

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：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）、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: 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. Yamashita (JAXA)

Abstract: Studies of our working group are aimed at understanding the graviperception mechanism and its interactions with other gravity-influenced phenomena of growth and development of plants. 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 continued our studies to reveal mechanisms underlying graviperception in plants, and based on microarray analysis of a gravitropic mutant and its wild type *Arabidopsis* and newly screened gravitropic mutants of *Arabidopsis* we obtained novel graviresponse-related genes. In addition, we utilized two agravitropic mutants of morning glory defective in gravisensing cell differentiation and found that graviperception was involved in the bending-induced growth of lateral shoots and that the mechanisms underlying gravity- and decapitation-regulated release from apical dominance were distinct and unique. Furthermore, we studied automorphogenesis of pea epicotyls and hydrotropism in *Arabidopsis* roots, as gravity-influenced growth responses in plants. The results provided us with a clue to understand the interaction between automorphogenesis and gravitropism in relation to auxin transport. Also, identification of genes responsible for ahydrotropism of *Arabidopsis* mutant revealed molecular mechanisms unique to hydrotropism but independent of gravitropism.

Key words; Apical dominance, *Arabidopsis*, Automorphogenesis, Auxin, Gravimorphogenesis, Graviperception, Gravitropism, Hydrotropism, MIZ1, MIZ2, Morning glory, Mutant, Pea, PsPINs, SGR9

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、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自発的形態形成、腋芽伸長、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

本年度は、植物の重力受容とシグナル伝達に機能すると考えられる新規遺伝子の機能の解析をすすめる、重力感受細胞の分化に異常のある突然変異体を用いたトランスクリプトーム解析ならびに新規突然変異体の単離・解析から、新規と考えられる重力屈性関連遺伝子が見出された。また、アサガオの重力応答突然変異体を用いた解析から、重力依存的な新規の腋芽伸長機構の存在が明らかになった。さらに、重力応答と相互作用する自発的形態形成ならびに水分屈性の分子機構を解析し、自発的形態形成をオーキシン輸送との関連で解析する実験系を構築するとともに、重力屈性とは独立して機能する水分屈性制御分子を明らかにした。

1. 植物の重力感受とシグナル伝達機構

(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 (田坂昌生)

植物は重力方向を感受して、器官の伸長方向を変化させる。これは重力屈性反応と呼ばれている。我々は、重力屈性の分子機構を調べるためにシロイヌナズナの重力屈性異常突然変異株を多数単離し解析してきた。本年度はそれらを使って以下の研究を行った。

1) 花茎重力屈性能を完全に失った *endodermal amyloplastless 1(eal1)* 変異株では、重力感受細胞である内皮細胞の分化に関わる転写因子 SHORT-ROOT(SHR) に 1 アミノ酸の欠失が生じていた。内皮細胞において発現する重力屈性に必要な遺伝子を抽出する目的で、この *eal1* の内皮細胞において野生株に比べて発現が弱まる遺伝子をマイクロアレイにより探索した。その結果、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。この遺伝子群には、内皮で機能する転写因子をコードする *SGR5* が含まれていたことから、期待通り重力屈性関連遺伝子が抽出できている可能性が高い。これらの遺伝子について入手できた T-DNA 挿入系統のうち少なくとも 1 系統は、単独変異体で重力屈性異常を示すことを明らかにした。この遺伝子は、植物特異的な新規遺伝子であり、現在その機能を解析中である。

2) 花茎重力屈性が弱くなった *sgr9-1* 変異株の原因遺伝子はリングフィンガーを持つ E3 ライゲース様タンパク質をコードしている。そして、変異体の表現型解析から、このタンパク質がアミロプラストの存在様式や動きに関与することがわかっている。本年度は、F-アクチンの形成阻害を薬剤処理等を行うと、*sgr9* 変異体の重力屈性異常が回復することを見いだした。この時、アミロプラストの重力方向への沈降も回復していた。ちなみに、野生型に同様の処理をすると、未処理に比べて重力屈性反応のキネティクスに若干の変化が見られ、しかも野生型と *sgr9* が良く似たキネティクスを示した。また、*SGR9* タンパク質が膜付着性の性質を有し、アミロプラスト上に存在する可能性が高いことも明らかにした。

以上の結果から、*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が考えられる。さらに *SGR9* と酵母 two-hybrid 法により相互作用するタンパク質の検索を行った。現在、複数の候補遺伝子について検証を進めている。

(2) 根の重力屈性新規突然変異体の単離とその変異原因遺伝子の同定による重力受容機構の解明 (藤

井伸治・宮沢豊・高橋秀幸)

根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ため、突然変異体のスクリーニング・遺伝解析のための効率的な形質評価が行えず、根の重力応答に関する遺伝学的解析が立ち後れている。この問題を克服し、より高感度に根の重力屈性の異常を検出するため、重力屈性と光屈性との干渉作用を利用した実験系に注目した。シロイヌナズナの根は正の重力屈性を示すとともに、負の光屈性を示す。野生型のシロイヌナズナの根では、下側から光を照射した場合、重力屈性が光屈性に比べて強く発現する結果、根は下方向に伸長する。一方、重力感受性が低下する突然変異体では、同じ条件下で、光屈性が強く発現し、根は上方向に伸長する。したがって、本実験系を用いることにより、根の重力屈性の低下を感度良く検出でき、新規のシロイヌナズナの根の重力屈性が異常な突然変異体の単離と、その遺伝学的解析が可能になると期待される。この重力屈性と光屈性との干渉作用を利用した実験系を用いて、EMS 処理で突然変異を誘発した 10 万株のシロイヌナズナ (Col) の M₂ 個体をスクリーニングし、44 系統の突然変異体を単離した。

44 系統の突然変異体のうち、ラフマッピング、野生型 *AUX1* 遺伝子との塩基配列の比較、および *aux1* 突然変異体との相補性検定の結果から、少なくとも 24 系統は *AUX1* 遺伝子が突然変異原因遺伝子であると考えられた。

第 5 染色体に突然変異遺伝子が座上していた 25-66 系統では、相補性検定の結果から、*PGM* 遺伝子に突然変異が生じていることが示唆された。25-66 系統では、デンプン粒の染色が認められることから、本系統では *PGM* の活性は消失しておらず、低下にとどまっていると予想される。一方、下側から光を照射したときの 25-66 系統の根の伸長方向は、*pgm-1* 突然変異体との間で有意差が認められなかった。*pgm-1* 突然変異は 623 アミノ酸からなる *PGM* タンパク質の 191 番目の Trp がストップコドンとなるナンセンス突然変異であり、完全に *PGM* タンパク質の活性が欠損すると考えられている。したがって、25-66 系統では、重力屈性の発現に必要なデンプン量の閾値よりも少ないデンプンが合成されていると予測される。

また、ラフマッピング、野生型遺伝子との塩基配列の比較、および相補性検定の結果から、6 系統 (35-70、11-16、19-14、20-5、21-126、33-17) は *PIN2* 遺伝子での、2 系統 (30-180、33-33 \ominus) は *ARG1/RHG* 遺伝子での突然変異であると考えられた。

現在、未同定の 11 系統の突然変異遺伝子を特定している。

2. 植物の重力依存的形態形成機構

(1) エンドウ芽生えの自発的形態形成を制御するオーキシン輸送 (上田純一・宮本健助)

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 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、自発的形態形成を示すことが明らかとなった。これらの事実は、植物の形態形成やオーキシン極性移動は重力によって制御される現象であることを示している。その後地上において 3 次元クリノスタットを用いて実施された一連の関連研究から、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、吸水後の子葉節基部での上胚軸の「負の重力屈性」が阻害された結果であることが明らかになった。また、上胚軸の「負の重力屈性」の阻害は、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の不均等分布の阻害に起因することが示された。さらに、重力応答異常を示す突然変異体、*ageotropum* エンドウは、野生型エンドウの Weibull's Weitor 品種に X 線を照射することによって得られた突然変異体で、重力刺激を受けても自発的形態形成を示すが、この *ageotropum* エンドウを用いた先行研究から、黄化エンドウ芽生え上胚軸における負の重力屈性 (正常な重力応答反応) は、上胚軸子葉側のオーキシン極性移動によって制御されていること、また、その極性移動能に応じて変化する上胚軸子葉側および反子葉側の内生オーキシンレベルが重要であることが示された。

本年度は、オーキシン極性移動と植物の重力応答反応 (重力形態形成) との関係をも分子レベルで明らかにすることを目的として、重力刺激に応答せず、自発的形態形成を示す重力応答突然変異体 *ageotropum* エンドウのオーキシン極性移動に注目し、オーキシン極性移動に密接に関係すると考えられる *PsPINs* および *PsAUX1* 遺伝子の構造とその発現を解析した。

正常な重力応答を示す野生型エンドウ (cv. Alaska 等) で明らかにされた *PsPIN1*, *PsPIN2* および *PsAUX1* 遺伝子の塩基配列から適当なプライマーを設計し、*ageotropum* エンドウを対象として RT-PCR および 3'RACE、5'RACE 法を用いて *ageotropum* エンドウの *PsPIN1*, *PsPIN2* および

PsAUX1 遺伝子の完全長 cDNA を分離し、それらの塩基配列を決定した。その結果、*ageotropum* エンドウの *PsPIN1*, *PsPIN2* および *PsAUX1* 遺伝子は野生型の Alaska エンドウのそれらの遺伝子と比較して、数個のアミノ酸の違いが認められるものの、欠損や挿入等の大きな構造変化は認められなかった。また、real time RT-PCR 法を用いて黄化芽生え上胚軸第 1 節間の成長、発達と子葉側および反子葉側上胚軸におけるこれらの遺伝子発現を調べた結果、いずれの場合もそれらの発現は *ageotropum* エンドウおよび Alaska エンドウ間で大きな差は認められなかった。

以上の結果から、黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸におけるオーキシン極性移動の低下は、オーキシン極性移動関連遺伝子である *PsPIN1*, *PsPIN2* および *PsAUX1* 遺伝子の構造 (塩基配列ならびに推定アミノ酸配列) や発現で説明することは困難であり、それらの発現産物の構造や機能、あるいは細胞内局在等に関係しているものと考えられた。今後は、これらオーキシン極性移動関連遺伝子産物に対する有効な抗体を作製し、これら遺伝子産物の動態解析を通して、*ageotropum* エンドウのオーキシン極性移動の低下ならびに植物の重力応答反応機構を明らかにすることが望まれる。

(2) アサガオの蔓の折り曲げに伴う重力応答依存的な頂芽優勢打破 (宮沢豊・藤井伸治・高橋秀幸)

我々は、アサガオの重力屈性突然変異体を用いて植物形態形成の重力依存性についても解析を行ってきた。その結果、2つのアサガオの重力屈性欠損系統 (*weeping*, *weeping2*; *we*, *we2*) について、それらの変異原因遺伝子が地上部での重力受容細胞である内皮細胞の分化に必須なシロイヌナズナ遺伝子 (*SCARECROW* および *SHORT-ROOT* 遺伝子) のアサガオホモログであることを明らかにするとともに、蔓巻き性の発現に必要と考えられる回旋転頭運動が重力応答によってコントロールされていることを証明した。さらに、我々は腋芽休眠打破が重力応答の制御下にあることを突き止めた。すなわち、野生型の品種である *Violet* は茎を折り曲げることにより茎頂を下方に向けると、新たに最上部となった腋芽の休眠が打破され伸長が開始された一方、*we* および *we2* においては、頂芽を折り曲げても、最上位の腋芽の伸長開始が起こらないことを明らかにした。一般に頂芽の存在は、下位節の腋芽の伸長を抑制する。この現象は頂芽優勢と呼ばれ、頂芽より基部方向へ輸送されるオーキシンが腋芽におけるサイトカイニンの合成を抑制することにより生じると考えられている。すなわち、オーキシンの供給

源である頂芽の切除もまた腋芽の伸長を促す。そこで、両突然変異系統について、頂芽を切除した際の腋芽伸長を野生型と比較した。その結果、突然変異系統では頂芽の除去に対して野生型と同様に応答し、直下の節からの腋芽伸長が観察された。また、この際に見られる腋芽付近でのオーキシン応答の低下とサイトカイニン合成を *PnIAA1* 遺伝子および *PnIPT1* 遺伝子の発現を指標に解析したところ、突然変異系統でも野生型と同様の遺伝子発現の変動が認められた。さらに我々は、頂芽を折り曲げた際に認められる腋芽伸長時には頂芽の切除の際に認められた *PnIAA1* 遺伝子の発現低下および *PnIPT1* 遺伝子の発現上昇が認められないことを明らかにした。これらのことから、頂芽の物理的除去による頂芽優勢の打破とは異なる機構で腋芽伸長を制御する重力応答依存的な新規システムが存在することが示唆された。

本研究で解析を行った形質、すなわち頂芽優勢や、回旋転頭運動は固着性生物である植物にとって、成長点を空間的に高い位置へ無駄なく移動させ、そこに存在する光・二酸化炭素の効率的利用を可能にする大変重要な仕組みである。アサガオは生育が容易で観察に適しており、日長を厳密に認識し花芽形成がおこるため、植物の栄養成長期および生殖成長期を厳密に分離することができる。さらに、ナショナルバイオリソースプロジェクトにより、突然変異系統や分子生物学的解析に使えるリソースが豊富にある。これらの背景と研究成果を踏まえ、蔓巻き性や頂芽優勢打破の重力依存性を解析することは、科学のみならず宇宙空間での植物栽培に対して非常に重要な知見を与えるものであり、将来の宇宙実験課題として非常に有望であると考えられた。

(3) 根の水分屈性制御機構 (宮沢豊・藤井伸治・高橋秀幸)

植物は周囲の環境刺激に対して屈性を発現し、生存に有利ならしめるべく自身の形態形成を統御する。とくに、水分吸収器官である根は重力屈性能を有するだけでなく、水分勾配に応答して水分屈性を発現し、水分含量の高い空間へと屈曲成長する。我々は、これまでに水分屈性突然変異体 (*mizu-kussei1*, 2: *miz1*, 2) の解析を行い、水分屈性に必須の役割を有する *MIZ1* 遺伝子の同定に世界で初めて成功し、さらに *MIZ2* が小胞輸送に必須の分子をコードしていることも見いだした。

本年度は、*MIZ1*-GFP 融合タンパク質を発現するシロイヌナズナ形質転換植物体の作出を行い、*miz1* 変異を相補する系統を得た。これを用いて

MIZ1-GFP 融合タンパク質の発現部位および細胞内局在を解析した結果、根において *MIZ1*-GFP は水分屈性に必須の役割を果たすと考えられるコルメラ細胞とその周縁部、ならびに屈曲部位の皮層細胞の細胞質に存在することが明らかになった。さらに *MIZ1* の機能解明を進めるために、*MIZ1* 過剰発現個体の作出を行った。CaMV35S プロモーターの下流に *MIZ1* 遺伝子をつなげたコンストラクトを野生型植物体に導入し、*MIZ1* 過剰発現システムを作出した。*MIZ1* mRNA 蓄積量の多かった 2 系統について解析した結果、野生型に比べ水分屈性時における根の屈曲角度が有意に増大した。このことから *MIZ1* 遺伝子発現レベルの改変により水分屈性能の亢進がもたらされることが示された。また、*miz2* においてもその変異原因遺伝子が *ARF-GEF* をコードする *GNOM* であることを明らかにし、他の *gnom* 変異体との比較解析から、水分屈性の発現には *GNOM* の *GEF* 活性が必要であること、水分屈性は重力屈性と比べ *GNOM* 機能の要求性がより高いことを明らかにした。

このように、根では重力屈性と水分屈性が干渉し合うように作用するが、本研究によって、重力屈性とは独立した極めてユニークな水分屈性制御機構が明らかになってきた。

発表論文

- Kitazawa D, Miyazawa Y, Fujii N, Nitasaka E, Takahashi H (2008) Characterization of a novel gravitropic mutant of morning glory, *weeping2*. *Adv. Space. Res.* 42: 1050-1059
- Kitazawa D, Miyazawa Y, Fujii N, Hoshino A, Iida S, Nitasaka E, Takahashi H (2008) The gravity-regulated growth of axillary bud is mediated by a mechanism different from decapitation-induced release. *Plant Cell Physiol.* 49: 891-900
- Miyazawa Y, Sakashita T, Funayama T, Hamada N, Negishi H, Kobayashi A, Kaneyasu T, Ooba A, Morohashi K, Kakizaki T, Wada S, Kobayashi Y, Fujii N, Takahashi H (2008) Effects of locally targeted heavy-ion and laser microbeam on root hydrotropism in *Arabidopsis thaliana*. *J. Rad. Res.* 49: 373-379
- Miyazawa Y, Takahashi A, Kobayashi A, Kaneyasu T, Fujii N, Takahashi H (2008) *GNOM*-mediated vesicular trafficking plays an essential role in hydrotropism of *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* (DOI 10.1104/pp.108.131003, in press)
- Takahashi H, Miyazawa Y, Fujii N (2008) Hormonal interactions during root tropic growth: hydrotropism versus gravitropism. *Plant Mol. Biol.* (DOI 10.1007/s11103-008-9438-x, in press)