

平成 20 年 3 月 28 日

平成 19 年度「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—」活動報告書

東北大学大学院生命科学研究科 高橋秀幸

1. 構成メンバ

氏 名	所属
高橋秀幸	東北大学大学院生命科学研究科
上田純一	大阪府立大学理学系研究科
田坂昌生	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科
保尊隆享	大阪市立大学大学院理学研究科
神阪盛一郎	富山大学理学部
山下雅道	宇宙航空研究開発機構宇宙科学 研究本部
北宅善昭	大阪府立大学大学院生命環境 科学研究科
藤井伸治	東北大学大学院生命科学研究科
宮本健助	大阪府立大学総合教育研究機構
村田 隆	基礎生物学研究所
金子康子	埼玉大学理学部
鎌田源司	宇宙航空研究開発機構宇宙科学 研究本部
曾我康一	大阪市立大学大学院理学研究科
宮沢 豊	東北大学大学院生命科学研究科

2. 本年度 WG 会合開催実績

- (1) 第 1 回：平成 19 年 12 月 4 日
 - (2) 第 2 回：平成 20 年 1 月 18 日
 - (3) 第 3 回：平成 20 年 3 月 6-13 日*
- * 航空機実験

3. 活動目的

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、生命維持システム、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、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。そのため、とくに本年度は、この植物の重力応答における重力受容・シグナル伝達機構を解明すべく研究を継続するとともに、重力依存的成長現象、それに機能するオーキシン輸送機構に関する解析を行った。

4. 活動内容

本年度は、植物の重力受容とシグナル伝達に機能すると考えられる新規遺伝子の機能について討論をすすめるとともに、他の植物関連の研究班 WG とも連携し、宇宙実験の実現に向けた課題と共同研究の可能性を議論した。また、重力受容を支配するシグナル伝達機構を明らかにするために、新規の重力屈性突然変異体を単離し、その変異原因遺伝子を同定するとともに、これらの分子の機能解析をすすめた。さらに、重力応答と相互作用する自発形態形成ならびに水分屈性に重要な役割を果たすオーキシン排出キャリアを明らかにするとともに、重力応答による頂芽優勢の打破に働く新規の分子機構の存在を見いだした。

植物の重力感受とシグナル伝達機構

(1) 突然変異体を用いたシュートの重力受容機構の解析

これまで、地上部の茎の重力屈性の分子機構を調べるために、シロイヌナズナの花茎が重力屈性異常を示す突然変異株 *shoot gravitropism(sgr) 1-9* を単離し解析してきた。本年度は、*SGR5* が *C2H2* タイプの Zn フィンガーとコイルドコイルドメインを含むタンパク質をコードしており、転写因子として機能し、*SGR9* がリングフィンガードメインを含むタンパク質をコードしており、ユビキチンライゲースの E3 サブユニットである可能性を明らかに

した。これらの遺伝子は内皮細胞で発現し、それらの変異株 *sgr5-1*、*sgr9-1* の花茎は弱い重力屈性能を示す。そして、それぞれの遺伝子を内皮細胞特異的に導入すると重力屈性能が正常に戻ることから、これらの遺伝子の内皮細胞における機能が重力屈性に重要なことがわかった。これらの変異株の交雑によって *sgr5-1sgr9-1* 二重変異株を作成すると、その変異株は全く重力屈性を示さなかった。これは、これらの遺伝子が相互に補完的に働くことを示唆する。

次に、生きている花茎の内皮細胞でアミロプラストの分布と動き、さらに液胞の動態を連続観察した。野生型の内皮細胞でアミロプラストの多くは重力方向（細胞の下側）に位置し、そこでダイナミックに動き回る。それに対して、*sgr5-1* と *sgr9-1* の内皮細胞の中でアミロプラストは細胞内にほぼ均一に分布し、そこで野生型に比べると少し運動性は落ちるが活発に動いていた。それに対して、*sgr5-1sgr9-1* の内皮細胞では、アミロプラストは細胞内に分散しており、運動性が大きく落ちていた。そして、いくつかのアミロプラストが固まって同じようなゆっくりとした動きを示す場合が多くみられた。液胞が異常な *sgr2-1* や *zig-1* では、アミロプラストは細胞壁に張り付くようにして内皮細胞の上下に分散して存在し、ほとんど運動しない。このことから、*sgr5-1sgr9-1* が重力屈性を示さないのはアミロプラストの運動性の低下と関連する可能性が示唆された。

機能を相補する SGR5-GFP タンパク質は核に存在し、このタンパク質が転写因子として機能する可能性が指示された。一方、SGR9-GFP タンパク質は変異株の機能を相補できるが、細胞内での存在を観察できない。しかし、リングフィンガー中の保存されたアミノ酸に点変異を入れた変異型 GFP 融合タンパク質は野生株の内皮細胞においてアミロプラストに局在した。そして、この形質導入植物は *sgr9-1* と同様な重力屈性異常を示すことから、このタンパク質がドミナントネガティブな影響を与えたことが示唆された。このタンパク質は色素体移行シグナルを持たないことから、アミロプラストの外部近傍に存在し E3 ライゲースとして機能する可能性が示唆される。これらの結果は、SGR5 と SGR9 は液胞を介することなくアミロプラストの存在様式やダイナミズムに関与し、重力感受に関わることを示唆している。

(2) 根の重力屈性新規突然変異体の単離とその変異原因遺伝子の同定による重力受容機構の解明

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。このことは、これまでに重力感受が独立した、少なくとも 2 つの経路により構成されていることが報告されているからも裏付けられている。そこで、この問題を克服するために、シロイヌナズナの根の重力屈性と光屈性との干渉作用を利用した実験系を用い、本研究では、これまでに根の重力屈性の低下した 44 系統の突然変異体を選抜することに成功した。それらの変異遺伝原因遺伝子のマッピング並びに、それら突然変異系統と既知の重力屈性突然変異体との相補性試験により、新規の重力屈性突然変異体である可能性の大きい系統を得た。この突然変異体の新規性を検証するとともに、その変異原因遺伝子の解析をすすめている。

植物の重力依存的形態形成を制御するオーキシン輸送機構

(1) エンドウ芽生えの自発的形態形成を制御するオーキシン輸送

宇宙微小重力環境下で認められる黄化エンドウ芽生え上胚軸の自発的形態形成は、吸水後の子葉節基部での上胚軸の「負の重力屈性」が阻害された結果であることが明らかにされた。さらに上胚軸の「負の重力屈性」の阻害は、芽生えの初期成長段階での子葉側、反子葉側上胚軸におけるオーキシンの不均等分布の阻害に起因することが示された。そこで本年度は、正常な重力応答反応を示す Alaska エンドウならびに重力応答突然変異体である *ageotropum* エンドウを用いて、その成長、発達に対する重力刺激ならびにオーキシン極性移動阻害剤の影響を詳細に検討した。

その結果、黄化エンドウ芽生え上胚軸における負の重力屈性（正常な重力応答反応）は、上胚軸子葉側のオーキシン極性移動によって制御されていること、また、その極性移動能に応じて変化する上胚軸子葉側および反子葉側の内生オーキシンレベルが重要であることが示唆された。さらに上胚軸におけるオーキシン極性移動のみならず、上胚軸子葉側から反子葉側へのオーキシンの（横）移動にはオーキシンの排出キャリアである PsPIN2 が重要な役割を担うものと推察された。

(2) キュウリ芽生えの重力形態形成を制御するオーキシン排出キャリア

ウリ科植物の芽生えは、茎と根の境界域の子葉面に一個ずつのペグを発達させる能力を有するが、地上では重力に応答して上側になった境界域のペグ形成を抑制する。そのとき重力感受がペグ形成・非形成領域のオーキシンの取り込みキャリアと排出キャリアの局在および発現バランスに作用してオーキシンの組織内分布や細胞内濃度を制御し、その結果として、偏差的なオーキシン応答が誘発される可能性を示してきた。本年度は、抗CsPIN1抗体を作成し、CsPIN1の役割をタンパク質レベルで解析した。その結果、CsPIN1は、オーキシンの維管束系を通った子葉側から基部（根側）への極性輸送を担うだけでなく、内皮細胞を介したオーキシンの横輸送に機能すること、さらに、茎と根の境界域にある4本の維管束における不均等なCsPIN1タンパク質の局在が重力刺激によって誘導され、ペグ非形成側（上側）に輸送されるオーキシン量が少なくなることが示された。

（3）根の水分屈性を制御するオーキシン排出キャリア

根は重力に応答して重力屈性を発現するだけでなく、水分勾配を感受して水分屈性を発現する。

本年度は、キュウリの水分屈性実験系を用い、水分屈性におけるオーキシン輸送の果たす役割とその機構を明らかにすることを目的とし、水分屈性に対するオーキシン輸送阻害剤の影響、ならびに、植物体内のオーキシン輸送を制御しているオーキシン排出担体のPINタンパク質の水分屈性の発現に伴う動態変化を解析した。その結果、水分屈性は、オーキシン作用阻害剤であるPCIB (*p*-Chlorophenoxyisobutyric acid)処理、オーキシン排出阻害剤であるTIBA (2,3,5-Triiodobenzoic acid)処理およびHFCA (9-Hydroxyfluorene-9-carboxylic acid)処理によって著しく低下することがわかった。また、これまでに単離したキュウリのオーキシン排出キャリアの中から、側方根冠、表皮、皮層で特異的にmRNA発現が認められるCsPIN5に着目し、抗CsPIN5抗体を作成し、免疫組織化学的な解析を行った。その結果、CsPIN5は、側方根冠および表皮細胞内で根の基部側の原形質膜に偏在しており、根冠から伸長領域に向けた求基本的なオーキシン輸送を担うことが示唆された。さらに、水分勾配刺激後、高水分側に比べ、低水分側で顕著なCsPIN5のシグナルの低下が認められ、これはウェスタンブロットによる解析でも同様であった。したがって、水分勾配刺激によって、オーキシン排出キャリアであるCsPIN5の動態が変化し、その蓄

積量が低水分側で低下することで、伸長領域でのオーキシンの不均等分配が引き起こされると考えられた。

根の水分屈性に関する宇宙実験の準備として航空機実験を実施した結果、重力変動が水分勾配に大きな影響を及ぼさないことが示唆された。

5. 成果

ここには、平成19年度の活動成果として発表した原著論文をリストする（学会発表等は省略）。

- Fujii N, Saito Y, Miyazawa Y, Takahashi H (2007) Light inhibits gravity-regulated peg formation and asymmetric mRNA accumulation of auxin-inducible CsIAA1 in the cortex of the transition zone in cucumber seedlings. *Adv Space Res* 39: 1147-1153
- Hoshino T, Miyamoto K, Ueda J (2007) Gravity-controlled asymmetrical transport of auxin regulates a gravitropic response in the early growth stage of etiolated pea (*Pisum sativum*) epicotyls: studies using simulated microgravity conditions on a three-dimensional clinostat and using an agravitropic mutant, *ageotropum*. *J Plant Res* 120: 619-628
- Kaneyasu T, Kobayashi A, Nakayama M, Fujii N, Takahashi H, Miyazawa Y (2007) Auxin response, but not its polar transport, plays a role in hydrotropism of *Arabidopsis* roots. *J Exp Bot* 58: 1143-1150
- Kitazawa D, Miyazawa Y, Fujii N, Nitasaka E, Takahashi H (2008) Characterization of a novel gravitropic mutant of morning glory, *weeping2*. *Adv Space Res* (in press).
- Miyamoto K, Hoshino T, Takahashi Y, Ueda J (2007) Auxin polar transport of etiolated *ageotropum* pea epicotyls is not affected by gravistimulation: Relevance to automorphosis-like growth and development. *Adv Space Res* 39: 1140-1146
- Miyazawa Y, Takahashi H (2007) How do *Arabidopsis* roots differentiate hydrotropism from gravitropism? *Plant Signal Behav* 2: 388-389
- Morita TM, Saito C, Nakano A, Tasaka M (2007) *Endoderm Amy6loplast less1* is a novel allele of *SHORT-ROOT*. *Adv Space Res* 39: 1127-1133
- Shimizu M, Miyazawa Y, Fujii N, Takahashi H (2008) *p*-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response for gravityregulated peg formation in cucumber seedlings. *J Plant Res* 121: 107-114

「植物の重力依存的成長制御を担うオーキシン排出キャリア動態の解析」が、「きぼう」船内実験室第2期利用前半期間候補テーマとして採択された。