

博士論文番号：0981021

シロイヌナズナにおける外的刺激による
微小管安定性制御機構の解析

藤田 智史

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物細胞機能研究室

(橋本 隆 教授)

平成 25 年 9 月 18 日提出

目次

1.序論1
1.1 微小管は α,β -tubulin heterodimer からなる動的な構造物である	
1.2 微小管の重合・脱重合は微小管結合タンパク質群や、tubulin の修飾によって制御される	
1.3 微小管を不安定化させるためには大きく 3つの方法がある	
1.4 植物において微小管の安定性は環境応答によっても変化する	
1.5 植物の微小管は、リン酸化経路による調節を受ける	
1.6 <i>phs1-1</i> 変異体の単離により、微小管の安定性を制御する新しいリン酸化経路の存在が示唆された	
2.材料と方法7
2.1 植物体と生育条件、ストレス処理および形質転換法	
2.2 分子生物学的手法	
2.3 パーティクルガンを用いたシロイヌナズナ表皮細胞での一過的発現法	
2.4 共焦点顕微鏡による画像の取得	
2.5 根の細胞における微小管の免疫染色	
2.6 大腸菌におけるタンパク質の発現および精製	
2.7 <i>In vitro</i> での kinase assay	
2.8 微小管関連画分の精製	
2.9 植物体からのタンパク質の抽出	
2.10 Phos-tag™を用いたリン酸化タンパク質の分離	
2.11 免疫沈降	
2.12 λ -phosphatase treatment	
2.13 Membrane transfer および immunoblotting	
2.14 質量分析サンプルの調製	
2.15 Immuno-kinase assay	
2.16 Multiple alignment および系統樹の作成	
3.結果17
3.1 PHS1(85-700a.a.)が微小管の脱重合を引き起こす	
3.2 Phosphatase 活性は微小管の消失に対して抑制的な効果をもつ	

- 3.3 PHS1 (85-700a.a.)は atypical kinase domain であり、*in vitro* で自己リン酸化活性をもつ
- 3.4 PHS1 の kinase 活性は *in vivo* での微小管不安定化活性に必要である
- 3.5 PHS1 の kinase domain は α -tubulin を *in vitro* で直接リン酸化する
- 3.6 PHS1 の kinase domain は α -tubulin を *in vivo* でもリン酸化する
- 3.7 Tubulin kinase domain はブタ α -tubulin の Thr349 をリン酸化する
- 3.8 α -tubulin Thr349 のリン酸化は微小管への取り込みを阻害する
- 3.9 高浸透圧ストレス条件下において Thr 349 がリン酸化した α -tubulin が PHS1 依存的に蓄積する
- 3.10 高浸透圧によって PHS1 による α -tubulin のリン酸化がわずかに亢進される
- 3.11 PHS1 は高浸透圧ストレス条件下において微小管の脱重合を促進する

4. 考察 27

- 4.1 PHS1 は kinase domain と phosphatase domain を持つタンパク質である
- 4.2 PHS1 は微小管中ではなく heterodimer の α -チューブリンをリン酸化する酵素であると考えられる
- 4.3 α -tubulin Thr349 のリン酸化は tubulin heterodimer の微小管への取り込みを阻害し、重合可能な tubulin 濃度を低下させる
- 4.4 高浸透圧ストレスは、PHS1 を介して微小管の脱重合を引き起こす
- 4.5 PHS1 および α -tubulin Thr349 のリン酸化による微小管制御は陸上植物および緑藻に限られる
- 4.6 Tubulin kinase domain は、微小管研究の新たな道具となりうる
- 4.7 高浸透圧はどのように PHS1 経路を活性化するのか？
- 4.8 PHS1 による微小管脱重合はどのような生理的現象に関わるのか？
- 4.9 最後に

5. 図表および付図 34

6. 参考文献 74

7. 謝辞 84

1.序論

微小管は、細胞内で様々な構造体・配置をとることによって細胞の生存に必須の役割を果たす。高等植物においては、微小管がつくる構造物は間期に細胞膜直下に作られる「表層微小管」および染色体の分配および分裂面の決定および形成に関わる「分裂期微小管」に分けられる(Fig. 1A, reviewed in Wasteney 2002)。通常の実験条件下では、間期微小管は安定的なネットワークとして細胞膜直下に存在する。間期微小管はセルロース合成酵素のレールとなり、細胞伸長の方向決定に重要なセルロースの配向を決定すると考えられている(Fig. 1B Paredez et al. 2006)。また、その機能はまだ明らかとなっていないものの植物の間期微小管は、様々な環境ストレスによって不安定化し、消失していくことも報告されている (Fig. 1C, reviewed in Nick 2013)。

このように、細胞は細胞周期などの内部環境、もしくは外部環境に応じて微小管で作られる構造物およびその配置を変え、必要に応じてそれを維持する。この過程は、「状況に応じて微小管の安定性を制御する」ことによって達成される。そこで著者は、この制御過程の一端を理解するために、微小管の安定性に異常を示すシロイヌナズナの変異体に着目し、外的刺激に応答する微小管の安定性制御機構に関する研究を行った。

1.1 微小管は α,β -tubulin heterodimer からなる動的な構造物である

微小管は、その構成単位である α,β -tubulin heterodimer が極性をもって規則的に結合することで形作られる中空構造の polymer である。真核生物では α -tubulin、 β -tubulin 共に複数の遺伝子がゲノム中に存在し、二次元電気泳動によって異なる化学的性質をもつ複数の isotype が存在することが示されている。本研究で用いたシロイヌナズナもゲノム中に α -tubulin が 6 遺伝子、 β -tubulin が 9 遺伝子コードされており、二次元電気泳動によって他の生物同様化学的に異なる性質を持った tubulin が複数存在することが示されている (Hussey et al. 1991)。すなわち、微小管は化学的に不均一性の高い構成単位から形作られる複雑な構造物である。

微小管は、*in vitro* および *in vivo* において伸び縮みを繰り返す非常に動的な構造物である (Mitchison and Kirschner 1984, Sammak and Borisy 1988, Shaw et al. 2003)。微小管に新たな heterodimer が加わることを重合、逆に微小管から離れる過程を脱重合と呼ぶ (Fig. 2)。この微小管の重合・脱重合のバランスの調節を理解することが、微小管が状況に応じて様々な構造物を構築・解

体すること、すなわち「微小管ネットワークの安定性を細胞の内外の状況に応じて制御すること」を理解するうえで必須である。

1.2 微小管の重合・脱重合は微小管結合タンパク質群や、tubulin の修飾によって制御される

細胞内では様々な微小管結合タンパク質群や tubulin の修飾、といった様々な因子が制御系によってバランスをとることによって微小管の安定性が制御されている(Fig. 3)。例えば、微小管の挙動は重合促進因子(XMAP215)と脱重合因子(XKCM1)の量比を人為的に変えることによって、振る舞いが変わる(Tournebize et al. 2000, Kinoshita et al. 2001)。また、kinase の一種である MARK2/PAR1 が微小管を安定化させる MAP2 や MAP4、tau といったタンパク質をリン酸化することで、強い微小管の不安定化が起こる(Drewes et al. 1997)。

他にも、tubulin が様々な修飾を受けることにより、微小管自体の安定性や、微小管上を動く motor タンパク質の processivity、他の微小管結合タンパク質の結合に大きく影響を与えることが示されてきている (reviewed in Janke and Bulinski 2011)。例えば、 α -tubulin Lys40 のアセチル化は微小管を強く安定化し(Mittelmeier et al. 2011)、 α -tubulin 脱チロシン化は CLIP-170 などの CAP-Gly motif を持つタンパク質の結合に影響する(Fig 4A, Peris et al. 2006)。また、 α,β -tubulin への polyglutamylation は、微小管を切断する酵素である katanin や spastin を呼び込むことが知られている(Fig 4B, Lacroix et al. 2010)。以上のように、tubulin の化学的修飾の微小管に対する効果はいくつかわかってきているものの、これらの修飾酵素の活性調節がどのような制御経路によって行われているのかについては不明な点が多い。また、タバコにおいてもアセチル化やポリグルタミン酸付加など、tubulin が修飾されることが示唆されている(Smertenko et al. 1997)が、植物においてその修飾の意義や修飾がどのような制御を受けているかは明らかとなっていない。

1.3 微小管を不安定化させるためには大きく 3 つの方法がある

微小管もしくは tubulin に作用することによって不安定化を促進するためには大きく 3 つの方法があると考えられている。その 3 つはそれぞれの不安定化促進様式により”sequester”、”destabilizer”、”severing enzyme”と呼ばれる(Fig. 5)。

Sequester の中で代表的なものは stathmin である。Stathmin はもともと、*in vitro* で微小管の脱重合を促進する因子として同定されたタンパク質である

(Belmont and Mitchison 1996)。Stathmin は細胞質に存在するタンパク質であり、tubulin heterodimer 二つと結合する。Stathmin に tubulin が結合することで、周辺の重合可能な tubulin 濃度が下がりその結果として微小管の脱重合が引き起こされる(Fig. 5A)。

Destabilizer としては kinesin-13 family および kinesin-8 family タンパク質があげられる(Walczak et al. 1996, Menella et al. 2005, Niwa et al. 2012)。Kinesin-13 family は通常の kinesin と異なりモーター活性を持たず、motor domain が微小管の+端から tubulin を取り去ることで、微小管の脱重合を促進する(Fig. 5B, Walczak et al. 1996)。

Severing enzyme の代表的なタンパク質である katanin は微小管を途中で切断することによって微小管を不安定化する(Fig. 5C, McNally and Vale 1993)。

細胞内においては、このような微小管を不安定化する系と、安定にする系を状況に応じて時空間的に制御することで、微小管の安定性が制御されている。

1.4 植物において微小管の安定性は環境応答によって変化する

植物においても多数の微小管関連タンパク質、例えば重合促進因子である EB1 (Komaki et al.2010)や MOR1/XMAP215 (Whittington et al. 2001)、微小管を束化して安定化する MAP65 (Sasabe et al. 2006)やその他多数の因子 (reviewed in Hamada 2007)が微小管の安定性制御に関わることが知られ、その働きは多岐にわたる。これらのタンパク質が、内部環境(細胞周期、植物ホルモン)や外部環境(光やストレスなど)に応じて制御されると考えられている。

これまでに、微小管が生物的・非生物的な外的刺激によって安定性を変えるという現象がいくつか報告されている。非生物学的ストレスとしては凍結・低温・高浸透圧(Bartolo and Carter 1991)や塩ストレス(Wang et al. 2007, Wang et al. 2011) 条件で微小管が脱重合することが知られている。また、生物学的ストレスとしては *Vitis rupestris* の微小管は flg22 (Chang and Nick 2012)や harpin (Qiao et al. 2010)といった elicitor に、シロイヌナズナの微小管も病原菌である *Verticillium dahliae* 由来の VD toxin に応答(Yao et al. 2011)して微小管が脱重合することが知られている。このような事実から、植物細胞は外的刺激に応じた微小管安定性制御機構を備えていることが示唆されている。しかしながら植物細胞において微小管の不安定化を促進する因子については katanin (Nakamura et al. 2010)を除いてこれまでに知見がない。kinesin-13 family のホモログ分子はシロイヌナズナゲノム中に存在するものの、このホモログ分子は脱重合活性を持っていないと考えられており(Lu et al. 2005)、stathmin のような tubulin binding protein は植物においては同定されていない。これまでに

外的刺激によって微小管の脱重合を引き起こす分子メカニズムは明らかになっていなかった。

1.5 植物の微小管は、リン酸化経路による調節を受ける

これまでに植物においてもリン酸化経路が微小管を制御することが、kinase および phosphatase の阻害剤を用いた実験や変異体の解析から示されている。

Ser/Thr phosphatase 阻害剤や Ser/Thr kinase 阻害剤でシロイヌナズナを処理した場合(Baskin and Wilson,1994)、もしくは tyrosine kinase 阻害剤や tyrosine phosphatase 阻害剤(Yemets et al. 2008, Sheremet et al. 2012) でシロイヌナズナ芽生えを処理した場合、著しい微小管配向の乱れが観察されている。また、トウモロコシの根の cut-open cell を用いた実験系において、cut-open cell に ATP を加えると著しい微小管の脱重合がおこること、またその効果が kinase 阻害剤である staurosporine で打ち消されることから微小管を脱重合させる kinase の存在が示唆された (Tian et al. 2004)。これらの実験から、微小管の重合脱重合のバランスに影響を与える kinase および phosphatase の存在が示唆されているが、具体的にどの kinase もしくは phosphatase の活性が阻害されることで間期表層微小管の安定性に影響しているかは明らかにはなっていない。

また、遺伝学的な解析によって微小管を制御する kinase や phosphatase が同定されてきた。TONNEAU2 (TON2)は protein phosphatase 2A の B” subunit をコードし、細胞分裂の際に新たな細胞板を形成する位置を決定するのに重要な微小管構造物である preprophase band(PPB Fig.1A)の形成に関わる (Camilleri et al. 2002)。また、細胞板形成時に重要な微小管構造物である phragmoplast(Fig. 1A)の形成時(Sasabe et al. 2006)や、高浸透圧ストレスを受けた時(Panteris et al. 2010, Beck et al. 2010)に微小管を安定化する MAP65 は MAP kinase によるリン酸化を受けて、その微小管安定化能を失うことが知られている。

一方で、リン酸化による微小管の安定性制御は微小管関連タンパク質を介したものでなく、tubulin を直接リン酸化することでも行われている。シロイヌナズナにおいてもこれまでにいくつかの tubulin リン酸化が報告されている。CKL6 (Casein kinase-like6, Ben-Nissan et al. 2008)および NEK6 / IBO1 (NimA-related kinase 6, Motose et al. 2011)は共に微小管上に局在し、 β -tubulin をリン酸化する。これらの kinase による β -tubulin のリン酸化は微小管重合阻害剤に対する耐性などから共に微小管を不安定にする効果があると考えられている。また、 α,β -tubulin のチロシン残基が未知の kinase によりリン酸化を受けることも知られている(Blume et al. 2008)がその微小管に対する効

果は明らかとなっていない。

これらの事実から、リン酸化は様々な局面で植物の微小管の安定性を制御できることが示唆されているが一部を除いて、どのような状況下でこのリン酸化経路を用いているかについては明らかではない。

1.6 *phs1-1* 変異体の単離により、微小管の安定性を制御する新しいリン酸化経路の存在が示唆された

これまでも述べたように、微小管ネットワークの安定性制御は微小管の重合・脱重合のバランスにより制御される。そこで微小管重合阻害剤である *propyzamide* により、重合・脱重合のバランスを脱重合側に偏よらせた場合に強い表現形を示す変異体の探索が行われた。そのスクリーニングの中で、チューブリンにミスセンス変異が入った多数の変異体および *propyzamide hypersensitive 1-1* 変異体(*phs1-1*; Naoi and Hashimoto 2004)が単離された。

phs1-1 は通常の栄養培地でも根が左ねじれを示し、低濃度の *propyzamide* で顕著な生長阻害を示す半優性変異体であった。マッピングおよび相補性試験から、*phs1-1* は *At5g23720* 遺伝子のミスセンス変異体であることが示された。この遺伝子は、GUS 染色および RT-PCR の結果から植物体全体で発現しており、特に細胞が伸長する領域で強く発現していることが明らかになっている (Pytela et al. 2010, Naoi and Hashimoto 2004)。また、詳細な局在解析から、PHS1-GFP は細胞質に一樣に存在し核ではほとんど観察されないことが示された。超遠心により分画した microsomal 画分に一定量の PHS1-GFP が存在することが確認されていることから、膜への結合によって細胞質に保持しているのではないかと考えられている。この局在解析から PHS1 は細胞質で機能していると考えられた (Pytela et al. 2010)。

PHS1 は、Dual specificity protein tyrosine phosphatase (DSP) domain をもつ (Kerk et al. 2002) 929 アミノ酸のタンパク質をコードしており、シロイヌナズナには他の明確なホモログは存在しない。*phs1-1* ではこのタンパク質の Arg64 が Cys に置換される変異が起きていた。この変異は DSP type の phosphatase に対してよく用いられる人工基質である OMFP (3-*O*-methylfluorescein phosphate) に対する活性を低下させることから、phosphatase 活性に影響する変異であることが示された。また、*phs1-1* 変異体では野生型に比べて微小管が、微小管脱重合剤である oryzalin に対して感受性が高くなっていた。すなわち、PHS1 タンパク質の phosphatase 活性と表層微小管の安定性に相関性があると考えられた (Naoi and Hashimoto 2004)。

この点をさらに明確にするために、Cys792 を Ser に置換することで

phosphatase 活性をほぼ完全に失わせた PHS1 (Naoi and Hashimoto 2004)を利用して研究がすすめられた。PHS1 の phosphatase 活性と微小管の関係を調べるために、GFP-TUB6 で微小管を可視化した葉の表皮細胞に 35S プロモーターで一過的に野生型 PHS1 および PHS1 (C792S: phosphatase-dead) を発現させる実験が行われた(Fig. 6)。その結果、野生型を発現させた場合では微小管にほとんど影響が見られなかったが、PHS1 (C792S)を発現させた時には、微小管が観察されなくなった(Supplemental Fig. 1, by Pytela)。この結果は、*phs1-1* 変異体の解析から得られた知見同様に、PHS1 の phosphatase 活性が表層微小管の安定性に相関があることを示唆した。

しかしながら、T-DNA 挿入変異体である *phs1-5* は null allele であることが確認されたが *phs1-1* とは異なり、野生型と区別のつかない成長を示した(Pytela et al. 2010)。*phs1-5* は null allele であるため、PHS1 の phosphatase 活性はほとんどないと考えられる。一方で、変異導入により phosphatase 活性を失わせた PHS1 (C792S)を発現する植物は強い伸長阻害を示す(Supplemental Fig. 2 by Pytela, Supplemental Fig. 3)。このことから、表現型が単純に phosphatase 活性と相関しないと考えられた。

これらの実験事実から PHS1 が、何らかのリン酸化経路を介して表層微小管の安定性制御に関わっていることが示唆されているが、その詳細な分子機構は未知であった。

本研究では、微小管安定性制御に関わると考えられた PHS1 を細胞生物学的・生化学的に解析することで、PHS1 と微小管の関係を明らかにすることを目指した。その中で、PHS1 に α -tubulin をリン酸化する kinase domain を発見し、このリン酸化が微小管の安定性制御に大きく寄与することを見出した。また、外的刺激にこの安定性制御機構が応答することを見出した。これらの結果から、外的刺激に応答したリン酸化による微小管制御機構についてのモデルを提示する。

2.材料と方法

2.1 植物体と生育条件、ストレス処理および形質転換法

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*. L) Columbia エコタイプを野生型として用いた。また、PHS1 の null 変異体である *phs1-5* (SALK_070121, ecotype: Columbia) (Pytela et al. 2010) は ABRC から得た。一過的発現系には *p35S::GFP-β-tubulin6* (*GFP-TUB6*)形質転換植物体 (ecotype: Columbia) を用いた(Nakamura et al. 2004)。

シロイヌナズナ種子は 0.1% Tween-20, 10%次亜塩素酸ナトリウム溶液中でボルテックスを用いて 5 分間振とうさせることにより滅菌した。滅菌処理後、滅菌水で洗浄したのち、0.2%寒天溶液に懸濁した。種子の収穫、顕微鏡観察およびタンパク質の抽出を目的とした場合には、寒天溶液に懸濁した種子をシロイヌナズナ培養用寒天培地 (2.5 mM KNO₃, 1.25 mM KPO₄, 1 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 35 μM Fe-EDTA, 7 μM MnCl₂, 5 μM NaCl, 0.5 μM ZnSO₄, 0.25 μM CuSO₄, 0.1 μM NaMoO₄, 0.005 μM CoCl₂, 1.5% [w/v] Agar, 1% [w/v] Sucrose)に播種した(Okada and Shimura 1992)。2 日間、暗所 4°Cで春化处理を行った後、23°C長日条件 (16 時間明所、8 時間暗所)、もしくは恒常的な暗所条件でほぼ垂直におき、生育させた。必要に応じて、発芽後 10 日前後の植物体を土 (サカタスーパーミックス A : 赤玉土 : パーライト小粒=2 : 1 : 0.5 の割合で混ぜたものに、少量のマグアンプKを加えたもの) に植え替え、23°Cで恒常的に明所または 16 時間明所/8 時間暗所の状態に置き生育させた。

一過的発現系を目的とした場合には、1/2 MS 培地 (2.3 g/L ムラシゲ・スカーグ 培地用 混合 塩 類 (NIHON PHARMACEUTICAL CO.), 50 μg/mL myo-inositol, 0.2 μg/mL thiamine, 0.05% [w/v] MES-KOH pH5.7, 0.7% [w/v] Agar, 1% [w/v] Sucrose) に半径 1.5-2.0 cm 円状に 8 粒とその中心に 1 粒播種した。この場合は丸シャーレを用い、平置きにして 16-20 日間生育させた。

植物体を液体で培養する場合は、滅菌した種子を一過的発現に用いた培地から寒天を除いた 1/2 MS 液体培地中で 130 rpm、23°C長日条件 (16 時間明所、8 時間暗所)で生育させた。

植物体のストレス処理は、以下のように行った。シロイヌナズナ栽培用寒天培地に播種した春化处理後 7 日目の植物体を 60-70 個体、5 mL tube に集め 0.8 M sorbitol、0.4 M NaCl 溶液もしくは 10 μM ABA (Sigma) を 1 mL 加えた。ネガティブコントロールには蒸留水を用いた。適当な時間処理した後、スポイトで液体を丁寧に取り除き液体窒素を用いて凍結させ、生化学的解析に用いた。

シロイヌナズナの形質転換は floral dip 法 (Clough et al. 1998) で行った。

形質転換をするコンストラクトを保持した *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90)株を適切な抗生物質を含む LB 培地で培養し、LB 培地を除いたのち、5% [w/v] sucrose, 0.05% [v/v] silvet L-77 に懸濁して、花芽および腋芽に添加した。その後、種を収穫し適切な抗生物質を含むシロイヌナズナ栽培用寒天培地で形質転換体を選抜した。

シロイヌナズナ培養細胞 (MM2d) は 95 mL の改変 LS 培地 (4.6 g/L ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類(NIHON PHARMACEUTICAL CO.), 0.2 mg/mL KH_2PO_4 , 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ myo-inositol, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ thiamine, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2,4-D, 3% [w/v] sucrose, KOH で pH5.8 に調整) を 300 mL の三角フラスコに分注したものをを用いて維持した。MM2d は暗所 27°C で 130 rpm で旋回培養し、一週間に一度、先を折ったピペットで 3 mL とり、新しい培地に植え継いだ。

2.2 分子生物学的手法

コンストラクトの作成には以下の酵素を用いた。DNA の増幅に Primestar GXL (Takara)もしくは Primestar Max (Takara)を、primer のリン酸化は Polynucleotide kinase (Takara)を、ligation には DNA Ligation kit <Mighty mix> (Takara)を、DNA の脱リン酸化には calf intestine alkaline phosphatase (CIAP, Takara)を用いた。制限酵素各種は NEB, TOYOBO, Takara のものを用いた。各種変異の導入には Supplemental table 1 にあげた primer を用いて megaprimer 法により行った (Kirsch and Joly 1998)。

一過的発現系に用いたコンストラクトは、*p35S promoter*- multi cloning site - *NOS terminator* をもつ pAN19 vector を用いた。この vector を *Sma* I で処理し、CIAP で処理し Econospin column (Gene Design Inc.)で処理することによって CIAP を除去した。PCR に用いる primer を polynucleotide kinase でリン酸化したのち、適当な鋳型を用いて PCR により目的配列を増幅した。*Sma* I 処理したベクターとライゲーション反応を行い、大腸菌 DH5 α に形質転換した。

大腸菌でのタンパク質発現ベクターは次のように作成した。*Xho* I 配列を付加したプライマーと *Xba* I 配列を付加したプライマー (Supplemental Table1 にあげた primer list を参照)を用いて、PHS1 全長および PHS1 (85-700a.a.)に対応する領域を PCR で増幅した。エタノール沈澱後、*Xho* I, *Xba* I 処理を行い、pCold-TF(Trigger factor)-Strep ベクター (Pytela et al. 2010)も同様に制限酵素で処理した。Ligation 反応を行ったのち大腸菌 DH5 α 株に形質転換した。作成したベクターはシーケンス解析により確認した。

pER85 vector の作成は以下のように行った。このベクターは pER8 (Zuo et al. 2000)を骨格とし、LR 反応によってインサートを挿入することで、sGFP を C

末端に融合することができる。この改変ベクターを作成するために、pER8 を *Xho* I で切断したのち、nucleotide blunting kit (Takara)を用いて平滑末端とし、self-ligation させて *Xho* I site を欠失させた。pGWB5 (Nakagawa et al. 2007) を鋳型とし PCR によって *attB1* から *attB2* の領域を増幅 (Supplemental table1 参照)し、pGEM-T (Promega)にクローニングして *attB1* から *attB2* の領域を *Xho* I site を欠失させた pER8 に *Asc* I、*Spe* I site を用いて導入した。このベクターを利用して、本研究で用いた XVE system のベクターを作成した。

Gateway cloning は付属のプロトコールの半量のスケールで反応を行い、protease K 処理は省略した。

pUBQ10::GFP-TUB6-rbc3A ter、*pUBQ10::GFP-TUA6-rbc3A ter*、*pUBQ10::mCherry-TUB6-rbc3A ter* は pBIN19 由来の改変ベクター (Miyashima et al. 2009) である pBIN30(Basta 耐性)および pBIN40 (Hygromycin 耐性)の *Asc* I site に挿入した。*UBQ10 promoter*は ATG から上流 558bp を用い、*rbc3A ter*は pER8 に用いられているものをそのまま用いた。また、これらのコンストラクトは、蛍光タンパク質と tubulin 遺伝子の間にリンカーとして coupler シークエンス (Shimozono and Miyawaki 2008)を挿入した。

大腸菌はクローニング用に DH5 α 株、植物の形質転換には *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90)株のヒートショックコンピテントセルを三重大学生命科学研究支援センター植物機能科学ゲノミクス部門のホームページ (<http://www.gene.mie-u.ac.jp/Protocol/Original/Original-Top.html>) を参考に作成して用いた。

2.3 パーティクルガンを用いたシロイヌナズナ表皮細胞での一過的発現法

一過的発現系は Pytela et al. (2010)に従った。pAN 19 vector にクローニングした *p35S::mCherry*および *p35S::PHS1* (全長およびフラグメント)をそれぞれ 2 μ g ずつ混合し、5 μ L になるように滅菌水を加えた。そこに、60 mg/mL になるように 50% glycerol に懸濁した 1.6 μ m gold particle (Bio-Rad) を 25 μ L, 0.1 M spermidine を 10 μ L、2.5 M CaCl₂ を 25 μ L 加え、3 分間ボルテックスにより混合した。その後 30 分間室温で静置し、卓上遠心機 (TOMY)で遠心後、上清を取り除き沈澱を崩さないように 150 μ L の 70% ethanol を加え、再度遠心し、上清を取り除いた。さらに 150 μ L の 100% ethanol を沈澱が崩れないように加え、遠心後上清を取り除いて 40 μ L の 100% ethanol を加え、ボルテックスで懸濁した。懸濁液を 15 μ L とり Macrocarrier (Bio-Rad laboratories) に塗りつけ、風乾後 PDS-1000 / He Biolistic particle delivery system (Bio-Rad laboratories)にセットした。Microcarrier (Bio-Rad laboratories) には 1100 PSI

のものを用いた。1/2 MS 培地上で生育させた GFP-TUB6 を恒常的に発現する植物体をセットし、金粒子をうちこんだ。遺伝子導入後、アルミホイルで包んで 12 時間 23°C でインキュベートした。観察には本葉を用い、スライドガラス上に蒸留水でマウントした。Nikon C1 共焦点顕微鏡を用いて、水銀ランプによって mCherry が発現している細胞を探し、1.0 μm ごとに取得した画像を Z-stack 機能によって重ね合わせた。画像は Adobe Photoshop Elements9 および Image J 1.47d によって加工し GFP を白で、mCherry を赤で示した。また一部のコンストラクトにおいては、東京大学新領域創成科学研究科の朽名夏磨博士に依頼し微小管の密度をそれぞれの画像について定量していただいた。

2.4 共焦点顕微鏡による画像の取得

pUBQ10::GFP-TUB6, *pUBQ10::GFP-TUA6*, *pUBQ10::mCherry-TUB6* 植物体およびその F1 植物体の観察は、播種後 7 日目の子葉を用いた。マウントは水で行い、観察は Nikon C2 共焦点顕微鏡を用いて行った。目的に応じて 1.0 μm ごとに取得した画像を Z-stack 機能によって重ね合わせた。

高浸透圧条件下での微小管の観察には、*pUBQ10::GFP-TUB6* (WT もしくは *phs1-5* background) の形質転換植物体を用いた。播種後 3 日目の暗所胚軸をスライドガラス上で、0.8 M sorbitol 中にマウントし、最初に観察した画像を 0 分として、10 分おきに 30 分間観察を行った。観察には、Nikon C2 共焦点顕微鏡を用いて行い、1.0 μm ごとに取得した画像を Z-stack 機能によって重ね合わせた。取得した画像は Image J1.47d によって加工および蛍光の定量を行い、目的に応じて GFP-TUA6 を白もしくは緑、GFP-TUB6 を白、mCherry-TUB6 をシアンで示した。ここで得た蛍光画像は東京大学新領域創成科学研究科の朽名夏磨博士に依頼し微小管の密度をそれぞれの画像について定量していただいた。

2.5 根の細胞における微小管の免疫染色

根の細胞における微小管の免疫染色については、Ishida et al. 2007 に従った。4 日間明所で生育させたシロイヌナズナを 0.05% DMSO もしくは 5 μM estardiol を含んだ培地に移して 6 時間培養した。その後 5 mL の固定液 (1.5% formamide, 0.5% glutaraldehyde in PEMT buffer) で 40 分処理した後、PEMT(50 mM PIPES-KOH pH7.2, 2 mM EGTA, 2 mM MgSO₄, 0.05% TritonX-100)溶液中で、10 分間の洗浄を 3 回繰り返した。酵素液 (0.4 M mannitol, 0.05% pectoryase Y-23(KYOWA chemical) in PEMT)を加え 30°C で 20 分間反応させた後、PEMT 溶液中で、10 分間の洗浄を 3 回繰り返した。-80°C

に冷却したメタノールを加え、 -20°C で10分間静置した。PBSで10分間1回洗浄した後、 NaBH_4 -PBS溶液を加え室温で13分反応させた。続いて、glycine溶液(50 mM glycine, 130 mM NaCl, 5.1 mM Na_2HPO_4 , 1.6 mM KH_2PO_4 , pH7.4)で5分間2回洗浄を行った後ブロッキング溶液中(1% BSA in PBS)で30分間静置した。その後ブロッキング溶液で5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整したYL1/2(抗 α -tubulin抗体, abcam)溶液中におき、 30°C で16時間反応させた。Glycine溶液で10分間3回洗浄した後、ブロッキング溶液で1/500に希釈したAlexa Fluor568 Goat anti-rat IgG (Molecular Probes)溶液中で 37°C で2時間静置した。PBS(130 mM NaCl, 5.1 mM Na_2HPO_4 , 1.6 mM KH_2PO_4 , pH7.4)で10分間3回洗浄した後、スライドガラスに退色防止液(50% glycerol, 0.1% *p*-phenylenedamine in 0.1 x PBS)を用いてマウントし、マニキュアで封入した。観察にはNikon C2顕微鏡を用い、0.275 μm ごとに得た画像をZ-stack機能を用いて重ね合わせた。

2.6 大腸菌におけるタンパク質の発現および精製

pCold-TF-Strep vectorにクローニングしたPHS1(85-700a.a.)およびPHS1全長は以下の手順で精製した。それぞれのコンストラクトを大腸菌Rosetta株に導入し、シングルコロニーをLB培地中で一晩 37°C , 230 rpmで振とう培養した。2.5 mLのovernight cultureを250 mLの新しいLB培地に移し、O.D. 600が0.6-0.8になるまで 37°C , 230 rpmで振とう培養した。O.D.600がその値に達したのち、 16°C で30分間静置した。その後、最終濃度が1 mMとなるようにisopropyl-1-thio- β -D-galacto-pyranoside (IPTG)を加え、 16°C , 160 rpmで24時間培養した。その後、培養液から菌体を集菌し、pelletに15 mLの抽出バッファー(50 mM Tris-Cl pH7.4, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole)を加え、pelletを懸濁した。このpellet懸濁液に1 mg/mLとなるようlysozymeを加え、30分間氷上で静置した。その後0.1%となるようにTriton-X100を加え、穏やかによく混ぜたのちさらに10分間氷上で静置した。このサンプルをソニケーター(TOMY UD-201 Output 3, Duty 30)で処理し、14500 rpmで30分間、 4°C で遠心し、上清を集め25 mm acrylic cellulose acetate membrane 0.45 μm filter (IWAKI)を通したものを粗抽出液とした。この粗抽出液をNi-sepharoseTM 6 fast flow(GE-healthcare)による精製に供した。必要な画分をNAP-5 column (GE-healthcare)により50 mM HEPES-KOH pH7.5, 1 mM DTTにbuffer交換し、30% glycerol [v/v]になるようにglycerolを加え、 -20°C で保存した。

2.7 *In vitro* での kinase assay

大腸菌から精製した 150 ng TF-Strep-PHS1 (全長および 85-700a.a.)と 1 μg の tubulins (ブタ脳もしくはMM2dから精製したもの)を 50 mM HEPES-KOH, 1 mM MnCl_2 , 1 mM DTT, 50 μM ATP および 5 μCi [γ - ^{32}P]-ATP 中で 30 分間、30°Cで反応させた。反応は 4x SDS sample buffer を加えることにより停止させた。サンプルはアクリルアミドゲル(MM2d tubulins を分離するときのみ 7.5% *T*, 0.66% *C*, SDS は無添加(Garfin et al. 2009)をスラブゲルに作成した。他の実験は 7.5% *T*, 3.3% *C*の通常の *Laemmli*法のゲルを用いた)で分離した (ここで *T* は acrylamide と bis-acrylamide のゲル中の濃度を合計したもの、*C* は acrylamide と bis-acrylamide の混合比を示す。)。シグナルは BAS3000 (Fujifilm)によって検出した。自己リン酸化活性の検出に関しては tubulin を除いて、同じ反応条件で行った。

2.8 微小管関連画分の精製

微小管関連画分は、Hamada et al. (2004)を改変し、次のように精製した。95 mL の改変 LS 培地に植え継いでから 5 日目のシロイヌナズナ培養細胞 (MM2d)、25 本を吸引濾過で回収した。これをプロトプラスト化液 (2% sumyzyme C (SHINNIHON CHEMICALS Corporation), 0.2% sumyzyme AP-2 (SHINNIHON CHEMICALS Corporation), 0.45 M sorbitol) 中で 100-110 rpm, 30°Cで 2 時間振とうした。プロトプラストを回収するために 2500 rpm, 25°Cで 5 分間遠心し、上清を除いた。回収したプロトプラストを 27% Percoll 溶液 (27% Percoll (GE-healthcare), 6.5 mM HEPES-KOH pH7.3, 0.49 M sucrose, 0.62 M sorbitol, 0.04 M MgCl_2) に懸濁し 14000 rpm, 25°Cで 30 分間遠心し、上清を除いてミニプロトプラストを得た。0.6 M sorbitol で懸濁し、2500 rpm, 4°Cで 3 分間遠心することでミニプロトプラストを洗浄し、この洗浄をもう一度繰り返した。洗浄したミニプロトプラストを氷冷した 50 mL の extraction buffer (50 mM PIPES-KOH pH7.0, 10 mM EGTA, 10% sucrose, 2 mM MgCl_2 , 1% casein, 1x complete (Roche), 1 mM PMSF, 4 mM DTT) に懸濁し、テフロンホモジェナイザーを 4500 rpm に設定し 2 往復させた。破碎産物に 1 mM GTP および 20 μM taxol を加え 10 分間 30°Cでインキュベートすることで微小管を重合させ、そののち 12000 x *g*, 30°Cで 10 分間遠心した。上清を捨てペレットを脱重合 buffer (20 mM PIPES-KOH pH 7.0, 0.4 M NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , complete (Roche), 1 mM PMSF, 1 mM DTT)に懸濁した後、氷上で 20 分間インキュベートした。その後、220,000 x *g*, 4°Cで 7

分間遠心を行い、上清を 30°C に温めた extraction buffer で 8 倍に希釈し 30°C で 10 分間インキュベートした。さらに、もう一度重合・脱重合サイクルを繰り返して、上清を陰イオン交換カラム (Resource Q column GE healthcare) で分離した。ブタ脳 tubulin は矢尾および関によって Itoh et al. (1997) に従って当研究室で精製されたものを用いた。

2.9 植物体からのタンパク質の抽出

凍結した植物体は 20 mM Na-PO₄ pH7.4, 100 μM Na₃VO₄, 50 mM β-glycerophosphate, complete (Roche) 中で乳鉢を用いて破碎後 10,000 x g, 4°C で 3 分間遠心したのち、上清を回収してさらに 10,000 x g, 4°C で 10 分間遠心した。この上清をタンパク質粗抽出液とし、濃度を Coomassie Protein Assay Reagent (THERMO SCIENTIFIC) を用いて決定した。Phos-tagTM を用いた解析を行う場合は、粗抽出液を TCA 沈殿させ、タンパク質濃度が 1 mg/mL となるように 1x SDS sample buffer にペレットを溶解した。本研究においては、粗抽出液をサンプルとした場合の泳動には 1 レーンあたり 20 μg のタンパク質をロードした。

2.10 Phos-tagTM を用いたリン酸化タンパク質の分離

Phos-tagTM gel の扱いは、Kinoshita and Kinoshita-Kikuta (2011) に従った。リン酸化チューブリンの分離には、resolving gel に 12.5 μM phos-tagTM (Wako), 25 μM Zn(NO₃)₂, 357 mM Bis-Tris pH6.8, Acrylamide (6% T, 3.3% C)、stacking gel には 357 mM Bis-Tris, Acrylamide (4% T, 3.3% C) の組成でミニゲルに作成したゲルを用いた。泳動バッファーには 100 mM Tris, 100 mM MOPS, 0.1% SDS, 5 mM Sodium bisulfite を用いた。泳動は 30 mA の定常電流で行った。泳動が終了したのち、Towbin buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 10% methanol) に EDTA が 10 mM になるように加えた溶液中で 10 分間穏やかに振とうし、Towbin buffer で 2 回軽く洗浄後、Towbin buffer 中で 10 分間穏やかに振とうした。その後、4°C の低温室内でウェット式転写装置 (Bio-rad laboratories) を氷水中にセットし Towbin buffer 中で PVDF membrane (immobilon-P, Millipore) に 100 V (constant voltage)、2 時間の条件で行った。転写が終了した membrane を immunoblotting による解析に供した。

2.11 免疫沈降

免疫沈降は Takahashi et al. (2011) の方法に従った。液体窒素で凍結した植物を EB2 buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 20% [v/v] glycerol, 5 mM NaF, 100 μ M Na₃VO₄, 50 mM β -glycerophosphate, 1 mM DTT, 0.1% [v/v] Triton X-100, 0.5 mM PMSE, complete (Roche)) 中で乳鉢を用いてすりつぶした。その後、GFP- α -tubulin の λ phosphatase treatment を行う場合は、10,000 x *g* で 3 分間遠心したのち、その上清をさらに 10,000 x *g* で 10 分間遠心して粗抽出液とした。Immuno-kinase assay を行う場合は 21,500 x *g* で 3 分間遠心したのち、その上清をさらに 21,500 x *g* で 15 分間遠心して粗抽出液とした。

粗抽出液をタンパク質濃度が 1 μ g/mL, total volume が 400 μ L となるように EB2 buffer を加えて調整した後、50 μ L の magnet-beads conjugated GFP 抗体 (Rat monoclonal 抗体、clone: RQ2, Medical and Biological Laboratories) を加え、30 分間 4°C でゆっくりと回転させながら反応させた。反応後 EB2 buffer で 3 回洗浄した。

2.12 λ -phosphatase treatment

λ -phosphatase treatment は基本的に Peck (2006) に従って行った。免疫沈降の洗浄後、1 mL の λ -phosphatase reaction buffer (50 mM HEPES- KOH pH7.5, 100 mM NaCl, 2 mM MnCl₂, 1 mM DTT) で一回洗浄した後、100 μ L の λ -phosphatase reaction buffer に懸濁し、30 μ L ずつを 3 本のチューブに分け図に示したように①phosphatase, phosphatase inhibitor 共になし、②400 U λ -phosphatase、③400 U λ -phosphatase、phosphatase inhibitor ありで 5 分間 30°C で反応させた。Phosphatase inhibitor は、終濃度が 1 mM Na₃VO₄、50 mM NaF、5 mM EDTA となるように用いた。反応後、上清を取り除き、500 μ L の 50 mM HEPES- KOH pH7.5, 1 mM DTT で一回洗浄した後、1 x SDS sample buffer に懸濁して、95°C で 5 分間処理しサンプルとした。サンプルは phos-tagTM を含むゲルで泳動し、抗 GFP 抗体(clone: JL-8, Clontech)により検出した。

2.13 Membrane transfer および immunoblotting

泳動が終了したゲルを PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore) に、セミドライ式転写装置 (ホライゾンプロット 4M ATTO 社製) で 15 V (constant voltage) の条件で 45 分間転写を行った。PHS1 以外の検出には modified Towbin buffer (20 mM Tris, 153.6 mM glycine, 0.08% [w/v] SDS, 20% [v/v] methanol), PHS1 の検出には Bjerrum Schafer-Nielsen transfer buffer (48 mM Tris-Cl, 39

mM glycine, 20% [v/v] methanol, 0.02% [w/v] SDS pH8.5) を用いた。2% Skim milk (GIBCO)を PBS-T (137 mM NaCl, 0.3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween-20)に溶解し、Blocking solution とした。Blocking solution 中で PVDF membrane を 1 時間ゆっくり振とうした。続いて blocking solution で 1/5000 (通常の SDS-PAGE で泳動したもの)もしくは 1/1000 (phos-tag™ を含むゲルで電気泳動をしたもの)に希釈した α -tubulin 抗体(Rat monoclonal 抗体、clone: YOL1/34, Millipore)もしくは 1/5000 に希釈した β -tubulin 抗体 (Mouse monoclonal 抗体、clone: KMX-1, CHEMICON)をハイブリパック中での反応を一時間行った。二次抗体として goat anti-rat IgG-horseradish peroxidase conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology)もしくは ECL™ peroxidase labeled anti mouse antibody (GE Healthcare)を Blocking solution で 1/10000 に希釈し、1 時間ゆっくり振とうした。検出は Immobilon Western Chemiluminiscent HRP substrate (Millipore)で行った。抗 PHS1 抗体 (Rabbit polyclonal 抗体, Pytela et al. 2010)および抗 GFP 抗体 (Mouse monoclonal 抗体、clone: JL-8, clontech)を用いるときは、blocking solution として 2% BSA を TBS-T (137 mM NaCl, 0.3 mM KCl, 25 mM Tris-Cl pH7.6, 0.1% Tween-20)に溶解したものを扱い、一次抗体として 2% BSA (TBS-T で作成した溶液)を用いて 1/1000 に希釈した抗 PHS1 抗体もしくは抗 GFP 抗体を用いた。二次抗体には ECL™ peroxidase labeled anti-rabbit antibody (GE Healthcare)もしくは ECL™ peroxidase labeled anti-mouse antibody (GE Healthcare)を 2% BSA (TBS-T 溶液)によって 1/10000 に希釈したものを扱った。

2.14 質量分析サンプルの調製

明所で液体培養した 6 日目の *XVE::PHS1 (85-700a.a.)-GFP* / *phs1-5* および *phs1-5* を 24 時間 5 μ M estradiol で処理して液体窒素中で凍結させた。これらの植物体からタンパク質を抽出し、免疫沈降を行った後にブタ脳から精製した tubulin と buffer 中 (50 mM HEPES-KOH pH7.5, 1 mM DTT, 1 mM MnCl₂, 50 μ M ATP) において 30°C で 30 分間反応させ 4 x SDS sample buffer を加えることで反応を停止させた。反応中はビーズが沈まないように 5 分に一回程度、反応液を軽く混ぜた。反応後のサンプルは 8% SDS-PAGE mini (TEFCO) でタンパク質を分離し、CBB で染色した後に理化学研究所中神博士に質量分析解析を依頼した。

2.15 Immuno-kinase assay

免疫沈降を行った後、1 mL の洗浄 buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.5, 1 mM DTT, 1 mM MnCl₂) でビーズを洗浄した後、110 μL の洗浄 buffer に懸濁し、50 μL ずつ二本の tube に分けた。片方の tube は buffer を取り除き、50 μL の 1x SDS sample buffer を加え、immunoblotting 用サンプルとした。もう一方の tube は buffer を取り除いた後、20 μL の kinase 反応 buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.5, 1 mM DTT, 1 mM MnCl₂, 5 μCi [γ -³²P]-ATP, 50 μM ATP, 1 μg ブタ tubulin) を加え、30°C で 30 分間反応させ 4 x SDS sample buffer を加えることで反応を停止させた。反応中はビーズが沈まないように 5 分に一回程度、反応液を軽く混ぜた。SDS-PAGE によってタンパク質を分離後、シグナルは BAS3000 (Fujifilm) によって検出した。

2.16 Multiple alignment および系統樹の作成

Actin-fragmin kinase homology region は T-coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/index.html>)、 α -tubulin の alignment に関しては、clustalw (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) で alignment を行った後、BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) により加工した。系統樹に関しては、COBALT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>) で alignment を作成した後、MEGA5.1 により、NJ 法により系統樹を作成した。kinase domain の保存配列は、WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) により作成した。*Marchantia polymorpha* の PHS1 配列に関しては、京都大学生命科学研究科河内孝之教授、西浜竜一講師、神戸大学理学研究科石崎公庸准教授に検索していただき、ゲノム配列および EST 配列をもとに cDNA 配列を推定して用いた。また *Micromonas* sp. RC299 に関しては、公開されているゲノム配列より全長 cDNA 配列を推定した。

3. 結果

3.1 PHS1(85-700a.a.)が微小管の脱重合を引き起こす

これまでに、phosphatase 不活性型である PHS1 (C792S)を一過的に発現させた場合に微小管が強く脱重合されること (Supplemental Fig. 1, by Pytela)植物体に恒常的にもしくは誘導的に発現させた場合も微小管が強く脱重合されること(Supplemental Fig. 2 by Pytela and Supplemental Fig. 3)から、PHS1 の phosphatase 活性の有無が細胞全体の表層微小管の安定性に影響を与えることが示唆されていた。一方で、DSP type phosphatase の活性中心である Cys を Ser に置換すると基質と結合したままになる”substrate trapping”が知られている(Sánchez-Pérez et al. 2000, Kinney et al. 2009)。そのため、phosphatase 不活性型 PHS1 (C792S)によって引き起こされる微小管脱重合が phosphatase に活性がないからなのか、phosphatase domain に基質が結合したままになることで、シグナル伝達経路が乱された結果なのかが不明であった。この点を明らかにするために、phosphatase domain を欠失させた PHS1 を細胞に発現させ、微小管への影響を評価することにした。もし、phosphatase に基質が結合し続けることが微小管不安定化の原因であるならば、phosphatase domain を欠失させた場合には微小管の不安定化は起こらないと考えた。

微小管への影響の評価には Pytela 同様にパーティクルガン法によって微小管可視化植物体(*35S::GFP-TUB6*, Nakamura et al. (2004))一過的発現系を用いた。この時、遺伝子導入マーカーとして mCherry を同時に発現させた (Fig. 6)。mCherry だけを発現させた場合は、微小管に影響を与えない(0/22: 微小管が消失した細胞 / mCherry が観察された細胞 Fig. 7A)。

最初に、Pytela の実験の再現を試みた。その結果、PHS1 全長を導入した場合は微小管の消失が観察されず(0/20)、phosphatase-dead である PHS1 (C792S)を発現した場合は、観察したすべての細胞で微小管が消失した(20/20)(Fig. 7B,C Supplemental Fig. 4)。また、*phs1-1*が持つ変異である R64C 変異を全長に導入した場合は、微小管の消失が観察されなかった(0/20)(Fig. 7D)。

次に、phosphatase domain を欠失した PHS1 を作成するために Domain search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)によって、phosphatase domain の位置を推定した。その結果、701-843a.a.が PHS1 の phosphatase domain であることが推定されたため、この領域を含む 701-929a.a. を deletion した PHS1 断片を *35S promoter* の下流にクローニングした。

同様の実験を行った結果、PHS1 (1-700a.a.)を発現させた細胞では微小管の消失が観察された(22/22) (Fig. 8A)。PHS1 (C792S: phosphatase-dead)と PHS1

(1-700a.a.:phosphatase-deleted)が同様の効果を微小管に対して持つことから、**phosphatase domain** そのものは微小管の消失に必要ではないことが示唆された。すなわち、“substrate trapping”ではなく、**phosphatase** に活性がないことが微小管の消失に必要であることが分かった。また、この結果は同時に 1-700a.a. に微小管の消失を促進する活性があることも示唆した。

次に、微小管の消失に必要な領域を絞り込むためにさらなる **deletion** 実験を行った。まず、欠失させる領域を決定するために SALAD (<http://salad.dna.affrc.go.jp/salad/en/>) によって、様々な植物の PHS1 において保存されている領域を推定した。この情報をもとにそれぞれの **deletion series** を *35S promoter* の下流にクローニングし、微小管可視化植物に一過的に発現させて微小管への効果を評価した(Fig. 16)。その結果 85-700a.a. では観察した細胞すべて (20/20) で微小管の消失が観察されたが他の **deletion series** では微小管の消失が観察されなかった (153-700a.a.:0/17, 85-642a.a.:0/18)(Fig. 8B-D, Supplemental Fig. 4)。以上の結果から、PHS1 による微小管の消失には 85-700a.a.が必要であることが明らかとなった。

3.2 Phosphatase 活性は微小管の消失に対して抑制的な効果をもつ

前節において、PHS1 (85-700a.a.)が微小管の安定性制御に強く影響していることが示唆された。一方で、PHS1 は **phosphatase domain** (701-929a.a.)も持つタンパク質である。そこで、**phosphatase domain** の微小管に対する効果を評価した。前節と同様の方法で効果を評価した結果、**phosphatase domain** のみ (PHS1 701-929a.a.)を発現させた場合は微小管の消失が観察されなかった (0/20) (Fig. 9A)。PHS1 全長に対して **phosphatase-dead** 変異(C792S)を導入した場合は、微小管の消失が見られることから、**phosphatase-dead** (PHS1 701-929a.a. C792S)を発現させた場合についても検討したが、微小管の消失は観察されなかった(0/20)(Fig. 9B)。この結果から、**phosphatase domain** 単独では、その活性に関わらず、微小管の安定性に影響を与えないことが示唆された。

次に微小管を不安定化させる活性をもつ PHS1 (85-700a.a.)と **phosphatase domain** の関係について検討した。それぞれを別々に *35S promoter* の下流にクローニングし、パーティクルガン法によって二つのベクターを同時に細胞に発現させた。その結果、PHS1 (85-700a.a.)を PHS1 **phosphatase domain**(701-929a.a.)と同時に発現させた場合は微小管の消失は観察されなかった(Fig. 10A)(0/20)。一方で PHS1 **phosphatase domain**(701-929a.a. C792S: **phosphatase-dead**)と同時に発現させた場合は微小管の消失が観察された(Fig. 10B)(20/20)。この結果は、**phosphatase** 活性が PHS1 (85-700a.a.)による微小

管不安定化活性を抑えていることを示唆する。

導入部で述べたように、これまでに *Pytela* によって PHS1 の全長を発現させた場合は微小管に対して効果がないが、PHS1 (C792S: phosphatase-dead) を発現させた場合は微小管の強い消失が観察された (Supplemental Fig.1)。今回観察された結果は、この結果と一致している。

3.3 PHS1 (85-700a.a.) は atypical kinase domain であり、*in vitro* で自己リン酸化活性をもつ

次に、PHS1(85-700a.a.) がどのように微小管を消失させるのかを分子レベルで明らかにするためにこの領域の生化学的機能を明らかにすることにした。そこでこの領域を query として BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 検索を行ったところ、PHS1 (208-330a.a.) が *Physarum polycephalum* (モジホコリ、真性粘菌の一種) の Thr kinase である Actin-fragmin kinase (AFK) と非常に弱い相同性を示すことが分かった (Fig. 11A,B)。この領域は phosphatase domain 同様、*Oryza sativa*, *Physcomitrella patens* の PHS1 においてもよく保存されており、他の植物種においても比較的保存された領域である (Fig. 11B, Fig. 12A)。AFK は Ser/Thr kinase の触媒ループによく保存されている (H/Y)RD(L/I)KPxN および Tyr kinase の触媒ループによく保存されている HRDL(R/A)A(A/R)N や、Glycine rich loop (GxGxxG)、activation loop 中の DFG motif といった、典型的な kinase に非常に保存されている "signature motif" を持たない atypical kinase のひとつである (Hanks and Hunter 1995, Eichinger et al. 1996, Scheef and Bourne 2005)。この kinase は actin と fragmin (*P. polycephalum* における gelsolin ホモログ) が複合体を作った時に actin の Thr202 および 203 をリン酸化し、このリン酸化は G-actin の F-actin への取り込みを阻害する (Waelkens et al. 1995)。

AFK と PHS1 で比較的保存性の高い 32a.a. の領域 (Fig. 12B) は AFK で触媒ループに当たると想定されたため (Steinbacher et al. 1999)、PHS1 も kinase 活性を持つ可能性が示唆された。

そこで、PHS1 が実際に kinase 活性を持つかを自己リン酸化活性により評価した。大腸菌で TF (Trigger factor)-strep-PHS1 (85-700a.a.) を発現させ、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ と反応させたところ、自己リン酸化活性が検出された (Fig. 13A)。また、同様に TF-strep-PHS1 全長を用いた場合も同様に自己リン酸化活性が検出された (Fig. 13B)。また、二価のカチオン (Mn^{2+}) 要求性を確かめるために、EDTA を加えたところ、自己リン酸化活性は失われた (Fig. 13B)。

次に、kinase 活性に重要なアミノ酸の同定を試みた。これまで AFK family

protein は粘菌からしか報告されておらず、活性に重要な配列およびアミノ酸を同定する試みが行われたものの同定には至っていなかった (Eichinger et al. 1996)。PHS1 の kinase domain は atypical kinase であるので、先に述べたような一般に kinase に保存されている配列は持たない。しかしながら、いくつかの atypical kinases (eg. ChaK, PI3K, AFK) においても ATP binding に Lys が重要である (Yamaguchi et al. 2001, Walker et al. 1999, Steinbacher et al. 1999, Scheef and Bourne 2005) ことが報告されていたので、様々な植物種 (*Arabidopsis thaliana* :NP 851066, *Oryza sativa* :NP 001042966, *Physcomitrella patens* :XP 001767164, *Vitis vinifera* :CBI15744, *Ricinus communis* :XP 002511103, *Zea mays* :NP 001140543) の PHS1 で保存されている Lys を探索した。その結果、シロイヌナズナの PHS1 で Lys187 と Lys682 の二つの Lys がこの 6 種類の植物間で保存されていた。保存された推定触媒ループとの距離から、Lys187 について検討した。Lys187 を Met に置換したタンパク質を大腸菌で発現させ、自己リン酸化活性によって活性の変化を検討した。その結果、この変異を導入したタンパク質では部分長・全長ともに自己リン酸化活性が検出されなかった (Fig. 13A,B)。

また、AFK の触媒ループ、およびそれに対応する *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens* および他の植物において PHS1 の部分配列のアミノ酸配列の比較を行ったところ、Asp309 と Asn324 が非常に保存されていた (Fig. 11B, 12B)。そこでこれら二つのアミノ酸に同時に変異を導入し、大腸菌によって発現させたタンパク質で自己リン酸化活性を検討したところ、これらの変異を導入したタンパク質も部分長、全長ともに自己リン酸化活性が検出されなかった (Fig. 13A,B)。

以上の結果より、PHS1 全長が kinase 活性を持ち少なくとも 85-700a.a. が kinase 活性を持つこと、K187 および D309/N324 が kinase 活性に重要であること、二価のカチオン (Mn^{2+}) を要求することが明らかとなった。

3.4 PHS1 の kinase 活性は *in vivo* での微小管不安定化活性に必要である

前述したとおり、kinase 活性をもつ PHS1 (85-700a.a.) のみを細胞に一過的に発現させた場合、微小管が強く不安定化される (Fig. 8B)。そこで、kinase 活性が微小管を消失させる活性に重要なかを検討した。前節で述べた結果から、PHS1 の kinase 活性には、K187, D309 および N324 が重要である (Fig. 13A,B)。そこで、これらのアミノ酸残基に変異を導入したコンストラクトを作成し (PHS1 (85-700a.a. K187M)、PHS1 (85-700a.a. D309A)、PHS1 (85-700a.a. N324A)、PHS1(85-700a.a. D309A N324A)) 微小管が可視化されたシロイヌナズ

ナ植物体に一過的に発現させた。その結果、これら 4 つのコンストラクトでは微小管の消失は観察されなかった(それぞれ順に 0/20, 0/20, 0/20, 0/20) (Fig. 14A-D, Supplemental Fig. 4)。

上記の phosphatase-deleted コンストラクトだけでなく、全長に変異導入によって phosphatase-dead にしたものに、さらに kinase-dead 変異を導入したものの(PHS1 K187M C792S, PHS1 D309A C792S, PHS1 N324A C792S)でも同様に微小管の消失は見られなかった(それぞれ 0/21, 0/20, 0/21)(Fig. 15A-C)。この結果から、PHS1 の kinase domain による微小管の消失には そのリン酸化活性が必要なことが示唆された。ここまでする一過的発現系のまとめを Fig. 16 に示した。

3.5 PHS1 の kinase domain は α -tubulin を *in vitro* で直接リン酸化する

これまでの結果から、PHS1 がもつ kinase 活性によって微小管の消失が引き起こされるということが示唆された。そこで PHS1 の kinase domain がどのような分子機構を介して微小管の消失を引き起こしているかを明らかにするために、この kinase の基質探索を行った。

これまでの様々な研究において、微小管関連タンパク質のリン酸化などが微小管の安定性を制御することが知られている(Drewes et al. 1997, Sasabe et al. 2006)ことから、PHS1 の kinase domain によって微小管関連タンパク質がリン酸化されることで消失が引き起こされているのではないかと考えた。そこで基質の候補としてシロイヌナズナ培養細胞(MM2d)から微小管関連画分を精製(modified from Hamada et al. 2004、材料と方法 2.8 を参照)し実験を行った。

大腸菌で発現させた PHS1 (85-700a.a. WT もしくは D309A N324A) もしくは PHS1 protein を含まない条件で微小管関連画分、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ とともにインキュベートし、SDS-PAGE で分離後 autoradiography によりリン酸化活性を検出した。その結果、多数のシグナルが検出されたが、ほとんどは PHS1 の kinase 活性に無関係なシグナルであった。しかしながら、fraction #34、36 において active な PHS1 kinase domain とインキュベートした時のみ強いシグナルが検出された(Fig. 17)。このシグナルはその分子量から tubulin に由来するものではないかと考えられた。また、もう一つの kinase 不活性型である PHS1 (85-700a.a. K187M)で同様の実験を行ったときも、この位置にはシグナルが検出されなかった(Fig. 18A)。

この可能性を検証するために、ブタ脳から精製した tubulins を同様に反応させたところ、こちらでも PHS1 (85-700a.a.)によりリン酸化された。この活性は kinase-dead の変異を導入したものでは検出されなかった (Fig. 18B)。このこと

から、tubulin が直接 PHS1 (85-700a.a.)によってリン酸化されていることが示唆された。

次に、このシグナルが α -tubulin、 β -tubulin のどちらに由来するものかを定めるために SDS-PAGE により MM2d 培養細胞から精製した α -tubulin と β -tubulin を分離した。ここでは、tubulin の分離を向上させるために、7.5% T, 0.66% C のスラブゲルを用いた (材料と方法 2.7 を参照)。この泳動により、MM2d から精製した tubulins は 3 本のバンドに分離し、上二本が β -tubulin, 一番下の一本が α -tubulin に相当するものであることを immunoblotting によって確認した(Fig. 19A)。そこで、TF-strep PHS1 全長、MM2d tubulin と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ を反応させたのち、同様のゲルを用いて tubulin を分離した。その結果、 α -tubulin に相当する位置にシグナルを検出した(Fig. 19B)。以上の結果から、PHS1 は *in vitro* で α -tubulin をリン酸化することが明らかとなった。

3.6 PHS1 の kinase domain は α -tubulin を *in vivo* でもリン酸化する

PHS1 の kinase domain が *in vivo* で α -tubulin をリン酸化するかについて検討するために、*phs1-5* (null allele)で PHS1 (85-700a.a.)-GFP を estradiol 誘導的に発現する形質転換植物体を利用した。この形質転換植物体を estradiol で処理し、タンパク質を抽出後 phos-tagTM を含む polyacrylamide gel を用いて電気泳動によりタンパク質を分離し immunoblotting により α -tubulin を検出した。その結果、estradiol により PHS1 kinase domain を発現させた植物では遅く泳動される α -tubulin のバンドが検出され、これは α -tubulin のリン酸化によるものであると考えられた(Fig. 19C、このバンドがリン酸化 α -tubulin に相当することは Fig. 24B に後ほど示す)。この結果、PHS1 の kinase domain は *in vivo* でも α -tubulin をリン酸化することが明らかとなった。

PHS1 のこの領域が *in vitro*, *in vivo* で tubulin をリン酸化することから、PHS1(85-700a.a.)を tubulin kinase domain と名付けた。

3.7 Tubulin kinase domain はブタ α -tubulin の Thr349 をリン酸化する

PHS1 による α -tubulin のリン酸化部位の同定を理化学研究所、中神弘史博士との共同研究により行った。そのために estradiol 誘導的に PHS1 (85-700a.a.)-GFP を発現する形質転換植物体 (*XVE::PHS1 (85-700a.a.)-GFP / phs1-5* background) から GFP 抗体による免疫沈降を行い、PHS1 (85-700a.a.)-GFP を得た。これを ATP および Mn^{2+} 存在下でブタ脳から精製した tubulin と反応させ、電気泳動にて分離して CBB で染色した後(Fig. 20A)、

tubulin のバンドを切り出して、質量分析による解析に供した。その結果、このバンドからは α -tubulin および β -tubulin に相当するペプチドが検出された(データ示さず)。さらに、免疫沈降によって得られた PHS1 (85-700a.a.)-GFP で tubulin を処理した時のみにリン酸化ペプチド(SIQFVDWCP \underline{p} TGFK, 2+)が検出された(Fig. 20B,C)。検出されたリン酸化 peptide はこの一種類で、液体クロマトグラフィーの結果からこのリン酸化 peptide 以外のピークには量的な差がほとんど見られなかった(Fig. 20D)ため、lane3 以外のサンプル中にはリン酸化 peptide がほとんどないと考えられた。今回検出されたリン酸化 peptide は α -tubulin に由来するペプチドであり、この Thr はシロイヌナズナの α -tubulin Thr349 に相当した。この Thr はシロイヌナズナゲノムにコードされている 6 つの α -tubulin 全て(Fig. 21A)に、また昆虫や菌類、哺乳動物の α -tubulin においても非常に高く保存されたアミノ酸であった(Fig. 21B)。またこの Thr349 は tubulin の構造から、tubulin heterodimer が微小管に取り込まれるときに interdimer 間の結合に重要なアミノ酸であると考えられている(Fig. 21C, Nogales et al. 1999)

以上の結果から、PHS1 全長および PHS1(85-700a.a.)は *in vitro* で α -tubulin Thr349 をリン酸化することが示唆された。

3.8 α -tubulin Thr349 のリン酸化は微小管への取り込みを阻害する

ここまでで、 α -tubulin の Thr349 が PHS1 によってリン酸化されることが示唆された。そこで、このリン酸化の効果を *in vivo* で評価するために GFP-TUA6 (WT)および Thr349 にリン酸化ミミック変異を導入した GFP-TUA6 (T349D)を *UBQ10 promoter*によって発現する植物体を作成した。これらの植物の子葉の表皮細胞を共焦点顕微鏡により観察したところ、GFP-TUA6 (WT)では、典型的な表層微小管が観察された(111/111 :微小管が観察された細胞数)が、GFP-TUA6 (T349D)では、蛍光が細胞質全体に散らばり微小管のパターンはどの細胞においても観察されなかった(0/110 :微小管が観察された細胞数)(Fig. 22A)。また、観察に用いたラインでは GFP-TUA6 (WT)、GFP-TUA6 (T349D)共に同程度の GFP-TUA6 が発現していた(Fig. 22B)。この結果から、GFP-TUA6 (T349D)を発現する植物体では観察可能な微小管がほとんど存在しないか、GFP-TUA6 (T349D)が微小管に取り込まれづらいという二つの可能性が考えられた。

そこで、GFP-TUA6 (T349D)を発現する植物体において微小管が存在するかどうかを検証するために、微小管マーカーである *pUBQ10:: mCherry-TUB6* 植物体と掛け合わせて、F1 植物体を観察した。その結果、GFP-TUA6 (WT) およ

び GFP-TUA6 (T349D)植物体において mCherry-TUB6 は、典型的な表層微小管として観察された(Fig. 23A)。また、この F1 植物においても GFP-TUA6 (WT) は典型的な微小管パターンを示し、mCherry-TUB6 と共局在した(Fig. 23A,B, Supplemental Fig. 5)。一方で、GFP-TUA6 (T349D)は細胞質全体に広がり、mCherry-TUB6 と共局在しなかった(Fig. 23 A,C, Supplemental Fig. 5)。このことから、GFP-TUA6 (T349D)を発現する細胞では、微小管自体は存在するものの、GFP-TUA6 (T349D)はほとんど微小管に取り込まれないことが明らかとなった。このことは、PHS1 によってリン酸化された α -tubulin は微小管に取り込まれづらくなっていることを示唆する。

3.9 高浸透圧ストレス条件下において Thr 349 がリン酸化した α -tubulin が PHS1 依存的に蓄積する

ここまでに、PHS1 の kinase domain が α -tubulin をリン酸化することが明らかとなった。次に PHS1 による α -tubulin リン酸化がどのような条件下で起こるかを検討することにした。これまでにイネ・シロイヌナズナにおいて高浸透圧ストレスによって α -tubulin がリン酸化されること、さらにイネにおいては α -tubulin Thr349 がリン酸化部位であることが報告されていた(名古屋大学 伴、修士論文 2009, Ban et al. 2013)。

そこで、まずこの現象が再現することを確認した。シロイヌナズナの明所芽生えを 60 分間 0.8 M sorbitol もしくは 0.4 M NaCl 中で処理したのち、タンパク質を抽出して phos-tag™ を用いた immunoblotting によって α -tubulin のリン酸化が起こっているかを検討したところ、伴らと同様にシフトした α -tubulin のバンドが見られた (Fig. 24A)。また、高浸透圧ストレスはしばしば ABA 依存的にシグナル伝達を引き起こすことが知られているため、この α -tubulin のリン酸化が ABA (Abscisic acid)に依存するか検討した。ABA で 60 分間処理した植物では α -tubulin のリン酸化が引き起こされなかった(Fig. 24A)ことから、高浸透圧条件下での α -tubulin リン酸化は ABA に依存しない経路であることが示唆された。

次に、このシフトしたバンドがリン酸化によるものであるかを検討した。GFP-TUA6 (WT)を発現する植物体に高浸透圧処理を行い、GFP 抗体で免疫沈降後に λ -phosphatase 処理によってシフトしたバンドが消失するか実験を行った。 λ -phosphatase によってシフトしたバンドは消失し、phosphatase inhibitors の存在下ではシフトしたバンドが消失しなかったことから、このシフトしたバンドがリン酸化によるものであることが強く示唆された (Fig. 24B)。

ところで、これまでに本論文において PHS1 は α -tubulin をリン酸化すること

を示してきた。そこで高浸透圧ストレス条件下で PHS1 が α -tubulin をリン酸化するのではないかと考え、野生型および *phs1-5* (null allele) を 0.8 M sorbitol および 0.4 M NaCl で処理し、phos-tagTM を用いた immunoblotting によって α -tubulin がリン酸化しているかを検討した。その結果、高浸透圧ストレスを与えた野生型植物のみでリン酸化 α -tubulin のバンドが検出され、*phs1-5* では高浸透圧ストレスを与えたものでもリン酸化 α -tubulin のバンドは検出されなかった (Fig. 24C)。

次に高浸透圧ストレス条件下での α -tubulin のリン酸化部位について確認する実験を行った。GFP-TUA6 (T349A) を発現する形質転換体を作成し、高浸透圧処理 (0.8 M sorbitol) を 60 分間行った。処理後、phos-tagTM を用いた immunoblotting を行った。GFP-TUA6 (WT) では、高浸透圧処理によってリン酸化によるバンドシフトが見られたが、GFP-TUA6 (T349A) ではこのバンドシフトが検出されなかった (Fig. 24D)。この結果は、高浸透圧条件下における PHS1 によるリン酸化部位が Thr349 であることを示唆している。

この結果から、高浸透圧条件下における α -tubulin のリン酸化は PHS1 依存的に起こることが明らかとなった。

3.10 高浸透圧によって PHS1 による α -tubulin のリン酸化がわずかに亢進される

次に、高浸透圧ストレスによるリン酸化 α -tubulin の蓄積が PHS1 の活性化によって引き起こされるかを検討した。液体 1/2 MS 培地で生育させた *XVE::PHS1-GFP / phs1-5* を 24 時間 estradiol 処理によって PHS1-GFP を発現させ、0.8 M sorbitol で 10 分間インキュベートした後、破碎後 GFP 抗体で免疫沈降を行った。そのビーズをブタ tubulin、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ とともにインキュベートした。その結果 0.8 M sorbitol 処理の有無に関わらず tubulin のリン酸化が検出され、高浸透圧処理を行ったものでわずかなリン酸化の亢進が見られた (Fig. 25)。このことから、高浸透圧条件下でのリン酸化 α -tubulin の蓄積は PHS1 の kinase 活性がわずかに活性化されたことによるものであることが示唆された。

3.11 PHS1 は高浸透圧ストレス条件下において微小管の脱重合を促進する

ここまでに、高浸透圧ストレス条件下で PHS1 依存的に α -tubulin がリン酸化すること、PHS1 によるリン酸化部位をリン酸ミミック型にした α -tubulin は微小管に取り込まれないこと、PHS1 の tubulin kinase domain を細胞に発現させると微小管がほとんど観察されなくなることを示した。

そこで、植物細胞内において高浸透圧ストレス条件下で表層微小管の状態が

どのように変化するかを観察した。微小管の観察には *GFP-TUB6* を *UBQ10 promoter* で発現させた野生型および *phs1-5* 植物体の暗所胚軸を用いた。暗所胚軸を 0.8 M sorbitol 水溶液でスライドガラス上にマウントして直ちに観察したものを 0 分として 10 分ごとに微小管を撮影した。この観察過程で、野生型、*phs1-5* 両方で原形質分離が観察された。野生型では 10 分前後から表層微小管の減少が観察され、30 分後には、ほとんど観察されなくなった。一方、*phs1-5* では 30 分間、表層微小管が維持され続けた(Fig. 26A, Supplemental Fig. 6)。この変化を、朽名夏麿博士(東京大学)との共同研究により 65 細胞以上で定量していただいたところ、0 分においては、野生型と *phs1-5* で細胞内の微小管の密度(単位面積当たりの微小管の長さ)は統計的に差がなかったが、10 分以降では微小管密度に統計的な差 ($p < 0.001$) が現れた(Fig. 26B)。この時のリン酸化 α -tubulin の蓄積を確認したところ、10 分程度から蓄積が確認され始めた(Fig. 26 C)。これらのことから、表層微小管は、高浸透圧条件下において PHS1 依存的に脱重合するということが明らかになった。

本研究で得られた結果を要約する。本研究では、phosphatase domain を持つタンパク質である PHS1 に、atypical kinase domain である tubulin kinase domain を新たに同定した。また、この kinase domain は、*in vivo* で微小管の脱重合を促進し、この微小管脱重合促進活性は PHS1 自身の phosphatase 活性によって抑えられていることを示した。さらにこの tubulin kinase domain は α -tubulin Thr349 をリン酸化し、このリン酸化 tubulin は高浸透圧条件下で蓄積することを明らかにした。また高浸透圧条件下において、表層微小管が PHS1 依存的に脱重合することを示した。本研究により、外部刺激に応答するリン酸化経路が微小管を制御することが明らかとなった。

4. 考察

4.1 PHS1 は kinase domain と phosphatase domain を持つタンパク質である

PHS1 はこれまでに phosphatase domain を持つタンパク質であることが報告されていた (Naoi and Hashimoto 2004, Walia et al. 2009)。今回の研究から、PHS1 は phosphatase domain に加えて微小管を強く不安定化する tubulin kinase domain も持つことが明らかとなった (Fig. 8B, Fig. 19)。

このように、一つのタンパク質上に protein kinase と protein phosphatase を共に持つタンパク質は植物 (Q940A2 など) やバクテリア (EIJ35126 など)、粘菌 (Q6XHA7 など) などにみられるものの、解析はほとんどなされておらず各々の domain の分子内での関係もこれまでに報告されていない。今回、一過的に PHS1 を発現させ、微小管への影響を評価する実験により、kinase が微小管の脱重合を促進し phosphatase はその効果を抑えるということが明らかとなった (Fig. 8B, Fig. 10A,B)。このことから PHS1 の場合は、同一分子上に存在する二つの domain は同じ経路に働きかけるとことが示唆された。同経路の domain が同じタンパク質上に存在することによって、素早い制御の切り替えが可能になると考えられる。

4.2 PHS1 は微小管中ではなく heterodimer の α -チューブリンをリン酸化する酵素であると考えられる

Tubulin には多数の修飾が知られているが、修飾酵素が微小管を好む場合と tubulin heterodimer を好む場合があることが知られている (Chu et al. 2011, Akella et al. 2010, reviewed in Janke and Bulinski 2011)。

PHS1 は細胞質に局在すること (Pytela 2010) から、tubulin heterodimer および微小管中の α -tubulin を基質にする両方の可能性が考えられた。本研究で行った *in vitro* における kinase assay (Fig. 18A,B, Fig. 19B) では微小管の形成に必要な GTP および微小管を安定化する taxol の非存在下で実験を行っているため、今回の条件では微小管はほとんど存在しないと考えられる。すなわち PHS1 は少なくとも tubulin heterodimer 中の α -tubulin はリン酸化できると考えられる。微小管中の α -tubulin をリン酸化しているかどうかについて今回は実験的に明らかにすることができなかったが、リン酸化部位である Thr349 は interdimer 間に位置するため、微小管中の tubulin には kinase がアクセスできないと推測される (Nogales et al. 1999, Johnson et al. 2011)。以上のことから、PHS1 の tubulin kinase domain は heterodimer 中の α -tubulin をリン酸化していると考

えられる。

4.3 α -tubulin Thr349 のリン酸化は tubulin heterodimer の微小管への取り込みを阻害し、重合可能な tubulin 濃度を低下させる

これまでに、tubulin の化学的修飾や微小管制御タンパク質の研究によって微小管の不安定化を促進する機構が考えられてきた。

化学的修飾では動物細胞を用いた実験によって CDK による β -tubulin Ser172 のリン酸化によって tubulin heterodimer が微小管にほとんど取り込まれなくなることが知られている。このリン酸化は tubulin 全体の 0.1%程度と見積もられており、どの程度細胞全体の微小管制御に寄与するかは明確でないが Ser 172 は β -tubulin の GTP 結合サイト近傍に位置し、GTP-GDP の交換能に影響を与えることで微小管への重合能に影響を与えると推測されている (Fourest-Lieuvain et al. 2006)。

今回の実験によりシロイヌナズナで α -tubulin Thr349 が PHS1 依存的にリン酸化することが示された (Fig. 19B,C)。また Thr349 にリン酸化ミミック変異を導入した α -tubulin は植物細胞内で微小管に取り込まれないが、その細胞に微小管自体は存在することを示した (Fig. 22A, 23A-C)。この Thr349 は interdimer 間の相互作用に非常に重要であることが立体構造を用いたモデリングによって示唆されている (Nogales 1999)。加えて *S.cerevisiae* でリン酸化ミミック型 α -tubulin (T350E、シロイヌナズナの T349 に相当: Fig. 21B を参照)を用いた生化学的な解析でもリン酸化ミミック型 tubulin が微小管に取り込まれないことが示されている (Johnson et al. 2011)。また、リン酸化ミミック tubulin (GFP-TUA6 T349D)が発現していても、微小管自体は細胞に存在することから、このリン酸化ミミック tubulin は既存の微小管の安定性にはほとんど影響を与えないのではないかと推測される。加えて、上で考察したように微小管に取り込まれていない tubulin がリン酸化されると考えられることから、このリン酸化は微小管の性質よりも tubulin の性質に影響すると考えられる。

以上のことから、Thr349 のリン酸化は既存の微小管に影響を与えるのではなく、interdimer 間の相互作用を妨げることによって微小管への取り込みを阻害しているのではないかと考えられる (Fig. 27)。すなわち、この制御は、重合可能な tubulin を減らす”sequester (Fig. 5A)”に近い制御であると考えられる。

4.4 高浸透圧ストレスは、PHS1 を介して微小管の脱重合を引き起こす

これまでも、微小管が高浸透圧条件下で脱重合するということが知られて

いた(Bartolo and Carter 1991)が、どのような分子がこの現象を担っているかは明らかとなっていなかった。

今回、野生型植物の微小管が消失する高浸透圧条件下でも、*phs1-5* 変異体では 30 分間微小管が維持され続けた(Fig. 26A,B)。このことから、高浸透圧ストレス条件下での微小管の不安定化は、PHS1 の機能を介したものであると考えられた。PHS1 によってリン酸化された α -tubulin は、リン酸化ミミック型 tubulin の局在解析(Fig. 23A,C)、リン酸化された tubulin の重合アッセイ(Supplemental Fig. 7, by Dr. Hotta)および tubulin kinase domain の一過的発現の結果(Fig. 8B)から微小管に取り込まれづらいと考えられる。また、高浸透圧条件下における α -tubulin リン酸化蓄積のタイムスケールも、微小管の消失と一致している(Fig 26A-C)。これらの事実から、高浸透圧条件下での微小管の不安定化は、PHS1 による α -tubulin のリン酸化が原因ではないかと考えられる。

高浸透圧条件下での微小管に関連したシグナル伝達系がこれまでに報告されている。微小管を安定化する活性を持つ MAP65 がリン酸化され、その安定化活性を失うと考えられている。また proteasome subunit である RPN10 の変異体(*rpn10-1*)でも *phs1-5* 同様に、高浸透圧ストレスにおいて微小管の消失が野生型に比べてゆっくり起こる(Wang et al. 2011)。そのため、タンパク質分解系も高浸透圧条件下での微小管不安定化に対して何らかの効果を持つと考えられる。このシグナル伝達系が PHS1 の経路とどのような関係にあるのかは興味深い問題である。

4.5 PHS1 および α -tubulin Thr349 のリン酸化による微小管制御は陸上植物および緑藻に限られる

これまでに伴ら(伴 2009, Ban et al. 2013)によってイネにおいて高浸透圧条件下で α -tubulin Thr349 のリン酸化が引き起こされることが明らかとなっていたが、このリン酸化に対応する修飾酵素は明らかとなっていなかった。

今回、PHS1 の tubulin kinase domain が α -tubulin Thr349 を *in vitro* および *in vivo* でリン酸化することを示した(Fig. 19)。また *phs1-5* (null allele)では高浸透圧条件下でも α -tubulin のリン酸化がほとんど検出されない(Fig. 24)ことから PHS1 は高浸透圧条件下で α -tubulin Thr349 をリン酸化する最も寄与度の高い酵素であると考えられた。

そこで、この PHS1 による微小管制御が生物界においてどの範囲に存在するかを推測するため、データベース検索を行った。PHS1 ホモログは *Chlamydomonas reinhardtii* などの緑藻、*Arabidopsis thaliana*、*Oryza sativa*、*Physcomitrella patens* などの陸上植物に存在が認められる(Fig. 12A)が、アー

ケプラスチダ界（葉緑体を一次共生によって獲得したと考えられている植物、Stoecker et al. 2009）においてさらに基部的な生物である紅色植物（*Cyanidioschyzon merolae*, Matsuzaki et al. 2004）、灰色植物（*Cyanophora paradoxa*, Price et al. 2012）にはホモログの存在が認められない。また、アーケプラスチダ界以外でも PHS1 ホモログの存在が認められなかった。このことから、PHS1 による微小管制御は、アーケプラスチダ界の限られた生物種において行われていると考えられる。これらの生物種、特に緑藻の PHS1 が tubulin を基質にするのか、高浸透圧ストレスに応答するのか、といった点は水中と陸上という全く異なる環境で生活している生物の外部刺激応答機構にどこまで共通性があるかという点で興味深い。少なくとも陸上植物の PHS1 は domain 内での保存性は高く、tubulin を基質にしているのではないかと考えられる。このことは、陸上植物の細胞においては、微小管の構成単位である tubulin を修飾することで細胞全体の微小管の不安定化を促進する独自のシグナル伝達経路を保持していることを示唆する。

また、これまでシロイヌナズナやイネを用いて行われた多数の phosphoproteome により α -tubulin Thr349 のリン酸化が検出されている (Mayank et al. 2012, Wang et al. 2012, Reiland et al. 2009, Sugiyama et al. 2008, Nakagami et al. 2010)。一方で、Thr349 は非常に保存されたアミノ酸であるにも関わらず (Fig. 21B)、動物細胞や酵母においてこれまでのところこの箇所のリン酸化は検出されていない (phosida (<http://www.phosida.com/>), phospho ELM, (<http://phospho.elm.eu.org/>), phospho-site plus (<http://www.phosphosite.org/homeAction.do?jsessionid=2A148A8DD2441FFDB85D8D216A24B593>))。このことから、この α -tubulin Thr349 リン酸化による微小管安定性制御も植物に特異的なものと推定される。

4.6 Tubulin kinase domain は、微小管研究の新たな道具となりうる

これまで、微小管研究は colchicine、nocodazol や benomyl、oryzalin、taxol といった微小管の重合・脱重合状態のバランスを変える様々な薬剤によって研究が進められてきた。薬剤は多様な生物種に効果があることが多く、入手できれば簡易に実験を行うことができる反面、一部の組織だけに効果を限定することや、表面から遠い組織を処理しづらいなどの欠点も持つ。一方で、遺伝子発現を用いれば、遺伝子導入の手間があるものの、特異的なプロモーターなどを用いて組織の位置に関係なく細胞単位・組織単位で実験を行うことが可能である。

今回、tubulin kinase domain の過剰発現が、 α -tubulin のリン酸化を通じて

微小管の重合阻害を起こすことを示した。これまでに植物以外では α -tubulin Thr349 のリン酸化は検出されておらず、tubulin kinase 様のタンパク質の存在も確認されていない。しかしながら tubulin kinase はブタの tubulin もリン酸化し(Fig. 18B)、COS-7 細胞において、微小管を脱重合する (Supplemental Fig. 8 by Mrs.Akamatsu)。加えてリン酸化ターゲットである Thr も生物界全体において広く保存されている(Fig. 21B)。これらの事実は、tubulin kinase が様々な生物種で tubulin をリン酸化し、重合を妨げることができる可能性を示唆する。この tubulin kinase domain を用いれば、他の生物種においても組織単位もしくは細胞単位で微小管を脱重合させるツールになるかもしれない。

4.7 高浸透圧はどのように PHS1 経路を活性化するのか？

今回、高浸透圧処理を与えた芽生えおよび与えていない芽生えから PHS1-GFP を免疫沈降し、tubulin に対する活性の変化を調べたがわずかな活性の亢進のみしか観察されなかった (Fig. 25)。このことは、PHS1 の kinase 活性が高浸透圧ストレスによってわずかに亢進されるものの、通常条件でも α -tubulin に対するリン酸化活性をある程度持つ可能性を示唆する。この推測は、kinase domain のみを発現させた場合は、外的刺激がなくても *in vivo* で α -tubulin をリン酸化すること(Fig. 19C)および大腸菌で発現させた PHS1 全長が *in vitro* で tubulin をリン酸化する結果(Fig. 19B)と一致する。

PHS1 の kinase domain が高浸透圧ストレスから直接制御を受けていないと考えられることから、高浸透圧によるリン酸化 α -tubulin 蓄積の制御機構については PHS1 の phosphatase domain が高浸透圧ストレスによって制御を受けている可能性も考えられる(Fig. 28)。詳細な分子機構は現時点では不明であるものの一連の一過的発現の実験から(Fig. 16) phosphatase domain は、tubulin kinase domain の効果を抑制すると考えられる。この機構を介して、高浸透圧ストレスによる制御を PHS1 の kinase domain が受けているのかもしれない(Fig. 28)。今後、ストレス条件下における PHS1 による α -tubulin のリン酸化状態の制御を明らかにするためにも PHS1 phosphatase domain 基質の同定もしくは、PHS1 の基質であることが示唆されている MPK18 (Walia et al. 2009)と PHS1 経路の関係性を明らかにすることが望まれる。

4.8 PHS1 による微小管脱重合はどのような生理的現象に関わるのか？

これまでに様々な生物現象において微小管の不安定化が関わっていることが示されてきた。例えば動物細胞において、繊毛の長さは微小管によって規定さ

れる。繊毛の長さはその動きを規定するうえで重要であるが、この繊毛の微小管の長さは、kinesin-8 family に属する KIF19 によって制御される(Niwa et al. 2012)。また分裂期微小管の動態は、kinesin-13 や stathmin を局所的に制御することによって決定されると考えられている。(Walczak et al. 1996, Tournebize et al. 1997)。他にも、微小管の状態が下流のシグナル伝達に重要な場合が知られている。動物において NF- κ B は免疫応答や初期発生に重要な転写因子であるが、この転写因子の活性化は微小管重合阻害剤である nocodazole によって引き起こされ、微小管安定剤である taxol によって阻害される (Rosette and Karin 1995, Spencer et al 1999)。他にも、ヒト培養細胞では、微小管重合阻害剤によって MAPK の活性化が起こることも示されている (Shinohara-Gotoh et al. 1991)。

その一方で、環境ストレスによる植物細胞における微小管の不安定化の意義は明確ではない。重合阻害剤もしくは微小管安定化剤を用いた実験により、塩ストレス条件下で微小管の一過的な消失が Ca^{2+} の流入に重要であるとの報告もあるものの、これが植物体の生存にどのように関わるかは不明である (Wang et al. 2007)。一つの仮説として、微小管が脱重合することによって微小管上に係留されていたタンパク質が解放され、細胞内で機能するということが考えられる。これまでに多数の微小管結合タンパク質が質量分析など (Hamada and Nagasaki et al. submitted) により同定されてきており、その中には転写因子など表層微小管から離れて機能するのではないかと考えられる因子が多数含まれる。このような因子が、細胞膜直下の表層微小管から解放されることによって何らかの機能を果たすようになるかもしれない。また alfalfa を微小管重合阻害剤で処理した場合には MAPK の活性化が起きることが示されている (Sangwan et al. 2002)。また先ほども述べたように、植物細胞において微小管の脱重合により Ca^{2+} の細胞内への流入が引き起こされることが知られている (Thion et al. 1996, Thion et al. 1998)。 Ca^{2+} は CDPK の活性化 (Sheen 1996) など様々なシグナルを活性化する。このように微小管が脱重合することで、細胞内で様々なシグナル伝達系が活性化しているのかもしれない。

これまでに、PHS1 の生理的意義を明らかにするために、*phs1-5* null allele を用いて、いくつかの試みが行われてきた。*phs1-5* は通常条件では野生型と変わらない生育をしめす (Pytela et al. 2010, 神戸修論 2011)。また、NaCl を含む培地上でも生育に差は見られなかった (神戸修論 2011)。このことは、微小管の脱重合以外にも高浸透圧ストレス応答に対して寄与度の高い現象があることを示唆し、他の経路と冗長的に働いている可能性も考えられる。少なくとも、これまでに SnRK2 (Boudsocq et al. 2004, Kobayashi et al. 2004) や MAPK3,6 (Droillard et al. 2002)、CDPK (Sheen 1996) も高浸透圧ストレスによって活性

化されることが明らかとなっており、PHS1 がこれらの経路と協調的に機能している可能性がある。他のリン酸化経路が、植物体の高浸透圧ストレス応答において PHS1 経路とどのように関わっているのかは非常に興味深い問題である。

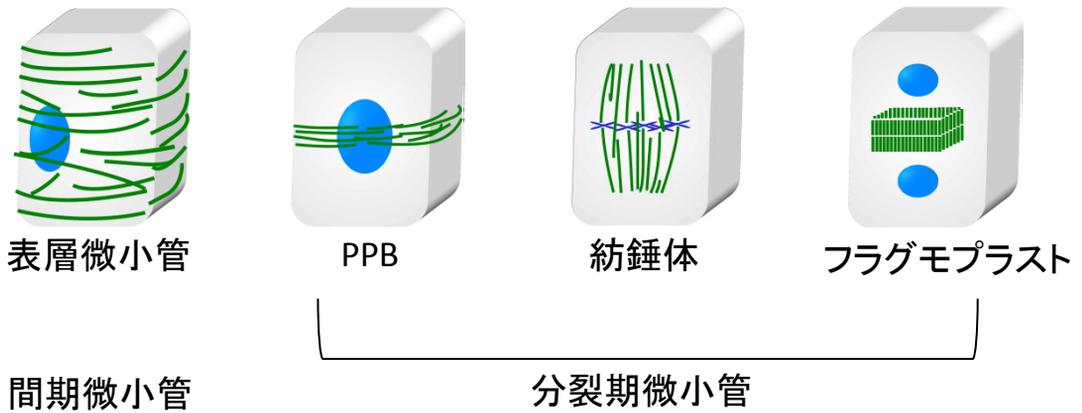
今後、どのような分子機構によって PHS1 の活性が制御されているのかを明らかにすることによっても、PHS1 がどのような生理的現象に関わっているのかも明らかになってくるかもしれない。

4.9 最後に

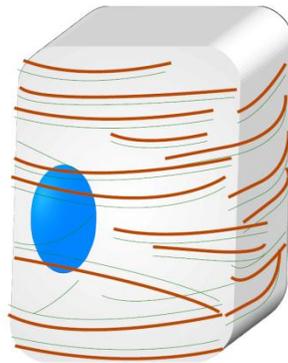
これまでに、様々なストレスによって微小管が脱重合することで「環境センサー」としての役割を果たしているのではないかとの仮説がこれまでに提唱されてきた(reviewed in Nick 2013)がどのように微小管が脱重合するかについては明らかにされていなかった。今回、高浸透圧ストレス条件下で野生型では微小管が強く不安定化される一方で *phs1-5* の微小管は維持され続けた(Fig. 26A,B)。このことから PHS1 を介した微小管不安定化促進機構の存在が明らかとなった(Fig. 28)。このことは、細胞が積極的に微小管を脱重合させるメカニズムをもつことを示唆し、この微小管脱重合に何らかの機能があることを想定させる。すなわち、植物細胞の間期微小管がこれまで強調されてきた「セルロース合成酵素のルール」以外に「環境センサー」としての役割を持っている可能性がより確からしくなったと考える。今後 PHS1 経路を切り口として、環境という物理的な刺激をどのように PHS1 経路が担っているような化学的シグナルに変換することで微小管脱重合を促進しているのか、微小管脱重合の下流でどのような現象が引き起こされているのかといったことが明らかになることが期待される。

4. 図表および付図

A



B



C



Figure 1 植物細胞の微小管は内外の状況に応じた配置をとる

- (A) 植物の微小管ネットワークは細胞周期における形態とその働きから大きく「間期微小管」と「分裂期微小管」の二つに分けられる。間期微小管は細胞膜直下に存在し、比較的安定なネットワークを作る。分裂期微小管はさらにPPB(前期前微小管束)、紡錘体、フラグモプラストに分けられ、細胞分裂に必須の役割を果たす。図中の緑は微小管、青はDNAを示す。
(modified from Wasteneys 2002)
- (B) 間期の表層微小管は、セルロース合成酵素のレールとなって、セルロース繊維が微小管にそったパターンとして作られる。緑は微小管、茶色はセルロース繊維を表す。
- (C) 間期の表層微小管は外的環境ストレスによって消失することがある。

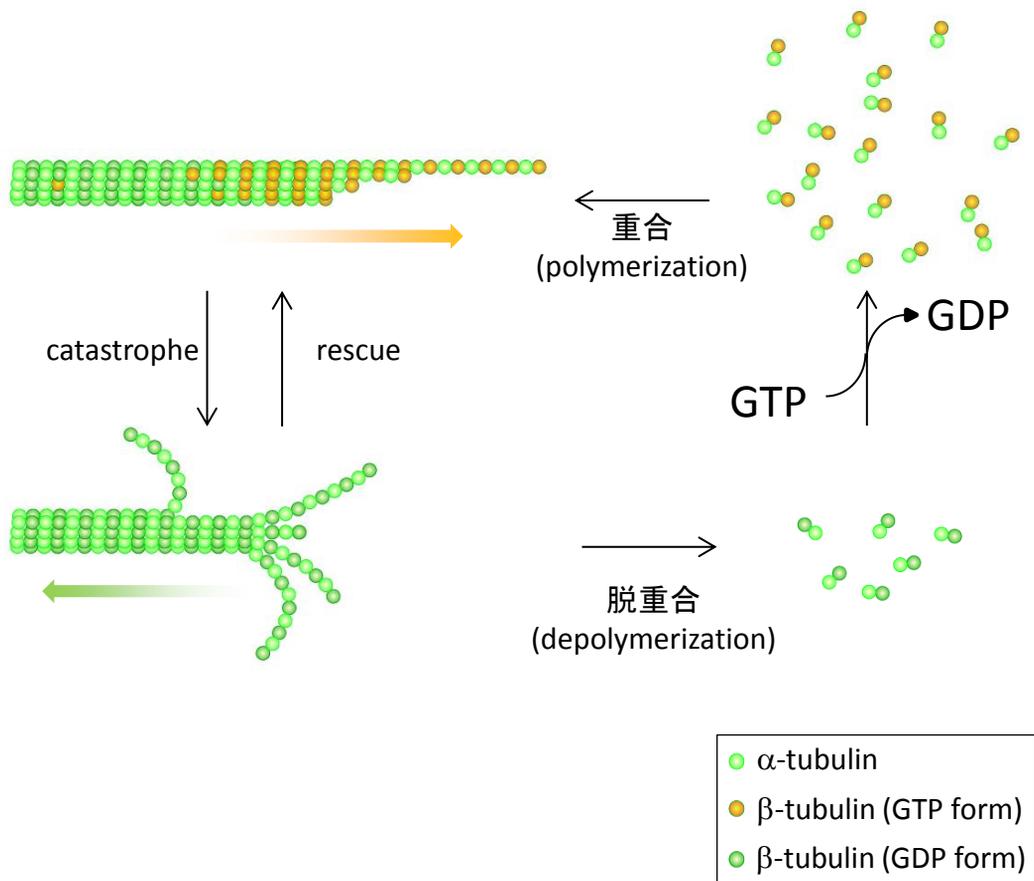


Figure 2 微小管は重合・脱重合を繰り返す動的な構造物である

α , β -tubulinはheterodimerとして安定に存在する。これが構成単位となって結合を繰り返し微小管を形成する(重合)。この時、 β -tubulinにGTPが結合していることが重要である。このGTPは微小管に取り込まれたのち加水分解してGDPとなる。GDP結合型 β -tubulinは微小管の先端から解離しやすい(脱重合)。微小管重合速度とGTP加水分解速度のバランスにより、微小管の伸縮が決定される。微小管のこの性質を動的不安定性 (dynamic instability)と呼ぶ。

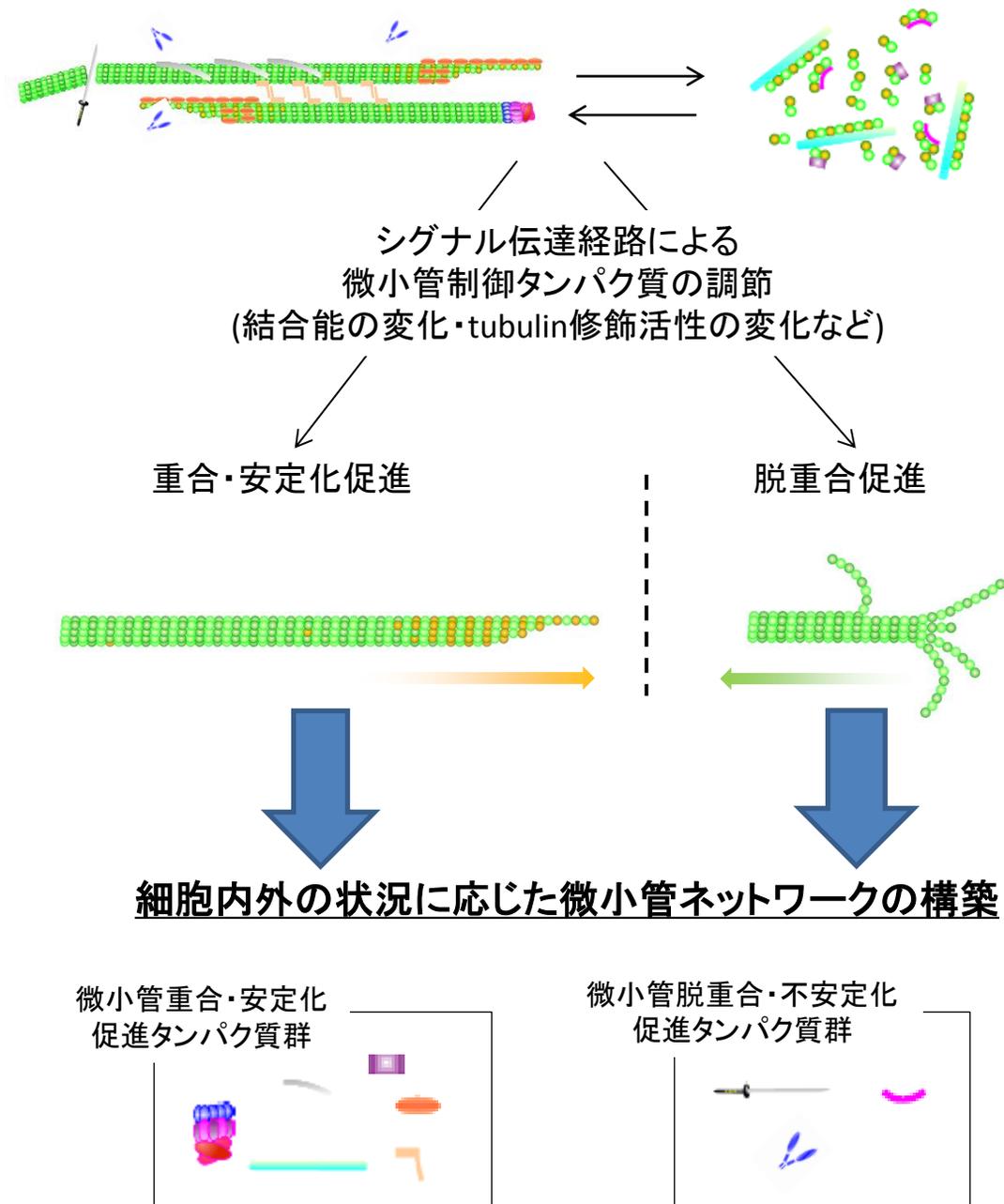


Figure 3 細胞内の微小管は微小管関連タンパク質の調節によって制御される

細胞内には様々な微小管重合・安定化促進タンパク質や、逆の働きを持つ脱重合・不安定化促進タンパク質が同時に存在する。これらの微小管への結合活性やtubulinの化学的修飾活性が細胞内外の状況に応じたシグナル伝達経路により制御されることで、状況に応じた微小管ネットワークが構築される。

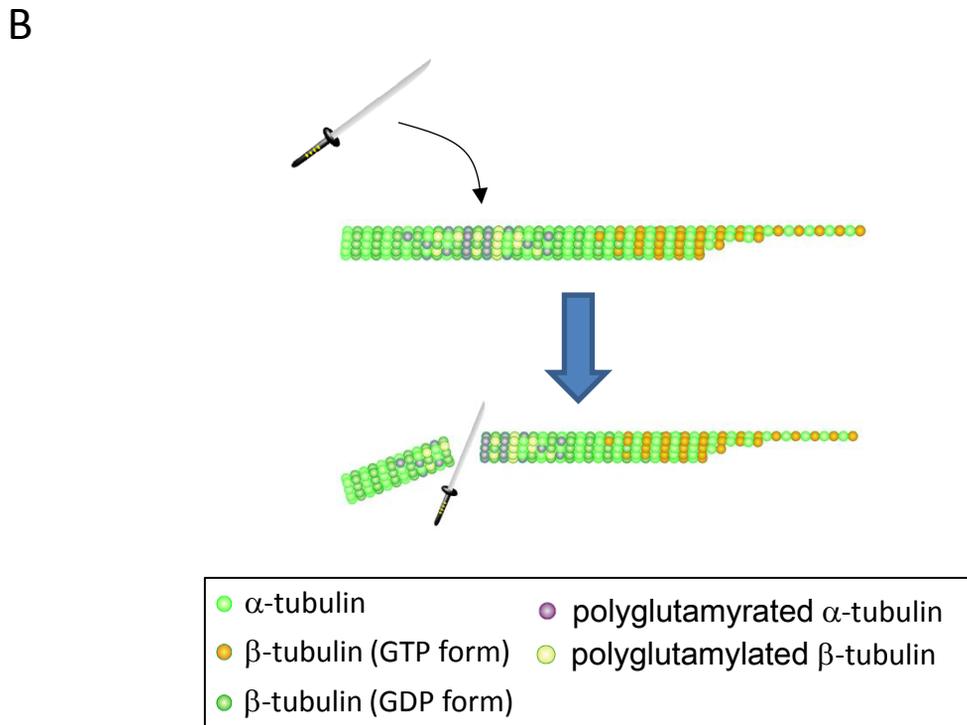
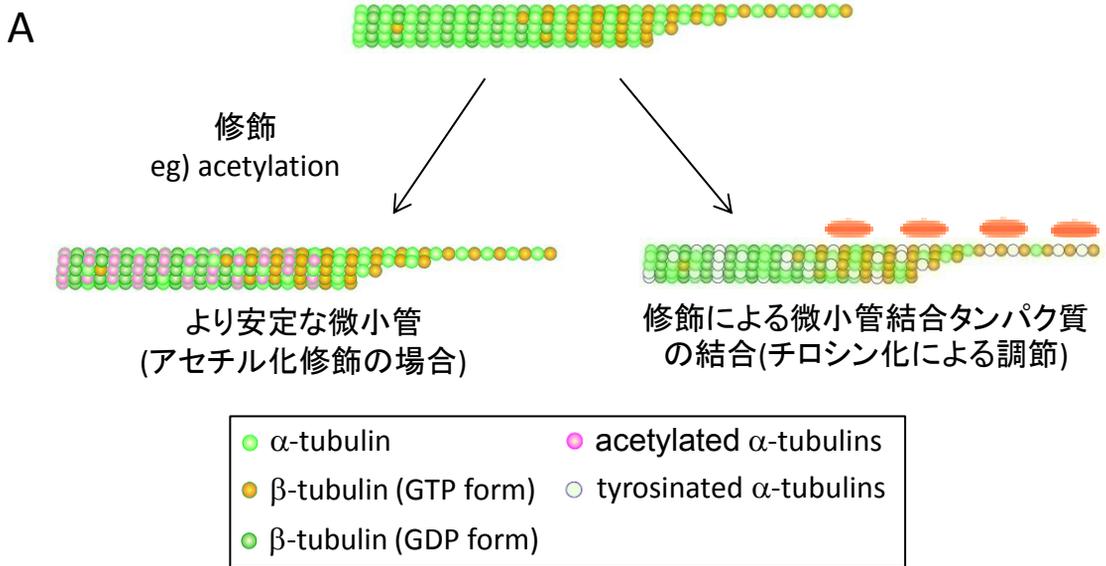


Figure 4 Tubulinの化学的修飾は微小管の安定性や結合タンパク質の結合に影響する

- (A) 微小管中の α -tubulin K40がアセチル化修飾され、安定な微小管が形成されたり、 α -tubulin C末端のtyrosine化によって結合タンパク質の結合能が調節される。
- (B) polyglutamine化された α, β -tubulinを含む微小管は切断タンパク質(spastin)によって切断されやすい。

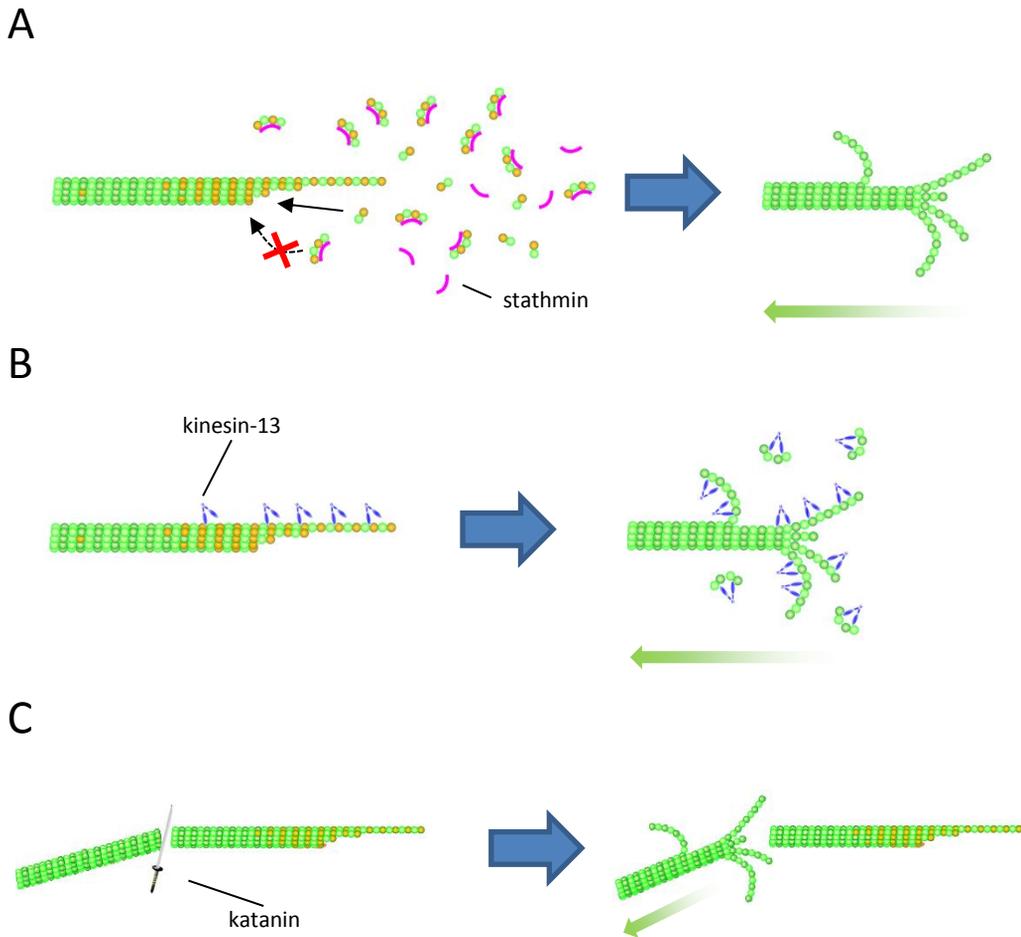


Figure 5 細胞内では微小管の不安定化を促進する3つの経路がある

- (A) Sequesterの例 重合可能なtubulinの量を減少させることにより重合を阻害することで、脱重合を優勢にさせる。tubulin結合タンパク質であるstathminが代表的なsequesterである。
- (B) Destabilizerの例 安定に存在する微小管に結合して、heterodimerを取り去ることにより、重合を促進する。Kinesin-13 familyが代表的なdestabilizerである。
- (C) Severing enzymeの例 微小管を途中で切断する。Kataninは代表的なmicrotubule severing enzymeである。

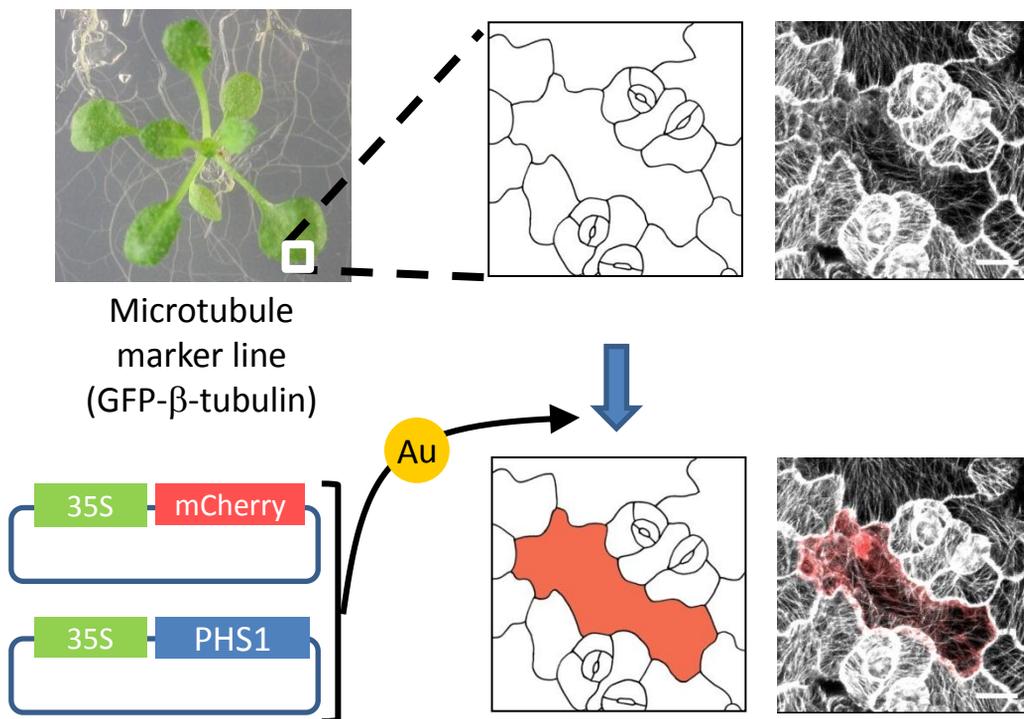


Figure 6 パーティクルガン法によるPHS1の一過的発現法の概略図

微小管マーカーラインであるGFP- β -tubulin (35S::*GFP-TUB6*植物体 Nakamura et al.2004)を水平に置いた培地上で生育させた。35S::*mCherry* (遺伝子導入マーカー)、35S::*PHS1*(全長および断片)を金粒子と混ぜ合わせ、これをパーティクルガンを用いて本葉の表皮細胞に導入した。mCherryの蛍光が観察された細胞にPHS1が発現していると考え、その細胞の微小管への影響を評価した。

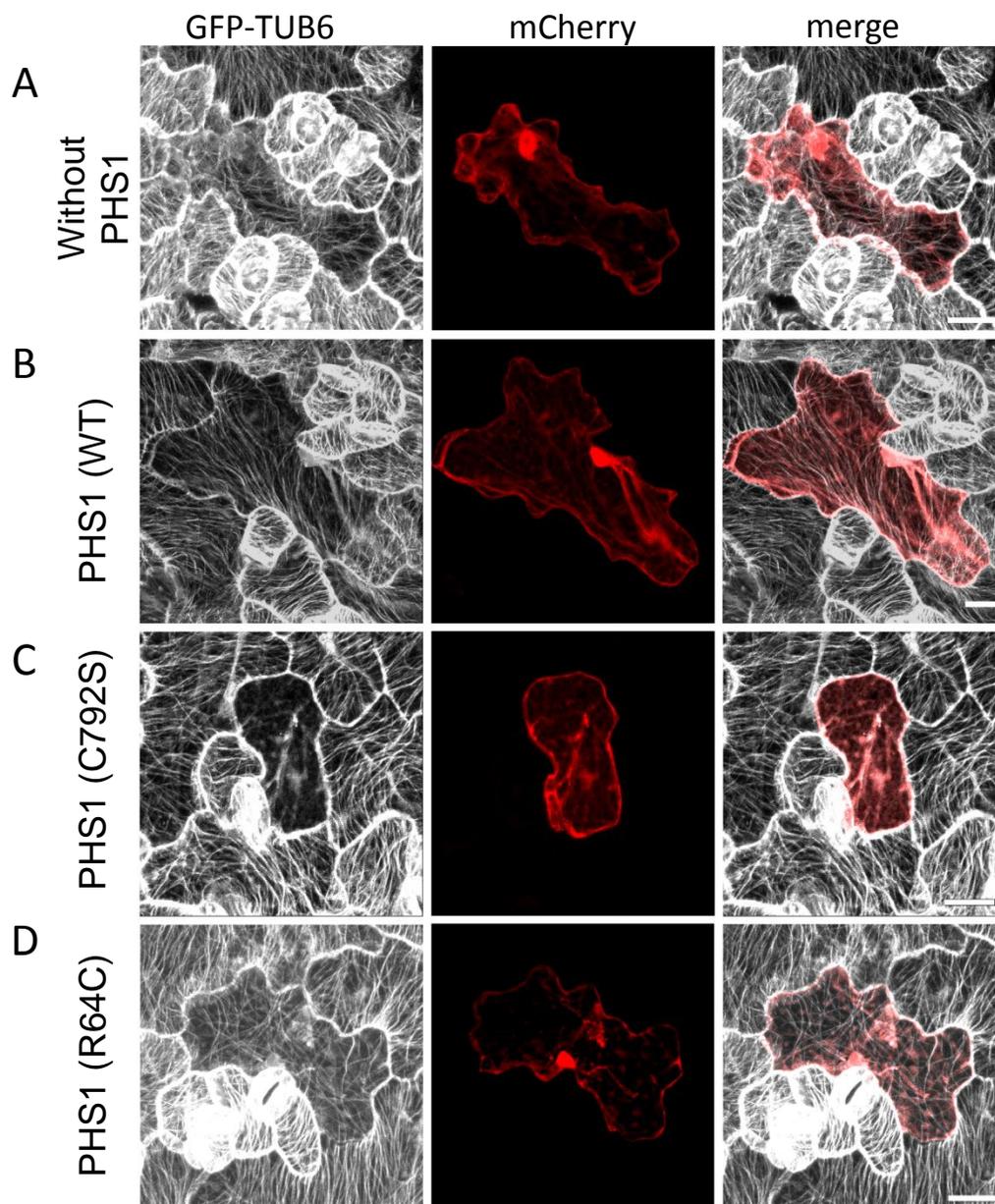


Figure 7 Phosphatase不活性型PHS1は微小管を強く不安定化する

- (A) 形質転換マーカーであるmCherryのみを発現させた場合、すべての細胞において微小管が維持されていた(0/20)。
 (B) PHS1全長を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管は維持されていた(0/20)。
 (C) Phosphatase-dead PHS1(C792S)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管の消失が見られた(20/20)。
 (D) PHS1 (R64C, *phs1-1*が持つ変異に相当する)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/20)。

文中の数字は(微小管が消失した細胞数 / mCherryが観察された細胞数)を示す。白はGFP-TUB6、赤はmCherryを示す。スケールバーは20 μ mを示す。(B,C)に関してはPytela氏による実験を再現したものである、Supplemental Fig.1を参照)

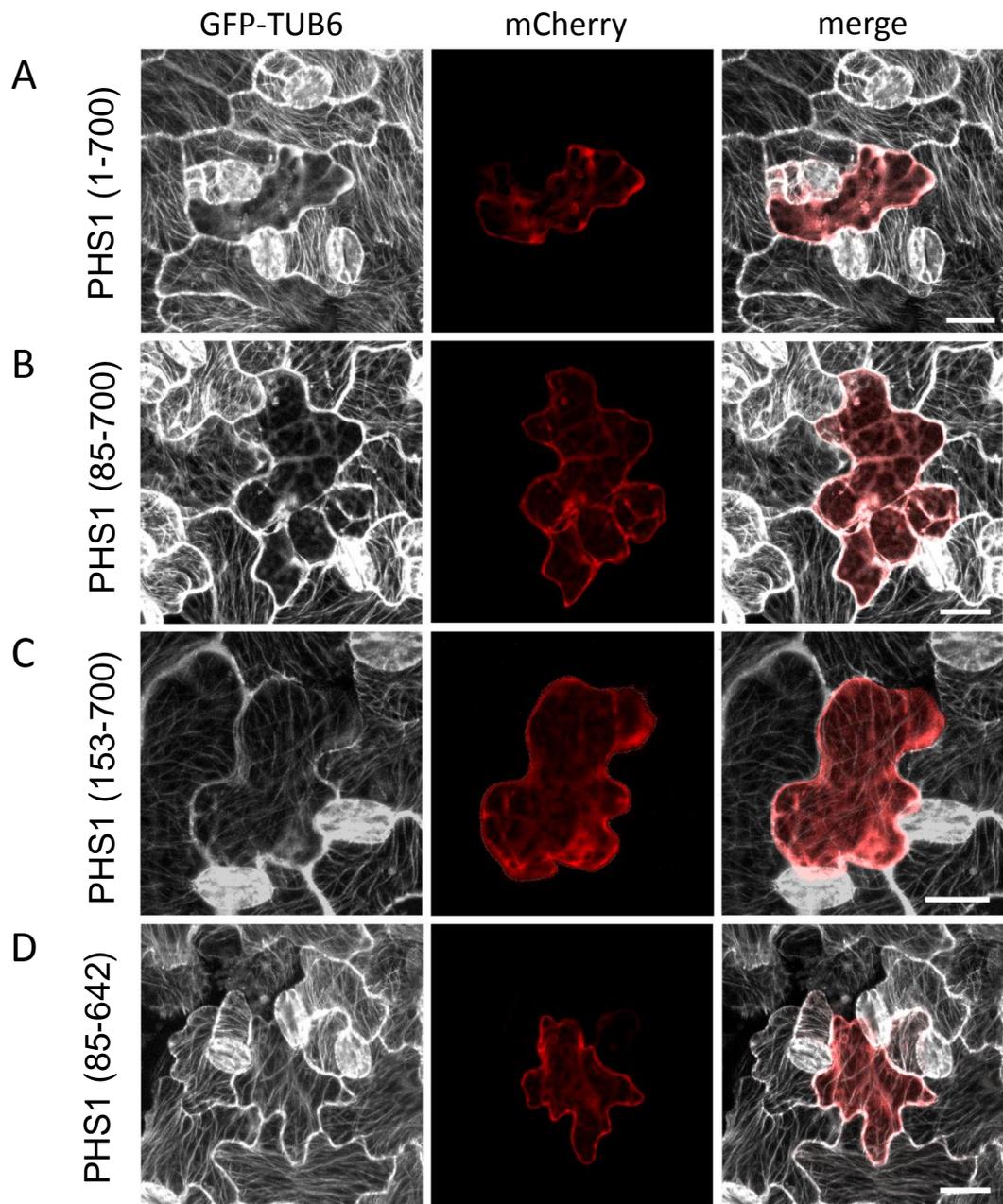


Figure 8 PHS1(85-700a.a.)は微小管を不安定化する活性を持つ最小領域である

- (A) PHS1 (1-700a.a.)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管の消失が観察された(22/22)。
- (B) PHS1 (85-700a.a.)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管の消失が観察された(15/15)。
- (C) PHS1 (153-700a.a.)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/17)。
- (D) PHS1 (85-642a.a.)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/18)。

文中の数字は(微小管が消失した細胞数 / mCherryが観察された細胞数)を示す。白はGFP-TUB6、赤はmCherryを示す。スケールバーは20 μ mを示す。

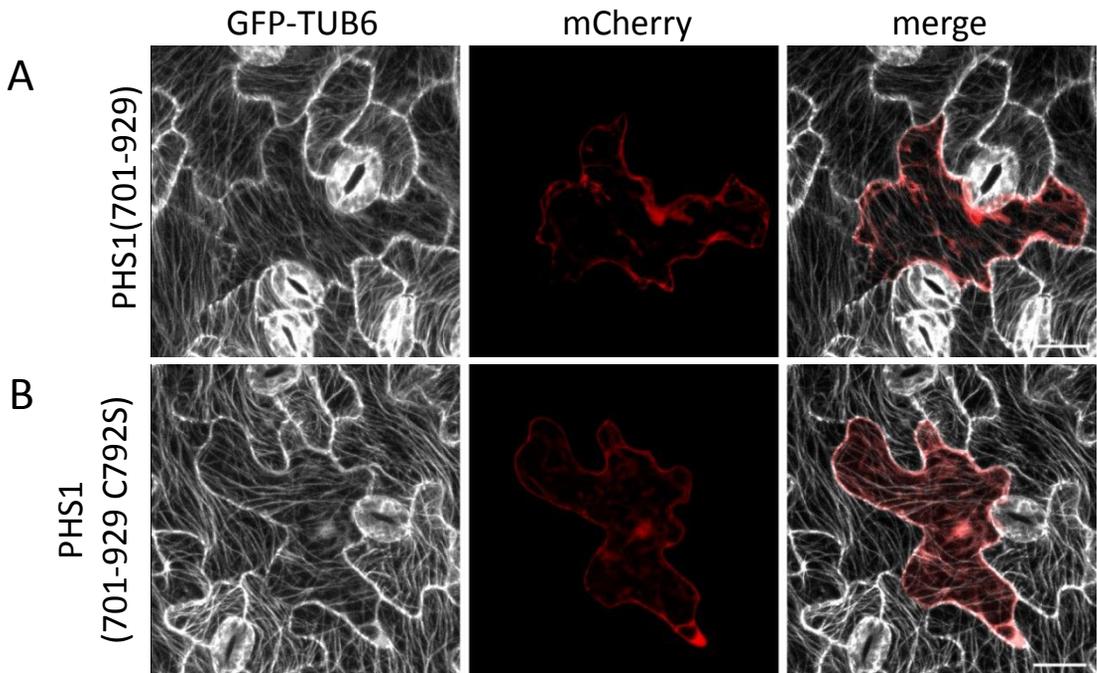


Figure 9 PHS1 phosphatase domain (701-929a.a.)のみを発現させた場合は微小管の維持に影響しない

- (A) PHS1 (701-929a.a.)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/20)。
- (B) PHS1 (701-929a.a. C792S)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/20)。

文中の数字は(微小管が消失した細胞数 / mCherryが観察された細胞数)を示す。白はGFP-TUB6, 赤はmCherryを示す。スケールバーは20 μ mを示す。

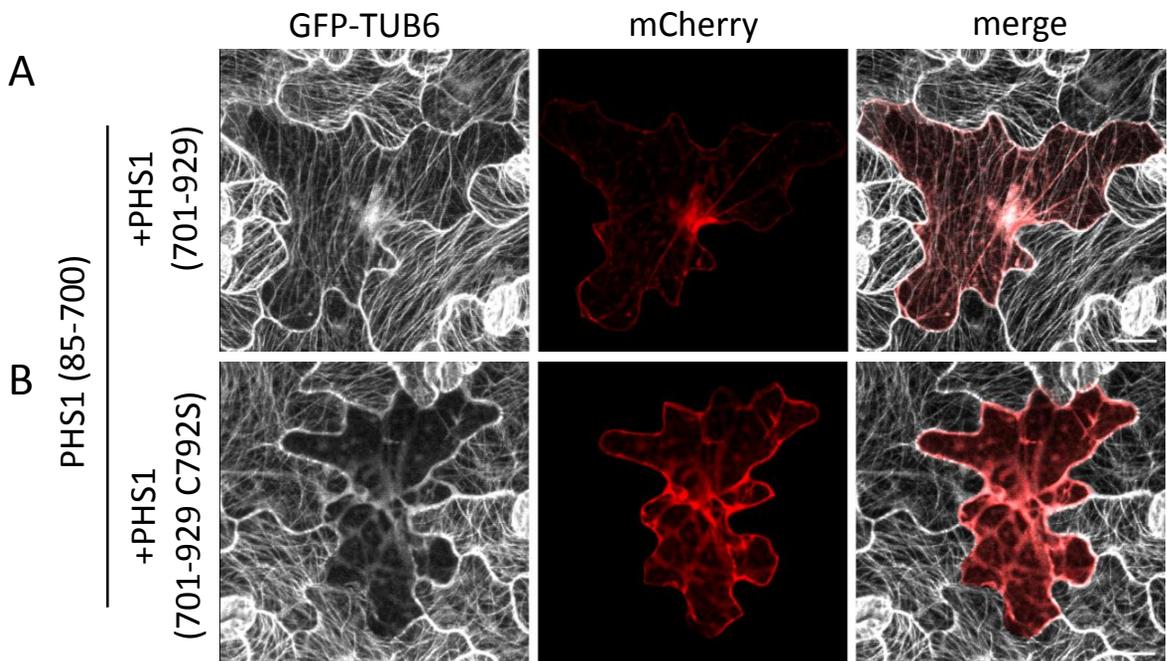
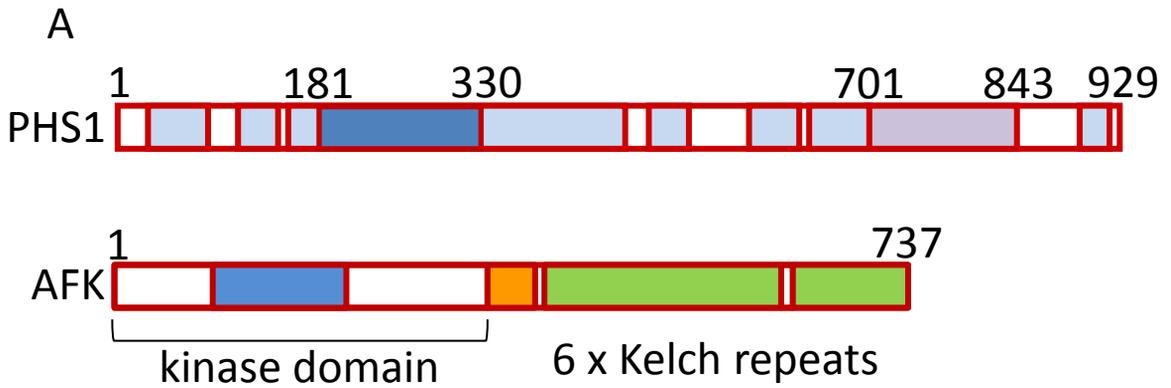


Figure 10 PHS1 (85-700a.a.)による微小管の不安定化活性はPHS1のphosphatase活性により抑制される

- (A) PHS1 (85-700a.a.)とPHS1 (701-929a.a.)を同時に発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/20)。
- (B) PHS1 (85-700a.a.)とPHS1 (701-929a.a. C792S)を同時に発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が消失した(20/20)。

文中の数字は(微小管が消失した細胞数 / mCherryが観察された細胞数)を示す。白はGFP-TUB6, 赤はmCherryを示す。スケールバーは20 μ mを示す。



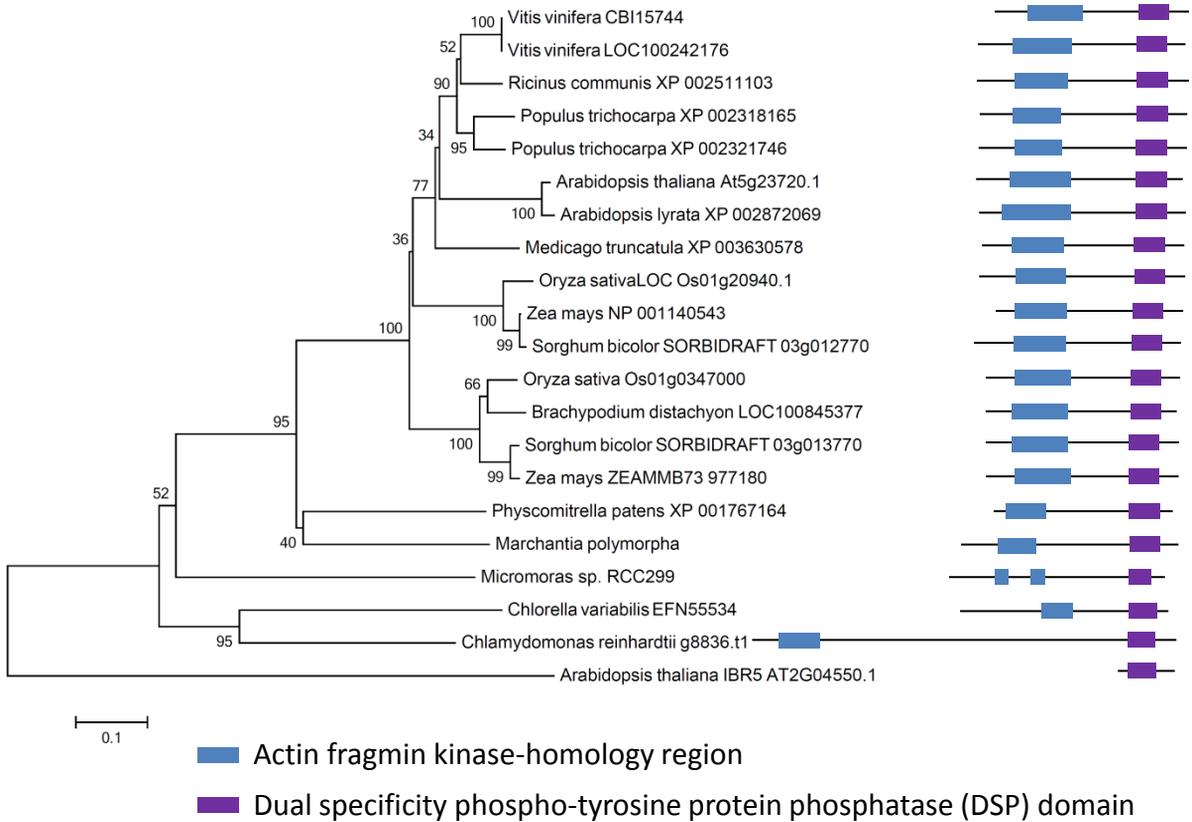
B

AtPHS1	181	E	E	A	A	V	I	K	F	A	S	S	R	M	A	T	Q	S	E	R	L	G	Y	E	F	S	K	W	L	G	V	Q	I	P	Q	A	R	V	I	H	S	C	N	P	E	W	T	L	I	K	E	A	T	E	K	A	Q	A	K	A	T	240
OsPHS1	156	E	T	A	A	V	I	K	I	A	P	S	R	M	A	T	Q	S	E	R	F	G	Y	E	L	A	K	W	L	G	V	R	T	P	Q	G	R	V	I	H	N	F	S	S	E	W	H	Q	M	K	D	A	V	E	N	A	R	D	A	A	I	215
PpPHS1	87	E	A	A	V	F	K	F	G	S	S	R	L	A	T	Q	S	E	R	L	G	I	E	I	A	R	H	L	G	V	A	T	P	Q	A	R	V	I	H	N	N	S	E	W	M	Q	I	Q	D	A	V	V	A	V	R	E	T	D	K	146		
AFK	91	E	S	G	V	F	I	V	K	R	S	T	--	N	I	E	S	E	T	F	C	S	L	L	C	M	R	L	G	L	H	A	P	K	V	R	V	V	S	N	S	E	E	G	T	N	M	L	E	C	L	A	A	I	D	K	S	--	143			
AtPHS1	241	S	E	G	D	E	V	G	E	M	T	C	S	E	L	L	E	A	E	L	S	R	C	L	L	M	S	Y	V	H	G	C	P	M	L	E	S	M	S	S	F	E	T	E	K	A	E	R	A	A	A	A	L	G	R	I	V	300				
OsPHS1	216	S	S	C	D	E	L	E	E	M	I	C	T	E	M	L	E	A	E	L	S	R	C	L	F	L	M	N	Y	V	H	G	S	P	L	E	N	T	M	P	F	D	S	H	D	S	A	E	K	T	A	E	A	L	G	R	V	I	275			
PpPHS1	147	A	N	E	N	V	I	G	L	Q	T	C	E	L	L	E	A	L	H	L	S	R	C	L	I	M	G	Y	I	R	G	K	P	L	A	E	S	K	Q	A	F	A	S	E	K	V	A	V	K	T	A	I	A	L	G	R	T	I	V	206		
AFK	144	-----	F	R	V	I	T	T	L	A	N	Q	A	N	I	L	L	M	E	L	V	R	G	I	T	N	K	L	T	T	T	S	A	P	E	V	L	T	K	S	T	M	Q	L	G	S	L	M	A	195												
AtPHS1	301	L	D	L	V	I	R	N	E	D	R	L	P	C	R	Q	L	R	W	R	G	N	P	A	N	L	L	L	T	D	R	330																														
OsPHS1	276	L	D	L	V	I	R	N	E	D	R	L	R	C	R	P	L	G	W	R	G	N	Y	A	N	L	L	V	A	D	R	305																														
PpPHS1	207	L	D	M	V	I	R	N	E	D	R	L	V	C	H	T	L	G	W	R	G	N	S	G	N	L	L	V	T	E	E	236																														
AFK	196	L	D	V	I	V	I	N	N	S	D	R	L	P	I	A	-	W	T	N	E	G	N	L	D	N	I	M	L	S	E	R	224																													

Figure 11 PHS1はAFK (actin-fragmin kinase) catalytic loop homology region相同配列をもつ

- (A) PHS1タンパク質およびAFKタンパク質の模式図を示す。AFK catalytic loop homology regionを青、DSP (dual-specificity phospho-tyrosine protein phosphatase) domainを紫、および様々なPHS1に保存された領域を水色で示した。AFKはAFK catalytic loop homology regionを青、Ser-Pro rich linkerを橙、Kelch repeatsは緑で示した。
- (B) A)に示したAFK catalytic loop homology regionのmultiple alignmentを示す。それぞれ At: *Arabidopsis thaliana* (NP 851066), Os: *Oryza sativa* (NP 001042966), Pp: *Physcomitrella patens* (XP 001767164)のPHS1を示す。AFKの配列は*Physarum polycephalum*(P80197)のAFKを示す。一致したアミノ酸は黒で、似たアミノ酸の場合は灰色で示す。

A



B



Figure 12 Actin fragmin kinase homology regionおよびDual specificity phospho-tyrosine protein phosphatase (DSP) domainは様々な植物種において保存されている

- (A) 様々な生物におけるPHS1の系統樹および二つのdomainの位置を示す。系統樹はアミノ酸配列により作成し、IBR5は外群として用いた。*Micromonas* sp.RC299 PHS1はゲノム配列からの推定、*Marchantia polymorpha* PHS1は京大生命科学研究科の西浜博士、河内教授および神戸大学理学研究科 石崎准教授に検索していただいた、ゲノム配列およびEST配列より配列を推定した。
- (B) Aに挙げた、20のPHS1ホモログの推定触媒ループの共通配列を示す。下に示した番号はシロイヌナズナPHS1 (At5g23720.1)のアミノ酸配列に対応する。活性に重要なD309, N324には*を付した。

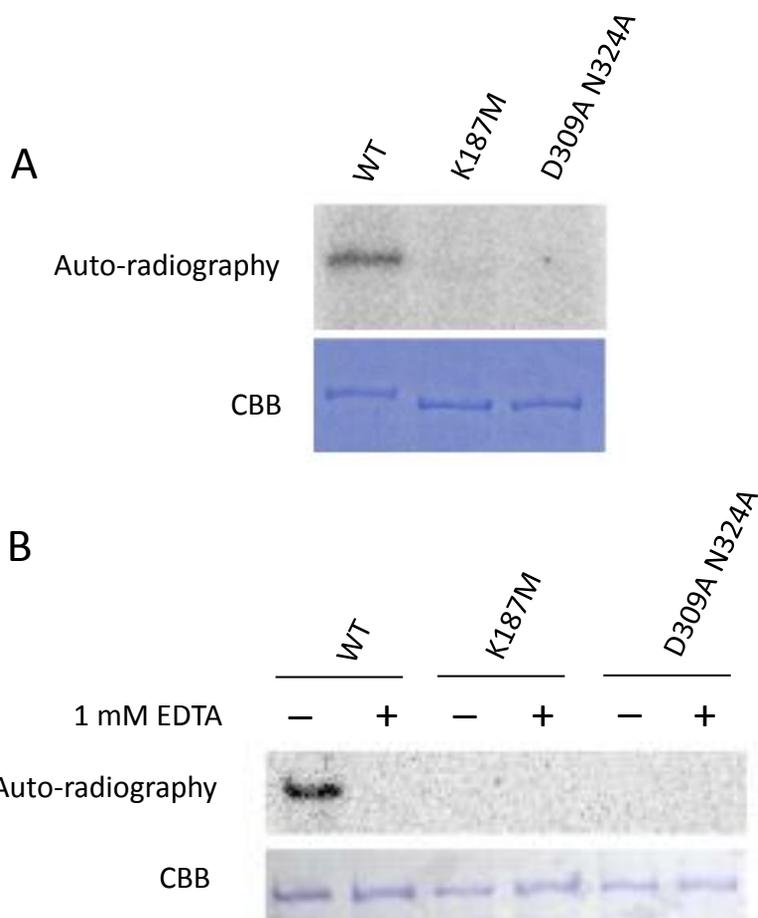


Figure 13 PHS1は自己リン酸化活性を示す

- (A) 大腸菌で発現させたTF-Strep-PHS1 (85-700a.a. WT, K187M, D309A N324A)を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ とインキュベートし、自己リン酸化活性を検討した。野生型ではシグナルが検出されたが、K187MもしくはD309A N324Aの変異を導入したものではシグナルが見られなかった。
- (B) 大腸菌で発現させたTF-Strep-PHS1 全長(WT, K187M, D309A N324A)を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ とインキュベートし、自己リン酸化活性を検討した。野生型ではシグナルが検出されたが、K187MもしくはD309A N324Aの変異を導入したものではシグナルが見られなかった。また、野生型で見られたシグナルも1 mM EDTAと同時にインキュベートすることにより検出されなくなった。

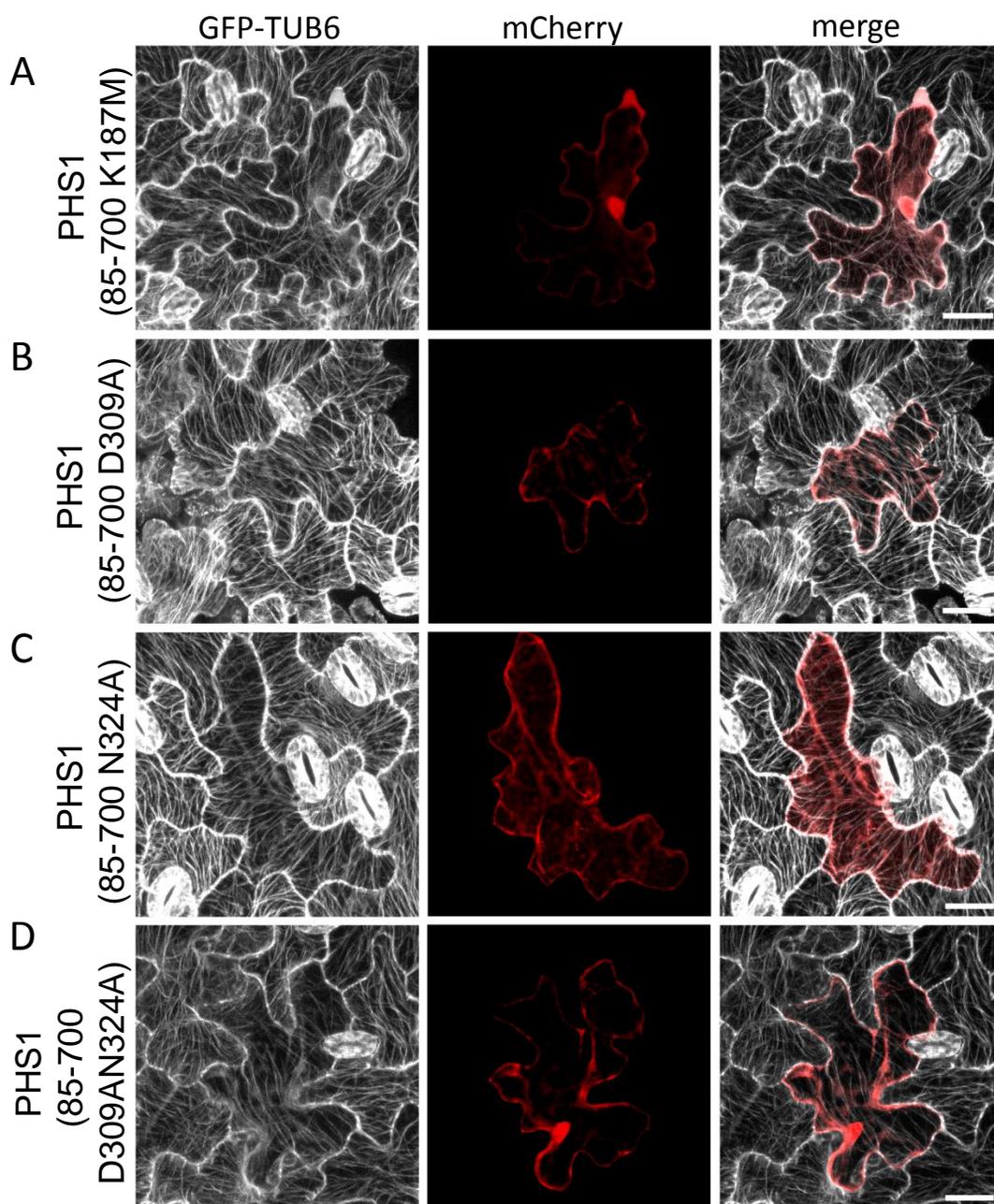


Figure 14 PHS1(85-700a.a.)による微小管の不安定化にはkinase活性が必須である

- (A) PHS1 (85-700a.a. K187M)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/20)。
- (B) PHS1 (85-700a.a. D309A)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/20)。
- (C) PHS1 (85-700a.a. N324A)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/20)。
- (D) PHS1 (85-700a.a. D309A N324A)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/20)。

文中の数字は(微小管が消失した細胞数 / mCherryが観察された細胞数)を示す。白はGFP-TUB6, 赤はmCherryを示す。スケールバーは20 μ mを示す。

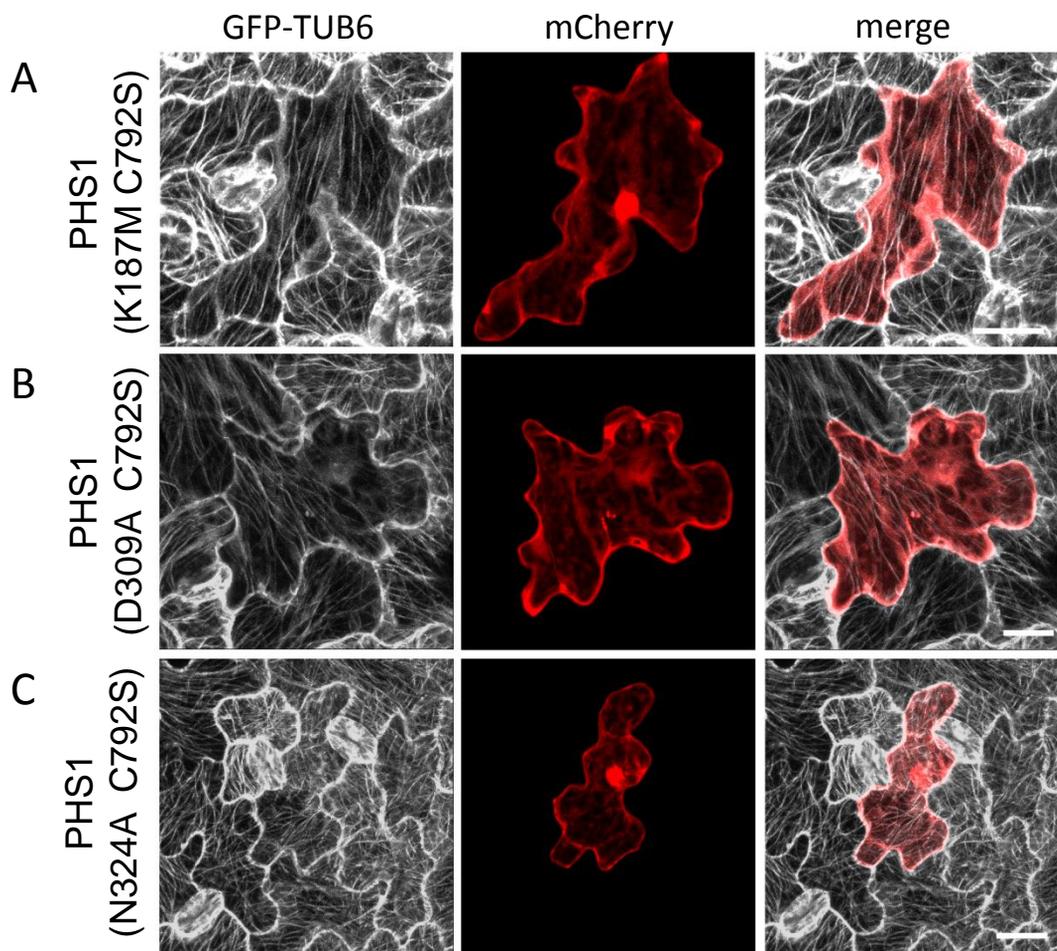


Figure 15 PHS1(C792S)による微小管の不安定化は、kinase-dead変異により抑制される

- (A) PHS1 (K187M C792S)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/21)。
- (B) PHS1 (D309A C792S)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/20)。
- (C) PHS1 (N324A C792S)を発現させた場合、観察したすべての細胞で微小管が維持されていた(0/21)。

文中の数字は(微小管が消失した細胞数 / mCherryが観察された細胞数)を示す。白はGFP-TUB6、赤はmCherryを示す。スケールバーは20 μ mを示す。

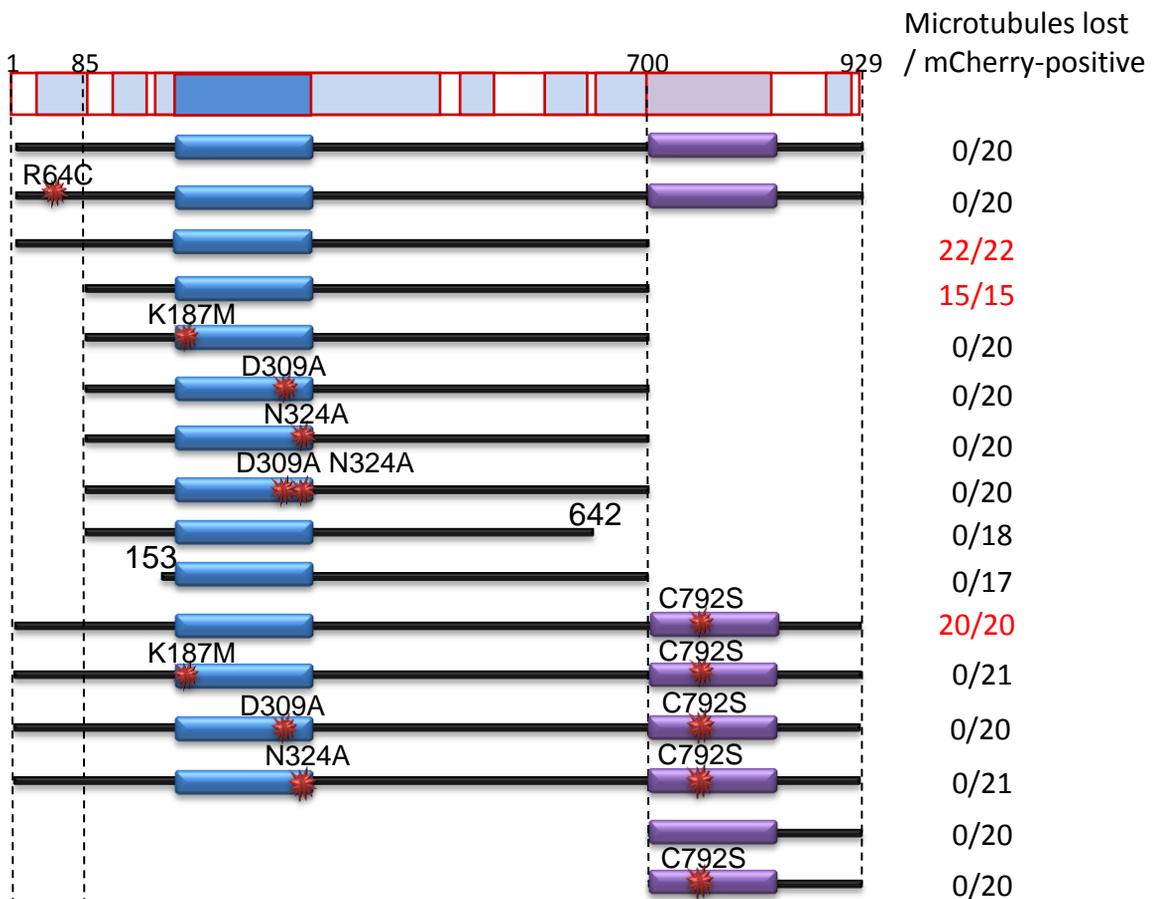


Figure 16 一過的発現系に用いたdeletion および mutation-seriesの結果のまとめ

ここに挙げたPHS1(全長、断片および変異型)を35S promoterによって一過的発現させた後に微小管を観察した。右に示した数は独立に2回行った実験での(微小管が観察されなかった細胞数/ mCherry が観察された細胞数)の合計を示す。また赤字で示した数字は微小管が脱重合したコンストラクトを示す。AFK catalytic loop homology region を青, DSP (dual-specificity phospho-tyrosine protein phosphatase) domain を紫、および様々なPHS1に保存された領域を水色で示した。

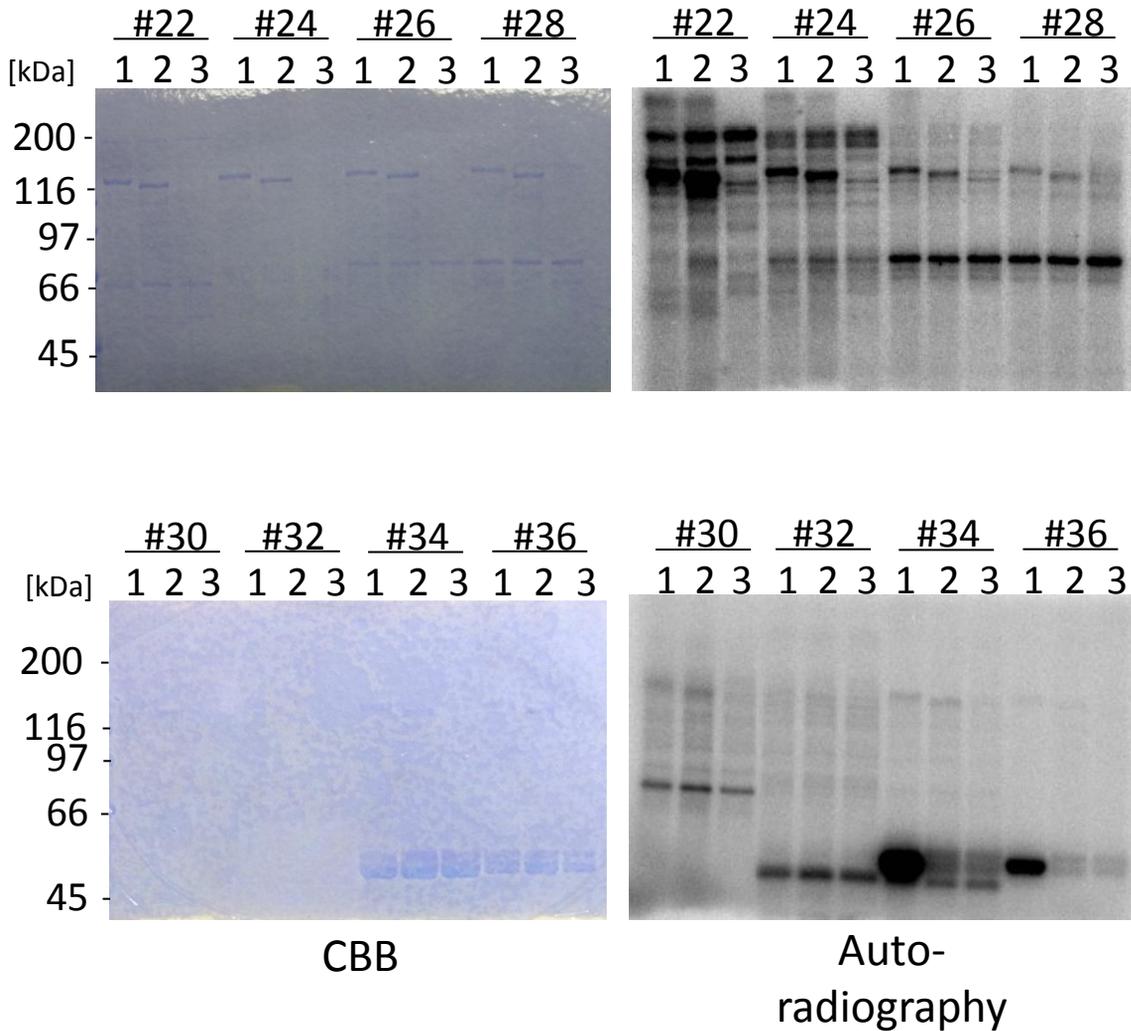


Figure 17 微小管関連画分からのPHS1 kinase domainに対する基質の探索

シロイヌナズナ培養細胞 (MM2d) から精製した微小管関連画分を、大腸菌で発現させたTF-Strep-PHS1 (85-700a.a. WT, lane1)およびTF-Strep-PHS1 (85-700a.a. D309A N324A, lane2)とともに、もしくはPHS1 proteinを含まない(lane3)条件で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ と共にインキュベートした。この実験で得られたCBB染色、autoradiographyの結果を示す。レーン上の数字は精製した微小管関連タンパク質の画分の番号を示す。

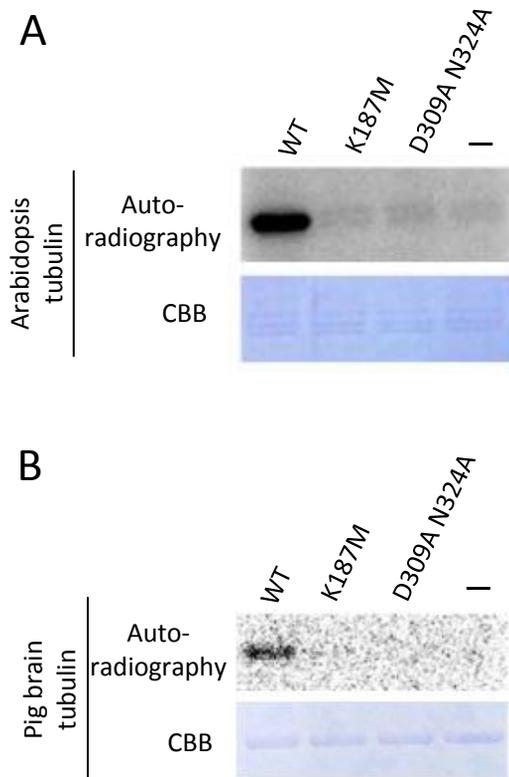


Figure 18 PHS1 (85-700a.a.) は、tubulinを直接リン酸化する

- (A) シロイヌナズナ培養細胞から精製したtubulinをTF-Strep-PHS1s (85-700a.a. WT, K187M および D309A N324A) もしくはPHS1を含まない条件(-)で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ と共にインキュベートした結果、PHS1(85-700a.a. WT)と共にインキュベートした時のみにシグナルが検出された。
- (B) ブタ脳(B)から精製したtubulinをTF-Strep-PHS1s (85-700a.a. WT, K187M および D309A N324A) もしくはPHS1を含まない条件(-)で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ と共にインキュベートした結果、PHS1(85-700a.a. WT)と共にインキュベートした時のみにシグナルが検出された。

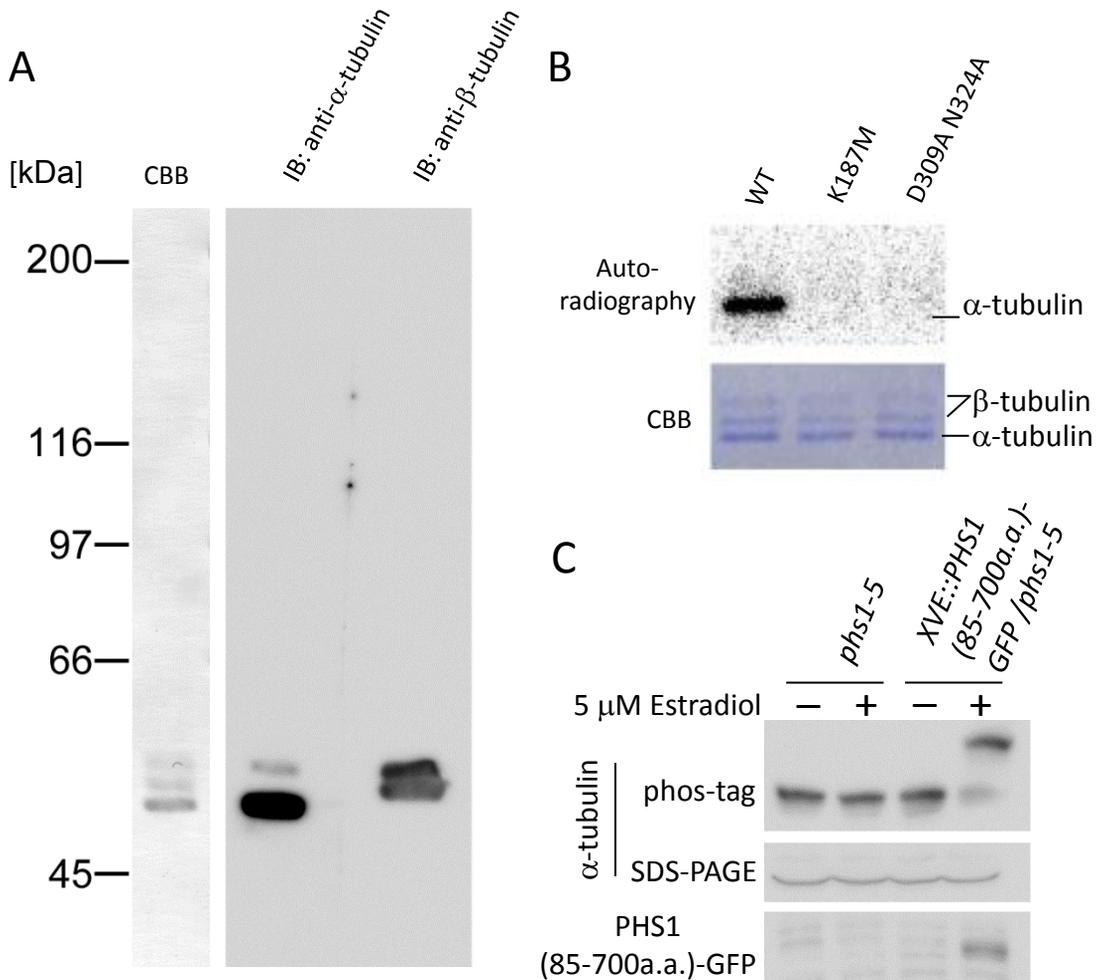
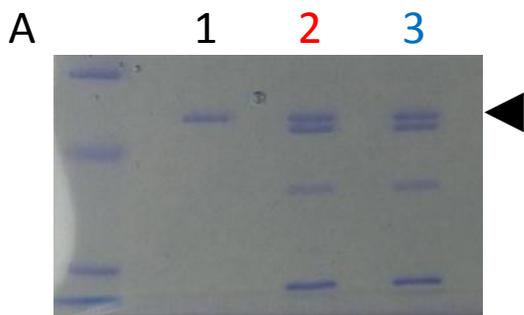


Figure 19 PHS1は、*in vitro*および*in vivo*で α -tubulinをリン酸化する

- (A) シロイヌナズナ培養細胞から精製したtubulinを電気泳動によって分離した。CBB染色によってMM2dから精製したtubulinは3本のバンドが検出された。Immunoblottingを行った結果3本のバンドのうち一番下のバンドが抗 α -tubulin抗体、上2本が主に抗 β -tubulin抗体によって検出された。
- (B) 大腸菌から精製したTF-Strep-PHS1全長とMM2dから精製したtubulinを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ とともにインキュベートしたところ、autoradiographyによって野生型のPHS1とともにインキュベートした時のみ α -tubulinの位置にシグナルが検出された。
- (C) 水耕栽培した6日目の *phs1-5* および *XVE::PHS1 (85-700a.a.)-GFP* 形質転換体の芽生えを5 μ M estradiolで12時間処理した。抽出したサンプルをphos-tagTM ゲルおよび通常のゲルで分離した後抗 α -tubulin抗体でimmunoblottingを行った。Estradiolで処理した *XVE::PHS1 (85-700a.a.)-GFP* 形質転換体のみで、遅く泳動される α -tubulinのバンドが検出された。 α -tubulinは抗 α -tubulin抗体で、PHS1(85-700a.a.)-GFPは抗PHS1抗体で検出を行った。



B

Hashimoto_gi|113205626|ref|NP_001038009.1|(100%), 50,151.7Da

Tubulin alpha-1B chain [Sus scrofa]

26 unique peptides, 56 unique spectra, 130 total spectra, 297/451 amino acids (66% coverage)



C

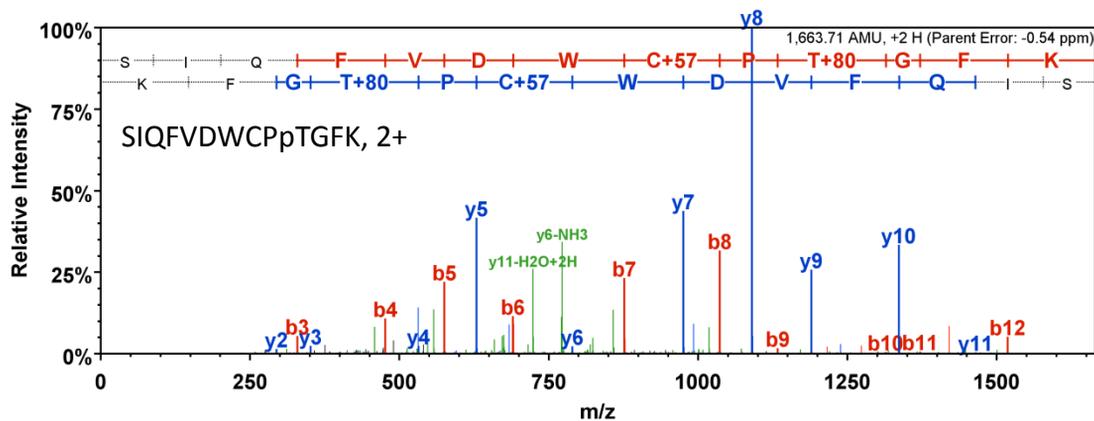
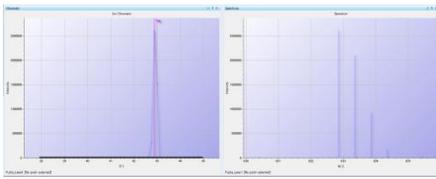


Figure 20 質量分析により、PHS1で処理したブタ α -tubulinからThr349のリン酸化が検出された (次ページに続く)

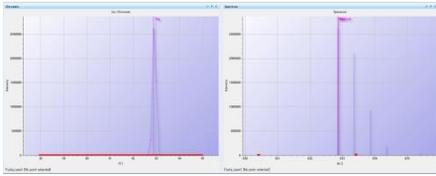
D

SIQFVDWCPpTGFK, 2+

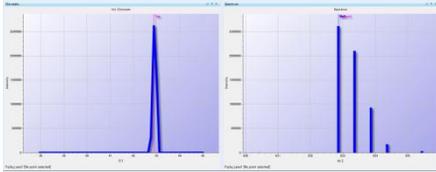
1



2

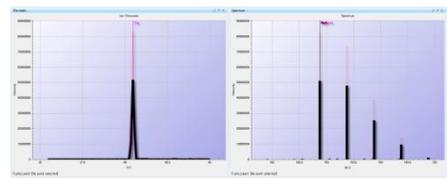


3

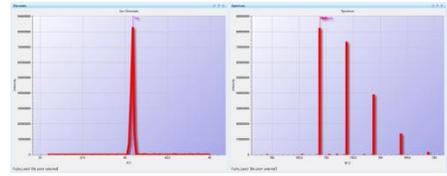


SIQFVDWCPTGFK, 2+

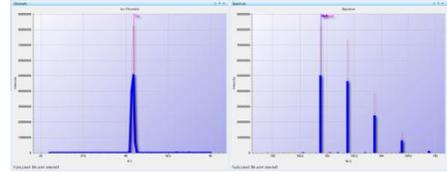
1



2

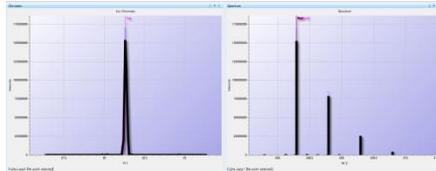


3

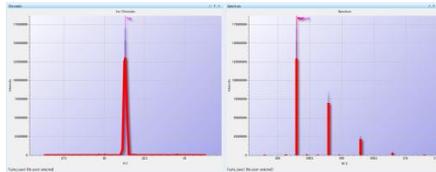


DVNAAIATIK, 2+

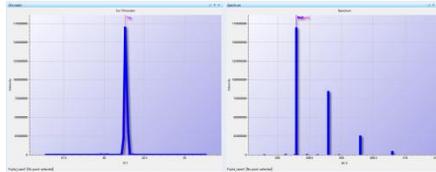
1



2

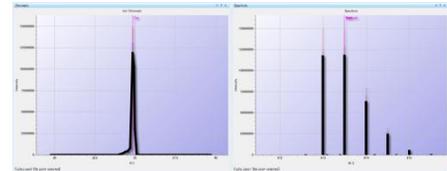


3

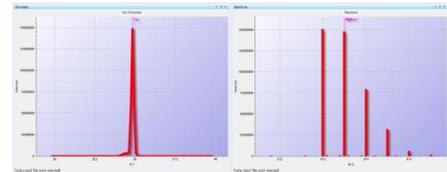


VGINYQPPTVPPGGDLAK, 2+

1



2



3

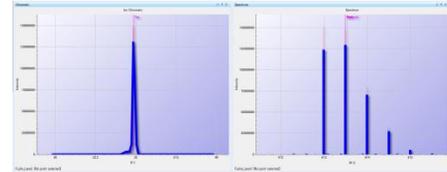


Figure 20 質量分析により、PHS1で処理したブタ α -tubulinからThr349のリン酸化が検出された (このデータは理化学研究所植物科学センター 中神弘史博士との共同研究により得られたものである)

- (A) 質量分析に供したサンプルの泳動写真を示す。ブタtubulinのみ (lane1)、*phs1-5*粗抽出液からGFP抗体で免疫沈降したビーズでブタtubulinを処理(lane2)、5 μ M estradiolで24時間処理した*XVE::PHS1 (85-700a.a.)-GFP*植物体からGFP抗体で免疫沈降を行いブタtubulinを処理した(lane3)。矢じりがブタチューブリンの位置を示す。
- (B) lane3のサンプルの解析結果を示す。このサンプルの解析においては、 α -tubulin(Tubulin-alpha 1B)のcoverageが66%であった。黄色は検出されたpeptide、緑は修飾が検出されたアミノ酸(oxidized methionine もしくはphospho-threonine)を示す。赤線はリン酸化peptideが検出されたpeptideを示す。
- (C) リン酸化が検出されたpeptideのspectrumを示す。このpeptideはlane3のサンプルからのみ検出された。
- (D) 各サンプルにおけるそれぞれのpeptideの液体クロマトグラフィーのspectrumを示す。それぞれの数字はAに示したlaneの番号に相当する。DVNAAIATIKおよびVGINYQPPTVPPGGDLAKはリン酸化peptideが検出されたpeptideの近傍のpeptideである。リン酸化peptideであるSIQFVDWCPpTGFK以外ではpeptideのピークに差が見られなかった。

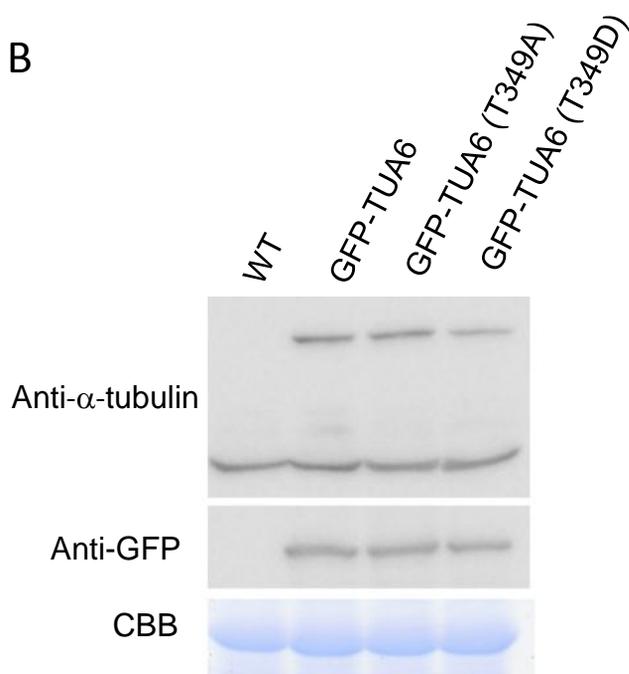
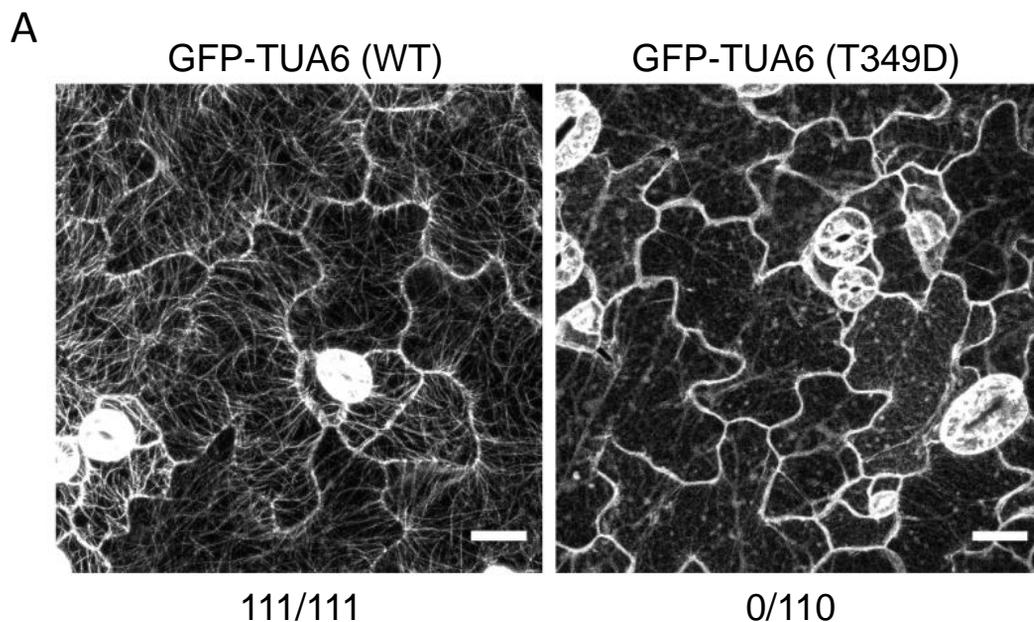


Figure 22 リン酸化ミミック型 α -tubulinは微小管に取り込まれない (1)

- (A) GFP-TUA6 (WTもしくは、T349D)を発現する植物体のGFP蛍光を共焦点顕微鏡を用いて観察した。T1で独立に単離した3ラインずつを観察したところ、野生型では111/111細胞で、T349Dでは0/110細胞で典型的な表層微小管を示すGFP蛍光が観察された。数字は、独立した3ラインの子葉を観察した合計の細胞数を示す。Scale barは20 μ mを示す。
- (B) タンパク質をpUBQ10::GFP-TUA6 (WT, T349A or T349D) から抽出し、immunoblottingにより解析した結果を示す。実験に用いたラインでそれぞれのGFP-TUA6の発現量は、ほぼ同じであった。

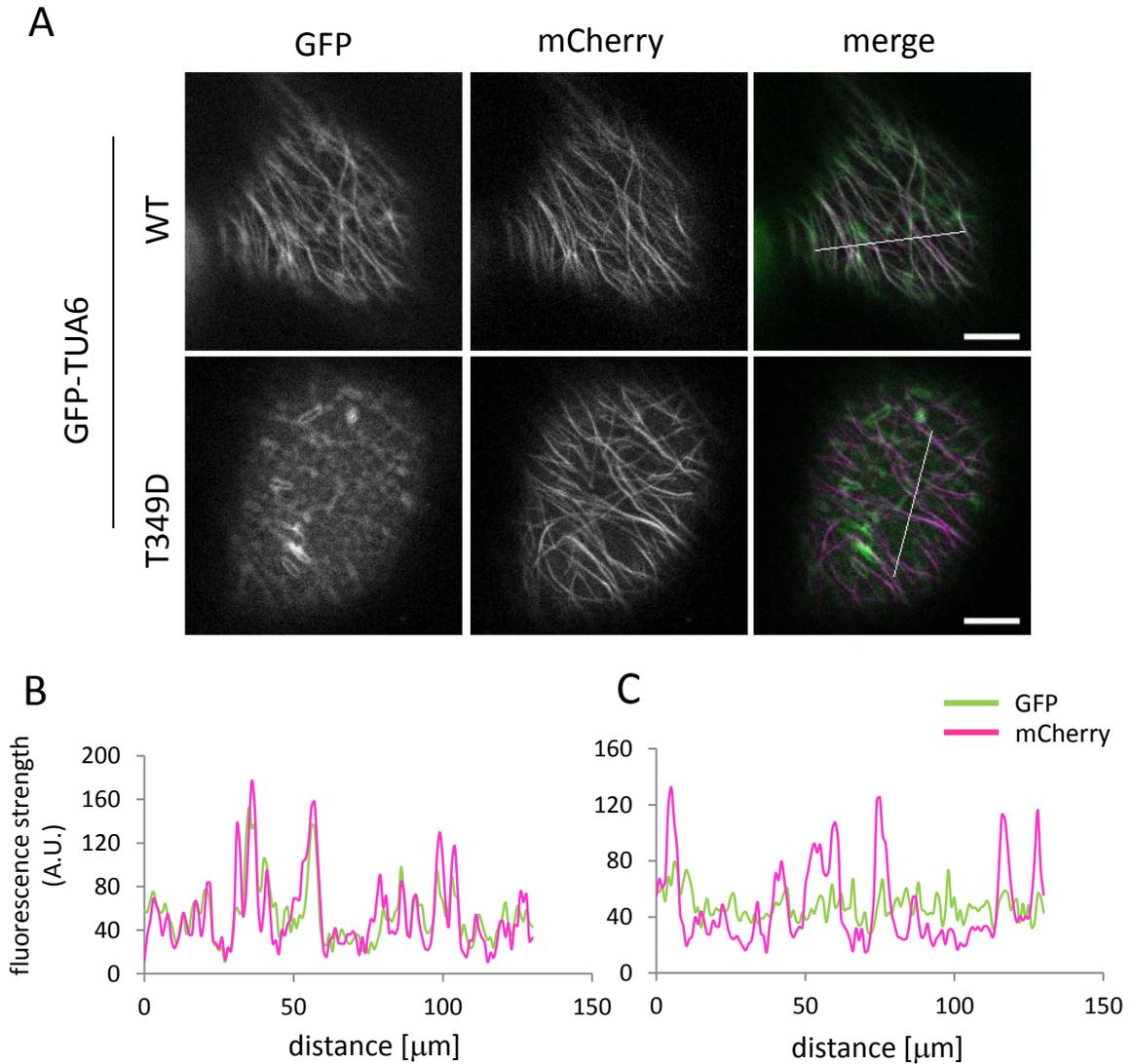


Figure 23 リン酸化ミミック型 α -tubulinは微小管に取り込まれない (2)

- (A) mCherry-TUB6とGFP-TUA6 (WTもしくはT349D)を掛け合わせ、F1植物体を観察した。GFPは緑、mCherryはマゼンタで示す。GFP-TUA6 (WT)ではmCherry-TUB6とほぼ同じパターンを示すが、GFP-TUA6 (T349D)は細胞質に広く局在し、微小管様のパターンは示さなかった。スケールバーは10 μ mを示す。
- (B) Aに示したGFP-TUA6 (WT) merge画像中の直線上のGFPおよびmCherryの蛍光の強さをImage Jを用いて計測した。GFPとmCherryのピークはほぼ同じパターンを示した。
- (C) Aに示したGFP-TUA6 (T349D) merge画像中の直線上のGFPおよびmCherryの蛍光の強さをImage Jを用いて計測した。mCherryは強いピークを示すが、GFPには特に強いピークは見られなかった。

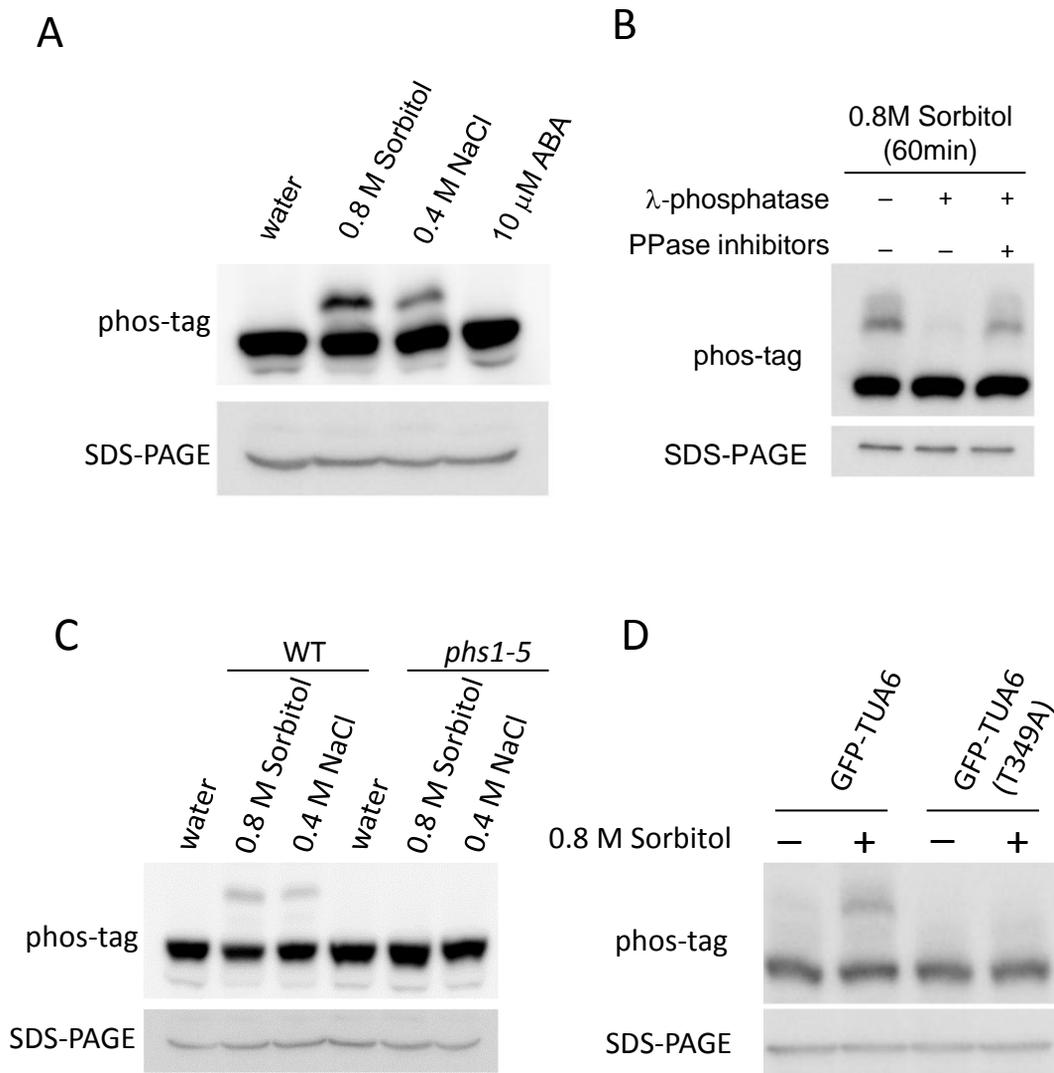


Figure 24 高浸透圧でのリン酸化 α -tubulinの蓄積はPHS1依存的に起こる

- (A) 7日目の野生型芽生えを0.8 M sorbitol, 0.4 M NaCl, 10 μ M ABA で60分間処理した後タンパク質を抽出し、phos-tag™を含むゲルおよび通常のLaemmli SDS-PAGEで泳動後、 α -tubulin抗体を用いてimmunoblottingを行った。0.8 M sorbitol, 0.4 M NaClで処理した植物のみでシフトしたバンドが検出された。 α -tubulinは抗 α -tubulin抗体で検出した。
- (B) 0.8 M sorbitolで処理したGFP-TUA6を発現する植物からGFP抗体によって免疫沈降をおこない、免疫沈降を行ったビーズを λ -phosphatase存在下、非存在下もしくはphosphatase阻害剤とともにインキュベートした。Phosphatase処理によって、phos-tag™をゲル上でゆっくり泳動されるバンドは消失した。検出には抗GFP抗体を用いた。
- (C) 野生型および*phs1-5*芽生えを0.8 M sorbitol, 0.4 M NaCl で60分間処理を行った後、(A) 同様にimmunoblottingを行った。その結果、野生型で見られたphos-tag™ gel上でのバンドシフトは*phs1-5*では見られなかった。検出には抗 α -tubulin抗体を用いた。
- (D) GFP-TUA6およびGFP-TUA6 (T349A)を発現する植物体の芽生えを0.8 M sorbitolで60分間処理した後、(A)同様に泳動を行い、GFP抗体でimmunoblottingを行った。その結果、GFP-TUA6で見られたphos-tag™ gel上でのバンドシフトがGFP-TUA6 (T349A)では見られなかった。検出には抗GFP抗体を用いた。

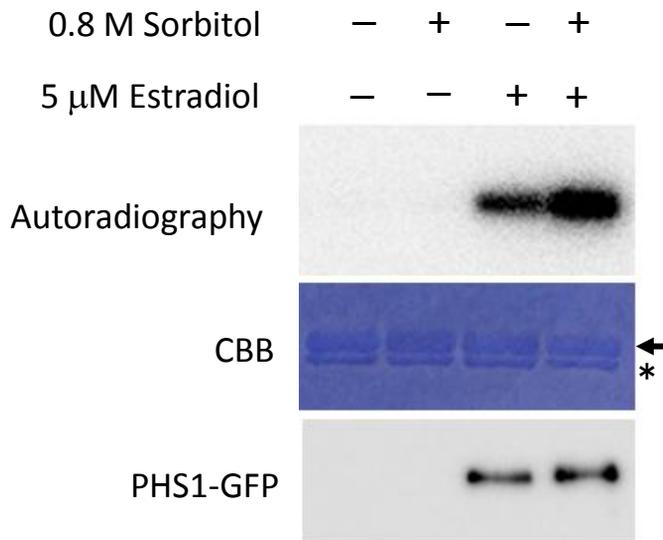


Figure 25 高浸透圧によって、PHS1による α -tubulinのリン酸化がわずかに亢進される

液体1/2MS培地中で生育させたXVE::PHS1-GFP / *phs1-5*を24時間estradiolで処理後、0.8 M sorbitolで処理した。GFP抗体で免疫沈降を行い、ブタ脳から精製したtubulinと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ と共にインキュベートしtubulinに対するリン酸化活性を評価した。高浸透圧ストレスの有無に関わらずtubulinのリン酸化が検出され、高浸透圧ストレスによってわずかにリン酸化活性が亢進された。矢印はtubulin、*は免疫沈降に用いたIgGを示す。PHS1-GFPの検出には抗PHS1抗体を用いた。

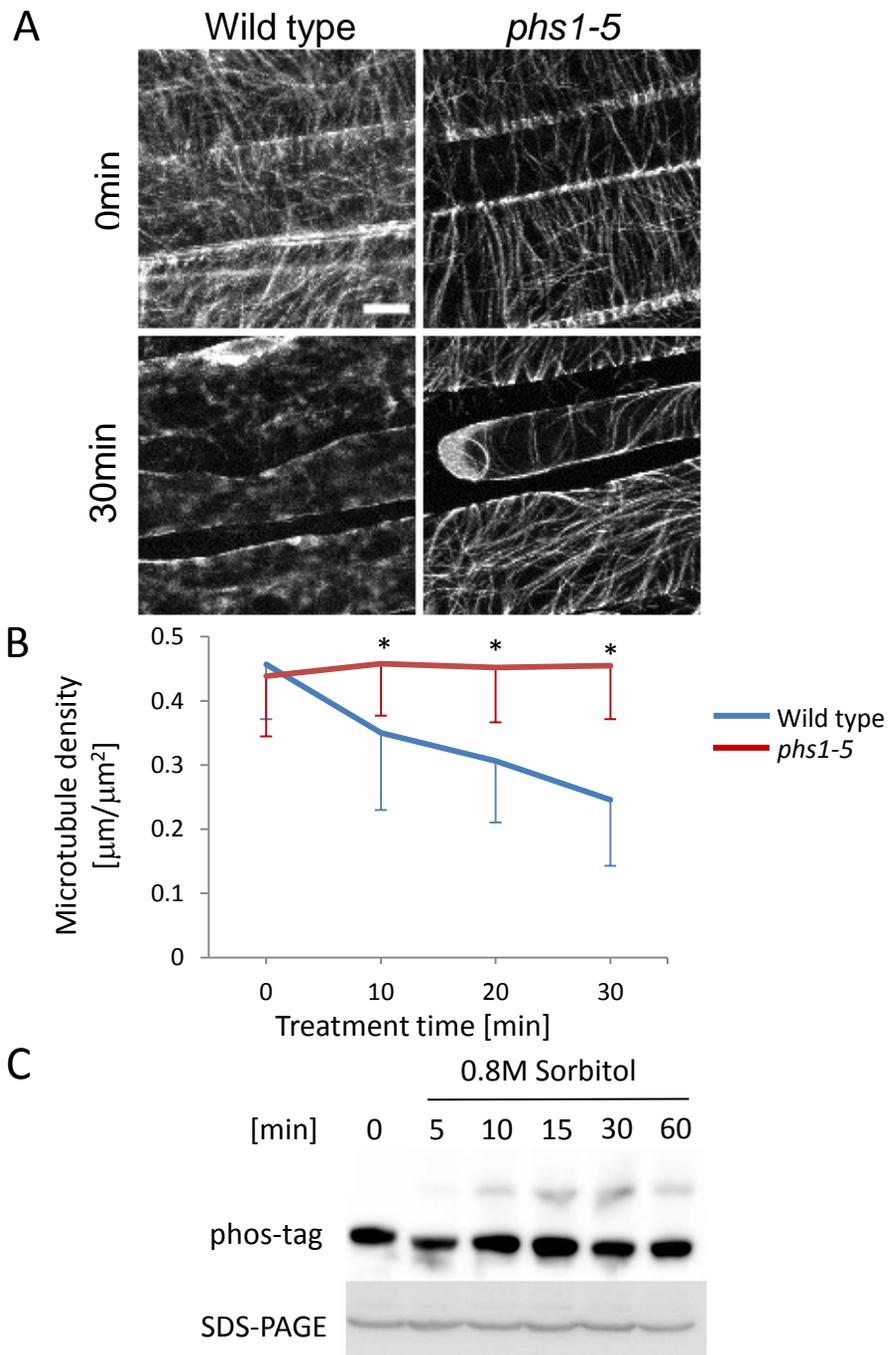


Figure 26 高浸透圧条件下で微小管はPHS1依存的に脱重合する

- (A) GFP-TUB6を発現する野生型植物および*phs1-5*の暗所胚軸を0.8 M sorbitolで30分間、スライドガラス上で処理した。その結果、野生型では30分で微小管が消失したが、*phs1-5*では微小管が維持された。この図はSupplemental Fig.6の白い四角で囲った部分を切り抜いたものである。スケールバーは10 μm を示す。
- (B) スライドガラス上で、GFP-TUB6を発現する野生型および*phs1-5*を0.8 M sorbitolで処理し、10分毎に共焦点画像を取得し、細胞内での微小管密度(細胞内での微小管の長さの合計[μm]/細胞の面積[μm^2])を測定した。野生型では時間と共に微小管密度の減少が認められたが、*phs1-5*では微小管密度が変化しなかった。定量は各々65細胞以上で行った。バーはSD値を示す。(Mann-Whitney U test * $p < 0.001$) (B)は東京大学新領域創成科学研究科朽名夏磨博士に定量化していただいた。
- (C) 3日目の野生型植物の暗所胚軸を0.8 M Sorbitolで上に示した時間処理し、 α -tubulin抗体でimmunoblottingを行った。その結果、10分程度からリン酸化 α -tubulinのシグナルが検出された。検出には抗 α -tubulin抗体を用いた。

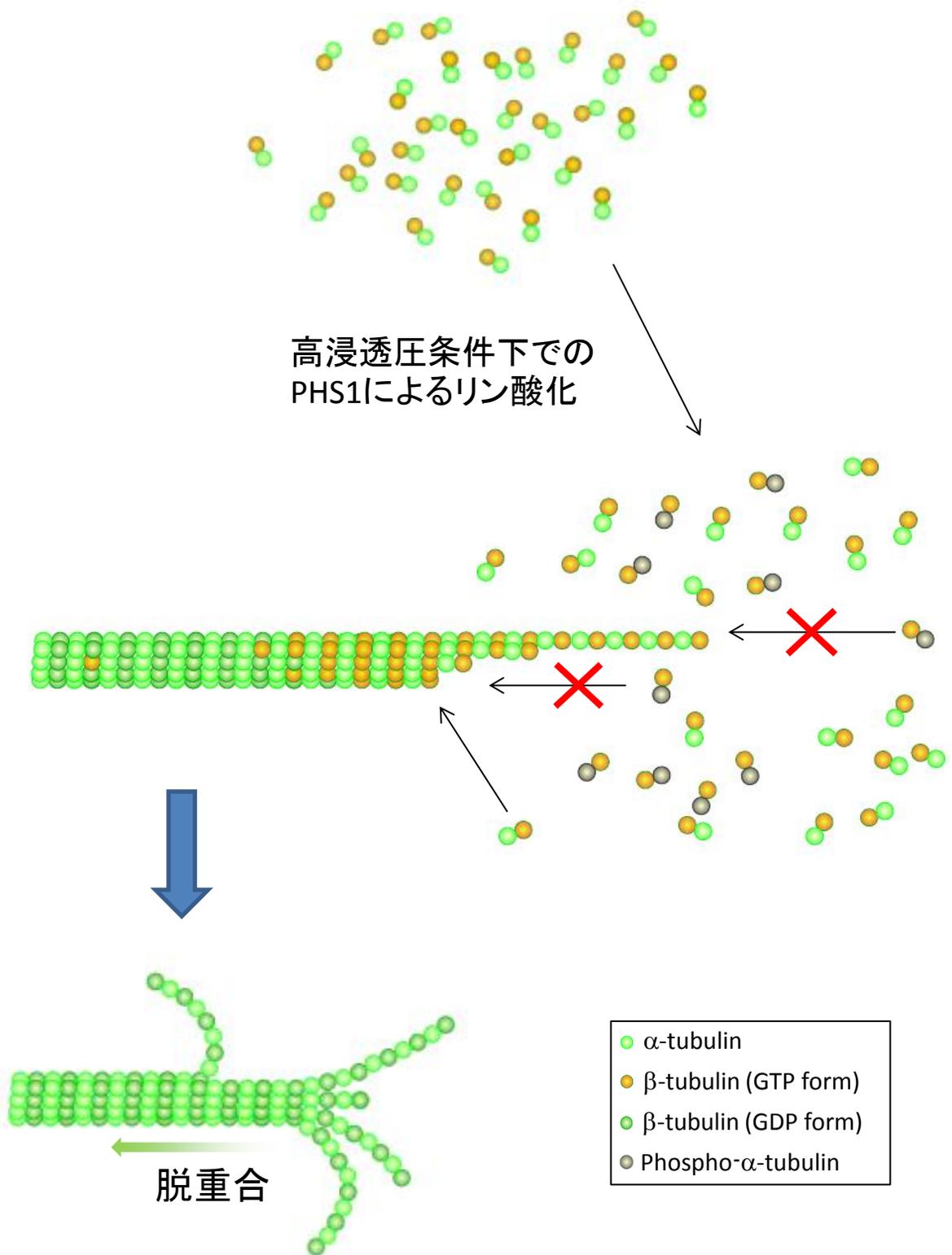


Figure 27 α -tubulin Thr349のリン酸化による微小管の脱重合モデル

PHS1によってThr349をリン酸化された α -tubulinは微小管に取り込まれない。その結果として重合可能なtubulin濃度が低下し、微小管の脱重合が重合に比べて優勢となり微小管の脱重合が促進される。

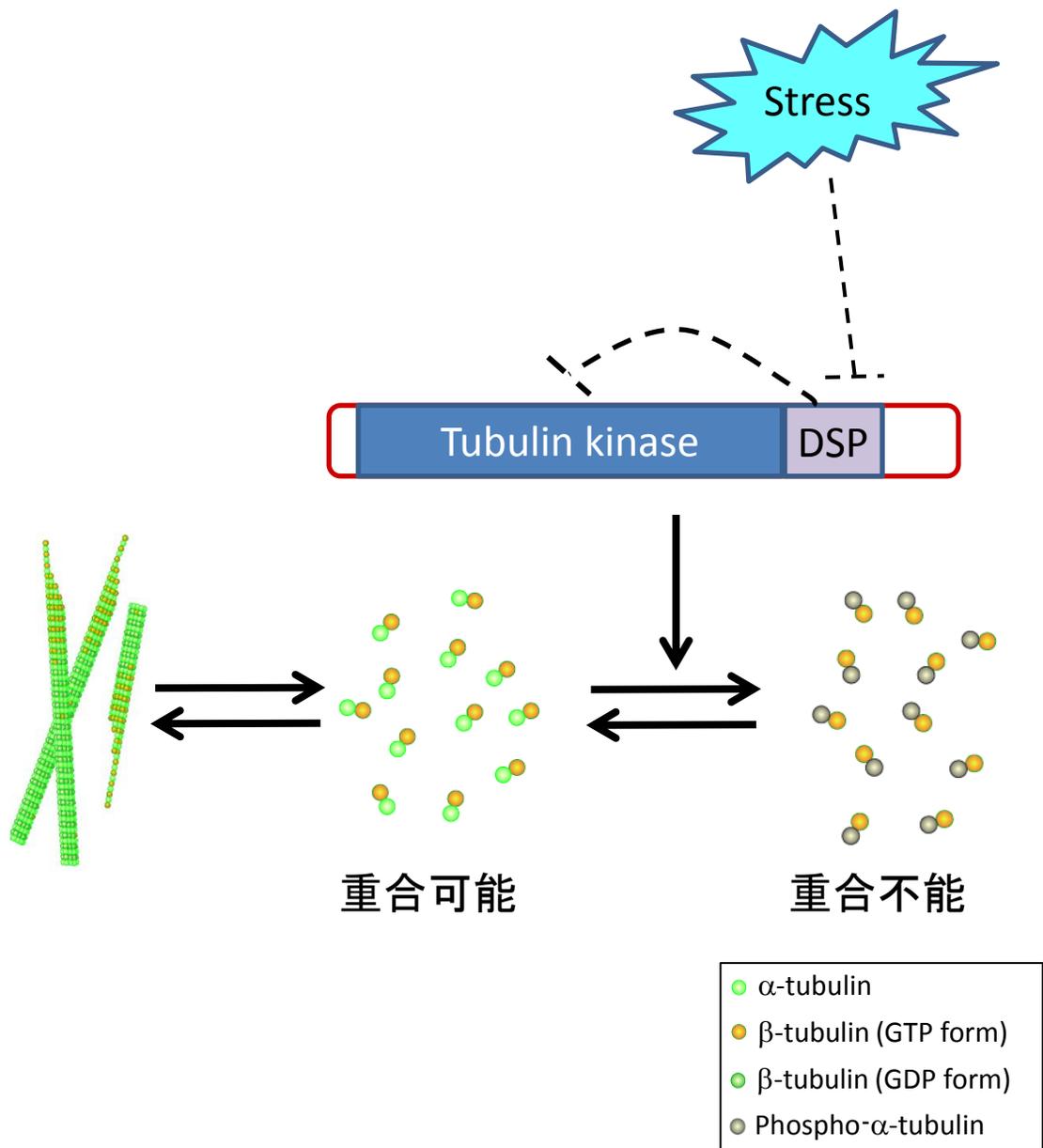
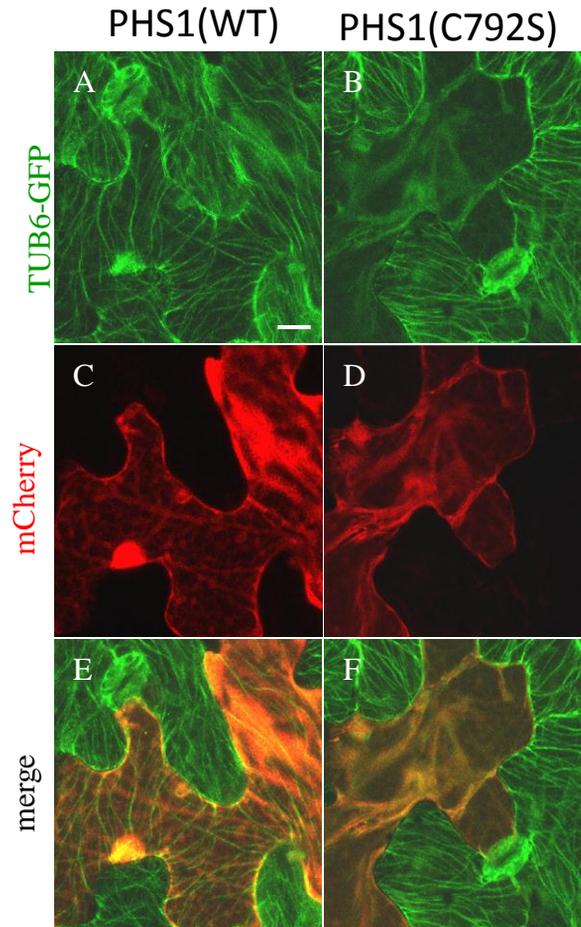


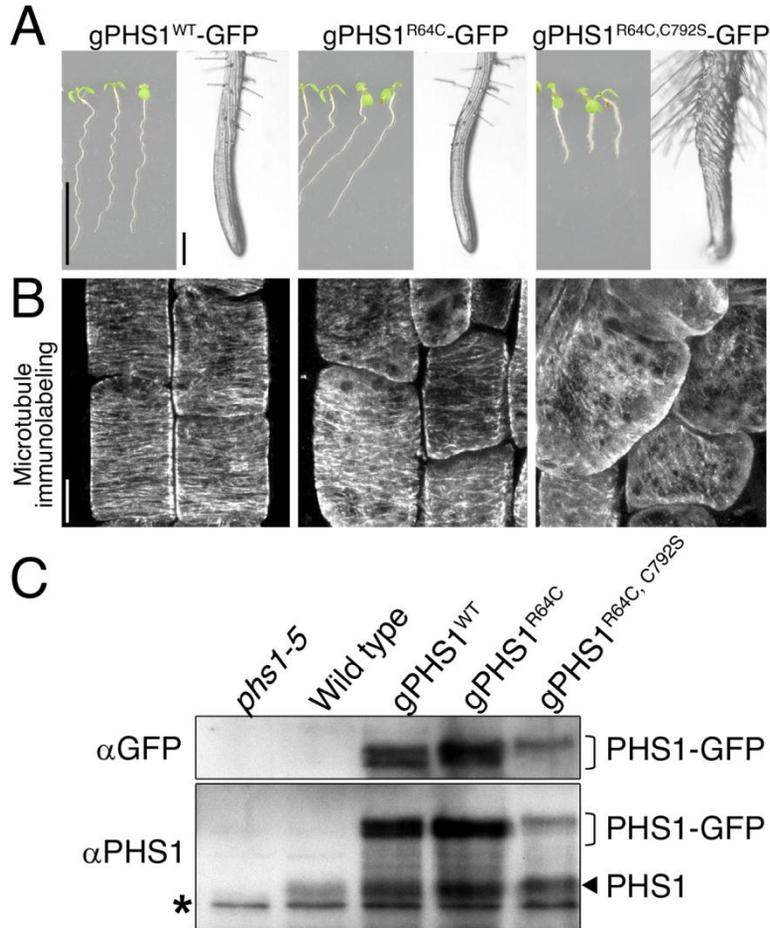
Figure 28 高浸透圧ストレスによる微小管不安定化のモデル

PHS1はtubulin kinase domainおよびDSP domainをもち、tubulin kinaseは α -tubulinをリン酸化することにより重合不能なtubulin heterodimerを作り出す。詳細な分子機構は不明であるがDSP domainはtubulin kinase domainの効果を抑え、リン酸化 α -tubulinの蓄積を抑える。高浸透圧ストレス条件下でもkinase活性はほとんど変わらないことから、高浸透圧ストレスによってPHS1のDSP domainが活性調節されると考えられる。



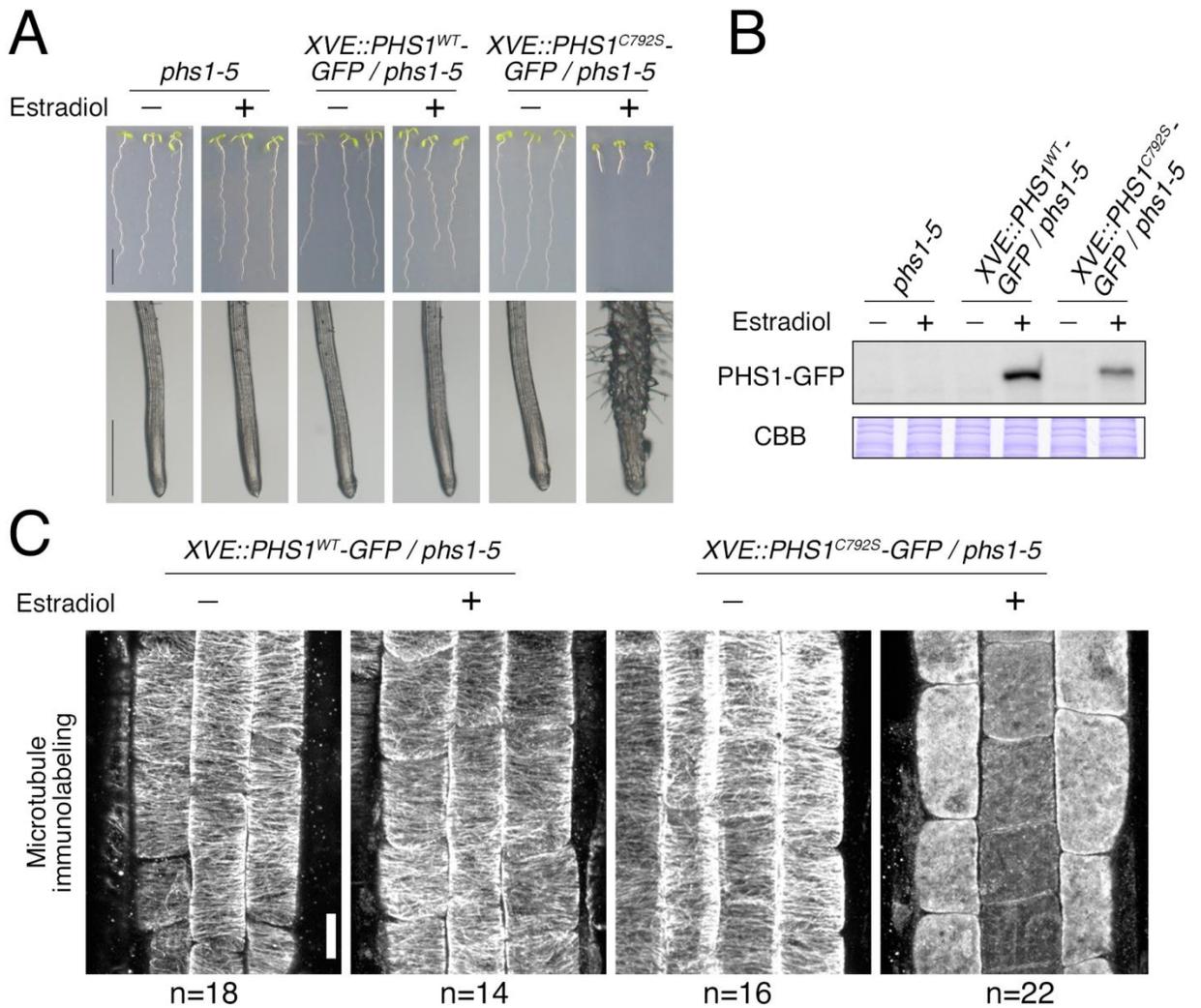
Supplemental Figure 1 PHS1のphosphatase不活性型は間期微小管を強く脱重合する(1)
(このデータはPytela Jaromir氏による未発表データである)

GFP-TUB6を発現する植物体、葉の表皮細胞に一過的にPHS1(WTもしくはC792S)とmCherry (transient marker)を同時に発現させた。mCherryが発現する細胞の微小管を観察したところ、PHS1(WT)では微小管に影響を与えなかった(A,C,E)が、phosphatase不活性型であるPHS1 (C792S)を発現させた場合、微小管が消失した(B,D,F)。(A,B)はGFP-TUB6、(C,D)はmCherry、(E,F)はmerge画像である。Scale barは10 μ mを示す。



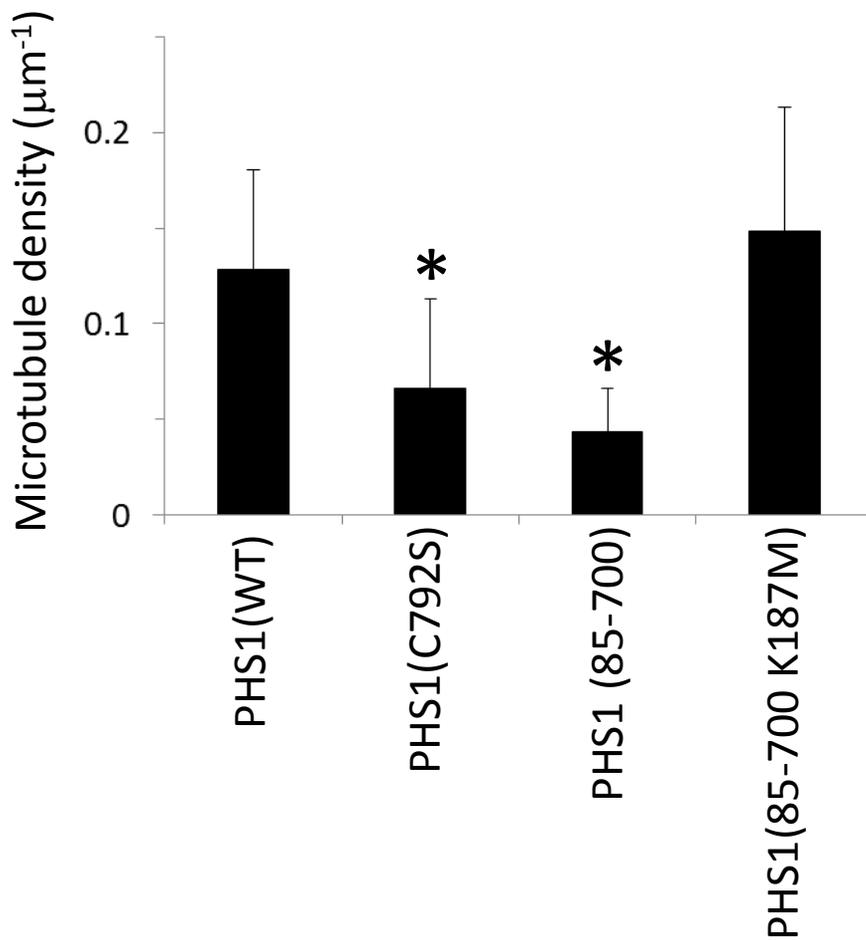
Supplemental Figure 2 PHS1のphosphatase不活性型は間期微小管を脱重合する (2)
(このデータはPytela Jaromir氏による未発表データである)

- A. シロイヌナズナ形質転換植物の5日目の芽生えを示す。左側は芽生え全体、右側は根の先端を示す。野生型および示した変異を含むgenome領域にC末端側にGFPを融合させ、pPHS1で発現させた。Barは1 cm (芽生え全体), 100 μm (根の先端)を示す。
- B. 根の伸長開始領域の表皮細胞における表層微小管の免疫染色像を示す。Scale barは10 μmを示す。
- C. それぞれの形質転換体におけるPHS1-GFPおよび内生のPHS1の発現量を示す。*はPHS1抗体による非特異的なバンドを示し、ローディングコントロールとして利用した。



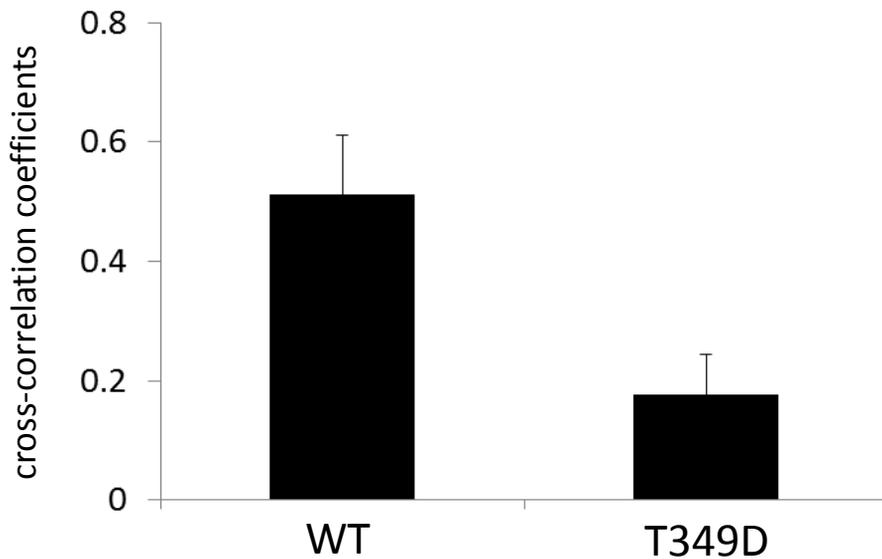
Supplemental Figure 3 PHS1のphosphatase不活性型は間期微小管を脱重合する (3)

- 野生型PHS1およびphosphatase-dead PHS1(PHS1^{C792S})をEstradiol誘導的に発現するシロイヌナズナ形質転換植物の芽生え全体(上側)および根の先端(下側)を示す。それぞれ0.05% DMSO (-), 5 μM estradiol(+)を含む培地で7日間生育させた。Barは1 cm (芽生え全体), 500 μm (根の先端)を示す。
- 6日目の液体培養した形質転換植物体を0.05% DMSO (-), 5 μM estradiol(+)条件下で24時間培養し、タンパク質を抽出してPHS1抗体でPHS1-GFPを検出した。CBBはローディングコントロールとして示した。
- 4日目の芽生えを0.05% DMSO (-), 5 μM estradiol(+)を含む寒天培地で6時間生育させた後、根の伸長開始領域の表皮細胞を抗tubulin抗体を用いて免疫染色を行った。nは観察した根の数を示す。Scale barは10 μmを示す。



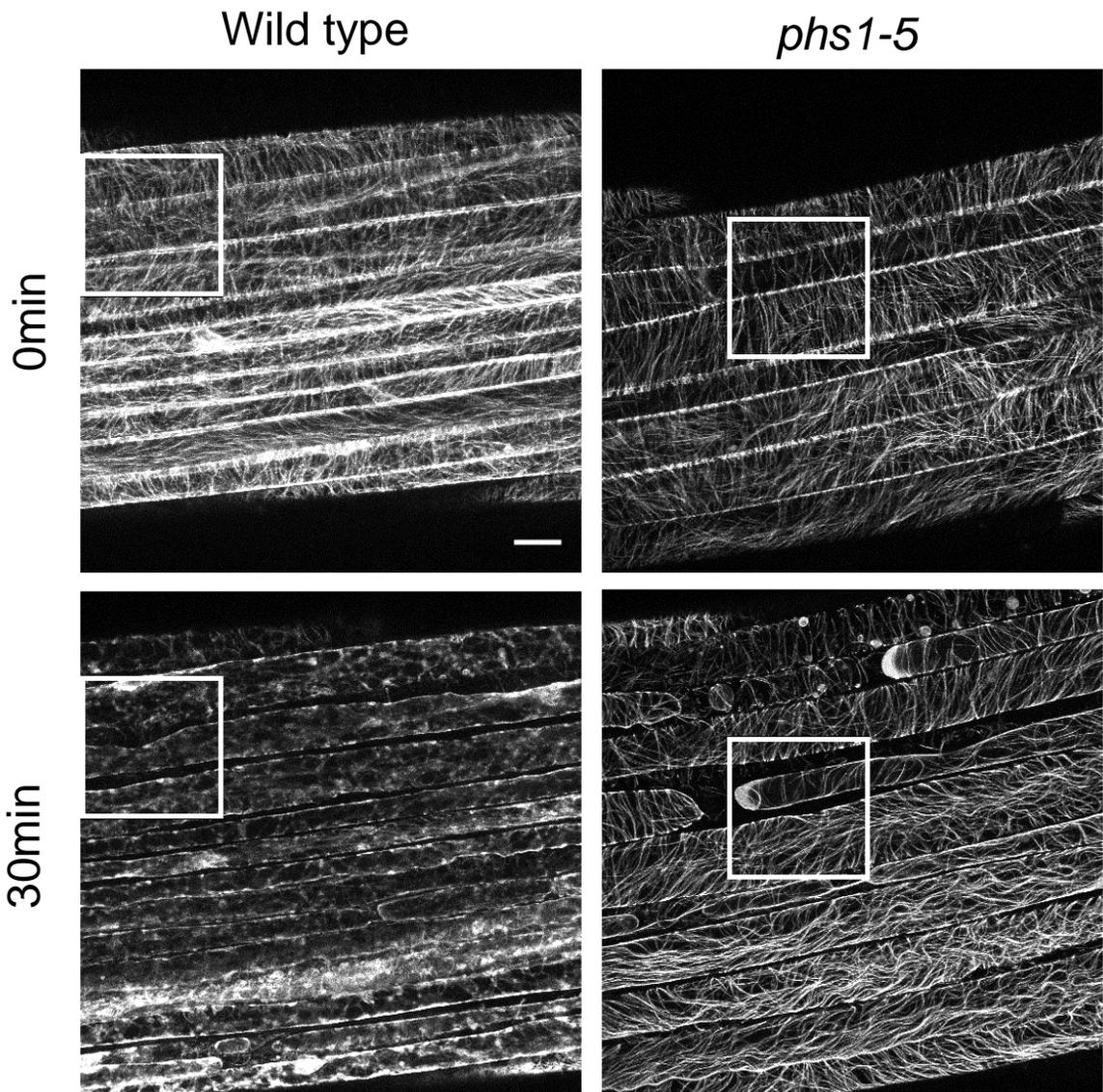
Supplemental Figure 4 一過的発現系における微小管密度 (Fig 7, 8, 14に関連)

PHS1 WT, PHS1(C792S), PHS1(85-700), PHS1(85-700)^{K187M}を発現させた時の微小管密度を示す。バーはSDを示し、*は $p < 0.001$ (Mann-Whitney U test)を示す($n \geq 15$)。この定量は東京大学 朽名博士によって行われた。



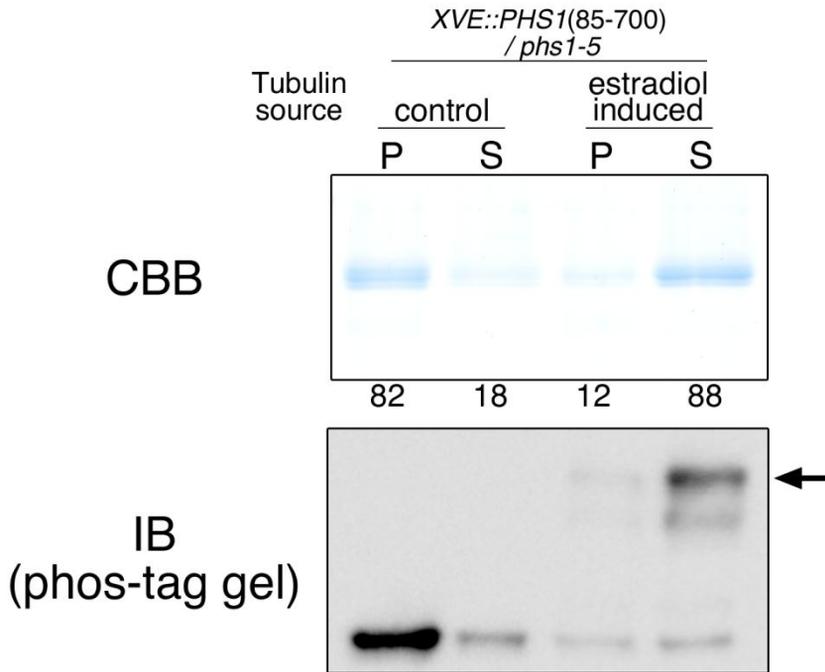
Supplemental Figure 5 リン酸化ミミック型 α -tubulinは微小管に取り込まれない(3) (Fig 23に関連)

mCherry-TUB6形質転換植物体とGFP-TUA6 (WTもしくはT349D)形質転換植物体のF1から取得した画像からPearsonの相関係数を算出した。バーはSDを示し、それぞれ13細胞以上から値を算出した。二者間には $p < 0.001$ (Mann-Whitney U test)で有意差があった。この定量は東京大学 朽名博士によって行われた。



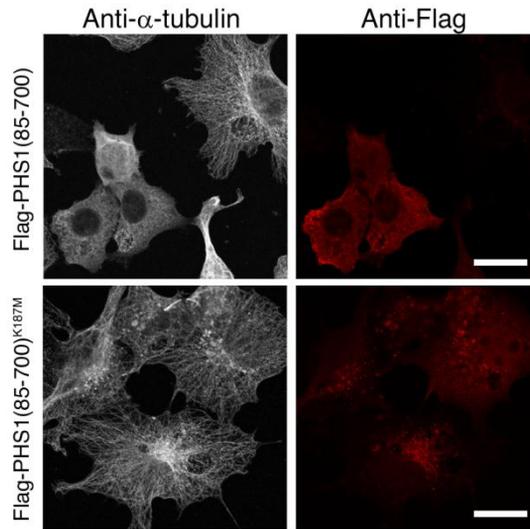
Supplemental Figure 6 間期微小管は高浸透圧ストレス条件下においてPHS1依存的に消失する

GFP-TUB6を発現する野生型商物および*phs1-5*の暗所胚軸を0.8 M sorbitolで30分間、スライドガラス上で処理した。その結果、野生型では30分間で微小管が消失したが、*phs1-5*では30分間微小管が維持された。Fig26 (A)の画像はこの画像の白く囲った部分を拡大して示した。スケールバーは20 μm を示す。



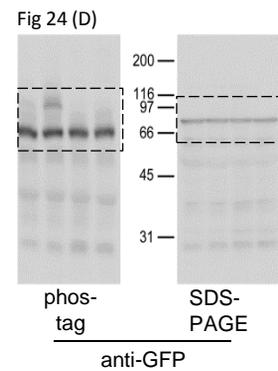
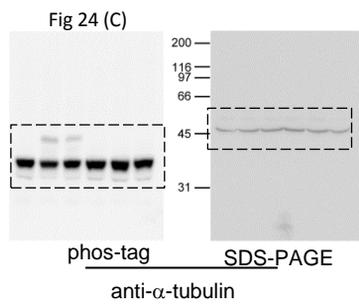
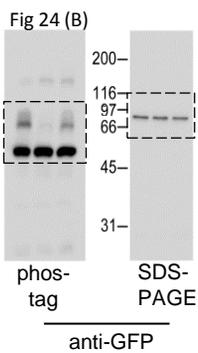
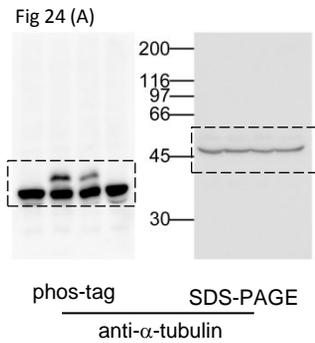
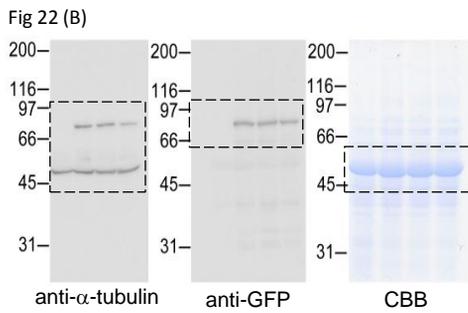
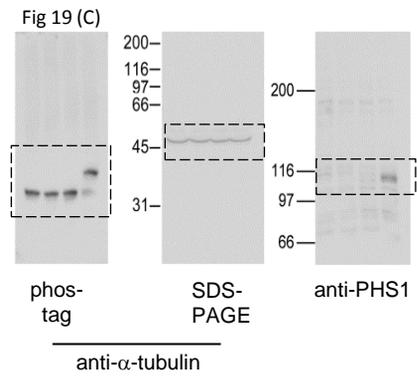
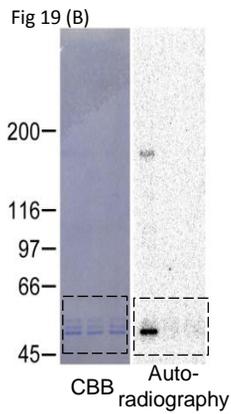
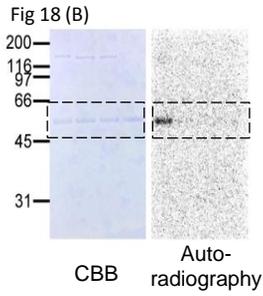
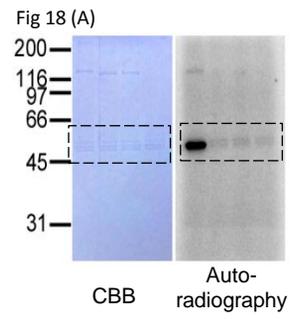
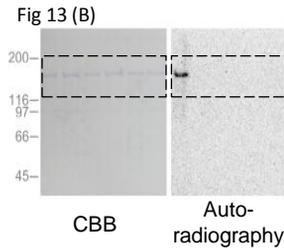
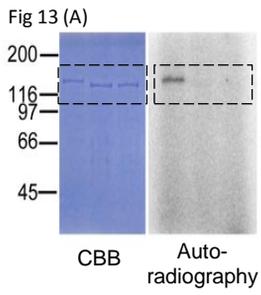
Supplemental Figure 7 リン酸化されたtubulinは微小管に取り込まれない (Fig 22に関連)

6日間液体培養した*XVE::PHS1(85-700)-GFP*植物体を24時間5 μM のEstradiolで誘導した。そこからタンパク質を抽出し、Widlund et al. (2012)の方法に従ってtubulinを精製した。その後、5 μM taxolの存在下で重合assayを行いCBBで染色(上段)、もしくはphos-tag gelを用いて分離後、抗 α -tubulin抗体によってリン酸化 α -tubulin(矢印)を検出した(下段)。CBB染色の下に示した数値は、pellet (P)およびsupernatant (S)に存在したtubulin量の比を示す。この精製および重合アッセイは、堀田博士によって行われた。

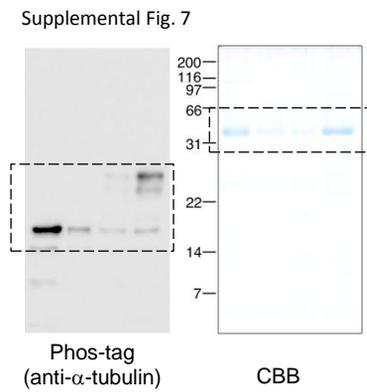
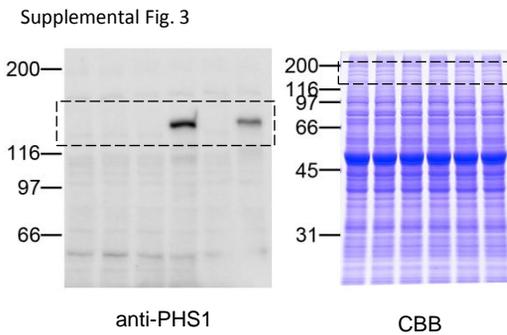
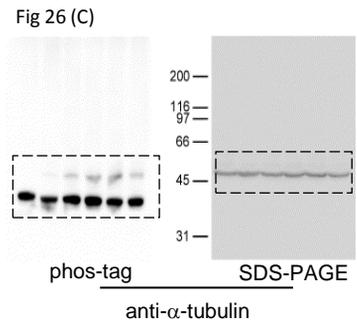
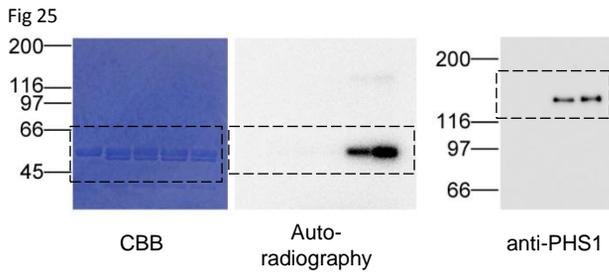


Supplemental Figure 8 PHS1 kinase domainは動物細胞においてもkinase 活性依存的に微小管の脱重合を引き起こす

COS-7細胞にFlag-PHS1(85-700)もしくはFlag-PHS1(85-700)^{K187M}を発現させた。抗 α -tubulin抗体(DM1A)により微小管(左)を、抗Flag抗体によりFlag-PHS1(85-700)が発現している細胞(右)を可視化させた。スケールバーは20 μ mを示す。この実験は、動物遺伝子機能研究室の赤松氏により行われた。



Supplemental Figure 9 ゲル写真の全体像 (次ページに続く)



Supplemental Figure 9 ゲル写真の全体像

図中の数値は分子量マーカーの位置を示す。分子量マーカーはSDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (#161-0317, Bio-rad laboratories)を用いた

6. 参考文献

Akella, J.S., Wloga, D., Kim, J., Starostina, N.G., Lyons-Abbott, S., Morrisette, N.S., Dougan, S.T., Kipreos, E.T., and Gaertig, J. (2010). MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature* 467, 218–222.

Ban, Y., Kobayashi, Y., Hara, T., Hamada, T., Hashimoto, T., Takeda, S., and Hattori, T. (2013). α -Tubulin is Rapidly Phosphorylated in Response to Hyperosmotic Stress in Rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 54, 848–858.

Bartolo, M.E., and Carter, J.V. (1991). Microtubules in mesophyll cells of nonacclimated and cold-acclimated spinach : visualization and responses to freezing, low temperature, and dehydration. *Plant Physiol.* 97, 175–181.

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.

Beck, M., Komis, G., Müller, J., Menzel, D., and Samaj, J. (2010). Arabidopsis homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *Plant Cell* 22, 755–771.

Belmont, L.D., and Mitchison, T.J. (1996). Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell* 84, 623–631.

Ben-Nissan, G., Cui, W., Kim, D.-J., Yang, Y., Yoo, B.-C., and Lee, J.-Y. (2008). Arabidopsis casein kinase 1-like 6 contains a microtubule-binding domain and affects the organization of cortical microtubules. *Plant Physiol.* 148, 1897–1907.

Blume, Y., Yemets, A., Sulimenko, V., Sulimenko, T., Chan, J., Lloyd, C., and Dráber, P. (2008). Tyrosine phosphorylation of plant tubulin. *Planta* 229, 143–150.

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

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.

Chang, X., and Nick, P. (2012). Defence Signalling Triggered by Flg22 and Harpin Is Integrated into a Different Stilbene Output in *Vitis* Cells. *PLoS ONE* *7*, e40446.

Chu, C.-W., Hou, F., Zhang, J., Phu, L., Loktev, A.V., Kirkpatrick, D.S., Jackson, P.K., Zhao, Y., and Zou, H. (2011). A novel acetylation of β -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Mol. Biol. Cell* *22*, 448–456.

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.

Drewes, G., Ebnet, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* *89*, 297–308.

Droillard, M., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Laurière, C. (2002). Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Lett.* *527*, 43–50.

Eichinger, L., Bomblies, L., Vandekerckhove, J., Schleicher, M., and Gettemans, J. (1996). A novel type of protein kinase phosphorylates actin in the actin-fragmin complex. *EMBO J.* *15*, 5547–5556.

Fourest-Lieuvin, A., Peris, L., Gache, V., Garcia-Saez, I., Juillan-Binard, C., Lantez, V., and Job, D. (2006). Microtubule Regulation in Mitosis: Tubulin Phosphorylation by the Cyclin-dependent Kinase Cdk1. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1041–1050.

Garfin, D.E. (2009). One-dimensional gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* *463*, 497–513

Hamada, T., Igarashi, H., Itoh, T.J., Shimmen, T., and Sonobe, S. (2004). Characterization of a 200 kDa microtubule-associated protein of tobacco BY-2 cells, a member of the XMAP215/MOR1 family. *Plant Cell Physiol.* *45*, 1233–1242..

Hamada, T. (2007). Microtubule-associated proteins in higher plants. *J. Plant*

Res. *120*, 79–98.

Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* *9*, 576–596.

Hussey, P.J., Snustad, D.P., and Silflow, C.D. (1991). Tubulin gene expression in higher plants. In *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*, (Academic Press Limited), pp. 15–27.

Ishida, T., Kaneko, Y., Iwano, M., and Hashimoto, T. (2007). Helical microtubule arrays in a collection of twisting tubulin mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 8544–8549.

Itoh, T.J., Hisanaga, S., Hosoi, T., Kishimoto, T., and Hotani, H. (1997). Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics. *Biochemistry* *36*, 12574–12582.

Janke, C., and Bulinski, J.C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 773–786.

Johnson, V., Ayaz, P., Huddleston, P., and Rice, L.M. (2011). Design, overexpression, and purification of polymerization-blocked yeast α -tubulin mutants. *Biochemistry* *50*, 8636–8644.

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.

Kinney, C.M., Chandrasekharan, U.M., Yang, L., Shen, J., Kinter, M., McDermott, M.S., and DiCorleto, P.E. (2009). Histone H3 as a novel substrate for MAP kinase phosphatase-1. *Am J Physiol Cell Physiol* *296*, C242–C249.

Kinoshita, K., Arnal, I., Desai, A., Drechsel, D.N., and Hyman, A.A. (2001). Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science* *294*, 1340–1343.

Kinoshita, E., and Kinoshita-Kikuta, E. (2011). Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics* *11*, 319–323.

- Kirsch, R.D., and Joly, E. (1998). An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic Acids Res.* *26*, 1848–1850.
- Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Minami, H., Kagaya, Y., and Hattori, T. (2004). Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* *16*, 1163–1177.
- Komaki, S., Abe, T., Coutuer, S., Inzé, D., Russinova, E., and Hashimoto, T. (2010). Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in Arabidopsis. *J. Cell. Sci.* *123*, 451–459.
- Lacroix, B., Van Dijk, J., Gold, N.D., Guizetti, J., Aldrian-Herrada, G., Rogowski, K., Gerlich, D.W., and Janke, C. (2010). Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell Biol.* *189*, 945–954.
- Lu, L., Lee, Y.-R.J., Pan, R., Maloof, J.N., and Liu, B. (2005). An internal motor kinesin is associated with the Golgi apparatus and plays a role in trichome morphogenesis in Arabidopsis. *Mol. Biol. Cell* *16*, 811–823.
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-I, T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, S.-Y., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Nishida, K., et al. (2004). Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* *428*, 653–657.
- Mayank, P., Grossman, J., Wuest, S., Boisson-Dernier, A., Roschitzki, B., Nanni, P., Nühse, T., and Grossniklaus, U. (2012). Characterization of the phosphoproteome of mature Arabidopsis pollen. *Plant J.* *72*, 89–101.
- McNally, F.J., and Vale, R.D. (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* *75*, 419–429.
- Mennella, V., Rogers, G.C., Rogers, S.L., Buster, D.W., Vale, R.D., and Sharp, D.J. (2005). Functionally distinct kinesin-13 family members cooperate to regulate microtubule dynamics during interphase. *Nat. Cell Biol.* *7*, 235–245.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* *312*, 237–242.
- Mittelmeier, T.M., Boyd, J.S., Lamb, M.R., and Dieckmann, C.L. (2011). Asymmetric properties of the *Chlamydomonas reinhardtii* cytoskeleton direct rhodopsin photoreceptor localization. *J. Cell Biol.* *193*, 741–753.

- Miyashima, S., Hashimoto, T., and Nakajima, K. (2009). ARGONAUTE1 acts in Arabidopsis root radial pattern formation independently of the SHR/SCR pathway. *Plant Cell Physiol.* *50*, 626–634.
- Motose, H., Hamada, T., Yoshimoto, K., Murata, T., Hasebe, M., Watanabe, Y., Hashimoto, T., Sakai, T., and Takahashi, T. (2011). NIMA-related kinases 6, 4, and 5 interact with each other to regulate microtubule organization during epidermal cell expansion in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* *67*, 993–1005.
- Nakagami, H., Sugiyama, N., Mochida, K., Daudi, A., Yoshida, Y., Toyoda, T., Tomita, M., Ishihama, Y., and Shirasu, K. (2010). Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiol.* *153*, 1161–1174.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* *104*, 34–41.
- Nakamura, M., Naoi, K., Shoji, T., and Hashimoto, T. (2004). Low concentrations of propyzamide and oryzalin alter microtubule dynamics in Arabidopsis epidermal cells. *Plant Cell Physiol.* *45*, 1330–1334.
- Nakamura, M., Ehrhardt, D.W., and Hashimoto, T. (2010). Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal Arabidopsis cortical array. *Nat. Cell Biol.* *12*, 1064–1070.
- Naoi, K., and Hashimoto, T. (2004). A semidominant mutation in an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase phosphatase-like gene compromises cortical microtubule organization. *Plant Cell* *16*, 1841–1853.
- Nick, P. (2013). Microtubules, signalling and abiotic stress. *Plant J.*
- Niwa, S., Nakajima, K., Miki, H., Minato, Y., Wang, D., and Hirokawa, N. (2012). KIF19A Is a Microtubule-Depolymerizing Kinesin for Ciliary Length Control. *Dev. Cell* *23*, 1167–1175.
- Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A., and Löwe, J. (1998). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat. Struct. Biol.* *5*, 451–458.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., and Downing, K.H. (1999). High-Resolution Model of the Microtubule. *Cell* *96*, 79–88.

Okada, K., and Shimura, Y. (1992). Mutational Analysis of Root Gravitropism and Phototropism of *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Functional Plant Biol.* *19*, 439–448.

Panteris, E., Komis, G., Adamakis, I.-D.S., Samaj, J., and Bosabalidis, A.M. (2010). MAP65 in tubulin/colchicine paracrystals of *Vigna sinensis* root cells: possible role in the assembly and stabilization of atypical tubulin polymers. *Cytoskeleton (Hoboken)* *67*, 152–160.

Paredez, A.R., Somerville, C.R., and Ehrhardt, D.W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* *312*, 1491–1495.

Peck, S.C. (2006). Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant J.* *45*, 512–522.

Peris, L., They, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., et al. (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* *174*, 839–849.

Price, D.C., Chan, C.X., Yoon, H.S., Yang, E.C., Qiu, H., Weber, A.P.M., Schwacke, R., Gross, J., Blouin, N.A., Lane, C., et al. (2012). *Cyanophora paradoxa* Genome Elucidates Origin of Photosynthesis in Algae and Plants. *Science* *335*, 843–847.

Pytela, J., Kato, T., and Hashimoto, T. (2010). Mitogen-activated protein kinase phosphatase PHS1 is retained in the cytoplasm by nuclear extrusion signal-dependent and independent mechanisms. *Planta* *231*, 1311–1322.

Qiao, F., Chang, X.-L., and Nick, P. (2010). The cytoskeleton enhances gene expression in the response to the Harpin elicitor in grapevine. *J Exp Bot* *61*, 4021–4031.

Reiland, S., Messerli, G., Baerenfaller, K., Gerrits, B., Endler, A., Grossmann, J., Gruissem, W., and Baginsky, S. (2009). Large-scale *Arabidopsis* phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks. *Plant Physiol.* *150*, 889–903.

Rosette, C., and Karin, M. (1995). Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF- κ B. *J Cell Biol* *128*, 1111–1119.

- Sammak, P.J., and Borisy, G.G. (1988). Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature* *332*, 724–726.
- Sánchez-Pérez, I., Martínez-Gomariz, M., Williams, D., Keyse, S.M., and Perona, R. (2000). CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* *19*, 5142–5152.
- Sangwan, V., Orvar, B.L., Beyerly, J., Hirt, H., and Dhindsa, R.S. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J.* *31*, 629–638.
- Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Sonobe, S., Igarashi, H., Itoh, T.J., Hidaka, M., and Machida, Y. (2006). Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev.* *20*, 1004–1014.
- Scheeff, E.D., and Bourne, P.E. (2005). Structural evolution of the protein kinase-like superfamily. *PLoS Comput. Biol.* *1*, e49.
- Shaw, S.L., Kamyar, R., and Ehrhardt, D.W. (2003). Sustained microtubule treadmilling in Arabidopsis cortical arrays. *Science* *300*, 1715–1718.
- Sheen, J. (1996). Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* *274*, 1900–1902.
- Sheremet, Y.A., Yemets, A.I., and Blume, Y.B. (2012). Inhibitors of tyrosine kinases and phosphatases as a tool for the investigation of microtubule role in plant cold response. *Tsitol. Genet.* *46*, 3–9.
- Shimozono, S., and Miyawaki, A. (2008). Engineering FRET constructs using CFP and YFP. *Methods Cell Biol.* *85*, 381–393.
- Shinohara-Gotoh, Y., Nishida, E., Hoshi, M., and Sakai, H. (1991). Activation of microtubule-associated protein kinase by microtubule disruption in quiescent rat 3Y1 cells. *Exp. Cell Res.* *193*, 161–166.
- Smertenko, A., Blume, Y., Viklický, V., Opatrný, Z., and Dráber, P. (1997). Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L. cells. *Planta* *201*, 349–358.
- Spencer, W., Kwon, H., Crépieux, P., Leclerc, N., Lin, R., and Hiscott, J. (1999). Taxol selectively blocks microtubule dependent NF-kappaB activation by phorbol ester via inhibition of IkappaBalpha phosphorylation and degradation.

Oncogene 18, 495–505.

Steinbacher, S., Hof, P., Eichinger, L., Schleicher, M., Gettemans, J., Vandekerckhove, J., Huber, R., and Benz, J. (1999). The crystal structure of the *Physarum polycephalum* actin-fragmin kinase: an atypical protein kinase with a specialized substrate-binding domain. *EMBO J.* 18, 2923–2929.

Stoecker, D.K., Johnson, M.D., Vargas, C. de, and Not, F. (2009). Acquired phototrophy in aquatic protists. *Aquat Microb Ecol* 57, 279–310.

Sugiyama, N., Nakagami, H., Mochida, K., Daudi, A., Tomita, M., Shirasu, K., and Ishihama, Y. (2008). Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Mol. Syst. Biol.* 4, 193.

Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K., and Shinozaki, K. (2011). Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 41, 649–660.

Thion, L., Mazars, C., Thuleau, P., Graziana, A., Rossignol, M., Moreau, M., and Ranjeva, R. (1996). Activation of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels by disruption of microtubules in carrot cells. *FEBS Lett.* 393, 13–18.

Thion, L., Mazars, C., Nacry, P., Bouchez, D., Moreau, M., Ranjeva, R., and Thuleau, P. (1998). Plasma membrane depolarization-activated calcium channels, stimulated by microtubule-depolymerizing drugs in wild-type *Arabidopsis thaliana* protoplasts, display constitutively large activities and a longer half-life in *ton 2* mutant cells affected in the organization of cortical microtubules. *Plant J.* 13, 603–610.

Tian, G.-W., Smith, D., Glück, 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.

Tournebize, R., Andersen, S.S.L., Verde, F., Dorée, M., Karsenti, E., and Hyman, A.A. (1997). Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis. *EMBO J.* 16, 5537–5549.

Tournebize, R., Popov, A., Kinoshita, K., Ashford, A.J., Rybina, S., Pozniakovskiy, A., Mayer, T.U., Walczak, C.E., Karsenti, E., and Hyman, A.A. (2000). Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *Nat. Cell Biol.* 2, 13–19.

- Waelkens, E., Gettemans, J., De Corte, V., De Ville, Y., Goris, J., Vandekerckhove, J., and Merlevede, W. (1995). Microfilament dynamics: regulation of actin polymerization by actin-fragmin kinase and phosphatases. *Adv. Enzyme Regul.* *35*, 199–227.
- Walczak, C.E., Mitchison, T.J., and Desai, A. (1996). XKCM1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell* *84*, 37–47.
- Walia, A., Lee, J.S., Wasteney, G., and Ellis, B. (2009). Arabidopsis mitogen-activated protein kinase MPK18 mediates cortical microtubule functions in plant cells. *Plant J.* *59*, 565–575.
- Walker, E.H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L., and Williams, R.L. (1999). Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* *402*, 313–320.
- Wang, C., Li, J., and Yuan, M. (2007). Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* *48*, 1534–1547.
- Wang, S., Kurepa, J., Hashimoto, T., and Smalle, J.A. (2011). Salt stress-induced disassembly of Arabidopsis cortical microtubule arrays involves 26S proteasome-dependent degradation of SPIRAL1. *Plant Cell* *23*, 3412–3427.
- Wang, X., Bian, Y., Cheng, K., Gu, L.-F., Ye, M., Zou, H., Sun, S.S.-M., and He, J.-X. (2012). A large-scale protein phosphorylation analysis reveals novel phosphorylation motifs and phosphoregulatory networks in Arabidopsis. *J Proteomics*.
- Wasteney, G.O. (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J. Cell. Sci.* *115*, 1345–1354.
- Whittington, A.T., Vugrek, O., Wei, K.J., Hasenbein, N.G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M.C., and Wasteney, G.O. (2001). MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* *411*, 610–613.
- Yamaguchi, H., Matsushita, M., Nairn, A.C., and Kuriyan, J. (2001). Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity. *Mol. Cell* *7*, 1047–1057.
- Yao, L.-L., Zhou, Q., Pei, B.-L., and Li, Y.-Z. (2011). Hydrogen peroxide modulates the dynamic microtubule cytoskeleton during the defence responses to *Verticillium dahliae* toxins in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* *34*, 1586–

1598.

Yemets, A., Sheremet, Y., Vissenberg, K., Van Orden, J., Verbelen, J.-P., and Blume, Y.B. (2008). Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells. *Cell Biol. Int.* *32*, 630–637.

Zuo, J., Niu, Q.W., and Chua, N.H. (2000). Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* *24*, 265–273.

伴佳典 修士論文 (2009) 名古屋大学生命農学科学研究科 服部研究室

神戸雅人 修士論文 (2011) 奈良先端科学技術大学院大学 橋本研究室

7.謝辞

本論文は、私が奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、植物細胞機能研究室で博士前期課程 2 年間および博士後期課程の 4 年間で行った研究をまとめたものです。本研究の立案から細部に至るまで全般にわたってご指導いただき、また常に視野を広げるための挑戦精神を忘れぬよう、叱咤激励を続けてくださいました奈良先端科学技術大学院大学、橋本隆教授に深く感謝いたします。

質量分析解析によるリン酸化部位の同定には理化学研究所植物科学センターの野村有子氏、中神弘史博士に、蛍光画像からの微小管の定量解析に関しては東京大学新領域創成科学研究科の朽名夏麿博士および馳沢盛一郎教授に、植物培養細胞からの微小管関連タンパク質の精製に関しては濱田隆宏博士（現 東京大学 助教）に大変お世話になりました。tubulin リン酸化の意義を *in vitro* で検証するために植物体からの tubulin 精製および重合アッセイを行っていた堀田崇博士、種間を超えた PHS1 tubulin kinase domain の効果の評価を行うために動物細胞での微小管免疫染色を行っていた赤松理恵氏のおかげで研究をさらに展開できました。また、京都大学生命科学研究科の河内孝之教授、西浜竜一講師、神戸大学理学研究科石崎公庸准教授にはゼニゴケにおける PHS1 配列を検索していただきました。 α -tubulin 立体構造の図は、首都大学東京理工学研究科三島正規准教授に改変していただきました。深く感謝いたします。

本研究を進めるうえで、アドバイザー委員としてバイオサイエンス研究科梅田正明教授、高山誠司教授、田坂昌生教授には多くのご助言をいただきました。深く感謝いたします。

植物細胞機能研究室、中島敬二准教授（現・植物発生シグナル研究室）、庄司翼助教には研究室内のセミナーなどで様々な角度からのご助言をいただきました。感謝いたします。

加藤壮英助教には平日・休日および昼夜を問わず、前期課程・後期課程を通じて様々な技術的困難・疑問に関する相談、データの解釈や世に溢れる様々な論文の学問的位置づけに関して具体的にご教示・議論していただきました。深く感謝いたします。

バイオサイエンス研究科箱嶋敏雄教授、弘前大学農学生命科学研究科の笹部美知子准教授、東京農工大学生物システム応用科学府の梅澤泰史准教授には本研究を進めるうえで数多くの助言をいただきました。感謝いたします。

高浸透圧ストレス応答に関しては名古屋大学生命農学科学研究科、服部東穂教授、伴佳典氏に進展のきっかけを与えていただきました。感謝いたします。

本研究を遅滞なく進めるうえで、植物細胞機能研究室秘書の山下聡美氏のご協力は欠かせないものでありました。深くお礼申し上げます。Pytela Jaromir 氏、小牧伸一郎博士（現 フランス国立科学研究センターCNRS）、中村匡良博士（現 Carnegie Institute at Stanford）、宮島俊介博士（現 Helsinki University）、石田喬志博士（現 熊本大学 特任助教）、八木慎宜博士、厚井聡博士（現 大阪市立大学講師）、長崎菜穂子博士（現 青翔高校教諭）、梶川昌孝博士（現 京都大学 助教）には、顕微鏡の扱い、タンパク質の扱い方、生物学の考え方など本研究を進めるうえで必須の技術・思考方法を伝授いただきました。また、Wong Jeh Haur 氏、乾良充氏、神戸雅人氏、高林周平氏、寶金佐和子氏には PHS1 の研究と一緒に進めていただきました。加えて、植物細胞機能研究室（前 植物遺伝子機能学講座）に在籍された多くの方々には研究室内外で昼夜を問わず様々な面で支えていただき大変お世話になりました。心よりお礼申し上げます。

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科の充実した設備だけでなく、その適切な維持によって滞りなく行うことができました。この環境を支えてくださった方々、特に大谷ひふみ氏、須浪哲平氏に深く感謝いたします。

また、本研究を進めるうえで、博士前期課程二年および博士後期課程の一年間、日本学生支援機構より、博士後期課程のうち二年間を日本学術支援機構より、さらに二年間奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科の RA により、一年間文部科学省「卓越した大学院拠点形成支援補助金」事業により経済的支援をいただきました。深くお礼申し上げます。

最後になりましたが、これまで暖かく見守り続けてくれた藤田修作、朋子夫妻に特に感謝したいと思います。

2013年 9月
藤田 智史