

「カルモデュリンを介した細胞死抑制機構の研究」

先端生命科学専攻植物細胞機能制御学分野 保里 善太
指導教官 内宮 博文教授

キーワード：細胞死、老化、アポトーシス、カルシウムシグナリング、カルモデュリン、*BI-1*

<序論>

植物におけるプログラム細胞死は、病原菌やウィルスの感染に対して生じる過敏感細胞死や、維管束形成時等に見られる重要な現象である。動物のプログラム細胞死であるアポトーシスでは、Bcl-2 ファミリータンパク質がその制御に重要な役割を果たしているが、植物にはこれらの相同遺伝子は発見されていない。それにもかかわらず動物のプログラム細胞死を促進する因子である Bax を植物で発現させると、アポトーシス様細胞死を引き起こすことが報告されている。このことは細胞死の制御機構が進化上である程度保存されていることを示している。

AtBI-1 (*Arabidopsis thaliana* Bax Inhibitor-1)は酵母における Bax 誘導性細胞死を抑制する因子としてシロイヌナズナより単離された。本因子を植物において過剰発現すると過酸化水素、サリチル酸等により引き起こされる細胞死を抑制することから、酸化ストレスに対する応答に関与していると考えられている。本因子は 7 回膜貫通領域を有する小胞体膜タンパク質で、C 末端領域は coiled-coil 構造を形成していると推測されている。この C 末端領域の 14 アミノ酸を欠損させた AtBI-1 タンパク質は細胞死抑制因子としての活性を失うことから、この領域が AtBI-1 の機能に重要であることが明らかとなっている。さらに最近では、オオムギの病原抵抗性遺伝子でありカルモデュリン (CaM)結合性が示されている MLO と AtBI-1 との機能的類似性が報告されている。

本研究では、こうした知見を背景に AtBI-1 の細胞死抑制機構におけるカルモデュリンの関与を明らかにすることを目的として研究を行った。



図 1 AtBI-1 過剰発現細胞 (AtBI-GFP2) は H_2O_2 による細胞死を抑制する

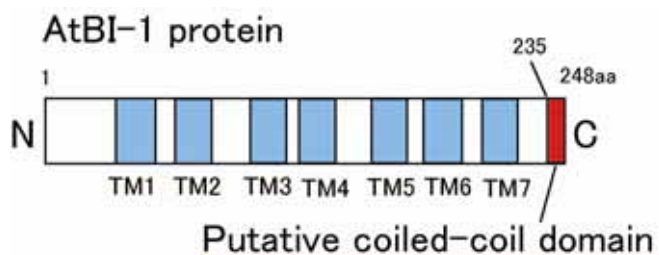


図 2 . AtBI-1 タンパク質の構造
7 回膜貫通領域を持つ小胞体膜タンパク質で、C 末端側は coiled-coil 構造を形成していると予想されている。C 末端側がサイトゾル中に突出している。

<結果と考察>

1 . AtBI-1 と AtCaMs の結合解析

すでにオオムギの MLO との結合性が示唆されているオオムギのカルモデュリン (HvCaM3) と AtBI-1 との結合解析を Split-ubiquitin 法により行った。この結果、AtBI-1 と HvCaM3 との結合性が確認された。次に、シロイヌナズナのカルモデュリン (AtCaMs) との結合解析を行うために、シロイヌナズナのゲノムデータベースを BLAST 検索して、*AtCaMs* 遺伝子の探索を行った。その結果シロイヌナズナには 16 種類の遺伝子が存在することが明らかとなった。このうちサブファミリーごとに 1 つ、計 7 つの遺伝子 *AtCaM3*, *AtCaM6*, *AtCaM7*, *AtCaM8*, *AtCaM9*, *AtCaM10*, *AtCaM11* を選択し、結合実験に用いた。AtBI-1 の C 末端側 14 アミノ酸を欠損した

酵母では Bax が引き起こす細胞死を抑制しないことが知られており、この領域が細胞死抑制活性に必須と考えられている。Overlay assay 法を用いて 7 種類の AtCaMs と AtBI-1 の C 末端側 14 アミノ酸との結合実験を行った結果、少なくとも 3 種類 (AtCaM3, AtCaM6, AtCaM7) が結合することが明らかとなった。AtBI-1 の C 末端側 14 アミノ酸への結合が coiled-coil 構造を介したものであるかを検証するために、この部位のアミノ酸を置換して coiled-coil 構造をとる可能性を低下させたタンパク質と AtCaM7 との結合実験を行った。この結果、coiled-coil 構造を形成する確率が低いタンパク質では、AtCaM7 との結合が極端に弱くなっていることがわかった。また、これらのタンパク質では酵母における Bax 誘導性細胞死の抑制活性も消失しており、CaM との結合が AtBI-1 の細胞死抑制能に重要であることが明らかとなった。

さらに AtCaM7 と AtBI-1 の結合が植物体内でも起こっているかを検証するために、Split-YFP 法を用いてタバコ BY-2 細胞内にて結合を解析した。この結果、核周辺に蛍光が観察された。

2. AtCaM7 及び AtBI-1 の発現解析

AtCaM7 と AtBI-1 遺伝子の植物体内での組織別の発現パターンを、野生型のシロイヌナズナの植物体を用いてノーザン解析により調べた。その結果、AtCaM7 と AtBI-1 はともに茎生葉、根、花で mRNA の蓄積量が多いことが示され、類似の発現パターンを示すことが分かった。これにより AtCaM7 と AtBI-1 遺伝子が植物体内で同時に発現して相互作用していることが考えられた。また葉の老化の際の AtCaM7 と AtBI-1 遺伝子の発現量を調べた。播種後 5 週目のロゼットの成葉と播種後 8 週目のロゼットの黄化した老化葉をノーザン解析した結果、AtCaM7、AtBI-1 共に老化葉では 2 倍以上の mRNA の蓄積が見られた。これらの結果は酸化ストレスに応答して両者が協調的に働いていることを示唆している。

3. 植物における AtCaMs 遺伝子の機能解析

AtCaM2、AtCaM9、AtCaM10 に T-DNA の挿入されたシロイヌナズナの植物体を得て、その表現型の観察を行った。その結果、野生型と比較して特に大きな変化は観察されなかった。現在、これら T-DNA 挿入変異体の遺伝子発現の解析を行っているところである。また、今後は酸化ストレス等に対して感受性になっているかを解析する予定である。

AtCaMs 遺伝子は相同遺伝子が 16 種類と数多くあるため、単一の遺伝子をノックアウトしただけでは、ほかの遺伝子とその機能を相補する可能性が考えられる。そのために、RNAi 法を用いて AtCaMs 遺伝子の一括サイレンシングも試みている。

<まとめと展望>

本研究により、1) AtBI-1 は最低 3 種類の AtCaMs と特異的に結合するカルモデュリン結合タンパク質であること 2) AtBI-1 の C 末端側 coiled-coil 領域に AtCaMs が結合すること 3) 植物体内では AtCaM7 と AtBI-1 は類似の発現パターンを示すこと、の 3 点が示された。

今後は AtCaMs の T-DNA 挿入変異体がストレスに対して感受性になっているのかを活性酸素種を用いた実験から明らかにしていきたい。また AtCaMs が結合することにより、AtBI-1 の機能がどのように変化するのかを明らかにしていきたい。

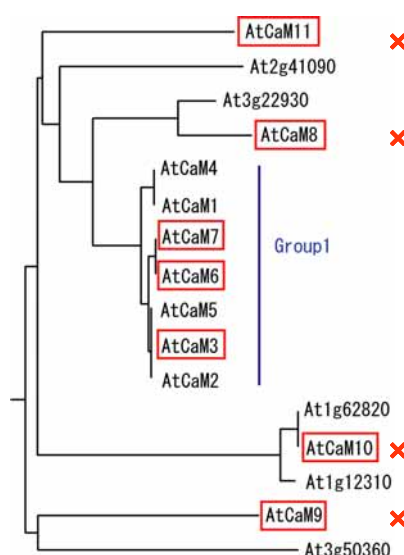


図 3 . シロイヌナズナのカルモデュリンの分子系統樹

は AtBI-1 との結合性が確認できたもの、×は結合性が確認されなかったものを示す

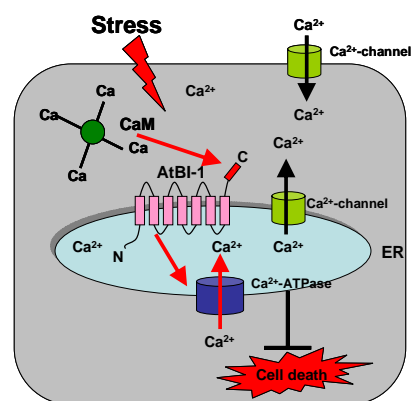


図 4 . 細胞内における AtBI-1 と CaMs のモデル図