

フロンティア生物の戦略 —植物の成長と重力受容システム—

研究班 WG 代表 東北大・院・生命科学 高橋秀幸

研究班 WG 構成員：飯野盛利（大阪市立大学）、上田純一（大阪府立大学）、鎌田源司（エイ・イー・エス）、神阪盛一郎（富山大学）、金子康子（埼玉大学）、北宅善昭（大阪府立大学）、曾我康一（大阪市立大学）、高橋秀幸（東北大学）、田坂昌生（奈良先端科学技術大学院大学）、藤井伸治（東北大学）、保尊隆享（大阪市立大学）、宮沢豊（東北大学）、宮本健助（大阪府立大学）、村田隆（基礎生物学研究所）、森田美代（奈良先端科学技術大学院大学）、山下雅道（宇宙航空研究開発機構）

Strategy of Frontier Organisms: Graviperception Systems for Plant Growth and Development

H. Takahashi

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

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

Members: M. Iino (Osaka City Univ.), (J. Ueda (Osaka Prefecture Univ.), M. Kamada (AES), S. Kamisaka (Toyama Univ.), Y. Kaneko (Saitama Univ.), Y. Kitaya (Osaka Prefecture Univ.), K. Soga (Osaka City Univ.), H. Takahashi (Tohoku Univ.), M. Tasaka (Nara Inst. of Science and Technology), N. Fujii (Tohoku Univ.), T. Hoson (Osaka City Univ.), Y. Miyazawa (Tohoku Univ.), K. Miyamoto (Osaka Prefecture Univ.), T. Murata (NIBB), M. Morita (Nara Inst. of Science and Technology), M. Yamashita (JAXA)

Abstract: Studies of our working group are aimed at understanding the graviperception mechanism and its interactions with mechanisms of other gravity-influenced phenomena of plant growth and development. Our collaborative works will bring about hypotheses on the molecular mechanisms underlying plant responses to gravity, which will be further verified by spaceflight experiments. This approach will also lead to the establishment of technology useful for controlling plant growth and development in space. We have continued our studies to reveal mechanisms underlying graviperception and its signal transduction in plants by using gravitropic mutants, and found various genes and molecules responsible for the mutations. Also, we have studied the gravity-influenced growth and development of plants; namely, gravimorphogenesis of cucumber seedlings, shoot circumnutation, and hydrotropism in seedling roots. The results obtained suggested molecular cascades for graviresponse and molecular networks for the interactions among the gravity-influenced phenomena. Based on these accomplishments, we are attempting to establish models and hypotheses to be verified by spaceflight experiments. Some of the subjects being dealt in this project are to be flown in this year. Currently, we are preparing to propose another spaceflight experiment on circumnutation and its relationship to graviresponse in plants.

Key words: Arabidopsis, Auxin, Circumnutation, Cucumber, Gravimorphogenesis, Graviperception, Gravitropism, Hydrotropism, Mutants, Pea, Rice

研究班 WG の目的と活動内容

生命維持の基盤となる植物は、重力をシグナルとして利用し、陸地環境における生存に必要な形態、姿勢、伸長方向の制御を可能にした。本研究班ワーキンググループは、このような生物進化、地球環境、生命維持、有人宇宙活動、いずれの観点からもフロンティアに立つ植物の生活を支える重力受容システムとそれが植物の成長を制御するメカニズムを理解するために、それらの分子機構に関するモデルを提唱し、それを宇宙実験で検証することを目的として活動している。本年度は、とくに、この植物の重力応答における重力受容・シグナル伝達機構を解明すべく研究を継続するとともに、重力依存的成長現象としてキュウリ芽生えの重力形態形成、重力影響を受けるイネ芽生えの回旋運動と根の水分屈性の制御機構に関する研究と討論を展開した。

本年度の活動成果

1. 植物の重力屈性

(1) 重力屈性突然変異体を用いたシュートの重力受容機構の解析（田坂・森田）

内皮細胞の分化に関わる転写因子 SHOOT-ROOT(SHR) の弱いアレルである *endodermal amyloplastless 1 (eal1)* 変異株は、内皮細胞は形成するものの重力屈性能を完全に失っている。昨年度までに、この変異体を用いたマイクロアレイ解析により、*eal1* において野生型に比べて 1/2 以下に発現量が低下した 29 遺伝子を見いだした。この遺伝子群 (*Down-regulated Genes in Eal1; DGE*) について、入手可能な T-DNA 挿入系統の重力屈性能を調べた結果、DGE1 と名付けた遺伝子の欠損変異体が重力屈性異常を示すことが分かった。DGE1

はイネ LAZY1 と弱いながら相同性示す。イネにおいても *lazy1* 変異体は地上部に重力屈性異常を示すことから、*DGE1* と *LAZY1* はオルソログであると考えられる。*DGE1* は花茎において内皮細胞と維管束を取り巻く組織で発現していた。*dge1* 変異体においては、内皮細胞のアミロプラストの挙動に特に異常がみられないことから、*DGE1* は重力受容以降のプロセスに関与する可能性が示唆された。

花茎重力屈性が弱くなった *sgr9* 変異株の原因遺伝子はリングフィンガーを持つ E3 リガース様タンパク質をコードしている。本年度は、*SGR9* の RING finger ドメインと MBP (ユビキチンリガーゼの偽基質) の融合リコンビナントタンパク質を作製し、*in vitro* 系における *SGR9* の E3 リガーゼ活性を調べた。その結果、*SGR9* は E3 リガーゼ活性を持つことがわかった。また、昨年度までに、*SGR9* はアミロプラスト近傍でアミロプラスト-アクチン間の相互作用を調節している可能性を示唆していたが、今年度はこれを検証すべく、vertical microscope を用いて、アミロプラストと F-アクチンの同時イメージングを行った。その結果、*sgr9* 中では複数のアミロプラストが F-アクチンに絡まるようにクラスターを形成しつつ動いており、このような様子は野生型ではほとんど観察されなかった。また、F-アクチンの形成を阻害する *ACT8* の優性変異 *fiz1* を *sgr9* 変異体にヘテロ接合体として導入すると、このようなクラスター状のアミロプラストがみられなくなり重力方向に沈降すると同時に、重力屈性能力を回復した。また、*fiz1* の影響は植物個体のどの組織にも及んでしまうので、*fiz1* が優性である事を利用して内皮にのみ *fiz1* 変異を持つ *ACT8* 遺伝子を *sgr9* で発現させ (pSCR::ACT8*fiz1*)、重力屈性への影響を調べた。この形質転換体は、重力屈性を大幅に回復させたことから、*sgr9 fiz1/+*においてみられた重力屈性の回復は、内皮でのアミロプラスト沈降回復に起因する可能性が高いと言える。これまでの結果から、*SGR9* はアミロプラスト近傍でアミロプラストと F-アクチンを解離させるように調節を行うことで、アミロプラストの重力方向への沈降を促進しているというモデルが考えられた。

(2) 黄化エンドウ初期芽生えの重力屈性反応とオーキシン極性移動能 (上田・宮本)

我々は、植物の成長、発達ならびにそれと密接に関係するオーキシンの動態に対する重力の影響を明らかにするために、1998年に STS-95 植物宇宙実験を実施した。その結果、宇宙微小重力環境下で生育した黄化エンドウ芽生えは上胚軸におけるオーキシン極性移動が低下するとともに、黄化エンドウ

芽生えは自発的形態形成を示すことが明らかとなった。さらに、その後、地上における3次元クリノスタットを用いた一連の関連研究によって、宇宙微小重力環境下で認められる黄化エンドウ芽生え上胚軸の自発的形態形成は、本来地上において認められる、芽生えの初期成長段階での子葉側、反子葉側上胚軸におけるオーキシン極性移動の不均等分布に由来する上胚軸の「負の重力屈性」が起らなかったことに起因することを示唆した。

黄化エンドウ芽生えの上胚軸第一節間の子葉側 (proximal 側) と反子葉側 (distal 側) で認められるオーキシン極性移動能の大きな差と上胚軸の重力応答との関係を明らかにする目的で、胚の向きが重力と平行になるように種子を置床して発芽・生育させた第一節間の成長期にある 3.5 日齢黄化エンドウ芽生えを水平に横たえて重力刺激を与え、重力屈性反応を測定した。その結果、proximal 側を重力側にした場合と distal 側を重力側にした場合では重力屈性 (屈曲角度) の度合いが異なること、すなわち、distal 側を重力側にした場合に比べて proximal 側を重力側にした場合の重力屈性反応が大きいことが示された。さらに、その経時的変化を調べたところ、屈性反応までの時間、および屈曲速度に違いがあることが明らかとなった。このことは、オーキシン極性移動能の偏りが重力屈性反応に関与していることを示唆している。

黄化エンドウ芽生えを一定時間 (30 分間および 60 分間)、水平に横たえて重力刺激を与えた後、伸長域を含む 15 mm 切片を切り出し、先端側から縦に 10 mm の切れ目を入れた後、水に浮かべ組織張力を測定した。その結果、正立に保った芽生えでは上胚軸第一節間の proximal 側と distal 側の組織張力 (開度) に有意な差は認められなかった。一方、30 分間水平に保ち重力刺激を与えた場合、distal 側を重力側にした場合には proximal 側と distal 側の組織張力 (開度) に有意な差が認められなかったが、proximal 側を重力側にした場合には、proximal 側に比べ proximal 側の組織張力が小さかった。この proximal 側と proximal 側の組織張力の差は、distal 側を重力側にした場合でも 60 分間の重力刺激を与えた場合には認められた。このことは proximal 側と proximal 側の組織張力の差と重力屈性反応との間の密接な関係を示唆している。

以上の結果から、黄化エンドウ芽生え上胚軸第一節間における重力屈性反応には、オーキシン極性移動能の局在に基づくオーキシン動態の変化によってもたらされる組織張力の変化が関与すること示唆された。

(3) 根の重力屈性新規突然変異体 (藤井・宮沢・高橋)

我々がシロイヌナズナの根の重力屈性の低下を指標に単離したシロイヌナズナの 31-46 系統は、*aux1* 遺伝子の Trp をコードする 445 番目のコドンがストップコドンに変化するナンセンス突然変異 (*aux1W445**) が生じていたが、完全機能欠損型 *aux1* 突然変異体 (*aux1-22*) に比べて高いオーキシン抵抗性を示した。これは、31-46 系統は *aux1* 突然変異の他に、*enhancer of aux1 (enax)* 突然変異が生じているためであると考えられた。そこで、*enax* 突然変異に注目して解析した結果、*enax* 突然変異体は *aux1W455** 突然変異体と同等のオーキシン抵抗性を示すが、*aux1W455* enax* 二重突然変異体 (31-46 系統) では、各単独突然変異体に比べてオーキシン抵抗性が増加することが示された。さらに、4 日齢の芽生えの根の重力屈性を解析した結果、*aux1W445** 突然変異体と *enax1* 突然変異体の根の重力屈性は遅延にとどまるが、*aux1W445* enax* 二重突然変異体では、根の重力屈性が欠損していた。以上の結果より、*enax* 突然変異は *aux1* 突然変異形質を強めることが示された。ラフマッピングにより *enax* 突然変異遺伝子がマッピングされた領域は、オーキシン抵抗性を引き起こす既知の突然変異遺伝子を含んでおらず、*enax* 突然変異遺伝子の同定・解析は、根の伸長成長制御に関する新たな知見を導けると期待される。

2. 重力応答に影響される植物の形態形成

(1) キュウリ芽生えのペグ形成 (藤井・宮沢・高橋)

STS-95 の宇宙実験によって提唱された「重力による形態形成のネガティブコントロール」により、ペグの形成面の決定に際し、キュウリ芽生えの積極的な重力刺激への応答は、胚軸と根の境界域の上側でのペグ形成の抑制であると予測される。これまでに、境界域における重力刺激に応答したオーキシンの動態変化を理解するために、境界域の内皮において発現する CsPIN1 タンパク質に対する抗体を作成し、ペグ形成開始時の境界域における CsPIN1 タンパク質の局在と重力に応答した動態変化を免疫組織化学染色法により解析してきた。酢酸メタノールにより固定した試料を解析した結果、重力刺激に応答した内皮細胞での CsPIN1 の局在パターンの変動は認められたが、境界域の上側での CsPIN1 の活性化やオーキシン量の減少を説明しうる結果は得られなかった。今回、キュウリの芽生えの境界域をカルノア固定液により固定し、免疫組織化学染色を行

った結果、ペグの形成面決定期のキュウリ芽生えの境界域の上側の内皮細胞に顕著な CsPIN1 シグナルが検出され、境界域の上側の内皮細胞においてオーキシン排出キャリア CsPIN1 が重力刺激に対して応答していることが示された。そして、そのシグナルは、内皮細胞の下側の細胞膜に認められたことから、重力刺激に応答した CsPIN1 により境界域の上側の内皮細胞から下側に向けてオーキシンが輸送され、境界域の上側でオーキシンが減少し、ペグ形成が抑制されると予測される。この結論は、オーキシン排出キャリアの阻害剤である TIBA 処理により、水平に発芽させたキュウリ芽生えの境界域の上側においてもペグ形成が誘導される実験結果と矛盾しない。重力刺激後の経時的な解析により、境界域の上側の内皮細胞の下側の細胞膜への CsPIN1 の局在は、重力刺激から 30 分後に認められた。GC-SIM-MS により IAA を定量した結果、IAA の偏差分布も重力刺激から 30 分後に認められた。すなわち、境界域の内皮細胞での CsPIN1 の局在変化と境界域での IAA の偏差分布の形成が一致した。したがって、境界域の上側の内皮細胞において CsPIN1 が機能することにより、境界域の上側のオーキシン量が低下し、ペグ形成が抑制されると考えられる。

(2) イネ芽生えの重力屈性と回旋運動 (飯野)

我々は、完全暗黒中で育てたイネ芽生えの幼葉鞘が典型的な回旋運動をしていることを見出し、この回旋運動と重力屈性の関係を解析した結果、回旋運動は重力屈性そのものではないが、その発現には重力シグナルが必要であるという結論に至った。

地上部が広がって成長する *lazy* (もつれ) 突然変異体はイネで古くから知られており、古典的連鎖地図の標識形質としても使われてきた。これまでに、連鎖検定用の *lazy* 突然変異体を品種“亀の尾”に交配して作出された準均一系統を用いて、突然変異体の幼葉鞘と葉鞘基部の重力屈性が低下していること、突然変異はアミロプラストの異常によるものではないことが報告されている。また、この突然変異体の幼葉鞘では、重力に応答したオーキシン不均等分配が欠損していることが、³H-IAA を用いた実験で示されている。我々はこれと同じ突然変異体を用いて、その幼葉鞘は、部分的に重力屈性を示すが、回旋運動はまったくしていないことを見出した。この結果は、突然変異の原因になる遺伝子 (*LAZY1*) は重力屈性よりも回旋運動の方に特異的に働いていることを示す。また、*lazy1* 突然変異体の幼根は正常な重力屈性と回旋運動を示すこと、すなわち、*LAZY1* は根の重力屈性と回旋運動には関与しないことも明らかになった。

我々は、マップベーススクローニングと相補性検定により、また RNA 干渉法を利用して、*LAZY1* を新規遺伝子として同定した。また、*Tos17* 挿入系統から日本晴バックグラウンドの *lazy1* 突然変異体も 2 つ得ることができた（どちらも、突然変異は *Tos17* 挿入ではなく、塩基配列欠失が原因）。亀の尾バックグラウンドの突然変異体、および日本晴バックグラウンドの突然変異体のうち少なくとも一つは、*LAZY1* ノルであった。また、イネには *LAZY1* のホモログ遺伝子が存在しないため、その遺伝子産物 (*LAZY1*) は単独で機能していると考えられた。*LAZY1* は幼葉鞘の全域で高く発現しているが、*lazy1* 突然変異体の根が正常な重力屈性を示すことに一致して、根では（特にその先端部では）ほとんど発現していなかった。

lazy1 突然変異体の幼葉鞘では、重力に応答したオーキシンの不均等分配が欠損している。我々は、³H-IAA を用いたトレーサー実験によって、横に傾けた幼葉鞘の上半分と下半分の間におけるオーキシン不均等分配が *lazy1* 突然変異体ではまったく生じないことを明らかにした。このことは、*lazy1* 突然変異体の幼葉鞘は、部分的な重力屈性を示すが、オーキシンを不均等に分配する能力をほぼ完全に失っていることを意味した。これらの結果から、重力屈性には *LAZY1* 依存と非依存のシグナル伝達系が存在し、*LAZY1* 依存の方にのみオーキシン不均等分配が関与しているという結論に至った。また、*lazy1* 突然変異体の幼葉鞘は回旋運動をしていないことから、回旋運動に関係しているのは、オーキシン不均等分布が関与する *LAZY1* 依存のシグナル伝達系の方であると考えられた。シロイヌナズナには *LAZY1* と相同性が比較的高いホモログ遺伝子が一つ存在する。我々の RNA 干渉法を用いた逆遺伝学的研究から、*AtLAZY1* もシロイヌナズナの重力屈性に関与していることが明らかになってきた。*LAZY1* とそのホモログは高等植物の重力屈性で普遍的な働きをしていると考えられる。

(3) 根の重力屈性と水分屈性 (宮沢・藤井・高橋)

水分屈性は、根が水分勾配を感知し水分含量の多い方向に屈曲する現象である。これまでの解析から、水分勾配刺激により根端のデンプンの分解が起こること、水分屈性発現に必須の分子として、*MIZ1* および *MIZ2* / *GNOM* があることが明らかになっている。*MIZ2* / *GNOM* は小胞輸送に機能する ARF-GEF であることが明らかになっている一方で、*MIZ1* は機能未知のタンパク質である。本年度は、まず、水分屈性発現過程において水分屈性に必須の分子である *MIZ1* の作用点を同定することを目的と

して、水分屈性を欠損した *miz1*、*miz2* および水分屈性の亢進が認められる *MIZ1* 過剰発現体を用いて生理学的解析を行った。その結果、(1)*miz1*、*miz2* ではともに水分勾配刺激により根端のデンプン分解が起こること、(2)小胞輸送阻害剤 BFA は *MIZ1* 過剰発現体においても強く水分屈性発現を阻害すること、(3)*miz2* バックグラウンドの *MIZ1* 過剰発現は *miz2* の表現型を呈することが明らかになった。これらの結果から、*MIZ1* は水分屈性発現過程において、水分勾配刺激依存的デンプン分解の下流、且つ *MIZ2* / *GNOM* の上流で機能することが示唆された。

また、*miz2* は水分屈性以外に目立った形態的異常を示さないことから、*miz2* は *GNOM* の機能のうち、水分屈性特異的に働く機能を欠損しているものと考えられている。そこで今回我々は、水分屈性の発現に必要な *GNOM* 機能を明らかにするため、*miz2* の遺伝学的解析を行った。GEF 活性中心に変異を持たない *gnom*^{B4049}、および *gnom*^{R5} をそれぞれ *miz2* と交配したトランスヘテロ接合体は、いずれも水分屈性を完全に欠損していた。一方、GEF 活性が失われた *gnom*^{emb30-1} と *miz2* のトランスヘテロ接合体は、部分的に水分屈性を回復した。以上の結果から、水分屈性に必要な *GNOM* 機能は、GEF 活性以外にも存在することが示唆された。

これまで、我々はエンドウ、キュウリ、シロイヌナズナなどを用いた研究により、根の重力屈性は水分屈性に干渉することを明らかにしてきた。そこで、重力屈性が水分屈性に干渉する機構を明らかにすることを目的として、シロイヌナズナの重力屈性が異常な突然変異体の根の水分屈性を解析した。その結果、オーキシン誘導性遺伝子の転写の抑制因子をコードしている *AXR2/IAA7* の機能獲得型突然変異体である *axr2* 突然変異体、およびオーキシン受容体を欠損した *tir1 afb1 afb2 afb3* 四重突然変異体の根では、正常な水分屈性の発現が認められなかった。したがって、重力屈性と水分屈性の発現にはオーキシン応答が必要であることが示された。

以上の通り、本研究によって植物の重力応答を制御する新規因子が明らかになり、それらの機能を理解する上で重要な知見が得られた。また、これまでほとんど研究されてこなかった重力屈性以外の重力形態形成、重力に影響される成長現象のしくみが解明されつつある。キュウリ芽生えの重力形態形成と根の水分屈性に関する宇宙実験は本年度実施される予定であり、現在、我々は回旋運動と重力屈性の関係を証明する宇宙実験の申請を考えている。