

「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 Ca^{2+} 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」

本研究ではまず、出芽酵母の伸展活性化 Ca^{2+} 透過チャネルをコードする *MIDI* 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。また、この遺伝子のホモログを見つけ、*AtMID1B* 遺伝子と名付けた。これまで、*AtMID1A* 遺伝子は根端や孔辺細胞などで選択的に発現していること、および *AtMID1A* 遺伝子の高発現株は発芽後生育阻害を受けていることを明らかにしている。

「成果」

平成13年度はその両遺伝子およびそのホモログである出芽酵母の *MIDI* 遺伝子に関し以下の研究成果を挙げている。(1) T-DNA タグラインのスクリーニングにより *AtMID1A* 遺伝子の欠損株を特定することができた。(2) *AtMID1B* 遺伝子は *AtMID1A* 遺伝子よりも発現量が多く、植物組織の至る所で発現していた。特に維管束での発現量が多かった。(3) *AtMid1A* タンパク質は細胞を直接伸展させる刺激に応答して Ca^{2+} を流入させる活性を持つことを明らかにした。(4) シロイヌナズナの *AtMID1A* 遺伝子および *AtMID1B* 遺伝子のホモログをタバコおよびイネから単離することに成功した。(5) 出芽酵母の *Mid1* チャネルの C-末端領域およびそこに存在するシステイン残基7個がチャネル活性に重要であることを明らかにした。

「今後の見通し」

AtMID1A 遺伝子に関して T-DNA 挿入欠損変異株が特定できたので、今後、野生株への戻し交配によりこの欠損株が間もなく樹立される見通しである。これにより、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。また、電気生理学的解析を更に進めることにより、*AtMid1A* タンパク質および *AtMid1B* タンパク質のイオ

ン透過性やイオン選択性も解明される。

2. 研究実施内容

「研究目的」

細胞膜に存在する伸展活性化 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 透過チャネルの遺伝子 *MIDI* 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 Ca^{2+} 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、更にそのホモログを *AtMID1B* 遺伝子と名付けた。平成 13年度は以下の研究結果を得た。

1) *AtMid1A* および *AtMid1B* 遺伝子欠損株のスクリーニング

シロイヌナズナの T-DNA 挿入変異株のスクリーニングを行った。その結果 *AtMID1A* 遺伝子への T-DNA 挿入株を7株特定した。そのうちの特に有望な1株について更なる解析が進行中である。今後、野生株への戻し交配を行い、欠損株の樹立を行う。*AtMid1B* 遺伝子欠損株の特定はまだなされていない。

2) *AtMid1A* および *AtMid1B* 遺伝子のアンチセンス鎖および 5'-非翻訳領域の RNAi を発現するコンストラクトを用いた発現抑制株の作製

各コンストラクトをアグロバクテリウムを用いてシロイヌナズナ野生型株に導入し、変異第2世代の種子を回収した。現在、mRNA の蓄積量を検定中であり、野生株に比べて抑制された株の単離を目指している。

3) *AtMid1B* 遺伝子のセンス鎖高発現株の解析

明確な表現型がなかった。

4) *AtMid1A-GFP* 融合遺伝子を用いた *AtMid1A* 遺伝子の発現部位の解析

AtMid1A タンパク質の細胞内局在部位を調べる目的で *AtMID1A-GFP* タンパク質の局在部位を蛍光顕微鏡で調べた。まだ解析を開始したばかりであり、明るい蛍光像を得られていない。今後測定条件を検討し、良好な画像が得られるよう工夫する。

5) *AtMid1B* 遺伝子プロモーター-*GUS* 融合遺伝子を用いた *AtMid1B* 遺伝子の発現部位の解析

AtMid1A 遺伝子と異なり、発芽後3日目以降も子葉でも根でも発現が続いた。特に葉の葉脈(維管束)と根の維管束で発現が著しいことが分った。成熟した植物体においても、葉、茎、花、根、鞘など植物体全体で発現することが明らかになった。

6) *AtMID1A* 遺伝子高発現株における細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

伸展活性化 Ca^{2+} 透過チャンネルとしての *AtMid1A* の植物細胞における役割を明らかにする目的で、*AtMID1A* 遺伝子高発現株と野生株に Ca^{2+} 濃度測定用のタンパク質である“カメレオン”を発現する株を樹立した。現在野生株の Ca^{2+} 濃度を測ることに成功している。

7) *AtMid1A* のチャンネル活性

AtMID1A 遺伝子を発現している CHO 細胞をフィブロネクチンでコートしたシリコン膜上で培養し、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fura-2 を導入し、細胞内の Ca^{2+} 濃度を測定した。その結果、*AtMid1A* はシリコン膜の伸展(すなわち細胞の伸展)に応じて細胞外から Ca^{2+} を動員することに関与することが明らかになった。

8) *AtMid1A* および *Mid1* タンパク質の精製

大腸菌および酵母の系を用いて、まず *AtMid1A* および *Mid1* タンパク質を高発現する株の樹立を目指した。現時点で *AtMid1A* タンパク質の高発現は成功していないが、*Mid1* タンパク質の高発現株は樹立することができた。酵母の実験条件を手本に、今後 *AtMid1A* タンパク質の高発現条件を検討する。

9) タバコ BY-2 細胞の *AtMid1A/B* ホモログの単離

シロイヌナズナの *AtMID1A/B* 遺伝子に相同なタバコの遺伝子を2種取ることに成功した。この二つを *NtMID1A* と *NtMID1B* と仮に名付けた。

10) イネの *AtMid1A/B* ホモログの単離

一つの *AtMid1A/B* ホモログ候補者を単離することに成功した。

11) 酵母 *Mid1* の解析

Mid1 タンパク質の C-末端領域が *Mid1* のチャンネルとしての機能に重要であることを明らかにした。特にこの C-末端領域に存在する10個のシステイン残基のうち7個が機能に必要であることを明らかにした。(Maruoka *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **277**:11645-11652, 2002)

12) 酵母 *Mid1* の疎水性領域 H2、H3 および H4 の解析

部位特異的変異導入法により、H2、H3 または H4 領域を完全に欠失した変異 *Mid1* チャンネルは機能をもたないことを明らかにした。更に、それぞれの領域のアミノ酸一つずつを別のアミノ酸に置換することにより、どのアミノ酸が *Mid1* チャンネルの機能に必要なかを明らかにした。(投稿準備中)

3. 研究実施体制

飯田グループ

① 研究者名:

飯田秀利(東京学芸大学 教授)

② 研究項目:

1. *AtMid1A* および *AtMid1B* 遺伝子欠損株のスクリーニング
2. *AtMid1A* および *AtMid1B* 遺伝子のアンチセンス鎖および 5'-非翻訳領域の RNAi を発現するコンストラクトを用いた発現抑制株の作製

3. *AtMid1B* 遺伝子のセンス鎖高発現株の解析
4. *AtMid1B* 遺伝子プロモーター-GUS融合遺伝子を用いた *AtMid1B* 遺伝子の発現部位の解析
5. 酵母 Mid1 チャンネルの C-末端および疎水性領域の解析

辰巳グループ

- ① 研究者名:
辰巳仁史(名古屋大学 助教授)
- ② 研究項目:
 1. フィブロネクチンでコートしたシリコン膜上の CHO 細胞の伸展に伴う AtMid1A チャンネル活性の測定
 2. AtMid1A および Mid1 タンパク質の精製

朽津グループ(東京理科大学):

- ① 研究者名:
朽津和幸(東京理科大学 助教授)
- ② 研究項目:
 1. タバコ BY-2 細胞の *AtMid1A/B* ホモログの単離
 2. イネの *AtMid1A/B* ホモログの単離

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Maruoka, T., Nagasoe, Y., Inoue, S., Mori, Y., Goto, J., Ikeda, M., and Iida, H.
Essential hydrophilic carboxyl-terminal regions including cysteine residues of the yeast stretch-activated calcium-permeable channel Mid1. *J. Biol. Chem.*, **277**:11645-11652, 2002.

(2) 特許出願

1. 国内出願 2件
2. 外国出願 なし