

シロイヌナズナにおけるリグニン合成に対する過重力刺激の影響

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、山口和夫

Effects of hypergravity stimulus on lignin formation in *Arabidopsis thaliana*

Daisuke Tamaoki¹, Ichirou Karahara¹, Tatsuya Wakasugi¹, Takumi Nishiuchi², 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.toyama-u.ac.jp

Abstract: Lignification, an important chemical modification of secondary cell walls, imparts mechanical strength to plant bodies. Deposition of lignin in secondary cell walls has been considered to be essential for the evolution of land plants. In the present study, we examined the effects of hypergravity conditions on lignin deposition in secondary cell walls of *Arabidopsis* inflorescence stems. Plants were grown for 3 days after exposure to basipetal hypergravity at 300 x g for 24 h. A secondary cell wall fraction was prepared by enzyme digestion of inflorescence stem segments to remove primary cell wall components. The content of lignin in a secondary cell wall fraction was significantly increased by hypergravity stimulus. Microarray analysis (22K) was used to identify genes that are modulated in expression in response to hypergravity conditions. The data showed that many genes putatively involved in lignin biosynthesis were expressed more than 2-fold by hypergravity treatment. Our data confirm that hypergravity-induced increase in the content of the constituents of secondary cell walls is due to the increased expression of genes responsible for the formation of secondary cell walls under hypergravity conditions.

Key words; lignin, hypergravity, *Arabidopsis*

1、はじめに

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り、植物は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、共にセルロースを主成分とし、細胞が分裂したときから持つ一次壁と細胞の分化に伴って形成される二次壁からなる。特に二次壁は特徴的な成分であるリグニンを含み、支持構造において重要な役割を果たしている。リグニンの沈着によって、二次壁は極度に高い引っ張り強度と壊れにくさを得ることができる。

重力環境と細胞壁についての研究は、特に、一次壁に関しては詳しく調べられてきた。微小重力環境下において細胞の伸展性が低下し、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)。

また重力環境と二次壁に関する研究もいくつか

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。しかし、二次壁と重力環境についての研究はまだ少なく、あまり進展していないのが実情である。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) の花茎においては、過重力刺激によってリグニン含量が増加することを私達はこれまでに明らかにした (Tamaoki et al. in press)。本研究において、私たちは重力環境の変化によりリグニン合成経路が調節される仕組みを分子レベルで明らかにすることを目的として、過重力処理したシロイヌナズナの花茎において、リグニン合成に関わる酵素をコードする遺伝子について発現解析を行った。

二次壁形成やリグニン合成経路には多くの遺伝子が関与しており、それぞれの遺伝子はファミリーを形成していることが多いため、ひとつひとつ発現解析を進めるには多くの時間を要する。そこ

で本研究においては、マイクロアレイ(22K)を用いて、長時間の過重力処理によって発現が変化する遺伝子について網羅的な解析を試みた。さらにマイクロアレイの実験結果の再現性を確認するため、定量的 PCR による発現解析を行った。その結果を報告する。

2、材料と方法

植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh ecotype Columbia) 種子を、試験管に入れたムラシゲ・スク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 growth stage 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 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。RNA 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。

リアルタイム PCR

遺伝子発現プロファイリングにより検出された、過重力によって発現量が上昇したいくつかのリグニン合成に関与すると考えられる遺伝子についてリアルタイム PCR により発現変化の再現性を検討した。PCR の反応装置は ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, US)を用いた。PCR 産物の検出には SYBR Green を用いた。遺伝子の発現レベルは、18S ribosomal RNA の値に対して標準化した相対的な

値として求めた。生物学的に 3 回の独立した実験を行った。

3、結果と考察

過重力処理直後の花茎基部においては、対照区と比べて、356 の遺伝子の発現が 2 倍以上に増加し、337 の遺伝子の発現が 1/2 以下に減少した。増加した遺伝子と減少した遺伝子の両方において、特に代謝と転写に関与する遺伝子群が最も大きく発現変化することがわかった。発現変化したこれらの遺伝子のうち、細胞壁に係る遺伝子に着目した。

リグニン合成に関与する遺伝子については、10 以上の遺伝子の発現が 2 倍以上に増加することがわかった。特にモノリグノールの重合に関与する酵素をコードする遺伝子の発現変化が大きく、また発現上昇した遺伝子数も多かった。過重力処理によってアセチルプロマイド抽出リグニン量が増加したのは(Tamaoki et al. in press)、モノリグノールの重合が促進したためであるという可能性が示唆される。

セルロース合成に関連すると推定される遺伝子については 8 遺伝子の発現が 2 倍以上に増加した。このことから過重力処理によりセルロース合成が促進される可能性が示唆された。

エンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH)をコードする遺伝子については、糖鎖転移反応を触媒すると推定されるグループ 2 に属する遺伝子のうち 3 遺伝子の発現が 2 倍以上に増加し、加水分解反応を触媒すると推定されるグループ 3 に属する遺伝子のうち 1 遺伝子で発現が 1/2 以下に減少した。これまでに過重力刺激によってキシログルカンが高分子化すると報告されている (Soga et al., 1999, 2001)。本研究の結果から、過重力刺激によってキシログルカンが高分子化するのは、キシログルカンの加水分解が抑制され、糖鎖転移が促進されるためであるという可能性が示唆される。

またエクステンシン様タンパク質をコードする遺伝子のうち 2 遺伝子の発現が 2 倍以上に増加した。木部の二次壁にはエクステンシン様タンパク質が存在することが知られている (Fukuda 1997)。このことから過重力処理による二次壁量の増加 (Tamaoki et al. in press)にはエクステンシン様タンパク質の増加も関与する可能性が示唆される。またエクステンシンは生長を抑制する働きを持つと推測されている (桜井ら 1991)。過重力刺激によってシロイヌナズナの花茎の生長が抑制される場合に (Tamaoki et al. in press)、エクステンシンが関わ

る可能性も考えられる。

以上の結果より、長時間の過重力刺激は、転写レベルでリグニン合成、セルロース合成およびキシログルカンの再構築に関わる遺伝子の発現を促進することで、リグニン量および二次および一次細胞壁量の増加と細胞壁の力学的性質の変化を引き起こすという可能性が示唆された。

本研究は（財）日本宇宙フォーラムが推進している「宇宙環境利用に関する地上研究公募」プロジェクトの一環として行ったものである。

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) Fukuda H. *Plant Cell*, **9**, 1147–1156 (1997)
- 4) Hoson T., Soga K., Mori R., Saiki M., Nakamura Y., Wakabayashi K., Kamisaka S. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 1067–1071 (2002)
- 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., Lukas S., Wakasugi T., Yamada K., Kamisaka S. *J. Plant Res.* (in press)
- 10) 桜井直樹, 山本良一, 加藤陽治 : 植物細胞壁と多糖類, 培風館, (1991)