

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名「植物の重力感知の分子機構」

### 2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

飯田 秀利 (東京学芸大学教育学部 教授)

主たる研究代表者

辰巳 仁史 (名古屋大学医学研究科 助教授(平成12年12月～))

朽津 和幸 (東京理科大学理工学部 教授(平成13年12月～))

### 3. 研究内容及び成果

#### 3-1. 研究課題全体の研究内容

植物が如何にして重力を感知するのか、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  $\text{Ca}^{2+}$  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、 $\text{Ca}^{2+}$ 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  $\text{Ca}^{2+}$ 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  $\text{Ca}^{2+}$ 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。

#### 3-2. 研究成果

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(MID1 遺伝子)を真核生物では世界で初めて特定していた。この MID1 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を目標とした。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

- 遺伝子単離と構造上の特徴(飯田グループ): 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%、AtMid1B 間で 13.6%であった。AtMid1A と AtMid1B 間の identity は 73.0%であった。
- 発現部位(飯田グループ): 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し、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。

- 高発現株の作出と生育(飯田グループ)：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 高発現株は、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日目で枯死する株から種子は作るが、矮小化する株まで多様であり、生育に阻害的に働く。また、この阻害効果は高  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度培地で育てると顕著となり、逆に低  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度培地で育てると軽減された。これらの結果は AtMid1A が  $\text{Ca}^{2+}$ 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。
- 欠損株の作出と生育(飯田グループ)：AtMID1A および AtMID1B 遺伝子の欠損植物体(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  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカーである  $\text{Mg}^{2+}$ 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  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{Ca}^{2+}$ の取込みに関与していることを示唆していた。
- AtMid1A のチャネル機能(その1)(辰巳グループ)：SA チャネル活性をもつかどうかを調べるために、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った。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  $\text{Ca}^{2+}$ 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。
- AtMid1A のチャネル機能(その2)(辰巳グループ)：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  $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光指示薬 fura-2 を導入し、蛍光顕微鏡下でシリコン膜に伸展刺激を行なった結果、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ が上昇することを確認した。上昇は細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ の流入によって起こり、 $\text{Gd}^{3+}$ 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。
- AtMid1A のチャネル機能(その3)(辰巳グループ)：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。 $\text{Ca}^{2+}$ 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  $\text{LaCl}_3$ 、 $\text{GdCl}_3$ 、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  $\text{Ca}^{2+}$ 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。
- AtMid1A は重力刺激応答と接触刺激応答に必要(飯田グループ;辰巳グループ)：エクオリン発現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  $\text{Ca}^{2+}$ 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入ることができる条件下で、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。

○イネとタバコの MID1 ファミリー遺伝子(朽津グループ): 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 (OsMID1 と命名) を発見した。OsMID1 はイネゲノムに1コピー存在した。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。推定二次構造を比較すると、OsMid1 と AtMid1A/B 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 のオースログ (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 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 MID1 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、MID1 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。

○イネ、タバコの MID1 ファミリー遺伝子の機能(朽津グループ): 出芽酵母の mid1 変異株にイネの OsMID1 遺伝子を導入した結果、OsMID1 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 NtMID1A でも得られた。したがって、OsMid1 と NtMid1A は、酵母細胞内で  $\text{Ca}^{2+}$  流入に関連した機能をもつことが示唆された。

○イネとタバコの MID1 ファミリー遺伝子産物の発現(朽津グループ): 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 解析を行った結果、いずれの組織においても OsMID1 遺伝子の発現が確認された。この結果は、OsMID1 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 3 5 S:GFP: NtMID1A/B, 3 5 S: NtMID1A/B:GFP の局在部位を BY-2 細胞を用いて解析中である。

○イネとタバコの MID1 ファミリー遺伝子の発現抑制株の作出と機能解析(朽津グループ): RNAi 法を用いた OsMID1 発現抑制株を作出した。その培養細胞では、増殖に対する  $\text{Ca}^{2+}$  感受性が低下していた。また、通常の生育条件下において OsMID1 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  $\text{Ca}^{2+}$  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、NtMID1A/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。

○イネ OsMID1 発現抑制株における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の動態(朽津グループ): 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 OsMID1 発現抑制株との間で比較した結果、OsMID1 発現抑制株では低浸透圧刺激により誘導される  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  動員は、野生株と OsMID1 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。

○出芽酵母の Mid1 の機能解析(飯田グループ)：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 MID1 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。

○Mid1 と Cch1 の協調(飯田グループ)：出芽酵母の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  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 CCH1 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  $\text{Ca}^{2+}$  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。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待:口頭		ポスター		報道	特許
国内	国外	国内	国外	国内	国外		
1	15	21	1	33	2	0	2

○論文口頭発表数とも必ずしも充分とは言えない。また AtMID1 の単離・同定に関する論文も纏められることを希望する。ただし、本プロジェクトが取り上げた課題の生物学における重要性とそれに伴う困難さを勘案すると理解できる面もあるが、タイムリーな発表を心掛けて欲しい。

○もともと知財を確保すべき課題とは位置付けられていないが、植物の重力センサーとしての主要遺伝子 AtMID1A,B は確保されている。今後の展開によっては重要な知財となる可能性がある。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

- 総合的には、本研究の目的は“植物がどのように重力を感知するか、伸展性チャンネルというタンパク質の機能を中心に解明する”という観点から成果を評価すると、プロジェクト期間内に明確に答えるに至らなかったことから高い評価を与えることはできない。しかし、本プロジェクトの設定課題は、植物学が昔から抱えてきて未だに解決できない難しい問いに対して、突破口と考えた AtMID1 遺伝子をもって真正面から答えようとしたチャレンジングな課題であった。本プロジェクトが解決しようとした課題は当初から困難さが予想されており、その意味では想定範囲内(厳しい予想側の結果であったことは残念だが)ということも言える。
- 科学技術の貢献に関しては、既に述べたように、本研究の設定課題に明確に答えることができれば、それはダーウィン以来の疑問に本プロジェクトが答えることができたことになったが(その意味では極めて大きなインパクトを持ち得たが)、今後の展開に期待したい。
- 今後の展開としては、本研究プロジェクトによって植物がどのように重力を感知するかの基礎的知見の集積はあったものの、明確な結果は得られなかった。研究代表者等はこのプロジェクト終了後も、重要ではあるが極めて難しい本研究課題をどのような戦略で攻めるのか、CREST での成果を基礎にして努力して欲しい。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

- 本プロジェクト採用時に、課題担当者が提案したこのプロジェクトの目的は、既に記載してきたように、極めてチャレンジングで魅力的なものであった。そしてその魅力は今でも変わっていない。このプロジェクトが目指した課題は重要であり、かつ困難なものであることは改めてここで特記しておきたい。このようなチャレンジングな課題を CREST のような大型のプロジェクトで果敢に取り上げていくことは、チャレンジングな課題が常に大きいリスクを伴うことを考えると、CREST 本来の趣旨にも合致しているのではないかと考える。