

植物の抗重力反応におけるシグナル変換・伝達機構の解明

大阪市大・院・理 保尊隆享、曾我康一
 横浜市大・木原生研 村中俊哉
 兵庫県大・院・生命理学 園部誠司

北海道東海大・工 榊 剛
 奈良先端大・院・バイオ 橋本 隆
 埼玉大・理 小竹敬久

Mechanisms of Signal Transformation and Transduction in Gravity Resistance in Plants

Takayuki Hoson*, Kouichi Soga, Takeshi Sakaki, Toshiya Muranaka,
 Takashi Hashimoto, Seiji Sonobe, Toshihisa Kotake

*; 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 force is a principal graviresponse in plants, comparable to gravitropism. Nevertheless, only limited information has been obtained for this graviresponse. The present study aims to clarify the mechanism of signal transformation and transduction processes, with reference to the roles of the plasma membrane and cortical microtubules. Under hypergravity conditions, the expression of genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl- Coenzyme A reductase (HMGR) was up-regulated, and the level of membrane sterols was kept higher, without influencing the level or composition of other membrane components. On the other hand, the expression of the majority of α - and β -tubulin genes was up-regulated and the percentage of cells with longitudinal cortical microtubules was increased by hypergravity. Also, increases in the level and molecular size of anti-gravitational xyloglucans and 1,3,1,4- β -glucans by gravity were brought about by suppression of their breakdown with their constant or enhanced biosynthesis. We have further examined the role of membrane sterols and cortical microtubules in gravity resistance using *Arabidopsis* mutants. Elongation growth of both *hmg* and tubulin mutants was suppressed even under 1 g conditions, and hypergravity did not influence their growth, suggesting that the mutation made plants hypersensitive to the gravitational force. The analysis with mutants has also revealed that the signal transduction process via membrane sterols is distinct from that via cortical microtubules. These results indicate that membrane sterols (rafts) and cortical microtubules are deeply and independently involved in maintenance of normal growth capacity against the gravitational force.

Key words; Gravity resistance, Membrane sterol, Microgravity, Microtubule, Plant, Space.

1. はじめに

植物が重力の力に打ち勝って正常な生命活動を営む「抗重力反応」は、重力屈性と並ぶ植物の主要な重力応答であり、植物が数億年前に生物のトップバッターとして初めて海から陸に進出して以来、陸上で進化、繁栄する上で重要な役割を果たしてきた。しかし、重力屈性と比べて、抗重力反応のメカニズムには未解明な点が数多く残されていた。我々は、抗重力における重力シグナルの受容が重力屈性の場合とは独立であり、平衡細胞ばかりでなく多くのふつうの植物細胞においてなされること、またその過程に原形質膜上に存在するメカノレセプターが関与することを示した。また、

最終的な反応として、細胞壁代謝と細胞壁環境の修飾に基づく細胞壁強度の増加が誘導されることを見いだした。本研究では、これらの成果を踏まえて、両過程をつなぐシグナル変換・伝達のメカニズムを解明することをめざした。ディファレンシャル・ディスプレイ法及び cDNA マイクロアレイ法を用いてシロイヌナズナの重力応答性遺伝子を探索したところ、抗重力反応のシグナル変換・伝達機構において、原形質膜成分と細胞表層微小管が重要な機能を果たしていることが示唆された (Yoshioka et al. 2003, Hoson and Soga 2003)。そこで、本研究ではこの点を特に重点的に解析した。

2. 原形質膜ステロールの機能

まず、シロイヌナズナ胚軸において、原形質膜構成脂質の合成や代謝に関わる遺伝子群の発現に対する重力の影響を網羅的に解析したところ、2つのヒドロキシメチルグルタリル-CoA レダクターゼ(HMGR)遺伝子の発現のみが過重力環境下で特異的に高まることがわかった。一方、シロイヌナズナ並びにアズキ芽ばえから原形質膜を構成する全脂質を抽出し、その成分の詳細な分析を行った結果、生重量当たりのステロールレベルが過重力処理により増加するのに対して、リン脂質、糖脂質、あるいは中性脂質のレベルには変化がなく、それらの組成や個々のクラスの脂肪酸組成にも重力環境による差は見られなかった。以上の結果より、重力は HMGR 遺伝子の発現を特異的に制御し、原形質膜成分中のステロールレベルのみに影響することが明らかになった。

膜ステロール組成は、重力環境に関わらずほぼ一定であった。また、過重力は、フリーのステロールより、ステロールグルコシド及びステロールグルコシド脂肪酸エステルレベルを顕著に増加させた。最近、これらのステロール誘導体が、膜ラフトの特徴的な成分であることが報告された(Lefebvre et al. 2007)。すなわち、重力が膜ラフト形成を促進することが示唆された。

植物の抗重力反応における重力シグナルの変換・伝達機構を理解するためには、この過程に関与することが示された遺伝子の機能を改変した突然変異体を単離し、重力シグナルに対する反応性の変化を解析することが有効である。そこで次に、膜ステロールの合成を律速する HMGR 遺伝子を T-DNA 挿入により破壊したシロイヌナズナ系統を選抜し、3種の純系ラインを得た。これらのノックアウトラインでは、芽ばえ及び植物体の矮化、老化の促進、並びに不稔などの多様な形質変化が認められた。これらの形質の変化は、芽ばえを HMGR の阻害剤であるロバスタチンで処理した時に誘導される変化とほぼ一致した。また、老化抑制には合成経路上流に位置するスクアレンが関係するのに対し、細胞成長には膜ステロールが関与することが明らかになった。

このようにして得られた *hmg* 変異体を様々な大きさの過重力環境下で生育させ、誘導される抗重力反応の強さを野生型の場合と比較した。*hmg* 変異体の胚軸の伸長成長は、1 g 下で既にかなり抑制されており、過重力を与えてもそれ以上の抑制は

見られなかった。この時の、胚軸細胞壁の強さを引っ張り試験機を用いて測定したところ、野生型では重力の大きさに応じて大きくなったのに対して、*hmg* 変異体ではほとんど変化が見られなかった。すなわち、*hmg* 変異体では抗重力反応を誘導する能力が低く、1 g 下でも既に過重力環境下に相当するようかなりのダメージを受けていることを示しており、植物が重力に抵抗するためには、HMGR の産物である膜ステロールの正常な供給が必須であることが支持された。

3. 表層微小管の機能

シロイヌナズナでは、6つの α -チューブリン及び9つの β -チューブリン遺伝子がファミリーを形成している。そこで、各メンバーそれぞれを特異的に認識するプライマーを作成し、それらの発現に対する重力の影響をリアルタイム PCR により網羅的に解析した。その結果、シロイヌナズナ胚軸ではほとんど全てのチューブリン遺伝子が発現しており、その大部分の発現が重力の大きさに応じてすみやかに増加することが明らかになった。

この解析に用いた胚軸では細胞分裂は起こっておらず、胚軸の成長は個々の細胞の伸長に由来する。したがって、発現しているチューブリン遺伝子の翻訳産物のほとんどは表層微小管を構成していることになる。そこで、蛍光抗体法により表層微小管のレベルと配向に対する重力の影響を検討した。過重力処理したアズキ上胚軸では、蛍光強度が増加する傾向が認められ、微小管レベルの増加が示唆されたが、重力は微小管の配向により顕著に影響した。すなわち、対照の表皮細胞では細胞長軸と直交する表層微小管を持つ細胞が多かったのに対し、過重力処理した上胚軸では細胞長軸と平行な表層微小管を持つ細胞が増加した。このような変化は、過重力環境下で茎の伸長成長が抑制され、肥大成長が誘導される結果とよく合致していた。また、重力刺激による表層微小管配向の変化は、成長速度の変化に先行して起こり始め、重力の大きさの log に比例して誘導された。

抗重力反応における表層微小管の機能を確認するため、チューブリン遺伝子の機能に異常を生じたシロイヌナズナ変異体を単離した。EMS 処理により植物体の構築や長軸方向の成長にゆがみを生じた突然変異体をスクリーニングした結果、微小管の配向が右巻きになり細胞が左巻きにねじれる *lefty* 変異体と、微小管が左巻きに配向し細胞が右

巻きにねじれる *spiral(spr)* 変異体が単離した。得られた変異体の原因遺伝子をマップベース・クローニングにより同定したところ、*lefty* 変異 15 系統と *spr* 変異 25 系統は α -チューブリン及び β -チューブリン遺伝子のアミノ酸置換による変異に由来し、**dominant negative** な機構で変異形質を示すことがわかった。

これらのチューブリン変異体の芽ばえを様々な大きさの過重力環境下で生育させ、その抗重力反応の強さを野生型と比較した。変異体の胚軸の伸長成長は、1 g 下で既にかなり抑制されていた。そして、野生型では重力の大きさに応じて伸長成長が抑制されるが、これらの変異体では過重力を与えてもそれ以上の大きな伸長抑制は見られなかった。また、この時、野生型では細胞壁強度が重力の大きさに応じて増加したのに対して、チューブリン変異体では細胞壁物性にほとんど変化が見られなかった。これらの結果から、チューブリン構造の変異により胚軸の重力に対する抵抗能力が低下し、1 g の重力の存在下でも既に大きな影響を受けて成長が抑制されることが示された。

チューブリン変異体では、表層微小管の配向に乱れが生じ、胚軸の表皮細胞列が 1 g 環境下で常に左または右巻きにねじれる表現型を示した。このような表皮細胞列のねじれは、コルヒチン処理をした野生型でも観察された。そして、過重力環境下ではチューブリン変異体における表層細胞列のねじれがさらに強調されることが明らかになった。このように、微小管の構造変異に起因し、配向の乱れによって引き起こされる表層細胞列のねじれも、重力に依存した現象であり、表層微小管の配向は植物が重力に対抗できる体を構築する上で極めて重要であることが明らかになった。

微小管には多くの微小管結合タンパク質が結合しており、その中には抗重力反応における重力シグナルの変換・伝達に直接関与するものが含まれる可能性がある。実際、*spr* 変異体にはチューブリン遺伝子ばかりでなく、微小管結合タンパク質遺伝子の変異による変異体が含まれていた。その 1 つである *spr2* 変異体は、チューブリン変異体と同様に、矮性やねじれを示した。同様の結果が、*mor1* 変異体でも得られた。これらの事実も、抗重力反応における表層微小管の機能の重要性を支持している。

4. 抗重力細胞壁多糖の代謝

キシログルカンは双子葉植物細胞壁における主要な抗重力多糖であり、重力はその分解を抑制する (Hoson and Soga 2003)。しかし、キシログルカンの合成に対する重力の影響はわかっていなかった。そこで、アズキ芽ばえカッティングに放射標識したグルコースあるいはフコースを効率的に取り込ませる実験系を開発し、この点を詳しく解析した。新規合成されるキシログルカンのレベルと分子量に対する過重力刺激の影響を検討した結果、重力はいずれにも顕著な作用を示さないことが明らかになった。

キシログルカンの分子量制御においては、エンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素(XTH)ファミリーが中心的な役割を果たしていることが知られている。そこで、アズキ芽生えを遠心過重力環境下で生育させ、既にクローニングされている 3 つの *XTH* 遺伝子の発現変化を解析した。その結果、加水分解活性のみを示す *VaXTHS4* 遺伝子の発現量は重力の大きさが大きくなるにつれて低くなったが、転移活性のみを示す *VaXTH1* 及び *VaXTH2* 遺伝子の発現量は生育環境の重力の大きさに関わらずほぼ一定の値を示すことがわかった。すなわち、過重力環境下でのキシログルカンの高分子化には、*VaXTHS4* 遺伝子のすみやかな発現抑制を介したキシログルカン分解の低下と、重力環境に関わらず *VaXTH* 及び *VaXTH2* 遺伝子の発現量を維持することによる継続的なキシログルカン合成が関与していることが示された。

単子葉イネ科植物では、抗重力多糖としてのキシログルカンの役割を β -1,3,1,4-グルカンが担っていると考えられる。そこで、イネ及びオオムギを材料として細胞壁 β -1,3,1,4-グルカンの *in vitro* 合成活性のアッセイ系を確立し、この多糖の合成に対する重力の影響を検討した。イネの芽生えを一種の微小重力環境である水中で生育させたところ、 β -1,3,1,4-グルカン合成活性が顕著に低下した。水中培養したイネ芽ばえでは、このグルカンの分解活性が増加するとともに、レベルの減少と分子量の低下が認められた。合成活性の低下は、高分子成分の供給減少により低分子化をもたらす。以上の結果から、水中において誘導される細胞壁強度の低下には、 β -1,3,1,4-グルカン分解活性の増加と合成活性の低下の両方が関与することが示された。

5. 抗重力反応におけるシグナル変換・伝達機構

抗重力反応のシグナル変換・伝達における遺伝子発現制御機構についての情報を得るため、1 g 下あるいは過重力環境下で生育させた野生型および *hmg* 変異体の芽ばえを材料として、トランスクリプトーム全体の変化をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その中からシグナリングに関わるといわれている遺伝子群に着目すると、全体の約 13% の遺伝子の発現が過重力環境下で促進された。そのうち、*hmg* 突然変異体において発現が抑制されている遺伝子は約 17% であり、全体の約 2% を占めるこれらの遺伝子の中に膜ステロールラフトを経由するシグナル伝達経路において働くものが存在すると考えられた。その中には多くの膜結合型の受容体型キナーゼと 2 種のカルモジュリンが含まれていた。最近、植物の膜ラフトの構成成分として多種の受容体型キナーゼが同定されており (Lefebvre et al. 2007)、これらの受容体型キナーゼが膜ラフトを経由する重力シグナル伝達経路において機能する可能性が高い。また、今までに同定されたメカノレセプターの多くは、カルシウムイオンチャンネルであるので、カルモジュリンが抗重力反応におけるシグナリングに関与することも十分に考えられる。

前項までに示したように、植物の抗重力反応におけるシグナル変換・伝達では、膜ステロールラフトと表層微小管が不可欠な役割を担っている。両者が同一経路において働くのか、それとも別々の経路で機能するのかを明らかにするため、マイクロアレイのデータを解析した。その結果、*hmg* 遺伝子の破壊は、チューブリン遺伝子や微小管結合タンパク質遺伝子の発現に全く影響しないことが明らかになった。すなわち、膜ラフトが働く経路と表層微小管が介在する経路は独立であることが示唆された。

以上の結果より、植物の抗重力反応におけるシグナル変換・伝達機構は、図 1 のようにまとめられる。メカノレセプターが重力シグナルを受容すると、その近傍で膜ラフト形成が促進され、受容体型キナーゼやカルモジュリンを介してシグナルが伝達される。その結果、様々な遺伝子の発現が誘導されるとともに、原形質膜上の H⁺-ポンプ活性やゴルジ小胞のエキソサイトシスの過程が調節される。同時に、原形質膜-微小管連絡を介してシグナルが伝達され、表層微小管の配向変化が誘導されて、セルロース繊維の配向や合成過程が調節される。両経路が機能する結果、細胞壁構成成分

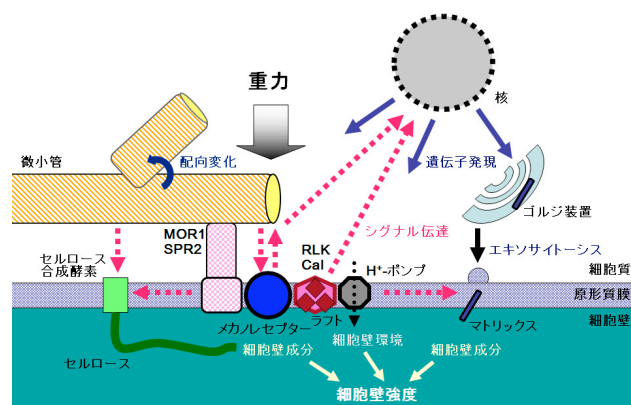


Fig. 1 Possible pathway of signal transformation and transduction in gravity resistance in plants

の代謝と細胞壁環境が修飾され、最終的な応答としての細胞壁強度の変化がもたらされる。

以上で明らかになったシグナル変換・伝達機構は、過重力に対する植物の抗重力反応に関わるものである。しかし、我々が本当に知りたいのは、地球上の 1 g の重力に対する抗重力反応機構である。そのためには、宇宙の微小重力を対照として、そこに 1 g の刺激を与えた時の反応のしくみを解析する必要がある。今後、「きぼう」における宇宙実験を通して、この点を明らかにしたい。

謝辞 本研究は (財) 日本宇宙フォーラムが推進する「宇宙環境利用に関する公募地上研究」プロジェクトの一環として行われた。

6. 文献

- 1) Hoson, T. and Soga, K.; New aspects of gravity responses in plant cells, *Int. Rev. Cytol.*, **229**, 209-244 (2003).
- 2) Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M.-A., Michaelson, L.V., Carde, J.-P., Sargueil-Boiron, F., Rossignol, M., Napier, J.A., Cullimore, J., Bessoule, J.J. and Mongrand, S.; Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: A proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system, *Plant Physiol.*, **144**, 402-418 (2007).
- 3) Yoshioka, R., Soga, K., Wakabayashi, K., Takeba, G. and Hoson, T.; Hypergravity-induced changes in gene expression in *Arabidopsis* hypocotyls, *Adv. Space Res.*, **31**, 2187-2193 (2003).