

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770065

研究課題名（和文）どのようなシグナル変換・伝達過程を経て植物は重力に対抗できる体を構築しているのか

研究課題名（英文）Signal perception and transduction in gravity resistance of plants.

研究代表者

曾我 康一 (SOGA KOUICHI)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00336760

研究成果の概要（和文）：本研究において単離した 2 つの遺伝子の発現量は、一方が過重力により低下し、他方が過重力により増加した。両遺伝子の欠損株は、野生型と比べ、過重力による胚軸成長の障害の程度が低く、なおかつ、細胞壁強度の増加の程度が低かった。一方、両遺伝子の過剰発現株では、野生型では、明瞭な変化が見られない低い過重力環境下においても、成長や細胞壁強度に変化が見られた。以上のように、本研究によって、「抗重力反応」におけるシグナル変換・伝達に関わると思われる 2 種の遺伝子を単離することができた。

研究成果の概要（英文）：Two gravity-responsive genes were isolated by screening of T-DNA insertion lines and DNA microarray in Arabidopsis. The transcriptional levels of one of the isolated gene were decreased, but the levels of the other were increased under hypergravity conditions. The isolated T-DNA insertion lines responded only weakly to hypergravity. On the other hand, 35S lines of the isolated genes were hypersensitive to hypergravity. Thus, the two isolated genes may be involved in the signal perception and transduction processes in gravity resistance in plants.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：抗重力反応、過重力、シロイヌナズナ、成長、細胞壁強度

1. 研究開始当初の背景

陸生植物が地上の 1 g 環境下で生きていくためには、重力に対抗できる体を構築する必要がある。植物は約 5 億年前に初めて陸に上がった際に、このような反応を獲得し、また、この反応が植物が地上で進化・繁栄する上で重要な役割を果たしたと考えられている。この反応の存在は古くから認識されていたにもかかわらず、反応を示す名称もなく、その特性や機構の解析も行われていなかった。そ

こで私たちは、この反応を抗重力 (gravity resistance) と名づけ、その特性と機構を遠心分離機を用いた過重力環境や宇宙の微小重力環境を利用して解析してきた。その結果、植物は、重力の大きさの対数に応じて、茎の細胞壁強度を増加させるとともに、茎を太く短くすることによって重力に対抗していることが明らかになった。重力による細胞壁強度の制御には、双子葉植物ではキシログルカンの、一方、単子葉イネ科植物では、1, 3, 1, 4-β-グルカンの代謝の変化が関与していた。

また、茎の形態変化に関しては、細胞質表層微小管の配向変化が関与していることが明らかになった。

抗重力における重力シグナルの受容について解析したところ、シグナルの受容は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ふつうの細胞でなされること、また、その過程に原形質膜上に存在する機械的刺激受容イオンチャンネル(メカノレセプター)が関与することが明らかになった。さらに、抗重力反応では方向と無関係に重力の大きさのみを情報として用いていることを示した。

一方、両過程をつなぐシグナル変換・伝達については、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いた解析を行った。その結果、ヒドロキシメチルグリタリル-CoA レダクターゼなど、いくつかの重力応答性遺伝子を単離することができ、細胞膜ラフトがシグナルの変換・伝達に関与している可能性を示した。しかしながら、シグナルの変換・伝達の詳細については、未解明な点が数多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、抗重力反応におけるシグナル変換・伝達のメカニズムの解明をめざし、シロイヌナズナにおいて、T-DNA 挿入ラインと DNA マイクロアレイを用いて、重力応答遺伝子の探索を行う。また、得られた遺伝子の発現プロファイルの解析や、同遺伝子の過剰発現株の抗重力反応の解析を行う。以上の実験により、抗重力反応におけるシグナルの変換・伝達に関わる因子を単離することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) T-DNA 挿入ラインを用いた探索

米国 SALK 研究所の T-DNA タグラインの種子を 24 穴プレート中の寒天に播種し、暗所 25°C で 2 日間生育させた。その後、遠心分離機を用いて芽生えに過重力刺激を 1 日間与えた。胚軸の長さや細胞壁強度を指標とし、候補遺伝子を探索した。

(2) DNA マイクロアレイを用いた探索

野生型の種子を 50 ml チューブ中の寒天に播種し、暗所 25°C で 2 日間生育させた。その後、芽生えに過重力刺激を 0.5 時間から 24 時間与えた。このような条件下で生育させた芽生えを材料とし、DNA マイクロアレイを利用して候補遺伝子の探索を行った。

(3) 過剰発現株

T-DNA 挿入ラインと DNA マイクロアレイを用いたスクリーニングにおいて、共通する遺伝子の発現をリアルタイム PCR を用いて解析

した。また、リアルタイム PCR において、確かに重力によって発現量が変わると確認された遺伝子に関しては、過剰発現株を作製し、胚軸の成長と細胞壁強度を解析した。

4. 研究成果

T-DNA ラインを過重力環境下で生育させ、胚軸の長さや細胞壁強度を測定した。その結果、野生型と比べて、過重力による成長の阻害の程度が低いものや高いものが複数の候補が単離できた。また、細胞壁強度に関しても、野生型と比べて、細胞壁強度の増加の程度が低いものや高いものが得られた。成長と細胞壁強度の変化は、同一ラインで同時に起こっているものと、独立しているものがあった。

過重力環境下で、0.5、1、3、6、12、24 時間生育させた野生型の芽生えを用いて DNA マイクロアレイにより遺伝子発現のプロファイルを調べた。その結果、対照である 1 g 環境下でも非常に多くの遺伝子の発現が 24 時間の生育時間の間に変わることがわかった。過重力環境下においたものでは、一過的に発現が増加するものや、時間とともに発現が増加するもの、逆に時間とともに発現が低下するものなど複数の候補を単離することができた。

上で述べた T-DNA 挿入ラインと DNA マイクロアレイを用いた重力応答遺伝子のスクリーニングにおいて、共通して単離されたものは 2 種であった。それぞれを遺伝子 A、B と名付けて、詳細な解析を行った。両欠損株 (T-DNA 挿入ライン) の 1 g 環境下での表現型に目立った変化は見られなかった。両欠損株を 300 g の過重力環境下で生育させて、胚軸成長の阻害率を測定したところ、いずれも野生型と比べて阻害率が低下した (図 1)。反応の程度は少し異なっており、遺伝子 B の欠損株の方がわずかに過重力に対する応答が悪かった。両者の 2 重欠損株を作製し、その反

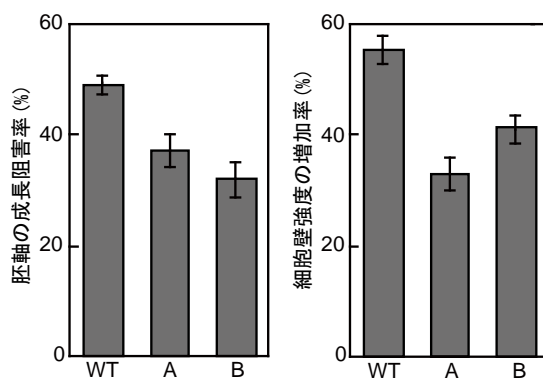


図 1 300 g 環境下で生育させた欠損株の胚軸の成長阻害率と細胞壁強度の増加率

応を調べたところ、わずかではあるが阻害率のさらなる低下が見られた。このことから、両遺伝子は、異なる経路で、過重力による伸長阻害を引き起こしている可能性が考えられる。また、両欠損株の500 gの過重力に対する反応を調べたところ、300 gの時と比べて、胚軸成長の阻害率が増加したことから、過重力には応答できるが、反応性が悪くなっていることが示された。

次に、両欠損株の細胞壁強度を解析した。いずれも野生型と比べて細胞壁強度の増加の程度が低下した(図1)。成長の場合とは逆に、遺伝子Aの欠損株の方が過重力に対する応答が悪かった。両者の2重欠損株では、成長の場合と同様に、わずかではあるが過重力に対する応答性が低下した。

図2は、リアルタイムPCRを用いて解析した遺伝子AならびにBの発現量を示している。遺伝子Aは、1 g環境下では、24時間の生育期間の間に発現は変化しなかった。ところが、過重力によって、発現量が低下した。遺伝子Bは、1 g環境では、24時間の生育期間の間に発現量が低下したが、過重力環境では、発現量が増加した。このように、遺伝子の発現パターンは両者で異なっていたが、成長や細胞壁強度は同様のパターンで変化することが示された。

次に、両遺伝子の過剰発現株を作製し、胚軸の成長と細胞壁強度を測定した。1 g環境下では、わずかに胚軸の成長が悪いものの、目立った表現型の変化は見られなかった。過剰発現株の過重力に対する応答性を調べたところ、野生型では、明瞭な変化が見られない30 gの過重力環境下においても、成長や細胞壁強度に変化が見られた(図3)。このことから、過剰発現株は、過重力に対して高感受性になっていることが示された。

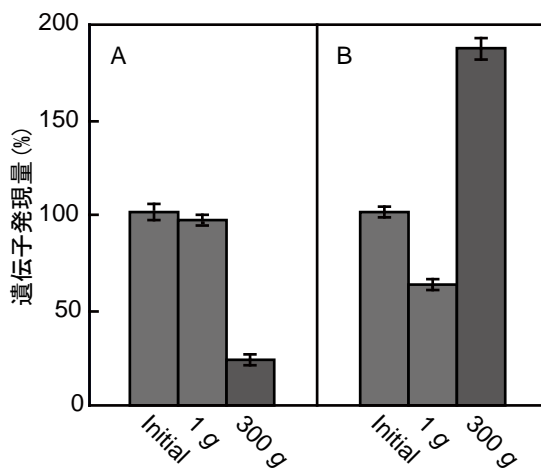


図2 300 g環境下で生育させた野生型芽ばえにおける遺伝子AとBの発現量

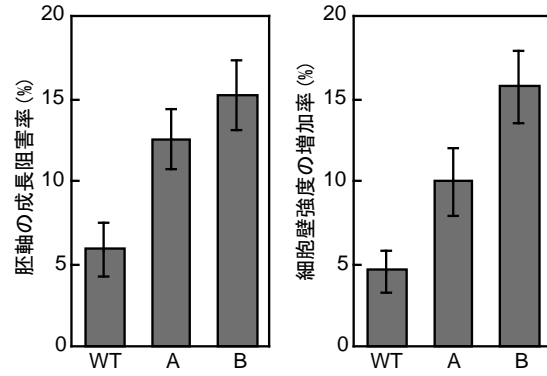


図3 30 g環境下で生育させた過剰発現株の胚軸の成長阻害率と細胞壁強度の増加率

以上のように、本研究によって、「抗重力反応」におけるシグナル変換・伝達に関わると思われる2種の遺伝子を単離することができた。両遺伝子のシグナル変換・伝達における役割に関しては、さらなる解析が必要であるが、本研究は、「抗重力反応」のシグナル変換・伝達の解明の重要なきっかけとなったと思われる。

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) Soga K. Resistance of plants to gravitational force. *Journal of Plant Research*, 査読有、(in press).
DOI: 10.1007/s10265-013-0572-4
- (2) Zhang Y, Soga K., Wakabayashi K and Hoson T. Effects of gravistimuli on osmoregulation in azuki bean epicotyls. *Advances in Space Research*, 査読有、Vol. 51, No. 3, 2013, p.458-464.
DOI: 10.1016/j.asr.2012.09.013
- (3) Soga K., Kotake T, Wakabayashi K and Hoson T, Changes in the transcript levels of microtubule-associated protein *MAP65-1* during reorientation of cortical microtubules in azuki bean epicotyls. *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol. 34, No. 2, 2012, p. 533-540.
DOI: 10.1007/s11738-011-0850-5

[学会発表] (計4件)

- (1) 曾我康一、小竹敬久、若林和幸、保尊隆享. アズキ上胚軸におけるMAP65遺伝子

の発現調節を介した表層微小管の配向変化. 日本植物学会第 76 回大会、2012 年 9 月 16 日、姫路

- (2) Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, and Hoson T. Regulation by gravity of the transcript levels of MAP65 in azuki bean epicotyls. 39th Committee on Space Research Scientific Assembly, 18 July 2012, Mysore, INDIA
- (3) 曾我康一、小竹敬久、若林和幸、保尊隆享. 重力による MAP65 遺伝子の発現制御. 日本宇宙生物科学会第 25 回大会、2011 年 9 月 30 日、横浜
- (4) 曾我康一. 植物が重力に対抗できる体を構築するメカニズムの解析. 日本植物学会第 75 回大会、2011 年 9 月 18 日、東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/pphys/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾我 康一 (SOGA KOUICHI)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：00336760