

微小管機能に関わるフォスファターゼの解析

直井 国子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物遺伝子機能学講座

(橋本 隆 教授)

平成 16 年 4 月 30 日提出

目次

序論	3
材料と方法	7
結果	13
考察	18
参考文献	24
図表	32
謝辞	68

序論

微小管は α -tubulin と β -tubulin がヘテロ二量体を作り、ヘテロ二量体が結合して直線的なプロトフィラメントを形成し、このプロトフィラメントが重合して中空の円筒状の微小管を形成する。シロイヌナズナでは α -tubulin 遺伝子は 6 個(Kopczak et al, 1992)、 β -tubulin 遺伝子は 9 個(Snustad et al, 1992)見つかっている。微小管は直径約 25 nm で 13 本のプロトフィラメントが円筒状に並んでいる。微小管は絶えず重合・脱重合が起きていて、この現象は動的不安定性(dynamic instability)と呼ばれている。微小管の動的不安定性には重合と脱重合の化学平衡状態を変えるためのエネルギーが必要であり、そのエネルギーは GTP の加水分解から得られる。 α -、 β -tubulin は各々 GTP が結合しており、 α -tubulin に結合している GTP は分子構造に固定され重合・脱重合のどちらの場合でも変化しない。しかし、 β -tubulin に結合している GTP は微小管の端に付加するときに加水分解されて GDP になる。動的不安定は GTP の加水分解とヘテロ二量体の結合との間に遅れがあるために生じると考えられている。微小管の伸長が速いとき、GTP が加水分解されるより速く微小管の端に結合するので微小管の端に GTP キャップができる。逆に、GTP キャップがなくなる等重合の速度が遅くなると微小管はどんどん縮み始める。このように微小管は伸長と解離を繰り返している(図 1)。動的不安定性により微小管の両端は重合する速度が異なっていて、速く伸長する端はプラス端、ゆっくり伸長する端はマイナス端と呼ばれている(Desai and Mitchison, 1997)。微小管は動植物を問わず多細胞生物中で高く保存されているタンパク質であるが、細胞内での微小管の構築は動物と植物では大きく異なっている(Wasteney, 2002)。植物細胞の細胞質分裂は細胞壁の基になる細胞板が分裂面に形成され、この細胞板が徐々に拡大して既存の細胞壁と結合して新しい細胞壁が出来て細胞質分裂が完了する。細胞板の形成される位置は有糸分裂前から決まっており、G2 期の終わり頃に細胞板が出来る位置の細胞膜付近に微小管が集まって前期前微小管束[preprophase band (PPB)]と呼ばれる微小管の束が形成される。有糸分裂に入ると微小管は動物細胞と同様に紡錘体となって染色体を細胞の両端へと移動させ、終期になると微小管はフラグモプラストを形成する。フラグモプラストは微小管が 2 列に並んでおり、微小管の他に細胞板の材料を含む小胞などが含まれ、その中心から細胞板が形成されて大きく成長する。フラグモプラストは細胞板の周囲に存在して一緒に細胞膜に近づいていく。細胞板が細胞膜に到達するとフラグモプラストは消滅して細胞質分裂は終わる。間期の微小管も動物細胞と植物細胞では異なっている。典型的な動物細胞の間期の微小管は核膜付近にある中心体から微小管が四方八方に伸長しているが、植物細胞では微小管は細胞質表層に存在し架橋分子を介して細胞膜と結合している。間期の植物細胞で見られるこの構造を表層微小管と呼んでいる(図 2A)。動物細胞の中心体には γ -tubulin 等から成る微小管形成中心体[microtubule organizing center (MTOC)]が存在し、

MTOC で微小管が形成されて細胞表層の方へと伸長していくが、植物細胞には動物細胞のような中心体が存在しない。植物細胞にも γ -tubulin (Liu et al, 1993)や動物細胞の MTOC に存在している分子があることは確認されているが、微小管が形成されるのが核膜付近なのか、それとも細胞質表層なのかは多く議論されていた。細胞質分裂直後の細胞では微小管が核膜付近に集まって存在し、その後表層へと移動するのが観察されている。 γ -tubulin の動態から MTOC は核膜付近で微小管を形成した後、表層に移行して表層で微小管の再構築を行っていると言われていた(Kumagai et al, 2003)が、シロイヌナズナの間期の細胞の微小管の動態を観察したところ、新しい微小管が細胞表層で形成されているのが確認されている (Shaw et al, 2003)。

植物細胞の形や伸長方向は細胞壁最内層のセルロース微繊維と表層微小管が制御していると考えられている。伸長している細胞の表層微小管は細胞の伸長方向に対して直角に配向し、表層微小管とセルロース微繊維が横方向に配向しているときに細胞は縦方向に伸長し、表層微小管とセルロース微繊維が縦方向に配向しているとき細胞は横方向に伸長する(図 2B)。細胞壁最内層のセルロース微繊維と表層微小管はほぼ同じ配向をしていて、このセルロース微繊維を表層微小管が制御しているというモデルが考えられている (Hirai et al, 1998)。セルロース微繊維を構成しているセルロースの合成酵素 *cellose synthase* (*CesA*)が 6 個集まってロゼットと呼ばれる複合体を細胞質側の細胞膜上で形成している。セルロースはロゼットの *CesA* で作られ、同じロゼット上で生成されたセルロースが束となり、セルロース微繊維が生成されてロゼットの中心から細胞質外へと送り出される。セルロース微繊維はセルロースの合成と同時に形成されている。ロゼットは細胞膜上を動く事が出来るが、表層微小管がロゼットの動きを制御していると考えられ、モノレール説とガードレール説の 2 つの説が言われている(図 3)。モノレール説は何らかの因子を介してロゼットと表層微小管が結合して表層微小管がロゼットの動きを制限しているのに対してガードレール説は表層微小管と近隣の表層微小管がロゼットの動く道筋を形成してその間をロゼットが自由に動いている。表層微小管の配向と細胞壁最内層のセルロース微繊維は必ずしも一致してはいないため、現在はガードレール説が主流である(Hirai et al, 1998)。しかし、伸長している細胞の表層微小管と細胞壁最内層のセルロース微繊維は似たような配向をとっているが、根の伸長が終わりつつある分化領域に近い伸長領域の細胞では表層微小管が細胞の伸長軸に対して直角に配向していたものが右巻きねじれの傾いた配向に変化する。このときのセルロース微繊維は直角のまま変化はない(Sugimoto et al, 2000)。高温で根が左巻きにねじれる変異株 *mor1-1* を高温下で生育した際の根の表層微小管の配向は短く変化しているが細胞壁最内層のセルロース微繊維は野生株や適温(23)時の *mor1-1* 変異株と同様の配向を示し、また、野生株に微小管重合阻害剤(オリザリン)や重合安定剤(タキソール)を加えて表層微小管の安定性を変化させると根の伸長速度が遅くなるが、セルロース微繊維の配向は薬剤無添加時と変わらない。このことから、最近では細胞壁最内層のセルロ

ー ス微繊維の制御を介さずに表層微小管が細胞伸長を制御しているという考えもある (Sugimoto et al, 2003)。シロイヌナズナの α -tubulin 遺伝子 *TUA6*, *TUA4* にミスセンス変異が入っている *lefty1*, *lefty2* 変異株は根や葉、花弁が左巻きにねじれ、根の表皮細胞層の表層微小管が右巻きの配向をしている。これは α -tubulin に変異が入ったことで微小管の安定性が変化したためと考えている(Thitamadee et al, 2002; Abe et al, 2004)。微小管の安定性は細胞伸長を制御する表層微小管の配向にとって重要な要因の一つである。

表層微小管と結合している微小管付随タンパク質[microtubule associated protein (MAP)]には微小管の重合・脱重合や安定性などをコントロールして表層微小管の配向を制御している可能性がある。MAP 等の微小管と相関する分子は動物細胞に比べると植物細胞ではあまり研究されていなかったが、最近になって様々な MAP が見つかって解析されている(Smertenko et al, 2000; Hashimoto, 2003; Lloyd and Chan, 2004)。当初は MAP65 のように微小管に結合しているタンパク質の精製等の生化学的手法で発見されていた(Jiang and Sonobe, 1993)が、今では変異株を用いた遺伝学的手法で新規の MAP が幾つか得られている。シロイヌナズナの MAP の変異株には細胞の形が変化し、成長阻害を受けているものがある。*fra2* (*botero1*)変異株は表層微小管の配向が変化して細胞が肥大した変異株で (Bichet et al, 2001)、*FRA2* 遺伝子は微小管を切断するカタニンの p60 サブユニットとして機能する(Burk et al, 2001)。*mor1-1* 変異株は高温感受性を持ち 28℃ で育てると表層微小管が短く切断されて幼植物の根や子葉は左巻きにねじれる。*MOR1* 遺伝子は動物や酵母で見つかっている XMAP215 に相同性がある(Whittington et al, 2001)。新規のフォスファターゼ 2A (PP2A)をコードしている *TON2* 遺伝子の変異株 *tonneau2* (*ton2*)は PPB が形成されず、また表層微小管の配向がランダムになるため細胞の分裂面に影響がでて細胞の伸長方向が狂っている(Camilleri et al, 2002)。イネの *tangled1* (*tan1*)変異株は PPB やフラグモプラストの位置がおかしくなり、細胞の分裂面が変化したため細胞の形が野生株とは異なっており (Cleary and Smith, 1998)、*TANGLED1* は新規の MAP である(Smith et al, 2001)。シロイヌナズナの右ねじれ変異株 *spiral* (*spr*)変異株の *spr1* は根の内皮細胞が膨れて表皮細胞は右巻きにねじれており、*spr2* の根はねじれていないが葉や花弁が右巻きにねじれている (Furutani et al, 2000)。*SPR1*, *SPR2* は共に微小管に局在する新規のタンパク質である (Nakajima et al, 2004; 成田, 修士論文, 2002)。

シグナル伝達などの生体内反応においてはタンパク質のリン酸化による活性化と脱リン酸化による不活性化が重要である。微小管には多くの MAP が結合しており、これらの MAP もリン酸・脱リン酸化されることで微小管への結合能が制御されている (図 4)。動物の MAP4 は微小管と結合して微小管を安定化させる。この MAP4 は細胞周期特異的なキナーゼ cyclin B-cdc2 と結合しリン酸化される。MAP4 をリン酸化しないようにした変異 MAP4 を発現させた細胞では G1 期が遅く、G2/M 期は速く進行する等、細胞周期の進行速度が変化する。このリン酸化しない変異 MAP4 は微小管と強く結合し、微小管重合阻害剤に対する抵抗

性が高まる(Chang et al, 2001)。植物でも MAP のリン酸化による微小管の安定性の制御について研究が行われている。様々なフォスファターゼ阻害剤 deltamethrin (PP2B 阻害剤), taumycyn (PP1, PP2A 阻害剤), microcystin LR (PP1, PP2A 阻害剤) やキナーゼ阻害剤 KT5720 (PKA 阻害剤), KT5823 (PKG 阻害剤), KN62 (CMK II 阻害剤) をシロイヌナズナに投与すると根は伸長阻害を受け、表層微小管の配向が崩れている(Baskin and Wilson, 1997)。BY - 2 培養細胞にキナーゼ阻害剤 6-dimethylaminopurin (6-DMAP) や staurosporin を用いると低温安定性な微小管の量が多く存在する(Mizuno, 1992)。トウモロコシの根に ATP を加えると微小管は脱重合を起こすが、ATP とキナーゼ阻害剤 staurosporin を加えると脱重合は起きない。また、PP1, PP2A フォスファターゼ阻害剤 cantharidin を加えると微小管の脱重合は促進される(Tian et al, 2004)。先に挙げたようにフォスファターゼ PP2A の変異株 *ton2* では PPB が形成されない(Camilleri et al, 2002)。このように、MAP のリン酸化・脱リン酸化ということで間接的ではあるがキナーゼやフォスファターゼの阻害剤の投与によっても微小管の安定性は変化する。

微小管が細胞の伸長方向や形を制御しているため tubulin や MAP の変異株でも細胞伸長や形態の異常が現れている。今までにみつかった MAP には動物細胞の MAP と相同性を持つものが多くあるが、PPB やフラグモプラスト、表層微小管といった植物特有の微小管構築があることから植物特有の MAP がまだ数多く存在している可能性がある。そこで、微小管の構築と維持に関与する新たな因子や MAP を遺伝学的手法で見つけるために微小管重合阻害剤の1つであるプロピザミドを用いてシロイヌナズナ変異株のスクリーニングを行った。プロピザミドに対して高感受性を示す変異株が幾つか単離されてそのうちの1つである *propyzamide hypersensitive1-1 (phs1-1)* の解析を行った。

材料と方法

生育条件

寒天培地は 0.5X *Arabidopsis* nutrient solution (Haughn and Somerville, 1986) に 2% (w/v) sucrose と 1.5% (w/v) Agar を加えたものを用いた。シロイヌナズナの種子は 20% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム、4% (v/v) Triton X-100 の溶液で滅菌して滅菌水で洗浄した後、4 日の暗所に 1 日静置して春化处理をしてから寒天培地に蒔き、22 日の長日条件(16 時間明/8 時間暗)下で培地を垂直に立てて発芽させた。暗所で育てる場合は春化处理をした後 22 日で 8–12 時間光にさらしてからアルミホイルで遮光して育てた。培地を 22 日に置いた時点を 0 日として日数を数え、以後、断りがない限りはこの条件で育てた(Furutani et al., 2000)。

薬剤は、それぞれプロピザミド(Wako)は 10 mM、タキソール(Nacalai tesque)とオリザリン(AccuStandard)、サイトカラシン D (Nacalai tesque)は 1 mM、RH-4032 [3,5-dichloro-N-(3-chloro-1-ethyl-1-methyl-2-oxopropyl)-benzamide] (Rohm and Haas company)は 0.1 mM のジメチルスルホキシド(DMSO)溶液を作り-20 °C に保存し、使用濃度に希釈して用いた。

変異株のスクリーニング

Ethylmethanesulfonate (EMS)処理をしたシロイヌナズナの M2 種子[ecotype: Columbia (Col)]と T-DNA のタグが挿入されている T2 種子(ecotype: Col)を 3 μ M のプロピザミドを添加した寒天培地で発芽させ、7 日目の幼植物の根の表現型が野生株と異なるものを探した。得られたプロピザミドに高感受性を示す変異株の 1 つを *propyzamide hypersensitive1-1* (*phs1-1*)と名付けた。この *phs1-1* 変異株は EMS によって変異原処理された変異株でアルビノが混ざっていたが、Col と戻し交配を 3 回行い完全に除去した。

phs1-2 変異株

Syngenta から取り寄せた T-DNA タグが挿入されている形質転換植物体(1293 C2)で、野生株 Col と戻し交配を 3 回行ってから実験に使用した。タグが挿入されているかの確認は PCR で行った。(プライマー: 5'-GAGAAGAAGCGAGATCAACC-3', 5'-TTACTCTAG CCTGTCGCATG-3', LB: 5'-CATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC-3')

免疫抗体染色法

根の表皮細胞層における表層微小管の配向を見るために Whole mount 法 (Sugimoto et al, 2000)を参考にして微小管を染色した。4 日目のシロイヌナズナ幼植物を 1.5% (v/v) formaldehyde, 0.5% (v/v) glutaraldehyde の PEMT 溶液(50 mM PIPES, 2 mM

EGTA, 2 mM MgSO₄, 0.05% (v/v) Triton X-100, pH 7.2)に 40 分浸して固定し、その後、PEMT 溶液で 3 回 5 分間洗浄を繰り返してから 0.05% (w/v) Pectolyase Y-23 (Kikkoman) の PEMT 溶液(0.4 M mannitol を加える)に入れて室温で 30 分間静置した。PEMT 溶液での洗浄を 3 回繰り返した後に冷やしたエタノールを入れて-20 ℃に 10 分間静置してから PBS 溶液(130 mM NaCl, 5.1 mM Na₂HPO₄, 1.6 mM KH₂PO₄, pH 7.4)に 10 分間浸透させた。1 mg/mL NaBH₄ の PBS 溶液に 20 分間入れてから洗浄液(50 mM glycine の PBS 溶液)に 30 分間浸した後に、洗浄液で 1000 倍希釈した一次抗体の抗 α -tubulin 抗体(mouse IgG: Oncogene Research Products)と一晩室温で反応させた。幼植物を洗浄液での 10 分間洗浄を 3 回繰り返し、二次抗体を加えた。二次抗体は Fluorescein-isothiocyanate (FITC)標識の抗マウス IgG 抗体(goat: Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.)を洗浄液で 100 倍希釈したものをを用いて 1-3 時間 37 ℃に静置した。二次抗体と反応させた後、PBS 溶液で 10 分間 3 回洗ってからスライドグラスに Mount 溶液(0.1% (w/v) phenylenediamine, 0.1X PBS, 50% (v/v)グリセロール, pH 9.0-9.5)で固定し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Zeiss)で表層微小管を観察した。

表層微小管の配向の測定には NIH image 1.61 を用いた。配向の傾きは細胞の伸長方向を 180 度とし、左肩上がりの配向を 0 度から 90 度、右肩上がりの配向を 90 度から 180 度として測定した(図 5)。表層微小管の長さに見える範囲だけを測定し、側面にまで伸びている分の長さは測定していないので実際は測定した長さよりも長いものがある(Sugimoto et al, 2003)。表層微小管はそれぞれ 6 個体の幼植物の根から 400 本以上を測定した。

透明化によるシロイヌナズナの胚の観察

さやを固定液(90% エタノール, 10% 酢酸)に入れてアスピレーターで 15 分間陰圧にした。さやが固定液中に沈んだら 4 ℃に移して一晩静置した。固定液を除いて、90%, 70%, 50%, 30% エタノールにそれぞれ 20 分ずつ順番に浸してエタノールから水に置換して、透明化液(飽水クロラル 8 g, グリセロール 1 mL, 蒸留水 2 mL)に浸した。スライドグラスにさやを置いて透明化液を滴下し、カバーグラスをかけて微分干渉顕微鏡で観察した。

PHS1 遺伝子の同定

phs1-1 変異株をエコタイプの異なる野生株 Landsberg *erecta* (Ler)と交配し、得られた F₂ 種子を 3 μ M のプロピザミド添加培地で育て *phs1-1* 変異株と同じ表現型を示す幼植物のゲノムを使ってマッピングを行った。シロイヌナズナのデータベースから Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS)マーカーと simple sequence length polymorphism (SSLP)マーカーを調べてマッピングを行った。ある程度原因遺伝子の場所を狭められたらその領域内の塩基配列をシーケンスで読んで変異を見つけた。変異の入っていた遺伝子の転写・翻訳は 3'-RACE system for rapid amplification of cDNA ends と 5'-RACE system for rapid

amplification of cDNA ends, ver. 2.0 (GIBCO)で調べた。

PHS1 遺伝子の発現量

14 日前後の幼植物全体から RNA を抽出した。各組織毎に RNA を抽出する時は根は 14 日前後の植物体を、葉、花・鞘、茎は 40 日前後の植物体から抽出した。RNeasy mini kit (QIAGEN)を使い RNA を抽出し reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)で発現量を調べた。1 本鎖 cDNA の合成は SuperScriptTMII Rnase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen)で行い、RT-PCR は 94 30 秒、57 1 分、72 1 分の温度設定で、サイクルをまわした。PHS1 遺伝子のプライマーは 5'-TCAAAAGGCTTTGGAGGCTC-3', 5'-GACTTTAACCGGGACAAACC-3' で、コントロールとしてアクチン遺伝子 ACT8 (5'-ATTAAGGTCGTGGCA-3', 5'-TCCGAGTTTGAAGAGGCTAC-5')も同時に発現量を見た。

コンストラクトの作成

形質転換植物体を作製するためにサブクローニングを行った。出来上がったコンストラクトを ColI か、もしくは *phs1-1* 変異株に Floral dip 法(Clough and Bent, 1998)か減圧浸潤法で形質転換した。*Agrobacterium tumefaciens* は MP90 株を使用した。

PHS1 遺伝子のプロモーターとターミネーターを含むゲノム領域をサブクローニングした。BAC MQM1 を制限酵素 Mro I, Xma I で処理して(図 6A)PHS1 ゲノム領域を取り出してこれを制限酵素 Xma I で処理をした pUC19(図 6B)に組み込んだ。次にこの PHS1 ゲノム/pUC19 を制限酵素 Fsp I と Mun I で処理をし(Fsp I は PHS1 ゲノム領域には切断箇所はなくベクターに切断箇所がある。)(図 6C)、Sma I と EcoR I で制限酵素処理をしたバイナリーベクター pBIN19(図 6E)に入れた(図 6F)。

PHS1 ゲノムに *phs1-1* 変異株と同じ変異(R64C)を入れるため、*phs1-1* 変異株から抽出したゲノムを PCR で増やして(プライマー: 5'-GTTGTTGATTTTCGACCG-3', 5'-TTACTCTAGCCTGTTCGCATG-3')制限酵素 Pac I, Msc I で処理した PCR 産物(図 6A a)を Pac I, Msc I で処理をした PHS1 ゲノム/pUC19(図 6C)に組み込んだ(図 6D)。バイナリーベクター pBIN19 には Fsp I, Mun I 処理をして入れた(図 6G)。

次に PHS1 cDNA を 35S cauliflower mosaic virus (CaMV) プロモーターで過剰発現させるコンストラクトを作った。At5g23720 には expressed sequence tag (EST)が 2 つ (AV546458, AV547753)ある。この 2 つの塩基配列をシーケンスで読んだところ、どちらも 5' 末端が欠けていたので AV546458 に欠けている 5' 末端をつなげることにした。AV546458/pBSIISK を制限酵素 Bpu1102 I, Xho I で切断し、pSP72 ベクターに入れ直した。5'-RACE 法で得られた 5' 末端に制限酵素 Nae I 切断部位を PCR でつなげて(プライマー: 5'-GCCGGCATGGCGGAACCTGAG-3', 5'-CAAGATTCTCCCTAGAGCTG-3') pGEM-T

ベクターに入れ、制限酵素 Not I, Pst I で切り出した 5'末端(図 7A)を Pvu II, Pst I で切断した AV546458/ pSP72(図 7B)につなげた(図 7C)。3'末端は poly A のままなので終止コドンの後に Xba I 切断部位をつなげた形にした。3'末端を PCR で増やし(プライマー: 5'-TTCGAAGGTCGGAGTAGAAG-3', 5'-GCTCTAGACTAACCAGGATGAG-3')(図 7B a)、pGEM-T ベクターに入れてから Xcm I, Pvu II で切り出して(図 7D)Xcm I, Sma I 処理した PHS1 cDNA/ pSP72 に組み込んだ(図 7E)。PHS1 cDNA を 35S CaMV promoter につなげるため、pAVA121 の 35S CaMV のプロモーターとターミネーターを使うことにした。PHS1 cDNA を Xho I, Xba I で切り出し(図 7E)、Xho I, Xba I 処理で green fluorescent protein (GFP)を抜いた pAVA121 ベクター(図 7H)に入れ、更にこれを Ase I, Fsp I で切り出し(図 7I) Ase I, Sma I 処理したバイナリーベクター pBIN19(図 7K)に入れた(図 7L)。

ゲノムと同様に cDNA も *phs1-1* 変異株と同じ変異の入った PHS1^{R64C} cDNA を作った。PHS1 cDNA/ pSP72 を鋳型に変異の入った PCR プライマーと SP6 プライマー(5'-CATACGATTTAGGTGACACTAT-3')を使って PCR で増やし(プライマー: 5'-CAGAGGATCCGTAAGTAGCACTTCGTTTACAAAC-3')(図 7E b)、これを pGEM-T ベクターに入れてから Nae I, BamH I で切り出し(図 7F)同じく Nae I, BamH I で処理した PHS1 cDNA/ pSP72(図 7E)に入れた(図 7G)。PHS1^{R64C} cDNA は上述と同様に pAVA121 に入れて(図 7J)プロモーターとターミネーターにつなげてから pBIN19 に入れた。

次に、*in vitro* での PHS1 タンパク質の解析に使うために PHS1 タンパク質を glutathione-S-transferase (GST)融合タンパク質として大腸菌内で過剰発現させて精製することにした。PHS1 cDNA の 5'末端に Nae I と Mun I 制限酵素切断部位をつなげて PCR をして(プライマー: 5'-GCCGGCAATTGATGGCGGAACCTGAG-3', 5'-CAGCTCGAATCAATATCCAC-3')(図 8A a)pGEM-T ベクターに入れてから(図 8B)5'末端を Nae I と BamH I で入れ換えて(図 8C)、3'末端は Xba I 切断部位をそのまま用いた。PHS1 cDNA を制限酵素 Mun I と Sal I (Sal I 切断部位は pGEM-T ベクター由来のもの)で切り出して(図 8C)EcoR I と Sal I で制限酵素処理をしたベクター pGEX 6P-1(図 8G)に入れた(図 8H)。図 6 と同様に PHS1^{R64C} cDNA も pGEX 6P-1 に入れた(図 8B, D, F)。PHS1 タンパク質のフォスファターゼ活性部位のシステインをセリンに変えて不活性化した PHS1^{C792S} タンパク質も作った。PHS1 cDNA/ pSP72 ベクター全体を 792 番目のアミノ酸残基のシステインがセリンに変わるようにヌクレオチドを変えたプライマー(5'-GAGTAGAAGCGCAACAGTAG-3', 5'-CGACCTTCGAAGCTATGAAC-3')で PCR して直鎖状の DNA を作った(図 8C b)。これをセルフライゲーションさせて、PHS1^{C792S} cDNA/ pSP72 プラスミドを作り(図 8E)、pGEX 6P-1 に cDNA を組み込んだ。出来上がった PHS1^{C792S} cDNA/ pGEX 6P-1 ベクターを大腸菌の BL21 (DE3)株に形質転換した。

共沈実験用のコンストラクトを作った。PHS1 は His-Tag の融合タンパク質で、MAP キナーゼ(MAPK)は GST 融合タンパク質として精製した。PHS1 cDNA/ pSP72 を制限酵素

Nae I と Not I (Not I 切断部位は pGEM-T ベクター由来のもの) で cDNA を切り出し (図 8A)、pET32b ベクターを Bgl II で制限酵素処理した後、Bgl II 切断部位を平滑末端にし、更に Not I で処理して (図 8I) PHS1 cDNA を組み込んだ。MAPK は Massachusetts General Hospital の Jen Sheen 教授から MAPK1-9 を分けて頂き (図 8N)、そのうち MAPK1-8 までを pGEX 6P-1 ベクターに入れた。MAPK1-4, 6 は頂いたベクターから制限酵素 BamH I, Stu I で切り出して BamH I, Sma I 処理した pGEX 6P-1 に入れた。MAPK7 は BamH I, EcoR I 処理で切り出して、BamH I, EcoR I 処理した pGEX 6P-1 に入れた。MAPK5 は PCR プライマー (5'-GCAGATCTATGGCGAAGGAAATTG-3', 5'-TGATAATCATCGCAAGACC-3') で N 末端に Bgl II 切断部位をつなげ、PCR 産物を Bgl II, Stu I で制限酵素処理をして BamH I, Sma I 処理をした pGEX 6P-1 に入れた。MAPK8 は PCR プライマーで N 末端に Xho I 切断部位を、C 末端に Not I 切断部位をつなげて PCR 産物を pUC19 ベクターに入れてから Xho I, Not I 制限酵素処理をして Sal I, Not I 処理をした pGEX 6P-1 に入れた。出来上がったコンストラクトは大腸菌 BL21 (DE3) 株に形質転換した。

シロイヌナズナ植物への形質転換用に 35S CaMV プロモーターで PHS1^{C792S} cDNA と PHS1^{R64C, C792S} cDNA を過剰発現させるコンストラクトを作った。PHS1^{C792S} cDNA/pSP72 と 35S::PHS1 cDNA/AVA121, 35S::PHS1^{R64C} cDNA/pAVA121 を制限酵素 Sty I, Xba I で処理して切り出した部分を入れ換えて (図 8E, J, K)、35S::PHS1^{C792S} cDNA/pAVA121, 35S::PHS1^{R64C, C792S} cDNA/pAVA121 を作り (図 8L, M)、この 2 つを pBIN19 に入れ換えた。得られた形質転換植物体の PHS1 遺伝子の発現量を RT-PCR で確認した (プライマー: 5'-GAGCATATTCTTGAGAGG-3', 5'-CTCCGACCTTCGAAGCAATG-3')。

PHS1 タンパク質の精製

形質転換した大腸菌を大量培養して過剰発現させた GST-PHS1 融合タンパク質 (Gupta et al, 1998; Xu et al, 1998) と His-tag 融合タンパク質を精製した。シングルコロニーを 100 mg/L ampicillin の LB 培地で 37 °C 12 時間前培養し、本培養の LB 培地 (100 mg/mL) に本培養液の 1/1000 量の前培養液を加えて O.D.₆₀₀ 値が 0.6 から 0.8 になるまで 37 °C で培養し、最終濃度が 1 mM になるよう isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) を加えて PHS1 融合タンパク質を過剰発現させて 18 °C で 18 時間培養した。

GST 融合タンパク質は培養液を集菌して抽出液 [100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl; pH 8.0, 2 μM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM benzamidine, and 2 mM EDTA] に 0.1% (v/v) Triton X-100 と 10 mg/L lysozyme を加え氷上に 1 時間静置してから、ソニケーターで大腸菌を破碎して 12000 回転で遠心して上清を集め、glutathione sepharose 4B (Pharmacia Biosciences) で精製した。

His-tag 融合タンパク質は集菌した大腸菌のペレットを抽出液に 0.1% (v/v) Triton X-100, 10 mM imidazole, 1 mg/mL lysozyme を加えたもので懸濁し、氷上に 30 分間静置し

てからソニケーターで大腸菌を破碎した。10000 回転で遠心して上清を Ni-NTA agarose (QIAGEN)のカラムに通して imidazole で抽出した。His-tag 融合 PHS1 タンパク質は imidazole を 100 mM, 250 mM, 500 mM, 1 M と濃度を振って抽出したときに 250 mM の分画に多く抽出されたので、共沈実験には 250 mM imidazole で抽出した分画を用いた。

フォスファターゼ活性の測定

3-*O*-methylfluorescein phosphate (OMFP)を人工基質として用いた。OMFP のリン酸基を PHS1 で脱リン酸化して生成された 3-*O*-methylfluorescein (OMF)を 477 nm の波長で測定した(Zhou and Zhang, 1999)。反応液(50 mM 3, 3-dimethylglutaric acid, 1 mM EDTA; pH 8.0, 150 mM NaCl, 50% (v/v) glycerol, pH 7.0) 800 μ L 中に 0.5 mM OMFP と PHS1 タンパク質を入れ反応させ、5 M NaOH 200 μ L を加えて反応を止めてから 477 nm の吸光度を吸光度計 Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 で測定した。

PHS1 タンパク質の共沈実験

PHS1 と MAPK1-8 が結合するかどうか共沈実験を行った(Zhou et al, 2001)。GST-MAPK 10 μ g を PBS [2 mM dithiothreitol (DTT)] 1 mL, glutathione sepharose 4B (Amersham Biosciences) 40 μ L と 4 で 2 時間ローテーターで攪拌した。PBS (2 mM DTT) で洗浄した後 His-tag-PHS1 1 μ g, PBS (2 mM DTT) 200 μ L を加えてローテーターで 4 2 時間攪拌し、洗浄後に PBS (2 mM DTT) 20 μ L, 5 x sample buffer 4 μ L を加えて 95 で 5 分間ヒートショックをした。遠心して得られた上清を用いて 10% のアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った。トランスブロット SD (Bio-Rad)を用いてアクリルアミドゲルをメンブレン HybondTM-P (Amersham Biosciences)に転写し(18V 30 分)、ウェスタンブロッティングをした。一次抗体は 10000 倍希釈した抗 6 x His 抗体(mouse IgG2a: CLONTECH)を使い 4 で一晩反応させ、二次抗体には 50000 倍希釈した Horseradish Peroxidase (HRP)と結合する抗マウス IgG 抗体(sheep, NA931: Amersham Biosciences)と室温で 1 時間反応させた。バンドの検出には ECL-plus (Amersham Biosciences)を用いた。

結果

変異株のスクリーニング

EMS 処理をしたシロイヌナズナの M2 種子と T-DNA タグを挿入したシロイヌナズナ形質転換植物体の種子を 3 μ M のプロピザミドを添加した寒天培地に蒔いて 7 日目の幼植物の根の表現型を見た。野生株は 3 μ M のプロピザミド添加培地では根は左巻きにねじれて左方向に伸長するが、変異原処理をした種子では右巻きにねじれるものや伸長阻害を受けているものがあった(図 9)。根の伸長阻害を受けている変異株には、 α -もしくは β -tubulin 遺伝子に変異が入っている変異株が 28 ライン、微小管を切断する働きを持つカタニンの変異株 *fra2* (Burk et al, 2001) のアレルが 10 ライン含まれていた(金子, 修士論文, 2003; 石田, 修士論文, 2004)。これらとは異なり新規の遺伝子に変異が入っていると思われる、プロピザミドに高感受性で根の伸長阻害を受けている変異株の 1 つを *propyzamide hypersensitive1-1* (*phs1-1*) と名付け解析していくことにした。

phs1-1 変異株の表現型

phs1-1 変異株は 3 μ M のプロピザミドを加えた寒天培地で育てると幼植物の根の表皮細胞は細胞肥大し、伸長阻害を受けているが、薬剤を加えていない培地では根は左巻きにねじれて左方向に伸長している(図 10A-H)。*phs1-1* 変異株の根の長さは左巻きねじれの変異株 *lefty1*, *lefty2* や右巻きねじれ変異株 *spr1* と同じ様にねじれているため野生株よりやや短い(Furutani et al, 2000; Thitamadee et al, 2002)。地上部をみると子葉は時折ねじれることがあるが、本葉や花弁はねじれない。トライコームも野生株と同じ表現型だった。温度感受性をみてみると高温(28 $^{\circ}$ C)で黄化胚軸に野生株とは異なる表現型が現れた。*phs1-1* 変異株の黄化胚軸は 23 $^{\circ}$ C では野生株と差はないが、28 $^{\circ}$ C で育てると黄化胚軸の表皮細胞が肥大した(図 10L)。根のねじれ表現型は高温では強調されることなく 23 $^{\circ}$ C での生育と同じ左巻きにねじれたままであった。低温(18 $^{\circ}$ C)では地上部、根共に目立った反応は示さず 23 $^{\circ}$ C で育てた時と同じ表現型であった。*spr1* 変異株はエチレンに感受性を示してエチレンを添加するとねじれが解消される。また、*spr1* のサプレッサーである *sos1* は塩(NaCl)感受性を示すので、*phs1-1* 変異株のエチレン感受性や塩耐性、それと根が重力方向から逸れて伸長するので重力屈性も調べたが全て野生株と同じ反応であった。

微小管重合阻害剤のプロピザミドに感受性を示したので、他の微小管重合阻害剤のオリザリン、RH-4032(プロピザミドのアナログ)や重合安定剤のタキソールに対して感受性を示すか、各薬剤を添加した寒天培地上で発芽させて 7 日目の幼植物の根の長さを測定した(図 11)。薬剤無添加時の根の長さに対する薬剤添加時の根の長さを比で表した。オリザリンと RH-4032 に対して、野生株はある程度の濃度の薬剤(オリザリンでは 100 nM 以上、

RH-4032 では 11 nM 以上)を加えないと根の伸長阻害は起きないのに対して *phs1-1* 変異株は野生株の根が伸長阻害を受ける濃度よりも低濃度で伸長阻害を受けていた(図 11B-C)。これはプロピザミドでも同様で、野生株は 1 μ M 以上のプロピザミドで伸長阻害を受けるのに対して *phs1-1* 変異株は低濃度のプロピザミドでも感受性を示した(図 11A)。一方、タキソールに対する感受性は *phs1-1* 変異株と野生株に顕著な差はなかった。(図 11D)。この事から、*phs1-1* 変異株は微小管重合阻害剤に対して感受性を示すが重合安定剤には感受性を示さない事が分かった。また、アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D に対する反応を見てみたが、ほぼ野生株と同じ程度の伸長阻害を受けて特徴的な反応は示さなかった(図 11E)。

phs1-1 変異株を右ねじれ変異株 *spr1-2*, *spr2-1* と左ねじれ変異株 *lefty1*, *lefty2*, MAP の変異株 *mor1-1* と交配して二重変異株を作った。全ての二重変異株で根が左巻きにねじれて左方向に伸長し、子葉が左巻きの時計回りにねじれていた。その中で *mor1-1phs1-1* のねじれ表現型が一番強く *spr2-1phs1-1* 二重変異株も少しねじれが強くなっていた。*mor1-1phs1-1*(図 12)と *spr2-1phs1-1*(図 13)は左巻きにねじれている根の表皮細胞層には薬剤無添加時でも細胞肥大を起こしている細胞があり、根の伸長は *phs1-1* 変異株よりも阻害されていた。*mor1-1phs1-1* の葉柄は幅広で短くなってねじれが見づらくなっていたが、時計回りにねじれていた。*spr2-1* の子葉は反時計回りにねじれているが、*spr2-1phs1-1* では時計回りにねじれていた(図 14)。*mor1-1phs1-1* ではトライコーム全体が小さく分枝が短くなり、また、雄しべの葯の中に花粉が殆どなかったため種子が得られなかった。

phs1-1 変異の遺伝的優劣性を調べるために野生株 Col と交配し、得られた *phs1-1* x Col F1, F2 種子のプロピザミドに対する感受性を野生株、*phs1-1* 変異株と比較した。3 μ M のプロピザミド添加培地では *phs1-1* x Col F2 幼植物の根は 3 種類の表現型が見られた。緩やかに左巻きにねじれて左方向に伸長している個体、左巻きねじれが強く極端に左方向に伸長している個体、伸長阻害を受けて細胞が肥大している個体の 3 種類であり(図 15A)、これらの根の表現型は、それぞれプロピザミド添加培地での Col と *phs1-1* x Col F1、*phs1-1* 変異株の表現型と似ていた。これは遺伝子型の違いが根の表現型の違いに反映している半優性な表現型と考えられたので、3 μ M のプロピザミド寒天培地で育てた時の Col, *phs1-1*, *phs1-1* x Col F1, F2 幼植物の根の長さを測定したところ、F2 幼植物は大体 3 種類の根の長さ(各々 Col, *phs1-1*, *phs1-1* x Col F1 幼植物の根の長さと同じぐらいの長さ。)に別れた(図 15B)。このプロピザミド添加時の F2 幼植物の根の表現型の 3 種類が 1:2:1 の比に分かれるか有意差検定(χ^2 検定)を行ったところ、 $\chi^2 = 1.35$ ($< 5.99 = \chi^2_{\alpha=0.05}$)だったので、*phs1-1* 変異株は半優性変異であると結論づけた。

表層微小管の配向

phs1-1 変異株が微小管重合阻害剤に感受性を示すことから、実際に根の表層微

小管の配向に野生株との違いがあるのか 4 日目の幼植物の表層微小管を免疫抗体染色法で染めて観てみた。根の伸長領域では表皮細胞の表層微小管は野生株では伸長方向に対して直角である横方向に配向しているが、*phs1-1* 変異株では野生株に比べるとやや右肩上がりの配向で少し短くなっているようにみえた(図 16A-B)。実際に表層微小管の長さと同配向している角度を測定して各々の平均値をみると、表層微小管の長さは野生株では $11.94 \pm 3.51 \mu\text{m}$ ($n = 405$)、*phs1-1* 変異株は $8.80 \pm 3.67 \mu\text{m}$ ($n = 451$)で(図 17A)、配向している角度の平均値は野生株が $89.35 \pm 22.03^\circ$ ($n = 449$)で *phs1-1* 変異株は $97.19 \pm 23.71^\circ$ ($n = 533$)であった(図 17B)。このことから、*phs1-1* 変異株の根の表層微小管は野生株よりもやや短くて右肩上がりの配向をしていることが分かった。

また、150 nM のオリザリン(野生株が根の伸長阻害を受ける濃度)を添加した寒天培地で育てた 4 日目の幼植物の根の伸長領域での表皮細胞の表層微小管を見てみた。150 nM のオリザリン添加培地では *phs1-1* 変異株はほぼ根の伸長が止まり、表皮細胞は細胞肥大を起こしている。オリザリン添加時の野生株と *phs1-1* 変異株の表層微小管の配向の差は歴然であった。野生株では表層微小管の配向が右肩上がりの配向になっていたが、*phs1-1* 変異株では表層微小管は脱重合してドット状で存在し、繊維状の表層微小管は辛うじて僅かに確認することが出来る程度になっていた(図 16C-D)。

PHS1 遺伝子の同定

PHS1 原因遺伝子のマッピングをするために 3 μM プロピザミドの寒天培地で育てた 7 日目の *phs1-1* x Ler F2 幼植物の根の表皮細胞が *phs1-1* 変異株と同様に肥大している個体を用いてマッピングを行った。その結果、*PHS1* 遺伝子座は第 5 染色体のセントロメアからやや北寄りの約 63kb の領域に狭められた(図 18A)。この 63kb の領域には open reading frame (ORF)が 15 個含まれており α -、 β -tubulin 遺伝子は含まれていなかった。狭めた領域内の 15 個全ての ORF の塩基配列をシーケンスで読んだところ、At5g23720 に 1 塩基置換の変異が入っていて、63kb の領域内の他の塩基には変異は起きていなかった。At5g23720 の転写を 5'-RACE 法と 3'-RACE 法で調べたところ、エクソン 11 個、イントロン 10 個からなり、At5g23720 の cDNA は 2787 ヌクレオチドで 929 アミノ酸残基から成る約 100kDa のタンパク質をコードしている遺伝子であった。この遺伝子から生成されるタンパク質のアミノ酸配列を BLAST 検索すると C 末端に dual-specificity protein phosphatase (DSP) catalytic domain を持つ遺伝子であった(図 18B)。*phs1-1* 変異株は 190 番目のヌクレオチドのシトシンがチミンに置き換わった 1 塩基置換の変異により *PHS1* タンパク質の 64 番目のアミノ酸残基のアルギニンがシステインに変化していた。

この At5g23720 が *PHS1* 遺伝子かどうか At5g23720 を植物に形質転換して相補試験を行った(図 19)。野生型 *PHS1* ゲノムを *phs1-1* 変異株に入れた形質転換植物体は 20 ラインのうち 5 ラインで根のねじれ形質が解消されてプロピザミドに対する感受性も野生株と同

じになり(図 19A-D)、*phs1-1* 変異株と同じ変異(R64C)を入れた *PHS1*^{R64C} ゲノムを野生株 Col に形質転換した植物体では 26 ラインのうち 6 ラインで根が左方向に伸長し、プロピザミドに高感受性を示した(図 19E-H)。この事から At5g23720 が *PHS1* の原因遺伝子であることが分かった。

***PHS1* 遺伝子の発現**

PHS1 遺伝子の発現量を Northern-blotting 法で調べようとしたが *PHS1* 遺伝子の発現量が少なく Northern-blotting 法では確認し難かったので、RT-PCR で *PHS1* 遺伝子の発現量を各器官毎(根、葉、茎、花・さや)に分けて調べた。その結果、野生株と *phs1-1* 変異株共に全ての器官で発現が確認できた。*phs1-1* 変異株の発現量は野生株と同じぐらい発現していた(図 20)。

PHS1 遺伝子の発現が完全に押さえられているヌルの *phs1* 変異株のアレルを得るために *PHS1* 遺伝子に T-DNA のタグが入っているラインを Syngenta から取り寄せた。取り寄せたライン(1293 C2)は T-DNA タグが *PHS1* 遺伝子の第 3 エキソンに両端が left border (LB)で入っており、挿入されている T-DNA タグは両端が LB だったので 2 コピー以上入っている。このラインの幼植物の根は野生株と同じように重力方向に伸長して左巻きにねじれていなかった。各個体の遺伝子型を PCR で確認したところ、1293 C2 ラインは 3 世代以上まわしても T-DNA タグがホモで挿入されている個体は得られなかった。T-DNA タグがヘテロで挿入されている植物体の自家受粉したさやの中を見ると、どのさやにも発生途中で死んだ種子が含まれていた(図 21A)。12 個のさやを調べると、正常な種子が 202 個で、死んでいる種子は 305 個であり、正常な種子と死んだ種子の比はおおよそ 2 : 3 であった。さやを透明化処理して観てみると、正常な種子が初期の球状型胚の時には T-DNA タグがホモで挿入されていると思われる種子は発育が遅く小さい胚が確認でき、後期の球状型胚や心臓型胚が観られるさやでは T-DNA タグがホモで挿入されていると思われる種子はつぶれて発生の途中で死んでいた(図 21B)。ヘテロでタグが挿入されている植物体の自家受粉で得られた次世代の幼植物は全て表現型が野生株と同じでねじれ形質は見られず、これらの植物体の遺伝子型を PCR で確認するとタグがホモで挿入されている個体はなかった(図 21C)。また、*phs1-1* 変異株と 1293 C2 ラインを交配すると F1 幼植物の根は *phs1-1* 変異株と同じ様に左巻きにねじれ、F2 幼植物の根も左巻きにねじれた(図 21C)。F2 幼植物の遺伝型を PCR で確認すると *phs1-1* ホモ接合体と *phs1-1* と 1293 C2 ラインのヘテロ接合体だけで T-DNA タグのホモ接合体はなかった。この事から *PHS1* 遺伝子のヌル変異は胚性致死になると思われた。この T-DNA 挿入株を *phs1-2* 変異株とした。

***PHS1* タンパク質のフォスファターゼ活性**

PHS1 タンパク質の解析を *in vitro* で行うために、GST 融合 *PHS1* タンパク質を大腸

菌で過剰発現させて glutathione sepharose 4B で精製した。GST は切断せずに融合タンパク質のままにフォスファターゼ活性を測定した(図 23C)。University of California, Berkeley の Rajeev Gupta 教授から譲って頂いた AtDsPTP1 と AtDsPTP1C135S をコントロールとして *in vitro* で測定する際によく用いられる基質 pyronitrophenylphosphatase (pNPP)でフォスファターゼ活性を測定した(Gupta et al, 1998; Xu et al, 1998)。AtDsPTP1 のフォスファターゼ活性は測定できたが GST 融合 PHS1 タンパク質の活性は測れなかったため、OMFP を pNPP の代わりの人工基質として用いた。OMFP は pNPP よりも疎水性が強く、OMFP の構造が pNPP よりチロシンフォスファターゼ(PTP)に結合しやすいので PTP により良い人工基質である(図 22)。GST 融合タンパク質 PHS1, PHS1^{R64C}, PHS1^{C792S} に加えて 30 と 20 で反応時間もしくは PHS1 の使用量を変えて測定した(図 23)。反応時間をふって測定する時の PHS1 は 60 µg 使用し、PHS1 の量をふる時には 1 時間反応させて測定を行った。フォスファターゼ活性部位のシステインをセリンに置換するとフォスファターゼ活性が失活することが知られている。PHS1 タンパク質のフォスファターゼ活性部位のシステインをセリンに置換した PHS1^{C792S} は全くフォスファターゼ活性を持たず、PHS1 と PHS1^{R64C} は活性を持っていた。20、30 のどちらでも PHS1^{R64C} は PHS1 の約半分ぐらいの活性であった(図 23A-B)。PHS1 のフォスファターゼ活性の反応時間による変化をみると 20 では反応時間を長くすると少しずつではあるがフォスファターゼ活性が上がっているが、30 では 30 分以上反応時間を長くしても反応時間 30 分時の値以上にフォスファターゼ活性が上がることはなかった(図 23B)。また、反応温度をシロイヌナズナの至適温度に近い 20 にして測定した方が 30 の時よりも PHS1 は 1.7 倍に PHS1^{R64C} では 1.4 倍に活性が上がった(図 23A-B)。

PHS1 と MAP キナーゼの結合能

PHS1 タンパク質は MAP キナーゼフォスファターゼ[mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase] (MKP)と相同性があったので、PHS1 の標的分子が MAP キナーゼかどうか、共沈実験を行った。PHS1 は His-tag 融合タンパク質として、MAP キナーゼは GST 融合タンパク質として大腸菌で過剰発現させて精製したものを使用した。MAP キナーゼは AtMPK1-9 を Massachusetts General Hospital の Jen Sheen 教授から分けて頂き、そのうち AtMPK1-8 を用いた。ポジティブコントロールとして Albert Einstein College of Medicine の Zhong-Yin Zhang 教授から譲って頂いた His tag-MKP3 と GST-ERK2 の組み合わせを用いた(Zhou and Zhang, 1999)。His tag 融合フォスファターゼ(PHS1, MKP3)と glutathione sepharose 4B に結合させた GST 融合 MAP キナーゼ(AtMPK1-8, ERK2)を混合して glutathione sepharose 4B を洗浄して 95 で熱処理をしてから SDS-PAGE を行い、抗 His tag 抗体を用いてウェスタンブロットングを行ったが、PHS1 は検出できなかった。このことから、PHS1 タンパク質は AtMPK1-8 のどれとも結合しない可能性がある(図 24)。

***phs1-1* 表現型に対するフォスファターゼ活性の必要性**

35S CaMV プロモーターにつなげた PHS1 cDNA もしくは PHS1^{R64C} cDNA を *phs1-1* 変異株もしくは Col1 に入れた形質転換植物体でもゲノムを挿入した時と同じように表現型が野生型に戻ったり(9 ライン中 1 ライン)、プロピザミドに対して高感受性を示した(33 ライン中 1 ライン)(図 25)。同じようにフォスファターゼ活性部位に変異を入れた PHS1^{C792S} cDNA と *phs1-1* 変異と酵素活性部位の両方に変異を入れた PHS1^{R64C, C792S} cDNA を 35S CaMV プロモーターでドライブして野生株に形質転換すると表現型はどうなるのか見てみた(図 26)。野生型の cDNA を Col1 に入れた形質転換体 35S::PHS1 では 31 ライン全ての表現型は野生型のままであった。35S::PHS1^{C792S} 形質転換植物体では発現量の多い少ないに関係なく根における特徴的な表現型は現れず野生株のままであったが、黄化胚軸は 23 では野生株と同じで 28 で育てると野生株の黄化胚軸よりも少し膨れた。35S::PHS1^{R64C, C792S} 形質転換植物体 44 ライン中 1 ラインの根では左方向に伸長して肥大している表皮細胞もあり、3 μM プロピザミド添加培地では根の表皮細胞が肥大して高感受性を示した。

考察

phs1-1 変異株の根は左巻きにねじれ、プロピザミドに対して高感受性を示した(図 11A)。根の左巻きねじれやプロピザミド等微小管重合阻害剤に対する高感受性は *lefty* 変異株(Thitamadee et al, 2002)に似て、黄化胚軸の高温感受性や根での表層微小管の配向は *mor1* 変異株(Whittington et al, 2001; Sugimoto et al, 2003)に似ている。しかし、*phs1-1* 変異株の地上部は *lefty* 変異株の表現型と異なっている。本葉と花弁は *lefty* 変異株では左巻きにねじれるが、*phs1-1* 変異株はねじれない。また、薬剤感受性では *phs1-1* 変異株は微小管重合阻害剤にだけ感受性を示し、微小管重合促進剤のタキソールには感受性を示さない(図 11)が、*lefty* 変異株は微小管重合阻害剤とタキソールの両方に感受性を示す(Thitamadee et al, 2002)。*phs1-1* 変異株はアクチン重合阻害剤のサイトカラシン D に対して感受性を示さない。*phs1-1* 変異株の表層微小管は野生株に比べると表層微小管の長さは僅かに短く配向はやや右肩上がりである。表層微小管の配向と微小管薬剤に対する感受性を併せて考えると *phs1-1* 変異株では表層微小管の脱重合が促進された結果、*phs1-1* 変異株の根は左巻きにねじれている。PHS1 タンパク質は表層微小管の重合・脱重合の制御に関わっており、*phs1-1* 変異株では微小管の動的不安定性のバランスが脱重合過多に崩れているのではないかと考えた。

右巻きねじれの *spr* 変異株との二重変異体は *phs1-1* 変異株の表現型の方が強く現れた左巻きねじれであった(図 13)。*mor1-1phs1-1* 二重変異体は根の表皮細胞の肥大やそれに伴う伸長阻害等の相乗的な表現型を示した(図 12)。*MOR1* の欠失変異である *gemini pollen1 (gem1)* 変異株は花粉母細胞の細胞質分裂時に形成される細胞板の形成が異常になり、細胞壁の形成が途中で終わり花粉細胞の多核化などが見られる(Park and Twell, 2001)。温度感受性を示す *mor1-1* との二重変異体で花粉が形成されないのは *mor1-1* 変異の表現型が強調されたためではないかと推測した。

PHS1 遺伝子のクローニングの結果、At5g23720 が *PHS1* 遺伝子であり、*phs1-1* 変異株に野生型の *PHS1* ゲノムか *PHS1* cDNA を入れれば植物体は野生株の表現型に戻るラインが得られ、*phs1-1* 変異株の変異を入れた *PHS1*^{R64C} ゲノムもしくは *PHS1*^{R64C} cDNA を野生株に入れると、植物体の表現型は *phs1-1* 変異株の表現型になるラインがあった(図 19)。これらの事から *phs1-1* 変異株の変異(R64C)はドミナント・ネガティブな変異であると考えられる。ヌルアレルの *phs1-2* 変異株では *phs1-2* ヘテロ接合体だと何も表現型は現れないが、*phs1-2* ホモ接合体になると胚性致死になる(図 21)。これは *PHS1* が胚発生に必要なためと思われる。*phs1-2* ヘテロ接合体では野生型の表現型なので、*phs1-1* 変異株のねじれ表現型は R64C 変異特異的な表現型であるのかもしれない。tubulin-folding cofactor 遺伝子に変異が入っている *pilz* 変異株は胚性致死でその胚の細胞の微小管が無くなっているのが確認

されている(Mayer et al, 1999; Kirik et al, 2002)。

この PHS1 タンパク質の N 末端はどのタンパク質とも相同性が無く、C 末端に dual-specificity protein phosphatase (DSP)と相同性のあるフォスファターゼ活性部位があった。フォスファターゼはタンパク質のリン酸基を取り除いて水酸基に換える脱リン酸化反応に必要な酵素で、タンパク質のリン酸化、脱リン酸化反応はそのタンパク質を活性化、不活性化させるのでシグナル伝達など生体内反応では重要な酵素である。フォスファターゼには大きく分けてセリン・スレオニンフォスファターゼとチロシンフォスファターゼ(PTP)の 2 種類がある。ちなみに表層微小管の異常な配向や PPB の欠失がみられるシロイヌナズナの *ton2* 変異株の *TON2* 遺伝子がコードしている PP2A はセリン・スレオニンフォスファターゼの代表的な酵素であり(Camilleri et al, 2002)、今までは植物では主にセリン・スレオニンフォスファターゼの阻害剤を用いて微小管の安定性とリン酸化の研究がされており、微小管の安定性と PTP の相関については調べられていない。

PTP スーパーファミリーは酵素活性部位のアミノ酸残基の配列から大きく classical PTPs (HCSAGXGRXG)と DSPs (HCXXGXXR)の 2 つのファミリーに分けられる(Tonks and Neel, 2001)。classical PTP ファミリーはリン酸化されたチロシンだけを脱リン酸化するが、DSP ファミリーはリン酸化されたチロシンだけでなくリン酸化されたセリン・スレオニンも脱リン酸化する(Luan, 2003)。DSPs には Cdc25 や MKP が含まれている(表 1)。MKP の基質は MAP キナーゼで、MAP カスケード中の MAP キナーゼは脱リン酸化によって活性型から不活性型に戻る。動物細胞の MKP は N 末端領域に MAP キナーゼ結合部位を持つものが多くある(Tonks and Neel, 2001; Tanoue et al, 2002)。MAP キナーゼ結合部位は正電荷を帯びたアミノ酸残基のアルギニンやリジンが 2 個もしくは 3 個並び、その両隣りに疎水性のアミノ酸残基が並んでいる(Tanoue, 2002)。このアミノ酸配列中の正電荷を帯びたアミノ酸残基に MAP キナーゼの負電荷のアミノ酸残基が結合すると言われている(Theodosiou and Ashworth, 2002)(図 27A)。シロイヌナズナで DSP の遺伝子は 18 個あり(Kerk et al, 2002)、その中で MKP ファミリーに属するものは 5 個ある(フォスファターゼ活性部位のモチーフ VVXVHCXXGXSRSTXXXAY(L/I)M を持つもの)(図 28)(Monroe-Augustus et al, 2003)。この 5 個の遺伝子のうちの 1 つが PHS1 で、その他に 3 つ AtDsPTP1 (Gupta et al, 1998)、AtMKP1 (Ulm et al, 2001)、IBR1 (Monroe-Augustus et al, 2003)が解析されている。AtDsPTP1 はフォスファターゼ活性を持ち、*in vitro* で AtMPK4 を不活性化させる(Gupta et al, 1998)。AtMKP1 の変異株 *mkp1* は UV に高感受性を示し、塩耐性を獲得した変異株で、*in vivo* で AtMPK6 を不活性化させる(Ulm et al, 2002)。IBR5 はオーキシンとアブシジン酸に対する感受性が弱まった変異株 *ibr5* の遺伝子でフォスファターゼ活性は確認されておらず標的分子も分かっていないが、MAP キナーゼが標的分子ではないかと考えられている(Monroe-Augustus et al, 2003)。DsPTP1 ファミリーはそれぞれ At3g06110 が 157 アミノ酸残基、AtDsPTP1 は 198 アミノ酸残基、IBR5 は 283 アミノ酸残基、AtMKP1 は 732 アミノ酸残

基、PHS1 は 929 アミノ酸残基から成る (図 28A)。At3g06110, AtDsPTP1, IBR5 はほぼフォスファターゼドメインしか持たないが、AtMKP1 と PHS1 は上記 3 つの DsPTP1 ファミリーに比べると大きなタンパク質で AtMKP1 は N 末端にフォスファターゼドメインがあり、中央にはアクチンフィラメントと結合する gelsolin に似た配列が存在する (Ulm et al, 2001)。PHS1 は C 末端にフォスファターゼドメインを持ってその他の領域は何のモチーフとも相同性がないが、N 末端に動物の MKP が持つ MAP キナーゼ結合部位の一部と似た配列があり、この配列はシロイヌナズナ以外の高等植物の EST にも存在する。*phs1-1* 変異株の変異 (R64C) は N 末端にある MAP キナーゼ結合部位と似た配列の中に存在している (図 27B)。

MAP キナーゼカスケードは細胞内シグナル伝達系で主要なものである。何らかのシグナルによって MAP キナーゼキナーゼキナーゼがリン酸化されて活性化すると MAP キナーゼキナーゼをリン酸化する。活性化された MAP キナーゼキナーゼは MAP キナーゼをリン酸化し、活性化した MAP キナーゼは細胞質内から核内へと移行して転写因子をリン酸化することで標的遺伝子が発現するように働きかける。植物の MAP キナーゼカスケードは環境応答や傷害応答、ホルモン応答、成長応答等の様々な生理的な反応でのシグナル伝達に関わり (図 29)、MKP は MAP キナーゼを脱リン酸化によって不活性化し、標的分子への伝達を止める。シロイヌナズナの MAP キナーゼキナーゼキナーゼは 60 個、MAP キナーゼキナーゼは 10 個、MAP キナーゼは 20 個見つかっている (Ichimura et al, 2002)。

PHS1 は MKP ファミリーに属してフォスファターゼドメインを持っているが、本当にフォスファターゼ活性があるのか、*in vitro* でフォスファターゼ活性を測定したところ、PHS1 タンパク質はフォスファターゼ活性が認められた (図 23)。シロイヌナズナの生育至適温度に近い 20 °C の方が 30 °C に比べて活性が高かった。同じ MKP ファミリーの AtDsPTP1 や AtMKP1 が MAP キナーゼと結合し、動物の MKP にある MAP キナーゼ結合部位と似たアミノ酸配列を PHS1 が持つことから PHS1 の標的分子も MAP キナーゼである可能性が高い。*phs1-1* 変異株の変異 (R64C) を入れた PHS1^{R64C} のフォスファターゼ活性は野生型の半分だった。先に述べたように *phs1-1* 変異株の変異箇所である N 末領域にはちょうど動物の MKP の MAP キナーゼ結合部位に似ている (図 27)。動物の MKP2 の N 末領域のキナーゼ結合部位にある正電荷のアミノ酸残基の 1 つをアラニンに置換すると結合能が落ちることが分かっている (Chen et al, 2001)。同様に PHS1 の N 末端は標的分子の結合部位で、PHS1^{R64C} タンパク質では結合部位の重要な正電荷を帯びたアミノ酸残基のアルギニンが親水性アミノ酸残基のシステインに置換されたことで標的分子との結合能力が落ちたと考えられる。フォスファターゼ活性の値が低いのは本来の標的分子ではない OMFP を人工基質として使用したので反応、もしくは結合が弱かったのかもしれない。MKP のフォスファターゼ活性は MAP キナーゼと結合していない時は不活性だが、リン酸化された標的分子と結合することによって活性化される。また、リン酸基のついていない不活性型の MAP キナーゼが結合部位に結合していても MKP は活性化されている。MAP キナーゼが MKP から離れると MKP は不活性に戻る

(図 30)(Theodosiou and Ashworth, 2002)。MKP3 は ERK1, ERK2 と N 末端で結合するが、JNK, p38 とは結合しない。MKP3 の N 末端のキナーゼ結合部位に ERK2 が結合すると MKP3 のフォスファターゼ活性は 40 倍も増加し、キナーゼ結合部位に結合しているのが不活性型の ERKs であっても MKP3 は活性化されて MAP キナーゼに対してフォスファターゼとして働くことができる(Camps et al, 1998; Camps et al, 1999)。MKP3 に ERK2 が結合すると MKP3 の高次構造が変化することが確認されている(Farooq et al, 2001)。これらのことから、人工基質ではなく本来の PHS1 の標的分子で反応させたら今回の実験結果よりも PHS1 のフォスファターゼ活性が上がると思われる。

PHS1 の標的分子を見つけるために MAP キナーゼとの共沈実験を行ったが PHS1 は AtMPK1-8 とは結合するという実験結果は得られなかった。シロイヌナズナでは MAP キナーゼは 20 個見つかっている(Ichimura et al, 2002)ので残りの AtMPK9-20 のどれかと結合する可能性がある。シロイヌナズナの MAP キナーゼは大きく 4 つのグループに分けられ、そのうち 3 つのグループには common docking (CD) domain と呼ばれている配列が存在する。この CD domain は MAP キナーゼキナーゼやフォスファターゼなどにある結合部位中の塩基性アミノ酸残基と結合する負電化を帯びたアミノ酸残基が存在する部位である(図 31)。PHS1 タンパク質の N 末端の正電荷を帯びたアミノ酸残基が並んでいる配列を考えると PHS1 タンパク質の標的分子の MAP キナーゼは CD domain を持つタンパク質と思われるので標的分子候補の MAP キナーゼはかなり限られてくる。

35S::PHS1^{C792S} 形質転換植物体の根の表現型は野生株と同じであり、35S::PHS1^{R64C, C792S} 形質転換植物体では根が左方向に伸長してプロピザミドに高感受性であった(図 26)。この結果から左巻きねじれの表現型にはフォスファターゼ活性は関与せず、R64C 変異特異的な表現型である。PHS1 タンパク質は C 末端にフォスファターゼ活性部位があり、N 末端領域は特徴的なドメインは何もなかったが、64 番目のアルギニンは PHS1 の機能上重要な働きを持つ MAP キナーゼ結合部位だと思われる。フォスファターゼ活性は 20 より 30 の方が低く、*phs1-1* 変異株の黄化胚軸の高温感受性はフォスファターゼ活性が関与しているように思われる。また、35S::PHS1^{R64C, C792S} 形質転換植物体で野生株とは異なる特徴的な表現型を確認できたラインが少なく、形質転換植物体については更なる解析が必要である。

本研究の結果から、PHS1 は複数の MAP キナーゼを不活性化する MKP で、その標的分子の 1 つが微小管の安定性に関わっている MAP キナーゼではないかと推論した(図 33A)。動物細胞の MAP キナーゼは MKP の N 末端にあるキナーゼ結合部位といわれる正電荷のアミノ酸残基に結合するが、MAP キナーゼによっては必ずしもその領域が必要ではなく(Tanoue et al, 2002)、また複数の MAP キナーゼが結合する MKP もある。MKP2 には ERK1, JNK1, p38 の 3 種類の MAP キナーゼが結合する(Chen et al, 2001)。MKP7 は ERK2, JNK1, p38 α の MAP キナーゼと結合するが、各 MAP キナーゼは結合する領域が異

なっている(図 32)(Masuda et al, 2003)。シロイヌナズナの MAP キナーゼは 20 個確認されているが MKP ファミリーは 5 つしかないので、MKP は複数個の MAP キナーゼを標的分子にしていると思われる。PHS1 は MKP ファミリーの中でフォスファターゼ活性部位以外の相同性を持たない領域が 1 番長いので、その分他の MKP よりも MAP キナーゼを認識する部位を複数箇所持っている可能性が高い。PHS1 タンパク質の標的 MAP キナーゼは各々 PHS1 との結合部位が異なり、それらのうちの 1 つが微小管の制御に関わる MAP キナーゼで PHS1 の 64 番目のアミノ酸残基アルギニンを含む N 末端の領域と結合し、他の MAP キナーゼは微小管以外の生体内反応に関係していて PHS1 との結合部位は 64 番目付近の N 末端の正電荷アミノ酸残基が多いキナーゼ結合部位ではないと考えている。*phs1-1* 変異株中の PHS1^{R64C} タンパク質は PHS1 タンパク質が制御している MAP キナーゼのうち、64 番目のアミノ酸残基アルギニンと結合する MAP キナーゼと結合できなくなりこの MAP キナーゼの脱リン酸化が出来なくなっている。この不活性化されない MAP キナーゼが微小管の機能をコントロールしていると考えた。*phs1-1* 変異株中ではこの MAP キナーゼカスケードが通常より活性化されるため微小管の安定性が不安定化に変化してねじれ表現型が現れた。*phs1-2* 変異株では、PHS1 は発現していないので PHS1 が制御している全ての MAP キナーゼが不活性化されずに MAP キナーゼカスケードが活性化されたまま働くため、*phs1-2* 変異株は胚性致死という表現型になると考えた(図 33B)。MAP キナーゼによっては MKP と複数箇所結合するものもある。ショウジョウバエでは、複眼形成や羽の静脈形成の異常という表現型を示す gain of function な変異を持つ MAP キナーゼ DERK (rolled)の変異体がある。これはフォスファターゼとの結合部位のアミノ酸置換の変異である (Brunner et al, 1994; Kim et al, 2004)。

MAP キナーゼは様々な生体反応に関わっており、細胞内の色々な箇所に存在している。それに伴い MAP キナーゼを不活性化する MKP も、核内に存在するものや細胞質内に存在するもの、核内と細胞質内両方に存在するものがある。中には核内で MAP キナーゼを不活性化し、不活性化型の MAP キナーゼを細胞質内に輸送する働きを持つ MKP がある (Theodosiou and Ashworth, 2002)。また、MAP キナーゼは転写因子以外の分子をリン酸化することがあり、ERK1 や ERK2 は細胞質内で微小管と結合し、MAP2, MAP4, tau 等微小管付随タンパク質をリン酸化する MAP キナーゼもある (Gundersen and Cook, 1999)。マウスの神経細胞では JNK1 が MAP2, MAP1B の活性化と微小管の束化を制御している (Chang et al, 2003)。*mor1-1phs1-1* 二重変異株が相乗的な表現型を示すのは PHS1 が不活性化する MAP キナーゼの標的因子の 1 つが XMAP215 のホモログの MOR1 であるかも知れない。

植物ではホルモン応答や傷害応答、塩耐性等のストレス応答での MAP キナーゼカスケードが盛んに解析されている (Ichimura et al, 2000; Tena et al, 2001; Ulm et al, 2002)。ストレス応答以外にも細胞質分裂を制御している MAP キナーゼカスケードも解析されている。タバコのキネシン様タンパク質 NACK1, NACK2 は NPK1 (MAP キナーゼキナーゼキナー

ゼ)と結合して PQR カスケードと呼ばれる MAP キナーゼカスケードが活性化される (Nishihama et al, 2002; Soyano et al, 2003)。NACK1, 2 と NPK1 はフラグモプラストの赤道面に局在して細胞板形成に関わっている。PQR カスケードの MAP キナーゼキナーゼ NQK1 と NACK1 のシロイヌナズナの変異株 *atnack1* と *anq1* は細胞の多核化や不完全な細胞壁などが見られ矮性である。また、PPB が形成されない *ton2* 変異株も細胞が肥大している (Camilleri et al, 2002)。今後、PHS1 タンパク質の標的 MAP キナーゼを見つけることで植物細胞での微小管の安定性などに関わる新しい MAP キナーゼカスケードの解明につながるであろう。

参考文献

- Abe, T., Thitamadee, S., and Hashimoto, T. (2004). Microtubule defects and cell morphogenesis in the *lefty1lefty2* tubulin mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45, 211-220.
- Baskin, T.I., and Wilson, J.E. (1997). Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. *Plant Physiol.* 113, 493-502.
- Bichet, A., Desnos, T., Turner, S., Grandjean, O., and Hofte, H. (2001). *BOTERO1* is required for normal orientation of cortical microtubules and anisotropic cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant J.* 25, 137-148.
- Brunner, D., Oellers, N., Szabad, J., W.H. Biggs III, Zipursky, S.L., and Hafen, E. (1994). A gain-of-function mutation in Drosophila MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* 76, 875-888.
- Burk, D.H., Liu, B., Zhong, R., Morrison, W.H., and Ye, Z.-H. (2001). A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* 13, 807-827.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., and Bouchez, D. (2002). The Arabidopsis *TONNEAU2* gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* 14, 833-845.
- Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., and Arkinstall, S. (1998). Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* 280, 1262-1265.
- Camps, M., Nichols, A., and Arkinstall, S. (1999). Dual specificity phosphatase: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.* 14, 6-16.
- Chang, L., Jones, Y., Ellisman, M.H., Goldstein, L.S.B., and Karin, M. (2003). JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of

microtubule-associated proteins. *Dev. Cell* 4, 521-533.

Chang, W., Gruber, D., Chari, S., Kitazawa, H., Hamazumi, Y., Hosanaga, S., and Bulinski, J.C. (2001). Phosphorylation of MAP4 affects microtubule properties and cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 114, 2879-2887.

Chen, P., Hutter, D., Yang, X., Gorospe, M., Davis, R.J., and Liu, Y. (2001). Discordance between the binding affinity of mitogen-activated protein kinase subfamily members for MAP kinase phosphatase-2 and their ability to activate the phosphatase catalytically. *J. Biol. Chem.* 276, 29440-29449.

Cleary, A.L., and Smith, L.G. (1998). The *Tangled1* gene is required for spatial control of cytoskeletal arrays associated with cell division during maize leaf development. *Plant Cell* 10, 1875-1888.

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.

Desai, A., and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 83-117.

Farooq, A., Chaturvedi, G., Mujtaba, S., Plotnikova, O., Zeng, L., Dhalluin, C., Ashton, R., and Zhou, M.-M. (2001). Solution structure of ERK2 binding domain of MAPK phosphatase MKP-3: structural insights into MKP-3 activation by ERK2. *Mol. Cell* 7, 387-399.

Furutani, I., Watanabe, Y., Prieto, R., Masukawa, M., Suzuki, K., Naoi, K., Thitamadee, S., Shikanai, T., and Hashimoto, T. (2000). The *SPIRAL* genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 127, 4443-4453.

Gundersen, G.G., and Cook, T.A. (1999). Microtubules and signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 81-94.

Gupta, R., Huang, Y., Kieber, J., and Luan, S. (1998). Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from *Arabidopsis*. *Plant J.* 16, 581-589.

Hashimoto, T. (2003). Dynamics and regulation of plant interphase microtubules: a comparative view. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 1-9.

Haughn, G.W., and Somerville, C. (1986). Sulfonyleurea-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 204, 430-434.

Hirai, N., Sonobe, S., and Hayashi, T. (1998). *In situ* synthesis of β -glucan microfibrils on tobacco plasma membrane sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15102-15106.

Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., and Shinozaki, K. (2000). Various abiotic stress rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* 24, 655-665.

Ichimura, K., et al. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends plant Sci.* 7, 301-308.

Jiang, C.J., and Sonobe, S. (1993). Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein. *J. Cell Sci.* 105, 891-901.

Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S., and Gribskov, M. (2002). The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 908-925.

Kim, M., Cha, G.-H., Kim, S., Lee, J.H., Park, J., Koh, H., Choi, K.-Y., and Ching, J. (2004). MKP-3 has essential roles as a negative regulator of the Ras/ mitogen-activated protein kinase pathway during *Drosophila* development. *Mol. Cell Biol.* 24, 573-583.

Kirik, V., Grini, P.E., Mathur, J., Klinkhammer, I., Adler, K., Bechtold, N., Herzog, M., Bonneville, J.-M., and Hulskamp, M. (2002). The *Arabidopsis* *TUBULIN-FOLDING COFACTOR A* gene is involved in the control of the α/β -tubulin monomer balance. *Plant Cell* 14, 2265-2276.

Kopczak, S.D., Haas, N.A., Hussey, P.J., Silflow, C.D., and Snustad, D.P. (1992). The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed α -tubulin genes. *Plant Cell* 4,

539-547.

Kumagai, F., Nagata, T., Yahara, N., Moriyama, Y., Horio, T., Naoi, K., Hashimoto, T., Murata, T., and Hasezawa, S. (2003). γ -tubulin distribution during cortical microtubule reorganization at the M/ G₁ interface in tobacco BY-2 cells. *Eur. J. Cell Biol.* 82, 43-51.

Liu, B., Marc, J., Joshi, H.C., and Palevitz, B.A. (1993). A γ -tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Sci.* 104, 1217-1228.

Lloyd, C., and Chan, J. (2004). Microtubules and the shape of plants to come. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 13-22.

Luan, S. (2003). Protein phosphatases in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 63-92.

Masuda, K., Shima, H., Katagiri, C., and Kikuchi, K. (2003). Activation of ERK induces phosphorylation of MAPK phosphatase-7, a JNK specific phosphatase, at Ser-446. *J. Biol. Chem.* 278, 32448-32456.

Mayer, U., Herzog, U., Berger, F., Inze, D., and Jurgen, G. (1999). Mutations in the PILZ group genes disrupt the microtubule cytoskeleton and uncouple cell cycle progression from cell division in *Arabidopsis* embryo and endosperm. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 100-108.

Mizuno, K. (1992). Induction of cold stability of microtubules in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 100, 740-748.

Monroe-Augustus, M., Zolman, B.K., and Bartel, B. (2003). IBR5, a dual-specificity phosphatase-like protein modulating auxin and abscisic acid responsiveness in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 2979-2991.

Nakajima, K., Furutani, I., Tachimoto, H., Matsubara, H., and Hashimoto, T. (2004). *SPIRAL1* encodes a plant-specific microtubule-localized protein required for directional control of rapidly expanding *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* Accepted.

Nishihama, R., Soyano, T., Ishikawa, M., Araki, S., Tanaka, H., Asada, T., Irie, K., Ito, M.,

Terada, M., Banno, H., Yamazaki, Y., and Machida, Y. (2002). Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/ MAPKKK complex. *Cell* 109, 87-99.

Park, S.K., and Twell, D. (2001). Novel patterns of ectopic cell plate growth and lipid body distribution in the *Arabidopsis gemini pollen1* mutant. *Plant Physiol.* 126, 899-909.

Shaw, S.L., Kamyar, R., and Ehrhardt, D.W. (2003). Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* 300, 1715-1718.

Smertenko, A., Saleh, N., Igarashi, H., Mori, H., Hauser-Hahn, I., Jiang, C.J., Sonobe, S., Lloyd, C.W., and Hussey, P.J. (2000). A new class of microtubule-associated proteins in plants. *Nat. Cell Biol.* 2, 750-753.

Smith, L.G., Gerttula, S.M., Han, S., and Levy, J. (2001). TANGLED1: A microtubule binding protein required for the spatial control of cytokinesis in maize. *J. Cell Biol.* 152, 231-236.

Snustad, D.P., Haas, N.A., Kopczak, S.D., and Silflow, C.D. (1992). The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed *b*-tubulin genes. *Plant Cell* 4, 549-556.

Soyano, T., Nishihama, R., Morikiyo, K., Ishikawa, M., and Machida, Y. (2003). NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Gen. Dev.* 17, 1055-1067.

Sugimoto, K., Williamson, R.E., and Wasteneys, G.O. (2000). New techniques enable comparative analysis of microtubule orientation, wall texture, and growth rate in intact roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124, 1493-1506.

Sugimoto, K., Himmelsbach, R., Williamson, R.E., and Wasteneys, G.O. (2003). Mutation or drug-dependent microtubule disruption causes radial swelling without altering parallel cellulose microfibril deposition in *Arabidopsis* root cells. *Plant Cell* 15, 1414-1429.

Tanoue, T., Yamamoto, T., and Nishida, E. (2002). Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases. *J. Biol. Chem.* 277, 22942-22949.

- Tena, G., Asai, T., Chiu, W.-L., and Sheen, J. (2001). Plant mitogen-activated protein kinases signaling cascades. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 392-400.
- Theodosiou, A., and Ashworth, A. (2002). MAP kinase phosphatases. *Genome Biol.* 3, 3009.1-3009.10.
- Thitamadee, S., Tsuthihara, K., and Hashimoto, T. (2002). Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature* 417, 193-196.
- Tian, G.-W., Smith, D., Gluck, S., and Baskin, T.I. (2004). Higher plant cortical microtubule array analyzed in vitro in the presence of the cell wall. *Cell Motil. Cytoskeleton* 57, 26-36.
- Tonks, N.K., and Neel, B.G. (2001). Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 182-195.
- Ulm, R., Revenkova, E., di Sansebastiano, G.-P., Bechtold, N., and Paszkowski, J. (2001). Mitogen-activated protein kinase phosphatase is required for genotoxic stress relief in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 15, 699-709.
- Ulm, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Peck, S.C., Zhu, T., Wang, X., Shinozaki, K., and Paszkowski, J. (2002). Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *EMBO J.* 21, 6483-6493.
- Wasteneys, G.O. (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J. Cell Sci.* 115, 1345-1354.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., and Waterhouse, P.M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27, 581-590.
- Whittington, A.T., Vugrek, O., Wei, K.J., Hasenbein, N.G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M.C., and Wasteneys, G.O. (2001). MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* 411, 610-613.

Xu, Q., Fu, H., Gupta, R., and Luan, S. (1998). Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphatase encoded by a stress-responsive gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 849-857.

Zhou, B., and Zhang, Z.-Y. (1999). Mechanism of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 activation by ERK2. *J. Biol. Chem.* 274, 35526-35534.

Zhou, B., Wu, L., Shen, K., Zhang, J., Lawrence, D. S., and Zhang, Z.-Y., (2001). Multiple regions of MAP kinase phosphatase 3 are involved in its recognition and activation by ERK2. *J. Biol. Chem.* 276, 6506-6515.

Zuo, J., Niu, Q.-W., and Chua, N.-H. (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* 24, 265-274.

石田喬志　ねじれをひきおこすチューブリン変異の解析　（修士論文、2004）

金子弥生　微小管機能に関わるアラビドプシス変異体の解析　（修士論文、2003）

成田典之　シロイヌナズナねじれ変異遺伝子 *SPR2* の解析　（修士論文、2002）

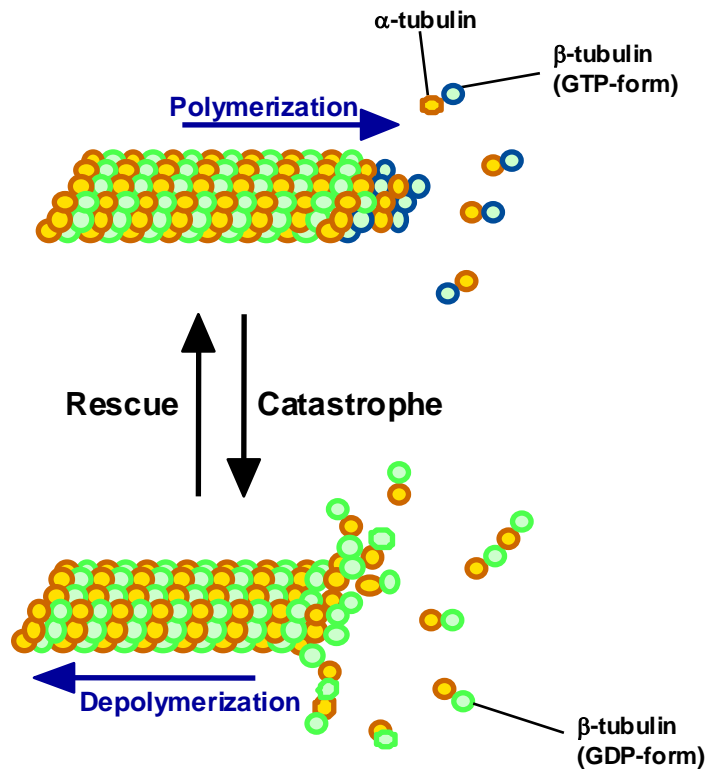


図1 微小管の動的不安定性

微小管の両端では絶えず重合・脱重合が起きている。重合では α -、 β -tubulinヘテロ二量体の β -tubulinに結合しているGDPがGTPになって重合する。そのため重合が起きている微小管の端では β -tubulinにはGTPが結合しているためGTP-capと呼ばれている。重合して微小管に取り込まれた β -tubulinは結合していたGTPがGDPに戻る。脱重合では β -tubulinはGDPのまま微小管からtubulinヘテロ二量体のpolymerが剥がれ落ちる。

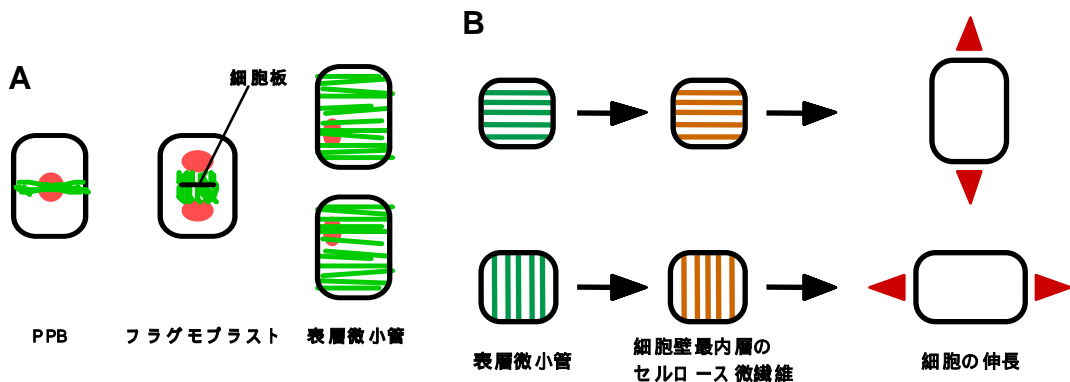


図2 細胞骨格と細胞の伸長方向

A 植物特有の微小管構造。preprophase band (PPB)は細胞周期のG2期に細胞板が形成される位置に現れる。後期から終期に移行するときにフラグモプラストが現れて細胞板が形成される。間期の植物細胞では微小管は細胞質表層付近に存在し、細胞の伸長方向を制御している。

B 表層微小管と細胞壁最内層のセルロース微繊維が横に配向するときは細胞は縦方向に伸長し、表層微小管とセルロース微繊維が縦に配向するときは細胞は横に伸長する。

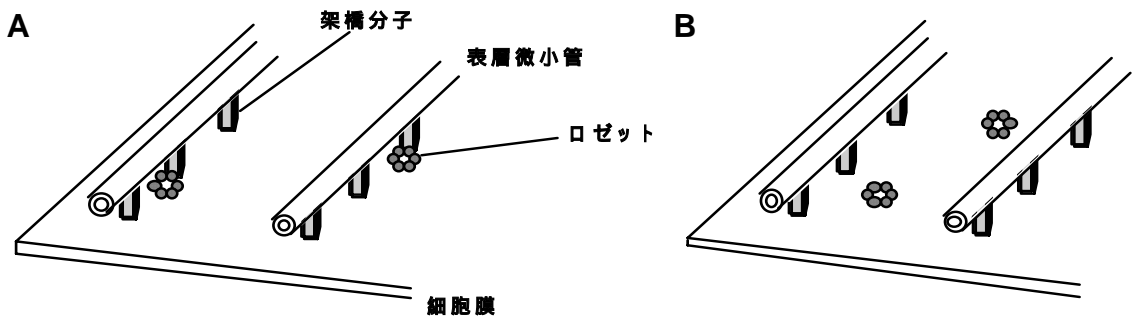


図3 表層微小管によるセルロース微繊維の配向制御

A モノレール説。細胞膜上に存在するセルロース合成酵素の複合体であるロゼットが表層微小管と細胞膜をつなぐ架橋分子と結合してロゼットの動きが固定されている。

B ガードレール説。各々の表層微小管の間にロゼットが存在し、動く範囲は制限されるがその範囲以内では自由に動き回れる。

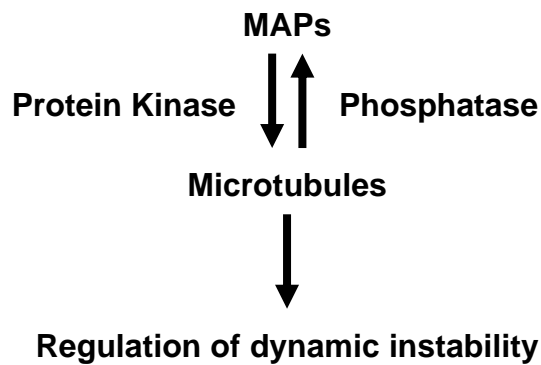


図4 微小管と微小管付随タンパク質

微小管に結合する微小管付随タンパク質(MAP)の中には微小管の動的不安定性を制御するものがある。MAPの微小管への結合にはMAPのリン酸化、脱リン酸化が関わっている。

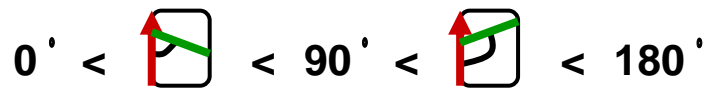


図5 表層微小管の配向角度

表層微小管の配向している角度を測定するのに細胞の伸長方向を180度として左肩上がりの配向を0度から90度、右肩上がりの配向は90度から180度と設定した。

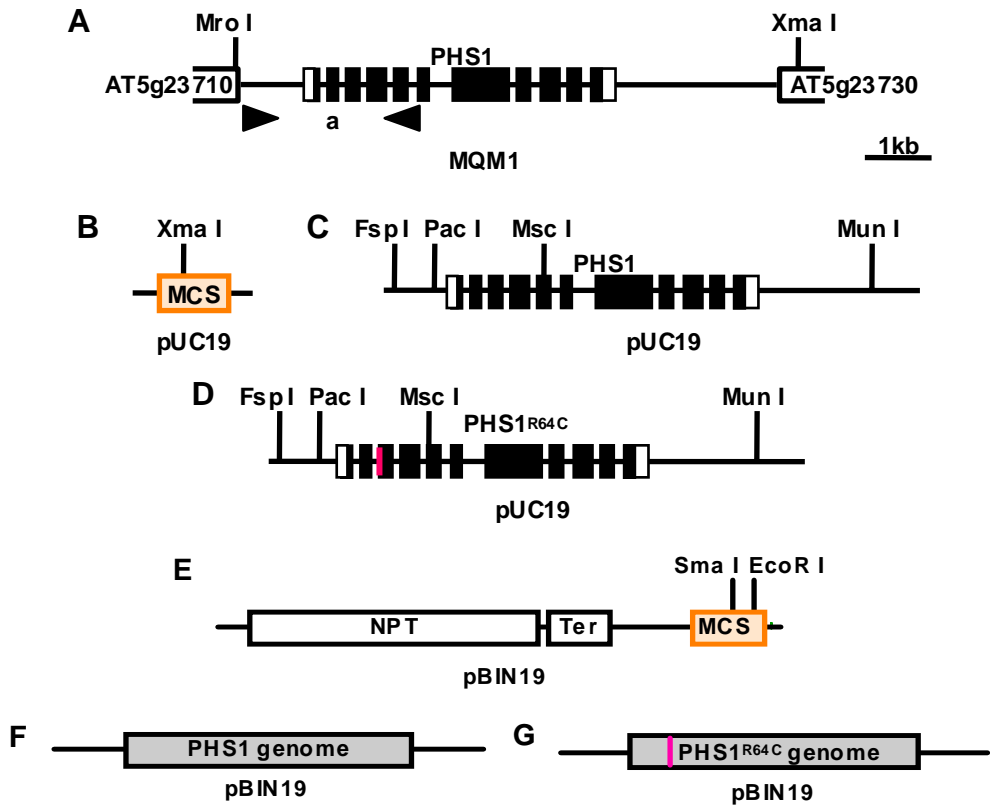


図6 PHS1ゲノムのサブクローニング
矢頭はPCRプライマーを、ピンク色は変異を示している。

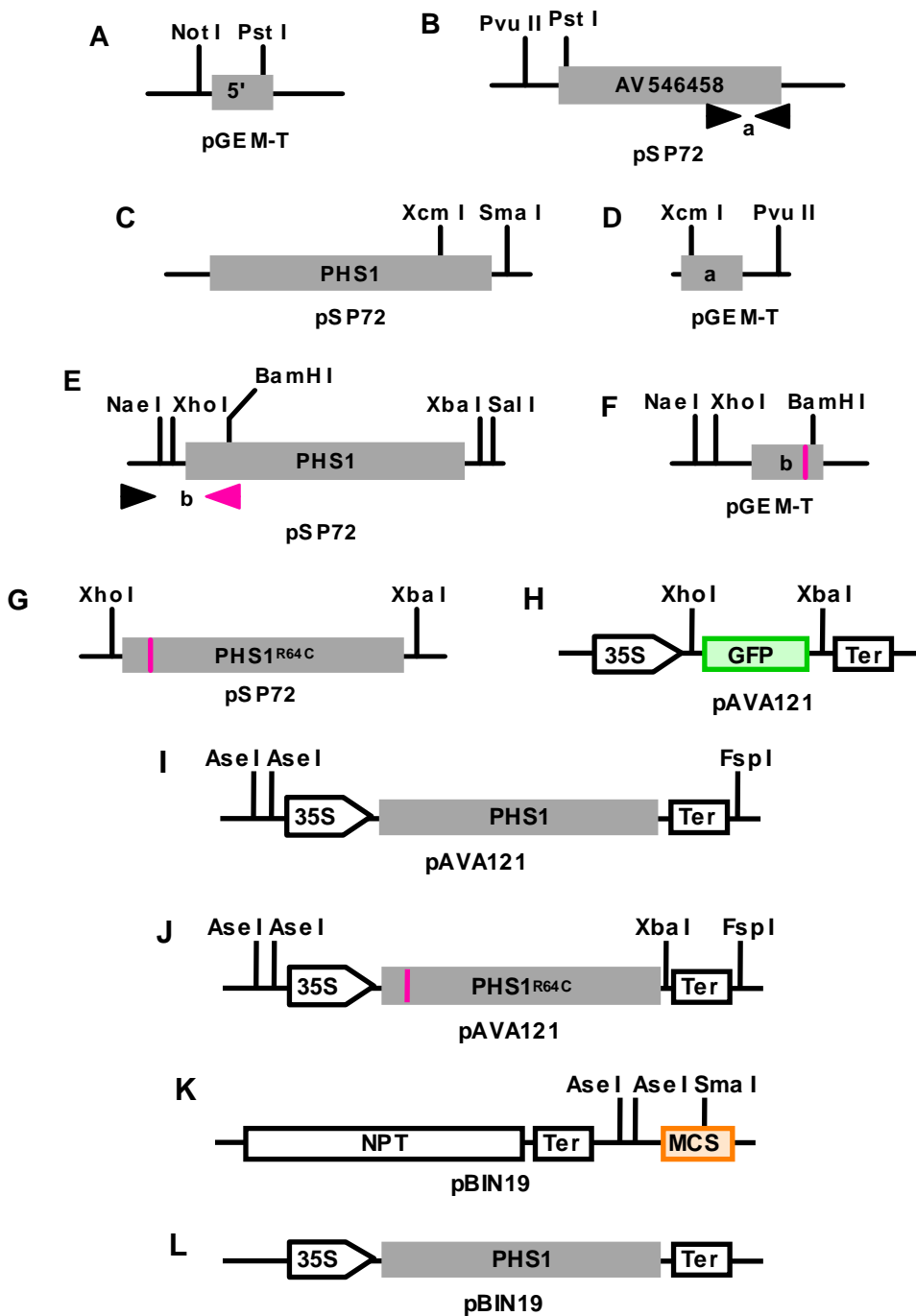


図7 PHS1 cDNAゲノムのサブクローニング
 矢頭はPCRプライマーを、ピンク色はR64C変異を示している。

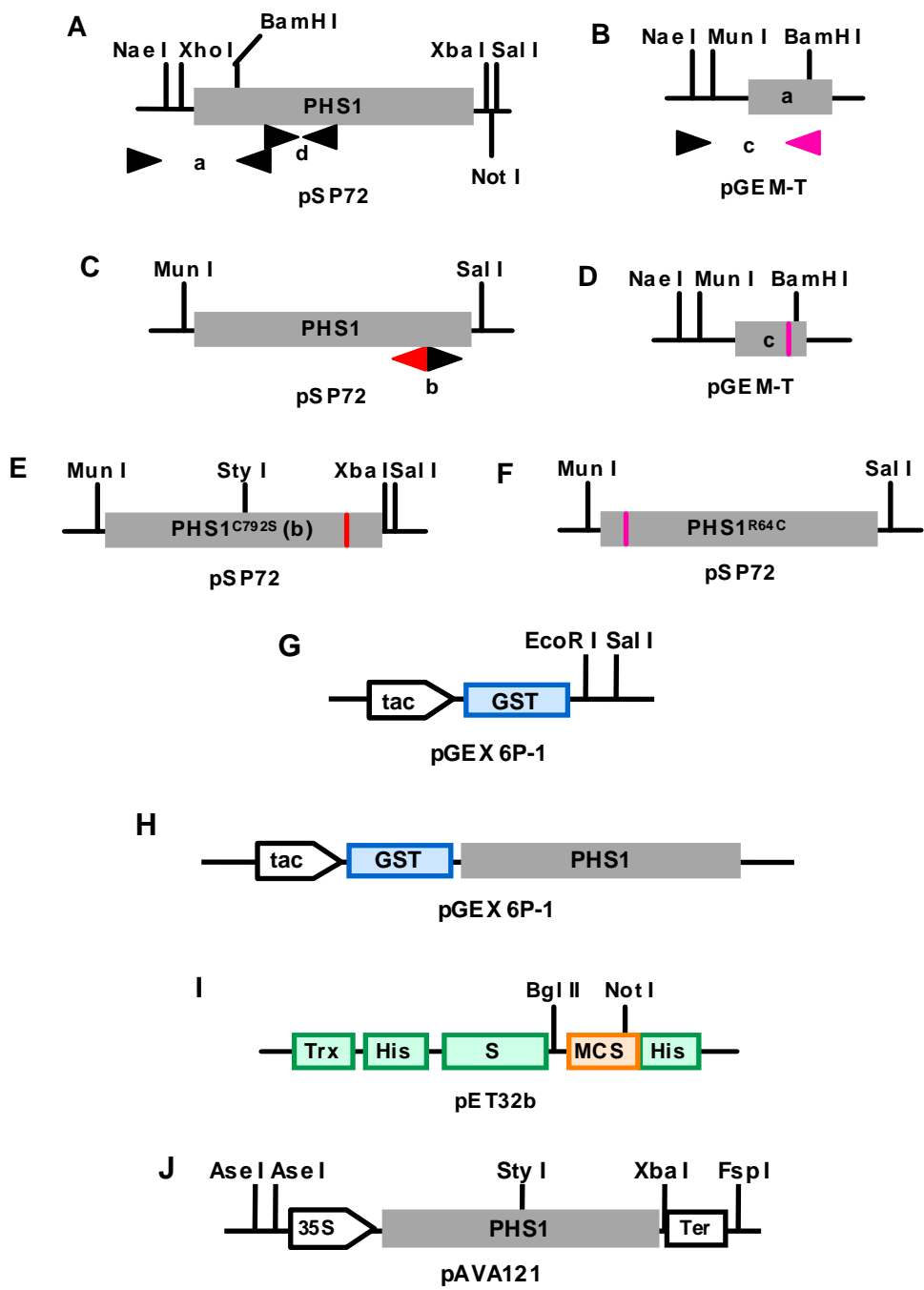


図8-1 PHS1 cDNAゲノムのサブクローニング

矢頭はPCRプライマーを、ピンク色はR64C変異を赤色はC792S変異を示している。

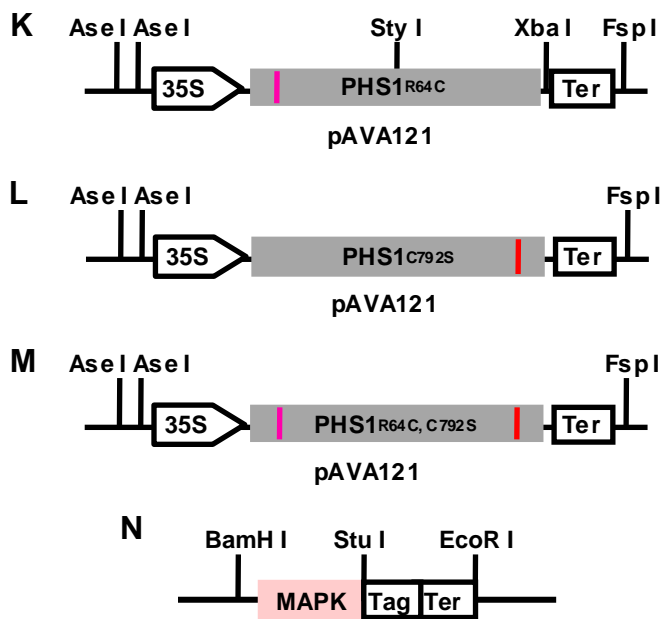


図8-2 PHS1 cDNAゲノムのサブクローニング
 矢頭はPCRプライマーを、ピンク色はR64C変異を赤色はC792S変異を示している。

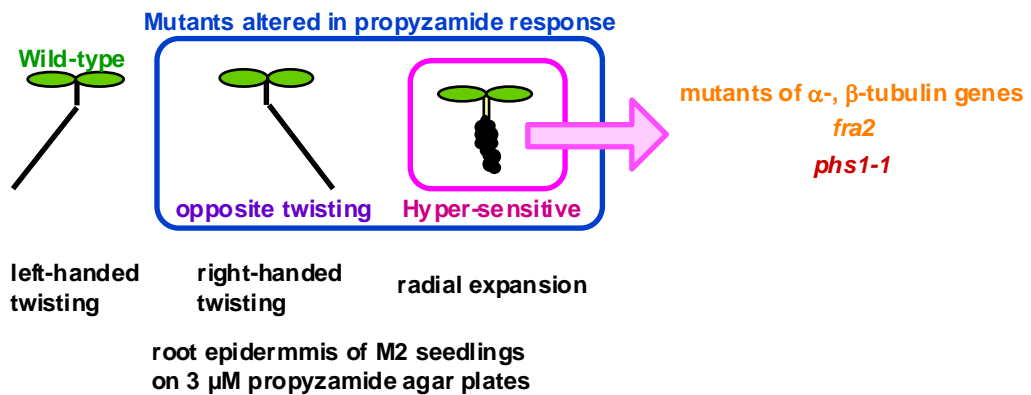


図9 スクリーニング

3 μ Mのプロピザミド添加培地上で生育させた野生株は左巻きにねじれる。そこで、変異原処理をしたM2、もしくはT-DNAタグを挿入したラインで右巻きにねじれるものや細胞肥大を起こしている変異株を単離した。細胞肥大を起こしている変異株には、 α -, β -tubulin遺伝子に変異が入ったものや*fra2*のアレル等があった。

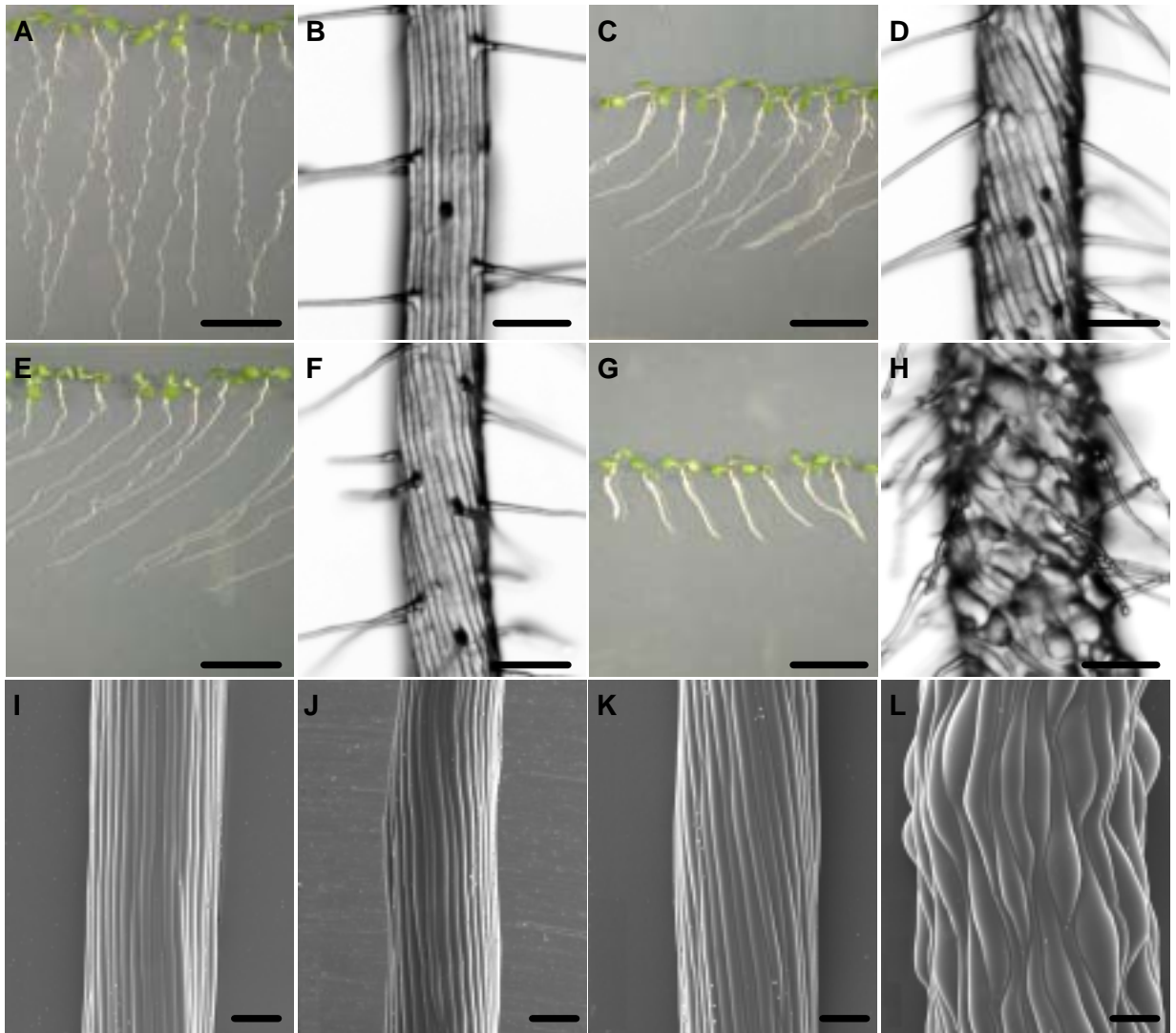


図10 *phs1-1*変異株の表現型

A-H 明所で育てた7日目の幼植物。薬剤無添加時のCol (A)と*phs1-1* (C)とその時の根の表皮細胞層(B, D)。3 μ Mのプロピザミド添加時のCol (E)と*phs1-1* (G)とその時の表皮細胞層(F, H)。

I-L 暗所で育てた5日目の幼植物の黄化胚軸。22 で育てたCol (I)と*phs1-1* (K)。28 で育てたCol (J)と*phs1-1* (L)。バーの長さ A, C, E, G = 1 cm, B, D, F, H, I-L = 100 μ m。

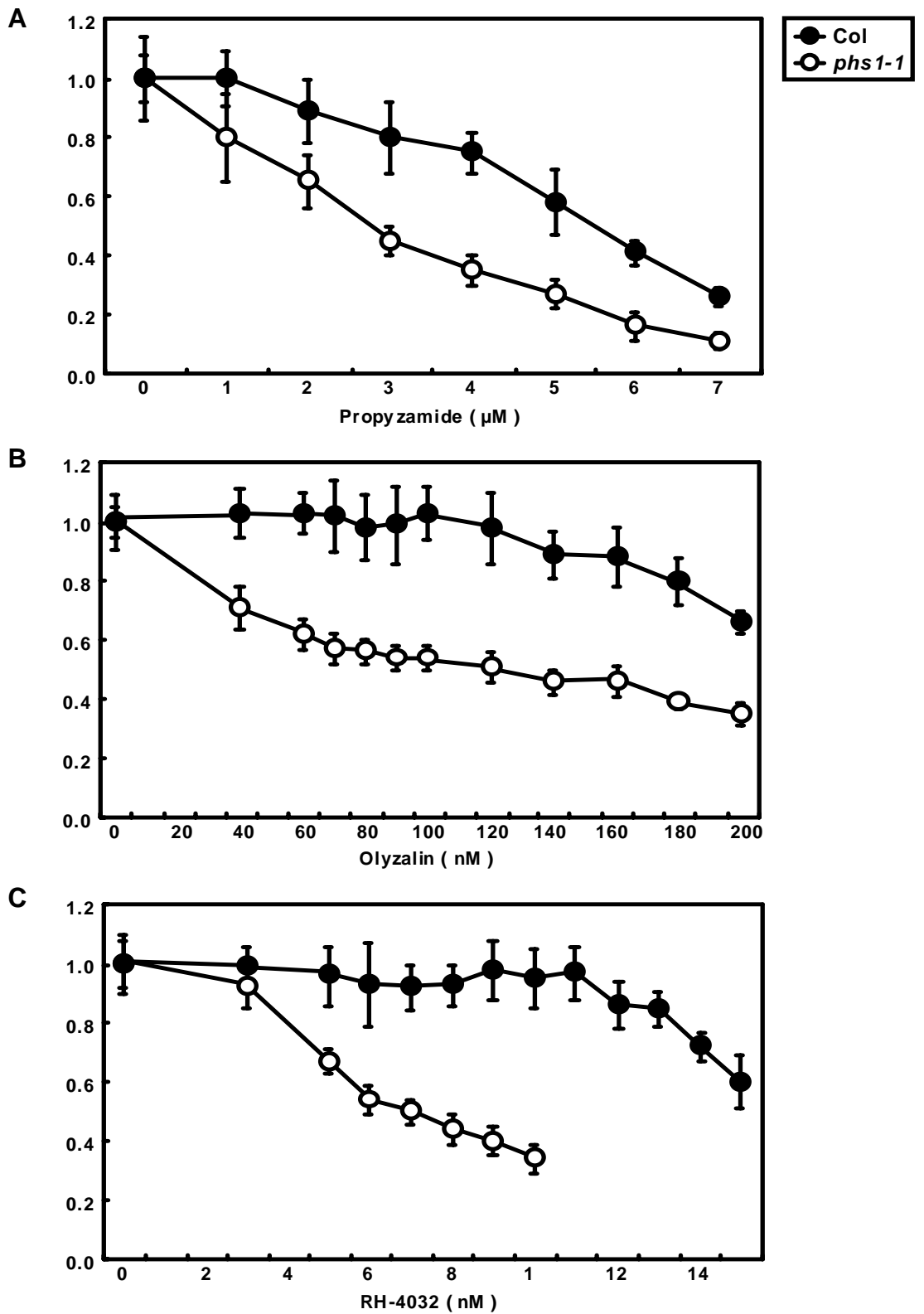


図11-1 *phs1-1*変異株の薬剤感受性
 x軸は各薬剤の濃度でy軸は各植物体の薬剤無添加時の根の長さに対する各濃度での根の長さの比。

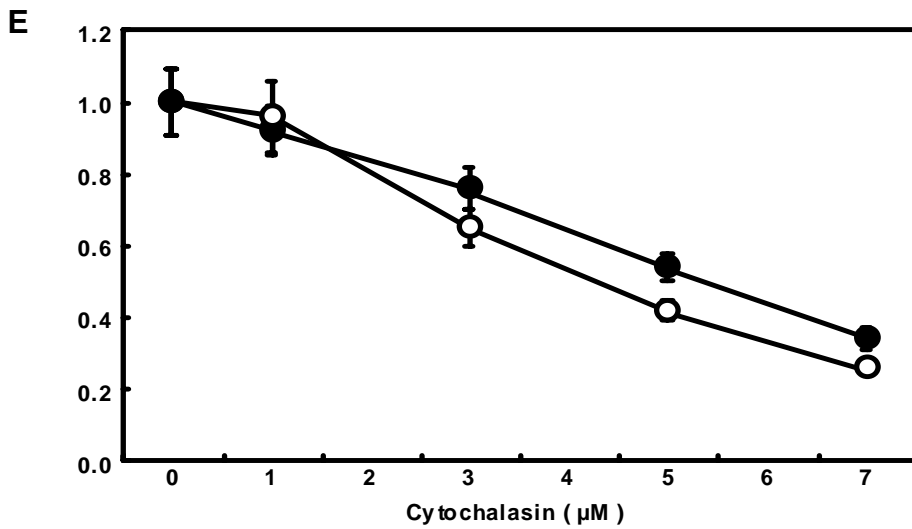
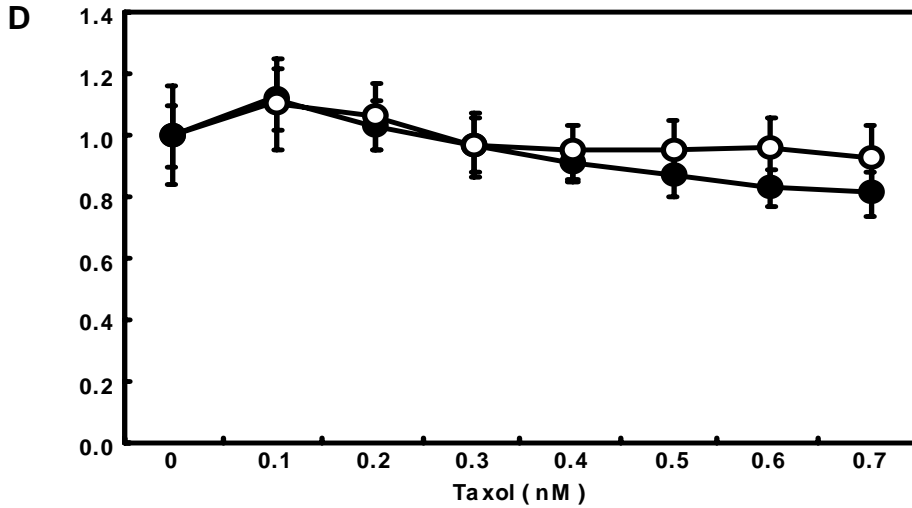


図11-1 *phs1-1*変異株の薬剤感受性
 x軸は各薬剤の濃度でy軸は各植物体の薬剤無添加時の根の長さに対する各濃度での根の長さの比。

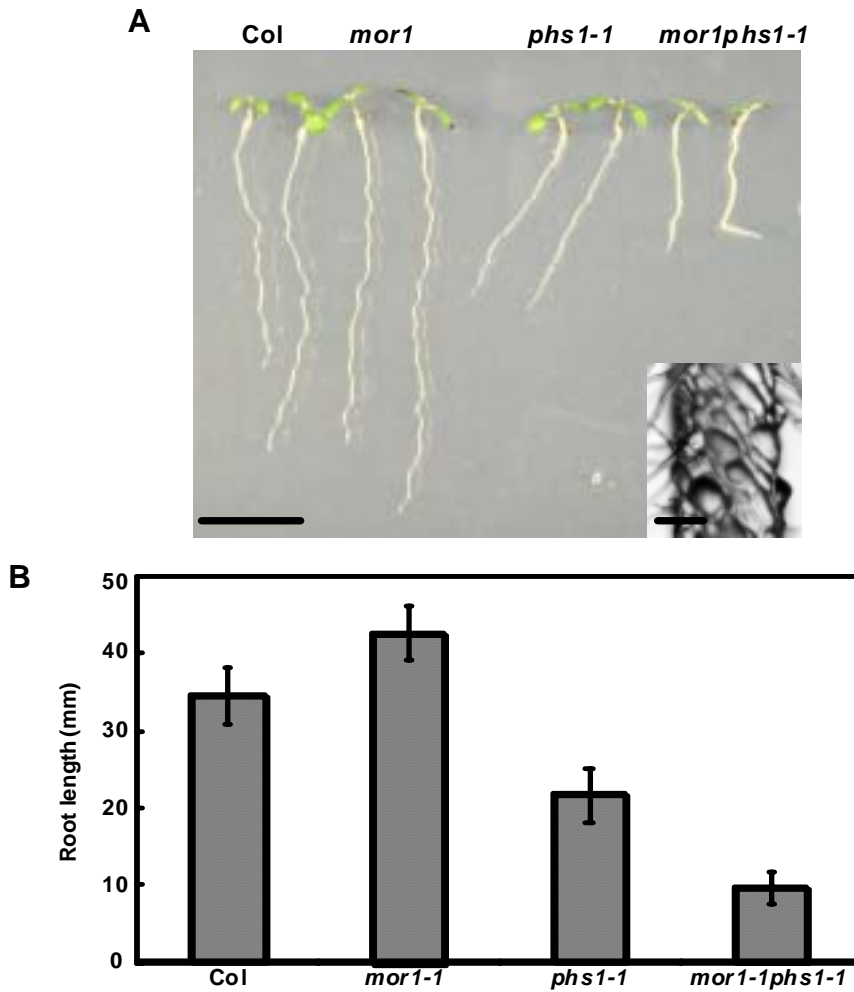


図12 *mor1-1phs1-1*二重変異株の根の表現型

A 7日目の幼植物, 右下の図は*mor1-1phs1-1*の根の表皮細胞層。バーの長さ 1 cm, 右下の図は100 μ m。

B 7日目の各植物体幼植物の根の長さ。

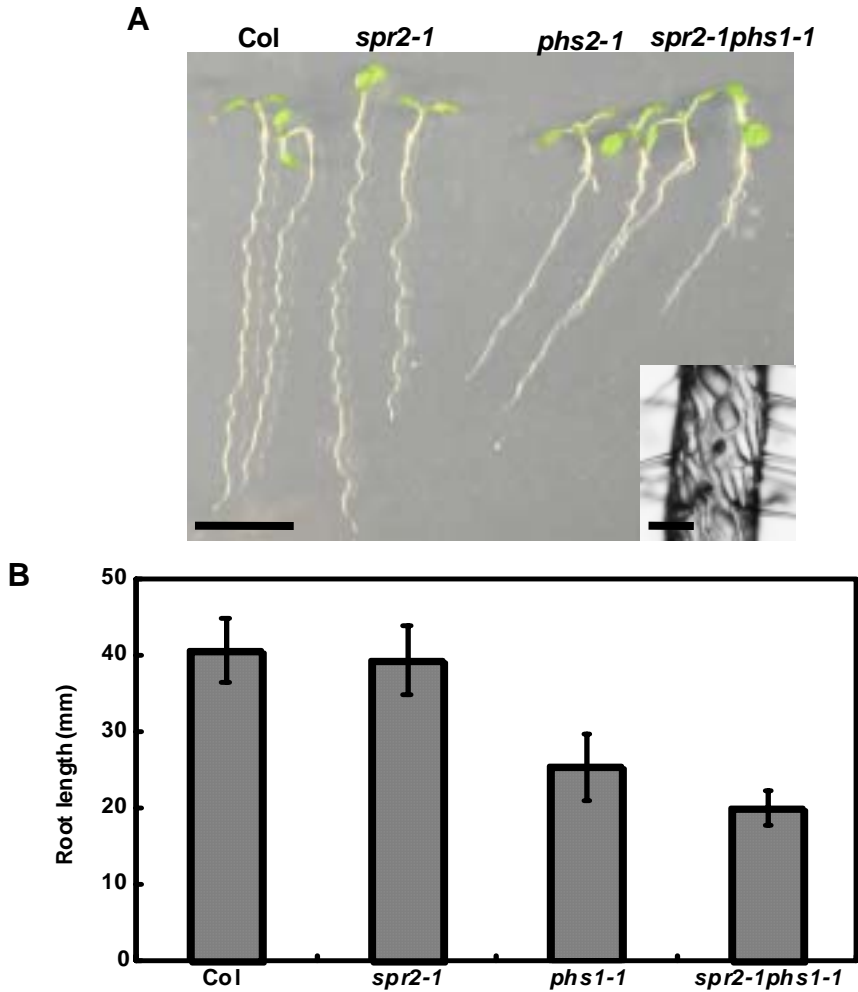


図13 *spr2-1phs1-1*二重変異株の根の表現型

A 7日目の幼植物。右下の図は*spr2-1phs1-1*の根の表皮細胞層。バーの長さ 1 cm、右下の図は100 μ m。

B 7日目の各植物体幼植物の根の長さ。

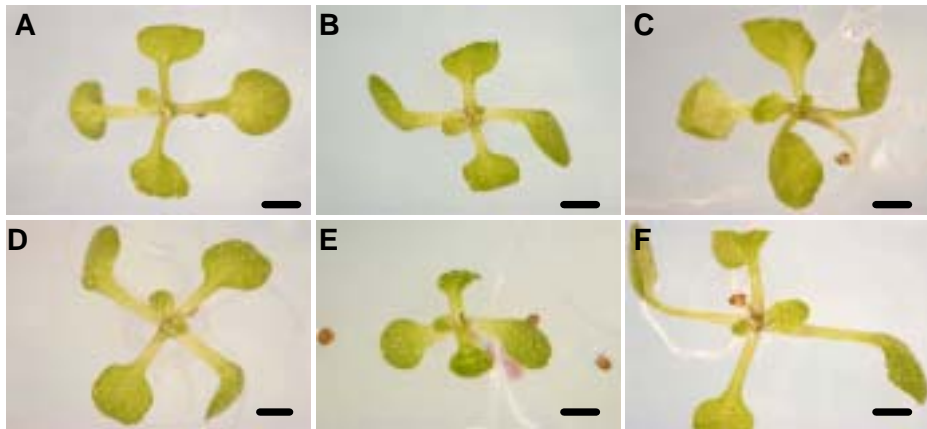


図14 二重変異株の地上部の表現型
 薬剤無添加培地で10日目の幼植物の子葉のねじれ。バーの長さ 1 mm。
 A Col, B *mor1-1*, C *spr2-1*, D *phs1-1*, E *mor1-1phs1-1*, F *spr2-1phs1-1*

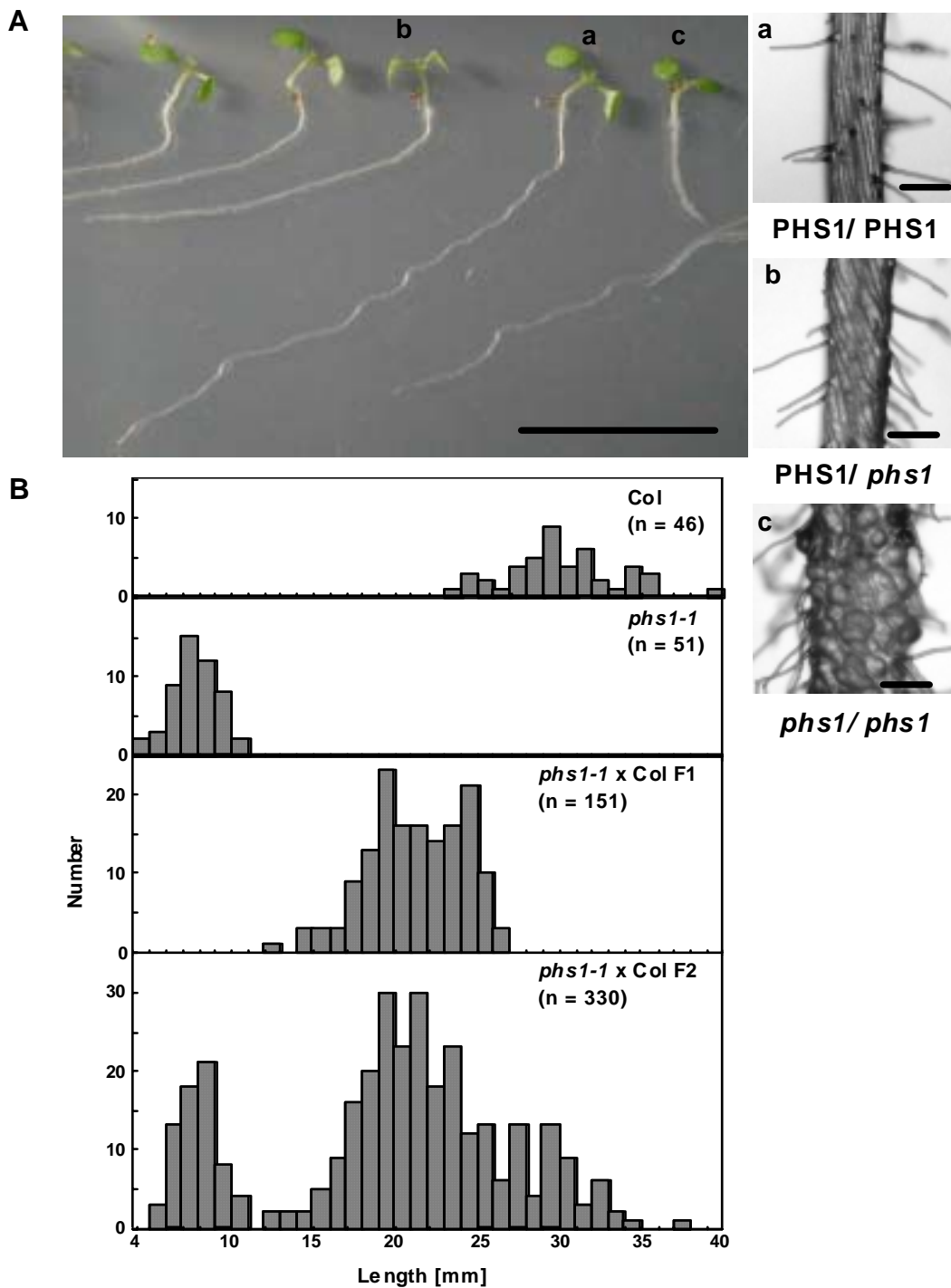


図15 *phs1-1* x Col F2幼植物のプロピザミドに対する反応

A 3 μ Mのプロピザミド添加培地で育てた7日目のF2幼植物(左図)とその時観られる根の表皮細胞層(右図)で図の下に各々の表現型に対する遺伝型を記した。バーの長さ 左図 = 1 mm, 右図 = 100 μ m。

B 3 μ Mのプロピザミド添加培地で育てた7日目の各幼植物の根の長さ別個体数。

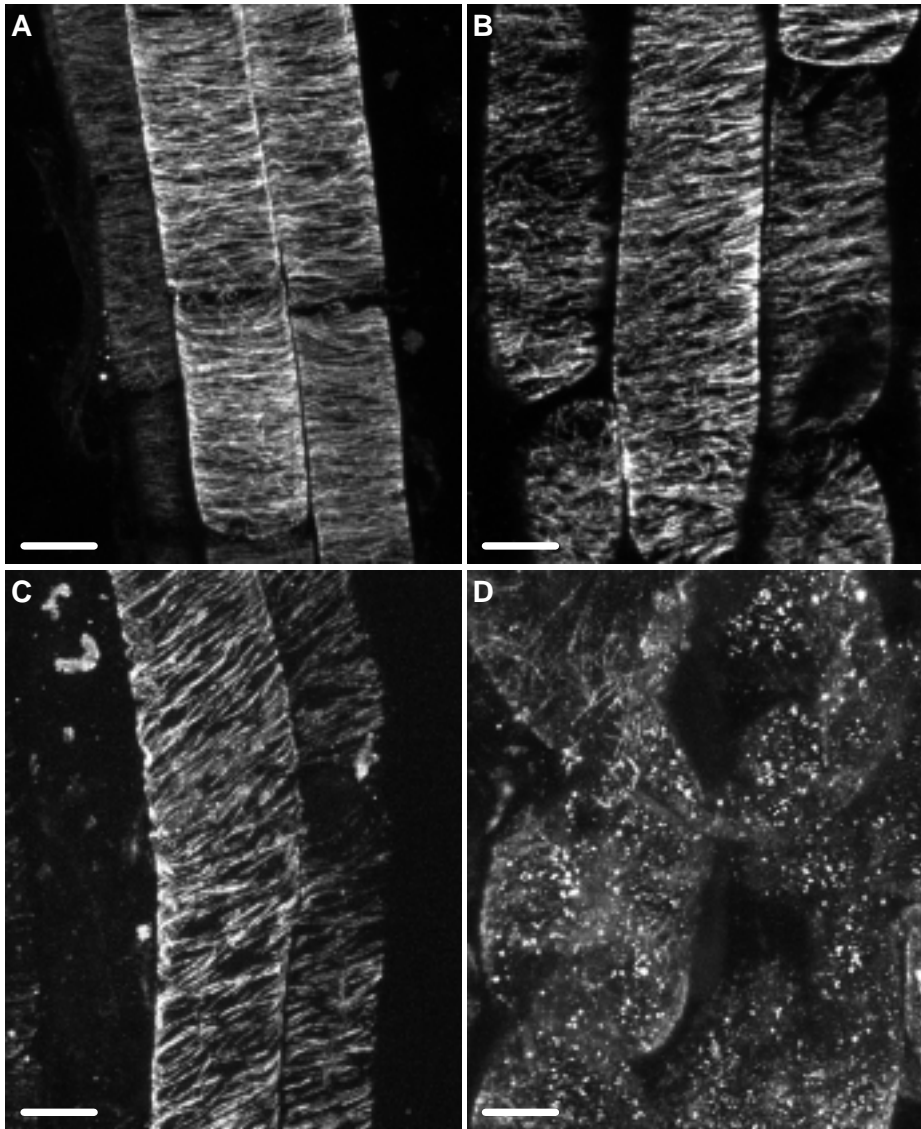


図16 *phs1-1* 幼植物の表層微小管の配向

4日目の幼植物の根の表層微小管で、伸長領域の表皮細胞層の細胞である。薬剤無添加時のCol (A)と*phs1-1* (B)と150 nMのオリザリン添加時のCol (C)と*phs1-1* (D)。Dでは左上の細胞に繊維状の表層微小管を確認することができる。バーの長さは全て 10 μm 。

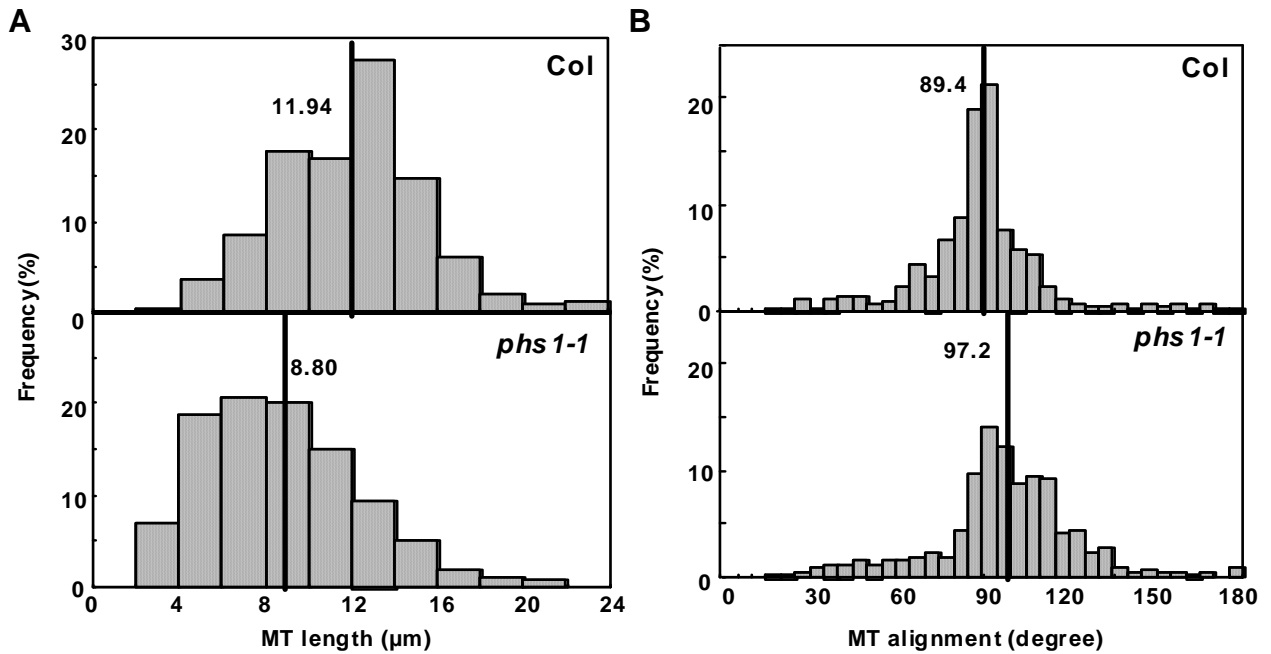


図17 *phs1-1* 幼植物の表層微小管の配向角度と長さ

A 表層微小管の長さ。正面の面に見えている表層微小管だけを測定しているのだからそれ以上長く側面にまで伸びている場合は側面部分は測定していない。グラフ中の値は各々の平均値。

B 表層微小管の配向している傾き。細胞の伸長方向に対して左肩上がりを90度以下、右肩上がりを90度以上として測定した。グラフ中の値は各々の平均値。

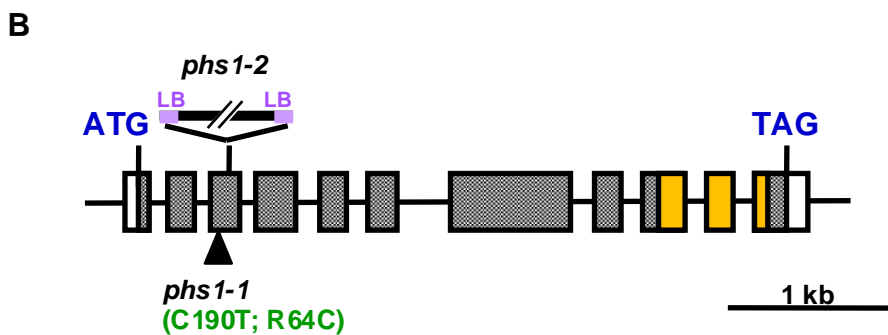
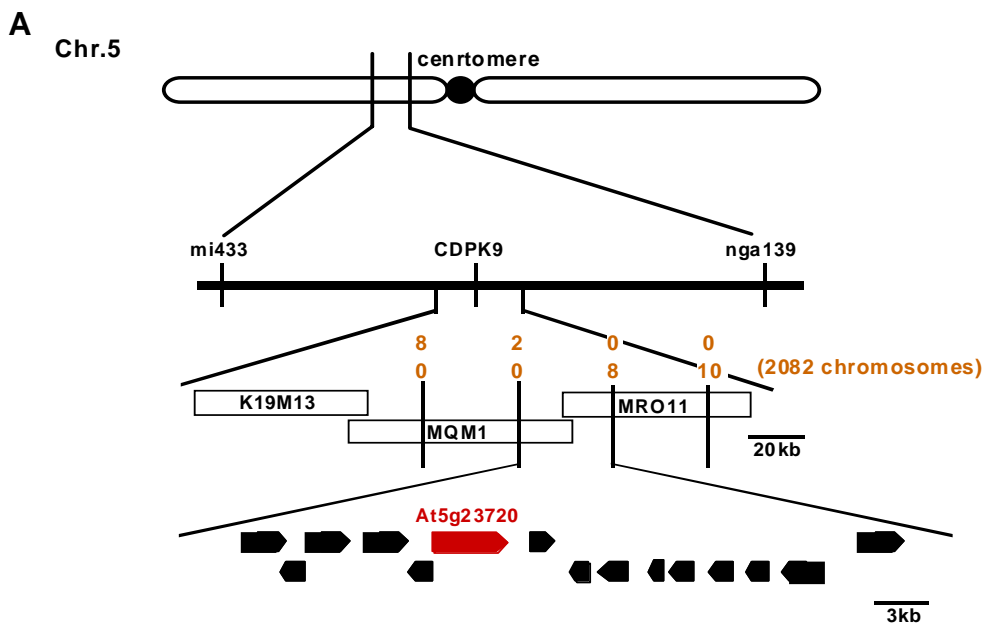


図18 *PHS*遺伝子の同定

A *phs1-1*変異株のマッピングを行った結果、*PHS*遺伝子は第5番染色体の中央よりやや北側よりあるBACのMQM1とMRO11上の63 kbの領域にマップされ、この領域に含まれるORFをシーケンスで読んだところ、At5g23720に変異が入っていた。

B *PHS*遺伝子は11のエキソンと10のイントロンからなり、C末領域にDsPTP1と相同性があった(黄色い領域)。*phs1-1*変異株は第3エクソンに変異があり、*phs1-2*変異株のT-DNAタグも第3エクソンに挿入されていた。

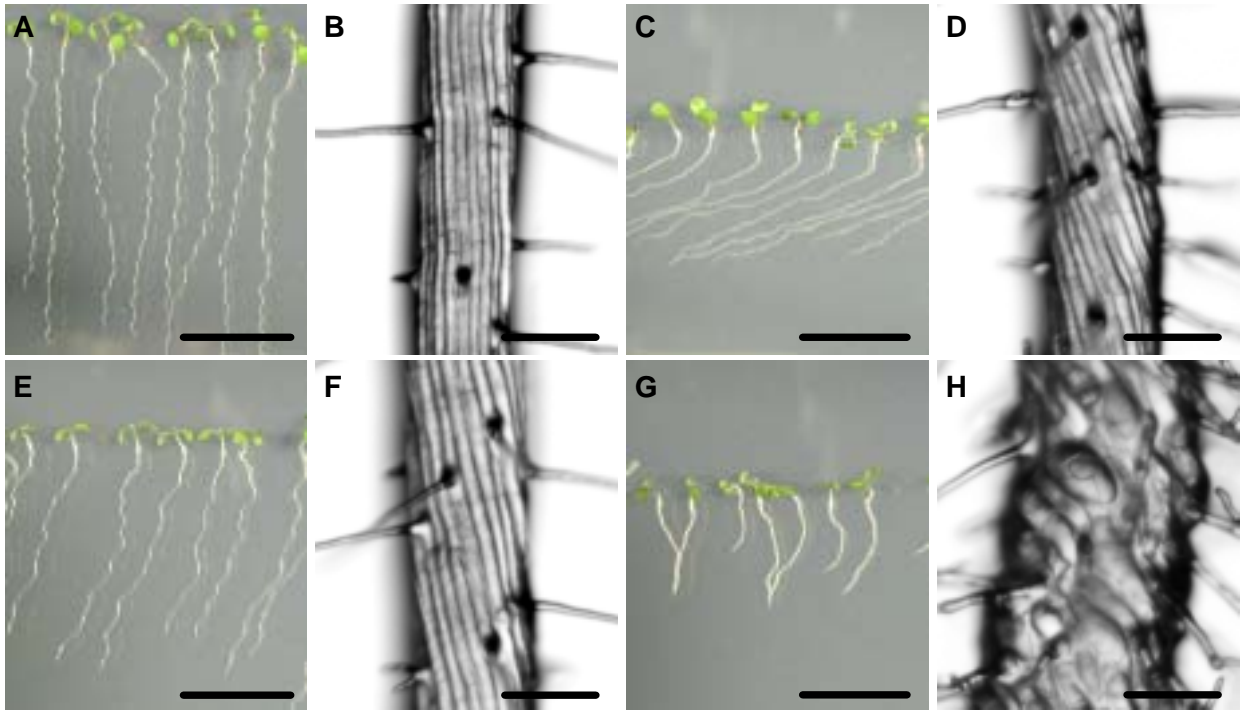


図19 *phs1-1*変異株の相補試験

薬剤無添加培地 (A, E) と 3 μ M プロビザミド添加培地 (C, G) で育てた 7 日目の形質転換植物体の幼植物とその根の表皮細胞層 (B, D, F, H)。

A-D PHS1ゲノムを *phs1-1* 変異株に入れた形質転換植物体。

E-H PHS1^{RG4C}ゲノムを Col に入れた形質転換植物体。

バーの長さ A, C, E, G = 1 cm, B, D, F, H = 100 μ m。

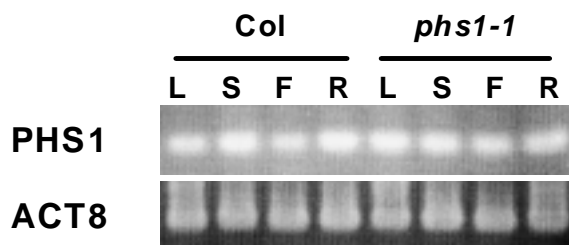


図20 *PHS1*遺伝子の発現量

Colと*phs1-1*変異での各組織別の*PHS1*遺伝子の発現量をRT-PCRで調べた。コントロールにアクチン遺伝子*ACT8*を用いた。L = 葉, S = 茎, F = 花・さや, R = 根。

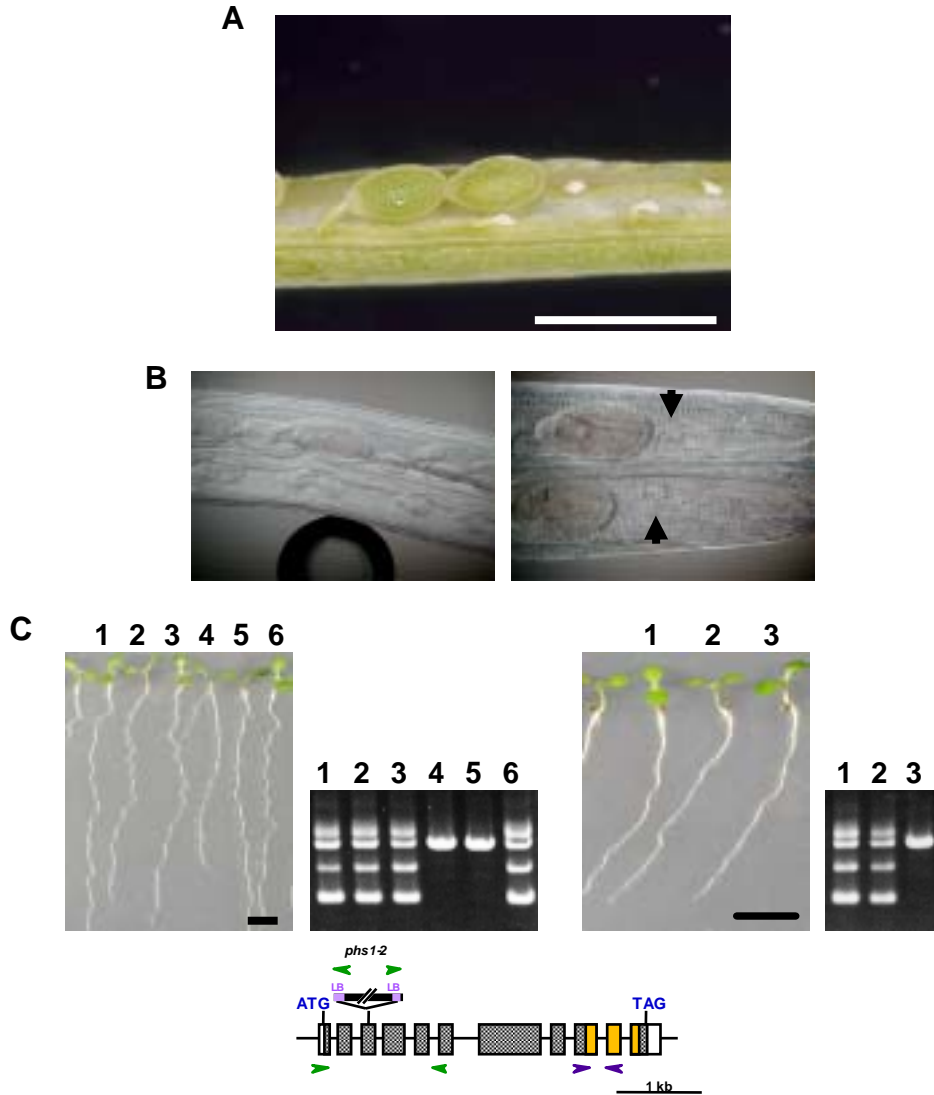


図21 *phs1-2*変異株の表現型と遺伝型

A *phs1-2*変異株のヘテロ接合体植物の自家受粉したさや。発生途中で死んだ種子が観られる。バーの長さ 1 mm。

B *phs1-2*ヘテロ接合体植物の透明化処理をしたさや。左図では初期球状胚の種子とそれより発育の遅い小さい種子が観られ、右図では後期球状胚、心臓型胚の種子とつぶれて死んでいる種子(矢印)が観られる。

C 左端の図は*phs1-2*ヘテロ接合体植物の7日目のF1幼植物。各個体の遺伝型は4と5は野生型でこの2つ以外の4個体は*phs1-2*ヘテロ接合体であった(左から2番目の図)。右から2番目の図は7日目の*phs1-2* x *phs1-1* F2幼植物で全て左巻きねじれであった。遺伝型を確認すると、1と2は*phs1-1*と*phs1-2*のヘテロ接合体で3は*phs1-1*のホモ接合体であった(右端の図)。バーの長さ 5 mm。PCRには3種類のプライマーを用いた(下端の図中の緑色の矢頭でT-DNAタグの両端のプライマーは同じもの)。紫色の矢頭はRT-PCR(図20)で用いたプライマーの位置。

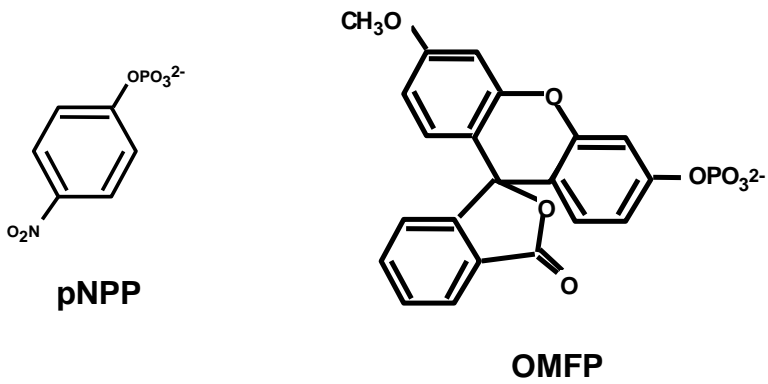


図22 フォスファターゼの人工基質
各々の吸収波長はpNPPが405 nmでOMFPは477 nmである。

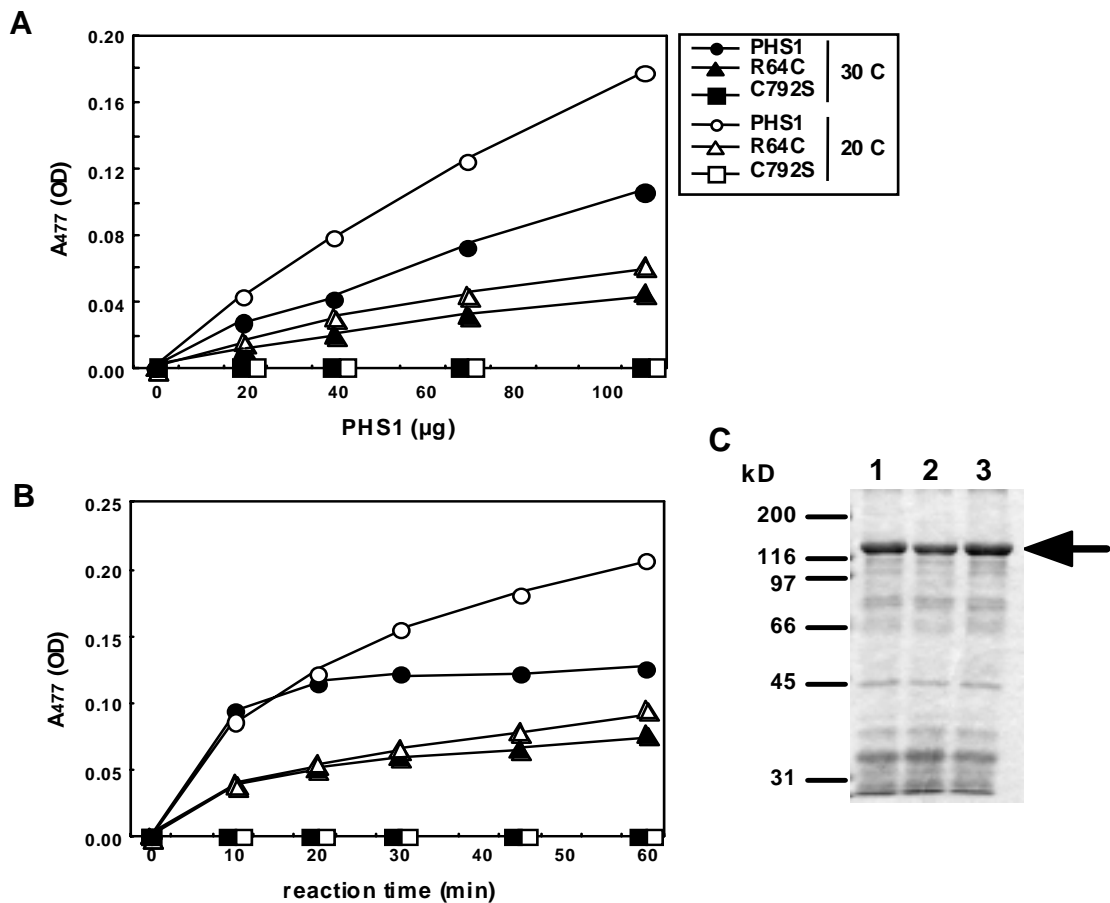


図23 *in vitro*でのPHS1タンパク質のフォスファターゼ活性

PHS1タンパク質(丸)と変異タンパク質、R64C(三角)とC792S(四角)のフォスファターゼ活性を20 (白色)と30 (黒色)で測定した。

A OMFPと1時間反応させてから測定した。

B PHS1 60 mgを用いて測定した。

C 大腸菌で過剰発現させたGST融合タンパク質(矢印)を用いた。1 GST-PHS1, 2 GST-PHS1^{R64C} (R64C), 3 GST-PHS1^{C792S} (C792S)。

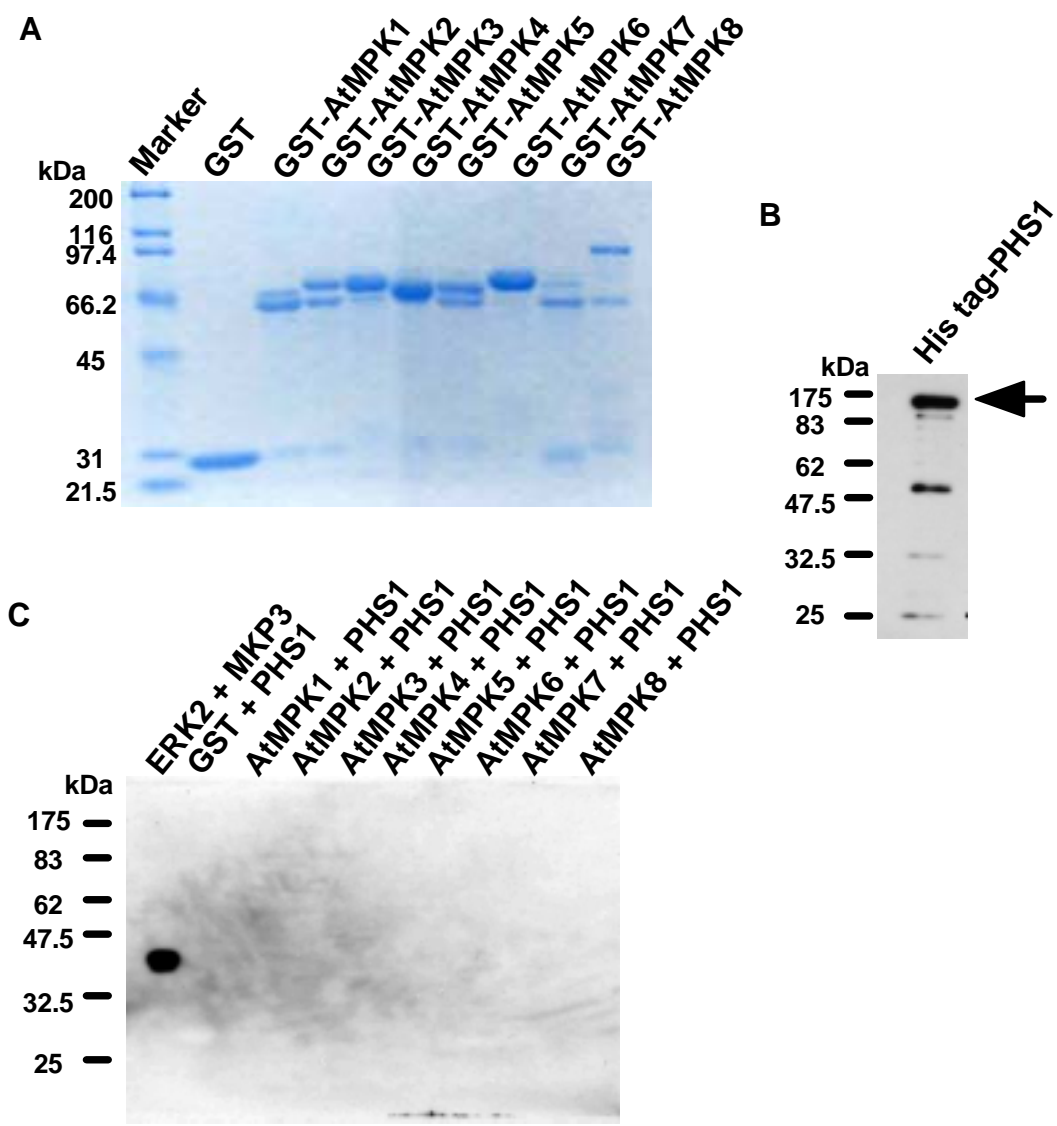


図24 PHS1タンパク質とMAPキナーゼの結合能

A GST融合MAPキナーゼのCBB染色。

B His tag融合PHS1のウェスタンブロットティング。抗His tag抗体を一次抗体に使用。

C PHS1とMAPキナーゼの共沈実験。抗His tag抗体を一次抗体に使用。ERK2とMAPキナーゼはGST融合でMKP3とPHS1はHis tag融合。

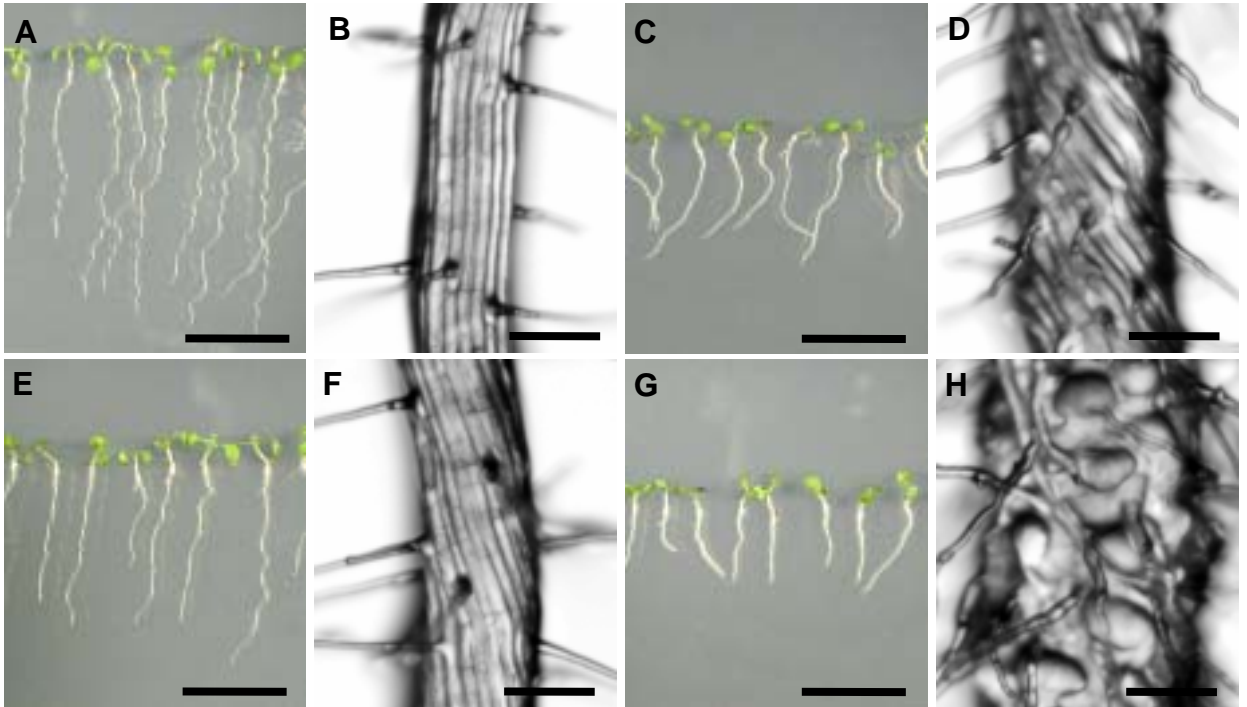


図25 *phs1-1*変異株の相補試験

薬剤無添加培地 (A, E) と $3 \mu\text{M}$ プロビザミド添加培地 (C, G) で育てた7日目の形質転換植物体の幼植物とその根の表皮細胞層 (B, D, F, H)。

A-D 35S::PHS1 cDNAを*phs1-1*変異株に入れた形質転換植物体。

E-H 35S::PHS1^{R64C} cDNAをColに入れた形質転換植物体。

バーの長さ A, C, E, G = 1 cm, B, D, F, H = 100 μm 。

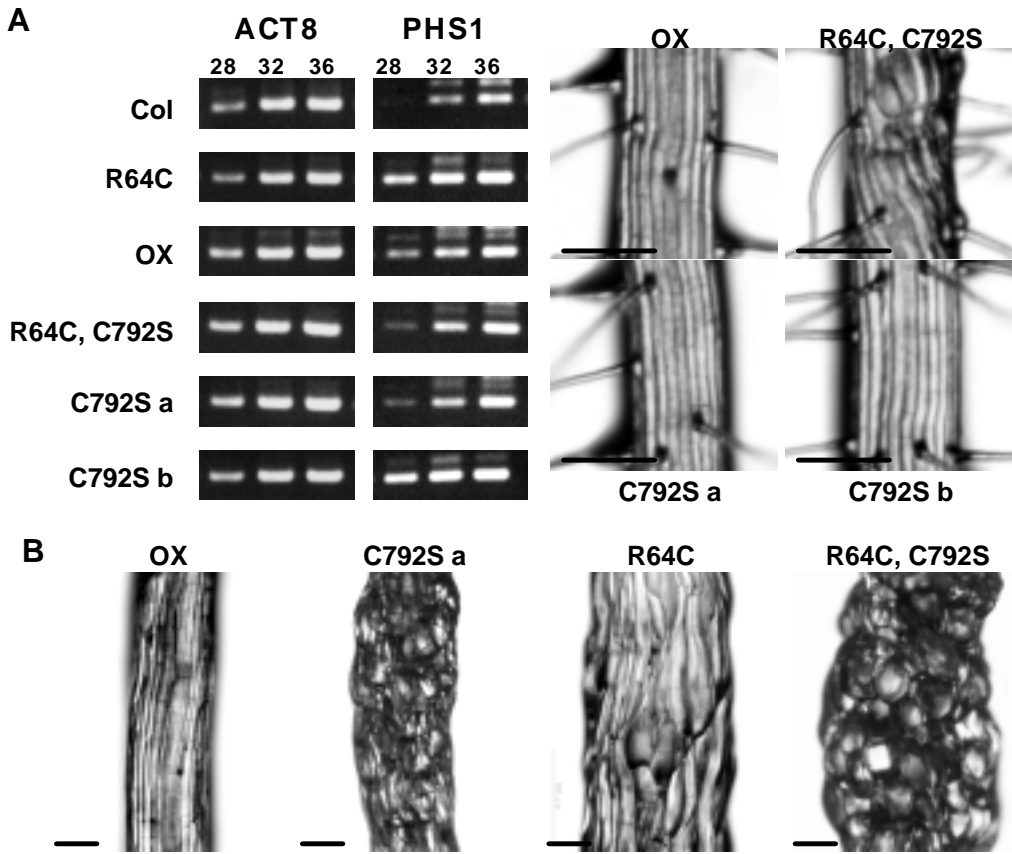


図26 形質転換植物体とPHS1遺伝子の発現量

A 左図の電気泳動の写真はRT-PCRの結果である。RNA発現量のコントロールとしてアクチン遺伝子ACT8を用いた。RT-PCRは28,32,36サイクルで行った。右図は7日目の幼植物の根の表皮細胞層である。バーの長さ 100 μm 。

B 5日目の幼植物の黄化胚軸である。バーの長さ 200 μm 。

OX; 35S::PHS1 cDNA in Col, R64C; 35S::PHS1^{R64C} cDNA in Col, C792S; 35S::PHS1^{C792S} cDNA in Col, R64C, C792S; 35S::PHS1^{R64C, C792S} cDNA in Col

A

	MAP kinase docking domain	substrate MAPKs
MKP-1	T I V R R R A K G A	p38 JNK/ SAPK ERK
MKP-2	T I V R R R A K G S	
PAC-1	A L L R R R A R G P	
MKP-3	G I M L R R L Q K G	ERK
Pyst2	G L M L R R L R K G	
MKP-4	A L L L R R L R R G	
hVH3	S V V L R R A R G G	
MKP-5	K I S R R R L Q Q G	p38 JNK/ SAPK ERK
MKP-7	K L M K R R L Q Q I	
hVH5	K L V K R R L Q Q G	

B

	<i>phs1-1</i> (R64C)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	D L V R K R S A T Y
<i>Medicago truncatula</i>	Q L V R K R T S K Y
<i>Solanum tuberosum</i>	E L V R K R S S K Y
<i>Lotus corniculatus</i>	Q L V R R R T A K Y
<i>Oryza sativa</i>	S L V R K R S G A F

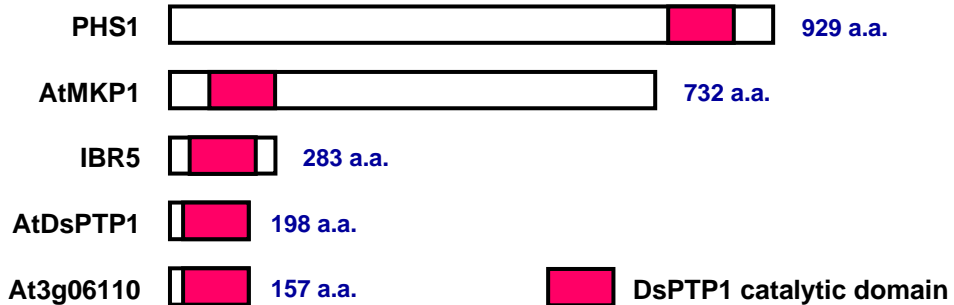
図27 MKPのMAPキナーゼとの結合部位

赤色は塩基性アミノ酸で緑色は疎水性アミノ酸である。

A 動物のMKPにはN末領域にキナーゼ結合部位があり、正電荷を帯びたアミノ酸残基が2,3個並び、その両隣りは疎水性アミノ酸残基に富んでいる。

B シロイヌナズナ以外の高等植物にも動物のMKPのN末領域にあるキナーゼ結合部位と似た配列を持つPHS1ホモログ等がある。

A



B

AtDsPTP1	DNVPSLIEGG	LYLGGVRAAS	NKAVLKSYNV	THILTVASS	L---RPAHPD	93
At3g86110	-----IQGG	LFIGGVRAE	NKDFLKSSNI	THVLTVAVA	L---APPVPD	67
PHS1	TEKPSMIQEM	LFIGGGLAAR	SIVTLNHLGI	THVLCCLCAE	IGQSDTQVPD	758
AtMKP1	DDVGENPHPP	TPS [*] AKTGER	LKLDLSTGG	RYTDKSSGLA	KREKIAFFDK	141
IBR5	AFPSEILPEF	LYLGGVDNRS	RSELLKTGGI	SAVLA---TVP	R---CQNLVRR	93
AtDsPTP1	DFVYKVVVVV	DKEDTLENV	FDECVDFIDE	AKRQGGVVLV	HC [*] FVGRSRV	143
At3g86110	DFVYKV-----	-----IEVY	FDECVDFIDG	RIQSGGGVVLV	HC [*] FVGRSRV	107
PHS1	LFEVQNF [*] SIT	DDEDSNIESI	FQENLDFIKH	GEETGGKILV	HC [*] FEGGRSRV	888
AtMKP1	ECSKVADHIY	DSPSEDITSI	LYDVFOYFED	VREQSRIFV	HC [*] CGVSRST	191
IBR5	SFTVHGL----	---DREKVLQ	FDDRIKFLDG	CEKDKRIVLV	HC [*] SGGGRSP	137
AtDsPTP1	TIVVAVLAKK	HGRTLAQALQ	HVKSRRPVAS	PHNDF-----	-----	178
At3g86110	TIVVAVLAKK	HGMGFSKARE	LVRSRRHGRV	PHNDF-----	-----	142
PHS1	TVVAVLALQ	KKLTLLERAS	KLAKVHARRQ	PHNDF-----	-----	835
AtMKP1	SLVAVLARR	EGQSFDDAFQ	VYKSRAGIAD	PHNDFACQLL	QCQKRVHAFP	241
IBR5	RVVAVLAKR	KGMRLAESHQ	WVKRRPSTD	ISPDK-----	-----	172

図28 シロイヌナズナのDsPTP1ファミリー

A シロイヌナズナのゲノム中でDsPTP1と相同性がある遺伝子はPHS1遺伝子を含めて5つあり、そのうち3つの遺伝子は既に解析されている。

B DsPTP1ファミリーのフォスファターゼドメイン。下線部位の配列がフォスファターゼ活性部位でその中のシステイン(星印)をセリンに置換すると失活する。相同性の高い箇所は網目を掛けて、5つ全てが同じアミノ酸残基の箇所はボックスで囲っている。

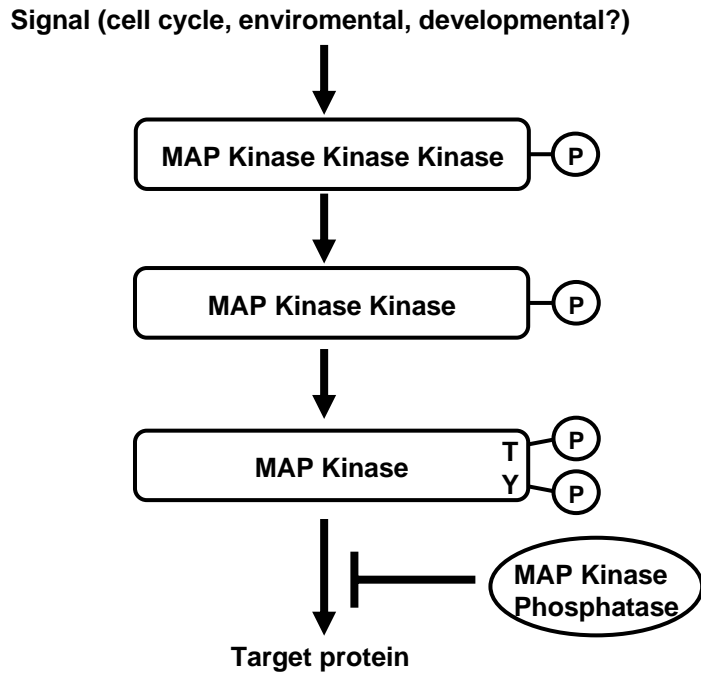


図29 MAPキナーゼカスケード

或るシグナルによりMAPキナーゼキナーゼキナーゼが活性化され、MAPキナーゼキナーゼをリン酸化する。活性化されたMAPキナーゼキナーゼはMAPキナーゼをリン酸化し、活性化されたMAPキナーゼは標的分子に働きかける。MKPはリン酸化されたMAPキナーゼを不活性化することでMAPキナーゼカスケードの流れを止める。

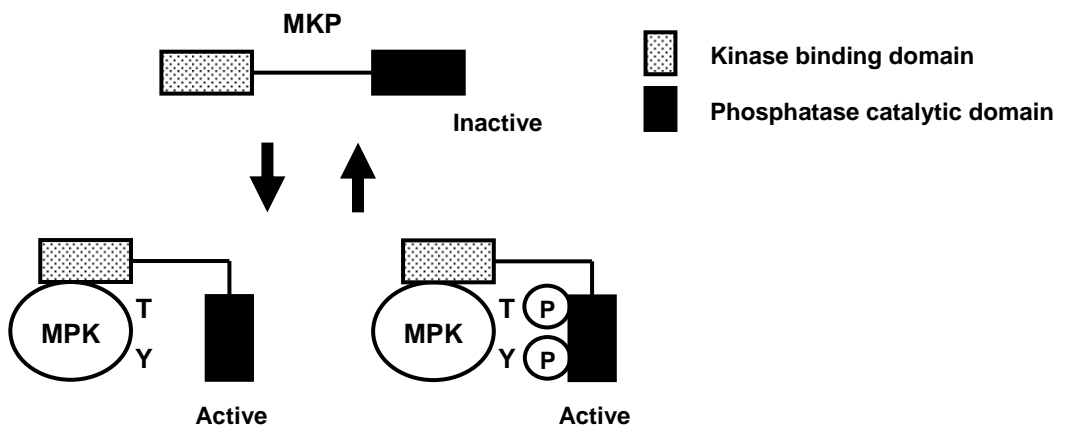


図30 MAPキナーゼフォスファターゼの活性化

MAPキナーゼフォスファターゼはMAPキナーゼが結合していないときには不活性だが、MAPキナーゼがリン酸化されている、されていないに関係なくMAPキナーゼが結合すると活性化される。

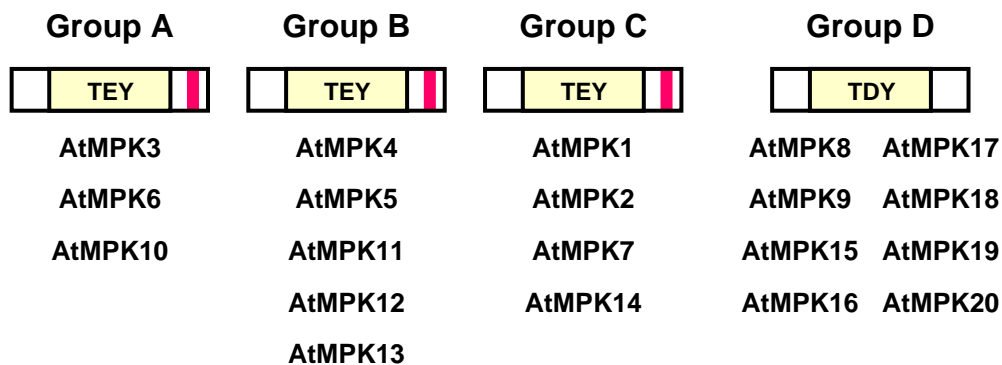


図31 シロイヌナズナのMAPキナーゼ

シロイヌナズナのMAPキナーゼは20個見つかっており、大きく4つのグループに分けられる。黄色いボックスはキナーゼ部位で、MAPキナーゼキナーゼやフォスファターゼが結合するCD domainをピンク色のボックスで示した。グループDはキナーゼ部位のチロシンとスレオニンの間のアミノ酸残基が他の3つのグループとは異なり、またCD domainを持たない。

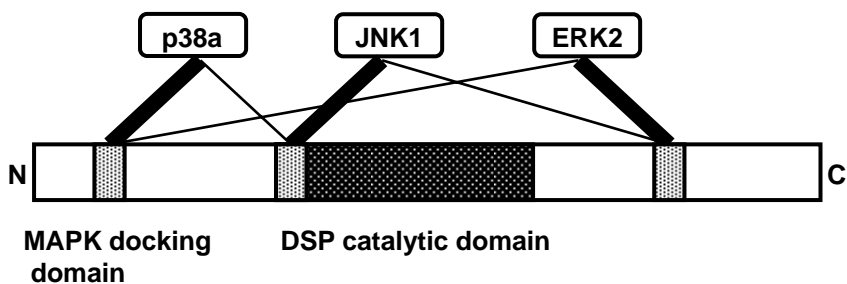


図32 MKP7のMPK結合部位

MKP7にはKinase docking domainがN末側とフォスファターゼ活性部位の2ヶ所と他にC末側にも似たような配列が存在する。JNK1とp38a、ERK2はMKP7のそれぞれ異なるKinase docking domainと強く結合し(太線)、その箇所以外にも弱く結合する箇所がある(細線)。

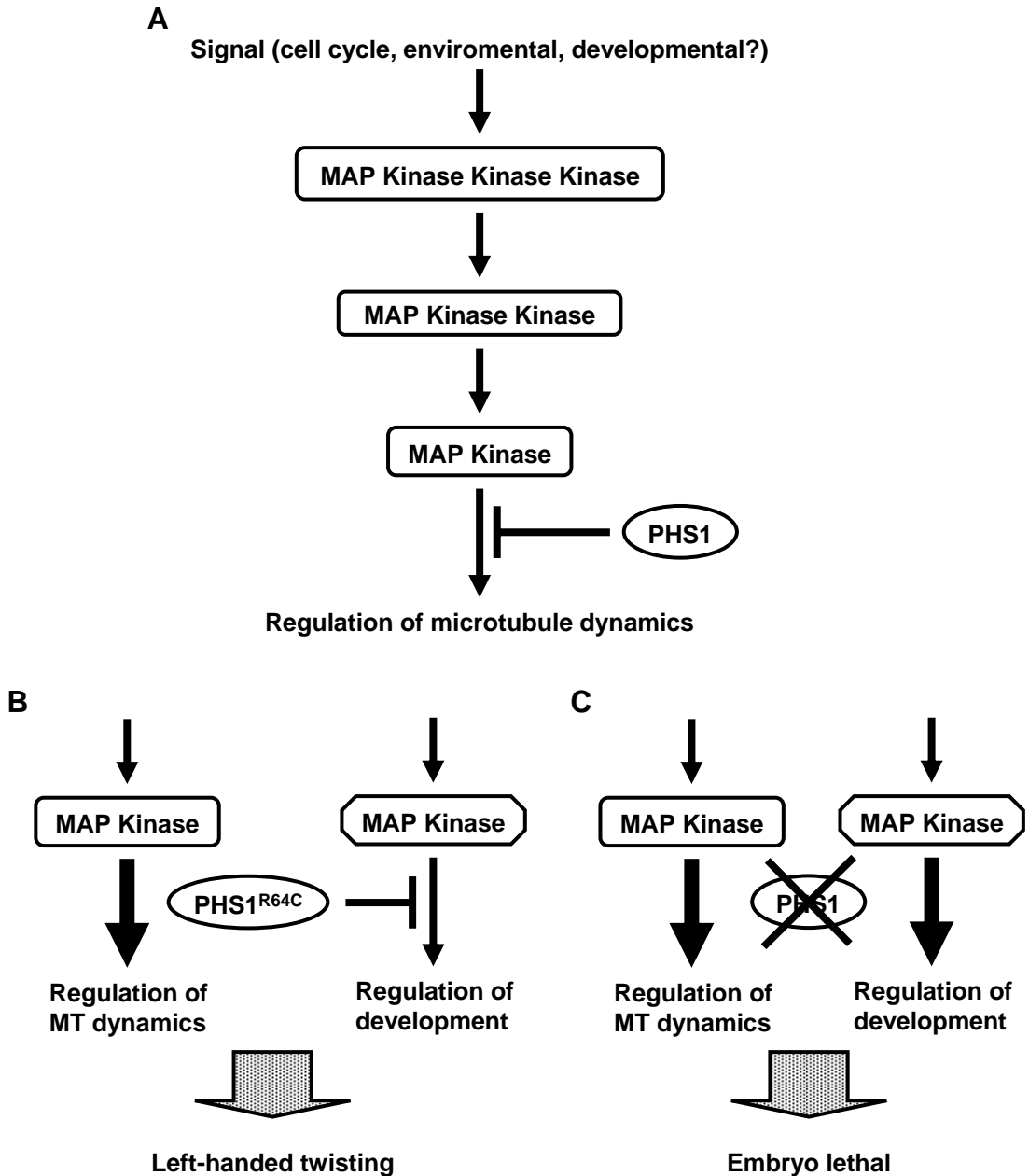


図33 植物細胞内でのPHS1の働き

A PHS1は複数のMAPキナーゼを不活性化するMAPキナーゼフォスファターゼで、標的分子の1つに微小管の安定性の制御に関わるMAPキナーゼがある。

B *phs1-1*変異株ではPHS1^{R64C}は微小管の安定性を制御するMAPキナーゼと結合しないため、そのMAPキナーゼカスケードが過剰に働くことで根が左巻きにねじれる。他のMAPキナーゼとは通常通り反応する。

C *phs1-2*変異株ではPHS1が発現していないためPHS1が不活性化する全てのMAPキナーゼを調整できず胚性致死になる。

表1 PTPスーパーファミリー

PTP Superfamily (HCX ₅ R)	
Classical PTPs (HCSAGXGRXG)	
Non-transmembrane PTPs (Intracellular)	PTP1B
Receptor-type PTPs	CD45
DSPs (HCXXGXXR)	VHR, MKP
Others	Cdc25

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なる御助言・御指導を頂いた奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物遺伝子機能学講座の橋本隆教授に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、適切な御助言・御指導を頂いた奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科形質発現植物学講座の田坂昌生教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、AtMPK1-9を譲って頂いた Massachusetts General Hospital の Jen Sheen 教授、MKP3 と ERK2 を譲って頂いた Albert Einstein College of Medicine の Zhong-Yin Zhang 教授、AtDsPTP1 と AtDsPTP1C135S を譲って頂いた University of California, Berkeley の Rajeev Gupta 教授に深く感謝致します。

本研究を行う上で適切な御助言・御指導を頂いた奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物遺伝子機能学講座の中島敬二助教授と庄司翼助手、財団法人地球環境産業技術研究機構植物研究グループの高瀬尚文主任研究員に深く感謝致します。

実験を行う上で適切な御助言・御指導を頂いた古谷育代博士と Siripong Thitamadee 博士、免疫抗体染色法の御指導をして頂いた杉本慶子博士に深く感謝致します。

在籍中、様々な事に関して協力して頂いた奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物遺伝子機能学講座の皆様感謝致します。

最後に、いつも温かく励ましてくれた直井政明・和子夫妻と直井寿将・美穂夫妻に感謝致します。

直井 国子