

「植物の機能と制御」
平成12年度採択研究代表者

飯田 秀利

(東京学芸大学教育学部、教授)

「植物の重力感知の分子機構」

1. 研究実施の概要

「研究のねらい」

細胞膜に存在する伸展活性化Ca²⁺透過チャネルの遺伝子を単離し、分子遺伝学および電気生理学的方法を用いてその構造と重力などの物理的的刺激に対する応答の分子機構を明らかにする。

「これまでの研究の概要と成果」

本研究ではまず、酵母の伸展活性化Ca²⁺透過チャネルをコードするMID1遺伝子に欠損をもつ突然変異株 (*mid1*変異株)の致死性を機能的に相補するシロイヌナズナの遺伝子を単離することに成功し、これを*AtMID1A* 遺伝子と名付けた。この遺伝子に関し以下の研究成果を挙げている。

- (1) *AtMID1A* 遺伝子産物 (*AtMid1A*)を電気生理学的に解析した結果、これは伸展活性化Ca²⁺透過チャネルとしてはたらくことを明らかにした。
- (2) *AtMID1A* は根端と孔辺細胞で発現していることが分かった。
- (3) *AtMID1A* のセンスRNAが高発現すると、高発現の効果の高いものは発芽後20日前後で枯れ、発現効果の低いものは種子が採れるものの花弁がほとんどなく植物体全体が矮小化していた。
- (4) *AtMID1A* に類似のシロイヌナズナ遺伝子を発見し、それを*AtMID1B*と名付けた。

「今後の見通し」

電気生理学的解析を更に進めることにより、*AtMid1A*タンパク質のイオン透過性やイオン選択性が解明される。また、*AtMid1A*タンパク質に対する抗体を作製中であり、近い将来これの細胞内分布が明らかになる。分子構造も明らかにする予定である。また、現在進行中の*AtMID1A* 遺伝子のT-DNA挿入変異株が確立されれば、重力屈性や気孔の開閉における*AtMid1A*タンパク質の役割が明らかになる。*AtMID1B*も*AtMID1A*と同じ解析を行なうことにより、これらの生理機能が分子遺伝学によりはっきりと分かるようになる。

2. 研究実施内容

「研究目的」

細胞膜に存在する伸展活性化Ca²⁺透過チャネルが植物の重力センサーであり、同時に種々の機械的刺激に対する応答反応の初期発生装置としてはたらくとの仮説に立ち、伸展活性化Ca²⁺透過チャネルの遺伝子を単離し、その分子構造と重力感知、気孔の開閉制御、および接触刺激に対する応答などにおける役割を分子レベルで明らかにする。

「方法と結果」

本研究に先立ち、我々は真核生物では世界で初めて出芽酵母の伸展活性化Ca²⁺透過チャネルの遺伝子MID1を特定することに成功した(Kanzaki et al., *Science* 285: 882-886, 1999)。本研究ではまず、酵母のmid1変異株の致死性を機能的に相補するシロイヌナズナのcDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、一つのcDNAクローンがmid1変異株の致死性を相補し、しかも酵母細胞のCa²⁺の取り込み能を上昇させた。この遺伝子をAtMID1A遺伝子と名付け、以後の実験に用い、以下のような研究結果を得た。

- (1) AtMID1A遺伝子をチャイニーズハムスター卵巣細胞に発現させ、パッチクランプ法により、細胞膜を進展させるとAtMid1Aタンパク質はCa²⁺を透過させた。このことはAtMid1Aが伸展活性化Ca²⁺透過チャネルであることを示す。
- (2) AtMID1A遺のプロモーターにβ-グルクロニダーゼ遺伝子(GUS)をつなぎ、AtMID1A遺の発現部位を調べた。その結果、根端と孔辺細胞で発現していることが分かった。根端は重力を感知する場所として知られ、孔辺細胞は細胞の膨圧変化により気孔の開閉を制御している。したがって、AtMid1Aはこれらの現象に関与している可能性が十分に考えられる。
- (3) AtMID1A遺のセンスRNA発現株を作製し、その株の表現型を調べた。その結果、高発現の効果の高いものは発芽後20日前後で枯れた。一方発現効果の低いものは種子が採れたが、花卉がほとんどなく植物体全体が矮小化していた。
- (4) AtMID1A遺遺伝子のT-DNA挿入変異株をスクリーニングした。現在、この遺伝子のプロモーター領域にT-DNAが挿入した可能性のある株を検出することができた。
- (5) AtMID1A遺に類似のシロイヌナズナ遺伝子を発見し、それをAtMID1Bと名付けた。この遺伝子についてもAtMID1A遺と同じ解析を行ないつつある。
- (6) AtMid1Aのオリゴペプチドに対する抗体を作製した。また、GST-AtMid1A融合タンパク質とGST-AtMid1B融合タンパク質とに対する抗体をそれぞれ作製している。

これらの抗体を使い、今後AtMid1AとAtMid1Bの細胞内局在部位の決定やこ

これらのタンパク質と直接相互作用するタンパク質の検索を行なう予定である。

3．主な研究成果の発表（論文発表）

なし