

植物の重力感知の分子機構

東京学芸大学教育学部 教授 飯田 秀利

1 研究実施の概要

植物が如何にして重力を感知するのか、その研究の歴史は進化論で有名なチャールズ・ダーウィンの著書(1880年)にまで遡ることができるが、その分子機構は未だ良く分かっていない。我々は重力センサーの分子の実体と役割を明らかにする目的で、細胞膜に存在する Ca^{2+} 透過性伸展活性陽イオンチャネル(以下、SAチャネルと略記)に着目して研究を行なった。SAチャネルとは、細胞に加わった物理的な力によって細胞膜が伸展したときに開口し、 Ca^{2+} などの陽イオンを透過させるイオンチャネルのことである。これまで、種々の生理学的研究から重力屈性には Ca^{2+} が重要な役割を担っていることが指摘されている。しかし、植物において、その Ca^{2+} を透過させるイオンチャネル分子の遺伝子の特定や重力に応答したイオンチャネルの開口機構は明らかされていない。

我々は本研究に先立ち、植物のモデル生物である出芽酵母の SAチャネルの遺伝子(*MIDI* 遺伝子)を真核生物では世界で初めて特定していた(Kanzaki *et al.*, *Science* **285**:882-886, 1999)。この *MIDI* 遺伝子に欠損をもつ突然変異株は、細胞膜の伸展が起きる条件で死ぬという表現型を示す。そこで、本研究において我々はこの変異株の致死性を相補するシロイヌナズナの cDNA の単離し、その遺伝子産物の活性を調べ、欠損株および高発現株を作製し解析することにより、重力感知の分子機構の解明における先駆的研究を成し遂げるという着想を得た。

この着想のもとに、以下の研究を実施し成果を得た。

(1) 遺伝子単離と構造上の特徴: 出芽酵母の *Mid1* の欠損変異株(*mid1* 変異株)の致死性を相補できるシロイヌナズナ遺伝子 *AtMID1A* と *AtMID1B* を単離した。遺伝子産物のアミノ酸配列上の相同性は、*Mid1* と *AtMid1A* 間で 13.1%、*Mid1* と *AtMid1B* 間で 13.6%であった。一次構造上は互いにあまり似ていないが、疎水性プロットは C-末端以外は似ていた。*AtMid1A* と *AtMid1B* 間の identity は 73.0%であった。

(2) 発現部位: *AtMID1A* promoter-GUS を使った実験から、*AtMID1A* 遺伝子は発芽後数日目までは子葉でも根でも発現するが、その後、根端のコルメラ細胞や気孔の孔辺細胞に選択的に発現することを明らかにした。一方、*AtMID1B* promoter-GUS を使った実験から、*AtMID1B* 遺伝子は植物体のどこでも発現していることを明らかにした。

(3) 高発現株の作出と生育: *AtMID1A* および *AtMID1B* 遺伝子の高発現トランスジェニック植物を作出した。表現型解析の結果、*AtMID1A* が高発現すると、その影響の強い株では発芽後約10日目で胚軸に顕著な茶色の色素が沈着し、約20日目で枯死した。それに比べて影響の比較的弱い株では種子を作れたが、植物全体が矮小化した。このように、*AtMID1A* 高発現は植物の生育に阻害的にはたらくことが明らかになった。また、この阻害効果は高 Ca^{2+} 濃度培地で育てると顕著となり、逆に低 Ca^{2+} 濃度培地で育てると軽減された。これらの結果は *AtMid1A* が Ca^{2+} の取込みに関与していることを示唆する。一方、*AtMID1B* 高発現は植物の生育に影響しないことを明らかにした。

(4) 欠損株の作出と生育: *AtMID1A* および *AtMID1B* 遺伝子のそれぞれに T-DNA が挿入された単一欠損植物体(*atmid1a* および *atmid1b* 欠損株)の作出に成功した。また、両者を交配させて、*atmid1a atmid1b* 二重欠損株を作出した。通常の生育条件下で、*atmid1a* 欠損株と *atmid1b* 欠損株は正常に生育した。一方、*atmid1a atmid1b* 二重欠損株は生育遅延を示した。さらに、この二重欠

損株は、天然の Ca^{2+} チャネルブロッカーである Mg^{2+} によって生育阻害を受けた。しかもこの生育阻害は培地中に CaCl_2 を補足することにより軽減された。したがって、これらの結果も *AtMid1A* と *AtMid1B* は培地中の Ca^{2+} の取込みに関与していることを示唆する。

(5) *AtMid1A* のチャネル機能(その1): *AtMid1A* が SA チャネル活性をもつかどうかを調べるために、*AtMID1A* 高発現株の葉肉細胞のプロトプラストを用いてパッチクランプ解析を行なった。この解析において、細胞膜上の SA チャネルを活性化するために、トリニトロフェノール(TNP)を用いた。その結果、TNP 添加5分後に Ca^{2+} 電流の振れ幅が野生株に比べて増加した。この増加は TNP による *AtMid1A* の活性化を示唆している。

(6) *AtMid1A* のチャネル機能(その2): *AtMid1A* タンパク質が SA チャネル活性をもつことは、細胞膜伸展法でも示した。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^{2+} 蛍光指示薬 fura-2 を導入し、蛍光顕微鏡下でシリコン膜を伸展させた。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^{2+} が上昇することを fura-2 の蛍光強度比 (F_{340}/F_{380})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^{2+} の流入によって起こり、 Gd^{3+} により阻害された。この結果は、*AtMid1A* が SA チャネル活性をもつことを示す。

(7) *AtMid1A* のチャネル機能(その3): 上の実験に加えて、細胞膜の伸展を引き起こす実験として低浸透圧ショックを用いた。この実験において、 Ca^{2+} 依存性発光タンパク質(エクオリン)を *AtMID1A* 高発現植物に発現させる実験系を作製し、その芽生えに低浸透圧ショックを与え、発光を計測した。発光強度は、野生株よりも高発現株においてより大きかった。この増大は LaCl_3 、 GdCl_3 、および EGTA によって阻害された。この結果は *AtMid1A* が細胞外からの Ca^{2+} 流入に関与する SA チャネル活性をもつことを示唆する。また、エクオリンを用いた同じ実験系においても、TNP を作用させると *AtMID1A* 高発現株は野生株より多く発光した。この結果も上の結果を支持した。

(8) *AtMid1A*は重力刺激応答と接触刺激応答に必要: エクオリンを発現している野生株の芽生えを回転させるとエクオリンの発光(すなわち細胞内 Ca^{2+} 濃度)が急激に上昇する。しかし、*atmid1a* 欠損株を回転させた場合、その上昇の程度は低かった。また、野生株の根が柔らかい寒天培地から固い寒天培地にスムーズに進入できる条件下で、*atmid1a*欠損株の根は移行できなかった。これらの結果から、*AtMid1A*は重力刺激応答と接触刺激応答に必要であることが明らかになった。

(9) イネとタバコの *MIDI*ファミリー遺伝子: イネ幼苗由来のcDNAを鋳型にしたPCRスクリーニングおよびゲノムデータベース検索により、*AtMID1A/B*と相同性の高い遺伝子(*OsMIDI*と命名)を発見した。*OsMIDI*はイネゲノムに1コピー存在した。この遺伝子産物*OsMid1*はアミノ酸配列において*AtMid1A*と66.7%、*AtMid1B*と57.4%、酵母*Mid1*とは20.0%の相同性を示した。これらの推定二次構造を比較すると、*OsMid1*と*AtMid1A/B*の推定二次構造に非常に高い類似性が見られた。一方、タバコBY-2細胞から2種類の*AtMID1A/B*のオーソログ(*NtMID1A/B*と命名)を見つけた。*NtMid1A*と*B*はアミノ酸レベルで83%の相同性を示した。また、*NtMid1A/B*は*AtMid1A/B*のどちらか一方とより相同性が高いということはなく、それぞれに対して60-70%の相同性を示した。なお、以上の情報に基づいてさまざまなゲノム情報のデータベースを検索した結果、広範な植物種に*MIDI*関連遺伝子が存在することが明らかとなった。したがって、*MIDI*ファミリー遺伝子ファミリーは多くの植物で

重要な役割をしていると考えられる。

(10) イネ, タバコの *MIDI*ファミリー遺伝子の機能: 出芽酵母の *mid1* 変異株にイネの *OsMIDI* 遺伝子を導入した結果, *OsMIDI* が酵母 *mid1* 変異株の致死性を部分的に相補した。同様の結果は *NtMIDIA* でも得られた。したがって, *OsMid1* と *NtMid1A* は, 酵母細胞内で Ca^{2+} 流入に関連した機能をもつことが示唆された。

(11) イネとタバコの *MIDI*ファミリー遺伝子産物の発現: 日本晴由来の培養細胞および植物体(成葉, 幼苗・根)から全RNAを抽出し, 半定量的RT-PCR解析を行なった結果, いずれの組織においても *OsMIDI* 遺伝子の発現が確認された。この結果は, *OsMIDI* がイネの基本的な生理過程に重要であることを示唆している。また, *OsMid1* の細胞内局在を調べるために, 蛍光タンパク質 GFP との融合タンパク質をタマネギの表皮細胞で一過的に発現させた結果, *OsMid1* タンパク質は細胞膜上に局在する可能性が示唆された。現在, タバコの 35S::GFP::*NtMIDIA/B*, 35S::*NtMIDIA/B*::GFP の局在部位を BY-2 細胞を用いて解析中である。

(12) イネとタバコの *MIDI*ファミリー遺伝子の発現抑制株の作出と機能解析: イネのレトロトランスポゾン *Tos17* が *OsMIDI* 遺伝子に挿入された突然変異株を検索したが, *OsMIDI* 破壊株は見出されなかった。そこで, RNAi法を用いた *OsMIDI* 発現抑制株を作出した。*OsMIDI* の発現抑制培養細胞では, 増殖に対する Ca^{2+} 感受性が低下していた。また, 通常の生育条件下において *OsMIDI* 発現抑制株は, 生育の遅延, 稔実率の低下, 穂位置の変化等の明確な表現型を示した。これらの結果は, *OsMid1* がイネの細胞において細胞外からの Ca^{2+} 流入を制御することにより, 植物の成長制御等のシグナル伝達に関与していることを示唆している。一方, *NtMIDIA/B* 発現抑制株の作出にも成功し, 現在その表現型を解析している。

(13) イネ *OsMIDI* 発現抑制株における細胞内 Ca^{2+} の動態: エクオリンをさまざまなプロモーターの制御下で恒常的または誘導的に細胞質に発現させたイネの形質転換株を世界に先駆けて作出した。野生株と *OsMIDI* 発現抑制株との間で比較した結果, *OsMIDI* 発現抑制株では低浸透圧刺激により誘導される Ca^{2+} 動員が野生型株の半分以下に低下していた。一方, 感染シグナル(エリシター)誘導性の Ca^{2+} 動員は, 野生株と *OsMIDI* 発現抑制株との間で明確な差異は見られなかった。これらの結果は, *OsMid1* が SA チャネルの実体またはその制御因子であることを示唆している。

(14) 出芽酵母の *Mid1* の機能解析: 植物のモデル生物である出芽酵母の *Mid1* タンパク質の機能を明らかにすることは, 植物の *MIDI* ファミリーの機能解析に役立つ。*In vitro* mutagenesis 法で H3 と H4 と名付けた疎水性領域および C-末端親水性領域に種々の変異を導入し, それら変異タンパク質の活性, 含量, 局在を調べた。その結果, H3 と H4 の領域内の活性に必要なアミノ酸残基を特定し, さらに C-末端領域内に 10 個存在するシステイン残基のうち 7 つが *Mid1* 活性に必要なことを明らかにした。また, *Mid1* タンパク質は細胞膜以外に小胞体膜にも存在すること, ジスルフィド結合による複合体を形成することを明らかにした。*Mid1* が SA チャネルとしてはたらく上で興味深い成果も得た。すなわち, 根毛や花粉管の伸長など, 極性成長のモデルである出芽酵母の極性成長を正に制御する *Spa2* の活性は *Mid1* の活性化の必要条件であることを明らかにした。極性成長は細胞膜の伸展を引き起こすので, *Mid1* の活性化には *Spa2* のはたらきが必要とされるものと考えられる。

(15) *Mid1* と *Cch1* の協調: 出芽酵母の電位依存性 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 取込み活性を測定した。その結果、Cch1 が活性をもつためには、Mid1 の共存が必要であることを明らかにした。

以上のように、我々はシロイヌナズナ、イネおよびタバコから SA チャネル活性をもつ遺伝子を世界に先駆けて単離することに成功した。とりわけ、研究の先行しているシロイヌナズナの分子遺伝学的解析から、AtMid1A は重力刺激応答と接触刺激応答に必要とされるという重要な研究成果を挙げることができたので、その意義は大きい。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究開始時に目指した目標は、植物の SA チャネルの遺伝子を特定し、その遺伝子産物の重力感知における分子機構を Ca^{2+} シグナルとの関連において明らかにすることであった。

5年間の研究計画と進め方は以下のとおりであった。

飯田グループ

1. シロイヌナズナの SA チャネル候補遺伝子を特定する。
2. その遺伝子の発現部位、遺伝子産物の細胞内局在部位を明らかにする。
3. その遺伝子の欠損株および高発現株を作出する。
4. その欠損株および高発現株の表現型を調べる。特に、重力感知、接触刺激応答、および浸透圧刺激応答に関して解析する。
5. その欠損株および高発現株の Ca^{2+} 取込みと培地中の Ca^{2+} の効果を調べる。
6. 研究の先行している出芽酵母の Mid1 を研究し、植物研究のモデルを提供する。

辰巳グループ

1. 電気生理学的方法を用いて、シロイヌナズナの SA チャネル候補遺伝子産物が確かに SA チャネル活性をもつことを証明する。
2. Ca^{2+} イメージングと直接膜伸展法を組み合わせ、SA チャネル候補遺伝子産物の活性を測定する。
3. Ca^{2+} イメージングと重力刺激法を組み合わせ、我々の SA チャネルが重力感知にはたっていることを証明する。
4. シロイヌナズナの SA チャネルと出芽酵母の Mid1 を精製し、*in vitro* で SA チャネル活性を測定する。

朽津グループ

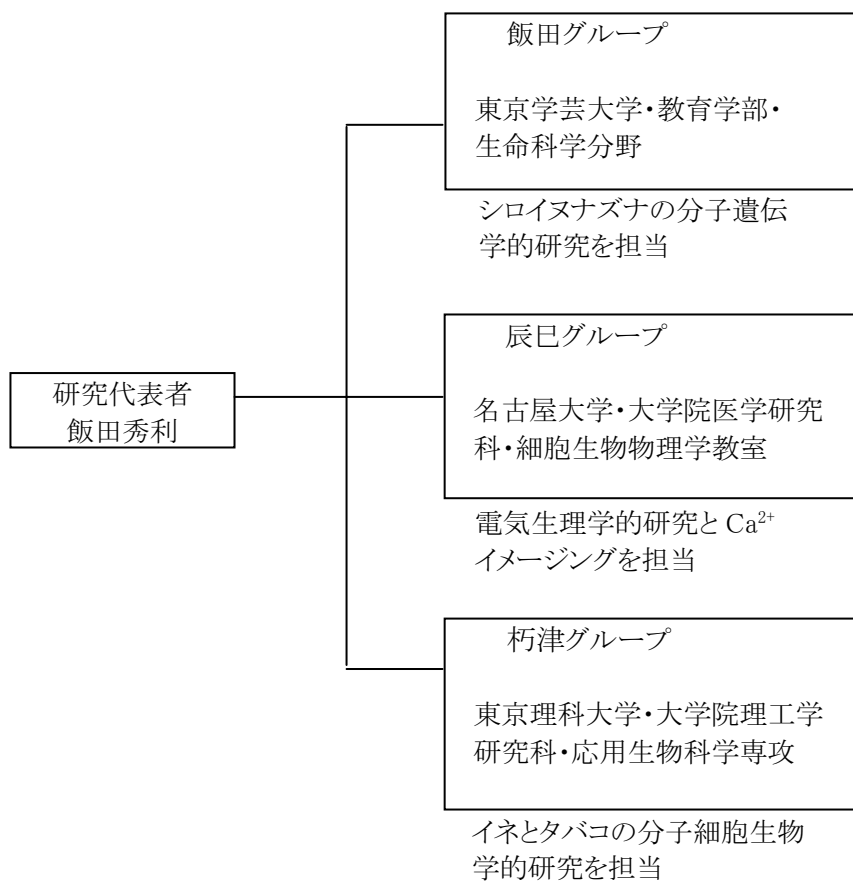
1. 我々が単離したシロイヌナズナ SA チャネル候補遺伝子のオーソログをイネとタバコか

ら単離する.

2. イネとタバコのオーソログについて, 上記の飯田グループの研究2-5と同じ解析を行なう.

これらの各グループの研究により, 上の「研究実施の概要」の項に記述したように, 当初の目標のかなりの部分は達成できたが, より質の高い研究成果とし, 優れた雑誌に論文発表するためには次の目標を設定して, 研究を行なう必要がある. すなわち, AtMid1A/B, OsMid1 および NtMid1A/B が SA チャネルとしてどのような役割をしているのかを明らかにするために, 植物における電気生理学的研究を更に推進する必要がある. また, ゲノム科学を有効に利用し, これらの SA チャネル候補分子の制御下にある酵素と転写因子を明らかにし, シグナル伝達のネットワークを明らかにすることが必要である.

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 シロイヌナズナの SA チャネル候補の分子遺伝学的研究

(東京学芸大学 飯田グループ)

1) 研究実施内容及び成果

(1) 酵母における機能と構造上の特徴

出芽酵母の SA チャネル Mid1 の欠損変異株 (*mid1* 変異株) の致死性を相補できるシロイヌナズナ遺伝子 *AtMID1A* と *AtMID1B* を単離し、その予想される構造を明らかにした。 *AtMID1A* cDNA をもつ酵母細胞の Ca^{2+} 取込み速度は増大した。アミノ酸配列上の相同性は、Mid1 と AtMid1A 間で 13%、Mid1 と AtMid1B 間で 12% であり、AtMid1A と AtMid1B 間で 73% であった。疎水性プロットは3者間で C-末端以外の部分は似ており、推定上の膜貫通領域が数カ所存在していた。これらの結果は、AtMid1A と AtMid1B が SA チャネルに機能上も構造上も似ていることを示している。

AtMid1A と AtMid1B はこれまでに報告されているどのタンパク質とも類似性はなく、新規のタンパク質である。以下に記述した朽津グループの項でも述べるが、種々のゲノムデータベースを調べた結果、AtMid1A と AtMid1B のオーソログは多くの植物に存在するので、MID1 ファミリーと称すべき新たなグループを成していることも明らかになった。その意味で、本研究の成果は、新たな研究分野の創出につながる画期的なものである。

(2) *AtMID1A* と *AtMID1B* の発現部位

ノーザンブロットングにより、*AtMID1A* は成熟個体の根、葉、花茎、花および鞘で発現していることを明らかにした(図1a)。ただし、鞘での発現は相対的に他所に比べ低かった。また、*AtMID1A* promoter-GUS をもつ植物の組織化学的解析から、芽生えの子葉(とりわけその先端部分と維管束系)および根端のコルメラ細胞で発現していることも明らかにした(図1b-h)。また、気孔の孔辺細胞

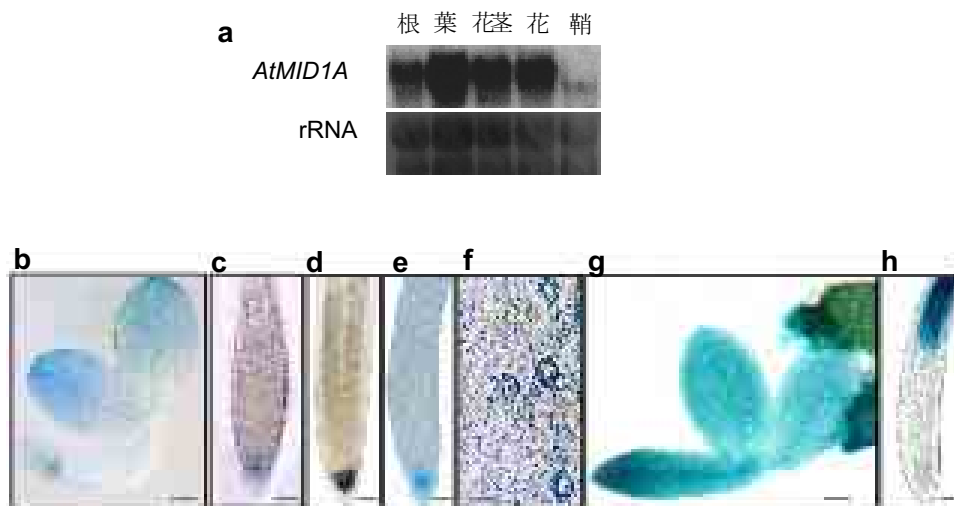


図1 *AtMID1A* mRNA のノーザン解析と *AtMID1A* と *AtMID1B* の GUS 染色による発現部位の解析

a, *AtMID1A* mRNA のノーザン解析; b, 発芽後3日目の *AtMID1A*::GUS 植物; c, 発芽後4日目の *AtMID1A*::GUS 植物の根; d, 発芽後14日目の *AtMID1A*::GUS 植物のヨウ素染色; e, 発芽後14日目の *AtMID1A*::GUS植物; f, *AtMID1A*::GUS植物の葉柄の孔辺細胞; g, 発芽後3日目の *AtMID1B*::GUS植物; h, 発芽後14日目の *AtMID1B*::GUS植物の根。

胞でも他の部分よりも多く発現していた。このように、*AtMID1A* は器官特異的に発現する。この発現様式の特徴は、*AtMid1A* が SA チャネルとしてはたらく可能性を考えるとたいへん興味深い。なぜなら、コルメラ細胞は重力感知に重要な細胞であり、細胞膜あるいは小胞体膜の伸展が重力屈性を起こさせるためのシグナル発生に必要と考えられているからである。また、孔辺細胞では、細胞の膨圧制御に SA チャネルが関与している可能性があるため、この発見は気孔の開閉制御の観点からも興味深い。

一方 *AtMID1B* promoter-GUS の解析から、*AtMID1B* は、根端以外の根の部分と子葉、および成熟個体のどの部分でも満遍なく発現していた。したがって、*AtMid1B* は多くの器官において一般的な生理現象に関与しているものと予想される。

(3)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などの結果、このタンパク質は細胞膜に局在していることが示唆された(図2)。*AtMid1B*-GFP も同じ蛍光イメージを与えた。

次に、*AtMid1A* に対する抗体を作製した。この抗体は、ウエスタンブロッティングにおいて、大腸菌と酵母に発現させた *AtMid1A* を高い力価で認識したが、シロイヌナズナの細胞粗抽出液中の *AtMid1A* を検出できなかった。これは *AtMid1A* の含量が少ないためと考えられる。そこで、酵母に発現させた *AtMid1A* を調べた結果、確かに膜分画に存在することが示された。

これらの結果は、*AtMid1A* が SA チャネルとして細胞膜上で機能しているという考えに一致する。

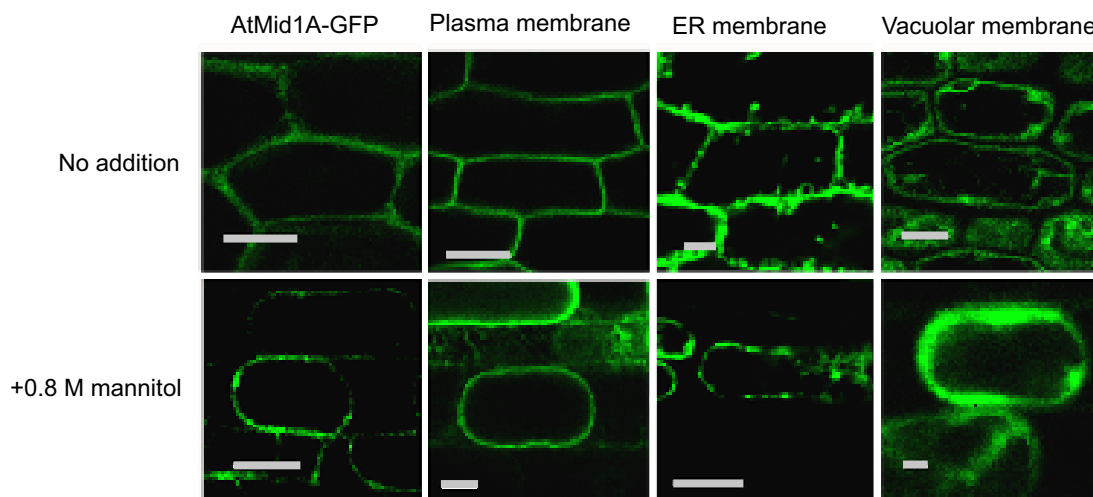


図2 *AtMid1A*-GFP の蛍光像

上部パネルは未処理の根であり、下部パネルは 0.8 M マンニトールで処理した根である。マーカータンパク質は以下の通り; 形質膜タンパク質, PIP2; 小胞体膜タンパク質, Q4 line タンパク質; 液胞膜タンパク質, delta-TIP.

(4) *atmid1a* 欠損株の根の表現型

AtMID1A が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である。通常の生育条件で、T-DNA の挿入により作出した *atmid1a* 欠損株の根と茎は正常に重力屈性を示した。ただし、生育条件を変えることにより、今後この欠損株の重力感知の異常を発見できる可能性がある。

一方、特筆すべきことに、*atmid1a* 欠損株の根は接触感知と応答に異常をもつことが示唆された。すなわち、我々が開発した二層寒天法において、*atmid1a* 欠損株の根は相対的に柔らかい寒天培地から、固い寒天培地に侵入することができないことを突き止めた(図3)。具体的に行なった実験は以下のごとくである。生育用培地の寒天を二層に分け、上層を 0.8%、下層を 1.6%とした。野生株は上層から下層へと根を伸ばすことができたが、*atmid1a* 欠損株は下層に根を侵入させることができなかった。この表現型は、*atmid1a* 欠損株に野生型 *AtMID1A* 遺伝子を導入すると解消された。さらに興味深いことに、発芽の時点から 1.6%のみの寒天培地で生育させると *atmid1a* 欠損株も野生株と同様に根をその培地に侵入させることができた。この結果は、根が一旦軟らかい培地に慣れたあと、より固い培地に適応するには *AtMid1A* が関与していることを示している。

この結果は、*AtMid1A* が土の固さを感じ、適応することに関与することを示唆しており、本研究プロジェクトにとってとりわけ重要な発見の一つである。

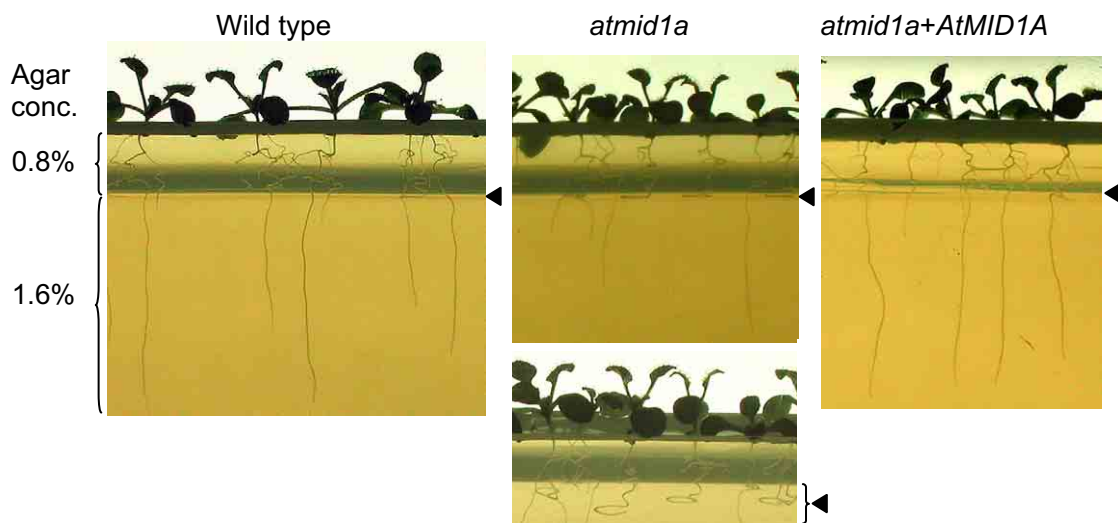


図3 二層寒天法による *atmid1a* 欠損株の根の表現型

下層の寒天濃度を 1.6%、上層の寒天濃度を 0.8%とした培地において、*atmid1a* 欠損株の根は下層に侵入できないものが多い(中央のパネル2つ)。野生型 *ATMID1A* 遺伝子を導入された *atmid1a* 欠損株の根(右のパネル)は野生型の根(左のパネル)と同じように下層に侵入できる。矢じりは上層寒天と下層寒天の境を示す。

(5) *AtMID1A* および *AtMID1B* 遺伝子の高発現株の表現型

35S プロモーターから *AtMID1A* が高発現すると、その影響の強い株では発芽後約10日目で胚軸に顕著な茶色の色素が沈着し、約20日目で枯死した。それに比べて影響の比較的弱い株では種子を作れたが、植物全体が矮小化した。興味深いことに、この矮小化は高 CaCl_2 含有培地では

ひどくなり, 低 CaCl_2 含有培地では軽減された(図4). このように, *AtMID1A* の高発現は CaCl_2 濃度に依存して植物の生育に阻害的にはたらくことが明らかになった. この結果は, *AtMid1A* が根からの Ca^{2+} の取込みに関与することを示唆する. 一方, *AtMID1B* の高発現は植物の生育に阻害的にはたたらなかった.

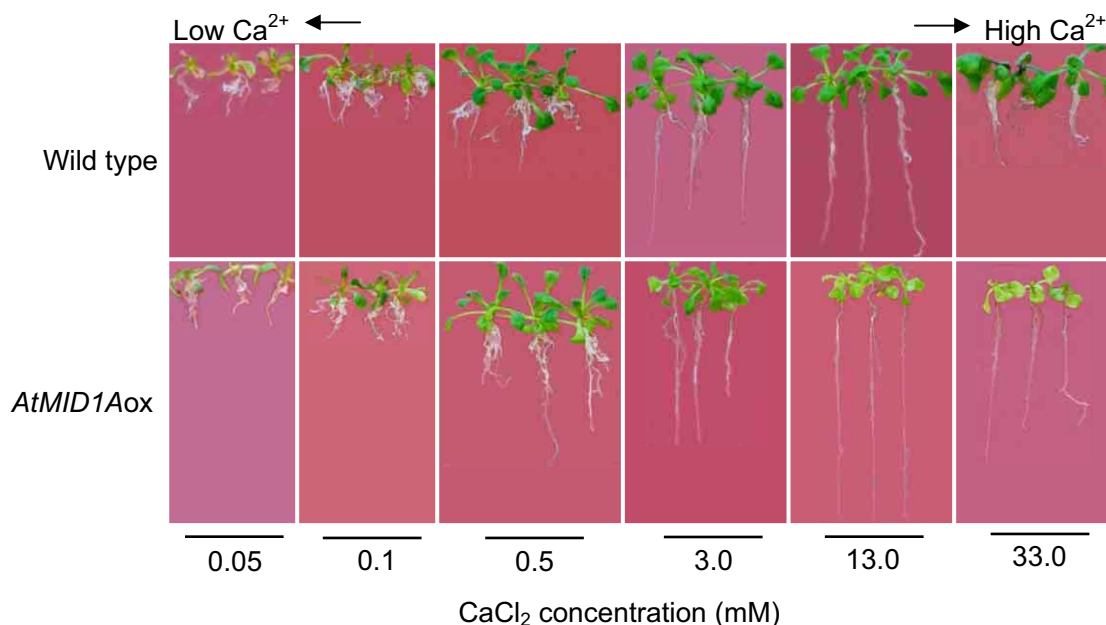


図4 *AtMID1A* 高発現株の Ca^{2+} 依存的生育

AtMID1A 高発現株(*AtMID1Aox*)の生育は培地の CaCl_2 濃度が高いと生育阻害を受け, 低いと正常に生育する.

(6) 根における $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取込み

上の実験から, *AtMid1A* が根における Ca^{2+} の取込みに関与していることが示唆されたので, その可能性を調べるために, 根における $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取込みを測定した. 植物体を寒天培地上に置いたナイロン網の上で21日間栽培し, その後14日間水耕栽培を行なった. 根のみ切り出し, $^{45}\text{CaCl}_2$ を含む培地に20分間ひたした後, 根に取込まれた放射能を測定した. その結果, *AtMID1A* 高発現株は野生株よりも約2倍 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を多く取込んだ. この取込みは, SA チャネルの阻害剤である Gd^{3+} によりほぼ完全に阻害されたが, 電位依存性 Ca^{2+} チャネルの阻害剤であるベラパミル(verapamil)によっては阻害されなかった.

一方, *AtMID1B* 高発現株は野生株よりも $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を取込むことはなかった. この結果は *AtMid1B-GUS* が根の先端で発現していないこと(図1h)と一致する. また, *atmid1a* 欠損株, *atmid1b* 欠損株および *atmid1a atmid1b* 二重欠損株は, 野生株と同程度に $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を取込んだ. この結果は, これらの欠損株では *AtMid1A* と *AtMid1B* 以外の Ca^{2+} チャネルまたはトランスポーターが Ca^{2+} 取込みを補足するものと考えられる.

以上の結果から, *AtMid1A* が SA チャネルとして根における Ca^{2+} の取込みに機能していることが示唆された. この結果は, 根では電位非依存性の Ca^{2+} チャネルが Ca^{2+} の取込みに関与していると

いうこれまでの電気生理学的知見に分子的基盤を初めて与えるものであり、意義が大きい。

(7)低浸透圧ショックによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇への AtMid1A の関与

もし AtMid1A が SA チャンネルとしてはたらくのであるならば、細胞膜の伸展を引起こす低浸透圧ショックに応答して、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に寄与するはずである。この考えに基づき、 Ca^{2+} 結合性発光タンパク質(エクオリン)を *AtMID1A* 高発現株に発現させる実験系を確立し、その芽生えに低浸透圧ショックを与え、発光強度をルミノメーターで測定した。その結果、AtMID1A 高発現株の発光強度は野生株の発光強度よりも大きかった。この結果は AtMid1A が Ca^{2+} を透過させる SA チャンネルとして機能することを示唆する。また、この実験結果は、以下に記述する辰巳グループによる電気生理学的解析のデータおよび直接的膜伸展法によるデータとも一致し、AtMid1A が SA チャンネルとしての機能をもつことを強く支持するものである。

(8)*atmid1a atmid1b* 二重欠損株の表現型

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* 欠損株と *atmid1b* 欠損株はこれらの表現型を示さなかった。

また、*atmid1a atmid1b* 二重欠損株は、天然の Ca^{2+} チャンネルブロッカーとして知られる Mg^{2+} によって生育阻害を受けた(図5)。この図の実験では、 MgSO_4 が使用されているが、 MgCl_2 でも同じ結果が得られた。したがって、この生育阻害は SO_4^{2-} または Cl^- によるものではなく Mg^{2+} によるものと考えられる。 Ca^{2+} 流入の観点から興味深いことに、その生育条件下に CaCl_2 を添加すると生育阻害が軽

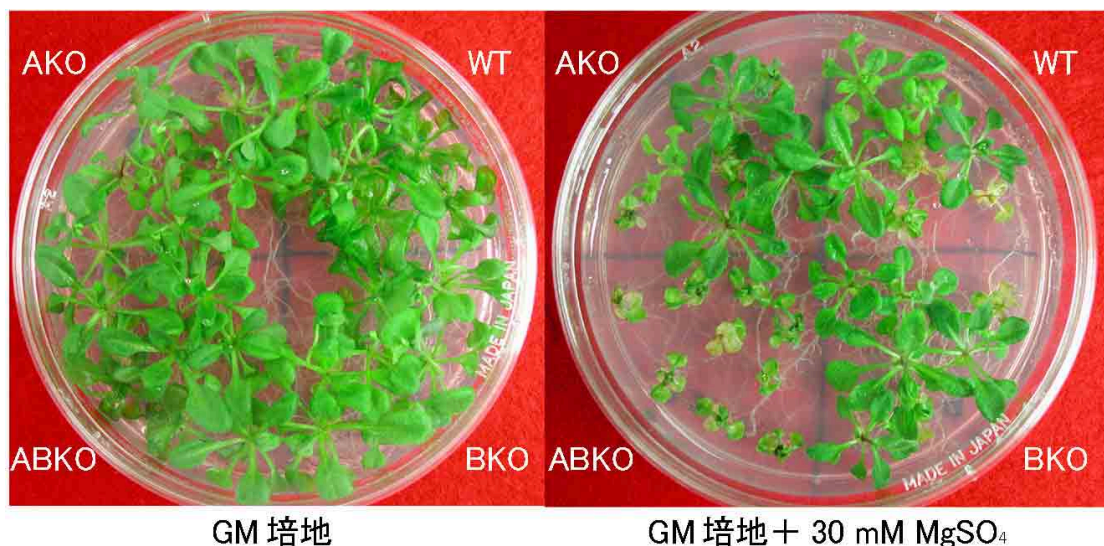


図5 *atmid1a atmid1b* 二重欠損株の Mg^{2+} 超感受性

ABKO, *atmid1a atmid1b* 二重欠損株; AKO, *atmid1a* 欠損株; BKO, *atmid1b* 欠損株; WT,野生株. なお, 30 mM MgCl_2 添加でも上図と同じ結果が得られている。

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。なお、この結果は、(6) で説明した *AtMID1B* 高発現株では、*AtMID1A* 高発現株と異なり、根における $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取込みが上昇しなかったという結果と矛盾する。その理由は、高発現株と欠損株では、注目している遺伝子とその関連の遺伝子群の発現と活性化の違いが現れることによるものと推測される。今後この点を注意深く研究する必要がある。

(9) 出芽酵母の Mid1 の機能解析

植物のモデル生物である出芽酵母の Mid1 タンパク質の研究は本研究の基盤であったので、本プロジェクトにおいて研究を続け、植物の *MID1* ファミリーの機能解析に役立てることを目指した。Mid1 には4つの疎水性領域(H1, H2, H3 および H4)が存在し、SA チャネル機能に重要と予想されている。そこで、*In vitro* mutagenesis 法で H3 と H4 領域および C-末端親水性領域に種々の変異を導入し、それら変異タンパク質の活性、含量、局在を調べた。その結果、H3 と H4 の領域内の活性に必要なアミノ酸残基を特定し、さらに C-末端領域内に10個存在するシステイン残基のうち7つが Mid1 活性に必要なことを明らかにした。AtMid1A と AtMid1B には互いに良く似た疎水性領域が3つ存在し、2次構造予測により膜貫通ドメインの可能性が考えられており、しかも C-末端領域にはシステイン残基が多い。したがって、今後出芽酵母の Mid1 の研究結果を基に、同様の分子解剖を AtMid1A と AtMid1B に適用することは、それらの構造と機能の関係を明らかにする上で役立つ。

また、Mid1 タンパク質は細胞膜以外に小胞体膜にも存在すること、ジスルフィド結合による複合体を形成することを明らかにした。Mid1 が SA チャネルとしてはたらく上で興味深い成果も得た。すなわち、根毛や花粉管の伸長など、極性成長のモデルである出芽酵母の極性成長を正に制御する Spa2 の活性は Mid1 の活性化の必要条件であることを明らかにした。極性成長は細胞膜の伸展を引き起こすので、Mid1 の活性化には Spa2 のはたらきが必要とされるものと考えられる。

(10) Mid1 と Cch1 の協調

出芽酵母の電位依存性 Ca^{2+} チャネル候補 Cch1 は、植物の Tpc1 と構造上似ている。Tpc1 は植物の細胞膜と液胞膜に存在しているという報告がある。出芽酵母では Mid1 と Cch1 が協調してはたらき Ca^{2+} を取込むことが遺伝学的に示されている。そこで、植物の Mid1 ファミリーと Tpc1 との関係を調べるための分子基盤を作ることを目的として、出芽酵母の Mid1 と Cch1 との協調関係を調べた。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、Mid1 単独、Cch1 単独または Mid1 と Cch1 の両方を高発現できる株を樹立し、 Ca^{2+} 取込み活性を測定した。その結果、Mid1 と Cch1 の両方を高発現する株においてのみ Ca^{2+} 取込みが増加した。したがって、遺伝学的に示唆されていた両者の協調関係を分子レベルで示すことができた。今後は AtMid1A, AtMid1B および Tpc1 の協調関係について調べる予定である。

2) 研究成果の今後期待される効果

本研究によって、重力や接触刺激の感知にはたらくことが予想されていた SA チャネル候補の遺伝子 (*AtMID1A* と *AtMID1B* と命名) を初めて植物から単離し、その欠損株と高発現株を作出することができた。これまでの研究から、それらの変異株の表現型解析によって、少なくとも *AtMid1A* タンパク質は細胞膜に存在し、根からの Ca^{2+} の取込みに関与し、根における接触刺激応答に必要であることを示すことができた。重力感知に関しては、後述する名古屋大学の辰巳グループによって、*AtMid1A* は重力刺激直後の Ca^{2+} 動員に関与することが示された。したがって、*AtMid1A* は重力と接触という、植物にとって重要な環境因子の感知に関与していることが示唆された。

今後は、この示唆をより掘り下げた研究が必要である。たとえば、*AtMid1A* とアミノ酸配列が 73% 同一の *AtMid1B* は同じ機能をもつのか、両タンパク質の制御下にあるシグナル伝達体と遺伝子群は何か、両タンパク質と相互作用して制御する因子は何か、Tpc1 との関係はあるのか、などである。これらの研究を展開することにより、重力や接触などの機械刺激の感知機構のネットワークを明らかにできるものと期待される。

社会への波及効果としては、宇宙生物学への寄与が考えられる。上述のように、*AtMid1A* は重力刺激後の Ca^{2+} 動員に関与するので、SA チャネルの変異植物体と野生株植物を地上と微小重下の両方で比較研究することにより、重力感知というあらゆる生物にとって最も根源的な生物のメカニズムを解明できる突破口の1つになるものと期待できる。

また、接触刺激と風による機械刺激は植物の成長遅延という共通の作用を引き起こすことが知られている。したがって、本研究の今後の成果は、これら、植物が常に直面している機械刺激を人為的に制御し、それぞれの生育環境にふさわしい機械刺激応答能をもった植物の作出に寄与できるものと期待される。

3. 2 *AtMid1A* と *AtMid1B* の電気生理学的研究

(名古屋大学 辰巳グループ)

1) 研究実施内容及び成果

AtMID1A は *mid1* 変異株の致死性を相補できる遺伝子としてシロイヌナズナから遺伝子が単離された。ただし、*AtMid1A* は Ca^{2+} 透過性機械受容チャネルであると予想されるが、チャネル活性については確認されていない。本研究では *AtMID1A* 遺伝子を導入した Chinese hamster ovary (CHO) 細胞の伸展による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の観察を行なった。これによって、① *AtMid1A* が機械刺激に応じて Ca^{2+} を透過するか検討し、② *AtMid1A* を効率良く機能発現している細胞を決めることでパッチクランプに有利な条件を見つけることを目的として研究を行なった。以下に述べるように、細胞の伸展による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が観察され、*AtMid1A* が伸展受容および Ca^{2+} 流入に重要な役割をもっていることが示唆された。

シロイヌナズナに Ca^{2+} 感受性の発光たんぱく質分子エクオリンを発現させた実験系において、低浸透圧刺激により細胞膜への機械刺激が発生し、その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こすことが、中川らとの共同実験で明らかになっている。この結果は、シロイヌナズナにおいて *AtMid1A* が機械刺激の受容装置としてはたらいっている可能性を示唆する。そこで、③シロイヌナズ

ナの葉肉細胞から直接パッチクランプ膜電流測定を行なって、AtMid1A が機械刺激受容チャネルとして機能することを示唆するデータを得た。最後に、④本研究課題であるところの植物における重力感知の分子機構を調べる上で重要な、重力感知における AtMid1A の役割を検討するため、重力刺激後の初期過程(細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇)を計測するための実験を構築した。そして、それを用いて、AtMid1A が重力感知の初期過程に関与することの示唆を得た。

(1)細胞の伸展による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の観察方法

AtMID1A を導入した 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増殖させ、 Ca^{2+} 蛍光指示薬である fura-2 を細胞内に導入した。この細胞を、蛍光顕微鏡下でシリコン膜を機械的に伸展させることにより、伸展させた(図6)。このとき、細胞内の fura-2 を 340 nm と 380 nm で励起し、fura-2 から発せられる蛍光強度の比(ratio)を時間を追って測定することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増減を推定した。ここで $\text{ratio} = F_{340}/F_{380}$ である。F340 は 340 nm で励起したときに発せられる蛍光強度、F380 は 380 nm で励起したときに発せられる蛍光強度である。

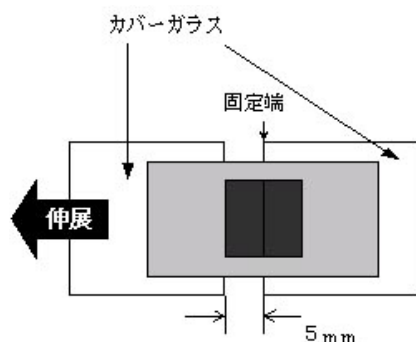


図6 細胞膜の伸展装置の概略図

シリコン膜(左図灰色の領域)の中心部(濃灰色部)に細胞を増殖させ、左図のようにカバーガラスを 5 mm の間隔で貼り付けた。この状態でシリコン膜の右端を固定してシリコン膜の左端を左へ引っ張ると、カバーガラスが貼られていない領域(幅 5 mm)にある細胞が伸展されることになる。本実験では最大伸展刺激では、シリコン膜の左端を 1.5 mm 引っ張ってカバーガラスが貼られていない領域(幅 5 mm)を 1.5 mm 伸展させ、結果として細胞を 30% 伸展させた。

この実験で機能発現を検討するために、AtMid1A と緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するプラスミドを CHO 細胞に導入した。なお、GFP はプラスミドの導入が成功した細胞を検出するために用いた。AtMid1A と GFP を導入した細胞を 30% 伸展させたところ、細胞内濃度の上昇がみられた。全体の細胞のうち反応がみられた細胞は 5.2% であった(観察細胞数 $n=765$)。コントロールとして GFP のみを導入した細胞では Ca^{2+} 濃度の上昇がみられなかった($n=808$)。また、 Ca^{2+} が存在していない培地では AtMid1A 発現細胞を伸展させても細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はみられなかった。したがって、膜伸展による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出によるものではなく、培地中の Ca^{2+} の流入によるものと推定される。さらに、伸展活性化イオンチャネルの阻害剤として知られる Gd^{3+} (30 μM)によって、この細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は阻害された。以上の結果から AtMid1A は CHO で発現し、伸展刺激に応じて Ca^{2+} を透過することが明らかになった。

AtMid1A を発現する細胞において、伸展強度を 10, 20 および 30% と大きくする実験を行なった結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度が伸展強度に正比例して上昇した。これは AtMid1A チャネルの開確率が伸展刺激の大きさに依存して大きくなるためであると考えられる(図7)。

これらのことから、AtMid1A は細胞膜に存在し、伸展刺激の受容により Ca^{2+} を透過し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させると考えられる。

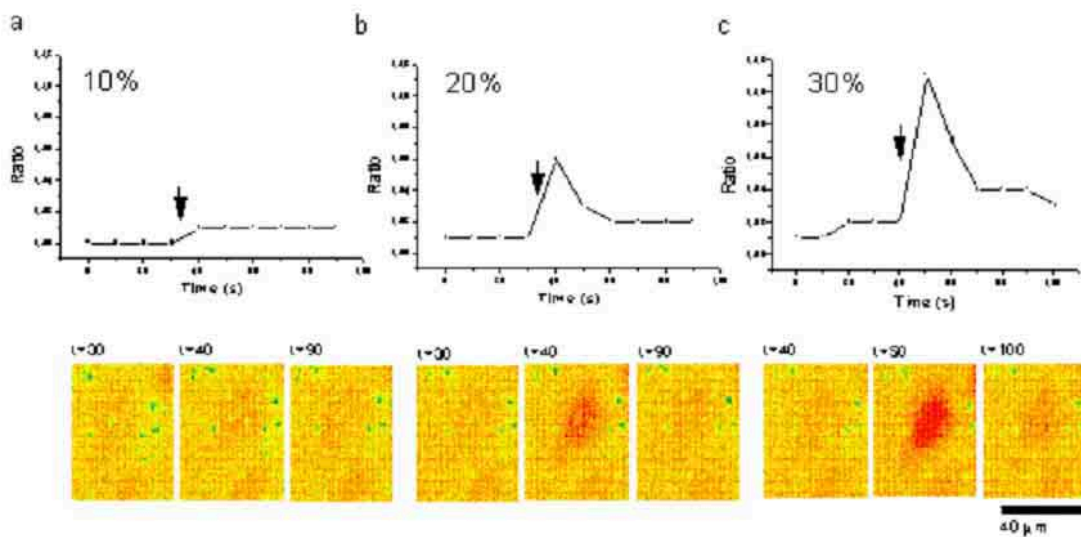


図7 伸展刺激による AtMid1A 発現 CHO 細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇

AtMID1A のみを導入した CHO 細胞において伸展強度を 10% (a), 20% (b) および 30% (c) と大きくした結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の大きさが伸展強度に正比例して大きくなった。これは AtMid1A をチャネルと考えた場合にチャネルの開確率が機械刺激の大きさに依存して大きくなるためであると考えられる。下のカラーパネルは3つ一組で、それぞれ上の a, b および c に対応する。

(2) パッチクランプによる電流測定

上記の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化のみでは、AtMid1A が機械刺激に応じるチャネルであることを証明することはできないので、さらにパッチクランプ法によるチャネル電流の記録を行なった。その結果、得られたチャネル電流も AtMid1A が機械刺激に応じるチャネルであることを示唆するものであった。

具体的には以下の実験を行なった。実験材料には AtMid1A 高発現植物体 (図8a) の葉肉細胞を用いた。伸展刺激に用いたのはトリニトロフェノール (TNP) である。TNP は膜にひずみを起こして SA チャネルを活性化し、その結果、細胞全体で観察される電流を上昇させる。図8bに示したように、TNP 添加5分後に電流の振れ幅がコントロールに比べて大きくなった。このことは TNP による SA チャネルの活性化を示している。この電流は膜電位を 10 mV おきに変化させたことによって生じたものである (図8c)。TNP による変化分は TNP の作用前後の電流電圧関係を引き算することで得られる。得られた差分電流を図8dに示す。この図は、TNP によって膜にひずみを起こしたときに発生する膜のイオン透過性の上昇には Ca^{2+} が関与することを示唆している。また、*atmid1a* 欠損植物体 (図8e) の葉肉細胞では TNP を加えてもイオン電流の上昇はなかった (図8f, g)。以上の結果から、AtMid1A は TNP により細胞膜にひずみ応力が発生した場合に活性化するイオン電流の発生に関与していると考えられる。

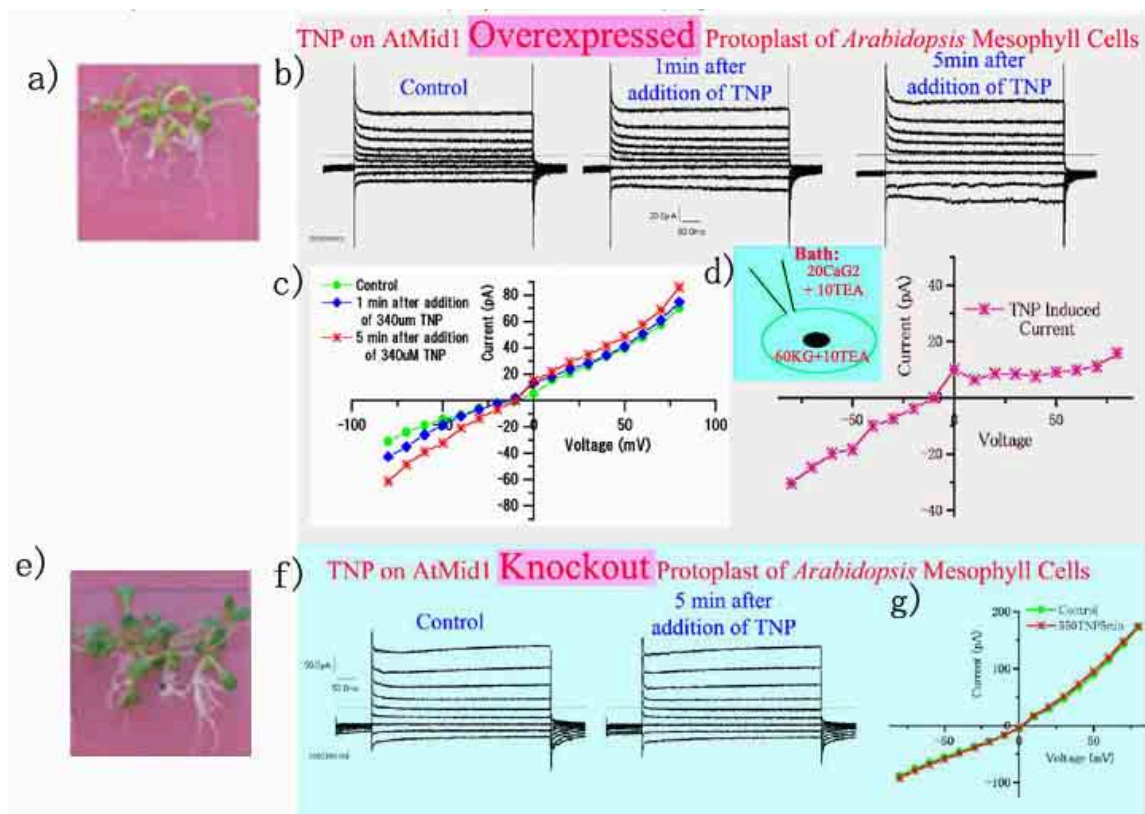


図8 パッチクランプによる電流測定

a) AtMid1A 高発現植物体; b) AtMid1A 高発現植物体の膜電流測定の例. 10 mV ごとに膜電位を変化させて電流を測定している. bの中央と右は TNP を作用させた膜電流の測定; c) bの結果をもとにして作成した電流/電圧プロット; d) cの結果をもとにした差分電流; e) *atmid1a* 欠損植物体; f) *atmid1a* 欠損植物体の膜電流測定の例. ノックアウト植物では TNP は作用を示さなかった. g) fの結果をもとにした電流/電圧プロット.

(3) AtMid1A は重力刺激後の Ca^{2+} シグナル発生に必要である

上記の結果から, AtMid1A は Ca^{2+} 透過性 SA チャネルとしてはたらいっていることが示唆された. Ca^{2+} 透過性 SA チャネルは古くから重力感知に必要なセンサーの1つと考えられているので, その可能性を調べる装置を開発した. 図9に示したように, エクオリン導入シロイヌナズナを直径 6 cm のシャーレで垂直培養し, セレンテラジンの負荷を行なった. シャーレを回転装置にセットして, エクオリン発光をモニターすることによって重力方向に依存した細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を記録した. 本装置を回転させることにより, 重力方向変化をシャーレ中の全ての植物体に全く同程度与えることができる.

この装置を用いて, 125 秒で垂直方向に一回転するようにセットし, AtMid1A 高発現株(約30個体)の生えているシャーレを装着し, 回転させた. その結果, エクオリンの発光(すなわち細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇)が 180 度に近づくと一過的に上昇し, 360 度に近づくともとのレベルに戻った(図 10a). 2度目の回転のときは, その上昇は小さくなった. 一方, 水平方向の回転ではエクオリンの発光は上昇しなかった(図 10b). 同じ結果はエクオリン発現野生株でも得られた. これらの結果は, 我々が重力方向変化に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を測定する装置の開発に成功したことを示す.

重要なことに、この装置を *atmid11a* 欠損植物体に適用した結果、この植物体では垂直方向への回転に伴うエクオリン発光の上昇が、野生株に比べ有意に低下していた(図10c)。この結果は AtMid1A が重力感知にはたらいっていることを示唆する。

以上の全てのデータを総合すると、AtMid1A は細胞膜の伸展によって活性化される Ca^{2+} 透過性 SA チャネルである可能性が高い。植物における重力感知は Ca^{2+} 透過性 SA チャネルが担っている可能性が長い間予想されてきたが、本研究によってそのことが正しいことが示唆された。今後、AtMid1A ばかりでなく AtMid1B も合わせて、それらの重力感知における役割を詳しく検討する予定である。

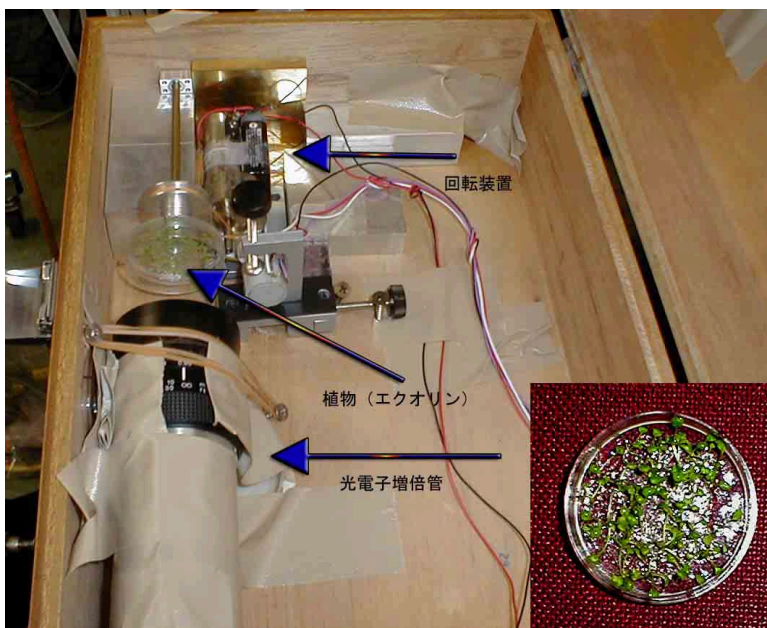


図9 重力方向変化に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度変化のモニター装置

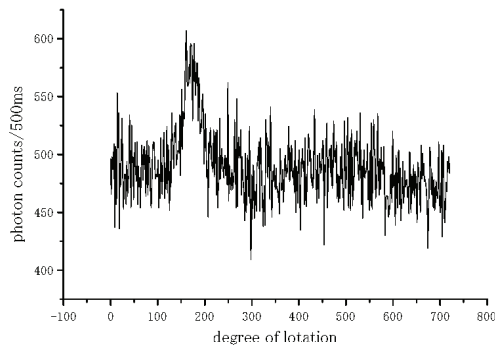
エクオリンを発現している植物体をシャーレごとフotonカウンターの入った回転装置に入れる。この装置を適宜傾けることにより、全ての植物体と同じ重力方向変化を与えることができる。

2) 研究成果の今後期待される効果

植物細胞における膜伸展などの機械刺激によって活性化する Ca^{2+} 透過性 SA チャネルの分子レベルでの解析は、本研究が世界で初めてのものである。類似した研究では、機械刺激、浸透圧、薬物、感染によって活性化する SA チャネルの存在は電気生理学的に知られているが、分子レベルという観点からは本研究は独創性が高い。したがって、今後我々の研究成果を基に、AtMid1A と AtMid1B を中心とした SA チャネルが関与する現象(たとえば、重力応答、接触応答、花粉管の伸長、気孔の開閉など)における機械刺激の感知と Ca^{2+} シグナル伝達の分子レベルでの研究が盛んになると期待される。

また、CHO 細胞に AtMid1A を発現させ、その細胞を直接伸展して刺激する実験は、我々が以前出芽酵母の Mid1 に適用した手法であるが、植物のイオンチャネルにおいても有効であることが示された。その点で、この手法は広く応用のきく実験方法として通用することが示された。

a, Vertical rotation



b, Horizontal rotation

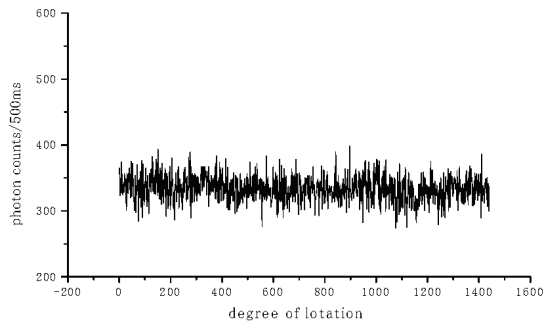
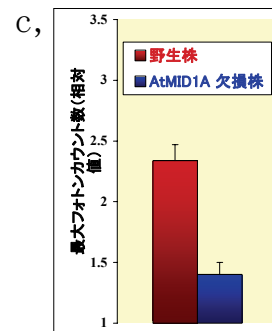


図10 AtMid1A 高発現株における重力方向変化に伴うエクオリン発光のモニタリング

a) 植物体を垂直方向に2回回転させた。この回転では植物体に重力方向の変化が加えられる。b) 植物体を水平方向に4回回転させた。この回転では植物体に重力方向の変化は加えられない。c) *AtMID1A*を欠損した植物体では重力方向変化によって誘起される細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が野生株に比べて低い。



植物の重力感知のメカニズムは、1880年ダーウィンによって記述されてから125年もの時間が経っているが、その生物学的な基盤は不明のままである。本研究はその解明を分子レベルで目指す独創的な研究である。最近イギリスのA. J. Trewavasたちのグループから細胞内 Ca^{2+} をモニターする類似の実験法が報告されたが、本研究の実験システムは簡便に重力反応を調べる点でより優れている。また、我々は*AtMid1A*と*AtMid1B*という分子的なツールを持っているので、今後この*AtMID1A*と*AtMID1B*の変異体を解析した結果は、植物の重力感知の分子機構を解明するブレイクスルーとなる重要な研究に発展することが期待される。

3.3 イネとタバコの *MIDI* ファミリーの分子細胞生物学的研究

(東京理科大学 朽津グループ)

1) 研究実施内容および成果

植物が、物理的的刺激やさまざまな生物的、非生物学的ストレスを感知してその信号を伝達する過程では、 Ca^{2+} 透過性伸展活性化陽イオンチャネルが関与する可能性が示唆されている。そこで、単子葉のモデル植物であるイネや、培養細胞系を用いて Ca^{2+} 動員の機構の解析が進んでいるタバコBY-2細胞から、酵母の*mid1*変異を部分相補する遺伝子を単離し、細胞内 Ca^{2+} 動態の調節やストレス応答、増殖・分化における*OsMIDI*の機能を分子細胞生物学的に解析した。

(1) イネ, タバコのMIDIファミリー遺伝子 *OsMIDI1*, *NtMIDI1A/B*の単離

イネ幼苗由来のcDNAを鋳型にしたPCRスクリーニングおよびゲノムデータベース検索により, *AtMIDI1A/B*と相同性の高い遺伝子を発見した. この遺伝子は1257 bpのopen reading frame (ORF) からなり, 418アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた. *OsMid1*は, アミノ酸配列において *AtMid1A*と66.7%, *AtMid1B*と57.4%, 酵母*Mid1*とは20.0%の相同性を示した. 疎水性プフィールにより*OsMid1*, *AtMid1A/B*, *Mid1*の推定二次構造を比較したところ, *OsMid1*と*AtMid1A/B*の推定二次構造に非常に高い類似性が見られた.

一方, *AtMid1A/B*で保存性の高い領域でプライマーを設計し, タバコ培養細胞BY-2のcDNAでPCRによるスクリーニングを行なった結果, 2種類の断片を得た. これらを*NtMIDI1A/B*と命名しRACE法, TAIL-PCR法により全長を決定した. *NtMid1A*と*B*はアミノ酸レベルで83%の相同性を示した. また, *NtMid1A/B*は*AtMid1A/B*のどちらか一方とより相同性が高いということはなく, それぞれに対して60-70%の相同性を示した. 疎水性プロフィールによる二次構造予測の結果, *NtMid1A/B*は複数の膜貫通領域をもち, 膜トポロジーは, *OsMid1*, *AtMid1A/B*とよく似ていた. 酵母の*Mid1*とは, 塩基配列でのホモロジーはほとんどないが, 膜トポロジーはある程度類似性が見られた.

以上の情報に基づいて, ささまざまなゲノム情報のデータベースを検索した結果, 広範な植物種に*MIDI*関連遺伝子が存在することが明らかとなり, *MIDI*ファミリーと命名した. サザン解析や, イネゲノムデータベースの解析の結果, イネのゲノム中にはシロイヌナズナと異なり, *MIDI*ファミリーの遺伝子として*OsMIDI1*が単独で存在することが判明した. この結果は, 植物の*MIDI*ファミリー遺伝子の機能を遺伝学的に解析する上で, イネを利用することの有効性を示している.

(2) 出芽酵母の*mid1*変異株を用いたイネ, タバコの*MIDI*ファミリー遺伝子の機能解析

出芽酵母の*mid1*変異株に*OsMIDI1*遺伝子を導入することにより, *mid1*表現型が相補されるか調べた. *TDH3*プロモーターによる発現系を用いた場合, α 因子を添加後8時間の生存率において, *mid1*変異株に比べて20%以上の上昇が確認された. このことから, 出芽酵母において*OsMIDI1*が酵母*MIDI1*の機能を部分的に相補することが示唆された.

同様に*NtMIDI1A*の全長をクローニングし, *TDH3*プロモーター下流に組み込み, *mid1*変異株に導入した結果, *NtMIDI1A*を導入した*mid1*変異株は α 因子添加後の致死性が部分的に回復した.

以上の結果から, *OsMid1*と*NtMid1A*は, 酵母細胞内で Ca^{2+} 透過に関連した機能をもつことが示唆された.

(3) イネとタバコの*MIDI*ファミリー遺伝子の発現部位と細胞内局在

*OsMIDI1*遺伝子がイネのどのような組織で機能するのかを調べるために, 日本晴由来の培養細胞および植物体(成葉, 幼苗・根)からtotal RNAを抽出し, 半定量的RT-PCR解析を行なったところ, いずれの組織においても*OsMIDI1*遺伝子の発現が確認された. この結果は, *OsMIDI1*がイネの基本的な生理過程に関与する可能性を示唆している. 現在, 各組織中における発現部位をより詳細に解析するため, *OsMIDI1::GUS*遺伝子を発現するイネ形質転換株の作出を進めている.

OsMid1の細胞内局在を調べるために、蛍光タンパク質GFPとの融合タンパク質をタマネギの表皮細胞で一過的に発現させた結果、OsMid1タンパク質は細胞膜上に局在する可能性が示唆された。また現在、35S:GFP:NtMIDIA/B, 35S:NtMIDIA/B:GFPを、エクオリン遺伝子を発現するタバコBY-2細胞に形質導入しGFP融合株を作出し、NtMid1A/Bの細胞内局在を解析している。

(4) イネ、タバコのMIDIファミリー遺伝子の発現抑制株の作出と機能解析

イネにおけるOsMIDIの機能を明らかにするため、イネのレトロトランスポゾンTos17がOsMIDI遺伝子に挿入された突然変異株を、約5万株のトランスポゾンタグラインからPCR法を用いて探索した。しかし、Osmid1破壊株は見出されなかったため、RNAi法を用いたOsMIDI発現抑制株の作出を進めた。アグロバクテリウム法を用いた形質転換の結果、OsMIDIの発現量が顕著に低下した株の作出に成功した。

OsMIDIの発現抑制培養細胞では、増殖に対するCa²⁺感受性が低下していた。通常の生育条件下における植物体を観察したところ、OsMIDI発現抑制株において、生育の遅延、稔実率の低下、穂位置の変化等の明確な表現型が見られた。この結果は、OsMid1がイネの細胞において細胞外からのCa²⁺流入を制御することにより、植物の成長制御等のシグナル伝達に関与していることを示唆している。

一方エクオリンを発現するタバコBY-2を用いて、誘導性プロモーター制御下によるNtMIDIA/B発現抑制株の作出に成功し、現在、さまざまな刺激による細胞内Ca²⁺濃度変化に対する影響を解析している。

(5) イネにおける細胞質Ca²⁺濃度測定系の確立

単子葉植物であるイネは、多くの重要な穀物のモデル植物としてゲノム解析が進められているが、さまざまな実験的な困難から、これまで細胞質のCa²⁺濃度を経時的に測定した報告はほぼ全くなく、解析が遅れていた。そこで、OsMid1の機能解析を行う目的で、エクオリンを、さまざまなプロモーターの制御下で、恒常的または誘導的に細胞質に発現させたイネの形質転換株を世界に先駆けて作出した。

解析の結果、懸濁培養細胞および植物個体の双方で、Ca²⁺動員を誘導する様々な刺激に対応した化学発光が観察され、細胞質Ca²⁺濃度を定量的に測定する実験系が構築できたと考えられる。解析の結果、イネ懸濁培養細胞は、浸透圧変化(低張、高張処理)により、Ca²⁺が動員されることが明らかになった。

(6) OsMIDI発現抑制株における細胞内Ca²⁺濃度変化の解析

OsMid1のCa²⁺動員制御への関与を直接的に解析するために、OsMIDI発現抑制株を再度形質転換し、エクオリンを発現させることにより、OsMIDI発現抑制株における細胞質Ca²⁺濃度測定系を確立した。そこで浸透圧変化により誘導されるCa²⁺動員の程度を、野生型株とOsMIDI発現抑制株との間で比較したところ、OsMIDI発現抑制株では低浸透圧刺激により誘導されるCa²⁺動員が野生型株の半分以上に低下していた。一方、感染シグナル(エリシター)誘導性のCa²⁺動員は、イネに

における電位依存性Ca²⁺チャネル候補因子OsTpc1の機能破壊株の結果(Kurusu *et al.*, *Plant J.*, 2005)とは異なり, 調べた限り, 野生型株とOsMIDI発現抑制株との間で明確な変化は見られていない. こうした結果は, OsMid1が浸透圧変化誘導性のCa²⁺動員に関与する, すなわちOsMid1が機械刺激受容型Ca²⁺チャネルの実体またはその制御因子として機能する可能性を示唆している.

(7) MtMID1AおよびNtMID1B過剰発現株の作製

エクオリンを発現するタバコBY-2細胞に35S:*NtMID1A*, 35S:*NtMID1B*を形質導入し, *MtMID1A*, *NtMID1B*過剰発現株を作出した. 現在, 種々の刺激に対するCa²⁺動員の解析を進めている.

2)研究成果の今後期待される効果

今後は, 浸透圧変化に対するさまざまな応答反応を野生型株とOsMIDI発現抑制株との間で比較することにより, Ca²⁺を介した浸透圧変化応答シグナル伝達系におけるOsMid1の役割を詳細に調べる計画である. 具体的には, 浸透圧変化により誘導される遺伝子の発現量について, マイクロアレイ解析法等を用いて網羅的に調べる予定である. また浸透圧変化と密接に関連すると考えられるさまざまな環境ストレス(乾燥, 塩その他)に対するCa²⁺動員を含む反応に, OsMid1が関与する可能性を検討する. これにより, OsMid1が環境ストレスへの適応機構に関与する可能性が検証できると考えられる.

また電位依存性Ca²⁺チャネルOsTpc1との機能分担を調べることにより, 植物における細胞膜を介したCa²⁺動員制御の環境適応機構への役割についても新たな知見が得られると想定される.

現在までのところ, 植物の栄養輸送能に関しては, Ca²⁺ポンプ(Ca²⁺-ATPase)やCa²⁺/H⁺対向輸送体(CAX)が代表的な輸送因子として解析が進められている. しかし, これらの因子はいずれも液胞等の内膜系に存在しており, 外界との接点であり, 環境応答等に深く関与していると考えられる細胞膜に存在するCa²⁺輸送体の分子実体の報告は遅れている. そこで今後は, OsMid1の細胞膜を介した養分吸収や環境応答への関与を調べる. また, 近年農業上大きな問題になっている二価の金属イオンであるカドミウムイオン(Cd²⁺)に関しても, 障害レベルや蓄積量を指標にして, 透過能を解析する予定である.

重力感知を含む動植物の環境応答や発生の情報伝達系においてCa²⁺チャネルが関与する可能性が長年にわたって指摘されながら, その分子実体は, 植物ではほぼ全く未解明であった. 本研究の結果, 植物界に広範に存在するMIDIファミリー遺伝子が, Ca²⁺ホメオスタシスの制御に重要な役割を果たすことが明らかになった. 特に, 農業上重要性が高く, 世界的な食糧問題, 環境問題の解決のために重要視されているイネにおいて, MIDIファミリーがOsMIDI単独の遺伝子として存在し, 発生や環境応答の過程で重要な役割を果たしていることが発見できたことは, 意義深い. 今後, その機能がさらに詳細に解析されることが強く期待される.

4 研究参加者

①飯田グループ(分子遺伝学的研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
飯田秀利	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	教授	研究全般	平成12年10月～ 平成18年3月
山中拓哉	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	CREST 研究員	AtMID1B の分子遺伝学的研究	平成13年4月～ 平成18年3月
中川祐子	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	群馬大学 博士課程 大学院生 D1～4 CREST 研究補助員 CREST 研究員	AtMID1A の分子遺伝学的研究	平成13年4月～ 平成17年3月 平成13年5月～ 平成14年3月 平成15年4月～ 平成17年3月 平成17年4月～ 平成18年3月
東 由美子	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	研究チーム 事務員	事務	平成12年12月～ 平成18年3月
多田智子	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	東京大学 博士課程 大学院生 D2～4 CREST 研究補助員 CREST 研究員	Mid1, AtMID1A および AtMID1B の分子遺伝学的研究	平成13年4月～ 平成15年9月 平成15年4月～ 平成15年9月 平成15年10月～ 平成15年12月
野間繁子	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	修士課程 大学院生 M2	Mid1, AtMID1A および AtMID1B の分子遺伝学的研究	平成13年4月～ 平成14年3月
丸岡貴司	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	修士課程 大学院生 M2	Mid1, AtMID1A および AtMID1B の分子遺伝学的研究	平成13年4月～ 平成14年3月
劉 麗萍	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	修士課程 大学院生 M2	Mid1, AtMID1A および AtMID1B の分子遺伝学的研究	平成13年4月～ 平成14年3月
池田光伸	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	修士課程 大学院生 M1～2	Mid1, AtMID1A および AtMID1B の分子遺伝学的研究	平成13年4月～ 平成15年3月

川崎京子	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	修士課程 大学院生 M1～2	Mid1, AtMID1A および AtMID1B の分子遺伝学 的研究	平成14年4月～ 平成16年3月
川島友香	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	修士課程 大学院生 M1～2	Mid1, AtMID1A および AtMID1B の分子遺伝学 的研究	平成16年4月～ 平成18年3月
寺島明日香	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	修士課程 大学院生 M1～2	Mid1, AtMID1A および AtMID1B の分子遺伝学 的研究	平成16年4月～ 平成18年3月
藤 金風	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	修士課程 大学院生 M1	Mid1, AtMID1A および AtMID1B の分子遺伝学 的研究	平成17年4月～ 平成18年3月
中野正貴	東京学芸大学 教育学部 生命科学分野	修士課程 大学院生 M1	Mid1, AtMID1A および AtMID1B の分子遺伝学 的研究	平成17年4月～ 平成18年3月

②辰巳グループ(電気生理学的研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
辰巳仁史	名古屋大学 医学研究科 細胞生物物理	助教授	電気生理学的研究	平成12年10月～ 平成18年3月
岸上明生	名古屋大学 医学研究科 細胞生物物理	CREST 研究員 名古屋大 学研究員	タンパク質精製および 電気生理学的研究	平成13年4月～ 平成17年6月 平成17年7月～ 平成18年3月
宮脇千賀子 (H14,10～ 尾関千賀子)	名古屋大学 医学研究科 細胞生物物理	博士課程 大学院生 CREST 研究補助 員	タンパク質輸送の研究 および電気生理学的研 究	平成13年4月～ 平成14年12月 平成13年5月～ 平成14年12月
豊田正嗣	名古屋大学 医学研究科 細胞生物物理	博士課程 大学院生 D1～2	タンパク質輸送の研究 および電気生理学的研 究	平成17年2月～ 平成18年3月

③朽津グループ(分子細胞生物学的研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
朽津和幸	東京理科大学 理工学部 応用 生物科学科	教授	分子細胞生物学的研究	平成13年12月～ 平成18年3月
来須孝光	東京理科大学 理工学部 応用	修士課程・ 博士過程	分子細胞生物学的研究	平成13年12月～ 平成17年3月

	生物科学科	大学院生 M2～D3 CREST 研究補助 員		平成17年4月～ 平成18年3月
大野良子	東京理科大学 理工学部 応用 生物科学科	ポスドクト ラル研究 員	分子細胞生物学的研究	平成16年4月～ 平成17年3月
林晃之	東京理科大学 理工学部 応用 生物科学科	ポスドクト ラル研究 員	分子細胞生物学的研究	平成17年4月～ 平成18年3月
門田康弘	東京理科大学 理工学部 応用 生物科学科	修士課程・ 博士課程 大学院生 M2～D3	分子細胞生物学的研究	平成13年12月～ 平成17年3月
小笠原よう子	東京理科大学 理工学部 応用 生物科学科	修士課程・ 博士課程 大学院生 M1～D3	分子細胞生物学的研究	平成13年12月～ 平成18年3月
櫻井康博	東京理科大学 理工学部 応用 生物科学科	修士課程 大学院生 M1～2	分子細胞生物学的研究	平成14年4月～ 平成16年3月
濱田淳平	東京理科大学 理工学部 応用 生物科学科	修士課程 大学院生 M1～2	分子細胞生物学的研究	平成16年4月～ 平成18年3月
大塚高弘	東京理科大学 理工学部 応用 生物科学科	修士課程 大学院生 M1	分子細胞生物学的研究	平成17年4月～ 平成18年3月
瀧口彬子	東京理科大学 理工学部 応用 生物科学科	修士課程 大学院生 M1	分子細胞生物学的研究	平成17年4月～ 平成18年3月

5 成果発表等

(1)論文発表 (国内1件, 海外15件)

1. 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. Pinontoan, R., Krystofova, S., Kawano, T., Mori, I. C., Tsuji, F. I., Iida, H.,
and Muto, S.
Phenylethylamine induces an increase in cytosolic Ca²⁺ in yeast.
Biosci. Biotechnol. Biochem. **66**:1069-1074, 2002.

3. Tada, T., Ohmori, M., and Iida, H.
Molecular dissection of the hydrophobic segments H3 and H4 of the yeast Ca²⁺ channel component Mid1
J. Biol. Chem. **278**:9647-9654, 2003.
4. 飯田秀利, 岸上明生, 多田智子, 中川祐子, 山中拓哉
植物の Ca²⁺チャネル
蛋白質核酸酵素, **48**:2061-2067, 2003
5. Tada, T., Ohmori, M., and Iida, H.
Phe³⁵⁶ in the yeast Ca²⁺ channel component Mid1 is a key residue for Viability after exposure to α -factor
Biochem. Biophys. Res. Commun. **313**:752-757, 2004
6. Yoshimura, H., Tada, T., and Iida, H.
Subcellular localization and oligomeric structure of the yeast putative stretch-activated Ca²⁺ channel component Mid1
Exp. Cell Res. **293**:185-195, 2004
7. Hashimoto K., Saito, M., Matsuoka, H., Iida, K., and Iida, H.
Functional analysis of a rice putative voltage-dependent Ca²⁺ channel, *OsTPC1*, expressed in yeast cells lacking its homologous gene *CCH1*.
Plant Cell Physiol. **45**:496-500, 2004
8. Iida, K., Tada, T., and Iida, H.
Molecular cloning in yeast by *in vivo* homologous recombination of the yeast putative α 1 subunit of the voltage-gated calcium channel.
FEBS Lett. **576**:291-296, 2004
9. Qi, Z., Kishigami, A., Nakagawa, Y., Iida, H., and Sokabe, M.
A mechanosensitive anion channel in *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells.
Plant Cell Physiol. **45**:1704-1708, 2004
10. Noma, S., Iida, K., and Iida, H.
The polarized morphogenesis regulator Spa2 is required for the function of the putative stretch-activated Ca²⁺-permeable channel component Mid1 in *Saccharomyces cerevisiae*
Eukaryot. Cell **4**:1353-63, 2005
11. Hashimoto, K., Saito, M., Iida, H., and Matsuoka, H.
Evidence for the plasma membrane localization of a putative voltage-dependent Ca²⁺ channel, *OsTPC1*, in rice.
Plant Biotechnol. **22**:235-239, 2005
12. Kurusu, T., Yagala, T., Miyao A., Hirochika, H., and Kuchitsu, K.
Identification of a putative voltage-gated Ca²⁺ channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice.
Plant J. **42**:798-809, 2005
13. Kuchitsu, K., Kadota, Y., and Kurusu, T.
Roles of the putative voltage-gated Ca²⁺ permeable channels, the TPC1 family, in plant stress signaling.

J. Agr. Meteorol. **60**:1109-1111, 2005

14. Kadota, K., Furuichi, T., Sano, T., Kaya, H., Murakami, Y., Gunji, W., Muto, S., Hasezawa, S., Kuchitsu, K.
Cell cycle-dependent regulation of oxidative stress responses and Ca²⁺ permeable channels NtTPC1A/B in tobacco BY-2 cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. **336**:1259-1267, 2005
15. Ozeki-Miyawaki, C., Moriya, Y., Tatsumi, H., Iida, H., and Sokabe, M.
Identification of functional domains of Mid1, a stretch-activated channel component, necessary for localization to the plasma membrane and Ca²⁺ permeation.
Exp. Cell Res. **311**:84-95, 2005
16. Kadota, K., and Kuchitsu, K.
Regulation of elicitor-induced defense responses by Ca²⁺ channels and cell cycle in tobacco BY-2 cells.
Biotechnology in Agriculture and Forestry (in press.)

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待, 口頭講演 (国内21件, 海外1件)
(招待講演)

1. 飯田秀利 (東京学芸大学教育学部生物学科, CREST, JST)
出芽酵母の伸展活性化Ca²⁺透過チャネルMid1とシグナル伝達
第167回酵母細胞研究会例会
東京都墨田区吾妻橋, アサヒビール(株)本社ビル3階 大会議室
平成15年11月14日
2. 飯田秀利^{1,2}, 中川祐子^{1,2,3,7}, 片桐健³, 戚智^{4,5}, 岸上明生^{2,4}, 古市卓也⁴,
辰巳仁史^{2,4}, 佐藤修正⁶, 加藤友彦⁶, 田端哲之⁶, 小島至⁷, 飯田和子⁸, 多田智
子^{1,2}, 丸岡貴司^{1,2}, 池田光伸^{1,2}, 川崎京子^{1,2}, 寺島明日香¹, 山中拓哉^{1,2}, 篠崎
一雄³, 曾我部正博^{4,5}
(¹東京学芸大・教育, ²CREST・JST, ³理研・植物分子生物, ⁴名大院・医, ⁵ICORP・
JST, ⁶かずさDNA研・植物遺伝子第一, ⁷群馬大・生体調節研, ⁸都臨床研・医薬
研究開発センター)
伸展活性化 Ca²⁺チャネルの新展開
第7回植物生体膜シンポジウム: 生体膜研究の新世紀
東京都, 東京大学農学部1号館
平成16年3月26日
3. 曾我部正博^{1,2,3}, 辰巳仁史¹, 早川公英², 河上敬介⁴, 宮津真寿美⁴
(¹名大院・医・細胞生物物理, ²科技振・国際共同・細胞力覚, ³生理研・分子生理,
⁴名大・医・保健)
細胞メカトランスダクションの多様性: SA チャネル, 細胞骨格, 接着分子
第27回日本分子生物学会年会
神戸市, 神戸ポートアイランド
平成16年12月10日
4. Hidetoshi Iida¹, Yuko Nakagawa^{1,2,3}, Takeshi Katagiri², Zhi Qi^{4,5}, Hitoshi
Tatsumi^{1,4}, Takuya Furuichi⁴, Akio Kishigami⁴, Shusei Sato⁶, Tomohiko Kato⁶,
Satoshi Tabata⁶, Itaru Kojima³, Kazuko Iida⁷, Asuka Terashima¹, Mitsunobu Ikeda¹,

Takuya Yamanaka¹, Kazuo Shinozaki², Masahiro Sokabe^{4,8}

(¹Dept. Biol., Tokyo Gakugei Univ. and CREST, JST, ²Lab. Plant Mol. Biol., RIKEN, ³Inst. Mol. Cell. Reg., Gunma Univ., ⁴Dept. Physiol., Nagoya Univ. Grad. Sch. Med. and ICORP, JST, ⁵Cent. Brain Cognit. Sci., Inst. Biophys., China, ⁶First Lab. Plant Gene Res., Kazusa DNA Res. Inst., ⁷Med. R & D Cent., Tokyo Metro. Inst. Med. Sci., ⁸Dept. Mol. Physiol., Natl. Inst. Physiol. Sci.)

A stretch-activated calcium-permeable channel in *Arabidopsis*

第46回日本植物生理学会年会

新潟市, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

平成17年3月26日

5. 飯田秀利

(東京学芸大・教育, CREST・JST)

植物における機械刺激の感知機構

岡山大学学術講演会

岡山市, 岡山大学

平成17年9月26日

(口頭講演)

1. 飯田秀利(東京学芸大学, CREST), 丸岡貴司(東京学芸大学, CREST)

Mid1チャネルの機能に必須のC-末端領域の決定

第34回酵母遺伝子フォーラム

京都市, 国立京都国際会館

平成13年7月27日

2. 辰巳仁史(名古屋大学, CREST)

細胞の中で働く分子の知恵

「知と構成」研究会

神奈川県三浦郡, 湘南国際村センター

平成13年7月28日

3. 辰巳仁史(名古屋大学, CREST), 早川公英 (JST 細胞力学プロジェクト)

河上敬介(名古屋大学), 曾我部正博(名古屋大学, JST 細胞力学プロジェクト)

血管内皮細胞における力受容と細胞反応

中部生理学会

名古屋市, 名古屋大学シンポジオン

平成13年10月19, 20日

4. 中川祐子(理化学研究所, CREST, 群馬大学)

シロイヌナズナの伸展活性化Ca²⁺透過チャネルの候補遺伝子の分子遺伝学的研究

「植物多細胞系」特定研究 若手ワークショップ

奈良県生駒市, 奈良先端技術大学院大学

平成13年10月22日

5. 辰巳仁史(名古屋大学, CREST)

Analysis of clustering and mechano-dependent adsorption of integrin at focal

Contacts of endothelial cells by multi-mode light microscopy

アメリカ生物物理学会
サンフランシスコ(アメリカ合衆国)
平成14年2月24日

6. 多田智子(東京学芸大学, 東京大学, CREST), 大森正之(東京大学),
飯田秀利(東京学芸大学, CREST)
出芽酵母の伸展活性化 Ca^{2+} 透過チャネル Mid1 の点突然変異 F356S の解析
日本生物物理学会第40回年会
名古屋市, 名古屋大学東山地区
平成14年11月4日
7. 辰巳仁史(名古屋大学, CREST)
Cellular and Molecular Sensor for Mechanical Stimuli
第80回日本生理学会大会
福岡市, 福岡国際会議場
平成15年3月24日
8. 川崎京子, 飯田秀利
(東京学芸大・教育・生物, 科学技術振興事業団・CREST)
出芽酵母Mid4のMAPキナーゼとしての同定と Ca^{2+} シグナルとの関係
第56回日本細胞生物学会大会
滋賀県大津市, ピアザ淡海滋賀県立県民交流センター
平成15年5月15日
9. 丸岡貴司¹, 川崎京子^{1,3}, 恩田美雪², 太田一寿², 伊藤隆司², 飯田秀利^{1,3}
(¹学芸大・教育, ²金沢大・がん研, ³CREST, JST)
出芽酵母の接合過程におけるMid1依存的シグナル伝達経路の解析
酵母遺伝学フォーラム第36回研究報告会
千葉県木更津市, かずさアカデミアホール
平成15年7月25日
10. 川崎京子, 飯田秀利
(東京学芸大・教育・生物, CREST, JST)
出芽酵母の Slt2 から成る MAPK 経路と Ca^{2+} の関係
酵母遺伝学フォーラム第36回研究報告会
千葉県木更津市, かずさアカデミアホール
平成15年7月25日
11. 辰巳仁史(名古屋大学, CREST)
バネッセント光で生体分子の機能を探る
日本分光学会医学生物学部会シンポジウム2003
千葉市, 幕張メッセ
平成15年9月12日
12. 辰巳仁史(名古屋大学, CREST)
Exocytosis and contact formation in neuronal growth cones
第46回日本神経化学学会大会
新潟市, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター
平成15年9月24~26日

13. 飯田秀利 (東京学芸大学教育学部生物学科, CREST, JST)

植物の重力感知の分子機構
「植物の機能と制御」第1回公開シンポジウム
東京都港区, コクヨホール
平成15年11月5日

14. Hidetoshi Iida^{1,2}, Yuko Nakagawa^{1,2,3,4}, Takeshi Katagiri³, Zhi Qi^{5,6}, Hitoshi Tatsumi^{2,5}, Takuya Furuichi⁵, Akio Kishigami^{2,5}, Shusei Sato⁷, Tomohiko Kato⁷, Satoshi Tabata⁷, Itaru Kojima⁴, Kazuko Iida⁸, Asuka Terashima^{1,2}, Mitsunobu Ikeda^{1,2}, Takuya Yamanaka^{1,2}, Kazuo Shinozaki³, Masahiro Sokabe^{5,9,10}

(1Dept. Biol., Tokyo Gakugei Univ., 2CREST, JST, 3Lab. Plant Mol. Biol., RIKEN, 4Inst. Mol. Cell. Reg., Gunma Univ., 5Dept. Physiol., Nagoya Univ. Grad. Sch. Med., 6Cent. Brain Cognit. Sci., Inst. Biophys., China, 7First Lab. Plant Gene Res., Kazusa DNA Res. Inst., 8Med. R & D Cent., Tokyo Metro. Inst. Med. Sci., 9ICORP, JST, 10Dept. Mol. Physiol., Natl. Inst. Physiol. Sci.)
Molecular identification and a physiological role of a calcium-permeable, stretch-activated channel in *Arabidopsis thaliana*
International Symposium on Plant Axis Formation and Signal Transduction
東京都, 東京大学弥生講堂
平成17年3月2日

15. 朽津和幸^{1,2,3}, 櫻井康博^{1,3}, 小笠原よう子^{1,3}, 来須孝光^{1,3}, 門田康弘^{1,3}, 中川祐子^{3,4}, 山中拓哉^{3,4}, 片桐健⁵, 篠崎一雄⁵, 飯田和子⁶, 飯田秀利^{3,4}
(¹ 東京理科大・理工・応用生物科学, ² 東京理科大・ゲノムセンター・細胞シグナル制御, ³CREST・JST, ⁴ 東京学芸大・教育・生物, ⁵ 理研・植物分子, ⁶ 都臨床研・医薬研究開発センター)

イネ・タバコの Ca²⁺透過性伸展活性化陽イオンチャネル候補遺伝子の単離と機能解析
第45回日本植物生理学会
東京都, 東京都立大学
平成16年3月28日

16. 辰巳仁史(名古屋大学, CREST)

イメージングのすばらしい世界
第9回鶴舞公開セミナー
名古屋市, 名古屋大学
平成16年4月22日

17. 野間繁子¹, 飯田和子², 飯田秀利^{1,3}

(¹ 学芸大・教育・生命科学, ² 都臨床研・細胞膜情報伝達, ³CREST・JST)
細胞極性制御因子 Spa2 による伸展活性化 Ca²⁺チャネル候補 Mid1 の活性制御
酵母遺伝学フォーラム第38回研究報告会
千葉県柏市, アミュゼ柏クリスタルホール
平成17年9月5~7日

②ポスター発表 (国内33件, 海外2件)

1. 辰巳仁史(名古屋大学, CREST)

Dynamic Contact Formation at Neuronal Growth Cones of PC12 Cells
国際生物物理学会
京都市, 国立京都国際会館
平成13年7月30～31日

2. 辰巳仁史(名古屋大学, CREST)
Formation of adhesive contacts at the growth cone of PC12 cells
国際生理学会
クライストチャーチ(ニュージーランド)
平成13年8月26日～31日
3. 多田智子(東京学芸大学, 東京大学, CREST), 大森正之(東京大学),
飯田秀利(東京学芸大学, CREST)
出芽酵母の伸展活性化 Ca^{2+} 透過チャネル Mid1 の構造機能相関
日本生物物理学会第39回年会
大阪府吹田市, 大阪大学コンベンションセンター
平成13年10月8日
4. 宮脇千賀子(名古屋大学), 辰巳仁史(名古屋大学, CREST), 飯田秀利(東京学
芸大学, CREST), 曾我部正博(名古屋大学, JST 細胞力学プロジェクト)
出芽酵母の伸展活性化 Ca^{2+} 透過チャネル Mid1 における膜移行の分子機構
日本生物物理学会第39回年会
大阪府吹田市, 大阪大学コンベンションセンター
平成13年10月8日
5. 丸岡貴司(東京学芸大学, CREST), 飯田秀利(東京学芸大学, CREST)
Analysis of the C-terminal Region of the Yeast Mid1 Channel
第24回日本分子生物学会年会
横浜市, パシフィコ横浜
平成13年12月10日
6. 劉麗萍(東京学芸大学, CREST), 飯田秀利(東京学芸大学, CREST)
Molecular genetic studies on the hydrophobic segment H2 of the stretch-activated
 Ca^{2+} -permeable channel Mid1 in *Saccharomyces cerevisiae*
第24回日本分子生物学会年会
横浜市, パシフィコ横浜
平成13年12月10日
7. 野間繁子(東京学芸大学, CREST), 飯田秀利(東京学芸大学, CREST)
出芽酵母における *mid1* 変異の多コピー抑圧遺伝子の単離と解析
第24回日本分子生物学会年会
横浜市, パシフィコ横浜
平成13年12月10日
8. 多田智子(東京学芸大学, 東京大学, CREST), 大森正之(東京大学),
飯田秀利(東京学芸大学, CREST)
Molecular dissection of the hydrophobic segments H3 and H4 of the yeast
stretch-activated Ca^{2+} -permeable channel Mid1
Gordon Research Conference on Ion Channels

ニューハンプシャー州ティルトン(アメリカ合衆国)
平成14年7月14～19日

9. 宮脇千賀子(名古屋大学, 東京学芸大学, CREST), 辰巳仁史(名古屋大学, CREST) 飯田秀利(東京学芸大学, CREST), 曾我部正博(名古屋大学, JST 細胞力学プロジェクト)
Ca²⁺透過性の伸展活性化チャンネル Mid1 の形質膜へのターゲッティング
日本生物物理学会第40回年会
名古屋市, 名古屋大学東山地区
平成14年11月4日
10. 丸岡貴司(東京学芸大学), 恩田美雪(金沢大学), 太田一寿(金沢大学), 伊藤隆司(金沢大学), 飯田秀利(東京学芸大学, CREST)
出芽酵母の Mid1 チャンネル依存的 Ca²⁺シグナルの網羅的解析
日本分子生物学会 第25回年会
横浜市, パシフィコ横浜
平成14年12月11日, 12日
11. Tominaga, M.¹ and Tatsumi, H.²
(¹Department of Physiology, Mie University School of Medicine, ²Department of Physiology, Nagoya University School of Medicine, and CREST JST)
Cutting Edge of the Recent Progress in Biological Sensors: From Chemical- to Physical- Sensation”
日本生理学会第80回年会
福岡市, 福岡国際会議場
平成15年3月24日
12. Hitoshi Tatsumi^{1,2}, Kimihide Hayakawa³, Masahiro Sokabe^{1,3}
(¹Dept Physiol, Nagoya Univ Grad Sch Med, ²CREST, JST, ³Cell Mechanosensing Project)
Mechanical stress activates SA channels in the vicinity of focal adhesions of Endothelial cells
第25回日本比較生理生化学大会
仙台市, 戦災復興記念館
平成15年7月18～20日
13. Ritzka Oshio¹, Hitoshi Tatsumi^{1,2}, Masahiro Kataoka³, Masahiro Sokabe^{1,4},
(¹Dept Physiol, Nagoya Univ Grad Sch Med, ²CREST, JST, ³Faculty of Engineering, Shinshu Univ, ⁴Cell-Mechanosensing Project, JST)
Visicle exocytosis and its retrieval at growth cones monitored by measuring intravesicular pH”
日本神経科学会
名古屋市, 名古屋国際会議場
平成15年7月23～25日
14. 宮津真寿美¹, 辰巳仁史^{2, 3}, 成瀬恵治^{2, 4}, 曾我部正博^{2, 4}
(¹名大・医・保健, ²名大院・医・細胞科学, ³JST・CREST, ⁴JST・ICORP・細胞力学)
周期的一軸伸展刺激に対する血管内皮細胞のインテグリンクラスターの場所依存

的応答

第41回日本生物物理学会年会

新潟市, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

平成15年9月23~25日

15. 平田宏聡¹, 辰巳仁史^{2,3}, 曾我部正博^{1,2}
(ICORP・「細胞力覚」・JST,²名大院・医学系・細胞情報医学,³CREST・JST)
ストレスファイバー・ダイナミクスの再構成的研究
第41回日本生物物理学会年会
新潟市, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター
平成15年9月23~25日
16. 川崎京子, 飯田秀利
(東京学芸大・教育・生物, CREST・JST)
出芽酵母の性接合過程における Ca²⁺シグナルと細胞壁合成系 MAPK 経路の関係
第26回日本分子生物学会年会
神戸市, 神戸国際展示場
平成15年12月12日
17. 中川祐子^{1,2,5}, 片桐健², 篠崎一雄², 威智³, 岸上明生^{1,3}, 古市卓也³,
辰巳仁史^{1,3}, 曾我部正博³, 佐藤修正⁴, 加藤友彦⁴, 田畑哲之⁴, 小島至⁵,
飯田和子⁶, 池田光伸¹, 山中拓哉¹, 飯田秀利¹
(¹東京学芸大・教育・CREST・JST, ²理研・植物分子生物, ³名大院・医・ICORP・
JST, ⁴かずさDNA研・植物遺伝子第一, ⁵群馬大・生体調節研, ⁶都臨床研・医
薬研究開発センター)
シロイヌナズナの Ca²⁺伸展活性化陽イオンチャンネル遺伝子の単離と機能解析
第45回日本植物生理学会
東京都, 東京都立大学
平成16年3月28日
18. 辰巳仁史^{1,4}, 清島大資², 河上敬介^{2,3}, 井上真寿美^{2,3}, 早川公英⁵,
曾我部正博^{1,5}
(¹名大院・医・細胞情報医学, ²名大院・医・リハビリテーション, ³名大院・医・保健,
⁴CREST・JST・JST, ⁵ICORP・「細胞力覚」・JST)
生理学研究所研究会「バイオ分子センサー研究会」
岡崎市, 自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター
平成16年9月9日~10日
19. 中川祐子^{1,2,5}, 片桐健², 篠崎一雄², 威智³, 岸上明生^{1,3}, 古市卓也³,
辰巳仁史^{1,3}, 曾我部正博³, 佐藤修正⁴, 加藤友彦⁴, 田畑哲之⁴, 小島至⁵,
飯田和子⁶, 池田光伸¹, 寺島明日香¹, 山中拓哉¹, 飯田秀利¹
(¹東京学芸大・教育・CREST・JST, ²理研・植物分子生物, ³名大院・医・ICORP・
JST, ⁴かずさDNA研・植物遺伝子第一, ⁵群馬大・生体調節研, ⁶都臨床研・医
薬研究開発センター)
シロイヌナズナの Ca²⁺透過性伸展活性化陽イオンチャンネル候補 AtMID1A の接触
刺激応答における機能解析
第27回日本分子生物学会年会
神戸市, 神戸ポートアイランド

平成16年12月8日

20. 寺島明日香¹, 中川祐子^{1,2,5}, 片桐健², 篠崎一雄², 威智³, 岸上明生^{1,3}, 古市卓也³, 辰巳仁史^{1,3}, 曾我部正博³, 佐藤修正⁴, 加藤友彦⁴, 田畑哲之⁴, 小島至⁵, 飯田和子⁶, 池田光伸¹, 山中拓哉¹, 飯田秀利¹
(¹東京学芸大・教育・CREST・JST, ²理研・植物分子生物, ³名大院・医・ICORP・JST, ⁴かずさDNA研・植物遺伝子第一, ⁵群馬大・生体調節研, ⁶都臨床研・医薬研究開発センター)
シロイヌナズナのCa²⁺透過性伸展活性化陽イオンチャネル候補 *AtMID1A* の発現と局在
第27回日本分子生物学会年会
神戸市, 神戸ポートアイランド
平成16年12月8日
21. 早川公英¹, 辰巳仁史^{2,3}, 曾我部正博^{1,2,4}
(¹JST・ICORP・細胞力覚, ²名大・医・第2生理, ³JST・CREST, ⁴生理研・分子生理)
コフィリンによるアクチン線維の切断/脱重合に対するアクチン線維構造の影響:
アクチン線維切断の1分子観察
第42回日本生物物理学会年会
京都市, 国立京都国際会館
平成16年12月13~15日
22. 平田宏聡¹, 辰巳仁史^{2,3}, 曾我部正博^{1,2,4}
(¹生理研, ²名大院・医学系・細胞生物物理, ³CREST・JST, ⁴ICORP・「細胞力覚」・JST)
F-アクチンネットワークからの張力依存的なストレスファイバーの形成
第42回日本生物物理学会年会
京都市, 国立京都国際会館
平成16年12月13~15日
23. 町山裕亮¹, 辰巳仁史^{1,2}, 曾我部正博^{1,3,4}
(¹名大院・医・細胞情報医学, ²CREST・JST, ³生理研, ⁴ICORP・「細胞力覚」・JST)
機械受容チャネル・ゲーティング機構の1分子解析法の開発
第42回日本生物物理学会年会
京都市, 国立京都国際会館
平成16年12月13~15日
24. 山中拓哉¹, 中川祐子^{1,2,5}, 寺島明日香¹, 片桐健², 岸上明生^{1,3}, 古市卓也³, 辰巳仁史^{1,3}, 佐藤修正⁴, 加藤友彦⁴, 田畑哲之⁴, 飯田和子⁶, 小島至⁵, 曾我部正博³, 篠崎一雄², 飯田秀利¹
(¹東京学芸大・教育・CREST・JST, ²理研・植物分子生物, ³名大院・医・ICORP・JST, ⁴かずさDNA研・植物遺伝子第一, ⁵群馬大・生体調節研, ⁶都臨床研・医薬研究開発)
シロイヌナズナのCa²⁺透過性伸展活性化陽イオンチャネルの候補遺伝子 *AtMID1B* の機能解析
第46回日本植物生理学会年会
新潟市, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター
平成17年3月26日

25. Inoue-Miyazu, M. ^{1,2}, Kawakami, K. ^{1,2}, Tatsumi, H. ^{1,3}, Naruse, K. ^{1,4}, Hayakawa, K. ^{1,2}, Kisyoshima, D. ^{1,2}, Sokabe, M. ^{1,4}
 (¹Dept.Physiol., Nagoya Univ Grad Sch Med, ²Dept.Phys. Ther. Nagoya Univ Grad Sch Med, ³CREST, JST, ⁴ICORP Cell-Mechanosensing, JST
 血管内皮細胞を周期的一軸伸展刺激するとチロシンリン酸化接着斑蛋白質の分布が経時変化する
 Changes in the distribution of tyrosine phosphorylated focal proteins caused by uniaxial cyclic stretch in endothelial cells
 第82回日本生理学会大会
 仙台市, 宮城県スポーツセンター
 平成17年5月18日
26. 西山智子¹, 辰巳仁史^{1,2}, 曾我部正博^{1,3,4}
 (¹名古屋大院・医・細胞生物物理, ²CREST, JST, ³SORST, 細胞力学プロジェクト, JST, ⁴分子生理学, NIPS, NINS)
 ピロカルピン処理をした海馬スライスカルチャーび共焦点顕微鏡による長時間イメージング
 第28回日本神経科学大会
 横浜市, パシフィコ横浜
 平成17年7月26~28日
27. Teng Jinfeng^{1,2*}, 飯田和子^{3*}, 多田智子^{1,2}, 阪彩香¹, 玉井弥美¹, 奥村万樹子⁴, 飯田秀利^{1,2}
 (¹学芸大・教育・生命科学, ²CREST・JST, ³都臨床研・細胞膜情報伝達, ⁴基生研・細胞増殖, Contributed equally)
 電位依存性 Ca²⁺チャネル候補 Cch1 の活性制御
 酵母遺伝学フォーラム第38回研究報告会
 千葉県柏市, アミュゼ柏クリスタルホール
 平成17年9月5~7日
28. 来須孝光^{1,2}, 杉山淑美¹, 岩崎洋平¹, 古市卓也⁴, 能鹿島央司¹, 宮尾安藝雄⁵, 廣近洋彦⁵, 朽津和幸^{1,2,3}
 (¹東京理科大・理工・応用生物科学, ²CREST・JST, ³東京理科大・ゲノムセンター・細胞シグナル制御, ⁴名古屋大院・医, ⁵農業生物資源研・分子遺伝)
 イネの細胞質 Ca²⁺濃度の非破壊モニタリング系の確立とCa²⁺チャネルを介したCa²⁺動員制御機構の解析
 日本植物学会第69回大会
 富山市, 富山大学
 平成17年9月21日
29. Takamitsu Kurusu^{1,3}, Toshikazu Yagala¹, Akio Miyao⁴, Hirohiko Hirochika⁴ and Kazuyuki Kuchitsu^{1,2,3}
 (¹Department of Applied Biological Science and ²Genome & Drug Research Center, Tokyo University of Science ³CREST, Japan Science and Technology Agency, ⁴Department of Molecular Genetics, National Institute of Agrobiological Sciences)
 Identification of a putative voltage-gated Ca²⁺ channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice”

Protein Phosphorylation in Plant Signaling 2005
つくば市, 筑波国際会議場(エポカル筑波)
平成17年10月20, 21日

30. 豊田正嗣¹,古市卓也¹,辰巳仁史^{1,2},曾我部正博^{1,3,4}
(¹名大院・医・細胞生物物理,²CREST, JST,³ICORP/ SORST 細胞力覚, JST,⁴生理研・分子生理)
シロイヌナズナの重力感知の分子メカニズム
第43回日本生物物理学会年会
札幌市, 札幌コンベンションセンター
平成17年11月23~25日
31. 平田宏聡¹,辰巳仁史^{2,3},曾我部正博^{1,2,4}
(¹生理研・細胞内代謝,²名大院・医・細胞生物物理,³CREST・JST,⁴SORST・細胞力覚・JST)
Fアクチンメッシュからストレス線維が形成される自己組織機構の解析
第43回日本生物物理学会年会
札幌市, 札幌コンベンションセンター
平成17年11月23~25日
32. 町山裕亮¹,辰巳仁史^{1,2},曾我部正博^{1,3,4}
(¹名大院・医・細胞情報医学,²CREST・JST,³生理研,⁴SORST・細胞力覚・JST)
単一機械受容チャネル分子の可視化と活性測定—ゲーティングの構造基盤の解明に向けて
第43回日本生物物理学会年会
平成17年11月23~25日
札幌市, 札幌コンベンションセンター
33. 早川公英¹,辰巳仁史^{2,3},曾我部正博^{1,2,4}
(¹科学技術振興機構・SORST・細胞力覚,²名大・院医/細胞生物物理,³科学技術振興機構・CREST,⁴生理研・分子生理)
機械刺激によるアクチン細胞骨格の動態制御の分子機構
第43回日本生物物理学会年会
札幌市, 札幌コンベンションセンター
平成17年11月23~25日
34. 清島大資¹,河上敬介²,辰巳仁史^{1,3},早川公英⁴,曾我部正博^{1,4,5}
(¹名古屋大院・医学系・細胞生物物理,²名古屋大・医・保健,³CREST・JST,⁴SORST・細胞力覚 JST,⁵生理研・分子生理)
機械刺激で生じるインテグリン脱接着の分子機構:Ca²⁺依存性脱リン酸化酵素の関与
第43回日本生物物理学会年会
札幌市, 札幌コンベンションセンター
平成17年11月23~25日
35. 藤 金風¹, 飯田和子², 多田智子¹, 阪彩香¹, 玉井弥美¹, 奥村万樹子^{2,3},
飯田秀利¹
出芽酵母の電位依存性 Ca²⁺チャネル候補 Cch1 の構造と機能

第28回日本分子生物学会年会
 福岡市, ヤフードーム
 平成17年12月7日

(3)特許出願

①国内出願 (2件)

1. 名称: 高等植物における伸展活性化カルシウム透過チャネルの *AtMID1A*
 遺伝子および当該遺伝子を用いたトランスジェニック植物

発明者: 飯田秀利, 中川祐子, 篠崎一雄, 片桐 健

出願人: 科学技術振興事業団, 理化学研究所

出願日:

出願番号:

2. 名称: 高等植物における伸展活性化カルシウム透過チャネルの *AtMID1B*

遺伝子および当該遺伝子を用いたトランスジェニック植物

発明者: 飯田秀利, 中川祐子, 篠崎一雄, 片桐 健

出願人: 科学技術振興事業団, 理化学研究所

出願日:

出願番号:

②海外出願 (0件)

(4)受賞等

なし

(5)その他特記事項

なし

6 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成13年 4月5日	「植物の重力感知の分子機構」グループ関係者のミーティング	科学技術振興事業団 「植物の機能と制御」 研究事務所	9人	植物の重力感知の分子機構の研究を推進するに当たり, その中心的な役割をされると考えられる伸展活性化カルシウム透過チャネルの機能について, 今までの研究成果の報告, それに関するディスカッション, 今後の方針の打合せ.
平成13年 12月5日	「植物の重力感知の分子機構」グループ関係者のミーティング	KKRホテル東京	13人	植物の重力感知の分子機構の研究を推進するに当たり, その中心的な役割をされると考えられる伸展活性化カルシウム透過チャネルの機能について, 今までの研究成果の報告, それに関するディスカッション, 今後の方針の打合せ.

平成14年 6月25日	チーム内打合せ	科学技術振興事業団 「植物の機能と制御」 研究事務所	18人	共同研究者の篠崎一雄先生(理化学研究所)の研究グループ, 長谷部光泰先生(岡崎国立共同研究機構)の研究グループとが一堂に会し, これまでの研究成果を報告, 更に今後の研究方針について討論.
平成15年 1月10日	チーム内打合せ	科学技術振興事業団 「植物の機能と制御」 研究事務所	18人	共同研究者の篠崎一雄先生(理化学研究所)の研究グループ, 長谷部光泰先生(岡崎国立共同研究機構)の研究グループとが一堂に会し, これまでの研究成果を報告, 更に今後の研究方針について討論.
平成15年 10月16日	チーム内打合せ	独立行政法人 科学技術振興機構 「植物の機能と制御」 研究事務所	17人	チームメンバーと, 共同研究者の篠崎一雄先生(理化学研究所)の研究グループが一堂に会し, 植物の重力感知の分子機構で中心的な役割をされると考えられる伸展活性化カルシウム透過チャネルの機能について, これまでの研究成果を報告, 更に今後の研究方針について討論. 11月5日に開かれる領域シンポジウムの発表内容について打合せ.
平成15年 11月5日	「植物の機能と制御」 第1回公開シンポジウム	コクヨホール		
平成16年 6月24日	チーム内打合せ	独立行政法人 科学技術振興機構 東京展示館	17人	チームメンバーと, 共同研究者の篠崎一雄先生(理化学研究所)の研究グループが一堂に会し, 植物の重力感知の分子機構で中心的な役割をされると考えられる伸展活性化カルシウム透過チャネルの機能について, これまでの研究成果を報告, 更に今後の研究方針について討論.
平成17年 2月22日	チーム内打合せ	独立行政法人 科学技術振興機構	18人	チームメンバーと, 共同研究者の篠崎一雄先生(理化学研究所)の研究グループが

		「植物の機能と制御」 研究事務所		一堂に会し、植物の重力感知の分子機構で中心的な役割をされると考えられる伸展活性化カルシウム透過チャネルの機能について、これまでの研究成果を報告、更に今後の研究方針について討論
平成17年 11月15日	チーム内打合せ	独立行政法人 科学技術振興機構 「植物の機能と制御」 研究事務所	19人	チームメンバーと、協同研究者の篠崎一雄先生(理化学研究所)の研究グループが一堂に会し、植物の重力感知の分子機構で中心的な役割をされると考えられる伸展活性化カルシウム透過チャネルの機能について、これまでの研究成果を報告し、更に今後の研究方針について討論。また、1月に開かれる終了シンポジウムの発表内容について打ち合わせ。

(2)招聘した研究者等
なし

7 結び

本研究は、植物において重力や接触刺激の感知にはたらくことが予想されていた SA チャネル候補の遺伝子 (*AtMID1A* と *AtMID1B* と命名) を突き止めたという観点から独創性の高い研究である。これらの遺伝子の欠損株と高発現株を用いた表現型解析によって、*AtMid1A* タンパク質は細胞膜に存在し、根からの Ca^{2+} の取込みに関与し、根における接触刺激応答に必要であること、および *AtMid1A* は重力刺激直後の Ca^{2+} 動員に関与することが示された。後者の発見は本研究課題である植物の重力感知の分子機構を解明する大きな第一歩と位置づけることができる。換言すれば、100年以上もの間多くの研究者が求めてきた植物の重力センサーの候補が初めて明らかになったと言え、学問上大きな意義がある。ただし、目標の達成度の観点から判断すると、その分子機構の解明がなされたというよりは、ようやく分子レベルの解明の糸口を掴んだ段階であり、今後の更なる研究が必要である。

本研究を行なうに当たり、多くの方々にお世話になった。研究グループに加わっていただいた名古屋大学大学院医学研究科の辰巳仁史助教授とその研究室の教授である曾我部正博先生、および所属の学生、研究員の皆様、同じく研究グループに加わっていただいた東京理科大学大学院理工学研究科の朽津和幸助教授とその学生、研究員の皆様に感謝いたします。また、研究グループメンバーにはなっていただけませんでした。本プロジェクト発足の初めからシロイヌナズナの分子生物学的解析で多大のご支援をいただいた理化学研究所植物科学研究センター長の篠崎一雄先生と研究員の片桐健博士に感謝いたします。また、研究に伴う事務を誠意を持って担当して

いただいた「植物の機能と制御」研究事務所の皆様および私の研究室で煩雑な事務作業をてきぱきとこなしていただいた東由美子さんに感謝いたします。

最後に本研究プロジェクトに参加いただいた皆様の集合写真を以下に掲げ、再度の謝意を表します。また、ハードワークにもめげず *AtMID1A* 遺伝子の単離を成功させた現 CREST 研究員の中川祐子博士のスナップ写真も感謝を込めて掲載いたします。

