

シロイヌナズナのHis-Aspリン酸リレー情報ネットワークの解析：  
リン酸基受容体型制御因子AIRRから見たシロイヌナズナ  
His-Aspリン酸リレー系の機能特徴解析

寺村 誠

報告番号	甲第	4950	号
------	----	------	---

①

シロイヌナズナのHis-Asp リン酸リレー情報ネットワークの解析  
：リン酸基受容体型制御因子ARRからみたシロイヌナズナ  
His-Asp リン酸リレー系の機能特徴解析

名古屋大学大学院生命農学研究科  
微生物学研究室

今村 綾

## 目次

略語表	5
第一章 序論	6
図表	9
第二章 ARR遺伝子群の検索と同定解析： 一次構造からみたタイプA ARR群およびタイプB ARR群の分類	
緒言	14
実験材料と実験方法	15
結果	19
考察	21
図表	24
第三章 タイプA ARR群の機能解析： 大腸菌His-Asp リン酸リレー系を用いたタイプA ARR群の機能的相補解析	
緒言	30
3-1: <i>in vivo</i> 解析	
実験材料と実験方法	31
結果	32
3-2: <i>in vitro</i> 解析	
実験材料と実験方法	34
結果	34
考察	36
図表	38
第四章：タイプA, タイプB ARR群と相互作用する因子の検索： two-hybrid 法を用いたARR群の機能解析	
緒言	41
実験材料と実験方法	42
結果	45
考察	47
図表	49
第五章 ARR 制御因子群のリン酸リレー機能解析： AHP を用いた <i>in vitro</i> リン酸転移解析	
緒言	50
実験材料と実験方法	51
結果	52
考察	52
図表	54

第六章 細胞内局在性解析： 玉葱表皮細胞を用いたHis-Asp リン酸リレー系因子の細胞内局在性解析	
緒言	55
実験材料と実験方法	56
結果	57
考察	58
図表	59
第七章 タイプB ARR群 機能ドメイン解析1：Bモチーフ3次元構造解析	
緒言	61
実験材料と実験方法	61
結果	62
考察	63
図表	64
第八章 タイプBARR群 機能ドメイン解析2：DNA結合能解析	
緒言	68
実験材料と実験方法	68
結果	69
考察	70
図表	72
第九章 植物固体レベルからみたARR群の生理的解析	
9-1：転写レベルでの発現様式解析	
緒言	75
実験材料と実験方法	75
結果	76
考察	77
図表	78
9-2：Gus形質転換体植物を用いたタイプAARR6発現様式の解析	
緒言	81
実験材料と実験方法	81
結果	84
考察	85
図表	86
第十章 総合考察	88
図表	94

要約	96
引用文献	100
報文目録	107
参考論文目録	108
謝辞	

略語表

DNA: deoxynucleic acid

a.a.: amino acid

ATP: adenosine triphosphate

cAMP: cyclic adenosine 3', 5' monophosphate

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

His: histidine residue

Asp: aspartic acid residue

EST: expression sequence tag line

NMR: nuclear magnetic resonance

dNTP: deoxynucleotide triphosphate

APS: ammonium persulfate

TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

ssDNA: single strand DNA

dsDNA: double strand DNA

cDNA: complement DNA

IPTG: isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate poly acryl amide gel electrophoresis

Hyg: hygromycin

Car: carbenicilline

GFP: green fluorescent protein

GUS:  $\beta$ -glucuronidase

P35S : cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter

MS: Murashige-Skoog

$\beta$ -Met:  $\beta$ -mercaptoethanol

## 第一章 緒言

## 情報伝達機構

生物にとって環境変化に対応する手段を獲得することは、生命維持に必須であり動物、昆虫、植物、そして細菌にいたるまでそれぞれに適切な環境適応手段を獲得・多様化させ、今日みられるような形態に至り、さらに刻々と変化する自然環境に対して現在もなお適応を続けている。このように生物（細胞）外からの環境シグナルを感知し、その情報を個々の細胞内遺伝子転写レベルまで伝達する経路は非常に重要な生物機能のひとつであり、その分子機構の解析は分子生物の非常に大きな視点のひとつで、動物（ほ乳類）や細菌の情報伝達機構の解析は早くから行われていた。多細胞生物にとって外環境（シグナル）は細胞外すなはち隣接した細胞である場合がほとんどであり単細胞生物にとってのそれは自然環境の様々な環境要因に相当しその機構は一見かけ離れているようだがシグナルの受容・導入に関する基本的なしくみは大変似通っている（figure 1-1）。動物細胞にはシグナルを受容する様々なレセプターが存在し、その情報は細胞内で一端統合されそして最終的な標的遺伝子の発現に最適な伝達経路（MAPキナーゼカスケードetc）に分配されている（figure 1-2）。一方、大腸菌に代表される原核生物においてはHis-Asp リン酸リレー系という情報伝達機構が主に用いられているが、自然環境からのそれぞれのシグナルを感受するセンサーが存在しその情報を下流の因子へと伝達している。その情報伝達機構の中にも情報を統合する新たな因子が同定され複雑になる伝達経路を制御していることが明らかにされつつある（figure 1-3）。これらの情報伝達はリン酸基の転移であったり、分子間の物理的な相互作用であったり、cAMPやCaイオンといったセカンドメッセンジャーであったりするが、いずれの場合も外界からの環境シグナルに対応した遺伝子発現をスムーズに行うことを目的としておりそれぞれの情報伝達分子機構は生物種の差異に関わりなく非常に広範囲で保存されていることが明らかである。シグナルの受容体・シグナルの伝達・シグナルに見合った遺伝子の発現という一連の機構形態は高度に保存されており、原核生物・真核生物あるいは単細胞生物・多細胞生物それぞれの生活環境にみあった分子および分子機構を（figure 1-1）独自に分化させていったと考えられる。このように、生物にとって情報伝達というカテゴリーは遺伝子発現制御・代謝・分化・成長・輸送などと並んで非常に重要な分野であるといえる。



## 新規情報伝達機構

近年、植物、酵母、カビにおいてはさらに興味深い情報伝達機構が存在していることが明らかとなった (figure 1-1)。

1993年Changらによって、高等植物シロイヌナズナはエチレン植物ホルモン応答の情報伝達にバクテリア型のヒスチジンキナーゼ (figure 1-3, figure 1-4) が機能していることが明らかとなりETR1=Ethylene resistant 1と称された (14)。また、出芽酵母においても浸透圧応答MAPキナーゼカスケードの上流にバクテリア型の情報伝達因子が機能していることが明らかにされ (37)、これらの遺伝子産物の存在はそれまで原核生物に固有のものであると考えられていた二成分制御系情報伝達機構が真核生物にも存在していることを推測させ非常に注目を集めた (figure 1-1)。“二成分制御系情報伝達機構とよばれていたこの情報伝達機構はセンサーヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターの2因子がペアで特定の外環境シグナル応答に対応する有効な手段 (2, 21, 42, 45, 55, 56, 64, 65, 66, figure 1-3) で、大腸菌をはじめとした原核生物はその全遺伝子中に高い割合でこの二成分制御系に属する情報伝達因子を保持していることがゲノムシーケンスが決定された様々なバクテリアで明らかである (41, 43)。この情報伝達機構はセンサーに保存されているHis残基とレシーバーに保存されているAsp残基間でのリン酸基の転移により下流へと情報が伝達されレシーバーは転写因子として標的遺伝子の転写を調節する。この外界からのシグナルを入力するセンサーキナーゼのATP依存的自己リン酸化に始まるリン酸リレーは、さらに新たなリン酸リレー仲介因子HPT因子 (Histidine-containing phosphotransfer) を加え (26, 27, 70)、“His残基”と“Asp残基”間でのリン酸リレーを基盤とした多段階リン酸リレーの概念を確立させるにいたり (26) 現在では“His=Aspリン酸リレー情報伝達機構 (ネットワーク)”と称されている (figure 1-3)。このような情報伝達機構が植物や真核微生物である酵母や粘菌の環境応答の上流に存在し得ることが明らかとなり (14, 16, 37) この機構の進化的重要性が示唆された (figure 1-1)。

1996年に開始され2000年に終了したシロイヌナズナの日欧米国際協調ゲノムプロジェクトの分析結果 (1) に拠ると、約25,000同定されたシロイヌナズナ全遺伝子のうち情報伝達系に関連する因子は約10%を占めていたことから情報伝達機構の重要性が推測できる。植物は光・感染・温度・湿度 (浸透圧)・栄養・接触・重力といった様々な自然環境要因に対して、組織と細胞間でのコミュニケーションをとりつつ、ダイナミックな形態変化や再構築を繰り返しながら種の保存という最終目的に帰している。このようなモデル植物シロイヌナズナの環境

変化に対する大胆かつ緻密な形態変化を伴った環境適応の最も上流、シグナル受容に注目しその情報伝達機構を分子レベルで明らかにすることにより、生物の中で最も種の数が多いといわれる植物の環境応答の特徴、および環境適応の特徴解明の手がかりが得られると思われる。

このシロイヌナズナゲノムプロジェクトを背景にしてHis-Aspリン酸リレー系を構成する3種類の因子について遺伝学的、生理学的手法を用いてこれまでに複数個ずつcDNAクローンを得るに至り (figure 1-4) そのうちレスポンスレギュレーターに関しては約20種類の存在が推測されている (table 1)。ここではArabidopsis Response Regulator: ARR と名付けたこれら一群のレスポンスレギュレーターcDNAの取得および機能解析を遺伝学的、生化学的手法を用いて行いシロイヌナズナにおけるHis-Aspリン酸リレー情報伝達機構の機能特徴の検討を行ったのでここに報告する。

ここにこのシロイヌナズナゲノムプロジェクトに参加したアメリカ・日本・ヨーロッパのグループの皆様に心より敬意を表したい。

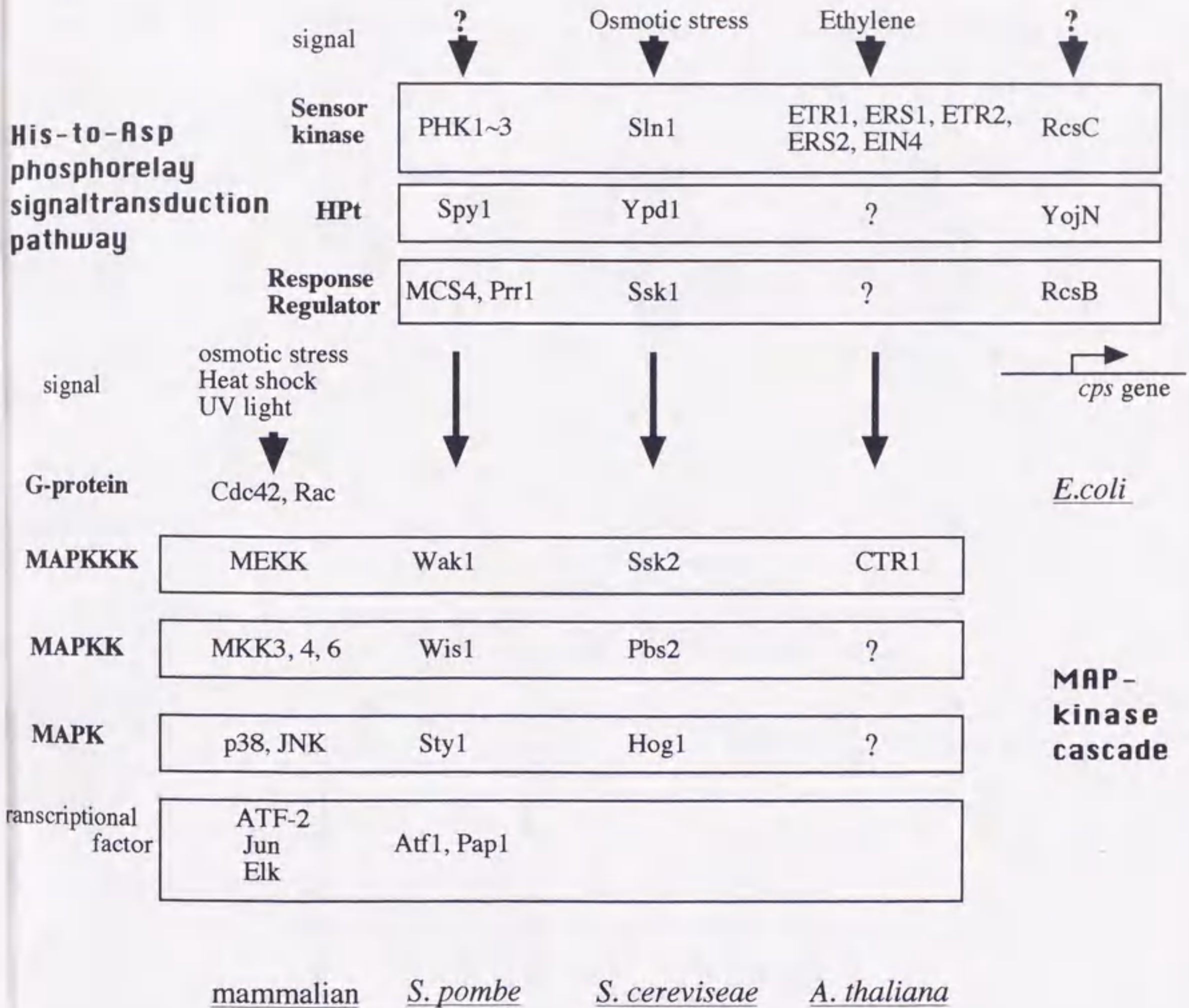


figure 1-1 A pertinent models of cellular signal pathways combined bacterial-type His-to-Asp phosphorelay signal transduction pathway and animal-type MAP kinase cascades in *S.cerevisiae* osmotic stress response and *A.thaliana* ethylene response (the signal of PHK1~3 in *S. pombe* is remained to be determined).

Here also shows the osmotic stress, heat shock and UV stress response pathway of mammalian MAP kinase cascade and the cps(capcid synthesis ) gene expression pathway dependent on the typical HKs-HPt-RRs signal transduction pathway (the signal for the RcsC HK is remained to be determined in our lab.) .

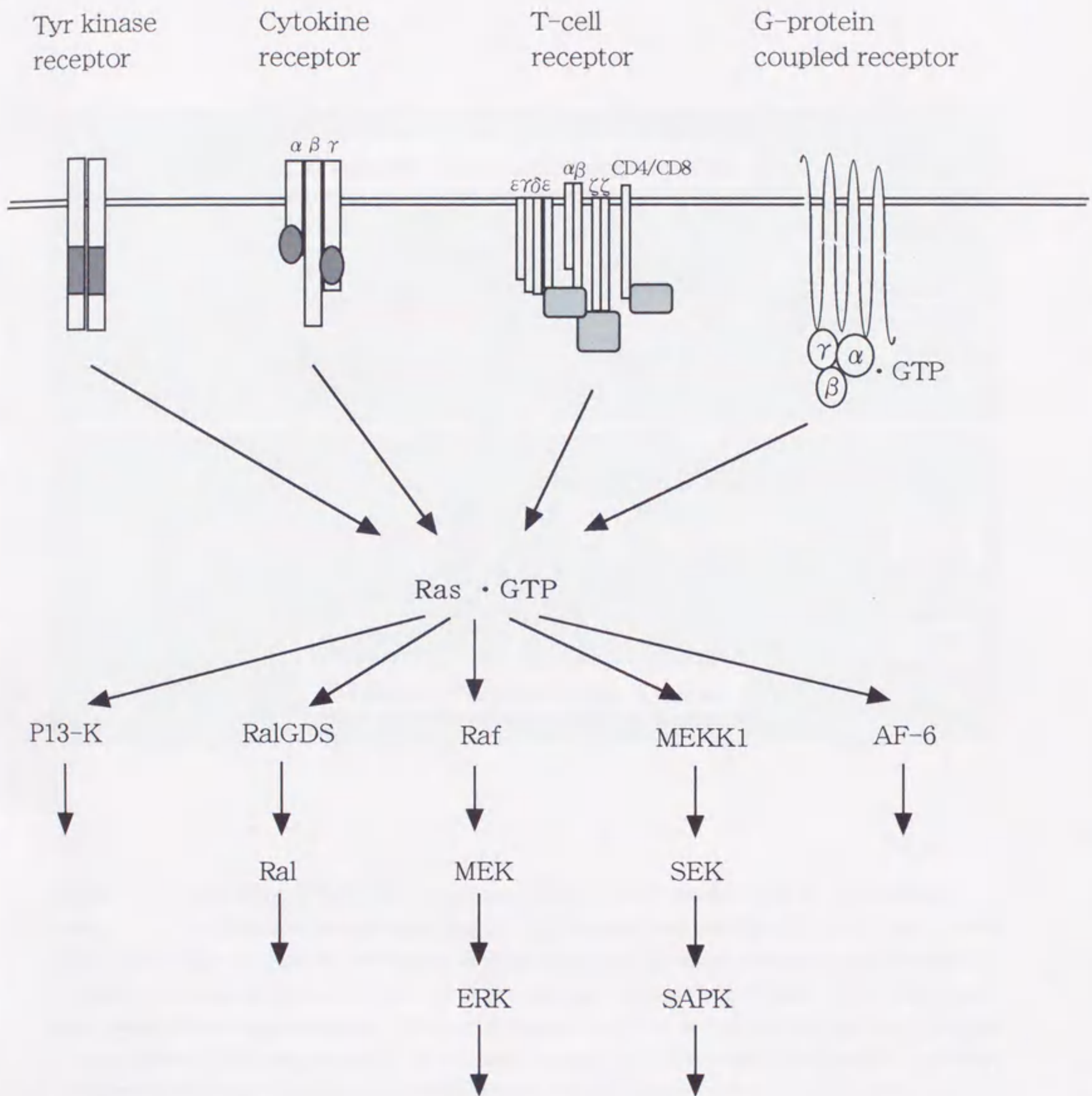


figure 1-2 The signaltransduction pathway dependent on the Ras protein and MAPkinase cascade. Here shows the Ras • GTP complex gathered the signal from each type of receptor and distribute the signal to each appropriate MAP kinase cascade.

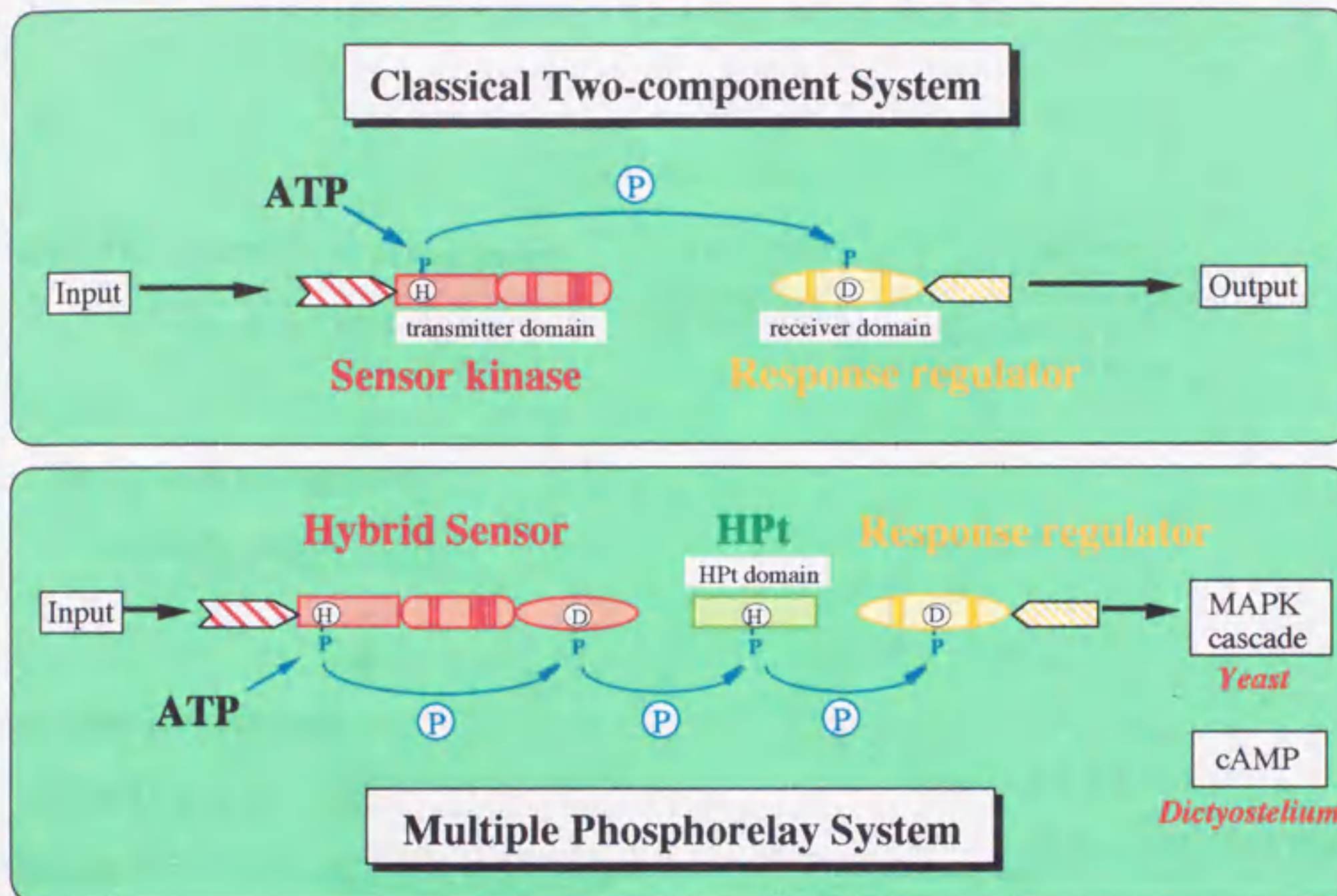


figure1-3 The scheme of the "classical two-component system" and the "multiple phosphorelay system". A phosphotransfer was the same way by which a signal was transduced. In the former system called "two component system", which was composed of two components, sensor kinase and response regulator, the response regulator was known to be working as a transcriptional factor so as to express the appropriate gene in response to the input signal. Compare with this, the "Multiple phosphorelay system" was composed of three, sensor kinase ( hybrid sensor) , response regulator and HPt (Histidine containing phosphotransfer) factor identified as a phosphotransfer factor, or more. Anyway in both system the phosphotransferring between His and Asp was the common device.

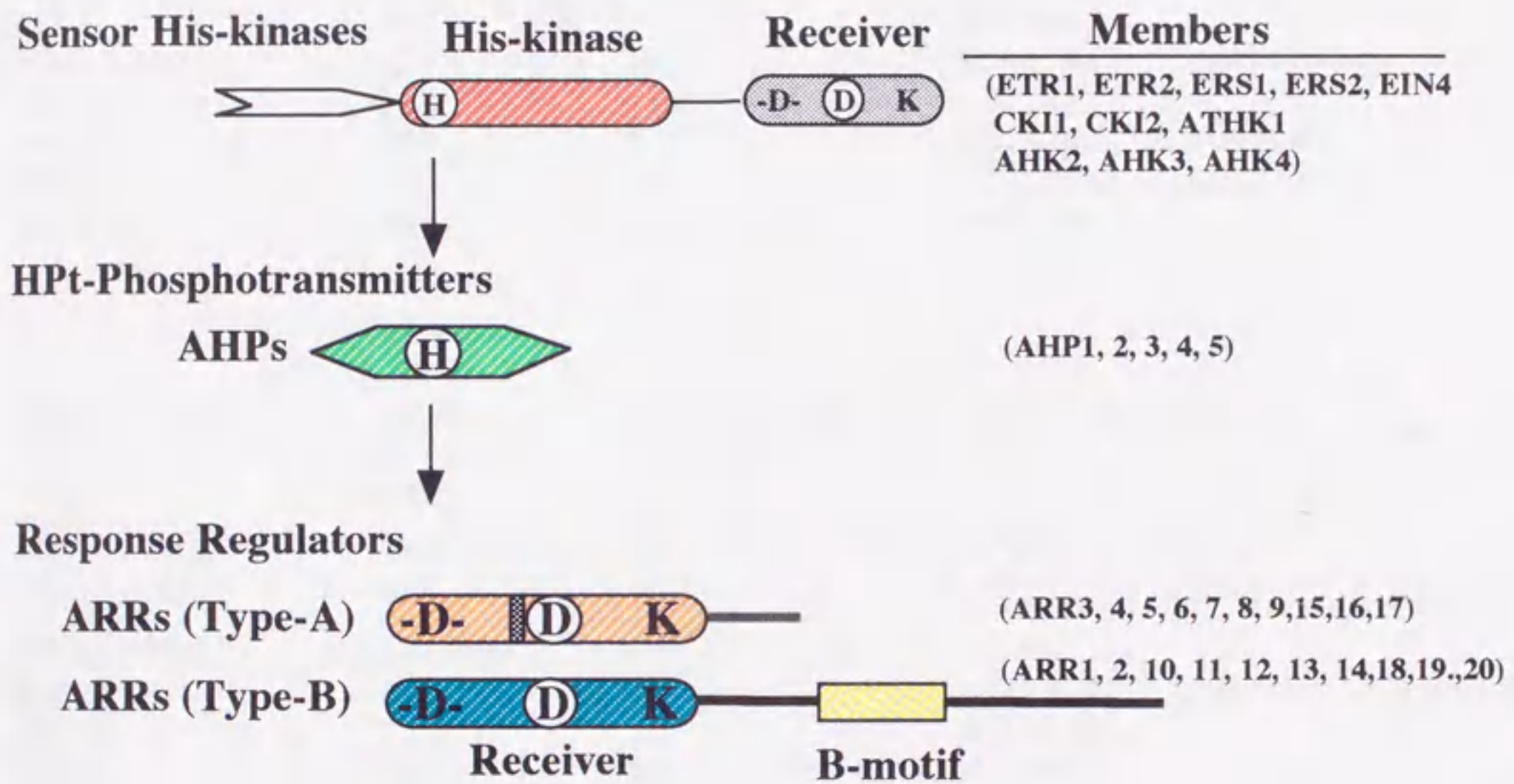


figure 1-4. Schematic representations of the structural designs of the signal transducers involved in the presumed *Arabidopsis* His-to-Asp phosphorelay network. They include His-kinases, HPt phosphotransmitters, and response regulators, each of which contains either histidine (H) or aspartate (D), both of which are crucial for the presumed phosphorelay interaction between these signal transducers, as schematically shown. Members of such His-to-Asp phosphorelay signal transducers are also listed, which have been found in *A. thaliana*, so far.

<sup>a</sup> Type-A ARR	A.A.	Chromosome	gDNA (Accession)
ARR3	231	I	AC007258
ARR4 (IBC7/ATRR1)	259	I	AC007067
ARR5 (IBC6/ATRR2)	184	III	AL049658
ARR6	186	V	AB009053
ARR7	206	I	AC068602
ARR8 (ATRR3)	224	II	AC005662 / (AC006217)
ARR9 (ATRR4)	234	III	ATF24113
ARR15	206	I	AC013258 / AC079672
ARR16	164	II	AC007660 / ATH279079
ARR17	122	III	ATT5P19

<sup>a</sup> Type-B ARR	A.A.	Chromosome	gDNA (Accession)
ARR1	669	III	AB028608 / AP001308
ARR2 (ARP5)	<sup>d</sup> 664/644	IV	ATFCA5 / Z97340
ARR10 (ARP4)	552	IV	ATF10N7 / AL049607 / AL16158
ARR11 (ARP3)	<sup>e</sup> 521/444	I	AC008113
ARR12	573	II	ATF13D4 / AC018722 / AL031369
ARR13	575	II	AC005623
ARR14	382	II	AC006069
ARR18	(632)	V	AB024029
ARR19	(612)	I	AC016041
ARR20	(426)	III	ATF26K9

table 1. Compiled list of *Arabidopsis thaliana* response regulators

a This classification is based on our results (24) and following reports (10, 11) .

b Each credit should be: ARR1 and ARR2 (Sakai et al. 1998b) ,ARR3 to ARR7 (Imamura et al 1998), ATRR1 to ATRR4 (Urao et al. 1998), IBC6 and IBC7 (Brandstatter and Kieber 1998), ARR15 to ARR17 (Brandstatter and Kieber 2000), and ARP3 and ARP5 (Buchholz et al. 1998).

ARR18 to ARR20 are based on the GenBank reports and these are not credited yet.

c This chromosomal location of each gene was estimated from the available genomic sequences of *Arabidopsis thaliana* (see the given GenBank accession nos.). With regard to ARR3 and ARR4, the locations were determined by Cleaved Amplified Polymorphic Sequences ( CAPS ) in our laboratory ( See reference 23).

d There appears to be a discrepancy between two reports (AB016472 and ATAJ5196).

e There appears to be a discrepancy between two (ARR11 and ARP3).

## 第二章 ARR遺伝子群の検索と同定解析

## 一次構造からみたタイプA ARR群およびタイプB ARR群の分類

## 緒言

植物ホルモン”エチレン”に対して非感受性の表現系を示したシロイヌナズナの変異原遺伝子を同定したところ、それがバクテリアによく用いられている二成分制御系情報伝達機構を構成する因子”センサーヒスチジンキナーゼ”であることが判明した(15, 79)。このことはそれまで原核生物に限って主要な環境応答手段であると考えられていた二成分制御系が高等植物においても植物ホルモンの受容/伝達という、植物体維持にとって非常に重要なシグナルの伝達に関わっていることを示唆しており、高等植物におけるこの情報伝達機構の存在とその機能的な重要性を強く推測させた(7, 21, 55, 65, 66)。当研究室では大腸菌の二成分制御系についての解析を精力的に行っていたのでこの情報伝達機構の基本構造が”センサー”と”レシーバー”がペアを形成して、二成分間のリン酸基転移によりシグナルを伝達するという機能的特徴をもっていることから考えると、シロイヌナズナにおいてセンサーキナーゼが存在していたことはすなわちレスポンスレギュレーター存在を強く推測させた。バクテリアで同定されているレスポンスレギュレーターが多く(e.x. OmpR)は上流のHis残基をもつセンサー(e.x. EnvZ)、もしくは新規に同定されたHPt (=Histidine containing Phosphotransfer) 因子からのリン酸基転移によりそれ自身の転写活性が調節されてターゲット遺伝子の発現を調節する(27, 72)。もしくはハイブリッド型のセンサーにおけるレシーバー領域は分子内のAsp残基で受け取ったリン酸基を自身のフォスファターゼ活性によりリン酸基をさらに下流へ伝達する(55)。また、これらの因子は構造的に見ても非常に保存されており特にレスポンスレギュレーターに関していえば、その分子内にリン酸基を受け取るAsp残基を含むD1領域およびD2、Kの3つの領域が高度に保存されている(*figure 1-4*)。そこで、これらレシーバー領域に保存された配列をもとにしてシロイヌナズナESTデータベースおよびゲノムの検索から得られた塩基配列をもとにシロイヌナズナレスポンスレギュレーターcDNAの検索および取得を試みた。



## 実験材料と実験方法

### シロイヌナズナ植物体とcDNA ライブラリー

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の ecotype は全て、*Columbia* を用いた。この植物体の生育条件は、土壌では22度で明所16時間、暗所8時間という条件で、また、MS (ムラシゲ・スコーグ) salts と2%ショ糖の寒天培地では連続照射下で生育させた。シロイヌナズナの cDNA ライブラリーは ecotype *Columbia* の緑化したロゼット葉体より精製した mRNA を逆転写反応して合成した cDNA を *EcoRI*-*NotI*-*BamHI* のリンカーをつけ、 $\lambda$ gt11 ファージに組み込んで cDNA ライブラリーとしており、理化学研究所の篠崎一雄先生より頂いた。10<sup>6</sup>種の独立した遺伝子を含むと考えられている。また、 $\lambda$ FIX ベクターのシロイヌナズナのゲノム DNA ライブラリーは静岡大学の小林先生より頂いた。

### ホモロジーサーチによるデータ検索

*E. coli* の典型的な CheY レスポンスレギュレーターのリシーバー領域を基にして、全塩基配列が決定されたラン藻 *Synechocystis* PCC6803 のデータベースから二成分制御系因子をホモロジーサーチした。こうしてラン藻から得られたリシーバー様配列をもとにさらにシロイヌナズナ EST (Expression Sequence Tag library) よりホモロジーサーチを行い、相同性が低いながらも保存されたアミノ酸を手がかりに3つのシロイヌナズナのリシーバー領域の塩基配列のデータ TC8770, TC9791, TC10702 を得ることができた。また、それ以後は ARR 遺伝子群のうちの一つを用いてコンピューター上でシロイヌナズナ EST およびゲノム情報より検索した。

### PCR 反応とクローニング

PCR 反応は主に宝酒造社の Ex Taq polimerase を使用し、PERKIN ELMER CETUS 社製の DNA thermal Cycler 480 で反応を行った。反応条件は基本的に熱変性 94°C で1分、再会合 55°C で2分、DNA の重合反応 72°C で3分で25サイクルで行った。ただし条件によって再会合の温度は 48~60°C に変更して行った。テンプレートは前述の  $\lambda$ gt11 ファージのライブラリーを使

用し、PCR反応の前に94℃で1分処理した。反応後の生成物は5% ポリアクリルアミドゲルで分離し確認した。

クローニングに関しては5% ポリアクリルアミドゲルで分離したフラグメントを切り出して、細かく切り刻み、TE bufferに一晩浸して溶出させ精製した。その後、pUC19にクローニングして制限酵素による切断のパターンで分離した。

### *E. coli* とその関連

主に用いた菌株は、*E. coli* K-12株である。通常の培養は、37℃でLuria-Broth 又は、Luria-broth寒天培地で行った。寒天培地の場合には寒天を終濃度1.5%(W/V)になるように加える。アンピシリンは50  $\mu$ g/ml となるように加えた。また、必要に応じて終濃度が、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase)を40  $\mu$ g/ml となるように加えた。

#### LB培地

Bacto tryptone (Difco Co.)	1%
Yeast Extract (Difco Co.)	0.5%
NaCl	0.5%

1M NaOHを加えてpHを7.4に調整する。

### 試薬

制限酵素、DNA ligation kit は宝酒造の製品(TaKaRa)を用いた。

### 形質転換

プラスミドによる大腸菌の形質転換にはCaCl<sub>2</sub> およびRbCl<sub>2</sub> 法を用いた。

### シロイヌナズナレスポンスレギュレーターARR3~7のスクリーニング

得られた3つのレシーバー領域のデータの一つTC8770に照らし合わせ、プライマーを作成した。プライマーはレシーバー領域のうちで必ず保存されているアミノ酸を中心に作成した。この保存されたアミノ酸は*E. coli* の走化性の典型的なレギュレーターCheYのアミノ酸配列に合わせると、D13、D57、K109となりこの3つのアミノ酸を中心にレシーバーはリン

酸基の受容体をポケットのようにして作っている。そして、リン酸基を受けとるアミノ酸はD57である。D13を中心にしたプライマーはD8770と命名され、複数のレシーバー領域の解析のため少し5'側にずらし作成したプライマーはD9791とD10702と命名された。D57を中心で作成したプライマーはPDプライマー(Phosphorylated D57)と命名され、K109を中心で作成されたプライマーはKプライマーと命名された。プライマー合成は宝酒造のカスタムサービスセンターに依頼した。それぞれの塩基配列は以下に記す。

D8770プライマー : 5' CGTTGATGACAGTC(AT)(GC)GTTGATCG(24mer)

D9791プライマー : 5' -CATGTTCTTGCTGTTGATGATAG(23mer)

D10702プライマー : 5' -CATGTTCTTGCCGTCGACGA(23mer)

PDプライマー : 5' -CAGTCATTCCAGGCATACAGTAATC(25mer)

Kプライマー : 5' -AGTTTCACCGGTTTCA(AG)TAAGAAATC(26mer)

#### ブランクハイブリダイゼーション\*

$\lambda$ gt11からのレギュレーターのスクリーニングで得られた350bpのフラグメントをプローブとして用いて全塩基配列の決定をするために、ブランクハイブリダイゼーションを行った。プローブはBOEHRINGER MANNHEIM社製のDIG DNA labeling mixtureを用いてPCR反応で作成した。反応条件はDig-ddNTPの取り込みの悪さ(増幅率通常1.75/サイクルに対し、Digを含むときは1.48/サイクル)を参考にして熱変性94°Cで1分、再会合48°Cで2分、DNAの重合反応72°Cで3分で40サイクル行った。プローブ合成の確認は1.2%アガロースゲルでDigの付加によってDNAフラグメントの分子量が増加したことによりバンドがシフトしたことで確認した。

このプローブを用いてブランクハイブリダイゼーションを行った。ブランクハイブリダイゼーションに関しては基本的にSnyder, M&Davis, R,Wらの方法に従った。( )前培養したY1090培養液500  $\mu$ lにファージ(前述の $\lambda$ gt11シロイヌナズナcDNAライブラリー)溶液50  $\mu$ l(5 $\times$ 10<sup>5</sup>ファージ in SM solution)を加え、37°Cで10分間感染させた後に、7.5mlのsoftagar

(Luria broth 培地 + 0.7% agar) を加え、Luria Broth + 1.5% agar をあらかじめ固化した角形プレートの上に均一に重層した。42°C で約3時間培養し、ブランクが十分大きくなった後に、角形プレートの大きさのAmersham 社のHybond TM -N+へブランクをトランスファーした。その後の発色による検索はサザンハイブリダイゼーションに従った。なお、検索したファージの挿入配列の長さはλgt11ファージのクローニングサイト周辺の塩基配列を基にして作成したプライマーによるPCR反応によって確認した。それぞれのプライマーをλ-forとλ-revと命名し、プライマー合成は宝酒造のカスタムサービスセンターに依頼した。塩基配列は以下参照

λ-for プライマー : 5' -GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG(24mer)

λ-rev プライマー : 5' -TTGACACCAGACCAACTGGTAATG(24mer)

検索されたファージは2~3回ブランクハイブリダイゼーションを繰り返すことで純粋な単一のファージとされ、DNAを単離した。このファージDNAから制限酵素で挿入配列を切り出し、1.2%アガロースで分離し、BIO-RAD社製のDNA Purification Kitで精製した。そしてARR3、ARR4はpUC118に*Bam*HIでクローニングし、ARR5、ARR6、ARR7はpBluescript に*Not*Iでクローニングした。塩基配列の決定には前述のオートシーケンサーで行った。

#### Type-B ARR 遺伝子のスクリーニングと同定

ARR1,2 遺伝子配列を用いてEST データベース (<http://www.tigr.org/>, The Institute for Genomic Research) およびゲノムのデータの検索を行い、この配列をもとにそれぞれ構築したプライマーを用いてシロイヌナズナcDNAライブラリーよりPCRで各cDNAクローンを得、塩基配列を決定した。ゲノムの情報と照らし合わせて推定される開始コドン、終止コドンを確認した上でそれぞれを全長クローンとしcDNA配列を決定した。

## DNA シークエンス

塩基配列の決定には、2本鎖DNAプラスミドでApplied Biosystems社製のPRISMTMReady Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kitを使用し、蛍光サンプルを調整し、同社のオートシーケンサー373DNA Sequencing Systemで解析した。あるいは、同社のキャピラリーオートシーケンサーPRISMTM 310 Genetic Analyzerで蛍光サンプルを解析した。シーケンスキットやそのマニュアルについては、付属のものに従った。

## 結果

## ARR3~7 cDNA の取得

緒言にも述べた通り、His-Asp リン酸リレー系情報伝達機構を構成する因子はそれぞれの特徴を示す保存領域を有しており、そのうちのレスポンスレギュレーターにはリン酸基を受け取るAsp残基を含むD1領域の他、D2およびK領域、3領域が保存されている (figure 1-4)。当初*E.coli*の典型的なレスポンスレギュレーター”CheY”のD1保存領域のアミノ酸配列をもとに、シロイヌナズナのESTデータベースを用いてコンピューター上でレスポンスレギュレーターの検索を行ったが、同定することは困難であった (figure 2-1)。そこで、CheYレスポンスレギュレーターのD1領域を用いて、まず全塩基配列が決定されたラン藻

(*Synechocystis* sp. PCC6803)よりレシーバー領域をもつバクテリア型のレスポンスレギュレーターをコードするいくつかのオープンリーディングフレーム (ORF) を得た (43)。この塩基配列から予想されたアミノ酸配列をもとにシロイヌナズナのESTデータベースからバクテリア型のレシーバーをTIGR: The institute of Genomic Researchにて検索した。

(<http://www.tigr.org/>) このように2段階に渡って検索を行った結果3種類の候補が単離できた (アクセス番号: TC10702, TC9791, TC8770)。ここで得られたアミノ酸配列は部分的なものであったが確かにバクテリア型レシーバーといえる特徴的なアミノ酸配列をもっていた。さらに新しいレシーバークローンを得るためにこれらのcDNA配列のレシーバーとしての特徴をよく示す保存された領域をもとにPCR用のプライマーを作成し、 $\lambda$ gT11シロイヌナズナのファージcDNAライブラリーからPCRによるスクリーニングを行った。その結果、制限酵

素処理パターンの異なる増幅断片が複数得られたのでそれぞれの塩基配列を決定し、少なくとも5種類の異なるクローンがシロイヌナズナのcDNAバンクから得られた (figure 2-1)。これらのヌクレオチド断片は多少の長さの違いはあったものの平均約340bpでありそのcDNA配列から予想されるアミノ酸配列を推定してみるとどれもレシーバー領域と部分的に一致することが分かった。そこでさらに5種類のクローンの全長塩基配列を決定するために入gT11シロイヌナズナcDNAバンクから上記5種類のクローンそのものをプローブにしてブランクハイブリダイゼーションを行った。その結果、すべてのクローンに対して3'末端poly(A) tailまで含んだ複数のcDNAを単離することができ、それぞれの中でもっとも長い塩基配列を示したものをそのクローンのcDNA塩基配列として決定した (figure 2-1)。それぞれの塩基配列の結果は、DDBJ/EMBL/GenBankデータベースにARR3;AB008486, ARR4; AB008487, ARR5; AB008488, ARR6; AB008489, ARR7; AB008490として登録した。どのcDNAクローンも全長ORFをコードしており、非常に相同性の高いものであったがはっきりと区別されるものであった (figure 2-1, figure 2-4, figure 2-5)。

#### ARR10, 11 および14の取得

報告のあったARR1およびARR2のcDNA配列をもとにして充実しつつあったシロイヌナズナのESTデータベースおよびゲノムデータを検索したところ我々がそれまでに取得していたARR3~7とは構造的に異なる特徴を持つ一群のレスポンスレギュレーター様の配列をいくつか得た。これらのデータベースより得られたゲノムおよびcDNA塩基配列をもとにORFを推定し、5'末端および3'末端に適切なプライマーを設定して、ロゼッタ葉より調整したcDNAライブラリーからPCRを用いてレスポンスレギュレーターをコードするcDNAクローンを取得することを試みた。その結果得られたクローンの塩基配列を決定したところレシーバー領域内にはレスポンスレギュレーターの特徴を示す3つのアミノ酸も保存されていたので、これらを新規なレスポンスレギュレーターとしそれぞれARR10 (ATAJ5195), ARR11 (ATAJ5194), ARR14 (AC006069)と名付けた (figure 2-2) (26)。これら3つのクローンはARR1およびARR2と非常によく似てレシーバー領域とそのC末端が約200 a.a. 長い構造をしており、

さらにARR1, 2 を単離した研究グループによっても示唆されていたのだがレシーバー領域のすぐC末端側には約65 a.a. からなるマウスのc-Myb に低レベルながらも類似した配列を総てのクローンにおいて確認することができBモチーフと名付けている (8, 29, 60)。また、データベース上でその存在を示唆されたARR12 およびARR13 については他のクローンと同様にプライマーを設定しPCR を用いてcDNA ライブラリーからの検索を試みたがクローンを得ることはできなかった。

## 考察

ARR3~7はタイプA ARR 群に属するレスポンスレギュレーターである

ここで得られた5種類のシロイヌナズナ、レスポンスレギュレーターのアミノ酸配列は *E. coli* の典型的なレスポンスレギュレーター-"CheY" (129 a.a.) と21.7%の同一性を示し、CheYに保存された機能的に必須である3つのアミノ酸Asp-13, Asp-57, Lys-109に相当するアミノ酸を全て有するレシーバー領域と比較的短いC末端領域から成っていた (48, 64, figure 2-1)。以上の一次配列上の特徴はこれら5種類のcDNA クローンが確かにシロイヌナズナのレスポンスレギュレーターとして独立に存在していることを強く推測させるものであった。そこで、我々はArabidopsis Response Regulatorの頭文字からこれらのクローンをARR3~7と名付けた。おもしろいことに、ARR3~7はどれもCheYと比較したときに既知のレシーバーにはみられない13 a.a. から成る挿入配列 (ARR3~7間で相同性がみられる) がレシーバー領域内に存在し、さらにN, C両末端にはCheYよりも余分なアミノ酸をもっていた。特にARR3とARR4のC末端側には長いアミノ酸配列があった。しかし、どちらの特徴的な配列もデータベースに報告されている既知のアミノ酸との相同性がみられなかった。いずれにしても、ここで新規に同定したこれら5種類のARR cDNA クローンはシロイヌナズナにおいて初めて同定されたバクテリア型のレスポンスレギュレーターであり、センサーキナーゼに始まる一群のHis-Aspリン酸リレー情報伝達機構がバクテリアと同様2因子 (もしくはそれ以上の因子) で情報を伝達していることを推測させた。

## 遺伝学的観点から見たタイプA ARR 群

ここで同定したARR3~7遺伝子を遺伝学的に比較してみるとARR3(231a.a.)とARR4(259a.a.)、ARR5(184a.a.)とARR6(186 a.a.)は互いにレシーバー領域およびそのC末端側にわたりよく似ていた (*figure 2-1, figure 2-4*)。レシーバー領域に比べそのC末端側のアミノ酸配列は比較的变化に富んでいたが上記2つのARR因子内ではそのC末端側についても相同性がみられた。機能的には既存のものからの情報は得られていないがタイプA ARR 群のARR因子はペアで存在し機能的にも相補しあっていることが推測された。

## ARR10, 11 &amp; 14 の取得

シロイヌナズナのゲノムサイズは約120Mb ( $10^8$ 塩基対)で既知の植物中で最も小さく真核生物ゲノムに特徴的な繰り返し配列が少ないので、早くからゲノム構造解析のターゲットとして注目され、1990年に国際プロジェクトが始まった。そして、1996年からはそのゲノム全塩基配列決定作業がすすめられ2000年には全塩基配列が決定された(1)。このように急速に進展した国際シロイヌナズナのゲノムプロジェクトを背景にして正確でより多くのゲノムデータ:ゲノム(YAC/BACクローン)や、EST、T-DNAタグラインなどのデータを解析することが可能となった。

ARR3~7と名付けたCheY様レスポンスレギュレーターを同定したのと同時期に他の研究グループによってARR1,2と名付けられたシロイヌナズナレスポンスレギュレーターが同定されていた(60)のでこれらをもとにしてESTもしくはゲノムデータベースを検索したところいくつかのクローンの存在を推測することができた。実際にそれぞれのクローンについてプライマーを設定しcDNAライブラリーから、ゲノムデータベースから推定されたcDNAの取得を試みたがそのうちARR10,11および14しか得ることができなかった。これら3種類のARR遺伝子については一次配列の特徴からバクテリア型レスポンスレギュレーターであると確定し、前に取得していたARR3~7とは明らかに異なるグループに属するレスポンスレギュレーターであると結論した (*figure 2-2*)。ゲノム上にはその配列が確認できたにもかかわらずARR12およびARR13についてはそのcDNAを取得することはできなかったが、特にARR12に関して



はARR10 と非常に相同性が高いことから設定したプライマーでは取得できなかったか、植物体におけるARR12,13 両者の発現量が低かったためか、用いたcDNA ライブラリーの性質上取得できなかったのではないかと考えている。

### ARR 遺伝子群の分類

以上のようにデータベースの検索およびcDNA の検索により *figure 2-4, table 1* に示したように現在までにシロイヌナズナにはレスポンスレギュレーター (ハイブリッド型センサーキナーゼのレシーバードメインは除く) は合計20種類存在していると推定している (このなかにはcDNA未確認のものも含む)。これらは、バクテリア型レスポンスレギュレーターに保存されている3つの領域が保存されており一次構造からシロイヌナズナにおけるHis-Asp リン酸リレー情報伝達機構を構成する因子のひとつレスポンスレギュレーターであると推定した。さらに、これらは全長の大きさと特徴的なモチーフから2つに分類できると判明した (25)。ひとつは大腸菌の走化性に関与しているCheYと非常によく似て、約200前後のアミノ酸から成るほぼレシーバー領域のみで構成されているグループであり (48, 64)、もうひとつはレシーバー領域のC末端側にさらに約300 アミノ酸残基が付加されて全長約500アミノ酸から成るグループである。そこで、前者の比較的小さなレシーバーのグループを”タイプA ARR 群”、もう一方の比較的大きなレシーバーのグループを”タイプB ARR 群”と名付けた。さらに解析した結果、タイプB ARR 群にはレシーバー領域のC末端側にマウスのc-Myb転写因子と低レベルながらも相同性のある約65 アミノ酸から成る特徴的な領域が保存されていることも分かりこのモチーフを”Bモチーフ”と名付けた (8, 25, 60, *figure 2-3*)。このようにA・B2種類に分類したARR 遺伝子群それぞれのタイプにおいてARR群は互いに高い相同性を示しているが、タイプA,B間ではそのレシーバー領域内でさえ保存されたD2/D1/K領域の数アミノ酸以外はほとんど相同性が見られなかった (*figure 2-3, figure 2-4*)。これまでに、推定されている全ARR 遺伝子群のうちタイプAに所属するものは10種類、タイプBに属するものは10種類あると思われるが (*table 1, figure 1-4, figure 2-4, figure 2-5*) これらのタイプ間にはどのような生化学的特徴があるのか、また、何を意味しているのか大いに興味をもつところである。



figure 2-1 Alignments of deduced amino acid sequences of *Arabidopsis* ARR with that of the *E. coli* CheY response regulator. (A) The CheY amino acid sequence is shown at the top. Gaps (---) were introduced for optimal alignment. Three amino acid residues, which are invariant in the bacterial receiver sequences, are boxed, and the phosphoaccepting aspartate residue is indicated. The extra sequences found in ARRs are also boxed.

## RECEIVER DOMAIN

ARR10 :MTMEQEIEVLDQFPVGMRVLAVDDDDQTCLRILQTLQRCQYHVTTTNQAQTALELLRENKKNKF  
 ARR11 :MEKSGFSPVGLRVLVDDDDPTWLKILEKMLKKCSYEVTTTCGLAREALRLRERKDG  
 ARR14 :MPINDQFPSGLRILVDDDDTSCLFILEKMLLRMLYQVTICSQADVALTILRERKDSF

(P)

DLVISDVDMPDMDGFKLLELVGLE-MDLPVIMLSAHSDPKYVMKGVKHGACDYLLKPVRIEELKNIWQH  
 DIVISDVNMPDMDGFKLLEHVGLE-LDLPVIMMSVDGETSRVMKGVQHGACDYLLKPIRMKELKI  
 DLVLSDVHMPGMNGYNLLQQVGLLEMDLPVIMMSVDGRTTVMGTGINHGACDYLIKPIRPEELKNIWQH

VRKSKLKKNSNVSNGSGNCDKANRKRKEQYEEEEEEERGNDNDPTAQ-----  
 DIEGCGYEGGADWITRYDEAHFLGGGEDVSFGKKRKFDFEKKLLQDESDPSSSS-----  
 ELRSSQALEDNKNSGSLETVVVSVSECSEESLMKCRNKKKKKRSVDRDDNEDDLLLDPGN-----

## B-MOTIF DOMAIN

-KKPRVLWTHELHNKFLAAVDHLGVE-RAVPPKILDLMNV-----DKLTRENVASHLQKFRVALKKVSD  
 -KKARVVWSFELHHKFNVAVNQIGCDHKAGPKKILDLMNVPW-----LTRENVASHLQKYRLYLSRLEK  
 SKKSRVWSIELHQQFVNAVNKLGID-KAVPKRILELMNV-----GLSRENVASHLQKFRLYLKRLSG

DAIQQANRAAIDSHFMQMSQKGLGGFYHHHRGIPVSGSQFHGGTTMMRHYSNRNLGRLNSLGAGMFQ  
 GKELKCYSGGVKNADSSPKDVEVNSGYQSPGRSSYVFSGGNSLIQKATEIDPKPLASASLSDLNTDVIM  
 EASQSNSESTKRYENIQALVSSGQLHPQTLAALFGQPIDNHHSASFGVWIPNDNLGRSQNEHFSVDVS

PVSSSFPRNHNDGGNIIQGLPLEELQINNNINRAFPSTSQNSPMVAPSNLLLLEGNPQSSSLPSNPG  
 PPKTKKTRIGFDPPISSSAFDSLWPNDVPEVLESKPVLYENSFLQQQPLPSQSSYVANSAPSLMEEEM  
 SASNRPVSVAVHGLSSSANFRQRGDVNNNRIRQGYGSNVNEESWILERSRQR; 382

FSPHFEISKRLEHWSNAALSTNIPQSDVHSPKPTLEWNAFCDSASPLVNPNLDTNPASLCRNTGFGSTN  
 KPPYETPAGGSSVNADEFLMPQDKIPTVTLQDLDPKAMKQEFNTEAILRSLNWELPESHHSVSLDIDL

ARR10: AAQTDFFYPLQMNQQPANNPVPTEAQLFRSSNPNEGLLMGQQKLQSGLMASDAGSLDDIVN  
 ARR11: DLTWLQGERFLANTGLQFQDYSSSPSLLSELPAHLNHWYGNRRLPDPDEYSFMVDQGLFIS; 534

ARR10: SLMTQEQSQSDFSEGDWDLGLAHSEHAYEKLHFPFSLSA; 552

*figure 2-2* Alignment of ARR10, ARR11 and ARR14, which we cloned. The conserved Asp residues are shaded by yellow, and receiver domain are shaded in orange and the characteristic domain of Type-B ARRs, the B-motif are shown in blue. After screening cDNA library with each appropriate primers for PCR, we decided each sequences as shown here.

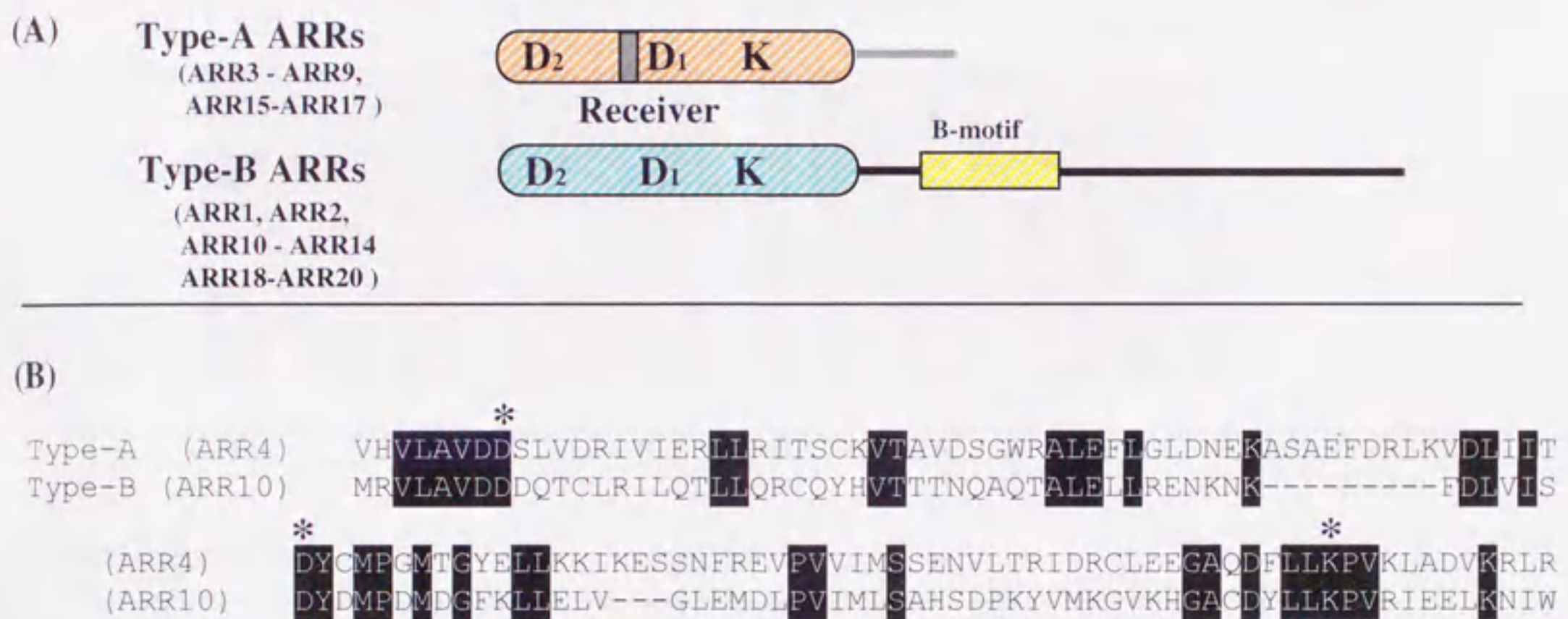


figure 2-3 . *Arabidopsis* possesses two types of response regulators.

(A) Twenty members of response regulators were classified into two subtypes (Type-A and Type-B), based on their structural designs ( see table 1). Each member of the Type-B response regulators has a large C-terminal extension, in which a highly conserved motif ( referred to as B-motif) is exclusively found, as schematically shown. (B) The amino acid sequences of Type-A receiver (ARR4) was compared with that of the Type-B (ARR10). Note that both of these have a set of crucially conserved amino acids (indicated by asterisks), yet their overall contexts are quite different from each other.

## (A) Type-A Receiver

```

ARR3  VHVLAVDSDSLVDRIVIERLLRITSCKVTAVDSGWRALEFLGLIDDKAAVE-----FDRKIDLIITDYCMP
ARR4  VHVLAVDSDSLVDRIVIERLLRITSCKVTAVDSGWRALEFLGLONEKASAE-----FDRKIDLIITDYCMP
ARR5  LHVLAVDSDSMVDRMFIERLLRVSSCKVTAVDSATRAIQYGLDGENNSSVG-----FEDLKINLMTDYSMP
ARR6  LHVLAVDSDSHVDRMFIERLLRVSSCKVTAVDSATRAIQYGLDVEEK-SVG-----FEDLKVNLMTDYSMP
ARR7  LHVLAVDSDSIVDRKVIERLLRITSCKVTAVDSATRAIQYGLDGGKGASN-----LKD LKVNLTVDYSMP
ARR8  FHVLAVDSDSLFDRKMIERLLQKSSQVTTVDSGSKALEFLGLRV--DDNDPNALSTSPQIHQVEINLIITDYCMP
ARR9  FHVLAVDSDSLFDRKLIERLLQKSSQVTTVDSGSKALEFLGLRQSTSDNDPNAFSKAPVNHQVVEVNLITDYCMP
ARR15 LHVLAVDSDSFVDRKVIERLLKTSACKVTTVESGTRAIQYGLDGDNGSSG-----LKD LKVNLTVDYSMP
ARR16 LHVLAVDNLIIDRKLVERLLKISCKVTTAENALRALEYLGLGDQNHQI-----DALTCNVMKVSITDYCMP
ARR17 LHVLAVDNLIIDRKLVERLLKISSCKVTTAENGLPALEYLGLGDPQQT-----DSLTVNMEVNLITDYCMP

```

```

ARR3  GMTGYELKKIKESTSFKVEFVVMSSENVMTRIDRCLEEGAEDFLLKPVKLADVKRIR
ARR4  GMTGYELKKIKESSNFREVPVVMSSENVLTRIDRCLEEGAQDFLLKPVKLADVKRIR
ARR5  GMTGYELKKIKESSAFREIPVVMSSENVLPRIIDRCLEEGAEDFLLKPVKLADVKRIR
ARR6  GMTGYELKKIKESSAFREVPVVMSSENVLPRIIDRCLEEGAEDFLLKPVKLSADVKRIR
ARR7  GLSEYDILKMKINESSAFREVPVVMSSENVLPRIIDRCLEEGAEDFLLKPVKLADVKRIR
ARR8  GMTGYDILKMKVKESSAFRSIPVVMSSENVLPRIIDRCLEEGAEDFLLKPVKLADLTCLK
ARR9  GMTGYDILKMKVKESSAFRDIIPVVMSSENVLPRIIDRCLEEGAEDFLLKPVRLADLNKLLK
ARR15 GLTGYELKKIKESSALREIPVVMSSENVLPRIIDRCLEEGAEDFLLKPVKLADVKRIR
ARR16 GMTGFELKMKVKESSNLREVPVVMSSENVLPRIIDRCLEEGAEDFLLKPVKLADVKRIR
ARR17 GMTGFELKMKVKESSNLKEVPVVMSSENVLPRIIDRCLEEGAEDFLLKPVKLADVKRIR

```

## (B) Type-B Receiver

```

ARR1  LRVLVVDDDDPTCLMILERMIMRTCLY-EVT--KCNRAEMALSLLRKNHNGFDIVISDVHMP
ARR2  LRVLVVDDDDPTCLMILERMIMRTCLY-RVT--KCNRAESALSLLRKNHNGFDIVISDVHMP
ARR10 MRVLAVDDDDQTCRLRILQTLQRCQY-HVT--TTNQAQTALLLRENKNGFDIVISDVDMF
ARR11 LRVLVVDDDDPTWKLKLEKMLKKSQY-EVT--TCGLAREALRLLRERKNGFDIVISDVNMF
ARR12 MRVLAVDDDDQTCRLKILESLRHQY-HVT--TTNQAQKALELLRENKNGFDIVISDVDMF
ARR13 INVMVVDONRVFLDIWSRMLEKSKYREITVIAVDYPKKALSTLKNQORDNIDLIITDYMP
ARR14 LRILVVDDDDTSCFLKMLRLRMY-QVT--ICSQADVALTILRERKDSFDLVLSDVHMP
ARR18 MRVLAVDDNPTCLRKLHELRLRKY-HVT--KTMESRKALEMLRENENMFDIVISDVEMF
ARR19 TNVLVVDNFTTLNLMKQIMKQYAY-QVS--IETDEKALAFITSCHEINIVITWDFHMP
ARR20 RVLLVGADSNSSIKNI---MTQYSY-QVT--KYESGEEAMAFMKKHEITDIVITWDFHMP

```

```

ARR1  DMDGFKLLEHVGLE-MDLPVIMMSADDSKSVVLKGVTHGAVDYLKPVREIHALKNIW
ARR2  DMDGFKLLEHVGLE-MDLPVIMMSADDSKSVVLKGVTHGAVDYLKPVREIHALKNIW
ARR10 DMDGFKLLEHVGLE-MDLPVIMMSADDSKSVVLKGVTHGAVDYLKPVREIHALKNIW
ARR11 DMDGFKLLEHVGLE-MDLPVIMMSADDSKSVVLKGVTHGAVDYLKPVREIHALKNIW
ARR12 DMDGFKLLEHVGLE-MDLPVIMMSADDSKSVVLKGVTHGAVDYLKPVREIHALKNIW
ARR13 GNNGLQKKQITQEFGNLSVLVMS--SDPNKEEESLSCGAMGFIPPIAPTDLPKIY
ARR14 GNNGNLQQVGLLEMDLPVIMMSADDSKSVVLKGVTHGAVDYLKPVREIHALKNIW
ARR18 ITDGFKLEI-GLE-MDLPVITHSDYDS---VMPGIIHGACDYLVKPVGLKELQNIW
ARR19 GIDGLQALKSITSK-LDLPVIMMSADDSKSVVLKGVTHGAVDYLKPVREIHALKNIW
ARR20 IINGLDALNIICKQ-MDLPVIMMSADDSKSVVLKGVTHGAVDYLKPVREIHALKNIW

```

## (C) B-motif

---

ARR1	KKPRV	VSVELHQQ	FVA	AVNQL	-GVE-	KAVPKKILE	LMNV	P----	GLTREN	VASHLQKYRI	YLRR
ARR2	KKPRV	VSVELHQQ	FVA	AVNQL	-GVD-	KAVPKKILE	MMNV	P----	GLTREN	VASHLQKYRI	YLRR
ARR10	KKPRV	LWTHELHNK	FLAA	VDHL	-GVE-	RAVPKKILD	LMNV	----	DKLTREN	VASHLQKFR	VALKK
ARR11	KKARV	VSFELHKK	FVNA	VNQL	-GCDH	KAGPKKILD	LMNV	PW----	LTREN	VASHLQKYR	LYLSR
ARR12	KKQRV	VTVELHKK	FVA	AVNQL	-GYE-	KAMPKKILD	LMNV	----	EKLTREN	VASHLQKFR	LYLKR
ARR13	KKKKI	WWTNPLQ	DLFLQ	AIQHI	-GYD-	KVVPKKILA	IMNVPY	----	LTREN	VASHLQKYR	LFVKR
ARR14	KKSRV	VVSIELHQQ	FVNA	VNKL	-GID-	KAVPKRILE	LMNV	P----	GLSREN	VASHLQKFR	LYLKR
ARR18	KKPRV	VSQELHQQ	KFVSA	VQQL	-GLD-	KAVPKKILD	LMSIE	----	GLTREN	VASHLQKYR	LYLK-
ARR19	RKPRM	TWTEELHQQ	KFEA	IEII	-GGIE	KANPK-VL	VECLQE	-MRIE	GITR	SNVASHLQ	KHRINLE-
ARR20	KKPRM	QWTP	ELHKK	FEVA	VEKM	-GSLE	KAFPKTIL	KYM-	QEELNVQ	GLTRNN	VASHLQKYRQSSKK
Myb-related motif	RKKG	VPWTEEE	HRQ	FLMGL	KKY-G	---	KGDWRNI	ARNF-VT	----	TRTPTQ	VASHAQKYFIRQVN

---

figure 2-4. Alignments of deduced amino acid sequences of Arabidopsis response regulators. The amino acid sequences were aligned for the following members; (A), Type-A receivers; (B), Type-B receivers; (C), B-motifs. These aligned regions correspond to those schematically indicated in figure 2-3 (amino acids numbers are omitted for clarify of these figures). Among each group, highly conserved amino acids are highlighted. In panel C, the partial sequence, denoted by "Myb-related motif", is from a putative Arabidopsis Myb-related transcriptional activator (GenBank Accession no. ATAC003028-2). Tryptophan residues that crucially conserved in a number of Myb-related proteins are indicated by asterisks.

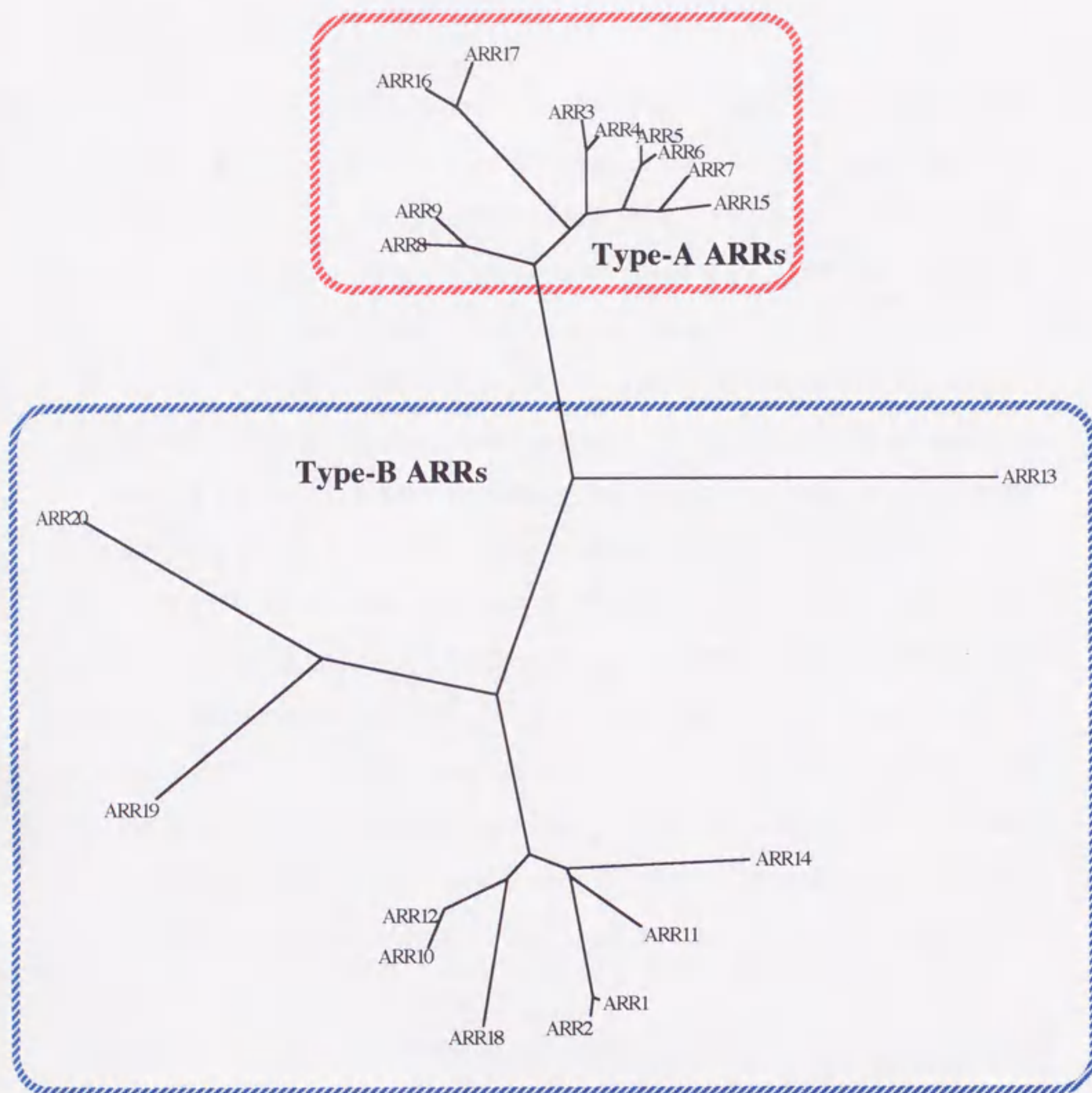


figure 2-5 The phylogenetic tree of the ARRs

This phylogenetic tree was constructed by "tree view" program of taxonomy and systematics at Glasgow. This analysis was done with those compared with each receiver domain amino acid sequences. Type-A ARR are surrounded by the red line and Type-B ARR are surrounded by the blue line.

## 第三章 タイプA ARR群の機能解析：

## 大腸菌His-Asp リン酸リレー系を用いたタイプA ARR群の機能的相補解析

## 緒言

当初、シロイヌナズナcDNA ライブラリーよりバクテリア型レシーバー領域をコードする遺伝子としてスクリーニングした（タイプA）ARR3~7はそのレシーバー領域に注目すると（タイプA）ARR群それぞれの遺伝子配列から推測されるアミノ酸配列にはバクテリア型レシーバーとして特徴を示すアミノ酸（リン酸基を受容するAsp 残基および酵素反応に重要なAsp 残基およびLys 残基領域）がいずれも保存されていた（figure 2-1）。このことは、これらのcDNAからつくられるタンパク質はバクテリアにみられるようにセンサーキナーゼ、またはHpt 因子のHis 残基にリン酸化したリン酸基を自身のレシーバー領域内Asp 残基に転移することが可能であることを十分推測させたが実際はどうかということが、問題であった。大腸菌に代表される原核生物はこのHis-Asp リン酸リレー情報伝達機構を主な生存戦略手段として用いており、そのゲノムに占めるこの情報伝達系因子の割合からもそれは十分納得できるところである。これに対して進化的にもまた生活環からも大きくかけ離れた高等植物シロイヌナズナにおいてこの情報伝達機構が存在していてもはたして本当に機能しているのかが疑問であり、また高等植物においてはさらに違う機能特徴をもっていることも考えられた。そこで我々の研究室で機能解析が進んでおりその実験系も確立されている *E.coli* に由来するハイブリッド型センサー、ArcB のC 末端側に存在するArcB<sup>s</sup> リン酸リレー仲介因子（Hpt 因子）（27,70）を用いて *in vivo* & *in vitro* で”リン酸リレー”という視点から（タイプA）ARR 群の機能を検討することを試みた。

なお、この章ではシロイヌナズナゲノムプロジェクトやEST データベースの確立等の経緯から、当初、クローニングおよび解析の先攻していたタイプA ARR 群についての解析について示した。同時期にARR1 およびARR2 2種類の現在のタイプB に属するARR 群を用いて他のグループが解析を行っていた（60）がこの当時はまだタイプA、タイプB という分類はしておらず、我々もタイプB ARR 遺伝子群のクローンには至っていなかった（25）。したがってこの章においては（タイプA）ARR 群と表記した。



3-1 *in vitro* 解析

～タイプA ARR 群のバクテリア型レシーバー能を、*in vitro* でみる～

## 実験方法

## Niカラムを用いたARR-H6の精製

pET-ARRシリーズを持つ*E. coli* BL21を0.2%カザミノ酸、15%ショ糖、ペタインを含むM9-グルコース培地800mlで培養した。培養温度は前培養、および本培養の対数増殖期までは37°Cで、0.5mM IPTG 添加後、タンパク合成誘導は25°Cで12時間行った。これらを集菌してその細胞を超音波細胞破碎器で破碎 (High, 80ワット, 30second×7~10times)した後、目的のタンパクの可溶性画分のものを得るために超遠心機 (Beckman TL-100 Ultracentrifuge) で30,000rpm, at 4°C for 1hr行い分離した。このサンプルの上澄みを4°CでpET His-TagRシステム (Novagen) のアフィニティーカラム、Ni-Columnに通して精製した。カラムに通したそれぞれのサンプルは15% SDS-PAGEにてその精製の程度、及び濃度を確かめた。

(figure 3-1)

*in vitro* リン酸基転移実験

ArcB<sup>C</sup>ポリペプチド (HPt領域) は、Mizunoらの方法 (27, 70) にしたがって精製されたものを用いた。また、ArcBキナーゼは*E. coli* より尿酸処理したmembraneとして用意した

(70) そしてまず、この尿酸処理したmembrane(25 μg)と精製したArcB<sup>C</sup>(5 μg)を、0.05mM[γ<sup>32</sup>P]ATP (10,000cpm/pmol), 200mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>とともにTEDGバッファー (Tris-HCl, EDTA, dithiothreitol, glycerol)に併せて、37°C, 30min. 反応させた。(2, 3) そして、この反応溶液をすぐにTEDGバッファーで平衡化させておいたセファデックスG-75 カラムによって分子ふるいした。200 μlずつ回収したフラクションの一部を15% SDS-PAGE ゲルにのせ、リン酸化型ArcB<sup>C</sup> (P-ArcB<sup>C</sup>) を含み、かつフリーのmembraneやATPを含まないフラクションを選んで回収した。このようにして、精製P-ArcB<sup>C</sup> (1 μg)と精製ARR-H6ポリペプチド(0.5 μg)を併せて66mM KCl, 7mM MgCl<sub>2</sub> をふくむTEDGバッファー、37°Cで反応させ何分か毎にそのサンプルの反応液をとって止め、12.5% SDS-PAGEに依って解析を行った。

SDS-PAGEについてはLaemmliの方法 (34) に従った。乾燥させたゲルは、BAS2000II, Fujix を用いて解析を行った。

## 結果

当初、シロイヌナズナ由来の一群の(タイプA) ARR 遺伝子群がバクテリア型レシーバーとしての特徴あるアミノ酸配列を持つことは示されていたものの、果たしてこのアミノ酸配列をもつタンパク質がバクテリア型レシーバーとしてHPt 因子、又は、センサートランスミッター領域内のリン酸化型His 残基間でリン酸リレーを行うことができるかが問題となった (6, 55)。このことを確かめるために次のような手順で実験を行った。まず(タイプA) ARR 遺伝子群 5種類の cDNAのうちARR3, ARR4, ARR6、3つのARRs を選び、各cDNAのレシーバー領域のみの機能タンパクを得るために適当なプライマーを用いてシロイヌナズナ *gt11* cDNAライブラリーからPCRによって増幅させた。この増幅断片を、*E. coli*タンパク大量発現ベクターpET22b(+)にクローニングしそれぞれの最適条件で発現させた。(ARR3, Met-15からLeu-175; ARR4, Met-15からLeu-175; ARR6, Met-10からArg-167 Fig.5及びFig.10A) 今回使用したpET 22b(+) ベクターでは目的のタンパクのC末端側に6個のHisが融合した構造で発現するため、これをタグとして*E. coli*で発現した可溶性全タンパク質の中から目的のタンパクのみを精製することができる系であった (figure 3-1)。このようにして得られたARRポリペプチドを用いて(タイプA) ARR群がリン酸基を受け取ることができるかどうか*in vitro*で検証した。この*in vitro* 実験ではリン酸基供与体として*E. coli*より精製したArcB<sup>r</sup>を使った (27, 70)。このペプチドは、*E. coli*に由来する嫌気性条件下で発現調節されるArcBセンサーキナーゼに存在する典型的HPt領域である (27)。このHPt領域についてはHis-Asp間のリン酸基転移の性質についてよく調べられており (70) *in vitro* 系においても*in vivo* 系においてもその分子内にあるHis 残基がリン酸化され、さらにそのリン酸基を別のレシーバー (e.g., *E. coli* 由来OmpRレスポンスレギュレーターなど) に転移させることが可能であることが分かっている。これを用いて精製したARRペプチドが<sup>32</sup>PでラベルしたHPt領域からリン酸基を受け取ることができるかどうかを*in vitro* の実験系において確かめた。(figure 3-2) <sup>32</sup>Pでラベルした精製HPt (lane 0) に66mM KClと7mM MgCl<sub>2</sub>を同時に加えたARR3-His6を加えて、一分おきに反応を止めSDS-PAGEを用いて解析を行った。その結果、ArcB<sup>r</sup> のラベルした

リン酸基はみるみるうちにぬけそれと同時にARR3-His6に（一時的なものとして）そのリン酸基が転移したことを確認することができた。同様にARR4, ARR6についてもArcB<sup>C</sup>との反応を行ったが、同様な結果を得た。また、ネガティブコントロールとしてpETベクターのみをもつ *E. coli* の全ライゼートから先のようにNiカラムを用いてタンパクの精製を行い、これを用いて<sup>32</sup>P-ArcB<sup>C</sup>との反応を見てみたが、この場合そのラベルしたArcB<sup>C</sup>のリン酸基の転移（脱リン酸化）はみられなかった（figure 3-2）。現在までにわかっているHis-Aspリン酸基転移機構と今回の結果を考え合わせると、Hpt領域のリン酸基がARR-His6のAspに転移され、そしてすぐにそのリン酸基はARR-His6から脱リン酸化されたというわけである。以上のことから、これらの精製したARR-His6ポリペプチドは、*in vitro* においてバクテリア型レシーバーとしての特徴をもつと結論付けた。

3-3 *in vivo* 解析

## 実験方法

 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定法

基本的には、Millerの方法に従った(40)。それぞれのプラスミドをもった*E. coli*, DZ225 を5ml, LB培地で、対数増殖期中期(ADS 60)まで培養し、1.5mlを遠心(4°C, 14,000rpm×3min.)により集菌し、1.5ml, 250mM リン酸緩衝液 (pH7.1)に懸濁し直した(49)。そのうち200 $\mu$ lを用いて、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性の測定に用いた。これに、Z緩衝液を800 $\mu$ l加えて反応液を1mlとした。反応停止には、1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を500 $\mu$ l用いた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の値は反応液量を補正して算出した。

## 結果

先に示した*in vitro*において(タイプA) ARR群がバクテリアのHis-Aspリン酸リレー情報伝達系因子と相互作用することが示されたことから*E. coli*内においても機能するのではないかということが予想された。そこで、pETベクターに挿入したARRフラグメントをpIN-III-A2ベクターに挿入して一群のプラスミドを構築した(pIN-ARRシリーズ)。これらより、タイプA ARR群 レシーバー領域のみのペプチドを*E. coli*内で一定のレベルで発現させることができた(figure 3-1)。これらのプラスミドを用いて次のような実験手順でHis-Aspリン酸リレー情報伝達系でのARR群の機能特徴を*in vivo*において調べた。ここでは、ArcB変異タンパク質(ArcB\* : His-717は含むがHis-292, Asp-576はそれぞれLeu, Glnに置き換えたもの)を発現するpIMA005も同時に用いた(figure 3-3)。言い換えると、このプラスミドは機能的なHPT領域(ArcB')をもつが、そのトランスミッター領域とレシーバー領域は機能していない。このArcB\*プラスミドを*E. coli* DZ225株( $\Delta envZ$ )内で多コピーで発現させるとOmpRレスポンスレギュレーター(27, 44, 45)にリン酸基を転移することができる。その結果、リン酸化型OmpRがompC-lacZ融合遺伝子の転写を活性化し $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が上昇(Lac+)するという実験系であった。この実験の一連の様子は図に示した(figure 3-3)。(※なおここでompC遺伝子はOmpR転写活性化因子のターゲットの一つである。)(45)この、*E. coli*, *in vivo*での結果は、HPT領域とレシーバー領域間におけるHis-Aspリン酸基転移

情報機構の特徴をよく表すものであるといえた。figure 3-3に示すように*E. coli* DZ225株、*ompC-LacZ* 融合遺伝子を持つ菌でははLac<sup>-</sup>の表現型を示した（+コントロールとする）。この株をpIMA005 *arcB*\*で形質転換すると先に述べた理由からβ-ガラクトシダーゼの活性は、上昇した（+*ArcB*\*）。この菌株を、さらにARR 遺伝子を持ったプラスミド；pIN-ARRシリーズそれぞれで形質転換するとそのβ-ガラクトシダーゼの活性は極端に減少した（+ARR群）。この*in vivo*における実験の結果から、*E. coli* 内で発現したARRレシーバーは、OmpRレシーバーと競合して*ArcB*のHPt領域からそのリン酸基を獲得したといえる。この結果は、figure 3-2の結果ともよく合う。さらに、ARRのリン酸基を受け取っていると思われるAsp残基に注目し、部位特異的変異導入法によってARR3のAsp-94をAsn残基に変えて同様に*in vivo*での機能をみたところリン酸基を受け取ることができなくなった（+ARR3-ΔD）。このことから、ARR3レシーバーはAsp-94においてリン酸基を受け取りHis-Aspリン酸リレー情報伝達機構の一因子として機能していることが示された。

これら*in vitro*と*in vivo*の結果から（figure 3-2, figure 3-3）今回新しくシロイヌナズナから単離したARR 遺伝子群はレスポンスレギュレーター配列を有しており、さらに情報伝達系においてリン酸基を受け取ることができる機能を持つことが示された。以上のことから高等植物においてもHis-Asp間リン酸リレー系情報伝達機構は重要な働きをしておりその機構にARR 群が関与していると結論した。

## 考察

アミノ酸配列の一次構造から推測する限り、(タイプA) ARR 群はレスポンスレギュレーターであると予測できたが果たしてこれらが本当にHis-Asp リン酸リレー情報伝達系に置いてレシーバーとしての機能を示すかどうかということは確かな証拠は得られていなかった。このことを確かめるために、ここでは当研究室で解析が進んでいる*E.coli* His-Asp リン酸リレー系をもちいて(タイプA) ARR 群が典型的なレスポンスレギュレーターとして機能していることを*in vitro*系, *in vivo*系で検証した。その結果、(タイプA) ARR 群はリン酸基を受け取ることができることが示され、この反応においてはそれぞれのレシーバー領域に保存されているアスハラギン酸が必須であることも分かった (*figure 3-2*, *figure 3-3*)。また、同時に*in vitro*実験系でみる限り(タイプA) ARR 群ポリペプチドのリン酸化は非常に一時的なものですぐに脱リン酸化されてしまった。 (*figure 3-2*) このことは、現在までの一般的なバクテリア型レシーバー領域の機能的な特徴と考え合わせると、非常によく合うものであった。一般にレシーバー領域はトランスミッターもしくは、HPI領域のHis残基がもつリン酸基を受け取る(55)。このリン酸基転移反応はレシーバー自身の触媒作用に依っているとされている。この意味では、レシーバーは酵素であるといえその基質であるレシーバーそれ自身を自己リン酸化しているといえる。また、リン酸化型Asp残基をもつレシーバーは非常に不安定ですぐに脱リン酸化型になる。そのようなレシーバーは、脱リン酸化も自己触媒していると考えられる。同様なリン酸化型CheYの半減期が*in vitro*ではほんの数秒であったという結果も報告されているので、この意味でレシーバーは自分自身に対して酵素として脱リン酸化を行うこともでき、この明らかな自己ホスファターゼ活性の視点からみるとその半減期がレシーバーの機能的な特徴を表しているともいえる。実際に、*figure 3-2*で示された結果から(タイプA) ARR群はこれら典型的なバクテリア型レシーバーの特徴である自己リン酸化及び、自己脱リン酸化能両方を兼ね備えていることが明らかになった。以上のことから考えると、(タイプA) ARR 群は確かに、バクテリア型His-Asp間リン酸リレー系においてレシーバーとして機能しているといえる。

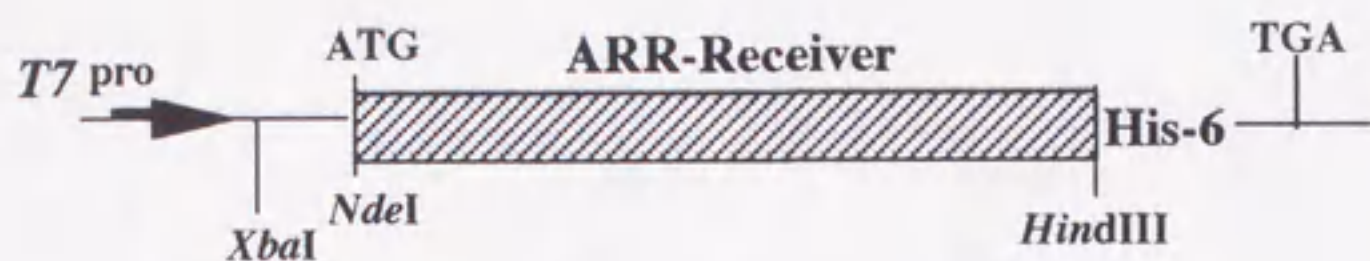
以上のように、我々は当時クローニングに成功していた(タイプA) ARR 群のうちARR3, ARR4, ARR6を用いてシロイヌナズナの(タイプA) ARR 群が*E.coli*の典型的なHPI領域からリン酸基を受け取ることができることをバクテリアの系を用いて*in vitro*, *in vivo*において実

証した (figure 3-2, figure 3-3)。この結果を真核微生物の酵母でも存在が確認されていた Sln1-Ypd1-Ssk1 His-Asp リン酸リレー情報伝達系と考え合わせると、センサーやレスポンスレギュレーターの間で機能する別のタイプの情報伝達調節因子 (HPt領域など) が存在することが大いに予測できた (37, 57)。同時期にシロイヌナズナのHPt領域に関しては5種類の異なるcDNAクローン (*Arabidopsis thaliana* HPt transmitter: AHP) が単離され、それぞれはHPt領域と思われる領域をコードしたポリペプチドであった (67)。高等植物においてもHis-Aspリン酸リレー系情報伝達機構が機能しているとするならばARR群のリン酸基供与体としてAHP因子群は有力な候補にあげられた。(タイプA) ARR 遺伝子産物の機能解析を、同じシロイヌナズナから単離されたAHP 因子群との相互作用に注目していくことでこの植物体におけるHis-Asp リン酸リレー情報伝達機構の詳細を明らかにする手がかりになると考えた。

この研究で我々は最初、高等植物において(タイプA) ARR群がレシーバーとして機能することを実証することに力を入れていたが、これらの因子の情報伝達系における機能的意義については、そのタンパク質分子の大きさや構造、およびフォスファターゼ活性の強さから*E.coli*の鞭毛回転を調節するCheY (48, 64) のように、低分子(タイプA) ARR群はそのリン酸化レベルに依存してシロイヌナズナの外界からの情報をインプットするETR1センサー (14)、もしくはCKIIセンサー (31) などのセンサーキナーゼにはじまるHis-Aspリン酸リレー系情報伝達機構における、ある段階での情報の流れのon-offスイッチとして機能しているとも推測できる。

A

## Overproduction Plasmids (pET-ARR-series)



B

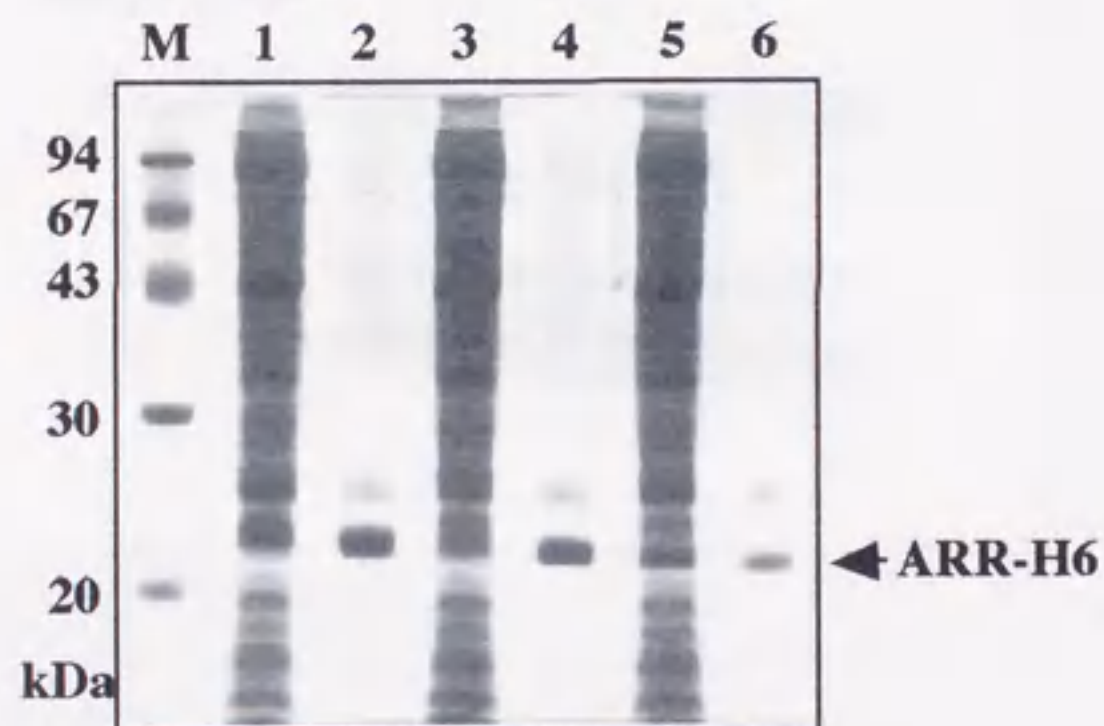


figure 3-1. Isolation of the ARR receiver domains

(A) Plasmids (pET-ARR series) were used to overexpress the ARR receiver domains in *E. coli*. The ARR genes can be expressed from plasmids under the T7 phage promoter, and the presumed ARR translation products were followed by a histidine tag (His  $\times$  6) at their C-termini. (B) These overexpressed ARR products (designated as ARR-H6) were analyzed by SDS-PAGE (lane 1, ARR3-H6; lane 2, ARR4-H6; lane 3, ARR6-H6). Then, they were purified by Ni-column chromatography (lane 2, ARR3-H6; lane 4, ARR4-H6; lane 6, ARR6-H6). These samples were used for the following experiment. (see figure 3-2)



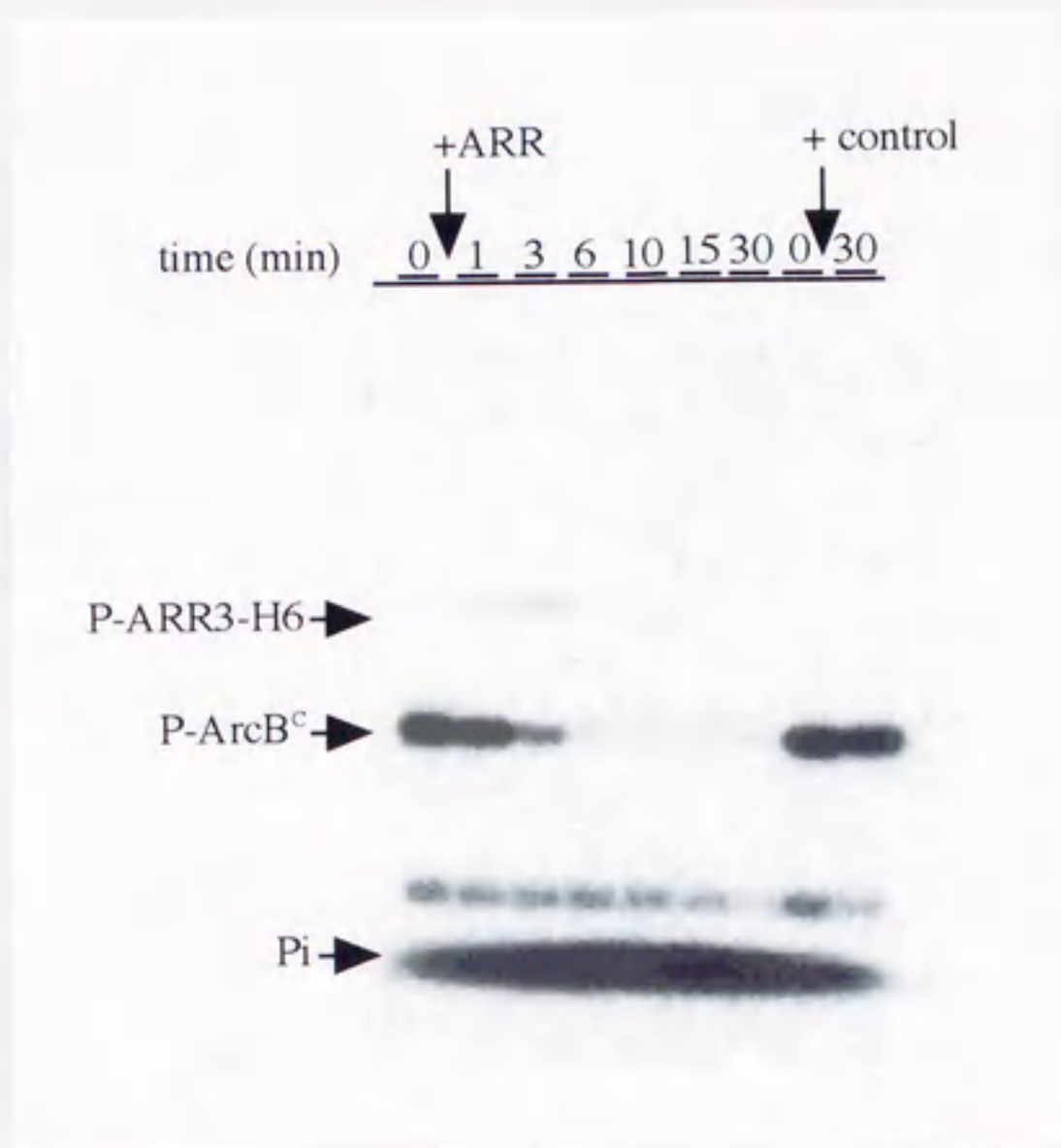


figure 3-2 The characterization of the ARR receiver ; *in vitro* phosphorelay activity

*In vitro* analyses of phosphorylation and dephosphorylation of the ARR receiver domains. The purified ArcB<sup>c</sup> polypeptide (HPT domain) was <sup>32</sup>P labeled (lane 0, designated as P-ArcB<sup>c</sup>), as described (27, 70). This preparation was incubated with ARR3-H6. At intervals (indicated by min), samples were immediately analyzed by the SDS-PAGE, followed by autoradiography. Note that ARR3-H6 was rapidly phosphorylated and dephosphorylated. Appropriate control experiments are described in this chapter.

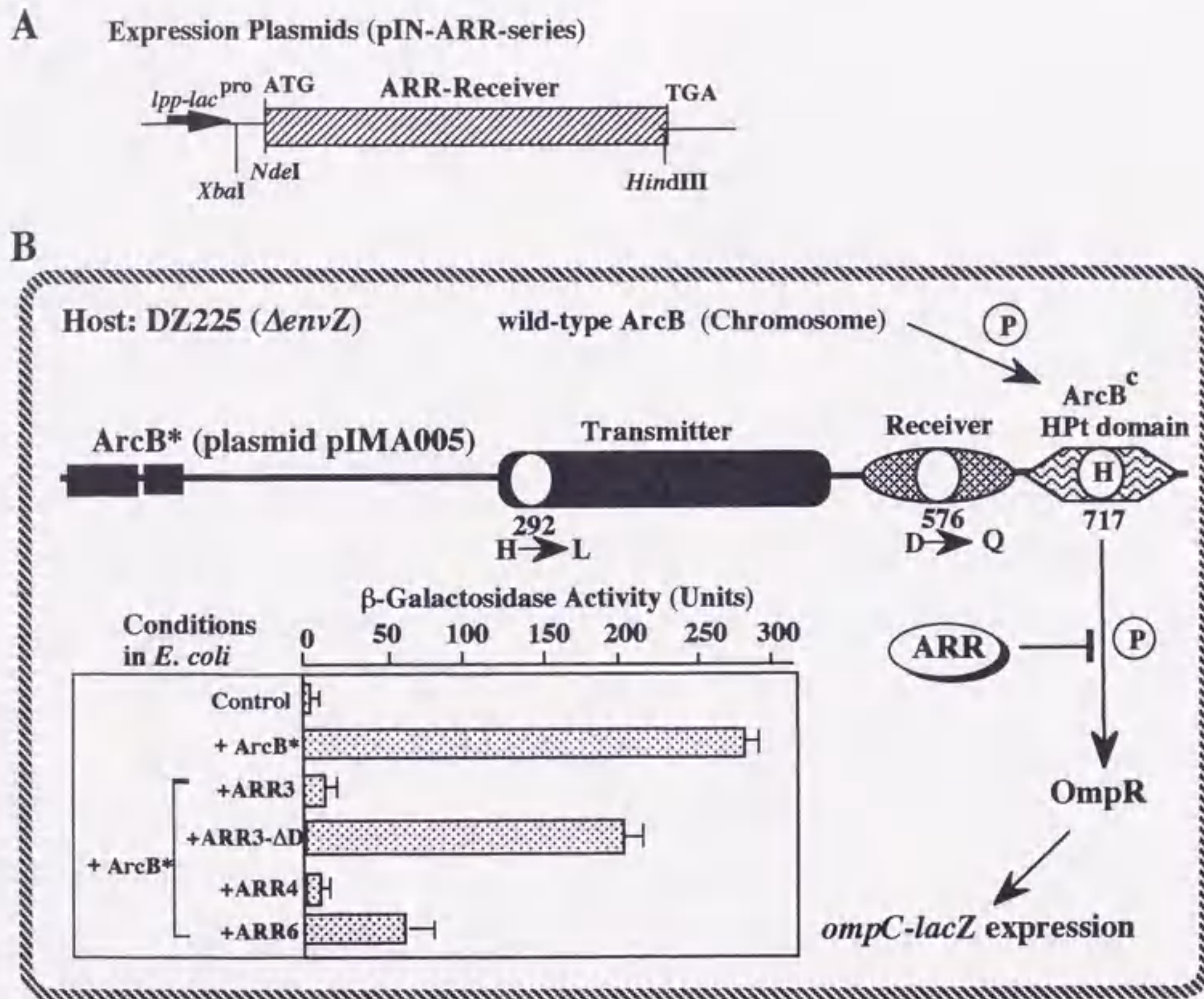


figure 3-3 *In vivo* interaction between an *E.coli* HPT domain and the ARR receivers.

(A) The structure of plasmids (pIN-ARR-series) by which the ARR receiver domains were moderately expressed in *E. coli* by using the *lpp-lac* promoter.

(B) An experimental design and the determined  $\beta$ -galactosidase activity in *E. coli*, showing a possible *in vivo* interaction between the *E. coli* HPT domain and the ARR receiver domains. The *E. coli* strain DZ225 ( $\Delta envZ$ , *arcB*<sup>\*</sup>) carrying an *ompC-lacZ* fusion was transformed with plasmid pIMA005. This plasmid carries a mutated *arcB* gene, to express a mutant ArcB sensor kinase (ArcB<sup>\*</sup>). The ArcB<sup>\*</sup> protein has only a functional HPT domain. In *E. coli*, one can observe a typical His-Asp multistep phosphotransfer signaling pathway, namely, ArcB (transmitter-receiver) to ArcB<sup>\*</sup> (HPT domain) to OmpR (receiver). This particular signal transduction can be monitored by measuring *ompC-lacZ* expression ( $\beta$ -galactosidase activity)(26, 68). The pIN-ARR series of plasmids were further introduced into these cells and  $\beta$ -galactosidase activities were determined, as indicated in the inset graph. Other details are given in this report.

#### 第四章：タイプA, タイプB ARR群と相互作用する因子の検索： two-hybrid 法を用いたARR群の機能解析

##### 緒言

バクテリアにおいて主要な情報伝達機構であるHis-Asp リン酸リレー情報伝達機構 (41, 55) は、近年真核生物にもその存在が報告されてきた (15)。また、シロイヌナズナにおいてもエチレンやサイトカイニンといった植物ホルモンの情報伝達にHis-Aspリン酸リレー情報伝達機構の因子が関与することが明らかになっている (14, 20, 22, 23, 59, 73)。エチレンの情報伝達機構においてはETR1, ETR2, ERS1, ERS2, EIN4 5種類のセンサーキナーゼが重複して相補的に機能しており外界からのエチレンシグナルにより不活性型になることが報告されている。そしてこれらの下流にはCTR1 MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) 因子がエチレンシグナルに対して負の調節をするように機能していることがわかっており、酵母と同様にHis-Asp リン酸リレー情報伝達機構の下流にMAPキナーゼ情報伝達経路が位置しているということでこの組み合わせの普遍性が指摘された (14, 20, 22, 23, 59, 73, *figure 1-1*)。

シロイヌナズナにおいて一次配列上バクテリア型レシーバーの特徴をもつARR遺伝子群はさらにタンパク質レベルにおいてリン酸基を受容・転移可能であり個々の視点からHis-Asp リン酸リレー系情報伝達因子の一つとしての基本的な機能特徴をもつことを示した (第三章; *figure 3-2, figure 3-3*)。しかし、大腸菌におけるEnvZ に対するOmpR、出芽酵母におけるSln1 に対するSsk1 などのような特異的な組み合わせが明らかにされているものはまだない。そこで、酵母のtwo-hybrid 法を用いてタイプA ARR 群のなかからARR3, ARR4 およびARR6 を、タイプB ARR 群のなかからARR10 を選びそれぞれが特異的に相互作用する因子をシロイヌナズナcDNA ライブラリーから検索した (13)。

実験方法および実験材料

two-hybrid system

two-hybrid system によるスクリーニング、及び解析はCLONTECH社製の MATCHMAKER™ Two-Hybrid system を用い、この説明書に従い実験を行った。

用いた酵母株

酵母株 遺伝子型

SFY526 MATa, *ura3-52, his3-200, ade2-101, 112, can, gal4-542, gal80-538,*

*URA3::GAL1-lacZ*

HF7c MATa, *ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-*

*542, gal80-538, LYS2::GAL1-HIS3, ura3::(GALA 17mers)<sub>3</sub>-CYC1-lacZ*

酵母用培地

YPD 培地 pepton (Difco co) 2%  
 Yeast extract (Difco co) 1% HCl でpH5.8 に調整

SD 培地 yeast nitrogen base without amino acid (Difco co) 0.67%  
 dextrose 2.0%  
 100X drop out 溶液 1.0%

(必要に応じ各アミノ酸を除いたものを用いる)

100X drop out 溶液

L-Valine	1.5%	L-Isoleucine	0.3%
L-Adenine hemisulfate salt	0.2%	L-Arginine HCl	0.2%
L-Histidine HCl monohydrate	0.2%	L-Leucine	1.0%
L-Lysine HCl	0.3%	L-Metionine	0.2%
L-Phenylalanine	0.5%	L-Thyrosine	0.3%
L-Threonine	2.0%	L-Tryptophan	0.2%
L-Uracil	0.2%		

## two-hybrid system に用いたプラスミド

酵母株に形質転換する *E. coli* と *Saccharomyces cerevisiae* のシャトルベクター各種プラスミドはMATCHMAKER™ Two Hybrid system に付属されていたプラスミドを使用した。

cloning vectors	Description	Size
pGBT9	<i>GAL4</i> <sub>(1-147)</sub> DNA binding domain, <i>TRP1</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	5.4kb
pGAD424	<i>GAL4</i> <sub>(768-881)</sub> activation domain, <i>LEU2</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	6.6kb

ターゲットとなるタンパク質はシロイヌナズナのレギュレーターを使用し、付属のpGBT9をベクターとしてGAL4のDNA結合領域との融合タンパク質を発現するようにプラスミドを構築した。各プラスミドの作製には適当なプライマーを設定しPCRで増幅したものをpGBT9のクローニングサイトに挿入した。

plasmid	cloning domain
pGBT9-ARR3	ARR3 full length: S8~A259
pGBT9-ARR4	ARR4 full length: S8~D259
pGBT9-ARR6	ARR6 Δ16a.a. : M10~E168
pGBT9-ARR10 Δ300	ARR10 Δ100a.a. : M1~C441
pGAD424-ARR10 Δ300	
pGBT9-ARR10R	ARR10R : M1~Q141
pGAD424-ARR10R	
pGBT9-AHP1	AHP1 : V4~F151
pGAD424-AHP1	
pGBT9-AHP2	AHP2 : M1~Q156
pGBT9-AHP3	AHP3 : M1~I155
pGAD424-AHP3	

## スクリーニングに用いたライブラリー

CLONTECH社の *Arabidopsis thaliana* MATCHMAKER cDNA Library を使用した。これはpGAD10 プラスミドで構築されたライブラリーで、GAL4の活性化領域とランダムなシロイヌナズナのcDNA産物を融合させるプラスミドで、挿入されているcDNAは0.6~4.0kbで独立したクローンが $3.0 \times 10^6$ 含まれていた。

### *Saccharomyces cerevisiae* への形質転換

*Saccharomyces cerevisiae* への形質転換はリチウムアセテート (LiAc) 法で行い、Ito, H らの方法 (63) と *Arabidopsis thaliana* MATCHMAKER cDNA Library の説明書に従った。また *Saccharomyces cerevisiae* HF7c への形質転換はまず pGBT9-ARR4 のような DNA 結合領域を含むプラスミドを形質転換し、その後ライブラリーを構成している転写活性化領域を含むプラスミドを逐次形質転換した。ライブラリーの形質転換効率は  $50 \mu\text{g}$  のプラスミドで約  $7.5 \times 10^6$  で、 $1.5 \times 10^6$  形質転換体 /  $1 \mu\text{g}$  DNA である。

### フィルター法による $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定

SD培地 (-Trp, -Leu) 上に二日間酵母を培養し、フィルターに菌体をトランスファーする。フィルターをZバッファーに浸した後、液体窒素で凍結・融解し、X-gal入のZバッファーで2~6時間反応させる。そして $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の+/-をフィルター上の青/白で判定した。

### 液体培養法による $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定

SD培地 (-Trp, -Leu, -His) で前培養した酵母をYPD培地に植え継ぎ3~4時間培養する。菌体をZバッファーで懸濁し液体窒素で凍結する。そのサンプルにONPG溶液を加え適宜  $1\text{M Na}_2\text{CO}_3$  で反応を止め420nmの吸光度測定を行った。基本的にはMillerの方法とMATCHMAKER™ Two-Hybrid system に従い測定・計算した。

### 酵母からのプラスミドDNAの回収

酵母をSD培地 (-Leu) で24~48時間培養し、Hoffman, Kaiser らの方法に従いプラスミドDNAを回収した(63)。この中には二種類のプラスミドが混ざっているため大腸菌HB101株にエレクトロポレーションでプラスミドDNAを導入しM9 (-Leu) +Amp上で選択後アルカリ法でプラスミドを回収した。

## 結果

## タイプA ARR 3,4 および6 と相互作用する因子のスクリーニング

pGBT9-ARR3, pGBT9-ARR4 およびpGBT9-ARR6 のプラスミドを保持した *Saccharomyces cerevisiae* HF7cに対して *Arabidopsis thaliana* のcDNA をGAL4 のDNA 活性化領域と融合させたプラスミドライブラリー（緑化したロゼッタ葉より作製）で形質転換しARR3, ARR4 およびARR6 と相互作用する因子をHis の栄養要求性を利用して検索した。それぞれに対して約 $5 \times 10^7$  程度の形質転換体をHis 栄養要求性を指標に検索したところ、ARR3, ARR6 を用いたスクリーニングからは相互作用因子を得ることができなかったが、一方、花木らがARR4 を用いて、これと相互作用する因子を検索したところ、候補が複数取得できた。これらについてさらに $\beta$ ガラクトシダーゼ活性をフィルター法により測定したところ13コロニーに $\beta$ ガラクトシダーゼ活性がみられた。これら13クローンのHis+,  $\beta$ gal +の形質転換酵母からライブラリー由来のプラスミドを回収し、再びpGBT9-ARR4 と組み合わせてHF7c、およびSFY526 株を形質転換し、His栄養要求性ならびに液体法による $\beta$ ガラクトシダーゼ活性測定を行い再現性を確かめた。こうして再現性のみられた13クローンの原因遺伝子の塩基配列を決定したところ、これらはすでにEST データベースにDNA binding protein (DBP) として登録されている遺伝子 (58) とその新規ホモログに収斂したのでそれぞれAtDBP1, AtDBP2 と命名した (81)。取得されたAtDBPのうち $\beta$ ガラクトシダーゼ活性を比較すると特にARR4とAtDBP1- $\Delta$ N (全長よりN 末端56アミノ酸が欠けたもの) の相互作用が最も強く、さらにpGBT9-ARR3, pGBT9-ARR4R, pGBT9-ARR6 をpGAD10-AtDBP $\Delta$ N と共にHF7c 株に形質転換したところいずれにおいてもHis- および $\beta$ -gal -であった。つまりAtDBP1はARR4 C末端部分 と特異的に相互作用する因子であるということがわかった。この相互作用についてはさらに*in vitro* においてタンパク質レベルでも結合することをARR4-His およびAtDBP1( $\Delta$ N)-GST 精製タンパク質を用いて確認された (data not shown here see reference no. 81)。

## タイプB ARR10 と相互作用する因子の検索

一方、現在10種類確認されているタイプB ARR 遺伝子群のうちARR10 と相互作用する因子をtwo-hybrid 法を用いて検索するために、ここではpGBT9-ARR10  $\Delta$ 300 (ARR10 のC 末端が300bp 欠けている) を用い、約 $3 \times 10^7$  程度の形質転換体から検索したところHis+を示すクローンが131 得られた。さらにフィルター法で $\beta$ ガラクトシダーゼ活性をみると131 のうち90 クローンがHis+、 $\beta$ -gal+ の表現系を示した。これらの一部について酵母からライブラリー由来のプラスミドを回収し、pGBT9-ARR10  $\Delta$ 300 と組み合わせ、HF7c 形質転換体のHis の栄養要求性により相互作用を再確認する一方で原因遺伝子のDNA 塩基配列を決定したところ、シロイヌナズナのHPt 因子のひとつであるAHP2 が取得された (67, 68, 75)。そこでAHP2 とARR10 の相互作用の特異性をARR10R (ARR10 Met1~Asn141 ; レシーバー領域のみ)、およびARR3, ARR4 に対してtwo-hybrid 法により検討、解析したところAHP2はARR10R と相互作用することが明らかになった。次にARR10  $\Delta$ 300 に対してAHP1およびAHP3 を検討してみると、両者はARR10  $\Delta$ 300 (特にレシーバー領域) と相互作用することが明らかになった。そして、AHP2 と同様にAHP1およびAHP3 はタイプA ARR (ARR3, ARR4) とは相互作用しないことも確認した (figure 4-1)。



## 考察

## タイプA ARR4 と特異的に相互作用する因子AtDBP1およびAtDBP2

タイプA ARR群の中でも、ARR4にだけ特異的に相互作用する因子としてAtDBP1、AtDBP2というESTデータベースに報告があったDNA結合タンパク質が得られた(58,81)。この因子とARR4の相互作用はAtDBP1のN末端が56アミノ酸分欠けたものの方がそのβガラクトシダーゼ活性が強く、相互作用が強いと思われるがAtDBP1のN末端部分にはプロリンが豊富に存在している以外、構造的に意味のある配列は見受けられていない。さらに、この相互作用はARR4のレシーバー領域のみを用いるとみられなくなったというデータから、ARR4 C末端部分とAtDBP1が相互作用しておりこのときにAtDBP1のN末56アミノ酸の部分はこの両者の相互作用に負に影響しているといえる。

## AtDBP1について

AtDBP1についての報告では、構造的にリジン残基を多く持った親水性タンパク質でDNAに非特異的に結合する因子と考えられており、その分子量とアミノ酸配列からAtDBP1がヒストンH1に似たタンパク質であるとされている(58)。さらに植物体において非常に広範囲に渡って発現しており特に根端や茎頂に多くみられ、根端組織にオーキシン処理を施すと発現が上昇するという(5)。ARR4がサイトカイニンで発現誘導されることを考え合わせると、両者間の相互作用はオーキシンとサイトカイニン2種類の植物ホルモン間の情報が交差する点であるとも考えられる。

## ARR10はAHP1~3と相互作用する

タイプB ARR遺伝子群に属するARR10を用いてこれと相互作用する因子を検索したところ、His-Aspリン酸リレー情報伝達機構に属するシロイヌナズナHpt因子AHP2が取得され、さらにこの相互作用はAHP1~3いずれにおいてもみられ、これらAHP群の間にβガラクトシダーゼ活性の違いはなかった。ARR群はタイプAおよびタイプB二種類に大別され今回スクリーニングに用いたARR10をはじめとするタイプB ARR遺伝子群はその分子内にBモチーフと名付けられたMyb様配列を併わせ持つことから転写因子として機能することが考えられる

(25, 36, 60)。つまりHis-Asp リン酸リレー情報伝達機構の下流に位置して、標的DNA に結合すると考えられる。従って今回はタンパク質-タンパク質間の相互作用を指標としてスクリーニングをおこなったためタイプB ARR 群レスポンスレギュレーターの上流で機能すると考えられるHP1 因子; AHP2 が取得されたと思われる。

また、スクリーニングの過程ではARR10 と相互作用する因子としてAHP2 のみが多数単離されたが、AHP1およびAHP3 はARR10との1対1の検討ではHis(+),  $\beta$ -gal (+)を示したにも関わらずスクリーニングでは取得されなかったが、これは今回用いたcDNA ライブラリーに原因があったと思われる。通常条件で生育したシロイヌナズナではAHP1~3 はいずれの器官においても発現しているが得にAHP3は葉ではわずかししか発現しておらず、さらにAHP1にいたってはほとんど発現していない(68)。今回はロゼッタ葉から調整したものであったのでAHP2 に集中してしまったと思われる。一方、ARR10 の発現は根で比較的多くみられるが葉でもその50%くらいは発現がみられるので葉由来のcDNA ライブラリーを用いた今回のスクリーニングは十分であったと考えている。

#### タイプA, タイプB ARR 群の違い

本実験において一番興味深い点はARR10 はAHP1~3 と結合できるがタイプA ARR群 (ARR3, ARR4 & ARR6) はAHP群と相互作用がみられないという点である (figure 4-1)。また、鈴木らによるとAHP2 と相互作用する因子のスクリーニングを行ったところ、タイプB ARR 群に属するARR1 も取得されたという。two-hybrid 法によって得られる因子は生体内における2つの因子間の相互作用の強弱の程度をある程度は反映していると思われ、今回のスクリーニングで得られた結果は生体内で、タイプB ARR 群の中でもARR1 あるいはARR10 が特異的にAHP2 と相互作用している可能性も示唆しているが今後さらなる検討が必要である。また、リン酸リレーの視点からみたとき、AHP 群とタイプB ARR群のいくつかの間には特異的なリン酸リレー経路が成立している可能性があったが、レスポンスレギュレーターのリン酸転移に必須であるAsp 残基を置換したARR1 でもAHP との間で相互作用がみられた(鈴木らによる)ことから、リン酸リレーと相互作用の間の関連性はないことが明らかにされている。これらAHP 因子とタイプB ARR 群両因子の相互作用にタイプA ARR 群がどのように関わっているのかもシロイヌナズナのHis-Asp リン酸リレー系情報伝達機構の機能特徴のひとつになると考えられ、今後検討したいところである。

Bait		Prey	+ His	- His	$\beta$ -Gal.
(A)		AHP2			- + + - -
(B)		AHP2			- + +
(C)		Vector AHP1 AHP2 AHP3			- + + +
(D)		Vector ARR10			- + + +

figure 4-1 Yeast two-hybrid analyses. Extensive two-hybrid analyses were conducted with use of a variety of pairs of bait/ prey, as schematically shown. The results were first scored with special reference to the histidine- autotrophy on appropriate agar-plates (+ His and - His, respectively)(see Materials and methods). There are two spots in each -His column and the right hand side one corresponds to 1/10 cells of the left. These results were then confirmed by the LacZ-reporter assay, as also indicated ( $\beta$ -Gal. + or -).

## 第五章 ARR 制御因子群のリン酸リレー機能解析 :AHP を用いた *in vitro* リン酸転移解析

### 緒言

第三章では大腸菌のHis-Asp系のHPr因子”リン酸化型ArcB”を用いて(27, 70) ARRのリン酸基受容およびリン酸基転移レシーバー能を示すことができたが (figure 3-2, figure 3-3)、次に植物体においてこの情報伝達系はリン酸リレーにより情報を伝達しているかどうかという点が問題であった。*in vitro*での実験が植物体内での機能をそのまま反映しているとは断定できないが基本的にシロイヌナズナのHPr因子であるAHP群とARR群の間でリン酸基リレーが可能かどうかを検討できると考えた。また、これまでに大腸菌や酵母における解析からこの情報伝達機構は特定のセンサーとレシーバー、およびHPr因子が互いに高度に親和性をもち特定のシグナルに対して特定の因子間でリン酸基リレーが成立していることが明らかになっている。これまでにシロイヌナズナには5種類のAHP(AHP1~5)群が単離されている(46, 67, 68)が、四章ではtwo-hybrid法を用いたARR群と相互作用する因子の検索結果(figure 4-1)から、タイプB ARR群に属しているARR10はAHP1~3と相互作用することが明らかとなり、これらがHis-Aspリン酸リレー系情報伝達機構に属する因子の特徴を持っていることからARR群とAHP群の間にはリン酸リレーが成立していることがますます強く推測されるに至った。さらに、それぞれ複数個ずつ存在しているARR群とAHP群の間のリン酸リレーをリン酸基転移を指標にした酵素反応という視点から分析すれば両者間に存在し得る特定のARRとAHPのペア(もしくは複数からなる集団)を明らかにすることができると考えた。

シロイヌナズナより単離されたAHPは大腸菌に由来するArcB<sup>+</sup>と32%の相同性を示すリン酸基を受け取るHis残基を保存する因子である。大腸菌由来のArcB<sup>+</sup>はArcBを過剰発現する菌株から調整した反転膜小胞を介してリン酸化しリン酸化型ArcB<sup>+</sup>として安定に存在するので精製することが可能である(27, 70)。同様に、精製したAHP2についても大腸菌より調整した反転膜小胞を介してATP依存的にリン酸化し、安定に存在する(37°C, 1hrでもリン酸化型AHPが確認できた)ことが確認され、基本的にHPr因子としての機能を持っていることが示された(25, 67)。

## 実験材料および実験方法

## リン酸化型AHP2の単離

まずAHP2をコード領域をpET 22b(+)にクローニングしBL21で発現させこの菌体から調整した抽出液の上清からNiアフィニティー樹脂を用いてHisタグのついたAHP2タンパク質を精製した。菌体はM9-Glc培地に0.2% カザミノ酸、15% ショ糖を加えた培地で培養した。このように精製したAHP2タンパク質を用いてリン酸化型AHP2を単離することを次に試みた。リン酸基供与体としてArcBキナーゼを用い、これを過剰発現する大腸菌株より尿酸処理した反転膜小胞を調整し $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP依存的にArcBキナーゼを介してAHP2をリン酸化させた(27, 70)。詳細は第三章3-2-1 *in vitro*リン酸基転移実験を参照されたい。

*in vitro*リン酸基転移実験

上記のようにAHP2-Hisを精製・調整し、10,000cpm, 37°C, 1hrの条件で $\gamma$ - $^{32}$ P-ATPと反応させAHP2をリン酸化させ $^{32}$ P-AHPを得た。これにAHP2と同様にHisタグをもって発現するように構築したARR6およびARR10,11を加えて1', 3', 5'分毎に一部を採取後、5×dye (0.05M Tris-HCl, 2% SDS, 6%  $\beta$ メルカプトエタノール, 10%グリセロール, 1% BPB)を加えて反応を止め、これらのサンプルを15% SDS-PAGEにアプライしてBAll station (BAS)-2050 (富士フィルム)により $^{32}$ Pを検出した。

## 結果

タイプA ARR6 およびタイプB ARR10RB, ARR11RBはいずれもリン酸化型AHP2 に保持されたリン酸基は即座にARR に奪われ、ARR6の脱リン酸化能はARR10RB およびARR11RB と比較すると非常に強くARR6 自身への転移の過程は検出できないくらいであり、一方ARR10RB およびARR11RBは自身にリン酸基が転移していることがわかる。このことからシロイヌナズナにおいてもレスポンスレギュレーターとHpt 因子間にはリン酸リレーが成立していることが明らかにできた (figure 5-1)。

## 考察

ARR群 およびAHP群は個々のレベルでそれぞれレシーバー、Hpt 因子としての性質を検討しておりどちらもバクテリアのHis-Asp リン酸リレー系を構成する因子の機能を相補することができることから確かにバクテリア様の機能をもっていることが示された (figure 3-2, figure 3-3)。さらに前章、two-hybrid 法を用いたARR 群と相互作用する因子を検索したところ、特にタイプB ARR10 がAHP1~3 と相互作用するという結果を得た。このことは植物においてもレスポンスレギュレーターとHpt 因子間にリン酸リレーが成立しているのではないかということを強く推測させた。そこで、タイプB ARRとしてARR10およびARR11 のレシーバーおよびBモチーフを含む領域のタンパク質 (ARR10 RB およびARR11 RB と表記) と、これと比較してタイプA ARR としてARR6 タンパク質を調整してリン酸リレーを検証することにした。

その結果、ARR 群はタイプA、タイプBに関わらずAHP2 との間にリン酸リレーを成立させていた。この結果は、シロイヌナズナにおいてもレスポンスレギュレーターとHpt 因子間はリン酸リレーという形で情報伝達を行っていることを確信させた。しかしここでひとつ考慮すべき点はタイプA ARR 群はtwo-hybrid 法においてはAHP1~3 いずれとも相互作用が確認できなかったにもかかわらずリン酸リレーは成立していたという点である。ここでもう一度*in vitro*系において確立したARR 群とAHP2 の間のリン酸リレーの結果をARR のフォスファターゼ活性という視点から見直すと、タイプA (ARR6) とタイプB (ARR10&11) ARR 間で脱リン酸化能に多少違いがみられている。この性質の違いがどの程度までシロイヌナズナのHis-

Asp リン酸リレー情報伝達機構におけるタイプA およびタイプB ARR 群の機能的役割を反映しているかはさらに検討が必要であるが次のようなモデルを考えられる。two-hybrid 法による各因子間の相互作用解析の結果を踏まえるとAHP 因子群の直接の標的はタイプB ARR群であり、そしてタイプA ARR群はフォスファターゼ活性が非常に強いことから、リン酸リレーに関してこの情報伝達の調節を行っている可能性である。いずれにしても、シロイヌナズナにおけるHis-Asp リン酸リレー情報伝達機構の下流に着目すると普遍的な機能特徴が保存されていることが明らかなので、以後はさらにタイプA, タイプB それぞれの機能的特徴を明らかにする必要があると考えている。

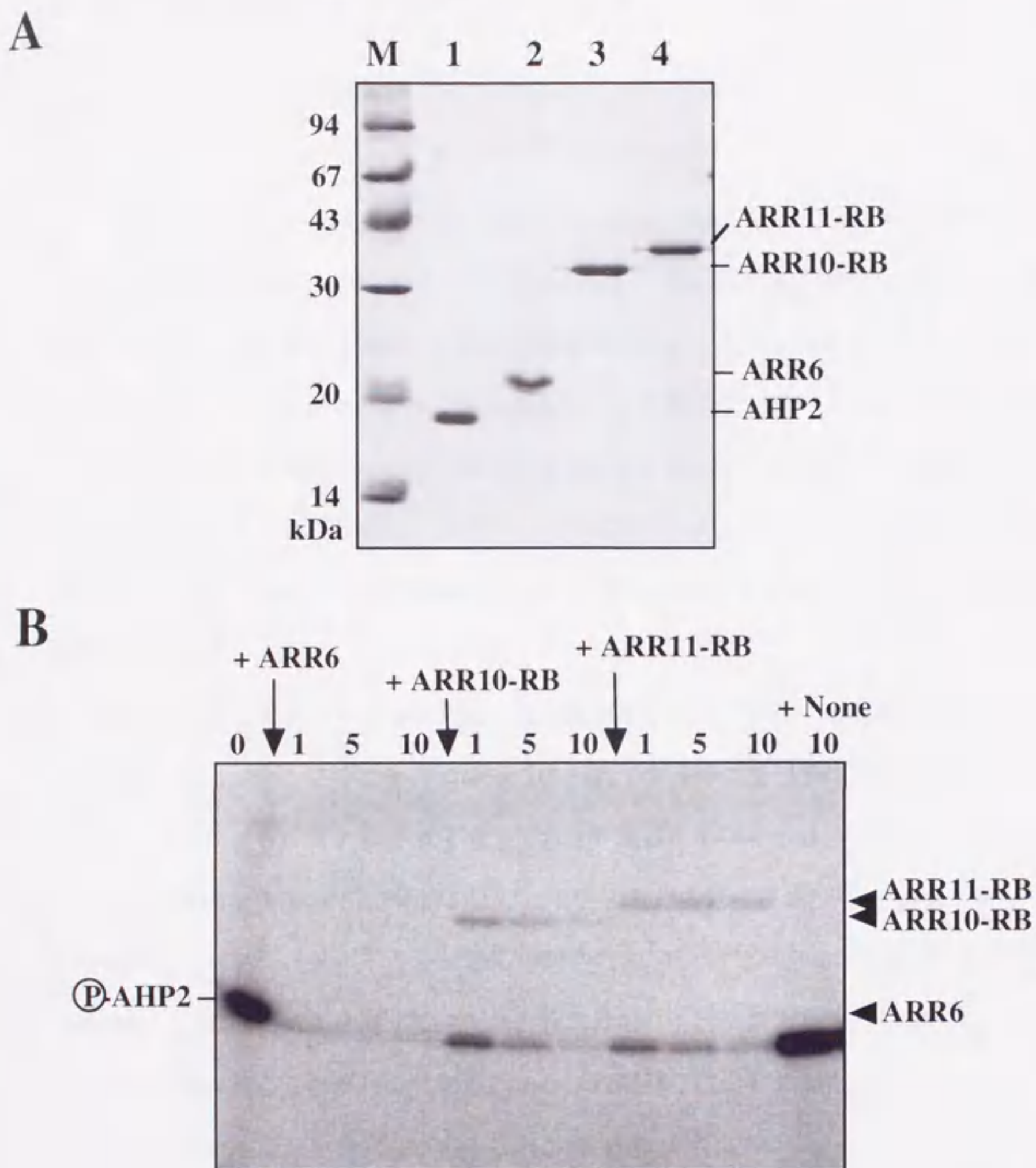


figure 5-1 Isolation of AHP and ARR polypeptides, and characterization of their *in vitro* phosphorelay activity. (A) Isolation of a set of polypeptides used in this study. They were analyzed by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis, followed by staining with Coomassie Brilliant Blue; lane M (molecular markers), lane 1 (AHP2), lane 2 (ARR6), lane 3 (ARR10-RB), lane 4 (ARR11-RB). (B) *In vitro* analyses of phosphotransfer between a representative of HPT phosphotransmitter (AHP2) and ARRs. The radioactively phosphorylated AHP2 polypeptide was purified (lane 0), and then the isolated ARR polypeptides were each added. As time intervals (min), the samples were analyzed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis, followed by autoradiography.



## 第六章 細胞内局在性解析：

## タマネギ表皮細胞を用いたHis-Asp リン酸リレー系因子の細胞内局在性解析

## 緒言

シロイヌナズナよりHis-Asp リン酸リレー系伝達機構を構成する因子がそれぞれ単離され、一次構造解析や生理学的性質、リン酸基リレー、他の因子との相互作用といった側面から植物におけるこの情報伝達機構の機能的特徴を明らかにしようと試みた。ARR群はその一次構造の特徴からタイプA およびタイプB 2種類に大別した(11, 25) がさらにここでは個々の因子の細胞内局在性を検討することで細胞内情報伝達の視点から個々の因子の機能特性を明らかにしようと考えた。そのために、タイプA、タイプB ARR群のうちそれぞれARR6およびARR7、ARR10そしてこれらの上流で機能していると考えている、AHP2 も合わせて細胞内局在性を検討することにした。

本来、シロイヌナズナ植物体あるいは培養細胞を用いて各因子の局在性を検討するのがもっともであるが、ここではひとつひとつの細胞が大きくて遺伝子の導入効率及び観察が容易であり、さらにクロロフィルが未発達なため蛍光観察においても容易であるという利点からタマネギの表皮細胞を用いてARR 群およびAHP2 の細胞内局在性をGFP との融合タンパク質として検討した(18)。オワンクラゲから単離されたGFP はそれ自身で長波長UV もしくは青色光を吸収し、緑色の蛍光を発するタンパク質で目的タンパク質の細胞内局在性を、蛍光顕微鏡下で容易に観察することが可能である。また、観察時には資料の固定や基質を必要としないので生体観察が可能だという利点があることから今回の解析に用いた。

## 実験方法および材料

## キメラ遺伝子の作製

GFP をコードするベクターp221-EGFP-C1 は奈良先端科学技術大学院大学 (NAIST)、植物遺伝子機能学講座の平塚 和之教授の御好意により頂いた (52)。このプラスミドはクローンテック社のpBI221 の35S プロモーターおよびNos ターミネーターの間に同社のpEGFP-C1 のEGFP-MCS 部分を挿入したものでpUC19 由来のアンピシリン耐性のプラスミド (全長 4545bp) である。このMCSにARR10, ARR10 Bモチーフ(T179~S242; 65a.a.), ARR6 (M1~I177; 177a.a.), ARR6 $\Delta$ C (M1~F151; 151a.a.), ARR7(M1~L198; 198a.a.), ARR7 $\Delta$ C (M1~C151; 151a.a.), AHP2 をクローニングしGFP タンパク質のC 末端側に各タンパク質が融合した融合タンパク質が発現するようにキメラ遺伝子を作成した (figure 6-1, figure 6-2)。キメラ遺伝子をコードしたプラスミドはキアゲン社のMidi plasmid purification Kit を用いて調整した。

## 遺伝子導入および培養

遺伝子導入にはタナカ (株) (札幌) のGIE-III型 (イデラ) 遺伝子導入装置を用いた。金粒子へのDNA のコーティングは同社の調整法に従った。今回、タマネギ表皮細胞への遺伝子導入条件はヘリウムガス3.8 kgf/cm<sup>2</sup>、打ち込み時間0.025S、1回当たりのDNA量0.4 $\mu$ g、タマネギ鱗片ターゲットまでの飛距離3 cm、640mmHg真空状態で行った。DNA を導入したタマネギ鱗片は15mm浅底シャーレに湿ったキムワイプをひきその上において25 $^{\circ}$ C、暗所で12hr~15hr培養後、Olympus 社の蛍光顕微鏡 (BH2-RFCA) でUV波長: 380-490nmで励起させ507 nm の蛍光を観察し同社のカメラ (フジフィルム: fujichrome 400) にて画像を取り込んだ。タマネギは水野 猛教授 (水野農園)、および今村 千代子の御好意による。

## 結果

ARR 遺伝子群はタイプA, タイプB 両者ともその分子内にNLS をもつ

タマネギ表皮細胞にキメラ遺伝子を導入後12 hr, 25°C暗所で培養した後、蛍光観察顕微鏡で観察した。まず、ARR6(タイプA), ARR7(タイプA), ARR10(タイプB) キメラ遺伝子をそれぞれ単独に導入すると、いずれにおいてもタマネギ表皮細胞の核に局在しているのが確認できた (figure 6-1)。EGFP ベクターのみでは細胞質画分および核で観察されていることからARR 遺伝子群はいずれも核移行シグナル (NLS= Nuclear localization signal) を持つことが明らかになった (60)。さらにタイプA ARRについてそれぞれのC末端側、数十アミノ酸を除いてレシーバー領域のみARR6  $\Delta$ C ( $\Delta$ 152~177a.a.), ARR7  $\Delta$ C ( $\Delta$ 152~198a.a.)をコードするタンパク質とGFP の融合タンパク質を用いて細胞内局在を検討した。その結果、レシーバー領域のみでは核に局在せず細胞質全体に局在することが分かった (figure 6-1)。つまり、ARR6, 7 はレシーバー領域のC 末端側にNLS をもっているといえタイプA ARR群 は核に局在して機能することが示唆された。また、Bモチーフと名付けたモチーフはタイプB ARR 群に保存されている特徴的なモチーフであるが (25, 60)、この領域のみをGFP との融合タンパク質としてタマネギ表皮細胞でその局在性を検討すると核に局在化することが分かりNLS はBモチーフ内に存在することが明らかとなった (figure 6-2)。

## ARR 遺伝子群の核局在と上流因子AHP との相互作用の検討

His-Asp リン酸リレー系情報伝達機構においてARR の上流に位置していると考えているAHP2 はARR 遺伝子群と異なり細胞質および核に局在していた。そこで、AHP2 とARR6 あるいはARR10 を同一細胞内に発現させることによってAHP2 がARR6 およびARR10 の細胞内局在性に対して影響を与えるかを検討しようとした。ここではAHP2 をP35S CaMVにより過剰発現させ、ARR6 あるいはARR10 の局在化をGFP の蛍光を指標に同定した。data not shown だが、ARR6およびARR10 の局在化の変化はみられていない。

## 考察

ARR 群はタイプA, タイプB 両者ともNLS を持ち核に局在することが明らかになった。タイプB ARR群はその分子内にBモチーフと名付けられたMyb 転写因子と低レベルながらも相同性を示す特徴的なモチーフを保存していた(8, 25, 29, 60) ことからHis-Asp リン酸リレー情報伝達機構において、転写因子として機能しているのではないかと推測できた。また、Lohrman らがパセリのプロトプラストを用いてARR10 およびARR11 を解析したところこれらはレシーバー領域のC末端側に2ヶ所NLS を同定したという報告もあり、今回Bモチーフ内に同定したNLS はこれに一致した(36)。一方、タイプA ARR群はタイプB ARR群と比較して非常に小さな分子でほぼレシーバー領域のみから構成されていたことから、当初は細胞質全体に局在してタイプB ARR群の機能を補助していると考えていたが解析の結果タイプA ARR 群に属するARR6 およびARR7 もそのC末端側にNLS を持つことが明らかとなった(*figure 6-1*)。タイプA ARR 群の中でもARR6 はレシーバー領域のC末端側がわずか28アミノ酸残基であるのに対し、ARR7は49 アミノ酸残基からなりその配列にも相同性がみられないが両者のレシーバー領域のC末端側にNLS を同定した。この事実からタイプA ARR 群はいずれもレシーバー領域のすぐC末端側にNLS をもつ因子であると結論した。シロイヌナズナにおけるHis-Asp リン酸リレー系には一連の経路にタイプA ARR 群がなんらかの形で非常にユニークな情報伝達および制御を行っているのではないかとと思われる。リン酸基転移、およびタイプA ARR 群がサイトカニンにより発現誘導されるという報告(第九章、*figure 9-3, figure 9-5*)を合わせて核局在性との関連を検討したいと考えている。

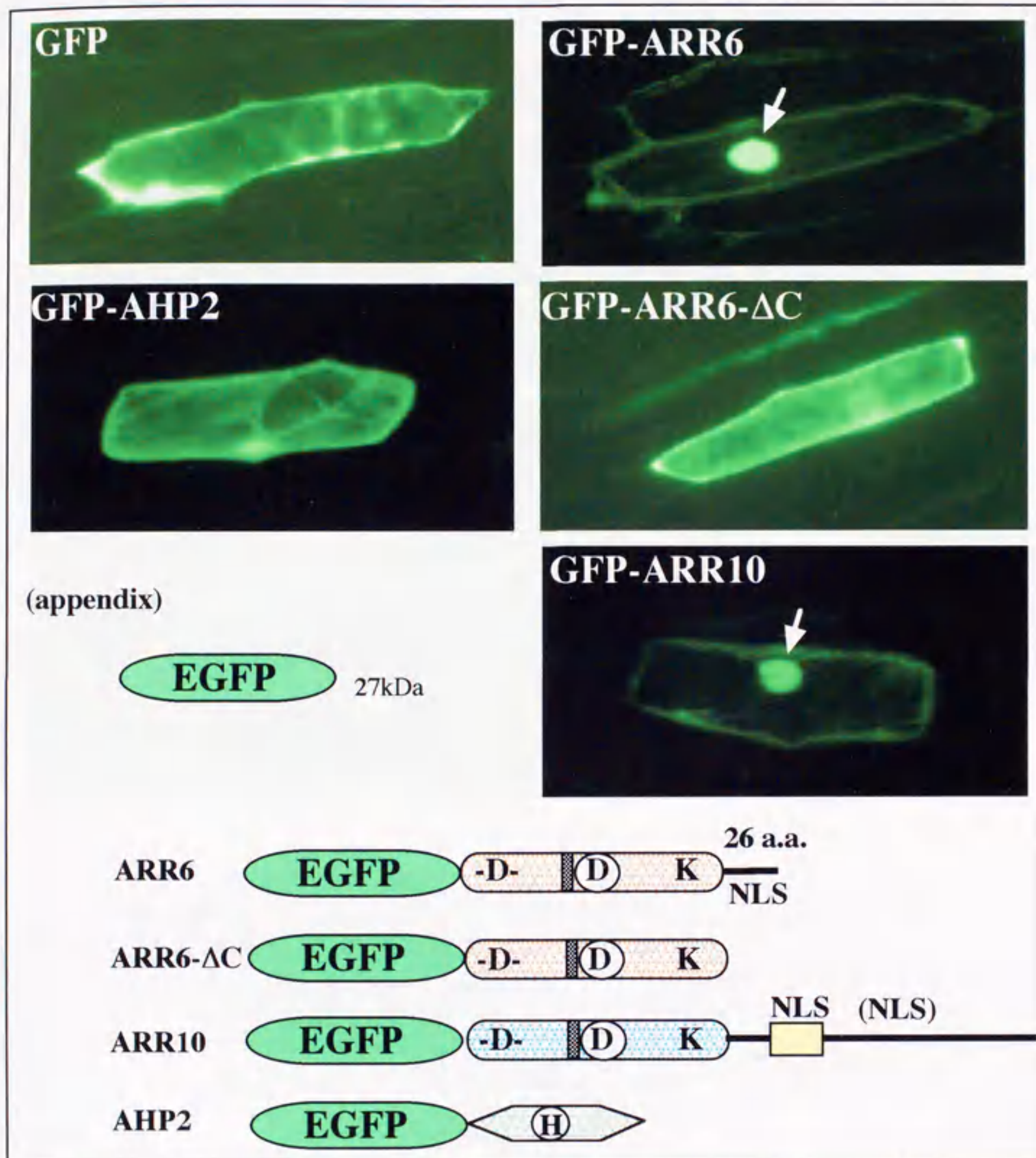


figure 6-1. Nuclear-localization of the GFP fusion proteins.

The recombinant genes carrying (35S-GFP), (35S-GFP-AHP2), (35S-GFP-ARR6), (35S-GFP-ARR6-ΔC), and (35S-GFP-ARR10) were respectively bombarded into onion skin epidermal cells. For ARR6-ΔC, see the appendix. The expression and localization of each product was observed after 24 h incubation, by a fluorescence microscopy

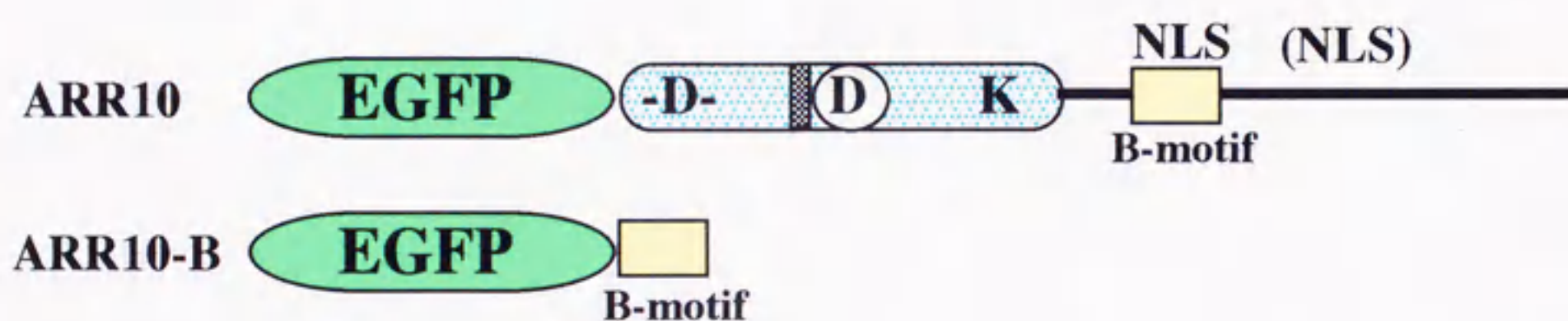
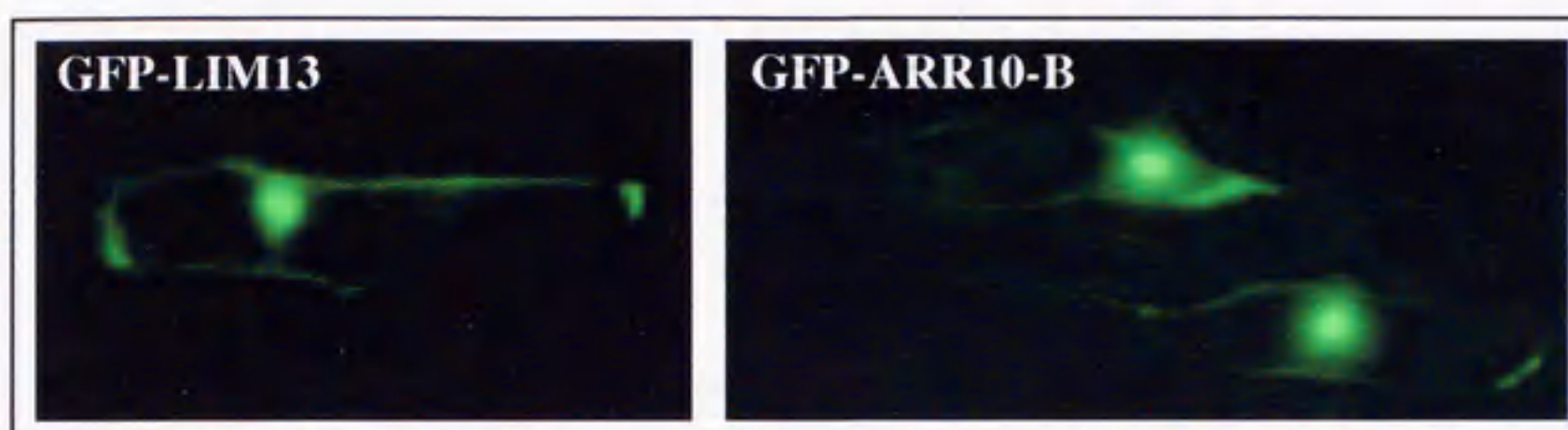


figure 6-2 . Nuclear-localization of the GFP fusion proteins. The recombinant genes carrying (35S-GFP-LIM13) and (35S-GFP-ARR-B) were respectively bombarded into onion skin epidermal cells. The former was examined as a positive reference. The expression and localization of each product was observed after 24 h incubation, by a fluorescence microscopy.

## 第七章 タイプB ARR群 機能ドメイン解析：Bモチーフ 3次元構造解析

## 緒言

タイプB ARR 遺伝子群 はレシーバドメインのC 末端側にB モチーフと名付けられたモチーフを共通もっている (25, 60)。これらのモチーフはマウスから単離されたc-Myb と1次配列上、約25%の相同性および9%の同一性があり (8, 29) 前章ではこのB モチーフ内にNLS が存在することが明らかにされた。しかしながら、その保存されている領域においてもMybタンパク質が機能する上で重要であるといわれている3つのトリプトファン残基のうち一つ (W188 ARR10) しか保存されておらず (figure 7-1)、タイプB ARR 群 がMyb 様転写因子として機能しているかどうかは疑問があった。そこでARR10に由来する B モチーフ65 アミノ酸 (推定タンパク質分子量 7.4kDa) 可溶性精製タンパク質を精製し3次元高次構造を明らかにすることでB モチーフの機能を推定しタイプB ARR群の細胞内での機能を明らかにする手がかりが得られると考えた。

## 実験方法および材料

## B モチーフタンパク質の精製

ARR10 にコードされているB モチーフ (T179~S242) 領域のアミノ酸配列65a.a.を用いてBモチーフタンパク質を大量発現および精製し、高次構造解析を行おうと考えた。BモチーフをコードするDNA をpET ベクターNde I-EcoRI にHis タグが発現しないように終止コドンを設定してクローニングし、BL21 (DE3) 菌株においてT7 プロモーター制御下、IPTG 誘導によりBモチーフタンパク質を高発現させた。

基本的には1.6 ℓ M9 培地 (800cc X2)、37℃で培養し、0.1mM IPTGによってタンパク質発現誘導して6時間後に集菌した。その菌体をフレンチプレス (10,000psi X2) で処理後、超遠心 (45,000 rpm, 3hr, 4℃, RP65T) によって可溶性画分を分離し、最終的に75-100% 硫酸画分にBモチーフを同定した。この時点で殆ど余分なタンパク質を除くことができた。こ

のサンプルをフオスフォセルロースカラムを用いて10mM KPi buffer および10mM NaCl で洗浄した後、600mM NaCl でBモチーフタンパク質を溶出した。最終的に0.614  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  のサンプルが得られ全量で約20mg 精製することができた (figure 7-2)。このサンプルを用いてX線解析を行い円偏光二色性 (CD) によりヘリックスあるいはシート構造を分析した (figure 7-2)。

さらに、M9培地のC源、N源をそれぞれ $^{13}\text{C}$  (Glc),  $^{15}\text{N}$  ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) による二重ラベルおよび $^{15}\text{N}$  単独ラベル条件で生育させた大腸菌から上記と同様の手順で (最後にFPLC) を行いラベルした精製タンパク質を調整し、これらの核磁気共鳴法 (NMR) による解析から3次元構造を決定した (figure 7-3)。なお、この解析は農林水産省 農業生物資源研究所 生物工学部 染色体操作研究室の山崎 俊正先生の多大な御協力による。

## 結果

### ARR10 Bモチーフは $\alpha$ ヘリックスに富んだ構造をしている

精製したタンパク質の高次構造を円偏光二色性 (CD) 解析によりこのポリペプチド構造を分析した結果、ARR10 Bモチーフは非常に $\alpha$ ヘリックスに富んでいることが明らかとなった (figure 7-2)。さらにこのタンパク質を $^{15}\text{N}$ 、および $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ 、でラベルしNMR解析によって3次元構造を決定した (figure 7-3, figure 7-4)。ここには、今回構造を決定したBモチーフおよびc-Myb、さらにホメオドメインのリボン構造および充填モデルを示してある。なおBモチーフ以外はDNAとの複合体の構造であり、ARR10由来BモチーフのN末端だけが長くのびているがにそれをふまえてこれをみるとDNA認識で核となる領域においては3者間で高度に構造が保存されていることが示され3つの $\alpha$ ヘリックス領域も確認できた (figure 7-3)。



## 考察

## 高次構造の決定と機能解析について

タンパク質を大量に発現、精製する技術の進歩と平行してタンパク質の高次構造を解析する機器分析の技術革新により転写因子のモチーフの構造解析が飛躍的に進んでいる。今回解析を行ったBモチーフは推定分子量が約7.4kDa と比較的小さなタンパク質でさらに比較的大量に可溶性タンパク質として精製することが可能で、さらに溶液中で高濃度に溶けて安定であったのでNMR による構造分析が可能であった。この技術はタンパク質の結晶を得なくても解析でき、c-Myb もこの手法によって決定された。

## B モチーフはMyb 様転写因子として機能すると推測される

ARR10 B モチーフは一次配列からだけでなく、今回決定されたBモチーフ単独の高次構造を既知のMyb 転写因子と比較しても3つの $\alpha$ ヘリックス ( $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ ) が織り成す構造が類似していることが明らかになった。また、ホメオドメインタンパク質とも高度に類似した構造をとっていた。figure 7-3, figure 7-4に示すように、ホメオドメインタンパク質がDNA を認識するのに重要であるアミノ酸は特に $\alpha 3$ ヘリックス領域に集中している。figure 7-1にタイプB ARR 群のB モチーフ一次配列を比較したが $\alpha 3$ ヘリックスに相当する領域でアミノ酸配列が非常に保存されていることがわかる。以上のことから、BモチーフはMyb 転写因子と高次構造の面からも転写因子として機能することが推定できた。つまりBモチーフを分子内にコードしているタイプB ARR 群はシロイヌナズナのHis-Asp リン酸リレー系情報伝達機構において転写因子として機能していることが強く示唆された。

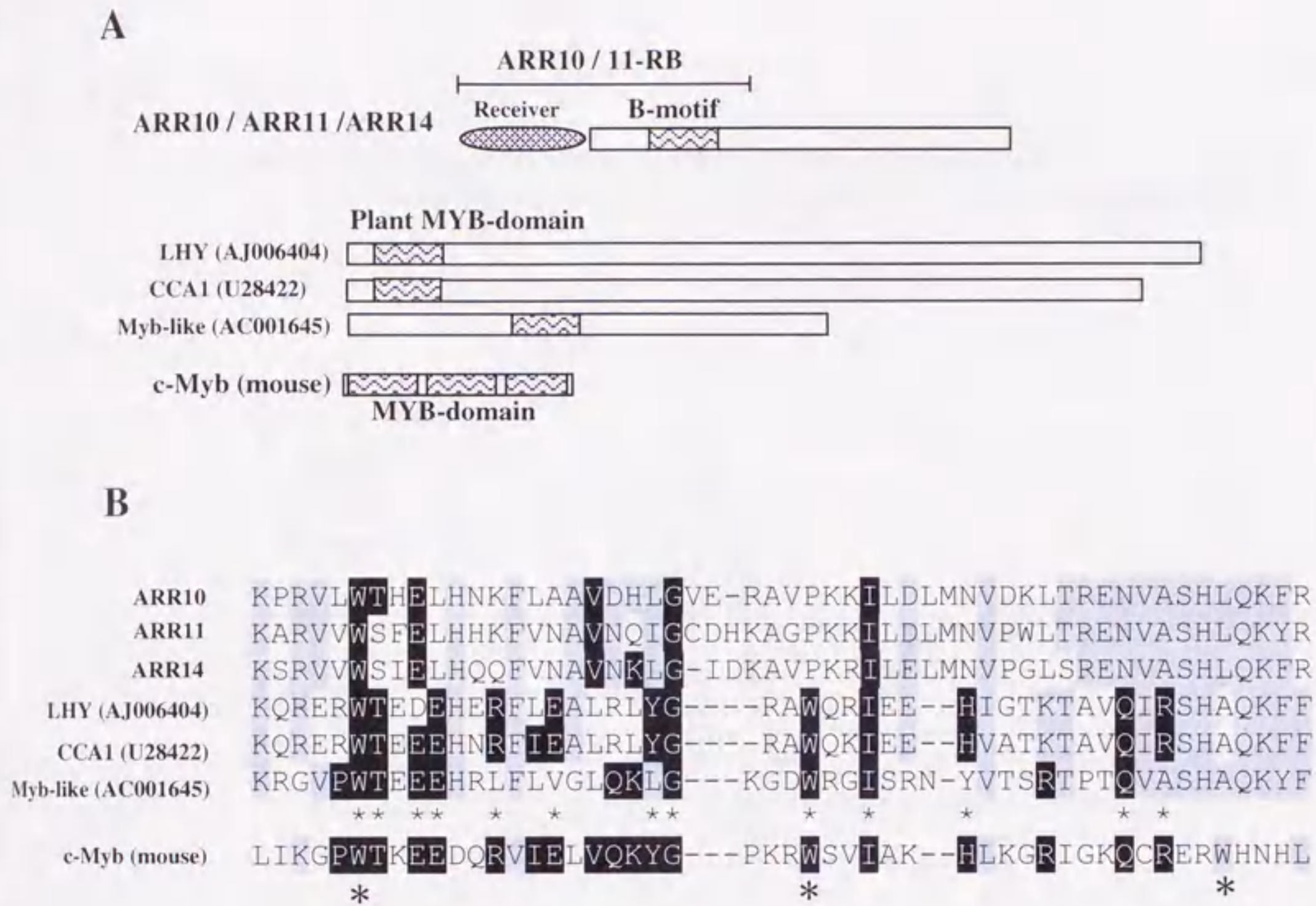
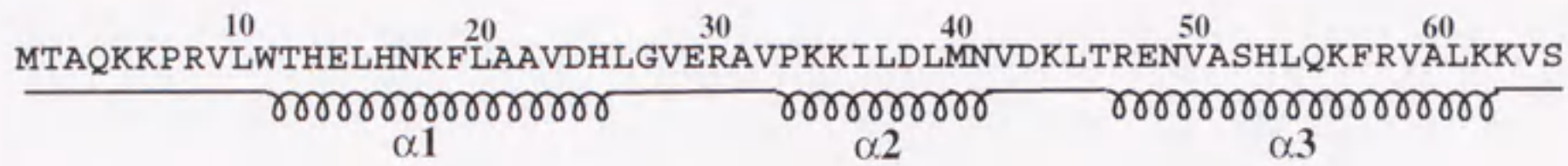
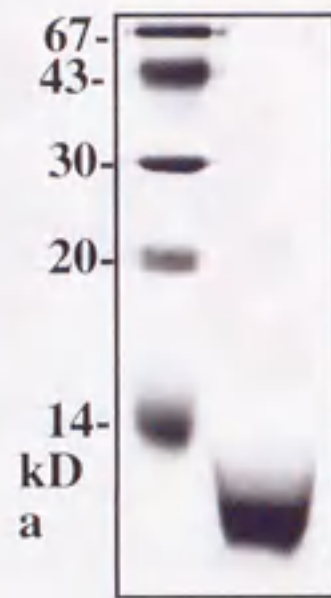


figure 7-1. Characteristic features of the B-motif found in the Type-B family of ARRs. (A) Schematic representations of the structures of the Type-B family of ARRs, in comparison with those of other plant proteins, each of which contains a MYB-related motif. (B) Alignment of the amino acid sequences of the B- and MYB-related motifs, in comparison with the authentic mammalian cMyb-repeats with three W marked by \*. Engailed homeodomain peptide (figure 7-3) need those amino acids, remarked by \*, to recognize DNA binding motif. The amino acids residues, which invariantly conserved among them, are shaded by black, and those nearly conserved are shaded by grey.

A



B



C

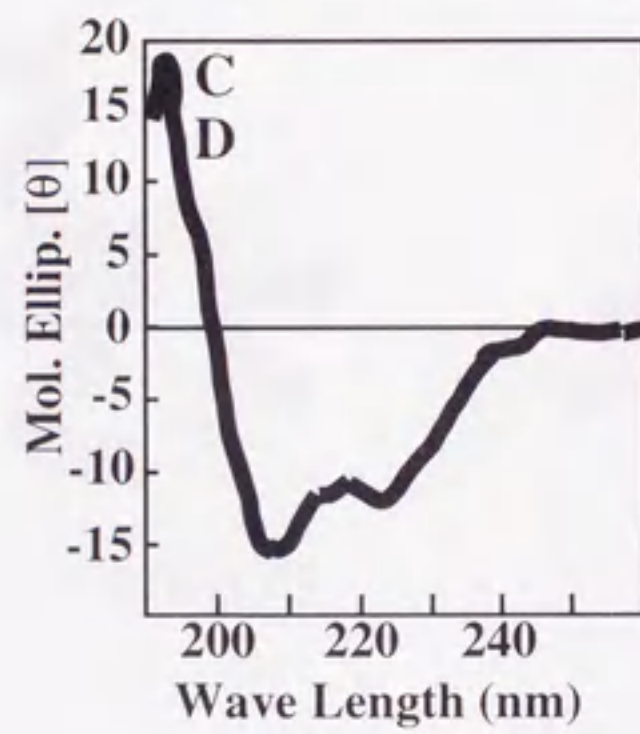
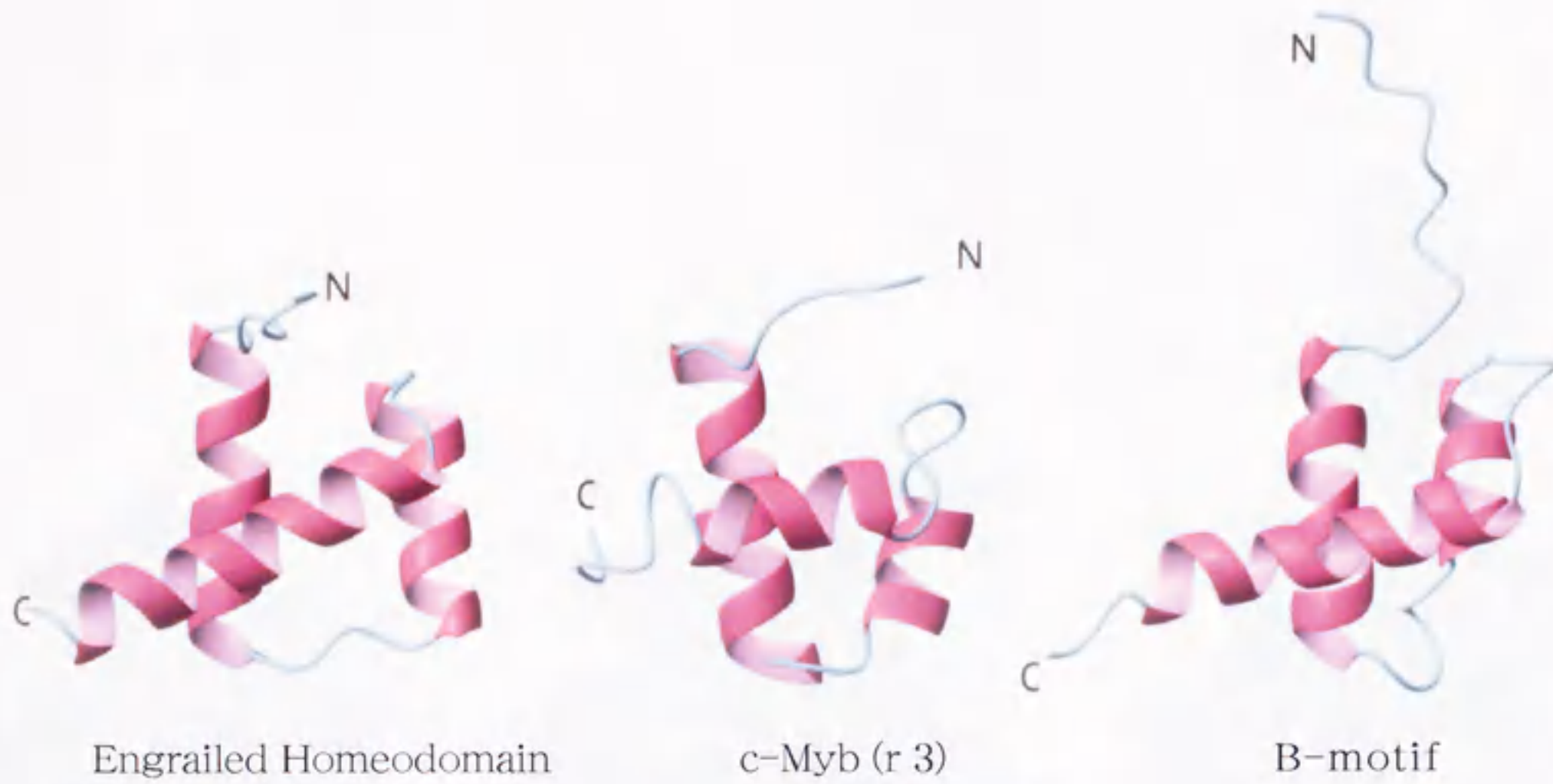


figure 7-2. Structure of the B-motif of ARR10.

(A) The primary and secondary structures of the B-motif of ARR10 are shown. The secondary structure was determined by NMR analyses. (B) A large amount of the B-motif consisting of 65 amino acids was purified, and it was analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. (C) Circular dichroism (CD) spectrum of the purified B-motif in aqueous solution.



```

c-Myb (r3) :   VKKTSWTEEDRI IYQAHKRLG-NR--WAET--A-KLLPGRTD--NAIKNHWN--STMRRKV
B-motif:     TAQKKPRVLWTHELHNKFLAAVDHLGVERAVPKKI--L-DLMNVDKLTRENVASHLQKFRVALKKVS
1HDD:       EKRPRTAFSSEQLARLKREFNE--NRYLTERRRQQLSSELGLN---EAQIKIWFQNKRAKIKK-S
              *  * *                               *   *                               *  * * * *
    
```

figure 7-3 The 3-D structure of B-motif, c-Myb ( $\alpha 3$ ) and engrailed Homeodomain

This ribbon structure of B-motif was designed using NMR by Toshimasa Yamazaki (NIAR). Here showed other proteins known as the c-Myb of mouse and related homeodomain protein. These have three  $\alpha$  helix motif and are resembled each other from the 3-D structural view point.

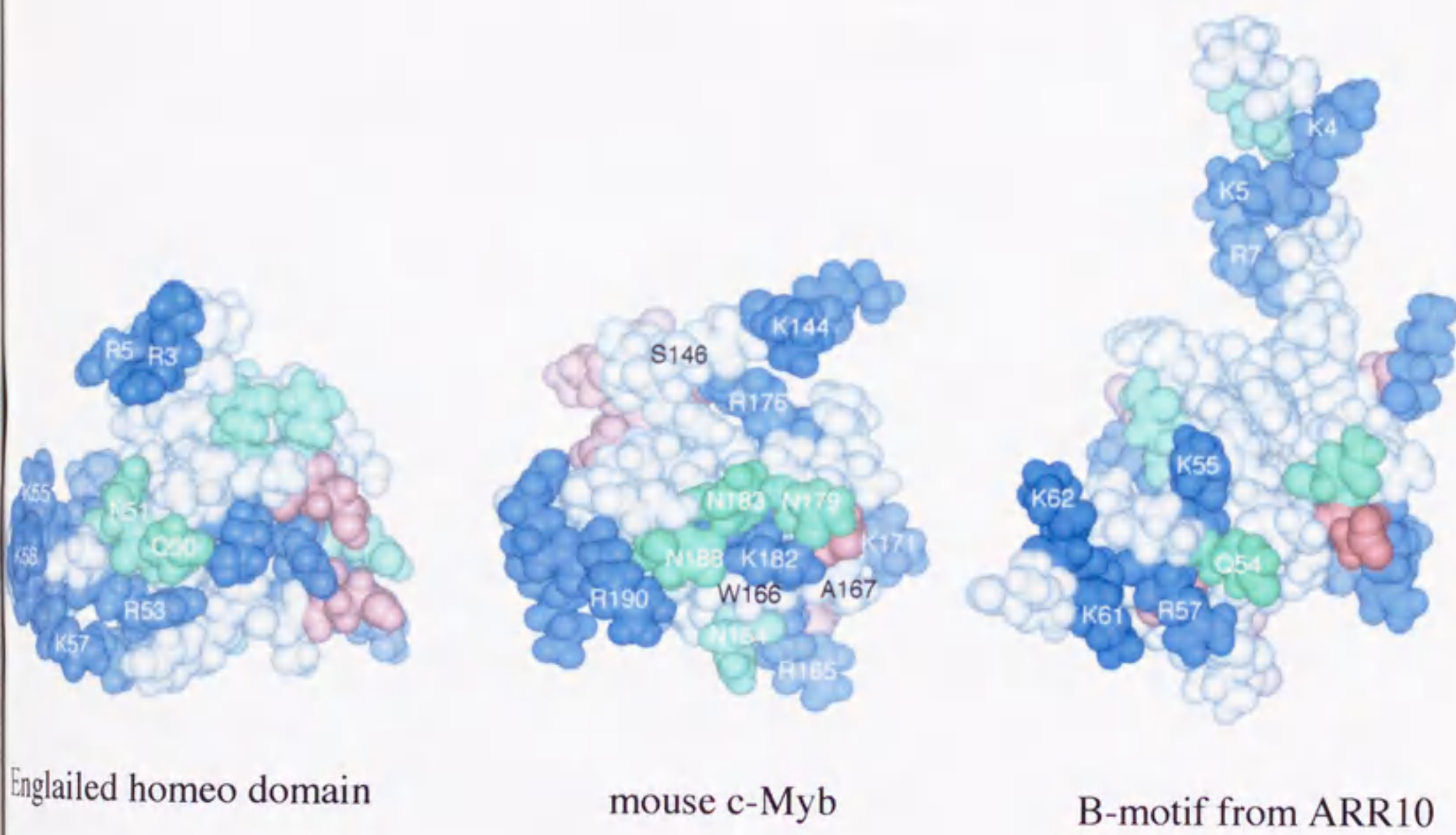


Figure 7-4 The 3-D structure of B-motif-II, c-Myb ( $\alpha 3$ ) and engrailed Homeodomain. This structure of B-motif was also designed by using NMR by Toshimasa Yamazaki (at NIAR). Here showed other proteins known as the c-Myb of mouse and related homeodomain protein. The presumed important amino acids for recognizing DNA were showed in each structure based on the engrailed homeo domain protein.

## 第八章 タイプBARR群機能ドメイン解析2: DNA結合能解析

## 緒言

第七章において高次構造のから判断してもタイプBARR群が転写因子として機能することがさらに強く示唆された。結果から非常に類似していることが明らかとなったホメオドメインタンパク質と比較したときにホメオドメインのDNA認識に必要なアミノ酸がBモチーフ内にも同定され、これらは3次元構造の視点からもタイプBARR群が転写因子としての機能をもつことを十分推測させた。そこで、このタイプBARR群のうちARR10が実際にDNAとの結合能をもつか、もつのであればどのような認識配列なのかを明らかにすることでタイプBARR群の標的遺伝子を類推できると考えた。

## 実験材料および実験方法

## ARR10 タンパク質の調整

ARR10 Bモチーフは構造解析に用いたヒスチジンのタグがついていないタンパク質を用いた(第七章を参照)。ARR10のDNA認識配列の同定はARR10 レシーバーおよびBモチーフ領域を含むタンパク質(ARR10 RB)を用いて行った。このタンパク質については第五章を参照していただきたい(*figure 5-1*)。

## ゲルシフト解析

Binding buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 0.5mM EDTA, 50mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol), 3.7x 10<sup>-6</sup>M, BSA, 0.225 μg / μl poly(dI-dC) でDNA断片および各濃度の精製タンパク質を合わせて、室温で30分置く。その後6X DNA dye を加え6%~アクリルアミドゲル(30:0.5 Ac/Bis, 10x E buffer, APS, TEMED)で泳動分離した。このときには泳動バッファ(E buffer: 40mM Tris-acetate pH7.4, 5mM Na acetate, 1mM EDTA)を用いた

(31)。

ARR10 BモチーフについてDNA に対する結合能があるかどうかの確認はARR6 の5' 非翻訳領域 (～-500、および大腸菌に由来するフォルミルDNA 断片を用いアクリルアミドゲルで泳動分離後、エチジウムブロマイドにより染色し検出した。

ラベルしたDNA を用いたときは3' 末端ラベリングによりHind III サイトを $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP によってDNA 断片を標識しアクリルアミドで電気泳動分離後、BAS II を用いて解析した。

### ARR10 タンパク質のDNA 認識配列の同定

figure 8-2 に示すようにランダムdNTP (N16) を16 mer 含む全長54 mer のssDNA、およびN16 を挟んだ両側にプライマー5'-GGCTGAGTCTGAACAAGCTT-3'(20mer)、5'-CGACGCTCAGTCTCGAGG-3'(18mer) を用意する (エスベックオリゴサービス(株))。まず、54mer ssDNA 2.5  $\mu$ g、と3' プライマー205pmol をもちいてKlenow fragment 処理を行った。こうして調整したdsDNAと、Ni-beadsに吸着させたARR10RB タンパク質10  $\mu$ g を T-K buffer (20mM Tris-HCl(pH8), 80mM KCl) 下で結合させ、4回T-K buffer で洗った後、設定した5' および3' プライマーでPCR を用いて目的の52bp DNA断片を増幅させた。このDNA 断片を8% アクリルアミドゲルで確認/分離し染みだした。こうして得られたDNA 断片を再びNi-ARR10 RB His と結合させPCR で増幅させる操作を7回繰り返した後pUC 19 にクローニングし塩基配列を決定した。

## 結果

### ARR10 (Bモチーフ) はDNA 結合能を示す

マウスのc-Myb と3次元構造からみても非常によくその立体構造が保存されていたB モチーフ (figure 7-3) は、DNA との結合能があることが示された (figure 8-1)。なおここで得られた結果では、B モチーフタンパク質の濃度が $10^{-7}$  MのオーダーからDNA との結合が確認できた。ここで示したDNA 断片はタイプA ARR6 の5' 非翻訳領域 および大腸菌由来のものであったが両者に対して同じ濃度範囲でARR10 B モチーフによるDNA 結合能が確認された。

## ARR10 RB のDNA 認識配列の同定

ランダムDNA断片とARR10RBタンパク質の結合を7回行い塩基配列を決定したところAGATcct /AGATacg/AGATtcg という3種類の配列に収斂した。AGATがコア配列となり3'が3種類に分かれていた (figure 8-3)。

## 考察

## ARR10 BモチーフはDNA 結合能をもつ転写因子であるといえる

ARR10が一次配列上および3次元構造解析によりMyb様BモチーフをもっておりNLSが保持されていたことからタイプB ARRに属するARR群はシロイヌナズナにおけるHis-Aspリン酸リレー系情報伝達機構において転写因子として機能している可能性が強く示唆されていた(25, 60)。ここでさらに、ARR10 RBを用いたDNA結合能の検討およびそのDNA認識配列の同定を行った。まず、Bモチーフを用いたDNA結合能の検討だが、ここで用いたDNA断片はARR6 5'非翻訳領域に由来する500 bp位のものであり、Bモチーフタンパク質が $3.3 \times 10^{-7}$  (M)からDNAとの結合がみられた (figure 8-1)。タンパク質濃度が $10^{-7}$  (M)と、非常に低くてもDNAに結合したことからかなり結合能は高いことが考えられたがBモチーフのDNAとの結合は大腸菌由来のDNA断片でも確認されており、ここではBモチーフのDNA認識の特異性までは言及しない(塩基配列は未確認である)。いずれにしても、ARR10 BモチーフはDNA結合能をもつ因子であることがここで明らかになった (figure 8-1)。

## AGATcct/ AGATacg/AGATtcg を認識するARR10RB

ARR10RBは今回のDNA認識配列のスクリーニングによりAGATcct/ AGATacg/ AGATtcgを認識することが分かった (figure 8-3)。この配列は、酒井らによって同定されたARR1/2のDNA認識配列(A/GGATT)と非常によく似ていた(Data not shown yet)。実験の条件からはAGATコア配列を含む3種類の配列に収斂したので、DNA認識配列を同定するには適していたと言える。ここで得られた配列をもとに、タイプA ARR群3~7の5'非翻訳領域-500 bpを検索したところ、AGATCTTがARR7の上流-350 bpまでの領域に2ヶ所確



認できた。このことからARR10の標的遺伝子候補のひとつにARR7が考えられた。今後はこの配列を参考にさらに標的遺伝子の同定を行い、タイプB ARR群の下流のこの情報伝達経路を検討したい。

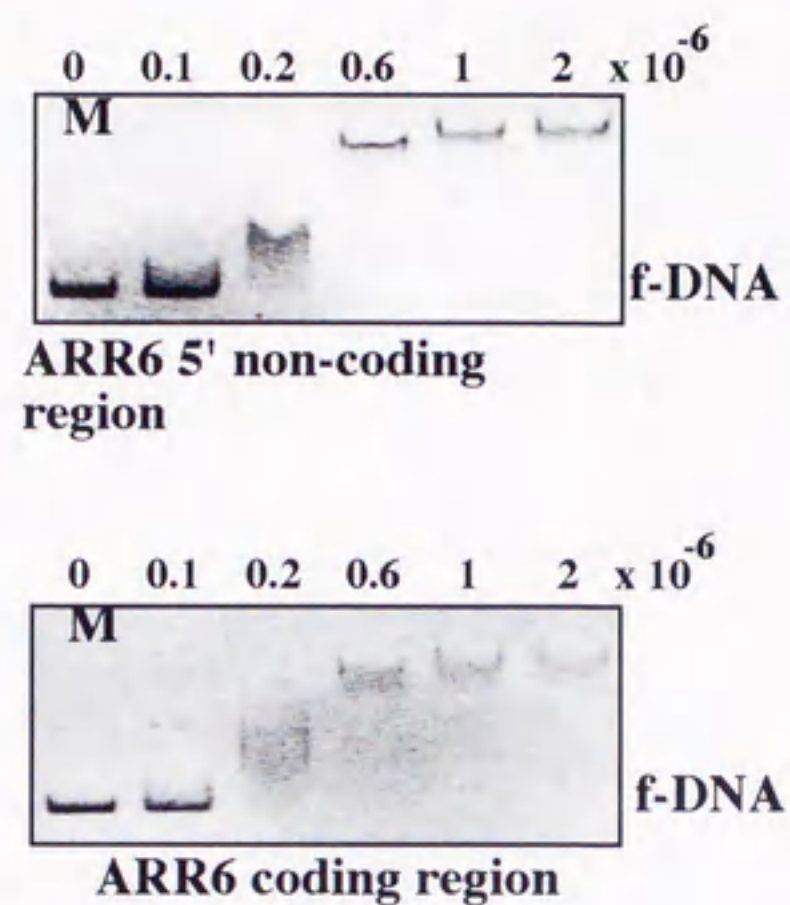


figure 8-1 The function of B-motif of ARR10

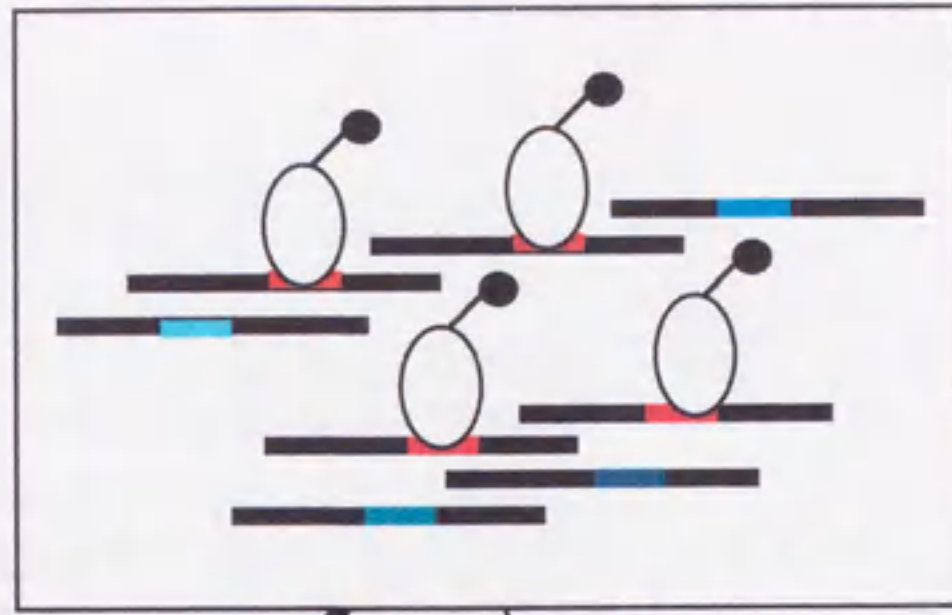
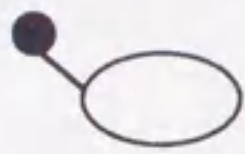
This purified B-motif (see figure 7-2) of the varied concentrations was incubated with the given DNA segments (see Materials and methods), and then the samples were subjected to gel-shift assays, in order to see the ability of the B-motif to bind DNA.

A

52bp (random N16) oligo

+ Binding

ARR10-RB-His6



DNA extraction

X7

PCR

B

~oligo 54mer~

primer-1 20mer

5'-GGCTGAGTCTGAACAAGCTT

5'-GGCTGAGTCTGAACAAGCTT

*Hind* III

N16

*Xho* I

NNN.....NNNCCTCGAGACTGAGCGTCG-3'

GGAGCTCTGACTCGCAGC-5'

primer-2 18mer

figure 8-2 A model for identification of DNA recognition sequences of ARR10 receiver protein. (A) Some 54bp oligonucleotides binding with ARR10RB(see Chapter 5.) were amplified by PCR using appropriate primer-1 and primer-2 (B) . These each oligonucleotides have random 16bp sequence out of 54 bp nucleotides .

**A**

```

2-ctcgaggAAGATACGTAGAAATCTaagctt
4-ctcgaggAAGATACGCCCGAATCaagctt
   aagcttAGATACGTTGATATCTcctcgag-13
5-ctcgaggATTCGCAAAGATACGCaagctt
   aagcttGATACGGTTAGATTCGcctcgag-17
   aagcttAGATTCGGTTGGAGATcctcgag-22
   aagcttAGATTCGGTTTGATTCcctcgag-8
   aagcttAGATTCGCGAAGATTCcctcgag-15
11-ctcgaggATACGTTAAGATTCGCaagctt

   21-ctcgaggAGATCTTACCGTATCCaagctt
   19-ctcgaggAGATCTTACCGTATCaagctt
   18-ctcgaggAGATCTTGGGAGAATCaagctt
   10-ctgaggGAAGATCTTGCGTATCaagctt
7-ctcgaggATCACATAAGATCTTCaagctt
14-ctcgaggATACGCCTAGATCTTCaagctt

```

**B**

<b>AGAT</b> a/tcg tt
-------------------------

figure 8-3 Three groups of sequences were gathered after sequencing. (A) 15 sequence out of 18 were classified into 3 groups. Among these there was the core sequence AGAT and following 3 nucliotids were different each other showing in (B).

## 第九章 植物固体レベルからみたARR群の生理的解析

## 9-1 転写レベルでの発現様式解析

## 緒言

第二章に示すようにARR 遺伝子群はシロイヌナズナのゲノム又はcDNA ライブラリーから単離され、ARR3~7についてはサザンハイブリダイゼーションによりシロイヌナズナのゲノム上に1コピーずつ存在することがわかった(24)。これらのうちの一部についてはESTデータベースにおいても確認することができ、植物体での発現が十分推測できた。そこでARR遺伝子群 遺伝子産物の植物体での機能を推測するために植物体レベルで各ARR 遺伝子の器官(葉、根、花、鞘) 特異的発現がみられるか注目した。ARR遺伝子産物がどのような外界もしくは内在性植物ホルモンの情報伝達に関わっているのかを明らかにする上で重要な知見が得られると考えた。

## 実験材料と実験方法

## DNA/RNAの調整とハイブリダイゼーション\*

全ゲノムDNAは、シロイヌナズナの葉からMurry & Thompsonの方法に従って調整した(41)。サザンハイブリダイゼーションは、DNAを制限酵素で処理した後、0.8%アガロースゲルに電気泳動して展開し、Hybond-N<sup>+</sup> nylon membrane (Amersham)に移した。ハイブリダイゼーションは<sup>32</sup>PでラベルしたDNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーションバッファー(0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH7.2, 7% SDS and 1mM EDTA)において65°C, 18hr行った。membraneをバッファー(40mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7.2, 1% SDS)で65°C, 5min洗い、この操作を3度、続いて同じバッファーで65°C, 15min. もう一度洗ったあと0.2×SSCと0.1% SDSを含む別のバッファーで65°C, 30min. 処理した。この後、オートラジオグラフィー(BAS-2000II, Fujix)で検出した。全RNAは、シロイヌナズナの根または、葉からフェノール-SDS法(41)で調整した。ノーザンハイブリダイゼーションは、RNAを2.2Mホルムアミドを含む1%アガロースゲルに電気泳動して展開し、Hybond-N<sup>+</sup> nylon membraneに移した。固定したmembraneは、<sup>32</sup>PでラベルしたDNA断片をプローブとしてバッファー(6×SSPE, 5×Denhalt' solution & 10% dextran sulphate と100 μg/ml salmon sperm DNAを含んだ

0.5% SDS) において65°C, 18hr行った。membraneを、2×SSPEと0.1% SDSバッファーで室温で30min.2度、2×SSPEと0.1% SDSバッファーで65°C, 30min.2度、0.2×SSPEと0.1% SDSバッファーで65°C, 30min.以上のように洗った後、オートラジオグラフィー (BAS-2000II, Fujix) で検出した。

### 植物ホルモン処理

共同研究グループの木羽らの協力による (33)。アルコール、植物ホルモンは全て窒素を枯渇させて水耕培養した植物体を用いて処理を行い0.36% メターノール、10 μMまたは100 μMトランスゼアチン (t-Zea)、100 μMベンジルアデニン (BA)、100 μMアデニン (Ade)、100 μM2,4,-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4,-D)、100 μMアブシジン酸 (ABA)、100 μMジベレリン酸 (GA<sub>3</sub>)、100 μMメチルジャスモン酸 (MeJA) で、エチレンに関しては100ppmで0.7, 2, 24時間処理し各植物体の葉より全RNAサンプルを用意し、ARR遺伝子それぞれより調整した<sup>32</sup>Pで標識したプローブをもちいてノーザンハイブリダイゼーションを行った (33)。

### 結果

通常条件で生育させたシロイヌナズナにおいてARR遺伝子の発現様式を植物組織器官 (根、葉、花、鞘) 別にみるとタイプA ARR群 (3~7)はどの器官でも発現がみられるが、その中の根で他の器官よりやや強く発現していることがわかる (figure 9-1)。一方、タイプB ARR10 においても、どの器官でも一定のレベルで発現しているが、根において他に比べて多少発現が強いことがわかった (figure 9-2)。このようにタイプA およびタイプB 間で、通常条件下では同じ発現パターンを示した。

さらに、木羽らによる種々の植物ホルモン処理をしたシロイヌナズナ切り取り葉におけるARR群の発現量をみると、特にタイプA ARR群 (ARR3~9) をサイトカイニンで処理したときその発現の程度には差があるが一応に発現誘導がみられた。一方、タイプB ARR群 においてはt-ゼアチン、ベンジルアデニン、オーキシシン、エタノール、アブシジン酸、ジャスモン酸、を与えた切り取り葉における発現様式を解析したが、これまでにタイプB ARR群 の発現誘導シグナルの同定には至っていない (33)。

## 考察

ARR遺伝子は一次構造上の特徴からタイプA およびタイプB と大別した (figure 2-3, figure 2-4, figure 2-5)。さらにこの章で示した通り、タイプA ARR群 は植物ホルモンのひとつであるサイトカイニンにより発現誘導されるがタイプB ARR群 は誘導されないという大きな違いを持つことを明らかにした (10, 12, 25, 33)。特にタイプA ARR 群のうちARR4, ARR5 はサイトカイニンおよび窒素により発現が誘導されるタンパク質 IBC4, IBC5 として 同定された (10, 12) ことからタイプA ARR 群の発現誘導はサイトカイニンと関連づけられ非常に注目を集めている。サイトカイニンはオーキシンと拮抗して細胞分裂や分化を促進する作用をもつ植物ホルモンのひとつで、植物体や植物病原菌に広く存在していることが知られている。さらにサイトカイニンは導管、および篩管を通して容易に移動するので植物体のいたるところに分布していると思われるが、その合成場所についての候補の一つに根があげられている。タイプA ARR遺伝子産物の発現が比較的根で多いという結果は、根の機能との関係、もしくは植物体内におけるサイトカイニンの分布を反映していることも推測させる。

CKI 1 遺伝子がサイトカイニン植物ホルモン受容のセンサーキナーゼとして機能していることが知られており (31) さらに我々の研究グループで同定・解析を行っているAHK4センサーキナーゼもサイトカイニンセンサーであることが明らかになった (to be published: Suzuki T; *Plant Cell Physiol.* 2001, Feb.)。タイプA ARR群は上流にこのCKI 1 因子をもったサイトカイニン情報伝達経路に関与していることが十分推測できる。CKI 1センサーキナーゼと現在までに同定されている10種類のタイプA ARR群 (table 1) が全てひとつの情報伝達経路に関わるかどうかは検討の必要があるが少なくとも複数でサイトカイニンに関与した情報伝達経路を構成していると思われる。

一方、タイプB ARR遺伝子群の発現を誘導するシグナル、および植物ホルモンは見つかっていないが、このタイプB ARR 遺伝子がBモチーフ というマウスのc-Myb と相同性のあるモチーフをもっており、さらにタイプB ARR群 は転写因子として機能していることを十分予測させている (25, 60)。八章に示した通りこのタイプB ARR 制御因子群の標的の1つにタイプA ARRがあげられており、この点でタイプB ARR とタイプA ARR が関連づけられているが、今後の解析で注目する点のひとつであり、サイトカイニンで誘導されるタイプA ARR群 とそうでないタイプB ARR群 の相互関係がどうなっているのかはとても興味あるところである。

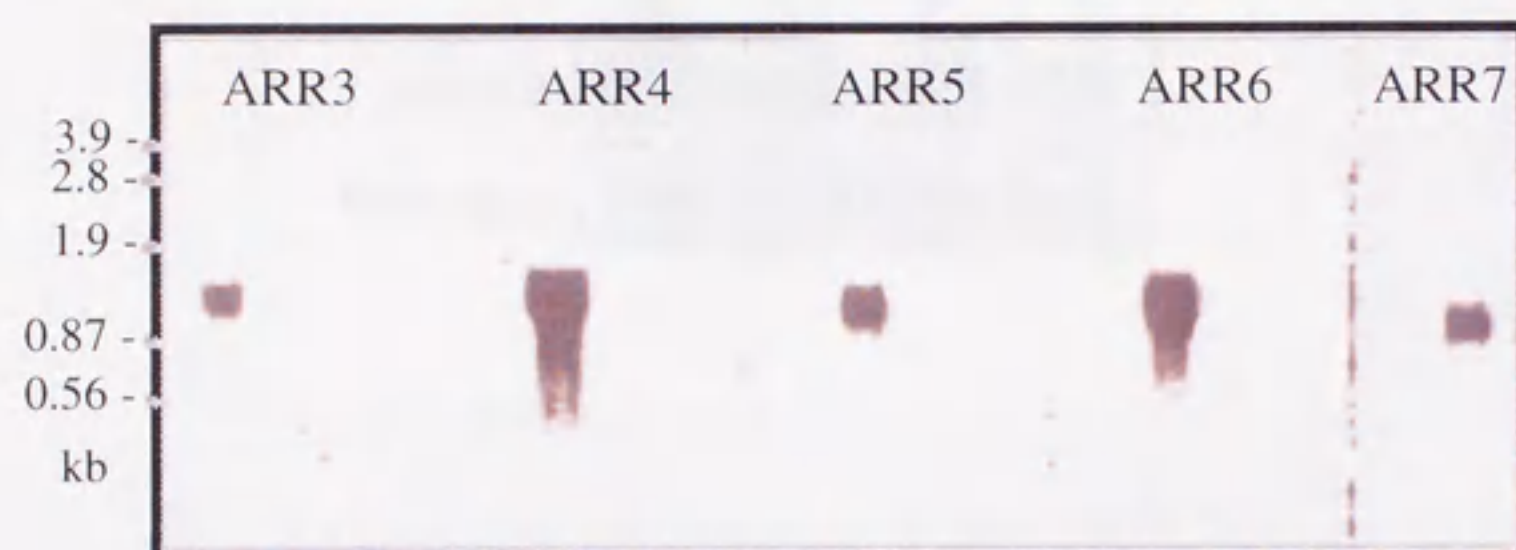


figure 9-1 Northern hybridization analysis of the ARR3~7 transcripts.

Northern hybridization analyses were carried out to locate the ARR3~7 transcript. Total RNAs were isolated from root.



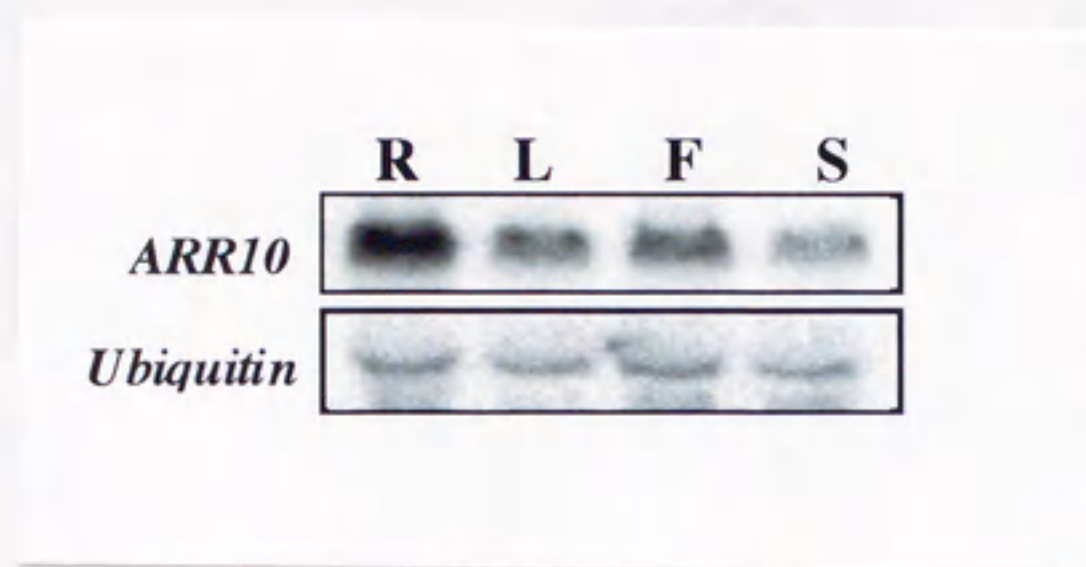


figure 9-2 Northern hybridization analysis of the *ARR10* transcripts.

Northern hybridization analyses were carried out to locate the *ARR10* transcript, with use of the ubiquitin transcripts as an internal and loading reference. Total RNAs were isolated from each organ indicated, R; root, L; leaf, F; flower, S; silique.

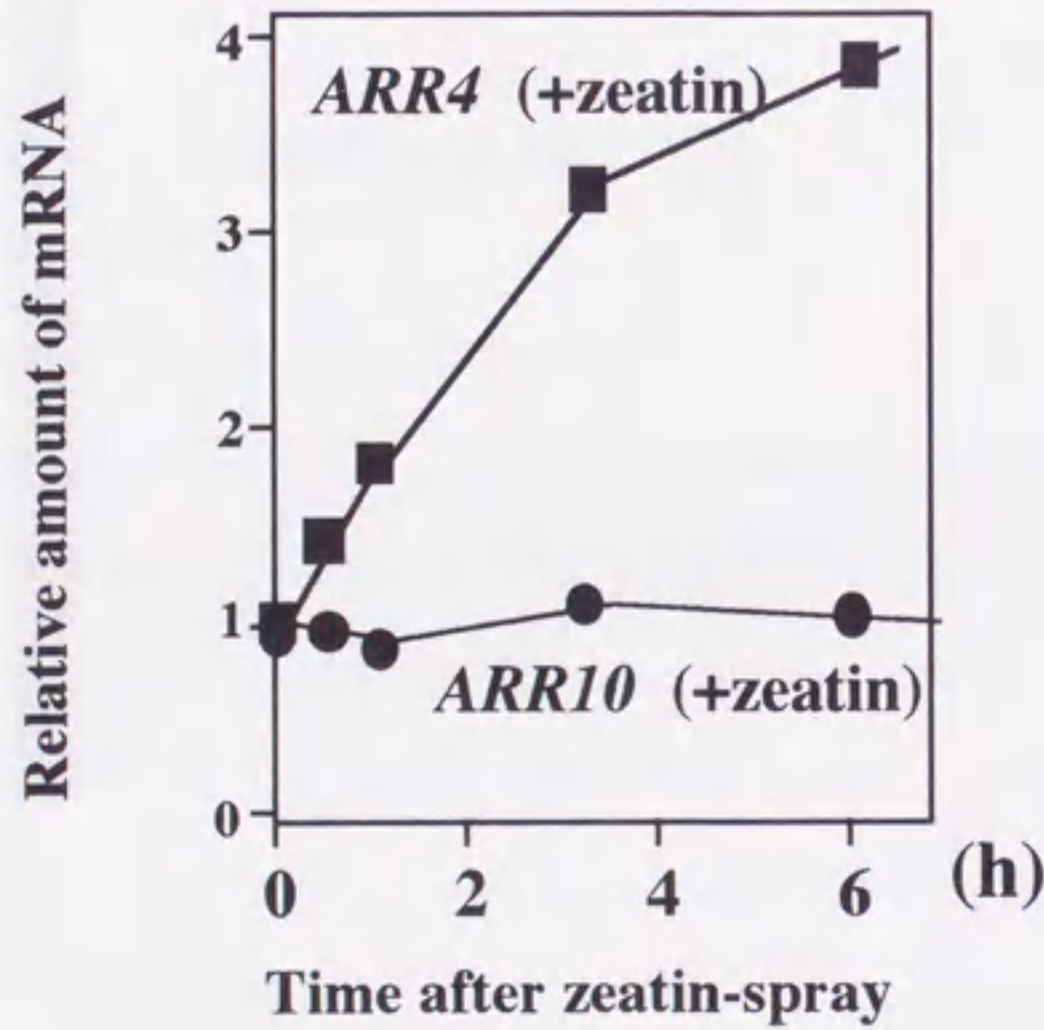
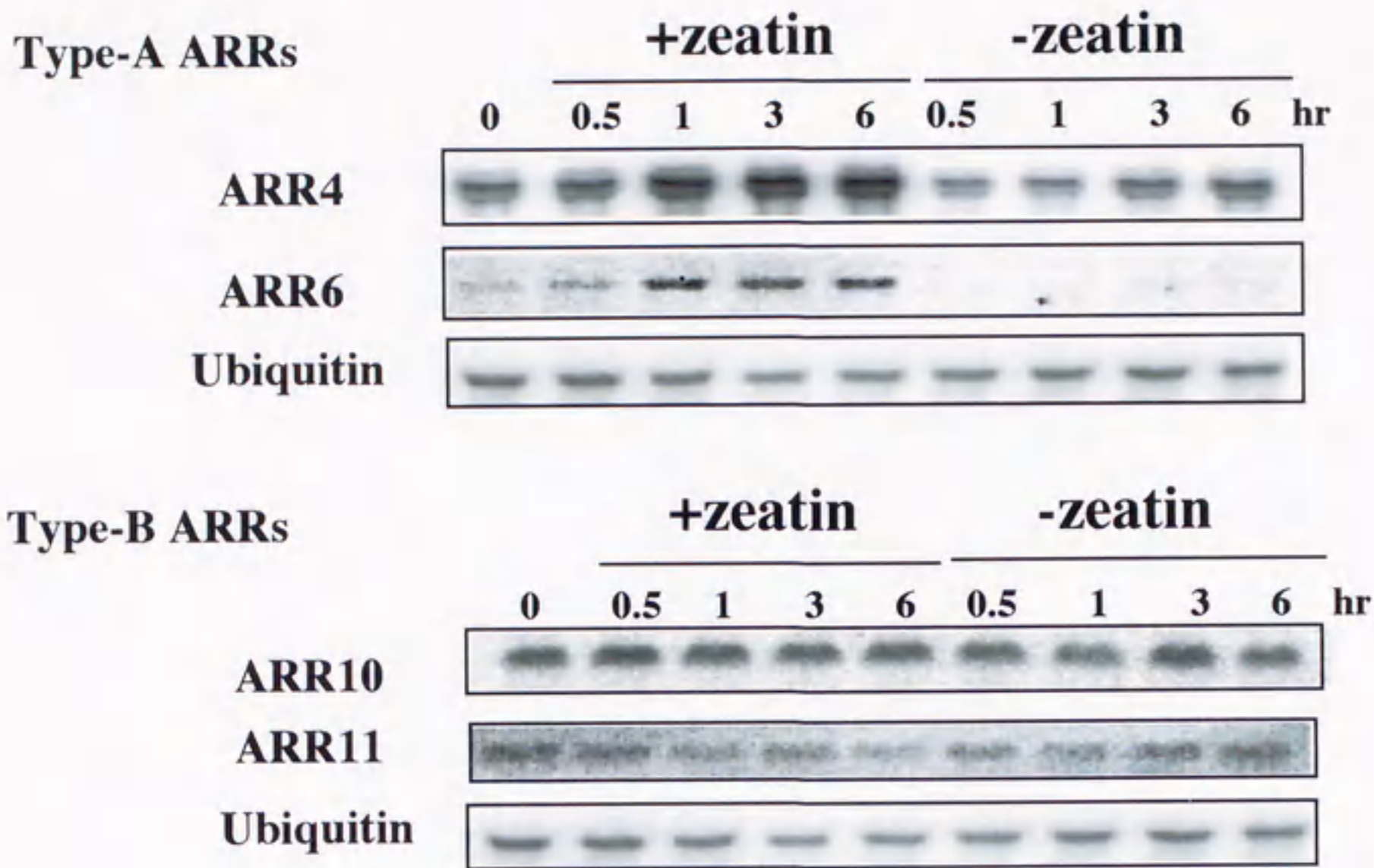


figure 9-3 Northern hybridization analyses. The cytokinin-induced accumulation of the ARR4 and ARR6 transcripts in the leaves of N-starved plants was examined. The experimental procedures are essentially the same as those described previously .

## 第九章 植物固体レベルからみたARR 遺伝子群の生理的様式

## 9-2 GUS 形質転換体植物を用いたタイプA ARR遺伝子ARR6の発現様式の解析

## 緒言

9-1で示したように、タイプA ARR 遺伝子は転写レベルでサイトカイニンにより発現誘導されることが明らかになった。サイトカイニンはオーキシシンと拮抗して植物体各組織における細胞分裂・細胞分化促進に関与することが知られている植物ホルモンで、根で合成されることが示唆されているが確かなことはまだ明らかになっていない。そこで、タイプA ARR遺伝子群 (ARR3~9) のサイトカイニン処理による発現様式パターンを植物体レベルで解析することによりタイプA ARR遺伝子群の関与する生理的機能やさらにサイトカイニンの機能についてもなんらかの知見が得られると考え、ARR6 プロモーター領域を用いた $\beta$ グルクロニダーゼ (GUS) マーカー遺伝子による発現様式解析を植物体を用いて試みた。

## 実験方法および実験材料

## ARR6 プロモーターGUS 形質転換植物体の作製:

## バイナリーベクターの構築

ここで用いたバイナリーベクターpABH-Hm1は、シロイヌナズナ $\beta$ アミラーゼ遺伝子の上流1.7kbをGUS 遺伝子の上流にもち $\beta$ アミラーゼ発現解析を行うために構築されたもので、名古屋大学生命農学研究科生物化学研究室より譲り受けた。このプラスミドはバイナリーベクターpBI101をもとにして、P35S(35S RNA polymerase promoter of cauliflower mosaic virus)の支配下にハイグロマイシン耐性遺伝子:HPT (hygromycin phosphotransferase gene)をTnos (the polyadenylation signal of nopaline synthase gene)とともにGUS 遺伝子と逆向きに挿入されている。このバイナリーベクターの $\beta$ アミラーゼの部分ARR6の5'-UTR:-725bp (PS), もしくは-2100bp (PL) 領域および読み枠内1stMetを含みGUSと読み枠が合致するようにGUS 遺伝子の上流に挿入し形質転換植物体の作製に用いた。なおARR6に関しては梅田・花木らによってARR6のcDNAクローニングとともにそのゲノムクローンとして上流約2kbpを第5染色体上に同定していた。(figure 9-4)

のでこれを用い、GUS 遺伝子との融合部分はPCR を用いて適当なつなぎ目になるように設計、構築した。

### アグロバクテリウムを用いたシロイヌナズナへの形質導入

アグロバクテリウム株(Ti プラスミド) はC58C1Rif<sup>r</sup> (pGV2260) を用い、エレクトロポレーション法 (ELECTRO CELL MANIPULATOR 600, BTX社製) により 上記のように構築したpBI101 (pBI系) バイナリーベクターを129 Ω、2.5kV の条件で導入した。アグロバクテリウムの培養はすべてLB、30 °Cで行った。

### 形質転換植物体の選択

形質転換に用いたシロイヌナズナは、長日条件下 (明期16 時間、暗期8 時間条件) 22°Cで生育させ、栄養成長から生殖成長に移行し第一花茎が約15~20cm 生育したところでこれを切り取り脇芽の形成を促し、15~20 cmのものが数本確認された植物体を選び順次、減圧湿潤法によりシロイヌナズナを形質転換した。形質転換に用いたアグロバクテリウムは30°C、LBで12 時間培養したものを集菌後、インフィルトレーション溶液\*で菌体を懸濁した菌液として調整した。そして開花がすでに始まり花びらが見えている花序および鞘の除去処理を施した植物体地上部を調整したアグロバクテリウム溶液に逆さまに浸し減圧状態でバイナリーベクターに由来する左右両境界領域によって挟まれた遺伝子領域のシロイヌナズナのゲノムへの遺伝子導入を試みた。

この形質転換第1 世代植物体 (以後T1 植物体と称する) から収穫した種子 (T1 種子) をMS (Hyg70 μg/ml, Car 300 μg/ml) 寒天培地上に適当数播き耐性を示した固体 (T2 植物体) を選びMS (Hyg20 μg/ml, Car 300 μg/ml) に移植し生育させ、適当な時期にロックウール上にさらに移植してT2 種子を得た。このようにして得られた数ラインに由来するT3 植物体のうちGUS 組織化学染色により染色が確認されGUS 発現が確認されたラインの中からホモラインを確立し以後の解析に用いた。

#### \*インフィルトレーションバッファー組成

MS salt	1/2 袋
1000 × Vitamin	1 ml
スクロース	50 g
1mg/ml ベンジルアミノプリン(BAP)	10 μl
シルエットL77	200 μl
dH <sub>2</sub> O	1 l に調整

MS salt はムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類（日本製薬株式会社）を用いた。

1000×Vitamin はThiamine Hydrochloride 300mg, Nicotinic Acid 500mg, Pyridoxine Hydrochloride 50mg を100ml に調整したものをを用いた。

### 植物体におけるGUS 組織化学染色法

基本的にはJeffersonら (28) の方法に従った。観察したい時期の植物体を固定化（固定化バッファー：0.3% マンニトール、10mM Mes、0.3% ホルムアルデヒド）で40 分間処理し、50mM リン酸バッファーで洗浄した後、0.5mg/ml X-グルクロニド溶液（50mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , pH7.0, 0.5mM フェリシアン化カリウム, 0.5mM フェロシアン化カリウム）に植物固体を浸し10 分間減圧状態においた後37℃で反応させた。適当時間反応させた後、～70% エタノール処理により反応を止め、脱色された植物体におけるインジゴチン色素の分布を光化学顕微鏡（LEICA MZ 6）で観察した。サイトカイニン処理はMS 液体培地にt-ゼアチン10  $\mu\text{M}$ になるように加えたものをを用いて適当な時間生育させた植物体に対して処理を行った。

### 植物体におけるGUS活性測定法

基本的にはJeffersonら (28) の方法に従った。適当な時期の植物体をGUS 抽出バッファー（50mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , pH 4.0, 10mM  $\beta$ -Met, 10mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0.1% Sodium Lauryl Sarcosine, 0.1% TritonX-100）中4℃条件下ホモゲナイザー（HOMOGENIZER HG30, HITACHI）により粉碎し15k rpm で15分間遠心後（himac CF15D2, HITACHI）その上清を採りサンプルとした。これにMUG アッセイバッファー（1mM MUG）を基質として加え適当な時間経過後、0.2N 炭酸ナトリウムにより反応を止めた。測定は励起光355 nm 処理による放出光460nm をSpectrofluorimeter によりMU の蛍光を測定し、これをMU の検量線から各サンプル中のタンパク質1mg、反応時間1分当たりのMU 量を決定してGUS 活性（pmolMU/min/mgP）とした。

## 結果

## ARR6 プロモーターGUS形質転換植物体の作製

ARR6 PS/PL (詳細は上記バイナリーベクター構築を参照) GUS 遺伝子のシロイヌナズナへの形質導入効率はそれぞれ、約30000 種子から39 ライン (PS), 12 ライン (PL)得られた。このうちGUS 染色により $\beta$ グルクロニダーゼ活性がみられたのは24 ライン (PS), 10 ライン (PL)であったのでこれら由来のホモラインを確立してARR6 発現パターン解析を行った。

## ARR6 発現パターン

最初に発芽後2日後の芽生えをGUS 染色して観察したところ、根、および側根の分裂組織部位、地上部胚軸の基部や葉の一部分に発現しているのが観察されたがそれ以外の器官(維管束など)にもまばらに発現しているのが観察された。このようにGUS の発現を確認したPS/PL形質転換植物体を $10\mu\text{M}$  トランスゼアチン (t-ゼアチン) で処理するといずれの固体においてもGUS 染色部位が植物体全体に渡って観察できた (figure 9-5) 。この植物体のGUS 活性を測定したところt-ゼアチン処理後5時間には無処理のもの2~5 倍の活性がみられ12時間後にはさらにその1.5 倍の活性上昇がみられた。特定の時期、特定部位における発現は同定できていない。

## 考察

## GUS遺伝子を用いた植物体における特定遺伝子の発現様式解析について

植物体における特定遺伝子の発現様式の解析には、GUS やルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いたり *in situ* 法を使った解析方法があるが、今回はそのなかでも特殊な装置や技術を要さないGUS をレポーター遺伝子として用いた。GUS についてはその組織化学染色法においてX-gluc を基質とした時に基質の染み込みにむらがあったり、GUSにより産出されるインジゴチン色素が組織から拡散してしまうといった指摘もある。そこで解析は常に処理、無処理の固体複数間の比較によりARR6 の発現パターンを観察した (figure 9-5)。

## GUS遺伝子を用いた、ARR6遺伝子の発現様式

我々がクローニングおよび生化学的解析を行ったARR3~7 および浦尾らによって同定されたARR8,9 は程度の差はみられるがいずれもサイトカイニン植物ホルモンによる発現誘導されるということをノーザン解析により明らかにしていた (10, 25, 33, 69)。そこでさらにその発現誘導を植物固体レベルで観察することで特異的に発現される植物器官やサイトカイニン誘導様式、さらにはその他にARR6 遺伝子の発現誘導に関わる環境因子が同定できると予想し、ゲノムクローンを得ていたARR6を用いてARR6 プロモーターGUS 形質転換植物体を作成した。

その結果はfigure 9-5 にみられるように、サイトカイニン無処理の時には葉や胚軸の基部、根維管束に部分的に観察されるが、サイトカイニン処理により植物体全体において非常に強く発現誘導されることが観察された。このことはGUS 活性測定によっても明らかであり、固体レベルでもARR6 がサイトカイニン誘導性であることが証明できた。この形質転換植物体の観察は、ノーザン解析の結果と一致しておりARR6 の発現は特定の部位だけにみられるものではなく植物体のいたるところで観察され、サイトカイニン処理により植物体全体においてその発現が誘導されることが明らかとなった。

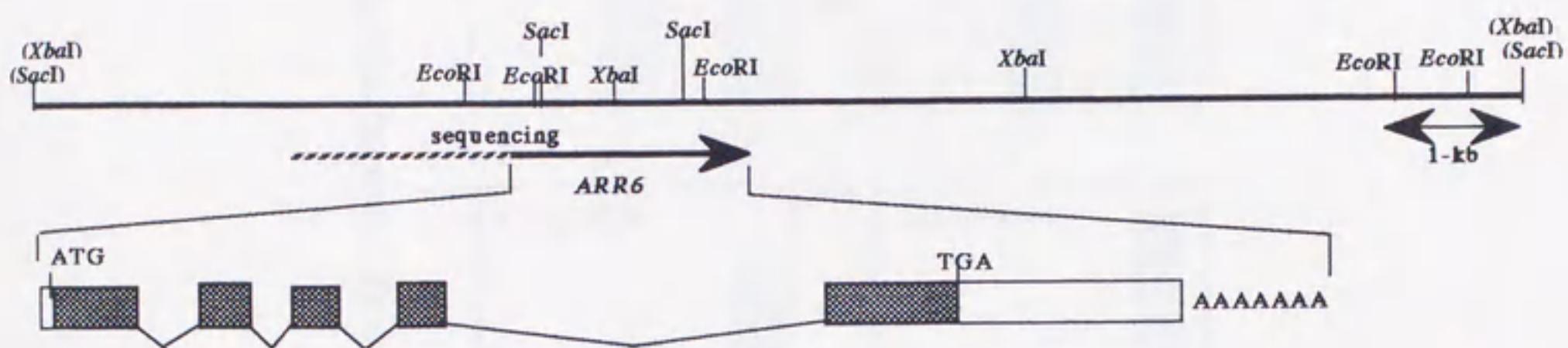


figure 9-4 The genomic structure determined in chromosome V for the ARR6 gene ; the sequenced region is indicated by the arrow. The restriction sites in parentheses are from the  $\lambda$  gt11 phage vector.



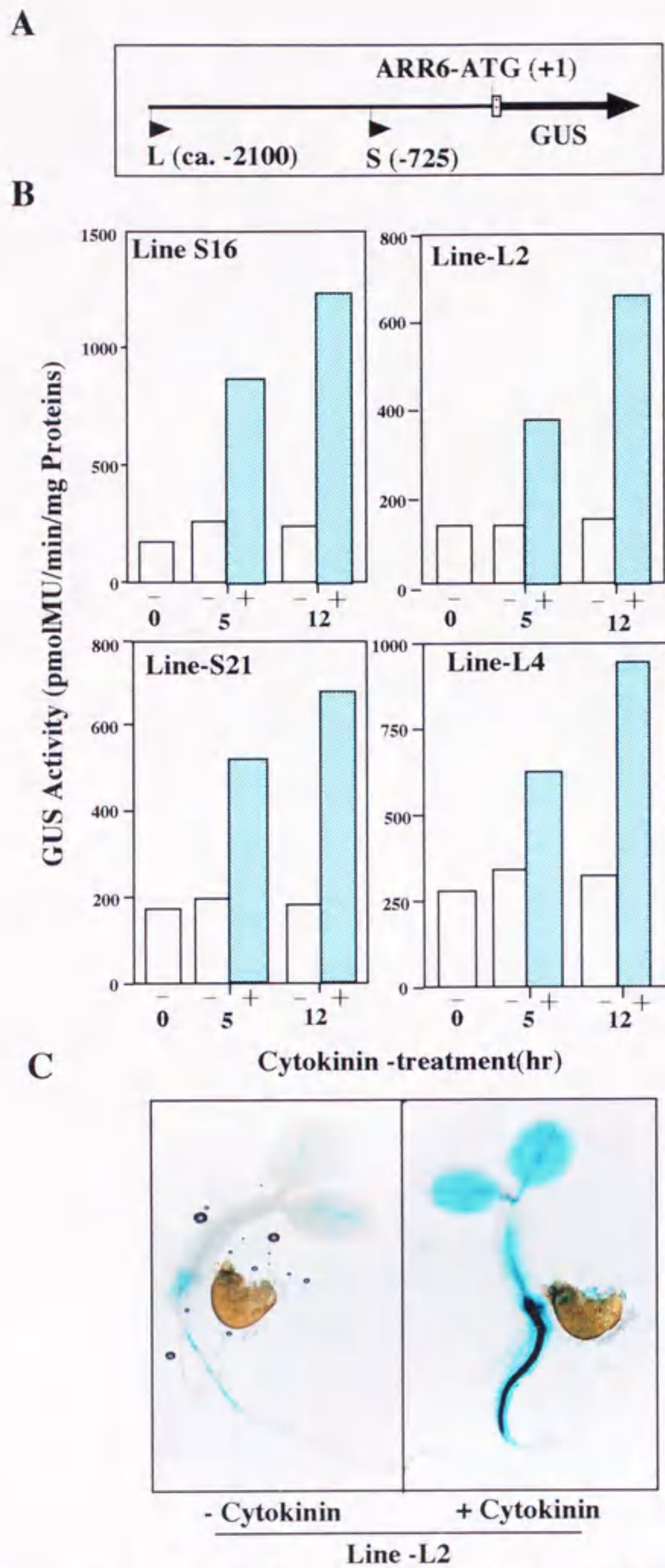


figure 9-5 . Characterization of the transgenic plants carrying the ARR6 promoter fused to the *GUS* gene. (A) Schematic representation of the ARR6-*GUS* fusion genes introduced into plants. (B) For each transgenic line, young seedlings were grown for 6 d, and then they were treated with *t*-zeatin (5 mM). These whole plants were assayed for GUS activities. (C) Histochemical analyses were also done for a representative of such cytokinin-treated seedlings.

## 第十章 総合考察

シロイヌナズナにおけるHis-Asp リン酸リレー系情報ネットワークに属する因子：レスポンスレギュレーターARR 群

シロイヌナズナにHis-Asp リン酸リレー系情報伝達機構が存在することが明らかになってから、現在までにセンサーヒスチジンキナーゼ群が11種類、HPt 因子が5種類、そしてレスポンスレギュレーター群が20種類同定されている(10, 14, 20, 23, 24, 31, 46, 60, 67, 68, 73)。このうちセンサーヒスチジンキナーゼに関してはエチレンセンサー5種類(23)、サイトカイニンセンサー1種類(31)、浸透圧センサー1種類(73)が感知するシグナルも同定されておりHis-Asp リン酸リレー系情報伝達機構が植物においても機能していることが明らかでこの情報伝達機構の普遍性が示されている。それではこれらセンサーにより感知された外界からの情報はどのような仕組みで細胞内へと伝達されるのであろうか。我々の研究室ではそれまで大腸菌を用いてこの系の解析を行ってきた(2, 3, 27, 41, 44, 45, 49, 70)。その知見を踏まえるとセンサーの下流にはそれと親和性の高いレスポンスレギュレーター、およびHPt 因子が存在して上流からのシグナルを伝達し対応していると考えられた。従って、当初、エチレンセンサーとしてETR1 が報告されたことと(14)、同時期に進行していたシロイヌナズナの国際ゲノムプロジェクトにより(1)同定されたゲノム配列やそれに伴って確立されつつあるESTのデータベースをもとにして我々がARR3~7(24)を同定した後複数の研究グループにより同定されたものもあわせると現在までに20種類のレスポンスレギュレーター：ARR1~20の存在が確認されている(1, 11, table 1)。

20種類もの存在が推定されているARR 群はその一次配列上の特徴からタイプA、およびタイプBの2種類に大別でき、タイプA ARR 群は約200a.a.からなりほぼレシーバー領域のみから構成され、一方タイプB ARR 群は約500a.a.から成るレシーバー領域のC末端側が非常に長い構造をしており、さらにレシーバー領域のすぐC末端側にはBモチーフと名付けたcMybと25%以下の相同性と9%の同一性をもつモチーフを保存している(25, 60, figure 2-3, figure 2-4)。そして何よりも大きな特徴のひとつとして、タイプA ARR 群は植物ホルモンサイトカイニンによって発現誘導されることがわかった(10, 12, 25, 33, 69, figure 9-3)。シロイヌナズナにHis-Asp リン酸リレー系情報伝達機構の存在が認められたこと、および20種類もの存在が確認されたARR 群のうち10種類が属するタイプA ARR 群がサイトカイニンの情報

伝達に関わっており、のこりの10種類が属するタイプB ARR 群は転写因子としての機能があることが示唆されたことからシロイヌナズナにおいてHis-Asp リン酸リレー系情報伝達機構が成立していることを推測させた。

### His-Asp リン酸リレー系情報伝達機構の一因子としてのARR群はAHP 群と相互作用している

このように単離されたARR 群について最初に疑問になった点は、植物においてもこの情報伝達機構ではリン酸転移を介した情報伝達が成立しているのかどうかであった。この点に関しては、まず大腸菌に由来するArcB (27, 70) との間でリン酸リレー能を示し植物に由来するレスポンスレギュレーターもその分子内のAsp 残基においてリン酸基を受容し、即座に転移させることが可能であることがわかった (24, figure 3-2, figure 3-3)。続いてシロイヌナズナに由来するHPt 因子、AHP2 を用いて検証した結果タイプA, タイプB の違いに関わりなくARR 群はリン酸化型AHP のリン酸基を自身のAsp 残基で受容し、即座に放出する(フォスファターゼ活性) ことが示され (25, 67) シロイヌナズナのHis-Asp リン酸リレー情報伝達機構もHis 残基とAsp 残基間におけるリン酸リレーによって情報伝達が行われていることが証明された (figure 3-2, figure 5-1)。細胞内局在性を検証した結果タイプA, タイプB ARR 群はいずれも核に局在しており、AHP2 は細胞全体に分布していた (figure 6-1)。一方で細胞内での物理的相互作用をtwo-hybrid 法で検討したところ、特にタイプB ARR 群はAHP 群 (AHP1~3) いずれとも相互作用することが明らかとなったがこれに対してタイプA ARR 群はAHP 群の間にはそのような相互作用は認められなかった (figure 4-1)。これらの結果はサイトカニンによって発現誘導されるタイプA ARR 群の機能的役割を推測する上で2つの可能性が考えられる。1つは、タイプA ARR 群はAHP 群およびタイプB ARR 群が形成する情報伝達経路とは別の情報伝達経路に属しており、*in vitro* 系および*in vivo* 系で示された (figure 3-2, figure 3-3, 24) リン酸リレーはタイプA ARR 群の保存されたレシーバー構造に拠るという可能性。もうひとつはタイプA ARR 群はタイプB ARR 群転写因子の直接または間接的な標的でありAHP とは直接相互作用はみられないという可能性である。いずれにしてもタイプA, タイプB ARR 群は上流のAHP 因子群を介して上流からのシグナルを伝達する経路を成立させていることが明らかとなった (figure 10-1)。

## BモチーフをもつタイプB ARR 群は転写因子として機能する

タイプB ARR 群はその分子内にcMyb 転写因子と25% 以下と低レベルだが相同性のあるモチーフを持っていることや(25, 60)、two-hybrid 実験系においてその全長を酵母GAL4 遺伝子のDNA 結合領域との融合遺伝子として酵母内で発現させるとそれのみで $\beta$ ガラクトシダーゼ活性をもつことから転写活性化能を持っていることが示唆されていた(36, 60)。そこでわれわれはタイプB ARR 群の機能上重要であると思われるB モチーフに注目して(29) Bモチーフの三次元構造解析を行い、高次構造の視点から本当にBモチーフがcMyb と同じ機能を持ち得るかどうかを検討した。その結果、Bモチーフは確かにcMyb や転写因子のひとつホメオドメインタンパク質と類似して $\alpha$ ヘリクスを3 回繰返した高次構造をとっておりDNA 認識アミノ酸も多く保存されていたことからタイプB ARR 群はシロイヌナズナHis-Asp リン酸リレー系情報伝達機構において転写因子として機能していることが強く示唆された。そこで、タイプB ARR 群の中からARR10 を用いてこれが認識するDNA 配列の同定を試みたところAGATCTT, AGATACG, AGATTCGの3 種類に収斂した。これらの配列のうちAGATACG についてはタイプA ARR 群の中のARR7 の-350 領域内に2箇所確認しており、タイプB ARR 群の標的遺伝子の候補のひとつにARR7があげられると考えている。いずれにせよ、タイプB ARR 群はDNA 結合能を持つcMyb 様タンパク質であり(*figure 8-1, 58*)、この情報伝達機構の中で転写因子として機能していることはほぼ確定的であると思われ、タイプA ARR 群との関連性については今後、さらに検討が必要であると思われる(*figure 10-2*)。また、このBモチーフと相同性のあるモチーフをもっている因子はLHY1 やCCA1 などサーカディアンのリズムを制御している因子内にもみられ(*figure 7-1, 61, 77, 78*) 機能的にも重要であることが推測される。

## 高等植物シロイヌナズナに存在しているHis-Asp リン酸リレー系情報伝達機構

His-Asp リン酸リレー系情報伝達機構は原核生物の主要な環境適応手段であり全ゲノムが決定されている大腸菌には約30ヘアのセンサーとレシーバーが同定・解析されている

(41)。この伝達機構の特徴として外界からの特定の情報入力を行うセンサーと、その情報をHis 残基とAsp 残基間でのリン酸リレーを介して標的遺伝子の転写因子として情報の出力を行うレシーバー間に非常に強い相互作用が成立していることがあげられ(21, 64)、これにより

情報の複雑化を防止し伝達の迅速化を図っていると考えられる。従って、このシグナル入力とシグナル出力を行うセンサーとレシーバーというのは非常に重要な因子であるといえる

(figure 1-3)。植物をはじめ生物にとって外界からの様々な刺激に対してどのように対応するかはその情報伝達にかかっているが、植物ホルモンはどんな環境下でも植物が成長・分化という非常に緻密に計画されたことを、スムーズに実行するために必要でありその伝達には正確性と速効性が要求される。そこでHis-Asp リン酸リレー系情報伝達系という単純だが速効性のある対応手段が用いられているのではないかと思われる。真核微生物である酵母においては浸透圧応答に対してSLN1-YPD1-SSK1 という一連のHis-Asp リン酸リレー系とその下流にはMAP キナーゼカスケードが位置していることが明らかになっており(figure 1-1, 37, 53, 57, 80)、シロイヌナズナのエチレン情報伝達機構の解析においても複数で機能する5種類のセンサーヒスチジンキナーゼとその下流にはセンサーのひとつと直接相互作用を示すCTR1 MAPKKK が同定されており、情報伝達系の類似性が明らかになっている(figure 1-1, 23)。

我々の研究室では、センサーヒスチジンキナーゼ(AHK2~4) およびAHP群(AHP1~5)の解析も同時に行っており(67, 68) それらの一部についてはサイトカイニン植物ホルモンを共通のシグナルとして認識するという、これらの一群の因子の関連性を示すデータが得られている(Suzuki T etc, Plant Cell Physiol, 2001, Feb.)。ここに同定・解析を示したタイプA ARR 群がサイトカイニンによる発現誘導を示したことから、サイトカイニンセンサーとして柿本らによって同定されたCKI 1 も合わせて上流のセンサーキナーゼおよびAHP 因子群、そしてタイプA、およびタイプB ARR 群がHis-Asp リン酸リレー系の機構に合致した関連性を成立させていることが推測される(figure 10-1)。一方、5種類のセンサーが同定されたエチレン情報伝達経路においては、この植物ホルモンに関連することが示されたレスポンスレギュレーターへの報告はまだない。シロイヌナズナにおいてはバクテリアと異なり気体形態をとるエチレンや様々な分子種のあるサイトカイニンあるいはオーキシシンといった植物ホルモンそれぞれ、および乾燥や低温ストレスといったストレスに対して独立した情報伝達因子の組み合わせをもって機能していることも考えられるし、ここに同定した一群のARRの中でエチレンのシグナル伝達に関与している因子が存在することも十分考えられる。

さらにシロイヌナズナにおいては疑似レスポンスレギュレーターという、レシーバー領域内のリン酸受容Asp 残基がGlu 残基になった因子 (APRR: Arabidopsis Pseudo Response Regulator) と呼ぶ因子が複数存在していることも明らかになっており、このうち

(APRR1,3,5,7,9) は時計遺伝子であることを示唆する有力なデータが得られている (38)。

また、赤色光/近赤色光の受容を担うフィトクロームがバクテリア型センサーキナーゼ様の構造をとっていることも明らかになっておりこれらのことから植物体においてHis-Asp リン酸リレー系情報伝達機構個々の構成因子の生物学的多様性が伺える。

## ARR 因子群の植物体における機能解析

シロイヌナズナの全塩基配列が決定され (1) ここにあげた20 種類のARR 群はシロイヌナズナに存在するすべてのレスポンスレギュレーターを網羅していると思われる(1, table 1, figure 2-3, figure 2-4) がこれらの分子レベルでの機能特性解析とともに植物体における機能解析も注目すべき点である。しかし、これまでにタイプA ARR3~7 についてそれぞれの大量発現系形質転換植物体を構築したもののそれによる顕著な表現系は得られていない。ここにあげた一連のタイプA, タイプB ARR群の分子レベルでの解析を踏まえるとタイプA ARR 群因子に関してはその短いC 末端側にNLS が存在していること (figure 6-1) からレシーバー領域のみを大量発現させた系を構築することを計画している。また、タイプB ARR 群についてもNLS がレシーバー領域外のB モチーフ内に存在していたこと (figure 6-2) からそのレシーバー領域のみを大量発現させた系を構築するとともに、転写因子としての機能をB モチーフに推測できたこと (figure 7-3, figure 7-4, figure 8-1) からレシーバー以外の領域のみを大量発現させることによりドミナントネガティブな作用が植物体内で機能することが予測され表現系が得られ、ARR 群の植物体レベルでの解析が行えるのではないかと考えている (figure 10-2)。

## 遺伝学的視点からみたARR 遺伝子群

我々がARR3~7 を同定した後、他の研究グループからもバクテリア型レスポンスレギュレーターが同定された。浸透圧・乾燥・低温ストレスによって誘導される遺伝子として同定されたARR8・ARR9 (73) およびサイトカイニンにより誘導されるARR15~17 (12) およびARR4 (IBC=Induced by cytokinin 7), ARR5 (IBC6) である。そして、現在までに20 種類のタイプA ARR として同定しているがこれらを遺伝学的視点からみたときその一次構造の特徴

や生理学的特徴にシロイヌナズナのゲノムの特徴がみられる。つまり、シロイヌナズナの遺伝子情報は2ヶ所に重複して存在しているという事実である(1)。タイプA ARR群およびタイプB ARR群のレシーバー領域のみを用いて構築した系統樹(*figure 2-5*)でも明らかだが殆どが相同性の高い2つのレシーバーの組になっており、Brandstatterらによって示された一次構造のモデル図においては(12)タイプA ARR群のレシーバーはもちろんそのC末端側の構造も2つずつのARR因子間で相同性が高く、さらにサイトカイニン処理による発現誘導パターンについても類似性を示していた。このような遺伝学的背景を踏まえてもタイプA ARR群、タイプB ARR群がどちらのタイプも同様に重複させて遺伝子上に存在させたことは非常に興味深いところである。今後生理学的な解析を行うと共に遺伝子の進化の視点にも注目したいと考えている。

## His - Asp Phosphorelay Signal Transduction in *Arabidopsis*

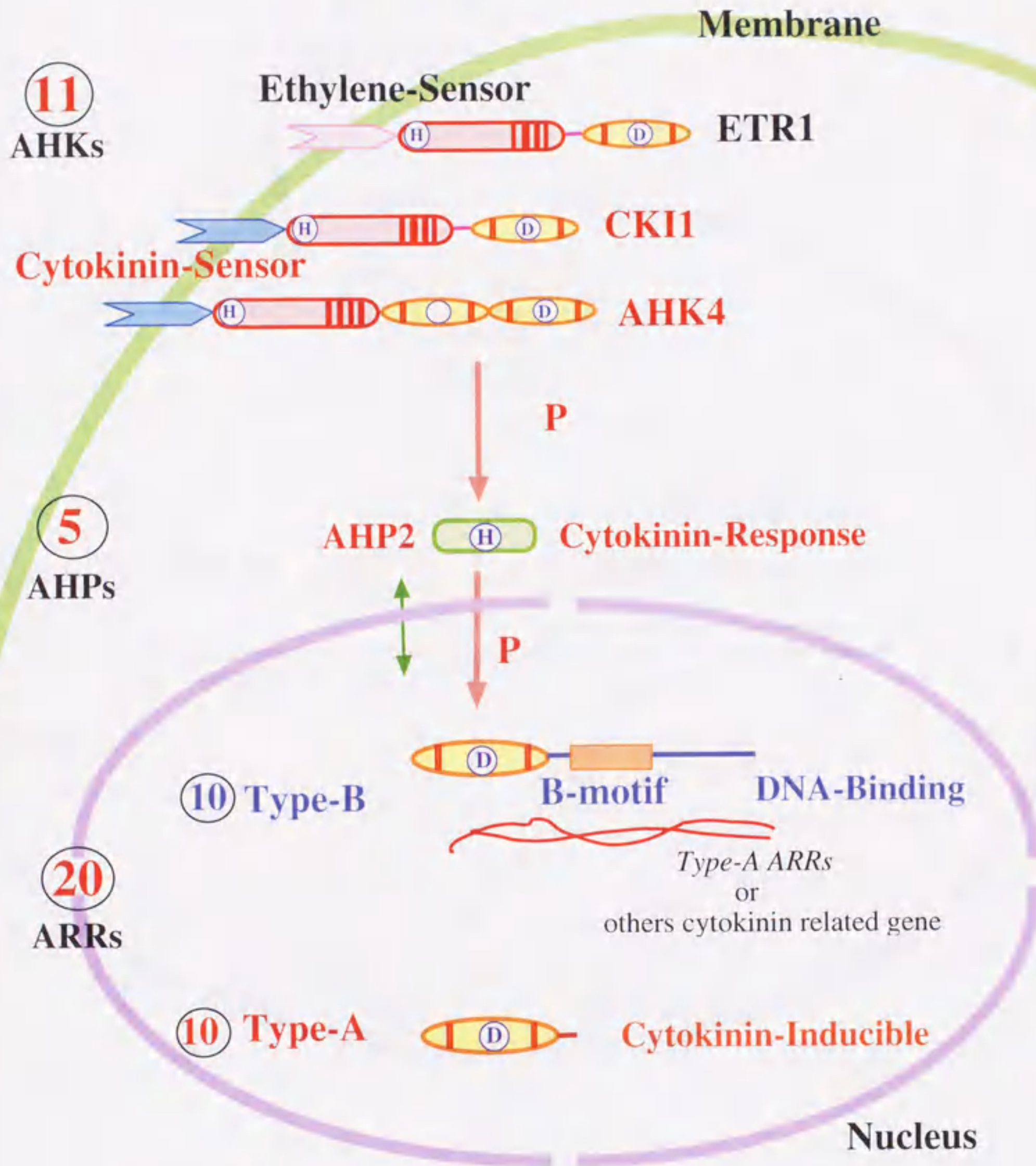


figure 10-1 The His-to-Asp phosphorelay signal transduction pathway of intercellular signal transduction pathway. Adding to the sensor histidine kinase, ethylene related and cytokinin related HKs, additional components of the His-to-Asp phosphorelay system were also found in *Arabidopsis*, including authentic response regulators (ARRs) and phosphotransfer intermediate protein (HPT). The biological roles of most ARRs are largely unknown, but *Type-A ARRs* may be a target of *Type-B ARRs* transcriptional factor in response to the plant hormone cytokinin.



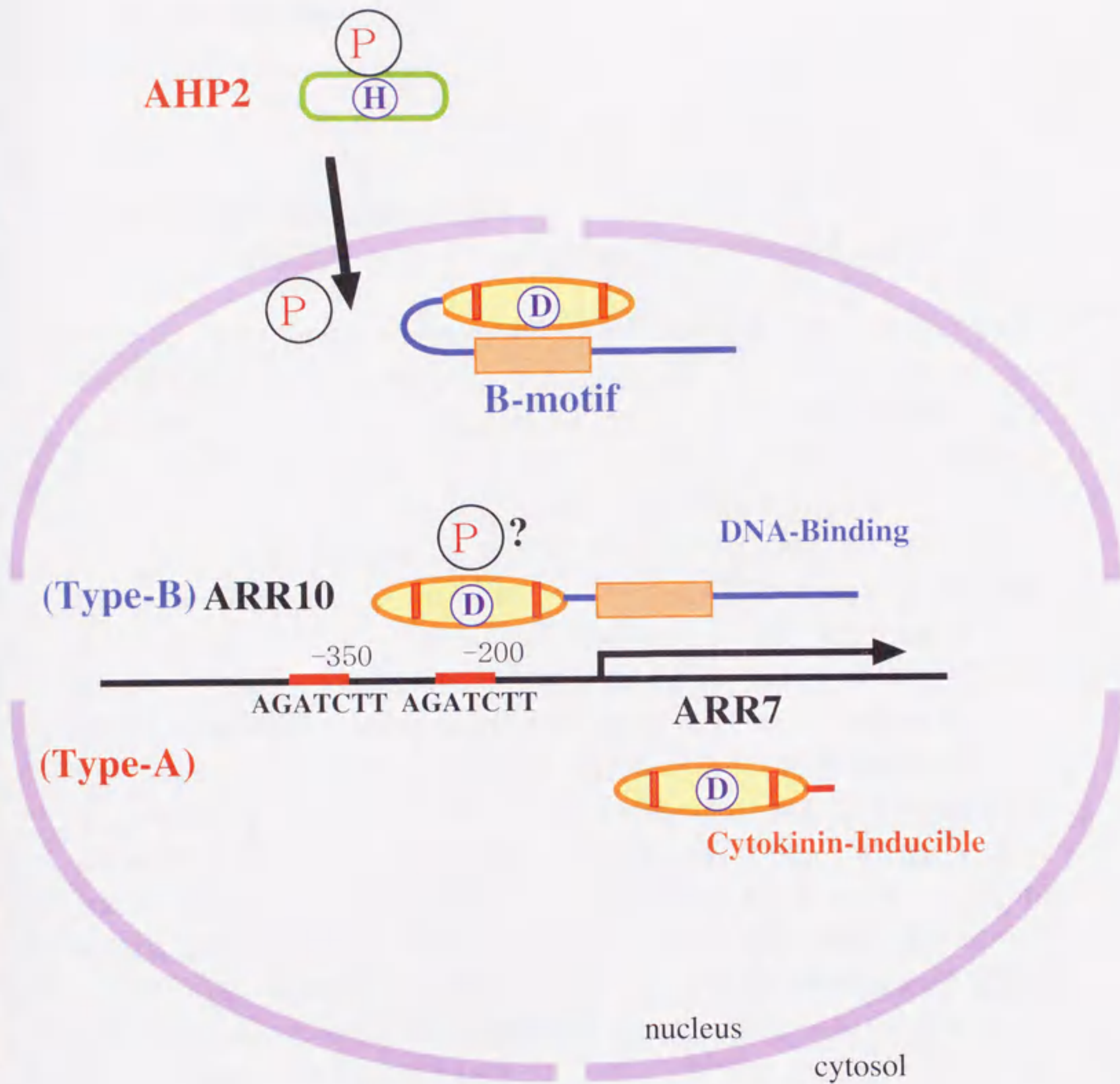


figure 10-2 Insight into the cellular events participated in the Type-A ARRs and Type-B ARRs contacting with AHPs. In nuclear one of the Type-B ARRs, ARR10 may bind to one of the Type-A ARRs, ARR7 as a transcriptional factor. We found the two target sequences "AGATCTT" which was one of the sequences screened with ARR10, within the -350 5'UTR of ARR7. The factors composing the His-Asp phosphorelay signal transduction pathway must have a switch by phosphorylation.

## シロイヌナズナのHis-Asp リン酸リレー情報ネットワークの解析

：リン酸基受容体型制御因子ARRからみたシロイヌナズナHis-Asp リン酸リレー系の機能特徴解析

### 要約

## 第二章 ARR遺伝子群の検索と同定解析

### 一次構造からみたタイプAARR群およびタイプBARR群の分類

エチレンやサイトカイニン、植物ホルモンや浸透圧応答の受容・伝達にバクテリア型センサーの関与が報告された(14, 22, 23, 31, 74)。このことは、それまでバクテリアにとって有効に機能していると考えられていたHis-Asp リン酸リレー情報伝達機構が高等植物シロイヌナズナにも存在することを示唆し、注目を浴びた。そこで我々は、この情報伝達系を構成するセンサー以外の因子バクテリア型レスポンスレギュレーターの同定を試みた。

その結果これまでに20種類のレスポンスレギュレーターを同定するに至っている(table 1, figure 2-4, figure 2-5)。これらは全て、レシーバーに保存されている3つのアミノ酸残基を保存し(96)ていたが、一次構造上の特徴からタイプAタイプB二種類に大別した(11, 25)。それぞれのタイプ内ARR群は非常に高い相同性を示す(figure 2-4)が、タイプAとタイプBARR群間においては相同性が低い(figure 2-3)。タイプAARR群は大腸菌のCheYと似てほぼレシーバー領域のみから構成されており(figure 2-1)合計10種類同定されている。12 a.a.から成る特徴的な配列をそのレシーバー内にもつがこれがどのような機能を示すかは分かっていない。一方タイプBARR群も10種類同定されているが、こちらはレシーバー領域のC末端に非常に長い伸長配列を持っており全長約400a.a.から成っている。そして、中央付近には65 a.a.から成るマウスのc-Mybと低レベルだが似た配列を保存しておりBモチーフと名付けている(25, 60)。全ARR遺伝子群がタイプA、タイプB二種類に大別できたことはARR群はHis-Asp リン酸リレー情報伝達機構において各タイプ特異的レシーバー機能があり、複数で機能していることを推測させる。

## 第三章 タイプAARR群の機能解析：

### 大腸菌His-Asp リン酸リレー系を用いたタイプAARR群の機能的相補解析

タイプAARR遺伝子群に属するARR3~7、5種類のARR遺伝子群を同定したが我々の一番の興味はこれらが一次構造上だけでなく機能的にもHis-Asp リン酸リレー情報伝達機構の機能的特徴を保持しているかどうかであった。特に、ここではこの情報伝達機構の大きな特徴のひとつであるHis残基とAsp残基間でのリン酸リレーという視点からARR群がそのレシーバー領域内に保存しているAsp残基においてリン酸基を受容できるかどうかを検討することを試み

た。この章ではその機能解析に大腸菌で非常に解析が進んでいるEnvZ-OmpR系を用いて我々が取得したARRがその機能を相補することができるかどうか*in vivo*, *in vitro*で解析した (figure 3-2, figure 3-3)。

#### 第四章：タイプA, タイプB ARR群と相互作用する因子の検索： two-hybrid法を用いたARR群の機能解析

ARR群は機能的にリン酸リレーを行うことができることが明らかになった (figure 3-2, figure 3-3) が、それではARR群はシロイヌナズナにおいてどのような因子と特異的に相互作用しているのかという視点から、酵母を用いたtwo-hybrid法によりARR群と相互作用する因子を検索することを試みた。これにより、タイプAの中でARR4と特異的に相互作用する因子として機能未知のDNA結合因子としてAtDBP1とこれに相同性のあるAtDBP2の2種類 (5, 58, 81) が、そしてタイプB ARR10と相互作用する因子としてAHP2が得られた。その後の解析から、ARR10はAHP1および3とも相互作用することが明らかとなった (25)。このことからタイプB ARR群は上流にAHPをもちリン酸リレーを成立させて情報伝達していることが強く示唆された。一方のタイプA ARR群についてはAHP群との相互作用は確認されなかった。このことから、シロイヌナズナのHis-Aspリン酸リレー情報伝達機構においてタイプA, タイプB ARR群はこの伝達機構のそれぞれ違う段階に位置して機能していることが推測された。

#### 第五章 ARR制御因子群のリン酸リレー機能解析： AHPを用いた*in vitro*リン酸転移解析

第三章でHis-Aspリン酸リレー系情報伝達機構に属するARR群は保存されたAsp残基において大腸菌のHpt因子に保存されたHis残基との間でリン酸リレー能を示した (figure 2-2, figure 2-3)。それではシロイヌナズナから単離されたARR群とAHP群両者間にリン酸リレーは成り立っているのかということが疑問になった。第四章で特にタイプB ARR群がAHP群と相互作用することが明らかになった (figure 4-1) が、リン酸リレーという視点ではARR群とAHP群の間で特異的親和性を示すのか、問題となるところであった。同時期に進行していたAHP群の解析においてAHP群はいずれもHis残基において大腸菌のハイブリッド型センサー (ArcB)を介してリン酸化し安定に保持し得ることが示されていたのでこの*in vitro*の系にさらにARR群を加えAHPとARR間のリン酸リレーを介した相互作用を検討した。その結果、リン酸化型AHPに対してARR群はそのタイプの違いに関わらずいずれもリン酸リレーを介した相互作用を示した (figure 5-1)。本実験においては特定のAHPとARR間の非常に強い親和性を示すまでには至らなかったが、シロイヌナズナに由来するAHP群とARR群の間のリン酸リレーを実証できHis-Aspリン酸リレー系の機能的特徴が植物においても保持されていることを明らかにできた。

## 第六章 細胞内局在性解析：

### 玉葱表皮細胞を用いたHis-Asp リン酸リレー系因子の細胞内局在性解析

この章では、His-Asp リン酸リレー系情報伝達機構におけるARR 群の細胞内機能特性を検討するに当たり、ARR (タイプA: ARR6, ARR7, タイプB: ARR10) とGFP の融合タンパク質としてタマネギ表皮細胞で発現させ細胞内の局在性という観点から検証した。その結果、タイプA, タイプB ARR 群はいずれも核局在性を示した (figure 6-1)。さらに、タイプB ARR 群はその分子内にマウスのcMYB タンパク質と低レベルながらも相同性を示すモチーフ” Bモチーフ” を保存している (25, 60) が、このBモチーフのみでも核に局在した (figure 6-2) ので、タイプB ARR群はそのBモチーフ内に核局在化シグナルをもつことがわかった。また、タイプA ARR 群に関してはほぼレシーバー領域のみから成っていることもあり、細胞質全体において発現しているのではないかと予想していたが、今回の解析の結果、そのC 末端側数十アミノ酸を欠失する (ARR6 $\Delta$ C, ARR7 $\Delta$ C) と細胞内全体にその発現が認められたことからこの領域に核局在化シグナルが存在しタイプA ARR群に関しても核に局在することが明らかとなった (figure 6-1)。一方、リン酸リレーが認められたAHP2 に関しても同様にGFP との融合タンパク質としてタマネギ表皮細胞で細胞内局在性を検証したところ、細胞質および核で発現することが示された (figure 6-1)。

## 第七章 タイプB ARR群 機能ドメイン解析1：Bモチーフ 3次元構造解析

タイプB ARR群にはBモチーフと名付けたcMyb と低レベルながら相同性を示すモチーフが保存されており第六章ではここに核局在化シグナルが存在することを示した (figure 6-1, figure 6-2)。我々はこのモチーフはタイプB ARR 群が機能する上で重要であると考え三次元構造解析を行うことにした。大腸菌の系を用いて大量に精製したBモチーフ精製タンパク質をCDスペクトルおよびNMR 構造解析を行い、三次元構造を決定した。その結果、Bモチーフは $\alpha$ ヘリクス領域を三回繰り返して持っておりマウスのcMyb とも似ているがホメオドメインタンパク質とも構造的にさらに似ておりまたホメオドメインタンパク質がDNA を認識するのに非常に重要であることが示されているアミノ酸に相当するアミノ酸はBモチーフにも保存されていることが明らかになった (figure 7-3)。以上の結果からもBモチーフをもつタイプB ARR 群はHis-Asp リン酸リレー系情報伝達機構において転写因子として機能することが強く示唆された。

## 第八章 タイプB ARR群 機能ドメイン解析2：DNA結合能解析

第七章でタイプB ARR 群は転写因子として機能することが強く示唆された。そこでこのタンパク質がどのようなDNA 配列を認識するのかを明らかにすることでタイプB ARR 群の標的遺伝子の手がかりを得ようと考えた。ここでは、タイプB ARR 群の中からARR10 を用いて

16bp ランダムDNA 配列を含む52 bp のオリゴヌクレオチドのプールから、ARR10-His6 が結合するDNA 配列を選択しPCR を用いて増幅する手法 (figure 8-1) によりARR10 が認識するDNA 配列の候補を3種類取得した (figure 8-2)。

## 第九章 植物固体レベルからみたARR群の生理的解析

これまでにタイプA, タイプB ARR 群について遺伝学的・生化学的手法を用いた解析を行ってきたが、それではこれらARR 群は植物体においてはどのような発現パターンを示しているのだろうか。われわれはこのことを調べるために、まず、植物体の器官別にmRNA の発現様式を検討することにした。その結果、ARR 群は器官特異的発現は認められず、タイプA, タイプB とも各器官 (根、茎、葉、花、鞘) で発現しており、多少、根における発現が他と比較して多いという結果を得た (figure 9-1, figure 9-2)。そこで、続いて各種植物ホルモン処理による発現誘導に着目して検討したところ、タイプA ARR 群はサイトカイニン(t-ゼアチン、ベンジルアデニン)により発現誘導されることが明らかとなり (25, 33, figure 9-3)、一方タイプB ARR 群はサイトカイニンをはじめ今までに発現を誘導させる植物ホルモンは同定されていない。そこで、サイトカイニンにより発現が誘導されたタイプA ARR 群に着目して、その中からARR6 (figure 9-4) を選びこのプロモーター領域にGUS マーカー遺伝子を融合させこの形質転換植物体を用いて植物固体レベルにおけるサイトカイニンによるARR6 の発現誘導パターンを検証しようと試みた。その結果、固体レベルではいずれの生育段階においてもサイトカイニンによる発現誘導が観察されさらにその発現は植物体全体に渡ってみられ、現在までの条件では特定の部位における発現誘導はみられていない (figure 9-5)。ここでは、ARR6 プロモーター-GUS 形質転換植物体、発芽後2日目の芽生えのGUS 染色およびGUS 活性の結果とともにサイトカイニン処理によるARR6 の発現誘導について示した (figure 9-5)。

## 引用文献

1. The Arabidopsis Genome Initiative: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 791-815 (2000)
2. Aiba H, Mizuno T, Mizushima S: Transfer of phosphoryl group between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264: 8563-8567 (1989).
3. Aiba H, Nakasai F, Mizushima S, Mizuno T: Evidence for the physiological importance of the phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR, in osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264: 14090-14094 (1989)
4. Alex LA, Borkovich KA, Simon MI: Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3416-3421 (1996)
5. Alliotte T, Tire C, Engler G, Peleman J, Caplan A, Montagu MV, Inze D: An Auxin-Regulated Gene of *Arabidopsis thaliana* Encodes a DNA-Binding Protein. *Plant Physiol.* 89:743-752 (1989)
6. Appleby JL, Parkinson JS, Bourret RB: Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* 86: 845-848 (1996).
7. Bourret RB, Borkovich KA, Simon MI: Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* 60: 401-441 (1991)
8. Baranowskij N, Forherg C, Part S, Willmitzer L: A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *EMBO J* 13: 5383-5392 (1994).
9. Bechtold N, Ellis J, Pelletier G: *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad Sci Paris Ser. Vie* 316: 1194-1199 (1993)
10. Brandstatter I, Kieber JJ: Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1009-1019 (1998).
11. Brandstatter I, Kieber JJ: Phosphorelay signaltransduction: the emerging family of plant response regulators. *TIBS* 24: 452-456 (1999)
12. Brandstatter I, Deruere J, Kieber JJ: Characterization of the Response of the *Arabidopsis* Response Regulator Gene Family to Cytokinin. *Plant Physiol* 124: 1706-

1717 (2000)

13. Brown JL, Bussey H, Stewart RC: Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J.* 13: 5186-5194 (1994)
14. Chang C, Kwok SF, Bleeker AB, Meyerowitz EM: *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539-544 (1993).
15. Chang C, Stewart RC: The two-component system: regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol* 117: 723-731 (1998).
16. Chang W, Thomason PA, Gross JD, Newell PC: Evidence that the RdeA protein is a component of a multistep phosphorelay modulating rate of development in *Dictyostelium*. *EMBO J.* 17: 2809-2816 (1998)
17. Church GM, Gilbert W: *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995 (1984)
18. Chiu H-I, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J: Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biol* 6: 325-330 (1996).
19. D'Agostino IB, Kieber JJ: Phosphorelay signal transduction: the emerging family of plant response regulators. *Trends Biol Sci* 24: 452-456 (1999).
20. Gamble RL, Coonfield ML, Schaller GE: Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7825-7829 (1998).
21. Hoch JA, Silhavy TJ: *Two-Component Signal Transduction* (Am Soc Microbiol, Washington, DC) (1995)
22. Hua J, Chang C, Sun Q, Meyerowitz EM: Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene. *Science* 269: 1712-1714 (1995).
23. Hua J, Meyerowitz EM: Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94: 261-271 (1998).
24. Imamura A, Hanaki N, Umeda ., Nakamura A, Suzuki T, Ueguchi C, Mizuno T: Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2691-2696 (1998).
25. Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Kiba T, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T: Compilation and characterization of *Arabidopsis* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol* 40: 733-742 (1999).
26. Inoue M: His-Asp phosphorelay; two components or more? *Cell* 85: 13-14 (1996)
27. Ishige K, Nagasawa S, Tokishita S, Mizuno T: A novel device of bacterial signal

transducers. EMBO J.13: 5195-5202 (1994)

28. Jefferson RA: Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405 (1987).
29. Jin H, Martin C: Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* 41: 577-585 (1999).
30. Jo Y, Nara F, Ichihara S, Mizuno T, Mizushima S, Purification and characterization of the OmpR protein, a positive regulator involved in osmoregulatory expression of the ompF and ompC genes in *Escherichia coli*. *J Biol. Chem.* 261: 15252-15257 (1986).
31. Kakimoto T: CKII, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274: 982-985 (1996).
32. Kato M, Mizuno T, Shimizu T, Hakoshima T: Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPT domain of ArcB. *Cell* 88: 717-723 (1997).
33. Kiba T, Taniguchi M, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T: Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 40: 767-771 (1999).
34. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685 (1970).
35. Lister C, Dean C: Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 4: 745-750 (1993)
36. Lohrmann J, Buchhol G, Keitel C, Sweere U, Kircher S, Baurle I, Kudla J, Schfer E, Harter K: Differential expression and nuclear localization of response regulator-like proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol* 1: 495-505 (1999).
37. Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H: A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature (London)* 369: 242-245 (1994)
38. Makino S, Kiba T, Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T: Genes encoding Pseudo-response regulators: Insights into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41:791-803 (2000)
39. Matsushika A, Makino S, Kojima M, Mizuno T: Circadian Waves of Expression of the APRR1/TOC1 Family of Pseudo-Response regulators in *Arabidopsis thaliana*: Insights into the Plant Circadian Clock. *Plant Cell Physiol.* 41: 1002-1012 (2000)
40. Miller JH: *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Lab. Press,



Plainview, NY) (1972)

41. Mizuno T: Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. DNA Res 4: 161-168 (1997).
42. Mizuno T: His-Asp phosphotransfer signal transduction. J Biochem (Tokyo) 123: 555-563 (1998).
43. Mizuno T, Kaneko T, Tabata S: Compilation of all genes encoding two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. strain PCC6803. DNA Res.3: 407-414 (1996)
44. Mizuno T, Mizushima S: Isolation and characterization of deletion mutants of the *ompR* and *envZ*, regulatory genes for expression of the outer membrane proteins, OmpC and OmpF, of *Escherichia coli*. J. Biochem (Tokyo) 101: 387-396 (1987)
45. Mizuno T, Mizushima S: Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of porin genes. Mol Microbiol 4: 1077-1082 (1990)
46. Miyata S-I, Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPT domain in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett 437: 11-14 (1998).
47. Murray MG, Thompson WF: Nucleic Acids Res 80: 4321-4325 (1980)
48. Mutoh N, Simon MI: J. Bacteriol 165: 161-166 (1986)
49. Nagasawa S, Tokishita S, Aiba H, Mizuno T: A novel sensor-regulator protein that belongs to the homologous family of signal transduction proteins involved in adaptive responses in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 6: 799-807 (1993)
50. Nakamura A, Kakimoto T, Imamura A, Suzuki T., Ueguchi C, Mizuno T: Biochemical characterization of a putative cytokinin-responsive His-kinase, CKII, from *Arabidopsis thaliana*. Biosci Biotechnol Biochem 63: 1627-1630 (1999).
51. Ogata K, Morikawa S, Nakamura H, Sekikawa A, Inoue T, Kanai H, Sarai A, Ishi S, Nishimura Y: Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. Cell 79: 639-648 (1994)
52. Ogata S, Takase H, Hiratsuka K, Hotta Y: Mutational analysis of the signal for a nuclear localization of proteins which accumulate specifically during meiosis in lily microsporocytes. Plant Cell Rep 19: 101-105 (1999)
53. Ota IM, Varshavsky A: A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. Science 262: 566-569 (1993)

54. Palmiter RD: Biochemistry 13: 3606-3615 (1974)
55. Parkinson JS, Kofoed EC: Communication modules in bacterial signaling proteins. Annu Rev Genet 26: 71-112 (1992).
56. Parkinson JS: Signal transduction schemes of bacteria. Cell 73: 857-871 (1993)
57. Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H: Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. Cell 86: 865-875 (1996)
58. Reymond P, Kunz B, Paul-Pletzer K, Grimm R, Eckerskorn C, Farmer EE: Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. The Plant Cell 8: 2265-2276 (1996)
59. Sakai H, Hua J, Chen QG, Medrano LJ, Bleecker AB, Meyerowitz EM: *ETR2* is an *ETR1*-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 95: 5812-5817 (1998a).
60. Sakai H, Aoyama T, Bono H, Oka A: Two-component response regulators from *Arabidopsis thaliana* contain a putative DNA-binding motif. Plant Cell Physiol 39: 1232-1239 (1998).
61. Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carre IA, Coupland G: The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. Cell 93: 1219-1229 (1998).
62. Schuster SC, Noegel AA, Oehmen F, Gerisher G, Simon MI: The hybrid histidine kinase DocA is part of the osmotic response system of *Dictyostelium*. EMBO J. 15: 3880-3889 (1996)
63. Sikorski RS, Hieter P: A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 122: 19-27 (1989)
64. Stock AM, Mottonen JM, Stock JB: Nature (London) 337: 745-749 (1989)
65. Stock JB, Ninfa AD, Stock AM: Protein phosphorylation and regulation of adaptive response in bacteria. Microbiol Rev 53: 450-490 (1989)
66. Stock JB, Stock AM, Mottomen JM: Signal transduction in bacteria. Nature (London) 344: 395-400 (1990)
67. Suzuki T, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T: Histidine-containing phosphotransfer (HPT) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. Plant

Cell Physiol 39: 1258-1268 (1998).

68. Suzuki T, Sakurai K, Imamura A, Nakamura A, Ueguchi C, Mizuno T: Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. Biosci Biotech Biochem in press (2000).

69. Taniguchi M, Kiba T, Sakakibara H, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T: Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. FEBS Lett 429: 259-262 (1998).

70. Tsuzuki M, Ishige K, Mizuno T: Phosphotransfer circuitry of the putative multi-signal transducer, ArcB, of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 18: 953-962 (1995).

71. Tokishita S, Yamada H, Aiba H, Mizuno T: Transmembrane signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*: II. the osmotic sensor, EnvZ, located in the isolated cytoplasmic membrane displays its phosphorylation and dephosphorylation abilities as to the activator protein, OmpR. J Biochem (Tokyo) 108: 488-493 (1990).

72. Uhl MA, Miller JF: Integration of multiple domains in a two component sensor protein, the Bordetella pertussis BvgAS. EMBO J.15: 1025-1038 (1996).

73. Urao T, Yakubov B, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: Stress-responsive expression of genes for two-component response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett 427: 175-178 (1998).

74. Urao T, Yakubov T, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K: A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. Plant Cell 11: 1743-1754 (1999).

75. Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: Two-component systems in plant signal transduction. Trends plant Sci 5: 67-74 (2000).

76. Wang N, Shaulsky G, Loomis WF: A two component histidine kinase gene that functions in Dictyostelium development. EMBO J.15: 3890-3898 (1996)

77. Wang Z-Y, Kenigsbuc, D, Sun L, Harel E, Ong EH, Tobin EM: A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis Lhcb* gene. Plant Cell 9: 491-507 (1997).

78. Wang Z-Y, Tobin EM: Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1(CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. Cell 93: 1207-1217 (1998).

79. Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ : Science 270:

1807-1809 (1995).

80. Wurgler-Murphy SM, Saito H: (1997) Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trend Biol Sci* 22: 172-176 (1997).

81. Yamada H, Hanaki N, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T: An Arabidopsis protein that interacts with the cytokinin-inducible response regulator, ARR4, implicated in the His-Asp phosphorelay signal transduction. *FEBS Lett* 436: 76-80 (1998).

報文目録

"Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis* "

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol95 pp.2691-2696, March 1998

Aya Imamura, Naoto Hanaki, Hiroyuki Umeda, Ayako Nakamura, Tomomi Suzuki,  
Chiharu Ueguchi and Takeshi Mizuno

"Compilation and Characterization of *Arabidopsis thaliana* Response Regulators  
Implicated in His-Asp Phosphorelay Signal Transduction"

*Plant Cell Physiol.* 40(7): 733-742 ,1999

Aya Imamura, Naoto Hanaki, Ayako Nakamura, Tomomi Suzuki, Mitsutaka Taniguchi,  
Takatoshi Kiba, Chiharu Ueguchi, Tatsuo Sugiyama and Takeshi Mizuno

"Characterization of the response regulator family of signal transducers involved in His-to-  
Asp phosphorelay signal in *Arabidopsis thaliana* "

to be submitted for *Plant Molecular Biology*

Aya Imamura, Mari Tachiki, Toshimasa Yamazaki, and Takeshi Mizuno

参考論文目録

"An Arabidopsis protein that interacts with the cytokinin-inducible response regulator, ARR4, implicated in the His-Asp phosphorelay signal transduction"

*FEBS Letters* 436: 76-80(1998)

Hisami Yamada, Naoto Hanaki, Aya Imamura, Chiharu Ueguchi and Takeshi Mizuno

"Histidine-Containing Phosphotransfer (HPT) Signal Transducers Implicated in His-to Asp Phosphotransrelay in *Arabidopsis* "

*Plant Cell Physiol.* 39(12): 1258-1268 (1998)

Tomomi Suzuki, Aya Imamura, Chiharu Ueguchi and Takeshi Mizuno

"Biochemical Characterization of a Putative Cytokinin-Responsive His-kinase, CK11, from 108108 *Arabidopsis thaliana* "

*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(9): 1627-1630(1999)

Ayako NAKAMURA, Tatsuo KAKIMOTO, Aya IMAMURA, Tomomi SUZUKI, Chiharu UEGUCHI and Takeshi MIZUNO

"Differential Expression of Genes for Response Regulators in Response to Cytokinins and Nitrate in *Arabidopsis thaliana*"

*Plant Cell Physiol.* 40(7): 767-771(1999)

Takatoshi Kiba, Mitsutaka Taniguchi, Aya Imamura, Chiharu Ueguchi, Takeshi Mizuno and Tatsuo Sugiyama

"Genes encoding pseudo-response regulators: Insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*."

*Plant Cell Physiol.* 41: 791-803(2000)

Makino, S., Kiba, T., Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Tanigushi, M., Ueguchi, C., Sugiyama, T. and Mizuno, T.

## 謝辞

本研究は多数の皆様のおかげでここにまとめることができたことを深く感謝いたします。

ARR3~7 のクローニングおよび塩基配列の決定につきましては花木 直人君、梅田 裕之さんの甚大なる御協力によるものです。

ARR10, 11, 14 のクローニングおよび塩基配列の決定につきましては中村 あや子さん、立木 麻理さん、松鹿 昭則さん、小島 正也君の御協力を得ました。

ArcB<sup>r</sup> につきましては都築さん、塩沢 格さん、荻野 智章君より指導を頂きました。

AHP2 につきましては鈴木 友美さんより精製タンパク質を頂きました。

two-hybrid法を用いた解析につきましては花木 直人君、山田 寿美先生よりデータを頂きました。

GFPをもちいた細胞内極在性解析につきましては奈良先端大学院大学の平塚 和之先生に御教授を頂きました。

ARR7-GFP の解析につきましては吉野 由里子さんにより検討して頂きました。

ARR10 Bモチーフの3次元構造解析につきましてはそのタンパク質の精製に関しては立木 麻理さん、小島 正也君、藤澤 洋二郎君、山田 寿美先生の御協力を頂き、NMRによる解析につきましては農林水産省、生物工学研究室の山崎 俊正先生ならびにその研究室の皆様によるものです。

植物形質転換体作製、ならびにGUSを用いた解析につきましては生化学研究室の間崎 剛君、中村 研三先生の御協力と指導を得ました。

植物体のエチレン処理につきましては分化遺伝学研究室の森 仁志先生ならびに立木 美保さんの御協力をえました。

共同研究を行って頂きました、植物生理学研究室の杉山 達夫先生ならびに研究室の皆様へ感謝いたします。

日々、研究を行うにあたり指導、激励をくださった微生物学研究室の饗場 浩文先生、山田 寿美先生、上口 智治先生、市原 茂幸先生、諸先輩方ならびに同級生・下級生そして家族の皆様へ深く感謝いたします。

研究活動等に対して指導、激励をくださった松岡 昇三伯父、木村 真人先生に感謝いたします。

最後に、本研究全般を指導してくださった水野 猛先生に心より感謝いたします。

2001.1. 今村 綾

今村 綾





Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

### Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



### Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

