

### 3-4 客員部門

#### 飯田 秀利 (客員教授)

1) 専門領域：分子細胞生物学

2) 研究課題：

- a) シロイヌナズナの  $\text{Ca}^{2+}$  透過性機械受容チャネル候補 MCA1 および MCA2 の構造と機能に関する研究
- b) 出芽酵母の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性機械受容チャネル Mid1 と電位作動性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルホモログ Cch1 の構造機能協関の解明

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 本研究の目的は、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性機械受容チャネル候補 MCA1 および MCA2 の構造と機能を明らかにすることである。これまで多くの人の研究から、機械刺激センサーの有力候補は  $\text{Ca}^{2+}$  透過性機械受容チャネル (MS チャネル) であることが示唆されている。本センターで研究を始める段階で、その MS チャネル候補として、我々のグループがシロイヌナズナの MCA1 と MCA2 を特定していた (Nakagawa *et al.*, *PNAS* **104**:3639-3644)。MCA1 と MCA2 はアミノ酸配列上互いに73%同一であり、両者は共通の構造上の特徴 (すなわち、N-half の推定上の制御領域、EF-hand-like モチーフ、coiled-coil モチーフ、PLAC8 モチーフ、システインリッチ領域、および膜貫通セグメント) をもっている。

本年度の研究では、EF-hand-like モチーフの  $\text{Ca}^{2+}$  結合能を酵母発現系を利用して調べ、MCA1 と MCA2 は確かに  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  を結合することを明らかにした。 $\text{Ca}^{2+}$  結合は MCA1 と MCA2 の活性を調節する可能性が考えられる。また、酵母で発現させた MCA1 も MCA2 も、非還元条件での SDS-PAGE により 2 量体および 4 量体を形成することが示唆された。

また、本センターの永山國昭教授と重松秀樹博士との共同研究により、MCA2 を精製し、ゼルニケ位相差低温電子顕微鏡により立体構造を観察した。その結果、まず精製した MCA2 も 2 量体と 4 量体を形成することを明らかにした。その上で、顕微鏡像の単粒子解析により、MCA2 は 4 量体を形成していることを明らかにした。

さらに、MCA1 と MCA2 の生体における機能を解明する一環として、*mca1* 欠損株と *mca2* 欠損株の低温ショック後の  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  の上昇をモニターした。その結果、両欠損株において低温ショック後の  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  の上昇が野生株よりも約半分に低下していた。この結果は、MCA1 と MCA2 が機械刺激だけでなく低温刺激の感知にも関与していることを示唆している。植物ゲノムには TRP チャネルホモログは存在しないので、MCA1 と MCA2 が植物において TRP チャネル様の多様な役割を担っている可能性が考えられる。

- b) 出芽酵母には、動物の電位作動性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの  $\alpha_1$  サブユニットのホモログである Cch1 が存在する。この遺伝子の存在は1997年に発見されたものの、大腸菌に“毒性”を示すので、これまで誰もクローニングができず、研究が遅れていた。我々の研究グループは大腸菌細胞内でのコピー数を少なく維持できるプラスミドを開

発することにより、昨年度 *CCHI* 遺伝子をクローニングすることに成功した (Iida *et al.*, *JBC* 282:25659-25667, 2007)。

クローン化した *CCHI* を利用して、出芽酵母内で Cch1 タンパク質を高発現させて  $\text{Ca}^{2+}$  流入の上昇を調べたが、全く上昇しなかった。ところが、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性機械受容チャネル活性をもつ Mid1 タンパク質を同時に高発現させると、 $\text{Ca}^{2+}$  流入が上昇した。つまり、Cch1 と Mid1 は協調してはたらくことが明らかになった。

次に Cch1 と Mid1 を共に高発現する細胞株を使って、電位作動性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルのブロッカーに対する感受性を調べることにより、Cch1 が薬理的にどのタイプの  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに分類されるのかを調べた。その結果、Cch1 はLタイプのチャネルのブロッカーであるニフェジピンとベラパミルに感受性を示したが、P/Q, N, R, および T のタイプのブロッカーには全く感受性を示さなかった。興味深いことに、Lタイプのチャネルブロッカーではあるが化学的にニフェジピンとベラパミルとは異なるジルチアゼムは、Cch1 に対しブロックするのではなく活性化した。この活性化の理由は、これらブロッカーの結合部位として知られる  $\alpha_1$  サブユニットの「ドメイン」の S5 と S6 セグメント、およびドメイン、の S6 セグメントのアミノ酸配列に関して、ほ乳類  $\alpha_1$  サブユニットと出芽酵母の Cch1 の間で大きく異なるからだと考えられる。

#### 4) 学術論文

**J. Teng, R. Goto, K. Iida, I. Kojima and H. Iida**, “Ion channel blocker sensitivity of voltage-gated calcium channel homologue Cch1 in *Saccharomyces cerevisiae*” *Microbiology*, **154**, 3775-3781 (2008).

#### 5) 著書, 総説

分子細胞生物学辞典 第2版. 村松正実, 篠崎一雄, 清水孝雄, 谷口 克, 月田承一郎, 西村善文, 林崎良英, 御子柴克彦, 柳田充弘, 米田悦敬 編. 東京化学同人. (2008).

植物ゲノム科学事典 駒嶺 穆 総編集 朝倉書店. (2009).

#### 6) 国際会議発表リスト

**H. Iida**, “Mechanosensitive channel candidates in plants 4<sup>th</sup> International” Symposium on Plant Neurobiology, Fukuoka (Japan), (2008.6).

**H. Shigematsu, K. Nagayama, K. Iida, M. Nakano, K. Mori and H. Iida**, “Molecular analysis of potential mechanosensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels in *Arabidopsis thaliana*” 7th OIB Symposium on Frontiers of Biological Imaging: Synergy of the Advanced Techniques. Okazaki (Japan), (2008.11).

#### 7) 招待講演

**H. Iida**, “Mechanosensitive channel candidates in plants 4th International” Symposium on Plant Neurobiology, Fukuoka (Japan), (2008.6).

飯田秀利, 森研堂, 中野正貴, “植物における機械受容カルシウムチャネル: その過去, 現在, 未来”, 日本植物学会第72回大会, 高知, (2008.9).

**H. Iida**, “Molecular characterization of Mid1 and Cch1 in yeast” Molecular Biology Seminar, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin (USA), (2009.2).

8) 学会および社会的活動

日本宇宙フォーラム生命科学系パネル委員

11) 外部獲得資金

科学研究費補助金 特定領域研究（細胞感覚）「シロイヌナズナのカルシウム透過性機械刺激センサーの動作機構」, 飯田秀利（代表）（2007年－2008年）.

科学研究費補助金 基盤研究(C), 「出芽酵母のカルシウムチャンネルホモログ Cch1 の機能解析と制御分子の解明」, 飯田秀利（分担）（2008年－2011年）.