

エチレン非感受性シロイヌナズナ突然変異体の花茎におけるリグニン生合成関連遺伝子の発現に対する過重力刺激の影響

富山大・理・生物 小林麻衣

富山大・院・理工 玉置大介、唐原一郎、神阪盛一郎

Effect of hypergravity stimulus on gene expression related to lignin formation in inflorescence stems of ethylene-insensitive *Arabidopsis* mutant *ein3-1*.

Mai Kobayashi¹, Daisuke Tamaoki², Ichirou Karahara², Seiichiro Kamisaka²

¹Department of Biology, Faculty of Science, University of Toyama, Gofuku, Toyama, 930-8555 Japan

²Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, Gofuku, Toyama, 930-8555 Japan

E-Mail: karahara@sci.u-toyama.ac.jp

Abstract: Our previous studies have shown that hypergravity stimulus inhibits growth, and promotes lignin formation in inflorescence stems of *Arabidopsis* by the up-regulation of genes related to lignin biosynthesis. In the present study, we examined whether ethylene is involved in these responses using ethylene-insensitive *Arabidopsis* mutant *ein3-1*. Our results revealed that hypergravity significantly inhibited growth of inflorescence stems, and promoted gene expression related to lignin formation in inflorescence stems of wild type. Growth inhibition of inflorescence stems was also observed in *ein3-1*. However, the effect of hypergravity on the gene expression was not observed in *ein3-1*, suggesting that ethylene signaling is involved in the up-regulation of the expression of lignin-related genes by hypergravity in *Arabidopsis* inflorescence stems.

Key words; Ethylene, *ein3-1*, Lignin, Hypergravity, *Arabidopsis*

1、序論

陸上植物は1 gの環境下で、重力に抗して生長する。そのために植物は細胞壁を発達させ、進化の過程において重力環境に適した体の強度を獲得してきたと考えられている。このように重力に抗して体作りを行うことは植物の抗重力反応と呼ばれる。細胞壁は一次壁と二次壁からなり、一次壁は細胞が分裂するとともに形成されて、二次壁は分化に伴って形成される。共にセルロースを主成分としているが、二次壁は特徴的な成分であるリグニンを含み、支持構造において特に重要な役割を果たしている。

植物が重力に応じて細胞壁の形成を調節することは一次壁においてまず明らかにされた。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成長が抑制される(Soga et al. 1999, 2001)。一方、微小重力環境下においてはキシログルカンを含む細胞壁多糖類の分子量が減少して、細胞壁の伸展性が増加する(Hoson et al. 2002)。

二次壁に関しては、以前の我々の報告で、過重力刺激(300 g)がシロイヌナズナの花茎においてリグニンの形成および二次壁の発達を促進することが明らかにされている(Tamaoki et al. 2006, Nakabayashi et al. 2006)。

シロイヌナズナの花茎においては、過重力刺激によりオーキシン応答性遺伝子やエチレン応答性遺伝子の発現が上昇することから(Tamaoki et al. 投稿中)、これらの植物ホルモンが過重力刺激による抗重力反応におけるシグナリングを担っている可能性が示唆されている。オーキシンについては、過重力刺激による内生オーキシン量の増加が花茎における抗重力反応に関与している可能性が示唆されている(Tamaoki et al. 2008)が、エチレンとの関わりについてはまだ詳しく調べられていない。

そこで本研究では、シロイヌナズナの花茎における抗重力反応にエチレンが関わるか否かを明らかにすることを目的とした。エチレン非感受性変異体 *ein3-1* を用いて、過重力刺激が花茎の長さ、乾燥重量、横断面積に与える影響を調べた。また、過重力刺激による二次壁におけるリグニン形成の促進にエチレンが関与するかを知るために、過重力刺激を与えた場合のリグニン合成関連遺伝子の発現およびリグニン含量の定量を *ein3-1* を用いて行い、野生型(WT)と比較した。

2、材料と方法

植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh

ecotype Columbia) の WT および *ein3-1* の種子を、試験管に入れたムラシゲ・スクグ寒天培地上に播種し、4°C 3 日間の低温処理後、20-26 日間、23°C で連続白色光下 (130 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) で生育させた。*ein3-1* は Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre から入手した。花茎が 5 mm の長さになった植物体 (Boyes ら(2001) の発達段階の分類によれば Stage No. 5 に相当する。また Smyth ら(1990)の花の発達段階の分類によると Stage 1-12 に相当する。) を選び、遠心機を用いて 25°C の条件で 300 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 g 対照区としては、25°C 暗所で 24 時間静置した。植物体はさらに連続白色光下で 3 日間生育させた。

乾燥重量測定

過重力処理後 3 日後に花茎長を測定し、花茎を切り離して、60°C で一晩乾燥させた。乾燥後、ウルトラマイクロ天秤(SE2, Sartorius, Goettingen, Germany)を用いて花茎の乾燥重量を測定した。

明視野顕微鏡観察と横断面積測定

過重力処理後 3 日間生育させた植物の花茎の基部から 5 mm の長さの切片を切り出し、切片を 5%(w/v) 寒天に包埋した。その後、リニアスライサー PRO7(堂阪イーエム株式会社, 京都, 日本)を用いて、基部から 2.5 mm の部位から 50 μm の厚さの横断切片を切り出し、明視野顕微鏡で観察した。花茎横断面の面積は明視野顕微鏡観察によって得られたデジタル画像から、ソフトウェア Openlab 3.0.2 (Improvision, Coventry, UK) を用いて測定した。

RNA 抽出

Plant RNA Isolation Mini kit (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)を用いて、1 g あるいは 300 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。

Real-time RT-PCR

PCR は ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, US) を用いた。PCR 産物の定量にはインターカレーター法 (SYBR Green を用いた) により行った。RNA の逆転写反応には PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ株式会社, 東京, 日本) を用い、付属のプロトコールに従って行った。PCR 反応は SYBR・Premix Ex Taq iPerfect Real Time (タカラバイオ株式会社, 東京, 日本) を用いて行った。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。

リグニン定量

過重力処理後 3 日後に花茎を切り出し、乾燥重量を測定後、トルエン/エタノール溶液で洗浄し、アセチルプロマイド法によりリグニン定量を行った (Tamaoki et al. 2006)。

3. 結果と考察

まず、過重力刺激が花茎の生長に与える影響にエチレンが関与するか否かを明らかにするために、過重力刺激後の花茎の伸長成長と乾燥重量、および花茎基部横断面の面積を WT と *ein3-1* において測定し比較した。花茎の伸長成長は WT と *ein3-1* 変異体の両方において過重力刺激によって有意に抑制された。その一方で、乾燥重量は WT において過重力処理により有意に増加したのに対し、*ein3-1* 変異体では変化が見られなかった。また、花茎基部横断面の面積は過重力処理により WT で有意に増加し、過重力処理は花茎の中心柱と皮層の横断面積を同程度に増加させることが確認されたが、*ein3-1* 変異体ではこのような花茎の横断面積の増加は見られなかった。これらのことから、過重力刺激による花茎の伸長成長抑制にはエチレンは関与していないが、乾燥重量の増加と花茎基部の横断面の面積の増加にはエチレンが関与しているという可能性が示唆された。

次に、過重力刺激による花茎におけるリグニン形成の促進にエチレンが関与するか否かを明らかにするためにリグニン合成関連遺伝子である *ATPA2*、*C3H*、*C4H* の過重力刺激後の発現を Real-time RT-PCR により解析した。その結果いずれの遺伝子も WT では過重力処理により発現量が増加したが、*ein3-1* では増加しなかった。また、花茎におけるリグニン含量の定量を行ったところ、WT では過重力刺激によるリグニン量の増加が見られたが、*ein3-1* では見られなかった。これらのことから、花茎において過重力刺激によるリグニン形成の促進にはエチレンのシグナリングが関与していることが示唆された。

以前の研究より、過重力刺激によるリグニン形成および二次壁形成の促進は過重力刺激による花茎における内生オーキシン量の増加が仲介することが示されている (Tamaoki et al. 2008)。またオーキシンはエチレン生合成を誘導することが知られていることから (Yang and Hoffman 1984)、過重力処理による内生オーキシン含量の増加がエチレン生合成およびシグナリングを促進し、リグニン形成を促進するとい

う可能性が考えられる。

以上の結果から、シロイヌナズナの花茎において過重力刺激により引き起こされる乾燥重量の増加や横断面の面積の増加、そしてリグニン形成にはエチレンが関与している可能性が示唆された。過重力刺激による花茎における内生オーキシンの増加がエチレン生合成とシグナリングを促進し、これらの抗重力反応を仲介しているという可能性が考えられる。

13) Yoshida S., Kuriyama H., Fukuda H. *Plant Cell Physiol.*, **46(12)**, 2019–2028 (2005)

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) Hoson T., Soga K., Mori R., Saiki M., Nakamura Y., Wakabayashi K., Kamisaka S. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 1067–1071 (2002)
- 4) Mattsson J., Ckurshumova W., Berleth T. *Plant Physiol.*, **131**, 1327–1339 (2003)
- 5) Nakabayashi I., Karahara I., Tamaoki D., Masuda K., Wakasugi T., Yamada K., Soga K., Hoson T., Kamisaka S. *Ann. Bot.*, **97**, 1083–1090 (2006)
- 6) Nakamura T., Sassa N., Kuroiwa E., Negishi Y., Hashimoto A., Yamashita M., Yamada M. *Adv. Space Res.*, **23**, 2017–2020 (1999)
- 7) Nedukha E.M. *Adv. Space Res.*, **17**, 37–45 (1996)
- 8) Soga K., Wakabayashi K., Hoson T., Kamisaka S. *Plant Cell Physiol.*, **40**, 581–585 (1999)
- 9) Soga K., Wakabayashi K., Hoson T., Kamisaka S. *Adv. Space Res.*, **27**, 1011–1016 (2001)
- 10) Tamaoki D., Karahara I., Schreiber L., Wakasugi T., Yamada K., Kamisaka S. *J. Plant Res.* **119**, 79–84 (2006)
- 11) Tamaoki et al., *Space Utiliz. Res.*, **24** 385–387 (2008)
- 12) Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 155–189