

植物の抗重力反応における微小管—原形質膜—細胞壁連絡の役割

Role of Microtubule-Membrane-Cell Wall Continuum in Gravity Resistance in Plants

Abstract: The present study aims to confirm the hypothesis that the structural or physiological continuum of microtubule-plasma membrane-cell wall is responsible for gravity resistance in plants, by the space experiment using *Arabidopsis* mutants. For this purpose, we have decided the procedure for space experiment in EMCS, such as the optimal method of seed sowing, condition of plant cultivation, and methods of sample fixation and collection. We have also selected one tubulin mutant (*tua6*) and one HMGR mutant (*hmg1*) in the Columbia background for space experiment. Hypergravity suppressed elongation growth, whereas it stimulated lateral expansion of stem organs. These mutants had thicker and shorter hypocotyls than wild-type even under 1 g conditions, and hypergravity did not affect their length or diameter, suggesting that the mutants are hypersensitive to the gravitational force. We expect that such defects of these mutants are rescued under microgravity conditions in space.

Key words: *Arabidopsis*, Cell wall, Gravity resistance, Membrane sterol, Microtubule, Mutant, Plasma membrane

概 要

本研究の目的は、シロイヌナズナ突然変異系統を用いて、抗重力反応における微小管—原形質膜—細胞壁連絡の役割を検証し、抗重力のしくみを明らかにすることにある。本年度は、EMCSを利用した宇宙実験に備えて、播種方法、植物育成環境、植物観察方法、試料固定及び回収条件などの軌道上操作の手順を検討し、確定した。また、多くのチューブリン並びにHMGR変異体の中から、最も宇宙実験に適した系統として *tua6* 並びに *hmg1* を選定し、遠心過重力環境を用いた予備実験を実施した。過重力環境下では植物茎器官の伸長成長が抑制され肥大成長が促進されるが、これらの変異体は1 g環境下で既に太く短い形状をしており、過重力環境でもそれ以上の伸長抑制や肥大促進が起こらなかった。すなわち、このような変異体は重力に抵抗する能力が低く、1 gの重力にも耐えられないことがわかった。宇宙の微小重力環境では、これらの変異体の形質が回復することが期待される。

1. はじめに

抗重力は、重力屈性と並ぶ植物の主要な重力反応であり、植物が数億年前に初めて陸に上がって以来、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、その機構については不明な点が多い。我々は、抗重力における重力シグナルの感受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一般的な植物細胞において原形質膜上のメカノレセプターの働きで行われることを示した [1-3]。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明らかにした。さらに、重力応答性遺伝子の解析により、シグナル変換・伝達機構において、原形質膜と微小管の構造的、機能的な協調が重要な働きを担うことが示唆された[1-3]。本研究は、シロイヌナズナ突然変異系統を用いて、このような抗重力のしくみを明らかにすることを目的としている。微小管、原形質膜、そして細胞壁の構築や機能に関わる突然変異体を地上で生育させると、いずれも細胞壁の形成が悪く、異常な成長、発達を示す。しかし、強固な細胞壁を形成する必要がない宇宙の微小重力環境では、これらの突然変異系統も野生型と同様に正常に生育する可能性が高い。宇宙実験によってこの仮説が実証されれば、植物の主要な重力反応である抗重力の機構が解明されるのみならず、宇宙並びに地球上での植物生産に貢献できる。

2. 成果の概要

2.1. 宇宙実験における操作手順の確定

本研究に関わる宇宙実験は、本年度ベースライン化が終了し、来年度内の打ち上げ、実施が予定されている。そこで、軌道上操作の各ステップについて検討し、実施のための操作手順を確定した。まず、種子の発芽に関しては、乾燥種子を打ち上げて、軌道上で吸水、発芽させることとし、播種数は1つのPCC (Plant Cultivation Chamber, ESAのMULTIGEN-1実験用に開発された植物栽培容器) 当たり7粒と定めた。また、培地にはMS栄養剤(シグマ社製M2909)を加えたZeoponiXを用いることにした。さらに、野生型と比べて変異体では成長の遅れが予想されるので、最大3日間先行して吸水させることができるような手順とした。次に、植物育成環境のうち、温度、湿度、給水、及びガス環境に関してはEMCS/MULTIGEN-1実験の設定環境通りとした。光環境に関しては、50及び75 W/m²の2段階が設定されているが、当初の想定値よりやや高めであり、2007年5月から行うPCC検証モデルを用いた栽培実験によって最終確認することになった。また、当初計画では連続光照射を予定していたが、16時間明/8時間暗の周期をつけることにした。この変更により大きな問題は生じないことを確認した。さらに、成育中の植物体の様子を継続して確認するため、植物育成期間中、毎日1回のビデオ撮影を行い、その画像は地上にダウンリンクするとともに軌道上で録画、保管することになった。最後に、軌道上で生育した植物試料の回収に関しては、胚軸部分以上の植物体全体を用い、遺伝子解析用にはRNAlaterを含むKFT内に、また生化学及び生理学的パラメータ測定用にはZiploc bagに入れて凍結することとした。このような試料の保存の温度条件として、KFTについては-20℃以下、またZiploc bagについては-80℃以下を要求することになった。また地上への輸送回収の際にはシャトル用冷凍庫のリソース関係上ともに-20℃以下を要求することになった。

2.2. 宇宙実験に適したチューブリン変異体の選抜と解析

表層微小管の構築に関わるシロイヌナズナ突然変異体を得るため、EMS処理した種子のM2世代より植物体の構築や長軸方向の成長にねじれを生じた系統の単離を行った。原因遺伝子のマップベース・クローニングにより、約40種類の α -チューブリン及び β -チューブリン遺伝子変異体が単離された。これらはいずれも1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。これらの変異体のうち、稔性や表現型の明瞭さなどの条件を満たした3種類に関して、さらに詳細な形質の解析を行った。これらの変異体、*tua3* (D205N)、*tua4* (S178 Δ)、*tua6* (A281T)は、1g環境下でも、伸長成長が抑制されるとともに肥大成長が促進されて、太く短い形状をしていた。また、過重力環境下では植物茎器官の伸長成長が抑制され肥大成長が促進されるが、これらの変異体ではそれ以上の伸長抑制や肥大促進が起らなかった。特に、*tua6*の胚軸では、もともと伸長抑制並びに肥大促進が顕著であり、過重力の影響は全く見られなかった。一方、胚軸のねじれについて詳細に調べたところ、過重力環境下では野生型でもわずかにねじれが促進されること、そして変異体では1g下でのねじれが見られ、それが過重力環境下ではさらに強調されることがわかった。特に、*tua6*では、1g下でのねじれが大きく、過重力の影響も最も明瞭であった。以上の結果から、宇宙実験には*tua6* (A281T)を使用するのが最良であることが示された。

2.3. 宇宙実験に適したHMGR変異体の選抜と解析

原形質膜の構築や機能に関わる突然変異体のうち、最も顕著な形質の変化を示すのは、膜ステロールの合成に関わ

る HMGR のノックアウト変異体 *hmg* である。最初に T-DNA 挿入によって得られた *hmg* 変異系統のエコタイプは WS であった。そこで戻し交雑によりバックグラウンドを Columbia に置換した *hmg1* の変異体を作成した。この変異体は矮性化、老化促進、不稔など、WS バックグラウンドのものと同様の形質を示した。さらに、抗重力反応について解析したところ、この変異体は、1 g 環境下でも、伸長成長が抑制されるとともに肥大成長が促進されて、太く短い形状をしていた。また、過重力環境下では植物茎器官の伸長成長が抑制され肥大成長が促進されるが、この変異体ではそれ以上の伸長抑制や肥大促進が起らなかった。チューブリン変異体の場合と同様に、この変異体も重力に抵抗する能力が低く、1 g の重力に耐えられないものと考えられる。このように、*hmg1* も宇宙実験に適した変異体であることが明らかになった。

3. まとめ

本年度の研究では、播種方法、植物育成環境、植物観察方法、試料固定及び回収条件などの宇宙実験の操作手順を様々な角度から検討し、そのほとんどを確定することができた。また、最も宇宙実験に適した系統として、多くのチューブリン変異体の中から *tua6* を選抜し、HMGR の変異体に関しては Columbia バックグラウンドの *hmg1* を作成した。これらの変異体を用いて予備実験を行ったところ、過重力環境下では植物茎器官の伸長成長が抑制され肥大成長が促進されるが、これらの変異体は 1 g 環境下で既に太く短い形状をしており、過重力環境でもそれ以上の伸長抑制や肥大促進が起らなかった。すなわち、このような変異体は重力に抵抗する能力が低く、1 g の重力にも耐えられないことがわかった。

本研究に関わる宇宙実験は、本年度ベースライン化が終了し、来年度内の打ち上げ、実施が予定されている。そこで、来年度は PCC の検証モデルを用いた栽培実験を実施する。また、軌道上で生育した植物試料の固定、保管条件は、地上で行う通常の実験の場合とは異なっているので、宇宙実験操作に即した試料分析を行い、想定している分析手順の有効性を確認する。さらに、今回の宇宙実験で得られる試料は、最大でも各処理 7 本とわずかであるので、通常は別々の試料で行う測定を同一試料を用いて連続的に実施する方法を検討し、限られた量の試料より最大限のデータを得る方法を確認する。このようにして、効率的な宇宙実験の実施をめざす。

4. 成果発表

4.1. 学術論文

- [1] Hoson T, "The mechanism and significance of gravity resistance in plants", *J. Gravit. Physiol.*, 13, 97-100, 2006.
- [2] Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T, "Hypergravity induces reorientation of cortical microtubules and modifies growth anisotropy in azuki bean epicotyls", *Planta*, 224, 1485-1494, 2006.
- [3] Nakabayashi I, Karahara I, Tamaoki D, Masuda K, Wakasugi T, Yamada K, Soga K, Hoson T and Kamisaka S, "Hypergravity stimulus enhances primary xylem development and decreases mechanical properties of secondary cell walls in inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana*", *Ann. Bot.*, 97, 1083-1090, 2006.
- [4] Soga K, Arai K, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T, "Modifications of xyloglucan metabolism in azuki bean epicotyls under hypergravity conditions", *Adv. Space Res.*, in press.
- [5] Koizumi T, Sakaki T, Usui S, Soga K, Wakabayashi K and Hoson T, "Changes in membrane lipid composition in azuki bean epicotyls under hypergravity conditions: Possible role of membrane sterols in gravity resistance", *Adv. Space Res.*, in press.

4.2. 学会発表

- [1] Hoson T, "The mechanism and significance of gravity resistance in plants", 27th Annual International Gravitational Physiology Meeting, April 2006, Osaka.
- [2] Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T, "Role of cortical microtubules in hypergravity-induced modification of growth anisotropy in azuki bean epicotyls", 27th Annual International Gravitational Physiology Meeting, April 2006, Osaka.
- [3] Matsumoto S, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K, Abe T, Ishida T, Hashimoto T and Hoson T, "Growth behavior in tubulin mutants of *Arabidopsis* under hypergravity conditions", 27th Annual International Gravitational Physiology Meeting, April 2006, Osaka.
- [4] Nakabayashi I, Karahara I, Tamaoki D, Masuda K, Wakasugi T, Yamada K, Soga K, Hoson T and Kamisaka S, "Effects of hypergravity

- stimulus on primary xylem development and mechanical properties of secondary cell walls in inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana* L.”, 27th Annual International Gravitational Physiology Meeting, April 2006, Osaka.
- [5] Ikushima T, Soga K, Hoson T and Shimmen T, “Dynamic organization of cortical microtubules and cell wall during gravitropism of azuki epicotyl”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 2006, Kyoto.
- [6] Hoson T, Koizumi T, Matsumoto S, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K and Sakaki T, “Role of membrane sterols and cortical microtubules in gravity resistance in plants”, 36th Committee on Space Research Scientific Assembly, July 2006, Beijing.
- [7] Soga K, Arai K, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T, “Modifications of xyloglucan metabolism in azuki bean epicotyls under hypergravity conditions”, 36th Committee on Space Research Scientific Assembly, July 2006, Beijing.
- [8] Koizumi T, Soga K, Wakabayashi K, Suzuki M, Muranaka T and Hoson T, “Involvement of membrane sterols in hypergravity-induced modifications of growth and cell wall metabolism in plant stems”, 36th Committee on Space Research Scientific Assembly, July 2006, Beijing.
- [9] Matsumoto S, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K, Abe T, Ishida T, Hashimoto T and Hoson T, “Up-regulation of tubulin genes and growth phenotype of tubulin mutants in *Arabidopsis* under hypergravity conditions”, 36th Committee on Space Research Scientific Assembly, July 2006, Beijing.
- [10] 松本翔平, 隈崎沙緒里, 曾我康一, 若林和幸, 阿部竜也, 石田喬志, 橋本隆, 保尊隆享, “シロイヌナズナ・チューブリン変異体の成長と形態に対する重力の影響”, 日本植物学会第70回大会, 2006年9月, 熊本.
- [11] 隈崎沙緒里, 松本翔平, 曾我康一, 若林和幸, 阿部竜也, 石田喬志, 橋本隆, 保尊隆享, “シロイヌナズナ MAPs 変異体の成長と形態に対する重力の影響”, 日本植物学会第70回大会, 2006年9月, 熊本.
- [12] 生嶋利充, 曾我康一, 保尊隆享, 新免輝男, “アズキ上胚軸の重力屈性における屈曲機構”, 日本植物形態学会第18回大会, 2006年9月, 熊本.
- [13] 保尊隆享, “植物の抗重力反応における微小管—原形質膜—細胞壁連絡の役割”, 日本宇宙生物科学会第20回大会, 2006年9月, 大阪.
- [14] 小泉朋子, 曾我康一, 若林和幸, 鈴木優志, 村中俊哉, 保尊隆享, “過重力による植物の茎の成長と細胞壁代謝の修飾における膜ステロールの役割”, 日本宇宙生物科学会第20回大会, 2006年9月, 大阪.
- [15] 松本翔平, 隈崎沙緒里, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, “重力による植物の成長調節における微小管の役割—微小管破壊剤を用いた解析”, 日本宇宙生物科学会第20回大会, 2006年9月, 大阪.
- [16] 隈崎沙緒里, 松本翔平, 曾我康一, 若林和幸, 阿部竜也, 石田喬志, 橋本隆, 保尊隆享, “重力による茎器官の成長と形態の調節における MAPs の役割”, 日本宇宙生物科学会第20回大会, 2006年9月, 大阪.
- [17] 中野紗帆, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, “重力による細胞壁代謝調節の茎部域による差異”, 日本宇宙生物科学会第20回大会, 2006年9月, 大阪.
- [18] 金原知也, 小竹敬久, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, 円谷陽一, “冠水微小重力によるイネ芽生えの β -1,3:1,4-グルカン合成活性の低下”, 日本宇宙生物科学会第20回大会, 2006年9月, 大阪.
- [19] 保尊隆享, “微小重力下の物質科学と生命科学—植物学の立場から”, 日本マイクログラビティ応用学会第22回学術講演会, 2006年12月, 東京.
- [20] Hoson T, “Changes in osmotic and cell wall properties of azuki bean epicotyls by submergence as anaerobiosis and as a response to microgravity”, ISPA Japan Pre-Symposium, December 2006, Tsukuba.
- [21] 生嶋利充, 曾我康一, 保尊隆享, 新免輝男, “アズキ上胚軸における重力屈性の解析”, 基礎生物学研究所研究会「植物細胞における細胞骨格の機能発現：滑り説から50年」, 2006年12月, 岡崎.
- [22] 保尊隆享, 神阪盛一郎, 高橋秀幸, 山下雅道, 北宅善昭, 飯田秀利, 村中俊哉, 橋本隆, 園部誠司, 谷本英一, 西谷和彦, 井上雅裕, 唐原一郎, 小竹敬久, 若林和幸, 曾我康一, “植物の抗重力反応解明”, 第23回宇宙利用シンポジウム, 2007年1月, 東京.
- [23] 小竹敬久, 金原知也, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, 円谷陽一, “重力シグナルがイネの β -1,3:1,4-グルカン合成活性に与える影響”, 第23回宇宙利用シンポジウム, 2007年1月, 東京.
- [24] 保尊隆享, “植物の抗重力反応における細胞壁と細胞膜の機能”, 第9回植物生体膜シンポジウム, 2007年3月, 松山.
- [25] 曾我康一, 小竹敬久, 若林和幸, 神阪盛一郎, 保尊隆享, “重力によるアズキ上胚軸の表層微小管配向の変化と γ -チューブリン遺伝子発現の増加”, 日本植物生理学会2007年度年会, 2007年3月, 松山.
- [26] 小泉朋子, 榊剛, 鈴木優志, 村中俊哉, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, “茎器官の抗重力反応における膜ステロールの役割”, 日本植物生理学会2007年度年会, 2007年3月, 松山.

5. 参 考 文 献

- [1] Hoson T and Soga K, “New aspects of gravity responses in plant cells”, *Int. Rev. Cytol.*, 229, 209-244, 2003.
- [2] Hoson T, Saito Y, Soga K and Wakabayashi K, “Signal perception, transduction, and response in gravity resistance. Another graviresponse in plants”, *Adv. Space Res.*, 36, 1196-1202, 2005.
- [3] 保尊隆享, “植物の抗重力反応—シグナル受容, 変換・伝達, そして応答—”, *生物工学*, 83, 565-567, 2005.