

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：飯野盛利（大阪市立大学）、上田純一（大阪府立大学）、鎌田源司（エイ・イー・エス）、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）、森田美代（奈良先端科学技術大学院大学）、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: M. Iino (Osaka City Univ.), J. Ueda (Osaka Prefecture Univ.), M. Kamada (AES), 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. Morita (Nara Inst. of Science and Technology), M. Yamashita (JAXA)

Abstract: Our studies are aimed at understanding the graviperception mechanism and its interactions with mechanisms of other gravity-influenced phenomena of plant growth and development. To understand the graviperception mechanisms, we isolated novel mutants defective in shoot or root gravitropism in *Arabidopsis*, identified the genes responsible for mutations, and clarified the roles of those molecules. In addition, we analyzed developmental phenomena that are regulated or influenced by graviresponse in plants as follows. It was found that graviresponse was required for circumnutation of rice coleoptiles as in dicotyledonous plants. Over-expression of *MIZ1* resulted in an enhancement of hydrotropic response in *Arabidopsis* roots, independently from the magnitude of gravitropic response. Lateral placement of a peg in cucumber seedlings appeared to involve an auxin efflux carrier, *CsPIN1*, whose localization together with auxin distribution changed within 30 min after gravistimulation. Analyses of polar auxin transport and expression of *ZmPIN1a* revealed their roles in seedling development of maize coleoptiles, which could be used to establish a model for spaceflight experiment of the gravity-regulated growth and development of plants. To verify some of hypotheses obtained by our studies, we have conducted an experiment in KIBO module of ISS and prepared two others to be flown.

Key words; *Arabidopsis*, Auxin, Circumnutation, Cucumber, Gravimorphogenesis, Graviperception, Gravitropism, Hydrotropism, Maize, Mutants, Rice

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、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と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。

本年度の活動成果

1. 植物の重力屈性

(1) 重力屈性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・森田）

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。我々は、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を多数単離し解析してきた。本年度はそれらを使って以下の研究を行った。

1) 内皮細胞の分化に関わる転写因子 *SHORT-ROOT(SHR)* の hypomorphic アリルである *endodermal amyloplastless 1(eal1)* 変異株は、内皮細胞は形成するものの重力屈性能を完全に失っている。*eal1* において野生型と比較して 1/2 以下に発現量が低下した遺伝子群 (*Down-regulated Genes in Eal1; DGE*) を見出した。昨年度までに、*DGE1* と名付けた遺伝子の欠損変異体が重力屈性異常を示すことを示した。*DGE1* はイネ重力屈性関連遺伝子 *LAZY1* と弱いながら相同性示すが、いずれも機能が類推で

きるモチーフを持たない。一方で、DGE1 と LAZY1 は、C 末端 13 アミノ酸において非常に高い相同性を示す。そこで、シロイヌナズナ全タンパク質中で同様の C 末端配列を持つタンパク質をコードする遺伝子を検索したところ、DGE1 以外に 4 遺伝子が見つかった。その内の一つは DGE 遺伝子群に含まれており、この遺伝子を DGE2 とした。また、4 遺伝子の中には DGE2 と高い相同性を示す遺伝子 (*DGE TWO-LIKE:DTL*) も含まれていたことから、DGE2 および DTL 遺伝子について、T-DNA 挿入変異体の表現型解析を行った。*dil* 変異体は側根が水平方向に伸長する異常が見られたが、地上部 では *dge2*、*dil* とともに顕著な表現型は観察されなかった。次に *dge1* との多重変異体を作成したところ、*dge1 dge2 del* 三重変異体は花茎の重力屈性を失い、また胚軸および根においても著しい重力屈性能の低下が観察された。現在、各変異体の更なる表現型解析と各遺伝子の機能解析を進めている。

2) 花茎重力屈性が弱くなった *sgr9* 変異株の原因遺伝子はリングフィンガーを持つ E3 リガーゼ様タンパク質をコードしている。本年度は、SGR9 の相互作用因子の単離を目指した。SGR9 の RING finger ドメイン中の変異 (C232A あるいは W244A) はいずれも *in vitro* 系での SGR9 の E3 リガーゼ活性を失わせる。また、野生型 SGR9-GFP は植物体内でほとんど蓄積がみられないが、これらの変異型 SGR9-GFP は植物体内で蓄積し、アミロプラスト局在を示す。また、変異型 SGR9-GFP を野生型背景に発現させると、その形質転換体は内生の SGR9 が存在するにもかかわらず重力屈性異常を引き起こすことから、優性阻害効果を持つと考えられる。これらの変異型 SGR9-GFP は、おそらく植物体内で、SGR9 が本来相互作用するタンパク質と結合し、蓄積していると期待される。そこで、GFP 抗体固定化カラムを用いて変異型 SGR9-GFP を含むタンパク質複合体の分離を行った。C232A および W244A のそれぞれを SGR9 のプロモーター制御下で、もしくは過剰に発現する 4 種の形質転換体を試料とした。対照としては GFP を過剰発現した形質転換体を用いた。各試料においてカラムに結合したタンパク質を質量分析器により解析し、対照の試料からは検出されなかったタンパク質を比較した。その結果、葉緑体外膜に存在するタンパク質群や、ACT2、Formin といったアクチン関連タンパク質、Calmodulin binding domain を含む IQD タンパク質などが含まれていた。葉緑体外膜に存在するタンパク質群には、葉緑体のアクチンに依存した移動に関与するタンパク質や根の重力屈性との関与が遺伝学的に示唆

されているタンパク質が含まれており、現在これらに着目した解析を進めている。

(2) 根の重力受容機構を解明するための新規突然変異体の単離 (藤井・宮沢・高橋)

1) シロイヌナズナの根の重力屈性の低下を指標に単離したシロイヌナズナの 31-46 系統の根は、オーキシン取り込み担体をコードする (*auxin resistant1: aux1*) 遺伝子に突然変異が生じていた。この系統について根の伸長における外生オーキシンに対する抵抗性を解析した結果、本系統は完全機能欠損型 *aux1* 突然変異体に比べて、高いオーキシン抵抗性を示した。さらに、31-46 系統の根においてオーキシン抵抗性が発現する原因について解析した結果、31-46 系統は、*aux1W455**突然変異と *aux1* 突然変異のオーキシン抵抗性を増加させる *enhancer of aux1 (enax)* 突然変異を保持していると考えられた。つまり、各単独突然変異体 (*enax* 突然変異体、*aux1W455**突然変異体) は同等のオーキシン抵抗性を示すが、*aux1W455* enax* 二重突然変異体 (31-46 系統) では、各単独突然変異体に比べてオーキシン抵抗性が増加することが示された。また、4 日齢の芽生えの根の重力屈性を解析した結果、各単独突然変異体 (*enax* 突然変異体、*aux1W455**突然変異体) の根の重力屈性は遅延にとどまるが、*aux1W455* enax* 二重突然変異体では、根の重力屈性が欠損していた。以上の結果より、*enax* 突然変異は *aux1* 突然変異形質を強めることが示された。*enax* 突然変異遺伝子をラフマッピングした結果、第5染色体の長腕に本突然変異遺伝子が単一劣性突然変異遺伝子としてマップされた。本マッピング領域は、オーキシン抵抗性を引き起こす既知の突然変異遺伝子を含んでおらず、*enax* 突然変異遺伝子の同定・解析は、根の伸長成長制御に関する新たな知見を導けると期待される。

2) 植物の重力応答による成長制御機構の本質的な理解には、重力刺激を生体情報に変換するプロセスの解明が必要である。植物の重力感受機構にはアミロプラストの沈降に依存する *PGM (PHOSPHOGLUCOMUTASE)* 経路と、*ARG1 (Altered Responses to Gravity 1)* 経路があると考えられている。しかし、アミロプラストの沈降を低下させる *pgm* 突然変異はデンプン合成経路を担うタンパク質をコードする遺伝子の突然変異であり、重力刺激を細胞内の情報に変換する分子をコードする遺伝子の突然変異とは考えられない。また、*ARG1* は *hsp70* 分子シャペロンと相互作用するタイプ II DnaJ 様タンパク質で、この分子と相互作用する分子の存

在が予想されるが、重力刺激を生体情報に変換するしくみの本質的な理解には至っていない。したがって、植物には重力シグナルを変換する未同定の分子(重力刺激感受分子)が存在すると予想される。そして、未同定の重力感受分子が植物に存在するのであれば、*PGM* 経路と *ARG1* 経路の 2 つの重力感受経路を欠損した *pgm arg1* 二重突然変異体においても、重力感受分子は機能を保持していると期待される。したがって、*pgm arg1* 二重突然変異体での重力応答性を検出できれば、その重力応答性を指標として、欠損した突然変異の同定が可能になると考えられる。そこで、本研究では過重力条件を用いて、*pgm arg1* 二重突然変異体の重力応答性を解析した。

野生型 (*Columbia*) の根では、1G と 25G の両条件下において、重力方向と逆向きに青色光を照射しても、重力屈性が光屈性に比べて強く発現し、重力屈性による屈曲が観察された。一方、*pgm arg1* 二重変異体では 1G 下で重力方向の逆向きに青色光を照射すると、重力屈性は強く発現せず、光屈性が強く発現した。これに対し、同じ青色光条件下でも過重力を与えることで *pgm arg1* 二重変異体の重力屈性が部分的に回復した。したがって、*pgm arg1* 二重突然変異体でも、重力刺激を生体内の情報に変換する分子が機能しており、下側から青色光を照射しながら 25G 下で実験を行うことにより、*pgm arg1* 二重突然変異体で機能している重力感受分子依存的な重力応答を検出できると考えられた。そして、本解析結果は、*pgm arg1* 二重突然変異体に EMS により突然変異を誘発し、25G 下で、下側から青色光を照射したときに、根が真上に伸長する *enhancer of pgm arg1* 突然変異が生じている *M₂* 植物を選抜することにより、重力感受分子の突然変異の同定が可能であることを示唆している。

2. 重力応答に影響される植物の形態形成

(1) キュウリ芽生えにおけるペグ形成の重力によるネガティブコントロール (藤井・宮沢・高橋)

発芽直後のキュウリ芽生えは、重力刺激にตอบสนองし、胚軸と根の境界領域にペグと呼ばれる突起を形成する。すなわち、種子を垂直に置いて発芽させると境界領域の両側に 1 個ずつを形成するが、種子を水平置きにして発芽させると境界領域の下側にのみ 1 つのペグを形成する。我々はこれまで、ペグ形成はオーキシンにより誘導されること、水平置き芽生えでは境界領域の上側でオーキシン濃度が減少することでペグ形成が抑制されること、さらに、オーキシン排出阻害剤 TIBA を用いた解析から、境界領域の上下におけるオーキシンの濃度勾配の形成には、

オーキシン排出キャリアが関与している可能性を見出した。そこで本研究では、胚軸と根の境界領域の重力感受細胞である内皮細胞において発現するオーキシン排出キャリア *CsPIN1* の局在パターンを免疫組織化学的に解析した。キュウリの芽生えの境界領域では 4 本の維管束が分化し、その周りに内皮が存在する。垂直置き芽生えでは、ペグが形成される左右両側の内皮における *CsPIN1* の局在パターンが対称であったのに対し、水平置き芽生えでは非対称で、*CsPIN1* はペグ形成が抑制される境界領域上側の内皮細胞の下側に顕著に蓄積していた。そして、この内皮での *CsPIN1* の蓄積の変動は、垂直置きに発芽させた芽生えを横倒し、重力刺激を与えてから 30 分後に認められた。そこで、この内皮での *CsPIN1* タンパク質の蓄積変動がオーキシン分布に与える影響を検討するため、重力刺激後の境界領域のオーキシンを抽出し、HPLC/GC-MS を用いて精製・定量した。その結果、垂直置きに発芽させた芽生えを横倒し、重力刺激を与えてから 30 分後に、境界領域の上下でのオーキシンの偏差分布が認められた。したがって、内皮において発現する *CsPIN1* の膜局在が重力刺激によって制御され、境界領域上側では内皮細胞内からより多くのオーキシンが排出されることでオーキシンの偏差分布が形成され、上側でのペグ形成を抑制する可能性が示唆された。本研究結果により、重力感受細胞である内皮細胞でのオーキシン排出キャリアの重力応答性が初めて明らかになり、重力感受細胞である内皮細胞が重力刺激にตอบสนองしてオーキシン偏差分布を形成する機構の新しい概念を提唱した。それを検証するための宇宙実験を 2011 年 2 月に打ち上げる。

(2) 黄化トウモロコシ芽生えの成長・発達におけるオーキシン極性移動の役割 (上田・宮本)

植物ホルモンの 1 種であるオーキシンは、細胞伸長の促進や老化の阻害など、植物の成長・発達に対して極めて多面的な生理作用を示す。また、オーキシンは極性移動を示し、これが植物の成長・発達と密接に関与していることも示唆されている。オーキシン極性移動とは、オーキシンが植物体の頂端部側から基部側へと一方向に移動する性質で、反極性側および極性側の細胞膜上に存在し、それぞれオーキシン取込み担体や排出担体と考えられている *AUX* タンパク質および *PIN* タンパク質などの働きによる現象であることが示されている。

我々の提案してきた「宇宙環境を利用した植物の重力応答反応機構および姿勢制御機構の解析」が、2010 年度に「きぼう」第 2 期利用後半期間に向けた候補テーマに選定された。同候補テーマにおいて

は、我々は宇宙実験の植物材料として双子葉植物のエンドウ (*Pisum sativum* L. cv. Alaska および *ageotropum*) と単子葉植物のトウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Honey Bantam) を想定している。そこで本研究では、双子葉植物と単子葉植物の成長・発達におけるオーキシン極性移動の重要性に着目し、それらを比較、検証するための宇宙実験系の確立を目指すことを目的として、黄化トウモロコシ芽生えを対象として、分子レベルの側面からの解析も踏まえながら、芽生えの成長・発達に対するオーキシン極性移動の役割を明らかにすることとした。

暗所で生育した黄化トウモロコシ芽生えの幼葉鞘および中胚軸の成長は S 字曲線で示される有限成長であった。その成長は、幼葉鞘にあっては中胚軸との接点に近接する細胞伸長に、また、中胚軸にあっては幼葉鞘に近接する細胞伸長に依存していることが示された。ラノリンペーストに含ませたオーキシン (Indole-3-acetic acid) を幼葉鞘先端に外生的に与えたところ、濃度依存的に幼葉鞘および中胚軸の成長を促進した。このことは、幼葉鞘先端で合成されたオーキシンが極性方向に移動し、幼葉鞘および中胚軸の細胞を伸長させることを示唆している。放射性オーキシン ($[1-^{14}\text{C}]$ indole-3-acetic acid) を用い、従来と同様の方法に従って幼葉鞘および中胚軸のオーキシン極性移動を測定した結果、各々の器官の成長に先立って高いオーキシン極性移動が認められた。トウモロコシ芽生えのオーキシン極性移動に密接に関与していると考えられている *ZmPIN1a* 遺伝子の発現を semi-quantitative RT-PCR によって調べた結果、幼葉鞘および中胚軸で認められる高いオーキシン極性移動に先立ってその強い発現が観察された。

以上の結果から、トウモロコシ種子が吸水すると、幼葉鞘や中胚軸の細胞において速やかにオーキシン極性移動関連遺伝子が発現し、幼葉鞘の頂端部で合成されたオーキシンは極性方向へ移動する。移動したオーキシンの作用により、幼葉鞘や中胚軸の特定領域の細胞が伸長し、芽生えは急速に成長・発達するものと考えられる。今後はオーキシン極性移動関連遺伝子産物、その小胞輸送や細胞膜基底部への配置などを詳細に研究し、植物の成長・発達におけるオーキシン極性移動の役割を明らかにする。

(3) イネ芽生えにおける回旋転頭運動の重力応答依存性 (高橋・宮沢・藤井)

植物の回旋転頭運動は、器官端部の螺旋状の運動で、生存に適した成長方向の決定やつる巻き運動に機能すると考えられる。近年、我々は双子葉植物のアサガオやシロイヌナズナの重力応答異常突然変

異体を用いて、回旋転頭運動に重力応答が必要であることを証明した。一方、単子葉植物における回旋転頭運動と重力応答の関係に関しては知見が乏しい。そこで我々は、イネの重力屈性突然変異体 *lazy1* を用いて、子葉鞘の回旋転頭運動の重力応答依存性を解析した。野生型イネにおいては、子葉鞘が最も成長する時期において回旋転頭運動が観察された。一方、*lazy1* においては、成長量は野生型と有意な差がないのに対し、重力屈性の低下と回旋転頭運動の欠損が観察された。さらに、クリノスタット上では野生型イネにおいても明瞭な回旋転頭運動を観察できなくなり、イネにおいても回旋転頭運動に重力応答を必要とすることが明らかになった。

(4) 根の重力屈性と水分屈性の相互作用 (宮沢・藤井・高橋)

水分屈性は、根が水ポテンシャルの勾配を感受し、水ポテンシャルの高い方に屈曲する現象である。同時に根は、重力屈性も示すため、地球上ではしばしば水分屈性は重力屈性に干渉される。これまでに我々は、シロイヌナズナの水分屈性突然変異体の解析から、根の水分屈性に必須の分子として MIZ1 および MIZ2 を見いだしてきた。今回、我々は MIZ1 過剰発現個体を作成して、その特性を解析した結果、MIZ1 過剰発現体において顕著な水分屈性の促進が認められることを発見した。また、MIZ1 過剰発現個体においては根の重力屈性も低下していたが、クリノスタット上においても MIZ1 過剰発現個体の水分屈性能は野生型より有意に上昇していたことから、MIZ1 過剰発現体で見られた水分屈性の促進は、重力屈性の低下によるのではなく、水分屈性のポジティブレギュレーターである MIZ1 分子の量が増えたことによるものと考えられた。

一方、宇宙環境 (微小重力) を利用して重力屈性と水分屈性を分離し、キュウリの根においてそれぞれのしくみを解明することを目的にした宇宙実験を 2010 年 5 月に打ち上げ、同年 10 月に実施した。

以上の通り、本研究によって植物の重力応答を制御する新たなしくみが明らかになりつつあり、未解明の課題を解決すべく実験系も確立された。また、これまでほとんど研究されてこなかった重力屈性以外の重力形態形成、重力に影響される成長現象のしくみが解明されつつある。さらに、本研究 WG の成果として、現在、2 つ宇宙実験を実施中であり、さらに、もう一つの宇宙実験が候補テーマとして採択され、その実施に向けた準備が進んでいる。