

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. Here, we report our accomplishments in 2006, which includes studies on the roles of cytoskeleton in graviresponse/graviperception, novel gravitropic mutants, genes responsible for gravitropism, auxin transport system involved in gravitropism and automorphogenesis, circumnutation and release from apical dominance that require graviperception, and molecular pathways that work for hydrotropism independently of gravitropism.

Key words; Apical dominance, Arabidopsis, Automorphogenesis, Auxin, Circumnutation, Columella, Cucumber, Cytoskeleton, Endodermis, Gravimorphogenesis, Graviperception, Gravitropism, Hydrotropism, Microgravity, Microtubule, Morning glory, Moss, Mutant, Pea

研究班 WG の目的

植物は重力をシグナルとして利用し、とくに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。この植物の重力応答（受容）の仕組みを理解することは、生物学的課題であるだけでなく、人類の生命維持システムの保持および宇宙への生命圏の拡大のために、エネルギー源と環境を確保するという観点から極めて重要である。本研究班ワーキンググループ(WG)では、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の先端に立つ植物の生活を支える「重力受容システム」の解明に向けて、研究の現状と課題を整理し、地上研究の方向を決定し、そこで得られる仮説を検証すべく宇宙実験系を確立することを目的としている。

研究班 WG の目標

本研究班 WG は、以下の 3 点を目標に活動する。

1. 植物の重力受容シグナル伝達機構を解明するための先導的研究を、重力屈性研究を中心に展開し、重力受容にかかわる新たなシグナル分子と制御機

構を見出し、重力感受から重力応答（屈曲）にいたる分子機構の全体像を理解する。

2. 植物の回旋運動、自発形態形成、水分屈性など、重力応答によって影響される成長制御の分子機構を解明し、重力屈性の分子機構と比較解析を行うとともに、それらの相互作用を理解する。

3. それらによって宇宙実験で検証すべき仮説と宇宙実験の実施法を確立し、それを実施するための共同研究体制を構築する。また他の研究班 WG とも協力し、宇宙環境における植物生産を視野に、そのための新たな植物の成長制御法を見出すための次世代型宇宙実験へと発展させる。

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重要であると考えられているものの、その実体が未だ不明な細胞骨格の役割について、研究の現状と今後の展望を踏まえて討論をすすめた。また、その細胞骨格研究、並びに重力屈性、回旋運動、自発形態形成、水分屈性に関する研究で、以下に述べる成果が得られた。

1. 重力応答における細胞骨格の役割：現状と今後の展望（村田 隆）

植物の重力応答は重力の方向の受容、受容した情報の変換と伝達、最終的な反応の過程に分けて考えることができる。アクチン、微小管などの細胞骨格は重力の受容や最終的な反応に深く関与していることが期待される。ここでは、重力応答における微小管の役割の解析に絞って議論を進める。

(1)重力応答の研究を行う基盤としての微小管構築機構の解析

重力応答における微小管の役割を理解するためには、その基盤として植物細胞における微小管の構築機構と機能について理解する必要がある。植物の微小管は細胞膜に沿って並び、細胞の伸長方向を制御する。また、先端成長を行う細胞（花粉管、根毛など）においては細胞の長軸方向に平行に並び、極性の維持に働くと考えられる。植物細胞が方向性を持って伸長するためには配列した微小管の構築が必須と考えられる。

近年の緑色蛍光タンパク質（GFP）などの蛍光タンパク質を用いたイメージング手法の発達により、生きた細胞内での微小管の形成と配列の過程を直接観察できるようになった。我々は、GFP 標識した α チューブリンを発現するタバコ培養細胞を用いて個々の微小管の挙動を解析し、微小管形成の主要な経路は既存の微小管上で新しい微小管が重合開始し、約 40 度の角度で分枝状に伸び出す経路であることを明らかにした。さらに、単離細胞膜-微小管複合体と細胞質抽出液を混ぜて微小管の形成を起こさせる無細胞系を用い、細胞質中の γ チューブリンが既存の微小管に結合し、新しい微小管を形成させることを見いだした。 γ チューブリンは微小管重合核のタンパク質複合体で、動物細胞においては中心体に局在することが知られている。この研究により、植物細胞においては細胞質 γ チューブリン複合体が既存の表層微小管に結合し、新しい微小管を枝分かれ状に形成させることが考えられた（Murata et al., *Nature Cell Biology*, 7, 961-968, 2005）。新しく伸び出した微小管は形成位置から切り出され、伸長、短縮を繰り返しながら他の微小管と相互作用を行い、互いに平行に配列することが知られている。今後は、微小管全体の並ぶ向きがどのようにして制御されるかを調べる必要がある。

(2)軌道上での微小重力実験を視野に入れた解析系の開発

GFP 標識タンパク質を用いたイメージング手法

は軌道上でのデータ取得に非常に適していると考えられる。試料を固定して地上に持ち帰り、染色を行って解析を行う方法は軌道上での試料の固定と軌道からの試料の回収に手間がかかり、実験遂行への制約が大きい。軌道上でデジタル画像としてデータを取得し送信する方法を使えば、試料の固定、回収は不要となり、将来は無人の衛星による実験も可能かもしれない。

軌道上でのイメージングによる微小管の解析に適した実験材料は以下の条件を満たしていることが必要と考えられる。1)重力屈性などの重力応答を行う。2)形質転換による GFP 標識タンパク質の発現が可能である。3)生きたままで細胞の顕微鏡観察が可能である。4)研究基盤としての微小管構築機構の理解が進んでいるか、今後進めやすい。これらの条件をすべて満たしている材料として、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) があげられる。ヒメツリガネゴケ原系体は暗所で重力屈性を示し、相同組み替えによる形質転換法も確立されている。原系体の細胞は 1 層であるため切片にしない無傷の状態でも顕微鏡観察が容易に行える。また、現在、ゲノム解読が進んでおり、ドラフト配列が近日中に公開される予定である。我々は、ヒメツリガネゴケ原系体の微小管を GFP- α チューブリンおよび mRFP- α チューブリンにより可視化し、原系体の伸長に伴う微小管の動態を観察する実験系を開発した。ヒメツリガネゴケ α チューブリン cDNA に GFP もしくは mRFP 遺伝子を融合させた融合遺伝子をヒメツリガネゴケに導入することによりヒメツリガネゴケの微小管の可視化に成功した。さらに、ガラススペースディッシュ（イワキ#3911-035）に薄い寒天培地を敷き、その中で原系体を育てることにより、高解像度で顕微鏡観察可能な状態で原系体を育てることに成功し、伸びている細胞の先端における微小管の挙動を観察することに成功した。現在、成長中の原系体を密閉したチャンバー中に入れ、薬剤を可逆的に投与するシステムの開発を行っている。

2. 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。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が多数単離され解析されている。その中の一つである *endodermal amyloplastless 1(eal1)* において、根は正常な重力屈性を示すが、花茎は重力屈性能を完全に失い、胚軸は

重力屈性能が弱まっていた。そして、この変異株では花茎の重力感受細胞である内皮細胞中のアミロプラスト（平衡石として機能すると考えられている）の発達と分化が異常なため、重力屈性が異常になると考えられていた。今回我々は、*EAL1* 遺伝子が *SHORT-ROOT(SHR)* 遺伝子である事を明らかにした。*SHR* タンパク質は転写の活性化因子であり、これが欠損すると根と胚軸や花茎の内皮細胞が分化せず、その為花茎の重力屈性能が完全に無くなる。そして、*SHR* は内皮より内側の髄で発現し、*SHR* タンパク質が細胞間を移動して内皮細胞の核で機能することが示されていた。*eal1* 変異では *SHR* 遺伝子のコード領域内の 3 塩基が欠損しており、その結果として 1 アミノ酸の欠失が生じていた。この変異したタンパク質は *SHR* タンパク質の性質を一部保持しており、そのために花茎や根で内皮細胞に相当する細胞層が形成されている。内皮細胞の分化には移動して来た *SHR* タンパク質が、やはり転写活性化因子であり内皮細胞で特異的に発現する *SCARECROW(SCR)* 遺伝子の発現を促す必要がある。*eal1* の内皮細胞で *SCR* プロモーターの活性をレポーターの発現で調べたところ、発現が弱い細胞や、発現が見られない細胞が観察された。さらに、別の転写因子をコードする *SHOOT GRAVITROPISM 5 (SGR5)* 遺伝子の発現も顕著に減少していた。この遺伝子は花茎の重力屈性に関与して主として内皮細胞で発現している (Morita et al., *Plant J.* 2006)。次に、花茎の内皮細胞中のアミロプラストを電子顕微鏡で観察したところ、糖が蓄積したアミロプラストの形態をしておらず、むしろ葉緑体に近い形態をしていた。これらの結果は、*eal1* の内皮細胞の分化が異常なために重力感受ができなかったことを強く示唆している。今後、*eal1* の内皮細胞における多面的な欠損のうちどれが重力感受に直接関与する異常かを分子遺伝学的に明らかにすることで、重力感受の分子メカニズムの一端を解明することができると思われる。

3. 根の重力受容機構を解析するための突然変異体の単離 (藤井伸治・宮沢豊・高橋秀幸)

植物の重力受容機構を研究するうえで、重力屈性の異常な突然変異体を用いた分子遺伝学的解析が有用である。しかし、根の重力屈性が異常になる突然変異体の多くは、オーキシン応答あるいはオーキシン輸送の異常に起因するもので、根の重力に対する初期応答に関する研究は進展していない。すなわち、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せず、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を行うことが困難で、それが根の重力応答に関する遺伝学的解析の立ち後れている原因と考えられる。

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、我々は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、根は下方方向に伸長する。これを利用し、我々は、根が不完全ながら重力屈性が低下し、同じ条件下で光屈性が発現して水平方向に伸長する突然変異体を選抜した。その結果、現在までに、EMS 処理で突然変異を誘発した 10 万株のシロイヌナズナの M_2 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。これまで解析した突然変異体のうち、2 系統は、 F_2 での野生型と突然変異形質との分離比が 15:1 であると予想され、2 重突然変異体となった場合に突然変異形質が発現する新規突然変異体と考えられた。今後、単一突然変異体だけでなく、これらの 2 重突然変異体に注目した研究によって、重力受容にかかわる新たな制御機構を明らかにできるものと期待される。

4. 重力応答のためのオーキシン輸送機構の解析 (上田純一・宮本健助)

我々は、植物生理学の重要な実験植物であるエンドウおよびトウモロコシを対象に、その成長、発達とそれに深く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 年に宇宙実験 (STS-95) 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上胚軸は、子葉節基部で子葉から離れる方向に約 45 度傾いて成長し、根は気中に向かって上胚軸の成長方向と逆方向に伸長することが示された (自発的形態形成)。さらに、宇宙微小重力環境下においては上胚軸におけるオーキシン極性移動が低下することが明らかとなった。これらの事実は、オーキシン極性移動が重力の支配下にある生理現象であり、植物の重力応答反応にはオーキシン極性移動が密接に関与していることを示している。このような黄化エンドウ芽生えの自発的形態形成の制御機構を明らかにするために、初期成長過程の芽生えに与える重力刺激の方向を変化させるとともに、クリノスタットを用いて重力の大きさを変化させながら上胚軸の成長と

重力との関係について詳細な解析を行った。その結果、黄化エンドウ芽生え上胚軸の自発的形態形成は、吸水後約 48 時間後に認められる上胚軸の子葉節基部での「負の重力屈性」の阻害によって引き起こされることが明らかとなった。

一方、昨年度までに実施された先行研究によって分離されたオーキシン極性移動関連遺伝子 *PsPIN2* および *PsAUX1* や既に分離されている *PsPIN1* (Chawla and DeMason, 2004) の発現に対するオーキシンの影響を調べた結果、これらオーキシン極性移動に関係する遺伝子はオーキシン応答性の遺伝子であることが明らかとなった。

つづいて、初期成長過程における黄化エンドウ芽生え上胚軸の負の重力屈性反応に対するオーキシンの役割を明らかにするための新たなモデル実験系を構築した。その結果、芽生えの初期成長段階では、オーキシンは上胚軸の子葉側に偏って極性移動し、その移動能は重力方向を変化させることによって劇的に変動することが示された。さらにオーキシン極性移動の変化に伴い、上胚軸の偏差成長に対応するように上胚軸においてオーキシンの不均等な蓄積が認められた。

初期成長過程の黄化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とオーキシンの不均等分布は、子葉側上胚軸におけるオーキシン極性移動が阻害され、子葉節基部においてオーキシンが横方向へ移動した結果であることを示唆している。実際に放射性オーキシン ($[1-^{14}\text{C}]$ indole-3-acetic acid) を用いてオーキシンの移動を測定した結果、子葉節基部でのオーキシンの横移動を示す実験結果が得られた。この結果は、オーキシン極性移動が低下しているシロイヌナズナ *mdr* 突然変異体においては重力応答反応が促進されることから支持される (Noh et al., 2003)。オーキシン極性移動を制御する *PsPIN1*、*PsPIN2* および *PsAUX1* 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、細胞からオーキシンを排出する *PsPIN1* および *PsPIN2* の発現は、黄化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 (Hoshino et al., Plant Cell Physiol. 2006)。

本年度の研究により、黄化エンドウ芽生え上胚軸における負の重力屈性は、重力刺激に応じて巧みに変化するオーキシンの移動によって制御されていることが明らかとなった。また、オーキシンの移動には、オーキシンの排出キャリアである *PsPINs* が重要な役割を担うことが示された。

5. 植物の回旋運動と腋芽伸長の重力応答依存性 (藤井伸治・宮沢豊・高橋秀幸)

これまでに、我々は重力応答欠損突然変異体のシダレアサガオ (*we1*) の変異が重力感受細胞の分化に必要な SCR にあることを突き止め、それを用いた研究から、回旋運動が重力依存的形態形成であることを明らかにするとともに、この重力依存性回旋運動が、蔓性植物のよじ登り現象に必要な可能性を示した (Kitazawa et al., PNAS 2005)。最近、アサガオの新たな重力屈性突然変異体として得られた *we2* のシュートも、回旋運動およびよじ登り現象を欠損していることを見出した。現在、*we2* の突然変異原因遺伝子を明らかにすることによって、回旋運動機構を解明するための研究を展開している。

また、茎を重力方向に折り曲げたまま生育させると、最上位となった節の腋芽が成長を開始する。アサガオの重力屈性欠損変異株 (*we1*, *we2*) を用いた解析の結果、折り曲げによる頂芽優勢の打破には重力応答を必要とすることがわかった。そこで頂芽優勢に働くサイトカイニンとオーキシンに注目し、折り曲げ処理時におけるそれらの動態変化を解析した。その結果、重力応答に依存した頂芽優勢の打破は、摘心による頂芽優勢打破の場合とは独立した機構によって起こる可能性が示唆された。

蔓性植物の回旋運動と頂芽優勢の打破は、植物の重力受容と多様な成長現象の関係を理解するための新たな実験系として期待される。

6. 重力屈性と相互作用する水分屈性の制御分子 (宮沢豊・藤井伸治・高橋秀幸)

我々は、根の重力屈性と相互作用する水分屈性の分子機構を明らかにするために、シロイヌナズナにおいて水分屈性能に異常を示す突然変異体 (*mizukussei: miz*) の単離と解析を行ってきた。今回、水分屈性を完全に欠損した *miz1* の突然変異原因遺伝子を同定することに成功した。また、*MIZ1* は水分勾配感受部位と考えられる根端で発現し、水分屈性の初期段階に関わる可能性が示唆された。*miz1* 突然変異体は正常な重力屈性を示し、これによって水分屈性には、重力屈性と独立した分子機構の存在することが明らかになった。

さらに、オーキシンは、根の重力屈性と水分屈性において重要な役割を果たすが、そのためのオーキシン輸送機構は両者で異なる可能性が示された (Kaneyasu et al., J. Exp. Bot. 2007)。