

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（宇宙航空研究開発機構）、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 (JAXA), 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. Our achievements in this year include identification of novel genes responsible for gravitropic response in shoots and roots, finding the roles of auxin efflux carriers in automorphogenesis, gravimorphogenesis (peg formation) and hydrotropism, and demonstrating the gravity-dependent release from apical dominance.

Key words: Apical dominance, Arabidopsis, Automorphogenesis, Auxin, auxin transport, Circumnutation, Cucumber, Endodermis, Gravimorphogenesis, Graviperception, Gravitropism, Hydrotropism, Microgravity, Morning glory, Mutant, Pea, PIN

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、生命維持システム、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。そのため、とくに本年度は、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、それに機能するオーキシン輸送機構に関する解析を行った。

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について討論をすすめるとともに、他の植物関連の研究班 WG と連携し、宇宙実験の実現に向けた課題と共同研究

の可能性を議論した。また、重力受容を支配するシグナル伝達機構を明らかにするために、するために、新規の重力屈性突然変異体を単離し、その変異原因遺伝子を同定するとともに、これらの分子の機能解析をすすめた。さらに、重力応答と相互作用する自発形態形成ならびに水分屈性に重要な役割を果たすオーキシン排出キャリアを明らかにするとともに、重力応答による頂芽優勢の打破に働く新規の分子機構の存在を見いだした。

1. 植物の重力感受とシグナル伝達機構

(1) 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。地上部の茎の重力屈性の分子機構を調べるために、田坂らはシロイヌナズナの花茎が重力屈性異常を示す突然変異株 *shoot gravitropism(sgr) 1-9* を単離し解析してきた。これまでのそれらの変異株並びに原因遺伝子の解析から、*SGR 1*、*SGR 7* は転写因子をコードし、重力感受細胞である内皮細胞の分化に関与

することを明らかにした。また、*SGR2* はフォスホリパーゼをコードし、*SGR3, 4(ZIG)*, *8* は、それぞれ細胞内の小胞輸送に関連するタンパク質をコードし、すべて内皮細胞の液胞膜の形成や動態に関連していた。そして、これらの遺伝子の異常により重力感受の際に平衡石として機能すると考えられるアミロプラストの細胞内分布や動態が異常を示すことを明らかにした。

今回は、*SGR5* と *SGR9* に関する最近の知見を報告する。*SGR5* は C2H2 タイプの Zn フィンガーとコイルドコイルドメインを含むタンパク質をコードしており、転写因子として機能する可能性が高い。一方、*SGR9* はリングフィンガードメインを含むタンパク質をコードしており、ユビキチンライゲースの E3 サブユニットの可能性が高い。これらの遺伝子は花茎において主として内皮細胞で発現しており、維管束系の一部でも発現がみられる。これらの遺伝子の変異株 *sgr5-1*, *sgr9-1* の花茎は弱い重力屈性を示す。そして、それぞれの遺伝子を内皮細胞特異的に導入すると重力屈性能が正常に戻ることから、これらの遺伝子が内皮細胞で機能することが重力屈性に重要なことがわかる。これらの変異株の交雑によって *sgr5-1sgr9-1* 二重変異株を作成すると、その変異株は全く重力屈性を示さなかった。これは、これらの遺伝子が相互に補完的に働くことを示唆する。

次に、生きている花茎の内皮細胞でアミロプラストの分布と動き、さらに液胞の動態を連続観察した。野生型の内皮細胞でアミロプラストの多くは重力方向（細胞の下側）に位置し、そこでダイナミックに動き回る。それに対して、*sgr5-1* と *sgr9-1* の内皮細胞の中でアミロプラストは細胞内にほぼ均一に分布し、そこで野生型に比べると少し運動性は落ちるがそこそこ活発に動いていた。それに対して、*sgr5-1sgr9-1* の内皮細胞では、アミロプラストは細胞内に分散しており、運動性が大きく落ちていた。そして、いくつかのアミロプラストが固まって同じようなゆっくりとした動きを示す場合が多くみられた。液胞が異常な *sgr2-1* や *zig-1* では、アミロプラストは細胞壁に張り付くようにして内皮細胞の上下に分散して存在し、ほとんど運動しない。このことから、*sgr5-1sgr9-1* が重力屈性を示さないのはアミロプラストの運動性の低下と関連する可能性が示唆される。野生型の内皮細胞内で液胞膜はダイナミックに動いており、アミロプラストは液胞膜にくるまれて袋状のバルブになっていたり、トランスバキューオラストランドの中に存在し、これらの膜に包まれたまま運動している。*sgr5-1*, *sgr9-1* および

sgr5-1sgr9-1 の内皮細胞中에서도液胞膜はやはりダイナミックに変形しており、アミロプラストを含むバルブやトランスバキューオラストランドが観察される。これは、*sgr2-1* や *zig* と大きく異なっており、この結果は *SGR5* と *SGR9* タンパク質は液胞膜に関係するタンパク質ではない事を示唆する。なお、*sgr5-1sgr9-1* の内皮細胞中でアミロプラストはクラスターを形成してそれを液胞膜が取り囲んでおり、しかもこのクラスター全体がゆっくりと運動していた。このクラスター形成がアミロプラストの運動性の低下および花茎の重力屈性能の低下と関連する可能性が高い。

機能を相補する *SGR5-GFP* タンパク質は核に存在し、このタンパク質が転写因子として機能する可能性を指示する。一方、*SGR9-GFP* タンパク質は変異株の機能を相補できるが、細胞内での存在を観察できない。しかし、リングフィンガー中の保存されたアミノ酸に点変異を入れた変異型 *GFP* 融合タンパク質は野生株の内皮細胞においてアミロプラストに局在した。そして、この形質導入植物は *sgr9-1* と同様な重力屈性異常を示すことから、このタンパク質がドミナントネガティブな影響を与えたことが示唆される。このタンパク質は色素体移行シグナルを持たないことから、アミロプラストの外部近傍に存在し E3 ライゲースとして機能する可能性が示唆される。これらの結果は、*SGR5* と *SGR9* は液胞を介することなくアミロプラストの存在様式やダイナリズムに関与し、重力感受に関わることを示唆している。

(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。このことは、これまでに重力感受が独立した、少なくとも2つの経路により構成されていることが報告されているからも裏付けられている。そこで、この問題を克服するために、シロイヌナズナの根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、本研究では、これまでに根の重力屈性の低下した 44 系統の突然変異体を選抜することに成功した。それらの変異遺伝原因遺伝子のマッピング並びに、それら突然変異系統と既知の重力屈性突然変異体との相補性試験により、新規の重力屈性突然変異体である可能

性の大きい系統を得た。この突然変異体の新規性を検証するとともに、その変異原因遺伝子の解析をすすめることによって、重力受容の新たな分子機構が見いだされるものと期待される。

2. 植物の重力依存的形態形成を制御するオーキシン輸送機構

(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)

上田らによって、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、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された。さらに上胚軸の「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。そこで本年度は、正常な重力応答反応を示す Alaska エンドウならびに重力応答突然変異体である *ageotropum* エンドウを用いて、その成長、発達に対する重力刺激ならびにオーキシン極性移動阻害剤の影響を詳細に検討した。

胚が重力ベクトルに対して垂直上向き (horizontal)、あるいはやや斜め上向き (inclined) になるように Alaska エンドウ種子を播種し、暗所で発芽、生育させた。その結果、前者では子葉側上胚軸の成長が、また、後者では反子葉側上胚軸の成長がそれぞれ促進され、芽生え上胚軸は正常な重力応答反応を示した。*ageotropum* エンドウ種子を Alaska エンドウと同様に播種し、暗所で発芽、生育させると、いずれの場合も芽生え上胚軸は子葉から離れる方向に約 45° の角度でまっすぐ伸長し、宇宙微小重力環境下で認められる自発的形態形成 (様の成長、発達) を示した。3次元クリノスタット上で作出される擬似微小重力環境下で Alaska エンドウ種子を播種し、暗所で発芽、生育させた場合、*ageotropum* エンドウの場合と同様に、いずれの播種方向においても上胚軸は子葉から離れる方向、すなわち自発的形態形成様の成長、発達を示した。

植物の茎における屈曲現象では、茎細胞の偏差的な成長を引き起こす茎でのオーキシンの不均等分布が重要であると考えられている。実際、エンドウのオーキシン応答性遺伝子である *PsIAA4/5* の発現を指標として上胚軸の内生オーキシンレベルを調べた結果、horizontal あるいは inclined に種子を置床した場合、上胚軸の成長が相対的に大きくなる側でオーキシンの内生レベルが高くなることが示された。また、放射性オーキシン ([1-¹⁴C]indole-3-acetic acid) を用いて黄化 Alaska エンドウ芽生えにおける

子葉側上胚軸のオーキシン極性移動を測定した結果、地上 1 g 環境下と比較して 3次元クリノスタット上で自発的形態形成に類似した成長、発達を示す場合、その低下が認められた。同様の低下は、地上 1 g 環境下で生育させた黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸においても認められた。オーキシンの排出キャリアをコードしている *PsPIN1*、*PsPIN2* 遺伝子およびその取り込みキャリアをコードしている *PsAUX1* 遺伝子の発現をノーザンブロット法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した結果、*PsPIN1* および *PsPIN2* 遺伝子の発現は、黄化 Alaska エンドウ芽生え上胚軸における不均等なオーキシン極性移動および子葉節基部でのオーキシンの不均等分布と相関していることが示された。

Alaska エンドウを 1 g 環境下、暗所で各種オーキシン極性移動阻害剤、すなわち 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA)、*N*-(1-naphthyl)phtalamic acid (NPA) あるいは 9-hydroxyfluorene-9-carboxylic acid (HFCA) 存在下で生育させると、宇宙微小重力環境下、あるいは 3次元クリノスタット上で作出される擬似微小重力環境下において認められる自発的形態形成に類似した成長、発達を示した。本研究において、Alaska エンドウ種子を暗所、horizontal あるいは inclined に播種し、芽生えにオーキシン極性移動阻害剤 (TIBA) を処理して上胚軸子葉側のオーキシン極性移動を低下させると上胚軸は子葉側に屈曲した。一方、1 g 環境下にくらべてオーキシン極性移動が低下する 3次元クリノスタット上での擬似微小重力環境下、暗所で Alaska エンドウ種子を horizontal あるいは inclined に播種し、芽生えに TIBA を処理すると、自発的形態形成に類似した成長、発達が見られず、上胚軸は 1 g 環境下で認められる正常な重力応答反応と同様に子葉側に屈曲した。この現象は、種子を inclined に播種した場合に顕著であった。正常な重力応答反応が認められない *ageotropum* エンドウ種子を暗所、horizontal あるいは inclined に播種し、芽生えに TIBA を処理した場合も上胚軸は同様に子葉側に屈曲した。特に、種子を inclined に播種した場合は、あたかも *ageotropum* エンドウが正常な重力応答反応を回復したかのように、上胚軸は子葉側に大きく屈曲した。

以上の結果から、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唆された。さらに上胚軸におけるオーキシン極性移動のみならず、上胚軸

子葉側から反子葉側へのオーキシンの(横)移動にはオーキシンの排出キャリアである PsPIN2 が重要な役割を担うことが推察された。

(2) キュウリ芽生えの重力形態形成を制御するオーキシン排出キャリア (藤井伸治・宮沢豊・高橋秀幸)

ウリ科植物の重力形態形成に関する宇宙実験と分子生物学的解析から、芽生えのペグ形成が重力によるネガティブコントロールにより制御され(茎と根の境界域の子葉面に一個ずつのペグを発達させる能力を有するが、地上では重力に応答して上側になった境界域のペグ形成を抑制する)、そのとき重力感受がペグ形成・非形成領域のオーキシンの取り込みキャリアと排出キャリアの局在および発現バランスに作用してオーキシンの組織内分布や細胞内濃度を制御し、その結果として、偏差的なオーキシン応答が誘発される可能性を示してきた。本年度は、抗 CsPIN1 抗体を作成し、CsPIN1 の役割をタンパク質レベルで解析した。その結果、重力感受細胞である内皮細胞での CsPIN1 の細胞膜での局在の極性変動が重要な役割を果たすことを明らかにした。すなわち、CsPIN1 は、オーキシンの維管束系を通った子葉側から基部(根側)への極性輸送を担うだけでなく、内皮細胞を介したオーキシンの横輸送に機能すること、さらに、茎と根の境界域にある4本の維管束における不均等な CsPIN1 タンパク質の局在が重力刺激によって誘導され、ペグ非形成側(上側)に輸送されるオーキシン量が少なくなることが示された。

(3) 根の水分屈性を制御するオーキシン排出キャリア (宮沢豊・藤井伸治・高橋秀幸)

これまで、高橋らは、根が重力に応答して重力屈性を発現するだけでなく、水分勾配を感受して水分屈性を発現する能力を有するが、地上では重力屈性が水分屈性に干渉することを示してきた。この水分屈性と重力屈性の間の干渉作用の程度は植物種によって異なり、地上では、キュウリやエンドウでは重力屈性が水分屈性に打ち勝ち、シロイヌナズナでは水分屈性が重力屈性に打ち勝って発現する。これまで、この水分屈性の発現にオーキシン分布が重要な役割を果たすことを示してきたが、水分勾配刺激の受容がオーキシンの分布を変化させる仕組みはわかっていなかった。

本年度は、キュウリの水分屈性実験系を用い、水分屈性におけるオーキシン輸送の果たす役割とその機構を明らかにすることを目的とし、水分屈性に

対するオーキシン輸送阻害剤の影響、ならびに、植物体内のオーキシン輸送を制御しているオーキシン排出担体の PIN タンパク質の水分屈性の発現に伴う動態変化を解析した。その結果、水分屈性は、オーキシン作用阻害剤である PCIB (*p*-Chlorophenoxyisobutyric acid)処理により約 35% にまで低下し、オーキシン排出阻害剤である TIBA (2,3,5-Triiodobenzoic acid) 処理および HFCA (9-Hydroxyfluorene-9-carboxylic acid)処理により、それぞれ約 15%と約 19%にまで低下した。これらの結果から、オーキシン輸送(排出)によるオーキシン偏差分布オーキシン応答が水分屈性に必須であることが示唆された。また、これまでに単離したキュウリのオーキシン排出キャリアの中から、側方根冠、表皮、皮層で特異的に mRNA 発現が認められる CsPIN5 に着目し、抗 CsPIN5 抗体を作成し、免疫組織化学的な解析を行った。その結果、CsPIN5 は、側方根冠および表皮細胞内で根の基部側の原形質膜に偏在しており、根冠から伸長領域に向けた求基的なオーキシン輸送を担うことが示唆された。さらに、水分勾配刺激後、高水分側に比べ、低水分側で顕著な CsPIN5 のシグナルの低下が認められ、これはウエスタンブロットによる解析でも同様であった。したがって、水分勾配刺激によって、オーキシン排出キャリアである CsPIN5 の動態が変化し、その蓄積量が低水分側で低下することで、伸長領域でのオーキシンの不均等分配が引き起こされると考えられた。

発表論文

- Kaneyasu T, Kobayashi A, Nakayama M, Fujii N, Takahashi H, Miyazawa Y (2007) Auxin response, but not its polar transport, plays a role in hydrotropism of *Arabidopsis* roots. *J Exp Bot* 58: 1143-1150.
- Kitazawa, D., Miyazawa, Y., Fujii, N., Nitasaka, E. and Takahashi, H. (2008) Characterization of a novel gravitropic mutant of morning glory, *weeping2*. *Adv Space Res* (in press).
- Kobayashi A, Takahashi A, Kakimoto Y, Miyazawa Y, Fujii N, Higashitani A, Takahashi H (2007) A gene essential for hydrotropism in roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4724-4729.
- Morita TM, Saito C, Nakano A, Tasaka M (2007) *Endoderm Amy6loplast less1* is a novel allele of *SHORT-ROOT*. *Adv Space Res* 39: 1127-1133.
- Shimizu M, Miyazawa Y, Fujii N, Takahashi H (2008) *p*-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response for gravityregulated peg formation in cucumber seedlings. *J Plant Res* (in press).