

過重力刺激がシロイヌナズナの花茎におけるリグニン形成とオーキシン動態に与える影響

富山大・院・理工 玉置大介、唐原一郎、若杉達也、山田恭司、神阪盛一郎
 金沢大・学際センター・ゲノム 西内 巧、山口和男

Effects of hypergravity on lignification and auxin dynamics in *Arabidopsis* inflorescence stems

Daisuke Tamaoki¹, Ichirou Karahara¹, Takumi Nishiuchi², Tatsuya Wakasugi¹, Kyoji Yamada¹, Kazuo Yamaguchi², Seiichiro Kamisaka¹

¹Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, Gofuku, Toyama, 930-8555 Japan

²Division of Functional Genomics, Advanced Science Research Center, Kanazawa University Takara-machi, Kanazawa, 920-0934 Japan

E-Mail: karahara@sci.u-toyama.ac.jp

Abstract: Lignification of secondary cell walls gives mechanical strength to plant bodies. Lignin deposition in secondary cell walls is assumed to be required for the evolution of land plants. Our previous study showed that the lignin content in a secondary cell wall fraction was significantly increased by hypergravity stimulus in *Arabidopsis* inflorescence stems. Our microarray data revealed that expression of genes involved in auxin signalings and metabolisms was modulated in response to hypergravity as well as those which are involved in lignin biosynthesis. In the present study, we investigated the effect of hypergravity on auxin dynamics in inflorescence stems using *DR5::GUS* plants and examined whether auxin dynamics is involved in hypergravity-induced lignification. Intensive GUS staining was observed in inflorescence stems of *DR5::GUS* plants by hypergravity condition. However, such *DR5::GUS* expression was cancelled by the TIBA treatment, while the promotion of lignin synthesis was not. These results suggest that, in inflorescence stems, the hypergravity-induced increase in endogenous auxin level is not involved in the hypergravity-induced promotion of lignin synthesis .

Key words; lignin, auxin, hypergravity, *Arabidopsis*

1、序論

植物のシュートは1 x g 環境下である地上において重力に抗して生長する。そのためには重力による負荷に耐えることのできる強固な構造が必要であった。植物はシルル紀に陸上へと進出し、地上で繁栄するために、進化の過程において細胞壁を発達させてきたと考えられている。細胞壁は一次壁と二次壁からなる。一次壁は細胞が分裂したときにはすでに形成されており、二次壁は分化に伴って形成される。共にセルロースを主成分としているが、二次壁のみは特徴的な成分であるリグニンを含み、支持構造において特に重要な役割を果たしている。

重力環境と細胞壁については一次壁に関して詳しく調べられてきた。微小重力環境下において細胞壁の伸展性が増加し、キシログルカンを含む細胞壁多糖類の分子量が減少し(Hoson et al., 2002)、過重力環境下においては細胞壁に含まれるキシログルカンが高分子化し、細胞壁の伸展性が低下することで茎の伸長が抑制されることがわかっている (Soga et al., 1999, 2001)。

一方、重力環境と二次壁に関する研究はいくつか報告されている。微小重力環境下においてリグニン形成に関する酵素の活性の低下とそれに伴うリグニン含量の低下が報告されている(Cowles et al. 1984; Nedukha 1996)。また、あて材形成の研究や、3次元クリノスタットを用いた研究(Nakamura et al. 1999)から、二次壁の発達と重力環境の関わりが示唆されている。私たちは以前の報告で過重力刺激(300 x g)がシロイヌナズナの花茎においてリグニンの形成および二次壁の発達を促進することを明らかにした(Tamaoki et al., 2006)。また、マイクロアレイ解析により、多くのリグニン形成に関与する遺伝子の発現が過重力刺激によって増加することも示した。しかし、重力刺激とリグニン形成および二次壁をつなぐシグナル伝達についてはよくわかっていない。

これまでに、シロイヌナズナの葉における維管束のパターン形成(Mattsson et al., 2003)や、ヒヤクニチソウの細胞培養系における管状要素分化(Yoshida et al., 2005)にオーキシンが関与することが示されていた。本研究では過重力刺激による二

次壁形成の促進にオーキシンが関与するか否かを確かめることを目的として、オーキシン応答性プロモーター(*DR5::GUS*)遺伝子を導入したシロイヌナズナを用いて、過重力刺激処理区および1 x g 対照区の花茎におけるオーキシンの分布を比較した。

2、材料と方法

植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh ecotype Columbia) の野生型および *DR5::GUS* 形質転換体の種子を、試験管に入れたムラシゲ・スカーグ寒天培地上に播種し、低温処理後、20-26 日間、23°C で白色光下 ($130 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) で生育させた。花茎が 5 mm の長さになった植物 (Boyes ら(2001) の発達段階の分類によれば Stage No. 5 に相当する) を選び、遠心機を用いて 25°C の条件で暗所で 300 x g の過重力を茎から根の方向に向けて 24 時間与えた (過重力処理区)。1 x g 対照区としては、25°C の条件で暗所で 24 時間静置した。植物体はさらに白色光下で 3 日間生育させ、以降の実験に用いた。

阻害剤処理

花茎が 5 mm の長さになった植物を選び、過重力処理の 3 時間前に 10^{-5} M トリヨード安息香酸 (TIBA) 水溶液 (0.1% DMSO を含む) を植物体全体にスプレーした。コントロール植物体は 0.1% DMSO 水溶液で処理した。GdCl₃ 処理の場合は、濃度が 0.1 mM になるように GdCl₃ 水溶液を培地に添加し、培地を 3 時間静置した後、過重力処理を行った。コントロール植物体の場合は培地に DDW を添加した後、過重力処理を行った。

リグニン定量

花茎が 5 mm の長さになった植物から花茎を切り出し、乾燥重量を測定後、トルエン/エタノール溶液で処理し、アセチルブロマイド法によりリグニン定量を行った。

GUS 染色

過重力処理直後の *DR5::GUS* 植物体より花茎を切り出し、X-gluc を含む染色溶液で染色した。染色した花茎に透明化処理を行って GUS 活性の組織局在を観察した。

GUS 活性定量

過重力処理直後の *DR5::GUS* 植物体より花茎を切り出し、抽出バッファー中でホモジナイズした。抽

出液を遠心分離し、上清に蛍光アッセイバッファー (4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクニド) を加えて 37°C で 60 分間インキュベートした後、停止反応液 (Na₂CO₃) を加え混和後、蛍光分光光度計を用いて 4-メチルウンベリフェロン量を測定した。また、各抽出液中のタンパク質量をブラッドフォード法により定量し、GUS 活性 (nmol MU/min/mg タンパク質) を求めた。

RNA 抽出

Plant RNA Isolation Mini kit (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) を用いて、1 x g および 300 x g 処理を 24 時間行った直後の植物体の花茎 から total RNA を抽出した。

マイクロアレイ解析

Arabidopsis 2 (22k) オリゴ DNA マイクロアレイキット (Agilent Technologies, Palo Alto, US) を用いて遺伝子発現プロファイリングを行った。cRNA の標識に用いた色素 (Cy3 及び Cy5) を交換する実験を行った。異なる RNA を用いて、生物学的には 2 回の実験を行った。それぞれの実験から、1 x g 条件における遺伝子発現レベルに対する 300 x g 条件における発現レベルの比 (300 x g / 1 x g : fold change) を算出して、その平均値を求めた。

3、結果と考察

マイクロアレイ解析の結果より、過重力処理直後の花茎においてオーキシンに関与する多くの遺伝子の発現が 2 倍以上または 0.5 倍以下に変化することがわかった。このことから、過重力刺激によって花茎内の内生オーキシン量が増加することが示唆されたので、*DR5::GUS* 形質転換体を用いて、過重力処理区と 1 x g 対照区において花茎におけるオーキシンの分布の指標である *DR5::GUS* の発現を調べた。その結果、過重力刺激を与えた *DR5::GUS* 形質転換体の花茎においてのみ強い GUS 染色が観察された。また GUS 活性を定量したところ、過重力刺激による GUS 活性の増加傾向が見られた。これらのことから過重力刺激によって花茎における内生オーキシン量が増加する可能性が示唆された。

次に過重力刺激を与えた *DR5::GUS* 形質転換体の花茎より切片を切り出し、GUS 活性の組織局在を観察した。その結果、表皮および皮層において強い GUS 活性の局在が観察された。このことから過重力刺激によって引き起こされる内生オーキシン量の増加は主に表皮および皮層において起こっ

ていることが示唆された。

次に花茎における内生オーキシンの量の変化が過重力刺激によるリグニン形成の促進に関与するかどうかを明らかにするために、オーキシン極性輸送阻害剤である TIBA を与えて過重力処理した場合のリグニン含量の変化を調べた。TIBA を与えた場合、過重力刺激処理した *DR5::GUS* 形質転換体において花茎でみられた、強い GUS 染色が消失した。このことから TIBA 処理によって、過重力刺激による内生オーキシンの量の増加も抑制される可能性が示唆された。しかし、TIBA を処理した場合でも、花茎において過重力刺激によるリグニン含量の増加傾向がみられたことから、過重力刺激による内生オーキシンの量の増加は、過重力刺激によるリグニン含量の増加にほとんど関与しない可能性が示唆された。

以前、私たちの研究は過重力刺激によるリグニン含量の増加にはメカノレセプターが関与する可能性を示唆した(Tamaoki et al., 2006)。しかし、過重力刺激を与えた *DR5::GUS* 形質転換体の花茎における強い GUS 染色は、メカノレセプターの阻害剤である塩化ガドリニウム処理によっても消失しなかった。このことから過重力刺激による内生オーキシンの量の増加はメカノレセプターに依存しないシグナル伝達経路で制御されている可能性が示唆された。

以上の結果から、シロイヌナズナの花茎において、過重力刺激により引き起こされる内生オーキシンの量の増加は、メカノレセプターを介したリグニン含量の増加には関わらない可能性が示唆された。また過重力刺激を与えた *DR5::GUS* 形質転換体の花茎において、表皮および皮層における GUS 染色の局在が観察されたことから、過重力刺激における内生オーキシンの量の増加は表皮および皮層において引き起こされることが示唆された。このことから、過重力刺激による内生オーキシンの量の増加は花茎の表皮および皮層における抗重力反応に関与している可能性がある。今後は、マイクロアレイ解析で明らかになったマーカー遺伝子の発現を指標として以上の結果を検証するとともに、過重力刺激による内生オーキシンの量の増加が、リグニン以外の二次壁や一次壁の成分に与える影響

を解析する必要がある。

謝辞

本研究は宇宙環境利用科学委員会研究ワーキンググループの研究費、日本学術振興会特別研究員奨励費の支援を得て行われたものである。また、*DR5::GUS* 形質転換体の種子を提供いただいた Thomas Guilfoyle 博士に感謝いたします。

参考文献

- 1) Boyes D. C., Zayed A. M., Ascenzi R., McCaskill A. J., Hoffman N. E., Davis K., Grolach J. *Plant Cell* **13**, 1499–1510 (2001)
- 2) Cowles J. R., Scheld H. W., Lemay R., Peterson C. *Ann. Bot.*, **54**, 33–48 (1984)
- 3) Hoson T., Soga K., Mori R., Saiki M., Nakamura Y., Wakabayashi K., Kamisaka S. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 1067–1071 (2002)
- 4) Mattsson J., Ckurshumova W., Berleth T. *Plant Physiol.*, **131**, 1327–1339 (2003)
- 5) Nakamura T., Sassa N., Kuroiwa E., Negishi Y., Hashimoto A., Yamashita M., Yamada M. *Adv. Space Res.*, **23**, 2017–2020 (1999)
- 6) Nedukha E.M. *Adv. Space Res.*, **17**, 37–45 (1996)
- 7) Soga K., Wakabayashi K., Hoson T., Kamisaka S. *Plant Cell Physiol.*, **40**, 581–585 (1999)
- 8) Soga K., Wakabayashi K., Hoson T., Kamisaka S. *Adv. Space Res.*, **27**, 1011–1016 (2001)
- 9) Tamaoki D., Karahara I., Schreiber L., Wakasugi T., Yamada K., Kamisaka S. *J. Plant Res.* **119**, 79–84 (2006)
- 10) Yoshida S., Kuriyama H., Fukuda H. *Plant Cell Physiol.*, **46(12)**, 2019–2028 (2005)