

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19770032  
 研究課題名（和文）植物細胞の伸長制御に関わる低分子量 G タンパク質 ROP の機能解析  
 研究課題名（英文）Molecular analysis of small G protein-mediated signaling involved in plant cell elongation  
 研究代表者  
 庄司 翼（SHOJI TSUBASA）  
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教  
 研究者番号：40343272

## 研究成果の概要：

植物細胞の形態形成は内的発生プログラムや外的環境要因に応じて可塑的に変化する。細胞形態を支配する微小管等の細胞骨格系が低分子 G タンパク質(ROP:Rho of plant)によってどのように制御されているかは興味深い。ROPの上流因子である RopGEF(Rop guanine nucleotide exchange factor)はアラビドプシスで14種類存在している。これまでにこれら RopGEFの機能欠損表現型は報告されていない。そこで RopGEFをアラビドプシス内で過剰発現させることでRopシグナルの構成的活性化を引き起こしその細胞形態形成に与える影響を評価した。

RopGEFcDNA の N 末端に GFP のバリエーションである Venus を連結して XVE 誘導プロモーター下で発現させることとした。VFP-RopGEF7 及び VFP-RopGEF9 発現植物体について表現型異常が観察された。根毛形成に関して VFP-RopGEF7 発現体では約 20%の根毛で先端の分枝が見られた。一方、VFP-RopGEF9 発現体では約半数の細胞で 2 本の根毛が見られた。さらに両発現体ともに根毛の太さがコントロール植物に比べて約 1.5 倍であった。葉の表皮細胞はジクソーパズル状の形態を示すことが知られている。VFP-RopGEF 導入植物では形態の顕著な変化は見られなかったが、VFP-RopGEF9 発現体では表皮細胞の入り組みの程度が減少し形がより単純になっていた。また、表皮細胞のくびれ部分には通常微小管の集積が見られるのに対し、VFP-RopGEF9 発現体では形が単純化したことを反映して、そうした集積は見られないことが GFP-TUB6 の観察から分かった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	480,000	3,480,000

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：植物生理、分子

キーワード：細胞伸長、微小管、ROP

## 1. 研究開始当初の背景

植物細胞は、分化の過程で拡散成長(diffuse growth)または先端成長(tip growth)により多種多様な形態をとる。こうした細胞形態形成プロセスは細胞の集合体である組織や器官全体の形に影響する。例えば、根や胚軸の細胞は分化の過程で軸方向に伸長し細長い円柱状の軸性器官を作り、葉の表皮細胞はジグソーパズル状の形態をとりつつ二次元的に広がり平らな葉面を構成する。

こうした細胞形態形成に微小管やアクチンなどの細胞骨格系が重要な働きを担う。中でも間期でみられる表層微小管は細胞膜直下に存在し、細胞壁の主成分であるセルロース微繊維の配向に関与する。それらは物理的な「たが」となり細胞伸長方向を制御することが知られている。またアクチンも先端成長を行う細胞の伸長軸に沿って太いフィラメントが配向し、先端の成長部位に動的なF-アクチンが集積する事が知られている。

近年植物では低分子量 G タンパク質 Rop(Rho of plant)がアクチンや微小管を制御することで、植物の様々な細胞形態に関わることが明らかになった。RopはGDP、GTPと特異的に結合し、GTPをGDPに加水分解する活性を持つタンパク質である。上流からのシグナルに応答してGDPとGTPと交換し、不活性型(GDP型)から活性型(GTP型)に転換される。活性化後、RIC(Rop interactive CRIB motif containing protein)などの下流の標的タンパク質(エフェクター)と相互作用し、情報を下流に伝達していく分子スイッチとして機能する。

シロイヌナズナにおいて Rop 遺伝子は 11 種類報告されている。中でも Yang らのグループは葉の表皮細胞において Rop2 と Rop4 がそれぞれ RIC1 と RIC4 を介して、微小管の配向やダイナミックな F-アクチンなどを制御し細胞形態形成に関与することを報告している(Fu et al., 2005)。

Rop を活性化する因子として、RopGEF(GTP exchange factor)が Rop4 を bite にした yeast two-hybrid system 法によって発見された(Berken et al., 2005)。RopGEF は、Rop と GDP との解離を促し、GTP との交換反応を促進することで Rop を活性化する。花粉管の一過的発現系を用いて RopGEF の生理機能が調べられ、RopGEF1 を花粉管で過剰発現すると先端が球状に膨らむことから(Gu et al., 2006)、先端成長に RopGEF が関与することが示唆された。

## 2. 研究の目的

これまでに Rop シグナルに関与する因子の先端成長への関与については調べられてきたが、根や胚軸などの伸長細胞における拡散伸長の制御に着目した研究はない。本研究では、Rop シグナル経路で現在最も上流に位置すると考えられている RopGEF に注目した。シロイヌナズナに存在する 14 種類の RopGEF ファミリーの中で、特に細胞の伸長に関与する因子の同定を試みた。本研究では RopGEF の全てをクローニングし、誘導的に過剰発現を促し、細胞の伸長と微小管動態への効果を調べた。

## 3. 研究の方法

RopGEF の恒常的な過剰発現が植物体の生殖機能に影響を与える可能性が考えられた。そこで誘導性遺伝子発現系(XVE システム)を用いた。XVE システムとはヒトエストロゲンレセプターを介して、 $\beta$ -エストラジオールにより目的のタンパク質の発現誘導が可能なシステムである(Zuo et al., 2000)。また RopGEF の細胞内局在を調べるために、RopGEF の N 末端に蛍光タンパク YFP を融合した。そして、表層微小管の影響を見るために、宿主植物として微小管を可視化できる GFP-TUB6 植物体を選んだ。

## 4. 研究成果

シロイヌナズナ 14 種類の RopGEF の中で、細胞伸長に関与する分子種を同定することを目的とし、RopGEF をシロイヌナズナ内で過剰発現させ、植物体に与える影響を評価した。

RopGEF1,2,3,5,7,9 について形質転換植物体を作製できた。現時点で完成した RopGEF7,9 について表現型を観察した。

### $\beta$ -エストラジオールによる YFP-RopGEF7,9 の発現の誘導

YFP-RopGEF7,9/XVE 形質転換体を用いて、XVE システムが正常に機能するかどうか調べた。YFP-RopGEF7,9/XVE 形質転換体をそれぞれ 3 日間通常培地で生育した後、発現を誘導するために  $1 \mu\text{M}$   $\beta$ -エストラジオールを添加した培地に移した。48 時間後に全植物体よりトータル RNA を抽出し、RT-PCR による発現解析を行った。内生の RopGEF と区別するため、YFP と RopGEF7 または YFP と RopGEF9 のつなぎ目を含む DNA 断片の増幅を行った。誘導条件下で育成した形質転換体のみ YFP-RopGEF7,9 mRNA が蓄積することを確認した。これ以降  $\beta$ -エストラジオールによりタンパク質発現

誘導を行ったものは「 YFP-RopGEF7/XVE(ED+) 」 「 YFP-RopGEF9 /XVE(ED+) 」 「GFP-TUB6(ED+)」と表記し、誘導を行っていないものを「YFP-RopGEF9/XVE(ED-)」 また「 YFP-RopGEF7 / XVE(ED-) 」 「GFP-TUB6(ED-)」と表記する。

#### YFP-RopGEF 過剰発現体の葉の表皮細胞の表現型

展開したシロイヌナズナの葉の表面はそのほとんどがジグソーパズル状の細胞に占められ、孔辺細胞やトライコームといった機能的にも形態的にも特殊に分化した細胞も観察できる。このジグソーパズル状の表皮細胞は突出した部分(lobe)とへこんだ部分(neck)が交互に現れる不定形の細胞で、葉の発生に沿ってその形が形成されていく。五角形や六角形に近い初期細胞が葉の長軸方向に拡大し、lobe や neck が見られない多角形細胞となる(stage1)。その多角形細胞で多方向に小さな lobe や neck の形成が始まる(stage2)。最終的に lobe が伸長し、neck が拡大することでジグソーパズル状となる(stage3)。この形成にも Rop シグナルの関与が報告されている(Fu et al., 2005)。恒常活性化型 Rop2 を導入した植物では、すでに stage2 で通常とは異なる葉の長軸方向への細胞伸長がみられ、stage3 において lobe の伸長や neck の拡大があまり起こらない表皮細胞ができる(Fu et al., 2005)。

そこで、Ropの活性化因子であるRopGEFの葉の表皮細胞に対する影響を調べた。0.1 μMのβ-エストラジオールを含む培地で発芽させたYFP-RopGEF7,9/XVE植物体の子葉の表皮細胞を観察した。YFP-RopGEF9/XVE植物体ではlobeの伸長が抑制されたまま、最終的にstage2の細胞がそのまま拡大したような表皮細胞の形態の変化が見られた。またYFP-RopGEF7/XVEでは誘導により特別な形態の変化が見られないものの、表皮細胞面積の増加が見られた。一方、GFP-TUB6に誘導を行っても顕著な変化はなかった。また誘導を行わない植物体では全ての植物体で顕著な表現型の変化はなかった(図3-4)。葉の表皮細胞の不定形さを客観的に評価する方法として、円形値を用いた。円形値は $4\pi \times (\text{一細胞辺りの面積}) / (\text{周囲の長さ})^2$ で表され、真円は1となり、形が複雑になればなるほど値が減少する。GFP-TUB6とYFP-RopGEF7/XVE植物体の葉の表皮細胞に関しては、誘導の有無に関わらず円形値の

変化はほとんど無かったが、YFP-RopGEF9/XVE植物体では誘導を行った場合のみ、円形値の有意な増加が見られた。つまり形がスムーズになったことを示す。

次にYFP-RopGEF9/XVE植物体で見られた葉の表皮細胞の形態変化と表層微小管の関係を調べた。ジグソーパズル状の細胞を作るGFP-TUB6とYFP-RopGEF7では矢印で示したとおり、neckの部分に微小管束が隣の細胞との境界に向かって1ヵ所集積する傾向が見られた。一方YFP-RopGEF9を誘導した場合、隣の細胞との境界を注目しても、微小管が特定の部位に集積する傾向が見られなかった。

トライコームの枝の本数は、微小管の安定性に影響を受けることが報告されている(阿部, 2005)。そこで次にYFP-RopGEF9/XVE植物体を1 μMβ-エストラジオールを含んだ培地で14日間育て、トライコームの観察を行った。しかし、GFP-TUB6に誘導を行ったものとの差は見られなかった。

#### YFP-RopGEF 過剰発現体の根毛細胞の表現型

根毛細胞は、単一細胞内での極性の確立や先端成長を調べる上でのモデル細胞である。根毛は大きく4段階のステップを経て形成される。まず細胞表面の特定の場所に根毛の形成位置を決まり(Initiation)、その場所が突起を形成する(Swelling)。その突起が成長し始め(Transition to Tip Growth)、最終的にその突起が先端成長により極度に発達し根毛となる(Tip Growth)。シロイヌナズナRop2恒常活性化型を過剰発現させた植物体では、根毛細胞が発生する位置が増える、根毛が分岐するといったInitiation及びTip Growthに関する異常な表現型が報告されていた(Jones et al., 2002)。またRhoGTPase GDP Dissociation Inhibitor(RhoGDI)をコードしているSCN1遺伝子の機能欠損型変異体ではTransition to Tip Growthで根毛の本数が変化することや太さに関して異常な表現型が見られることが報告されている(Carol et al., 2005)。そこで、同様の表現型がYFP-RopGEF7,9/XVE植物体で見られるか検証した。YFP-RopGEF9/XVE(ED+)において半数の根毛でSwellingのステージで根毛が2本発生する異常が見られた。一方でYFP-RopGEF7/XVE(ED+)ではTip Growthのステージで根毛が同じ所から2本に分岐する異常が多く見られた。しかしInitiationステージではYFP-RopGEF7,9の効果はほとんど見られなかった。また

GFP-TUB6(ED+)では、表現型に変化はなかった。次に、根毛の太さを測定した。そこで GFP-TUB6 と YFP-RopGEF7,9XVE(ED+) において、根毛基部での太さを測定した。その結果、YFP-RopGEF7,9(ED+) 共に、GFP-TUB6 より根毛が太くなっていた。

#### YFP-RopGEF 過剰発現体の根の伸長に対する影響

次に根の伸長に RopGEF が関与するのかを調べた。XVE 発現誘導システムは、 $\beta$ -エストラジオールの濃度に依存して発現量を調節することができる(Zuo et al, 2000)。そこで、YFP-RopGEF7/XVE 植物体及び YFP-RopGEF9/XVE 植物体について、 $\beta$ -エストラジオールの濃度を  $0.01 \sim 0.2 \mu\text{M}$  まで変化させ、根の伸長に対する効果を調べた。 $\beta$ -エストラジオールによる根の伸長に対する影響は、DMSO のみ添加した時の根の長さに対する各濃度の  $\beta$ -エストラジオール添加時の根の長さの比をとった。その結果、GFP-TUB6 では  $0.01 \sim 0.2 \mu\text{M}$  の  $\beta$ -エストラジオール添加により、根の伸長がやや促進した。一方、YFP-RopGEF7/XVE、YFP-RopGEF9/XVE では、 $\beta$ -エストラジオールによる誘導の影響はほとんど見られなかった。

#### YFP-RopGEF 過剰発現体における微小管薬剤の感受性

$\beta$ -エストラジオールによって発現の誘導を行っても、*phs1* のような根が短くなる表現型が見られなかった。わずかな効果なため、表現型として現れていない可能性が考えられた。プロピザミドは微小管重合阻害剤として微小管を不安定にする(Naoi and Hashimoto, 2000)。YFP-RopGEF9/XVE ホモライン 1 系統及び YFP-RopGEF7/XVE 1 系統をプロピザミド  $3 \mu\text{M}$  と  $5 \mu\text{M}$  にした培地に添加した 7 日目の幼植物体の根の長さを測定した。プロピザミドの感受性は、各濃度のプロピザミドにおける GFP-TUB6(ED-) の根の長さに対する比によって判定した。プロピザミド無添加の時、GFP-TUB6 は  $\beta$ -エストラジオールにより根の伸長の傾向を示すものの影響はあまり見られない。一方 RopGEF7 については、誘導を与える前にすでに根の伸長が見られ、 $\beta$ -エストラジオール添加により逆にわずかにその効果がかき消された。RopGEF9 は、RopGEF7 に比べて値の伸長に影響しなかった。この傾向は微小管機能を低下させた  $3 \mu\text{M}$ 、 $5 \mu\text{M}$  プロピザミドを処理した植物でも見られた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1) Yao M, Wakamatsu Y, Itho TJ, Shoji T, Hashimoto T Arabidopsis SPIRAL2 promotes uninterrupted microtubule growth by suppressing the pause state of microtubule dynamics. *J Cell Sci.* (2008) 121:2372-81. **査読有**

2) Shoji T, Hashimoto T Why does anatabine, but not nicotine, accumulate in jasmonate-elicited cultured tobacco BY-2 cells? *Plant Cell Physiol.* (2008) 49:1209-16. **査読有**

3) Shoji T, Ogawa T, Hashimoto T Salt stress affects cortical microtubule organization and helical growth in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* (2008) 49:1003-12. **査読有**

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄司 翼 (SHOJI TSUBASA)

奈良先端科学技術大学院大学、バイオサイエンス研究科、助教

研究者番号：4034272

