

# 過重力環境を利用したシロイヌナズナの重力屈性異常突然変異体の重力応答性の評価

東北大学大学院生命科学研究科 藤井伸治、山川あゆみ、宮沢豊、高橋秀幸

宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究所 山下雅道

## Estimation of graviresponsiveness of agravitropic mutants of Arabidopsis using hyper-gravity condition

Nobuharu Fujii, Ayumi Yamakawa, Yutaka Miyazawa and Hideyuki Takahashi

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Katahira 2-1-1 Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8577

Masamichi Yamashita

Institute of Space and Astronautical Science, Japan Aerospace Exploration Agency, Yunodai 3-1-1 Chuou-ku, Sagami-hara, Kanagawa, 252-5210

E-Mail: nobuharu@ige.tohoku.ac.jp

Abstract: It has been suggested that Arabidopsis has at least 2 gravity-sensing pathways: one is amyloplasts sedimentation pathway and another is *ARG1* (*ALTERED RESPONSE TO GRAVITY1*) pathway. It has been shown that *pgm* (*phosphoglucosyltransferase*) mutation reduces amyloplast sedimentation and gravity sensing in plants. *ARG1* genes encode DnaJ-like protein. However, these genes would not be considered to encode a receptor that is activated by gravistimulation and in turn alters intracellular molecules to create a response. Therefore, it is predicted that plants have an unidentified gravity-sensing molecule. To identify that, we have been attempting to detect a mutation that is defective in the gene that encodes the gravity-sensor. In this study, we evaluated gravity-responses of *pgm arg1* double mutant that was defective in both 2 gravity-sensing pathways by using hyper-gravity conditions. Our results suggested that gravity responses depending on the unidentified gravity-sensing molecule that remained in *pgm arg1* double mutant could be detected by using 25G condition with irradiating blue light from below.

*Key words*; Arabidopsis, gravitropism, hyper-gravity

### 【はじめに】

植物は独立栄養性の固着性生物である。約5億年前の植物の陸地環境への進出は、エネルギーを生産する独立栄養性を保証する光合成に必要な大気、光の獲得を容易にする一方で、地中に存在する限定された養水分の獲得能力を必要とした。そのために植物は地球上に普遍的に存在する重力を利用して自身の器官の成長方向を制御する能力を獲得した。すなわち、根や茎は重力受容細胞を有し、重力刺激を生体内の情報に変換するシグナル変換機構を通じて重力屈性を発現させる。これによって植物は養水分の存在する土中に根系を発達させ、光と大気存在する地上部に茎葉を繁茂させる。植物の有するこの能力が現在の生態系構築の基盤となり、人類をはじめとしてすべての生物のエネルギー生産を可能にしている。したがって、植物の重力応答機構を理解することは、単なる植物の生理現象の理解にとどまらず人類の生存に必要な生態系を保持し、エネルギー生産および環境の確保という観点からも重要かつ不可欠である。

植物の重力応答機構に関して、生理学および近年のシロイヌナズナ重力屈性異常突然変異体を用いた分子遺伝学的解析により、重力受容から屈曲に至る過程が解析されてきた。その結果、根端のコルメラ細胞および茎葉の内皮細胞が重力受容細胞として機能し、その細胞内におけるアミロプラストの沈降が完全な重力屈性の発現に必要であることや、屈性発現に必要な偏差成長には植物ホルモンの1つであるオーキシンの重力依存的な偏差分布が関与することが明らかにされてきた<sup>1)</sup>。しかしながら、これらの重力応答による成長制御機構の本質的な理解には、重力刺激を生体情報に変換するプロセスの解明が必要である。現在、アミロプラストの沈降を感受し、そのシグナルを生体情報に変換する機構に関しては、細胞学的解析から主に以下の2つの仮説が予想されている<sup>2)3)</sup>。

- ① 沈降性アミロプラストが細胞の下側に移動することにより、根の重力感受細胞であるコルメラ細胞内に張り巡らされているアクチンフィラメ

ントが引っ張られ、下流のシグナル伝達分子を活性化する。

- ② コルメラ細胞特異的に観察される細胞膜近辺に存在する交差している小胞体を、細胞の下側に移動した沈降性アミロプラストが圧迫し、下流のシグナル伝達経路を活性化する。

この2つの仮説は1970年代に既に提唱されているが、これらのいずれが正しいか、あるいはこれらの仮説以外の機構が植物の重力感受に機能しているかは解明されていない。

生化学的・分子生物学的研究による解明が困難であった植物の生理現象・形態形成を担う遺伝子が、主にシロイヌナズナの突然変異体を用いた分子遺伝学的研究により同定され、その分子機構が解明されるようになった。現在では、シロイヌナズナの全ゲノム塩基配列が解読されるとともに、T-DNA挿入系統等が整備されている<sup>4)</sup>。このような分子遺伝学的研究のリソースが整備されていても、未解明の形質を担う分子機構を解明するためには、注目している形質の異常な突然変異体を単離し、これらの突然変異体に注目した分子遺伝学的な解析が必要となる。

植物の重力に対する初期応答の異常なシロイヌナズナ突然変異体では重力屈性が完全に消失しない。例えば、デンプンを合成できない *pgm* (*phosphoglucosyltransferase*) 突然変異体や *adg1* (*ADGase small subunit*) 突然変異体では、アミロプラストが細胞の下側に沈降しないが、重力屈性は完全に消失せず、屈曲速度の低下にとどまる<sup>5)6)</sup>。また、重力感受が異常となるシロイヌナズナの *arg1* (*altered responses to gravity 1*) 突然変異体や *arl2* (*arg1-like 2*) 突然変異体の根の重力屈性もまた低下にとどまる<sup>7)8)</sup>。*arg1* 突然変異体と *arl2* 突然変異体の二重突然変異体の重力屈性は、それぞれ単独の突然変異体と変わらないことから、ARG1 と ARL2 は同一経路で機能していると考えられる<sup>7)</sup>。さらに、*pgm* 突然変異と *arg1* 突然変異、または *pgm* 突然変異と *arl2* 突然変異との二重突然変異体を作成すると、それぞれ単独の突然変異体に比べてさらに重力屈性が低下することから、植物の重力感受機構にはアミロプラストの沈降に依存する経路 (PGM 経路) と、ARG1/ARL2 に依存する経路 (ARG1 経路) があることが示唆されている<sup>8)</sup>。しかしながら、PGM や ADGase はデンプン合成経路を担うタンパク質であり、重力刺激を細胞内の情報に変換する分子であるとは考えられない。また、ARG1 と ARL2 は hsp70 分子シャペロンと相互作用するタイプ II DnaJ 様タンパク質であり、この分子と相互作用する分子の存

在が予想されるが、これらの知見は重力刺激を生体情報に変換する分子機構のモデルを構築するには不十分である。したがって、植物には重力刺激を細胞内の情報に変換する未同定の分子が存在すると予想される。そして、未同定の重力感受分子が植物に存在するのであれば、PGM 経路と ARG1 経路の2つの重力感受経路を欠損した *pgm arg1* 二重突然変異体では機能する重力感受分子が重力刺激の感受に貢献していると期待される。したがって、*pgm arg1* 二重突然変異体での重力応答性を検出できれば、その重力応答性を指標として、*pgm arg1* 二重突然変異体の重力感受分子の機能が突然変異によって欠損した突然変異の同定が可能となる。

Fitzelle と Kiss<sup>9)</sup>は、過重力により *pgm* 突然変異体のデンプン粒を含まないプラスチドが沈降し、屈曲速度の低下が回復することを見出した。そこで、本研究では過重力条件を用いて、重力感受性が低下した突然変異体、特に *pgm arg1* 二重突然変異体での重力応答性を解析した。

#### 【材料と方法】

野生型 Columbia (Col)、*pgm-1* 突然変異体、*arg1-3* 突然変異体、*pgm-1 arg1-3* 二重突然変異体をそれぞれ角形シャーレ中の 1/2 MS 培地 (1.5% agar) 上に播種し、遠心機を用いた過重力環境 (25G) または静置状態 (1G) で生育させた。光条件は遠心力の方向と逆向きに青色光 (260  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を照射するか、またはアルミ箔で角形シャーレを覆い遮光した。スキャナーで撮影した芽生えの画像を用いて、根および胚軸の成長方向を測定し、重力屈性能を評価した。

#### 【結果と考察】

野生型 (Col)、*pgm* 突然変異体、*arg1* 突然変異体、および *pgm arg1* 二重変異体のいずれの胚軸でも、重力方向と逆向きに青色光を照射すると、重力屈性よりも光屈性が強く発現した。また、過重力刺激を与えても、光屈性が強く発現したことから、胚軸では重力屈性よりも光屈性が優先されることがわかった。

野生型 (Col) の根では、1G と 25G の両条件下において、重力方向と逆向きに青色光を照射しても、重力屈性による屈曲が観察された。これに対し、*pgm arg1* 二重変異体では 1G 条件下で重力方向の逆向きに青色光を照射すると、重力屈性は発現せず、光屈性が強く発現した。そして、青色光条件下でも過重力を与えることで *pgm arg1* 二重変異体の重力屈性が回復した。

以上の結果から、*pgm arg1* 二重突然変異体でも、重力刺激を生体内の情報に変換する分子が機能しており、下側から青色光を照射しながら 25G 条件下で実験を行うことにより、*pgm arg1* 二重突然変異体で機能している重力感受分子依存的な重力応答を検出できると考えられた。そして、本解析結果は、*pgm arg1* 二重突然変異体に EMS により突然変異を誘発し、25G 条件下で、下側から青色光を照射したときに、根が真上に伸長する *enhancer of pgm arg1* 突然変異が生じている M<sub>2</sub> 植物を選抜することにより、重力感受分子での突然変異は同定可能であることが示唆された。

#### 【参考文献】

- 1) Morita MT, Tasaka M. Gravity sensing and signaling. (2004) *Curr Opin Plant Biol.* 7:712-718.
- 2) Björkman T. Perception of gravity by plants. (1988) *Advances in Botanical Research.* 15: 1-41.
- 3) Perrin RM, Young LS, Murthy UMN, Harrison BR, Wang Y, Will JL, Masson PH. (2005) Gravity signal transduction in primary roots. *Ann Bot* 96: 737-743.
- 4) Heazlewood JL, Millar AH. (2005) AMPDB: the Arabidopsis Mitochondrial Protein Database. *Nucleic Acids Res.* 33: D605-610.
- 5) Kiss JK, Hertel R, Sack FD. (1989) Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 177: 198-206.
- 6) Vitha S, Zhao L, Sack FD. (2000) Interaction of root gravitropism and phototropism in Arabidopsis wild-type and starchless mutants. *Plant Physiol.* 122: 453-462.
- 7) Sedbrook JC, Chen R, Masson PH. (1999) *ARG1* (*altered response to gravity*) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:1140-1145.
- 8) Guan C, Rosen ES, Boonsirichai K, Poff KL, Masson PH. (2003) *ARG1-LIKE2* gene of Arabidopsis functions in a gravity signal transduction pathway that is genetically distinct from the *PGM* pathway. *Plant Physiol.* 133: 100-112.
- 9) Fitzelle KJ, Kiss JZ. (2001) Restoration of gravitropic sensitivity in starch-deficient mutants of Arabidopsis by hypergravity. *J Exp Bot.* 52: 265-275.