

「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

本研究のねらいは、シロイヌナズナの伸展活性化Ca²⁺チャネルの候補であるAtMid1AとAtMid1BおよびイネのホモログOsTpc1などの構造と植物体における生理機能を分子遺伝学的に調べることにより、植物の重力感知や接触感知の分子機構を明らかにすることである。また、AtMid1AとAtMid1Bなどのモデル分子である出芽酵母のMid1についてもその構造・機能協関を明らかにする。

これまでの研究から、*AtMID1A*と*AtMID1B*の遺伝子を単離し、その欠損株および高発現株を樹立した。また*AtMID1A*の遺伝子産物は確かに伸展活性化Ca²⁺チャネルの活性を有することを明らかにした。これらの遺伝子産物の植物体における機能を調べるために、*atmid1a*欠損株の根の表現型、AtMid1Aタンパク質の細胞内局在部位、および*atmid1a atmid1b*二重欠損株の生育等を解析した。その結果、*atmid1a*欠損株の根は寒天培地の固さを感じ適応する過程に異常をもつこと（接触刺激応答異常）、AtMid1Aは細胞膜に存在すること、*atmid1a atmid1b*二重欠損株は生育遅延を起こすことなどを明らかにした。また、イネの*OsMIDI*遺伝子のRNAiによる発現抑制株を樹立し、この株が出穂を含む生育遅延を起こすことを明らかにした。OsMid1とともににはたらくことが予想される電位依存性Ca²⁺チャネル候補OsTpc1の機能的解析を行なった。また、植物のモデル生物である出芽酵母の伸展活性化Ca²⁺チャネルMid1と電位依存性Ca²⁺チャネル候補Cch1が共存するときにCa²⁺流入を引き起こすことを明らかにした。

今後は、上記の欠損株と発現抑制株などを用いて、重力感知と接触感知の異常および生育遅延を詳しく解析する予定である。それらの解析に必要な植物株群は樹立できたので、今後本研究分野において先駆的な成果が得られるものと期待できる。

2. 研究実施内容

本年度は、(1) *atmid1a*欠損株の根の表現型、(2) 細胞内局在部位、(3) *atmid1a atmid1b*二重欠損株の表現型、(4) *OsMIDI*遺伝子の発現抑制株の表現型などの解析を主目的として研究を行なった。それらの方法と得られた成果およびそれらの研究と密接に関連のある研究の成果は以下のとおりである。

(1) *atmid1a*欠損株の根の表現型

先に報告したように、*AtMID1A*は根端で選択的に発現している。根端は重力感知や接触感知に重要な部位として知られている。そこで、T-DNAの挿入により作出した*atmid1a*欠損株の重力屈性を調べたが、少なくとも通常の生育条件下で、根と茎は正常に重力屈性を示した。しかし、*atmid1a*欠損株の根は接触感知に異常をもつことを明らかにした。すなわち、我々が開発した二層寒天法において、*atmid1a*欠損株の根は、野生株の根とは異なり、相対的に柔らかな寒天培地から固い寒天培地に侵入することができなかった。ただし、*atmid1a*欠損株を播種時から固い寒天培地で生育させれば、その根はこの固い寒天培地に侵入することができた。これらの結果は、*AtMid1A*が寒天の固さを感じ、適応することに関与することを示唆している。

(2) 細胞内局在部位

AtMid1A-GFPタンパク質を発現するシロイヌナズナを作製し、局在部位を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で調べた。マーカータンパク質との比較および原形質分離の実験の結果、このタンパク質は細胞膜に局在していることを明らかにした。

(3) *atmid1a atmid1b*二重欠損株の生育

*atmid1a atmid1b*二重欠損株を通常の条件下で生育させ、その生育過程を観察した。その結果、この株は野生株に比べ発芽後に葉の展開や花茎の形成が遅れるなどの生育遅延を示した。すなわち、この二重欠損株では野生株に比べ、葉の展開が約0.5日遅れ、花茎の伸長が約2日遅れた。一方、*atmid1a*欠損株はこれらの表現型を示さなかったが、*atmid1b*欠損株は弱い表現型を示した。

また、*atmid1a atmid1b*二重欠損株は、天然の Ca^{2+} チャネルブロッカーとして知られる MgSO_4 または MgCl_2 によって生育阻害を受けた。しかし、その生育条件下に CaCl_2 を添加すると生育阻害が軽減された。これらの表現型は単一遺伝子欠損株ではみられなかった。

これらのことから、*AtMid1A*と*AtMid1B*は根における Ca^{2+} の取り込みに関与しており、機能的に重複しているものと考えられる。

(4) *OsMIDI*遺伝子の発現抑制株の表現型

*OsMIDI*を過剰発現株、アンチセンスRNA法やRNAi法により発現を抑制させたイネの培養細胞、および植物個体を作成することに成功した。RNAi発現抑制株のホモ個体T2世代を解析したところ、 Ca^{2+} 感受性の低下や、出穂を含む生育の遅延が観察された。現在、培養細胞、植物固体の両方を用いて、環境ストレス応答機構と細胞内 Ca^{2+} 動態の解析を続けている。*OsMid1*とGFPとの融合タンパク質をタマネギ表皮細胞に一過的に発現させて、細胞内局在部位を調べたところ、細胞膜上に蛍光が観察されたことから、*OsMid1*は細胞膜に局在する可能性が示唆された。

(5) イネの電位依存性 Ca^{2+} チャネル候補*OsTpc1*の機能的解析

植物の電位依存性 Ca^{2+} チャネル候補である*Tpc1*が、確かに電位依存性 Ca^{2+} チャネルであるとの証拠はない。そこで、イネの*OsTPC1* cDNAを酵母細胞で発現させ、その葉

理的性質を調べた。その結果、動物のL型電位依存性Ca²⁺チャネルのブロッカーであるベラパミルとニフェジピンによってOsTpc1の活性が阻害された。

(6) 葉肉細胞の伸展活性化陰イオンチャネルの発見

電気生理学的方法を使って、我々はシロイヌナズナの葉肉細胞のプロトプラスト上に陰イオンを透過させる伸展活性化陰イオンチャネルを発見した。興味深いことに、細胞膜の脂質二重層のうち外側の層を伸展させたときにのみこのチャネルは活性化した。したがって、このチャネルは細胞の浸透圧の上昇を感知している可能性が考えられる。

(7) Mid1とCch1の協関

酵母の電位依存性Ca²⁺チャネル候補Cch1は、植物のTpc1と構造上似ている。大腸菌に障害を与える*CCHI*遺伝子のクローニングは長い間不可能とされてきたが、我々は大腸菌を用いないクローニング法によりそれに成功した。この遺伝子を利用して、細胞のCa²⁺取り込み活性を測定した。その結果、Cch1が活性をもつためには、AtMid1Aのホモログである酵母のMid1の共存が必要であることを明らかにした。

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*OsMIDI*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（原著論文）発表

- Hashimoto K., Saito, M., Matsuoka, H., Iida, K., and Iida, H.
Functional analysis of a rice putative voltage-dependent Ca²⁺ channel, *OsTPCI*, expressed in yeast cells lacking its homologous gene *CCHI*.
Plant Cell Physiol. **45** : pp 496-500, 2004
- Qi, Z., Kishigami, A., Nakagawa, Y., Iida, H., and Sokabe, M.
A mechanosensitive anion channel in *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells.

Plant Cell Physiol. **45** : pp 1704-1708, 2004

○ Iida, K., Tada, T., and Iida, H.

Molecular cloning in yeast by *in vivo* homologous recombination of the yeast putative $\alpha 1$ subunit of the voltage-gated calcium channel.

FEBS Lett. **576** : pp 291-296, 2004

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数 : 0 件 (CREST研究期間累積件数 : 2 件)