

「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<sup>2+</sup>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」

まず、出芽酵母の伸展活性化Ca<sup>2+</sup>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 (*midI*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*AtMIDIA*遺伝子と名付けた。また、この遺伝子のホモログを見つけ、*AtMIDIB*遺伝子と名付けた。これまで、*AtMIDIA*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、*AtMIDIA*遺伝子の高発現株は発芽後生育阻害を受けていること、*AtMIDIB*遺伝子の発現は組織特異性が低いこと、を明らかにした。また、*AtMIDIA/B*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。

「研究成果」

平成14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) *AtMIDIA*遺伝子のノックアウト株を樹立した。(2) *AtMIDIA*遺伝子高発現株は野生株に比べ高Ca<sup>2+</sup>濃度の培地で成長が阻害された。(3) *AtMIDIB*遺伝子の高発現株は通常の生育条件下で野生株と成長に関して同じであった。(4) *AtMIDIB*遺伝子へのT-DNA挿入ノックアウト株を樹立した。(5) チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞およびシロイヌナズナのプロトプラストを用いた実験によりAtMid1Aタンパク質は進展活性化Ca<sup>2+</sup>チャネル活性をもつことを示した。(6) タバコおよびイネのMIDIホモログは出芽酵母の*midI*変異を相補した。現在これらホモログの高発現株およびノックダウン株を作製中である。(7) シロイヌナズナAtMid1Aタンパク質および出芽酵母Mid1タンパク質を大腸菌より部分精製した。(8) 出芽酵母のMid1チャネルのH3およびH4領域の分子解剖により、この領域とそこに存在する重要なアミノ酸残基を特定した。

「今後の見通し」

シロイヌナズナの*AtMID1A*遺伝子と*AtMID1B*遺伝子の二重ノックアウト株が樹立できる見通しが立ったので、平成15年度中にそれを使った重力屈性、接触応答、気孔の開閉機構についての表現型を明確に知ることができる。タバコとイネの*MIDI*ホモログに関してもノックダウン株の表現型を解析できる。出芽酵母のMid1とシロイヌナズナAtMid1Aタンパク質をリポソームに組み込み電気生理学的にチャンネル活性を解析できる。これらの研究を通してMid1ファミリーのチャンネル機能と生理学的機能を分子レベル解明できる。

## 2. 研究実施内容

平成14年度の主要な研究目的は、(1)シロイヌナズナの*AtMID1A*のノックアウト株の樹立を行なうこと、(2)その表現型を調べること、(3)*AtMID1B*の高発現株へのCa<sup>2+</sup>効果を調べること、(4)*AtMID1B*遺伝子へのT-DNA挿入ノックアウト株を樹立すること、(5)AtMid1Aタンパク質が伸展活性化Ca<sup>2+</sup>透過チャンネルであると証明すること、(6)シロイヌナズナ以外の植物からの*MIDI*ホモログを単離すること、(7)出芽酵母Mid1チャンネルのH3領域とH4領域を分子解剖することなどであった。

シロイヌナズナの*AtMID1A*のノックアウト株の樹立に際しては、*AtMID1B*遺伝子へのT-DNA挿入をPCR法で確認した後、候補株を野生株に掛け合わせし、F2世代においてT-DNAにより破壊された*Atmid1A*遺伝子をホモに持つ株を確立した。RT-PCRとノーザン解析により、確かにこの株では*AtMID1A* mRNAが発現していないことが示された。

次にこの*AtMID1A*のノックアウト株の表現型を調べた。現時点でこの株は通常の生育条件では野生株と同じように正常に成長した。今後は、重力、機械刺激、ホルモンなどの条件を変え、表現型を解析する。

*AtMID1A*高発現株のCa<sup>2+</sup>応答性において興味深い結果が得られた。すなわち、CaCl<sub>2</sub>濃度が0.05 mMから2.0 mMまで段階的に変えた培地を作り、野生株と*AtMID1A*高発現株を生育させた。その結果、0.05 mM~0.5 mMの濃度では*AtMID1A*の高発現株は野生株と同様に生育したが、それよりも高い濃度(1.0 mMと2.0 mM)では*AtMID1A*の高発現株の生育が特異的に阻害された(図1)。このことは、Ca<sup>2+</sup>透過性の伸展活性化チャンネルが高発現したために、Ca<sup>2+</sup>が流入し過ぎて生育が阻害されたものと考えられる。

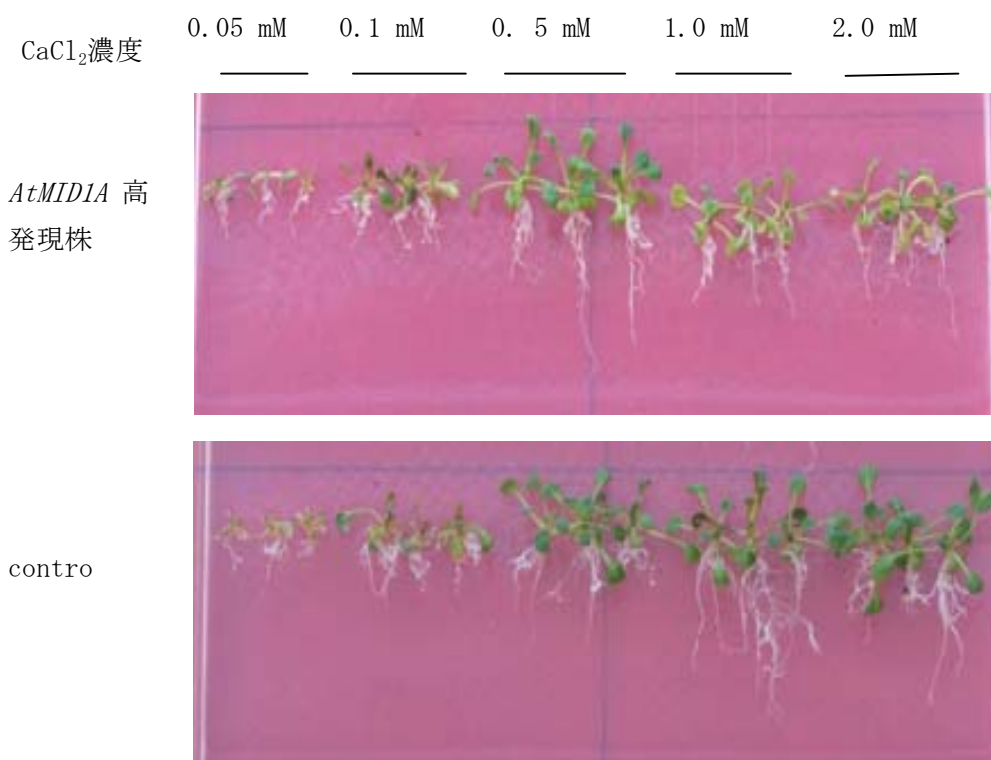


図1 *AtMID1A*高発現株は高濃度CaCl<sub>2</sub>含有培地で生育阻害を受ける

次に、*AtMID1B*のノックアウト株の樹立の実験は順調に進んだ。まず、T-DNAが挿入されている種子のライブラリーをPCR法で解析し、*AtMID1B*遺伝子座にT-DNAが挿入しているものを見出した。その種子由来の植物と野生株を掛け合わせ、F2世代において*AtMID1B*ノックアウト遺伝子をホモにもつ株を樹立できた。今後はこれを使って、表現型の解析と、*AtMID1A*のノックアウト株との掛け合せによる二重ノックアウト株の樹立を行なう。

*AtMid1A*タンパク質が伸展活性化Ca<sup>2+</sup>透過チャネルであることは以下のような方法で証明した。すなわち、*AtMid1A*タンパク質をCHO細胞に発現させ、その細胞をフィブロネクチンでコートしたシリコン膜に接着させた。その後細胞にCa<sup>2+</sup>蛍光指示薬fura-2を導入し、蛍光顕微鏡下でシリコン膜を30%伸展させた。このとき細胞も一緒に伸展する。この伸展刺激を行なった結果、細胞内Ca<sup>2+</sup>が上昇することをfura-2の蛍光強度比 (F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub>) を測定することにより確認することができた。しかもこの上昇は細胞外からのCa<sup>2+</sup>の流入によって起り、Gd<sup>3+</sup>により阻害された。この結果は、*AtMid1A*タンパク質が伸展活性化Ca<sup>2+</sup>透過チャネル活性をもつことを示す。

*AtMid1A*タンパク質が伸展活性化Ca<sup>2+</sup>透過チャネルであることの証明は別のアプローチからも進みつつある。すなわち、*AtMid1A*および出芽酵母のMid1を大腸菌で高発現し、精製し、リポソームに組み込み、パッチクランプ法でチャネル活性を電気生理学的に調べるということである。一般的に、イオンチャネルを大腸菌に大量発現させると毒性を示すため、その精製は困難であることが多い。*AtMid1A*とMid1の場合もそうであったが、さまざまな

条件を系統的にテストしたことにより、それらを精製することができた。しかも、リポソームに組込むこともできた。今後、これを用いて電気生理学的に解析する予定である。

タバコの*MIDI*ホモログは2種、イネの*MIDI*ホモログは1種存在した。それぞれ*NtMID1A*、*NtMID1B*、*OsMID1*と名付けた。*NtMID1A*と*OsMID1*は出芽酵母の*mid1*変異を相補した。したがってこれらもCa<sup>2+</sup>の取込みに関与しているものと考えられる。現在これらの高発現株およびノックダウン株を作製中である。

出芽酵母Mid1の分子解剖は植物のMid1ホモログ分子の構造・機能相関を知る上で重要な手掛かりになる。そこで、Mid1の4つの疎水性領域の中でも特にイオンチャネルとして重要な2つの領域を解析した。すなわち、H3領域 (Ile<sup>337</sup>-Phe<sup>356</sup>) とH4領域 (Leu<sup>366</sup>-Gly<sup>388</sup>) をそれぞれ欠失した変異Mid1タンパク質 (H3DeとH4De) を作製し、そのCa<sup>2+</sup>取込み活性を調べた。その結果両者とも活性がなかった。このことはH3領域もH4領域もMid1の機能に必要な領域であることを示す。次に、それぞれの領域内のアミノ酸残基を1個ずつ別のアミノ酸 (セリンまたはアラニン) に変えて、その変異Mid1の活性を調べた。その結果、H3領域では、セリンまたはアラニンへのマイルドなアミノ酸置換にもかかわらず、Mid1の活性は様々に変化した。一方、H4領域では、この領域内の個々のアミノ酸置換変異のうち約半数においてMid1活性のわずかな低下がみられたが、大きな活性の変化を示す変異はなかった。これらの結果および一次構造の特徴を総合して判断すると、H3領域はイオン選択フィルターの機能を持ち、H4領域はイオンと直接接触しない膜貫通ヘリックスを形成しているものと考えられる。

### 3. 研究実施体制

#### 飯田グループ

- ① 研究分担グループ長：飯田 秀利 (東京学芸大学教育学部、教授)
- ② 研究項目：*AtMID1A*、*AtMID1B*、および*MIDI*遺伝子の分子遺伝学的研究および全研究グループの統括。

#### 辰巳グループ

- ① 研究分担グループ長：辰巳 仁史 (名古屋大学大学院医学研究科、助教授)
- ② 研究項目：*AtMID1A*、*AtMID1B*、および*MIDI*遺伝子産物の電気生理学的および構造生物学的研究。

#### 朽津グループ

- ① 研究分担グループ長：朽津 和幸 (東京理科大学理工学部、助教授)
- ② 研究項目：*NtMID1A*、*NtMID1B*、および*OsMID1*遺伝子産物の細胞生物学的研究

### 4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

#### (1) 論文 (原著) 発表

○ Tada, T., Ohmori, M., and Iida, H.

Molecular dissection of the hydrophobic segments H3 and H4 of the yeast Ca<sup>2+</sup>

channel component Mid1

*J. Biol. Chem.*, **278**:9647-9654, 2003

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：2件）