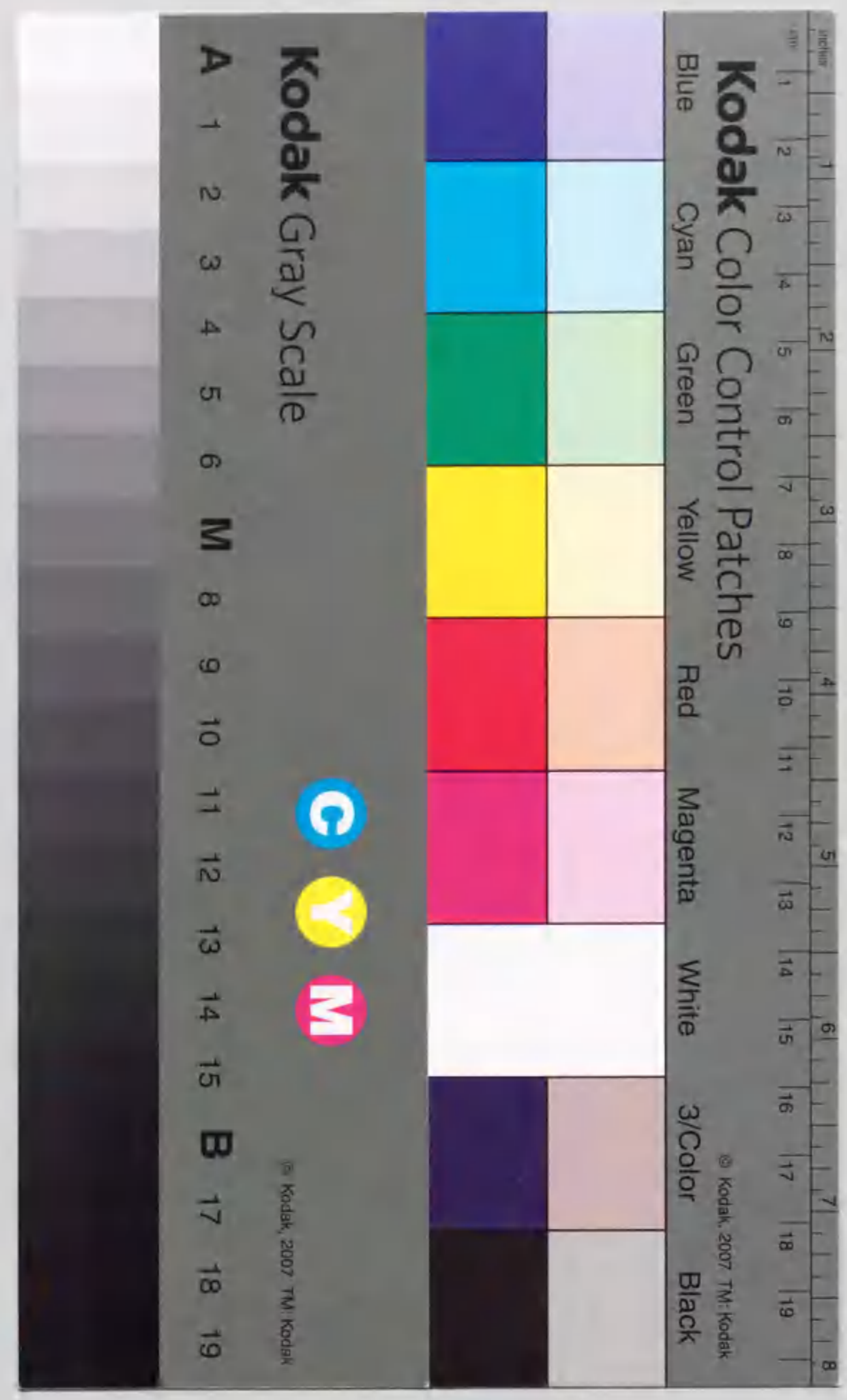


STE11ファミリーに属する  
タバコのプロテインキナーゼNPK1の構造及び機能の解析

坂野 弘 美



報告番号 甲第 2990 号

主論文

①

STE11 ファミリーに属する  
タバコのプロテインキナーゼ NPK1 の構造及び機能の解析

坂野弘美

## 目次

### 要旨

第1章 序論 1

第2章 材料と方法 3

第3章 結果 7

1. プロテインキナーゼをコードする cDNA のクローニング
2. NPK1 cDNA のクローニング
3. 出芽酵母を用いた NPK1 の機能解析
4. サザンブロット解析
5. NPK1 の転写パターン
6. タバコ培養細胞における NPK1 タンパク質の検出
7. NPK1 の自己リン酸化活性

第4章 考察 12

図表 15

謝辞 26

引用文献 27

## 要旨

本研究では、植物の細胞増殖の制御に関わるプロテインキナーゼ遺伝子を PCR によりクローニングすることを試みた。ウシのプロテインキナーゼ C と酵母の cAMP 依存性キナーゼのアミノ酸配列に対応する塩基配列を持つ合成オリゴヌクレオチドを用い、鋳型にはタバコ培養細胞由来の cDNA を用いて PCR を行なった。その結果、プロテインキナーゼ遺伝子の一部と推定される 5 つの異なる DNA 断片を得た。これらの内の 1 つ CA7 の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は出芽酵母の STE11 及び BCK1 のキナーゼ領域と高い相同性を示した。STE11 は接合因子の情報伝達、BCK1 は正常な細胞増殖の調節に関わる情報伝達を行うプロテインキナーゼで、ともにマウス MEKK(MAPKKK) とアミノ酸配列に有意な相同性がある。CA7 をプローブとして全翻訳領域を含む cDNA を単離し、その由来となった遺伝子を *NPK1* と名づけた。cDNA の塩基配列から推定される *NPK1* のキナーゼ領域のアミノ酸配列は、出芽酵母 STE11 と 48%、BCK1 と 44%、マウス MEKK と 45% のアミノ酸が同一であったが、キナーゼ領域以外では有意な相同性は見られなかった。この *NPK1* の C 末端のアミノ酸配列をもつペプチドを合成し、それに対する抗体を作製した。この抗体を用いて、タバコ培養細胞から抽出した全タンパク質に対してイムノプロットングを行った結果、単一バンドが検出され、その見かけ上の分子量からこれが *NPK1* タンパク質であると推定された。また、同じ抗体を用いた免疫沈降物中のキナーゼ活性を調べたところ、リン酸化を受ける主要なタンパク質はウエスタンプロットングで検出されたタンパク質と見かけ上の分子量が一致していた。この結果は、*NPK1* タンパク質が自己リン酸化活性を持つプロテインキナーゼであることを示唆している。次に、*NPK1* が酵母において STE11 あるいは BCK1 と同様な働きを果たし得るかどうかを調べた。そのために、出芽酵母の *STE11* あるいは *BCK1* の変異株で *NPK1* cDNA 及び *NPK1Δ374* を発現させた。*NPK1Δ374* は *NPK1* のキナーゼ活性の制御領域と推定される C 末端側を欠失させたもので、恒常的な活性を示すことが期待される。*ste11* 変異株は接合できないという表現型を示す。この変異株で *NPK1* cDNA あるいは *NPK1Δ374* を発現させたが、接合能は回復しなかった。次に *bck1* 欠損株を用いて同様な実験を行なった。*bck1* 欠損株は、高温 (35 °C) では細胞破裂を起し正常な生育ができない。この株で *NPK1* cDNA を発現させると部分的に生育能が回復した。また、*NPK1Δ374* を発現させるとほぼ完全に生育能が回復した。*BCK1* の含まれるシグナル伝達経路の上流には *PKC1* が存在し、下流には *MKK1/MKK2* 及び *MPK1* が存在することから、これらの遺伝子の変異株についても同様な実験を行った。その結果、*pkc1* 欠損株で *NPK1Δ374* を発現させると弱いながらも *pkc1* 欠損

株の生育能が回復した。一方、下流の遺伝子である *MKK1/MKK2*、*MPK1* の欠損株で同様な実験を行ったが、生育能は回復しなかった。これらのことから、*NPK1* は確かに *BCK1* が関与する情報伝達系を活性化することにより、*bck1* 欠損株や *pkc1* 欠損株の生育能を回復させたことが分かった。*NPK1* の *BCK1* に対する構造的、機能的類似性は、植物にも *BCK1* が関与しているような情報伝達経路が存在する可能性を示している。次に、タバコ培養細胞 BY-2 における *NPK1* の転写量の変化を RNA プロット解析により調べた。その結果、新鮮培地で希釈した直後には *NPK1* はほとんど転写されていないのに対して、その翌日には *NPK1* の mRNA 量は急激に増加することが分かった。その後、対数増殖期から定常期初期にかけて転写量が減少し、定常期後期では mRNA はほとんど検出されなかった。このことは、*NPK1* は分裂に先だって、あるいは増殖期に転写されていることを示している。次に、*NPK1* の植物個体の各器官における mRNA 量を調べた。その結果、*NPK1* は成熟葉に比べて、根、茎で転写量が多いことが分かった。一般に、根と茎には頂端分裂組織や形成層などの分裂組織があるのに対して、成熟葉では分裂組織がほとんど含まれていないことが知られている。従って、この結果も *NPK1* が増殖細胞で特異的に発現していることを示唆している。以上の *NPK1* の転写に関する実験結果は、*NPK1* キナーゼが細胞増殖の過程で機能しているという可能性を支持している。

## 第1章 序論

植物の生長は光、温度等の外的要因と植物ホルモン等の内的要因により調節されている。植物細胞はこれらの刺激を感知し、細胞内の様々な生化学的な変化を引き起こすが、その情報伝達機構の解明は植物細胞の増殖、分化の制御を理解する上で重要である。植物ホルモンであるオーキシシンとサイトカイニンが植物細胞の増殖、分化の調節において中心的な役割を果たしていると考えられている。とりわけオーキシシンはその作用機作の解明について、いくつかの生化学的なアプローチがなされている。一つはオーキシシンの受容体の精製である。現在までにオーキシシン受容体の候補としてマングビーン(1)とトウモロコシ(2)からオーキシシン結合タンパク質(ABP)が精製されている。トウモロコシではABPのcDNAがクローン化されその一次構造が決定されているが(3)、ABPがオーキシシンシグナルの伝達を行う受容体であるという証拠はない。もう一つのアプローチはオーキシシンによる遺伝子発現の誘導機構の解析である。これまでにエンドウ、大豆、タバコからオーキシシンにより発現が誘導される遺伝子が同定され、その発現誘導の機構が解析されている(4)。しかし、オーキシシンなどの植物ホルモンの増殖シグナルから細胞増殖に至るまでには、細胞質から核へのシグナルの伝達、転写因子の活性化、遺伝子発現の誘導といった多段階の過程が必要とされる。この高次にわたる情報伝達の機構を理解するには上記のようなアプローチのみでは限界がある。一方、タンパク質の活性を制御する分子機構として、リン酸化によるタンパク質の修飾が知られている。情報伝達を行う分子はシグナルが止まったあとすぐさま元の状態に戻らなければならない。タンパク質のリン酸化は可逆的な反応であり、情報伝達に適した分子機構であると考えられる。オーキシシンやサイトカイニンのシグナルにより、様々なタンパク質のリン酸化が引き起こされるといふ報告はあるが(5)、そのプロテインキナーゼが精製されたという例はない。

動物や酵母では、細胞内の情報伝達を担う因子として多くのプロテインキナーゼが解析されている。中でもプロテインキナーゼC(PKC)は酵母からヒトに至るまで普遍的に存在し、細胞増殖や細胞分化の制御において中心的な役割を果たしている(6, 7, 8)。ほ乳類では現在までに10のサブタイプのPKCが知られているが(9)、近年、出芽酵母と分裂酵母でもPKC相同遺伝子が見つかった(10, 11)。ほ乳類のPKCの活性化は原癌遺伝子である*c-fos*やコラーゲナーゼなど多くの遺伝子の発現を誘導するが(7, 8)、PKCからのシグナルが遺伝子発現を誘導するまでの過程はほとんど分かっていない。

酵母においては遺伝学的な解析によりPKCの下流のシグナル伝達の機構が明らかになりつつある。出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のPKCをコードすると考えら



れている *PKC1* 遺伝子の欠損株は細胞周期が G2 期で停止するという表現型を示す (10)。このことは *PKC1* は細胞増殖に必須な遺伝子であることを示している。最近、出芽酵母から *PKC1* 変異の優性抑圧変異として、*BCK1-20* が同定された (12)。*BCK1* のアミノ酸配列から *BCK1* はプロテインキナーゼをコードすると推定されている。*BCK1* の欠損株は生育が温度感受性となるが、高温での *BCK1* 欠損の表現型は *PKC1* 欠損の表現型と非常に良く似ている (10, 12)。これらのことから、*PKC1* と *BCK1* は同じ情報伝達経路に含まれ、*PKC1* の下流に *BCK1* が存在していると考えられる。すなわち、*BCK1* の優性変異 *BCK1-20* が *PKC1* の変異を抑圧するのは、*BCK1* のプロテインキナーゼ活性が恒常的になるような変異が導入されたためであり、*PKC1* からのシグナルがなくても常に *BCK1* がその下流にシグナルを送るために正常な生育能が回復したと考えられる。

また、*BCK1* の下流には *MKK1/MKK2*、*MPK1* が存在することが示されているが、そのアミノ酸配列から *MKK1/MKK2*、*MPK1* もプロテインキナーゼをコードしていると考えられる (13, 14)。さらに *MKK1/MKK2* は動物の MAP キナーゼキナーゼと、*MPK1* は MAP キナーゼとアミノ酸配列に有意な相同性が見られる。MAP キナーゼ (ERKs) は様々な増殖因子により、共通に活性化されることから細胞増殖の制御において中心的な働きをしていると考えられている (15, 16, 17, 18)。MAP キナーゼキナーゼは MAP キナーゼの活性化因子であり、このようなプロテインキナーゼによる多段階のシグナル伝達の機構は酵母からは乳類に至るまで広く保存されている。

一方、細胞外シグナルから遺伝子発現に至る情報伝達系で最も詳細に解析されている経路として、出芽酵母の接合を制御する情報伝達経路がある (19)。接合フェロモンのシグナルは細胞膜上に存在する受容体に結合する。このシグナルが細胞内に伝えられると 3 量体 G タンパク質を経て、*STE11*、*STE7*、*FUS3/KSS1* のプロテインキナーゼカスケードを活性化する (19, 20)。その結果、細胞周期が G1 期で停止するとともに、転写調節因子 *STE12* が活性化され接合型特異的遺伝子の発現が誘導される。ここで働くプロテインキナーゼ *STE11*、*STE7*、*FUS3/KSS1* はそれぞれ *BCK1*、*MKK1/MKK2*、*MPK1* と構造的に類似している (12, 13, 14)。すなわち、酵母には非常に類似した異なる情報伝達系が複数存在していることがわかる。このことは、これらのキナーゼカスケードが情報伝達機構の基本単位として進化的に保存されており、進化の過程において様々なシグナルに応じて多様化してきたと考えられる。

本研究では、タバコから出芽酵母 *BCK1* 関連遺伝子、*NPK1* の cDNA を単離し、*NPK1* の構造及び機能の解析を行った。この *NPK1* cDNA は出芽酵母において、*BCK1* と同等な機能を持っており、*NPK1* のカルボキシル末端側を欠失させた cDNA は *PKC1* の変異を抑圧することができることを示した。さらに、RNA プロット解析、イムノプロット解析により、*NPK1* の発現様式について調べた。

## 第2章 材料と方法

### 1. 植物

植物として *Nicotiana tabacum*, *N.sylvestris*, *N.tomentosiformis*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Oryza sativa* を用いた。植物は温室で昼間 28°C、16 時間、夜間、20°C、8 時間のサイクルで生育させた。タバコ培養細胞 BY-2 (21) は 0.2 mg/l の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を含む LS 培地を用いて 26°C で培養し、1 週間毎に植え継いだ。

### 2. 酵母

以下の *Saccharomyces cerevisiae* 株を実験に用いた。

DL251 (*MATa/MAT $\alpha$* , *leu2*, *ura3*, *his4*, *trp1*, *can-1'*, *bck1 $\Delta$ ::URA3*), DL456 (*MATa/MAT $\alpha$* , *leu2*, *ura3*, *his4*, *trp1*, *can-1'*, *mpk1 $\Delta$ ::TRP1*), SNY235 (*MATa*, *leu2*, *ura3*, *his4*, *trp1*, *pkc1 $\Delta$ ::LEU2*), KMY167-7A (*MAT $\alpha$* , *leu2*, *ura3*, *his3*, *trp1*, *tyr1*, *ste11'*), 15Dau (*MATa*, *ade1*, *leu2*, *ura3*, *his2*, *trp1*).

酵母は 2% グルコースを含む YEP 培地 (1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto Peptone) で培養した。形質転換体の選抜には適当な栄養源を含む SD 培地 (0.7% yeast nitrogen base without aminoacids [Difco Laboratory], 0.2%) を用いた。形質転換は酢酸リチウム法 (22) により行った。接合体の形成は、YEpGAP112 及びそれから構築したプラスミドの場合には 50 mg/l のウラシルを含む SD 寒天培地を、pSTE11.1 (23) の場合には 20 mg/l のウラシルを含む SD 寒天培地を用いた。

### 3. RNA の調製

植物試料からグアニジンチオシアン酸法により、全 RNA を抽出した。この全 RNA から最終濃度 0.8 M の塩化リチウムで高分子量の RNA を沈澱させた後、オリゴ (dT) セルロースカラムクロマトグラフィーを行うことにより、ポリ A<sup>+</sup> RNA を調製した。

### 4. プロテインキナーゼをコードする DNA 断片のクローニング

対数増殖期のタバコ培養細胞 BY-2 から調製したポリ A<sup>+</sup> RNA から第 1 鎖の cDNA を合成し、50 ng の cDNA を PCR の鋳型に用いた。センス鎖側は P1A; 5'-GGIACIGGIT/ACITTT/CGGIC/AGIGT -3' (*Saccharomyces cerevisiae* の cAMP 依存性キナーゼの触媒サブユニット

ト(24)のサブドメイン I のアミノ酸配列 GTGSFGRV に対応する)と PIC; 5'-GGIA/GAAGGI TCIT/CTTGGIA/GAATG-3' (ウシの PKC $\alpha$  (25) のサブドメイン I のアミノ酸配列 GKGSF GKV に対応する)、アンチセンス側は P7R; 5'-CCG/AAAG/ATCIGT/CIAT/GT/CTT-3' (多くのプロテインキナーゼで保存されているサブドメイン VII のアミノ酸配列 KI/LA/TDFG に対応する)の塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを合成し、プライマーに用いた。反応温度は熱変性、アニール、伸長をそれぞれ、94 °C、48 °C、72 °C、反応時間はそれぞれ、1分、2分、2分とし、30 サイクルの PCR 反応を行った。増幅された 420 塩基対の DNA 断片は T4 DNA ポリメラーゼで平滑化した後、pUC18 の *Sma*I 部位に挿入した。12 のプラスミドクローンの挿入部分の塩基配列を決定した結果、5つのクローン (pUC-CC5, pUC-CC12, pUC-CC15, pUC-CA4, pUC-CA7) はプロテインキナーゼをコードし得る塩基配列を持っていた。

#### 5. cDNA クローニング

第 1 鎖の cDNA は対数増殖期のタバコ培養細胞 BY-2 から調製したポリ A<sup>+</sup>RNA からスーパースク립ト (Bethesda Research Laboratories) を用いて合成した。第 2 鎖は Bethesda Research Laboratories が推奨する方法に従い合成した。合成された 2 本鎖 cDNA は *Eco*RI-*Nof*I-*Bam*HI アダプターを連結させた後、 $\lambda$ gt10 の *Eco*RI 部位に挿入した。この cDNA ライブラリーから  $8 \times 10^5$  のプラークを <sup>32</sup>P で標識した CA7 DNA 断片をプローブに用いてスクリーニングした。CA7 DNA 断片 (図 1 参照) は pUC-CA7 を *Hinc*II で切断することにより得た。得られた 13 の組み換えファージの DNA から *Nof*I により挿入断片を切り出し、pBluescript SK の *Nof*I 部位にクローニングした。このうちの 2 つのプラスミド (pNPK1-#6 と pNPK1-#13) の挿入部分の塩基配列を決定した。

#### 6. プラスミド

欠失変異体 cNPK1 $\Delta$ 374 を作製するために pNPK1-#6 を *Eco*O109I (塩基配列 1166 の位置で切断される) で切断後、T4 DNA ポリメラーゼで平滑化し、さらに *Xba*I で切断した。これにより生じた約 1200 塩基対の DNA 断片を pBluescript SK の *Xba*I と Klenow fragment により平滑化した *Spe*I の間に再挿入した。ここで作製したプラスミドを pNPK1 $\Delta$ 374 と名づけた。このプラスミドが持つ変異 cDNA では 373 番目のトレオニンの次に終止コドンが生じていることを塩基配列を決定することにより確認した。YE pGAP-NPK1 と YE pGAP- $\Delta$ 374 は酵母発現ベクター YE pGAP112 の TDH3 プロモーター と TDH3 ターミネーターの

間にそれぞれ cNPK1 と cNPK1Δ374 を挿入することにより作製した。pRS314[*BCK1*]、YEp352[*PKC1*]、pSTE11.1 はすべて多コピーベクターで、それぞれ *BCK1* 遺伝子、*PKC1* 遺伝子、*STE11* 遺伝子を持っている。

#### 7. サザンプロット解析

植物の DNA を制限酵素で完全消化し、0.7% アガロースで電気泳動により分画した。電気泳動後、1.5 M NaCl、0.5 N NaOH で 30 分間変性させ、同じ組成の溶液を用いてナイロン膜 (Gene Screen Plus, Du Pont 社製) に転写した。フィルターは 2XSSC で洗浄した後、80 °C で 2 時間減圧乾燥させた。次に 6XSSC、1% SDS により 65 °C で 1 時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、<sup>32</sup>P で標識したプローブを加え、同様な条件で一晩ハイブリダイゼーションを行った。洗浄は 2XSSC、1% SDS により 65 °C で行った。

#### 8. RNA プロット解析

2.2 M のホルマリンを含む 1% アガロースゲルで電気泳動後、20XSSC によりナイロン膜に転写した。その後の処理はサザンプロット解析と同様に行った。

#### 9. 塩基配列の決定

pNPK1-#6 と pNPK1-#13 の持つ cNPK1 の両鎖について、シーケネース Ver. 2 (USB) を用いてジデオキシ法 (26) により塩基配列を決定した。

#### 10. 植物細胞のタンパク質の調製

BY-2 の懸濁培養液から遠心により細胞を集めた。細胞を 5 倍量の 10 mM トリシュー塩酸 (pH 8.0) で洗浄した後に、細胞量と等量の抽出緩衝液 [50 mM トリシュー塩酸 (pH 8.0)、150 mM NaCl、50 mM β-グリセロリン酸、1 mM オルトバナジン (V) 酸ナトリウム、1 mM EDTA、1 μg/ml アンチパイン、1 μg/ml ロイペプチン、1 μg/ml ペプスタチン A、1 mM PMSF] に懸濁し、超音波破碎した。破碎液から遠心により沈澱物を除き、その上澄を全タンパク質とした。

#### 11. 抗 NPK1 抗体の作製とウエスタンプロット法

NPK1 のカルボキシル末端のアミノ酸配列 CRSKSRFASPGR の合成ペプチドをキーホールリンペットのヘモシアニンに結合させ、抗原として用いた。このタンパク質を Freund の完全アジュバントと混ぜて、ウサギ (ニュージーランド小型ラビット) に注射した。抗血清は 7 回注射した後に集めた。

ウエスタンブロットは、2 次抗体としてアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギ IgG (Bio-Rad) を用いて、供給元のプロトコールに従って行った。

## 12. 免疫沈降法によるキナーゼ活性の検出

抽出した 2 mg (1 ml) の全タンパク質にウサギ血清を加え、1 時間、4 °C で反応させた。これに蒸留水で懸濁したプロテイン A-セファロースビーズ (Pharmacia) 100  $\mu$ l を加えて、さらに 30 分反応させた。低速遠心により、ビーズを集めた後、抽出緩衝液で 2 度洗浄した。このビーズをさらにリン酸化緩衝液 [ヘパース水酸化カリウム (pH 7.6)、2 mM 塩化マグネシウム、2 mM 塩化マンガン] で洗浄し、リン酸化反応に用いた。10  $\mu$ l のセファロースビーズに 10  $\mu$ l のリン酸化緩衝液を加えて懸濁させた。これに 1  $\mu$ l の 1 mM ATP (10  $\mu$  Ci の [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP を含む) を加えて、30 °C で 30 分反応させた。反応後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画し、オートラジオグラフィーを行った。

### 第3章 結果

#### 1. プロテインキナーゼをコードする cDNA のクローニング

酵母や動物では既に100以上のプロテインキナーゼ遺伝子がクローニングされ、塩基配列が決定されている。それらの塩基配列から推定されるアミノ酸配列は部分的に非常に保存されており、Hanksらによりキナーゼ領域が11のサブドメインに分類されている(27)。植物のプロテインキナーゼ遺伝子をクローニングするために、その保存された領域のアミノ酸配列に対応する塩基配列を持つプライマーを用いて、PCRを行った。センス方向のプライマーにはそれぞれ酵母のcAMP依存性キナーゼ(APK)とウシのPKC $\alpha$ のサブドメインIに対応する塩基配列を持つオリゴヌクレオチドP1AとP1Cを合成した。アンチセンス方向のプライマーにはほとんどの既知のプロテインキナーゼで保存された領域、サブドメインVIIに対応する合成オリゴヌクレオチドP7Rを用いた。PCRの鑄型には対数増殖期のタバコ培養細胞BY-2のポリA<sup>+</sup>RNAから合成した第1鎖のcDNAを用いた。P1AとP7R、P1CとP7Rの2種類の組み合わせでPCRを行った結果、どちらも約420bpのDNA断片が得られた。これらのDNA断片をクローニングし塩基配列を決定した結果、5つのクローン(CA4, CA7, CC5, CC12, CC15)がプロテインキナーゼの一部と推定されるアミノ酸配列をコードしていた(図1)。CA4, CA7はP1AとP7Rのプライマーの組み合わせでPCRを行った場合に、CC5, CC12, CC15はP1CとP7Rの組み合わせの場合に得られた。しかし、これらの中にはAPKやPKCに対応するようなクローンはなかった。

5つのクローンのうち、3クローンが既知のプロテインキナーゼのアミノ酸配列と有意な相同性が見られた。CA7は出芽酵母のSTE11(27)とBCK1(12)及び分裂酵母のByr2(29)。CC5は出芽酵母のSNF1(30)、CC15はトウモロコシのZmPK1(31)とそれぞれ相同性が見られた。

#### 2. NPK1 cDNA (cNPK1) のクローニング

CA7とアミノ酸配列の高い相同性が見られたSTE11, BCK1は出芽酵母のプロテインキナーゼで、これらが含まれている情報伝達経路は比較的よく解析されている。図11から分かるようにSTE11は出芽酵母の接合因子のシグナル伝達を行っている。接合シグナルが伝わると、接合型特異的遺伝子の発現が誘導されるとともに細胞周期がG1期で停止し、その結果、接合が起こる。一方、BCK1は出芽酵母のPKC1(酵母のPKC相同遺伝子)の下流で働くキナーゼで、これらが欠失すると細胞破裂を起こし、正常な生育ができなくなる(10, 12, 32)。そこで、CA7に対応するタバコの遺伝子が植物細胞の細胞増殖と

何らかの関わりがあるのではないかと考えて、CA7の全長のcDNAを単離し、その機能を解析することにした。

CA7をプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングし、ほぼ全長のcDNAをクローニングした。独立に単離した2クローン(#6と#13)について塩基配列を決定した結果、#13よりも#6の方が5'側が20塩基対長いことを除けば、完全に一致していた。また、これらの塩基配列はCA7と完全に一致する塩基配列を含んでいた。図2に#6の塩基配列とそこから推定されるアミノ酸配列を示した。#6の開始コドンと推定されるATGの上流には同一読み枠中に終始コドンが存在することから、#6は全翻訳領域を含んでいると思われる。#6の3'末端には動物で知られているポリアダニル化シグナルに似た塩基配列AATAAが見られ、その6塩基後ろに15ヌクレオチドのポリAが存在していた。このことから#6が3'末端側もほぼ全長を含んでいることが分かる。推定されるアミノ酸配列から、このcDNAは690アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、そのアミノ末端側にはプロテインキナーゼに保存されているアミノ酸配列が見られた。そこでこのcDNA(cNPK1)に対応する遺伝子をNPK1(Nicotiana Protein Kinase 1)と名づけた。Genbankに対して相同性の検索を行ったところ、NPK1のキナーゼ領域は*Saccharomyces cerevisiae* STE11(28)と48%、*Schizosaccharomyces pombe* Byr2(29)と47%、*S. cerevisiae* BCK1(12)と44%のアミノ酸が同一であった。Byr2は分裂酵母の接合シグナルの伝達に関わっており、機能的にもSTE11と相同な遺伝子である。図3の(A)にキナーゼ領域のアミノ酸配列の比較を示した。図3の(B)はドメイン構成の比較を示しているが、STE11とBCK1のキナーゼ領域がカルボキシル末端側にあるのに対して、NPK1のキナーゼ領域はアミノ末端側に存在しており、キナーゼ領域以外は有意な相同性は見られなかった。

### 3. 出芽酵母を用いたNPK1の機能解析

NPK1は出芽酵母のSTE11及びBCK1と相同性が高かったので、NPK1が酵母においてSTE11あるいはBCK1と同様な機能を果たし得るかどうかを調べた。前述のようにNPK1はアミノ末端にキナーゼ領域を持ち、カルボキシル末端側は活性の制御領域と推定される。STE11は制御領域を欠失させると恒常的なキナーゼ活性を示すことが知られている(33)。そこでNPK1のカルボキシル末端側を欠失させたcDNA、cNPK1Δ374[図3(B)]を作製し、この実験に用いた。*ste11*温度感受性株は制限温度(35℃)では接合できない。この株でcNPK1あるいはcNPK1Δ374を発現させたが、接合能は回復しなかった(図4B)。次に、BCK1変異株を用いて実験を行った。BCK1欠損株は25℃では生育できるが35℃では生育できない。しかし、浸透圧調整剤として1Mのソルビトールを加えると35℃で

も生育できる。酵母発現ベクター YEpGAP112 に NPK1 あるいは NPK1Δ374 を組み込み、この株で発現させた。正の対照実験として多コピーベクターに *BCK1* 遺伝子を組み込み、同じ株に形質転換した。図 4 A から分かるように、ベクターのみの場合には 35 °C でソルビトールを含まない培地では生育できないのに対して、cNPK1 あるいは cNPK1 Δ374 を発現させた場合にはソルビトールなしでも生育能が回復した。しかし、cNPK1Δ374 が *BCK1* 遺伝子そのものを戻した場合とほぼ同様な生育能の回復を示すのに対して、全長の翻訳領域を含む cNPK1 を発現させた場合には回復の度合いは弱かった。一方、ソルビトールを含む培地ではどの株も生育できた。

図 1 1 に示すように *BCK1* の含まれるシグナル伝達経路の上流には *PKC1* (10) が存在し、下流には *MKK1/MKK2* (13) 及び *MPK1* (14) が存在することから、これらの遺伝子の変異株についても同様な実験を行った。*pkc1* 欠損株は低温 (25 °C) でも生育できないが、*bck1* 欠損株と同様に 1 M のソルビトールを培地に加えると生育できる。この株に上の実験と同様なプラスミドを形質転換した。同時に *PKC1* 遺伝子を持つ多コピーベクターも形質転換した。その結果、ソルビトールを含む培地ではどの株も生育できるのに対して、ソルビトールを含まない培地ではベクターのみ、あるいは cNPK1 を発現させた場合にはほとんど生育できなかった (図 5)。しかし、cNPK1Δ374 を発現させた場合は、*PKC1* 遺伝子を戻した場合に比べると、弱いながらも *pkc1* 欠損株の生育能が回復した。一方、下流の遺伝子である *MKK1/MKK2* (データは示していない)、*MPK1* (図 6) の欠損株で同様な実験を行ったが生育能は回復しなかった。このことから、NPK1 は *PKC1* や *BCK1* が存在しているこのシグナル伝達カスケードを活性化できることが分かった。

#### 4. サザンプロット解析

タバコゲノム中における *NPK1* のコピー数を調べるために CA7 をプローブとしてサザンプロット解析を行った。プローブに用いた DNA 中には認識配列が存在しない制限酵素 (*Pst*I, *Hind*III, *Eco*RI) で *N. tabacum* のゲノム DNA を完全消化し、サザンプロット解析を行った。その結果、それぞれ 2 本ずつのバンドが見られた (図 7)。従って、*N. tabacum* には 2 コピーの *NPK1* が存在していることが分かる。*N. tabacum* は *N. sylvestris* と *N. tomentosiformis* 由来のゲノムを持つ複 2 倍体であることから、*N. sylvestris* と *N. tomentosiformis* についても *NPK1* のコピー数を調べた。図 7 から分かるように、*N. sylvestris* と *N. tomentformis* にはそれぞれ 1 コピーずつの *NPK1* が存在しており、そのバンドの位置はそれぞれ *N. tabacum* のそれと一致している。従って、*N. tabacum* の *NPK1* は *N. sylvestris* と *N. tomentformis* のそれに由来していることが分かる。

次に、*NPK1* が他の植物種にも存在するかどうかを調べるために、弱い条件 (55 °C) で



ハイブリダイゼーションを行い、サザンブロット解析を行った。タバコと同じく双子葉植物であるシロイヌナズナの他、単子葉植物のイネ、トウモロコシでもシグナルが確認された(図8)。従って、*NPK1* と相同な遺伝子は、少なくとも草本植物に広く存在していると考えられる。

#### 5. *NPK1* の転写パターン

*NPK1* の機能を探る手掛かりを得るために、タバコ培養細胞とタバコ植物個体の各器官における *NPK1* の mRNA 量を RNA プロット解析により調べた。

図9Aはタバコ培養細胞BY-2の増殖曲線を示している。このグラフからBY-2は2日目から5日目で対数増殖期にあることが分かる。この細胞の増殖過程における *NPK1* の mRNA 量を調べた。図9Bから分かるように、*NPK1* は植え継ぎの希釈後1日目で転写量が多く、その後減少し、7日目ではほとんど発現していない。一方、内部対照として用いた *N1510* は増殖過程を通して、ほぼ一定量転写されている。

次に、植物個体の根、茎、成熟葉で *NPK1* の mRNA 量を調べた。その結果、*N1510* がほぼ同量転写されているのに対して、*NPK1* mRNA は根、茎では比較的多く存在するが、成熟葉ではほとんど転写されていなかった(図9C)。

#### 6. タバコ培養細胞における *NPK1* タンパク質の検出

*NPK1* がタンパク質として実際に翻訳されているかどうかを調べるために、免疫学的に *NPK1* タンパク質を検出した。対数増殖期と定常期のタバコ培養細胞BY-2から全タンパク質を抽出し、SDS-ポリアクリルアミドゲルにより分画した後に、イムブロットを行った(図10)。その結果、*NPK1* は対数増殖期と定常期の両方で検出された。見かけ上の分子量は対数増殖期と定常期で異なっており、対数増殖期で65 kDa、定常期では67 kDaであった。おそらく定常期の *NPK1* は何らかの共有結合による修飾を受けていると推定される。

#### 7. *NPK1* の自己リン酸化活性

*NPK1* が実際にプロテインキナーゼをコードしているかどうかを調べるために、大腸菌で組み換え *NPK1* を生産させ、そのキナーゼ活性を調べることを試みた。しかし、*NPK1* を発現させるプラスミドを持つ形質転換体は増殖できないために、大腸菌で *NPK1* を生産させることはできなかった。そこで、抗 *NPK1* 抗体により植物細胞から免疫沈降させた *NPK1* を用いて自己リン酸化能を調べた。対数増殖期と定常期にあるBY-2の全タンパ

ク質から免疫沈降を行った。免疫沈降させたプロテイン A セファロースビーズを、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と反応させた後、SDS-ポリアクリルアミドゲルで分画し、オートラジオグラフィを行った。図10から分かるように、免疫前のウサギの血清を用いた場合には、65~67 KDaの位置にシグナルが見られないのに対して、NPK1のカルボキシル末端の合成ペプチドを抗原として免疫したウサギの血清を用いた場合には、イムノプロットにより検出されたNPK1と同じ位置にバンドが見られた(図10)。このことからNPK1は自己リン酸化能を持つと考えられる。従って、NPK1はプロテインキナーゼであることが分かる。

## 第4章 考察

塩基配列から推定される NPK1 タンパク質の一次構造は *S. cerevisiae* の BCK1、STE11 及び *S. pombe* の Byr2 とキナーゼ領域においてアミノ酸配列の相同性が見られた。酵母の変異株を用いた実験において、カルボキシル末端を欠失した NPK1 cDNA (cNPK1Δ374) の高発現は酵母の *bck1* 欠失変異株の正常な生育能を回復させたが、*ste11* 変異を相補することはできなかった。また、cNPK1Δ374 の高発現は BCK1 のシグナル伝達経路の上流の遺伝子である PKC1 の欠失を部分的に抑圧できるが、下流の遺伝子である MPK1 の欠失は抑圧できなかった。このことは NPK1 は確かにこの BCK1 の関与するシグナル伝達系を、おそらくは BCK1 の直接の標的と考えられている MKK1/MKK2 をリン酸化することにより、活性化できることを示唆している。また、NPK1 のキナーゼ領域は構造的には BCK1 よりも STE11 により近いが、機能的には BCK1 により近いことが分かる。

NPK1 はアミノ末端側にキナーゼ相同領域を持ち、カルボキシル末端側には活性の制御領域と推定される長い領域を持っている。*bck1* 変異株で cNPK1 と cNPK1 Δ374 を発現させた実験から、cNPK1 よりも cNPK1Δ374 を発現させた場合の方が生育能が高いことが分かった。この効果は、*pkc1* 変異株を用いた実験ではより顕著に現れている。すなわち、cNPK1 を発現させたても *pkc1* 株の生育能は全く回復しないが、cNPK1 Δ374 を発現させた場合には弱くではあるが生育能が回復する。このことは cNPK1 Δ374 で欠失している部分、すなわち、カルボキシル末端側はキナーゼ活性の負の制御領域であることを示している。

酵母を用いた実験結果から、NPK1 は酵母において BCK1 と同様な機能を果たし得ることが分かった。NPK1 と相同性の高い塩基配列は、双子葉植物だけでなく単子葉植物にも存在することから、植物種に広く存在し、何らかの情報伝達の機能を担っていると考えられる。植物において PKC は見つからないが、NPK1 の存在は、植物でも酵母と同様に、PKC1 や BCK1 を介した情報伝達の機構が存在し、細胞増殖の制御に関与している可能性を示唆している。

RNA プロット解析の結果、NPK1 はタバコ培養細胞 BY-2 において植えつき後 1 日目で mRNA 量が多く、その後、徐々に減少していき、7 日目ではほとんど転写されていない。従って、NPK1 の mRNA は分裂に先だって、あるいは増殖期で特異的に転写されていることが分かった。また、植物体の各器官での NPK1 の mRNA 量を見ると、根と茎で比較的多いのに対して、成熟葉ではほとんど転写されていない。一般に、成熟葉では根や茎に比べて分裂細胞が非常に少ないことから、NPK1 は増殖細胞で特異的に発現しているのではないかと考えられる。また、本研究室の平野の実験結果から NPK1 は若い葉ほど mRNA

量が多く、成熟するに従い mRNA 量が減少していくが、この転写パターンは *cdc2* 相同遺伝子のそれと非常によく似ていることが明らかにされている（未発表データ）。これらのことから、*NPK1* は生長過程、あるいは分裂期の細胞で特異的に転写されていることが分かる。従って、*NPK1* は細胞増殖の過程で何らかの役割を果たしているのではないかと推測される。

ウエスタンプロットの結果から *NPK1* は見かけ上の分子量が 65 KDa のタンパク質として確認された。従って、*NPK1* の転写物は確かに翻訳されていることが分かった。RNA プロット解析から予想される結果に反して、ウエスタンプロットの結果、対数増殖期と定常期の BY-2 では、ほぼ同量の *NPK1* タンパク質が存在していた。これは *NPK1* タンパク質の代謝回転が、対数増殖期で速く、定常期では *NPK1* タンパク質が安定でほとんど分解を受けないためではないかと考えられる。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動における *NPK1* の移動度は対数増殖期よりも定常期の方が若干遅い。従って、定常期において、*NPK1* はリン酸化などの何らかの修飾を受けている、あるいは対数増殖期とは異なるプロセッシングをうけていると推定される。このことと *NPK1* の活性や *NPK1* タンパク質の量を一定に保つ機構との間にどのような関係があるかは今後の重要な課題である。

タバコの遺伝子 *NPK1* はその塩基配列からプロテインキナーゼをコードしていると推定された。実際、抗 *NPK1* 抗体による免疫沈降複合体にはキナーゼ活性があり、沈降物の中で、ウエスタンプロットで確認される *NPK1* タンパク質と同一の分子量のタンパク質がリン酸化される。従って、*NPK1* は自己リン酸化能のあるプロテインキナーゼであると思われる。しかし、免疫沈降物の中に *NPK1* 以外で *NPK1* をリン酸化するプロテインキナーゼが共沈してきている可能性も否定はできない。この可能性は、キナーゼ活性を欠損させた *NPK1* 変異遺伝子を培養細胞で高発現させ、その細胞から免疫沈降を行ない、免疫沈降物中のキナーゼ活性の度合を調べることにより検討できるであろう。

動物の MAP キナーゼは様々な増殖因子により活性化されるプロテインキナーゼである。一方、酵母では既に接合因子のシグナル伝達経路にいくつかのプロテインキナーゼが存在し、このうちの *FUS3/KSS1* は MAP キナーゼのアミノ酸配列と高い相同性を持つことが知られていた(34)。1992年から1993年にかけて、この MAP キナーゼ活性化因子として、マウス、ラット、アフリカツメガエルから MAP キナーゼキナーゼ (MAPKK) の cDNA がクローニングされた(35, 36, 37)。図5に示すように *FUS3/KSS1* の活性化因子は *STE7* であるが(38)、興味深いことに *MEK* と *MAPKK* のアミノ酸配列は *STE7* と有意な相同性が見られる。このことから *MEK/MAPKK* の活性化因子は *STE11* 様のキナーゼであることが推測されていた。1993年になり、Lange-Carter らは、PCR によりマウスから *STE11* とアミノ酸配列に相同性のある *MEKK* (*MEK Kinase / MAPKKK*) をクローニングし、*MEKK* がリン酸化により *MEK* を活性化することを報告した(39)。*MEKK* のキナーゼ領域のアミノ酸配列は、*NPK1* のそれと 45% のアミノ酸が同一であった。

また、酵母には接合因子のシグナル伝達系とは別に、これによく似たシグナル伝達系が知られている。1990年に Levin らは出芽酵母からプロテインキナーゼC相同遺伝子 *PKC1* をクローニングした(12)。*PKC1* の欠失は致死となるが Lee と Levin は *pkc1* 変異を抑圧する優性変異として *BCK1-20* を同定した(12)。また、松本らの研究グループはこのシグナル伝達系に *MKK1/MKK2*、*MPK1* が含まれることを示した(13, 14)。図 11 に示したように *BCK1* と *STE11*、*MKK1/MKK2* と *STE7*、*MPK1* と *FUS3/KSS1* はアミノ酸配列の相同性が高い。さらにアフリカツメガエルの MAP キナーゼは *MPK1* の変異を相補できることが示されている(14)。このように酵母と動物には非常によく似たキナーゼカスケードが存在していることが分かる。一方、マウスでは原癌遺伝子産物である Raf プロテインキナーゼも MAPKK をリン酸化することにより活性化できることが示されている(40, 41, 42)。また、津田らはショウジョウバエの Raf の変異株の抑圧遺伝子として MAPKK 相同遺伝子である *Dsor1* を単離している(43)。これらのことから Raf は MAPKK の活性化因子であることが分かる。さらに、最近の研究では、Raf は Ras と相互作用することにより活性化されることも明らかにされている(44, 45, 46)(図 11)。また、アフリカツメガエルの卵母細胞において Mos も MAPKK を活性化できることが示されており(47)、MAPKK の上流は非常に多様化した情報伝達のネットワークが存在すると考えられる。上記のようにマウスでの MEKK の存在は動物と酵母の情報伝達機構の類似性を伺わせるが、酵母ではこれまでのところ Raf や Mos に対応するような遺伝子は見つかっていない。従って、Raf や Mos による MAPKK の活性化は動物に固有の機構なのかもしれない。

植物では、アルファルファから MAP キナーゼ相同遺伝子 (*MsERK1/MsK7*) がクローニングされている(48, 49)。また、本研究室の柴田によりタバコから MAPKK 関連遺伝子 *NPK2* の cDNA がクローニングされている(未発表データ)。*NPK1*、*NPK2*、MAP キナーゼホモログの相互関係は不明であるが、植物にも動物や酵母と同様なキナーゼカスケードが存在すると考えられる。実際、*MsK7* は細胞周期特異的あるいは器官特異的な発現パターンを示すが(49)、このパターンは *NPK1* のそれと非常に類似している。従って、*NPK1* の下流には *MsERK1/MsK7* があるかも知れない。

CC5	GKGSFGKVKIAEHTLTGHK <b>VAK</b> ILNRRKIKNME-----MEEKVRR <b>E</b> IK	
CC12	GRSFGKVKYKGTY--NGED <b>VAK</b> LLERPENDLER <b>AHL</b> --MEQQFQQ <b>E</b> VM	
CC15	GKGSFGKVKYKATMP-VGGV <b>VAK</b> VLATDSKQ-----GEKEFF <b>T</b> EVT	
CA4	VTGSFGRVYEGFTD-DGFF <b>F</b> AV <b>K</b> VSLEFDPGNQQ-----SLYQLEQ <b>E</b> IS	
CA7	<u>GRVYMGMNVDSGELL<b>A</b>KE<b>V</b>SIAMNGASRERAQAHVRELE<b>E</b>EVN</u>	III
		I
		II
CC5	ILRLFMHP <b>H</b> IRLYEVVETPSDIYVMEYVKSGELFDYI <b>V</b> EKGR--LQE	
CC12	MLARLKHPN <b>I</b> VRFIGACRKP <b>M</b> WCI <b>V</b> TEYAKGGSVRQFLTKRQ <b>N</b> RSVPL	
CC15	LLGRLLHHR <b>N</b> LVNLVGYCVDKGHRILLYEFMSNGSLANLLY <b>S</b> EEHT-L <b>S</b> W	
CA4	LLSQFRH <b>K</b> NI <b>V</b> RYHGTEK <b>D</b> ESKLYIFLELLTKGSLASVYRKYR--LRD	
CA7	LLKNLSHPN <b>I</b> VRYLGTAREAGSLNILLEFVPGGSISSLLAKFGS--FPE	V
		IV
CC5	DEARKFFQQIIS <b>G</b> VE <b>Y</b> CHRNM--VVH <b>R</b> DLK <b>P</b> ENLLD <b>S</b> KNW <b>V</b> KI <b>A</b> DF	
CC12	KLAVKQALDVAR <b>G</b> ME <b>Y</b> VHGLN---LIH <b>R</b> DLK <b>S</b> DNLSIAADKS <b>I</b> KL <b>T</b> DF	
CC15	EDRLQIALDVSH <b>G</b> VE <b>Y</b> LHDGAVPPV <b>I</b> H <b>R</b> DLK <b>S</b> AN <b>I</b> LLDH	
CA4	SHVSDYTRQILS <b>G</b> LH <b>Y</b> LHSRN---V <b>I</b> H <b>R</b> DI <b>K</b> CAN <b>I</b> LV <b>D</b> V <b>S</b> GS <b>V</b> KL <b>A</b> DF	
CA7	SVIRMYTTQ <b>L</b> LL <b>G</b> LE <b>Y</b> LHKNG---IM <b>H</b> RD <b>I</b> K <b>G</b> AN <b>I</b> LV <b>D</b> N <b>K</b> GC <b>I</b> KL <b>A</b> DF	VII
		VI

図1 PCR断片の塩基配列から推定されるアミノ酸配列  
ローマ数字はプロテインキナーゼのサブドメインの番号を示している。  
プロテインキナーゼで保存されているアミノ酸は太字で示した。  
下線の付いたアミノ酸はPCRのプライマーに対応している。

CTGACCCTAAGCGACACACACTTCCACTCTTTGGTCTCCCAAACTCTCTCCAAATGCGAGATTTCACGGCTCCGTCCTGGCCGATCTCTGGTTTTCAAGCAGTCCGGAGACTTCGATACCGG 120  
 1 \* T L H T S L F A P P N L S P Q D F I G S V R R S L V F K Q S G D F D T G  
 CGCTGGCGGTTCGGCAGCGGATTCGGAGGCTTCGTTGAGAACTAGTTCGAGCATTCGCAATCGAGTATGGAACTCTTCGMAAGCTCATGTTCCGTCCTCCGCTATTCCTA 240  
 24 A A G V G S G F G F E K L G S I R K S I G I F S K A H V P A L P S I S K  
 AGCTGAGCTGCCCGGAGGCTCCGGAAGATGACACTCCGCAATCCGGTGGAGGAAGTGAATGATGGATGGTGGTTTTATGGGATGAATGTTGATTCGG 360  
 64 A E L P A K A R K D D T P I R W R K G E M I G C G A F G R V Y M G M N V D S G  
 AGAGTTACTTCCCTAAAGGAGTTTCGGATGGATGAATGGTGGCTTCGAGAGGAGGACAGCTCATGTTAGAGCTTTGAGGAGAGTGAATCTATGAGAACTCTCCCAACC 480  
 104 E L L A I K E V S I A M N G A S R E R A Q A H V R E L E E E V N L L K N L S H P  
 CAACATAGTGGATTTGGGAACCTGCAAGAGAGGAGGATCAATTAATATATTGTTGAAATTTGCTGGTGGCTCAATCTGTCACHTTTGGGAAATTTGGATCCCTCCGATC 600  
 144 N I V R Y L G T A R E A G S L N I L E F V P G G S I S L L G K F G S F P E S  
 IGTATAGAAATGACACCAAGCAATTTGATAGGTTGGATTTGCAATAGAAATTAAGGAGCAACACTACTTTGACAAATAGGTTGCATTA 720  
 184 V I R M Y T K Q L L L G L E Y L H K N G I M H R D I K G A N I L V D N K G C I K  
 ACITGGATTTCCGTCATCCAGAAAGTGTGTAATTCGCTACTATGACTGGTCCCAATCAATGAAGGTACTCCATAGTGGTCCGACTCCGAACTCATTTCGAGACTGGCCATAG 840  
 224 L A D F G A S K K K V E L A T M T G A K S M K G T P Y M A P E V I L Q T G H S  
 CTCTCTGCTGACATATGGAGTTCGGATGCACTATATCGAAATGGCTACAGAAACCTCCTTGGAGCCAGGATCAGAGGTTGCTCTCTCCATATAGGACACCAAACTC 960  
 264 F S A D I W S V G C T I I E M A T G K P W S Q Q Y Q E V A A L F H I G T T K S  
 CCATCCCGCATCCAGAGCATCTTCTGCTGAATCAAGGACTTCTTAATAATGTTGCAAGAAACCGCACCTGAGCATTCGATCAAAATTTGCTTCAGCATCCATTTGTTAC 1080  
 304 H P I P E H L S A E S K D F L L K C L Q K E P H L H S A S N L L Q H P F V T  
 AGCAGAATCAGGAAGCTCGCCCTTTCTCGCTCATCCTTTATGGAAACCCCGAAACATGGCGGCAAGGATGGATGTTAGGACCTCAATCCTGATAGAGCTTCCTG 1200  
 344 A E H Q E A R P F L R S F M G N P E N M A A Q R M D V R T S I I P D M R A S C  
 CAATGTTTGAAGATTTGGGTGATGAGGCTGAGGCTGACCTGATCCGAGAACTTCTTAGGAAAGACTCCTGAAACTAGGAACTCTGATGACATGTGCCA 1320  
 384 N G L K D V G V S A V R C S T V P E N S L G K E S L W K L G N S D D D M C Q  
 GATGATAATGATGATTTATGTTGGTGCATCTGAAATGCAGTTGCATTTGCTCTCTGCTAATTAAGAGTTTAAATCCCATGATCAAGGAGGATCTTGGCTTGCATTTCC 1440  
 424 M D N D F M F G S V K C S S D L H S P A N Y K S F N P M C E P D N D W P C K  
 ATTTGATGAAAGTCCCGAGTTGACGAAAGTCAAGCAACCTGCAATGATCAAGCACTATAAGCCCATTAACCCCATGATCAAGGAGGATCTTGGCTTGCATTTCC 1560  
 464 F D E S P E L T K S Q A N L H Y D Q A T I K P T N N P I M S Y K E D L A F T F P  
 AAGTGGCAATCGAGGAGGATGATGAATGACAGAGTCTAAATTAGGCAATCTTTGATGAAAGGCTGCAAGACTGCAACACCACTATATGAGGATCTA 1680  
 504 S G Q S A A E D D E L T E S K I R A F L D E K A M D L K L Q T P L Y E G F Y  
 CAATTTTGAATTTCCAGCACCCAGTCCCGTTGGCACTGGGAAGGAAATGTTCCAAATTAACCTAACCCAAAGGAGGTCACCAAAAGTATGCTTAGCAGAG 1800  
 544 N S L N V S T P S P V G T G N K E N V P S N I N L P P K S R S P K R M L S R R  
 GCTCTACTGCCATGAAAGTGTGTTGCTCCAGCCAGTCAATCCAGCGAATCAATATTTGGTCCCTAAATGTTGGTAACTTCAGGAACTCAGTTCCGAGGATAA 1920  
 584 L S T A I E G A C A P S P V T H S K R I S N I G L N G E A I Q E A Q L P R H N  
 TGAATGAAAGATCTTCTGCTCAACCGTGAAGCAGTTAATCAAGCTTCTCGAGGCAAAAGGTTGAAAGAGCTTGTGAAGGAGGTTGCAAGGAAACGAGATTTATGCG 2040  
 624 E W K D L L G S Q R E A V N S S F S E R Q R R W K E E L D E E L Q R K R E I M R  
 TCAGGAGTCAACTTATCACCAACCAAGGATCCAATTTCAATCGATGAGAAATCAAGTTTGCATCTCTGGAAGATAAATGATGTTCTGTCCTAAACTAAAGTCAGTT 2160  
 664 Q A V N L S P P K D P I L N R C R S K S R F A S P G R \*  
 TGAAGATAAATTAATGATCTCTGCAACCCAGAGGATGAGTCTGAGCAGGATACGAAGGTTTCTTGACCGGTTACTACGGAATATCAGCGCTTGCAGATAG 2280  
 AGTGGCTGTACTACAGGAATCTGCAACTGTAATTAATAAGCAATATTTGGTTGATTCGTTTTGATCATCTCCGAGGAGGATTTGAGAAATGCGAGCCCT 2400  
 TTTTAACTATATAAGTCTCTCATGGTAGTTGCCAATATAAACCAGAGAAAGTCCAGTTCTCATCTGCTGAAATGTTGTAATAATGATATAATGATTTACGGCTC 2520  
 TACAACCAATAATTTGCAAAAAA

図2 NPK1 cDNAの塩基配列とそこから推定されるアミノ酸配列  
 右の数字は塩基配列の番号を示している。開始コドンと推定されるメチオニンは四角で囲ってあり、このメチオニンを1番と  
 してアミノ酸番号が左に示してある。終始コドンはアスタリスクで示してある。3'端付近にある二重線はポリA付加シグナル  
 に似た塩基配列を示している。CA7に対応する塩基配列には下線が引いてある。

(A)

**NPK1** 77 PIRWRK**GEMIGCGAFGRVYMG**MNVDSGELLAIKEVSIAMNGASRERAQAHVRELEE-  
**BCK1** 1172 EFAN**MKGEMIGKGSFGAVYLC**LNVT**TGEMMAVKQVEVPKYSSQNEA**ILSTVEALRS-  
**STE11** 412 PKN**WLKGCIGSGSFGSVYLG**MNAHTGELMAVKQVEIKNNIGVPTDNNKQANSDE(  
**Byr2** 391 SIK**WIRGALIGSGSFGQVY**LGMNASSGELMAVKQVILDSVSESKDRHAKLLDALAG-  
**I II**

**NPK1** 133 ---EVN**LLKNL**SHPNIVRYLGTAREAGSLNILLEFVPGGSISSLLGKFGSFPESVIR  
**BCK1** 1228 ---EVSTLKDLDHLNIVQYLG**FENKNNI**YSLFLEYVAGGSVGLIRMYGRFDEPLIK  
**STE11** 504 36)EMN**LLKEL**HHENIVYYGASQEGGNL**NIFLEYV**PGGSVSSMLNNYGPFEESLIT  
**Byr2** 447 ---E**IALLOEL**SHHEIVQYLG**SNLNSDHLN**IFLEYVPGGSVAGLLTMYGSFEETLVK  
**III IV V**

**NPK1** 187 MYTK**QLLLGLE**YLHKNIGIMHRDIK**GANILVDN**KGCIKLADFGASKKVVEL-ATMTGA  
**BCK1** 1282 HLT**TQVLKGL**AYLHSGILHRDMKADNLLDQDGICKISDFG**ISRKS**KDIYSNSDM-  
**STE11** 558 N**FRQILIG**VAYLHKKNIHRDIK**GANILDI**KGCVKITDFG**ISK**KLSPLNKKQNKR  
**Byr2** 501 N**FIKQTLK**GLEYLHSGIVHRDIK**GANILVDN**KGKIKISDFG**ISK**KL-ELNSTSTKT  
**VI VII**

**NPK1** 243 KSMK---GTPY**WMAPE**VILQ**TGHSFSA**--DIWSVGCTI**EMATG**KPPWSQQYQEV-  
**BCK1** 1338 -TMR---GTV**FWMAPE**M-VDTKQGYSAKV**DIWSL**GCIVLEMFAGK**RFP**WSN--LEVV  
**STE11** 615 ASLQ---GS**VFWMSPE**VVKQ**TATT**--AKADI**WSTGC**VV**IE**MFTGKH**FP**DFSQ-M-  
**Byr2** 557 GGAR**PSFQGS**S**FWMAPE**VVKQ**TMT**--EKT**DIWSL**GC**LVIE**MLTSKH**FP**NC**DQ**-M-  
**VIII IX**

**NPK1** 293 AAL**FHIGTTK**SHPP**IEH**----LS**AESKDF**LLK**CLQ**KEPH**LRSAS**NLLQ**HPF**VTA**EHQ**  
**BCK1** 1387 A**AMFKIG**KSKS**APP**IPED**TLPLISQ**IGRN**FLD**AC**FEIN**PE**KRPT**AN**ELLS**HP**FSE**VNET (44%)  
**STE11** 664 Q**AIFKIG**TNTT-**PEIP**SW----AT**SEGK**N**FLR**KAF**ELDYQ**Y**RPSA**LE**LLQHP**WLD**AHII**\* (48%)  
**Byr2** 610 Q**AIFR**IGEN**IL-PE**FP**SNIS**SS----A**IDF**LE**KTF**A**IDC**N**LRPT**ASE**LLS**HP**FVS**\* (47%)  
**X XI**

(B)

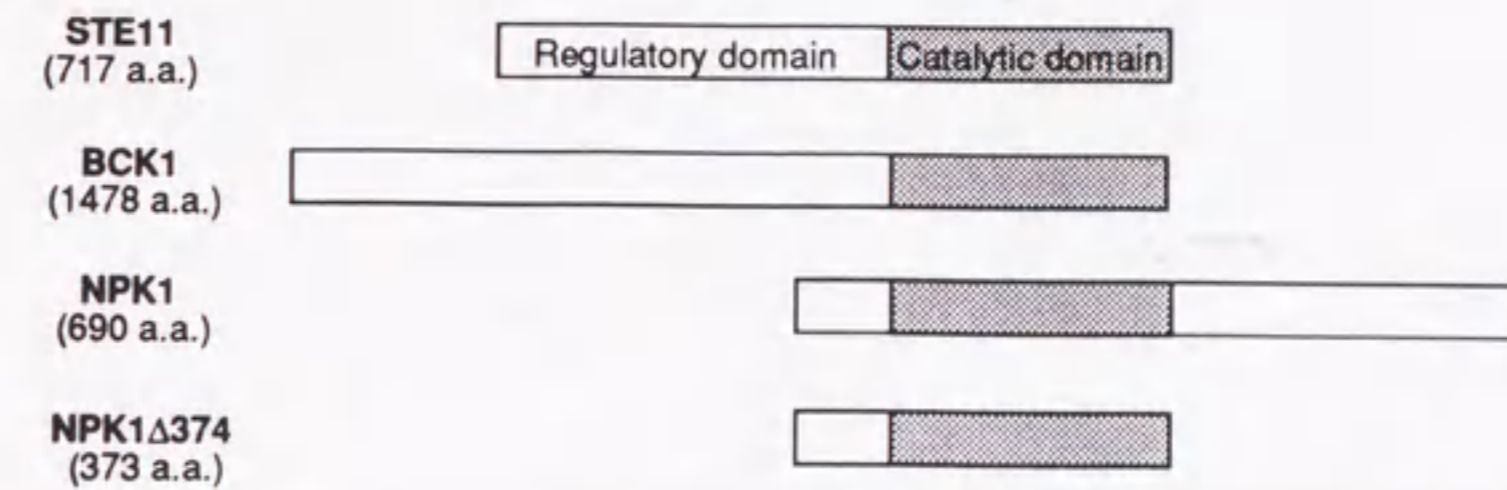


図3

(A) タバコ NPK1 と出芽酵母 STE11、BCK1 及び分裂酵母 Byr2 のキナーゼ領域のアミノ酸配列の比較

左の数字はアミノ酸番号を、ローマ数字はプロテインキナーゼのサブドメインの番号を示している。括弧内は NPK1 と同一のアミノ酸残基のパーセントを示している。

(B) STE11、BCK1、NPK1 及び NPK1Δ374 のドメイン構成の比較

括弧内の数字はそれぞれのタンパク質のアミノ酸残基の数を示している。キナーゼ領域は網掛がしてある。



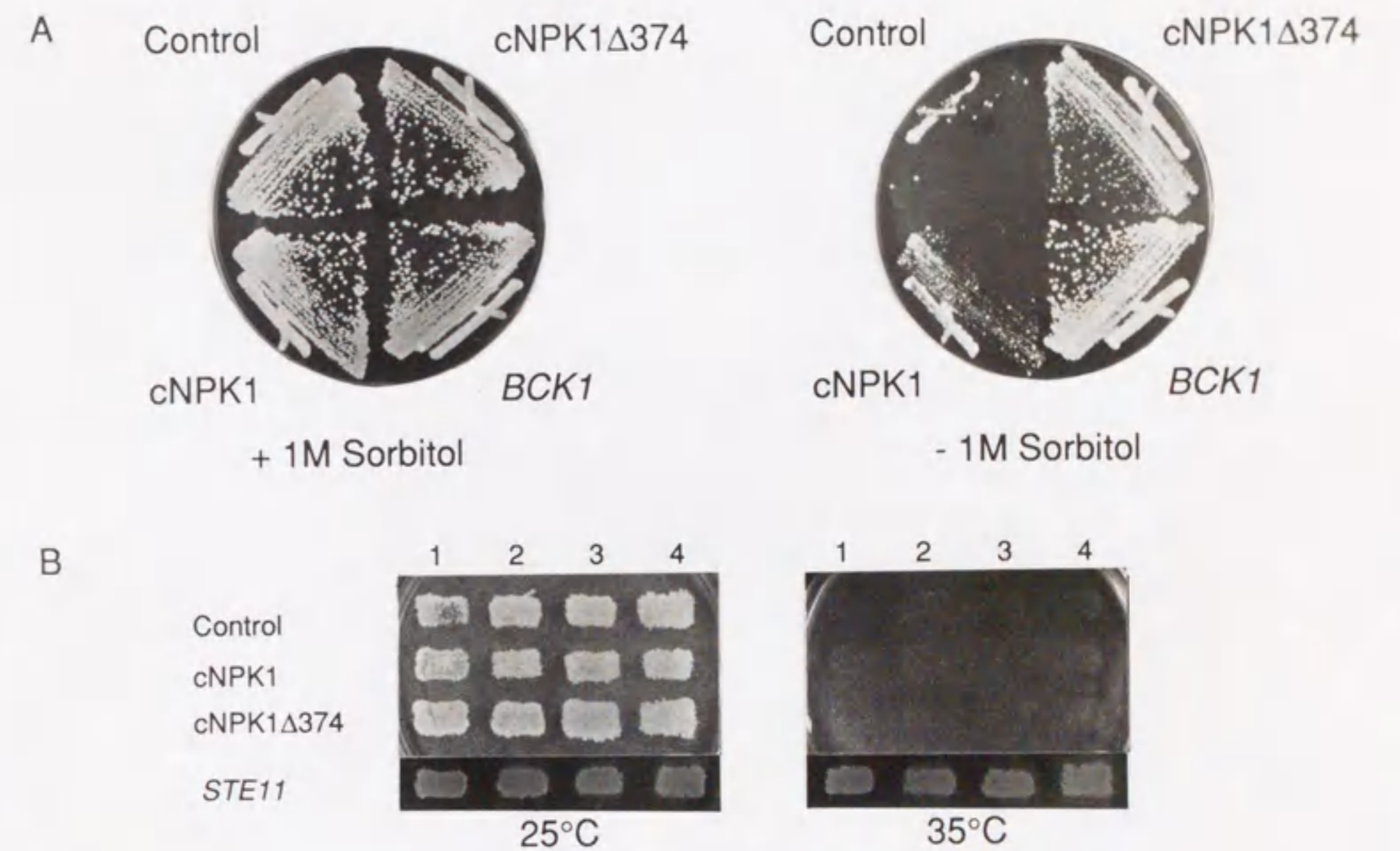


図 4

(A) NPK1 cDNA による *bck1Δ* 変異の相補

下記のそれぞれのプラスミドを持つ *S. cerevisiae* DL251(*bck1Δ/bck1Δ*) 株を 1M のソルビトールを含む寒天培地 (左) と含まない寒天培地 (右) で 35 °C で 2 日間培養した。Control ; ベクタープラスミド YEpGAP112、cNPK1 ; YEpGAP112-NPK1、cNPK1Δ374 ; YEpGAP112-Δ374、*BCK1* ; pRS314[*BCK1*]

(B) cNPK1 及び cNPK1Δ374 の発現が STE11 温度感受性株に及ぼす影響

(A)と同様のそれぞれのプラスミドを持つ KMY167-7A 株のパッチを形質転換体選抜培地で 25 °C (左) と 35 °C (右) で生育させた。このプレートに 15 Dau 株を一面に生育させたプレート上にレプリカし、それぞれの温度で一晩接合させた。接合体の形成を確認するために、このプレートを適当な栄養源を含む最小培地にレプリカし、さらに 2 日間それぞれの温度で生育させた。上の数字は独立の形質転換体を示している。



図5 NPK1Δ374 による *pkc1Δ* 変異の抑圧  
YE<sub>p</sub>GAP112 (control)、YE<sub>p</sub>GAP112-NPK1 (cNPK1)、YE<sub>p</sub>GAP112-Δ374 (cNPK1Δ374)、YE<sub>p</sub>352[PKC1] (PKC1) を持  
つ出芽酵母 SNY235 株 (*pkc1Δ::LEU2*) を 1 M のソルビトールを含む培地 (左) と含まない培地 (右) で 25 °C で生育さ  
せた。

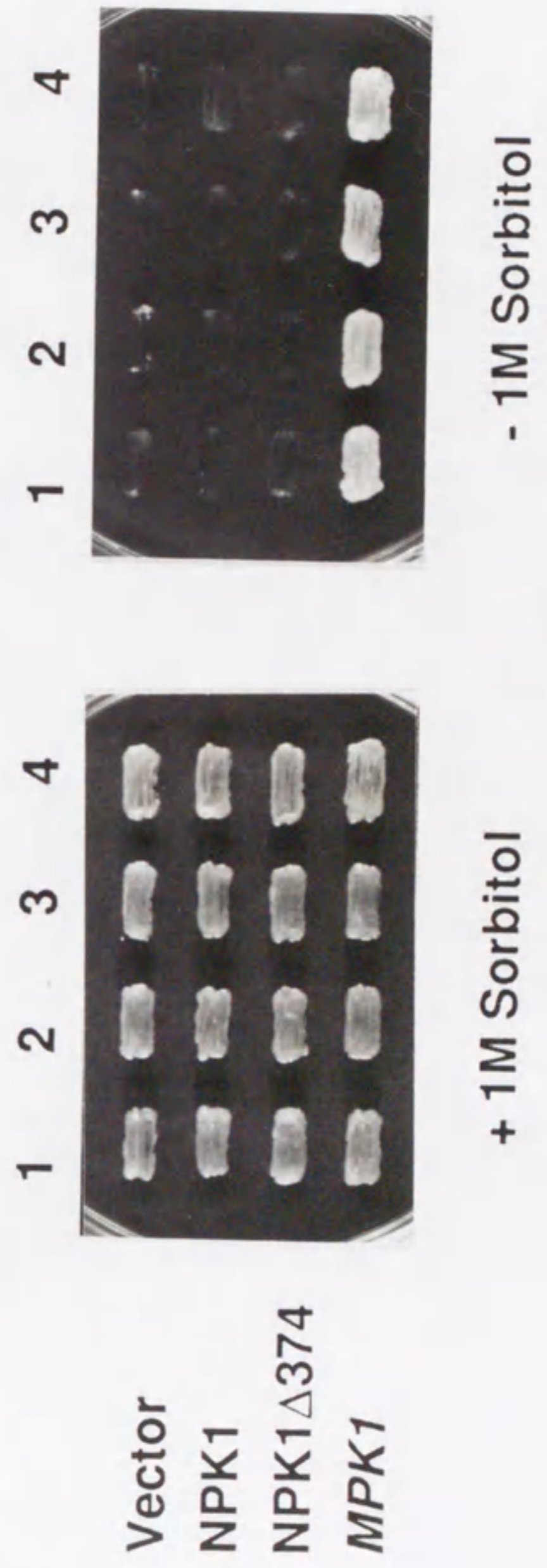


図6 NPK1 cDNA の発現が *mpk1* 変異株に及ぼす影響  
 YEpGAP112 (control)、YEpGAP112-NPK1 (cNPK1)、YEpGAP112- $\Delta$ 374 (cNPK1 $\Delta$ 374)、YEp352[MPK1] (MPK1) を持  
 つ出芽酵母 DL456 株 (*mpk1* $\Delta$ ::TRP1) を 1 M のソルビトールを含む培地 (左) と含まない培地 (右) で 35 °C で生育させ  
 た。

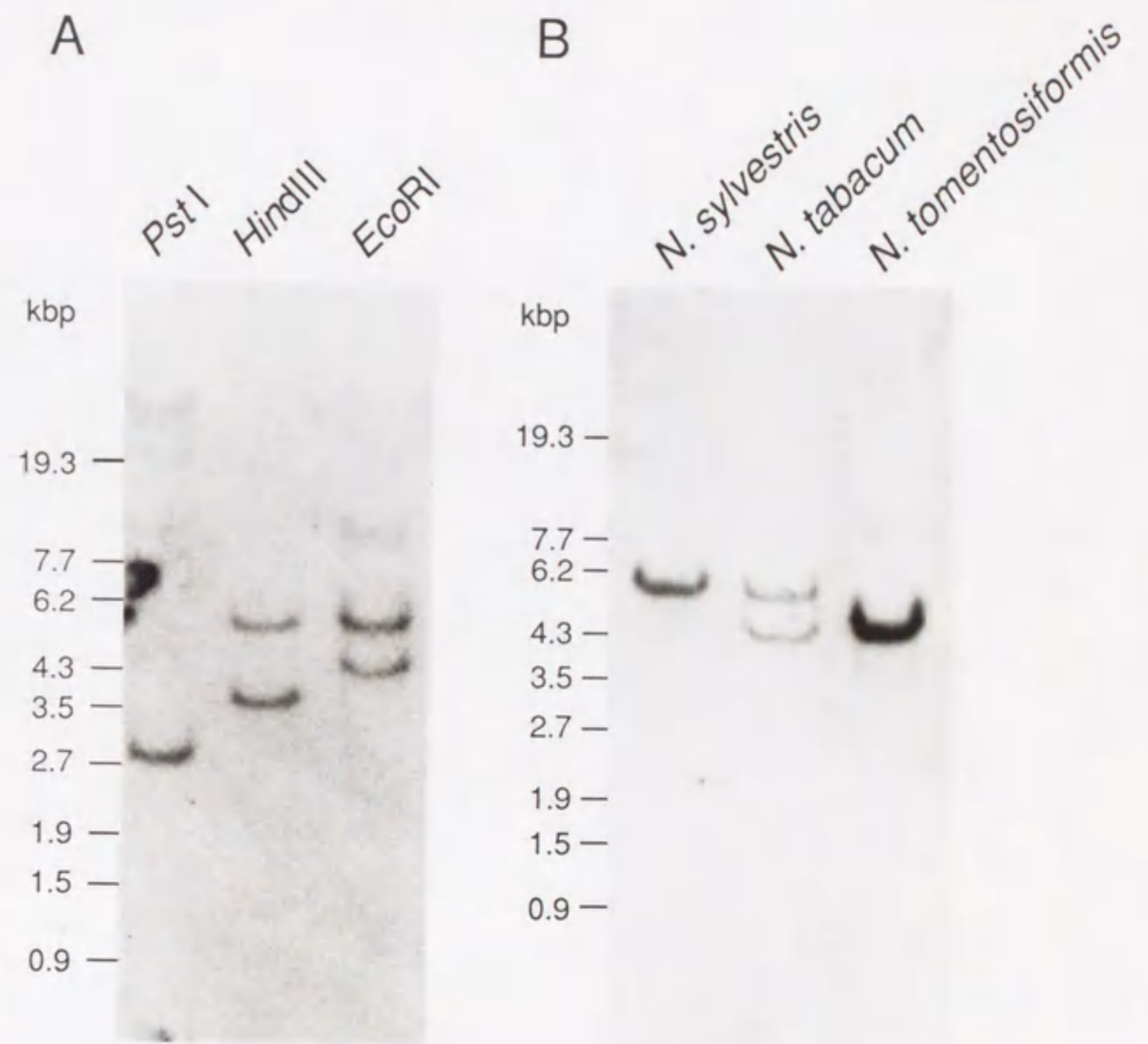


図7 *Nicotiana* 属のゲノム DNA に対するサザンブロット解析

(A) *N. tabacum* のゲノム DNA 10  $\mu$ g を *Pst*I、*Hind*III、*Eco*RI でそれぞれ完全分解した後、0.7% アガロースで分画し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。プローブには  $^{32}$ P で標識した CA7 DNA 断片を用いた。

(B) *Nicotiana* 属の各植物種のゲノム DNA を *Eco*RI で完全分解し、(A) と同様な実験を行った。

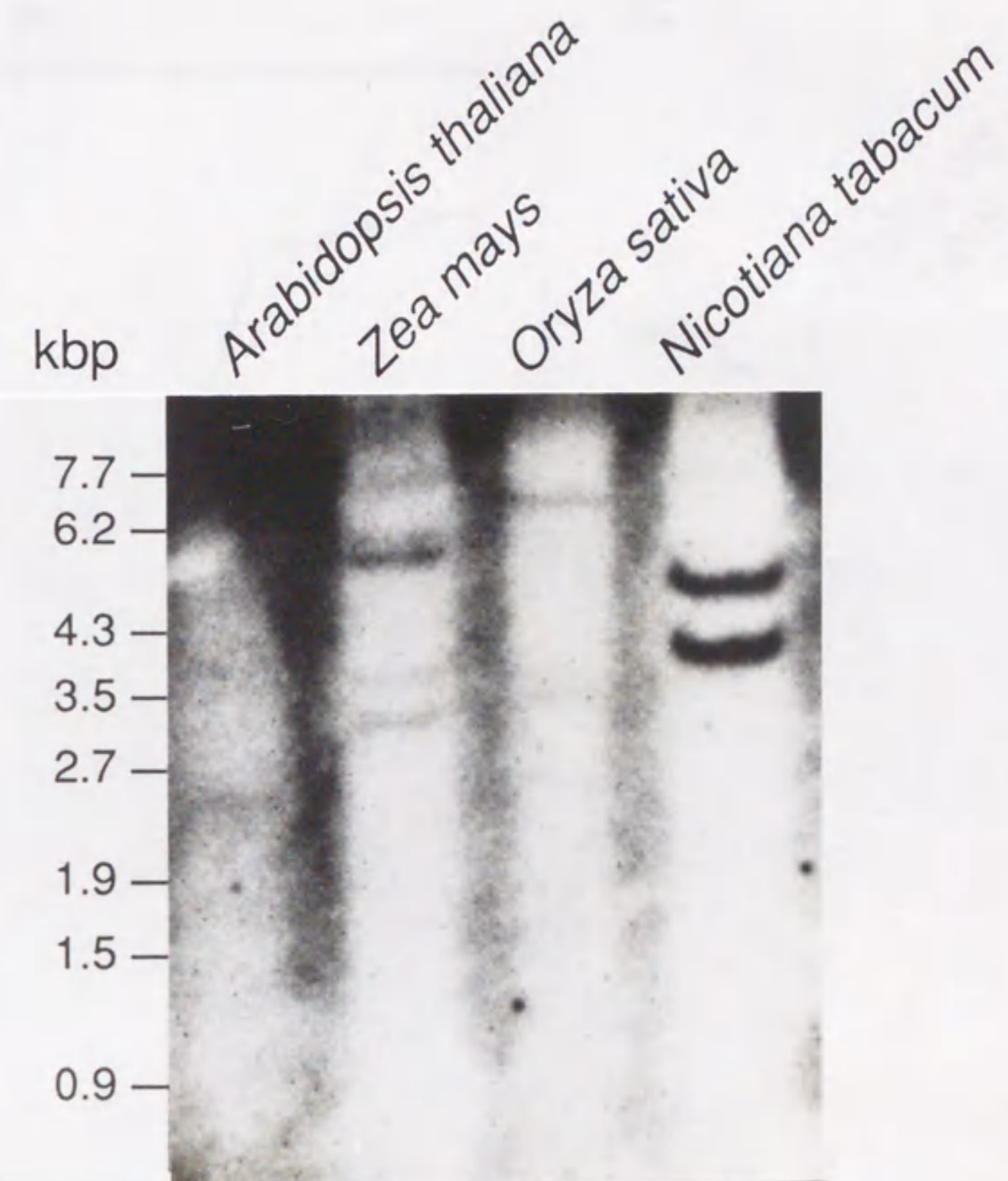


図8 様々な植物種に見られる *NPK1* 様塩基配列

シロイヌナズナ (1  $\mu$ g)、トウモロコシ (20  $\mu$ g)、イネ (5  $\mu$ g)、タバコ (10  $\mu$ g) のゲノム DNA を *EcoRI* で完全分解し、サザンブロット解析を行った。プローブには  $^{32}$ P で標識した CA7 DNA 断片を用い、ハイブリダイゼーションは 6xSSC、1% SDS 溶液中で 55  $^{\circ}$ C で行った。

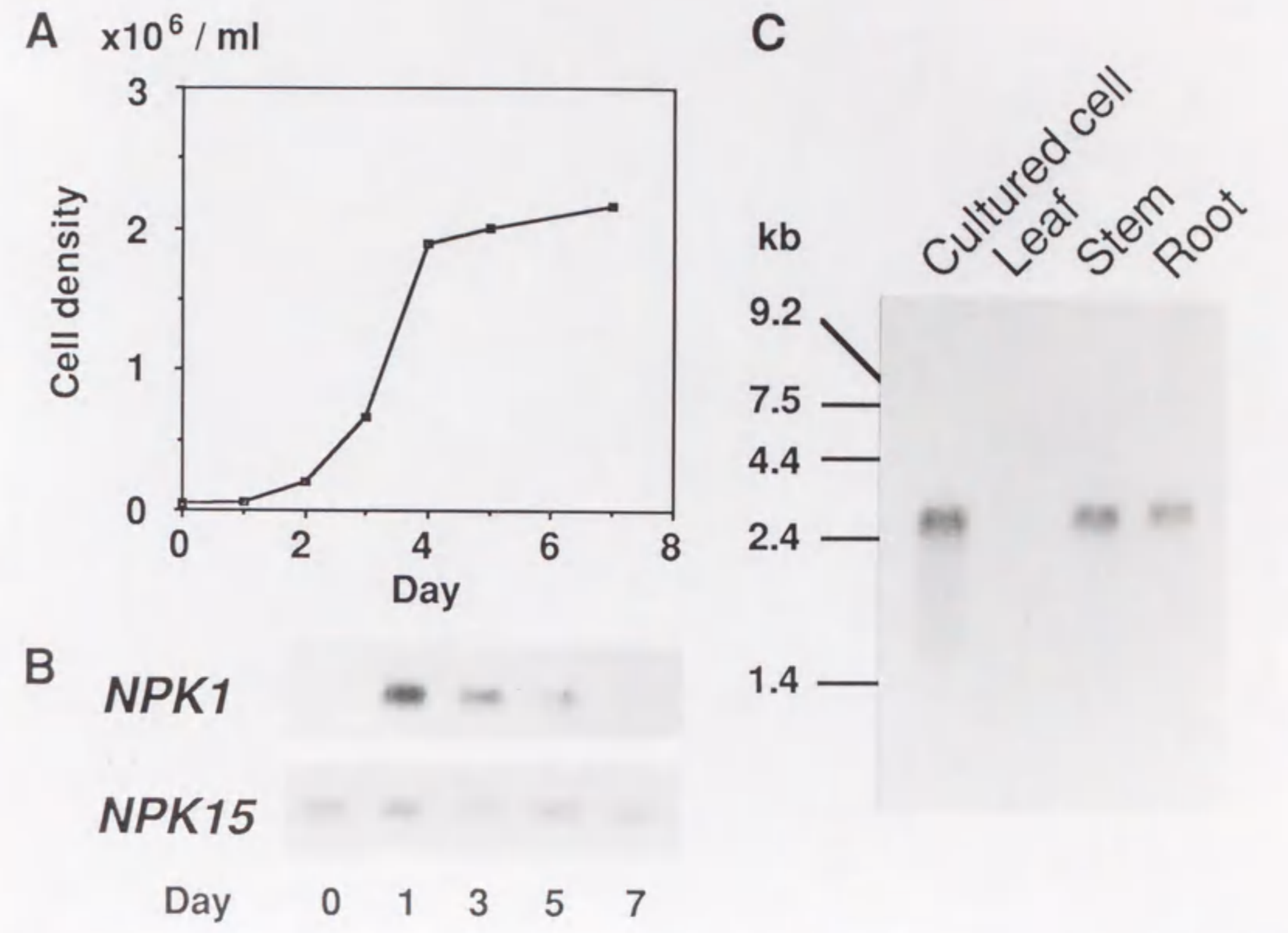


図9 *NPK1* 遺伝子の発現パターン

(A) 懸濁培養細胞 BY-2 の生長曲線

横軸に植え継ぎ後の日数、縦軸に細胞濃度がプロットしてある。

(B) BY-2 の増殖過程における *NPK1* の発現量の変化

植え継ぎ後、0日目、1日目、3日目、5日目、7日目の BY-2 からポリ A<sup>+</sup> RNA を調製し、アガロース変性ゲルで分画した。電気泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーし、RNA ブロット解析を行った。プローブには <sup>32</sup>P で標識した CA7 DNA 断片と未知のタンパク質をコードするタバコの遺伝子の cDNA (N1510) を用いた。

(C) タバコ植物個体の各器官における *NPK1* の発現量

植え継ぎ後 1 日目の BY-2 (Cultured cells)、根 (Root)、茎 (Stem)、成熟葉 (Leaf) からポリ A<sup>+</sup> RNA を調製し、(B) と同様な手順で RNA ブロット解析を行った。左の数字はサイズマーカーの位置を示している。

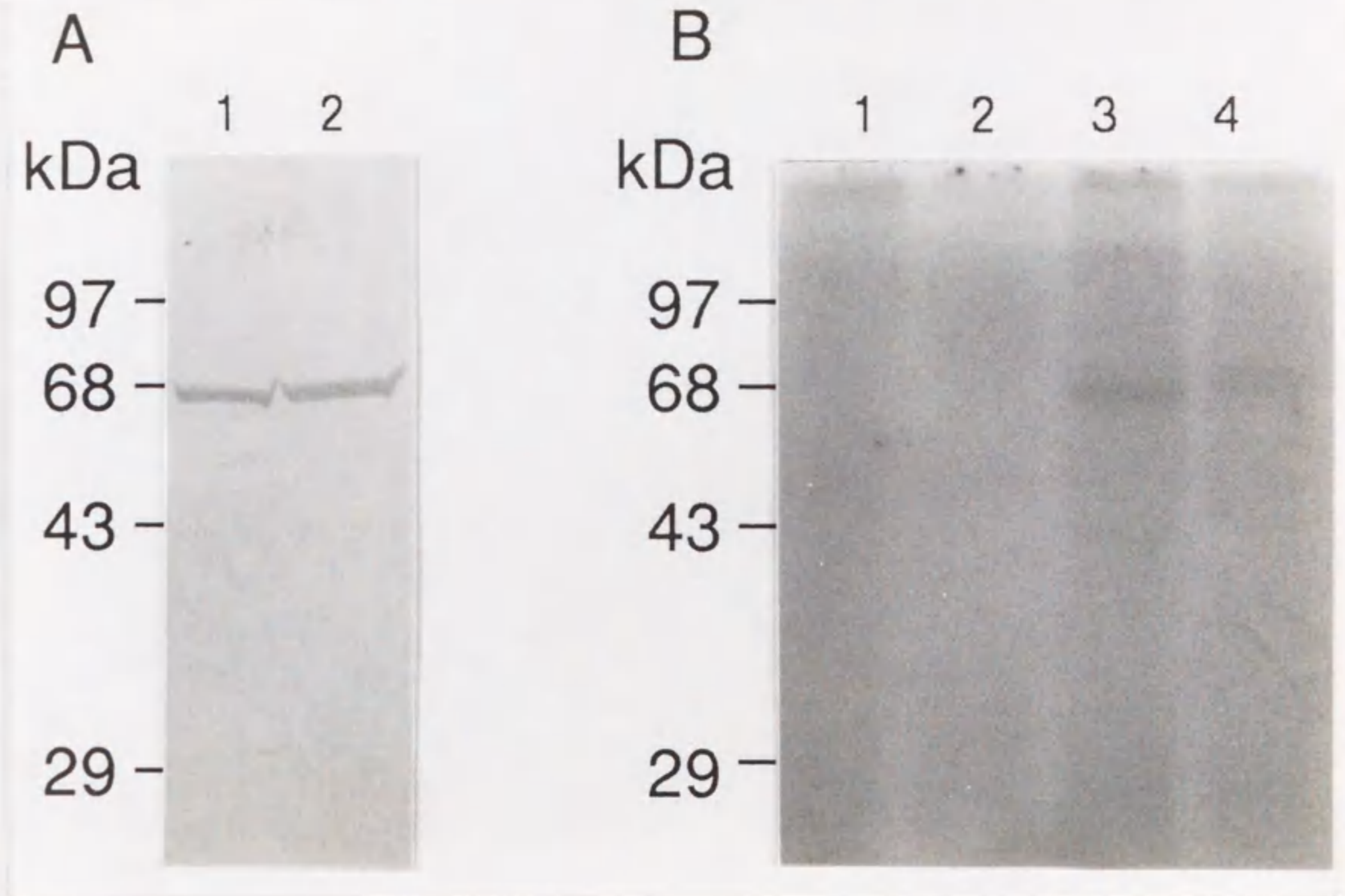


図10 タバコ培養細胞におけるNPK1タンパク質

(A) 抗NPK1抗体を用いたイムノブロッティング

BY-2から調製した全タンパク質100 $\mu$ gをSDSポリアクリルアミドゲルで分画後、ニトロセルロース膜に転写し、ウサギ抗NPK1血清を用いてイムノブロッティングを行った。

レーン1；対数増殖期のBY-2全タンパク質

レーン2；定常期のBY-2全タンパク質

(B) NPK1の自己リン酸化活性

BY-2から調製した全タンパク質2mgをウサギ抗NPK1抗体と反応させた後、プロテインAセファロースを用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物の1/10量を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と反応させた後、SDSポリアクリルアミドゲルで分画し、オートラジオグラフィを行った。

レーン1、2；免疫前のウサギ血清を用いた。レーン3、4；NPK1合成ペプチドで

免疫したウサギ血清を用いた。レーン1、3；対数増殖期のBY-2全タンパク質。レ

ーン2、4；定常期BY-2の全タンパク質。



Budding yeast

Mating pheromone

Receptor

G proteins

STE20 PKC1

STE11 BCK1

STE7 MKK1/MKK2

FUS3/KSS1 MPK1

Mating

Cell growth

Plant

NPK1

NPK2

MAPK hom.

Cell growth ?

Animal

Growth factor

Receptor

Ras

Raf

MEKK(MAPKKK)

MEK(MAPKK)

MAPK

Cell growth

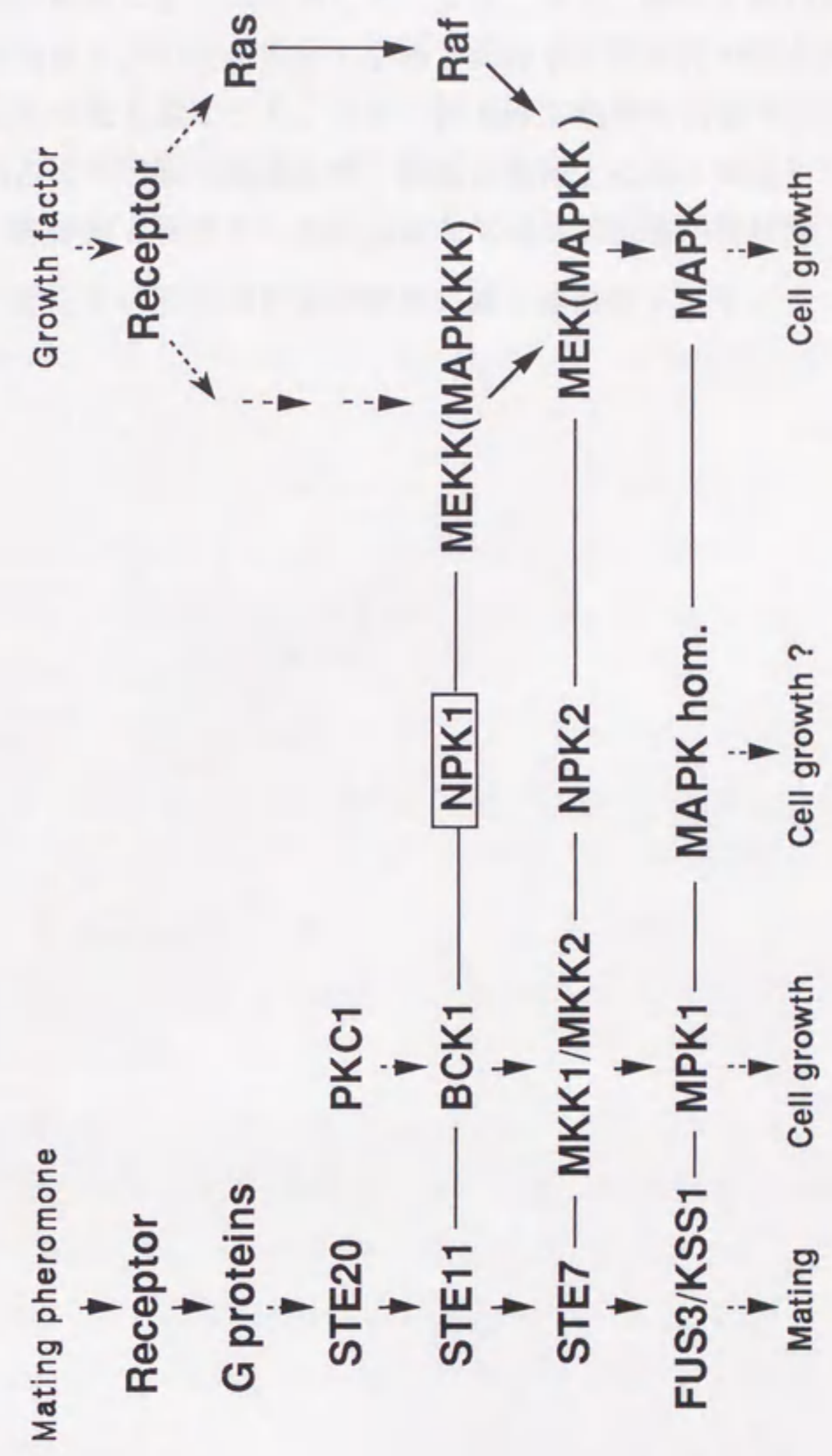


図 11 様々な生物種に保存されている MAP キナーゼカスケードの模式図  
 アミノ酸配列に有意な相同性が見られるものは線で結んだ。



# 謝辞

本研究の遂行にあたり、常に適切な御指導、御示唆を頂いた名古屋大学理学部生物学科町田泰則教授に厚く御礼申し上げます。また、酵母を用いた実験を行なうにあたり、御指導、御助言を頂いた名古屋大学理学部分子生物学科の松本邦弘教授ならびに入江賢児氏に深く感謝の意を表します。また、抗 NPK1 抗体を作製するにあたり御協力、御助言を頂いた名古屋大学医学部医学科、萩原正敏博士に厚く御礼申し上げます。最後に、数々の御助言、御援助を頂きました名古屋大学理学部生物学科植物学第二講座の吉岡泰博士、宇佐美昭二博士をはじめ研究室の皆様に深く感謝致します。

## 引用文献

1. Sakai, S. and Hanagata, T. 1983. Purification of an auxin-binding protein from etiolated mung bean seedlings by affinity chromatography. *Plant Cell Physiol.* **24**, 685-693.
2. Lober, M. and Klambt, D. 1985. Auxin-binding protein from Coleptile Membranes of corn (*Zea mays* L.). I Purification by immunological methods and characterization. *J. Biol. Chem.* **260**, 9848-9853
3. Tillmann, U., Viola, G., Kayser, B., Siemeister, G., Hesse, T., Palme, K., Lober, M. and Klambt, D. 1989. cDNA clones of auxin-binding protein from corn coleptiles (*Zea mays* L.): Isolation and characterization by immunological methods. *EMBO J.* **8**, 2463-2467.
4. Key, J. L. 1989. Modulation of gene expression by auxin. *Bioessays* **11**, 52-58.
5. Ranjeva, R. and Boudet, A. M. 1987. Phosphorylation of proteins in plants: regulatory effects and potential involvement in stimulus/response coupling. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **38**, 73-93.
6. Housey, G. M., Johnson, M. D., Hsiao, W. L. W., O'Brian, C. A., Murphy, J. P., Kirschmeier, P. and Weinstein, I. B. 1988. Overproduction of Protein Kinase C Causes Disordered Growth Control in Rat Fibroblasts. *Cell* **52**, 343-354.
7. Muramatsu, M., Kaibuchi, K. and Arai, K. 1989. A protein kinase C cDNA without the regulatory domain is active after transfection *in vivo* in the absence of phorbol ester. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 831-836.
8. Hata, A., Akita, Y., Konno, Y., Suzuki, K. and Ohno, S. 1989 Direct evidence that the kinase activity of protein kinase C is involved in transcriptional activation through a TPA-responsive element. *FEBS Lett.* **252**, 144-146.
9. Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**, 607-614.
10. Levin, D. E., Field, F. O., Kunisawa, R., Bishop, J. M. and Thorner, J. 1990. A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* **62**, 213-224.
11. Toda, T., Shimanuki, M. and Yanagida, M. 1993. Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape

- control. EMBO J. **12**, in press.
12. Lee, K. S., and Levin, D. E. 1992. Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. Mol. Cell. Biol. **12**, 172-182.
  13. Irie, K., Takase, M., Lee, K. S., Levin, D. E., Araki, H., Matsumoto, K. and Oshima, Y. 1993. MKK1 and MKK2, encoding *Saccharomyces cerevisiae* MAP kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. Mol. Cell. Biol. **13**, 3076-3083.
  14. Lee, K. S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K. and Levin, D. E. 1993. A yeast MAP kinase homolog (*MPK1*) mediates signalling by protein kinase C. Mol. Cell. Biol. **13**, 3067-3075.
  15. Ahn, N. G., Seger, R. and Krebs, E. G. 1992. The mitogen-activated protein kinase activator. Curr. Opin. Cell Biol. **4**, 992-999.
  16. Pelech, S. L. and Sanghera 1992. MAP kinase: charting the regulatory pathways. Science **257**, 1355-1356.
  17. Pelech, S. L. and Sanghera 1992. Mitogen-activated protein kinase: versatile transducers for cell signalling. Trends Biochem Sci. **17**, 233-238.
  18. Blenis, J. 1993. Signal transduction via the MAP kinase: Proceed at your own RSK. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **90**, 5889-5892.
  19. Marsh, L., A. M. Neiman, and I. Herskowitz. 1991. Signal transduction during pheromone response in yeast. Annu. Rev. Cell Biol. **7**, 699-728.
  20. Zhou, Z., A. Gartner, R. Cade, G. Ammerer, and B. Errede. 1993. Pheromone induced signal transduction in *S. cerevisiae* requires the sequential function of three protein kinases. Mol. Cell. Biol. **13**, 2069-2080.
  21. Kato, K., Matsumoto, T., Koiwai, A., Mizusaki, S., Nishida, K., Noguchi, M. and Tamaki, E. 1972. Liquid suspension culture of tobacco cells. p. 689-695. In G. Terui (ed.), Fermentation Technology Today. Soc Ferment. Technol., Japan.
  22. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. 1983 Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. **153**, 163-168.
  23. Cheleff, D. T. and Tachell, T. 1985. Molecular cloning and characterization of *STE7* and *STE11* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **5**, 1878-1886.
  24. Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. and Wigler, M. 1987 Three different genes

- in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* **50**, 277-2874.
25. Parker, P. J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E, Stabel, S., Waterfield, M. D. and Ullrich, A. 1986. The complete primary structure of protein kinase C - the major phorbol ester receptor. *Science* **22**, 853-859.
  26. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
  27. Rhodes, N., Connell, L. and Errede, B. 1990. STE11 is a protein kinase required for cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast. *Genes & Dev.* **4**, 1862-1874.
  28. Hanks, S. K. and Quinn, A. M. 1991 Protein kinase catalytic domain sequence database: Identification of conserved features of primary structure and classification of family members, p. 38-62. In *Methods in Enzymol.* vol. **200**. Academic Press, London.
  29. Wang, Y., Xu, H.-P., Riggs, M., Rodgers, L. and Wigler, M. 1991. *byr2*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a protein kinase capable of partial suppression of the *ras1* mutant phenotype. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3554-3563.
  30. Celemza, J. L. and Carlson, M. 1986. A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* **233**, 1175-1180.
  31. Walker, J. C. and Zhang, R. 1990. Relationship of a putative receptor protein kinase from Maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature* **345**, 743-746.
  32. Levin, D. E., and Bartlett-Heubusch, E. 1992. Mutants in the *S. cerevisiae* *PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J. Cell Biol.* **116**, 1221-1229.
  33. Cairns, B. R., Ramer, S. W. and Kornberg, R. D. 1992. Order of action of components in the yeast pheromone response pathway revealed with a dominant allele of the STE11 kinase and the multiple phosphorylation of the STE7 kinase. *Genes & Dev.* **6**, 1305-1318.
  34. Boulton, T. G., Yancopoulos, G. D., Gregory, J. S., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J. and Cobbs, M. H. 1990. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* **249**, 64-65.
  35. Crews, C. M., Alessandrini, A. and Erikson, R. L. 1992. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the *ERK* gene product. *Science* **258**, 478-480.

36. Kosako, H., Nishida, E. and Gotoh, Y. 1993. cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathway in yeasts to vertebrates. *EMBO J.* **12**, 787-794.
37. Wu, J., Harrison, J. K., Vincent, L. A., Haystead, C., Haystead, T. A. J., Michel, H., Hunt, D. F., Lynch, K. R. and Sturgill, T. W. 1993. Molecular structure of a protein-tyrosine/threonine kinase activating p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase: MAP kinase kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 173-177.
38. Errede, B., Gartner, A., Zhou, Z., Nasmyth, K. and Ammerer, G. 1993. A pheromone induced kinase cascade in *S. cerevisiae* of the FUS3 kinase by the STE7 kinase *in vitro*. *Nature* **362**, 261-264.
39. Lange-Carter, C. A., Pleoman, C. M., Gardner, A. M., Blumer, K. J. and Johnson, G. L. 1993. A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and raf. *Science* **260**, 315-319.
40. Howe, L. R., Leever, S. J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P. and Marshall, C. J. 1992. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* **71**, 335-342.
41. Dent, P., Haser, W., Haystead, T. A. J., Vincent, L. A., Roberts, T. M. and Sturgill, T. W. 1992. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and *in vitro*. *Science* **257**, 1404-1407.
42. Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X.-f., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R. and Avruch, J. 1992. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**, 417-421.
43. Tsuda, L., Inoue, Y. H., Yoo, M.-A., Mizuno, M., Hata, M., Lim, Y.-M., Adachi-Yamada, T., Ryo, H., Masamune, Y. and Nishida, Y. 1993. A protein kinase similar to MAP kinase activator acts downstream of the raf kinase in *Drosophila*. *Cell* **72**, 407-414.
44. Vojetek, A. B., Hollenberg, S. M. and Cooper, J. A. 1993. Mammalian Ras interacts directly with serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**, 205-214.
45. Zhang, X.-f., Settleman, J., Kyriakis, J. M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S. J., Marshall, S. J., Bruder, J. T., Rapp, U. F. and Avruch, J. 1993. Normal and oncogenic p21<sup>ras</sup> proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* **364**, 308-313.
46. Warne, P. H., Viciano, P. R. and Downward, J. 1993. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 *in vitro*. *Nature* **364**, 352-355.
47. Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Woude, G. F. V. and Cooper, J. A. 1993. Mos

stimulates MAP kinase in Xenopus oocytes and activates a MAP kinase kinase *in vitro*. Mol. Cell. Biol. 13, 2546-2553.

48. Duerr, B., M. Gawienowski, T. Ropp, and T. Jacobs. 1993. MsERK1: a mitogen-activated protein kinase from a flowering plant. The Plant cell 5, 87-96.

49. Claudia, J., Pay, A., Bogre, L., Hirt, H. and Heberle-Bors, E. 1993. The plant homologue of MAP kinase is expressed in a cell-cycle dependent and organ-specific manner. Plant J. 3, 611-617.

stimulates MAP kinase in Xenopus oocytes and activates a MAP kinase kinase *in vitro*. Mol. Cell. Biol. 13, 2546-2553.

48. Duerr, B., M. Gawienowski, T. Ropp, and T. Jacobs. 1993. MsERK1: a mitogen-activated protein kinase from a flowering plant. The Plant cell 5, 87-96.

49. Claudia, J., Pay, A., Bogre, L., Hirt, H. and Heberle-Bors, E. 1993. The plant homologue of MAP kinase is expressed in a cell-cycle dependent and organ-specific manner. Plant J. 3, 611-617.