

ダイコン根細胞骨格画分におけるプロテインキナーゼおよび プロテインフォスファターゼ活性の特徴

吉田克志・大口富三¹

(野菜・茶業試験場, ¹愛媛大学農学部)

Characterization of Protein Kinase and Protein Phosphatase Activities
Associated with Japanese Radish Roots Cytoskeleton Fractions

Katsuyuki YOSHIDA and Tomizo OHGUCHI¹

(National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea,

¹College of Agriculture, Ehime University)

細胞骨格は細菌を除く全ての生物の細胞質の基本構造であり、細胞の基本的な働きの有機的な活動を可能にしている。近年、細胞骨格がシグナルトランスダクション、物質輸送およびタンパク質合成に関与することが報告されており、細胞機能の重要な部分に関与していることが明らかになりつつある(阿部 1998)。細胞骨格の基本的なタンパク質繊維系としてアクチン、微小管および中間径フィラメントが知られているが、特にアクチン繊維にはシグナルトランスダクションに関与する酵素が結合することが植物細胞で明らかになっている(Putnam-Evansら 1989, Tan・Boss 1992)。ダイズではカルシウムイオン依存性プロテインキナーゼが細胞骨格に結合していることが証明されているが(Putnam-Evansら 1989)、他の植物種における同様な研究はなく、さらにプロテインホスファターゼと細胞骨格との関係についての報告は見当らない。本報ではダイコン根組織から細胞骨格を分離し、そこに存在するプロテインキナーゼおよびプロテインフォスファターゼについて調査した結果を報告する。

材 料 と 方 法

供試植物

圃場で3か月間栽培した白首宮重ダイコン (*Raphanus sativus* Linn. var. *hortensis* Backer) の成熟根を供試した。

細胞骨格分離法

ダイコン根組織は低温室で5×5×5mmに細断し、CSBS法(Itoら 1994)で細胞骨格を含むミクロゾームを分離した。その後Tanら(1992)の方法に準じて1%TritonX-100不溶性の細胞骨格画分を分離し、さらにF-アクチン画分を調整した。

プロテインキナーゼ活性測定法

吉田ら(2000)の方法に従い、細胞骨格画分およびF-アクチン画分に存在するプロテインキナーゼ活性測定とその性質の解析ならびにSDS-PAGEによるリン酸化タンパク質の検出を行った。

プロテインフォスファターゼ活性測定法

プロテインフォスファターゼ活性の測定は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いてリン酸化したホスホリラーゼAを基質とするプロテインフォスファターゼアッセイシステム (GIBCO BRL) を用いて解析した。

結 果 と 考 察

ダイコン根からミクロゾーム画分、細胞骨格画分およびF-アクチン画分を分離し、それぞれの画分のプロテインキナーゼ活性を0.1mMカルシウムイオン存在下および非存在下において調査した。いずれの画分においてもカルシウムイオン依存性のプロテインキナーゼ活性が認められ、特にF-アクチン画分に強い活性が認められた (Fig.1)。そこで、以下の実験ではF-アクチン画分を用いて実験を行った。

カルシウムイオン存在下でF-アクチン画分プロテインキナーゼの至適pHを調査したところ、pH7.0-7.5の中性領域において比較的幅広い至適pHが観察され、至適pH6.5のダイコン細胞膜プロテインキナーゼ (吉田・大口 2000) とは性質が異なることが確認された (Fig.2)。

プロテインキナーゼの基質として、ヒストンH1 (Sigma) およびカゼイン (和光) を用いて、F-アクチン画分のプロテインキナーゼによるそれら基質のリン酸化を調査した (Fig.3)。ヒストンH1を用いた場合には0.2mg/ml以上の濃度でヒストンキナーゼ活性が認められた。また、カゼインを用いた場合には濃度依存的にタンパク質リン酸化の促進が確認され、1mg/mlのときには0.1mg/mlの場合の約2倍高いプロテインキナーゼ活性が観察され、F-アクチン画分におけるカゼインキナーゼの存在が確認された。

F-アクチン画分のプロテインキナーゼに及ぼす阻害剤と活性化剤の影響を調査した。プロテインキナーゼの活性はカルモジュリンやプロテインキナーゼCの活性化剤により、活性増高が認められた (Fig.4)。また、カルシウムイオン/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼの特異的な阻害剤であるKN-93はプロテインキナーゼCの特異的阻害剤H7より低濃度でより強いプロテインキナーゼ阻害活性が認められ、F-アクチン画分におけるカルシウムイオン/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ活性が高いことが示唆された (Fig.4)。一方、阻害剤の実験ではプロテインキナーゼの強力な阻害剤であるスタウロsporinやK252aにより強い活性阻害が観察された (Fig.4)。

ダイコン根細胞骨格におけるリン酸化タンパク質を明らかにするために、ダイコン根組織から分離したミクロゾーム、細胞骨格およびF-アクチン画分と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を*in vitro*で反応させ、リン酸化タンパク質をSDS-PAGEで調査した。各画分のリン酸化はカルシウムイオン存在下で促進されたが、特にF-アクチン画分におけるリン酸化が著しかった (Fig.5)。また、各画分で認められるリン酸化タンパク質のほとんどがF-アクチン画分に存在することが観察され、リン酸化されるタンパク質の多くがF-アクチン画分に存在することが示唆された (Fig.5)。

ミクロゾーム、細胞骨格およびF-アクチン画分におけるプロテインフォスファターゼ活性について、リン酸化ホスホリラーゼAを基質として調査した。プロテインフォスファターゼ活性は各画分において認められたが、特にF-アクチン画分において他の画分の約2.5倍の強い活性が認められ、プロテインフォスファターゼがF-アクチンに結合していることが強く示唆された (Fig.6)。また、オカダ酸によるプロテインフォスファターゼ活性阻害を指標にしてF-アクチン画分におけるプロテインフォスファターゼの特徴を調査した結果、F-アクチン画分に含まれるプロテインフォスファターゼはほとんどがプロテイン

フォスファターゼ1型であり、2A型はほとんど含まれないことが確認された (Table 1).

以上の実験の結果から、ダイコン根細胞の細胞骨格、特にF-アクチン画分にプロテインキナーゼおよびプロテインホスファターゼが結合していることが明らかになった。このうち、F-アクチン画分に存在するプロテインキナーゼは細胞膜プロテインキナーゼ (吉田・大口 2000) と至適pHが異なること、またカゼインキナーゼ活性を持つことから、細胞膜プロテインキナーゼとは性質や機能が異なることが示唆された。Putnam-Evansら (1989) はダイズのカルシウムイオン依存性プロテインキナーゼはF-アクチンに局在することを報告しており、さらに、Grabskiら (1998) はプロテインキナーゼやプロテインフォスファターゼの阻害剤を用いた研究から、アクチン繊維の構造変化にタンパク質のリン酸化および脱リン酸化反応が関与することを報告している。従って、ダイコン根細胞骨格に存在するプロテインキナーゼおよびプロテインフォスファターゼはアクチンネットワークの調節および細胞内シグナルトランスダクションにおいて重要な機能を担うと考えられる。

引用文献

- 阿部俊之助 1998. 遺伝子の構造と機能. 駒野徹編. 学会出版センター, 東京. 266.
- Grabski, S., Arnoys, E., Busch, B. and Schindler, M. 1998. *Plant Physiol.* 116:279.
- Ito, Y., Abe, S. and Davies, E. 1994. *J. Exp. Bot.* 45: 253.
- Putnam-Evans, C., Harmon, A. C., Palevitz, B. A., Fechheimer, M. and Cormer, M. J. 1989. *Cell Motil. Cytoskel.* 12:12.
- Tan Z. and Boss W. F. 1992. *Plant Physiol.* 100:2116.
- 吉田克志・大口富三 2000. 日作東海支部報130:1

Characterization of Protein Kinase and Protein Phosphatase Activities Associated with Japanese Radish Roots Cytoskeleton Fractions: Katsuyuki Yoshida and Tomizo Ohguchi¹ (National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, ¹College of Agriculture, Ehime University)

Abstract: We studied protein kinase and protein phosphatase in the cytoskeleton fractions of Japanese radish root tissues. The cytoskeleton fractions were isolated from Japanese radish roots by CSBS method. The F-actin fraction was purified from cytoskeleton. The protein kinase activity of the F-actin fraction is higher than that of the cytoskeleton fraction. The F-actin bound protein kinase requires calcium ions. The optimum pH of protein kinase is 7.0. The protein kinase can phosphorelate not only histon IIIS but also casein and was activated by calmodulin and inhibited by KN-93. The protein phosphatase activity was also associated with the cytoskeleton especially the F-actin fraction. These results suggest that protein kinases and protein phosphatases are co-localized in F-actin fraction. They might regulate some physiological processes in Japanese radish root cells.

Key words: cytoskeleton, F-actin, Japanese radish, protein kinase, protein phosphatase.

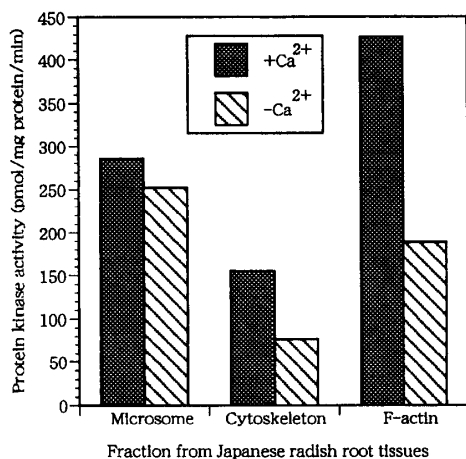


Fig.1. Protein kinase activity of microsome, cytoskeleton and F-actin fractions from Japanese radish root tissues with or without calcium ions.

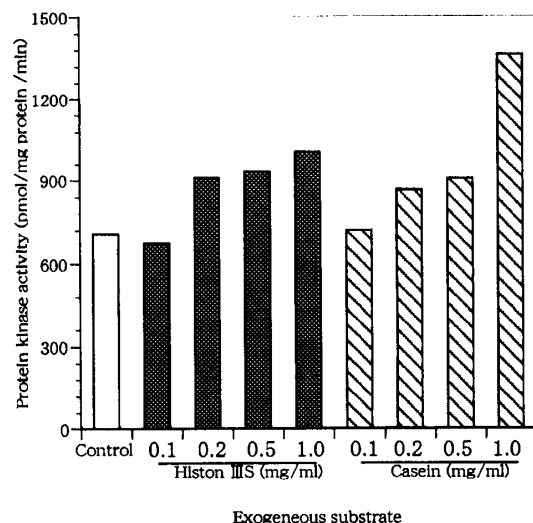


Fig.3. Phosphorylation of histon III S and casein with F-actin bound protein kinase in Japanese radish root tissues.

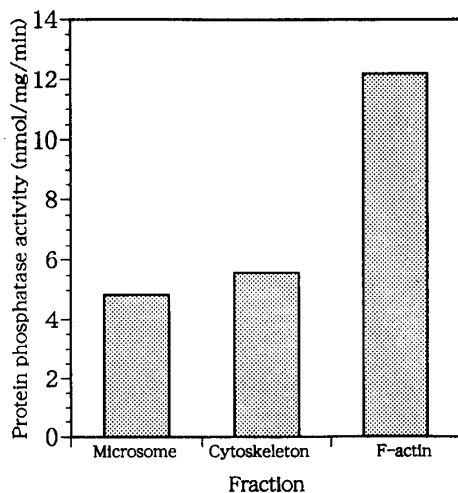


Fig.6. Protein phosphatase activity of microsome, cytoskeleton and F-actin fractions from Japanese radish root tissues.

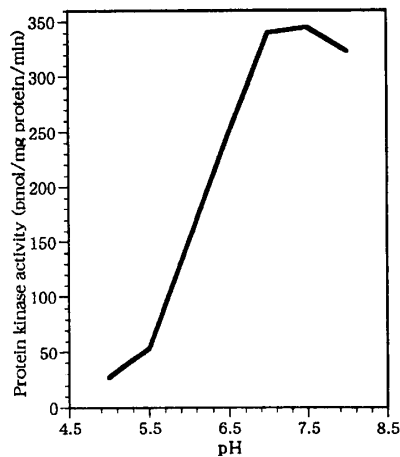


Fig.2. Effect of various pH on F-actin bound protein kinase activity in Japanese radish root tissues.

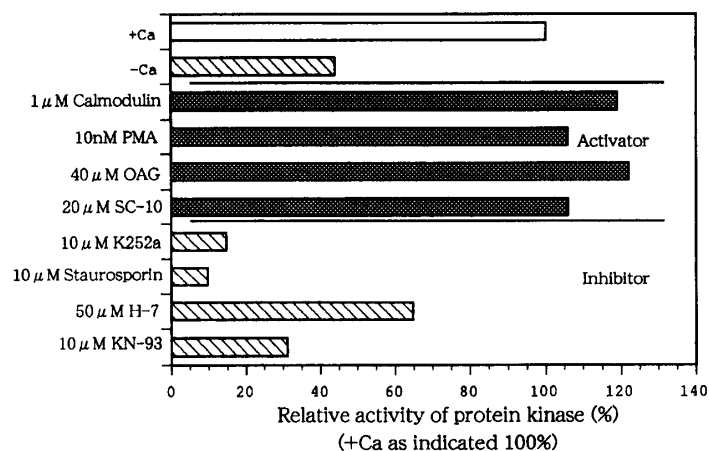


Fig.4. Effect of activators and inhibitors on F-actin bound protein kinase activity in Japanese radish root tissues.

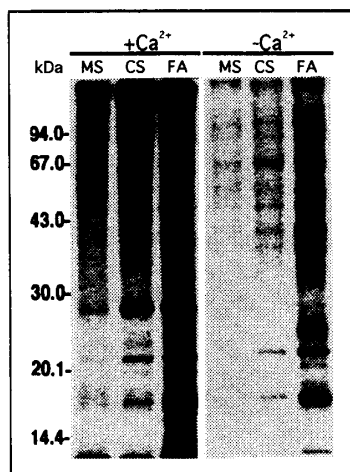


Fig.5. SDS-PAGE analysis of phosphorylation of microsome (MS), cytoskeleton (CS) and F-actin fractions (FA) isolated from Japanese radish root tissues. Proteins were labeled *in vitro* with [γ -³²P]ATP for five minutes with or without calcium ions.

Table 1. Characterization of protein phosphatase in F-actin fraction from Japanese radish root tissues

	Activity (nmol/mg protein/min)
Total	13.08
Protein phosphatase 1	12.21
Protein Phosphatase 2A	0.87