

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 isolated novel amino acid substitution mutants defective in formation of cortical microtubules (*lefty* & *spr*) in the Columbia background. The mutant defective in synthesis of membrane sterols (*hmg*) in the Columbia background was also produced by crossing the WS background mutant with wild type Columbia. In addition, we designed new software and interface for measuring the mechanical properties of the cell walls, suitable for space experiments.

Keywords : *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、宇宙実験に適したColumbiaエコタイプの突然変異体を作成した。表層微小管の形成に関わる変異体に関しては、チュブリン遺伝子の1アミノ酸置換に起因し、表層微小管の配向が右巻きになって細胞が左巻きにねじれる *lefty* 変異体 15 系統、及び微小管が左巻きに配向し細胞が右巻きにねじれる *spiral(spr)* 変異体 25 系統を、Columbiaエコタイプより新たに選抜した。一方、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* (WSエコタイプ) に関しては、戻し交雑によりColumbiaバックグラウンドに置き換えた。また、細胞壁物性測定用の引っ張り試験機を更新するとともに、プログラムを改良して、宇宙実験に適した測定条件を設定した。

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. 宇宙実験に適したシロイヌナズナ突然変異体の選抜

シロイヌナズナはエコタイプによって表現型が大きく異なる。そのため、変異体を用いた解析を行う際には、その変異体に対応する野生型を対照とする必要がある。宇宙実験においては、実験の機会やリソースに厳しい制限があるため、エコタイプを統一することが求められる。エコタイプの様々な特性を考慮すると、Columbiaを標準とするのがベストであると考えられる。

表層微小管の構築に関わる適度な突然変異体を得るため、まず、Lerエコタイプの植物体をEMS処理し、得られたM2世代より植物体の構築や長軸方向の成長にゆがみを生じた突然変異系統の単離を行った。得られた変異系統の原因遺伝子をマップベース・クローニングにより同定したところ、その一部はチュブリン遺伝子の1アミノ酸置換に由来することがわかった。そこで、次に、Columbiaエコタイプの植物体を用いて同様の解析と単離を行った。特に、微小管脱重合剤であるプロピザマイドに高感受性を示し、低濃度処理によって根の形態に顕著な変異を示す系統を重点的に選抜した。その結果、微小管の配向が右巻きになり細胞が左巻きにねじれる*lefty* 変異体15系統と、微小管が左巻きに配向し細胞が右巻きにねじれる*spiral(spr)* 変異体25系統を新たに選抜した。その原因遺伝子の解析によって、このような変異が α -チュブリン及び β -チュブリン遺伝子の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。

原形質膜の構築や機能に関わる突然変異体のうち、本研究の目的にもっとも合致するのは、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 *hmg1* 変異系統のエコタイプはWSであった。そこで *hmg1* のバックグラウンドをColumbiaに置換するために、*hmg1* の戻し交雑を行った。これまでに、合わせて5世代の戻し交雑を行った結果、理論上、 $[1 - (1/32)] \times 100 = 96.9\%$ のゲノムがColumbiaに置き換わったことになる。さらにもう一世代、戻し交雑を行っている。

2.2. 宇宙実験に適した細胞壁物性測定条件の確立

宇宙実験で得られる植物試料には限りがあるため、最小限の試料で最大限の成果を得る必要がある。抗重力の最終的な反応である細胞壁物性の変化を解析するための引っ張り試験では、従来、測定値の試料毎のばらつきが避けられなかった。そこで、荷重計測精度が高い新鋭万能試験機 (TENSILON RTE-1210) を新たに導入した。これにより、測定に必要な試料数を半分以下に減らすことが可能になった。

植物細胞壁物性の測定によく使われる方法は、荷重一伸び解析法と応力緩和法である。従来は、別々の試料について2つの方法を適用していた。宇宙実験で得られる植物試料を効率よく使用するため、同じ試料に両方法を連続的に適用するプログラムとインターフェイスを開発した。その結果、同一試料から、全コンプライアンス、粘性率、弾性率、最小緩和時間、応力緩和速度などのパラメータを得ることが可能になった (図1)。プログラムはまだ完全ではないが、これを用いることにより、宇宙実験に適した測定条件の設定が容易になった。

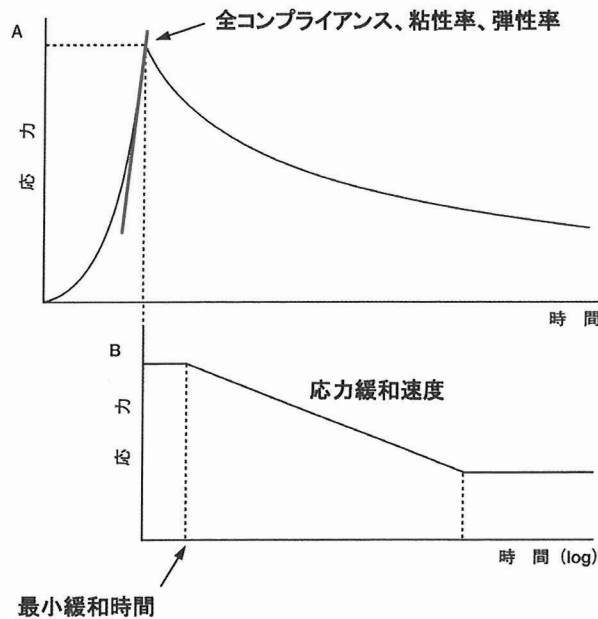


図1 植物細胞壁物性の測定法と得られるパラメータ

3. まとめ

本年度の研究において、宇宙実験により適したColumbiaエコタイプのシロイヌナズナ突然変異体を作成した。表層微小管の形成に関わる変異体に関しては、チュプリン遺伝子の1アミノ酸置換に起因する *lefty* 変異体15系統と *spr* 変異体25系統をColumbiaエコタイプより新たに選抜した。一方、WSエコタイプの *hmg* 変異体に関しては、戻し交雑によりColumbiaバックグラウンドに置き換えた。これによって、共通の野生型を対照として、宇宙の微小重力環境における変異体の成長変化を統一的に解析することが可能になった。また、細胞壁物性測定用の引っ張り試験機を更新して必要試料数を減らすとともに、測定プログラムとインターフェイスを、荷重-伸び解析法と応力緩和法を同一試料について連続的に適用できるように改良した。その結果、最小限の試料で効率的な解析ができるようになった。

本研究で計画している宇宙実験では、植物育成容器として、MULTIGEN-1実験用に開発されたPCC(Plant Cultivation Chamber)を用いる。そのため、PCCの環境に合わせて、適切な播種数、給水方法、培地 (ZeoponiXなど) 等の育成条件を設定する必要がある。また、植物育成チェンバーであるEMCS (European Modular Cultivation System) では、2種類の光強度しか設定できないので、この条件下での各変異体の生育を確認しなければならない。さらに、試料回収に関しては、KFT (Kennedy Fixation Tube)とRNAlaterを用いた試料保存手順と試料凍結条件 (温度等) を確定する予定である。

成果発表

学術論文

- [1] Hoson, T., Saito, Y., Soga, K., Wakabayashi, K. "Signal perception, transduction, and response in gravity resistance. Another graviresponse in plants." *Adv. Space Res.*, 36, 1196-1202, 2005
- [2] Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Hoson, T. "Hypergravity inhibits elongation growth of azuki bean epicotyls independently of the direction of stimuli." *Adv. Space Res.*, 36, 1269-1276, 2005
- [3] Wakabayashi, K., Soga, K., Kamisaka, S., Hoson, T. "Changes in levels of cell wall constituents in wheat seedlings grown under continuous hypergravity conditions." *Adv. Space Res.*, 36, 1292-1297, 2005
- [4] Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Hoson, T. "Mechanoreceptors rather than sedimentable amyloplasts perceive the gravity signal in hypergravity-induced inhibition of root growth in azuki bean." *Funct. Plant Biol.*, 32, 175-179, 2005

- [5] Wakabayashi, K., Soga, K., Kamisaka, S., Hoson, T. "Increase in the level of arabinoxylan-hydroxycinnamate network in cell walls of wheat coleoptiles grown under continuous hypergravity conditions." *Physiol. Plant.*, 125, 127-134, 2005
- [6] Saiki, M., Fujita, H., Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Yamashita, M., Hoson, T. "Cellular basis for the automorphic curvature of rice coleoptiles on a three-dimensional clinostat: Possible involvement of reorientation of cortical microtubules." *J. Plant Res.*, 118, 199-205, 2005
- [7] Nakabayashi, I., Karahara, I., Tamaoki, D., Masuda, K., Wakasugi, T., Yamada, K., Soga, K., Hoson, T., Kamisaka, S. "Effects of hypergravity stimulus on primary xylem development and mechanical properties of secondary cell walls in inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana* L." *Ann. Bot.*, in press
- [8] 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

学会発表

- [1] 保尊隆享, 曾我康一, 若林和幸 "植物のもう一つの重力反応: 抗重力" 日本植物学会第69回大会 2005年9月 富山
- [2] 曾我康一, 若林和幸, 神阪盛一郎, 保尊隆享 "植物の抗重力反応—メカノレセプターを介した表層微小管の配向調節—" 日本植物学会第69回大会 2005年9月 富山
- [3] 曾我康一, 若林和幸, 神阪盛一郎, 保尊隆享 "過重力環境下におけるアズキXTH遺伝子の発現変化" 日本宇宙生物科学会第19回大会 2005年9月 東京
- [4] 小泉朋子, 曾我康一, 若林和幸, 鈴木優志, 村中俊哉, 保尊隆享 "植物の抗重力反応における膜ステロールの役割" 日本宇宙生物科学会第19回大会 2005年9月 東京
- [5] 中林いづみ, 唐原一郎, 玉置大介, 増田恭次郎, 曾我康一, 保尊隆享, 神阪盛一郎 "シロイヌナズナの花茎における木部の発達に過重力刺激が与える影響" 日本宇宙生物科学会第19回大会 2005年9月 東京
- [6] Hoson, T. "Role of microtubule-membrane-cell wall continuum in gravity resistance in plants." *Biology IWG Meeting October 2005 ESTEC, ESA, Noordwijk*
- [7] 保尊隆享, 神阪盛一郎, 高橋秀幸, 山下雅道, 飯田秀利, 村中俊哉, 橋本 隆, 園部誠司, 谷本英一, 西谷和彦, 小竹敬久, 若林和幸, 曾我康一 "植物の抗重力反応解明研究班WGの活動報告" 第22回宇宙利用シンポジウム 2006年1月 東京
- [8] 曾我康一, 新井邦典, 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キシログルカン代謝の調節" 第22回宇宙利用シンポジウム 2006年1月 東京
- [9] 曾我康一, 新井邦典, 若林和幸, 神阪盛一郎, 保尊隆享 "遠心過重力環境下におけるアズキ上胚軸のキシログルカン代謝の変化" 日本植物生理学会2006年度年会 2006年3月 筑波
- [10] 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" 日本植物生理学会2006年度年会 2006年3月 筑波

参 考 文 献

- [1] Hoson, T., Soga, K. "New aspects of gravity responses in plant cells." *Int. Rev. Cytol.*, 229, 209-244, 2003
- [2] Hoson, T., Saito, Y., Soga, K., 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