

光屈性の重力屈性への干渉作用を利用した実験系によるシロイヌナズナの根の重力屈性突然変異体のスクリーニング

東北大学大学院生命科学研究科 藤井伸治、菅野祐司、山口弘子、宮沢豊、高橋秀幸

Isolation of root agravitropic mutants of Arabidopsis by experiments using interfering effects of phototropism on gravitropism

Nobuharu Fujii, Yuji Kanno, Hiroko Yamaguchi, Yutaka Miyazawa and Hideyuki Takahashi
Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Katahira 2-1-1 Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8577

E-Mail: nobuharu@ige.tohoku.ac.jp

Abstract: It is believed that there are not enough number of mutants available for understanding molecular mechanism of gravity response in root. This is because mutants defective in the signaling pathway of gravity-response display weak defect in gravitropism, which makes difficult to isolate such mutants. To overcome this issue, we used interference of phototropism with gravitropism to screen approximately 100,000 ethylmethanesulfonate (EMS)-mutagenized *M₂* seedlings of Arabidopsis and obtained 44 lines with altered gravitropism. We will present our recent results of genetic analysis of these mutants.

Key words; Arabidopsis, gravitropism, plant, root

【はじめに】

植物は固着性生物でありかつ独立栄養性を有する。約5億年前の植物の陸地環境への進出は、独立栄養性を保証するエネルギー生産である光合成に必要な大気、光の獲得を容易にする一方で、地中に存在する限定された水養分の獲得能力を必要とした。そのために植物は地球上に普遍的に存在する重力を利用して自身を形作る能力を獲得した。すなわち、根や茎は重力受容細胞を有し、重力刺激に誘発されるシグナル伝達系を通して重力屈性を発現させる。これによって植物は水養分の存する土中に根系を発達させ、光と大気の大存在する地上部に茎葉を繁茂させる。植物の有するこの能力が現在の生態系構築の基盤となり、人類をはじめとしてすべての生物のエネルギー生産を可能にしている。したがって、植物の重力応答機構を理解することは、単なる植物の生理現象の理解にとどまらず人類の生存に必要な生態系を保持し、エネルギー生産および環境の確保という観点からも重要かつ不可欠である。

植物の重力応答機構に関して、生理学および近年のシロイヌナズナ重力屈性異常突然変異体を用いた分子遺伝学的解析により、重力受容から屈曲に至る過程が解析されてきた。その結果、根端のコルメラ細胞および茎葉の内皮細胞が重力受容細胞として機能し、その細胞内におけるアミロプラストの沈降が完全な重力屈性の発現に必要であることや、屈性発現に必要な偏差成長には植物ホルモンの1つであるオーキシンの重力依存的な偏差分布が関与することが明らかにされてきた¹⁾。しかしながら、これらの重力応答による成長制御機構の本質的な解明には、重力シグナルを生体情報に変換されていくプロセスを解明することが必要である。現在、アミロプラストの沈降を感受し、そのシグナルを生体情報に変換する機構に関して

は、細胞学的解析から主に以下の2つの仮説が予想されている²⁾³⁾。

- ① 沈降性アミロプラストが細胞の下側に移動することにより、根の重力感受細胞であるコルメラ細胞内に張り巡らされているアクチンフィラメントが引っ張られ、下流のシグナル伝達分子を活性化する。
- ② コルメラ細胞特異的に観察される細胞膜近辺に存在する交差している小胞体を、細胞の下側に移動した沈降性アミロプラストが圧迫し、下流のシグナル伝達経路を活性化する。

この2つの仮説は1970年代に既に提唱されているが、これらのいずれが正しいか、あるいはこれらの仮説以外の機構が植物の重力感受に機能しているかは解明されていない。

生化学的・分子生物学的研究による解明が困難であった植物の生理作用・形態形成を担う遺伝子が、主にシロイヌナズナの突然変異体を用いた分子遺伝学的研究により同定され、その分子機構が解明されるようになった。現在では、シロイヌナズナの全ゲノム塩基配列が解読されるとともに、T-DNA挿入系統等が整備されている⁴⁾。このような分子遺伝学的研究のリソースが整備されていても、未解明の形質を担う分子機構を解明するためには、注目している形質の異常な突然変異体を単離し、これらの突然変異体に注目した分子遺伝学的な解析が必要となる。

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しないため、突然変異体のスクリーニング・遺伝解析のため、突然変異体のスクリーニング・遺伝解析のため

めの効率的な形質評価が行えず、根の重力応答に関する遺伝学的解析が立ち後れている。例えば、デンプンを合成できない *pgm* (*phosphoglucomutase*) 突然変異体や *adg1* (*ADGase small subunit*) 突然変異体では、アミロプラストが細胞の下側に沈降しないが、重力屈性は完全に消失せず、屈曲速度の低下にとどまる⁵⁾⁶⁾。また、シロイヌナズナの *arg1* (*altered responses to gravity 1*), *arl2* (*arg1-like 2*) 重力感受異常突然変異体の根の重力屈性のもまた低下にとどまる⁷⁾⁸⁾。*arg1* 突然変異体と *arl2* 突然変異体の2重突然変異体の重力屈性は、それぞれ単独の突然変異体でのそれと変わらないことから、ARG1とARL2は同一経路で機能していると考えられる⁷⁾。ARG1とARL2はhsp70分子シャペロンと相互作用するタイプII DnaJ様タンパク質であり、この分子と相互作用する分子の存在が示唆されるが、この知見から重力刺激を生体情報に変換する分子機構のモデルを構築するには不十分である。さらに、*pgm-1* 突然変異体と *arg1* 突然変異体、または *arl2* 突然変異体と2重突然変異体を作成すると、さらに重力屈性が低下することから、根の重力感受機構にはアミロプラストの沈降に依存する経路 (PGM経路)と、ARG1/ARL2に依存する経路があることが示唆されている⁸⁾。このように、重力感受は独立した2つの経路により構成されているため、新規な根の重力感受機構が異常な突然変異体単離を単離するためには重力屈性の低下を感度よく検出できるスクリーニング系が必要となる。そこで、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⁶⁾。シロイヌナズナの根は正の重力屈性を発現するとともに、負の光屈性を発現する。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、根は下方向に伸長する。一方、不完全ながら重力屈性が低下している *pgm* 突然変異体では、同じ条件下で、重力屈性に比べて光屈性が強く発現し、根は水平方向から上方向に伸長する。したがって、本実験系を用いることにより、根の重力屈性の低下を感度良く検出でき、新規のシロイヌナズナの根の重力屈性が異常な突然変異体の単離と、その遺伝学的解析が可能になると期待される。本稿では、本実験系を用いて、シロイヌナズナの根の重力屈性突然変異体をスクリーニングした結果を報告する。

【結果と考察】

根は正の重力屈性を示すとともに、負の光屈性を示す。この重力屈性と光屈性との干渉作用を利用し、根の重力屈性が部分的に低下する突然変異体を選

抜するために、重力屈性が部分的に低下している *pgm* 突然変異体を用いて、寒天培地に添加するアガロースの種類と濃度、およびスクロース濃度を変え、下側から光を照射した際の、根の伸長方向を解析した。その結果、1% スクロース、0.25% ゲランガムを含む培地で生育させると、*pgm* 突然変異体の根は光屈性を最も強く発現し、水平方向から上方向に伸長するのに対し、野生型の根は重力屈性を強く発現し、下側に伸長することを見出した。この実験条件を用いて、既存のいくつかのシロイヌナズナの根の重力屈性突然変異体の根の伸長角度を解析した結果、*pgm* 突然変異体に加え、根の重力感受が異常である *arg1* 突然変異体の根でも、光屈性が重力屈性に比較して強く発現した。したがって、本実験系により、*pgm*、*arg1* 突然変異体のような重力感受異常突然変異体が選抜されることが予想された。

そこで、EMSを処理したシロイヌナズナのM₂種子100,000粒を発芽させる際に、下側から光を照射し、72時間、生育させた後、根の光屈性が重力屈性に比べ強く発現し、根が水平方向から上方向に伸長する芽ばえを選抜した (1次スクリーニング)。そして、選抜した芽生えの根を水平になるように寒天培地に移植し、再度、下側から光を照射し、根が水平方向、もしくは水平方向よりも上方向に伸長する628個体の芽ばえを選抜した (2次スクリーニング)。これらのうち後代を採種できた303系統のM₃個体で再現性を検証し、下側からの光照射により根が水平方向、もしくは水平方向よりも上方向に伸長する44系統の芽ばえを選抜した。そして、第5染色体の長腕に突然変異が座上していると予測された系統は、第5染色体の長腕に座上している根の重力屈性が異常な既存の *pgm*、*adg1*、*pin2* 突然変異体との間で相補性試験を行った結果、PGM、ADG1、PIN2遺伝子以外の遺伝子に突然変異を生じていると予測された。今後、本系統に注目した研究を展開することにより、根の重力応答機構に関する新知見が得られると期待される。また、引き続き、遺伝解析を終えていない系統での遺伝解析を行なうことにより、根の重力応答機構の分子ネットワークの構築が可能になると期待される。

【参考文献】

- 1) Morita MT, Tasaka M. Gravity sensing and signaling. (2004) Curr Opin Plant Biol. 7:712-718.
- 2) Björkman T. Perception of gravity by plants. (1988) Advances in Botanical Research. 15: 1-41.
- 3) Perrin RM, Young LS, Murthy UMN, Harrison BR, Wang Y, Will JL, Masson PH. (2005) Gravity

signal transduction in primary roots. *Ann Bot* 96: 737-743.

- 4) Heazlewood JL, Millar AH. (2005) AMPDB: the Arabidopsis Mitochondrial Protein Database. *Nucleic Acids Res.* 33: D605-610.
- 5) Kiss JK, Hertel R, Sack FD. (1989) Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 177: 198-206.
- 6) Vitha S, Zhao L, Sack FD. (2000) Interaction of root gravitropism and phototropism in Arabidopsis wild-type and starchless mutants. *Plant Physiol.* 122: 453-462.
- 7) Sedbrook JC, Chen R, Masson PH. (1999) *ARG1* (*altered response to gravity*) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:1140-1145.
- 8) Guan C, Rosen ES, Boonsirichai K, Poff KL, Masson PH. (2003) *ARG1-LIKE2* gene of Arabidopsis functions in a gravity signal transduction pathway that is genetically distinct from the *PGM* pathway. *Plant Physiol.* 133: 100-112.