

「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 教授)

### 「植物の重力感知の分子機構」

#### 1. 研究実施の概要

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・接触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、*AtMIDIA*遺伝子産物 (*AtMID1A*) は予想どおり伸展活性化Ca<sup>2+</sup>透過チャネルの活性をもつこと、などを明らかにした。また、タバコおよびイネの*AtMIDIA/B*遺伝子のホモログも酵母の*midI*変異を相補することを示した。

「研究成果」

平成15年度は以下の研究成果を挙げた。(1) *AtMIDIA*遺伝子のノックアウト株の根は固い寒天培地に接触した後、その培地に侵入することができないことを発見した。この発見は*AtMID1A*が接触刺激応答に関与することを示すものであり、本研究プロジェクトにとって大きな発見である。(2) *AtMIDIA*遺伝子と*AtMIDIB*遺伝子の二重ノックアウト株が樹立できた。この株の生育は野生株や単一ノックアウト株よりも遅かった。(3) イネから動物の電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルのホモログ遺伝子を単離することに成功し、*OsTPC1*と名付けた。(4) *OsTPC1*タンパク質は、電位依存性Ca<sup>2+</sup>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りブロックされたので、確かに電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルであることが示唆された。(5) 出芽酵母のMid1チャネルを精製することができた。(6) 出芽酵母のMid1チャネルは形質膜だけでなく小胞体膜にも局在することを発見した。また、Mid1はジスルフィド結合により多量体を形成することを発見した。

「今後の見通し」

シロイヌナズナの*AtMIDIA*ノックアウト株の根は固い寒天培地に対する接触刺激応答に

異常があることが分かったので、今後のAtMID1AとAtMID1Bの研究の方向性が見えてきた。すなわち、これらの単一および二重ノックアウト株を用いて、根や茎などの接触刺激応答とCa<sup>2+</sup>動態との関係を明確に調べることができる。また、イネの電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル候補*OsTPC1*を単離できたので、既に単離してある*OsMID1*との機能相関を調べることが可能になった。この研究はCa<sup>2+</sup>チャネル研究の先駆的な仕事になると期待される。さらに、出芽酵母のMid1を精製できたので、リポソームに組み込み電気生理学的にチャネル活性を解析できる。以上の研究を通してMid1ファミリーのチャネル機能と生理的役割を分子レベルで解明できる。

## 2. 研究実施内容

(1) *AtMID1A*遺伝子と*AtMID1B*遺伝子のノックアウト株が樹立できたので、それらが物理的刺激に対する応答反応に関与しているかどうかを明らかにすることを第一の目的とした。これまでのところ、AtMID1AとAtMID1Bが重力感知に関与しているという証拠は得ていない。しかし、興味深いことにAtMID1Aが接触刺激応答に関与していることを発見した。使用した方法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*ノックアウト株は下層に根を侵入させることができなかった。ところが、発芽の時点から1.6%のみの寒天培地で生育させると*AtMID1A*ノックアウト株も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。

(2) *AtMID1A*遺伝子と*AtMID1B*遺伝子の二重ノックアウト株が樹立できたので、まず通常の生育条件での生長を観察した。その結果、*AtMID1A AtMID1B*二重ノックアウト株は、播種後発芽までの時間に差はなかったが、子葉の展開、二葉、四葉および六葉の展開において野生株よりも遅くなることが明らかになった。現在この遅れが高濃度Ca<sup>2+</sup>により回復したり、逆に低濃度Ca<sup>2+</sup>により遅れが顕著になるかどうか検討中である。

(3) イネから動物の電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルのホモログ遺伝子を単離することに成功し、*OsTPC1*と名付けた。*OsTPC1*は、先に古市ら(2001)によって単離されていたシロイヌナズナの*AtTPC1*の塩基配列情報をもとにPCR法で取得することができた。この*OsTPC1*が実際にCa<sup>2+</sup>チャネルとして機能し得るのかどうかを明らかにするために、*OsTPC1*の酵母ホモログである*CCH1*遺伝子を欠損した酵母変異株(*cch1*欠損株)に導入した。その結果、*OsTPC1*は*cch1*欠損株の条件致死性を相補することができた。このことは、*OsTPC1*がCa<sup>2+</sup>チャネルとして機能することを示すものである。さらに、*OsTPC1*は、電位依存性Ca<sup>2+</sup>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りブロックされた。以上の結果は、*OsTPC1*が電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルであることを示唆する。これは植物の電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル活性を世界で初めて示したものである。

(4) 出芽酵母のMid1タンパク質を精製することができた。His-tagとV5エピトープを付けたMid1の組換え体が大腸菌で発現させ、Ni-NTAカラムとイオン交換カラムを用いて精製

した。精製標品をCa<sup>2+</sup>内包リポソーム上に再構成させ、低浸透圧下に置いた。その結果、Mid1を含まないコントロールのCa<sup>2+</sup>内包リポソームに比べ、Mid1を含むCa<sup>2+</sup>内包リポソームはより多くのCa<sup>2+</sup>を放出した。この結果はMid1が単独で伸展活性化Ca<sup>2+</sup>透過チャネル活性をもつことを示唆するものである。

(5) 特異的抗体を用いた間接蛍光抗体法と細胞分画法を用いて、出芽酵母のMid1タンパク質は形質膜だけでなく小胞体膜にも局在することを発見した。小胞体はCa<sup>2+</sup>ストアとして重要な細胞内小器官である。また、Mid1はジスルフィド結合により多量体を形成することを、非還元条件下における電気泳動法により発見した。これらの知見は、シロイヌナズナとイネのAtMID1の機能解明にヒントを与えるものである。

### 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

- Abe, F., Iida, H.  
Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, Bull and Bul2.  
*Mol. Cell. Biol.* **23** : pp 7566-7584, 2003
- Yoshimura, H., Tada, T., Iida, H.  
Subcellular localization and oligomeric structure of the yeast putative stretch-activated Ca<sup>2+</sup> channel component Mid1  
*Exp. Cell Res.* **293** : pp 185-195, 2004
- Tada, T., Ohmori, M., Iida, H.  
Phe<sup>356</sup> in the yeast Ca<sup>2+</sup> channel component Mid1 is a key residue for viability after exposure to  $\alpha$ -factor

Biochem. Biophys. Res. Commun. **313** : pp 752-757, 2004

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0 件 (CREST研究期間累積件数：2 件)