

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—

研究班 WG 代表 東北大・院・生命科学 高橋秀幸

研究班 WG 構成員：飯野盛利（大阪市立大学）、上田純一（大阪府立大学）、鎌田源司（エイ・イー・エス）、神阪盛一郎（富山大学）、金子康子（埼玉大学）、北宅善昭（大阪府立大学）、曾我康一（大阪市立大学）、高橋秀幸（東北大学）、田坂昌生（奈良先端科学技術大学院大学）、藤井伸治（東北大学）、保尊隆享（大阪市立大学）、宮沢豊（東北大学）、宮本健助（大阪府立大学）、村田隆（基礎生物学研究所）、森田美代（奈良先端科学技術大学院大学）、山下雅道（宇宙航空研究開発機構）

Strategy of Frontier Organisms: Graviperception Systems for Plant Growth and Development

H. Takahashi

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577
E-Mail: hideyuki@ige.tohoku.ac.jp

Members: M. Iino (Osaka City Univ.), J. Ueda (Osaka Prefecture Univ.), M. Kamada (AES), S. Kamisaka (Toyama Univ.), Y. Kaneko (Saitama Univ.), Y. Kitaya (Osaka Prefecture Univ.), K. Soga (Osaka City Univ.), H. Takahashi (Tohoku Univ.), M. Tasaka (Nara Inst. of Science and Technology), N. Fujii (Tohoku Univ.), T. Hoson (Osaka City Univ.), Y. Miyazawa (Tohoku Univ.), K. Miyamoto (Osaka Prefecture Univ.), T. Murata (NIBB), M. Morita (Nara Inst. of Science and Technology), M. Yamashita (JAXA)

Abstract: Our studies are aimed at understanding the graviperception mechanism and its interactions with mechanisms of other gravity-influenced phenomena in plant growth and development. To understand the graviperception mechanisms, we isolated novel mutants defective in shoot or root gravitropism in *Arabidopsis*, identified the genes responsible for mutations, and clarified the roles of those molecules. In addition, we analyzed developmental phenomena that are regulated or influenced by graviresponse in plants; namely, gravimorphogenesis (peg formation in cucurbitaceous plants), automorphogenesis (pea epicotyls), and hydrotropism in roots. To verify some of hypotheses obtained by our studies, we have conducted spaceflight experiments in KIBO module of ISS.

Key words; *Arabidopsis*, Automorphogenesis, Auxin, Cucumber, Gravimorphogenesis, Graviperception, Gravitropism, Hydrotropism, Maize, Peas

研究班 WG の目的と活動内容

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、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と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。

本年度の活動成果

1. 植物の重力屈性

(1) 重力屈性突然変異体を用いたシュートの重力受容機構の解析（田坂・森田）

植物は重力方向を感受して、器官の伸長方向を変化させる。これは重力屈性反応と呼ばれている。われわれは、シロイヌナズナの重力屈性異常突然変異株を多数解析し、重力屈性の分子機構の解明を目指

している。

内皮細胞の分化に関わる転写因子 *SHORT-ROOT(SHR)* の hypomorphic アリルである *endodermal amyloplastless 1(eal1)* 変異株は、内皮細胞は形成するものの、重力屈性能を完全に失っている。マイクロアレイを用いた解析により、*eal1* において野生型と比較して 1/2 以下に発現量が低下した遺伝子群 (*Down-regulated Genes in Eal1; DGE*) を見出した。*DGE* 遺伝子群の中で、イネ重力屈性関連遺伝子 *LAZY1* とアミノ酸配列において 23% の相同性を示すものを *DGE1* と名付け、その遺伝子の挿入変異体が重力屈性異常を示すことを示した。*DGE1*、*LAZY1* とともに機能が類推できるモチーフを持たないが、*DGE1* と *LAZY1* は、C 末端 13 アミノ酸において非常に高い相同性を示す。そこで、シロイヌナズナ全タンパク質中で同様の C 末端配列を持つタンパク質をコードする遺伝子を検索したところ、*DGE1* 以外に 4 遺伝子が見つかった。いずれも機能が類推できるモチーフを持たず、機能未知である。その内の一つは *DGE* 遺伝子群に含まれており、こ

の遺伝子を DGE2 とした。また、4 遺伝子の中には DGE2 とアミノ酸配列において 66% の相同性を示す遺伝子 (*DGE TWO-LIKE:DTL*) も含まれていたことから、DGE2 及び DTL 遺伝子について、T-DNA 挿入変異体の表現型解析を行った。

dge1 dge2 dtl 三重変異変異体は花茎の重力屈性を失っていた。また、暗所で生育させた黄化芽生えの胚軸の伸長方向は、野生型では重力と反対方向を向き、これは重力屈性能を反映している。一方、三重変異体では胚軸の伸長方向に明らかにばらつきが見られ、重力屈性能が低下していることが示された。三重変異体の根においては、側根が水平方向もしくは上方に伸長する異常が見られた。主根の重力屈性を解析するために、主根が 2~3cm に伸長した植物体を、水平に倒して重力刺激を与え、12 時間後の主根の屈曲角度を測定した。その結果、三重変異体の主根の重力屈性能は著しく低下していることがわかった。このように、*dge1 dge2 dtl* 三重変異変異体では、花茎、胚軸、根のすべての器官に重力屈性異常が見られた。

この屈性異常が重力屈性に特異的なものなのか、あるいは重力屈性と光屈性の両方に共通した屈性異常であるのかを検討した。一方向から青色光を 12 時間照射した花茎では、野生型では先端部のみが青色光の方向に向き、三重変異体では花茎の基部から青色光の方に屈曲した。野生型は正常な重力屈性能を持っているため、重力屈性が光屈性に干渉して屈曲角度が小さくなったと考えられる。この結果から、三重変異体の花茎が光屈性能を保持しているといえる。また、胚軸についても同様の実験を行い、野生型と三重変異体との間で光屈性に違いは見られなかった。従って、三重変異体は、光屈性と共通している偏差成長などのプロセスに異常はなく、重力屈性に特異的なプロセスに異常を持つと考えられる。さらに、*dge1dge2dtl* 三重変異体のコルメラ細胞(根)ならびに内皮細胞(花茎)を解析した結果、それら細胞形態やアミロプラストの重力方向への沈降には特に異常が見られなかった。

これらの結果から、*dge1dge2dtl* 三重変異体では、アミロプラスト沈降による重力受容に異常はなく、偏差成長能にも異常はないと考えられる。従って、三重変異体はこれらのプロセスの間で起こる重力刺激の細胞内もしくは細胞間シグナル伝達に異常をもつ可能性が考えられる。DGE1、DGE2、DTL の少なくともいずれかは、それらのプロセスに関与する新規遺伝子であることが期待される。

(2) 根の重力受容機構を解明するための新規突然変異体の単離 (藤井・宮沢・高橋)

植物の根は根端のコルメラ細胞で重力を感知している。デンプン粒に富むプラスチドであるアミロプラストは、コルメラ細胞中で重力方向に従ってアクチンフィラメントなどと相互作用しながら細胞内を移動する。コルメラ細胞は、このアミロプラスト移動による刺激を感知することで、重力を受感していると考えられているが、重力感受分子は同定されていない。また、重力感受細胞で発現する ARG1 (Altered Response to Gravity1) が重力感受に機能しているが、ARG1 は DnaJ タンパク質であるため、その分子構造から重力感受の分子レベルでの仕組みの理解には至っていない。デンプンを合成できないためにアミロプラストが正常に沈降しない *pgm* (*phosphoglucomutase*) 突然変異体と *arg1* 突然変異体での重力屈性の低下に比較して、*arg1 pgm* 二重突然変異体では、重力屈性がより低下するものの、完全に欠損しない。そこで、新規の重力感受分子欠損突然変異体を取得するために、*arg1 pgm* 二重突然変異体に EMS (ethylmethane sulfonate) を処理して突然変異を誘発して得られた M₂ 世代の芽生えにおいて、*arg1 pgm* 二重突然変異体で残存している重力屈性能に異常を示す突然変異体 (*enhancer of arg1 pgm* 突然変異体) を選抜する方法の構築を試みた。その結果、*arg1 pgm* 二重突然変異体よりも重力屈性が低下している新規の重力屈性異常突然変異体候補、2 系統が選抜された。

また、PGM/ARG1 の下流で、オーキシン排出キャリア PIN3 (Pin-Formed3) が、植物体を横倒しにして重力刺激を与えると、新しく下側になったコルメラの細胞膜に局在を変化させ、オーキシンを偏差的に排出することで、オーキシンが偏差的に伸長域に輸送され、それによって形成されたオーキシンの不均等分布が偏差成長(屈曲)を誘導することが示唆されている。しかしながら、PIN3 遺伝子に突然変異を持つ *pin3* 突然変異体の重力屈性は野生型と同程度である。このことから、PIN3 以外にも根端で発現してオーキシンのシグナルを伸長領域に伝達する分子が存在すると予想される。そこで、*pin3* 突然変異体に EMS を処理して突然変異を誘発し、重力屈性が低下している M₂ 個体を選抜することで *pin3* 以外のシグナル伝達分子に突然変異 (*enhancer of pin3* 突然変異) が生じた突然変異体の選抜を試みた。18000 個体の M₂ 世代の芽生えから、1 次スクリーニングで 403 個体を選抜し、2 次スクリーニングで 14 個体を選抜した。さらに、M₃ について根と胚軸の伸長方向で重力屈性能を評価したところ、2 系統の突然変異体で根の重力屈性が著しく低下していた。

以上のように、重力感受分子の探索のために実験条件の検討を行い、*arg1 pgm* 二重突然変異体での重力屈性異常をさらに強める突然変異 (*enhance of arg1 pgm* 突然変異) を検出する実験系を構築した。また、PIN3 とともに重力感受細胞で重力応答に関わる分子を欠損した突然変異体 (*enhancer of pin3* 突然変異体) の探索のためのスクリーニングを行い、根の重力屈性に異常を持つ2系統を選抜した。今後、本研究で単離した突然変異体の突然変異原因遺伝子を同定・解析することにより、植物の重力感受機構と重力応答機構に関する新しい知見が得られると期待される。

2. 重力応答に影響される植物の形態形成

(1) キュウリ芽生えにおけるペグ形成の重力によるネガティブコントロール (藤井・宮沢・高橋)

発芽直後のキュウリ芽生えは、重力刺激に応答し、胚軸と根の境界領域にペグと呼ばれる突起を形成する。すなわち、種子を垂直に置いて発芽させると境界領域の両側に1個ずつを形成するが、種子を水平置きにして発芽させると境界領域の下側にのみ1つのペグを形成する。われわれはこれまで、境界域の上側のペグ形成に対して、重力がネガティブに作用すること、その結果、上側でオーキシンが減少すること、このオーキシンの現象に重力感受細胞である内皮細胞に局在するオーキシン排出キャリア CsPIN1 が関与することを明らかにした。すなわち、CsPIN1 の局在が、下側に比べて上側の内皮細胞で顕著になる。この CsPIN1 局在の境界域における重力応答性を検証するために、現在、宇宙実験 (CsPINs) を実施中である。CsPINs 宇宙実験は、2011年2月に打ち上げられ、1部の実験区を除いて、実験が2011年7月に実施され、化学固定試料が地上に回収された。

(2) 黄化エンドウ芽生えの重力応答反応とオーキシン動態 (上田・宮本)

Alaska エンドウ種子を、胚が垂直になるように播種し、暗所で発芽、生育させた。その結果、芽生え上胚軸は正常な重力応答反応を示した。既に報告しているとおり、3次元クリノスタットを用いて作出された擬似微小重力環境下においては、黄化 Alaska エンドウ芽生えは宇宙微小重力環境下で認められる自発的形態形成様の成長、発達を示した。10 μ M のオーキシン極性移動阻害剤を黄化 Alaska エンドウ芽生えに外生的に投与すると、同様な自発的形態形成様の成長、発達を示した。*ageotropum* エンドウ種子を Alaska エンドウと同様に播種し、暗所で発芽、生育させると、芽生え上胚軸は子葉から離れる方向約45°の角度でまっすぐ伸長し、自発的形態形

成様の成長、発達を示した。黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸第1節間におけるオーキシン極性移動は、黄化 Alaska エンドウに比べて約50%であった。

黄化 Alaska エンドウ芽生えにおけるオーキシン極性移動は、上胚軸第1節間および第2節間では異なる様相を示した。すなわち、上胚軸第2節間におけるオーキシン極性移動は子葉側および反子葉側ともほぼ同様の値であったが、第1節間においては反子葉側に比べ、子葉側で著しく大きな値を示した。このような関係は、重力応答突然変異体である黄化 *ageotropum* エンドウにおいても同様であった。オーキシン極性移動に密接に関係すると考えられる *PsPINs*、*PsAUX1* 遺伝子発現をノーザン法によって調べた結果、*PsPIN1* 遺伝子の発現は反子葉側に比べて子葉側で高く、オーキシン極性移動との間に正の相関が認められた。一方、*PsPIN2* および *PsAUX1* 遺伝子の発現については、子葉側、反子葉側で大きな差は認められなかった。

従来より、植物の地上部および地下部が示す重力屈性は内生オーキシンレベルの違いによる偏差成長の結果として説明されてきた。重力屈性に代表される植物の重力応答反応は、重力の感受、その情報 (信号) 伝達および内生の植物ホルモンによる成長制御の結果として現れる現象である。従って、最終的に茎あるいは根の細胞において偏差成長が生じるためには、植物ホルモンの質的、量的差異が必要となる。植物ホルモンの中でこのような偏差成長と密接に関係するものとしてオーキシン (インドール酢酸) があげられる。オーキシンが重力側および反重力側でしかるべき量的差異を生じるためには、オーキシンの重力側から反重力側への、あるいは反重力側から重力側への組織を横断する移動が必要とされる。このようなオーキシンの横方向への移動を示した実験は、そのほとんどが放射性オーキシンを用いてその放射活性を測定することにより、あるいはオーキシン誘導性遺伝子の発現活性により示唆されたものであって、実際、オーキシン (IAA) 分子を直接測定した研究報告は多くない。本研究では、d5-IAA を内部標準物質として、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて黄化 Alaska および黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸第1節間における内生オーキシン量を調べた。その結果、新鮮重量あたりの内生オーキシン量は、黄化 Alaska エンドウが黄化 *ageotropum* エンドウに比べて高い値を示した。また、何れの黄化芽生えにおいても新鮮重量あたりの内生オーキシン量は頂端鉤状部で最も高く、ついで *PsPIN1* 遺伝子発現やオーキシン極性移

動と同様に、反子葉側に比べて子葉側で高い値を示した。

オーキシン極性移動阻害剤である TIBA 存在下で黄化 Alaska エンドウを発芽、生育させ、オーキシン極性移動関連遺伝子である *PsPINs*、*PsAUX1* 遺伝子発現、オーキシン極性移動およびオーキシン誘導性遺伝子である *PsIAA4/5* 遺伝子の発現量によって内生オーキシン量を調べた。その結果、TIBA (10 μ M) は *PsPINs*、*PsAUX1* 遺伝子発現にはほとんど影響しないものの、濃度依存的に上胚軸におけるオーキシン極性移動を低下させるとともに内生オーキシン量を減少させた。

以上の結果から、オーキシン極性移動関連遺伝子、特に *PsPIN1* 遺伝子の発現、オーキシン極性移動および内生オーキシン量はいずれも反子葉側に比べて子葉側で高い値を示すことが明らかとなった。このことと、上胚軸子葉側第 1 節間のオーキシン極性移動は黄化 *ageotropum* エンドウに比べて黄化 Alaska エンドウにおいて大きいことを合わせて考えると、黄化エンドウ芽生え上胚軸の重力応答反応は子葉側上胚軸におけるオーキシン動態だけで制御されていることが強く示唆される。今後は、黄化 Alaska および黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸の異なる重力応答反応のメカニズムを明らかにするとともに、子葉側および反子葉側においてオーキシン動態に差異があるにもかかわらず、上胚軸が偏差成長することなく真っ直ぐに伸長 (成長) するメカニズムを解析することが求められる。

(3) 根の重力屈性と水分屈性の相互作用 (宮沢・藤井・高橋)

水分屈性は、根が水ポテンシャルの勾配を感受し、水ポテンシャルの高い方に屈曲する現象である。根は水分屈性と同時に重力屈性も示すことから、重力が恒常的に存在する地球上での水分屈性は重力屈性の影響から免れることができない。実際に、これまでのわれわれの研究から重力屈性が水分屈性に干渉することが見いだされている。さらにわれわれは、植物種によってこの干渉作用の程度が異なることも見いだしてきた。すなわち、シロイヌナズナやハツカダイコンでは、1G においても明瞭な水分屈性を観察することができる一方で、エンドウやキュウリは 1G の存在下では明瞭な水分屈性を観察することができず、3D クリノスタットや重力屈性異常突然変異体でのみ、水分屈性が観察される。このような重力屈性と水分屈性の相互作用の生じる原因を明らかにするために、エンドウと同じマメ科のモデルであるミヤコグサを用いて水分屈性発現機構の解析を行った。その結果、ミヤコグサは、エンドウ

と異なり 1G 下でも明瞭な水分屈性を観察することができることが明らかになった。さらに、重力屈性および水分屈性発現に対するオーキシン輸送の必要性について阻害剤を用いて解析したところ、ミヤコグサの水分屈性にオーキシン極性輸送は必要とされないことが強く示唆された。同様の阻害剤処理によって、ミヤコグサの重力屈性は強く阻害されたことから、重力屈性と水分屈性は異なるオーキシン動態制御によって誘起されることが明らかになった。一方、エンドウではオーキシン極性輸送阻害剤処理により水分屈性、重力屈性ともに、強い阻害が認められた。これまでのシロイヌナズナ、キュウリを用いたわれわれの研究結果と合わせ、これらの結果から、水分屈性および重力屈性におけるオーキシン動態制御に関与する分子の異同が、重力屈性の水分屈性に対する干渉作用の程度を決定していることが考えられた。さらに、同じマメ科に属するエンドウとミヤコグサで水分屈性発現機構に差異が認められたことから、水分屈性発現機構の多様化が種分化の過程で生じたことが示唆された。

宇宙環境 (微小重力) を利用して重力屈性と水分屈性を分離し、キュウリの根においてそれぞれのしくみを解明することを目的とした宇宙実験 (Hydro Tropi) を 2010 年 5 月に打ち上げ、同年 10 月に実施し、2011 年 3 月に化学固定試料を回収した。また、CsPINs 宇宙実験は、2011 年 2 月に打ち上げられ、同年 6 月および 7 月に 1 部の実験区を除いて実験を実施し、化学固定試料を回収した。

以上のように、本 WG の研究活動は、植物の重力感受ならびに、それによって支配される成長現象を制御する新規の分子機構を見出し、それを検証するための宇宙実験を実施している。

参考文献

- Watanabe C, Fujii N, Yanai K, Hotta T, Kim D-H, Kamada M, Sasagawa-Saito Y, Nishimura T, Koshihara T, Miyazawa Y, Kim K-M, Takahashi H (2012) Gravistimulation changes the accumulation pattern of the CsPIN1 auxin efflux facilitator in the endodermis of the transition zone in cucumber seedlings. *Plant Physiology* 158: 239-251
- 山川あゆみ・藤井伸治・宮沢豊・山下雅道・高橋秀幸. 過重力環境を利用した重力感受経路の検討. 日本宇宙生物科学会第 25 回大会. 2011 年 9 月 30 日-10 月 1 日 (横浜)
- 奈良敬孝・森脇哲平・山崎誠和・宮沢豊・高橋秀幸. ミヤコグサの水分屈性実験系の構築と生理学的解析. 日本宇宙生物科学会第 25 回大会. 2011 年 9 月 30 日-10 月 1 日 (横浜)
- 宮本健助・戸田雄太・上田英二・上田純一. オーキシン極性輸送能の不均衡分布を有する黄化エンドウ上胚軸第一節間の重力屈性: 重力刺激の方向および組織張力の観点から. 日本宇宙生物科学会第 25 回大会. 2011 年 9 月 30 日-10 月 1 日 (横浜)