した結果、それぞれ 10 個、2 個のタンパク質が同定された。無処理あるいはマンニトール処理をおこなった sGFP 発現植物体からは、それぞれ 1 個、7 個のタンパク質が同定された。各サンプルから同定されたタンパク質の集合関係をベン図に示した (図 8)。

SRK2D-sGFP を発現する植物体を用いたサンプルから同定されたタンパク質から、陰性対照である sGFP を発現する植物体を用いたサンプルから同定されたタンパク質を除くことで、SRK2D 特異的な相互作用タンパク質を示した (表 3、4)。無処理のサンプルからは、SRK2D 以外に 8 個のタンパク質が同定された (表 3)。それぞれのタンパク質の細胞内局在性について SUBA3 データベースを用いて調べた結果 (Tanz et al., 2013)、核局在性タンパク質が 1 個、細胞質局在性タンパク質が 2 個、細胞膜局在性タンパク質が 1 個、色素体局在性タンパク質が 2 個、細胞外局在性タンパク質が 2 個であった。マンニトール処理をおこなったサンプルからは、SRK2D 以外に細胞質局在性タンパク質が 1 個同定さ

れた（表4）。SRK2D-sGFP 発現植物体から調製したサンプルで特異的に同定されたタンパク質のうち、無処理時とマンニトール処理時で共通していたタンパク質は SRK2D だけであった（図8）。

表 2 LC-MS/MSによって検出されたタンパク質の数

植物体	ストレス	同定された ペプチド数 (95 %)	同定された タンパク質数 (95 %)	同定された単一 タンパク質数 (95 %)
35S:SRK2D-sGFP	無処理	47	11	10
35S:SRK2D-sGFP	0.8 Mマンニトール	13	2	2
35S:sGFP	無処理	2	1	1
35S:sGFP	0.8 Mマンニトール	18	7	7

ProteinPilotTM Software 4.0の解析ソフトにより同定率95 %以上とされたペプチド、タンパク質の数を示した。
1つのサンプルを3分割してLC-MS/MSのサンプルとしたため、単一サンプル内で重複したタンパク質から、
同定されたタンパク質を除いたものの数を同定された単一タンパク質数とした。

表 3 LC-MS/MSによって同定されたタンパク質 (無処理時)

AGI code	タンパク質名	コードされるタンパク質	同定された ペプチド数 (95 %)	ペプチドの カバー率 (%)	細胞内局在
AT3G50500	SRK2D	SNF1-related protein kinase 2.2	32	49.1	核
AT3G16530		Legume lectin family protein	1	27.9	細胞外
AT3G26650	GAPA	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit	1	18.4	色素体
AT4G23940	ARC1	FtsH extracellular protease family	1	12.7	色素体
AT1G78340	ATGSTU22	glutathione S-transferase TAU 22	1	9.2	細胞質
AT1G77620		P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	1	4.1	核
AT5G60390		GTP binding Elongation factor Tu family protein	1	4	細胞質
AT5G19740		Peptidase M28 family protein	1	3.1	細胞外
AT2G37280	ABCG33	pleiotropic drug resistance 5	1	1.8	細胞膜

ProteinPilotTM Software 4.0の解析ソフトにより同定率95 %以上とされたペプチドの数とそのカバー率を示した。
細胞内局在についてはSUBA3 (<http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/>) のデータベースを基にした。

表 4 LC-MS/MSによって同定されたタンパク質 (0.8 Mマンニトール処理時)

AGI code	タンパク質名	コードされるタンパク質	同定された ペプチド数 (95 %)	ペプチドの カバー率 (%)	細胞内局在
AT3G50500	SRK2D	SNF1-related protein kinase 2.2	12	46.6	核
AT1G12360	KEU	Sec1/munc18-like (SM) proteins superfamily	1	14.7	細胞質

ProteinPilotTM Software 4.0の解析ソフトにより同定率95 %以上とされたペプチドの数とそのカバー率を示した。
細胞内局在についてはSUBA3 (<http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/>) のデータベースを基にした。

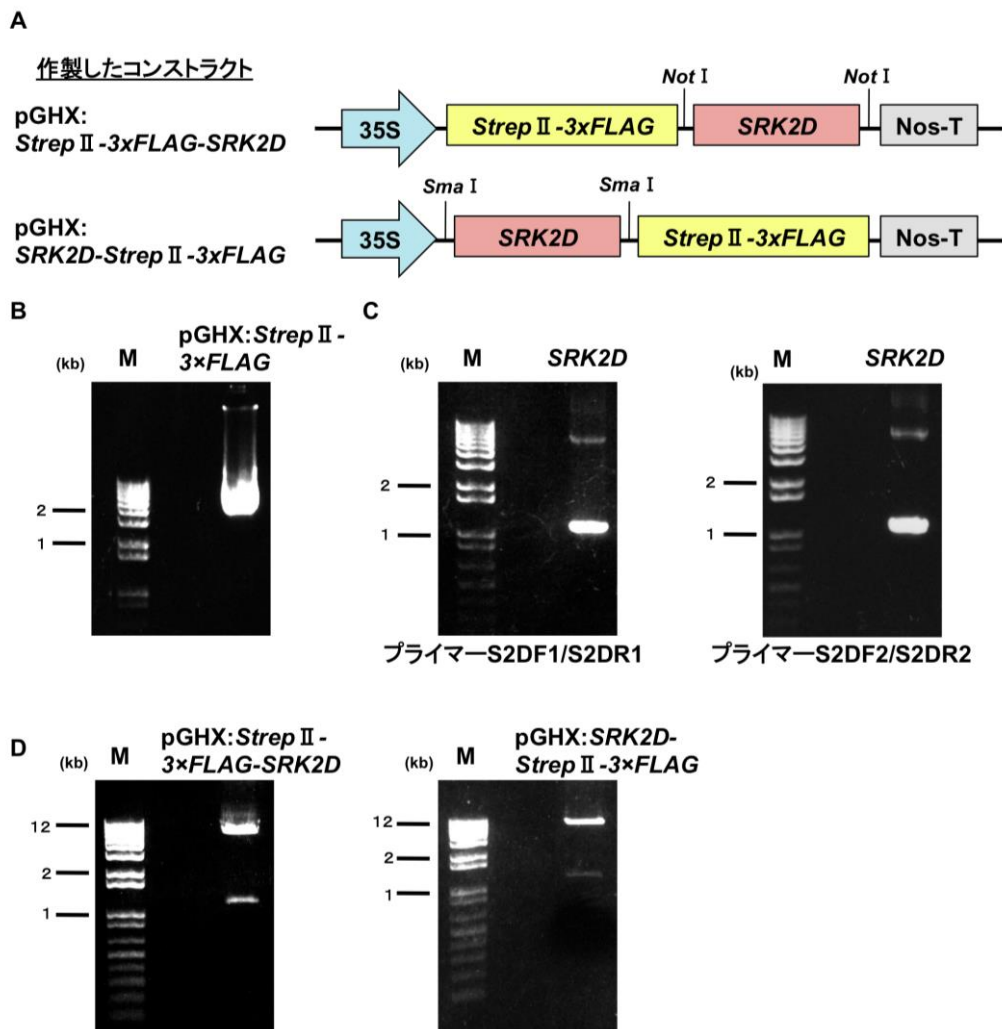


図3 本実験で作製したプラスミド

A 本実験で作製したプラスミドの模式図。作製したコンストラクトは pGHX:Strep II-3xFLAG-SRK2D 並びに、pGHX:SRK2D-Strep II-3xFLAG である。

B pGHX:Strep II-3xFLAG をミニプレップした結果。M は分子量マーカ。

C SRK2D を PCR 反応により増幅させた結果。M は分子量マーカ。

D 精製したコンストラクトを制限酵素処理した結果。M は分子量マーカ。

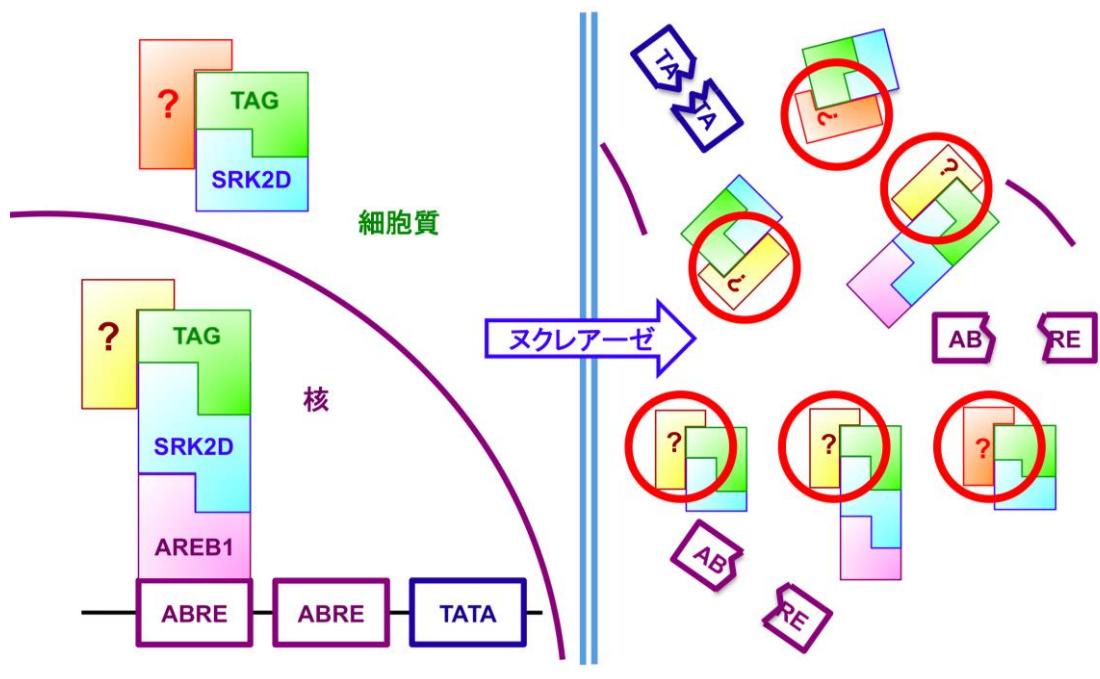


図4 SRK2Dを単離するにあたって、ヌクレアーゼ処理によって細胞内で生じることの概念図

SRK2Dは細胞質にも核内にも存在する。ただ、目的の核内のSRK2DはAREB転写因子を介してその認識配列であるABRE配列と結合している可能性がある。そこで、ヌクレアーゼ処理を施すことで、ABRE配列などのDNA配列を分解することにより、可溶性画分に細胞質に存在するSRK2Dと核内に存在するSRK2Dを持ってくるのが可能になる。つまり、赤く丸で囲った目的の相互作用因子が同じ画分に抽出できる。

ウエスタンブロッティング: Histone H3抗体

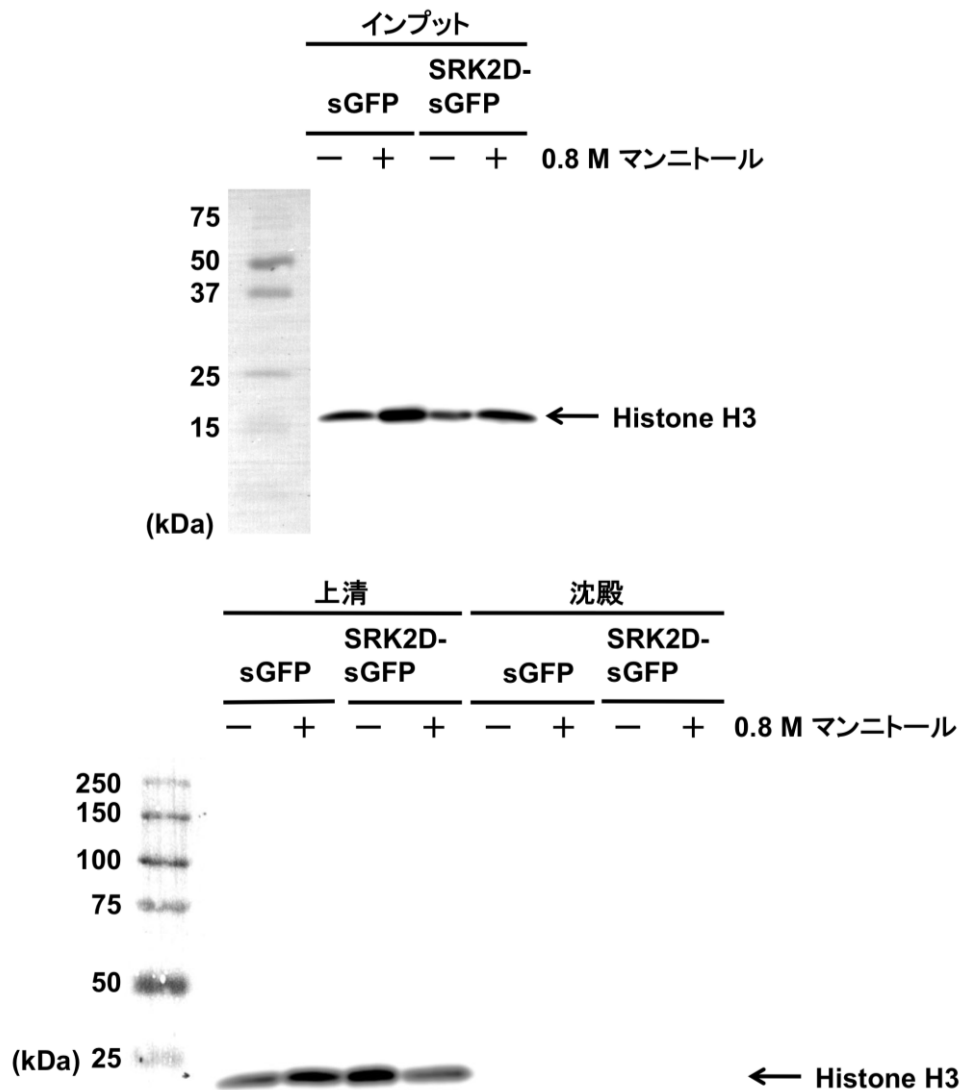


図5 ウエスタンブロッティングによる、SRK2D-sGFP 過剰発現体における共免疫沈降実験系における核内物質の可溶化画分への移動の評価

1次抗体には抗 Histone H3 抗体、2次抗体には Anti rabbit HRP 抗体を使用した。

植物体を破碎した後、ミラクロスにて濾過し、これをインプットとした。その後ヌクレアーゼ処理を2時間施した。上清と沈殿画分の分離条件は、5000 g、4 °C、10 分の条件で遠心した。

ウエスタンブロッティング:GFP抗体

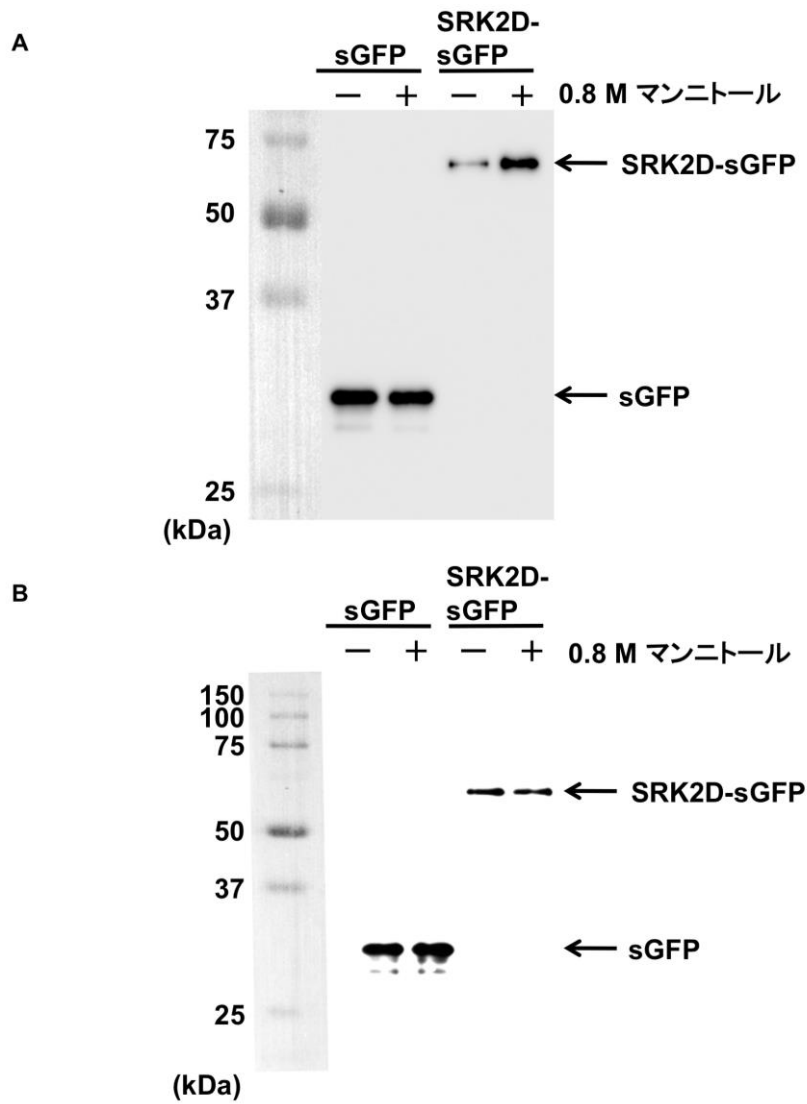


図6 ウエスタンブロッティングによる、SRK2D-sGFP 過剰発現体における共免疫沈降の評価

1次抗体には抗GFP抗体、2次抗体にはAnti rabbit HRP抗体を使用した。

A 1回目の結果

B 2回目の結果

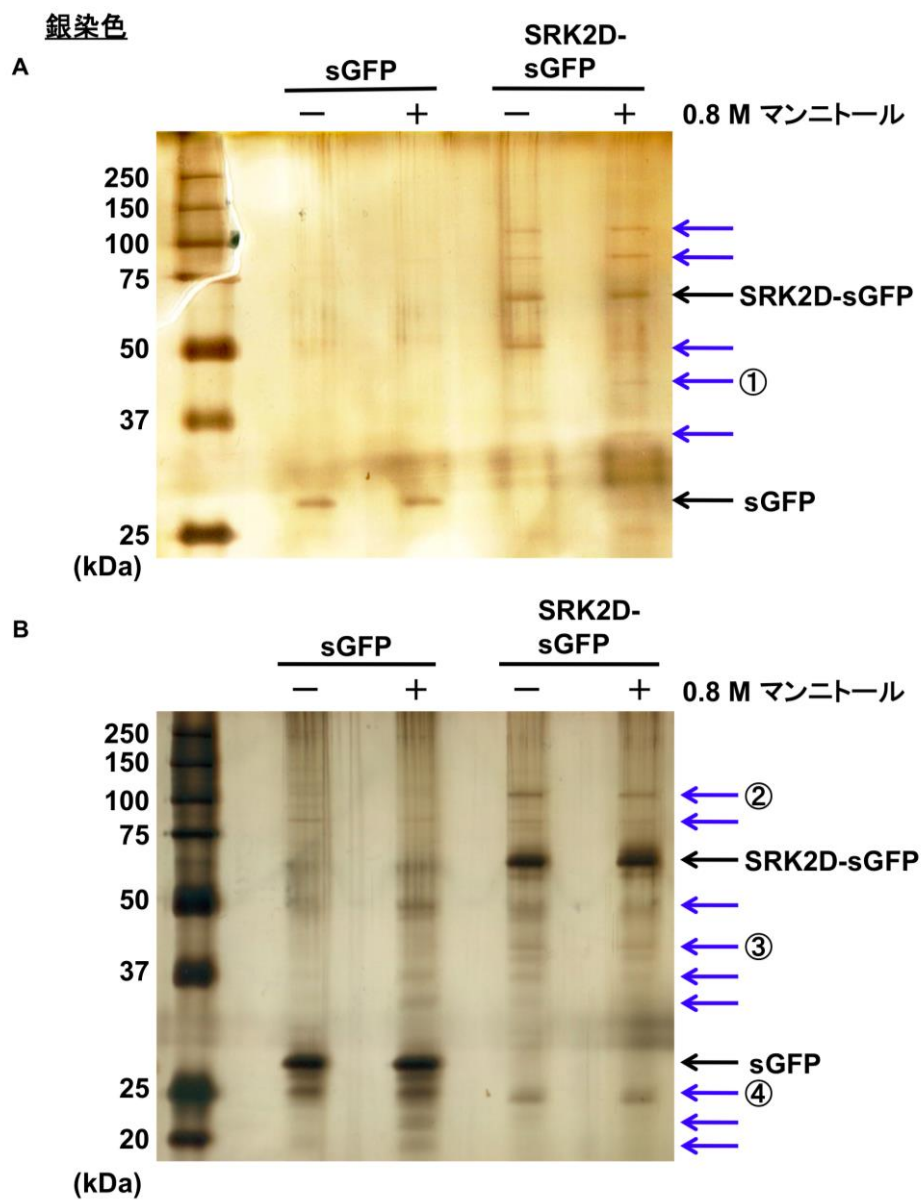


図 7 銀染色による、SRK2D-sGFP 過剰発現体における共免疫沈降の評価
SRK2D-sGFP、sGFP 以外の確認できるバンドを青の矢印で示した。

A 1 回目の結果

B 2 回目の結果

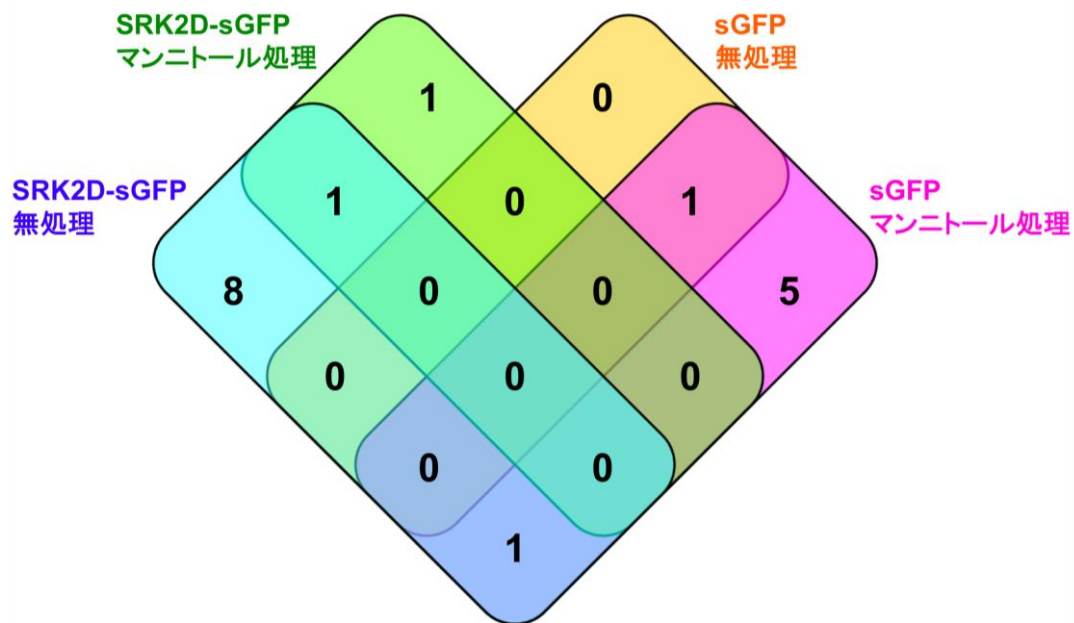


図8 LC-MS/MSによって検出されたタンパク質の集合関係

LC-MS/MSによって検出された同定率95%以上とされたタンパク質をサンプルに含まれる相互作用タンパク質としてその数を示した。また、その集合関係を色付きの角丸四角形で表した。SRK2D-sGFP発現植物体から調製したサンプルで特異的に同定されたタンパク質は無処理時に9個、マンニトール処理時に2個であり、共通していたタンパク質はSRK2Dだけであった。

第4章 考察

本研究では ABA を介さない浸透圧ストレス伝達経路において SRK2D タンパク質が核内部で結合する相互作用因子を単離、同定するという目的で、ヌクレアーゼ処理を用いた共免疫沈降法により SRK2D を含むタンパク質複合体を精製し、LC-MS/MS 解析により SRK2D 相互作用タンパク質の候補を同定した。SRK2D-sGFP 特異的に精製されたタンパク質として、無処理のサンプルからは 8 個、マンニトール処理を施したサンプルからは 1 個のタンパク質が同定され、浸透圧ストレスの有無に関わらず共通して同定されたタンパク質は、SRK2D 以外に存在しなかった（表 3、表 4）。銀染色によりストレス前後でバンドパターンに違いが見られたこととあわせて考えると（図 7 A）、SRK2D は浸透圧ストレスの有無によって相互作用するタンパク質を変化させているのかもしれない。また、銀染色の結果（図 7 A）、マンニトール処理を施したサンプルにのみ検出されている①で示した 45 kDa 付近のバンドについて考察を試みる。マンニトール処理を施した SRK2D-sGFP 発現植物体のサンプルから同定された KEU タンパク質は分子量が 75 kDa であるが、マンニトール処理を施した植物体を乳鉢で破砕した際、あるいはその後の抽出操作の際に KEU タンパク質が分解されたと仮定すると、KEU の分解産物が銀染色で特異的に検出された 45 kDa 付近のバンドに相当する可能性は考えられる。一方、二回目におこなった銀染色ではマンニトール処理の有無に関わらず 45 kDa 付近でバンドが検出されている（図 7 B）。これに関しては一回目の銀染色の結果よりも二回目の銀染色の結果のほうが検出されたバンドの数が多かったことから、KEU とは異なる別のタンパク質が検出されているのかもしれない。KEU タンパク質は小胞輸送で重要な働きを持つ Sec1 タンパク質ファミリーに含まれており（Assaad et al., 2001）、浸透圧ストレス時に SRK2D によりリン酸化されることで活性化され、細胞内で何らかの物質を輸送することで浸透圧ストレス応答に関与していると推測される。

本実験で同定されたタンパク質の局在に焦点をあててみる。SRK2D 相互作用因子の候補として、重複を除き 9 個のタンパク質が同定されたが、そのうち核局在性タンパク質が 1 個、細胞質局在性タンパク質が 3 個であった（表 3、表 4）。SRK2D タンパク質リン酸化酵素は核および細胞質で PP2C 脱リン酸化酵素である ABI1 と相互作用し、また核内で AREB 転写因子と相互作用することが既に知られているが（Fujita et al., 2009）、今回の LC-MS/MS 解析では ABI1 などの

PP2C および転写因子は検出されなかった。唯一核局在性タンパク質として同定されたタンパク質についてもペプチドのカバー率が 4.1 %しかないことから (表 3)、SRK2D と相互作用するタンパク質のうち、核局在性タンパク質は比較的微量であることが予想され、核局在性タンパク質を効率よく同定されるように実験系をもう一度見直す必要がある。

ABI1 や AREB1 など既知の SRK2D 相互作用タンパク質が検出されなかったことから、今回の LC-MS/MS 解析で検出された同定率 95 %以上のペプチドおよびタンパク質の数は実際より少なかったと予測される。その理由としては、LC-MS/MS のサンプル調製の際にプレキャストゲルに流し込むサンプルのタンパク質量が少なかったこと、LC-MS/MS のサンプル作製の際にゲルからタンパク質を完全に溶出できていなかったことが考えられる。今回は各サンプルを植物体 100 個体、約 2 g から共免疫沈降することで調製したが、植物体を 200 個体などの倍量にすることや、ゲルからのタンパク質抽出溶液の組成などを変えることによって、LC-MS/MS 解析においてより多くのペプチド、タンパク質を同定し、ABI1 などの既知の SRK2D 相互作用タンパク質を検出できると考えられる。また、今回の実験ではタグの中でも比較的分子量の大きい sGFP を使用した。そのため、SRK2D の機能またはコンフォメーションに何らかの影響を及ぼしている可能性がある。今後は、本実験で作出した SRK2D-Strep II -3×FLAG 融合タンパク質を発現する形質転換体を用いて同様の実験をおこない、SRK2D 相互作用タンパク質の単離、同定に適したタグを検証する必要があると考えられる。

本研究において、LC-MS/MS による解析はまだ一度しかなされていないので、今回だけの結果を用いて色々と推測するのは信頼性が十分でないと言える。よって、実験条件などは細かく改善をしながら何度か同様の実験をおこなう必要がある。また、本研究は ABA を介さない浸透圧ストレス伝達経路においても、SnRK2 が核内部でなんらかの相互作用因子と結合し、浸透圧ストレス応答性遺伝子の転写を活性化しているのではないかという仮説に基づいておこなわれている。そして、共免疫沈降法を用いて SRK2D を含むタンパク質複合体を抽出して、その複合体に含まれるタンパク質を同定することで SRK2D を活性化させる未知の因子を明らかにしようとした。しかし、ABA を介さない浸透圧ストレス伝達経路においても、ABA を介した浸透圧ストレス伝達経路同様に、SRK2D が不活性化状態のときは SRK2D にタンパク質脱リン酸化酵素である PP2C が結合していると考えられる。したがって、SRK2D を含むタンパク質複合体を単離し

でも、SRK2D の活性制御に関わる未知の因子よりも、SRK2D により制御される下流のタンパク質がその相互作用因子として同定される可能性が高い。そこで、更なる解析を進めていくにあたって今後は SRK2D の上流制御因子である ABI1 を含む PP2C についても本実験同様に相互作用因子の探索を進める。

参考文献

Assaad, FF., Huet, Y., Mayer, U., Jürgens, G., (2001) The Cytokinesis Gene KEULE Encodes a Sec1 Protein That Binds the Syntaxin KNOLLE. *J. Cell Biol.* 152: 531-543.

Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., Lauriere, C. (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279: 41758-41766.

Fujii, H., Zhu, JK. (2009) *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 8380-8385.

Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Three SnRK2 Protein Kinases are the Main Positive Regulators of Absciscic Acid Signaling in Response to Water Stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50: 2123-2132

Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Three *Arabidopsis* SnRK2 Protein Kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, Involved in ABA Signaling are Essential for the Control of Seed Development and Dormancy. *Plant Cell Physiol.* 50: 1345-1363.

Tanz, SK., Castleden, I., Hooper, CM., Vacher, M., Small, I., Millar, HA. (2013) SUBA3: a database for integrating experimentation and prediction to define the SUBcellular location of proteins in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 41: D1185-D1191.

Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., Shinozaki, K. (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in

Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106: 17588-17593.

Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. Plant Cell Physiol. 51: 1821-1839.

Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., Shinozaki, K. (2006) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. J. Biol. Chem. 281: 5310-5318.

国連人口基金 (2012) 世界人口白書 2012

国連経済社会局 (2006) 世界人口推定・予測値

謝辞

本研究をおこなうにあたって何1つ不自由のない恵まれた環境を与えてくださり、学業、進路にわたってご指導、ご助言を頂いた植物分子生理学研究室の篠崎和子教授に深く感謝申し上げます。ならびに、本研究にあたりご支援頂いた植物分子生理学研究室の吉田拓也特任助教に感謝致します。特に吉田拓也特任助教には研究を進めるにあたり実験計画、実験方法についての的確なご指導、貴重なご助言を頂き、そして本論文の執筆の際にも透徹した思考力の育成に尽力して頂きましたことを重ねてお礼申し上げます。また、実験材料を提供して頂いた、独立行政法人国際農林水産業研究センターの藤田泰成博士に深く感謝致します。本研究において LC-MS/MS の機器を用いて解析して頂いた共同研究機関である理化学研究所植物科学研究センター機能開発研究グループの高橋史憲博士、水門佐保様にも厚くお礼申し上げます。

そして、国際農林水産業研究センター生物資源領域の研究員、実験技術補佐員および秘書の方々に感謝致します。

研究していくにあたってご指導頂いた植物分子生理学研究室の諸先輩方、技術補佐員および秘書の方々にも、この場を借りて感謝の意を申し上げます。

平成 25 年 2 月 福井佑太