

## 核-細胞質間の蛋白質輸送と植物の環境応答

山本直樹

植物でも importin  $\alpha$  をはじめ、核輸送にかかわる蛋白質の cDNA が単離され個々の特性が明らかになりつつある。これによって蛋白質の核輸送の側面からの生物学的な考察が可能になってきた。植物はさまざまな環境要因の変化に鋭敏に反応するが、このシグナル伝達の機構解明に核-細胞質間の蛋白質輸送からの研究が必要である。フィトクロム、転写因子、COP1 などの光環境応答にかかわる因子や環境ストレスにかかわる因子が環境変化に応じて細胞質と核との間で分布を変えることが示され、その機構の解明が急速な展開を見せている。

**Key words** 【importin】【環境応答】【フィトクロム】【COP1 蛋白質】

はじめに 生物は刻々と変化する環境のなかでその変化を認識し適切に応答し、最終的に身を守り種の保存を図っている。とりわけ、危機的な状況から移動によって回避することのできない植物にとって、各種のストレスからの防御など迅速な対応が重要な意味をもつ。

クローンヒツジ、ドリーの誕生が話題に上る 30 年あまりも以前に、植物細胞の分化全能性が明らかにされている。これによって遺伝子調節の重要性が指摘されるようになり、分子生物学・分子遺伝学の発展によってその分子機構が急速に明らかにされつつある。遺伝子の複製と転写という生命活動の最も重要な事柄が、核という細胞内器官で行なわれている。環境変化の認識からシグナルの伝達の過程において、転写因子の核輸送をはじめとする核と細胞質の間の蛋白質の輸送は、生物がとりうる迅速な環境応答の優れた対応と考えることができる。また、実際に環境変化に応答して蛋白質が核と細胞質の間をシャトルするとの報告が蓄積して

きた。

本稿では植物細胞の核-細胞質間の蛋白質輸送を担う装置の概要を示すとともに、これらの分子メカニズムの環境応答における意義について、最近の報告を示しながら考察したい。

真核細胞では核膜により核は細胞質から仕切られている。核は遺伝子の複製や転写ならびに遺伝子発現の調節の場であり、これらに必要な蛋白質は核に輸送されなければならない。一方、RNA やリボソームサブユニットは蛋白質合成の場、細胞質へ輸送されなければならない。これらの分子は核膜孔を通過しなければならないが、分子量 40~60 K 以上の分子は能動的、選択的に輸送され、さらにそれは綿密に制御されている<sup>1)</sup>。

核蛋白質は核局在化シグナル (nuclear localization signal; NLS) とよばれる 3~5 つの塩基性アミノ酸残基を含む配列をもち、NLS 蛋白質とよばれる。この NLS は核蛋白質輸送因子、importin [→今月の Key

表 1 核移行シグナル (NLS) と核外移行シグナル (NES)

| 核移行シグナル (NLS)                |                               |
|------------------------------|-------------------------------|
| 単極型 NLS (SV40 T 抗原)          | CTPPKKKKRV                    |
| 双極型 NLS (トウモロコシ転写因子 O2)      | MPTEERVKKRRESNRESARRSYKAAHLKC |
| Mat 型 NLS (トウモロコシ転写因子 R)     | CYMISEALRKAIK                 |
| 核外移行シグナル (NES)               |                               |
| HIV-1 Rev                    | LPPERETL                      |
| TF IIIA ( <i>X. laevis</i> ) | KPSGTETNGSDKTTQ               |
| プロテインキナーゼ A インヒビター           | ALKAGD                        |
| SqLCV BRI <sup>a)</sup>      | VTKRVSLEKDTIDHGTQL            |

a) squash leaf curl virus のゲノムにコードされている蛋白質<sup>15)</sup>

Words (p.2367)]  $\alpha$  に認識され, importin  $\beta$  とともに NLS 蛋白質-importin  $\alpha$ -importin  $\beta$  の三者からなる核輸送複合体を形成する. importin  $\beta$  の働きにより同複合体は核膜孔へ運ばれるが, ここまではエネルギーの消費を伴わない反応である. ついで低分子量 GTPase, ATP, GTP 存在下で核膜孔を通過し, 核内で核輸送複合体は解離して核蛋白質の輸送は完了する. その後, importin  $\alpha$ , importin  $\beta$  は再び細胞質へ回送される.

importin  $\alpha/\beta$  系以外にさまざまな核輸送系が明らかになっているが, 本稿の主題から外れるので植物細胞で確定していない分野については記載しない. 昨年国内のレビュー誌でも核輸送を特集しているのでそちらを参照していただきたい\*1.

## I. 核-細胞質間の蛋白質輸送

植物細胞の核輸送は基本的なプロセスに関しては動物細胞や酵母と類似しており, 保存的なものとして理解してよいと思われる. しかし, 以下に述べるように個々のプロセスを詳細にみでみると, 植物細胞の核輸送の特性が明らかになってきた.

### 1. 核膜孔複合体 (NPC)

核膜孔は少なくとも 100 種類もの蛋白質からなる分子量約 125,000 K にも及ぶ巨大な複合体であり, 核膜孔複合体 (nuclear pore complex; NPC) [→今月の

Key Words (p.2368)] とよばれている. NPC には低分子量の化合物の拡散用のチャンネルと, 分子量 40~60 K 以上の蛋白質 (または複合体) の輸送用のチャンネルがある<sup>2)</sup>. NPC の基本構造は動植物を通じて保存的とされるが, 後述するような植物細胞に特異的な核輸送機構の特徴から類推すれば, NPC に関しても植物細胞の特徴があるかと思われる. 事実, 一部の NPC 蛋白質,

ヌクレオポリンは *N*-アセチルグルコサミンの修飾を受けているが, 酵母では糖鎖の修飾はみられないし, 動・植物間で糖鎖の違いがみられている<sup>3)</sup>.

## 2. 核内輸送機構

### A. NLS

植物の核蛋白質の NLS は 3 つのタイプに分類されており<sup>3)</sup>, それぞれここでは, ① 単極型 NLS, ② 双極型 NLS, ③ Mat 型 NLS とよぶことにする (表 1). ① 単極型 NLS は SV40 T 抗原に見いだされたものと相同性のあるもので, 塩基性アミノ酸残基に富むクラスターがみられる. ② 双極型 NLS は *Xenopus* ヌクレオプラスミンに見いだされたものと相同性を示し, 約 10 アミノ酸残基で隔てられた 2 つの塩基性アミノ酸のクラスターからなっている. ③ Mat 型 NLS は酵母で見いだされたものと類似な NLS で, 塩基性アミノ酸残基に加えて疎水性アミノ酸を含む. この NLS は動物細胞内では機能しないことから, 植物細胞の核輸送機構のひとつの特徴とすることができる.

### B. importin $\alpha$

動物では importin  $\alpha$  遺伝子は多重遺伝子族を形成している. 植物でも同様に, シロイヌナズナやイネからおのおの 3 つの importin  $\alpha$  遺伝子が見いだされている<sup>4)</sup>. 複数の importin  $\alpha$  の分子種の存在意義として, 機能分化や核輸送基質の特異性が予想される. 筆者らはイネの 3 つの importin  $\alpha$  cDNA を単離し<sup>5,6)</sup>, importin

\*1 核-細胞質間輸送の分子メカニズム (西田栄介監修), 細胞工学, Vol. 18, No. 4 (1999); 細胞核研究の最先端—核の機能構造とダイナミクス, 蛋白質 核酸 酵素 (増刊), Vol. 44, No. 12 (1999); 核-細胞質間輸送と小胞輸送, 実験医学 (増刊), Vol. 17, No. 18 (1999)

$\alpha 1a^{5)}$ , importin  $\alpha 1b$  (筆者ら:投稿中), importin  $\alpha 2^{6)}$  と命名した. 個々の遺伝子について転写レベルを調べてみると, 組織特異的な発現など互いに異なった発現特性を示し, とくに importin  $\alpha 1a$  遺伝子の発現は光合成器官で光による負の調節を受けていることが明らかとなった<sup>5)</sup>. これらのデータは, importin  $\alpha$  分子間の機能分化と解釈できるかもしれない.

*in vitro* の NLS 蛋白質との結合アッセイと, セミインタクト HeLa 細胞による核輸送アッセイ系<sup>\*2</sup> [→今月の Key Words(p.2367)]により, イネの3つの importin  $\alpha$  について組換え蛋白質の機能解析を行なった<sup>7)</sup>. importin  $\alpha 1a$  は, 単極型, 双極型 NLS に結合し, かつ核輸送活性を示したが, importin  $\alpha 2$  は単極型 NLS としか結合しなかった. また, 3 分子種いずれも Mat 型 NLS を基質としなかった (表2). これらに加えて, importin  $\alpha$  分子間の機能分化を示唆する知見が得られた (筆者ら:投稿中). 後述する光形態形成の抑制因子 COP1 に双極型 NLS が見いだされているが, イネの importin  $\alpha$  のうち, importin  $\alpha 1b$  だけが COP1-NLS を認識結合できることが示された. 一方, 対照的にシロイヌナズナの importin  $\alpha$  (At-IMP $\alpha$ ) は植物の3タイプの NLS すべてを認識することが報告されている<sup>8)</sup>. しかし, のちにこの At-IMP $\alpha$  は特殊なものであって, importin  $\beta$  非存在下で核輸送活性を示すことが示された (後述).

#### C. importin $\beta$ を必要としない importin $\alpha$ , At-IMP $\alpha$

これまで importin  $\alpha/\beta$  による核輸送以外に, transportin のように importin  $\beta$  ファミリーのメンバーが単独で働き, importin  $\alpha$  を必要としない核輸送経路が発見されてきた. これとは逆で, シロイヌナズナの importin  $\alpha$  (At-IMP $\alpha$ ) は単独で, importin  $\beta$  の力を借りずに, NLS 蛋白質の核輸送を行なうことが報告された<sup>9)</sup>. ここで興味深いのは, イネの importin  $\alpha 1a$  とシロイヌナズナの At-IMP $\alpha$  は少なくとも1次構造上高いホモロジーを示していることである. それにもかかわらず, 機能的には高度に多様化していることが示唆された.

#### D. importin $\alpha$ の細胞内局在

動物細胞の核輸送機構が急速な展開をみせた背景には, セミインタクト細胞を用いた核輸送アッセイ系の

表2 importin  $\alpha$  の NLS 蛋白質の特異性

| importin の分子種                      | 核蛋白質    |         |           |
|------------------------------------|---------|---------|-----------|
|                                    | 単極型 NLS | 双極型 NLS | Mat 型 NLS |
| イネ                                 |         |         |           |
| importin $\alpha 1a$ <sup>7)</sup> | +       | +       | -         |
| importin $\alpha 1b$ <sup>4)</sup> | +       | +       | -         |
| importin $\alpha 2$ <sup>6)</sup>  | +       | -       | -         |
| シロイヌナズナ                            |         |         |           |
| At-IMP $\alpha$ <sup>8)</sup>      | +       | +       | +         |

+は importin  $\alpha$  が NLS を認識・結合したことを示し, -は認識・結合しなかったことを示す. a) 筆者ら:投稿中.

開発がある. そこで植物においても動物細胞の核輸送アッセイ系と類似の系の開発が試みられた<sup>10,11)</sup>. このアッセイ系では NLS 蛋白質の核輸送が観察され, NLS に変異を導入した核蛋白質では核輸送がみられなくなる. しかし, 動物細胞では importin  $\alpha/\beta$  などの核蛋白質輸送因子の添加が必要条件であるが, タバコプロトプラストから調製されたこの系では, importin などの可溶性成分の添加なしでも NLS 蛋白質が核に輸送される. 界面活性剤処理などにより細胞膜に小さな穴ができて細胞質の可溶性の因子が洗い流されると期待されたが, 実際には依然と importin 類が細胞質に検出された<sup>12)</sup>. また, 筆者らは, importin  $\alpha$  と GFP とからなるキメラ遺伝子を構築し, importin  $\alpha$  の細胞内分布をトランジェントアッセイで見ると, 核に蓄積していることがわかった (筆者ら:未発表).

核輸送複合体の形成から NPC へのターゲティングの機構に関して明確な知見は得られていないが, 下記の実験から細胞骨格の関与が指摘された<sup>12)</sup>. シロイヌナズナの importin  $\alpha$  (At-IMP $\alpha$ ) の細胞内分布を抗体染色すると, 核から細胞膜に向かって放射状に, 細胞骨格の分布と類似の細胞内分布を示す. すなわち, importin  $\alpha$  の分布は, 微小管やマイクロフィラメントの分布と一致する. 薬剤処理により細胞骨格の脱重合に導くと, importin  $\alpha$  の分布に変化が現われ, 拡散するように見えるとともに, 核への局在傾向が強まった. さらに詳細な研究が必要である.

#### E. importin $\beta$

植物の importin  $\beta$  cDNA がイネから単離されたが,

\*2 動物細胞をジギトニンで処理すると細胞膜には小孔ができるが, 核膜は損傷を受けない. このセミインタクト細胞の細胞質性核輸送成分を洗い流したのち, NLS 蛋白質と核輸送成分を添加すると NLS 蛋白質の核輸送がみられ, 核輸送アッセイ系として活用されてきた.

興味深いことにイネには2つの遺伝子 (*importin  $\beta$ 1*, *importin  $\beta$ 2*) が同定された<sup>13)</sup>。哺乳類、酵母からは1遺伝子しか単離されていない。シロイヌナズナの *importin  $\alpha$*  (At-IMP $\alpha$ ) が1次構造上とくに著しい特徴を示すわけでもないが、特徴的な機能を示すことはすでに述べた。これから想像をたくましくすると、2分子種の *importin  $\beta$*  がおのおの固有の役割をもっているのかもしれない。現在まだ *importin  $\beta$ 1* についてしか機能解析がなされていない<sup>14)</sup> が、*importin  $\beta$ 2* の機能解析が必要である。

## F. WGA

WGA (wheat germ agglutinin, コムギ胚芽凝集素) は、NPC を構成する蛋白質群の糖鎖、N-アセチルグルコサミンに特異的に結合して NLS 蛋白質の核輸送を阻害するため、動物細胞の能動的な蛋白質の核輸送の証拠として使用されている。タバコプロトプラストの核輸送アッセイ系では、WGA による阻害は観察されなかった<sup>10,11)</sup>。筆者らはイネ *importin  $\alpha$ 1a* の核輸送活性を HeLa 細胞のセミインタクト核輸送アッセイ系で調べた。対照に用いたマウス *importin  $\alpha$*  による核輸送は WGA により阻害されたが、イネ *importin  $\alpha$*  による核輸送は阻害されなかった<sup>4)</sup>。WGA による核輸送阻害は、NPC への結合だけでなく、*importin  $\alpha$*  分子との相互作用にも関与する可能性を示唆している。

## 3. 核外輸送

核外輸送の分子機構は核内輸送のそれと比較して遅れているが、ここ5年間ほどの間に急速な進歩がみられた。核外輸送のシグナルは、PKI (プロテインキナーゼ A の阻害因子)、HIV Rev 蛋白質、転写因子 TF-III A などに見いだされ、ロイシン残基に富むわずかな10残基あまりの短い配列が機能することが明らかになり、NES (nuclear export signal) とよばれている。一方、NES の認識・受容に関しては、exportin 1 [→今月の Key Words (p.2367)], あるいは CRM1 とよばれる *importin  $\beta$*  ファミリーに属する蛋白質が輸送因子として機能する。

植物ジェミニウイルスの1種、squash leaf curl virus のゲノムにコードされている蛋白質、BR1、BL1 は、1本鎖のゲノム DNA 核外輸送から細胞間移行を経て全身感染に至る過程に関与する。BR1 には NES 様の配列がみられ (表1)、この NES 様の配列を含む断片と GUS

( $\beta$ -グルクロニダーゼレポーター) の融合蛋白質は細胞質に局在することなどの根拠から、NES が機能していると推定された。また、NES 領域に変異を導入するとその DNA の感染性が消失し、この変異の直後に TF-III A の NES 配列を挿入すると感染力の回復がみられた。植物細胞のなかでも NES が植物細胞の核外輸送に保存的に機能することが示された<sup>15)</sup>。

一方、exportin に関しては、シロイヌナズナの EST クローンをもとに cDNA クローンが単離された。two hybrid システムにより、cDNA 由来の組換え蛋白質が Rev NES や PKI NES と相互作用することが示された。また、この分子間相互作用が、核外輸送を阻害する抗生物質レプトマイシン B によって阻害された<sup>16)</sup>。以上のように、植物細胞でも NES 蛋白質が exportin によって核外輸送されると考えられるようになった。

## II. 植物の光環境応答と核-細胞質間輸送

### 1. フィトクロムの核移行

一次生産者としての植物が光合成機能を全うするためには、光合成関連の遺伝子の発現、光合成の場としての葉緑体の形成、さらに光合成器官としての葉や効率のよい受光に適した植物の姿勢の形成が前提となる。大雑把にこのプロセスを光形態形成とよぶが、文字どおり環境要因としての光が重要かつ多様な影響を及ぼすので、植物と光の関係として光形態形成のメカニズムは古くより研究されてきた。光形態形成の光受容体として、フィトクロムやクリプトクロムが働いている。フィトクロムには赤色光を吸収する Pr 型と近赤外光を吸収する Pfr 型があって、赤色光を受容して生理的に活性な Pfr 型と、近赤外光を受容して不活性な Pr 型に、可逆的に光変換する。近年、フィトクロムは、光に依存して核と細胞質の間で分布を変えることが明らかになった<sup>17)</sup>。また、青色光の光受容体であるクリプトクロムが核に局在することが示された<sup>18,19)</sup>。植物の光形態形成の光環境応答の分子メカニズムを明らかにするうえで、核輸送の視点からの考察が意義深いものであることを示している<sup>20)</sup>。

シロイヌナズナのフィトクロムは5分子種、PHY-A ~E から構成されており、とりわけ PHY-A と PHY-B に関する知見が蓄積している。シロイヌナズナの PHY-B の C 末端側の断片と GUS とからなるキメラ遺伝子を

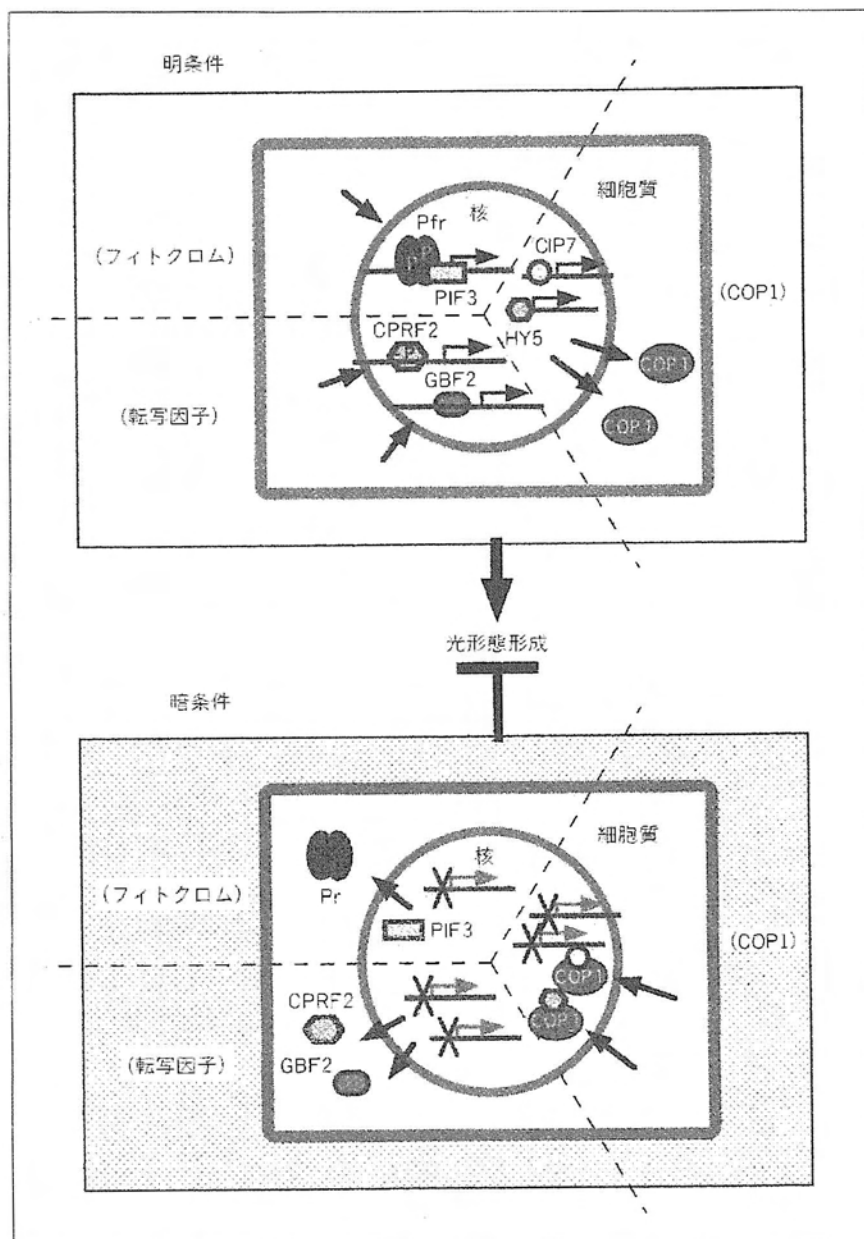


図1 光シグナルによるフィトクロム、転写因子、COP1蛋白質の核-細胞質間輸送のモデル

核-細胞質間の蛋白質輸送が光形態形成の光シグナル伝達で重要な役割を担っていることが解明されており、現在提案されているモデルを簡単に1枚の図にまとめた。①Pr型フィトクロムは暗所では細胞質に分布するが、明所ではPfr型に光変換し同時に核内に分布を変える。核内では転写因子(PIF3)との分子間相互作用により遺伝子調節に関与しているかもしれない。②光の遺伝子調節にかかわる転写因子(CPRF2やGBF2)は暗所では細胞質に分布するが、明所で核へ輸送され遺伝子調節に寄与する。③光形態形成の負の調節因子(COP1)は、暗所で核内に局在して転写因子(CIP7やHY5)との分子間相互作用を介して遺伝子の発現を抑える。光によりCOP1は細胞質へ移行するとともに、CIP7やHY5は遺伝子の発現に貢献できるようになる。

構築し、融合蛋白質のGUS活性をもとにPHY-Bの細胞内分布が決められた<sup>17)</sup>。PHY-Bは、明所で核に分布

し、暗所に移すと核から消失して細胞質へと分布を変える(図1)。この魅力的な知見は、さらに補強されて説得力のあるものとなった<sup>21)</sup>。全長のPHY-BとGFPからなるキメラ遺伝子をシロイヌナズナの $phy-B$ 変異株に導入したところ、 $phy-B$ 変異が相補され、さらに前報告と同様、PHY-Bの光による核-細胞質間のシャットリングが確認された。タバコのPHY-Bも同様に赤色光の働きにより核へ輸送される<sup>22)</sup>。赤色光の効果は近赤外光により打ち消されるので、PHY-B分子自身による光シグナルの光受容が細胞内分布を調節していると推測できる。フィトクロムのN末端側のシステイン残基に発色団が共有結合する。このシステインをアラニンに置換したPHY-B\*-GFPはもはや核に分布しなくなってしまう<sup>22)</sup>。この事実も上述の推論を確かなものにしていく。また、PHY-Aの核輸送も同様に光の影響を受けているので<sup>22)</sup>、光によるフィトクロムの核輸送は全分子種に共通した特性と考えられる。

フィトクロムが光受容後に何を行なっているかについて、遺伝子調節をあげることができる。上記のフィトクロムの核局在が明らかになるまで、フィトクロムは細胞質に分布するとする考えが主流であり、この2つの考えを矛盾なく説明するには困難があった。しか

し、最近のフィトクロムの光による細胞質-核間のシャットリングの発見によって説明が容易になった<sup>20)</sup>。次に生

ずる疑問は、核に輸送されたフィトクロムの役割であろう。これに関しても最近の研究例を紹介したい。光シグナルの伝達機構を明らかにするために、PHY-AのC末端側を使ってtwo hybridシステムを実施したところ、PHY-Aと相互作用を示す蛋白質PIF3 (phytochrome-interacting factor 3) が単離された<sup>23)</sup>。PIF3は双極型のNLS様配列をもち、事実GUS-PIF3融合蛋白質は核局在を示した。1次構造上の特性とあわせてPIF3は転写因子と推定された。PIF3はPHY-A、PHY-BいずれのC末端側の断片とも相互作用を示すが、全長のPHY-Bを用いた実験ではPfr型だけに結合した<sup>24)</sup>。また、組換え体を作成してPIF3の発現の増減を調べると植物の光形態形成(下胚軸の伸長)に変化が見られるとともに、光調節遺伝子の転写レベルが変化した<sup>23)</sup>。したがって、フィトクロムは核内で直接的に転写調節にかかわっている可能性が示唆されるようになった(図1)。

## 2. 青色光受容体クリプトクロムの核局在

青色光が植物の発達に著しい影響を与えることは、1世紀前に明らかにされたが、実体が同定されないままクリプトクロムという概念的な名称が与えられていた。1993年になってシロイヌナズナの変異株の研究から実体が明らかになり、UVで生じたピリミジン2量体の修復に働くフォトリアーゼに起源をもつフラビン蛋白質であった<sup>25)</sup>。その後、シロイヌナズナに2種類のクリプトクロム(CRY1, CRY2)があることがわかった<sup>19,25)</sup>。また、植物界ばかりでなくショウジョウバエや哺乳類からもホモログが単離されている<sup>18)</sup>。植物のクリプトクロムは下胚軸の伸長阻害、子葉の展開、アントシアニン合成や概日性に関与することが示されている<sup>18)</sup>。クリプトクロムのシグナル伝達機構については推定の域を脱していないが、興味深いことは、少なくともシロイヌナズナのCRY1, CRY2いずれもが核に局在することである<sup>18,19)</sup>。屈光性の青色光受容体として有力な候補にあげられたNPH1が膜結合蛋白質であることと対照的であり、クリプトクロムが核内で光環境刺激を受容し、すぐさまその場で転写調節にかかわっている可能性が考えられる。

## 3. 転写因子

転写因子が機能する場合は核であるから、生合成のあ

と細胞質から核へ輸送されなければならない。ここで取り上げる2つの転写因子は、光環境に応答して細胞内分布を変えることが報告されている。

### A. 光による転写因子の核内輸送

*rbcS*や*cab*に代表されるように、光合成関連の遺伝子の多くは光の調節を受けている。この光調節にかかわるcisエレメントとしてGボックスが同定され、さらにGボックスに結合するbZIP型の転写因子が同定された。シロイヌナズナのGBF2(G-box binding factor 2)は暗所では細胞質に分布するが、青色光下で核に分布する<sup>26)</sup>(図1)。また、パセリのCPRF2も暗所では細胞質に分布しているが、明所に移すと核へ分布を変える。このときの光シグナルはフィトクロムに受容される<sup>27)</sup>。

### B. シャトリングの分子機構とリン酸化シグナル

パセリCPRF2 (common plant regulatory factor 2)にはNLS様配列がみられるとともに、欠失変異を用いた実験から細胞質保持にかかわる保存的な配列が見いだされている。これらをもとに、細胞質に保持する力と核への移行の力の差し引きによって細胞内分布が決定されるが、この決定にあたってCPRF2のリン酸化が決め手となるとする作業仮説を立てた<sup>27)</sup>。最近、CPRF2がおそらくフィトクロムを介してリン酸化されることが報告された<sup>28)</sup>。このリン酸化はCPRF2のDNA結合活性に影響をもたらないこと、また核蛋白質のNLS近傍のセリン残基のリン酸化により促進されるとする考え方<sup>29)</sup>からも、光によるCPRF2のリン酸化が核輸送を導くとする考え方が支持される。

## 4. COP1蛋白質

シロイヌナズナで発見されたCOP1 (constitutive photomorphogenic 1)蛋白質は光刺激を受容して核-細胞質の細胞内分布を変える。すなわち、暗所では核に蓄積し、明所では核から消失する<sup>30)</sup>。COP1はbZIP型の転写因子HY5<sup>31)</sup>やCOP1下流のターゲット蛋白質として同定された転写因子CIP7<sup>32)</sup>と相互作用を示すことから、核内でこれらの転写因子に対して負の影響を及ぼしているものと推察される。COP1の変異体では暗形態形成(skotomorphogenesis)がみられず、暗所でも疑似的な光形態形成を示す。また、フィトクロムやクリプトクロムの変異株を使った実験により、COP1はこれらの光受容体の下流で機能していることが推定され

る。したがって暗所では COP1 は核内にあって遺伝子発現を抑え、明所では COP1 の核外移行のために抑制が外れて一連の光形態形成関連の遺伝子が発現すると考えられる<sup>35)</sup> (図 1)。

COP1 の光による細胞内分布の変化の分子機構として、核移行と細胞質保持の 2 方向の解析がなされている。COP1 に双極型 NLS が同定できたので、COP1 の核輸送には importin  $\alpha/\beta$  系が機能していると推測される。また、N 末端側の約 180 アミノ酸残基の領域を切除すると COP1 が構成的に核に分布するようになったので、CLS (cytosolic localization signal) と名づけられた<sup>34)</sup>。COP1 とアフィニティーを示す蛋白質、CIP1 (COP1 interacting protein 1)<sup>35)</sup> や CIP8<sup>36)</sup> は細胞質局在を示す。これらは、明所での COP1 の細胞質保持に関与している可能性が考えられる。

COP1 の発見者 Deng らは、哺乳動物ゲノム中にも COP1 ホモログがあることを見だし、これを植物細胞に導入するとシロイヌナズナの COP1 と同様に光条件により細胞内分布を変えることを示した<sup>37)</sup>。このことは、上記の光による細胞内分布の変化、および、それに基づく光シグナル伝達は植物界に特異的なものと考えられがちであるが、これと類似のメカニズムが広く生物界に分布している可能性を示している。

### III. 環境ストレスと核-細胞質間輸送

#### 1. 温度ストレス

トマトの熱ショック蛋白質遺伝子の転写因子、HSF2 は単独では核に輸送されないが、構成的に存在する同族の転写因子 HSF1 が共存するときには熱ショック刺激により核へ輸送される<sup>38)</sup>。HSF の核輸送のためには、HSF2 と HSF1 からなるヘテロ 2 量体の形成が必要であるようだ。

核輸送の調節機構としてパートナー分子の存在が必要な例が HSF のほかにも知られている。シロイヌナズナの花の形態にかかわる 2 つのホメオティック遺伝子、*AP3* と *PI* の例である<sup>39)</sup>。GUS との融合蛋白質のトランジェントアッセイで調べると、単独で発現させたときにはいずれも細胞質に分布していた。しかし、両者を共発現させたときには分布は核にみられた。両蛋白質にそれぞれ NLS 様の配列がみられるが、単独のときにはマスクされていたものが、2 分子間の相互作用によ

り NLS を露出するなどの変化の結果と推測されている。

#### 2. 病害ストレス

病原体の感染を受けた植物は抗菌性低分子物質フィトアレキシンを生産して自己防衛する。細胞壁物質に由来するエリシターが宿主細胞によって受容・認識されてからフィトアレキシンの生成に至るシグナル伝達の過程で、MAP キナーゼの関与が示されている。パセリのエリシター応答性の MAP キナーゼは、培養細胞にエリシターを添加すると数分後から急速に活性化される。この活性化と時を同じくして核への輸送がみられた<sup>40)</sup>。ただし、この MAP キナーゼには NLS を見いだすことができないため、importin  $\alpha/\beta$  が直接核輸送しているとは考えにくい。しかし、エリシターのシグナル伝達系に MAP キナーゼの核輸送の関与が明らかとなり、MAP キナーゼカスケードの分子機構を考察するうえで興味深い。

おわりに 本文の前半では核輸送についてあらましを述べ、また植物細胞に特異的にみられる特性を紹介した。これらの知見は、植物分子細胞生物学研究全般において核輸送の視点からの考察を可能にしてくれた。また、後半では植物のさまざまな環境応答における転写因子などの興味深い核-細胞質間の細胞内分布の変化についていくつかの例を紹介した。これらはシグナル伝達の分子機構の解明のために、核-細胞質間の輸送機構の理解が大切であることを物語っている。筆者はこれから将来大きく成長する分野であると信じているが、さらなる発展のためには前者“核輸送それ自体の研究”と後者“シグナル伝達の分子機構の研究”とは融和が図られなければならないと考えている。現状に関しては両者おのおのが独自の道を歩んできたという印象が強い。植物細胞の核-細胞質間輸送機構解明のために克服すべき問題点として、核輸送アッセイ系の確立をあげたい。本文でも指摘したことであるが、動物細胞の核輸送研究においては優れたセミインタクト細胞のアッセイ系の貢献が大である。しかし、植物で開発されたアッセイ系は、核蛋白質 (NLS 蛋白質) のアッセイに使うことができて、未知の核輸送関連の蛋白質のアッセイには使えない。ぜひとも克服したい問題である。また、核外輸送のアッセイ系も間もなく必要にな

ってくるであろう。

現状では、核輸送蛋白質の情報量が限られている。たとえば、動物細胞や酵母で明らかになっている importin  $\beta$  ファミリーメンバーによる多様な輸送機構とは対照的に、植物では importin  $\beta$  自身と exportin が同定されているにすぎない。核輸送アッセイ系が確立されれば容易に核輸送にかかわる蛋白質の生化学的な特性を評価できよう。2000 年にはシロイヌナズナの全ゲノムの塩基配列が決定される計画である。このようにゲノム生物学の発展には目覚ましいものがある。これらのゲノム情報を基に個々の核輸送蛋白質に関して、生化学・細胞生物学のレベルへと展開を図ることができるのではなかろうか。このような背景のもとで、個々のシグナル伝達経路における核輸送調節の機構解明が加速されることを期待している。

## 文 献

- Mattaj, I. W., Englmeier, L. : *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 265-306 (1998)
- Heese-Peck, A., Raikhel, N. V. : *Plant Mol. Biol.*, **38**, 145-162 (1998)
- Hicks, G. R., Raikhel, N. V. : *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **11**, 155-188 (1995)
- Yamamoto, N., Deng, X.-W. : *Genes Cells*, **4**, 489-500 (1999)
- Shoji, K., Iwasaki, T., Matsuki, R., Miyao, M., Yamamoto, N. : *Gene*, **212**, 279-286 (1998)
- Iwasaki, T., Matsuki, R., Shoji, K., Sanmiya, K., Miyao, M., Yamamoto, N. : *FEBS Lett.*, **428**, 259-262 (1988)
- Jiang, C.-J., Imamoto, N., Matsuki, R., Yoneda, Y., Yamamoto, N. : *J. Biol. Chem.*, **273**, 24083-24087 (1998)
- Smith, H. M., Hicks, G. R., Raikhel, N. V. : *Plant Physiol.*, **114**, 411-417 (1997)
- Hubner, S., Smith, H. M., Hu, W., Chan, C. K., Rihs, H. P., Paschal, B. M., Raikhel, N. V., Jans, D. A. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 22610-22617 (1999)
- Hicks, G. R., Smith, H. M., Lobreaux, S., Raikhel, N. V. : *Plant Cell*, **8**, 1337-1352 (1996)
- Merkle, T., Leclerc, D., Marshallsay, C., Nagy, F. : *Plant J.*, **10**, 1177-1186 (1996)
- Smith, H. M., Raikhel, N. V. : *Plant Cell*, **10**, 1791-1799 (1998)
- Matsuki, R., Iwasaki, T., Shoji, K., Jiang, C. J., Yamamoto, N. : *Plant Cell Physiol.*, **39**, 879-884 (1998)
- Jiang, C.-J., Imamoto, N., Matsuki, R., Yoneda, Y., Yamamoto, N. : *FEBS Lett.*, **437**, 127-130 (1988)
- Ward, B. M., Lazarowitz, S. G. : *Plant Cell*, **11**, 1267-1276 (1999)
- Haasen, D., Kohler, C., Neuhaus, G., Merkle, T. : *Plant J.*, **20**, 695-705 (1999)
- Sakamoto, K., Nagatani, A. : *Plant J.*, **10**, 859-868 (1996)
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J., Liu, D. : *Science*, **284**, 760-765 (1999)
- Kleiner, O., Kircher, S., Harter, K., Batschauer, A. : *Plant J.*, **19**, 289-296 (1999)
- Nagy, F., Schafer, E. : *EMBO J.*, **19**, 157-163 (2000)
- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S. A., Nagatani, A. : *J. Cell Biol.*, **145**, 437-445 (1999)
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schafer, E., Nagy, F. : *Plant Cell*, **11**, 1445-1456 (1999)
- Ni, M., Tepperman, J. M., Quail, P. H. : *Cell*, **95**, 657-667 (1998)
- Ni, M., Tepperman, J. M., Quail, P. H. : *Nature*, **400**, 781-784 (1999)
- Ahmad, M., Cashmore, A. R. : *Nature*, **366**, 162-166 (1993)
- Terzaghi, W. B., Bertekap, R. L. Jr., Cashmore, A. R. : *Plant J.*, **11**, 967-982 (1997)
- Kircher, S., Wellmer, F., Nick, P., Rugner, A., Schafer, E., Harter, K. : *J. Cell Biol.*, **144**, 201-211 (1999)
- Wellmer, F., Kircher, S., Rugner, A., Frohnmeyer, H., Schafer, E., Harter, K. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 29476-29482 (1999)
- Jans, D. A., Hubner, S. : *Physiol. Rev.*, **76**, 651-685 (1996)
- von Arnim, A. G., Deng, X.-W. : *Cell*, **79**, 1035-1045 (1994)
- Ang, L.-H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A., Deng, X.-W. : *Mol. Cell*, **1**, 213-222 (1998)
- Yamamoto, Y. Y., Matsui, M., Ang, L.-H., Deng, X.-W. : *Plant Cell*, **10**, 1083-1094 (1998)
- Osterlund, M. T., Ang, L.-H., Deng, X.-W. : *Trends Cell Biol.*, **9**, 113-118 (1999)
- Stacey, M. G., Hicks, S. N., von Arnim, A. G. : *Plant Cell*, **11**, 349-364 (1999)
- Matsui, M., Stoop, C. D., von Arnim, A. G., Wei, N., Deng, X. W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4239-4243 (1995)

- 36) Torii, K. U., Stoop-Myer, C. D., Okamoto, H., Coleman, J. E., Matsui, M., Deng, X.-W. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 27674-27681 (1999)
- 37) Wang, H., Kang, D., Deng, X.-W., Wei, N. : *Curr. Biol.*, **9**, 711-714 (1999)
- 38) Scharf, K. D., Heider, H., Hohfeld, I., Lyck, R., Schmidt, E., Nover, L. : *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2240-2251 (1998)
- 39) McGonigle, B., Bouhidel, K., Irish, V. F. : *Genes Dev.*, **10**, 1812-1821 (1996)
- 40) Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H.,

Scheel, D. : *Science*, **276**, 2054-2057 (1997)

#### 山本直樹

略歴：1976年 東京都立大学大学院理学研究科博士課程修了。宇都宮大学教育学部，林野庁森林総合研究所，農水省農業生物資源研究所を経て，1999年より現所属（教授）。研究テーマ：植物の環境応答の分子機構と核輸送。関心事：これまで植物の生長・発達に及ぼす光の影響に関する研究を続けてきたが，最近は蛋白質の核輸送の視点からアプローチしている。