

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：12604

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370017

研究課題名（和文） シロイヌナズナの物理刺激感受における新規機械受容性カルシウムチャンネルの役割解明

研究課題名（英文） Roles of novel mechanosensitive calcium channels in perception of physical stimuli in Arabidopsis

研究代表者

飯田 秀利 (IIDA HIDETOSHI)

東京学芸大学・教育学部・教授

研究者番号：70124435

研究成果の概要（和文）：我々が2007年に報告したシロイヌナズナの機械受容性カルシウムチャンネルの有力候補であるMCA1とMCA2に着目し、物理刺激の感受における役割を研究した。その結果、MCA1は根端に発現しており、寒天培地の固さを感じてを明らかにした。一方MCA2は根端に発現しておらずその感受には関与しないことも明らかにした。更に、MCA1とMCA2は低温の感受にも関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this project, we studied on the roles of novel mechanosensitive calcium channel candidates, MCA1 and MCA2, in perception of physical stimuli in Arabidopsis. The two proteins were first reported by our research group in 2007. Here, we have shown that MCA1, which is expressed at the root tip, is involved in perception of hardness of agar medium. By contrast, MCA2, which is not expressed there, is not responsible for perception of it. In addition, we have shown that both MCA1 and MCA2 function in perception of cold shock.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、機械・低温刺激

1. 研究開始当初の背景

あらゆる生物にとって物理的の刺激を感じて応答することは生存に必須のことである。このことは植物でも例外ではない。例えば物理的の刺激の一種である接触を感じて、茎や根は伸長の方向を変えて光や栄養をより多く獲得しようとする。また、低温にさらされると、植物は耐冷性や耐凍性を獲得するための準備を始める。

植物における接触刺激の研究は、古くはチャールズ・ダーウィンの著書 *The Movements and Habits of Climbing Plants* (1888)にまで遡ることができる。それ以来、長年多くの研究者が機械刺激応答のメカニズムを研究してきた。その結果、接触刺激応答には Ca^{2+} が重要なセカンドメッセンジャーであることが明らかになり、 Ca^{2+} によって活性化する機能タンパク質のいくつかが明らかになっ

た。ただし、機械刺激を感受して Ca^{2+} シグナルを発生させるタンパク質（すなわち機械受容性 Ca^{2+} チャネル）の分子の実体は不明のままであった。

このような状況下で、我々は先にシロイヌナズナの新規の機械受容性 Ca^{2+} チャネル候補の遺伝子 (*MCA1* と命名) を特定することに成功した (Nakagawa *et al.*, 2007)。MCA1 タンパク質は全長にわたる既知のいかなるイオンチャネルとも相同性がないが、膜貫通セグメントをもち、いくつかの推定上の機能ドメインをもつ。しかも、特徴的な N-half と C-half が coiled-coil で連結されている構造をしている。また N-half には Ca^{2+} 結合ドメイン様配列が存在する。ノーザンブロット法で調べると、MCA1 は植物体のどの器官でも発現しており、また細胞膜に局在している。さらに、MCA1 は根からの Ca^{2+} の取込みに関与しており、*mca1* 欠損植物体の初生根は、寒天培地の固さを感受できない。また、シロイヌナズナゲノムには、MCA1 とアミノ酸配列上 73% 同一な MCA2 があり、両者の構造上の特徴も互いに良く似ている。

低温刺激を与えた場合にも瞬時に細胞内 Ca^{2+} 濃度が一過的に上昇する (Knight MR *et al.*, *Nature* **352**:524-526, 1991)。その Ca^{2+} シグナルは、順次 (1) カルモデュリン、(2) 低温誘導性転写因子 CBF (C-repeat 結合因子=DREB1)、(3) C-repeat element (CRT) をもつ低温誘導性遺伝子群 (*COR*)、の活性化を引き起す (Knight MR, *Phil Trans R Soc Lond B*, **357**:871-875, 2002)。ここにおいても、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起すのは細胞膜に存在する機械受容性 Ca^{2+} チャネルであることがイオンチャネルブロッカーを用いた研究から示唆されている (Sangwan V *et al.*, *Plant J.* **27**:1-12, 2001)。しかし、接触刺激の場合と同様に、このチャネルの分子の実体は不明である。このような背景の基に、予備実験により、*mca1 mca2* 二重欠損株の芽生えにおいて、低温刺激直後の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が野生株芽生えよりも低いことを発見した。

2. 研究の目的

本研究では上記の背景と予備実験の結果を踏まえ、接触刺激と低温刺激の感受と応答における MCA1 と MCA2 の役割を明らかにする。さらに、上述のように MCA1 と MCA2 は新規の機械受容性 Ca^{2+} チャネルである可能性が高いので、構造と機能の相関も明らかにする。

3. 研究の方法

接触刺激の研究においては、我々の開発した二層寒天法を用いる。この方法は下層に 1.6% の寒天 MS 培地、上層に 0.8% 寒天 MS 培地を作り、その上に播種する。播種後、発芽・生育とともに初生根は伸長し、上層から下層

へと侵入しようとする。この時、実際に侵入できた割合を、野生株と欠損株で比較する。これにより、MCA1 と MCA2 が初生根において寒天の固さを感受し、応答することに関与しているか否かを判定する。

Ca^{2+} 取込み能を測定するには、播種後通常の MS 培地で 21 日間栽培した後、14 日間水耕栽培する。その後、シュートを切り捨て、根を $^{45}\text{CaCl}_2$ を含む取込み溶液に浸け、20 日間培養し、根に取込まれた $^{45}\text{Ca}^{2+}$ をシンチレーションカウンターで計測する。

MCA1 と MCA2 の構造機能相関を調べるために、酵母発現系を作製した (Nakano *et al.*, 2011)。タンパク質を *in vitro* mutagenesis 法で N 末端および C 末端から部分切除して、どの部位が Ca^{2+} 取込みに必要十分であるかを調べた。

4. 研究成果

二層寒天法を用いた研究成果は以下のとおりである。まず、野生株は上層寒天培地から下層寒天培地へと初生根を侵入させることができるが、*mca1* 欠損株の初生根はそれを行えないことは既に報告している (Nakagawa *et al.*, 2007)。本研究では、*mca2* 欠損株と *mca1 mca2* 二重欠損株を作出し、同様の実験を行った。その結果、*mca2* 欠損株の初生根は野生株の初生根と同じように、上層から下層へと初生根を侵入させることができた。一方、*mca1 mca2* 二重欠損株の初生根は、*mca1* 欠損株の初生根と同じようにそれを行えなかった。このことは、MCA1 が初生根において寒天の固さを感受し応答することに関与していることを示唆している (Yamanaka *et al.*, 2010)。

MCA1 と MCA2 はタンパク質の構造上は良く似ているが、どうしてような役割の違いが生じるのであろうか。この原因を探るために、GUS 染色法で MCA1 と MCA2 の発現部位を調べた。その結果、MCA1-GUS は根端に発現していたが、MCA2-GUS はこの部位に発現していなかった。したがって、根端における発現の有無が、MCA1 と MCA2 の役割の違いを生じさせている可能性が考えられた。

MCA1 と MCA2 の役割の違いは根における Ca^{2+} 取込みにも見られた。*mca1* 欠損株は野生株と同様の Ca^{2+} 取込み能を保持していたが、*mca2* 欠損株と *mca1 mca2* 二重欠損株は Ca^{2+} 取込み能が低下していた。このことは、根において、栄養としての Ca^{2+} を取込むのは MCA1 よりも MCA2 が主に担っていることを示唆する。

MCA1 と MCA2 の構造機能相関を調べる実験の結果、両タンパク質ともに C 末端から約半分を切除された N 末端領域が Ca^{2+} 取込みに必要十分であることが明らかになった。この領域には 1 つがけ推定上の膜貫通領域 (TM1) が

存在し、しかもこの TM1 には Ca^{2+} と相互作用し得るアスパラギン酸(Asp²¹)残基が存在する。そこで、TM1 欠損タンパク質、および Asp を Asn に置換した変異タンパク質 D21N を作製し、活性を調べた。その結果、MCA1 と MCA2 の両方において、TM1 欠損タンパク質も D21N タンパク質も Ca^{2+} 取込み能が無くなるかまたは著しく低下した。この結果は、TM1 が膜貫通して Ca^{2+} を透過させるポアを形成することを示唆する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Furuichi, T., Iida, H., Sokabe, M., and Tatsumi, H. Expression of arabidopsis MCA1 enhanced mechanosensitive channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Plant Signal. Behav.* 査読有、7 巻、2012、印刷中
- ② Nakayama, Y., Yoshimura, K., and Iida, H. A gain-of-function mutation in gating of *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 causes constitutive glutamate secretion. *Appl. Environ. Microb.* 査読有、2012、印刷中
- ③ Zanni, E., Franco, M., Nakano, M., Iida, H., Palleschi, C., Uccelletti, D. *KIMIDI* a relevant key player between ER homeostasis and mitochondrial dysfunction in *Kluyveromyces lactis*. *Microbiol.* 査読有、2012、印刷中
- ④ Kurusu, T., Yamanaka, T., Nakano, M., Takiguchi, A., Ogasawara, Y., Hayashi, T., Iida, K., Hanamata, S., Shinozaki, K., Iida, H., and Kuchitsu, K. Involvement of the putative Ca^{2+} -permeable mechanosensitive channels, NtMCA1 and NtMCA2, in Ca^{2+} uptake, Ca^{2+} -dependent cell proliferation and mechanical stress-induced gene expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells. *J. Plant Res.* 査読有、2012、DOI : 10.1007/s10265-011-0462-6
- ⑤ Kurusu, T., Nishikawa, D., Yamazaki, Y., Gotoh, M., Nakano, M., Hamada, H., Yamanaka, T., Iida, K., Nakagawa, Y., Saji, H., Shinozaki, K., Iida, H., Kuchitsu, K. Plasma membrane protein OsMCA1 is involved in regulation of hypo-osmotic shock-induced Ca^{2+} influx and modulates generation of reactive oxygen species in cultured rice cells. *BMC Plant Biol.* 査読有、12 巻、2012、P11
- ⑥ Nakano, M., Iida, K., Nyunoya, H., and Iida, H. Determination of structural regions important for Ca^{2+} uptake activity in Arabidopsis MCA1 and MCA2 expressed in yeast. *Plant Cell Physiol.* 査読有、52 巻、2011、P1915-1930
- ⑦ Fujiu, K., Nakayama, Y., Iida, H., Sokabe, M., and Yoshimura, K. Mechanoreception in motile flagella of Chlamydomonas. *Nat. Cell Biol.* 査読有、13 巻、2011、P630-633
- ⑧ Yamanaka, T., Nakagawa, Y., Mori, K., Nakano, M., Imamura, T., Kataoka, H., Terashima, A., Iida, K., Kojima, I., Katagiri, T., Shinozaki, K., and Iida, H. MCA1 and MCA2 that mediate Ca^{2+} uptake have distinct and overlapping roles in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 査読有、152 巻、2010、P1284-1296
- ⑨ Teng, J., Iida, K., Ito, M., Izumi-Nakaseko, H., Kojima, I., Adachi-Akahane, S., and Iida, H. Role of glycine residues highly conserved in the S2-S3 linkers of domains I and II of voltage-gated calcium channel α_1 subunits. *Biochim. Biophys. Acta.* 査読有、1798 巻、2010、P966-974

[学会発表] (計 26 件)

- ① 中山 義敬、飯田 秀利、分裂酵母の低浸透圧ショック応答に必要な機械受容チャネル、日本農芸化学会大会 2012、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学 (京都市)
- ② 中野正貴、飯田和子、丹生谷博、飯田秀利、酵母細胞を利用したシロイヌナズナの MCA1 と MCA2 の低浸透圧応答性の研究、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学 (京都市)
- ③ 飯田秀利、出芽酵母と植物に固有の Ca^{2+}

- チャネル— その構造と役割、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学（京都市）
- ④ 中野正貴、飯田和子、丹生谷博、飯田秀利、シロイヌナズナの Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル候補 MCA1 と MCA2 の Ca^{2+} 取込み活性に重要な領域の特定、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜（横浜市）
 - ⑤ 中野正貴、飯田和子、丹生谷博、飯田秀利、シロイヌナズナの Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル候補 MCA1 と MCA2 の Ca^{2+} 取込み活性に重要な領域の特定、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜（横浜市）
 - ⑥ Nakayama, Y., Yoshimura, K. and Iida, H., Mechanosensitive channels essential for survival upon hypo-osmotic shock in fission yeast、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜（横浜市）
 - ⑦ 鎌野俊平 飯田和子、雷 凱健、飯田秀利、シロイヌナズナの Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル候補 MCA1 および MCA2 の膜トポロジーの決定、2011 年 12 月 15 日、第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（横浜市）
 - ⑧ 飯田秀利、植物の機械刺激受容と Ca^{2+} シグナリング、日本植物学会第 75 回大会、2011 年 9 月 17 日、東京大学駒場キャンパス（東京都）
 - ⑨ 中野正貴、飯田秀利、飯田和子、丹生谷博、酵母細胞を利用したシロイヌナズナの MCA1 および MCA2 の Ca^{2+} 取込み活性に重要な領域の特定、第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 20~22 日、東北大学（仙台市）
 - ⑩ 岩元明敏、豊田理沙、飯田秀利、 Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル候補遺伝子 MCA1, MCA2 がシロイヌナズナの根端成長に及ぼす影響の細胞動力的解析、第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 20~22 日、東北大学（仙台市）
 - ⑪ Iida, H.、Novel mechanosensors generating calcium signals - a lesson from plants、第 88 回日本生理学会大会第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会、2011 年 03 月 28 日、パシフィコ横浜（横浜市）
 - ⑫ 中野正貴、飯田和子、丹生谷博、飯田秀利、シロイヌナズナの Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル候補の酵母発現系を用いた構造と機能の解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 7~10 日、神戸ポートアイランド（神戸市）
 - ⑬ 飯田秀利、中野正貴、原茂恵美子、今村朋美、飯田和子、重松秀樹、永山國昭、カルシウム透過性機械受容チャネルの構造と機能、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 7~10 日、神戸ポートアイランド（神戸市）
 - ⑭ 原茂恵美子、飯田秀利、 Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル候補 MCA1 および MCA2 の欠損株のイオンストレス感受性、日本植物学会第 74 回大会、2010 年 09 月 9 日~11 日、中部大学（春日井市）
 - ⑮ 中野正貴、飯田和子、原茂恵美子、今村朋美、森研堂、丹生谷博、飯田秀利、環境ストレス応答に関与する Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル候補 MCA1 および MCA2、日本植物学会第 74 回大会、2010 年 09 月 9 日~11 日、中部大学（春日井市）
 - ⑯ 大富泰弘、曾我康一、若林和幸、飯田秀利、保尊隆享、シロイヌナズナ MCA 変異体の成長に対する重力の影響、日本宇宙生物科学会第 24 回大会、2010 年 09 月 17~18 日、東北大学（仙台市）
 - ⑰ Tatsumi, H., Iida, H., Sokabe, M., Furuichi, T., Toyota, M.、Molecular mechanism of gravity-sensing in Arabidopsis seedlings、日本宇宙生物科学会第 24 回大会、2010 年 09 月 17~18 日、東北大学（仙台市）
 - ⑱ Nakano, M., Iida, K., Nyunoya, H., Iida, H.、Molecular study on Arabidopsis Ca^{2+} -permeable mechanosensitive channel candidates using yeast、第 21 回シロイヌナズナ国際研究会、2010 年 06 月 6~10 日、パシフィコ横浜（横浜市）
 - ⑲ 中野正貴、飯田和子、丹生谷博、飯田秀利、出芽酵母を用いたシロイヌナズナの Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル候補の構造と機能の解析、第 50 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18~21 日、熊本大学（熊本市）

- ⑳ 平出恵利華、後藤純、三上薫、岩崎滋美、宇井千明、飯田秀利、出芽酵母の Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル候補 Mid1 と Zds1/Zds2 の物理的・遺伝的相互作用の解析、第 32 日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜（横浜市）
- ㉑ Nakano, M., Iida, K., Nyunoya, H., and Iida, H.、Structure-function analysis of Arabidopsis Ca^{2+} -permeable mechanosensitive channel candidates using a yeast Ca^{2+} channel mutant、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜（横浜市）
- ㉒ 飯田 秀利、Structure and function of potential Ca^{2+} -permeable mechanosensitive channels in Arabidopsis thaliana、第 8 回統合バイオサイエンスシンポジウム、2009 年 11 月 18 日、ヤマハリゾートつま恋（掛川市）
- ㉓ 飯田 秀利、生き物が重力を感じる仕組み、筑波宇宙センター 公開市民講座「きぼう」の小さな宇宙飛行士たち –いろいろな生き物を宇宙につれて行くのはなぜだろう？–、2009 年 10 月 4 日、筑波宇宙センター（つくば市）
- ㉔ 今村 朋美、飯田 秀利、 Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル候補 MCA1 および MCA2 欠損株の塩ストレス感受性、日本植物学会第 73 回大会、2009 年 9 月 17~20 日、山形大学（山形市）
- ㉕ Teng, J., Izumi-Nakaseko, H., Iida, K., Kojima, I., Adachi-Akahane, S., Iida, H.、Role of glycine residues highly conserved in the domain I/II S2-S3 linkers of voltage-gated calcium channel $\alpha 1$ subunits、第 36 回国際生理学会世界大会、2009 年 7 月 29 日、国立京都国際会館（京都市）
- ㉖ 重松秀樹、飯田和子、中野正貴、飯田秀利、永山國昭、Structural analysis of Arabidopsis Mca2 using Zernike phase-contrast images、日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会、2009 年 5 月 26~29 日、仙台国際センター（仙台市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u-gakugei.ac.jp/~iida/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 秀利 (IIDA HIDETOSHI)
東京学芸大学・教育学部・教授
研究者番号：70124435

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

飯田 和子 (IIDA KAZUKO)
東京都医学総合研究所・主任研究員
研究者番号：40151229

岩野 恵 (IWANO MEGUMI)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号：50160130