

令和元年6月13日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07390

研究課題名(和文)カルモジュリン様タンパク質による低温時におけるカルシウム認識機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of calcium recognition mechanism at low temperature by calmodulin-like protein

研究代表者

三浦 謙治 (Miura, Kenji)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00507949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物は低温刺激を受けると、一過的なカルシウムイオン濃度上昇がみられる。このカルシウムの一過的上昇に、機械刺激受容性カルシウムチャネルMCAが関与することが明らかとなった。また、MCAは低温ストレス応答にも関与することが明らかとなった。

また、カルシウムシグナルと低温シグナルをつなぐ因子として、カルモジュリン様タンパク質CML10、CML12が関与することが明らかとなった。これらは低温シグナル因子ICE1と相互作用することで、低温ストレス応答に関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、カルシウムシグナル伝達と低温シグナル伝達をつなぐことで、その詳細なメカニズムを明らかにした研究である。植物がストレス応答に応じて放出カルシウムのパターン認識に関して、その詳細を明らかにする目的で研究を行った。植物に50種類あるカルモジュリン様タンパク質のうち、CML10、CML12が低温ストレス応答に関与することを明らかにしたことで、カルシウムシグナルに関与する分子機構の一端を明らかにした研究である。

研究成果の概要(英文)：A transient increase in calcium ion concentration was observed, when plants are treated with cold stresses. Mechanosensitive calcium channel MCA is involved in this transient increase in calcium concentration. Moreover, MCA is also involved in low temperature stress responses.

In addition, calmodulin-like proteins, CML10 and CML12, are involved as factors linking calcium signal and low temperature signal. These CMLs interact with ICE1, an important transcription factor for cold signaling, to regulate cold stress responses.

研究分野：植物分子生物学、植物生理学

キーワード：植物 シグナル伝達 発現制御 カルシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

植物は、機械刺激、ホルモン、病原菌、光、環境ストレスといった、様々な異なった刺激を受けると細胞質内のカルシウム濃度を一過的に上昇させることが知られている。この一過的カルシウムイオン上昇のパターンは、刺激ごとに異なっており、この刺激特異的、時間空間的なパターンはカルシウムシグネチャと呼ばれている。この一過的カルシウムイオンの上昇は低温刺激を受けた際にも見受けられ、低温刺激を受けた直後のみ、鋭いピークが観察される (Knight et al., Nature 1996)。

このカルシウムシグネチャを、植物がどのような作り出すか、またそのシグネチャをどのように解読しているかは、はっきりとは分かっていない。動物細胞においては、TRP (transient receptor potential) チャンネルがカルシウムイオンのチャンネルとして働くとともに、温度センサーとして働いていることが示唆されている。その中でも TRPA1 は低温センサーであると考えられている。ただ、陸上植物には TRP に相同なタンパク質は存在しておらず、藻類であるクラミドモナスには TRP と同様の機構があると考えられている。一方、イネにおいて、細胞膜および小胞体膜に局在する COLD1 が低温センサーとして働くことが同定された (Ma et al., Cell 2015)。この COLD1 は 3 量体 G タンパク質共役受容体 (GPCR) のうちの サブユニットと結合して、低温センシングのためにカルシウムチャンネルを活性化するとともに、G タンパク質の GTPase 活性を促進することが明らかとなった。

このようにセンサーについては明らかにされつつあるが、低温ストレス応答時におけるカルシウムシグナル伝達の詳細なメカニズムについては、まだ分かっていないことも多い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、低温ストレス応答時におけるカルシウムシグナル伝達のメカニズムを明らかにするため、このシグナル伝達に関わる因子を同定するとともに、低温シグナル伝達にどのように関わるかを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 機械刺激受容性カルシウムチャンネル MCA による低温ストレス応答

本研究では、機械刺激受容性カルシウムチャンネルとして明らかになっている MCA の低温ストレス応答における役割を明らかにする目的で、その変異体 *mca1* および *mca2* を用いた研究を行った。具体的には、低温刺激に応じたカルシウム濃度の一過的上昇の違いを野生型、*mca1* 変異体、*mca2* 変異体、*mca1 mca2* 二重変異体で調べた。また、これらの変異体が低温ストレス耐性に関わるかを調べるため、低温に曝し、生存率および電解質漏出率を調べることで、凍結耐性を調べた。また、低温シグナル伝達への影響を調べるため、低温ストレス応答性遺伝子の発現評価を行った。野生型および *mca1 mca2* 二重変異体を低温に曝し、3, 6, 12, 24, 72 時間後にサンプリングを行った。これらの植物体から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作製したのち、低温ストレス誘導性遺伝子特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。

### (2) カルモジュリン様タンパク質による低温ストレス応答

低温シグナル伝達に関わる MYC 型転写因子 ICE1 の相互作用因子として、カルモジュリン様タンパク質 (CML) を単離している。この CML が低温ストレス応答および低温シグナル伝達にどのように関わるかを明らかにする目的で、その過剰発現体および RNAi 体を用いた研究を行った。具体的には、CML10 過剰発現体および CML10-RNAi 体を低温に曝し、生存率および電解質漏出率を調べることで、凍結耐性を調べた。また、上述の通り、RT-PCR を行い、低温シグナル伝達に関与するかを調べた。ICE1 と CML との結合に関わる領域 (CaMBD) を特定し、その結合領域の欠損変異体を作製することで、ICE1 における CaMBD の重要性を明らかにした。

## 4. 研究成果

### (1) 機械刺激受容性カルシウムチャンネル MCA による低温ストレス応答

低温ストレス刺激による細胞内カルシウム濃度が一過的に上昇する仕組みを明らかにする目的で、カルシウムチャンネルの 1 つである MCA に着目して研究を行った。まず、MCA が低温刺激に応答した一過的カルシウム濃度の上昇に影響を及ぼすかを変異体を用いて調べたところ、*mca1 mca2* 変異体ではカルシウム一過的上昇レベルが減少していた (図 1)。そこで、これらの変異体の凍結耐性を調べたところ、*mca1 mca2* 変異体では低温ストレス感受性を示した (図 2)。このことから、MCA が低温刺激に応答したカルシウムシグナル伝達および、そのシグナルを通じて低温ストレス耐性に影響を及ぼすことが明らかになった。低温シグナルにおいて、CBF/DREB1 を介したシグナル伝達経路が重要な役割を果たしているが、*mca1 mca2* 二重変異体では

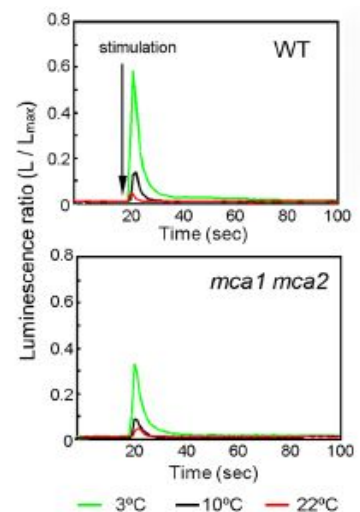


図 1. 低温刺激による一過的カルシウム上昇と *mca1 mca2* 二重変異による影響

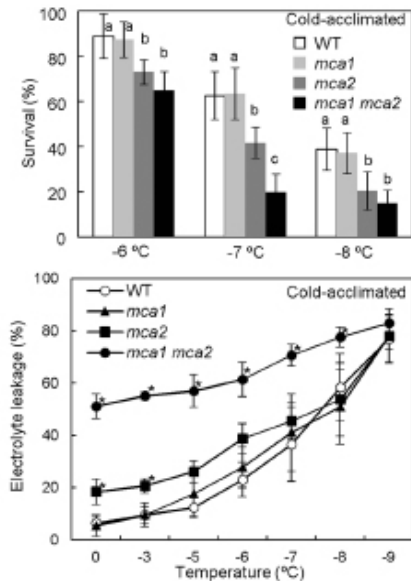


図 2. *mca1 mca2* 二重変異体は低温ストレス感受性を示した。(上)低温に曝した際の生存率。(下)低温に曝した際の電解質漏出率。漏出するほど、低温ストレスに弱いことを示す。

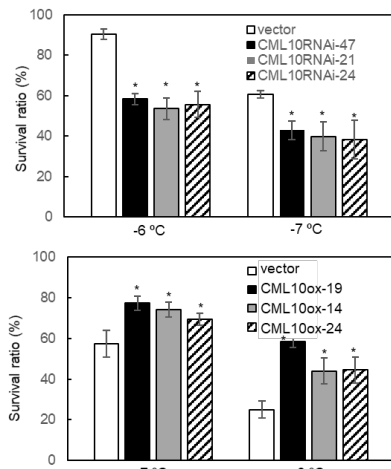


図 3. *CML10*-RNAi 体では低温感受性を(上)、過剰発現体では低温耐性を(下)示した。

mechanosensitive channels MCA1 and MCA2 mediate cold-induced cytosolic  $Ca^{2+}$  increase and cold tolerance in Arabidopsis. *Sci. Rep.* 8, 550. 査読有

- Yamamoto, T., Hoshikawa, K., Ezura, K., Okazawa, R., Fujita, S., Takaoka, M., Mason, M.S., Ezura, H., Miura, K. (2018) Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants. *Sci. Rep.* 8, 4755. 査読有
- Ohta, M., Sato, A., Renhu, N., Yamamoto, T., Oka, N., Zhu, J.K., Tada, Y., Suzuki, T., Miura, K. (2018) MYC-type transcription factors, MYC67 and MYC70, interact with ICE1 and negatively regulate cold tolerance in Arabidopsis. *Sci. Rep.* 8, 11622. 査読有
- Lin, X.L., Niu, D., Hu, Z.L., Kim, D.H., Jin, Y.H., Cai, B., Liu, P., Miura, K., Yun D.J., Kim, W.Y., Lin, R., Jin, J.B. (2016) An Arabidopsis SUMO E3 ligase, SIZ1, negatively regulates photomorphogenesis by promoting COP1 activity. *PLoS Genet.* 12, e1006016. 査読有
- Kitajima, S.\*, Miura, K.\*, Aoki, W., Yamato, K.T., Taira, T., Murakami, R., & Aburaya, S. (2016) Transcriptome and proteome analyses provide insight into laticifer's defense of *Euphorbia tirucalli* against pests. *Plant Physiol. Biochem.* 108, 434-446. 査読有

*CBF/DREB1* およびその下流の低温ストレス応答性遺伝子の発現には影響がなかったことから、MCA は *CBF/DREB1* とは違う経路を制御することで、低温ストレス応答に関わっていることが示唆された。

## (2) カルモジュリン様タンパク質による低温ストレス応答

ICE1 と相互作用する因子として CML10, CML12 が単離された。CML10 の過剰発現体では低温ストレス耐性を、CML10 および CML12 の発現量を低下させた RNAi 体では低温ストレス感受性を示した(図 3)。また、*CBF/DREB1A* およびその下流の低温ストレス応答性遺伝子も過剰発現体では、その発現量が上昇しており、RNAi 体では減少していた。これらのことから、CML10 が低温ストレス応答において、重要な役割を果たすことが示唆された。

低温ストレス応答に関わるのが CML10 および CML12 であるかを確認するため、*cm12* 変異体に CRISPR/Cas9 を用いて、ゲノム編集により、*cm10* に変異を導入した、*cm10 cm12* 二重変異体を作出した。これは、*CML10* および *CML12* が非常に近接しているため、通常の交配では二重変異体を作出することができないため、ゲノム編集技術を用いた。この *cm10 cm12* 二重変異体を用いて低温ストレス耐性を調べたが、野生型と同様であったことから、*CML10*, *CML12* 以外の *CML* も低温ストレス応答に関わっていることが示唆された。シロイヌナズナにおいて *CML* は 50 遺伝子あり、そのほかの *CML* が関与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

- Hoshikawa, K., Fujita, S., Renhu, N., Ezura, K., Yamamoto, T., Nonaka, S., Ezura, H., Miura, K. (2019) Efficient transient protein expression in tomato cultivars and wild species using agroinfiltration-mediated high expression system. *Plant Cell Rep.* 38, 75-84. 査読有
- 三浦謙治、星川健、江面浩、(2018年)「植物によるタンパク質高生産システムの開発」バイオサイエンスとインダストリー76巻 382-385.
- Mori, K., Renhu, N., Naito, M., Nakamura, A., Shiba, H., Yamamoto, T., Suzuki, T., Iida, H., Miura, K. (2018)  $Ca^{2+}$ -permeable

〔学会発表〕(計9件)

1. 塩見祐生、秋野順治、三浦謙治、Eric Hyrmeiya Sayadogo、北島佐紀人「アグロインフイルトレーションによる植物の乳液タンパク質の生産と抗昆虫活性の検討」日本農芸化学会 2019 年度東京大会、2019 年 3 月 26 日 東京(東京農業大学) 口頭
2. Na Renhu, Hiroki Okuda, Rieko Nozawa, Tsuyoshi Furumoto, Kenji Miura, “PIF4 is a negative regulator in cold signaling” 第 60 回日本植物生理学会年会、2019 年 3 月 13 日 名古屋(名古屋大学) ポスター
3. 三浦謙治、星川健、山本剛史、高岡美予、江面浩「植物におけるタンパク質大量発現「つくばシステム」」第 60 回日本植物生理学会年会、2019 年 3 月 13 日 名古屋(名古屋大学) 口頭
4. 三浦謙治、飯田秀利、「植物における低温ストレス応答とカルシウムチャネル MCA の関わり」第 63 回低温生物工学会セミナー及び年会、2018 年 6 月 9 日 さいたま(埼玉大学) 招待講演
5. Kenji Miura, Tohru Ariizumi, Hiroshi Ezura, “Targeted base editing in tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion”, Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017 年 11 月 5 日, Academia Sinica, 台北、国際招待講演
6. Kenji Miura, “Functional analysis of ICE1 interacting proteins for cold tolerance”, Tsukuba Global Science Week 2017, 2017 年 9 月 26 日、つくば(つくば国際会議場) 口頭
7. 奥田大貴、野澤理恵子、古本強、三浦謙治、「PIF4 はシロイヌナズナの低温耐性を負に制御している」第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 16 日-18 日 鹿児島(鹿児島大学)、ポスター
8. 三浦謙治、太田賢、佐藤愛子、岡和、多田安臣、「ICE1 相互作用因子である MYC 型転写因子は低温ストレス耐性に抑制的に働く」第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 16 日-18 日 鹿児島(鹿児島大学)、ポスター
9. Kenji Miura, Masaru Ohta, Aiko Sato, Hayato Shiba, Machiko Nakazawa, “Functional analysis of ICE1 interacting proteins for cold tolerance” International Conference on Arabidopsis Research, 2016 年 7 月 1 日, Gyeongju Hwabaek International Convention Center (Gyeongju, Korea), 国際招待講演

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：植物細胞における発現システムとその利用

発明者：三浦謙治、星川健、江面浩

権利者：筑波大学

種類：特許

番号：特願 2017-107965、PCT/JP2018/008512

出願年：2017 年

国内外の別：国内、外国

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/view/tsukubapmcb>

6. 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者

飯田秀利(Hidetoshi Iida) 東京学芸大学 教育学部 教授

根本由梨(Yuri Nemoto) 筑波大学生命環境科学研究科 技術補佐員

Na Renhu 筑波大学生命環境科学研究科 大学院生

奥田大貴(Hiroki Okuda) 筑波大学生命環境科学研究科 大学院生