

論文内容の要旨

論文題名：Functional analysis of *Arabidopsis AtCAP1* gene
(アラビドプシス *AtCAP1* 遺伝子の機能解析)

氏名 ロベルト・アントニオ・バレロ
ROBERTO ANTONIO BARRERO

序論

植物の細胞骨格は、細胞形態形成、器官形成、分化等、多岐にわたる細胞形成において機能的に重要である。たとえば、ミクロフィラメント形成は、細胞分裂時の分裂板の伸長、細胞壁などの諸過程に必須である。アデニレートシクレース関連タンパク質 (CAP; Cyclase-Associated Protein) は酵母などの Ras-cAMP 信号伝達において機能を有しているが、多くの生物におけるアクチン細胞骨格の制御にも関与する。CAP タンパク質自身は、単量体のアクチンとの結合活性を有し、酵母のアクチンフィラメントと重合することが知られている。最近、CAP はショウジョウバエのアイ・ディスク形成において、過剰なアクチンの蓄積を押さえる事により、光レセプターの分化を制御する役割を担っている事が報告されている。

本研究では、植物では殆ど、その機能の不明な CAP タンパク質をコードする遺伝子をシロイヌナズナから単離し *AtCAP1* と命名した。*AtCAP1* は、436 個のアミノ酸から構成されており (図 1)、ゲノム上に 1 コピー存在する (図 2A)。私は修士課程において、*AtCAP1* を酵母で過剰発現すると、その C 末端領域未ドメイン (A6, アミノ酸 188 個) が、CAP 欠損細胞を相補する事を明らかにした。この事は、*AtCAP1* が、細胞骨格形成に必要である事を示唆したものである。本研究は、植物細胞を用いた *AtCAP1* の機能解明を目的として遂行された。

結果と考察

1. *AtCAP1* の発現とアクチンへの結合

CAP 抗体を用い、その発現を調べたところ、培養細胞や根で発現が強く、茎、葉、花器において低い事が判明した。CAP の C 末端領域 (A6, アミノ酸 158 個) を用いて、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質を作成した (図 3.A.B)。この GST-A6 を用い、アクチンとの結合実験を行ったところ、*in vitro* で両者の結合が確かめられた (図 2D)。

2. 植物個体における *AtCAP1* の過剰発現

AtCAP1 遺伝子を過剰に発現する、いくつかの形質転換アラビドプシス植物が作成された。ベクターとしては、図 4 に示す構築が用いられた。独立した 3 系統 (S4,S9,S11) について詳細に解析した (図 4B)。すべての系統は、本遺伝子を 1 コピー有する。図 4B に示すように、導入した遺伝子の発現による *AtCAP1* タンパク質量は、DEX の量に比例して増加した。S4 が最も *AtCAP1* タンパク質を蓄積し、S11 は最も少なかった。アラビドプシス植物体における *AtCAP1* の過剰発現の効果を調べるために、比較的若い植物が用いられた。*AtCAP1* タンパク質を過剰に発現する植物は、小葉とロゼット葉のサイズが減少したが、主根は野生型と同じであった。このような器官サイズの減少は、本タンパク質蓄積量と正の相関を示した。S4 植物では葉身は 31.9%横方向に減少した。葉柄の長さは 73.8%減少した。このことは、くりかえし実験でも証明された。したがって、アラビドプシスの *AtCAP1* の過剰発現は葉器官サイズの減少を引き起こすことが示された。このような現象が葉細胞の伸長あるいは数の変化によるのかを調べるための実験を行った。その結果、S4 植物の表皮細胞のサイズは野生型よりも小さかった。一方、細胞面積も野生型よりも減少した。第 3 葉の柵状細胞数は野生型のものの 59%であった。したがって、細胞数およびそのサイズの減少が葉の形態変化を誘導するものと思われる。

3. 培養細胞における *AtCAP1* の効果

AtCAP1 を過剰に発現するタバコ BY-2 が得られた (図 5A)。そのような細胞株を 7 日間培養し、DEX を含む培地に移し、24 時間培養した。アクチンのレベルは一定に保たれているのに対し、*AtCAP1* は DEX の添加量の増大と共に増加した (図 5A)。さらに本タンパク質の発現は、DEX 処理後 2 時間目から始まることが示された (図 5B)。次に、タバコ細胞の増殖を調べたところ、*AtCAP1* のレベルは増殖の阻害と平行であることが示された (図 6)。コントロールでは、そのような変化は認められなかった。図 7 に示すように、*AtCAP1* タンパク質の発現は、タバコ細胞の分裂活性を押さえているものと考えられた。

4. *AtCAP1* とアクチンとの細胞内相互作用

植物細胞内において *AtCAP1* タンパク質がアクチンに結合するかどうかを調べるために形質転換 BY-2 細胞が用いられた。材料をホモジナイズ後、タンパク質を *AtCAP1* 抗体で沈澱させ、電気泳動した。続いて、アクチン抗体で処理したところ、明らかなバンドが認められた (図 8)。このことは *AtCAP1* が細胞中でアクチンと直接あるいは間接的に相互作用する可能性を示唆するものである。

以上、論議したように *AtCAP1* タンパク質は、細胞分裂および伸長の両者を制御すると考えられる。このことは、細胞骨格形成に重要なアクチンとの相互作用を *AtCAP1* が担っている可能性を示唆するものである。

今後、本遺伝子のノックアウト植物の解析、あるいは生化学的研究を通して、植物の分化や増殖における本遺伝子の機能が明らかになるものと思われる。

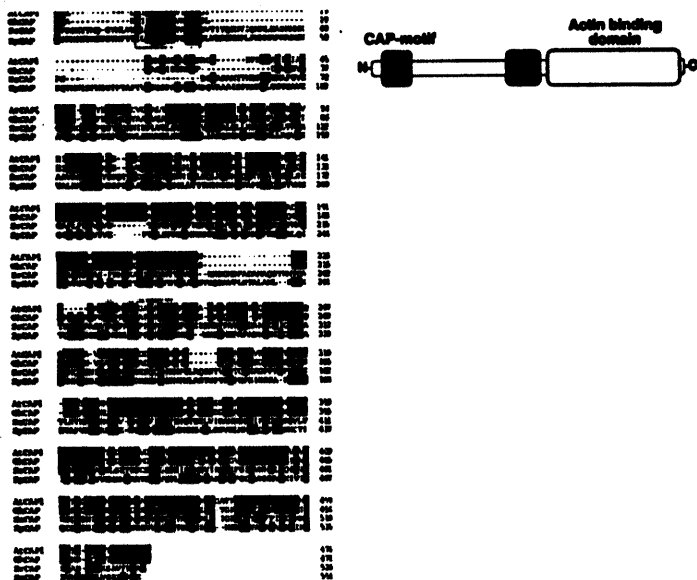


図1 CAPのアミノ酸配列とその構造。
AtCAP1の中央にはプロリンに富む配列があり、C末端領域にはアクチン結合部位と考えられる配列が存在する。

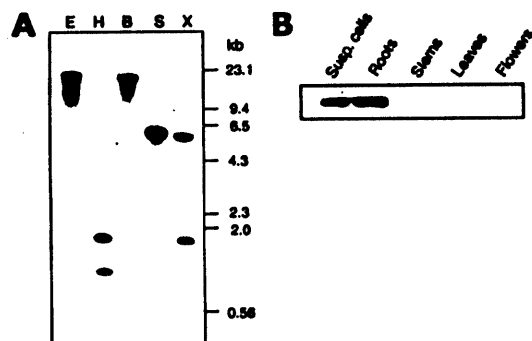


図2 DNAおよびタンパク質の解析。(A) AtCAP1のサザン解析。DNAは(EcoRI(E), HindIII(H), BamHI(B), SacI(S), XbaI(X))で処理された。(B)植物の各器官から抽出したタンパク質(20 μg)を電気泳動し、AtCAP1抗体で処理したもの。

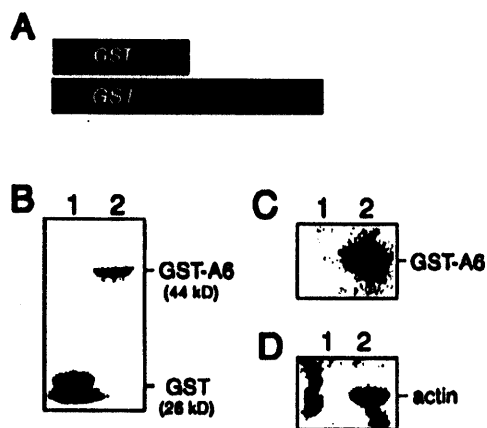


図3 AtCAP1 C末端ドメイン(A6)とアクチンの *in vitro* 結合実験。(A) GST および A6(AtCAP1のC末端ドメイン)。(B) GSTのクマシーブルーによる染色像。GST(1)、GST-A6(2) (C) GST(1)、GST-A6(2)のタンパク質ゲルプロットの抗 AtCAP1 抗体による処理。(D) AtCAP1 C末端ドメインのアクチンへの結合実験。GST(1)または GST-A6(2)は各々アクチン混合され、電気泳動、およびゲルプロット後抗アクチン抗体で処理された。

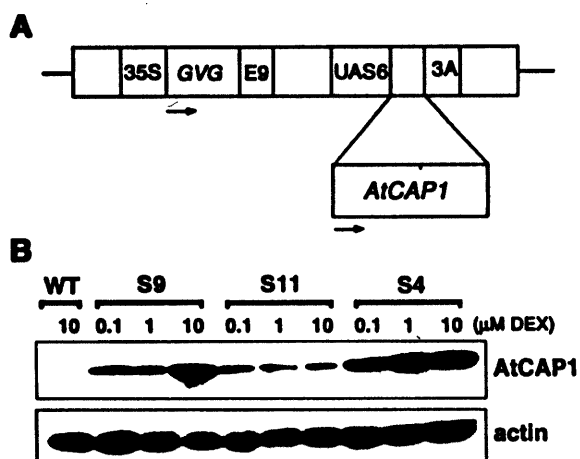


図4 形質転換アラビドプシスにおける AtCAP1 の発現解析。(A) ベクターの模式図。35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; GVG, the chimeric GVG transcription factor; E9, pea rbcS-E9 poly(A); UAS6, six copies of the DNA binding sites for GAL4; AtCAP1, AtCAP1 coding sequence; 3A, pea rbc3A poly(A) additional sequence. 矢印は転写方向を示す。(B) AtCAP1(52kDa)とアクチン(46kDa)。7日目の植物を異なる濃度の DEX で2日間処理された。

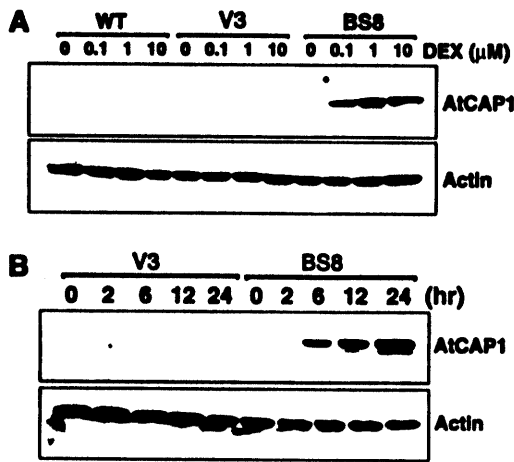


図5 タバコ BY-2 培養細胞における AtCAP1 とアクチンの発現。(A) DEX の濃度変化に伴う AtCAP1 とアクチンタンパク質発現の変化。(B) AtCAP1 とアクチンタンパク質発現の経時変化 (7日目の培養細胞を用いた。)。DEX (1 μM)。

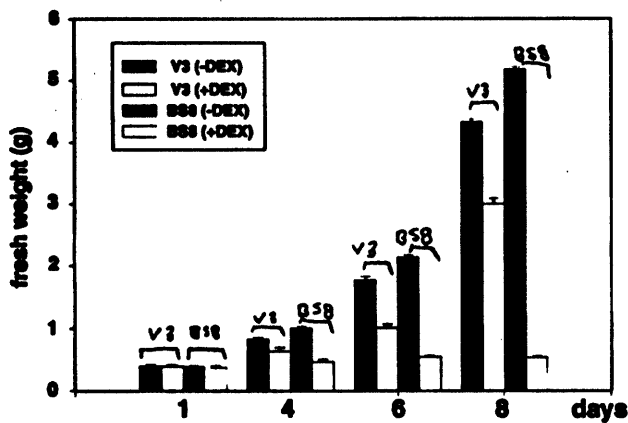
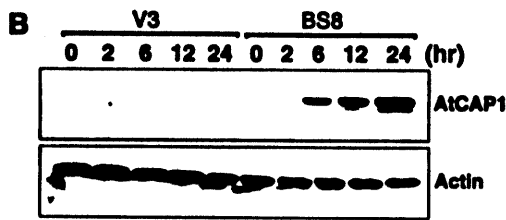


図6 タバコ BY-2 培養細胞の増殖変化。7日目の BY-2 細胞が DEX(1 μM)の存在下、あるいは非存在下で培養された (データは2反復の平均値)。

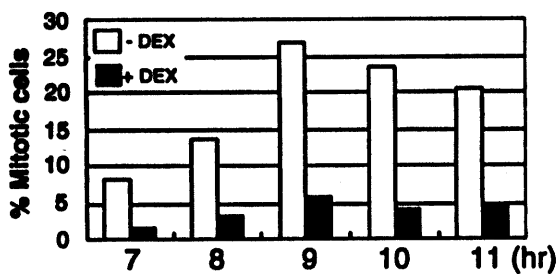


図7 AtCAP1 を発現する BY-2 分裂細胞の変化。形質転換 BY-2 細胞 (7日目) がアフィディコリン(5mg/L)を含む培地で 24 時間培養された。その後、細胞を洗浄し、DEX(1 μM)有無の条件で培養。約 500 細胞を用いて、DAPI 染色による分裂細胞数を記録。

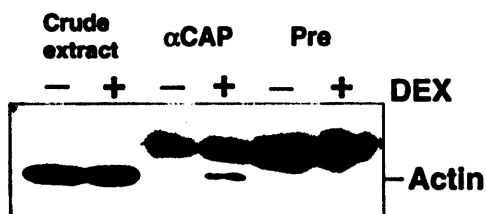


図8 AtCAP1 のアクチンへの結合実験。AtCAP1 を過剰発現する BY-2 細胞を DEX 有無の培地に移し 24 時間培養した。抽出した全タンパク質を AtCAP1 抗体(αCAP)処理し、ゲルプロット解析に供し、アクチン抗体で処理した (Pre ; コントロール血清)。