

シロイヌナズナの支持組織の細胞壁構築に関与する遺伝子の同定

Identification of genes responsible for cell-wall dynamics in supporting tissues of *Arabidopsis thaliana*

Abstract: Cell wall confers mechanical strength to the plant tissues, and thereby offer support to the aerial portion of the plant body. We have focused our research effort on a set of genes that play important roles in specific aspects of cell wall construction in supporting tissues of the inflorescence stem of *Arabidopsis*. Results from two microarray screenings identified several key candidate genes responsible for cell wall formation in supporting tissues of the inflorescence stem. We examined expression profiles of promoter::GUS fusion constructs for each of the genes. The results indicated that each of the genes exhibited distinct expression patterns in terms of cell specificity. Reverse genetics analysis for function of the genes indicated that glycine-rich protein modifies mechanical strength of the cell wall in protoxylem in basal of the stem, thereby providing a conduit for the translocation of water and nutrients.

Key words: *Arabidopsis*, inflorescence stem, secondary cell wall

概 要

植物は細胞壁の物理的な強度によって自らの体を支えている。我々は、シロイヌナズナ花茎の支持組織の細胞壁構築において重要な役割を担う遺伝子の解析を重点的に進めている。マイクロアレイ法を用いた2種類のスクリーニングによって、花茎支持組織の細胞壁構築に特に重要であると考えられる数種の遺伝子を同定した。プロモーター::GUS形質転換体を用いた細胞レベルでの発現解析では、各遺伝子が独自の細胞特異的発現を有することを明らかにした。また同定された遺伝子について逆遺伝学的な機能解析を行なったところ、グリシンリッチタンパク質が原生木部の細胞壁の構造に関与していて、それ故、木部における物質輸送に必須なものであることを示唆する結果を得た。

1. はじめに

1 g 重力環境下で、植物は立体的な形態を構築するために自重を支える支持組織を形成する。この支持組織の物理的な強度または柔軟性は、個々の細胞を取り囲む細胞壁の性質に依存するものと考えられている。我々は昨年度までの研究で、花茎の支持組織で特異的に高発現し、かつ重力方向の変化に伴い発現変化を示す細胞壁関連遺伝子群を同定した。本年度は、これらの細胞壁関連遺伝子群の発現を細胞レベルで解析することによって、支持組織において物理的強度に貢献している遺伝子と柔軟性等の性質に関与していると考えられる遺伝子の分類を目指した。またこれらの遺伝子が欠損した突然変異体の表現型を解析することにより、遺伝子産物の植物体における機能の解明も試みた。

2. 成果の概要

2.1. 細胞壁関連遺伝子の花茎基部における細胞レベルでの発現解析

2.1.1. 材料および方法

材料は全て実験植物であるシロイヌナズナを用いた。昨年度までにマイクロアレイ法で同定した、花茎基部で高発現を示し、かつ重力方向の変化に伴い発現変化を示す 16 種類の細胞壁関連遺伝子（表 1）の 5' 上流のプロモーター領域（2 ～ 3 kb）をゲノム DNA より PCR 法によって増幅し、サブクローニングした後、下流にレポーター遺伝子である β -グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子を連結した（図 1）。このキメラ遺伝子を、バイナリーベクターにクローニングした後、アグロバクテリウムを介した、形質転換法によって薬剤耐性遺伝子とともにシロイヌナズナ植物体に導入した。抗生物質を用いた選抜によって形質転換体を単離し、これを解析に用いた。形質転換体の花茎（8 cm）の基部を組織固定した後、VIBRATOME を用いて横断切片（70 μ m）にして、GUS の基質である 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid (X-Gluc) を与え、発色部位を正立顕微鏡で観察した。同様に形質転換体の各器官（花、葉、根）の遺伝子発現解析も行った。

2.1.2. 結果

形質転換体を用いて遺伝子発現の解析を行った 16 種類の細胞壁関連遺伝子の全てが、それぞれ固有の発現プロファイルを有していた。このうちセルロース合成やリグニン代謝に関与するセルロース合成酵素遺伝子やペルオキシダーゼ遺伝子は [1]、花茎基部の維管束や維管束間繊維組織で特に強い発現を示していた。またこれらの遺伝子は、二次壁の構築やリグニン合成が見られる花器官や葉の維管束組織においても発現が確認された。 β -1,3-グルカナーゼ、ペクチナーゼ、グリシンリッチタンパク質は、花茎基部の特定の細胞または組織に発現を示した。特にペクチナーゼに関しては、細胞壁の肥厚や硬化が起こらない内皮組織のみで特異的に発現しており、花茎組織の強度以外の特性（柔軟性）に関与している可能性を示す結果となった。

表 1 プロモーター::GUS 形質転換体によって発現解析を行なった細胞壁関連遺伝子

遺伝子ファミリー名	遺伝子名
β -1,3-glucanase	BGL2
β -1,4-glucanase	CEL2
Cellulose synthase	IRX3
	IRX5
Chitinas	CTL2
Galactosidase	BGAL4
Glycine-rich protein	GRP
Laccase	Lac1
	IRX12
	Lac17
Pectinesterase	PMT61
Peroxidase	PER42
	PER64
Polygalacturonase	PG20
	PG43

細胞壁関連遺伝子の5'上流プロモーター領域



図1 プロモーター::GUS 融合遺伝子の模式図

2.2. 突然変異体の解析

2.2.1. 材料および方法

公開されている Salk Institute Genomic Analysis Laboratory のシロイヌナズナ T-DNA タグラインより、花茎の横倒しによって発現が抑制された細胞壁関連遺伝子に T-DNA が挿入されていると考えられる突然変異体のラインを入手して、このうち 7 ラインについてホモジェニアスな突然変異体を分離して、花茎の生長や横倒し時の屈曲パターン、さらに組織形態についての解析を行なった。分離した各突然変異体の花茎の形態を観察するとともに、花茎の切片を作成して組織を観察した。また T-DNA 突然変異体において形態変化を引き起こしたグリシンリッチタンパク質 (GRP) については間接蛍光抗体法や GRP プロモーター::GFP 形質転換体を用いて、タンパク質の局在部位の解析を行なった。また GRP が木部の輸送機能に関与している可能性が示されたため、無機栄養素の T-DNA 突然変異体へ過剰投与によって、輸送機能の低下により生じること考えられる突然変異体の表現型が相補できるかを実験した。

2.2.2. 結果

7 種類の遺伝子のホモジェニアスな突然変異体について、花茎の形態や生長パターンを観察したところ、6 種類の突然変異体については野生型の植物との違いは確認できなかった。また横倒し時の屈曲パターンや組織細胞の形態的な変異は確認されなかった。一方、構造タンパク質の一種であるグリシンリッチタンパク質 (GRP) をコードしている遺伝子の T-DNA 突然変異体については、花茎において顕著な形態変化が認められた。grp 突然変異体は、花茎の抽台までは野生型植物との形態的な違いは観察されなかったが、花茎の伸長に伴い花茎の上部組織が枯死することが確認された。間接蛍光抗体法や GRP プロモーター::GFP 形質転換体を用いて、GRP タンパク質の局在部位の解析を行なったところ、GRP タンパク質は突然変異体で形態変異が認められた花茎上部組織では発現していなく、花茎基部の原生木部の管状要素 (道管) の細胞壁に局在していることが確認された。この結果より、grp 突然変異体の花茎上部で表現型は、GRP タンパク質の欠損によって花茎基部の道管の輸送機能が低下したことによるものではないかと考えられた。そこで grp 突然変異体に過剰の無機栄養素を投与したところ、花茎上部で表現型は部分的に相補されることが確認された。

3. まとめ

シロイヌナズナの花茎基部の支持組織は、花茎の横倒しによって、増大する花茎上部の重さから解放される。このことから、花茎の支持組織で高発現している細胞壁関連遺伝子のうち、花茎を横倒しにすることによって発現が抑制される細胞壁関連遺伝子は、花茎上部の重さというシグナルを直接受け取り、その重さを支えるための細胞壁を構築するキー遺伝子であるのではないかと考えられた [2]。しかしながら、花茎は多様な細胞タイプから成る組織であり、細胞壁の肥厚や硬化によって支えるための強度に貢献する細胞もあれば、強度には貢献せずに特定の機能をもつ細胞なども存在する。そこで選抜された細胞壁関連遺伝子について、花茎基部における細胞レベルでの発現解析を行い、細胞壁が肥厚や硬化する細胞で発現しているのか、あるいは特殊な機能をもつ細胞で発現しているか等を解析した。この結果、セルロース合成遺伝子、キチナーゼ遺伝子、ペルオキシダーゼ遺伝子が、花茎基部において二次細胞壁の構築やリグニン化がみられる維管束や維管束間繊維組織で高発現していることが明らかになり、これらの遺伝子が、花茎の支持組織の強度に直接貢献するものであることが期待された。一方で、本研究においては、これらの遺伝子が欠損した突然変異体の形態的变化等を確認できなかった。解析した遺伝子のほとんどが遺伝子ファミリーを形成していることから [3]、幾つかの遺伝子が機能を重複しているものと推定している。今後、二重あるいは三重突然変異体を作成することによって、花茎基部の支持組織におけるこれら遺伝子産物の役割が証明されることが期待される。

GRP 遺伝子が欠損した突然変異体は、花茎上部組織の枯死という表現型を示した。GRP タンパク質は花茎基部の管状要素 (道管) の細胞壁に限られていることから、grp 突然変異体では GRP 欠損によって花茎基部の道管機能に障害が起こり、上部組織への物質輸送が滞っているものと推測された。もしこの仮説が正しいのであれば、過剰の無機栄養素を投与することによって、上部組織への無機栄養素量が補填でき、grp 突然変異体の花茎上部で表現型を抑えることができるのではないかと考え、過剰の無機栄養素の投与実験を行なった。この結果、grp 突然変異体の花茎上部で表現型を部分的に抑制することができ、GRP タンパク質が花茎基部の道管の輸送機能に関与するという仮説は支持され

た。今後は花茎基部の管状要素の細胞壁における GRP の具体的な役割を解明していく。

4. 成 果 発 表

4.1. 学術論文

- [1] Osato Y, Yokoyama R and Nishitani K, “A principal role for AtXTH18 in *Arabidopsis thaliana* root growth - a functional analysis using RNAi plants”, *J. Plant Res.*, 119, 153-162, 2006.
- [2] Yokoyama R and Nishitani K, “Identification and characterization of *Arabidopsis thaliana* genes involved in xylem secondary cell walls”, *J. Plant Res.*, 119, 189-194, 2006.
- [3] Suzuki H, Takahashi S, Watanabe R, Fukushima Y, Fujita N, Noguch A, Yokoyama R, Nishitani K, Nishino T and Nakayama T, “An isoflavone conjugate-hydrolyzing beta-glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings. Purification, gene cloning, phylogenetics and cellular localization”, *J. Biol. Chem.*, 281, 30251-30259, 2006.
- [4] Yoshida K, Imaizumi N, Kanako S, Kawagoe Y, Tagiri A, Tanaka H, Nishitani K and Komae K, “Carbohydrate binding module of a rice endo-b-1,4-glucanase OsCel8-1 expressed in auxin-induced lateral root primordial is posttranslationally truncated”, *Plant Cell Physiol.*, 47, 1555-1571, 2006.
- [5] Nishitani K, “A brief history of the XTH gene family”, In *The Science and Lore of the Plant Cell Wall: Biosynthesis, Structure and Function*. ed. Hayashi T., Brown Walker Press, pp. 148-154, 2006.
- [6] 西谷和彦, “植物細胞壁の構造と機能-比較ゲノムからのアプローチ”, *植物の生長調節*, 41, 34-45, 2006.
- [7] 倉澤香澄, 横山隆亮, 西谷和彦, “「プラントミメティックス-植物に学ぶ」第1章 細胞壁と細胞 第一節 植物細胞壁構造の多様性と動態-ゲノム情報からのアプローチ”, (株) エヌ・ティー・エス, pp. 272-278, 2006.
- [8] Nishitani K and Vissenberg, “Roles of the XTH protein family in the expanding cell”, In *The Expanding Cell* ed. by Jean-Pierre Verbelen Springer, pp. 89-116, 2006.

4.2. 学会発表

- [1] 倉澤香澄, 松井章浩, 斎藤圭, 横山隆亮, 西谷和彦, “シロイヌナズナのエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) 遺伝子ファミリークラス III に属するメンバーの発現と機能の網羅的解析”, 第 47 回日本植物生理学会年会, 2006 年 3 月, 筑波.
- [2] 横山隆亮, 西谷和彦, “シロイヌナズナの道管形成に関与するグリシンリッチタンパク質の機能解析”, 第 47 回日本植物生理学会年会, 2006 年 3 月, 筑波.
- [3] Imoto K, Kwon HK, Yokoyama R and Nishitani K, “Genomic and Proteomic Approaches to Cell Wall Dynamics in *Arabidopsis*”, The 53rd NIBB Conference, June 2006, Okazaki.
- [4] Nishitani K, Gordon Research Conference on Plant Cell Wall, July 2006, New England.
- [5] Kurasawa K, Yokoyama R and Nishitani K, “Functional analysis for the XTH family of genes in *Arabidopsis thaliana*”, 8th international congress of plant molecular biology, Aug 2006, Adelaide.
- [6] Yokoyama R and Nishitani K, “Functional analyses of an *Arabidopsis* glycine-rich protein involved in physical properties of xylem cell wall”, 8th international congress of plant molecular biology, Aug 2006, Adelaide.
- [7] 横山隆亮, 西谷和彦, “シロイヌナズナのグリシンリッチタンパク質の機能解析”, 日本植物学会 70 回大会, 2006 年 9 月, 熊本.
- [8] 倉澤香澄, 横山隆亮, 西谷和彦, “シロイヌナズナの生殖器官形成の過程における XTH の役割”, 日本植物学会 70 回大会, 2006 年 9 月, 熊本.
- [9] 西谷和彦, “国際宇宙ステーションで実施予定の宇宙実験「CELL-WALL」の概要”, 日本宇宙生物科学会第 20 回大会, 2006 年 9 月, 大阪.
- [10] 西谷和彦, “植物細胞壁タンパク質解析に向けたプロテオームとトランスクリプトームの融合”, 第 2 回シンポジウム植物プロテオーム研究の最前線, 2006 年 11 月, 筑波.
- [11] 野上三貴, 星野真紀子, 木下芳子, 井本桂子, 横山隆亮, 西谷和彦, “シロイヌナズナにおいて細胞成長に関与する細胞壁関連遺伝子群の解析”, 日本植物学会東北支部第 19 回大会, 2006 年 12 月, 青森.
- [12] 原吉直, 横山隆亮, 西谷和彦, 石澤公明, “ヒルムシロ殖芽の嫌気耐性における H⁺-ATPase の役割解析”, 日本植物学会東北支部第 19 回大会, 2006 年 12 月, 青森.
- [13] 原田太郎, 横山隆亮, 西谷和彦, 石澤公明, “水生植物ヒルムシロ殖芽の特異な無酸素応答-サブトラクション法で単離した発現が上昇する遺伝子の解析-”, 日本植物学会東北支部第 19 回大会, 2006 年 12 月, 青森.

5. 参考文献

- [1] Brown DM, Zeef LAH, Ellis J, Goodacre R and Turner SR, "Identification of Novel Genes in Arabidopsis Involved in Secondary Cell Wall Formation Using Expression Profiling and Reverse Genetics", *Plant Cell*, 17, 2281-2295, 2005.
- [2] Yokoyama R and Nishitani K, "Identification and Characterization of Arabidopsis thaliana Genes Involved in Xylem Secondary Cell Walls", *Journal of Plant Research*, 119, 189-194, 2006.
- [3] Yokoyama R and Nishitani K, "Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and *Arabidopsis*", *Plant and Cell Physiology*, 45, 1111-1121, 2004.