

## 9524 耐塩性緑藻ドナリエラの浸透圧調節の分子機構

助成研究者：鳥山 尚志 (名古屋大学 生物分子応答研究センター)

共同研究者：湯浅 高志 (名古屋大学)

単細胞緑藻ドナリエラ(*Dunaliella tertiolecta*)は極めて高い耐塩性を持ち、細胞内グリセロール濃度を調節することによって0.5~5M NaCl中に生育できる。これまでの研究によって、ドナリエラが低浸透圧を受容してそれに対して応答するに至る過程には、Ca<sup>2+</sup>を唯一の活性調節因子とするCa<sup>2+</sup>-依存性プロテインキナーゼ(CDPK)が関与することを示した。一方、高・低浸透圧負荷によって活性化を受けるプロテインキナーゼの存在を見いだしている。

抗CDPK抗体を利用して発現cDNAライブラリーからCDPKcDNAを単離し、全塩基配列を決定した。一方、精製CDPKをV8プロテアーゼ処理して得た3本のペプチドのアミノ酸配列を決定した。これらのアミノ酸配列は塩基配列から演繹されるアミノ酸配列と完全に一致した。全アミノ酸配列中にはN末端側に11のキナーゼドメインと、C末端側に4つのCa<sup>2+</sup>結合サイトを含むカルモデュリン類似配列、両者に挟まれて偽基質ドメインが存在し、典型的なCDPKであることが明らかになった。

ゲル内活性測定法によって、浸透圧に反応して活性化を受けるプロテインキナーゼを解析した。低浸透圧負荷(0.5→0.2M NaCl)によっても高浸透圧負荷(0.5→1.1M NaCl)によっても40-kDaプロテインキナーゼが活性化された。前者は1~2分後をピークとして一過的に活性化されたのに対し、後者は20秒以内に活性化され活性化状態は10分以上保持された。前者はミエリン塩基性蛋白質(MBP)とヒストンをリン酸化したが、カゼインは基質としなかった。後者はカゼインとヒストンを基質としたが、MBPはリン酸化しなかった。従って両者は質量では識別できないが、活性化の挙動と基質特異性を異にする異分子種であり、前者をLAPキナーゼ(low osmotic pressure-activated protein kinase)、後者をHAPキナーゼ(high osmotic pressure-activated protein kinase)と命名した。両キナーゼの活性化はプロテインキナーゼ阻害剤K-252aで抑制され、活性化両キナーゼはアルカリホスファターゼ処理により不活性化された。これらの結果はドナリエラには浸透圧シグナルを伝達するプロテインキナーゼカスケードが存在し、両キナーゼの上流に位置するキナーゼが、浸透圧負荷によって何らかの機構によって活性化を受けることを示している。両キナーゼは異なるキナーゼによってリン酸化されるものと考えられる。LAPキナーゼの上流因子の一つとしてCDPKが予想される。タバコ培養細胞では低浸透圧負荷後70秒をピークとする一過的な細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が起こり、これに引き続いてLAPキナーゼに類似したキナーゼの活性化が観察された。植物細胞ではCDPKを構成要素とするプロテインキナーゼカスケードの存在が推測される。



## 9524 耐塩性緑藻ドナリエラの浸透圧調節の分子機構

助成研究者：鳥山 尚志 (名古屋大学 生物分子応答研究センター)

共同研究者：湯浅 高志 (名古屋大学)

### 1. 研究目的

単細胞緑藻ドナリエラは極めて高い耐塩性をもち、細胞内グリセロール濃度を調節することにより0.5~5M NaCl中に生育できる。浸透圧変化に対応する機構としてNa<sup>+</sup>排出やグリセロール合成系に関する研究は広範に行われているが、浸透圧変化の受容とシグナル伝達機構についてはほとんど解明されていない。我々は低浸透圧負荷により膨潤したドナリエラの形状回復にCa<sup>2+</sup>と蛋白質リン酸化が関与すること、Ca<sup>2+</sup>依存性プロテインキナーゼ(CDPK)がこのリン酸化を触媒することを既に明らかにした(1)。本研究では植物独特のプロテインキナーゼであるCDPKが浸透圧調節に関与することから、その遺伝子を単離し塩基配列から演繹される蛋白質の構造と機能を解析する。一方、CDPKとは別に浸透圧ショックに応答して活性化を受けるプロテインキナーゼの存在を見いだしている。動物細胞や酵母で環境ストレスによってMAPキナーゼカスケードが活性化されるが、ドナリエラの浸透圧刺激の伝達に同様な経路が機能している可能性がある。CDPKと浸透圧応答性キナーゼの関係について解析する。

### 2. 研究方法

#### 2.1. CDPKの構造と機能

##### 2.1.1. 全長cDNAの単離と塩基配列決定

発現ベクターに構築したドナリエラcDNAライブラリーを、抗CDPK抗体を用いてスクリーニングして3つのcDNA(DPK1, DPK2, DPK3)を単離しそれらの5'末端塩基配列を決定していた(未発表)。これらをアミノ酸に読み替えると、いずれもプロテインキナーゼ活性ドメインと相同性の高い領域を含んでいた。*E. coli*で発現した組み換え体蛋白質の質量は、いずれも精製CDPKのそれよりも小さく、全長をコードしていないと考えられたので、<sup>32</sup>PでラベルしたDPK3をプローブとして再度cDNAライブラリーをスクリーニングしてより長鎖のクローン(#14)を得、ダイデオキシ法により全塩基配列を決定した。

##### 2.1.2. 精製CDPKの部分アミノ酸配列決定

精製CDPKのN末端アミノ酸はエドマン分解法では決定できず、修飾を受けていると推定された。そこでV8プロテアーゼで加水分解してペプチド断片を得、SDS-PAGEで分画、PVDF膜にブロッキングして自動ペプチドシーケンサーで分析した。

## 2.2. 浸透圧変化に应答して活性化されるプロテインキナーゼの解析

### 2.2.1. ドナリエラ細胞の浸透圧処理およびプロテインキナーゼ阻害剤処理

ドナリエラ(*Dunaliella tertiolecta*)は既に報告した方法(1,2)で培養し、細胞濃度0.5%(v/v)になるように0.5M NaClを含む培地に懸濁して用いた。適当な濃度のNaClまたはソルビトールを含む1.5倍容の培地で細胞懸濁液を急激に希釈することによって、高・低浸透圧ショックを与えた。阻害剤は浸透圧ショック負荷前に30分間処理した。浸透圧処理後、経時的に一定量の細胞を10%TCAで殺し、遠心して集め、80%アセトンで洗ってTCAを除去し乾燥させた後、SDS-PAGE試料緩衝液に溶解した。

### 2.2.2. プロテインキナーゼのゲル内活性測定

基質蛋白質2mg/mlを加えてSDS-PAGE分離ゲル(10%アクリルアミド)を固化させた。用いた基質に応じてヒストンゲル、カゼインゲル、MBP(ミエリン塩基性蛋白質)ゲルと呼ぶ。これらのゲルを用いて定法通り電気泳動を行った。ゲルを20%(v/v)イソプロパノールを含む50 mM トリス-HCl(pH 8)/5 mM 2-メルカプトエタノール(洗液)で繰り返し洗ってSDSを除いた。次にゲルを6 Mゲアニジン-HClを含む洗液に浸し、ゲル内の蛋白質を完全に変性させた。蛋白質の再活性化はゲルを0.05%TweenX-100を含む洗液と4<sup>0</sup>Cで15~20時間振とうすることにより行った。ATPを含まない反応液(40 mM HEPES-KOH, pH7.6/ 10 mM MgCl<sub>2</sub>/ 0.5 mM EGTA/1 mM DTT)でゲルを平衡化した後、25 μM[γ-<sup>32</sup>P] ATPを添加して酵素反応を開始し30<sup>0</sup>Cで1時間続けた。5% TCA/1% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·7H<sub>2</sub>O(停止液)を加えて反応を停止し、未反応のATPは停止液で繰り返しゲルを洗浄して除いた。ゲルを乾燥後放射活性のあるバンドをバイオイメージングアナライザーまたはオートラジオグラフィーで検出した。

## 2.3. 低浸透圧ショックによるタバコ培養細胞細胞礎質Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇

### 2.3.1. エクオリン導入細胞の調製

夜光クラゲのCa<sup>2+</sup>依存性発光蛋白質エクオリンは、Ca<sup>2+</sup>と結合して400nm付近の波長の光を発生する。エクオリンはアポエクオリンと発色団セレンテラジンから構成されている。アポエクオリンcDNAが単離され動植物細胞に形質転換されて、細胞礎質Ca<sup>2+</sup>濃度の測定に利用されている(4)。タバコ培養細胞BY-2にアポエクオリンcDNAを組み込んだバイナリーベクターをもつ*Agrobacterium tumefaciens*を感染させ、アポエクオリンを形質導入した。この形質転換体と化学合成したセレンテラジンを取り込ませて、細胞礎質でホロエクオリンを構成させた。

### 2.3.2. 低浸透圧ショックによる発光の測定

エクオリンを細胞礎質にもつタバコ細胞懸濁液を、蔗糖を含まない培地で希釈す

ることにより、低浸透圧ショックを与えた。直ちにATPフォトメーターで細胞礎質 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇によって起こる発光を測定した。

### 3. 結果

#### 3.1. CDPKの構造と機能

##### 3.1.1. CDPKcDNAの全塩基配列

Fig. 1にcDNA#14の全塩基配列を示した。ORFは639アミノ酸をコードし、この値はSDS-PAGEで得られた精製酵素の質量60-kDaから予想されるアミノ酸残基数よりかなり多かった。演繹されたアミノ酸配列中には、N末端側に11のキナーゼドメイン、C末端側に4つの $\text{Ca}^{2+}$ 結合サイトをもつカルモデュリン類似ドメインが含まれていた。両者に挟まれて偽基質ドメインが存在し、典型的なCDPKの一つであることが示された。

##### 3.1.2. 精製 CDPKの部分アミノ酸配列

V8プロテアーゼ加水分解産物のうち3ペプチドのアミノ酸配列を決定した(Table 1)。これらの配列はいずれもcDNAの塩基配列から演繹された配列の一部と一致した。

#### 3.2. 浸透圧変化に応答して活性化されるプロテインキナーゼの解析

##### 3.2.1. 高・低浸透圧ショックに応答したプロテインキナーゼの活性化

Fig. 2Bは浸透圧ショック後のプロテインキナーゼ活性の変化をヒストンゲルで追跡した結果である。低浸透圧ショック(NaCl濃度を0.5Mを0.2Mに低下)により40-kDaプロテインキナーゼが急激に活性化され、1~2分でピークに達し以後急速に不活性化された。高浸透圧ショックではもっと早く40-kDaプロテインキナーゼが活性化を受け、活性化状態は5分後まで変化せず、以後ゆっくり不活性化された。また、60-kDaプロテインキナーゼも2~5分に一過性にわずかに活性化された。浸透圧ショックを与えない(等浸透圧処理)細胞でも75-kDaプロテインキナーゼの強い活性が検出された。このバンドは高・低浸透圧ショックによりゆっくり活性化を受けた。

同様な実験をカゼインゲルを用いて行った(Fig. 2C)。高浸透圧ショックを受けた細胞では40-kDaプロテインキナーゼが活性化を受け、活性化のパターンはヒストンゲルにおけるそれと類似していた。40-kDaプロテインキナーゼ活性はヒストンゲルではほとんど検出されず活性化も見られなかった。また、75-kDaと85-kDaプロテインキナーゼが低浸透圧処理細胞と等浸透圧処理細胞でわずかに検出されたが、高浸透圧処理細胞では検出されなかった。

基質蛋白質を含まないゲルで同様な実験を行った結果がFig. 2Aである。プロテインキナーゼの活性は浸透圧処理の如何に拘わらず検出できなかった。このことはヒ

ストンやカゼインをリン酸化した上記のプロテインキナーゼ活性は、それらの自己リン酸化能によっては検出できないことを示している。

Fig. 3はMBPゲルを用いて低浸透圧ショックを与えた細胞を解析した結果である。このゲルでは等浸透圧処理細胞においても、60~200 kDaにわたって多数の強いプロテインキナーゼ活性のバンドが観察されたが、40-kDaプロテインキナーゼが特異的に一過的な活性化を示した。図には示さないが高浸透圧ショック細胞のプロテインキナーゼのパターンは等浸透圧処理細胞と同様であった。

低浸透圧ショックによる40-kDaプロテインキナーゼの一過的活性化のパターンはヒストンゲルとMBPゲルとで類似していた。一方、高浸透圧ショックによる40-kDaプロテインキナーゼの極めて急速な活性化は、ヒストンゲルとカゼインゲルで観察された。これらの結果はドナリエラは少なくとも2つの40-kDaプロテインキナーゼをもち、それらは基質特異性を異にし、浸透圧に対する異なった応答性をもっていることを示唆している。低浸透圧ショックで活性化されるキナーゼをLAPキナーゼ、高浸透圧ショックで活性化されるキナーゼをHAPキナーゼと命名した。

### 3.2.2. 浸透圧強度とプロテインキナーゼ活性化

Fig. 4はHAPキナーゼの活性化に対する浸透圧強度の影響を見たものである。浸透圧ショック後2分の活性を示している。ヒストンゲルではNaCl濃度50~1000mMで濃度に依存した40-kDaプロテインキナーゼの活性化が観察された。75-kDaと85-kDaキナーゼは活性に変化が見られなかった。40-kDaプロテインキナーゼの活性化はソルビトール濃度に依存しても観察された。ソルビトールによっては5~150kDaにわたって多数のキナーゼが活性化された。一方、MBPゲル中で検出されるプロテインキナーゼはNaCl濃度変化の影響を受けなかった。ソルビトール濃度を1.2M以上に上昇させたときには、45~150kDaのプロテインキナーゼが多数活性化された。これらの結果はNaClとソルビトールはドナリエラに異なった刺激を与えていることを示している。ソルビトールで活性化された40-kDaプロテインキナーゼとNaClで活性化されたHAPキナーゼが同じ酵素であるかどうかは明らかではない。

### 3.2.3. 浸透圧ショックによるプロテインキナーゼ活性化のK-252aとスタウロsporinによる阻害

K-252aとスタウロsporinはセリン/トレオニン-タイププロテインキナーゼとチロシン-タイププロテインキナーゼの強力な阻害剤である。ドナリエラ細胞をK-252aで前処理すると、浸透圧ショックによるLAPキナーゼとHAPキナーゼの活性化は完全に阻害された(Fig. 5)。スタウロsporinも同様な効果があった。K-252a処理細胞では浸透圧ショックと無関係に45-kDaプロテインキナーゼが検出された。チロシン-タイププロテインキナーゼ特異的阻害剤として知られるゲルダナマイシンは、LAPキ

ナーゼとHAPキナーゼの活性化に影響しなかった。これらの結果はK-252aとスタウロスポリンは、LAPキナーゼとHAPキナーゼをリン酸化して活性化すると想像されるプロテインキナーゼを阻害することによって、浸透圧ショックによるLAPキナーゼとHAPキナーゼの活性化を抑制したことを示唆している。

#### 3.2.4. 脱リン酸化によるLAPキナーゼとHAPキナーゼの失活

高・低浸透圧ショックを与えた細胞の抽出液をアルカリフォスファターゼで処理すると、LAPキナーゼとHAPキナーゼは完全に失活した。すなわちこれらのプロテインキナーゼはリン酸化を受けた結果活性化されたことを示している。アルカリフォスファターゼ処理は浸透圧ショックの影響を受けない75-kDaと85-kDaプロテインキナーゼも失活させた。従ってこれらのキナーゼもリン酸化による活性化を受けていることが明らかである。

#### 3.2.5. 抗フォスフォチロシンモノクロン抗体による免疫沈降

抗フォスフォチロシンモノクロン抗体PY-20を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、浸透圧ショックを与えた細胞からも未処理の細胞からも、免疫交叉する蛋白質は検出されなかった。しかし同じ抗体で細胞の抽出液を免疫沈降させ、沈殿物をゲル内活性測定によって解析した(Fig. 7)ところ、浸透圧処理の如何に拘わらず75-kDaプロテインキナーゼ活性バンドが検出された。高浸透圧ショックを与えた細胞の免疫沈降物からは100-kDaプロテインキナーゼが検出された。LAPキナーゼとHAPキナーゼに相当する40-kDaプロテインキナーゼは免疫沈降物からは検出されなかった。これらの結果はLAPキナーゼとHAPキナーゼはチロシン残基がリン酸化されていないことを示している。また100-kDaプロテインキナーゼは高浸透圧ショックによって活性化されたと考えられる。

### 3.3. 低浸透圧ショックによるタバコ培養細胞細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇

ドナリエラにおいて低浸透圧ショックが細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を引き起こすことが推定されている。ドナリエラにエクオリンを導入してこれを確認することが望まれるが、ドナリエラの形質転換法が未だ確立されていないので、形質転換が容易でかつ浸透圧ショックを容易に負荷できるタバコ培養細胞を用いることにした。

Fig. 8はタバコ細胞懸濁液に低浸透圧ショックを与えた後の発光の経時変化である。ショック後70秒をピークとする一過的な細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が起こったことを示している。

## 4. 考察

### 4.1. CDPKの構造と機能

精製 CDPKの3カ所の部分アミノ酸配列は、cDNA#14の塩基配列と完全に一致したので、このcDNAは精製 CDPK蛋白質をコードしていると考えられる。アミノ酸配列はN末端側にキナーゼドメインをC末端側にカルモデュリン類似ドメインをもち、両者に挟まれて偽基質ドメインをもつ典型的な CDPKの一つである。既に得られている酵素学的諸性質( $10^{-7}$ ~ $10^{-6}$ M  $\text{Ca}^{2+}$ で顕著に活性化される。カルモデュリン阻害剤で阻害されるなど)(1,3)と蛋白質の構造上の特徴は良く一致している。

#### 4.2. 浸透圧変化に应答して活性化されるプロテインキナーゼの役割

高・低浸透圧ショックをドナリエラに与えると、それぞれHAPキナーゼとLAPキナーゼが活性化された。いずれも質量40kDaであるが活性化速度、基質特異性が異なるので異なる酵素であることは明らかである。NaCl濃度の上昇と低下のシグナルは異なった経路で伝達されると考えられる。また、浸透圧上昇をNaClで行うかソルビトールで行うかによっても異なったプロテインキナーゼが活性化された。両者のシグナルは異なった経路で伝達されるのであろう。

HAPキナーゼとLAPキナーゼの活性化はK-252aやスタウロスポリンで阻害されたこと、および活性化された酵素をアルカリフォスファターゼ処理すると失活したことから、活性化は酵素蛋白質のリン酸化の結果であると考えられた。したがって、HAP・LAPキナーゼをリン酸化して活性化するプロテインキナーゼが存在し、これらが浸透圧ショックによってまず活性化を受けるはずである。また、HAP・LAPキナーゼのリン酸化はチロシン残基では起こっていないことが免疫学的に示されたので、活性化キナーゼはチロシンキナーゼではないと考えられる。

著者らは、先にドナリエラに低浸透圧ショックを負荷すると、5分後をピークとして28~32kDaの複数のペプチドが一過的にリン酸化されることを報告した。K-252aやスタウロスポリンはこのリン酸化を阻害するだけでなく、低浸透圧で膨潤した細胞の形状回復をも阻害した。LAPキナーゼの活性化もこれらの阻害剤で抑制された。また、LAPキナーゼの活性化は1~2分でピークに達したので、28~32kDaのペプチドのリン酸化に先立って起こっているように見える。LAPキナーゼはこれらのペプチドをリン酸化するプロテインキナーゼの活性化キナーゼであるかも知れない。

一方、28~32-kDaペプチドのリン酸化はカルシウムイオノフォア処理によっても引き起こすことができたので、低浸透圧ショックにより細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が起こった結果であると推測された。低浸透圧ショックによる細胞礎質 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は、エクオリン導入タバコ細胞で直接確認された。同じことがドナリエラで起こっている可能性を示唆するものであろう。 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇はCDPKの活性化をもたらすであろう。また、これがLAPキナーゼの活性化に先立つものであるなら、CDPKはLAPキナーゼの上流に位置する活性化キナーゼである可能性がある。



これまでに登場したプロテインキナーゼは浸透圧シグナル伝達経路の構成要素であると考えられるが、それぞれが相互にどのように配置されているかについては、今後更に明らかにして行かなくてはならない。

文献

- (1) Yuasa, T. and Muto, S. (1992) Arch. Biochem. Biophys., 296: 175-182.
- (2) Yuasa, T. and Muto, S. (1992) *In* Research in Photosynthesis. Vol. IV. ed., Murata, N. pp.263-266. Kluwer Acad. Publ.
- (3) Yuasa, T., Takahashi, K. and Muto, S. (1995) Plant Cell Physiol., 36: 699-708.
- (4) Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M. and Trewavas, A.J. (1991) Nature, 352, 524-526.

注) Muto, S.は鳥山尚志の学術活動名

Table 1. Amino acid sequences of peptides produced by V8 protease digestion from *Dunaliella* CDPK.

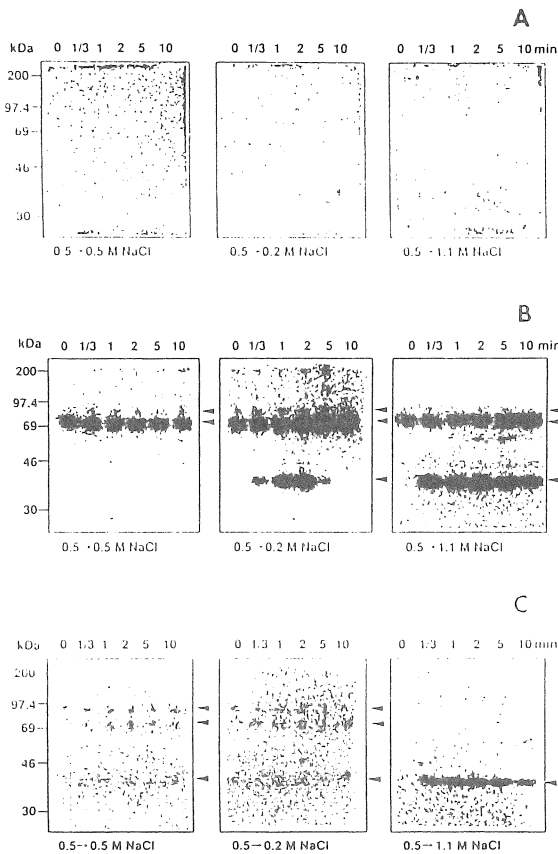
Peptide 1	V - Q/M - I - M - D - X - M - A - G - X - P - N - V - V - X - X - X - X - V - Y -
Peptide 2	Q/N - G - V - A - S - D - E - P - L - E - M - V - E/V -
Peptide 3	X - F - N - X - N - V - V - L - R - D - V - A - X - G - G - X - K - A -

```

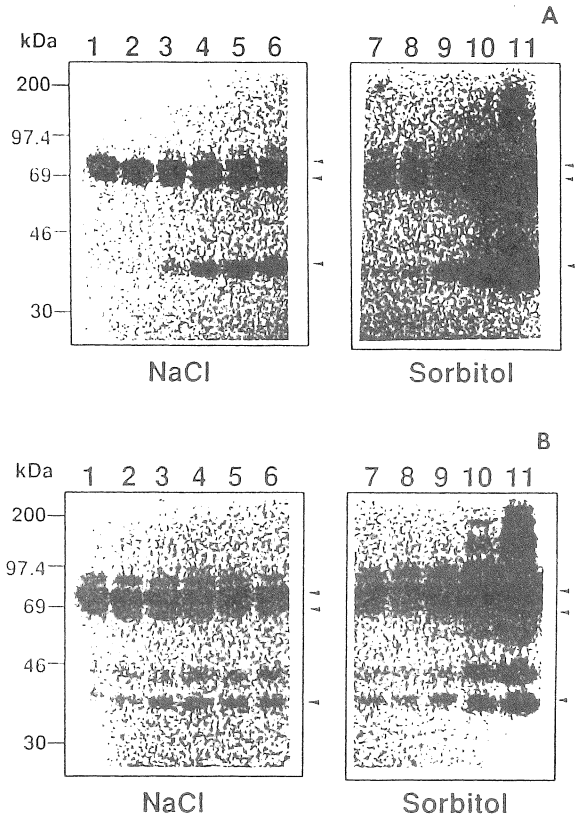
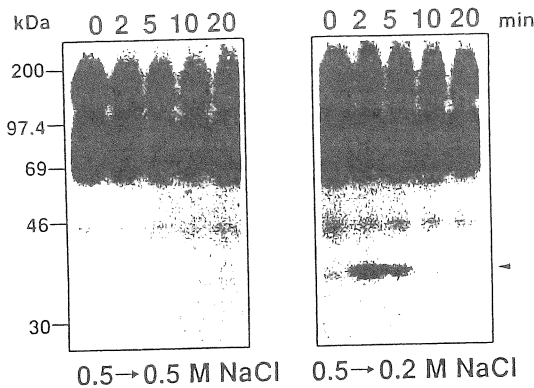
CAGTTAGTCTAACTCGACGACCTTTCCTGCTGGGCCATCCATCCATCCACATCAACAACAACACACATAAT 75
TTGGGGGGCCATCTTGAAGCCGCTCCCTTTAATTCACATCCACAACCCCTCAGCCTCAAAGCATGGGAGCGTG 150
1 M A S V 4
GACTGCACGTTGGTCTCTGGCAGGGGACATTAAGACGCTGGAGATAGTTGGCAAGCAGAGCCCTATGGCCGTGCTG 225
D C T L V S A R G I K D V E I V G K Q S P Y A V L 29
ACTGTGGGCCCCAAGACATTCAAAAGCGGGACGGCAAAACGGAGGTGGTAGCGACCCGCTGAGTGAATTTGCCCCG 300
T V G P K T F K S G T A N G G G S D P V S E F A P 54
CAAAACTTTTCGCAAAATCACTCGACCGACGGCTGTGAGCTGTGGTGCACACGGGACCAAGAGCCATCATGCT 375
Q N F S A N H L T Q R C E L S V Q R D E R A H H A 79
TTCGCCAAGGCTGCCCCCAATTCCTTTGGAGTTGCAAGTTTGAACAGACTTTCATCATCAAAACGCTACC 450
F P K P A P P I L C E L Q V W N Q T F S F T N V T 104
CCCGATTATCCGTCAGATTGGAGATATCAACTCCAACGTAGTGCTGAGGGATGTCGCTATTTGGTGGATGAAG 525
P D S S V K L E I F N S N V V L R D V A I G G C K 129
GC'TCCCATGGACAAGGCGTTATCAGCTGGCAAGGACGAGCTCACCTCCCATCATCACCAAGAAAGCGAACGCC 600
A P M D K A L S A G K D E L T L P I I T K K G K P 154
CATGGTGAAGTCAAGCTGATAC'TGACCTCAAGCCGATGCCCAAAGCAAATGGTGAAGTACGACCAAGACAAG 675
H G E V K L I L T L K P D A T K Q M V T S H K T R 179
AAGGCAGCTGGGCGCTGGATCC'TGCCACCTACGGCAATACCGACTGCTGGAAAGGAT'ATGAGCTGGCACATC 750
K A A G A W I L P T Y G N T D C W K D Y E G T L 204
CTTGGGAAGGGCACCTTTGGCACCACCTACCTCGCAGACAGAGAAGAAGACGGGGCAGAAAGTGGCTGTCAAGGTC 825
L G K G T F G T T Y L A T E K K1 T G O K C A V K V 929
ATCTCAAAGCGCAAGCTGACCACACCGATCAGCTAGATGATGATAAGAAAGAGGTCAGACTCATGACCAACCTG 900
I S K R K L T T P1 D E V D D V K K F V Q I M H H L1 254
GC'TGGCCACCCCAAGCTGGTGGCTTTAAAAGGAGTGTACAGGACAAAAGCAATGTCTGT'TTAGCAA'TGGAGGTT 975
A G H P N V V G L K G V Y E D1 K S N V C L A M E V 279
GCCACAGGTGCCAGCTGT'TGACTCCATCGTCAAGCCTGGCCACTACAGTGAGCCCGATGCCCGAGAGCTGATA 1050
A T G G G E L F D S I V K R G1 H Y S E P D A A E F L I 304
CGTACGATTTGTGAGGCTTGTGGCCACTGCCACAACATGGGGCGTATCCATAGGGACCAAGCCCGCAACCTTC 1125
R T I V S V V A H C H N M1 G V T H R D L K P E N E 329
CTGC'TGCCCAAGTCCCCAGAGCTCAGCTAAAGGCAACGGACTTCGGTCTCAGCTCCCTTCTCCAGGAGGGC 1200
L L S D K S P R A1 D L K A T D F G L S S F O E1 G 354
CAAGTATTCACGTGACATTTGGGTTCTGCTATTAGCTTGCCTCCGAAAGTCC'TGGCTGCTTCATGGCAAGGAA 1275
O V F T D I V G S A Y V V A P E V1 L R R S S Y G K E 379
GGGGACATTTGGAGCTGGCGCATCATCTGTACATCCCTGCTGTGGCGGTTC'CCCCCATCCATGGCGCAGGTGAG 1350
A D I T W S C G I I L Y I L L C G F P P P E H G1 D S E 404
AAGAAGATTTTCGAGCCATCATCAGCAAGTCTGTGGACTTTAACACGCAAGCCGTGGCCCAAGTCTCAGCTCCT 1425
K K T F E A I T S K S V D F N T1 Q P W P R I T S A P 429
GCCAAGGACTGTGTGAAGCGCATGTTGACGGCGGACCCGAAAGCGTGGCAGCCGCAACAGAGATCATGCAAGCAC 1500
A K D C V K R M L Q R D P K K R A T A N E I M Q H 454
GACTGGATGCGTGAGAA'TGGTGTGCCAGTGTGAGCCTCTGGAGATGGAGGTCGTGTCCGCCATCAAGAACTTC 1575
D W1 M R E N G V A S D E P L E M E V V S K I K N F 479
AGTGGCATGAACAAGCTCAAGAAGGAGGCCCTCAAGGTCACTCGTGTAAACCT'GGCCATCGATAAATCTCTGCT 1650
S G M H K L K K E A L K V I A V N L P I D E I S G 504
ATGGGGAGATGTCATGGACATCGACAAGACAAGAGCGGCAACATCAGGAT'TGACGAAT'TTGGCGGGCAGCTT 1725
M R E M F M D I D K D K S G N I T I D E F A A A L 529
CACAAAGGGCCAGATTTGTGACGGAGAAGGAGATTGAGAAGATCATGAACGAGGCTGATGTGGATGGGGACGGC 1800
H K K G O I V T F K E T E K I M K E A D V D G D G 554
ACCATCGACTATGAGGAG'TTCCTGGCTGCCACCATCAACCTGGGCAACTGCAACGAGAGGAAAACTGAAGACT 1875
T I D Y E F F L A A T I N L G K L O R E E N I K T 579
GCATTTGAGCACTTTGATTTGGACGGCAACCGTGAATCTCCGATAACGAGCTCGTCCAGTCTCTCTAAGCTG 1950
A F E H F D L D G N G F I S H N E L V O G L S K I 604
GGCATCAACGACGGCAGCTTAAAGGATATCATCAAGGAGGTAGATGCAGATGGCAACGGCCAGATCGACTACAC 2025
G I N D A H V K D I I K E V D A D G N G O I D Y N 629
GAGTTTGCATCATGATGCGCAACCTGGATTAAGGTACCGACGGGAAAAAGTCAAGGCCCTGATCATCTGCATC 2100
E F C I M M R N L D * 639
GCTCCTAGCCGTTACAGATATGTTTACAGAAA'TGTTACGACTTCTTGGCTTAAAGAAATGGAGGATGTTGGTTGC 2175
TCAGGGCAACAGCTTGGTGGTTTTTACTCATGCTGCTGTGGCTTGTTCAGTAGCTGTGCATGTTGTTGTATAG 2250
ACACTGCTGCAC'TAAAGCTTAAAGCTCGAGAGGTGCTCTAGTACTGCTCTCGTGTGCTTCTAGTGGAGGGGT 2325
GAGTTGAACAGGTGCC'TTCTTTAATAAGTCTAATCGGAGAATGGATGGCTTGTCTTTTGTGGAACTGTGAG 2400
CAAGCTCAGCAGAGCTTGTGTGTAGCAC'TTGAGATGTGACCGCTTGAAGGGGTGATGCTGTCAAATTTGA 2475
ATTGAGGGGAAGCATTCAGCTTAAATGGCCACATAAGAATGCAACCGATAATTTTGAAGAAAGAAACAGAACGT 2550
ACTTGTAGACATTTTAACTCGCCGCTCCCTTGTCTTCCTCATTTGGTATTTCTCGAGCTGAAGTGCACCTGG 2625
AGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. 1. Nucleotide sequence of cDNA coding Dunaliella CDPK and amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence. Kinase domains are indicated by thin underlines and calmodulin-like domain by a thick underline.

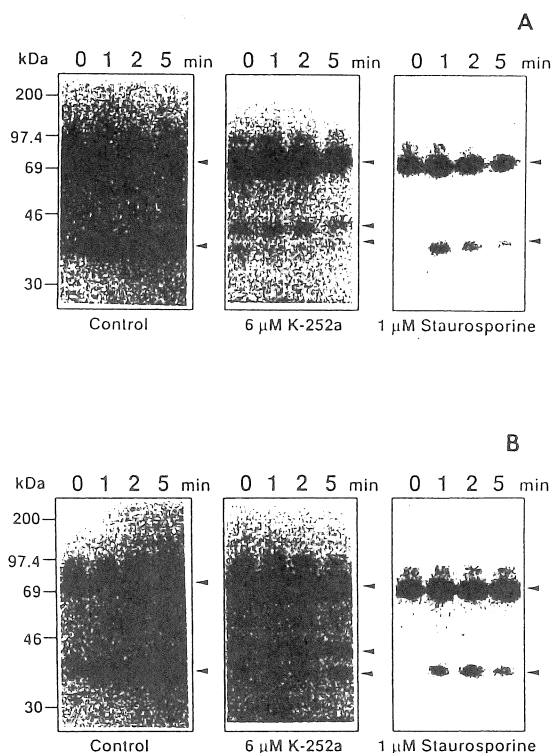


**Fig. 2** Effects of osmotic shock on the activities of various protein kinases. *Dunaliella* cells were killed by 10%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  at the indicated times after osmotic shock and cell extracts ( $38 \mu\text{g}$  protein lane<sup>-1</sup>) were subjected to electrophoresis. In-gel assays of kinase activities were performed on no-substrate gels (A), histone-gels (B) and casein-gels (C). Left panels, isoosmotic conditions (0.5 M NaCl, 1,119 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); central panels, hypoosmotic shock (0.2 M NaCl, 503 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); right panels, hyperosmotic shock (1.1 M NaCl, 2,324 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>). The activities of protein kinase were visualized with a Bioimaging analyzer. The duration of exposure to imaging plates was 16 h for histone-gels and for the casein-gel that was used for hyperosmotically shocked cells, and 30 h for the other gels. The locations of 85-, 75- and 40-kDa kinases are indicated by arrowheads (from top to bottom).

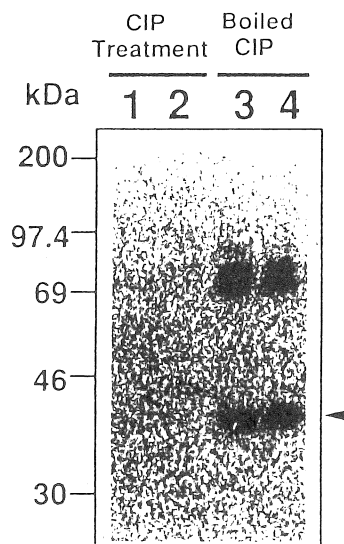


**Fig. 4** Dose-dependent activation of protein kinases by osmotic shock. In-gel assays of kinase activities were performed in histone-gels (A) and MBP-gels (B). The osmolarity of medium that contained 0.5 M NaCl was changed by adding NaCl (left panel) or sorbitol (right panel) to the indicated concentrations. Lane 1 (control), 0.5 M NaCl (final, 1,120 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); lane 2, 0.55 M NaCl (final, 1,220 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); lane 3, 0.6 M NaCl (final, 1,314 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); lane 4, 0.75 M NaCl (final, 1,612 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); lane 5, 1.1 M NaCl (final, 2,325 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); lane 6, 1.5 M NaCl (final, 3,092 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); lane 7, 0.5 M NaCl and 0.1 M sorbitol (final, 1,235 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); lane 8, 0.5 M NaCl and 0.2 M sorbitol (final, 1,335 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); lane 9, 0.5 M NaCl and 0.5 M sorbitol (final, 1,757 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); lane 10, 0.5 M NaCl and 1.2 M sorbitol (final, 2,756 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); and lane 11, 0.5 M NaCl and 2 M sorbitol (final, 5,134 mOsm (kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>). *Dunaliella* cells were killed by 10%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  2 min after the osmotic shock. The resultant cell extracts ( $42 \mu\text{g}$  of protein lane<sup>-1</sup>) were subjected to in-gel assays of protein kinase activities as described in the legend to Fig. 1. The locations of the 85-, 75- and 40-kDa kinases are indicated by arrowheads (from top to bottom).

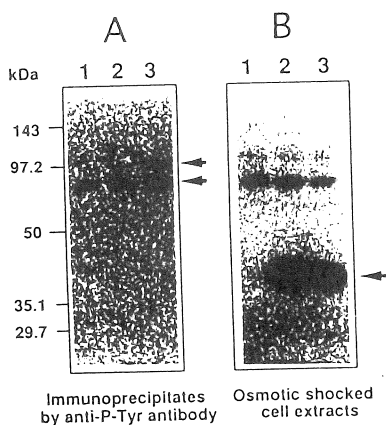
**Fig. 3** Effects of hypoosmotic shock on activities of protein kinases in MBP-gels. Left panel, isoosmotic conditions; right panel, hypoosmotic shock. *Dunaliella* cells were killed by 10%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  at the indicated times after exposure to osmotic shock. Electrophoresis was performed with  $49 \mu\text{g}$  of protein lane<sup>-1</sup> in MBP-gels and the activities of protein kinases were analyzed by autoradiography. The location of the 40-kDa kinase is indicated by an arrowhead.



**Fig. 5** Effects of inhibitors of protein kinases on the activation of protein kinases by hypo- and hyperosmotic shock. *Dunaliella* cells were subjected to hypoosmotic (transfer from 0.5 to 0.2 M NaCl; panel A) or hyperosmotic (transfer from 0.5 to 1.1 M NaCl; panel B) shock. Inhibitors were included at the indicated concentrations. In-gel assays of kinase activities were performed with 46  $\mu\text{g}$  of protein lane<sup>-1</sup> in histone-gels, as described in the legend to Fig. 1. Arrowheads indicate the 75-, 45- and 40-kDa kinases (from top to bottom).



**Fig. 6** Deactivation of protein kinases by treatment with a phosphatase. *Dunaliella* cells were subjected to hypoosmotic shock (transfer from 0.5 to 0.2 M NaCl, lanes 1 and 3) or hyperosmotic shock (transfer from 0.5 to 1.1 M NaCl, lanes 2 and 4). Cells (packed cell volume, 2  $\mu\text{l}$ ) were killed by 10%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ , 2 min after the osmotic shock, and cell extracts were treated with calf intestinal alkaline phosphatase (CIP; 0.5 U ml<sup>-1</sup>, lanes 1 and 2) or boiled CIP (lanes 3 and 4) for 10 min as described in Materials and Methods. An in-gel assay of kinase activities was performed in a histone-gel as described in the legend to Fig. 1. An arrow indicates the 40-kDa kinase.



**Fig. 7** Activities of protein kinase in immunoprecipitates of extracts of *Dunaliella* cells treated with anti-phosphotyrosine monoclonal antibodies. *Dunaliella* cells were subjected to isoosmotic conditions (transfer from 0.5 to 0.5 M NaCl, lanes 1), hypoosmotic shock (transfer from 0.5 to 0.2 M NaCl, lanes 2) or hyperosmotic shock (transfer from 0.5 to 1.1 M NaCl, lanes 3). Cells (packed cell volume, 2  $\mu\text{l}$ ) were killed by 10%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ , 2 min after osmotic shock, and cell extracts were solubilized in Laemmli's sample buffer. Half of each resultant sample was immunoprecipitated with anti-phosphotyrosine antibodies (clone PY-20) as described in Materials and Methods. In-gel assays of kinase activities with the cell extracts (A) and the immunoprecipitates (B) were performed in histone-gels as described in the legend to Fig. 1. The duration of the exposure of the gel in A to the imaging plate was 150 h, while that of in B was 20 h. Arrows indicate the 100- and 75-kDa kinases in A and the 40-kDa kinase in B.

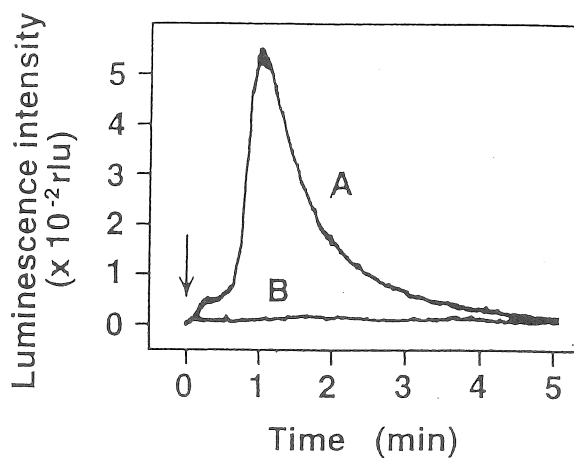


Fig. 8. The hypoosmotic shock-induced  $[Ca^{2+}]_c$  elevation in tobacco suspension culture cells transformed with apoaequorin cDNA. Three-day old transgenic tobacco suspension culture cells were incubated with 1 mM coelenterazine for 8 h. The cells were washed with and suspended in the fresh medium. After 30 min, the suspension was diluted (indicated with an arrow) with 2 volumes of the medium depleted sucrose (90 mosmol, A) or the normal medium (120 mosmol, B). the osmolarities of the deluted suspension were 125 (A) and 200 mosmol (B).

## Molecular mechanism of osmoregulation in the halotolerant green alga *Dunaliella*

Shoshi Toriyama and Takashi Yuasa  
Nagoya University Bioscience Center, Nagoya University

The halotolerant green alga *Dunaliella* grows in media containing 0.5 - 5 M NaCl by regulating its cellular concentration of glycerol. We have shown that  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase (CDPK) which requires only  $Ca^{2+}$  as the activator, involves in the process of osmoregulation after hypoosmotic shock in *Dunaliella tertiolecta*. We have also discovered protein kinases which were activated in response to hypo- and hyperosmotic shocks.

In the present study, a cDNA coding CDPK was cloned from expression cDNA library by using an anti-*Dunaliella* CDPK antibody and its whole nucleotide sequence was determined. On the other hand, amino acid sequences of 3 polypeptides produced by V8 proteinase digestion of the purified CDPK were determined. These amino acid sequences coincided with the respective parts of the amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence. The deduced amino acid sequence contained 11 protein kinase domains at N-terminal region, calmodulin-like domain with 4  $Ca^{2+}$  binding sites at C-terminal region, and a pseudosubstrate domain between the kinase domains and the calmodulin-like domain, indicating that this is a typical CDPK.

Using an in-gel protein kinase assay, protein kinases activated in response to osmotic shock in *Dunaliella* cells were analysed. Protein kinases with molecular mass of 40-kDa were activated by both hypoosmotic (0.5 to 0.2 M NaCl) and hypersomotic (0.5 to 1.1 M NaCl) shocks. The hypoosmotic shock responsive kinase (low osmotic pressure-activated protein kinase; LAP kinase) was transiently activated with a peak 1-2 min after the shock, while the hyperosmotic shock responsive kinase (high osmotic pressure-activated protein kinase; HAP kinase) was rapidly activated within 20 sec and remained in the activated state over 10 min. LAP kinase phosphorylated myelin basic protein (MBP) and histone but not casein. On the other hand, HAP kinase phosphorylated casein and histone but not MBP. Activation of both kinases were suppressed by a protein kinase inhibitor K-252a. The activated kinases were deactivated by the treatment of alkaline phosphatase. These results suggest the presence of protein kinase cascades transducing osmotic signals in *Dunaliella* cells. CDPK is one of candidates for the upstream regulator of LAP kinase. In tobacco suspension culture cells, hypoosmotic shock induced a transient increase in cytosolic  $Ca^{2+}$ , and subsequent activation of LAP kinase-like kinase.