

Seedlings overexpressing *OsTPC1* showed greening of roots under light conditions (Fig. 4E). Greening roots with developed chloroplasts are also observed in a constitutive photo morphogenetic mutant, *cop1* (Deng and Quail 1992). Light signal transduction may somehow be enhanced in *OsTPC1* over-expressing plants. Plasma membrane Ca²⁺ influx is suggested to be involved in phytochrome-mediated light signal transduction (Neuhaus et al. 1997, Long and Iino 2001), which is necessary for induction of greening (Nagatani et al. 1993). Microinjection of Ca²⁺ and cGMP is reported to bypass the phytochrome-mediated signal transduction to induce chloroplast development in a mutant defective in phytochrome A (Bowler et al. 1994). Abnormal root greening in the *OsTPC1*-overexpressing plants may be attributed to enhanced sensitivity to light.

Concluding remarks and future perspectives

We have shown that *OsTPC1* has Ca²⁺ transport activity in both yeast and suspension-cultured plant cells and may play a key role in regulation of growth and development in plants. The *OsTPC1* overexpressors and *Ostpc1* mutant established in the present study should be powerful tools to further characterize its physiological roles as a signal transducer to regulate [Ca²⁺]_{cyt} in plants.

Materials and Methods

Plant materials and growth conditions

Sterilized seeds of *Oryza sativa* cv. Nipponbare were germinated on Murashige and Skoog (MS) agar medium (Murashige and Skoog 1962) and grown for 10 d in a growth chamber under long day conditions (16 h light/8 h darkness, 28°C). Seedlings were transplanted in soil and grown in a greenhouse (16 h light/8 h darkness, 28°C and 60% humidity). Suspensions-cultured cells were maintained at 25°C in a liquid AA medium (Su et al. 1992) containing 2,4-D (1 mg liter⁻¹) and kinetin (0.2 mg liter⁻¹). Cell growth was measured by transferring 7-day-old-cultured cells (0.5 g FW) to fresh medium without or supplemented with CaCl₂ as indicated.

Isolation of *OsTPC1* cDNA

We identified a putative voltage-gated calcium channel in the chromosome I of rice (Accession No. AP003335) by using the Rice BLAST (<http://riceblast.dna.affrc.go.jp/>) with the amino acid sequences of several Ca²⁺ channels as queries. The estimated coding region of *OsTPC1* was amplified by PCR using two synthetic primers: *OsTPC1* forward (5'-CCACTTCTACTTCCGCTTCCGCTCGC-3') and *OsTPC1* reverse (5'-TCTTGCTTTCCTGCAGGGCCATGAAGA-3'). Total RNA was isolated from leaves of rice with Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol, and quantified spectrophotometrically. First-strand cDNA was synthesized from 3 µg of total RNA with the Oligo-dT primer and reverse transcriptase (Invitrogen). One µl within 20 µl cDNA products was used as the template for PCRs; 30 cycles at 95°C for 60 s, at 55°C for 90 s, and at 72°C for 90 s. To obtain full-length cDNA for *OsTPC1* and to define the open reading frame, 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR and 5'-RACE PCR were performed with a 3'-full RACE core kit (Takara Co.) and a 5'-RACE system (Gibco) ver 2.0 according to the manufac-

turer's protocol. KOD dash DNA polymerase (Toyobo) was used as a DNA polymerase.

Expression analysis of *OsTPC1* by RT-PCR

First-strand cDNA was synthesized from the total RNA extracted from each rice tissues. Suspension-cultured cells, 4-day-old cultured cells (Nipponbare); mature leaves, grown in soil for 3 months; shoots and roots, grown in MS medium for 10 d after germination. The PCR primer used was *OsTPC1*-F1 (5'-TTAATTCTTGCTGTCATTATGATAGCTTT-3'), *OsTPC1*-R1 (5'-CTATTGGTCACGGTTTTGAGATCATCAAG-3'), *OsActin1* (5'-TCCATCTTGGCATCTCTCAG-3') and *OsActin2* (5'-GTACCCGCATCAGGCATCTG-3') (Kojima et al. 2002). PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

Isolation of genomic DNA and Southern blot analysis

Genomic DNA was isolated from leaves of rice with Nucleon Phytopure kit (Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's protocol. Genomic DNA (1.5 µg) was cleaved with *Bam*HI and *Xba*I overnight at 37°C. Cleaved DNA was separated by 0.8% agarose gel electrophoresis at 65 V for 13.5 h, and transferred to nylon membrane filter (Hybond-N+; Amersham Pharmacia Biotech). ³²P-labeled *OsTPC1* cDNA was used as a probe. Hybridization was carried out at 42°C in a solution that contained sodium phosphate buffer (pH 7.2), 7% SDS, and 20 µg ml⁻¹ denatured salmon sperm DNA, and stringent washing was performed at 55°C in 2× SSC and 0.1% SDS. After hybridization, the filter was exposed to X-ray film.

Functional complementation of a yeast Ca²⁺-requiring mutant

A wild-type strain of *S. cerevisiae* W303-1A (Wallis et al. 1989) and *chl1::TRP1* null mutant strain K927 (Locke et al. 2000) were used. The yeast cells were transformed with *OsTPC1* cDNA inserted into pYES2 (Invitrogen) by using standard procedures and grown on yeast nitrogen base minimal media containing appropriate amino acids and 2% galactose (SGal medium). Exponentially growing cells were transferred into SGal media deficient in CaCl₂ (SGal-Ca medium; Iida et al. 1994) and the cellular growth was monitored by measuring A₆₀₀.

Ca²⁺ uptake in yeast cells

Ca²⁺ uptake was measured by the method described by Eilam and Chernichovsky (1987) with slight modifications. Cells (10⁷ cells ml⁻¹) grown on SGal medium were pre-incubated for 120 min at 30°C in 10 mM MES-Tris buffer (pH 6.0) containing 100 mM glucose. Calcium uptake was initiated by adding ⁴⁵CaCl₂ solution to a final concentration of 72 kBq ml⁻¹ (0.72 kBq µmol⁻¹). Aliquots (100 µl) were filtered through Millipore filters (0.45 µm; Millipore) that pre-soaked in washing solution (20 mM MgCl₂ and 0.1 mM LaCl₃) and washed five times with the same solution. Radioactivities in yeast cells were counted with a liquid scintillation counter.

Overexpression of *OsTPC1* in rice

A coding region *OsTPC1* cDNA was introduced into a Ti-based vector, pSMAB704 (Yamashita et al. personal communication), in the sense orientation downstream of the CaMV 35S promoter in place of GUS. The construct was introduced into calli (*Oryza sativa* cultivar Nipponbare) by means of *Agrobacterium*-mediated transformation, according to the protocol of Tanaka et al. (2001). Transformed calli were selected for bialaphos (Meiji Seika, Tokyo, Japan) resistance, and then transgenic plants were regenerated. In order to determine whether or not each T₁ plant has the transgene, we amplified 35S-*OsTPC1* products from genomic DNA of each plant by means of PCR, using 35S-F1 (5'-GCAAGACCCTTCTCTATATAAGG-3') and *OsTPC1*-R2 (5'-CTATTGGTCACGGTTTTGAGATCCATCAAG-3') as specific primers.

Isolation of *Tos17* insertional mutant of the *OstPC1*

Large populations (39,744 lines) of rice (*Oryza sativa* cultivar Nipponbare) mutants generated by means of *Tos17*-mediated mutagenesis were made available by the Laboratory of Gene function at the National Institute of Agrobiological Resources (Tsukuba, Japan). Details of mutagenesis with *Tos17* have been described (Hirochika 1999). As a result, we isolated one mutant line (NF1041) by PCR screening. *Tos17* insertion in the mutant (*Ostpc1*) was confirmed by DNA gel blot analysis, and its exact position was determined by sequencing. RT-PCR was used mRNA expression analysis of *Ostpc1* mutant using exon11P (5'-TACCATTGCAATAAAATTCCAGAAA-3') and P2 (5'-CTATTGGTCACGGTTTGTGATCCATCAAG-3') as specific primers.

Measurement of chlorophyll content

Roots of plants grown for 14 d in a growth chamber (continuous light, 28°C) were homogenized in 80% acetone. The homogenate was centrifuged, and absorbance spectrum of the supernatant was measured. Total chlorophyll contents were calculated according to the following equation (Arnon 1949): total chlorophyll ($\mu\text{g ml}^{-1}$) = $8.02 (A_{663} - A_{710}) + 20.2 (A_{645} - A_{710})$.

Acknowledgments

We would like to thank Drs. Takuya Furuichi and Shoshi Muto for helpful discussion and sharing unpublished results, Drs. Hiroshi Tanaka and Ms. Haruko Onodera for technical suggestions on *Agrobacterium*-mediated transformation, Dr. Hiroaki Ichikawa for providing a Ti-based vector, pSMAB704, Dr. Muneo Yamazaki for technical suggestions, Drs. Tomoko Tada and Hidetoshi Iida for technical suggestions on Ca²⁺ uptake in yeast cells and Dr. Katsumi Higashi for comments on the manuscript. This work was supported in part by a Rice Genome Project Program (No. MP2134) from the Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries of Japan.

References

- Amon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1–15.
- Benitah, J.P., Gomez, A.M., Fauconnier, J., Kerfant, B.G., Perrier, E., Vassort, G. and Richard, S. (2002) Voltage-gated Ca²⁺ currents in the human pathophysiological heart: a review. *Basic Res. Cardiol.* 97 (Suppl. 1): 111–118.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H. and Chua, N.H. (1994) Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* 77: 73–81.
- Deng, X.W. and Quail, P.H. (1992) Genetic and phenotypic characterization of cop1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2: 83–95.
- Eilam, Y. and Chernichovsky, D. (1987) Uptake of Ca²⁺ driven by the membrane potential in energy-depleted yeast cells. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1641–1649.
- Fischer, M., Schnell, N., Chattaway, J., Davis, P., Dixon, G. and Sanders, D. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS Lett.* 419: 259–262.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Törres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D.G., Davies, J.M. and Dolan, L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442–446.
- Fozzard, H.A. and Hanck, D.A. (1996) Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. *Physiol. Rev.* 76: 887–926.
- Furuichi, T., Cunningham, K.W. and Muto, S. (2001) A putative two-pore channel *AtTPC1* mediates Ca²⁺ flux in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Cell Physiol.* 42: 900–905.
- Hamilton, D.W.A., Hills, A., Kohler, B. and Blatt, M.R. (2000) Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97: 4967–4972.
- Hirochika, H. (1999) Retrotransposons of rice as a tool for forward and reverse genetics. In *Molecular Biology of Rice*. Edited by Shimamoto, K. pp. 43–58. Springer-Verlag, Berlin.
- Hirochika, H. (2001) Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 118–122.
- Iida, H., Nakamura, H., Ono, T., Okamura, M.S. and Anraku, Y. (1994) *MID1*, a novel *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a plasma membrane protein, is required for Ca²⁺ influx and mating. *Mol. Cell. Biol.* 14: 8259–8271.
- Ishibashi, K., Suzuki, M. and Imai, M. (2000) Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270: 370–376.
- Kiegle, E., Gilliam, M., Haseloff, J. and Tester, M. (2000) Hyperpolarization-activated calcium currents found only in cells from the elongation zone of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J.* 21: 225–229.
- Klüsener, B., Young, J.J., Murata, Y., Allen, G.J., Mori, I.C., Hugouvieux, V. and Schroeder, J.I. (2002) Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Physiol.* 130: 2152–2163.
- Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T. and Yano, M. (2002) *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis* *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant Cell Physiol.* 43: 1096–1105.
- Li, H., Lin, Y., Heath, R.M., Zhu, M.X. and Yang, Z. (1999) Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell* 11: 1731–1742.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391–1406.
- Locke, E.G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y. and Cunningham, K.W. (2000) A homolog of voltage-gated Ca²⁺ channels stimulated by depletion of secretory Ca²⁺ in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 20: 6686–6694.
- Long, C. and Iino, M. (2001) Light-dependent osmoregulation in pea stem protoplasts. Photoreceptors, tissue specificity, ion relationships, and physiological implications. *Plant Physiol.* 125: 1854–1869.
- Malho, R. and Trewavas, A.J. (1996) Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. *Plant Cell* 8: 1935–1949.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Nagatani, A., Reed, J.W. and Chory, J. (1993) Isolation and initial characterization of *Arabidopsis* mutants that are deficient in phytochrome A. *Plant Physiol.* 102: 269–277.
- Neuhaus, G., Bowler, C., Hiratsuka, K., Yamagata, H. and Chua, N.H. (1997) Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *EMBO J.* 16: 2554–2564.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E. and Schroeder, J.I. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature* 406: 731–734.
- Peterson, B.Z., Lee, J.S., Mülle, J.G., Wang, Y., Leon, M. and Yue, D.T. (2000) Critical determinants of Ca²⁺-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca²⁺ channels. *Biophys. J.* 78: 1906–1920.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. and Harper, J.F. (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14: S401–S417.
- Shimamoto, K. and Kozuka, J. (2002) Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 399–419.
- Su, R.C., Rudert, M.L. and Hodges, T.K. (1992) Fertile indica and japonica rice plants regenerated from protoplasts isolated from embryogenic haploid suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 12: 45–49.
- Tanaka, H., Kayano, T., Ugaki, M., Shiobara, F., Onodera, H., Ono, K., Tagiri, A., Nishizawa, Y. and Shibuya, N. (2001) Ultra-fast transformation technique for monocotyledons. PCT Application WO 01/06844 A1.
- Taylor, A.R., Manison, N.F., Fernandez, C., Wood, J. and Brownlee, C. (1996) Spatial organization of calcium signaling involved in cell volume control in the *Fucus* rhizoids. *Plant Cell* 8: 2015–2031.
- Very, A.A. and Sentenac, H. (2002) Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane. *Trends Plant Sci.* 7: 168–175.
- Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfé, M. and Rothstein, R. (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* 58: 409–419.

- Ward, J.M., Pei, Z.M. and Schroeder, J.I. (1995) Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* 7: 833–844.
- White, P.J. (2000) Calcium channels in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 171–189.
- White, P.J., Bowen, H.C., Demidchik, V., Nichols, C. and Davis, J.M. (2002) Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1564: 299–309.
- White, P.J. and Broadley, M.R. (2003) Calcium in plants. *Ann. Bot.* 92: 487–511.

(Received October 29, 2003; Accepted March 16, 2004)



Identification of putative voltage-dependent Ca^{2+} -permeable channels involved in cryptogein-induced Ca^{2+} transients and defense responses in tobacco BY-2 cells[☆]

Yasuhiro Kadota,^a Takuya Furuichi,^b Yoko Ogasawara,^a Tatsuaki Goh,^a
Katsumi Higashi,^c Shoshi Muto,^d and Kazuyuki Kuchitsu^{a,c,*}

^a Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

^b Graduate School of Medicine, Nagoya University, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan

^c Genome & Drug Research Center, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

^d Bioscience Center and Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University Chikusa-ku, Nagoya 464-8610, Japan

Received 16 March 2004

Abstract

Ca^{2+} is the pivotal second messenger for induction of defense responses induced by treatment of pathogen-derived elicitor or microbial infection in plants. However, molecular bases for elicitor-induced generation of Ca^{2+} signals (Ca^{2+} transients) are largely unknown. We here identified cDNAs for putative voltage-dependent Ca^{2+} -permeable channels, *NiTPC1A* and *NiTPC1B*, that are homologous to *TPC1* (two pore channel) from suspension-cultured tobacco BY-2 cells. *NiTPC1s* complemented the growth of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in *CCH1*, a putative Ca^{2+} channel, in a low Ca^{2+} medium, suggesting that both products permeate Ca^{2+} through the plasma membrane. Cosuppression of *NiTPC1s* in apoaequorin-expressing BY-2 cells resulted in inhibition of rise in cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) in response to sucrose and a fungal elicitor cryptogein, while it did not affect hypoosmotic shock-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase. Cosuppression of *NiTPC1s* also caused suppression of cryptogein-induced programmed cell death and defense-related gene expression. These results suggest that *NiTPC1s* are involved in Ca^{2+} mobilization induced by the cryptogein and sucrose, and have crucial roles in cryptogein-induced signal transduction pathway.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Calcium ion; Cryptogein; Suspension-cultured tobacco BY-2 cell; Two pore channel

Ca^{2+} plays an essential role as an intracellular second messenger in plants [1]. Changes in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) due to Ca^{2+} fluxes in response to a variety of external and internal stimuli are suggested to serve to communicate and amplify signals by triggering intracellular biochemical processes [2]. Physiological evidences suggest that rapid increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Ca^{2+} transients) are mediated by Ca^{2+} chan-

nels located on the plasma membrane and endomembranes such as endoplasmic reticulum and tonoplast [3]. In animal cells, many voltage-dependent Ca^{2+} channels function in the transduction of sensory input and Ca^{2+} signaling by permeating Ca^{2+} at the plasma membrane [4,5]. In plants, both the hyperpolarization-activated and the depolarization-activated inward-rectifying Ca^{2+} permeable channels have been electrophysiologically identified [6–9]. Activation of voltage-dependent Ca^{2+} channels has been suggested to be involved in response to various signals, including abscisic acid [10], blue and red light [11,12], nod factors [13], and fungal elicitors [14,15]. However, the gene encoding voltage-dependent channel with high affinity for Ca^{2+} permeation had not been cloned from plants for a long time. Recently, we isolated a full-length cDNA encoding a putative Ca^{2+}

[☆] Abbreviations: $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, cytosolic free Ca^{2+} concentration; PCD, programmed cell death; RACE, rapid amplification of cDNA ends; RT-PCR, reverse transcriptase-PCR; SGal medium, yeast nitrogen base minimal media containing appropriate amino acids and 2% galactose; SGal-Ca medium, SGal medium depleted CaCl_2 .

* Corresponding author. Fax: +81-4-7123-9767.

E-mail address: kuchitsu@rs.noda.tus.ac.jp (K. Kuchitsu).

permeable channel (AtTPC1; GenBank Accession No. AB053952; Fig. 1A) from *Arabidopsis thaliana* [16]. However, physiological roles of AtTPC1 remain largely unknown.

Plants respond to attacks from pathogens by activating a variety of defense mechanisms, including the synthesis of phytoalexins, the expression of defense-related genes, and programmed cell death (PCD) known as hypersensitive response, which restricts pathogen growth at the site of infection [17]. Ca²⁺ channel blockers inhibit such defense responses and PCD in several systems, suggesting the importance of Ca²⁺ in induction of these responses [18,19]. Cryptogein, a 10-kDa proteinaceous elicitor that is produced by the pathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*, induces cell

death and defense-related gene expression in tobacco plants and tobacco cell suspensions [20,21]. This cell death is induced via a specific signal transduction pathway including various ion fluxes, protein kinase activation, and production of reactive oxygen species [20,22,23]. After an apparent lag of 1 min, cryptogein induced characteristic two transient peaks in [Ca²⁺]_{cyt} as well as anion efflux and H⁺ influx in suspension-cultured tobacco BY-2 cells [22]. Pharmacological analyses suggested importance of anion efflux in induction of Ca²⁺ influx through the plasma membrane. Since an anion efflux plays a major role in abscisic acid-induced plasma-membrane depolarization [10], voltage-dependent Ca²⁺ channels might be involved in cryptogein-induced Ca²⁺ signaling.

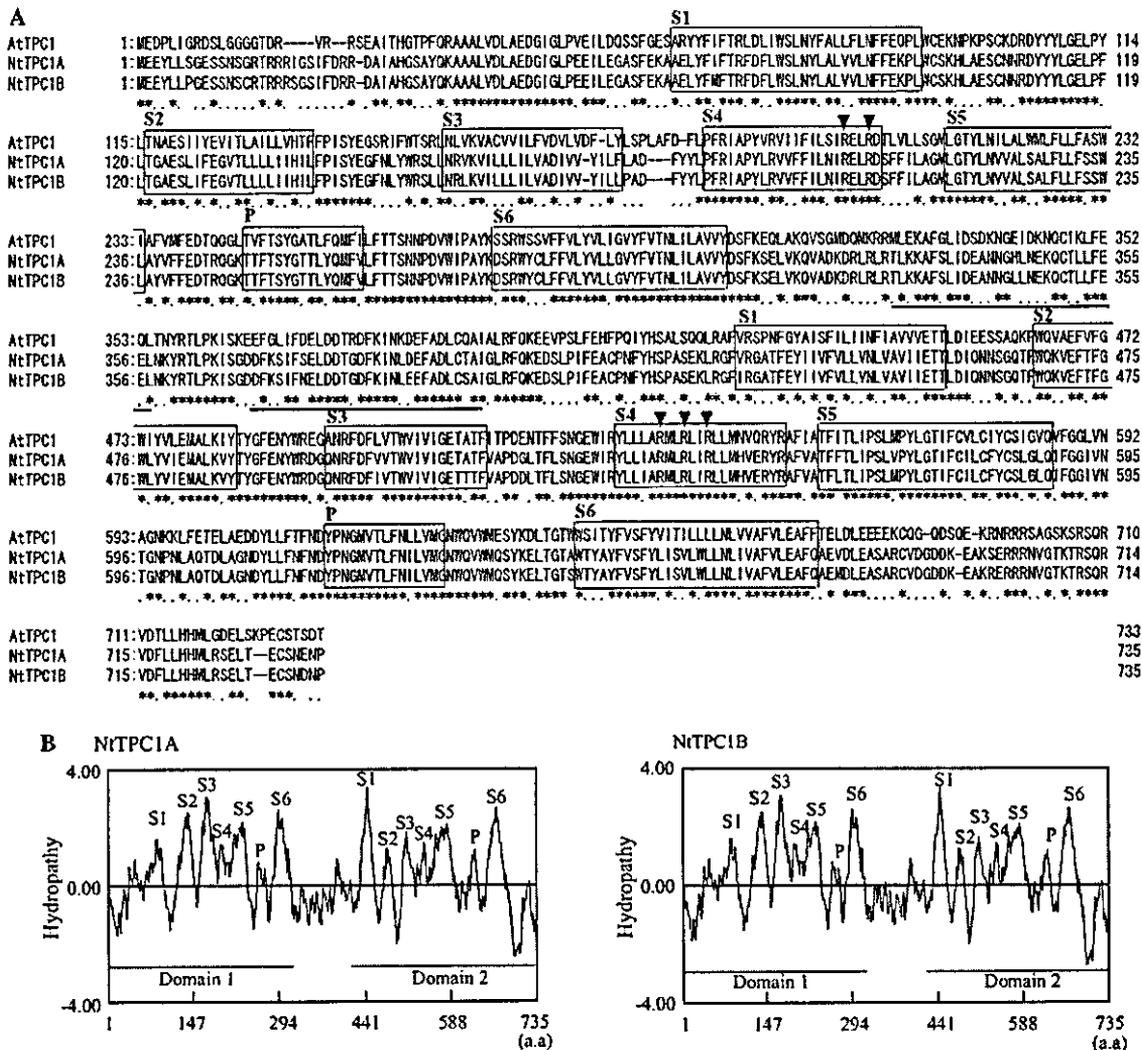


Fig. 1. (A) Multiple amino acid sequence alignment of AtTPC1, NtTPC1A, and NtTPC1B. Identical and similar amino acid residues are denoted with asterisks (*) and periods (.), respectively. Twelve putative transmembrane segments are open boxed. Two putative pore loops are gray boxed. Arginine residues (R) located at intervals of two amino acids in S4 segments are indicated with arrowheads. Two putative EF-hand motifs are underlined. GenBank accession numbers corresponding to the proteins are as follows: *AtTPC1* (AB053952), *NtTPC1A* (AB124646), and *NtTPC1B* (AB124647). (B) Kyte and Doolittle hydropathy plot of NtTPC1A and NtTPC1B. The six hydrophobic segments (S1–S6) and a pore loop segment (P) in each domain are indicated.

We here report isolation of putative voltage-dependent Ca^{2+} permeable channels (*NtTPC1A* and *NtTPC1B*) from tobacco BY-2 cells, and analysis of their roles in cryptogein signal transduction in BY-2 cells. NtTPC1s are required for cryptogein-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ changes, defense-related gene expression, and PCD. Furthermore, NtTPC1s were shown to have essential roles in Ca^{2+} signaling of sucrose.

Materials and methods

Isolation of *NtTPC1A* and *NtTPC1B* cDNAs and plasmid construction. Comparing the conserved region of rat *TPC1* (*TPC1*; GenBank Accession No. AB018253) and *AtTPC1* (*AtTPC1*; GenBank Accession No. AB053952), two primers *TPC1fw* (5'-AACATCCAACAATCC TGATGTCTGGATTCC-3') and *TPC1rev* (5'-TCATAAGAAGCCT TATCAGTCTTAACATTC-3') were synthesized, and the fragments of *TPC1* homologs of tobacco were amplified by PCR.

Total RNA was extracted from tobacco BY-2 cells (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2, cell line BY-2) with Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). First-strand cDNA was synthesized from 5 μg of total RNA with Superscript II (Invitrogen), and the cDNA product was used as the template for PCRs. As a result, we obtained two independent cDNA fragments encoding *TPC1* homologs, termed *NtTPC1A* and *B*. To obtain full length cDNA for *NtTPC1A* and *B* and to define the open reading frame, 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR and 5'-RACE PCR were performed with RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1 (Takara, Otsu, Japan) and 5'-Full RACE core Kit (Invitrogen). All of these PCRs were performed using KOD dash DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan). DNA sequencing was performed with ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit and an ABI PRISM 310 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Yeast strains, expression of plant cDNAs, and growth of transformants. A wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A [24] and *chl1::TRP1* null mutant strain K927 [25] were used. The coding regions of *NtTPC1A* cDNA and *NtTPC1B* cDNA were inserted into pYES2 (Invitrogen), and transformed to yeast cells by using standard procedures. The transformed yeast cells were grown on yeast nitrogen base minimal media containing appropriate amino acids and 2% galactose (SGal medium). Exponentially growing cells were transferred into SGal media deficient in CaCl_2 (SGal-Ca medium) and the cell growth (A_{600}) was measured [26].

Plant material, transformation, and selection of transformed cell lines. Transgenic tobacco BY-2 cells, which express apoaequorin specifically in the cytosol, were grown in modified Linsmaier and Skoog medium as reported [27,28]. The cell suspension was agitated on a rotary shaker at 100 rpm at 28 °C in the dark and used 1 week after subculture. An additional transformation of apoaequorin-expressing cells was carried out according to An [29] with minor modifications as follows: 4 ml of 3-day-old exponentially growing culture was transferred to a 90-mm petri dish and incubated at 28 °C with 100 μl of fresh overnight culture of *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 containing the binary vector pSMAB704 (generous gift from Dr. Ichikawa), which contains cauliflower mosaic virus 35S promoter and the coding region of *AtTPC1*. After 48-h co-cultivation, the tobacco cells were washed and plated on the LS agar medium containing 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bialaphos (Aventis, Strasbourg, France) and 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ calbencillin (Wako, Osaka, Japan). Each 3–4 weeks, the transformants were selected and transferred onto fresh medium for the selection. To select the *NtTPC1s*-cosuppressing cell line, immunoblot analysis of microsomal membrane fraction with anti-*AtTPC1* antibody was performed. The antibody specifically cross-reacted to the linker domain of the *AtTPC1* (Furuichi and Muto, unpublished results).

Measurement of changes in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. The apoaequorin-expressing BY-2 cell suspension was incubated with 1 μM coelenterazine at least 6 h. For each experiment, details are written in the legends. Aequorin luminescence reflecting $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was measured with a Lumiscouter 2500 luminometer (Microtech Nitton, Funabashi, Japan) equipped with A/D converter (MacLab, AD instruments, Castle Hill, Australia) and analyzing software (Chart v3.6.8, AD instruments). The 250 μl of cells was transferred to a cylindrical plastic cuvette and kept for 15 min at room temperature with stirring on a rotator at 150 rpm to recover cells from mechanical stress caused by pipeting. The cuvette containing cell suspension was set in the luminometer and rotated 17 revolutions every 3 s in the clockwise and counterclockwise in turn to stir the cells during luminescence measurement. Aequorin luminescence curves shown in this paper were normalized with total luminescence of each cell line.

Expression and purification of cryptogein. *Pichia pastoris* (strain GS115) carrying the plasmid pLEP3 was used for cryptogein production. Cryptogein which produced according to O'Donohue et al. [30] was dissolved in distilled water. Cryptogein concentration was determined using UV spectroscopy employing extinction coefficients of 8306 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ at 277 nm [31].

Northern analysis. Denatured total RNA (15 μg) was subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel containing 5.5% formaldehyde and then transferred onto a Hybond-N membrane (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK). Hybridization was performed at 65 °C in phosphate buffer (500 mM Na-phosphate, pH 7.2, 1 mM EDTA, 1% bovine serum albumin, and 7% SDS) with random primed [^{32}P] probes for *Hsr203J* [32] and *Hin1* [33] cDNA from tobacco. The hybridization signal was visualized with a Typhoon 9210 (Amersham Bioscience).

Cell death assay with Evans blue. The 7-day-old cells were diluted (1/5) in fresh growth medium and incubated for 6 h before cryptogein application (same condition for $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ measurement). Cell death was measured 24 h after application of cryptogein (1 μM) or distilled water. One milliliter of the cell suspension was incubated with 0.05% Evans blue (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 15 min and then washed to remove unabsorbed dye. The selective staining of dead cells with Evans blue depends upon extrusion of the dye from living cells via the intact plasma membrane [34]. Dye that had been absorbed by dead cells was extracted in 50% methanol with 1% SDS for 1 h at 60 °C and quantified by absorbance at 595 nm. The value was divided by the fresh weight of the cells to average the cell volume.

Results

Molecular cloning of *NtTPC1A* and *NtTPC1B*

Ishibashi et al. [35] and Furuichi et al. [16] have cloned two-pore channels from rat kidney (*TPC1*; GenBank Accession No. AB018253) and *Arabidopsis* (*AtTPC1*; GenBank Accession No. AB053952), respectively. Using the conserved region between rat *TPC1* and *AtTPC1*, we cloned two putative orthologs from tobacco BY-2 cells by reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) amplification. Two cDNAs designated *NtTPC1A* and *NtTPC1B* (GenBank Accession Nos. AB124646 and AB124647) were amplified. *NtTPC1A* and *NtTPC1B* encode polypeptides of 735 amino acids with predicted molecular masses of 84,847 and 85,126, respectively (Fig. 1A). The deduced amino acid sequences of *NtTPC1A* and *NtTPC1B* are quite similar to each other (97.1% identity), and were 66.5% and 65.9% identical to *AtTPC1*, respectively.

A computer-assisted Kyte and Doolittle hydropathy plot of the deduced amino acid sequences of NtTPC1s indicated the presence of two conserved homologous domains (I and II), both of which contain six transmembrane segments (S1–S6) and a pore loop (P) between S5 and S6 in each domain (Fig. 1B). These predicted structures are similar to those of rat TPC1 and AtTPC1 [16,35], and also similar to the half of the general structure of α -subunits of voltage-activated Ca^{2+} channels [36]. As observed in AtTPC1, two EF-hand motifs were found in the linker domain between domain I and domain II of NtTPC1s by using Pfam database (<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam/>) (Fig. 1A). AtTPC1 and rat TPC1 have two potential protein kinase C phosphorylation sites between domains I and II (S336 and S364 in AtTPC1), whereas NtTPC1s have only one site at S364 (Fig. 1A).

NtTPC1s complement the growth of *S. cerevisiae cchl* mutant

Saccharomyces cerevisiae CCH1 has sequence homology with the α -subunit of animal L-type Ca^{2+} channel. Ca^{2+} uptake activity and growth of a yeast mutant defective CCH1 are suppressed in a low Ca^{2+} medium [37]. To know whether NtTPC1s permeate Ca^{2+} , we expressed NtTPC1A and NtTPC1B in a *cchl* mutant K927 strain. The both transformants recovered growth rates (Fig. 2), suggesting that NtTPC1s rescued Ca^{2+} transport activity across the plasma membrane of *cchl* mutant.

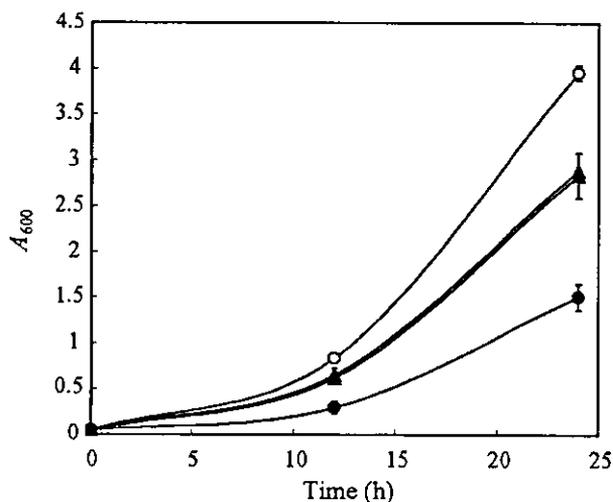


Fig. 2. NtTPC1A and NtTPC1B rescue growth rate of yeast *cchl* mutant. Exponentially growing cells of strains W303-1A (wild-type)/pYES2, K927 (*cchl*)/pYES2, K927 (*cchl*)/pYES2-NtTPC1A, and K927 (*cchl*)/pYES2-NtTPC1B were transferred into SGal-Ca medium, and the cell growth (A_{600}) was measured at the indicated times. Open circle, W303-1A (wild-type)/pYES2; closed circle, K927 (*cchl*)/pYES2; open triangle, K927 (*cchl*)/pYES2-NtTPC1A; and closed triangle, K927 (*cchl*)/pYES2-NtTPC1B. Vertical bars represent SE of three independent experiments.

NtTPC1s are involved in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ changes induced by sucrose

Transgenic BY-2 cell line expressing apoaequorin gene is a powerful tool for analyzing $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ changes. When AtTPC1 cDNA was overdriven using cauliflower mosaic virus 35S promoter in apoaequorin-expressing

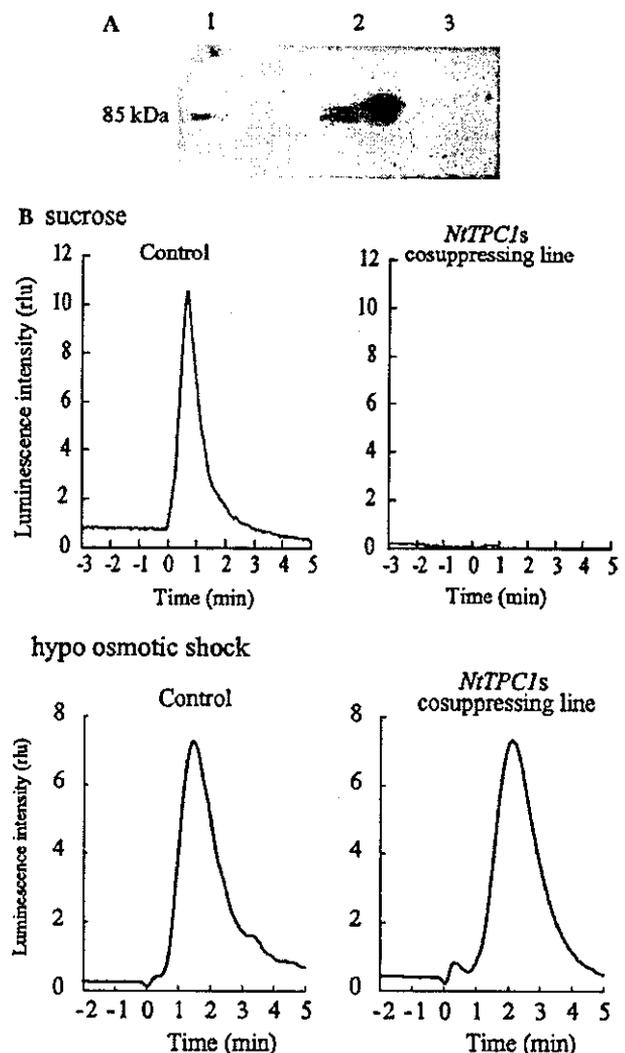


Fig. 3. Cosuppression of NtTPC1s resulted in the absence of sucrose-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ responses. (A) Western blot analysis of control and NtTPC1s-cosuppressing line of BY-2 cells using anti-AtTPC1 antibody. Microsomal membrane fractions (50 μg of protein) were electrophoresed using SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride membrane, probed with the anti-AtTPC1 antibody, and revealed by chemiluminescence. Lane 1, marker; 2, fraction from control cell line; and 3, fraction from NtTPC1s-cosuppressing cell line. (B) NtTPC1s-cosuppressing cells did not induce $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increases in response to sucrose. The 7-day-old cells after subculture were transferred to the sucrose free medium and cultured further 2 days. To reconstitute the aequorin, cells were incubated with 1 μM coelenterazine for 8 h and used for the assays. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ responses to sucrose (100 mM) and hypoosmotic shock (200 μl H_2O was added to the 400 μl culture) were measured. Data are from one representative experiment of three independent experiments.

BY-2 cells, cells of which both *AtTPC1* and endogenous *NtTPC1s* were suppressed were isolated as a cosuppressing cell line. Fig. 3A shows immunoblot analysis of a transgenic cell line with anti-*AtTPC1* antibody. Control cells expressed endogenous *NtTPC1s* (85 kDa), whereas the expression of the endogenous *NtTPC1s* and the transgenic *AtTPC1* was cosuppressed in the transgenic line. Using *NtTPC1s*-cosuppressing line, we attempted to clarify possible involvement of *NtTPC1s* in Ca^{2+} signaling induced by various stimuli.

Since the sucrose/ H^+ symporter that facilitates sucrose uptake on the plasma membrane is an electrogenic transporter, influx of translocated sucrose induces plasma membrane depolarization and is thought to activate a voltage-dependent Ca^{2+} channel on the plasma membrane [38]. In *A. thaliana*, the expression of sucrose/ H^+ co-transporters is necessary for sucrose-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase [39] in aequorin-expressing leaves. Furthermore, sucrose-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase was enhanced by overexpression of *AtTPC1* and suppressed by antisense expression of it [16]. In BY-2 cells,

the transcriptional level of *NtSUT1A*, one of the sucrose/ H^+ co-transporter orthologs, is significantly increased by sugar-starvation and this was well correlated with the intensity of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase (data not shown). Application of sucrose (100 mM) after sugar-starvation induced a transient $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase in control cells, while the *NtTPC1s*-cosuppressing line did not show any changes (Fig. 3B). This result suggests that *NtTPC1s* are involved in sucrose-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase.

On the contrary, hypoosmotic shock induced similar $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ change both in control and the *NtTPC1s*-cosuppressing lines (Fig. 3B). The intensities of total luminescence, which caused by the addition 1/5 volumes of 1 M $\text{CaCl}_2/20\%$ EtOH solution, were also equivalent in both cell lines (data not shown), suggesting that cosuppression of *NtTPC1s* does not affect apoaequorin expression and the aequorin luminescence. These results suggest that *NtTPC1s* are involved in sucrose-induced Ca^{2+} signaling, but not in hypoosmotic shock-induced Ca^{2+} signaling.

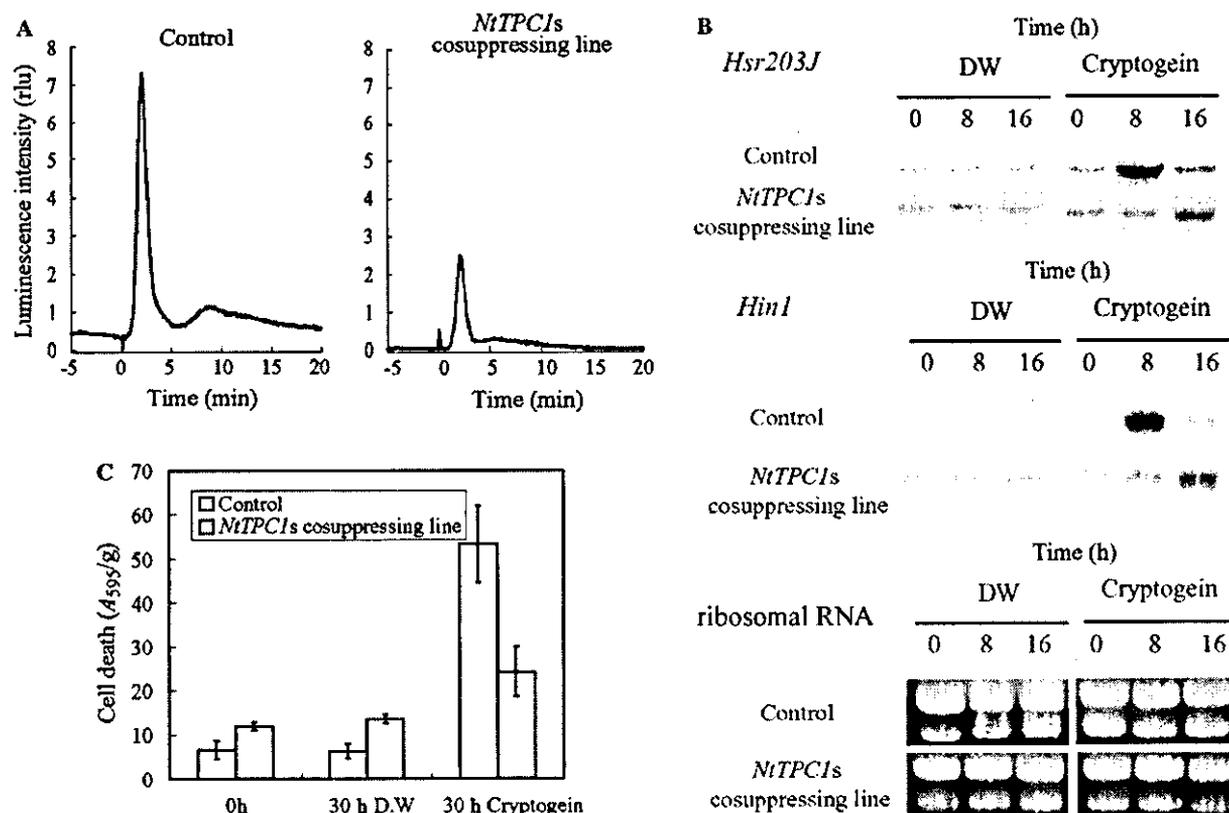


Fig. 4. Cosuppression of *NtTPC1s* inhibits cryptogein-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase and programmed cell death. (A) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increases induced by cryptogein (1 μM) in control cell and *NtTPC1s*-cosuppressing line. The 7-day-old cells after subculture were diluted (1/5) in fresh growth medium and incubated with 1 μM coelenterazine for 6 h. Data are from one representative experiment of six independent experiments. (B) Defense-related gene expression in *NtTPC1s*-cosuppressing cells (or line). Cryptogein (1 μM) or DW was applied to the BY-2 cells and the expression of defense-related genes (*Hsr203J* and *Hin1*) was analyzed by RNA gel blot analysis. (C) Cryptogein-induced cell death is suppressed in *NtTPC1s*-cosuppressing line. After 30 h after cryptogein (1 μM) application, dead cells were analyzed by Evans blue assay. Bars represent means \pm SE of four independent experiments.

NtTPC1s cosuppression caused inhibition of cryptogein-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase, defense-related gene expression, and PCD

To deduce physiological roles of NtTPC1s in cryptogein-induced Ca^{2+} signaling and defense responses, we analyzed the $[Ca^{2+}]_{cyt}$ changes, the cryptogein induced cell death, and the transcriptional level of defense-related genes in the *NtTPC1s*-cosuppressing line. Fig. 4A shows that cryptogein induced biphasic $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increases in control BY-2 cells as reported previously [22]. Cryptogein also induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ transients in *NtTPC1s*-cosuppressing line, but the increase was significantly suppressed in comparison with that of control cells, suggesting that NtTPC1s are involved in cryptogein-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase. To further characterize the role of NtTPC1s in cryptogein signaling pathway, we analyzed the induction of defense-related genes (Fig. 4B) and PCD (Fig. 4C). A hypersensitive response-related (*hsr*) gene, *hsr203J* that encodes a serine hydrolase with esterase activity, is postulated to regulate either the establishment or limitation of hypersensitive cell death [32]. The expression of the harpin-induced (*hin*) gene *hin1* is also reported to correlate with the hypersensitive response [33]. In control cells, the expression of *Hsr203J* and *Hin1* as well as PCD was induced 8 and 30 h after the application of cryptogein, respectively (Figs. 4B and C). Conversely, the expression of defense-related genes was delayed and suppressed, and PCD induction was also significantly suppressed in the *NtTPC1s*-cosuppressing line.

Discussion

Molecular cloning of putative voltage-dependent Ca^{2+} permeable channels (NtTPC1A and NtTPC1B) from tobacco

The overall structure of NtTPC1s is similar to the half of the general structure of α -subunits of voltage-activated Ca^{2+} channels [36]. The expression of *NtTPC1s* recovered the growth rate of a Ca^{2+} requiring mutant *cchl* (Fig. 2), suggesting that NtTPC1s could permeate Ca^{2+} from extracellular space to cytosol. The S4 segments of NtTPC1s have positively charged arginine residues (domain 1 and domain 2 have 4 and 5 arginine residues, respectively) and some of them are located at intervals of two amino acids (indicated with arrowheads in Fig. 1A). This structure is conserved among mammalian voltage-gated Ca^{2+} channels and functions as a voltage sensor [40]. In plants, influx of translocated sucrose to the mesophyll cells depolarizes the membrane potential since the sucrose- H^+ symporter that facilitates sucrose uptake on the plasma membrane is an electrogenic transporter [38] and may subsequently

activate a voltage-activated Ca^{2+} channel on the plasma membrane. BY-2 cells showed a transient $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase in response to sucrose, while *NtTPC1s*-cosuppressing cells did not induce any change (Fig. 3B). Considering from the conserved structure of voltage-sensor, these results may indicate that NtTPC1s are voltage-dependent Ca^{2+} -permeable channels. However, electrophysiological analyses of NtTPC1s are needed for direct identification of their voltage dependency. Furthermore, it should be a very important future research subject to show whether NtTPC1s are really responsible for the various kinds of voltage-dependent Ca^{2+} currents that have been electrophysiologically identified [41]. However, patch clamp analysis of ectopically expressed rat TPC1 and AtTPC1 in the *Xenopus* oocyte [35], and cultured animal cells (data not shown), respectively, was unsuccessful at this moment.

On the other hand, in the case of hypoosmotic shock [28,42], both control and *NtTPC1s*-cosuppressing line induced similar $[Ca^{2+}]_{cyt}$ change (Fig. 3B), suggesting that NtTPC1s may not be involved in hypoosmotic shock-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase.

The role of NtTPC1s in defense responses

We showed here that NtTPC1s are involved in the cryptogein-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase, defense-related gene expression, and induction of PCD. Pharmacological experiments have shown that the first peak of biphasic $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increases is influx of Ca^{2+} through the plasma membrane and this Ca^{2+} influx may activate the second peak of the $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase that are due to the release of Ca^{2+} from intracellular Ca^{2+} stores via an inositol trisphosphate-dependent pathway [21]. Suppression of *NtTPC1s* expression strongly inhibited both of the two peaks of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase (Fig. 4A), suggesting that NtTPC1s are required for the former Ca^{2+} influx through the plasma membrane in this response.

We also obtained BY-2 cell lines overexpressing *AtTPC1*. In comparison with the control lines, the *AtTPC1*-overexpressing cells showed enhanced cryptogein-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase and PCD (data not shown), suggesting that the strong inhibition of cryptogein-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ changes and PCD in *NtTPC1s*-cosuppressing line is due to the reduced expression level of NtTPC1s. Recently, Kurusu et al. [45] isolated a TPC1 homologue from rice (*OsTPC1*; GenBank Accession No. AB071014). Overexpressor of *OsTPC1* showed severer elicitor-induced cell death than control cells, while the knockout cells did not induce PCD (Kurusu et al., submitted). These results suggest that TPC1 play an essential role in induction of defense responses in both monocotyledonous and dicotyledonous plants.

In the *NtTPC1s*-cosuppressing line, sucrose-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase was completely inhibited (Fig. 3B), but

the inhibition of cryptogein-induced $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase was weaker. These results may suggest that other Ca^{2+} -permeable channels are also involved in cryptogein-induced $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ change. NtTPC1-independent Ca^{2+} influx may induce depolarization of the plasma membrane to activate NtTPC1s. AtCNGC2, a cyclic nucleotide-gated ion channel that permeate cations including Ca^{2+} and K^{+} [43], is suggested to have an essential role in induction of avirulent pathogen-induced PCD [44], suggesting that CNGCs may also be involved in elicitor-induced Ca^{2+} mobilization. Possible cooperative relationship between the TPC1 family and CNGCs in the elicitor-induced $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ changes may be an important future research subject.

In conclusion, the present results suggest that NtTPC1s are putative voltage-dependent Ca^{2+} -permeable channels at the plasma membrane and play significant roles in Ca^{2+} -mediated signal transduction induced by a fungal elicitor, cryptogein, as well as sucrose. Further characterization of NtTPC1s would reveal the molecular mechanisms for these signaling pathways and their roles in induction of downstream events.

Acknowledgments

The authors are grateful to Drs. Toyoki Amano and Toshio Sano for valuable technical suggestions, and to Drs. Kaoru Suzuki and Hiroaki Ichikawa for generous gifts of cDNA clones of *Hsr203J* and *Hin1*, and binary vector pSMAB704, respectively. We also thank Professor Jean-Claude Pernollet for donating the cryptogein. We are grateful to Dr. Tomonori Kawano for thankful discussion. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for the Research for the Future Program and Scientific Research (B) (No. 14340251) from the Japan Society for the Promotion of Science to K.K. and Grants-in-Aid for Scientific Research in Priority Areas from the Ministry of Education, Science, Culture, Sports and Technology, Japan, to K.K. (No. 13039015) and S.M. (No. 13039008) and a Scientific Research Grant (No. 14-155) from the Japan Society for the Promotion of Science to T.F.

References

- [1] S. Muto, Intracellular Ca^{2+} messenger system in plants, *Int. Rev. Cytol.* 142 (1993) 305–345.
- [2] D. Sanders, J. Pelloux, C. Brownlee, J.F. Harper, Calcium at the crossroads of signaling, *Plant Cell* 14 (Suppl.) (2002) S401–S417.
- [3] D. Sanders, C. Brownlee, J.F. Harper, Communicating with calcium, *Plant Cell* 11 (1999) 691–706.
- [4] J.P. Benitah, A.M. Gomez, J. Fauconnier, B.G. Kerfant, E. Perrier, G. Vassort, S. Richard, Voltage-gated Ca^{2+} currents in the human pathophysiologic heart: a review, *Basic Res. Cardiol.* 97 (Suppl. 1) (2002) I11–I18.
- [5] D. Lipscombe, J.Q. Pan, A.C. Gray, Functional diversity in neuronal voltage-gated calcium channels by alternative splicing of Ca(v)alpha1, *Mol. Neurobiol.* 26 (2002) 21–44.
- [6] Z.M. Pei, Y. Murata, G. Benning, S. Thomine, B. Klusener, G.J. Allen, E. Grill, J.I. Schroeder, Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells, *Nature* 406 (2000) 731–734.
- [7] P. Thuleau, J.M. Ward, R. Ranjeva, J.I. Schroeder, Voltage-dependent calcium-permeable channels in the plasma membrane of a higher plant cell, *EMBO J.* 13 (1994) 2970–2975.
- [8] L. Thion, C. Mazars, P. Nacry, D. Bouchez, M. Moreau, R. Ranjeva, P. Thuleau, Plasma membrane depolarization-activated calcium channels, stimulated by microtubule-depolymerizing drugs in wild-type *Arabidopsis thaliana* protoplasts, display constitutively large activities and a longer half-life in ton 2 mutant cells affected in the organization of cortical microtubules, *Plant J.* 13 (1998) 603–610.
- [9] J.P. White, C.H. Bowen, V. Demidchik, C. Nichols, M.J. Davies, Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1564 (2002) 299–309.
- [10] J.M. Ward, Z.M. Pei, J.I. Schroeder, Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants, *Plant Cell* 7 (1995) 833–844.
- [11] E. Ermolayeva, H. Holmeyer, E. Johannes, D. Sanders, Calcium-dependent membrane depolarisation activated by phytochrome in the moss *Physcomitrella patens*, *Planta* 199 (1996) 352–358.
- [12] A. Harada, T. Sakai, K. Okada, Phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca^{2+} differently in *Arabidopsis* leaves, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 8583–8588.
- [13] D.W. Ehrhardt, R. Wais, S.R. Long, Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals, *Cell* 85 (1996) 673–681.
- [14] K. Kuchitsu, M. Kikuyama, N. Shibuya, *N*-Acetylchitooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production, induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells, *Protoplasma* 174 (1993) 79–81.
- [15] M. Kikuyama, K. Kuchitsu, N. Shibuya, Membrane depolarization induced by *N*-acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells, *Plant Cell Physiol.* 38 (1997) 902–909.
- [16] T. Furuichi, K.W. Cunningham, S. Muto, A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca^{2+} flux in *Arabidopsis* leaf cells, *Plant Cell Physiol.* 42 (2001) 900–905.
- [17] M.C. Heath, Hypersensitive response-related death, *Plant Mol. Biol.* 44 (2000) 321–334.
- [18] B. Blume, T. Nurnberger, N. Nass, D. Scheel, Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley, *Plant Cell* 12 (2000) 1425–1440.
- [19] J. Ebel, A.A. Bhagwat, E.G. Cosio, M. Feger, U. Kissel, A. Mithöfer, T. Waldmüller, Elicitor-binding proteins and signal transduction in the activation of a phytoalexin defense response, *Can. J. Bot.* 73 (1995) 506–510.
- [20] M. Binet, C. Humbert, D. Lecourieux, M. Vantard, A. Pugin, Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells, *Plant Physiol.* 125 (2001) 564–572.
- [21] P. Ricci, P. Bonnet, J.C. Huet, M. Sallantin, F. Beauvais-Cante, M. Bruneteau, V. Billard, G. Michel, J.C. Pernollet, Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco, *Eur. J. Biochem.* 183 (1989) 555–563.
- [22] Y. Kadota, T. Goh, H. Tomatsu, R. Tamauchi, K. Higashi, S. Muto, K. Kuchitsu, Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells: pharmacological characterization of molecular relationship among cytosolic Ca^{2+} transients, anion efflux and production of reactive oxygen species, *Plant Cell Physiol.* (2004) 160–170.
- [23] D. Lecourieux, C. Mazars, N. Pauly, R. Ranjeva, A. Pugin, Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells, *Plant Cell* 14 (2002) 2627–2641.
- [24] J.W. Wallis, G. Chrebet, G. Brodsky, M. Rolfe, R. Rothstein, A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase, *Cell* 58 (1989) 409–419.

- [25] E.G. Locke, M. Bonilla, L. Liang, Y. Takita, K.W. Cunningham, A homolog of voltage-gated Ca^{2+} channels stimulated by depletion of secretory Ca^{2+} in yeast, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 6686–6694.
- [26] H. Iida, H. Nakamura, T. Ono, M.S. Okumura, Y. Anraku, MID1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a plasma membrane protein, is required for Ca^{2+} influx and mating, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 8259–8271.
- [27] T. Nagata, Y. Nemoto, S. Hasezawa, Tobacco BY-2 cell line as the “Hela” cell in the cell biology of higher plants, *Int. Rev. Cytol.* 132 (1992) 1–30.
- [28] K. Takahashi, M. Isobe, M.R. Knight, A.J. Trewavas, S. Muto, Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic Ca^{2+} in tobacco suspension-culture cells, *Plant Physiol.* 113 (1997) 587–594.
- [29] G. An, High efficiency transformation of cultured tobacco cells, *Plant Physiol.* 79 (1985) 568–570.
- [30] M.J. O’Donohue, H. Gousseau, J.C. Huet, D. Tepfer, J.C. Pernollet, Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding beta-cryptogein, an elicitor produced by *Phytophthora cryptogea*, *Plant Mol. Biol.* 27 (1995) 577–586.
- [31] M.J. O’Donohue, G. Boissy, J.C. Huet, C. Nespoulous, S. Brunie, J.C. Pernollet, Overexpression in *Pichia pastoris* and crystallization of an elicitor protein secreted by the phytopathogenic fungus, *Phytophthora cryptogea*, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 254–261.
- [32] D. Pontier, M. Tronchet, P. Rogowsky, E. Lam, D. Roby, Activation of *hsr203*, a plant gene expressed during incompatible plant–pathogen interactions, is correlated with programmed cell death, *Mol. Plant Microbe Interact.* 11 (1998) 544–554.
- [33] S. Gopalan, W. Wei, S.Y. He, *hrp* gene-dependent induction of *hin1*: a plant gene activated rapidly by both harpins and the *avrPto* gene-mediated signal, *Plant J.* 10 (1996) 591–600.
- [34] J.G. Turner, A. Novacky, The quantitative relation between plant and bacterial cells involved in the hypersensitive reaction, *Phytopathology* 64 (1974) 885–890.
- [35] K. Ishibashi, M. Suzuki, M. Imai, Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270 (2000) 370–376.
- [36] W.A. Catterall, Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 (2000) 521–555.
- [37] M. Fischer, N. Schnell, J. Chattaway, P. Davies, G. Dixon, D. Sanders, The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating, *FEBS Lett.* 419 (1997) 259–262.
- [38] D.R. Bush, Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44 (1993) 513–542.
- [39] T. Furuichi, I.C. Mori, K. Takahashi, S. Muto, Sugar-induced increase in cytosolic Ca^{2+} in *Arabidopsis thaliana* whole plants, *Plant Cell Physiol.* 42 (2001) 1149–1155.
- [40] H.A. Fozzard, D.A. Hanck, Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms, *Physiol. Rev.* 76 (1996) 887–926.
- [41] A.A. Very, H. Sentenac, Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane, *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 168–175.
- [42] K. Takahashi, M. Isobe, S. Muto, An increase in cytosolic calcium ion concentration precedes hypoosmotic shock-induced activation of protein kinases in tobacco suspension culture cells, *FEBS Lett.* 401 (1997) 202–206.
- [43] Q. Leng, R.W. Mercier, W. Yao, G.A. Berkowitz, Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel, *Plant Physiol.* 121 (1999) 753–761.
- [44] S.J. Clough, K.A. Fengler, I.C. Yu, B. Lippok, R.K. Smith Jr., A.F. Bent, The *Arabidopsis* *dnd1* “defense, no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 9323–9328.
- [45] T. Kurusu, Y. Sakurai, A. Miyao, H. Hirochika, K. Kuchitsu, Identification of a putative voltage-gated Ca^{2+} -permeable channel (OsTPC1) involved in Ca^{2+} influx and regulation of growth and development in rice, *Plant Cell Physiol.* 45 (2004) in press.

植物がストレスを感じる仕組みを「見る」

— ホルモン受容部位や情報の伝達を可視化するバイオイメーjing技術の開発 —

東京理科大学 理工学部・ゲノムセンター 朽津 和幸

移動することなく、環境変化に対応して自らの体を再構築することにより適応する戦略を進化させてきた植物は、さまざまな環境ストレスを感知し、情報を処理する仕組みを発達させてきた。悪環境に強い植物を育成したり、植物を環境浄化に役立てるためには、環境情報を認識する仕組みを分子レベルで明らかにすることが重要と考えられる。環境ストレスの情報を伝えるホルモン（アブシジン酸）の分子プローブや、それを蛍光標識して定量的に解析する技術を開発することにより、細胞表層でシグナルが検知される部位の分布を生きたまま観察する、すなわち機能を顕微鏡で「見る」ことが可能となった。

生物の生命活動を支える上で、生体分子の代謝ネットワークと同時に、情報伝達ネットワークが重要な役割を果たしている。実際、これまで機能面から分類されていた種々の生命現象の多くが、情報伝達の問題に帰着されることが次々と明らかにされつつある。植物は、動物とは異なる適応戦略を持って進化してきた。近年明らかにされたシロイヌナズナやイネのゲノム上に存在する情報伝達関連の遺伝子を動物と比較すると、それぞれが異なる遺伝子群を多様化させて来たことがわかる。多様な環境変化を察知する能力を発達させて来た植物が獲得した独自の情報伝達機構を研究することは、基礎、応用の両面から今後ますます重要性を増すと考えられる。

情報伝達の複雑なネットワークを解きほぐすためには、シグナル分子の時間的、空間的動態を生きたまま捉えることが鍵となる。近年、レーザー、画像解析などの技術革新に伴い、バイオイメーjingの技術発展が著しい。顕微鏡はもはや構造を観察する道具ではなく、生きたままの細胞内で働く分子の機能的な情報を得る場となる。そこで本研究では、ストレス応答過程における細胞内のシグナル分子の動態を生きたまま可視化する技術を開発することを目標とした。

植物が乾燥、高塩濃度、低温、凍結などの環境ストレスにさらされると、細胞は水ストレスの問題解決を迫られる。そのとき、アブシジン酸（ABA）と呼ばれる植物ホルモンの合成が誘導され、気孔の孔

辺細胞に働き、気孔を閉鎖すると共に、ストレス応答に関連した遺伝子発現調節を司る。例えば、水ストレスに応答した浸透圧調節物質、プロリンの合成は、ABAにより誘導される。またABAは成長制御にも関与し、ストレスにさらされたときに一時的に栄養成長を停止し、エネルギーをストレスから身を守る防御のために振り向けると考えられる。近年の分子遺伝学的研究の急速な進展にもかかわらず、ABAの受容体の分子実体は解明されておらず、その局在部位も定かではない。そこで本研究では、ABAを光らせて、ABAが生きた細胞のどこでどのように認識されるかを目で見えることを試みた。

ホルモン等の一次性シグナル伝達分子が細胞膜上の受容体で認識された後、細胞内で情報が処理・伝達される機構を解析するためには、特異的な分子プローブを用いて可視化解析を行うことが有効と考えられ、その方法論の開発が重要な課題である。そこでABAをビオチン化した誘導体（bioABA；図1A）を合成し、蛍光ラベルされたアビジンを用いて、細胞表層の受容部位を三次元的に可視化することを試みた。ビオチン化したABA（bioABA）は、ソラマメの気孔孔辺細胞においてABAと同様の生理活性が認められたので、これを分子プローブとして用いることにより、ABA結合部位の可視化と定量解析を行った。bioABAと蛍光標識化アビジン処理で、孔辺細胞プロトプラスト（GCP）表層のbioABA結合部位の可視化が可能となった（図1B）。さらにフ

「形態・生理」課題名：植物細胞のストレス応答シグナル伝達過程のバイオイメーjing

キーワード：ストレス、植物ホルモン、アブシジン酸、気孔、シグナル伝達、受容体、プロトプラスト、バイオイメーjing、分子プローブ

連絡先：東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 朽津 和幸 (Tel: 04-7122-9404 ; e-mail : kuchitsu@rs.noda.tus.ac.jp)

ローサイトメトリーを用いた実験系を確立し、GFPの蛍光を定量的に解析した(図1C)。bioABAのGFPへの結合は、無標識のABAの添加により濃度依存的に阻害され、GFPの事前のプロテアーゼ処理により抑制された。生理活性のあるABAの構造類縁体はbioABAの結合を阻害したが、活性のない類縁体は阻害しなかった。一方、ABAと共存させることによりABA活性を阻害した類縁体は、bioABAの結

合を阻害した(図1D)。これらの結果は、細胞膜上のABA受容体タンパク質の可視化が可能となったこと、気孔孔辺細胞の細胞表層にABA受容部位が存在することを示唆している¹⁾。さらに最近この手法を、全ゲノム構造が明らかになっているシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)やその突然変異株に応用することに成功し、受容体同定に向けた重要な基礎が確立された。

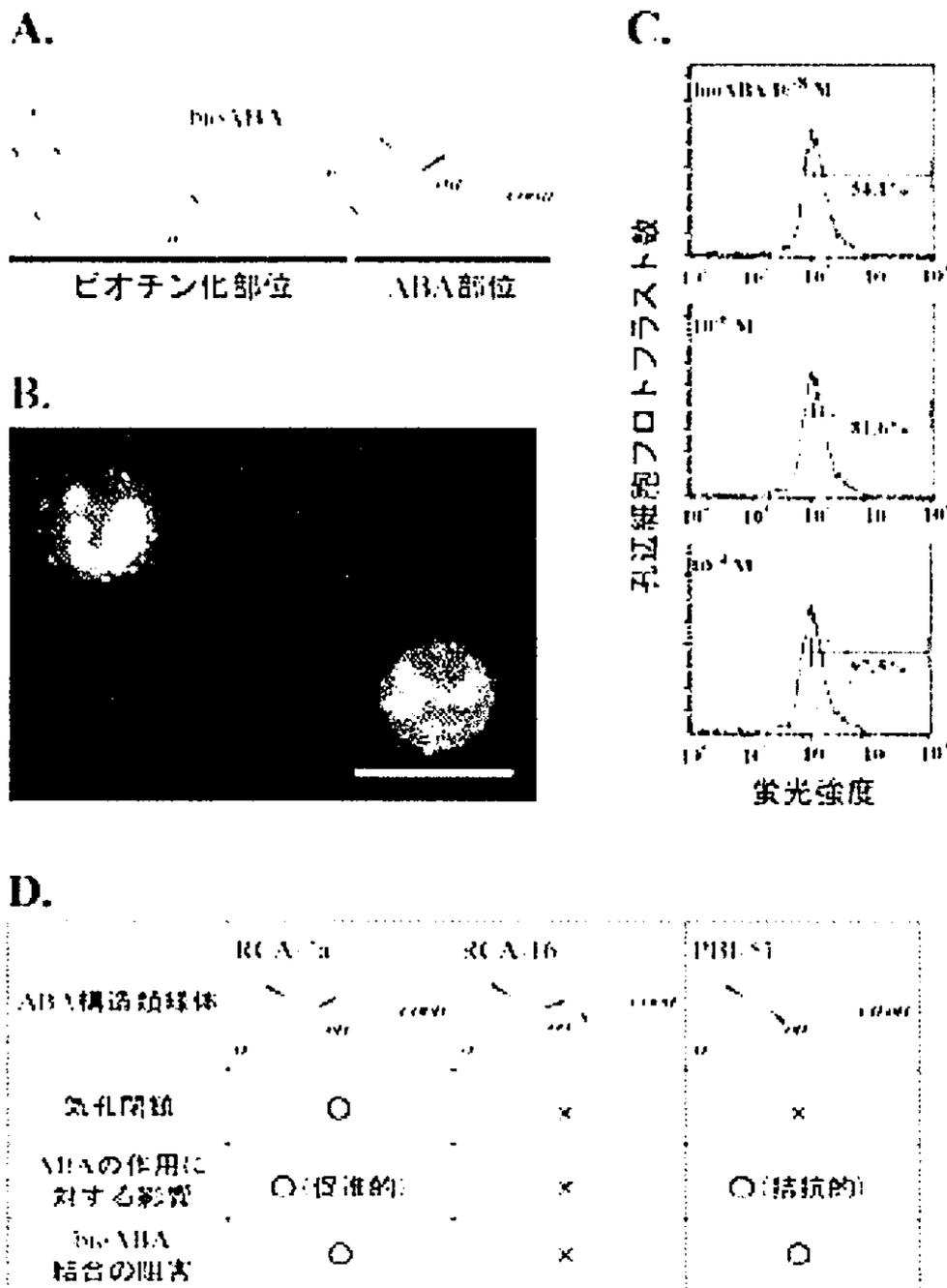


図1. ピオチン化アブシジン酸(bioABA)を用いたアブシジン酸(ABA)受容部位の可視化。(A) bioABAの構造。(B) ソラマメの葉の気孔孔辺細胞プロトプラストにおける、ABA結合部位の可視化(蛍光顕微鏡像)。緑色は標識アビジンの蛍光、赤色は葉緑体の自家蛍光を示す。(C) フローサイトメトリー法による蛍光強度の定量化。実線は対照、点線はbioABAを示す。bioABAは濃度依存的に孔辺細胞プロトプラストに結合する。(D) bioABAの結合に対するABA構造類縁体の影響。

植物ホルモンABAの特異的なタンパク質性の結合部位を生きのまま可視化することにより、細胞表面にパッチ状に点在する状態を生きのまま可視化することが可能となった。最近私たちの研究グループでは、シグナル伝達系において受容体の直下で機能し、細胞の情報伝達に重要な役割を果たす細胞膜のCa²⁺チャネル分子を同定することに成功した²⁷⁾。このタンパク質の細胞内分布を調べたところ、ABA受容部位と同様に細胞膜上にパッチ状に点在することが明らかとなった。細胞膜上の特定の部位に、外部からの情報を受け取る受容体と、その情報を細胞内部に伝える情報伝達因子が複合体を形成し、効率よく情報を伝達しているのかも知れない。

こうした情報伝達系の分子的な実体解明の研究は、今端緒についたばかりである。今後は、一次性シグナル分子受容体の活性化と、二次性シグナル分子の動員を、バイオイメージング法を用いて可視化解析する技術を確立することにより、シグナル伝達系における各種細胞ごとの個性や情報の仕分けの分子機構など、従来の方法では解析できなかった、細胞レベルにおける情報処理に関連した高次の生命現象を統合的に解析することが可能になると期待される。さらにバイオイメージング法に代表される分子生理学的手法、遺伝子の単離と遺伝子産物の機能解析を行う分子生物学的手法、突然変異体とその原因遺伝子のクローニングを行う分子遺伝学的手法などを巧みに有機的に組み合わせることが、研究の飛躍的な進展の鍵となると期待される。

論文発表等

1. Yamazaki, D., Yoshida, D., Asami, T., and Kuchitsu, K.
Visualization of abscisic acid perception sites on the

plasma membrane of stomatal guard cells. *Plant J.*, **35**, 129-139 (2003).

2. Kadota, Y., Goh, T., Tomatsu, H., Tamauchi, R., Higashi, K., Muto, S. and Kuchitsu, K. Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells: pharmacological characterization of molecular relationship among cytosolic Ca²⁺ transients, anion efflux and production of reactive oxygen species. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 160-170 (2004).
3. Kadota, Y., Furuichi, T., Ogasawara, Y., Goh, T., Higashi, K., Muto, S., and Kuchitsu, K. Identification of putative voltage-dependent Ca²⁺-permeable channels involved in cryptogein-induced Ca²⁺ transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 823-830 (2004).
4. Kurusu, T., Sakurai, S., Miyao, A., Hirochika, H., and Kuchitsu, K. Identification of a putative voltage-gated Ca²⁺-permeable channel (OsTPC1) involved in Ca²⁺ influx and regulation of growth and development in rice. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 693-702 (2004).
5. Karita, E., Yamakawa, H., Mitsuhashi, I., Kuchitsu, K., and Ohashi, Y. Three types of tobacco calmodulins characteristically activate plant NAD kinase at different Ca²⁺ concentration and pHs. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1371-1379 (2004).
6. Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Higashi, K., Sano, T., Nagata, T., Hasezawa, S., and Kuchitsu, K. Crosstalk between elicitor-induced cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 cells. *Plant J.*, **40**, 131-142 (2004).
7. Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Maeda, M., Ohno, R., Higashi, K., Sano, T., Muto, S., Hasezawa, S., and Kuchitsu, K. Cell-cycle dependence of elicitor-induced signal transduction in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.*, in press.

2 アブシジン酸シグナル伝達とイオンチャネル

Abscisic Acid Signal Transduction and Ion Channels

来須孝光*, 朽津和幸*, ** †

Kurusu Takamitsu, Kuchitsu Kazuyuki

*東京理科大学 理工学部 応用生物科学科, **東京理科大学 ゲノム創薬研究センター 細胞シグナル制御部門

† E-mail: kuchitsu@rs.noda.tus.ac.jp

KEY WORDS ● アブシジン酸 (ABA), イオンチャネル, Ca^{2+} 振動, 二次メッセンジャー, リン酸化/脱リン酸化

葉の気孔閉鎖がアブシジン酸(ABA)により誘導される際の情報伝達系の上流では, Ca^{2+} に代表される細胞質のイオン濃度変化や膜電位の変化が重要な役割を果たしており, 複数のイオンチャネルによって制御されている。ゲノム情報に基づく分子遺伝学的研究と, バイオイメージング法などの分子生理学的研究が車の両輪として進展した結果, 情報伝達系とその調節に関与する多くの因子や, 植物独自のイオンチャネルの制御機構が明らかになりつつある。

はじめに

生物の生命活動を支えるうえで, 生体分子の代謝ネットワークと同時に, 情報伝達ネットワークが重要な役割を果たしている。実際, これまで機能面から分類されていた種々の生命現象の多くが, 情報伝達の問題に帰着されることが次々と明らかにされつつある。植物は, 動物とは異なる適応戦略をもって進化してきた。近年明らかにされたシロイヌナズナやイネのゲノム上に存在する情報伝達関連の遺伝子を動物と比較すると, それぞれが異なる遺伝子群を多様化させてきたことがわかる。多様な環境変化を察知する能力を発達させてきた植物が獲得した独自の情報伝達機構を研究することは, 基礎, 応用の両面から今後ますます重要性を増すと考えられる。

植物ホルモンの作用機作研究においては, これまで植物個体にホルモンを投与する研究

が先行し, その多機能性が強調されてきた。しかし近年のゲノム解析の進展や, 突然変異体から得られた情報により, 各組織・細胞で発現する情報伝達機構の実体が解明され, 多様な作用を分子レベルで統一的に理解することが可能になりつつある。

アブシジン酸(abscisic acid; ABA)は, 種子などの生殖器官と, 栄養器官の両方で生理作用をもつ。生殖器官における代表的機能としては, 種子における休眠と発芽の制御があげられる。一方, 栄養器官においては, 主として水ストレスによってABAが増加する。水ストレスは, 乾燥の他, 高塩濃度, 低温, 凍結などの環境ストレスにも起因する。ABAは気孔*1の孔辺細胞に働き, 気孔を閉鎖するとともにストレス応答に関連した遺伝子発現調節を司る。例えば, 水ストレスにตอบสนองした浸透圧調節物質であるプロリンの合成は, ABAにより誘導される¹⁾。またABAは成長制御にも関与し, エチレン(ethylene)とのクロストークも指摘されている^{2), 3)}。

本稿では, まず情報伝達におけるイオンの重要性, およびそれを制御しているイオンチャネル*2について概説した後, ABA情報伝達に関与する受容体やイオンチャネルの分子実体とその制御機構に関する研究の現状を概観する。特にモデル系として最も研究の進んでいる, 孔辺細胞におけるABAによる気孔閉鎖の制御機構に焦点を当てて, 最近の知見を踏まえて解説するとともに, 植物独自の情報伝達系の解明に向けた将来を展望したい。

*1 気孔

葉などの表皮組織に存在する孔で, 開閉を制御し大気と植物体内とのガス交換の調節を行っており, CO_2 の取込みと蒸散の95%以上を支配している。蒸散は, 道管における水の移動, 根の吸水, 土壌からの無機養分の取込みの原動力となる。

*2 イオンチャネル

生体膜を貫通して存在し, 特定のイオンを選択的に透過させる孔(channel)を形成する膜タンパク質で, 開閉の2つの状態をとることにより, イオンの流出入を制御している。開口状態では, イオンは膜内外の濃度勾配と電位差に従ってエネルギー非依存的に受動輸送される。イオンチャネルには, 透過するイオンに対する選択性の高いものや低いものがあり, イオン選択性によって分類される。プロトプラストなどにパッチクランプ法^{97), 98)}(*8参照)を適用することにより, ささまざまなイオンチャネルの性質を解析することができる。イオンチャネルの開閉は, 一般に膜電位や種々の情報伝達物質などによって調節されている。 K^+ チャネル閉鎖の分子機構の解明により, 2003年のノーベル化学賞がMacKinnonに贈られた。

◆ 1. 植物の情報伝達とイオンチャネル

動物の神経系に代表されるように、生物は情報の伝達に膜電位^{*3}やイオン濃度の変化を利用している。この際、カルシウムイオン(Ca²⁺)などのイオンが二次メッセンジャー^{*4}として特に重要な役割を果たしており、時間的・空間的なイオン濃度の調節には、イオンチャネルが関与している。神経系では、ナトリウムイオン(Na⁺)チャネルが電気信号を伝えるうえで重要不可欠な機能を果たす。血液は150mMのNa⁺を含んでおり、細胞内外のNa⁺の濃度勾配は非常に大きい。それに対して、生理食塩水濃度のNa⁺存在下で生育、増殖できる陸上植物は、特別な耐塩機構を発達させたものに限られており、多くの植物はNa⁺濃度が高い環境では生育できない。実際、動物細胞などでNa⁺の濃度勾配を形成するのに重要な働きを担っているNa⁺/K⁺-ATPaseや、神経細胞などの情報伝達に重要な役割を果たしているNa⁺チャネルは一般に植物細胞には存在しない。植物のイオンチャネルの情報伝達系における役割やその分子機構は、動物細胞と大きく異なると思われる。

● 1. K⁺チャネル^{*5}

酵母細胞の機能相補クローニング法を用いて、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)から、*KATI*⁴⁾と*AKT1*⁵⁾が植物のイオンチャネルとして最初に単離された。この2つの遺伝子は互いに相同性をもつと同時に、動物細胞のShaker型K⁺チャネル^{*6}と相同性があった。アフリカツメガエル(*Xenopus*)の卵母細胞^{*7}に*KATI*のmRNAを注入し大量発現させた実験の結果、*KATI*産物は動物細胞のShaker型とは逆の整流性をもつK⁺_{in}チャネルであることが判明した⁶⁾。卵母細胞で発現させて解析した*KATI*の電気生理学的性質と、パッチクランプ法^{*8}により解析した孔辺細胞のK⁺_{in}チャネルの性質がよく一致することから、*KATI*産物が孔辺細胞のK⁺_{in}チャネルの実体と考えられてきたが、*KATI*を破壊したシロイヌナズナでも正常な気孔開閉が起り、変異植物体の孔辺細胞における内向きK⁺電流は野生型と変わらない⁷⁾。実際植物

表1 シロイヌナズナの細胞膜Ca²⁺透過性チャネル候補遺伝子群

チャネル	透過するイオン	遺伝子数
膜電位依存性		
TPC1 (two-pore channel 1)	Ca ²⁺	1
リガンド依存性		
CNGC (cyclic nucleotide-gated channel)	K ⁺ , Rb ⁺ , Cs ⁺ , Ca ²⁺ , Pb ²⁺	~20
iGluR (ionotropic glutamate receptor)	Ca ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺	~20

文献17を参考にした。

の孔辺細胞には5種のShaker型K⁺チャネルが発現していることが確認されており、KAT1, KAT2, AKT1はK⁺輸送活性をもつ⁸⁾。AKT1は根で強く発現しており、破壊株においては低濃度のK⁺では生育が抑制され、また根毛における内向き電流はほぼ完全に消失することから、AKT1は根における最も重要な栄養源の一つであるK⁺の吸収に関与していると考えられている⁹⁾。

AKT2は比較的整流性の低いK⁺チャネルであり、膜電位が静止電位よりもプラスの時には外向きにK⁺を輸送し、マイナスの時には逆に内向きにK⁺を輸送する¹⁰⁾。AKT2は主に節節部に発現しており、ABAによって発現誘導されるが¹⁰⁾、遺伝子破壊株に明確な表現型は観察されず、機能は不明な点が多い¹¹⁾。

● 2. Ca²⁺チャネル

電気生理学的研究から、植物の細胞膜には膜電位依存性、機械刺激受容性や、イオン選択性の低い陽イオンチャネルなどのCa²⁺透過性のイオンチャネルが存在すると考えられてきた。近年のゲノム解析の進展により、これら一部のCa²⁺透過性チャネル候補遺伝子がようやく単離されつつある(表1)。ABAを含む多くの情報伝達系において膜電位変化が観察されており、膜電位依存性Ca²⁺チャネルは、膜電位変化に伴って大量のCa²⁺を細胞外から細胞質に動員する機能を担っている可能性がある¹²⁾。しかし植物のゲノム中には、動物に多種存在し広く研究されているL型電位依存性Ca²⁺チャネルは存在せず、その分子の実体は謎であった。2000年になってラットで単離された機能未知の新奇Ca²⁺チャネルをコードするTPC1¹³⁾の相同遺伝子が植物ゲノ

*3 膜電位

膜によって隔てられた溶液の間に発生する電位差。植物細胞の膜電位は一般に動物細胞に比べてより大きく、しばしば-200mVに達する。これは、細胞膜のP型H⁺輸送性ATPaseなどのATPの加水分解と共役した起電性イオンポンプによる成分と、イオンチャネルによって規定され膜内外のイオン(主にK⁺)の不均等分布によって生じる拡散電位成分とから成る。

*4 二次メッセンジャー

一般に生物は、受容体で外界の情報(ABAなどのホルモンのような一次シグナル)を認識し、一連の情報伝達カスケードあるいはネットワークを介して、核における遺伝子発現その他の細胞機能の調節を制御する。この過程では、タンパク質同士の相互作用と並んで、二次メッセンジャーと総称される低分子物質が情報の伝達と増幅を担う。細胞質内の遊離Ca²⁺、cAMP・cGMPなどの環状ヌクレオチド、IP₃などのイノシトールリン脂質などが代表的なものであるが、植物細胞における機能は十分に理解されていないものも多い。

ムに存在することが明らかとなり、シロイヌナズナから *AtTPC1* 遺伝子が単離された¹⁴⁾。TPC1ファミリーは、動植物を含めて広範囲の生物種に存在し、細胞膜を介した細胞外からの Ca^{2+} 流入に関与する可能性が考えられるが、その生理活性や機能はほとんど不明であり、今後の解析が待たれる。

●3. 陰イオンチャネル

一般に陰イオンチャネルのイオン選択性は低く、 Cl^{-} をはじめとして多種の陰イオンを輸送する。植物には、動物に広くみられる Cl^{-} チャネルをコードする *CLC*ファミリーの相同遺伝子が数多く存在する¹⁵⁾。しかしこれまでに解析されたものはいずれも細胞内膜系に局在するもので¹⁶⁾、細胞膜の膜電位変化など、情報伝達系に関与すると想定される、細胞膜局在の陰イオンチャネルの実体は依然として不明である。

◆ 2. ABAによる気孔孔辺細胞の閉鎖誘導の分子機構

植物が陸上に進出する過程で、水分の蒸発を制御するため、植物は気孔を発達させた。すなわち気孔以外の部分で水分の蒸発を抑える構造を作り、体内の水分量に応じて気孔の開度を巧みにコントロールすることで体内の水分量を制御する。水ストレスのシグナルを伝達するホルモンとしてABAが利用される。

ところが、植物の光合成は CO_2 の供給が律速となることが多い。葉類にみられるような無機炭素濃縮機構¹⁸⁾をもたない陸上植物では、 CO_2 は基本的には拡散によって葉緑体内の炭酸固定酵素 RuBisCO に供給される。 CO_2 の拡散の最大の障壁は、多くの場合気孔である。強光下で光合成の光化学反応速度が高いにもかかわらず CO_2 の供給が追いつかないと、単に光合成速度が低下するだけでなく、余った還元力は活性酸素の発生などにつながり植物の傷害の重大な原因となる。そのため、水分の蒸散および CO_2 の吸収の鍵を握る重要な組織である気孔の開度は、水ストレスの状態だけでなく、光、湿度、 CO_2 濃度などによっても調節されている。

気孔が閉鎖する際には、孔辺細胞に蓄積されていた K^{+} と Cl^{-} に代表される大量のイオ

ンが細胞内から細胞外に排出される。孔辺細胞においても他の大部分の植物細胞と同様、細胞体積の大部分は液胞によって占められている。すなわち、気孔閉鎖の際には、 K^{+} 、 Cl^{-} などのイオンが液胞膜、細胞膜の2種類の膜を通過して細胞外に輸送されると考えられる。

●1. ABA受容体

エチレンやサイトカイニン、ブラシノステロイド等に対する受容体が単離され、その実体はいずれも細胞膜に局在するプロテインキナーゼと考えられているが、ABAの受容体についてはその分子の実体はおろか、その局在部位も不明な点が多い。ABAを細胞内に顕微注射した実験から、気孔の孔辺細胞¹⁹⁾と種子の糊粉層のアリユーロン細胞²⁰⁾の両方で、細胞外にABAを検知する受容体が存在することが示唆されている。一方、ケージドABA^{*9)}を用いた実験²¹⁾などは、細胞内にABA受容体が存在する可能性を示唆している。最近、ソラマメ (*Vicia faba*) の孔辺細胞から42kDaのABA結合タンパク質が単離され、細胞膜上でのABA受容に関与する可能性が指摘されている²²⁾が、このタンパク質をコードする遺伝子はまだ同定されていない。筆者らは、ABAにビオチンを付加させたビオチン化ABAが組織・細胞レベルの両方でABAの生理活性をもつことを見だし、それを分子プローブとして用いて受容部位の可視化を試みた。蛍光標識アビジンを用いて可視化したところ、ABA結合部位が細胞膜上にパッチ状に存在していた(図1)²³⁾。フローサイトメータとレーザー共焦点蛍光顕微鏡を用いて定量解析した結果、細胞膜上に可視化された未知の分子はタンパク質性のABA受容体としての性質を示すと考えられた。このような受容部位の可視化技術は、受容体候補遺伝子の解析や情報伝達機構の解析に有効であると期待される。

非常に多くの構造の化合物が活性をもつオーキシンやジベレリンなどの植物ホルモンとは対照的に、天然に存在するアブシジン酸活性をもつ化合物は基本的にABAのみと考えられ、ABA活性をもつ合成化合物の種類も限られている。しかし、これらの化合物の構造的特異性は、器官、組織、現象によって異なる

*5 K^{+} チャネル

カリウムイオン (K^{+}) に対する特異性が高いイオンチャネル。 K^{+} チャネルは、両方向に同じようにイオンを透過させるのではなく、その分子構造によってイオンを透過させやすい方向性をもつ。これを整流性と呼ぶ。細胞膜に存在する K^{+} チャネルには、 K^{+} の細胞外から細胞質への流入を媒介する内向き整流性 K^{+} チャネル (K^{+}_{in} チャネル) と、 K^{+} の細胞質から細胞外への排出を媒介する外向き整流性 K^{+} チャネル (K^{+}_{out} チャネル) とがある。

*6 Shaker型 K^{+} チャネル

膜電位依存性 K^{+} チャネルの一群で、最初ショウジョウバエの *Shaker* 突然変異体の原因遺伝子として単離されたことからこのようによばれる。S1~S6の6つの膜貫通領域と、H5とよばれるポア(イオンの通る孔)形成部位を含むサブユニットが集合して、一般に4量体として機能する。

*7 卵母細胞

一般に、クローニングされた膜タンパク質の遺伝子の機能を解析するためには、その遺伝子産物を大量発現させ電気生理学的な解析を行う必要がある。こうした実験系として、アフリカツメガエルの卵母細胞や、昆虫の細胞がよく使われる。

*8 パッチクランプ法

ガラス管微小電極(パッチピペット)を膜に密着させて、ピペット内領域を外部から電気的に隔絶する(ギガシールとよばれる)ことにより、イオンチャネルを通過するイオンの流れを電気的に測定する方法。この方法を開発した功績により、1991年のノーベル医学生理学賞がNeher²⁷⁾とSakmannに贈られた。

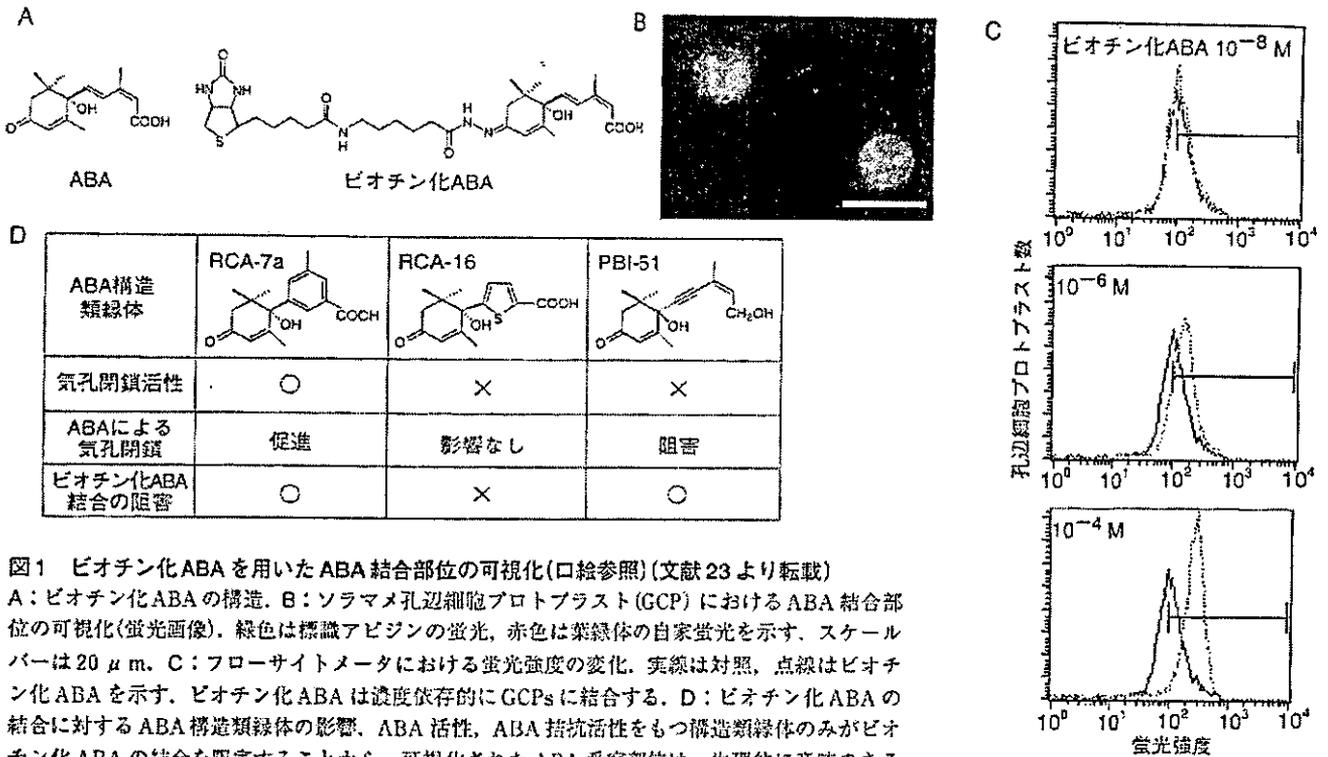


図1 ビオチン化ABAを用いたABA結合部位の可視化(口絵参照)(文献23より転載)

A: ビオチン化ABAの構造。B: ソラマメ孔辺細胞プロトプラスト(GCP)におけるABA結合部位の可視化(蛍光画像)。緑色は標識アビジンの蛍光、赤色は葉緑体の自家蛍光を示す。スケールバーは20 μ m。C: フローサイトメータにおける蛍光強度の変化。実線はビオチン化ABAを示す。ビオチン化ABAは濃度依存的にGCPsに結合する。D: ビオチン化ABAの結合に対するABA構造類縁体の影響、ABA活性、ABA拮抗活性をもつ構造類縁体のみがビオチン化ABAの結合を阻害することから、可視化されたABA受容部位は、生理的に意味のあるABAシグナルを選択的に受容すると考えられる。

ることから、ABAの受容体は複数存在し、組織ごとに微妙に異なっている可能性も指摘されている。

●2. 二次メッセンジャー

1) Ca^{2+} 振動

孔辺細胞をABAで処理すると、一般に細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇する²⁴⁾。ソラマメの孔辺細胞のプロトプラストを用いた実験では、ABA処理後2秒以内にイオン選択性の低い陽イオンチャネルが活性化されるとともに、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇する²⁵⁾。すなわち、ABAによる気孔の閉鎖には、細胞外からの Ca^{2+} の流入が必要である。カメレオンとよばれる Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質⁹⁵⁾を用いた最近の研究から、ABA処理により植物の細胞質内で特徴的な Ca^{2+} 濃度の振動(Ca^{2+} 振動*10)が発生していることが明らかとなった²⁶⁾(図2)。細胞質内において時間的・空間的な Ca^{2+} 濃度勾配が形成され、単純な陽イオンである Ca^{2+} が二次メッセンジャーとしてさまざまなシグナルを下流に伝達していると考えられる。実際ABAによって引き起こされる特異的な Ca^{2+} の振動が観察されないような

変異体では気孔の閉鎖は誘導されない^{27), 28)}。ABAシグナル以外においても、この Ca^{2+} 振動の特異的な変化パターンは動物細胞における例²⁹⁾と同様に、植物における重要な情報をコードしているのかもしれない。

2) 活性酸素

近年、活性酸素(reactive oxygen species; ROS)の一種である H_2O_2 (過酸化水素)が情報伝達系に関与する可能性が議論されている。ABA処理により H_2O_2 の蓄積が観察されるとともに、ABA処理によって観察される Ca^{2+} チャネルの活性化パターン³⁰⁾は、 H_2O_2 により活性化される過分極活性化型 Ca^{2+} チャネルの活性化パターンとよく似ている³¹⁾。また H_2O_2 の生成に関与すると考えられるNADPHオキシダーゼをコードする遺伝子*AtrbohD*、*F*の二重変異体では、 H_2O_2 の産生がみられず、また気孔の閉鎖が抑制される³²⁾。こうした結果は、ABAにより誘導される細胞膜を介した Ca^{2+} 流入の上流にNADPHオキシダーゼが重要な機能を担っており、活性酸素(H_2O_2)が Ca^{2+} 動員の調節因子として機能することを示唆している。しかしNADPHオキシダーゼ

*9 ケージドABA

基になる生理活性物質を化学的に修飾し、基本骨格となる分子の性質を光分解性保護基でマスクしたものをケージド(caged)化合物とよぶ。あらかじめ目的の場所に導入しておくことにより、紫外光など光の照射で、瞬時に目的位置のみで生理活性物質を遊離させることができる。ケージド Ca^{2+} 、ケージドABA、ケージド IP_3 等が開発されているが、利用する場合には通常、細胞質に顕微注射する必要がある。

*10 Ca^{2+} 振動

複数のイオンチャネル等が制御された結果、細胞質の遊離の Ca^{2+} 濃度が特定の振幅、周期をもって変動すること、特定の周期や振幅自体がシグナルとして作用していると考えられている。

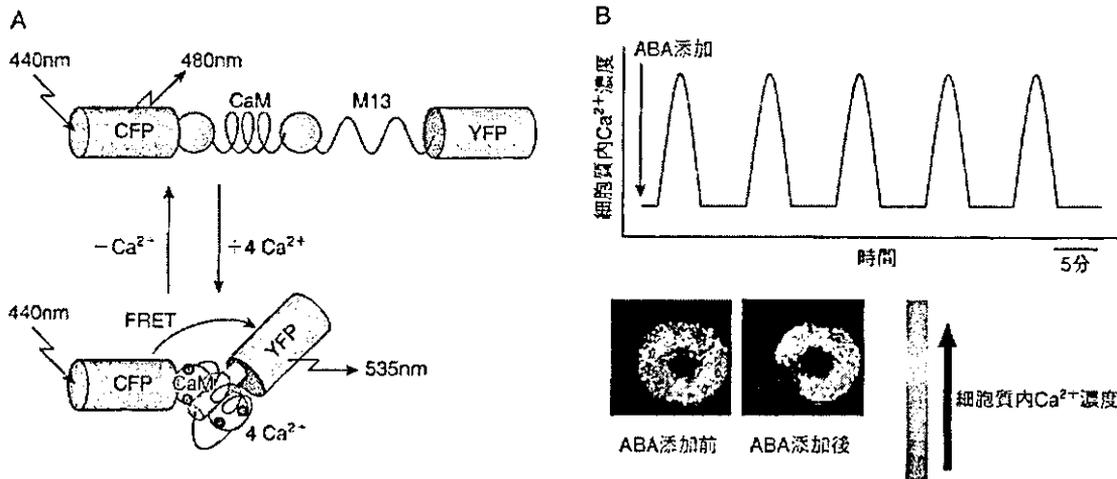


図2 Ca²⁺感受性蛍光タンパク質カメレオンによる細胞質内Ca²⁺濃度の測定とABA処理にみられる特徴的なCa²⁺振動(口絵参照)

A: カメレオンの構造(文献95より転載)。Ca²⁺が結合すると、CFPからYFPへの蛍光共鳴エネルギー移動が誘起され、長波長側の蛍光が観察される。B: カメレオンによるCa²⁺イメージングとABA処理による特徴的なCa²⁺濃度変化(文献96より一部改変)。

の活性化機構や、ABAに呼応してCa²⁺の流入を担うイオンチャネルの分子実体は解明されていない。一方、植物のNADPHオキシダーゼ(rboh)ファミリーは、N末端領域にEFハンド(Ca²⁺結合)モチーフをもち、その活性がCa²⁺によって調節される可能性が指摘されており、活性酸素とCa²⁺は植物の多くの情報伝達系で、相互依存的に制御していると考えられる³³⁾。

3) イノシトールリン脂質とcADPRリボース

ケージドIP₃を細胞内に導入して、細胞内のイノシトール1,4,5-3リン酸(IP₃)濃度を高めると、細胞内のCa²⁺濃度が上昇するとともに気孔は閉鎖する³⁴⁾。IP₃やサイクリックADPリボース(cADPR)は、動物の細胞内カルシウム貯蔵庫からCa²⁺を放出させる機能をもつ二次メッセンジャーとして知られているが、植物細胞の液胞においてもIP₃やcADPRで処理するとCa²⁺が動員されることが報告されている³⁵⁾。また孔辺細胞プロトプラストをABA処理するとIP₃の増加が認められる³⁶⁾。ツクサ(*Commelina communis*)孔辺細胞にcADPRを注入すると細胞内のCa²⁺濃度上昇が起こり、気孔が閉鎖する³⁷⁾。またIP₃を生成するホスホリパーゼC(PLC)やcADPRを生じるADP-リボシルシクラーゼの阻害剤

を加えると、ABAによる気孔閉鎖がそれぞれ部分的に阻害され、両者を同時に処理するとABAによる気孔閉鎖が完全に阻害される³⁸⁾。実際、孔辺細胞に発現するPLCの発現レベルを抑制させても、部分的な阻害しか起こらない³⁹⁾ことから、IP₃とcADPRによる2種の細胞内Ca²⁺動員経路がともに機能していると考えられる(図3)。IP₃やcADPRによるCa²⁺の遊離はいずれも液胞などの細胞内Ca²⁺貯蔵庫に由来し、細胞内膜系のイオンチャネルに作用すると想定されるが、現段階では植物細胞においてIP₃受容体や、リアノジン受容体*11などのCa²⁺チャネルは発見されていない。またIP₃以外にIP₆も、孔辺細胞におけるCa²⁺遊離に関与する可能性が示唆されている⁴⁰⁾。

一方、ホスホリパーゼDの働きによりホスファチジルコリンから遊離したホスファチジン酸(PA)は、動物において重要なシグナル物質として機能する。孔辺細胞でも、ABAによりPAが一過的に増加する。ABAの代わりにPAを与えると、気孔の部分的な閉鎖と開口阻害が観察された。一方で細胞内Ca²⁺濃度に変化がみられなかったことから、PAもABAの情報伝達に関与し、Ca²⁺シグナルの下流に関与すると考えられる⁴¹⁾。

*11 リアノジン受容体
ER(小胞体)など細胞内のCa²⁺貯蔵庫の膜上に存在するCa²⁺チャネルには、IP₃によって活性化されるIP₃受容体のほかに、Ca²⁺自身によって活性化され、CICRを誘導するものがある。このイオンチャネルは植物アルカロイドのリアノジンにより特異的に阻害されることから、リアノジン受容体とよばれる。

A イオンチャネルの機能

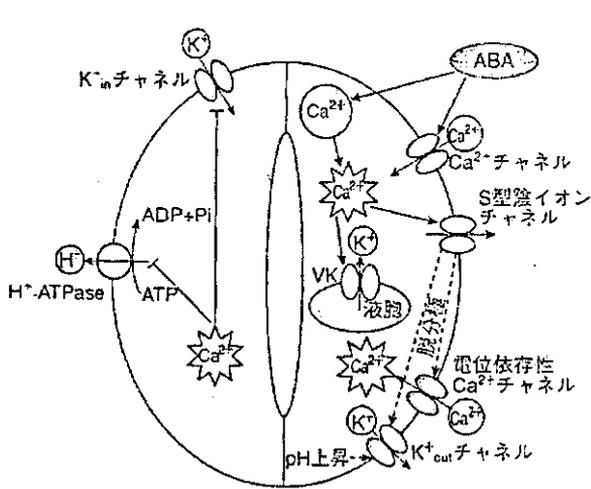
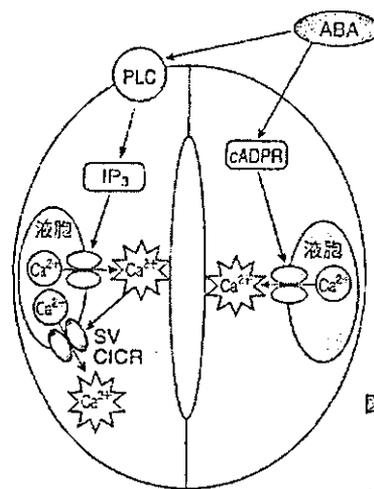
B 細胞内のCa²⁺動員

図3 気孔閉鎖におけるイオンチャネルの機能と情報伝達機構のモデル(文献96より一部改変)
A:イオンチャネルの機能, B:細胞内のCa²⁺動員.

4) NO (一酸化窒素)

植物の病原菌防御応答などにおいてNO(一酸化窒素)が二次メッセンジャーとして機能する可能性が議論されている⁴²⁾が、最近ABA情報伝達系においてもその関与が提唱されている。ABAにより孔辺細胞にNOの蓄積が観察され、また細胞内Ca²⁺レベルを減少させても蓄積レベルに変化が観察されないことから、Ca²⁺シグナルの上流に位置していると推測されている⁴³⁾。この情報伝達系にはサイクリックGMP (cGMP) やcADPRの関与も指摘されているが、その詳細やNO生成の分子機構は不明である。

5) pH

孔辺細胞をABAで処理すると細胞質のpHが上昇し、二次メッセンジャーとして機能している可能性が議論されている⁴⁴⁾。事実、細胞質がアルカリ化することにより、気孔閉鎖において重要なK⁺_{out}チャネルが活性化がされる⁴⁵⁾。細胞質のpH変化はCa²⁺濃度の変化と並んでさまざまな情報伝達系における二次メッセンジャーとして機能している可能性があり、例えばエリシターの情報伝達過程では、細胞膜上の受容体が活性化されると細胞質のpHが一過的に低下し⁴⁶⁾、遺伝子発現調節に重要な役割を果たしていると考えられている。細胞質のpH調節の機構は、動物で大きく異なると考えられ、植物細胞の情報伝達の過程で細胞質のpHが変化する分子機構は未解明

の点が多い。

●3. Ca²⁺シグナル

孔辺細胞の細胞外Ca²⁺濃度を変化させると細胞内のCa²⁺濃度の振動が観察され、この時同時に気孔は閉鎖する⁴⁷⁾。またABAによっても振動が観察される⁴⁸⁾。一方、気孔の開口においても、細胞内のCa²⁺増加が観察される⁴⁹⁾。同じ細胞内のCa²⁺増加をどのように識別し、下流の反応を制御しているのだろうか？

これは、二次メッセンジャーを介した情報伝達系の大きなパラドックスである。この疑問に対する回答として、細胞がCa²⁺濃度の時間的・空間的パターンを見分けている可能性が指摘されている。実際、細胞質にCa²⁺が動員される際のCa²⁺濃度変化は、一過性の変化(Ca²⁺ transient)、ゆっくりとした上昇(gradual increase)、振動(Ca²⁺ oscillation)など、刺激の種類によって多様な特徴的パターンを示すことが明らかにされつつある。

孔辺細胞の膜電位を変化させることによって、特定の周期をもった細胞内Ca²⁺濃度の振動を人為的に作り出すと、周期的なCa²⁺濃度の振動によって気孔閉鎖が誘導される²⁷⁾。一方、シロイヌナズナのV(液胞)型H⁺-ATPaseの変異体である*det3*では、外液のCa²⁺濃度を増加させても細胞内のCa²⁺が高い状態に保たれ、振動は起こらず気孔の閉鎖も誘導されない。しかしこの変異体に特定の周期をもった細胞内Ca²⁺濃度の振動を人為的に与