

## 植物の抗重力反応に関わる遺伝子特定の試み

保尊隆享（大阪市大・院・理）

谷村祐介（大阪市大・院・理）

曾我康一（大阪市大・院・理）

服部隆行（大阪市大・院・理）

馬淵敦士（大阪市大・院・理）

若林和幸（大阪市大・院・理）

## Towards Identification of Genes Underlying Gravity Resistance in Plants

*Takayuki Hoson\*, Takayuki Hattori, Yusuke Tanimura, Atsushi Mabuchi, Kouichi Soga, Kazuyuki Wakabayashi*

\*, Graduate School of Science, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585

E-mail: hoson@sci.osaka-cu.ac.jp

**Abstract:** Resistance to the gravitational acceleration, gravity resistance, is a principal graviresponse in plants, comparable to gravitropism. We have shown the outline of events leading to gravity resistance, with ground-based studies and space experiments. To clarify the detailed mechanism of gravity resistance, we need to identify genes underlying this response and unveil their functions. Both the gene expression analysis and the phenotypic analysis of mutants may be effective for the purpose. We identified, with microarray and RNAseq analyses, a number of genes in Arabidopsis, whose expression was up- or downregulated under microgravity conditions in space. The expression of a part of these genes was modified in the opposite direction under hypergravity conditions. On the other hand, we found various candidate genes by a phenotypic screening of confirmed homozygous T-DNA insertion lines in Arabidopsis for cell wall extensibility and the degree of hypergravity-induced suppression of elongation growth. The suitable combination of both approaches may be effective for identification of genes involved and understanding the whole mechanism of gravity resistance in plants.

**Key words;** Arabidopsis, Gene expression, Gravity resistance, Microgravity, Plant, T-DNA insertion line.

### 1. はじめに

植物は、数億年前に海から陸に上がって以来、重力に抵抗するための強固な体と様々なしくみを発達させ、陸上植物として多彩に進化、繁栄してきた。このような重力に抵抗する反応は、植物の代表的な重力反応である重力屈性とは独立したものであるが、その存在は、従来きちんと認識されていなかった。そこで我々は、これを「抗重力反応（gravity resistance）」と名づけ（Hoson and Soga 2003, 保尊 2005）、その実態や基本的なプロセスの流れを明らかにしてきた（保尊他 2010, Hoson and Wakabayashi 2015）。

抗重力反応のメカニズムの全容を理解するためには、さらに、関与する遺伝子を特定し、それぞれの機能を解明する必要がある。そのための手法として考えられるのは、網羅的な遺伝子発現解析と変異体の表現型解析である。前者に関しては、実際、抗重力反応の研究初期に実施した Differential display

法により、過重力下で誘導される遺伝子として  $\alpha$ -チューブリンと *HMGR* が同定され（Yoshioka et al. 2003）、微小管や膜ラフトの関与が明らかになった実績がある。そこで、最近「きぼう」実験棟で実施した Resist Tubule 実験により得られたシロイヌナズナ花茎を材料として、マイクロアレイ及び RNAseq 解析を行い、遺伝子発現解析の有効性を検証するとともに、抗重力反応に関わる候補遺伝子群を見出した。一方、後者に関しては、シロイヌナズナの純系 T-DNA 挿入変異体ラインを対象とした網羅的な表現型解析（スクリーニング）を実施し、抗重力反応に関わる遺伝子の特定をめざした。

### 2. 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析の信頼性を検証するため、まず Resist Tubule 宇宙実験における同一処理区から得られた独立試料間の比較を行った。微小重力環境で発現が低下あるいは増加した上位 100 遺伝子の種類

について、同じ栽培容器から得られた2つの試料を比較したところ、非常に高い割合で共通していた。これにより、マイクロアレイあるいはRNAseq解析の信頼性が確認された。

次に、同じ環境下で生育した2種の類似した系統間の比較を行った。微小重力環境で発現が低下あるいは増加した上位100遺伝子の種類について比較したところ、かなりの遺伝子が共通していた。これらの遺伝子は、微小重力環境において、確かに発現が低下あるいは増加するものと考えられる。共通していた遺伝子は、細胞成分の構築に関わるタンパク質、一次及び二次代謝に関わる酵素類、植物ホルモンの代謝と活性に関わるタンパク質、転写因子やシグナル伝達分子、ストレス応答に関わるタンパク質などをコードしており、その種類は多様であった。

一方、抗重力反応の程度は、微小重力から過重力に至る幅広い重力範囲で直線的である (Hoson and Soga 2003, 保尊 2005) ことから、微小重力環境で発現が低下あるいは増加した遺伝子の発現は、過重力環境下では、逆方向に変化することが予想される。しかし、実際には、微小重力環境で発現が低下あるいは増加した遺伝子、過重力下で発現が低下あるいは増加した遺伝子ともに、逆の重力環境において発現量の顕著な変化を示さないものが多く、予想通りの変化を示す遺伝子は一部に留まった。すなわち、網羅的な遺伝子発現解析は多くの情報をもたらすが、その解釈、利用にあたっては十分な注意深さが必要である。

### 3. 変異体の表現型解析

遺伝子構造を改変した変異体の活用は、現在の生理学の最も重要な手段の1つとなっている。Resist Tubule 宇宙実験でも、遺伝子発現解析により関与が推定され、さらにその生理機能が確認されたシロイヌナズナ遺伝子に関する数種の変異体を用いた。

変異体の利用方法としては、遺伝子改変を施した一群の変異体ラインを対象として、表現型の網羅的解析を実施し、候補遺伝子のスクリーニングを行うことも有効である。シロイヌナズナでは、ゲノムプロジェクトの副産物として、T-DNA 挿入箇所が特定され、純系、安定化された変異体ライン (confirmed homozygous T-DNA insertion lines) が整備されている。この遺伝子欠損変異体ラインを対象として、抗重力反応に関わる遺伝子のスクリーニングを行った。

抗重力反応の最終過程は、細胞壁代謝の修飾を介した細胞壁強度の増加である (保尊他 2010, Hoson and Wakabayashi 2015)。そこで、細胞壁物性を指標とした網羅的解析を行った。その結果、約数%の割合で細胞壁物性に差異を示すラインが見つかった (Mabuchi et al. 2016)。その中には、既に細胞壁の構築や代謝に関わることがわかっている遺伝子と、今まで細胞壁との関係が示されていない遺伝子のラインとがほぼ同じ割合で含まれていた。後者の中から、特に、ANL2 遺伝子が、新規細胞壁関連遺伝子として同定された (Mabuchi et al. 2016)。

植物は、重力が大きくなるにともなって、伸長成長の抑制と肥大成長の促進により、重力に抵抗できる形態を構築する。これも抗重力反応の主要なメカニズムである。そこで、過重力による伸長抑制の程度を指標とした網羅的解析を行った。その結果、やはり数%の割合で、野生型に比べて成長抑制率が低いラインが見つかった (服部他 2018)。これらの中には、1 g 下での成長には変化がないものも見られたが、1 g 下で矮性であり過重力下でもそれ以上の抑制を示さないラインが多かった。また、いずれも、重力屈性や成熟植物体の形質には野生型との顕著な違いは見られなかった (服部他 2018)。

以上、2種類のスクリーニングで選抜された変異体の中には、抗重力反応に関わる遺伝子の欠損体が含まれている可能性が高い。

### 4. まとめと展望

Resist Tubule 宇宙実験により得られたシロイヌナズナ花茎を用いたマイクロアレイ及びRNAseq解析により、抗重力反応に関わる可能性のある新規遺伝子群が特定された。これらの遺伝子に関わる T-DNA 挿入変異体の細胞壁物性や過重力による伸長抑制の程度を解析することにより、これらの遺伝子の抗重力反応における機能が解明されることが期待できる。一方、細胞壁物性及び過重力による伸長抑制の程度を指標とした純系 T-DNA 挿入変異体ラインの網羅的表現型解析の結果、それぞれいくつかの候補遺伝子が見出された。細胞壁物性に基いて選抜された変異体については過重力による伸長抑制の程度を、また過重力による伸長抑制の程度により選抜された変異体については細胞壁物性を解析することにより、候補遺伝子の絞り込みが可能である。さらに、遺伝子発現解析の結果と対照することにより、候補遺伝子の抗重力反応における機

能を確認することが可能になる。このように、網羅的な遺伝子発現解析と変異体の表現型解析のそれぞれの特徴を生かし、融合させることにより、植物の抗重力反応に関わる遺伝子が特定され、この反応の全体像が解明されることが期待される。

## 5. 文献

- 1) Hoson, T. and Soga, K., *Int. Rev. Cytol.*, **229**, 209 (2003).
- 2) 保尊隆享, *生物工学*, **83**, 565 (2005).
- 3) 保尊隆享他, *生物工学*, **88**, 292 (2010).
- 4) Hoson, T. and Wakabayashi, K., *Phytochemistry*, **112**, 84 (2015).
- 5) Yoshioka, R. et al., *Adv. Space Res.*, **31**, 2187 (2003).
- 6) Mabuchi, A. et al., *J. Plant Physiol.*, **191**, 29 (2016).
- 7) 服部隆行他, *日本宇宙生物科学会第32回大会*, P-10 (2018).