

シロイヌナズナの支持組織の細胞壁構築に關与する遺伝子の同定

Identification of genes responsible for cell-wall dynamics in supporting tissues of *Arabidopsis thaliana*

Abstract : Cell wall confers mechanical strength to the plant tissues, and thereby offer support to the aerial portion of the plant body. Using gene-specific oligonucleotide microarray system, we identified a set of genes that play important roles in specific aspects of cell wall construction in supporting tissues of the inflorescence stem of *Arabidopsis*. Some of the genes were reported to be involved in secondary wall deposition or lignification of xylem cells of the inflorescence stem. The expression of these genes sharply decreased when the inflorescence stem are placed horizontally. The results suggest that the weight carried by the upper part of the stem may be a signal for the induction of cell wall rigidification in supporting tissues of the stem. Reverse genetics analysis for function of the genes indicated that glycine-rich protein modifies mechanical strength of the cell wall in protoxylem in basal of the stem, thereby providing a conduit for the translocation of water and nutrients.

Keywords : cell wall, *Arabidopsis*, inflorescence stem, glycine rich protein

概 要

植物は細胞壁の物理的な強度によって自らの体を支えている。我々は、マイクロアレイ解析によって、シロイヌナズナの花茎を支えている組織において細胞壁の構築に重要な役割を果たす遺伝子群を同定した。これらの中には、花茎基部の2次細胞壁の肥厚やリグニン化に關与すると報告されている遺伝子が含まれていた。花茎を横倒しにすることによって、これらの遺伝子の発現が顕著に抑制された。このことは、花茎の重さ自体が支持組織の細胞壁の強度を制御していることを示唆するものであった。同定された遺伝子について逆遺伝学的な機能解析を行なったところ、グリシンリッチタンパク質が原生木部の細胞壁の構造に關与していて、それ故、木部における物質輸送に必須なものであることを示唆する結果を得た。

1. はじめに

1g重力環境下で、植物は立体的な形態を構築するために自重を支える支持組織を形成する。この支持組織の物理的な強度または柔軟性は、個々の細胞を取り囲む細胞壁の性質に依存するものと考えられている。我々は昨年度までの研究で、シロイヌナズナの756種類の細胞壁関連遺伝子の発現を包括的に解析できるオリゴDNAチップを開発して、花茎の支持組織で特異的に高発現する細胞壁関連遺伝子を同定している。本年度は、重力方向の変化に伴うこれらの遺伝子の発現変化を解析することによって、特に細胞壁の物理的な性質に重要な役割を果たすと考えられる遺伝子の同定を目指した。またこれらの遺伝子が欠損した突然変異体の表現型を解析することにより、遺伝子産物の植物体における機能の解明も試みた。

2. 成果の概要

2.1. 重力方向の変化に対する細胞壁関連遺伝子の発現への影響

2.1.1. 材料および方法

花茎が80～120 mmに成長したシロイヌナズナを実験材料に用いた。花茎が重力方向と垂直になるようにシロイヌナズナ植物体を30または60分間横倒しにした後、上部より1～5 cmの区間の花茎よりトータルRNAを抽出した。またコントロールとして重力方向を変えずに静置したままの植物体の同区間の花茎よりトータルRNAを抽出した。精製した各RNAをCy5またはCy3でラベルして、シロイヌナズナの756種類の細胞壁関連遺伝子の発現を解析するために開発したオリゴDNAチップを用いてマイクロアレイ解析を行なった。我々はこの中で特に花茎の支持組織で特異的に高発現する細胞壁関連遺伝子の発現について比較解析を行なった。

2.1.2. 結果

花茎の支持組織で特異的に高発現していた45種類の細胞壁関連遺伝子のうち19種類の遺伝子発現が、花茎を横倒しにすることによって抑制されていることが明らかになった(表1)。この19遺伝子の中には、これまでの細胞壁の研究によって、花茎の支持組織において細胞壁の肥厚や硬化に直接関与することが明らかにされた細胞壁関連遺伝子の大半が含まれていた[1,2]。またセルロースやリグニン代謝に関与すると推測される他の遺伝子も含まれていて、これらの遺伝子も同様の発現制御を受けていることから、細胞壁の肥厚や硬化に直接関与することが期待された。また同様の発現制御を受けている多糖の分解酵素や構造タンパク質をコードする新規の遺伝子も同定された。

表1 花茎を横倒しにすることによって発現が抑制された細胞壁関連遺伝子

遺伝子ファミリー名	遺伝子名
β -1,3-glucanase	BGL2
β -1,4-glucanase	CEL2
	IRX2
Cellulose synthase	IRX3
	IRX5
Chitinase	CTL2
Galactosidase	BGAL4
Glycine-rich protein	GRP
Laccase	Lac1
	IRX12
	Lac17
Pectinesterase	PMT61
	PMT107
Peroxidase	PER42
	PER64
	PER71
Polygalacturonase	PG3
	PG20
	PG43

遺伝子名が太字で書かれているものは、これまでに細胞壁の肥厚や硬化に関与していると証明された遺伝子

2.2 突然変異体の収集と表現型の解析

2.2.1. 材料および方法

公開されているSalk Institute Genomic Analysis LaboratoryのシロイヌナズナT-DNAタグラインより、花茎の横倒しによって発現が抑制された細胞壁関連遺伝子にT-DNAが挿入されていると考えられる突然変異体のラインを検索した。T-DNAが挿入されている突然変異体を含むと考えられるタグラインが見つかった遺伝子については、これらの種子を入手した。PCR法で確認することによって、入手したタグラインより各遺伝子が欠損しているホモジェニアスな突然変異体を分離した。分離した各突然変異体の花茎の形態を観察するとともに、花茎の切片を作成して組織を観察した。またT-DNA突然変異体において形態変化を引き起こしたグリシンリッチタンパク質（GRP）遺伝子についてはリアルタイムRT-PCR法やGRPプロモーター::GUS形質転換体を用いて発現解析を行なった。

2.2.2. 結果

花茎を横倒しにすることによって発現が抑制された19種類の細胞壁関連遺伝子のうち、11種類の遺伝子について、T-DNAが挿入されている突然変異体を含むと考えられるタグラインの種子を入手した（図1）。PCR法で確認することによって、現在までに7種類の遺伝子についてホモジェニアスな突然変異体を分離した。分離した各突然変異体の花茎の形態を観察したところ、6種類の突然変異体については野生型の植物との違いは確認できなかった。一方、構造タンパク質の一種であるグリシンリッチタンパク質（GRP）をコードしている遺伝子のT-DNA突然変異体については、花茎において顕著な形態変化が認められた。grp突然変異体は、花茎の抽台までは野生型植物との形態的な違いは観察されなかったが、花茎の伸長に伴い花茎の上部組織が枯死することが確認された。リアルタイムRT-PCR法やGRPプロモーター::GUS形質転換体を用いて遺伝子の発現解析を行なったところ、GRP遺伝子は突然変異体で形態変異が認められた花茎上部組織では発現していなく、花茎基部の原生木部の柔細胞で発現していることが確認された。

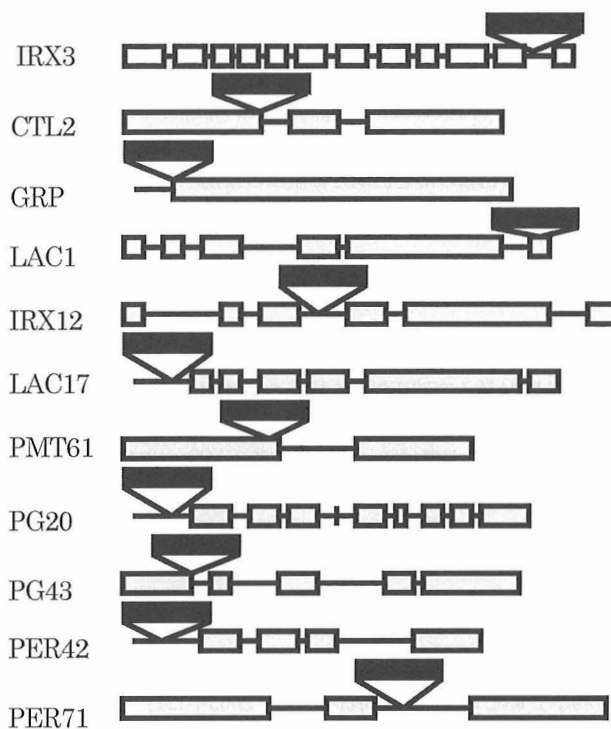


図1 シロイヌナズナT-DNA突然変異体の模式図
黒抜きのボックスはT-DNAを示す

3. まとめ

シロイヌナズナの花茎を横倒しすることによって、花茎の支持組織で特異的に発現していた19種類の細胞壁関連遺伝子の発現が抑制された。花茎基部の支持組織は、花茎の横倒しによって、増大する花茎上部の重さから解放される。このことは、同定された19種類の細胞壁関連遺伝子が、花茎上部の重さというシグナルを受け取り、その重さを支えるための細胞壁を構築するキー遺伝子であることを示唆するものであった。実際、この中には、これまでに報告がある細胞壁の肥厚や硬化に直接関わるセルロース合成関連遺伝子やリグニン合成関連遺伝子が含まれていた。この「重さのシグナル」については、微小重力下における本遺伝子群の発現解析によって証明されることが期待される。本実験において、多くの遺伝子の突然変異体は顕著な形態的变化を示さなかった。解析した遺伝子のほとんどが遺伝子ファミリーを形成していることから[3]、幾つかの遺伝子が機能を重複しているものと推定される。Laccase, Peroxidase, Polygalacturonaseなどは、同定した19種類の遺伝子の中に類似のメンバーが含まれていることから、この遺伝子同士が機能を重複しているものと考えられる。今後、二重あるいは三重突然変異体を作成することによって、遺伝子産物の機能を明らかにしていく。GRP遺伝子の突然変異体については、花茎上部組織の枯死という表現型を示した。GRP遺伝子の発現は花茎基部の原生木部柔細胞に限られていることから、突然変異体ではGRP欠損によって花茎基部の木部道管機能に障害が起こり、上部組織への物質輸送が滞っているものと推測される。今後、原生木部の細胞壁におけるGRPの機能を詳細に解析していく。

成 果 発 表

学術論文

- [1] Vissenberg, K., Oyama, M., Osato, Y., Yokoyama, R., Verbelen, J-P., Nishitani, K. "Differential expression of *AtXTH17*, *-18*, *-19* and *-20* genes in *Arabidopsis* roots. Physiological roles in specification in cell wall construction." *Plant Cell Physiol.*, 46, 192-200, 2005
- [2] Matsui, A., Yokoyama, R., Seki, M., Shinozaki, S., Takahashi, T., Komeda, Y., Nishitani, K. "*AtXTH27* plays an essential role in cell wall modification during the development of tracheary elements." *Plant J.*, 42, 525-534, 2005
- [3] Imoto, K., Yokoyama, R., Nishitani, K. "Comprehensive approach to genes involved in cell wall modifications in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Mol. Biol.*, 58, 177-192, 2005
- [4] Kwon, H-K., Yokoyama, R., Nishitani, K. "A Proteomic Approach to Apoplastic Proteins Involved in Cell Wall Regeneration Protoplasts of *Arabidopsis* Suspension Cultured Cells." *Plant Cell Physiol.*, 46, 843-857, 2005
- [5] 横山隆亮, 西谷和彦 "1gの重力下における植物の形態形成と細胞壁の役割" *生物工学*, 83, 568-570, 2005

学会発表

- [1] 横山隆亮, 西谷和彦 "シロイヌナズナの道管分化に関わるグリシンリッチタンパク質の機能解析" 第46回植物生理学会年会 2005年3月 新潟
- [2] 倉澤香澄, 松井章浩, 横山隆亮, 西谷和彦 "シロイヌナズナエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素(XTH)遺伝子ファミリークラスIIIに属する全メンバーのT-DNA挿入突然変異体を用いた機能解析" 日本植物学会第69回大会 2005年9月 富山
- [3] 横山隆亮, 西谷和彦 "道管の構築と機能における細胞壁の役割" 日本植物学会第69回大会 2005年9月 富山
- [4] 井本桂子, 松井章浩, 横山隆亮, 西谷和彦 "重力環境下における維管束植物の支持組織形成に関わる細胞壁動態の逆遺伝学的解析" 日本植物学会第69回大会 2005年9月 富山
- [5] 倉澤香澄, 松井章浩, 横山隆亮, 西谷和彦 "シロイヌナズナエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素(XTH)遺伝子ファミリークラスIII全メンバーの機能解析" 第28回日本分子生物学会年会 2005年12月 福岡
- [6] 横山隆亮, 西谷和彦 "シロイヌナズナのグリシンリッチタンパク質の細胞間輸送と機能の解析" 第28回日本分子生物学会年会 2005年12月 福岡
- [7] 池田雄介, 横山隆亮, 西谷和彦 "互いに類似した2つのシロイヌナズナのエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素(XTH)遺伝子の発現解析" 日本植物学会東北支部 第18回岩手大会 2005年12月 盛岡

参 考 文 献

- [1] Turner, S.R., Somerville, C.R. "Collapsed xylem phenotype of *Arabidopsis* identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall." *Plant Cell*, 9, 689-701, 1997

- [2] Brown, D.M., Zeef, L.A.H., Ellis, J., Goodacre, R., Turner, S.R. "Identification of Novel Genes in Arabidopsis Involved in Secondary Cell Wall Formation Using Expression Profiling and Reverse Genetics." *Plant Cell*, 17, 2281-2295, 2005
- [3] Yokoyama, R., Nishitani, K. "Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and *Arabidopsis*." *Plant Cell Physiol.*, 45, 1111-1121, 2004